	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0005118 (43) 공개일자 2013년01월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/78 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0066508 (22) 출원일자 2011년07월05일 심사청구일자 2011년07월05일		(71) 출원인 연세대학교 원주산학협력단 강원도 원주시 연세대길 1 (72) 발명자 김택중 강원도 원주시 만대로 89, 이편한세상아파트 204동 1703호 (무실동) 김한성 강원도 원주시 판부면 서곡리 원주 더샵아파트 108-602 (74) 대리인 특허법인 남앤드남

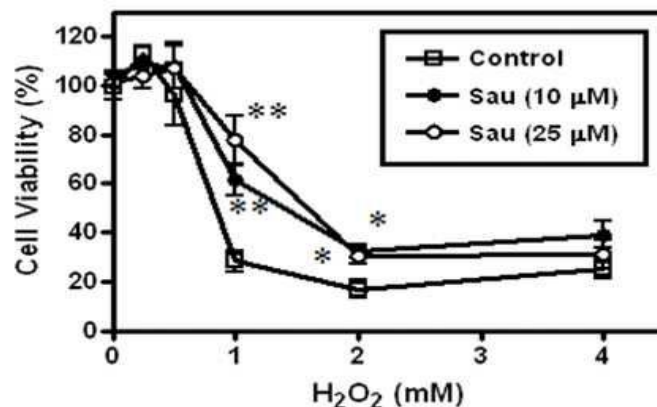
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근위축 억제 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 삼백초 추출물로부터 분리한 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 근육관련 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 삼백초 추출물로부터 얻은 사우치논은 근세포에 대해 강한 항산화 효과를 가지고 있어서 항산화 및 근위축 질환의 치료 또는 예방에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

삼백초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 삼백초 추출물의 농도는 1 내지 10 μm 인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물은 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 형태를 포함하는 경구형 제형인 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물은 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 형태인 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 6

삼백초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 삼백초 추출물의 농도는 1 내지 10 μm 인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물.

청구항 9

삼백초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육강화 식품 조성물.

청구항 10

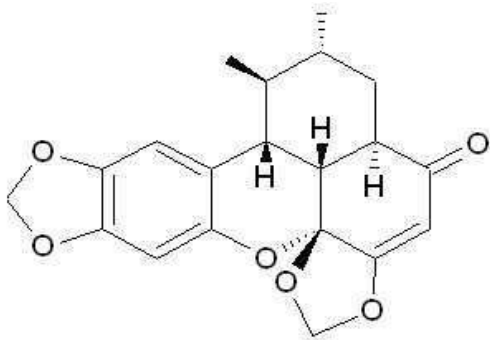
제 9 항에 있어서,

상기 삼백초 추출물의 농도는 1 내지 10 μm 인 것을 특징으로 하는 근육강화 식품 조성물.

청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

<화학식 1>



청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 14

제 11 항에 있어서,

상기 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물은 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 형태를 포함하는 경구형 제형인 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 15

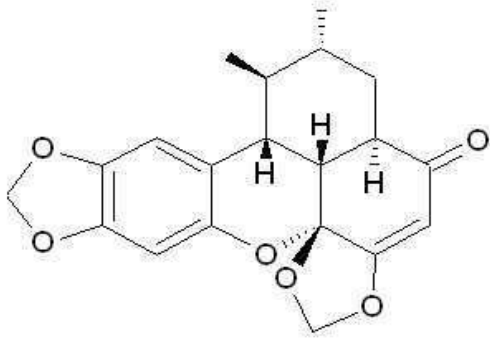
제 11 항에 있어서,

상기 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물은 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 형태인 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물.

청구항 16

하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물.

<화학식 1>



청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염 좌인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물.

청구항 18

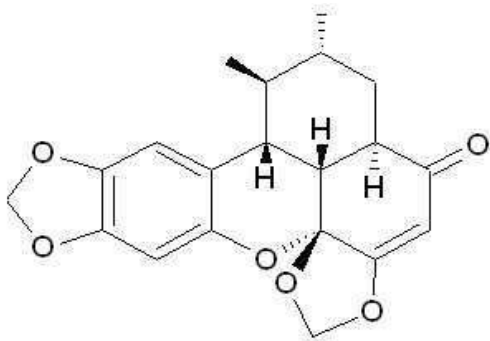
제 16 항에 있어서,

상기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 인 것을 특징으로 하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물.

청구항 19

하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근육강화 식품 조성물.

