

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 11월 28일 (28.11.2013)



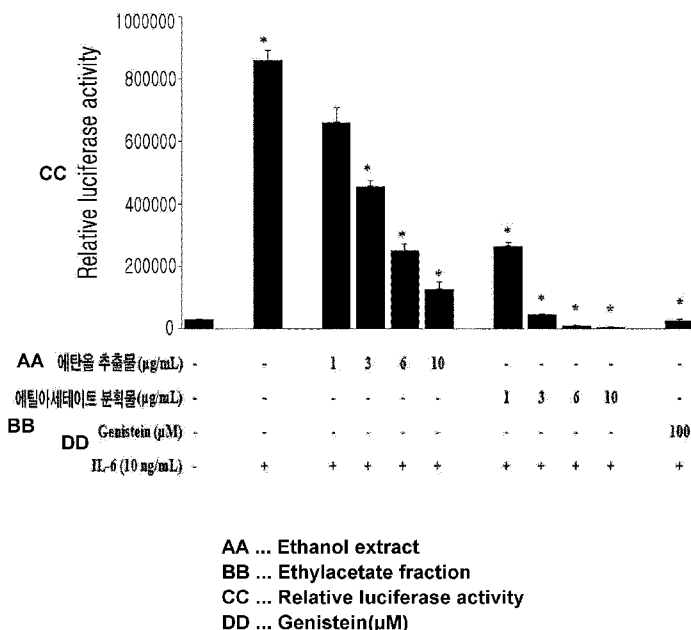
(10) 국제공개번호
WO 2013/176471 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 36/31 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004457
- (22) 국제출원일: 2013년 5월 21일 (21.05.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0053899 2012년 5월 21일 (21.05.2012) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 노문철 (RHO, Mun Chul); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 오현미 (OH, Hyun Mee); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이우송 (LEE, Woo Song); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김상현 (KIM, Sang Hyun); 700-842 대구시 중구 동인동 2가 101 경북대의대, Daegu (KR). 이승웅 (LEE, Seung Woong); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박찬선 (PARK, Chan Sun); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 안극현 (AHN, Keug Hyun); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-973 서울시 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

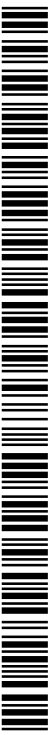
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING STAT3-MEDIATED DISEASE, COMPRISING *SALVIA PLEBEIA* R. BR. EXTRACT OR FRACTION THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating STAT3-mediated diseases, comprising a *Salvia plebeia* R. Br. extract or fraction thereof as an active ingredient, and to a method for treating STAT3-mediated diseases, comprising a step of injecting the composition into an individual suspected of having a STAT3-mediated disease. Furthermore, the present invention relates to a food composition and a quasi-drug composition for preventing or improving STAT3-mediated diseases, comprising the *Salvia plebeia* R. Br. extract or fraction thereof as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 곰보배추(*Salvia plebeia* R. Br.)의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 STAT3 매개 질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, STAT3 매개 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 의약품 조성물에 관한 것이다.



WO 2013/176471 A1

- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 곶보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 곶보배추(*Salvia plebeia* R. Br.)의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 STAT3 매개 질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, STAT3 매개 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 의약외품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인터류킨-6(IL-6)는 B 세포 자극 인자 2(BSF2) 또는 인터페론-2(INF-2)로도 불리는 사이토카인(cytokine)으로, B 임파구의 활성화에 관여하는 분화인자로 발견되었다. 그 후, 여러 가지 세포의 기능에 영향을 미치는 다기능 사이토카인이라는 것이 밝혀졌다. IL-6는 세포막 위에 두 종류의 단백질을 매개로 그 생물학적 활성을 전달한다. 하나는 IL-6가 결합하는 단백질인 IL-6 수용체로, IL-6 수용체는 세포막을 관통하여 발현되어 있으며 약 80kDa의 분자량을 가지는 막결합형 단백질이다. 다른 하나는, 비리간드 결합성의 시그널 전달에 속하는 약 130kDa의 분자량을 가지는 막단백질 gp130이다. IL-6와 IL-6 수용체는 IL-6/IL-6 수용체 복합체를 형성하고, 이어서 gp130과 결합한다. 이러한 리간드와 수용체들의 결합 후, 세포 내에서는 JAK2(Janus Kinase 2)가 인산전이반응(transphosphorylation)에 의해 활성화된다. 활성화된 JAK2에 의해 수용체 세포질 도메인(cytoplasmic domains)의 여러 타이로신 잔기(tyrosine residues)가 인산화(phosphorylation)되고, 이것은 SH2나 다른 인산타이로신 결합 모티프(phosphotyrosine binding motif)를 가지고 있는 STAT3(signal transducers and activators of transcription 3)와 같은 세포질 내 단백질의 도킹 사이트(docking site) 역할을 하게 된다. 수용체의 세포질 도메인(cytoplasmic domain)에 결합한 STAT3는 JAK2에 의해 인산화가 된 후 수용체에서 떨어져 나오며, 이러한 활성화된 STAT3들은 세포질 내에 서로서로 결합하여 호모다이머(homodimer) 또는 헤테로다이머(heterodimer)를 이룬 후 핵 내로 들어가 목적 유전자의 인식 서열(recognition sequence)에 결합하여 전사를 증가시킨다.

[3]

- [4] 이러한 IL-6에 의해 유도되는 신호전달체계와 염증성 질환, 자가면역질환 및 대사성 질환에 대한 관련성이 이미 알려져 있다. 염증성, 자가면역질환 등의 치료를 위해서 IL-6에 의해 유도되는 신호전달체계의 억제에 대하여 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재 IL-6의 신호전달체계의 억제에 대하여 항 IL-6 R

항체(anti-IL-6 receptor antibody)를 이용한 것이 가장 많이 알려져 있다. 상기 항 IL-6 R 항체를 이용한 류마티스성 관절염에 대한 활액 세포 성장 억제제(국제특허공개 제96/011020호), 항 IL-6 R 항체를 이용한 형질구 증가증, 초면역 글로블린 혈증, 빈혈, 신염, 악액질, 류마티스성 관절염, 목축업자 질병 및 맥관증식신염과 같은 IL-6 산물에 기인하는 질병의 치료 등이 이미 알려진 바 있다(국제특허공개 제96/012503호). 또한, 항 IL-6 R 항체는 다발성 경화증, 포도막염, 만성 갑상선염, 지연성 과민증 및 아토피성 피부염과 같은 민감성 T 세포 관련 질병(국제특허공개공보 제98/042377호), 전신성 에리테마토스의 치료, 크론병의 치료(국제특허공개공보 제99/047170호), 췌장염의 치료(국제특허공개공보 제00/010607호), 건선의 치료(국제특허공개공보 제02/034292호) 및 연소성 만성 관절염의 치료(국제특허공개공보 제02/080969호)에 적용될 수 있음이 보고되었다. 그러나, 상기 항 IL-6 R 항체의 경우 개체 내에 도입되는 경우 외래 단백질로서 인지될 수 있는 부분인 에피토프를 가질 수 있으므로, 치료제로서 사용될 경우 여전히 면역원성일 수 있다. 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 면역체계에 인지되지 않는 단백질이 아닌 작은 분자 화합물(small molecule compound)을 이용하여 IL-6 및 STAT3에 의해 매개되는 질병의 치료제를 개발하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

[5]

[6]

한편, 인터류킨-11(IL-11)은 IL-6 패밀리에 속해 있는 염증성 사이토카인으로 IL-6와 거의 같은 신호전달체계를 갖는 것으로 알려져 있으며, 조혈, 면역반응, 염증 및 각종 암세포에서 그 발현이 증가된 것으로 알려져 있다. 최근 IL-11이 그 수용체인 IL-11R와 gp130에 결합하여 위암, 대장암 세포 증식 및 암 침윤을 촉진시키는 것이 보고되었고(Nakayama T 등 *Int J Oncol*, 2007, 30, 825-833, Yoshizaki A 등, *Int J Oncol* 2006, 29, 869-876), IL-11/STAT3 신호에 의해 smad7가 활성화되고 동시에 TGF 시그널을 유도하는 smad 활성인자(smads activator)가 차단됨으로서 항세포사멸 유전자, 전혈관형성 유전자 또는 증식유전자가 관여하는 발암 프로그램(oncogenic program)이 활성화되어 염증관련 위종양이 유도될 수 있다(Ernst 등 *J. Clin. Invest* 2008, 118(5), 1728-1738). 또한, IL-11은 뼈 세포의 증식 및 분화의 조절에 관여하고 있어, 골다공증에 있어 치료 표적이 될 수 있음이 알려져 있다(Sims NA et al., *J Bone Miner Res.* 2005 Jul;20(7):1093-102.). 이러한 사실들이 밝혀지면서 IL-11에 의한 gp130/JAK/STAT3 경로가 골다공증과 같은 다양한 질병의 치료에 있어서 새로운 표적으로 부각되고 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8]

이에 본 발명자들은 상기 IL-6 또는 IL-11에 의해 활성화되는 STAT3 경로를

표적으로 하는 천연물을 찾기 위하여 예의 노력한 결과, 곰보배추의 추출물 및 분획물이 IL-6에 의해 활성화되는 염증, 자가면역 질환 등에 관련된 전사인자인 STAT3의 전사활성 및 인산화를 저해하며 IL-6에 의해 유도되는 신호전달체계를 효과적으로 저해시킴을 확인하고, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 STAT3 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 발명을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 본 발명의 하나의 목적은 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 STAT3 매개 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, STAT3 매개 질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명의 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물은 오랫동안 천연약재로 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, IL-6에 유도되는 STAT3 신호전달체계를 효율적으로 저해시키므로, STAT3 매개성 질환, 예컨대 염증성 질환, 자가면역질환 또는 대사성 질환의 예방 또는 치료에 있어서 유용하게 이용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은, 곰보배추 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 IL-6에 의해 유도되는 루시퍼라제의 발현 저해활성을 나타낸 도이다.

[18] 도 2는, 곰보배추 에탄올 추출물의 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 인산화를 저해하는 활성을 나타낸 도이다.

[19] 도 3은, 곰보배추 에틸아세테이트 분획물의 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 인산화를 저해하는 활성을 나타낸 도이다.

[20] 도 4는, 곰보배추 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 IL-6에 의해 유도되는 JAK2 및 ERK 인산화를 저해하는 활성을 나타낸 도이다.

[21] 도 5는, 곰보배추 에탄올 추출물의 STAT3에 의해 유도된 SOCS-3 mRNA 발현

- 저해활성을 나타낸 도이다.
- [22] 도 6은, 곰보배추 에탄올 추출물의 STAT3에 의해 유도된 MCP-1 mRNA 발현 저해활성을 나타낸 도이다.
- [23] 도 7은, 곰보배추 에탄올 추출물의 STAT3에 의해 유도된 ICAM-1 mRNA 발현 저해활성을 나타낸 도이다.
- [24] 도 8은, 곰보배추 에탄올 추출물의 효능을 확인하기 위한, 류마티스 관절염 마우스 모델의 제작 스케줄을 나타낸 도이다.
- [25] 도 9는, 곰보배추 에탄올 추출물 투여에 의한 류마티스 관절염 유도 마우스의 발바닥 두께 감소 효과를 나타낸 도이다.
- [26] 도 10은, 류마티스 관절염 유도 마우스의 관절염의 심한 정도가 곰보배추 에탄올 추출물 투여에 의해 감소되는 효과를 보임을 나타낸 도이다.
- [27] 도 11은, 곰보배추 에탄올 추출물 투여에 의한 류마티스 관절염 유도 마우스의 관절염 발병률 감소를 나타낸 도이다.
- [28] 도 12는, 곰보배추 에탄올 추출물의 투여에 의한 류마티스 관절염 유도 마우스의 혈중 면역글로불린 G1의 감소를 나타낸 도이다.
- [29] 도 13은, 곰보배추 에탄올 추출물의 투여에 의한 류마티스 관절염 유도 마우스의 혈중 면역글로불린 G2a의 감소를 나타낸 도이다.
- [30] 도 14는, 아토피 피부염 마우스 모델 제작 스케줄을 나타낸 도이다.
- [31] 도 15는, 곰보배추 에탄올 추출물이 아토피 피부염 유도 마우스의 귀두께 감소 효과를 나타냄을 확인한 도이다. 여기서, AD는 아토피 피부염을, MEBC는 곰보배추 추출물을 나타낸다.
- [32] 도 16은, 곰보배추 에탄올 추출물의 아토피 피부염 유도 마우스의 혈중 면역글로불린 E 억제 효과를 확인한 도이다.
- [33] 도 17은, 곰보배추 에탄올 추출물의 아토피 피부염 유도 마우스의 혈중 면역글로불린 G2a의 억제 효과를 확인한 도이다.
- [34] 도 18은, 곰보배추 에탄올 추출물의 아토피 피부염 유도 마우스의 혈중 히스타민의 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 19는, 곰보배추 에탄올 추출물의 아토피 피부염 유도 마우스의 염증 유발성 사이토카인의 분비 억제 효과를 나타낸 도이다. 여기서, AD는 아토피 피부염을, MEBC는 곰보배추 추출물을 나타낸다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 하나의 양태로서, 본 발명은 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [38]
- [39] 본 발명에서 용어, "곰보배추(*Salvia plebeia* R. Br.)"란 쌍떡잎식물

통화식물목에 속하는 꿀풀과의 두해살이풀로서, 설건초 또는 과동청 등으로 불리는 식물을 의미한다. 형태적으로 줄기는 사각 기둥 모양이고 짧고 부드러운 털로 덮여 있으며, 잎은 타원형이거나 피침형을 나타내며, 끝은 무디거나 갑자기 뾰족해진 모양을 가지며 기부는 원형이거나 췌기 모양을 나타낸다. 약리활성의 측면에서는 해혈, 토혈, 혈뇨, 복수, 백탁 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 곰보배추의 STAT3 매개 질환의 치료용도에 대하여 알려진 바 없다. 또한 본 발명에서 곰보배추는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

- [40] 본 발명에서 용어, "곰보배추 추출물"이란 곰보배추를 추출하여 수득한 추출물을 의미한다. 상기 곰보배추 추출물은 곰보배추 분쇄물을 건조 중량의 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올 등과 같은 탄소수 1(C₁) 내지 6(C₆)의 알콜과 같은 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매를 용출할 수 있으며, 추출 온도는 20°C 내지 100°C, 바람직하게는 실온에서, 추출기간은 약 12시간 내지 4일, 바람직하게는 3일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출한 추출물일 수 있다. 바람직하게는 냉침추출로 1회 내지 5회 연속 추출하여 감압여과하고, 그 여과추출물을 진공회전농축기로 20°C 내지 100°C, 바람직하게는 실온에서 감압농축하여 물, 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 곰보배추 조추출물을 수득한 결과물이 될 수 있으나, 본 발명의 STAT3 매개 질환의 치료 효과를 나타낼 수 있는 추출물인 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함한다. 상기 곰보배추 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 뿌리, 지상부, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하다.

