



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0019998

(43) 공개일자 2015년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/704 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0165638

(22) 출원일자 2013년12월27일

심사청구일자 2013년12월27일

(30) 우선권주장

PCT/KR2013/007309 2013년08월14일

대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

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

(72) 발명자

한명주

서울 성북구 선잠로 92-24, (성북동)

김동현

서울 성북구 선잠로 92-24, (성북동)

(74) 대리인

고영갑, 임상엽, 권정기, 권영준

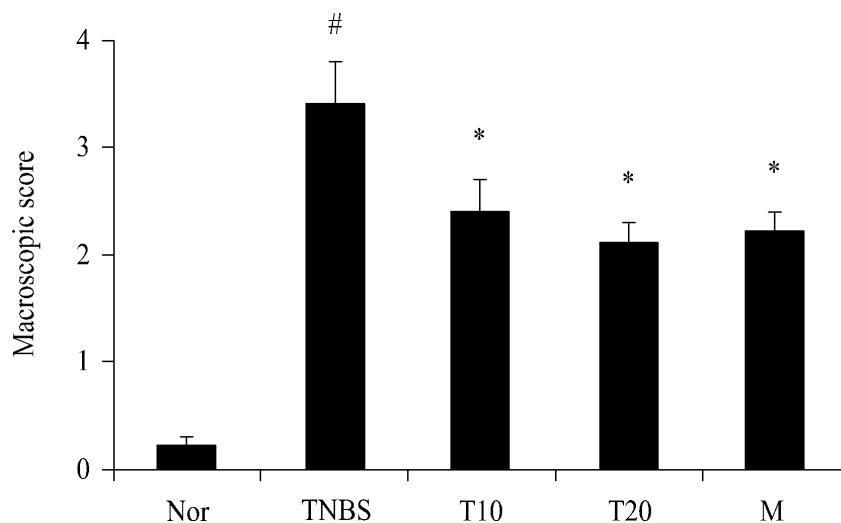
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 티모사포닌 A-III를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 티모사포닌 A-III의 신규 용도에 관한 것으로서, 티모사포닌 A-III 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 급성 대장염이나 만성 대장염을 예방 또는 치료하는데에 사용될 수 있고, 특히, 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 또는 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

티모사포닌 A-III 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 티모사포닌 A-III는 지모로부터 분리된 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 대장염은 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

티모사포닌 A-III 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 식품학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 티모사포닌 A-III는 지모로부터 분리된 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 대장염은 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 출원은 티모사포닌 A-III의 신규 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 티모사포닌 A-III를 유효성분으로 포함

하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

대장염은 대장에 염증이 발생하는 질환으로, 다양한 원인에 의해 발생하고, 테네스무스(tenesmus, 시원치 않음), 복부팽만감, 하복 부통, 설사 등이 주요 증상으로 나타나고, 분변 중에 점액, 고름이나 혈액이 섞이는 경우도 있다. 대장염은 원인에 따라 크게 감염성 대장염과 비감염성 대장염으로 구분될 수도 있고, 발병 기간에 따라 급성 대장염과 만성 대장염으로 구분될 수도 있다. 급성 대장염에는 아메바성이질, 세균성이질, 살모넬라나 항생물질에 의한 위막성 대장염(pseudomembranous enteritis) 등이 있고 만성 대장염에는 궤양성 대장염, 크론병, 결핵, 매독, X선 등에 의한 것이 있다. 또한, 대장염은 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 뿐만 아니라 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 포함한다. 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 중 대표적인 질환인 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC)과 크론병(Crohn's disease; CD)은 아직 원인이 명확히 밝혀져 있지 않고 있으며, 복통과 더불어 심한 만성 설사와 혈성 설사를 일으킬 수 있으며, 완치가 힘들고 호전과 악화를 반복하는 특성이 있다. 궤양성 대장염은 대장의 점막에 진무름(미란)이나 궤양이 연속적으로 형성되는 질환으로, 혈변, 점혈변, 설사, 복통이 일어나고, 중증인 경우에는 발열, 체중감소, 빈혈 등의 전신성의 증상이 나타난다. 또한, 궤양성 대장염은 위장관 어느 부위에서도 발생할 수 있다. 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 복통, 설사, 혈변과 더불어, 중증의 경우에는 발열, 하혈, 체중감소, 전신권태감, 빈혈 등의 증상이 나타난다. 궤양성 대장염과 크론병은 병변과 염증 증상에 있어서 차이가 있지만 여러 면에서 유사한 양상을 보이기 때문에 두 질환의 구분이 서로 명확하지 않은 경우가 흔하다.

