(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0031996
(43) 공개일자 2024년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/89 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/89 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0027770(분할)
(22) 출원일자 2024년02월27일
심사청구일자 2024년02월27일
(62) 원출원 특허 10-2020-0186456
원출원일자 2020년12월29일
심사청구일자 2020년12월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
안광석
서울특별시 성북구 길음로 33, 809동 1802호
양민희
서울특별시 송파구 위례광장로 215 (장지동, 위례스타힐스)
(74) 대리인
특허법인한얼

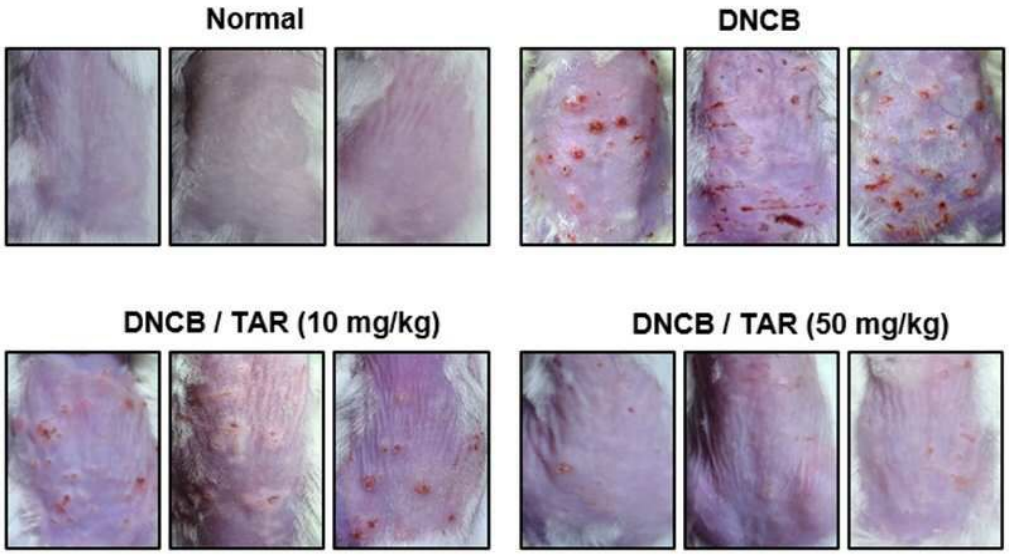
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **세모고랭이 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 및 사료조성물에 관한 것이다. 본 발명의 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학 조성물은 세포독성을 나타내지 않으면서도, 염증에 의해 생성되는 NO 생성 및 염증성 단백질의 발현을 억제할 수 있으므로, 안전하면서도 효과적인 염증성 질환 치료제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3b



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세모고랭이 추출물은 세모고랭이를 극성용매 또는 비극성용매로 추출하여 수득한 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 극성 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 용매인 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 추출은 냉침추출법, 가열추출법, 초음파추출법, 환류추출법 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법을 사용하여 수행되는 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 세모고랭이 분획물은 상기 세모고랭이 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 및 이들의 조합으로부터 선택되는 분획방법에 적용하여 수득하는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항의 약학 조성물을 아토피 피부염이 발병되거나 또는 발병될 가능성이 있는 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 아토피 피부염의 예방 또는 치료방법.

청구항 8

세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는, 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는, 아토피 피부염 예방 또는 개선용 사료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세모고랭이 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 및 사료조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체는 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이루고 있으나, 여러 가지 요인들로 인하여 이러한 균형 상태를 잃고 산화를 촉진하는 방향으로 기울게 되면, 생체 내에 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 세포손상 및 병리적 질환을 유발하게 된다. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 화학적으로 불안정하고 반응성이 높아 DNA, 단백질, 지질 및 탄수화물과 같은 여러 생체물질과 쉽게 반응할 수 있으며, 생체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 암 등을 초래하게 된다.

[0003] 한편, 인체 내에서 대식세포는 병원체에 반응하여 종양 괴사 인자-α(tumor necrotic factor-α, TNF-α), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-1β(IL-1β) 등과 같은 염증유발인자를 생성하고, 유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)와 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2, COX-2)를 합성하여 일산화질소(NO) 및 프로스타글란딘(prostaglandin E2, PGE_2)을 생성한다. 생리학적으로 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 염증 반응이 일어나게 되면 관련 세포들에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다.

[0004] 이러한 염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등이 생체로 유입되면, 숙주세포는 감염을 극복하기 위해 염증반응의 원인이 되는 사이토카인 등의 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다. 그리고, 이러한 미생물 및 생체의 이물질 등이 면역세포에 의해 인식이 되면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서도 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발한다고 알려져 있다. 분자생물학 및 유전공학의 발전에 따라, 다양한 연구를 통하여 염증과 관련된 세포내의 분자표적들이 밝혀지고 있으며, 특히 감염초기 비 특이적 선천성 면역반응 단계에서 병원체의 특정부분을 인지하는 유전자가 밝혀지면서 염증초기의 발생과정에 대한 새로운 분자적 기전 해석이 이루어지고 있다.

[0005] 상기 연구결과의 다른 하나로서, 염증반응시에 수반되는 NO의 생성을 억제할 수 있는 물질이 염증반응을 억제할 수 있음이 규명되었다. 특히, 천연물로부터 유래되어 생체에 대한 안전성이 확보되면서도, NO의 생성을 억제할 수 있는 성분이 규명되었다. 예를 들어, 일본공개특허 제2000-319154호에는 다양한 천연물로부터 유래된 카페산, 클로로겐 산, 계피산, p-쿠말산, 헤스페리딘, 로스 마린산 등의 페닐프로파노이드 화합물이 피부염증을 억제할 수 있음이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2012-0077219호에는 콜라비 추출물 또는 이로부터 유래된 설포라판을 포함하는 아토피 피부염 완화용 피부 외용제 조성물이 개시되어 있다.

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 천연물로부터 유래되어, 안전하면서도 우수한 염증억제 효과를 나타내는 성분을 규명하고자, 예의 연구노력한 결과, 세모고랭이 추출물이 안전하면서도 우수한 염증억제 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태는 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 용어 "세모고랭이(Schoenoplectus triqueter)"란, 외떡잎식물 벼목 사초과의 여러해살이풀을 의미하는데, 다음과 같은 특징을 갖는다고 알려져 있다: 물가에서 자란다. 땅속줄기가 옆으로 뻗으면서 마디에서 녹색의 원줄기가 1개씩 자라서 높이 50~100 cm로 된다. 잎은 퇴화하고 잎집으로 되어 원줄기를 감싸며 원대는 삼각형이다. 포는 1개가 원줄기와 연속되어 원줄기같이 보인다. 꽃은 7~10월에 핀다. 작은이삭은 타원형에서 달걀모양이고 1~3개씩 모여 달리며 전체가 산방상으로 된다. 비늘조각은 긴 타원형이며 막질(膜質:얇은 종이처럼 반투명한 것)이고 길이 4 mm 내외이다. 열매는 수과(瘦果)이며 달걀을 거꾸로 세운 모양이고 렌즈형이며 갈색으로 성숙한다. 암술머리는 2개이고, 화피갈래조각은 가시와 같이 생기며 3~5개이다. 한국을 비롯한 아시아와 유럽에 분포한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 세모고랭이는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 용어 "추출물"이란, 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 세모고랭이 추출물을 의미한다. 상기 세모고랭이 추출물은 상기 세모고랭이의 식물전체, 이의 건조물, 가공물 등을 단독으로 또는 조합하여, 물 또는 다양한 유기용매 등으로 추출하여 수득할 수 있다. 이때, 사용되는 유기용매는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 극성용매 또는 비극성용매가 될 수 있고, 다른 예로서, 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 등이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 에탄올 또는 그의 혼합용매를 사용할 수 있다. 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법 역시 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 세모고랭이의 전체, 세모고랭이의 일부, 이들의 건조물 또는 이들의 가공물 등을 상기 용매에 침지하고, 10 내지 25℃의 상온에서 추출하는 냉침추출법, 40 내지 100℃로 가열하여 추출하는 가열추출법, 초음파를 가하여 추출하는 초음파추출법, 환류냉각기를 이용한 환류추출법 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어 "분획물"이란, 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 분획물은 상기 세모고랭이 추출물을 다양한 분획방법에 적용하여 수득한 분획물로 해석될 수 있다. 상기 추출물의 분획물은 상기 추출물을 다양한 분획방법에 적용하여 수득할 수 있는데, 상기 분획방법은 특별히 제한되지 않으나, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법 등이 될 수 있다. 특히, 상기 용매 분획법에 사용되는 용매는 특별히 이에 제한되지 않으나, 극성 용매 또는 비극성 용매를 사용할 수 있고, 바람직하

