



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월27일
 (11) 등록번호 10-1332824
 (24) 등록일자 2013년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 36/47 (2006.01) C07C 69/56 (2006.01)
 C07C 69/533 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0125873
 (22) 출원일자 2011년11월29일
 심사청구일자 2011년11월29일
 (65) 공개번호 10-2013-0059741
 (43) 공개일자 2013년06월07일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020100118667 A*
 Deng, Bin 외 3명. Natural Product Research.
 2010, Vol. 24, No. 16, 페이지 1503-1509.*
 US20110251421 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
케이랩 멀티랩 (주)
 서울특별시 서초구 남부순환로356길 95-3, 3층 4
 층 (양재동, 유나이티드양재빌딩)
 (72) 발명자
이혜정
 서울특별시 관악구 승방길 49, 화목빌라 201호 (남현동)
안준호
 서울특별시 서초구 반포2동 한신3차 아파트 25동
 701호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김홍균

전체 청구항 수 : 총 1 항

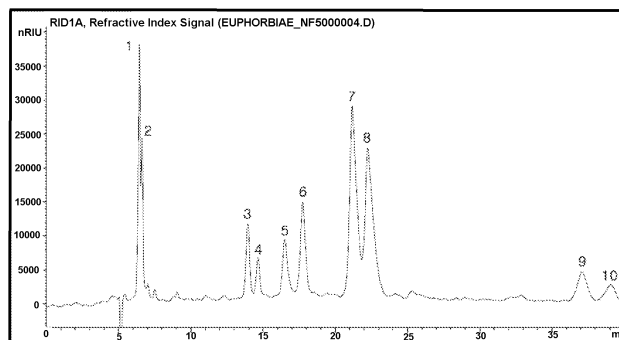
심사관 : 김미화

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

(57) 요약

본 발명은 민대극에서 추출한 인제놀-3-팔미테이트 (Ingenol-3-palmitate) 또는 인제놀-3-미리스티네이트 (Ingenol-3-myristinate) 화합물을 포함하는 항염증 효과를 갖는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 관절염에 강력한 항염증 활성을 나타내는 본 발명의 민대극 (Euphorbia ebracteolata) 추출물 또는 분획물은 천연물 유래의 생약으로서 독성 및 부작용이 없으며, 염증 반응의 핵심 매개물질인 일질소산화물(Nitric Oxide)과 Tumor necrosis factor- α , Interleukin-1 β 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



Mobile phase : 70% Hex / 30% EA Retention time : 40min
 Column : YMC Pack-SIL Injection : 160 times
 Flow rate : 3.0ml/min

(72) 발명자

장용하

서울특별시 성북구 길음2동 동부센트레빌아파트
105동 901호

김수환

서울특별시 송파구 문정동 시영아파트 8동 201호

특허청구의 범위

청구항 1

유효성분으로서 민대극(*Euphorbia ebracteolata*)에서 추출한 인제놀-3-팔미테이트(*Ingenol-3-palmitate*) 또는 인제놀-3-미리스티네이트(*Ingenol-3-myristinate*)를 조성물 내에서 농도가 1 내지 100mg/kg이 되도록 함유하는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이며,

상기 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트 물질은 상기 민대극 건조 뿌리 1kg당 물 또는 에탄올 용매 5 내지 20L를 첨가하고 20 내지 50℃에서 0.5 내지 2일 동안 방치한 후 여과 및 감압 증발시켜 중간 추출물을 얻고,

상기 중간 추출물에 물과 에탄올이 1:1로 혼합된 용매를 첨가하여 물과 에탄올 층으로 분리한 후, 분리된 물 층에 핵산을 첨가하여 유기 물질을 추출하고,

상기 유기 물질을 크로마토그래피로 분획하여 추출하는 방법으로부터 획득되는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 민대극으로부터 유효활성 성분을 추출 및 정제하는 방법과 그 추출물을 함유한 인제놀-3-팔미테이트(*Ingenol-3-palmitate*) 또는 인제놀-3-미리스티네이트(*Ingenol-3-myristinate*)의 생약 조성물 및 이를 이용한 항관절염 효과를 갖는 약학적 조성물에 관한 것이다. 상세하게는 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 생리활성 성분을 추출 및 농축하여 항염증 효능을 갖는 유효물질을 규명하고, 이를 이용한 관절염 치료 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 관절에 노화 등의 퇴행이 발생하면 관절을 구성하는 연골세포 (chondrocytes)에서 관절의 기질물질들인 유형 II 콜라겐 (type-II collagen) 및 프로테오글리칸 (proteoglycan) 등의 합성 저해가 일어나며 인터루킨-1β (interleukin-1β, IL-1β) 및 종양괴사인자-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 등 염증성 사이토카인 (cytokine)이 생성된다. 관절염은 이러한 기작을 통해 관절 기질을 분해하는 기질 금속 단백질 분해효소 (matrix metalloproteinase, MMP)의 합성 및 활성이 증가됨으로 인해 관절조직이 파괴되어 유발되는 질병이다.

[0003] 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. 관절염이 진행되면 MMP-1, 2, 3, 8, 9, 13 등의 발현과 활성이 증가 (Wieland HA et al., Nat Rev Drug Discov 4: 331-344, 2005)한다. 이와 동시에 염증성 사이토카인은 지질대사산물인 프로스타글란딘 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)의 생성을 증가시켜 관절에서 염증반응을 유발시킨다. 그 원인은 불확실하나, 노쇠 현

상이나 과다한 체중과 관계가 깊은 질환으로 알려져 있으며, 이 질환에서는 일차적으로 관절 연골의 퇴행성 변화가 나타난다. 퇴행성 변화는 관절 연골에서 시작되어 연골 세포가 괴사하게 되고, 기질이 카텡신 B (Cathepsin B), 카텡신 D (Cathepsin D), 콜라게나아제 (Collagenase) 등에 의해 파괴된다. 프로테오글리칸 (Proteoglycan)과 콜라겐 (Collagen)의 생성이 파괴정도를 따라가지 못하면 외력에 대한 연골의 적응 능력이 점점 감소하여 결국 연골 하골 조직에 미세 골절 등이 발생하게 된다. 질환이 진행되면, 연골 하골의 경화, 관절 주위에 골의 과잉형성 및 관절의 변형 등이 발생하고 연골의 표면이 거칠어져 관절막으로 싸인 관절강 안에 염증 반응이 반복되어 나타나게 된다. 따라서, 관절염은 반복적인 동통, 관절의 강직감, 관절의 점진적인 운동 장애 등을 일으키게 된다.

[0004] 관절염이 발생하면 관절 내 염증 반응과 함께 통증이 증가하게 되는데, 이러한 통증은 이미 언급된 PGE₂의 생성 때문이다. PGE₂는 사이클로 옥시제네이스-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)라는 효소에 의해 합성되며, 이는 NO, TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인이나 기타 다른 자극에 의해 활성이 증가된다. 또한 골관절염이 진행되면 연골이 파괴되면서 사이토카인, 케모카인, 단백 분해효소 등과 같은 염증 관련 인자들이 분비되어 활액막에 염증을 일으켜 혈청 히알루론산 (hyaluronic acid, HA) 농도가 상승되기도 한다. IL-1 β 와 TNF- α 는 활액막에 분포하는 생체에 직접 손상을 주거나 활액막에 분포되어 있는 감각신경 섬유 및 유해수용기 (nociceptor)를 자극하여 손상을 줄 수 있다. 이러한 염증성 사이토카인들은 연골 세포와 비만 세포로부터 PGE₂와 히스타민을 유리시키며, 이는 다시 유해수용기를 자극하므로 통증을 느끼게 된다.

