



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0040995
(43) 공개일자 2016년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/336 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/336 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0131916
(22) 출원일자 2015년09월17일
심사청구일자 2015년09월17일
(30) 우선권주장
1020140134560 2014년10월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
권혁무
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 402동
201호 (교수아파트)
최수연
제주특별자치도 제주시 금월길 46-2, B동 302호
(아라이동, 프로빌B단지연립주택)
이환희
서울특별시 영등포구 가마산로79길 7, 102동 204
호 (신길동, 삼성래미안아파트)
(74) 대리인
제일특허법인

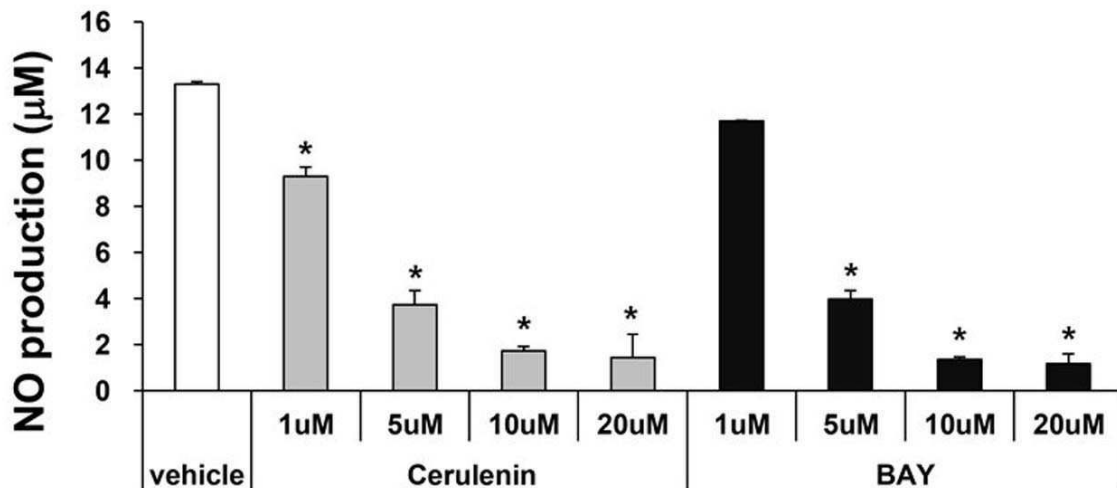
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 세룰레닌(cerulenin), 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항염증 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체는 우수한 염증 질환의 예방, 치료 및 개선 효과를 나타내어, 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물뿐만 아니라 관련 식품 또는 화장품의 소재로서 응용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/341 (2013.01)

A61K 8/4973 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0020163

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구실지원

연구과제명 만성콩팥병과 신장염증에서 TonEBP 전사인자의 역할 규명 및 새로운 항염증제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

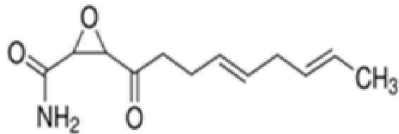
명세서

청구범위

청구항 1

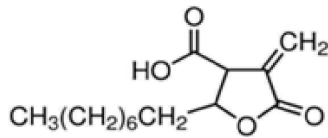
하기 화학식 1 또는 2로 각각 표시되는 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는, 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



, 또는

[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NF- κ B의 전사활성, 일산화질소의 생성 또는 염증관련 인자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 염증관련 인자는 유도형 일산화질소 합성효소(iNOS), 사이클로옥시게나제-2(COX-2), 인터루킨-6(IL-6), 단핵구 케모택틱 단백질-1(MCP-1), 인터루킨-1 β (IL-1 β) 및 종양 괴사 인자- α (TNF- α)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 염증 질환은 만성 염증 질환, 급성 염증 질환 또는 염증 관련 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 만성 염증 질환은 류마티스 관절염, 동맥경화, 당뇨, 골다공증, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 루푸스 및 다발성 경화증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 급성 염증 질환은 패혈증, 쇼크 및 장기이식의 거부 반응으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 염증 관련 질환은 안과 질환, 기관지염, 피부염, 알러지, 전신성 홍반성 낭창, 망막염, 위염, 간염, 장염, 췌장염 및 신장염으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

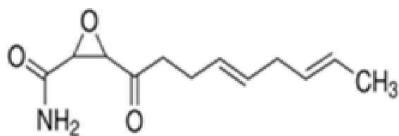
제7항에 있어서,

상기 피부염 또는 알러지는 과민증, 알러지성 비염, 천식, 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 곤충 알러지, 식품 알러지 및 약품 알러지로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

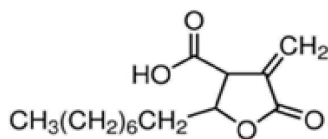
하기 화학식 1 또는 2로 각각 표시되는 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 염증 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



, 또는

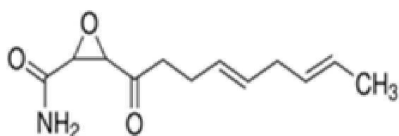
[화학식 2]



청구항 10

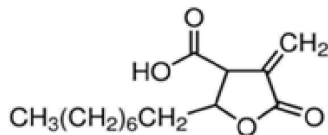
하기 화학식 1 또는 2로 각각 표시되는 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 염증 개선용 화장품 조성물:

[화학식 1]



, 또는

[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세룰레닌(cerulenin), 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등과 같은 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응으로서, 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 기작이다. 염증을 유발하는 여러 요인에는 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

[0003] 염증은 정상적인 경우에 생체 내에서 염증반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는 작용을 하지만, 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되어 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다.

[0004] 염증 반응과 관련된 효소는 면역세포에 의해 생산되는데, 면역세포들은 히스타민(histamine), 일산화질소(nitric oxide, NO) 또는 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2) 등의 도움으로 혈관을 통해 손상된 부위로 이동하여 염증반응을 개시한다. 상기 손상된 부위로 이동한 면역세포는 종양 괴사 인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 또는 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6)과 같은 사이토카인(cytokine)이나 대식세포 염증 단백질(macrophage inflammatory protein, MIP-1), 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8), 단핵구 케모택틱 단백질-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 등과 같은 케모카인(chemokine)을 분비하여 직접적인 외부침입물질을 파괴하거나 다른 면역세포들을 모아 염증반응을 개시한다. 염증유발 물질인 인터페론- γ (interferon- γ), 리포테이코산(lipoteichoic acid), 지질다당체(lipopolysaccharide, LPS) 등이나 다양한 염증 유도 사이토카인에 노출될 경우, 유도형 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)와 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2, COX-2)가 발현되어, NO와 PGE2가 과량 생성된다. 이들 여러 염증 개시 인자들(iNOS, COX-2, TNF α , IL-6 등)은 활성화된 NF- κ B(nuclear factor- κ B)에 의해 전사가 촉진되며, 이로 인해 NO가 필요 이상으로 생성되면 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응에 의해 유발되는 조직손상, 돌연변이 유발(mutagenesis), 신경조직의 손상 등을 일으킨다. 또한, COX-2가 과발현될 경우에도 염증 반응을 일으킨다.