게는 비극성 용매를 사용할 수 있다. 상기 용매 분획법은 비극성 수준이 높은 용매로부터 낮은 용매를 사용하여 상기 추출물을 순차적으로 분획하는 방식으로 수행될 수 있는데, 예를 들어 헥산 또는 에틸아세테이트를 이용하여 상기 추출물을 순차적으로 분획하는 방법을 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "염증성 질환(Inflammatory disease)"이란, 염증유발인자 또는 방사선조사 등 유해한 자극으로 인해 인체 면역체계를 과도하게 항진시켜 대식세포와 같은 면역세포에서 분비되는 TNF-α(tumor necrosis factor-α), IL-1(interleukin-1), IL-6, 프로스타글란딘(prostagladin), 루코트리엔(luecotriene) 또는 산화질소(nitric oxide, NO)와 같은 염증유발물질(염증성 사이토카인)에 의해 유발되는 질환을 의미한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 알레르기성 염증질환, 염증성 피부질환, 염증성 안구질환, 염증성 골관절질환, 염증성 근육질환, 염증성 장질환 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증 등의 염증성 피부질환이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 아토피 피부염이 될 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어 "아토피 피부염"이란, 건조증, 소양증, 홍반성 습진을 특징으로 하는 만성 염증성 피부질환을 의미하는데, 피부 장벽 기능 이상도 주요 발병 원인으로 보고되고 있다. 구체적으로 경피수분손실(transepidermal water loss)의 증가, 각질층 내 수분량의 감소, 피부 표면 pH의 증가와 같은 장벽 기능의 이상이 관찰되면, 이러한 이상이 병변의 중증도와 연관이 있다는 결과가 지속적으로 보고된 바 있다.

[0021] 본 발명의 용어 "예방"이란, 상기 약학 조성물의 투여로 염증성 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0022] 본 발명의 용어 "치료"란, 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하는데, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 본 발명의 목적상 상기 치료는 상기 약학 조성물의 투여로 염증성 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 포함하는 것으로 해석될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 담체는 비자연적인 담체가 될 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명의 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 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 상기 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0026] 본 발명의 상기 약학 조성물에 포함된 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않

으나, 최종 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있고, 바람직하게는 0.001 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[0027] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 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 중요하다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 실시양태는 상기 약학 조성물을 염증성 질환이 발병되거나 또는 발병될 가능성이 있는, 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0030] 이때, 상기 세모고랭이, 추출물, 분획물, 염증성 질환, 예방 및 치료의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0031] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 염증성 질환이 발병될 가능성이 있거나, 또는 발병된 조직을 포함하는 모든 동물을 의미하는데, 인간은 제외된다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 염증성 질환을 완화 또는 치료할 수 있다.

[0032] 본 발명의 용어, "완화"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 염증성 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0033] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 조성물을 염증성 질환의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 염증성 질환의 치료가 수행되거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0035] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0036] 상기 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0037] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 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.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 세모고랭이 추출물은 세포독성을 나타내지 않으면서도(도 1a), LPS 처리에 의해 증가된 NO_2의 수준(도 1b), COX-2 및 iNOS 발현수준(도 1c 및 1d), PGE_2 수준(도 1e), IL-6 및 TNF-α의 발현수준(도 1f, 1g 및 1h), p38, ERK 및 JNK의 인산화 수준(도 2a), NF-κB 및 AP-1의 결합 활성(도 2b 및 2c) 및 p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준(도 2e)를 감소시키고, LPS 처리에 의해 감소된 IκB-α 발현수준을 회복시키는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 2d). 또한, 아토피 동물모델에 세모고랭이 추출물을 처리하면, 아토피

동물모델에서 유발된 아토피 피부염 증상을 개선시킴(도 3b)과 동시에 증대된 비장의 길이 및 중량을 감소시키고(도 3c), 비후된 등 조직의 두께를 감소시키며(도 3d), 증가된 대식세포의 수를 감소시키고(도 3e), 혈장내 증가된 PGE_2, IL-6 및 TNF-α 의 수준을 저하시키는 효과(도 3f)를 나타냄을 확인하였다. 뿐만 아니라, 아토피 동물모델의 등 조직에서 나타나는 COX-2 및 iNOS의 증가된 발현수준을 감소시키고(도 4a), p38, ERK 및 JNK의 증가된 인산화 수준은 감소시키며(도 4b), NF-κB 및 AP-1의 증가된 결합 활성(도 4c 및 4d)을 감소시킴을 확인하였다.

[0039] 따라서, 본 발명에서 제공하는 세모고랭이 추출물 또는 그의 분획물은 염증성 질환 또는 아토피 피부염의 증상을 개선시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0040] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0041] 이때, 상기 세모고랭이, 추출물, 분획물, 염증성 질환 및 예방의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0042] 상기 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물은 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함한다. 식품이 음료인 경우에는 100㎖를 기준으로 1~30g, 바람직하게는 3 ~ 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크륨(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[0043] 한편, 상기 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 식품 조성물을 이용하여 염증성 질환의 예방 또는 개선용 기능성식품을 제조할 수 있다.

[0044] 구체적인 예로, 상기 조성물을 이용하여 농산물, 축산물 또는 수산물의 특성을 살려 변형시키는 동시에 저장성을 좋게한 가공식품을 제조할 수 있다. 이런 가공식품에는 예들 들어, 과자, 음료, 주류, 발효식품, 통조림, 우유가공식품, 육륙가공식품, 국수 등을 포함한다. 과자는 비스킷, 파이, 케익, 빵, 캔디, 젤리, 껌, 시리얼(곡물 푸레이크 등의 식사대용품류 포함) 등을 포함한다. 음료는 탄산음료, 기능성이온음료, 쥬스(예들 들어, 사과, 배, 포도, 알로에, 감귤, 복숭아, 당근, 토마토 쥬스 등), 식혜 등을 포함한다. 주류는 청주, 위스키, 소주, 맥주, 양주, 과실주 등을 포함한다. 발효식품은 간장, 된장, 고추장 등을 포함한다. 통조림은 수산물 통조림(예들 들어, 참치, 고등어, 꽁치, 소라 통조림 등), 축산물 통조림(쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 칠면조 통조림 등), 농산물 통조림(옥수수, 복숭아, 파일애플 통조림 등)을 포함한다. 우유가공식품은 치즈, 버터, 요구르트 등을 포함한다. 육류가공식품은 돈까스, 비프까스, 치킨까스, 소세지. 탕수육, 너겟류, 너비아니 등을 포함한다. 밀봉포장생면 등의 국수를 포함한다. 이 외에도 상기 조성물은 레토르트식품, 스프류 등에 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 용어 "기능성식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다.

[0046] 본 발명의 용어 "건강식품(health food)"이란, 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강 보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 호용된다. 상기 식품은 염증성 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0047] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0048] 이때, 상기 세모고랭이, 추출물, 분획물, 염증성 질환, 예방 및 치료의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0049] 본 발명의 용어 "사료"란 가축이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.

[0050] 상기 사료는 사료 첨가제 또는 보조사료를 포함할 수 있다.