[0003]

종래, 궤양성 대장염 및 크론병의 발생율은 서양인에게 높다고 알려져 있었지만, 최근, 식습관 등의 생활습관의 변화로 인해 우리나라 등 동양에서도 환자수가 급증하고 있다. 그렇지만, 원인이 불분명한 이유도 있어 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라, 증상을 완해시키고, 이러한 상태를 가능한 한 장기간 유지하는 약제가 사용되고 있는 실정이다. 이러한 대증요법을 위한 약제로서, 주로 아미노살리실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되지만, 다양한 부작용이 보고되고 있다. 예를 들어, 아미노살리실산 제제로서 자주 사용되는 살라조실과피리딘은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 부신피질스테로이드제는 일반적으로 프레드니솔론의 경구투여, 관장, 좌약, 정맥 주사 등으로 사용되지만, 위궤양이나 장기사용에 의한 대퇴골두 괴사 등 부작용이 강하다. 그러나 투약의 중단은 증상을 재발시키기 때문에, 이들 약제는 계속적으로 사용하지 않을 수 없다. 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 궤양성 대장염, 크론병 등의 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다. 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)도 마찬가지로 그 원인이 명확하지 않은 만성 복부 질환이다. 현재, IBS의 근본적인 치료제는 존재하지 않으며, 각 타입의 증상 경감을 목적으로 한 대증요법이 행해지고 있다. 예를 들어, 하리형 IBS에 대해서는 평활근의 수축을 억제하는 진경작용을 갖는 항콜린제가 사용되며, 변비형 IBS에는 염류 하제, 대체형 IBS에는 약제로 조절하기 곤란하고, 기본적으로 소화관 운동기능 개선제가 사용되고 있다.

[0004]

한편, 지모(知母, Anemarrhena asphodeloides Bunge)는 외떡잎식물 백합목 지모과의 여러해살이풀로서, 이를 껍질째 말린 모지모(毛知母) 또는 이의 뿌리줄기를 약재로 사용하고 있다. 한방에서 지모의 뿌리줄기는 해열제로 사용하고, 만성기관지염 또는 당뇨병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 지모의 약학적 용도와 관련하여 대한민국 등록특허 공보 제10-0856335호에는 지모로부터 분리된 화합물의 호흡기 질환 예방 및 치료 효과가 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-0923953호에는 지모 추출물의 콜린신경계 손상 개선 효과가 개시되어 있으며, 대한민국 등록특허공보 제10-1075742호에는 지모로부터 분리된 화합물의 지질대사 질환 예방 및 치료 효과가 개시되어 있다.

[0005]

지모에 포함된 유용한 화합물로는 만지페린, 네오만지페린, 티모사포닌 등이 알려져 있으며, 이들의 치료학적 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-0702184호에는 티모사포닌 A-III를 유효성분으로 하는 불임, 전립선암, 유방암, 다낭성 난소 증후군, 만성 신부전증 또는 클라인펠터 증후군의 치료용 황체형성호르몬 분비촉진제가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1235114호에는 티모사포닌 A-III가 유효성분으로 35 ~ 65%(w/w) 함유된 당뇨 합병증 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0056290호에는 티모사포닌 A-III, 티모사포닌 B-II 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 혈전성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0661397호에는 티모사포닌 A-III를 유효성분으로 하는 성장호르몬 분비촉진용

