



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월29일  
(11) 등록번호 10-2038108  
(24) 등록일자 2019년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 15/203 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)  
A61K 31/7034 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07H 15/203 (2013.01)  
A23L 33/10 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2016-0182924  
(22) 출원일자 2016년12월29일  
심사청구일자 2016년12월29일  
(65) 공개번호 10-2018-0077998  
(43) 공개일자 2018년07월09일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020150002398 A  
Natural Product Sciences, 2014, 20권, 2호,  
130-134

(73) 특허권자  
영진약품 주식회사  
서울특별시 송파구 올림픽로35다길 13 (신천동)  
재단법인 전남생물산업진흥원  
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)  
(72) 발명자  
이용남  
경기도 용인시 수지구 수지로78번길 20, 103동  
907호(상현동, 풍산아파트)  
이동구  
경기도 수원시 영통구 권광로304번길 92-3, 102  
호(매탄동)  
(74) 대리인  
(뒷면에 계속)  
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

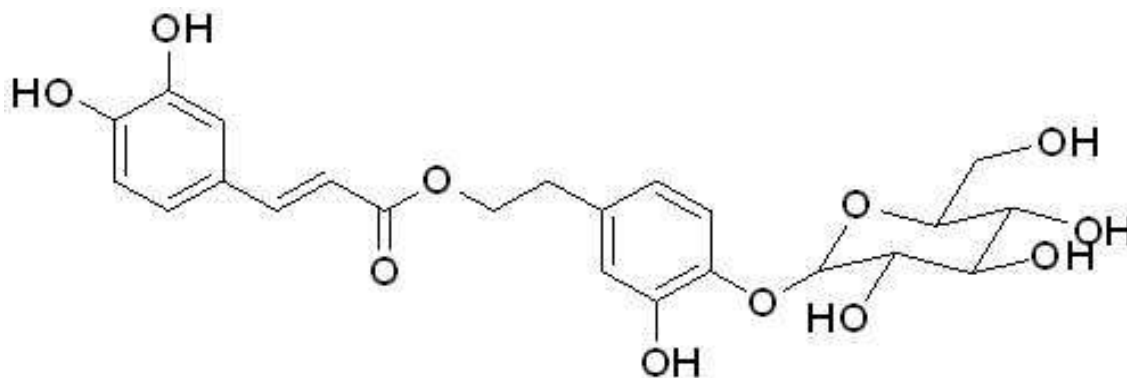
심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 **멸꿀 잎 추출물로부터 분리된 신규한 카페인산 화합물 및 이를 유효성분으로 하는 항염, 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*) 잎에서 분리한 신규 카페인산 화합물 및 이를 유효성분으로 하는 골조직 또는 연골조직 생성 촉진용, 또는 류마티스 관절염과 같은 골조직 또는 연골조직 파괴 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료용 약학적 또는 식품 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 파골세포 분화억제와 콜라겐 타입 II, 아그레칸 발현 및 생산 촉진을 통해 골조직 또는 연골조직 생성 촉진, 또는 골조직 또는 연골조직 파괴 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료효과를 갖는 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 31/7034** (2013.01)  
**A61K 36/185** (2013.01)  
**A23V 2002/00** (2013.01)  
**A23V 2200/306** (2013.01)  
**A23V 2200/324** (2013.01)  
**A23V 2250/21** (2013.01)

(72) 발명자

**유지석**

경기도 수원시 팔달구 일일로18번길 4-26, 171동  
 1306호(화서동, 꽃피버들마을 코오롱아파트)

**최철웅**

광주광역시 서구 풍암순환로 14, 105동 203호(풍암  
 동, 호반·중흥아파트)

**반상오**

전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 101동 1805호  
 (화순광신프로그레스)

**강후원**

전라남도 나주시 영산포로 205-7 (영산동)

**김재용**

전라남도 순천시 왕궁길 60, 304동 207호(조례동,  
 중흥3차아파트)

**이규욱**

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 101동  
 404호(성은연립)

**김재갑**

경기도 부천시 경인로134번길 51, 2동 507호(송내  
 동, 삼익아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10051145
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오의료기기산업핵심기술개발사업
연구과제명	관절질환치료용 글로벌천연물신약개발
기여율	1/1
주관기관	(주)노바셀테크놀로지
연구기간	2014.12.01 ~ 2019.11.30

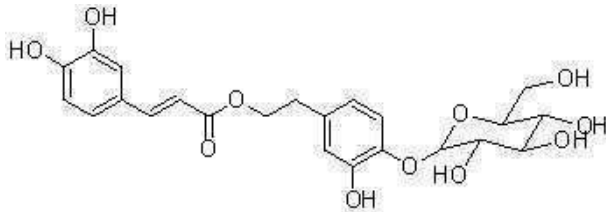
**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*) 잎 추출물로부터 분리된, 하기 화학식 1의 3-하이드록시-4-(((3,4,5,6)-3,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸) 테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)펜에틸 3-(3,4-디하이드록시페닐)아크릴레이트 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 용매화물:

[화학식 1]



**청구항 2**

제1항에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는, 항염용 약학적 조성물.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는, 관절염, 자가 면역 질환에 의한 관절의 파괴질환, 다발성 근육염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 진신흡반성루푸스, 다발성근육염, 류마티스다발근육통(polymyalgia rheumatica), 골다공증, 골전이암 및 파제트병(Paget's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제4항에 있어서, 상기 관절염은, 골관절염, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 건선관절염 및 반응성관절염(reactive arthritis)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

**청구항 7**

제4항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물이 전체 조성물의 중량 기준으로 0.000001 내지 50중량% 포함되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

**청구항 8**

제4항에 있어서, 상기 조성물은 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LPTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 리모나데제 (LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액체(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제 (OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPESIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제(INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLSMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제

(TROCHES), 톨크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS) 및 경피제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 갖는 것인, 약학적 조성물.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제1항에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는, 항염용 식품 조성물.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

제1항에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는, 관절염, 자가 면역 질환에 의한 관절의 파괴질환, 다발성 근육염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 전신홍반성루푸스, 다발성근육염, 류마티스다발근육통(polymyalgia rheumatica), 골다공증, 골전이암 및 파제트병(Paget's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

제12항에 있어서, 상기 관절염은, 골관절염, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 건선관절염 및 반응성관절염(reactive arthritis)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 식품 조성물.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물이 전체 조성물의 중량 기준으로 0.000001 내지 50중량% 포함되는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 유기산, 인산염, 황산화제, 유당 카제인, 텍스트린, 포도당, 설탕 및 솔비톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

**청구항 17**

제12항에 있어서, 상기 조성물은 기능성 식품, 건강보조식품 또는 건강기능식품인 것인, 식품 조성물.

**청구항 18**

제12항에 있어서, 상기 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 과립제, 분말제 또는 음료 형태인 것인, 식품 조성물.

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 멸균 및 추출물로부터 분리된 신규한 카페인산 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 향염, 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 건조된 멸균(*Stauntonia hexaphylla*) 잎으로부터 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1개 내지 4개의 저급 알코올을 비롯한 유기용매 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매 등으로 추출하여 그 분획을 얻고 이를 다시 크로마토그래피 등을 통하여 정제하여 분리된 신규한 카페인산 화합물의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조 가능한 신규한 카페인산 화합물의 향염 또는 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 골조직은 대체로 뼈의 표면이 튼튼한 치밀골질로 이루어지고, 중심부 또는 장골(長骨)의 양 끝은 골질이 그물눈 같이 연합된 해면골질(海綿骨質)로 되어 있다. 대부분의 뼈는 처음에 결합조직 중의 연골로서 발생하여 이것이 나중에 골조직으로 바뀌는데, 일부 뼈는 결합조직 중에서 직접 만들어진다. 골단(骨端)에서는 이웃뼈와 접하는 부분에 관절면이 있고, 그 표면은 초자연골(硝子軟骨)인 관절연골로 덮여 있다. 해면질 가운데의 해면소주(海綿小柱)는 일정한 배열로 되어 있는 것이 특징이다. 골 간부(骨幹部)의 넓은 수강(髓腔)은 해면소주로 된 소강(小腔)과 연속되어 있고 모두 골수로 채워져 있다. 조혈작용을 하는 골수는 혈관이 많이 분포되어 붉은색을 띠며, 적색골수라고 한다. 골질의 구조는 치밀질이나 해면질 모두 두께 5~12 $\mu$ m의 골판이 겹쳐 있는데, 치밀질에서는 동심원상으로 몇 층이 겹친 골층판(하버스층판)이 여러 방향으로 배열되어 있고, 각 층판의 중심에는 하버스판이 있어 혈관이 통한다. 골 세포는 골층판 사이에 배열되어 있으며, 불규칙한 별 모양으로 가는 원형질 돌기로 인접한 다른 골세포와 연결되어 있다. 뼈의 표면에는 질긴 결합조직성 골막이 있으며, 신경과 혈관이 분포되어 뼈의 보호와 영양을 맡고 있다. 골막이 결손되면 뼈의 생존, 신생 및 재생 등이 곤란하게 된다. 골질의 성분은 수분 20%, 세포를 포함한 유기질 35%, 무기질 45%인데, 뼈의 일정한 탄력성은 유기질이 있기 때문이다. 연령이 증가함에 따라 무기질(주로 인산칼슘)이 증가하여 뼈의 경도도 증가한다.

