



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0091604
(43) 공개일자 2013년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/045 (2006.01) *A61K 31/05* (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0013012

(22) 출원일자 2012년02월08일

심사청구일자 2013년03월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김지영

서울특별시 서초구 잠원동 신반포한신아파트 306동 1204호

김성환

경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교국제캠퍼스 생명과학대학 309호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

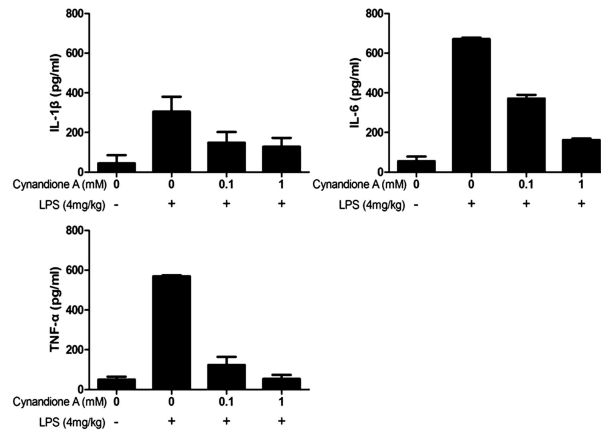
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 시난디온 A를 포함하는 항염증용 조성물

(57) 요약

본 발명은 시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 약제학적 조성물, 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 화장품 조성물, 및 의약품 조성물, 및 염증성 질환의 치료방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 염증 매개 인자인 NO, iNOS, PEG₂, COX-2, IL-6 및 IL-1 β 등의 생성 억제 활성이 우수하여, 염증성 질환에 탁월한 효과가 있으며, 독성을 나타내지 않는 바, 염증성 질환의 예방, 개선, 또는 치료를 위한 안전한 제제로서 유용하게 사용될 수 있다

대표도 - 도14



(72) 발명자

이상민

경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교국제캠퍼스 생명과학대학 309호

박지혜

경기도 수원시 영통구 영통동 1029-5번지 401호

박근형

경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교국제캠퍼스 생명과학대학 309호

백남인

경기도 수원시 영통구 망포동 쌍용아파트 104동 2001호

이태훈

경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교국제캠퍼스 생명과학대학 309호

특허청구의 범위

청구항 1

시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 염증성 질환을 예방 또는 치료하는데 사용되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 동맥경화, 아토피성 피부염, 부종, 전신성 홍반성 루푸스, 경피증, 궤양성 대장염, 건선, 아나필락시스, 피부염, 당뇨병성 망막증, 망막염, 황반 변성, 포도막염, 결막염, 관절염, 강직성 척추염, 골관절염, 골다공증, 알레르기, 당뇨, 당뇨병성 신장병, 신염, 신장염, 쇼그렌 증후군, 크론씨 병, 자가 면역 췌장염, 치주질환, 천식, 이식편 대 숙주 질환, 만성 골반 염증 질환, 자궁내막염, 비염, 편도염, 중이염, 인후염, 방광염 및 만성 전립선염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환인 것인 약제학적 조성물.

청구항 4

시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 7

시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 염증성 질환의 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 염증성 질환 치료방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 약제학적 조성물, 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 화장품 조성물, 및 의약품 조성물, 및 염증성 질환의 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증반응은 조직의 손상, 외부의 자극 또는 다양한 감염원에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 혈관과 체액 내의 각종 염증 매개 인자 및 다양한 면역 세포의 유기적 상호작용으로 인한 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 세포 침윤 및 체액 삼출, 순환 장애, 조직의 변질 및 과증식 등 일련의 복합적인 병리 현상이다. 염증반응의 과정은 초기에 대식세포가 상처부위로 모여들어 침입한 세균을 공격한 후, 상처부위에 혈장이 축적되고 혈류가 증가되어 발열, 홍반, 부종, 통증 현상 등의 외적 증상이 일어나게 된다. 이러한 염증 반응이 지속적으로 또는 과도하게 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상(과민성 알러지 질환, 만성 염증 질환)으로 진행되며, 심각한 이상 장애를 초래하게 된다.

[0003] 대부분의 염증 질환의 치료제로서 널리 사용되고 있는 제제인 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDS)는 시클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)라고 하는 아라키돈산(arachidonic

acid)로부터 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성에 관여하는 효소 활성을 억제함으로써, 항염증 작용을 나타내는데, 주 치료작용 외에 위장관 장애, 간장애, 신장애 등의 심각한 부작용을 야기하므로 장기간의 사용에 있어서 제약이 따르는 실정이다. 따라서, 부작용이 거의 없어 장기간 사용하는데 무리가 없으면서 항염증 효능에 탁월한 새로운 소염 진통제의 개발이 널리 요구되고 있다.

[0004] 생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있다. 대식세포(Macrophage)는 다양한 기능을 가진 세포로, 화학적 자극에 의하여 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 산화질소(NO)를 생성하여 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 염증반응의 결과로서, iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의해 생성된 산화질소의 상기 생리학적 농도(Supraphysiological concentrations)가 다양한 염증 질환의 병리생물학에 있어서 역할을 하고 있다(Kobayashi Y. et al., J Leukoc Biol., 88, pp1157-62, 2010). 염증반응의 유도 물질들 중에서 LPS(lipopolysaccharide)는 백혈구와 같은 면역세포와 상호작용을 하며, 단핵세포의 대식세포들에 있어서 iNOS 이소 형태의 활성화에 의한 산화질소 농도의 증대에 의한 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 하고 있다(Korhonen R. et al., Curr Drug Targets Inflamm Allergy., 4, pp471-79, 2005). LPS는 그람 음성 세균의 외막(outer membrane)에 존재하는 엔도톡신(endotoxin)이며, TLR4(tolllike receptor 4)와의 결합은 IL-6(interleukin-6) 및 케모카인(chemokines) 등 많은 사이토카인 유전자의 활성화를 이끄는 신호전달을 개시하고, 이는 그 부분의 염증을 유도한다. 특히 인터페론 γ , TNF- α 와 같은 사이토카인 자극에 의해 발현되는 유터성 질소산화물 합성효소(iNOS)는 장시간 동안 다량의 질소산화물(NO)을 생산한다. 이러한 산화적 스트레스는 I κ B에 의하여 억제되어 있는 염증 반응의 전사인자인 NF κ B 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 활성화된 NF κ B는 핵으로 이동하여 iNOS, IL-1 β 나 TNF- α 와 같은 여러 종류의 사이토카인 등 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 이들 인자들을 저해하면 염증 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다(Karin M. et al., Cold Spring Harb Perspect Biol., 1, pp1-14, 2009).

