

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2021년 12월 9일 (09.12.2021) WIPO | PCT

WO 2021/246833 A1

- (51) 국제특허분류:

<i>A61K 36/185</i> (2006.01)	<i>A61K 36/23</i> (2006.01)
<i>A61K 36/71</i> (2006.01)	<i>A61K 36/88</i> (2006.01)
<i>A61K 36/25</i> (2006.01)	<i>A61K 36/484</i> (2006.01)
<i>A61K 36/355</i> (2006.01)	<i>A61K 31/36</i> (2006.01)
<i>A61K 36/84</i> (2006.01)	<i>A61K 31/7048</i> (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/007047
- (22) 국제출원일: 2021년 6월 4일 (04.06.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0068577 2020년 6월 5일 (05.06.2020) KR
- (71) 출원인: 백주연 (BACK, Ju Youn) [KR/KR]; 04633 서울
시 중구 퇴계로12가길 15, 301호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김승진 (KIM, Soong Jin); 10337 경기도 고양시
일산동구 탄중로 416, 902동 104호, Gyeonggi-do (KR).
노유연 (ROH, Yu Yeon); 13610 경기도 성남시 분당구
황새울로108번길 10-1, 203호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 공간 (GHONG-GAN INTER-
NATIONAL PATENT LAW FIRM); 35209 대전시 서
구 둔산서로 137, 5층, Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: COMPOSITION, FOR PREVENTING OR TREATING INFLAMMATORY DISEASE, COMPRISING HYDROLYSIS EXTRACT OF PULSATILLA KOREANA AND ANEMONE RADDEANA AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 백두옹(Pulsatilla koreana) 과 썩의바람꽃(Anemone raddeana) 의 가수분해추출물을 유효성분으로 포함 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a composition, for preventing or treating an inflammatory disease, comprising, as an active ingredient, a self-hydrolysis extract using a hydrolase in a plant cell from one or more plants selected from Pulsatilla koreana, Pulsatilla chinensis, Pulsatilla cernua, Anemone raddeana, Aralia elata, Akebia quinata, Lonicera species, Adonis amurensis, Hedera helix, Hedera colchica and Patrinia scabiosifolia, and/or additionally an angiogenesis inhibitor. The composition, for preventing or treating an inflammatory disease, comprising a hydrolysis extract of Pulsatilla koreana and Anemone raddeana and/or an angiogenesis inhibitor as an active ingredient is prepared by means of: i) a first step of preparing a first-plant self culture medium by adding distilled water to a first plant and grinding same; ii) a second step of preparing a second-plant extract by applying an organic solvent to a second plant; iii) a third step of mixing the first-plant self culture medium of the first step and the second-plant extract of the second step and hydrolyzing same while stirring at 37 °C; iv) a fourth step of fractionating by applying an organic solvent to the hydrolysis product obtained by means of the hydrolysis of the third step; v) a fifth step of obtaining an eluate by applying the fraction of the fourth step to column chromatography; and vi) a sixth step of fractionating by applying an organic solvent to the eluate of the fifth step.

(57) 요약서: 본 발명은 백두옹(Pulsatilla koreana), 중국할미꽃(Pulsatilla chinensis), 가는잎할미꽃(Pulsatilla cernua), 썩의 바람꽃(Anemone raddeana), 두릅(Aralia elata), 으름덩굴(Akebia quinata), 인동속 식물(Lonicera species), 복수초(Adonis amurensis), 양담쟁이(Hedera helix), 페르시아 담쟁이(Hedera colchica) 및 마타리(Patrinia scabiosifolia)로부터 1종 이상 선택된 물에서 식물 세포내 가수분해효소를 이용한 자체 가수분해추출물 및/또는 추가로 혈관신생 억제작용 물질을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, i) 제1 식물에 증류수를 넣고 분쇄하여 제1 식물 자체 배지를 제조하는 1 단계; ii) 제2 식물에 유기 용매를 가하여 제2 식물 추출물을 제조하는 2 단계; iii) 상기 1 단계의 제1 식물 자체 배지에 상기 2 단계의 제2 식물 추출물을 혼합하고 37 °C에서 교반하면서 가수분해시키는 3 단계; iv) 상기 3단계의 가수분해를 통해 얻은 가수분해물에 유기용매를 가하여 분획하는 4 단계; v) 상기 4 단계의 분획물을 컬럼 크로마토그래피에 가하여 용출액을 확보하는 5 단계; vi) 상기 5 단계의 용출액에 유기용매를 가하여 분획하는 6 단계; 를 통해 제조되는 백두옹(Pulsatilla koreana) 과 썩의바람꽃(Anemone raddeana) 가수분해추출물 및/또는 혈관신생 억제 물질을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.



WO 2021/246833 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*)의 가수분해추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*)의 가수분해추출물 및/또는 혈관신생 억제 물질을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 질병 부담(disease burden)조사에 따르면 척추질환, 혈관계 질환, 만성 퇴행성 폐 질환, 퇴행성 관절염 등 노령화에 관련된 질환이 국민이 앓는 질환의 상위권에 올라와 있다. 특히 컴퓨터 등 앉아서 일하는 직장인들에게는 물론, 노인들이 잘 걸리는 척추관절질환은 흔한 질병으로 등장하고 있다.
- [3] 척추관절질환에는 척추관협착증, 루마티스 관절염, 허리디스크, 목디스크, 경추관협착증, 오십견, 퇴행성관절염 등이 포함되며, 주로 해당 척추나 관절 주위의 근육, 인대, 혈관, 신경 등의 조직의 퇴행성 변화로 인한 것이다.
- [4] 척추관협착증은 척추를 연결해주는 결합조직인 황색인대가 발달 장애, 선천성 결함, 상해 등에 의하여 손상되어 과대증식(hypertrophy)하여 생기는 질환이다. 황색인대가 과대증식하면 척추주위의 신경, 근육 등을 압박하여 통증을 일으키게 된다. 황색인대의 과대증식과정에는 면역세포, 면역물질들이 관여하며 또한 왕성한 혈관신생 활동도 주요 역할을 한다.
- [5] 루마티스 관절염은 아직 잘 밝혀지지 않은 항원(antigen)에 대한 면역학적 반응에 의하여 관절활막에 병변이 생기고 악화되어 발생하는 질환이다. 관절염에 걸린 활막에는 활막세포가 증식하고 염증세포의 침윤이 일어나고 혈관신생이 활발하며 세포표면에는 부착물질(adhesion molecule)이 생기고 다양한 사이토카인들이 발현된다. 결국 활막혈관은 형질변화를 일으켜 백혈구 등이 유입되어 다른 세포들과 어울려 특이한 조직을 형성하며 주변 조직을 파괴한다. 이 특이 조직을 'pannus'라 한다. 황색인대의 과대증식에서와 마찬가지로 pannus 형성에도 왕성한 혈관신생이 큰 역할을 한다.
- [6] 상기와 같은 척추관절질환은 염증 및 혈관신생과 관련이 있으며, 최근 천연 식물자원으로부터 강력한 항염효과를 나타내는 화합물을 분리하여 부작용을 최소화한 항염제에 대한 관심이 높아지고 있다.
- [7] 천연 식물자원으로부터 얻을 수 있는 생체활성 물질로는 사포닌을 들 수 있다. 사포닌(saponin)은 식물계에 널리 분포하는 배당체(glycoside)의 총칭으로, 미나리아재비과(Ranunculaceae), 두릅나무과(Araliaceae), 마과(Dioscoreaceae), 콩과(Leguminosae), 박과(Cucurbitaceae), 국화과(Compositae), 장미과(Rosaceae),

백합과(Liliaceae), 꼭두서니과(Rubiaceae), 갈매나무과(Rhamnaceae), 석죽과(Caryophyllaceae) 등에 많이 함유되어 있다.

- [8] 사포닌(saponin)은 스테로이드, 스테로이드알카로이드 혹은 트리테펜(triterpene) 골격의 비당부분(aglycone)을 가지고 있으며, 비당부분에 보통 한 개 이상의 당쇄(sugar chains)가 붙어 있다(Bachran, C., et al., 2008). 사포닌은 비당부분의 구조와 붙어 있는 당 측쇄의 수와 당의 종류에 따라 다양성을 나타낸다. 당이 비당부분의 한쪽 기능기에만 결합되어 있는 사포닌을 모노데스모사이드(monodesmoside)라 하고, 당이 두 개 기능기에 결합되어 있는 사포닌은 비스데스모사이드(bidesmoside)라 한다.
- [9] 사포닌은 비당부분(aglycone)의 골격 구조에 따라 담마란(dammarane)계와 올레아난(oleanane)계의 2가지로 나뉘는데, 식물체의 대부분은 올레아난계의 사포닌을 함유한다. 올레아난계의 비당부분은, Hederagenin과 Oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 사포닌들을 포함하는데, 인삼 사포닌이 주로 포함되는 담마란계와 함께, 최근 올레아난계의 사포닌 또한 강력한 생체 활성을 갖는 것을 알려지고 있다.
- [10] 예를 들어, 올레아난계의 비당부분을 갖는 사포닌이 포함된 할미꽃은 전통적으로 아메바성 질환과 살균제로, 그리고 요통에 사용하는 생약제이다. 최근의 연구 보고에 따르면 할미꽃의 사포닌은 우수한 항암성을 보이고 있다 [Y Kim, SC Bang, JH Lee, BZ Ahn. Arch Pharm Res. 2004 Sep;27(9):915-8.; Kim Y, Bang SC, Lee JH, Ahn BZ. SC Bang, Y Kim, JH Lee, BZ Ahn. J Nat Prod. 2005 Feb;68(2):268-72].
- [11] 또한, 최근 연구에 따르면 백두옹의 메탄올 추출물이 염증을 일으키는 세포 및 면역물질 등의 활성을 억제한다는 보고도 있으며 [SH Lee, E Lee, YT Ko. BMB reports 45(6):371-6(2012)], 또 다른 보고에서는 백두옹에서 분리한 사포닌들이 염증유발 물질인 TNF- κ B의 작용과 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor) 활성을 억제한다는 보고도 있다 [W Li, XT Yan, YN Sun, TT Ngan, SH Shim, YH Kim. Biomol Ther 22(4), 334-340 (2014)].
- [12] Bang 등은 백두옹의 유효 활성성분으로 백두옹 뿌리로부터 17종의 사포닌을 분리하였고, 이중 6개의 사포닌 구조를 분석한 결과, 헤데라게닌(hederagenin), 올레아놀릭산(oleanolic acid), 베틀린산(betulinic acid), 23-히드록시베틀린산(23-hydroxybetulinic acid)을 비당부분으로 하고 있으며, 항암, 항염 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 백두옹은 또한 혈관신생 억제 물질인 Deoxypodophyllotoxin(DPT)도 이 뿌리에 함유되어 있다.
- [13] 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*)은 미나리아재비과 바람꽃속에 속하는 여러해살이풀로, 중국, 극동러시아 및 우리나라에 분포하고 있다. 꿩의바람꽃의 주요 활성 성분으로는 올레아난형 트리테르페노이드 및 그 배당체 등이 알려져 있고, 항염, 항종양, 진통, 항경련 등의 생리학적 활성이 있음이 알려져 있다(Sun, Y.X., et al., 2011). 특히 꿩의바람꽃의 뿌리에는 Hederacolchiside A1(HcolA1)를

