(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월07일
(11) 등록번호 10-1391777
(24) 등록일자 2014년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/282 (2006.01) *A61P 21/02* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0036727
(22) 출원일자 2011년04월20일
심사청구일자 2012년02월16일
(65) 공개번호 10-2012-0119014
(43) 공개일자 2012년10월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR100527877 B1*
KR100700065 B1*
US20080311230 A1*
KR1020060038396 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
삼육대학교산학협력단
서울특별시 노원구 화랑로 815, 산학협력단 (공릉동, 삼육대학교)
(72) 발명자
정재훈
서울특별시 노원구 화랑로 815, 제1과학관 305호 (공릉동, 삼육대학교)
우태선
서울특별시 광진구 천호대로107길 21 (중곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

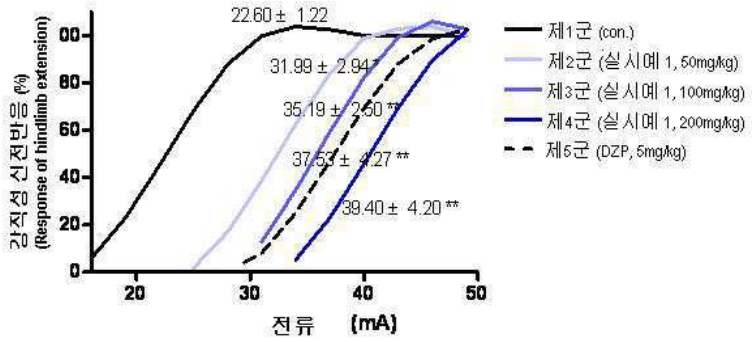
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물**

(57) 요 약

본 발명은 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 인진호 추출물 또는 인진호 추출물의 유효성분인 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)의 항경련 효과에 대한 것이며, 특히 생약에서 유래된 성분으로, 인체에 안전하며 용량이 증가할수록 경련 억제 효과가 증가하므로 인체에 과량 사용해도 부작용이 적은 약학조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

류종훈

서울특별시 동대문구 회기로25길 31, 경희대학교 약학대학관 412호 (회기동)

최재수

부산광역시 해운대구 대천로 187, 화목아파트 105동 1502호 (좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	09112 한약재 890
부처명	식품의약품안전평가원
연구사업명	한약재 평가기술 과학화 연구
연구과제명	한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 연구
기 여 율	1/2
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2010.01.14 ~ 2010.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

인진호(*Artemisiae capillaris* Herba) 추출물을 유효성분으로 포함하는 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 2

인진호(*Artemisiae capillaris* Herba) 추출물을 유효성분으로 포함하는 경련 완화 및 예방용 약학조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인진호 추출물은 60 내지 80%의 에탄올을 추출용매로 하여 추출한 것인 약학조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인진호 추출물은 카필라리신(capillarisin) 또는 에스쿨레틴(esculetin) 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 것인 약학조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 경련성 질환은 비외상성 간질 우울증, 불안 장애 및 정신병 장애로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 약학조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 경련성 질환은 Cl^-의 세포내 유입량이 증가됨에 따라 치료 또는 예방되는 질환인 약학조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 경련성 질환은 감마-아미노부티르산(GABA) 수용체의 조절에 의하여 치료 또는 예방되는 질환인 약학조성물.

청구항 8

제2항에 있어서,

상기 경련은 뇌막염(meningitis), 산욕열(childhood fevers), 뇌암(brain tumor), 두뇌 외상(head trauma), 대뇌순환계의 퇴행성 질병(degenerative disease) 및 출산 도중의 외상으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상에 의한 것인 약학조성물.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 경련은 Cl^-의 세포내 유입량이 증가됨에 따라 완화 또는 예방되는 것인 약학조성물.

청구항 10

제2항에 있어서,

상기 경련은 감마-아미노부티르산(GABA) 수용체의 조절에 의하여 완화 또는 예방되는 것인 약학조성물.

