(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 10 월 30 일 (30.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/175543 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/8964 (2006.01) *A61K 36/718* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001252

(22) 국제출원일: 2014 년 2 월 17 일 (17.02.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0044990 2013 년 4 월 23 일 (23.04.2013) KR

(71) 출원인: **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내(서천동, 경희대학교), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **김동현 (KIM, Dong Hyun)**; 136-822 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR). **한명주 (HAN, Myung Joo)**; 136-822 서울시 성북구 선잠로 92-24 (성북동), Seoul (KR).

(74) 대리인: **고영갑 (KO, Young Kap)** 등; 463-400 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 645 번길 12(삼평동) 공공지원센터 4 층, Gyeonggi-do (KR).

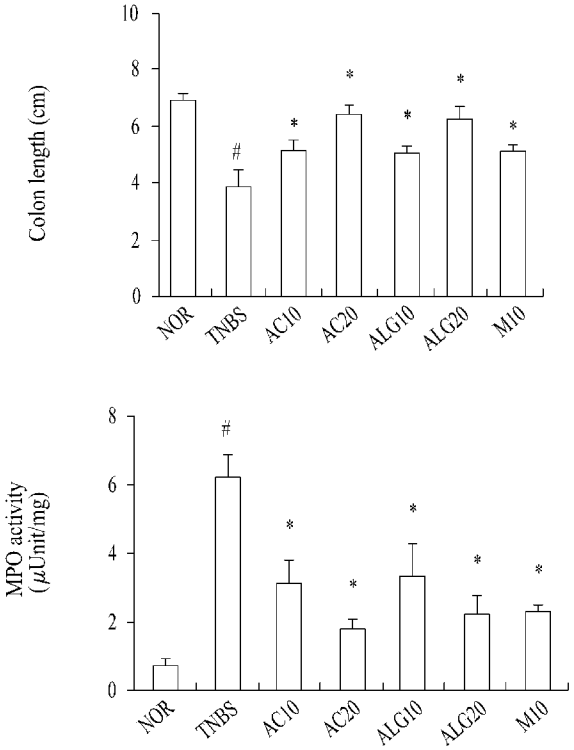
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, 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, SA, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION FOR PREVENTING, RELIEVING OR TREATING COLITIS, CONTAINING COMPLEX EXTRACTS

(54) **발명의 명칭** : 복합 추출물을 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a novel use of an *Anemarrhena asphodeloides* root extract and the like, and a Rhizoma Coptidis extract and the like, and specifically, provides a composition for preventing, relieving or treating colitis, containing, as active ingredients: at least one selected from the *Anemarrhena asphodeloides* root extract, an alcohol-soluble fraction of the *Anemarrhena asphodeloides* root extract having a carbon number of 3 to 8, mangiferin, a pharmaceutically acceptable salt of mangiferin, neomangiferin, or a pharmaceutically acceptable salt of neomangiferin; and at least one selected from the Rhizoma Coptidis extract or an alcohol-soluble fraction of the Rhizoma Coptidis extract having a carbon number of 3 to 8. According to the present invention, complex extracts comprising the *Anemarrhena asphodeloides* root extract and the like, and the Rhizoma Coptidis extract and the like can have excellent prevention or treatment activity against colitis in animal models, and thus can be used as ingredients for food and pharmaceutical use provided to a pharmaceutical composition or a functional food composition.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/175543 A1

