



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036925
(43) 공개일자 2009년04월15일

(51) Int. Cl.

A61K 36/066 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0102227

(22) 출원일자 2007년10월10일

심사청구일자 2007년10월10일

(71) 출원인

강원대학교산학협력단

강원 춘천시 효자동 192-1 강원대학교로 42

주식회사머쉬텍

강원 춘천시 근화동 798-3

(72) 발명자

김태웅

강원 춘천시 퇴계동 한주아파트 101-1102

성재모

강원 춘천시 후평2동 한신아파트 2동 302호

(74) 대리인

이덕록

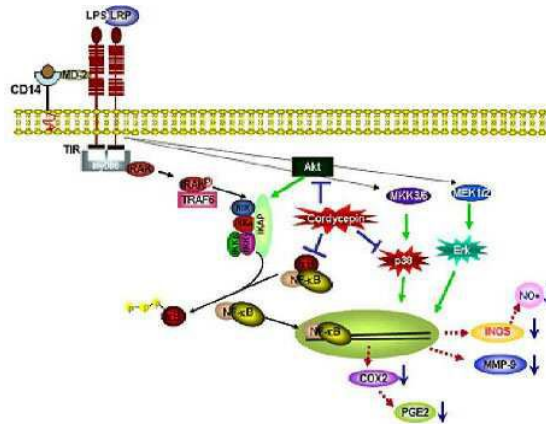
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 번데기 동충하초 추출물을 유효성분으로 하는 항염증치료제

(57) 요약

본 발명은 번데기 동충하초 추출물을 유효성분으로 하는 항염증 치료제에 관한 것으로, 번데기 동충하초의 메탄올 추출물을 이용한 부탄올 분획과 이로부터 분리한 코디세핀은 PI3k/AKT/IkB의 경로뿐만 아니라 p38의 인산화를 억제하는 경로를 통해서 염증 유발 물질을 억제하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도11



특허청구의 범위

청구항 1

번데기 동충하초의 메탄올 추출물을 물에 녹인 후 핵산, 부탄올, 에틸 아세테이트 그리고 물 순으로 분획한 다음 부탄올 분획물을 감압 증류하여 용매를 제거하는 것을 특징으로 하는 번데기 동충하초로부터 항염증 치료용 부탄올 분획물을 제조하는 방법.

청구항 2

제 1항 기재의 방법으로 얻은 번데기 동충하초 메탄올 추출물의 부탄올 분획물을 용매로 메탄올과 클로로포름을 0:100 내지 100:0 범위에서 농도구배적으로 사용하여 1차 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 1차 분리를 하는 단계;

상기 단계의 분획물 중 메탄올과 클로로포름을 10:90의 비율로 사용하여 분획함으로써 얻은 90% 클로로포름 분획물을 Sephadex LH 20 사이즈 컬럼을 사용하여 단일 용매로 메탄올을 흘려주면서 2차 정제하는 단계; 및

상기 단계의 정제물을 HPLC를 이용하여 다시 정제하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 번데기 동충하초로부터 항염증 치료용 코디세핀을 제조하는 방법.

청구항 3

제 1항 기재의 방법으로 제조된 번데기 동충하초 메탄올 추출물의 부탄올 분획물 또는 제 2항 기재의 방법으로 제조된 번데기 동충하초에서 분리한 코디세핀을 유효성분으로 함유하는 항염증 치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 번데기 동충하초 추출물을 유효성분으로 하는 항염증 치료제에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 번데기 동충하초의 메탄올 추출물과 부탄올 분획물들은 항염증 효과가 있으며, 상기로부터 정제한 코디세핀은 항염증 효과가 있어 이를 이용한 항염증 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 동충하초는 예로부터 귀중한 한약재로서 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독, 항암효과 등 여러 가지 약리활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 특히, 항염증 효과로는 "Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol.* 2006 Vol. 545, pp.92-199."와 "Methanol extract of Cordyceps pruinosa inhibits *in vitro* and *in vivo* inflammatory mediators by suppressing NF-kappaB activation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003, Vol 1. pp1-8"이 보고되어 있다. 항암효과로는 "*In vitro* Antitumor Activity of Ergosterol Peroxide Isolated from Cordyceps militaris on Cancer Cell Lines from Korean Patients. *The Korean Journal of Mycology* 2001, Vol. 29, pp61-66"이 보고되어 있다. 항산화 효과로는 "Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* *Journal of Ethnopharmacology* 2005, Vol 96, pp 555-561"와 "Comparison of protective effects between cultured Cordyceps militaris and natural Cordyceps sinensis against oxidative damage. *Agric Food Chem.* 2006, Vol, 19. pp.132-138"이 알려져 있다.

<3> 동충하초의 항염증 효과와 관련하여 국내 특허공개번호 제2004-41912호에는 인터루킨-1의 생산을 억제하여 피부 염증을 조절하는 동충하초 추출물과 이를 이용한 화장료 조성물이 기재되어 있다.

<4> 동충하초의 혈전용해작용과 관련해서는 국내 특허공개번호 제2001-67974호에는 피브린 용해 활성이 있는 분자량이 66kDa의 효소 단백질이 기재되어 있다.

<5> 또한, 국내 특허공개번호 제2003-39981호에는 동충하초에서 발견되는 항암 및 면역증강물질인 코디세핀(cordycepin)이 콜라겐에 의해 유발되는 혈전형성을 억제하여 혈소판 응집을 억제하는 항혈전제로 사용할 수 있

음이 기재되어 있다.

