(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0015742
(43) 공개일자 2016년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0098390
(22) 출원일자 2014년07월31일
심사청구일자 2014년07월31일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
나민균
대전시 유성구 엑스포로 448 406동 1605호 (전민동, 엑스포아파트)
배종섭
대구광역시 수성구 욱수천로 7 103동 1603호
(74) 대리인
백경업

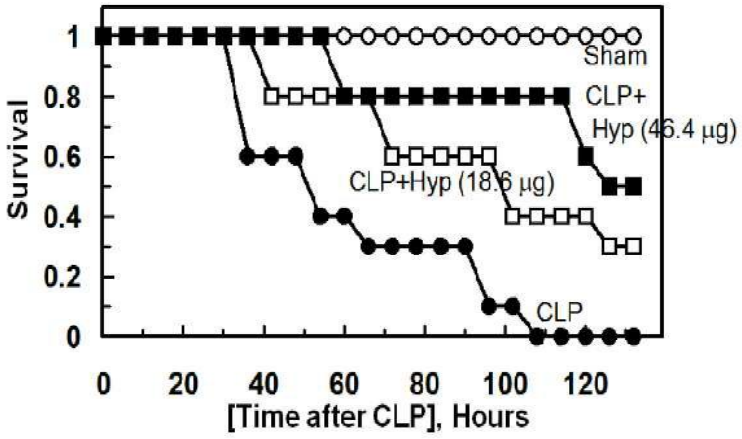
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **하이페로사이드를 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 하이페로사이드(hyperoside)를 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 혈관내피세포에서 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 우수하여 패혈증의 예방 또는 치료용 의약 조성물이나 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 용이하게 이용가능하다.

대 표 도 - 도2



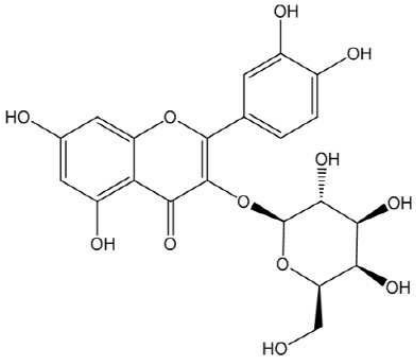
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013-055587
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 심혈관계질환 치료제 개발 기반연구
기 여 율 1/4
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013-075378
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국생명공학연구원
연구사업명 해외우수연구기관유치사업 (위탁과제)
연구과제명 식물자원의 생리활성 대사산물 발굴
기 여 율 1/4
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201315670000
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구실육성사업
연구과제명 혈관항상성조절 통합연구실
기 여 율 1/4
주관기관 경북대학교
연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A111305
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업
연구과제명 안정적 패혈증 치료 후보물질 및 패혈증 조기진단키트 개발
기 여 율 1/4
주관기관 경북대학교
연구기간 2011.11.01 ~ 2014.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 하이페로사이드(hyperoside)를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하이페로사이드는 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 있는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

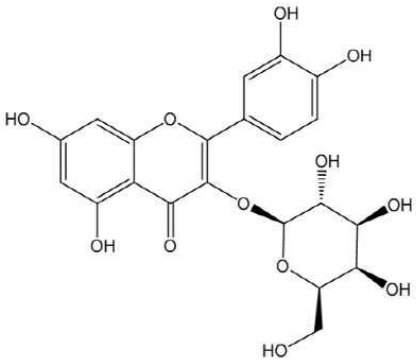
제1항에 있어서,

상기 조성물에 하이페로사이드가 0.001~50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

유효성분으로서 하기 화학식 1의 하이페로사이드(hyperoside) 및 약제학적 부형제를 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제4항에 있어서,

상기 하이페로사이드는 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 있는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

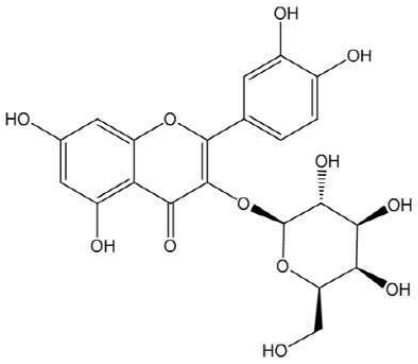
제4항에 있어서,

약학 조성물에는 하이페로사이드가 0.001~50 중량% 포함되는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1의 하이페로사이드(hyperoside)를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 8