- 비슷한 30여 종의 사포닌이 확인되었다[Y.Zhao, X. Zhan g, Ch.Lu, Y.Yu, Y.Zhan g, J.Lu; J. Food and Drug Analysis; 26(2018), 1113-1121.].
- [14] Gepdiremen 등은 썩의바람꽃 뿌리의 주성분인 Hederacolchiside E(HcolE)와 백두옹의 사포닌인 Hederacolchiside F(HcolF)의 carrageenan 유발 랫트 발 염증에 대하여 항염효과를 평가하였는데, 일정 범위에서 HcolF의 효과를 확인하였을 뿐, HcolE는 그 효과가 미미하다고 보고하였다 [A. Gepdiremen, V Mshvildadze, H Sueleyman, R. Elias. *Phytomedicine* 12, 440-444(2005)].
- [15] 또한, 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*)에 Hederacolchiside E(HcolE) 및 Hederacolchiside F(HcolF)가 다량 함유되어있으며, [M.Getia, V.Mashvildaze, G.Dekanosidze, A. Pichette; *Intern.J. Pharmaceutical Sciences and Research* 10(2019), 3838-40.] 으름덩굴(*Akebia quinata*)의 종자에도 HcolF을 비롯하여 다양한 구조의 사포닌들이 함유되어 있다.
- [16] 한편, 염증과 동반되어 나타내는 혈관신생을 억제하는 물질로 천연추출물이 이용될 수 있다. 예를 들어, 전호(*Anthriscus sylbvestris*)는 숲의 가장자리 습기가 있는 곳에 잘 자라는 여러해살이 식물로, 그 뿌리에 들어 있는 deoxypodophyllotoxin(DPT)은 3ng/ml농도에서 HUVEC의 혈관형성을 100% 저지하였다는 보고가 있다 [Y. Kim, SB Song, YJ You, BZ AHN. *Planta Medica*. 68, 271-4(2002)].
- [17] 개시호(*Bupleurum longiradiatum*)는 제주도를 비롯한 전국의 높고 깊은 산지에서 자라며, 독성 물질로서 Bupleurotoxin(BPT), acetylbupleurotoxin(aBPT)을 함유하고 있다. 이 성분들은 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 인간 제대 정맥 내피 세포(Human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)의 혈관형성을 100% 저지하였으며 [Y.J. You, I.S. Lee, Y. Kim, K.H. Bae, B.Z. Ahn. *Arch.Pharm.Res.* 25,640-2(2002)], 복수초(*Adonis amurensis*) 뿌리에 들어있는 카데놀라이드류(cardenolides)들인 cymarol, cymarol, cymarilic acid는 그 각각이 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 HUVECs의 혈관신생을 60-80% 저해하였다는 보고가 있다 [Y.J.Yoy, Y.Kim, NH Nam, BZ ahn. *Phytother.Res.* 17, 568-570(2003)].
- [18] 인도문주란(*Crinum latifolium*, Amarylidaceae)은 인도, 베트남, 남중국등지에 자라며, 이 식물의 잎의 용매추출물은 HUVEC의 혈관신생을 억제하는 활성을 보였다. 작용물질은 4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin 이었으며 이물질은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 HUVEC의 혈관형성을 53% 저지하였다 [N.H. Nam, Y. Kim, Y.J. You, DH Hong, H.M. Kim, B.Z. Ahn. *Nat.Prod. Res.* 18(6):485-91(2004)].
- [19] 썩의바람꽃(*Anemone raddeana*)에서도 뿌리에서 분리된 hederacolchiside A1(HcolA1)은 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 HUVECs의 혈관형성을 100% 저지한다고 보고되어 있다. 그러나 이 물질구조의 23번 탄소에 수소대신 OH기가 결합된 hederacolchiside A(HcolA)는 그와 같은 활성을 보이지 않는다고 보고되었다 [CI Barthomerf, D Boivin, R Beliveau. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54, 432-40(2004)].
- [20] 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 광과감초(*Glycyrrhiza glabra*) 등은 감초속으로

이들의 뿌리는 한방에서는 비장을 보하고, 청열해독과 약물작용의 조화를 이루는 약으로 상용되고 있다. 감초는 병균독, 식중독 등에 대한 해독작용, 항염작용, 항궤양 작용 등의 약리작용을 가진다. 감초의 주성분은 glycyrrhizin 등의 사포닌이며 Liquiritin, isoliquiritin 등의 플라본 성분도 함유하고 있다. 1995년 Kobayashi 등은 감초의 물추출물이 육아종의 혈관신생(granuloma angiogenesis) 억제함을 발견하고 해당 유효 성분을 확인한 바 Isoliquiritin임을 알게되었다 (Kobayashi S 등, 1995).

- [21] 본 발명자들은 선행연구를 통하여 백두옹 자체가 가지는 효소를 이용한 가수분해를 통해 백두옹 사포닌인 3-O-[O- α -L-람노피라노실-(1 \rightarrow 2)-[O- β -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)]- α -L-아라비노피라노실] 헤테라제닌 28-O- α -L-람노피라노실-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실 에스터를 항암효과가 강력한 백두옹 사포닌인 3-O-[O- α -L-람노피라노실-(1 \rightarrow 2)-[O- β -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)]- α -L-아라비노피라노실] 헤테라제닌으로 변환시킨 후에 추출한 백두옹 조성물의 제조 방법을 특허 등록한 바 있다(한국등록특허 제628334호).
- [22] 그러나, 백두옹 자체 효소를 이용한 백두옹 추출물의 가수분해 효율이 낮은 문제가 있었으며, 본 발명의 백두옹과 꿩의바람꽃의 가수분해추출물을 이용한 항염증용 조성물은 기재되어 있지 않다.
- [23] 이에, 본 발명자들은 백두옹을 비롯한 다양한 식물로부터 분리한 올레아난계 사포닌의 항염능력 및 상기 화합물의 항염효과를 극대화할 수 있는 방법을 연구하는 과정에서 백두옹 및 꿩의바람꽃 뿌리, 그리고 혈관신생억제 작용을 갖는 추출물을 이용하여 항염활성이 우수한 항염증용 조성물 및 이의 제조방법을 수립함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.
- [24] 종래 선행기술로서 한국공개특허 제2003-16225호에는 백두옹추출물 및 꿩의바람꽃 추출물을 포함하는 무균염증치료용약제가 기재되어 있으나, 본 발명의 백두옹과 꿩의바람꽃의 가수분해추출물 및/또는 혈관신생억제 작용을 갖는 물질을 포함하는 항염증용 조성물은 기재되어 있지 않다.
- [25] 한국공개특허 제2018-5984호에는 할미꽃 추출물 및 복수초추출물을 포함하는 피로 예방 및 개선용 조성물이 기재되어 있으나, 역시 본 발명의 백두옹과 꿩의바람꽃의 가수분해추출물 및/또는 혈관신생 억제 물질, 이를 포함하는 우수한 항염증용 조성물은 기재되어 있지 않다.
- [26] [선행기술문헌]
- [27] [특허문헌]
- [28] 한국등록특허 제628334호, 백두옹의 항암효과를 증진시키는 방법 및 이 방법으로 제조된 항암 조성물, 2006.09.19. 등록.
- [29] 한국공개특허 제2003-16225호, 유효성분으로서 아네모닌을 함유하는 무균염증 치료용 약제, 2003.02.26. 공개.

- [30] 한국공개특허 제2018-5984호, 피로 예방 및 개선용 조성물, 2018.01.17. 공개.
- [31] [비특허문헌]
- [32] Yong K., Seong-Cheol B., J.H Lee, B.Z Ahn, Pulsatilla Saponin D: the Antitumor Principle from Pulsatilla koreana. Arch. Pharm. Res. 27(9), 915-918, (2004)
- [33] Bang, S.C., Kim, Y., Lee, J.H. Ahn B.Z., Triterpenoid saponins from the roots of Pulsatilla koreana. J. Nat. Prod, 68, 268-272, (2005)
- [34] Lee S.H., Lee E, Ko Y.T., Anti-inflammatory effects of a methanol extract from Pulsatilla koreana in lipopolysaccharide-exposed rats. BMB Rep., 45(6): 371-376, (2012)
- [35] Wei Li, Xi Tao Yan, Ya Nan Sun, Thi Thanh Ngan, Sang Hee Shim, Young Ho Kim, Anti-Inflammatory and PPAR Transactivational Effects of Oleanane-Type Triterpenoid Saponins from the Roots of Pulsatilla koreana, Biomol Ther., 22(4), 334-340, (2014)
- [36] A. Gepdiremen, V Mshvildadze, H Sueleyman, R. Elias., Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema, Phytomedicine, 12(6-7), 440-444, (2005)
- [37] Bang, S.C., et al., Antitumor activity of Pulsatilla koreana saponins and their structure-activity relationship, Chem. Pharm. Bull.(Tokyo), 53(11), 1451-1454, (2005)
- [38] Yong Kim, Song-Bae Kim, Young-Jae You, Byung-Zun Ahn, Deoxydopodophyllotoxin; The Cytotoxic and Antiangiogenic Component from Pulsatilla koreana, Planta Med., 68(3), 271-274, (2002)
- [39] Young-Jae You, Im-Seon Lee, Yong Kim, Ki-Hwan Bae, Byung-Zun Ahn, Antiangiogenic activity of Bupleurum longiradiatum on human umbilical venous endothelial cells, Archives of Pharmacal Research, 25(5), 640-642, (2002)
- [40] You Y.J., Kim Y., Nam N.H., Ahn B.Z., Inhibitory effect of Adonis amurensis components on tube-like formation of human umbilical venous cells, Phytother Res. 17(5), 568-570, (2003)
- [41] Nam N.H., Kim Y., You Y.J., Hong D.H., Kim H.M., Ahn B.Z., New constituents from Crinum latifolium with inhibitory effects against tube-like formation of human umbilical venous endothelial cells, Nat Prod Res. 18(6), 485-491, (2004 Dec)
- [42] Chantal Barthomeuf, Dominique Boivin, Richard B*?*liveau, Inhibition of HUVEC tubulogenesis by hederacolchiside-A1 is associated with plasma membrane cholesterol sequestration and activation of the Ha-Ras/MEK/ERK cascade, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 54(5), 432-440, (2004)
- [43] Kobayashi S, Miyamoto T, Kimura I, Kimura M., Inhibitory effect of isoliquiritin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. Biol Pharm Bull, 18(10), 1382-6, (1995 Oct)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [44] 본 발명의 목적은 백두옹과 쩡의바람꽃 뿌리의 가수분해추출물을 포함하는 항염증용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [45] 본 발명의 목적은 백두옹과 쩡의바람꽃 뿌리의 가수분해추출물에 혈관신생억제 작용 물질을 추가로 포함하는 항염증용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [46] 또한 본 발명의 목적은 백두옹과 쩡의바람꽃 뿌리 추출물의 교차가수분해를 통해 활성 사포닌 함량을 증가시키고, 여기에 혈관신생억제 작용 물질을 추가로 포함함으로써 척추관절질환의 항염활성이 뛰어난 사포닌 함유 항염증용 조성물 및 이들로 구성된 척추관절질환의 치료를 위한 천연약물 신약을 개발하는 데에 있다.