[0005] 기존의 급성 또는 류마티스성 관절염과 같은 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 스테로이드성 소염 약물들은 녹내장, 백내장, 고혈압, 조울증, 체중증가, 당뇨병 및 골다공증과 같은 부작용을 유발한다. 따라서, 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적은 천연물질 유래 성분으로, 효과적으로 염증을 억제할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 세룰레닌은 HMG-CoA 환원효소의 활성을 저해함으로써 스테롤 생합성을 억제하며, 지방산 생합성시, 지방산 생합성 효소에서 축합반응을 담당하는 부분의 시스테인과 반응하여 공유결합을 형성함으로써 지방산 생합성 효소의 활성을 저해하는 것으로 알려져있다. 또한, 세룰레닌은 폴리케타이드의 생합성도 저해하여, 폴리케타이드 생합성 경로를 갖는 루코마이신(Leucomycin), 메틸살리실산(Methylsalicylic acid), 캔디시딘(Candididin), 플라바논(Flavanone), 얼터나리올(Alternariol) 등이 모두 세룰레닌에 의해 생합성이 저해되는 것으로 알려져있다. 그러나, 이의 산업화에 대한 연구는 아직 미미한 실정으로서, "피지 생성 및 모공 크기 감소 방법"에 관한 대한민국공개특허 제10-2007-0023730호에 세룰레닌의 피지 생성 억제 효과가 공개되어 있는 정도이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체가 부작용 없이 우수한 항염증 활성을 갖는다는 것을 발견 함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2007-0023730호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 세룰레닌(cerulenin), 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는, 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 염증 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증 개선용 식품 및 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 조성물은 천연물로부터 유래한 것으로, MTT 분석 결과 세포 독성이 없어 부작용이 발생할 가능성이 낮아, 염증 질환의 개선, 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 세룰레닌의 NO 생성 억제를 확인하고 BAY11-7082와 비교한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 세룰레닌 또는 BAY11-7082의 처리 농도를 의미하고, 세로축은 NO의 생성량을 나타낸다.

도 2는 세룰레닌의 세포 독성을 확인하고 BAY11-7082와 비교한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 세룰레닌 또는 BAY11-7082의 처리 농도를 의미하고, 세로축은 세포 생존율(cell viability(%))을 나타낸다.

도 3은 세룰레닌이 염증관련 인자들인 iNOS, COX-2, TNF α , IL-6, MCP-1 및 IL-1의 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인한 그래프들로서, 상기 그래프들의 가로축의 Con은 LPS를 처리하지 않은 군이고, LPS 100ng/ml은 LPS를 100ng/ml로 처리한 군을 나타낸다. 또한, 세로축은 각 염증관련 인자들의 CypA mRNA 발현에 대한 상대적인 mRNA 발현 정도를 나타낸다.

도 4는 세룰레닌이 염증관련 인자들인 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 억제하는 것을 확인한 전기영동 사진으로서, 상기 그림 위의 숫자는 LPS의 농도(ng/ml)이며, 좌측은 각 단백질에 특이적인 1차 항체를 이용하여 발현을 확인한 단백질을 나타낸다.

도 5는 세룰레닌의 NF- κ B 전사활성 억제를 확인한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 LPS의 처리여부 및 농도를 나타내고, 세로축은 NF- κ B 리포터 활성(reporter activity)을 레닐라(renilla) 값의 비율로 보정한 NF- κ B의 전사활성 정도를 나타낸다.

도 6은 세룰레닌이 마우스에 투여된 LPS에 의한 혈청 TNF- α 농도 증가를 억제하는 것을 확인한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 세룰레닌 및 LPS 투여 여부를 나타내고, 세로축은 TNF- α 의 혈청 농도(ng/ml)를 나타낸다.

도 7은 세룰레닌 유도체 C75의 NO의 생성 억제를 확인하고 세룰레닌과 비교한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 시료들의 처리 농도를 의미하고, 세로축은 NO의 생성량을 나타낸다.

도 8은 세룰레닌 유도체 C75의 세포 독성을 확인하고 세룰레닌과 비교한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 시료들의 처리 농도를 의미하고, 세로축은 세포 생존율(cell viability (%))을 나타낸다.

도 9는 세룰레닌 유도체 C75가 염증관련 인자들의 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인하고 세룰레닌과 비교한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 LPS의 처리여부 및 농도를 나타내고, 세로축은 각 염증관련 인자들의 CypA mRNA 발현에 대한 상대적인 mRNA발현 정도를 나타낸다.

도 10은 패혈증 동물모델에서 세룰레닌이 동물의 생존율을 증가시킴을 확인한 그래프로서, 상기 그래프의 가로축은 패혈증 유발을 위한 갈락토사민 N(galactosamine N) 및 LPS 투여 후 시간 경과를 나타내고, 세로축은 동물의 생존율을 나타낸다.

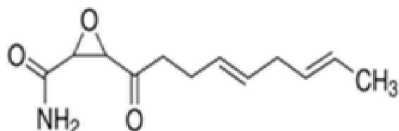
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 세룰레닌(cerulenin), 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

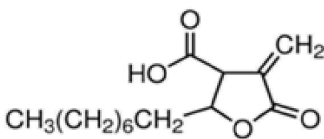
[0017] 상기 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체는 각각 하기 화학식 1 또는 2로 표시될 수 있다:

[0018] [화학식 1]



[0019] , 또는

[0020] [화학식 2]



[0021] .

[0022] 상기 세룰레닌($C_{12}H_{17}NO_3$; (2R,3S)-3-[(4E,7E)-nona-4,7-dienoyl]oxirane-2-carboxamide)의 분자량은 223.2(g/mol)이다.

[0023] 상기 세룰레닌은 세팔로스포리움 캐롤렌스(*Cephalosporium caerulens*)로부터 추출되거나 당업계에 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

[0024] 상기 세룰레닌 유도체 C75($C_{14}H_{22}O_4$; 4-Methylene-2-octyl-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxylic acid)의 분자량은 254.32(g/mol)이다.

[0025] 본 발명에 따른 조성물의 유효성분인 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체는 NF- κ B의 전사활성, 일산화질소의 생성

및 염증관련 인자의 발현을 억제함으로써 염증 질환의 예방 및 치료 용도로 사용될 수 있다.