<화학식 1>



청구항 20

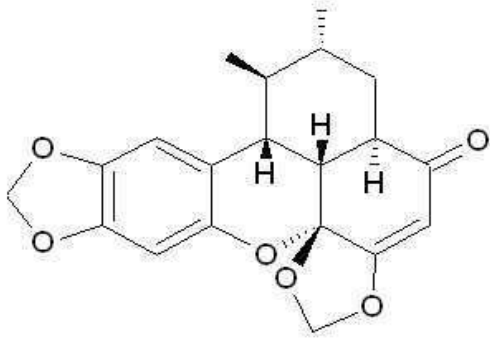
제 19 항에 있어서,

상기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 인 것을 특징으로 하는 근육강화 식품 조성물.

청구항 21

하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 약학 조성물.

<화학식 1>



청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μ m인 것을 특징으로 하는 항산화 약학 조성물.

청구항 23

제 21항에 있어서,

상기 항산화 약학 조성물은 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 형태를 포함하는 경구형 제형인 항산화 약학 조성물.

청구항 24

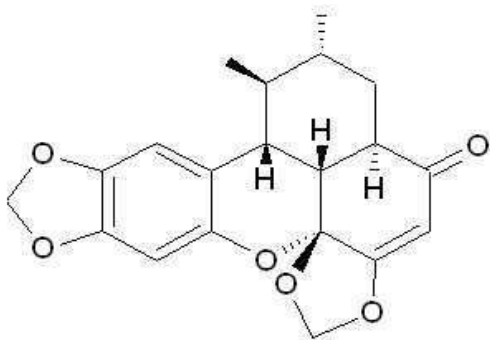
제 21 항에 있어서,

상기 항산화 약학 조성물은 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 형태인 항산화 약학 조성물.

청구항 25

하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 식품 조성물.

<화학식 1>



청구항 26

제 25 항에 있어서,

상기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μ m인 것을 특징으로 하는 항산화 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 삼백초 추출물로부터 분리한 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 근육관련 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 삼백초는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로 풀 전체 또는 뿌리나 잎이 풍독(風毒), 이뇨(利尿), 수종(水腫), 임질(淋疾), 간염(肝炎), 폐렴(肺炎), 변독(便毒), 고혈압(高血壓) 등의 치료에 민간에서 사용되어왔다(정 보섭, 신 민교: 향약대사전, 영림사, 서울, 812-814 (1990)). 삼백초는 잎, 꽃 및 뿌리가 백색이며, 윗부분의 화서(花序)밑에 달린 3개의 잎이 흰색으로 변하므로 삼백초(三白草)라 불린다.
- [0003] 삼백초의 화학 성분에 대한 연구는 그 동안 주로 지상부의 플라보노이드류(flavonoids), 알칼로이드류(alkaloids), 아미노산류(amino acids), 지방산류(fatty acids), 퀸론류(quinone) 및 정유성분에 대해 진행되었다. 또한 제2구리산(cupric acid), 리놀산(linoleic acid) 및 라우린산(lauric acid)의 지방산과 알라닌(alanine), 발린(valine), 글루탐산(glutamic acid), 아스파라긴산(aspartic acid), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine) 및 프롤린(proline) 등의 아미노산의 존재도 확인되었다. 그러나, 본 발명에 따라 삼백초로부터 분리 동정되는 사우치논 화합물이 근육세포 보호작용을 갖는다는 사실은 보고된 바 없다.
- [0004] 본 발명자들은 상기한 목적 달성을 위해 예의 연구를 거듭하는 과정에서, 산화 스트레스의 관여가 시사되어 있는 근위축의 억제에는 항산화 작용을 갖는 물질의 섭취가 효과적이라는 관점에서 각종 근육세포 억제 작용을 갖는 물질에 관하여 검토를 거듭했다. 그 결과, 삼백초에서 추출한 사우치논이 산화스트레스에 의한 근세포 손상을 억제하고 근 위축에 대하여 억제 효과를 나타낸다는 사실을 발견하고, 사우치논을 포함하는 성분이 산화적 스트레스로 기인한 노화, 만성 알콜중독, 죽상동맥경화증, 암, 관상심장질환, 백내장, 당뇨병, 다운증후군, 간염, 허혈이나 재관류성 손상, 류마티스성 관절염, 신부전증, 염증반응, 각종 퇴행성 신경질환, 뇌졸중 발작 및 심근경색 등의 질환예방을 위한 의약품과 건강기능식품 및 식품의 산화방지를 위한 식품첨가물 등에 유용하게 사용될 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