약학 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1118112호에는 티모사포닌 B-II를 포함하는 뇌졸중(중풍)의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1235115호에는 티모사포닌 A-III를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0923953호에는 만지페린, 네오만지페린, 또는 만지페린과 네오만지페린의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상으로 인한 기억력 감퇴 및 뇌손상의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1075742호에는 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 (E)-5,7-디하이드록시-3-(4'-하이드록시벤질리덴)-6-메틸크로만-4-온((E)-5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxybenzylidene)-6-methylchroman-4-one), 7-하이드록시-3-(4-하이드록시벤질)쿠마린(7-hydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)coumarin) 또는 1,3-비스(4-하이드록시페닐)프로프-2-인-1-온(1,3-bis(4-hydroxyphenyl)prop-2-yn-1-one) 신규 화합물을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환(비만, 당뇨병, 고콜레스테롤증, 고지혈증, 동맥경화 등)의 예방 및 치료용 약학 조성물이 개시되어 있다.

[0006] 그러나, 대장염 예방 또는 치료와 관련된 지모의 효과는 알려진 바가 없으며, 나아가 티모사포닌 A-III의 대장염 예방 또는 치료와 관련된 약리 효과는 연구된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이러한 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명은 티모사포닌 A-III의 대장염 예방 또는 치료에 관한 신규 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 확보된 수많은 약용 작물의 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 대상으로 대장염에 대한 예방 또는 치료 활성을 갖는 추출물을 개발하기 위하여 연구를 수행하였다. 그 결과, 지모로부터 분리된 티모사포닌 A-III가 대장염 모델동물에 대해 우수한 대장염 예방 또는 치료 활성을 가진다는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 일 측면은 티모사포닌 A-III 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이때, 상기 약학 조성물은 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 측면은 티모사포닌 A-III 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 식품 조성물은 바람직하게는 식품학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 티모사포닌 A-III는 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 구성하는 식의약적 소재로 사용될 수 있다. 이러한 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물은 급성 대장염이나 만성 대장염을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있고, 특히, 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 또는 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 티모사포닌 A-III의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 약물 치료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화를 나타낸 그래프이고, 도 3은 약물 치료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에서 적출한 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이다.

도 4는 약물 치료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이를 나타낸 것이고, 도 5는 약물 치료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에서 적출한 대장의 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0014] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0020] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0021] 본 발명의 일 측면은 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 다른 측면은 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명에서 대장염은 세균 감염이나 장 내용물의 병적 발효 등으로 인해 대장에 염증이 발생한 상태를 말하며, 감염성 대장염과 비감염성 대장염을 포함하는 개념이다. 본 발명에 따른 복합 추출물을 통해 예방 또는 치료가 가능한 구체적인 대장염의 종류는 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군 등이 있으나, 여기에 제한되는 것은 아니다. 염증성 대장 질환은 예를 들어 궤양성 대장염 (ulcerative colitis), 또는 크론병(Crohn's disease) 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 복합 추출물을 통해 예방 또는 치료가 가능한 대장염은 급성 대장염과 만성 대장염을 모두 포함한다. 급성 대장염은 급성으로 오는 대장 또는 결장의 염증을 말하는데, 염증으로 인해 점막이 손상되어 점액성 설사나 선혈 증상을 주로 보인다. 본 발명에서 급성 대장염은 일반적인 급성 감염성 대장염뿐만 아니라 급성 위막성 대장염 및 급성 궤양성 대장염을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 일 측면에 따른 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 티모사포닌 A-III[timosaponin A-III, 3-O-β-D-글루코피라노실-(1→2)-β-D-갈락토펜노실 살사사포제닌] 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함한다. 또한, 본 발명의 다른 측면에 따른 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물은 티모사포닌 A-III 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함한다. 상기 티모사포닌 A-III는 2,4,6-트리니트로벤젠술포산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)에 의해 유발된 대장염 모델동물에서 대장의 외관을 양호하게 하고 결장의 수축을 억제하며, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 낮게 유지시켜 대장염을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 티모사포닌 A-III는 다양한 공지의 방법에 의해 합성된 것일 수도 있고, 상업적으로 입수된 것일 수도 있고, 식물 등에서 분리된 것일 수도 있으며, 바람직하게는 지모로부터 분리될 수 있다. 예를 들어 티모사포닌 A-III는 (i) 지모를 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매, 가장 바람직하게는 70% 에탄올로 추출하고 감압농축시키는 단계; (ii) 생성된 추출물을 물에 재현탁하고 메틸렌클로라이드로 분획하여 물 분획을 수득하는 단계; (iii) 수득된 물 분획을 부탄올로 분획하여 부탄올 분획을 수득하는 단계; (iv) 수득된 부탄올 분획을 감

