



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월11일
(11) 등록번호 10-1285234
(24) 등록일자 2013년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/27 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0071519
(22) 출원일자 2010년07월23일
심사청구일자 2010년07월23일
(65) 공개번호 10-2012-0010026
(43) 공개일자 2012년02월02일
(56) 선행기술조사문헌
논문:J. NAT. PROD.*
논문:STEROIDS
논문:CHINA PAPERS
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
케일럽 멀티랩 (주)
서울특별시 서초구 남부순환로356길 95-3, 3층 4층 (양재동, 유나이티드양재빌딩)
(72) 발명자
이혜정
서울특별시 관악구 승방길 49, 화목빌라 201호 (남현동)
안준호
서울특별시 서초구 신반포로19길 10, 한신3차아파트 25동 701호 (반포동)
장용하
서울특별시 양천구 목동동로 130, 목동 14단지아파트 1428동 1003호 (신정동)
(74) 대리인
김홍균

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김용원

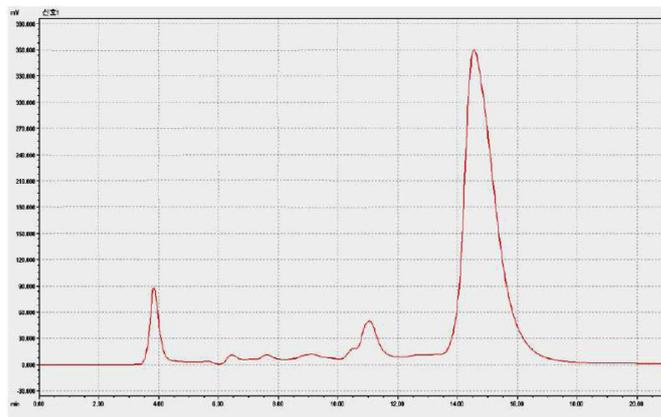
(54) 발명의 명칭 백미 추출물을 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 관절염에 강력한 항염증 활성을 나타내는 스테로이드 글루코사이드 화합물을 포함하는 백미(Cynanchum atratum) 추출물 및 항염증 효과를 갖는 상기 백미 추출물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 백미(Cynanchum atratum) 추출물 또는 분획물은 천연물 유래의 생약으로서 독성 및 부작용이 없으며, 염증 반응의 핵심 매개물질인 일산화질소(Nitric Oxide)와 Tumor necrosis factor- α 의 생성을 현저히 억제하고, 염증매개물질인 PGE₂ 억제 작용 등의 탁월한 항염증 효과를 가지므로 이를 함유하는 조성물은 관절염 염증 질환들을 근본적으로 치료하고 예방할 뿐만 아니라 증상을 완화 및 개선시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

백미(Cynanchum atratum)의 건조 뿌리 1kg당 알콜 용매 5 내지 20 l 를 첨가하고 20 내지 50℃에서 0.5 내지 2 일 동안 방치한 후 여과 및 감압 증발시켜 알콜 추출물을 얻는 단계;

상기 알콜 추출물에 물과 핵산이 1:1로 혼합된 용매를 첨가한 후, 분리된 물층에 클로로포름을 첨가하여 유기 물질을 추출하는 단계; 및

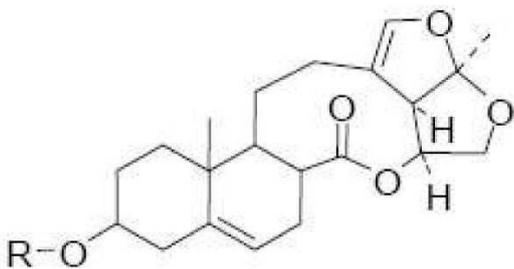
상기 유기 물질을 4단계의 크로마토그래피로 분획하여 각 분획을 항염증 효력시험을 통하여 유효분획을 추출하는 단계로 추출한 스테로이드 글루코사이드를 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조방법.

청구항 2

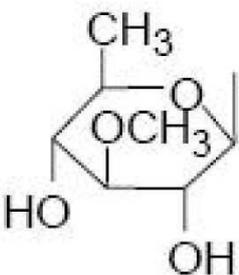
청구항 1에 있어서,

상기 스테로이드 글루코사이드는 하기 화학식 1로 나타낸 화합물인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조방법.

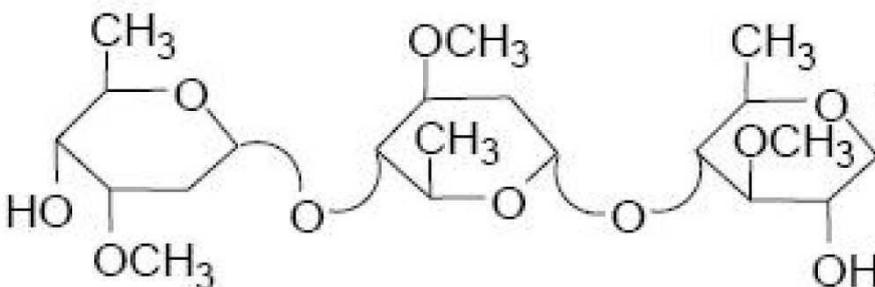
[화학식 1]



상기 식에서 R은



또는



이다.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 알콜 용매는 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 크로마토그래피는 순상 진공 플래시 크로마토그래피, 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피 및 C18 역상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피로 이루어진 군에서 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조방법.

청구항 5

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 관절염에 강력한 항염증 활성을 나타내는 스테로이드 글루코사이드 화합물을 포함하는 백미(Cynanchum atratum) 추출물 및 항염증 효과를 갖는 상기 백미 추출물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 상세하게는 백미(Cynanchum atratum)의 생리활성 성분을 추출 및 농축함으로써 관절의 염증질환과 진통 억제 효과 및 연골 보호효과를 가지는 관절염 치료 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이다. 일단 자극이 가해지면 국소적으로 히스티민(histamine), 세로토닌(serotonine), 브래드키닌(bradykinin), 프로스타그랜딘류(prostaglandins), 하이드록실-에이코사테트라에노익산(Hydroxyl-eicosatetraenoic acid, HETE), 류코트리엔(leukotriene)과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 손상에 따른 초기에 발생하는 적당한 염증은 손상 부위에 대한 빠른 복구를 가져오기 위한 정상적인 반응이다.

[0003] 그러나 장기간에 걸친 지속적인 염증반응은 손상부분에 대한 복구를 어렵게 하고 주위 세포에 대한 피해를 가하여 주변조직에 대한 방어력을 떨어뜨려 더욱 증세를 악화시킬 수 있다. 또한 장기간에 걸친 염증반응은 주변조직에 대한 지속적인 손상을 유도해 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 발생시킬 수도 있다.

[0004] 따라서 염증 반응이 나타난 조직은 빠른 시간 내에 복구프로그램이 잘 작동하도록 적절한 항염증제를 처치해야 한다. 하지만, 염증성 질환을 치료하기 위해 사용되고 있는 스테로이드성 제제들은 여러 가지 많은 부작용을 나타내고 있어 그 사용을 제한하고 있다. 따라서, 항염증 효과가 탁월하며 부작용이 적은 항염증제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0005] 관절염 관련 질환은 전 세계 인구의 약 12%가 고통을 겪고 있는 대표적인 퇴행성, 난치성 질환으로 국내에도 약 200만 명 이상의 환자가 있다. 관절염은 신체의 근 골격 및 결합 조직에 염증성 변화가 생겨 근 골격계에 전신 증상이 나타나는 것을 총칭하는 병명이다. 상기 질환은 관절, 뼈, 연골 조직 또는 척수에 영향을 주어, 종종 영구적인 조직 손상, 기형, 퇴화 및 장애를 일으키는 만성 염증을 특징으로 한다. (Hofbause, L.C., et al., Arthritis and Rheumatisu 44: 253-259, 2001). 관절염은 퇴행성 관절염(골관절염), 류마티스 관절염, 관절의 류마티즘 또는 콜라겐 질환으로 분류된다.