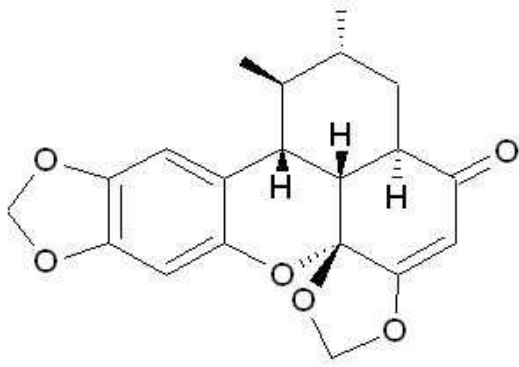
해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 삼백초 추출물로부터 분리한 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 근육관련 질환 치료 및 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 일 구체예에서, 삼백초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물을 제공한다. 상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌이고, 삼백초 추출물의 농도는 1 내지 10 μm 이며, 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 형태를 포함하는 경구형 제형이며, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 형태이다.
- [0007] 일 구체예에서, 삼백초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물을 제공하고, 상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌이며, 삼백초 추출물의 농도는 1 내지 10 μm 이다.
- [0008] 일 구체예에서, 삼백초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육강화 식품 조성물을 제공하고, 상기 삼백초 추출물의 농도는 1 내지 10 μm 이다.
- [0009] 일 구체예에서, 하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 약학 조성물을 제공한다. 상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌이고, 하기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 이며, 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 형태를 포함하는 경구형 제형이며, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 형태이다.

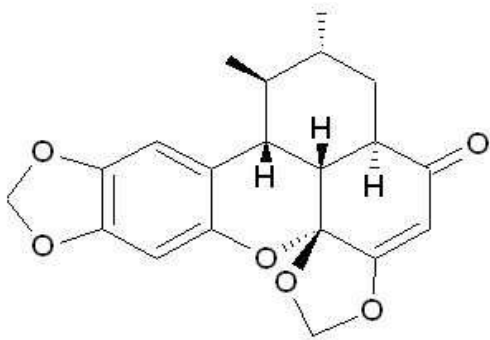
[0010] <화학식 1>



[0011]

[0012] 일 구체예에서, 하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료용 또는 근육손상 보호용 식품 조성물을 제공하고, 상기 근육질환은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌이며, 하기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 이다.

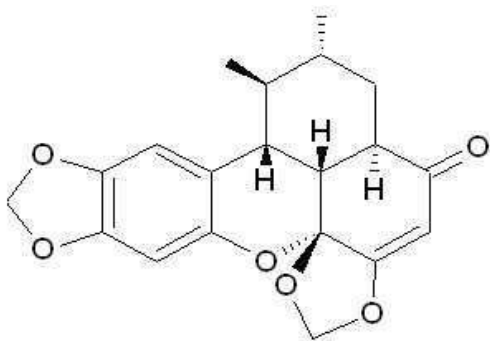
[0013] <화학식 1>



[0014]

[0015] 일 구체예에서, 하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 근육강화 식품 조성물을 제공하고, 하기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 이다.

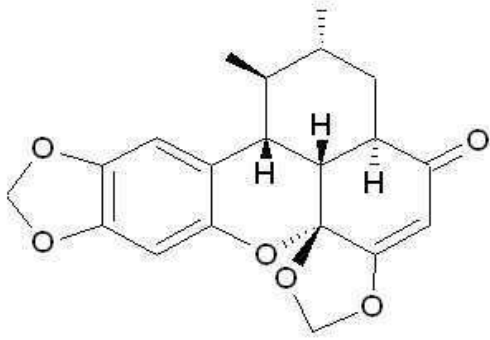
[0016] <화학식 1>



[0017]

[0018] 일 구체예에서, 하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 약학 조성물을 제공한다. 하기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μm 이고, 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 형태를 포함하는 경구형 제형이며, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 형태이다.

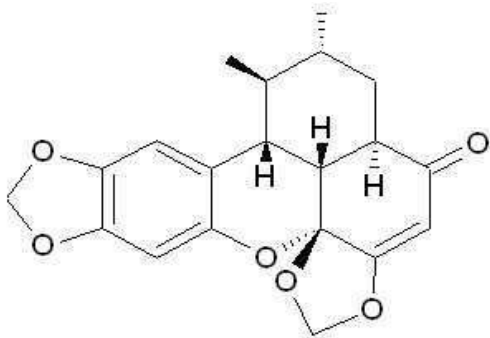
[0019] <화학식 1>



[0020]

[0021] 일 구체예에서, 하기 화학식 1로 표시되는 사우치논을 유효성분으로 포함하는 항산화 식품 조성물을 제공한다, 하기 화학식 1의 농도는 10 내지 100 μ m이다.

