(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월13일
(11) 등록번호 10-1715520
(24) 등록일자 2017년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9066 (2006.01) *A61K 31/12* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 36/076* (2006.01)
A61K 36/284 (2006.01) *A61K 36/54* (2006.01)
A61K 36/744 (2006.01) *A61K 36/79* (2006.01)
A61K 36/884 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/9066 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0158811
(22) 출원일자 2015년11월12일
심사청구일자 2015년11월12일
(56) 선행기술조사문헌
CN104800696 A
CN001970021 A
CN001060074 C
KR1020070109004 A

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이상수
강원도 춘천시 지석로 97, 109동 1402호 (석사동, 현진에버빌1차)
남주석
강원도 춘천시 마장길 58, 103동 1002호 (사농동, 롯데캐슬더퍼스트1단지아파트)
이준희
강원도 춘천시 영서로 2333, 하나한의원 (온의동)
(74) 대리인
김지형

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 박수진

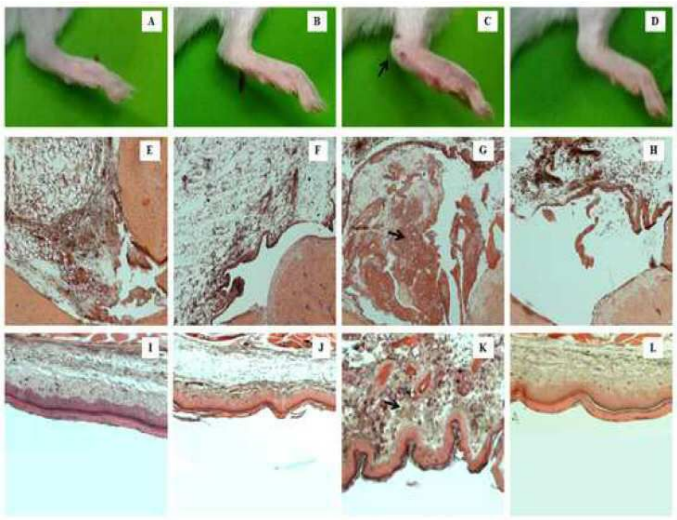
(54) 발명의 명칭 **통풍 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 통풍 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 울금 100 중량부에 대해 오미자 70 ~ 90 중량부, 인지 70 ~ 90 중량부, 치자 70 ~ 90 중량부, 택사 50 ~ 70 중량부, 저령 50 ~ 70 중량부, 백봉령 50 ~ 70 중량부, 백출 50 ~ 60 중량부 및 육계 10 ~ 30 중량부를 혼합한 약재의 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 통풍 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

또한 본 발명에 따라 제조된 약학 조성물은 한방 임상에서 통풍 및 골관절염 치료에 효능이 있는 약재를 사용함으로써 부작용을 최소화하고 항염 및 통증억제 작용이 증대되는 약학 조성물을 통풍 및 골관절염 치료를 목적으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A61K 36/076 (2013.01)
A61K 36/284 (2013.01)
A61K 36/54 (2013.01)
A61K 36/744 (2013.01)
A61K 36/79 (2013.01)
A61K 36/884 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

통풍 치료용 약학 조성물에 있어서,

상기 약학 조성물은 울금 100 중량부에 대해 오미자 70 ~ 90 중량부, 인지 70 ~ 90 중량부, 치자 70 ~ 90 중량부, 택사 50 ~ 70 중량부, 저령 50 ~ 70 중량부, 백봉령 50 ~ 70 중량부, 백출 50 ~ 60 중량부 및 육계 10 ~ 30 중량부를 혼합한 약재의 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 통풍 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 혼합한 약재의 추출물은 물 100 중량부에 대해 상기 혼합한 약재 5 ~ 20 중량부를 혼합하여 90 ~ 120℃의 온도에서 2 ~ 5 시간 동안 가열 추출하는 단계;

상기 가열 추출한 추출물을 3,000rpm에서 8 ~ 12분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하는 단계;

상기 침전물을 제거한 추출물을 감압 농축하는 단계; 및

상기 감압 농축한 농축액을 동결 건조기로 건조하여 약학조성물로 제조하는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 통풍 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 추출물의 유효성분은 커큐민(curcumin), 시잔드린(schisandrin), 카피린(capillin), 게니포사이드(geniposide), 크로신(crocin), 알리솔(alisol), 글루칸(glucan), 에르고스테롤(ergosterol), 파키만(pachyman), 파키믹산(pachymic acid), 아트락틸론(atractylon), 신나믹알데하이드(cinnamic aldehyde) 및 신남산(cinnamic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 통풍 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 엑스제, 유제, 시럽제, 내용액제, 에어로졸, 트라스트제, 패치제, 비수성용제, 동결건조제제 또는 멸균 주사제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 약제학적 제제로 제제화되는 것을 특징으로 하는 통풍 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 통풍 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 울금 100 중량부에 대해 오미자 70 ~ 90 중량부, 인지 70 ~ 90 중량부, 치자 70 ~ 90 중량부, 택사 50 ~ 70 중량부, 저령 50 ~ 70 중량부, 백봉령 50 ~ 70 중량부, 백출 50 ~ 60 중량부 및 육계 10 ~ 30 중량부를 혼합한 약재의 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 통풍 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통풍은 혈액 내에 요산의 농도가 높아지면서 요산염 결정이 관절의 연골, 힘줄, 주위 조직에 침착되는 질병이다. 이러한 현상은 관절의 염증을 유발하여 극심한 통증을 동반하는 재발성 발작을 일으키며, 요산염 결정에 의한 통풍결절이 침착되면서 관절의 변형과 불구가 발생하게 된다. 관절의 이상 외에도 다양한 신장질환을 일으키고 요산에 의해 콩팥에 돌이 생기는 콩팥돌증이 나타나기도 한다.