[0005] 최근 연구에 따르면, NO는 세 가지 주요한 NOS 이성질체(isoform)인 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)에 의해 아르기닌(arginine)으로부터 생성되는 자유라디칼이다. nNOS와 eNOS는 Ca²⁺/칼모듈린(calmodulin)에 의해 조절되지만, iNOS는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), LPS와 같은 염증성 자극에 의해 전사 수준에서 조절된다. nNOS나 eNOS에 의해 수초 내에 소량 생성된 NO는 혈관확장, 신경전달, 병원체에 대한 세포과피 등과 같은 정상적인 생리기능을 담당하지만, 대식세포에서 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성하고 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히고, 염증성 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 전사인자인 NF κ B를 활성화시켜 염증반응, 암, 동맥경화 등 만성질환에 관련하는 것으로 알려져 있다. (Korhonen et al., Current Drugs Target, 4, p471-479, 2005; T. J. Guzik et al., Journal of Physiology and Pharmacology, 4, p469-487, 2003).

[0006] NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관 확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 NO를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. iNOS의 발현은 NF- κ B 활성으로 유도되며 이는 대식세포에서 LPS나 사이토카인(cytokine)에 의해 염증성 매개물질이 과잉 생산되는 중요한 매커니즘이 된다. 따라서, iNOS 활성 억제제의 개발은 상기 질병의 치료제로서 개발 가능성이 높으며, 또한 이러한 관점에서 iNOS에 의한 NO 생성을 억제하는 화합물은 인체의 다양한 염증질환의 치료제로 사용될 수 있다.

[0007] 또 다른 염증유발물질인 PGE₂, PGF_{2 α} 그리고 PGI₂와 같은 프로스타글란딘은 아라키돈산(arachidonic acid)에서 유래한 일종의 호르몬으로 다양한 생리활성에 관여하고 상기 호르몬의 율속효소인 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, COX)에 의해 발현이 조절된다. COX의 활성을 저해하여 프로스타글란딘의 합성을 저해하는 아스피린 인도메타신 같은 비스테로이드성 소염진통제는 관절염에 우수한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0008] 한편, TNF- α 는 BCG, LPS 및 염증유발인자에 의해 활성화된 대식세포와 섬유아세포 등에서 생산되어 세포 살상 효과, 프로스타글란딘 및 IL-1, IL-6와 같은 사이토카인(cytokine)의 생산을 유도한다. 종양괴사인자로 발견된 TNF- α 는 류마티스 관절염, 장기이식거부반응 등의 자가면역질환, 천식, 아토피성피부염 등의 알러지성 염증질환 및 폐혈증, 급성간질환 등의 급성면역질환 등에 대한 관련성이 보고되면서 TNF- α 의 합성을 억제하는 화합물에 대한 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0009] 다음으로 ICAM-1, VCAM-1을 포함한 세포 부착 분자(CAM)는 혈관내피세포 표면에서 발현되는 세포부착물질군의 대표적인 단백질이며, 염증반응시에 발현량이 급속히 진행되어 혈류중의 면역세포들이 염증발생부위에 흡착하게

되며 이는 염증반응의 증폭작용에 중요한 작용을 한다. 또한 최근 연구결과에 의하면, 염증반응에 있어서 ICAM-1, VCAM-1을 포함하는 다양한 CAM의 발현이 중요한 염증매개인자로 연구되고 있으며 이들은 염증 환자의 지표 단백질로 활용이 되고 있는 실정이다. 따라서, CAM 발현의 저해작용을 통한 항염증 및 항동맥경화 물질의 탐색 연구가 활발히 진행 중에 있다.

[0010] 한편, 시난디온 A(cynandione A)는 CCl₄에 의해 손상된 간세포 보호 효과 정도만이 연구된 상태이고, 아직까지 시난디온 A에 대한 연구는 거의 진행된 바 없다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 부작용이 없으면서 우수한 항염증 효과를 갖는 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 시난디온 A가 염증 반응에 의해 증가된 산화질소 생성을 억제하고, 각종 염증성 사이토카인, 염증 매개 인자, 및 세포 부착 분자 등의 발현을 억제함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 억제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

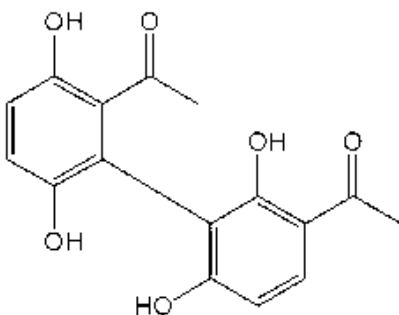
[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 시난디온 A 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 염증성 질환의 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 시난디온 A(cynandione A) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 억제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명에서 시난디온 A(cynandione A)는 하기 화학식 1의 화합물로 표기될 수 있다. 시난디온 A는 일반적인 화학 합성에 의해 수득되거나, 천연물로부터 분리되거나, 또는 판매되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

화학식 1



[0019]

- [0020] 본 발명에서 시난디온 A의 염은 약학적으로 허용가능한 염으로서, 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다.
- [0021] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마르산, 글루코산, 메탈설포산, 아세트산, 글리콜산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔 설포산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 의한 부가염은 통상의 방법, 즉, 시난디온 A를 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 당량 또는 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조하거나, 또는 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조하거나 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 시난디온 A의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 동일한 효능을 나타내는 용매화물, 수화물 및 입체 이성질체도 모두 발명의 범주 내로 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 시난디온 A에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 조성물은 염증성 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명에서, 용어 "염증"이란 외부 감염원 (박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발 물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 의미할 수 있으며, "염증성 질환"이란 상기와 같은 염증을 동반하는 질병을 의미한다.
- [0027] 상기 염증성 질환은 염증 반응과 관련 있는 질병이라면 제한되지 않으며, 예를 들어, 류마티스 관절염, 동맥경화, 아토피성 피부염, 부종, 전신성 홍반성 루푸스, 경피증, 궤양성 대장염, 건선, 아나필락시스, 피부염, 당뇨병성 망막증, 망막염, 황반 변성, 포도막염, 결막염, 관절염, 강직성 척추염, 골관절염, 골다공증, 알레르기, 당뇨, 당뇨성 신장병, 신염, 신장염, 쇼그렌 증후군, 크론씨 병, 자가 면역 췌장염, 치주질환, 천식, 이식편 대 숙주 질환, 만성 골반 염증 질환, 자궁내막염, 비염, 편도염, 중이염, 인후염, 방광염, 또는 만성 전립선염 등일 수 있다. 바람직하게는, 류마티스 관절염, 동맥경화, 또는 아토피성 피부염 일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에서는 시난디온 A가 염증을 유도하는 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 증가된 산화질소(NO)의 생성을 저해하고, 염증 유발인자인 프로스타글란딘, iNOS, COX-2의 유전자 및 단백질 발현을 저해하며, 염증반응에 의해 유도된 IL-1, IL-6, TNF- α 의 유전자 발현이 저해하고, 세포 부착 분자인 ICAM-1, VCAM-1의 단백질 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 시난디온 A가 LPS로 증가된 I κ B- α 의 인산화를 저해하고, NF- κ B의 핵 내 이동을 저해하며, 핵 내의 타겟 DNA의 결합 활성을 저해할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 항염증 활성을 마우스 동물 모델에서도 확인하였으며, 특히, 시난디온 A는 항염증 활성을 나타내는 모든 범위 내에서 세포 독성을 나타내지 않는 안전한 물질임을 확인하였는 바, 시난디온 A는 부작용 없이 염증성 질환을 효과적으로 치료하고 개선할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 조성물의 투여에 의해 염증성 질환에 의한 증상을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"란 조성물의 투여에 의해 염증성 질환에 의한 증세가 호전되거나 이렇게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 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, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있

다. 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 유술제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0033] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 시난디온 A 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 염증성 질환의 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 치료방법을 제공한다.