[0051] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 세모고랭이 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학 조성물은 세포독성을 나타내지 않으면서도, 염증에 의해 생성되는 NO 생성 및 염증성 단백질의 발현을 억제할 수 있으므로, 안전하면서도 효과적인 염증성 질환 치료제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1a는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포의 생존율 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 NO_2의 농도변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1c는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

도 1d는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS의 mRNA 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 1e는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 생성되는 PGE_2의 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1f는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 발현되는 IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 1g는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 생성되는 IL-6의 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1h는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 생성되는 TNF-α의 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 세모고랭이 추출물이 처리된 조건하에서, LPS의 처리시간에 따른 대식세포로부터 발현되는 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

도 2b는 LPS 처리에 의해 증가된 NF-κB의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 2c는 LPS 처리에 의해 증가된 AP-1의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 2d는 세모고랭이 추출물이 처리된 조건하에서, LPS의 처리시간에 따른 대식세포로부터 발현되는 IκB-α의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

도 2e는 세모고랭이 추출물이 처리된 조건하에서, LPS의 처리시간에 따른 대식세포로부터 발현되는 p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

도 3a는 아토피 동물모델의 제작 및 이에 세모고랭이 추출물을 처리한 실험경과를 나타내는 개략도이다.

도 3b는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(DNCB/TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(DNCB/TAR 50 ㎎/㎏)의 아토피 피부염이 유발된 부위를 나타내는 사진이다.

도 3c는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 비장의 길이를 측정한 결과를 나타내는 사진 및 체중대비 비장의 중량비를 나타내는 그래프이다.

도 3d는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직의 세포를 대상으로 H&E 염색을 수행한 결과를 나타내는 현미경사진 및 표피층의 두께를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3e는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직의 세포를 대상으로 Toluidine blue 염색을 수행한 결과를 나타내는 현미경사진 및 대식세포의 수를 계수한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3f는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 채취된 혈장내 PGE_2, IL-6 및 TNF-α 의 수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직으로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

도 4b는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직으로부터 발현되는 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

도 4c는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직에서 증가된 NF-κB의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 4d는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직에서 증가된 AP-1의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 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.

[0055] **실시예 1: 세모고랭이 추출물의 제조**

[0056] 세모고랭이(Schoenoplectus triqueter (L.) Palla)에 95%(v/v) 에탄올을 가하여 추출하고, 이를 여과하여 액상성분을 수득한 다음, 용매성분을 제거하여 세모고랭이 추출물(TAR)을 수득하였다.

[0057] **실시예 2: 세모고랭이 추출물의 항염증 활성 분석**

[0058] **실시예 2-1: 세포생존율 분석**

[0059] 배양된 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에, 실시예 1에서 제조한 다양한 농도(0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 ㎍/㎖)의 세모고랭이 추출물를 처리하고, LPS (1 ㎍/㎖)를 처리하거나 또는 처리하지 않은 조건에서 24시간 동안 배양한 다음, 상기 각 대식세포의 세포 생존율을 MTT분석법으로 측정하였다(도 1a).

[0060] 도 1a는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포의 생존율 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0061] 도 1a에서 보듯이, 세모고랭이 추출물의 농도증가에 따라, 세포 생존율이 감소되는 경향을 나타내었으나, 세모고랭이의 최대 처리농도에서도 90% 이상의 세포생존율을 나타냄을 확인하였다.

[0062] **실시예 2-2: NO_2 생성억제 효과**

[0063] 배양된 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에, 실시예 1에서 제조한 세모고랭이 추출물를 단독으로 처리하거나(5 ㎍/㎖) 또는 다양한 농도(0, 1, 2.5, 5 ㎍/㎖)로 LPS (1 ㎍/㎖)와 함께 22시간 동안 처리한 후, 상기 대식세포에

서 생성되는 아질산염 (nitrite, NO_2)의 수준을 Griess 반응 분석법으로 측정하였다(도 1b).

[0064] 도 1b는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 NO_2의 농도변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0065] 도 1b에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 NO_2의 농도는 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 감소됨을 확인하였다.

[0066] **실시예 2-3: COX-2 및 iNOS의 발현수준 분석**

[0067] 상기 실시예 2-2와 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS의 발현수준을 웨스턴블럿 분석법으로 측정하였다(도 1c). 이때, 내부대조군으로는 β-액틴을 사용하였다.

[0068] 도 1c는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

[0069] 도 1c에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2 및 iNOS의 발현수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 감소됨을 확인하였다.

[0070] **실시예 2-4: COX-2 및 iNOS의 mRNA 수준 분석**

[0071] 상기 실시예 2-2와 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS의 mRNA 수준을 RT-PCR 분석법으로 측정하였다(도 1d). 이때, 내부대조군으로는 GAPDH를 사용하였다.

[0072] 도 1d는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS의 mRNA 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

[0073] 도 1d에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 COX-2 및 iNOS의 mRNA 수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 억제됨을 확인하였다.

[0074] **실시예 2-5: PGE_2 생성수준 분석**

[0075] 상기 실시예 2-2와 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 생성되는 PGE_2의 수준을 항-PGE_2 항체가 코팅된 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다(도 1e).

[0076] 도 1e는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 생성되는 PGE_2의 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0077] 도 1e에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 PGE_2 생성수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 억제됨을 확인하였다.

[0078] **실시예 2-6: IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수준 분석**

[0079] 상기 실시예 2-2와 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 발현되는 IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수준을 RT-PCR 분석법으로 측정하였다(도 1f). 이때, 내부대조군으로는 GAPDH를 사용하였다.

[0080] 도 1f는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 발현되는 IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

[0081] 도 1f에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 억제됨을 확인하였다.

[0082] **실시예 2-7: IL-6 생성수준 분석**

[0083] 상기 실시예 2-2와 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 생성되는 IL-6의 수준을 항-IL-6 항체가 코팅된 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다(도 1g).

[0084] 도 1g는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 생성되는 IL-6의 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0085] 도 1g에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 IL-6 생성수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 억제됨을 확인하였다.

[0086] **실시예 2-8: TNF-α 생성수준 분석**

[0087] 상기 실시예 2-2와 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 생성되는 TNF-α의 수준을 항-TNF-α 항체가 코팅된 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다(도 1h).

[0088] 도 1h는 세모고랭이 추출물의 처리농도에 따른 대식세포로부터 생성되는 TNF-α의 수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0089] 도 1h에서 보듯이, LPS 처리에 의해 증가된 TNF-α 생성수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 유의하게 억제됨을 확인하였다.

[0090] **실시예 3: 세모고랭이 추출물의 항아토피 활성 분석**

[0091] **실시예 3-1: p38, ERK 및 JNK 인산화 수준 분석**

[0092] 배양된 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에, 실시예 1에서 제조한 세모고랭이 추출물(5 ㎍/㎖)을 2시간 동안 처리한 다음, 다시 LPS (1 ㎍/㎖)를 다양한 시간(0, 5, 15, 30 또는 60분) 동안 처리하였다. 그런 다음, 상기 대식세포로부터 발현되는 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK의 발현수준을 웨스턴블럿 분석법으로 측정하였다(도 2a). 이때, 내부대조군으로는 β-액틴을 사용하였고, 대조군으로는 세모고랭이 추출물을 처리하지 않고, 다양한 시간동안 LPS를 단독처리한 세포를 사용하였다.

[0093] 도 2a는 세모고랭이 추출물이 처리된 조건하에서, LPS의 처리시간에 따른 대식세포로부터 발현되는 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

[0094] 도 2a에서 보듯이, p38, ERK 및 JNK의 발현수준은 세모고랭이 추출물 및 LPS 처리에 의해 변화되지 않았으나, p38, ERK 및 JNK의 인산화 수준은 LPS의 처리시간에 비례하여 증가하는 추세를 나타내었으며, 이처럼 LPS 처리에 의해 증가된 p38, ERK 및 JNK의 인산화 수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 억제됨을 확인하였다.