제7항에 있어서,

하이페로사이드는 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 있는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 건강기능식품에 하이페로사이드가 0.001~50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 건강기능식품은 각종 식품류, 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제에서 선택되는 것을 특징으로 하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하이페로사이드를 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 패혈증(sepsis, 敗血症)은 녹농균, 대장균, 연쇄상구균, 포도상구균, 폐렴균 같은 미생물에 감염되었을 때 미생물이나 그 미생물이 생산한 독소에 의해 오한과 함께 고열, 관절통, 두통, 권태감 등의 전신적인 증상이 나타나는 상태를 말한다. 이러한 증상이 심해지면 저혈압이 동반되고 소변량이 줄며 패혈성 쇼크가 나타나기도 한다

(Nat. Med. 2003, 9, 517-524). 미생물의 감염 경로를 잘 알 수 없는 경우도 있으나 맹장염, 중이염, 피부화농증, 욕창, 폐질환, 담낭염, 신우염, 골수염 등이 패혈증의 원인 병소로 알려져 있다. 혈액검사와 소변검사, 뇌척수액 검사 등을 통해 패혈증을 진단할 수 있으며 백혈구 수와 급성염증성물질이 증가한 경우도 패혈증을 진단하는데 도움을 준다.

[0003] 아직까지 패혈증의 치료를 위한 근본적인 치료제는 확인되지 않은 상태이다. 패혈증은 통상적인 염증 억제 치료 방법으로는 잘 낫지 않으며, 유일하게 FDA 승인을 받은 드로트레코긴 알파(drotrecogin alfa, Xigris®, Engl. J. Med. 2012, 366, 2055-2064)조차도 임상단계에서 패혈증에 대한 치료 효과가 명확하지 않아 이에 대한 연구가 중단되어 있는 실정이다.

[0004] 한편, 대식세포에서 NO의 생성, 염증 관련 각종 사이토카인의 활성, COX-2의 활성 등과 같은 대표적인 염증반응으로 생성되는 현상에 있어서는 우수한 항염증 효과가 있는 각종 항염증 화합물들이 직접적인 패혈증 현상에 있어서는 전혀 효과가 없는 것으로 확인되기도 하였다. 따라서, 현재 패혈증의 치료를 위해, 주로 항생제나 항진균제 주사를 이용하거나 환자의 상태에 따라 혈액투석 또는 수혈을 하기도 하는데, 항생제와 항진균제가 잘 들으면 패혈증이 완치되기도 하지만, 모든 항생제와 항진균제가 패혈증의 치료에 효과적인 것이 아니며, 또한, 약제에 내성이 있는 미생물에 감염된 경우와 면역력이 약한 환자인 경우, 또 너무 늦게 치료를 시작한 경우 등에서는 치료가 어려워 환자가 사망하기도 한다. 패혈증의 사망률은 50~70%에 달해 매우 높은 편이며, 전세계적으로도 사망의 원인 중에서 높은 비중을 차지하는 것으로 알려져 있다(Nat. Med. 2003, 9, 517-524). 패혈증에 대한 합병증이 발생할 경우에는 후유증이 생길 수 있는데, 합병증으로 뇌막염이 있는 경우에는 신경학적 후유증이, 화농성 관절염이 함께 나타났을 경우에는 뼈 성장에 이상이 생기기도 한다.

