



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월11일
(11) 등록번호 10-1987971
(24) 등록일자 2019년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/35 (2006.01) A23K 20/121 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/12 (2006.01) A61K 36/75 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/35 (2013.01)
A23K 20/121 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2018-0000373

(22) 출원일자 2018년01월02일
심사청구일자 2018년01월02일

(56) 선행기술조사문헌

CN104398637 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

오원근
서울특별시 관악구 행운동 관악파크푸르지오 아파트 102동 902호

최상호

대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

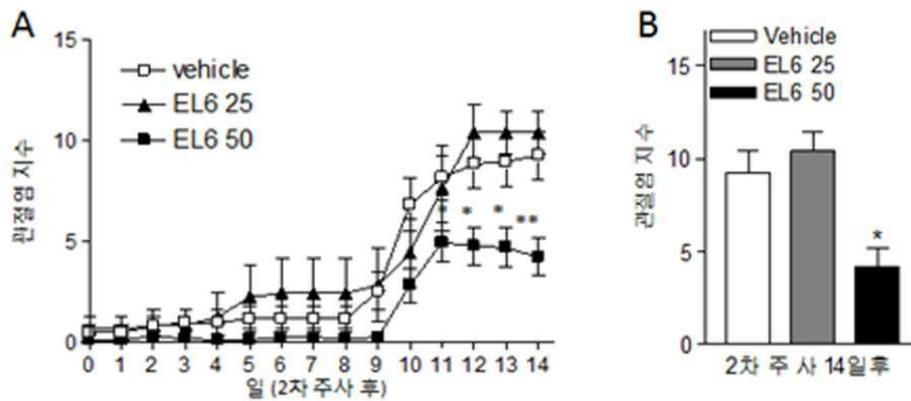
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 방향족 케톤계 화합물, 이를 포함하는 삼차고 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 관절염의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고 (*Melicope pteleifolia*) 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 관절염의 개체에 투여되어 염증, 부종, 및 파누스를 완화하며, 연골 손실 및 골 침식을 완화할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 31/12 (2013.01)
A61K 36/75 (2013.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

CN104857166 A*
 JP2004067625 A
 JP00543643 B
 JP06088443 B
 W02007139887 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(72) 발명자

김용훈

대전광역시 유성구 과학로 125

엄상미

대전광역시 유성구 과학로 125

오세량

대전광역시 유성구 과학로 125

이철호

대전광역시 유성구 과학로 125

박정근

서울특별시 동대문구 망우로 82 삼육보건대학교 사
 택 1-B

이바울

부산광역시 사하구 당리동 에덴아파트 1동 403호

응우옌 반 썩

베트남, 하노이, 호앙 쿠옥 비에트 로드 18, 베트
 남 아카데미 오브 사이언스 앤드 테크놀로지 (브이
 에이에스티)

트란 더 바이트

베트남, 하노이, 호앙 쿠옥 비에트 로드 18, 베트
 남 아카데미 오브 사이언스 앤드 테크놀로지 (브이
 에이에스티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017075031
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 원천기술개발사업
 연구과제명 해외생물소재 확보 네트워크 운영 및 활용지원
 기 여 율 60/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2017.10.01 ~ 2018.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9B8069409
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오. 의료기술개발
 연구과제명 식물 생리활성물질자원은행
 기 여 율 40/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2017.07.01 ~ 2017.12.31

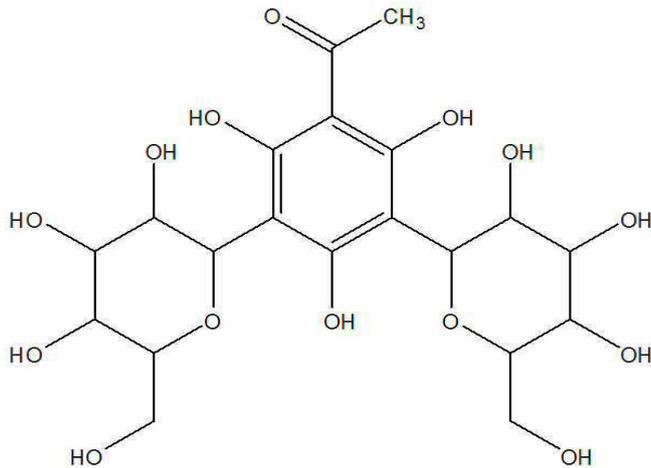
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물로부터 수득되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 분획물은 삼차고 추출물을 이온교환수지에서 5 내지 50%(v/v)의 에탄올로 용출시킨 것인, 약학적 조성물.

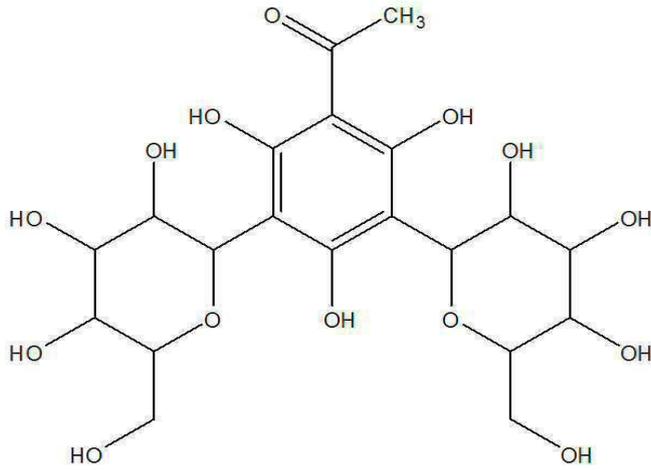
청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 관절염은 급성 류마티스성 관절염, 만성 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 타박성 관절염, 통풍성 관절염, 위축성 관절염, 만성 염증성 관절염, 변형성 관절염, 감염성 관절염, 폐경기 관절염, 단절성 관절염, 비대증 관절염, 또는 화농성 관절염인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 분획물을 유효성분으로 포함하며, 상기 분획물은 삼차고 추출물을 이온교환수지에서 5 내지 50%(v/v)의 에탄올로 용출시킨 것인, 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

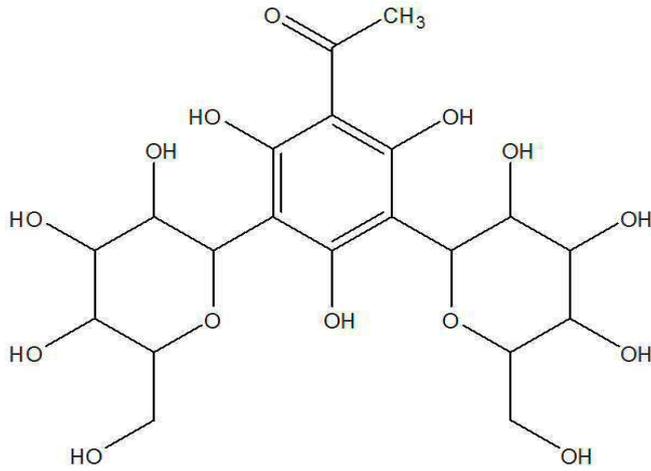
[화학식 1]



