



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월13일
(11) 등록번호 10-1715676
(24) 등록일자 2017년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 17/04 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61K 36/80 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 17/04 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0085752
(22) 출원일자 2015년06월17일
심사청구일자 2015년06월17일
(65) 공개번호 10-2016-0148936
(43) 공개일자 2016년12월27일
(56) 선행기술조사문헌
J. Nat. Prod. Vol. 62, Pages 901-903(공개일:
1999.)

(73) 특허권자
영진약품공업주식회사
서울특별시 송파구 올림픽로35다길 13 (신천동)
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
이용남
경기도 수원시 영통구 법조로149번길 22, 202호
유지석
경기도 수원시 권선구 매곡로 100, 102동 805호
(금곡동, 동성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김정아

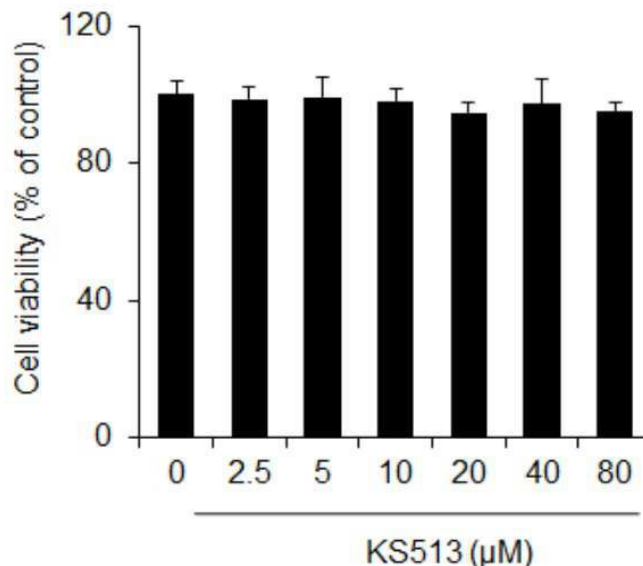
(54) 발명의 명칭 산꼬리풀 추출물로부터 분리된 신규 화합물 (KS 513) 및 이를 유효성분으로 포함하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 산꼬리풀 추출물로부터 분리된 신규 화합물, 상기 추출물로부터 분리된 (3R,5S,5aS,6R,7S,8R,8aS)-8-클로로-8a-히드록시-5-(2-히드록시아세톡시)헥사히드로-1H-3,6-메타노시클로펜타[e][1,3]디옥세핀-7-일 3,4-디히드록시벤조에이트{(3R,5S,5aS,6R,7S,8R,8aS)-8-chloro-8a-hydroxy-5-(2-hydroxy acetoxy)hexahydro-1H-3,6-

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



Effect of KS-513 on the Cell viability in RAW264.7

methanocyclopenta[e][1,3]dioxepin-7-yl 3,4-dihydroxybenzoate} (KS-513) 을 유효성분으로 포함하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 화합물을 대상으로 RAW264.7 세포에서의 세포생존률 시험 (실험예 1); LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 유전자 발현이 유도된 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS와 COX-2, 전구 염증 매개 사이토카인 유전자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현양에 대한 영향실험(실험예 2); NO 생성과 관련된 효소유전자 iNOS의 단백질 발현 및 NO 생성농도에 대한 억제실험 (실험예 3); 전구 염증 매개 효소 유전자 COX-2의 단백질 발현 및 PGE₂생성농도에 대한 억제실험 (실험예 4); 전구 염증 매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 분비 억제실험 (실험예 5)을 통하여, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 및 PGE₂의 생성억제, iNOS 및 COX-2 단백질과 유전자의 발현을 억제시켰으며, 전구 염증 매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 의 분비량도 억제시킴을 확인하여, 상기 조성물을 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 치료용 약학조성물, 건강기능식품 또는 건강보조식품으로 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)

A61K 36/80 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/314 (2013.01)

(72) 발명자

신대회

서울특별시 서초구 효령로77길 20, 1동 1007호 (서초동, 현대ESA아파트)

류병환

경기도 성남시 분당구 금곡로 39, 104동 303호 (구미동, 화이트빌)

오세량

대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

안경섭

대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

이형규

대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

이수의

대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

송혁환

대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

류형원

대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 TGC3241313

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오 의료기기산업 핵심기술 개발사업

연구과제명 천식/COPD 치료제 개발을 위한 천연물 신약후보 YPL-001의 분석 및 활성연구

기여율 1/1

주관기관 동아제약(주)연구소

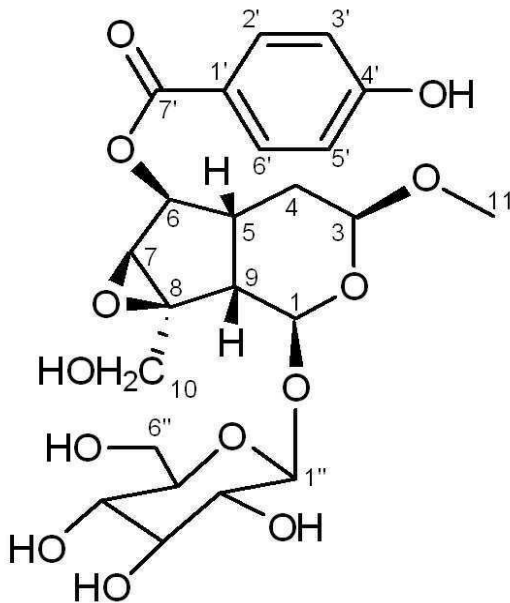
연구기간 2013.07.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

산꼬리풀 추출물로부터 분리된 하기 구조식 (a)의 신규 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 { (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate } (KS-513) 화합물, 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화물:



(a)

청구항 2

산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 { (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate } (KS-513) 화합물을 유효성분으로 포함하는 알리지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 { (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate } (KS-513) 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유한 알리지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

삭제

청구항 6

산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 개선용 건강보조식품.

청구항 7

산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 개선용 식품첨가물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산꼬리풀 추출물로부터 분리된 신규 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] [문헌 1] Minoguchi K and Adachi M. Pathophysiology of asthma. In: Cherniack NS, Altose MD, Homma I, editors. Rehabilitation of the patient with respiratory disease. New York: McGraw-Hill, 1999, pp97-104.
- [0003] [문헌 2] Elias JA, et al., J. Clin. Invest., 111, pp291-297, 2003
- [0004] [문헌 3] Maggi E., Immunotechnology, 3, pp233-244, 1998; Pawankar R., Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 1, pp3-6, 2001
- [0005] [문헌 4] Barnes PJ, et al., Pharmacol Rev., 50, pp515-596, 1998
- [0006] [문헌 5] 한국특허등록 제 10-860080호
- [0007] [문헌 6] 한국특허공개 제10-2006-125499호
- [0008] [문헌 7] 한국특허출원 제 10-2013-84167호

- [0009] [문헌 8] 한국특허출원 제 10-2014-36245호
- [0010] [문헌 9] Ishiyama *et al.*, *Talanta*, 44, pp.1299-1305, 1997;
- [0011] [문헌 10] Tominaga *et al.*, *Anal. Commun.*, 36, pp.47-50, 1999
- [0012] [문헌 11] Kim *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 104, pp.1906-1917, 2008
- [0013] [문헌 12] Busse, P. J., Zhang, T. F., Srivastava, K., Lin, B. P., Schofield, B., Sealfon, S. C. & Li, X. M. (2005) Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo, *The Journal of allergy and clinical immunology*. **116**, 1256-63
- [0014] [문헌 13] Smirnova, M. G., Birchall, J. P. & Pearson, J. P. (2000) TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model, *Cytokine*. **12**, 1732-6
- [0015] [문헌 14] Sikder, MA. *et al.*, *Phytotherapy research : PTR*. 28, 62-8. 2014
- [0016] [문헌 15] Shin, I. S., Hong, J., Jeon, C. M., Shin, N. R., Kwon, O. K., Kim, H. S., Kim, J. C., Oh, S. R., Ahn, K. S. (2013) Diallyl-disulfide, an organosulfur compound of garlic, attenuates airway inflammation via activation of the Nrf-2/HO-1 pathway and NF-kappaB suppression, *Food and Chemical Toxicology*. **62**, 506-13
- [0017] [문헌 16] Bhavsar, T., Liu, X. J., Patel, H., Stephani, R., Cantor, J. O. (2008) Preferential recruitment of neutrophils by endothelin-1 in acute lung inflammation induced by lipopolysaccharide or cigarette smoke, *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. **3**, 477-81