- [41] 본 발명의 일 실시예에서는 곰보배추 분쇄물을 에탄올을 용출 용매로써 사용하여, 실온에서 7일간 냉침 추출한 다음, 감압 여과하고 진공회전농축기로 실온에서 에탄올 용매를 제거하여 추출하였다(실시예 1).

[42]

- [43] 본 발명에서 용어, "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 상기 분획물은 바람직하게는 곰보배추 추출물을 n-헥산, 에틸아세테이트 등의 용매를 이용한 용매분획방법으로 분획한 결과물일 수 있으며, 극성 용매 분획물과 비극성 용매 분획물을 모두 포함하며, 구체적으로는 헥산 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물 등이 모두 사용될 수 있다. 보다 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물일 수 있으며, 본 발명의 STAT3 매개 질환의 치료 효과를 나타낼 수 있는 분획물은 모두 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

바람직하게는, 물 분획물의 경우 STAT3 루시페라제 활성을 저해하지 않는바, 본 발명의 분획물에 포함되지 않을 수 있다.

[44] 상기에서 얻은 곰보배추 조추출물을 증류수에 현탁한 후, 현탁액의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 2회 내지 5회에 걸쳐 비극성 용매 가용층을 추출, 분리하여 수득할 수 있다. 또한 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다(Harborne J.B. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed. p6-7, 1998). 구체적으로, 상기 곰보배추 조추출물을 물에 현탁한 후, 동량의 에틸아세테이트 용매를 이용하여 연속 추출로 곰보배추 각 용매 가용 추출물을 수득할 수 있고, 더욱 구체적으로는 곰보배추 조추출물을 물에 현탁한 후, 동량의 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있다.

[45] 본 발명의 일 실시예에서는 곰보배추 조추출물을 물에 현탁 시킨 후, 동량의 에틸아세테이트를 가하여 혼합하여 분획하고, 이 과정을 3회 반복하여 얻은 에틸아세테이트 가용성 분획물을 감압농축하여 에틸아세테이트 가용 추출물을 수득하였다 (실시예 1).

[46]

[47] 본 발명에서 용어, "STAT3 매개 질환"은 IL(interleukin)-6 또는 IL-11이 그의 수용체에 결합하여 STAT3의 인산화, 즉 STAT3의 활성화를 유도하고, 인산화된 STAT3가 핵 내로 이동하여 자가면역질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환의 발병 또는 진행에 관여하는 그의 표적 유전자를 발현시킴으로써 발병되는 질환을 총칭하는 의미이다. 상기 STAT3 매개 질환은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 자가면역질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환일 수 있다.

[48] 본 발명에서 용어, "자가면역질환"은 병적인 개체의 자체 항원에 대한 면역 반응이 직간접적 원인으로 나타나는 질환을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 상기 IL-6 또는 IL-11에 의해 활성화된 STAT3에 의하여 매개되는 자가면역질환일 수 있다. 상기 자가면역질환은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 아토피성 피부염, 류마티스 관절염, 골관절염, 건선, 천식, 이식편대 숙주질환, 면역결핍증, 전신 홍반성 루푸스 또는 다발성 경화증일 수 있다. 자가면역질환에서 활성화된 STAT3는 주요 전사인자로 작용하므로, IL-6에 의해 매개되는 STAT3의 활성화를 억제시키는 본 발명의 조성물은 자가면역질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[49] 본 발명에서 용어, "염증성 질환"은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 상기 IL-6 또는 IL-11에 의해 활성화된 STAT3에 의하여 매개되는 염증성 질환을 의미할 수 있다. 상기 염증성 질환은 형질구 증가증, 초면역 글로불린 혈증, 빈혈, 신염, 악액질, 목축업자 질병, 맥관증식신염, 포도막염, 만성 갑상선염, 지연과민증, 크론병, 췌장염, 연소성 특발성 위축증, 당뇨병 및 알쯔하이머를 포함한다. 본 발명의 곰보배추 추출물

또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 STAT3에 의해 매개된 염증이 유발된 질병에 유용하게 사용될 수 있으나, STAT3에 의해 매개된 염증이 유발된 피부 외의 신체 부위의 치료에 보다 유용하다. IL-6는 다양한 면역 반응에 관여하고 있는 사이토카인으로 알려져 있지만, 피부에서 IL-6에서의 역할은 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 피부에서 IL-6는 숙주 방어(host defense)에 있어, 각질층 향상(enhancement)에 관여하여 자극 또는 감염으로부터 보호하는데 관여하고 있으며, 또한 그 외의 다른 역할에 있어서는 인터페론 감마와 같은 다른 인자가 요구되어, 내장 기관 등 다른 부위에서의 면역 반응에 관여하는 것과는 차이가 있으므로, 본 발명의 IL-6가 관여하는 염증성 질환의 경우에는 피부 염증보다는 다른 신체 부위의 염증 치료에 유용할 수 있다.

- [50] 본 발명에서 용어, "대사성 질환"은 생체 내 물질대사 장애에 의해서 발생하는 질환을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 IL-6 또는 IL-11에 의해 활성화된 STAT3에 의해 매개된 대사성 질환일 수 있다. 상기 대사성 질환은 이에 제한되지 않으나, 골다공증, 동맥경화 또는 심근경색일 수 있다. 상기 골다공증의 원인 중 하나로 골 흡수를 촉진하는 IL-6의 과도한 생산을 들 수 있으며, 이에 따라 IL-6에 의해 매개되는 STAT3의 활성을 억제하는 본 발명의 조성물은 골다공증의 치료에 효과적일 수 있다.
- [51] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명자들은 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 루시퍼라제 활성을 곰보배추의 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 분획물이 농도 의존적으로 저해시킴을 확인하였고(도 1), 또한 IL-6에 의해 유도되는 STAT3의 티로신 705번 잔기(Tyr⁷⁰⁵)의 인산화를 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물이 농도 의존적으로 효과적으로 저해시키며(도 2 및 3), STAT3의 인산화를 매개하는 JAK2의 인산화 역시 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물이 효과적으로 저해시켰으며, STAT3의 표적 유전자인 SOCS-3, MCP-1 및 ICAM-1의 mRNA 발현을 곰보배추의 에탄올 추출물이 감소시킴을 확인하였다(도 7). 또한, 본 발명에서는 곰보배추 에탄올 추출물이 제2형 콜라겐에 의해 유도된 류마티스 관절염 마우스의 발 부종, 관절염 발병 등을 효과적으로 치료함을 확인하였으며, 또한, 곰보배추 에탄올 추출물의 효능을 상용되고 있는 관절염 치료제인 케토프로펜과 비교하였을 때에도 케토프로펜과 유사한 치료효능을 나타냄을 확인하였다(도 9, 10 및 11). 나아가, 곰보배추 에탄올 추출물은 콜라겐에 대한 면역글로블린 G1 및 G2a의 생성도 효과적으로 억제하는 결과를 나타내었다(도 12 및 13). 이와 같은 결과로부터 본 발명의 곰보배추 추출물이 대표적인 자가면역질환의 일종인 류마티스 관절염을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하여, 이를 자가면역질환과 같은 STAT-3 매개 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [52] 또한, 본 발명에서는 곰보배추 추출물이 집먼지 진드기 추출물과 DNCB에 의해 유도한 아토피 피부염 마우스 모델에서 치료효능이 있음을 입증하였다.

구체적으로, 곰보배추 에탄올 추출물은 아토피 피부염 유도 마우스의 귀두께 부종을 효과적으로 감소시켰으며(도 15), 아토피 피부염에 의한 혈중 면역글로블린 E와 글로블린 G2a의 생성을 억제시키는 결과를 나타내었다(도 16 및 17). 또한, 곰보배추 에탄올 추출물은 아토피 피부염에 의한 히스타민 유리를 억제시키는 결과를 나타내었으며(도 18), 염증성 사이토카인의 생성 및 분비를 억제시키는 결과를 나타내었다(도 19). 이와 같은 결과로부터 본 발명의 곰보배추 추출물이 대표적인 자가면역질환의 일종인 아토피 피부염을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 나타내어, 이를 자가면역질환과 같은 STAT-3 매개 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다. 종합하면, 본 발명의 IL-6에 의해 유도된 STAT3 활성을 저해시킨 곰보배추의 추출물 및 이의 분획물은 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료에 있어 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[53]

[54] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 STAT3 매개 질환을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 STAT3 매개 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[55]

[56] 본 발명의 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 곰보배추 추출물 및 그 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함하도록 제조함이 바람직하다.

[57]

상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다.

비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[58] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[59] 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[60] 상기 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사 등의 다양한 방식이 고려될 수 있다.

[61]

[62] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 STAT3 매개 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, STAT3 매개 질환 치료 방법을 제공한다.

[63] 구체적으로, 본 발명의 치료 방법은 상기 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 STAT3 매개 질환 의심 개체 내에 투여하는 것을 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 면역억제 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 바람직한 투여방식은 정맥 주사, 피하주사, 피내주사제, 근육주사 및 점적 주사이다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 STAT3 매개 질환 의심개체에

투여하여, STAT3 매개 질환의 발생 또는 진행을 막아 STAT3 매개 질환을 치료할 수 있다. 상기 STAT3 매개 질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[64]

[65] 또 다른 양태로서, 본 발명은 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[66]

[67] 상기 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물에 관해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 보다 구체적으로, 본 발명의 추출물 또는 분획물은 STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선을 목적으로, 바람직하게는 자가면역질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가할 수 있다.

[68]

본 발명의 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.

[69]

본 발명의 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있으며, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품을 포함한다.

[70]

상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 또한, 상기 식품은 공지의 제조방법에 따라 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환 등의 제형으로도 제조될 수 있다. 본 발명에 의한 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 것 이외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로서 포함할 수 있다.

[71]

상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[72]

[73] 또 다른 양태로서, 본 발명은 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을

유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[74]

[75] 상기 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물에 관해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선을 목적으로, 바람직하게는 자가면역질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약외품 조성물에 첨가할 수 있다.

[76]

본 발명에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것 과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물질로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물질 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물질 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물질을 의미한다. 또한 상기 의약외품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함한다.

[77]

본 발명의 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[78]

상기 피부외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 상기 개인위생용품에는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 비누, 화장품, 물티슈, 휴지, 샴푸, 피부 크림, 얼굴 크림, 치약, 립스틱, 향수, 메이크-업, 파운데이션, 볼터치, 마스크라, 아이세도우, 선스크린 로션, 모발 손질 제품, 에어프레쉬너 겔 또는 세정 겔일 수 있다. 또한, 본 발명의 의약외품 조성물의 또 다른 예로 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제가 있다.

