

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 31/12

(45) 공고일자 1999년06월 15일

(11) 등록번호 10-0204500

(24) 등록일자 1999년03월29일

(21) 출원번호 10-1996-0052674

(65) 공개번호 특1998-0034576

(22) 출원일자 1996년11월07일

(43) 공개일자 1998년08월05일

(73) 특허권자 한국과학기술연구원 박원훈
서울특별시 성북구 하월곡동 39-1

(72) 발명자 이정준
대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 132동 201호
김환목
대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 133동 1301호
김항섭
대전광역시 서구 만년동 강변아파트 107동 1601호
홍영수
대전광역시 유성구 어은동 산 1번지
한상배
충청북도 청주시 흥덕구 사직동 204-8

(74) 대리인 이원희

심사관 : 김희수

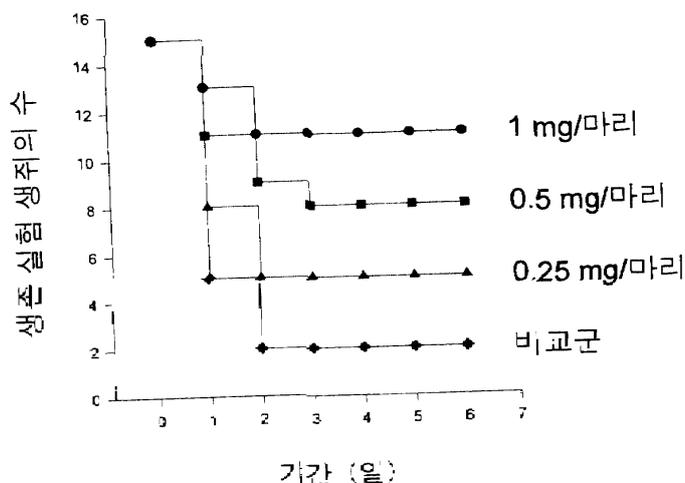
(54) 파테노라이드화합물의 패혈증 치료제로서의 새로운 용도 및 그의 제조방법

요약

본 발명은 파테노라이드(parthenolide)화합물을 종양괴사인자-알파(TNF- α), 나이트릭 옥사이드(NO) 및 프로스타그란딘 E₂(PGE₂)의 합성저해제로 사용하는 새로운 용도 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

보다 상세하게는, 본 발명은 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactone) 화합물인 파테노라이드를 종양괴사인자-알파, 나이트릭 옥사이드 및 프로스타그란딘 E₂의 합성저해제로 이용하는 새로운 용도 및 파테노라이드를 태산목(Magnolia grandiflora L.)에서 추출하는 새로운 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 파테노라이드는 그람음성 세균의 세포벽 성분인 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유발되는 면역질환은 패혈증(sepsis, endotoxemia) 등의 치료제로 널리 이용될 수 있다.

대표도



명세서

도면의 간단한 설명

제1도는 본 발명의 파테노라이드 화합물을 쥐의 대식세포 Raw 264.7세포주에 처리하여 나이트릭 옥사이드

합성(NO)을 저해하는 효과를 측정하여 나타낸 것이다.

제2도는 본 발명의 파테노라이드 화합물을 쥐의 대식세포 Raw 264.7세포주에 처리하여 종양괴사인자(TNF- α) 합성을 저해하는 효과를 측정하여 나타낸 것이다.

제3도는 본 발명의 파테노라이드 화합물을 쥐의 대식세포 Raw 264.7세포주에 처리하여 프로스타그란딘 E₂(PGE₂) 합성을 저해하는 효과를 측정하여 나타낸 것이다.

제4도는 본 발명의 파테노라이드 화합물을 실험생쥐에서 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유도된 치사 독성을 억제하는 효과를 측정하여 나타낸 것이다.

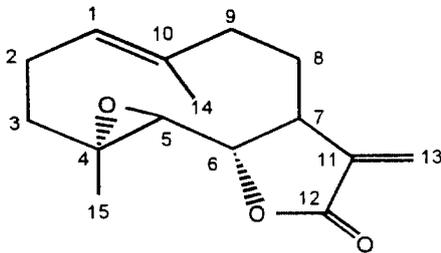
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 하기 화학식1의 파테노라이드(parthenolide)화합물을 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 나이트릭 옥사이드(nitric oxide NO) 및 프로스타그란딘 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)의 합성저해제로 사용하는 새로운 용도 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

화학식 1



보다 상세하게는, 본 발명은 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactone)화합물인 파테노라이드를 종양괴사인자-알파, 나이트릭 옥사이드 및 프로스타그란딘E₂의 합성 저해제로 이용하는 새로운 용도 및 파테노라이드를 태산목(Magnolia grandiflora L.)에서 추출하는 새로운 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 파테노라이드는 그람음성 세균의 세포벽 성분인 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유발되는 면역질환은 패혈증(sepsis, endotoxemia) 등의 치료제로 널리 이용될 수 있다.