- [0026] 상기 염증관련 인자는 유도형 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthases, iNOS), 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2, COX-2), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), 단핵구 케모택틱 단백질-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), 인터루킨-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 및 종양 괴사 인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 조성물은 독성 없이 농도 의존적 NO 생성 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 1, 5, 10 및 2 μ M의 세룰레닌을 함유하는 각각의 조성물은 독성 없이 NO의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다(실시예 1-2, 도 1 및 도 2 참조).
- [0028] 본 발명에 따른 조성물은 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, MCP-1 β 및 IL-1 β 의 발현 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 세룰레닌 10 μ M을 처리한 실험군에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, MCP-1 및 IL-1 β 의 mRNA 발현이 현저하게 억제되는 것으로 확인되었다(실시예 1-3, 도 3 참조).
- [0029] 본 발명에 따른 조성물은 iNOS 및 COX-2의 발현 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 세룰레닌 10 μ M을 처리한 실험군에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현이 현저하게 억제되는 것으로 확인되었다(실시예 1-4, 도 4 참조).
- [0030] 본 발명에 따른 조성물은 NF- κ B 전사활성 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 세룰레닌 10 μ M을 처리한 실험군에서는 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B 전사활성이 현저하게 억제되는 것으로 확인되었다(실시예 1-5, 도 5 참조).
- [0031] 본 발명에 따른 조성물은 TNF- α 혈중 농도 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 세룰레닌이 LPS에 의한 TNF- α 의 분비를 크게 억제하는 것으로 확인되었다(실시예 1-6, 도 6 참조).
- [0032] 본 발명에 따른 조성물은 독성 없이 농도 의존적 NO 생성 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 1, 5 및 10 μ M의 세룰레닌 유도제 C75는 LPS에 의한 NO의 생성을 독성 없이 억제하는 것으로 확인되었다(실시예 2, 도 7 및 도 8 참조).
- [0033] 본 발명에 따른 조성물은 iNOS, COX-2 및 IL-6의 mRNA 발현 억제 활성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 세룰레닌 유도제 C75 10 μ M을 처리한 실험군에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2 및 IL-6의 mRNA 발현이 현저하게 억제되는 것으로 확인되었다(실시예 2, 도 9 참조).
- [0034] 본 발명에 따른 조성물은 패혈증 동물모델의 생존율을 증가시킨다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 세룰레닌을 15, 30 또는 60mg/kg으로 처리한 실험군에서 갈락토사민 N(galactosamine N) 및 LPS에 의해 유도되는 패혈증에 대한 생존율이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다(실시예 3, 도 10 참조).
- [0035] 상기 염증 질환은 만성 염증 질환, 급성 염증 질환 또는 그 외의 염증 관련 질환일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 만성 염증 질환은 류마티스 관절염, 동맥경화, 당뇨, 골다공증, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 루푸스 또는 다발성 경화증일 수 있다.
- [0037] 상기 급성 염증 질환은 패혈증, 쇼크 또는 장기이식의 거부 반응일 수 있다.
- [0038] 상기 그 외의 염증 관련 질환은 안과 질환, 기관지염, 피부염, 알러지, 전신성 홍반성 낭창, 망막염, 위염, 간염, 장염, 채장염 또는 신장염일 수 있다.
- [0039] 상기 피부염 또는 알러지는 과민증, 알러지성 비염, 천식, 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 곤충 알러지, 식품 알러지 또는 약물 알러지일 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또한 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도제의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않아야 한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적으로 사용 가능한 유리산과 화학식 1의 염기

화합물의 산부가염, 알칼리 금속염(나트륨염 등)과 알칼리 토금속염(칼슘염 등), 유기염기와 화학식 1의 카르복실산의 유기염기부가염, 아미노산부가염 등이 가능하다.

- [0041] 본 발명에 따르는 화합물의 바람직한 염의 형태로는 무기산 또는 유기산과의 염을 들 수 있다. 이 때, 무기산은 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 브롬산 등이 사용될 수 있다. 또한, 유기산은 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 글루탐산 등이 사용될 수 있다. 유기염기부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기는 트리스(하이드록시메틸)메틸아민, 디사이클로헥실아민 등이다. 아미노산부가염 제조에 사용될 수 있는 아미노산은 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산이다.
- [0042] 이와 같은 염은 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어 상기한 화학식 1 또는 2의 화합물을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 1,4-디옥산과 같은 물과 섞일 수 있는 용매에 녹인 다음에 유리산 또는 유리염기를 가한 후에 결정화시켜 제조할 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명에 따른 화합물들은 비대칭 탄소중심을 가질 수 있으므로 R 또는 S 이성질체, 라세믹 화합물, 개개의 거울상이성질체(enantiomer) 또는 혼합물, 개개의 부분입체이성질체(diastereomer) 또는 혼합물로서 존재할 수 있으며, 이들 모든 입체이성질체(stereoisomer) 및 혼합물은 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0044] 또한, 본 발명의 범주에는 화학식 1의 헤테로사이클 유도체의 수화물 또는 용매화물의 형태도 포함된다. 이러한 수화물 또는 용매화물은 공지된 방법으로 제조될 수 있으며, 비독성 및 수용성인 것이 바람직하고, 물 또는 알코올계 용매(특히, 에탄올 등)의 분자가 1개 내지 5개 결합된 수화물 또는 용매화물인 것이 바람직하다.
- [0045] 본 발명에 따른 조성물은 항염증 효과가 있는 것으로, 본 발명의 조성물에 항염증 효과가 있음이 공지된 물질을 하나 이상 추가로 함유할 수 있다. 상기 공지된 물질은 COX-2 저해제 또는 일산화질소(NO) 저해제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에 따른 조성물에는 부형제, 운환제, 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 첨가제가 추가로 함유될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 제형화하여 사용될 수 있다. 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 예컨대, 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 코안, 경막외 및 구강경로를 통하여 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 경구 투여를 위한 고형제제는 정제, 알약, 연질 또는 경질 캡셀제, 환제, 산제 또는 과립제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 한편, 비경구 투여를 위한 형태는 크림, 로션제, 연고제, 경고제, 액제, 패취제 또는 주사제 등의 형태일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중, 병증의 정도, 투여경로에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 5 내지 500mg/kg의 양, 바람직하게는 100 내지 250mg/kg의 양을 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0051] 또한, 본 발명은 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 염증 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체는 각각 상기 화학식 1 또는 2로 표시될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 염증 개선용 식품 조성물은 본 발명의 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 전체 조성물의 0.1 내지 100중량%, 바람직하게는 20 내지 80중량%의 양으로 포함한다.
- [0054] 본 발명의 염증 개선용 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태일 수 있으며, 건강 기능을 위한

기타의 천연 또는 합성물질 및 제품화를 위한 첨가물 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0055] 본 발명의 건강음료는 100ml을 기준으로 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 0.1 내지 50g, 바람직하게는 1 내지 10g의 비율로 함유할 수 있다. 또한, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르하진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 화합물 100mg당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g이다.
- [0056] 상기 외에 본 발명의 염증 개선용 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0057] 상기 본 발명의 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가할 수 있는 염증 개선용 식품으로는, 예를 들어 각종 식품류, 음료류, 껌류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은 세룰레닌, 세룰레닌 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 염증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0059] 상기 세룰레닌 또는 세룰레닌 유도체는 각각 상기 화학식 1 또는 2로 표시될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 화장료 조성물은 염증의 개선을 목적으로 피부에 직접 적용될 수 있다.
- [0061] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 화장료 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 화장료 조성물은 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 담체 성분을 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 실리케이트, 폴리머 파우더 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 담체 성분을 포함할 수 있으며, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르 등을 더 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 용매, 용매화제, 유탁화제 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 담체 성분을 포함할 수 있다. 이의 예로는, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물 등을 들 수 있다.
- [0065] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미세결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가, 트라가칸트 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 담체 성분을 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시

네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 담체 성분을 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 화장료 조성물에서 "담체 성분"이란 화장품 제제에 포함될 수 있는 이미 공지되어 사용되고 있는 화합물 또는 조성물로서, 피부에 접촉시 인체가 적응가능한 이상의 독성, 불안정성 또는 자극성이 없는 성분이다.