[0005] 만병초(萬病草, *Rhododendron brachycarpum*)는 쌍떡잎식물 진달래목 진달래과(Ericaceae)의 상록관목으로서, 한국(지리산, 울릉도, 강원과 북부지방), 일본 등의 고산지대에서 자란다. 높이는 1~4 m이며, 나무껍질은 잿빛이 섞인 흰색이다. 잎은 어긋나지만 가지 끝에서는 5~7개가 모여 달리고 타원형이거나 타원 모양 바소꼴이며 혁질(革質:가죽 같은 질감)이다. 길이 8~20 cm, 너비 2~5 cm이고 가장자리는 밋밋하며 뒤로 말린다. 겉은 짙은 녹색이고 뒷면에는 연한 갈색 털이 빽빽이 난다. 잎자루는 길이 1~3 cm이다. 꽃은 6~7월에 피고 10~20개씩 가지 끝에 총상꽃차례로 달린다. 작은꽃자루는 붉은빛을 띤 갈색으로서 털이 빽빽이 난다. 화관은 깔때기 모양으로 흰색 또는 연한 노란색이고 안쪽 윗면에 녹색 반점이 있으며 5갈래로 갈라진다. 수술은 10개이고 암술은 1개이다. 씨방에는 갈색 털이 빽빽이 난다. 열매는 삭과로서 타원 모양이며 길이 약 2 cm이고 9월에 갈색으로 익는다. 진홍색 꽃이 피는 것을 홍만병초(*Rhododendron brachycarpum* var. *roseum*)라고 한다. 관상용으로 분에 심으며 잎은 이뇨제와 강장제로 쓴다. 만병초는 전통적으로 심혈관질환, 당뇨병, 고혈압, 간염, 류마티스 관절염, 두통 등 질병의 치료에 주로 사용되어 왔다. 하이페로사이드(Hyperoside, quercetin-3-*O*-β-D-galactopyranoside)는 플라보놀 배당체(flavonol glycoside)의 한 종류로서, 하이페리쿰 속(*Hypericum*) 및 크라태거스 속(*Crataegus*)에서 주로 발견되는 화합물이었으나 최근에는 하이페로사이드가 만병초로부터도 분리되는 것이 확인된 바 있다. 하이페로사이드는 항산화효과, 항고지혈증 효과, 항암효과, 항염증 효과, 심장 보호 효과 등이 있음이 알려져 있는데, 현재까지 하이페로사이드가 패혈증에 치료 효과가 있음은 전혀 확인된 바 없다.

[0006] HMGB1(high mobility group box 1)은 패혈증이 진행되어 혈관의 손상이 있을 때 발현되는 단백질로서(Toxicol. Appl. Pharm. 2012, 262, 91-98; J. Cell. Physio. 2013, 228, 975-982), 본 발명자들은 상기 하이페로사이드가 HMGB1의 발현을 억제함으로써 패혈증의 치료 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 한편, 한국공개특허 제2009-0131399호에는 창이자, 만병초 및 우엉의 혼합추출물이 항염 및 피부자극완화 효과가 있음이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제508402호에는 만병초를 함유하는 생약 추출물이 간염에 치료 효과가 있다는 것이 개시되어 있지만, 상기 선행문헌에는 하이페로사이드 화합물이 패혈증을 치료하는 효과가 있다는 것에 대해서는 전혀 개시되어 있지 않다. 또한 하이페로사이드가 대식세포에서 일반적인 항염증 효과가 있음이 개시되어 있기는 하지만 아직까지는 CLP 수술(cecal ligation and puncture operation)로 유도된 패혈증 동물 모델 실험을 이용하여 하이페로사이드가 패혈증 치료 효과가 있음을 개시한 선행문헌은 확인되지 않는다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2009-0131399호 (항염 및 피부자극완화 효과가 있는 천연 식물의 혼합추출물을

함유하는 화장료 조성물, 2009.12.29. 공개)

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제508402호 (간염 억제활성을 갖는 한약재 추출물, 2005. 08.05. 등록)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Bae, J. S. et al., Activated protein C inhibits high mobility group box 1 signaling in endothelial cells. Blood 2011, 118, 3952-3959.

(비특허문헌 0002) Choi, Y. H. et al., Rhododendric acid A, a new ursane-type PTP1B inhibitor from the endangered plant Rhododendron brachycarpum G. Don., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22, 6116-6119.

(비특허문헌 0003) Lee, J. D. et al., Flavonol-rich RVHxR from Rhus verniciflua Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. Int. Immunopharmacol. 2009, 9, 268-276.

(비특허문헌 0004) Lee, W. et al., Barrier protective effects of withaferin A in HMGB1-induced inflammatory responses in both cellular and animal models.

(비특허문헌 0005) Riedemann, N. C. et al., Novel strategies for the treatment of sepsis., Nat. Med. 2003, 9, 517-524.

(비특허문헌 0006) Ranieri, V. M. et al., Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock., Engl. J. Med. 2012, 366, 2055-2064.

(비특허문헌 0007) Lee, S. et al., Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. Phytother Res., 2008, 22(11), 1552-1556.

(비특허문헌 0008) Kim, S.J. et al., Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor-κB activation in mouse peritoneal macrophages. Am J Chin Med., 2011, 39(1), 171-181.