기술적 해결방법

- [47] 본 발명은 백두옹(*Pulsatilla koreana*) 및 쩡의바람꽃(*Anemone raddeana*) 뿌리의 가수분해추출물 및 이를 포함하는 항염증용 조성물을 제공한다.
- [48] 백두옹 또는 쩡의바람꽃 뿌리에 함유된 HcolF 및 HcolE는 Hederagenin 또는 oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 사포닌이며, 주로 식물세포 내 저장형태인 bisdesmoaside(ester)로 존재한다. 그러나, 상기 물질들은 그 가수분해물인 monodesmoside(free carboxylic acid) 상태일 때에 높은 항염효과를 나타내나, 자연상태에서는 bisdesmoaside(ester)의 형태로 존재한다.
- [49] 본 발명에서 가수분해추출물은 식물세포 내 저장형태의 화합물이 식물 내, 또는 외부로부터 유래된 효소, 조효소 등을 이용하여 보다 저분자 단위로 분리된 화합물의 추출물을 의미하며, 이하 발효물 또는 발효추출물도 같은 의미로 사용하였다.
- [50] 본 발명자들은 백두옹 또는 쩡의바람꽃의 뿌리에 함유되어 있는 사포닌 bisdesmoaside(ester)를 항염 활성이 높은 사포닌 monodesmoside로 전환시켜 항염성 사포닌이 고농도로 함유된 추출물을 제조하는 방법을 수립하고, 이의 항염활성을 확인하는 한편, 여기에 혈관신생 억제 물질을 포함하는 전호, 개시호, 인도 문주란, 복수초, 감초로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 추출물을 혼합한 혼합물, 또는 이로부터 분리한 혈관신생 억제 물질(데옥시포도필로톡신 등)을 추가 혼합함으로써 항염효과가 현저히 증대되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [51] 또한, 상기 Hederagenin과 Oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 고농도의 사포닌 함유 추출물에 혈관신생을 억제하는 식물 추출물을 혼합함으로써 항염효과를 증가시킬 수 있었다.
- [52] Hederagenin과 Oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 사포닌 함유식물은 사포닌을 다량 함유한 식물로는 백두옹, 바람꽃류(쩡의바람꽃, 복수초등),

담쟁이류(담쟁이, 페르시아 담쟁이등), 그리고 으름덩굴종자 등이 있다. 구체적으로는 미나리아재비과(Ranunculaceae), 두릅나무과(Araliaceae), 마과(Dioscoreaceae), 콩과(Leguminosae), 박과(Cucurbitaceae), 국화과(Compositae), 장미과(Rosaceae), 백합과(Liliaceae), 꼭두서니과(Rubiaceae), 갈매나무과(Rhamnaceae), 석죽과(Caryophyllaceae) 등에 포함되는 식물일 수 있다.

[53] 더욱 구체적으로는 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 썩의바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로 이루어진 군에서 각각 선택되는 1종 이상이다.

[54] 상기 hederagenin 또는 Oleanolic acid를 아글리콘으로 한 사포닌은 Hederacolchiside A(HcolA) 또는 Hederacolchiside A1(HcolA1)일 수 있다. 상기 HcolA 또는 HcolA1는 Hederacolchiside E 또는 Hederacolchiside F의 가수분해에 의해 형성될 수 있다.

[55] 상기 가수분해는 올레아난계 사포닌을 다량 함유한 식물의 추출물 내에 포함된 효소에 의하여 가수분해된 것일 수 있다. 상기 가수분해는 올레아난계 사포닌을 다량 함유한 식물의 추출물에, 역시 올레아난계 사포닌을 다량 함유한 식물의 추출물을 함께 가수분해시키는 것일 수 있다. 상기와 같이 식물의 추출물은 식물의 분쇄물에 물을 첨가하여 추출한 추출물에 유기용매를 가하여 제조한 추출물일 수 있다.

[56] 본 발명자들은 선행실험에서 분쇄된 식물체에 일정량의 물을 가하여 분쇄한 식물 분쇄물에는 식물체 내의 비스데스모사이드(bidesmoside) 형태의 사포닌이 다른 물질들과 결합, 융합된 거대분자형태를 띠고 있었다. 이에 본 발명자들은 식물의 분쇄물에 일정량의 물을 첨가하고, 일정 조건에서 식물체 내의 거대분자가 가수분해될 수 있도록 하여 식물체 내의 모노데스모사이드의 함량을 증가시키고자 하였다.

[57] 또한 이때 2종 이상의 식물을 사용함으로써 2종 이상의 식물 내의 가수분해효소를 함께 사용하는 경우, 2종 이상의 식물의 모노데스모사이드(monodesmoside) 형태의 사포닌 함유량을 현저히 증가시킬 수 있었다.

[58] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다.

[59] 본 발명의 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물은 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 썩의바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*) 중에서 1종 이상 선택된 식물 분쇄물의 물 가수분해 발효물의 유기용매 추출물을 포함하는

염증성질환 예방 또는 치료용 조성물일 수 있다.

- [60] 상기 유기용매는 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매일 수 있다. 따라서 본 발명은 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 쩡의바람꽃(*Anemone raddeana*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 선택된 식물 분쇄물의 물 가수분해 발효물과 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 쩡의바람꽃(*Anemone raddeana*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 선택된 식물의 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 및 에틸아세테이트 중에서 선택된 유기용매의 추출물을 혼합하여 가수분해한 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [61] 상기 염증성질환은 척추관협착증, 루마티스 관절염, 허리디스크, 목디스크, 경추관협착증, 오십견, 퇴행성관절염으로 이루어진 군 중 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [62] 본 발명은 상기 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물에 전호(*Anthriscus sylvestris*), 개시호(*Bupleurum longiradiatum*), 복수초(*Adonis amurensis*), 인도문주란(*Crinum latifolium*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 및 광과감초(*Glycyrrhiza glabra*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관신생억제 억제작용을 갖는 식물추출물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [63] 또한, 본 발명은 상기 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물에 테옥시포도필로톡신(*deoxypodophyllotoxin*; DPT), 빈블라스틴(*vinblastine*), 빈크리스틴(*vincristine*), 비노렐빈(*vinorelbine*), 파클리탁셀(*paclitaxel*), 도세탁셀(*docetaxel*), 캄프토테신(*camptothecin*), 토포테칸(*topotecan*), 이리노테칸(*irinotecan*), 벨로테칸(*belotecan*), 포도필로톡신(*podophyllotoxin*), 에토포시드(*etoposide*), 테니포시드(*teniposide*), 부플레우로톡신(*bupleurotoxin*; BPT), 아세틸부플레우로톡신(*acetylbupleurotoxin*; aBPT), 시마린(*cymarine*), 시마릴릭산 (*cymarilic acid*), 시마롤(*cymarol*), 이소리퀴리틴(*Isoliquiritin*) 및 4-세네시오일옥시메틸 3,4-디메톡시쿠마린(4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관신생 억제물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [64] 본 발명은 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 쩡의바람꽃(*Anemone raddeana*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 선택된 식물 분쇄물의 물 가수분해 발효물과 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 쩡의바람꽃(*Anemone raddeana*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 선택된 식물의 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 및 에틸아세테이트 중에서 선택된 유기용매의 추출물을 혼합하여 가수분해한 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물에 테옥시포도필로톡신(*deoxypodophyllotoxin*; DPT), 빈블라스틴(*vinblastine*), 빈크리스틴(*vincristine*), 비노렐빈(*vinorelbine*), 파클리탁셀(*paclitaxel*),

도세탁셀(docetaxel), 캄프토테신(camptothecin), 토폠테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 벨로테칸(belotecan), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 부플레우로톡신(bupleurotoxin; BPT), 아세틸부플레우로톡신(acetylbupleurotoxin; aBPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 시마롤(cymarol), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 4-세네시오일옥시메틸 3,4-디메톡시쿠마린(4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관신생 억제물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [65] 이때 상기 혈관신생 억제물질은 바람직하게는 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin; DPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 시마롤(cymarol) 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [66] 상기 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물은,
- [67] i) 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 썩의 바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로부터 1종 이상 선택된 제1 식물에 증류수를 넣고 분쇄하여 제1 식물 추출물을 제조하는 1단계;
- [68] ii) 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 썩의 바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로부터 1종 이상 선택된 제2 식물에 유기용매를 가하여 제2 식물 추출물을 제조하는 2단계;
- [69] iii) 상기 1단계의 제1 식물 추출물에 상기 2단계의 제2 식물 추출물을 혼합하고 37°C에서 교반하면서 가수분해시키는 3단계;
- [70] iv) 상기 3단계의 가수분해를 통해 얻은 가수분해물에 유기용매를 가하여 분획하는 4단계;
- [71] v) 상기 4단계의 분획물을 컬럼 크로마토그래피에 가하여 용출액을 확보하는 5단계; 및
- [72] vi) 상기 5단계의 용출액에 유기용매를 가하여 분획하여 분획물을 얻는 6단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법;을 통해 제조될 것일 수 있다.
- [73] 본 발명의 ‘제1 식물 추출물’은 식물체가 가수분해를 위한 반응챔버가 되면서 가수분해 기질로도 사용되는 방식을 말하는 것으로, 식물로부터 사포닌 배당체를 분리하는 과정에서 식물 세포 내에 존재하는 가수분해효소(hydrolase)에 의해 사포닌의 에스터(ester)기가 가수분해 되는 것을

이용한 것이다.