[79]

발명의 실시를 위한 형태

[80]

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[81]

[82]

실시예 1: 곰보배추 추출물 및 분획물의 제조

[83]

[84]

실시예 1-1: 곰보배추 추출물 제조

- [85] 곰보배추는 물로 깨끗이 세척하여 그늘에서 건조한 후, 와링 브랜드로 분말화시켰다. 분말화된 곰보배추 8kg을 에탄올 50L에 넣고 실온에서 7일간 냉침 추출한 후, 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 실온에서 에탄올 용매를 제거한 후 추출된 잔사로서 곰보배추 조추출물 1.1kg을 수득하였다.
- [86]
- [87] **실시예 1-2: 분획물 제조**
- [88] 상기 조추출물에서 활성 분획물을 분리하기 위하여, 곰보배추 조추출물을 물 1L에 현탁 시킨 후 동량의 에틸아세테이트를 가하여 혼합하여 분획하였다. 상기 과정을 3회 반복하여 수가용성 분획물 1L 및 에틸아세테이트 가용성 분획물 3L를 얻은 후, 상기 에틸아세테이트 가용성 분획물을 감압농축하여 에틸아세테이트 가용 추출물 145g을 수득하였다. 남은 수가용성 분획물을 감압농축하여 35g을 수득하였으며, 이를 물 분획물로 사용하였다.
- [89]
- [90] **실시예 2: 곰보배추 추출물 및 분획물의 IL-6에 의해 유도되는 STAT3의 전사활성 억제 효과 분석**
- [91]
- [92] 곰보배추 추출물 및 분획물의 IL-6에 의해 유도되는 STAT3의 전사활성 억제 효과를 측정하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [93]
- [94] **실시예 2-1: 루시퍼라제(luciferase)가 도입된 형질전환체 제조**
- [95] Hep3B 세포(ATCC HB-8064)에 STAT3 리포터 유전자를 포함하는 pStat3-Luc와 pcDNA3.1(+)(Clontech laboratories, Palo Alto, CA)를 리포펙타민 플러스(lipofectamine plus, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 형질감염(transfection)시켰다. 형질감염 후 이틀 후, 하이그로마이신(hygromycin)을 상기 형질감염시킨 세포에 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 루시퍼라제(luciferase)가 안정하게 발현되는 클론(clone)을 얻었다. 이 클론에서 루시퍼라제가 안정하게 발현되는지 여부는 루시퍼라제 어세이를 통하여 확인하였다.
- [96]
- [97] **실시예 2-2: IL-6 반응성 STAT3 루시퍼라제 검사**
- [98] 상기 형질감염된 세포를 DMEM(GIBCO 119950965) 배지로 무혈청 배양(serum starvation)하고 시료를 하기와 같이 1시간 처리한 후, 10ng/mL IL-6(R&D system, USA)를 첨가하여 12시간 동안 배양하였다.
- [99]
- [100] 1: 음성대조군(비처리군);
- [101] 2: 양성대조군(IL-6 10ng/mL);
- [102] 3: 추출물 및 분획물(1, 3, 6, 10 μ g/mL); 및

- [103] 4: Genestein 처리군(100 μ M)
- [104]
- [105] 상기 반응한 세포를 PBS로 세척한 다음, 50 μ L 용해 완충용액(luciferase assay system, promega, USA)을 넣고 20분간 교반한 다음, 30 내지 100 μ L의 루시페라제 기질(luciferase assay system, promega, USA)을 넣고 발색 정도를 루미노미터(luminometer; EG&G BERTHOLD, USA)를 이용하여 5분 안에 측정하였다. 실험 결과, 곰보배추 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물은 농도 의존적으로 STAT3 루시페라제 활성을 저해하였다. 구체적으로, 곰보배추 에탄올 추출물은 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 루시페라제 활성을 10, 6, 3, 1 μ g/mL에서 각각 88%, 73%, 48%, 23% 저해하였으며, 에틸아세테이트 분획물은 6, 3, 1 μ g/mL에서 각각 100%, 98%, 72% 저해하였다(도 1).
- [106] 이러한 결과는 IL-6에 의해 유도되는 STAT3 활성화를 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물이 효과적으로 억제시킬 수 있음을 나타내는 것이다.
- [107]
- [108] STAT3는 염증성 빈혈에서 활성화되어 대식세포의 철의 분비를 막는 헵시딘(Hepcidin)의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있고(Wrighting DM et al, Blood. 2006 Nov 1;108(9):3204-9), 인간의 사구체 신염(Arakawa T et al, Nephrol Dial Transplant. 2008 Nov;23(11):3418-26.), 악액질 환자의 골격근, 크론병 환자(Lovato P et al., J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):16777-81.), 만성 췌장염(Fukuda A et al, Cancer Cell. 2011 Apr 12;19(4):441-55)과 같은 염증성 질환에서 활성화되어 있으므로, 상기 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 본 발명의 조성물은 상기 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [109]
- [110] 또한, STAT3는 류마티스 관절염에 있어서 골흡수의 치료에 새로운 표적으로 여겨지고 있으며, 천식의 경우 기도(air way)의 상피에 존재하는 STAT3는 천식 등에 있어 알러지성 염증반응을 유도하는 것으로 보고되었으며(Simeone-Penney MC et al., J Immunol. 2007 May 15;178(10):6191-9.), 이식편대 숙주질환의 발생(Ma HH et al., Cell Immunol. 2011;268(1):37-46.), 다발성 경화증 환자 및 동맥경화가 발생된 ApopE-/- 마우스에서는 STAT3가 인산화되어 활성화되어 있음이 알려져 있다.
- [111]
- [112] 따라서, 상기와 같은 결과는 본 발명의 곰보배추 추출물을 포함하는 조성물이 상기와 같은 자가면역질환 및 대사성 질환의 예방 또는 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [113]
- [114] 실시예 2-3: 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물의 IL-6 유도 STAT3, JAK2 및 ERK 인산화 저해활성 검정

[115] 6 웰 플레이트에 5×10^5 세포/웰로 Hep3B, U266 세포를 분주하여 배양접시에 80%의 밀도로 가득차게 배양한 후, 무혈청 배지로 교환하여 추가로 12시간 배양하고 하기와 같이 시료를 60분간 처리하였다.

[116]

[117] 1: 음성대조군(비처리군);

[118] 2: 양성대조군(IL-16 10ng/mL);

[119] 3: 추출물 및 분획물(10, 30, 60 μ g/mL); 및

[120] 4: Genestein 처리군(100 μ M)

[121]

[122] 이후 20ng/mL 농도의 IL-6를 처리하여 20분간 반응시킨 뒤, 40 μ L 용해 완충용액([pH 8, 20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 10% 글리세롤, 1% Triton X-100, 1mM Na₃VO₄, 2mM EDTA, 1mM PMSF, 20mM 류펩틴(leupeptin), 20mg/mL 아프로토닌 (aprotinin); Sigma, USA)을 사용하여 세포를 용해시킨 후, 원심분리(13000g, 15분)하여 단백질이 녹아있는 상등액을 수득하였다. 단백질의 농도는 DC 단백질 검사 키트(Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였고, 4 내지 12%의 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(SDS-PAGE)에 단백질을 로딩하여 175mA에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후, 겔의 단백질을 PVDF 멤브레인(Westran S, pore size 0.2 ; Whatman, USA)으로 35V에서 90분 동안 전사시켰다. 전사된 멤브레인을 Tris-완충용액(T-TBS; 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 0.2% Tween-20, 5% skim milk; Sigma, USA)을 이용하여 상온에서 1시간 차단하고 T-TBS로 5번 세척하였다. 상기 멤브레인에 일차항체로 phospho-Stat3, phospho-JAK2 및 phospho-ERK(1:1000 희석)의 다중클론항체를 4 내지 12시간 동안 처리하였다. T-TBS로 5번 세척 후 이차항체로 HRP-결합 항-마우스 항체(1:5000 희석) 및 항-레빗 항체(1:1000 희석)를 1시간 동안 반응시켰다. T-TBS로 세척한 다음, 암실에서 ECL 키트(Amersham, USA)를 이용하여 필름을 현상시켰다. 그 결과, 곰보배추 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물이 IL-6에 의해 유도된 STAT3, JAK2 및 ERK 인산화를 저해하였다(도 2 내지 4).

[123]

[124] 이와 같은 결과는, 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물이 IL-6 하위의 JAK2의 인산화를 저해하여 불활성화시키고, JAK2에 의해 인산화되어 활성화되는 STAT3의 인산화를 감소시키는 것을 보여주는 것으로, 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물이 IL-6에 의해 매개되는 신호전달체계를 억제시킴을 나타내는 것이다. 나아가, 이와 같은 결과는 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 본 발명의 조성물이 IL-6에 의해 활성화되는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

[125]

[126] 실시예 2-4: 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물의 STAT3에 의해 유도된

SOCS-3, MCP-1 및 ICAM-1 mRNA 발현 저해 활성 검증

[127] 6 웰 플레이트에 5×10^4 세포/웰의 농도로 Hep3B 세포를 분주하여 배양접시에 80%의 밀도로 가득차게 배양한 후, 무혈청 배지로 교환하여 추가로 12시간 배양하고 하기와 같이 시료를 60분간 처리하였다.

[128]

[129] 1: 음성대조군(비처리군);

[130] 2: 양성대조군(IL-6 10ng/mL); 및

[131] 3: 추출물 및 분획물(10, 30, 60 μ g/mL);

[132]

[133] 이후 20ng/mL 농도의 IL-6를 처리하여 6시간 동안 반응한 뒤, 세포를 튜브에 모아 원심분리 하여 배지를 제거하고, PBS로 1회 세척한 후, RNeasy 미니 용출 클린업 키트(RNeasy Mini Elute Cleanup kit)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA의 농도와 순도는 2100 Bioanalyzer system(Agilent Technologies)로 측정하였고, Maxime RT PreMix(Random primer, iNtRON Biotechnology, INC)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[134]

[135] SOCS-3 mRNA의 발현 정도는 Taqman PCR master mix kit(Applied Biosystem)를 사용해 Real-time PCR을 통해 측정하였다. MCP-1, ICAM-1 mRNA의 발현 정도는 SYBRGreen master mix kit(Applied Biosystem)를 사용해 Real-time PCR을 통해 측정하였다.

[136] 그 결과, 곰보배추 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 IL-6 유도 증가된 사이토카인 억제 인자인 SOCS-3, 사이토카인인 MCP-1 및 세포접착인자인 ICAM-1의 mRNA 발현을 저해하였다(도 5 내지 7). 이와 같은 결과는 곰보배추 추출물 또는 이의 분획물이 IL-6에 의해 활성화되는 STAT3 신호전달경로를 저해한다는 것을 STAT3의 표적 유전자의 발현 감소를 통하여 뒷받침하는 것이다.

[137]

[138] **실시예 3: 곰보배추 추출물의 콜라겐 유도 류마티스 관절염 치료 효과**

[139]

[140] 곰보배추 추출물이 제2형 콜라겐(bovine type II collagen)에 의해 유도되는 류마티스 관절염을 억제시켜 류마티스 관절염 치료 효과를 가지고 있는지 여부를 측정하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[141]

[142] **실시예 3-1: 콜라겐 유도 류마티스 관절염 마우스 모델 제작 및 관절염 억제 효과 검증**

[143] 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)은 자가 면역질환의 일종으로 관절 활액막에 만성적으로 비대 및 염증반응이 일어남으로써 연골과 골 파괴로 인한 관절의 파괴와 변형을 특징으로 하는 만성 염증성 질환이다. 본 발명에서는

이러한 류마티스 관절염에 대한 대표적인 동물 모델로서, 콜라겐 유도 관절염(collagen-induced arthritis; CIA) 모델을 이용하여, 본 발명의 곰보배추 추출물의 콜라겐 유도 관절염에 대한 치료 효과를 확인하였다.

[144] 구체적으로, 본 발명에서는 콜라겐 유도 관절염 마우스를 제작하기 위하여 6~8주령의 BALB/c 마우스를 이용하였다. 제2형 콜라겐(bovine CII, Chondrex)을 완전 프로인트 보강제(complete Freund adjuvant, Chondrex)와 혼합하여 마우스 꼬리에 CII 100 μ g 을 피내 주사하였으며, 면역화한 21일 후에 CII와 불완전 프로인트 보강제(incomplete Freund adjuvant)를 혼합한 후 2차 면역화 시켰다.

[145] 그 다음, 곰보배추 추출물이 관절염이 유도된 상기 마우스에 치료 효과를 나타낼 수 있는지를 확인하기 위하여, 곰보배추 에탄올 추출물을 2 mg/kg, 10 mg/kg 또는 50 mg/kg의 농도로 3차수에 녹인 후, 1차 면역화 후 28일째부터 매일 경구 투여하였으며, 비교군으로서는 현재 시중에 판매되고 있는 관절염 치료제 케토톱의 주성분인 케토프로펜(Ketoprofen, Sigma)을 3차수에 녹인 후 5 mg/kg를 경구투여 하여 관절염 치료 효과를 확인하였다. 이와 같은 투여 과정을 도 8에 나타내었으며, 도 8에서 W는 주(week)를 나타낸다. 관절염의 심한 정도(clinical arthritis index)는 발의 부종과 발적을 평가하였으며 0~4 점(0: 부종 없음, 1: 한 개의 관절의 가벼운 부종, 2: 2개 이상 관절의 중등도 부종, 3: 대부분의 관절의 심한 부종, 4: 전체적인 심한 부종)으로 분류하였다. 상기와 같은 실험을 수행한 결과를 도 9 내지 11에 나타내었다.

[146] 그 결과, 도 9 내지 11에 나타낸 바와 같이, 곰보배추 에탄올 추출물을 경구 투여한 경우, 제2형 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유도 마우스의 발두께, 관절염의 심한 정도, 발병률 모두를 효과적으로 억제하는 결과를 나타내었고, 이러한 효과는 관절염 치료제인 케토프로펜과 비슷함을 알 수 있었다(도 9, 10 및 11).

[147]

[148] 실시예 3-2: 혈중 면역글로블린 G1 및 G2a 검사

[149] 실험 종료 후 마우스를 사망시킨 뒤 개복하여 복강 내에서 채혈한 다음, 이를 3,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 면역 글로블린 G1과 G2a 측정은 BD Biosciences사의 ELISA 키트를 사용하여 다음과 같이 측정하였다.

[150] 구체적으로, 코팅 완충액(Coating Buffer, 1L 증류수 안에 8.40g NaHCO₃, 3.56g Na₂CO₃을 녹임, pH 9.5)에 포획 항체(Purified rat anti-mouse IgG1, Anti-mouse IgG2a)를 각각 1:250의 비율로 코팅 완충액에 희석시킨 뒤 각 웰에 100 μ L씩 분주하고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 뒤 세척 완충액(0.05% Tween-20 PBS)로 3번 세척하였다. 그 다음, Assay Diluent(10% FBS PBS)를 각 웰 당 200 μ L씩 분주한 뒤 37°C에서 1시간 반응 시키고 이를 다시 세척 완충액로 3번 세척하였다. 그 다음 마우스 혈청을 Assay Diluent에 1:300으로 희석하여 각 웰당 100 μ L씩 분주한 뒤 37°C에서 2시간 반응 시키고 5번 세척한 뒤 검출 항체(Biotin rat-anti

mouse IgG1, Bioninylated-anti-mouse IgG2a)과 효소 반응액(SAV-HRP)을 각각 1:250으로 Assay Diluent에 희석하여 각 웰당 100 μ L씩 워킹 용액(working solution)을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응 시킨 후 각각 1분 동안 7회 세척하였다. 마지막으로 기질 용액(Substrate Solution)을 100 μ L씩 분주하고 빛을 차단한 뒤 30분 방치한 다음 50 μ L의 중지 용액(Stop Solution) 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 12 및 13에 나타내었다.