패혈증(sepsis, endotoxemia)은 병원성 그람음성 세균이 생체에 감염된 경우 세포벽의 성분인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)가 독소로 작용하여 생체의 면역체계가 과도하게 활성화됨으로써 유발되는 염증 반응으로서, 이는 병원 중환자 병동에 입원한 환자가 사망하는 주요한 원인이 되며 이에 의한 치사율이 보통 30%이상인 매우 심각한 질병이다. 또한, 패혈증은 다양한 항생제에 대한 내성을 갖는 병원균이 점차로 증가하는 현상과 관련하여 그의 치료가 매우 중요한 문제로 대두되고 있으나 아직까지 이에 대한 적합한 치료제가 개발되지 못하였다.

구체적으로 패혈증은 상기 리포폴리사카라이드(LPS)가 생체내의 면역 체계를 과도하게 항진하여 대식세포와 같은 면역세포에서 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-1(interleukine-1, 인터루킨-6 프로스타그란딘(prostaglandin), 류코트라이엔(leucotriene) 및 나이트릭 옥사이드(nitric oxide, NO) 등의 염증 유발 물질을 생산함으로써 유발되는데, 생체 내에서 리포폴리사카라이드에 의한 독성이 나타나는 것은 상기의 각 염증 유발 인자 또는 이들의 상호 상승적 작용에 기인하는 것으로 알려져 있다.

상기에서 보는 바와 같이, 패혈증에서 나타나는 종양괴사인자-알파는 생체내에서 활성화된 대식세포 또는 섬유아세포 등으로부터 생산되는 물질로서 BCG(Bacillus Calmette-Guerin) 또는 리포폴리사카라이드(LP S)를 처리한 동물의 혈청에서 얻을 수 있다. 본 종양괴사인자-알파는 생체내에서 세포를 치사시키고, 프로스타그란딘의 생산을 유도하며, 인터루킨-1 및 인터루킨-6 와 같은 세포분열인자(cytokine)의 생산을 유도하는 등의 기능을 갖는다고 보고되었다. 따라서, 이는 다양한 면역질환과 관련되어 있으며 특히 최근 관심이 집중되고 있는 관절염, 자가 면역질환 및 패혈증 등과 같은 질환에 직접 또는 간접적으로 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 구체적으로 최근 연구를 통해 종양괴사인자-알파 수용체의 유전자가 손상된 쥐는 리포폴리사카라이드에 의한 치사 독성에 저항성을 갖는다고 알려지고, 또 다른 연구를 통해 종양괴사인자-알파에 대한 항체를 쥐에 투여한 경우 상기 치사 독성에 대한 예방적인 효과가 있음이 입증되었다(Beutler, B., Science, 229, 869m 1985; Pfeffer, K. et al., Cell, 73, 457, 2993).

또한, 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 프로스타그란딘은 아라키돈산에서 유래되는 일종의 호르몬으로 다양한 생리 활성을 갖고 있는데, 그 종류로는 프로스타그란딘 E₂(PGE₂), 프로스타그란딘 2 α (PGF 2 α) 그리고 프로스타그란딘 I₂(PGI₂) 등이 있다. 실제로 아스피린 및 인도메타신 같은 비스테로이드성 소염진통제는 이러한 프로스타그란딘의 합성 과정에 작용하는 율속효소인 PGHS(prostaglandin H₂ synthase, 일명 cyclooxygenase 라고도 칭함)를 저해하여 강력한 소염진통 작용을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 상

기의 아스피린 및 인도메타신등은 관절염 등에도 우수한 효과가 있으므로, 프로스타그란딘의 합성을 저해하는 화합물이 상기 작용이외의 소염진통 및 관절염 치료 등의 효과가 있을 것으로 예상할 수 있다.

한편, 최근의 연구를 통해 프로스타그란딘을 합성하는 과정에서 유효효소로 작용하는 PGHS 효소가 정상 상태에서 발현되는 PGHS-1 효소 및 리포폴리사카라이드와 같은 마이토젠 및 세포분열인자(cytokine) 등에 의해 발현이 유도되는 PGHS-2 효소의 2종류로 나누어진다고 보고되었다. 그리고 상기 아스피린은 특정 인자에 의해 발현이 유도되는 PGHS-2 효소에 작용하여 이의 활성을 저해함으로써 약리효과를 나타내고, 정상 상태에서 발현되는 PGHS-1 효소에 작용하여서는 아스피린이 부작용을 나타낸다고 알려졌다.

또한, 나이트릭 옥사이드도 내피세포 또는 대식세포에서 생산되는 물질로서 이에 의해서도 리포폴리사카라이드의 독성이 나타난다. 나이트릭 옥사이드는 생체 내에서 세포를 치사시키거나, 세균을 죽이는 작용을 포함하여 다양한 생리활성을 나타내는데, 특히 혈관 내피세포가 이완하는 과정에 있어서 혈압의 항상성(homeostasis)을 유지하는 작용은 매우 중요하다. 따라서 리포폴리사카라이드에 의한 독성으로 나타나는 주요 증상인 혈압 강하는 리포폴리사카라이드에 의해 합성이 유도된 과량의 나이트릭 옥사이드 때문인 것으로 알려져 있다(Kilbourn, R. G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3629, 1990).