발명의 내용

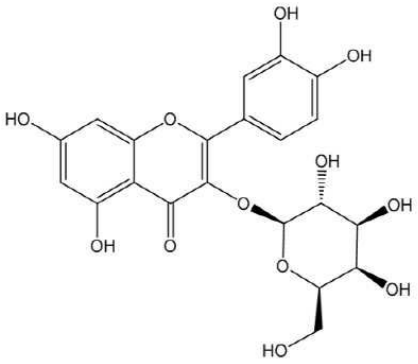
해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 하이페로사이드를 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 하기 화학식 1의 하이페로사이드(hyperoside)를 유효성분으로 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 조성물에 하이페로사이드는 0.001~50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 한다. 상기 하이페로사이드는 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 있다.

[0015] 또한 본 발명은 유효성분으로서 하이페로사이드 및 약제학적 부형제를 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물에 하이페로사이드는 0.001~50 중량%로 포함될 수 있다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 하이페로사이드를 유효성분으로서 함유하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강기능식품에 하이페로사이드는 0.001~50 중량%로 포함될 수 있다. 또한 상기 건강기능식품은 각종 식품류, 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제에서 선택될 수 있다.

[0017] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0018] 상기 하이페로사이드는 만병초 추출물로부터 분리될 수 있으며, 상기 만병초 추출물은 만병초를 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출 농축하여 얻은 것일 수 있다. 이 외의 추출조건은 제한되지는 않으나, 상기 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매는 만병초 중량의 1~20배를 가하는 것이 바람직하며, 추출온도는 20~100℃인 것이 바람직하고, 추출시간은 1시간 내지 7일 이내가 바람직하다. 상기 만병초 추출물은 상법에 따라, 물 또는 각종 유기용매에 의한 추출, 유기용매와 물의 분배, 칼럼크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합한 방법을 이용하여 분획 또는 정제하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 만병초 추출물은 만병초를 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출 농축하여 얻은 만병초 추출물을 물에 현탁한 후, 상기 현탁물에 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및, 부탄올로 이루어진 군에서 선택되는 용매를 가하여 얻은 만병초 분획물로 제조할 수 있다. 상기 만병초 추출물은 만병초의 전초, 뿌리, 잎, 가지, 줄기, 열매, 꽃으로부터 선택되는 모든 부위로부터 추출가능하다.

[0019] 본 발명의 하이페로사이드를 만병초 추출물로부터 분리할 때 크로마토그래피를 이용할 수 있는데, 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압액체 크로마토그래피(MPLC; medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography), 역상 크로마토그래피(reversed phase chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[0020] 한편, 상기 하이페로사이드는 만병초로부터 추출하는 것 외에도, 하이페로사이드가 포함되었다고 알려진 다른 식물로부터도 추출할 수 있으며, 통상의 방법으로 인공적으로 합성하여 사용할 수도 있다.

[0021] 상기 하이페로사이드는 맹장염(복강 내의 배설물, 즉, 장내 소화물의 누출로 인한 증상)이 원인이 되는 패혈증의 치료에 특히 더 효과적이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 하이페로사이드 및 약제학적 부형제를 함유하는 패혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 약제학적 부형제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈,

메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 이외 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 기타 부형제를 추가 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 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 단순희석제인 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, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 또한 상기 하이페로사이드는 본 발명의 조성물에 바람직하게는 0.001~90 중량%, 더 바람직하게는 0.001~50 중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30 중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[0023] 본 발명의 하이페로사이드를 함유한 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01 ㎎/㎏/일 내지 대략 2000 ㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1 ㎎/㎏/일 내지 500 ㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 또한 상기 하이페로사이드는 본 발명의 약학 조성물에 바람직하게는 0.001~90 중량%, 더 바람직하게는 0.001~50 중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30 중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 하이페로사이드 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 하이페로사이드는 본 발명의 건강기능식품에 바람직하게는 0.001~90 중량%, 더 바람직하게는 0.001~50 중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 하이페로사이드(hyperoside)를 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 혈관내피세포에서 HMGB1(high mobility group box 1)의 발현을 억제하는 효과가 우수하여 패혈증의 예방 또는 치료용 의약 조성물이나 패혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 용이하게 이용가능하다. 하이페로사이드는 기존에 항염증 효과가 있다고 알려져 있는 화합물이기는 하지만, 대식세포에서 NO의 생성, 염증 관련 각종 사이토카인의 활성, COX-2의 활성 등과 같은 대표적인 염증반응으로 생성되는 현상에 있어서는 우수한 항염증 효과가 있는 각종 항염증 화합물들이 직접적인 패혈증 현상에 있어서는 전혀 효과가 없는 것으로 확인되기도 하였던 바, 본 발명은 하이페로사이드가 패혈증에 우수한 치료 효과가 있음을 처음으로 확인한 발명이라고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 CLP 수술법으로 유도된 패혈증 동물에서 본 발명의 화합물인 하이페로사이드가 HMGB1의 발현을 억제하는 효과가 있는 것을 나타내는 결과이다.