[0003] 만성염증인 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)의 정확한 발병원인과 기작은 아직까지 잘 알려져 있지 않지만, 현재까지 밝혀진 유력한 발병원인 중 한 가지는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)와 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)의 수적 불균형으로 인해 뼈의 항상성이 무너져서 발생하는 것으로 알려져 있다. 정상적인 상태의 파골세포는 단핵구 및 대식세포에서 분화되어 오래된 뼈를 파괴시키거나 손상된 뼈를 제거하는 역할을 하지만, 류마티스 환자에서 발견되는 파골세포의 양상은 파골세포 생성(osteoclastogenesis)으로 인한 수적 증가와 지속적인 생존 및 과도한 활성이 확인되며, 이로 인해 뼈가 크게 손상되는 병리학적 형태를 보인다. 파골세포는 뼈를 분해시키기 위한 다양한 효소를 생성하는데, 뼈를 산화시켜 분해시키는 산성인산화 효소인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)과 뼈와 연골의 세포지지조직을 분해하는 MMP-9(matrix metalloproteinase-9), 콜라겐을 분해하는 cathepsin K등이 주 효소로 알려져 있으며, 이 효소들은 성숙한 파골세포의 특별한 표지자로 사용되고 있다. 파골세포의 전구체인 대식세포에 RANKL을 처리하였을 때, NF- $\kappa$ B와 MAPK kinase의 활성화를 보여 염증매개물질을 생성한다.

[0004] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성화와 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하는 주 효소로서(Smith 등, J. Biol.Chem., 271, 33157(1996)), 두 종류의 이성 효소인 COX-1과 COX-2가 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 COX-1은 위나 신장과 같은 조직에 일정하게 존재하며, 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, 상기 COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다. 또 하나의 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)는 NO 합성효소(NOS)에 의해 L-알지닌으로부터 생성되며, UV와 같은 외부 스트레스나 엔도톡신 또는 사이토카인과 같은 물질에 의해 많은 종류의 세포에서 생성된다. 상기와 같은 염증 자극들은 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 증가시키고, 이를 통하여 세포 내에서 NO 생성을 유도하여, 대식 세포를 활성화시킴으로써 염증 반응을 일으킬 수 있다. 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0005] 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염 물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 염증 질환 또는 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 최근 위염과 관련한 치료제의 기전은 2번째 히스타민 수용체(H2 receptor)를 막아서 위벽세포에서 위산의 분비를 감소시키는 H2

저해제(H2-Blockers)가 주를 이룬다. 위산이 줄어들음으로 인해 이미 손상된 위벽세포(위궤양 등)의 추가적인 손상을 방지하게 된다. 이러한 H2 저해제는 간에서의 다른 약들의 대사를 방해하기 때문에(potent inhibitors of P-450) 다른 약과 같이 복용할 경우 주의가 필요하고, 항안드로젠(Anti-Androgen) 효과가 있어서 남성에게서 여성형 유방(gynecomastia), 발기부전(impotence), 성욕 감소 등의 부작용이 발생할 수 있다. 또한 태반과 뇌혈관 장벽을 통과하므로 임신부나 노인에게 부작용이 더 위험할 수 있고, 두통이나 혼동, 혼미, 어지럼증 등을 일으킬 수 있다.

[0006] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 효과적으로 NO의 생성을 억제할 수 있고, iNOS 및 TNF- $\alpha$  발현도 억제할 수 있으며, COX-2 효소의 활성을 유효하게 억제할 수 있어 항염 효과, 조골세포 ALP 활성 및 조골세포 분화 촉진, 파골세포 분화 억제 및 골 또는 연골조직의 생성이 우수할 뿐만 아니라, 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적어 그 사용 함량의 제한이 거의 없는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*)은 남부해안지역이 자생지인 으름덩굴과의 상록덩굴식물로 키가 15 m까지 자라며 4월 중순에서 5월 중순에 흰색의 꽃이 피고 가을에는 어린이 주먹 크기의 검붉은 색의 열매가 매달리는 식물이다. 이름이 '꿀같이 달다'라는 뜻에 유래되었을 만큼 열매가 맛있는 과일로 알려져 있으나 굵은 씨앗이 많고 과육이 적어 과일은 상품화되지 못하고 있다. 잎은 남부지방에서 월동이 가능하고 육질이 두꺼우며 관상 가치가 높아 정원용, 피콜라용 등으로 이용이 증가하고 있으며, 그에 따라 묘목 생산이 증가하고 있는 자원식물이다.

[0009] 이러한 배경하에서, 본 발명자는 멸꿀로부터 생리학적 활성을 가지고 있는 물질을 찾아내고자 연구하던 중, 신규한 플라보노이드와 카페인산 화합물을 분리 및 정제하였고, 이들의 이화학적 분석 및 스펙트럼 분석을 통하여 동정하고 항염, 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 관련 선행 기술로는 카페인산 페네틸에스테르를 유효성분으로 함유하는 통풍 예방 또는 치료용 조성물(대한민국특허공개번호 제10-2016-0047665호), 카페인산 페네틸에스테르를 함유하는 비만 예방용 식품 조성물 또는 비만 치료용 제약 조성물(대한민국특허공개번호 제10-2011-0021252호), 카페인산 및 클로로젠산을 유효성분으로 함유하여 cAMP 및 cGMP의 생성을 증가시키는 항혈전제(대한민국특허공개번호 제10-2010-0079786호)이 있다.

(특허문헌 0003) [특허문헌 1] 대한민국특허공개번호 제10-2016-0047665호

(특허문헌 0004) [특허문헌 2] 대한민국특허공개번호 제10-2011-0021252호

(특허문헌 0005) [특허문헌 3] 대한민국특허공개번호 제10-2010-0079786호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 상기와 같은 배경하에서, 본 발명의 목적은 천연물인 멸꿀로부터 유래한 신규한 유효성분을 포함하는 항염, 골조직 또는 연골조직 생성 촉진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 멸꿀로부터 유래한 신규한 유효성분을 포함하는 골조직 또는 연골조직을 파괴하는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

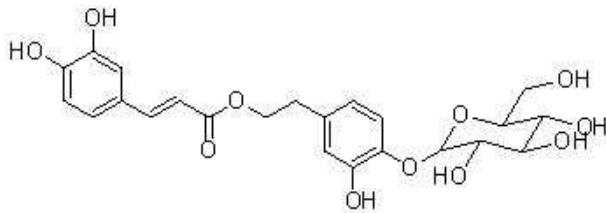
[0013] 또한 본 발명의 목적은, 상기 멸꿀로부터 유래한 신규한 유효성분을 포함하는 항염, 골조직 또는 연골조직 생성 촉진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 멸꿀로부터 유래한 신규한 유효성분을 포함하는 골조직 또는 연골조직을 파괴하는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 멸균 및 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1의 신규한 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 용매화물을 제공한다.