[0006] 관절염 질환 중 가장 흔히 나타나는 퇴행성 관절염은 관절 연골이 닳아 없어지면서, 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환이다. 퇴행성 관절염은 관절을 구성하는 연골세포(chondrocytes)에 노화 등의 퇴행이 발생하여 연골세포에서 관절의 기질물질인 유형 II 콜라겐(type-II collagen) 및 프로테오글리칸(proteoglycan) 등의 합성이 저해됨과 동시에 인터루킨-1β(interleukin-1β, IL-1β) 및 종양괴사인자(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 등의 염증성 사이토카인(cytokine)이 생성됨에 따라 관절 기질을 분해하는 기질 금속 단백질 분해효소

(matrix metalloproteinase, MMP)의 합성 및 활성이 관절 세포에서 증가됨으로 인해 관절 조직이 파괴됨으로써 유발되는 질병이다. 또한 관절염은 염증성 사이토카인에 의한 일산화질소(NO)의 생성과 생성된 일산화질소에 의한 자가 증폭적인 사이토카인의 생성으로 더욱 많은 MMP의 합성이 유발되게 되어 관절 기질의 분해가 촉진됨으로써 더욱 악화된다. 이와 동시에 염증성 사이토카인은 지질대사산물인 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)의 생성을 증가시켜 관절염에서 염증반응을 유발시킨다. 그 원인은 불확실하나, 노쇠 현상이나 과다한 체중과 관계가 깊은 질환으로 알려져있으며, 이 질환에서는 일차적으로 관절 연골의 퇴행성 변화가 나타난다. 퇴행성 변화는 관절 연골에서 시작되어 연골 세포가 피사하게 되고, 기질이 카텡신 B(Cathepsin B), 카텡신 D(Cathepsin D), 콜라게나아제(Collagenase) 등에 의해 파괴된다. 프로테오글리칸(Proteoglycan)과 콜라겐(Collagen)의 생성이 파괴정도를 따라가지 못하며 외력에 대한 연골의 적응 능력은 점점 감소하여 결국 연골 하골 조직에 미세 골절 등의 소견이 생기게 된다. 질환이 진행되면, 연골 하골의 경화, 관절 주변에 골의 과잉형성, 관절의 변형 등이 발생하게 되며, 연골의 표면이 거칠어지게 되고 관절막으로 싸인 관절강 안에 염증 반응이 반복되어 나타나게 된다. 따라서, 반복적인 동통, 관절의 강직감, 관절의 점진적인 운동 장애 등을 일으키게 된다.

[0007] 관절염 중 류마티스 관절염은 병적 증상이 주로 가동 관절에 대칭적으로 나타나는 전신성, 만성 염증성 질환이며, 면역체계에 이상이 생겨 발생하는, 아직은 그 원인이 정확히 밝혀지지 않은 자가 면역 질환으로 알려져 있다. 상기 질환은 주변 관절의 구조적 기형을 일으키는, 연골 파괴 및 골 침식을 야기하는 지속적인 염증성 활막염을 특징으로 한다. 류마티스성 관절염과 관련된 증상에는 관절 부종, 관절 압통, 염증, 조조경직 및 특히 관절을 구부릴 때의 동통이 포함된다. 관절염이 진행된 단계에 있는 대상체는 골침식과 함께 관절 파괴를 비롯한 구조적 손상이 발생하게 된다.(Firestein, G.S., Nature 423: 356-361, 2003). 추가로, 환자는 자가면역 과정과 관련된 맥관염에 기인한 피부, 신장, 심장, 폐, 중추 신경계 및 눈의 손상을 비롯한 각종 장기의 손상 같은 다른 임상적 증상이 있을 수 있다.

[0008] 관절염과 관련된 다른 증상에는 적혈구 침강 속도의 증가 및 혈청 C-반응성 단백질(CRP) 및 (또는) 가용성 IL-2 수용체(IL-2r) 농도의 증가가 포함된다. 적혈구 침강 속도는 활성 류마티스성 관절염에 걸린 거의 모든 환자에서 증가된다. 혈청 C-반응성 단백질의 농도 역시 증가되고 이는 질환 활성도 및 진행성 관절 손상의 가능성과 관련 있다. 추가로, 활성 류마티스성 관절염에 걸린 환자의 혈청 및 활액에서 T-세포 활성화의 산물인 가용성 IL-2r의 농도도 증가된다(Udagawa, N., et.al., Arthritis and Research 4: 281-289, 2002).

[0009] 류마티스성 관절염의 전개와 지속에 Th1 유형의 CD4+ T 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, CD4+ T 림프구는 인터페론-감마(IFN- γ) 및 IL-17 같은 가용성 물질과 CD69 같은 세포 표면 물질에 의한 신호 전달을 통해 대식 세포, 활막 세포들을 자극하여 염증성 사이토카인(TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-2, IL-6)과 매트릭스 메탈로프로티나아제(matrix metalloproteinase, MMP)를 분비하게 한다. 이렇게 분비된 사이토카인들은 활막의 증식을 촉진하여 판누스(pannus)를 형성하고, MMP와 함께 연골 파괴를 일으킨다. 또한 활성화된 CD4 + T 세포는 CD40L, CD28, α 1b2 인테그린(integrin) 등이 매개된 세포 표면 접촉을 통해 B 세포를 활성화하여 류마티스성 인자(rheumatoid factor)를 포함한 항체를 생산케 한다. CD4+ T 세포는 활성화됨에 따라 vvas에 오스테오프로테제린 리간드(osteoprotegerin ligand, OPGL)를 발현하여 과골 세포 생성(osteoclastogenesis)을 촉진하여 뼈 파괴에 결정적인 역할을 한다(Kong Y.Y., et al., Nature 402: 304-309, 1999). 활성화된 대식세포, 섬유아세포 등은 VEGF, FGF와 같은 물질을 분비하여 새 혈관 형성을 촉진한다. 활막 조직 내의 활성화된 혈관 내피 세포는 IL-8과 같은 케모카인을 분비하고 결합분자(adhesion molecule) 발현을 유도하고 염증성 세포의 침윤을 촉진하여 염증반응의 증폭 사이클을 이룬다. 또한, 류마티스 관절염은 T-림프구와 항원 제시 세포사이의 항원-비특이성 세포간 상호작용과 관련된 T-세포-매개의 자가 면역 질환이라 생각된다. 일반적으로, T-세포 반응의 크기는 T-세포 표면 분자와 그의 리간드 사이의 상호작용에 의해 유도된 동시 자극 반응에 의해 결정된다. 주된 동시 자극 신호는 T-세포 표면 수용체인 CD28 및 CTLA4와 그의 리간드, 예를 들어 항원 제시 세포 상의 B7-관련 분자 CD80(즉, B7-1) 및 CD86(즉, B7-2) 사이의 상호작용에 의해 제공된다(Linsley, P., et al., ann. Rev. Immunol. 11: 191-212,1993). 동시자극이 없을 때의 T-세포 활성화는 면역 시스템이 자극에 대해 반응하지 않는 무력성(anergic) T-세포 반응을 초래한다(Schwartz, R.H., et.al., Cell 71: 1065-1068, 1992).

[0010] 골관절염이 유도되면, 관절 내 염증 반응과 함께 통증이 증가하게 되는데, 이러한 통증은 활액 내에서 통증유발과 관련된 중요 인자인 프로스타글란딘 E2(PGE2)의 생성이 증가하기 때문이다. 사이클로 옥시제네이스 2(cyclooxygenase-2, COX-2)는 통증 유발 물질인 프로스타글란딘 E2를 합성하는 효소이며, 이는 NO(nitric oxide), TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인(IL-1 β , TNF- α), 케모카인, 단백 분해효소 등과 같은 염증 관련 인자들이 분비된다. 이러한 염증 반응은 골관절염의 초기에도 관찰되며, 활액막에 염증이 생겨 혈청 히알

루론산(hyaluronic acid, HA) 농도가 상승되기도 한다. 활액막에는 감각신경 섬유가 분포되어 있으며, IL-1 β 와 TNF- α 는 활액막에 분포하는 생체에 손상을 주거나 손상을 줄 수 있는 유해자극을 감지하는 수용체인 유해 수용기(nociceptor)를 자극하거나 민감하게 할 수 있다. 이러한 염증성 사이토카인들은 연골세포와 비만세포로부터 PGE2와 히스타민을 유리시키며, 이는 다시 유해수용기를 자극하므로 통증을 느끼게 된다. 골관절염에서는 염증 반응과 함께 연골이 파괴되어 활액 내로 프로테오글리칸이 방출되어 활액량과 활액 내의 프로테오글리칸의 농도가 증가한다. 프로테오글리칸은 단백질과 당분으로 구성되어 있으며, 콜라겐 섬유와 엉겨 붙어 연골 내에 뻘뻘하게 밀집된 구조 또는 틀을 형성하여 몸을 굽혔다 폈다 하는 운동을 가능하도록 연골에 탄력성을 부여하는 복합 분자이다. 또한 프로테오글리칸은 연골 조직 내의 수분을 함유할 수 있는 스폰지 기능을 함으로써 연골이 계속적으로 관절 운동을 할 수 있도록 한다. 골관절염이 발생한 연골 조직은 MMP(matrix metalloproteinase)에 의하여 파괴되며, 골관절염이 진행되면 MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13 등의 발현과 활성이 증가한다(Wieland, HA., et.al., Nat Rev Drug Discov 4: 331-344, 2005).

[0011] 현재 사용되고 있는 퇴행성 관절염 및 류마티스 관절염의 치료방법은 다음과 같다. 초기 치료에 많이 사용되는 약물은 비스테로이드성 소염제(NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug)로서, 이들 NSAID들은 증세를 약간 호전시키기는 하지만 관절부위 연골 손실이나 질병의 진행을 막을 수는 없으며, 장기간에 걸쳐 투여되고, 장기 복용 시 위장계, 중추 신경계, 조혈 기관, 신장, 간 등에 부작용이 심하게 나타나서 이 치료법을 사용하는 환자의 절반 가량이 1년 이내에 치료를 중단해야만 한다(Langenegger, T., et. al., Clin Orthop. 366: 22-30, 1999). 다음 단계로는 금을 포함하는 화합물 약제(gold drugs; gold sodium thiomalate, gold sodium thiosulfate)나 페니실아민(penicillamine), 항말라리아제(anti-malarials)와 같은 항관절염 제제(disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 등이 사용된다. 그러나 상기 제제들 역시 관절염의 진행을 다소 감소시키지만, 심각한 부작용을 동반할 수 있기 때문에 항류마티스제(Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug, DMARD)를 이용한 치료법이 시작된 5년 이후에는 5-15% 환자만이 이 약물을 계속 사용하고 있다. 상기의 치료제가 더 이상 효과를 보이지 않을 경우에는 류마티스가 발생한 관절부위를 외관절 시술에 의해 인공관절로 교체해야만 하는 경우도 있다(Simon, L.S., Int. J. clin. Pract., 54: 243-249, 2000).