청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



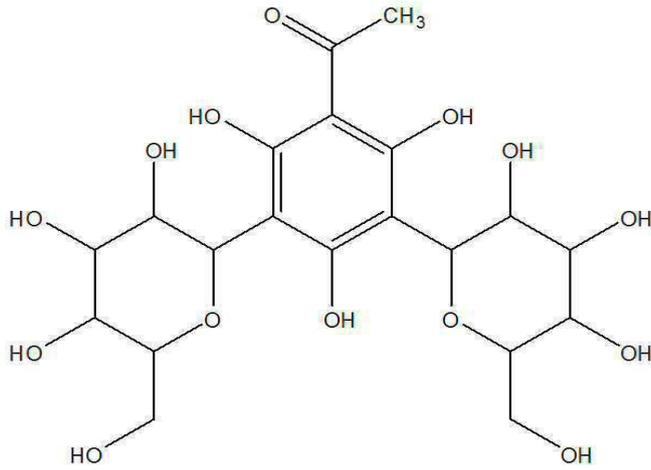
청구항 8

제7항에 있어서, 상기 화합물은 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물로부터 획득되는 것인, 식품 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 분획물을 유효성분으로 포함하며, 상기 분획물은 삼차고 추출물을 이온교환수지에서 5 내지 50%(v/v)의 에탄올로 용출시킨 것인, 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

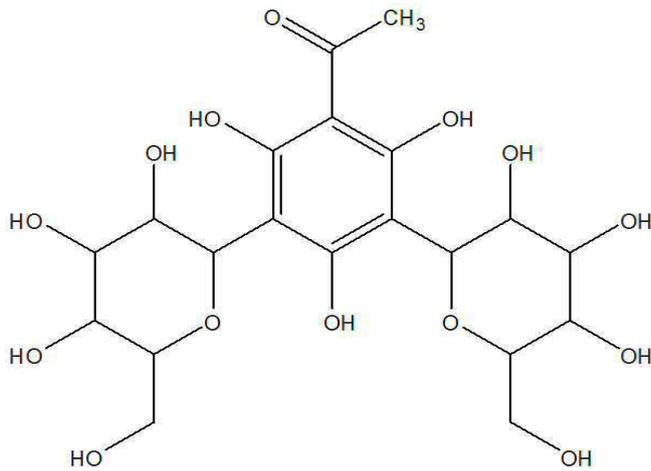
[화학식 1]



청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선용 사료 조성물:

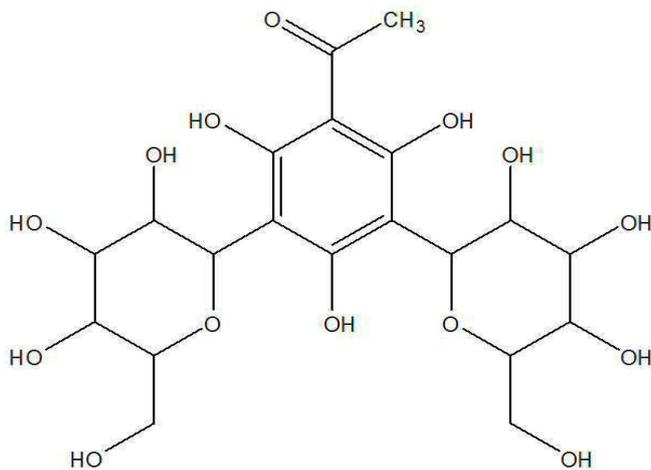
[화학식 1]



청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료 방법:

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 방향족 케톤계 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고 (*Melicope pteleifolia*) 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 관절염(arthritis)은 여러 가지 원인에 의해 관절, 특히 무릎 관절에 염증이 생긴 것으로, 부종과 발열이 동반된다. 관절염은 적어도 100가지 이상의 형태로 분류될 수 있으나 가장 빈번히 발병하는 것은 퇴행성 관절염 (osteoarthritis, OA)과 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)이다.

[0004] 퇴행성 관절염은 가장 일반적인 관절염의 형태로, 관절 연골이 점차 마모되어 진행되는 퇴행성 질환이며 대부분 중년 및 노년층에 흔히 나타나게 된다. 관절 연골의 손상을 가져오는 원인으로는 체중과다, 관절의 외상, 주위 뼈의 질환, 근육의 약화, 관절의 신경 손상, 등이 있다. 이밖에 유전적인 소인에 의해서도 발생할 수도 있다. 퇴행성 관절염이 주로 발생하는 관절은 고관절, 슬관절, 요추 등이며, 손가락이나 발가락 등에서 발생할 수도 있다. 퇴행성 관절염은 류마티스 관절염과 달리 손목이나 팔꿈치, 발목 등에는 잘 발생하지 않는다.

[0005] 류마티스 관절염은 전신성 염증질환으로 인구의 1%의 유병률을 가지는 관절염의 하나로 자가면역 기전에 의해 유발되는 염증 반응으로, 심하고 급격한 관절 파괴와 이에 상응하는 기능 장애를 가져오는 대표적인 난치성 질환이다(허남욱 외, 국민건강영양조사를 이용한 한국인 관절염의 유병률 현황과 연도별 변화, 대한류마티스학회지, Vo. 15, No.1, page 11-26, March 2008).

[0006] 류마티스 관절염은 관절염 중에서도 가장 심각한 이환과 기능 장애를 일으키며, 치명율은 장기적으로 볼 때 악성 종양이나 심혈관계 질환의 치명율과 비슷한 것으로 알려져 있다. 활막에 비세균성 염증 반응이 만성적으로 나타나며, 이로 인해 활막이 증식되고 활액의 양이 증가하여 관절의 부종과 동통을 초래하는 것을 특징으로 한다. 류마티스 관절염은 관절뿐만 아니라 몸의 여러 기관에 영향을 미치므로 류마티스성 질환으로 불리기도 한다. 주요 특징으로는 면역반응의 활성화가 있는데 이러한 반응을 일으키는 정확한 요인에 대해서는 아직 정확히 알려지지 않았으나 자가면역 반응이 이 질환의 만성화와 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, 류마티스 관절염은 염증성 매개체들과 사이토카인의 국소적인 방출과 함께 T 세포가 중요한 역할을 하여 결과적으로 관절을 파괴하는 지속적인 자가면역 반응으로, 나타나는 주요 증상은 피로, 무력감, 동통 등이며 관절염이 진행되면서 발열 및 체력쇠약을 동반한다.

