



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년09월18일
(11) 등록번호 10-1182582
(24) 등록일자 2012년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/355 (2006.01) A61K 36/35 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0044441
(22) 출원일자 2012년04월27일
심사청구일자 2012년04월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR100841408 B1
KR101074839 B1
KR1020050005633 A
KR1020110006060 A

(73) 특허권자
주식회사 휴온스
경기도 성남시 분당구 판교로 253, 씨-901 (삼평동, 판교 이노밸리)
(72) 발명자
윤성태
서울특별시 강남구 대치동 670 동부센트레빌 105-2004
김정훈
경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 롯데아파트 126-501
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 22 항

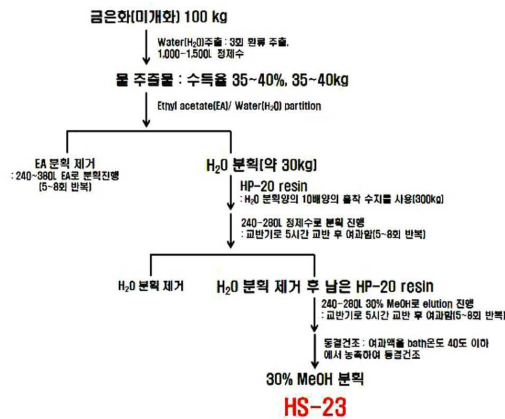
심사관 : 정세준

(54) 발명의 명칭 **활성성분이 증대된 금은화 정제물을 제조하는 제조방법 및 이를 함유한 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 금은화 정제물을 유효성분으로 하는 중증 패혈증 및 패혈증성 쇼크 치료용 약학 조성물로서, 천연물을 소재로 한 치료제이므로 부작용이 적으면서, 패혈증으로 인한 장기의 손상과 관련된 다장기기능부전증후군(multiple organ dysfunction syndrome)을 억제하여 사망률을 낮춤으로써 사망률이 높은 중증 패혈증 및 패혈증성 쇼크의 치료에 있어서 기존 패혈증 치료요법과 병용 사용가능한 패혈증 치료제로서 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임방호

서울특별시 금천구 시흥3동 948 삼일아파트 407호

김영목

서울특별시 성동구 옥수 2동 극동아파트 8동 310호

연성흠

경기도 화성시 향남읍 행정리 480번지 풍림아이원
아파트 1409동 1303호

김현수

경상남도 창원시 성산구 상남동 토월성원 A 304동
202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 70007545

부처명 지식경제부

연구사업명 광역경제권선도산업육성사업

연구과제명 패혈증 및 패혈증성 쇼크 치료의 금은화 유래 천연물신약 개발

주관기관 주식회사 휴온스

연구기간 2009.10.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

건조 상태의 금은화 시료에 추출용매로 추출하는 제 1단계; 상기 추출물을 여과법, 원심분리법 또는 이들의 조합으로 처리하여 금은화 조추출물(연조엑스)를 얻는 제 2단계; 상기 조추출물에 물을 가하여 현탁물을 제조한 후, 상기 현탁물에 비극성 용매를 첨가하여 분획을 수행하여 상기 비극성용매에 가용한 비극성용매 가용 물질을 제거하고 남은 잔사를 회수하여 제 1차 정제물을 얻은 제 3단계; 상기 제 1차 정제물에 정제수를 넣고 상기 정제수의 중량과 동일 중량의 흡착성 수지를 이용한 흡착크로마토그래프 또는 이온교환수지를 이용한 킨럼크로마토그래프의 방법을 수행한 후에, 정제수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 또는 이의 혼합용매로부터 선택된 세척용매로 세척하여 제 2차 정제물을 수득하는 제 4단계; 상기 제 2차 정제물을 감압농축 및 건조하는 제 5단계 공정을 포함하는 금은화 정제물의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출용매는 금은화 시료 중량의 1 내지 100배 부피(v/w)의 물, 주정, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 헥산, 에칠에테르, 에틸아세테이트, 시클로헥산, 디메틸설폭사이드(DMSO), 클로로포름, 또는 메틸렌 클로라이드로부터 선택된 단독용매 또는 하나 이상의 혼합용매를 사용함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출용매는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 또는 부탄올로부터 선택된 단독용매 또는 하나 이상의 혼합용매를 사용함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 1단계의 추출용매로 물을 사용하는 경우에 선택적으로, 추출효율을 높이기 위해서 시료 중량의 0.1 ~ 5 중량%의 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 또는 탄산나트륨(NaCO_3) 를 첨가함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출조건은 20 내지 120℃의 추출온도에서 1 내지 72시간 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 속슬렛(Soxhlet) 추출 또는 초음파 추출 방법을 사용함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 2단계에서, 상기 추출물을 여과법, 원심분리법 또는 이들의 조합을 수행하여 금은화 조추출물(연조엑스)를 수득함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 3단계에서, 상기 조추출물 중량의 0.005 내지 5배 부피 (v/w)의 물을 가한 후, 상기 물 부피의 0.1 내지 50배 부피 (v/v)의 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 또는 에틸아세테이트 용매를 첨가하여 분획을 수행함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 4단계에서, 상기 제 1차 정제물에 1 내지 30배량(w/w)의 정제수를 넣고 상기 정제수의 중량과 동일 중량의 SP207, HP 20, Diaion HP 20, SP-850 resin, 활성탄, 또는 Amberlite XAD-2,4 흡착성 수지(resin)를 이용한 흡착크로마토그래프의 방법을 수행함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 4단계에서, 상기 제조방법의 제 4단계의 흡착크로마토그래프법 이외에 추가적으로 상기 정제수의 중량과 동일 중량의 AG 50W-x8, 앰버라이트(Amberlite) IR-120, Amberlite IRA-400, 도웁스(Dowex) 50W-x8, 앰버라이트(Amberlite) IRC-50, 바이오-렉스(Bio-Rex) 70, 듀올라이트(Duolite)-436, 듀올라이트(Duolite)-WK40, 앰버라이트(Amberlite) IRA-67 또는 도웁스(Dowex) 3-x4A로부터 선택된 이온교환수지를 이용한 컬럼크로마토그래프의 방법을 수행함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 4단계에서, 추가적으로 상기 제 4단계에 Sephadex LH-20 resin, Sephadex G15 resin, 또는 Sephadex G25으로부터 선택된 세파덱스 컬럼크로마토그래피법을 수행함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 제조방법의 제 5단계에서, 10℃ 내지 80℃ 온도에서 감압농축하고, 상온건조법, 동결건조법, 또는 열풍건조법을 수행함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제 1항의 제조방법으로 수득한 금은화 정제물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 함유하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 14

제 1항의 제조방법으로 수득한 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제와의 조합을 유효성분으로 하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제의 상대적인 중량 배합비가 0.1 내지 10: 0.1 내지 10(w/w)임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 16

제 13항 또는 제 14항에 있어서,

상기 기존 패혈증 치료제는 페니실린(penicillin) 계열, 퀴놀론(quinolone) 계열, 모노박탐(monobactam) 계열, 아미노글리코시드(aminoglycoside) 계열, 세팔로스포린(cephalosporin) 계열, 테트라시클린(tetracyclines) 계열, 글리코펩티드(glycopeptide) 계열, 또는 카바페넴(carbapenem) 계열 항생제로부터 선택된 항생제, 메페남산(mefenamic acid), 인도메타신(indomethacin), 이부프로펜(ibuprofen), 피록시카

(piroxicam), 또는 디클로페낙(diclofenac)으로부터 선택된 항염증제, 암포테리신(amphotericin) B, 니스타틴(nystatin), 그리세오폴빈(griseofulvin), 또는 아졸(azole) 계열 항균제로부터 선택된 항균제 및 시티리진(cetirizine), 페소페나딘(fexofenadine), 또는 클로르페니라민(chlorpeniramine)으로부터 선택된 항알러지제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 치료제임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 17

제 13항 또는 제 14항에 있어서,

상기 패혈증은 경증, 중증 패혈증, 화상으로 인해 유발되는 감염증 및 패혈증, 급성 상기도 감염으로 인후두염, 염증성장질환(IBD), 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 또는 급만성 간염인 약학조성물.

청구항 18

제 13항 또는 제 14항에 있어서,

상기 다장기 기능부전(MODS)은 패혈증을 인한 간장, 신장, 심장, 폐, 소장, 대장, 십이지장, 위, 췌장, 비장 등으로부터 선택된 장기 손상임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 19

제 13항 또는 제 14항에 있어서,

상기 패혈증성 쇼크는 패혈증성 쇼크, 화상으로 인해 유발되는 감염증 및 패혈증, 급성 상기도 감염으로 인후두염, 염증성장질환(IBD), 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 또는 급만성 간염임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 20

제 13항 또는 제 14항에 있어서,

상기 약학조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액로부터 선택된 제형임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 21

제1항의 제조방법으로 수득한 금은화 정제물을 유효성분으로 함유하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 22

제1항의 제조방법으로 수득한 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제와의 조합을 유효성분으로 하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 23

제 21항 또는 제 22항에 있어서,

상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 활성성분이 증대된 금은화 정제물을 제조하는 제조방법 및 이를 함유한 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Clinical Insights into Sepsis Treatments, Chang Youl Lee, M.D., 대한중환자의학회지: 제 25 권 제 4 호.

[0003] [문헌 2] Jean-Louis Vincent, Edward Abraham., The Last 100 Years of Sepsis., Centennial Review., 2006.

