(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0046294
(43) 공개일자 2014년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/19 (2006.01) *A61K 31/185* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0112595
(22) 출원일자 2012년10월10일
심사청구일자 2012년10월10일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김군도
부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, LG메트로시티)
신평균
경기도 수원시 권선구 일월천로4번길 74, 106동 703호(구운동, 성원아파트)
최우석
부산광역시 수영구 광안해변로 386, 104동 2603호(민락동, 롯데캐슬 자이언트아파트)
(74) 대리인
위병갑

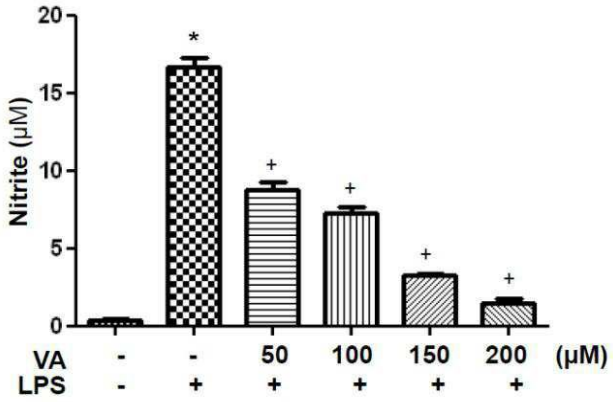
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 베라트르산은 염증반응을 유발시키는 자극인자에 의한 대식세포에서 산화질소 생성 억제 효과가 우수하고, 염증성 사이토카인인 IL-1β의 생성을 억제하는 효과가 우수하며, MAPK, NF-κB, GSK-3β, c-Raf의 인산화를 억제하는 효과가 우수하여 과다한 염증반응으로 유발될 수 있는 염증질환의 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 베라트르산은 세포에 독성을 유발하지 않기 때문에 체내 안정한 특징이 있어 염증질환을 예방 또는 개선할 수 있는 기능성 건강식품의 소재로도 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

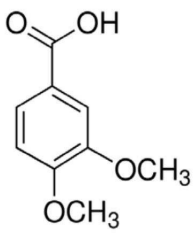
과제고유번호	PJ008171
부처명	시스템합성생명공학사업단
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	버섯 대사물질의 세포내 작용분자들에 대한 기전 연구
기 여 율	1/1
주관기관	농업진흥청
연구기간	2012.05.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물;

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 베라트르산은 산화질소(nitric oxide), iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 INF-γ(interferon-γ)의 생성 또는 발현을 억제하고; NF-κB, MAPK(MAP Kinase), STAT-1, GSK-3β, c-Raf의 인산화를 감소 또는 억제하는 것을 특징으로 하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 베라트르산은 조성물에 0.1 내지 200㎛M의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 염증질환은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-쉔라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho- pulmonary dysplasia) 및 염증성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

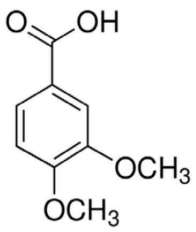
청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 함유하는 소염제.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품;

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 베라트르산은 산화질소(nitric oxide), iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 INF-γ(interferon-γ)의 생성 또는 발현을 억제하고; NF-κB, MAPK(MAP Kinase), STAT-1, GSK-3β, c-Raf의 인산화를 감소 또는 억제하는 것을 특징으로 하는 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 염증질환은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-쉔라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho- pulmonary dysplasia) 및 염증성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염증질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 베라트르산의 신규한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증성 장애는 전 세계에서 가장 중요한 건강 문제 중 하나이다. 염증은 일반적으로 외부 물질 또는 해로운 자극에 의한 숙주 침입에 대해 신체 조직의 국소화된 보호 반응이다. 염증의 원인은 박테리아, 바이러스 및 기생충과 같은 감염성 원인; 화상 또는 방사선 조사와 같은 물리적 원인; 독소, 약물 또는 산업적 제제와 같은 화학 약품; 알레르기 및 자가면역 반응과 같은 면역적 반응, 또는 산화성 스트레스와 연관된 상태일 수 있다.

[0003] 염증은 통증, 적화현상, 부기, 열 및 감염된 영역의 궁극적인 기능 손실을 그 특징으로 한다. 이들 증상은 면역계의 세포사이에서 일어나는 일련의 복잡한 상호작용의 결과이다. 세포의 반응으로 인해 결과적으로 여러 그룹의 염증 매개자의 상호작용 네트워크가 생성된다: 단백질(예를 들면, 사이토카인, 효소(예를 들면 프로테아제, 퍼옥시다제), 주요 염기성 단백질, 점착 분자(ICAM, VCAM), 지질 매개자(예를 들면, 에이코사노이드, 프로스타글란딘, 류코트라이엔, 혈소판 활성화 인자(PAF)), 반응성 산소 종(예를 들면, 하이드로퍼옥사이드, 슈퍼옥사이

드 음이온 O2-, 산화질소(NO) 등). 그러나, 염증의 이들 매개자중 대부분은 또한 정상적인 세포 활성의 조절자이다. 따라서, 염증 반응의 결핍으로 인해 숙주가 제어되지 않으면서 손상(즉, 감염)되고, 따라서 만성 염증으로 인해 부분적으로는 상기 언급된 매개자중 여럿이 과다 생성됨으로써 매개되는 염증성 질환이 야기된다.

[0004] 특히, 염증성 질환 중 하나인 자가면역 질환은 면역 체계가 그 자신의 기관을 공격하여 자발적인 반응을 일으키는 것을 특징으로 한다. 이러한 반응들은 T 림프구에 의한 자가항원(auto-antigen)의 인식에 기인하며, 이로 인하여 체액상(자가항원 생성) 및 세포상 (림프구 및 대식세포 세포독성 활성 증가) 면역 반응이 유발된다. 자가면역 질환으로서는 다음과 같은 것들을 들 수 있다: 류마티스성 질환, 건선, 전신성 피부근염, 다발성 경화증, 홍반성 낭창, 또는 항원에 의한 면역반응 악화, 즉, 천식, 약물 또는 음식에 대한 알레르기 등. 이러한 질환들은 모두 제한성이고 만성인 질환들이며, 경우에 따라서는 치명적이고, 현재까지 상기 질환들을 치료할 수 있는 효과적인 치료 방법이 존재하지 않는 실정이다. 그러므로, 당해 질환의 진행중에 질환을 경감시키거나 완화시킬 수 있는 약물, 의약 또는 매체라면 환자의 건강을 위해서 중요한 해결 수단이 된다고 할 것이다.

