



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0034336
(43) 공개일자 2017년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7034 (2006.01) A61K 31/09 (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7034 (2013.01)
A61K 31/09 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0117282
(22) 출원일자 2016년09월12일
심사청구일자 2016년09월12일
(30) 우선권주장
1020150132471 2015년09월18일 대한민국(KR)
1020160006400 2016년01월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
정현택
울산광역시 울주군 범서읍 장검길 88, 109동 180
1호 (울산 문수산 더샵)
조연수
울산광역시 울주군 언양읍 복문11길 9, 107동
1301호 (신울산 경남아너스빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

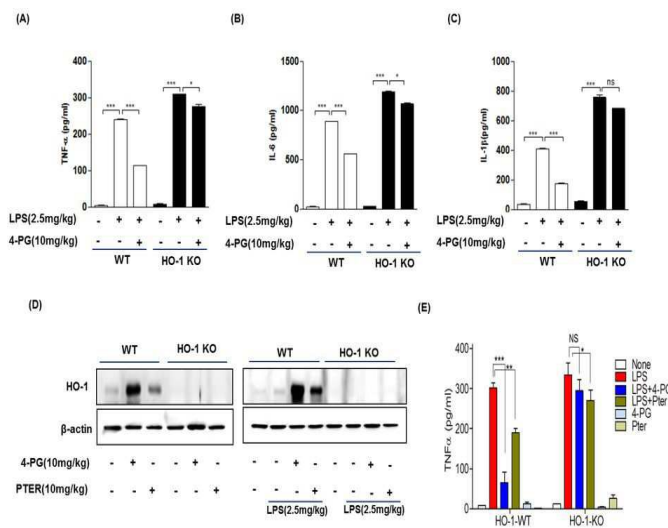
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 테로스틸벤 4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드(pterostilbene 4'-glucoside)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 상기 테로스틸벤 4'-글루코시드는 헬 옥시게나아제-1(HO-1) 또는 트리스 테트라폴린(TTP)의 발현 증가를 유도하여 LPS 자극에 의해 유도된 염증성 사이토카인의 감소에 탁월한 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 테로스틸벤-4'-글루코시드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 효과적인 염증성 질환 치료제로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/7032 (2013.01)

(72) 발명자

진영경

울산 남구 무거동 울산대학교 기린관 1409호

박정민

울산광역시 남구 수암로 315-2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-1036

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 바이오활성가스를 이용한 대사질환 제어 원천기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

테로스틸벤 4'-글루코시드(pterostilbene 4'-glucoside)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 테로스틸벤 4'-글루코시드는 헴 옥시게나아제-1(HO-1) 또는 트리스테트라폴린(TTP)의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 폐렴, 대장염, 염증성 장염 및 궤양성 장염으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 20 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

테로스틸벤 4'-글루코시드(pterostilbene 4'-glucoside)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증반응은 생체 또는 조직에 기질적 변화를 가져오는 화학적 물질, 세균 감염 및 물리적 작용에 의해 발생된 손상부위를 재생하려는 복구기전으로, 유해한 자극, 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현되면 국소적으로 염증성 성분과 같은 혈관활성 물질이 유리되어 염증이 유발된다.

[0003] 이러한 염증반응은 사이토카인, 프로스타글란딘 E2, 유리라디칼 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 특히, 대식세포에서는 사이토카인, 종양괴사인자- α , 리포폴리사카라이드와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 NF- κ B(nuclear factor- κ B)를 활성화시키며, 그 결과 유도성 산화질소(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 사이클로옥시제나아제-2(cyclooxygenase-2, COX-2)를 발현시켜 과량의 산화질소(NO)와 프로스타글란딘 E2를 생성하여 염증을 일으키게 된다.

[0004] 헴 옥시게나아제(Heme oxygenase; HO)는 heme이 일산화탄소, 빌리루빈과 철로 산화 분해되는 과정에서 촉매작용을 하는 효소로, 포유류에서는 3 종류의 HO 동형단백질이 확인되었으며, 그 헴 옥시게나아제-1(HO-1)에 의한 헴의 분해는 다양한 약리 작용을 한다.

[0005] 상기 약리 작용 중 헴의 철 및 담록소로의 분해는 세포보호 작용과 항산화 작용을 통하여 DNA의 산화적 손상을 예방하고 발암의 개시를 막고, 산화적 또는 염증 유발성 세포나 조직 손상에 의한 암 촉진과정을 억제하여 보호하는 역할을 한다. 또한, 헴의 일산화탄소로의 분해는 염증 반응에 관여하는 것으로 보고되어짐에 따라, 몇몇 연구에서는 HO-1 유도에 의해 알러지성 기도염과 급성폐질환이 완화되는 것이 확인되었다.

[0006] 또한, 트리스테트라폴린(Tristetraprolin; TTP)은 천연물에 포함된 성분으로 다양한 염증성 사이토카인의 mRNA

에 있는 ARE(AU-rich element)와 결합하여 사이토카인의 발현을 감소시키는 역할을 하는 것으로 보고되어 졌다.

