



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0034068

(43) 공개일자 2015년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/75 (2006.01) A61K 31/56 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0114162

(22) 출원일자 2013년09월25일

심사청구일자 2013년09월25일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이동호

서울 강남구 삼성로 212, 23동 1402호 (대치동, 은마아파트)

김나현

서울 송파구 올림픽로 135, 251동 2203호 (잠실동, 리센즈아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

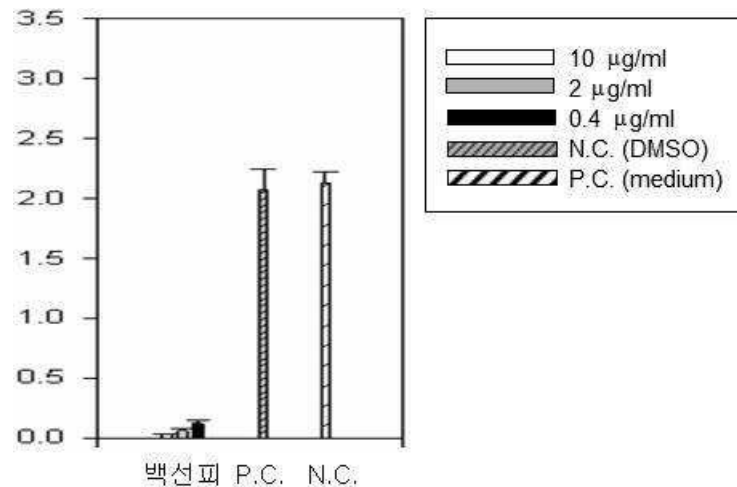
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 백선평 추출물과 이로부터 분리된 신규 글래브레탈-타입 트리테르페노이드 및 이의 용도

(57) 요약

백선평 추출물과 이로부터 분리된 4종의 신규 글래브레탈-타입 트리테르페노이드 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의하면, 부작용이 적고 우수한 면역억제 효과가 있는 조성물을 제공하여 장기이식거부반응, 자가면역질환, 알레르기, 아토피 등과 같은 면역 과민반응으로 야기되는 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물뿐만 아니라 식품첨가물로도 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전태훈

서울 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자존아파트)

최상필

서울 동대문구 무학로44길 16, 201호 (용두동)

배준범

경기 광주시 중앙로346번길 45-53, 103동 302호 (송정동, 태영하이츠빌)

명세서

청구범위

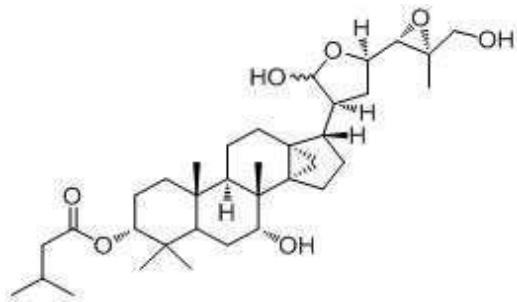
청구항 1

백선피 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물.

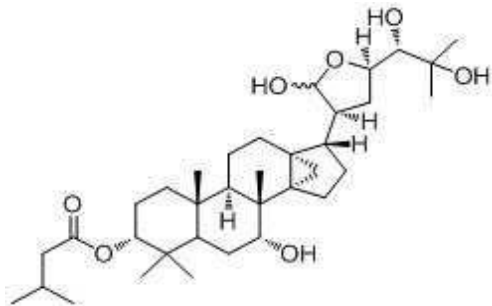
청구항 2

하기 화학식 1 ~ 4로 각각 표시되는 화합물 1 ~ 4에서 선택되는 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물.

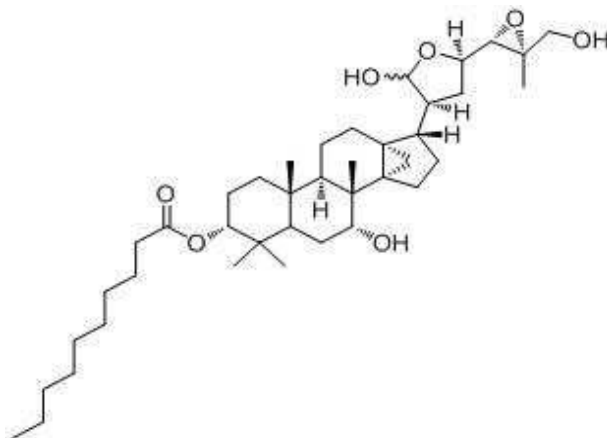
[화학식 1]



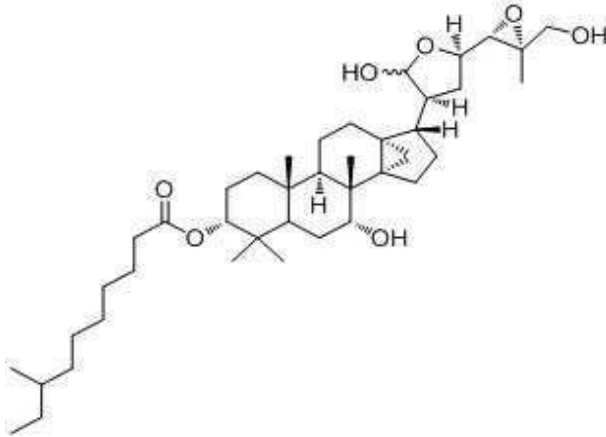
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 3

제2항에 있어서, 상기 트리테르페노이드 화합물은 백선피에서 분리된 것을 특징으로 하는 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물.

청구항 4

제2항 기재의 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물이 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식거부반응; 루푸스 또는 류마티스 관절염의 자가면역질환; 비염, 천식, 아토피의 알러지성 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 면역억제용 조성물.

청구항 6

물, 알코올 또는 이들의 혼합용매로 백선피 추출물을 추출하는 제1단계;

상기 제1단계에서 추출된 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산(hexane)과 클로로포름으로 순차적으로 분획하는 제2단계; 및

상기 제2단계에서 상기 클로로포름에 용해된 분획물을 클로로포름과 메탄올($\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$)의 혼합용매를 사용하여 농도구배 실리카 젤 크로마토그래피(gel chromatography)를 수행하여 분획물을 수득하는 제3단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제2항 기재의 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 백선피 추출물과 이로부터 분리된 신규 글래브레탈-타입 트리테르페노이드(glabretal-type triterpenoid) 및 이의 용도에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 면역억제 활성추적법을 바탕으로 한 백선피로부터 분리된 4종의 신규 글래브레탈-타입 트리테르페노이드 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

현재 우리나라는 수명 연장과 삶의 질의 향상으로 면역질환에 대한 사회적, 경제적 관심이 높아지고 있다. 면역억제제는 type I 당뇨병, 류머티스성 관절염 같은 자가면역질환이나 장기이식 시 면역세포에 의한 거부 반응의

치료에 사용되며, 전 세계 시장은 올해 100억 달러 수준으로 이러한 추세는 인간의 수명이 향상됨으로써 향후 더욱 확대될 전망이다.

[0003]

기존의 면역억제제로 천연물 추출물에서 분리된 사이클로스포린 A(cyclosporin A)나 타크로리무스(tacrolimus, FK506)가 대표적이다. 사이클로스포린 A는 실린드로카르폰 루시디움(*Cylindrocarpon lucidum*)과 톨리포클라디움 인플라툼(*Tolypocladium inflatum*)에서 분리되었고 타크로리무스(FK506)는 방선균(*Streptomyces tsukubaensis*)에서 분리되었으며, 이들은 오늘날 임상에서 가장 많이 사용되고 있는 면역억제제로 장기 이식에서 거부반응의 예방과 치료에 널리 사용되고 있다(Borel et al., *Inflammation Res.* 43:179-186, 1994; Herold et al., *J. Immunol.* 136:1315-1321, 1986; Kronke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:5214-5218, 1984; Mann, *Nat. Prod. Rep.* 18:417-430, 2001; Siekierka et al., *Nature* 341:755-757).

[0004]

하지만 이들은 면역세포 특이적이지 않기 때문에 신장 독성, 혈관 경직, 림프종, 피부암 유발뿐만 아니라 각종 감염증과 같은 부작용의 이유로 새로운 면역억제 작용물질의 필요성이 제시되고 있다(Huang et al., *Eur. J. Pharmacol.* 211:359-364, 1992).

[0005]

한편, 운향과 식물인 백선(*Dictamnus albus* L.)은 아시아와 유럽에 자생하는 다년생 초본으로 잎에서 방출되는 가연성의 방향물질로 인해 '가스 플랜트(gas plant)' 또는 '버닝 부쉬(burning bush)'라고 알려져 있다(Gao et al., *Chem. Biodiversity*, 8:1234-1244, 2011; Storer et al., *Tetrahedron*, 29:1217-1222, 1973). 백선은 예로부터 월경 불순, 항수정, 기침, 황달, 류머티즘, 피부병 등에 사용되었다(Jeong et al., *Arch. Pharm. Res.*, 29:1119-1124, 2006; Woo et al., *Planta Med.*, 53:399-401, 1987; Beis et al., *Turk. J. Pharm. Sci.*, 2:111-124, 2005). 이 식물에는 알칼로이드(alkaloids), 리모노이드(limonoids), 플라보노이드(flavonoids), 쿠마린(coumarins), 세스퀴테르펜 글리코사이드(sesquiterpene glycosides), 정유(essential oils)가 함유된 것으로 알려졌다(Storer et al., *Tetrahedron*, 29:1217-1222, 1973; Baser et al., *Planta Med.*, 60:481-482, 1994; Souleles et al., *Planta Med.*, 55:402, 1989).