- <6> 따라서, 본 발명자들은 동충하초의 메탄올추출물 및 부탄올분획물의 염증억제 효과 및 유효성분인 코디세핀의 지속적인 염증 치료제로서의 작용을 확인하고, 천연물을 이용한 염증치료제로서, 본 발명을 안출하게 된 것이다.
- <7> 따라서, 본 발명의 목적은 번데기 동충하초 추출물 또는 그로부터 분리 정제한 코디세핀의 항염증제로서의 용도를 제공하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명의 상기 목적은 번데기 동충하초의 메탄올 추출 및 헥산, 부탄올, 에틸 아세테이트, 물 분획물을 제조하고, 이들의 항산화 및 항염증 효과를 조사하고, 상기 동충하초 부탄올 분획물로부터 코디세핀을 분리 정제하고, 상기 코디세핀의 항염증효과 및 신생내막과 심근세포에 대한 영향을 조사하고, 동충하초 추출물의 급성독성평가를 실시함으로써 달성하였다.

과제 해결수단

- <9> 본 발명은 번데기 동충하초 추출물의 제조단계; 상기 추출물의 항산화 및 항염증 효과 조사단계; 상기 동충하초 부탄올 분획물로부터 코디세핀을 분리 정제하는 단계; 상기 코디세핀의 항염증효과 및 신생내막과 심근세포에 대한 영향을 조사하는 단계; 및, 동충하초 추출물의 급성독성평가를 실시하는 단계로 구성된다.
- <10> 본 발명은 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 부탄올 분획물 또는 그로부터 정제한 코디세핀을 유효성분으로 함유하는 항염증 치료제를 제공함을 특징으로 한다.
- <11> 본 발명에서 상기 항염증 치료용 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 부탄올 분획물은 번데기 동충하초의 메탄올 추출물을 물에 녹인 후 헥산, 부탄올, 에틸 아세테이트 그리고 물 순으로 분획한 다음 부탄올 분획물을 감압 증류하여 용매를 제거함으로써 제조할 수 있다.
- <12> 본 발명에서 상기 번데기 동충하초 유래의 항염증 치료용 코디세핀은 제 1항 기재의 방법으로 얻은 번데기 동충하초 메탄올 추출물의 부탄올 분획물을 용매로 메탄올과 클로로포름을 0:100 내지 100:0 범위에서 농도구배적으로 사용하여 1차 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 1차 분리를 하는 단계; 상기 단계의 분획물 중 메탄올과 클로로포름을 10:90의 비율로 사용하여 분획함으로써 얻은 90% 클로로포름 분획물을 Sephadex LH 20 사이즈 컬럼을 사용하여 단일 용매로 메탄올을 흘려주면서 2차 정제하는 단계; 및 상기 단계의 정제물을 HPLC를 이용하여 다시 정제하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.

효과

- <13> 본 발명은 번데기 동충하초 추출물을 유효성분으로 하는 항염증 또는 동맥경화성혈전증 치료제에 관한 것으로, 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 부탄올 분획물 이로부터 분리한 코디세핀은 PI3k/AKT/IkB의 경로뿐만 아니라 p38의 인산화를 억제하는 경로를 통해서 염증 유발 물질을 억제하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명의 번데기 동충하초에서 분리한 코디세핀은 신생내막의 형성을 억제함으로써 동맥경화성혈전증 치료 시 나타나는 동맥혈관 재협착을 억제하는 뛰어난 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <14> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명하나, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <15> **실시예 1: 번데기 동충하초 추출물의 제조**
- <16> 본 실시예에서 사용된 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균주는 강원대학교 생물환경학부의 성재모 교수 연구실에서 제공받아, 주식회사 머쉬텍에서 인공 대량생산된 자실체를 건조하여 가늘게 세절한 후 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.
- <17> 상기 번데기 동충하초를 50℃ 드라이오븐에서 말린 다음 블랜더로 잘게 갈아서 메탄올에 70℃에서 추출(동충하초 30g/메탄올 500ml)한 후, 감압증류(60℃)하여, 용매를 완전히 날려 농축물을 얻음으로써 메탄올

추출물(분말)을 얻었다. 상기 메탄올 추출물 25g를 1L의 물에 녹인 후 헥산, 부탄올, 에틸 아세테이트 그리고 물 순으로 분획하였다. 마찬가지로 각각의 분획물 모두 감압 증류(60℃)하여 용매를 완전히 날려 농축물을 얻고, 수율을 계산하였다.

표 1

<18> 번데기 동충하초의 추출 및 수득율

	메탄올	헥산	부탄올	에틸 아세테이트	물
추출용매량(ml)	8000	2000	2000	6000	1000
추출양(g)	60	8.95	3.24	0.78	32.04
수득율(%)	15	14(3.5%)	12(3%)	1.1(0.3%)	53(13.2%)

<19> 표 1에 나타난 바와 같이, 번데기 동충하초의 추출 후 수율을 계산한 결과, 메탄올은 15%의 수율을 얻었으며, 메탄올 추출물을 다시 여러 용매로 분획한 결과, 물(13.2%), 헥산(3.5%), 부탄올(3%)과 에틸 아세테이트(0.3%)의 순서로 수율을 얻었다.

<20> 이하 효능 실험에서는 부탄올(3%) 분획이 가장 좋은 결과를 얻어 부탄올 분획물을 본 실험에 사용되지만, 수율 면에서는 상당히 낮은 3%를 보였다.