압축하고 메탄올에서 재결정을 유도한 후, 생성된 침전물을 메탄올로 세척하여 메탄올 불용성 분획과 메탄올 가용성 분획을 수득하는 단계; 및 (v) 수득된 메탄올 가용성 분획을 컬럼 크로마토그래피하여 티모사포닌 A-III를 주성분으로 함유하는 분획을 수득하는 단계에 의해 제조될 수 있다. 상기 단계 (v)에서, 컬럼 크로마토그래피는 바람직하게는 실리카겔 컬럼 상에서 메틸렌클로라이드, 메탄올 및 물의 혼합용매를 사용하여 수행한다. 상기 혼합용매는 메틸렌클로라이드:메탄올:물 7:1:0.5~7:3:1인 것이 바람직하다.

[0024]

본 발명에서 약학 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로는 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알칼 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딘산 등을 사용할 수 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용화 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0025]

본 발명에 약학 조성물에서 티모사포닌 A-III와 같은 유효성분의 함량은 본 발명의 약학 조성물에서 추출물 기반의 유효성분 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.1~50 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 티모사포닌 A-III와 같은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 발명의 약학 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. 또한, 본 발명에 따른 대장염 예방 또는 치료용 조성물은 티모사포닌 A-III 외에 대장염 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 추출물 기반의 성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 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, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 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. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여된다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발

명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 티모사포닌 A-III를 기준으로 할 때 0.1 내지 1000 mg/kg인 것이 바람직하고, 1 내지 500 mg/kg인 것이 더 바람직하며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0026]

본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물에서 티모사포닌 A-III와 같은 유효성분의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량% 이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 티모사포닌 A-III 외에 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 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. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0027]

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0028]

1. 지모로부터 분리된 티모사포닌 A-III(timosaponin A-III)의 제조

[0029]

지모를 그대로 또는 거피하여 잘 말린 후, 70% 에탄올을 이용해 수욕상에서 추출한 후 완전 건조시켜 지모의 70% 에탄올 추출물을 제조하였다. 수득한 지모의 70% 에탄올 추출물을 물에 재현탁한 후 CH_2Cl_2 로 분획하고, 물층을 BuOH로 추출한 다음 감압농축하였다. 감압농축된 BuOH 추출물을 MeOH로 재결정을 유도하고 결정화되어 침전된 침전물을 MeOH로 세척하여, 메탄올 불용성 분획과 메탄올 가용성 분획을 수득하였다. 그런 다음, 메탄올 가용성 분획은 메틸렌클로라이드, 메탄올 및 물의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 7:1:0.5 \rightarrow 7:2:0.5 \rightarrow 7:3:1$)하여 티모사포닌 A-III, 티모사포닌 B-II, 티모사포닌 B-III 및 티모사포닌 D를 분리하였다. 티모사포닌 A-III의 분리 여부는 질량 분석 및 ^{13}C -NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 확인하였다. 도 1은 티모사포닌 A-III의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

[0030]

<티모사포닌 A-III : 백색 무정형 분말>

[0031]

FAB-MS m/z: 763.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

[0032]