청구항 11

카필라리신(capillarisin)을 유효성분으로 포함하는 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 12

카필라리신(capillarisin)인 유효성분 및 약제학적으로 허용 가능한 담체로 이루어진 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 13

에스쿨레틴(esculetin)을 유효성분으로 포함하는 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 14

에스쿨레틴(esculetin)인 유효성분 및 약제학적으로 허용 가능한 담체로 이루어진 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)을 유효성분으로 하는 인진호 추출물을 포함하는 약학조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 경련은 총 인구의 1%에서 나타나는 비교적 흔한 질환이며, 근래에 급증하는 교통사고와 산업현장의 안전사고 등에 의해 발생 가능성은 더 높아지고 있는 추세이다(D. Y. Kim et al., Kor. J. Pharmacogn. 29,pp179-186, 1998). 뇌막염(meningitis), 산욕열(childhood fevers), 뇌암(brain tumor), 두뇌 외상(head trauma), 대뇌순환계의 퇴행성 질병(degenerative disease) 등이 원인으로 알려져 있으나, 대부분의 경우에는 그 원인을 알지 못한다. 출산 도중의 외상도 원인 중의 하나로 간주되고 있다. 비외상성 간질은 연령에 상관없이 나타나지만, 일반적으로 10세 이전에 발병한다. 간질환자의 약 70-75%가 현재 사용되는 약물로 치료를 받고 있다. 복합국소발작 환자의 경우는 다른 종류의 간질환자보다 상용 약물로 치료하기가 훨씬 더 어렵다.

[0003] 경련을 유발시키는 뇌흥분은 감마-아미노부티르산(GABA) 수용체-염소이온투과담체(ionophore) 복합체(GR복합체)를 통해 조절되며, 상기 GR 복합체는 GABA 등의 신경전달물질에 의해 조절된다. 상기 GABA는 뉴런막을 투과하는 염화이온의 전도도를 조절함으로써 각각의 뉴런의 흥분을 조절한다. GABA는 GR 복합체상에 있는 그것의 인식부위와 상호작용을 하여 GR 복합체의 전기화학적 구배를 떨어뜨려 세포내로 염소이온의 유입을 촉진시킨다. 이 음이온수준의 세포내 증가는 투과막 전위의 과분극을 초래하고, 흥분성 유입물에 대한 뉴런의 감수성을 낮추게 된다(즉, 뉴런 흥분을 감소시킴). 바꾸어 말하면, 염화이온농도가 높을수록 뇌흥분(각성의 수준)은 낮아져 항경련 효과를 나타내게 된다.

[0004] 경련에 대하여 처방되는, 대부분의 항경련제들은 부작용을 초래할 수 있다.

[0005] 심각한 부작용이 나타나지 않는다면, 1차 약물을 수주 또는 수개월 계속 투여해야 효과가 나타난다. 발작의 적절한 조절이 이루어지지 않으면 이차 약물을 선택하고, 일차 약물 복용 중지 시기와 이차 약물 복용 시기를 결정한다. 과거에는 자주 약물들을 복합 처방하여 6개 이상의 약물을 투여 받는 경우까지 있었다. 이러한, 항경련제의 장기 사용되는 특성과 빈번한 부작용의 발현으로 인해 좀 더 안전하고 효과적인 치료제의 개발이 시급하게 요구되고 있다.

[0006] 한편, 인진호(Artemisiae capillaris Herba)는 국화과(Compositae)에 속하는 사철쑥(Artemisia capillaris Thunb.)의 지상부이다. 인진호의 주된 효능은 간세포 보호 효과로 알려져 있으며, 인진호 물 추출물은 human hepatoma cell line에서 NF-κB의 활성화를 억제함으로써 LPS로 유도한 염증반응을 억제한다(S. H. Hong et al., Int. J. Mol. Med. 13, pp717-720, 2004). 또한 Hep G2 cell에서 EtOH로 유도한 cytokine (TNF-α, IL-1

α)의 분비를 억제한다(H. N. Koo et al., Immunopharmacol. Immunotoxicol. 24, pp441-453, 2002). 인진호의 성분 중 capillarisin과 esculetin 6,7-dimethylether에는 담즙분비촉진작용이 있다(T. Ikenaga et al., Biol. Pharm. Bull. 17, 150-151). 카필라리신(capillarisin)은 인진호의 주요 성분으로써 (Komiya et al., 1976) 효과적인 담즙분비 작용과, xanthine oxidase의 억제효과를 나타내며(Chang et al., 1993), 에스쿨레틴(esculetin)은 coumarin 유도체로써 인진호외 여러 식물들에 포함되어 있는 성분이며(Chang et al., 1996), 많은 약리학적 효과를 지니고 있는데, 대표적으로 xanthine oxidase 억제 (Egan et al., 1990), 항혈전응고 효과(Okada et al., 1995), N-methyl-N-nitrosourea로 유도된 항 유방암 효과 등이 알려져 있다.