[0095] **실시예 3-2: NF-κB의 결합 활성 분석**

[0096] 배양된 마우스 대식세포 RAW264.7 세포에, 실시예 1에서 제조한 세모고랭이 추출물를 단독으로 처리한 실험군(5 ㎍/㎖); 또는 세모고랭이 추출물을 다양한 농도(0, 1, 2.5, 5 ㎍/㎖)로 전처리 한 다음, LPS (1 ㎍/㎖)를 22시간 동안 처리한 실험군을 각각 준비하고, 상기 준비된 각각의 대식세포의 핵 추출물을 수득하였다. 상기 수득한 각각의 핵 추출물을 대상으로 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하여, NF-κB의 결합 활성을 분석하였다(도 2b). 이때, 내부대조군으로는 Oct-1을 사용하였다.

[0097] 도 2b는 LPS 처리에 의해 증가된 NF-κB의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

[0098] 도 2b에서 보듯이, NF-κB의 결합 활성은 LPS 처리에 의해 증가되지만, 이처럼 증가된 NF-κB의 결합 활성은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0099] **실시예 3-3: AP-1의 결합 활성 분석**

[0100] 상기 실시예 3-2에서 수득한 핵추출물을 대상으로 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하여, AP-1의 결합 활성을 분석하였다(도 2c). 이때, 내부대조군으로는 Oct-1을 사용하였다.

[0101] 도 2c는 LPS 처리에 의해 증가된 AP-1의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

[0102] 도 2c에서 보듯이, AP-1의 결합 활성은 LPS 처리에 의해 증가되지만, 이처럼 증가된 AP-1의 결합 활성은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0103] **실시예 3-4: IκB-α의 발현수준 분석**

[0104] 상기 실시예 3-1과 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 발현되는 IκB-α의 발현수준을 웨스턴블럿 분석법으로 측정하였다(도 2d). 이때, 내부대조군으로는 β-액틴을 사용하였다.

[0105] 도 2d는 세모고랭이 추출물이 처리된 조건하에서, LPS의 처리시간에 따른 대식세포로부터 발현되는 IκB-α의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

[0106] 도 2d에서 보듯이, LPS의 처리시간이 증가될 수록 IκB-α의 발현수준이 감소되는 경향을 나타내었으나, LPS와

세모고랭이 추출물을 함께 처리한 경우에는 LPS로 인한 IκB-α 단백질의 분해가 억제되며, 이를 통해 NF-κB의 활성화를 억제함을 확인하였다.

[0107] **실시예 3-5: p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준 분석**

[0108] 상기 실시예 3-1과 동일한 조건으로 세모고랭이 추출물과 LPS를 처리한 대식세포로부터 발현되는 p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준을 웨스턴블럿 분석법으로 측정하였다(도 2e). 이때, 내부대조군으로는 Lamin B를 사용하였다.

[0109] 도 2e는 세모고랭이 추출물이 처리된 조건하에서, LPS의 처리시간에 따른 대식세포로부터 발현되는 p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

[0110] 도 2e에서 보듯이, LPS의 처리시간이 증가될 수록 p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준이 증가되는 경향을 나타내었으나, LPS와 세모고랭이 추출물을 함께 처리한 경우에는 오히려 처리시간이 증가될 수록 p65, p-p65, c-Jun 및 c-Fos의 발현수준이 억제되는 경향을 나타냄을 확인하였다.

[0111] **실시예 4: 아토피 동물모델에 대한 세모고랭이 추출물의 치료효과**

[0112] **실시예 4-1: 아토피 동물모델의 제작 및 이에 대한 세모고랭이 추출물의 처리**

[0113] 마우스의 등부분을 제모하고, 제모된 부위에 4일 동안 1% DNCB를 도포한 후, 8일 동안 사육하면서 아토피 피부염이 유발된 아토피 동물모델을 제작하였다. 그런 다음, 상기 제작된 아토피 동물모델의 아토피 피부염이 유발된 부위에 16일 동안 10 또는 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물을 처리하고, 마우스를 희생시켰다(도 3a). 이때, 대조군으로는 1% DNCB를 도포하지 않은 마우스를 사용하였다.

[0114] 도 3a는 아토피 동물모델의 제작 및 이에 세모고랭이 추출물을 처리한 실험경과를 나타내는 개략도이다.

[0115] **실시예 4-2: 세모고랭이 추출물의 아토피 치료효과**

[0116] 상기 실시예 4-1에서 준비한 대조군, 아토피 동물모델, 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스의 아토피 피부염이 유발된 부위를 촬영하여 비교하였다(도 3b).

[0117] 도 3b는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(DNCB/TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(DNCB/TAR 50 ㎎/㎏)의 아토피 피부염이 유발된 부위를 나타내는 사진이다.

[0118] 도 3b에서 보듯이, 아토피 동물모델의 아토피 피부염이 유발된 부위에 세모고랭이 추출물을 처리하면, 농도의존적으로 아토피 피부염이 개선됨을 확인하였다.

[0119] **실시예 4-3: 비장 크기 분석**

[0120] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 비장을 적출하고, 적출된 비장의 길이 및 체중대비 비장의 중량비율을 측정하였다(도 3c).

[0121] 도 3c는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 비장의 길이를 측정한 결과를 나타내는 사진 및 체중대비 비장의 중량비를 나타내는 그래프이다.

[0122] 도 3c에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, 비장의 길이 및 중량이 증가되었으나, 이처럼 증가된 비장의 길이 및 중량은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[0123] **실시예 4-4: 피부조직 분석**

[0124] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 아토피 피부염이 유발된 등 피부조직을 각각 적출하고, 적출된 조직의 세포를 대상으로 H&E 염색을 수행한 후, 현미경으로 관찰하고, 표피층의 두께를 측정하였다(도 3d).

[0125] 도 3d는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 ㎎/㎏) 및 50 ㎎/㎏의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 ㎎/㎏)로부터 적출된 등 피부조직의 세포를 대상으로 H&E 염색을 수행한 결과를 나타내는 현미경사진 및 표피층의 두께를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0126] 도 3d에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, 등 피부의 표피층과 진피층이 비후되었으나, 이처럼 비후된

등 피부의 표피층과 진피층은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 두께가 감소됨을 확인하였다.

[0127] **실시예 4-5: 피부조직 내 대식세포 수준 분석**

[0128] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 아토피 피부염이 유발된 등 피부조직을 각각 적출하고, 적출된 조직의 세포를 대상으로 Toluidine blue 염색을 수행한 후, 현미경으로 관찰하고, 대식세포의 수를 계수하였다(도 3e).

[0129] 도 3e는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 mg/kg) 및 50 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 mg/kg)로부터 적출된 등 피부조직의 세포를 대상으로 Toluidine blue 염색을 수행한 결과를 나타내는 현미경사진 및 대식세포의 수를 계수한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0130] 도 3e에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, 등 피부의 표피층과 진피층에 존재하는 대식세포의 수가 증가되었으나, 이처럼 증가된 대식세포의 수는 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[0131] **실시예 4-6: 혈장분석**

[0132] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 각각의 혈장을 채취한 후, 이들 혈장에 포함된 PGE_2, IL-6 및 TNF-α 의 수준을 ELISA assay를 통해 측정하였다(도 3f).

[0133] 도 3f는 대조군(Normal), 아토피 동물모델(DNCB), 10 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 mg/kg) 및 50 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 mg/kg)로부터 채취된 혈장내 PGE_2, IL-6 및 TNF-α 의 수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0134] 도 3f에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, 혈장내 존재하는 PGE_2, IL-6 및 TNF-α 의 수준은 모두 급격히 증가되었으나, 이처럼 증가된 혈장내 PGE_2, IL-6 및 TNF-α 의 수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[0135] **실시예 5: 아토피 동물모델 유래의 염증성 인자에 대한 세모고랭이 추출물의 효과**

[0136] **실시예 5-1: COX-2 및 iNOS의 발현수준 분석**

[0137] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 아토피 피부염이 유발된 등 피부조직을 각각 적출하고, 적출된 조직으로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS의 발현수준을 웨스턴블럿 분석법으로 측정하였다(도 4a). 이때, 내부대조군으로는 β-액틴을 사용하였고, 대조군으로는 아토피 피부염이 유발되지 않은 마우스를 사용하였다.