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 본 발명은 산고리폴 추출물로부터 분리된 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 알리지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 일반적으로 염증 반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려고 하는 생체의 방어 반응과정이다. 따라서 이러한 일련의 반응에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포, 면역관여 세포 등이 포함된다. 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환이 사이토카인(cytokine)이라는 분자 수준에서의 이해가 시도되고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다.
- [0021] 알레르기 반응은 그 반응 형태에 의해 I형, II형, III형 및 IV형의 4 가지 유형으로 분류될 수 있고, 또는 항원에 의한 재감작(感作) 후 발증까지의 시간에 의해서 I형, II형 및 III형 알레르기는 즉시형 알레르기라고 불리며, IV형 알레르기는 지연형 알레르기로 분류될 수 있다.
- [0023] 이 중, I형 알레르기는 IgE 항체가 관여하는 반응으로서, 아나필락시형 알레르기라고 불리우며, 여기에는 기관지 천식, 아토피성 질환(피부염, 장염 등), 화분증 등의 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 음식물 알레르기 등이 포함된다.
- [0025] 천식(asthma)이란 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민성을 그 특징으로 하는 질환으로 기도의 광범위한 협착에 의해 발생하는 천명(喘鳴), 호흡곤란, 기침 등의 임상 증세들은 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전될 수 있다. 대부분의 천식은 알레르기성이며, 만성 기도염증(chronic airway inflammation)과 기도 과민반응성(bronchial hyperresponsiveness)이 특징이다(Minoguchi K and Adachi M. Pathophysiology of asthma. In: Cherniack NS, Altose MD, Homma I, editors. Rehabilitation of the patient with respiratory disease. New York: McGraw-Hill, 1999, pp97-104).
- [0027] 천식은 그 원인에 따라 외인성 천식과 내인성 천식으로 나누어질 수 있다. 외인성 천식의 경우 원인 항원에 노출되었을 때 증상이 나타나는 천식을 말한다. 원인 항원에 대한 피부시험이나 기관지 유발시험이 양성반응을 보이며 발병 연령이 어린 것이 일반적이다. 집 먼지, 진드기가 가장 많은 원인 항원이며, 그밖에 꽃가루, 동물의 상피, 곰팡이 등이 원인 항원으로 작용한다. 내인성 천식의 경우에는 상기도 감염, 운동, 정서불안, 한랭 기후 및 습도의 변화 등이 천식을 유발하거나 악화시키는 경우인데, 성인형 천식에서 흔히 볼 수 있다. 그 외에도 약

물에 의해 유발되는 천식, 운동 유발성 천식 및 직업성 천식 등이 있다.

- [0029] 천식은 TH2(T helper 2) 타입 면역세포가 생성하는 인터루킨-4, 5, 13에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도 주변 조직으로 이동, 침윤하기 때문에 만성 염증질환으로도 인식되고 있다(Elias JA, et al., J. Clin. Invest., 111, pp291-297, 2003). 천식을 앓고 있는 환자의 기관지에서 활성화된 호산구, 비만세포, 폐포 대식세포 등의 염증세포는 다양한 염증매개인자들(시스테인 류코트리엔, 프로스타글란딘 등)을 분비하면서 강력한 기관지 수축작용에 관여한다(Maggi E., Immunotechnology, 3, pp233-244, 1998; Pawankar R., Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 1, pp3-6, 2001; Barnes PJ, et al., Pharmacol Rev., 50, pp515-596, 1998).
- [0031] 따라서 염증세포 활성화에 관여하는 IL-4, IL-5, IL-13 등 사이토카인 및 면역글로불린 E의 생산과 이들의 작용으로 호산구 등 염증세포에서 분비되는 시스테인 류코트리엔 생합성 등은 염증 및 알레르기 반응과 이로 인한 천식을 유발하는 주요 원인이므로 이들의 생산을 억제하기 위한 약물을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.
- [0033] 만성폐쇄성 폐질환 (Chronic Obstructive pulmonary disease, COPD)는 전세계적으로 해마다 증가하고 있는 질환으로, 인류의 건강을 위협하는 원인 중 하나이다. 현재, 만성폐쇄성 폐질환은 많은 나라에서 사망의 주요원인으로 주목되고 있으며, 특히 2020년에는 만성폐쇄성 폐질환이 인류의 사망원인 중 3번째 원인이 될 것으로 예측되고 있다 (Vestbo, J., Hurd, S.S., Agusti, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes,P.J., Fabbri, L.M., Martinez, F.J., Nishimura, M., Stockly, R.A., Sin.D.D., Rodriguez-Roisin, R., 2013. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 187, 347-365.). 일반적으로 만성폐쇄성 폐질환은 지속적인 폐조직내 공기흐름을 억제 및 폐쇄시켜 결국 환자를 사망에 이르게 한다 (Le, A., Zielinski, R., He, C., Crow, M.T., Biswal, S., Tudor, R.M., 2009. Pulmonary epithelial neutrophilin-1 deletion enhances development of cigarette smoke-induced emphysema. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180, 396-406.). 이러한 만성폐쇄성 폐질환은 담배연기, 먼지, 화학물질, 대기오염, 세균감염 등의 다양한 원인에 의해서 발생된다 (Li, Y., Li, S.Y., Li, J.S., Deng, L., Tian, Y.G., Jiang, S.L., Wang, Y., Wang, Y.Y., 2012. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection. Biol. Pharm. Bull. 35, 1752-1760.). 특히, 흡연은 만성폐쇄성 폐질환의 가장 큰 원인으로 간주되고 있으며, 실제 만성 폐쇄성 폐질환에 걸린 환자의 80% 이상이 흡연자로 밝혀졌다 (Rabe et al., 2007). 담배연기에는 수많은 독성화학물질 포함되어 있어, 흡연시 폐조직 내 해로운 변화를 야기한다 (Stampfli, M.R., Anderson, G.P., 2009. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. Nat. Rev. Immunol. 9, 377-384.). 이러한 독성화학물질은 폐조직내호중구 (Neutrophils) 를 비롯한 다양한 염증세포의 침윤을 일으키고, 이로 인하여 폐염증이 발생하게 된다 (Terashima, T., Wiggs, B., English, D., Hogg, J.C., van Eeden, S.F., 1997. Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulated the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155, 1441-1447). 임상연구에서도 만성폐쇄성 폐질환 환자의 기관지폐포세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 혹은 객담 (Sputum) 에서 호중구 및 대식세포 (Macrophages)의 수가 현저하게 증가하였다 (O' Donnell, R., Breen, D., Wilson, S., Djukanovi, R., 2006. Inflammatory cells in the airway in COPD. Thorax 61, 448-454.). 이러한 염증세포들은 활성산소종 (Reactive oxygen species), 염증성사이토카인 (Cytokines), 케모카인 (Chemokines), 및 조직손상을 야기하는 다양한 효소를 생산한다 (Profita, M., Sala, A., Bonanno, A., Riccobono, L., Ferraro, M., La Grutta, S., Albano, G.D., Montalbano, A.M., Gjomarkaj, M., 2010. Chronic obstructive pulmonary disease and neutrophil infiltration: role of cigarette smoke and cyclooxygenase products. Am. J. Physiol. Lung Cell.Mol. Physiol. 298, L262-L269.). 특히, 호중구는 만성폐쇄성 폐질환이 발병하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Hiemstra, P.S., van Wetering, S., Stolk, J., 1998. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. Eur. Respir. J. 12, 1200-1208.). 호중구는 많은 염증성사이토카인, 케모카인 및 화학주성인자를 생성할 뿐만아니라, 엘라스틴 분해효소 (Elastase)를 분비하여, 정상적인 폐포형태를 파괴하고 결국에는 폐기종 (Emphysema)을 야기한다 (Hoenderdos, K., Condliffe, A., 2013. The neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 48, 531-539.). 따라서, 담배연기로 인한 염증세포 특히 호중구의 침윤을 억제하는 것은 만성폐쇄성 폐질환의 치료에 있어 매우 중요한 치료수단으로 인식되고 있다.
- [0035] 따라서, 만성 폐쇄성 폐질환은, 가역적인 기류 폐쇄와 알려지성 기관지 염증 반응을 주된 특징으로 나타내는 천

식과는 구분되어서 적합하게 치료되어야 하지만, 현재의 치료법은 단지 증상의 경감을 제공함에 불과하고, 최근 치료법 중 어느 것도 만성 폐쇄성 폐질환의 근본적인 치료 효과를 임상적인 결과로 나타내지 못하고 있다 (Hele DJ, Belvisi MG. 2003. Novel therapies for the treatment of inflammatory airway diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 5-18; Fox JC, Fitzgerald MF. 2009. The role of animal models in the pharmacological evaluation of emerging anti-inflammatory agents for the treatment of COPD. *Curr Opin Pharmacol.* 9: 231-242)