[0007] 관절염의 대표적인 치료제로는 골 관절염에서와 같이 Cox-2 억제제가 주로 사용되어 염증 감소를 통한 급성 통증 감소, 및 관절 기능 개선을 목적으로 사용되나, 류마티스 관절염 환자의 직접적인 치료나 관절 파괴 예방 등의 효과는 기대하기 어려운 실정이다.

[0008] 또한, 류마티스 관절염 치료 시에 비스테로이드성 항염제(NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug)를 사용하여 관절이 붓고 아픈 증상을 좋아지게 하는데 효과를 보고 있지만, 이 약물은 관절부위 연골 손실이나 질병의 진행을 막을 수는 없으며, 장기간 사용시 위십이지장 궤양 등의 소화기 부작용이 문제될 수 있다. 스테로이드 호르몬제도 염증을 조절해 주는 약제이나 얼굴이 둥그렇게 되고, 체중이 늘며, 당뇨병, 고혈압 등이 발병될 수 있으므로 가능한 저용량을 사용해야만 한다.

[0009] 이러한 부작용 및 결점을 지니고 있어 효과적이고 안전한 관절염 치료제의 개발에 대한 요구가 지속되고 있으며, 특히 류마티스 관절염의 치료를 위해서는 약제를 장기간 복용할 필요가 있기 때문에, 부작용이 적은 약제를 개발하는 것이 매우 중요하고 시급한 문제가 되고 있다.

[0011] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 인체에 무해한 천연 추출물 중 관절염의 예방 또는 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 방향족 케톤계 화합물, 이를 포함하는 삼차고 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 관절염의 예방 또는 치료용 조성물이 관절염의 개체에 투여되어 염증, 부종, 및 파누스를 완화하며, 연골 손실 및 골 침식을 완화할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

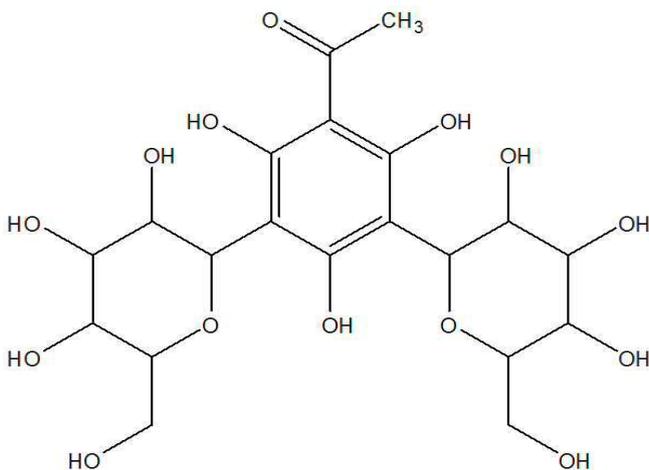
해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 하나의 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0019] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0020] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0022] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태로서 본 발명은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

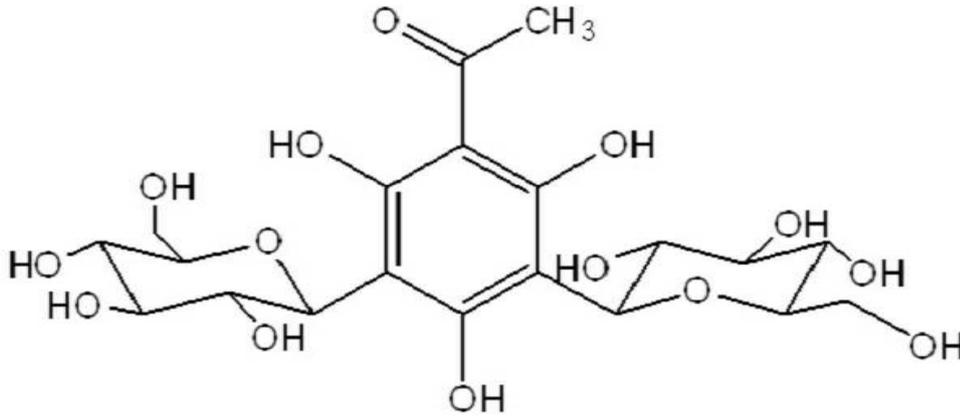
[0023] [화학식 1]



- [0024]
- [0025] 본 발명에서 "화학식 1로 표시되는 화합물" 이 관절염의 예방 또는 치료용도로 사용될 수 있다. 상기 화합물은 본원에서 화합물 1이라고도 명명한다. 상기 추출물 또는 분획물로부터 분리될 수 있으나, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이라면 입수 방법에 제한되지 않고, 관절염의 예방 또는 치료용도에 사용될 수 있다.
- [0026] 상기 화합물 1은 상기 화학식 1의 구조를 가지면서 관절염의 예방 또는 치료용도를 나타내는 한 입체이성질체의 종류에는 제한되지 않는다. 구체적으로, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물과 같이, β-D-글루코스 배당체가 유

효성분으로 사용될 수 있다. 이는 본원에서 EL6로 명명한다.

[0027] [화학식 2]



[0028]

[0029] 상기 화합물 1은 관절염의 개체에 투여되어 염증, 부종, 및 파누스를 완화하며, 연골 손실 및 골 침식을 완화할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 관절염 동물모델에 EL6를 투여한 결과, 염증, 부종, 및 파누스가 완화되며, 나아가 연골 및 침식 정도가 완화된 것을 확인하였다(실시예 2).

[0030] 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 개체에 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화합물 1의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 또한, 상기 화합물 1은 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합하거나 집합으로 사용될 수 있다.

[0031] 상기 본 발명의 화합물 1의 약학적으로 허용가능한 염은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 제조된 염을 의미하며, 이러한 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 구체적으로, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 약리학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 하기 무기산과 유기산 및 염기로부터 유도된 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0032] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0034] 본 발명은 상기 화합물 1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염뿐 아니라 이로부터 제조될 수 있는, 동일한 효능을 나타내는 용매화물이나 수화물 모두 본 발명의 범주 내로 포함할 수 있다.

