



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0016609
(43) 공개일자 2008년02월21일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 A61K 31/05 (2006.01) A61K 36/48 (2006.01)
 A61K 36/48 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7028470
 (22) 출원일자 2007년12월06일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2007년12월06일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/018006
 국제출원일자 2006년05월09일
 (87) 국제공개번호 WO 2006/122160
 국제공개일자 2006년11월16일
 (30) 우선권주장
 60/679,337 2005년05월09일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 유니젠 파아마슈티컬스, 인크.
 미합중국 워싱턴주 98516, 라세이, 윌라메트 드라이브 엔.이. 2660
 (72) 발명자
 지아, 쿼
 미국, 워싱턴 98502, 올림피아, 웨이 엔더블류, 3443 32번지
 홍, 메이-평
 미국, 콜로라도 80234, 노스글렌, 1228 웨스트 111번가
 (74) 대리인
 조인제</p> |
|--|--|

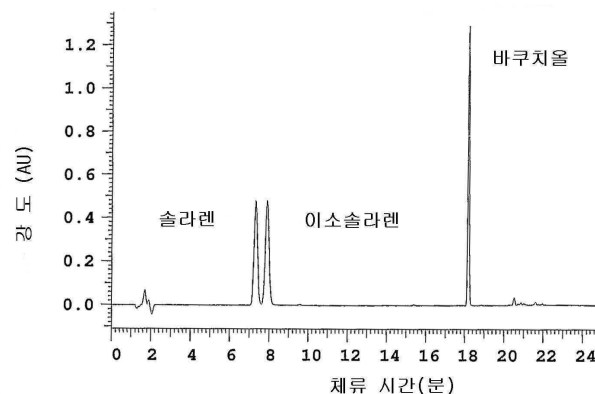
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 바쿠치올의 조성물 및 그것의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 낮은 농도의 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물을 가지는 바쿠치올(UP246)의 조성물을 제공한다. 본 발명은 바쿠치올 조성물의 분리, 정제 및 분석에 대하여 향상된 방법을 더 제공한다. 마지막으로, 본 발명은 정제된 바쿠치올 조성물 및 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase; COX), 리폭시게나아제(lipoxygenase; LOX), 경미한 염증 이상 및 여러가지 세균 감염에 의해 매개되는 여러가지 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 그것의 제형을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

푸라노쿠마린 불순물들을 실질적으로 포함하고 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바쿠치올이 식물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 식물이 솔라리아(*Psoralea*) 속 식물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 식물이 솔라리아 코틸리폴리아 L. (*Psoralea corylifolia* L.; 콩과) 또는 솔라리아 글랜들로사 L. (*Psoralea glandulosa* L.; 콩과)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 조성물이 종자(seeds), 줄기(stems), 껍질(barks), 잔가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리(roots), 뿌리 껍질(roots barks), 어린 순(young shoots), 뿌리줄기(rhizomes), 꽃 및 다른 생식기관, 잎 및 다른 지상부(aerial parts) 및 전체 식물로부터 선택된 식물의 일부로부터 분리된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물에서 바쿠치올의 양은 27 중량% 내지 100 중량%의 범위인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물에서 바쿠치올의 양은 적어도 30%인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 푸라노쿠마린은 솔라렌 및 이소솔라렌으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

a) 유기용매를 사용하여 바쿠치올을 함유하는 식물을 추출하는 단계;

b) 염기로 a) 단계에서 얻어진 유기 추출물을 처리하는 단계; 및

c) 푸라노쿠마린 불순물들을 함유하지 않는 바쿠치올 조성물을 얻기 위하여 혼합물을 정제하는 단계;

를 포함하는 푸라노쿠마린 불순물들을 실질적으로 함유하지 않는 바쿠치올을 포함하는 조성물을 제조하기 위한 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 정제 방법은 컬럼 크로마토그래피, 추출 후 결정화, 용매 분배, 재결정화 및 그것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

푸라노쿠마린 불순물들을 실질적으로 함유하지 않은 바쿠치올을 포함하는 약제학적 조성물을 유효량으로 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함하는, 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase; COX) 및 리폭시게나아제(lipoxygenase; LOX)에 의해 매개된 피부, 치아, 입 또는 잇몸의 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 조성물에서 바쿠치올의 양은 27 중량% 내지 100 중량%의 범위내인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 COX 및 LOX에 의해 매개된 피부의 질병 및 이상은 다른 포유류의 피부암, 자외선, 화학물질, 열, 바람 및 건조한 환경에의 노출로 인한 피부 손상, 주름, 처진 피부, 눈 주변의 주름 및 다크서클, 피부병 및 피부의 다른 알려지 관련 이상 뿐만 아니라 여드름, 비듬, 췌변, 열화상, 국소 상처, 균, 미생물 및 바이러스 감염에 의해 야기된 경미한 염증성 이상, 백반, 전신 홍반성 낭창, 건선, 암, 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 입, 잇몸 및 치아의 질병 및 이상은 치주 질환, 구강 전암성(oral precancerous) 이상, 구강암 및 다른 구강의 악성 종양, 의치의 물리적 식체에 의해 야기되는 민감한 잇몸 및 치아, 후유증, 치수염, 과민증, 고통 및 염증, 입안, 잇몸 또는 혀 상에서의 외상, 손상, 이갈기 및 다른 경미한 상처, 치태 및 치석, 치아 칼슘 손실, 단백질 가수분해 및 충치로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 투여의 방법은 국소, 에어로졸, 좌약, 피내(intradermic), 근육내 및 정맥내 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 투여의 방법은 국소적인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 조성물은 비점착성 거즈, 붕대, 스왑, 클로스 와이프, 패치, 마스크, 클렌저, 소독제, 용액, 크림, 로션, 연고, 겔 또는 에멀전, 액체, 페이스트, 비누 또는 파우더를 사용하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제11항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 국소 적용에 약제학적, 피부병학적 및 미용학적으로 적합한 전통적인 첨가제 및 선택적으로 보조제 및/또는 담체, 및/또는 통상의 방출 비히클 또는 방출 제어된 비히클을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

푸라노쿠마린 불순물들을 실질적으로 함유하지 않는 바쿠치올을 포함하는 약제학적 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함하는, 골관절염 및 류마티스성 관절염의 병리학적 이상에 따른 일반적인 관절 통증 및 뻣뻣함, 운동성의 결핍 및 물리적 기능의 손실, 생리통, 동맥경화증, 비만, 당뇨병, 알츠하이머병, 호흡기 알러지성 반응(respiratory allergic reaction), 만성 정맥 부전(chronic venous insufficiency), 건선, 만성 긴장성 두통(chronic tension headache), 편두통, 염증성 장질환, 전립선암 및 다른 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 방법.

청구항 20

푸라노쿠마린 불순물들을 실질적으로 함유하지 않는 바쿠치올을 포함하는 약제학적 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함하는, 세균 감염에 의해 매개된 피부, 입, 치아 또는 잇몸의 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 세균 감염은 세균 감염, 바이러스 감염 또는 진균 감염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 세균은 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 또는 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제20항에 있어서,

상기 피부, 입, 치아 또는 잇몸의 이상은 비듬, 여드름, 무좀(athletes foot), 충치, 치은염, 치주염, 치수염, 의치의 물리적 식재에 의해 야기된 치주 이상, 외상, 손상, 이갈기, 신생물(neoplastic) 및 백질(material alba), 다른 퇴행성 변화, 박막, 치태, 치석 및 착색으로 이루어진 군으로부터 선택된 치주 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제20항에 있어서,

상기 투여 방법은 국소, 에어로졸, 좌약, 피내, 근육내 및 정맥내 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 투여의 방법은 국소적인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 조성물은 비점착성 거즈, 붕대, 스왑, 클로스 와이프, 패치, 마스크, 클렌저, 소독제, 용액, 크림, 로션, 연고, 젤 또는 에멀전, 액체, 페이스트, 비누 또는 파우더를 사용하여 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제20항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 국소 적용에 약제학적, 피부병학적 및 미용학적으로 적합한 전통적인 첨가제 및 선택적으로 보조제 및/또는 담체, 및/또는 통상의 방출 비히클 또는 방출 제어된 비히클을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

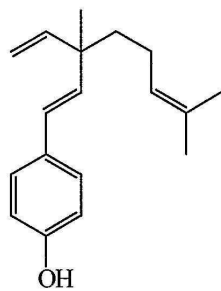
기술 분야

- <1> 본 발명은 바쿠치올(bakuchiol)의 조성물 및 낮은 농도의 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물을 가지는 그 조성물에 관련된 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 바쿠치올 조성물의 분리, 정제 및 분석에 대하여 향상된 방법을 제공한다. 마지막으로, 본 발명은 정제된 바쿠치올 조성물 및 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase; COX), 리폭시게나아제(lipoxygenase; LOX), 경미한 염증 이상 및 여러가지 세균 감염에 의해 매개되는 여러가지 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 그것의 제형을 제공한다.

배경 기술

- <2> 하기에 나타낸 구조의 바쿠치올은 방향족 고리 상의 단일 하이드록실기 및 불포화된 탄화수소 사슬을 가지는 페놀성 화합물이다. 바쿠치올은 솔라리아 코틸리폴리아(*Psoralea. corylifolia* L; 콩과(Luguminosae))의 종자 및 솔라리아 글랜돌로사(*Psoralea. glandulosa* L; 콩과(Papilionaceae))의 지상부로부터 분리되어왔다.

화학식 1



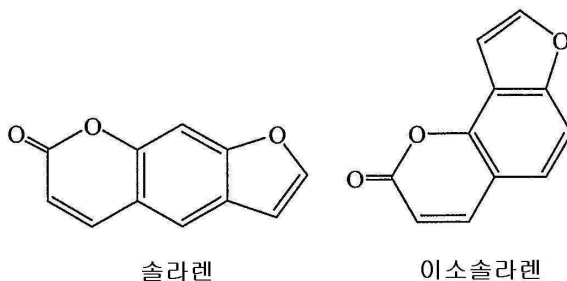
바쿠치올

- <3>
- <4> 식물 솔라리아 코틸리폴리아로부터 추출된 바쿠치올은 항암, 항산화(Haraguchi *et al.* (Sept. 2002) *Phytother Res.* 16(6):539-544), 항세포독성((Dec. 1989) *Yakugaku Zasshi.* 109(12):962-965), 항균성(Newton *et al.* (Jan. 2002) *J Ethnopharmacol.* 79(1):57-67) 및 간보호 활성(hepatoprotective activity; Cho *et al.* (Nov. 2001) *Planta Med.* 67(8):750-751)을 가짐을 나타내었다. 바쿠치올은 또한 토포아이소머라아제(topoisomerase) II 억제제임을 나타내었다(Sun *et al.* (Mar. 1998) *J Nat Prod.* 61(3):362-366). 바쿠치올은 20.8 +/- 1.9 μ M의 IC₅₀ 값을 나타내는 투약 의존성(dose-dependent manner)으로 PTP1B 활성을 억제한다(Kim *et al.* (Jan. 2005) *Planta Med.* 71(1):87-99). 항암제로서의 방사선요오드화된(radioiodinated) 바쿠치올의 제조 및 시험관 내 평가는 바타프 등에 의해 보고되어 있다(Batap *et al.* (Mar. 2005) *Appl Radiat Isot.* 62(3):389-393). 바쿠치올의 테르펜 사슬(terpenoid chain)은 바쿠치올의 항산화 활성에 중요하다고 보고되어 있다(Adhikari *et al.* (Sept. 2003) *Chem Res Toxicol.* 16(9):1602-1069).
- <5> 바쿠치올은 또한 구강내 병원균에 대한 항균제의 개발에 유용한 화합물이며, 충치를 예방하고 치료하기 위한 식품 첨가물 및 양치질 물약에 사용하는데 큰 가능성을 가지는 것으로 보고되어 있다(Katsura *et al.* (Nov. 2001) *Antimicrob Agents Chemother.* 45(11):3009-3013). 솔라리아 코틸리폴리아 활성 추출물의 항염증 및 항해열(antipyretic) 활성 추적 분획(activity-guided fractionation)은 사이클로바쿠치올(cyclobakuchiols) A와 B 및 안젤리신(angelicin)과 같은 세가지 다른 활성 화합물과 함께 바쿠치올의 분리를 야기한다(Backhouse *et al.* (Nov. 2001) *J Ethnopharmacol.* 78(1):27-31). 바쿠치올은 알려진 바로는 염증 부위에서 아이코사노이드(eicosanoid)의 생산, 이동 및 탈과립(degranulation)과 같은 백혈구성 기능을 조절하며, 분비성 및 세포내 PLA2의 약한 억제제이다. 바쿠치올은 각각 인간의 호중성 백혈구(neutrophils) 및 혈소판 마이크로솜(platelet microsomes)에 의한 LTB₄ 및 TXB₂의 형성을 투약 의존성으로 감소시킨다(Ferrandiez *et al.* (Sept. 1996) *J Pharm Pharmacol.* 48(9):975-980). 바쿠치올은 또한 RAW 264.7 대식세포(macrophages)에서 핵 전사 인자-카파

비(nuclear transcription factor-kappaB)의 불활성화를 통하여 유도성 산화 질소 합성 유전자의 발현을 억제한다(Pae *et al.* (Sept. 2001) International Immunopharmacol. 1(9-10):1849-1855). 바쿠치올에 의한 미토콘드리아성 지질 과산화(mitochondrial lipid peroxidation)의 억제 또한 보고되어 있다(Haraguchi *et al.* (Aug. 2000) Planta Med. 66(6):569-571). 오톨로비움 푸베센스(*Otholobium pubescens*; 콩과(Fabaceae))로부터 분리된 바쿠치올의 분리 및 혈당강하(antihyperglycemic) 활성은 크레니스키 등에 기재되어 있다(Krenisky *et al.* Biol Pharm Bull. (Oct. 1999) 22(10):1137-1140). 마지막으로, 다수의 다른 쿠마린 타입 화합물 뿐만 아니라 바쿠치올도 포함하는 버구지(buguzhi) 약제로 칭해지는 조추출물(crude extract)은 뼈의 치유를 촉진하는 것으로 보고되어 있다(US 2004/0043089A1).