[0005] 현재 사용되고 있는 관절염의 치료방법은 1차로 적당한 비스테로이드성 항염증 약물 (NSAIDs)을 사용하여 염증을 완화를 시도하고 염증이 심하거나 NSAIDs의 효능이 없으면 스테로이드 제제를 사용한다. 난치성인 경우 면역억제제나 수술요법을 실시하게 된다. 염증 완화에 사용되는 NSAIDs는 주로 COX를 억제하여 염증반응에 관여하는 프로스타글란딘 (prostaglandin)의 생성을 억제함으로써 관절염의 항염증 작용을 나타내지만 위장 장애, 간 장애, 신 기능 장애 등의 부작용을 야기하여 장기간의 사용이 어렵다. 스테로이드 제제 역시 환자에게 사용할 수 있는 가장 빠른 방법으로, 관절염의 항염증 효과가 빠르고 극적으로 나타나는 약물이지만 세균 감염에 대한 저항력을 약하게 하고, 당뇨병의 악화, 부신부전증, 정신 기능 장애 등을 일으키는 것으로 독성이 매우 심각할 뿐만 아니라 치료를 시작하면 중지하기가 어렵기 때문에 사용상 주의가 필요하며, 가능하면 금해야 하는 것으로 알려져 있어 효력이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 관절염 치료제의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 실정이다. 따라서 효능 및 부작용 측면을 고려하면 예로부터 임상적 경험이 풍부하고 안전성 측면에서 탁월한 평가를 받고 있는 천연물 제제가 관절염 질환의 예방 및 치료제 개발에 있어 좋은 후보물질이 될 것으로 생각된다.

[0006] 민대극은 대극과 대극속에 속하는 식물로 전 세계에 약 1,600종이 있으며 우리나라에는 약 11종 및 변종이 자라고 있다. 대극과의 민대극은 뿌리가 좀 더 가늘고, 우리나라 강원도 저지대 풀밭과 전라도 지역의 숲 속에서 드물게 자라는데 이른 봄에 땅으로부터 올라오는 새순이 꽃게의 다리처럼 붉은색을 띠기 때문에 붉은 이름이며, 암꽃과 수꽃에 소포엽이 없다는 뜻에서 민대극이라고 한다. 본 발명에서 제시하는 주성분인 민대극이라는 생약제는 일반적으로 한약제로서 널리 잘 알려져 있을 뿐만 아니라 독성 등의 부작용이 적은 특징을 갖고 있다. 민대극이라는 생약의 관절염에 대해 고유한 약리작용 및 주 효능에 대한 유효성분 분리와 과학적으로 입증될 만한 치료효과를 입증하기 위해 관절염 치료의 핵심인 관절의 연골과 골조직을 보호 유지시키고 재생시키는 것에 초점을 맞추어 본 발명을 완성하게 되었다. 이에 본 발명가들은 내독소 물질을 사용하여 염증을 유발시키고 그 염증을 제거하는 효과를 검색한 결과 민대극 지하부의 핵산 추출물이 유의성있는 염증 제거 활성을 보여, 이로부터 대식세포의 염증에 대하여 효과가 있는 성분을 추적 분리하여 이를 새로운 염증 질환 치료제로 개발하였다.

[0007] 본 발명은 단일 생약제로부터 유효활성 성분을 추출 및 정제하는 방법과 그 추출물을 함유한 생약 조성물 및 이를 이용한 항관절염 치료법에 관한 것으로, 상세하게는 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)을 열수 혹은 알코올성 수용액으로 추출 농축함으로써 관절연골 보호효과를 가지는 관절염 치료법 및 상기 치료를 위한 조성물에 관한 것이다. 민대극 추출물을 제조하여 인터페론 γ /LPS로 자극한 RAW264.7 세포주에서 본 발명의 민대극 추출물이 NO와 PGE₂ 생성 억제, NO 생산 효소인 iNOS 발현 억제, 전염증성 사이토카인인 IL-1 β 발현 억제, TNF- α 발현 억제 등의 우수한 항염증 효과를 가지며, 세포 독성이 전혀 없는 안전한 물질임을 확인함으로써 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 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)에서 관절염에 우수한 항염증 생리활성 성분을 추출, 분획물을 제조하였다. 특히 민대극 분획물 중 높은 면역세포 활성화 효과, 우수한 생체내 염증세포의 파괴능 및 염증세포의 성장을 효과적으로

억제할 수 있는 추출물을 헥산층에서 분리하고 그 효능을 증명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

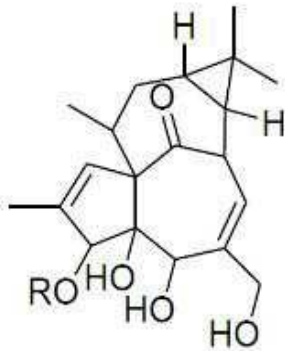
[0008] 본 발명은 민대극 (Euphorbia ebracteolata)에서 면역기능 증강 및 염증성 질환에 효과가 있는 유효물질을 추출하여 이를 이용하여 관절염 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 적절한 실시 형태에 따르면, 유효성분으로서 민대극(Euphorbia ebracteolata)에서 추출한 인제놀-3-팔미테이트(Ingenol-3-palmitate), 인제놀-3-미리스티네이트(Ingenol-3-myristinate)를 포함하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 다른 적절한 실시 형태에 따르면, Ingenol-3-palmitate, Ingenol-3-myristinate는 하기 화학식 1로 나타낸 화합물인 것을 특징으로 한다.

화학식 1



[0011]

[0012] (상기 식에서 R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 또는 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ 이다.)

[0013] 본 발명의 다른 적절한 실시 형태에 따르면, Ingenol-3-palmitate, Ingenol-3-myristinate는 민대극 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 메탄올이 1 : 1로 혼합된 용매를 첨가한 후, 분리된 물 층에 헥산을 첨가하여 유기 물질을 추출하는 단계, 및 상기 유기 물질을 3단계의 크로마토그래피로 분획하여 추출되는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 다른 적절한 실시 형태에 따르면, 알콜 용매는 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 적절한 실시 형태에 따르면, 크로마토그래피는 순상 진공 플래시 크로마토그래피, C18 순상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피로 이루어진 군에서 선택된 1종인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0016] 민대극 (Euphorbia ebracteolata)에서 추출한 화합물은 염증반응에 관여하는 대식세포에서의 일산화질소와 염증 매개 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 및 염증매개인자인 PGE $_2$ 의 활성을 억제한다. 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 항염증제제로서 개발될 수 있으며 염증반응에 의해 발생하는 위염, 대장염, 간염, 관절염 및 동맥 경화, 암 등의 퇴행성 질환의 예방에도 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 민대극 (Euphorbia ebracteolata) 추출물의 지표성분인 인제놀-3-팔미테이트 (Ingenol-3-palmitate) 의

HPLC 크로마토그램이다.