[0068] 본 발명의 화장료 조성물은 담체 성분 이외에도, 항산화제, 안정화제, 용해화제, 보습제, 안료, 향료, 자외선 차단제, 발색제, 계면활성제 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 보조제라면 사용에 제한이 없다.

[0069] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[실시예 1. 세룰레닌의 항염증 활성 확인]

[실시예 1-1. 시료, 세포 및 마우스의 준비]

[0073] 세룰레닌의 항염증 활성을 측정하기 위해 다음의 시료, 세포 및 마우스를 준비하였다.

[0074] DMEM(Dulbecco's modified Eagles medium), FBS(Fetal bovine serum) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)은 Hyclone(Thermo Scientific Inc., Germany)에서, 사이버 그린(SYBR green)은 Roche(Switzerland)에서, Dual-luciferase reporter system 및 그리스 시약 시스템(Griess reagent system)은 promega(USA)에서, TNF- α ELISA kit는 R&D system(USA)에서 구입하였다. 또한, 항-iNOS 다클론 항체는 BD bioscience(USA), 항-COX2 다클론 항체는 Cell Signaling(USA), Anti-HSC70 단일클론 항체는 Rockland(USA)에서 구입하였다. 세룰레닌, BAY11-7082, MTT 및 나머지 시약들은 Sigma Aldrich Co.(USA)에서 구입하였다.

[0075] 세룰레닌의 항염증 활성을 측정하기 위한 실험은 ATCC에서 구입한 대식세포주 RAW264.7 및 마우스로부터 분리한 복강대식세포(peritoneal macrophages)를 사용하였다. RAW264.7 및 복강대식세포는 10% FBS 및 페니실린(100U/ml)/스트렙토마이신(100 μ g/ml)을 첨가한 글루코스 고함량(high glucose) DMEM을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

[0076] 동물모델에서 세룰레닌의 항염증 활성 측정 실험을 위해 C57/BL6 마우스 종을 사용하였다. 식이는 고형 사료를 이용하였으며 마우스 및 식이는 효창사이언스(한국)에서 구입하였다. 상기 실험동물의 사육은 20 $^{\circ}$ C 내지 24 $^{\circ}$ C의 온도 조건, 60% 내지 70%의 습도 조건 및 12시간 주기의 주야조명 조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0077] 상기 세포, 마우스, 시약 및 장치를 이용하여 염증 반응에 관련된 인자들의 mRNA 발현, 단백질 발현, 전사활성 및 NO 생성을 측정하여 세룰레닌의 항염증 활성을 측정하였다. 항염증 활성을 확인하기 위한 실험 결과는 mean $\pm$ S.D.로 표시하였으며, 통계적 유의성과 관련하여, *(p<0.05)로 정의하여, 상기 p<0.05를 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[실시예 1-2. 일산화질소(NO)의 생성 억제 및 독성 확인]

[0079] 세룰레닌의 항염증 활성을 확인하기 위하여, NO의 생성 억제 여부를 분석하였다. 이때 항염증 활성을 비교하기 위하여, 항염증 활성을 가지고 있는 것으로 알려진 NF- κ B 억제제인 BAY11-7082를 사용하였다.

[0080] 마우스 대식세포주인 RAW264.7세포를 96웰 플레이트에 5×10^4 세포/웰로 분주하고 16시간 동안 안정화시킨 후, 세룰레닌 및 BAY11-7082를 농도별(1, 5, 10, 20 μ M)로 1시간 동안 처리하였다. 그 후, 염증반응 유도체로서 LPS

를 100ng/ml 농도로 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 상기 배양액에 그리스 시약을 첨가하여, NO의 함량을 정량하였다. 구체적으로, 상기 배양한 세포배양액 50 μ l와 그리스 시약 50 μ l를 혼합하여 실온에서 5분 정도 반응시킨 후, 540nm에서 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Tecan)로 흡광도를 측정하였다. 0.1M 니트라이트(nitrite) 표준 용액을 이용하여 표준곡선을 얻은 후, 상기 세포배양액의 NO 농도를 산출하였다. 상기 산출된 NO 값은 도 1에 나타내었다.

[0081] 또한, 세룰레닌의 독성을 확인하기 위하여, 상기 세포가 배양된 96웰 플레이트에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액(5mg/ml) 20 μ l를 첨가한 후 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양액을 모두 제거하고 생성된 포마잔 크리스탈(formazan crystal)을 DMSO 150 μ l에 용해한 후, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 측정 결과를 도 2에 나타내었으며, 세포 생존율은 LPS만 처리한 대조군(control)에 대한 백분율로 표시하였다.

[0082] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 세룰레닌은 각 농도(1, 5, 10, 20 μ M)에서 독성 없이, NO의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 한편, BAY11-7082는 세룰레닌과 비슷한 NO 생성 억제능을 보였지만, 상당한 독성을 나타내었다. 구체적으로, 세룰레닌은 LPS 처리에 의해 증가된 NO 생성량을 억제하였고, 1 μ M을 처리하였을 때부터 유의적으로 NO 함량을 감소시켰으며, 농도 의존적으로 계속하여 NO 함량을 감소시켰다. 또한, BAY11-7082는 독성을 나타내었지만, 세룰레닌은 20 μ M의 농도로 처리하여도 세포에 독성을 유발하지 않는 것으로 나타났다.

[0083] 실시예 1-3. 염증관련 인자들의 mRNA 발현 억제 확인

[0084] 세룰레닌의 항염증 활성을 확인하기 위하여, 1차 세포(primary cell)인 복강대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증관련 인자들의 mRNA 발현 억제 여부를 분석하였다. 즉, 염증 반응에 중요한 전사조절 인자로 알려진 NF- κ B의 표적유전자들인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, MCP-1 및 IL-1 β 의 mRNA 발현을 실시간(real-time) PCR법으로 확인하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 복강대식세포를 수득하기 위하여, 체중이 20g 내지 25g인 수컷 마우스(C57/BL6)에 3% 티오글리콜레이트(thioglycollate) 1ml를 복강으로 투여하고, 투여 4일 후, 복강으로부터 복강대식세포를 수득하였다. 상기 수득한 복강대식세포를 24시간 동안 DMEM 배지에서 배양하고, 6웰 플레이트에 200 $\times$ 10⁴ 세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세룰레닌을 10 μ M 농도로 1시간 전처리하고 LPS(100ng/ml)를 처리하여 TNF- α 의 발현 확인을 위해 1시간 처리하였으며, 다른 사이토카인들을 위해 6시간 동안 배양하였다. 상기 LPS 처리 후, 각각의 세포로부터 RNA를 분리하였다.

[0086] 상기 RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기 배양한 세포를 1ml PBS로 2회 세척 후 500 μ l의 트리졸 시약(trizol reagent, Life technologies)으로 용해(lysis)시킨 후, 클로로포름(chloroform) 100 μ l를 첨가하고 볼텍싱(vortexing)하였다. 이를 10분간 상온에서 배양(incubation)한 후, 13,000rpm 조건으로 15분 동안 원심분리하여 400 μ l의 상층액을 수득하여, 500 μ l의 이소프로판올(isopropanol)과 10분 동안 상온에서 배양하였다. 그 후, 13,000rpm 조건으로 15분 동안 원심분리하여 펠렛(pellet)을 수득하였다. 상기 수득한 펠렛을 75% 에탄올 1ml로 씻어내고, 상온에서 건조시켜 RNA를 분리하였다.