[0005] 자가면역 질환의 치료방법을 탐색하여 적당한 약물과 방법을 찾고자 집중적인 노력을 해왔다. 오늘날, 자가면역 질환의 치료는 주로 면역억제 약물, 예컨대 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 칼시뉴린 억제제(calcineurin inhibitors) 및 증식억제제-대사물 작용 억제제(antiproliferatives-antimetabolites)의 사용에 근거한 것이다. 그러나, 이와 같은 약리 요법은 다양한 표적들에 대하여 작용하므로, 전체적으로는 면역기능을 저하시킬 수 있다. 그렇지 않으면, 이러한 약리 요법을 장기간 사용하였을 경우 여러 가지 세포 독성 작용이 문제가 되어, 면역 체계를 비특이적인 방식으로 억제함으로써, 환자를 감염증 및 암에 걸릴 위험에 노출시킬 수 있다. 칼시뉴린과 글루코코르티코이드는, 그들의 신독성과 당뇨병 유발 특성에 기인하여 또 다른 문제점을 나타내기 때문에, 몇 가지 임상학적 증상의 경우(예: 신기능 부전, 당뇨병 등)에는 그 사용이 제한된다.

[0006] 이러한 이유로, 자가면역질환을 포함하는 면역질환 또는 염증성 질환을 가지는 환자는 질병 예방 및 보조 치료로서 사용될 수 있는, 주된 부작용이 없고 약한 소염 효과를 갖는 "천연"으로 간주되는 치료 유형에 특히 관심을 갖게 되었고, 천연 유래의 치료제 개발에 많은 연구자들의 관심이 증대되고 있다.

[0007] 이에 최근에는 부작용이 적고 안정적인 치료제를 개발하기 위해 천연물에 연구가 진행되고 있는데, 이러한 종래 기술로는 대한민국 등록특허 제668,067호에 생각으로부터 분리한 페닐부테노이드 유도체 화합물이 항염 활성이 우수하다는 내용이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제396,526호에는 커큐마 잔토리자 록스브로부터 분리한 잔토리졸이 항염 활성을 가지고 있어 염증질환 치료 용도로 사용할 수 있다는 내용이 개시되어 있다.

[0008] 한편, 본 발명자들은 버섯에 함유된 성분인 베라트르산이 우수한 항염 활성이 있음을 최초로 규명하였는데, 특히 LPS(lipopolysaccharides)로 자극시킨 대식 세포에서 염증반응 유발인자인 인터류킨-1β(IL-1β)의 생성을 억제시키는 활성이 있고, 산화질소(Nitric oxide; NO)의 생성 억제 및 산화질소 생성에 관여하는 산화질소합성효소인 iNOS(Inducible nitric oxide synthase), IκBα(inhibitory kappa B-alpha), NF-κB, 인터페론-γ(Interferon-γ; IFN-γ), STAT-1, GSK-3β(glycogen synthase kinase-3β) 및 c-Raf(RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase)의 활성 억제가 있었으며, MAPK family인 ERK(extracelluar signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38의 활성화 억제 기작을 통해 염증을 억제하는 활성이 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 국제공개특허 제10-2012-0048589

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 그러므로 본 발명의 목적은 베라트르산(Veratric acid)을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

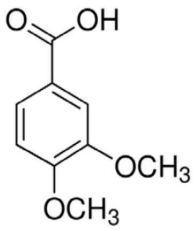
[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 베라트르산(Veratric acid)을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 상기 조성물을 유효성분을 포함하는 소염제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 베라트르산은 산화질소(nitric oxide), iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 INF-γ(interferon-γ)의 생성 또는 발현을 억제하고; NF-κB, MAPK(MAP Kinase), STAT-1, GSK-3β, c-Raf의 인산화를 감소 또는 억제할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 베라트르산은 조성물에 0.1 내지 200μM의 농도로 포함되어 있을 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증질환은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-쉔라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho- pulmonary dysplasia) 및 염증성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 함유하는 소염제를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 베라트르산은 산화질소(nitric oxide), iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 INF-γ(interferon-γ)의 생성 또는 발현을 억제하고; NF-κB, MAPK(MAP Kinase), STAT-1, GSK-3β, c-Raf의 인산화를 감소 또는 억제할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증질환은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-쉔라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성

관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho- pulmonary dysplasia) 및 염증성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 베라트르산(Veratric acid)은 염증반응을 유발시키는 자극인자에 의한 대식세포에서 염증성 사이토카인인 IL-1β의 생성을 억제하는 활성이 우수하고, MAPK 및 산화질소(NItric oxide; NO) 생성 활성을 억제하는 효과가 우수하여 과다한 염증반응으로 유발될 수 있는 염증질환 및 면역질환의 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있고, 체내 안정한 특징이 있어 기능성 건강식품의 소재로도 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 베라트르산(Veratric acid)의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 베라트르산을 대식세포(RAW264.7), HaCaT, HEK293 세포에 농도별로 처리한 다음, 세포생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 베라트르산과 LPS를 독립적으로 대식세포(RAW264.7)에 처리하여 산화질소(Nitric oxide; NO) 생성 여부를 비교 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, 산화질소 생성 억제를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4a와 4b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, 산화질소합성효소(Inducible nitric oxide synthase; iNOS)의 유전자 및 단백질 발현을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, 사이클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2; COX-2) 유전자 및 단백질 발현을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6a와 6b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-γ의 단백질 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a와 7b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, STAT-1의 단백질 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8a와 8b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, NF-κB 및 IκBα의 단백질 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8c와 8d는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, NF-κB가 세포 내 분포 양상을 면역형광현미경을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9a와 9b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, JNK, ERK1/2 및 p38의 단백질 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 10a와 10b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, GSK-3β 단백질 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

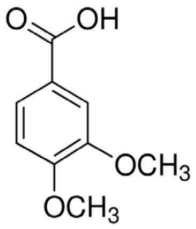
도 11a와 11b는 베라트르산을 LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에 농도별로 처리한 다음, c-Raf 단백질 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 항염 활성이 우수하고 세포 내 독성을 유발하지 않는 새로운 염증 질환 치료제로서 베라트르산 화합물의 신규 용도를 제공한다는 점에 특징이 있다.

[0026] 구체적으로 본 발명에 따른 상기 베라트르산은 하기 화학식으로 표시되는 구조식을 갖는 화합물일 수 있다.

[0027] [화학식]



[0028]

[0029] 또한, 본 발명에 따른 상기 베라트르산 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0030] 또한, 본 발명에서 제공하는 염증 질환 치료를 위한 활성성분인 상기 베라트르산 화합물은 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로도 제조할 수 있다.

[0031] 상기 화합물을 천연으로부터 분리하는 경우, 상기 화합물은 종래의 물질을 추출하고 분리하는 방법을 이용하여 식물 또는 식물의 일부로부터 수득될 수 있다. 줄기, 뿌리 또는 잎 등 식물로부터 목적하는 추출물을 획득하기 위하여 식물을 적절히 탈수하여 침연(macerated)하거나 단지 탈수하고, 목적하는 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제할 수 있다. 또한 상기 화합물을 화학적 합성법으로 제조하는 경우, 상기 화합물에 상응하는 합성 화합물 또는 이들의 유도체는 일반적으로 구매 가능한 물질이거나, 공지의 합성 방법을 이용하여 화학적으로 제조될 수 있다.