^{13}C NMR (125 MHz) 30.971 (C-1), 27.031 (C-2), 75.522 (C-3), 30.971 (C-4), 36.963 (C-5), 26.833 (C-6), 26.833 (C-7), 35.557 (C-8), 40.260 (C-9), 35.278 (C-10), 21.174 (C-11), 40.341 (C-12), 42.503 (C-13), 56.483 (C-14), 32.183 (C-15), 81.376 (C-16), 62.216 (C-17), 16.622 (C-18), 24.040 (C-19), 40.907 (C-20), 14.941 (C-21), 109.7 (C-22), 26.434 (C-23), 26.229 (C-24), 27.573 (C-25), 69.882 (C-26), 16.308 (C-27), 102.588 (3-Gal C-1'), 81.879 (C-2'), 75.263 (C-3'), 71.753 (C-4'), 76.650 (C-5'), 62.824 (C-6'), 106.167 (O-3 Glu C-1''), 76.987 (C-2''), 78.459 (C-3''), 72.987 (C-4''), 78.064 (C-5''), 65.129 (C-6'')

[0033]

2. 대장염이 유도된 모델동물 실험을 통한 대장염 치료 효과 측정

[0034]

(1) 실험동물의 준비

[0035]

4주령 ICR 수컷 생쥐(24-27g)를 오리엔트바이오(주)로부터 구입하였다. 모든 생쥐는 습도 $50 \pm 10\%$, 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$

의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 켜 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

(2) TNBS에 의한 급성 대장염 유발 및 시료 투여

실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠술포산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 가볍게 에테르로 마취한 후 NBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1ml 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1ml 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1ml를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 시료를 생리식염수에 녹여 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식사시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다.

(3) 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

1) 체중 변화량 분석

TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에 시료 투여를 종료하고 다음날에 실험동물의 체중을 측정한 후 최초 체중과 비교하여 체중 변화량을 산출하였다.

2) 외관 분석

적출한 대장은 그 길이와 외관을 관찰하여 하기 표 1의 기준(Hollenbach 등, 2005 대장염 정도에 대한 기준)에 따라 점수로 매겼다. 이때 양성 대조군으로 메살라진(Mesalazine; Sigma) 투여군을 사용하였다. 또한, 장내 미생물 분석을 위해 대장 내용물의 일부를 채취하여 영하 80℃에서 냉동보관하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리 식염수에 세척한 후 일부는 병리조직용 샘플로 사용하기 위해 4% 포름알데히드 고정액으로 고정하였으며, 나머지는 분자생물학적 분석을 영하 80℃에서 냉동보관하였다.

표 1

외관 점수(Macroscopic Score)	기준
0	어떠한 궤양과 염증도 발견되지 않음
1	출혈이 없는 충혈이 발견됨
2	충혈이 있는 궤양이 발견됨
3	한 곳에서만 궤양과 염증이 발견됨
4	궤양과 염증이 2곳 이상에서 발견됨
5	궤양이 2cm 이상으로 확대되어 있음

3) 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

대장조직 100mg에 lysis buffer 200μl를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 Mouse MPO assay ELISA kit(Hbt HK210, USA)을 사용하여 MPO 활성을 측정하였다. 상층액 100μl를 96 well plate에 넣은 다음 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200μl의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100μl의 희석된 tracer를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200μl의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200μl의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100μl의 희석된 streptavidin-peroxidase conjugate를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200μl의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200μl의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100μl의 TMB substrate solution을 첨가하고 plate를 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그리고 100μl의 정지 용액을 첨가하여 반응을 중지시키

고 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 체중 변화량, 대장의 외관, 대장의 길이 및 MPO 활성 측정 결과

도 2는 약물 시료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화를 나타낸 그래프이고, 도 3은 약물 시료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에서 적출한 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이다. 도 4는 약물 시료로 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이를 나타낸 것이고, 도 5는 약물 시료로 제조예 34에서 티모사포닌 A-III를 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에서 적출한 대장의 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 2 내지 도 5에서 "Nor"은 정상군을 나타내고, "TNBS"는 TNBS에 의해 급성 대장염을 유발한 모델동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 군을 의미하고, "T"는 티모사포닌 A-III를 의미한다. 또한, "T10" 및 "T20"은 각각 약물 시료 "T"의 1회 투여량이 10mg/마우스 kg 및 20mg/마우스 kg 인 것을 의미한다. 또한, 도 2 내지 도 5에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미하고, 메살라진의 1회 투여량은 10mg/마우스 kg이다. 도 2 내지 도 5에서 보이는 바와 같이 티모사포닌 A-III는 농도 의존적으로 TNBS에 의해 유도된 급성 대장염을 완화하거나 개선하는 효과를 나타내었다. 또한, 티모사포닌 A-III의 대장염 예방 또는 치료 효과는 양성 대조 약물로 사용한 메살라진과 동등한 수준이었다.