[0007] 본 발명자들은 인진호 추출물과 상기 인진호 추출물의 유효성분인 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)이 강력한 항경련 효과 및 세포 내로 유입되는 Cl^-의 양을 증가시키는 효과가 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 인체에 무해하면서, 우수한 항경련 효과를 가지는 약학조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 우수한 항경련 효과를 갖는 인진호 추출물, 상기 추출물의 제조방법 및 상기 추출물을 포함하는 약학조성물에 대한 것이다.

[0010] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[0011] 본 발명의 '인진호(*Artemisiae capillaris* Herba)는 '국화과(Compositae)에 속하는 사철쑥(*Artemisia capillaris* Thunb.)의 지상부이며, 이의 아종, 변종을 포함함은 물론이다. 또한, 본 발명의 인진호는 당업계에서 자명하고 본 발명의 예방 및 치료 목적과 동일 또는 유사한 용도로 사용할 수 있는 동속생약을 포함한다.

[0012] 상기 '추출물'은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물 일 수 있으며, 특히 에탄올로 추출한 추출물인 것이 바람직하며, 상기 에탄올은 60 내지 80%의 에탄올일 수 있는데, 70% 에탄올인 것이 가장 바람직하다.

[0013] 상기 인진호 추출물은, 건조된 인진호를, 건조된 인진호의 중량대비 1.5 내지 10배의 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로, 45 내지 100℃의 추출온도에서 1 내지 20시간 동안 1회 내지 5회 반복하여 추출하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명의 인진호 추출물 제조방법은, 건조된 인진호를, 건조된 인진호의 부피대비 3 내지 5배의, 60 내지 95%의 에탄올, 바람직하게는 70%의 에탄올로, 55 내지 95℃, 바람직하게는 90℃의 추출온도에서, 1 내지 5시간, 바람직하게는 3시간 동안, 1 내지 3회, 바람직하게는 2회 반복하여 추출하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명은, 상기 인진호 추출물의 제조방법 및 상기 제조방법으로부터 제조된 인진호 추출물을 포함한다.

[0015] 본 발명의 인진호 추출물은 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)을 유효성분으로 포함한다.

[0016] 본 발명의 인진호 추출물 또는 인진호 추출물에 포함된 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)은 우수한 항경련 효과를 나타내며, 상기 항경련 효과는 염소이온의 세포 내 유입을 촉진시키는 메커니즘에 의한 것일 수 있다. 구체적으로 본 발명의 인진호 추출물물은, GABA가 GR 복합체상에 있는 그것의 인식부위와 상호작용을 하여 GR 복합체의 전기화학적 구배를 떨어뜨림으로 염소이온의 세포 내 유입을 촉진시키며, 이 음이온수준의 세포내 증가는 투과막 전위의 과분극을 초래하고, 흥분성 유입물에 대한 뉴런의 감수성을 낮추어(즉, 뉴런 흥분을 감소시킴) 항경련 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0017] 상기 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)은 상기 인진호 추출물로부터 제조될 수 있으며, 바람직하게는 상기 인진호 추출물에 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올 순으로 용매를 가하여 층분리하는 방법으로 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명은, 인진호 추출물을 포함하는 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은, 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)을 포함하는 경련성 질환 치료 및 예방용 약학조성물

을 제공한다. 본원에서 정의되는 '경련성 질환'은 Cl^-의 세포내 유입량이 증가됨에 따라 치료되는 질환일 수 있으며, 구체적으로 감마-아미노부티르산(GABA) 수용체의 조절에 의하여 치료되는 질환일 수 있다. 상기 '경련성 질환'은 비외상성 간질 우울증, 불안 장애 또는 정신병 장애 중 하나 이상일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은, 인진호 추출물을 포함하는 경련 완화 및 예방용 약학조성물을 제공한다. 본 발명은 카필라리신(capillarisin) 및/또는 에스쿨레틴(esculetin)을 포함하는 경련 완화 및 예방용 약학조성물을 제공한다. 본원에서 정의되는 '경련'은 Cl^-의 세포내 유입량이 증가됨에 따라 완화/예방되는 증상일 수 있으며, 구체적으로 감마-아미노부티르산(GABA) 수용체의 조절에 의하여 완화/예방되는 증상일 수 있다. 상기 '경련'은 뇌막염(meningitis), 산욕열(childhood fevers), 뇌암(brain tumor), 두뇌 외상(head trauma), 대뇌순환계의 퇴행성 질병(degenerative disease) 또는 출산 도중의 외상에 기인한 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 90% 중량으로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다.