[0007] 이에 따라, 염증성 질환 치료에 있어 헵 옥시게나아제-1과 트리스테트라폴린 역할의 중요성이 확인되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2014-0093435호(2014.07.28 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드(pterostilbene 4'-glucoside; 4-PG)를 유효성분으로 함유하는 조성물을 염증성 질환 치료제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 테로스틸벤 4'-글루코시드는 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 또는 트리스테트라폴린(TTP)의 발현 증가를 유도하여 LPS 자극에 의해 유도된 염증성 사이토카인의 감소에 탁월한 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 테로스틸벤-4'-글루코시드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 효과적인 염증성 질환 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG) 처리에 따른 HO-1 발현 수준 변화를 확인한 결과로, 도 1A는 0, 1, 5 및 10 μ M 농도의 4-PG를 12시간 동안 대식세포인 RAW264.7에 처리한 후 헵 옥시게나아제-1(HO-1) mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 1B는 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 1C는 10 μ M 농도의 4-PG를 0, 2, 4, 8, 및 12시간 동안 대식세포인 RAW264.7에 처리한 후 헵 옥시게나아제-1(HO-1) mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 1D는 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 단백질을 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 2는 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)에 의해 유도된 헵 옥시게나아제-1(HO-1)의 발현 증가에 따른 항염증 효과를 확인한 결과로, 도 2A는 대식세포인 RAW264.7에 4-PG 10 μ M를 처리하여 6시간 동안 배양시키고, LPS 100ng/ml를 4시간 동안 처리한 후 염증성 사이토카인 및 HO-1 mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 2B는 상기 과정에 따라 4-PG 및 LPS 처리된 RAW264.7 세포에서 HO-1 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 2C는 레스베라트롤의 유사물질인 테로스틸빈(PTER)과 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 HO-1 유도 효과를 비교하기 위해, RAW264.7 세포에 4-PG 또는 PTER을 각각 10 μ M 처리하여 6시간 동안 배양시키고 LPS 100ng/ml를 4시간 동안 처리한 후 HO-1 mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 2D는 4-PG의 항염증 작용이 HO-1 매개에 의한 것인지 확인하기 위해, RAW264.7 세포에 siRNA를 주입시켜 HO-1의 발현을 억제시키고, 4-PG 10 μ M 처리하여 6시간 동안 배양시키고 LPS 100ng/ml를 4시간 동안 처리한 후 HO-1 mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 2E 상기 과정으로 4-PG 및 LPS 처리된 RAW264.7 세포에서 ELISA 분석을 수행하여 염증성 사이토카인 TNF- α 의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 3은 급성폐손상모델에서 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 항염증 효과를 확인한 결과로, 도 3A, 3B 및 3C는 Balb/c 야생형과 HO-1이 결핍된 마우스에 4-PG 10mg/kg 또는 PTER 10mg/kg을 복강 내 주사로 4일 동안 투여하고, LPS 2.5mg/kg를 비강 내에 투여한 후 24시간 후에 PBS를 넣어 기관지 폐포를 세척한 유체(BAL fluid)를

수집하고 ELISA를 수행하여 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL- β 1의 발현 수준변화를 확인한 결과이며, 도 3D는 상기 과정으로 처리된 동물모델의 폐조직을 수집하여 HO-1 단백질 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 3E는 폐조직에서 TNF- α 발현 수준을 확인한 ELISA 분석 결과이다.

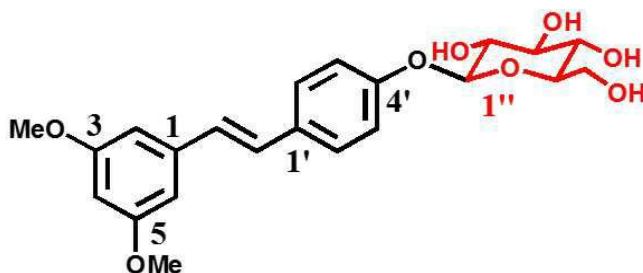
도 4는 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG) 처리에 따른 트리스테트라폴린(TTP) 발현 수준 변화를 확인한 결과로, 도 4A는 대식세포인 RAW 264.7에 0, 1, 5, 10 및 20 μ M 농도의 4-PG 또는 10 μ M 테로스틸빈(PTER)을 12시간 처리하여 농도의존적으로 TTP mRNA 발현 수준 변화를 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 4B는 4-PG 농도의존적으로 TTP mRNA 발현 수준 변화를 확인한 실시간 RT-PCR 결과이며, 도 4C는 4-PG 농도의존적으로 TTP 단백질 발현 수준 변화를 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 4D는 10 μ M 농도의 4-PG를 0, 2, 4, 8 및 12 시간 동안 처리하여 시간의존적으로 TTP mRNA 발현 수준 변화를 확인한 RT-PCR 결과, 도 4E는 처리 시간의존적으로 TTP mRNA 발현 수준 변화를 확인한 real-time RT-PCR 결과이며, 도 4F는 처리 시간의존적으로 TTP 단백질 발현 수준 변화를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다(n=3). *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. cells without treatment.

도 5는 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)에 의해 유도된 트리스테트라폴린(TTP)의 발현 증가에 따른 항염증효과를 확인한 결과로, 도 5A는 대식세포인 RAW264.7에 4-PG 10 μ M를 처리하여 6시간 동안 배양시키고, LPS 100ng/ml을 4시간 동안 처리한 후 IL-6, TNF- α , TTP 및 GAPDH mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과이며, 도 5B 및 5C는 상기 과정에 따라 4-PG 및 LPS 처리된 RAW264.7 세포의 배양액에서 IL-6 및 TNF- α 수준을 확인한 ELISA 결과이며, 도 5D는 24시간 도동안 RAW264.7 세포에 scRNA 또는 TTP siRNA를 형질주입시키고 4-PG 10 μ M를 처리하여 6시간 동안 배양시키고, LPS 100ng/ml을 4시간 동안 처리한 후 TTP 및 TNF- α mRNA 발현 수준을 확인한 실시간 RT-PCR 결과이다(n=3). **: p<0.01, ***: p<0.001, and ns: not significant.