- <6> 따라서, 바쿠치올은 여러가지 질병 및 이상의 예방 및 치료에 사용하기 위한 많은 가능성을 가지는 생물학적 활성을 가지는 천연 물질이다. 그러나, 공존하는 독성 화합물의 존재 뿐만 아니라 주로 천연원(natural sources)에서의 낮은 농도 때문에, 여기에는 일반적으로 이 화합물의 용도에 관련된 많은 제한이 있다. 솔라리아 속 식물로부터 분리된 바쿠치올 조성물의 용도에 관련된 주요 문제점 중의 하나는 하기에 나타낸 구조의 솔라렌(psoralen) 및 이소솔라렌(isopsoralen)과 같은 솔라렌의 존재이다. 푸라노쿠마린으로도 알려져 있는 솔라렌은 많은 과일 및 야채를 포함하는 식물들에서 자연적으로 생성되는 2차 대사물질이다.

화학식 2



- <7>
- <8> 많은 건강상의 위험들이 솔라렌을 함유하는 식물 및 합성 솔라렌의 취급, 국소 적용 및 섭취와 관련되어 있다. 솔라렌들은 자외선에 대한 피부의 민감성을 증가시키고 피부암을 촉진시키는 광독성제(phototoxic agents)로 잘 알려져 있다(Epstein (1999) Med. Surg. 18(4):274-284). 솔라렌은 백서에서 성장의 억제를 유도하는 것으로 나타났다(Diawara *et al.* (1997) Cancer Lett. 114(12):159-160). 솔라리아 식물들의 조추출물로부터의 성선 독성(gonadal toxicity)은 시상하부-뇌하수체-고환축(hypothalamus-pituitary-gonadal axis)의 파괴와 직접적으로 관련되어 있다(Takizawa *et al.* (2002) J. Toxicological Sciences 27(2):97-105). 암컷 백서의 식이에서 솔라렌, 베르갭텐(bergapten; 5-메톡시솔라렌) 및 크산토크신(xanthotoxin; 8-메톡시솔라렌)의 경구 투여는 투약 의존성으로 출생률(birthrates); 착상 부위(implantation site), 새끼(pups), 황체(corpora lutea)의 수; 가득찬 자궁 및 빈 자궁의 무게; 및 순환 에스트로겐의 농도를 감소시킨다(Diawara *et al.* (1999) J. Biochem. Molecular Toxicology 13(3/4):195-203). 솔라렌들은 또한 간효소(liver enzymes) CYP1A1 및 UGT1A6의 mRNA를 유도하는 것으로 나타났으며, 솔라렌들에 의해 증가된 에스트로겐의 대사가 생식 독성(reproductive toxicity) 및 측정된 난소의 난포 기능(ovarian follicular function) 및 배란(ovulation) 감소를 설명할 수 있음을 암시한다(Diawara *et al.* (May-June 2003) Pediatr Pathol Mol Med. 22(3):247-58). 솔라렌 및 이소솔라렌은 솔라리아 종자들의 건조 중량의 약 0.1 - 2%를 차지하며, 에탄올 및 다른 유기 용매의 조추출물에서 중량의 약 1 - 20%를 차지한다. 바쿠치올 조성물, 특히 식물원으로부터 분리된 것들의 순도 및 안정성을 증가시키기 위하여 다른 쿠마린들 뿐만 아니라 솔라렌 및 이소솔라렌과 같은 독성 화합물들을 제거하기 위한 방법에 대한 필요성이 남아있다.

- <9> 세포막으로부터의 아라키돈산(arachidonic acid; AA)의 방출 및 대사는 여러가지 다른 경로에 의하여 전염증성 대사물질의 생성을 야기한다. 논란의 여지는 있으나, 염증에 대한 두가지의 가장 중요한 경로는 효소 리폭시게나아제(LOX) 및 사이클로옥시게나아제(COX)에 의하여 매개된다. 이 경로들은 각각 염증성 반응의 개시와 진행에 중요한 역할을 하는 류코트리엔(leukotrienes)과 프로스타글란딘(prostaglandins)을 생성하는 경로들과 병행하여 일어난다. 이들 혈관수축성 화합물들은 조직들 안으로 염증성 세포들의 침투를 촉진하는 화학주성 물질(chemotaxins)이며, 염증성 반응을 지속시킨다.

- <10> COX 효소의 억제는 대부분의 비스테로이드성 항-염증성 약제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDS)

에 기인한 작용 기작이다. COX 효소에는 사이클로옥시게나제-1(COX-1)과 사이클로옥시게나제-2(COX-2)로 구별되는 2가지의 이성체(isoform)가 있고, 대략 60%의 서열 상동성을 보이나 그 발현 프로파일과 기능에 있어서 서로 다르다. COX-1은 혈소판 응집, 위장에서의 세포 기능의 보호 및 정상적인 신장 기능의 유지와 같은 일반적인 생리학적 기능의 조절을 돕는 생리학적으로 중요한 프로스타글란딘의 생성에 관여하는 효소의 구조적 형태(constitutive form)이다(Dannhardt and Kiefer(2001) Eur. J. Med. Chem. 36:109-26). 두 번째 이성체인 COX-2는 인터루킨-1 β (IL-1 β) 및 다른 성장 인자들과 같은 전-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)에 의해 유도될 수 있는 효소의 형태이다(Herschmann(1994) Cancer Metastasis Rev. 134:241-56; Xie *et al.* (1992) Drugs Dev. Res. 25:249-65). 이 이성체는 아라키돈산으로부터 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)의 생성을 촉진시킨다.

<11> COX 및 LOX에 대한 이중 특이성을 증명하는 억제제들은 아라키돈산 대사의 다중 경로를 억제하는데 명백한 이점을 가질 것이다. 이러한 억제제들은 다중 류코트리엔의 염증 효과 뿐만 아니라 프로스타글란딘의 염증 효과 또한 그들의 생성을 제한함으로써 차단할 것이다. 이것은 PGE₂, LTB₄, LTD₄ 및 LTE₄의 혈관확장, 혈관 침투성 및 화학주성 효과를 포함하며, 또한 서행성 아나필락시스 물질(slow reacting substance of anaphalaxis)이라고도 알려져 있다. 이중에서, LTB₄는 가장 강력한 화학주성 및 화학운동 효과를 가진다(Moore (1985) in Prostanoids: pharmacological, physiological and clinical relevance, Cambridge University Press, N.Y., pp. 229-230).

<12> COX 억제제의 작용 기작이 대부분의 통상적인 NSAIDs의 작용 기작과 일치하기 때문에, COX 억제제는 일시적인 이상 및 만성 질병에서의 염증으로 인한 죽상혈전증, 통증 및 부종(swelling)을 포함하는 이와 동일한 많은 증상들을 치료하는데 사용된다. 따라서, 염증의 이러한 매개물질들을 생성하는 효소들은 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염(osteoarthritis) 및 알츠하이머와 같은 질병의 발병 원인이 되는 염증의 치료에 도움이 되는 다수의 새로운 약제의 개발에서 표적이 되어 왔다.

<13> 일시적인 피부 이상은 피부의 과색소 침착(skin hyperpigmentation), 검버섯(age spots), 백반(vitilago), 전신 홍반성 낭창(systemic lupus erythromatosus), 건선(psoriasis), 암(carcinoma), 흑색종(melanoma) 및 다른 포유류의 피부암과 같은 프로스타글란딘 및 류코트리엔 경로에 직접적으로 관련되어 있는 피부 이상 뿐만 아니라 경미한 찰상(abrasions) 또는 접촉성 피부염과 관련된 염증의 치료 또한 포함한다. COX 억제제의 사용은 피부 경화증(scleroderma)과 같은 류마티스성 피부 이상 뿐만 아니라, 전신 홍반성 낭창(SLE; Geobel *et al.* (1999) Chem. Res. Toxicol. 12:488-500; Patrono *et al.* (1985) J. Clin. Invest. 76:1011-1018)과 같은 질병을 포함하도록 확장되어 왔다. COX 억제제들은 또한 건선과 같은 류마티스성 유래가 아닌 염증성 피부 이상을 완하시키기 위하여 사용되었으며, 프로스타글란딘의 과생성으로부터 야기된 염증을 감소시키는 COX 억제제들은 직접적인 이익을 제공할 수 있다(Fogh *et al.* (1993) Acta Derm Venerologica 73:191-193). 최근에 전신성 경화증(system sclerosis)을 가진 환자들의 피부에서 5-리폭시게나아제의 과발현이 보고되었다. 이것은 LOX 경로가 전신성 경화증의 발병에 중요한 것일 수 있다는 것을 시사하며, 효과적인 치료 표적임을 의미할 수 있다(Kowal-Bielecka (2001) arthritis Rheum. 44(8):1865). 마지막으로, 알레르겐(allergen) 주입 부위에서 COX-2 및 5-LOX 모두의 증가된 효소 활성은 피부 알러지 반응의 초기 및 후기 단계 모두에서의 증상을 치료하기 위한 이중 COX/LOX 억제제 사용에 대한 가능성을 시사한다(Church (2002) Clin. Exp. Allergy.32(7):1013).

<14> 프로스타글란딘 및 류코트리엔은 또한 상처, 화상(scald), 세균성 감염, 피부염 및 다른 많은 피부 질병 및 이상들의 생리학적 및 병리학적 과정에서 중요한 역할을 한다. 현저하게 높아진 사이클로옥시게나아제 및 리폭시게나아제의 활성과 함께 열 또는 화학적 화상 후의 전염증성 캐스케이드(cascade)의 활성은 잘 기록되어 있으며, 그 후에 일어나는 심각한 증상 및 복합 장기 부전(multiple organ failure)을 야기할 수 있는 면역기능 장애의 진전에 중요한 역할을 한다(Schwacha (2003) Burns 29(1):1; He (2001) J. Burn Care Rehabil. 22(1):58).

<15> 항염증성 약제로서의 용도 이외에도, COX 억제제들에 대한 또 다른 잠재적 역할은 암의 치료에 있다. COX의 과발현은 여러가지 인간의 악성 종양에서 증명되었으며, COX의 억제제들은 피부 종양을 가진 동물의 치료에 효과가 있는 것으로 나타났다. 반면에, 작용 기작은 완전히 이해되어 있지 않으나, COX의 과발현은 세포사멸을 억제하고 종양형성성 세포 타입의 침습성(invasiveness)을 증가시키는 것으로 나타났다(Dempke *et al.* (2001) J. Can. Res. Clin. Oncol. 127:411-17; Moore and Simmons (2000) Current Med. Chem. 7:1131-1144). 상승 조절된 COX 생산은 피부에서의 광선 각화증(actinic keratosis) 및 편평세포 암종(squamous cell carcinoma)의 생성에 관련되어 있다. COX의 증가는 또한 DNA 손상에 의해 생성된 병변(lesion)에서 발견된다(Buckman *et al.*

(1998) Carcinogenesis 19:723). 따라서, COX의 발현 또는 단백질 기능의 조절은 염증성 반응 및 언젠가는 일 어날 암으로의 진행을 감소시킬 것으로 보인다. 사실, 인도메타신(indomethacin) 및 셀레브렉스(CelebrexTM)와 같은 COX 억제제들은 UV 유도성 홍반(erythema) 및 암의 형성을 치료하는데 효과적이라는 것이 밝혀졌다 (Fischer (1999) Mol. Carcinog. 25:231; Pentland (1999) Carcinogenesis 20:1939). 최근에는, 리폭시게나 아제의 과발현 또한 상피암의 발생(Muller (2002) Cancer Res. 62(16):4610) 및 흑색종의 암화 과정(Winer (2002) Melanoma Res. 12(5):429)에 관련되어 있는 것으로 나타났다. 리폭시게나아제 경로로부터 생성된 아라 키돈산 대사물질은 리폭시게나아제 경로의 억제가 암의 진행을 예방하는데 효과적인 표적이라는 것을 암시하는, 종양 성장에 관련된 신호 전달(signal transduction)에서 중요한 역할을 한다(Cuendet (2000) Drug Metabol Drug interact 17(4):109; Steele (2003) Mutat Res. 523-524:137). 따라서, 이중 COX/LOX 억제 활성을 가지 는 치료제의 사용은 암의 화학예방(chemoprevention)에 아주 큰 이점을 제공한다.

<16> 여드름(acne)은 피지선(sebaceous glands), 난포성 표피탈락(follicular epithelial desquamation), 세균성 증 식 및 염증에 의한 피지의 과도한 생성을 특징으로 하는 모지피 단위(pilosebaceous unit)의 만성 질병이다. 호르몬 불균형, 세균 감염 및 염증은 여드름 발병에 관련된 세가지의 주요 인자이다(Toombs (2005) Dermatol. Clin. 23(3):575-581; Nishijima et al. (2000) J. Dermatol. 27(5):318-323). 여드름의 예방 및 치료를 위한 최근의 치료제들은 레티노이드(retinoids)와 같은 항염증제, 항균제 및 호르몬제를 포함한다(Leyden (2003) J. Am. Acad. Dermatol. 49(3 Suppl):S200).

<17> 여드름에 관련된 주요 세균 종들은 프로피오니박테리움 아크네스(propionibacterium acnes) 및 그람 양성 스타 필로코커스 에피더미디스(Staphylococcus epidermidis)이다(Perry and Lambert (2006) Lett. Appl. Microbial. 42(3):185-188). 최근의 치료제들은 벤조일 퍼록사이드 및 암피실린 및 겐타마이신과 같은 다른 항균제들을 포 함한다(Fernandez et al. (2005) Expert Rev. Anti Infect Ther. 3(4):557-591). 유감스럽게도, 프로피오니박 테리움 아크네스 및 스타필로코커스 에피더미디스 모두에 대한 약물 내성이 보고되어 있다(Nishijima et al. (2000) J. Dermatol. 27(5):318-323).

<18> 레티노이드(Millikan (2003) J. Am. Acad. Dermatol. 4(2):75) 및 COX 억제제 살리실산(Lee (2003) Dermatol Surg 29(12):1196)과 같은 항염증제의 국소 적용은 또한 여드름의 치료에 효과적이며 안전한 치료라는 것이 임 상적으로 증명되었다. 또한, 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs)는 여드 림, 건선, 썬번(sun burn), 결절성 홍반(erythema nodosum), 한랭글로불린혈증(cryoglobulinemia), 급성 발열 성 호중구성 피부증(Sweet's syndrome), 전신성 비만 세포증(systemic mastocytosis), 두드러기(urticarial), 청피반성 혈관염(livedoid vasculitis) 및 결절성 혈관염(nodular vasculitis)을 포함하는 일반적인, 일반적이 지 않은 피부병에 대한 치료제로서 문서에 의해 충분히 입증되었다(Friedman (2002) J. Cutan Med. Surg. 6(5):449).