3. 티모사포닌 A-III를 포함하는 약학 조성물의 제조

<3-1> 산제의 제조

티모사포닌 A-III	20 mg
유당	100 mg
탈크	10 mg

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<3-2> 정제의 제조

티모사포닌 A-III	10 mg
옥수수전분	100 mg
유 당	100 mg
스테아린산 마그네	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<3-3> 캡슐제의 제조

티모사포닌 A-III	10 mg
결정성 셀룰로오스	3 mg
유 당	15 mg
스테아린산 마그네슘	0.2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<3-4> 환의 제조

티모사포닌 A-III	10 mg
-------------	-------

[0068]	유당	150 mg
[0069]	글리세린	100 mg
[0070]	자일리톨	50 mg
[0071]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
[0072]	<3-5> 과립의 제조	
[0073]	티모사포닌 A-III	15 mg
[0074]	대두추출물	50 mg
[0075]	포도당	200 mg
[0076]	전분	600 mg
[0077]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0078]	<3-6> 주사제의 제조	
[0079]	티모사포닌 A-III	10 mg
[0080]	소듐 메타비설파이트	3.0 mg
[0081]	메틸파라벤	0.8 mg
[0082]	프로필파라벤	0.1 mg
[0083]	주사용 멸균증류수	적량
[0084]	상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2ml를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.	
[0085]	4. 지모 추출물 등을 포함하는 식품 조성물의 제조	
[0086]	<4-1> 밀가루 식품의 제조	
[0087]	밀가루 100 중량부에 티모사포닌 A-III 0.5 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.	
[0088]	<4-2> 유제품(dairy products)의 제조	
[0089]	우유 100 중량부에 티모사포닌 A-III 0.5 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0090]	<4-3> 선식의 제조	
[0091]	현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0092]	검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0093]	상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 티모사포닌 A-III를 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.	
[0094]	곡물류(현미 30 중량부, 율무 17 중량부, 보리 20 중량부),	

[0095] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0096] 티모사포닌 A-III(1 중량부),

[0097] 영지(0.5 중량부),

[0098] 지황(0.5 중량부)

[0099] <4-4> 건강음료의 제조

[0100] 액상과당(0.5 g), 올리고당(4 g), 설탕(2 g), 식염(0.5 g), 물(77 g)과 같은 부재료와 티모사포닌 A-III 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0101] <4-5> 야채 주스의 제조

