



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월02일

(11) 등록번호 10-2272425

(24) 등록일자 2021년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/342 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/342 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0101327

(22) 출원일자 2019년08월19일

심사청구일자 2019년08월19일

(65) 공개번호 10-2021-0021846

(43) 공개일자 2021년03월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR101686431 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

장문석

서울특별시 용산구 이촌로64길 15, 105동 102호(이촌동, 엘지한강자이아파트)

박성규

서울특별시 송파구 올림픽로 269, 102동 1908호(신천동, 롯데캐슬골드)

김하영

서울특별시 강서구 수명로2길 105, 503동 1302호(내발산동, 마곡수명산파크5단지아파트)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

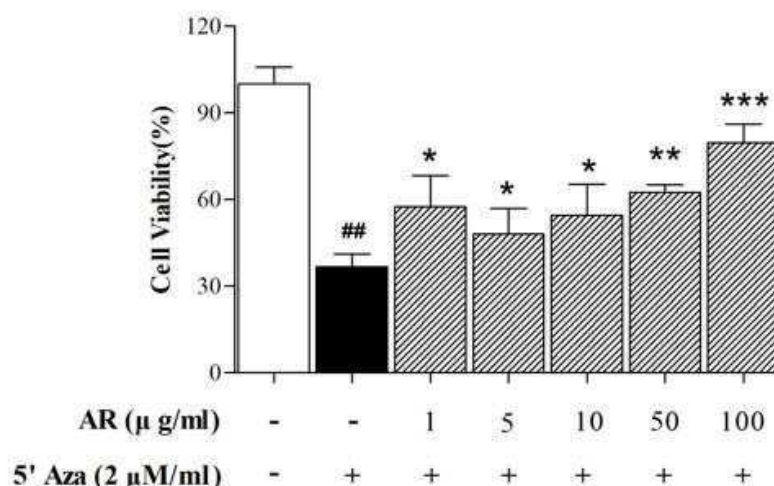
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 상기 추출물은 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키고, 자가항체인 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB의 생산을 감소시키며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 또는 IL-6의 분비를 감소시키는 효과가 있어, 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

사삼(Adenophrae Radix) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB 의 생산을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 또는 IL-6의 분비를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 0.1 내지 1000 mg/kg 의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

사삼(Adenophrae Radix) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

시험관 내(*in vitro*)에서 사삼(Adenophrae Radix) 열수 추출물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 AQP5

(Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사삼(Adenophrae Radix)은 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 잔대의 뿌리를 말한다. 사삼은 우리나라, 일본, 중국 등에 자생하는 높이 50-100 cm 내외의 다년생 초본으로서, 지상부 전체에 털이 밀생하고 뿌리는 비대하며, 꽃은 7-9 월에 자색의 종모양으로 피는 특징이 있다.

[0003] 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)은 침샘 및 눈물샘과 같은 외분비샘에 림프구 및 자가면역 항체들이 침윤하여 발생하는 만성 및 전신성 자가면역 질환이다. 안구 건조증 및 구강 건조증(xerostomia)은 침샘 및 눈물샘에서의 염증 및 파괴에 의한 결과로 나타난다. 구강 건조는 연하 곤란(dysphagia), 씹기 어려움, 대화의 불편함, 미각의 변화, 충치 증가 및 심각한 물리적, 기능적, 사회적, 정신적 영향을 일으킬 수 있다. 쇼그렌 증후군은 0.5 % 내지 1.0 %의 유병율을 가진 가장 흔한 자가면역 질환이지만, 정확한 원인 및 병리적 메커니즘을 완전히 밝혀지지 않은 상태이다.