<19> 치주질환은 일부 또는 모든 치아 지지 구조(잇몸, 시멘트질, 치주 인대, 치조골 및 다른 치아 주변 조직)의 염 증 및 감염이다. 치은염(잇몸) 및 치주염(잇몸 및 뼈)은 치주질환의 두가지 주요 형태이다. 미 국립 구강악안 면연구소(National Institute of Dental and Craniofacial Research)에 의해 배포된 국제 구강 정보(National Oral Information)에 따르면, 미국 성인의 80 퍼센트가 현재 몇가지 형태의 치주질환을 가지고 있다고 추정된다. 치주질환은 피막(pellicle)이 깨끗한 치아(들) 상에 형성될 때 시작된다. 이 피막은 호기성 그람- 양성 세균(aerobic gram-positive bacteria; 주로 악티노미세스속(actinomyces) 및 연쇄상구균(streptococci))을 유인하여, 치석을 형성한 치아에 부착된다. 수일 내에 피막이 두꺼워지고 밑에 깔려있는 세균이 산소를 모두 소비하면, 혐기성 운동성 간균(anaerobic motile rods) 및 스피로헤타(spirochetes)가 잇몸 밑 부분(subgingival area)에서 증식하기 시작한다. 혐기성 세균에 의해 배출된 내독소(endotoxins)는 염증, 잇몸 조 직 파괴 및 심지어는 뼈의 손실을 야기한다. 치주질환의 네개의 주요 단계는 하기에 나타낸 것과 같이 특징지 을 수 있다. 치주질환으로부터 야기된 현미경적 병변(microscopic lesions)이 몇몇 감염자의 간, 신장 및 뇌에 서 발견된다는 점에서 치주질환의 파괴적인 영향은 치과 위생 및 건강 그 이상이다.

<20> 치주질환의 4단계

<21>	1급	염증
	2급	염증, 부종, 프로빙에 대한 치은출혈
	3급	염증, 부종, 프로빙에 대한 치은출혈, 화농성 분비물 -- 근소내지 정도(slight to moderate)의 뼈 손실

4급	염증, 부종, 프로빙에 대한 치은출혈, 화농성 분비물, 이동성 -- 심각한 뼈 손실
----	---

<22> 치주질환을 치료하기 위한 현재의 방법들은 주요한 목적인 감염의 억제에 한정되어 있다(Genco *et al.*(1990) in *Contenporary Periodontics*, The C.V. Mosby Company, St. Louis, pp.361-370). 일반적인 항균제 또는 항플라크제는 클로르헥시딘, 트리클로산, 스탠노스 플루오르화물(stannous fluoride), 리스테린(listerine), 과산화수소, 염화세틸피리디늄(cetylpyridinium chloride) 및 생귀나린 알칼로이드(sanguinarine alkaloids)를 포함한다. 항균성 세구제(anti-microbial mouth rinse), 멸균칩(antiseptic chip), 항생 젤/마이크로스피어 및 효소 억제-독시사이클린 처방은 치주 질환을 치료하고 억제하기 위한 비기계적/물리적 선택으로 바람직하다. 유감스럽게도, 현재는 감염을 억제할 뿐 아니라 염증도 모두 억제하는 기능을 하는 단일 치주 약물은 없다.

<23> 이전의 일반적인 설명과 하기의 상세한 설명 모두는 단지 예시적이고 설명적인 것으로 이해되어야 할 것이며, 청구된 것으로서 본발명을 제한하는 것은 아니다.

발명의 상세한 설명

<24> 본 발명의 요약

<25> 본 발명은 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 물질의 신규 조성물을 포함한다. 이 물질의 조성물은 또한 본원에서 UP256으로 칭한다. 어떤 실시예에서, 상기 조성물은 콩과(luguminosae and papilipnaceae), 녹나무과(Lauraceae) 및 목련과(Magnoliaceae)를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 식물들의 과(family)로부터 얻어진다. 다른 실시예에서, 상기 조성물은 솔라리아(*Psoralea*), 사사프라스(*Sassafras*), 매그놀리아(*Magnolia*) 및 아스트라틸로드(*Astractylodes*)를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 식물들의 속으로부터 선택된 식물(들)로부터 얻어진다. 바람직한 실시예에서, 상기 식물은 솔라리아 코틸리폴리아(*Psoralea corylifolia* L. ; 콩과) 또는 솔라리아 글랜둘로사(*Psoralea glandulosa* L. ; 콩과)를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 조성물은 전체 식물로부터 얻어질 수 있거나, 종자(seeds), 줄기(stems), 껍질(barks), 잔가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리(roots), 뿌리 껍질(roots barks), 어린 순(young shoots), 뿌리줄기(rhixomes), 꽃 및 다른 생식기관, 잎 및 다른 지상부(aerial parts)를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 식물의 하나 또는 그 이상의 개개의 부분으로부터 얻어질 수 있다.

<26> 조성물에서의 바쿠치올의 양은 추출 방법 및 조추출물의 정제 정도에 좌우되는 약 14 내지 100 중량%의 범위내일 수 있다. 한 실시예에서, 조성물에서의 바쿠치올의 양은 30% 내지 100%의 범위내이다. 다른 실시예에서, 조성물에서의 바쿠치올의 양은 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시예에서, 조성물에서 바쿠치올의 양은 약 30%이다.

<27> 불순물은 바쿠치올 조성물에서 원치 않는 임의의 물질을 포함한다. 전형적으로, 바쿠치올 조성물에 존재하는 불순물들은 천연원 및 합성 방법으로부터의 분리를 모두 포함하는, 바쿠치올을 생산하는데 사용된 방법에 의해 생긴 결과물이다. 예를 들어, 천연원으로부터의 바쿠치올 분리에서 불순물들은 솔라렌, 이소솔라렌 및 다른 쿠마린 타입 성분과 같은 푸라노쿠마린을 포함한다.

<28> 본 발명은 또한 바쿠치올의 정제되지 않은 조성물 및 천연원으로부터 얻어진 관련 화합물을 분리하고 정제하기 위한 향상된 방법을 포함한다. 이러한 조성물들을 분리하고 정제하기 위한 향상된 방법은 식물원으로부터의 화합물 추출 단계, 염용액을 사용한 조추출물의 가수분해 단계 및 컬럼 크로마토그래피, 추출 후 결정화, 용매 분배, 재결정화 및 그것들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 방법에 의한 정제 단계를 포함한다. 이러한 방법으로 정제된 조추출물들은 솔라렌 및 이소솔라렌과 같은 푸라노쿠마린 불순물들을 본질적으로 함유하고 있지 않다. 따라서, 이러한 화합물들과 관련된 광독성, 국소 자극, 발암성(carcenogenecity) 및 생식 독성의 가능성은 본질적으로 제거되었다. 본 발명의 방법에 의해 분리 및 정제된 이러한 조성물들의 순도는 약 27% 내지 100%로부터 선택된 범위내이다.

<29> 또한, 본 발명은 불순물들의 검출 및 정량을 가능하게 하는 바쿠치올 조성물을 분석하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명의 이 실시예에서, 바쿠치올 조성물을 분석하기 위한 방법은 고압액체 크로마토그래피(high-pressure liquid chromatography; HPLC)에 의해 상기 조성물들을 분석하는 단계로 이루어진다. HPLC에 의한 분석은 혼합

물에서 여러가지 성분들의 정량을 가능하게 하며, 또한 추출, 가수분해 및 정제 과정을 유도하기 위하여 솔라리아 식물에서 바쿠치올, 솔라렌, 이소솔라렌 및 다른 천연 성분들을 찾아내기 위한 방법을 제공한다.

<30> 본 발명은 또한 COX와 LOX에 의해 매개된 피부, 입, 치아 및 잇몸의 질병 및 이상을 예방 및 치료하기 위한 방법을 포함한다. COX와 LOX에 의해 매개된 피부, 입, 치아 및 잇몸의 질병 및 이상을 예방하고 치료하기 위한 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 바람직하게는 국소적으로 투여하는 것으로 이루어져 있다. 상기에서 언급한 바와 같이, 조성물에서 바쿠치올의 양은 27% 내지 100%의 범위내이다. 바람직한 실시예에서, 조성물에서 바쿠치올의 양은 약 30%이다. 또한 상기에서 언급한 바와 같이 바람직한 실시예에서, 바쿠치올은 솔라리아 속 식물에서 식물(들)로부터 분리된다.

<31> 피부의 COX와 LOX에 의해 매개된 질병 또는 이상은 다른 포유류의 피부암, 자외선, 화학물질, 열, 바람 및 건조한 환경에의 노출로 인한 피부 손상, 주름, 처진 피부, 눈 주변의 주름 및 다크서클, 피부병 및 피부의 다른 알려진 관련 이상 뿐만 아니라 여드름, 비듬, 췌변, 열화상, 국소 상처, 균, 미생물 및 바이러스 감염에 의해 야기된 경미한 염증성 이상, 백반, 전신 홍반성 낭창, 건선, 암, 흑색종도 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 피부, 입, 치아 및 잇몸의 COX와 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상은 치주 질환, 구강 전암성(oral precancerous) 이상, 구강암 및 다른 구강의 악성 종양, 의치의 물리적 식재에 의해 야기되는 민감한 잇몸 및 치아, 후유증, 치수염, 파민증, 고통 및 염증, 입안, 잇몸 또는 혀 상에서의 외상, 손상, 이갈기 및 다른 경미한 상처, 치태 및 치석, 치아 칼슘 손실, 단백질 가수분해 및 충치를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

<32> 본 발명은 골관절염 및 류마티스성 관절염의 병리학적 이상에 따른 일반적인 관절 통증 및 뻣뻣함, 운동성의 결핍 및 물리적 기능의 손실, 생리통, 동맥경화증, 비만, 당뇨병, 알츠하이머병, 호흡기 알러지성 반응(respiratory allergic reaction), 만성 정맥 부전(chronic venous insufficiency), 건선, 만성 긴장성 두통(chronic tension headache), 편두통, 염증성 장질환, 전립선암 및 다른 고형 종양을 포함하는 다른 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함한다.

<33> 상기 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상을 예방하고 치료하기 위한 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것으로 이루어져 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 조성물에서 바쿠치올의 양은 27% 내지 100%의 범위내이다. 바람직한 실시예에서, 조성물에서 바쿠치올의 양은 약 30%이다. 또한 상기에 언급한 바와 같이 바람직한 실시예에서, 바쿠치올은 솔라리아 속 식물에서 식물(들)로부터 분리되었다.

<34> 본 발명은 세균, 바이러스, 균의 감염을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 세균성 감염에 의하여 매개된 피부, 입, 치아 또는 잇몸의 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함하며, 상기 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 약제학적 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함한다. 세균 감염에 의해 매개된 피부, 입, 잇몸 및 치아의 질병 및 이상은 비듬, 여드름, 무좀(athletes foot); 충치, 치은염, 치주염, 치수염, 의치의 물리적 식재에 의해 야기된 치주 이상, 외상, 손상, 이갈기, 신생물(neoplastic) 및 백질(material alba), 다른 퇴행성 변화; 박막, 치태, 치석 및 착색으로 이루어진 균으로부터 선택된 치주 질환을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

<35> 한 실시예에서, 박테리아는 프로피오니박테리움 아크네스 또는 스태필로코커스 에피더미디스로부터 선택된다.

<36> 본 발명의 조성물들은 당업자들에게 잘 알려져 있는 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여 방식은 소화관 내(구강) 투여, 비경구적(정맥, 피하 및 근육내) 투여 및 국소 적용을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직한 실시예에서, 상기 조성물들은 국소적으로 투여된다. 본 발명에 따른 예방 및 치료의 방법은 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 조성물을 치료학적 유효량으로 이를 필요로 하는 환자에게 내부(internally) 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다.

<37> 상기의 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명 모두는 단지 예시적이며 설명적인 것으로만 이해되어야 하며, 청구된 것으로서 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

<38> 본 발명의 상세한 설명

<39> 본 발명은 낮은 농도의 불순물들을 가지는 바쿠치올 조성물(UP246)을 포함한다. 본 발명은 바쿠치올 조성물의 분리 및 정제를 위한 향상된 방법을 포함한다. 또한, 본 발명은 여러가지 불순물들의 검출 및 정량을 가능하게 하는 바쿠치올의 조성물을 분석하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명은 사이클로옥시게나아제(COX), 리폭시게나

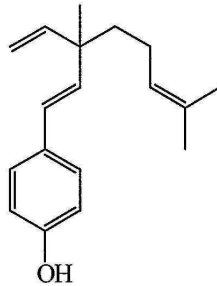
아제(LOX), 경미한 염증성 이상 및 여러가지 세균성 감염에 의하여 매개된 여러가지 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 정제된 바쿠치올 조성물 및 이것들의 제형을 사용하기 위한 방법을 더 포함한다.

<40> 여러가지 용어들이 본 발명의 특징을 나타내기 위하여 본원에 사용되고 있다. 본 발명의 화합물에 대한 설명의 명료화를 돕기 위하여 다음의 정의가 제공된다.

<41> 용어 "하나(a or an)"의 개체(entity)는 하나 또는 그 이상의 개체를 말함을 주의하여야 한다. 이와 같이, 용어 "하나", "하나 또는 그 이상(one or more)" 및 "적어도 하나(at least one)"는 본원에서 서로 교환하여 사용될 수 있다.

<42> 본원에서 사용된 "바쿠치올"은 하기의 식을 가지는 화합물을 칭한다:

<43> [화학식 1]



바쿠치올

<44>

<45> 여기에서, 중심 이중결합은 시스(cis) 또는 트랜스(trans)일 수 있다. 바쿠치올과 구조적으로 관련된 페놀성 화합물들 또한 이러한 정의 내에 포함된다.

