



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0069323
(43) 공개일자 2018년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/718 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 36/539 (2006.01) A61K 36/708 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/718 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0171411

(22) 출원일자 2016년12월15일

심사청구일자 2016년12월15일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)

이민정

대구광역시 북구 동암로38길 19-41

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

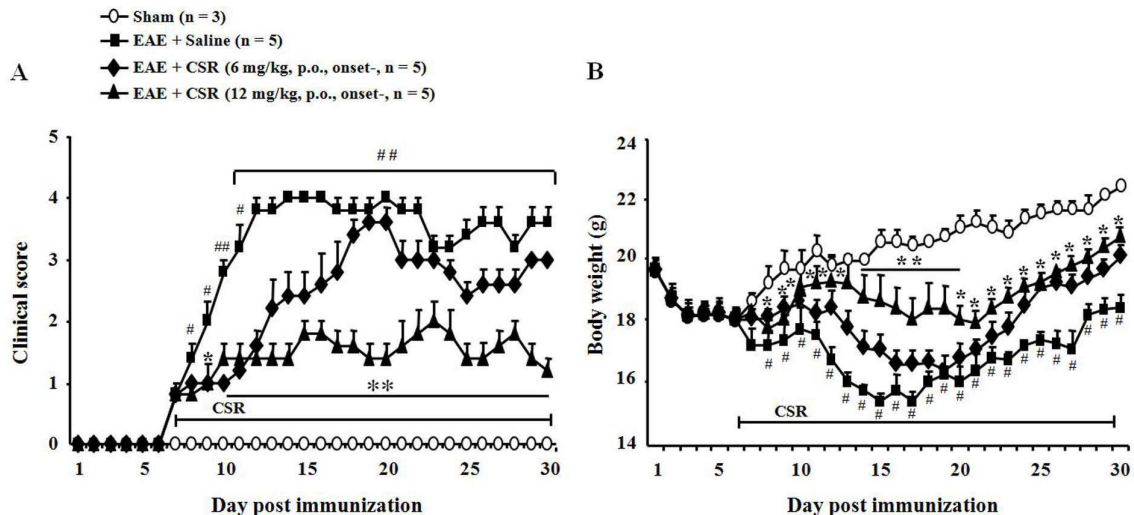
(54) 발명의 명칭 신경계 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 혼합추출물은 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE) 동물모델에서 질병의 신경학적인 장애의 정도와

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



체중의 감소를 개선할 뿐만 아니라, 척수에서 탈수초화와 신경아교세포(미세아교세포와 별아교세포)의 활성을 억제하였으며, 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β), 케모카인(RANTES, MCP-1, MIP-1 α) 및 iNOS의 mRNA의 발현, 내피세포 부착단백질(ICAM-1, VCAM-1)과 연결인자(claudin-3, claudin-5, ZO-1)의 mRNA 발현과 NF- κ B 신호기전을 억제하였다. 이러한 효과는 Treg 세포의 활성을 증가시켜서 Th1 세포의 활성을 억제하는 기작과 관련이 있었다. 그러므로 본 발명의 혼합추출물을 다발성 경화증을 포함한 신경계 자가면역질환의 발생을 예방하거나 치료할 수 있는 식의약품으로 활용할 수가 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 36/539 (2013.01)

A61K 36/708 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A2A1A11051240

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업/핵심

연구과제명 단핵구계열세포 특이적 JAK-STAT3 신호기전의 활성화에 의한 헌팅턴질환의 발생 및 병리기
능 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서 상기 혼합추출물은 물, C₁~C₂의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 제조된 것을 특징으로 하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서 상기 황련, 황금 및 대황은 1:1:1의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 탈수초화(demyelination)를 억제시키는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 Th1 세포 반응을 억제(down-regulation)하고 Treg 세포 반응을 증가(up-regulation)시키는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 자가면역성 질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 궤양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사구체신염, 쇼그렌증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 개선용 건강 기능 식품.

청구항 9

제 8항에 있어서 상기 황련, 황금 및 대황을 1:1:1의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 개선용 건강 기능 식품.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 자가면역성 질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 궤양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사구체신염, 쇼그렌증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 자가면역질환 개선용 건강 기능 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물(CSR)을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다발성 경화증(Multiple sclerosis; MS)은 인체 내 면역 체계의 결손에 의해 뇌와 척수의 백질 부분의 신경을 덮는 지방질로 된 수초(myelin sheath; 미엘린)를 침범하여 수초 탈락(demyelination)을 산발적으로 일으키는 질환으로, 구체적으로 수초가 손상을 받아 수초막의 두께가 감소하면 신경 자극은 전달되지만 효율성이 떨어지고 이에 정상적인 신경 자극 전달이 방해받게 되어 발병되는 질병이다. 쉽게 설명하자면 전선을 둘러싸고 있는 절연체가 손상되면 전기의 전도가 느려지는 것과 마찬가지로 신경 세포 간의 전도 속도가 느려지는 현상을 초래하여 증상을 일으킨다. 초기에는 수초가 회복되면서 완화 증상이 나타나지만, 결국 악화가 반복되며 손상이 영구화된다.

[0003] 현재로서는 명확한 발병 원인이 밝혀지지 않았으나, 유전적인 요인이 작용되며 바이러스와 관련된 것으로 알려져 있으며, 최근에는 자가 면역 반응에 의해 수초의 파괴가 오는 것으로 알려지고 있다. 또 더운 지방보다는 추운 지방 사람들에서 발병률이 높은 점으로 미루어 환경적 요인도 개입하고 있는 것으로 보인다. 이 외에 홍역, 헤르페스 등 바이러스가 면역계에 자극을 가해 발생한다는 연구보고가 있고 감염, 상처, 임신 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 요소들은 초기 증상과 함께 선행되어 나타나거나 증상의 악화를 가져온다. 발병 기전을 설명하는 하나의 가설은 다음과 같은데 이를 분자모방설(molecular mimicry)이라고 한다. 바이러스 감염 후 면역계가 바이러스를 이물질로 인식하는데 바이러스의 일부분이 수초의 구성 분자 물질과 같을 때에 바이러스에 대한 임파구(lymphocyte)가 중추신경계(central nervous system, CNS)로 유입되어 수초를 이물질로 인식하여 수초를 파괴하게 된다. 신경 말단에서 수초가 소실되면 적절한 기능을 수행할 수 없고 소실된 곳에 흉터가 형성되거나 경화증(굳음증)이 나타나게 된다. 다발성 경화증이란 명칭은 이러한 손상 부위의 특징으로부터 유래되었다. 탈수초화가 되면 신경 자극이 신경을 따라 전달되는 속도가 정상보다 느려지게 되면 상처가 회복되어 수초가 다시 형성된다고 할지라도 신경 말단의 반응 시간이 여전히 느리다.

[0004] 이 질환은 시간적으로는 재발이 반복되고 공간적으로는 병소들이 중추 신경계에 산재되는 특성이 있다. 따라서 증후 및 징후가 다양하게 나타난다. 다발성경화증에서 중추 신경계 침범의 특정 부위에 따라 시각 장애를 보일 수 있는 시신경 침범 증상과 복시, 안면 감각 장애, 현훈 등의 뇌간 침범 증상과 운동 실조증, 평형장애 등을 보이는 소뇌 침범 증상이 있다. 가장 흔한 증상은 감각 및 운동 마비인데 대부분에서 이는 척수 침범

증상이다. 감각계 증상으로는 무감각증 얼얼한 느낌, 화끈거림 등의 이상 감각이 올 수 있다. 턱을 가슴에 갖다 댈 때에 등 아래로 뻗치는 이상 감각이 이 질환에 특징적인데 이를 레르미테증상(Lhermitte's symptom) 이라고 한다. 운동 장애 증상으로는 편마비, 양측 하지 마비 및 사지 마비 등으로 올 수 있다.

[0005] 중추신경계는 신경세포(neuron)와 신경아교세포(neuroglia, 신경교세포)로 이루어져 있다. 신경아교세포는 전체 뇌세포의 90%, 부피로는 전체 뇌의 50%를 차지하고 있고, 상기 신경교세포는 다시 별아교세포(astrocytes, 성상세포), 미세아교세포(microglia, 소교세포) 및 희소돌기아교세포(oligodendrocytes, 펴지교세포)의 세 종류로 구성되어 있다. 이들 중에서 미세아교세포(microglia)는 중추신경계에 상재하는 면역세포로서(Stoll and Jander, Prog Neurobiol 58:233-247, 1999; Kim and de Vellis, J Neurosci Res 81:302-313, 2005) 전체 뇌세포의 5 ~ 10%를 차지한다. 상기 미세아교세포는 중추신경계에서 일차 방어라인으로서 기능한다. 자극을 받는 경우, 휴지기의 분지 형태 미세아교세포는 아메바 형태로 전환되어(Giulian et al., J Neurosci 15:7712-7726, 1995), 중추신경계 내의 면역 및 염증반응에 적극적으로 관여한다(Aloisi, Glia 36:165-179, 2001). 이러한 미세아교세포의 형태변화는 시험관내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*)에서 관찰된 적이 있으나(Perry and Gordon, Trends Neurosci 11:273-277, 1998; Suzumura et al., Brain Res 545:301-306, 1991; Raivich et al., Brain Res Rev 30:77-105, 1999), 이에 대한 정확한 기작은 아직까지 규명되어 있지 않다. 활성화된 미세아교세포는 손상된 신경조직 영역으로 이동하여 미생물 및 세포파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다(Gehrmann et al., Brain Res Rev 20:269-287, 1995).

[0006] 염증반응은 척수손상 후에 나타나는 이차적 손상의 주된 요인 중의 하나로서 급성, 만성 척수손상의 병리현상 조절에 중추적인 역할을 한다. 척수손상 후의 염증반응은 염증과 관련한 유전자 및 단백질의 발현이나 활성이 증가되어 발생하는데, 특히 종양괴사인자 알파(Tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-1베타(Interleukin-1 β , IL-1 β), 인터루킨-6 (IL-6) 등의 염증성 전 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)이나 사이클로옥시게나제(Cyclooxygenase 2; COX-2), 유도형 일산화질소 합성효소(Inducible nitric oxide synthase, iNOS) 및 프로스타글란딘 합성효소(Prostaglandin synthase-2) 등의 염증매개물질이 관여한다고 알려져 있다. 이러한 물질들은 손상 후에 유입된 혈액세포나 척수 내에 존재하는 미세아교세포에서 분비되어 세포독성을 나타내며 축삭퇴화나 탈수초화의 진행에도 영향을 미치게 된다. 또한 척수손상 후에 유입되는 혈액세포 중에서 특히 호중성 백혈구(neutrophil)나 큰포식세포(macrophage, 대식세포) 등이 염증반응을 유도하여 세포사멸 및 신경교성반흔(gliotic scar)의 형성에 관여하고, 주위 세포의 부가적인 활성화를 야기하여 연속적인 염증반응을 일으킨다고 알려져 있어 이들의 유입을 억제하는 것이 중요한 치료전략 중 하나로 평가되고 있다.

[0007] 또한 평소 중추신경계의 면역반응에 관여하는 미세아교세포는 척수손상 후에 과도하게 활성화되면 염증 유발물질을 생성/분비하여 세포독성을 야기하게 되는데, 특히 척수손상 후의 미세아교세포 활성화는 서행적으로 일어나는 신경세포와 희소돌기아교세포의 세포사멸에 관여한다고 알려져 있으며, 최근 척수손상 후에 미세아교세포에서 증가하는 p38 미토젠 활성화 단백질 키나제[p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)]의 활성화는 희소돌기아교세포의 세포사멸을 유도하는 신경성장 인자 전구물질(pro-nerve growth factor, pro-NGF)을 생성하고, 축삭퇴화과정에도 관여한다고 보고된 바 있다.

[0008] 말초 혈액은 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB)를 통해 수초(myelin, 미엘린) 항원에 대한 T 세포의 자가 반응을 일으키고 다발성 경화증 환자의 중추신경계에서 탈수초화를 유도한다. Naive T 세포는 이차 림프관에서 수지상세포(dendritic cells)와 같은 항원 제시 세포를 수축시킴으로써 활성화되고, 다른 사이토카인 프로파일 및 특정 이펙터(effector)의 기능에 따라 helper T (Th) 세포 서브세트(Th1, Th2, Th17, 또는 Treg)로 분화된다. Th1 세포는 IFN- γ (interferon- γ) 및 IL-12에 반응하여 T-bet을 정의하는 전사 인자를 발현하고, 세포 내 병원성에 대한 세포 매개 면역에 관여하는 사이토카인 IFN- γ , IL-2 및 TNF- α 를 생성한다. Th2 세포는 IL-4, IL-5 및 IL-13에 반응하여 분화하고, GATA-3를 발현하고, IL-4, IL-5 및 IL-13을 분비하고, 체액 면역을 매개한다. Th17 세포는 IL-1 β , IL-6, IL-23 및 TNF- α 에 반응하여 분화하고, IL-17A, IL-17F 및 IL-21을 분비하며, T 세포 매개자가 면역 질환에서 중요한 병원성 역할을 한다. Treg 세포(Regulatory T cell)는 흉선(thymus)에서 TGF- β (transforming growth factor beta)에 반응하여 유도되며, Foxp3 (Treg 세포의 중요한 전사 인자, forkhead box P3), 글루코 코르티코이드(glucocorticoid) 유도 TNF 수용체 관련 단백질, 세포 독성 T 세포 항원 4, CD62L 및 CD69를 발현하고, 말초 자기-관용 및 면역 항상성(immune homeostasis)의 유지에 중심적인 역할을 한다.