[0034] 본 발명에서, 용어 "개체"란 염증성 질환이 이미 발병되었거나 발병될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.

[0035] 상기 염증성 질환, 예방 및 치료는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0036] 본 발명의 조성물은 기존의 염증성 질환의 치료제와 병행하여 투여할 수 있으며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0037] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0038] 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 염증의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품 조성물에 첨가할 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 15 중량부 이하, 보다 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 조성물을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있으며, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품을 포함할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨과 같은 당알콜일 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 조성물 100 ml 당 바람직하게는 약 0.01 내지 0.04g, 보다 바람직하게는 0.02 내지 0.03g일 수 있다. 상기 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제 및 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제일 수 있다.

- [0042] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0043] 상기 본 발명의 식품 조성물은 염증의 예방 또는 개선을 위한 사료첨가제의 형태로 제공될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 가금류, 가축 등에게 꾸준히 섭취하게 함으로써 염증을 예방할 수 있고, 이미 발생한 염증을 치료할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 사료첨가제는 공지의 담체, 안정제 등을 포함할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 포함할 수도 있으며, 그 형상으로는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 가금류 및 가축 등에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.
- [0045] 또 다른 양태로서, 본 발명은 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0046] 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 염증의 예방 또는 개선을 목적으로 화장료 조성물에 첨가할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 상기 유화 제형으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 상기 가용화 제형으로는 유연화장수 등이 있다. 적합한 제형은 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 바이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태일 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태일 수 있다.
- [0047] 상기 화장료 조성물은 추가적으로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제, 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0048] 또 다른 양태로서, 본 발명은 시난디온 A 또는 이의 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0049] 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 염증의 예방 또는 개선을 목적으로 의약외품 조성물에 첨가할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미한다.
- [0051] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 패치, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제일 수 있다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명의 시난디온 A는 독성을 나타내지 않으며, 염증 매개 인자인 NO, iNOS, PEG2, COX-2, IL-6 및 IL-1 β

생성 억제 활성이 우수하여, 염증성 질환에 탁월한 효과가 있으므로 염증성 질환의 예방, 개선, 또는 치료를 위한 안전한 제제로서 유용하게 사용될 수 있다

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 NO 생성 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 PGE₂ 생성 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 세포독성 실험 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 혈관내피세포에 대한 시난디온 A의 세포독성 실험 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 iNOS와 COX-2 유전자 발현 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 유전자 발현 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 혈관내피세포에 대한 시난디온 A의 ICAM-1, VCAM-1, IL-1 β , IL-6, 및 TNF- α 유전자 발현 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 혈관내피세포에 대한 시난디온 A의 ICAM-1과 VCAM-1 단백질 발현 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 I κ B- α 의 인산화 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 NF- κ B 핵 내 이동 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 RAW264.7 세포에 대한 시난디온 A의 핵 내의 타겟 DNA 결합 활성 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 시난디온 A에 의한 혈관내피세포와 면역세포의 기능성 부착활성 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 14는 마우스모델에 대한 시난디온 A의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성 저해 효과를 나타낸 것이다.
- 도 15는 마우스모델에 대한 시난디온 A의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 저해 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 실시예 1: 시난디온 A (cynandione A)의 준비

- [0057] 시난디온 A(cynandione A)의 항염증 효과를 확인하기 위하여, 먼저 시난디온 A를 준비하였다. 구체적으로, 백하수오 뿌리 분말 5 kg을 80% 메탄올 수용액 10 L로 실온에서 12시간 동안 2회 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하고 감압 농축하여 메탄올 추출물(845 g)을 얻었다. 얻어진 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(3 L $\times$ 3)와 물(3 L)로 분배 추출하였고, 다시 물 층을 *n*-부탄올(3 L $\times$ 3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물(CWE, 78 g), *n*-부탄올 분획물(CWB, 91 g) 및 물 분획물(CWH, 650 g)을 얻었다. 에틸아세테이트 분획물(78 g)로부터 SiO₂ 칼럼 크로마토그래피(column chromatography(c.c.)) (ϕ 15 $\times$ 16 cm, *n*-헥산-에틸아세테이트)를 실시하여 19개의 분획물(CWE-1 ~ CWE-19)을 얻었다. 그 중 CWE-7 분획물(4.53 g)에 대하여 SiO₂ c.c. (ϕ 4.5 $\times$ 15 cm, 클로로포름:메탄올:물 = 10:5:1)를 실시하여 6개의 분획(CWE-7-1 ~ CWE-7-6)으로 나누었고, 시난디온 A[CWE-7-5, 300 mg, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.50, CHCl₃:MeOH = 10:1]를 분리하였다.

[0058] 실시예 2: 산화질소(nitric oxide, NO) 생성 측정

- [0059] 96-웰 플레이트에서 마우스 대식세포인 RAW264.7 (1×10^4 cells/mL)를 10% FBS, 페니실린(100 unit/mL), 스트렙토마이신설페이트(100 μ g/mL)가 포함된 DMEM 배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소의 환경에서 배양하였으며, 시난디온 A(40, 20, 10, 5, 0 μ M)를 처리한 후, 리포폴리사카라이드(LPS, 1 μ g/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양

된 세포 배지 100 μl 를 Griess 시약(5% (v/v), 인산 및 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌디아민-염산에 용해된 동량의 1% (w/v) 설퍼닐아미드) 100 μl 에 혼합한 후, 실온에서 10 분 동안 배양하였으며, 그 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신선한 배지는 모든 실험에서 무처리군으로 사용하였다. 시료에서의 산화질소(NO)의 양은 배지에서 준비된 소듐니트라이트(sodium nitrite) 표준곡선으로부터 계산되었다.

[0060] 그 결과, LPS를 처리한 군에서 NO의 생성이 유의적으로 증가하였으나, 시난디온 A를 추가적으로 처리한 군에서는 LPS로 증가된 NO의 생성량이 시난디온 A의 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 특히, 시난디온 A를 40 μM 처리한 군에서는 LPS를 처리하지 않은 군 보다 NO의 생성량이 적음을 확인할 수 있었다(도 1).