<46> 본원에 사용된 용어 "불순물"은 천연원으로부터 바쿠치올의 분리로부터 전형적으로 생기는 바쿠치올 조성물에서의 원치않는 임의의 물질을 포함한다. 용어 불순물은 솔라렌, 이소솔라렌 및 다른 쿠마린 타입 불순물들을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 군으로부터 선택되는 푸라노쿠마린 화합물을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 불순물들은 또한 이러한 조성물들을 얻기 위한 합성 과정으로부터 생기는 불순물을 칭한다.

<47> 본원에서 사용된 "치료적(Therapeutic)"은 치료 및/또는 예방(prophylaxis)을 포함한다. 치료적이 사용될 때는 인간 뿐만 아니라 다른 동물도 말한다.

<48> "약제학적 또는 치료적으로 유효한 투약량 또는 양"은 바람직한 생물학적 결과를 유도하기에 충분한 수준의 투약량을 말한다. 상기 결과는 징후, 증상 또는 질병의 원인 또는 바람직한 생물학적 시스템의 또 다른 변화를 완화시킬 수 있다.

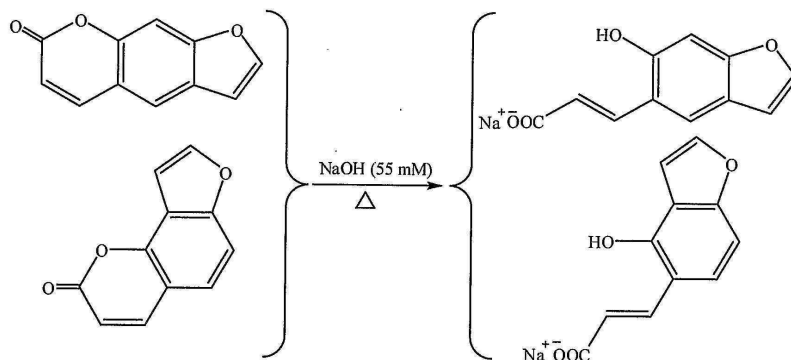
<49> "플라시보(Placebo)"는 비활성 물질(non-active substance)로 질병의 징후, 증상 또는 원인을 완화시킬 수 있는 바람직한 생물학적 효과를 유도하기 위한 약제학적 또는 치료적 유효량 또는 투약량의 대응품을 말한다.

<50> "수용자" 또는 "환자"는 본원에 기재된 조성물을 투여받는 인간 또는 동물의 살아있는 피실험자이다. 따라서, 본원에 기재된 발명은 인간 뿐만 아니라 가축에도 적용할 수 있고, 용어 "환자" 또는 "수용자"는 방법을 제한하는 것으로 해석해서는 안된다. 가축의 적용의 경우에, 투약 범위는 동물의 체중을 고려하여 하기에 기재된 것과 같이 결정할 수 있다.

<51> 여러가지의 인용이 이 출원을 통하여 제공된다는 것에 유의하여야 한다. 각각의 인용은 참조에 의해 그 전체가 본원에 명확하게 통합되어 있다.

<52> 본 발명은 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 물질의 신규한 조성물을 포함한다. 이 물질의 조성물은 또한 본원에서 UP256으로 칭한다. 어떤 실시예에서, 상기 조성물은 솔라리아 속 식물로부터 선택된 식물(들)로부터 얻어진다. 바람직한 실시예에서, 상기 식물은 솔라리아 코틸리폴리아(콩과) 또는 솔라리아 글랜들로사(콩과)를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 조성물은 전체 식물로부터 얻어질 수 있거나, 종자(seeds), 줄기(stems), 껍질(barks), 잔가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리(roots), 뿌리 껍질(roots barks), 어린 순(young shoots), 뿌리줄기(rhizomes), 꽃 및 다른 생식기관, 잎 및 다른 지상부(aerial parts)를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 식물의 하나 또는 그 이상의 개개의 부분으로부터 얻어질 수 있다.

- <53> 조성물에서의 바쿠치올의 양은 추출 방법 및 조추출물의 정제 정도에 좌우되는 약 14 내지 100 중량%의 범위내 일 수 있다. 한 실시예에서, 조성물에서의 바쿠치올의 양은 30% 내지 100%의 범위내이다. 다른 실시예에서, 조성물에서의 바쿠치올의 양은 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시예에서, 조성물에서 바쿠치올의 양은 약 30%이다.
- <54> 불순물은 바쿠치올 조성물에서 원치 않는 임의의 물질을 포함한다. 전형적으로, 바쿠치올 조성물에 존재하는 불순물들은 천연원 및 합성 방법으로부터의 분리를 모두 포함하는, 바쿠치올을 생산하는데 사용된 방법에 의해 생긴 결과물이다. 예를 들어, 천연원으로부터의 바쿠치올 분리에서 불순물들은 솔라렌, 이소솔라렌 및 다른 쿠마린 타입 성분과 같은 푸라노쿠마린을 포함한다.
- <55> 본 발명은 또한 천연원으로부터 얻어진 정제되지 않은 바쿠치올 조성물을 분리하고, 분석하고 정제하기 위한 향상된 방법을 포함한다. 이러한 조성물을 분리하고 정제하기 위한 향상된 방법은 식물원으로부터의 화합물 추출 단계, 염기 용액을 사용한 조추출물의 가수분해 단계 및 컬럼 크로마토그래피, 추출 후 결정화, 용매 분배, 재결정화 및 그것들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 방법에 의한 정제 단계를 포함한다. 이러한 방법으로 정제된 조추출물들은 솔라렌 및 이소솔라렌과 같은 푸라노쿠마린 불순물들을 본질적으로 함유하고 있지 않다.
- <56> 고압액체 크로마토그래피를 사용하여 바쿠치올 조성물을 분석하기 위한 방법은 실시예 1(표 1)에 기재되어 있다. HPLC에 의한 분석은 혼합물에서 여러가지 성분들의 정량을 가능하게 하며, 또한 추출, 가수분해 및 정제 과정을 유도하기 위하여 솔라리아 식물에서 바쿠치올, 솔라렌, 이소솔라렌 및 다른 천연 성분들을 찾아내기 위한 방법을 제공한다.
- <57> 식물원으로부터의 바쿠치올 추출 효율은 실시예 2에 기재한 것과 같은 두가지의 추출 조건 하에서 6개의 다른 유기용매 시스템을 사용하여 평가하였다. 그 결과를 표 2에 기재하였다. 표 2를 참고하면, 바쿠치올은 많은 유기용매 및/또는 그것들의 조합을 사용하여 솔라리아 식물로부터 추출될 수 있다는 것을 알 수 있다. 여러가지 추출물에서 바쿠치올의 양은 최대 29.1 중량% 내지 13.7 중량% 범위이다. 석유 에테르를 사용한 추출은 높은 회수율로 조추출물에서 가장 높은 순도의 바쿠치올을 제공하는 것으로 결정되었다. 조추출물의 대표 HPLC 크로마토그램은 도 1에 나타내었다. 이 도면을 참고하면, 조추출물은 푸라노쿠마린 불순물들인 솔라렌 및 이소솔라렌 뿐만 아니라 바쿠치올도 포함되어 있다는 것을 알 수 있다. 실시예 3은 70℃에서 석유 에테르를 사용한 대규모 추출에 대하여 기재하고 있다.
- <58> 컬럼 크로마토그래피에 의한 바쿠치올 조추출물의 정제 효율은 실시예 4에 기재되어 있다. 푸라노쿠마린 불순물들로부터 바쿠치올을 분리하기 위하여 여덟개의 다른 형태의 레진들이 그것들의 능력에 대하여 특이적으로 평가되었다. 실리카 젤 및 CG-161 레진 모두가 충분히 분리된다는 것이 증명되었다. 그러나, 산업적 규모 상에서 식물 조추출물의 컬럼 크로마토그래피 분리는 전형적으로 식물 조추출물의 복잡성에 의한 이 샘플들의 매우 낮은 충전량을 언급하지 않더라도, 고가의 장비 및 시약 및 숙련된 경험자를 필요로한다는 점에서 경제적으로 적합하지 않다.
- <59> 실시예 5-7은 푸라노쿠마린 불순물들로부터 바쿠치올을 분리하기 위한 신규하고, 경제적인 방법을 기재하고 있으며, 상기 방법은 염기를 사용하여 상기 불순물들을 함유하는 조성물을 처리하는 것을 포함한다. 설명을 목적으로 NaOH를 사용한 하기의 도식에 나타낸 바와 같이, 염기를 사용한 처리는 푸라노쿠마린의 락톤 고리를 열어 그것들을 카르복시산에 대응하는 염기로 전환시키고, 그것들은 그 후 여러가지 방법에 의해 혼합물의 잔여물로부터 쉽게 분리될 수 있다.



<60>

<61>

염기용액은 소듐 하이드록사이드, 포타슘 하이드록사이드, 칼슘 하이드록사이드 및 리튬 하이드록사이드를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는, 락톤 고리를 열기 위해 사용될 수 있는 임의의 염기로부터 선택될 수 있다. 상기 용액은 산염(acid salt)으로의 전환을 최대화시키기 위하여 서로 다른 농도 및 pH 값을 가지도록 선택될 수 있다. 반응 용액은 또한 반응물, 효율 및 생산량을 최대화시키기 위하여 서로 다른 온도 및 압력 하에서 가열될 수 있다.

<62>

쿠마린이 그것들 각각의 카르복시산염으로 완전히 전환되었는지를 확실히 하기 위하여 HPLC에 따라 반응이 진행될 수 있다. 가수분해 전후의 미정제 조성물의 HPLC 크로마토그램은 도 2A 및 B에 나타내었다. HPLC에 의하여 결정된 바와 같이 반응의 완료에 따라, 반응 용액은 컬럼 크로마토그래피 추출 후에 결정화, 용매 분배, 재결정화 또는 그것들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 여러가지 방법을 사용하여 처리될 수 있다. 이러한 방법으로 정제된 조추출물은 솔라렌 및 이소솔라렌과 같은 푸라노쿠마린 불순물들을 본질적으로 포함하고 있지 않다.

<63>

실시예 5-7을 참고하면, 여러가지 조건 하에서의 가수분해 후의 용매 분배에 서 푸라노쿠마린, 솔라렌 및 이소솔라렌은 바쿠치올 조성물로부터 효과적으로 제거된다. 더욱이, 바쿠치올의 순도는 약 10% - 30% 내지 30% - 50% 정도 증가된다. 용매 분배를 위하여 사용될 수 있는 유기 용매는 석유 에테르, 에틸 아세테이트, 에틸 에테르, 헥산, 클로로포름, 프로판올, 부탄올 및 메틸렌 클로라이드 그리고 물과 혼합할 수 없는 다른 유기 용매(water immiscible organic solvents)도 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

<64>

실시예 7에 기재된 한 실시예에서, 미정제 반응 혼합물은 컬럼상에 직접 충전한 후 극성용매로 용리하였다. 이 실시예에 따르면, 70% 내지 100%의 바쿠치올을 포함하는 조성물이 얻어질 수 있다. 실시예 7에서, 가수분해 후 미정제 반응 혼합물은 높은 순도(대략 99%)의 바쿠치올을 얻기 위하여 CG_161 cd 컬럼상에 직접 충전한 후 메탄올로 용리하였다. 이 실시예에 따라 사용될 수 있는 다른 타입의 레진은 XAD(amerlite), CG-71/CG-161 또는 다른 타입의 폴리스티렌 레진; 이온교환 레진 및 실리카 겔을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 상기 컬럼은 다른 극성 용매의 조합물 뿐만 아니라 메탄올/물, 에탄올/물, 아세톤/물 및 아세토니트릴/물도 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 군으로부터 선택된 용매로 용리될 수 있다. 가수분해 후의 컬럼 충전량은 가수분해 이전보다 매우 높다는 것에 주목할 필요가 있다. 또한, 이러한 매우 높은 순도의 푸라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물의 색은 밝은 갈색이며, 그것들은 색 및 제형화, 저장 및 미용학적 적용에 특히 적합하게 만드는 활성제의 조성물 모두에 대하여 매우 안정하다.

<65>

대안적인 실시예에서, 미정제 반응 혼합물은 먼저 유기 용매로 추출된 후, 크로마토그래피 및/또는 용매 분배 및/또는 재결정화에 의하여 더 정제될 수 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 추출의 방법 및 추가 정제의 정도에 따라 약 30% 및 100% 사이를 포함하는 바쿠치올 조성물을 즉시 얻을 수 있다.

<66>

본 발명은 본 발명의 정제된 바쿠치올 조성물 및 그것들의 제형을 사용하기 위한 방법 및 사이클로옥시게나아제(COX), 리폭시게나아제(LOX), 경미한 염증성 이상 및 여러가지 세균 감염에 의해 매개된 여러가지 질병 및 이상의 치료를 포함한다. 본원에서 UP256으로 칭해지는 이 고유의 푸라노쿠마린을 함유하지 않은 바쿠치올 조성물의 생물학적 특성 및 안전성은 실시예 8-11에 기재된 것과 같이 평가되었다.

<67>

실시예 8에서, 매우 높은 순도의 조성물 UP256(MH-258-12-08, 순도 99%)을 COX-1 및 COX-2 효소 모두에 대한 억제에 대하여 테스트하였다. UP256은 두가지 효소 모두에 대하여 강력한 억제 활성을 보였다. COX-1에 대한 IC₅₀은 2.34 μM로 측정된 반면, COX-2에 대한 IC₅₀은 78 μM로 정량되었다. 따라서, 이 조성물은 종래의 COX 억제제보다 COX-1 및 COX-2 효소에 대하여 더욱 균형잡힌 조절을 제공한다. 예를 들어, COX-1 대 COX-2에 대하여

150배 이상 효과적인 COX-1 선택적 억제제인 아스피린은 위장관 부작용을 야기한다. 반대로, COX-2에 대하여 50-200배 이상의 효과를 가지는 선택적 COX-2 억제제인 바이옥스(Vioxx[®]), 셀레브렉스(Celebrex[®]) 및 벅스트라(Bextra[®])는 그만큼의 위장관 손상을 야기하지는 않지만, 이러한 COX-2 선택적 약물은 심혈관 위험을 증가시킨다. 반면에, 본원에 기재된 물질의 신규 조성물은 COX-1 선택적 NSAIDs에 의해 야기되는 위염 및 COX-2 선택적 억제제에 의해 내포되는 심혈관 위험 없이 아이코사노이드 경로에 대한 최적의 조절을 제공한다.