도 6은 염증성 장질환 모델에서 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 항염증 효과를 확인한 결과로, 도 6A는 10주령 야생형 생쥐(WT mice)와 TTP 발현이 억제된 생쥐(TTP KO mice)에 DSS(3%, w/v) 및 4-PG(10mg/kg)를 함께 또는 단독으로 7일 동안 처리 후 4-PG 처리군 및 DSS+4-PG 처리군 생쥐에 4-PG를 3일 동안 추가로 복강주사하고 처리 10일 후 각 처리군 생쥐들을 안락사시킨 후 맹장에서 항문까지의 결장을 수집하여 촬영한 이미지이며, 도 6B는 각 처리군의 결장 길이를 나타낸 그래프이며, 도 6C는 대장 조직을 절제하고 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 수행한 결과이며, 도 6D는 대장 조직에서 myeloperoxide 발현을 통하여 대장 내로 호중성 백혈구 침입을 확인한 결과이며, 도 6E 및 6F는 생쥐 혈청 내 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 단백질 발현 수준을 확인한 ELISA 분석결과이다(n=6). *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, 및 ns: not significant.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드(pterostilbene 4'-glucoside)를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0015] 상기 테로스틸벤 4'-글루코시드는 헴 옥시게나아제-1(HO-1) 또는 트리스테트라폴린(TTP)의 발현을 유도할 수 있다.
- [0016] 보다 상세하게는 하기 화학식 1과 같은 테로스틸벤 4'-글루코시드가 헴 옥시게나아제-1 또는 트리스테트라폴린의 발현을 유도하여 항염증 효과를 나타낼 수 있다.
- [0017] [화학식 1]



- [0018]
- [0019] 본 발명의 일실시예에 따르면, 대식세포인 RAW264.7에 4-PG 10 μ M를 처리하여 6시간 동안 배양시키고, LPS 100ng/ml을 4시간 동안 처리한 후 염증성 사이토카인 및 HO-1 발현 수준을 확인한 결과, 도 2A 및 2B와 같이 4-PG와 LPS가 함께 처리된 실험군에서 HO-1의 mRNA 및 단백질의 발현 수준이 증가되었으며, LPS에 의해 유도되는

염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

- [0020] 또한, 상기 동일한 방법으로 RAW264.7 세포에 4-PG 10 μ 및 LPS 100ng/ml를 처리한 후 TTP의 발현 수준과 염증성 사이토카인 TNF- α 및 IL-6의 발현 수준을 확인한 결과, 도 5A 내지 5C와 같이 4-PG가 처리된 실험군에서는 4-PG가 처리되지 않은 대조군보다 TTP의 발현 증가가 확인되었으며, LPS에 의해 증가된 사이토카인의 mRNA 및 단백질 수준의 역시 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0021] 상기 결과로부터 4-PG는 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 또는 트리스테트라폴린(TTP)의 발현 증가를 유도하여 LPS 자극에 의해 유도된 염증성 사이토카인 감소에 탁월한 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 테로스틸벤-4'-글루코시드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 효과적인 염증성 질환 치료제로 사용될 수 있다.
- [0022] 상기 염증성 질환은 폐렴, 대장염, 염증성 장염 및 궤양성 장염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0023] 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 테로스틸벤-4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구체예에서, 테로스틸벤-4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 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, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0028] 상기 테로스틸벤-4'-글루코시드의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 본 발명은 테로스틸벤 4'-글루코시드를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.
- [0031] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 본 발명에 따른 테로스틸벤 4'-글루코시드 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0032] 상기 건강식품에 함유된 테로스틸벤 4'-글루코시드의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할

수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0033] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0037] 하기의 참조예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 참조예를 제공하기 위한 것이다.

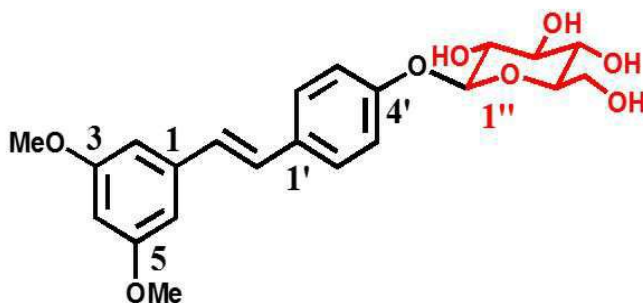
[0039] <참조예> 시약 및 화학물질

[0040] 하기 화학식 1의 테로스틸벤 4'-글리코시드(4-PG)를 오카야마 대학 생명과학과에서 얻었으며, 테로스틸벤(Pterostilbene; Pter)은 Tokyo Chemical Industry (TCI, Japan)에서 구입하였다. 4-PG 및 Pter을 DMSO에 용해시켰으며, 모든 실험에서 0.1% 또는 이 보다 적은 농도의 DMSO를 대조군으로 사용하였다.

[0041] 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharides; LPS) 및 트리테트라프롤린(tristetraprolin; TTP) 항체를 Sigma Aldrich (USA)에서 구입하였으며, β -액틴을 Cell Signaling에서 구입하였다.

[0042] DSS(Dextran sulfate sodium)를 MP Biomedicals에서 구입하여 사용하였다.