- [0004] [문헌 3] R. Phillip Dellinger MD, Jean-Louis Vincent MD PhD, John Marshall MD, Konrad Reinhart MD., Important issues in the design and reporting of clinical trials in severe sepsis and acute lung injury., *Journal of Critical Care.*, 2008.
- [0005] [문헌 4] www.fda.gov
- [0006] [문헌 5] Wang, P., et al., Differential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. *Am J Physiol*, 1992. 263(1 Pt 1): p. G38-43.
- [0007] [문헌 6] Yang, M. and K. Li, The role of cytokines and transcription factors in megakaryocytopoiesis. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2002. 10(6): p. 580-5.
- [0008] [문헌 7] Wada, H., et al., Increased plasma level of interleukin-6 in disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1993. 4(4): p. 583-90.
- [0009] [문헌 8] Qin, S., et al., Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1637-42.
- [0010] [문헌 9] Cinel, I. and S.M. Opal, Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*, 2009. 37(1): p. 291-304.
- [0011] [문헌 10] Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(11): p. 813-22.
- [0012] [문헌 11] Rivers, E., et al., Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2001. 345(19): p. 1368-77.
- [0013] [문헌 12] Qin, S., et al., Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1637-42.
- [0014] [문헌 13] Cinel, I. and S.M. Opal, Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*, 2009. 37(1): p. 291-304.
- [0015] [문헌 14] Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(11): p. 813-22.
- [0016] [문헌 15] Rivers, E., et al., Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2001. 345(19): p. 1368-77.
- [0017] [문헌 16] Deitch, E.A., Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*, 1992. 216(2): p. 117-34.
- [0018] [문헌 17] 정보섭 외, 도해향약대사전, p939-940, 1998
- [0019] [문헌 18] Daniel Rittirsch, Markus S Huber-Lang, Michael A Flierl & Peter AWARD, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *NATURE PROTOCOLS* Vol.4 No.1 2009
- [0020] [문헌 19] Coskun AK et al., The effects of montelukast on antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines on the heart, liver, lungs, and kidneys in a rat model of cecal ligation and puncture-induced sepsis. *ScientificWorldJournal*. 2011 Jul 7;11:1341-56.
- [0021] [문헌 20] Masami Yamada et al., Discovery of Novel and Potent Small-Molecule Inhibitors of NO and Cytokine Production as Antisepsis Agents: Synthesis and Biological Activity of Alkyl 6-(N-Substituted sulfamoyl)cyclohex-1-ene-1-carboxylate, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 7457-7467

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 본 발명은 활성성분이 증대된 금은화 정제물을 제조하는 제조방법 및 이를 함유한 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 금은화 정제물은 천연물을 소재로 한 치료제이므로 부작용이 적 으면서, 패혈증으로 인한 장기의 손상과 관련된 다장기기능부전증후군(multiple organ dysfunction syndrome)을 억제하여 사망률을 낮춤으로써 사망률이 높은 중증 패혈증 및 패혈증성 쇼크의 치료에 있어서 기존 패혈증 치료 요법과 병용 사용가능한 패혈증 치료제로서 효과적으로 이용될 수 있다.

- [0023] 중증 패혈증(severe sepsis)은 신체 장기 기능 부전과 저관류를 동반한 패혈증 상태로 전신 산소 요구량과 산소 공급 간의 불균형을 초래하여 패혈증성 쇼크(septic shock)나 신체 다장기 기능부전 증후군(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)으로 급속히 진행되어 높은 사망률을 보이는 질환이다. 발열 혹은 저체온증, 심박 동 증가, 심박출량의 증가, 전신의 순환저항 감소, 호흡성 알칼리증 및 백혈구 수의 이상증가 혹은 감소 등이 혼한 증상이며 이의 진행은 빠른 기관손상으로 이어져 나아가서는 죽음에 이르게 한다(1).

- [0024] 중증 패혈증 및 패혈증성 쇼크로 인한 환자 사망률은 미국 내 29%, 유럽 내 27%로서 계속 증가하고 있는 추세로 중환자실 환자의 주요 사망원인이다(2). 미국의 경우 매년 750,000명 이상의 패혈증 환자가 발생하며 이중 매년 210,000 명 이상이 사망하고, 유럽 중환자실 환자의 37% 및 15% 정도가 중증 패혈증 및 패혈증성 쇼크 환자이다. 국내의 경우 내과 및 외과 중환자실에서의 중증 패혈증으로 인한 사망률은 65% 이며 내과 중환자실에서 사망한 전체 환자의 51% 정도가 패혈증이 원인이다.

- [0025] 지난 2001년과 2002년 미국과 유럽에서 허가를 취득하여 전 세계적으로 중증 패혈증 치료제로 이용되고 있는 약 물은 일라이 릴리(Eli Lilly)사의 자이그리스(Xigris) 하나 뿐 이다. 이 또한 APACHE II 점수 25이상의 높은 사 망 위험도를 가지고 있는 환자들에게 국한되어 사용하도록 권고되어 패혈증 치료에 한계가 있다(3). 또한 자이 그리스의 임상 결과, 자이그리스를 투여한 군에서 28일 후 생존율이 대조군 30.8%에 비해 36.9%로서 유일한 패 혈증 치료제인 자이그리스가 환자의 사망 가능성을 낮출 수 있는 정도는 6.1%에 불과한 실정이며 미국 식품의약 품안전청(FDA)은 자이그리스가 응혈과정에 개입하기 때문에 심각한 출혈이나 뇌졸중을 유발할 수 있다고 경고하 며 출혈 가능성이 높은 환자에게는 절대 사용해서는 안 된다고 권고하는 등 유일한 패혈증 치료제인 자이그리스 는 높은 가격과 국한된 환자의 범위 및 낮은 사망률 완화 등 여러 문제점을 가지고 있다.

- [0026] 이러한 문제점에도 불구하고 지난 10 년간 사용되어 왔던 유일한 패혈증 치료제인 자이그리스 마저 2011년 10월 25일 모든 시장에서 자진 철수하기로 발표하였다. 시장 자진 철수 이유는 최근 1,696명(자이그리스 투여군: 851 명, 플라시보 투여군 : 845명)의 패혈증 환자를 대상으로 실시한 임상시험(PROWESS-SHOCK trial) 결과 28일 후 사망률이 자이그리스 투여 군이 26.4%(223/846), 플라시보 투여 군이 24.2%(202/834)로 나타나 패혈증성 쇼크 환자들의 사망률을 감소시키는 데 자이그리스가 유의할 만한 효능을 입증하지 못하였으며 protein C 결핍 환자 들의 사망률을 감소시키는 2차적 효능마저 충족시키지 못하는 것으로 나타났기 때문이다(4).

- [0027] 패혈증은 세균, 바이러스, 진균과 같은 감염성 물질 이외에도 외상과 같은 비감염성 과정을 거쳐 더욱 악화될 수 있으며, 패혈성 쇼크(septic shock)나 신체 다 장기 기능 부전 증후군(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)으로 진행된다(1,16). 패혈증의 발병과정에서 가장 두드러진 특성은 패혈증 초기에 체내 염증계 가 과활성화되는 것으로 이를 바탕으로 과거로부터 수년간 패혈증의 치료를 위해 염증반응을 수반하거나 촉진하 는 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-1(IL-1) 및 인터루킨-8(IL-8)과 같은 염증 매개체 를 억제하려는 수많은 시도가 이루어져 왔으나 환자의 생존율은 크게 개선되지 않고 있다.

- [0028] 1992년 Wang 등은 인체의 패혈증과 가장 유사한 모델인 cecal ligation and puncture(CLP)로 야기시킨 다세균 성 패혈증 모델에서 CLP 후 2-10 시간까지는 심박출량이 증가하고 말초저항이 감소하여 장기에 혈액량을 증가시 키는 과역동학적(hyperdynamic) 상태가 되고 이와는 반대로 16-20시간에는 모든 장기에 혈류순환이 감소하는 저역 동학적(hyponamic) 상태가 되는 것을 관찰하여 치료약물 개발에 획기적인 발판을 마련하였으나(5) 아직까지 면 역 및 혈액학적인 부분의 복잡한 병태생리학적 기전으로 인해 치료약물 개발에는 많은 어려움을 안고 있는 실정

이다.

[0029] 패혈증 진행과정 중 임상적 특징은 패혈증 초기 단계에서 선천성 면역 반응의 과활성화로 인해 체내 염증계가 비정상적으로 활성화 되는 것이다. 즉, 숙주내 대식세포나 단핵세포가 그람 음성 균의 내독소(endotoxin)와 같은 감염성 물질을 인지하고 활성화되어 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-6(IL-6), 종양 괴사 인자- α (TNF- α)와 같은 여러가지 염증 유발 사이토카인들이 과분비 된다. 이러한 현상을 "사이토카인 스톰(cytokine storm)" 이라고 하며 이는 패혈증 발병 후 10-12시간까지 지속된다. 패혈증 초기에 분비되는 여러 사이토카인 중 종양 괴사 인자- α (TNF- α)는 패혈증 초기에 가장 먼저 혈중에서 검출되는 사이토카인으로서 인터루킨-6(IL-6)과 인터루킨-8(IL-8)과 같은 사이토카인들의 분비를 촉진시킬 뿐만 아니라 다른 사이토카인들과 함께 호중구와 혈관 내피 세포로부터 세포 유착 물질들의 발현을 촉진시킴으로써 염증 반응을 더욱 가속화시킨다(6-8). 인터루킨-6(IL-6)은 주로 림프구와 단구에서 분비되는 염증성 사이토카인으로서(9), 패혈증 발병 후 6시간에 혈중 농도가 최고치를 나타낸다. 다양한 세포의 성장 및 분화, 면역 반응에 관여하며, 종양 괴사 인자- α (TNF- α)와 함께 패혈증의 진단과 예후의 표지 인자로 알려져 있으며, 이의 억제로 실험동물에서 패혈증 생존율이 크게 개선되었다. 또한 혈소판의 생성을 촉진하고 혈소판의 활성화를 도모하여 응고를 촉진시키는 작용이 있으며(10), Wada 등은 패혈증, 급성저혈압, 심한외상 등의 질병이나 상해에 대한 반응으로 초래되는혈역학상태의 불균형으로 인한 과중성 혈관 내 응고증(disseminated intravascular coagulation, DIC)에서 IL-6의 증가를 보고한 바 있다(11).