<21> 실험예 1: 동충하초 분획물의 항산화 효과

<22> DPPH 방법에 따라 상기에서 얻은 동충하초 분획물의 항산화 효과를 조사하였다. 상기 방법은 전자공여능력(electron donating ability EDA%)에 의한 환원력으로 항산화능력을 표시하는 방법이다. 동충하초의 각 시료를 최종 농도가 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml이 되게 DMSO와 잘 섞고 0.1mM DPPH 용액(에탄올 용해) 2.8 ml을 가하여 총 부피가 3ml이 되게 조성하였다. 37℃에서 30분간 배양한 후 스펙트로포토미터를 이용하여 515nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 전자공여능력을 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산하였다.

수학적 식 1

$$EDA = \frac{\text{대조군의 } O.D. - \text{시료의 } O.D.}{\text{대조군의 } O.D.}$$

<23>

<24> 단, 시료의 O.D.는 시료를 가한 시험액의 흡광도를, 대조군의 O.D.은 시료대신 DMSO(또는 에탄올)를 가한 시험액의 흡광도 값이다.

<25> 도 1에 나타난 바와 같이, 부탄올 분획물에서 가장 효과가 좋았다.

<26> 실험예 2: 동충하초 부탄올 분획물의 항염증 효과실험

<27> 상기 결과로부터, 항산화 효과가 있는 물질은 항염효과가 있는 것으로 알려져 있어 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 부탄올 분획물을 LPS로 유도된 대식세포에서의 염증유발인자인 NO와 iNOS 및 COX-2를 비교하였다.

<28> 대식세포인 RAW 264.7세포는 ATCC에서 구입하였으며, 10% FBS DMEM 배지[페니실린(100 유닛/ml)+스트렙토마이신(100µg/ml)]으로 배양하였으며, 배양 조건은 5% CO₂, 37℃로 유지되는 배양기에서 배양하였다. 그 후 60mm 배양 접시에 2×10⁶ 개의 세포를 심고 24시간 배양 후 실험 시작하였다. 번데기 동충하초의 각 분획을 DMSO에 100mg/ml로 녹인 후, 각각의 최종 농도가 되도록 DMSO의 최종농도가 0.5% 이하가 되게 시료를 첨가하였다. 그리고 각각의 시료를 세포에 가하기 전에 LPS(1µg/ml), IFN-γ(10U/ml)을 세포에 가한 후 각각의 시료를 세포에 첨가하였다.

<29> 나이트라이트의 측정

<30> NO의 생성은 나이트라이트 측정으로 간접적으로 확인하였다. 실험 과정은 다음과 같다. 세포에 시료를 투여한 지 16시간 후에 배지를 걸어서(100µl) A, B의 Griess reagent(A; 1% sulfanilamide, B ; 0.1% naphthylenediamine in 5% phosphoric acid)를 섞은 시약(50µl+50µl=100µl)과 반응시킨 후 550nm에서 측정하였다. 이때 나이트라이트 기준물질로 소듐 나이트라이트를 사용하여 Raw264.7세포의 nitrite의 분비를 측정하였다.