[0032] 한편, 상기 본 발명의 베라트르산 화합물은 염증 반응을 매개하는 물질을 억제하여 항염 활성을 갖는 특징이 있다.

[0033] 즉, 본 발명의 일실시예에 따르면, 대식세포(RAW264.7)에 LPS를 처리하여 유발된 염증 반응을 베라트르산이 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었는데, 구체적으로 LPS에 의해 유발되는 산화질소의 생성 및 iNOS의 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 염증성 사이토카인인 IFN-γ 및 IL-1β의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

[0034] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 본 발명의 베라트르산 화합물은STAT-1, NF-κB, GSK-3β, c-Raf의 인산화를 억제하여 산화질소 생성을 억제시킬 수 있는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

[0035] 내독성 물질인 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)는 염증유발 인자의 생성을 유도하는 물질로서, 염증반응을 일으키는 염증성 사이토카인(Pro-inflammatory cytokines)들의 생성을 촉진한다. 즉, 염증반응을 일으킬 수 있는 외부자극이 가해지는 경우, TNF-α 등의 염증성 사이토카인들의 발현이 유도되고, 생성된 염증성 사이토카인들은 iNOS 및 COX-2를 코딩하는 유전자의 발현을 자극시켜, 염증반응에 관여하는 산화질소(Nitric oxide; NO) 및 PGE_2 물질을 생성하여 염증반응을 일으킨다. 이러한 산화질소는 IFN-γ, STAT-1, NF-κB, GSK-3β 및 c-Raf 등에 의해 iNOS를 자극하여 생성될 수 있다.

[0036] 그러므로 이러한 염증성 사이토카인 및 산화질소 등의 염증 유발 물질들이 과다하게 분비되거나 세포 자체가 활성화된 상태로 오래 지속될 경우 조직 손상이라는 심각한 부작용을 초래한다.

[0037] 따라서 본 발명의 베라트르산은 지질다당류(lipopolysaccharide: LPS)에 의하여 자극된 대식세포(RAW264.7)에서 상기 기술된 바와 같은 염증 반응 유발물질의 발현, 활성 등을 억제할 수 있어 항염제로서 사용할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0038] 또한, 본 발명자들은 본 발명에 따른 베라트르산의 염증성 사이토카인 생성 억제가 이들의 상위 신호전달체계인 NF-κB와 MAPK의 활성 억제에 기인한 것임을 규명하였다.

[0039] 일반적으로 NF-κB와 MAPK는 신호전달이 활성화 되는 경우 염증 유발인자가 생성 및 생성 촉진된다. 따라서 NF-κB와 MAPK의 신호전달을 억제하는 경우, 염증 유발 생리활성 물질의 생산을 억제하게 되고 궁극적으로 염증질

환을 예방 및 치료할 수 있게 된다.

[0040] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 베라트르산을 처리한 대식세포(RAW264.7)와 처리하지 않은 대식세포에 LPS로 염증을 유발시킨 다음, NF-κB의 활성과 MAPK의 인산화를 측정하였는데, 베라트르산을 처리한 군은 NF-κB와 MAPK의 활성을 대조군과 유사한 수준으로 유지하는 것으로 나타났으며(도 8과 도9 참조), 나아가 면역형광현미경을 통해 NF-κB의 전사활성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(도 8c와 도 8d 참조).

[0041] 전사인자인 NF-κB(Nuclear factor kappa B)는 염증유발 사이토카인, 독성화합물, 박테리아감염, 바이러스감염, 방사선, UV, 활성산소 등의 다양한 외부자극에 의해 활성화되어 세포사멸, 면역반응, 염증반응 등 다양한 세포반응에 관련된 단백질 발현을 조절하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 비정상적인 NF-κB의 활성은 각종 암, 관절염 등의 염증질환, 천식이나 아토피 피부염과 같은 알러지성 질환 및 염증질환과 관련되어 있어, NF-κB의 활성을 저해하는 물질은 상기와 같은 질환들을 치료하기 위한 치료제로서의 표적이 되고 있다[A. S. Baldwin Jr, J. Clin. Invest., 2001, 107, 241-246].

[0042] 또한, NF-κB는 정상 상태의 경우, 세포 내 사이토졸에 존재하지만 자유라디컬, 염증을 유발하는 자극, 발암물질, 독신, 자외선 등의 자극이 있는 경우, 활성화되어 핵 내로 이동되고, 핵 내에서 세포사멸 억제, 세포변형, 증식, 침윤, 전이 또는 화학적 저항, 염증 등을 일으키는 다양한 유전자의 발현을 유도한다[Chen., Biochem Biophy Res Comm, 2005, 332:1; Jove et al., Endocrinology, 2005, 146:3087; Dandrona et al., Circulation, 2005, 111:1448; Aggarwal et al., Ann N Y Acad Sci, 2004, 1030:434]. 따라서 NF-κB의 활성을 억제하면 이들 질환 관련 유전자의 발현을 억제할 수 있다.

[0043] 본 발명에서는 이러한 NF-κB와 IκBα의 인산화를 통해 확인하였는데, 이는 외부 자극이 없는 상태에서 NF-κB는 세포질 내에서 IκB (inhibitory-κB)라는 억제단백질과 복합체를 형성하고 있다가 세포외 자극이 주어지면 IκB는 인산화에 의해 불활성화되고 분해되며, NF-κB는 IκB로부터 해리하여 핵으로 이동하여 활성형을 띄게 된다. 그 결과 iNOS 및 COX-2를 발현시켜 과량의 산화질소와 PGE2를 생성하여 염증을 유발한다.

[0044] 또한, 본 발명의 베라트르산은 MAPK family들의 활성을 억제하는 작용이 있는데, MAPK는 세포외 자극을 세포막에서부터 세포내 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달 경로로 잘 알려져 있다. MAPK는 성장호르몬, 사이토카인 및 스트레스 등의 수용체로부터 활성화된 신호를 세포내로 전달하여 세포의 증식, 분화, 사멸 등 다양한 기능을 담당한다. MAPK는 크게 1) ERK(the extracellular signal-activated kinases), 2) JNK(the c-JUN N-terminal kinase), 3) p38 MAPK 세 가지로 분류할 수 있으며, ERK(ERK1/2)는 성장호르몬의 신호전달에 주로 관여하며 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 담당하고, 반면에 스트레스 kinase로 분류되는 p38 MAPK 와 JNK는 이름 그대로 세포 외부의 스트레스성 자극에 의해 활성화 되며 염증반응, 면역반응, 세포사멸 등을 매개함이 알려져 있다. 따라서 이들 MAP kinase 저해제를 이용할 경우, 염증질환을 치료할 수 있다.