[0037] 천식과 COPD는 원칙적으로 상이한 병리기전을 나타내는데, 예를 들어, (1) 염증세포 면에서, 천식은 비만세포 (mast cell), 호산구(Eosinophils), CD4+ 세포 (Th2), 대식세포(Macrophages) 등이 주로 작용하는데 반하여, COPD는 호중구(Neutrophils), CD8+ 세포 (Tc) 등이 주로 작용한다는 점에서 상이하며; (2) 염증매개인자 면에서, 천식은 류코트리엔(Leukotriene B), 히스타민(Histamine), IL-4, IL-5, IL-13, 에오타신(Eotaxin), RANTES, 산화적 스트레스(Oxidative stress) 등이 주로 관여되는데 반하여, COPD는 TNF-alpha, IL-8, GRO-alpha 등이 주로 관여된다는 점에서 상이하며; (3) 염증현상 면에서, 천식은 전체 기도에 작용하여, AHR(기도 과민반응 과민), 상피성 쉼딩(Epithelial shedding), 섬유증(Fibrosis), 조직질실상 발전이 없으며(no parenchymal involvement), 점액분비(mucus secretion), 비교적 가역적 기류장애 현상, 기침, 재채기, 호흡곤란(dyspnea)을 주로 어린 시기에 발생하는 데 반하여, COPD는 말초 기도에 작용하여, 상피성 변성(Epithelial metaplasia), 조직질실상 손상 (parenchymal destruction), 비교적 비가역적 기류장애 현상, 만성 기관지염, 폐기종을 주로 성인기에 발생하는 점에서 상이한 점 등의 별개의 병리기전을 갖는 것으로 알려져 있다 (Barnes PJ. 2000. Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest* 117: 10S-14S; Seatta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. 2001. Cellular and structural base of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 163: 1304-1309)

[0039] 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환이 사이토카인 (cytokine)이라는 분자 수준에서의 이해가 시도되고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다. 이들 사이토카인들은 세포가 특정한 상황에서 세포밖으로 분비되는 단백질들로서, 주로 인터루킨(interleukin; IL) 계열이 많이 알려져 있다. 사이토카인들은 다양한 세포에서 분비되어 염증세포의 이동을 유도하고, 세포의 활성화에 관여하여 염증반응을 조절한다. 이렇게 사이토카인들의 역할은 아주 다양하여 면역기능의 일부를 담당하거나, 세포의 분화를 유도하기도 한다. 특히, IL-4는 기도 염증성 질환인 천식과 관련된 중요한 사이토카인이다.

[0040] 천식의 기도염증에서는 type 2 helper T(Th2)세포가 우세한데 그 기전은 확실히 규명되지 않았지만 Th0세포의 일차 분화시기에 알레르기항원에 의해 자극된 전구 CD4 T-세포에서 분비되는 IL-4에 의해 Th2 세포로 분화된다. Th2세포에서는 IL-4, 5, 6, 9, 13 등이 분비되며 이들은 알레르기성 기도염증을 유발시키며, 특히 IL-4는 B-세포를 자극하여 IgE의 생산을 증가시킨다. 그러므로, IL-4의 발현과 생성은 천식 질환의 메커니즘을 규명하는데 중요한 요인으로서, 이를 억제하는 약물의 탐색은 상기 질환의 예방 또는 치료의 전략이 될 수 있다.

[0041] 지금까지 본 발명자들은 염증, 알레르기 및 천식 질환에서 특징적으로 나타나는 다양한 종류의 사이토카인 및 케모카인에 대한 항체를 이용한 치료제로써 여러 가지 자원, 특히 안전성 및 유효성이 이미 알려진 천연물 자원을 이용한 치료제 개발을 중점으로 하여 개발되어 오고 있어 온 바, 특히 본 발명자들은 꼬리풀속 식물 추출물의 항염, 항알레르기 및 항 천식 활성을 확인하여 특허출원하고 (한국특허등록 제 10-860080호) 상기 추출물로부터 분리된 카탈폴(catalpol) 유도체 성분, 예를 들어, 베프로시드 (verproside, 6-O-3,4-Dihydroxybenzoyl catalpol), 피크로시드 II (picroside II, 6-O-4-hydroxy-3-methoxybenzoyl), 베르미노시드 (verminoside, 6-O-3,4-dihydroxy cinnamoyl catalpol), 6-O-베라트로일카탈폴 (6-O-veratroylcatalpol, 6-O-3,4-Dimethoxy benzoyl), 미네코시드 (minecoside, 6-O-3-hydroxy-4-methozycinnamoyl catalpol), 카탈폴 (catalpol) 등의 성분을 분리하고 이들 성분들이 항염, 항알레르기 및 항 천식 활성을 나타냄을 확인하여 특허출원한 바가 있으며 (한국특허공개 제10-2006-125499호); 카탈폴 유도체들의 함량이 매우 소량으로 산업상 대량으로 생산하기에 어려운 문제점을 안고 있는 상기 기존 발명의 후속으로 고함량의 카탈폴 유도체를 다량 함유한 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*)유래 산꼬리풀 신규 정제물을 발명하고 이의 염증, 알레르기 및 천식의 치료제로서의 효능을 확인하여 출원하고 (한국특허출원 제 10-2013-84167호); 또한 상기 산꼬리풀 신규 정제물의 만성 폐쇄성 폐질환 치료제로서의 효능을 확인하여 후속으로 출원한 바가 있다 (한국특허출원 제 10-2014-36245호).

[0043] "산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* = *Veronica rotunda* var. *subintegra*)은 현삼과 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본으로서, 산꼬리풀의 높이는 40~80 cm 정도이고, 줄기는 곧게 서 있으며, 굽은 털이 있다. 산꼬리풀의 잎은 마주나기를 하며 좁은 달걀형이거나 긴 타원형이다. 산꼬리풀 잎의 끝은

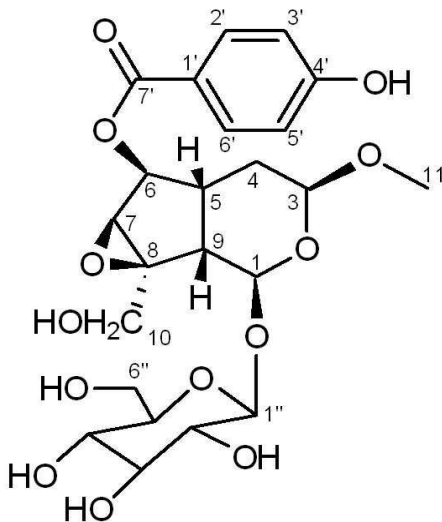
뾰족하며 기부는 좁아지고, 가장자리에는 불규칙한 톱니가 있고, 잎의 길이는 5~10 cm이다. 잎의 뒷면의 맥위로 는 털이 약간 있다. 산꼬리풀의 꽃은 가지와 줄기 끝에 파란빛을 띤 자주빛의 꽃이 총상꽃차례로 달린다. 꽃받 침과 꽃잎은 각 4개이며 끝은 뾰족하다. 수술은 2개이며 꽃밥은 짙은 자주색이다. 산꼬리풀의 열매는 삭과로 넓 은 달걀 뒤집은 모양이다. 산꼬리풀은 한국, 일본, 만주, 사할린섬, 우수리강 등지에 분포한다 (Flora of China 18; 1-212. 1998).

[0045] 이에, 본 발명자들은 산꼬리풀(*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 신규 화학구조를 갖는 새로운 신규 화합물을 분리하고 이를 대상으로 RAW264.7 세포에서의 세포생존률시험 (실험예 1); LPS로 처 리한 RAW 264.7 세포에서 유전자 발현이 유도된 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS와 COX-2, 전구 염증 매개 사이토카인 유전자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현양에 대한 영향실험(실험예 2); NO 생성과 관련된 효소 유전자 iNOS의 단백질 발현 및 NO 생성농도에 대한 억제실험 (실험예 3); 전구 염증 매개 효소 유전자 COX-2의 단백질 발현 및 PGE₂생성농도에 대한 억제실험 (실험예 4); 전구 염증 매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 분비 억제실험 (실험예 5)을 통하여, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 및 PGE₂의 생성억제, iNOS 및 COX-2 단백질과 유전자의 발현을 억제시켰으며, 전구 염증 매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 의 분비량 도 억제시킴을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0047] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 산꼬리풀 추출물로부터 분리된 하기 구조식 (a)의 신규 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시 메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤 조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy- 6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물, 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화물을 제공한다.