[0004] 쇼그렌 증후군의 치료는 인공 눈물, 국소 윤활제 (인공 타액 및 질 윤활제) 및 pilocarpine, cevimeline, prednisone, immunosuppressants (azathioprine, cyclosporine)와 같은 stimulant를 사용하여 주로 건조 증상을 완화시키고 있다. 그러나, 이러한 치료법은 장기간 투여시 발한, 잦은 배뇨, 홍조, 부비동염, 메스꺼움과 같은 부작용을 일으킬 수 있고, 증상 완화가 일시적이라는 한계가 있다. 따라서, 부작용 없이 근본적인 치료를 위한 약물의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0045762호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 사삼 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 사삼 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈청 내의 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB 의 생산을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 사삼 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 또는 IL-6의 분비를 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 시험관 내(in vitro)에서 사삼(Adenophrae Radix) 추출물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합물에 의해 추출된 것일 수 있고, 상기 유기 용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB 의 생산을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 또는 IL-6의 분비를 감소시키는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 0.1 내지 1000 mg/kg 의 양으로 투여되는 것일 수 있고, 바람직하게는 1 내지 1000 mg/kg 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10 내지 1000 mg/kg 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 100 내지 1000 mg/kg 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명은 사삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 쇼그렌 증후군의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 사삼 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 사삼 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈청 내의 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB 의 생산을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 사삼 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 또는 IL-6의 분비를 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0024] 또한, 시험관 내(*in vitro*)에서 사삼(Adenophrae Radix) 추출물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 추출물을 AQP5 (Aquaporin 5)의 발현을 증가시키고, 자가항체인 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB 의 생산을 감소시키며, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 또는 IL-6의 분비를 감소시키는 효과가 있어, 쇼그렌 증후군의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 NS-SV-AC 세포에 사삼 추출물 및 2 μ M의 5-Aza를 48 시간 동안 처리한 후, 세포생존율을 측정한 결과이다 (데이터는 평균 $\pm$ S.D. 로 표시함 (n=3); ##: p < 0.01, 정상군(normal)과 비교하여 유의한 경우; 및 *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001, 대조군(control)과 비교하여 유의한 경우).
- 도 2는 NS-SV-AC 세포에 사삼 추출물 및 2 μ M의 5-Aza를 처리한 후, 유체 분비율을 측정한 결과이다 (데이터는 평균 $\pm$ S.E. 로 표시함 (n=3); #: p < 0.05, 정상군(normal)과 비교하여 유의한 경우; 및 *: p < 0.05, 대조군(control)과 비교하여 유의한 경우).
- 도 3A는 NS-SV-AC 세포에 사삼 추출물 및 2 μ M의 5-Aza를 처리한 후, 웨스턴블롯을 통해 AQP5 단백질의 발현량을 측정한 결과이고, 3B는 웨스턴블롯의 결과를 표준화로 정량한 결과이다 (데이터는 평균 $\pm$ S.E. 로 표시함 (n=3); #: p < 0.05, 정상군(normal)과 비교하여 유의한 경우; 및 *: p < 0.05, 대조군(control)과 비교하여 유의한 경우).
- 도 4는 NS-SV-AC 세포에 사삼 추출물 및 2 μ M의 5-Aza를 처리한 후, 면역형광분석을 통해 AQP5 단백질의 발현양상을 측정한 결과로서, 왼쪽 라인은 AQP5에 대한 양성을 빨간색 점(dot)으로 나타낸 것이고, 오른쪽 라인은 DAPI (파란색)와 AQP5를 함께 나타낸 것이다 (A, B: 정상군(normal); C, D: 5-Aza 만을 처리한 대조군

(control); E, F: 5-Aza 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 사삼 추출물을 처리한 그룹; 배율: $\times 200$; 및 Bar = 100 μm).

도 5는 NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물에 처리한 후, 타액 분비량을 측정한 결과이다 (N: 정상군; C: 대조군; 100, 500, 1000: 사삼 추출물을 100, 500, 1000 mg/kg으로 처리한 그룹; #: $p < 0.05$, 정상군(normal)과 비교하여 유의한 경우; 및 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 대조군(control)과 비교하여 유의한 경우).

도 6A는 NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물에 처리한 후, 웨스턴블롯을 통해 AQP 5 단백질 및 M3R 단백질의 발현량을 측정한 결과이고, 6B는 AQP 5 단백질의 발현량을 표준화로 정량한 결과이며, 6C는 M3R 단백질의 발현량을 표준화로 정량한 결과이다 (N: 정상군; C: 대조군; 100, 500, 1000: 사삼 추출물을 100, 500, 1000 mg/kg으로 처리한 그룹; 데이터는 평균 $\pm$ S.D. 로 표시함 ($n=3$); #: $p < 0.05$, 정상군(normal)과 비교하여 유의한 경우; 및 *: $p < 0.05$, 대조군(control)과 비교하여 유의한 경우).

도 7은 NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물에 처리한 후, 마우스 혈청에서 자가항체인 anti-Ro/SSA (A) 및 anti-La/SSB (B)의 양을 ELISA를 통해 측정한 결과이다 (N: 정상군; C: 대조군; 및 100, 500, 1000: 사삼 추출물을 100, 500, 1000 mg/kg으로 처리한 그룹).

도 8은 NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물에 처리한 후, 마우스 혈청에서 TNF- α (A), IFN- γ (B) 및 IL-6 (C)의 양을 ELISA를 통해 측정한 결과이다 (N: 정상군; C: 대조군; 100, 500, 1000: 사삼 추출물을 100, 500, 1000 mg/kg으로 처리한 그룹; 데이터는 평균 $\pm$ S.D. 로 표시함 ($n=6$); ###: $p < 0.001$, 정상군(normal)과 비교하여 유의한 경우; 및 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 대조군(control)과 비교하여 유의한 경우).

도 9는 NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물에 처리한 후, 침샘 조직의 조직학적 변화를 관찰한 결과이다 (A: 정상군; B: 대조군; C: 사삼 추출물을 100 mg/kg으로 처리한 그룹; D: 사삼 추출물을 500 mg/kg으로 처리한 그룹; E: 사삼 추출물을 1000 mg/kg으로 처리한 그룹; 화살표: 염증성 병변; 배율: $\times 200$; 및 Bar = 100 μm).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에서 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 사삼(Adenophorae Radix)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 사삼(Adenophorae Radix)의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0030] 상기 사삼으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 물을 사용할 수 있다.
- [0031] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 사삼 추출물의 제조 방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0032] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 사삼 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0033] 따라서, 본 발명에 있어서 사삼 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획물 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0035] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.

