

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 11월 1일 (01.11.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/148247 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/56 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003383
- (22) 국제출원일: 2012년 4월 30일 (30.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0041189 2011년 4월 29일 (29.04.2011) KR
10-2011-0098547 2011년 9월 28일 (28.09.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 노문철 (RHO, Mun Chul) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 이우송 (LEE, Woo Song) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 오현미 (OH, Hyun Mee) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 김영민 (KIM, Young Min) [KR/KR]; 대전광역시 유성

구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 류영배 (RYU, Young Bae) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 박수진 (PARK, Su Jin) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 이송웅 (LEE, Seung Woong) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 조경오 (CHO, Kyoung Oh) [KR/KR]; 광주광역시 북구 용봉동 1101-4번지 현대아파트 203동 1002호, 500-734 Gwangju (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

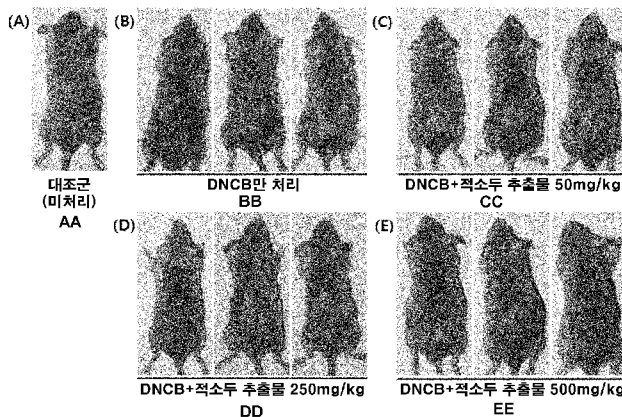
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING OLEANOLIC ACID ACETATE AS AN ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING TLR- OR IL-6-MEDIATED DISEASES

(54) 발명의 명칭: 올레아놀린산 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환예방 또는 치료용 약학적 조성물

[Fig. 9]



AA ... Control group (not treated)
BB ... Treated with DNCB only
CC ... DNCB + phaseoli semen extract 50 mg/kg
DD ... DNCB + phaseoli semen extract 250 mg/kg
EE ... DNCB + phaseoli semen extract 500 mg/kg

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating TLR- or IL-6-mediated diseases, containing oleanolic acid acetate or pharmaceutically acceptable salts thereof as an active ingredient, and to a pharmaceutical composition for preventing or treating TLR- or IL-6-mediated diseases and containing phaseoli semen extract, or a fraction thereof, which contains said compound or salts as an active ingredient. The phaseoli semen extract or compound according to the present invention is derived from a natural substance, which has long been used in natural medicine, and therefore causes no side effects. The phaseoli semen extract or compound inhibits the activity of TLR-3 and TLR-7 induced by Poly(I:C) and Poly(I), which are the synthetic analogues of dsRNA and ssRNA, blocks signaling pathways including NF- κ B, and inhibits the transcriptional activity and phosphorylation of STAT3, which is an inflammation-related transcription factor activated by IL-6. Therefore, the phaseoli semen extract or compound of the present invention can be widely used in developing agents for preventing or treating TLR- and IL-6-mediated diseases, such as atopic dermatitis or arthritis.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 올레아놀린산 아세테이트(oleanolic acid acetate) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 상기 화합물 또는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 적소두 추출물 또는 화합물은 오랫동안 천연약재로서 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, dsRNA 및 ssRNA의 합성 유사체인 Poly(I:C)와 Poly(I)에 의해 유도되는 TLR-3 및 TLR-7의 활성저해 및 NF- κ B를 포함하는 신호전달 경로를 차단하고, IL-6에 의해 활성화되는 염증관련 전사인자인 STAT3의 전사활성 및 인산화를 저해함으로써, TLR 및 IL-6 매개성 질환, 예컨대 아토피성 피부염 또는 관절염 등의 예방 또는 치료제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 올레아놀린산 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 올레아놀린산 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 올레아놀린산 아세테이트(oleanolic acid acetate) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 상기 화합물 또는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 상기 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유효성분을 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제, 건강기능식품 및 개인위생용품에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 면역반응은 활성화된 면역세포가 외래성 및 내인성 물질(항원)에 대하여 일으키는 일련의 반응이다. 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등이 생체로 유입되면, 숙주세포는 감염을 극복하기 위해 염증반응의 원인이 되는 사이토카인 등의 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다. 그리고 이러한 미생물 및 생체의 이물질 등이 면역세포에 의해 인식이 되면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서도 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발한다(Chen G.Y., Nat. Rev. Immunol., 10(12): 826-837, 2010).
- [4] 분자생물학 및 유전공학의 발전으로 염증과 관련된 세포내의 분자표적들이 밝혀지고 있으며, 특히 감염초기 비 특이적 선천성 면역반응 단계에서 병원체의 특정부분을 인지하는 유전자가 밝혀지면서 염증초기의 발생과정에 대한 새로운 분자적 기전 해석이 이루어지고 있다. 최근 염증초기의 병원체를 인지하는 유전자로서 톨-유사 수용체(Toll-like receptor, TLR)가 병원체의 원형질 막 구성물(lipopolysaccharide(LPS:endotoxin), peptidoglycan)과 핵산 구성물(ds RNA, single strand RNA, GpG DNA etc.)을 인지하는 것이 알려지면서, TLR에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Brown J., et al, J. Dent. Res., 2010, Epub ahead of print; Palusinska-Szys M., et al., Folia Microbiol.(Praha), 2010, 55(5), 508-14).
- [5] TLR은 제1형 막투과 신호전달 분자(type I transmembrane signaling molecule)로서 선천성 면역계(innate immune system)를 담당하는 세포에서 주로 발현되어 있다. 이 세포에서 TLR은 세포외 도메인(extracellular domain)을 통해서

PAMPs(pathogen-associated molecular patterns)나 MAMPs(microorganism-associated molecular patterns)를 인식하며 그 결과 선천성 면역세포에서 염증성 세포 활성화를 유도한다. TLRs가 밝혀진 이래로 TLRs에 결합하는 PAMPs를 찾는 노력이 계속되어왔으며, 지금까지 TLR10, TLR12, TLR13을 제외하고 각각 하나 이상의 리간드가 밝혀졌다(Kawai T. et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008, 1143, 1-20). TLRs는 서로 다르지만 신호 전달 기작을 공유한다(Liew F.Y., et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, 5(6), 446-458).

- [6] TLR들에 의한 신호전달에서 공통점은 TIR(Toll/interleukin-1 receptor-like domain)도메인을 통한 NF- κ B의 활성화이다. TLR에 의한 신호전달과정은 TIR 도메인을 가진 MyD88과 상호작용하여 복합체를 형성한다. MyD88의 C-말단에 위치한 TIR 도메인은 TLR와의 복합체를 형성하고, N-말단에 위치한 Death 도메인은 인산화효소(Ser/Thr kinase)인 IRAK(IL-1R associated kinase)-1 또는 IRAK-2와 복합체를 형성하게 된다. IRAK-1은 다시 TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)와의 상호작용을 통해 NIK(NF- κ B-inducing kinase)를 활성화시키고, NIK의 활성화는 다시 IKK(I κ B kinase)를 인산화하고 인산화된 IKK는 다시 I κ B(inhibitory κ B)를 인산화시키게 되며, 결과적으로 NF- κ B의 활성화를 야기시킨다. 활성화된 NF- κ B는 핵으로 이동하여 전사인자로써 작용하고 사이토카인 및 세포접합분자 관련 유전자의 발현을 유도한다(Brown J., et al., *J. Dent. Res.*, 2010, Epub ahead of print; Palusinska-Szys M., et al., *Folia Microbiol.(Praha)*, 2010, 55(5), 508-14).
- [7] 특히 TLR-7은 ssRNA(single-stranded RNA)와 ssRNA 유사체인 polyI(polyinosinic acid)을 인지하는 것으로 알려져 있다. 즉, TLR-7이 ssRNA를 인식한 후, 어댑터 단백질(adaptor protein)인 MyD88과 반응하여 전사인자인 NF κ B와 AP-1을 활성화시켜 염증성 사이토카인을 생성하게 된다. 또 하나의 기작으로, TRIF에 의존적인 기작은 TRIF, TBK1(ANK-binding kinase 1), TRAF3와 전사인자인 IRF3에 연속적으로 신호를 전달하여 타입 I 인터페론의 생산을 유도한다. 그리고 TLR-3는 RNA 바이러스의 증식 중에 생기는 dsRNA(double-stranded RNA)와 dsRNA 유사체인 polyI:C(polyinosinic-polycytidylic acid)를 인지하는 것으로 알려져 있다. 즉, TLR-3의 루신-풍부 반복모티프(leucine-rich repeat motif) 형태의 엑토도메인(ectodomain)인 dsRNA를 인식한 후, 어댑터 단백질인 TRIF와 반응하여 전사인자인 IRF3와 NF κ B를 활성화시켜 제1형 IFN과 IL-6 및 IL-12 등의 염증성 사이토카인을 생성시킨다(Alexopoulou L., et al., *Nature*, 2001, 413, 732-738). 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 대장염, 췌장염, 류마티스 관절염, 천식 등의 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6, IL-10과 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 개발할 수 있다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다.

- [8] STAT3(signal transducers and activators of transcription)는 류마티스 관절염을

포함한 자가면역 질병에서 NF- κ B와는 또 다른 하나의 중요한 전사인자로서 역할을 하는 것이 알려져 있다. 특히, STAT3는 염증반응을 매개하는 사이토카인인 인터류킨-6(interleukin-6, IL-6)에 의해서 활성화 되는 것이 잘 알려져 있으며, 표피 성장 인자(EGF)에도 활성화되는 것으로 알려졌다(Darnell Jr. J.E., et al., Science, 1994, 264, 1415-1421).

- [9] IL-6는 B-세포 자극인자 2 또는 인터페론 β 2로 알려진 사이토카인으로 B림파구계 세포의 활성화에 관여하는 분화인자로서 발견되었고(Hirano T., et al., Nature, 1986, 324, 73-76), 그 후 T세포의 분화 및 증식, 신경세포의 분화, 파골세포형성, 간세포에서 단백질의 생산 등에 영향을 미치는 다기능성 사이토카인인 것으로 밝혀졌다(Akira S., et al., Adv. In Immunology, 1993, 54, 1-78).
- [10] 2개의 작용적으로 상이한 막 수용체 분자가 IL-6 활성을 유도하는데 필요한데, 이들 중 하나는 IL-6에 특이적으로 결합하는 분자량이 약 80 KD인 인터루킨-6수용체(IL-6R)이며 다른 하나는 시그널 전달에 관여하는 분자량이 약 130 KD인 gp130이다. IL-6와 IL-6R은 IL-6/IL-6R 복합체를 형성한 다음, 다른 하나의 막 단백질인 gp130과 결합함으로써 IL-6에 의한 세포내의 신호전달이 유도된다(Taga T., et al., J. Exp. Med., 1987, 196, 967). 또한 IL-6의 세포내 신호전달을 유도하는 과정에서 gp130 및 JAK(Janus kinase)의 인산화가 STAT3의 전사활성에 필수적인 것으로 밝혀졌다(Heinrich P., et al., Biochem. J., 2003, 374, 1-20). IL-6와 수용체들의 결합 후, 세포내에서는 JAK2(Janus Kinases 2)가 인산화에 의해 활성화되며, 활성화된 JAK2에 의해 수용체 세포질 내 도메인의 여러 타이로신 잔기가 인산화 되고 이것은 SH2나 다른 인산화타이로신 결합 모티프를 가지고 있는 STAT3와 같은 세포질 내 단백질의 결합 역할을 하게 된다. 수용체의 세포질 내 도메인에 결합한 STAT3는 JAK2에 의해 인산화된 후 수용체에서 떨어져 나온다. 활성화된 STAT3는 세포질 내에 서로서로 결합하여 동형 또는 이형이량체를 이룬 후 핵 내로 들어가 표적분자의 전사활성 영역에 결합하여 전사를 증가시킨다(Levy, D.E., et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2002, 3, 651-662; Darnell, J.E., Science, 1997, 277, 1630-1635). 이러한 IL-6의 과도한 생산은 류마티스 관절염, 캐슬먼 증후군(Castleman Syndrome), 크론씨 병, 골다공증, 암성 악액질(Cancer cachexia), 동맥경화, 당뇨 등 다양한 질환에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다(Akira S., et al., Adv. Immunology, 1993, 54, 1-78; Kallen K., et al., Exp. Opin. Invest. Drugs, 1997, 6, 237-266). 아울러, STAT3의 구조적 활성화 및 과다발현이 골수종, 유방 암종, 전립선 암, 뇌 종양, 두경부 암종, 흑색종, 백혈병 및 림프종, 특히 만성 골수성 백혈병 및 다발성 골수종을 포함하여 여러 형태의 암에 관여하는 것으로 보인다(Niu, et al., Cancer Res., 1999, 59, 5059-5063).
- [11] 기존의 보고에 있어서는 어떤 물질의 iNOS 활성 억제 등 항산화 효과 등을 관찰하고, 곧바로 이와 같은 물질이 염증성 질환의 치료효과도 있을 것이라는 보고가 있었으나, 항산화제가 류마티스 관절염 및 루프스병 등과 같은

염증질환으로 분류된 질환에 효과가 없다는 보고가 있는 등(Karen H. Costenbader, et al., American Journal of Epidemiology, 172(2):205-216, 2010), 항산화효과가 곧바로 염증질환의 치료에 적용할 수 없는 문제점 등이 있었다.

[12]

[13]

한편, 자가면역 피부질환 중 대표적으로 알려진 것이 아토피성 피부염이다. 아토피성 피부염은 만성적이며 재발성이 높은 피부질환으로써 피부의 부스럼, 습진, 간지러움, 염증 반응을 동반한다. 병리학적, 유전학적 작용기작은 아직까지 정확히 밝혀지지 않았다. 아토피는 민감성이 높은 특정 유전자, 환경, 피부외벽의 손상 정도, 면역적인 요인 등이 복합적인 영향을 미치는 면역 반응이다. 아토피 피부염은 전형적인 Th2 형태의 면역질환으로 정의되는데(Mamessier, E., et al, European Journal of Dermatology, 2006, 16(2), 103), 이는 아토피 피부염의 시작에 있어서 Th2 면역반응이 중요한 기능을 담당하고 있기 때문이다. 항원인 알레르겐이 피부를 통해 체내로 유입되면 피부에 위치하고 있는 항원 제시세포를 이를 인지하고 그에 반응하게 된다. 이때, 알레르겐은 특이적으로 Th2 형태의 면역반응을 유도하고 이렇게 Th2 표현형의 APCs는 T 세포를 자극하여 Th2 세포로의 분화를 유도하게 된다. Th2 세포는 다량의 Th2 형태의 사이토카인을 발현시키고, Th2 형태의 사이토카인은 비만세포(mast cell)를 활성화시켜 히스타민과 같은 수용성 매개인자의 분비를 촉진시키며 B 세포를 자극하여 IgE의 생산을 촉진시킨다. 이러한 매개인자는 다시 면역세포를 염증 부위로 유도함으로써 더욱 강화되어진 Th2 형태의 면역반응을 유도하게 되어 결국 아토피 피부염을 유발하게 된다. 이러한 아토피성 피부염의 치료를 위한 표적 후보 유전자로는 IgE에 높은 친화성을 가지는 FcεR1b, Th2 형태의 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13, 케모카인의 일종인 에오타신(eotaxin), RANTES 등이 있으며 아토피의 유발에 있어 큰 역할을 한다(Hoffjan, S., et al., Journal of Molecular Medicine, 2005, 83(9), 682-692; Cookson, W., Nat. Rev. Immunol., 2004, 4(12), 978-988). 따라서, Th2 형태의 사이토카인과 케모카인의 유전자의 발현을 조절하는 물질을 발명한다면, 아토피를 비롯한 다양한 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15]

본 발명자들은 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 치료물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 천연자원 가운데 적소두(팥 및 이팥) 추출물, 분획물 그리고 이로부터 정제된 화합물을 이용하여, 첫째, dsRNA 및 ssRNA의 합성 유사체인 Poly(I:C)와 Poly(I)에 의해 유도되는 TLR-3 및 TLR-7의 활성저해 및 NF-κB를 포함하는 신호전달 경로를 차단하는 활성을 확인하고, 둘째, IL-6에 의해 활성화되는 염증관련 전사인자인 STAT3의 전사활성 및 인산화를 저해하는 것을 확인하고,

마지막으로 DNCB에 의한 NC/Nga 마우스의 아토피성 피부염 및 콜라겐 유도 관절염을 억제하는 효과를 규명함으로써 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 발명을 완성하였다.

[16]

과제 해결 수단

[17] 본 발명의 하나의 목적은 올레아놀린산 아세테이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 올레아놀린산 아세테이트 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 또는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제, 건강기능식품, 또는 개인위생용품을 제공하는 것이다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 발명의 적소두 추출물 또는 화합물은 오랫동안 천연약재로서 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, dsRNA 및 ssRNA의 합성 유사체인 Poly(I:C)와 Poly(I)에 의해 유도되는 TLR-3 및 TLR-7의 활성화 및 NF- κ B를 포함하는 신호전달 경로를 차단하고, IL-6에 의해 활성화되는 염증관련 전사인자인 STAT3의 전사활성 및 인산화를 저해함으로써, TLR 및 IL-6 매개성 질환, 예컨대 아토피성 피부염 또는 관절염 등의 예방 또는 치료제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1a는 팔 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물의 HPLC 수행결과를 나타내는 크로마토그램이다.

[25] 도 1b는 이팔 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물의 HPLC 수행결과를 나타내는 크로마토그램이다.

[26] 도 2a 및 2b는 적소두의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물의 THP-1-blue 세포에서 poly(I) 처리에 의해 증가된 SEAP 활성 저해 효과를 나타낸 그래프 및 표이다.

- [27] 도 3은 적소두 메탄올 추출물의 THP-1-blue 세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 증가된 SEAP 활성 저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 4a 및 4b는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I) 처리에 의해 활성화 되어 핵으로 이동하는 NF κ B P50(도 4a) 및 AP-1의 C-Jun(도 4b)의 활성을 억제하는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.
- [29] 도 4c 내지 도 4e는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I) 처리에 의해 인산화되는 IKK α/β (도 4c), I κ B(도 4d), p38 및 JNK(도 4e)의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.
- [30] 도 5a 및 5b는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 활성화 되어 핵으로 이동하는 NF κ B P65/p50(도 5a) 및 AP-1의 C-Jun(도 5b)의 활성을 억제하는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.
- [31] 도 5c 내지 도 5e는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 인산화되는 IKK α/β (도 5c), I κ B(도 5d), p38 및 JNK(도 5e)의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.
- [32] 도 5f는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 활성화 되어 인산화되는 IRF3의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.
- [33] 도 6a 내지 6e는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1 세포에서 poly(I) 처리에 의해 유도된 염증성 사이토카인인 TNF α (도 6a), 염증성 사이토카인인 IL-6(도 6b), 케모카인인 RANTES(도 6c), IFN β (도 6d), 케모카인인 MCP-1(도 6e)의 mRNA 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- [34] 도 7a는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1 세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 유도된 염증성 인자인 TNF α (도 7a), 염증성 인자인 IL-6(도 7b), 세포접착인자인 ICAM-1(도 7c), 케모카인인 MCP-1(도 7d)의 mRNA 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- [35] 도 8a는 적소두 메탄올 추출물의 Hep3B 세포에서 IL-6 처리에 의해 유도되는 STAT3 인산화를 저해하는 효과를 나타내는 사진이다.
- [36] 도 8b는 적소두로부터 분리 정제된 화학식 1의 화합물의 Hep3B 세포에서 IL-6 처리에 의해 유도되는 STAT3 인산화를 저해하는 효과를 나타내는 사진이다.
- [37] 도 9는 적소두 메탄올 추출물의 NC/Nga 마우스에서 DNCB에 의해 유도되는 아토피성 피부염에 대한 증세가 개선되는 효과를 NC/Nga 마우스의 등 피부를 나타내는 사진이다.
- [38] 도 10은 적소두 메탄올 추출물의 NC/Nga 마우스에서 DNCB에 의해 유도되는 아토피성 피부염에 대한 증세가 개선되는 효과를 피부 중증도로 나타내는 그래프이다.
- [39] 도 11은 적소두 메탄올 추출물의 NC/Nga 마우스에서 DNCB에 의해 유도되는 아토피성 피부염에 대한 혈액내의 호산구 변화를 수치로 나타내는 그래프이다.
- [40] 도 12는 정상 DBA/1 OlaHsd와 CIA 유발 마우스모델의 앞다리와 뒷다리의 상태를 나타내는 사진이다.