[0003] 통풍은 나이가 많을수록 혈중 요산 농도가 높을수록 발병할 가능성이 높아지며, 요산은 음식을 통해 섭취되는 퓨린이라는 물질을 인체가 대사하고 남은 산물로 혈액, 체액, 관절액 내에서는 요산염의 형태로 존재한다. 혈액 내 요산 농도가 일정 수치 이상을 넘으면 고요산혈증이라고 하는데, 그 원인을 크게 요산이 과잉 생산되는 경우와 요산의 배설이 감소되는 경우로 나눌 수 있다.

[0004] 또한 각각의 경우에 대하여 다양한 원인 질환이 있을 수 있지만, 그 원인을 밝힐 수 없는 경우도 있다. 또한 체중 증가는 고요산혈증과 밀접한 연관이 있으며, 통풍은 주로 남성에게서 발생되며, 이는 남성의 콩팥에서 요산 제거 능력이 나이가 들수록 감소하는데 반해 여성은 폐경 이전까지 여성호르몬의 영향으로 요산 제거 능력이 유지되기 때문이다. 고요산혈증을 오래 앓은 환자들은 통풍결절(tophi)이라 불리는 요산 결정체가 귓바퀴 등에 생길 수 있다. 혈액 속에 요산수치가 장기간 높게 올라가면 콩팥, 방광, 각 관절에 침착되고 신장에는 요산결석이 생길 수 있다.

[0005] 통풍은 혈중 요산의 과포화로 인하여 관절과 기타 조직의 monosoudium urate(MUS) 결정의 침착으로 초래되는 염증성 관절염의 형태이다. 또한 통풍과 동반되는 염증은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응으로 염증반응이 일어나면 여러가지 염증인자들이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 만들어지는 prostagrandin E2(PGE2) 등이 있다. 그 밖에도 염증반응의 전사인자인 nuclear factor-kB(NF-kB)와 TNF-α에 의해 염증이 발생된다. 이들이 통증의 감수성을 높이는 것으로 알려져 있다.

[0006] 관절의 연골 부위의 연골기질의 대사에는 MMP-1, MMP-3, MMP-13와 같은 matrix methalloproteinase가 중요한 작용을 하고, 또한 염증성 사이토카 인인 인터루킨-1β(IL-1β), IL-6, TNF-α와 그 외 프로스타글란딘, 산화질소(NO) 등의 염증성 물질(inflammatory mediators)들이 관여한다.

[0007] 기계적 자극 등에 의해 활성화된 연골세포(chondrocyte)에서 분비된 MMPs는 연골의 주요 구성 성분인 콜라겐과 프로테오글리칸을 분해시키고, 염증성 사이토카인과 그 외 염증성 물질들은 활성화된 연골세포에서 생성되는 MMPs의 분비를 촉진시켜 MMPs의 활성을 높일 뿐 아니라, 염증세포들을 자극하여 염증을 악화시킨다.

[0008] 국내등록특허공보 제10-0492470호(통풍 치료 및 예방용 조성물), 국내등록특허공보 제10-1346281호(29가지 약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 통풍 예방, 개선 또는 치료용 조성물) 및 국내공개특허공보 제10-2013-0130580호(혼합 약재 추출물을 유효성분으로 포함하는 통풍 예방 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법)에 대한 기술이 공개되었으나, 상기 종래의 발명은 조성물을 제조함에 있어 사용되는 약재의 종류가 많아 비경제적인 문제점이 있거나, 약재의 종류가 적으나 함량이 적어 통풍 진통 완화 및 항염 작용에 대한 효과가 미미하다는 아쉬움이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 국내등록특허공보 10-0492470 B1 (2005.05.23)

(특허문헌 0002) 국내등록특허공보 10-1346281 B1 (2013012.23)

(특허문헌 0003) 국내공개특허공보 10-2013-0130580 A (2013.12.02)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 본 발명은 한방 임상에서 통풍에 대한 항염작용 및 진통완화 효과가 높은 천연물 약재를 조합하여 통풍 치료에 효과가 있으며, 부작용은 적은 약학 조성물을 제조하는 것에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명에 따른 통풍 치료용 약학 조성물은 울금 100 중량부에 대해 오미자 70 ~ 90 중량부, 인지 70 ~ 90 중량부, 치자 70 ~ 90 중량부, 택사 50 ~ 70 중량부, 저령 50 ~ 70 중량부, 백봉령 50 ~ 70 중량부, 백출 50 ~ 60 중량부 및 육계 10 ~ 30 중량부를 혼합한 약재의 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 또한 상기 혼합한 약재의 추출물은 물 100 중량부에 대해 상기 혼합한 약재 5 ~ 20 중량부를 혼합하여 90 ~ 120 ℃의 온도에서 2 ~ 5 시간 동안 가열 추출하는 단계, 상기 가열 추출한 추출물을 3,000rpm에서 8 ~ 12분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하는 단계, 상기 침전물을 제거한 추출물을 감압 농축하는 단계 및 상기 감압 농축한 농축액을 동결 건조기로 건조하여 약학조성물로 제조하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한 상기 추출물의 유효성분은 커큐민(curcumin), 시잔드린(schisandrin), 카피린(capillin), 게니포사이드(geniposide), 크로신(crocin), 알리솔(alisol), 글루칸(glucan), 에르고스테롤(ergosterol), 파키만(pachyman), 파키믹산(pachymic acid), 아트락틸론(atractylon), 신나믹알데하이드(cinnamic aldehyde) 및 신남산(cinnamic acid)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한 상기 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 엑스제, 유제, 시럽제, 내용액제, 에어로졸, 트라스트제, 패치제, 비수성용제, 동결건조제제 또는 멸균 주사제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 약제학적 제제로 제제화되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따라 제조된 약학 조성물은 한방 임상에서 통풍 및 골관절염 치료에 효능이 있는 약재를 사용함으로써 부작용을 최소화하고 항염 및 통증억제 작용이 증대되는 약학 조성물을 통풍 및 골관절염 치료를 목적으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 human chondrocyte cell line인 SW1353에서 MSU에 의해 발현이 증가한 염증 관련 지표들이 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이다.