[151] 그 결과, 도 12 및 13에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 곰보배추 추출물은 혈청 IgG1 및 IgG2a의 농도를 효과적으로 감소시키는 결과를 나타내었다(도 12, 13).

[152]

[153] 실시예 4: 곰보배추 추출물의 아토피 피부염(atopic dermatitis) 억제 효과

[154]

[155] 곰보배추 추출물의 아토피 피부염 억제효과를 측정하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[156]

[157] 실시예 4-1: 아토피 피부염 마우스 모델의 확립 및 곰보배추 추출물에 의한 귀두께 감소 효과 검증

[158] 아토피 피부염을 유도하기 위하여, 집먼지 진드기 추출물(house dust mite extract, Dermatophagoides farinae extract, DFE)과 우추(2,4-dinitrochlorobenzene)를 마우스에 사용하였으며, 아토피 피부염 유도 과정은 도 14에 나타내었다.

[159] 상기와 같은 아토피 피부염 마우스 모델을 이용하여, 본 발명의 곰보배추 추출물이 대표적인 자가면역질환인 아토피 피부염을 치료할 수 있는지를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[160] 구체적으로, 곰보배추 추출물의 경구 투여한 다음, 아토피 피부염 유도 마우스의 귀두께 감소 효과를 실험하였다.

[161]

[162] 1: 음성대조군 (비처리군);

[163] 2: 양성대조군 (DFE/DNCB 20 μ g/mL);

[164] 3: 추출물 (20, 100 mg/kg)

[165]

[166] 용액을 바르기 전 마우스의 귀에 반창고를 사용하여 동일한 힘과 횡수로 스트리핑(striping)을 3, 4회 반복한 후 DFE를 10 mg/mL으로 녹인 용액을 매주 목요일에 마우스 귀의 앞/뒷면에 20 μ g씩 도포하였다. 또한, AOO(acetone/olive oil, 1:3)에 녹인 DNCB(1%)는 매주 월요일에 마우스 귀의 앞/뒷면에 20 μ g씩 도포하여 화요일과 금요일마다 귀두께를 측정하였다. 이와 같이, DFE와 DNCB를 마우스 피부에 도포하면 귀두께가 증가하게 되는데, 이러한 귀두께 증가를 곰보배추 추출물이 억제할 수 있는지를 확인하였다.

[167] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 곰보배추 에탄올 추출물을 경구 투여한

결과, 농도 의존적으로 아토피 피부염에 의한 귀 두께를 감소시키는 결과를 나타내었다(도 15).

[168]

[169] 실시예 4-2: 곰보배추 추출물에 의한 아토피 피부염에 의한 혈중 면역글로블린 E와 면역 글로블린 G2a의 억제 효과 검증

[170] 4주간의 실험 종료 후 마우스를 사망시킨 뒤 채혈한 다음, 이를 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 면역 글로블린 E와 면역 글로블린 G2a의 측정은 BD Biosciences사의 ELISA 키트를 사용하여 다음과 같이 측정하였다.

[171] 코팅 완충액(1L 증류수 안에 8.40 g NaHCO₃, 3.56 g Na₂CO₃, pH 9.5)에 포획 항체(Purified rat anti-mouse IgG1, Anti-mouse IgG2a)를 각각 1:250의 비율로 코팅 완충액에 희석시킨 뒤 각 웰에 100 μ L씩 분주하고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 뒤 세척 완충액(0.05% Tween-20 PBS)으로 3번 세척하였다. 그 다음 Assay Diluent(10% FBS PBS)를 각 웰 당 200 μ L씩 분주한 뒤 37°C에서 1시간 반응시키고 이를 다시 세척 완충액으로 3번 세척하였다. 그 다음 마우스 혈청을 Assay Diluent에 1:300으로 희석하여 100 μ L씩 각 웰 당 분주한 뒤 37°C에서 2시간 반응시키고 5번 세척한 뒤 검출 항체(Biotin rat-anti mouse IgG1, Bioninylated-anti-mouse IgG2a)과 효소 시약(SAv-HRP)을 각각 1:250으로 Assay Diluent에 희석하여 각 웰 당 100 μ L씩 워킹 용액(working solution)을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 각각 1분 동안 7회 세척하였다. 마지막으로 기질 용액을 100 μ L씩 분주하고 빛을 차단한 뒤 30분 방치한 다음 50 μ L의 중지 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 16 및 17에 나타내었다.

[172] 그 결과, 도 16, 17에서 나타난 바와 같이, 곰보배추 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 혈청 내 면역 글로블린 E와 면역 글로블린 G2a 양을 억제하는 결과를 나타내었다.

[173]

[174] 실시예 4-3: 아토피 피부염에 의한 히스타민의 유리 억제 측정

[175] 에펜돌프 튜브에 혈청을 취하여 PBS에 1/100으로 희석한 뒤 0.1M HCl 450 μ L와 60% 과염소산 용액 50 μ L를 혼합한 후에 원심분리(400 g, 20분)하였다. 그 다음, 상등액 800 μ L를 취해 5M NaOH 용액 500 μ L, 증류수 3mL, n-butanol 10mL, NaCl 1.2g을 혼합한 시험관에 넣고 이를 진탕한 후에 원심분리(500g, 10분)를 수행하였다. 상기 시험관에서 부탄올(Butanol)층 8 ml를 취해 0.1 M HCl 3mL, n-heptane 10mL를 가하여 진탕하고 다시 원심분리(500g, 10분)를 수행하여 얻어진 수층 2mL에 1M NaOH 400 μ L, 1% o-phthaldialdehyde 용액(Sigma) 100 μ L를 가하여 혼합하고 2분 동안 방치한 다음, 방출파장(emission) 438nm, 여기파장(excitation) 353 nm에서 형광강도를 형광분석기 (RF-5301 PC, Shimadzu 사)를 이용하여 측정하였다.

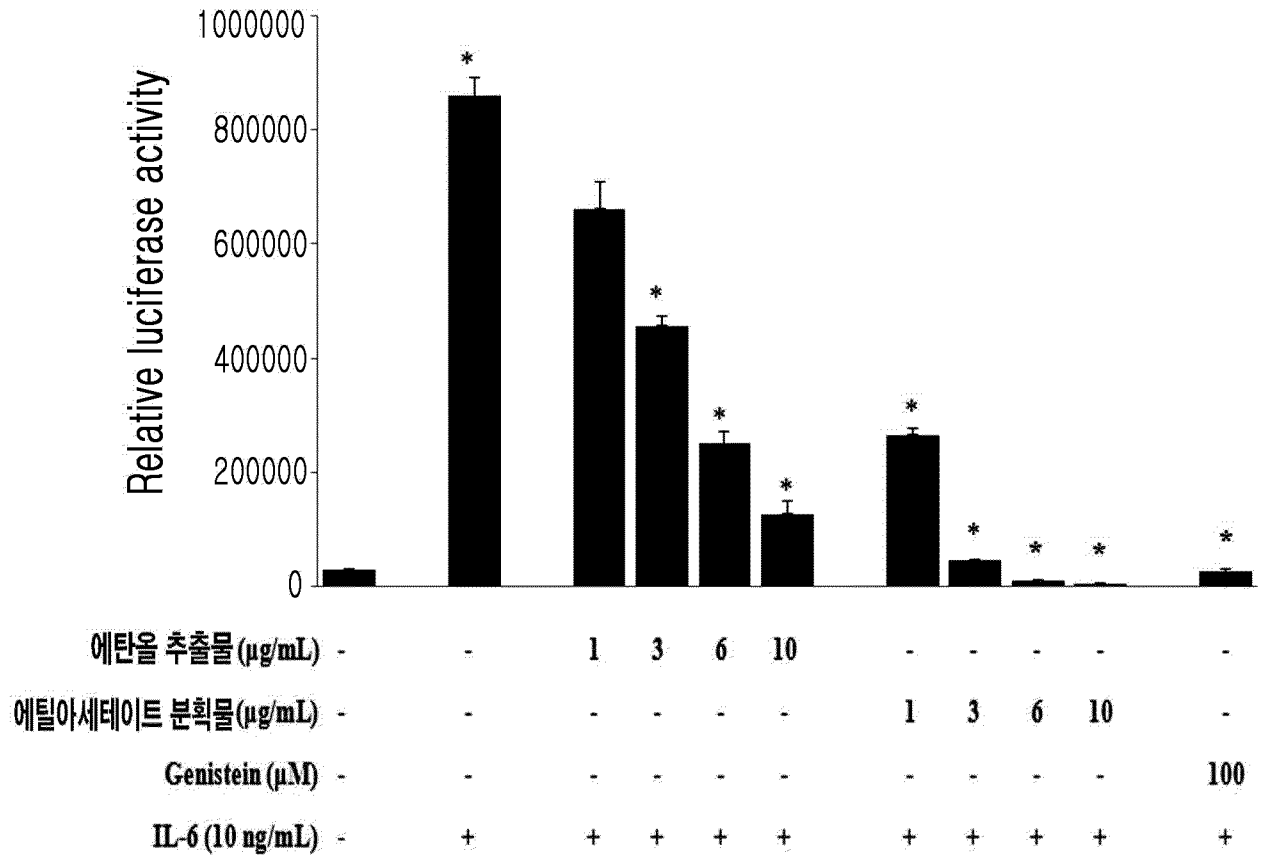
- [176] 그 결과, 도 18에서 나타난 바와 같이 곰보배추 에탄올 추출물은 농도의존적으로 혈청 내 히스타민의 유리를 억제하는 결과를 나타내어, 상기 곰보배추 에탄올 추출물이 대표적인 자가면역질환인 아토피 피부염의 치료효과를 나타낼 수 있음을 시사하였다.
- [177]
- [178] 실시예 4-4: 아토피 피부염에 의한 염증 유발성 사이토카인의 분비 저해활성 검증
- [179] 실험 종료 후 마우스를 사망시킨 뒤 귀조직을 잘라낸다. 귀조직 내의 염증 유발성 사이토카인 발현을 측정하기 위해, Maxime RT PreMix(Random primer, iNtRON Biotechnology)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 각 튜브 당 2 μ L의 cDNA, 1 μ L의 센스 및 안티센스 프라이머 용액 (0.4 μ M), 12.5 μ L의 SYBR Premix Ex Taq (Takarabio), 와 9.5 μ L의 dH₂O를 함께 혼합하여 총 25 μ L가 되도록 하였다. TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-31, IL-17 mRNA의 발현 정도는 TP850 소프트웨어를 사용해 real-time PCR을 통해 측정하였다.
- [180] 그 결과, 도 19에서 나타난 바와 같이 곰보배추 에탄올 추출물은 농도의존적으로 염증 유발성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-31 및 IL-17 모두의 발현을 억제하여, 분비 억제 효과를 나타낼 수 있음을 시사하였다.
- [181]
- [182] 상기와 같은 결과를 종합하면, 본 발명의 곰보배추 추출물은 STAT3 매개 질환의 대표적인 예인, 류마티스 관절염 및 아토피 피부염 모두에 대한 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있음을 나타내므로, 이와 같은 결과는, 곰보배추 추출물을 염증성 질환, 자가면역질환 및 대사성 질환과 같은 다양한 STAT3 매개 질환의 치료에 이용할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [183]
- [184] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

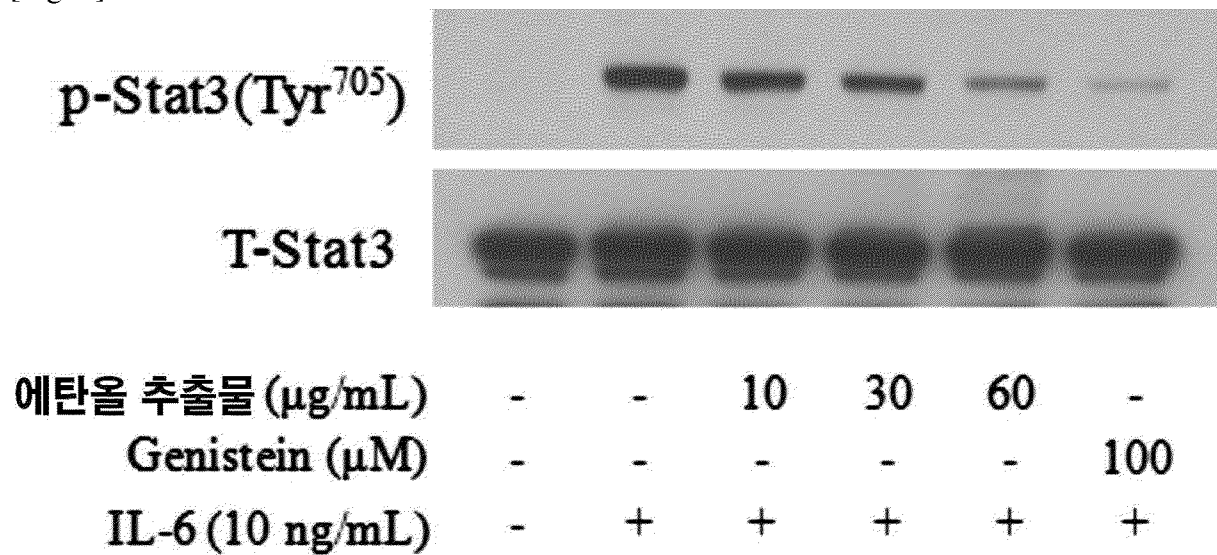
- [청구항 1] 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 알콜 및 이들의 혼합 용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 추출물인 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 알콜 용매는 에탄올인 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 STAT3 매개 질환은 염증성 질환, 자가면역질환 및 대사성 질환으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 염증성 질환은 형질구 증가증, 초면역 글로블린 혈증, 빈혈, 신염, 약액질, 목축업자 질병, 맥관증식신염, 포도막염, 만성 갑상선염, 지연과민증, 크론병, 췌장염, 연소성 특발성 위축증, 당뇨병 및 알쯔하이머로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 자가면역질환은 아토피성 피부염, 류마티스 관절염, 골관절염, 건선, 천식, 이식편대 숙주질환, 면역결핍증, 전신 홍반성 루푸스 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 대사성 질환은 골다공증, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 STAT3 매개 질환은 자가면역질환인 류마티스 관절염인 것인 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 STAT3 매개 질환은 자가면역질환인 아토피성 피부염인 것인 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 STAT3 매개 질환 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, STAT3 매개 질환 치료 방법.
- [청구항 13] 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 14] 곰보배추의 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는,