[0035] 본원에서 사용되는 용어, "삼차고" (三苦)는 *Melicope pteleifolia*의 학명을 가지는 Rutaceae과의 관목이다. 해발 2300 내지 2800m 부근의, 상록수와 낙엽수가 혼합된 숲과 숲의 가장자리, 덩굴, 늪지대 숲 등에 서식한다. 구체적으로, 캄보디아, 라오스, 미얀마, 태국, 대만, 베트남 등에서 주로 서식한다. 본 발명에서 삼차고는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어, "추출물"은 삼차고를 추출하여 수득한 추출물을 의미한다. 상기 삼차고 추출물은 삼

차고 분쇄물을 건조 중량의 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올 등과 같은 탄소수 1(C₁) 내지 4(C₄)의 저급 알코올의 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매를 용출 용매로써 사용하고, 추출 온도는 20 내지 100 °C, 바람직하게는 실온에서, 추출 기간은 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출할 수 있으나, 관절염의 예방 또는 치료 활성이 있는 물질, 구체적으로 화학식 1의 화합물을 추출하는 방법이라면 제한없이 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 초음파 추출기를 이용하여 물 또는 에탄올로 1 내지 3 시간씩, 수회 추출한 결과물이 될 수 있으나, 관절염의 예방 또는 치료 활성을 나타낼 수 있는 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함한다. 상기 삼차고 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 뿌리, 지상부, 줄기, 잎, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하다. 본 발명의 일 실시예에서는 삼차고 있을 분쇄한 후 물 또는 에탄올을 넣고 2시간 초음파 추출하였다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서는, 삼차고 추출물이 70% 에탄올을 사용한 추출 조건에서 화합물 1로서 EL6의 함유량이 가장 높게 나타났으나, 추출되는 추출량 및 화합물 1을 함유한 분획물을 최적화하기 위한 레진의 사용 편의성을 고려하여, 물 이나 다른 농도의 에탄올을 사용하여 추출할 수 있다.

[0038] 본원에서 사용되는 용어, "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명의 분획물은 관절염 예방 또는 치료에 사용되는 물질, 특히 화합물 1을 함유하는 분획물을 수득하기 위한 방법이라면 그 방법에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 삼차고 분획물은 전술한 삼차고 추출물을 1 내지 10배량의, 구체적으로 5 내지 8배량의 물로 현탁한 후, 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 용매 분획법 등 다양한 분획방법을 이용하여 분획물을 수득할 수 있다.

[0039] 보다 구체적으로, 삼차고 추출물을 용매의 흐름 하에 이온 교환수지에 통과시켜 추출물을 분획하는 방법을 이용할 수 있으며, 본 발명에서 삼차고 추출물을 분획하기 위하여 사용한 이온 교환수지는 합성흡착제로 방향족계 무치환 수지(디아이온 HP-20류, SP825류, AXT204류, XAD1600T류, MN200류) 중의 하나일 수 있다. 상기 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethylacetate), 아세톤(acetone), 클로로포름(chloroform) 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 구체적으로, 탄소수 1(C₁) 내지 4(C₄)의 저급 알코올 용매를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로 5 내지 50%(v/v)의 에탄올 용매를 사용할 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 디아이온 HP-20을 흡착제로 하고, 40% (v/v) 에탄올 용매를 사용하여 수득한 분획물에서 EL6의 함유량이 가장 높게 나타났다. 또한, 상기 일실시예의 분획물을 관절염의 동물 모델에 투여한 결과 염증과 부종, 파누스가 완화됨을 확인하였다(실시예 2).

[0040] 본원에서 사용되는 용어, "관절염"은 개체의 관절에 염증이 발생하는 현상과 이로부터 수반되는 증상을 포함한다. 상기 관절염은 통증, 부종, 파누스 및/또는 뻣뻣한 증상 등을 수반할 수 있다.

[0041] 본 발명에서, 관절염이란 관절염으로 분류되는 모든 질환을 포함하고, 그 중 급성 류마티스성 관절염, 만성 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 타박성 관절염, 통풍성 관절염, 위축성 관절염, 만성 염증성 관절염, 변형성 관절염, 감염성 관절염, 폐경기 관절염, 단절성 관절염, 비대증 관절염, 또는 화농성 관절염 등일 수 있으며, 보다 구체적으로, 본 발명에서 상기 관절염은 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 타박성 관절염, 또는 통풍성 관절염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명의 유효성분인 화합물 1로서 EL6은 관절염의 개체에 투여되어 염증, 부종, 및 파누스를 완화하며, 연골 손실 및 골 침식을 완화할 수 있는바(실시예 2), 본 발명의 조성물은 단순히 염증이 완화되는 수준을 넘어 직접적인 관절염 치료를 달성할 수 있다.

[0043] 본원의 약학적 조성물은 관절염의 "예방"(prevention) 및/또는 "치료"(treatment)의 용도를 갖는다. 예방적 용도에 있어, 본원의 약학적 조성물은 본원에 기술된 질환, 장애, 또는 상태를 가지고 있거나 발병 위험이 있는 것으로 의심되는 개체에 투여된다. 치료적 용도에 있어, 본원의 약학적 조성물은 본원에 기술된 장애를 이미 앓고 있는 환자와 같은 개체에 본원에 기술된 질병, 장애, 또는 상태의 증상을 치료하거나 적어도 부분적으로 정지시키기 위해 충분한 양으로 투여된다. 이러한 사용에 효과적인 양은 질환, 장애 또는 상태의 심각도 및 경과, 이전의 치료, 개체의 건강 상태와 약물에 대한 반응성, 및 의사 또는 수의사의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0044] 본원의 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 화합물 1의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.

[0045] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

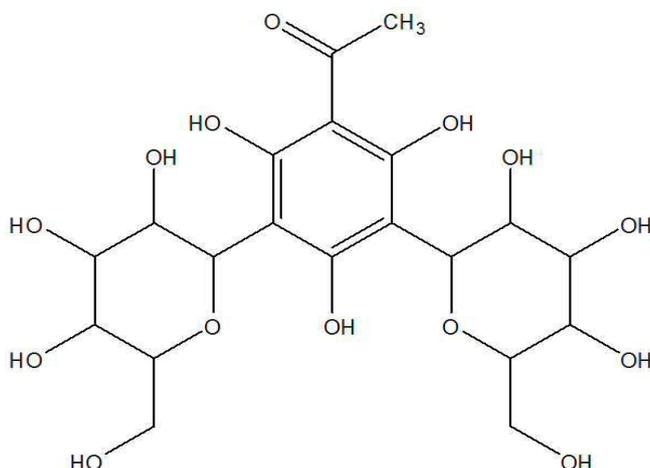
[0046] 본 발명의 조성물은 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 조성물은 관절염의 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함한다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0048] 본원의 약학적 조성물이 상기 개체에 투여될 경우, 염증, 부종, 및 파누스가 완화되며, 연골 손실 및 골 침식이 완화될 수 있다.