도 2는 민대극 (Euphorbia ebracteolata) 추출물의 지표성분인 인제놀-3-미리스티네이트 (Ingenol-3-myristinate) 화합물의 HPLC 크로마토그램이다.

도 3은 비교예 및 실시예의 민대극 추출물의 면역세포의 독성을 측정하는 것이다.

도 4는 비교예 및 실시예의 민대극 추출물의 NO의 생성 억제량을 측정하는 것이다.

도 5는 비교예 및 실시예의 민대극 추출물의 TNF- α 의 생성 억제량을 측정하는 것이다.

도 6는 비교예 및 실시예의 민대극 추출물의 IL-1 β 의 생성 억제량을 측정하는 것이다.

도 7은 비교예 및 실시예의 민대극 추출물의 PGE₂의 생성 억제량을 측정하는 것이다.

도 8은 실시예의 민대극 추출물 제조과정을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 명세서에서 “관절염” 또는 “염증억제”라 함은, 질병 상태로 진행된 만성 염증, 꽃가루와 같이 일반적으로 무해한 물질에 의한 염증반응, 천식 혹은 퇴행성 관절염과 같은 염증반응 등 인체에 유해한 염증반응의 억제를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에서 “민대극 추출물”이라 함은, 천연물인 민대극으로부터 유효성분을 추출하여 얻어진 것이라면 특별히 한정하지 않고 모두 포함한다. 예컨대, 민대극을 물이나 유기용매에 넣고 정치, 교반, 가압 또는 가열 등의 수단을 통해 유효성분을 용출함으로써 얻어진 결과물을 들 수 있다. 또한, 상기와 같이 얻어진 액상 추출물을 동결건조함으로써 얻어진 동결건조물을 포함한다. 또한, 그러한 동결건조물을 분쇄한 분말을 포함한다. 그 외에도 유효성분을 추출하기 위해 가능한 수단이 무엇이든지 가리지 않고 추출된 모든 추출물을 포함하며, 추출된 후 동결 건조 등의 가공을 거친 것까지도 모두 포함된다. 기타, 증탕이나 상온에 의한 추출법과 같이 예로부터 전해 내려오거나, 한의서 또는 교과서에 기재되어 있는 통상적인 추출법에 의한 추출물을 포함한다. 또한, 특정 활성 화합물들을 분리하기 위한 특별한 추출방법인 Stass Otto 추출법이나 각종 칼럼 크로마토그래피 방법 등을 통하여 얻어진 분획 추출물을 포함한다.
- [0020] 상기 민대극은 채취한 것, 양식한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 일례로 채취한 후 물로 세척하여 이물질 및 염분을 제거한 후 건조하여 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 민대극 추출물은 상기 민대극을 초음파 추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 실시 형태에 따르면, 민대극 추출물은 민대극의 건조 뿌리 1 kg당 물 또는 알코올 용매 5 내지 20 L를 첨가하고 20 내지 50℃에서 0.5시간 내지 2일 동안 방치한 후 여과 및 감압 증발시켜 알코올 추출물을 얻는 단계; 상기 알코올 추출물에 물과 헥산이 1:1로 혼합된 용매를 첨가한 후, 분리된 헥산층에서 유기 물질을 추출하는 단계; 및 상기 유기 물질을 3단계의 크로마토그래피로 분획하여 추출되는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다.
- [0022] 이하에서는 추출 방법을 상세하게 설명한다.
- [0023] 먼저 민대극 (Euphorbia ebracteolata)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 알코올 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.
- [0024] 다음으로 추출된 물질은 감압 여과하고 여액을 진공회전농축기로 20 내지 100℃, 바람직하게는 50 내지 70℃에서 감압 농축한 후 추출된 잔사를 진공 동결 건조기로 건조하여 알코올 추출물을 얻을 수 있다. 수득된 각각의 추출물은 -20℃에서 보관하면서 실험에 이용하였다.
- [0025] 얻어진 알코올 추출물에 대하여 물과 헥산을 1:1 비율로 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층으로 분리한다. 분리된 헥산층을 감압 건조하여 헥산 추출물을 제조한다. 이때 감압 건조 조건은 상기와 같다.
- [0026] 다음으로 헥산 추출물을 순상 진공 플래시 크로마토그래피, C18 순상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피로 연속적으로 분리 정제하여 본 발명의 민대극 추출물을 제조한다. 이때 각 단계의 분획물에 대해서는 항염증 효력

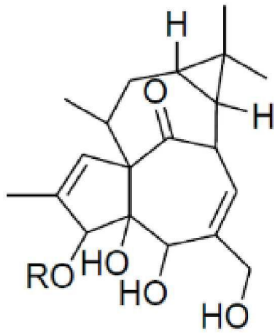
시험을 통하여 유효분획을 선택하고, 선택된 유효 분획을 다음 단계의 크로마토그래피로 분리정제하는 것이 바람직하다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 민대극 추출물을 염증을 억제할 정도의 양으로 투여하는 단계를 포함하는 염증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0028] 이때, 염증을 억제할 정도의 양이란 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게는 0.1내지 500 mg/kg 더욱 바람직하게는 1 내지 100 mg/kg이다. 상기 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 제조된 민대극 추출물은 Ingenane diterpene 계열의 물질로서 하기 화학식 1로 나타내는 화합물을 유효성분으로 포함한다.

[0030] [화학식 1]



[0031]

[0032] 상기 식에서 R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 또는 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ 이다.

[0033] 상기 식에서 R이 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 인 경우에는 인제놀-3-팔미테이트 (Ingenol-3-palmitate)이고, R이 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ 인 경우에는 인제놀-3-미리스티네이트 (Ingenol-3-myristinate)이다.

[0034] 본 발명의 민대극 추출물은 상기 화합물의 이성체도 포함할 수 있다.

[0035] 상기에서 수득된 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 추출물에서 분리된 화합물을 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 생성과 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 염증유발인자인 PGE₂의 활성을 뛰어난게 억제시킴을 확인하였다.

[0036] 상기의 제법으로 수득된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 랫트에 경구투여하고 카라기난으로 뒷발에 부종을 유도하였을 경우에, 대조군과 비교하여 유의적인 부종 억제율을 나타내었으며, 민대극 추출물을 랫트에 경구 투여하고 미코박테리움 부티리시움 (*Mycobacterium butyricum*) 함유 CFA (Complete Freund's Adjuvant)로 뒷발에 만성관절염을 유도하였을 경우에도 대조군과 비교하여 탁월한 소염진통효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0037] 본 발명의 민대극은 오랫동안 생약으로 사용되어 오던 약제로서 이로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.

[0038] 상기 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의 민대극 추출물에서 유래한 화합물은 항염증 효과가 뛰어나며, 매우 안전한 것으로 판단되는바, 항염증용 의약품, 건강기능식품, 기능성 사료 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 생리활성 성분을 함유하는 항염증용 및 염증성 질환의 치료 및 예방을 위한 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하다.