[0022] <화학식 1>



[0023]

발명의 효과

[0024] 본 발명의 삼백초 추출물로부터 얻은 사우치논은 근세포에 대해 강한 항산화효과를 가지므로, 부작용 및 독성이 적어 새로운 근위축 질환의 예방, 치료제 및 산화적 스트레스로 기인한 노화, 만성 알콜중독, 죽상동맥경화증, 암, 관상심장질환, 백내장, 당뇨병, 다운증후군, 간염, 허혈이나 재관류성 손상, 류마티스성 관절염, 신부전증, 염증반응, 각종 퇴행성 신경질환, 뇌졸중 발작 및 심근경색 등의 질환 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 사우치논의 처리농도에 따른 근세포의 괴사 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 사우치논의 처리농도에 따른 근세포의 괴사를 농도의존적으로 예방하고 회복하는 효과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 사우치논과 N-아세틸시스테인의 처리농도에 따른 근세포의 괴사 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4 는 사우치논의 처리농도에 따른 근세포의 세포독성을 나타내는 그래프이다.

도 5 는 사우치논의 처리에 따른 근세포 아포토시스의 예방 효과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명에서, "근육 이상과 관련된 질환"이라 함은 근육 소모 및 관련 질환, 이에 한정되지는 않지만, 예를 들면, 근육감소증, 악액질, 근육손상, 근이영양증 및 근육피로를 말한다. "근육 질환의 치료"라 함은 또한 근육 수행력 및 강도 및 근육기능의 유지를 포함하고, 상기 "근육 질환"은 긴장감퇴증, 근위축, 근육경련, 결합조직염, 근성 피로, 근염, 근육경직 또는 근육염좌를 말한다.

[0027] 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특

정으로 한다. 위축증 및 비대증이 일어나는 과정은 포유동물 중 전체에서 보존된다. 다양한 연구에 의해 동일한 기본 분자, 세포 및 생리학적 과정이 설치류와 인간 모두에서 위축증 동안에 일어나는 것이 입증되었다(The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle, Cell Metabolism, 2007).

[0028] 근육 소모는 다양한 원인에 기인하며, 다양한 병증, 질병 및 질환과 관련된다. 이들로는 유전자 이상에 의해 야기된 근이영양증, 예를 들면, 뒤센(Duchenne)형 근이영양증, 진행성 근이영양증, 베커(Becker)형 근이영양증, 디제린-란도즈(Dejerine-Landouzy) 근이영양증, 에르브(Erb)씨 근이영양증, 척수성 근위축증 및 영아 신경축삭 퇴행위축증이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 근육 소모는 또한 다양한 만성 질환 및 노화 과정에 의해 야기될 수 있다. 신체가 노화됨에 따라, 증가 비율의 골격근이 섬유 조직으로 대체된다. 그러므로, 인간에서 정상적 노화는 약화 및 퇴화의 원인이 되는, 근육감소증으로 불리는 상태인 골격 근육량 및 강도의 진행성 감소와 관련된다(The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Short Article Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors, Molecular cell, 2004).

[0029] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0030] 실시예

[0031] 실시예 1. 삼백초의 추출 및 분획

[0032] 음건한 삼백초 10kg을 클로로포름과 메탄올 (1:1)의 혼합용매로 3회, 2시간 동안 열탕 추출하였고, 감압농축하여 총 추출물 1.8kg을 얻었다. 삼백초 추출물(1.8kg)을 증류수에 현탁시킨 다음, 염소화 탄화수소로 분획하고 감압농축하여 염소화 탄화수소 분획과 물 분획을 얻었다. 농축한 염소화 탄화수소 분획물을 다시 90% 메탄올에 현탁시킨 다음, n-헥산으로 분획하여 90% 메탄올 분획물(120g)과 n-헥산 분획물(60g)을 얻었다.

[0033] 실시예 2. 사우치논의 분리 및 동정

[0034] n-헥산 분획(60g)을 n-헥산: 에틸아세테이트의 혼합용매 (100:1 ~ 0:1)로 실라카겔 컬럼크로마토그래피하여 20개의 소분획(Fr. 1~20)으로 나누었다. 이 중 6번 소분획(2g)을 n-헥산: 염소화 탄화수소: 메탄올 (5:1:1)의 혼합용매로 세파텍스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 무색 침상 결정으로 사우치논(800 mg)을 얻었다.