도 2는 CLP 수술법으로 유도된 패혈증 동물들에 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 투여한 후 생존율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게

본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0029] **<실시예 1. 만병초로부터 화합물의 분리>**

[0030] 만병초의 잎을 전남 광주의 만병초 재배 농장에서 얻고, 건조된 만병초 잎(25 kg)을 메탄올로 실온에서 1주일 동안 2회 추출(각각 250 ℓ씩)하였고, 갈색의 슬러리 형태의 농축 추출물(6 kg)을 얻었다. 상기 추출물(3 kg)을 물(10 ℓ)에 현탁한 후, *n*-헥산(10 ℓ)으로 분획(3번 반복)하였고 이를 농축하여 *n*-헥산 분획물을 얻었다. *n*-헥산층과 분리된 물층(잔사)에 클로로포름을 가해 얻은 클로로포름층을 농축하여 클로로포름 분획물을 얻었다. 클로로포름층과 분리된 물층(잔사)에 에틸아세테이트를 가해 얻은 에틸아세테이트층을 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 에틸아세테이트층과 분리된 물층(잔사)에 부탄올을 가하여 얻은 부탄올층을 농축하여 부탄올 분획물을 얻었다. 각 용매들은 모두 10 ℓ씩 가하고 동일한 용매를 이용하여 3번씩 반복 분획 추출하였다. 이에, 최종적으로 *n*-헥산 분획물 438 g, 클로로포름 분획물 140 g, 에틸아세테이트 분획물 450 g, 부탄올 분획물 320 g을 얻었다.

[0031] 상기 에틸아세테이트 분획물을 실리카겔 컬럼(20×15 cm)을 이용한 VLC(vacuum liquid chromatography) 및 클로로포름:메탄올(90:10→0:100, v:v)의 용출 조건을 이용하여 10개의 소분획물을 얻었다(Fr.E1~Fr.E10). 이 중에서 Fr. E4(143.77 g)를 실리카겔 컬럼(18×30 cm)을 이용한 크로마토그래피 및 디클로로메탄:메탄올(9:1→8:2, v:v)의 용출 조건을 이용해 7개의 소분획물을 얻었다(Fr.E41~Fr.E47). 하이페로사이드(7.6 g)는 MPLC[KP-C18-HS (340 g) column] 및 메탄올:물(3:7→5:5, v:v)의 용출 조건을 통해 Fr.E47(9.97 g)으로부터 얻었다. 한편, 상기 하이페로사이드의 물리화학적 성질은 하기와 같다.

[0032] yellow amorphous powder;

[0033] ESI-MS *m/z* 465 $[M+H]^+$;

[0034] ^{1}H-NMR (250 MHz, CD_3OD) δ_H 7.67 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 5.38 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1"), 5.12 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-6"a), 4.84 (1H, m, H-6"b), 4.42-3.20 (4H, m, H-2", H-3", H-4", and H-5");

[0035] ^{13}C-NMR (63 MHz, CD_3OD) δ_C 175.5 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-2), 156.2 (C-9), 148.4 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.4 (C-3), 122.0 (C-6'), 121.1 (C-1'), 115.9 (C-5'), 115.1 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.8 (C-1"), 98.6 (C-6), 93.4 (C-8), 75.8 (C-5"), 73.1 (C-3"), 71.2 (C-2"), 67.9 (C-4"), 60.1 (C-6").