[0043] [화학식 1]



[0044]

[0045] 하기의 실험예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0047] <실험예 1> 세포 및 동물

[0048] 생쥐 대식세포인 RAW264.7을 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0049] BALB/c HO-1 KO 생쥐를 Dr. Mark A. Perrella (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA)에게서 제공받아 울산대학교 동물실험실 내 무균시설에서 사육하였다.

[0051] <실험예 2> RT-PCR

[0052] 제조사의 설명서에 따라 TRIzol reagent (Invitrogen)를 이용하여 세포로부터 전체 RNAs를 추출하였다. 전체 RNAs로 M-MLV 역전사효소 및 dT(oligo)를 이용하여 cDNA를 제작하였다. PCR 시스템에서 상기 제작된 cDNA를 이용하여 GAPDH, HO-1, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 증폭시켰다.

- [0054] <실험예 3> 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay)
- [0055] 프로테아제 및 포스파타아제 억제제가 포함된 용해 버퍼를 이용하여 세포를 용해시키고, BCA protein assay reagent (Pierce)를 이용하여 단백질 함량을 측정하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 분해하고, PDVF 막으로 옮긴 후 각 일차 항체를 적당하게 희석하여 반응시켰다.
- [0057] <실험예 4> ELISA 분석
- [0058] 4-PG 10 μ M을 6시간 동안 처리한 후 LPS 100ng/ml을 4시간 동안 처리하여 배양한 RAW264.7 세포의 배지 상층액과 안락사시킨 마우스로부터 수집된 혈청에서 TNF- α 및 IL-6 단백질 수준을 BioLegend MAXTM ELISA kits (BioLegend, San Diego, USA)를 이용하여 확인하였다.
- [0060] <실시예 1> 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 발현 유도를 통한 급성폐손상 치료 효과 확인
- [0061] 1. 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 발현 유도 확인
- [0062] 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 발현 유도 효과를 확인하기 위해, RAW264.7 세포에 0, 1, 5 및 10 μ M 4-PG를 0, 2, 4, 8 및 12 시간 동안 처리한 후 HO-1 발현 수준을 RT-PCR과 웨스턴 블롯으로 확인하였다.
- [0063] 그 결과, 도 1과 같이 4-PG의 처리농도 및 처리시간 의존적으로 HO-1의 mRNA와 단백질 발현 증가가 나타났으며, 특히 10 μ M 4-PG를 12시간 처리한 경우 HO-1가 가장 많이 발현되었다.
- [0064] 상기 결과로부터 4-PG는 대식세포의 HO-1 발현을 효과적으로 유도하는 것이 확인되었다.
- [0066] 2. 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 발현 유도에 따른 항염증 효과 확인
- [0067] 앞선 실험에서 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)에 의한 헵 옥시게나아제-1(HO-1) 발현 유도가 확인됨에 따라, 4-PG 처리에 의해 항염증 효과가 나타날 수 있는지 확인하였다.
- [0068] 먼저, RAW264.7 세포에 4-PG 10 μ M를 처리하여 6시간 동안 배양시키고, LPS 100ng/ml을 4시간 동안 처리한 후 염증성 사이토카인 및 HO-1 발현 수준을 확인하였다.
- [0069] 그 결과, 도 2A 및 2B와 같이 4-PG와 LPS가 함께 처리된 실험군에서 HO-1의 mRNA 및 단백질의 발현 수준이 증가된 반면, LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현은 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0070] 상기 결과로부터 4-PG는 LPS 자극에 의해 유도된 염증성 사이토카인 감소에 탁월한 효과를 나타내는 것이 확인되었다.
- [0071] 한편, 레스베라트롤의 유사물질인 테로스틸빈(PTER)과 테로스틸벤-4'-글루코시드(4-PG)의 HO-1 유도 효과를 비교하기 위해, RAW264.7 세포에 4-PG 또는 PTER을 각각 10 μ M 처리하여 6시간 동안 배양시키고 LPS 100ng/ml를 4시간 동안 처리한 후 HO-1의 발현 정도를 확인하였다.
- [0072] 그 결과, 도 2C와 같이 4-PG가 처리된 세포에서 PTER 보다 HO-1 발현 수준이 향상된 것을 확인할 수 있었다.
- [0073] 상기 결과로부터 확인된 4-PG의 항염증 작용이 HO-1 매개에 의한 것인지 확인하기 위해, RAW264.7 세포에 siRNA를 주입시켜 HO-1의 발현을 억제시키고, 4-PG 10 μ M 처리하여 6시간 동안 배양시키고 LPS 100ng/ml를 4시간 동안 처리한 후 ELISA 분석을 수행하여 염증성 사이토카인 TNF- α 의 발현 수준을 확인하였다.
- [0074] 그 결과, 도 2D 및 2E와 같이 HO-1의 발현이 억제된 세포에서는 4-PG 처리에도 염증성 사이토카인 TNF- α 의 수준이 감소되지 않은 반면, 4-PG 처리에 의해 HO-1의 발현이 유도된 세포에서는 효과적으로 TNF- α 의 발현 감소가 나타났다.