[0009] EAE(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis)는 수초 기본 단백질(myelin basic protein, 뇌의 백질 및 척수의 성분)에 대하여 동물을 자가 면역시킴으로써 유도되고 다발성경화증에서 관찰되는 유사한 임상증상과 병리증상, 즉 수초탈락(demyelination)과 마비(paralysis)를 발생시킨다. EAE 동

물모델에서 임상증상이 발현하는 원인이 사람의 다발성 경화증과 유사하기 때문에 다발성 경화증을 비롯한 신경계 자가 면역 질환 연구를 위하여 적합한 동물모델이다. Steinman 등은 다발성 경화증 환자의 뇌 병소에서 관찰되는 우세한 세포 유형이 $CD4^+ T^-$ 세포라는 것(Oksenberg et al., 1990, Nature 345:344-345), 그리고 이들 뇌 병소에서 세포와 연관된 T-세포 수용체(항원 인식을 주도하는 분자)가 EAE를 유발하는 원인이 되는 $CD4^+ T^-$ 세포 상에서 동일한, 항원 인식을 위한 3개의 아미노산 결합 모티프를 갖는다는 것(Oksenberg et al., 1993, Nature 362:68-70)을 증명하였다.

[0010] 다발성 경화증 환자는 여전히 항염증제(anti-inflammatory drugs; corticosteroids), 인터페론 및 인터페론-베타(interferon- β , IFN- β), 미토산트론(mitoxantrone), 나탈리주맙(natalizumab)과 같은 약물 섭취, 침술, 벌독침 등과 같은 대체 요법으로 재발을 막고 질병을 완화시킨다. 그러나, 이러한 요법은 장기간의 치료가 필요하고 인플루엔자(influenza) 유사 증후군과 같은 제한된 효과 및 부작용을 가진다. 따라서, 다발성 경화증의 진행을 지연시키거나 예방하기 위한 효율적이고 안전한 약물의 개발이 중요하다. 탈수초의 원인이 되는 메커니즘이 광범위하게 연구되고 있지만 아직 다발성 경화증의 완전한 병인 및 다발성 경화증에 대한 혁신적 약물이 개발된 바가 없다.

[0011]

[0012] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래의 다발성경화증 질환용 약제를 개발하기 위해 연구하던 중, 황련(*Coptidis rhizome*; *Coptis chinensis* FRANCH의 뿌리 줄기), 황금(*Rhei Rhizoma*; *Rheum officinale* BAILL의 뿌리 줄기), 및 대황(*Scutellariae Radix*; *Scutellaria baicalensis* GEORGI의 뿌리)의 혼합추출물이 면역적 신경 장애에서 유익한 효과를 나타내는 것을 확인하였고, MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein)로 유도한 EAE 마우스의 신경학적 증상 및 세포학적 측면을 관찰한 결과, 상기 혼합추출물이 신경계 자가면역질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은 황련, 황금 및 대황의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환의 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 신경계 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 혼합추출물은 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE) 동물모델에서 질병의 신경학적인 임상 증상의 정도와 체중의 감소를 개선할 뿐만 아니라 탈수초화를 억제하고 신경아교세포의 활성을 완화하였으며, 염증성 사이토카인 및 케모카인(TNF- α , IL-1 β , iNOS)의 mRNA를 억제하는 것을 확인하였으며, Th1 세포 반응을 억제하고 Treg 세포 반응을 증가시킴으로써 EAE를 지연시키거나 완하시킬 수 있음을 확인하였으므로 다발성 경화증을 포함한 신경계 자가면역질환의 발생을 예방하거나 발생 초기 증상의 치료법으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 EAE(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis)가 유도된 동물 모델에 본 발명의 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*)의 혼합추출물(CSR)의 투

여 일정을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 주요 구성 성분에 대한 정량적 HPLC (high-speed liquid chromatography) 분석을 나타낸 도이다.

도 3은 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)에서 임상 증상에 대한 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 효과를 확인한 도이다(Student's t-test; [#]p < 0.05 및 ^{##}p < 0.01 versus 허위대조군; *p < 0.05 및 **p < 0.01 versus EAE 실험군):

Sham: 허위대조군;

EAE + Saline: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 6 또는 12 mg/kg 투여군;

A 행동장애 정도 확인;

B 체중 변화 확인.

도 4는 본 발명의 혼합추출물(CSR)을 처리를 통한 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수 절편에서 탈수초화 및 면역세포 침윤 정도를 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군;

A; 룩솔 페스트 블루(Luxol fast blue, LFB) 및 H&E(Hematoxylin and eosin) 염색 결과, B; 탈수초화 정도, C; 염증 정도, D; 수초의 마커(MBP, myelin basic protein)의 mRNA 발현 정도, E; 희소돌기아교세포의 마커(PDGFR α , platelet-derived growth factor α receptor)의 mRNA 발현 정도(ANOVA test; [#]p < 0.05 및 ^{##}p < 0.01 versus 허위대조군; *p < 0.05 versus EAE 실험군).

도 5는 본 발명의 혼합추출물(CSR)을 처리를 통한 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수 내에 분포하는 미세아교세포(resident microglia) 및 말초성 큰포식세포(peripheral macrophages)의 이동/침윤을 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군;

A-D; 항-Iba-1 (anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1) 항혈청에 대한 면역 반응, E; Iba-1에 대한 면역반응의 정량화, F; 실시간 PCR (real time polymerase chain reaction) 분석을 통한 미세아교세포의 마커(CD11b)의 mRNA 발현 분석, G; 미세아교세포 및 큰포식세포의 분포에 대한 유세포 분석, H; 유세포 분석(G)의 정량화(CD11b⁺ 세포를 CD11b⁺/CD45^{+(low)} 세포 (R6; microglia) 및 CD11b⁺/CD45^{+(high)} 세포 (R7; macrophage) 집단으로 나누었으며 각 집단의 백분율을 그래프에 나타내었다.) Bars = 10 μ m. 정량화된 데이터는 평균 염증 점수, 유도 배수(fold induction) 또는 % 세포 $\pm$ SEM으로 나타내었다(ANOVA test; ^{##}p < 0.01 versus 허위대조군; *p < 0.05 및 **p < 0.01 versus EAE 실험군).

도 6은 본 발명의 혼합추출물(CSR)을 처리를 통한 EAE 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수 내에서 혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB)의 형성 유지(integrity)를 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군;

A-D; 항-GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein) 항혈청에 대한 면역 반응, E; GFAP에 대한 면역반응의 정량화, F; ICAM-1, G; VCAM-1, H; claudin-3, I; claudin-5, 및 J; ZO-1의 mRNA 발현량(실시간 PCR). Bars = 10 μ m. 정량화된 데이터는 평균 염증 점수, 유도 배수(fold induction) 또는 % 세포 $\pm$ SEM으로 나타내었다 (ANOVA test; $^{\#}p < 0.05$ 및 $^{##}p < 0.01$ versus 허위대조군; $^*p < 0.05$ 및 $^{**}p < 0.01$ versus EAE 실험군).

도 7은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리를 통한 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수에서 $CD4^{+}$ T 세포의 이동/침윤을 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군;

A; CD3의 mRNA 발현, B 및 C; $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$, D 및 E; $CD4^{+}/IFN-\gamma^{+}$ 및 $CD4^{+}/IL-17^{+}$, F 및 G; $CD4^{+}/Foxp3^{+}$ 및 $CD4^{+}/IL-4^{+}$ T 세포의 분포의 유세포 분석. 정량화된 데이터는 % 세포 $\pm$ SEM으로 나타내었다 (ANOVA test; $^{\#}p < 0.05$ 및 $^{##}p < 0.01$ versus 허위대조군; $^*p < 0.05$ 및 $^{**}p < 0.01$ versus EAE 실험군).

도 8은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리를 통한 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수에서 $CD4^{+}/IFN-\gamma^{+}$ 및 $CD4^{+}/Foxp3^{+}$ T 세포와 관련한 사이토카인의 발현을 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군.;

A; $IFN-\gamma$, B; IL-2, C; TGF- β 및 D; Foxp3의 mRNA 발현(실시간 PCR). 정량화된 데이터는 유도 배수(fold induction) $\pm$ SEM으로 나타내었다(ANOVA test; $^{\#}p < 0.05$ 및 $^{##}p < 0.01$ versus 허위대조군; $^*p < 0.05$ 및 $^{**}p < 0.01$ versus EAE 실험군).

도 9는 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리를 통한 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수에서 $CD4^{+}/IL-17^{+}$ 및 $CD4^{+}/IL-4^{+}$ T 세포와 관련한 사이토카인의 발현을 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군;

A; IL-17(Th17 세포에 의해 생산된 인터루킨), B; IL-23(Th17 세포에 의해 생산된 인터루킨), C; IL-4 (naive Th 세포에서 Th2 세포로의 분화를 유도하는 사이토카인), D; IL-5 (Th2 세포에 의해 생산된 인터루킨)의 mRNA 발현 확인.

도 10은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리를 통한 EAE가 유도된 동물 모델(onset treatment)의 허리 척수에서 염증 관련 인자의 발현을 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

CSR: 정상 마우스에 CSR 투여군;

A; RANTES(케모카인), B; MCP-1(케모카인), C; MIP-1 α (케모카인), D; TNF- α (사이토카인), E; IL-1 β (사이토카인) 및 F; iNOS의 mRNA 발현 정도 확인, G 및 H; p-IkBa의 단백질 발현 정도 확인, G 및 I; NF/kB (p65)의 단백질 발현 정도 확인(ANOVA test; ^{##} p < 0.01 versus 허위대조군; * p < 0.05 및 ** p < 0.01 versus EAE 실험군).

도 11은 EAE가 유도된 동물 모델의 임상 증상에 대한 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 전투여(pre-treatment) 및 후투여(post-treatment)의 효과를 확인한 도이다:

Sham: 허위대조군;

EAE + Saline: EAE 유도군;

EAE + CSR: EAE가 유도된 마우스에 CSR 12 mg/kg 투여군;

A; EAE의 행동학적인 장애에 대한 전투여(pre-treatment; EAE를 유도하기 1시간 전 부터 매일 1회)의 효과;

B; EAE의 체중변화에 대한 전투여의 효과;

C; EAE의 행동학적인 장애에 대한 후투여(post-treatment; EAE 유도 후 행동학적인 장애가 최고에 달하는 시점(17일)부터 매일 1회)의 효과;

D; EAE의 체중변화에 대한 후투여의 효과(Student' s t-test; [#] p < 0.05 및 ^{##} p < 0.01 versus 허위대조군; * p < 0.05 및 ** p < 0.01 versus EAE 실험군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명은 황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*) 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 황련, 황금 및 대황은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 황련, 황금 및 대황 추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하다

[0021] 1) 건조한 황련, 황금 및 대황을 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0022] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0023] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하는 단계.

[0024] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 70% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 용매의 양은 황련, 황금 및 대황의 건조 중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고 7 내지 10배로 하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 3시간이 바람직하고, 1시간 내지 2시간이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 1회 내지 5회인 것이 바람직하고 3회인 것이 더욱 바람직하다. 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 혼합추출물은 황련, 황금 및 대황을 혼합한 후 추출할 수 있고, 황련, 황금 및 대황을 각각 추출한 추출물을 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 혼합추출물은 황련, 황금 및 대황을 1:1:1의 중량비로 혼합될 수 있다.

[0026] 상기 조성물은 탈수초화(demyelination)를 억제시키고, Th1 세포 반응을 억제(down-regulation)하고 Treg 세포 반응을 증가(up-regulation)시키는 특징을 가진다.

[0027] 상기 자가면역성 질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨

병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 궤양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사구체신염, 쇼그렌증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 황련, 황금 및 대황의 혼합 열수 추출물(CSR)을 제조하기 위해 세 개의 건조 약제 황련, 황금 및 대황을 동일한 무게로 열수 추출하여 동결건조하였다. 또한, 본 발명의 혼합 추출물의 효과를 알아보기 위해 MOG 펩타이드(MOG₃₅₋₅₅; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 동물모델(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)을 제조하였다.