따라서 상기에서 살펴본 종양괴사인자-알파, 프로스타그란딘 및 나이트릭 옥사이드 등의 합성을 저해하는 화합물은 면역질환인 패혈증 등의 치료에 그 효과가 탁월할 것으로 생각된다(Beutler, B., Science, 229, 869, 1985; Pfeiffer, K. et al., Cell, 73, 457, 1993; Kilbourn, R. G. et al., PNAS, USA, 87, 3629, 1990; Novogrodsky, A. et al., Science, 264, 1319, 1996).

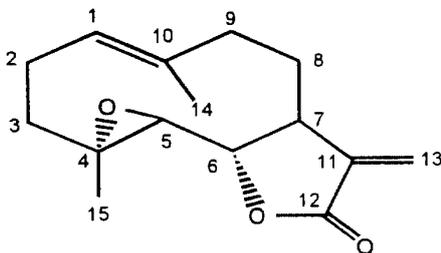
지금까지 연구된 패혈증의 치료제로서는 그람 음성 세균의 세포벽 성분인 리피드 A(lipid A)에 대한 단일 크론 항체, 종양괴사인자-알파(TNF- α)에 대한 항체 그리고 인터루킨-1 수용체(IL-1 receptor)를 차단하는 재조합 단백질 등을 이용하여 개발되었으나 아직 그 구체적인 임상 효능까지는 입증되지 못하였다(Stone, R. Science, 264, 365, 1994)). 또한 최근에는 단백질 타이로신 인산화효소에 작용하는 저해제인 티로포스틴(tyrophostin) 유도제 AG126가 생쥐에서 리포폴리사카라이드에 유발된 치사 독성을 억제하고, 상기 유도제 AG126의 패혈증 치료 효과가 종양괴사인자-알파(TNF- α)의 합성을 저해하는 효과와 관련있다고 보고된 바 있다(Novogrodsky, A. et al., Science, 264, 1319, 1994).

세스퀴테르펜 락톤은 식물에 널리 분포되어 있는 화합물로서 특히 여름흰국화(feverfew)라고 알려진 타나세툼 파테니움 L(Tanacetum parthenium L.)의 추출물에서 분리된 바 있고, 상기 추출물이 편두통을 치료하는 효과를 갖도록 하는 주요 활성 성분으로 알려져 있다(Johnson, E. S. et al., British Med. J., 291, 569, 1985). 또한 세스퀴테르펜 락톤 화합물은 암 세포주에서 세포 독성을 나타내는 것을 포함하여 다양한 생체 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(Satter, E.A. et al., J. Nat. Prod., 59, 403, 1996 ; Picman, A, K., Biochemical systematics and ecology, 14, 255-281, 1986). 최근에는 카라지난(carrageenan)에 의해 유발된 부종 및 관절염과 관련하여 파테노라이드가 포함된 여름흰국화 추출물이 효과가 없다고도 보고되었다(Patrick, M. R. et al., Annals Rheumatic Diseases, 48, 547, 1989). 그러나 지금까지 파테노라이드 화합물이 리포폴리사카라이드 등에 의해 유발된 패혈증(sepsis.endotoxemia)을 치료하는데 효과가 좋다는 사실은 전혀 보고된 바가 없었다.

본 발명자들은 패혈증을 치료할 수 있는 치료제를 개발하고자 다양한 식물의 추출물을 연구한 결과, 목련과에 속하는 태산목(Magnolia grandiflora L.)의 잎과 줄기에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 나이트릭 옥사이드, 종양괴사인자-알파 및 프로스타그란딘 E₂의 합성을 저해하는 활성물질을 찾아, 이를 분리, 정제하고, 그의 화학 구조를 동정하여 이를 이미 보고된 바 있는 세스퀴테르펜 락톤 화합물인 파테노라이드로 확인함으로써, 태산목 추출물 및 파테노라이드 화합물을 패혈증 치료제로 사용하는 새로운 용도를 제공하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 세스퀴테르펜 락톤 화합물인 하기 화학식 1의 구조를 갖는 파테노라이드를 면역질환인 리포폴리사카라이드에 의한 패혈증의 치료제로 사용하는 새로운 용도를 제공함에 그 목적이 있다.



본 발명의 파테노라이드 화합물은 기관지 확장제, 항 히스타민제, 소염진통제 및 항생제 중에서 선택된 하나 이상과 함께 사용하여 패혈증 치료에 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 파테노라이드 화합물을 나이트릭 옥사이드(NO)의 합성 저해제로 사용하는 용도에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 파테노라이드 화합물을 종양괴사인자-알파(TNF- α) 합성 저해제로 사용하는 용도를 제공함에 그, 목적이 있다.

또한, 본 발명은 파테노라이드 화합물을 프로스타그란딘 E₂(PGE₂)의 합성 저해제로 사용하는 용도를 제공함에 그 목적이 있다.

또한, 본 발명은 파테노라이드 화합물을 태산목(Magnolia grandiflora L.)에서 얻는 새로운 제조방법을 제공함에 그 목적이 있다. 구체적으로 태산목의 잎과 줄기를 유기용매인 저급 알코올류, 에테르, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매 등을 사용하여 추출하고 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 및 재결정등을 수행하여 분리, 정제한다.