**화학식 1**



[0017]

[0018] 상기 화학식 1의 화합물은 본 발명자에 의해 처음으로 제공되는 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 카페인산 화합물의 염, 바람직하게는 약학적으로 허용되는 염을 제공한다. 상기 "약학적으로 허용되는 염"은 순수한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등의 유발 없이 사람 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 염을 의미한다. 상기 약학적으로 허용되는 염은 당 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면 문헌(S.M. Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66, 1, 1977)에 상세히 기술되어 있다. 염은 본 발명의 화합물을 최종적으로 분리 및 정제하는 동안에 동일반응계에서 제조하거나 별도로 무기 염기 또는 유기 염기와 반응시켜 제조할 수 있다. 적합한 염기 부가염 형태는, 예를 들면 암모늄염, 리튬, 소듐, 포타슘, 마그네슘, 칼슘 등의 염과 같은 알칼리염 및 알칼리토금속염, 유기염기와의 염, 예를 들면 1차, 2차 및 3차 지방족 및 방향족 아민, 예를 들면 메틸아민, 에틸아민, 프로필아민, 이소프로필아민, 4가지 부틸아민 이성체, 디메틸아민, 디에틸아민, 디에탄올아민, 디프로필아민, 디이소프로필아민, 디-n-부틸아민, 피롤리딘, 피페리딘, 모폴린, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 퀴누클리딘, 피리딘, 퀴놀린 및 이소퀴놀린, 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판디올, 하이드라바민 염, 및 아르기닌, 라이신 등의 아미노산과의 염 등이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 카페인산 화합물의 수화물 또는 각각의 결사슬(side chain)에 당(glucose)등의 화합물이 결합된 배당체와 같은 유도체 화합물을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 카페인산 화합물은 천연으로부터 분리되거나 당 업계에 공지된 카페인산 화합물의 화학적 합성법으로 제조할 수 있다.

[0026] 바람직하게는 본 발명의 카페인산 화합물은 천연 식물로부터 분리 및 정제할 수 있다. 즉, 종래의 물질을 추출하고 분리하는 방법을 이용하여 식물 또는 식물의 일부로부터 수득될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물을 제조하기 위한 원료 식물(생약)은 멸균로서, 식물 전체를 사용하거나 일부 부위를 사용할 수 있고, 바람직한 사용가능 부위는 잎이다. 이러한 원료 식물은 목적하는 추출물을 획득하기 위하여 적절히 건조하여 침연(macerated)하거나, 단지 건조시켜 적절한 용매, 예를 들어 정제수와 같은 물, 탄소수 1개 내지 4개를 갖는 유기용매를 사용할 수 있다. 상기 유기용매는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등의 탄소수 1개 내지 4개의 저급알코올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 클로로포름 및 석유에테르 등의 각종 용매를 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 본 발명에 사용된 추출 방법은 통상적으로 식물 또는 생약의 추출에 사용되는 모든 방법을 제한없이 사용할 수 있으며, 예컨대, 냉침, 상온 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 퍼콜레이션법 또는 환류 냉각 추출법일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 추출 공정은 단회일 수도 있으나, 필요한 경우 2회 이상 반복할 수 있다.

[0028] 또한 목적하는 추출물은 본 발명의 화학식 1의 화합물의 분리를 위해 추가적으로 분획 등의 공정을 더 거칠 수 있으며, 이때 사용되는 분획 용매는 상기 추출 용매를 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 이러한 정제방법으로, 예를 들어, 역상 분배 크로마토그래피법(Reverse phase partition chromatography), 순상 흡착 크로마토그래피법(Normal phase adsorption chromatography), 이온교환 크로마토그래피법 (ion exchange chromatography), 크기 배제 크로마토그래피법 (size exclusion chromatography) 또는 이들의 하나 이상의 조합으로 구성된 추가 정제방법을 수행하는 각각 농도구배 크로마토그래피로 분리 및 정제할 수 있다. 상기 크로마토그래피로는 실리카겔(silica gel)이나

활성 알루미나(alumina)등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 고속액체 크로마토그래피(HPLC)등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 그러나 화합물의 추출 및 분리정제 방법은 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.

- [0030] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명에 다른 화학식 1의 카페인산 화합물을 멸균 용액으로부터 물을 사용하여 추출하고 이를 분리, 정제하여 제조하였다.
- [0031] 이러한 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 파골세포의 TRAP 활성을 억제하고 파골세포의 분화를 억제하여 골조직의 생성을 촉진하고, 염증성 사이토카인의 억제를 통해 연골세포의 생성 또는 분화에 관한 인자인 아그레칸(aggrecan), 콜라겐 유형II(collagen II)의 생성을 촉진하여 연골조직의 생성 또한 촉진하며 항염 효과를 나타냄에 의해 골조직 생성, 연골조직 생성 촉진능을 가지며, 이로 인해, 관절 또는 연골을 파괴하거나 손상시키는 다양한 질환들로부터 보호할 수 있다.
- [0033] 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 항염, 골조직 생성 또는 연골 조직 생성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명에 따른 조성물 내의 유효성분으로서의 화학식 1의 카페인산 화합물은 사용 형태 및 목적, 환자 상태, 증상의 종류 및 경중 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 전체 중량 기준으로 0.000001 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 40 중량%일 수 있다. 그러나 이는 투약자의 필요에 따라 증감할 수도 있고, 식생활, 영양 상태, 골조직 또는 연골조직의 손상 진행 정도 등과 같이 다양한 인자에 따라 적절하게 증감할 수 있으므로, 상기 범위에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 발명에 따른 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구 또는 비경구(예를 들어, 피부, 정맥, 근육 내, 피하) 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제(TABLETS), 연질 또는 경질 캡셀과 같은 캡셀제(CAPSULES), 과립제(GRANULES), 환제(PILLS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 전제(DECOCTIONS), 침제(INFUSIONS), 액체(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 엘릭실제(ELIXIRS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 트로키제(TROCHES), 탄크제(TINCTURES), 주정제(SPIRITS) 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 경고제(PLASTERS), 로션제(LPTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 에어로솔제(AEROSOLS), 연고제(OINTMENTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 카타플라스마제(CATAPLSMA), 크림제(CREAMS), 파스타제(PASTES)의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 상기 혼합 추출물 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다. 예를 들어, 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 체중, 연골의 손상 정도, 질환의 진행 정도 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6회 투여될 수 있다.
- [0040] 또 다른 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 골조직 또는 연골조직을 파괴하는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0041] 상기 골조직 또는 연골조직을 파괴 또는 손상시키는 질환은, 이에 제한되는 것은 아니나, 관절염, 자가 면역 질환에 의한 관절의 파괴질환, 다발성 근육염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 전신홍반성루푸스, 다발성근육염, 류마티스다발근육통(polymyalgia rheumatica), 골다공증, 골전이암 또는 파제트병(Paget's disease)를 들 수 있다. 또한 상기 관절염은, 다양한 형태의 관절염, 예를 들어 골관절염, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 건선관절염, 응성관절염(reactive arthritis) 등과 같은 질환을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 류마티스 관절염이다. 이러한 조성물에 포함되는 화학식 1의 화합물의 함량, 제형, 투여경로, 포함되는 보조제 등에 관한 사항은 모두 상기 골조직 또는 연골조직 생성 촉진 조성물의 사항을 그대로 적용할 수 있다.
- [0043] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는



용매화물을 포함하는, 골조직 또는 연골조직의 생성 촉진이나 골조직 또는 연골 조직을 파괴 또는 손상시키는 질환의 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 식품이란 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 첨가하는 것도 포함된다. 본 발명의 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 상기 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 전체 중량에 대하여 0.000001 내지 50중량% 첨가될 수 있다. 상기 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 유효 용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 항염, 골조직 또는 연골 조직 손상의 개선 또는 유지를 위한 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물외에, 유기산, 인산염, 향산화제, 유당 카제인, 텍스트린, 포도당, 설탕 및 솔비톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[0044] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 과립제, 분말제, 액제, 현탁제 등과 같은 음료 형태인 경구투여용 식품의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 화학식 1의 카페인산 화합물, 이의 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스킨류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