[0006]

백선(*D. albus* var. *caucasicus*) 추출물은 혈액응고 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Petrov et al., *Uch. Zap., Pyatigorskii Farm. Inst.* 5:335-338, 1961). 또한 백선에서 분리된 퓨로퀴놀린 알칼로이드(furoquinoline alkaloid)는 생체 외에서 평활근 이완 관련 효소인 인간 포스포다이에스테라제 5(human phosphodiesterase 5)를 억제하는 것으로 보고되었다(Nam et al., *Arch. Pharm. Res.* 28:675-679, 2005). 더욱이 백선피(*D. dasycarpus* T.)에서 분리된 글리코사이드(glycosides)는 면역시스템을 조절한다고 보고되었다(Chang et al., *J. Nat. Prod.* 64:935-938, 2001; Chang et al., *Planta Med.* 68:425-429, 2002).

[0007]

본원발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 공개특허 제10-2012-0124142호(2012.11.13)에는 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 다중약물내성 억제용 조성물이 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-1181347호(2012.09.17)에는 백선피 추출물을 유효성분으로 포함하는 지질 관련 심혈관 질환 또는 비만의 예방 및 치료용 조성물에 대해 기재되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허 제10-1011671호(2011.01.28)에는 백선피 추출물 또는 리모노이드 화합물을 포함하는 퇴행성 뇌신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대해 기재되어 있다. 그러나, 백선피 추출물 및 이로부터 분리된 신규 글라브레탈-타입 트리테르페노이드(glabretal-type triterpenoid)의 면역억제 활성에 대해 알려진 바는 없다.

[0008]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009]

(특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0124142호(2012.11.13)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1181347호(2012.09.17)

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-1011671호(2011.01.28)

발명의 내용

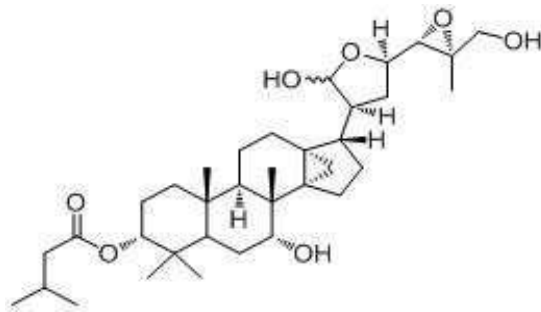
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 천연물로부터 면역억제 활성이 있는 물질을 분리하기 위해 본 발명자들이 보유하고 있는 국내 유통 중인 약용자원 500종에 대한 추출물 라이브러리를 이용하여 활성을 타진한 결과, 백선피에서 강력한 면역억제 활성을 확인하였다. 이 결과를 토대로 면역억제 활성 추적법을 기반으로 하여 추출물과 그의 분획물에 대한 유의성 있는 활성을 확인하였고, 이로부터 신규 화합물을 분리, 정제하여 그 구조를 동정하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 백선피의 추출물 또는 이로부터 분리된 신규 글래브레탈-타입 트리테르페노이드를 포함하는 면역억제 활성 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 백선피 추출물에서 분리된 신규 글래브레탈-타입 트리테르페노이드 화합물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

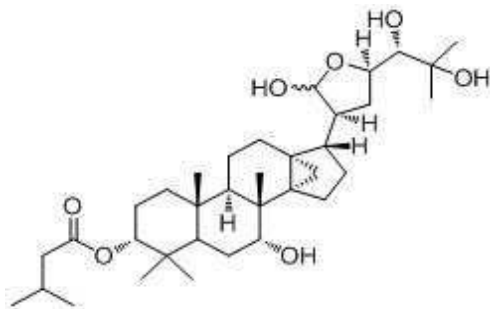
과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 하기 화학식 1 ~ 4로 각각 표시되는 화합물 1 ~ 4에서 선택되는 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물을 제공한다.

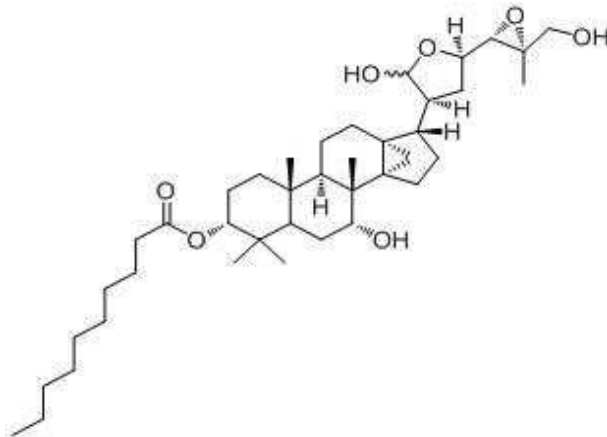
화학식 1



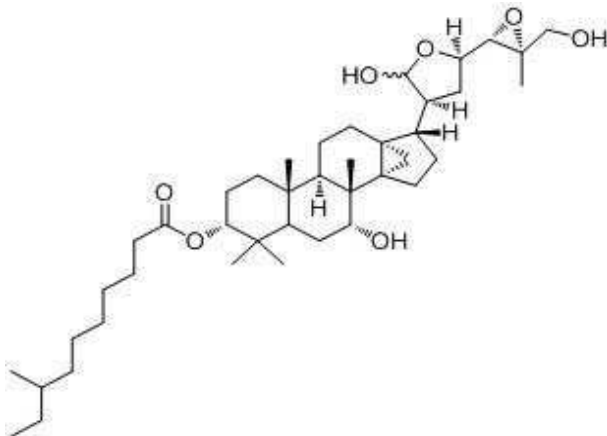
화학식 2



화학식 3



화학식 4



본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 화학식 1 ~ 4로 각각 표시되는 화합물 1 ~ 4에서 선택되는 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물을 제공한다.

바람직하게, 상기 조성물은 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식거부반응; 루푸스 또는 류마티스 관절염의 자가면역질환; 비염, 천식, 아토피의 알러지성 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 물, 알코올 또는 이들의 혼합용매로 백선피 추출물을 추출하는 제1단계; 상기 제1단계에서 추출된 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산(hexane)과 클로로포름으로 순차적으로 분획하는 제2단계; 및 상기 제2단계에서 상기 클로로포름에 용해된 분획물을 클로로포름과 메탄올(CHCl_3 -MeOH)의 혼합용매를 사용하여 농도구배 실리카 젤 크로마토그래피(gel chromatography)를 수행하여 분획물을 수득하는 제3단계를 포함하는 본 발명에 의한 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

본 발명자들은 백선피 추출물의 강력한 면역억제 활성을 확인하고, 백선피에서 면역억제 활성추적법을 바탕으로 4개의 신규 글라브레탈-타입 트리테르페노이드(glabretal-type triterpenoid)인 디타브레톨 A ~ D(dictabretol

A ~ D, 화학식 1~4)를 분리하였다. 화합물 1~4의 구조는 2D NMR을 비롯한 분광학적 분석법을 통해 확인되었다. 면역억제 활성은 T 세포를 기반으로 측정하였고 활성화된 T 세포의 증식을 IC₅₀ 1.48 μ M까지 억제하는 것으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0025] 따라서, 본 발명은 백선피 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 조성물의 유효 성분인 백선피 추출물을 제조하기 위한 추출 용매로는 천연물 추출에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있는데, 물, 탄소수 1~4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 메탄올이다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 ~ 4로 각각 표시되는 화합물 1 ~ 4에서 선택되는 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물을 제공한다.

[0028] 본 발명에 의한 상기 화학식 1 ~ 4로 각각 표시되는 화합물 1 ~ 4는 하기와 같이 디타브레톨 A ~ D(Dictabretol A ~ D)로 구조가 결정되었다.

[0029] **화합물 1(Dictabretol A, 화학식 1)**

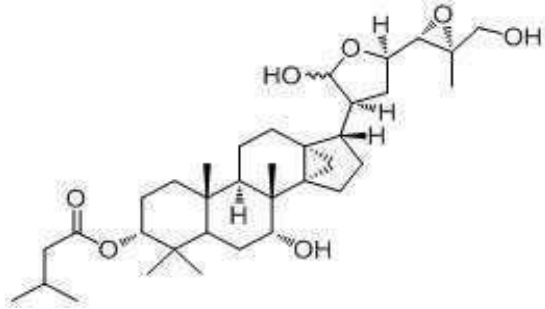
[0030] 디타브레톨 A(Dictabretol A)는 흰색의 비결정성 고체로 분리됐고 녹는점이 234.4 °C이다. 분자 화학식은 HRESIMS에서 587.3951의 값이 측정됨으로써 C₃₅H₅₆O₇로 결정되었으며, 이 분자의 불포화도는 8임을 확인하였다.