또한, 본 발명은 파테노라이드가 포함되어 패혈증의 치료제로 사용될 수 있는 태산목 추출물 및 그 제조방법을 제공함에 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactone)화합물인 파테노라이드(parthenolide)가 세포 면역 반응에 관여하는 나이트릭 옥사이드(nitric oxide NO), 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 및 프로스타그란딘E₂(prostaglandin PGE₂)등의 합성을 저해하는 활성을 이용하여, 파테노라이드 화합물을 패혈증의 치료제로 사용하는 새로운 용도를 제공한다.

본 발명은 파테노라이드 화합물을 목련과에 속하는 태산목(Magnolia grand iflora L.)의 잎과 줄기로부터 얻는다. 태산목은 북아메리카가 원산지인 상록교목으로 우리나라 남부지방에서 주로 정원수로 키우고 있는 흔한 식물이다.

우선, 본 발명은 태산목의 잎과 줄기부터 용매를 사용하여 그의 추출물을 분리하고, 태산목 추출물이 리포폴리사카라이드로 자극된 세포주에서 나이트릭 옥사이드, 종양괴사인자-알파 및 프로스타그란딘의 합성을 저해하는 활성을 나타냄을 확인한다.

본 발명은 상기 태산목 추출물에서 나이트릭 옥사이드, 종양괴사인자-알파 및 프로스타그란딘의 합성을 저해하는 활성물질을 분리, 정제하여 그의 화학 구조를 확인한 결과, 이 활성물질이 동식물에서 분리되어 이미 보고된 바 있는 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactone)화합물인 화학식1로 나타낼수 있는 파테노라이드 화합물임을 확인한다.

구체적으로 본 발명의 태산목을 이용하여 태산목 추출물을 얻고 이로부터 파테노라이드 화합물을 분리, 정제하기 위하여, 태산목의 잎과 줄기 등을 먼저 저급 알코올류로 추출한다. 이때 사용하는 알코올은 탄소수 1-4의 저급 알코올을 사용할 수 있다. 상기 추출액은 물과 메틸렌 클로라이드 등으로 분획하여 농축한 다음 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 등을 여러번 수행한다.

이때 전개 용매로는 다이클로로메탄과 시안화메탄의 혼합용매 또는 헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매 등을 사용한다. 구체적으로 다이클로로메탄과 시안화메탄의 비유리 50 : 1에서 3 : 1의 범위의 혼합용매를 사용하는 것이 바람직하고, 10 : 1에서 5 : 1의 비율로 변화시키면서 혼합용매를 사용하는 것은 더욱 바람직하다. 또한 헥산 : 에틸아세테이트의 비율이 10 : 1에서 2 : 1인 범위의 혼합용매도 사용하며, 3 : 1인 혼합용매를 사용하는 것은 더욱 바람직하다.

상기의 과정을 통해 활성물질을 얻고 이를 에테르 등의 유기용매에 용해하여 여과하고 에테르와 헥산 등을 이용하여 재결정함으로써 순수한 파테노라이드 화합물을 회수한다.

본 발명에서 얻은 파테노라이드 화합물의 물리 화학적 성질을 탄소 및 수소 핵자기 공명 스펙트럼 등으로 조사하여, 본 화합물이 기지의 물질과 동일함을 확인한다.

본 발명은 파테노라이드 화합물이 패혈증의 치료에 사용될 수 있는가를 확인하기 위하여, 본 화합물이 나이트릭 옥사이드, 종양괴사인자-알파 및 프로스타그란딘 E₂의 합성에 미치는 효과를 쥐의 대식세포 Raw 264.7 세포주등을 이용하여 조사한다.

상기 파테노라이드 화합물이 나이트릭 옥사이드 합성을 저해하는 효과는 리포폴리사카라이드와 파테노라이드를 세포 배양액에 가하여 나이트릭 옥사이드의 합성을 유도하고 이로부터 생성된 나이트릭 디옥사이드(NO₂)의 양을 덩 등의 방법(Ding A.H, et al ., J. Immunol., 141, 2047, 1988)으로 측정하여 확인한다. 그 결과, 본 발명의 파테노라이드 화합물은 0.5 μ g/ml이상의 농도에서 나이트릭 옥사이드 합성을 73% 이상이나 저해하는 것으로 나타났다(제1도 참조).

상기 파테노라이드 화합물이 종양괴사인자-알파의 합성을 저해하는 효과는 상기 세포에 리포폴리사카라이드와 파테노라이드를 가한 다음 세포 배양액을 회수하여 이제 존재하는 종양괴사인자-알파의 양을 L929세포를 이용한 바이오에세이방법(Aggarwal, B.B.et al., J. Biol. Chem., 260,2345,1985)으로 측정하여 확인한다. 섬유아세포인 L929세포는 종양괴사-알파에 민감하여 상기 효과를 측정하는데 유용하고, L929세포의 생존율은 SRB(Skehan, P. R. et al., J. Natl. Cancer Inst., 82, 1107, 1990)방법으로 측정한다. 그 결과, 본 발명의 파테노라이드 화합물은 1 μ g/ml 농도에서 종양괴사인자-알파의 합성을 80%이상이나 저해하는 것으로 나타났다(제2도 참조).