- [0036] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 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. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 젼제 또는 젼의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젼라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 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.
- [0037] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 싸이코트리아 루브라 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젼라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 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 위텡솔(witepsol), 마크로글, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0040] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0042] 본 발명의 식품 조성물은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있으며, 기능성 식품, 건강기능식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다.
- [0043] 본 발명의 용어, "기능성 식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0044] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 조성물은 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 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, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물 및 이의 분획물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젼리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

- [0046] 또한, 본 발명에 적용될 수 있는 식품에는 예컨대, 특수영양식품(예: 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예: 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예: 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예: 스낵류), 유가공품(예: 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예: 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등) 등 모든 식품을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 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.
- [0049] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **실시예 1. 실험방법**
- [0052] **1.1. 사삼(Adenophorae Radix) 추출물의 준비**
- [0053] 사삼은 본초마루(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 50 g의 건조된 사삼 샘플은 1 L의 물을 넣고 100 °C에서 2 시간 동안 끓이고, 현탁액을 여과한 후, 감압증류하였다. 여과액(filtrate)은 동결건조시켜 1.5 g의 분말을 수득하였다. 건조된 추출물을 증류수(Millipore, Billerica, MA, USA)에 용해시키고 실온에서 2 분 동안 교반하여 사용하였다.
- [0055] **1.2. 세포배양**
- [0056] 인간 침샘 선포세포 (Human salivary gland acinar cell, 이하 "NS-SV-AC 세포")는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. NS-SV-AC 세포주는 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco-BRL), 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin 이 첨가된 DMEM (Dulbecco's minimal essential medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0058] **1.3. 세포생존율 및 세포증식 어세이**
- [0059] 세포증식은 MTT 어세이로 결정되었다. NS-SV-AC 세포는 24 시간 동안 굵주리게 한 후, 여러 농도의 사삼 추출물 (1, 5, 10, 50 또는 100 µg/mL) 및 2 µM의 5-aza-2'-deoxycytidine (이하, "5-Aza"로 기재함, Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)를 동시에 처리하였다. 48 시간 후, 배지를 제거하고 MTT를 처리하였다. 이후, microtiter plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 570 nm 에서 분광 광도계 분석을 수행하였다.
- [0061] **1.4. 동물실험**
- [0062] 20 주령의 NOD/SCID (non-obese diabetic mice) 암컷 마우스가 쇼그렌 증후군 (Sjogren's syndrome) 마우스 모델로 사용되었고, 20 주령의 정상 Balb/c 암컷 마우스가 정상 모델로 사용되었다 (새론바이오 INC., Seoul, Korea). 동물은 경희대학교의 동물실험관리센터(Center for Laboratory Animal Care and Use)에서 12 시간 명암 주기의 무균 환경에서 생육되었다. 본 발명에서 마우스 이용에 대한 프로토콜은 경희대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care & Use Committee, IACUC)로부터 승인받았다 (KHUASP(SE)-16-113).
- [0063] 마우스는 무작위로 5 그룹으로 분류되었다: 정상 그룹 (N, Balb/c, n=6); 대조군 (C, NOD/SCID, n=6) 및 3 개의 사삼 추출물 처리 그룹(100, 500 또는 1000 mg/kg, o.p., n=6/each group). 사삼 추출물은 4 주 동안 일주일에 5 일 처리되었다. 동물은 위관 양을 조절하고 일반적인 건강상태를 확인하기 위하여 매주 무게를 측정하였다.
- [0065] **1.5. 유체 분비(fluid secretion) 측정**
- [0066] 대조군 세포와 5-Aza (2 µM)로 48시간 동안 처리된 세포에서의 전체 유체 분비율(net fluid secretion rate)은 기존 방법의 변형된 형태로 측정되었다. 간단히, NS-SV-AC 세포는 six-well Transwell-Col culture chambers (Coster, Cambridge, MA, USA)에서 배양되었다. 정단부 유체(apical fluid)는 0.4 ml의 초삼투압성 배지(hyperosmotic medium, 400 mOsm)로 교체되었고, 기저측부 챔버의 배지는 등삼투압성 배지(isosmotic

medium, 300 mOsm)로 교체되었다. 4 시간 후, 정단부의 액체를 모았고, 눈금이 있는 파이펫으로 부피를 측정하였다.

[0067] *In vivo* 연구에서, 각 암컷 마우스는 urethane (1.3 g/kg)의 복강내 주입에 의해 마취되었다. 타액은 모세 페이퍼 플러그로 입의 바닥에서 10 분 동안 수집되었고, 페이퍼 플러그의 무게는 침샘 수집 전후로 측정되었다. 타액의 양은 10 분 당 몸무게 1 g 당 타액의 밀리리터(mL)로 표준화되었다.

[0069] 1.6. ELISA 분석

[0070] IgG 검출은 mouse anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB ELISA kit (Signosis, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행되었다. 모든 혈청 샘플은 1:50으로 희석되었다.