[0012] 일산화질소(Nitric oxide, NO)는 내피세포, 호중구 등에서 생성되며 L-아르기닌(L-arginine)에서 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 시트룰린(citrulline)으로 전환 시에도 생성된다. 또한 일산화질소(nitric oxide)는 대부분의 기관에서 세포간 메신저(intercellular messenger)로서 작용하고 혈관의 항상성, 혈관 내피세포에 백혈구나 혈소판의 부착 억제와 혈소판 응집억제 및 신경전달 물질로서 작용한다. 아울러 면역계에서는 대식세포 및 항미생물 방어에 관여하며 슈퍼 옥사이드 음이온(superoxide anion)과 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxyxynitrite (ONOO-)를 생성하기도 한다. NO는 과잉생성 시 신경퇴행성 질환, 만성염증, 폐혈증, 고혈압, 혈전증, 신부전증, ARDS (성인호흡곤란 증후군), AIDS에 의한 뇌장애, 기관지 경련, 발작, 남성 발기 부전증 등을 야기 시킨다. 일산화질소(Nitric oxide: NO)는 또 다른 종류의 활성종으로서 세포독성이 강하나 세포 간 혹은 세포내 신호전달에 중요한 역할을 하며 생체 내에서 내피 의존성 확장 인자 (Endothelium Derived Relaxing Factor: EDRF)로서 면역반응에 관계하고 세포 항상성을 유지하는데 특히 기억력과 관련 있는 퇴행성 신경전달물질로서의 가능성 때문에 현재 뜨거운 관심을 받고 있다. 일산화질소는 여러 조직에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 합성되는데 NOS는 세 가지의 isoform을 가지고 있으며 type I (neuronal nitric oxide synthase, nNOS), type II (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 및 type III (endothelium nitric oxide, ecNOS)로 구분되며 type I과 III는 Ca²⁺와 칼모듈린(calmodulin)에 의해 조절되는 constitutive form (cNOS)으로, type II는 post-transcription에 의해 조절되는 cytokine-inducible form (iNOS)으로 언급된다. cNOS는 세포내에 존재하여 정상적인 생리기능을 유지하게 하는데 단기간에 소량의 NO를 생성함으로써 NO로 하여금 직접적인 효과를 나타낼 수 있게 하는 반면 iNOS는 사이토카인(cytokine)에 노출된 후에 발현되어 다량의 NO를 생성함으로써 nitrosation, nitration과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 된다. 특히 대식세포가 활성화되면서 생성되는 NO는 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것으로 유명하다. NO는 반감기는 6-10초로 대단히 짧아 실질적으로 직접 검출하여 연구하는데 어려움이 많으므로 대부분의 NO 연구는 NOS 발현 유무나 NO의 안정화된 부산물인 아질산염(nitrite), 질산염(nitrate)을 측정하여 간접적으로 이루어지고 있다.

[0013] 염증 반응이 진행하게 되면 염증성 사이토카인의 발현이 지속적으로 증가하게 되고 이로 인해 염증 반응이 장기화하게 되는데 이들 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6, IL-8 등의 발현을 억제시키는 것은 염증을 완화하는데 매우 중요하다. 또한, 염증성 사이토카인의 발현을 유도하는 전사조절인자인 NF- κ B의 발현을 억제함으로써 항염증 효능을 보이게 된다(Inoue et al., Cancer Sci, 98, 268-274, 2007). 세균이나 바이러스, 염증성 유도 물질

에 민감하게 반응하여 세포내로 신호를 전달하는 Toll-like receptors는 세포 내 신호전달 시스템을 통하여 NF- κ B나 IRF3 등과 같은 전사조절 인자를 활성화시켜 염증을 유발하는 사이토카인, 케모카인 등의 발현을 촉진시킨다. (Kollisch et al., Immunology, 114, 531-541, 2005). 염증성 사이토카인의 발현을 억제시키거나 전사조절 인자인 NF- κ B나 IRF3의 발현을 억제시키는 물질의 탐색은 항염증 치료 및 개선에 유용한 기능성 화장품 또는 의료제를 제공하게 된다.

[0014] 이에 본 발명가들은 면역기능 증진으로 항염증 효과를 나타낼 수 있는 물질을 탐색하는 과정에서 일산화질소 (Nitric Oxide, NO) 생성 측정, 종양 괴사 인자(Tumor Necrosis Factor- α)와 대표적인 염증성 사이토카인인 Interleukin- 1β 의 농도 측정 시험 방법 및 세포 독성 효능 확인을 통해 무독성의 식품소재, 천연물 또는 종래의 한방제의 효능을 검증하였다. 또한 관절염 치료의 핵심인 관절의 연골과 골조직을 유지시키면서 동물 실험을 통한 관절염의 진통 억제 효과와 부종을 감소 효과 및 항염 효과를 확인하여 백미(Cynanchum atratum)에서 관절염에 우수한 항염증 생리활성 성분을 추출, 분획물을 제조하였다. 특히 백미 분획물 중에서 클로로포름 층에서 높은 면역세포 활성화 효과를 보이고, 생체 내에서 염증세포의 파괴능이 우수하고 염증세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 추출물을 분리하고 그 효능을 증명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 백미(Cynanchum atratum)의 생리활성 성분 추출물을 함유하는 면역기능 증강 또는 염증성 질환의 치료 및 예방에 유용한 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 면역 활성 증진 및 항염증 효과를 나타내는 백미(Cynanchum atratum)의 생리활성 성분을 유효성분으로 함유하는 항염증용 약학 조성물 및 염증성 질환의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물을 제공한다.

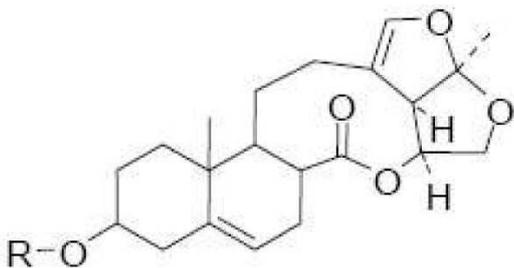
과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 적절한 실시 형태에 따르면, 유효성분으로서 백미(Cynanchum atratum)에서 추출한 스테로이드 글루코사이드를 포함하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 적절한 실시 형태에 따르면,

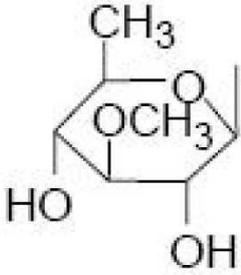
[0018] 상기 스테로이드 글루코사이드는 하기 화학식 1로 나타낸 화합물인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

화학식 1



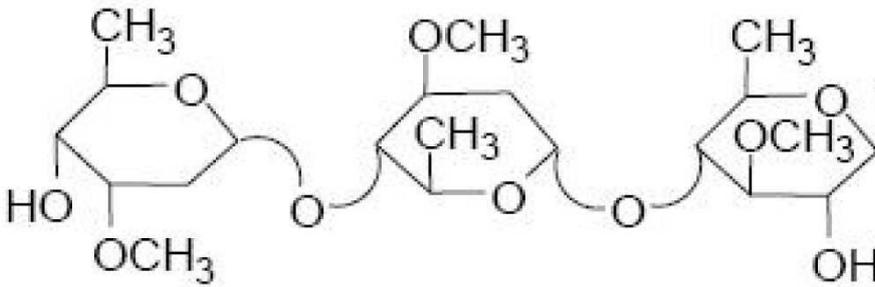
[0019]

[0020] 상기 R은



[0021]

[0022] 또는



[0023]

[0024] 이다.

[0025] 본 발명의 또 다른 적절한 실시 형태에 따르면, 상기 스테로이달 글루코사이드는 백미의 건조 뿌리 1kg당 물 또는 알콜 용매 5 내지 20 l 를 첨가하고 20 내지 50℃에서 0.5 내지 2일 동안 방치한 후 여과 및 감압 증발시켜 알콜 추출물을 얻는 단계; 상기 알콜 추출물에 물과 핵산이 1:1로 혼합된 용매를 첨가한 후, 분리된 물층에 클로로포름을 첨가하여 유기 물질을 추출하는 단계; 및 상기 유기 물질을 4단계의 크로마토그래피로 분획하여 추출되는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 적절한 실시 형태에 따르면, 상기 알콜 용매는 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 적절한 실시 형태에 따르면, 상기 크로마토그래피는 순상 진공 플래시 크로마토그래피, 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피 및 C18 역상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피로 이루어진 군에서 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 백미(Cynanchum atratum)의 추출물은 염증반응에 관여하는 대식세포에서의 일산화질소(Nitric Oxide)와 염증매개 사이토카인인 Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-1 beta, 염증매개인자인 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂)의 활성을 억제한다. 본 발명의 백미 추출물을 함유하는 약학적 조성물은 항염증제제로서 개발될 수 있으며 염증반응에 의해 발생하는 위염, 대장염, 간염, 관절염 및 동맥경화, 암 등의 퇴행성 질환의 예방에도 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 백미(Cynanchum atratum) 추출물의 지표성분인 스테로이달 글루코사이드 화합물을 HPLC차트를 나타낸 것이다.