[0024] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가로스, 벤토나이트, 잔탄 검 등을 포함한다.

[0025] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한 포유동물에게 치료상 유효량의 인진호 추출물 또는 인진호 추출물을 포함하는 약학조성물을 투여하는 단계를 포함하는 경련 치료방법을 제공한다. 상기 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다. 또한, "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명에서 용어, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 추출물 또는 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 추출물 또는 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 내피 투여, 비내 투여, 폐내투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 인진호 추출물의 투여량은 체중 60kg 성인기준으로 70% 에탄올 인진호 추출물 10~1000mg/일, 단일 성분 (capillarisin 및/또는 esculetin)10~100mg/일이며, 일회투여량은 5~10mg/kg일 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 생약에서 유래되어, 인체에 안전하며 용량이 증가할수록 경련 억제 효과가 증가하므로 인체에 과량 사용해도 부작용이 적은 장점이 있다. 또한, 간세포 보호 및 이담작용을 가지면서 경련을 억제하는 효과가 있어, 간기능이 허약한 환자에게 특히 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 실시예와 비교예를 각각 투여한 생쥐에, 전기충격에 의해 경련을 유발시킨 후, 경련을 일으킨 쥐의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 2는 실시예와 비교예를 각각 투여한 생쥐에, 전기충격에 의해 경련을 유발시킨 후, 경련을 일으킨 쥐의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 3은 실시예와 비교예를 각각 투여한 생쥐에, 전기충격에 의해 경련을 유발시킨 후, 경련을 일으킨 쥐의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예를 농도별로 투여한 세포 내의 시간별 Cl^-농도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 실시예와 비쿠쿨린(bicuculline)을 병용투여한 세포 내의 시간별 C Cl^-농도를 나타낸 그래프이다.

도 6은 실시예를 농도별로 투여한 세포 내의 시간별 Cl^-농도를 나타낸 그래프이다.

도 7은 실시예와 비쿠쿨린(bicuculline)을 병용투여한 세포 내의 시간별 Cl^-농도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 하기 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0031] **실시예 1. 인진호 추출물의 제조**

[0032] 인진호 (*Artemisia capillaris* Thunb.) 조추출물은 건조한 인진호 전초 (450 g, 경상북도 영천에서 채집)를 마쇄하여 분말화 한 후, 상기 인진호 전초 건조 중량의 약 3 내지 5의, 70% 에탄올 용매로, 90 ℃의 추출 온도에서 약 3 시간 동안 열수 추출법으로 2회 연속 추출한 후, 감압여과하고 여액을 진공회전농축기로 50 ℃에서 감압 농축하여, 인진호 조추출물 64.9 g을 수득하였다.

[0033] **실시예 2. 카필라리신(capillarisin)의 제조**

[0034] 실시예 1의 방법대로 제조된 인진호 조추출물에, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 n-부탄올의 순서로 용매를 가하여 다음과 같이 분획물을 수득하였다:

[0035] 실시예 1의 방법으로 제조된 인진호 조추출물 450 g을 물 1L에 현탁한 후, (i) 디클로로메탄: 물: 메탄올을 10: 9: 1로 혼합한 혼합물을 가하여 디클로로메탄 가용성 분획물(18g) 및 수가용성 분획물을 수득하였다.

[0036] (ii) 상기 (i)의 수가용성 분획물에 에틸 아세테이트를 가하여 에틸 아세테이트 가용성 분획물(7g) 및 수가용성 분획물을 수득하였다.

[0037] (iii) 상기 (ii)의 수가용성 분획물에 부탄올을 가하여 부탄올 가용성 분획물(9.8 g)과 수가용성 분획물(11g)을 수득하였다.