- [41] 도 13은 적소두 메탄올 추출물의 DBA/1 OlaHsd 마우스 에서 CIA로 유발시킨 관절염에 대한 증세가 개선되는 효과를 CIA 유발정도로 나타내는 그래프이다.
- [42] 도 14는 올레아놀린산 또는 올레아놀린산 아세테이트의 농도에 따른 Hep3B 세포에서 IL-6 처리에 의해 유도되는 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해하는 효과를 나타낸 그래프이다.
- [43] 도 15는 적소두 메탄올 추출물이 마우스 골수세포로부터 분리된 포식세포가 파골세포로 분화되는 것을 저해하는 효과를 나타내는 사진이다.
- [44] 도 16은 올레아놀린산 아세테이트가 마우스 골수세포로부터 분리된 포식세포가 파골세포로 분화되는 것을 저해하는 효과를 나타내는 사진이다.

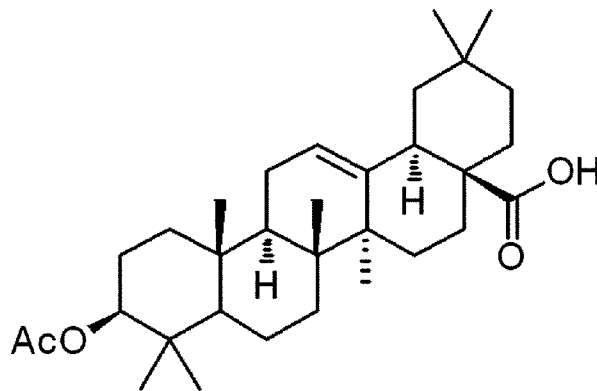
[45]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[47] [화학식 1]

[48]



[49]

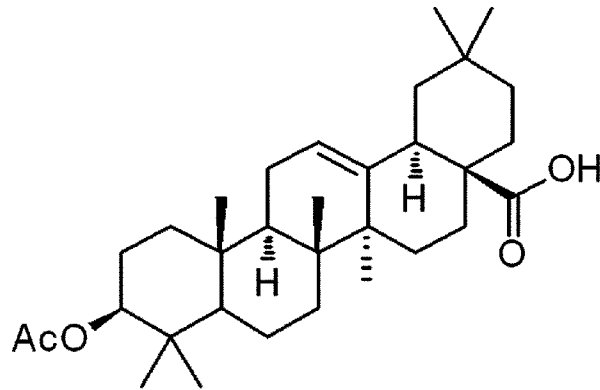
- [50] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 적소두에 속하는 팔과 이팔으로부터 각각의 메탄올 추출물을 수득하고, 상기 메탄올 추출물을 물, n-헥산, 에틸아세테이트 등으로 분획하여 각각의 분획물을 수득하였다. 상기 추출물과 분획물을 HPLC로 분석한 결과, 팔과 이팔은 상호 유사한 HPLC 크로마토그램을 나타내었고, 상기 n-헥산 분획물로부터 유효성분인 올레아놀린산 아세테이트(oleanolic acid acetate, 화학식 1)와 스티그마스테롤(stigmasterol, 화학식 2)을 각각 정제하였다.

- [51] 하기 화학식 1 또는 2의 화합물은 상용화된 화합물 또는 공지된 방법에 의해 수득할 수 있다. 본 발명에 따른 적소두로부터 화합물 1과 2의 추출, 분리 및 정제방법은 구체적으로 다음과 같다. 적소두의 헥산 가용성 분획물을 헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 분리한다. 이중 Fr.3과 Fr.4는 메탄올을 이용하여 재결정을 실시하였으며, 화학식 1, 2의 순수한 화합물을 분리한다.

[52]

[53] 화학식 1

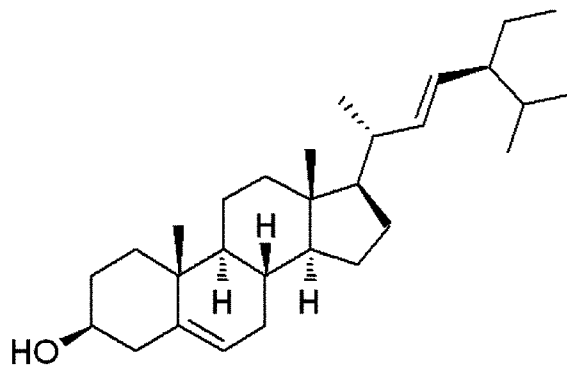
[54]



[55]

[56] 화학식 2

[57]



[58]

[59] 본 발명의 용어 "TLR 및 IL-6 매개성 질환"이란 톨-유사 수용체(Toll-like receptor, TLR)에 속하는 TLR-3와 TLR-7의 활성화에 의하여 활성화된 NF- κ B가 핵으로 이동하여 핵에서 각종 사이토카인 및 세포접합분자 관련 유전자가 발현되고, IL-6에 의하여 STAT3의 활성화가 억제됨에 의하여 발병되는 질환을 총칭하는 의미이다. 상기 TLR 및 IL-6 매개성 질환은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 크게 염증성 질환, 자가면역질환, 암 질환 또는 대사성 질환일 수 있다.

[60]

[61] 본 발명에서 상기 염증성 질환은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 바람직하게는 상기 TLR 및 IL-6에 의하여 매개되는 염증성 질환일 수 있다. 상기 염증성 질환은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염증, 패혈증, 다발성 연골염, 경피증, 피부염, 습진, 통풍, 치주질환, 베체트 증후군, 부종, 맥관염, 가와사키병, 당뇨병성 망막염, 자가면역 췌장염, 혈관염, 사구체 신염, 세균 및 진균의 급성 및 만성 감염, 급성 및 만성 기관지염, 및 인플루엔자 감염증 등이 포함될 수 있다.

[62] 본 발명의 일 실시예에서는 화학식 1의 올레아놀린산 아세테이트가 농도

의존적으로 STAT3 루시페라제 활성을 저해시킴을 확인하였으며(표 7), 특히 공지된 올레아놀린산보다도 현저히 우수한 염증성 질환의 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있음을 확인함으로써(도 14), 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물이 IL-6에 의한 STAT3의 활성화와 관련된 염증성 질환의 예방 또는 치료에 효과적임을 확인하였다.

- [63] 본 발명에서 상기 자가면역질환은 병적인 개체의 자체 항원에 대한 면역반응이 직간접 원인으로 나타나는 질환을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 바람직하게는 상기 TLR 및 IL-6에 의하여 매개되는 자가면역질환일 수 있다. 상기 자가면역질환은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 아토피성 피부염, 관절염, 건선, 천식, 이식편대 숙주질환, 면역결핍증, 전신 홍반성 루프스, 및 다발성 경화증이 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 아토피성 피부염 또는 관절염일 수 있다. TLR는 면역반응을 자극하고 자가면역질환의 발달에 연관되어 있고, IL-6에 의해서 활성화되는 STAT3는 다양한 자가면역질환에서 중요한 전사인자로서 기능하며, 그에 따라 본 발명에서 농도 의존적으로 STAT3 루시페라제 활성을 저해시킴을 확인한 화학식 1의 올레아놀린산 아세테이트는 TLR 및 IL-6에 의해 매개되는 자가면역질환에 효과적임을 확인하였다. 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 종래의 항산화제의 작용기작에 의한 것과는 상이한 작용기작에 의하여 치료효과를 나타낼 수 있다.
- [64] 본 발명에서 상기 암 질환은 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 종괴 또는 종양을 형성하는 질환을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 TLR 및 IL-6에 의하여 매개되는 암 질환일 수 있다. 상기 암 질환은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 골수종, 유방 암종, 전립선 암, 뇌 종양, 두경부 암종, 흑색종, 백혈병 및 림프종을 포함할 수 있다. IL-6에 의해서 활성화되는 STAT3는 그 구조적 활성화 및 과다발현이 만성 골수성 백혈병 또는 다발성 골수종을 포함한 여러 형태의 암에 관련되어 있어, 상기 STAT3의 활성을 저해시킴으로써 상기 암 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [65] 본 발명에서 상기 대사성 질환은 생체 내 물질대사 장애에 의해서 발생하는 질환을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 바람직하게는 TLR 및 IL-6에 의하여 매개되는 대사성 질환일 수 있다. 상기 대사성 질환은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 골다공증, 동맥경화, 및 심근경색을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 골다공증일 수 있다. IL-6의 과도한 생산은 특히 골다공증에 관여하는 것이 다양하게 밝혀지고 있으며, 이에 따라 본 발명의 조성물은 IL-6 매개성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 화학식 1의 화합물을 처리하는 경우, 농도 의존적으로 파골세포의 수와 크기가 줄어드는 것을 확인함으로써, 상기 화합물이 파골세포의 분화를 억제하여 골다공증의 예방 및 치료에 효과를 나타냄을 확인하였다(도 16).

- [66] 본 발명에서 상기 TLR 및 IL-6 매개성 질환은 상기 질환 외에도 TLR 및 IL-6에 의하여 매개되는 다양한 질환을 모두 포함할 수 있으며, 그 예로 아나필락시스 또는 과민성 반응, 알츠하이머병, 악액질, 비만, 초면역성 글로불린 혈증, 메니에르병, 통증, 과민성 폐질환, 내분비성 안과질환 등을 포함할 수 있다.
- [67] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 올레아놀린산 아세테이트가 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 유의적으로 저해하였으나, 스티그마스테롤은 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성에 대한 저해활성을 나타내지 않음을 확인하였다(표 4). 따라서, 상기 화학식 1의 화합물은 ssRNA인 poly(I)와 dsRNA인 poly(I:C)에 의해 유도되는 TLR7과 TLR3 신호전달 경로를 억제하고, 이의 분획물은 poly(I)에 의해 유도되는 TLR7의 신호전달 경로를 억제할 수 있으므로, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료에 적합함을 확인하였다.
- [68] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 화학식 1 및 2의 화합물이 농도 의존적으로 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해시켰으며(표 7), 화학식 1의 화합물은 공지된 올레아놀린산 보다도 현저하게 우수한 염증성 질환의 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다(도 14). 따라서, 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 IL-6에 의한 STAT3의 활성화와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [69]
- [70] 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 상기 올레아놀린산 아세테이트, 이의 염, 추출물 또는 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함하도록 제조함이 바람직하다.
- [71]
- [72] 본 발명의 용어 "약학적으로 허용되는 염"이란, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산,

시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[73]

[74]

본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 적소두 추출물과 분획물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 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 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 적소두 추출물과 이의 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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.

[75]

[76]

본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 보다 효과적인 예방 또는 치료를 위하여, 본 발명의 상기 올레아놀린산 아세테이트, 이의 염, 추출물 또는 분획물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여함이 바람직하고, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[77]

본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한

경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[78]

[79] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환 치료 방법을 제공한다.

[80]

본 발명에서 상기 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체는 TLR 및 IL-6 매개성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. TLR 및 IL-6 매개성 질환 및 투여에 관해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[81]

[82] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[83]

본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함함으로써, TLR 및 IL-6 매개성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. TLR 및 IL-6 매개성 질환에 대해서는 상기에서 언급한 바와 같으며, 상기 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 경우, TLR 및 IL-6 매개성 질환은 바람직하게는 자가면역질환, 암 질환 또는 대사성 질환일 수 있다.

[84]

본 발명의 일 실시예에서는 자가면역질환 중 대표적인 질환인 관절염 모델 마우스에서 적소두 추출물이 CIA 유발정도를 개선시킴을 확인하였으며(도 13), 대표적인 자가면역 피부질환인 아토피성 피부염 동물모델에서 적소두 추출물이 증세 개선 효과가 있음을 확인함으로써(도 9 및 10), 상기 적소두 추출물이 자가면역질환을 예방 또는 치료하는 데에 효과적인 유효성분임을 확인하였다. 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 적소두 추출물을 처리하는 경우, 농도 의존적으로 파골세포의 수와 크기가 줄어드는 것을 확인함으로써, 상기 추출물이 파골세포의 분화를 억제하여 골다공증의 예방 및 치료에 효과를 나타냄을 확인하였다(도 15).

[85]

[86] 본 발명의 용어 "적소두(赤小豆)"란 콩과의 팥(*Phaseolus angularis* Wight)의 종자를 의미하는데, 형태적으로는 원주모양으로 조금 납작하고 종피는 적갈색으로 매끈매끈하며 광택이 있으며, 약리활성의 측면에서는 이뇨, 소염, 배농, 해열, 진신부종, 간경화, 황달, 종기, 화농성 질환, 수종, 각기병, 소갈,

이질설사 등의 치료를 위한 민간요법에 사용되어 왔다. 그러나, 본 발명의 TLR-3 및 TLR-7 활성화에 의해 유도되는 질환의 치료용도에 대하여는 알려진 바 없으며, 본 발명자들에 의하여 최초로 규명되었다. 본 발명의 목적상, 상기 적소두는 팥(*Phaseoli angularis* Wight) 또는 이팥(또는 덩굴팥, *Phaseolus calcaratus* Roxburgh)의 종자를 의미하는 것으로 사용되지만, 이에 제한되지는 않는다.

- [87] 본 발명의 용어 "적소두 추출물"이란 적소두를 추출하여 수득한 추출물을 의미하는데, 본 발명의 목적상, 적소두 추출물은 적소두의 분쇄물을 물, 탄소수 1 내지 6의 알콜(메탄올, 에탄올, 부탄올 등), 이들의 혼합 용매 등으로 추출하여 수득한 결과물이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않고, 상기 결과물은 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물 등을 모두 포함한다.
- [88] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 적소두 분쇄물을 건조 중량의 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올 등과 같은 탄소수 1(C1) 내지 6(C6)의 알콜의 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매를 용출 용매로써 사용하고, 추출 온도는 20 내지 100°C, 바람직하게는 실온에서, 추출 기간은 약 12시간 내지 4일, 바람직하게는 3일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출할 수 있다. 바람직하게는 냉침추출로 1회 내지 5회 연속 추출하여 감압여과하고, 그 여과추출물을 진공회전농축기로 20 내지 100°C, 바람직하게는 실온에서 감압농축하여 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 적소두(팥 및 이팥) 조추출물을 수득할 수 있다.
- [89] 본 발명의 용어 "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명에서는 바람직하게는 적소두의 추출물을 n-헥산, 에틸아세테이트 등의 용매를 이용한 용매분획방법으로 분획한 결과물일 수 있으며, 극성 용매 분획물과 비극성 용매 분획물을 모두 포함하며, 구체적으로는 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물 등이 모두 사용될 수 있다.
- [90] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 수득한 적소두 조추출물을 증류수에 현탁한 후, 현탁액의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 헥산, 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 2회 내지 5회에 걸쳐 비극성 용매 가용층을 추출, 분리하여 수득할 수 있다. 또한 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다(Harborne J.B. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed. p6-7, 1998). 구체적으로, 상기 적소두 조추출물을 물에 현탁한 후, 등량의 n-헥산 및 에틸아세테이트 용매를 이용하여 연속 추출로 적소두 각 용매 가용 추출물을 수득할 수 있고, 더욱 구체적으로는 적소두 조추출물을 물에 현탁한 후, 등량의 n-헥산을 혼합한 후 분획하여 n-헥산 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있으며, 이 수가용성 분획물에 에틸아세테이트를 가하여

에틸아세테이트 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있다.

[91]

[92] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 적소두의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물이 poly(I)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 유의적으로 저해하고(도 2), poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 적소두의 메탄올 추출물이 유의적으로 저해하며(도 3), 적소두의 95% 메탄올 추출물은 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 유의적으로 저해하였으나, 50% 메탄올 추출물에서는 낮은 저해활성을 나타냄을 확인하였고(표 2 및 표 3), 적소두 추출물은 poly(I) 또는 poly(I:C)에 의해 유도되는 염증성 인자의 발현을 억제시킴을 확인하였다(도 6 및 도 7). 따라서, 발명의 적소두 추출물은 ssRNA인 poly(I)와 dsRNA인 poly(I:C)에 의해 유도되는 TLR7과 TLR3 신호전달 경로를 억제하고, 이의 분획물은 poly(I)에 의해 유도되는 TLR7의 신호전달 경로를 억제할 수 있으므로, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료에 적합함을 확인하였다.

[93]

본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 적소두 추출물이 poly(I)와 poly(I:C)에 의해 활성화되는 전사인자인 NF- κ B(p65, p50)와 AP-1(p-c-Jun)의 핵내 이동을 농도 의존적으로 감소시키고(도 4a, 4b, 5a 및 5b), NF- κ B의 상위 단계인 IKK, I κ B의 활성화를 농도 의존적으로 감소시키며(도 4c, 4d, 5c 및 5d), MAP 키나아제 신호전달계인 JNK, p-38의 인산화 활성을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다(도 4e 및 5e). 또한 poly(I:C)에 의해 유도되는 TLR3의 신호전달과정 중 하나인 IRF3의 인산화 활성화에도 적소두 추출물이 농도 의존적인 억제활성을 나타냄을 확인하였다(도 5f). 이상의 결과로, 본 발명에서 적소두 추출물은 TLR 및 IL-6 매개성 질환을 예방 또는 치료하는데 적합함을 알 수 있었다.

[94]

또한, 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 적소두의 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물은 농도 의존적으로 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해시키고(표 5 및 표 6), 아토피성 피부염 동물모델에 적소두 추출물을 섭취시킨 결과, 아토피성 피부염에 대한 증세가 개선되었으며(도 9 및 도 10), 호산구 수치가 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군에 비해 감소됨을 확인하였다(도 11). 아울러, 적소두 추출물은 관절염(collagen-induced arthritis, CIA) 모델 마우스에서 CIA 유발정도를 개선시켰다(도 13). 따라서, 본 발명의 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물은 IL-6에 의한 STAT3의 활성화와 관련된 질환, 예컨대 아토피성 피부염, 관절염 등의 예방 또는 치료에 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[95]

[96] 본 발명의 상기 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학적 조성물 역시 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는

희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[97]

[98] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환 치료 방법을 제공한다. 상기 조성물은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물이며, 상기 TLR 및 IL-6 매개성 질환, 의심개체 및 투여에 관해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[99]

[100] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 또는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[101] 상기 화학식 1의 화합물, 적소두 추출물 또는 이의 분획물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같으며, 상기 유효성분은 TLR 및 IL-6 매개성 질환을 예방 또는 개선할 수 있는 피부 외용제에 포함될 수 있다. 상기 피부 외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다.

[102]

[103] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 또는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[104] 상기 화학식 1의 화합물, 적소두 추출물 또는 이의 분획물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같으며, 상기 유효성분은 TLR 및 IL-6 매개성 질환을 예방 또는 개선할 수 있는 건강기능식품에 포함될 수 있다.

[105]

[106] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 종래로부터 약제로 사용되어온 적소두의 추출물로부터 유래되어 그의 안전성이 입증되었으므로 식품 조성물로 사용할 수 있다. 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이들을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물은 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함한다. 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1~30g, 바람직하게는 3 ~ 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate),

판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[107]

[108] 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이들을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 식품 조성물을 이용하여 다양한 기능성식품을 제조할 수 있다.

[109]

본 발명에서 용어, "기능성식품(functional food)"은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 본 발명에서 용어, "건강식품(health food)"은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강 보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다. 상기 식품은 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 개선 및 회복에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[110]

[111] 이러한 기능성 식품의 구체적인 예로, 상기 조성물을 이용하여 농산물, 축산물 또는 수산물의 특성을 살려 변형시키는 동시에 저장성을 좋게 한 가공식품을 제조할 수 있다. 상기 조성물을 포함하는 건강기능식품은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 마아가린, 지방 지속성(fat continuous) 또는 물 지속성(water continuous) 또는 양쪽 지속성(bicontinuous) 스프레드, 지방 감소된 스프레드, 초콜렛, 또는 초콜렛 코팅 또는 초콜렛 속(fillings) 또는 베이커리 속과 같은 과자류, 아이스크림, 아이스크림 코팅, 아이스크림 함유물, 드레싱, 마요네즈, 치즈, 크림 대체물, 건조 스프, 드링크, 시리얼 바, 소스, 스낵바, 유제품, 임상 영양식품, 소아용식품 등의 형태로 제조된 것을 사용할 수 있다.