[0029] 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리가 EAE가 유발된 마우스의 임상증상을 완화시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 마우스의 체중 및 임상 증상(행동학적인 장애)의 척도를 구분하여 확인하였다. 그 결과, EAE가 유발된 모든 마우스는 14-16일에 임상 증상의 정점을 찍고 이후 유지되었고, EAE + CSR (6.0 및 12.0 mg/kg) 처리군에서 EAE 실험군에 비해 8-30일에서 상대적으로 낮았다(도 3의 A 및 표 1 참조). 또한, 평균 체중은 EAE 실험군에서 마우스의 임상 점수에 반비례하여 감소하였지만, EAE 실험군과 비교하여 EAE + CSR 처리군의 체중 감소 경향이 유의적으로 차단되는 것을 확인하였다(도 3의 B 참조).

[0030] 본 발명의 혼합추출물(CSR)이 신경세포의 사멸 및 탈수초 현상의 억제 효과를 가지는지를 확인하기 위하여 수초(myelin sheath; 미엘린)의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루 염색(Luxol fast blue, LFB) 및 H&E(Hematoxylin and eosin)염색을 시행하였다. 그 결과, 탈수초화의 수준은 EAE 실험군 마우스의 척추 백질에서 가장 높았고, 반면에 EAE + CSR 처리군에서는 EAE 실험군과 비교하여 유의적으로 낮았으며, 이는 염증 세포(파란색 점들)의 침윤 수준과 반비례하였다(도 4의 A 내지 C 참조). 또한, MBP 항체(수초 마커)를 이용한 면역염색에 따른 결과, MBP-면역반응은 EAE 실험군에서 유의하게 감소하였으나, EAE + CSR 처리군에서는 감소가 경감되었고, 실시간 PCR 분석에 의한 MBP 및 혈소판 유도 성장 인자 알파 수용체(PDGF α R, 희돌기교세포 마커)의 mRNA 발현 변화 또한 EAE 실험군에서는 감소되었으나 EAE + CSR 처리군에서는 감소가 억제되는 것을 확인하였다(도 4의 D 및 E).

[0031] 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리가 단핵 세포가 EAE 마우스의 척수로의 이동/침윤에 영향을 주는지를 확인하였다. 그 결과, EAE + CSR 처리군에서는 Iba-1-면역반응성 세포의 활성화가 유의적으로 억제되었다(도 5의 A 내지 E 참조). 또한, EAE + CSR 처리군에서는 증가된 CD11b의 mRNA 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(도 5의 F 참조).

[0032] 본 발명자들은 EAE 마우스의 척수 내 별아교세포 활성화 수준을 면역조직화학적 염색법으로 확인하였다. 그 결과, GFAP-면역반응성 별아교세포의 강도는 EAE 실험군 척수에서 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서 증가된 강도가 감소하였다(도 6의 A 내지 D 참조). 본 발명자들은 실시간 PCR 분석을 통해 이들의 발현에 대한 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 효과를 확인하였다. 그 결과, 내피세포 ICAM-1 및 VCAM-1의 mRNA 발현은 EAE 실험군의 척수에서 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서는 증가된 발현이 억제되었다(도 6의 F 및 G). 또한, claudin-3, claudin-5, 및 zona occludens-1(ZO-1)의 mRNA 발현이 EAE 실험군에서 감소된 반면, EAE + CSR 처리군에서 억제되었다(도 6의 H 내지 J 참조).

[0033] 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물(CSR)이 말초성 T 세포의 분화 및 EAE 마우스의 중추 신경계로의 이동/침윤을 조절할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, T 세포의 마커인 CD3의 mRNA 발현이 EAE 실험군 마우스에서 유의적으로 증가한 반면, EAE + CSR 처리군에서는 EAE 실험군과 비교하여 발현이 유의적으로 감소하였고(도 7의 A 참조), 이어서, 도움 T (Th; CD4⁺) 및 세포 독성 T (CD8⁺) 세포의 분포는 유세포 분석법에 의해 분석한 결과, CD4⁺ T 세포의 분포는 EAE 실험군의 척수에서 $7.4 \pm 0.5\%$ 로 증가한 반면, EAE 실험군과 비교하여 EAE + CSR 처리군에서 $4.4 \pm 0.7\%$ 로 유의적으로 감소하였다(도 7의 B 및 C 참조).

[0034] 본 발명자들은 척수 내 Th1 (CD4⁺/IFN- γ ⁺), Th2 (CD4⁺/IL-4⁺), Th17 (CD4⁺/IL-17⁺), 및 Treg (CD4⁺/Foxp3⁺) 세포의 분포를 연구하였다. 그 결과, CD4⁺/IFN- γ ⁺ T 세포의 분포는 EAE 실험군의 척수에서 $15.7 \pm 1.8\%$ 로 유의하게 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서 $2.7 \pm 0.7\%$ 로 유의적으로 감소되었으며(도 7의 D 및 E 참조), IL-2에 대한 mRNA의 발현 정도(유도배수;induction fold)는 각각 1.0 ± 0.0 , 31.5 ± 8.9 , 1.7 ± 0.4 , 및 $1.3 \pm$

0.3이었다(도 8의 B 참조). 또한, 억제(suppressor) T 세포로 알려진 $CD4^+/Foxp3^+$ T 세포의 분포는 EAE 실험군의 척수에서 $12.0 \pm 2.1\%$ 로 유의적으로 증가하였고 EAE + CSR 처리군에서 $17.9 \pm 3.1\%$ 로 더 증가하였다(도 7의 F 및 G 참조).

[0035] 본 발명자들은 EAE 유도 후 14-16일에 척수 내에서 대표적 염증성 매개인자의 mRNA 발현을 조사하였다. 그 결과, EAE 실험군의 척수에서 대표적인 케모카인[RANTES(CCL5), 단핵구 화학주성 단백질-1(MCP-1; 또는 CCL2), 및 큰포식세포 염증 단백질(MIP)-1 α], 사이토카인(TNF- α 및 IL-1 β), 및 유도성 산화 질소 합성효소(iNOS)의 mRNA 발현이 현저히 증가하였고, EAE + CSR 처리군에서 이러한 증가가 유의적으로 억제되었다(도 10의 A 내지 F 참조). 본 발명자들은 웨스턴 블롯 분석을 통해 EAE 유도 초기 단계(onset treatment)에서 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리가 NF- κ B 신호 전달 경로에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, AE 유도 초기 단계에 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리는 EAE 마우스의 척수 내 NF- κ B (p65) 및 p-I κ B α 의 발현의 증가를 유의적으로 차단하였다(도 10의 G 내지 I 참조).

[0036] 본 발명자들은 EAE의 임상 증상에 대한 예방 및 치료효과를 투여 시간대 별로 확인하고자 본 발명의 혼합추출물(CSR)을 EAE 유도 1시간 전 투여(pre-treatment)한 실험군 및 임상 증상이 최고조에 달하는 EAE 유도 17일 후 투여(post-treatment)로 실험군을 대상으로 임상 증상을 조사하였고 그 결과, CSR의 전투여의 경우 신경학적 장애의 발병을 지연시키고 EAE의 증상을 경감시켰으며, 체중 변화 또한 이와 상응하였다(도 11의 A 및 B 참조). 그러나, CSR의 후투여의 경우 EAE 마우스에서 신경 손상 및 체중 변화 수준에 현저한 긍정적 효과를 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 11의 C 및 D 참조).

[0037] 따라서, 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 발병 치료(onset-treatment)가 내재성 미세아교세포(resident microglia) 및 말초성 큰포식세포(peripheral macrophages)의 활성화/침윤을 억제하여 EAE의 임상 증상을 억제시키고, 별아교세포의 활성화 억제 및 뇌혈관 장벽(BBB)의 투과성의 감소와 연관된 접착제 및 접합 분자의 발현 감소 또는 증가를 통해 EAE 마우스에 대한 보호 효과를 나타내며, Th1 세포의 분화/이동/침윤을 억제하고 Tregs 세포를 증가시킴으로써 EAE의 임상 증상을 감소시키며, NF- κ B 신호 전달 경로의 활성화와 관련된, 케모카인/사이토카인 및 iNOS의 발현 억제를 통해 EAE의 임상 증상을 완하시킴으로, 본 발명의 혼합추출물(CSR)은 자가면역 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용할 수 있다.

[0038] 상기 본 발명의 혼합추출물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0039] 상기 본 발명의 혼합추출물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 본 발명의 혼합추출물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 황련, 황금 및 대황의 혼합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 혼합추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않

는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0042] 또한, 본 발명은 황련, 황금 및 대황 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0043] 상기 황련, 황금 및 대황은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 황련, 황금 및 대황 추출물은 하기와 같은 단계로 제조되는 것이 바람직하다.

[0044] 1) 건조한 황련, 황금 및 대황을 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0045] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0046] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하는 단계.

[0047] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 70% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 용매의 양은 황련, 황금 및 대황의 건조 중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고 7 내지 10배로 하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 방법은 열수추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출 시간은 30분 내지 3시간이 바람직하고, 1시간 내지 2시간이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 1회 내지 5회인 것이 바람직하고 3회인 것이 더욱 바람직하다. 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 동결건조하는 것이 바람직하다.

[0048] 상기 혼합추출물은 황련, 황금 및 대황을 혼합한 후 추출할 수 있고, 황련, 황금 및 대황을 각각 추출한 추출물을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 혼합추출물은 황련, 황금 및 대황을 1:1:1의 중량비로 혼합될 수 있다.

[0049] 상기 자가면역성 질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 췌양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사구체신염, 쇼그렌증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 본 발명에서는 황련과 황금 및 대황의 혼합추출물은 다발성경화증의 동물모델인 EAE에서 신경학적인 임상증상(행동)과 체중 감소를 개선하며, 척수의 탈수초화, 미세아교세포의 침윤 및 활성화, 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β)/케모카인(RANTES, MCP-1, MIP-1 α) 및 iNOS의 mRNA의 발현 그리고 NF- κ B의 신호기전을 억제하였다. 이러한 효과는 Treg 세포의 활성화를 통한 Th1 세포의 활성 억제와 관련이 있었다. 그러므로 상기 혼합추출물은 다발성경화증 발생을 예방하거나 치료할 수 있는 건강 기능 식품으로 활용될 수 있다.

[0051] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0052] 본 발명의 황련, 황금 및 대황으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 혼합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량 %로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 황련, 황금 및 대황으로 구성된 군

으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함한 혼합물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0054] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿2등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0055] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0056] 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

실시예 1

[0057] **황련(*Coptidis rhizome*), 황금(*Scutellariae Radix*) 및 대황(*Rhei Rhizoma*) 혼합추출물의 제조**

[0058] **<1-1> 황련, 황금 및 대황의 혼합 열수 추출물(CSR)의 제조**

[0059] 세 개의 건조 약제 황련, 황금 및 대황은 옴니허브(Omniherb)(대한민국, 대구)로부터 구입하였다. 상기 세 약제의 혼합 열수 추출물을 제조하기 위하여, 황련, 황금 및 대황을 동일한 무게로 열수 추출하여 동결건조하였다.

[0060] 구체적으로, 열수 추출을 하기 위해 황련, 황금 및 대황을 음건하고 세절하여 같은 무게 비율로 혼합하였다(각 33.3 g/ 총 100 g). 상기 혼합물은 환류 추출 시스템을 이용하여 1 L의 증류수에 90분간 넣었으며 90분간 비등시켰다. 수성 추출물을 20-25 μ m의 공극을 가지는 Whatman No. 4 필터 페이퍼를 통해 여과하고, EYELA N-1200A (EYELA, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 60 $^{\circ}$ C에서 진공 증발시켜 농축하였으며, 동결 건조시켜 사용시까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 수율은 18.3%였고, CSR로 명명하였다.

[0061] 동물에 대한 상기 추출물의 1일 투여량은 동물의 체중, 동물의 신진 대사율, 최종 추출 수율 및 인간에 대한 전통적 투여량을 고려하여 결정하였다.

[0062] **<1-2> 황련, 황금 및 대황의 혼합 에탄올 추출물의 제조**

[0063] 황련, 황금 및 대황의 혼합 에탄올 추출물을 제조하기 위하여, 황련, 황금 및 대황을 각각 6.0 g씩 에탄올 추출하여 동결건조하였다.

[0064] 구체적으로, 에탄올 추출을 하기 위해 황련, 황금 및 대황을 건조시켜 적당한 크기로 분쇄 후 95% 에탄올(주정) 5 L를 가하고 교반하면서 하루 동안 실온에서 추출한 후, 여과지를 사용하여 에탄올 가용부만을 회수하였다. 여과물은 동일한 방법으로 1회 더 반복 실시한 후 에탄올 가용부를 모아 감압 농축하여 에탄올 추출물을 수득하였다.