도 2는 human chondrocyte cell line인 SW1353에서 MSU에 의해 발현이 증가한 matrix metalloproteinase가 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이다.

도 3은 human primary chondrocyte에서 MSU에 의해 발현이 증가한 염증 관련 지표들이 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이다.

도 4는 human primary chondrocyte에서 MSU에 의해 발현이 증가한 matrix metalloproteinase가 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이다.

도 5는 면역세포인 human monocyte cell line인 THP-1에 MSU에 의해 발현이 증가한 염증 관련 지표들이 본 신약 처리 24 시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이다.

도 6은 마우스 오른쪽 발목 관절에 MSU crystals 및 약학 조성물을 처리하여 변화된 발목 조직을 H&E 염색기법 결과를 나타낸 상태도이다.

도 7은 본 발명에 따른 약학 조성물 및 xylene으로 마우스 오른쪽 귀에 염증 유발 후, 마우스 귀의 무게를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 통풍 및 골관절염 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에 따른 통풍 치료용 약학 조성물은 울금 100 중량부에 대해 오미자 70 ~ 90 중량부, 인지 70 ~ 90 중량부, 치자 70 ~ 90 중량부, 택사 50 ~ 70 중량부, 저령 50 ~ 70 중량부, 백봉령 50 ~ 70 중량부, 백출 50 ~ 60 중량부 및 육계 10 ~ 30 중량부를 혼합한 약재의 추출물을 유효성분으로 포함하는 것이 바람직하다.

[0019] 또한 상기 혼합한 약재의 추출물은 물 100 중량부에 대해 상기 혼합한 약재 5 ~ 20 중량부를 혼합하여 90 ~ 120 ℃의 온도에서 2 ~ 5 시간 동안 가열 추출하는 단계, 상기 가열 추출한 추출물을 3,000rpm에서 8 ~ 12분 동안

원심분리하여 침전물을 제거하는 단계, 상기 침전물을 제거한 추출물을 감압 농축하는 단계 및 상기 감압 농축한 농축액을 동결 건조기로 건조하여 약학조성물로 제조하는 단계로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0020] 또한 상기 추출물의 유효성분은 커큐민(curcumin), 시잔드린(schisandrin), 카피린(capillin), 게니포사이드(geniposide), 크로신(crocin), 알리솔(alisol), 글루칸(glucan), 에르고스테롤(ergosterol), 파키만(pachyman), 파키믹산(pachymic acid), 아트락틸론(atractylon), 신나믹알데하이드(cinnamic aldehyde) 및 신남산(cinnamic acid)을 포함하는 것이 바람직하다.

[0021] 또한 상기 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 엑스제, 유제, 시럽제, 내용액제, 에어로졸, 트라스트제, 패치제, 비수성용제, 동결건조제제 또는 멸균 주사제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 약제학적 제제로 제제화되는 것이 바람직하다.

[0022] 또한 도 1은 human chondrocyte cell line인 SW1353에서 MSU에 의해 발현이 증가한 염증 관련 지표들이 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이며, 도 2는 human chondrocyte cell line인 SW1353에서 MSU에 의해 발현이 증가한 matrix metalloproteinase가 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이며, 도 3은 human primary chondrocyte에서 MSU에 의해 발현이 증가한 염증 관련 지표들이 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이며, 도 4는 human primary chondrocyte에서 MSU에 의해 발현이 증가한 matrix metalloproteinase가 본 신약 처리 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이며, 도 5는 면역세포인 human monocyte cell line인 THP-1에 MSU에 의해 발현이 증가한 염증 관련 지표들이 본 신약 처리 24 시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 나타낸 그래프이다.

[0023] 또한 도 6은 마우스 오른쪽 발목 관절에 MSU crystals 및 약학 조성물을 처리하여 변화된 발목 조직을 H&E 염색기법 결과를 나타낸 상태도이며, 도 7은 본 발명에 따른 약학 조성물 및 xylene으로 마우스 오른쪽 귀에 염증 유발 후, 마우스 귀의 무게를 측정한 그래프이다.

[0024] 이하에서 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

[0025] 본 발명에 의해 제조된 약학 조성물은 울금, 오미자, 인진, 치자, 택사, 저령, 백봉령, 백출 및 육계를 일정비율로 혼합하여 추출하는 것이 바람직하다.

[0026] 상기 본 발명에 사용하는 울금(주성분;curcumin)은 온울금(溫鬱金), 강황(薑黃), 광서아출(廣西莪朮) 또는 봉아출(蓬莪朮)의 덩이뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거하고 쪄서 말린 것이다. 이 생약의 주성분인 커큐민(curcumnin)은 LPS로 유도한 TNF와 IL-1의 생산을 억제하며, 여러 동물모델에서 진통작용을 나타낸다. 또 다른 성분인 ar-tumerone은 쥐의 뇌교세포인 BV-2 세포에서 NF-kB, MAPK 신호전달 체계를 조절하여 항염증 효능을 나타낸다.

[0027] 상기 본 발명에 사용하는 오미자(주성분;schisandrin)는 Schicandra chinensis Baillon(오미자과)의 잘 익은 열매이다. 이 생약의 주성분인 shisandrin A, B 및 achisanhenol 등은 간의 대사효소계를 활성화시키며, shisandrin B, C 및 schisandrol B는 CCl 4에 의해 유도되는 지질과산화를 억제하며, CCl 4와 liver microsome 내의 지질과의 결합을 억제한다. Gomisin C는 rat 호중구의 산화적파괴현상을 억제하고, gomisin 유도체, shisandrin 유도체 등은 ACAT(acyl-CoA:cholesterol acyltransferase)활성을 억제하며, Gomisin N의 억제활성이 가장 크다.