**발명의 효과**

[0045] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 화합물은 본 발명자들에 의해 자연계에서 처음으로 분리 및 정제된 신규한 카페인산 화합물로서, 이들은 탁월한 항염, 골조직 생성 또는 연골조직 생성 촉진효과를 나타내는바, 골조직 또는 연골조직 파괴와 관련된 류마티스 관절염과 같은 다양한 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료제로서 매우 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0046] 도 1은 화학식 1의 화학 구조식이며;
- 도 2은 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 3는 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 4은 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 DEPT 135 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 5는 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 HOMO COSY 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 6은 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 HMQC 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 7은 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 HMBC 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 8은 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물 MS 스펙트럼 분석 결과이며;
- 도 9는 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물의 파골세포에 대한 TRAP 활성화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이며;
- 도 10는 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물의 파골세포 분화 염색 결과를 나타낸 그래프이며;
- 도 11은 멸꼴로부터 분리한 본 발명의 화학식 1의 카페인산 화합물의 연골세포 분화(생성)에 대한 collagen type II, aggercan 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0047] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0049] **참조예 1: 분석 기기**

[0050] NMR 스펙트라(spectra)는 내분 표준물질(internal standard)로 테트라메틸실란(tetramethylsilane)을 이용하여 기기(Bruker MHz FT-NMR spectrometer)에서 기록하였다. HRMS는 기기 (UPLC/Quttro Micro spectrometer)에서 수행하고 HPLC 분석은 UV/VIS 탐지기(G4212B), 펌프(G1311C)를 이용하여 기기(Agilent)에서 수행하였다.

[0052] **실시예 1: 멸균된 추출물로부터 신규 화합물 분리**

[0053] 1-1. 멸균물로부터 추출 및 분획물 제조

[0054] 전라남도 천연자원연구원에서 제공받은 멸균(*Stauntonia hexaphylla*)의 잎 4 kg을 물 40 ℓ로 추출하는 과정을 2회 반복하였다. 얻어진 추출물을 감압 농축하여 225 g의 추출물을 얻었고 상기 추출물을 물에 현탁하고 부피 1000 ml의 n-부탄올 분획에서 179 g의 추출물을 순차적으로 얻었다.

[0056] 1-2. 화합물의 정제

[0057] 상기 실시예 1에서 얻은 n-헥산 분획, 클로로포름 분획, 에틸아세테이트 분획 및 n-부탄올 분획 중 n-부탄올 분획 179 g에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(200-400 mesh ASTM, Merck)를 수행하였다. 이때 용리액으로는 클로로포름과 메탄올의 혼합 용매를 사용하였으며, 클로로포름과 메탄올의 혼합 비율은 메탄올을 0, 10, 30, 50, 70 및 100%로 점차 극성을 높여가는 농도구배 크로마토그래피를 수행하여 여기에서 얻은 분획들(f1-f6)을 회수하고 감압농축하였다. 그 결과, f1 6 g, f2 8 g, f3 7.5 g, f4 7.5 g, f5 7.5 g 및 f6 8.5 g 의 6개의 분취액을 얻었고, 그 중 f5 분취액 7.5 g에 대하여 다시 Lichoprep RP18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 10 mg 을 분리하였다. 이때 용리액으로는 메탄올과 물 1:3의 비율로 혼합하여 사용하였으며 농도구배 크로마토그래피를 수행하였다.

[0059] 1-3. 화학식 1 화합물의 동정

[0060] 상기 실시예 1에서 분리·정제된 화합물의 구조를 동정하기 위하여 다음과 같은 방법으로 IR 스펙트럼, NMR 분석 및 HRMS 질량분석을 수행하였다.

[0062] <1-3-1> 화학식 1의 화합물 분석결과

[0063] 성상 : 하얀색의 결정(메탄올),

[0064] 분자식: C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>

[0065] MP: 285-288 °C

[0066] <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra: 표 1

[0067] HRMS (30 V, rel. int., %): m/z 479 [M]<sup>+</sup>

[0068] 분석결과, <sup>1</sup>H-NMR스펙트럼은 여덟 개의 올레핀성(δ 6.26, 6.44, 6.72, 6.76, 7.04, 7.38, 7.46, 및 7.52), 한 개의 아노머성(anomeric)(δ 5.1)을 나타내었다. <sup>1</sup>H-NMR스펙트럼의 아노머성 프로톤 시그널의 결합 상수에 근거하여, 상기 아노머성 위치의 배열은 β 형태인 것으로 결정되었다. <sup>13</sup>C-NMR스펙트럼에서, 한 개의 아노머성 탄소의 화학 시프트는 δ 102.9에서 표시되었다. β-D-글루코즈 아노머성 프로톤 시그널은, δ 5.1(H-1')에서의 프로톤 시그널 및 δ 144.8(C-15), 탄소 시그널 사이의 상관에 의해 C-15 및 C-1' 위치에 각각 연결된 것이 명확해졌다. 이러한 데이터의 분석 결과는 표 1에 나타내었다.

**표 1**

[0070]

No.	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	HMBC <sup>1</sup> H→ <sup>13</sup> C
1	-	125.4	

2	7.46	121.3	C-6
3	-	148.3	C-2
4	-	145.2	
5	7.04	115.7	
6	7.38	114.7	C-2,5
7	7.52	145.4	
8	6.26	113.7	
9	-	166.5	
10	3.67	69.9	C-11
11	2.64	35.1	C-10
12	-	129.1	
13	6.76	116.2	C-14,17
14	6.44	119.4	C-13
15	-	144.8	C-1'
16	-	143.4	C-17
17	6.72	115.3	C-13
Glc-1'	5.1 (brs)	102.9	C-15
Glc-2'	-	73.2	-
Glc-3'	-	73.4	-
Glc-4'	-	70.1	-
Glc-5'	-	76.4	-
Glc-6'	-	63.5	C-5'

[0071] 상기의 결과들을 근거로 화학식 1의 화합물을 3-hydroxy-4-(((3,4,5,6)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenethyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate으로 동정하였고, 이는 아직까지 보고된 바 없는 천연에서 처음으로 분리된 신규한 카페인산 화합물임을 확인하였고 이를 YJ-001로 명명하였다.

[0073] **실시예 2: 골수세포의 분리 및 파골세포 분화**

[0074] 4-5주령 된 ICR 마우스의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고  $\alpha$ -MEM essential medium을 통과시켜 골수 세포를 수집하고, 50 ng/mL M-CSF(macrophage-colony stimulation factor)를 처리하여 24시간 배양하였다. 미 부착 세포를  $\alpha$ -MEM으로 세척한 후 48well에  $5 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 50 ng/mL의 M-CSF가 첨가된  $\alpha$ -MEM 배지에 3일간 배양하였다. 그 후 50 ng/mL의 MCSF와 100 ng/mL의 RANKL(Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand)을 함께 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다.

[0076] **실시예 3: 멸균 및 추출물로부터 유래된 화학식 1의 화합물에 의한 파골세포의 TRAP 활성측정**

[0077] 파골세포는 특징적으로 타르트레이트(tartrate)에 대해 저항성을 나타내는 산성 포스파타제(acid phosphatase)인 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)을 가지며 이는 다른 골조직 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다고 알려져 있다(Minkin, C., Calcif. Tissue Int., 34: 285-290, 1982). 따라서, 본 발명의 멸균 및 추출물로부터 유래된 화학식 1의 화합물에 의한 파골세포의 TRAP 활성을 다음과 같이 실험하였다. 상기 [실시예 2]에서 설명한 바와 같이, 48-well에  $5 \times 10^5$  cells/well이 되게 cell을 접종하고 분화인자(RANKL, MCSF)와 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. TRAP 활성 측정은 TRAP activity assay kit(AK04F, COSMO BIO CO., LTD)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 4일간 배양 후 반응 후 배양 상층액 30ul/well을 새로운 96 plate에 분주하고 준비된 kit의 Chromogenic substrate/Tartrate-containing buffer 170ul/well를 넣어 37°C에서 30분 내지 3시간 동안 반응 후 540nm에서 흡광도를 측정한다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

[0078] 실시예 1에서 얻어진 화학식 1의 화합물은 각각 농도별로, 즉, 멸균 및 추출물 유래 화학식 1의 화합물 0.1, 1, 10, and 100ug/ml 각각을 파골세포에 처리하고, 4일간 배양한 다음 파골세포의 TRAP 활성(TRAP 활성은 타르트레이트에 대해 저항성을 나타내는 산성 포스파타제 활성을 의미한다)에 미치는 영향을 측정하고 그 결과를 도 9에 그래프로 나타내었다. 도 9로부터 본 발명의 화학식 1의 화합물은 각각 농도(0.1, 1, 10, and 100ug/ml) 의존적으로 파골세포의 활성 억제 작용을 한다는 것을 확인하였다.