[0061] 실시예 3: 프로스타글란딘(Prostaglandin E_2 , PGE_2) 생성 측정

[0062] 96-웰 플레이트에서 마우스 대식세포인 RAW264.7 (1×10^4 cells/mL)를 10% FBS, 페니실린(100 unit/mL), 스트렙토마이신설페이트(100 $\mu\text{g/mL}$)가 포함된 DMEM 배지로 37°C, 5% 이산화탄소의 환경에서 배양하였으며, 시난디온 A(40, 20, 10, 5, 0 μM)를 처리한 후, LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포 배지 100 μl 를 상업적으로 판매되고 있는 프로스타글란딘 E_2 효소 면역 분석 키트(Prostaglandin E_2 enzyme immunoassay kit (assay designs사, USA))의 사용순서에 따라, 혼합 후에 사용법 시간 동안 처리를 해주고, 그 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 570 nm ~ 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신선한 배지는 모든 실험에서 무처리군으로 사용하였다. 시료에서의 프로스타글란딘의 생성량은 사용한 키트속에 들어있는 분석 버퍼(assay buffer)에 준비된 PGE_2 스탠다드 표준곡선으로부터 계산되었다.

[0063] 측정 결과, LPS 처리에 따라 증가된 프로스타글란딘의 생성량은 시난디온 A의 처리에 따라 감소되었으며, 시난디온 A의 농도 의존적으로 감소되었다(도 2).

[0064] 실시예 4: 시난디온 A의 세포독성 실험

[0065] 시난디온 A의 세포독성 실험은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포독성 실험 배양액은 배양실험 종료 3시간 전에 MTT 용액 (인산완충용액-살린 속에 10 mg/mL, pH 7.4) 5 mL를 첨가하였다. 세포는 반응 종료까지 계속 배양시켰다. 배양은 포르마잔의 용해성을 증가시키기 위해 DMSO를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 540 nm에서 광학 밀도(OD)는 ELISA 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정하였다.

[0066] RAW264.7 대식세포 또는 인간의 혈관내피세포(HUVECs)에 시난디온 A를 5, 10, 20, 40 μM 의 양으로 처리하여 세포 독성을 측정한 결과, 모든 군에서 세포 독성이 관찰되지 않아, 시난디온 A가 매우 안전한 물질임을 확인할 수 있었다(도 3, 도 4).

[0067] 실시예 5: iNOS, COX-2, IL-1, ICAM-1, VCAM-1, TNF- α 및 IL-6의 mRNA 발현 측정

[0068] DMSO를 이용해 시난디온 A 10 mM을 만들었으며, 이를 농도별로 희석하여 RAW264.7 세포 또는 혈관내피세포(HUVECs)에 처리하였다. 그런 후, LPS를 처리하고 24시간 배양한 뒤 세포에서 RNA 전체를 분리하고 각각의 유전자에 대한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0069] 사용한 프라이머는 하기와 같았다.

[0070] iNOS: 5' -TCT TCG AAA TCC CAC CTG AC-3' (sense, 서열번호 1) 및 5' -CCA TGA TGG TCA CAT TCT GC- 3' (antisense, 서열번호 2)

[0071] TNF- α : 5' - TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG-3' (sense, 서열번호 3) 및 5' -CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3' (antisense, 서열번호 4)

[0072] IL-6: 5' -GAG GAT ACC ACT CCC AAC AG-3' (sense, 서열번호 5) 및 5' -TTC ACA GAG GAT ACC ACT CC-3' (antisense, 서열번호 6)

[0073] IL-1 β : 5' - GAA GCT GTG GCA GCT ACC TAT GTC T-3' (sense, 서열번호 7) 및 5' - CTC TGC TTG TGA GGT GCT GAT GTA C-3' (antisense, 서열번호 8)

- [0074] COX-2: 5' -GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG-3' (sense, 서열번호 9) 및 5' -GGA GGA AGA GGA TGC GGC AGT-3' (antisense, 서열번호 10)
- [0075] ICAM-1: 5' -CTC CAA TGT GCC AGG CTT G -3' (sense, 서열번호 11) 및 5' -CAG TGG GAA AGT GCC ATC CT-3' (antisense, 서열번호 12)
- [0076] VCAM-1: 5' -GTC TTC ACC ACC ATG GAG AA-3' (sense, 서열번호 13) 및 5' -AGG AGG CAT TGC TGA TGA TC-3 (antisense, 서열번호 14)
- [0077] 상기 프라이머들을 이용하여 95℃에서 10분동안 초기 변성(initial denaturation) 시켰으며, 95℃에서 30초, 58℃에서 30초, 및 72℃에서 30초 조건으로 23 내지 28회 증폭하였다.
- [0078] 수행 결과, RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 iNOS와 COX-2의 유전자 발현이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소하게 됨을 확인하였다(도 5).
- [0079] 또한, RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 유전자 발현이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소하게 됨을 확인하였다(도 6).
- [0080] 또한, 혈관내피세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 ICAM-1, VCAM-1, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현량이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소하게 됨을 확인하였다(도 7).

[0081] **실시예 6: iNOS, COX-2, ICAM-1, 및 VCAM-1의 단백질 발현 측정**

- [0082] 시난디온 A가 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RAW264.7 대식세포에 시난디온 A를 농도별로 처리하고 동시에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그런 후 세포를 용해시켜 모은 총 단백질을 전기영동법으로 분리한 후 전환하여, iNOS와 COX-2의 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 iNOS와 COX-2의 발현량을 측정하였다.
- [0083] 그 결과, RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소하게 됨을 확인하였다(도 8).
- [0084] 또한, 시난디온 A가 ICAM-1, VCAM-1의 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 인간 혈관내피세포(HUVECs)에 시난디온 A를 농도별로 처리하고 동시에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그런 후 세포를 용해시켜 모은 총 단백질을 전기영동법으로 분리한 후 전환하여, ICAM-1과 VCAM-1 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 ICAM-1과 VCAM-1의 발현량을 측정하였다.
- [0085] 그 결과, 혈관내피세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 ICAM-1 및 VCAM-1의 단백질 발현이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소하게 됨을 확인하였다(도 9).

[0086] **실시예 7: I κ B- α 의 인산화 및 분해 정도 측정**

- [0087] 시난디온 A가 I κ B- α 의 인산화 및 분해에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, RAW264.7 대식세포에 시난디온 A를 농도별로 처리하고, 동시에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 3시간 동안 배양하였다. 그런 후 세포를 용해시켜 모은 총 단백질을 전기영동법으로 분리한 후 전환하여, p-I κ B- α 와 I κ B- α 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 p-I κ B- α 와 I κ B- α 의 발현량을 측정하였다.
- [0088] 그 결과, RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 I κ B- α 의 인산화가 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다(도 10).

[0089] **실시예 8: p65 단백질의 핵 내 이동량 측정**

- [0090] 시난디온 A가 핵 내로 이동하는 p65 단백질에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RAW264.7 대식세포에 시난디온 A를 농도별로 처리하고 동시에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 2시간 동안 배양하였다. 그런 후 세포를 용해시켜 모은 핵 내 단백질을 전기영동법으로 분리한 후 전환하여, p65 와 PCNA 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 핵 내 p65 와 PCNA의 발현량을 측정하였다.

[0091] 그 결과, RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 핵 내의 p65 단백질 발현이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 저해되었다(도 11). 즉, 시난디온 A가 p65의 핵 내 이동을 저해함을 알 수 있었다.