[0102] 티모사포닌 A-III 2 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

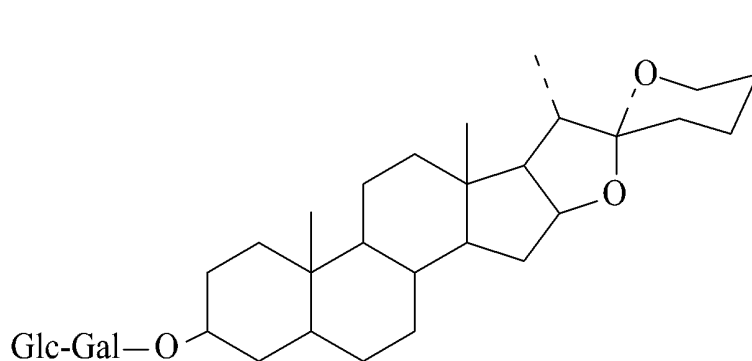
[0103] <4-6> 과일 주스의 제조

[0104] 티모사포닌 A-III 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

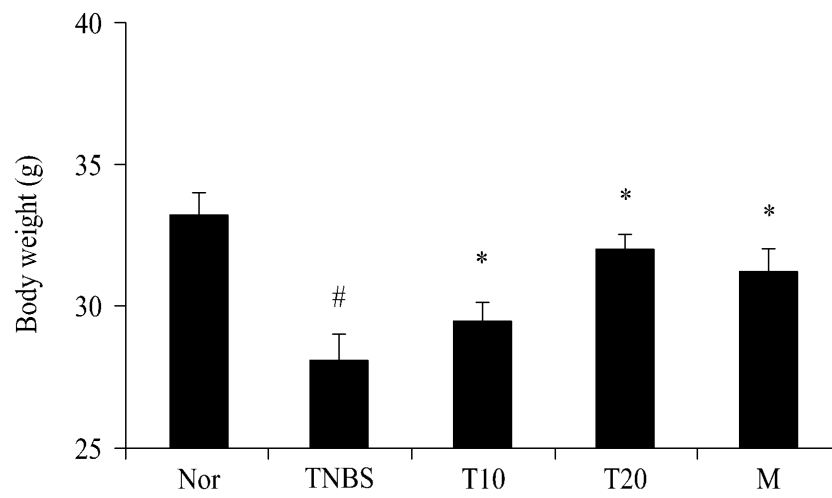
[0105] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

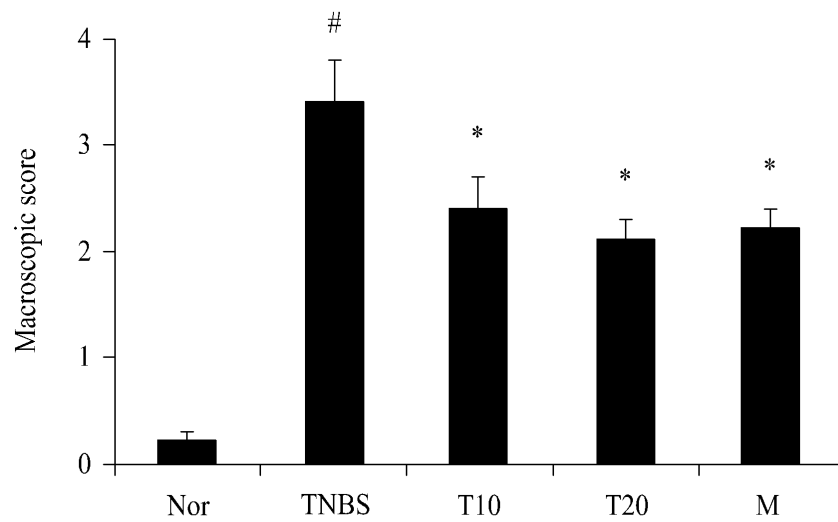
도면1



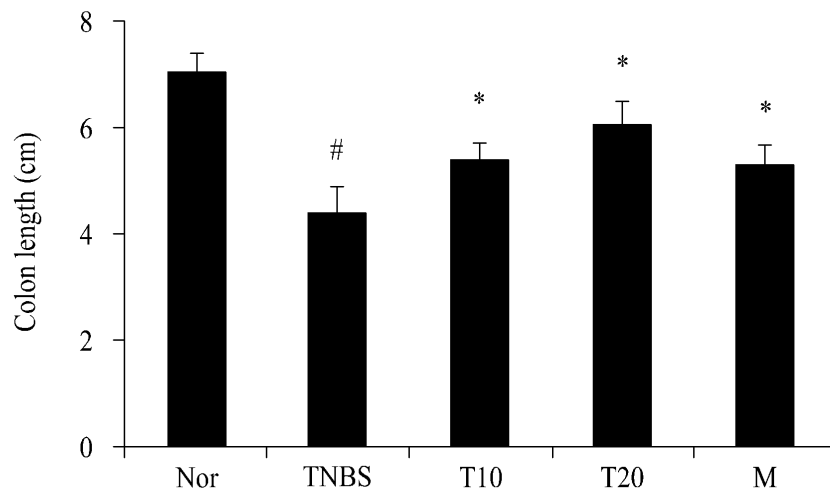
도면2



도면3



도면4



도면5