- [0075] 상기 결과로부터 4-PG의 항염증 작용은 HO-1의 발현을 유도함으로써, 항염증 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 테로스틸벤-4'-글루코시드(4-PG)는 염증성 질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0077] 3. 급성폐손상모델에서 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 항염증 효과 확인
- [0078] 앞선 실험에서 확인된 바와 같이 HO-1의 발현 유도를 통한 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 항염증 효과를 급성폐손상 동물모델에서 확인하였다.
- [0079] 먼저, Balb/c 야생형과 HO-1이 결핍된 마우스에 4-PG 10mg/kg 또는 PTER 10mg/kg을 복강 내 주사로 4일 동안 투여하고, 급성폐손상모델을 만들기 위해 LPS 2.5mg/kg를 비강 내에 투여한 후 24시간 후에 PBS를 넣어 기관지 폐포를 세척한 유체(BAL fluid) 및 폐를 수집하고 ELISA를 수행하여 염증성 사이토카인의 수준을 확인하였다.
- [0080] 그 결과, 도 3A 내지 도 3C와 같이 4-PG가 처리된 야생형 급성폐손상모델에서 수집된 유체에서는 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 수준이 감소한 반면, HO-1이 결핍된 마우스에서는 4-PG 처리에도 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 감소가 나타나지 않았다.
- [0081] 또한, PTER가 처리된 급성폐손상모델과 4-PG가 처리된 급성폐손상모델의 유체에서 HO-1 발현 수준을 확인한 결과, 도 3D 및 도 3E와 같이 PTER 처리군 보다 4-PG 처리군에서 더 많은 HO-1 발현이 유도되었으며, 염증성 사이토카인 TNF- α 의 수준 역시 PTER 처리군보다 4-PG 처리군에서 탁월한 감소 효과를 나타내었다.
- [0082] 상기 결과로부터 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)는 급성폐손상 모델에서 레스베라트롤 유사물질인 테로스틸빈(PTER)보다 우수한 HO-1 발현 유도 및 항염증 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 테로스틸벤-4'-글루코시드(4-PG)는 급성폐손상 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0084] **<실시예 2> 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 트리스테트라폴린(Tristetraprolin; TTP) 발현 유도를 통한 염증성 장질환 치료 효과 확인**
- [0086] 1. 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 트리스테트라폴린(TTP) 발현 유도 확인
- [0087] 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 트리스테트라폴린(TTP) 발현 유도 효과를 다양한 처리농도 및 처리시간으로 확인하였다.
- [0088] 먼저, 대식세포인 RAW 264.7에 0, 1, 5, 10과 20 μ M 농도의 4-PG를 12시간 처리하여 농도의존적으로 TTP의 발현 수준을 확인한 결과, 도 4A 내지 4C와 같이 4-PG 처리 농도의존적으로 TTP의 mRNA 및 단백질 발현 수준의 증가가 나타났다.
- [0089] 또한, 10 μ M 농도의 4-PG를 0, 2, 4, 8 및 12 시간 동안 처리하여 시간의존적으로 TTP의 발현 수준을 확인한 결과, 도 4D 내지 4F와 같이 4-PG 처리 시간의존적으로 TTP의 mRNA 및 단백질 발현 수준의 증가가 나타났다.
- [0090] 상기 결과로부터 4-PG를 10 μ M 농도로 12시간 처리했을 때 TTP가 가장 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0091] 한편, 테로스틸벤 4'-글루코시드와 항염증, 항산화와 항암 효과를 나타내는 테로스틸빈(PTER)의 TTP의 발현 유도 수준을 비교하기 위해, 두 약물을 각각 10 μ M 농도로 RAW 264.7에 12시간 처리하고 TTP의 발현 수준을 확인하였다.
- [0092] 그 결과, 도 4G와 같이 테로스틸빈이 처리된 대조군보다 4-PG가 처리된 실험군에서 TTP의 mRNA 및 단백질의 발현이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0094] 2. 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 트리스테트라폴린(TTP) 발현 유도에 따른 항염증 효과 확인
- [0095] 앞선 실험에서 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)에 의해 트리스테트라폴린(TTP) 발현 유도가 확인됨에 따라, 4-PG에 의해 항염증 효과가 나타날 수 있는지 확인하였다.
- [0096] 먼저, RAW264.7 세포에 4-PG 10 μ M을 6시간 전처리하고 LPS 100ng/ml를 4시간동안 처리한 후 TTP의 발현 수준과 염증성 사이토카인 TNF- α 및 IL-6의 발현 수준을 확인하였다.