[0040] 또한 본 발명의 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 생리활성 성분을 포함하는 조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0041] 관절염에 탁월한 효능을 나타내는 생리활성 성분을 함유하는 화합물의 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.

- [0042] 본 발명에 따른 화합물을 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. 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물 또는 화합물에 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.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물은 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.
- [0044] 본 발명은 염증성 질환 또는 관절염의 예방 효과를 나타내는 상기 화합물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 민대극 (Euphorbia ebracteolata) 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합체, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0045] 본 발명에 의한 조성물은, 유효성분으로서 민대극 화합물을 전체 조성물 중량 중 0.001 내지 99.9 중량% 함유할 수 있다. 0.001 중량% 이상이어야 효과를 기대할 수 있고, 불순물의 존재 등으로 인해 99.9 중량%를 넘기 어렵기 때문이다.
- [0046] 또한 상기 민대극에서 추출한 화합물은 관절염의 분자생물학적 소견에서 관절염의 항염증 활성을 나타내며, 염증 및 통증 유발 동물에서 소염 및 진통 활성이 탁월하므로, 관절염의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 식품 조성물은, 예를 들어, 츄잉껌, 캐러멜 제품, 캔디류, 빙과류, 과자류 등의 각종 식품류, 청량 음료, 미네랄 워터, 알코올 음료 등의 음료 제품, 비타민이나 미네랄 등을 포함한 건강기능성 식품류일 수 있다.
- [0048] 이때, 상기 식품 중의 상기 민대극 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.001 내지 99.9 중량%로 가할 수 있으며, 음료 중에는 100 mL를 기준으로 0.001 내지 0.1 g, 더 바람직하게는 0.05 내지 0.1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 민대극 화합물을 함유하는 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 민대극 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0050] 상기 외에 본 발명의 건강기능성 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 기능성 식품 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0051] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 비교예 1: 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*) 추출물의 제조
- [0053] 정한인터콥에서 구입한 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 건조된 뿌리 240 g (건조중량)에 메탄올 1 L를 가하여 48시간 방치한 후, 여과하는 과정을 3회 반복하고 감압하에서 용매를 증발 건조하여 메탄올 추출물 16.81 g을 수득하였다.
- [0054] 비교예 2: 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*) 분획물의 제조
- [0055] 상기 비교예 1에 예시된 상기 추출물에 대하여 물과 헥산 (각 200 mL)을 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층을 분리한다. 분리된 헥산층을 감압 건조하여 헥산 추출물인 유기물질 5.27 g을 얻었다.
- [0056] 실시예 1: 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*) 생리활성 유효분획 화합물의 제조 1
- [0057] 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 건조된 뿌리 240 g (건조중량)에 메탄올 1 L를 가하여 48시간 방치한 후, 여과하는 과정을 3회 반복하고 감압 하에서 용매를 증발 건조하여 메탄올 추출물 16.81 g를 수득하였다. 상기 추출물에 대하여 물과 헥산 (각 200 mL)을 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층을 분리하고, 헥산층을 감압 건조하여서 유기물질 5.27 g을 얻었다. 수득한 유기물질을 순상 진공 플래시 크로마토그래피 (normal phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 분획시켰다. 이때 컬럼은 유리필터 컬럼 100x95 (내경 x 길이, mm), 고정상은 TLC용 반분취 실리카 (semi-preparative silica), 용출액으로는 50내지 100% (v/v) 헥산, 에틸아세테이트 혼합용액을 사용하며 세척용액으로는 100% 에틸아세테이트를 사용하였다. 상기 각 분획에 대하여 RAW 264.7 세포에서 염증 유도 인자인 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 NO의 양을 측정하고, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 PGE₂의 양을 측정하여 리포폴리사카라이드를 전혀 처리하지 않은 양성대조군과 리포폴리사카라이드를 처리한 음성대조군과의 비교를 통해서 유효분획 화합물 0.4 g, 0.19 g을 선택하였다. 선택된 유효분획에 대하여 C18 순상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피 컬럼 (C18 normal-phase semi-preparative HPLC column) (YMC Pack-SIL컬럼, 입자직경 5 μ m, 10 X 250 (내경 X 길이, mm), 용출액: 70% (v/v) 헥산/ 30% 에틸아세테이트, 용출속도: 3 mL/min, 굴절율 검출기) 상에서 분리 정제하여, 유지시간 37분과 39분에 용출되는 점액성 액상성분을 수득하였다. 수득한 물질은 Ingenol diterpene ester 계열로 유지시간 37분에 용출되는 인제놀-3-팔미테이트 (Ingenol-3-palmitate) 41.23 mg을 추출하였다. 추출된 물질의 HPLC 크로마토그램을 도 1 및 2에 나타내었다.
- [0058] 실시예 2: 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*) 생리활성 유효분획 화합물의 제조 2
- [0059] 민대극 (*Euphorbia ebracteolata*)의 건조된 뿌리 240 g (건조중량)에 메탄올 1 L를 가하여 48시간 방치한 후, 여과하는 과정을 3회 반복하고 감압 하에서 용매를 증발 건조하여 메탄올 추출물 16.81 g를 수득하였다. 상기 추출물에 대하여 물과 헥산 (각 200 mL)을 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층을 분리하고, 헥산층을 감압 건조하여서 유기물질 5.27 g을 얻었다. 수득한 유기물질을 순상 진공 플래시 크로마토그래피 (normal phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 분획시켰다. 이때 컬럼은 유리필터 컬럼 100x95 (내경 x 길이, mm), 고정상은 TLC용 반분취 실리카 (semi-preparative silica), 용출액으로는 50내지 100% (v/v) 헥산, 에틸아세테이트 혼합용액을 사용하며 세척용액으로는 100% 에틸아세테이트를 사용하였다. 상기 각 분획에 대하여 RAW 264.7 세포에서 염증 유도 인자인 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 NO의 양을 측정하고, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 PGE₂의 양을 측정하여 리포폴리사카라이드를 전혀 처리하지 않은 양성대조군과 리포폴리사카라이드를 처리한 음성대조군과의 비교를 통해서 유효분획 화합물 0.4 g, 0.19 g을 선택하였다. 선택된 유효분획에 대하여 C18 순상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피 컬럼 (C18 normal-phase semi-preparative HPLC column) (YMC Pack-SIL컬럼, 입자직경 5 μ m, 10 X 250 (내경 X 길이, mm), 용출액: 70% (v/v) 헥산/ 30% 에틸아세테이트, 용출속도: 3 mL/min, 굴절율 검출기) 상에서 분리 정제하여, 유지시간 37분과 39분에 용출되는 점액

성 액상성분을 수득하였다. 수득한 물질은 유지시간 39분에 용출되는 인제놀-3-미리스티네이트 (Ingenol-3-myristinate) 37.42 mg을 추출하였다. 추출된 물질의 HPLC 크로마토그램을 도 1 및 2에 나타내었다.