[0045] 그러므로 이러한 내용을 토대로, 본 발명은 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 "염증 질환"은 NO, iNOS, COX-2, PGE_2, TNF-α 등과 같이 일련의 염증 반응을 일으키는 다양한 자극 요인들로 인하여 유발된 염증을 동반하는 질환을 말한다. 상기 염증성 질환에는 부종 등과 같은 일반적인 염증 증상을 포함하여 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근 육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease; 또는 'charcot joint'이라고도 함), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-쉔라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury) 및 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia) 등을 포함하며, 이에 제한되지는 않는다. 또한 급·만성 습진, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 박탈 피부염, 일광 피부염, 건선 등 염

증성 피부질환도 포함된다.

[0047] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양의 베라트르산을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 염증질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말하며, 상기 조성물에 대해 베라트르산은 0.1 내지 200㎛M 의 농도로 함유될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명에 따른 베라트르산의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 ㎎/day/체중㎏, 바람직하게는 0.5 ~ 10 ㎎/day/체중㎏이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 염증 또는 면역질환의 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0049] 또한, 상기에서 약학적으로 허용되는 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 염증질환의 증상의 예방 및 개선용 조성물은 염증 또는 면역질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0052] 따라서 본 발명은 베라트르산을 함유하는 조성물을 포함하는 염증 질환 증상의 예방 및 치료용 약제를 제공할 수 있으며, 특히 상기 조성물을 포함하는 소염제를 제공할 수 있다.

[0053] 나아가 본 발명에 따른 베라트르산은 세포에 대한 독성을 유발하지 않고 부작용을 일으키지 않아 안정성이 있어 체내에 안심하고 사용할 수 있으므로 염증질환의 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물로도 사용할 수 있다.

[0054] 그러므로 베라트르산을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 및 개선용 식품 조성물은 염증질환 증상의 예방 및 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[0055] 본원에서 상기 “식품”이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0056] 본원발명에 따른 염증질환 증상의 예방 및 개선용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 캔디류, 쵸코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0057] 또한, 상기 “기능성 식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 본원발명에서 상기 “음료”란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 염증 및 면역질환 증상의 예방 및 개선용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는

천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0059] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 염증질환 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0060] 본원발명의 염증질환 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100㎖를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0062] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)의 세포 독성 평가**

[0063] 베라트르산의 세포독성 평가를 위해 사용한 세포주는 대식세포인 RAW264.7, 인체배아신장세포인 HEK293(Human Embryonic Kidney) 및 각질형성세포인 HaCaT(Human Keratinocyte)를 사용하였다. 세포 독성 실험을 위해, 먼저, 10% Fetal Bovine Serum(FBS)와 1% penicillin(100 U/㎖)/streptomycin (100 U/㎖)이 포함되어 있는 DMEM 배양액을 이용하여 상기 세포주를 5% CO_2 및 37℃의 온도조건에서 배양하였다. 이후 배양된 세포를 96 웰 플레이트에 1×10^5 세포수로 분주하고, 베라트르산을 농도별(0, 50, 100, 150, 200 μM)로 각 세포에 처리하여 3시간 동안 배양시켰다. 배양 후 100 ng/㎖ LPS를 함유한 배지를 처리하여 24시간 동안 LPS 자극을 주었다. 이후 배양액을 제거한 후, WST-1 용액(Daeil Lab Service, Korea)을 처리하여 3시간 동안 다시 배양하였고, 배양액의 광학밀도를 ELIZA 분석기를 이용하여 460 ㎚에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존률을 분석하였다.

[0064] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 베라트르산을 각 세포에 농도별로 처리한 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군과 세포생존률에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 고농도인 200 μM에서도 모든 세포에 독성을 나타내지 않는 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 베라트르산이 세포에 독성을 유발시키지 않아 체내 안정할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

실 시 예 2

[0065] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)의 산화질소(Nitric oxide; NO) 생성 억제 활성 분석**

[0066] 베라트르산이 염증을 유발시키는 산화질소의 생성을 억제하는 활성이 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 앞서 준비된 대식세포인 RAW264.7 세포를 96웰 플레이트에 1×10^5 세포수로 분주한 후, 베라트르산을 농도별(0, 50, 100, 150, 200 μM)로 각 세포에 처리하여 3시간 동안 배양시켰고 100 ng/㎖ LPS를 함유한 배지를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양액을 수득하여 LPS에 의해 유발되는 산화질소의 생성정도는 상개 배양액을 Griess 시약으로 반응시킨 후 ELISA(BD PharMingen, USA)를 이용하여 540 ㎚에서 측정하였다.

[0067] 그 결과, 도면 3a에서 나타낸 바와 같이, 독립적으로 LPS와 베라트르산을 처리하였을 경우에는 LPS가 대식세포를 자극하여 산화질소 생성이 증가하는 반면에 베라트르산만을 처리하였을 경우에는 대조군과 유사하거나 산화질소를 거의 생성하지 않는 것을 알 수 있었다. 또한 도면 3b에서 나타낸 바와 같이, LPS와 베라트르산을 같이

처리하였을 경우에는 LPS에 의해 자극된 대식세포에서 과도한 산화질소 생성이 베라트르산에 의해 억제되는 것으로 나타났고 이러한 산화질소 생성 억제 정도는 처리한 베라트르산의 농도 의존적으로 비례하는 것으로 나타났다.

실 시 예 3

[0068] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)의 산화질소합성효소(Inducible nitric oxide synthase; iNOS)에 미치는 영향분석**

[0069] 상기 실시예 2에서 베라트르산이 LPS로 자극된 대식세포에서 산화질소 생성을 억제한다는 것을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 베라트르산의 산화질소 생성 억제 기작이 산화질소 생성에 관여하는 산화질소합성효소인 iNOS 유전자 발현 및 단백질 활성 조절을 통해 이루어지는 것인지를 확인하기 위해 다음과 같이 RT-PCR과 웨스턴 블럿을 수행하였다.