- [74] 상기 ‘제1 식물 추출물’을 위한 제1 식물은 식물 세포 내에 가수분해효소가 존재하고 사포닌을 함유하는 식물 모두 이용 가능하며, 바람직하게는 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 썩의 바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이다. 더 바람직하게는 백두옹, 중국할미꽃, 가는잎할미꽃, 썩의바람꽃, 복수초, 양담쟁이, 페르시아 담쟁이로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며, 더욱 바람직하게는 백두옹 및 썩의바람꽃으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이다.
- [75] 상기 1단계의 제1 식물 추출물은, 제1 식물에 증류수를 가하여 믹서기로 1차 분쇄하는 단계; 및 상기 1차 분쇄물을 초음파를 가하여 2차 분쇄하는 단계; 를 통해 제조될 수 있다.
- [76] 상기 제1 식물 추출물 내에서 가수분해되는 제2 식물은 사포닌을 함유하는 식물 모두 이용 가능하며, 바람직하게는 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 썩의 바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이다. 더욱 바람직하게는 백두옹, 썩의바람꽃, 복수초, 양담쟁이, 페르시아 담쟁이로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며, 더욱 바람직하게는 백두옹 및 썩의바람꽃으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이다.
- [77] 상기 제1 식물 추출물 및 제2 식물 추출물 제조 시 이용되는 식물체는 뿌리, 잎, 열매, 종자 등을 이용할 수 있다. 그러나 식물 유(oil)를 다량으로 함유하는 종자류의 경우에는 식물 유를 제거하는 과정이 복잡하여 바람직하지 못하며, 엽록소 또는 왁스를 포함하는 식물 잎의 경우에는 엽록소 또는 왁스를 제거하는 과정 동안에 가수분해효소가 불활성화 될 수 있어 바람직하지 못하다. 바람직하게는 식물체의 뿌리, 과육이다.
- [78] 상기 2단계의 제2 식물 추출물은 식물을 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트 및 헥산으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등일 수 있다.
- [79] 또한, 상기 식물 추출물은 식물을 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트 및 헥산으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 농축한 농축액에 유기용매를 가하여 분획한 분획물 일 수 있다.

- [80] 상기 3단계의 가수분해는 식물에 존재하는 사포닌의 28번 위치의 글리코실 에스터(glycosyl ester)기를 가수분해하여 자유산기를 가지도록 함으로써 항염 활성이 높은 항염성 사포닌으로 전환시키는 것으로, 상기 가수분해는 상기 식물 자체 배지에 존재하는 가수분해효소(hydrolase)를 이용하여 식물 자체 배지 및 식물 추출액 내에 존재하는 사포닌의 글리코실 에스터기를 가수분해시켜 항염성 사포닌으로 전환시키는 것이다.
- [81] 상기 제1 식물 추출물을 위한 제1 식물 및 상기 제1 식물 추출물 내에서 가수분해되는 제2 식물은 서로 교차되어 가수분해될 수 있다. 제1 식물을 백두옹, 제2 식물을 꿩의바람꽃으로 선택하여 백두옹의 제1 식물 추출물에서 꿩의바람꽃의 제2 식물 추출물을 가수분해할 수 있다. 반대로 제1 식물을 꿩의바람꽃, 제2 식물을 백두옹으로 선택하여 꿩의바람꽃의 제1 식물 추출물에서 백두옹의 제2 식물 추출물을 가수분해할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 제1 식물 추출물을 위한 제1 식물 및 상기 제1 식물 추출물 내에서 가수분해되는 제2 식물은 동일한 식물일 수도 있다. 예를 들어 백두옹의 물 추출물인 제1 식물 추출물에서 백두옹의 유기용매 추출물인 제2 식물 추출물을 가수분해할 수 있다. 상기 제2 식물의 선택은 목적하는 사포닌 종류의 배합비율에 따라 선택하여 사용할 수 있다.
- [82] 상기 백두옹의 가수분해물에 포함된 유효 항염 화합물은 주로 Hederacolchiside F로부터 가수분해된 Hederacolchiside A이며, hederagenin을 아글리콘으로 하는 사포닌이다. 꿩의바람꽃 뿌리의 가수분해물에 포함된 유효 항염 화합물은 주로 Hederacolchiside E로부터 가수분해된 Hederacolchiside A1이며, Oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 사포닌이다.
- [83] 상기 교차가수분해를 통하여 교차가수분해물을 얻을 수 있으며, 이를 통해 본 발명은 항염활성이 우수한 모노데스모사이드(monodesmoside)의 함유량을 극대화할 수 있다. 또한, 제1 식물 및 제2 식물의 종류와 혼합비율 조절함으로써 hederagenin을 아글리콘으로 한 Hederacolchiside A(HcolA)와 Oleanolic acid를 아글리콘으로 한 Hederacolchiside A1(HcolA1)의 함량비가 1:2 ~ 2:1 인 천연물 항염증용 조성물을 제공할 수 있다. 상기 HcolA 및 HcolA1의 함량비는 1:1인 경우 항염활성이 가장 뛰어났으며, 함량비가 1:2 ~ 2:1의 범위를 넘는 경우, 예를 들어 HcolA 또는 HcolA1의 함량비가 1:3 또는 3:1인 경우 항염활성이 떨어졌다.
- [84] 상기 4단계는 가수분해를 통해 얻은 가수분해물에 유기용매를 가하여 분획하는 단계이다.
- [85] 상기 5단계는 4단계의 분획물을 컬럼 크로마토그래피에 가하여 용출액을 확보하는 단계이다. 상기 5단계의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), HP-20 컬럼 크로마토그래피(HP-20 column chromatography), RP-18 컬럼 크로마토그래피(RP-18 column chromatography), LH-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피

- (High-performance liquid chromatography), 역상 컬럼 고성능 액체 크로마토그래피(reverse phase HPLC) 등에서 선택하여 사용할 수 있다.
- [86] 상기 6단계에서 5단계의 용출액에 유기용매를 가하여 분획하여 분획물을 얻을 수 있다. 상기 4단계 또는 상기 6단계의 유기용매는 C1 내지 C4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 헥산 및 아세톤 등일 수 있다. 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등 일 수 있으며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올이며, 더욱 바람직하게는 메탄올이다.
- [87] 본 발명의 항염증용 조성물은 상기 Hederagenin과 Oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 고농도의 사포닌 함유 추출물에 혈관신생을 억제하는 식물 유래 물질을 혼합함으로써 항염효과를 증가시킬 수 있다.
- [88] 상기 6단계 이후, 상기 6단계의 분획물에 혈관신생 억제 물질을 혼합하는 7단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 7단계의 혈관신생 억제 물질(Angiogenesis Inhibitors)은 척추관절 질환에서 황색인대의 이상증식이나, pannus 형성 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 본 발명은 이들 혈관신생을 억제하는 물질들을 사포닌과 조합함으로써 척추관절질환 치료에 있어서 상승효과를 극대화하는 것을 확인하였다.
- [89] 본 발명에 따른 혈관신생 억제 물질은 식물 추출물일 수 있으며, 상기 혈관신생 억제 물질로 이용될 수 있는 식물 추출물은 전호(*Anthriscus sylvestris*), 개시호(*Bupleurum longiradiatum*), 복수초(*Adonis amurensis*), 인도문주란(*Crinum latifolium*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 광과감초(*Glycyrrhiza glabra*) 또는 꿩의바람꽃 등의 추출물일 수 있다. 상기 식물로부터 혈관신생억제 작용을 하는 추출물을 얻어서 사포닌 함유추출물과 혼합함으로써 항염증 작용에 있어서 상승효과를 내도록 하였다.
- [90] 상기 식물 추출물은 미나리아재비과(*Ranunculaceae*), 두릅나무과(*Araliaceae*), 마과(*Dioscoreaceae*), 콩과(*Leguminosae*), 박과(*Cucurbitaceae*), 국화과(*Compositae*), 장미과(*Rosaceae*), 백합과(*Liliaceae*), 꼭두서니과(*Rubiaceae*), 갈매나무과(*Rhamnaceae*), 석죽과(*Caryophyllaceae*) 등에 포함되는 식물 추출물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 전호(*Anthriscus sylvestris*), 개시호(*Bupleurum longiradiatum*), 복수초(*Adonis amurensis*), 인도 문주란(*Crinum latifolium*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 광과감초(*Glycyrrhiza glabra*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 추출물이며, 더욱 바람직하게는 복수초(*Adonis amurensis*) 추출물 또는 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 추출물 이다.
- [91] 상기 혈관신생억제 작용물질은 혈관신생을 억제하는 식물 추출물로부터 정제된 화합물일 수 있다. 상기 혈관신생을 억제하는 식물 추출물로부터 정제된 화합물은 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelvine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 캄프토테신(camptothecin), 토폠테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 벨로테칸(belotecan), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide),

데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin; DPT), 부플레우로톡신(bupleurotoxin; BPT), 아세틸부플레우로톡신(acetylbupleurotoxin; aBPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 시마롤(cymarol), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 4-세네시오일옥시메틸

3,4-디메톡시쿠마린(4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin) 이고, 바람직하게는 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin), 부플레우로톡신(bupleurotoxin; BPT), 아세틸부플레우로톡신(acetylbupleurotoxin; aBPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 시마롤(cymarol), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 4-세네시오일옥시메틸

3,4-디메톡시쿠마린(4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin)으로 이루어진 군 중 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin; DPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 시마롤(cymarol)으로 이루어진 군 중 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[92] 상기 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*) 가수분해추출물 및/또는 전호, 개시호, 인도 문주란, 복수초로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.

[93] 상기 약학적 조성물은 상기 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*) 가수분해추출물 및/또는 전호, 개시호, 인도 문주란, 복수초로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 추출물에 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다.

[94] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 백두옹과 꿩의바람꽃의 가수분해추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 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, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [95] 상기 약학적 조성물의 투여량은 치료 받을 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 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [96] 상기 약학적 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 점막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 특히 염증질환이 진행되는 환부에 직접 주사로 투여될 수 있다.
- [97] 상기 ‘항염증’이란 아래에서 정의되는 염증성 질환의 개선(증상의 경감), 그러한 질환의 발병 억제 또는 지연을 포함하는 의미이다.
- [98] 상기 ‘염증성 질환’이란 외부의 물리.화학적 자극 또는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염 또는 자가면역에 대한 국부적 또는 전신적 생체 방어 반응으로 특정되는 염증 반응이 일으키는 병리적 증상으로서 정의될 수 있으며, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티스성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염(아토피성 피부염 포함), 습진, 다발성 경화증 등일 수 있다.
- [99] 상기 ‘염증성 질환’은 특히 염증성 척추관절질환일 수 있으며, 척추관협착증, 루마티스 관절염, 허리디스크, 목디스크, 경추관협착증, 오십견, 퇴행성관절염일 수 있다.
- [100] 또한, 상기 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*) 가수분해추출물 및 혈관신생억제 작용 물질을 포함하는 항염증용 조성물은 건강기능식품일 수 있다.

[101] 상기 건강기능식품은 상기 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 썩의바람꽃(*Anemone raddeana*) 및 혈관신생 억제 물질을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[102] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 백두옹과 썩의바람꽃의 가수분해추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다.

발명의 효과

[103] 본 발명의 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 썩의바람꽃(*Anemone raddeana*) 가수분해추출물 및/또는 추가의 혈관신생억제 작용물질을 포함하는 염증성 척추관절질환의 치료를 위한 천연약물 신약을 개발하는 데에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[104] 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.