[112]

[113] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 또는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의

약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 개인위생용품을 제공한다.

- [114] 상기 화학식 1의 화합물, 적소두 추출물 또는 이의 분획물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같으며, 상기 유효성분은 TLR 및 IL-6 매개성 질환을 예방 또는 개선할 수 있는 개인위생용품에 포함될 수 있다. 이때, 상기 개인위생용품은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 비누, 화장품, 물티슈, 휴지, 샴푸, 피부 크림, 얼굴 크림, 치약, 립스틱, 향수, 메이크-업, 파운데이션, 볼터치, 마스크라, 아이섀도우, 선스크린 로션, 모발 손질 제품, 에어프레쉬너 젤, 세정 젤 등이 될 수 있다.

[115]

발명의 실시를 위한 형태

- [116] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[117]

- [118] **실시예 1: 적소두 추출물 및 분획물의 제조 및 화학식 1 및 2의 화합물의 분리정제**

- [119] **실시예 1-1: 적소두 추출물의 제조**

- [120] 적소두(팥 또는 이팥)는 물로 깨끗이 세척하여 그늘에서 건조한 후, 와링 브랜드로 분말화시켰다. 분말화된 적소두 20 kg을 메탄올 100 ℓ에 넣고 실온에서 3일간 냉침 추출한 후, 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 실온에서 메탄올 용매를 제거한 후 추출된 잔사로서 적소두 추출물 450g을 제조하였다.

[121]

- [122] **실시예 1-2: 분획물의 제조**

- [123] 상기 제조된 적소두 추출물에서 활성 분획물을 분리하기 위하여, 적소두 추출물을 물 1ℓ에 현탁시키고 동량의 n-헥산을 가하여 혼합하여 분획하고, 이 과정을 4회 반복하여 수가용성 분획물 1ℓ와 n-헥산 가용성 분획물 4ℓ를 수득하였다.

- [124] 이어, 상기 n-헥산 가용성 분획물을 감압 농축하여 n-헥산 가용 추출물 50g을 수득하였다.

- [125] 또한, 상기 수가용성 분획물 1ℓ에 동량의 에틸아세테이트를 가하여 혼합하여 분획하고, 이 과정을 3회 반복하여 수가용성 분획물 1ℓ와 에틸아세테이트 가용성 분획물 3ℓ를 다시 수득하였다.

- [126] 상기 수득한 에틸아세테이트 가용성 분획물을 감압농축하여 에틸아세테이트 가용 추출물 35g을 수득하고, 남은 수가용성 분획물을 감압농축하여 35g을

수득하였으며, 이를 물 분획물로 사용하였다.

[127]

[128] **실시예 1-3: 적소두 추출물 및 분획물의 HPLC 분석**

[129] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 수득한 각각의 적소두 추출물 및 분획물을 대상으로 하여 HPLC 분석을 수행하였다.

[130] 이때, HPLC는 Agilent Technologies 1200 series를 사용하였고, 분석용 컬럼은 YMC 사의 J'sphere ODS-H80(YMC, 4 μ m, 4.6mm I.D. x 150mm) 컬럼을 사용하였다(도 1a 및 1b). 이때, 분석용매는 5%~90% CH₃CN을 1ml/min 흘려주면서 210nm에서 분석하였고, 시료는 10 μ l를 주입하였다(표 1).

[131]

[132] 표 1

[Table 1]

용매조건

시간(분)	용매(%)	
	CH ₃ CN	H ₂ O
0	5	95
15	5	95
25	30	70
30	30	70
50	90	10
70	90	10

[133]

[134] 도 1a는 팔의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물의 HPLC 수행결과를 나타내는 크로마토그램이고, 도 1b는 이팔의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물의 HPLC 수행결과를 나타내는 크로마토그램이다.

[135] 상기 도 1a 및 1b에서 보듯이, 카테킨-7-글루코피라노시드(catechin-7-glucopyranoside, catechin-7-glu), 루틴(rutin), 올레아놀린산 아세테이트(oleanolic acid acetate, OAA) 및 스티그마스테롤(stigmasterol)의 피크는 각각 5.5, 24.5, 35.5, 35.5 분대에 관찰되었으며, 팔 및 이팔의 HPLC 크로마토그램은 상호 유사한 패턴을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[136]

[137] **실시예 1-4: 유효성분의 정제**

[138] 상기 실시예 1-2에서 수득한 n-헥산 분획물 80g을 헥산:에틸아세테이트(100:1 → 1:1)로 구성된 단계농도 구배(step gradient) 용매 시스템을 이용하여 실리카겔

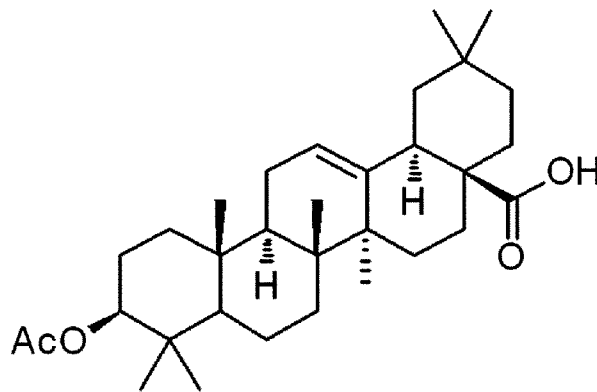
컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography)에 적용하여 5개의 활성분획(Fr.1-5)을 수득하였다. 상기 활성분획 중에서 3번 및 4번 분획에 메탄올을 가하여 재결정과정을 수행함으로써, 흰색분말상을 나타내는 2종의 화합물을 정제하였다.

- [139] 상기 정제한 2종의 화합물을 기기분석(^1H -, ^{13}C -NMR, MS) 및 문헌 값(Voutquenne L. et al. *Phytochemistry* 2003, 64, 781?789; Kongduang D. et al. *Tetrahedron letters* 2008, 49, 4067-4072)에 적용하여, 각각 올레아놀린산 아세테이트(oleanolic acid acetate, 화학식 1) 및 스티그마스테롤(stigmasterol, 화학식 2)임을 확인할 수 있었다.

[140]

[141] 화학식 1: 올레아놀린산 아세테이트

[142]

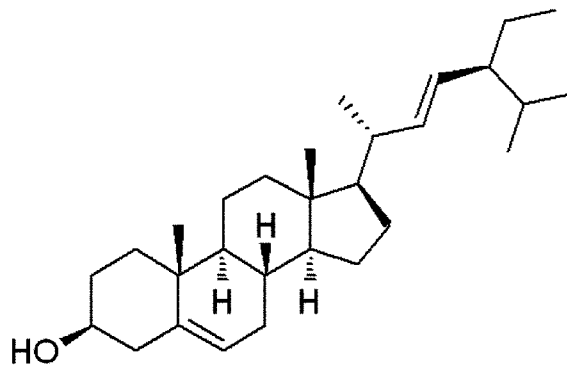


- [143] 4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid acetate

[144]

[145] 화학식 2: 스티그마스테롤

[146]



- [147] (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(E,2R,5S)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol

[148]

- [149] 실시예 2: 적소두 추출물, 분획물 및 화합물의 poly(I) 또는 poly(I:C) 처리에 의한 NFκB/AP-1 의존적 SEAP 활성 저해 효과

- [150] THP1-Blue-CD14 세포를 2×10^5 cells/ $100 \mu\text{l}$ 의 농도로 96웰 플레이트에 접종하고 37°C 에서 3시간 동안 배양하였다.
- [151] 시료로서 상기 실시예 1-1 내지 1-2에서 수득한 적소두 추출물 및 각 분획물을 세포배양액에 1시간 전처리 하고, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Poly(I) 혹은 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 poly(I:C)를 처리함으로써 NFkB/AP-1 의존적 SEAP 활성저해 효과를 측정하였다(도 2 및 도 3).
- [152] 도 2는 적소두의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물의 THP-1-blue 세포에서 poly(I) 처리에 의해 증가된 SEAP 활성 저해 효과를 나타낸 그래프이고, 도 3은 적소두 메탄올 추출물의 THP-1-blue 세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 증가된 SEAP 활성 저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [153] 도 2에서 보듯이, 적소두의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물이 poly(I)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 유의적으로 저해하는 것을 확인하였고, 도 3에서 보듯이, poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 적소두의 메탄올 추출물이 유의적으로 저해함을 확인하였다.
- [154]
- [155] 또한, 적소두 추출물의 원천에 따라 차이를 나타내는 지를 확인하기 위하여, 팔으로부터 유래된 추출물과 이팔으로부터 유래된 95% 및 50% 메탄올 추출물을 대상으로 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 저해활성을 측정하였다(표 2 및 3).
- [156]
- [157] 표 2

[Table 2]

poly(I) 처리에 의해 증가된 SEAP 활성 저해 효과

시료($\mu\text{g/ml}$)		저해도(%)
팔95% 메탄올 추출물	100	27.09
	60	12.58
	30	-
팔50% 메탄올 추출물	100	3.07
	60	8.79
	30	15.23
이팔95% 메탄올 추출물	100	41.66
	60	27.21
	30	16.80
이팔50% 메탄올 추출물	100	17.04
	60	24.92
	30	26.07
루테올린(μM)	60	96.27
	30	79.23

[158]

[159] 표 3

[Table 3]

poly(I:C) 처리에 의해 증가된 SEAP 활성 저해 효과

시료($\mu\text{g/ml}$)		저해도(%)
팔95% 메탄올 추출물	100	71.61
	60	64.64
	30	36.96
팔50% 메탄올 추출물	100	16.07
	60	30.71
	30	10.71
이팔95% 메탄올 추출물	100	87.50
	60	82.14
	30	68.57
이팔50% 메탄올 추출물	100	27.68
	60	27.68
	30	7.14
루테올린(μM)	60	67.32
	30	47.68

[160]

[161] 상기 표 2 및 표 3에서 보듯이, 적소두의 종류(팔 또는 이팔)에 상관없이 95% 메탄올 추출물은 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 유의적으로 저해하였으나, 50% 메탄올 추출물에서는 낮은 저해활성을 나타냄을 확인하였다.

[162]

[163] 한편, 헥산 분획물로부터 정제한 화학식 1의 올레아놀린산 아세테이트 또는 화학식 2의 스티그마스테롤의 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성에 미치는 영향을 조사하였다(표 4).

[164]

[165] 표 4

[Table 4]

poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성화에 미치는 올레아놀린산 아세테이트 또는 스티그마스테롤의 효과

시료(μ M)		저해도(%)	
		poly(I:C)	poly(I)
올레아놀린산 아세테이트	100	64.39	83.01
	60	47.16	74.58
	30	9.28	43.90
	10	-	2.02
스티그마스테롤	100	-	1.42
	60	4.92	2.63
	30	8.71	-
카테킨-7-글루코피라노시드	60	11.16	-
	30	13.19	-
루틴	60	-	-
	30	-	-

[166]

[167] 상기 표 4에서 보듯이, 올레아놀린산 아세테이트는 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성을 유의적으로 저해하였으나, 스티그마스테롤은 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성화에 대한 저해활성을 나타내지 않았다. 뿐만 아니라, 적소두의 주요 화합물로 알려진 카테킨-7-글루코피라노시드 및 루틴에 대한 저해활성을 검증해본 결과 poly(I) 및 poly(I:C)에 의해 유도된 SEAP의 활성화에는 영향을 주지 않음을 확인하였다.

[168]

[169] **실시예 3: poly(I) 또는 poly(I:C)에 의해 유도되는 염증성 인자 발현에 대한 적소두 메탄올 추출물의 효과**

[170] 적소두 메탄올 추출물의 poly(I)와 poly(I:C)에 의해 유도되는 염증성 인자 발현 억제효과를 측정하기 위해, Human peripheral blood monocytic cell line인 THP-1을 이용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[171] 먼저, poly(I) 혹은 poly(I:C)에 의해 유도되는 염증성 인자 억제 효과 측정을 위해 THP-1 세포를 12웰 플레이트에 각 웰당 5×10^5 세포수가 되도록 분주하고, FBS를 첨가하지 않은 RPMI 1640(penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g) 배지로 배양하였다. 12 시간 후, 적소두 메탄올 추출물의 최종농도가 60 μ g/ml 가 되도록 DMSO(dimethylsulfoxide) 로 희석하여 1시간 전처리 하고, 50 μ g/ml의 poly(I) 혹은

100 μ g/ml의 poly(I:C)를 처리하여 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 세포를 튜브에 모아 원심분리 하여 배지를 제거하고, PBS로 1회 세척한 후, RNeasy Mini Elute Cleanup kit를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA의 농도와 순도는 2100 Bioanalyzer system(Agilent Technologies)로 측정하였고, Taqman reverse transcription reagents kit(Applied Biosystems)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 염증성인자의 발현 정도는 SYBR Green PCR master mix kit(Applied Biosystem)를 사용해 Real-time PCR을 통해 측정하였다(도 6 및 도 7).

[172] 도 6은 적소두 메탄올 추출물의 THP-1 세포에서 poly(I) 처리에 의해 유도된 염증성 사이토카인의 발현억제효과를 나타내는 그래프이고, 도 7은 적소두 메탄올 추출물의 THP-1 세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 유도된 염증성 사이토카인의 발현억제효과를 나타내는 그래프이다. 도 6 및 도 7에서 보듯이, 대조군에 비해 50 μ g/ml의 poly(I)를 처리한 군에서는 염증성 인자인 TNF α , IL-6, MCP-1, RANTES, IFN β 의 발현이 유의적으로 증가하고, 100 μ g/ml의 poly(I:C)를 처리한 군에서 대조군과 비교할 때 염증성 인자인 TNF- α , IL-6, ICAM-1, MCP-1의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[173] 이에 반하여, 적소두 메탄올 추출물(60 μ g/ml)을 1시간 전 처리한 군에서는 각각의 염증성 인자 모두에서 그 수치가 유의적으로 억제되는 것으로 나타나, 적소두 메탄올 추출물이 poly(I) 또는 poly(I:C)에 의해 유도되는 염증성 인자의 발현을 억제시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

[174]

[175] 실시예 4: 적소두 메탄올 추출물에 의해 조절되는 TLR-7 및 TLR-3 신호전달 경로

[176] TLRs(Toll-like receptors)에 각각의 리간드가 결합하면, MyD88 혹은 TRIF adaptor가 TLRs로 이동하게 되는데, 리간드로 TLR7에는 ssRNA가, TLR3에는 dsRNA가 결합하게 되면 세포내로 신호전달이 개시되어, NF κ B와 MAPK/AP-1를 공통으로 활성화시키고, TLR3는 IRF-3 경로를 추가적으로 활성화 시켜 염증성 사이토카인을 생성한다. 따라서, 본 발명의 적소두 추출물이 TLR7, TLR3의 신호전달 경로에 미치는 영향을 다음과 같은 실험을 통해 확인하였다.

[177] 먼저, THP-1 세포를 각 웰당 1.5 $\times$ 10⁶ 세포수가 되도록 분주하여 FBS를 첨가하지 않은 RPMI 1640 배지에 12시간 배양하였다. 그 후, 추출물을 30, 60 또는 100 μ g/ml의 농도로 1시간동안 전처리 하고, 50 μ g/ml의 poly(I) 혹은 100 μ g/ml의 poly(I:C)를 각각 3시간 처리하였다. 3시간 후, 세포를 튜브에 옮겨 원심분리를 통해 배지를 제거하고, PBS로 1회 세척한 다음, NE-PER Nuclear extraction reagents(Thermo scientific)과 Cell lysis buffer를 사용해 핵 추출물과 총 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯분석을 수행하였다. 상기 핵추출물에서는 NF κ B p65/p50 및 p-c-Jun을 확인하였고, 총 단백질에서는 MAPKs, I κ B, IKK isoforms, IRF3를 측정하였다(도 4 및 도 5).

[178] 도 4a는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1 세포에서 poly(I) 처리에 의해 활성화

되어 핵으로 이동하는 NF κ B P50의 활성을 억제하는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고, 도 4b는 AP-1의 C-Jun 활성을 억제하는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이며, 도 4c는 IKK α/β 의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고, 도 4d는 I κ B의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이며, 도 4e는 p38 및 JNK의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.

[179] 또한, 도 5a는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I:C) 처리에 의해 활성화 되어 핵으로 이동하는 NF κ B P65/p50의 활성을 억제하는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고, 도 5b는 AP-1의 C-Jun 활성을 억제하는 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고, 도 5c는 IKK α/β 의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이며, 도 5d는 I κ B의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고, 도 5e는 적소두 메탄올 추출물의 THP-1세포에서 poly(I) 처리에 의해 인산화되는 p38 및 JNK의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이며, 도 5f는 IRF3의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다.

[180]

[181] 상기 도 4 및 도 5에서 보듯이, 적소두 추출물이 poly(I)와 poly(I:C)에 의한 NF κ B와 p-c-Jun의 핵내 이동을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인 할 수 있었고(도 4a, 4b, 5a 및 5b), NF κ B의 상위 단계인 IKK, I κ B의 활성화도 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인 할 수 있었으며(도 4c, 4d, 5c 및 5d), AP-1 활성화의 상위 단계인 MAPKs, 즉 JNK, p-38의 활성화 또한, 추출물에 의해서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었고(도 4e 및 5e), TLR3의 신호전달에서 나타나는 P-IRF3의 활성화에도 적소두 추출물이 농도 의존적인 억제활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(도 5f).

[182]

[183] 이상의 결과들을 종합해보면, 적소두 추출물은 TLR-7와 TLR-3의 신호전달 경로에서 NF κ B와 MAPKs/ AP-1의 활성화를 억제시킴으로서, 염증성 인자들의 발현을 억제 한다는 사실을 확인할 수 있었다.

[184]

[185] 실시예 5: 적소두 추출물, 분획물 및 화합물의 IL-6에 의해 유도되는 STAT3의 전사활성 억제 효과

[186] 적소두 추출물, 분획물 및 이로부터 정제된 각 화합물의 IL-6에 의해 유도되는 STAT3의 발현억제 효과를 확인하였다.

[187] 실시예 5-1: 형질전환체 제조

[188] Hep3B 세포(ATCC HB-8064)에 pStat3-Luc와 pcDNA3.1(+)(Clontech laboratories, Palo Alto, CA)을 리포펙타민 플러스(lipofectamin plus, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 함께 형질감염 시켰다. 이를 후 부터 하이그로마이신을 처리(100 μ g/ml)하여, 루시퍼라제가 안정하게 발현되는 클론을 얻었다. 상기 클론에서 루시퍼라제가 안정하게 발현되는지는 루시퍼라제 분석법을 통해

확인하였다.

[189]

[190] 실시예 5-2: IL-6 반응성 STAT3 리포터 유전자 검사

[191] 상기 실시예 5-1에서 수득한 클론에 포함된 형질감염된 세포를 DMEM(GIBCO 119950965)으로 무혈청 배양(serum starvation)하고 시료를 하기와 같이 1시간 처리한 후 10ng/ml IL-6(R&D system, USA)를 첨가하여 12시간 동안 배양하였다.

[192] 1: 음성대조군(비처리군);

[193] 2: 양성대조군(IL-6 10ng/ml); 및

[194] 3: 분획물(10, 30, 60 μ g/ml) 및 화합물.

[195]

[196] 상기 배양된 세포를 PBS로 세척하고 50 μ l 용해 완충용액(luciferase assay system, promega, USA)을 넣고 20분간 교반한 후, 30-100 μ l의 루시페라제 기질(luciferase assay system, promega, USA)을 넣고 발색정도를 루미노미터(luminometer; EG&G BERTHOLD, USA)로 5분 안에 측정하였다(표 5 및 표 6).