[0065] **<1-3> 황련, 황금 및 대황의 혼합 메탄올 추출물의 제조**

[0066] 황련, 황금 및 대황의 혼합 메탄올 추출물을 제조하기 위하여, 황련, 황금 및 대황을 각각 6.0 g씩 메탄올 추출하여 동결건조하였다.

[0067] 구체적으로, 메탄올 추출을 하기 위해 황련, 황금 및 대황을 건조시켜 적당한 크기로 분쇄 후 95% 메탄올 5 L를 가하고 교반하면서 하루 동안 실온에서 추출한 후, 여과지를 사용하여 메탄올 가용부만을 회수하였다. 여과물은 동일한 방법으로 1회 더 반복 실시한 후 메탄올 가용부를 모아 감압 농축하여 메탄올 추출물을 수득하였다.

실시예 2

[0068] **HPLC 정량 분석을 통한 황련, 황금 및 대황 혼합추출물의 동정**

[0069] 본 발명자들은 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 추출물을 동정하고자 HPLC(high-performance liquid chromatography)를 이용하였다.

[0070] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 추출물 1 g을 70% 메탄올 200 ml에 용해시키고 0.45 μ m PVDF(polyvinylidene difluoride) 필터를 통해 여과시켰다. 혼합추출물(CSR)의 정량 분석에 사용된 표준 물질은 황련의 베르베린(berberine), 대황의 센노시드(sennoside) A, 및 황금의 바이칼린(baicalin)이다. 표준 원액은 각각 50 ml의 메탄올에 각각의 샘플을 녹여 제조하였다. 상기 샘플은 25℃의 phenomenex luna C18 역상 C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)에서 분리하였다. 검출 과정은 베르베린의 경우 UV 203 nm, 센노시드 A의 경우 254 nm, 및 바이칼린의 경우 210 nm이다. 이동상은 유속 1.0 ml/분에서 (A) 아세토니트릴(acetonitrile)/물 (40/60, v/v) 및 (B) 아세토니트릴(acetonitrile)/물 (90/10, v/v)로 구성된다. 용매 농도 구배 용출 프로그램은 다음과 같다: A : B, 0 분 (100 : 0), 20 분 (75 : 25), 35 분 (25 : 75), 및 최종적으로 36 분 (0 : 100).

[0071] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 베르베린(황련), 센노시드 A(대황), 및 바이칼린(황금)의 피크는 각각 2.387 분, 1.807 분 및 6.967 분에 표준에 부합했다(도 2). 각 성분의 최종 농도는 각각 0.3 g/ml, 0.4 g/ml, 및 1.1 g/ml이었다.

실시예 3

[0072] **동물모델(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)의 제조**

[0073] 실험적 자가 면역성 뇌척수염(EAE)은 T 세포 매개성 자가면역성 질병으로써, 중추신경계에서 염증세포의 침윤과 수초탈락의 특성을 가지는 사람의 다발성경화증(multiple sclerosis, MS)의 동물모델이다.

[0074] 본 발명의 혼합추출물의 효과를 알아보기 위해 하기와 같은 방법으로 동물모델(실험적 자가 면역성 뇌척수염, experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)을 제조하였다.

[0075] 구체적으로, 암컷 성체 C57BL/6 마우스 (Narabiotec Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea; weight, 23-25 g; Seed mice were originated from Taconic Biosciences Inc., Cambridge, IN, USA)를 명암주기(light on 08:00 to 20:00)에서 23±2℃의 일정한 온도를 유지하였으며, 음식과 물을 자유롭게 섭취시켰다. 상기 동물들은 실험 1주일 전 실험환경에 적응시켰다. 행동학적인 검사를 하기 위하여, 도 3에 나타난 바와 같이 본 발명의 실시예 <1-1>에서 제조한 추출물(CSR)을 EAE 유도 후 질병이 나타나기 시작하는 시점(6~8일)부터 매일 1회씩 구강으로 투여하였다(onset treatment; 그룹당 n = 3-5):

[0076] Sham 군; 허위대조군 [용매 처리, s.c. + saline, p.o.],

[0077] EAE 군; 실험군 [MOG₃₅₋₅₅ 200 μ g, s.c. + saline, p.o.],

[0078] EAE + CSR 군; CSR 처리군 [MOG₃₅₋₅₅ 200 μ g, s.c. + CSR 6 또는 12 mg/kg, p.o.], 및

[0079] CSR; CSR 단독 처리군 [용매 처리, s.c. + CSR 12 mg/kg, p.o.].

[0080] EAE를 유도하기 위해, 상기 마우스의 뒷발에 200 μ g의 MOG₃₅₋₅₅ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 불완전한 Freund's adjuvant(Difco, Detroit, MI, USA), 및 550 μ g의 결핵균(myco bacterium tuberculosis) H37Ra (Difco)을 함유하는 100 μ l의 에멀전으로 피하 면역화 시켰다(Choi et al., 2015; Lee et al., 2016a; Lee et al., 2016b; Lee et al., 2016c). 마우스는 면역화 0일 및 면역화 후 2일에 250 ng의 백일해 독소(PTX; List Biologic, Campbell, CA, USA)를 복강 내 주사하였다. 허위대조군의 마우스는 MOG₃₅₋₅₅ 펩티드 또는 PTX 대신에 식염수로 단독 처리하였다. EAE의 임상 징후는 다음과 같이 매일 점수를 매겼다: 증상 없음(단계 0); 꼬리 긴장도의 부분적 상실(단계 1); 꼬리의 마비(단계 2); 한쪽 뒷다리의 약한 마비(paraparesis)(단계 3); 양쪽 뒷다리의 마비(paraplegia)(단계 4); 한쪽 앞 다리까지 마비(tetraparesis)(5 단계); 앞쪽 양쪽 다리까지 마비(tetraplegia)(6 단계); 죽음(death)(7 단계).

[0081] **<실험예 1> EAE에 대한 황련, 황금 및 대황 혼합추출물의 치료 효과 확인**

[0082] **<1-1> 신경학적인 증상 변화 확인**

[0083] 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리가 EAE가 유발된 마우스의 임상증상을 완화시킬 수 있는지 확인하기 위하여, EAE가 유도된 날부터 30일 동안 매일 마우스의 몸무게를 측정하였으며 임상 증상의 척도를 구분

하여 확인하였다.

[0084] 구체적으로, EAE 유도 후 질병이 나타나기 시작하는 시점(6~8일)부터 투여(onset treatment)하는 실험군을 대상으로 하였고, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 투여는 6 또는 12 mg/kg으로 하였다. 허위대조군, EAE 실험군, EAE + CSR 처리군, 및 CSR 단독 처리군 각각의 실험군의 신경학적인 임상증상 및 체중 변화를 비교하였다.

[0085] 그 결과, 도 3 및 표 1에 나타난 바와 같이 EAE가 유발된 모든 마우스는 EAE 유도 후 7.3 ± 0.2일부터 조기 임상 징후(0.5 단계, 꼬리의 긴장도의 부분적 상실)를 나타내었다. EAE 실험군의 평균 임상 점수는 면역화 후, 7-12일에서 서서히 증가하였고, 14-16일(4.0 ± 0.0)에 정점을 찍고 이후 유지되었다. 그러나 EAE + CSR (6.0 및 12.0 mg/kg) 처리군에서 평균 임상 점수는 EAE 실험군에 비해 면역 후 8-30일에서 상대적으로 낮았다(도 3의 A).

[0086] 또한, 평균 체중은 EAE 실험군에서 마우스의 임상 점수에 반비례하여 감소하였지만, EAE 실험군과 비교하여 EAE + CSR 처리군의 체중 감소 경향이 유의적으로 차단되는 것을 확인하였다(도 3의 B). 본 발명의 혼합추출물(CSR)만을 단독으로 처리한 경우, 정상 마우스의 임상 점수 및 체중 증가에는 영향을 미치지 않았다. 따라서, 본 발명의 혼합추출물(CSR)은 EAE의 발달 및 진행 모두 완하시킬 수 있다.

표 1

[0087]	실험군	Incidence (%)	발병 평균 일 수(± SEM)	임상 최대 점수(± SEM)	임상 점수 합계(± SEM)	사망(%)
EAE 유도 후 질병이 나타나기 시작하는 시점부터 투여 (onset-treatment)	허위대조군	3/3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0
	EAE 실험군	5/5	7.2 ± 0.2	4.0 ± 0.0 ^{##}	80.2 ± 0.8 ^{##}	0
	EAE + CSR 6 mg/kg 처리군	5/5	7.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2	57.6 ± 2.0 [*]	0
	EAE + CSR 12 mg/kg 처리군	5/5	7.6 ± 0.6	2.2 ± 0.2 [*]	35.2 ± 1.9 ^{**}	0
EAE 유도 7일 전 투여 (pre-treatment)	허위대조군	3/3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0
	EAE 실험군	6/6	7.8 ± 0.3	4.0 ± 0.0 ^{##}	73.3 ± 1.4 ^{##}	0
	EAE + CSR 12 mg/kg 처리군	6/6	10.8 ± 1.0	2.7 ± 0.2 [*]	40.8 ± 2.6 [*]	0
EAE 유도 후 임상증상이 최고에 달하는 시점부터 투여 (post-treatment)	허위대조군	3/3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0
	EAE 실험군	6/6	8.2 ± 0.5	3.5 ± 0.2 [#]	58.7 ± 3.2 ^{##}	0
	EAE + CSR 12 mg/kg 처리군	6/6	8.2 ± 0.5	3.5 ± 0.2	56.7 ± 2.2	0

[0088] <1-2> 탈수초화(demyelination) 및 면역세포의 침윤(infiltration) 억제 확인

[0089] 척수의 탈수초는 다발성 경화증(Multiple sclerosis) 환자의 전형적인 조직 병리학적 특징이기 때문에, 본 발명자들은 EAE의 임상 점수와 탈수초의 수준 사이의 상관관계를 확인하였다(Axisa and Hafler, 2016; Frohman et al., 2006). 본 발명의 혼합추출물(CSR)이 신경세포의 사멸 및 탈수초 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여 미엘린 수초(myelin sheath)의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루 염색(Luxol fast blue, LFB) 및 H&E(Hematoxylin and eosin)염색을 시행하였다.

[0090] 구체적으로, EAE 유도 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 17일 사이에 생쥐를 마취시키고, 4 % 파라 포름 알데히드 (PFA)액을 심장으로 관류하여 고정하고 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였고 적출한 척수는 4% PFA에 담가 4℃에서 하루 정도 고정시킨 다음 30% 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결 절편을 제작하여 10-μm 두께로 절단하였다(Choi et al., 2015; Lee et al., 2016a; Lee et al., 2016b, Lee et al., 2016c). 상기 절편은 탈수초 및 면역 세포 침윤을 각각 평가하기 위해 luxol fast blue (LFB) 및 H&E(Hematoxylin and eosin)로 염색되었다. 상기 절편은 탈수되고 커버슬립(cover slipped)되었다(Choi et al., 2015; Lee et al., 2016a; Lee et al., 2016b; Lee et al., 2016c). LFB 염색 후 탈수초의 수준을 평가하였다(Fissolo et al., 2012):