IR 스펙트럼을 통해 수산기 (3402 cm⁻¹)와 에스테르작용기 (1723 cm⁻¹)를 확인했다. ¹H NMR 스펙트럼에서 (클로로포름, 표 1) δ_H 0.88 (H-19), 1.31 (H-27), 0.84 (H-28), 0.87 (H-29), 1.04 (H-30), 0.96 (H-4'), 및 0.95 (H-5')로부터 7개의 메틸기를 확인했다. δ_H 4.65 (H-3), 3.75 (H-7), 5.43 (H-21), 3.94 (H-23), 3.18 (H-24), 및 3.65 (H-26)의 신호로부터 6개의 옥시메틴을 확인했고, 알리파틱메틴과 메틸렌의 중복 신호도 확인했다. 또한 좀 더 고 자장 영역인 δ_H 0.71 (2H, doublet, J = 4.5 Hz, H-18a) 과 0.46 (2H, doublet, J = 5.0 Hz, H-18b)에서 사이클로프로필메틸렌기의 특징적인 신호를 확인했다. ¹H 과 ¹³C NMR 스펙트럼 (클로로포름, 표 1과 2) 분석과 더불어 HMBC 스펙트럼으로부터 화합물 1이 glabretal-type triterpenoid 임을 밝혔다 (Kamperdick et al., J. Nat. Prod. 66:675-678, 2003; Mulholland et al., Phytochemistry 34:579-580, 1993; Su et al., Bioorg. Med. Chem. 14:960-972, 2006). 화합물 1의 ¹H 과 ¹³C NMR 스펙트럼은 C-24 [δ_H 3.18 (1H, doublet, J = 7.5 Hz) 및 δ_C 63.38]과 C-25 (δ_C 60.74)에서 3치환형 에폭시기 신호를 보였다. 추가로 δ_C 98.26 (C-21) 와 δ_H 5.43 (1H, overlap, H-21) 의 신호로부터 헤미아세탈기의 존재를 추론했다. δ_H 2.21 (2H, broad doublet, J = 7.0 Hz, H-2'), 2.13 (1H, multiplet, H-3'), 0.96 (3H, doublet, J = 2.0 Hz, H-4'), 및 0.95 (3H, doublet, J = 2.0 Hz, H-5') 의 ¹H NMR 신호를 통해 이소발레르산의 존재를 확인했다. 이소발레르산은 δ_H 0.84 (H-28) 및 δ_H 0.87 (H-29) 와 δ_C 77.77 (C-3), 36.16 (C-4), 및 41.27 (C-5) 사이의 HMBC 상호연관과 δ_H 4.65 (H-3) 과 δ_C 33.85 (C-1), 22.88 (C-2), 36.16 (C-4), 41.27 (C-5), 27.79 (C-28), 21.87 (C-29), 및 172.95 (C-1') 사이의 상호연관을 통해 3번 탄소에 위치함을 확인했다 (Kamperdick et al., J. Nat. Prod. 66:675-678, 2003).

[0031] δ_H 4.65 (1H, broad singlet, H-3) 과 3.75 (1H, broad singlet, H-7) 의 넓은 단일신호는 이소발레르산과수산기가 알파 방향으로 되어있다는 것을 나타낸다(Su et al., Bioorg. Med. Chem. 14:960-972, 2006; Ntalli et al., Molecules 15:5866-5877, 2010). 나아가 화합물 1의 입체구조에 대한 상대배치는 H-3/H-19 과 H-7/H-30 간의 NOE 상호연관과 glabretal-type triterpenoid의 문헌 값과의 비교를 통해 확인했다 (Kamperdick et al., J. Nat. Prod. 66:675-678, 2003; Mulholland et al., Phytochemistry 34:579-580, 1993; Su et al., Bioorg. Med. Chem. 14:960-972, 2006; Ntalli et al., Molecules 15:5866-5877, 2010; Ochi et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 61:3225-3229, 1988). 게다가 HSQC 스펙트럼으로부터 확인된 H-21 (δ_H 5.43 overlap) 과 C-21 (δ_C 98.26 and 102.17)의 상호연관과 ¹³C NMR 스펙트럼이 밀접하게 짝을 이루는 신호를 통해 이 화합물이 21번 탄소가 분리되지 않는 에피머성 혼합물이라는 것을 확인했다(Kamperdick et al., J. Nat. Prod. 66:675-678, 2003; Su et al., Bioorg. Med. Chem. 14:960-972, 2006; Ntalli et al., Molecules 15:5866-5877, 2010). 위

의 결과에 따라 신규 glabretal-type triterpenoid인 dictabretol A의 구조가 결정되었다.

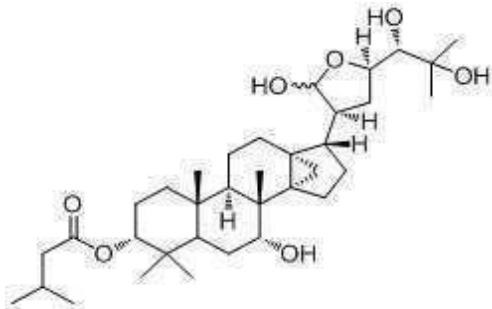
[화학식 1]



화합물 2 (Dictabretol B, 화학식 2)

딕타브레톨 B(Dictabretol B)는 흰색의 비결정성 고체로 분리됐고 녹는점이 229.9 °C이며, HRESIMS에서 589.4103의 값이 측정됨으로써 분자화학식이 $C_{35}H_{58}O_7$ 이고 불포화도가 7임을 확인했다. ^1H 과 ^{13}C NMR 스펙트럼은 (표 1과 2) 화합물 1과 매우 유사하였고, 이 화합물 역시 glabretal-type triterpenoid 임을 알 수 있었다. 추가적으로 26번 탄소의 단일신호 메틸기 [δ_H 1.28 (3H, singlet) and δ_C 26.93] 가 1번 화합물의 메틸렌 신호 [δ_H 3.65 (2H, doublet, $J = 12.5$ Hz) and δ_C 64.95] 를 대체하였고, 이는 26번의 수산기가 소실된 것임을 나타낸다. 2번 화합물의 C-24 (δ_C 75.27) 과 C-25 (δ_C 73.72)의 저자장 이동은 에폭시환의 개방을 명시하는데 (Su et al., Bioorg. Med. Chem. 14:960-972, 2006), 이는 화합물 1에 비해서 불포화도가 1이 감소하는 것으로 입증되었다. 따라서 화합물 2의 구조는 26번 탄소에 단일 메틸기를 가지고 24,25-디하이드록시기를 가짐을 명확하게 결정했다. 마찬가지로 화합물 2 또한 에피머성 혼합물로 분리되었다. 하지만 부 이성질체의 1D와 2D NMR 신호가 구조해석을 완성하기에는 뚜렷하지 않기에 주 이성질체의 ^1H 과 ^{13}C NMR 결과만을 표에 포함시켰다 (표 1 과 2).

[화학식 2]

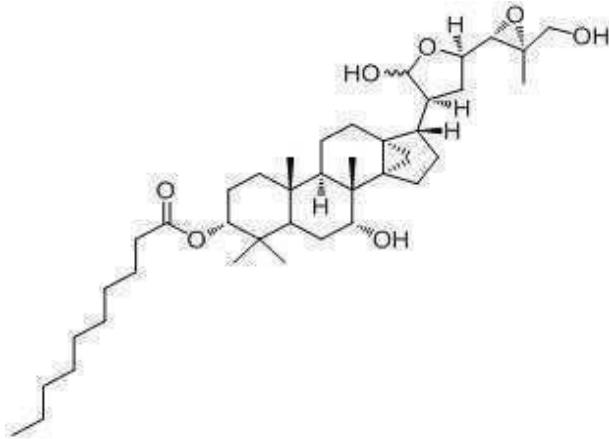


화합물 3 (Dictabretol C, 화학식 3)

딕타브레톨 C(Dictabretol C)는 무색의 오일로 분리됐다. 분자화학식은 HRESIMS에서 657.4731의 값에 따라 $C_{40}H_{66}O_7$ 이고 불포화도는 8임을 확인했다. 화합물 3의 ^1H 과 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 (표 1과 2) 이소발레르산에 해당하는 신호가 없다는 것을 제외하고는 화합물 1과 매우 유사하였으며 glabretal-type triterpenoid 임을 알 수 있었다. ^1H NMR 스펙트럼에서 C-4'-C-7' 긴 지방족 사슬에 해당하는 δ_H 1.24-1.61의 메틸렌기와 δ_H 0.87의 메틸기 신호를 통해 테칸산의 존재를 확인하였으며, 이는 질량 스펙트럼으로 입증되었다. 추가로 HMBC분석에서 δ_H 4.63 (H-3) 와 δ_C 33.85 (C-1), 36.20 (C-4), 41.25 (C-5), 27.71 (C-28), 21.84 (C-29), 및 173.65 (C-1') 의 상호연관과 δ_H 2.32 (H-2') 와 δ_C 77.78 (C-3), 173.65 (C-1'), 25.19 (C-3'), 및 29.19 (C-4') 의 상호

연관을 바탕으로 데칸산이 3번 탄소에 위치함을 확정하였다. 그러므로 1D와 2D NMR 스펙트럼을 통해 화합물 3은 3번 탄소에 데칸산 치환기를 가지는 glabretal triterpene 임이 결정되었다.

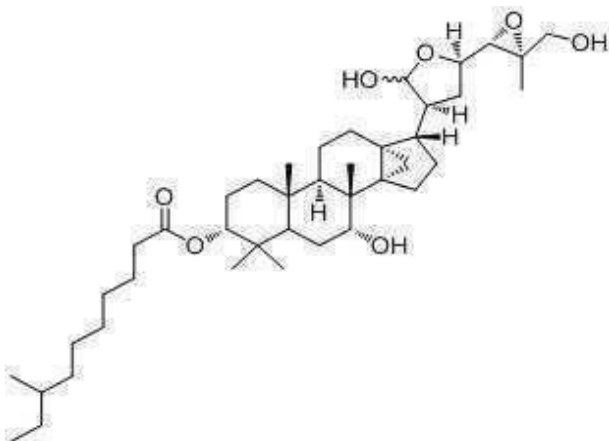
[화학식 3]



화합물 4 (Dictabretol D, 화학식 4)

딕타브레톨 D(Dictabretol D)는 노란색의 오일로 분리됐다. 분자화학식은 HRESIMS에서 671.4887의 값에 따라 $C_{41}H_{68}O_7$ 이고 불포화도는 8임을 확인했다. 화합물 4의 ^1H 과 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 (표 1과 2) 8'번 탄소에 안테이소 형의 메틸 결사슬의 전형적인 신호를 제외하고는 화합물 3과 거의 일치하였다. 8번 위치에 메틸기가 붙은 데칸산의 존재는 HMBC 분석에서 $\delta_H 0.86$ (H-10') 과 $\delta_C 34.36$ (C-8') 및 $\delta_C 29.71$ (C-9')의 상호연관과 $\delta_H 0.84$ (H-11')와 $\delta_C 36.58$ (C-7'), $\delta_C 34.36$ (C-8'), 및 $\delta_C 29.71$ (C-9')의 상호연관을 바탕으로 결정됐다. 더욱이, 8'번 탄소의 메틸 치환에 따른 감마효과로 인해 10'번 ($\delta_C 11.41$)에 위치한 말단 메틸기의 고자장 이동이 확인됐고, 이것은 화합물 3번의 엔알킬 결사슬이 아닌 안테이소 형의 메틸 결사슬의 존재를 의미한다 (Kim et al., J. Antibiot. 59:797-800, 2006; Wang et al., J. Nat. Prod. 66:51-56, 2003). 따라서 화합물 4의 구조는 화합물 3의 데칸산 부분에서 8'번 탄소에 메틸 치환기를 가지는 것으로 명백히 결정되었다.