<68> UP256에 의한 COX 억제의 작용 기작은 NSAIDs의 작용 기작과는 완전히 다르다는 것 또한 중요하다. 아스피린, 바이옥스[®], 셀레브렉스[®] 및 벅스트라[®]는 단단하게 결합된 효소-억제제 복합체를 형성하기 위하여 공유결합을 통하여 COX 효소와 불가역적으로 결합한다. 이러한 상호작용은 효소의 활성 부위 및 사이드 포켓(side pocket)을 완전히 변화시키며 효소를 파괴한다(Walker and Krumbal et al. (2001) Biochem. 357:709-718). 반면에 UP256은 더욱 약하고 가역적인 결합을 통하여 COX 효소를 억제한다. 이러한 상호작용적 과정에서, COX 효소의 구조 및 기능은 불가역적으로 변경되어 더욱 나은 내성과 안전성 프로파일을 가져온다.

<69> 실시예 9는 LOX 억제 검정을 설명한다. LOX의 억제는 만성 염증의 증상들과 직접적으로 관련되어 있는 식세포성 류코트리엔의 축적을 감소시키며, 또한 잠재적 위장관 부작용 감소시킨다. 이러한 효능은 실시예 9에 기재되어 있다. 실시예 9를 참고하면, 매우 높은 순도의 UP256 조성물인 MH-258-12-08(순도 99%)를 인간 5-리폭시게나아제(5-LO 또는 5-LOX) 효소에 대하여 4개의 농도로 두 번 테스트하였다. COX-2 억제 활성은 용량 반응 및 IC₅₀(효소의 활성을 50%로 억제시키는데 필요한 농도)의 측정에 의하여 확인되었다. 용량 반응 곡선은 도 6에 도시되어 있다. LOX 억제에 대한 IC₅₀은 3.41 μM로 측정되었다. 따라서, UP256은 류코트리엔 생산을 현저하게 감소시키는 부가적 이점을 제공한다. 류코트리엔 생성에서의 이러한 감소는 이부프로펜과 같은 전통적인 비스테로이드성 항염증성 약물에 비하여 월등히 뛰어나다.

<70> 실시예 10은 UP256의 항균 활성을 측정하기 위해 설계된 실험을 설명한다. 실시예 10을 참고하면, 6개의 다른 미생물의 억제를 위하여 UP256을 8가지의 농도로 두 번 테스트하였다. UP256은 1 μg/mL의 최소한의 효과적인 농도로 프로피오니박테리움 아크네스 및 그람 양성 스태필로코커스 에피더미디스 두가지의 특정 미생물을 억제한다는 것을 발견하였다. 이 미생물들은 모두 여드름, 피부염 및 다른 피부 감염과 직접적으로 관련되어 있다. UP256은 또한 30 μg/mL의 농도에서 트리코파이트론 멘타그로파이트스(*Trichophyton mentagrophytes*)의 중간 정도의(moderate) 억제를 나타내었다. 에피더모파이트론 플로썸(*Epidermophyton floccosum*), 마이크로스포럼 카니스(*Microsporum canis*) 또는 피티로스포럼 오발레(*Pityrosporum ovale*)에 대한 억제는 없음을 알았다.

<71> UP256을 30% 및 70%의 농도로 실시예 10에 기재한 것과 같이 마우스에서의 급성 독성에 대하여 테스트하였다. 마우스들은 14일간 일일 2g/kg을 경구로 투여하여 테스트하였다. 마우스들은 몸무게 증가 및 혈액화학검사에 관련하여 역효과를 나타내지 않았다. 게다가, 테스트된 어떠한 주요 장기에서도 독성은 관찰되지 않았다. 결론적으로, 체중, 혈액검사 및 조직학적 데이터는 대조군과 치료군 사이에 차이점을 보이지 않았다. 14일간의 연구 동안, 역효과는 관찰되지 않았다. 따라서, UP256은 믿을 수 있는 안전성 프로파일을 가지는 것으로 결론 지을 수 있다.

<72> 마지막으로, UP256은 log P = 6.13의 분배계수(partition coefficient)를 가진다. 화학 화합물의 분배계수는 화학 화합물의 친수성/친유성 밸런스 값의 열역학적 기준(measure)을 제공하여, 그것의 생물학적 이용성을 제공한다. 6.13의 분배계수를 가진다는 것은 이 화합물이 약물전달 시스템에서 제형화될 때, 높은 세포막 침투성 및 생물학적 이용성을 가짐을 의미한다.

<73> 따라서, 본 발명은 피부, 입, 치아 및 잇몸의 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 방법을 포함한다. 피부, 입, 치아 및 잇몸의 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상을 예방하고 치료하기 위한 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 바람직하게는 국소적으로 투여하는 것으로 이루어진다. 상기에 언급한 바와 같이, 조성물에서의 바쿠치올의 양은 27% 내지 100%의 범위내이다. 바람직한 실시예에서, 조성물에서의 바쿠치올의 양은 약 30%이다. 또한 상기에 언급한 바와 같이 바람직한 실시예에서, 바쿠치올은 솔라리아 속 식물에서 식물(들)로부터 분리되었다.

<74> 피부의 OX와 LOX에 의해 매개된 질병 또는 이상은 다른 포유류의 피부암, 자외선, 화학물질, 열, 바람 및 건조한 환경에의 노출로 인한 피부 손상, 주름, 처진 피부, 눈 주변의 주름 및 다크서클, 피부병 및 피부의 다른 알려지 관련 이상 뿐만 아니라 여드름, 비듬, 췌변, 열화상, 국소 상처, 균, 미생물 및 바이러스 감염에 의해 야

기된 경미한 염증성 이상, 백반, 전신 홍반성 낭창, 건선, 암, 흑색종도 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 피부, 입, 치아 및 잇몸의 COX와 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상은 치주 질환, 구강 전암성(oral precancerous) 이상, 구강암 및 다른 구강의 악성 종양, 의치의 물리적 식재에 의해 야기되는 민감한 잇몸 및 치아, 후유증, 치수염, 파민증, 고통 및 염증, 입안, 잇몸 또는 혀 상에서의 외상, 손상, 이갈기 및 다른 경미한 상처, 치태 및 치석, 치아 갈습 손실, 단백질 가수분해 및 충치를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

<75> 본 발명은 골관절염 및 류마티스성 관절염의 병리학적인 이상에 따른 일반적인 관절 통증 및 뻣뻣함, 운동성의 결핍 및 물리적 기능의 손실, 생리통, 동맥경화증, 비만, 당뇨병, 알츠하이머병, 호흡기 알러지성 반응, 만성 정맥 부전, 건선, 만성 긴장성 두통, 편두통, 염증성 장질환, 전립선암 및 다른 고형 종양을 포함하는 다른 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함한다.

<76> 상기 COX 및 LOX에 의해 매개된 질병 및 이상을 예방하고 치료하기 위한 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올을 포함하는 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것으로 이루어져 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 조성물에서 바쿠치올의 양은 27% 내지 100%의 범위내이다. 바람직한 실시예에서, 조성물에서 바쿠치올의 양은 약 30%이다. 또한 상기에 언급한 바와 같이 바람직한 실시예에서, 바쿠치올은 솔라리아 속 식물에서 식물(들)로부터 분리되었다.

<77> 본 발명은 세균, 바이러스, 균의 감염을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 세균성 감염에 의하여 매개된 피부, 입, 치아 또는 잇몸의 질병 및 이상의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함하며, 상기 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 푸마노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올로 이루어진 약제학적 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함한다. 세균 감염에 의해 매개된 피부, 입, 잇몸 및 치아의 질병 및 이상은 비듬, 여드름, 무좀; 충치, 치은염, 치주염, 치수염, 의치의 물리적 식재에 의해 야기된 치주 이상, 외상, 손상, 이갈기, 신생물 및 백질, 다른 퇴행성 변화; 박막, 치태, 치석 및 착색으로 이루어진 균으로부터 선택된 치주 질환을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

<78> 한 실시예에서, 박테리아는 프로피오니박테리움 아크네스 또는 스태필로코커스 에피더미디스로부터 선택된다.

<79> 본 발명의 조성물들은 당업자들에게 잘 알려져 있는 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여 방식은 소화관 내(구강) 투여, 비경구적(정맥, 피하 및 근육내) 투여 및 국소 적용을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직한 실시예에서, 상기 조성물들은 국소적으로 투여된다. 본 발명에 따른 예방 및 치료의 방법은 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물들이 실질적으로 함유되어 있지 않은 바쿠치올로 이루어진 조성물을 치료학적 유효량으로 이를 필요로 하는 환자에게 내부(internally) 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다.

<80> 본 발명에 따른 예방 및 치료 방법은 합성되고/되거나 단일 식물 또는 다수의 식물로부터 분리된 UP256(바쿠치올) 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 치료학적 유효량으로 이를 필요로 하는 수용자에게 전신(systemically) 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. UP256의 순도는 화합물을 수득하고 정제하기 위하여 사용되는 방법에 따라 30% 내지 100%를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직한 실시예에서, UP256의 용량은 일반적으로 국부 제형의 총 중량에 기초한 0.001% 내지 100%의 범위 및 수용자의 총 체중에 기초한 0.001 내지 200mg/kg의 범위로부터 선택되는 효과적이며, 독성을 나타내지 않는 양이다. 일반적인 임상학적 테스트를 사용하는 당업자들은 치료될 특정 병에 대한 최적의 용량을 결정할 수 있다.

<81> 본 발명은 제형을 최적화시키고 원하는 생리학적 활성을 얻기 위하여 합성되고/되거나 단일 식물 또는 다수의 식물로부터 분리된 UP256(바쿠치올)과 효소, 수용체, 세균 및 다른 시험관내 및 생체내 모델을 사용하는 약제학적으로 허용가능한 담체의 서로 다른 조성물의 평가를 포함한다. 본 발명의 조성물은 당업자에게 알려져 있는 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여의 방법은 장내(경구) 투여, 비경구(정맥내, 피하내 및 근육내) 투여 및 국소 적용을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 치료 방법은 합성되고/되거나 단일 식물 또는 다수의 식물들로부터 분리된 UP256(바쿠치올)을 치료학적 유효량으로 이를 필요로 하는 환자에게 내부 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 바쿠치올은 푸라노쿠마린 불순물들을 실질적으로 함유하고 있지 않다. 한 실시예에서, 상기 조성물은 국소적으로 투여된다. 국소 투여를 위한 방법은 다른 공지의 약제학적 제형 뿐만 아니라 치약, 젤, 연고, 양치질 물약, 츄잉검, 텅크제, 드링크도 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 치약으로 제형화될 때, 조성물의 함량은 바쿠치올의 0.1 내지 2 중량%의 범위일 수 있다.

<82> 본 발명의 조성물은 약제학적 및/또는 미용학적으로 허용가능한 첨가제, 보조제 및/또는 담체와 같은 다른 성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 치료될 수용자가 허용

할 수 있는 첨가제로 제형화될 수 있다. 첨가제는 약물을 위한 희석제 또는 비히클로서 사용되는 비활성 물질이다. 이러한 첨가제의 예로는 물, 완충액, 식염수, 글리세린, 수화된 실리카, 프로필렌 글리콜, 알루미늄 옥사이드, 카라기난, 셀룰로오스 겔, 티타늄 디옥사이드, 링거액, 텍스트로스 용액, 만니톨, 헥스액, 방부제 및 다른 수성의 생리학적으로 균형잡힌 염용액을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 고정유, 참기름, 에틸올레이트 또는 트리글리세리드와 같은 비수용성 비히클 또한 사용될 수 있다. 다른 유용한 제형들은 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은 점성 강화제를 함유하는 현탁액을 포함한다. 첨가제들은 또한 EDTA, 디소듐 DDTA, BHA, BHT, 디암모늄 사이트레이트, 노르디하이드로구아레틱산, 프로필 갈레이트, 소듐 글루코네이트, 소듐 메타바이설페이트, t-부틸-하이드로퀴논, SnCl_2 , H_2O_2 및 2,4,5-트리하이드록시부티로페논, 비타민 C, 비타민 E 및 등장성(isotonicity) 및 화학적 안정성을 강화시키는 다른 물질과 같은 미량의 첨가제를 함유할 수 있다. 제형의 pH를 조정하기 위한 물질의 예로는 소듐 하이드록사이드, 소듐 카보네이트, 소듐 바이카보네이트, 펜타소듐 트리포스페이트, 테트라소듐 피로포스페이트, 소듐 라우릴 설페이트, 칼슘 페록사이드, 포스페이트 버퍼, 바이카보네이트 버퍼, 트리스 버퍼, 히스티딘, 사이트레이트 및 글리신 또는 그것의 혼합물을 포함하는 반면, 향미의 예로는 티메로살, m- 또는 o-크레졸, 포르말린, 과일 추출물 및 벤질 알콜을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 표준 제형은 투여를 위한 현탁액 또는 용액과 같은 적절한 액체로 얻을 수 있는 액체 또는 고체 중 하나일 수 있다. 따라서, 비액상 제형에서 첨가제는 텍스트로스, 인간 혈청 알부민, 방부제 등을 포함할 수 있고, 멸균수 또는 식염수가 투여 전에 첨가될 수 있다.

<83> 본 발명의 한 실시예에서, 상기 조성물은 또한 보조제 또는 담체를 포함할 수 있다. 보조제는 일반적으로 특정 생물활성제에 대하여 포유류의 생물학적 활성을 강화시키는 전형적인 물질이다. 적합한 보조제는 프로인트 보조제; 다른 세균의 세포벽 성분; 알부민, 칼슘, 구리, 철, 아연, 마그네슘, 주석에 기반한 염; 실리카; 폴리뉴클레오티드; 톡소이드; 혈청 단백질; 바이러스 피막 단백질; 다른 세균 유래 조제품; 감마 인터페론; 헌터스 티터맥스 보조제(Hunter's Titermax adjuvant; Vaxcel. T.M., Inc. Norcross, Ga)와 같은 블록 공중합 보조제; 리비 보조제(Ribi adjuvant; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.로부터 입수가능); 및 Quil A(Superfos Biosector A/S, Denmark로부터 입수가능)와 같은 사포닌 및 그것의 유도체를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 담체는 전형적으로 치료된 수용자에서 치료학적 조성물의 반감기를 증가시키는 화합물이다. 적합한 담체는 중합성 서방형 제형, 생분해성 식재료, 리포솜, 박테리아, 바이러스, 오일, 에스테르 및 글리콜을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

<84> 한 실시예에서, 상기 조성물은 수용자 안에서 본발명의 조성물을 서서히 방출하는 서방형 제형으로서 제조된다. 본원에 사용된 것으로서, 서방형 제형은 서방형 비히클에 본 발명의 조성물을 포함한다. 적합한 서방형 비히클은 당업자들에게 잘 알려져 있을 것이다. 서방형 제형은 생분해성(biodegradable, 즉 bioerodible)인 것이 바람직하다.