상기 파테노라이드 화합물이 프로스타그란딘E₂의 합성을 저해하는 효과는 아스피린을 각 웰에 3시간씩 처리하여 세포 내에 존재하는 효소PGHS-1(일명 cyclooxygenase-1)을 불활성화시키고, 리포폴리사카라이드 및 파테노라이드를 세포에 가한다음 각 웰에서 배양 상등액을 회수하여 방사능 면역표지 분석방법(radioimmuno assay)으로 프로스타그란딘 E₂를 정량하여 확인한다. 그 결과, 파테노라이드는 5 μ g/ml이상의 농도에서 프로스타그란딘의 합성을 95%이상이나 저해하는 것으로 나타났다(제3도 참조).

좀 더 구체적으로 본 발명의 파테노라이드 화합물이 패혈증의 치료에 효과가 있는지를 알아보기 위하여, 실험 생쥐에서 리포폴리사카라이드로 유발된 치사 독성이 파테노라이드 화합물의 처리에 의해 억제되는가를 조사한다.

그결과, 리포폴리사카라이드만을 투여한 대조군의 경우는 실험 생쥐의 87%가 3일 이내에 사망하고, 리포폴리사카라이드를 투여하기 2시간 전에 파테노라이드를 미리 가한 실험군의 경우는 투여한 파테노라이드 양에 따라 치사율이 급격히 낮아짐을 관찰할 수 있다. 따라서 본 발명의 파테노라이드는 리포폴리사카라

이드에 의한 치사독성을 현저히 낮추고 그에 대해 생체를 보호하는 효과가 탁월함을 알 수 있다(제4도 참조).

상기의 결과를 통해 본 발명의 태산목 추출물 및 파테노라이드 화합물은 나이트릭 옥사이드, 중앙과사인자-알파 및 프로스타그란딘 E₂의 합성 저해제로 유용하게 사용될 수 있음을 확인한다. 따라서, 상기 태산목 추출물 또는 파테노라이드 화합물을 유효성분으로 하는 약학적 조성물을 패혈증의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 파테노라이드 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 패혈증의 치료를 위해 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 또한 본 발명의 파테노라이드 화합물을 기관지 확장제, 항히스타민제, 항생제 및 소염진통제 등과 약학적으로 허용되는 부형제와 혼합하여 투여하면 더욱 바람직하다.

구체적으로 본 발명의 파테노라이드 화합물은 체중 1kg 당 1-10mg 씩 일 2-3회 투여하는 것이 바람직하나, 패혈증 같은 급성질환에는 체중 1kg 당 10-100mg 씩 1일 2-3회 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

이하 실시예에 의해 본 발명을 상세히 설명한다.

하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1]

[태산목으로부터 파테노라이드 화합물의 분리, 정제]

태산목의 잎과 줄기(1.5kg)를 얻어 잘 건조시킨 다음, 이를 잘게 부수어 실온에서 메탄올 10 L로 3회 반복하여 추출한다. 이렇게 얻은 메탄올 추출액을 농축하여 물과 메틸렌 클로라이드로 분획한 다음 메틸렌 클로라이드 층을 감압 농축하여 65g의 농축한 추출물을 얻었다. 상기 추출물(65g)을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하는데, 이 때 전개 용매로는 다이클로메탄과 시안화메탄의 혼합용매를 사용하고, 구체적으로는 다이클로메탄과 시안화메탄의 비율이 10 : 1에서 5 : 1의 비율인 혼합용매를 사용하였다[CH₂Cl₂ : CH₃CN(10 : 1) → CH₂Cl₂ : CH₃CN(5 : 1)].

상기 과정을 통해 나이트릭 옥사이드의 합성을 저해하는 활성이 가장 높은 분획을 얻어 농축하고 추출물 잔사(5g)를 얻었다. 이렇게 얻은 분획을 이용하여 다시 실리카겔 크로마토그래피를 수행하는데, 이때 전개 용매로는 헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매를 사용하고, 구체적으로는 헥산 : 에틸아세테이트의 비율이 3 : 1인 혼합용매를 사용하였다.

상기의 활성을 가진 성분이 농축되어 있는 분획을 얻어 증발 농축한 결과, 1.5g의 활성물질을 얻고 이를 100ml의 에테르에 용해하여 여과한 다음 그의 여액에 헥산을 가함으로써 활성물질 침전 770mg을 얻었다. 이렇게 얻은 침전물을 다시 에테르와 헥산을 이용하여 재결정하고, 그 결과 순수한 파테노라이드 화합물을 450mg을 회수하였다.

[실시예2]

[태산목으로부터 파테노라이드 화합물의 물리 화학적 성질]

실시예1에서 얻은 태산목 추출물로부터 분리, 정제한 세스퀴테르펜 락톤 화합물인 파테노라이드의 물리 화학적 성질을 다음과 같이 규명하였다.