[0030] 패혈증 초기의 과염증 반응은 패혈증이 진행됨에 따라 항염증 반응 및 면역 억제 상태가 지속되는 이른바 "면역 마비 상태(immune paralysis)"로 전환된다. 이러한 패혈증 후기 단계에서는 특히 사이토카인 유사 물질인 고 이동도군-1(High mobility group box-1, HMGB-1)이 대식세포로부터 분비되며 이는 염증을 일으킴과 동시에 조직 세포들의 자연 세포사를 유도한다(12). 또한 염증 억제 물질인 인터루킨-10(IL-10), 전환 성장 인자(TGF), 인터루킨-13(IL-13) 및 용해성 사이토카인 억제제(IL-1ra, sIL-1ra, sTNFR)등이 염증성 사이토카인의 과도한 생성에 대한 보상 기전으로 생성된다. 최근 연구 결과에 따르면 패혈증 후기의 면역 마비 현상을 일으키게 하는 주요 원인에 염증 저하 뿐아니라 면역 세포의 자연세포사 현상이 대두되고 있다(13-14). 특히 면역 T 세포의 자연 세포사로 인한 항원이나 항원 그룹에 대한 반응의 감소 또는 결여는 패혈증 후기의 면역 결핍 상태인 "아네르기(anergy) 상태"를 야기하게 되며 이는 숙주의 면역 반응의 마비를 일으켜 기회 감염 등 이차적인 요인에 의해 더 이상 회복이 불가능한 상태로 패혈증이 진행 되게 한다.

[0031] 중증 패혈증(severe sepsis)은 장기 기능 부전과 저관류(hypoperfusion)를 동반한 패혈증으로 이는 관류 이상으로 인하여 젓산증, 빈뇨, 갑작스런 정신장애를 동반하는데, 2001 년 Rivers 등에 따르면 중증 패혈증시 동반되는 혈류장애(혈관내 용적 감소, 말초혈관 확장, 심근기능 저하, 대사 증가 등)는 전신 산소 요구량과 산소 공급간의 불균형을 초래하여 이로 인해 유발된 조직 저산소증이 다 장기 기능 부전 및 사망의 중요한 요인이 된다고 한다(15).

[0032] 패혈증으로 인한 세포 및 조직의 비정상적인 신호 전달은 궁극적으로 다 장기 기능 부전 증후군 (Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)을 일으킨다. 다 장기 기능 부전은 호흡기관으로부터 시작되어 장관, 간, 신장, 조혈기관 및 심장 부전으로까지 이어지게 되며 장기 부전의 순서는 환자의 상태와 패혈증을 야기시킨 초기의 손상 정도에 따라 다르다(16).

[0033] 위와 같이 패혈증의 병인은 매우 복잡하여 모든 상황에 적합한 하나의 약물을 선택하는 데는 한계가 있다. 현재 약물 개발의 초점은 염증 반응이 주이며 이로 인해 현재까지 초기 소생법에 이은 항생제, NSAIDs를 비롯한 항염증제 및 항사이토카인의 치료 위주로 시행하고 있으나 이들의 효과는 극히 제한적이다. 또한 다케다(Takeda)사의 TLR4 선택적 저해제 TAK-242와 에자이(Eisai)사의 에리토란(eritoran)의 예와 같이 임상 3상 시험에서 각각 중증 패혈증 환자의 사이토카인 수치를 감소시키지 못하고 사망률을 개선시키지 못하여 1차 유효성 평가 지표를 충족시키지 못하는 등 대부분이 효능 부족의 이유로 개발 중인 약물 대다수가 최종 임상 시험 단계에서 중단되는 실정이다.

[0034] 금은화는 인동과의 인동덩굴(Lonicera japonica Thunberg) 또는 그 변종의 꽃봉오리로서, 알려진 성분으로는 루테올린(luteolin), 이노시톨(inositol), 사포닌(saponin), 탄닌(tannin), 이소클로로겐산 (isochlorogenic acid), 클로로겐산 (chlorogenic acid) 등이 알려져 있다(17).

[0035] 그러나 상기 문헌의 어디에도 약리활성 성분의 함량을 보다 더 높일 수 있는 개선된 금은화 정제물의 정제방법 및 이 정제물을 함유한 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료효과에 대하여 언급이 되거나 시사한 기재는 전혀 없다.

[0036] 이에 따라, 본 발명자는 금은화 추출물 중 약리활성 성분의 함량을 보다 더 높일 수 있는 개선된 정제방법을 개발하고 본 방법으로 제조된 금은화 정제물이 중증 패혈증 모델에서 종래의 추출방법을 통해 얻어진 금은화 추출물의 치료 효능과 비교시에 보다 탁월하고 우수한 패혈증 치료효과를 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0037] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 건조 상태의 금은화 시료에 추출용매로 추출하는 제 1단계; 상기 추출물을 여과법, 원심분리법 또는 이들의 조합으로 처리하여 금은화 조추출물(연조엑스)을 얻는 제 2단계; 상기 조추출물에 물을 가하여 현탁물을 제조한 후, 상기 현탁물에 비극성 용매를 첨가하여 분획을 수행하여 상기 비극성용매에 가용한 비극성용매 가용 물질을 제거하고 남은 잔사를 회수하여 제 1차 정제물을 얻은 제 3단계; 상기 제 1차 정제물에 정제수를 넣고 상기 정제수의 중량과 동일 중량의 흡착성 수지(resin)를 이용한 흡착크로마토그래프 또는 이온교환수지를 이용한 컬럼크로마토그래프의 방법을 수행한 후에, 세척 용매로 수차례 세척하여 제 2차 정제물을 수득하는 제 4단계; 상기 제 2차 정제물을 감압농축 및 건조하는 제 5단계 공정을 포함하는 금은화 정제물의 제조방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 하나의 구현예로서, 상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출용매는 금은화 시료 중량의 약 1 내지 100배(v/w), 바람직하게는 약 2 내지 20배(v/w), 보다 바람직하게는 5 ~ 15 배 부피(v/w)의 물, 주정, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 헥산, 에칠에테르, 에틸아세테이트, 시클로헥산, 디메틸설폭사이드(DMSO), 클로로포름, 또는 메틸렌 클로라이드로부터 선택된 단독용매 또는 하나 이상의 혼합용매, 보다 바람직하게는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 또는 부탄올로부터 선택된 단독용매 또는 하나 이상의 혼합용매, 보다 더 바람직하게는 물을 사용함이 바람직하다.

[0039] 선택적으로, 상기 제조방법의 제 1단계의 추출용매로 물을 사용하는 경우 추출효율을 높이기 위해서 시료 중량의 0.1 ~ 5 중량%, 바람직하게는 0.2 ~ 2 중량%의 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 탄산나트륨(NaCO₃) 등의 약염기, 바람직하게는 탄소수소나트륨을 물에 첨가하는 것이 바람직하다.

[0040] 구체적으로, 상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출조건은 약 20 내지 120℃, 바람직하게는 30 내지 100℃의 추출온도에서 약 1 내지 72시간, 바람직하게는 2 내지 12시간 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 속슬렛(Soxhlet) 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 열수 추출법을 사용함이 바람직하다.

[0041] 구체적으로, 상기 제조방법의 제 2단계에서, 상기 추출물을 여과법, 원심분리법 또는 이들의 조합, 바람직하게는 여과법을 수행하여 금은화 조추출물(연조엑스)을 수득함이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 하나의 구현예로서, 상기 제조방법의 제 3단계에서, 상기 조추출물 중량의 약 0.005 내지 5배, 바람직하게는 0.05 내지 3배 부피 (v/w)의 물을 가한 후, 상기 물 부피의 약 0.1 내지 50배, 바람직하게는 약 0.5 내지 10배 부피 (v/v)의 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 또는 에틸아세테이트 등의 비극성 용매, 바람직하게는 헥산, 메틸렌 클로라이드 또는 에틸아세테이트, 보다 바람직하게는, 헥산 또는 메틸렌 클로라이드 용매를 첨가하여 분획을 수행함이 바람직하다.

[0043] 상기 제 3단계 공정을 통하여 헥사데카논산, 메칠 리놀레네이트, 리나를, 카바크롤 및 메칠팔미테이트 등과 같은 정유와 베타 시토스테롤과 같은 스테롤 화합물 등의 비극성용매에 가용한 비극성용매 가용 물질은 제거가능하다.