[0060] 실시예 3: 민대극 (Euphorbia ebracteolata) 생리활성 유효분획 화합물의 제조 3

[0061] 민대극 (Euphorbia ebracteolata)의 건조된 뿌리 240 g (건조중량)에 메탄올 1 L을 가하여 48시간 방치한 후, 여과하는 과정을 3회 반복하고 감압 하에서 용매를 증발 건조하여 메탄올 추출물 16.81 g을 수득하였다. 상기 추출물에 대하여 물과 헥산 (각 200 mL)을 첨가하여 혼합한 후, 헥산층과 물층을 분리하고, 헥산층을 감압 건조하여서 유기물질 5.27 g을 얻었다. 수득한 유기물질을 순상 진공 플래시 크로마토그래피 (normal phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 분획시켰다. 이때 컬럼은 유리필터 컬럼 100 x 95 (내경 x 길이, mm), 고정상은 TLC용 반분취 실리카 (semi-preparative silica), 용출액으로는 50내지 100% (v/v) 헥산, 에틸아세테이트 혼합용액을 사용하며 세척용액으로는 100% 에틸아세테이트를 사용하였다. 상기 각 분획에 대하여 RAW 264.7 세포에서 염증 유도 인자인 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 NO의 양을 측정하고, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 PGE₂의 양을 측정하여 리포폴리사카라이드를 전혀 처리하지 않은 양성대조군과 리포폴리사카라이드를 처리한 음성대조군과의 비교를 통해서 유효분획 화합물 0.4 g, 0.19 g을 선택하였다. 선택된 유효분획에 대하여 C18 순상 반-분취 고성능 액체 크로마토그래피 컬럼 (C18 normal-phase semi-preparative HPLC column)(YMC Pack-SIL컬럼, 입자직경 5 μ m, 10 x 250 (내경 x 길이, mm), 용출액: 70% (v/v) 헥산/ 30% 에틸아세테이트, 용출속도: 3 mL/min, 굴절율 검출기) 상에서 분리 정제하여, 유지시간 37분과 39분에 용출되는 점액성 액상성분을 수득하였다. 수득한 각각의 물질은 모두 Ingenol diterpene ester계열로 유지시간 37분에 용출되는 인제놀-3-팔미테이트 (Ingenol-3-palmitate)와 유지시간 39분에 용출되는 인제놀-3-미리스티네이트 (Ingenol-3-myristinate)를 각각 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1의 조성비로 혼합 화합물을 만들었다. 추출된 물질의 HPLC 크로마토그램을 도 1 및 2에 나타내었다.

[0062] [실험재료]

[0063] 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)]

[0064] [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 프로메가사 (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.

[0065] 실험예 1. 세포 배양

[0066] RAW 264.7 마우스 대식세포 (Macrophage)는 우태아혈청 (FBS, Fetal bovine serum, 10%)과 항생제 (antibiotics-antimycotics, 100 U/mL penicillin G sodium, 100 ug/mL streptomycin sulfate and 0.25 ug/mL amphotericin B)가 함유된 DMEM 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건으로 격일마다 계대 배양하였다.

[0067] 실험예 2. 세포 독성 시험 (MTS assay)

[0068] RAW 264.7 마우스 대식세포 (Macrophage)를 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 웰 (well) 당 5 \times 10³으로 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 후, 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물과 셀레록시브, 아세클로페낙을 각각 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 50 μ g/mL의 농도로 투여한다. 투여 후 다시 37 $^{\circ}$ 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 20 μl 씩 첨가하여 1 시간 내지 4 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하면서 반응시킨다. 반응 중지 후 490 nm에서 흡광광도계를 이용하여 흡광도 측정을 한다. 시험물질을 첨가하지 않은 양성대조군을 생존율 100%로 환산하여 시험물질에 대한 실험군에서의 생존율을 계산하여 도 3에 나타내었다.

[0069] 측정결과 도 3에 나타내었다. 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 민대극 추출물 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트는 항염증 효과를 강력하게 유도하는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0070] 도 3을 보면, RAW 264.7 마우스 대식세포 (mouse macrophage cell)에서의 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물 간의 세포독성 효과는 시험 물질이 전혀 첨가되지 않은 대조군, 양성대조군으로 쓰인 셀레루시브, 아세클로페낙과 비교하여 볼 때 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 안전한 물질들임을 확인할 수 있었다.

[0071] 실험예 3. 일질소산화물 (Nitric Oxide, NO) 생성 측정

[0072] 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 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물 및 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물과 셀레루시브, 아세클로페낙 모두 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 투여하고 1시간 동안 배양한다. 배양 후 염증 유발 인자인 리포폴리사카라이드를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 24시간 배양한다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 모두 50 μl 씩 취하여 그리스시약 (Griess reagent) (0.1% 나프틸에틸렌디아민 (naphthylethylenediamine)용액과 1% 술파닐아미드 (sulfanilamide in 5% H₃PO₄) 용액) 180 μl 과 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 아질산나트륨 (sodium nitrite) 용액을 이용하여 작성하였고, 이를 이용하여 흡광도 평균을 아질산염 (nitrite) 양으로 환산하였다. 리포폴리사카라이드만을 처리한 음성대조군에서의 아질산염 (nitrite) 양을 기준으로 하여 시험물질 처리군의 일질소산화물 생성 저해 활성을 비선형회귀분석 (non-linear regression analysis)을 이용하여 각 시험물질의 IC₅₀ (일질소산화물 생성을 50% 저해하는 농도)을 결정하는 방법으로 시험물질 간의 효력을 비교하여 도 4에 나타내었다.

[0073] 도 4에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포 (mouse macrophage cell)에 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물과 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물을 투여한 경우 일질소산화물 (Nitric Oxide, NO)의 생성량을 비교한 결과, 순수한 항염증 활성물질인 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3이 대체적으로 기존의 염증치료제인 셀레루시브, 아세클로페낙에 비해서 우수한 억제효과를 보였음을 확인할 수 있었다. 실시예 1은 음성대조군, 셀레루시브, 아세클로페낙 보다 각각 62.5%, 44.3%, 31.6% 정도의 높은 항염증 효율을 나타냈다. 실시예 2는 음성대조군, 셀레루시브, 아세클로페낙 보다 각각 58%, 38%, 23% 정도의 높은 항염증 효율을 나타냈으며, 실시예 3에서는 대체로 높은 조성비율의 화합물들이 우수한 항염증 효율을 나타냈다.