[화학식 4]



상기 화학식 1 ~ 4로 각각 표시되는 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 염, 수화물 및 용해화물을 포함한다.

- [0047] 본 발명에 따른 상기 화학식 1 ~ 4의 화합물은 바람직하게는 백선피로부터 추출 및 정제하여 얻을 수 있고, 유기합성을 통하여 얻을 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 신규 트리테르페노이드(triterpenoid)의 분리 및 정제방법은 다음과 같다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 물, 알코올 또는 이들의 혼합용매로 백선피 추출물을 추출하는 제1단계; 상기 제1단계에서 추출된 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산(hexane)과 클로로포름으로 순차적으로 분획하는 제2단계; 및 상기 제2단계에서 상기 클로로포름에 용해된 분획물을 클로로포름과 메탄올(CHCl_3 -MeOH)의 혼합용매를 사용하여 농도구배 실리카 젤 크로마토그래피(gel chromatography)를 수행하여 분획물을 수득하는 제3단계를 포함한다.
- [0050] 나아가 상기 제3단계에서 수득된 분획물을 클로로포름과 메탄올(CHCl_3 -MeOH)을 이동상으로 세파텍스 LH-20로 정제하고, 정제된 분획물을 헥산-아세톤(hexane-acetone)을 이동상으로 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분리하여 분획물을 수득하는 제4단계; 상기 제4단계에서 수득된 분획물을 아세토니트릴과 물(MeCN- H_2O)을 사용하여 역상(Reverse Phase, RP) 컬럼을 이용하여 분획물을 수득하는 제5단계 및 상기 제5단계에서 수득된 분획물을 디클로로메탄과 메탄올(CH_2Cl_2 -MeOH)의 혼합용매를 사용하여 크로마토그래피를 수행하여 화학식 1의 화합물 1을 수득하는 제6단계를 포함한다.
- [0051] 또한, 상기 제4단계에서 수득된 분획물을 아세토니트릴과 물(MeCN- H_2O)을 사용하여 역상(Reverse Phase, RP) 컬럼을 이용하여 분획물을 수득하는 제5단계 및 상기 제5단계에서 수득된 분획물을 헥산과 아세톤(hexane-acetone)의 혼합용매, 디클로로메탄과 메탄올(CH_2Cl_2 -MeOH)의 혼합용매 또는 클로로포름과 메탄올(CHCl_3 -MeOH)의 혼합용매를 각각 사용하여 크로마토그래피를 수행하여 화학식 2의 화합물 2, 화학식 3의 화합물 3, 또는 화학식 4의 화합물 4를 각각 수득하는 제6단계를 포함한다.
- [0052] 나아가 본 발명은 상기 백선피 추출물 또는 이로부터 분리한 상기 화합물 1 ~ 4의 신규 트리테르페노이드(triterpenoid) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역억제용 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 제공한다.
- [0053] 상기 조성물은 면역과민반응에 의해 야기되는 장기이식거부반응; 루푸스 또는 류마티스 관절염의 자가면역질환; 비염, 천식, 아토피의 알러지성 질환의 예방, 개선 또는 치료에 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [0054] 본 발명에 의해 분리된 상기 화합물 1 ~ 4에 대한 면역억제 활성이 T 세포에서의 증식과 사이토카인의 분비를 통해 측정되었고, 이를 위해 8-10주 된 OT-II T 세포 수용체를 가진 형질전환 생쥐에서 채취한 지라세포를 사용하였다. 세포 생존력은 프로피디움 요오드화물 염색을 통해 측정되었고, 세포 증식과 사이토카인 분비에 활성이 있는 농도에서 T 세포에 어떠한 독성도 없음을 나타냈다. 세포 증식 측정 결과, 화합물 1, 3, 및 4에서 IC_{50} 값이 1.49, 1.78, 및 1.48 μM 이었으며 [양성대조군으로 cyclosporin A (IC_{50} 0.05 μM) 사용], 이는 세포 성장의 속도가 상대적으로 감소했음을 나타냈다 (표 3). 추가로 활성화된 T 세포에서 사이토카인 IL-2와 IFN- γ 의 분비 정도를 측정하였으나, 어떠한 화합물도 사이토카인 분비에 있어서 특별한 효과를 보이지 않았다. 이 결과를 통해서 화합물 1, 3, 및 4는 사이토카인 분비에 영향을 주지 않으며 T 세포의 증식을 억제하는 것으로 확인됐다.
- [0055] 본 발명의 화합물 1 ~ 4의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식의 화합물에 존재할 수 있는 히드록시기의 염을 포함하며, 히드록시기의 염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속류염, 마그네슘, 칼슘 등의 알칼리 토금속류염을 들 수 있다. 바람직하게는 생리학적으로 허용 가능한 나트륨, 칼륨, 칼슘과의 염 등을 들 수 있으며, 이들 염들은 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 화합물 1 ~ 4는 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 무독성염 및 용매화물로 제조될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 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. 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키

거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

- [0057] 본 발명의 조성물은 약제학적 또는 식품학적 분야에서 공지의 방법의 의해 제제화될 수 있고, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 등과 혼합하여 약제학적 또는 식품학적으로 통상으로 허용되는 제제, 예를 들면 액제, 시럽제, 캡슐제 등으로 제제화될 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌[Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA]에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구투여할 수 있다.
- [0059] 상기 본 발명의 조성물을 포함하는 액제, 캡슐제 등은 건강보조식품으로 사용될 수 있으며, 본 발명에서 사용된, 용어 "건강보조식품"이라 함은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀제, 분말제, 과립제, 액상제, 환제 등의 형태로 제조 가공한 건강식품 또는 음료, 요구르트, 치즈 등의 기능성 식품을 말한다.
- [0060] 본 발명의 조성물은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일 0.01~500mg/kg, 바람직하게는 0.1~200mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화된 단위투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 백선피 추출물, 이로부터 분리 정제된 화합물 1 ~ 4를 식품 제조시 원료 물질에 첨가하거나 조리된 식품에 적절히 혼합하여 상기한 건강 증진용 식품 또는 음료를 제조할 수 있으며, 이 경우 최종적으로 제조된 식품 또는 음료 중에 백선피 추출물, 이로부터 분리 정제된 화합물 1 ~ 4의 함량은 각각 0.01 내지 30 중량% 범위이다.
- [0062] 본 발명의 약학 조성물 또는 건강 증진용 식품 또는 음료는 목적하는 효과를 상승시키거나 보완하기 위해 약학적으로 허용되는 다른 생약제 또는 이의 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0063] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 백선피 추출물 및 신규 화합물은 면역세포 및 류머티스성 관절염 동물모델에서 면역 기능을 억제시키는 효능이 매우 뛰어나 경쟁력 있는 면역억제제로써 유용하게 이용될 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 유효성분인 백선피 추출물 등은 천연물질로서 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 본 발명에 의한 백선피 추출물의 T 림프구 활성화에 대한 영향을 보여주는 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따라 백선피에서 분리된 신규 트리테르페노이드 화합물에 의한 면역세포의 세포 생존도에 대한 영향을 보여주는 도면이다.
- 도 3a ~ 도 3d는 본 발명에 따라 백선피에서 분리된 신규 트리테르페노이드 화합물에 의한 면역세포의 세포 증식능력 억제효과를 분석한 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 4는 본 발명에 따라 백선피에서 분리된 신규 트리테르페노이드 화합물에 의한 면역세포의 세포주기 활성억제효과를 분석한 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 5a 및 도 5b는 본 발명에 따라 백선피에서 분리된 신규 트리테르페노이드 화합물에 의한 면역세포의 세포 주기 관련 조절자를 분석한 결과를 보여주는 도면이다.
- 도 6은 본 발명에 따라 백선피에서 분리된 신규 트리테르페노이드 화합물에 의한 류머티스성 관절염 모델동물에 대한 치료 효과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0067] **재료 및 방법**

[0068] **식물 재료**

[0069] 백선피는 대한민국 경동시장에서 2008년 1월에 구매했으며, 대한민국 충북대학교 약학대학 이경순 명예교수에 의해 동정 되었다. 식물 표본은 대한민국 고려대학교 생명과학대학에 보관되었다(SS45-01142008).