[105] <실시예 1. 식물 유기용매 추출물 제조>

[106] 실시예 1-1. 백두옹의 유기용매 추출물(Pk-ex)의 제조

[107] 백두옹 150g을 취하여 분쇄하고, 이 중 100g을 취하고 여기에 메탄올 300ml를 가하고 5시간 1차 환류 추출하였다. 그 다음 이를 여과하여 상층액을 보관하고 식물 잔체에 다시 메탄올 300 ml를 가하고 5시간 2차 환류 추출하였다. 여과 후 1차 및 2차 메탄올층을 합하여 감압증류하여 부피가 절반이 되도록 농축하였다. 여기에 헥산 200 ml를 가하고 흔들어 준 다음 5분간 세워두었다가 헥산층은 버리고, 메탄올층을 취하여 건고하였다. 이 건고물에 에탄올 30 ml를 가하고 교반한 후 세워두어 생성된 불용분은 여과하여 제거하고 에탄올층을 건고하였다(Pk-ex).

[108] 실시예 1-2. 썩의바람꽃뿌리 유기용매 추출물(Ar-ex)의 제조

[109] 실시예 1-1과 같은 방법으로 하여 썩의바람꽃 뿌리 추출물(Ar-ex) 5.13 g을 얻었다.

[110] 실시예 1-3. 페르시안담쟁이 잎 추출물(Hc-ex)

[111] 페르시안 담쟁이 잎 300 g을 분쇄한 후 그 중 200g을 취하고 여기에 메탄올 400 ml를 가하여 5시간 1차 환류하였다. 이를 여과 후 메탄올층은 보관하고 식물잔체에는 다시 메탄올 400 ml를 가하고 5시간 2차 환류하였다. 1, 2차 환류한 메탄올층을 합한 다음 300 ml정도가 되도록 농축한 후 여기에 헥산 300ml를 가하고 흔들어 준다음, 헥산층은 버리고, 메탄올 층을 취하여 상기와 동일 방법으로 탈지를 2회 반복하였다. 상기 메탄올층을 건고한 후, 건고물에 에탄올 40ml를 가하여 흔들어 준 다음 12시간 실온에서 세워두었다가 불용분은

여과하여 제거하고 에탄올층은 건고하여 페르시안담쟁이 잎 추출물(Hc-ex) 3.45g을 얻었다. 크로마토그래피 분석을 통하여 이 중에 HcolA-ester(hederacolchiside F)와 HcolA1-ester(hederacolchiside E)가 함유되어 있는 것을 확인하였다.

[112] <실시예 2. 식물 발효 추출물 제조>

[113] 실시예 2-1. 백두옹 발효 추출물(Pf-ex)의 제조

[114] 백두옹 150 g을 분쇄하고, 이 중 100 g을 취하여 발효조에 넣고 여기에 물 150 g을 가하고 혼화한 다음 초음파를 가하여 2차 분쇄한다. 2차 분쇄가 끝나면 상기 분쇄물의 온도를 37°C에서 150분간 교반한 다음 반응물을 섭씨 80도에서 30분 가열한다. 이를 실온으로 식히고, 전체부피의 절반 정도로 농축한 후, 여기에 메탄올 400ml를 가하고 실온에서 5 시간 교반하였다. 메탄올 용해분은 여과하여 보관하고 식물잔체에는 다시 메탄올 400ml를 가하고 5시간 교반한 후 여과하였다. 메탄올 용액은 앞의 것과 합하였다. 합한 메탄올 용매분은 감압농축하여 건고하였다. 건고물에는 에탄올(ethanol) 50ml를 가하고 혼화하였다. 이를 실온에서 2시간 둔 다음 생성된 불용분은 원심분리 또는 여과하여 제거한다. 에탄올 용분을 건고하여 고형분 9.7g을 얻었다.

[115] 이 중 Hederacolchiside A를 정량하였다. Hederacolchiside A 및 Hederacolchiside A1의 정량은 Y.Zhao 등의 방법에 따라 실시하였다. HPLC(Lab Alliance Series III, SSI, USA)에 C18 분석 컬럼(250mm x 4.5cm, Alltech Associates Co. USA)에, 아세트니트릴(A), 0.1% 포스포릭산 수용액(B) 농도구배 용매 시스템을 이용하였다(이동 속도 : 1.0 ml/min., 203 nm에서 측정). 표준시약으로 Hederacolchiside A 및 Hederacolchiside A1은 구입하여 (CoreSciences, info@coresciences.co.kr) 표준곡선을 제작하고, 추출물을 HPLC로 분석 후, Hederacolchiside A 및 A1의 피크의 크기를 측정하여 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 정량 결과, 수득량 9.7 g 중 HcolA 103.4 mg으로 HcolA의 수득률은 1.07%였다. 상기 농축물(Pf-ex) 9.7 g을 생리식염수에 용해시켜 HcolA 농도를 1.0 mg/ml이 되도록 제제화 하였다.

[116] 실시예 2-2. 꿩의바람꽃 뿌리 발효 추출물(Af-ex)의 제조

[117] 꿩의바람꽃 뿌리를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 농축물 11.3 g을 얻었으며, 이 중 HcolA1 180.5 mg으로 HcolA1 수득률은 1.87%였다. 상기 농축물(Af-ex)을 HcolA1 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 생리식염수에 용해시켜 제제로 활용하였다.

[118] <실시예 3. 혼합발효물의 유기용매 추출물의 제조>

[119] 실시예 3-1. 백두옹과 꿩의바람꽃 뿌리 발효물의 혼합발효물의 유기용매 추출물(PfAr-ex)의 제조

[120] 백두옹 150 g을 잘게 분쇄한 다음, 그 중 100 g을 취하여 수조에 넣고, 여기에 꿩의바람꽃 뿌리 추출물(Ar-ex) 4.13 g을 가하고 물 150 ml를 가한 다음, 5분간 초음파 분쇄하고, 이를 37°C에서 3시간 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝나면

온도를 80°C로 올려 20분간 가열한 다음 발효물이 실온으로 되면 여기에 메탄올 400 ml를 가하고 실온에서 6시간 1차 교반하였다. 교반 후 여과하여 메탄올 추출액은 보관하고 식물잔체에는 다시 메탄올 400 ml를 가하고 6시간 2차 교반한 후, 여과한 다음, 1, 2차 메탄올추출액을 합하여 감압하에 300ml 정도가 되도록 농축시켰다.

[121] 그 다음 여기에 헥산 300ml를 가하고 15분간 흔들여 준 후, 헥산층은 제거하고 메탄올층에 다시 헥산 300ml를 가하여 흔들여 준 후, 헥산층을 제거하였다. 메탄올층을 취하여 감압건고하여 추출물(PfAr-ex) 5.43g을 얻었다. 크로마토그래피 분석을 통하여 PfAr-ex 5.43g 내에 HcolA 98.3mg(1.81%), HcolA1 145.5mg(2.68%)가 함유된 것을 확인하였다.

[122] 실시예 3-2. 썩의바람꽃 뿌리에 백두옹 추출물(Pk-ex)을 혼합하여 발효한 발효물의 유기용매추출물(AfPk-ex)의 제조

[123] 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 썩의바람꽃뿌리에 백두옹 용매추출물(Pk-ex)를 가하고 발효한 후 용매추출하여 추출물(AfPk-ex) 4.6 g을 얻었다. 크로마토그래피 분석을 통하여 추출물 (AfPk-ex) 4.6g 내에 HcolA 108.3mg HcolA1 123.28 mg 이 함유된 것을 확인하였다. 이를 생리식염수에 녹여 HcolA 1.0mg + HcolA1 1.1mg/ml의 제제로 만들었다.

[124] 상기 실시예 2-1 및 2-2에서 얻은 PfAr-ex 또는 AfPk-ex 중의 HcolA 와 HcolA1의 혼합 비율을 확인하였다. HcolA 및 HcolA1를 고농도로 포함한 백두옹 및 썩의바람꽃 추출물을 제조하기 위하여 백두옹과 썩의바람꽃 뿌리를 각각 단독으로 추출한 추출물의 g당 함량은 HcolA 10.6mg/g ex(HcolA 103.4 mg/9.7 g) 와 HcolA1 18.6mg/g ex(HcolA1 180.5 mg/9.7 g)이다. 이에 비하여 백두옹과 썩의바람꽃을 혼합발효를 통해 교차가수분해하여 얻은 PfAr-ex 및 AfPk-ex의 추출물 g당 함량은 HcolA 23.5/g-ex 및 HcolA1 26.8mg/g-ex로 단독 발효때 보다 훨씬 높은 함량이다 (표 1).

[125] [표1]

구분	가수분해처리에 따른 Hederacolchiside 함량(mg/g)	
	단독 추출	교차가수분해
백두옹	Hederacolchiside A 10.6	Hederacolchiside A 23.5
썩의바람꽃	Hederacolchiside A1 18.6	Hederacolchiside A1 26.8

[126] 이와 같은 현상을 PfAr-ex의 예를 들어 설명해보면, 썩의바람꽃 뿌리를 용매추출하는 과정에서 사포닌 외의 대부분의 물질은 제거되고 HcolF 함량이 높은 엑기스(Ar-ex)가 얻어진다. 발효기질은 HcolF가 고농도로 들어있는 이 엑기스를 바람꽃뿌리와 혼합하여 발효시키면 가수분해 속도가 높아지기 때문에

보다 완벽하게 가수분해가 이루어진다.

[127] <실시예 4. HcolA 및 HcolA1를 포함하는 고농도의 사포닌 함유 제제의 제조>

[128] 지름 2cm의 칼럼에 Daiion HP20을 물과 함께 부어 고정물 높이가 40cm가 되도록 하고, 증류수 500 ml를 통과시켜 칼럼을 안정시킨 다음, AfPk-ex 100 mg을 물 10ml에 용해시켜 칼럼 위에 고르게 가하여 흡착시켰다. 이후, 물 5ml씩으로 두 번 세척한 후, 물 200 ml를 가하여 30분에 걸쳐 통과시켰다. 다음, 20% 메탄올 용액 200 ml를 낮은 속도로 서서히 통과시킨 다음 연달아 30% 메탄올 수용액으로 통과시켰다. 20% 메탄올 통과 시작과 동시에 유출액은 10ml씩을 시험관에 포집하였으며, 동시에 사포닌의 색반응으로 사포닌 유출의 시작과 종료를 확인하였다. 35째 시험관부터 41째 시험관까지 사포닌 반응을 보였으며, 이를 건고하여 HcolA 및 HcolA1를 포함하는 고농도의 사포닌 함유 제제 22.2mg을 얻었다.

[129] 사포닌의 색반응은 모세관을 사용하여 각 시험관에서 용출물을 찍어내어 실리카겔 판에 점적한 다음, 건조하고 그 위에 무수초산을 분무한 다음 110°C에서 가열하였다. 이 때 적색의 반점이 나타나는 것으로 사포닌 용출의 시작과 끝을 판정하였다.