STAT3 매개 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

[Fig. 1]

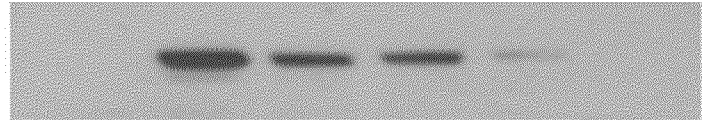


[Fig. 2]

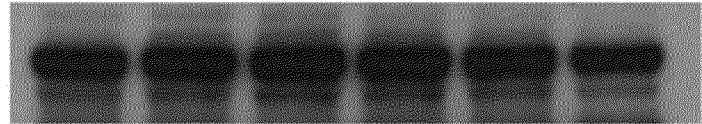


[Fig. 3]

p-Stat3(Tyr⁷⁰⁵)



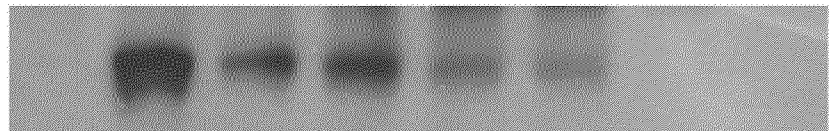
T-Stat3



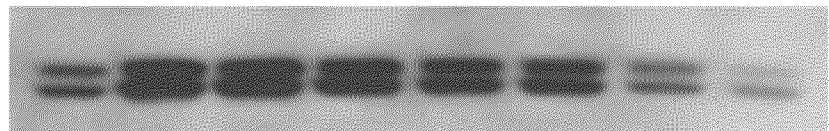
에틸아세테이트 분획물 (μg/mL)	-	-	10	30	60	-
Genistein (μM)	-	-	-	-	-	100
IL-6 (10 ng/mL)	-	+	+	+	+	+

[Fig. 4]

p-JAK2(Tyr^{1007/1008})

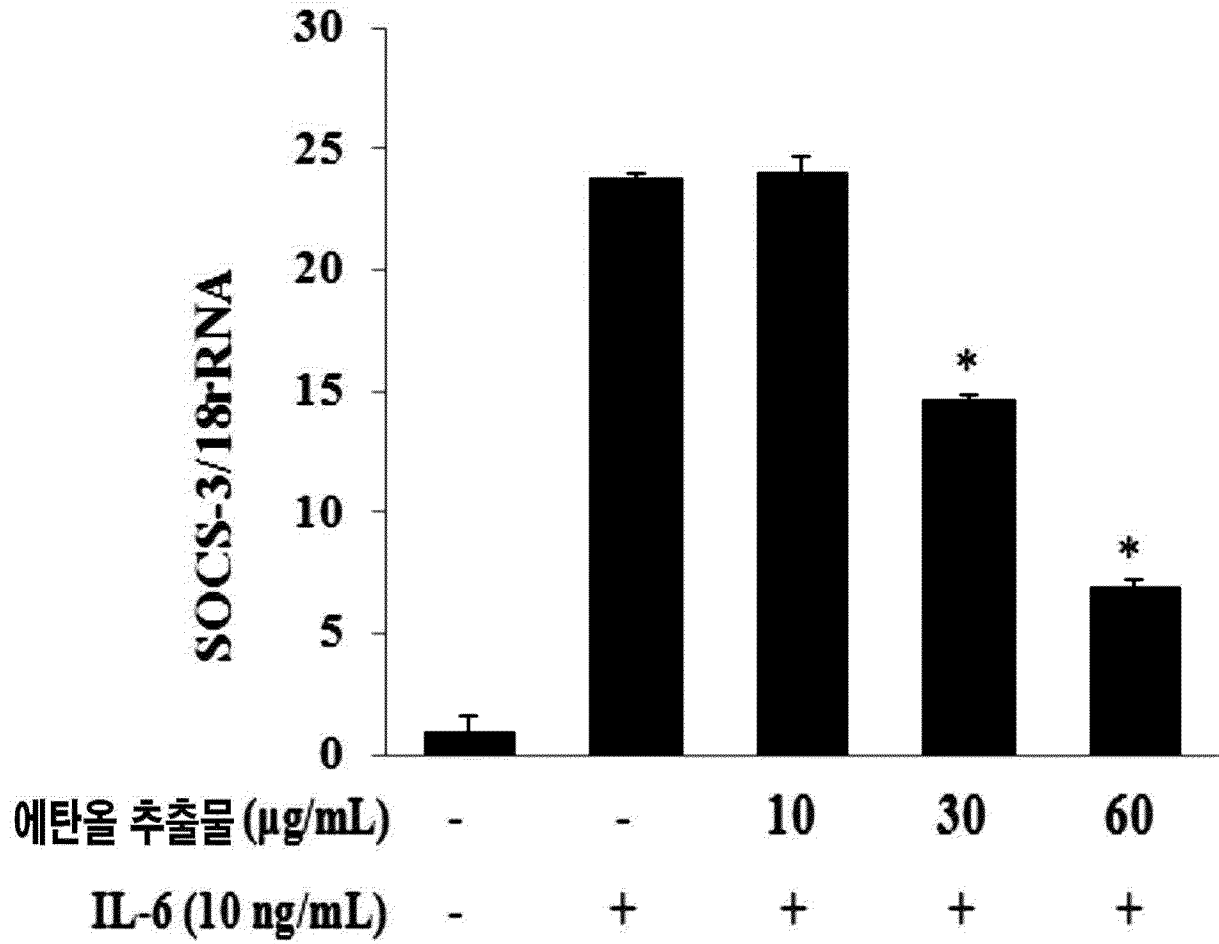


P-ERK(Tyr^{202/204})

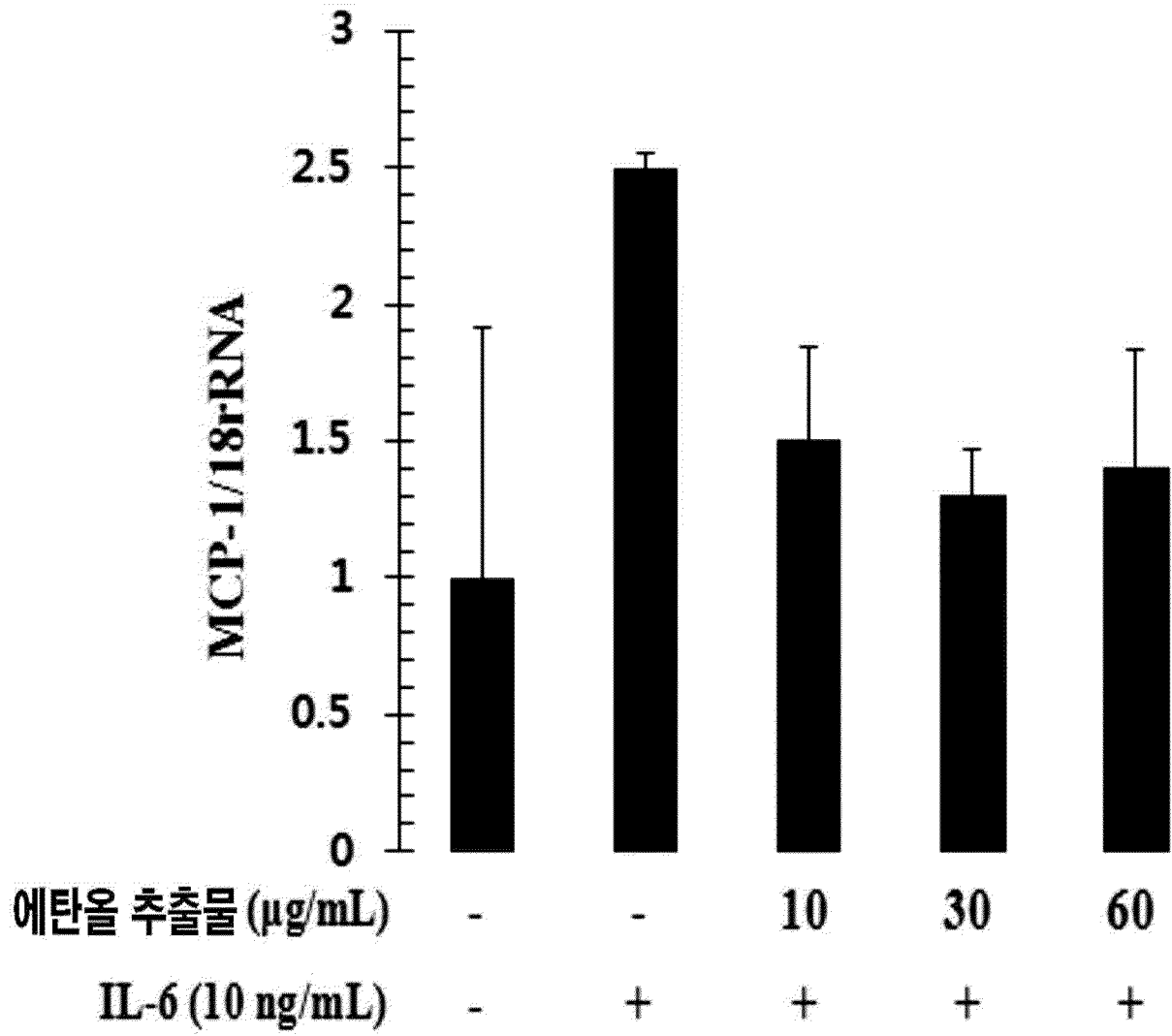


에탄올 추출물 (μg/mL)	-	-	10	30	60	-	-	-
에틸아세테이트 분획물 (μg/mL)	-	-	-	-	-	10	30	60
IL-6 (10 ng/mL)	-	+	+	+	+	+	+	+

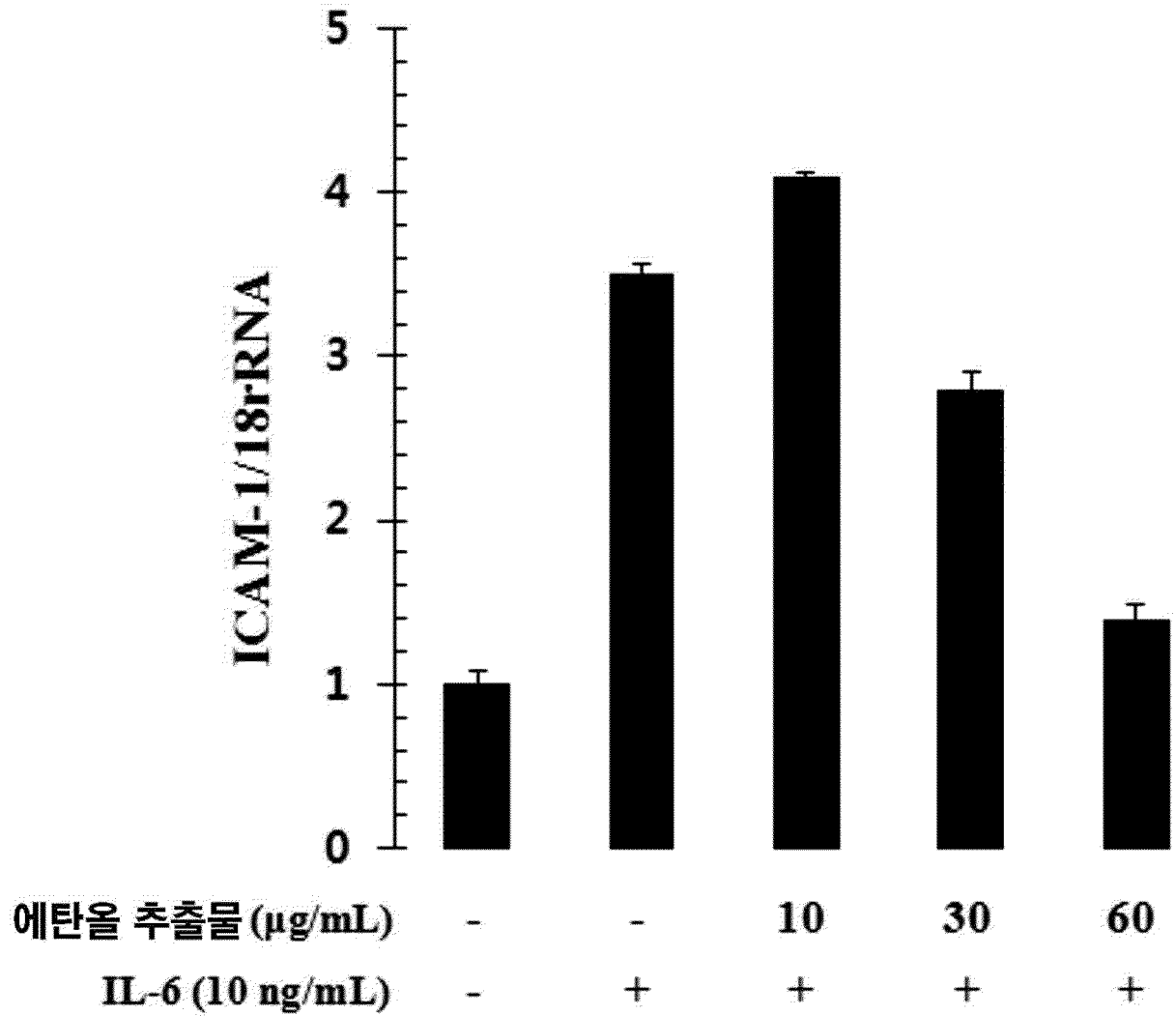
[Fig. 5]