[0138] 도 4a는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 mg/kg) 및 50 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 mg/kg)로부터 적출된 등 피부조직으로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

[0139] 도 4a에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, 등 피부조직으로부터 발현되는 COX-2 및 iNOS의 발현수준이 급격히 증가되었으나, 이처럼 증가된 COX-2 및 iNOS의 발현수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[0140] **실시예 5-2: p38, ERK 및 JNK 인산화 수준 분석**

[0141] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 아토피 피부염이 유발된 등 피부조직을 각각 적출하고, 적출된 조직으로부터 발현되는 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK의 발현수준을 웨스턴블럿 분석법으로 측정하였다(도 4b). 이때, 내부대조군으로는 β-액틴을 사용하였고, 대조군으로는 아토피 피부염이 유발되지 않은 마우스를 사용하였다.

[0142] 도 4b는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 mg/kg) 및 50 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 mg/kg)로부터 적출된 등 피부조직으로부터 발현되는 p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK의 발현수준 변화를 비교한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 분석사진이다.

[0143] 도 4b에서 보듯이, p38, ERK 및 JNK의 발현수준은 아토피 피부염의 발병여부에 의해 변화되지 않았으나, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, p38, ERK 및 JNK의 인산화 수준이 증가하였으며, 이처럼 증가된 p38, ERK 및 JNK의 인

산화 수준은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0144] **실시예 5-3: NF-κB의 결합 활성 분석**

[0145] 상기 실시예 4-1에서 희생시킨 각각의 마우스로부터 아토피 피부염이 유발된 등 피부조직을 각각 적출하고, 적출된 조직으로부터 각각의 핵 추출물을 수득하였다. 상기 수득한 각각의 핵 추출물을 대상으로 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하여, NF-κB의 결합 활성을 분석하였다(도 4c). 이때, 내부대조군으로는 Oct-1을 사용하였다.

[0146] 도 4c는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 mg/kg) 및 50 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 mg/kg)로부터 적출된 등 피부조직에서 증가된 NF-κB의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

[0147] 도 4c에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, NF-κB의 결합 활성이 증가되었으며, 이처럼 증가된 NF-κB의 결합 활성은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0148] **실시예 5-4: AP-1의 결합 활성 분석**

[0149] 상기 실시예 5-3에서 수득한 핵추출물을 대상으로 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하여, AP-1의 결합 활성을 분석하였다(도 4d). 이때, 내부대조군으로는 Oct-1을 사용하였다.

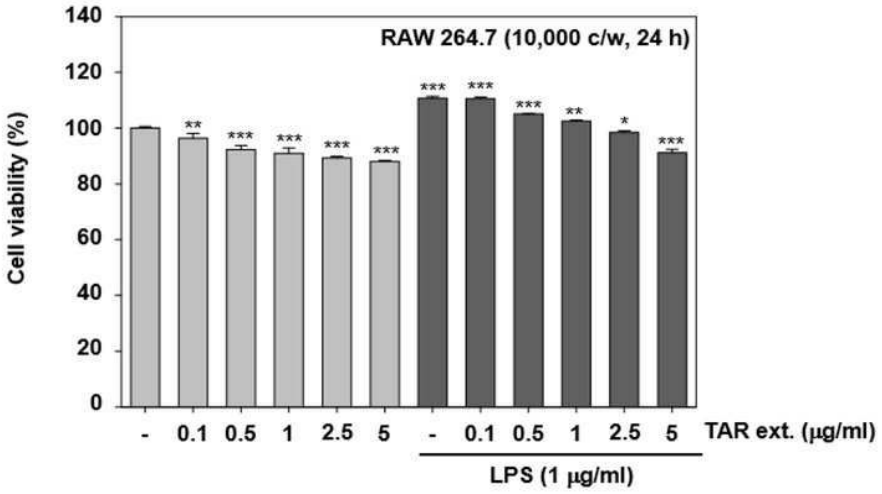
[0150] 도 4d는 대조군(NT), 아토피 동물모델(DNCB), 10 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 10 mg/kg) 및 50 mg/kg의 세모고랭이 추출물 처리된 마우스(TAR 50 mg/kg)로부터 적출된 등 피부조직에서 증가된 AP-1의 결합 활성에 미치는 세모고랭이 추출물의 억제효과를 나타내는 전기영동사진이다.

[0151] 도 4d에서 보듯이, 아토피 피부염이 유발됨에 따라, AP-1의 결합 활성이 증가되었으며, 이처럼 증가된 AP-1의 결합 활성은 세모고랭이 추출물의 처리에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

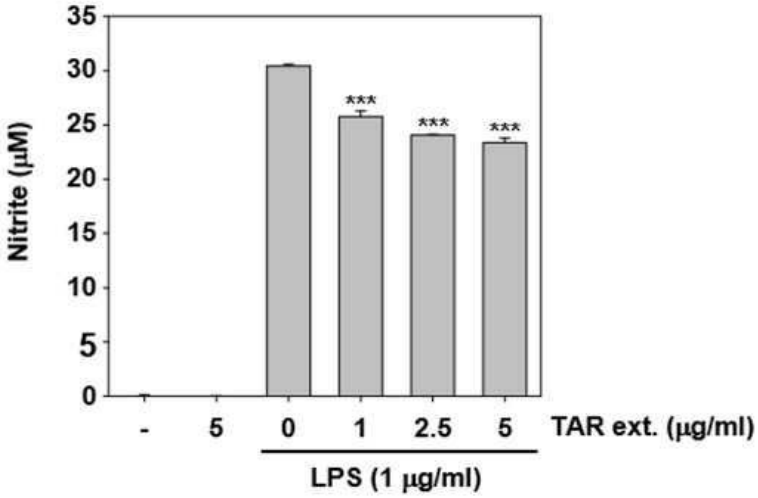
[0152] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