[197]

[198] 표 5

[Table 5]

STAT3 루시퍼라제 활성화에 대한 적소두 메탄올 추출물 및 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물의 활성저해 효과

시료($\mu\text{g/ml}$)		저해율(%)	세포생존율(%)
메탄올	60	34.3	98.5
	30	31.1	97.0
	10	13.9	94.8
	6	3.3	93.5
헥산	60	102.2	94.1
	30	96.2	99.4
	10	53.2	101.5
	6	18.2	103.0
에탄올	60	100.9	93.7
	30	98.6	98.9
	10	74.4	98.5
	6	52.1	96.7
부탄올	60	25.1	105.2
	30	25.8	101.1
	10	5.8	97.3
	6	-	94.3
증류수	60	27.2	89.0
	30	30.2	91.2
	10	17.3	95.2
	6	9.4	93.1
제니스테인(μM)	100	95.2	-

[199]

[200] 상기 표 5에서 보듯이, 적소두의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물은 농도 의존적으로 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해함을 알 수 있었다.

[201]

[202] 표 6

[Table 6]

STAT3 루시퍼라제 활성화에 대한 팔 및 이팔의 95% 및 50% 메탄올 추출물의 활성저해 효과

시료($\mu\text{g/ml}$)		저해율(%)	세포생존율(%)
팔 95% 메탄올 추출물	60	37.7	94.1
	30	5.9	91.4
팔 50% 메탄올 추출물	60	24.9	96.3
	30	-	99.9
이팔 95% 메탄올 추출물	60	68.3	87.3
	30	34.8	89.5
이팔 50% 메탄올 추출물	60	22.2	101.2
	30	8.7	104.3
제니스테인(μM)	100	95.1	-

[203]

[204] 상기 표 6에서 보듯이, 팔 및 이팔의 95% 및 50% 메탄올 추출물들은 농도 의존적으로 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해함을 알 수 있었다.

[205]

[206] 한편, 헥산 분획물로부터 정제된 올레아놀린산 아세테이트와 스티그마스테롤에 의한 STAT3 루시퍼라제 활성억제 효과를 측정하였다(표 7).

[207]

[208] 표 7

[Table 7]

STAT3 루시퍼라제 활성화에 대한 올레아놀린산 아세테이트와 스티그마스테롤의 활성저해 효과

시료(μM)		저해율(%)
올레아놀린산 아세테이트	30	100
	10	97.2
	6	95.1
	3	84.3
	1	51.2
스티그마스테롤	100	58.4
	60	29.4
	30	-
	10	-
카테킨-7-글루코피라노시드	100	0.4
	60	15.9
	30	8.3
	10	-
루틴	100	-
	60	-
	30	-
	10	-
제니스테인	100	95.4

[209]

[210] 상기 표 7에서 보듯이, 올레아놀린산 아세테이트와 스티그마스테롤은 농도 의존적으로 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해하였으며, IC₅₀ 값은 각각 <1 μM 과 90 μM 로 측정되었다. 그러나, 적소두의 주요 화합물로 알려진 카테킨-7-글루코피라노시드와 루틴은 STAT3 루시퍼라제 저해활성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[211]

[212] 실시예 5-3: IL-6 유도 STAT3 인산화 저해활성 검정

[213] 6 웰 플레이트에 각 웰당 5×10^5 세포수가 되도록 Hep3B 세포를 분주하여 배양접시에 80% 정도로 배양한 후, 무혈청 배지로 교환하여 추가로 12시간 배양하고 하기와 같이 시료를 60분간 처리하였다.

- [214] 1: 음성대조군(비처리군);
- [215] 2: 양성대조군(IL-6 10ng/ml);
- [216] 3: 분획물(10, 30 또는 60 μ g/ml) 및 화합물 1(3, 6, 10 또는 30 μ M)
- [217] 4: 제니스테인 처리군(100 μ M).
- [218]
- [219] 그런 다음, 20ng/ml IL-6를 처리하여 20분간 반응한 뒤 40 μ l 용해 완충용액(pH 8, 20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1mM Na₃VO₄, 2mM EDTA, 1mM APMSF, 20 μ M 류펩틴(leupeptin), 20 μ g/ml 아프로토닌(aprotinin; Sigma, USA)을 사용하여 세포를 용해시킨 후, 원심분리(13000g, 15분)하여 단백질이 포함된 상등액을 수득하였다. 단백질의 농도는 DC 단백질 검사 키트(Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였고, 4~12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔(SDS-PAGE)에 단백질을 로딩하여 175mA에서 2시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 겔의 단백질을 PVDF 멤브레인(Westran S, pore size 0.2mm; Whatman, USA)으로 35V에서 90분 동안 전사시켰다. 전사된 멤브레인을 Tris-완충용액(T-TBS; 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 0.2% Tween-20, 5% skim milk; Sigma, USA)으로 상온에서 1시간 차단하고 T-TBS로 5번 세척하였다. 상기 멤브레인에 일차항체로 phospho-STAT3(1:1000 희석)의 다클론 항체를 4°C에서 12시간 동안 처리하였다. T-TBS로 5번 세척 후 이차항체로 HRP-결합 항-마우스 항체(1:5000 희석)를 1시간 반응시켰다. T-TBS로 세척한 다음 암실에서 ECL 키트(Amersham, USA)를 이용하여 필름을 현상시켰다(도 8a 및 8b).
- [220] 도 8a는 적소두 메탄올 추출물의 Hep3B 세포에서 IL-6 처리에 의해 유도되는 STAT3 인산화를 저해하는 효과를 나타내는 사진이고, 도 8b는 적소두로부터 분리 정제된 화합물 1의 Hep3B 세포에서 IL-6 처리에 의해 유도되는 STAT3 인산화를 저해하는 효과를 나타내는 사진이다.
- [221] 도 8a 및 8b에서 보듯이, 적소두 추출물 및 화합물 1의 화합물은 IL-6 유도 STAT3 인산화 저해 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [222]
- [223] **실시예 6: 적소두 메탄올 추출물의 아토피성 피부염에 대한 증상개선 효과**
- [224] 실험동물모델에 사용되는 무특이 병원체(Specific Pathogen Free, SPF) NC/Nga 마우스는 SLC, Inc.(Japan)으로부터 구입하였으며, 실험을 하기 위하여 이들 마우스를 일정한 온도(23 $\pm$ 3°C), 습도(55 $\pm$ 15%) 및 조사량(7:00시부터 19:00시까지) 하에서 사육하였다. 구입 후 생후 8주령 된 암컷 NC/Nga 마우스를 SPF 동물사육실에서 1주일 동안 안정시킨 후 실험에 사용하였다.
- [225] NC/Nga 마우스는 크게 3개의 실험군으로 나누었다. 구체적으로, ① 아토피성 피부염을 유발하지 않은 음성대조군, ② 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군 및 ③ 아토피성 피부염 유발 및 투약군으로 설정하였다.
- [226] 활성평가용 시료인 적소두 메탄올 추출물은 100% 에탄올을 이용하여 녹인 후

사료에 첨가하여 2주 동안 개체에 용량별로 섭취하게 하였다. 2주 후 아토피성 피부염을 유발하기 위해 1% 농도의 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)를 0.2%로 희석하여 100 μ l를 4일 간격으로 전 실험 기간 동안 NC/Nga 마우스의 등 피부 전체에 도포하여 감작시켰다. DNCB를 도포한 후 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군 및 투약군에 있는 NC/Nga 마우스와 비교하여 피부 중증도(skin severity)를 조사하였다.

- [227] 아토피성 피부염에 대한 피부 중증도(skin severity)는 홍반(erythema), 부종(edema), 건조도(dryness), 표피박리증(excoriation)에 대한 정도를 임상적 지표로 하여 각각의 증상에 대해 수치화한 후 이들의 값을 실험군의 평균 수치로 나타내었다. 각각의 증상에 대한 값은 육안 관찰을 통해 증상에 따라 가벼움(점수 1), 보통(점수 2), 심함(점수 3)으로 표기하였으며, 피부 중증도는 아래의 수식을 계산한 값을 나타내었다(도 9 및 10).

[228]

[229] 피부중증도 = Σ 개체의(홍반 + 부종 + 건조도 + 표피박리증)/개체수

[230]

- [231] 도 9는 적소두 메탄올 추출물의 NC/Nga 마우스에서 DNCB에 의해 유도되는 아토피성 피부염에 대한 증세가 개선되는 효과를 NC/Nga 마우스의 등 피부를 나타내는 사진이고, 도 10은 적소두 메탄올 추출물의 NC/Nga 마우스에서 DNCB에 의해 유도되는 아토피성 피부염에 대한 증세가 개선되는 효과를 피부 중증도로 나타내는 그래프이다.

- [232] 도 9 및 10에서 보듯이, 아토피성 피부염을 유발하지 않은 음성대조군은 아토피성 피부염을 포함하여 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았지만 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군에서는 DNCB를 도포한 후 7일령부터 홍반 및 부종 등의 증세를 포함하는 아토피성 피부염의 증세가 발생함을 확인하였다.

- [233] 한편, 아토피성 피부염 유발 및 투약군은 적소두 메탄올 추출물을 하루 동안 50mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg 농도로 섭취하게 한 결과 각각의 투약군 모두에서 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군에 비해 홍반, 부종 등의 아토피성 피부염에 대한 증세가 개선되는 효과를 확인할 수 있었다.

[234]

- [235] 실시예 7: 적소두 메탄올 추출물의 혈액내의 호산구(eosinophil) 수치에 대한 감소 효과

- [236] 실시예 6의 아토피성 피부염을 유발하지 않은 음성대조군, 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군, 그리고 아토피성 피부염 유발 및 투약군에 대해 호산구 수치에 대한 변화를 조사하였다.

- [237] 구체적으로, DNCB를 도포하기 시작한 최초일로부터 22일 후 각각 실험군의 NC/Nga 마우스를 희생하여 혈액내의 호산구 수치를 자동혈액분석기(Automated Hematology Analyzer)를 이용하여 측정하였다(도 11).

- [238] 도 11은 적소두 메탄올 추출물의 NC/Nga 마우스에서 DNCB에 의해 유도되는

아토피성 피부염에 대한 혈액내의 호산구 변화를 수치로 나타내는 그래프이다. 도 11에서 보듯이, 아토피성 피부염을 유발하지 않은 음성대조군에 비해 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군에서는 호산구(eosinophil) 수치가 증가하였으며, 아토피성 피부염 유발 및 투약군은 적소두 메탄올 추출물을 하루 동안 50mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg 농도로 섭취하게 한 결과 각각의 투약군 모두에서 호산구(eosinophil) 수치가 아토피성 피부염 유발 및 비투약 대조군에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[239]

[240] 실시예 8: 적소두 메탄올 추출물의 콜라겐 유도에 의한 CIA 관절염마우스에 대한 증상개선 효과

[241] 먼저, 암컷 6주령의 DBA/1 OlaHsd 마우스(15~20g)는 HARLAN(San Jose, CA, USA)사에서 공급받았고, 동물은 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12 시간(light-dark cycle)의 환경에서 1 주간 적응시킨 다음, 이후의 실험에 사용하였다.

[242]

[243] 다음으로, 상기 적응된 DBA/1 OlaHsd 마우스를 이용하여 류마티스 관절염 마우스(CIA) 모델을 제조하였다.

[244] 구체적으로, DBA/1 OlaHsd 마우스 6마리를 한 군으로 관절염을 유발시키지 않은 정상군과 CIA로 유발시키고 약물을 처리하지 않은 대조군 및 methotrexate(2 mg/kg) 처리군, 적소두 메탄올 추출물 처리군(100 mg/kg)으로 나누었다. CIA 유발은 8주령의 DBA/1 OlaHsd 마우스에 100μg의 소의 제2형 콜라겐과 0.1ml 어쥬번트(Complete Freund's Adjuvants)를 혼합하여 마우스 꼬리의 등위 부분에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 부스팅하여 CIA 모델을 제조하였다.

[245]

[246] 끝으로, 상기 제조된 CIA 모델에 적소두 메탄올 추출물 투여하고 관절염 지표(Arthritis index, AI) 및 발병을 분석을 수행하였다.

[247] 구체적으로, 정상군과 대조군에게는 생리식염수를 매일 1회 각각 0.1ml 씩 매일 경구에 주사하였고, MTX는 2mg/kg의 농도로, 적소두 메탄올 추출물(100mg/kg) 처리군은 매일 오전 11시에 경구투여 하였다. 이어, 제2형 콜라겐으로 부스팅하고, DBA/1 OlaHsd 마우스의 각 4개의 발(paw)에서 관절염 징후를 아래의 기준으로 발병율(incidence,%)을 결정하고, 하기의 표 8에 도시된 CIA유발정도 지표에 따라 마우스의 증상을 1주일에 1회씩 기록하였다(도 12 및 도 13).

[248]

[249] 표 8

[Table 8]

CIA 유발정도

관절염 지표	유 발 정 도
0	작은 관절(손가락뼈, 중수지절(손허리, 손가락 뼈 관절, 중족지절) 또는 큰 관절(손목/손목뼈, 발목/족근골)에 부종 또는 발적이 없음.
1	작은 또는 큰 관절에 약간의 부종 및 또는 발적이 발생
2	하나 또는 여러 개의 작은 또는 큰 관절에 보통의 부종 및 또는 발적이 발생
3	큰 관절에 심한 부종과 발적이 있고, 보통의 부종 및 또는 발적이 작은 관절에 발생
4	큰 관절에 매우 심한 부종과 발적이 있고, 심한 부종 및 또는 발적이 작은 관절에 발생

[250]

[251] 도 12는 정상 DBA/1 OlaHsd와 CIA 유발 마우스모델의 앞다리와 뒷다리의 상태를 나타내는 사진이고, 도 13은 적소두 메탄올 추출물의 DBA/1 OlaHsd 마우스에서 CIA로 유발시킨 관절염에 대한 증세가 개선되는 효과를 CIA 유발정도로 나타낸 그래프이다.

[252] 상기 도 13에서 보듯이, 적소두 메탄올 추출물은 DBA/1 OlaHsd 마우스에 CIA로 관절염을 유발시킨 모델에서 대조군과 비교하여 CIA 유발정도를 개선시키는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[253]

[254] **실시예 9: IL-6 유도 STAT3 인산화 저해활성 검정을 이용한 올레아놀린산과 올레아놀린산 아세테이트의 활성비교**

[255] 상술한 실시예를 통하여, 적소두로부터 유래된 본 발명의 올레아놀린산 아세테이트가 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 이와 같은 본 발명의 올레아놀린산 아세테이트가 기존의 올레아놀린산에 비해 현저한 효과가 있는 특히 유도체임을 확인하기 위해, 본 발명의 올레아놀린산 아세테이트가 공지된 올레아놀린산에 비하여 활성면에서 어떠한 차이를 나타내는지를 상기 실시예 5-2의 방법을 이용하여 확인하고자 하였다.

[256] 구체적으로, 시료로서 올레아놀린산 또는 올레아놀린산 아세테이트를 각각 0.1, 1, 3, 6 또는 10 μ M로 처리하는 것을 제외하고는, 실시예 5-2와 동일한 방법을 수행하여, STAT3 루시퍼라제 활성에 대한 올레아놀린산 또는 올레아놀린산 아세테이트의 저해효과를 측정하고, 상호 비교하였다(도 14).

[257] 도 14는 올레아놀린산 또는 올레아놀린산 아세테이트의 농도에 따른 Hep3B

세포에서 IL-6 처리에 의해 유도되는 STAT3 루시퍼라제 활성을 저해하는 효과를 나타낸 그래프이다. 도 14에서 보듯이, 본 발명의 올레아놀린산 아세테이트는 $IC_{50}=0.9\mu M$ 의 저해활성을 나타낸 반면, 공지된 올레아놀린산은 $10\mu M$ 에서도 약 14%의 저해활성을 나타냄에 불과함을 알 수 있었다.

[258] 따라서, 본 발명의 올레아놀린산 아세테이트는 공지된 올레아놀린산 보다도 현저하게 우수한 염증성 질환의 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[259]

[260] 실시예 10: RNAKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 적소두 추출물 및 올레아놀린산 아세테이트의 효과

[261]

[262] 5주령 생쥐의 넙적다리뼈와 정강뼈를 분리하고 뼈속질 공간을 1 cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α -MEM (α -minimum essential medium) 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 포식세포(bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였다. 포식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 파골세포 분화 인자인 RNAKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) (50 ng/ml)을 첨가하여 배양하고 적소두 추출물 및 올레아놀린산 아세테이트를 농도별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는 TRAP 용액(Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 분화된 파골세포로 판단하였다.

[263] 그 결과, 적소두 추출물 및 올레아놀린산 아세테이트를 처리한 실험군에서 파골세포의 분화를 억제하는 것을 확인하였다. 도 15 및 16은 각각 적소두 메탄올 추출물 및 올레아놀린산 아세테이트가 마우스 골수세포로부터 분리된 포식세포가 파골세포로 분화되는 것을 저해하는 효과를 나타내는 사진이다. 상기 도 15에서 보듯이, 적소두 추출물을 처리하지 않은 대조군 세포에서는 TRAP 양성 다핵형 뼈파골세포가 잘 형성되는 것을 확인할 수 있었지만, 적소두 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 파골세포의 수와 크기가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 특히, $50 \mu g/ml$ 의 농도에서는 현저하게 파골세포의 분화를 줄이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 16에서 보듯이, 올레아놀린산 아세테이트를 처리한 군에서도 역시 파골세포의 분화를 현저하게 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 $10\mu M$ 의 낮은 농도에서도 현저한 효과를 나타냄을 확인하였다.

[264] 따라서, 본 발명의 적소두 추출물 및 올레아놀린산 아세테이트는 파골세포 분화를 억제함으로써, 골다공증의 예방 및 치료에 현저한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[265]

[266] 제제예 1: 산제의 제조

[267] 올레아놀린산 아세테이트, 이를 포함하는 적소두 추출물 또는 상기 추출물의

분획물 0.1g, 유당 1.5g 및 탈크 0.5g를 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[268]

[269] 제제예 2: 정제의 제조

[270] 올레아놀린산 아세테이트, 이를 포함하는 적소두 추출물 또는 상기 추출물의 분획물 0.1g, 락토스 7.9g, 결정성 셀룰로오스 1.5g 및 마그네슘 스테아레이트 0.5g을 혼합하고, 직타법(direct tableting method)에 의해 유효성분을 50 mg으로 포함하는 500 mg짜리 정제를 제조하였다.

[271]

[272] 제제예 3: 분말제의 제조

[273] 올레아놀린산 아세테이트, 이를 포함하는 적소두 추출물 또는 상기 추출물의 분획물 0.1g, 옥수수전분 5g 및 카르복시 셀룰로오스 4.9g을 잘 혼합하여 분말을 제조하고, 경질 캡슐에 상기 분말 500 mg을 넣어 캡슐제를 제조하였다.

[274]

[275] 제제예 4: 주사제의 제조

[276] 통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 올레아놀린산 아세테이트, 이를 포함하는 적소두 추출물 또는 상기 추출물의 분획물 0.1g과 적량의 주사용 멸균 증류수 및 pH 조절제를 포함하는 2ml 용량의 주사용 앰플을 제조하였다.

[277]

[278] 제제예 5: 액제의 제조

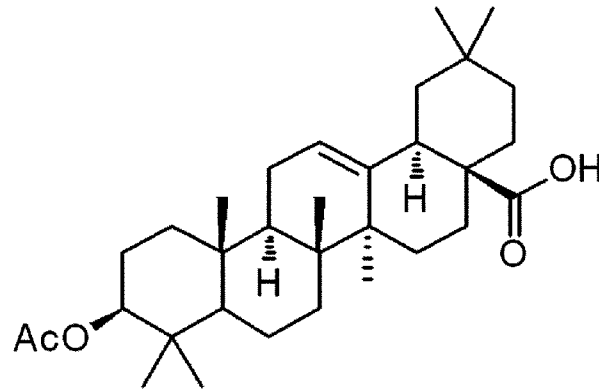
[279] 통상적인 액제의 제조방법에 따라, 정제수에 올레아놀린산 아세테이트, 이를 포함하는 적소두 추출물 또는 상기 추출물의 분획물 0.1g, 이성화당 10g 및 만니톨 5g을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[280]

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 TLR 및 IL-6 매개성 질환은 염증성 질환, 자가면역질환, 암 질환 및 대사성 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 염증성 질환은 ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염증, 패혈증, 다발성 연골염, 경피증, 피부염, 습진, 통풍, 치주질환, 베체트 증후군, 부종, 맥관염, 가와사키병, 당뇨병성 망막염, 자가 면역 췌장염, 혈관염, 사구체 신염, 세균 및 진균의 급성 및 만성 감염, 급성 및 만성 기관지염, 및 인플루엔자 감염증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

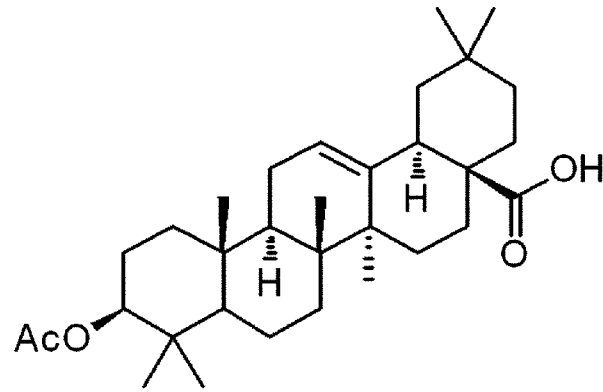
[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 자가면역질환은 아토피성 피부염, 관절염, 건선, 천식, 이식편대 숙주질환, 면역결핍증, 전신 홍반성 루프스, 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 암 질환은 골수종, 유방 암종, 전립선 암, 뇌종양, 두경부 암종, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 대사성 질환은 골다공증, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 8] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 피부外用제.