[0071] NOD/SCID 마우스 혈청에서의 TNF- α , IFN- γ 및 IL-6의 양은 mouse TNF- α , IFN- γ 및 IL-6 ELISA kit (R&D)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행되었다.

[0073] 1.7. 웨스턴블롯 분석

[0074] 전체 단백질 추출을 위하여 NS-SV-AC 세포 및 NOD/SCID 마우스의 침샘은 lysis buffer로 4 °C에서 1 시간 동안 처리하여 용해시켰다. 불용성 물질은 Smart R17 Refrigerated Micro Centrifuge (한일 BioMed, Inc. Seoul, Korea)를 사용하여 4 °C에서 20 분 동안 13,000 x g 에서 원심분리하여 버렸다. 세포 용해물에서 단백질의 농도는 Protein Assay를 사용하여 결정되었다. 동일한 양의 단백질은 120 V에서 2 시간 동안 10% SDS-PAGE로 분리되었다. 분리된 단백질은 멤브레인으로 이동시켰고, 5 % 탈지분유 (in TBST, 0.5% Tween-20가 포함된 Tris-buffered saline(10 mM of Tris-Cl, pH 7.4))로 상온에서 1 시간 동안 블러킹시켰다. 이후, 멤브레인은 rabbit anti-AQP 5 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA), anti-M3R (1:500) (Abcam, Cambridge, England) 및 anti- β -tubulin (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc)으로 표지되었다.

[0076] 1.8. 면역형광 염색

[0077] NS-SV-AC 세포는 슬라이드 글라스에 분주되고, 5-Aza 와 함께 사삼 추출물의 처리 또는 무처리로 48 시간 동안 배양되었다. 세포는 2 % 파라포름알데하이드로 고정시켰고, 상온에서 4 시간 동안 anti-AQP 5 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA)가 처리되었다. 침샘 조직은 4 % 파라포름알데하이드로 고정시킨 후, 포매하였다. 이후, Cyanine dyes (Cy3)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 2 차 항체로 사용되었다. 면역염색된 세포는 DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 마운팅 용액으로 처리되고, Olympus Immunofluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하여 가시화되었다.

[0079] 1.9. 침샘의 조직학적 분석

[0080] 침샘은 각 그룹의 마우스를 안락사하는 시기에 분리하여 4 % 파라포름알데하이드로 고정시키고, O.C.T compound 로 포매시킨 후, 5 μ m 두께로 절단하였다. 각 절편은 헤마톡실린(hematoxylin) 염료로 염색하였다.

[0082] 1.10. 통계 분석

[0083] 통계 분석은 GraphPrism 4.0.3 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 데이터는 평균±표준편차(standard deviation, S.D.) 또는 평균±표준오차(standard error, S.E.)로 나타내었고, SPSS software version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석되었다.

[0085] 실시예 2. NS-SV-AC 세포에서 사삼 추출물에 의한 세포증식 증가 효과

[0086] 본 발명자들은 사삼 추출물에 의하여 NS-SV-AC 세포에서 세포증식에 대한 효과가 있는지 확인하는 위하여, 살아 있는 세포의 대사 활성을 측정하는 MTT 어세이를 통해 실험을 수행하였다. NS-SV-AC 세포는 실험 전에 24 시간 동안 starvation medium 에서 배양하여 성장이 멈추도록 하였고, 이후, 사삼 추출물 및 2 μ M의 5-Aza 를 48 시간 동안 처리하였다. 정상 대조군(normal)은 PBS를 처리하였고, 대조군(control)은 5-Aza 만을 처리하였다.

[0087] 그 결과, 5-Aza 및 사삼 추출물을 처리한 그룹에서는 5-Aza 만을 처리한 대조군 그룹에 비해 현저하게 세포생존율이 증가하였음을 확인하였다 (도 1). 구체적으로 사삼 추출물의 농도를 1, 5, 10, 50 및 100 μ g/mL로 처리한 경우 세포생존율은 각각 57.4 $\pm$ 10.8 %, 48.1 $\pm$ 8.9 %, 54.6 $\pm$ 10.7 %, 62.4 $\pm$ 6.8 % 및 79.7 $\pm$ 6.3 % 로서, 5-Aza 만을 처리한 그룹인 36.8 $\pm$ 4.3 % 에 비해 증가되었다.

[0088] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 설폰세포의 세포증식을 향상시키고, 5-Aza에 의해 유도된 세포독성으로부터 선

포세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0090] 실시예 3. NS-SV-AC 세포에서 사삼 추출물에 의한 유체 분비율 증가 효과

[0091] 본 발명자들은 사삼 추출물이 NS-SV-AC 세포에서 유체 분비율을 증가시키는 효과가 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 5-Aza 만이 처리된 세포에서는 전체 유체 분비율이 $1.1 \pm 0.3 \mu\text{l}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ 로서 대조군($1.6 \pm 0.2 \mu\text{l}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)에 비해 현저히 감소되었음을 확인하였다 (도 2). 그런데, 5-Aza 와 함께 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 사삼 추출물을 동시에 처리한 경우에는 전체 유체 분비율이 $1.7 \pm 0.2 \mu\text{l}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ 로서, 5-Aza 만을 처리한 그룹에 비해 현저하게 유체 분비율이 증가되었음을 확인하였다 (도 2).