- <31> 웨스턴 블랏팅
- <32> 대식세포에서 PGE2, NO의 생성 단백질인 COX-2 및 iNOS를 다음과 같이 측정하였다. 최초 얻어진 세포들을 PBS(PBS, 시그마 케미칼 컴퍼니, 미국)로 2회 가법계 세척하였다. 그 후 PBS를 완전히 제거 후 세포용해 및 염색시약인 포스포 샘플 버퍼(phospho sample buffer)를 200 μ l을 각각의 접시에 넣고 스크래퍼를 이용하여 긁었다. 그 후 7%의 SDS-PAGE를 통하여 전기이동하고, 전기 이동한 SDS-PAGE 젤의 단백질을 PVDF막으로 이동시켰다. 단백질 이동이 완료된 PVDF막을 상온에서 PBS-T(in 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.4 (PBS-T) containing 5% milk)로 블로킹하였다. 그 후 PBS-T를 사용하여 5분간 세 번 세척한 후 5% 탈지분유 PBS-T에 녹인 1차 항체를 붙이고, 2차 항체를 붙이기 전 PBS-T로 충분히 세척하였다. 40분간 방치한 후 역시 PBS-T로 20분씩 3번 세척하였다. 마지막으로 ECL detection system (애머삼, 영국)을 사용하여 특정 단백질의 양 및 위치를 확인하였다. 단백질 양의 보정은 PVDF막을 재활용(striping)하여 액틴단백질의 양을 확인함으로써 동량임을 보여주었다. 각각의 항체는 비디사(BD co.) 및 케이맨사(Cayman co.)에서 구입하였다.
- <33> 도 2에 나타난 바와 같이, 15 μ g/ml을 처리하였을 경우 NO와 iNOS의 발현이 억제되는 것을 알 수가 있었으며, 메탄올 추출물에 대한 COX-2의 발현의 억제효과보다 특이적으로 부탄올 분획물이 억제하는 것을 알 수가 있었다.
- <34> 또한, 부탄올 분획물을 IFN- γ 로 유도된 대식세포에서의 염증유발인자인 NO와 iNOS 그리고 COX-2를 비교한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 15 μ g/ml을 처리하였을 경우 NO와 iNOS의 발현이 억제되는 것을 알 수가 있었다. LPS로 유도된 COX-2의 억제는 5 μ g/ml에서 완전히 억제되었지만 IFN- γ 로 유도된 대식세포에서의 COX-2의 발현의 억제되지 않음을 알 수가 있었다. 따라서 COX-2의 발현은 NF κ B 경로를 통한 단백질의 발현을 억제함을 알 수가 있었으며, 이 부탄올 분획물은 특이적으로 NF κ B의 세포신호전달을 억제할 수 있는 물질이 함유되어 있을 것으로 생각된다.
- <35> 참고로, 번데기 동충하초의 에탄올 추출물의 경우, 에탄올 추출물을 배양된 DMSO에 녹인 후에 전체부피의 0.5% 이하가 되게 하여 처리를 한 결과 NO의 생성은 약 300 μ g/ml을 처리하였을 경우 NO의 양이 약 50% 감소하는 것을 알 수가 있었으며, iNOS의 단백질 발현은 약 100 μ g/ml 정도 처리하였을 경우 단백질 발현이 약 50% 감소하였다. 또한 PGE2를 생성하는 COX-2의 발현은 400 μ g/ml을 처리하였을 경우에도 완전히 저해되지 않는 것을 알 수가 있었다(미도시됨).
- <36> 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 경우, 메탄올 추출물을 배양된 DMSO에 녹인 후에 전체부피의 0.5% 이하가 되게 하여 처리를 한 결과 LPS로 유도된 대식세포에서의 NO의 생성은 50 μ g/ml을 처리하였을 경우 NO의 양이 약 50% 감소하는 것을 알 수가 있었으며, iNOS의 단백질 발현은 약 50 μ g/ml 정도 처리하였을 경우 단백질 발현이 완전히 억제되는 것을 알 수가 있었다. 또한 PGE2를 생성하는 COX-2의 발현 또한 50 μ g/ml 처리하였을 경우 발현이 저해되는 것을 알 수가 있었다. LPS로 유도된 대식세포에서는 50 μ g/ml을 처리하였을 경우 NO의 양이 약 50% 감소, iNOS와 COX-2 발현이 완전히 억제되었지만, IFN- γ 로 유도된 대식세포에서의 NO의 생성량과 iNOS, COX-2의 단백질 발현은 LPS로 유도된 염증억제효과보다 낮음을 알 수가 있었다. 이 결과로 볼 때 번데기 동충하초 메탄올 추출물은 NF κ B의 경로를 통한 염증현상을 더욱 강하게 저해하는 것을 알 수가 있었다(미도시됨).
- <37> 아울러, 29종의 여러 균류에서 제조된 번데기동충하초 자실체의 항염 특성을 비교한 결과 NO, iNOS 및 COX-2의 억제 실험에서 균주마다 약간의 차이는 있으나 모두 비슷한 항염효과를 나타냈다(미도시됨).
- <38> **실시예 2: 동충하초 분획물에서 유효성분 코디세핀의 분리 및 정제**
- <39> 상기 실시예 1에서 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 부탄올 분획물이 가장 항염증 효과가 좋았기 때문에 실리카겔 크로마토그래피와 sephadex LH 20 그리고 HPLC를 통해서 정제작업을 수행하였다.
- <40> 구체적으로, 실리카겔 칼럼 크로마토그래피[Silica gel60(0.2~0.5)](MERCK)를 7.5cm \times 30cm 칼럼에 패킹한 후 클로로포름 100%에서 메탄올 100%로 순차적으로 흘려주었다. 세파덱스 칼럼 크로마토그래피[Sephadex-LH20](파마시아, USA)을 2.5cm \times 100cm 칼럼에 패킹한 후 메탄올 100%로 흘려주었다. 처음 번데기 동충하초 부탄올 분획물을 1차 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 통하여 1차 분리를 하였으며, 이때 용매는 (메탄올:클로로포름 =0:100, 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 30:70, 40:60, 30:70, 100:0)로 단계적으로 변화시키면서 분리를 하였다. 그리고 각각의 분획의 생리활성을 확인한 후 90% 클로로포름 분획물을 제2차 정제작업으로 Sephadex LH 20 사이즈 컬럼을 사용하였으며, 단일 용매 메탄올로 흘려주면서 Si90-Se1과 Si90-Se2로 분획하였다. Si90-Se2를 다시 HPLC를 이용하여 단일물질인 코디세핀을 정제하였다.
- <41> HPLC(High performance liquid chromatography) 분석은 KNAUER(Wellchrom HPLC-pumpK-1001,Wellchrom fast

scanning spectrophotometer K-2600, and 4 channel degasser K-500) 시스템을 사용하여 분석을 진행하였다. 칼럼은 Vydec C18 칼럼을 사용하였으며(37℃), 용매는 3차 증류수와 아세트나이트릴로 사용하였다. 구배(Gradient) 시료는 모두 DMSO, 아세톤, 클로로포름에 녹인 후 분석하였다.