[0070] **세포 증식 및 사이토카인 분비에 대한 효능 분석**

[0071] 8-10주 된 OT-II T 세포 수용체를 가진 형질전환 생쥐 (H-2b haplotype; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)에서 채취한 지라세포 (1×10^6 cells/well)를 96-well plate에 퍼뜨렸다. 그 다음으로 지라세포는 OVA323-339 peptide(323ISQAVHAAHAEINEAGR339; AnaSpec, Fremont, CA, USA)를 이용해 자극시킨 후, 각각의 화합물이 포함된 RPMI-10 medium 에서 5% CO₂와 37℃의 조건 하에서 배양했으며, DMSO (0.1%)가 대조군으로 사용됐다. 다음날 프로피디움 요오드화물 염색을 실행하여 세포 생존력을 측정하였고, 그 결과는 FACSCalibur™ system with CellQuestsoftware™ (BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용한 유동 세포 분석법에 의해 분석됐다. 상대적인 세포 성장 속도는 각각의 화합물을 처리한 뒤 삼일 후에 MTT assay kit을 이용하여 제조사의 설명 (Promega, Madison, WI, USA)에 따라 측정됐다. 세포 배양액 중 상층액을 취하여 IL-2와 IFN-γ의 분비 정도를 sandwich ELISA kit을 이용하여 제조사의 설명 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 따라 측정됐다.

[0072] **실시예 1. 백선피 추출 및 이로부터 글라브레탈-타입 트리테르페노이드 분리**

[0073] 백선피로부터 활성물질을 분리하기 위해, 건조된 백선피 5 kg을 상온에서 메탄올(methanol: MeOH)로 3회 추출했고, 여과 과정을 거쳐 진공 속에서 용매를 제거하였다. 메탄올 추출물은 증류수에 현탁시킨 후, 헥산(*n*-Hexane), 클로로포름(chloroform: CHCl₃), 그리고 에틸아세테이트(ethylacetate: EtOAc)를 순차적으로 이용하여 분획하였다.

[0074] 면역억제 활성 결과에 따라, CHCl₃ 추출물(95 g)로 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(CHCl₃-MeOH, 100:0 to 50:50)를 실행하였고, 5개의 분획(SS45-47-1-SS45-47-5)을 얻었다. 세부 분획인 SS45-47-4(12.8 g)는 CHCl₃-MeOH(1:1)을 이동상으로 세파텍스 LH-20을 이용해 9개의 분획(SS45-51-1-SS45-51-9)으로 정제되었다. 얻어진 분획 중 SS45-51-3(4.4 g)는 hexane-acetone(10:1 to 1:1, 그리고 순수 acetone)을 이동상으로 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 이용해 분리하였으며, 11개의 분획(SS45-56-1-SS45-56-11)을 얻었다. 그 중에서 SS45-56-5(900 mg)는 RP-18을 이용한 진공액체크로마토그래피를 통해 acetonitrile-Water(40-100% acetonitrile, 그리고 acetonitrile-acetone 1:1)로 용리하였고, 최종적으로 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 CH₂Cl₂-MeOH(1:0, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1)의 조건으로 용리하여 화합물 1(dictabretol A, 65 mg)을 분리했다. 또한 분획 SS45-56-4(203 mg)는 RP-18을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 통해 acetonitrile-Water(3:7, 5:5, 7:3, 8:2, 9:1, 그리고 순수 acetonitrile)를 이동상으로 하여 9개의 분획(SS45-57-1-SS45-57-9)으로 나뉘었다. 얻어진 분획 중 SS45-57-2(44 mg)는 이동상을 hexane-acetone (10:1 to 1:1)으로 한 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리하였고, 화합물 2(dictabretol B, 33 mg)를 얻었다. 분획 SS45-57-6(36 mg)은 이동상을 CH₂Cl₂-MeOH(1:0, 80:1, 50:1, 30:1, 20:1, 10:1)로 한 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리하였고, 화합물 3(dictabretol C, 23 mg)을 얻었다. 분획 SS45-57-8(9 mg)은 이동상을 CHCl₃-MeOH(1:0, 80:1, 50:1, 30:1, 20:1, 10:1)로 한 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리하였고, 화합물 4(dictabretol D, 5 mg)를 얻었다.

[0075] **실시예 2. 화합물의 구조분석**

[0076] 상기 실시예 1에서 얻은 화합물의 구조를 분석하기 위하여 하기와 같은 분석을 실시하였다. 녹는점과 선광도는 각각 Stanford Research System MPA100과 JASCO P-2000 선광계를 이용해 측정하였다. IR 스펙트럼은 Varian 640-IR을 이용했다. ^1H , ^{13}C , 및 2D NMR 스펙트럼은 Varian 500 MHz NMR을 이용하였고 내부표준물질인 TMS가 포함된 CDCl_3 를 이용하였으며 화학적 이동은 δ 값으로 표현했다. 고분해능 전자분무 이온화(high-resolution electrospray ionization: HRESI) 질량 스펙트럼은 Waters Q-TOF 질량분석기를 사용해 측정했다. 컬럼 크로마토그래피는 실리카 겔(Kieselgel 60, 70-230 and 230-400 mesh, Merck, Darmstadt, Germany), 세파텍스 LH-20(GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 및 YMC-gel ODS-A(75 μm , YMC, Kyoto, Japan)를 이용했다. 박막 크로마토그래피는 pre-coated silica gel 60 F_{254} plates(0.25mm, Merck, Darmstadt, Germany)를 이용했다.

[0077] **화합물 1 (화학식 1)**

[0078] **Dictabretol A (1):** 흰색 비결정성 고체 형태이며 녹는점이 234.4 $^{\circ}\text{C}$ 이다. 선광도를 측정한 결과 $[\alpha]_D^{27}$ -22.6(c 0.3, CHCl_3)의 수치를 얻었다. IR 스펙트럼을 측정한 결과 3402, 2967, 1723, 1216, 1054 cm^{-1} 에서 관찰되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR자료(500 MHz, CHCl_3)는 표 1 및 2의 결과와 같다. 음성 ESIMS에서 587 $[\text{M-H}]^-$, 633 $[\text{M+HCOO}]^-$ 의 값이 관찰되었고, 양성 ESIMS에서 611 $[\text{M+Na}]^+$ 의 값이 관찰되었으며, 음성 고분해능 ESIMS에서 587.3951 $[\text{M-H}]^-$ ($\text{C}_{35}\text{H}_{55}\text{O}_7$, 587.3948로 계산)의 값을 확인하였다.

[0079] **화합물 2 (화학식 2)**

[0080] **Dictabretol B (2):** 흰색 비결정성 고체 형태이며 녹는점이 229.9 $^{\circ}\text{C}$ 이다. 선광도를 측정한 결과 $[\alpha]_D^{27}$ -20.2(c 0.3, CHCl_3)의 수치를 얻었다. IR 스펙트럼을 측정한 결과 3444, 2930, 1727, 1387, 1095 cm^{-1} 에서 관찰되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR자료(500 MHz, CDCl_3)는 표 1 및 2의 결과와 같다. 음성 ESIMS에서 589 $[\text{M-H}]^-$, 635 $[\text{M+HCOO}]^-$ 의 값이 관찰되었고, 양성 ESIMS에서 613 $[\text{M+Na}]^+$ 의 값이 관찰되었으며, 음성 고분해능 ESIMS에서 589.4103 $[\text{M-H}]^-$ ($\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{O}_7$, 589.4104로 계산)의 값을 확인하였다.

[0081] **화합물 3 (화학식 3)**

[0082] **Dictabretol C (3):** 무색 오일 형태이며 선광도를 측정한 결과 $[\alpha]_D^{27}$ -33.2(c 0.3, CHCl_3)의 수치를 얻었다. IR 스펙트럼을 측정한 결과 3421, 2931, 1721, 1215, 1025 cm^{-1} 에서 관찰되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR자료(500 MHz, CDCl_3)는 표 1 및 2의 결과와 같다. 음성 ESIMS에서 657 $[\text{M-H}]^-$, 703 $[\text{M+HCOO}]^-$ 의 값이 관찰되었고, 양성 ESIMS에서 681 $[\text{M+Na}]^+$ 의 값이 관찰되었으며, 음성 고분해능 ESIMS에서 657.4731 $[\text{M-H}]^-$ ($\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{O}_7$, 657.4730로 계산)의 값을 확인하였다.

[0083] **화합물 4 (화학식 4)**

[0084] **Dictabretol D (4):** 노란색 오일 형태이며 선광도를 측정한 결과 $[\alpha]_D^{27}$ -17.9(c 0.3, CHCl_3)의 수치를 얻었다. IR 스펙트럼을 측정한 결과 3392, 2931, 1718, 1216, 1023 cm^{-1} 에서 관찰되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR자료(500 MHz, CDCl_3)는 표 1 및 2의 결과와 같다. 음성 ESIMS에서 671 $[\text{M-H}]^-$, 717 $[\text{M+HCOO}]^-$ 의 값이 관찰되었고, 양성 ESIMS

에서 695 $[M+Na]^+$ 의 값이 관찰되었으며, 음성 고분해능 ESIMS에서 671.4887 $[M-H]^-$ ($C_{41}H_{67}O_7$, 671.4887로 계산)의 값을 확인하였다.