- [0091] 0, 탈수초화 없음
- [0092] 1, 주변 침윤 및 백질의 25 % 미만을 수반하는 약간의 탈수초화
- [0093] 2, 백질의 50 % 미만을 수반하는 탈수초화
- [0094] 3, 백질의 50 % 이상을 수반하는 확산과 광범위한 탈수초화.
- [0095] H&E 염색 후 면역 세포의 이동(recruitment) 및 침윤(infiltration) 정도는 다음 기준에 따라 점수를 매겼다 (Fissolo et al., 2012):
- [0096] 0, 병변 없음
- [0097] 1, 뇌척수(meninges)에서만 세포 이동/침윤
- [0098] 2, 실질(parenchyma)에서 매우 이산(discrete)되고 표재성 침윤(superficial infiltrates)
- [0099] 3, 백질에 중간 정도의 침윤 (25 % 미만)
- [0100] 4, 백질에 심각한 침윤 (50 % 미만)
- [0101] 5, 백질에 더 심각한 침윤 (50 % 이상)
- [0102] 본 발명자들은 도 3에 나타난 바와 같이 본 발명의 혼합추출물(CSR)을 6.0 mg/kg 보다 12.0 mg/kg를 처리하였을 때 EAE 증상을 억제하는데 더욱 효과적이었기 때문에 이후 실험은 12.0 mg/kg으로 처리하였다. 면역화 후 임상 점수가 피크인, 14-16일에 요추 척수 절편을 루솔 페스트 블루 염료로 염색, 헤마톡실린(hematoxyline)으로 대비염색한 후, 정량화하였다.
- [0103] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 탈수초화의 수준(열은 부분)은 EAE 실험군 마우스의 척추 백질에서 가장 높았고, 반면에 EAE + CSR 처리군에서는 EAE 실험군과 비교하여 유의적으로 낮았으며, 이는 염증 세포(파란색 점들)의 침윤 수준과 반비례하였다(도 4의 A 내지 C 참조).
- [0104] 또한, MBP 항체(수초 마커)를 이용한 면역 염색에 따른 결과, MBP-면역반응은 EAE 실험군에서 유의하게 감소하였으나, EAE + CSR 처리군에서는 감소가 경감되었고, 실시간 PCR 분석에 의한 혈소판 유도 성장 인자(PDGF α R, 회돌기교세포 마커)에 대한 MBP 및 알파 수용체의 mRNA 발현 변화 또한 EAE 실험군에서는 감소되었으나 EAE + CSR 처리군에서는 감소가 억제되는 것을 확인하였다(도 4의 D 및 E). CSR 자체는 탈수초화 또는 수초 분자의 변화를 유도하지 않았다.
- [0105] <1-3> 척수 내 골수 세포의 이동(recruitment) 및 침윤(infiltration) 억제 효과 확인
- [0106] 다발성 경화증 환자 및 EAE 모델에서 단핵구 세포(내재성 미세아교세포 및 말초성 큰포식세포)가 탈수초성 병변(demyelinated lesions)으로 이동/침윤(recruited/infiltrated)되기 때문에(Hoglund and Maghazachi, 2014; Rawji and Yong, 2013), 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 처리가 단핵 세포가 EAE 마우스의 척수로의 이동/침윤에 영향을 주는지 확인하였다.
- [0107] 구체적으로, EAE 유도 후 임상 증상이 피크 단계(14-16일)에서, 척수 절편은 1차 면역혈청(antiserum)으로 토끼 항-이온화 칼슘 결합 어댑터 분자-1 (Iba-1; ionized calcium-binding adapter molecule 1) (1:2,000; WAKO, Osaka, Japan) 또는 토끼 항-아교 섬유 산성 단백질(GFAP; Glial fibrillary acidic protein) (1:2,000; DACO, USA), 2차 면역혈청으로 바이오틴화 토끼 IgG 항체(1:200; Vector Laboratories, USA), 그리고 아비딘-바이오 틴화 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)-복합체 (1:200; Vector Laboratories), 및 3,3'-diamino-benzidine를 이용하여 면역염색을 하였다.
- [0108] 또한, mRNA 발현 확인을 위해 EAE 유도 후 임상 증상이 피크 단계(14-16일)에서, 허리부위의 척수를 적출한 총 RNA를 TRIsure 시약을 이용하여 공지된 메뉴얼에 따라 추출하였다(Bioline, UK). cDNA를 합성하기 위해 0.5 μ g의 Oligo dT, 0.5 mM dNTP mix, 5x first-strand buffer, RNase out, 5 mM dithiothreitol (DTT), 및 M-MLV 역전사효소를 포함하는 반응 혼합물(reaction mixture) 중에서 1 μ g의 총 RNA를 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. RT-PCR 분석은 제조사의 메뉴얼에 따라 수행되었다(RT-PCR kit; Roche, Germany). PCR 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다. PCR 증폭을 위해, 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍은 6 μ l of PCR Master Mix (Lucigen, WI, USA) 중에서 1 μ l의 cDNA 및 0.6 U의 Econo TaqDNA 중합효소를 반응시켰다. 결과물의 5-7 μ l를 2% 아가로스 겔에서 전기영동하고 트랜스일루미네이터에서 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색한 후

확인하였다. 각 유전자의 발현 수준은 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)으로 표준화 하였다.

표 2

[0109]

프라이머	Forward 서열 (5'→3')	서열 번호	Reverse 서열 (5'→3')	서열 번호
CD11b	TGC TTA CCT GGG TTA TGC TTC TG	1	CCG AGG TGC TCC TAA AAC CA	2
CD3	CTC TGG GCT TGC TGA TGG	3	GGT TGG GAA CAG GTG GTG	4
Claudin-3	CTG GGA GGG CCT GTG GAT GAA CT	5	TCG CGG CGC AGA ATA GAG GAT	6
Claudin-5	ACG GGA GGA GCG CTT TAC	7	GTT GGC GAA CCA GCA GAG	8
Foxp3	GGC CCT TCT CCA GGA CAG A	9	GCT GAT CAT GGC TGG GTT GT	10
GAPDH	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	11	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T	12
ICAM-1	TGC GTT TTG GAG CTA GCG GAC CA	13	CGA GGA CCA TAC AGC ACG TGC AG	14
IFN- γ	ACA ATG AAC GCT ACA CAC TGC AT	15	TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA	16
IL-1 β	TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT	17	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT	18
IL-2	GCC CAA GAA GGC CAC AGA	19	GCA CTT CCT CCA GAG GTT TGA G	20
IL-4	CGA AGA ACA CCA CAG AGA GTG AGC T	21	GAC TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G	22
IL-5	GAG TCA TGA GAA GGA TGC TT	23	ACA GTT TTG TGG GGT TTT TG	24
IL-17	GTG TCT CTG ATG CTG TTG	25	AAC GGT TGA GGT AGT CTG	26
IL-23	TGG CAT CGA GAA ACT GTG AGA	27	TCA GTT ATT GGT AGTCCT GTT	28
iNOS	GGC AAA CCC AAG GTC TAG GTT	29	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT	30
MBP	CTA TAA ATC GGC TCA CAA GG	31	AGG CGG TTA TAT TAA GAA GC	32
MCP-1	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A	33	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	34
MIP-1 α	CAG CCA GGT GTC ATT TTC CT	35	AGG CAT TCA GTT CCA GGT CA	36
PDGF α R	GCC AGG AGA CGA GGT ATC AA	37	TGT TCC CAA TGC CAA GGT C	38
RANTES	ACA CCA CTC CCT GCT GCT TT	39	GAC TGC AAG ATT GGA GCA CTT G	40
TGF- β	GCC CTG GAT ACC AAC TAT TGC	41	GCA GGA GCG CAC AAT CAT GTT	42
TNF- α	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	43	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T	44
VCAM-1	CCT CAC TTG CAG CAC TAC GGG CT	45	TTT TCC AAT ATC CTC AAT GAC GGG	46
ZO-1	AAG GCA ATT CCG TAT CGT TG	47	CCA CAG CTG AAG GAC TCA CA	48

[0110]

또한, 실시간(Real-time) PCR의 경우 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용하여 수행하였으며, Fold-induction은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 계산되었다. PCR 증폭은 적어도 세 번 수행하였다.

[0111]

또한, 유세포 분석(flow cytometry assay)을 위해 EAE 유도 후 임상 증상이 피크 단계(14-16일)에서 각 그룹의 6마리의 마우스를 마취시키고 척수의 요추 절편을 해부한 후 해리시켰다. 구체적으로, 전체 조직으로부터 정제된 단일 세포 현탁액을 제조한 후(300g에서 5 분간 원심 분리) 2% PFA로 고정시키고, 세포를 2 % FBS를 함유하는 PBS로 세척하고, 마우스 항-마우스 CD32 (BD Bioscience)로 10분간 처리하여 Fc 수용체를 차단하고 2 % FBS 세척 완충액으로 2 회 세척하였다. 형광 표식을 이용한 면역 마커의 세포 표면 염색을 위해 세포를 APC 항-마우스 CD4 (RM4-5, BD Biosciences), PE 항-마우스 CD8a (53-6.7, BD Biosciences), APC 항-마우스/인간 CD11b (M1/70; Biolegend), 및 PE 항-마우스 CD45 (30-F11; BD Biosciences)과 함께 30분간 4°C에서 반응시켰다. 염색되지 않은 세포를 음성대조군으로 사용하였다. 세포 내 세포 염색을 위해, 세포는 PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate, Sigma), ionomycin (Sigma), 및 Golgistop (protein transport inhibitor, BD Biosciences)으로 5시간 동안 재자극(restimulated)시켰다. 자극 후, 세포는 PerC3 anti-mouse CD4 (RM4-5, BD Biosciences), FITC anti-mouse IFN- γ (BD Biosciences), PE anti-mouse IL-17A (TC11-18H10, BD Biosciences), PE anti-mouse IL-4 (11B11; Biolegend), APC anti-mouse/rat forkhead box P3 (Foxp3) (FJK-16s; eBioscience)으로 4°C에서 30분간 형광염색하였다. 염색된 세포는 2% FBS 위상 버퍼로 2회 세척하여 유세포 분석을 위해 사용하였다. 데이터는 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences)로 수집하였고 CellQuest Pro software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. CD4⁺ T 세포는 Th1, Th2, Th17, and Treg 세포 분포를 분석하기 위해 사용되었다. 동시 분석을 위한 한 세포의 세 컬러의 염색 및 세포 내 사이토카인의 결과는 CD4⁺ 세포 분포 내 백분율로 나타내었다.

[0112]

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 미세아교세포(microglia)/큰포식세포(macrophage) 계열 세포의 마커인 Iba-

1-면역반응성 세포는 EAE 실험군의 척수에서 짧고 두꺼운, 확대된 세포체의 활성화 형태를 나타내었지만, EAE + CSR 처리군에서는 세포의 활성화가 유의적으로 억제되었다(도 5의 A 내지 E). 또한, CD11b의 mRNA 발현이 허위 대조군과 비교하여 EAE 실험군에서 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서는 증가된 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(도 5의 F). CSR 자체는 허위대조군과 비교하여 Iba-1-면역반응성 세포의 활성화 및 CD11b의 mRNA 발현을 유도하지 않았다.

[0113] 여기서, Iba-1-면역반응성은 내재성 미세아교세포(resident microglia) 및 말초성 큰포식세포(peripheral macrophages) 모두에서 나타내기 때문에, 상기 두 세포의 집단은 유세포 분석법에 의해 구분되었다.

[0114] 미세아교세포의 분포를 나타내는 $CD11b^+/CD45^{+(low)}$ 세포 및 큰포식세포를 나타내는 $CD11b^+/CD45^{+(high)}$ 세포의 분포는 허위 대조군($0.1 \pm 0.0\%$ 및 $0.1 \pm 0.0\%$, 각각)과 비교하여 각각 $4.0 \pm 0.0\%$ 및 $3.1 \pm 0.3\%$ 로 EAE 실험군의 척수에서 증가하였고, 반면에 EAE 실험군과 비교하여 EAE + CSR 처리군에서 증가된 분포가 각각 $1.9 \pm 0.3\%$ 및 $1.0 \pm 0.2\%$ 로 억제되는 것을 확인하였다(도 5의 G 및 H).

[0115] 이러한 결과는 CSR로 발병 치료(onset-treatment)가 내재성 미세아교세포(resident microglia) 및 말초성 큰포식세포(peripheral macrophages)의 활성화/침윤을 억제하여 EAE의 임상 증상을 억제시키는 것을 나타낸다.

[0116] <1-4> 척수 내 뇌혈관 장벽 유지 효과 확인

[0117] 자가면역성 뇌질환의 진행은 혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB)을 통과해서 중추신경계에 침윤하는 단핵구 유래 큰포식세포와 $CD4^+$ T 세포의 염증세포의 침윤에 의해 악화되며, 활성화된 큰포식세포의 수초의 탐식으로 인해 중추신경계의 탈수초화가 진행되는 것으로 알려져 있다. EAE 질병 과정동안 활성화된 큰포식세포는 TNF- α , IL-1, nitric oxide 등의 염증성 매개인자의 분비에 의해 중추신경계의 탈수초화를 유도해 EAE 질병의 악화에 밀접한 영향을 미치게 된다.

[0118] 별아교세포(astrocytes)는 혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB)의 형성 및 유지를 위해 필수적이기 때문에 (Willis, 2010), 본 발명자들은 EAE 마우스의 척수 내 별아교세포의 활성화 수준을 면역조직화학법으로 확인하였다.

[0119] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 GFAP-면역반응성 별아교세포의 강도는 EAE 실험군 척수에서 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서 증가된 강도가 감소하였다(도 6의 A 내지 E).

[0120] 뇌혈관 장벽의 투과성은 접착(adhesive) 및 결합 분자(junctional molecules)의 변화에 의해 매개되기 때문에, 본 발명자들은 실시간 PCR 분석을 통해 이들의 발현에 대한 본 발명의 혼합추출물(CSR)의 효과를 확인하였다.

[0121] 그 결과, 내피세포 ICAM-1 및 VCAM-1의 mRNA 발현은 EAE 실험군의 척수에서 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서는 발현이 억제되는 것을 나타내었다(도 6의 F 및 G). 또한, claudin-3, claudin-5, 및 zona occludens-1(ZO-1)의 mRNA 발현이 EAE 실험군에서 감소된 반면, EAE + CSR 처리군에서 발현의 감소가 억제되었다(도 6의 H 내지 J).