- <42> 1차 실리카 칼럼 후, 이 분획물들을 대식세포에 LPS를 처리한 후 항염증 효과가 있는 분획물을 NO 생성 억제효과로 관찰하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, 1차 실리카 칼럼 후 분획물의 NO 생성을 실험한 결과 90% 클로로포름에서 염증효과가 있었다.
- <43> 또한, 100% 메탄올로 분획한 후 TLC(Thin layer chromatography)를 이용하여 화합물의 정제 정도를 확인하였다. TLC 판은 MERCK(Kieselgel 60 F254)에서 구입하였다. 전개용매는 물, 메탄올, 부탄올, 아세트산 및 클로로포름을 시료의 극성에 맞게 섞은 후 전개하였다. 확인법은 UV(366nm/254nm) 및 10% 황산(에탄올)의 두 가지 법으로 확인하였다(도 5).
- <44> 강원대학교 공동실험관(¹H NMR, ¹³C NMR, hetero COSY, COSY)[BRUKER]에서 NMR을 이용하여 코디세핀의 구조를 확인하고, 분자량을 결정하였다. 용매는 CDCl₃, DMSO를 사용하였으며, 내부 기준물질로는 TMS를 사용하였다.
- <45> 번데기 동충하초의 코디세핀은 도 6에 나타난 순으로 정제를 하였으며, 시그마사에서 판매되는 코디세핀, 정제된 코디세핀, 및 합성된 코디세핀의 구조는 HPLC와 NMR을 통해 같은 물질임을 확인하였고, NO 생성을 억제하는 효과 역시 같은 것으로 알 수 있었다.
- <46> 실험예 1: 코디세핀의 항염증 조사
- <47> 일반적으로 외부감염 상황에서 LPS 및 여러 가지 면역 유발 물질에 의해 대식세포의 활성화가 진행되게 된다. 이때 대식세포에서 분비되는 프로스타글란딘, NO 및 사이토카인을 통하여 1차적인 면역작용이 일어나게 된다. 그러나 이러한 1차적인 면역작용은 외부 항원에만 영향을 주는 것이 아니라 생체 자신 또한 손상을 받게 되는데, 이러한 단점을 보완하기 위하여 생체는 좀더 항원에 특이적인 2차적인 면역반응이 일어나게 된다.
- <48> 그러나 종종 1차적인 면역작용이 지속되게 되는 경우가 생기는데 이러한 것을 염증이라 한다. 또한 LPS와 IFN- γ 에 유도되는 대식세포에서의 iNOS와 COX-2의 발현은 다른 세포신호전달을 통해서 이뤄진다. LPS는 NF κ B 경로를 통해서 이런 염증 유발 단백질들이 발현이 되며, IFN- γ 의 경우는 STAT라는 분자가 이량체(dimer)로 형성되어 염증 유발 단백질의 DNA 프로모터 부분에 결합함으로써 단백질들이 발현이 된다.
- <49> 따라서, 본 실험에서는 번데기 동충하초의 항염증 효과를 확인하기 위해 LPS와 IFN γ 를 각각 대식세포에 처리한 다음에 번데기 동충하초 추출물(메탄올, 에탄올)과 분획물을 처리하여 염증인자 NO를 측정하였다.
- <50> 또한, 단백질 수준에서 저해효과를 보기 위해 웨스턴 블랏팅과 RT-PCR을 이용하여 NO 생성효소인 iNOS, PGE2 생성효소인 COX-2의 발현량을 억제하는지에 대해서 실험하였다.
- <51> 1. 코디세핀이 LPS로 유도된 대식세포에서 발현되는 염증 단백질의 저해효과
- <52> 도 7에 나타난 바와 같이, 번데기 동충하초에서 분리된 코디세핀은 약 15 μ g/ml에서 NO 및 iNOS 형성을 억제함을 알 수가 있었고, COX-2 단백질과 TNF- α 의 mRNA의 발현을 억제함을 알 수가 있었다(도 8). 하지만 인터페론 감마에 유도되는 염증 유발은 억제되지 않았다(미도시됨).
- <53> 2. 코디세핀에 의한 IkB의 인산화 억제효과
- <54> LPS로 유도된 대식세포에서 코디세핀의 억제 효과는 세포내의 신호 전달에 있어서 어떤 기작으로 억제를 보이는지를 확인하였다. 기존에 알려진 LPS로 유도된 대식세포에서는 IkB 단백질의 인산화를 통한 NF κ B 경로를 통해서 일어나는 것으로 알려져 있다. 따라서, NF κ B의 저해제로 알려져 있는 커큐민(Curcumin)을 사용하여 코디세핀이 IkB의 인산화를 억제함에 있어서 대조군으로 사용하였다.
- <55> 도 9에 나타난 바와 같이, 코디세핀이 농도의존적으로 IkB의 인산화를 억제함을 알 수 있었다.
- <56> IkB를 인산화시키는 단백질로 IKK의 활성이 필요한데 이 단백질을 PI3K/Akt의 경로를 통해서 인산화된다는 보고가 있다. 따라서 PI3K의 저해제인 LY294002을 처리하였을 경우 IkB의 인산화가 억제됨을 알 수가 있었으며, 따라서, 코디세핀은 PI3K/Akt 신호전달을 억제함을 제시할 수가 있다.
- <57> 도 9에서 IkB는 업스트림에 PI3K-Akt 경로를 통해서도 IkB의 인산화를 억제할 수 있다는 결과를 통해서 코디세핀이 Akt의 인산화 억제능력을 본 결과 농도에 따라서 AKt의 인산화를 농도에 따라서 억제하였다, 따라서

PI3K/Akt/IkB의 신호전달을 통해서 염증 유발 단백질인 iNOS, COX-2 그리고 TNF- α 의 발현을 조절함을 알 수가 있었다. 또한 LPS에서 유도되는 대식세포에서는 MAPKs에 의해서 이러한 염증 단백질이 발현된다는 보고가 많이 알려져 있다. 이 MAPKs에는 ERK, p38 그리고 JNK로 이루어져 있으며, 특히 p38은 단백질의 mRNA의 안정을 증가 시켜준다는 보고가 있다. 따라서 p38의 인산화를 코디세핀이 억제할 수 있는지를 확인한 결과 농도에 따라서 p38의 인산화가 억제됨을 보였다(도 10). MAPKs의 하나인 Erk의 인산화 또한 iNOS와 COX-2의 발현을 조절한다는 연구 결과가 많이 보고되어 있지만 코디세핀의 경우 같은 농도를 처리하였을 경우 p38의 인산화는 억제되었지만 Erk는 억제 되지 않음을 알 수가 있었다(미도시됨). 따라서, LPS로 유도된 대식세포내의 신호전달에 있어서 코디세핀이 PI3k/AKT/IkB의 경로뿐만 아니라 p38의 인산화를 억제하는 경로를 통해서 염증 유발 물질을 억제 하였다. 따라서, 코디세핀은 항염 치료제로서의 가능성이 있음을 알 수가 있었다(도 11).