도 2는 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물의 면역세포의 독성을 측정한 것이다.

도 3은 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1의 백미 추출물의 NO의 생성 억제량을 측정한 것이다.

도 4는 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1의 백미 추출물의 TNF-α의 생성 억제량을 측정한 것이다.

도 5는 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1의 백미 추출물의 IL-1 β 의 생성 억제량을 측정한 것이다.

도 6은 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1의 백미 추출물의 PGE₂의 생성 억제량을 측정한 것이다.

도 7은 실시예 1의 백미추출물 제조과정을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명의 백미 추출물은 백미의 건조 뿌리 1kg당 물 또는 알콜 용매 5 내지 20 l를 첨가하고 20 내지 50℃에서 0.5시간 내지 2일 동안 방치한 후 여과 및 감압 증발시켜 알콜 추출물을 얻는 단계; 상기 알콜 추출물에 물과 헥산이 1:1로 혼합된 용매를 첨가한 후, 분리된 물층에 클로로포름을 첨가하여 유기 물질을 추출하는 단계; 및 상기 유기 물질을 4단계의 크로마토그래피로 분획하여 추출되는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다.

[0031] 먼저 백미(Cynanchum atratum)의 뿌리는 물로 세척하여 중금속 또는 오염물질 등을 제거하고 건조시킨 후 분쇄한다. 다음으로 건조 중량의 약 5 내지 25배, 바람직하게는 약 20배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올과 같은 저급 알콜 또는 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 이들의 혼합 용매를 사용하여 추출한다. 바람직하게는 메탄올로 20 내지 100℃, 바람직하게는 20 내지 50℃의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 추출하고, 추출회수는 1회 내지 5회, 바람직하게는 2회 내지 3회 연속 추출한다.

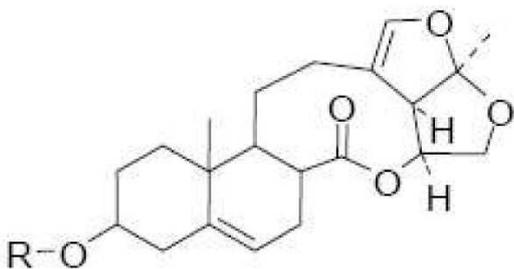
[0032] 다음으로 추출된 물질은 감압 여과하고 여액을 진공회전농축기로 20 내지 100℃, 바람직하게는 50 내지 70℃에서 감압 농축한 후 추출된 잔사를 진공동결 건조기로 건조하여 알콜 추출물을 얻을 수 있다. 수득된 각각의 추출물은 -20℃에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

[0033] 얻어진 알콜 추출물에 대하여 물과 헥산을 1:1 비율로 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층으로 분리한다. 분리된 물층에 클로로포름을 첨가하여 혼합한 후 정지한다. 이후 물층과 클로로포름층이 분리되면, 클로로포름층을 감압 건조하여 클로로포름 추출물을 제조한다. 이때 감압 건조 조건은 상기와 같다.

[0034] 다음으로 클로로포름 추출물을 순상 진공 플래시 크로마토그래피, 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피, C18 역상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피, 역상 분석용 HPLC 컬럼으로 연속적으로 분리 정제하여 본 발명의 백미 추출물을 제조한다. 이때 각 단계의 분획물에 대해서는 항염증 효력시험을 통하여 유효분획을 선택하고, 선택된 유효 분획을 다음 단계의 크로마토그래피로 분리정제하는 것이 바람직하다.

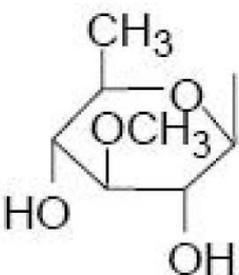
[0035] 본 발명에서 제조된 백미 추출물은 스테로이달 글루코사이드(steroidal glucoside) 계열의 물질로서 하기 화학식 1로 나타낸 화합물을 유효성분으로 포함한다.

[0036] 화학식 1



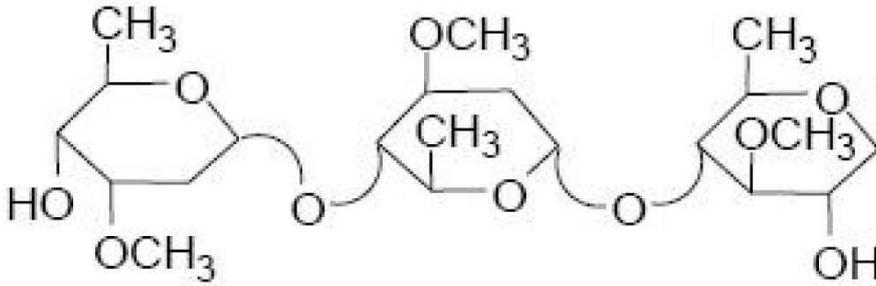
[0037]

[0038] 상기 식에서 R은



[0039]

[0040] 또는

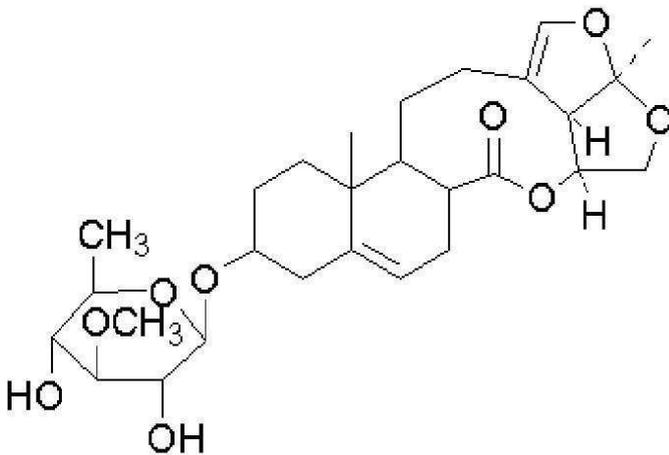


[0041]

[0042] 또는 이와 유사한 당인 것이 바람직하다.

[0043] 특히 본 발명에서는 하기 화학식 2로 나타낸 글로코제닌 C-모노-D-테벤토시드(glaucogenin C-mono-D-thevetoside)을 유효성분으로 포함한다.

화학식 2



[0044]

[0045] 본 발명의 백미 추출물은 상기 화합물의 이성체도 포함할 수 있다.

[0046] 상기에서 수득된 백미(Cynanchum atratum)의 추출물을 함유하는 항염증제의 효능을 조사하기 위하여, 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)로 자극시킨 RAW 264.7 마우스 대식세포와 C57BL/6 생쥐에 상기 추출물을 다양한 농도로 첨가하고 염증반응인자에 미치는 영향을 생화학적 분석과 더불어 분자생물학적인 실험을 통하여 실시한 결과, 본 발명에 따른 상기 추출물이 대식세포에서의 질소 산화물(Nitric Oxide) 생성과 염증성 사이토카인인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α), IL-1 β (Interleukin-1 beta) 및 염증유발인자인 Prostaglandin E₂의 활성을 뛰어나게 억제시킴을 확인하였다.

[0047] 상기의 제법으로 수득된 본 발명의 백미(Cynanchum atratum) 추출물을 랫트에 경구투여하고 카라기난으로 뒷발에 부종을 유도하였을 경우에, 대조군과 비교하여 유의적인 부종억제율을 나타내었으며, 백미(Cynanchum atratum) 추출물을 랫트에 경구투여하고 미코박테리움 부티리시움(Mycobacterium butyricum) 함유 CFA(Freund's complete adjuvant)로 뒷발에 만성관절염을 유도하였을 경우에도 대조군과 비교하여 탁월한 소염진통효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0048] 또한, 본 발명의 백미(Cynanchum atratum)는 오랫동안 생약으로 사용되어 오던 약제로서 이로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.

[0049] 본 발명의 백미(Cynanchum atratum)의 생리활성 성분을 함유하는 항염증 및 염증성 질환의 치료 및 예방을 위한 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 백미 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이

바람직하다.