<85> 본 발명의 치료제는 연고, 겔, 로션 또는 크림 베이스와 같은 것, 또는 에멀전과 같은 것, 패치, 드레싱 또는 마스크, 비점착성 거즈, 붕대, 스왑 또는 클로스 와이프 같은 것을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 치료학적 조성물을 국소적으로 투여하기 위한 당업자에게 공지된 임의의 적합한 수단에 의하여 국소적으로 투여된다. 이러한 국소 적용은 국소 적용에 대해 공지된 임의의 표준 방법을 사용하여 임의의 환부에 국소적으로 투여될 수 있다. 치료 조성물은 투여 방법에 따라 여러가지 단위 용량(unit dosage)의 형태로 투여될 수 있다. 약물 전달의 특정 방법에 대하여, 본 발명의 치료 조성물은 본 발명의 첨가제로 제형화될 수 있다. 본 발명의 치료제는 임의의 수용자, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간에게 투여될 수 있다. 투여의 특정 방법은 치료될 상태에 의존할 것이다.

<86> 한 실시예에서, 적합한 연고는 일반적으로 국부 제형의 총 중량에 기초하여 0.001% 내지 100%의 범위, 흰색 소프트 파라핀의 65% 내지 100%(바람직하게는 75% 내지 96%)의 범위, 액상 파라핀의 0% 내지 15%의 범위, 및 라놀린 또는 그것들의 합성 동등물의 유도체의 0% 내지 7%(바람직하게는 3% 내지 7%) 범위로부터 선택되는 효과적이며, 독성을 나타내지 않는 양의 바람직한 농도의 UP256(바쿠치올)로 이루어져 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 연고는 폴리에틸렌-액상 파라핀 매트릭스를 포함할 수 있다.

<87> 한 실시예에서, 적합한 크림은 상기에 제공한 바와 같이 합성되고/되거나 단일 식물 또는 다수의 식물들로부터 분리된 바람직한 농도의 UP256(바쿠치올)과 함께 유효 시스템으로 이루어져 있다. 상기 유효 시스템은 예를 들어 0.1 내지 1%의 N,N"-메틸렌비스[N'-(3-(하이드록시메틸)-2,5-디옥소-4-이미다졸리디닐)우레아](제품명 Imidurea USNF에 한하여 입수가능)와 같은 하나 또는 그 이상의 첨가제, 0.1 내지 1%의 알킬 4-하이드록시벤조에이트(예를 들어, 상표 Nipastat에 한하여 입수가능한 혼합물), 0.01 내지 0.1%의 소듐 부틸 4-하이드록시벤

조에이트(상표 Nipabutyl sodium에 한하여 Nipa Laboratories로부터 입수가가능함), 및 0.1 내지 2%의 페녹시에탄올과 함께, 바람직하게는 2 내지 10%의 폴리옥시에틸렌 알콜(예를 들어, 상표 Cetomacrogol TM1000에 한하여 입수가가능한 혼합물), 10 내지 25%의 스테아릴 알콜, 20 내지 60%의 액상 파라핀, 및 10 내지 65%의 물로 이루어진다.

<88> 한 실시예에서, 적합한 겔은 반고체 시스템으로 이루어져 있으며, 겔의 액체상은 고도의 가교결합으로 삼차원의 중합형 매트릭스 안에 구속되어 있다. 상기 액체상은 예를 들어 0.1 내지 2%의 메틸 4-하이드록시벤조에이트(메틸파라벤) 또는 페녹시에탄올-분별(differential)과 같은 하나 또는 그 이상의 방부제와 함께; 예를 들어 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜과 같은 0 내지 20%의 수혼화성(water-miscible) 첨가제, 및 예를 들어 트래거캔스, 펙틴, 카라기난, 아가 및 알긴산과 같은 천연물질 또는 메틸셀룰로오스 및 카복시폴리메틸렌(카보폴; carbopol)과 같은 합성 또는 반합성 화합물일 수 있는 0.1 내지 10%, 바람직하게는 0.5 내지 2%의 농축제(thickening agent), 바람직한 양의 UP256(바쿠치올)과 함께 물로 이루어질 수 있다. 또 다른 적합한 염기는 70 내지 90%의 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, 미국 처방집(U.S. National Formulary; USNF)에 따라 제조된 40%의 폴리에틸렌 글리콜 3350 및 60%의 폴리에틸렌 글리콜 400을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜 연고), 5 내지 20%의 물, 0.02 내지 0.25%의 항산화제(예를 들어, 부틸화된 하이드록시톨루엔) 및 0.005 내지 0.1%의 킬레이트제(예를 들어, 에틸렌디아민 테트라아세트산; EDTA)와 함께 바람직한 양의 UP256(바쿠치올)로 이루어진다.

<89> 상기에서 사용된 것과 같은 용어 소프트 파라핀은 흰색의 소프트 파라핀 및 노란색의 소프트 파라핀을 베이스로 한 크림 또는 연고를 포함한다. 상기 용어 라놀린은 천연 양모지(wool fat) 및 정제된 양모지를 포함한다. 라놀린의 유도체들은 특히 그것들의 물리적 또는 화학적 특성을 변경하기 위하여 화학적으로 변경된 라놀린을 포함하며, 라놀린의 합성 동등물은 특히 합성 또는 반합성 화합물 및 라놀린 대용으로써 제약 및 미용업계에 알려져 있고 사용되고 있는 혼합물을 포함하며, 예를 들어 라놀린 치환체로 일컬어질 수 있다.

<90> 사용될 수 있는 라놀린의 하나의 적합한 합성 동등물은 Softisan 69로 알려져 있는 상표 SoftisanTM에 한하여 입수가가능한 물질이다. 다이나마이트 노벨 악티엔게젤샤프트(Dynamit Nobel Aktiengesellschaft)로부터 입수가가능한 Softisan 649는 천연 식물성 지방산, 이소스테아르산(isostearic acid) 및 아디프산(adipic acid)의 글리세린 에스테르이며, 그것의 특성은 헤름스도르프에 의하여 논의되었다(H.Hermsdorf in Fette, Seifen, Anstrichmittel, Issue No. 84, No.3(1982), pp.3-6).

<91> 적합한 연고 또는 크림 베이스의 성분으로서 본원에서 상기에 언급된 다른 물질들 및 그것들의 특성은 표준 참고 업무(standard reference works), 예를 들어 약전(pharmacopoeia)에 논의되어 있다. 세토마크로골 1000(cetomacrogol 1000)은 식 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 를 가지며, 여기에서 m은 15 또는 17일 수 있고, n은 20 내지 24일 수 있다. 부틸화된 하이드록시톨루엔은 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸(2,6-di-tert-butyl-p-cresol)이다. 니파스타트(Nipastat)는 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 4-하이드록시벤조에이트의 혼합물이다.

<92> 본 발명의 조성물은 전통적인 제약 기술에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 예를 들어 앞서 언급된 조성물들은 편리하게도 높은 온도, 바람직하게는 60-70°C에서 소프트 파라핀, 만일 존재한다면 액상 파라핀 및 라놀린 또는 그것의 유도체 또는 합성 동등물과 함께 혼합함으로써 제조될 수 있다. 그 후, 상기 혼합물을 상온에서 냉각시키고, 코르티코스테로이드 및 임의의 다른 성분과 함께 무피로신(mupirocin)의 수화된 결정성 칼슘염을 첨가한 후, 충분히 분산을 유지하기 위하여 교반하였다.

<93> 투여의 방법에 상관없이, 특정 용량은 대략 수용자의 체중에 따라 계산된다. 당업자들에 의해 관례대로 만들어지는 상기 언급된 각 제형을 포함하는, 치료를 위한 적절한 투약량을 결정하는데 필요한 계산결과의 추가 분할은 과도한 실험 없이, 특히 본원에 기재된 용량 정보 및 검정에 따라 그들에 의해 관례대로 수행되는 업무의 범위 내에 있다. 이러한 투약량은 적절한 용량 반응 데이터와 함께 사용하여 투약량을 결정하기 위해 확립된 검정법의 사용을 통하여 확인될 수 있다.

<94> 본원에 기재된 발명은 인간에의 적용 뿐만 아니라 가축에도 사용될 수 있으며, 상기 용어 "수용자(host)"는 방법을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다는 것에 주의하여야 한다. 가축 적용의 경우에서, 투약 범위는 동물의 체중을 고려하여 상기에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.

실시예

<101> 하기의 실시예는 단지 예시를 목적으로 제공되는 것으로 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

<102> 실시예 1 : HPLC에 의한 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 정제를 위한 방법

<103> 하기에 기재된 것과 같이 생성된 추출물, 분획 및 신규 조성물에서의 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 양을 포토다이오드 어레이 검출기(PhotoDiode Array detector; HPLC/PDA) 및 루나 페닐-헥실 컬럼(Luna Phenyl-hexyl column; 250 mm x 4.6mm)를 사용하여 고압액체 크로마토그래피(high pressure liquid chromatography; HPLC)에 의해 정량하였다. 12분에 걸쳐 36% 내지 100%의 ACN으로, 그 후 3분간 100%의 ACN으로 아세토니트릴(acetonitrile; ACN)-물 기울기를 사용하여 컬럼으로부터 목적 화합물을 용리하였다. 사용된 상세한 HPLC 조건은 표 1에 기재하였다. HPLC 분리의 크로마토그램은 도 1에 도시하였다. 정량 표준으로서 상용의 순수 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌을 사용하여 체류 시간 및 UV 피크 면적(peak area)에 기초하여 목적 화합물을 확인하고 정량화하였다. 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 체류 시간은 각각 18.19분, 7.33분 및 7.95분이었다.

표 1

<104> 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 정량을 위한 HPLC 조건

컬럼	루나 페닐-헥실, 150 x 4.6mm
기울기	0-8분 36% ACN/물 8-20분 36% ACN/물 내지 100% ACN 20-23분 100% ACN 23-28분 36% ACN/물
흐름 속도	1mL/분
검출	0-11분 246nm (솔라렌 및 안젤리신에 대하여, 7-8분) 11-28분 260nm (바쿠치올에 대하여, 18-19분)
온도	35℃
표준 농도	바쿠치올에 대하여 메탄올에 용해시킨 0.1mg/mL 솔라렌 및 이소솔라렌에 대하여 0.025mg/mL
추출 준비물	MeOH에 용해시킨 0.2mg/mL
선형 범위	0.01mg/mL 내지 0.15mg/mL

<105> 실시예 2 : 솔라리아 식물로부터의 바쿠치올 추출을 위한 일반적인 방법

<106> 회전 교반기(Wrist Shaker)

<107> 플라스크에 용매(100mL) 및 솔라리아 코틸리폴리아의 종자 파우더(10g)를 넣고, 혼합물을 상온에서 1시간 동안 회전 교반기에서 교반시켰다. 그 후, 상기 혼합물을 필터에 통과시키고, 여과액을 수집하였다. 새로운 용매를 사용하여 한번 이상 추출 과정을 반복하여 여과액을 합치고, 용매는 회전 증발건조기 상에서 제거시키고, 잔류물은 높은 진공하에서 건조시켰다.

<108> 환류(Reflux)

<109> 상기 추출 방법에 따라서, 샘플 식물 물질을 하기의 용매로 추출하였다 : 디클로로메탄(dichloromethane; DCM), EtOAc, 아세톤, MeOH, 석유 에테르(BP 35-60℃) 및 석유 에테르(BP 60-90℃). 그 후, 실시예 1에 기재된 것과 같이 추출물을 HPLC 분석에 의해 분석하였다. 그 결과를 표 2에 기재하였다.

표 2

<110> 여러가지 솔라리아 코틸리폴리아 추출물의 정량

	석유 에테르 (35-60℃)	DCM	EtOAc	아세톤	MeOH	석유 에테르 (35-60℃)	석유 에테르 (60-90℃)
추출물의 중량(g)	0.5833	1.7535	1.6710	1.8932	1.8795	0.6457	0.9203
추출물에서 바쿠 치올의 %	29.1%	14.2%	13.7%	13.7%	13.9%	25.6%	27.2%
식물에서 바쿠치 올의 %	1.7%	2.5%	2.3%	2.6%	2.6%	2.6%	2.7%
방법	회전 교반기(100ml/10g 고체)					환류(50ml/10g 고체)	

<111> 실시예 3 : 솔라리아 식물로부터 바쿠치올의 대량 추출

<112> 솔라리아 코틸리폴리아의 종자 파우더(2kg) 및 9리터의 석유 에테르(BP 60-90℃)를 1시간 동안 항온수조 안에서 70℃로 회전 증발 건조기 상의 20L 플라스크에 넣어 회전시켰다. 그 후, 상기 용액을 개별적인 용기 안으로 옮기고, 용매를 진공 하에서 제거하였다. 새로운 용매를 바이오매스 안으로 첨가하고, 추출 공정을 3번 이상 반복하였다. 21 중량%의 바쿠치올 및 3 중량%의 솔라렌/이소솔라렌을 가지는 335g의 조추출물(MH-258-01-01)을 얻기 위하여 상기 추출물을 결합시키고 증발시켰다.