[0044] 본 발명의 하나의 구현예로서, 상기 제조방법의 제 4단계에서, 상기 제 1차 정제물에 약 1 내지 30배량(w/w), 바람직하게는 약 5 내지 15배량(w/w), 보다 바람직하게는 약 8 내지 12배량(w/w)의 정제수를 넣고 상기 정제수

의 중량과 동일 중량의 수용성 물질의 분리정제에 사용되는 SP207, HP20SS, Diaion HP 20, SP-850 resin, 활성탄, Amberlite XAD-2,4, 바람직하게는 Diaion HP 20, SP-850 resin, Amberlite XAD-2,4 등의 흡착성 수지(resin)를 이용한 흡착크로마토그래프의 방법을 이용하여 추가 정제과정을 수행함이 바람직하다.

[0045] 상기 제조방법의 제 4단계의 흡착크로마토그래프법 이외에 추가적으로 상기 정제수의 중량과 동일 중량의 AG 50W-x8, 앰버라이트(Amberlite) IR-120, Amberlite IRA-400, 도웁스(Dowex) 50W-x8 및 SK1B 등과 같은 강산성 양이온 교환수지; 앰버라이트(Amberlite) IRC-50, 바이오-렉스(Bio-Rex) 70, 듀올라이트(Duolite)-436 및 WK40 등과 같은 약산성 양이온 교환수지; 앰버라이트(Amberlite) IRA-67 및 도웁스(Dowex) 3-x4A 등과 같은 약염기성 양이온 교환수지, 바람직하게는 강산성 양이온 교환수지인 SK1B형 교환수지, 보다 바람직하게는 Amberlite IR-120, Amberlite IRA-400 등의 이온교환수지를 이용한 컬럼크로마토그래프의 방법을 수행하여 추가 정제과정을 수행가능하다.

[0046] 상기 제조방법의 제 4단계에서, 흡착크로마토그래프의 방법 또는 이온교환수지를 이용한 컬럼크로마토그래프를 수행하고, 수지 또는 이온교환 컬럼 등에 흡착되는 물질 이외의 물질을 세척용매로서 정제수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 또는 이의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매를 이용하여 용매로 수차례 세척하여 수지에 흡착되는 물질 이외의 물질을 제거하는 추가 정제과정을 수행하여 제 2차 정제물을 수득함이 바람직하다.

[0047] 상기 제 4단계 공정을 통하여 프롤린 등의 아미노산, 글루코오스, 수크로스, 이노시톨 등의 중성당 등 약리 활성과는 관련이 없는 물질은 제거가능하다.

[0048] 추가적으로 상기 제 4단계에 Sephadex LH-20 resin, Sephadex G15 resin, 또는 Sephadex G25 등의 세파덱스 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 분자량 별로 정제를 실시하여 보다 정제된 제 3차 정제물을 수득함이 바람직하다.

[0049] 상기 제조방법의 제 5단계에서, 당업계에 통상적인 감압농축 및 건조법을 수행가능하다. 바람직하게는 약 10℃ 내지 80℃, 바람직하게는 60℃ 이하 온도에서 감압농축하고, 상온건조법, 동결건조법, 열풍건조법 등의 건조법을 수행함이 바람직하다.

[0050] 본 발명의 상기 정제 및 제조공정을 통하여, 본 발명자는 당업계에 통상적으로 알려진 추출방법보다 활성성분으로 알려진 클로로겐산의 함량면에서 약 5.8배 (1.6%수율이 9.4%의 고함량으로 수율 상승)로 상승하고 3,5-디(di)-0-카페오일퀴닌산(caffeoylquinic acid), 메틸(methyl) 3,5-디(di)-0-카페오일 퀴닌산(caffeoyl quinate) 등과 같은 클로로겐산 유도체 함량면에서 약 5.2배 (2.5% 수율이 12.84%의 고함량으로 수율 상승)로 당업자가 예기치 못한 고함량의 활성성분을 함유하여 함량이 증대됨을 확인할 수 있었으며, 패혈증 모델을 이용한 생존률 면에서,

[0051] 일반적인 패혈증 모델보다 중증의 패혈증을 유도한 동물 모델에서 광범위 항생제 단독 사용시 보다 본 정제물과 항생제 병용 사용시 약 20%에 가까운 생존률 증가 효과를 발휘함을 확인할 수 있어 당업자가 예기치 못한 탁월한 패혈증 치료효과를 나타냄을 확인하였다.

[0052]

[0053] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득한 금은화 정제물을 유효성분으로 하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 다장기 기능부전(MODS)는 패혈증으로 인한 장기의 손상임을 특징으로 한다.

[0055] 상기 다장기 기능부전(MODS)의 장기는 간장, 신장 및 심장으로부터 선택된 장기임을 특징으로 한다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득한 금은화 정제물 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 함유하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0057] 또한 본 발명은 당업계에 통상적으로 사용되는 기존 패혈증 치료제와의 병용 또는 조합하여 사용가능하다.

[0058] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득한 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제와의 조합을 유효성분으로 하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.

- [0059] 상기 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제와의 조합은 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제의 상대적인 중량 배합비가 0.1 내지 10: 0.1 내지 10(w/w), 바람직하게는 1 내지 10 : 1 내지 10(w/w), 보다 바람직하게는 1 내지 5 : 1 내지 50(w/w)의 범위 내에서 선택함이 바람직하다.
- [0060] 상기 기존 패혈증 치료제는 페니실린(penicillin) 계열, 퀴놀론(quinolone) 계열, 모노박탐(monobactam) 계열, 아미노글리코시드(aminoglycoside) 계열, 세팔로스포린(cephalosporin) 계열, 테트라시클린(tetracyclines) 계열, 글리코펩티드(glycopeptide) 계열, 카바페넴(carbapenem) 계열 등의 항생제, 메페남산(mefenamic acid), 인도메타신(indomethacin), 이부프로펜(ibuprofen), 피록시캠(piroxicam), 디클로페낙(diclofenac) 등의 항염증제, 암포테리신(amphotericin) B, 니스타틴(nystatin), 그리세오폴빈(griseofulvin), 아졸(azole) 계열 등의 항균제 및 시티리진(cetirizine), 펙소페나딘(fexofenadine), 클로르페니라민(chlorpeniramine) 등의 항알러지제 등으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 치료제, 바람직하게는, 페니실린(penicillin) 계열, 퀴놀론(quinolone) 계열, 모노박탐(monobactam) 계열, 아미노글리코시드(aminoglycoside) 계열, 세팔로스포린(cephalosporin) 계열, 테트라시클린(tetracyclines) 계열, 글리코펩티드(glycopeptide) 계열, 카바페넴(carbapenem) 계열 등의 항생제, 보다 바람직하게는 아목시실린, 암피실린, 반코마이신, 아미카신, 이미페넴 등의 살균성 항생제로부터 선택됨이 바람직하다.
- [0061] 본원에서 정의되는 패혈증은 이에 제한되지는 않으나, 경증, 중증 패혈증, 화상으로 인해 유발되는 감염증 및 패혈증, 급성 상기도 감염으로 인후두염, 염증성장질환(IBD), 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 급만성 간염 등 바람직하게는 중증 패혈증을 포함하고,
- [0062] 본원에서 정의되는 다장기 기능부전(MODS)은 이에 제한되지는 않으나, 경증, 중증 패혈증, 화상으로 인해 유발되는 감염증 및 패혈증 등 바람직하게는 중증 패혈증을 인한 간장, 신장, 심장, 폐, 소장, 대장, 십이지장, 위, 췌장, 비장 등으로부터 선택된 장기 손상을 포함하고,
- [0063] 본원에서 정의되는 패혈증성 쇼크는 이에 제한되지는 않으나, 중증 패혈증, 화상으로 인해 유발되는 감염증 및 패혈증으로 인한 패혈증성 쇼크를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 생약 정제물을 0.1 내지 50%중량으로 포함한다.
- [0065] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 정제물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 따른 정제물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 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, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 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 상기 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 스테아이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 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, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 정제물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 정제물은 1일 0.01mg/kg

내지 10g/kg으로, 바람직하게는 1mg/kg 내지 1g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0069] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 및 직장, 또는 정맥 등의 방법을 통하여 투여할 수 있다.

[0070] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 수득한 금은화 정제물을 유효성분으로 함유하는 패혈증, 다장기 기능부전 (MODS) 및 패혈증성 쇼크의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0071] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득한 금은화 정제물 및 기존 패혈증 치료제와의 조합을 유효성분으로 하는 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0072] 본 발명의 정제물을 포함하는 건강기능식품은 목적 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0073] 본 발명의 정제물은 목적 질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 정제물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

[0074] 이 때, 본 발명의 정제물을 포함하는 식품첨가물의 경우, 식품 전체 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%가 되도록 첨가시켜 사용할 수 있고, 건강기능식품 또는 음료 중의 상기 정제물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 30중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02~5g, 바람직하게는 0.3~1g의 비율로 가할 수 있다.

[0075] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 정제물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 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 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g이다.

[0076] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 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 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.