[0035] 사우치논의 구조 결정

[0036] C₂₀H₂₀O₆

[0037] [α]_D; +95.0° (c, 0.63; CHCl₃),

[0038] R_f; 0.35 (n-헥산: EtOAc = 5: 1),

[0039] UV (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ); 299.5 (2.55), 254.2 (2.74) nm,

[0040] IR (neat) ν_{max} 2916, 1676, 1664, 1418, 1433, 1321, 1241, 1184, 1155, 979, 926, 892, 756 cm⁻¹

[0041] EIMS (m/z) (rel. int.); 356 [M⁺] (100), 270 (13), 257 (18), 205 (26), 175 (57), 151 (39), 138 (23),

[0042] HR EIMS; m/z 356.1262 (calcd for C₂₀H₂₀O₆ m/z 356.1260),

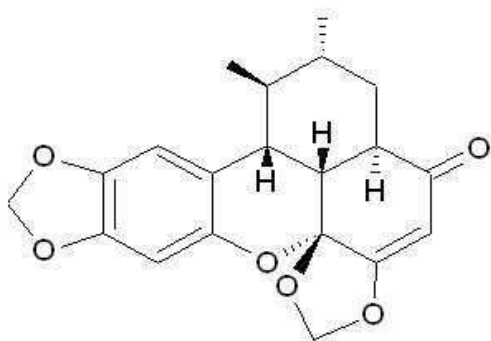
[0043] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.82 (1 H, s, H-6), 6.38 (1 H, s, H-3), 5.90 (1 H, d, J = 1.40 Hz, aromatic-OCH₂O-), 5.87 (1 H, d, J = 1.40 Hz, aromatic -OCH₂O-), 5.65 (1 H, s, aliphatic -OCH₂O-), 5.60 (1 H, s, aliphatic -OCH₂O-), 5.57 (1 H, s, H-3'), 3.03 (1 H, d, J = 5.40 Hz, H-7), 2.52 (1 H, td, J = 11.93, 3.47 Hz, H-1'), 2.48 (1 H, d, J = 5.40 Hz, H-6'), 2.44 (1 H, m, H-8), 1.92 (1 H, m, 7'-Hax),

1.88 (1 H, m, H-8'), 1.64 (1 H, m, 7'-Heq), 1.22 (3 H, d, J = 7.26 Hz, H-9), 0.71 (3 H, d, J = 7.39 Hz, H-9'),

[0044] ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 199.69 (C-2'), 168.66 (C-4'), 146.72 (C-5), 145.70 (C-2), 143.26 (C-4), 115.73 (C-1), 105.54 (C-6), 101.34 (C-3'), 101.24 (aromatic -OCH₂O-), 100.42 (C-5'), 99.50 (C-3), 98.19 (aliphatic -OCH₂O-), 37.60 (C-6'), 37.55 (C-1'), 35.06 (C-7), 34.82 (C-8), 33.45 (C-8'), 25.27 (C-7'), 21.29 (C-9), 20.92 (C-9')

[0045] 이상의 분광학적 기기 분석 결과를 문헌치(Sang Hyun Sung and Young Choong Kim, J. Nat. Prod. 63 (7), 1019-1021 (2000))와 비교, 검토하여 사우치논으로 동정하였다.

[0046] <화학식1>



[0047]

[0048] 실시예 3. 근육세포배양계에서의 항산화를 통한 생존률 향상 효과

[0049] 실시예 3-1. 세포배양

[0050] 정상 골격근육세포(C₂C₁₂)를 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)이 5% 함유된 DMEM배지에서 배양하였다. 즉, 75-cm² plastic flask (Falcon Co., England)에 정상 골격근육세포를 10% FBS, 7.5% NaHCO₃ 150 μg/ml, 글루타민 58.4 μg/ml 및 항생제(antibiotic)/항진균제(antimycotics) 4.4 μl/ml 가 함유된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂의 조건하에서 배양하였다. 2~3일마다 한번씩 2차 배양하여 세포주를 유지하였다.

[0051] 실시예 3-2. 세포정량

[0052] 세포가 자란 75-cm² 플라스틱 플라스크에서 배지액을 제거하고, CMF-PBS (calcium magnesium free-phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후, 0.25% trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 세포 배양액으로 중화시켜서 원심분리(1500 rpm, 3min) 하였다. 남은 세포의 펠렛(pellet)에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복흡입하여 단일 세포부유액을 만든 후 트립판 블루(trypan blue)를 세포부유액과 9:1의 비율로 혼합하여 광학현미경상에서 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 측정하였다.