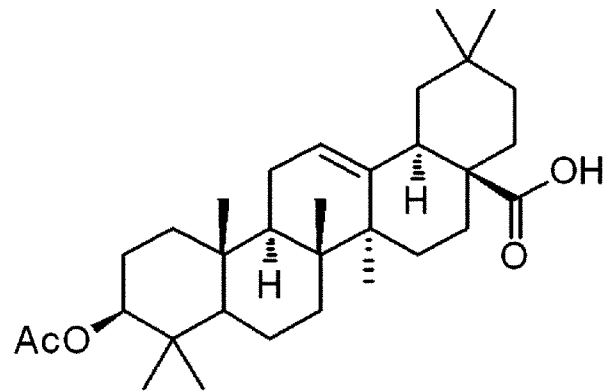
[화학식 1]



[청구항 9]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

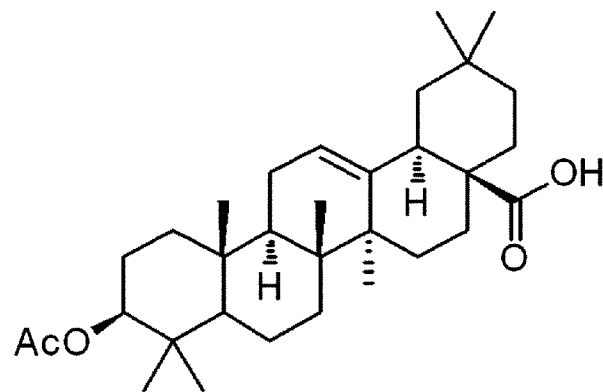
[화학식 1]



[청구항 10]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 개인위생용품.

[화학식 1]



[청구항 11]

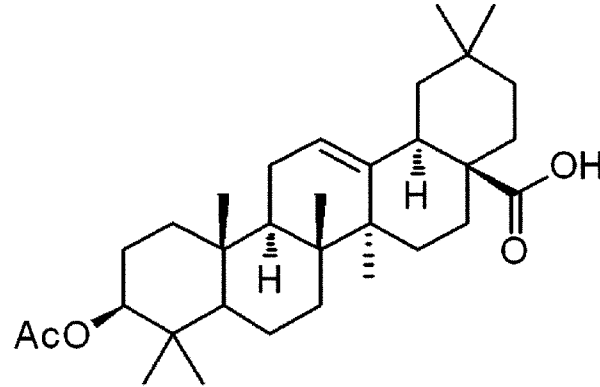
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환 치료 방법.

[청구항 12]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는

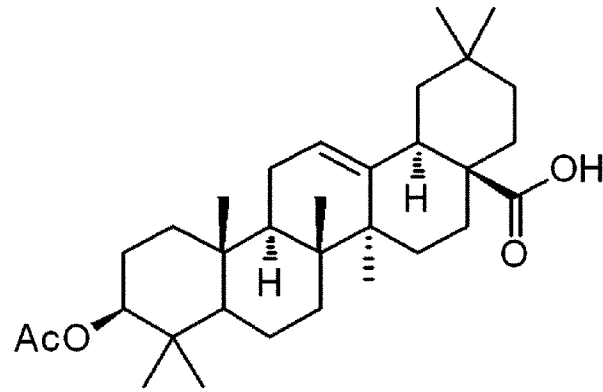
염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 적소두 추출물은 적소두를 물, 탄소수 1 내지 6의 알콜 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득한 것인 조성물.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 분획물은 적소두 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 물 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 수득한 것인 조성물.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 TLR 및 IL-6 매개성 질환은 자가면역질환, 암 질환, 대사성 질환, ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 자가면역질환은 아토피성 피부염, 관절염, 건선, 천식, 이식편대 숙주질환, 면역결핍증, 전신 홍반성 루프스, 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 암 질환은 골수종, 유방 암종, 전립선 암, 뇌종양, 두경부 암종, 흑색종, 백혈병 및 림프종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 대사성 질환은 골다공증, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 19] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제.

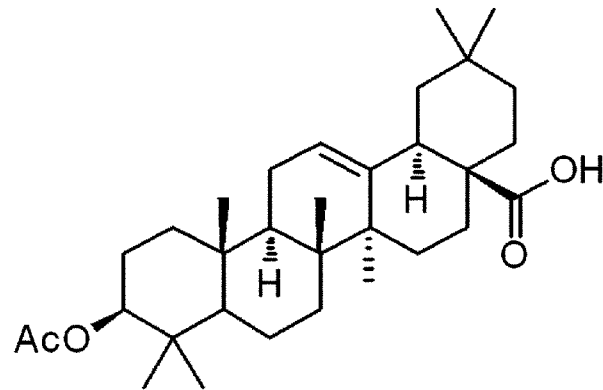
[화학식 1]



[청구항 20]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

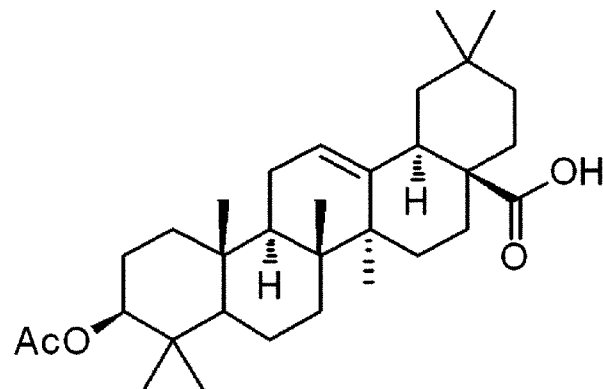
[화학식 1]



[청구항 21]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 적소두 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 개선용 개인위생용품.

[화학식 1]

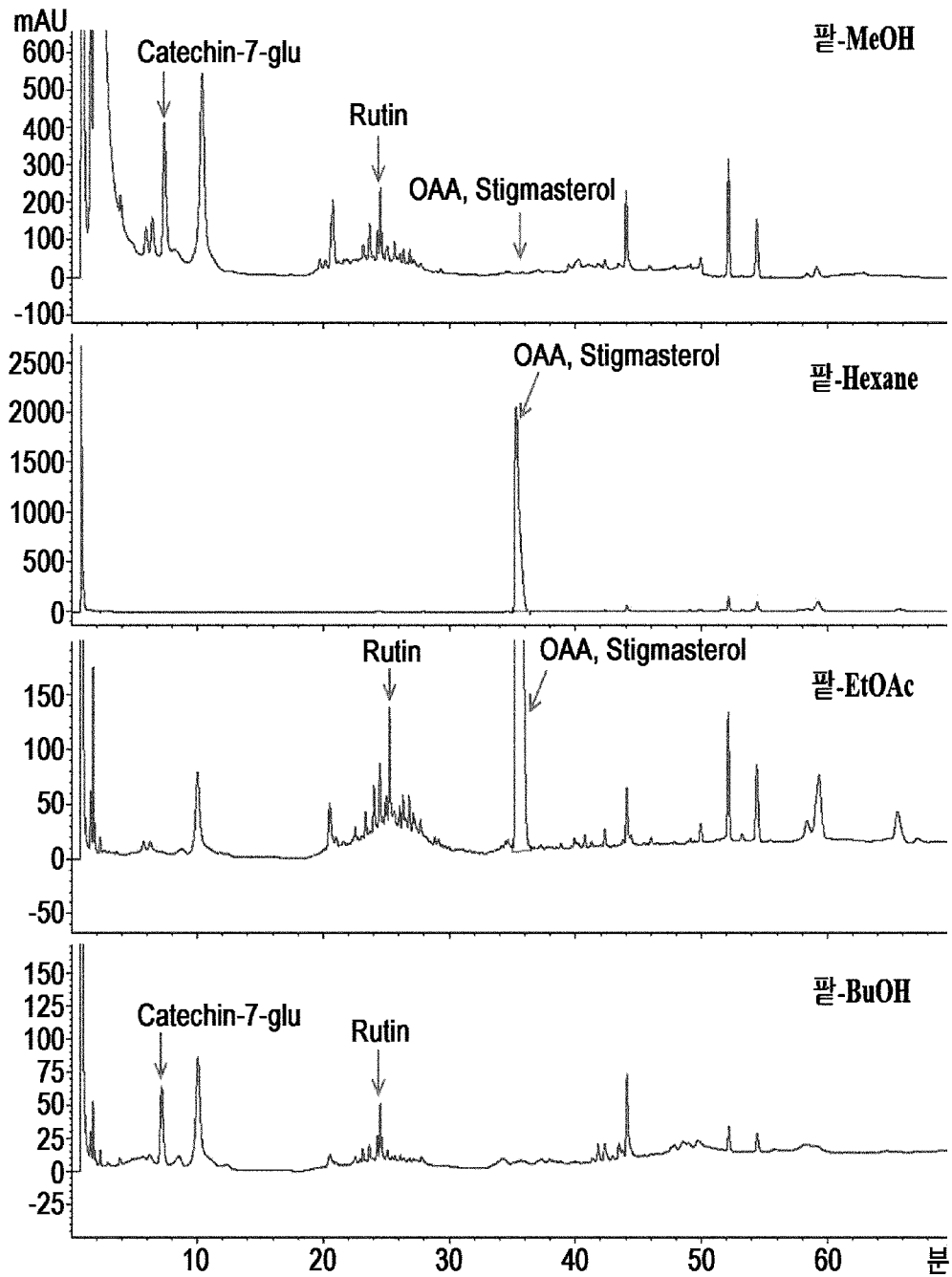


[청구항 22]

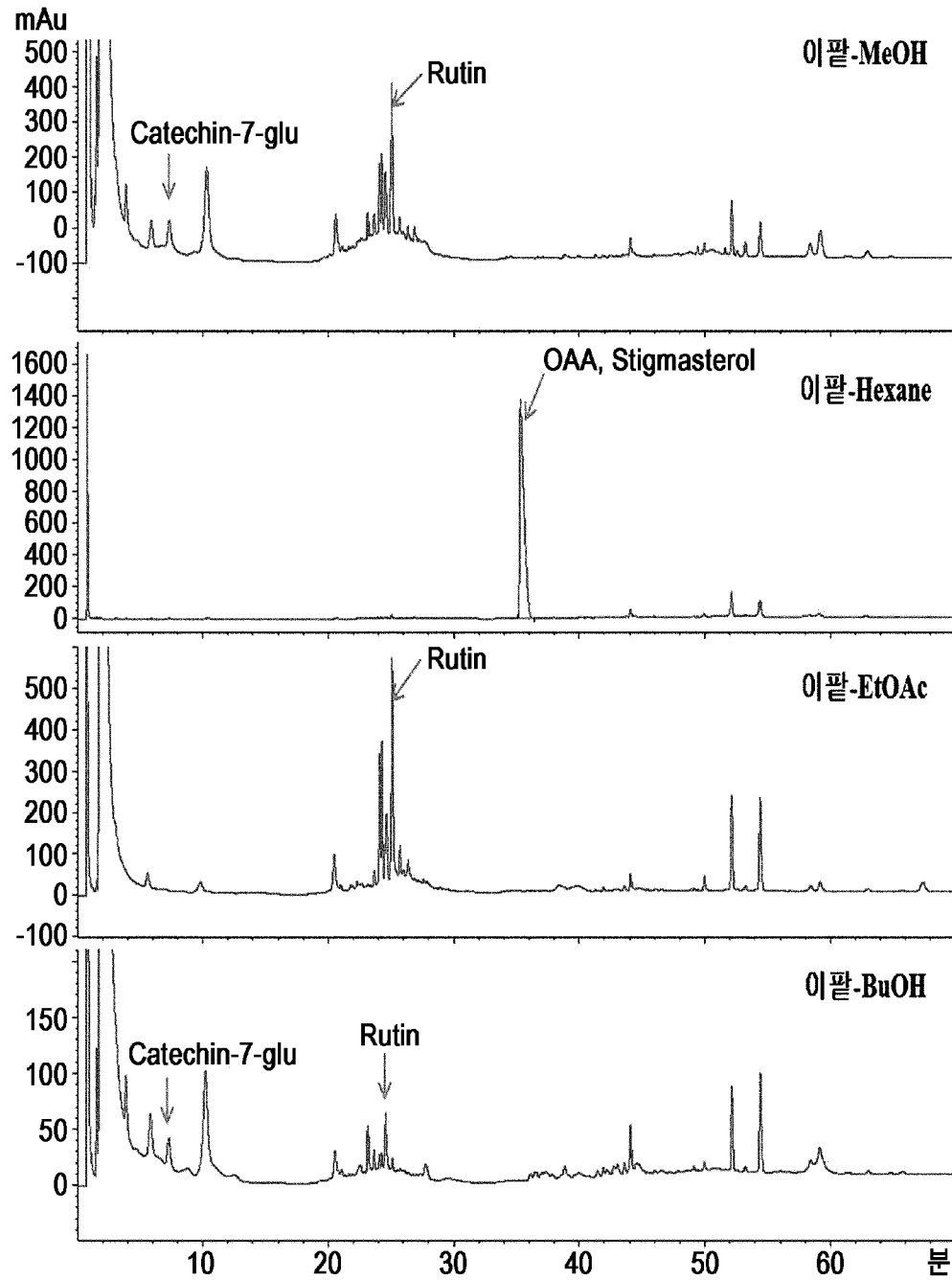
제12항 내지 제18항 중 어느 한 항의 조성물을 TLR 및 IL-6 매개성 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, TLR 및 IL-6 매개성

질환 치료 방법.

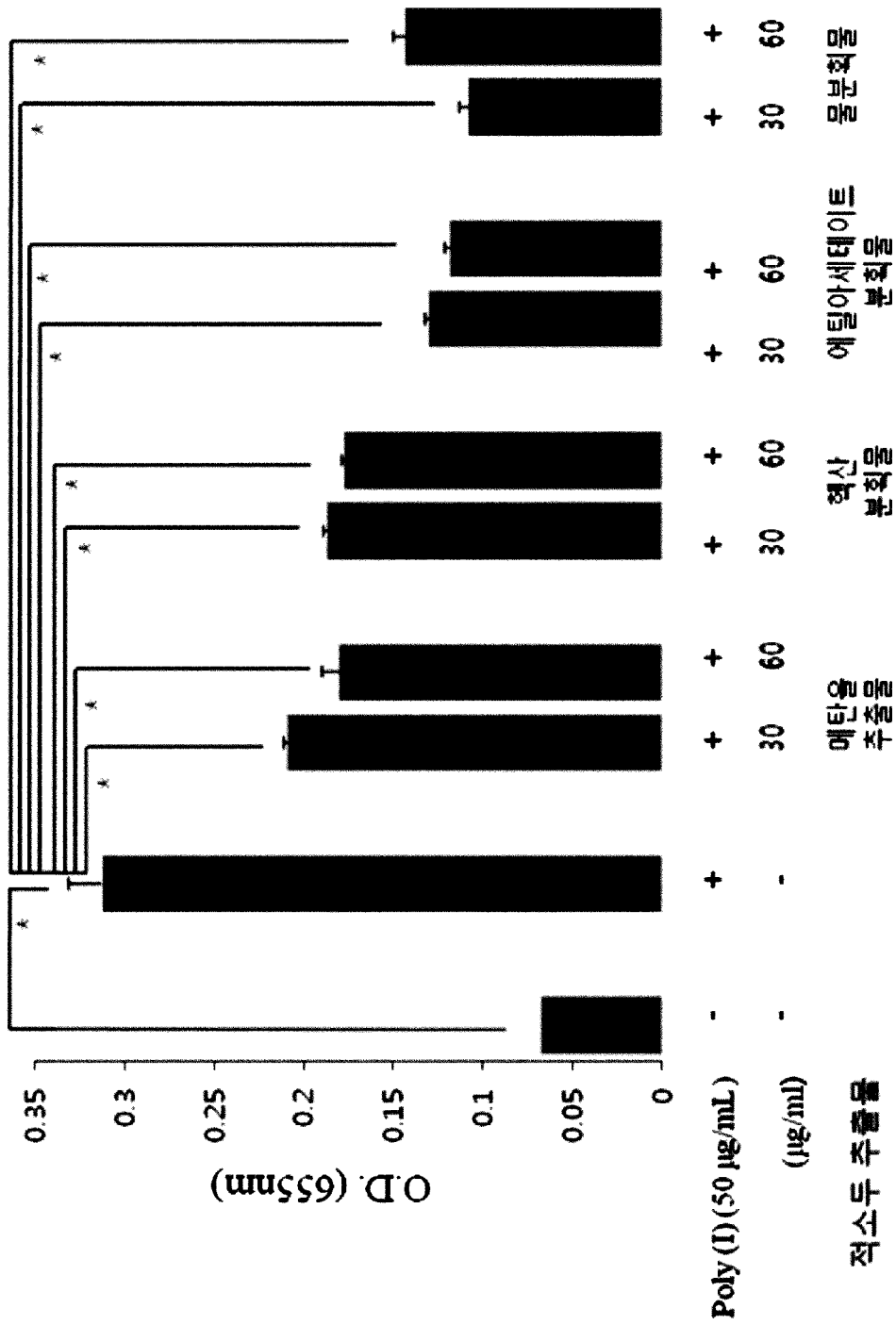
[Fig. 1a]



[Fig. 1b]



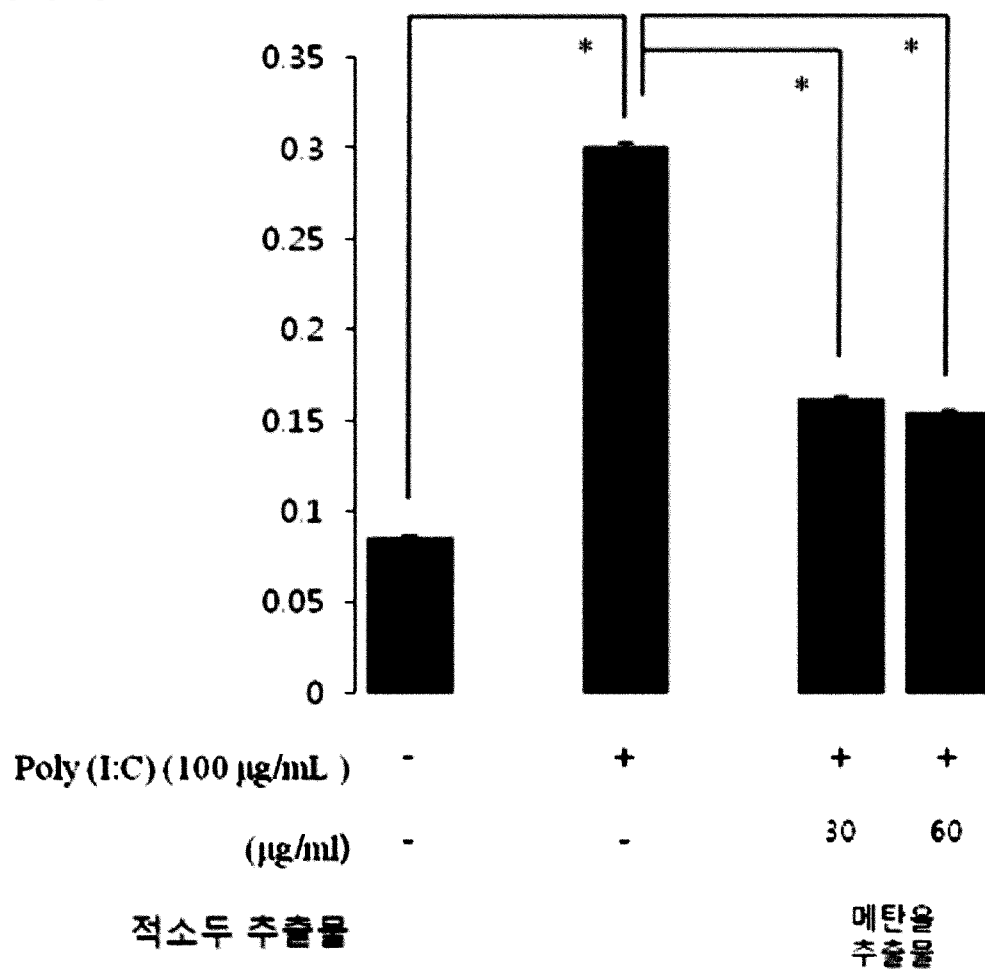
[Fig. 2a]