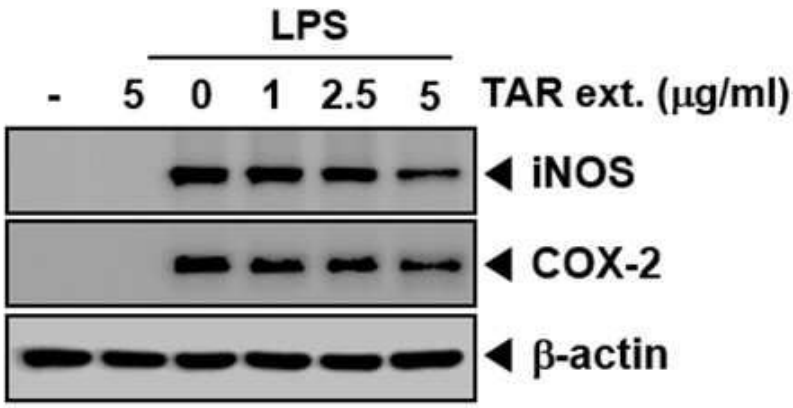
도면1a



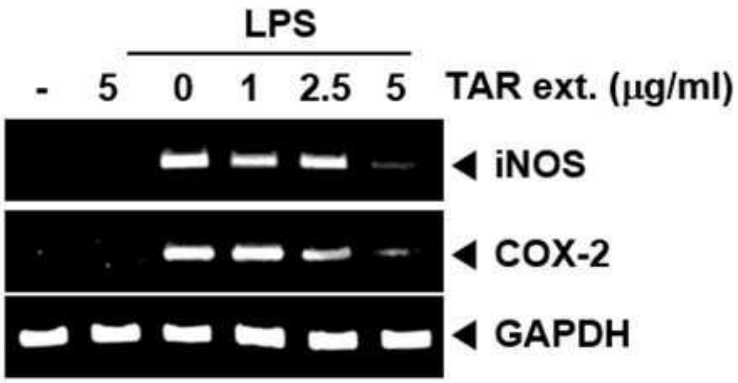
도면1b



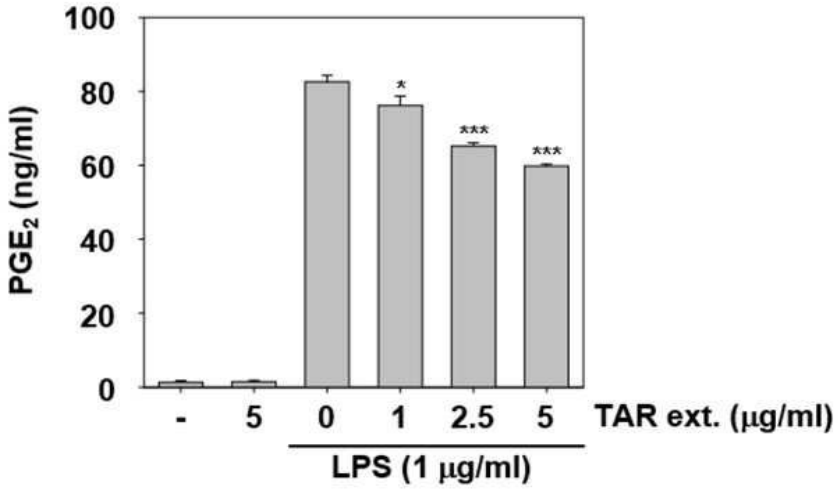
도면1c



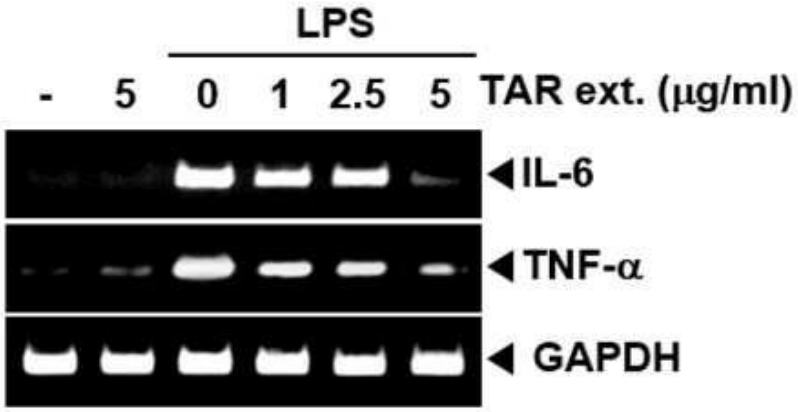
도면1d



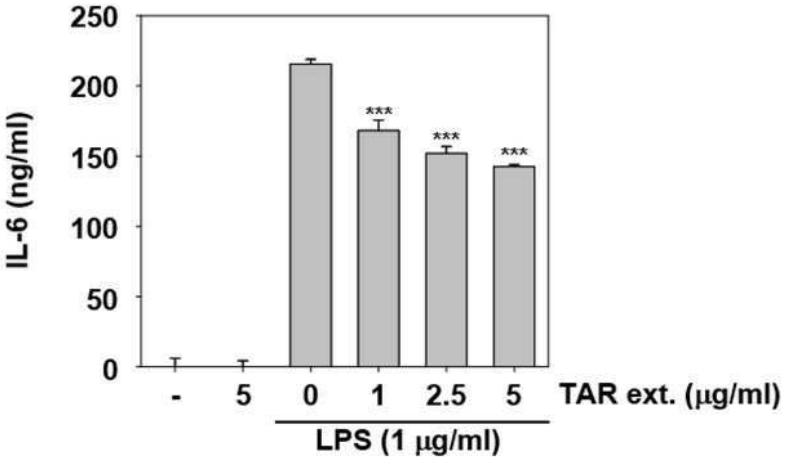
도면1e



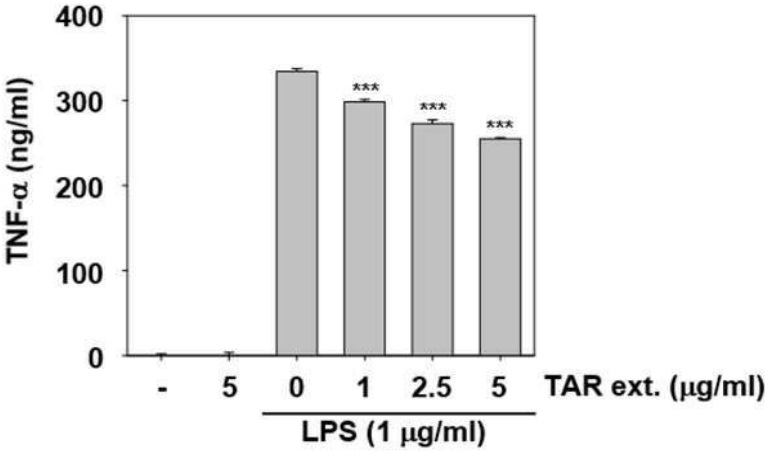
도면1f



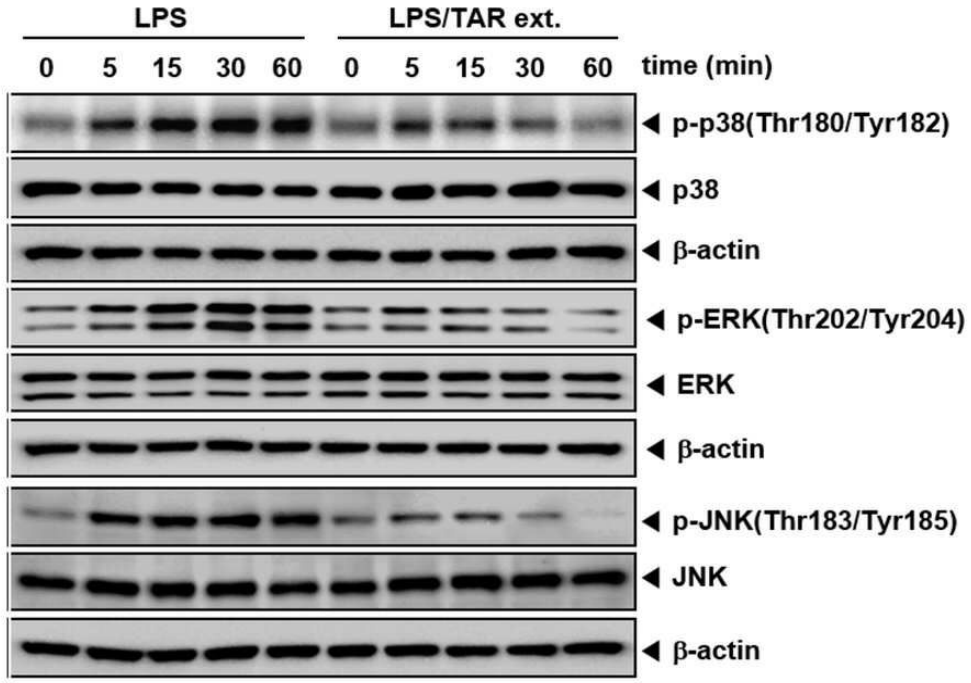
도면1g



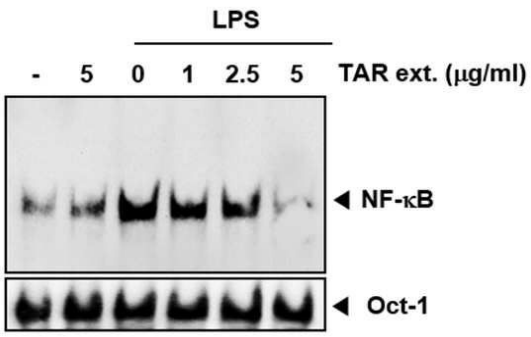
도면1h



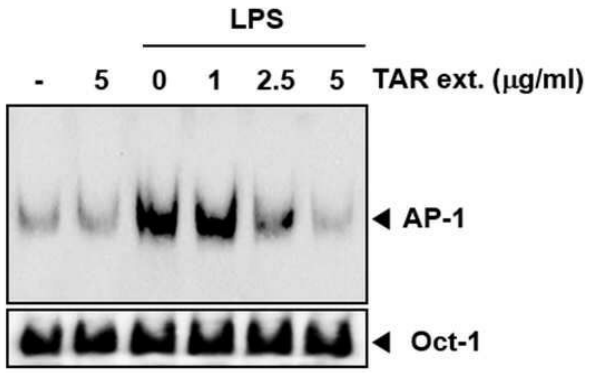
도면2a



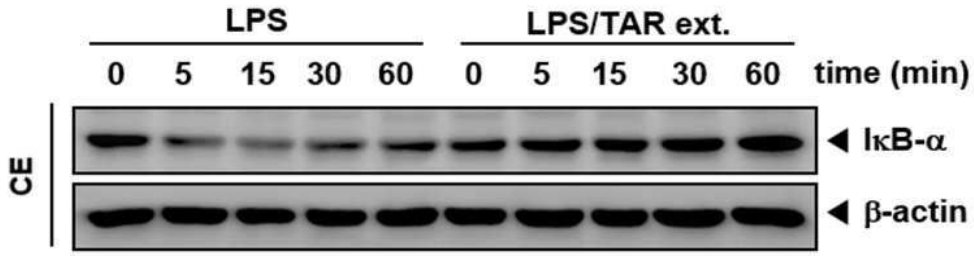