[0092] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 선포에서 유체 분비율을 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0094] 실시예 4. NS-SV-AC 세포에서 사삼 추출물에 의한 AQP 5 단백질의 발현량 증가 효과

[0095] 본 발명자들은 사삼 추출물이 막 채널 단백질인 AQP5(Aquaporin 5) 단백질의 발현에 변화를 주는지 확인하기 위하여 웨스턴블롯 및 면역형광 분석을 수행하였다.

[0096] 그 결과, 5-Aza 만이 처리된 세포에서는 AQP5 단백질의 발현량이 $51.7 \pm 20.2 \%$ 로서 대조군(100 %)에 비해 현저히 감소되었음을 확인하였다 (도 3). 그런데, 5-Aza 와 함께 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 사삼 추출물을 동시에 처리한 경우에는 AQP5 단백질의 발현량이 87.2% 로서, 5-Aza 만을 처리한 그룹에 비해 현저하게 AQP5 단백질의 발현량이 증가되었음을 확인하였다 (도 3).

[0097] 또한, 웨스턴블롯 결과와 동일하게 면역형광 분석에서도 5-Aza 와 함께 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 사삼 추출물을 동시에 처리한 경우 5-Aza 만을 처리한 그룹에 비해 AQP5 단백질의 발현이 증가되었음을 확인하였다 (도 4).

[0098] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 NS-SV-AC 세포에서 AQP 5 단백질의 발현량을 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0100] 실시예 5. NOD/SCID 마우스에서 사삼 추출물에 의한 타액 분비 증가 효과

[0101] NOD/SCID 마우스는 자가면역 메커니즘에 의해 췌장 B 세포가 파괴된 동물 모델로서, 쇼그렌 증후군의 동물 모델로 사용되고 있다. 본 발명자들은 NOD/SCID 마우스를 통해 *in vivo* 에서도 사삼 추출물에 의해 타액 분비를 증가시키는 효과가 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 쇼그렌 증후군 마우스 모델인 NOD/SCID 마우스인 대조군 그룹 (C)에서는 타액 분비가 $5.8 \pm 1.3 \mu\text{l}/10 \text{ min}/\text{g}$ 로서 정상 마우스 그룹 (N)에 비해 현저하게 타액 분비가 감소되었음을 확인하였다 (도 5). 그런데, NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물을 100, 500 및 1000 mg/kg의 양으로 처리된 그룹에서는 각각 타액 분비량이 12.2 ± 2.7 , 14.2 ± 2.2 및 $12 \pm 3.2 \mu\text{l}/10 \text{ min}/\text{g}$ 으로서, 대조군 그룹 (C)에 비해 현저하게 타액 분비가 증가되었음을 확인하였다.

[0102] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 쇼그렌 증후군 동물 모델에서 타액 분비량을 증가시키는 효과가 있어, 쇼그렌 증후군에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

[0104] 실시예 6. NOD/SCID 마우스에서 사삼 추출물에 의한 AQP 5 단백질 및 M3R 단백질의 발현량 증가 효과

[0105] 타액 분비(salivary secretion)는 막 채널 단백질인 아쿠아포린(aquaporin)-관련 메커니즘과 연관되며, AQP5는 선포세포(acinar cell)에 존재하는 주요 물의 이동 채널 단백질이며, M3R(anti-muscarinic receptor type III)는 췌장 B 세포에서 발현량이 높은 단백질로서 혈당 항상성의 조절제로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 NOD/SCID 마우스에서 사삼 추출물에 의해 AQP 5 단백질 및 M3R 단백질의 발현량에 영향을 주는지 확인하기 위해 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0106] 그 결과, NOD/SCID 마우스인 대조군 그룹 (C)에서는 AQP 5 단백질의 발현량이 81.7% 로서 정상 마우스 그룹 (N, 100 %)에 비해 현저하게 발현량이 감소되었음을 확인하였다 (도 6A 및 6B). 그런데, NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물을 1000 mg/kg의 양으로 처리된 그룹에서는 AQP 5 단백질의 발현량이 93% 으로서, 대조군 그룹 (C)에 비해 AQP 5 단백질의 발현량이 증가되었음을 확인하였다 (도 6B).

[0107] 또한, NOD/SCID 마우스인 대조군 그룹 (C)에서는 M3R 단백질의 발현량이 81.7% 로서 정상 마우스 그룹 (N, 100 %)에 비해 현저하게 발현량이 감소되었음을 확인하였다 (도 6A 및 6C). 그런데, NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물을 500 및 1000 mg/kg의 양으로 처리된 그룹에서는 M3R 단백질의 발현량이 각각 95% 및 95.1% 로서, 대조군 그룹 (C)에 비해 M3R 단백질의 발현량이 증가되었음을 확인하였다 (도 6C).