[Fig. 2b]

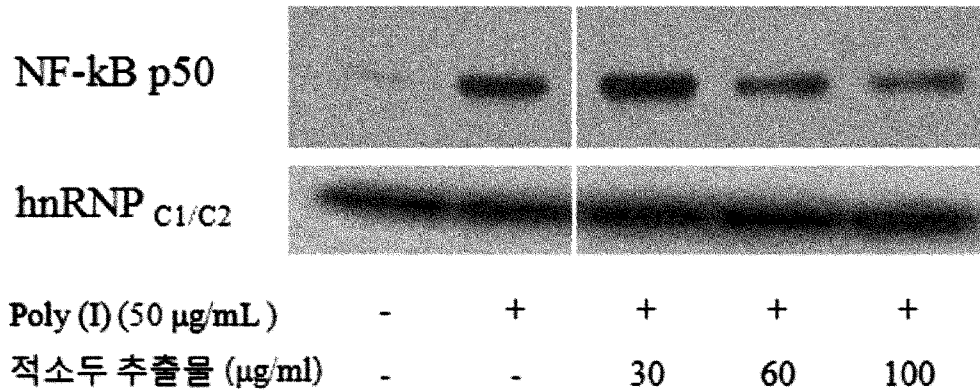
Samples	Dose	Inhibition(%)	Viability(%)
적소두 MeOH ext.	30 $\mu\text{g/ml}$	42.2	87.8
	60 $\mu\text{g/ml}$	54.0	93.3
적소두 Hexane fr.	30 $\mu\text{g/ml}$	51.3	108.7
	60 $\mu\text{g/ml}$	55.2	97.5
적소두 Ethyl acetate fr.	30 $\mu\text{g/ml}$	74.3	98.8
	60 $\mu\text{g/ml}$	79.0	101.5
적소두 H ₂ O fr.	30 $\mu\text{g/ml}$	83.5	98.9
	60 $\mu\text{g/ml}$	69.0	103.9

[Fig. 3]

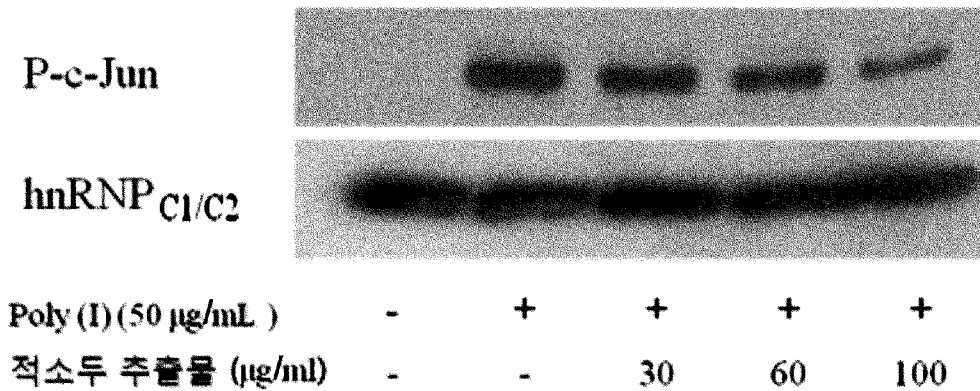


Samples		Inhibition(%)	Viability(%)
적소두 추출물	30 $\mu\text{g/ml}$	64.4	87.8
	60 $\mu\text{g/ml}$	68.1	93.3

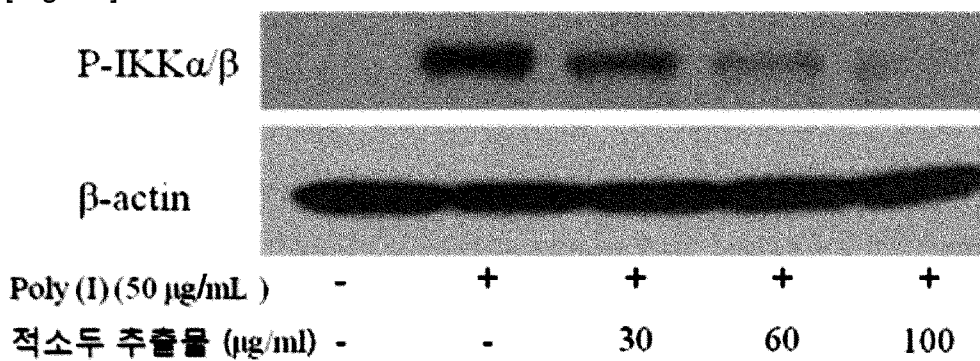
[Fig. 4a]



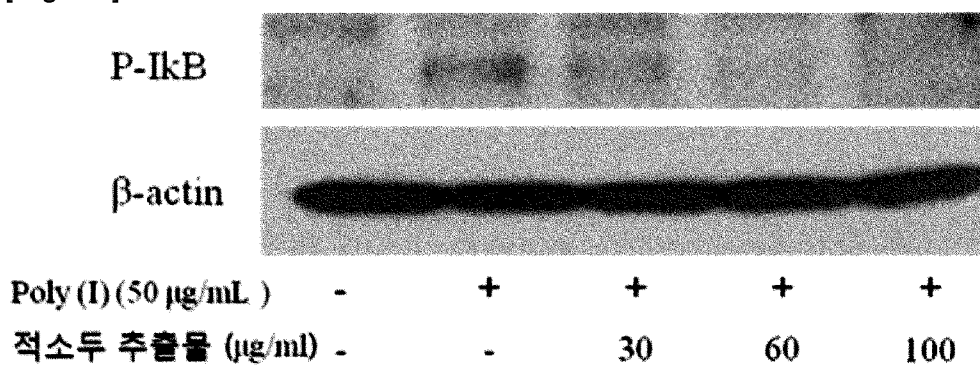
[Fig. 4b]



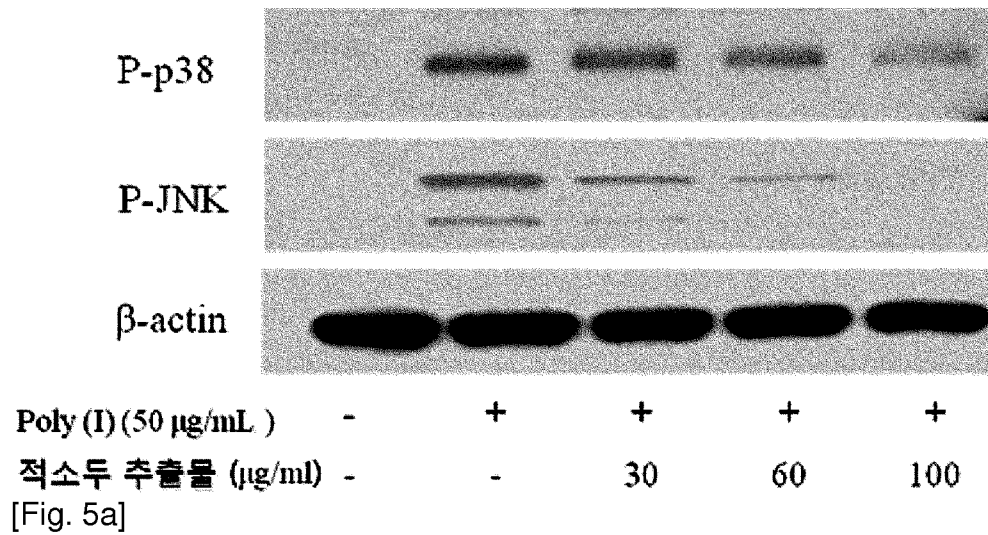
[Fig. 4c]



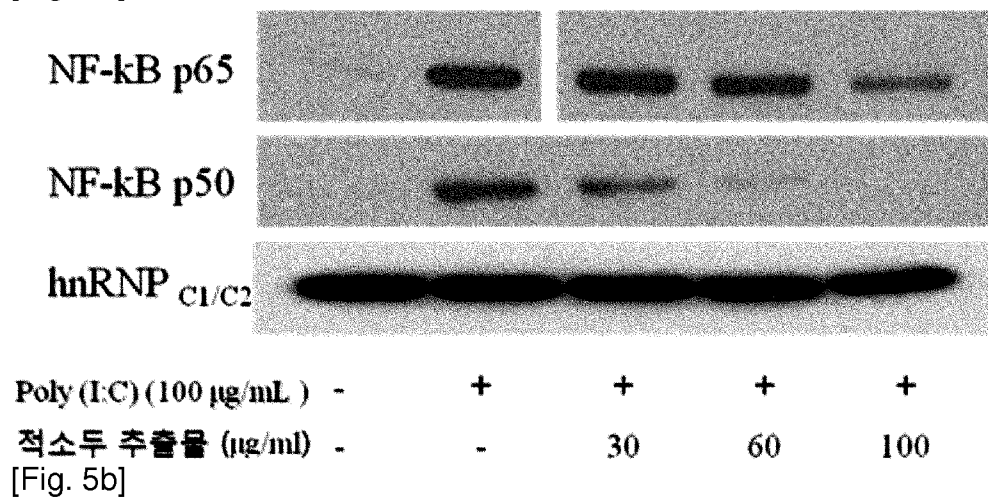
[Fig. 4d]



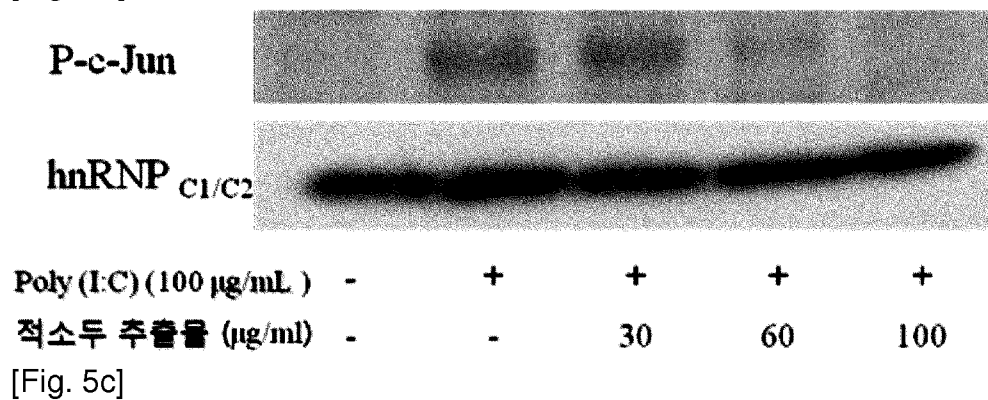
[Fig. 4e]



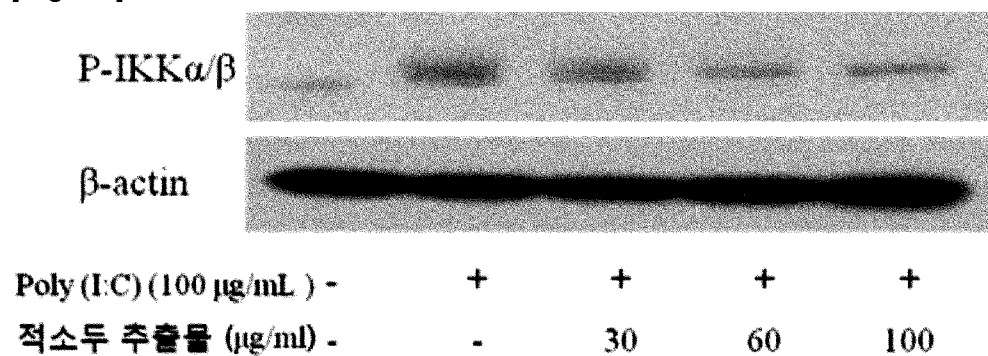
[Fig. 5a]



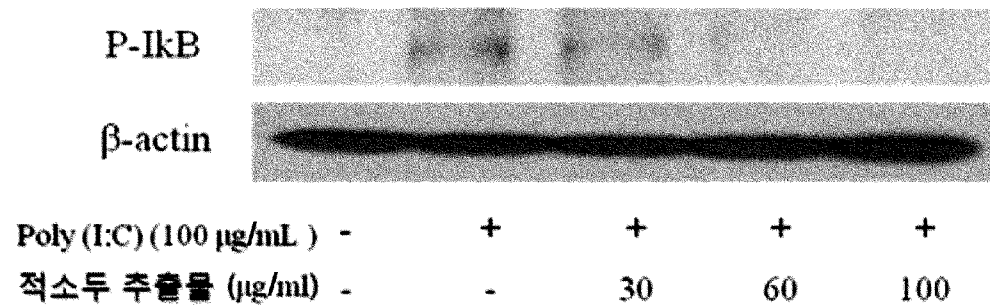
[Fig. 5b]



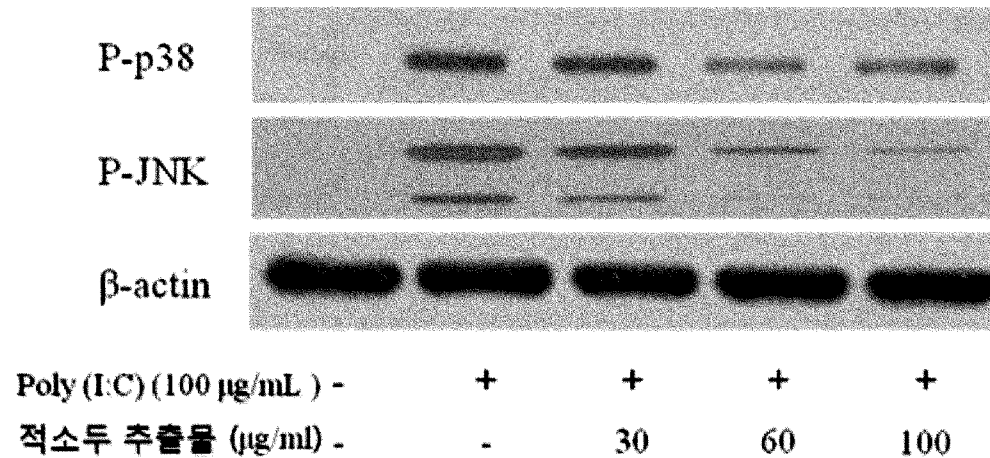
[Fig. 5c]



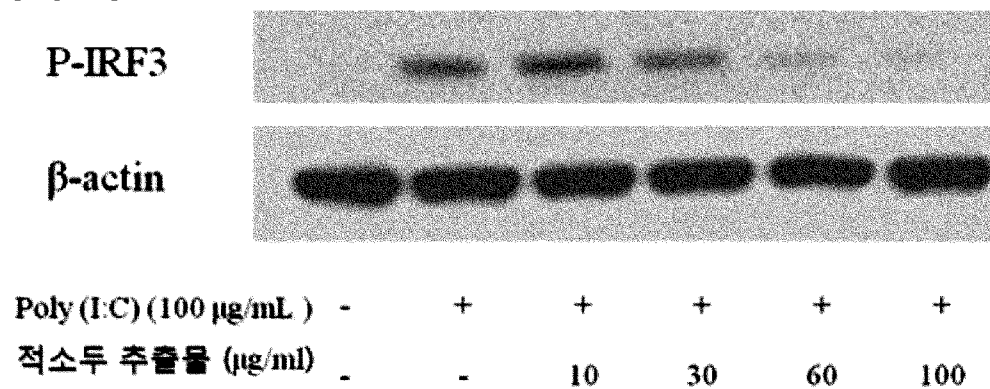
[Fig. 5d]



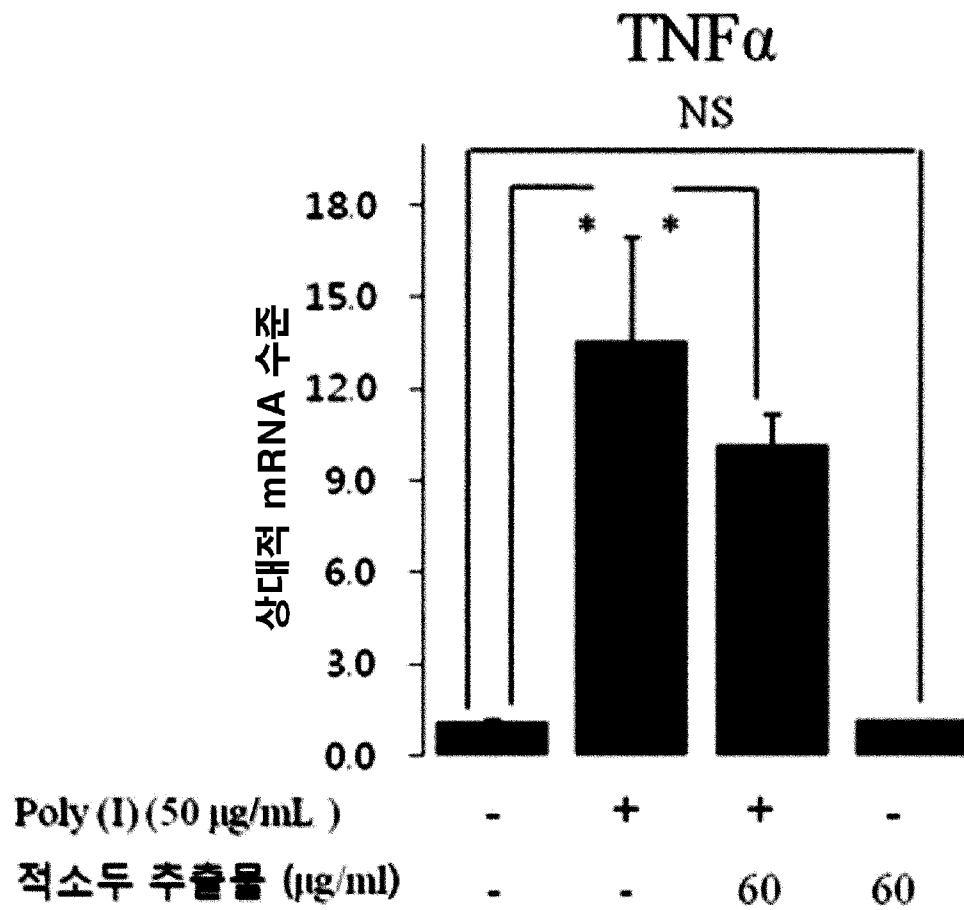
[Fig. 5e]