화학식 1



[0048] (a)

[0049] (a)

[0051] 본 발명의 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

[0052] 본 발명의 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동일한 몰량의 화합물 및 몰 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나,

또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

- [0053] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 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, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산 및 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.
- [0054] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비 용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0055] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 하이드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조 방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 유도체들은 당업계에 잘 알려진 실리카겔 컬럼, 및 재결정법을 이용한 정제과정을 반복수행하는 분리 방법 및 정제방법, 예를 들어, 한국특허공개 제 10-2006-125499호에 개시된 산꼬리풀(*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 정제물로부터 분리하는 방법 또는 화학적으로 합성하여 제조하거나, 상업적으로 구입가능하다.
- [0059] 본원에서 정의되는 상기 화합물들은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용가능한 염 및 이의 용매화물로 제조가능하다.
- [0060] 따라서, 본 발명은 상기 화합물들은 이의 이성체, 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화물을 포함함을 특징으로 한다.
- [0061] 본 발명의 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 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 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [0062] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 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, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.
- [0063] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비 용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0065] 또한, 본 발명의 화합물은 비대칭 중심을 가지므로 상이한 거울상 이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 본 발명의 화합물의 모든 광학 이성질체 및 R 또는 S형 입체 이성질체 및 이들의 혼합물도 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 한다. 본 발명은 라세미체, 하나 이상의 거울상 이성질체 형태, 하나 이상의 부분 입체 이성질체 형태 또는 이들의 혼합물의 용도를 포함하며, 당업계에서 알려진 이성질체의 분리 방법이나 제조과정을 포함한다.

- [0066] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0067] 본 발명의 화합물들은 하기와 같은 제조방법으로 수득될 수 있다.
- [0068] 예를 들어, 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0069] 건조된 산꼬리풀(*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 을 세척 및 세절 후 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 10~100% 메탄올을 수회 섞은 다음에 10 내지 150℃, 바람직하게는 20 내지 70 의 온도에서 30분 내지 72시간, 바람직하게는 1시간 내지 48시간 초음파 추출법, 열수 추출법, 상온 추출법 또는 환류추출법, 바람직하게는 냉침추출법을 약 1 내지 20회, 바람직하게는 2 내지 10회 반복 수행하여 얻은 추출액을 여과, 감압 농축, 및 건조하여 본 발명의 조추출물을 얻을 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명의 화합물들은 상기에서 얻은 조추출물을 역상크로마토그래피법, 플래쉬 컬럼크로마토그래피, RP C18 컬럼크로마토그래피 또는 실리카겔 오픈 컬럼크로마토그래피, Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피, 세파텍스 컬럼 크로마토그래피법 등의 하나 이상의 정제방법을 선택적으로 수회 반복 수행하여 본 발명의 화합물인 신규 구조의 KS-513 화합물을 분리가능하다.
- [0071] 본 발명자들은 상기 제조방법으로 수득되는 화합물들을 대상으로 RAW264.7 세포에서의 세포생존률 시험 (실험예 1); LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 유전자 발현이 유도된 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS와 COX-2, 전구 염증 매개 사이토카인 유전자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현양에 대한 영향실험(실험예 2); NO 생성과 관련된 효소유전자 iNOS의 단백질 발현 및 NO 생성농도에 대한 억제실험 (실험예 3); 전구 염증 매개 효소 유전자 COX-2의 단백질 발현 및 PGE₂생성농도에 대한 억제실험 (실험예 4); 전구 염증 매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 분비 억제실험 (실험예 5)을 통하여, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 및 PGE₂의 생성억제, iNOS 및 COX-2 단백질과 유전자의 발현을 억제시켰으며, 전구 염증 매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비량도 억제시킴을 확인하여, 상기 조성물을 알리지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 치료용 약학조성물 또는 건강기능식품으로 유용함을 확인하였다.
- [0072] 또한, 본 발명의 식물원료는 오랫동안 식용되거나 생약으로 사용되어 오던 약재로서 본 발명의 식물 추출물로부터 분리된 화합물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- [0073] 본 발명의 약학 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 90 중량 %로 포함한다.
- [0075] 따라서, 본 발명은 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 포함하는 알리지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0078] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유한 알리지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0079] 본 발명에서 산꼬리풀은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 또한 본 발명의 산꼬리풀로부터 분리된 화합물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 열풍 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조될 수 있다.
- [0081] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 상기 산꼬리풀 추출물로부터 분리된 화합물을 포함하는 조성물의 투여로

알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 산꼬리풀 추출물로부터 분리된 화합물을 포함하는 조성물의 투여로 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0082] 다른 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 상기 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 분리된 (1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2',3':4,5]시클로펜타[1,2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2',3':4,5]cyclopenta[1,2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환 환자에게 투여함을 포함하는 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환을 치료하기 위한 치료방법을 제공한다.

[0084] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 상기 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 분리된 (1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2',3':4,5]시클로펜타[1,2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2',3':4,5]cyclopenta[1,2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 포함하고 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유한 조성물을 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환환자에게 투여함을 포함하는 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환을 치료하기 위한 치료방법을 제공한다.

[0086] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환 환자를 치료하기 위한 치료제 제조를 위한 상기 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 분리된 (1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2',3':4,5]시클로펜타[1,2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2',3':4,5]cyclopenta[1,2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물의 용도를 제공한다.

[0087] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알려지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환 환자를 치료하기 위한 치료제 제조를 위한 상기 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*) 추출물로부터 분리된 (1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2',3':4,5]시클로펜타[1,2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS,1bS,2S,4S,5aR,6S,6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S,3R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2',3':4,5]cyclopenta[1,2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 포함하고 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유한 조성물의 용도를 제공한다.

[0089] 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학 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 있다. 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 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 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, 비수성

용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다.

- [0091] 상기한 제제에는 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물을 포함하는 약학조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0093] 본 발명의 화합물은 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.
- [0094] 또한, 본 발명은 산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0096] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0097] 본 발명의 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품은, 조성물 총중량에 대하여 상기 화합물을 0.01 내지 95%, 바람직하게는 1 내지 80% 중량백분율로 포함한다.
- [0098] 또한, 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선을 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 약학 투여형태 또는 티백제, 침출차, 건강 음료 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.
- [0099] 또한, 본 발명은 산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 개선용 건강보조식품을 제공한다.
- [0102] 또한, 본 발명은 산꼬리풀 (Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum) 추출물로부터 분리된 (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 {(1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl 4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물을 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 개선용 식품 또는 식품첨가물을 제공한다.
- [0103] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안전청에 승인된 식품첨가물공정의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0105] 본원에서 정의되는 "주성분" 이라 함은 전체 식품 조성물 100% 중량 기준 대비 약 1 내지 99%(w/w), 바람직하

게는, 5 내지 60%, 보다 바람직하게는, 20 내지 50%(w/w) 중량을 함유함을 특징으로 한다.

[0106] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0107] 본 발명의 화합물이 포함된 기능성 식품으로는 빵, 떡류, 건과류, 캔디류, 초콜릿류, 츄잉껌, 쥬류와 같은 과자류 아이스크림류, 빙과류, 아이스크림 분말류와 같은 아이스크림 제품류 우유류, 저지방 우유류, 유당분해우유, 가공우유, 산양유, 발효유류, 버터유류, 농축유류, 유크림류, 버터유, 자연치즈, 가공치즈, 분유류, 유청류와 같은 유가공품류 식육가공품, 알가공품, 햄버거와 같은 식육제품류 어묵, 햄, 소세지, 베이컨 등의 어육가공품과 같은 어육제품류 라면류, 건면류, 생면류, 유당면류, 호화건면류, 개량숙면류, 냉동면류, 파스타류와 같은 면류 과실음료, 채소류음료, 탄산음료, 두유류, 요구르트 등의 유산균음료, 혼합음료와 같은 음료 간장, 된장, 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 식초, 소스류, 토마토케첩, 카레, 드레싱과 같은 조미식품 마가린, 쇼트닝 및 피자를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0108] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 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 덱스트린, 시클로덱스트린 등)과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1~20 g, 바람직하게는 약 5~12 g이다.