[0108] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 쇼그렌 증후군 동물 모델에서 AQP 5 단백질 및 M3R 단백질의 발현량을 증가시

킴으로써 쇼그렌 증후군에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

[0110] 실시예 7. NOD/SCID 마우스에서 사삼 추출물에 의한 자가항체(autoantibody)의 생산량 감소 효과

[0111] anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB는 심각한 림프구의 침윤에 의해 침샘 및 눈물샘의 손상과 관련된 자가면역 바이오 마커로서 알려져 있다. 쇼그렌 증후군 환자 중 약 70 %는 anti-Ro/SSA 가 검출되고, 약 60 %는 anti-La/SSB 가 검출된다. 이에 본 발명자들은 사삼 추출물이 쇼그렌 증후군 동물 모델인 NOD/SCID 마우스의 혈청에서 자가항체(autoantibody)인 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB의 생산량을 감소시키는 효과가 있는지 확인하기 위하여 ELISA를 수행하였다.

[0112] 그 결과, NOD/SCID 마우스인 대조군 그룹 (C)에서는 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB의 생산량이 정상 마우스 그룹에 비해 현저하게 증가되었음을 확인하였다 (도 7). 그런데, NOD/SCID 마우스에 사삼 추출물을 100, 500 및 1000 mg/kg의 양으로 처리된 그룹에서는 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB의 생산량이 대조군 그룹 (C)에 비해 현저하게 감소되었음을 확인하였다 (도 7).

[0113] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 쇼그렌 증후군 동물 모델에서 자가항체인 anti-Ro/SSA 및 anti-La/SSB의 생산량을 현저하게 감소시킴으로써 쇼그렌 증후군에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

[0115] 실시예 8. NOD/SCID 마우스에서 사삼 추출물에 의한 염증성 사이토카인의 억제 효과

[0116] Th1 세포 및 Th2 세포의 균형은 자가면역 질환에서 중요한 역할을 한다. Th1 세포에 의해 분비되는 염증성 사이토카인인 IFN- γ 은 쇼그렌 증후군 환자에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. 또한, TNF- α 및 IL-6는 B 세포를 활성화시키고 염증반응을 유도하며, 특히, IL-6는 B 세포의 과활성과 관련되는 것으로 보고되고 있다. 이에 본 발명자들은 사삼 추출물이 쇼그렌 증후군 동물 모델인 NOD/SCID 마우스의 혈청에서 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)인 TNF- α , IFN- γ 및 IL-6의 양을 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 ELISA를 수행하였다.

[0117] 그 결과, NOD/SCID 마우스인 대조군 그룹 (C)에서는 TNF- α 의 양이 116.6 ± 19.0 pg/ml 로서 정상 마우스 그룹 (N)에 비해 현저하게 증가하였고, 사삼 추출물을 100, 500 및 1000 mg/kg으로 처리한 그룹에서는 각각 61.4 ± 27.6 , 59.3 ± 22.9 및 58.2 ± 17.4 pg/ml로서 대조군 그룹에 비해 현저하게 감소되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 8A).

[0118] 또한, IFN- γ 의 경우 대조군 그룹 (C)에서는 90.7 ± 10.9 pg/ml 로서 정상 마우스 그룹 (N)에 비해 현저하게 증가하였고, 사삼 추출물을 100 및 1000 mg/kg 으로 처리한 그룹에서는 각각 31.4 ± 20.4 및 40.8 ± 21 pg/ml 으로서 현저하게 감소되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 8B).

[0119] 또한, IL-6의 경우 대조군 그룹 (C)에서는 203.7 ± 24.6 pg/ml 로서 정상 마우스 그룹 (N)에 비해 현저하게 증가하였고, 사삼 추출물을 100 mg/kg 으로 처리한 그룹에서는 97.42 ± 27 pg/ml 로서 현저하게 감소되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 8C).

[0120] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 쇼그렌 증후군 동물 모델의 항체에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IFN- γ 및 IL-6의 양을 현저하게 감소시킴으로써 쇼그렌 증후군에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

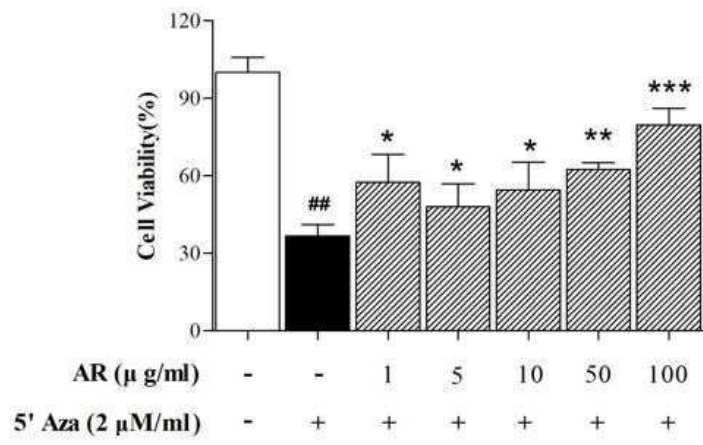
[0122] 실시예 9. NOD/SCID 마우스에서 사삼 추출물에 의한 침샘 조직의 조직병리학적 변화

[0123] 본 발명자들은 사삼 추출물이 침샘 조직에 조직학적 변화를 주는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, NOD/SCID 마우스인 대조군 그룹 (C)에서는 정상 마우스 그룹 (N)에 비해 림프구의 침윤 및 염증성 병변이 발견되었다 (도 9A 및 9B). 반면, 사삼 추출물을 처리한 그룹에서는 침윤 및 염증에 의한 세포 손상이 대조군 그룹에 비해 현저하게 향상되었음을 확인하였다 (도 9C, 9D 및 9E).