[0053] 실시예 3-3. H₂O₂ 농도별 근육 세포괴사에 대한 사우치논의 효과

[0054] H₂O₂의 농도별 세포괴사에 대한 사우치논의 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 근육세포를 5×10⁴ cells/well이 되도록 넣고 CO₂ 배양기에서 배양시킨 다음, 사우치논의 농도를 0, 10, 25 μM씩 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 전체부피를 100 μl로 조절하여 37℃, 5% CO₂의 조건에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 H₂O₂를 0 mM에서부터 4 mM까지 농도별로 전체부피가 200μl가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 60분 배양시킨 후, EzCyttox kit 10μl 첨가 후, 한시간 후 흡광도를 측정하여 그 효과를 결정하였다.

[0055] 도 1에서와 같이 H_2O_2 의 농도에 따른 정상 근육세포의 생존력을 측정한 결과, H_2O_2 의 농도가 증가됨에 따라 근육세포의 피사가 유도됨을 알 수 있었다. H_2O_2 농도별 근육세포피사에 대한 사우치논의 근육세포피사 예방능력을 측정한 결과, 사우치논 첨가군이 세포 생존율이 증가함을 볼 수 있었다.

[0056] **실시예 3-4. H_2O_2 로 유도된 근육 세포피사에 대한 사우치논의 농도별 효과**

[0057] H_2O_2 로 유도된 세포피사에 대한 사우치논의 농도별 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 근육세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 CO_2 배양기에서 배양시킨 다음, 사우치논의 농도를 0 μM 로부터 100 μM 까지 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 전체부피를 100 μl 로 조절하여 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 H_2O_2 를 1 mM 농도로 전체부피가 200 μl 가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 60분 배양시킨 후, EzCyttox kit 10 μl 첨가 후, 한시간 후 흡광도를 측정하여 그 효과를 결정하였다.

[0058] 도 2에서와 같이 1 mM H_2O_2 에 의해 유도된 근육세포피사에 대한 사우치논의 농도별 근육세포생존율을 측정한 결과, 사우치논의 농도가 0 μM 로부터 100 μM 증가됨에 따라 세포생존율이 회복됨을 알 수 있었다. 이에 따라 사우치논의 농도별 근육세포피사 예방 효과가 증가됨을 알 수 있었다.

[0059] **실시예 3-5. H_2O_2 로 유도된 근육 세포피사에 대한 사우치논과 N-아세틸시스테인의 비교효과**

[0060] H_2O_2 로 유도된 근육세포피사에 대한 사우치논과 N-아세틸시스테인(항산화 양성테조군) 효과를 비교 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 근육세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 CO_2 배양기에서 배양시킨 다음, 사우치논과 N-아세틸시스테인의 농도를 10 μM 과 5 mM씩 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 전체부피를 100 μl 로 조절하여 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 H_2O_2 를 1 mM 농도로 전체부피가 200 μl 가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 60분 배양시킨 후, EzCyttox kit 10 μl 첨가 후, 한시간 후 흡광도를 측정하여 그 효과를 결정하였다.

[0061] 도 3에서와 같이 H_2O_2 로 유도된 근육세포피사에 대한 사우치논과 N-아세틸시스테인 효과를 비교 관찰한 결과, 이데솔리드와 N-아세틸시스테인의 농도 10 μM 에서 N-아세틸시스테인 보다 사우치논의 뛰어난 세포생존율이 회복됨을 알 수 있었다.

[0062] **실시예 3-6. 세포독성 측정**

[0063] 사우치논의 독성측정은 EzCyttox 키트를 이용하였다. 즉, 정상 근육세포(C_2C_{12})를 96-well plate에 5×10^4 cells/well 되도록 분주하였다. 이를 37°C, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양한 후, 10, 25, 50 μM 의 다양한 농도의 사우치논을 첨가하여 48시간동안 배양하였다. 세포생존율을 48시간 배양시간 정상 근육세포를 대상으로 EzCyttox 키트를 이용하여 사우치논의 세포독성을 결정하였다.

[0064] 사우치논이 첨가된 배양 정상 근육세포에서 세포독성을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다. 사우치논을 첨가하지 않았을 경우, 세포 생존율을 100%로 볼 때 사우치논을 첨가한 첨가군에서는 95% 이상의 생존율을 보였다. 따라서, 본 실험에 사용한 사우치논은 배양 근육세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

[0065] **실시예 3-7. H_2O_2 에 의한 근육세포 아포토시스에 대한 사우치논의 효과**

[0066] H_2O_2 의 농도별 아포토시스에 대한 사우치논의 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 커버글라스에 근육세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 CO_2 배양기에서 배양시킨 다음, 사우치논의 농도를 10 μM 씩 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 37°C, 5% CO_2 의 조건에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 H_2O_2 를 1 mM 농도로 첨가한 다음,

이를 다시 24 시간 배양시킨 후, DAPI 염색한 후 그 효과를 결정하였다.