[0070] (1) RT-PCR

[0071] 앞서 준비된 LPS와 베라트르산이 함께 처리된 대식세포인 RAW264.7을 사용하였는데, 배양된 상기 세포로부터 RNA 추출은 2-mercaptoethanol (Sigma, USA)를 사용하여 분리하였으며, 추출된 RNA를 주형으로 하여 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다, 이후 전기영동 후 자외선광으로 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

[0072] [표 1]

[0073] 프라이머 서열

[0074]

유전자명	서열(5'→3')	
	Sense(forward)	Antisense(reverse)
iNOS	ATG-TCC-GAA-GCA-AAC-ATC-AC	TAA-TGT-CCA-GGA-AGT-AGG-TG
GAPDH	AGG-CCG-GTG-CTG-AGT-ATG-TC	TGC-CTG-CTT-CAC-CAC-CTT-CT

[0075] (2)웨스턴 블럿

[0076] 앞서 준비된 LPS와 베라트르산을 함께 처리한 대식세포를 수집하여 용리버퍼(50 mM Tris-Cl [pH7.5], 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS and a cocktail of proteinase inhibitors [1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 μM aprotinin, 1 μM leupeptin, and 1 μM pepstatin A (Intron Biotechnology, Gyeonggi, Korea)]를 사용하여 세포를 용해시킨 후, 단백질 샘플들을 12%-SDS PAGE에서 전기영동 시킨 다음, nitrocellulose 멤브레인으로 전기적 이동시킨 다음, iNOS를 인식하는 1차 항체를 처리하여 반응시키고, 멤브레인을 세척한 후 여기에 다시 horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG 또는 anti-rat igG(Cell Signaling Technology, USA)를 처리하여 반응시킨 다음, enhanced chemiluminescent(ECL) detection system(PIERCE, USA)을 사용하여 시그널을 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 베라트르산을 처리한 경우, iNOS의 유전자 발현과 단백질 활성 수준이 베라트르산에 의해 농도 의존적으로 강하게 감소 또는 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 베라트르산이 LPS로 자극된 대식세포에서 iNOS 유전자 발현 억제를 통해 단백질 발현 수준을 현저하게 감소시키는 것을 알 수 있었다.

실 시 예 4

[0078] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)의 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향분석**

[0079] 본 발명자는 염증반응을 유발시키는 것으로 알려진 프로스타글란딘 G_2(Prostaglandin G_2;PGE_2)의 생성을 촉매하

는 사이클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2; COX-2)의 유전자 발현 및 단백질 발현에 베라트르산이 미치는 효과를 확인하기 위해 상기 실시예 3에서 실시한 RT-PCR과 웨스턴 블럿을 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 단 RT-PCR 수행 시 사용한 프라이머 서열을 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0080] [표 2]

[0081] 프라이머 서열

[0082]

유전자명	서열(5'→3')	
	Sense(forward)	Antisense(reverse)
COX-2	GGG-GTA-CCT-TCC-AGC-TGT-CAA-AAT-CTC	GAA-GAT-CTC-GCC-AGG-TAC-TCA-CCT-G
GAPDH	AGG-CCG-GTG-CTG-AGT-ATG-TC	TGC-CTG-CTT-CAC-CAC-CTT-CT

[0083] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 베라트르산은 COX-2 유전자 및 단백질 발현에 있어 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

실 시 예 5

[0084] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)의 염증성 사이토카인과 인터페론-γ(interferon-γ; IFN-γ)의 단백질 발현에 미치는 영향 분석**

[0085] 앞서 확인한 실시예들의 결과를 통해 본 발명의 베라트르산이 LPS 자극에 의한 산화질소의 생성을 억제 및 감소할 수 있는 효과가 있으며, 이는 iNOS의 발현 억제를 통한 기작으로 유발되어진다는 사실을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 베라트르산의 항염 활성이 염증을 유발시키는 염증성 사이토카인의 생성 억제와 사이토카인으로 자극된 IFN-γ 분비 억제를 통해 이루어지는지 확인하기 위해 상기 실시예 3과 같은 웨스턴 블럿 방법을 통해 IL-1β, IL-6, TNF-α 및 IFN-γ의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0086] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, LPS로 자극된 대식세포(RAW264.7)에서 베라트르산은 IL-6와 TNF-α의 단백질 발현 수준에 영향을 주진 않았으나, IL-1β의 단백질 발현 수준은 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 사이토카인에 큰 영향을 주지 않았던 베라트르산은 IFN-γ의 단백질 발현을 감소시키는 것으로 나타났다.

[0087] 이러한 결과를 통해, 베라트르산은 염증 유발인자인 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성에 있어, IL-1β를 특이적으로 억제하고 또한 IFN-γ를 효과적으로 감소 또는 억제하는 특성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

실 시 예 6

[0088] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)의 STAT-1 인산화에 미치는 영향 분석**

[0089] 분비된 IFN-γ은 STAT-1 인산화를 촉진시켜 iNOS의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있고, iNOS의 활성은 산화질소 생성을 야기하여 염증 유발하는데 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 상기 실시예 5에서 IFN-γ 단백질 수준을 감소시킨 베라트르산이 STAT-1 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 실시예 3에서 실시한 웨스턴 블럿을 통해 STAT-1과 인산화된 STAT-1의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0090] 그 결과, 도 7에서 나타낸 바와 같이, LPS로 자극된 대식세포에서 IFN-γ를 감소시킨 베라트르산은 농도 의존적으로 STAT-1의 인산화 작용을 감소시킨 것으로 나타났다. 이러한 결과는 통해 본 발명자들은 본 발명의 베라트르산이 LPS로 자극된 염증 유발 환경에서 IL-1β와 IFN-γ 단백질의 발현 수준을 억제할 수 있으며, 이로 인해 STAT-1 인산화 역시 감소시키고 iNOS의 전사를 감소시키는 작용을 통해 산화질소의 생성을 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

실 시 예 7

[0091] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)이 NF-κB 및 IκBα 인산화에 미치는 영향**

[0092] NF-κB는 전사 인자로서 인산화된 IκBα에 의해 활성화가 되면 핵 안으로 이동하여 타겟 분자들이 전사가 일어

나도록 프로모터 부위에 결합하는 특징이 있다. 이에 본 발명자들은 NF-κB 및 IκBα의 단백질 수준에 베라트르산이 영향을 미치는지 확인하기 위해 다음과 같이 웨스턴 블럿과 면역형광현미경 검사를 하였다. 즉, 상기 실시예 3의 방법과 같이 웨스턴 블럿을 통해 LPS로 자극된 대식세포에서 NF-κB와 IκBα의 단백질 발현 수준을 확인하였고, 면역형광현미경 검사는 100 μM 베라트르산을 1시간 동안 처리한 후 LPS를 12시간동안 배양하고, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)을 실온에서 15분간 처리후, 4% 포름알데히드로 세포를 고정 후 세포 내 NF-κB의 분포를 시각적으로 확인하였다.

[0093] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 베라트르산을 처리한 경우, 인산화된 NF-κB의 단백질 발현이 현저하게 감소되는 것으로 나타났으며, 이러한 감소 정도는 베라트르산의 처리 농도에 비례하여 감소하는 것으로 나타났다. 또한 인산화된 IκBα도 베라트르산의 처리에 의해 감소하는 것으로 나타났다(도 8a와 8b 참조). 면역형광현미경을 이용하여 NF-κB의 세포 내 분포 양상을 확인 한 결과, 핵 내로 NF-κB의 이동을 베라트르산이 억제한 것으로 나타났다(도 8c와 8d 참조). 따라서, 본 발명에 사용된 베라트르산은 IκBα의 인산화를 감소시킴으로써 NF-κB가 세포질에서 핵 내로 이동하는 것을 억제하였다는 사실을 알 수 있었고, NF-κB와 IκBα의 인산화 억제를 통해 iNOS 발현의 조절을 하는 것으로 알 수 있었다.