[0122] 상기 결과는 본 발명의 혼합추출물 CSR의 발병 치료(onset-treatment)가 별아교세포의 활성화 억제를 통해, 및 뇌혈관 장벽(BBB)의 투과성의 감소와 연관된 연결인자 및 부착분자의 발현을 감소 또는 증가를 통해 EAE 마우스에 대한 보호 효과에 기여할 수 있음을 나타낸다.

[0123] <1-5> 척수 내 $CD4^+$ T 세포의 침윤 억제 효과 확인

[0124] 자가 반응성 T 세포가 말초로부터 뇌혈관 장벽(BBB)를 통해 중추 신경계(central nervous system; CNS)의 병변으로 이동/침윤하기 때문에(Hohlfeld, 1997), 본 발명자들은 본 발명의 혼합추출물 CSR이 EAE 마우스의 말초에서 T 세포의 분화 및 중추 신경계로의 이동/침윤을 조절할 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0125] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 T 세포의 마커인 CD3의 mRNA 발현이 허위대조군과 비교하여 EAE 실험군 마우스에서 유의적으로 증가한 반면, EAE + CSR 처리군에서는 EAE 실험군과 비교하여 발현이 유의적으로 낮은 것을 확인하였고(도 7의 A), 이는 상기에서 확인한 임상 점수 및 척수 탈수초의 수준과 일치하였다.

[0126] 이어서, 헬퍼 T (Th ; $CD4^+$) 및 세포 독성 T ($CD8^+$) 세포의 분포는 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

[0127] 그 결과, $CD4^+$ T 세포의 분포는 허위대조군($0.2 \pm 0.0\%$)과 비교하여 EAE 실험군의 척수에서 $7.4 \pm 0.5\%$ 로 증가한 반면, EAE 실험군과 비교하여 EAE + CSR 처리군에서 $4.4 \pm 0.7\%$ 로 유의적으로 분포가 감소하였다(도 7의

B 및 C). 그러나, $CD8^+$ T 세포의 분포는 면역화 또는 CSR의 발병 치료에 의해 유의적인 영향을 받지 않았다.

[0128] $CD4^+$ T 세포의 불균형이 EAE 모델 및 다발성 경화증 환자에서 발견되었기에(Dendrou et al., 2015; Dittel, 2008; Hoglund and Maghazachi, 2014), 본 발명자들은 척수 내 Th1 ($CD4^+/IFN-\gamma^+$), Th2 ($CD4^+/IL-4^+$), Th17 ($CD4^+/IL-17^+$), 및 Treg ($CD4^+/Foxp3^+$) 세포의 분포를 연구하였다.

[0129] 그 결과, $CD4^+/IFN-\gamma^+$ T 세포의 분포는 허위대조군($1.2 \pm 0.0\%$)과 비교하여 EAE 실험군의 척수에서 $15.7 \pm 1.8\%$ 로 유의하게 증가된 반면, EAE + CSR 처리군에서 분포가 $2.7 \pm 0.7\%$ 로 유의적으로 감소되었으며(도 7의 D 및 E), 이는 척수 내 IFN- γ 및 IL-2 (Th1 세포에 의해 생산된 인터루킨)의 mRNA 발현 레벨의 변화와 상응하는 결과를 나타내었다. 즉, 허위대조군, EAE 실험군, EAE + CSR 처리군 및 CSR 단독 처리군에서 IFN- γ 의 유도 정도(fold inductions)는 각각 1.0 ± 0.0 , 39.2 ± 4.0 , 3.4 ± 1.9 , 및 1.0 ± 0.1 로 나타났다(도 8의 A). 그리고 IL-2에 대한 유도 정도는 각각 1.0 ± 0.0 , 31.5 ± 8.9 , 1.7 ± 0.4 , 및 1.3 ± 0.3 이었다(도 8의 B).

[0130] 또한, 억제(suppressor) T 세포로 알려졌던 $CD4^+/Foxp3^+$ T 세포의 분포는 허위대조군($4.5 \pm 1.3\%$)과 비교하여 EAE 실험군의 척수에서 $12.0 \pm 2.1\%$ 로 유의적으로 증가하였고 EAE + CSR 처리군에서 $17.9 \pm 3.1\%$ 로 증가가 더욱 명백하였으며(도 7의 F 및 G), 이는 TGF- β (Treg 세포의 유도자) 및 Foxp3(Tregs의 분화 및 기능에 대한 중요한 전사 인자)의 mRNA 발현의 변화와 상응하였다(도 8의 C 및 D).

[0131] 그러나, 도 9에 나타난 바와 같이 $CD4^+/IL-17^+$ 및 $CD4^+/IL-4^+$ T 세포의 분포는 EAE 실험군 또는 발병후 CSR를 처리(onset-treatment)한 실험군 마우스의 척수에서 척수 내 IL-17(Th17 세포에 의해 생산된 인터루킨), IL-23(Th17 세포에 의해 생산된 인터루킨), IL-4 (naive Th 세포에서 Th2 세포로의 분화를 유도하는 사이토카인), 및 IL-5 (Th2 세포에 의해 생산된 인터루킨)의 변하지 않는 mRNA 발현과 병행하여 유의적인 변화는 없었다(도 9).

[0132] 이러한 결과는 본 발명의 혼합추출물 CSR의 발병 치료가 Th1 세포의 분화/이동/침윤을 억제하고 Tregs 세포를 증가시킴으로써 EAE의 임상 증상을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[0133] <1-6> 척수 내 염증 매개체의 발현 억제 효과 확인

[0134] 사이토카인 및 케모카인과 같은 염증 매개체는 다발성 경화증 환자 및 EAE의 진행 과정 중 미세아교세포/큰포식 세포 및 T 세포의 활성화 또는 이동에 의한 면역 반응에서 중요한 역할을 한다(Imitola et al., 2005; Petermann and Korn, 2011; Szczucinski and Losy, 2007). 따라서, 본 발명자들은 EAE 유도 후 14-16일에 척수 내 대표적 염증성 매개인자의 mRNA 발현을 조사하였다.

[0135] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 허위대조군 및 CSR 단독 투여군의 척수에서 대표적인 케모카인 [RANTES(CCL5), 단백질 합성 억제 단백질-1(MCP-1; 또는 CCL2), 및 큰포식세포 염증 단백질(MIP)-1 α], 사이토카인(TNF- α 및 IL-1 β), 및 유도성 산화 질소 합성효소(iNOS)의 mRNA 발현이 거의 나타나지 않은 반면, EAE 실험군에서 상기 발현이 현저히 증가하였고, EAE + CSR 처리군에서 이러한 증가가 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 10의 A 내지 F).

[0136] NF- κ B 신호 전달 경로는 다발성 경화증 및 EAE 중 염증 반응을 활성화시키기 때문에(Pahan and Schmid, 2000)), 본 발명자들은 웨스턴 블롯 분석을 통해 발병 후(onset treatment) 본 발명의 혼합추출물 CSR의 처리가 NF- κ B 신호 전달 경로에 미치는 영향을 조사하였다.

[0137] 그 결과, 발병 후 본 발명의 혼합추출물 CSR의 처리는 EAE 마우스의 척수 내 NF- κ B (p65) 및 p-I κ B α 의 발현의 증가를 유의적으로 차단하였다(도 10의 G 내지 I).

[0138] 상기 결과는 본 발명의 혼합추출물 CSR의 발병 치료(onset treatment)는 NF- κ B 신호 전달 경로의 활성화와 관련된, 케모카인/사이토카인 및 iNOS의 발현 억제를 통해 EAE의 임상 증상을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

[0139] <실험예 2> EAE에 대한 황련, 황금 및 대황 혼합추출물의 예방 및 치료 효과 확인

[0140] 상기 <실험예 1>의 결과로부터 CSR의 치료 효과를 입증하였고, 임상 증상의 발병 단계에서 세포 메커니즘을 확인하였다. 본 발명자들은 EAE의 임상 증상에 대한 예방 및 치료효과를 투여 시간대 별로 확인하고자 본 발명의 실시예 <1-1>에서 제조한 추출물(CSR)을 EAE 유도 1시간 전 투여(pre-treatment)한 실험군 및 임상 증상이 최고

조에 달하는 EAE 유도 17일 후 투여(post-treatment)로 실험군을 대상으로 임상 증상을 조사하였다.

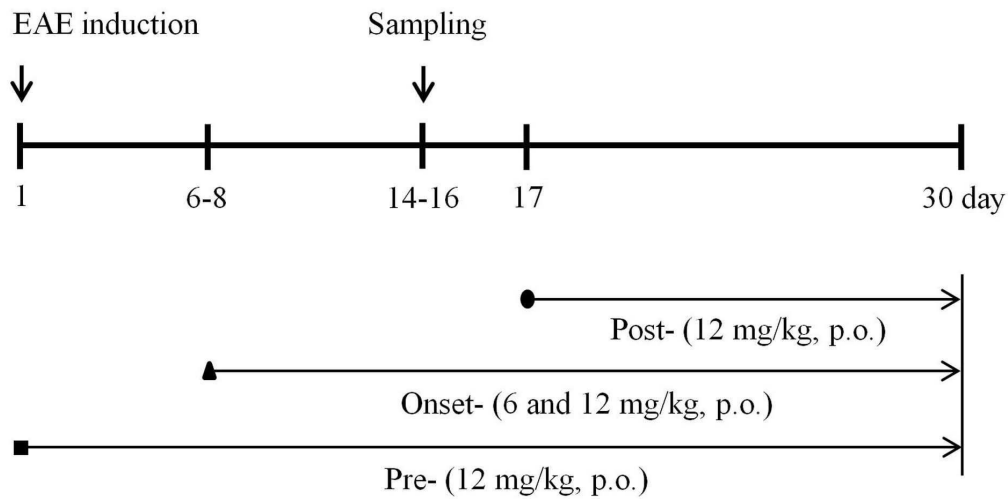
[0141] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 CSR의 전투여의 경우 신경학적 장애의 발병을 지연시키고 EAE의 증상을 경감시켰으며, 체중 변화 또한 이와 상응하였다(도 11의 A 및 B). 그러나, CSR의 후투여의 경우 EAE 마우스에서 신경 손상 및 체중 변화 수준에 현저한 긍정적 효과를 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 11의 C 및 D).

[0142] 종합하면, 상기 결과는 본 발명의 혼합추출물 CSR가 EAE 임상 증상의 초기 단계에서 예방적 및 치료적 효과를 가지지만, 임상 증상의 후기 단계에서는 치료적 효과를 가지지 않음을 나타낸다.

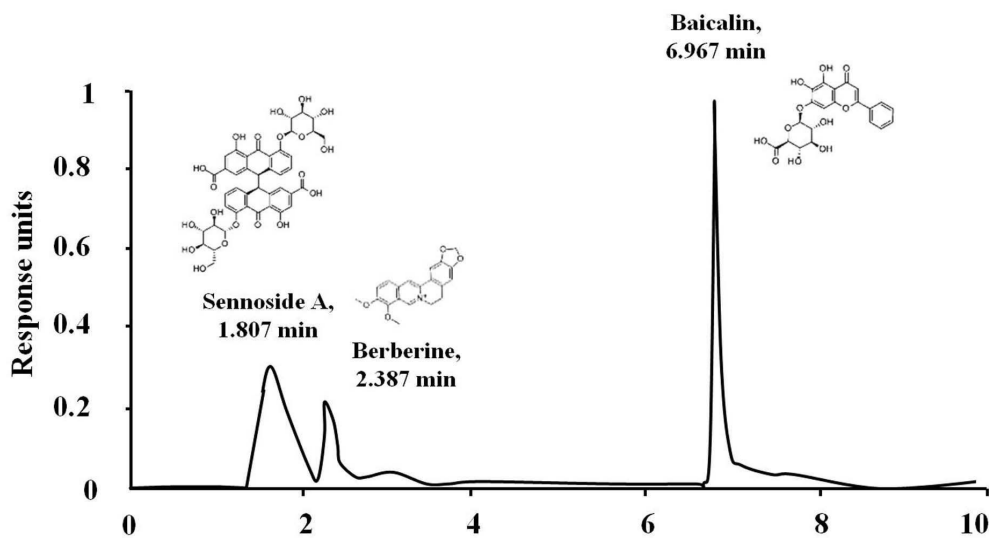
[0143] 상기 모든 데이터의 통계 분석은 SPSS 21.0 package (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하여 수행하였고, 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 신경학적 점수, 조직학적 점수 및 면역학적 검정의 합은 여러 그룹의 비교를 위해 one-way ANOVA with Tukey post hoc test를 이용하였다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