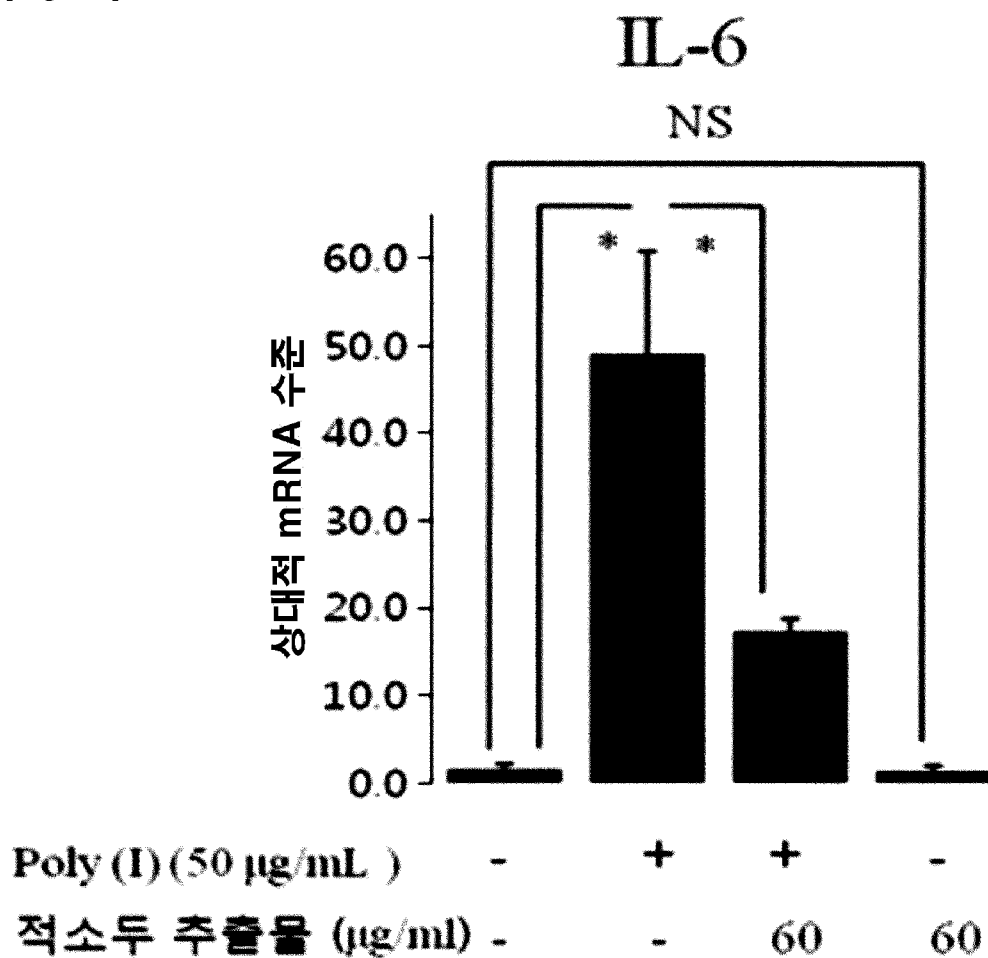
[Fig. 5f]



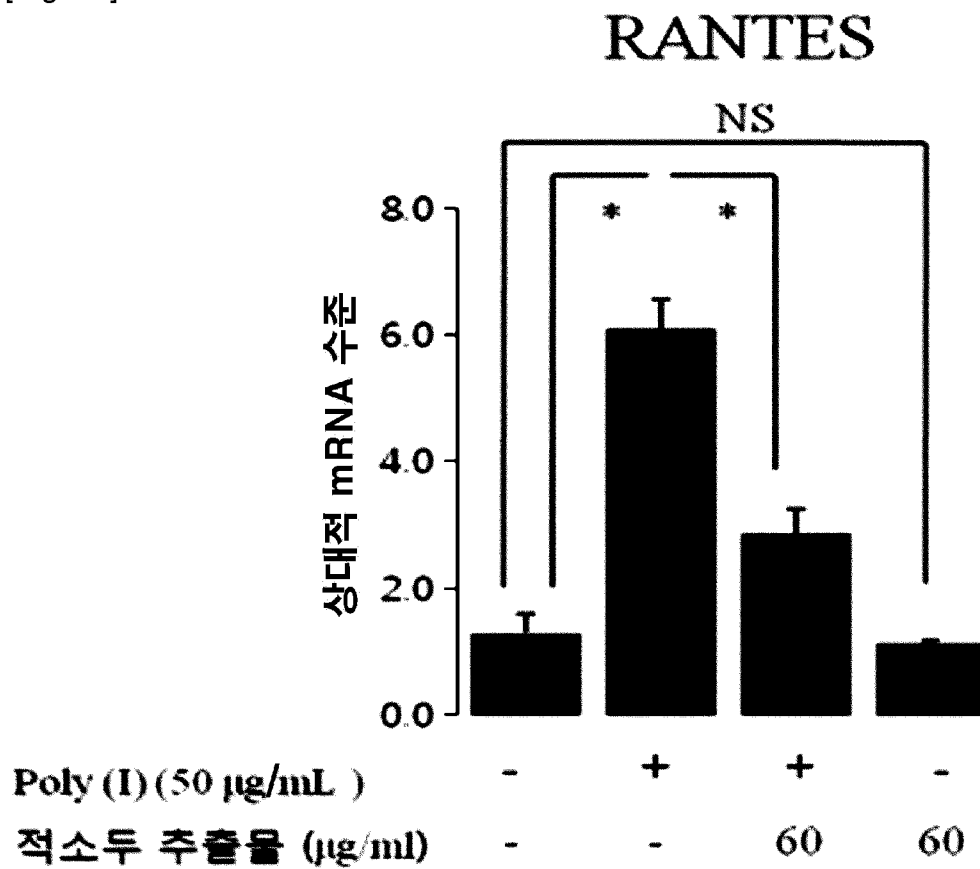
[Fig. 6a]



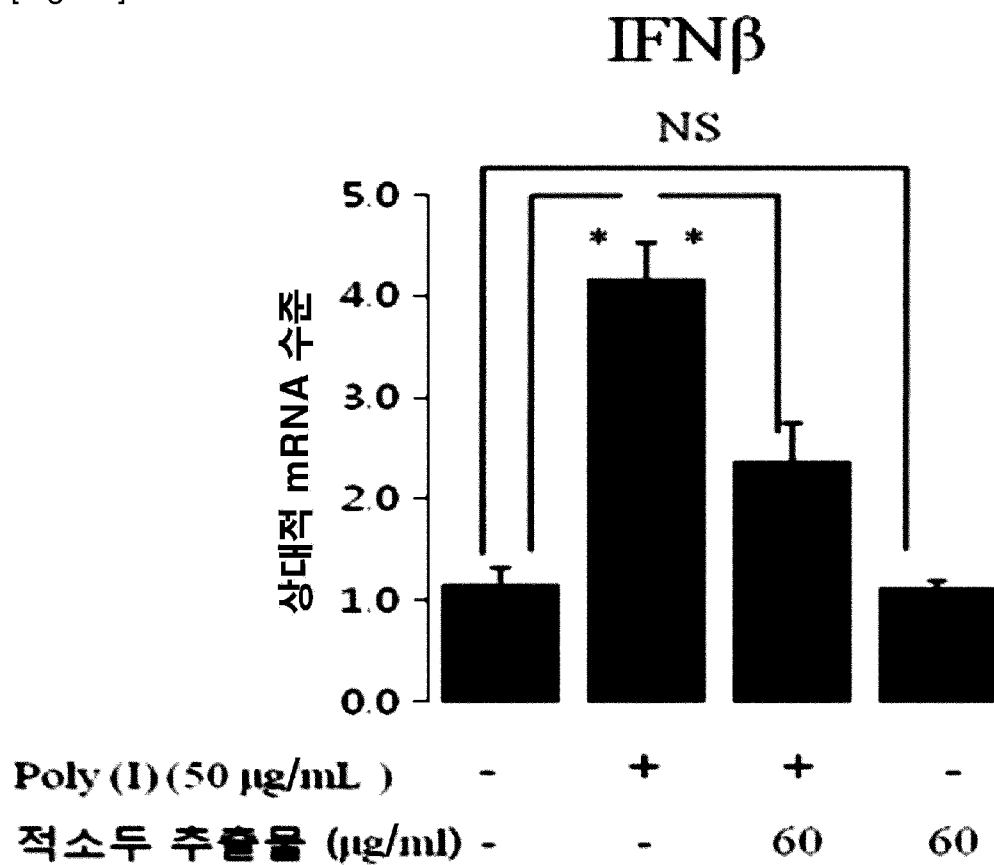
[Fig. 6b]



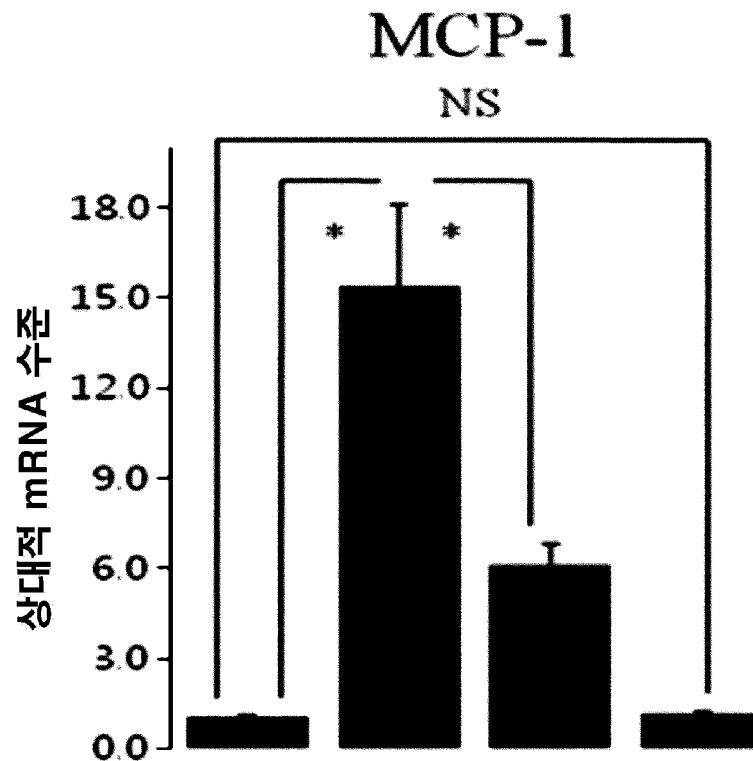
[Fig. 6c]



[Fig. 6d]



[Fig. 6e]



Poly (I) (50 µg/mL)

-

+

+

-

적소두 추출물 (µg/ml)

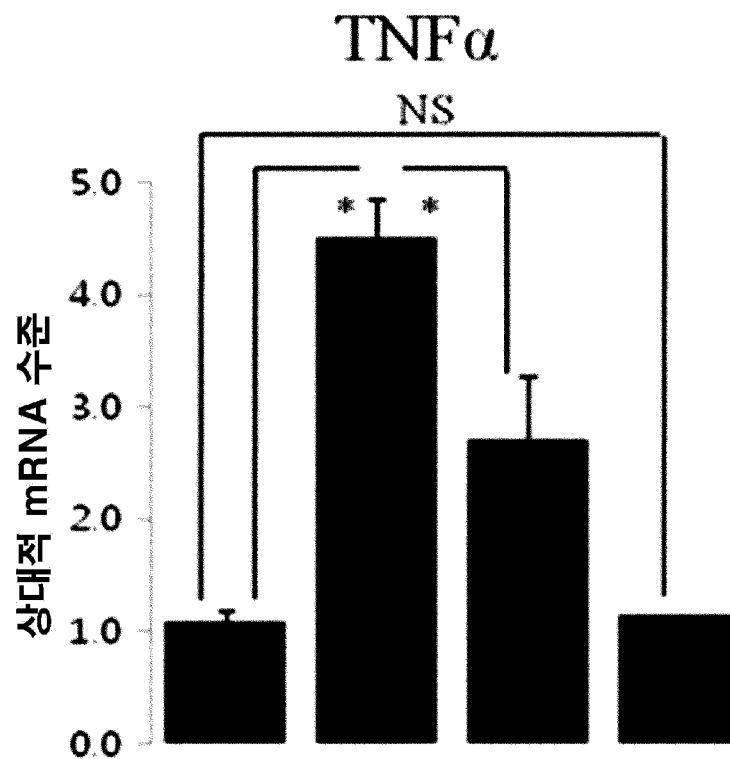
-

-

60

60

[Fig. 7a]



Poly (I:C) (100 µg/mL)

-

+

+

-

적소두 추출물 (µg/ml)

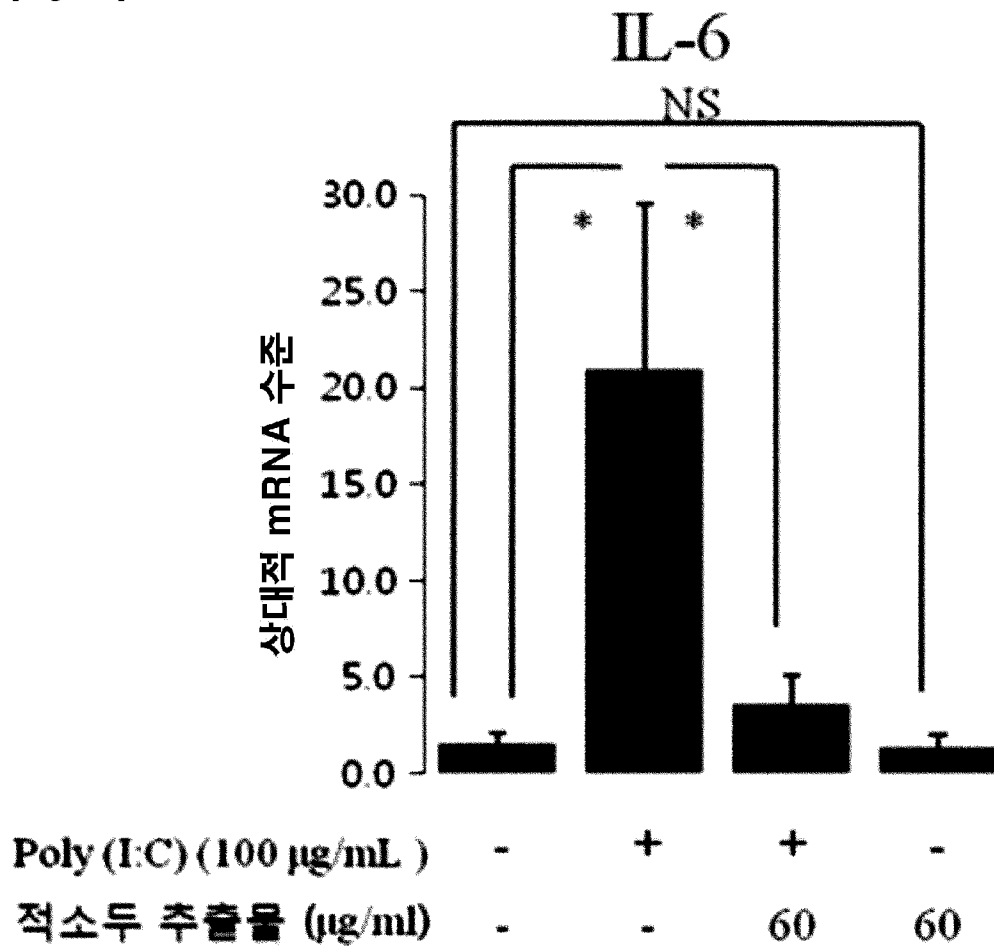
-

-

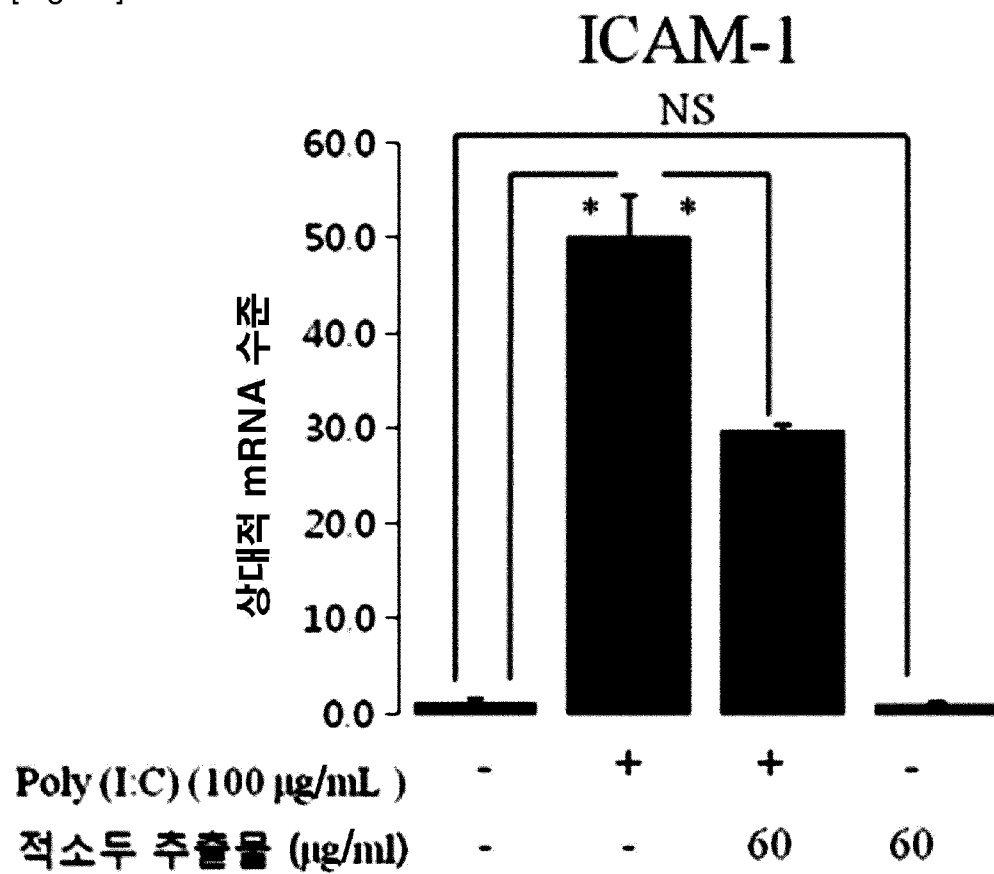
60

60

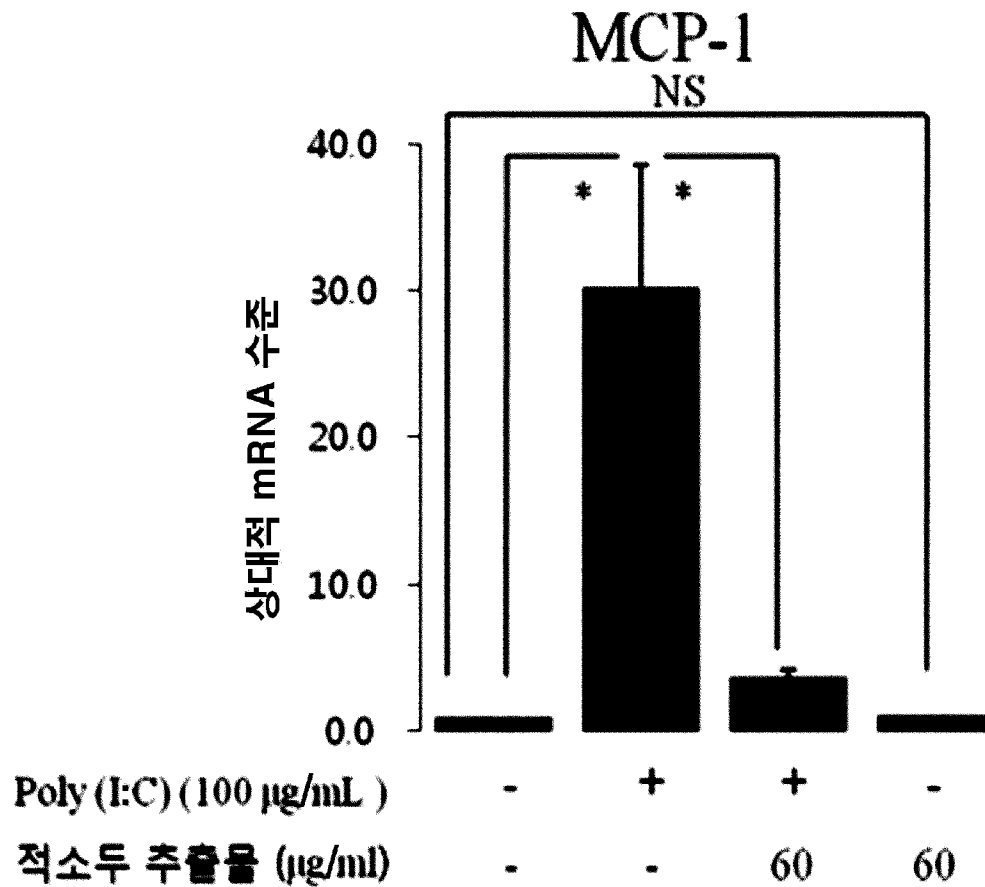
[Fig. 7b]