실 시 예 8

[0094] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)이 MAPK 인산화에 미치는 영향**

[0095] 염증성 사이토카인을 생성시키는 상위 신호전달체계인 MAPK 활성에 베라트르산이 영향을 미치는 지 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 실시한 동일한 조건으로 웨스턴 블럿을 통해 LPS로 자극된 대식세포에서 JNK, p38 및 ERK1/2의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0096] 웨스턴 분석 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 베라트르산을 처리한 경우, JNK, p38, ERK1/2의 인산화를 억제하는 것으로 나타났으며, 특히 베라트르산은 p38의 인산화 조절에 더 강한 효과를 나타내는 것으로 나타났다(도 9b 참조).

실 시 예 9

[0097] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)이 GSK-3β의 인산화에 미치는 영향**

[0098] 염증 반응을 야기시키는 상위 신호전달체계인 GSK-3β의 인산화에 베라트르산이 영향을 미치는 지 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 수행한 웨스턴 블럿을 통해 LPS로 자극된 대식세포에서 GSK-3β(glycogen synthase kinase-3β)의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0099] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 베라트르산을 처리한 경우, GSK-3β의 인산화를 베라트르산의 농도 의존적으로 현저하게 억제시키는 것으로 나타났고, 이러한 결과는 본 발명에 사용된 대식세포(RAW264.7)에서 GSK-3β의 억제는 iNOS의 발현을 감소 조절과 인터류킨-10(IL-10)의 생성을 증폭시키는 것으로 알려져 있다.

실 시 예 10

[0100] **베라트르산(Veratric acid; 3,4-Dimethoxybenzoic acid)이 c-Raf의 인산화에 미치는 영향**

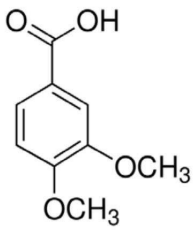
[0101] c-Raf(RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase)의 Ser^{338} 부위에 인산화가 되면, iNOS의 발현을 유도하는 특징이 있다. 이에 본 발명자들은 c-Raf 단백질 수준에 베라트르산이 영향을 미치는지 확인하기 위해, 상기 실시예 3에서 실시한 동일한 조건으로 웨스턴 블럿을 통해 LPS로 자극된 대식세포에서 c-Raf 단백질 수준을 확인하고, 또한 c-Raf의 Ser^{259} 및 Ser^{338} 부위의 인산화된 단백질 수준을 확인하였다.

[0102] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 베라트르산을 처리한 경우, c-Raf의 Ser^{259} 부위의 인산화에는 아무런 영향을 주지 않았으나 Ser^{338} 부위의 인산화는 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과는 베라트르산이 c-Raf의 인산화에 있어 Ser^{338}에 더 강력한 역할을 가진다는 것을 알 수 있다.

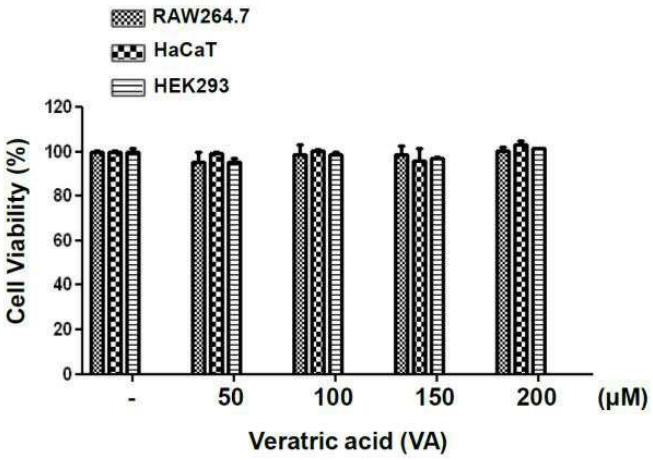
[0103] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에 대한 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