- 1) 물질의 색상 : 백색 판상 결정
- 2) 분자량 : 248
- 3) 분자식 : C₁₅H₂₀O₃
- 4) 융점 : 113-115°C
- 5) 수소핵자기 공명 스펙트럼

그 결과를 나타내면 다음과 같다

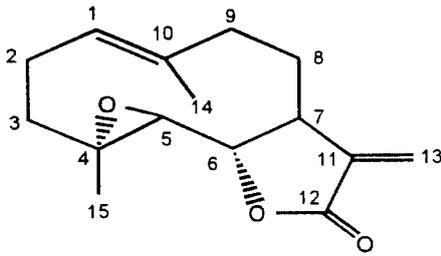
δ : 1.31(3H, s, H-15), 1.72(3H, s, H-10), 2.78(1H, d, J=9Hz, H-5), 3.86(1H, t, J=8Hz, H-6), 5.21(1H, m, H-1), 5.62(1H, d, J=3Hz, H-13), 6.33(1H, d, J=3Hz, H-13)

- 6) 탄소핵자기 공명 스펙트럼

그 결과를 나타내면 다음과 같다

δ : 125.2(CH, C-1), 24.1(CH₂, C-2), 36.3(CH₂, C-3), 61.5(C, C-4), 66.3(CH, C-5), 82.4(CH, C-6), 47.6(CH, C-7), 30.6(CH₂, C-8), 41.4(CH₂, C-9), 134.6(C, C-10), 139.2(C, C-11), 169.2(C=O, C-12), 121.1(=CH₂, C-13), 16.9(CH₃, C-14), 17.2(CH₃, C-15)

7) 화학식



[실시예3]

[파테노라이드에 의한 나이트릭 옥사이드의 합성저해]

본 발명은 파테노라이드 화합물에 의한 나이트릭 옥사이드 합성의 저해 정도를 조사하기 위하여, 쥐의 대식세포 Raw 264.7 세포주를 이용하였다.

상기 Raw 264.7세포주를 DMEM(Dulbecco Modified Eagle's Medium)배지를 이용하여 현탁시킨 다음 96-웰 플레이트에 각 웰당 1×10^5 세포씩 가하고 37°C , 5% CO_2 에서 배양하여 세포를 각 웰에 부착시켰다. 3시간 이 경과한 다음 각 웰이 리포폴리사카라이드는 최종농도가 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 가하고, 파테노라이드는 배지 1ml당 $25\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $0.5\mu\text{g}$, $0.05\mu\text{g}$, $0.005\mu\text{g}$ 이 되도록 가하였다. 배지에 리포 폴리사카라이드와 파테노라이드를 가한다음 20시간 동안 배양하여 배양액 중에서 합성이 유도된 나이트릭 옥사이드로부터 생성된 나이트라이트(NO_2)의 양을 디스크의 방법으로 측정하였다.

구체적으로 설명하면, 상기 세포 배양액 $100\mu\text{l}$ 및 동일 용량의 그리스(Griess)시약[1% 술파닐아마이드(sulfanilamide)를 5% 포스포릭산에 녹인 용액과 0.1% 나프틸에틸렌디아민(naphtylethylene diamine)염산염 수용액을 1 : 1의 비율로 섞은 시약]을 96-웰 플레이트에 가하고 10분동안 방치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 나이트릭 다이옥사이드의 양은 소듐 나이트라이트(NaNO_2)의 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

그 결과, 본 발명의 파테노라이드 화합물은 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 나이트릭 옥사이드 합성을 73%이상이나 저해하는 것으로 나타났다(제1도 참조).

[실시예 4]

[파테노라이드에 의한 종양괴사인자-알파의 합성저해]

본 발명은 파테노라이드 화합물에 의한 종양괴사인자-알파 합성의 저해 정도를 조사하기 위하여, 실시예 3에서와 같이 쥐의 대식세포 Raw 264.7세포주를 이용하였다.

먼저 Raw264.7세포를 DMEM배지에 현탁하여 24-웰 플레이트에 0.5×10^6 세포/ml로 농도로 가하고 37°C , 5% CO_2 에서 배양하여 세포를 각웰에 부착시켰다. 3시간이 경과한 다음 각 웰이 리포폴리사카라이드는 최종농도가 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 가하고, 파테노라이드는 배지 1ml당 $10\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0.5\mu\text{g}$, $0.1\mu\text{g}$, $0.01\mu\text{g}$ 이 되도록 가하였다. 이를 20시간 동안 배양한 다음 세포 배양액을 회수하여 원심분리하고, 이를 투석하여 $0.2\mu\text{m}$ 멤브레인 필터(membrane filter)를 사용하여 여과하였다. 상기 여액중에 있는 각각의 종양괴사인자-알파의 양을 L929세포를 이용한 바이오에세이 방법으로 측정하였다.

구체적으로 설명하면, 종양괴사인자-알파에 민감한 섬유아세포인 L929 세포를 50% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 RPMI배지에 현탁시켜 96웰 플레이트에 웰당 2×10^4 세포가 되도록 가하고 37°C , 5% CO_2 에서 24시간 동안 배양하였다. 그후 배지를 제거하여 악티노마이신-D(Sigma사 제품) 과 상기의 Raw 264.7 세포배양액을 웰당 $50\mu\text{l}$ 되도록 가하고, 소태아 혈청(FBS)도 최종농도 5%되도록 가한 다음 37°C , 5% CO_2 에서 24시간동안 배양하였다. L929세포의 생존율은 SRB방법으로 측정하였다.