[0038] 상기 (i)의 디클로로메탄 가용성 분획물 18g에, 헥산:에틸 아세테이트의 10:1 → 0:1의 혼합용매를 사용하여 시간당 1000 ㎖의 속도로 실리카겔 칼럼 크로마토그래피와 재결정법을 수행하여 카필라리신(30mg)을 수득하였다. 수득한 카필라리신의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 측청치(JOEL(Janapn), JNM ECP-400 spectrometer로 측정함.)는 다음과 같다.

[0039] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ :9.80(1H,brs,-OH),7.85(1H,d,*J*=9.50Hz,H-4), 6.97 (1H, s, H-5), 6.73 (1H, s, H-8), 6.15 (1H, d, *J*=9.50Hz,H-3);

[0040] ^{13}C-NMR(100MHz,DMSO-*d*6) δ:160.8(C-2),150.4(C-6),148.5(C-7),144.4(C-4), 142.9 (C-8a), 112.3 (C-5), 111.5 (C-3), 110.7 (C-4a), 102.6 (C-8).

[0041] **실시예 3. 에스쿨레틴(esculetin)의 제조**

[0042] 상기 실시예 2 (ii)의 에틸 아세테이트 분획물 (7 g)에, 헥산: 에틸 아세테이트의 10:1 → 0:1의 혼합용매를 사용하여, 시간당 1000 mℓ의 속도로 실리카겔 칼럼 크로마토그래피와 재결정법을 수행하여 에스쿨레틴 (10 mg)을 수득하였다. 수득한 에스쿨레틴의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 측청치(JOEL(Janapn), JNM ECP-400 spectrometer로 측정함.)는 다음과 같다.

[0043] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ:9.80(1H,brs,-OH),7.85(1H,d,*J*=9.50Hz,H-4), 6.97 (1H, s, H-5), 6.73 (1H, s, H-8), 6.15 (1H, d, *J*=9.50Hz,H-3);

[0044] ^{13}C-NMR(100MHz,DMSO-*d*6) δ:160.8(C-2),150.4(C-6),148.5(C-7),144.4(C-4), 142.9 (C-8a), 112.3 (C-5), 111.5 (C-3), 110.7 (C-4a), 102.6 (C-8).

[0045] **비교예 1. 디아제팜(DZP)의 준비**

[0046] 정신안정제, 최면제, 골격근이완제 또는 항경련약 등으로 이용되는 다아제팜(명인제약의 디아제팜 주 10mg/2ml)을 준비하였다.

[0047] **실험예 1. 항경련효과의 확인**

[0048] **실험예 1-1. 인진호 추출물의 항경련효과의 확인**

[0049] 20~25g의 생쥐(ICR mouse male 4주령) 를 각군당 20마리씩 제1군 내지 제5군의 5개 군으로 나누어, 제1군(control;con.)에는 생리식염수를, 제2군 내지 제4군에는 실시예 1을 각각 50, 100, 200mg/kg씩, 제5군(DZP)에는 비교예 1을 5mg/kg 경구투여 하였다. 투여방법은 제1군 내지 제5군 모두 동일하였으며, 구체적으로, 투여 전 12시간부터 공복상태를 유지시킨 생쥐에게, 경구투여용 존데를 이용하여 투여하였다.

[0050] 상기와 같이 처리한지 30분 후, 상기 제1군 내지 제5군에 전기충격을 유발시켰다. 전기충격방법은 제1군 내지 제5군 모두 동일하였으며, 구체적으로, 생쥐의 양쪽귀를 ear clip으로 연결하여 전류를 조절하며 전기충격을 가하였다(Electro Convulsive Therapy 7801, UGO BASILE, Italy. Frequency - 50Hz, Pulse width 0.5ms, Shock duration - 1 sec. mouse).

[0051] 전류의 세기별로 경련(강직성 신전; hindlimb extension)을 일으키는 생쥐를 계수하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0052] 도 1에서, 그래프에 나타나있는 숫자들은 50%가 경련을 일으키는 전류를 나타내는 CC_{50}이며, 95%의 신뢰도로 통계처리 되었다.

[0053] 도 1을 참고하면, 실시예 1의 인진호 70% 에탄올 추출물을 투여한 생쥐는 모두 control에 비해 전기경련의 역치가 증가하였음을 알 수 있다. 이는 인진호 70% 에탄올 추출물에 의해 쥐의 경련이 감소함을 의미하는 것이다. 또한, 인진호 에탄올 추출물에 의한 쥐의 경련 감소효과는 용량 의존적임을 알 수 있다.