[0050] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

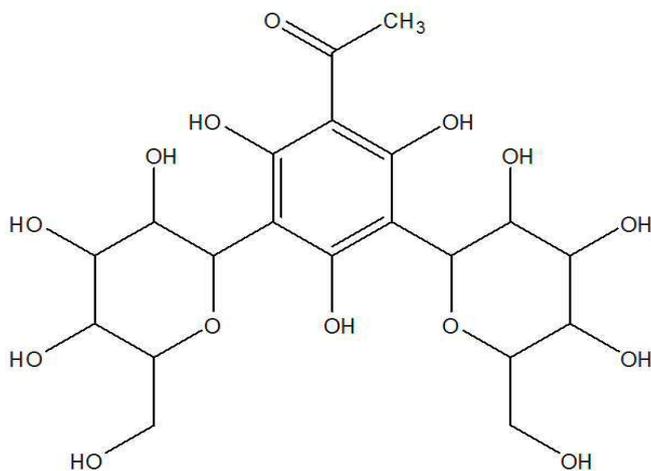
[0051] [화학식 1]



[0052]

- [0053] 여기에서 사용되는 용어는 상기에서 설명한 것과 같다.
- [0054] 본원에서 용어, "개선"은 화합물 1을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 관절염의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0055] 본 발명의 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 칩제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 견, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0056] 본 발명의 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로 화합물 1을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다.
- [0058] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0059] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함한다. 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.
- [0062] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은, 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 관절염의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0063] [화학식 1]

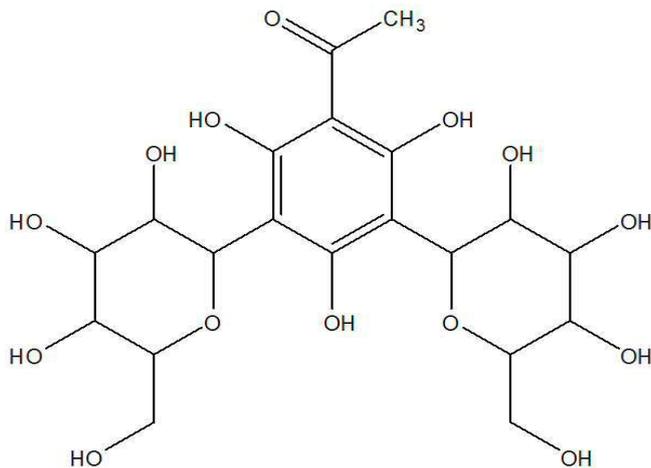


[0064]

- [0065] 여기에서 사용되는 용어는 상기에서 설명한 것과 같다.
- [0066] 본원에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에 따른 관절염의 예방 또는 치료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조 가능하며, 바람직하게는 농후사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있다.
- [0067] 농후사료에는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 빼 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 조사료에는 야초, 목초, 풋배기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋배기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 넣고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 본 발명에 따른 상기 관절염의 예방 또는 치료용 조성물을 포함하는 사료용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 첨가하여 제조 가능하다.

[0071] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은, 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 상기 화합물을 포함하는 삼차고(*Melicope pteleifolia*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 관절염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0072] [화학식 1]



- [0073] 여기에서 사용되는 용어는 상기에서 설명한 것과 같다.
- [0074] 본 발명에서 상기 "개체"는 관절염이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물을 관절염의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.
- [0075] 본원에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 관절염의 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0078] 본원에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0079] 본 발명의 약학적 조성물은 관절염을 예방 또는 치료 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0082] 본원의 조성물은 관절염 개체 또는 의심 개체에 투여되어, 염증, 부종, 및 파누스를 완화하거나, 연골 손실 및 골 침식을 완화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0084] 도 1 및 2는, 삼차고로부터 수득된 EL6의 1H NMR 및 13C NMR 스펙트럼을 각각 나타낸 도이다.
- 도 3 및 4은 삼차고로부터 수득된 EL6의 HSQC 및 HMBC 스펙트럼을 각각 나타낸 도이다.
- 도 5는 삼차고로부터 수득된 EL6의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도이다.
- 도 6은 관절염 동물 모델의 약물 투여 스케줄을 나타낸 모식도이다.
- 도 7은 삼차고 분획물 100mg/kg을 관절염 동물 모델에 투여할 때, 관절염 지수를 나타낸 도이다.
- 도 8은 EL6 25mg/kg(EL6 25로 표시) 및 50mg/kg(EL6 50으로 표시)을 관절염 동물 모델에 투여할 때, 관절염 지수를 나타낸 도이다.
- 도 9는 EL6 25mg/kg(EL6 25로 표시) 및 50mg/kg(EL6 50으로 표시)을 관절염 동물 모델에 투여할 때, 발목의 두께(도 9의 A) 및 발목의 외관(도 9의 B)을 나타낸 도이다.
- 도 10은 EL6 50mg/kg(EL6 50으로 표시)을 관절염 동물 모델에 투여할 때, 관절 절편의 H&E 염색사진(도 10의 A)과 조직병리학적 관절염 지수(도 10의 B)를 나타낸 도이다.
- 도 11은 EL6 50mg/kg(EL6 50으로 표시)을 관절염 동물 모델에 투여할 때, 연골의 Safranin O와 Toluidine blue 염색 결과와 골의 미세단층촬영(micro-CT) 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0087] 실시예 1: 삼차고 추출물로부터 분획물의 제조 및 활성 화합물의 분리

[0089] 활성 화합물의 용매 추출조건 확인

[0090] 본 발명에서 사용된 삼차고는 2017년 베트남 하노이의 미덕 약초거리(My Duc herbal distract)에서 구입한 후 베트남 생태생물자원 연구소 (Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam)의 Tran The Bach의

검증을 받아 사용하였다. 상기 삼차고 및 10g을 각각 100ml의 증류수, 30%[v/v] 에탄올 수용액, 70%[v/v] 에탄올 수용액, 95% 에탄올, 메탄올, 및 에틸아세테이트를 사용하여 2시간 동안 초음파 추출기로 3회에 걸쳐 추출하였다. 이후, 고형분을 제거한 추출액을 감압 농축하여 각 추출물 당 0.33~2.08g의 추출물을 얻었다.

[0092] 이들 추출물에서 고성능액체크로마토그래피/질량분석기(HPLC/MS)로 EL6의 함량을 평가한 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

| 추출용매 | 추출량 | 추출물 중 EL6의 함량 (%) |
|---------|-------|-------------------|
| 증류수 | 2.08g | 4.38% |
| 30% 에탄올 | 1.55g | 2.86% |
| 50% 에탄올 | 1.19g | 5.60% |
| 70% 에탄올 | 1.59g | 6.07% |
| 95% 에탄올 | 0.62g | 1.45% |
| 메탄올 | 1.12g | 5.39% |
| 에틸아세테이트 | 0.33g | 0%(검출안됨) |

[0096] 표 1의 결과를 참고하면, 삼차고 추출물은 70% 에탄올을 사용한 조건에서 EL6의 함유량이 가장 높았으나, 추출되는 추출량 및 EL6을 함유한 분획을 최적화하기 위한 레진의 사용 편의성을 고려하여 증류수를 사용하여 초음파 추출기로 3회 추출하는 방법을 최적 추출조건으로 설정하였다.