[0087] 상기 분리된 RNA는 0.1% DEPC(Diethyl pyrocarbonate) 용액 20 μ l 내지 30 μ l에 녹여 cDNA 합성을 위하여 사용되었다. 상기 분리된 RNA를 4g 분주하여, M-MLV 역전사효소(reverse transcriptase, promega)를 이용하여 cDNA를 합성하고, 이를 이용하여 염증성 인자들의 mRNA 함량 측정을 위한 실시간 PCR 분석을 수행하였다.

[0088] 염증관련 인자들 iNOS, COX-2, TNF α , IL-6, MCP-1 및 IL-1 β 의 함량 측정을 위한 프라이머의 서열과 실험 조건은 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

확인대상 mRNA	프라이머 서열		서열 번호	실험 조건
iNOS	센스	GCTCATGCGGCTCCTTT	1	Step 1: (1 cycle) 95°C 5min Step 2: (45cycles) 95°C 10sec 60°C 10sec 72°C 10sec
	안티센스	CCTGGTACGGGCATTGCT	2	
COX-2	센스	TGCTGTACAAGCAGTGGCAA	3	
	안티센스	AGGGCTTTCAATTCTGCAGCCA	4	
TNF α	센스	TGGGACAGTGACCTGGACTGT	5	
	안티센스	TTCGGAAGCCCATTTGAGT	6	
IL-6	센스	ACTTACAAGTCGGAGGCTT	7	
	안티센스	CTGAAGGACTCTGGCTTTGTCT	8	
MCP-1	센스	AACTGCATCTGCCCTAAGGT	9	
	안티센스	AGTGCTTGAGGTGGTTGTGGAA	10	
IL-1 β	센스	GGGCTGCTTCCAAACCTTTGAC	11	
	안티센스	ATGGGAACGTCACACACCAGCA	12	
CypA	센스	CAGCCATGGTCAACCCACCG	13	
	안티센스	CTGCTGTCTTTGGAACCTTGTCTG	14	

[0089]

[0090]

상기 염증관련 인자들의 mRNA 발현 정도는 도 3에 나타내었으며, mRNA 발현 정도는 대조군인 CypA mRNA 양에 대한 비율로 보정하여 나타내었다.

[0091]

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, MCP-1 및 IL-1β의 mRNA 발현이 낮은 반면, LPS를 처리하였을 때 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, MCP-1 및 IL-1β의 mRNA 발현이 증가하였으며, 세룰레닌 10 μM을 처리한 실험군에서는 LPS에 의해 유도되는 mRNA 발현 증가가 현저하게 억제되는 것으로 나타났다.

[0092]

실시에 1-4. 염증관련 인자들의 단백질 발현 억제 확인

[0093]

세룰레닌의 항염증 활성을 확인하기 위하여, 1차 세포인 복강대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증관련 인자들인 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 억제 여부를 면역블롯팅 분석법(immunoblot analysis)으로 확인하였다.

[0094]

1차 세포는 상기 실시예 1-3과 같은 방법으로 실험동물을 사육하여 수득하였고, 이를 24시간 동안 DMEM 배지에 서 배양한 후, 6웰 플레이트에 200×10^4 세포/웰로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세룰레닌을 10 μM 농도로 1시간 전처리하고 LPS(100ng/ml 또는 1000ng/ml)를 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 상기 LPS 처리 후, 각각의 세포로부터 단백질을 분리하였다.

[0095]

단백질의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, 배양한 세포를 1ml PBS로 2회 세척한 뒤, PBS를 제거하고 0.01M Tris-HCl(pH7.4), 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, 0.001M EGTA, 1% Triton X-100, 0.002M PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride) 및 프로테아제 억제제(protease inhibitor)를 포함하는 RIPA 버퍼를 200 μl 넣어, 볼텍싱한 다음 30분간 얼음 위에 놓은 후, 13,000rpm의 조건으로 10분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 수득하여, BCA 시약(pierce biotechnology)을 이용해 단백질 함량을 정량하였다.

[0096]

상기 정량한 단백질 샘플을 동량으로 분주한 후, 5×SDS 샘플 버퍼와 혼합하여, 95에서 5분간 끓인 후에 7% 젤을 이용하여, SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질을 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)에 이동시키고, 상온에서 1시간 동안 5% 탈지 우유(skim milk)로 전처리하여 비특이적 항체결합을 억제하였다. 그 후, 항-iNOS 다클론 항체, 항-COX-2 다클론 항체 및 항-HSC70 단일클론 항체를 5% 탈지 우유에 침

가하여 상기 막과 함께 항체의 종류에 따라 4 내지 24시간 반응시켰다. 상기 반응 후, PBST로 10분간 3번 세척하고, 2차 항체로 상온에서 1시간 반응시켰다. 그리고나서, 막은 PBST로 10분간 3번 세척한 후, ECL 웨스턴 블롯팅 탐지 시약(ECL western blotting detection reagent, GE healthcare)과 반응시켜 LAS2000(GE healthcare)로 각 단백질 발현 정도를 확인하였다.

[0097] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 iNOS 및 COX-2의 발현이 되지 않았지만, LPS를 100ng/ml 또는 1000ng/ml로 처리하였을 때 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 LPS에 의해 증가하는 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현이 세룰레닌에 의해 현저하게 억제되는 것을 확인하였다. 즉, 세룰레닌이 우수한 항염증 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

[0098] 실시예 1-5. NF-κB의 전사활성 억제 확인

[0099] 세룰레닌의 항염증 활성을 확인하기 위하여, RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 증가되는 NF-κB 전사활성 억제 여부를 루시퍼라제 어세이(Luciferase assay)를 수행하여 확인하였다.

[0100] 구체적으로, 상기 RAW264.7 세포에 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, life technologies)을 이용하여, NF-κB 리포터 벡터 및 레닐라 벡터를 트랜스펙션시켜 글루코즈 고함량 DMEM 배지로 24웰 플레이트에 40×10^4 세포/웰이 되도록 분주하였다. 배양 6시간 후, 배지를 교체하고 다시 16시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 세룰레닌 또는 BAY11-7082를 10 μM로 첨가하고, 1시간 뒤에 LPS 100ng/ml을 처리하여 8시간 배양하고 라이시스 버퍼(lysis buffer)를 100 μl 첨가하였다. 상기의 세포 용해물(lysate)을 50 μl씩 96웰 화이트 플레이트에 분주한 후 Dual-luciferase reporter system(promega)을 이용하여 NF-κB 전사활성 정도를 측정하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이때, NF-κB 전사활성 정도는 각 샘플의 대조군인 레닐라 값의 비율로 보정하여 나타내었다.