[130] <실시예 5. 혈관신생억제 작용을 갖는 식물추출물의 제조>

[131] 본 발명은 상기 Hederagenin과 Oleanolic acid를 아글리콘으로 하는 고농도의 사포닌(HcolA 및 HcolA1) 함유 추출물에 혈관신생을 억제하는 식물 추출물을 혼합함으로써 항염효과를 증가시킬 수 있었다.

[132] 실시예 5-1. 복수초 추출물의 제조

[133] 복수초(Adonis amurensis)는 cymarin, cymarilic acid, cymarol 등 혈관신생억제물질을 함유한 식물이다. 복수초 건조 뿌리를 분쇄하고 이중 200g을 메탄올 500 ml를 가하고 12시간 교반한 다음, 여과 후 메탄올층은 따로 보관하고 남은 식물잔체에 다시 메탄올 300 ml를 가하고 7시간 교반하여 메탄올층을 다시 수득하였으며, 이 과정을 1회 반복 시행하였다. 상기 메탄올층을 모아 감압증류기에서 건고하고, 여기에 메탄올 100 ml를 가하고 흔들어 준 후, 정치하여 불용분은 여과하여 제거하였다. 메탄올 층에는 헥산 100 ml를 가하고 흔들어 준 다음 헥산층을 버리고, 상기 헥산 처리 과정을 1회 반복하였다. 남아있는 메탄올층은 건고한 다음, 여기에 물 50 ml를 가하여 용해시키고, 여기에 초산에틸(ethyl acetate) 100ml를 가하고 10분간 흔들어 주고 정치한 후 초산에틸층은 분리하여 보관하였다. 물층은 다시 초산에틸 50ml를 가하고 흔들어 주고 정치 후 초산에틸층은 분리하여 이전 것과 합한 다음, 초산에틸층을 건고하고 여기에 초산에틸 40 ml를 가하고 고정분을 녹인 다음 헥산 10ml를 추가하고 흔들어 혼합하였다. 이를 냉장고에서 12시간 정치한 후 생성된 불용분(유독성 cardenolides 포함)은 여과하여 제거하고 초산에틸/헥산 용액은 건고하였고 이를 다시 에탄올로 세척하여 건고하여 건고물 2.9g을 얻었으며, 이를 Ad-ex라 표시하였다.

- [134] AD-ex 2.9 g은 YJ You 등의 방법에 따라 cymarine/cymarilic acid/cymarol(CCC) 혼합물 90 mg를 함유한 것을 확인하였고, 1000 μg CCC/100 ml = 10 μg CCC/ml 이 되도록 에탄올에 용해하여 사용하였다.
- [135] 실시예 5-2. 개시호 추출물의 제조
- [136] 개시호는 혈관신생억제물질인 bupleurotoxin과 acetyl bupleurotoxin(BTPa)를 포함하고 있다. 음건한 개시호 전초를 분쇄하고 그 중 100 g을 취하고 여기에 메탄올 400 ml를 가하고 질소하에서 5시간 교반하였다. 이를 여과한 후 메탄올은 질소가스 하에 보관하고 식물잔체에 동일량의 메탄올을 가하여 질소 존재하에 5시간 교반하였다. 이를 여과후 메탄올 층은 처음 것과 합하고 질소하에서 감압 증류하여 전체액의 3분의 1의 양이 되도록 농축하였다. 여기에 에틸아세테이트 200 ml를 가하고 흔들어 준 다음, 에틸아세테이트 층을 취하여 건고하였다. 여기에 무수 에틸알코올 5 ml를 가하고 침전물이 생기면 원심분리하여 제거하여 개시호 추출물(BPT-ex)을 수득하였다. 상기 추출물에는 bupleurotoxin/acetyl bupleurotoxin이 0.3 mg 포함되어 있었다.
- [137] 실시예 5-3. 인도문주란 추출물의 제조
- [138] 인도문주란(*Crinum latifolium*)은 혈관신생억제물질인 2-seneciolyloxy-methyl-3,4-dimethoxycoumarin(SDC)이 포함되어 있다. 건조한 인도문주란 300 g을 잘게 분쇄하고, 이 분쇄물 200 g과 50% 메탄올 수용액(V/V) 400 ml를 혼합하여 1시간 환류하였다. 반응 후 여과하여 메탄올층은 보관하고, 식물잔체에는 50% 메탄올 400 ml를 가하여 실온에서 10 시간 교반하였다. 이후, 메탄올층을 모두 합하고 감압하에 전체 양이 100 ml 이 되도록 농축하였다. 이어서 상기 농축액에 0.1N HCl을 가하여 pH 4.5 로 맞춘 후, 클로로폼 200 ml를 가하고 10분간 흔들어 주었다. 클로로폼층은 분리하여 보관하고 수용액층은 다시 한 번 같은 양의 클로로폼으로 추출하였다. 클로로폼층은 합하여 물 200 ml 씩으로 두 번 세척한 후, 감압 건고하여 인도문주란 추출물(Cla-ex) 2.1 g을 수득하였다. Cla-ex 2.1 g에는 2-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin(SDC)이 8 mg 함유되어 있었다.
- [139] 실시예 5-4. Deoxy podophyllotoxin(DPT)의 원액조제
- [140] 전호의(*Anthriscus sylvestris*)의 혈관신생억제물질인 Deoxy podophyllotoxin(DPT)은 시판되고 있으므로 구입하여 사용하였다. DPT 0.15 mg을 에탄올 100 ml에 용해시켜 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하여 DPT 원액으로 사용하였다
- [141] 실시예 5-5. 감초 추출물의 제조
- [142] 음건한 감초 50g을 취하여 분쇄하고 이 중 10g을 취하였다. 여기에 메탄올 40ml를 가하고 교반하면서 1시간 환류하였다. 반응물을 여과하고 남은 식물체에는 메탄올 40ml를 가하고 1시간 환류하였다. 여과하여 메탄올 용해분은 전 것과 합한 후 메탄올을 제거하고 건고하였다.
- [143] 건고물에는 에탄올 10ml를 가하고 혼화한 다음 실온에서 1시간 세워둔 후 생긴

불용분은 제거하였다. 에탄올 용액은 건조하였다. 여기에 생리식염수 10ml를 가한 후 교반하여 실온에서 12시간 세워둔 다음 여과하여 얻은 용액을 제제(Gly-ex, 감초추출물 원액)로 사용하였다. 감초추출물 내의 isoliquiritin은 isoliquiritin 표준품으로 HPLC를 이용하여 표준곡선을 만들어 정량하였다. 이때 HPLC는 C-18(reverse-phase) 컬럼을 이용하였으며, 용매: 물 / formic acid (100/0.04) 와 acetonitrile로 순차 용출(gradient elution)하였다. 용출속도는 0.2m/min 이었으며, 용출온도는 실온으로 368 nm 파장에서 검출하였다. 상기 수득한 감초추출물 원액 1ml에는 Isoliquiritin 4.1mg이 함유되어 있었다.

[144] <실시예 6. 백두옹 및 꿩의바람꽃 가수분해추출물을 포함하는 항염증용 조성물 항염효과 확인>

[145] 상기 실시예 1 내지 5에서 제조한 가수분해추출물을 이용하여 항염증용 조성물을 하기 표 2와 같이 제조하고 카라게닌으로 부종을 유발한 랫트에서 항염 효과를 확인하였다.

[146] [표2]

조성물	구성
대조군	생리식염수 2 ml
제제 1	Pf-ex(1ml)
제제 2	Pf-ex(1ml) + DPT(1ml)
제제 3	Af-ex(1ml)
제제 4	Af-ex(1ml) + DPT(1ml)
제제 5	Pf-ex(1ml) + Af-ex(1ml)
제제 6	Pf-ex(1ml) + Af-ex(1ml) + DPT(1ml)
제제 7	Pf-ex(1ml) + Af-ex(1ml) + Gly-ex(1ml)
제제 8	Pf-ex(1ml) + Af-ex(1ml) + Ad-ex(1ml)
제제 9	AfPk-ex(1ml)
제제 10	AfPk-ex(1ml) + DPT(1ml)
제제 11	AfPk-ex(1ml) + Gly-ex(1ml)
제제 12	PfAr-ex(1ml)
제제 13	PfAr-ex(1ml) + Gly-ex(1ml)
제제 14	Pf-ex(1ml) + Af-ex(1ml) + Gly-ex(1ml) + DPT (1ml)
제제 15	AfPk-ex(1ml) + DPT(1ml) + Gly-ex(1ml)
비교예 1	Indomethacin 10mg/kg 경구투여
비교예 2	HcolA 1 mg + HcolA1 1 mg
비교예 3	Pk-ex(1ml)
비교예 4	Ar-ex(1ml)
비교예 5	Hc-ex(1ml)
비교예 6	제제 14를 카라게닌 주사 점에 직접 주사

[147] Wistar rat을 3마리 한 조로 하여 실험군을 부종은 1%(w/v) lambda carrageenin 용액 0.1 ml을 랫트의 뒤 왼쪽발에 족저주사(subplantar injection)하여 생성시켰다. 뒤 오른쪽 발에는 0.1 ml 생리식염수를 동일하게 주사하였다. 하기 대조군, 제제 1~16 및 비교예 1~5는 부종유발 1시간 전에 마리당 1 ml씩 복강 주사하였으며, Indomethacin은 부종유발 1시간 전 경구투여 하였다. 대조군은 생리식염수 2 ml을 사용하였다. 비교예 1은 인도메타신(Indomethacin) 10 mg/kg을 경구투여 받은 군이다. 약효는 카라게닌 투여 2시간부터 1시간 단위로 4시간까지 부종의 부피를 측정하여 백분율(%)로 평가하였다. $\{[1-S/C] \times 100\}$ (단, S:제제 투여군의

부종부피, C:카라게닌 투여군의 부종부피) 부종의 부피는 water plethysmography 법으로 측정하였다. 제제 16은 랫트의 카라게닌 주사 점에 제제 9를 직접 주사하여 그 항염효과를 관찰한 것이다. 이는 척추골격 질환의 경우 임상에서 약물을 환부에 직접주사하는 경우가 많은 점을 고려한 것으로, 한방의 약침 등에도 응용할 수 있는 방법이다. 본 발명에서는 제제 14를 선택하여 0.2ml 를 랫트의 뒷다리 왼쪽 족저 카라게닌 주사점에 30분 간격으로 두 번 직접 주사하였다(비교예 6). 즉, 카라게닌 주사 후 150과 180분에 각각 주사하였으며, 항염평가는 240분(카라게닌 주사 후 4시간)에 실시하였다. 비교예 2는 HcolA 1 mg 및 HcolA1 1 mg을 혼합한 제제이다. 대조군은 생리식염수 투여군이다.