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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 지모 추출물 등과 황련 추출물 등의 신규 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 지모 추출물, 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8 인 알코올 가용성 분획물, 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염에서 선택된 1 종 이상 및 황련 추출물 또는 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8 인 알코올 가용성 분획물에서 선택된 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 지모 추출물 등과 황련 추출물 등으로 이루어진 복합 추출물은 대장염 유도 모델동물에 대해 우수한 대장염 예방 또는 치료 활성을 가지므로, 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 구성하는 식의약적 소재로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 복합 추출물을 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 지모 추출물 등과 황련 추출물 등의 신규 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 지모 추출물 등과 황련 추출물 등을 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 대장염은 대장에 염증이 발생하는 질환으로, 다양한 원인에 의해 발생하고, 테네스무스(tenesmus, 시원치 않음), 복부팽만감, 하복 부통, 설사 등이 주요 증상으로 나타나고, 분변 중에 점액, 고름이나 혈액이 섞이는 경우도 있다. 대장염은 원인에 따라 크게 감염성 대장염과 비감염성 대장염으로 구분될 수도 있고, 발병 기간에 따라 급성 대장염과 만성 대장염으로 구분될 수도 있다. 급성 대장염에는 아메바성이질, 세균성이질, 살모넬라나 항생물질에 의한 위막성 대장염(pseudomembranous enteritis) 등이 있고 만성 대장염에는 궤양성 대장염, 크론병, 결핵, 매독, X선 등에 의한 것이 있다. 또한, 대장염은 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 뿐만 아니라 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 포함한다. 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 중 대표적인 질환인 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC)과 크론병(Crohn's disease; CD)은 아직 원인이 명확히 밝혀져 있지 않고 있으며, 복통과 더불어 심한 만성 설사와 혈성 설사를 일으킬 수 있으며, 완치가 힘들고 호전과 악화를 반복하는 특성이 있다. 궤양성 대장염은 대장의 점막에 진무름(미란)이나 궤양이 연속적으로 형성되는 질환으로, 혈변, 점혈변, 설사, 복통이 일어나고, 중증인 경우에는 발열, 체중감소, 빈혈 등의 전신성의 증상이 나타난다. 또한, 궤양성 대장염은 위장관 어느 부위에서도 발생할 수 있다. 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 복통, 설사, 혈변과 더불어, 중증의 경우에는 발열, 하혈, 체중감소, 전신권태감, 빈혈 등의 증상이 나타난다. 궤양성 대장염과 크론병은 병변과 염증 증상에 있어서 차이가 있지만 여러 면에서 유사한 양상을 보이기 때문에 두 질환의 구분이 서로 명확하지 않은 경우가 흔하다.

[3] 종래, 궤양성 대장염 및 크론병의 발생율은 서양인에게 높다고 알려져 있었지만, 최근, 식습관 등의 생활습관의 변화로 인해 우리나라 등 동양에서도 환자수가 급증하고 있다. 그렇지만, 원인이 불분명한 이유도 있어 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라, 증상을 완해시키고, 이러한 상태를 가능한 한 장기간 유지하는 약제가

사용되고 있는 실정이다. 이러한 대증요법을 위한 약제로서, 주로 아미노살리실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되지만, 다양한 부작용이 보고되고 있다. 예를 들어, 아미노살리실산제제로서 자주 사용되는 살라조설파피리딘은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 부신피질스테로이드제는 일반적으로는 프레드니솔론의 경구투여, 관장, 좌약, 정맥 주사 등으로 사용되지만, 위궤양이나 장기사용에 의한 대퇴골두 괴사 등 부작용이 강하다. 그러나 투약의 중단은 증상을 재발시키기 때문에, 이들 약제는 계속적으로 사용하지 않을 수 없다. 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 궤양성 대장염, 크론병 등의 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다. 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)도 마찬가지로 그 원인이 명확하지 않은 만성 복부 질환이다. 현재, IBS의 근본적인 치료제는 존재하지 않으며, 각 타입의 증상 경감을 목적으로 한 대증요법이 행해지고 있다. 예를 들어, 하리형 IBS에 대해서는 평활근의 수축을 억제하는 진경작용을 갖는 항콜린제가 사용되며, 변비형 IBS에는 염류 하제, 대체형 IBS에는 약제로 조절하기 곤란하고, 기본적으로 소화관 운동기능 개선제가 사용되고 있다.

[4] 한편, 지모(知母, Anemarrhena asphodeloides Bunge)는 외떡잎식물 백합목 지모과의 여러해살이풀로서, 이를 껍질째 말린 모지모(毛知母) 또는 이의 뿌리줄기를 약재로 사용하고 있다. 한방에서 지모의 뿌리줄기는 해열제로 사용하고, 만성기관지염 또는 당뇨병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 지모의 약학적 용도와 관련하여 대한민국 등록특허 공보 제10-0856335호에는 지모로부터 분리된 화합물의 호흡기 질환 예방 및 치료 효과가 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-0923953호에는 지모 추출물의 콜린신경계 손상 개선 효과가 개시되어 있으며, 대한민국 등록특허공보 제10-1075742호에는 지모로부터 분리된 화합물의 지질대사 질환 예방 및 치료 효과가 개시되어 있다. 또한, 황련(Coptis)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 미나리아재비과의 상록 여러해살이풀로서, 구체적인 예로는 *Coptis teeta, Coptis japonica, Coptis chinensis, Coptis deltoidea, Coptis omeiensis* 등이 있다. 한방에서는 이의 뿌리줄기를 채취하여 햇볕에 말린 것을 약재로 사용하고 있고, 약효 성분으로 베르베린(Berberine), 콥티신(Coptisine), 워레닌(Worenine), 팔마틴(Palmatine) 등이 알려져 있으며, 항균, 소염, 해열, 담즙 분비 촉진, 혈압 하강 작용 등의 효능이 있는 것으로 보고되고 있다. 황련의 약학적 용도와 관련하여 대한민국 공개특허공보 제10-2001-0085669호에는 황련 추출물을 유효성분으로 포함하는 약물 중독 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허공보 제10-2009-0029022호에는 황련 추출물을 유효성분으로 하는 자외선으로 인한 피부질환 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0022733호에는 천황련 추출물을 포함하는 췌장암