<113> 실시예 4 : 바쿠치올 추출물을 정제하기 위한 여러가지 크로마토그래피 방법의 평가

<114> 푸라노쿠마린, 특히 솔라렌/이소솔라렌 오염에 의한 오염물을 함유하지 않는 고순도의 바쿠치올을 얻기위한 방법으로써 컬럼 크로마토그래피의 사용 가능성을 측정하기 위하여, 실시예 2에 기재된 방법을 사용하여 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 정제되지 않은 용매 추출물(MH-206-70-1)을 정제하기 위한 여러가지 크로마토그래피 방법을 평가하였다. 간단히 말하면, 바쿠치올로부터 푸라노쿠마린 불순물들을 분리하기 위한 노력의 일환으로, 각각의 텅빈 컬럼 카트리지(1.3cm ID 및 20mL 충전, Bio-Rad사)를 서로 다른 것으로 채우고, 서로 다른 용매로 용리하였다. 상기 분획(분획 당 10mL)을 시험관에 수집하고, 20%의 EtOAc/석유 에테르로 전개하여 실리카 겔 TLC 판을 분석하였다. 표준 용액을 사용하여 측정된 그것들의 체류 시간을 기초로 하여 목적 화합물인 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌을 확인하였다. 그 결과를 표 3에 기재하였다.

표 3

<115> 솔라리아 코틸리폴리아의 조추출물에서 푸라노쿠마린으로부터 바쿠치올의 컬럼 크로마토그래피 분리에 대한 요약

매질	컬럼 크기/추출물 충전	용리 용매	결과
Al2O3(중성) (J.T.Baker)	2mL/25mg	1. 석유 에테르 2. EtOAc 3. MeOH	거의 분리되지 않음
XAD-4 (amerlite polystyrene resin)	5mL/19mg	100% 물에서 100% MeOH로부터 20% 증가하는 MeOH/물의 기울기	분리되지 않음
XAD-7 (amerlite polyacrylate resin)	8mL/16mg	100% 석유 에테르에서 100% MeOHfhqnxj 20%	다소 분리됨
		100% 물에서 100% MeOH로부터 20% 증가하는 MeOH/물 기울기	거의 분리되지 않음
폴리아마이드	5mL/50mg	1. 석유 에테르 2. 5% 아세톤/석유 에테르 3. 아세톤	분리되지 않음
LH-20	8mL/50mg	석유 에테르	분리되지 않음
실리카 겔	5mL/50mg	1. 석유 에테르 2. 15% EtOAc/석유 에테르	잘 분리됨
CG-17md	5mL/50mg	1. 석유 에테르 2. 아세톤	분리되지 않음
CG-161cd	5mL/50mg	석유 에테르	분리되지 않음
	6mL/50mg	MeOH/물 단계 기울기	잘 분리되나 저수율

<116> 실시예 5 : 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 석유 에테르 추출물의 가수분해

<117> 실시예 3에 기재된 것과 같이 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 석유 에테르 추출물(25g; MH-258-01-01)을 1L의 둥근바닥 플라스크에 500mL의 NaOH 용액(56.5mM)과 혼합하였다. 상기 용액을 1시간 동안 가열 선반(heating mantel)에서 환류시켰다. 상기 용액의 일부분을 플라스크로부터 주기적으로 취하여 실시예 1에 기재

된 것과 같이 HPLC에 의해 분석하였다.

- <118> HPLC 분석 후 중단된 반응은 솔라렌 및 이소솔라렌의 피크가 완전하게 사라졌음을 나타내었다. 그 후, 대략 36mg/mL의 고체 내용물을 가지는 어두운 갈색의 용액(MH-258-10-01)을 얻기 위하여 반응 혼합물을 상온에서 냉각시켰다.
- <119> 분액 여두 안의 20mL의 가수분해 용액(MH-258-10-01)을 DCM(20mL)에 첨가하였다. 혼합물을 10분간 흔들어주어 층을 분리가능하게 하였다. DCM 층을 분액 여두의 바닥으로부터 제거하고, 20mL의 새로운 DCM을 사용하여 추출을 한번 이상 반복하였다. 푸라노쿠마린 오염물을 함유하지 않고 31%의 바쿠치올을 포함한 118mg의 조성물(MH-258-07-01)을 얻기 위하여, 유기층을 결합하고 진공 하에서 회전 증발기에 의해 용매를 제거하였다(도 3).
- <120> 실시예 6 : 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 메탄올 추출물의 가수분해
- <121> 실시예 2에 기재된 것과 같이 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 건조 메탄올 추출물(MH-293-68-01)을 교반/핫 플레이트 상에서 2L의 비커에 1L의 NaOH 용액(DI 물에 용해시킨 44g의 NaOH)과 함께 혼합하였다. 상기 용액을 2시간 동안 끓이면서 교반하였다. 총 부피를 약 1200mL로 유지시키기 위하여 비커에 물을 첨가할 필요가 있다. 2시간 후, 상기 용액을 상온에서 냉각시키고, 그 후 600mL의 분액 여두로 이동하였다. 석유 에테르(250mL)를 첨가하고 상기 혼합물을 10분간 흔들어주어, 층을 분리가능하게 하였다. 석유 에테르 층을 분액 여두의 상부로부터 제거하고, 새로운 용매를 사용하여 3번 반복하여 추출하였다. 푸라노쿠마린 오염물들을 함유하지 않고 51%의 바쿠치올을 포함한 2.25g의 조성물(MH-293-74-01)을 얻기 위하여 유기 추출물을 결합시키고, 진공 하에서 회전 증발기에 의해 용매를 제거하였다.
- <122> 실시예 7 : 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 석유 에테르 추출물의 가수분해 후 컬럼 크로마토그래피에 의한 정제
- <123> 실시예 3에 기재된 것과 같은 솔라리아 코틸리폴리아의 종자로부터 분리된 석유 에테르 추출물(25g; MH-258-01-01)을 1L의 둥근바닥 플라스크에서 500mL의 NaOH 용액(56.5mM)과 함께 혼합하였다. 용액의 일부분을 주기적으로 플라스크로부터 취하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 HPLC에 의해 분석하였다. HPLC 분석에서 솔라렌 및 이소솔라렌의 피크가 완전히 사라질때까지 반응을 진행시켰다. 그 후, 대략 35mg/mL(MH-258-10-01)의 고체 내용물을 가지는 어두운 갈색의 용액을 얻기 위하여 반응 혼합물을 상온에서 냉각시켰다.
- <124> 150mL의 이 용액(MH-258-10-01)을 미리 준비된 CG-161cd 컬럼에 충전시켰다. 미리 준비된 컬럼(5x13cm)은 4 컬럼 부피의 탈이온수(DI water)로 평형을 맞춘 300mL의 CG-161cd 레진을 포함한다. 충전 물질(MH-258-10-01)을 컬럼 상부로 공급하고, 컬럼을 pH 7에 이르도록 하기 위하여 2500mL의 탈이온수를 사용하여 용리한 후 2500mL의 70% MeOH/물 및 4500mL의 90% MeOH/물로 바쿠치올을 용리하였다. 바쿠치올이 컬럼으로부터 완전히 용리될때까지 용리액(eluent)을 TLC로 관찰하였다. 바쿠치올(2L)만을 함유하는 분획을 결합시키고, 용매를 제거하기 위하여 진공 하에서 증발시켰다. 이 방법을 사용하여, 푸라노쿠마린을 함유하지 않은 높은 순도의 바쿠치올(2.3g; 99%의 순도, MH-258-12-08 및 -09)을 얻었다. 초기 및 후기의 바쿠치올 또한 수집하여 결합시키고, 진공 하에서 증발시켰다. 이 분획들로부터 푸라노쿠마린을 함유하지 않은 70%의 바쿠치올을 함유한 조성물(MH-258-12-07 및 -10)을 2.5그램의 양으로 얻었다. CG-16cd 컬럼의 충전량은 1리터의 CG-161cd 레진 당 400mL의 미정제 가수분해용액으로 추측된다. 분리 후, CG-161cd 컬럼을 클로록스(Clrox)로 세척한 후 MeOH와 4 컬럼 부피의 탈이온수로 세척하여 회수하였다. 컬럼은 수년간 재사용할 수 있다.
- <125> 실시예 8 : 정제된 바쿠치올에 의한 COX-1 및 COX-2의 억제
- <126> COX-1 및 COX-2를 억제하는 화합물의 선별을 위하여, 두가지 효소 모두의 퍼옥시다아제 활성의 억제를 이용한 고속(high throughput), 시험관내(in vitro) 검정을 전개하였다(Needleman *et al.* (1986) Annu Rev Biochem. 55:69). 간단히 말하면, 검사할 조성물 또는 화합물을 고정된 양의 COX-1 및 COX-2 효소에 대하여 적정하였다. 보조인자(cofactor)로서 아라키돈산의 존재하에 각 효소의 퍼옥시다아제 활성을 가시화시키기 위하여, 쪼겔 수 있는 퍼옥사이드 발색단(peroxide chromophore)를 검정에 포함시켰다. 전형적으로, 96-웰 형식에서 검정을 수행하였다. 100%의 DMSO에 용해시킨 10mg/mL의 저장 용액으로부터 취한 각각의 억제제를 하기 범위의 농도를 사용하여 상온에서 3번 테스트하였다 : 0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 50, 100 및 500 µg/mL. 각각의 웰에 트리스 완충액에 희석시킨 10 µL의 22 µM 헤마틴, DMSO에 희석시킨 10 µL의 억제제 및 25 유닛의 COX-1 또는 COX-2 효소 중 어느 하나와 함께 pH 7.5, 150 µL의 100mM Tris-HCl을 첨가하였다. 상기 성분들을 회전 플랫폼 상에서 10초간 혼합하고, 반응을 개시하기 위하여 10 µL의 2mM N,N,N',N'-테트라메틸-p-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride; TMPD) 및 20 µL의 1.1mM 아라키돈산을 첨가하였

다. 플레이트를 10초간 흔들어준 후, 570nm에서 흡광도를 읽기 전에 5분간 배양하였다. 억제제의 농도 대 % 억제에 대한 도면을 작성하고, X축 상에서 농도를 가로지르고 등온선(isotherm)을 따라 반-극대점(half-maximal point)을 취함으로써 IC₅₀ 값을 결정하였다. 그 후 효소 단위 수에 대하여 IC₅₀ 값을 일반화시켰다. 높은 순도(99%)의 바쿠치올 샘플(MH-258-08)을 COX-1 및 COX-2 억제 모두에 대하여 테스트하였다. 그 결과를 하기의 표 4에 요약하였다.

표 4

<127> 바쿠치올에 의한 COX 활성의 억제

화합물명	COX-1(IC ₅₀)	COX-2(IC ₅₀)
MH-258-08(99% 바쿠치올)	2.34 μ M	5.78 μ M

<128> 실시예 9 : 정제된 바쿠치올(MH-258-12-08)에 의한 5-리폭시게나아제의 억제

<129> 상기에 언급한 바와 같이, 염증 반응에 관여하는 가장 중요한 경로 중의 하나는 하이드로퍼옥사이드 5-, 12- 및 15-HPETE를 생성하기 위하여 AA와 같은 지방산의 산화를 촉매한 후 류코트리엔으로 전환시키는 비-헴(non-heme), 철-함유 리폭시게나아제(5-LOX, 12-LOX 및 15-LOX)에 의하여 생성된다. 공개된 방법을 사용하여 리폭시게나아제 억제 검정을 수행하였다(Carter *et al.* (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 256(3):929-937, Safayhi *et al.* (2000) Planta Medica. 66:110-113). 5-LOX를 인간의 PBML 세포로부터 분리하였으며, 아라키돈산을 기질로 사용하였다. 테스트 제품 및 양성 대조군을 1%의 DMSO에 용해시켰다. 배양 완충액으로서 HBSS(Hank's balanced salt solution)을 사용하였다. 37°C에서 15분간 전배양 후, 동일한 온도에서 5분간 배양하였다. 이 검정은 EIA 정량화를 사용하여 LTB₄의 형성을 검출한다. 높은 순도의 바쿠치올(99% 바쿠치올; #MH-258-12-08)을 양성 대조군 - 5가지 농도의 NDGA에 관하여 10 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M 및 10nM의 농도로 두 번 테스트하였다. 용량 반응 곡선을 도 6에 나타내었다. 바쿠치올(99% 순도)에 의한 5-LOX 억제에 대한 IC₅₀은 3.41 μ M 였다.

<130> 실시예 10 : 정제된 바쿠치올의 항균 활성

<131> 공개된 방법을 사용하여 높은 순도의 바쿠치올 샘플(99%의 순도; #MH-258-12-08)의 항균 활성을 평가하였다 (Modugno *et al.* (1994) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 38:2362-2368; Misiek *et al.* (1973) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 3:40-48). 간단히 말하면, 스타필로코커스 에피더미디스(그람 양성, ATCC 12228)를 물러-힌튼 브로스 배지(Mueller-Hinton broth medium)에서 20시간 동안 37°C에서 배양하였다. 프로피오니박테리움 아크네스(ATCC 6919)를 클로스트리디움이 강화된 배지(Reinforced Clostridial medium)에서 2일간 37°C에서 배양하였다. 테스트 제품 및 양성 대조군을 1mL의 배양 부피로 1%의 DMSO에 용해시켰다. 평가 시간은 1일이었다. 탁도의 측정은 정량화 방법으로서 사용하였다. 높은 순도의 바쿠치올 샘플(99%; #MH-258-12-08)을 각각 스타필로코커스 에피더미디스에 대하여 0.1 μ g/mL로 겐타마이신을 주고, 프로피오니박테리움 아크네스에 대하여 0.1 μ g/mL로 암피실린을 준 양성 대조군에 관하여 100 μ g/mL, 30 μ g/mL, 10 μ g/mL, 3 μ g/mL, 1 μ g/mL, 0.3 μ g/mL, 0.1 μ g/mL 및 0.03 μ g/mL의 농도로 두 번 테스트하였다. 스타필로코커스 에피더미디스 및 프로피오니박테리움 아크네스 모두에 대하여 1 μ g/mL에서 바쿠치올에 의한 현저한 억제를 나타내었다. 또한, 매우 높은 순도의 바쿠치올 샘플은 30 μ g/mL의 중간 농도에서 트리코피톤 멘타그로피트(*Trichophyton mentagrophytes*; ATCC 9533)의 활성을 억제하였다. 마지막으로, 에피더모피톤 플로코섬(*Epidermophyton floccosum*; ATCC 18397), 마이크로스포럼 카니스(*Microsporium canis*; ATCC 36299) 및 피티로스포럼 오발레(*Pityrosporum ovale*; ATCC 38593)에 대해서는 어떠한 억제도 관찰되지 않았다.