- [148] 제제 1과 제제 3은 각각 백두옹과 썩의바람꽃뿌리를 발효한 후 용매추출한 Pf-ex 1ml(HcolA 1mg 함유) 또는 Af-ex 1ml(HcolA1 1mg 함유)에 생리식염수를 가하여 5 ml가 되게 한 제제로 본 발명의 제제의 항염평가의 기초가 되는 제제이다. 제제 1은 제제 3과 대비된다. 제제 3은 HcolA1 1mg가 들어있는 Af-ex 1ml를 취하여 전체액이 5ml가 되게 생리식염수를 가한 것이다. 두 제제 모두 항염작용이 약하며 비교예 1의 Indomethacin(63.3%)보다도 약하였으나, 비교예 3(Pk-ex, 23.0% 부종감소), 비교예 4(Ar-ex, 19.4% 부종감소), 비교예 5(Hc-ex, 15.5% 부종감소)보다는 우수한 항염작용을 보여 주었다.
- [149] 제제 2는 백두옹 제제 1에 혈관신생 억제물질인 deoxypodophyllotoxin(DPT)를 1.5 μ g을 가한 것이다. 제제 1에 비하여 항염활성이 7.0% 상승하였다. 이는 DPT의 혈관신생 억제작용을 통한 항염작용의 상승효과에 기인한 것이다.
- [150] 제제 4는 제제 3에 DPT를 가한 것으로 항염활성은 강화되었다. 이는 DPT의 상승효과에 의한 것이다. 제제 2와 유의한 차이를 보이지 않았다.
- [151] 제제 5는 제제 1과 제제 3을 1 대 1로 혼합한 것이다. 제제 5의 활성은 60.5%로 제제1이나 제제 3보다 월등히 높다. 제제 5의 Pf-ex에는 HcolA 1.0mg, Af-ex에는 HcolA1 1.0mg이 들어있는 추출물이다. 작용성분의 양으로 계산하면 (HcolA 1.0mg + HcolA1 1.0mg)/5ml인 제제이다. 작용물질양으로 보면 제제 1 또는 제제 3에 비하여 2배나 많다. 제제 5의 항염작용이 강화된 것은 작용물질의 양적증가에 기인하였다고 볼 수 있다.
- [152] 제제 5는 비교예 2와 대비된다. 비교예 2는 순수 작용물질을 이용하여 (Hcol A 1ml + HcolA1 1mg)/5ml이 되게 만든 것으로 항염활성(40.7%)은 제제 5 보다 훨씬 낮다. 결론적으로 제제 5의 활성이 높은 것은 추출물 중에는 HcolA나 HcolA1외에도 항염효과를 상승시키는 다른 물질들이 존재하기 때문으로 해석된다.
- [153] 제제 6은 제제 5에 DPT를 가함으로써 항염작용이 9.2% 향상되었다.
- [154] 제제 7은 제제 6의 DPT 대신 감초 추출물인 Gly-ex를 가한 제제이다. 제제 7과 제제 6의 두 제제간의 항염활성은 유의한 차이를 보이지 않았다.
- [155] 제제 8은 제제 6, 제제 7과 대비되는 것으로 혈관신생억제제로 DPT, Gly-ex대신 복수초 추출물(Ad-ex)을 혼합한 제제이다. 이들 3개 혈관신생 억제제 중 복수초

- 추출물(Ad-ex)이 가장 강한 항염작용 상승효과를 보였다.
- [156] 제제 9는 썩의바람꽃 뿌리에 백두옹의 용매추출물(Pk-ex)을 가하여 발효시킨 제제로 구성과 효과는 제제 5와 유사하다.
- [157] 제제 10은 제제 9에다 DPT를 첨가한 것으로 항염작용은 63.3%로 높으며 DPT 첨가로 인한 상승효과는 7.3%이다.
- [158] 제제 11은 제제 9에다 감초 추출물 Gly-ex를 가한 제제로서 항염효과는 72.4%로 매우 높다. Gly-ex 첨가로 인한 항염작용 상승효과는 13.7%이다.
- [159] 제제 12는 백두옹에 썩의바람꽃 뿌리의 용매추출물(Ar-ex)를 가하고 발효시킨 제제로 구성과 효과는 제제 9와 유사하다.
- [160] 제제 13은 백두옹에 썩의바람꽃 뿌리의 용매추출물(Ar-ex)를 가하고 발효하여 얻은 추출물 PfAr-ex에 감초추출물 Gly-ex를 가한 것으로 제제 11과 항염작용이 유사하다.
- [161] 제제 14는 제제 5에다 혈관신생억제제인 DPT 와 Gly-ex를 동시에 가한 제제로서 항염작용은 제제 5의 60.5%에 비하여 18.6% 증가되었다.
- [162] 제제 15는 제제 9에다 DPT와 Gly-ex를 가한 것으로 제제 14와 유사한 항염작용을 보여주었다.
- [163] 비교예 6의 경우, 제제 14를 직접주사를 마친 후 1시간대에 랫트 뒷발의 부피는 87% 감소하였다. 또한 비교예 6의 3마리 랫트의 왼쪽 뒷발은 그 부종 크기가 카라게닌 주사를 맞지 않은 오른발과 큰 차이를 보이지 않았고 이들의 움직임 또한 자유로웠다. 따라서 특히 복수초 추출물은 랫트에 대하여 특별한 독성 징후를 나타내지 않음에 따라 비교예 6과 같이 제제 9 등을 환부에 직접 주사하는 경우 항염효과가 증가할 것으로 사료된다.
- [164] 상기 실험 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 부종 크기 감소율(%)은 아래와 같이 각 시간 후의 카라게닌 주사에 의한 부종(대조군) 크기에 대하여 각 제제에 의한 각 시간 후의 부종 크기의 비율로 나타내었으며, 부종의 평균감소율은 2, 3, 4시간 후의 각 제제에 의한 부종의 감소율의 평균값으로 나타내었다.
- [165] 부종 크기 감소율(%) = {1 - (각 제제의 부종크기/대조군의 부종크기)}x100

[166] [표3]

조성물	처리 시간 (시간)에 따른 부종 크기 (감소율 %)			부종평균 감소율 (%)
	2시간	3시간	4시간	
대조군	0.814 ± 0.045	0.831 ± 0.011	0.867 ± 0.064	(0)
제제 1	0.400 ± 0.088(51)	0.467 ± 0.019(44)	0.428 ± 0.056(51)	(48.6)
제제 2	0.357 ± 0.013(56)	0.363 ± 0.045(56)	0.387 ± 0.082(55)	(55.6)
제제 3	0.443 ± 0.022(45)	0.450 ± 0.056(45)	0.513 ± 0.01(41)	(36.6)
제제 4	0.398 ± 0.078(51)	0.369 ± 0.035(55)	0.401 ± 0.073(53)	(53.0)
제제 5	0.304 ± 0.012(63)	0.340 ± 0.043(59)	0.351 ± 0.023(59.5)	(60.5)
제제 6	0.287 ± 0.057(65)	0.252 ± 0.087(69.7)	0.221 ± 0.036(74.5)	(69.7)
제제 7	0.309 ± 0.034(62)	0.286 ± 0.031(65.8)	0.208 ± 0.065(76)	(67.9)
제제 8	0.201 ± 0.021(75)	0.187 ± 0.078(77)	0.189 ± 0.037(78)	(76.6)
제제 9	0.354 ± 0.012(56.5)	0.342 ± 0.043(58.8)	0.331 ± 0.023(61.8)	(58.7)
제제 10	0.304 ± 0.044(63)	0.300 ± 0.083(64)	0.321 ± 0.046(63)	(63.3)
제제 11	0.229 ± 0.056(72)	0.228 ± 0.045(73)	0.237 ± 0.098(73)	(72.4)
제제 12	0.296 ± 0.074(64)	0.341 ± 0.059(59)	0.357 ± 0.078(59)	(60.0)
제제 13	0.214 ± 0.055(74)	0.214 ± 0.055(74)	0.218 ± 0.085(75)	(73.2)
제제 14	0.174 ± 0.033(79)	0.182 ± 0.025(78)	0.182 ± 0.046(79)	(78.6)
제제 15	0.214 ± 0.055(74)	0.211 ± 0.056(74.6)	0.218 ± 0.085(75)	(74.5)
비교예 1	0.304 ± 0.012(63)	0.300 ± 0.043(64)	0.321 ± 0.023(63)	(63.3)
비교예 2	0.456 ± 0.069(44)	0.508 ± 0.059(39)	0.527 ± 0.034(39)	(40.7)
비교예 3	0.632 ± 0.059(22)	0.639 ± 0.077(23)	0.652 ± 0.048(25)	(23..0)
비교예 4	0.663 ± 0.038(19)	0.679 ± 0.045(18)	0.681 ± 0.063(21)	(19.4)
비교예 5	0.674 ± 0.066(17)	0.712 ± 0.053(14)	0.736 ± 0.053(15)	(15.5)
비교예 6	-	-	0.165 ± 0.032(79.7)	(79.7)

[167] 본 발명의 제제와 항염작용의 관계를 종합해 보면, 첫째, 단일 식물제제인 Pk-ex(비교예 3)나 Ar-ex(비교예 4)보다 Pf-ex(제제 1)나 Af-ex(제제 3)가 항염작용이 증가하였으며, 이 두 추출물을 혼합하여 제제 5로 제조한 경우와 추가의 확인실험으로 제제 5에서 Pf-ex(0.5 ml)와 Af-ex(0.5 ml)로 혼합된 제제의 경우 55.2% 부종 감소율의 실험결과를 통해 Pf-ex와 Af-ex를 혼합 사용시 항염작용이 상승적 효과를 확인하였다.그러나 제제 5 중의 순수 작용물질을

분리하여 만든 비교예 2를 투여한 군에서는 약한 항염작용을 보였다. 이는 결국 제제 5 중에는 순수작용물질 외에 작용을 상승시키는 물질들이 들어 있다고 볼 수 있으며, 또한 제제 5에 혈관신생억제제인 DPT, Gly-ex, Ad-ex등을 가하면 항염작용은 대폭 증가하였다.

[168] 제제 5 또는 제제 9에 DPT와 Gly-ex를 추가하여 만든 제제 14와 제제 15는 본 발명 제제 중 최강의 항염작용을 보였다.

[169] <제제예 1. 약학적 제제>

[170] 본 발명의 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*) 가수분해추출물 또는 이들의 교차가수분해추출물 및 혈관신생 억제 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물은 경구제제 또는 주사제제로 제조될 수 있다. 특히 주사제제는 환부에 직접 주사함으로써 항염효과를 증가시킬 수 있다.