[0028] 상기 본 발명에 사용하는 인진(주성분;capillin)은 사철쑥 atremisia capollaris Thunberg (국화과 ; Compositae)의 지상부이다. 봄에 채취한 것을 면인진이라 하고 가을에 채취한 것을 인호진이라 한다. 이 약물의 물추출물은 NF-kB의 활성화를 억제함으로써 LPS로 유도한 염증반응을 억제한다. 또한 EtOH로 유도한 cytokine(TNF-,IL-1α)의 분비를 억제한다. 이 약물의 성분 중 하나인 capillarisin은 항염증효과를 나타낸다.

[0029] 상기 본 발명에 사용하는 치자(주성분;geniposide, crocin)는 치자나무의 잘 익은 열매로서 그대로 또는 끓는 물에 데치거나 찐 것이다. 이 약물의 성분인 genipin은 항산화작용과 용량 의존적인 형관신생 및 NO 생성 저해작용으로 소염작용을 가지며, crocin은 prostaglandin E2 등의 유리 억제를 통해 항염증 작용을 가진다.

[0030] 상기 본 발명에 사용하는 택사(주성분;alisol)는 질경이택사의 덩이줄기로서 잔뿌리 및 주피를 제거한 것이다. 이 약물의 MeOH 추출물과 terpenoid 계 성분들은 항체매개 알러지반응과 세포매개 알러지반응을 억제하며 항보

체활성을 가지고 있다. 또한 sesquiterpenoid계 성분과 triterpenoid계 성분들은 LPS로 유도한 NO의 생성을 억제하며 그 중에서 alismol과 alisol F는 iNOS 생합성을 억제한다.

[0031] 상기 본 발명에 사용하는 저령(주성분;glucan, ergosterol)은 Poluporus umbellatus Fries의 균핵이다. 오리나무속 또는 참나무속 등의 뿌리에 부착하여 자란다. 물추출물은 세뇨관에서의 전해질과 물의 재흡수를 억제함으로써, 정상인이나 실험동물에 대해서 이뇨작용을 나타내는 것으로 보인다. 또한 알코올 추출물은 황색포도상구균과 대장균에 대한 억제작용이 있다.

[0032] 상기 본 발명에 사용하는 백복령(주성분;pachyman, pachymic acid)은 Poria cocos Wolf의 균핵이다.이 생약의 성분인 3β-phydroxybenzoyldehydrotumulosic acid는 TPA나 arachidonic acid로 유도한 귀의 염증을 억제한다. Dehydrotumulosic acid와 pachymic acid는 피부염과 같은 염증성질환에 효과가 있다. 또한 이 생약의 추출물은 sodium lauryl sulphate로 유도한 자극성 접촉성 피부염에 대해 항염증활성이 있으며, 이는 phospholipase A2의 억제와 관련이 있다.

[0033] 상기 본 발명에 사용하는 백출(주성분;atractylon)은 삽주의 뿌리줄기로서 그대로 또는 주피를 제거한 것이다. 이 생약이 주약인 복합처방의 물추출물은 현저한 면역증강작용을 나타낸다. 또한 추출물은 LPS에 의한 염증반응을 억제하며, 산화적 스트레스에 의한 조골세포 분화억제로부터 보호 작용을 갖는다.

[0034] 상기 본 발명에 사용하는 육계(주성분;cinnamic aldehyde, cinnamic acid)는 육계의 줄기껍질로서 그래도 또는 주피를 약간 제거한 것이다. 이 생약의 성분인 cinnamic aldehyde, cinnamic acid, cinnamic alchol은 LPS로 염증을 유발한 RAW264.7 세포주와 carrageenan으로 처리한 mouse 모델에서 항염증작용을 나타낸다.

[0035] 실시예

[0036] 실시예 1

[0037] 각 약재를 표 1에 나타난 바와 같이 혼합한 후, 증류수 2000㎖와 혼합하여 3시간 동안 가열 추출한다. 상기 가열 추출한 추출물을 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 제거한 후, rotary evaporator로 감압 농축한다. 상기 감압 농축한 농축액을 동결건조기로 건조하여 얻은 분말을 실험에 사용하였다.

표 1

[0038]

연번	약재명	용량(g)	비율
1	울금	30	5
2	오미자	24	4
3	인지	24	4
4	치자	24	4
5	택사	18	3
6	저령	18	3
7	백봉령	18	3
8	백출	12	2
9	육계	6	1

[0039] 실험예

[0040] 실험예 1 : 세포 배양

[0041] Human chondrocyte cell line인 SW1353, Mouse Osteoblast cell line인 MC3T3 E-1, 및 Human Monocyte cell line인 THP-1를 각각 DMEM(Invitogen, Carlsbaed, CA) 배지, MEM-α(Invitogen, Carlsbad, CA)배지, RPMI 1640 (Invitogen, Carlsbad, CA) 배지에서 배양한다. 상기 세 종류의 배지 모두 10%의 우태아혈청(FBS)와 100U/㎖의 페니실린과 100U/㎖의 스트렙토마이신을 첨가하여 37℃ 온도, 5% 이산화탄소 농도의 항온항습배양기에서 배양한다.

[0042] 실험예 2 : RNA 분리 및 quantitative-PCR(q-PCR)

[0043] 상기 실험예 1에 의해 배양된 세포에 통풍의 유발원으로 알려진 monosoudium urate(MSU)를 처리하여 통풍 시 연골세포에서 일어나는 염증 상황을 만들어 상기 MSU에 의해 유발되는 염증인자들의 mRNA 발현량을 측정한다.