그결과, 본 발명의 파테노라이드 화합물은 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 종양괴사인자-알파합성을 80%이상이나 저해하는 것으로 나타났다(제2도 참조).

[실시예 5]

[파테노라이드에 의한 프로스타그란딘 E_2 의 합성저해]

실시예 3에서와 보는바와 같이 파테노라이드 화합물에 의한 프로스타그란딘 합성의 저해정도를 조사하기 위하여, 쥐의 대식세포 Raw 264.7세포주를 DMEM배지 현탁하여 24-웰 플레이트에 세포 0.5×10^6 세포/ml 농도로 세포를 가하고 37°C , 5% CO_2 에서 이를 배양하였다. 20시간동안 이를 배양한 다음 $500\mu\text{m}$ 농도의 아스피린을 각 웰에 3시간씩 처리하여 세포내에 존재하는 효소 PGHS-1을 불활성화시켰다.

이들 세포를 수회 세척한 다음 리포폴리사카라이드는 최종농도가 이 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 가하고, 파테노라이드는 배지 1ml당 $10\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0.3\mu\text{g}$, $0.1\mu\text{g}$, $0.01\mu\text{g}$ 이 되도록 가하여 CO_2 배양기에서 배양하였다. 8시간이 경과한 다음 각 웰에서 배양상등액을 전량(1ml)을 회수하고 방사능 면역표지 분석방법(radioimmuno assay)으로 프로스타그란딘 E_2 를 정량하였다.

구체적으로 설명하면, 세포 배양액 $200\mu\text{l}$ 씩을 취하여 $300\mu\text{l}$ 의 PBS-젤(0.1%젤라틴이 들어있는 인산완충용

액)에 희석한 다음 여기에 방사능이 표지된 프로스타그란딘 [^3H]-PGE₂ 용액 100 μl 와 프로스타그란딘 E₂-항혈청 200 μl 씩을 가하여 잘 섞고 이를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 방치하였다. 이렇게 방치하는 동안에 시료중에 존재하는 프로스타그란딘E₂는 [^3H]-PGE₂와 경쟁적으로 프로스타그란딘 E₂-항혈청에 결합하게 된다. 12시간 동안 방치한 다음 결합하지 않고 유리된 [^3H]-PGE₂와 프로스타그란딘E₂는 활성탄을 가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 방치함으로써 제거한다.

상기 활성탄에 흡착된 [^3H]-PGE₂와 프로스타그란딘E₂는 원심분리하여 제거하고 상층액에 있는 [^3H]-PGE₂와 항체의 결합체(complex)에 존재하는 방사능을 액체 신틸레이션 측정기(Liquid scintillation counter)를 이용하여 측정하였다. 또한 그 측정값에서 프로스타그란딘 E₂의 양을 정량하였다.

그 결과, 파테노라이드는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 프로스타그란딘의 합성을 95%이상이나 저해하는 것으로 나타났다(제3도 참조).

[실시예 6]

[리포폴리사카라이드의 치사 독성을 억제하는 파테노라이드의 효과]

상기의 실시예에서 보는 바와 같이, 파테노라이드 화합물이 쥐의 대식세포 Raw 264.7 세포주에서나이트릭 옥사이드, 종양괴사인자-알파, 프로스타그란딘 E₂ 합성을 강력하게 저해하므로, 본 발명의 파테노라이드 화합물이 패혈증의 치료에 효과가 있는지를 알아보기 위하여 실험 생쥐에서 리포폴리사카라이드로 유발된 치사 독성이 파테노라이드에 의해 억제되는지를 실험하였다.

특정 병원균이 없는(specific pathogen free) ICR마우스(암컷, 22-27g, 6 주령)를 비교군과 파테노라이드 투여군 등 4개의 실험군으로 나누어 각각 15마리씩 실험에 사용하였다. 비교군에는 30% PEG 400만을 200 μl 씩 복강에 주사하고, 파테노라이드 투여군에는 파테노라이드를 각각의 투여군에 1mg/마리, 0.5mg/마리 그리고 0.25mg/마리 용량으로 30% PEG 400에 용해한 파테노라이드를 복강에 투여하였다. 파테노라이드를 투여한지 2시간이 경과한 다음 생리식염수에 녹인 리포폴리사카라이드(Sigma사 제품: E. coli 055 : B5 LPS)를 3mg/마리 용량으로 복강에 투여하고 6일동안에 걸쳐 실험 생쥐의 치사를 관찰하였다.

그결과, 리포폴리사카라이드만을 투여한 대조군의 경우는 실험 생쥐의 87%가 3일 이내에 사망하였으나, 리포폴리사카라이드를 투여하기 2시간 전에 파테노라이드를 미리 가한 실험군의 경우는 1mg/마리 용량에서는 치사율이 27%로 낮아졌고, 0.5mg/마리 및 0.25mg/마리 용량에서도 치사율이 각각 47%와 67%로 낮아졌다. 따라서 본 발명의 파테노라이드는 리포폴리사카라이드에 의한 치사 독성이 현저히 낮추고 그에 대해 생체를 보호하는 효과가 탁월함을 알 수 있었다(제4도 참조).