[0101] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 NF-κB의 전사활성이 낮지만, LPS를 처리하였을 때 전사활성이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, LPS에 의해 증가하는 NF-κB 전사활성이 세룰레닌에 의해 억제되고, 세룰레닌의 NF-κB 전사활성 억제 정도가 BAY11-7082보다 우수함을 확인하였다. 즉, 세룰레닌이 NF-κB 전사활성을 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 가지는 것으로 나타났다.

[0102] 실시예 1-6. 마우스에서 LPS에 의해 유도되는 TNF-α의 혈중 농도 감소 확인

[0103] 세룰레닌의 염증성 사이토카인의 분비 억제를 확인하기 위하여, C57/BL6 마우스 중에서 LPS에 의해 유도되는 혈청(serum) TNF-α 농도증가의 억제 여부를 확인하였다.

[0104] 구체적으로, 8주령 C57/BL6 수컷 마우스를 각 4마리씩 아무것도 투여하지 않은 군, 세룰레닌 60mg/kg을 복강으로 투여한 군, LPS 50mg/kg을 투여한 군, 및 세룰레닌 60mg/kg을 투여한 후 1시간 후에 LPS 50mg/kg을 투여한 군으로 나누어 실험을 진행하였다. LPS를 투여하고 1시간 뒤에 마우스로부터 혈액 200 μl를 수득하여, BD 마이크로콘테이너(BD microtainer)로 13,000rpm에서 3분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 상기 분리된 혈청을 50배 희석시킨 후, TNF-α ELISA kit(R&D system)를 이용하여 혈청 TNF-α 농도를 측정하였다.

[0105] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, LPS를 투여하지 않은 대조군에서는 TNF-α의 혈청 농도가 낮지만, LPS를 투여하였을 때 TNF-α의 혈청 농도가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 LPS에 의해 증가하는 TNF-α 혈청 농도가 세룰레닌에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 즉, 세룰레닌이 LPS에 의한 TNF-α의 분비를 크게 억제하는 것으로 나타났다.

[0106] 실시예 2. 세룰레닌 유도체 C75의 항염증 활성 확인

[0107] 상기 실시예 1-2 및 1-3에서 확인한 세룰레닌의 LPS에 의해 유도되는 NO 생성 억제 및 염증관련 인자들의 mRNA 발현 억제를 세룰레닌 유도체인 C75를 이용하여 확인하였다.

[0108] 구체적으로, RAW264.7 세포에서 상기 실시예 1-2에서와 동일한 방법으로 C75 및 세룰레닌을 1, 5, 10 μM로 처리하여 NO 생성 억제를 확인하였고, 그 결과는 도 7에, 세포독성을 확인한 결과는 도 8에 나타내었다. 또한, 상기 실시예 1-3에서와 동일한 방법으로 C75 및 세룰레닌이 LPS에 의해 유도되는 염증관련 인자들의 mRNA 발현 억제

를 확인하여 도 9에 나타내었다.

[0109] 그 결과, 도 7, 8에 나타난 바와 같이, C75 및 세룰레닌은 각 농도(1, 5, 10 μ M)에서 독성 없이, NO 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, C75 및 세룰레닌은 iNOS, COX-2 및 IL-6의 mRNA 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

[0110] 실시예 3. 마우스 모델에서 세룰레닌의 패혈증 치료 효과 확인

[0111] 세룰레닌이 동물 모델에서도 염증 질환의 치료 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 패혈증 마우스 모델에 세룰레닌을 처리하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, 8주령의 C57/BL6 마우스 중 약 25g의 체중을 갖는 8마리의 마우스를 하나의 군으로 실험을 수행하였다. 먼저, 패혈증 유도 1시간 전 40% DMSO 용액에 용해한 세룰레닌을 각각 15, 30 및 60 mg/kg의 농도로 각 군의 마우스에 복강으로 투여하였고, 대조군으로는 40% DMSO 용액만을 마우스에 투여하였다. 그리고 나서, 패혈증을 유도하기 위해 갈락토사민 N(galactosamine N) 및 LPS를 각각 700mg/kg 및 150 μ g/kg의 농도가 되도록 PBS에 용해하여 이를 복강 투여한 뒤, 각 군의 마우스 모델의 생존율을 측정하였다. 생존율 측정은 패혈증 유도 후 1시간 마다 확인하여 계산하였다.

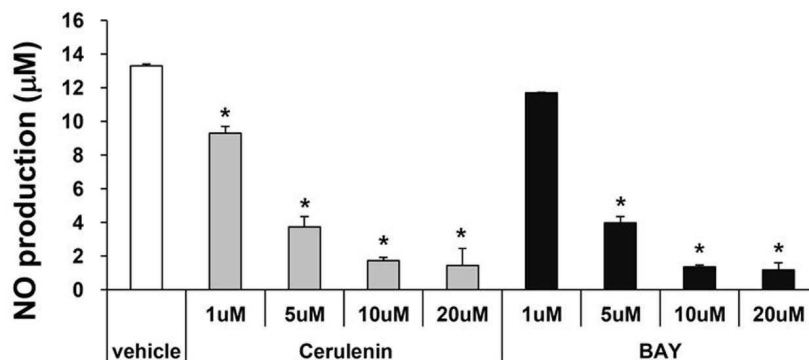
[0113] 그 결과, 패혈증 유도 1시간 후 마우스의 생존율을 기준으로 상대적인 값을 도 10에 나타내었다.

[0114] 도 10에 나타난 바와 같이, 세룰레닌을 30mg/kg의 농도로 투여한 마우스 군은 패혈증 유도 6시간 후부터, 세룰레닌을 15mg/kg의 농도로 투여한 마우스의 군은 8시간 후부터 생존율이 급격하게 감소하여 12시간 경과 후에 15mg/kg 투여군은 약 10%, 30mg/kg 투여군은 약 25%의 생존율을 나타내었다. 한편, 세룰레닌 60mg/kg 투여군은 패혈증 유도 7시간 후 생존율이 60% 정도로 급격히 감소하였으나, 그 이후로 완만한 감소세를 나타내어 12시간 경과 후에는 약 40%의 생존율을 나타내었다. 반면, 용매 대조군은 패혈증 유도 7시간 후 생존율이 20%까지 감소하였고, 12시간 경과 후에는 10%까지 감소함을 확인하였다.

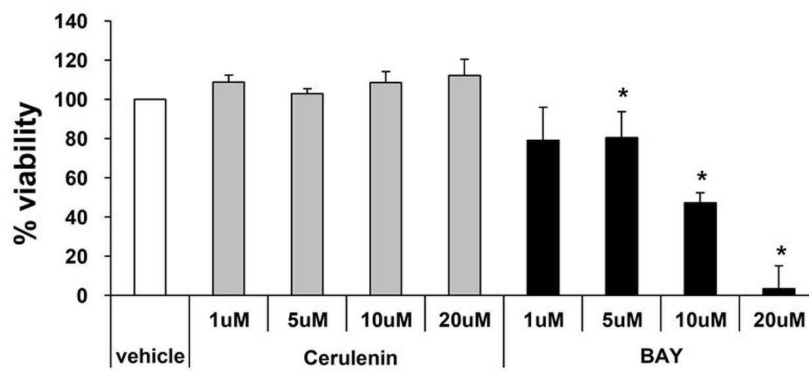
[0115] 상기 결과로부터, 염증성 인자들의 발현 및 활성을 억제하는 본 발명의 세룰레닌은 패혈증 발생 동물모델에서 생존율을 증가시켜 패혈증 예방 및 치료 효과가 있음을 확인하였고, 동일한 활성을 나타내고 있는 세룰레닌 유도체 또한 동일한 효과가 있음을 알 수 있다.