- [0050] 또한 본 발명의 백미(*Cynanchum atratum*)의 생리활성 성분을 포함하는 조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 관절염에 탁월한 효능을 나타내는 생리활성 성분을 함유하는 분획물의 약학적 투여 형태는 이들의 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 분획물을 포함하는 약학조성물은, 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. 추출물을 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 셀룰로즈, 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 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 추출물 또는 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 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, 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 추출물 또는 분획물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물 또는 분획물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 약학조성물은 쥐, 생쥐, 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.
- [0055] 본 발명은 염증성 질환 또는 관절염의 예방 효과를 나타내는 상기 추출물 또는 분획물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 백미(*Cynanchum atratum*) 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합체, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0056] 본 발명의 백미(*Cynanchum atratum*) 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0057] 또한 본 발명의 백미(*Cynanchum atratum*) 추출물 또는 분획물은 관절염의 분자생물학적 소견에서의 항염증 활성을 나타내며, 염증 및 통증 유발 동물에서 소염 및 진통 활성이 탁월하므로, 관절염의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.
- [0058] 이하, 본 발명을 비교예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 비교예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0059] 비교예 1: 백미(*Cynanchum atratum*) 추출물의 제조
- [0060] 정한인터콕에서 구입한 백미(*Cynanchum atratum*)의 건조된 뿌리 200g(건조중량)에 메탄올 1L를 가하여 48시간 방치한 후, 여과하는 과정을 3회 반복하고 감압하에서 용매를 증발 건조하여 메탄올 추출물 40.4g을 수득하였다.
- [0061] 비교예 2: 백미(*Cynanchum atratum*) 분획물의 제조
- [0062] 상기 비교예 1에 예시된 상기 추출물에 대하여 물과 헥산(각 200ml)을 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층을 분리하고, 물층에 클로로포름 200ml을 첨가하여 혼합한다. 이후 물층과 클로로포름층을 분리하고 클로로포름층을 감압 건조하여 클로로포름 추출물인 유기물질 8.4g을 얻었다.
- [0063] 실시예 1: 백미(*Cynanchum atratum*) 생리활성 분획물 제조
- [0064] 백미(*Cynanchum atratum*)의 건조된 뿌리 200g(건조중량)에 메탄올 1L를 가하여 48시간 방치한 후, 여과하는 과정을 3회 반복하고 감압 하에서 용매를 증발 건조하여 메탄올 추출물 40.4g를 수득하였다. 상기 추출물에 대하여 물과 헥산(각 200ml)을 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층을 분리하고, 물층에 클로로포름 200ml을 첨가하여 혼합한다. 이후 물층과 클로로포름층을 분리하고 클로로포름층을 감압 건조하여서 유기물질 8.4g을 얻었다. 수득한 유기물질을 순상 진공 플래시 크로마토그래피(normal phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 분획시켰다. 이때 컬럼은 유리필터 컬럼 100 x 95mm(내경 x 길이), 고정상은 TLC용 반분취 실리카(semi-preparative silica), 용출액으로는 50내지 100%(v/v) 디클로로메탄, 메탄올 혼합용액을 사용하며 세척용액으로는 100% 메탄올을 사용하였다. 상기 각 분획에 대하여 RAW 264.7 세포에서 염증 유도 인자인 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 NO의 양을 측정하고, 대표적인 염증성 사이토카인인 종양괴사인자- α (TNF- α), 인터루킨-1 β (IL-1 β) 및 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂)의 양을 측정하여 리포폴리사카라이드를 전혀 처리하지 않은 양성대조군과 리포폴리사카라이드를 처리한 음성대조군과의 비교를 통해서 유효분획 3.84g을 선택하였다. 선택된 유효 분획에 대하여 다시 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피(reversed-phase open column chromatography)를 이용하여 분획하였다. 이때 컬럼은 유리 필터컬럼 25 x 400mm(내경 x 길이), 고정상은 TLC용 C18 반분취 실리카 (semi-preparative silica), 용출액은 70% 메탄올 수용액을 사용하며, 세척용액은 100% 메탄올을 사용하였다. 상기 각 분획을 상기와 동일한 항염증 효력시험을 실시하여 유효분획 0.24g을 선택하고, C18 역상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피 컬럼(C18 reversed-phase semi-preparative HPLC column)(YMC-ODS컬럼, 입자직경 5 μ m, 10 X 250mm(내경 X 길이), 용출액: 70%(v/v) 메탄올, 용출속도:2ml/min, 굴절율 검출기) 상에서 분리 정제하여, 유지시간 27분에 용출되는 점액성 액상성분을 수득하였다. 다시 역상 분석용 HPLC 컬럼(C18 reversed-phase analytical HPLC column)(YMC-ODS컬럼, 입자직경 5 μ m, 4.6 X 250mm(내경 X 길이), 용출액: 70%(v/v) 메탄올, 용출속도: 0.8ml/분, 굴절율 검출기)으로 분리 정제하여, 유지시간 14.5분에 용출되는 스테로이드 글루코사이드(steroidal glucoside) 계열의 물질인 글로코제닌 C-모노-D-테벤토시드(glucogenin C-mono-D-thevetoside)을 25.9mg을 추출하였다. 추출된 물질의 HPLC 차트를 도 1에 나타내었다.
- [0065] [실험재료]
- [0066] DMEM 배양액, 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS), 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)은 라이프 테크놀로지사(Life Technologies Inc., Grand Island, NY)에서 구입하였다. 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2에이치-테트라졸리움, 이너 솔트 : MTS(a)]
- [0067] [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS(a)], 디메틸 술폭사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO), 및 E.Coli 리포폴리사카라이드 (Lipopolysaccharide, LPS)는 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co., MO, U.S.A)에서 구입하였다. 질소 산화물(Nitric Oxide) 측정용 그리스 시약 시스템 키트(Griess reagent system kit)는 프로메가(Promega)사 (Promega, WI, U.S.A)에서 구입하였으며, TNF- α , IL-1 β Cytokine level 측정용 엘리사 키트(ELISA kit)는 이바이오사이언스 (ebioscience, CA, U.S.A)에서 구입하였다.

- [0068] 실험예 1. 세포 배양
- [0069] RAW 264.7 마우스 대식세포(Macrophage)는 우태아혈청(FBS, Fetal bovine serum)(10%)과 항생제(antibiotics-antimycotics, 100U/ml penicillin G sodium, 100ug/ml streptomycin sulfate and 0.25ug/ml amphotericin B)가 함유된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 격일마다 계대 배양하였다.
- [0070] 실험예 2. 세포 독성 시험 (MTS assay)
- [0071] RAW 264.7 마우스 대식세포 (Macrophage)를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 웰(well) 당 5×10^3 으로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 후, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물과 셀레룩시브를 각각 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 500µg/ml의 농도로 투여한다. 투여 후 다시 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48 내지 72시간 동안 배양한다. 배양 후 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS(a)] 용액을 각 웰(well) 당 20µl씩 첨가하여 1 시간 내지 4 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하면서 반응시킨다. 반응 중지 후 490nm에서 흡광광도계를 이용하여 흡광도 측정을 한다. 시험물질을 첨가하지 않은 양성대조군을 생존율 100%로 환산하여 시험물질에 대한 실험군에서의 생존율을 계산하여 도 2에 나타내었다.
- [0072] 도 2를 보면, RAW 264.7 마우스 대식세포(mouse macrophage cell)에서의 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물의 간 세포독성 효과는 시험 물질이 전혀 첨가되지 않은 양성 대조군(positive control) 또는 셀레룩시브와 비교하여 볼 때 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 안전한 물질됨을 확인할 수 있었다.
- [0073] 실험예 3. 일질소산화물(Nitric Oxide, NO) 생성 측정
- [0074] RAW 264.7 세포를 페놀 레드(phenol red)가 없는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 현탁하여 24-웰 플레이트(24-well plate)의 각 웰(well) 당 5×10^5 개씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양 조건에서 24시간 동안 배양하였다. RAW 264.7 세포에 LPS 1µg/ml, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물 및 셀레룩시브를 각각 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml의 농도로 투여하고, DMSO를 동시 처리하여 20시간 배양한다. 상등액 100µl를 그리스시약(Griess reagent) (0.1% 나프틸에틸렌디아민(naphthylethylenediamine)용액과 1% 술파닐아미드(sulfanilamide in 5% H₃PO₄) 용액) 180µl과 반응시켜 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 아질산나트륨(sodium nitrite) 용액을 이용하여 작성하였고, 이를 이용하여 흡광도 평균을 아질산염(nitrite) 양으로 환산하였다. LPS만을 처리한 군에서의 아질산염(nitrite) 양을 기준으로 하여 시험물질 처리군의 NO 생성 저해 활성을 비선형회귀분석(non-linear regression analysis)을 이용하여 각 시험물질의 IC₅₀ (NO 생성을 50% 저해하는 농도)을 결정하는 방법으로 시험물질 간의 효력을 비교하여 도 3에 나타내었다.
- [0075] 도 3에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포(mouse macrophage cell)에 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물을 투여한 경우 산화질소(Nitric Oxide, NO)의 생성량을 비교한 결과, 순수한 항염증 활성물질인 실시예 1이 기존의 염증치료제인 셀레룩시브에 비해서 우수한 억제효과를 보였음을 확인할 수 있었다.
- [0076] 실험예 4. TNF-α, IL-1β 사이토카인레벨(Cytokine Level) 측정
- [0077] RAW 264.7 셀(cell)을 24-웰 플레이트(24-well plate)에 웰(well) 당 5×10^5 개씩 분주하여 배양하고 LPS 1µg/ml, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물 및 셀레룩시브를 각각 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml의 농도로 투여하였다. 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양한 후 세포 배양액을 취하여 TNF-α, IL-1β 함량을 효소면역분석법 키트(enzyme immuno assay, EIA) 키트(kit)를 사용하여 측정하였다. 각각의 사이토카인에 대한 포획(Capture) 항체가 부착된 96-웰 플레이트(96-well plate)에 세포 배양액을 첨가하고 24시간 반응 후 희석된 TNF-α, IL-1β 항체와 서양고추냉이 페록시다제(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체를 각각

2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1× phosphate buffered saline tween (1× PBST) 로 5회 세척한 후 다음 효소기질을 가하여 30분 반응시킨다. 그 다음 2N-황산(2N-sulfuric acid)를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응 중지 후 발색된 흡광도는 흡광광도계를 사용하여 450nm 파장에서 측정하였다. TNF- α , IL-1 β 의 함량은 표준 물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

[0078] 도 4에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포(mouse macrophage cell)에서의 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물을 투여한 경우, 염증성 사이토카인인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)에 대한 발현 농도를 비교한 결과, 실시예 1이 농도별로 유의하게 TNF- α 를 억제함을 확인하였다.