도면2b



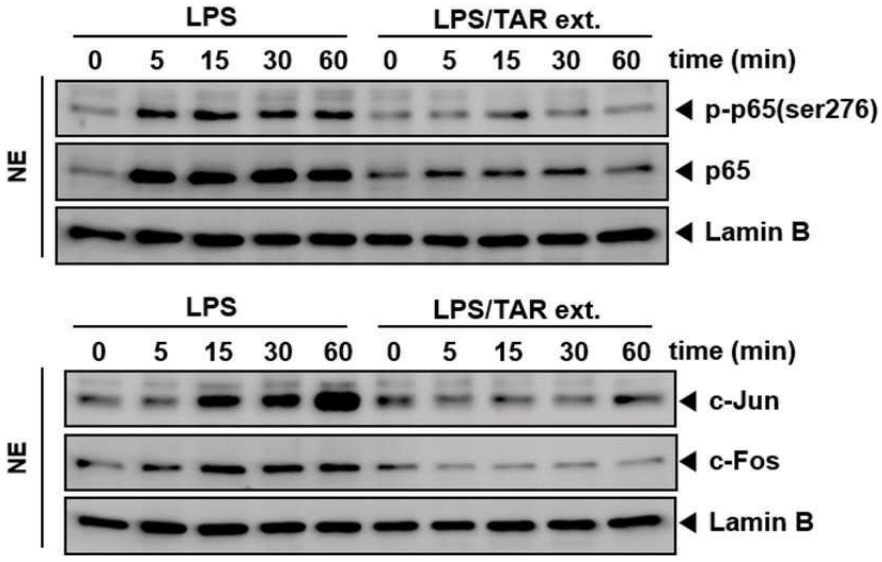
도면2c



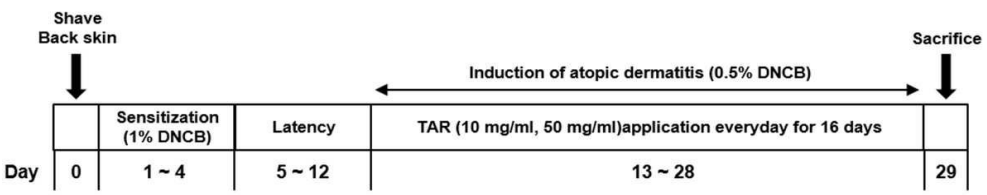
도면2d



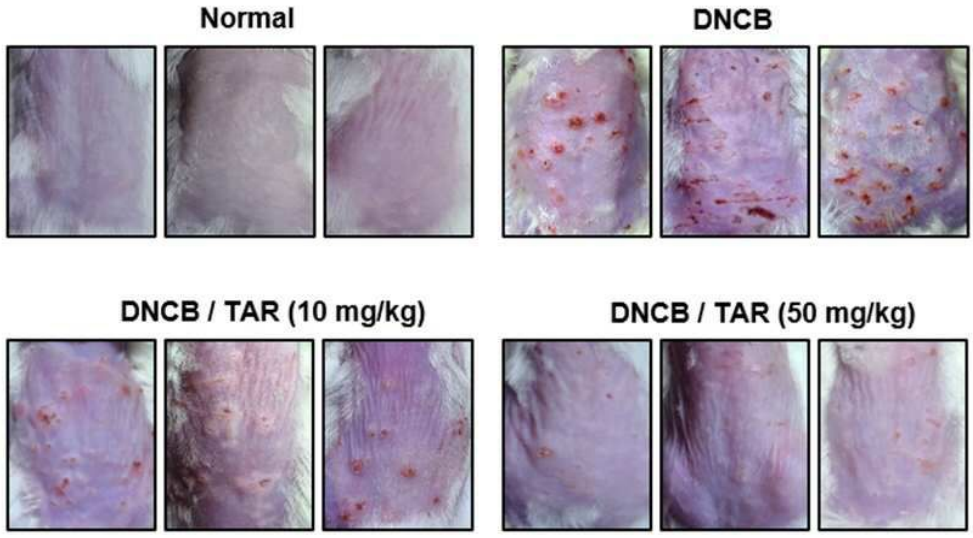
도면2e



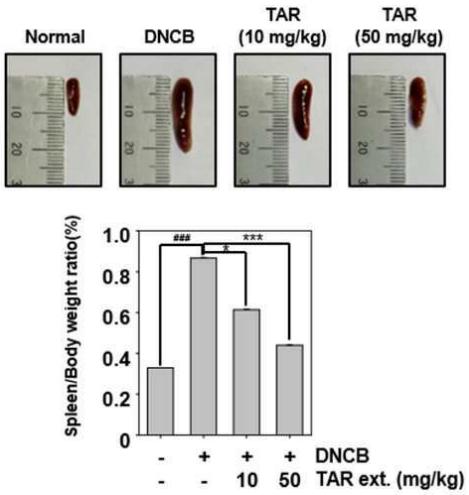
도면3a



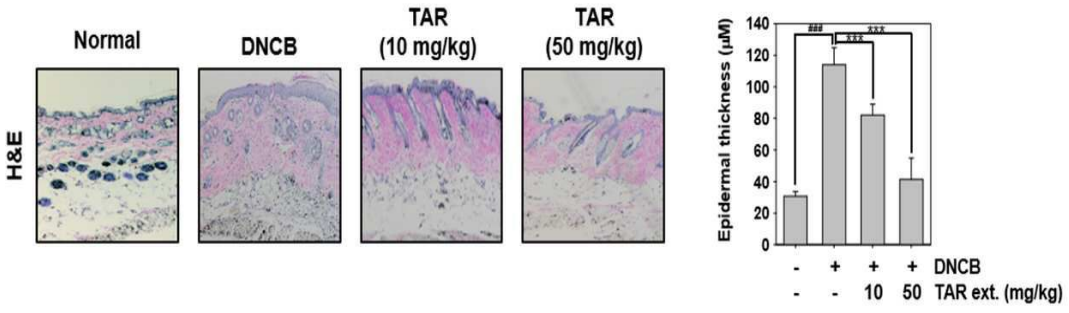
도면3b



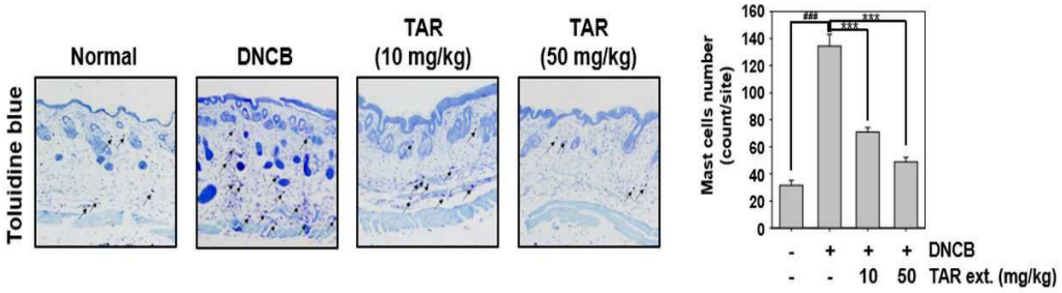
도면3c



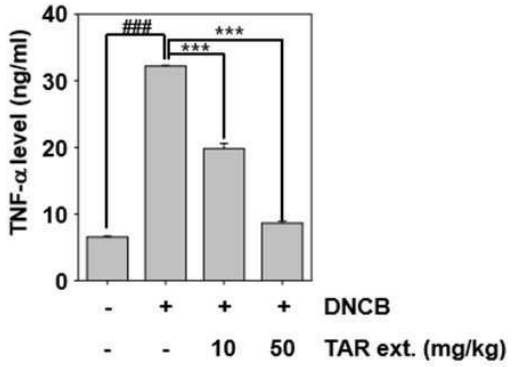
도면3d

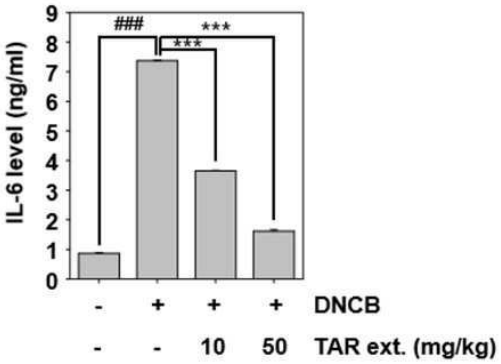


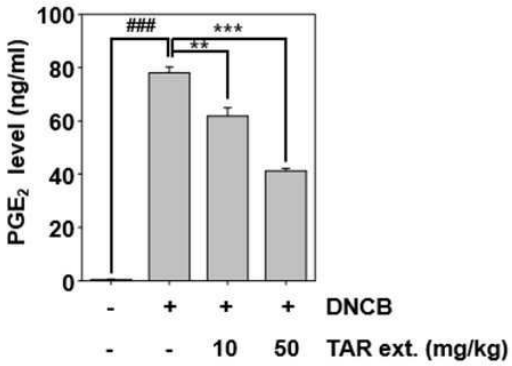
도면3e


Normal
DNCB