[0080] 실시예 4: 멸골 및 추출물로부터 유래된 화학식 1의 화합물에 의한 파골세포 분화 억제

[0081] 상기 실시예 2에서 설명한 바와 같이, 48-well에  $5 \times 10^5$  cells/well이 되게 cell을 접종하고 분화인자(RANKL, MCSF)와 본 발명의 화학식 1의 화합물을 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 고정된 cell에 기질용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100  $\mu$ L씩 분주하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후, 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 15분 동안 cell을 고정하였다. PBS로 cell을 3번 세척하였다. TRAP 염색은 50 mM tartrate acid를 포함하는 50mM sodium acetate buffer 10 mL에 1 mg/mL naphtol AS-MX phosphate와 N,N-dimethylformamide 100  $\mu$ L를 첨가하여 염색액을 제조한 후 10% formaldehyde로 고정된 cell에 염색액을 45  $\mu$ L씩 분주하고 37°C에서 30분간 염색 후 현미경으로 관찰하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0082] 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군 세포에서는 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 형성되었지만 본 발명의 멸골 및 추출물 유래의 화학식 1의 화합물을 처리한 실험군에서는 각각 농도(0.1, 1, 10, and 100ug/ml) 의존적으로 파골세포의 분화가 억제되었음을 알 수 있다. 상기 결과로부터, 본 발명의 화학식 1의 화합물은 농도 의존적으로 파골세포의 분화 억제 작용을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0084] 실시예 5: 멸골 및 추출물로부터 유래된 화학식 1의 화합물에 의한 연골세포 분화(생성) 바이오마커 아그레칸(aggrekan), 콜라겐 유형II(collagen II) mRNA 발현(생성) 측정

[0085] 연골세포 primary cell을 수득하기 위해 고밀도 배양법(high density 법)을 사용하였다. 구체적으로 생후 5일 된 Rat의 무릎 위아래 1cm를 절단하여 무릎연골을 1X PBS(20% P/S함유)이 담긴 50ml 코니칼 튜브에 보관한다. 상온에서 1X PBS(20% P/S함유)로 15분씩 3회 washing 한 후, 1% Collagenase D(또는 H) 400ul, Trypsin 400, serum free media (DMEM F-12) 1.2 ml을 넣고 37°C에서 교반하며 1 시간 동안 배양하였다. 배양 시간 후 상온에서 1X PBS(20% P/S함유)로 3회 washing 한 후 연골부분만 절제하여 새로운 50ml 코니칼 튜브에 넣고 여기에 Collagenase 600 ul, media (10% FBS, 1% P/S) 1.4 ml를 넣고 37°C에서 교반하며 6시간 동안 배양하였다. 배양 후 mesh를 통해 거른 다음, 12 well micro plate에 셀 개수가 1.5(또는 2.0) X 10<sup>5</sup> 이 되도록 seeding하고 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 배양 후, Media (10% FBS, 1% P/S)으로 배지 교체를 하고 다시 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 DMEM F-12 media(10% FBS, 1% P/S), DMEM F-12 media(10% ITS, 1% P/S) 비율을 1:1 비율로 혼합하여 배지를 교환해주고 37°C에서 24시간 동안 배양 한다. 24시간 후, DMEM F-12 media (10% ITS, 1% P/S)로 교체하고 37°C에서 24시간 동안 배양 한다. 24시간 배양 후, serum free media(DMEM F-12)로 교체하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간배양 후, BMP-2 또는 BMP-7 100 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물 50ug/ml을 각각 처리하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 각각의 세포로부터 RNA를 분리하였다. 상기 RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 구체적으로, 상기 배양한 세포를 GIT solution(easy BLUE Total RNA extraction kit, (주)인트론바이오테크놀로지)으로 용해(lysis)시키고, 실온에서 10,000 rpm 조건으로 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 펠렛(pellet)을 수득하였다. 상기 펠렛에 0.1% DEPC solution (Sigma) 1 ml을 첨가하고, 12,000 rpm 조건으로 2분간 다시 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후, 펠렛을 수득하였다. 상기 수득한 펠렛에 구아니디움(guanidinium) 0.5 ml을 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하였다. 추가로, phenol/chloroform/iso-amylalcohol 혼합용액(25:24:1)을 0.5 ml 첨가하고, 볼텍싱한 후, 12,000 rpm의 조건으로 3분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액과 동량의 이소프로필알코올(iso-propylalcol)을 첨가하고 잘 혼합한 후, -20°C에서 30분간 방치시켰다. 이 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 후, 펠렛을 70% 에탄올 수용액으로 씻어 내고(washing), 진공 하에 건조시켜 RNA를 분리하였다. 상기 분리된 RNA는 0.1% DEPC용액 1 ml에 녹여 연골세포 마커인 콜라겐 II(Col II), 아그레칸(aggrekan)의 mRNA 함량을 측정하기 위해 사용하였고 하우스 키핑 유전자(house keeping gene)로 GAPDH를 사용하였다. 상기 연골세포 바이오마커인 콜라겐 II(Col II)와 아그레칸(aggrekan)의 mRNA 함량 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기 분리된 RNA 3  $\mu$ g에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고, 42°C에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70°C에서 15분 동안incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 2에 기재하였다

표 2

[0086]

확인대상 mRNA	Primer sequence		Annealing Tm(°C)
Col II	sense	TGGCATCGACATGTCAGCCTTTC	60
	anti-sense	TGCAGAAGACTTTCATGGCGTCCA	

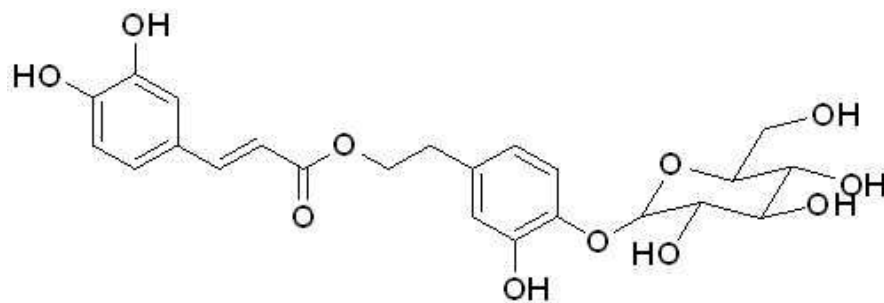
Aggrecan	sense	ACAGTGAGCTCAGGCTTGCCTGTA	62
	ant i-sense	GTGACATCCTCTACACCTGAAGCA	
GAPDH	sense	TGGTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC	60
	ant i-sense	AGACAACCTGGTCTCAGTGTAGC	

[0087] 상기 real-time PCR 결과는 GAPDH 함량과 함께 비교하여 사진으로 촬영한 결과를 도 11에 나타내었다.