발명의 효과

[0077] 본 발명의 제조방법으로 얻은 금은화 정제물은 당업계에 통상적으로 알려진 추출방법보다 활성성분으로 알려진 클로로겐산의 함량 및 그 패혈증에 대한 효능면에서, 당업자가 예기치 못한 탁월한 패혈증 치료효과를 나타냄을 확인하여 패혈증, 다장기 기능부전(MODS) 및 패혈증성 쇼크의 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 금은화 정제물 HS-23을 제조하는 공정과정을 나타낸 도이며;
 도 2는 표준물질: CGA의 HPLC 데이터(a), 금은화 추출 정제물 HS-23 (미개화 물추출물 + 30% MeOH fr.)HPLC 데이터(b) 및 기존 추출물 SL-101(미개화 물추출물 total) HPLC 데이터(c)을 자외선흡광도계를 검출기로 하여 성분 분석한 그래프이며(여기에서 * Retention time-18분대: CGA, 9분, 21분대: CGA 유도체 피크임);

도 3은 CLP 처치 다세포성 중증 패혈증 모델에서 항생제 이미페넴 단독 투여군과 이미페넴과 HS-23을 병용투여 하였을 때 CLP 처치 후 10일까지의 생존률 변화를 비교 관찰한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 본 발명은 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.

[0080] **비교예 1. 통상적 추출법에 따른 금은화 추출물(SL-101)의 제조.**

[0081] 금은화를 정선하여 대한약전 통칙 중 절도에 따라 조절로 한 다음 추출기에 넣고 8~10 배량의 정제수를 넣은 다음에 80~100℃에서 2~3시간 동안 환류추출법으로 추출하여 추출액을 여과하고 여액을 60℃이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물(연조엑스)를 얻었다(이하, SL-101이라 함, 수득률 약 40.0%).

[0082] **실시예 1. 금은화 정제물 (HS-23)의 제조.**

[0083] **1.1. 5배량 HP-20 resin사용(HS-23a)**

[0084] 금은화를 정선하여 대한약전 통칙 중 절도에 따라 조절로 한 다음 추출기에 넣고 10 배량의 정제수를 넣은 다음에 100℃에서 3시간 동안 환류추출법으로 추출하여 추출액을 여과하고 여액을 60℃이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물(연조엑스)를 얻었다(수득률 약 40.0%). 이 연조엑스를 1L의 정제수에 용해시킨 다음에 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출하여 에틸아세테이트층을 제거한 다음에 5배량의 정제수를 넣고 이 정제수의 중량과 같은 중량의 HP-20 resin(미세다공비이온 흡착제 수지; MITSUBISHI CHEMICAL)를 넣어 5시간 동안 교반하여 정제수에 용해되는 부분을 제거한다. 남은 분획에 10배량의 정제수와 동량의 30% 메탄올을 넣고 5시간 동안 교반하여 흡착시킨 흡착물을 감압 여과하는 과정을 4회 반복한 다음 여과액을 60℃ 이하에서 감압 농축 후 동결건조하여 건조엑스를 얻는다(수득률 3.1%, 도 1 참조, 이하, HS-23이라 함).

[0085] **1.2. 10배량 HP-20 resin사용(HS-23b)**

[0086] HP-20 resin의 사용량을 상기 에틸아세테이트를 제거한 연조엑스 양의 10배(w/w)로 하는 점만을 제외하고는 상기 1.1의 제조과정과 동일한 정제공정을 수행하여 건조엑스를 얻는다(수득률 3.1%, 도 1 참조, 이하, HS-23b이라 함).

[0087] **실시예 2. 금은화 정제물 (HS-23c)의 제조.**

[0088] 금은화를 정선하여 대한약전 통칙 중 절도에 따라 조절로 한 다음 추출기에 넣고 10 배량의 정제수를 넣은 다음 100℃에서 3시간 환류추출법으로 추출하여 추출액을 여과하고 여액을 60℃이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물(연조엑스)를 얻었다(수득률 약 40.0%). 이 연조엑스를 1L의 정제수에 용해시킨 다음 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출하여 에틸아세테이트층을 제거한 다음에 10배량의 정제수를 넣고 이 정제수의 중량과 같은 중량의 SP-850 resin(합성 흡착제 수지, MITSUBISHI CHEMICAL)를 넣어 5시간 동안 교반하여 정제수에 용해되는 부분을 제거한다. 제거 후 남은 수지(resin)을 10배량의 정제수로 세척하여 정제수에서 더 이상 물질이 추출되지 않음을 확인한 후에 수지 부피의 2~3배 가량의 10% 메탄올을 넣고 5시간 동안 교반하여 흡착시킨 흡착물을 감압 여과하는 과정을 3~5회 반복하고 그 후에 남아있는 레진에 다시 부피의 3배 가량의 20% 메탄올을 넣고 동일한 방법으로 감압여과한다. 그 후에 다시 30% 메탄올을 동일한 방법으로 실시하고 최종 여과되어 나온 10%, 20%, 30% 정제물을 합하여 60℃ 이하에서 감압 농축 후 농축물의 3배 가량의 30% 메탄올을 사용하여 녹인 후 Sephadex LH-20 resin(GE Healthcare, USA)을 사용하여 3.5 kDa 이하의 분자량을 가진 스테로이드, 테르페노이드, 지질, 폴리페놀, 알칼로이드 및 아미노산 등의 정제를 실시한다. 그 결과 30% 메탄올 용매를 이동상으로 정제되는 정제물을 수득하여 60℃ 이하에서 감압 농축 후 동결건조하여 건조엑스를 얻는다(이하, HS-23c이라 함, 수득률 1.6%).

[0089] 실시예 3. 금은화 정제물 (HS-23d)의 제조.

[0090] 금은화를 정선하여 대한약전 통칙 중 절도에 따라 조절로 한 다음 추출기에 넣고 10 배량의 정제수를 넣은 다음 100℃에서 3시간 환류추출법으로 추출하여 추출액을 여과하고 여액을 60℃이하에서 감압농축기(EYELA N-1000, EYELA Ltd., JAPAN)로 감압농축하여 조추출물(연조엑스)을 얻었다(수득률 약 40.0%). 이 연조엑스를 1~2L의 정제수에 용해시킨 다음 동량의 에틸아세테이트로 3~5회 추출하여 에틸아세테이트층을 제거한 다음 10배량의 정제수를 넣고 이 정제수의 중량과 같은 중량의 Amberlite-XAD-2 resin(미세다공비이온 흡착제 수지, ROHM & HAAS Co.,USA)를 넣어 5시간 동안 교반하여 정제수에 용해되는 부분을 제거한다. 남은 분획에 10배량의 정제수와 동량의 30% 메탄올을 넣고 5시간 동안 교반하여 흡착시킨 흡착물을 감압 여과하는 과정을 5회 반복한 다음 여과액을 60℃ 이하에서 감압 농축 후 동결건조하여 건조엑스를 얻는다(이하, HS-23d이라 함, 수득률 2.8%).

[0091] 실시예 4. 고성능액체크로마토그래프(HPLC) 성분 패턴 분석 및 클로로겐산류 함량 비교

[0092] 4.1. 시료의 처리

[0093] 상기 비교예 및 실시예에서 수득한 시료들 약 100mg을 정밀하게 달아 정제수 70ml를 넣고 10분 동안 초음파 추출한 다음 여과하고 여액에 정제수를 넣어 정확하게 100ml로 한 다음 여과한 액을 시료로 이용하고 하기 표 1 조건의 HPLC 조건으로 성분들의 패턴 분석 및 유효활성성분들의 양을 분석하였다.

표 1

HPLC 조건

Column	Agilent Eclipse Plus C18 HPLC column (4.6 x 250 mm, 5 μm)				
Mobile phase (gradient)	0~25min	25~30min	0~25min	0~25min	0~25min
	0.1% TFA 93(%) ACN 7(%)	0.1% TFA 93 → 0 ACN 7 → 100	0.1% TFA 0 ACN 100	0.1% TFA 0 → 93 ACN 100 → 7	0.1% TFA 93 ACN 7
Flow rate	1.0 mL/min				
Absorbance	UV 330nm				
Peaks	chlorogenic acid(CGA)				

[0095] 4.2. 실험 결과

[0096] 상기 실험 결과,

[0097] 1. 도 2에서 액체크로마토그래프법에 따라 C18 컬럼을 사용하여 자외부흡광광도계(측정파장 330nm) 검출기로 분석한 결과 SL-101과 비교하여 HS-23이 클로로겐산의 피이크 면적이 더 넓고 기타 배당체 성분 등의 분석 피이크가 발견되지 않아 더 정제된 물질임을 확인하였다.

[0098] 2. 표 2에서 HS-23의 정제 과정 중 흡착성 수지를 물 추출물 중량의 5배, 10배 양을 사용하여 정제한 후 클로로겐산(CGA)을 표준품으로 하여 액체크로마토그래프법으로 각각 분석 비교한 결과 10배 양의 HP-20 흡착성 수지를 사용하였을 때 유효활성성분인 클로로겐산 및 클로로겐산 유도체 함량이 더 높아짐을 확인하였다.