[0044] RNA 분리는 TRIzol 시약을 사용한다. 260/280의 흡광도 비율로 RNA의 순도를 측정한 다음, 2㎍의 RNA를

SuperScript(Invitrogen)을 사용하여 cDNA를 합성한다. 상기 합성된 cDNA의 1/10을 Real-time PCR을 실시하기 위해 EXPRESS SYBR green qPCR Supermix(Bioneer, Korea) PCR 혼합시약을 사용한다. q-PCR은 Roter-Gene Q(Qiagen, Hilden, Germany)기기를 사용하여 수행하는 것이 바람직하며, 반응은 95℃에서 20초, 60℃에서 20초, 72℃에서 25초의 프로그램을 사용하여 총 40cycle 증폭하는 것이 바람직하다. mRNA의 발현량은 GAPDH를 기준으로 하여 △△CT법으로 정량화하는 것이 바람직하다.

[0045] 상기 mRNA의 발현량을 측정한 결과는 하기 도 1 내지 도 5와 같이 나타났다.

[0046] 하기 도 1은 human chondrocyte cell line인 SW1353에 통풍의 유발원인 MSU를 1mg/㎖ 처리한 후, 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 50㎍/㎖, 100㎍/㎖, 200㎍/㎖씩 농도별로 처리하여 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것으로, 상기 제조된 약학 조성물을 처리한 그룹에서는 발현량이 농도 의존적으로 현저하게 억제되었음을 확인할 수 있다.

[0047] 하기 도 2는 human chondrocyte cell line인 SW1353에 MSU를 1mg/㎖ 처리한 후 증가한 matrix metalloproteses가 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 100㎍/㎖, 200㎍/㎖씩 농도별로 처리하여 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것으로, 상기 제조된 약학 조성물을 처리한 그룹에서는 발현량이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있다.

[0048] 하기 도 3은 human Primary chondrocyte에 MSU를 1mg/㎖ 처리한 후, 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 100㎍/㎖, 200㎍/㎖ 씩 농도별로 처리하여 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 확인할 결과를 나타낸 것으로, 상기 제조된 약학 조성물을 처리한 그룹에서는 발현량이 농도 의존적으로 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다.

[0049] 하기 도 4는 human Primary chondrocyte에 MSU를 1mg/㎖ 처리한 후 증가한 matrix metalloproteses가 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 100㎍/㎖, 200㎍/㎖씩 농도별로 처리하여 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것으로, 상기 제조된 약학 조성물을 처리한 그룹에서는 발현량이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있다.

[0050] 하기 도 5는 human monocyte cell line인 THP-1에 MSU를 200㎍/㎖ 처리한 후, 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물 200㎍/㎖을 처리하여 24시간 후 변화된 mRNA 발현량을 q-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것으로 상기 제조된 약학 조성물을 처리한 그룹에서 발현량이 농도 의존적으로 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다.

[0051] 실험예 3 : 세포생존능력 실험(MTT 실험)

[0052] 세포를 96-well plate에 한 well 당 2×10^4개의 세포를 심고, 안정화 시킨 후 MSU와 본 발명의 신약을 농도(㎍/㎖)별로 처리하고 48시간 후 MTT(5㎍/㎖) 시약을 약물들을 처리된 96-well plate에 첨가하여 2시간 동안 37℃ 온도에서 더 배양한다. 상기 온도에서 배양한 후, 96-well plate안의 모든 매양액을 제거하고 남아있는 formazan crystal을 well당 DMSO 200㎕에 녹인 후, 570㎚의 파장에서 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 측정한다.

[0053] 실험예 4 : 젖산 탈수소 효소 실험(LDH 실험)

[0054] 세포를 96-well plate에 한 well당 2×10^4개의 세포를 심고 안정화시킨 후, MSU와 본 발명의 신약을 농도(㎍/㎖)별로 처리하고 48시간 후, 각 well당 10㎕의 세포 배양액을 새로운 96-well plate로 옮긴 후 각각 40㎕의 PBS를 더 첨가한다. 이 후 각 well당 50㎕의 LDH 시약을 첨가하여 25℃ 온도에서 어두운 곳에서 45분 동안 반응시킨다. 상기 반응액에 50㎕의 반응 종료 용액을 첨가하고 490㎚의 파장에서 UV-visiblespectrophotometer를 사용하여 측정한다.

[0055] 실험예 5 : Alkaline phosphate(ALP) 활성 실험

[0056] MC3T3 E-1을 24 well plate에 한 well당 9×10^4개의 세포를 심고 안정화시킨 후, MSU(1mg/㎖)처리 후 통풍과 유사한 시험관 내 환경에서 본 시약을 농도(㎍/㎖)별로 처리하고 48시간 후, 이 세포들을 각각 차가운 PBS로 두 번씩 세척한 뒤, 각 well당 150㎕의 RIPA 버퍼로 용해시킨다. 20㎕의 세포 용해액을 100㎕의 CSPD substrate (Roche, Manneheim, Germany)와 섞은 후, 30분 동안 반응시킨다. 상기 반응시킨 반응물은 발광도를 luminometer(Glomax, Promega, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정한 후, 측정값을 표준화하기 위해 각각의 세포 용해액의 단백질량을 단백질 정량 키트(Bio-Rad, Hercules, CA)로 확인한다.

[0057] 상기 실험예 1 내지 실험예 5의 실험 결과로 본 발명에 의해 제조된 약학 조성물은 COX2, IL1β, TNF-α, iNOS 등의 대표적인 염증 관련 지표의 발현을 억제하고, MMP-1, MMP-9, MMP-13 등의 matrix metalloproteinase의 발현을 억제시켜 통풍 및 골관절염에 있어 항염 및 통증 억제 작용이 있는 것을 확인할 수 있다.

[0058] 실험예 6 : MSU crystals을 통해 유발된 마우스 발목 관절염 모델 실험

[0059] MSU crystals(300㎍)을 10㎕ endotoxin-free PBS 또는 PBS(control)에 섞어서 2.5% isoflurane로 마취한 BALB/c 마우스의 발목 관절에 25㎕씩 주사한다. BALB/c 마우스에 MSU crystals (750㎍)을 주사하고 1시간 후 본 신약(500mg/kg)을 경구 투여한다. 8시간 간격으로 2회 더 경구 투어를 진행하여 총 3회에 걸쳐 본 발명의 신약을 경구투여한다. MSU crystals (750㎍)을 발목에 주사하고 18시간 후에 각각의 마우스를 희생하여 얻은 발목 조직을 조직병리학적으로 염증 변화를 확인한다.