[0054] 특히, 양성대조군으로 사용된 비교예 1(디아제팜)의 항경련 효능과 비교할 때, 인진호 70% 에탄올 추출물 100mg/kg에서는 대등한 효과가, 200mg/kg에서는 더 강력한 항경련 효과가 나타났다.

[0055] **실험예 1-2. 카필라리신(capillarisin)의 항경련효과의 확인**

[0056] 제2군 내지 제4군에서, 실시예 1 대신 실시예 2를 0.5, 0.7, 1mg/kg씩 사용한 것을 제외하고, 상기 실험예 1-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하여, 실험결과를 도 2에 나타내었다.

[0057] 도 2를 참고하면, 실시예 2의 카필라리신을 투여한 생쥐는 모두 control에 비해 전기경련의 역치가 증가하였음을 알 수 있다. 이는 카필라리신에 의해 쥐의 경련이 감소함을 의미하는 것이다. 또한, 인진호 에탄올 추출물에 의한 쥐의 경련 감소효과는 용량 의존적임을 알 수 있다.

[0058] 특히, 양성대조군으로 사용된 비교예 1(디아제팜)의 항경련 효능과 비교할 때, 카필라리신 0.7mg/kg에서는 대등

한 효과가, 1mg/kg에서는 더 강력한 항경련 효과가 나타났다.

[0059] **실험예 1-3. 에스쿨레틴(esculetin)의 항경련효과의 확인**

[0060] 제2군 내지 제4군에서, 실시예 1 대신 실시예 3을 1, 2, 5mg/kg씩 사용한 것을 제외하고, 상기 실험예 1-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0061] 실험결과를 도 3에 나타내었다.

[0062] 도 3에 의하면, 실시예 3의 에스쿨레틴을 투여한 생쥐는 모두 control에 비해 전기경련의 역치가 증가하였으며, 이는 에스쿨레틴에 의해 쥐의 경련이 감소함을 의미하는 것이다. 또한, 인진호 에탄올 추출물에 의한 쥐의 경련 감소효과는 용량 의존적임을 알 수 있다.

[0063] 특히, 양성대조군으로 사용된 비교예 1(디아제팜)의 항경련 효능과 비교할 때, 에스쿨레틴 2mg/kg에서는 대등한 효과가, 5mg/kg에서는 더 강력한 항경련 효과가 나타났다.

[0064] **실험예 2. Cl^- 의 세포내 유입량 증가 효과 확인**

[0065] 항경련효과의 메커니즘을 확인하기 위해 in vitro 실험으로 인진호 추출물 또는 에스쿨레틴을 처리한 신경모세포종(neuroblastoma cell)에서, Cl^-의 세포내 유입정도를 Cl^- 퀀칭(quenching) 형광 염로인 MQAE(-(6-methoxyquinolyl) acetoetylester(MQAE))에 의해 측정하여, GABA receptor와 본 발명의 인진호 추출물의 항경련 효과와의 연관성을 알아 보았다.

[0066] **실험예 2-1. 인진호 추출물의 Cl^- 의 세포내 유입량 증가 효과 확인**

[0067] (1) 인진호 추출물의 효과

[0068] 신경모세포종(neuroblastoma cell;한국 세포주 은행에서 구입, SH-SY5Y human neuroblastoma cell.)에 실시예 1을 각각 2, 10, 50 ug/ml의 농도로 처리하였다. 그 후, 상기 신경모세포종을 37℃ 5% CO_2에서 배양시킨 후, 염소이온에 민감한 형광탐침인 N-(6-methoxyquinolyl) acetoetylester(MQAE)를 세포내로 봉입시켰다(Verkman et al., 1989). 실험과정은 West and Molly(1996)에 의해 설계된 방법으로 진행되었다.

[0069] 상기 신경모세포종을 4×10^5 cells/ml로 Hank;s solution에 현탁시킨후 MQAE를 최종농도 5mM로 2시간 이상 배양하였다. 배양된 신경모세포종을 Hank's solution으로 두 번 세척하였다. 형광(excitation wavelength = 355nm; emission wavelength = 450nm)을 교반중인 cuvette 내에서 Cl^- 의 농도의 변화를 측정하였다. 실험은 실온에서 시행하여 형광탐침이 새어나오는 것을 최소화 하였다.