[0092] **실시예 9: NF- κ B 단백질의 핵 내 DNA에 결합하는 활성 정도 측정**

[0093] 시난디온 A가 핵 내에서 DNA에 결합하는 NF- κ B 단백질의 결합 활성도에 어떤 영향을 미치는지 측정하기 위해, RAW264.7 대식세포에 시난디온 A를 농도별로 처리하고 동시에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 2시간 동안 세포를 배양하였다. 그런 후 세포를 용해하여 핵 추출물을 제조하였다. 핵 추출물 (5 μ g)을 이중-스트랜드 NF- κ B 올리고뉴클레오타이드와 혼합하고, [γ -³²P]dATP로 말단을 라벨화하였다. 결합 반응은 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.42 M KCl, 6 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 20% 글리세롤, 0.5 mM PMSF, 0.75 mM 스페르미딘(Spermidine), 0.15 mM 스페르민(Spermine) 및 10% 수크로즈(Sucrose)가 포함된 반응 용액 40 μ l에서 실온에서 30분간 수행하였다. NF- κ B의 p65 서브유닛에 대한 항체를 방사선으로 라벨화된 프로브를 첨가하기에 앞서 4°C에서 30분간 반응 혼합물 내 핵 추출물로 공동 배양하였다. 10, 50배 라벨화되지 않은 올리고뉴클레오타이드와 경쟁하여 결합 특이성을 검사하였다. 반응 물질을 0.5% Tris boric acid EDTA(TBE) 버퍼 내에서 6% 폴리아크리아미드 젤(polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 젤을 80°C에서 한 시간 동안 말린 뒤, -70°C에서 24 시간 동안 X 선 필름에 노출시켰다.

[0094] 그 결과, RAW264.7 세포에서 LPS 처리로 인해 증가된 NF- κ B 단백질의 핵 내 표적 단백질에 대한 결합 활성이 시난디온 A를 처리함에 따라 농도 의존적으로 저해되었다(도 12).

[0095] **실시예 10: 시난디온 A가 혈관내피세포(HUVECs)와 면역세포(U937)의 기능성 부착활성에 미치는 영향 측정**

[0096] 내피세포에서 염증성 세포 부착분자의 발현량의 증가는 백혈구와 그 밖에 다른 면역세포와의 부착성을 증가시키는 것으로 이미 잘 알려져 있는데, LPS로 CAM이 활성화되어 있는 혈관내피세포에 시난디온 A를 처리하였을 때 세포부착이 감소하는지를 세포 부착 분석법(cell adhesion assay)을 통해서 확인하였다.

[0097] 구체적으로, HUVECs을 0.1% 젤라틴이 도포되어진 상태의 48 웰 플레이트에 배양하고 LPS로 CAM을 인위적으로 활성화시킨 뒤, 시난디온 A를 농도별로 처리한 후, 세포를 12시간동안 배양하였다. 그런 다음, PBS로 세포를 세척한 후, 면역세포인 U937 세포를 칼세인 AM을 이용하여 형광염색한 후 2.5×10^5 cells/well의 농도로 HUVECs이 깔려진 위에 동시에 처리하였다. 1시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후, PBS로 다시 세척하였다. 마지막으로 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 형광 이미지를 분석하였다. 추가적으로 Wallace Victor 21420 Multilabel counter(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)를 이용하여 각각의 웰의 형광성을 측정하였다.

[0098] 그 결과, LPS로 인해 증가된 혈관 내피세포 및 면역세포의 세포 부착 기능의 활성도가 시난디온 A를 처리함에 따라 감소됨을 확인하였다(도 13).

[0099] **실시예 11: 마우스모델에서 시난디온 A에 의한 iNOS와 COX-2의 발현량 측정 및 전-염증성 사이토카인의 생성량 측정**

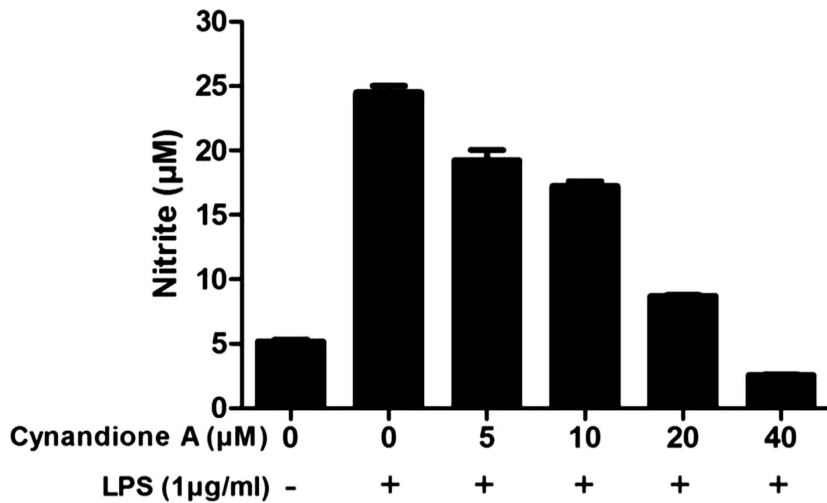
[0100] 시난디온 A가 마우스모델에서도 세포 내의 활성과 비슷하게 나타나는지를 확인하기 위해서, 수컷 C57BL/6N의 7 ~ 8주령 마우스를 가지고 활성을 테스트하였다. 마우스는 12시간 주기로 낮과 밤의 환경을 조사해 주었으며, 먹이와 물의 경우는 자유롭게 접근을 할 수 있도록 허용하였다. 마우스는 5마리씩 대조군(오직 PBS만 처리한 군), LPS(4 mg/kg), LPS+시난디온 A(0.1 mM), LPS+시난디온 A(1 mM)의 4개의 그룹으로 나뉘었다. 24시간 간격으로 시난디온 A(0.1 mM, 1 mM)와 PBS를 복강주사로 주입해주었고, 2번째 주입 후 12시간이 지난 후에 LPS(4 mg/kg)와 PBS를 주입해 주었다. LPS와 PBS 주입 12시간 후에 마우스를 경추탈골의 방법을 통해 죽인 후 전체 혈액샘플을 심장천자(cardiac puncture)의 방법을 통해서 1.5 mL 튜브에 모았고, 이를 일정시간 동안 실온에 나두었다. 그런 다음, 4°C, 20분 동안 12,000 $\times$ g의 원심분리를 통해 혈청샘플을 얻었으며, 이를 상업적으로 판매되고 있는 마우스 전-염증성 사이토카인 ELISA 키트(Mouse Proinflammatory cytokine ELISA kit (eBioscience, USA))의 사용 순서에 따라 혼합한 후에 사용법 시간 동안 처리를 해주고, 그 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에서의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량은 사용한

키트 속에 들어있는 분석 버퍼(assay buffer)에 준비된 각각의 스탠다드 표준곡선으로부터 계산되었다. 마우스 비장의 경우, 각각의 마우스에서 비장을 적출하여 그 조직을 갈아서 세포를 분리해낸 후 12시간 동안 5% CO₂, 37℃의 환경에서 배양 시켰고, 그런 다음 세포를 용해시켜 모은 총 단백질을 전기영동법으로 분리한 후 전환하여, iNOS 또는 COX-2의 항체를 가지고 웨스턴 블랏을 이용하여 NOS 또는 COX-2의 발현량을 측정하였다.