[0060] 실험예 7 : H&E 염색

[0061] 조직학적 평가를 위하여 MSU crystals을 통해 유발된 마우스 발목 관절염 모델에서 발목을 회수 한 후 5% 포르말린용액에 고정한다. 고정한 조직을 파라핀 블록으로 제작하여 2㎛의 두께로 잘라 슬라이드에 고정한다. 조직 절편을 탈파라핀 과정을 거친 후, H&E 염색을 실시한다. 상기 H&E 염색은 세포의 핵에 헤마톡실린이 세포질에 에오신이 염색되는 것으로 MSU crystals을 통해 유발된 마우스 발목 관절염 부위의 염증세포의 침윤을 확인하기 위해 실시하는 것이다.

[0062] 실험예 7의 결과는 하기 도 6과 같이 나타났으며, 하기 도 6의 A, E, I는 PBS만 주사한 마우스, B, F, J는 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물만 경구 투여한 마우스, C, G, K는 MSU crystals를 주사한 마우스, D, H, L은 MSU crystals를 주사한 후 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 경구투여한 마우스이다. A 내지 D는 각 군의 마우스 발목 관절 사진이며, E 내지 H는 각 군의 마우스로부터 얻은 발목 관절 조직을 나타난 사진이며, I 내지 L은 발목 조직의 피부를 H&E 염색을 하여 나타난 조직 사진이다. C, G, K의 화살표는 발목 관절의 부종을 보여주는 것이다. MSU crystals만 주사한 마우스의 발목에 심한 부종이 보이는 것과 비교하여 MSU crystals을 주사한 후 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 경구 투여한 마우스의 발목에서는 유의하게 부종이 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0063] 실험예 8 : 마우스 ear edema 모델 실험

[0064] 마우스(BALB/c, 6주, Male)를 대조군(n=5)과 양성대조군인 dexamethasone 투여군(n=5) 및 신약 투여군(n=10)으로 나눈다. 본 발명의 신약 투여군은 하루 2회 신약 (500mg/kg) 경구 통하고, 나머지 두 실험군은 생리식염수를 경구 투여하여 2주 동안 실험을 실시한다. 양성대조군의 경우 마지막 날에만 dexamethasone(1mg/kg)을 1회 복강 투여한다. 실험 14일에 본 발명의 신약 투여군에 신약을 경구 투여하고, 양성대조군은 dexamethasone(1mg/kg)을 복강 투여한다. 30분 후 마우스 오른쪽 귀를 xylene을 마우스 귀 안쪽과 바깥쪽 각각 15㎕씩 도포하여 염증을 유발시킨다. 30분 후 모든 실험 마우스를 희생하여 일정하게 귀를 잘라 그 무게를 측정한다.

[0065] 무게를 측정한 결과는 하기 도 7과 같이 나타났으며, Xylene으로 염증 유발한 마우스 귀의 무게는 대조군과 비교하여 2배 정도의 무게차ㄹ이를 나타내는 것을 확인 할 수 있으며, 상기 실시예 1에 의해 제조된 약학 조성물을 2주 동안 경구투여한 마우스 귀의 무게는 xylene으로 염증 유발한 귀와 비교하여 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

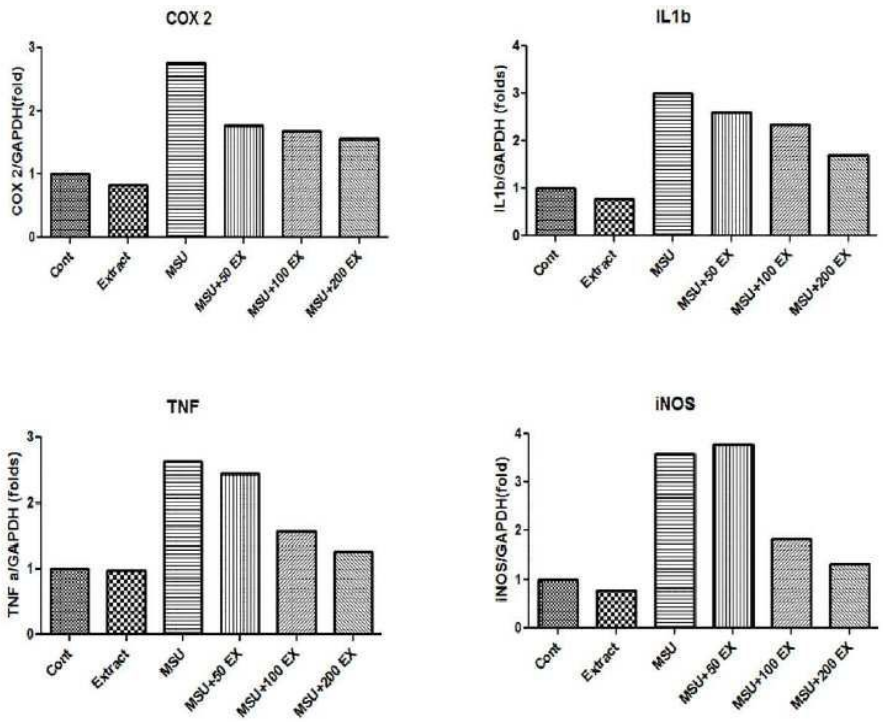
[0066] 상기 실험예 6 내지 실험예 8의 실험 결과로 염증을 유발시킨 동물 모델에서 항염작용을 관찰하였으며, MSU 결정으로 유발된 발목 관절염 모델에서 염증에 의해 나타난 부종이 치료되는 효과를 조직염색법으로 확인할 수 있었으며, 마우스 ear edema모델에서 또한 본 발명에 따라 제조된 약학 조성물을 경구 투여한 마우스에서 유의한 염증 완화 효과가 있는 것으로 나타난 것을 확인할 수 있다.