<132> 실시예 11 : 정제된 바쿠치올의 급성 독성 평가

<133> 두가지 순도 수준의 바쿠치올(UP256; 약 20% 순도의 샘플 및 99% 순도의 샘플)을 테스트하여 급성 독성 연구를 완료하였다. 14일간의 연구에 40마리의 4-5주령 암컷 ICR 마우스들을 사용하였다. 마우스에 일일 테스트 제품 하나 당 중량에 대하여 약 2g/kg으로 매일 100mL의 급성 복용량(acute dose)을 투여하였다. 첫번째 10마리의 마우스에는 20.7%의 바쿠치올을 함유하는 조성물을 준 반면, 두번째 그룹의 10마리 마우스에는 99%의 바쿠치올을 함유하는 조성물을 주었다. UP256 조성물을 물에 현탁시켜 주사기를 통하여 투여하였다. 대조군으로서, 20마리의 마우스들에 물을 투여하였다. 기준점, 3개의 중간점 및 끝점을 포함하여 모든 마우스들의 체중을 측정하였다. 또한, 모든 그룹의 식이 및 물 소비를 관찰하였다. 임의의 비정상적인 건강 이상 또는 행동을 2주간에 걸쳐 기록하였다. 모든 마우스들의 부검을 14일째에 완료하고, 블러드 스크린을 완료하기 위하여 모든 그룹

으로부터 얻은 혈액을 수집하였다. 또한, 각 그룹으로부터 임의로 2마리의 마우스를 골라 조직병리학 검사를 위하여 신장 및 간 조직을 적출하였다.

<134> 대조군을 포함한 모든 그룹에 대하여 계산된 평균 체중은 2주의 연구 기간에 걸쳐 계속 증가하였다. 체중의 감소를 보이는 마우스들은 없었으며, 식이/물 소비는 모든 그룹에서 동일하였다. 연구자에 대한 공격성(즉, 물기) 및 서로에 대한 공격성(즉, 케이지 내에서의 싸움)은 단지 대조군에 비해 치료군 사이의 행동에서만 현저한 차이를 보였다. 이것은 남성 호르몬인 안드로겐을 투여받은 마우스에서 예측될 수 있는 행동이다. 모든 마우스들에 대한 부검은 어떤 장기에서도 큰 이상 또는 변화가 없음을 보여주었다. 혈액 검사는 치료군이 대조군에 대하여 정상임을 보여주었다. ICR 마우스에 대한 단백질, 효소 및 이온 농도는 정상 범위 내에 있었다. 장기에서의 어떤 극소의 변화를 측정하기 위하여 조직병리학과에 신장 및 간 조직을 보냈으며, 신장에서는 큰 변화가 나타나지 않았고 간에 대한 간세포 핵(hepatocyte nuclei)은 마우스에 한하여 정상 내에 있음을 보고받았다. 검사한 조직 절편 모두에는 종양 형성(neoplasia)의 실질적인 염증 또는 증거가 없었다.

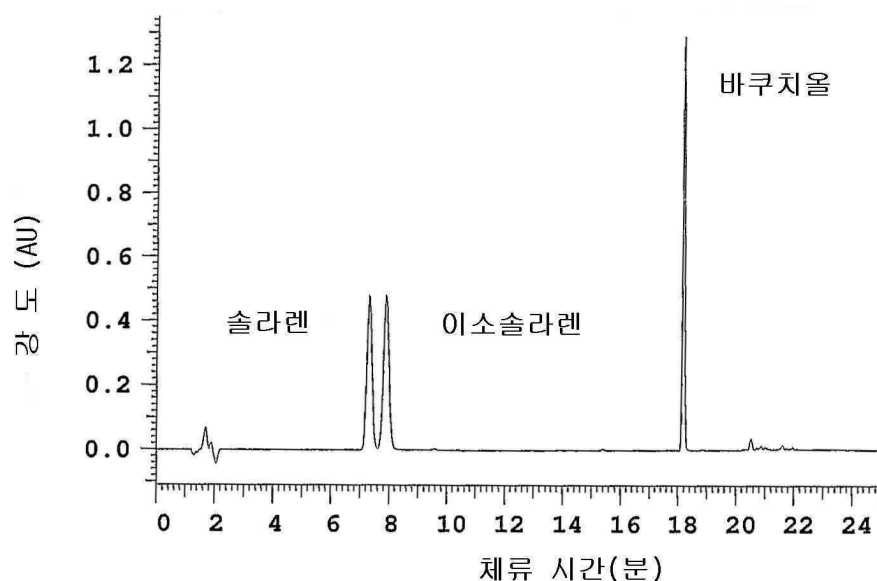
<135> 결론적으로, 체중, 혈액 검사 및 조직학적 데이터들은 모두 대조군에 관하여 치료군도 동일하였다. UP256 샘플에 대한 14일간의 연구에서도 또한 어떠한 역효과도 관찰되지 않았다. 따라서, 20% 및 99%의 순도 수준 모두에서 UP256은 믿을 수 있는 안정성 프로파일을 갖는다고 결론지을 수 있다.

도면의 간단한 설명

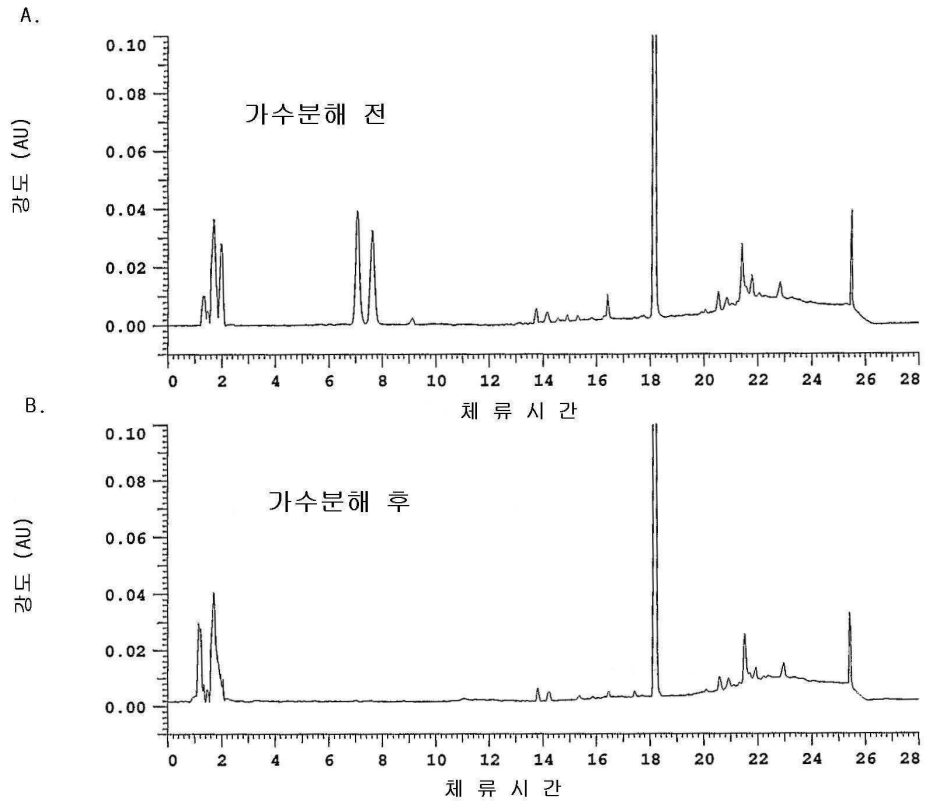
- <95> 도 1은 솔라리아 식물로부터의 대표 추출물의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- <96> 도 2는 수산화나트륨 가수분해 반응 전(도 2A) 및 후(도 2B)의 솔라리아 추출물의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- <97> 도 3은 31%의 바쿠치올로 이루어진 UP256 샘플(MH-258-07-01)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- <98> 도 4는 41%의 바쿠치올로 이루어진 UP256 샘플(MH-258-07-02)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- <99> 도 5는 99%의 바쿠치올로 이루어진 UP256 샘플(MH-258-12-08)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- <100> 도 6은 양성 대조군(NDGA; - ■ -)에 대한 UP256 조성물 (#MH-258-12-08; - ● -)에 의한 효소 5-리폭시게나아제(5-L0)의 활성 억제의 용량 반응 곡선을 그래프로 나타낸 것이다.

도면

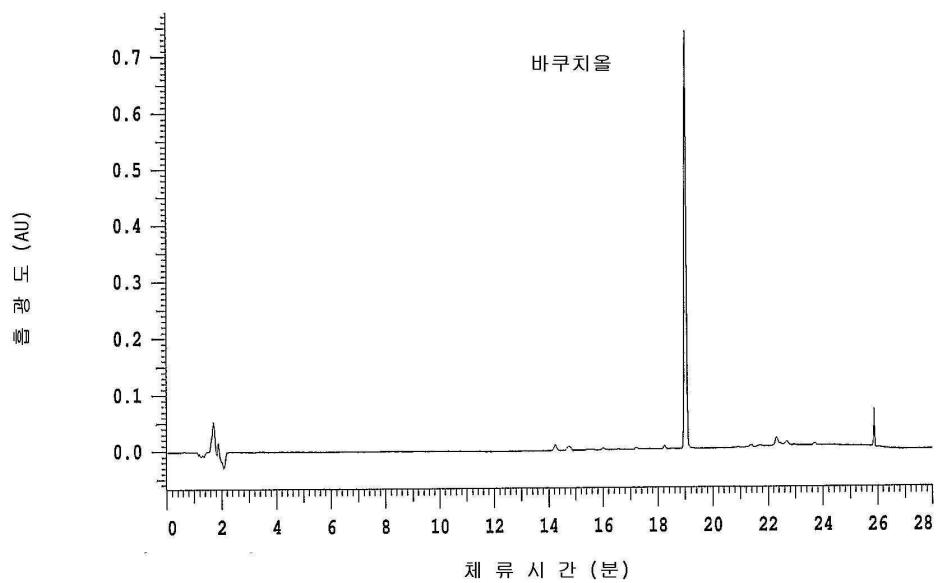
도면1



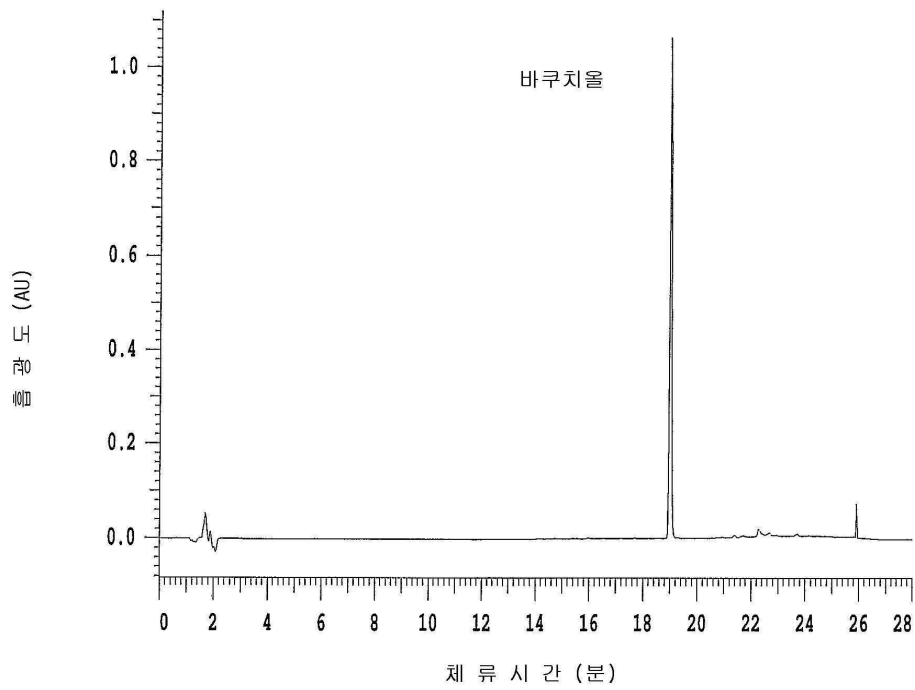
도면2



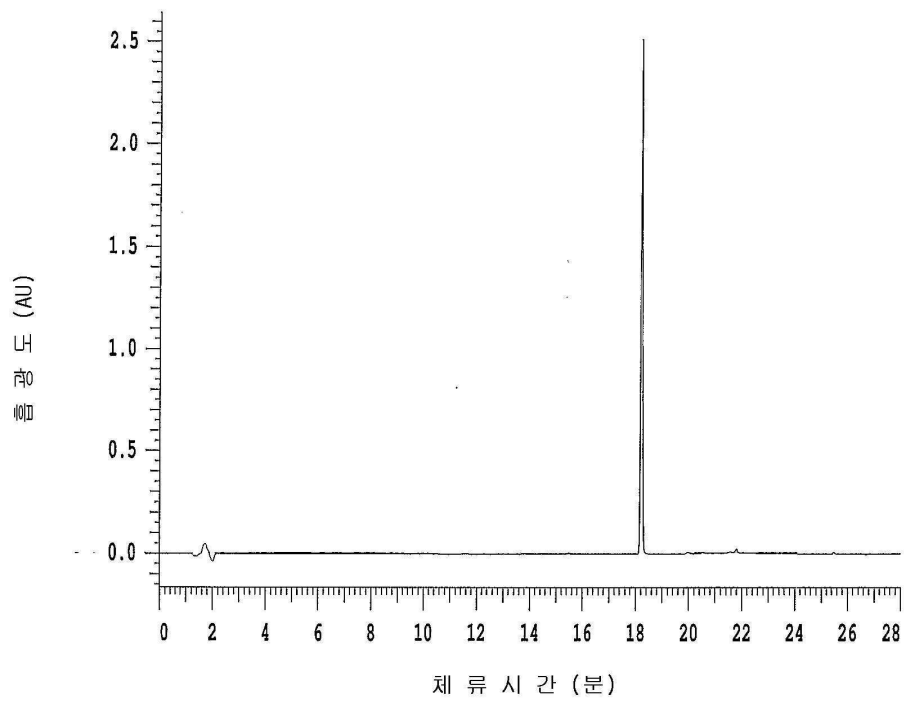
도면3



도면4



도면5



도면6