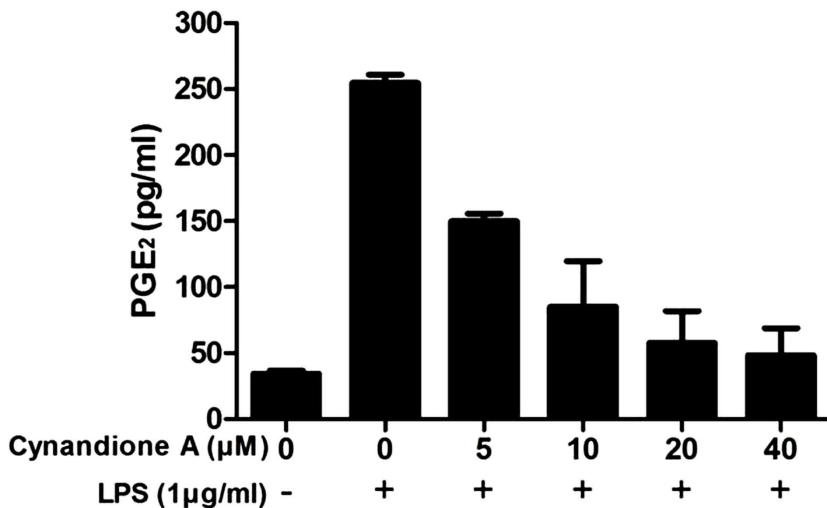
[0101] 그 결과, 마우스에 시난디온 A를 처리한 군에서 LPS로 인해 증가된 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량이 감소되었으며(도 14), 마우스에 시난디온 A를 처리한 군에서 LPS로 인해 증가된 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현량이 감소되었다(도 15).