[0067] 따라서 본 발명에 따라 제조된 약학 조성물을 통풍 치료용으로 사용하여 통증 억제 및 항염 작용을 하며, 부작용이 적은 약학 조성물을 제공할 수 있다.

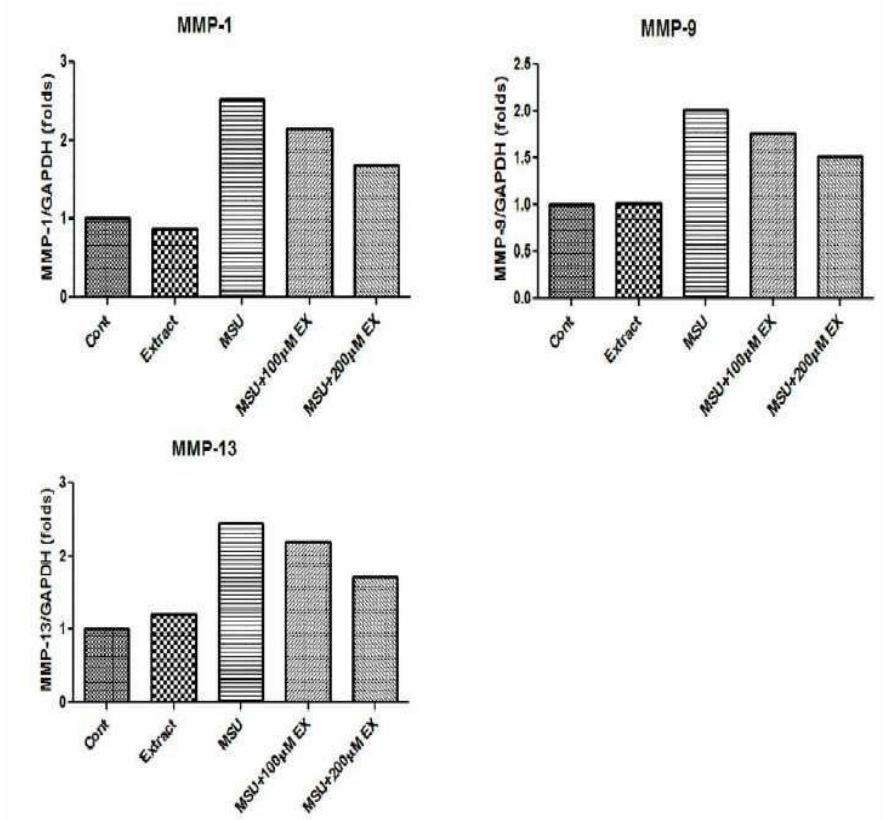
[0068] 또한 본 발명에 따라 제조된 약학 조성물은 골관절염에 의한 염증과 통증을 완화하는 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있다.

도면

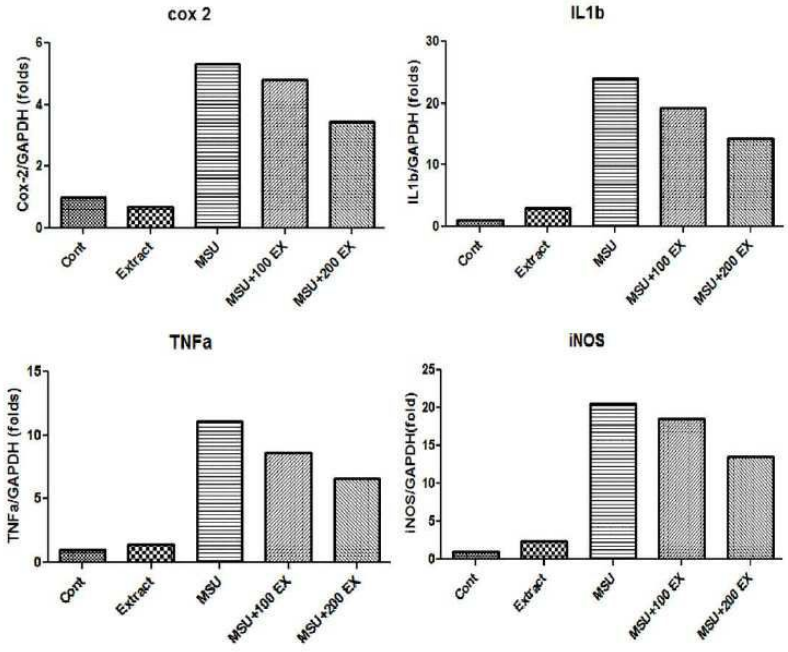
도면1


COX 2
COX 2/GAPDH(fold)
IL1b
IL1b/GAPDH (folds)
TNF
TNF a/GAPDH (folds)
iNOS
iNOS/GAPDH(fold)
Cont
Extract
MSU
MSU+50 EX
MSU+100 EX
MSU+200 EX