치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-0970739호에는 황련 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있고, 이 밖에도 황련 추출물을 포함하는 치주질환용 조성물, 황련 추출물을 포함하는 당뇨합병증의 예방 및 치료용 조성물, 황련 추출물을 포함하는 신경세포 보호 및 재생용 조성물 등이 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 지모 추출물 등과 황련 추출물 등의 신규 용도를 제공하는 것이고, 구체적으로 지모 추출물 등과 황련 추출물 등을 포함하는 복합 추출물의 대장염 예방, 개선 또는 치료에 관한 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[6] 본 발명의 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 확보된 수많은 천연물을 대상으로 대장염에 대한 예방 또는 치료 활성을 갖는 추출물을 개발하기 위하여 연구를 수행하였다. 그 결과, 지모 추출물 등과 황련 추출물 등으로 이루어진 복합 추출물이 대장염 유도 모델동물에 대해 우수한 대장염 예방 또는 치료 활성을 가진다는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지모 추출물, 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물, 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 약학적으로(또는 식품학적으로) 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적으로(또는 식품학적으로) 허용가능한 염에서 선택된 1종 이상 및 황련 추출물 또는 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 이때, 상기 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 바람직하게는 약학 조성물 또는 식품 조성물의 형태를 가진다.

[8] 또한, 상기 지모 추출물, 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물, 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염에서 선택된 1종 이상 대 황련 추출물 또는 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물에서 선택된 1종 이상의 중량비는 10:1 내지 1:10의 범위일 수 있고, 1:1 내지 5:1인 것이 바람직하고 1:1 내지 4:1인 것이 더 바람직하고, 2:1 내지 4:1인 것이 가장 바람직하다. 예를 들어, 상기 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분은 지모 추출물 및 황련 추출물의 조합으로 이루어질 수 있고, 이때 지모 추출물 대 황련 추출물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것이 바람직하고 1:1 내지 4:1인 것이 더 바람직하며 2:1 내지 4:1인 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 대장염 예방, 개선 또는 치료용

조성물의 유효성분은 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물의 조합으로 이루어질 수 있고, 이때 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 대 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것이 바람직하고 1:1 내지 4:1인 것이 더 바람직하며 2:1 내지 4:1인 것이 가장 바람직하다.

[9] 또한, 상기 지모 추출물의 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매인 것이 바람직하다. 또한, 상기 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물은 바람직하게는 지모 추출물에 물을 가하여 현탁시킨 후, 탄소 수가 3 내지 8인 알코올을 첨가하고 분획하여 수득할 수 있고, 더 바람직하게는 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물이다. 상기 지모 추출물 또는 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물은 바람직하게는 활성 물질로 만지페린(Mangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)을 포함할 수 있다.

[10] 또한, 상기 황련 추출물의 원료는 천황련(*Coptis chinensis*)인 것이 바람직하다. 또한, 상기 황련 추출물의 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매인 것이 바람직하다. 또한, 상기 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 바람직하게는 지모 추출물에 물을 가하여 현탁시킨 후, 탄소 수가 3 내지 8인 알코올을 첨가하고 분획하여 수득할 수 있고, 더 바람직하게는 황련 추출물의 부탄올 가용성 분획물이다. 상기 황련 추출물 또는 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 바람직하게는 활성 물질로 베르베린(Berberine)을 포함할 수 있다.

[11] 또한, 본 발명의 조성물을 적용하여 치료, 개선 또는 예방할 수 있는 대장염의 구체적인 종류는 급성 대장염 또는 만성 대장염 등 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군일 수 있다.

발명의 효과

[12] 본 발명에 따른 지모 추출물 등과 황련 추출물 등으로 이루어진 복합 추출물은 대장염 유도 모델동물에 대해 우수한 대장염 예방 또는 치료 활성을 가지므로, 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 구성하는 식의약적 소재로 사용될 수 있다. 이러한 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물은 급성 대장염이나 만성 대장염, 특히, 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 또는 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료하는데에 사용될 수 있다.