[0067] 도 5에서와 같이 H_2O_2 에 따른 정상 근육세포의 아포토시스를 측정된 결과, H_2O_2 에 의해 근육세포의 아포토시스가 유도됨을 알 수 있었다. 사우치논의 근육세포 아포토시스 예방 능력을 측정된 결과, 사우치논 첨가군이 아포토시스를 예방함을 볼 수 있었다.

[0068] 본 발명에서 상기 방법으로 수득한 사우치논에 대한 근육세포사 예방을 조사하기 위해 상기와 같은 실험방법을 수행하였다. 배양한 근육세포에 산화스트레스를 처리하여 유도되는 근육세포 사멸을 본 발명의 사우치논을 처리한 후 근육세포의 괴사 억제 및 예방 효과를 확인하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 화합물은 항산화 물질로 이미 잘 알려져 있는 N-아세틸시스테인보다도 강한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0069] 또한, 본 발명에 따른 항산화 화합물에 대하여 급성 독성시험한 결과, 50% 치사량(LD50)은 적어도 1 g/kg 이상인 것으로 나타나 매우 안전한 물질임을 확인할 수 있었다.

[0070] 실시예 4. 랫트에 대한 비경구투여 급성 독성 시험

[0071] 본 발명의 항산화 화합물의 급성 독성을 알아보기 위하여, 6 주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 다음과 같은 방법으로 급성독성실험을 실시하였다. 본 발명의 항산화 화합물 각각을 10 mL의 생리식염수에 현탁하여 0.1 g/kg의 용량으로 상기 랫트 2 마리의 전경골근 (anterior tibialis)에 근육 내 주사 투여하였다. 시험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액 생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다. 시험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 본 발명의 화학식 1의 항산화 화합물은 랫트에서 0.1 g/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 비경구 투여 최소치사량(LD50)은 0.1 g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

[0072] 제제예: 경구 또는 비경구투여용 제형에 대한 제제예

[0073] 제제예 1. 시럽제 제조

[0074] 본 발명의 사우치논 또는 이의 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로서 2 % (중량/부피)로 함유하는 시럽제는 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[0075] 제조된 항산화 화합물(2 g), 사카린(0.4 g), 당(25.4 g)을 온수 80 g에 용해시켰다. 이 용액을 냉각시킨 후, 여기에 글리세린(8.0 g), 사카린(0.4 g), 향미료(0.04 g), 에탄올(4.0 g) 및 소르브산(0.4 g)을 혼합하고, 여기에 증류수를 첨가하여 전체 용량이 100 mL가 되게 하였다. 상기 항산화 화합물은 기타 다른 형태의 약학적으로 허용되는 그의 염으로도 대체 사용할 수 있다.

[0076] 제제예 2. 정제 제조

[0077] 유효성분 15 mg이 함유된 정제는 하기와 같은 방법으로 제조한다.

[0078] 제조된 항산화 화합물(250 g)을 락토오스(175.9 g), 감자전분(180 g) 및 콜로이드성 규산(32 g)과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분(160 g), 활석(50 g) 및 스테아린산 마그네슘(5 g)을 첨가해서 얻은 혼합물을 타정하여 정제로 만들었다.

[0079] 제제예 3. 주사액제의 제조

[0080] 유효성분 10 mg을 함유하는 주사액제는 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[0081] 실시예 1에서 제조된 항산화 화합물(1 g), 염화나트륨(0.6 g) 및 아스코르브산(0.1 g)을 증류수에 용해 시켜서 100 ml 용액을 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 °C에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

[0082] 본 발명에 따른 물질을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명의 추출물은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.01 내지 500 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 또한 그 추출물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

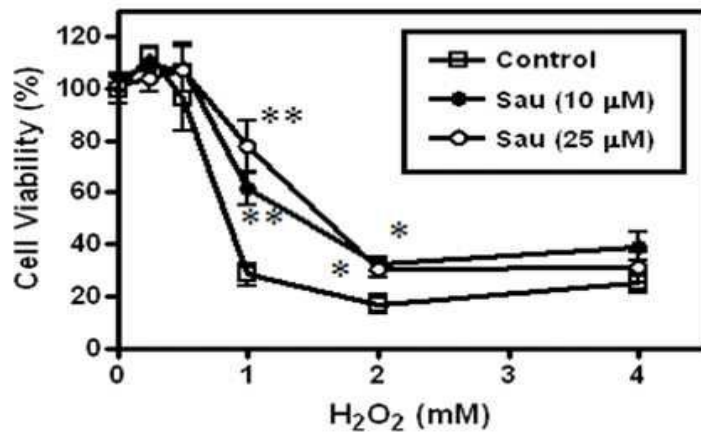
[0084] 본 발명에 따른 물질을 포함하는 조성물은 항산화를 예방하고 근위축 및/또는 근기능 저하를 개선하는 건강기능식품을 제공한다. 본 발명에 따른 물질을 포함하는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다. 또한, 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다.