[0098] **삼차고 분획 정제물의 제조**

[0099] 삼차고를 절단하여 추출기에 넣고 5-8 배량의 정제수를 넣은 다음 30-50에서 1-2시간 동안 초음파 추출기를 사용하여 추출액을 얻었다. 3회 추출한 추출액을 합하고 여과하여 여액을 얻었다.

[0100] 삼차고 증류수 추출액을 삼차고 원물대비 5-10배 중량의 디아이온 HP-20 resin(합성 흡착제 수지, Mitsubishi Chemical)에 통과시켜 흡착 시켰다. 10배수의 증류수를 사용하여 세척한 후 3-5배량의 40%(v/v) 에탄올, 60%(v/v) 에탄올, 80%(v/v) 에탄올, 100%(v/v) 에탄올을 사용하여 각각 용출하였다. 표 2는 디아이온 HP-20에 흡착된 EL6을 증류수, 40%(v/v) 에탄올, 60%(v/v) 에탄올, 80%(v/v) 에탄올 및 100%(v/v) 에탄올 사용시 용출되는 정도를 HPLC로 분석한 결과이다. EL6 및 아세타페논계 화합물의 함량을 고성능액체크로마토그래피/질량분석기(HPLC/MS)로 평가한 결과 최적 용매는 40%(v/v) 에탄올 사용시 최대가 됨을 확인하였다.

표 2

| 용출 용매조건 | 증류수 | 40% EtOH | 60% EtOH | 80% EtOH | 100% EtOH |
|---------|------|----------|----------|----------|-----------|
| EL6 | 0.8% | 35.5% | 0.06% | 0%(검출안됨) | 0%(검출안됨) |

[0103] 이후, 40%(v/v) 에탄올에 용출된 용출액을 여과하여 감압농축기에서 농축 후 동결건조하여 건조엑스를 수득하였다.

[0105] **삼차고로부터 활성화합물 EL6 (3,5-di-C-β--glucopyranosyl phloracetophenone)의 수득**

[0106] 상기 40%(v/v) 에탄올 용출액 일부를 농축한 후 medium pressure liquid chromatography (MPLC, Watcher® Flash Cartridge, 3×15 cm; 40-60 μm 입자크기)하에서 40%(v/v) 메탄올 용매를 사용하여 용출 시켰다. 이후, 얻어진 분획에 대하여 Gilson HPLC system [Optima Pak C18 Column; 10 × 250 mm, 5 μm particle size, RS Tech, Korea; mobile phase MeOH in H₂O containing 0.1% HCO₂H (0-50 min: 15-30% MeOH, 51-60 min: 100% MeOH); flow rate 2 mL/min; UV detection at 205 and 254 nm]를 실시하여 정제된 주화합물인 EL6를 얻었다.

[0108] 얻어진 화합물 EL6의 물리화학적 성질은 다음과 같다.

[0109] **화학식: 3,5-di-C-β--glucopyranosyl phloracetophenone**

[0110] Brownish gum.

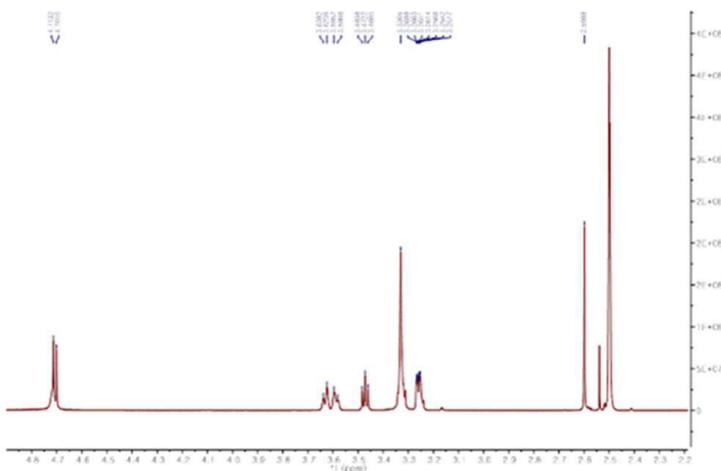
[0111] [α]_D; +56.4 (c 0.3, MeOH).