[0109] 상기 외에 본 발명의 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. 그밖에 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 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0110] 또한, 본 발명의 화합물은 목적 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml을 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0112] 상기 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 화합물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 효과

[0114] 본 발명에 따른 화합물이 RAW264.7 세포에서의 세포생존률시험(실험예 1); LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 유전자 발현이 유도된 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS와 COX-2, 전구 염증 매개 사이토카인 유전자인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현양에 대한 영향실험(실험예 2); NO 생성과 관련된 효소유전자 iNOS의 단백질 발현 및 NO 생성농도에 대한 억제실험(실험예 3); 전구 염증 매개 효소 유전자 COX-2의 단백질 발현 및 PGE₂ 생성농도에 대한 억제실험(실험예 4); 전구 염증 매개 사이토카인 TNF-α, IL-1β, IL-6 분비 억제실험(실험예 5)을 통하여, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO 및 PGE₂의 생성억제, iNOS 및 COX-2 단백질과 유전자의 발현을 억제시켰으며, 전구 염증 매개 사이토카인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 분비량도 억제시킴을 확인하여 상기 조성물을 알러지, 염증, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0116] 도 1은 KS-513의 RAW264.7세포에서의 세포생존율에 미치는 영향을 나타낸 도이며;
 도 2는 KS-513의 RAW264.7세포에서의 LPS-유도 염증-관련 유전자인 TNF-α, IL-6, IL-1β, iNOS 및 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이며;

도 3는 KS-513의 RAW264.7세포에서의 western blot 및 Nitric oxide assay법을 이용한 iNOS 발현 및 NO 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (통계 분석은 시험법(Student's t-test)으로 수행하고 P값(*, <0.05)을 통계적으로 유의성이 있다고 간주함);

도 4는 KS-513의 RAW264.7세포에서의 western blot 및 enzyme immunoassay(EIA)법을 이용한 COX-2 발현 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (통계 분석은 시험법(Student's t-test)으로 수행하고 P값(**p<0.01 및 ***p<0.001))을 통계적으로 유의성이 있다고 간주함);

도 5는 KS-513의 RAW264.7세포에서의 IL-1β, TNF-α 및 IL-6의 LPS-유도 분비에 미치는 영향을 ELISA assay법으로 시험한 결과를 나타낸 도이다 (통계 분석은 시험법(Student's t-test)으로 수행하고 P값(*, <0.05, **, <0.01 및 ***, <0.001)을 통계적으로 유의성이 있다고 간주함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0117] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0120] **참조예 1: 분석 기기**

[0121] 용점(Melting points)은 기기 (Koflermicrohostage)에서 보정없이 측정하고 광학 회전을(Optical rotation)은 기기 (Jasco P-1020 polarimeter)에서 분석하였으며, UV 데이터는 기기 (UV-VIS 2450 spectrometer), FT-IR 스펙트라(spectra)는 기기 (Jasco FT/IR-4200), NMR 스펙트라(spectra)는 내분 표준물질(internal standard)로 테트라메틸실란 (tetramethylsilane)을 이용하여 기기(Varian UNITY 400 MHz FT-NMR spectrometer)에서 기록하였다. HRESIMS 는 기기 (Waters Q-TOF Premier spectrometer)에서 수행하고 HPLC 분리는 UV/VIS-155 탐지기(detector), 펌프(pump 305)를 이용하여 기기(Gilson)에서 수행하였다.

[0124] **실시예 1: 산꼬리풀 추출물로부터 신규 화합물 분리**

[0125] 1-1. 조추출물 제조

[0126] 산꼬리풀 (*Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* = *Veronica rotunda* var. *subintegra*) 전초 (GAP 재배, 충북 음성군 소이면 비산리 244번지, KRIB 0020697, Plant Extract Bank of KRIBBm 대전, Korea) 4.0 kg을 건조, 절단한 후, 산꼬리풀 전초 시료에 메탄올 10L를 가하여 상온에서 24시간 동안 냉침 추출하였다. 그 후, 78℃에서 12시간 교반하면서 환류 추출을 수행한 후 진공 여과하여 상층액을 회수하였다. 상기 과정을 2회 반복하여 상층액을 회수하고 이 추출액을 감압농축기(EYELA, N-2100, JAPAN)로 감압 농축하여 산꼬리풀 메탄올 추출물 397.4 g 을 수득하였다.

[0128] 1-2. 분획물 제조

[0129] 1-1 단계에서 얻은 조추출물 (200 g) 을 역상 크로마토그래피법으로(preparative reversephase chromatography; Zeoprep C18, 75 μm, 200 × 250 mm, Zeochem, Louisville, U.S.A) 용매(25% MeOH-water solution)를 이용하여 유출하였고 여기에서 얻은 분획들(f1-f4)을 회수하고 감압농축하였다. 이중 분획 f2 (5.0 g)를 중간압 액체 크로마토그래피법으로(medium pressure liquid chromatography (MPLC), 컬럼: RP C-18 (Zeoprep C18, 10 μm, 20 × 250 mm, Zeochem, Louisville, U.S.A)에서 경사 혼합 전개 용매 (MeOH-water solution= 2:8, 3:7, 4:6, 10:0)로 유출하여 5개 소분획 (f2a, f2b, f2c, f2d, 및 f2e)을 수득하였다.

[0131] 1-3. KS-513 화합물 분리

[0132] 상기 소분획 f2b (2.3 g)을 HPLC (SynergiPolar-RP, 4.0 μm, 21.2× 250 mm, Phenomenex, Torrance, U.S.A., 23% MeCN-water)를 수행하여 하기 물질처를 갖는 신규 구조의 이리도이드 배당체 KS-513 (7.2 mg)을 수득하였다.

[0134] (1)

[0135] (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(히드록시메틸)-4-메톡시-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)옥타히드로옥시레노[2', 3':4, 5]시클로펜타[1, 2-c]피란-6-일 4-히드록시벤조에이트 $\{$ (1aS, 1bS, 2S, 4S, 5aR, 6S, 6aS)-1a-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(((2S, 3R, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)octahydrooxireno[2', 3':4, 5]cyclopenta[1, 2-c]pyran-6-yl

4-hydroxybenzoate} (KS-513) 화합물].

- [0136]性状 : 백색 무정형 분말상 (white amorphous powder),
- [0137] $[\alpha]_D^{20}$ -64.0° (c 0.2, MeOH).
- [0138] 분자식: C₂₃H₂₉O₁₃
- [0139] HRESEMS (observed m/z 513.1609 [M-H]⁻): quasimolecular 3:1 ion cluster
- [0140] ¹³C and DEPT NMR spectra: 표 1

표 1

[0141] ¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz) NMR spectroscopic data for KS-513 in DMSO

Position	δ_c	δ_H (J in Hz)
Agluc		
1	93.2	5.10, d (7.6)
3	98.0	4.68, dd (9.2, 2.4)
4	28.2	1.72, d (13.6)
		1.56, m
5	34.4	2.33, m
6	76.0	5.24, d (9.0)
7	57.9	3.68, d (9.0)
8	65.5	
9	41.5	2.29, t (8.0)
10	58.3	3.85, m
		3.85, m
11	55.4	3.37, s
Aroyl		
1'	119.8	
2'	131.6	7.84, d (8.4)
3'	115.4	6.87, d (8.4)
4'	162.8	
5'	115.4	6.87, d (8.4)
6'	131.6	7.84, d (8.4)
7'	165.8	
Glc		
1"	97.4	4.59, d (8.0)
2"	73.4	3.04, m
3"	76.6	3.19, m
4"	70.3	3.04, m
5"	77.4	3.13, m
6"	61.3	3.69, d (8.8)
		3.43, dd (12.0, 5.6)

[0144] **실험예 1: 세포생존률에 미치는 영향**

[0145] 본 실험에 앞서, 실시예 시료들의 RAW264.7 세포에서의 세포생존률에 미치는 영향을 확인하기 위하여 하기와 같은 방법으로 실험하였다(Lee, S.U., Choi, Y.H., Kim, Y.S., Min, Y.K., Rhee, M., Kim, S.H., 2010. Anti-resorptive sauro lactam exhibits in vitro anti-inflammatory activity via ERK-NF-kappaB signaling pathway. International immunopharmacology 10, 298-303.)

[0147] 생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포(TIB-71, ATCC)를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가한 DMEM 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)에 1x10⁵/ml의 농도로 현탁하여 100 μl씩 96 웰 플레이트에 접종하여 4시간동안 부착하였다. KS-513화합물을 농도별로 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 세포 수를 셀 수 있는

CCK-8(Dojindo사) 키트에서 설명한 대로, CCK-8 용액을 10 μ l 씩 첨가하였고, 최소 30분에서 최대 4시간까지 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 DMSO를 0.2% 처리한 음성대조군을 100%로 하여 상기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

수학적 식 1

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{추출물처리한 OD570nm 값}}{\text{음성대조군 OD570nm 값}} \times 100$$

[0148]

표 2

[0150]

The summary of cell viability by KS-513 in RAW264.7 cells

시료	농도 (μ M)	RAW264.7세포 생존율 (%, 평균 \pm 편차)
음성대조군	0	100.00 \pm 4.17
KS-513	2.5	99.58 \pm 3.66
	5	99.26 \pm 5.68
	10	98.18 \pm 3.28
	20	94.66 \pm 3.03
	40	97.23 \pm 7.00
	80	95.14 \pm 2.74

[0152]

실험 결과:

[0153]

도 1과 표 2에 나타난 바와 같이, KS-513의 농도에 따른 RAW264.7 세포의 세포 생존율을 조사해본 결과, 80 μ M 이하에서도 세포 생존률이 95% 이상임을 확인함으로써, 세포독성이 거의 없음을 확인하였음.