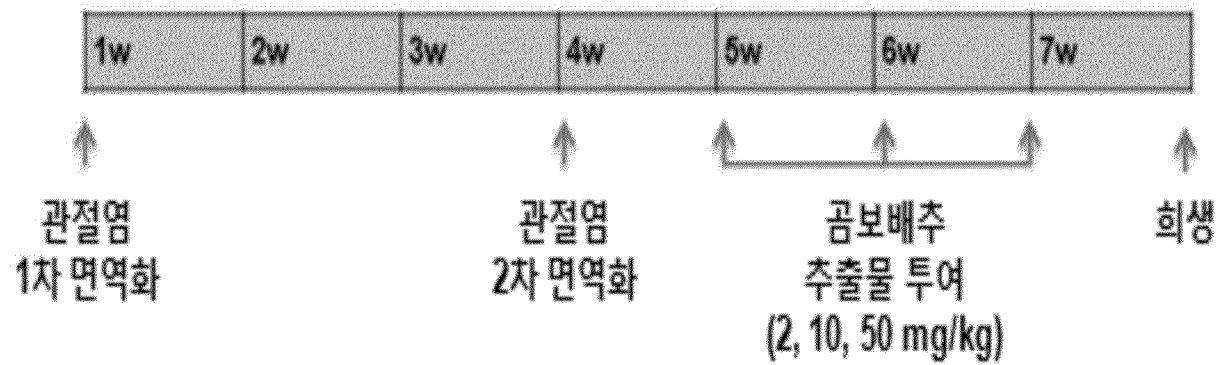
[Fig. 6]



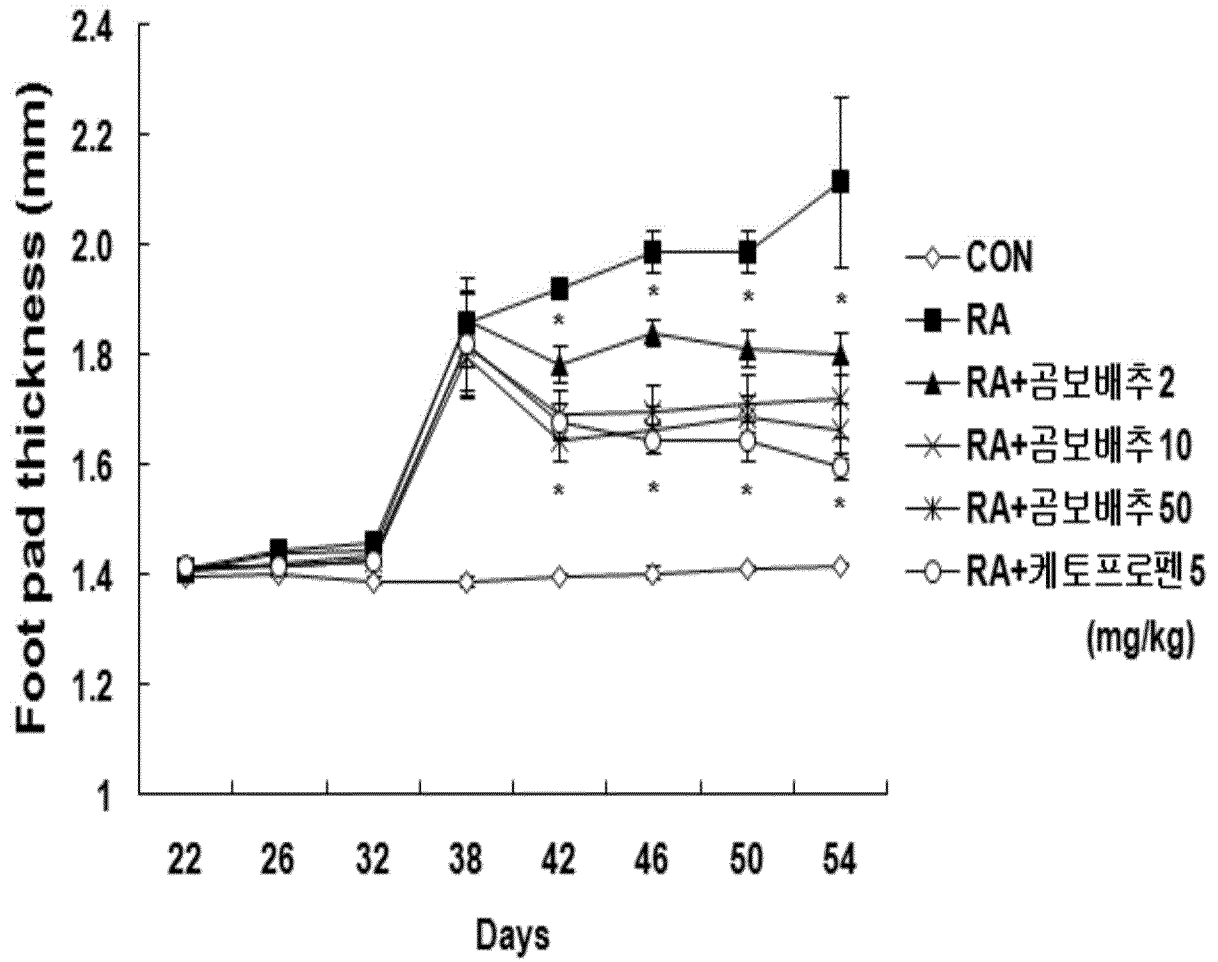
[Fig. 7]



[Fig. 8]

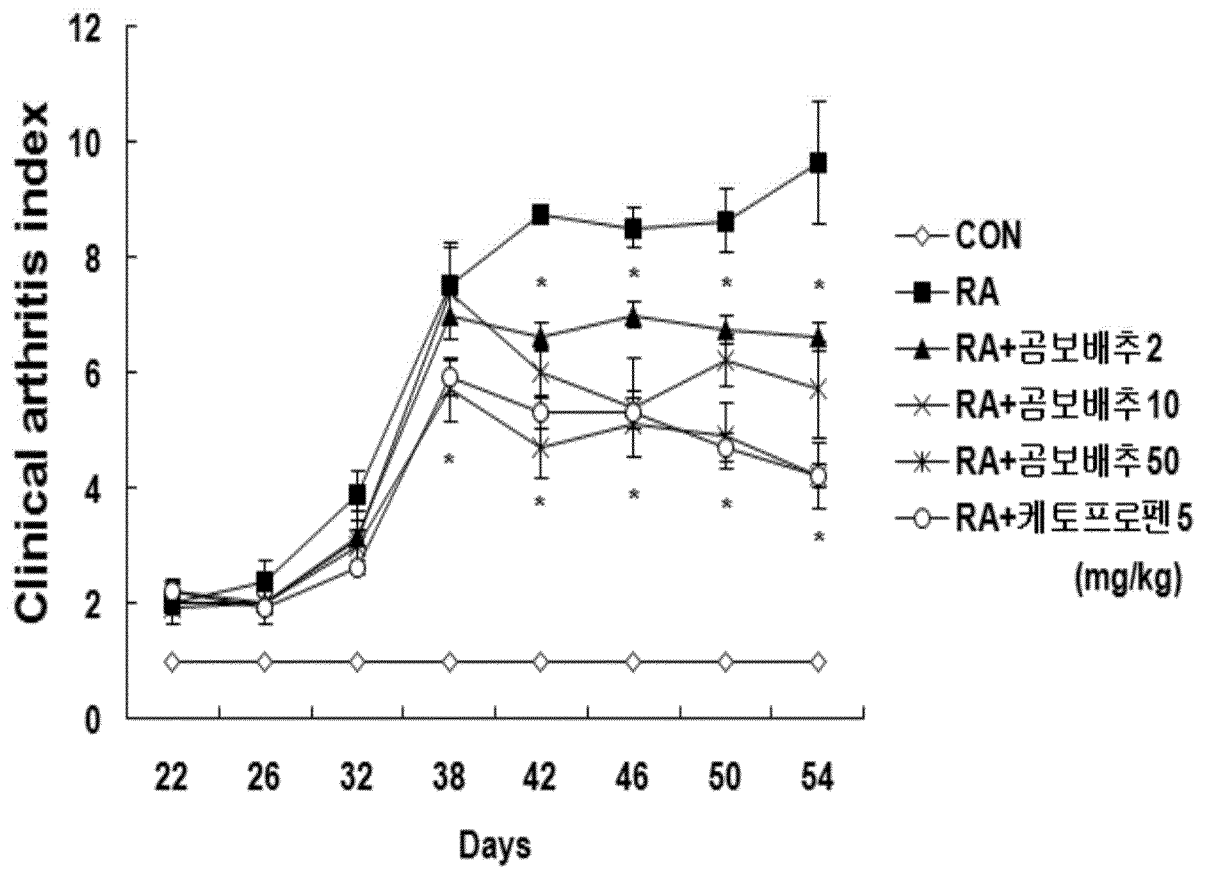


[Fig. 9]



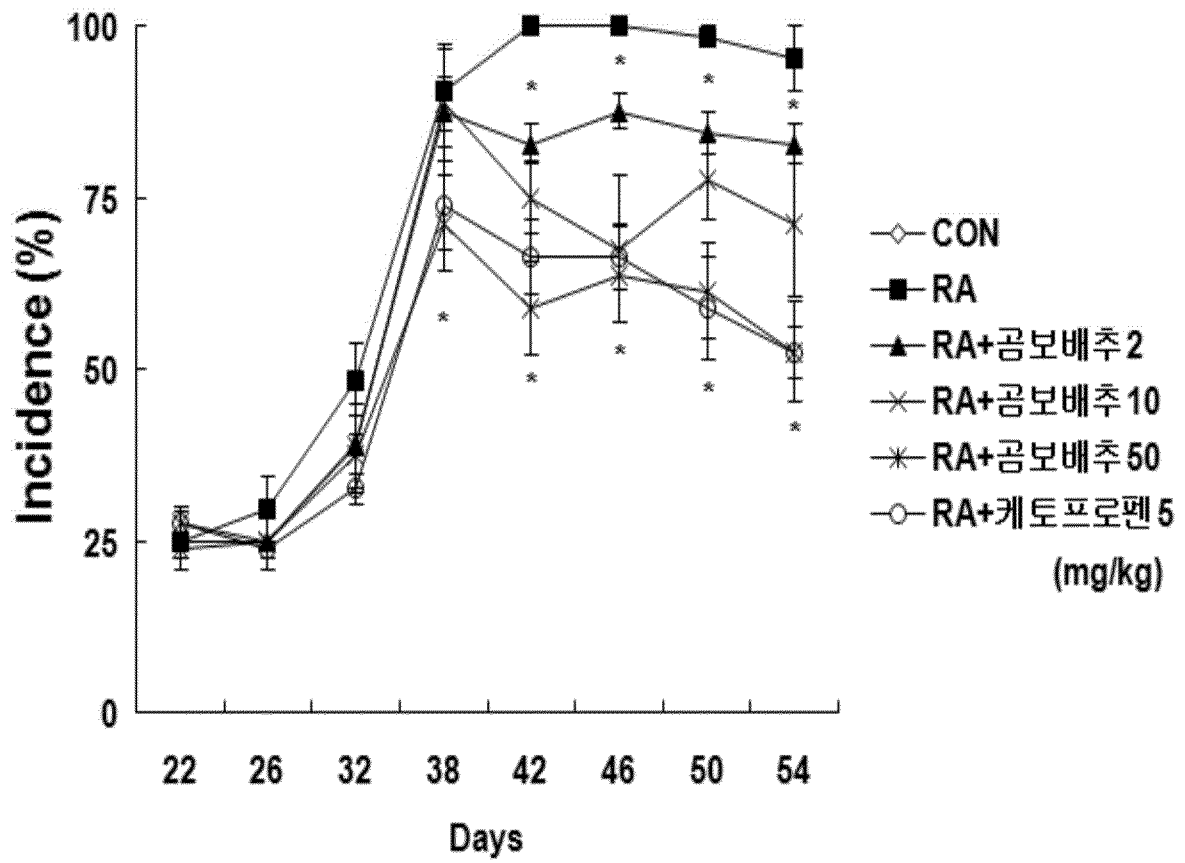
CON: 대조군 ; RA: 류마티스 관절염 ; 공보배추: 공보배추 추출물

[Fig. 10]