- [0112] UV $\lambda_{\max}(\text{MeOH})(\log \epsilon)(\text{nm})$ 234(3.48), 286(3.49).
- [0113] IR(KBr) ν_{\max} 3354, 1621, 1447, 1277, 1048 cm^{-1} .
- [0114] ESIMS m/z 475[M-H₂O+H]⁺, 491[M-H]⁻.
- [0115] ¹H NMR(800 MHz, DMSO-*d*₆): 9.15(1H, s, 6-OH), 4.71(2H, d, *J* = 10.0 Hz, H-1', 1), 3.61(4H, m, H-6', 6), 3.47(2H, t, *J* = 9.0 Hz, H-2', 2), 3.33(2H, t, *J* = 9.0 Hz, H-4', 4), 3.26(4H, m, H-3', 3, 5', 5), 2.60(3H, s, H-8).
- [0116] ¹³C NMR(200 MHz, DMSO-*d*₆): 104.8(C-1), 161.3(C-2, 6), 104.0(C-3, 5), 161.1(C-4), 203.5(C-7), 32.9(C-8), 74.6(C-1', 1), 72.1(C-2', 2), 77.8(C-3', 3), 69.2(C-4', 4), 81.1(C-5', 5), 60.0(C-6', 6).
- [0118] 수득된 EL6의 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 각각 도 1 및 2에 나타냈으며, HSQC 및 HMBC 스펙트럼을 각각 도 3 및 4에 나타내었다. 또한, HPLC 크로마토그램을 도 5에 나타내었다.
- [0120] **실시예 2: 콜라겐 유도 관절염 동물모델에서 삼차고 분획물 및 유효성분 EL6의 생체내 (in vivo) 효능 검증**
- [0122] **동물모델의 준비**
- [0123] 콜라겐에 의해 유도되는 관절염 (collagen induced arthritis, CIA) 동물모델을 준비하였다. 시험동물은 8주령의 수컷 DBA/1J 마우스를 사용하였다. 제2형 콜라겐 (CII)을 2mg/ml이 되도록 0.1M 아세트산 용액에 녹인 후 식염수 완충액 (phosphate buffered saline)으로 투석하여 M. 투베르쿨로시스 (tuberculosis)를 함유하는 Complete Fred's Adjuvant (CFA, Chondrex)와 동량으로 섞은 후 면역원을 마리당 100 μ l씩 (즉 100 μ g/100 μ l) 마우스의 꼬리 기저부에 피하 주사 하였다 (1차 주사). 이로부터 3주 후 동일한 CII를 동량의 CFA와 섞은 후 100 μ l씩 (즉 100 μ g/100 μ l) 마우스의 꼬리 기저부에 피하주사 하였다 (2차 주사). 이로부터 1주 후 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)를 마리당 40 μ g씩 복강주사 하고, 1주 후에 실험을 종료하였다.
- [0125] **투여 그리고 관절염 효능 평가 방법**
- [0126] 대조군에는 vehicle (0.5% carboxymethyl cellulose, CMC)을, 실험군에는 vehicle용액에 현탁시킨 삼차고 분획물을 100mg/kg (삼차고 분획물 100으로 표시)의 농도로, 또는 EL6를 25mg/kg (EL6 25로 표시)와 50 mg/kg(EL650으로 표시)의 농도로 1일 1회 실험종료일까지 경구투여 하였다 (도 6).
- [0127] 두 번째 접종을 시작점으로 하여 실험 종료일까지 1일 1회 관절 염증의 위중도를 평가하였다. 이때 관절염 평가는 네 다리에서 아래의 척도에 따라 매긴 점수를 합산하여 사용하였다. 관절염 평가에 따른 점수 기준은 다음과 같다.
- [0128] 0점 : 정상
- [0129] 1점 : 하나의 발가락에 국한된 염증과 부종
- [0130] 2점 : 두 개 이상의 발가락에 염증과 부종 또는 발 전체의 미미한 부종
- [0131] 3점 : 발 전체의 염증과 부종
- [0132] 4점 : 발 전체의 심각한 염증과 부종 또는 발 전체의 강직 (ankylosis)
- [0133] 실험 종료 일 발목 관절의 두께를 캘리퍼스로 측정하고, 시험군별 사진을 촬영하였다.
- [0134] 실험 종료 후 시험동물을 처사시킨 후, 마우스의 뒷발을 10% 중성완충 포르말린으로 고정하고 뼈에서 석회질을 제거한 후 파라핀으로 포매하였다. 5 μ m의 관절 절편을 준비하고 헤마톡실린 (Hematoxylin)과 에오신 (Eosin)으로 (H&E) 염색하고, 조직병리학적으로 관절 염증의 위중도를 평가하였다. 이때 관절염 평가는 아래의 척도에 따라 매긴 점수를 평균하여 사용하였다. 관절염 평가에 따른 점수 기준은 다음과 같다.
- [0135] 0점 : 정상
- [0136] 1점 : 미미한 염증 및 염증세포가 침윤된 활막의 증식
- [0137] 2점 : 1점 소견과 더불어 활막 하 조직의 육아종성 병변

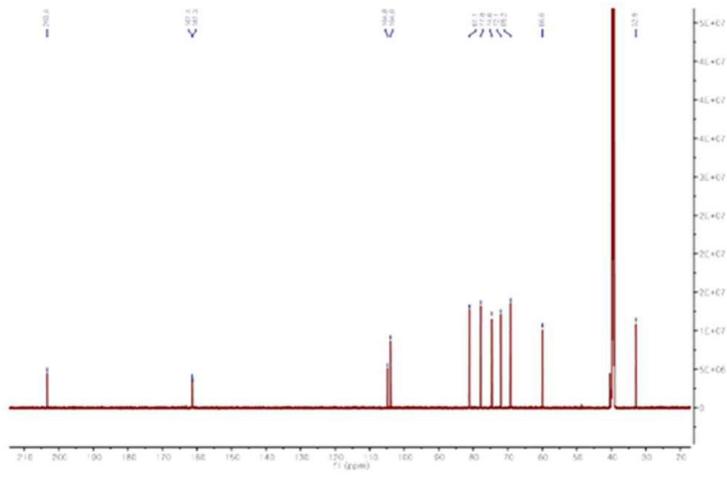
- [0138] 3점 : 2점 소견과 더불어 파누스 (pannus) 형성과 골 미란
- [0139] 또한 연골 파괴 정도를 확인하기 위하여 사프라닌 0 (Safranin O)와 톨루이딘 블루 (toluidine blue) 염색으로 조직학적 검사를 실시하고, 3차원적인 연골 및 골 침식 정도를 확인하기 위해 미세단층촬영기 (micro-CT) 분석을 실시하였다.
- [0141] **결과**
- [0142] 삼차고 분획물을 100mg/kg의 용량으로 경구투여한 군은 CII 2차 주사 후 10일째부터 실험 종료일까지 vehicle을 경구투여한 군에 비해 관절염 지수가 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$, Student' s t-test) (도 7).
- [0143] EL6를 25mg/kg의 용량으로 경구투여한 군은 vehicle을 경구투여한 군과 유사하게 관절염 지수가 증가하였으나, EL6를 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군은 CII 2차 주사 후 11일째부터 실험 종료일까지 vehicle을 경구투여한 군에 비해 관절염 지수가 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$, Student' s t-test) (도 8).
- [0144] 실험 종료시점에서 발목 관절의 두께가 vehicle을 경구투여한 군은 $2.94\pm 0.16\text{mm}$ 이었고 EL6를 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군은 $2.30\pm 0.11\text{mm}$ 로 나타나, vehicle을 경구투여한 군에 비해 EL6 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군의 발목 관절의 두께가 유의하게 감소하였고 ($p<0.05$, Student' s t-test), 육안사진 촬영 결과에서도 발 관절 전체적으로 부종이 줄어들어 있었다 (도 9).
- [0145] H&E 염색을 통한 조직학적 검사 결과 vehicle을 경구투여한 군은 활막의 명확한 증식, 중등도의 염증세포 침윤 및 관절강 내 파누스 형성이 관찰된 반면, EL6를 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군은 vehicle 투여군에서 관찰된 조직병리학적 변화들이 뚜렷이 감소하였으며, 정량적인 조직병리학적인 관절염 지수 역시 vehicle을 경구투여한 군은 1.69 ± 0.25 이었고 EL6를 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군은 0.82 ± 0.24 로 EL6를 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군에서 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$, Student' s t-test) (도 10).
- [0146] Vehicle을 경구투여한 군은 연골의 파괴정도를 Safranin O와 Toluidine blue 염색 결과에서 뚜렷한 연골손실이 관찰되었고 Micro-CT 분석에서 다수의 골 침식을 확인할 수 있었다. 반면 EL6를 50mg/kg의 용량으로 경구투여한 군에서는 이러한 연골파괴 및 골 침식 소견이 뚜렷이 회복되었다 (도 11). 이를 통해 화합물 1을 관절염의 개체에 투여할 경우, 염증, 부종, 및 파누스를 완화하며, 연골 손실 및 골 침식을 완화하는 것임을 알 수 있다.
- [0148] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