TAR (10 mg/kg)
TAR (50 mg/kg)
Toluidine blue
Mast cells number (count/site)
###
***
***
DNCB
TAR ext. (mg/kg)

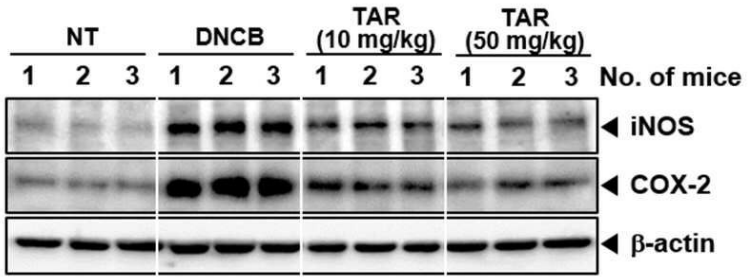
도면3f


TNF-α level (ng/ml)
###
***
***
DNCB
TAR ext. (mg/kg)

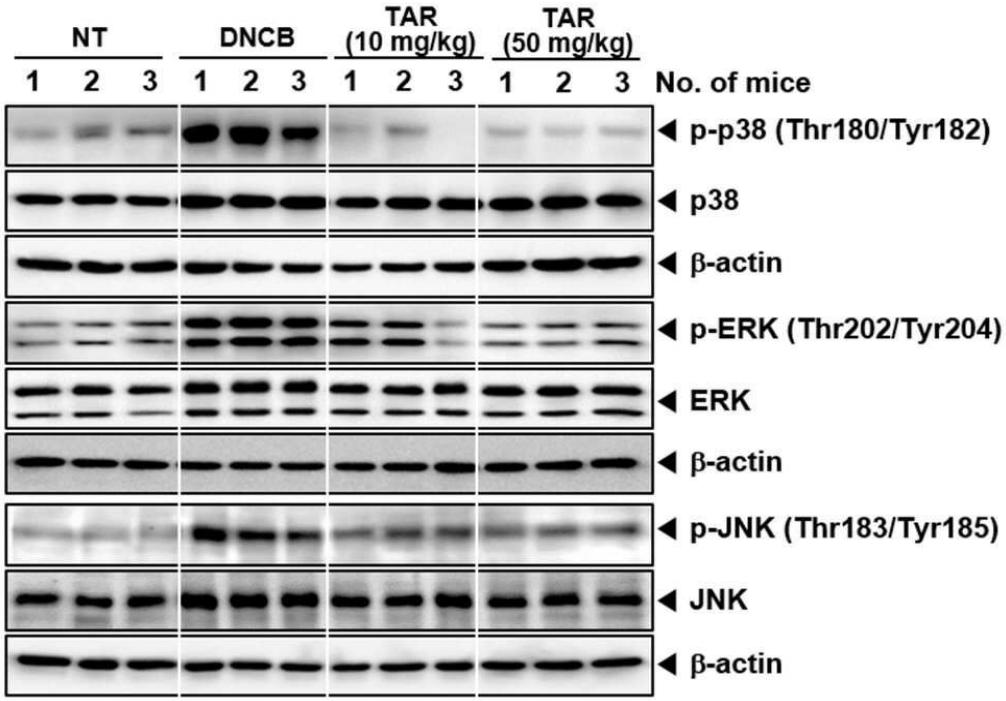

IL-6 level (ng/ml)
###
***
***
DNCB
TAR ext. (mg/kg)


PGE2 level (ng/ml)
###
***
**
DNCB
TAR ext. (mg/kg)

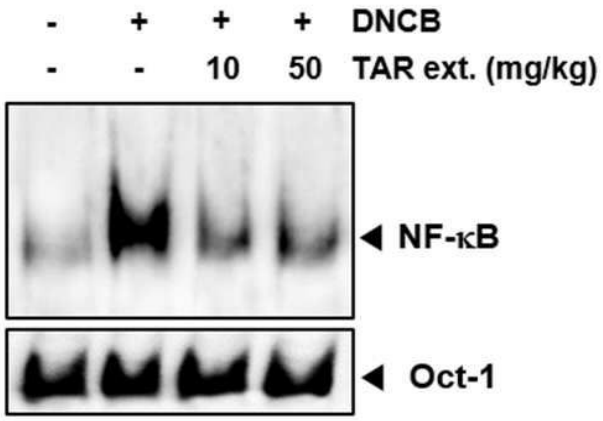
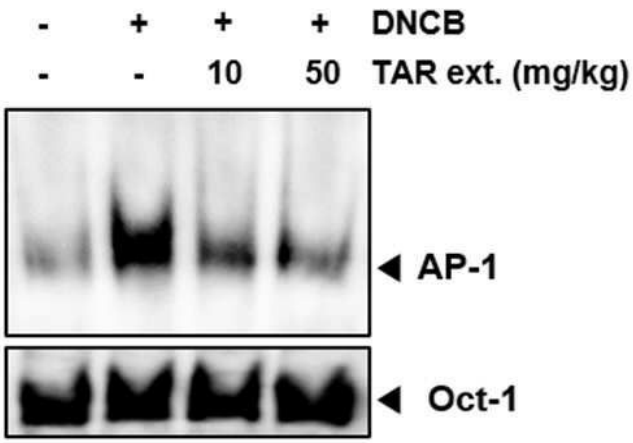
도면4a



도면4b



도면4c



도면4d