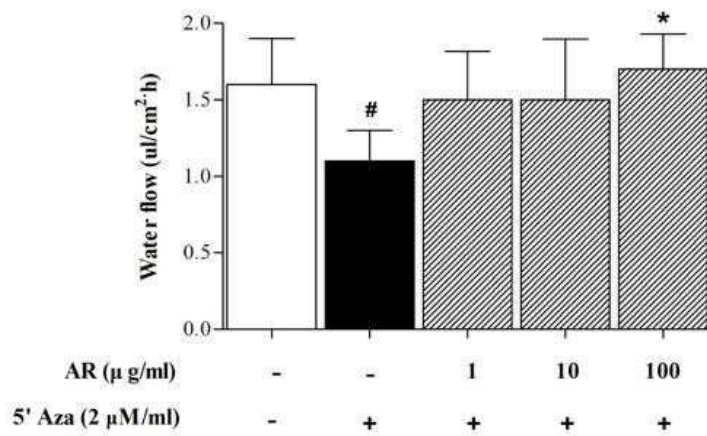
[0124] 상기 결과로부터, 사삼 추출물은 쇼그렌 증후군 동물 모델의 침샘 조직에서 침윤 및 염증에 의한 세포 손상을 회복시키는 효과를 통해 쇼그렌 증후군에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