- [0097] 그 결과, 도 5A 내지 5C와 같이 4-PG가 처리된 실험군에서는 4-PG가 처리되지 않은 대조군보다 TTP의 발현이 증가되었으며, LPS에 의해 증가된 사이토카인의 mRNA 및 단백질 수준의 역시 현저한 감소가 확인되었다.
- [0098] 상기 실험결과로부터 확인된 4-PG의 항염증 작용이 TTP 발현 유도에 의한 것인지를 확인하기 위해, RAW264.7 세포에 TTP siRNA를 형질주입시켜 TTP의 발현을 억제시키고 앞선 실험과정과 동일하게 4-PG 10 μ M을 6시간 전처리 하고 LPS 100ng/ml를 4시간 동안 처리한 후 염증성 사이토카인 TNF- α 의 발현 수준을 확인하였다.
- [0099] 그 결과, 도 5D 및 5E와 같이 4-PG는 LPS에 의해 증가된 TNF- α 의 mRNA 발현을 감소시켰으나, TTP의 발현이 억제된 실험군에서는 4-PG 처리에도 염증성 사이토카인의 감소가 나타나지 않았다.
- [0100] 상기 결과로부터 4-PG는 TTP의 발현을 유도함으로써, 항염증 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)는 염증성 질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0102] 3. 염증성 장질환 모델에서 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)의 항염증 효과 확인
- [0103] 앞선 실험에서 확인된 바와 같이 트리스테트라폴린(TTP) 발현 유도를 통한 테로스틸벤-4'-글루코시드(4-PG)의 항염증 효과를 염증성 장질환 동물모델에서 확인하였다.
- [0104] 먼저, 급성 장질환 동물모델을 만들기 위하여 10주령 야생형(WT) 생쥐와 TTP 발현이 억제된 생쥐에 DSS(3%, w/v) 및 4-PG(10mg/kg)를 함께 또는 단독으로 7일 동안 처리 후 각 그룹의 생쥐에 4-PG를 3일 동안 추가로 복강 주사 후 생쥐에서 결장부위를 수집하여 결장길이를 확인하였다.
- [0105] 그 결과, 도 6A 및 6B와 같이 DSS가 단독으로 처리된 WT 생쥐군보다 DSS+4-PG가 처리된 WT 생쥐군의 결장 길이(colon length, DSS: 4.70 $\pm$ 0.10 cm vs. DSS+4-PG: 5.55 $\pm$ 0.15 cm)가 덜 감소된 반면, TTP 발현이 억제된 생쥐군에서는 4-PG 처리에도 결장길이 회복이 나타나지 않았다(colon length, DSS: 4.55 $\pm$ 0.15 cm vs. DSS+4-PG: 4.85 $\pm$ 0.05 cm).
- [0106] 또한, 각 생쥐군들의 조직학적 변화를 확인하기 위해, 각 실험군의 생쥐에서 수집된 결장을 H&E 염색하였다.
- [0107] 그 결과, 도 6C와 같이 WT 생쥐군에서는 DSS에 의해 상피 소낭(epithelial crypts)이 사라지고, 점막부위로 여러 염증세포가 축적된 것이 확인되었으나, 4-PG 처리된 WT 생쥐군에서는 DSS에 의해 유도된 점막 및 상피세포의 손상이 완화된 것이 확인되었다. 또한, TTP 발현이 억제된 생쥐군에서는 4-PG 처리에도 DSS에 의해 유도된 점막 및 상피세포의 손상이 개선되지 않았다.
- [0108] 한편, 염증세포가 결장조직에 얼마만큼 침투되는지 확인하기 위해, Mouse Myeloperoxidase DuoSet kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 MPO(Myeloperoxidase) 효소 활성을 결장 조직에서 확인하였다.
- [0109] 그 결과, 도 6D와 같이 WT 생쥐군에서 DSS에 의해 증가된 MPO 활성이 4-PG 처리에 의해 현저하게 감소된 반면, TTP가 발현 억제된 생쥐군에서 4-PG 처리에도 MPO 활성 감소가 나타나지 않았다.
- [0110] 마지막으로 4-PG 처리에 따른 염증성 사이토카인 TNF- α 및 IL-6 발현 수준을 ELISA 분석으로 확인하였다.
- [0111] 그 결과, 도 6E 및 6F와 같이 4-PG 처리된 WT 생쥐군에서는 DSS에 의해 증가된 TNF- α 와 IL-6의 발현 수준이 효과적으로 감소하였지만 TTP 발현이 억제된 생쥐군에서는 4-PG의 항염증효과가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0112] 상기 결과로부터 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)는 염증성 장질환 동물모델에서 트리스테트라폴린(TTP) 발현을 유도하여 항염증 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 테로스틸벤 4'-글루코시드(4-PG)는 염증성 장질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0114] 이하, 본 발명의 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0116] <제제예 1> 주사제의 제조
- [0117] 테로스틸벤 4'-글루코시드 10 mg, 소듐 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및

주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ml이 되도록 제조한 후, 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0118] <제제예 2> 정제의 제조

[0119] 테로스틸벤 4'-글루코시드 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0120] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0121] 테로스틸벤 4'-글루코시드 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0123] 이하, 본 발명에 따른 플라스마로젠 또는 이의 유사체를 이용한 건강식품 제조예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아니라 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0125] <제조예 1> 건강식품의 제조

[0126] 테로스틸벤 4'-글루코시드 10 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 µg, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B 1 0.13 mg, 비타민 B 2 0.15 mg, 비타민 B 6 0.5 mg, 비타민 B 12 0.2 µg, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 µg, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 µg, 판토텐산 칼슘 0.5 mg), 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

[0128] <제조예 2> 건강음료의 제조

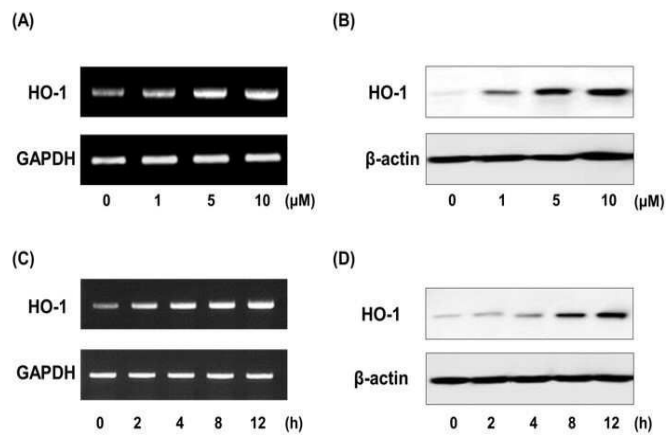
[0129] 테로스틸벤 4'-글루코시드 10 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g 및 정제수를 가하여 전체 900 ml가 되도록 하며, 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다.