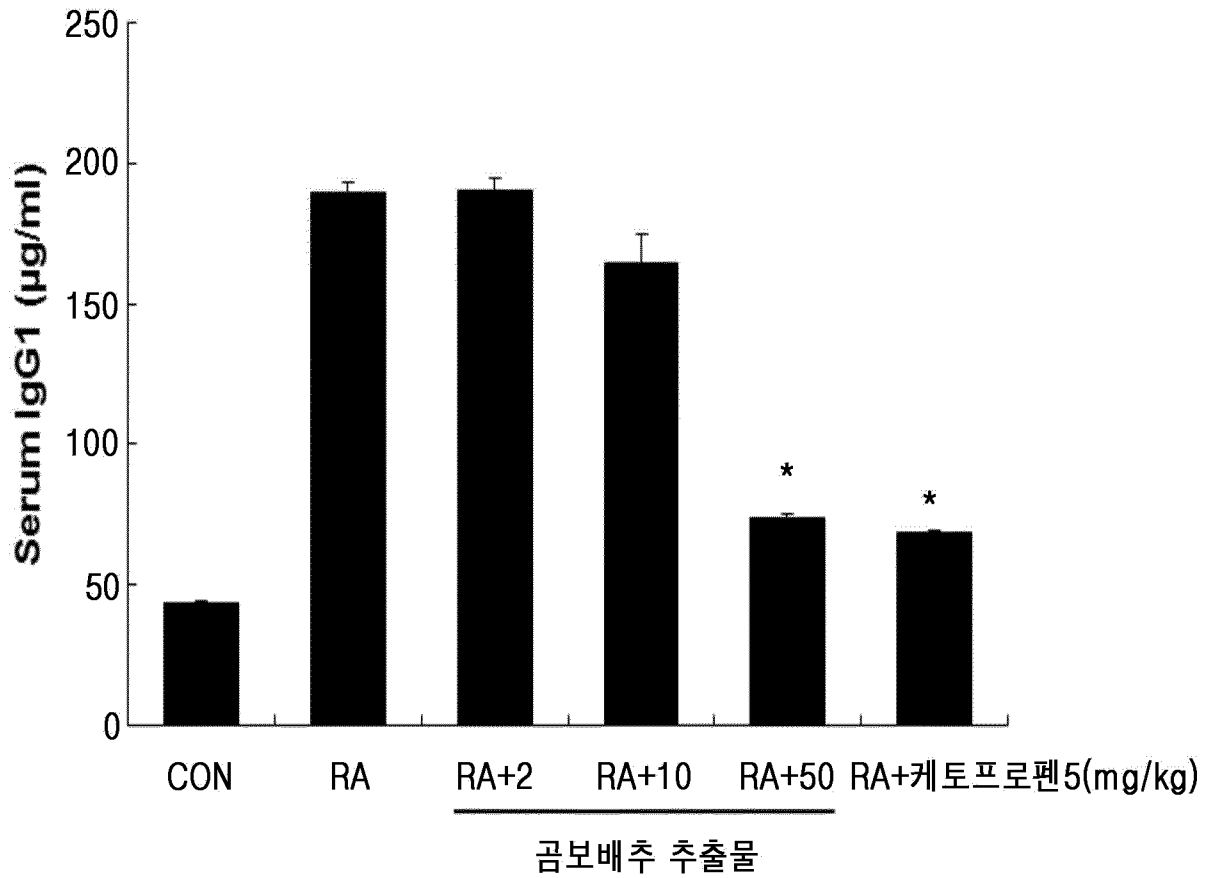
CON: 대조군 ; RA: 류마티스 관절염 ; 공보배추: 공보배추 추출물

[Fig. 11]



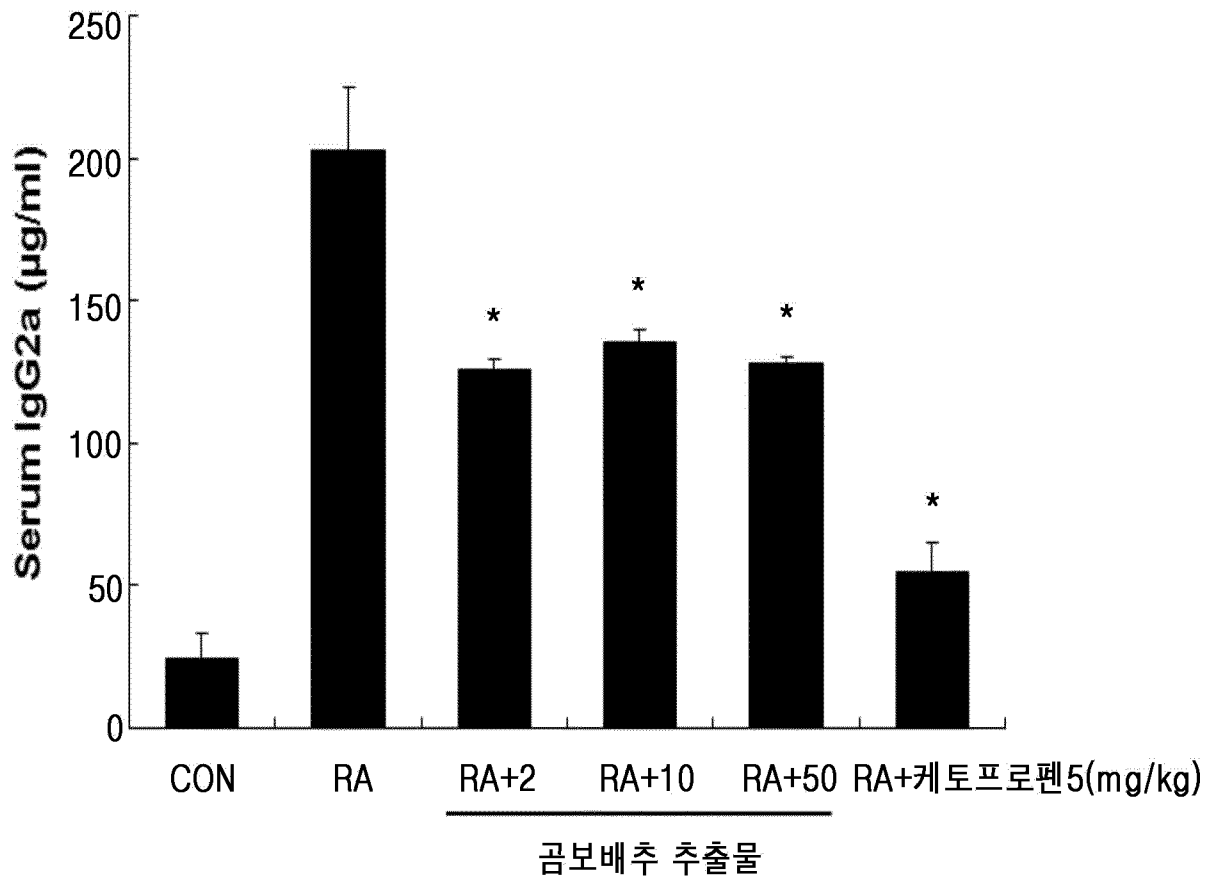
CON: 대조군 ; RA : 류마티스 관절염 ; 공보배추: 공보배추 추출물

[Fig. 12]



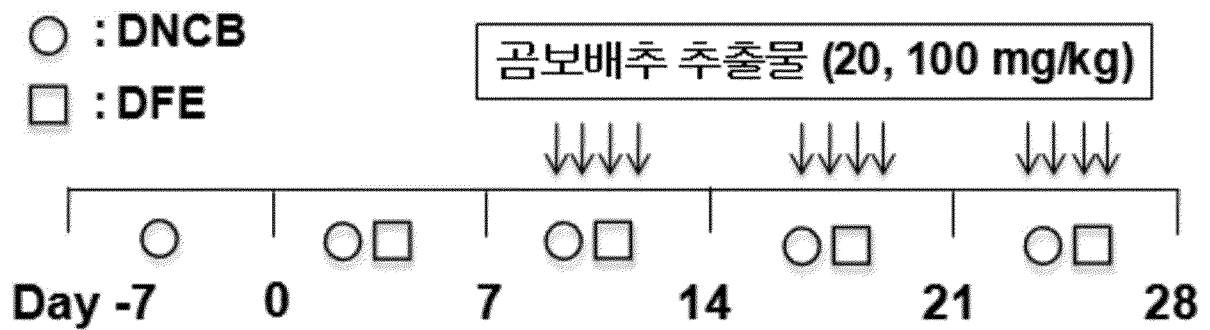
CON:대조군;RA:류마티스 관절염

[Fig. 13]

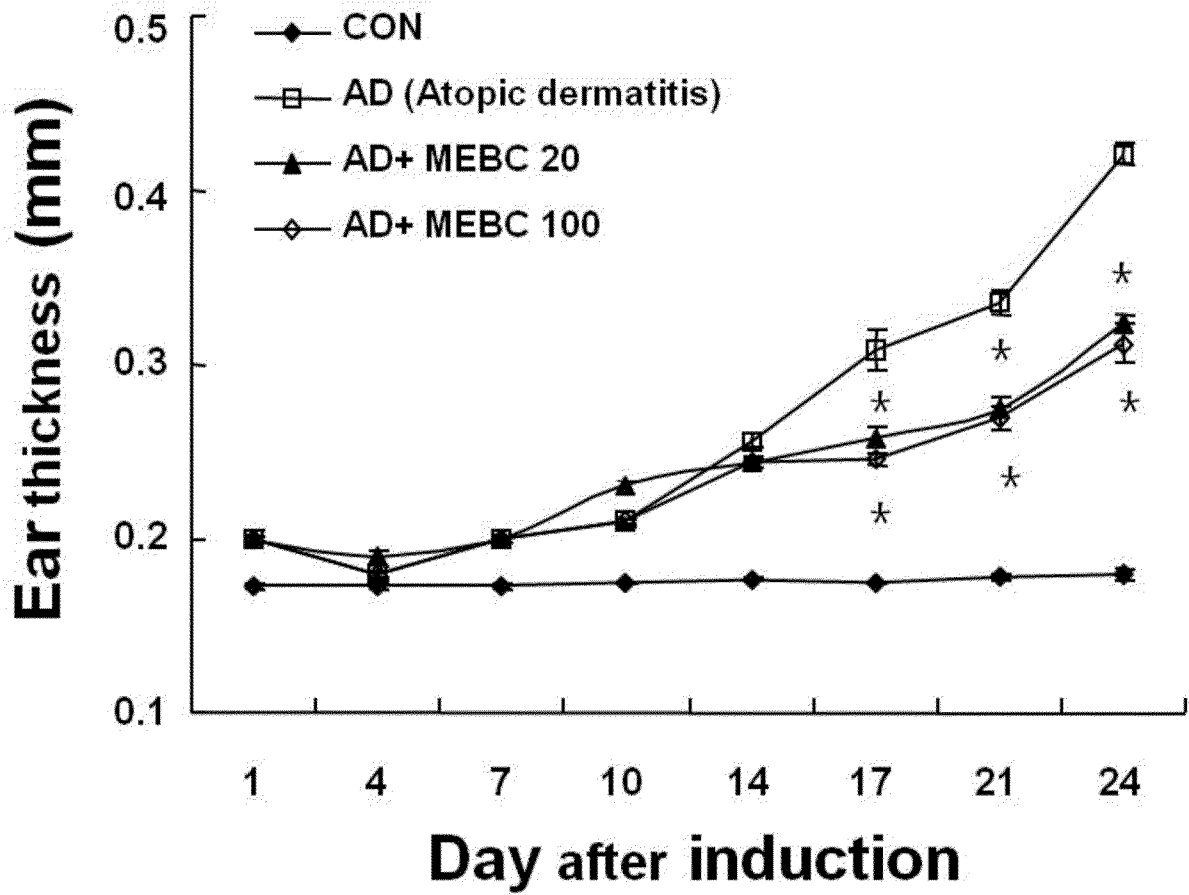


CON:대조군;RA:류마티스 관절염

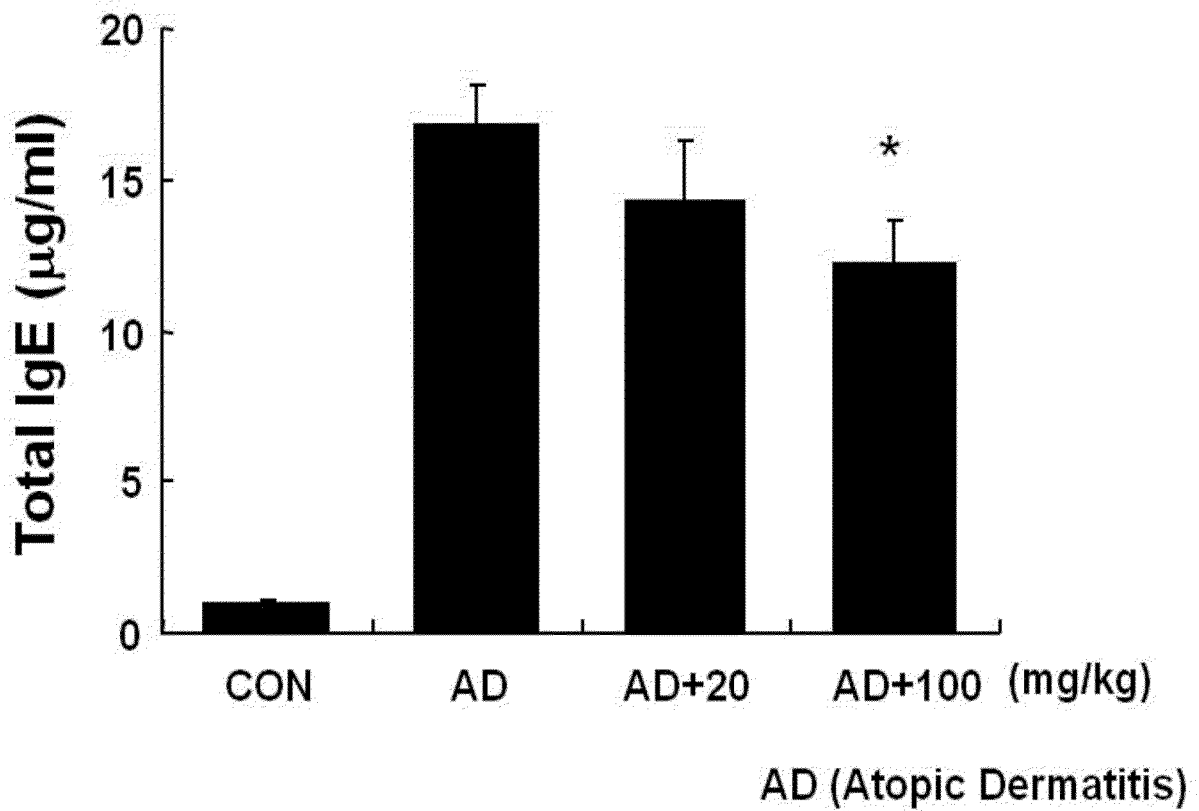
[Fig. 14]