[0074] 실험예 4. TNF- α , IL-1 β 사이토카인레벨 (Cytokine Level) 측정

[0075] RAW 264.7 셀 (cell)을 24-웰 플레이트 (24-well plate)에 웰 (well) 당 5×10^5 개씩 분주하여 배양하고 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물 및 셀레루시브, 아세클로페낙을 모두 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 투여하고 1시간 동안 배양한다. 배양 후 염증 유발 인자인 리포폴리사카라이드를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 24시간 배양한다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 모두 50 μl 씩 취하여 TNF- α , IL-1 β 함량을 효소면역분석

법 키트 (enzyme immuno assay, EIA)를 사용하여 측정하였다. 각각의 표적 사이토카인에 대한 포획 (Capture) 항체가 부착된 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 세포 배양액을 모두 50 μ l씩 첨가하고 24시간 반응 후 1X assay diluent에 1/250X 비율로 희석된 TNF- α , IL-1 β 항체와 서양고추냉이 페록시다제 (horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체를 각각 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1 \times phosphate buffered saline tween (1 \times PBST) 로 5회 세척한 후 다음 효소기질을 가하여 30분간 반응시킨다. 그 다음 2N-황산 (2N-sulfuric acid)를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응 중지 후 발색된 흡광도는 흡광도계를 사용하여 450 nm 파장에서 측정하였다. TNF- α , IL-1 β 의 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

[0076] 도 5에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포 (mouse macrophage cell)에서의 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물을 투여한 경우, 염증성 사이토카인인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)에 대한 발현 농도를 비교한 결과, 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 화합물이 농도별로 유의하게 중앙괴사인자의 유리를 억제함을 확인하였다. 실시예 1은 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 각각 36%, 18%, 17% 정도의 우수한 항염증 효율을 나타냈으며, 실시예 2는 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 각각 36%, 19%, 18% 정도의 우수한 항염증 효율을 나타냈다. 실시예 3의 화합물들은 대체로 높은 조성비율을 나타낸 화합물에서 우수한 항염증 효과를 보였다.

[0077] 도 6에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포 (mouse macrophage cell)에서의 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물을 투여한 경우, 염증성 사이토카인인 IL-1 β (Interleukin-1 β)에 대한 발현 농도를 비교한 결과, 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3이 농도별로 유의하게 IL-1 β 를 억제함을 확인하였다. 실시예 1은 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 각각 48%, 21%, 7% 정도의 우수한 항염증 효율을 나타냈으며, 실시예 2는 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 각각 55%, 31%, 19% 정도의 우수한 항염증 효율을 나타냈다. 실시예 3의 화합물들은 대체로 높은 조성비율을 나타낸 화합물에서 우수한 항염증 효과를 보였다. 이는 도 5, 도 6에서의 TNF- α , IL-1 β 발현 억제가 염증을 유발시키는 인자인 LPS (Lipopolysaccharide)를 첨가하지 않은 양성대조군 또는 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 우수한 항염증 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0078] 실험예 5. 프로스타글란딘 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 생성 측정

[0079] RAW 264.7 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 현탁하여 24-웰 플레이트 (96-well plate)의 각 웰 (well) 당 5×10^5 개씩 넣어 37 $^{\circ}$ 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 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물 및 셀레콕시브, 아세클로페낙을 모두 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 50 μ g/mL의 농도로 동시 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 리포폴리사카라이드를 1 μ g/mL의 농도로 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상등액을 희석하여 PGE₂ 항체플레이트 (PGE₂ antibody plate)에 가하고 PGE₂-AChE 트래이서 (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 (Ellman'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.

[0080] 도 7에서 확인되는 바와 같이, RAW 264.7 마우스 대식세포 (mouse macrophage cell)에서의 비교예 1과 비교예 2의 민대극 추출물, 실시예 1의 인제놀-3-팔미테이트, 실시예 2의 인제놀-3-미리스티네이트 및 실시예 3의 인제놀-3-팔미테이트와 인제놀-3-미리스티네이트를 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1의 비율로 섞은 화합물을 투여한 경우,

염증을 유발시키는 원인 중 하나인 프로스타글란딘(Prostaglandin E₂)의 농도를 비교한 결과, 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3이 셀레콕시브, 아세클로페낙에 상응하는 우수한 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 실시예 1은 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 항염증 효율이 각각 70%, 47%, 47%로 높게 나타났으며, 실시예 2는 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 각각 58%, 27%, 27% 정도의 우수한 항염증 효율을 나타냈다. 실시예 3의 화합물들은 대체로 높은 조성비율을 가진 화합물이 음성대조군, 셀레콕시브, 아세클로페낙보다 우수한 항염증 효율을 나타냈다. 이는 도 7에서의 PGE₂ 발현 억제가 염증을 유발시키는 인자인 LPS(Lipopolysaccharide)를 첨가하지 않은 양성대조군 또는 셀레콕시브, 아세클로페낙 보다 우수한 항염증 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

- [0081] [제제예 1] 캡슐제의 제조
- [0082] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 200 mg
- [0083] 유당 50 mg
- [0084] 전분 50 mg
- [0085] 탈크 2 mg
- [0086] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0087] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

- [0088] [제제예 2] 정제의 제조
- [0089] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 200 mg
- [0090] 유당 100 mg
- [0091] 전분 100 mg
- [0092] 탈크 2 mg
- [0093] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0094] 통상의 정제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 타정하여 정제를 제조한다.

- [0095] [제제예 3] 액제의 제조
- [0096] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 1000 mg
- [0097] 설탕 2000 mg
- [0098] 이성화당 2000 mg
- [0099] 레몬향 적량
- [0100] 정제수를 가하여 전체 1000 mL로 맞춘 후 통상의 액제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합한 후, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

- [0101] [제제예 4] 건강 기능성 식품의 제조
- [0102] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 1000 mg
- [0103] <비타민 혼합물>
- [0104] 비타민A 아세테이트 70 μg
- [0105] 비타민E 1.0 mg

- [0106] 비타민B1 0.13 mg
- [0107] 비타민B2 0.15 mg
- [0108] 비타민B6 0.5 mg
- [0109] 비타민B12 0.2 μg
- [0110] 니코틴산아미드 1.8 mg
- [0111] 엽산 50 μg
- [0112] 판토텐산칼슘 0.5 mg
- [0113] <무기질혼합물>
- [0114] 산화아연 0.82 mg
- [0115] 탄산마그네슘 25 mg
- [0116] 구연산칼륨 90 mg
- [0117] 탄산칼슘
- [0118] 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.

- [0119] [제제예 5] 건강 기능성 음료의 제조
- [0120] 실시에 1, 실시에 2, 실시에 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 1000 mg
- [0121] 구연산 1000 mg
- [0122] 올리고당 100 g
- [0123] 매실농축액 2 g
- [0124] 타우린 1 g
- [0125] 정제수 포함하여 전체 900 mg
- [0126] 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.

- [0127] [제제예 6] 캡슐제의 제조
- [0128] 실시에 1, 실시에 2, 실시에 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 200 mg
- [0129] 통상의 관절염치료 약물 (NSAIDs) 50 mg
- [0130] 유당 50 mg
- [0131] 전분 50 mg
- [0132] 탈크 2 mg
- [0133] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0134] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다. 상기 NSAIDs로는 공지된 비스테로이드성 항염증 약물을 사용할 수 있으며, 그 함량은 적절히 조절될 수 있다.