[0070] 측정된 모든 형광 값은 MQAE 이온-선택적 신호를 최대로 제거하는 5μM valinomycin을 포함하는 HEPES-buffered KSCN 용액을 이용하여 따로 측정한 배경형광치(background fluorescence)를 통해 보정하였다 (Shumaker et al., 1999). 다른 실험으로 F_0 값은 10mM tributyltin 및 10mM nigericin을 포함하는 염소-제거 KNO_3 용액에 세포를 현탁시켜 측정하였다.

[0071] 실험결과는 신경모세포종 세포내 염소이온과 비례하는 값인 상대적 형광(F/F_0; F_0=염소이온이 없을 때 형광치, F = 시간에 따른 형광치)으로 계산하여 도 4에 나타내었다.

[0072] (2) 비쿠쿨린(bicuculline)의 병용 사용에 의한 효과

[0073] 신경모세포종(neuroblastoma cell)에 실시예 1 10ug/ml, 실시예 1 10ug/ml 와 GABA receptor의 길항제인 비쿠쿨린(Bicuculline , Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo, USA)) 250mN, 실시예 1 10ug/ml 와 Bic. 500mN를 처리한 것을 제외하고, 상기 (1)과 동일한 방법으로 실험을 진행하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0074] **실험예 2-2. 에스쿨레틴(esculetin)의 Cl^- 의 세포내 유입량 증가 효과 확인**

[0075] (1) 에스쿨레틴(esculetin)의 효과

[0076] 신경모세포종(neuroblastoma cell)에 실시예 3을 각각 1, 2, 3μM 처리한 것을 제외하고, 상기 실험예 2-1(1)과 동일한 방법으로 실험을 진행하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

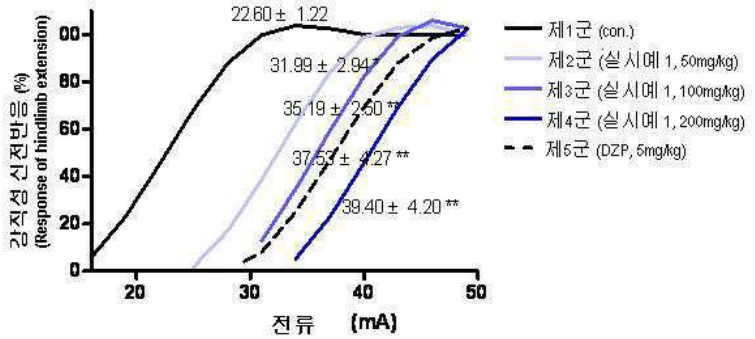
[0077] (2) 비쿠쿨린(bicuculline)의 병용 사용에 의한 효과

[0078] 신경모세포종(neuroblastoma cell)에 각각, 실시예 3을 10μM, 실시예 3 10μM 및 Bic. 250μM, 실시예 3 10μM 및 Bic. 500μM 처리한 것을 제외하고, 상기 실험예 2-1(1)과 동일한 방법으로 실험을 진행하여, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

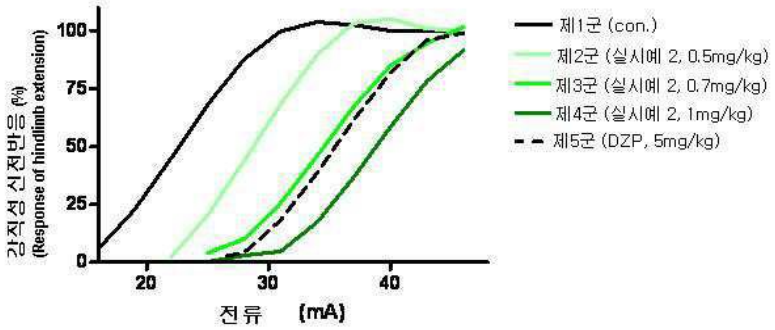
[0079] 상기 결과를 종합해 보면, 인진호 70% 에탄올 추출물과 esculetin에서 Cl^-이 세포내 유입이 농도 의존적으로 일어났고 (도 4, 6), GABA receptor의 길항제인 bicuculline에 의해서 유입정도가 차단되었다 (도 5, 7).