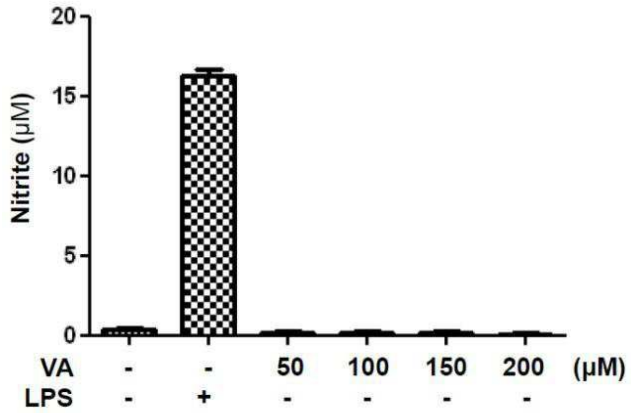
도면1



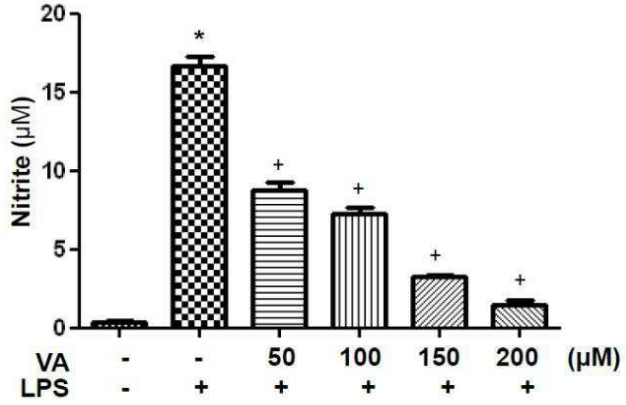
도면2



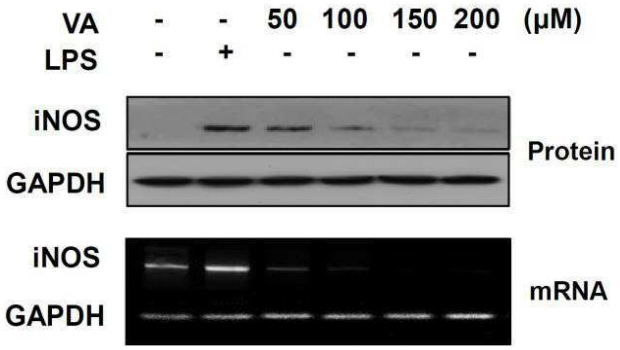
도면3a



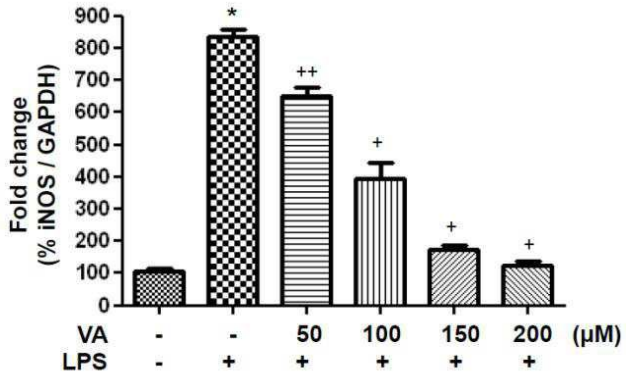
도면3b



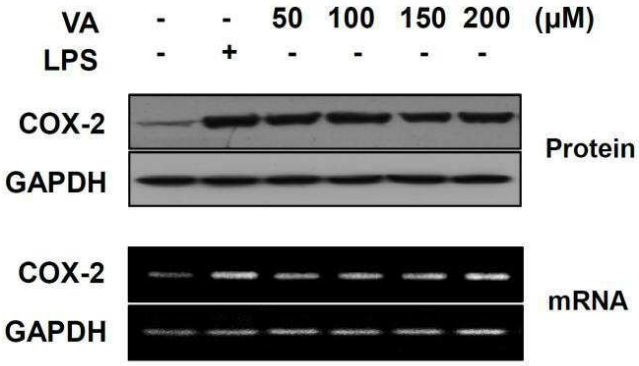
도면4a



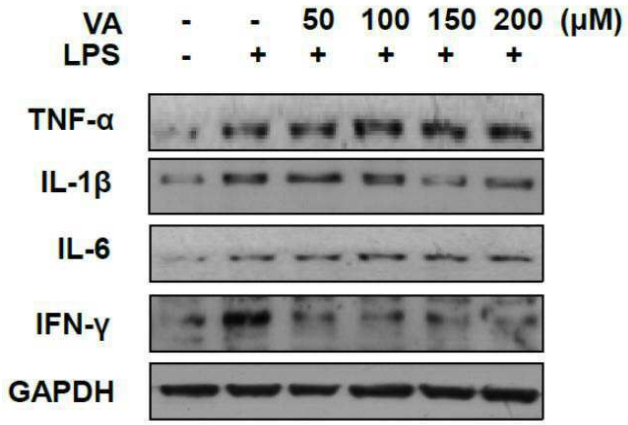
도면4b



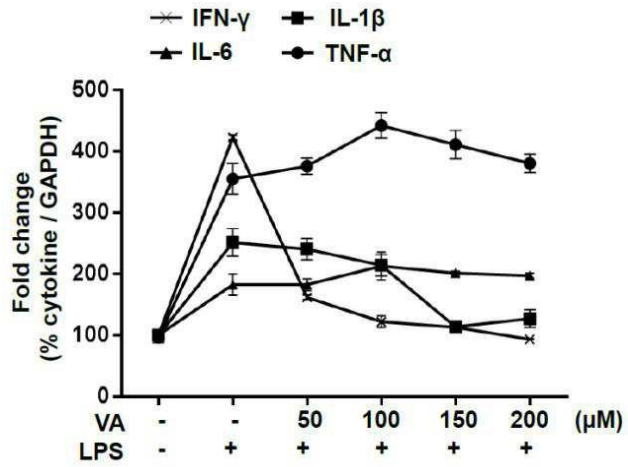
도면5



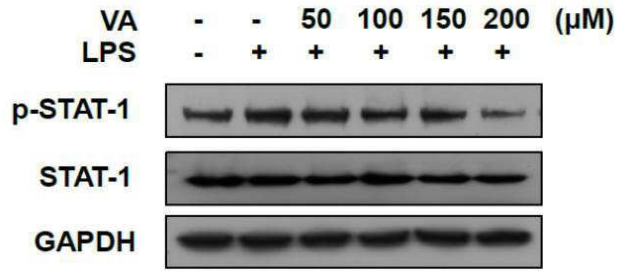
도면6a



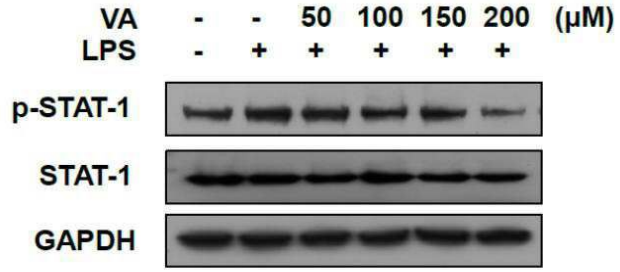
도면6b



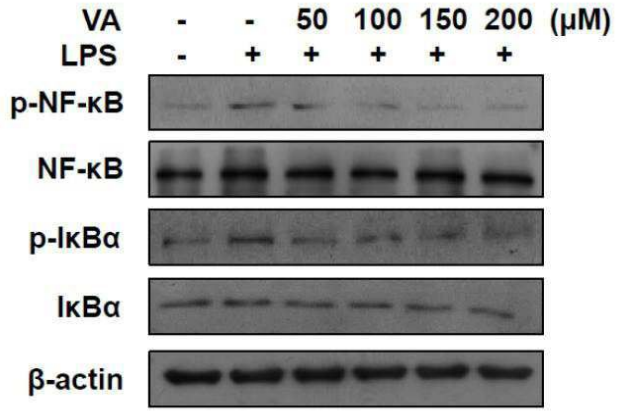
도면7a



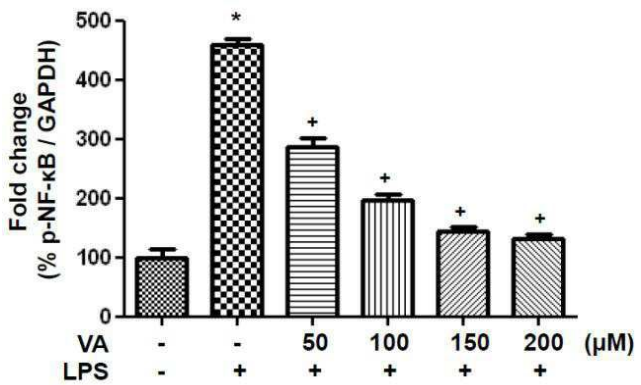