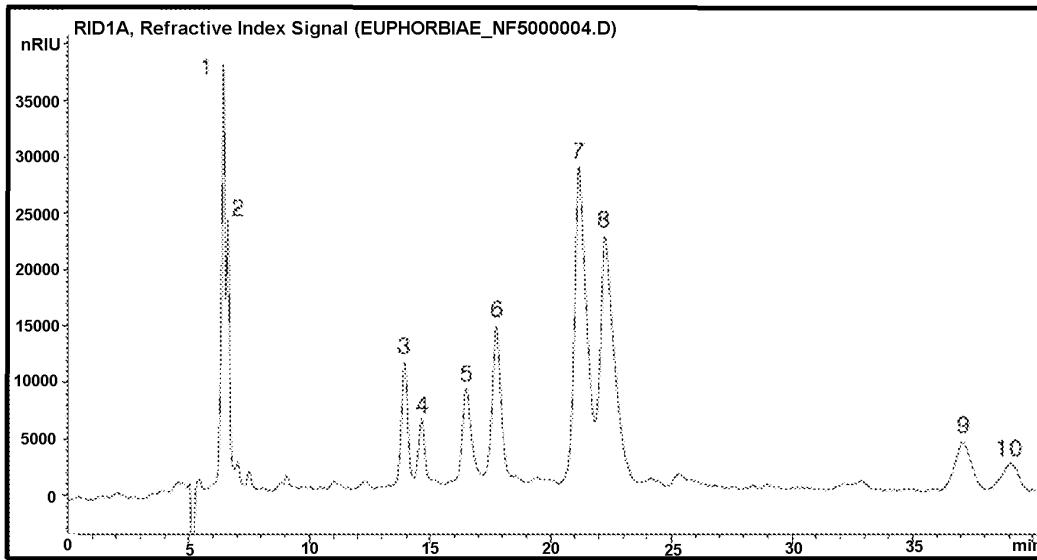
- [0135] [제제예 7] 연고제의 제조
- [0136] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 1.0중량%
- [0137] 요소 20.0중량%
- [0138] 백색 바셀린 15.0중량%
- [0139] 경질 유동 파라핀 6.0중량%
- [0140] 세탄올 3.0중량%
- [0141] 스테아릴알콜 3.0중량%
- [0142] 모노스테아르산글리세릴 5.0중량%
- [0143] 향료 적당량
- [0144] 방부제 적당량
- [0145] 완충제 1.0중량%
- [0146] 정제수 나머지방
- [0147] 통상의 연고제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하여 연고제를 제조한다.

- [0148] [제제예 8] 주사제의 제조
- [0149] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 300 mg
- [0150] 만니톨 180 mg
- [0151] 주사용 멸균 증류수 2,974 mg
- [0152] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0153] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

- [0154] [제제예 9] 로션제의 제조
- [0155] 실시예 1, 실시예 2, 실시예 3의 민대극 추출화합물 (1:1:1) 4.00 (%)
- [0156] 갈조 엑기스 1.00 (%)
- [0157] 시트르산나트륨 0.10 (%)
- [0158] 시트르산 0.05 (%)
- [0159] 1,3-부틸렌글리콜 3.00 (%)
- [0160] 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비 (%)로 로션을 제조한다.

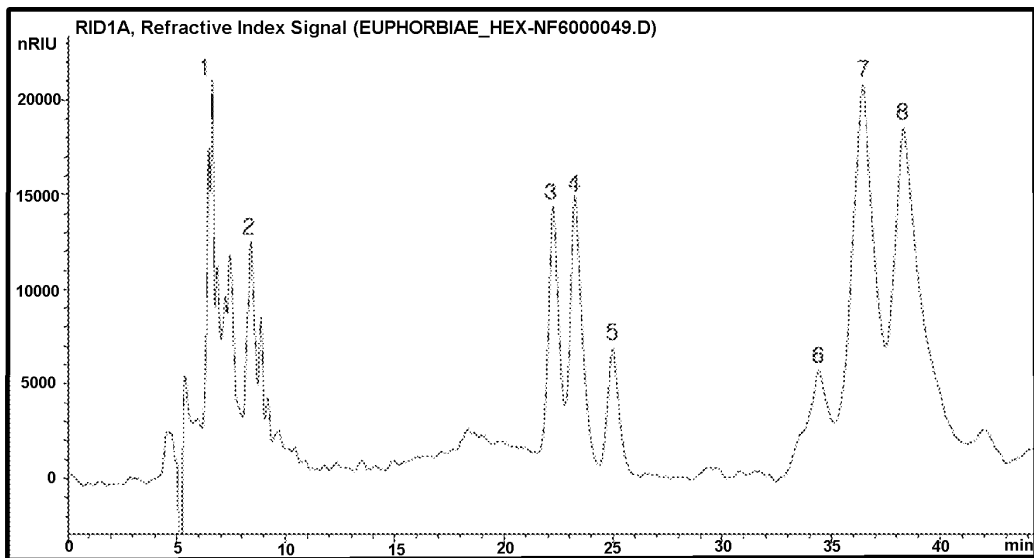
도면

도면1



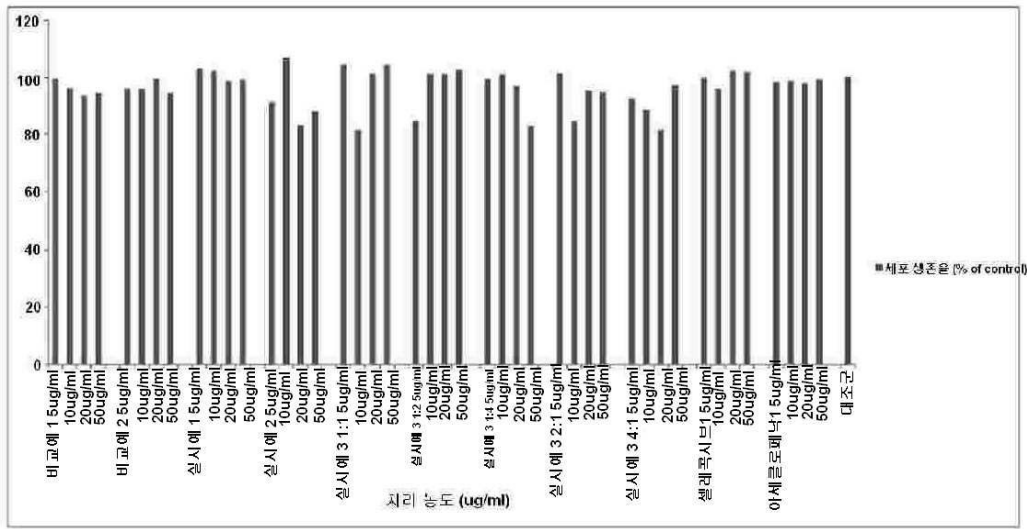
Mobile phase : 70% Hex / 30% EA Retention time : 40min
Column : YMC Pack-SIL Injection : 160 times
Flow rate : 3.0ml/min