[0156]

실험예 2: KS-513에 의한 전구 염증 매개 사이토카인과 효소 유전자의 mRNA 생성 저해 효과

[0157]

실시에 시료들의 RAW264.7 세포에서의 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하기 위하여 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS와 COX-2, 전구 염증 매개 사이토카인 유전자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현양을 확인하고자, RAW264.7 세포에 LPS(1 μ g/mL)로 유도된 iNOS, COX-1, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 유전자의 mRNA 발현양을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)을 이용하여 하기와 같이 문헌에 기재된 방법을 응용하여 실험하였다(Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.).

[0159]

세포준비는 6 웰-플레이트에 RAW264.7 세포를 1 \times 10⁶ cells/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 배양한 후, KS-513를 2.5, 5, 10, 20 μ M 농도로 1시간 동안 전처리하였고, LPS를 1 μ g/mL의 농도로 처리한 다음, 12시간 배양하였다.

[0160]

총(Total) RNA를 추출하기 위해서 TrizolB(invitrogen)을 사용하여 리보핵산(RNA)을 추출하였고, 정량 후, Omniscript RT kit (205113, Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 상보적 핵산(cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형과 하기 표 3에 나타낸 프라이머를 각각 혼합하고, PCR mix(PCR Master Mix, Bioneer, Korea)를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성(Denaturation)을 하고, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 30 사이클(cycle)을 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 효소를 불활성화시키는 PCR을 수행하였다(표 3 과 도 2).

표 3

[0161]

Primer sequences used in this study.

유전자	방향	염기서열
iNOS	sense	5'- CCTGTTCAGCTACGCCTTC-3'
	antisense	5'- AAGGCCAAACACAGCATAACC-3'
COX-1	sense	5'- GTGGCTATTTCTGCAGCTC-3'

COX-2	antisense	5'- CAGTGCCTCAACCCCATAGT-3'
	sense	5'- AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3'
IL-1β	antisense	5'- GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'
	sense	5'- CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3'
IL-6	antisense	5'- AGGCCACAGGTATTTTGTTCG-3'
	sense	5'- GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'
TNF- α	antisense	5'- GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3'
	sense	5'- ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'
GAPDH	antisense	5'- CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
	sense	5'- AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'
	antisense	5'- ACACATTGGGGTAGGAACA-3'

[0163] 실험 결과:

[0164] 도 2 그래프와 이를 정리한 표 4에서 나타난 바와 같이, RAW264.7 세포에서 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS 와 COX-2, 전구 염증 매개 사이토카인 유전자인 IL-1β, IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현양을 조사한 결과, LPS(1μg/mL)로 자극한 세포에서 iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, KS-513 을 전처리한 세포에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 LPS 처리군을 100% 기준으로 볼 때, KS-513으로 인해 농도 의존적으로 저해율이 현저하게 감소되고 있음을 확인하였다.

표 4

[0166] The summary for inhibitory activity on mRNA expression of proinflammatory cytokines by KS-513

표적유전자		음성대조군	LPS처리군 (1 μg/mL)	KS-513(μM)			
				2.5	5	10	20
iNOS	Fold*	1.00 ± 0.10	8.88 ± 2.27	7.25 ± 2.51	5.94 ± 2.91	2.48 ± 0.19	1.32 ± 0.47
	#억제율(%)	88.71	0.06	18.41	33.09	72.12	85.19
COX-2	Fold*	1.09 ± 0.62	7.86 ± 2.09	4.72 ± 0.21	2.64 ± 0.15	1.43 ± 0.50	0.97 ± 0.38
	#억제율(%)	86.11	0.03	39.91	66.40	81.81	87.66
TNF- α	Fold*	1.00 ± 0.08	11.21 ± 0.48	9.60 ± 3.33	5.34 ± 3.27	2.72 ± 0.99	1.49 ± 0.77
	#억제율(%)	91.07	0.03	14.34	52.39	75.69	86.70
IL-1β	Fold*	1.02 ± 0.30	16.70 ± 1.80	10.41 ± 1.09	5.72 ± 0.24	2.56 ± 0.14	1.70 ± 0.59
	#억제율(%)	93.88	0.01	37.69	65.75	84.68	89.85
IL-6	Fold*	1.15 ± 0.81	31.15 ± 2.30	24.73 ± 2.26	14.24 ± 1.44	8.57 ± 1.23	2.35 ± 0.81
	#억제율(%)	96.30	0.01	20.62	54.30	72.50	92.46

*, 음성대조군 기준
#, LPS처리군 기준

[0169] 실험예3: KS-513에 의한 효소 유전자 iNOS 발현과 NO 생성 저해 효과

[0170] 실시예 시료들의 RAW264.7 세포에서의 효소 유전자 iNOS 발현과 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 하기 와 같이 실험하였다.

[0171] NO는 NO 합성효소에 의해 혈관이완, 혈액응고, 신경전달, 신장 기능, 염증 및 항종양 기능 등의 다양한 생물학 적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다. 활성산소의 일종으로 최근 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려 진 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NOS (Nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine으로부터 생 성되는데, 특히 iNOS(inducible NOS)가 염증반응에 관여하며, TNF- α, lipopolysaccharide(LPS)와 같은 염증성 사이토카인의 자극이 있을 때 발현된다(Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 6, 3051-3064.).

[0173] 3-1. iNOS 발현양에 미치는 영향

[0174] 실시예 시료들의 RAW264.7 세포에서의 효소 유전자 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 하기와 같이 문헌에 기재된 방법을 응용하여 실험하였다(Lee, S.U., Choi, Y.H., Kim, Y.S., Min, Y.K., Rhee, M., Kim, S.H., 2010. Anti-resorptive sauro lactam exhibits in vitro anti-inflammatory activity via ERK-NF-kappaB signaling pathway. International immunopharmacology 10, 298-303.).

[0175] RAW264.7 세포에서 KS-513에 의한 전구 염증 매개 효소 유전자인 iNOS의 발현양을 확인하고자, RAW264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)로 유도된 iNOS의 단백질 발현양을 western blot을 이용하여 측정하였다. 세포준비는 6 웰-플레이트에 RAW264.7 세포를 1×10⁶ cells/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 배양한 후, KS-513를 2.5, 5, 10, 20 µM 농도로 1시간 동안 전처리하였고, LPS(L6529, Sigma)를 1 µg/mL의 농도로 처리한 다음, 24시간 배양하였다.

[0176] 단백질을 추출하기 위하여 세포를 빙냉(Ice-cold) PBS로 3회 세척한 후, 용해완충액(lysis buffer; 50 mM TrisHCl (pH8.0), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 및 protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Germany), 11697498001]을 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다.

[0177] 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분리시킨 후, 단백질을 막(nitrocellulose membrane(BR162-0145, Bio-Rad)에 transfer하였다. 이 막(membrane)을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 차단 완충액(blocking buffer; 5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 1XPBS용액(SH30258.01, Hyclone)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체(anti-iNOS)를 가하여 1-2시간 동안 반응시켰다.

[0178] 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음에, 2차 항체(secondary antibody)로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 LAS-4000 이미지 분석장비(LAS-4000, Fujifilm)에서 단백질을 확인하였다.

[0179] 각 시료의 단백질 정량은 어세이용 키트(Bradford protein assay kit, Thermo)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다(도 3A).

[0181] 3-2. NOS 생성에 미치는 영향

[0182] NO의 농도는 배양액 내의 니트라이트(nitrite) 농도는 문헌에 기재된 시스템(Griess Reagent System)을 이용하여 측정하였다(Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. Journal of immunology 141, 2407-2412.).

[0183] RAW264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 18시간 동안 배양한 후 KS-513을 2.5, 5, 10, 20 µM 농도로 1시간 동안 전처리하였고, LPS를 1 µg/mL의 농도로 처리한 다음, 24시간 배양하였다. 배양액과 동량의 Griess Reagent(G4410, Sigma)를 가하고 10분간 상온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소듐 니트라이트(sodium nitrite)의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다(도 3B).