표 1

Table 1. ^1H NMR Data for Compounds 1-4^a

position	1	2	3	4
1	1.36 m, 1.13 m	1.37 m, 1.15 m	1.35 m, 1.12 m	1.36 m, 1.13 m
2	1.89 m, 1.58 m	1.89 m, 1.58 m	1.88 m, 1.56 m	1.89 m, 1.58 m
3	4.65 brs	4.65 brs	4.63 brs	4.65 brs
4				
5	1.96 m [1.93 m]	1.95 m	1.96 m [1.93 m]	1.96 m [1.95 m]
6	1.61 m	1.61 m	1.56 m	1.63 m
7	3.75 brs	3.75 brs	3.75 brs	3.76 brs
8				
9	1.30 overlap	1.32 m	1.30 overlap	1.31 m
10				
11	1.30 overlap	1.29 overlap	1.30 overlap	1.33 m
12	2.12 m; 1.79 m	2.10 m; 1.77 m		2.09 m; 1.77 m
13				
14				
15	1.93 m; 1.55 m	1.93 m	1.93 m; 1.55 m	1.93 m; 1.55 m
16	1.64 m	1.66 m	1.63 m	1.64 m
17	2.18 m [2.02 m]	2.17 m	2.20 m	2.21 m [2.04 m]
18	0.71 d (4.5); 0.46 d (5.0) [0.79 d (5.0); 0.49 (5.0)]	0.72 brd (4.5); 0.47 d (4.5)	0.70 d (4.5); 0.46 d (4.5) [0.78 d (5.0); 0.48 (5.0)]	0.72 d (4.5); 0.48 d (5.0) [0.81 d (4.5); 0.50 d (4.5)]
19	0.88 s	0.89 s	0.88 s	0.90 s
20	1.86 m [2.13 m]	1.86 m	1.86 m [2.14 m]	1.88 m [2.15 m]
21	5.43 overlap [5.43 overlap]	5.35 brs	5.43 overlap [5.42 overlap]	5.44 overlap [5.45 overlap]
22	1.96 m; 1.68 m	1.85 m; 1.98 m	1.98 m; 1.69 m	1.98 m; 1.70 m
23	3.94 dt (9.5, 7.0) [4.03 ddd (10.5, 7.5, 5.0)]	4.48 t (7.5)	3.93 dt (9.5, 7.5) [4.03 ddd (10.5, 7.5, 5.5)]	3.97 dt (9.5, 7.5) [4.05 ddd (10.5, 7.5, 5.0)]
24	3.18 d (7.5) [3.06 d (7.5)]	3.15 s	3.17 d (7.5) [3.05 d (7.5)]	3.17 d (7.5) [3.07 d (7.5)]
25				
26	3.65 d (12.5) [3.57 d (12.5)]	1.28 s	3.64 d (12.5) [3.56 d (12.5)]	3.67 d (12.0) [3.59 d (12.0)]
27	1.31 s	1.26 s	1.30 s	1.33 s
28	0.84 s	0.85 s	0.83 s	0.85 s
29	0.87 s	0.88 s	0.87 s	0.89 s
30	1.04 s [1.03 s]	1.04 s	1.03 s [1.02 s]	1.06 s [1.05 s]
1'				
2'	2.21 brd (7.0)	2.23 brd (6.0)	2.32 m	2.34 t (7.5) [2.34 t (7.5)]
3'	2.13 m	2.13 m	1.61 m	1.62 m
4'	0.96 d (2.0)	0.97 d (1.0)	1.26 m	1.31 m
5'	0.95 d (2.0)	0.96 d (1.0)	1.26 m	1.26 m
6'			1.26 m	1.29 m
7'			1.26 m	1.28 m; 1.07 m
8'			1.24 m	1.29 m
9'			1.27 m	1.31 m
10'			0.87 m	0.86 m
11'				0.84 m

^a Measured at 500 MHz, obtained in CDCl₃, with TMS as an internal standard. chemical shifts are shown in the δ scale with J values (Hz) in parentheses; shifts of the minor components in brackets when different from the main components. The assignments were based on DEPT, ^1H - ^1H COSY, HSQC, and HMBC experiments.

[0085]

표 2

Table 2. ^{13}C NMR Data for Compounds 1-4^a

position	1		2		3		4	
	major	minor	major		major	minor	major	minor
1	33.85	33.75	34.10		33.85	33.74	33.86	
2	22.88	22.84	23.10		22.82	22.79	22.83	22.81
3	77.77		77.99		77.78	77.74	77.78	77.73
4	36.16	36.14	36.39		36.20	36.19	36.21	36.19
5	41.27	41.33	41.50		41.25	41.32	41.26	41.33
6	24.21		24.45		24.20		24.21	
7	74.30	74.17	74.49		74.30	74.17	74.29	74.17
8	38.99	39.05	39.23		38.99	39.05	39.00	39.07
9	44.04	43.85	44.25		44.06	43.88	44.06	43.87
10	37.24	37.29	37.47		37.24	37.29	37.25	37.31
11	16.16	16.02	16.35		16.17	16.03	16.16	16.03
12	25.57	25.64	25.96		25.57	25.62 ^b	25.61	25.65 ^b
13	28.99	28.58	29.18		28.99	28.57	28.98	28.61
14	36.98		37.25		36.97		36.99	
15	26.32	25.89	26.52		26.31	25.89 ^b	26.32	25.90 ^b
16	27.50	26.20	27.67		27.49	26.10 ^b	27.51	26.21 ^b
17	44.71	48.28	45.16		44.71	48.22	44.72	48.29
18	13.75	13.60	13.97		13.73	13.58	13.74	13.57
19	15.68	15.57	15.87		15.67	15.56	15.68	15.57
20	49.38	50.78	48.95		49.37	50.75	49.39	50.82
21	98.26	102.17	97.72		98.25	102.15	98.29	102.21
22	30.69	32.88	29.50		30.69	32.79	30.71	32.87
23	78.07	76.91	78.90		78.06	76.87	78.06	76.93
24	63.38	60.99	75.27		63.45	61.06	63.31	60.92
25	60.74	59.99	73.72		60.72	60.02	60.61	59.89
26	64.95	64.66	26.93		65.02	64.71	64.98	64.63
27	14.61	14.79	26.97		14.63	14.78	14.59	14.79
28	27.79		28.00		27.71		27.73	
29	21.87	21.86	22.09		21.84		21.85	
30	19.54	19.43	19.73		19.54	19.42	19.55	19.43
1'	172.95		173.09		173.65		173.64	
2'	43.84		44.06		34.76		34.77	
3'	25.76	25.78	25.96		25.19		25.22	
4'	22.45		22.66		29.19 ^b		29.25 ^b	
5'	22.47		22.68		29.28 ^b	29.27	29.49 ^b	
6'					29.35 ^b	29.34	26.95	
7'					29.45 ^b		36.58	
8'					31.87		34.36	
9'					22.67		29.71 ^b	
10'					14.11		11.41	
11'							19.22	

^a Measured at 125 MHz; obtained in CDCl₃ with TMS as an internal standard. The assignments were based on DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC experiments. ^b Assignments are interchangeable in the same column.

[0086]

[0087]

표 3은 8-10주 된 OT-II T 세포 수용체를 가진 형질전환 생쥐로부터 분리된 비장세포를 이용하여 T 세포 증식에 대한 분리된 화합물 1 ~ 4의 억제 효과를 나타낸다.

표 3

compound	IC ₅₀ (μM)
1	1.49
2	> 20
3	1.78
4	1.48
cyclosporin A	0.05

실시예 3. 면역억제에 대한 효능 분석

1) 백선피 추출물 처리가 T 림프구 활성화에 미치는 영향

백선피 추출물이 면역계 세포에 미치는 영향을 고찰하기 위해 8-10주 된 OT-II T 세포 수용체를 가진 형질전환 생쥐(H-2b haplotype; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)에서 채취한 비장세포(1×10^6 cells/well)를 사용하였다. 비장세포에서 면역세포를 분리 후 96 well plate에 3×10^3 cells/well로 seeding 하였다. 그 후, OVA peptide(323ISQAVHAHAHAEINEAGR339; AnaSpec, Fremont, CA, USA)를 넣어주어 T 림프구의 활성을 자극시킨 후, 백선피 추출물을 농도(10 μg/ml, 2 μg/ml, 0.4 μg/ml) 별로 넣고 3일 동안 배양하였다.

3 일째 되는 날 MTS assay를 이용하여 면역세포의 증식을 측정하였다. 그 결과 P.C.(positive control, 자극 준 상태) 및 N.C.(negative control, 자극 안 준 상태)과 비교하였을 때, 백선피가 0.4 μg/ml에서도 면역세포의 증식을 월등히 억제하는 것으로 나타났다(도 1).

2) 백선피에서 분리된 화합물 처리에 의한 면역세포의 세포 생존도 측정

백선피에서 분리된 화합물 1, 3 및 4의 처리에 의한 면역세포의 세포 생존도(cell viability)를 알아보기 위해, PI(Propidium Iodide)와 Annexin V staining 후 유세포 분석기(flow cytometry, FACSCalibur™ system with CellQuestsoftware™ (BD Biosciences, San Jose, CA))를 통하여 세포 생존도를 측정하였다.

세포는 생쥐 T 림프구인 RMA 세포주, 생쥐 B 림프구인 A20 세포주, 생쥐 대식세포주인 J774 세포주를 6 well 조직 배양 플레이트에 5×10^5 /well 농도의 세포를 RMA 세포주와 A20 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(invitrogen) 배지에서 배양하였고, J774 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM(invitrogen) 배지에서 배양하였다.

이때 백선피에서 분리된 화합물 1, 3, 및 4 샘플을 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여 세포에 처리하여, 최종농도가 0.1% DMSO로 10uM, 5uM, 2uM 농도가 되도록 처리하고 24시간 후에 세포 생존도를 측정하였고 그 결과를 도 2에 나타났다. 이때 세포 생존도의 측정은 PI^{low}와 Annexin V^{low} 세포를 생존한 것으로 간주하였다.

3) 백선피에서 분리된 화합물 처리에 의한 면역세포의 세포증식능력 억제효과 분석

백선피에서 분리된 화합물 1 ~ 4의 처리에 의한 면역세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위하여 CFSE [Carboxyfluorescein succinimidyl ester] proliferation assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다.