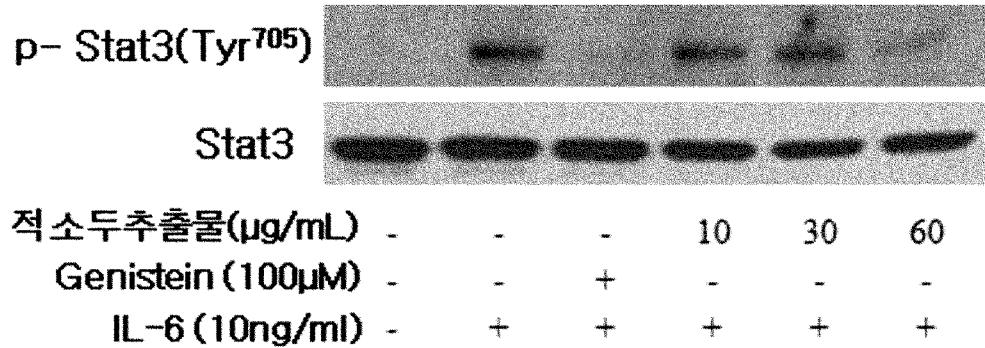
[Fig. 7c]



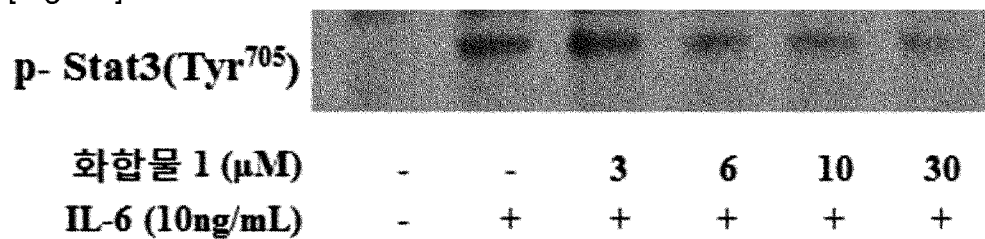
[Fig. 7d]



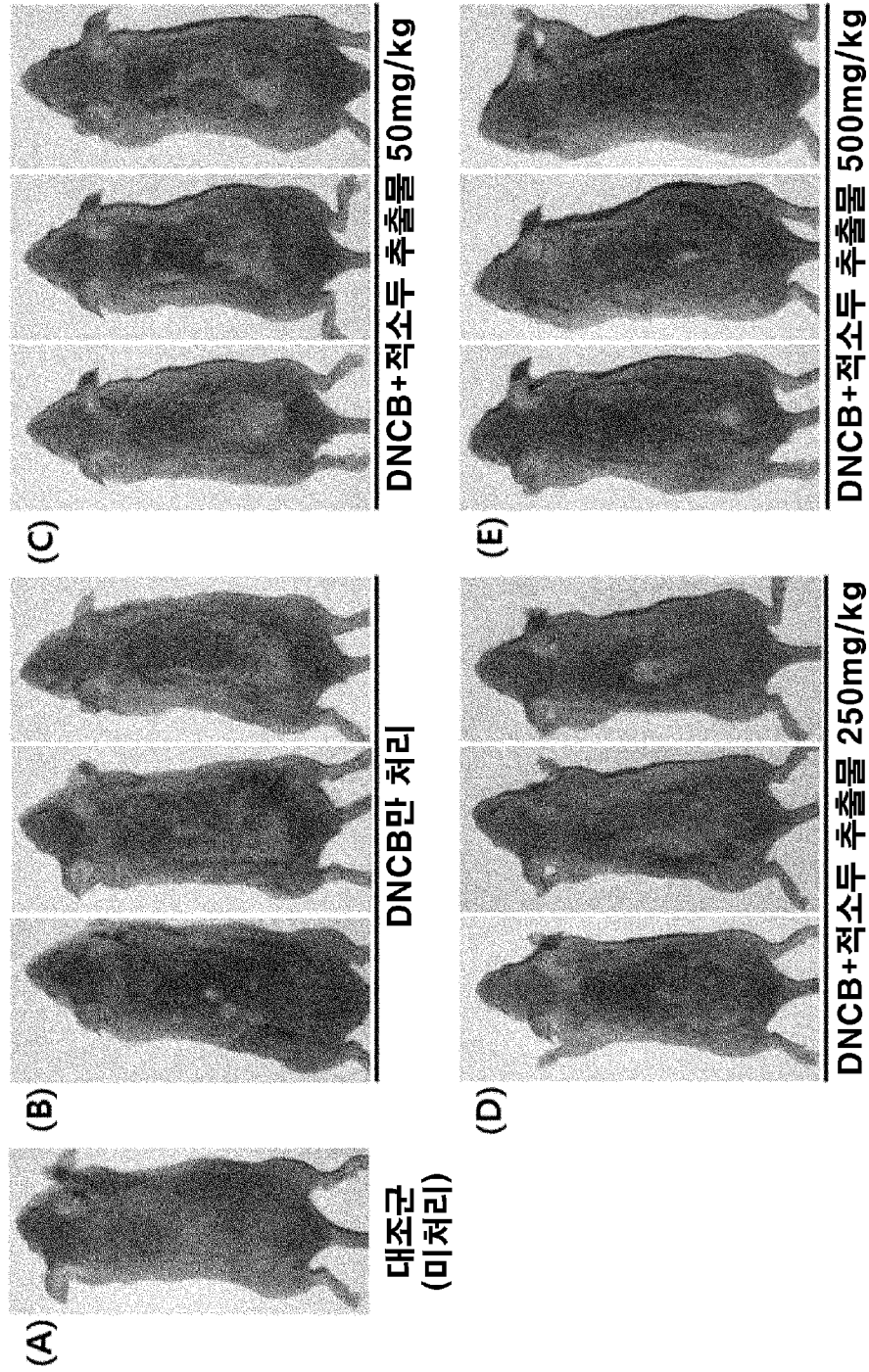
[Fig. 8a]



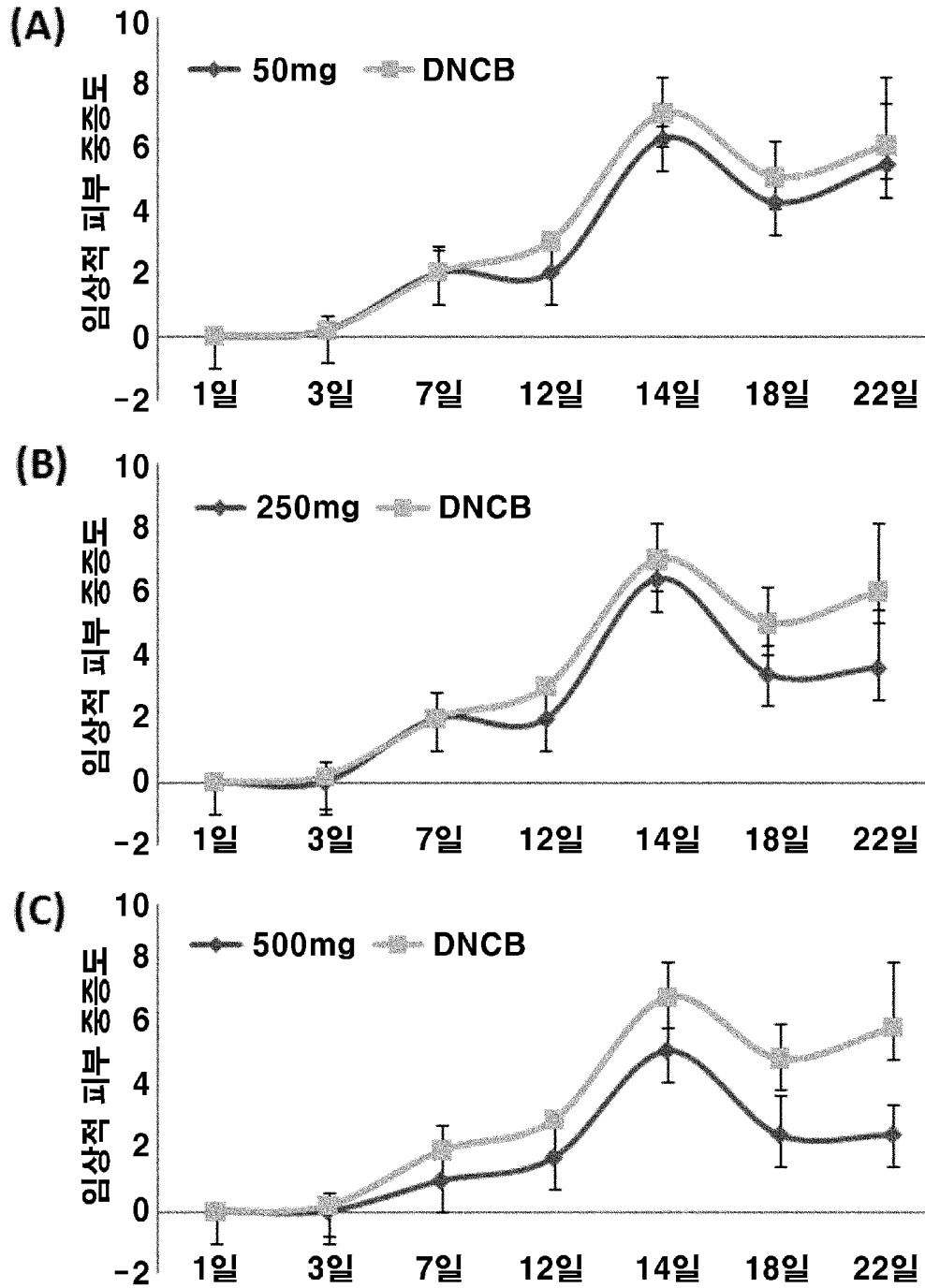
[Fig. 8b]



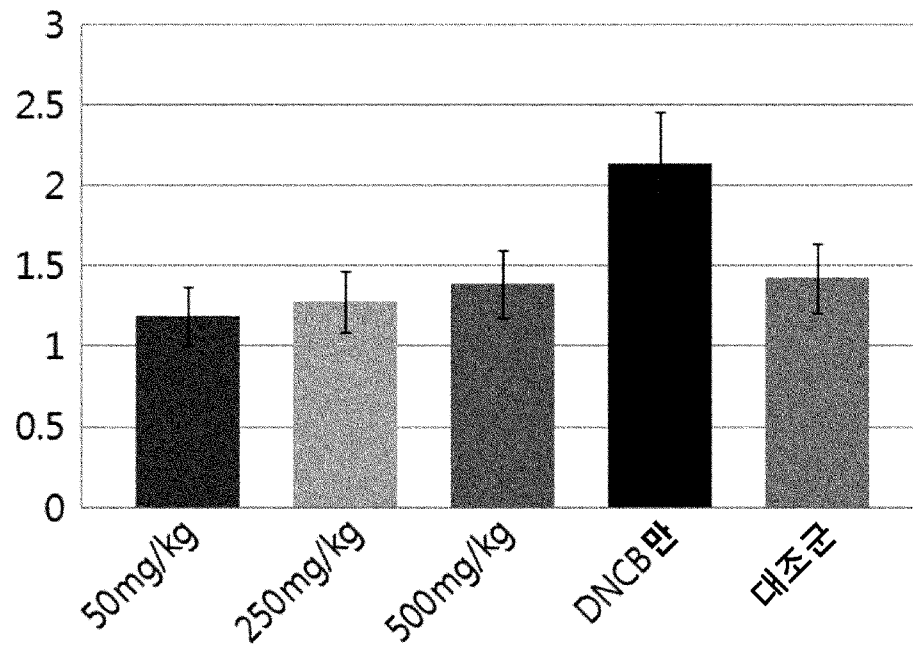
[Fig. 9]



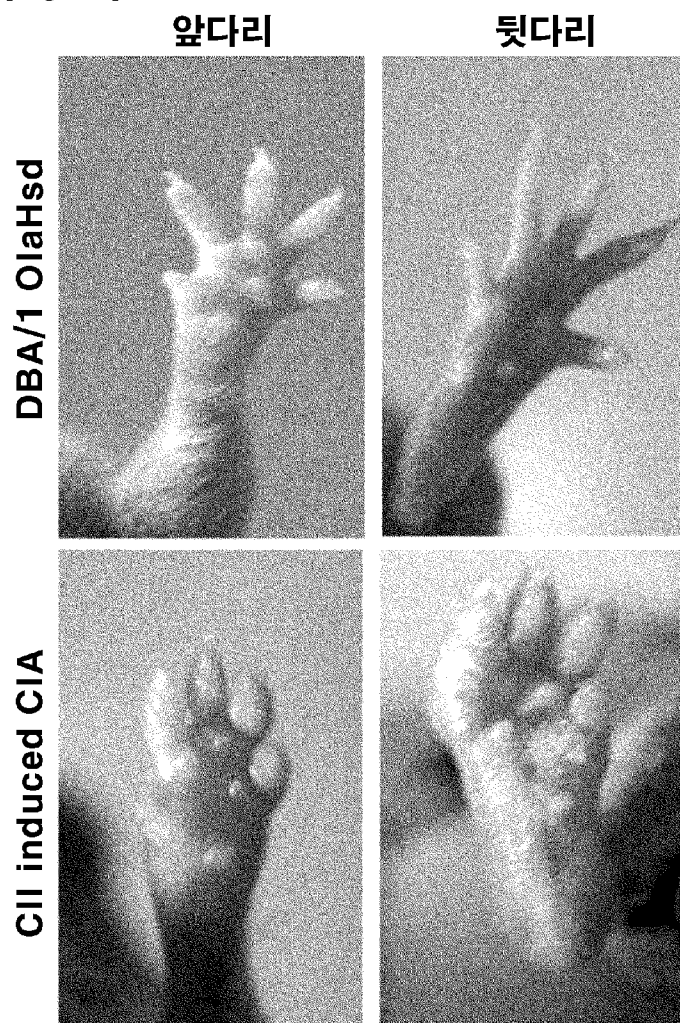
[Fig. 10]



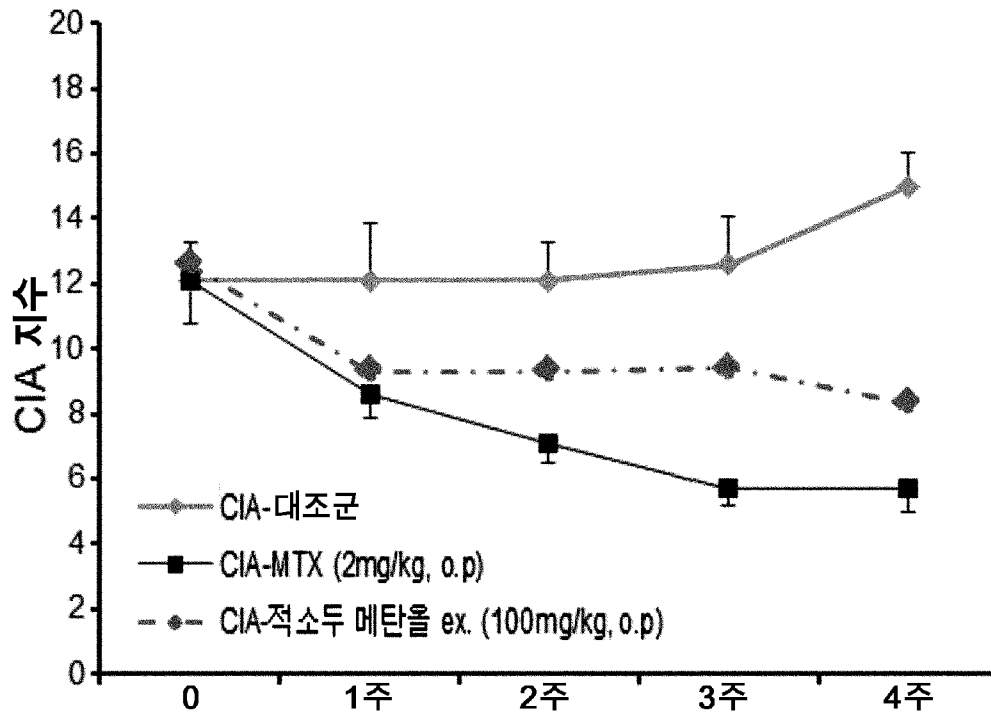
[Fig. 11]

호산구 (eosinophil) 수치

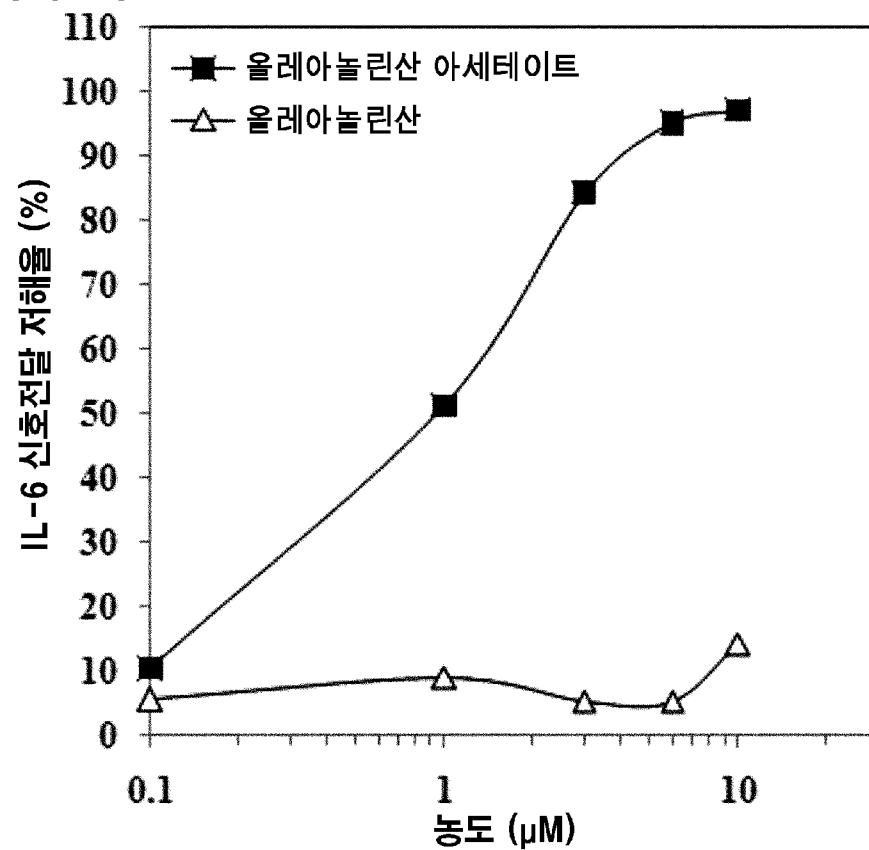
[Fig. 12]



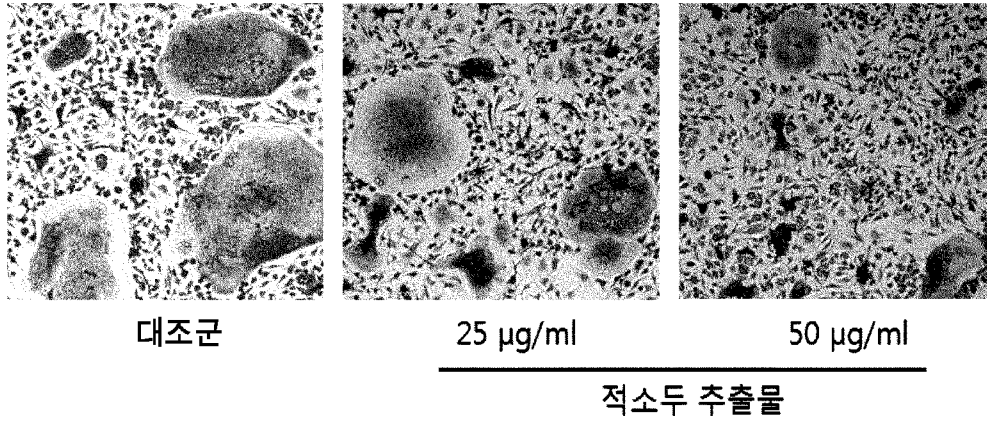
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]