도면

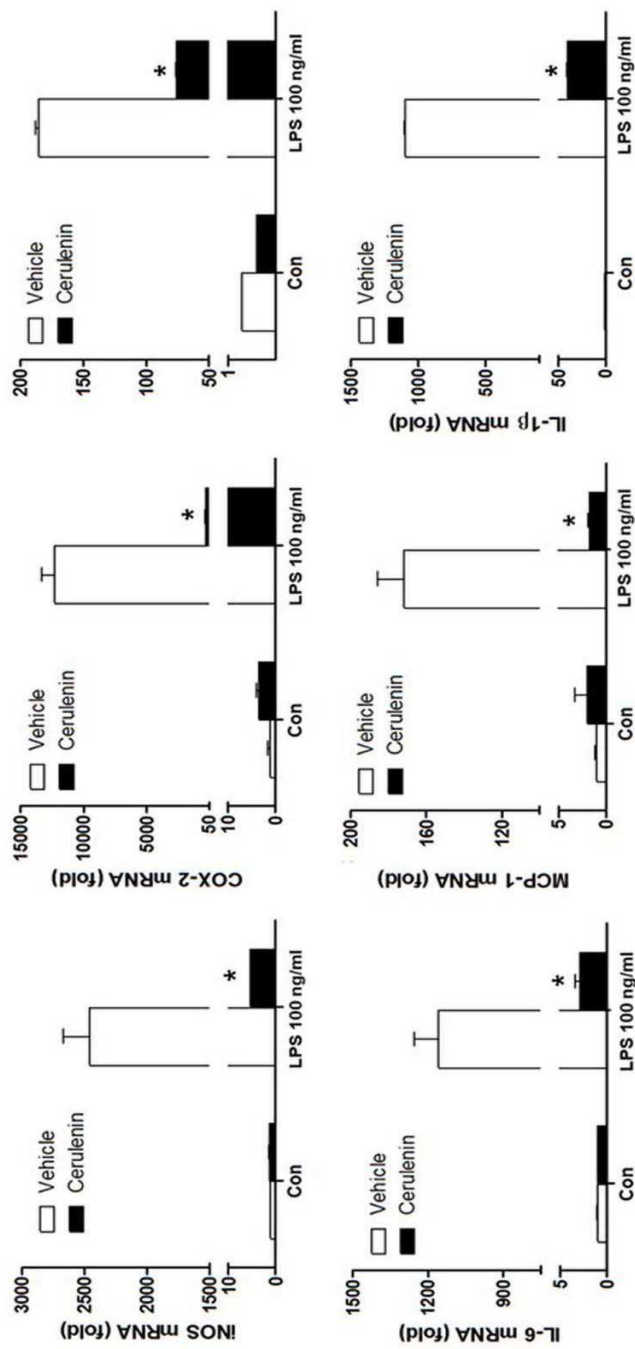
도면1



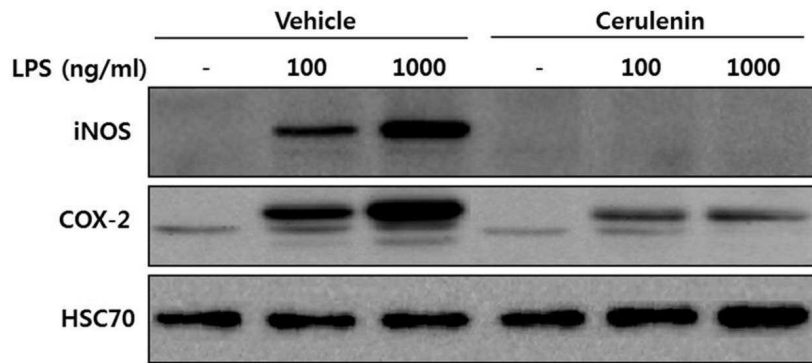
도면2



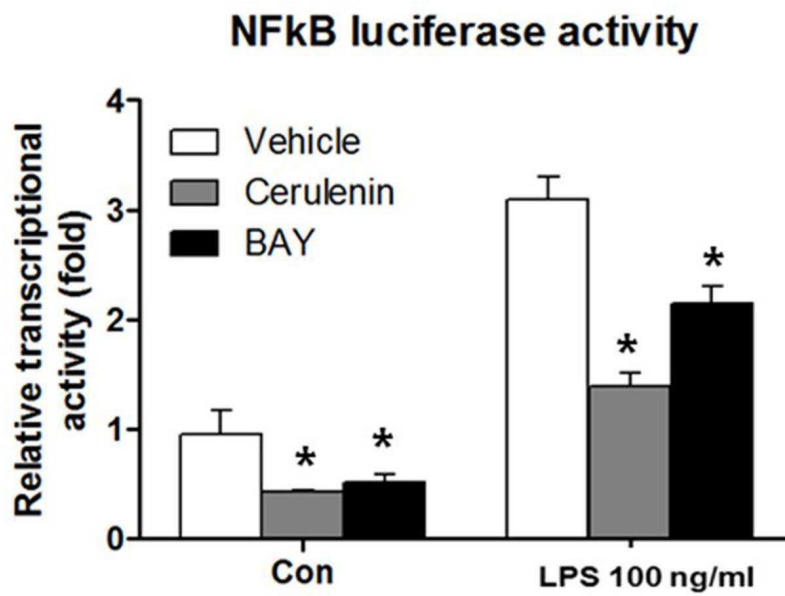
도면3



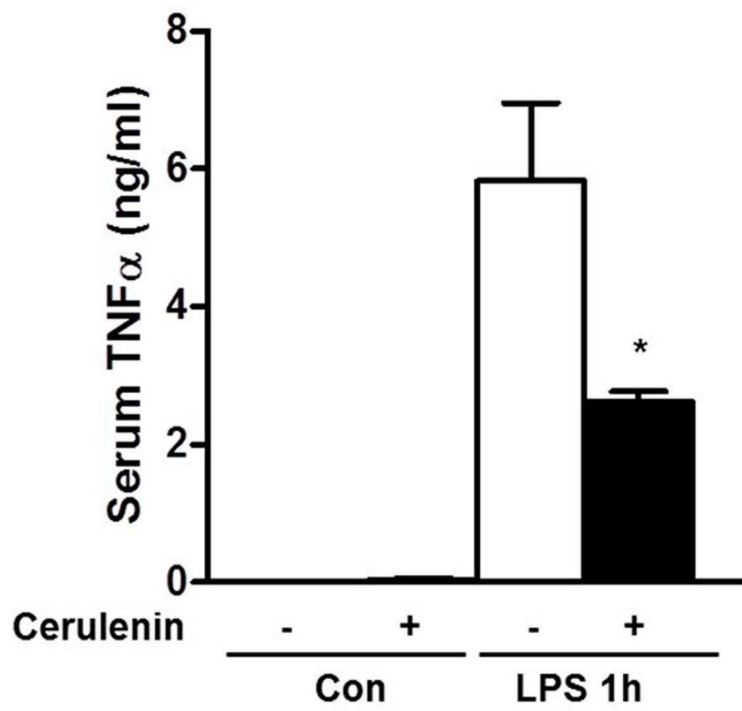
도면4



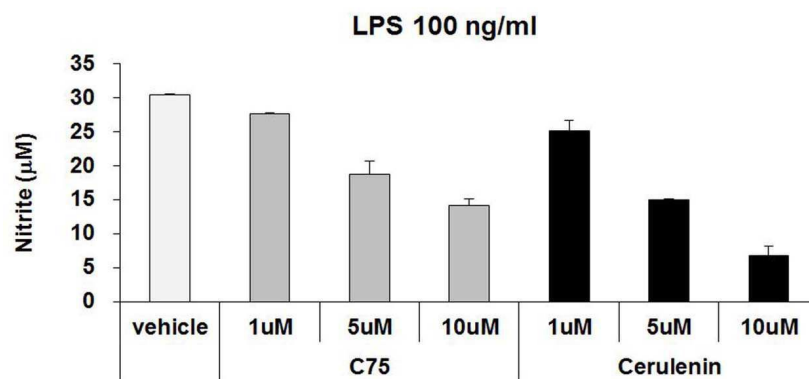
도면5



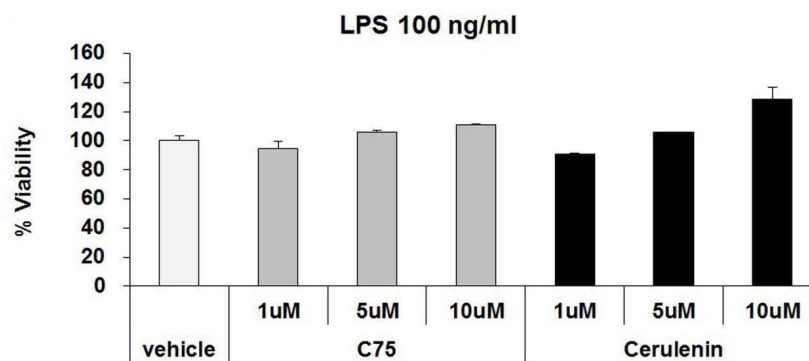
도면6



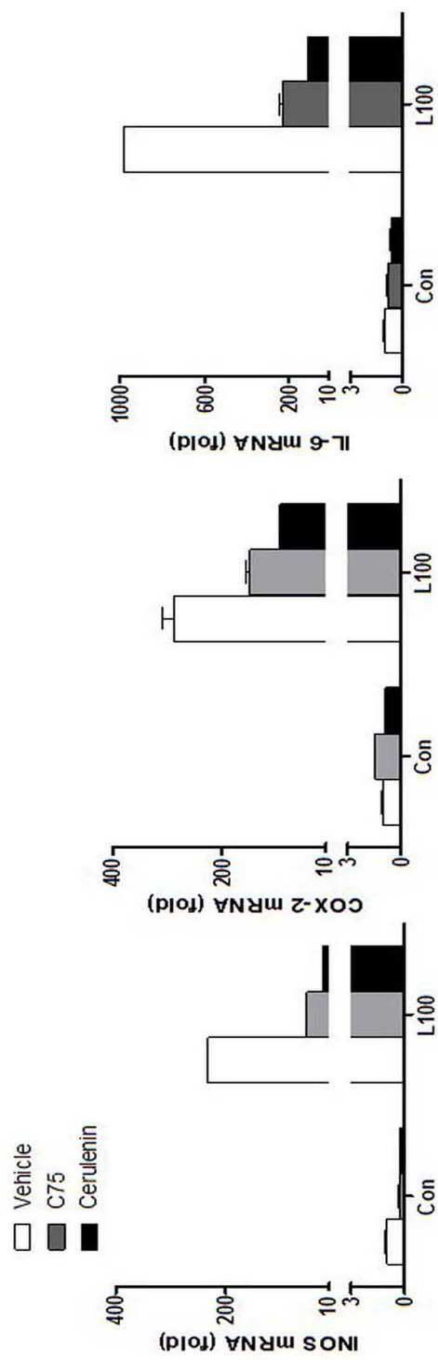
도면7



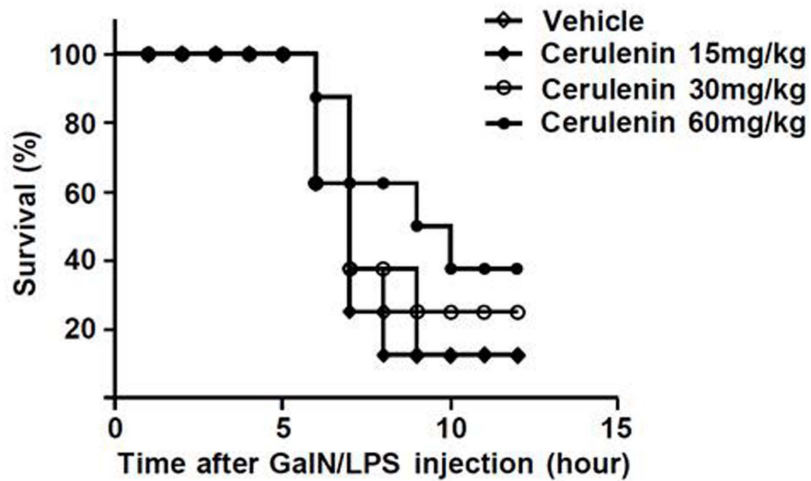
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> UNIST Academy-Industry Research Corporation
- <120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES COMPRISING CERULENIN OR CERULENIN DERIVATIVE AS AN ACTIVE INGREDIENT
- <130> FPD/201508-0087/C
- <150> KR 2014/134560
- <151> 2014-10-06
- <160> 14
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> sense primer for iNOS
- <400> 1

gctcatgctgg cctccttt

18

- <210> 2
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> antisense primer for iNOS
- <400> 2

cctgggtacgg gcatttgct	18
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sense primer for COX-2	
<400> 3	
tgctgtacaa gcagtggcaa	20
<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antisense primer for COX-2	
<400> 4	
agggctttca attctgcagc ca	22
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sense primer for TNF-alpha	
<400> 5	
tgggacagtg acctggactg t	21
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antisense primer for TNF-alpha	
<400> 6	
ttcggaaagc ccatttgagt	20
<	
210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> sense primer for IL-6
 <400> 7
 acttcacaag tcggaggctt 20
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer for IL-6
 <400> 8
 ctgaaggact ctggctttgt ct 22
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for MCP-1
 <400> 9
 aactgcatct gccctaaggt 20
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer for MCP-1
 <400> 10
 agtgcttgag gtggttgtgg aa 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for IL-1beta
 <400> 11
 gggtgcttc caaacctttg ac 22
 <210>
 > 12
 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for IL-1beta

<400> 12

atgggaacgt cacacaccag ca 22

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for CypA

<400> 13

cagccatggt caaccccacc g 21

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for CypA

<400> 14

ctgctgtctt tggaactttg tctg 24