<58> 실험예 2: 번데기 동충하초의 급성독성평가

<59> 번데기 동충하초의 여러 분획물이 어떠한 독성을 나타내는지를 확인하기 위하여 실험동물(흰쥐)을 이용하여, Bahren's Karber법에 의해 실험하여 독성을 관찰하였다. 이를 위해, 체중 20-25g의 웅성 생쥐 10마리씩을 1군으로 하여 번데기 동충하초의 메탄올 엑스를 용매로 분획하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물분획을 제조한 것을 경구 투입하여 안전성검사(급성독성)를 실시하였다.

표 2

<60> 번데기 동충하초의 각 분획물의 급성독성평가

실험군	투여량(g/kg)	사망 수/처리 수	최소 LD(g/kg, p.o.)
헥산 분획물	2.0	0/10	-
	4.0	0/10	-
부탄올 분획물	2.0	0/10	-
	4.0	0/10	-
에틸아세테이트 분획물	2.0	0/10	-
	4.0	0/10	-
물 분획물	2.0	0/10	-
	4.0	0/10	-

<61> 표 2에 나타난 바와 같이, 2.0g/kg, 4.0g/kg 및 시료 최대 투여용량인 6.0g/kg/을 투여한 후, 72시간 관찰하였으나 사망하거나 이상증상을 보이는 동물이 없으므로, 본 시료는 독성이 극히 미약하거나 없음을 확인할 수 있었다. 또한, 코디세핀의 급성독성평가는 문헌상 보고된 바에 따르면, 15mg/kg/day 처리한 급성독성실험에서도 안정성이 있다고 보고되어 있다.

<62> 상기 결과로부터, 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 분획물들 또는 그로부터 정제된 코디세핀은 항염증효과가 있었다.

산업이용 가능성

<63> 상기 실시예와 실험예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 번데기 동충하초 추출물을 유효성분으로 하는 항염증 또는 동맥경화성혈전증 치료제에 관한 것으로, 번데기 동충하초의 메탄올 추출물의 부탄올 분획과 이로부터 분리한 코디세핀은 PI3k/AKT/IkB의 경로뿐만 아니라 p38의 인산화를 억제하는 경로를 통해서 염증 유발 물질을 억제하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명의 번데기 동충하초에서 분리한 코디세핀은 신생내막의 형성을 억제함으로써 동맥경화성혈전증 치료 시 나타나는 동맥혈관 재협착을 억제하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 항염증 또는 동맥경화성혈전증 치료에 효과가 있으므로 약학산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<64> 도 1은 번데기 동충하초 추출물의 항산화 효과를 나타낸 것이다.

<65> 도 2는 LPS로 유도된 대식세포에 대한 번데기 동충하초 부탄올 분획물의 NO, iNOS 및 COX-2 억제 효과를 도시한 것이다.

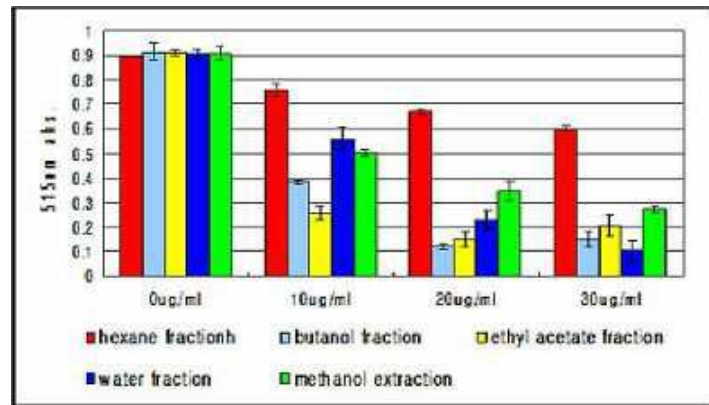
<66> 도 3은 IFN- γ 로 유도된 대식세포에 대한 번데기 동충하초 부탄올 분획물의 NO, iNOS 및 COX-2 억제 효과를 도

시한 것이다.