도면7b



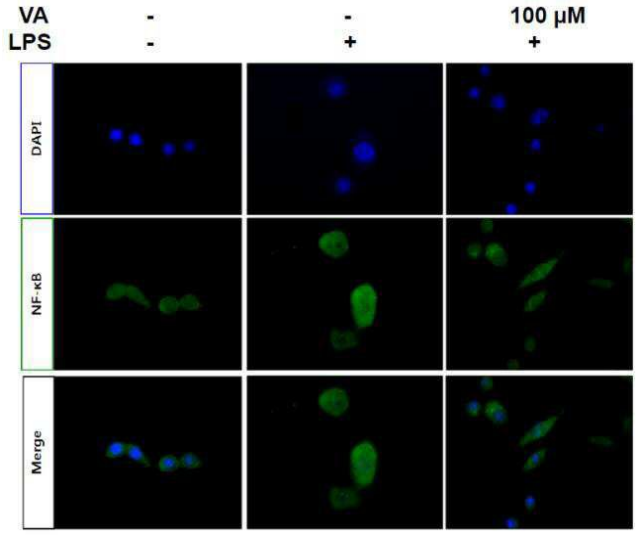
도면8a



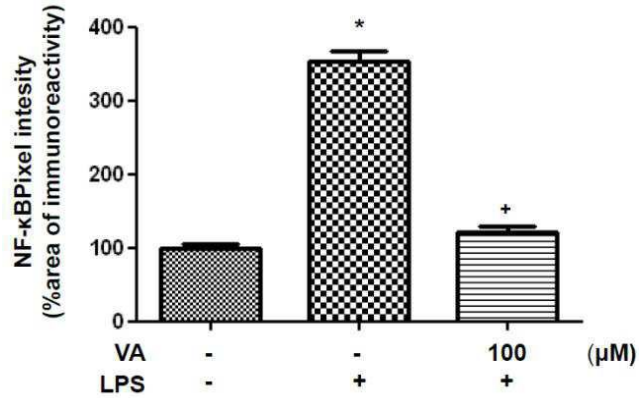
도면8b



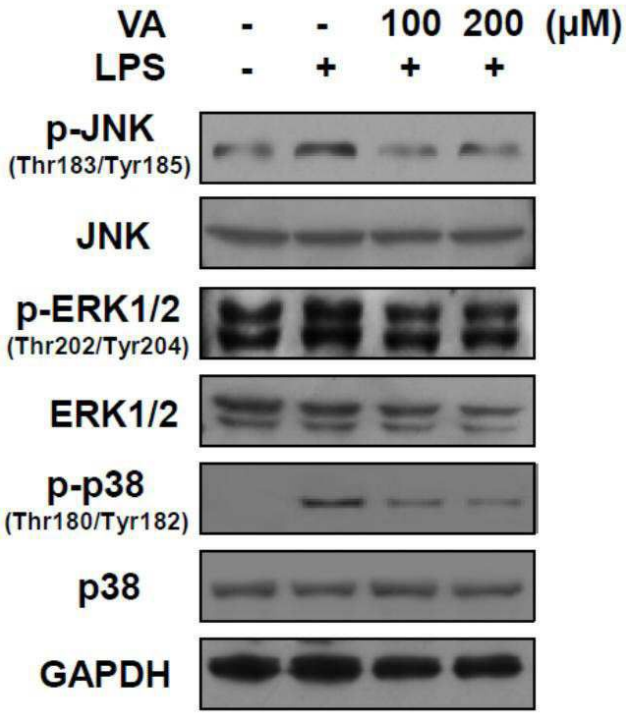
도면8c


VA - - 100 μM
LPS - + +
DAPI
NF-κB
Merge

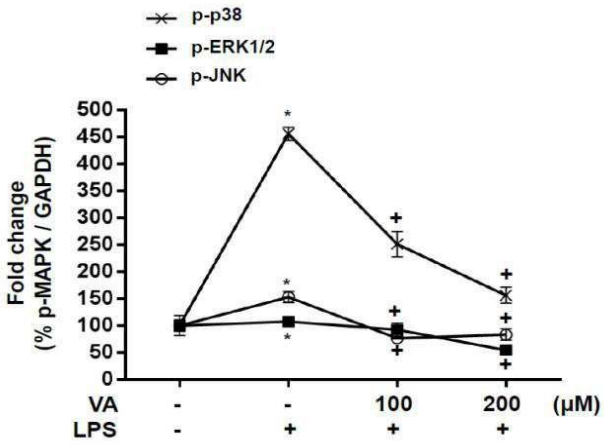
도면8d


NF-κBPixel intesity
(%area of immunoreactivity)
400
300
200
100
0
*
+
VA - - 100 (μM)
LPS - + +

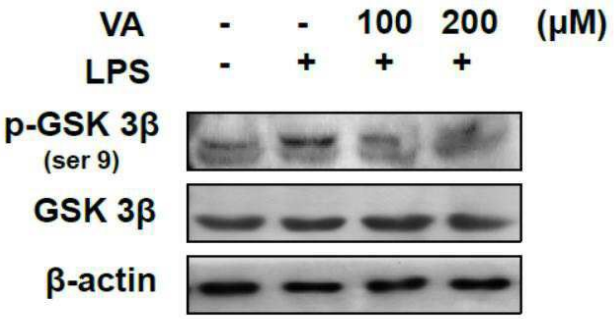
도면9a



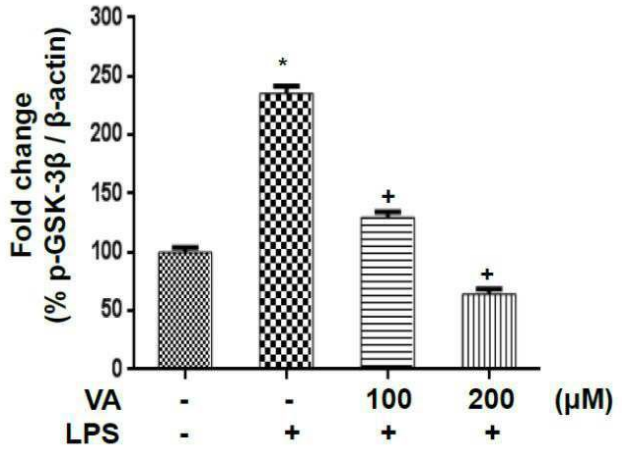
도면9b



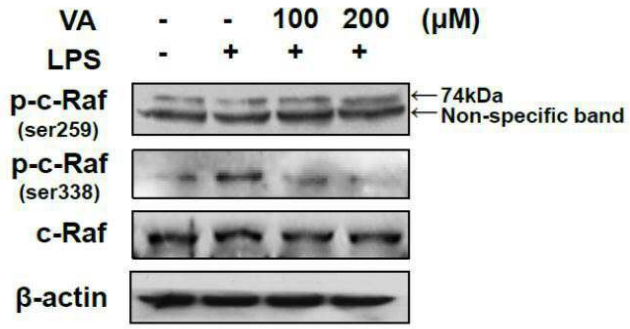
도면10a



도면10b



도면11a



도면11b