도면2

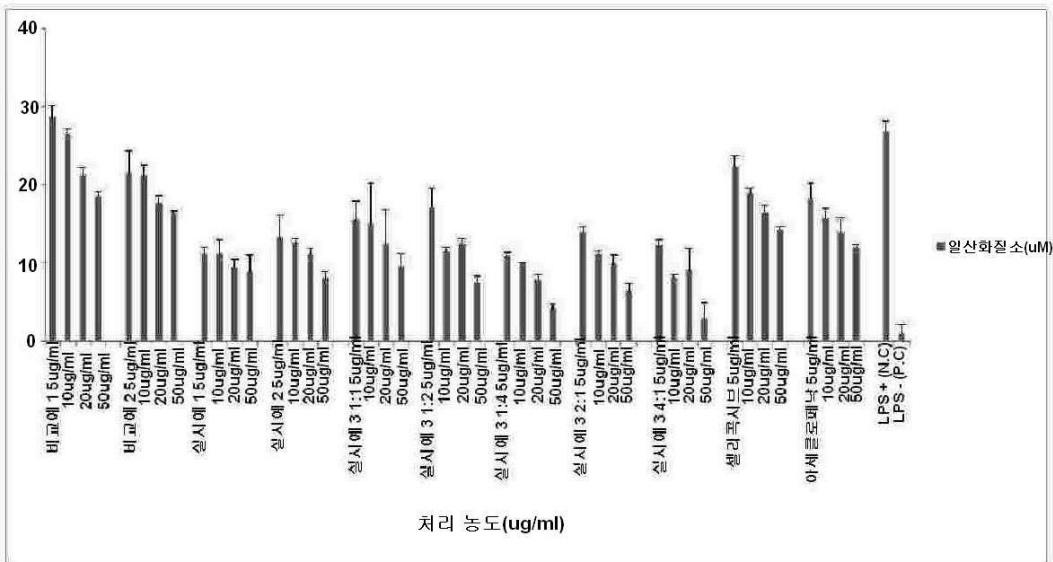


Mobile phase : 70% Hex / 30% EA Retention time : 45min
Column : YMC Pack-SIL Injection : 51 times
Flow rate : 3.0ml/min

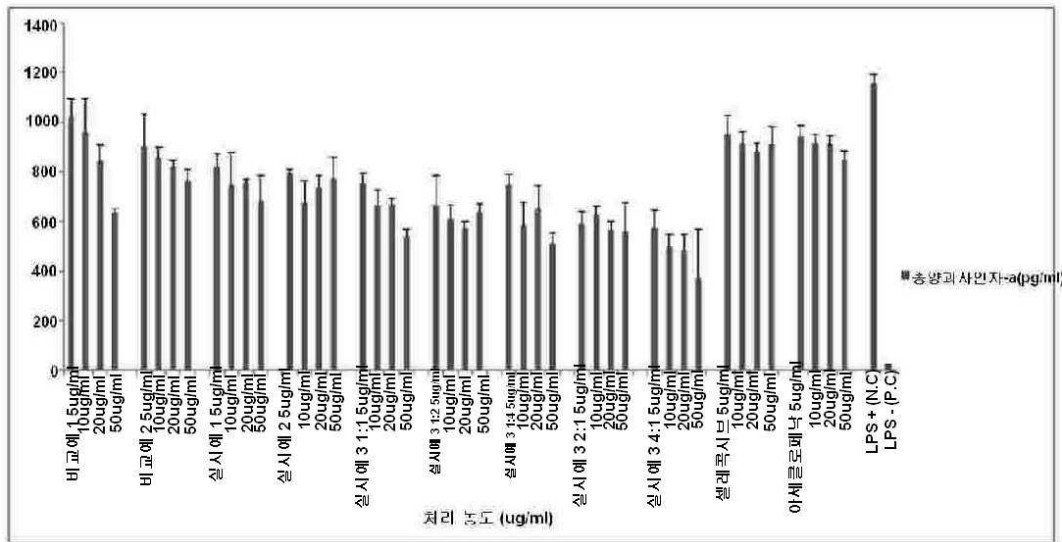
도면3



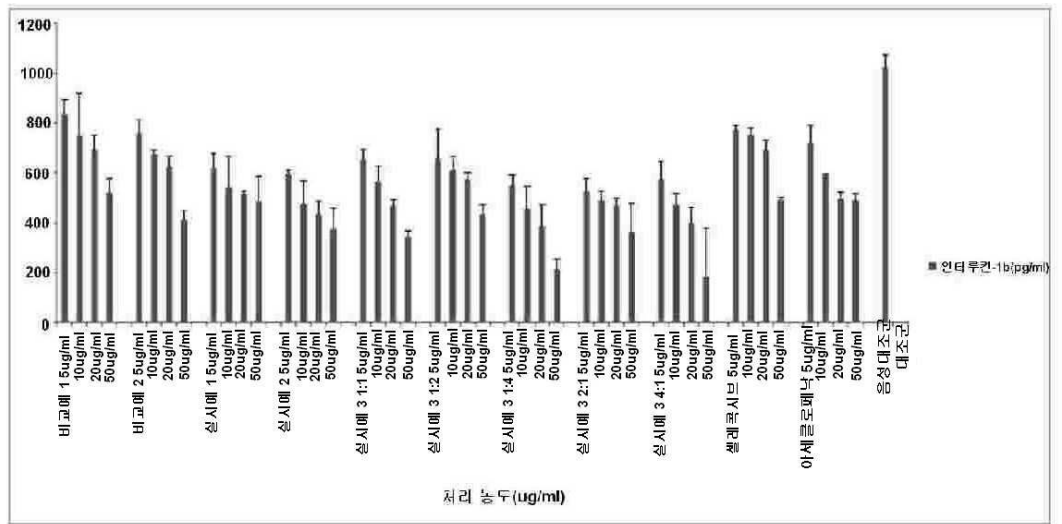
도면4



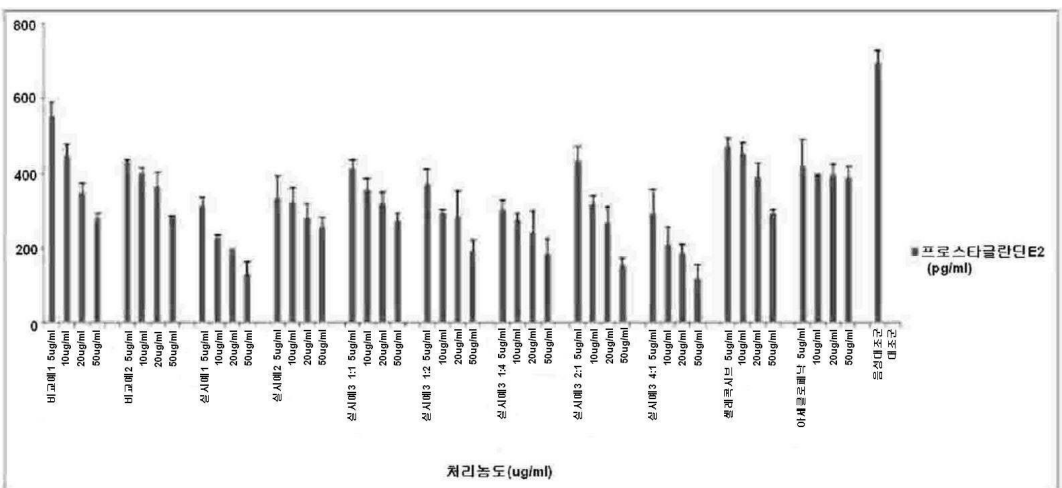
도면5



도면6



도면7



도면8