[0079] 도 5에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포(mouse macrophage cell)에서의 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물을 투여한 경우, 염증성 사이토카인인 IL-1 β (Interleukin-1 β)에 대한 발현 농도를 비교한 결과, 실시예 1이 농도별로 유의하게 IL-1 β 를 억제함을 확인하였다. 이는 도 4, 도 5에서의 TNF- α , IL-1 β 발현 억제가 염증을 유발시키는 인자인 LPS(Lipopolysaccharide)를 첨가하지 않은 양성대조군 또는 셀레콕시브에 상응하는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0080] 실험예 5. 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂, PGE₂) 생성 측정

[0081] RAW 264.7 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 현탁하여 96-웰 플레이트(96-well plate)의 각 웰(well) 당 1 × 10⁵ 개씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양 조건에서 24시간 동안 배양하였다. RAW 264.7 세포를 인산완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)으로 1회 세척하고 새로운 DMEM 배지로 교체한 다음 LPS (1 μ g/ml)와 LPS 1 μ g/ml, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물 및 셀레콕시브를 각각 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 농도로 동시 처리하여 20시간 동안 배양하였다. 상등액을 희석하여 PGE₂ 항체플레이트 (PGE₂ antibody plate)에 가하고 PGE₂-AChE 트랜서(tracer)를 처리하여 상온에서 18시간 이상 배양하였다. 배양 후 PGE₂ 항체플레이트 (PGE₂ antibody plate)를 0.05% Tween in PBS로 1분간 5회씩 세척한 다음, 엘림시약(Eliman's reagent)을 처리하여 상온에서 약 7시간 동안 배양하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정한 후, PGE₂ 표준 용액으로 작성한 검량선에 그 수치를 대입하여 PGE₂ 생성량을 환산하였다. LPS만을 처리한 군에서의 PGE₂ 생성 저해 활성을 비선형 회귀분석(non-linear regression analysis)를 이용하여 각 시험물질의 IC₅₀ (PGE₂ 생성을 50% 저해하는 농도)를 결정하는 방법으로 시험물질 간의 효력을 비교하였다.

[0082] 도 6에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포(mouse macrophage cell)에서의 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1의 백미 추출물을 투여한 경우, 염증을 유발시키는 원인 중 하나인 프로스타글란딘(Prostaglandin E₂)의 농도를 비교한 결과, 실시예 1이 셀레콕시브에 상응하는 우수한 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0083] 실험예 6. 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델 (Collagen-Induced Arthritis model)을 이용한 관절염 치료 효과 실험

[0084] 관절염 심화 정도 측정

[0085] 6-1. 측정 방법

[0086] 상기 실시예에 대한 관절염의 진통 효과를 알아보기 위해 포르말린 동물모델 실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(Fazli-Tabaei S et al., Behav. Pharmacol., 16, pp613-619, 2005).

[0087] 실험동물로는 체중 20-25 g의 수컷 ICR 마우스(오리엔트바이오, 일본)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 10마리씩 사용하였다. 각 처리군 별 약물을 경구투여하고, 1시간 후 10% 포르말린용액(Formalin, Sigma, USA)을 좌측 후지에 피하 투여하고, 주사 직후부터 5분까지(1st phase)와 피하주사 직후 15분부터 20분까지(2nd phase)마우스가 발바닥을 핥는 시간을 측정하여 기록하였으며, 억제율(%)은 셀레콕시브 처리군의 평균시간을 100으로 기준하여 상대수치로 나타내었다.

표 1

구분	농도(mg/kg)	억제율(%)	
		1st phase	2nd phase
비교예 1	400	90.4	75.9
비교예 2	400	115.6	105.2
실시예 1	400	126.4	124.1
대조군(셀레록시브)	400	100	100

[0088]

[0089]

[0090] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 관절염에 항염증 활성을 나타내는 실시예 1의 백미 추출물이 비교예 1의 백미 추출물과 비교예 2의 클로로포름 층 분획물보다 진통 억제율이 뛰어났으며, 양성대조군으로 사용한 셀레록시브에 비하여도 우수함을 확인할 수 있었다.

[0091] 상기 실시예에 대한 진통효과를 알아보기 위해 MIA(monosodium iodoacetate)로 유도한 관절염 동물 모델 실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(James D. Pomonis et al., Pain, 114, pp339-346, 2005). 실험 동물로는 체중 200~220g의 수컷 SD 랫트(오리엔트바이오, 일본)를 수일간 순화시킨 후, MIA(monosodium iodoacetate)(SIGMA, St. Louis, MO; cat #I2512)를 식염수에 녹여 왼쪽 뒷발 무릎 관절강 내에 주사함으로써 관절염을 유발시키고 1주 동안의 회복기간을 두었다. 1주 후 인카파시탄스 테스트(incapacitance tester, Linton, stoelting Co., Wood Dale, IL)를 이용해 관절염이 유발된 개체를 선별하고 선별된 개체들만으로 군을 구성하여 각 군당 10마리씩이 되도록 한다. 군 분리 후 유발 8일째부터 매일 같은 시간대에 시료를 경구투여하고, 투여를 시작한지 1주일 후부터 측정을 시작하며 3주 동안 주 1회 실시한다. 측정치는 인카파시탄스 테스트(incapacitance tester, Linton, stoelting Co., Wood Dale, IL)를 이용하였고, 측정치는 하기 수학적 식 1을 이용하였으며, 억제율(%)은 셀레록시브 처리군의 평균 측정값을 100으로 기준하였을시 상대 수치로 나타내었다.

수학적 식 1

$$\% \text{ 왼쪽 뒷다리의 무게} = \frac{\text{왼쪽 뒷다리의 무게}}{\text{왼쪽 뒷다리의 무게} + \text{오른쪽 뒷다리의 무게}} \times 100$$

[0092]

표 2

구분	농도(mg/kg)	억제율(%) - 3주째
비교예 1	400	76.1
비교예 2	400	86.4
실시예 1	400	100.7
대조군(셀레록시브)	400	100

[0093]

[0094] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 관절염에 항염증 활성을 나타내는 실시예 1의 백미 추출물이 비교예 1의 백미 추출물과 비교예 2의 클로로포름 층 분획물보다 진통 억제율이 뛰어났으며, 양성대조군으로 사용한 셀레록시브에 비하여도 우수함을 확인할 수 있었다.

[0095] 핫 플레이트 테스트를 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(Pharmacological report, 60 (2008) 409-414). 실험동물로는 체중 15~20g의 수컷 ICR 마우스(오리엔트바이오, 일본)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 8-9 마리씩 사용하였다. 시료를 각각 경구투여하고, 1시간, 2시간 후에 온도가 55℃가 유지되는 플라스

텍 실린더에 마우스를 넣고 뒷발바닥을 핏거나 점프하는 동작을 취했을 때의 시간을 측정하였다. 마우스의 컷오프(cut-off) 시간은 15초로 정하였으며, 억제율(%)은 양성대조군인 셀레콕시브의 억제효과를 기준으로 하여 계산한 상대 억제율(%)로 나타내었다.

표 3

구분	농도(mg/kg)	억제율(%)
비교예 1	400	85.2
비교예 2	400	114.2
실시에 1	100	132.1
	200	133.5
	400	143.2
대조군(셀레콕시브)	400	100

[0096]

[0097] 실험결과, 상기 표 3에 나타난 바와 같이 실시에 1의 추출물은 농도별로 실험한 결과, 실시에 1의 추출물이 단일 추출물인 비교예 1 및 클로로포름 층 분획물인 비교예 2와 비교하여 진통 억제율이 뛰어났으며, 양성대조군으로 사용한 셀레콕시브에 비하여도 우수함을 확인할 수 있었다.

[0097]

[0098] 항염효과를 알아보기 위하여 아세트산 유도된 리팅 시험법 동물모델 실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(H. O. J collier et al., Br. J. Pharmac. Chemother., 32, pp295-310, 1968).

[0098]

[0099] 실험동물로는 체중 20~23 g의 수컷 ICR 마우스(오리엔트바이오, 일본)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 7-10마리씩 사용하였다. 각 처리군 시료를 경구투여하고, 1시간 후 1% 아세트산 용액(Acetic acid, Sigma, USA)을 복강투여하고, 주사 후 5분 후부터 20분간 마우스가 몸부림하는 횟수를 측정하여 기록하였다. 억제율(%)은 양성대조군인 셀레콕시브의 억제효과를 기준으로 하여 계산한 상대 억제율(%)로 나타내었다.