세포주 실험으로는 실시예 3-2와 동일한 세포주를 각각 1×10^7 을 0.1% 우태아 혈청이 함유된 PBS에 1.5uM CFSE로 상온에서 8분간 1ml에 혼합한 후 100% 우태아 혈청을 1ml 혼합하고 37℃에서 10분 동안 인큐베이션

해주었다. 이어 1500rpm에 5분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고, 세포들을 2% 우태아 혈청이 함유된 PBS로 3회 세척하여 CFSE staining을 한 후 다시 count하여 6well 조직배양 플레이트에 1×10^5 /well의 농도로 staining된 세포를 실시예 3-2와 동일한 조건의 배지에서 배양하였다.

[0100] 이때 백선피에서 분리된 화합물 1, 2, 3, 및 4 샘플을 최종농도가 0.1% DMSO로 2uM 농도가 되도록 처리하고 1일, 3일, 5일 후에 유세포 분석기를 이용하여 세포의 형광 감소 정도를 측정하여 세포의 증식능력 정도를 측정하였고 그 결과를 도 3a ~ 도 3c에 나타냈다.

[0101] 또한 primary cell에서 세포증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 8주령에서 10주령 형질전환 생쥐(trnasgenic mouse)인 OT II 생쥐의 비장(spleen)을 분리하여 세포 5×10^7 을 위와 동일한 방법으로 스케일 업 하여 CFSE staining한 후 96well round 조직 배양 플레이트에 5×10^5 /well 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(invitrogen) 배지에서 배양하였다. 비장 세포를 생체 외 (in vitro) 자극 신호를 주기 위해서, OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (³²³ISQAVHAAHAEINEAGR³²⁹; AnaSpec, Fremont, CA, USA)를 1uM/ml 처리하였다.

[0102] 이때 백선피에서 분리된 화합물 1, 2, 3, 및 4 샘플을 최종농도가 0.1% DMSO로 0.5uM 농도가 되도록 처리하고 1일, 3일, 5일 후에 유세포 분석기를 이용하여 세포의 형광 감소 정도를 측정하여 세포의 증식능력 정도를 측정하였고 그 결과를 도 3d에 나타냈다.

[0103] 4) 백선피에서 분리된 화합물 처리에 의한 면역세포의 세포주기 활성억제효과 분석

[0104] 백선피에서 분리된 화합물 1 ~ 4의 처리에 의한 면역세포의 세포주기활성을 알아보기 위해, PI(Propidium iodide) cell cycle analysis를 유세포 분석기를 이용하여 세포주기 분석을 실시하였다.

[0105] RMA 세포주와 J774 세포주를 이용하여 6 well 조직 배양 플레이트에 5×10^5 /well 농도의 세포를 RMA 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(invitrogen) 배지에서 배양하였고, J774 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM(invitrogen) 배지에서 배양하였다.

[0106] 이때 백선피에서 분리된 화합물 1, 2, 3, 및 4 샘플을 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여 세포에 처리하여, 최종 농도가 0.1% DMSO로 2uM 농도가 되도록 처리하고 24시간 후에 세포를 수확하여 PBS로 washing 한 후 70% 에탄올로 -20℃에 12시간 고정시켰다. 이 후 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고 50ug/ml의 PI(Propidium Iodide), 0.1mg/ml의 RNaseA, 0.05% Triton X-100을 넣은 PBS 500ul 로 세포를 풀어서 37℃에서 40분간 인큐베이션 시키고 PBS로 washing해 준 후 유세포 분석기를 이용하여 분석을 실시하였고 그 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4에 나타난 바와 같이, RMA 세포주에 화합물 1, 3, 및 4 샘플을 처리해 준 실험구에서 S기가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0107] 5) 백선피에서 분리된 화합물 처리에 의한 면역세포 세포주기 관련 조절자 분석

[0108] 백선피에서 분리된 화합물 1 ~ 4의 처리에 의해 RMA세포주에서 세포주기 중 S기로의 이행이 억제되는 것을 확인하였기에 백선피 화합물이 세포주기 양성조절자인 cyclin D1과 cyclin E와 세포주기 음성조절자인 p27^{KIP1}, p21^{CIP1} 그리고 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1}을 상위에서 억제하는 c-Myc의 발현량에 미치는 효과를 알아보기 위해, anti-cyclin D1 (Santa-cruz), anti-cyclin E (Santa-cruz), anti-p27KIP1 (Santa-cruz), anti-p21CIP1 (Santa-cruz) 와 anti- c-Myc (Santa-cruz) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 실시하였다.

[0109] 세포배양은 실시예 3-4와 동일한 조건으로 수행하였으며, 웨스턴 블롯(western blot)은 배양 1일 후 세포를 수확하여 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 RIPA lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)로 lysis 시킨 후, 10%, 12% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동시켜 Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 transfer하였다. 그 후 항체를 이용하여 immunoblot을 실시하였다. immunoreactive band는 ECL system을 이용, Biomolecular imaging system(ImageQuant™

LAS4000mini Bio-molecular Imager, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 시각화하였고 그 결과를 도 5a에 나타냈다.

또한 primary cell에서 세포주기에 백선포가 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포주기 양성 조절자인 cyclin E와 음성 조절자인 p27^{KIP1}을 위와 동일한 항체를 이용, 웨스턴 브롯팅(western blotting) 실시하였다. 세포는 실시예 3-3에서 사용한 OT II mouse의 비장 세포를 96well round 조직 배양 플레이트에 1×10^6 /well 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(invitrogen) 배지에서 배양하였다. 비장 세포를 생체 외 (in vitro) 자극 신호를 주기 위해서, OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (³²³ISQAVHAHAHAEINEAGR³²⁹; AnaSpec, Fremont, CA, USA)를 1uM/ml 처리하였다. 이때 백선포에서 분리된 화합물 1 샘플을 최종농도가 0.1% DMSO로 0.5uM 농도가 되도록 처리하고 3일 후에 세포를 수확하여 위와 동일한 조건으로 웨스턴 블롯(Western blot)을 실시하였고 그 결과를 도 5b에 나타냈다.

6) 백선포에서 분리된 화합물에 의한 류마티스성 관절염 동물모델에 대한 치료 효과

백선포에서 분리된 화합물에 의한 콜라겐으로 유도한 류머티스성 관절염 동물모델(Collagen-induced arthritis model)에 대한 치료 효과에 대해 알아보기 위해, 실험 하루 전에 제2형 콜라겐 용액 (2.5 mg/ml)을 0.05M 아세트산으로 제조하여 4℃에서 보관하였다. 면역화 직전에, 동일한 부피의 CFA(Complete Freund's Adjuvant)을 쓰리웨이 스탬프를 이용하여 혼합하였다. 이 혼합액을 마우스의 꼬리 아랫부분에 140 ul 피하 주사하였다. 3주가 지난 후 다시 콜라겐 용액을 동일한 부피의 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant)와 혼합하여 꼬리에 100 ul 피하 주사하였다. 2차 접종 후 10일 후부터 치료 투여를 2일에 한 번씩 3주 동안 지속시켰다. 음성 대조군을 비히클 (0.5% DMSO)로 처리하고 양성 대조군을 엔브렐 (8 mg/kg)로 처리하였다. 백선포 화합물 1 샘플은 10 mg/kg로 시험하였다.

그 결과를 도 6에 나타냈고 이때 관절염의 임상평가는 4개의 각 발의 부종 및 발적을 관절염 점수로 순위를 매겼다. 0 - 증상 없음; 1 - 하나의 발가락 및 관절에 국한된 경한 부종과 발적; 2 - 관절의 2 가지 이상 유형의 보통의 발적 및 부종; 3 - 발가락을 포함한 전체 발의 심한 발적 및 부종; 4 - 다수의 관절을 포함한 최대로 염증을 일으킨 사지의 발적 및 부종 (동물당 최대의 누적 임상 관절염 점수 16)

조성물 실시예

제제예 1. 산제의 제조

백선포 추출물 2g

유당 1g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

제제예 2. 정제의 제조

백선포 추출물 100mg

옥수수전분 100mg

유당 100mg

스테아린산 마그네슘 2mg

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

제제예 3. 캡슐제의 제조

- [0126] 백선피 추출물 100mg
- [0127] 옥수수전분 100mg
- [0128] 유당 100mg
- [0129] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0130] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0131] 제제예 4. 캡슐제의 제조
- [0132] 실시예 1의 클로로포름 분획물 200mg
- [0133] 유당 100mg
- [0134] 전분 93mg
- [0135] 탈크 2mg
- [0136] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0137] 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0138] 제제예 5. 주사제의 제조
- [0139] 백선피 추출물 100 mg
- [0140] 만니톨 180 mg,
- [0141] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0142] 증류수 2974 mg
- [0143] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 제조방법에 따라서 주사제를 제조하였다.
- [0144] 제제예 6. 건강식품의 제조
- [0145] 백선피 추출물 100 mg
- [0146] 비타민 혼합물 적량
- [0147] 비타민 A 아세테이트 70 μg
- [0148] 비타민 E 1.0 mg
- [0149] 비타민 B1 0.13 mg
- [0150] 비타민 B2 0.15 mg
- [0151] 비타민 B6 0.5 mg
- [0152] 비타민 B12 0.2 μg
- [0153] 비타민 C 10 mg
- [0154] 비오틴 10 μg
- [0155] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [0156] 엽산 50 μg
- [0157] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0158] 무기질 혼합물 적량