[171] 제제예 1-1. 산제의 제조

[172] 본 발명의 백두옹, 꿩의바람꽃 가수분해추출물 또는 이들의 교차가수분해추출물 및 복수초 추출물 혼합물 2g, 유당 1g을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[173] 제제예 1-2. 정제의 제조

[174] 본 발명의 백두옹, 꿩의바람꽃 가수분해추출물 또는 이들의 교차가수분해추출물 및 감초 추출물 혼합물 100mg, 미결정셀룰로오스 100mg, 유당수화물 60mg, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스 20mg 및 스테아르산마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[175] 제제예 1-3. 캡슐제의 제조

[176] 본 발명의 백두옹, 꿩의바람꽃 가수분해추출물 또는 이들의 교차가수분해추출물 및 복수초 추출물 혼합물 100mg, 미결정셀룰로오스 100mg, 유당수화물 60mg, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스 20mg 및 스테아르산마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[177] 제제예 1-4. 주사제의 제조

[178] 본 발명의 백두옹, 꿩의바람꽃 가수분해추출물 또는 이들의 교차가수분해추출물 및 감초 추출물 혼합물 10mg, 주사용 멸균 증류수 적량 및 pH 조절제 적량을 혼합한 후 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.

청구범위

- [청구항 1] 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*) 중에서 1종 이상 선택된 식물 분쇄물의 물 가수분해 발효물의 유기용매 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 유기용매는 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 유기용매 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은, 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 선택된 식물 분쇄물의 물 가수분해 발효물과 백두옹(*Pulsatilla koreana*)과 꿩의바람꽃(*Anemone raddeana*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 선택된 식물의 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 및 에틸아세테이트 중에서 선택된 유기용매의 추출물을 혼합하여 가수분해한 추출물을 포함하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성질환은 척추관협착증, 루마티스 관절염, 허리디스크, 목디스크, 경추관협착증, 오십견, 퇴행성관절염으로 이루어진 군 중 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 전호(*Anthriscus sylvestris*), 개시호(*Bupleurum longiradiatum*), 복수초(*Adonis amurensis*), 인도 문주란(*Crinum latifolium*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 및 광과감초(*Glycyrrhiza glabra*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관신생억제 억제작용을 갖는 식물추출물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 조성물은 데옥시포도필로톡신(*deoxypodophyllotoxin; DPT*), 빈블라스틴(*vinblastine*), 빈크리스틴(*vincristine*), 비노렐빈(*vinorelbine*), 파클리탁셀(*paclitaxel*), 도세탁셀(*docetaxel*), 캄프토테신(*camptothecin*), 토폠테칸(*topotecan*), 이리노테칸(*irinotecan*), 벨로테칸(*belotecan*),

- 포도필로톡신(podophyllotoxin), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 부플레우로톡신(bupleurotoxin; BPT), 아세틸부플레우로톡신(acetylbupleurotoxin; aBPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 시마롤(cymarol), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 4-세네시오일옥시메틸 3,4-디메톡시쿠마린(4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관신생 억제물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin; DPT), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 캄프토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 벨로테칸(belotecan), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 부플레우로톡신(bupleurotoxin; BPT), 아세틸부플레우로톡신(acetylbupleurotoxin; aBPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 시마롤(cymarol), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 4-세네시오일옥시메틸 3,4-디메톡시쿠마린(4-seneciolyloxymethyl-3,4-dimethoxycoumarin)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관신생 억제물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 혈관신생 억제물질은 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin; DPT), 시마린(cymarín), 시마릴릭산(cymarilic acid), 이소리퀴리틴(Isoliquiritin) 및 시마롤(cymarol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 9] 제1항의 염증성질환 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법에 있어서, i) 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 꿩의 바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*), 복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아 담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로부터 1종 이상 선택된 제1 식물에 증류수를 넣고 분쇄하여 제1 식물 추출물을 제조하는 1단계; ii) 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 중국할미꽃(*Pulsatilla chinensis*), 가는잎할미꽃(*Pulsatilla cernua*), 꿩의 바람꽃(*Anemone raddeana*), 두릅(*Aralia elata*), 으름덩굴(*Akebia quinata*), 인동속 식물(*Lonicera species*),

복수초(*Adonis amurensis*), 양담쟁이(*Hedera helix*), 페르시아
담쟁이(*Hedera colchica*) 및 마타리(*Patrinia scabiosifolia*)로부터 1종 이상
선택된 제2 식물에 유기용매를 가하여 제2 식물 추출물을 제조하는
2단계;
iii) 상기 1단계의 제1 식물 자체 배지에 상기 2단계의 제2 식물 추출물을
혼합하고 37°C에서 교반하면서 가수분해시키는 3단계;
iv) 상기 3단계의 가수분해를 통해 얻은 가수분해물에 유기용매를 가하여
분획하는 4단계;
v) 상기 4단계의 분획물을 컬럼 크로마토그래피에 가하여 용출액을
확보하는 5단계; 및
vi) 상기 5단계의 용출액에 유기용매를 가하여 분획하여 분획물을 얻는
6단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/007047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 36/185(2006.01)i; A61K 36/71(2006.01)i; A61K 36/25(2006.01)i; A61K 36/355(2006.01)i; A61K 36/84(2006.01)i; A61K 36/23(2006.01)i; A61K 36/88(2006.01)i; A61K 36/484(2006.01)i; A61K 31/36(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 36/185(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 31/335(2006.01); A61K 31/34(2006.01); A61K 31/365(2006.01); A61K 31/704(2006.01); A61K 36/23(2006.01); A61K 36/258(2006.01); A61K 36/71(2006.01); A61P 29/00(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 백두옹(Pulsatilla koreana), 썩의바람꽃(Anemone raddeana), 가수분해(hydrolysis), 관절염(arthritis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DY	KR 10-2003-0016225 A (HU, Shiqing et al.) 26 February 2003 (2003-02-26) See claims 10-13 and 17; and page 4, third paragraph.	1-8
DA		9
X	KR 10-2019-0127454 A (BACK, Ju Youn et al.) 13 November 2019 (2019-11-13) See claims 1-3; and paragraphs [0031], [0033]-[0036], [0039] and [0048]-[0051].	9
Y		1-8
Y	KR 10-2017-0051918 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) 12 May 2017 (2017-05-12) See abstract; and claims 1 and 5.	5-8
A	KR 10-0315200 B1 (KIM, Song Bae) 21 March 2002 (2002-03-21) See claims 1-6.	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 September 2021		Date of mailing of the international search report 15 September 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/007047

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0833216 B1 (KIM, Song Bae) 01 July 2008 (2008-07-01) See abstract; and claims 1-2 and 4-5.	1-9
.....		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/007047

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2003-0016225 A	26 February 2003	AU 2001-31481 A1	14 August 2001
		AU 2001-31481 B2	17 February 2005
		AU 3148101 A	14 August 2001
		AU 779940 B2	17 February 2005
		BR 0108074 A	01 April 2003
		CA 2399123 A1	09 August 2001
		CN 1208056 C	29 June 2005
		CN 1306818 A	08 August 2001
		CN 1388759 A	01 January 2003
		EA 006946 B1	30 June 2006
		EA 200200746 A1	26 December 2002
		EP 1252893 A1	30 October 2002
		EP 1252893 B1	10 December 2008
		JP 2003-521520 A	15 July 2003
		JP 4198359 B2	17 December 2008
		US 2003-0064117 A1	03 April 2003
		US 2006-0062860 A1	23 March 2006
		US 7297353 B2	20 November 2007
		WO 01-56583 A1	09 August 2001
		ZA 200206181 A	04 August 2003
ZA 200206181 B	04 August 2003		
KR 10-2019-0127454 A	13 November 2019	CN 112074285 A	11 December 2020
		EP 3789032 A1	10 March 2021
		US 2021-0236576 A1	05 August 2021
		WO 2019-212140 A1	07 November 2019
KR 10-2017-0051918 A	12 May 2017	None	
KR 10-0315200 B1	21 March 2002	KR 10-2000-0031849 A	05 June 2000
KR 10-0833216 B1	01 July 2008	KR 10-2001-0109710 A	12 December 2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/185(2006.01)i; A61K 36/71(2006.01)i; A61K 36/25(2006.01)i; A61K 36/355(2006.01)i; A61K 36/84(2006.01)i; A61K 36/23(2006.01)i; A61K 36/88(2006.01)i; A61K 36/484(2006.01)i; A61K 31/36(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/185(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 31/335(2006.01); A61K 31/34(2006.01); A61K 31/365(2006.01); A61K 31/704(2006.01); A61K 36/23(2006.01); A61K 36/258(2006.01); A61K 36/71(2006.01); A61P 29/00(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 백두옹(Pulsatilla koreana), 핑의바람꽃(Anemone raddeana), 가수분해(hydrolysis), 관절염(arthritis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DY DA	KR 10-2003-0016225 A (후 취청 등) 2003.02.26 청구항 10-13, 17; 페이지 4, 3번째 단락	1-8 9
X Y	KR 10-2019-0127454 A (백주연 등) 2019.11.13 청구항 1-3; 단락 [0031], [0033]-[0036], [0039], [0048]-[0051]	9 1-8
Y	KR 10-2017-0051918 A (조선대학교산학협력단) 2017.05.12 요약; 청구항 1, 5	5-8
A	KR 10-0315200 B1 (김송매) 2002.03.21 청구항 1-6	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2021년09월15일(15.09.2021)	2021년09월15일(15.09.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	정다원	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0833216 B1 (김송배) 2008.07.01 요약; 청구항 1-2, 4-5	1-9

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2003-0016225 A	2003/02/26	AU 2001-31481 A1	2001/08/14
		AU 2001-31481 B2	2005/02/17
		AU 3148101 A	2001/08/14
		AU 779940 B2	2005/02/17
		BR 0108074 A	2003/04/01
		CA 2399123 A1	2001/08/09
		CN 1208056 C	2005/06/29
		CN 1306818 A	2001/08/08
		CN 1388759 A	2003/01/01
		EA 006946 B1	2006/06/30
		EA 200200746 A1	2002/12/26
		EP 1252893 A1	2002/10/30
		EP 1252893 B1	2008/12/10
		JP 2003-521520 A	2003/07/15
		JP 4198359 B2	2008/12/17
		US 2003-0064117 A1	2003/04/03
		US 2006-0062860 A1	2006/03/23
		US 7297353 B2	2007/11/20
		WO 01-56583 A1	2001/08/09
		ZA 200206181 A	2003/08/04
ZA 200206181 B	2003/08/04		
KR 10-2019-0127454 A	2019/11/13	CN 112074285 A	2020/12/11
		EP 3789032 A1	2021/03/10
		US 2021-0236576 A1	2021/08/05
		WO 2019-212140 A1	2019/11/07
KR 10-2017-0051918 A	2017/05/12	없음	
KR 10-0315200 B1	2002/03/21	KR 10-2000-0031849 A	2000/06/05
KR 10-0833216 B1	2008/07/01	KR 10-2001-0109710 A	2001/12/12