[0130]

[0131] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

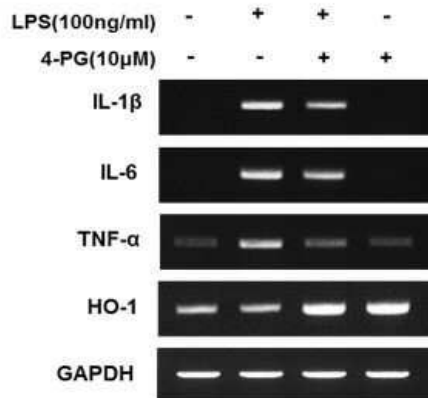
도면

도면1

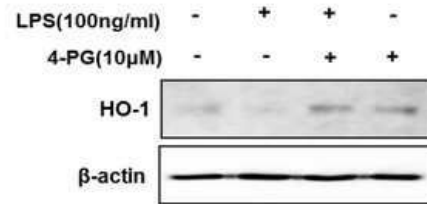


도면2

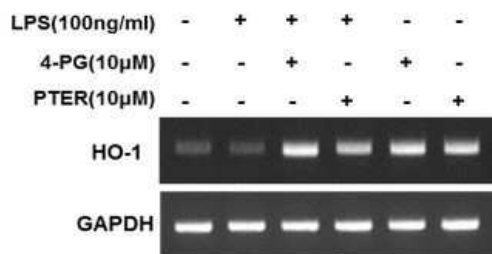
(A)



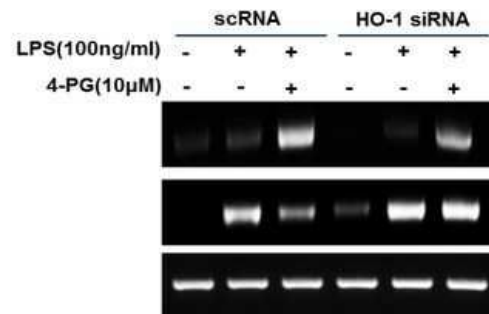
(B)



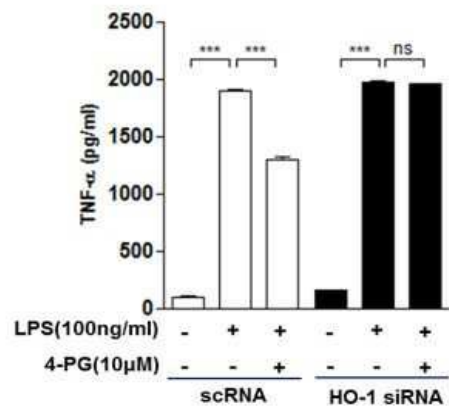
(C)



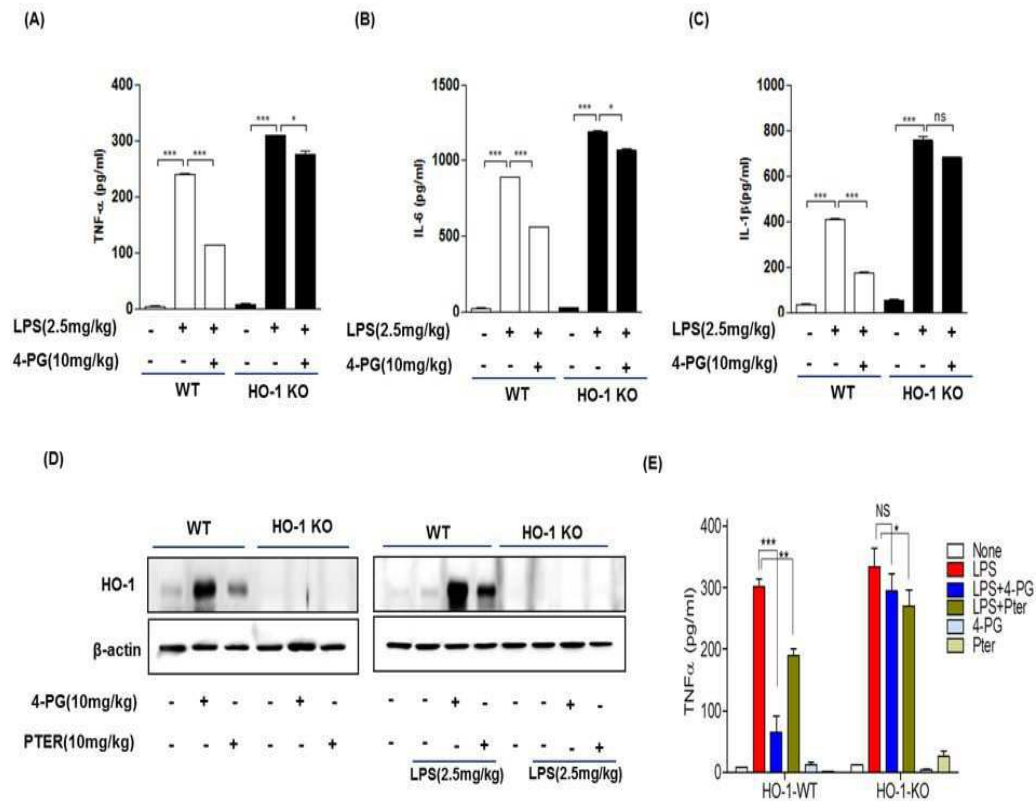
(D)