[0099]

표 4

구분	농도(mg/kg)	억제율(%)
비교예 1	400	31
비교예 2	400	42.3
실시에 1	100	65.4
	200	67.1
	400	79.3
대조군(셀레콕시브)	400	100

[0100]

[0101] 실험결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 실시에 1의 추출물은 농도별로 실험한 결과, 실시에 1의 추출물이 단일 추출물인 비교예 1 및 클로로포름 층 분획물인 비교예 2와 비교하여 항염효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0101]

[0102] 웅성 Wistar 흰쥐(오리엔트, 수컷, 6주령)를 수일간 순화시킨 후 실험시작 전날부터 절식시킨 후 체중을 측정 후 군을 나누어 시료를 체중 당 400mg/kg 농도로 경구투여한 후 카라기난을 식염수에 용해시켜 뒷다리 좌측 발바닥에 피하 주사하여 염증을 유발하였다. 일정시간 간격으로 부피측정기(plethysmometer)를 이용하여 카라기난을 주사하지 않은 우측 발바닥과 좌측 발바닥의 부종정도를 측정하였다. 이 때 발바닥에 이물질이 묻지 않도록 주의하였다. 또한 양성대조군으로 셀레콕시브를 체중 당 100mg/kg 농도로 경구투여하였다. 셀레콕시브의 투여군의 무게를 기준으로 억제율(%)을 계산하여 하기 표 5에 나타내었다.

[0102]

표 5

[0103]

구분	농도(mg/kg)	억제율(%)
비교예 1	400	90
비교예 2	400	92.3
실시예 1	400	106.3
대조군(셀레록시브)	400	100

[0104]

상기와 같이 발바닥 부종을 측정 한 결과, 표 5에서 나타나는 바와 같이, 실시예 1의 추출물을 400mg/kg으로 경구투여한 군이 기존에 사용되던 항염 치료제인 셀레록시브를 경구투여한 군보다 우수함을 확인할 수 있었다.

[0105]

[제제예 1] 캡슐제의 제조

[0106]

실시예 1의 복합 추출물 200 mg

[0107]

유당 50 mg

[0108]

전분 50 mg

[0109]

탈크 2 mg

[0110]

스테아린산 마그네슘 적량

[0111]

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0112]

[제제예 2] 정제의 제조

[0113]

실시예 1의 백미 추출물 200 mg

[0114]

유당 100 mg

[0115]

전분 100 mg

[0116]

탈크 2 mg

[0117]

스테아린산 마그네슘 적량

[0118]

통상의 정제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 타정하여 정제를 제조한다.

[0119]

[제제예 3] 액제의 제조

[0120]

실시예 1의 백미 추출물 1000 mg

[0121]

설탕 2000 mg

[0122]

이성화당 2000 mg

[0123]

레몬향 적량

[0124]

정제수를 가하여 전체 1000 ml로 맞춘 후 통상의 액제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합한 후, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0125]

[제제예 4] 건강 기능성 식품의 제조

[0126]

실시예 1의 백미 추출물 1000 mg

[0127]

<비타민 혼합물>

- [0128] 비타민A 아세테이트 70 μg
- [0129] 비타민E 1.0 mg
- [0130] 비타민B1 0.13 mg
- [0131] 비타민B2 0.15 mg
- [0132] 비타민B6 0.5 mg
- [0133] 비타민B12 0.2 μg
- [0134] 니코틴산아미드 1.8 mg
- [0135] 엽산 50 μg
- [0136] 판토텐산칼슘 0.5 mg
- [0137] <무기질혼합물>
- [0138] 산화아연 0.82 mg
- [0139] 탄산마그네슘 25 mg
- [0140] 구연산칼륨 90 mg
- [0141] 탄산칼슘

- [0142] 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 과립을 제조하여, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다. 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 배합비를 임의로 변형 실시 하여도 무관하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

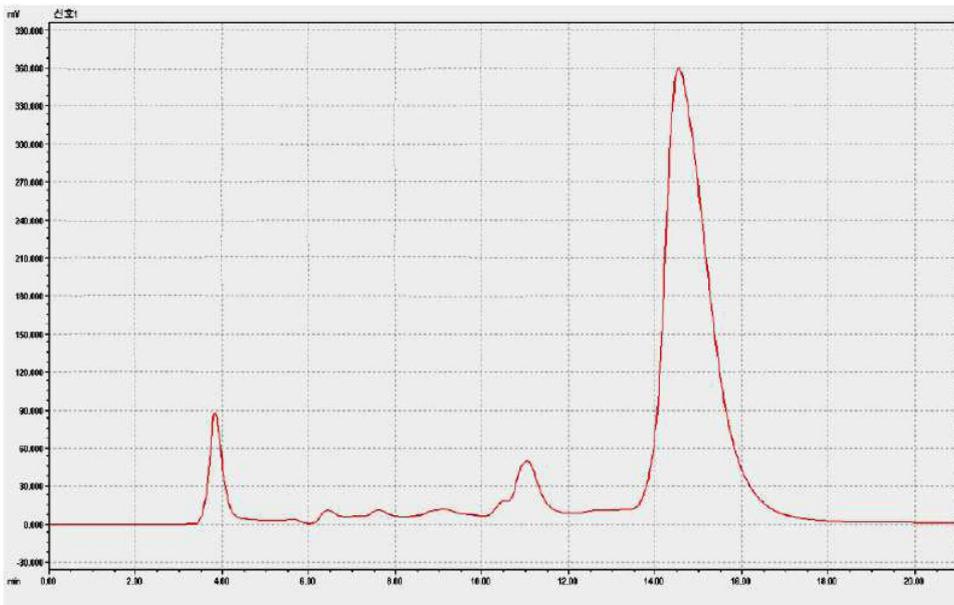
- [0143] [제제예 5] 건강 기능성 음료의 제조
- [0144] 실시에 1의 백미 추출물 1000 mg
- [0145] 구연산 1000 mg
- [0146] 올리고당 100 g
- [0147] 매실농축액 2 g
- [0148] 타우린 1 g
- [0149] 정제수 포함하여 전체 900 mg
- [0150] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고, 약 1시간 동안 80℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ml 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

- [0151] [제제예 6] 캡슐제의 제조
- [0152] 실시에 1의 백미 추출물 200 mg
- [0153] 통상의 관절염치료 약물 (NSAIDs) 50 mg
- [0154] 유당 50 mg
- [0155] 전분 50 mg
- [0156] 탈크 2 mg

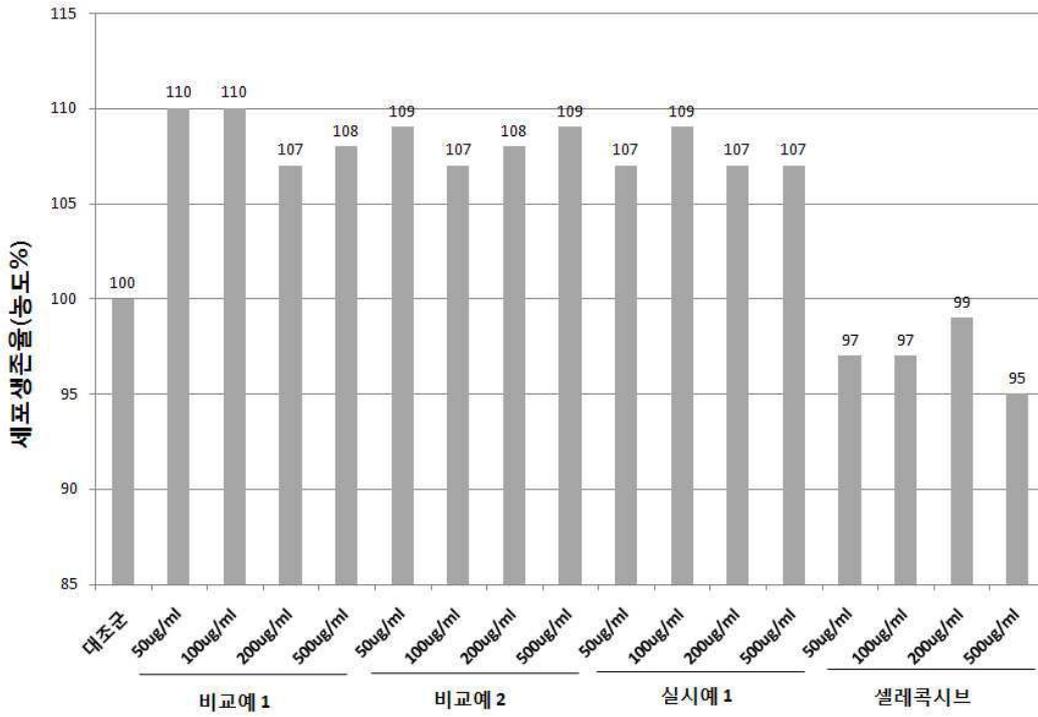
- [0157] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0158] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다. 상기 NSAIDs 로는 공지된 비스테로이드성 항염증 약물을 사용할 수 있으며, 그 함량은 적절히 조절될 수 있다.
- [0159] [제제예 7] 연고제의 제조
- [0160] 실시에 1의 백미 추출물 1.0중량%
- [0161] 요소 20.0중량%
- [0162] 백색 바셀린 15.0중량%
- [0163] 경질 유동 파라핀 6.0중량%
- [0164] 세탄올 3.0중량%
- [0165] 스테아릴알콜 3.0중량%
- [0166] 모노스테아르산글리세릴 5.0중량%
- [0167] 향료 적당량
- [0168] 방부제 적당량
- [0169] 완충제 1.0중량%
- [0170] 정제수 나머지방
- [0171] 통상의 연고제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하여 연고제를 제조한다.