[0085] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 필수 성분으로서 본 발명에 따른 물질을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 솔비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제인 타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등; 및 합성 향미제, 예를 들어 사카린, 아스파르탐 등을 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 10 g, 바람직하게는 약 5 내지 6 g이다.

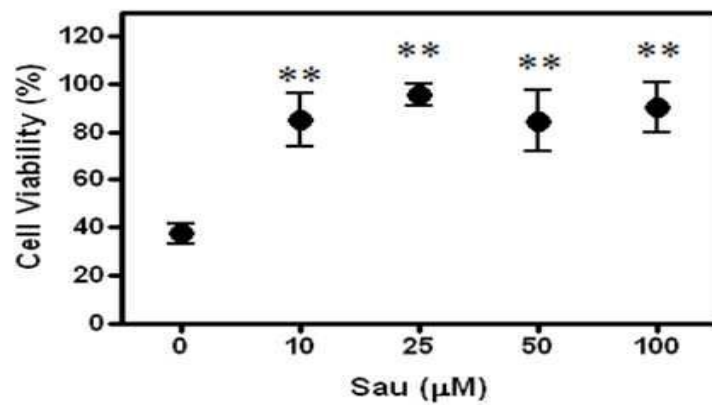
[0086] 지금까지 예시적인 실시 태양을 참조하여 본 발명을 기술하여 왔지만, 본 발명의 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 범주를 벗어나지 않고서도 다양한 변화를 실시할 수 있으며 그의 요소들을 등가물로 대체할 수 있음을 알 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 본질적인 범주를 벗어나지 않고서도 많은 변형을 실시하여 특정 상황 및 재료를 본 발명의 교시내용에 채용할 수 있다. 따라서, 본 발명이 본 발명을 실시하는데 계획된 최상의 양식으로서 개시된 특정 실시 태양으로 국한되는 것이 아니며, 본 발명이 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

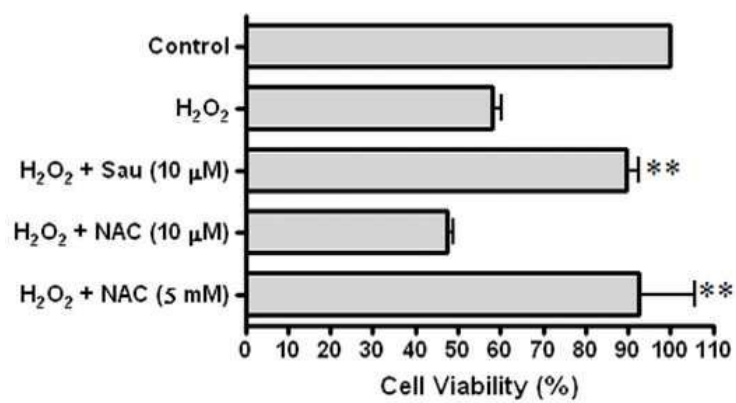
도면1



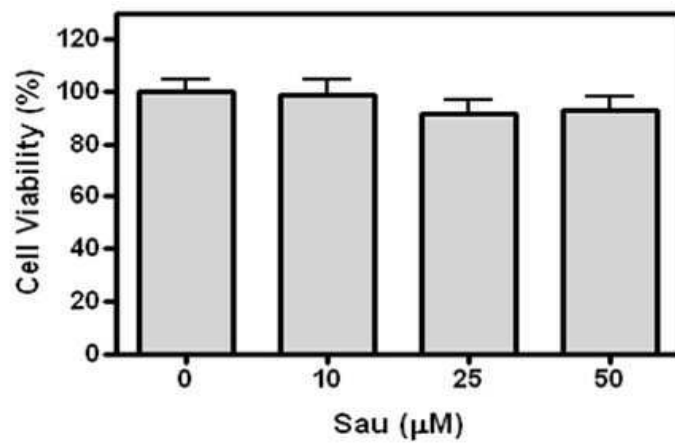
도면2



도면3



도면4



도면5