표 2

HPLC 분석결과

분획	추출물 중량의 5 배 양의 HP-20 흡착수지 사용 (HS-23a)		추출물 중량의 10 배 양의 HP-20 흡착수지 사용 (HS-23b)	
	CGA 함량	CGA + CGA 유도체 함량	CGA 함량	CGA + CGA 유도체 함량
SL-101 (물 분획)	2.6 %	3.8 %	1.6 %	2.5 %
HS-23 (30% 메탄올 분획)	2.8 %	3.9 %	9.4 %	12.8 %

- [0100] **참조예 1. 사용 시약 및 시료 준비**
- [0101] 1-1. 시약
- [0102] [성분패턴분석 및 추출정제] 사용 시약
- [0103] CGA(chlorogenic acid>95%, Aldrich C3878), TFA(Trifluoroacetic acid, Sigma Aldrich 299537), HP-20 resin(MITSUBISHI CHEMICAL), Acetonitrile(Burdick&Jackson, for HPLC), Water(Burdick&Jackson, for HPLC), Ethyl acetate(Junsei)을 구입하여 HPLC 분석시험에 사용하였다.
- [0104] [패혈증 동물 효력시험] 사용 시약
- [0105] ketamine hydrochloride(유한케타민50주사, (주)비케이팜), Imipenem(Sigma-Aldrich I0160), LPS(E.coli 0111:B4 Sigma-Aldrich, L4130), 실크 봉합선(silk suture, 의료용건제봉합사 No.2 및 No.3, 원산업)을 구입하여 CLP 처치 패혈증 모델 및 LPS 유도 과염증반응 동물 모델 시험에 사용하였다.
- [0106] 1-2. 시료준비
- [0107] [성분패턴분석 및 추출정제]
- [0108] 상기 비교예 및 실시예에서 수득한 시료(HS-23)를 약 100mg을 정밀하게 달아 정제수 70ml를 넣고 10분 동안 초음파 추출한 다음 여과하고 여액에 정제수를 넣어 정확하게 100ml로 한 다음 여과한 액을 시료로 이용하였다.
- [0109] [패혈증 동물 효력시험]
- [0110] CLP 패혈증 모델에서 생쥐에 ketamine hydrochloride(60 mg/kg) 및 xylazine hydrochloride(8 mg/kg)를 복강주사하여 마취시킨 후 Chaudry 등(1979)의 방법에 따라 CLP를 통해 sepsis를 유발시켰다. 즉, 복강 정중부를 약 15 mm 절개한 후 cecum을 외부로 노출시킨 후, intestinal obstruction이 일어나지 않도록 ileocecal valve의 말단을 3.0 silk suture로 결찰하고 20-gauge needle을 이용하여 cecum에 두개의 구멍을 만들어 일정량의 fecal material을 유출시키고, fecal material을 포함하여 cecum을 다시 복강내에 넣고 봉합한 후 dehydration이 일어나지 않게 하기 위하여 4 ml/100 g b. wt.의 생리식염수를 피하주사를 통해 주입하였다.
- [0111] LPS 염증모델에서 시료인 금은화 정제물(HS-23)을 10% N,N-dimethylacetamide와 10% cremophor를 함유한 PBS 완충용액에 녹여 100mg/ml stock으로 만들고 HS-23과 LPS stock의 희석은 PBS를 사용하였다.
- [0112] 1-3. 통계 분석
- [0113] [패혈증 동물 효력시험]
- [0114] CLP 패혈증 모델의 생존율에 대한 각 실험군 간의 통계학적 유의성은 log-rank test를 시행하였으며 그 밖의 실험의 실험군에 대한 통계학적 유의성은 two-way ANOVA를 시행하였고, 각각의 시기에 따른 실험군 간의 차이는 Bonferroni correction으로 P<0.01및 P<0.05의 수준에서 유의성을 검증하였다.
- [0115] LPS 염증 모델의 통계학적 유의성은 one-way ANOVA와 Dunnet's test를 이용하여 p<0.05의 수준에서 차이를 검증하였다.
- [0116] **실험예 1. 중증패혈증 모델(Severe Sepsis CLP model)에서 항생제 병용투여 효능 평가**
- [0117] 상기 실시예에서 얻은 시료를 대상으로 중증패혈증 모델(Severe Sepsis CLP model)에서 항생제 병용투여에 의한 패혈증에 대한 치료효과를 측정하기 위하여 하기와 같이 문헌에 개시된 방법을 변형하여 실험을 수행하였다 (18).
- [0118] 1. 생쥐(ICR계 웅성, 23-25g, 8주령, 대한바이오링크(주))에 마취제(ketamine hydrochloride, 100 mg/kg, 유한케타민50주사, (주)비케이팜)를 복강주사하여 마취시킨 후에 CLP(Cecal ligation and puncture)를 통해 패혈증을 유발시켰다. 즉, 복강 정중부를 절개한 후 맹장을 외부로 노출시켜 회맹장판(ileocecal valve)의 말단을 실

크 봉합선(silk suture, 의료용 견제 봉합사 No.2 및 No.3, 원산업)으로 결찰하고 바늘을 이용하여 맹장에 두개의 구멍을 만든 후 일정량의 분변(fecal material)을 유출시켰다. 분변을 포함하여 맹장을 다시 복강 내에 넣고 봉합한 후에 생리식염수를 피하주사를 통해 주입하였다. 상기 방법으로 생쥐에 패혈증을 유도한 직후에 꼬리 정맥에 실시예 2(HS-23b)의 시료 또는 비히클(PBS)을 투여하였다.

[0119] 2. 본 실험 예에서는 특이적으로 회맹장관 말단의 결찰시키는 위치를 조절하고 천공 횟수를 2회 이상으로 하여 노출되는 분변의 양을 증가시켜 일반적인 CLP 모델보다 중증의 패혈증 모델을 유도하여 생존률 평가 등의 치료 효능을 확인하였다.

[0120] 3. 생쥐에 결찰위치와 천공회수를 조절하여 유도한 중증 패혈증을 유발한 후에 0 및 24시간에 HS-23 40 mg/kg을 단독 투여한 군과 HS-23과 반합성 카바페넴 계열 항생제인 이미페넴(imipenem, Cat.No. I0160, Sigma-aldrich) 25 mg/kg을 12 시간 간격으로 4일 동안 병용투여한 군의 생존율을 10일간 비교 관찰한 결과 10일 후 최종 생존률이 CLP처치군이 8%, 이미페넴 단독 투여군이 33%, 이미페넴 및 HS-23 병용투여군이 50%로 나타나 광범위 항생제 단독투여에 비해 약 17% 생존률 증가 효과를 나타내었다(도 3).

[0121] 4. 조제용매인 생리식염수 및 phosphate buffered saline (PBS)만을 투여한 비히클군의 경우, CLP 후 1일째 75%의 생존율을 보였고 이후 지속적으로 감소하여 2일째 33%, 및 3일째 17%의 생존율을 나타내었으며 4일째부터 10일째까지 8%의 생존율을 나타내었음.

[0122] 5. 이미페넴 25 mg/kg 용량 단독 투여군의 경우, CLP 후 1일째 83%의 생존율을 보였고 이후 지속적으로 감소하여 2일째 58%, 3일 및 4일째 50%, 및 5일째 42%의 생존율을 나타내었으며 7일째부터 10일째까지 33%의 생존율을 나타내었다.

[0123] 6. 이미페넴 25 mg/kg 및 HS-23 40 mg/kg 용량 병용 투여군의 경우, CLP 후 1일째 92%의 생존율을 보였고 이후 지속적으로 감소하여 2일째 75% 및 3일째 58%의 생존율을 나타내었으며 7일부터 10일째까지 50%의 생존율을 나타내었다.

[0124] **실험예 2. 중증 패혈증 모델에서의 다장기기능부전(MODS)에 대한 효능 평가**

[0125] 상기 실시예에서 얻은 시료를 대상으로 다장기기능부전(MODS)에 대한 치료효과를 측정하기 위하여 하기와 같이 문헌에 개시된 방법을 변형하여 실험을 수행하였다(19).

[0126] 1. 중증 패혈증 유도 시에 나타나는 간장, 신장, 심장 등의 장기 기능 손상을 H&E 염색을 통하여 관찰하고 HS-23 투여에 따른 간장의 손상 정도 변화를 알라닌 아미노트랜스퍼레이즈(alanine aminotransferase, 이하 'ALT' 라고 함), 신장의 손상 정도 변화를 혈액내 요소 질소(blood urea nitrogen, 이하 'BUN' 이라고 함) 및 크레아티닌(creatinine, 이하 'CRE' 라고 함) 농도 측정, 심장의 손상 정도 변화를 락테이트 디하이드로게네이스(lactate dehydrogenase, 이하 'LDH' 라고 함) 농도 측정을 자동혈액화학분석기(Hitachi 7600, Tokyo, Japan)을 통하여 확인하였다.

[0127] 2. CLP 후 1, 3, 6, 12, 24 및 48시간에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청에서 ALT, BUN, CRE 및 LDH 농도를 측정하여 각 장기의 기능 손상 정도를 관찰하여 각각 표 3에 나타내었다.

[0128] 3. 실험결과 : 결과는 표 3과 같으며 HS-23은 중증 패혈증으로 인한 장기 손상을 나타내는 ALT, BUN, CRE 및 LDH의 상승을 아래 표 3과 같이 현저히 억제하였다.

표 3

[0129]

생체 다장기 기능부전 평가

시간항목		12hr	24hr	48hr
ALT(IU/1)	CLP	135.2 ± 19.0	197.2 ± 8.0	89.4 ± 9.2
	CLP+HS-23	93.5 ± 4.3	130.3 ± 13.4	75.1 ± 9.1
BUN(mg/dl)	CLP	37.9 ± 2.2	32.0 ± 4.4	25.4 ± 1.7
	CLP+HS-23	26.2 ± 2.1	22.1 ± 1.4	17.2 ± 1.5
CRE(mg/dl)	CLP	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.16 ± 0.01
	CLP+HS-23	0.17 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.16 ± 0.02
LDH(IU/1)	CLP	-	1564.3 ± 98.1	977.3 ± 111.0
	CLP+HS-23	1056.5 ± 105.6	1237.0 ± 61.8	-

[0130]

실험예 3. 염증반응 모델(LPS-induced inflammation model)에 대한 생존율 및 효능 평가

[0131]

상기 실시예에서 얻은 시료를 대상으로 염증반응 모델(LPS-induced inflammation model)에 대한 생존율을 측정하기 위하여 하기와 같이 문헌에 개시된 방법을 변형하여 실험을 수행하였다(20).