표 5

[0185] The summary for inhibitory activity of NO production by KS-513

시료	농도 (µM)	LPS (1 µg/mL)	NO production 발현 양 (LPS처리군에 대한 상대적인 %)	저해율(%)
음성대조군	0	-	18.66 ± 2.01	81.44
LPS처리군	0	+	100.10 ± 3.79	0.00
KS-513	2.5	+	91.89 ± 4.24	8.21
	5	+	83.69 ± 3.79	16.41
	10	+	80.06 ± 2.68	20.04
	20	+	72.16 ± 3.57	27.94

- [0187] 실험 결과:
- [0188] 상기 도 3A에서 나타난 바와 같이, LPS 처리군에서는 iNOS 단백질 발현양상이 증가하였으며, KS-513을 전처리하였을 때, 농도 의존적으로 iNOS 단백질 발현양이 감소하였다.
- [0189] 또한, 상기 도 3B에 그래프와 이를 정리한 표 5에서 나타난 바와 같이, LPS처리군을 100 % 보았을 때, KS-513으로 인해 농도 의존적으로 NO의 생성율이 감소하고 있으며, 이에 따라 저해율이 증가되고 있음을 확인하였다.
- [0192] **실험예 4: KS-513에 의한 효소 유전자 COX-2 발현과 PGE₂생성저해 효과**
- [0193] 실시예 시료의 효소 유전자 COX-2 발현과 PGE₂생성 저해 효과를 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Chen, C., Chen, Y.H., Lin, W.W., 1999. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. Immunology 97, 124-129.).
- [0194] RAW264.7 세포에서 KS-513에 의한 전구 염증 매개 효소 유전자인 COX-2의 발현양을 확인하고자, RAW264.7 세포에 LPS(1 µg/mL)로 유도된 COX-2 단백질 발현양을 측정하고자, 도 3A와 동일한 방법으로 세포를 준비하고, COX-2 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다(도 4A).
- [0195] 세포내 PGE₂ 생성을 측정하고자 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 18시간 동안 배양한 후 KS-513을 2.5, 5, 10, 20 µM 농도로 1시간 동안 전처리하였고, LPS를 1 µg/mL 의 농도로 처리한 다음, 24시간 배양하였다. 세포내 PGE₂ 농도는 enzyme immunoassay (EIA; Amersham Pharmacia) system을 사용하여 측정하였다(도 4B).

표 6

[0196] The summary for inhibitory activity of PGE₂ productionby KS-513

시료	농도 (µM)	LPS (1 µg/mL)	PGE ₂ production발현양 (LPS처리군에 대한 상대적인 %)	저해율(%)
음성대조군	0	-	14.43 ± 0.35	85.57
LPS처리군	0	+	100.00 ± 0.92	0.00
KS-513	2.5	+	92.68 ± 7.29	7.31
	5	+	72.87 ± 8.78	27.13
	10	+	51.65 ± 8.44	48.35
	20	+	28.23 ± 4.72	71.77

- [0198] 실험 결과:
- [0199] 상기 표 6 및 도 4A에서 나타난 바와 같이, LPS 처리군에서는 COX-2 단백질 발현양상이 증가하였으며, KS-513을 전처리하였을 때, 농도 의존적으로 COX-2 단백질 발현양이 감소하였다.
- [0200] 또한, 상기 도 4B에 그래프와 이를 정리한 표 6에서 나타난 바와 같이, LPS처리군을 100 % 보았을 때, KS-513으로 인해 농도 의존적으로 PGE₂의 생성율이 감소하고 있으며, 이에 따라 저해율이 유의적으로 증가되고 있음을 확인하였다.
- [0203] **실험예5: KS-513에 의한 전구 염증 매개 사이토카인 생성저해 효과**
- [0204] 실시예 시료의 전구 염증 매개 사이토카인 저해 효과를 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Lee, S.U., Choi, Y.H., Kim, Y.S., Min, Y.K., Rhee, M., Kim, S.H., 2010. Anti-resorptive sauro lactam exhibits in vitro anti-inflammatory activity via ERK-NF-kappaB signaling pathway. International immunopharmacology 10, 298-303.).
- [0206] 염증에는 많은 매개물질이 관여하는데 활성화된 림프구 및 대식세포 등의 여러 세포에서 분비되는TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 등은 염증과 깊은 관련이 있으므로 이를 염증성 사이토카인이라고 한다.

[0207] 이러한 염증성사이토카인은 염증을 나타내는 중요한 지표이므로, KS-513에 의한 염증성사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위해, RAW264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 18시간 동안 배양한 후 KS-513을 2.5, 5, 10, 20 μM 농도로 전처리하고 1시간 후에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 후 24시간 동안 배양한 후 세포배양액을 얻은 다음 배양액에 함유된 IL-1 β (559603, BD), IL-6 (555240, BD), TNF- α (5558534, BD)을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다(도 5).

[0209] 실험 결과:

[0210] 상기 도 5 그래프와 이를 정리한 표 7-9에서 나타난 바와 같이, RAW264.7 세포에서 전구 염증 매개 사이토카인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량을 조사한 결과, LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극한 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량이 현저하게 증가하였으며, KS-513을 전처리한 세포에서 생성량이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 또한 LPS 처리군을 100% 기준으로 볼 때, KS-513으로 인해 농도 의존적으로 저해율이 현저하게 감소되고 있음을 확인하였다.

표 7

[0211] The summary for inhibitory activity on cytokine production of IL-6 by KS-513

시료	농도 (μM)	LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	IL-6 발현양 (LPS처리군에 대한 상대적인 %)	저해율(%)
음성대조군	0	-	0.00 \pm 0.87	100
LPS처리군	0	+	100.00 \pm 8.84	0.00
KS-513	2.5	+	75.21 \pm 2.20	24.79
	5	+	71.34 \pm 5.75	28.66
	10	+	51.13 \pm 2.31	48.87
	20	+	39.25 \pm 2.85	60.75

표 8

[0213] The summary for inhibitory activity on cytokine production of TNF- α by KS-513

시료	농도 (μM)	LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	TNF- α 발현양 (LPS처리군에 대한 상대적인 %)	저해율(%)
음성대조군	0	-	0.00 \pm 1.08	100
LPS처리군	0	+	100.00 \pm 5.80	0.00
KS-513	2.5	+	97.38 \pm 0.58	2.62
	5	+	86.12 \pm 1.14	13.88
	10	+	68.03 \pm 2.51	31.97
	20	+	58.44 \pm 3.50	41.56

표 9

[0215] The summary for inhibitory activity on cytokine production of IL-1 β by KS-513

시료	농도 (μM)	LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	IL-1 β 발현양 (LPS처리군에 대한 상대적인 %)	저해율(%)
음성대조군	0	-	0.00 \pm 0.49	100
LPS처리군	0	+	100.00 \pm 4.52	0.00
KS-513	2.5	+	95.17 \pm 3.68	4.83
	5	+	76.69 \pm 3.40	23.31
	10	+	61.56 \pm 3.18	38.44
	20	+	46.10 \pm 2.51	53.9

[0217] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

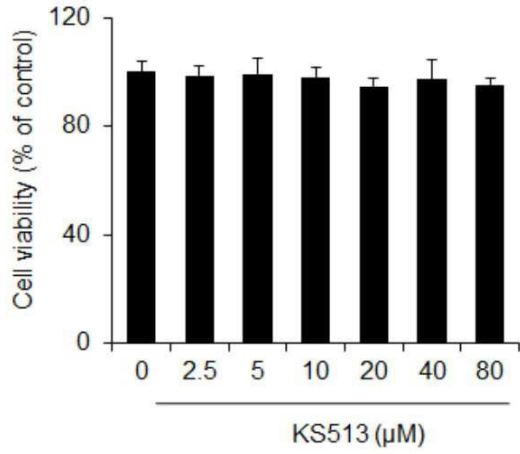
- [0219] **제제예 1. 산제의 제조**
- [0220] KS 513 ----- 20 mg
- [0221] 유당 ----- 100 mg
- [0222] 탈크 ----- 10 mg
- [0223] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0225] **제제예 2. 정제의 제조**
- [0226] KS 513 ----- 10 mg
- [0227] 옥수수전분 ----- 100 mg
- [0228] 유당 ----- 100 mg
- [0229] 스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg
- [0230] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0232] **제제예 3. 캡슐제의 제조**
- [0233] KS 513 ----- 10 mg
- [0234] 결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg
- [0235] 락토오스 ----- 14.8 mg
- [0236] 마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg
- [0237] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0239] **제제예 4. 주사제의 제조**
- [0240] KS 513 ----- 10 mg
- [0241] 만니톨 ----- 180 mg
- [0242] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0243] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ----- 26 mg
- [0244] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0246] **제제예 5. 액제의 제조**
- [0247] KS 513 ----- 20 mg
- [0248] 이성화당 ----- 10 g
- [0249] 만니톨 ----- 5 g
- [0250] 정제수 ----- 적량
- [0251] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 mL 로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0253] **제제예 6. 건강 식품의 제조**
- [0254] KS 513 ----- 1000 mg
- [0255] 비타민 혼합물 ----- 적량
- [0256] 비타민 A 아세테이트 ----- 70 μg
- [0257] 비타민 E ----- 1.0 mg