[13] 한편, 약용 작물로부터 추출 또는 분획된 종래의 다양한 생약들은 대표적인 대장염 치료제인 메살라진보다 약효가 크지 않은 것으로 보고되고 있다. 따라서, 지모 추출물 등과 황련 추출물 등을 병용하는 경우 메살라진보다 뛰어난 항대장염 효능을 보인다는 점은 높은 시너지에 의한 결과이고 예측하기 힘든 사항이라 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

[15] 도 2는 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고, 도 3은 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[16] 도 4는 약물 시료로 제조예 3에서 수득한 만지페린(Mangiferin)을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 점수, 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[17] 도 5는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 6은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[18] 도 7은 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 8은 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이다.

[19] 도 9는 약물 시료로 제조예 3에서 수득한 만지페린(Mangiferin)을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현량을 나타낸 그래프이다.

[20] 도 10은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 11은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이다.

[21] 도 12는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다.

[22] 도 13은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 제조예 3에서 수득한 만지페린(Mangiferin)을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다.

[23] 도 14는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이

억제되는 것을 나타낸 결과이다.

[24] 도 15는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 16은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[25] 도 17은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 18은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이다.

[26] 도 19는 DSS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다.

[27] 도 20은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 21은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[28] 도 22는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 23은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이다.

[29] 도 24는 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다.

[30] 도 25는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 26은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

[31] 도 27은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 28은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이다.

[32] 도 29는 DSS에 의해 만성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[33] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[34] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[35] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[36] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[37] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[38] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[39] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[40]

[41] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명은 적어도 2가지 생약의 추출물로 이루어진 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 복합 추출물은 지모 추출물, 지모 추출물 중 탄소 수가 3 내지 8인 알코올에 대한 가용성 분획물(이하, '지모 추출물의 알코올 가용성 분획물'이라 한다), 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 약학적으로(또는 식품학적으로) 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적으로(또는 식품학적으로) 허용가능한 염에서 선택된 1종 이상(이하, '제1 유효성분'이라 한다) 및 황련 추출물 또는 황련 추출물 중 탄소 수가 3 내지 8인 알코올에 대한 가용성 분획물(이하, '황련 추출물의 알코올 가용성 분획물'이라 한다)에서 선택된 1종 이상(이하, '제2 유효성분'이라 한다)을 포함한다. 이때, 복합 추출물을 구성하는 제1 유효성분과 제2 유효성분의 혼합비는 크게 제한되지 않는다. 예를 들어, 복합 추출물 내에서 상기 제1 유효성분 대 제2 유효성분의 중량비는 10:1 내지 1:10일 수 있고, 대장염 예방, 개선 또는 치료 효과를 고려할 때 1:1 내지 5:1인

것이 바람직하고 1:1 내지 4:1인 것이 더 바람직하고, 2:1 내지 4:1인 것이 가장 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분인 복합 추출물은 다양한 조합에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 지모 추출물 및 황련 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 지모 추출물 및 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 지모 추출물의 알코올 가용성 추출물 및 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 만지페린 및 황련 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 만지페린 및 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 네오만지페린 및 황련 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 네오만지페린 및 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 이 중, 제품화에 따른 경제성 측면 및 대장염의 예방, 개선 또는 치료 효과를 고려할 때, 상기 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분은 지모 추출물 및 황련 추출물의 조합으로 이루어지거나 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 가용성 분획물로 이루어지는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분이 지모 추출물 및 황련 추출물의 조합으로 이루어지는 경우, 대장염의 예방, 개선 또는 치료 효과를 고려할 때 지모 추출물 대 황련 추출물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것이 바람직하고 1:1 내지 4:1인 것이 더 바람직하고, 2:1 내지 4:1인 것이 가장 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분이 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 가용성 분획물로 이루어지는 경우, 대장염의 예방, 개선 또는 치료 효과를 고려할 때 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 대 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것이 바람직하고 1:1 내지 4:1인 것이 더 바람직하고, 2:1 내지 4:1인 것이 가장 바람직하다.

[42] 또한, 본 발명에서 황련은 황련속(*Coptis*) 속에 해당하는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 *Coptis teeta, Coptis japonica, Coptis chinensis, Coptis deltoidea, Coptis omeiensis* 등에서 선택될 수 있고, 이 중 대장염의 예방, 개선 또는 치료 효과와 관련하여 그 뿌리줄기에 포함된 활성성분의 양과 구성비를 고려할 때 천황련(*Coptis chinensis*)인 것이 바람직하다.