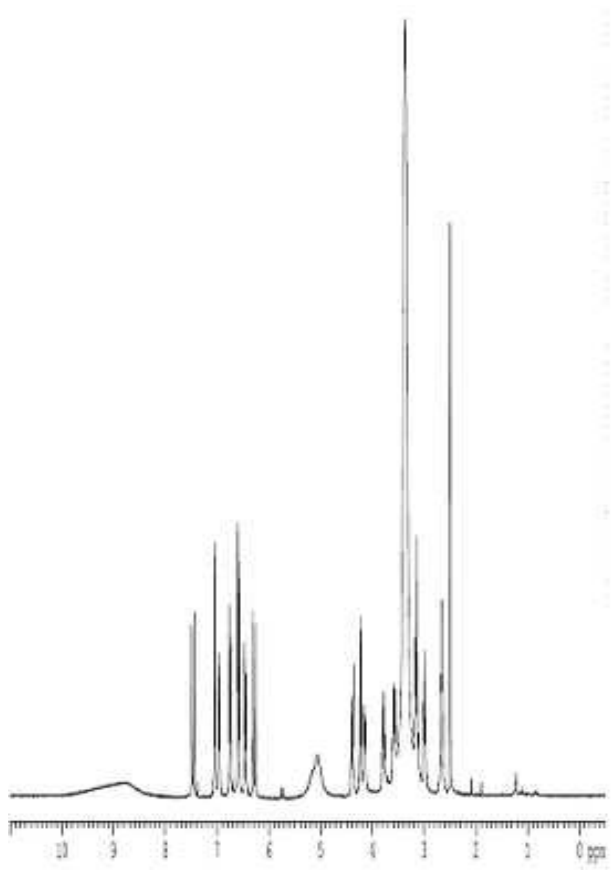
[0088] 도 11에 나타낸 바와 같이, IL-1 $\beta$  (10ng/ml)를 처리한 음성대조군은 연골세포와 관련된 바이오마커(biomarker)인 콜라겐 II(Col II)와 아그레칸(aggrecan)의 mRNA 발현양이 IL-1 $\beta$ 를 처리하지 않는 정상군에 비해 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 반면에, BMP-2(100ng/ml)를 처리한 양성대조군은 연골세포와 관련된 바이오마커(biomarker)인 콜라겐 II(Col II)와 아그레칸(aggrecan)의 mRNA 발현양이 IL-1 $\beta$ 를 처리하지 않는 정상군 보다 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 화학식 1의 화합물을 50ug/ml의 농도로 처리한 실험군의 경우, 정상군에 비해 연골세포와 관련된 바이오마커(biomarker)인 콜라겐 II(Col II)와 아그레칸(aggrecan)의 mRNA 발현양이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물이 연골세포의 생성(합성)에 중요한 연골세포외기질분자(ECM; extracellular matrix)의 주요구성 성분인 type II collagen(Col II)의 발현과 황산화 프로테오글리칸(aggrecan)의 합성을 촉진하는 것을 확인한 것이다.