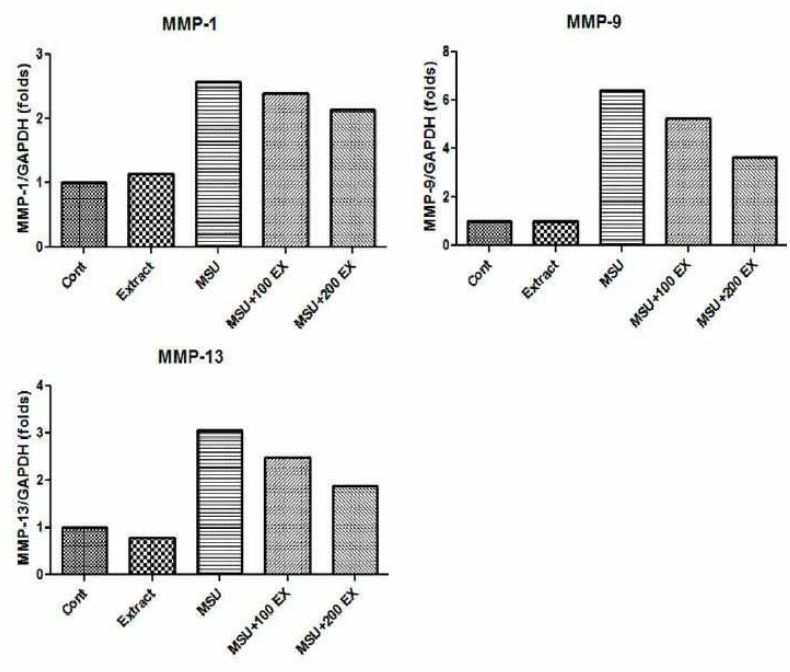
도면2


MMP-1
MMP-1/GAPDH (folds)
MMP-9
MMP-9/GAPDH (folds)
MMP-13
MMP-13/GAPDH (folds)
Cont
Extract
MSU
MSU+100μM EX
MSU+200μM EX

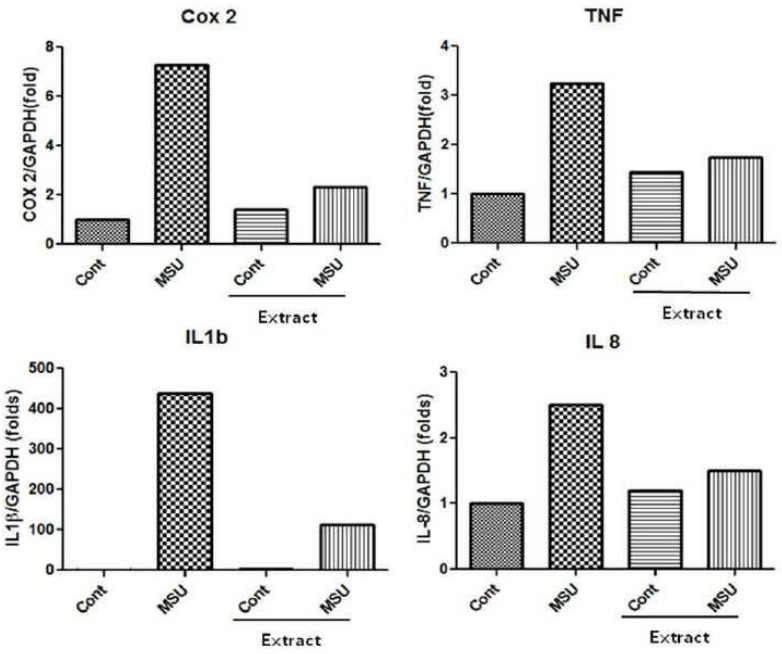
도면3


cox 2
Cox-2/GAPDH (folds)
IL1b
IL1b/GAPDH (folds)
TNFa
TNFa/GAPDH (folds)
iNOS
iNOS/GAPDH(fold)
Cont
Extract
MSU
MSU+100 EX
MSU+200 EX

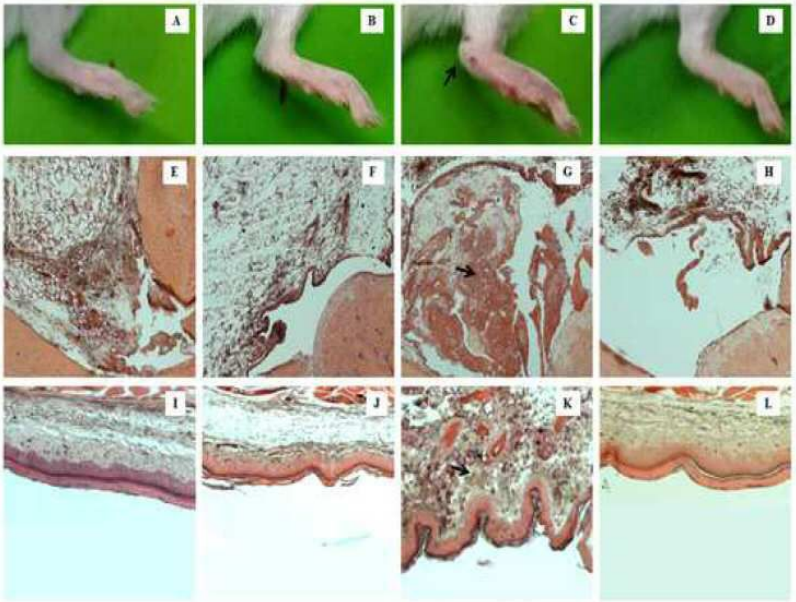
도면4


MMP-1
MMP-1/GAPDH (folds)
MMP-9
MMP-9/GAPDH (folds)
MMP-13
MMP-13/GAPDH (folds)
Cont
Extract
MSU
MSU+100 EX
MSU+200 EX

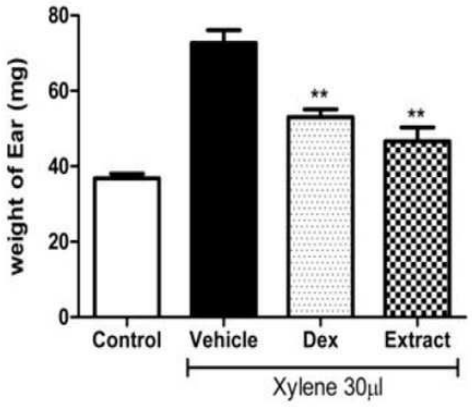
도면5


Cox 2
COX 2/GAPDH(fold)
TNF
TNF/GAPDH(fold)
IL1b
IL1β/GAPDH (folds)
IL 8
IL-8/GAPDH (folds)
Cont
MSU
Extract

도면6


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

도면7


80
60
40
20
0
weight of Ear (mg)
**
**
Control
Vehicle
Dex
Extract
Xylene 30μl