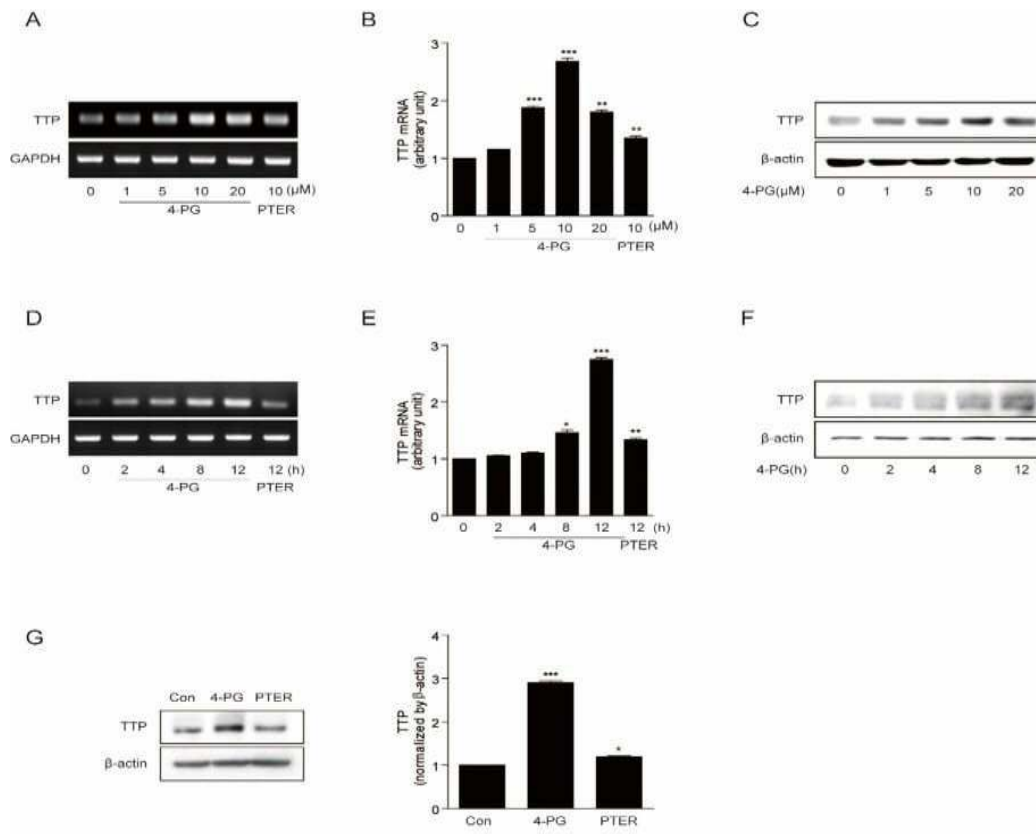
(E)



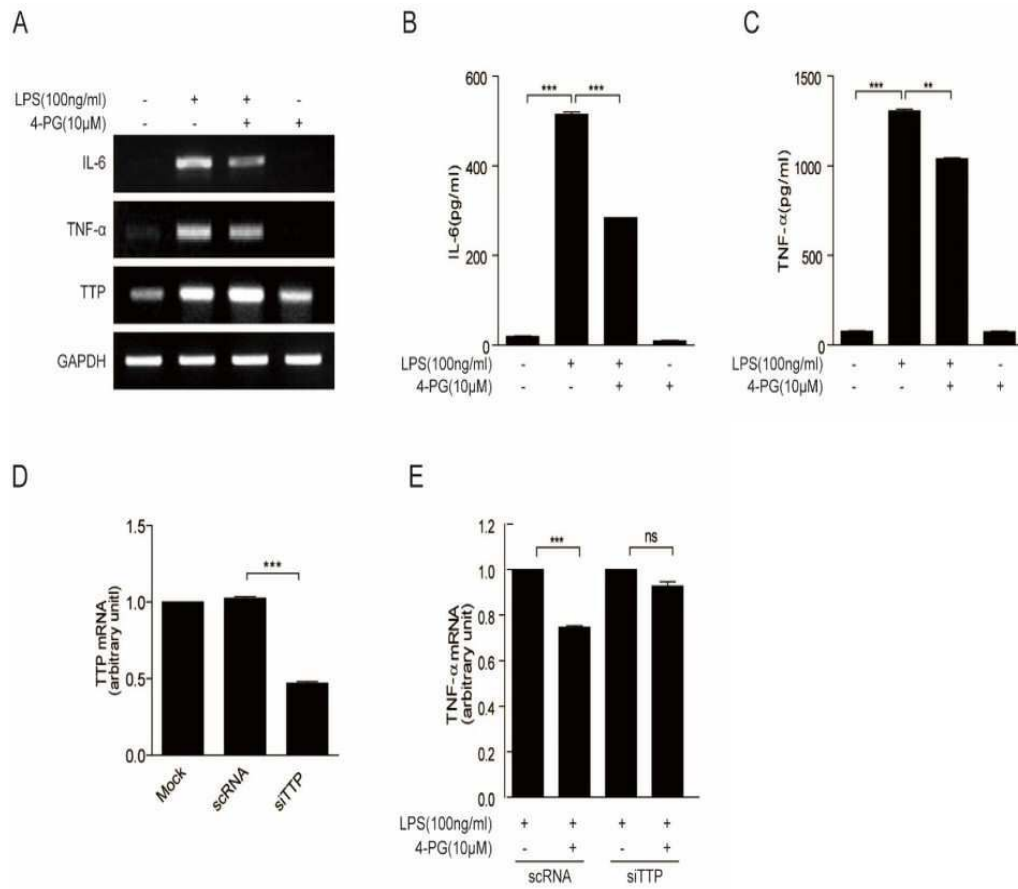
도면3



도면4



도면5



도면6