[0132]

1. 생쥐(C57BL/6, 웅성, 18~20g, 8주령, 한국생명공학연구원)에 그람 음성균 유래 염증 반응 유도 물질인 LPS (E.coli 0111:B4 Sigma-Aldrich, L4130)를 복강으로 주사하고 금은화 추출 정제물(HS-23)을 1-8시간 후에 정맥으로 투여한 실험 결과, 1시간 후에 HS-23을 투여한 실험군의 경우 LPS 투여 후 18시간 때는 90%의 생존율을 나타내었고, 21시간 때는 80%, 24-72시간 때는 70%로 생존율이 현저히 증가하였다(표 4).

[0133]

2. LPS 투여 후 각 시간별로 혈액을 원심분리하여 취한 혈청으로부터 ELISA법으로 각 염증매개인자의 발현농도를 측정하였다. 시간별로 측정된 결과 TNF-α는 LPS 투여 1시간 후, IL-1β와 IFN-γ는 8시간 후, HMGB-1은 19시간 후 농도가 최고점에 도달하였다(표 5 내지 표 8).

표 4

[0134]

LPS 염증모델에서 생존율 효능 평가

생존율(%)	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후
그룹	18hr	21hr	24hr	48hr	72hr
LPS 복강주사	80	50	30	10	0
LPS 복강주사 + 1시간 후 HS-23(3mg/kg) 주입	90	80	70	70	70
LPS 복강주사 + 4시간 후 HS-23(3mg/kg) 주입	80	50	50	20	10
LPS 복강주사 + 8시간 후 HS-23(3mg/kg) 주입	80	50	40	20	10

표 5

[0135]

LPS 처치 후 염증매개인자 바이오마커(TNF-α)의 변화

시간	정상	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후
항목		1hr	2hr	4hr	6hr
TNF-α (pg/ml)	63	7,715 [#]	2,485	1,057	710

표 6

[0136] LPS 처치 후 염증매개인자 바이오마커(IL-1β)의 변화

시간	정상	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후
항목		4hr	8hr	12hr
IL-1β (pg/ml)	46	288	1,341 [#]	1,177

표 7

[0137] LPS 처치 후 염증매개인자 바이오마커(IFN-γ)의 변화

시간	정상	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후
항목		4hr	8hr	12hr
IFN-γ (pg/ml)	150	1,472	29,886 [#]	18,283

표 8

[0138] LPS 처치 후 염증매개인자 바이오마커(HMGB-1)의 변화

시간	정상	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후	LPS 처치 후
항목		16hr	18hr	19hr	21hr
HMGB-1 (pg/ml)	787	1,227	5,719	8,818 [#]	3,900

[0139] HS-23을 정맥으로 투여하고 동시에 LPS를 복강 주사 한 후 혈중 TNF-α, IL-1β, IFN-γ 및 HMGB-1 농도가 최고점에 도달하는 시간을 ELISA로 측정하였고 LPS 투여 대조군과 비교하여 HS-23 투여군이 염증 매개 인자의 발현 상승을 하기 표 9에 나타난 바와 같이 현저히 억제하였다.

표 9

[0140] 금은화 정제물(HS-23)이 염증인자 바이오마커에 미치는 효과

항목	그룹	vehicle	LPS	LPS + HS-23 1 mg/kg	LPS + HS-23 3 mg/kg
TNF-α (pg/ml)	1시간 후	60	7,715	2,951 [*]	1,940 [*]
IL-1β (pg/ml)	8시간 후	20	1,341	823 [*]	128 [*]
IFN-γ (pg/ml)	8시간 후	206	29,886	28,576	476 [*]
HMGB-1 (pg/ml)	19 시간 후	1,122	8,818	7,863	1,806 [*]

#p<0.05 vs. vehicle alone-treated group
*p<0.05 vs. LPS alone-challenged group

[0141] 실험예 4. 안정성 시험

[0142] 상기 실시예에서 얻은 시료를 대상으로 안정성을 평가하기 위하여 하기와 같이 식약청고시 의약품등 안정성 시험기준에 따라 실험을 수행하였다.

[0143] 1. 시험검체 : 상기 실시예 1에서 제조한 HS-23과 이를 원료로 한 동결건조 주사제 시제품의 안정성시험을 실시하여 아래와 같이 원료 시료와 주사제 시제품의 안정성을 입증하였다.

[0144] 2. 시험조건 및 기간 : 대한약전에 규정된 주사제의 기준 및 시험방법 항목에 따라 장기보존시험을 수행하였으며 냉장보관(5±3℃) 조건에서 2년간 실험하였다.

[0145] 3. 시험결과 : 아래의 표 10 및 표 11과 같으며 2년 동안 금은화 중 지표물질로 선정된 클로로겐산 함량의 변화

가 거의 없었으며 기타 시험항목도 적합하여 약제학적으로 매우 안정한 제제임을 알 수 있다.

표 10

[0146] 비임상시험 원료의 안정성 시험

개월	성상	확인시험	중금속	건조감량	함량(mg/g) 금은화 중 클로로겐산
초기	적합	적합	적합	1.6%	62.0mg
3개월	적합	적합	적합	1.6%	61.7mg
6개월	적합	적합	적합	1.5%	61.5mg
9개월	적합	적합	적합	1.6%	61.3mg
12개월	적합	적합	적합	1.6%	61.0mg
18개월	적합	적합	적합	1.6%	60.8mg
24개월	적합	적합	적합	1.6%	60.4mg

표 11

[0147] 시제품 동결건조 주사제의 안정성시험

개월	성상	확인시험	중금속	pH	함량(%) 금은화 중 클로로겐산	무균 시험	주사제의 불용 성 미립자	불용성이물
초기	적합	적합	적합	5.3	110	음성	적합	적합
3개월	적합	적합	적합	5.3	108	-	적합	적합
6개월	적합	적합	적합	5.2	108	-	적합	적합
9개월	적합	적합	적합	5.3	107	-	적합	적합
12개월	적합	적합	적합	5.3	106	-	적합	적합
24개월	적합	적합	적합	5.3	105	-	적합	적합

[0148] 실험예 5. 독성 시험(GLP 기관)

[0149] 상기 실시예에서 얻은 시료를 대상으로 안전성을 평가하기 위하여 GLP인증기관인 안전성평가기관에 실험을 의뢰하여 수행하였다.

[0150] 1. 본 발명의 약학조성물의 안전성을 조사하기 위하여 GLP인증기관인 (주)바이오톡스텍에서 설치류/비설치류 단회정맥투여 독성시험, 안전성약리시험, 유전독성시험, 설치류/비설치류 4주 반복정맥투여 독성시험 등의 독성시험을 실시하였다.

[0151] 2. 표 12에서 단회정맥투여 독성시험 결과에서 치사량이 500 mg/kg을 상회하고, 4주 반복정맥투여 독성시험에서 민감한 동물종의 무독성용량(NOEL) 값이 75 mg/kg을 상회하며 100 mg/kg, 300 mg/kg의 용량까지 각각 심혈관계, 호흡기계, 중추신경계에 영향이 없는 것으로 나타났다. CLP 처치 다세균성 패혈증 동물모델에서 유효용량이 40 mg/kg인 점을 감안하면 유효용량 대비 무독성용량 값이 약 2배, 최대내성용량은 5배 높아 본 발명의 약학조성물이 안전함을 확인하였다.

표 12

[0152] 독성시험

시험항목	시험 결과
랫드 단회정맥투여 독성시험	개략의 치사량은 수컷 500 mg/kg, 암컷 1,000 mg/kg를 상회함.
비글견 단회정맥투여 용량증가 독성 시험	최대 내성용량은 암수 모두에서 200 mg/kg를 상회함.

랫드 4주 반복정맥 투여독성시험 및 2주 회복 시험	암수 랫드에 대한 무독성용량(NOEL)값은 75 mg/kg를 상회함. 암수 75 mg/kg 투여용량에서 비장의 장기 중량증가가 관찰되었으나 2주 회복시험에서 회복되어 이는 가역적인 변화로 사료됨.
비글견 4주 반복정맥 투여독성시험 및 2주 회복 시험	암수 비글견에 대한 무독성용량(NOEL)은 100 mg/kg이고, 최대내성용량(MTD)은 200 mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.
유전독성 시험	?복귀돌연변이 시험 - 음성 ?염색체이상 시험 - 음성 ?마우스 소핵시험 - 음성
안전성약리 시험	?심혈관계 시험 - 6.25, 25, 100 mg/kg 투여용량에서 혈압, 심박수, 심전도 parameters 등 심혈관계에 미치는 영향 없음. ?호흡기계 시험 - 75, 150, 300 mg/kg 투여용량에서 분당 호흡수, 분당 호흡량, 1회 호흡량 등의 호흡기계에 미치는 영향 없음. ?중추신경계 시험 - 75, 150, 300 mg/kg 투여용량에서 운동성, 행동변화, 운동협조성, 체온, 감각/운동신경의 반사반응 등의 중추신경계에 미치는 영향 없음.