도면

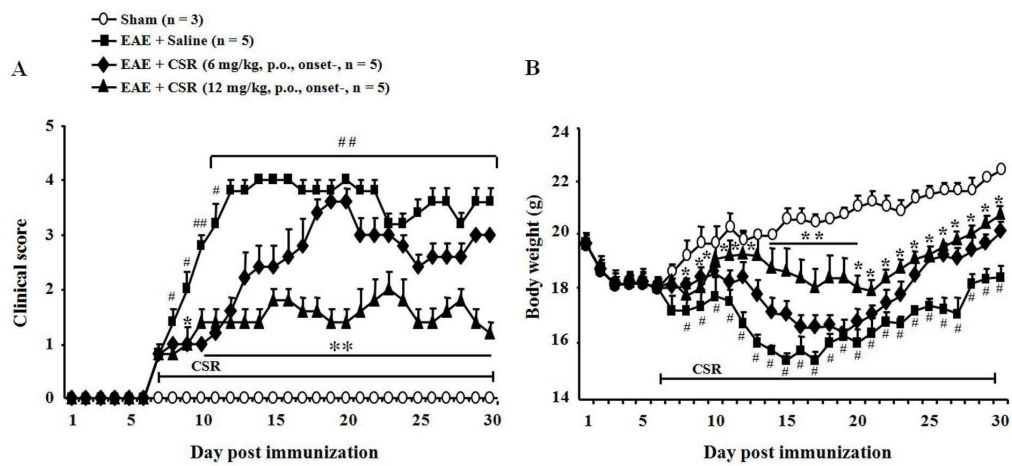
도면1



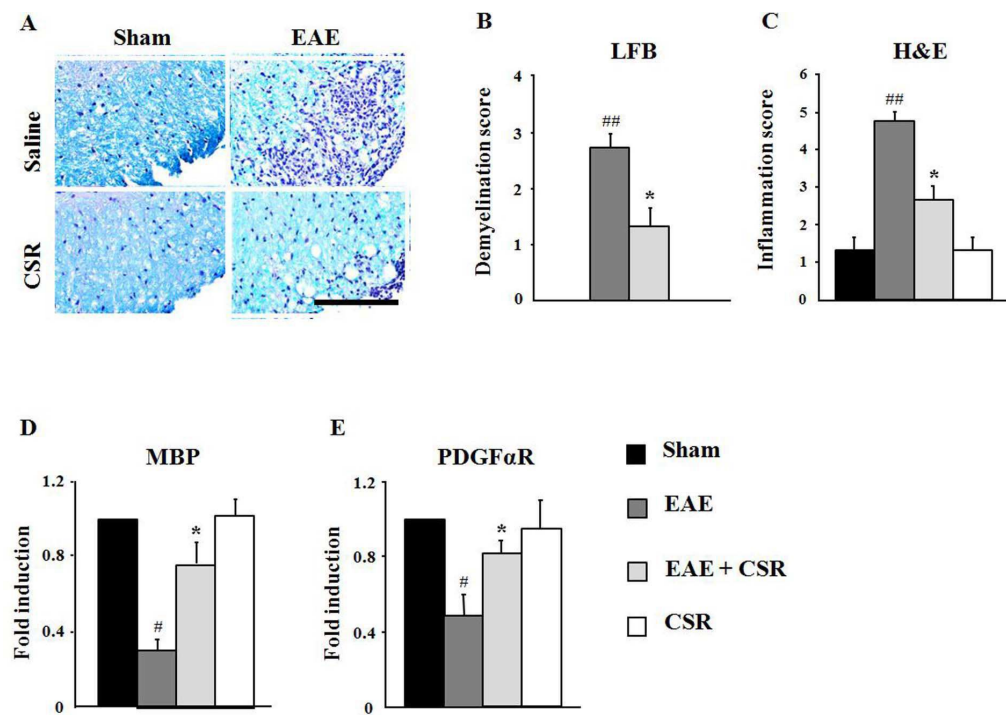
도면2



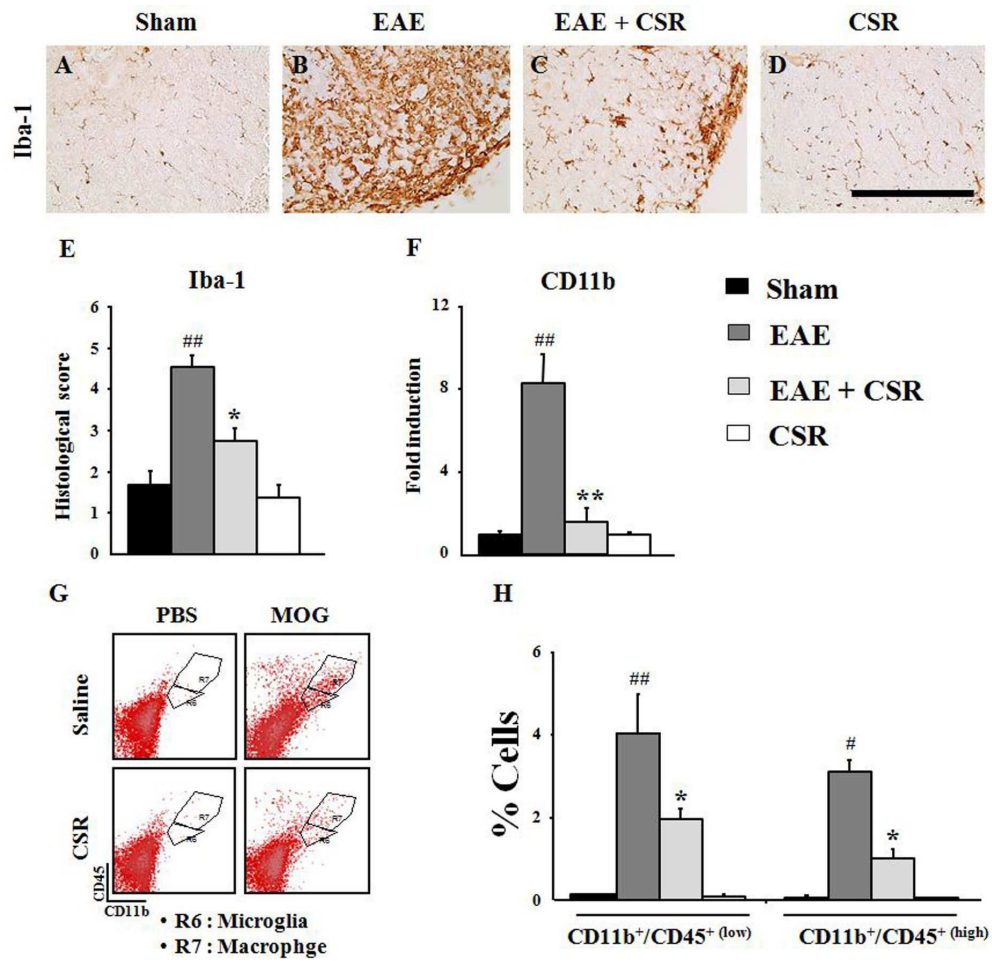
도면3



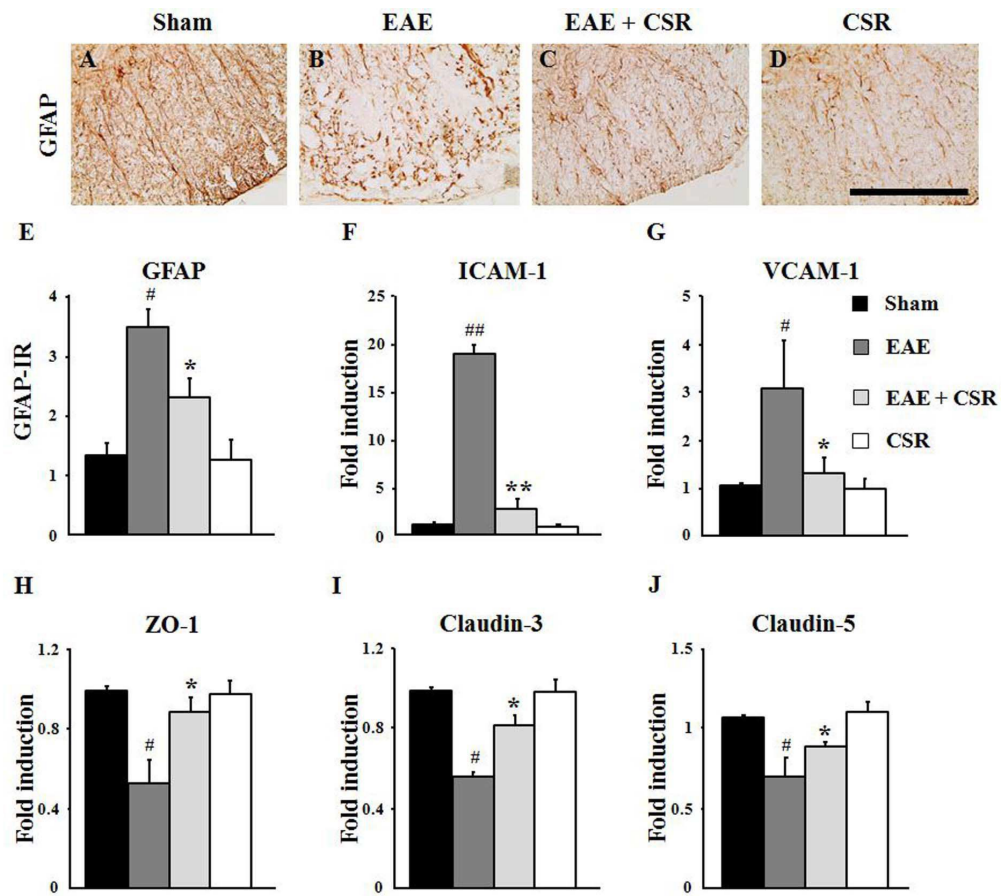
도면4



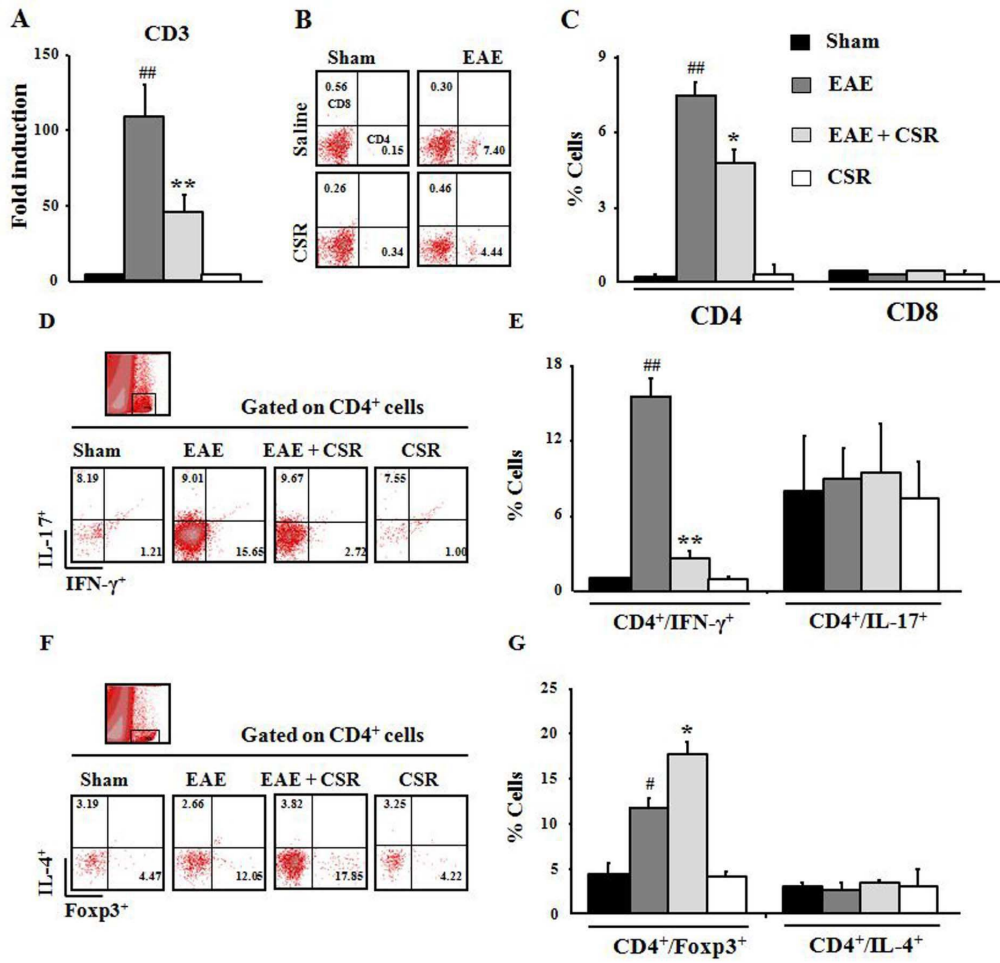
도면5



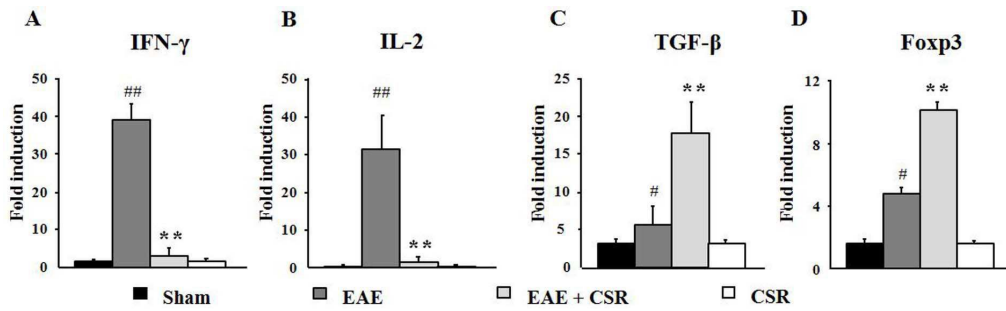
도면6



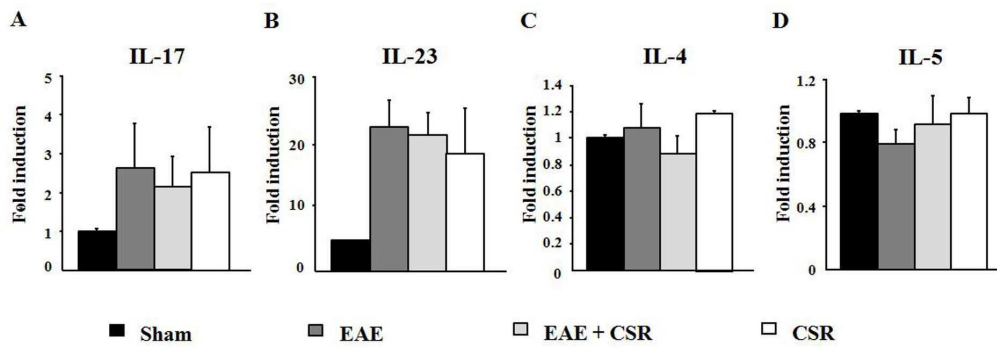
도면7



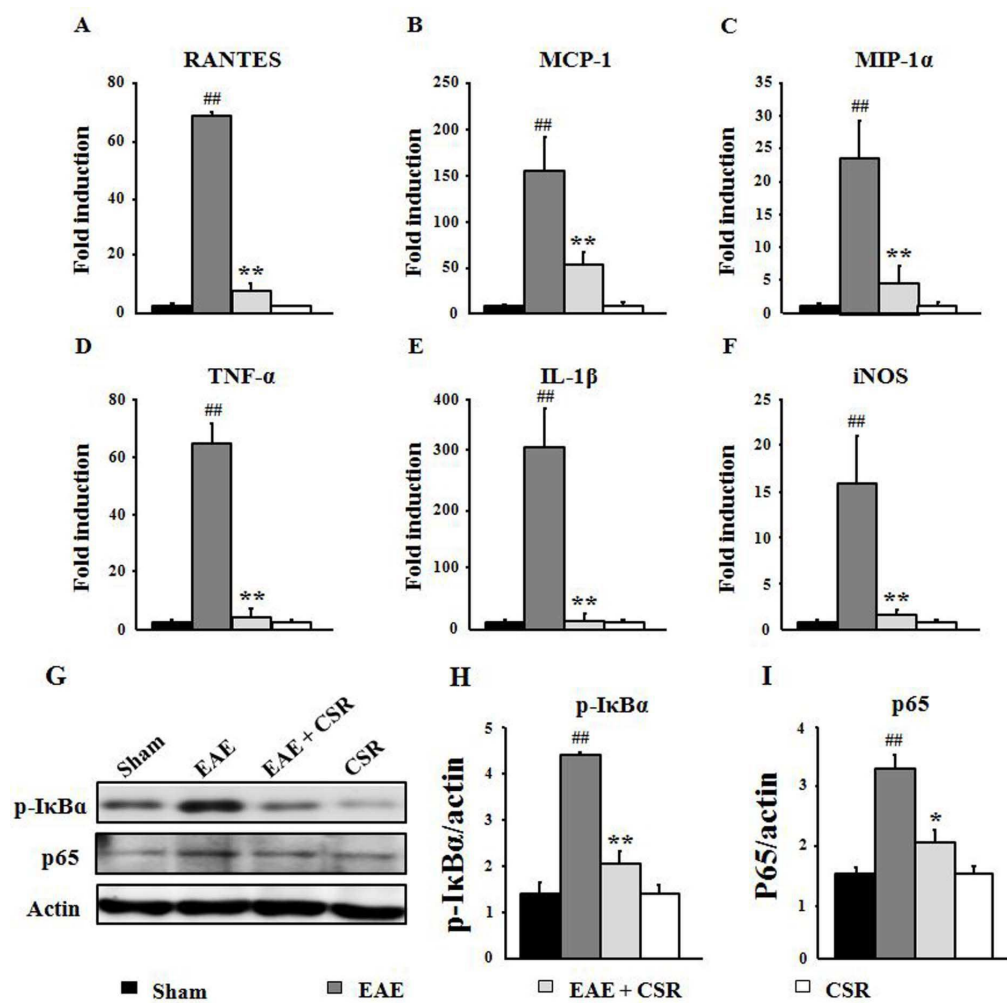
도면8



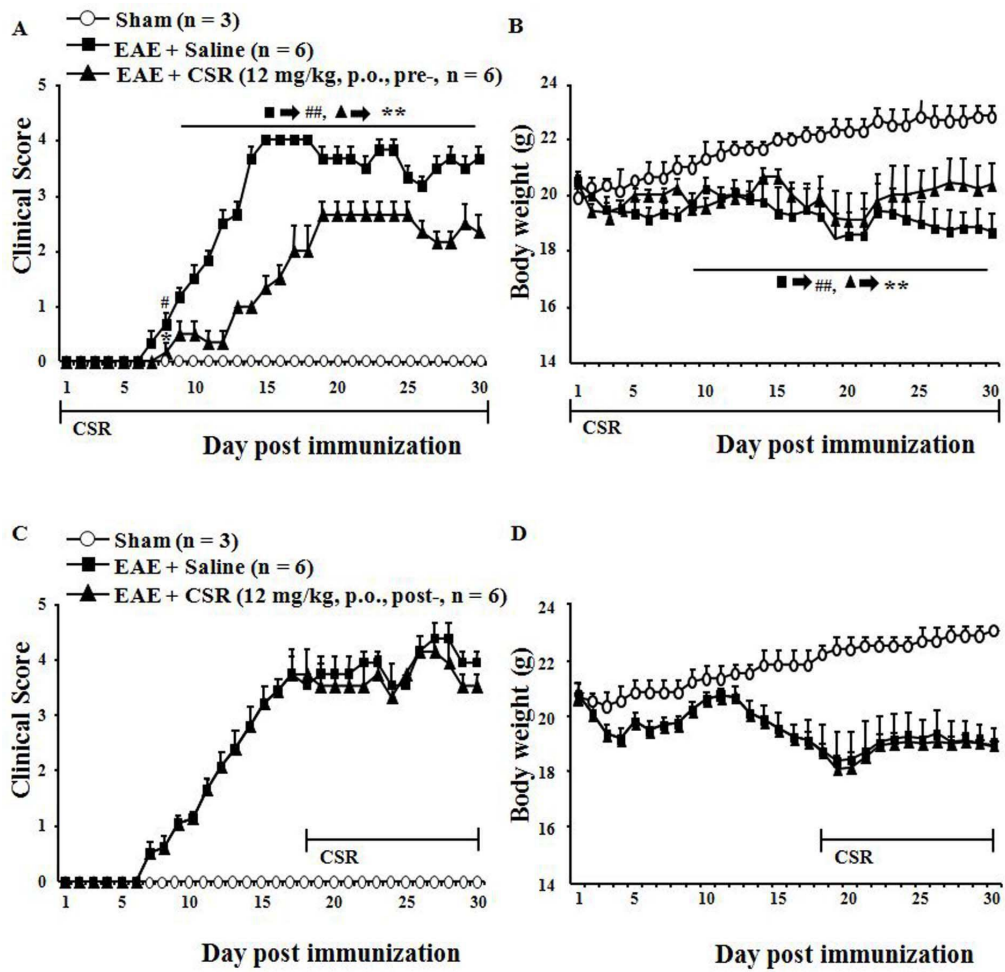
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> The compositions for prevention or treatment of autoimmune diseases

<130> 2013P-12-041

<160> 48

<170> KoPatent In

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD11b F

<400> 1

tgcttacctg gggttatgctt ctg

<210> 2

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD11b R
 <400>
 > 2
 ccgaggtgct cctaaaacca 20
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD3 F
 <400> 3
 ctctgggctt gctgatgg 18
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD3 R
 <400> 4
 gggttggaac aggtggtg 18
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Claudin-3 F
 <400> 5
 ctgggagggc ctgtgatga act 23
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Claudin-3 R
 <400> 6

tcgcggcgca gaatagagga t	21
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Claudin-5 F	
<400> 7	
acgggaggag cgctttac	18
<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Claudin-5 R	
<400> 8	
gttggcgaac cagcagag	18
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Foxp3 F	
<400> 9	
ggcccttctc caggacaga	19
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Foxp3 R	
<400> 10	
gctgatcatg gctgggttgt	20
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> GAPDH F
 <400> 11
 aggtcatccc agagctgaac g 21
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH R
 <400> 12
 caccctgttg ctgtagccgt at 22
 <210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ICAM-1 F
 <400> 13
 tgcgttttgg agctagcgga cca 23
 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ICAM-1 R
 <400> 14
 cgaggaccat acagcacgtg cag 23
 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IFN-gamma F
 <400> 15
 acaatgaacg ctacacactg cat 23
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IFN-gamma R

<400> 16

tggcagtaac agccagaaac a 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1 beta F

<400> 17

ttgtggctgt ggagaagctg t 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1 beta R

<400> 18

aacgtcacac accagcaggt t 21

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 F

<400> 19

gccaagaag gccacaga 18

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 R

<400> 20

gcacttctc cagaggttg ag 22

<210> 21

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-4 F
 <400> 21
 cgaagaacac cacagagagt gagct 25