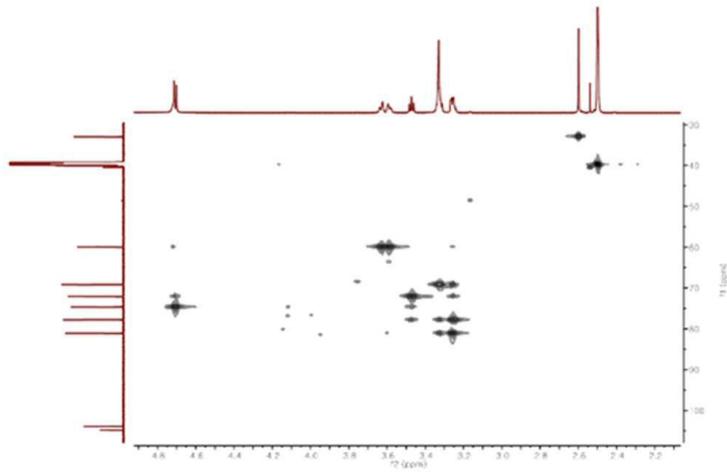
도면1



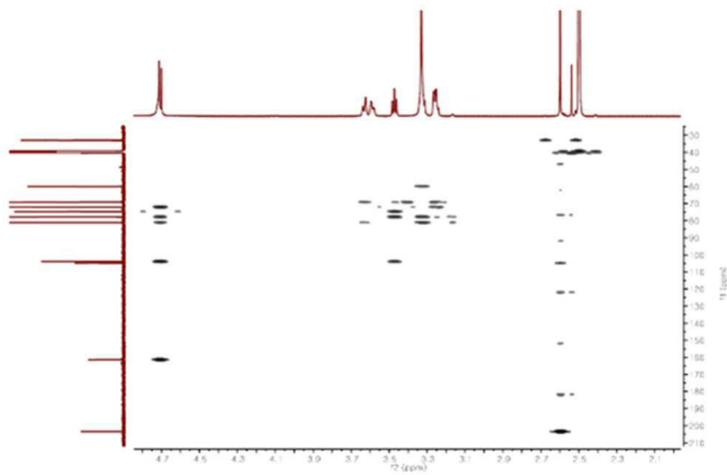
도면2



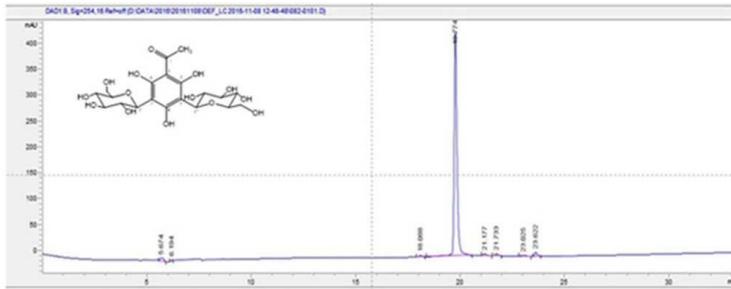
도면3



도면4

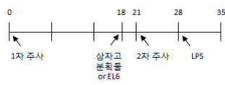


도면5

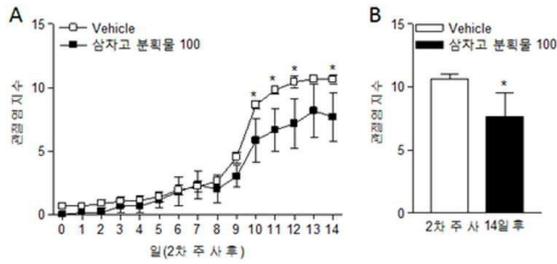


G6100 Series LC/MSD Single Quad
 H₂O with 0.1% formic acid and ACN with 0.1% formic acid
 3%-50% gradient (3-33 min)
 100% isocratic (33-43 min)
 Flow rate : 0.6 ml/min
 INNO Column C18 : 5 um, 120A, 4.6 mm x 250 mm

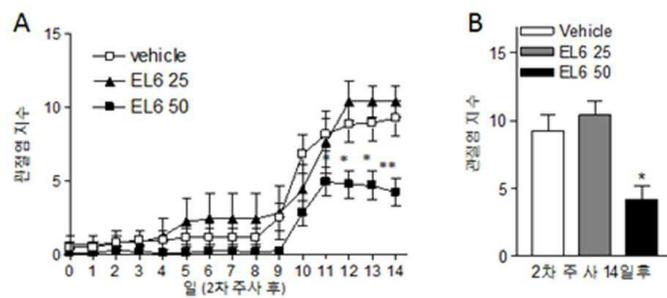
도면6



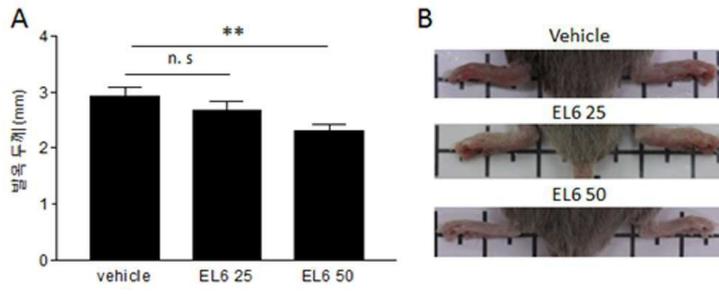
도면7



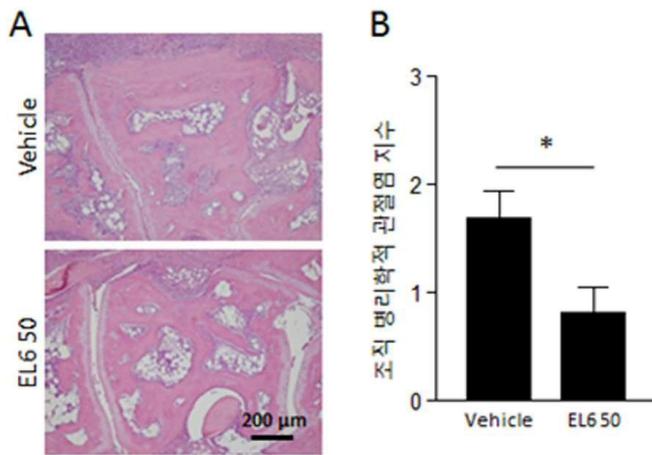
도면8



도면9



도면10



도면11