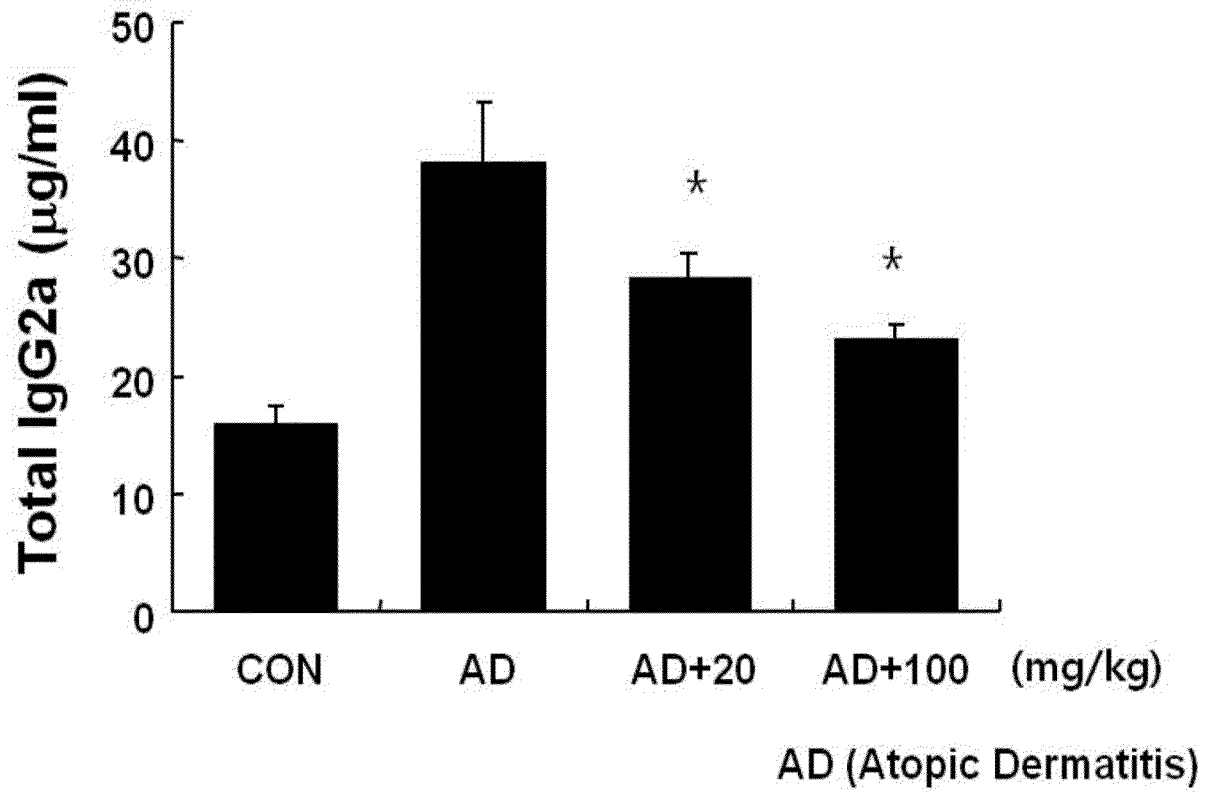
[Fig. 15]



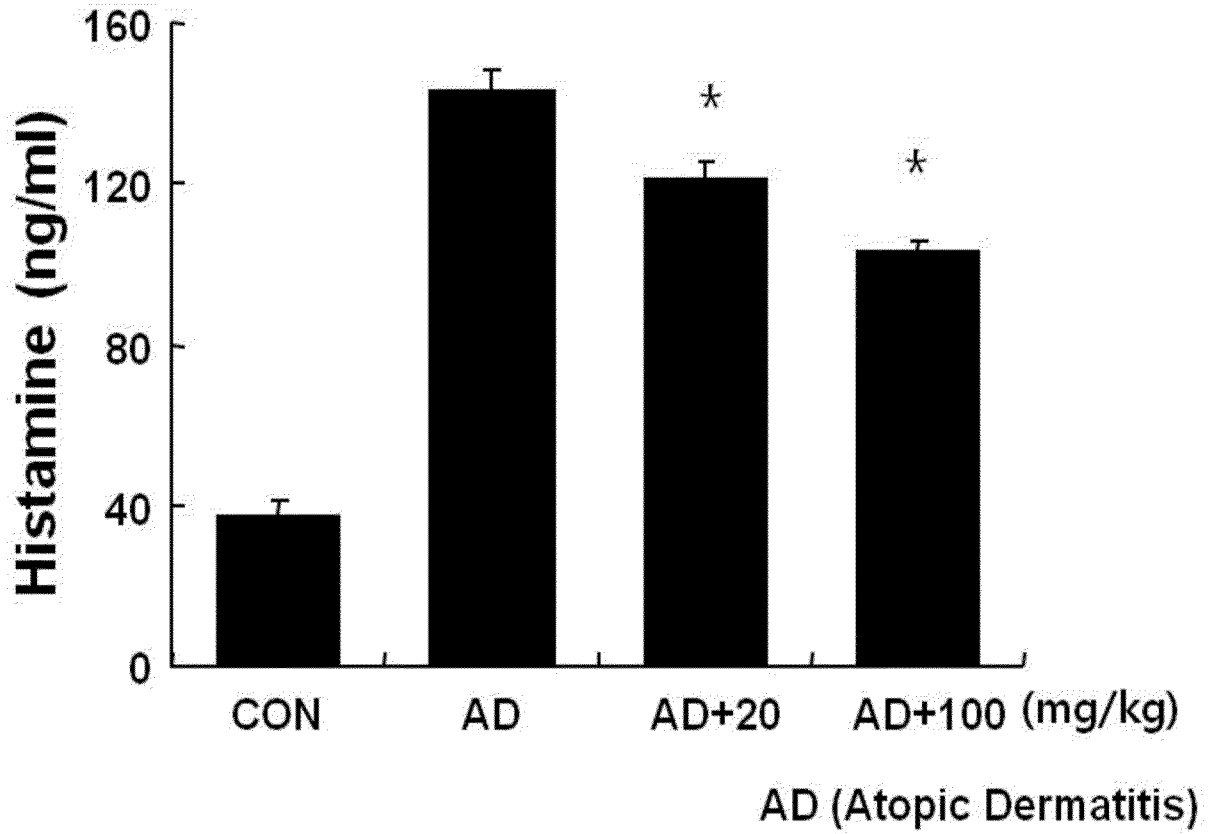
[Fig. 16]



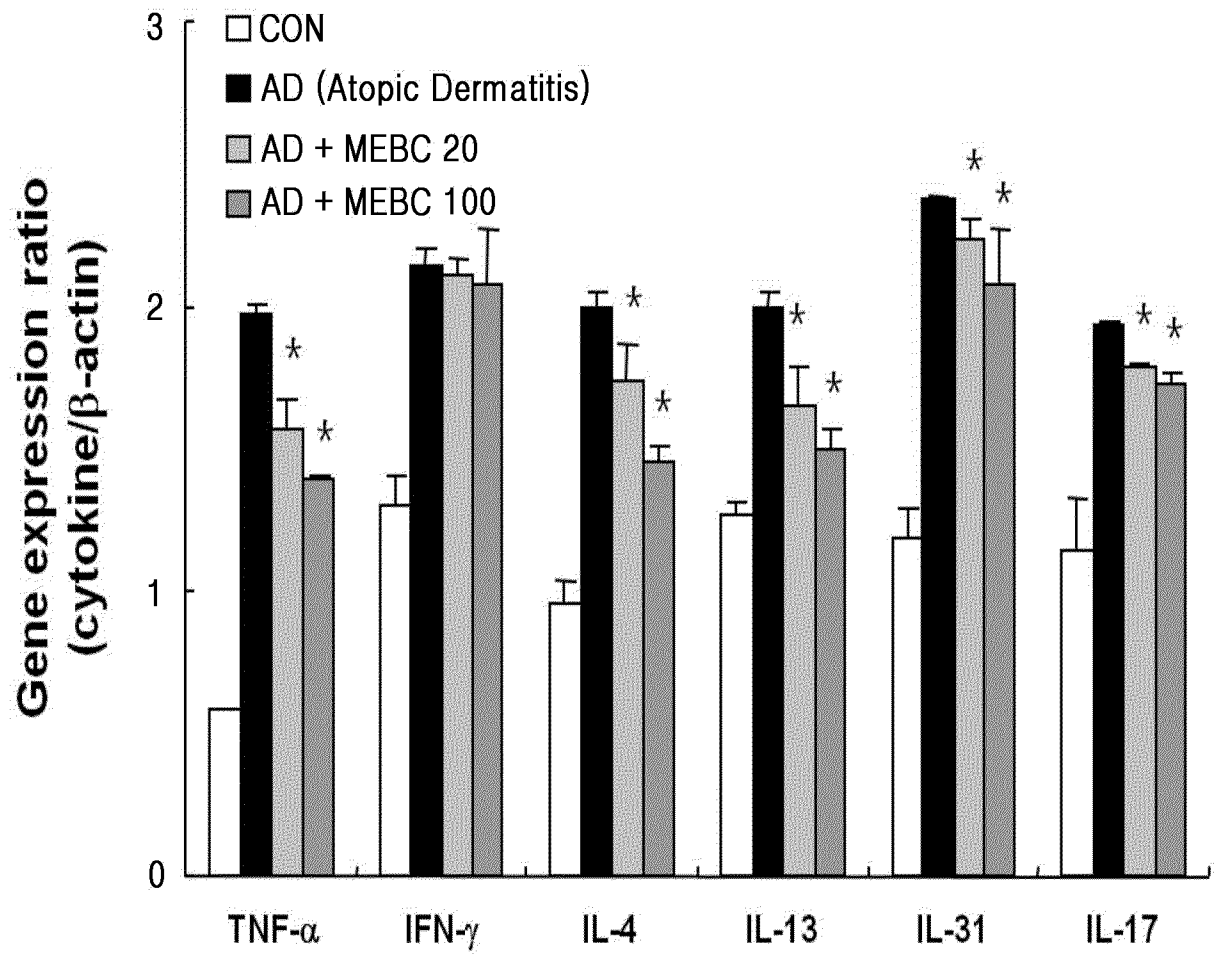
[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/31(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/31; A61Q 19/08; A23L 1/212; A61K 8/97; A23L 1/30; A61P 29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: salvia plebeia R. Br., Salvia plebeia R. Br., Salvia plebeia, salvia plebeia R. Br., rheumatism, atopy, anti-inflammation, inflammation, sclerosis of the arteries, STAT3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JO, Sun Young et al., "A Study on the Anti-inflammatory and Anti-allergic Effect of Salvia plebeia R. extracts", the korean society of pharmacognosy, 2010, vol. 41, no. 1, pages 31-37 See abstract; pages 31-36.	1-11,13,14
X	SHIN, T.-Y. et al., "Effect of Salvia plebeia on IgE antibody mediated allergic reaction in rats", International Journal of Oriental Medicine, 2000, vol. 1, no. 2, pages 29-35. See abstract and page 33.	1-8,10,11,13,14
X	KR 10-2011-0078672 A (COREANA COSMETICS CO., LTD.) 07 July 2011 See claims 1 to 11 and paragraph [0016].	1-8,10,11,13,14
X	JUNG, H.-J. et al., "Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of Salvia plebeia R. Brown", Journal of Ethnopharmacology, 2009, vol. 126, pages 355-360. See abstract and page 359.	1-8,10,11,13,14
A	KR 10-0813483 B1 (KIM, Jae Myoung et al.) 13 March 2008 See claims 1 and 2.	1-11,13,14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 SEPTEMBER 2013 (25.09.2013)

Date of mailing of the international search report

25 SEPTEMBER 2013 (25.09.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004457

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/004457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0078672 A	07/07/2011	KR 10-1176528 B	17/08/2012
KR 10-0813483 B1	13/03/2008	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/31(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/31; A61Q 19/08; A23L 1/212; A61K 8/97; A23L 1/30; A61P 29/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 곱보배추, 배암차즈기, 여지초, 설건초, 류마티스, 아토피, 항염, 염증, 동맥경화, STAT3		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	조선영 외 5명, `배암차즈기(Salvia plebeia R.) 주출물의 항염 및 항 알레르기 효과`, 생약학회지, 2010, 41권, 1호, 페이지 31-37 요약; 페이지 31-36 참조.	1-11,13,14
X	Shin, T.-Y. 외 6명, `Effect of Salvia plebeia on IgE antibody mediated allergic reaction in rats`, International Journal of Oriental Medicine, 2000, 1권, 2호, 페이지 29-35. 요약 및 페이지 33 참조.	1-8,10,11,13,14
X	KR 10-2011-0078672 A (주식회사 코리아나화장품) 2011.07.07 청구항 제1항 내지 청구항 제11항 및 단락 [0016] 참조.	1-8,10,11,13,14
X	JUNG, H.-J. 외 3명, `Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of Salvia plebeia R. Brown`, Journal of Ethnopharmacology, 2009, 126권, 페이지 355-360. 요약 및 페이지 359.	1-8,10,11,13,14
A	KR 10-0813483 B1 (김재명 외 1명) 2008.03.13 청구항 제1항 및 제2항 참조.	1-11,13,14
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 09월 25일 (25.09.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 09월 25일 (25.09.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 최승희 전화번호 +82-42-481-8740 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제12항은 사람의 치료방법에 관한 것으로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재
- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
 - 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
 - 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0078672 A	2011/07/07	KR 10-1176528 B	2012/08/17
KR 10-0813483 B1	2008/03/13	없음	