도면

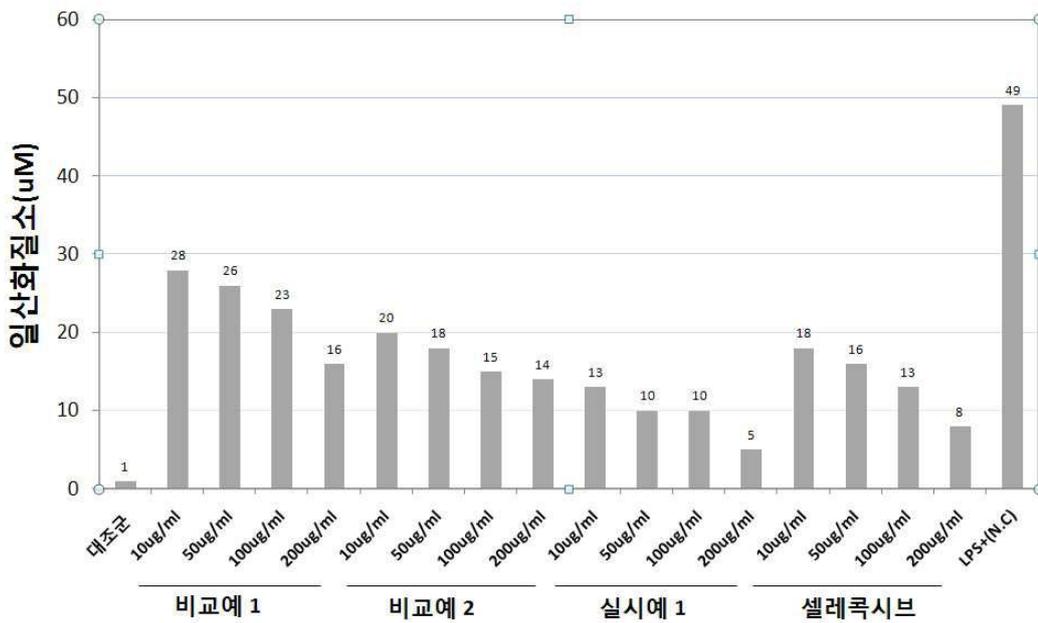
도면1



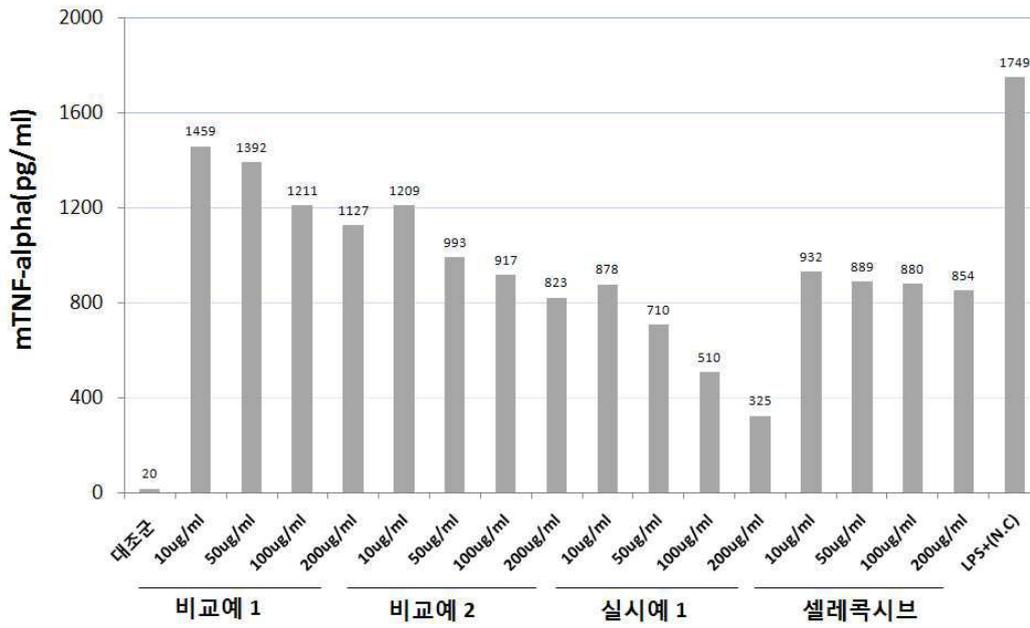
도면2



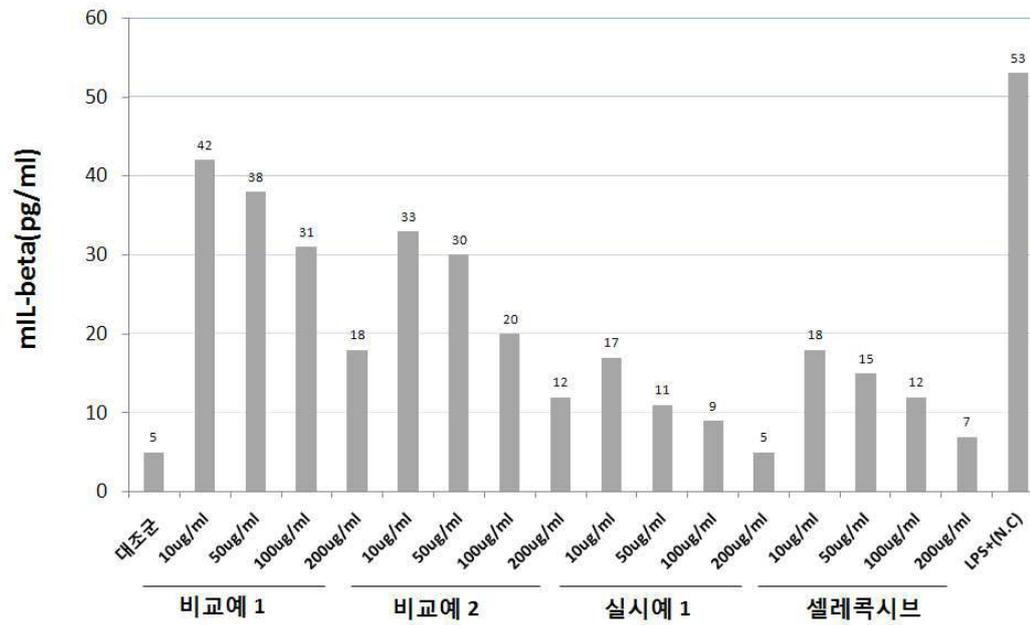
도면3



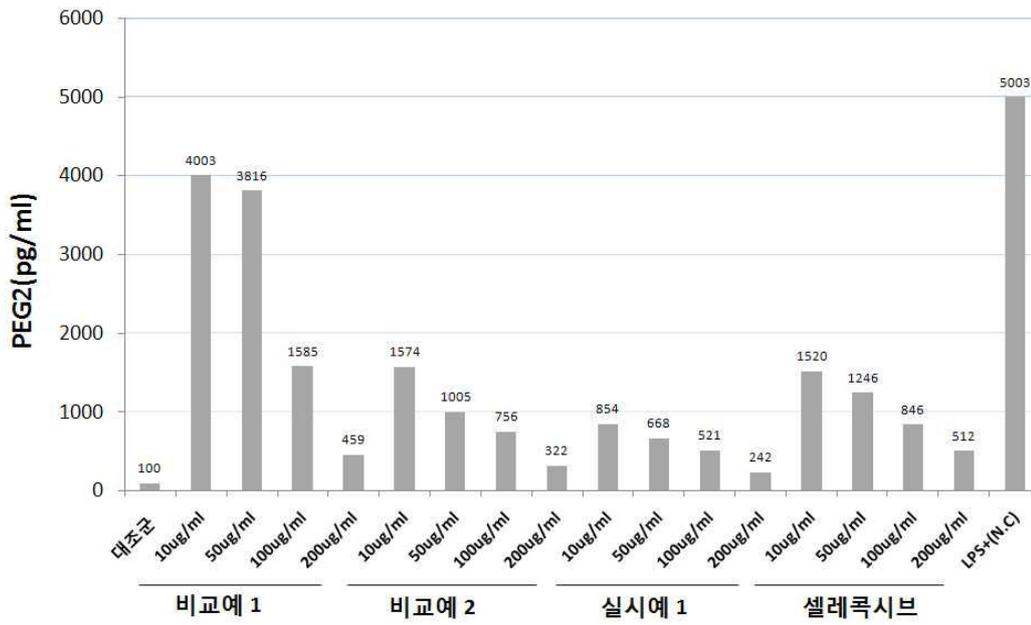
도면4



도면5



도면6



도면7