[0153] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 하기와 같이 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 위함이다.

[0154] **제제예 1. 산제의 제조**

- [0155] HS-23b 20 mg
- [0156] 유당 100 mg
- [0157] 탈크 10 mg

[0158] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0159] **제제예 2. 정제의 제조**

- [0160] HS-23a 10 mg
- [0161] 옥수수전분 100 mg
- [0162] 유당 100 mg
- [0163] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0164] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0165] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

- [0166] HS-23c 10 mg
- [0167] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0168] 락토오스 14.8 mg
- [0169] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0170] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0171] **제제예 4. 주사제의 제조**

- [0172] HS-23d 10 mg
- [0173] 만니톨 180 mg

[0174]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0175]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg
[0176]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0177]	제제예 5. 액제의 제조	
[0178]	HS-23b	20 mg
[0179]	이성화당	10 g
[0180]	만니톨	5 g
[0181]	정제수	적량
[0182]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0183]	제제예 6. 건강 식품의 제조	
[0184]	HS-23a	1000 mg
[0185]	비타민 혼합물	적량
[0186]	비타민 A 아세테이트	70 µg
[0187]	비타민 E	1.0 mg
[0188]	비타민 B ₁	0.13 mg
[0189]	비타민 B ₂	0.15 mg
[0190]	비타민 B ₆	0.5 mg
[0191]	비타민 B ₁₂	0.2 µg
[0192]	비타민 C	10 mg
[0193]	비오틴	10 µg
[0194]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0195]	엽산	50 µg
[0196]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0197]	무기질 혼합물	적량
[0198]	황산제1철	1.75 mg
[0199]	산화아연	0.82 mg
[0200]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0201]	제1인산칼륨	15 mg
[0202]	제2인산칼슘	55 mg
[0203]	구연산칼륨	90 mg
[0204]	탄산칼슘	100 mg

[0205] 염화마그네슘 24.8 mg

[0206] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0207] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0208] HS-23c 100 mg

[0209] 비타민 C 15 g

[0210] 비타민 E(분말) 100 g

[0211] 젖산철 19.75 g

[0212] 산화아연 3.5 g

[0213] 니코틴산아미드 3.5 g

[0214] 비타민 A 0.2 g

[0215] 비타민 B₁ 0.25 g

[0216] 비타민 B₂ 0.3g

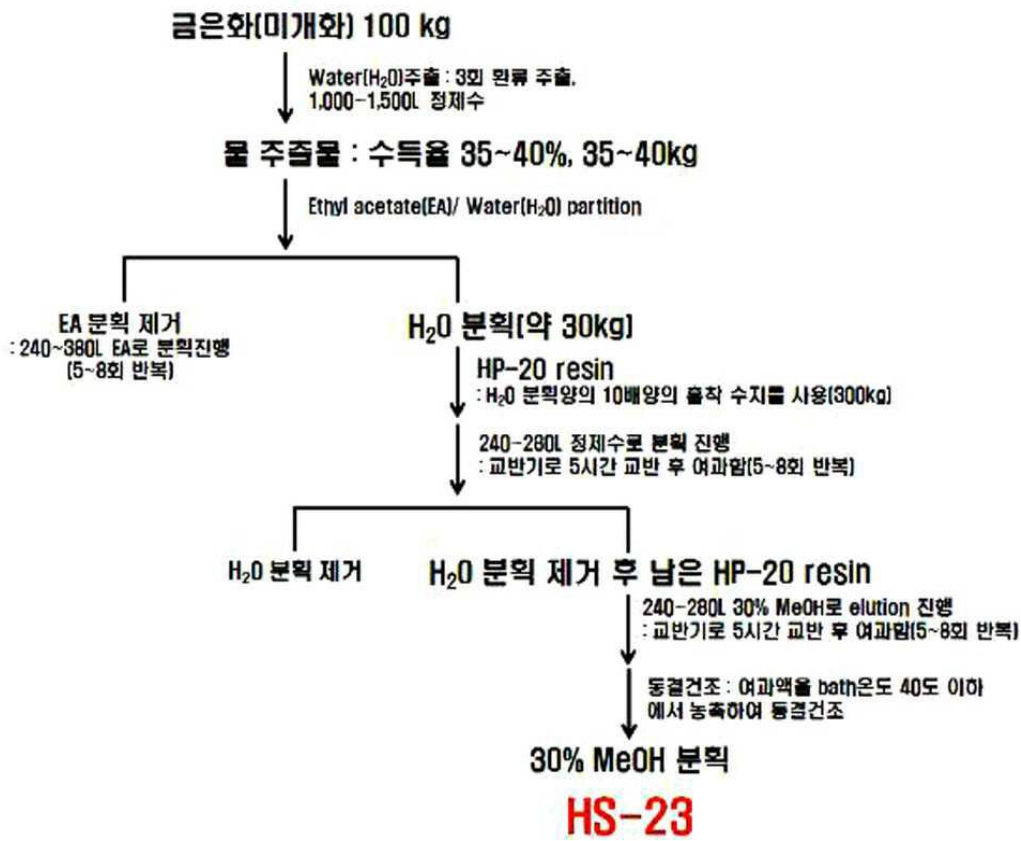
[0217] 물 정량

[0218] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0219] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

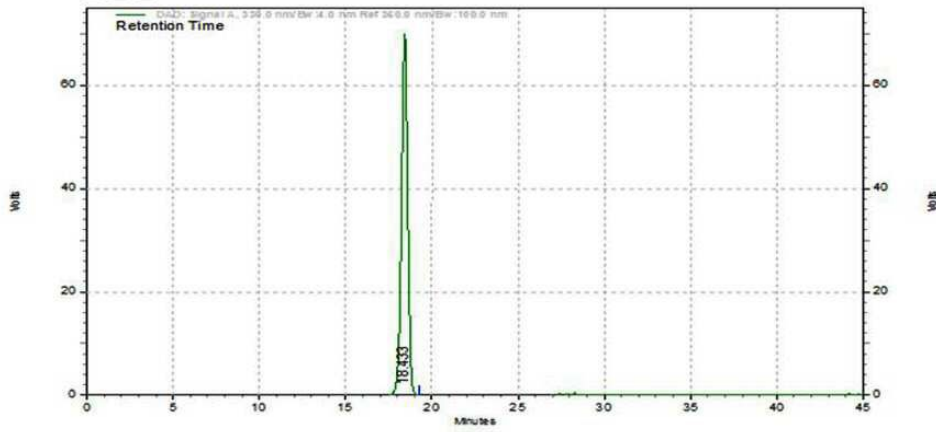
도면

도면1

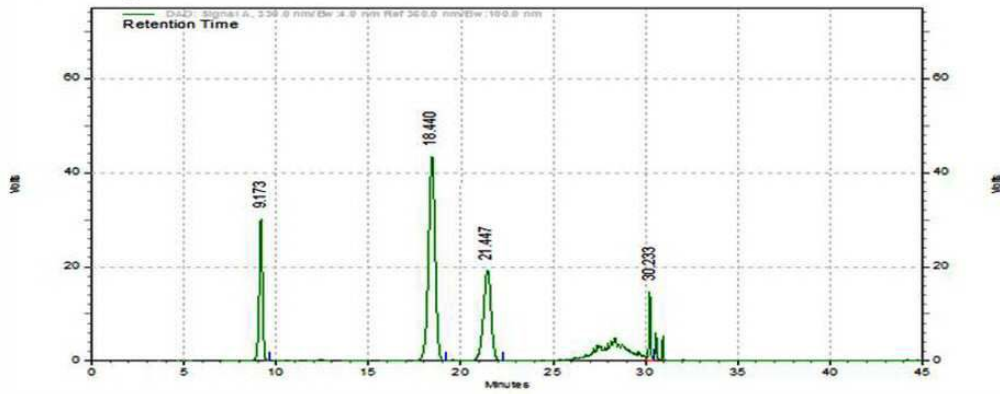


도면2

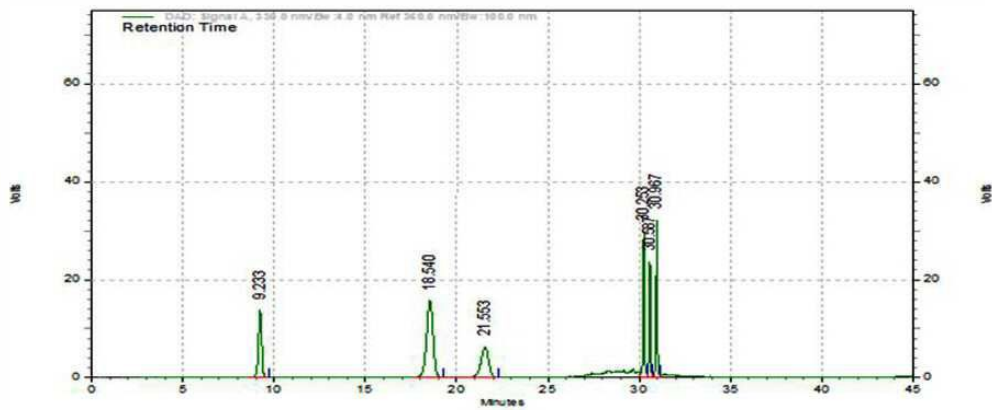
a. 표준물질 : CGA



b. Sample : HS-23



c. Sample : SL-101



도면3