도면

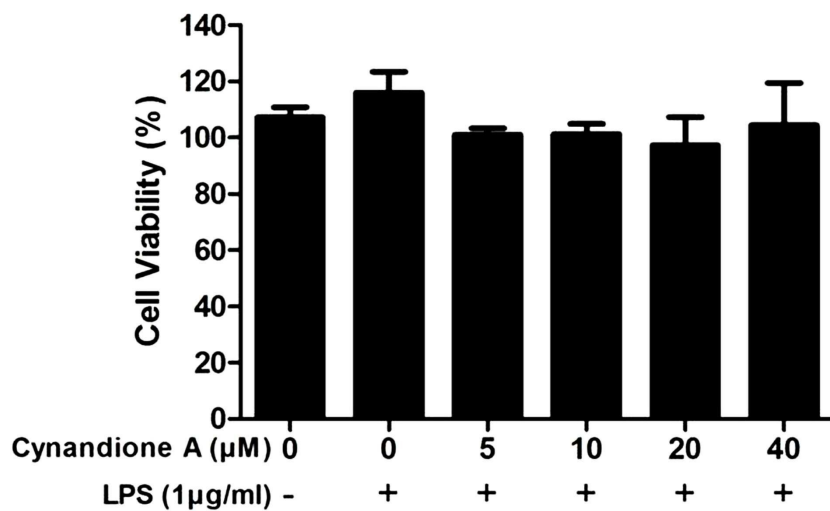
도면1



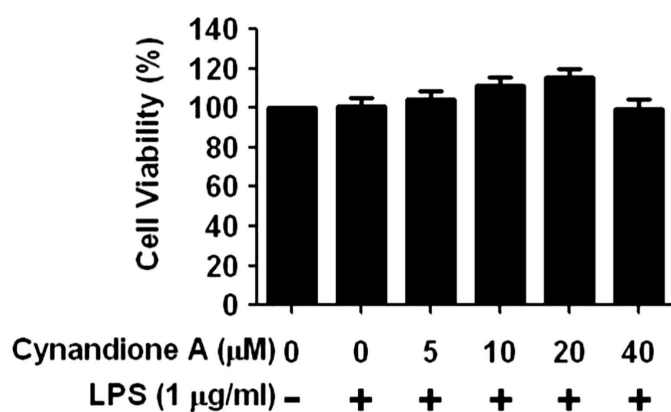
도면2



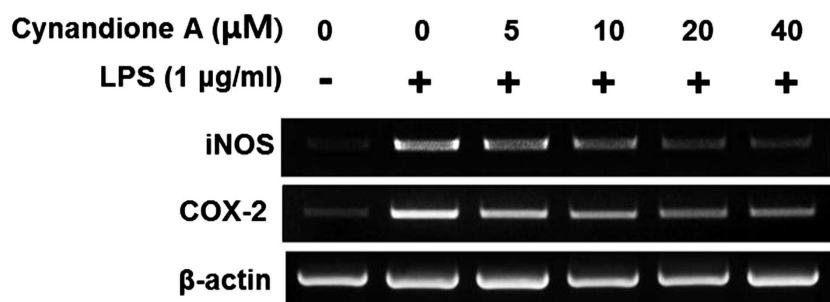
도면3



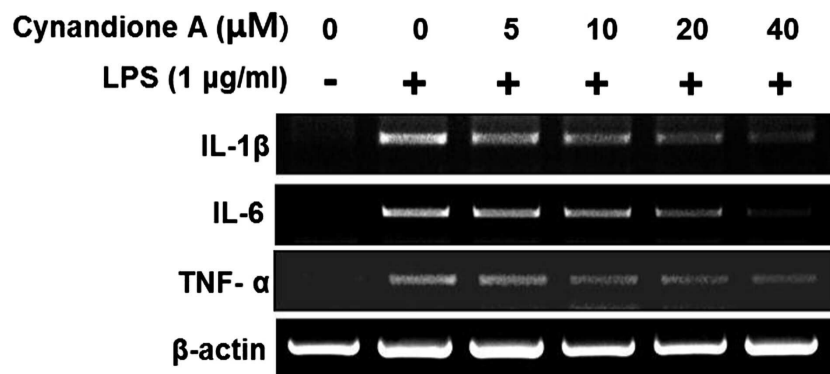
도면4



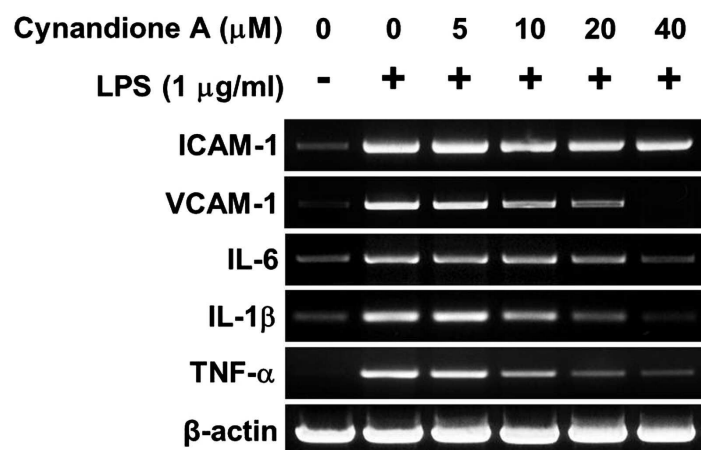
도면5



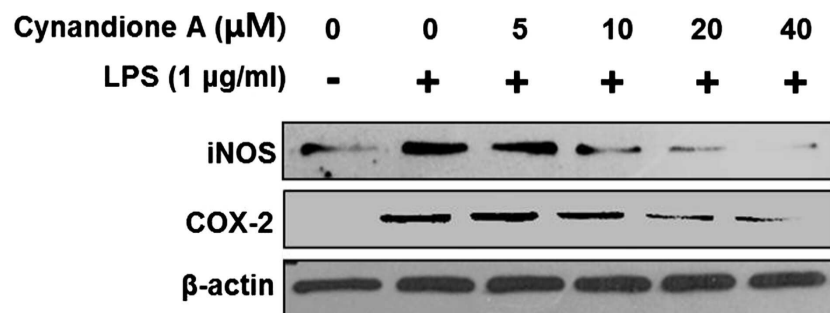
도면6



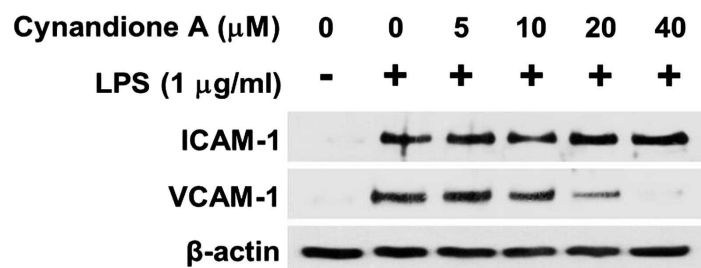
도면7



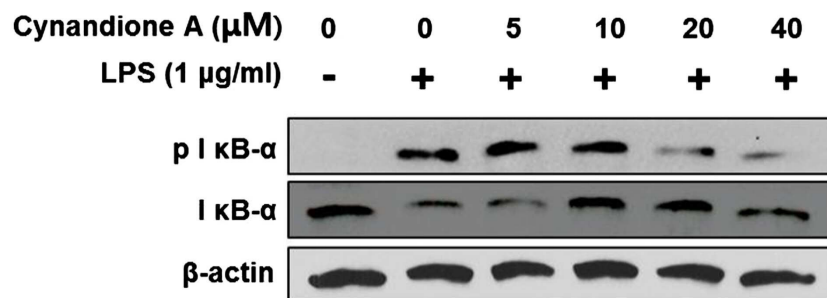
도면8



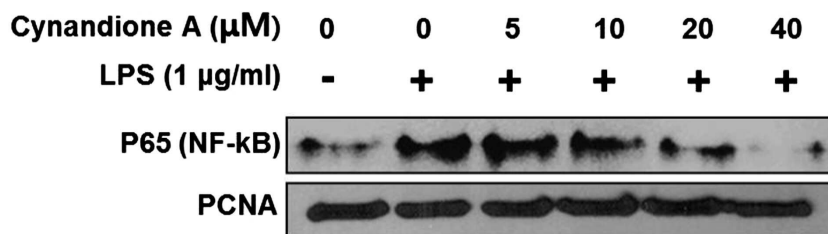
도면9



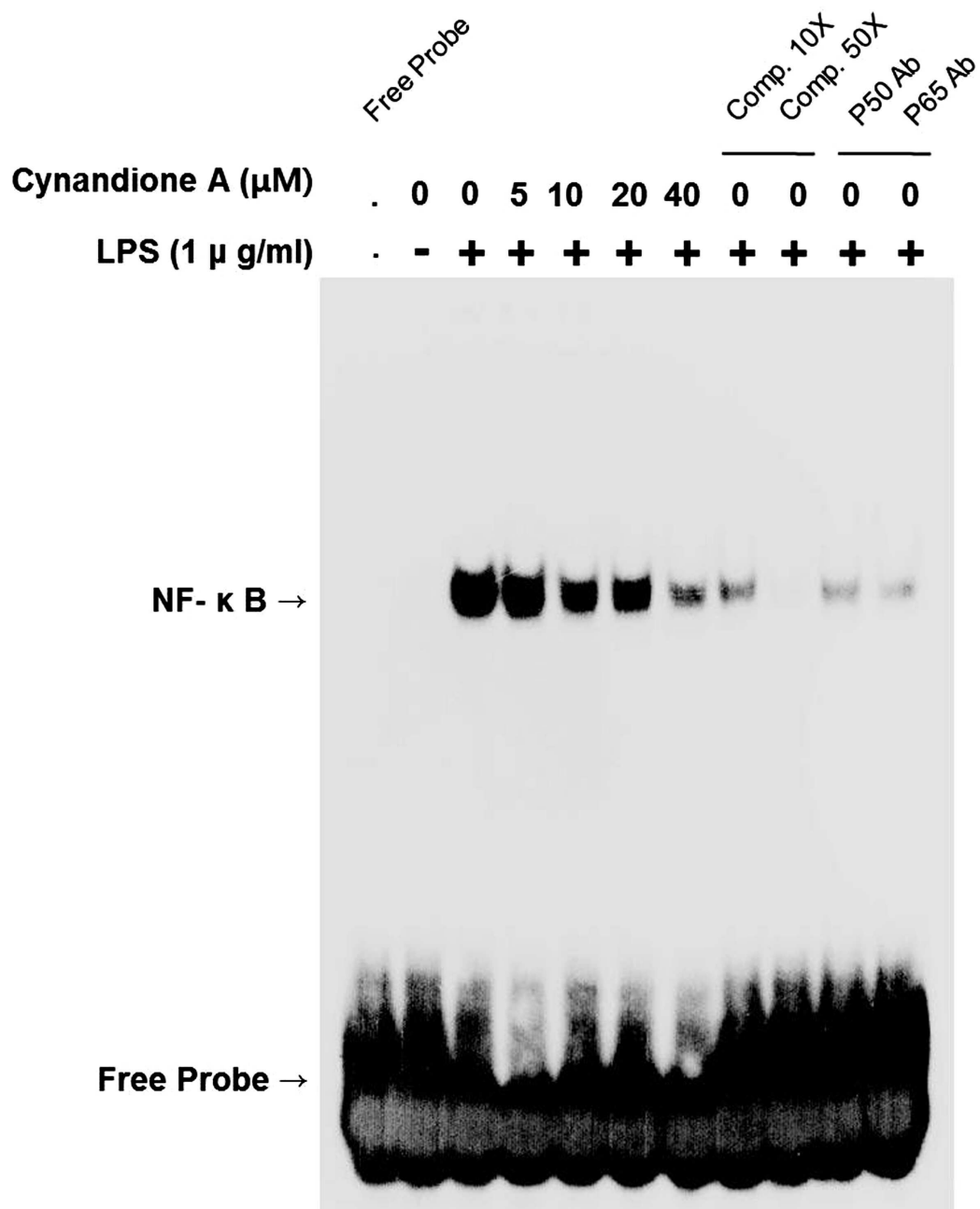
도면10



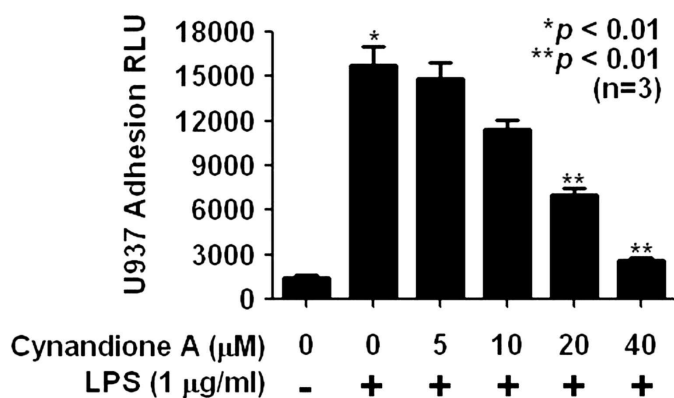
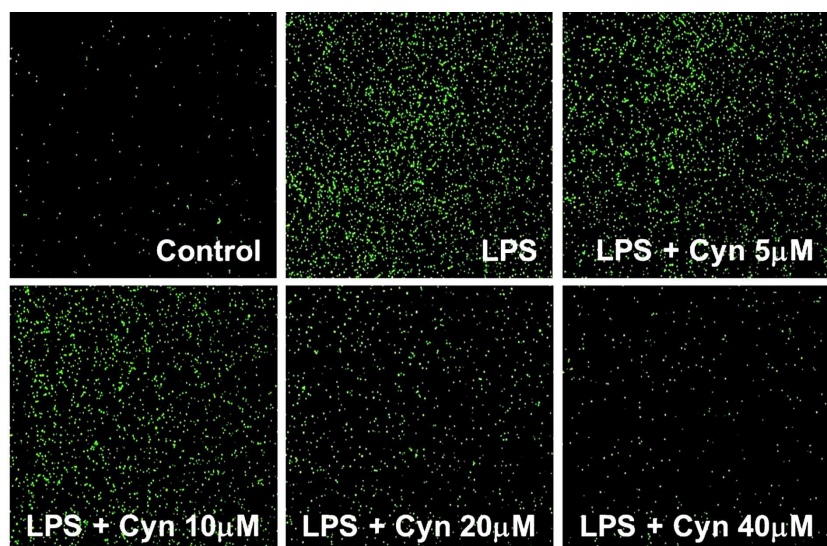
도면11



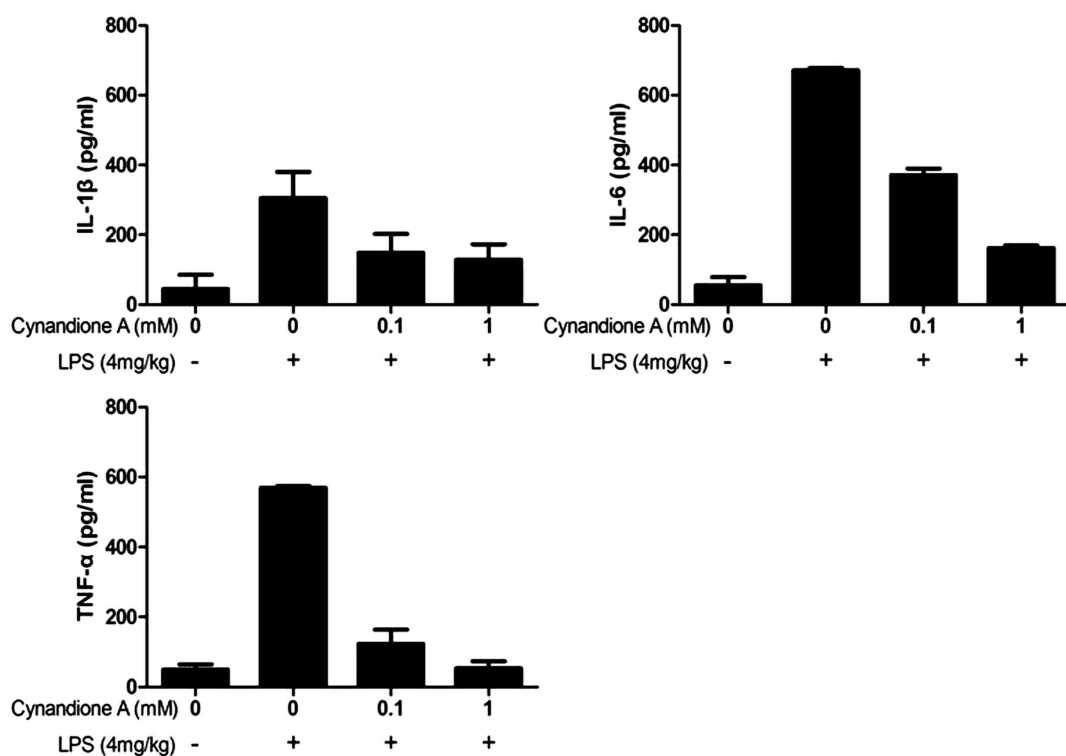
도면12



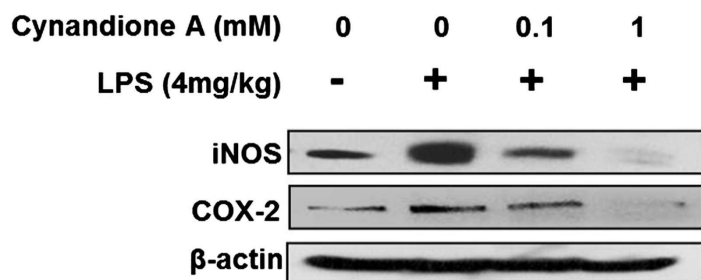
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Anti-inflammatory compositions comprising cynandione A

<130> PA111028KR

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for iNOS

<400> 1

tcttcgaaat cccacgtgac

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for iNOS

<400> 2

ccatgatgggt cacattctgc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for TNF-alpha

<400> 3

ttgacctcag cgctgagttg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for TNF-alpha

<400> 4

cctgtagccc acgtcgtagc 20

<

210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for IL-6

<400> 5

gaggatacca ctccaacag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for IL-6

<400> 6

ttcacagagg ataccactcc 20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

gaagctgtgg cagctaccta tgtct 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for IL-1beta
 <400> 8
 ctctgcttgt gagtgctga tgtac 25
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for COX-2
 <400> 9
 gtgggccgcc ctaggcacca g 21
 <210> 10

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer for COX-2
 <400> 10
 ggaggaagag gatgcggcag t 21
 <210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for ICAM-1
 <400> 11
 ctccaatgtg ccaggttg 19
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer for ICAM-1

 <400> 12
 cagtgggaaa gtgccatcct 20
 <210> 13
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for VCAM-1

<400> 13

gtcttcacca ccatggagaa

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer for VCAM-1

<400> 14

aggaggcatt gctgatgatc

20