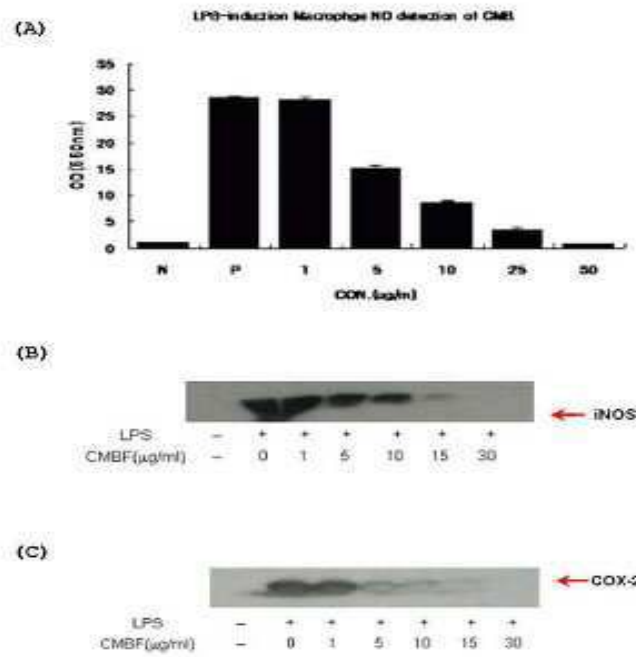
- <67> 도 4는 번데기 동충하초의 1차 실리카 칼럼 후 분획물의 NO 생성 억제 효과를 도시한 것이다.
- <68> 도 5는 번데기 동충하초의 1차 실리카 칼럼 후 분획물의 TLC 결과를 도시한 것으로, 10% 황산으로 검출하고 전개용매로는 클로로포름:메탄올:물 = 64:14:2를 사용한 것이다.
- <69> 도 6은 번데기 동충하초에서 코디세핀의 정제 과정과 상기 정제된 코디세핀과 시판 코디세핀의 HPLC를 통한 구조분석을 비교한 결과를 도시한 것이다.
- <70> 도 7은 LPS로 유도된 대식세포에서 코디세핀에 의한 iNOS 단백질 및 mRNA의 발현 억제를 통한 NO 생성 억제 효과를 도시한 것이다.
- <71> 도 8은 코디세핀에 의한 COX-2 단백질의 발현 억제 및 TNF- α 의 mRNA 발현 억제 효과를 도시한 것이다.
- <72> 도 9는 I κ B의 인산화 및 분해에 대한 코디세핀의 효과를 도시한 것이다.
- <73> 도 10은 LPS로 유도된 대식세포에서 I κ B의 인산화 억제 효과를 도시한 것이다.
- <74> 도 11은 코디세핀의 항염증 효과의 세포내 신호억제 메커니즘을 도시한 것이다.