 <210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-4 R
 <400> 22
 gactcattca tgggtgcagct tatcg 25

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-5 F
 <400> 23
 gagtcatgag aaggatgctt 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-5 R
 <400> 24
 acagttttgt ggggtttttg 20
 <210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-17 F
 <400> 25

gtgtctctga tgctgttg	18
<210> 26	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-17 R	
<400> 26	
aacggttgag gtagtctg	18
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-23 F	
<400> 27	
tggcatcgag aaactgtgag a	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-23 R	
<400> 28	
tcagttattg gtagtcctgt t	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> iNOS F	
<400> 29	
ggcaaaccga aggtctaggt t	21
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> iNOS R

<400> 30

tcgctcaagt tcagcttggt 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBP F

<400> 31

ctataaatcg gtcacaagg 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBP R

<400> 32

aggcggttat attaagaagc 20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP-1 F

<400> 33

cttctgggcc tgctgttca 19

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP-1 R

<400> 34

ccagcctact cattgggatc a 21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP-1 alpha F
 <400> 35
 cagccaggtg tcattttcct 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MIP-1 alpha R
 <400> 36
 aggcattcag ttccaggtca 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PDGFalphaR F
 <400> 37
 gccaggagac gaggtatcaa 20

 <210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PDGFalphaR R
 <400> 38
 tgttccaat gccaaggtc 19
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANTES F
 <400> 39
 acaccactcc ctgctgcttt 20
 <210> 40

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANTES R
 <400> 40
 gactgcaaga ttggagcact tg 22

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGF-beta F
 <400> 41
 gccctggata ccaactattg c 21

<210> 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGF-beta R
 <400> 42
 gcaggagcgc acaatcatgt t 21

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha F
 <400> 43
 agcaaaccac caagtggagg a 21

<210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha R
 <400> 44

gctggcacca ctagttggtt gt	22
<210> 45	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VCAM-1 F	
<400> 45	
cctcacttgc agcactacgg gct	23
<210> 46	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VCAM-1 R	
<400> 46	
ttttccaata tcctcaatga cggg	24
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZO-1 F	
<400> 47	
aaggcaattc cgtatcgttg	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZO-1 R	
<400> 48	
ccacagctga aggactcaca	20