발명의 효과

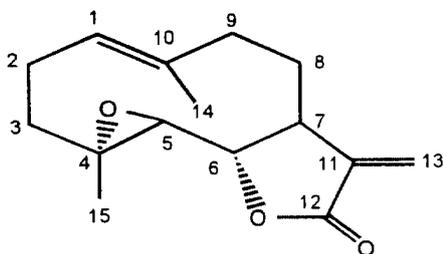
본 발명의 태산목 추출물과 파테노라이드 화합물은 생체 면역 반응에 관여하는 나이트릭 옥사이드, 종양괴사인자-알파 및 프로스타그란딘E₂의 합성을 상기 실시예에서 보는 바와 같이 효과적으로 저해함으로써, 이를 포함하는 약학적 조성물은 지금까지 그 치료에 많은 어려움이 있었던 패혈증을 극복하는 우수한 치료제로 널리 이용될 수 있다.

또한, 본 발명의 파테노라이드 화합물은 태산목으로부터 용이하게 분리, 정제될수 있고 이미 관절염, 염증, 두통 등과 관련성이 알려져 있어 패혈증 치료제 이외에도 다양한 질환의 치료제로서 사용될수 있으므로, 본 발명의 제조방법은 경제적으로 그 유용성이 매우 크다고 할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 파테노라이드 화합물을 유효성분으로 함유하는 패혈증 치료제.



청구항 2

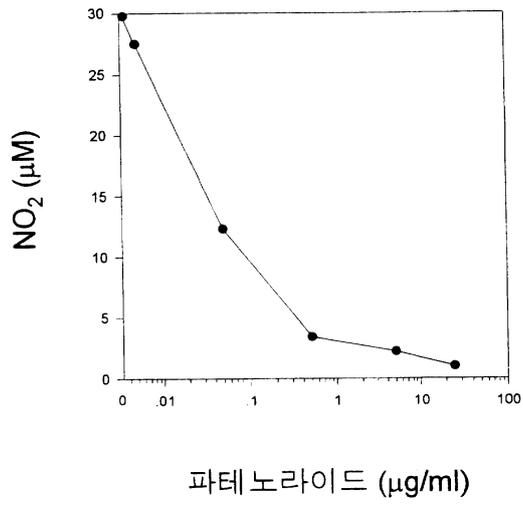
화학식 1의 파테노라이드 화합물을 포함하는 나이트릭 옥사이드의 합성 저해제.

청구항 3

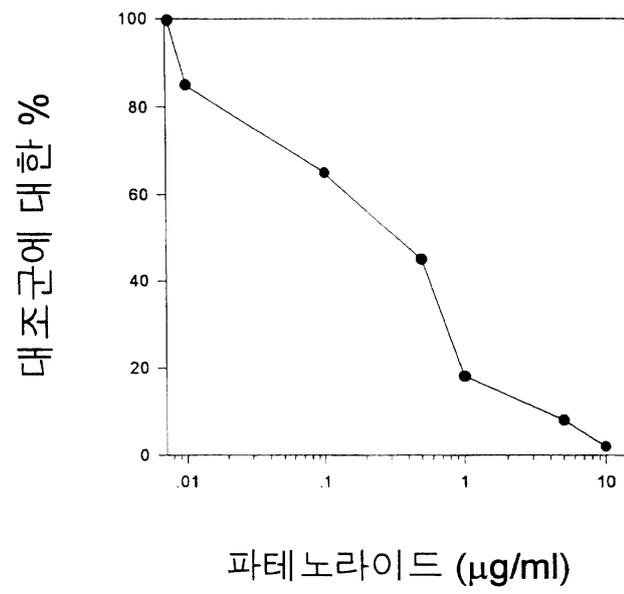
태산목(Magnolia grandiflora L.)을 저급 알코올로 추출하여 분획한 다음 유기용매를 사용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 및 재결정을 수행하여 화학식 1의 파테노라이드 화합물을 제조하는 방법.

도면

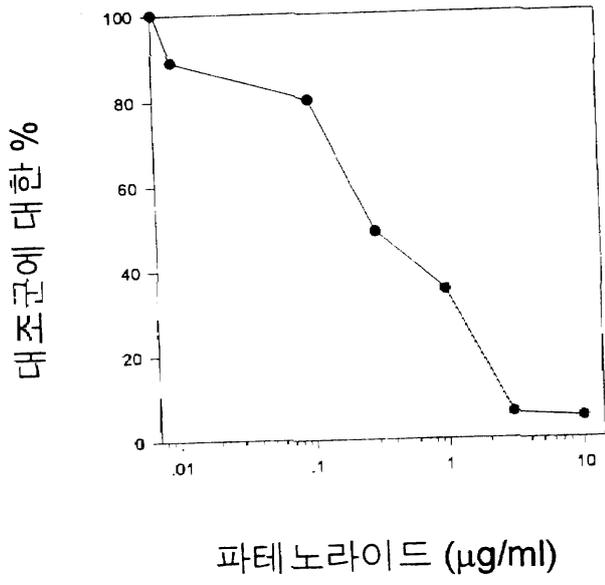
도면1



도면2



도면3



도면4