도면

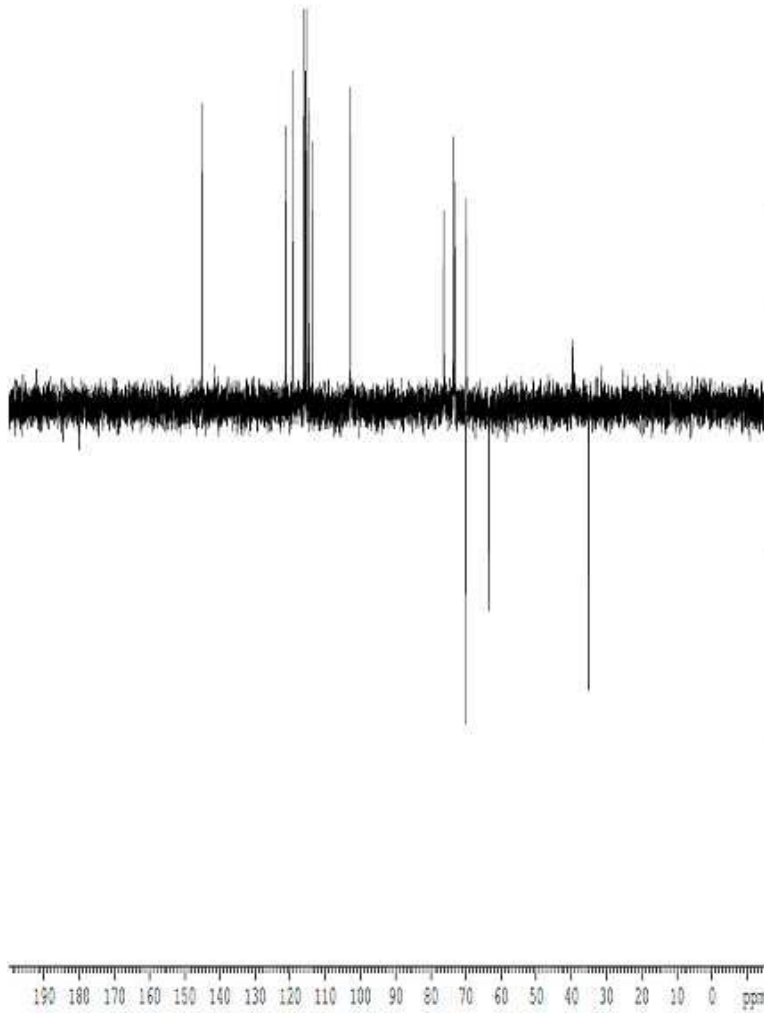
도면1



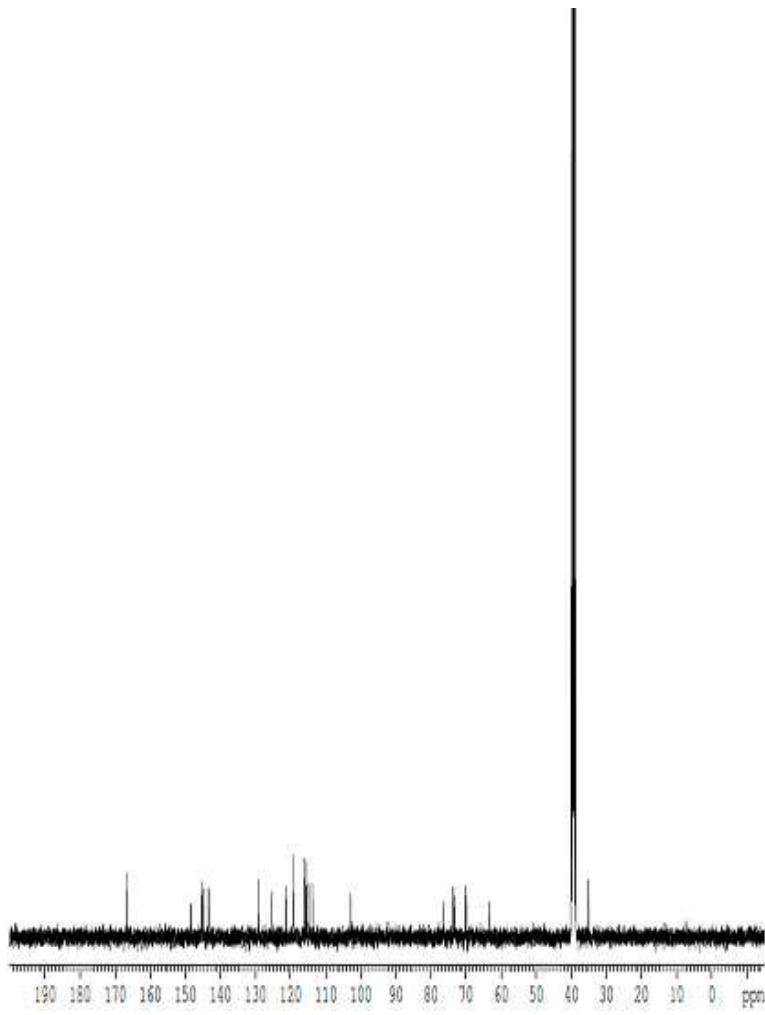
도면2



도면3

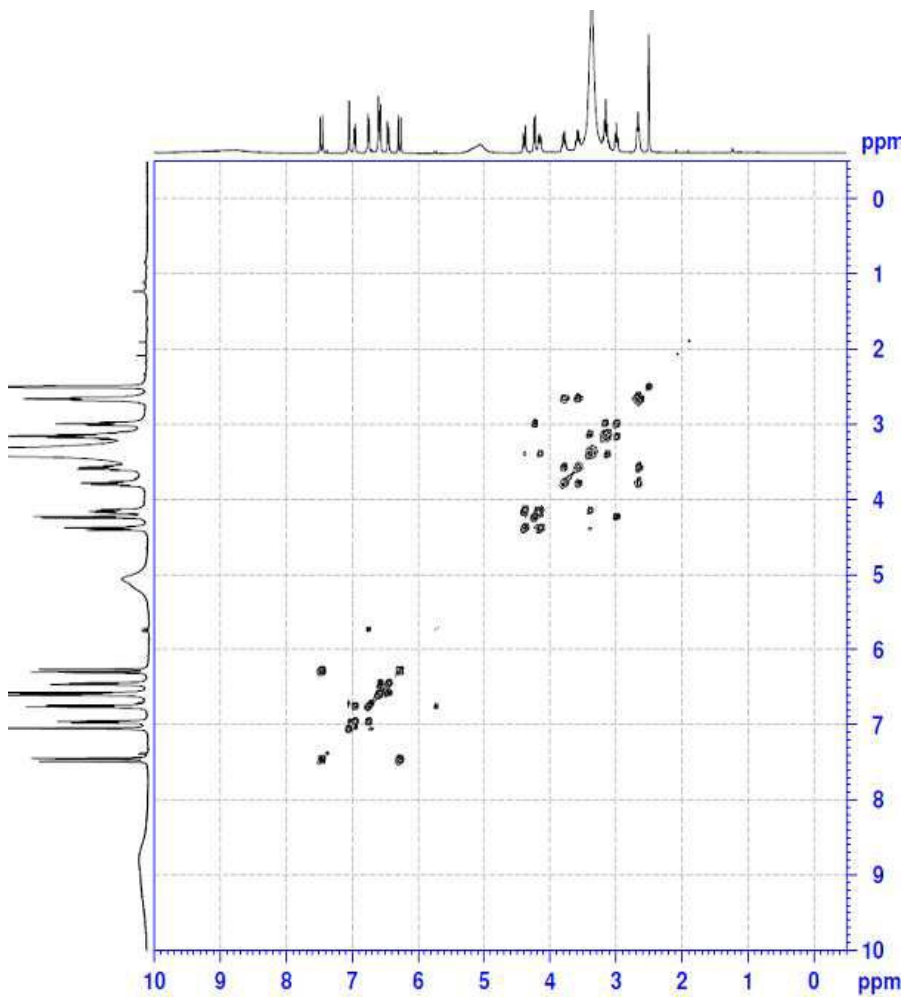


도면4

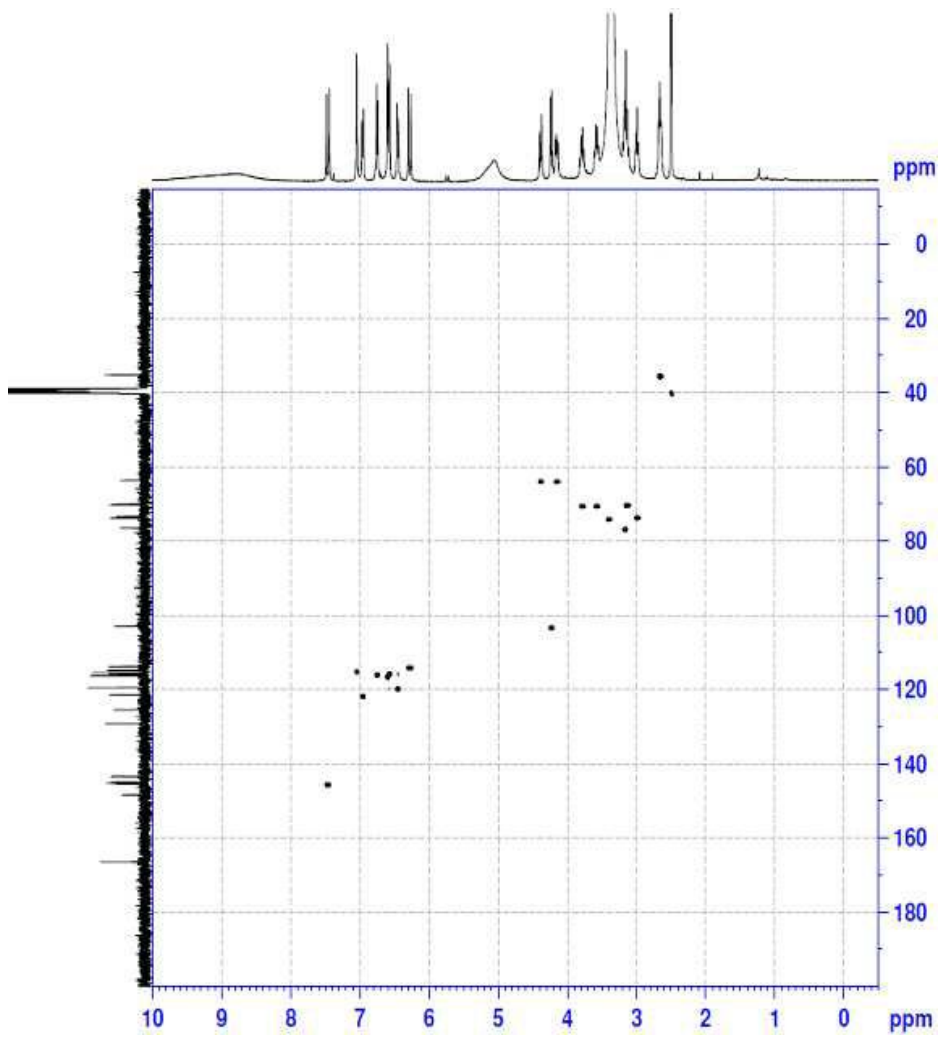




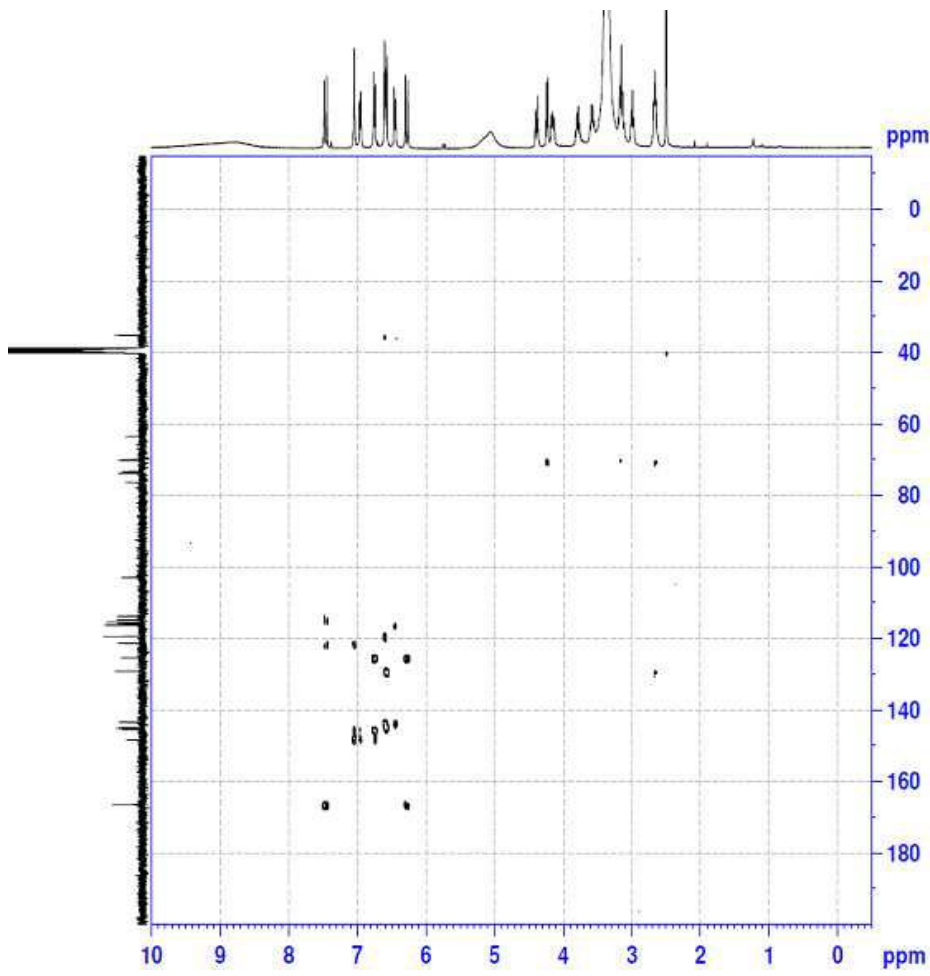
도면5



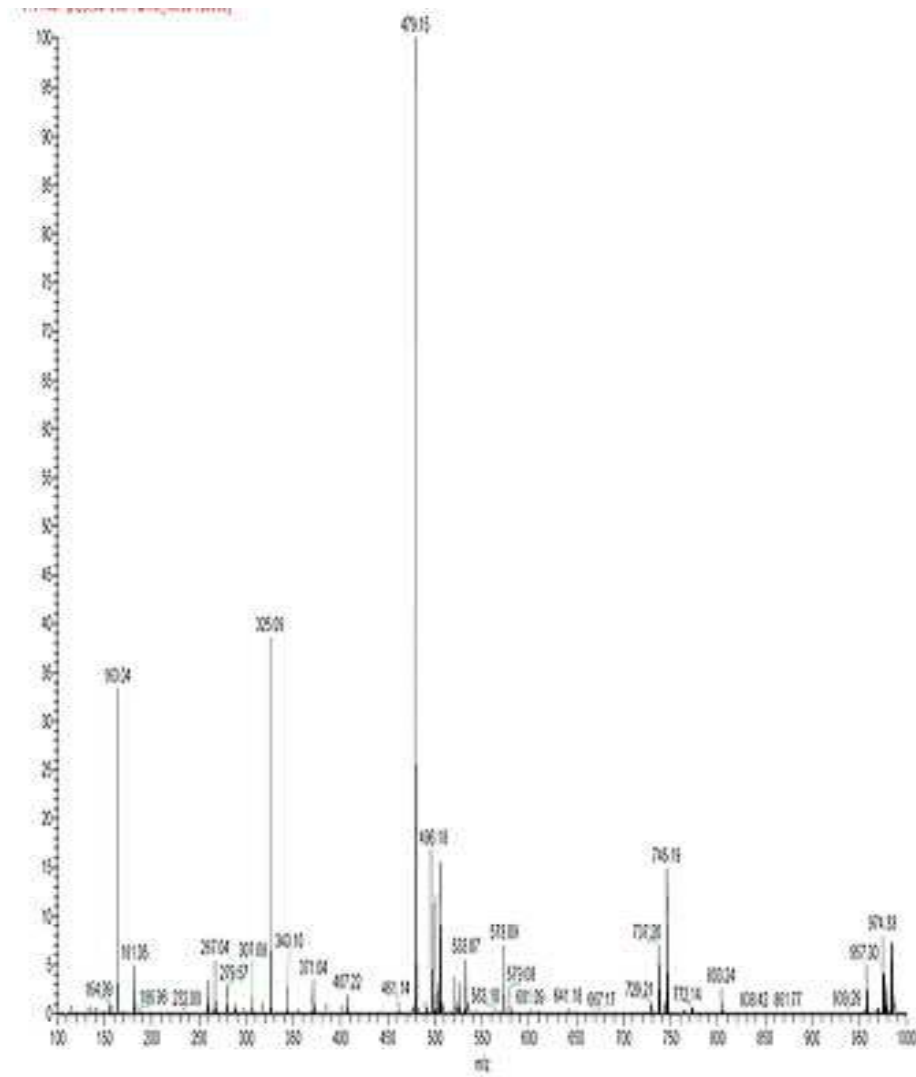
도면6



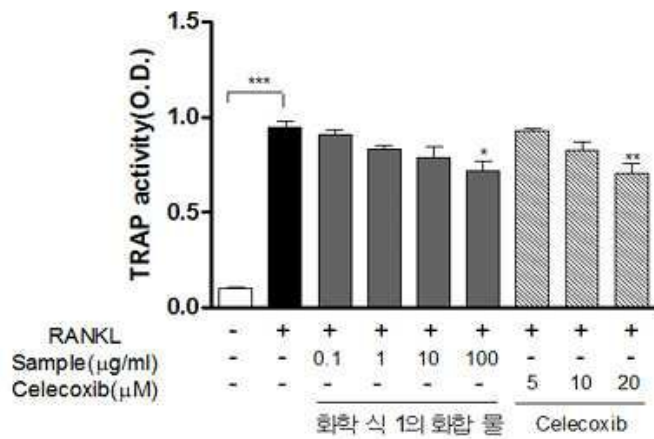
도면7



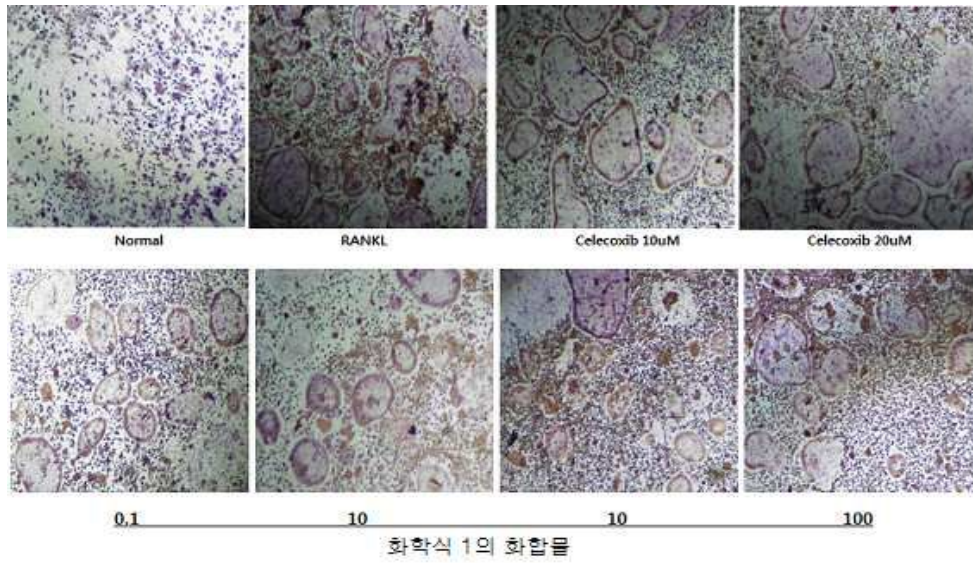
도면8



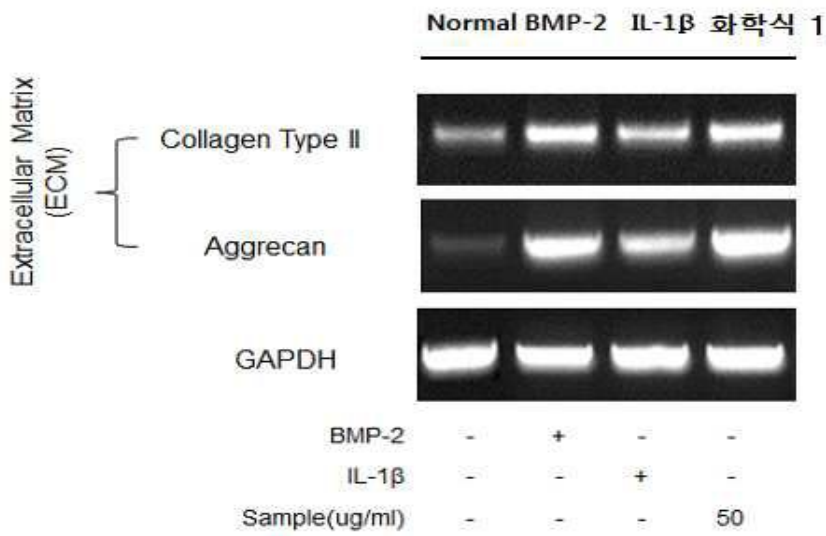
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Yung jin pharm. co., ltd.  
Jeonnam bioindustry foundation
- <120> Novel caffeic acid compound from Stauntonia hexaphyll leaf extract and composition for anti-inflammatory, and improvement of bone tissue generation or cartilage tissue generation
- <130> DPP20165146KR
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Col II sense primer  
 <400> 1  
 tggcatcgac atgtcagcct ttgc 24

<210> 2  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Col II antisense primer  
 <400> 2  
 tgcagaagac tttcatggcg tcca 24

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Aggrecan sense primer  
 <400> 3  
 acagtgagct caggcttgcc tgta 24

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Aggrecan antisense primer  
 <400> 4  
 gtgacatcct ctacacctga agca 24

<210> 5  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAPDH sense primer  
 <400> 5

tggtgctgag tatgtcgtgg agtc 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH antisense primer

<400> 6

agacaacctg gtcctcagtg tagc 24