[0159] 황산제1철 1.75 mg

[0160] 산화아연 0.82 mg

[0161] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0162] 제1인산칼륨 15 mg

[0163] 제2인산칼슘 55 mg

[0164] 구연산칼륨 90 mg

[0165] 탄산칼슘 100 mg

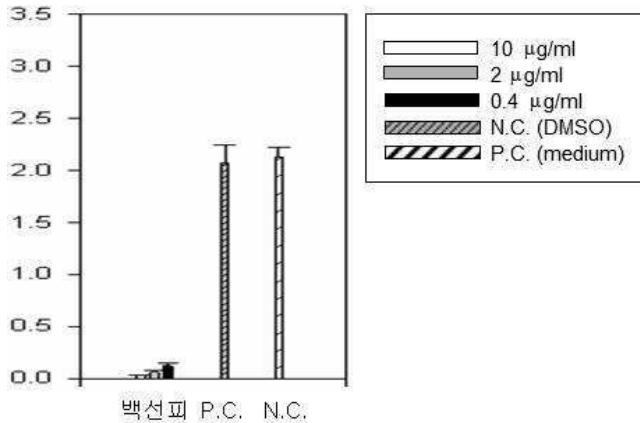
[0166] 염화마그네슘 24.8 mg

[0167] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

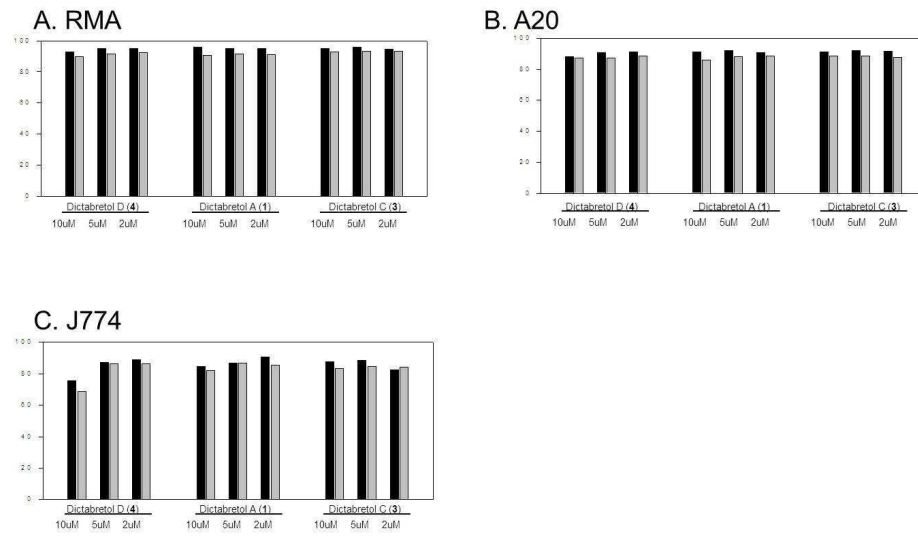
[0168] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

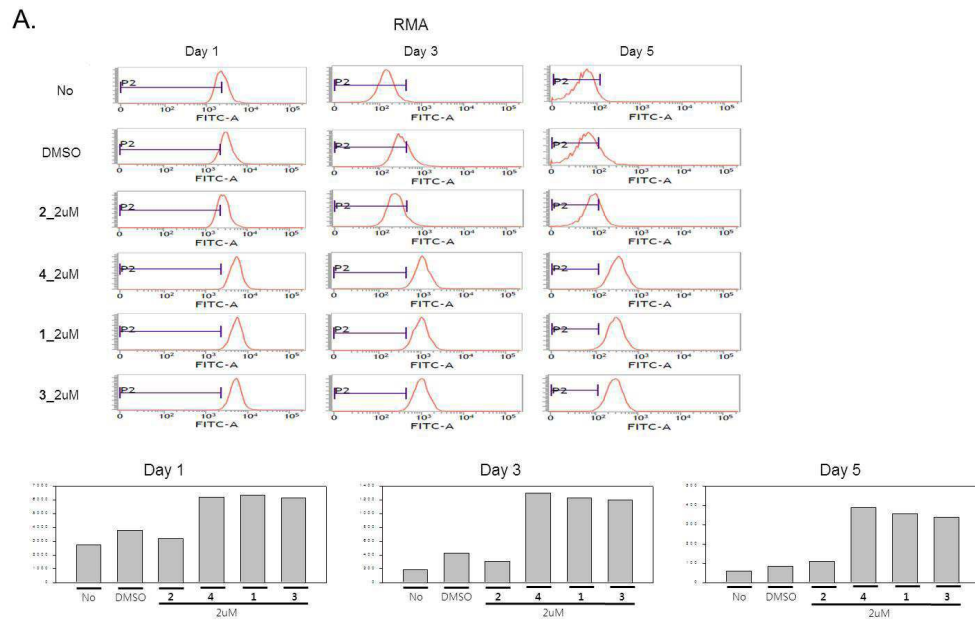
도면1



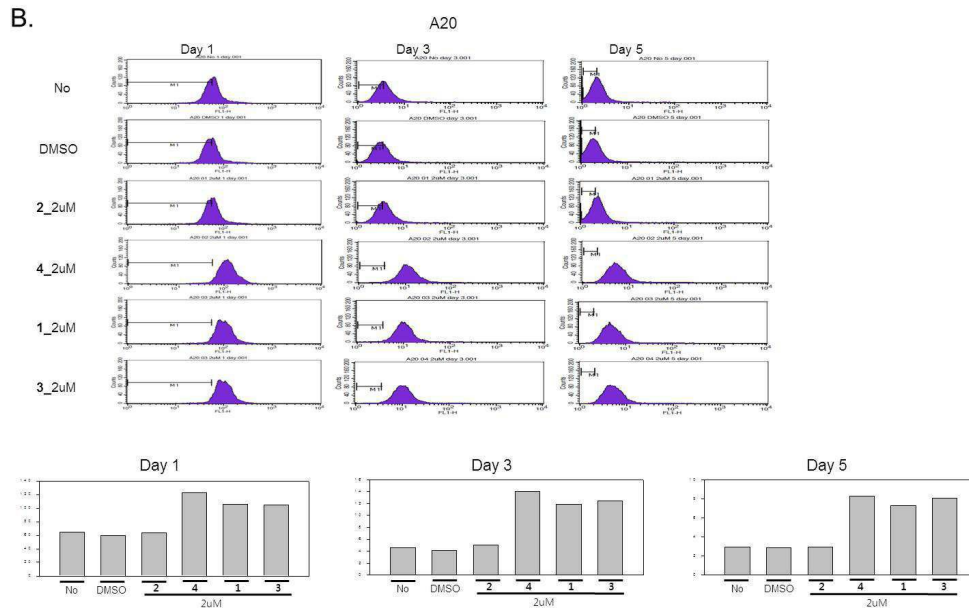
도면2



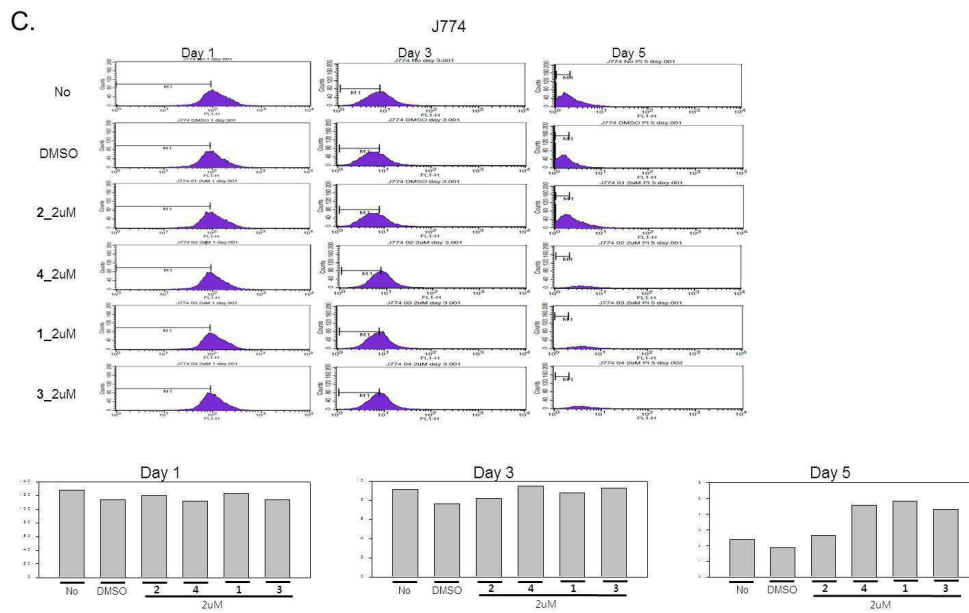
도면3a



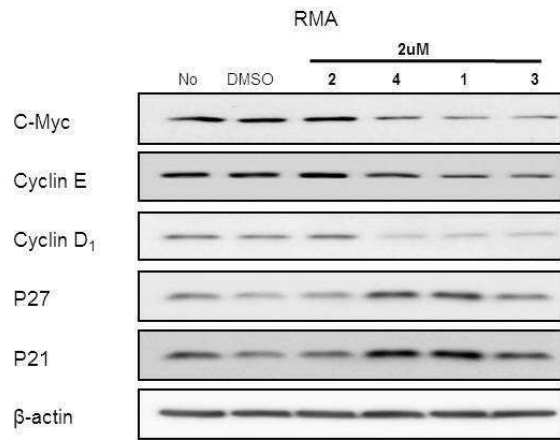
도면3b



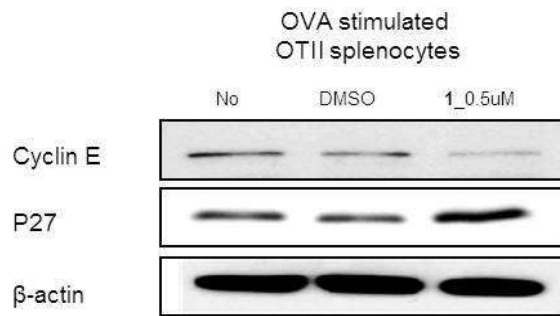
도면3c



도면5a



도면5b



도면6