도면

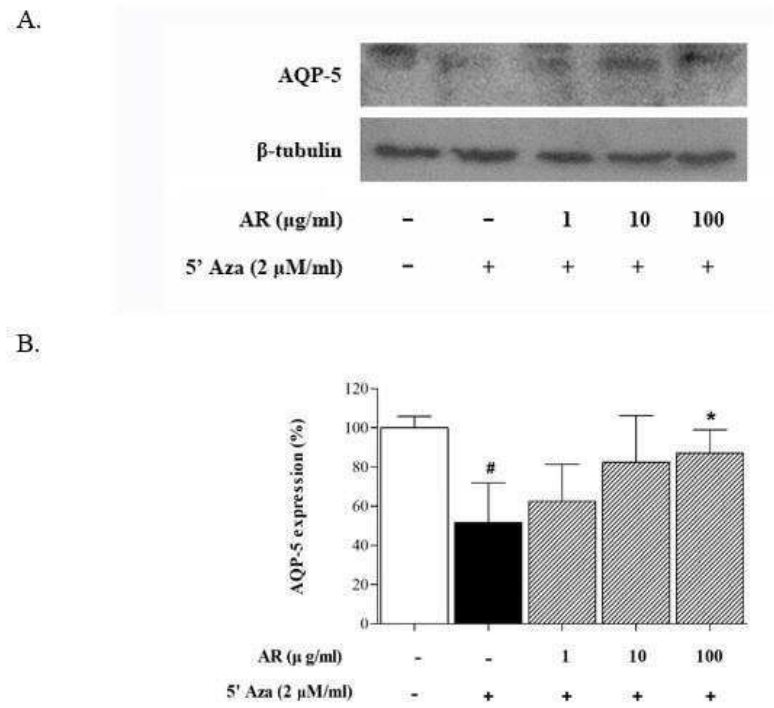
도면1



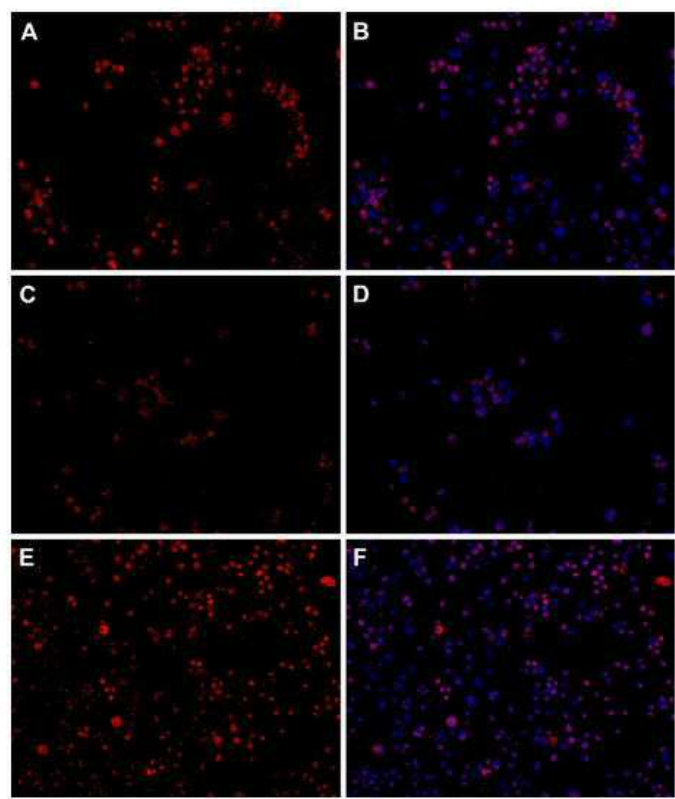
도면2



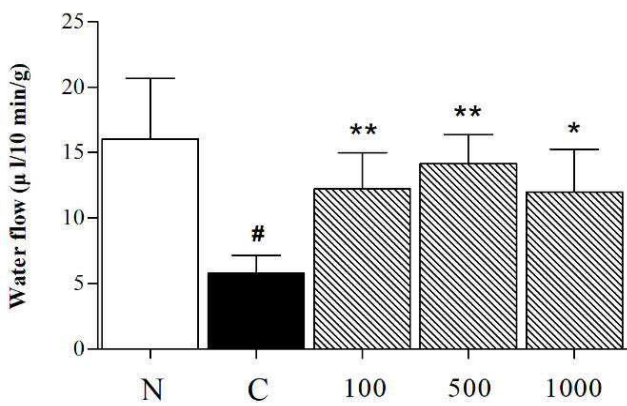
도면3



도면4

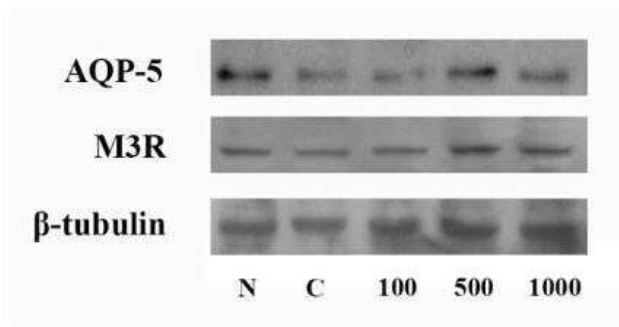


도면5

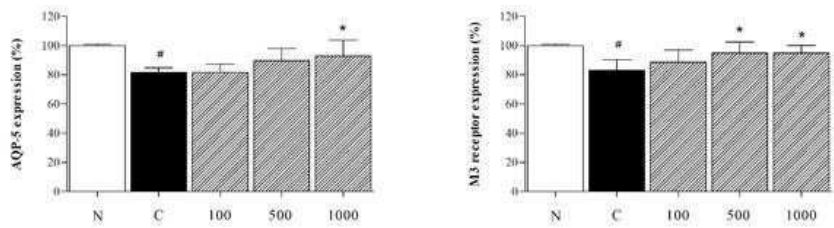


도면6

A.

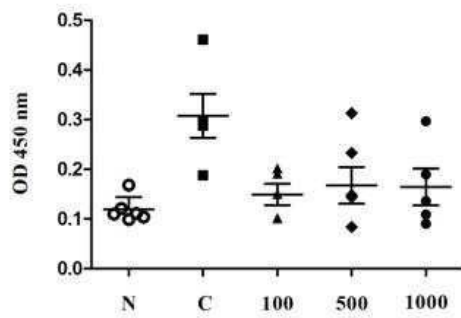


B.

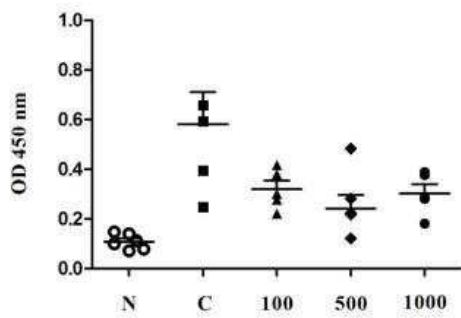


도면7

A.

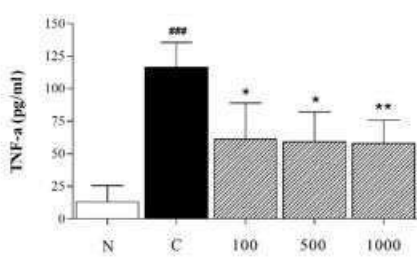


B.

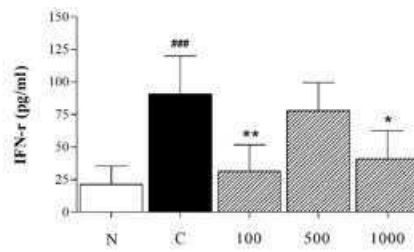


도면8

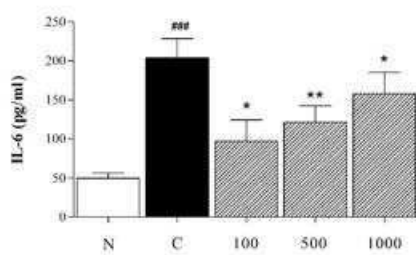
A.



B.



C.



도면9