[0258]	비타민 B ₁ -----	0.13 mg
[0259]	비타민 B ₂ -----	0.15 mg
[0260]	비타민 B ₆ -----	0.5 mg
[0261]	비타민 B ₁₂ -----	0.2 μg
[0262]	비타민 C -----	10 mg
[0263]	비오틴 -----	10 μg
[0264]	니코틴산아미드 -----	1.7 mg
[0265]	엽산 -----	50 μg
[0266]	판토텐산 칼슘 -----	0.5 mg
[0267]	무기질 혼합물 -----	적량
[0268]	황산제1철 -----	1.75 mg
[0269]	산화아연 -----	0.82 mg
[0270]	탄산마그네슘 -----	25.3 mg
[0271]	제1인산칼륨 -----	15 mg
[0272]	제2인산칼슘 -----	55 mg
[0273]	구연산칼륨 -----	90 mg
[0274]	탄산칼슘 -----	100 mg
[0275]	염화마그네슘 -----	24.8 mg
[0276]	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.	
[0278]	제제예 7. 건강 음료의 제조	
[0279]	KS 513 -----	100 mg
[0280]	비타민 C -----	15 g
[0281]	비타민 E(분말) -----	100 g
[0282]	젖산철 -----	19.75 g
[0283]	산화아연 -----	3.5 g
[0284]	니코틴산아미드 -----	3.5 g
[0285]	비타민 A -----	0.2 g
[0286]	비타민 B ₁ -----	0.25 g
[0287]	비타민 B ₂ -----	0.3g
[0288]	물 -----	정량
[0289]	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.	
[0290]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나,	

수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

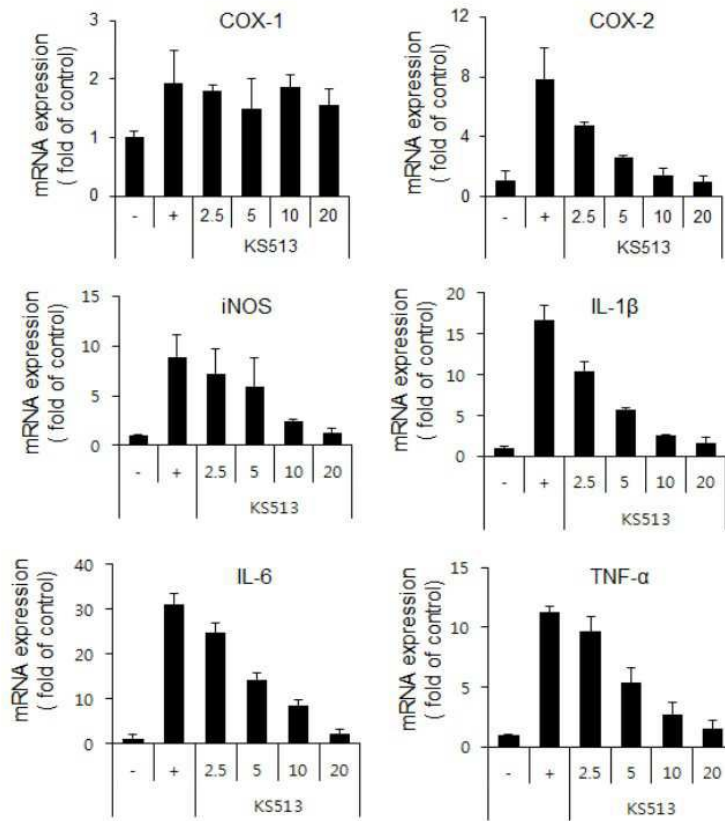
도면

도면1



Effect of KS-513 on the Cell viability in RAW264.7

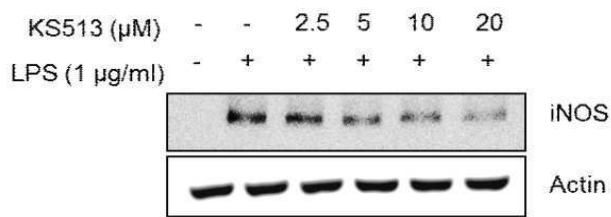
도면2



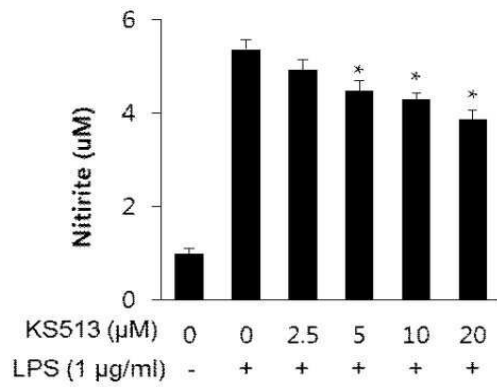
Effect of KS-513 on LPS-induced inflammation-related genes TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS and COX-2 mRNA expressions in RAW264.7 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of KS-513 for 2 h before the addition of 1 μ g/mL LPS, and the cells were further incubated for 12 h. The effect of KS-513 on the mRNA levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS and COX-2 was evaluated by quantitative real-time PCR. For reference, COX-1 mRNA level was also evaluated.

도면3

A



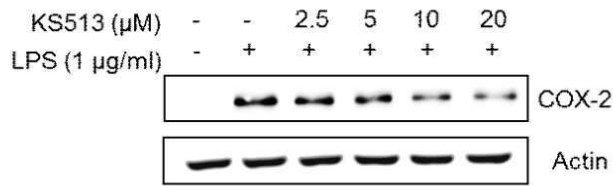
B



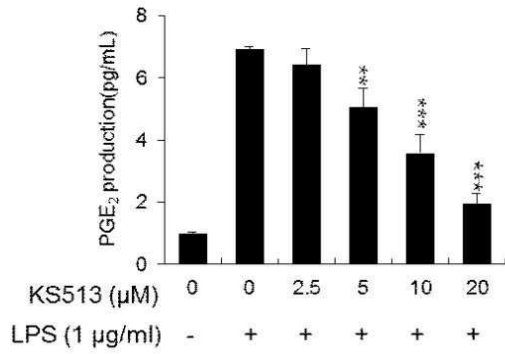
Inhibitory effect of KS-513 on iNOS expression and NO production using western blot and Nitric oxide assay, respectively. Statistical analysis was performed with Student's t-test. *P* values of *, <0.05 was considered statistically significant.

도면4

A

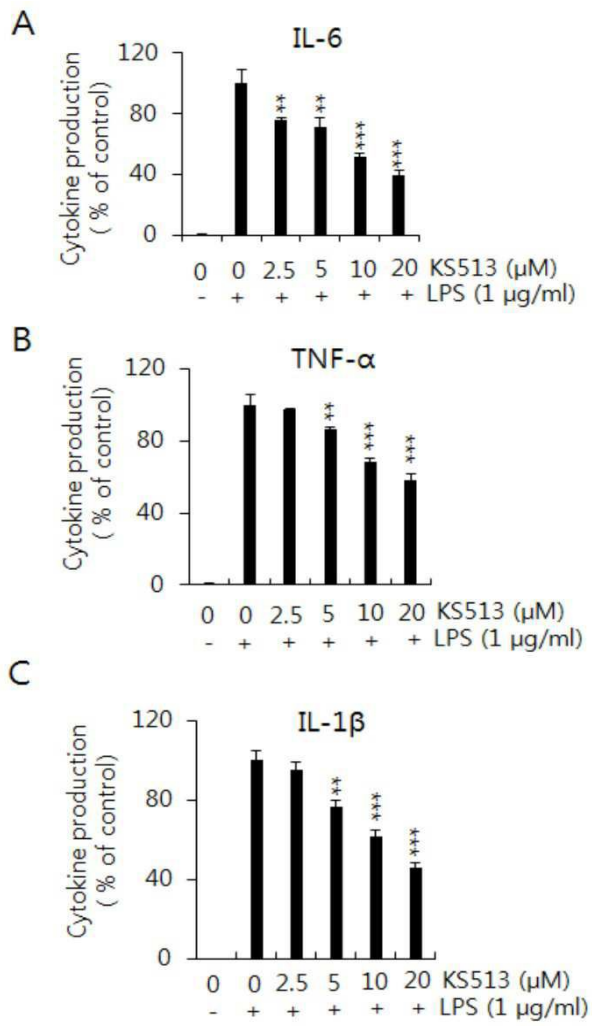


B



Inhibitory effect of KS-513 on COX-2 expression and PGE₂ production using western blot and enzyme immunoassay(EIA), respectively. Statistical analysis was performed with Student's t-test. *P* values were considered statistically significant(** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

도면5



Effects of KS-513 on LPS-induced release of IL-1β, TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells. TNF-α, IL-1β and IL-6 releases were measured by ELISA assay. Statistical analysis was performed with Student's t-test. P values of *, <0.05, **, <0.01 and ***, <0.001 were considered statistically significant.