도면

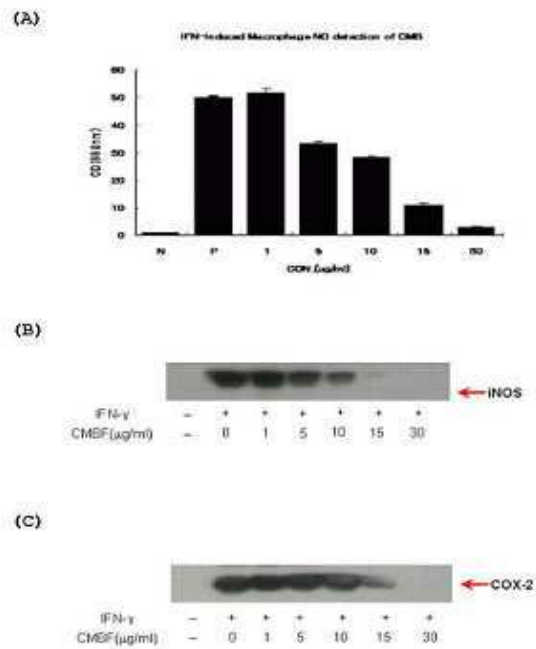
도면1



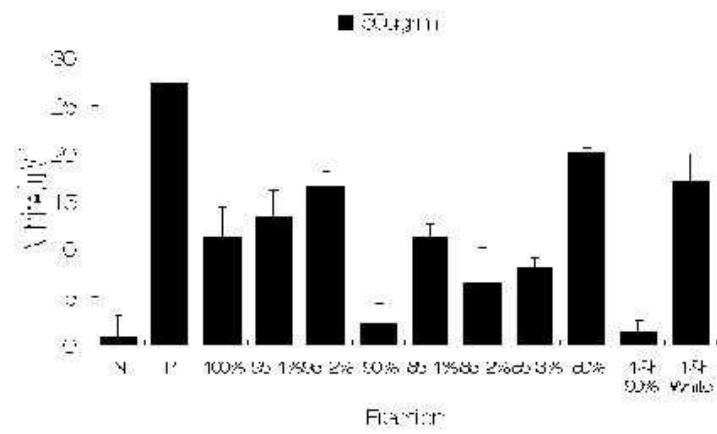
도면2



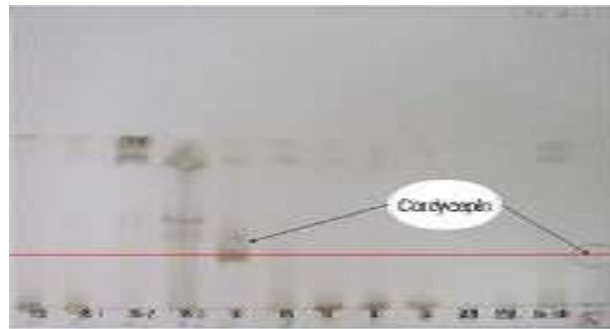
도면3



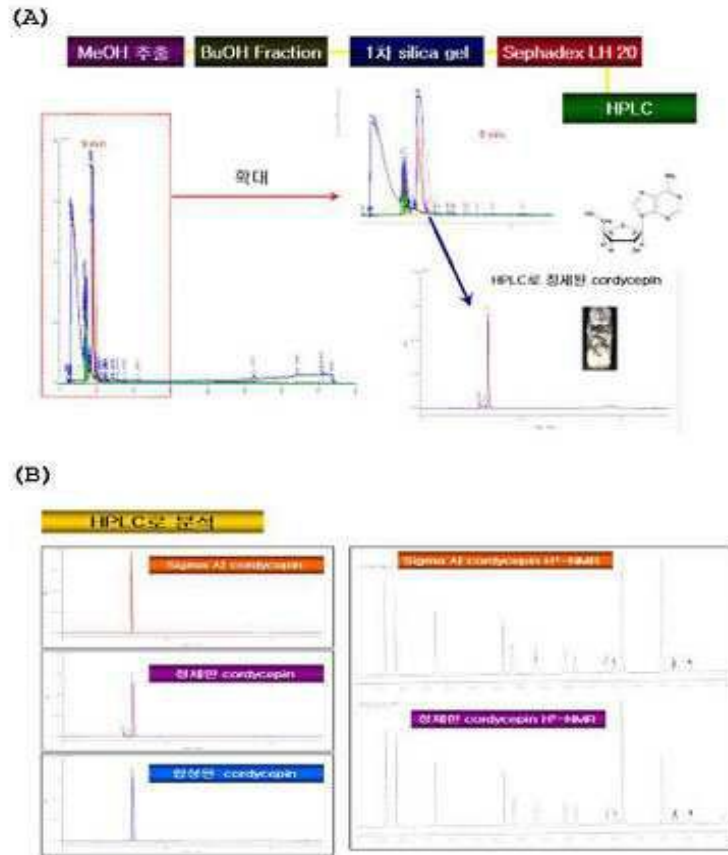
도면4



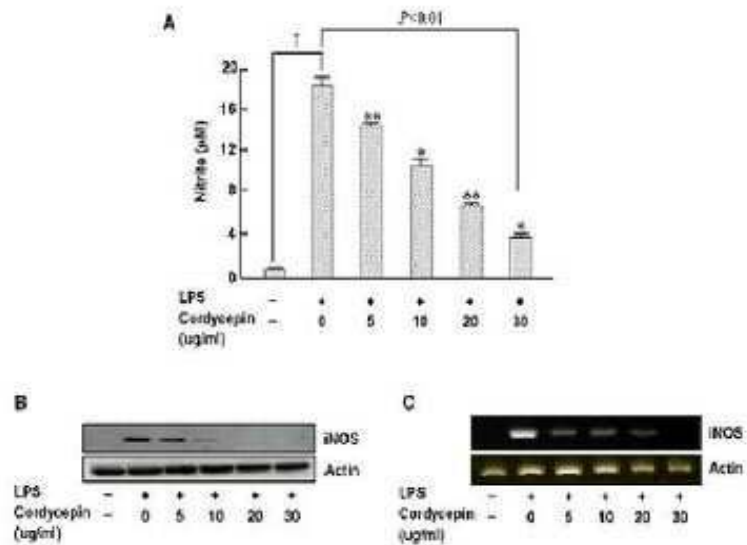
도면5



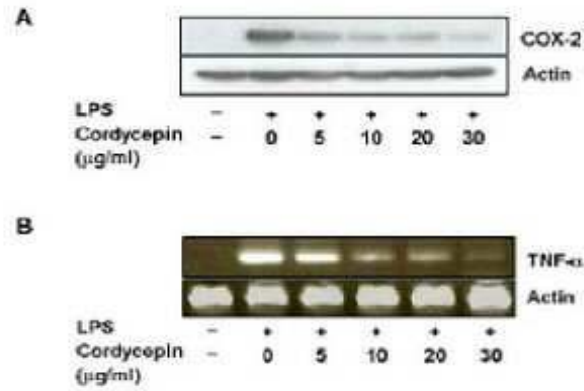
도면6



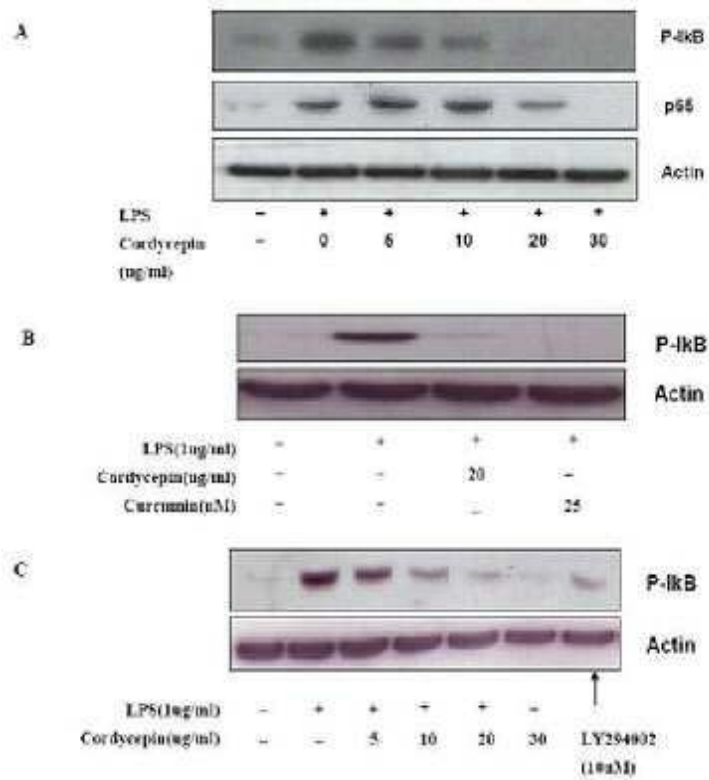
도면7



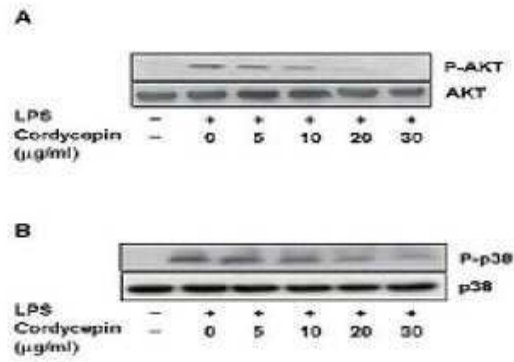
도면8



도면9



도면10



도면11