[0036] **<실시예 2. 패혈증 동물모델 유도>**

[0037] 마우스의 맹장을 터트리는 CLP 수술법(cecal ligation and puncture operation)을 이용하여 마우스에 패혈증을 유도하였다. CLP 수술에 이용된 마우스는 수컷 C57BL/6 마우스를 이용하였고, 각 군당 10마리씩 이용하였다(6~7주령 및 체중 18~20g의 마우스를 구입하고 12일간 실험실에서 순응화한 후 사용, Orient Bio Co. Sungnam, Kyungki-Do, Republic of Korea). 마우스를 졸레틸 50(zoletil 50) 및 3%(w/v) 이소플루란(isoflurane, Forane ㄾ, Choongwae Pharma. Corp., Seoul, Korea)으로 마취시켰다. 패혈증 모델을 유도하기 위해 배 부위 2㎝ 절개를 하여 맹장과 근처의 창자를 노출시켰다. 맹장 끝으로부터 5 ㎜ 부위의 맹장을 3.0-실크 봉합선으로 강하게 묶고, 22-게이지 바늘로 이를 터트렸다. 맹장을 부드럽게 짜 내어 천공 부위를 통해 소량의 배설물(장내 소화물)이 누출되게 하였고, 이 배설물을 복강에 노출시켰으며, 개복부위를 4.0-실크 봉합선으로 봉합하였다. 대조군(sham, sham-operated mice)은 맹장을 묶고 터트리는 단계를 수행하지 않고 단순히 배만 절개하고 다시 봉합하였다. 각 마우스들은 CLP 수술 24시간 후부터 패혈증 증상에 노출되었는데, 전율(shivering)이 있거나 털이 곤두서거나(bristled hair) 또는 무기력증(weakness) 등의 현상이 나타났다.

[0038] **<실시예 3. 패혈증 동물모델의 혈중 HMGB1 농도 확인>**

[0039] 실시예 2의 방법으로 CLP 수술을 수행한 마우스에 16시간 후에 하이페로사이드(18.6, 46.4 ㎍/mouse)를 정맥투여하였다.

[0040] 6시간 후 마우스의 혈액을 채취한 후 2000×g에서 5분간 원심분리하여 혈청 샘플을 얻었다. 상기 혈청 샘플을 이용하여 ELISA(competitive enzyme-linked immunosorbent assays)를 수행하기 위해 96웰 플레이트(96-well plastic flat microtiter plates, Corning, NY, USA)에 HMGB1 단백질(Taipei City, Taiwan, 20mM

carbonate/bicarbonate buffer[pH 9.6] containing 0.02% sodium azide)을 코팅하여 4℃에서 18시간 이상 밤을 지새워 반응하였다. 이 후, 플레이트를 PBS-T(PBS-0.05%[w/w] Tween 20)로 3번 세척한 후, PBS-T를 넣어서 4℃에서 18시간 이상 밤을 지새워 보관하였다.

[0041] 한편, HMGB1 단백질(Taipei City, Taiwan, 단백질 정량용, PBS-T에 희석), 마우스의 혈청 샘플은 각각 96웰 플레이트에서 항-HMGB1 항체(Santa Cruz, CA, PBS-T에 1:1000 희석)와 37℃에서 90분간 전반응시켰다. 상기 마우스의 혈청 샘플은 1mM PMSF, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF, 1㎍/㎖ 아프로티닌(aprotinin), 1㎍/㎖ 펩스타틴(pepstatin), 1㎍/㎖ 류펩틴(leupeptin) 및 10% RIPA lysis buffer(Upstate Biotechnology, USA)를 함유하고 있는 단백질 분리 시약을 이용해 4℃에서 1시간 동안 볼텍싱(vortexing)하여 분해시킨 후 원심분리(15000rpm, 4℃, 20분)하여 얻은 상층액이다.

[0042] 상기 항체가 전반응된 HMGB1 단백질, 마우스 혈청 샘플을 HMGB1이 코팅된 플레이트로 옮겨 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후, 각 플레이트들은 PBS-T로 3번 세척하였고, 실온에서 90분간 2차 항체(peroxidase-conjugated anti-goat IgG antibodies, R&D Systems, PBS-T에 1:2000 희석)와 반응시켰다.

[0043] 각 플레이트들을 PBS-T로 3번 세척한 후, 실온의 암실에서 60분간 200㎕씩의 기질용액(100㎍/㎖ *o*-phenylenediamine & 0.003% H_2O_2)을 처리하였다. 다음으로는 50㎕의 8N H_2SO_4으로 모든 반응을 중단시킨 후, 490nm에서 흡광도를 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 1에 나타내었다.