도면

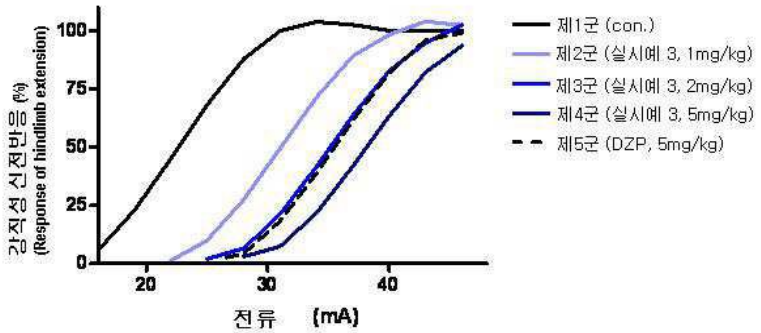
도면1



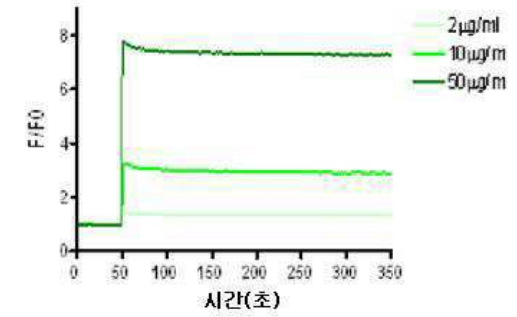
도면2



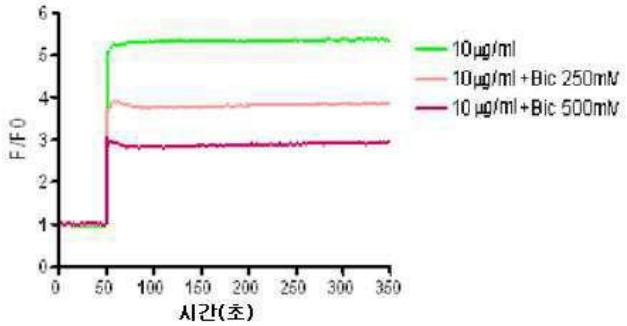
도면3



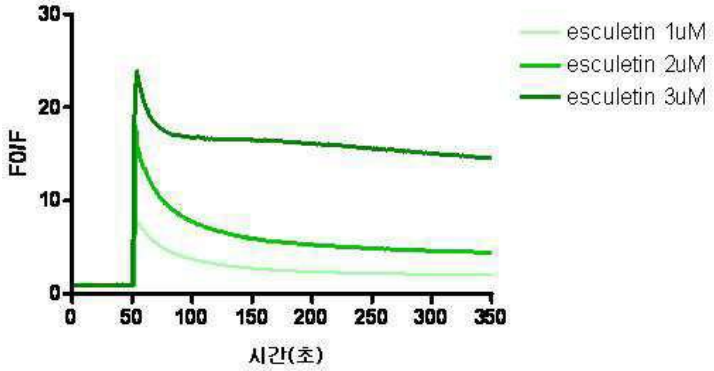
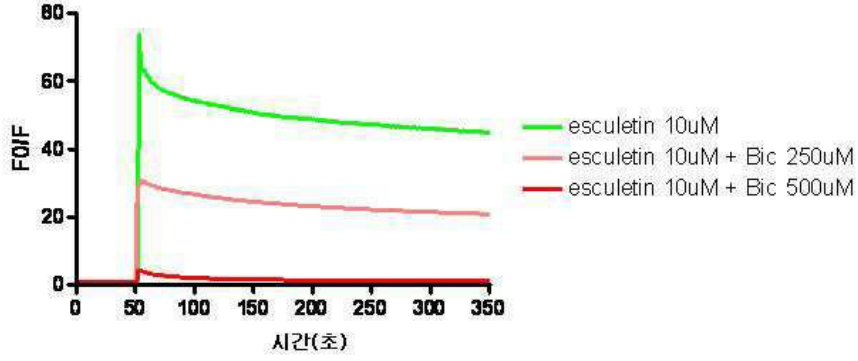
도면4



도면5



도면6



도면7