[0044] 도 1을 참고하면, CLP 수술법으로 유도된 패혈증 동물에서 본 발명의 화합물인 하이페로사이드가 HMGB1의 발현을 현저하게 억제하는 효과가 있는 것으로 확인된다.

[0045] **<실시예 4. CLP 수술 동물의 생존율 확인>**

[0046] 실시예 2의 방법으로 CLP 수술을 수행하고 16시간 후에 하이페로사이드(18.6, 46.4 ㎍/mouse)를 정맥투여하였다. 마우스의 생존은 CLP 수술을 수행한 지 6시간 후부터 132시간까지 확인하였고(카플란-마이어의 생존 분석법[Kaplan-Meier survival analysis]에 따라 관찰), 시간에 따른 마우스의 생존결과는 도 2에 나타내었다.

[0047] 도 2를 참고하면, 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 투여한 마우스 그룹은 CLP 수술 이후 132시간 째에 30~50%의 생존율을 갖는 것으로 확인되어 패혈증의 치료 효과가 아주 우수함을 알 수 있다.

[0048] **<실시예 5. 독성실험>**

[0049] **실시예 5-1. 급성독성**

[0050] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통을 각 군당 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400:Tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v) 만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 상기 PEG-400:Tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2g/kg/day 농도의 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0051] **실시예 5-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0052] 장기 독성 실험은 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 각 농도로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 투여한 실험군과 PEG-400:Tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0053] **<제제예 1. 약학적 제제>**

[0054] **제제예 1-1. 정제의 제조**

[0055] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드 200 g을 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼

합하였다. 이 혼합물에 10%(w/v) 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0056] **제제예 1-2. 주사액제의 제조**

[0057] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0058] **<제제예 2. 식품 제조>**

[0059] **제제예 2-1. 조리용 양념의 제조**

[0060] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0061] **제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0062] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0063] **제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0064] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0065] **제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0066] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드를 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0067] **제제예 2-5. 야채주스 제조**

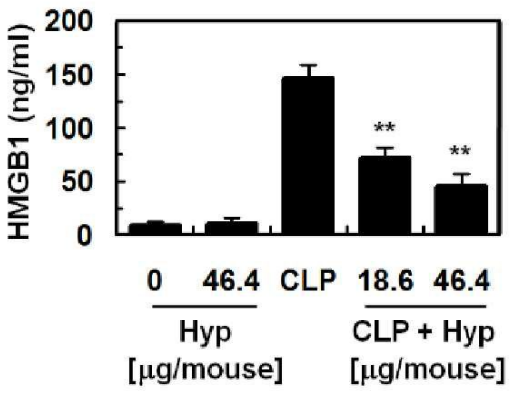
[0068] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드 0.5 g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0069] **제제예 2-6. 과일주스 제조**

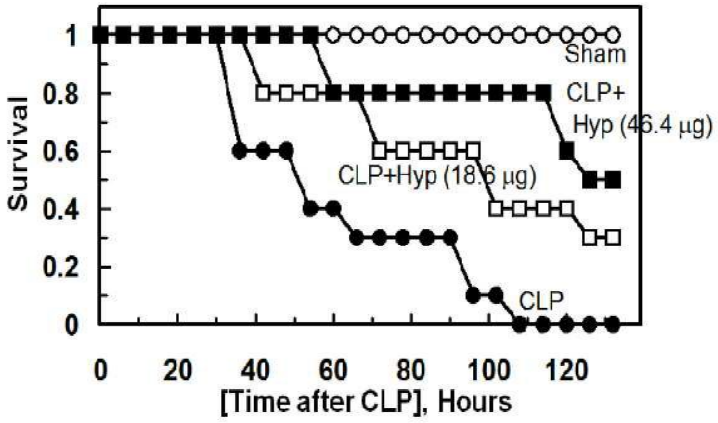
[0070] 본 발명의 화합물인 하이페로사이드 0.1 g을 사과주스 또는 포도주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

도면1



도면2


Survival
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
[Time after CLP], Hours
Sham
CLP+
Hyp (46.4 μg)
CLP+Hyp (18.6 μg)
CLP