[43] 또한, 본 발명에서 대장염은 세균 감염이나 장 내용물의 병적 발효 등으로 인해 대장에 염증이 발생한 상태를 말하며, 감염성 대장염과 비감염성 대장염을

포함하는 개념이다. 본 발명에서 상기 복합 추출물을 통해 예방, 개선 또는 치료가 가능한 구체적인 대장염의 종류는 크게 제한되지 않으며, 급성 대장염과 만성 대장염을 모두 포함하며, 더 구체적으로 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군 등이 있다. 또한, 염증성 대장 질환은 예를 들어 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 또는 크론병(Crohn's disease) 등이 있다. 급성 대장염은 급성으로 오는 대장 또는 결장에의 염증을 말하는데, 염증으로 인해 점막이 손상되어 점액성 설사나 선혈 증상을 주로 보인다. 본 발명에서 급성 대장염은 일반적인 급성 감염성 대장염뿐만 아니라 급성 위막성 대장염 및 급성 궤양성 대장염을 포함한다. 본 발명에 따른 복합 추출물은 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물, 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물, 옥사졸론(Oxazolone)에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물, 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물에 대해 대장의 외관을 양호하게 하고 결장의 수축을 억제하며, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 낮게 유지시켜 대장염을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[44] 본 발명의 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분인 복합 추출물은 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 복합 추출물은 지모 및 황련을 혼합한 후 여기에 추출 용매를 가하고 혼합 추출물을 추출하여 제조할 수도 있고, 다시 혼합 추출물에 탄소 수가 3 내지 8인 알코올을 가하고 분획하여 제조할 수도 있다. 또한, 상기 복합 추출물은 지모 및 황련으로부터 각각 지모 추출물 및 황련 추출물을 얻은 후 이들을 혼합하여 제조할 수도 있고, 다시 지모 추출물 및 황련 추출물로부터 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물을 얻은 후 이들을 혼합하여 제조할 수도 있다. 구체적으로, 상기 복합 추출물을 구성하는 지모 추출물 또는 황련 추출물은 당업계에 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들어 용매 추출법을 사용하여 제조될 수 있다. 용매 추출법에 이용되는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 디에틸에테르, 에틸 아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올 또는 이들의 혼합물인 함수 알코올에서 선택되는 것이 바람직하고, 함수 알코올인 것이 더 바람직하다. 추출 용매로 물을 사용하는 경우 물은 열수인 것이 바람직하다. 또한, 추출 용매로 알코올을 사용하는 경우 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올인 것이 바람직하고, 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 추출 용매로 함수 알코올을 사용하는 경우 알코올 함량은 50~90%인 것이 바람직하고, 60~85%인 것이 더 바람직하다. 한편, 상기한 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도

실질적으로 동일한 효과를 나타내는 지모 추출물 또는 황련 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 또한, 복합 추출물을 구성하는 지모 추출물 또는 황련 추출물에는 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 다른 추출 방법을 통해 얻어진 추출물 내지 정제 및 발효 과정을 거친 추출물도 포함될 수 있다. 예를 들어, 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extraction)에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리 또는 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리, 각종 미생물의 발효 산물에 의한 추출 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 및 추출방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함된다. 일반적으로 초임계 유체는 기체가 고온 고압 조건에서 임계점에 도달하였을 때 갖는 액체 및 기체의 성질을 지니고 있으며, 화학적으로 비극성 용매와 유사한 극성을 지니고 있으며 이러한 특성으로 인해 초임계 유체는 지용성 물질의 추출에 사용되고 있다(J. Chromatogr. A. 1998;479:200-205). 이산화탄소는 초임계 유체기기의 작동으로 압력 및 온도가 임계점까지 이르는 과정을 거치면서 액체 및 기체 성질을 동시에 지닌 초임계 유체가 되고 그 결과 지용성 용질에 대한 용해도가 증가한다. 초임계 이산화탄소가 일정량의 시료를 함유한 추출 용기를 통과하게 되면 시료에 함유된 지용성 물질은 초임계 이산화탄소에 추출되어 나온다. 지용성 물질을 추출한 후 추출 용기에 남아있는 시료에 다시 소량의 공용매가 함유된 초임계 이산화탄소를 흘려 통과시키면 순수한 초임계 이산화탄소만으로는 추출되지 않았던 성분들이 추출되어 나오게 할 수 있다. 본 발명의 초임계 추출법에 사용되는 초임계 유체는 초임계 이산화탄소 또는 이산화탄소에 추가적으로 공용매를 혼합한 혼합유체를 사용함으로써 효과적으로 유효 성분을 추출할 수 있다. 이러한 공용매로 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 대부분 이산화탄소를 함유하고 있는데 이산화탄소는 실온에서 공기 중으로 휘발되고, 공용매는 감압증발기로 제거할 수 있다. 또한, 상기 초음파 추출법은 초음파 진동에 의해 발생되는 에너지를 이용하는 추출방법으로, 초음파가 수용성 용매 속에서 시료에 포함된 불용성인 용매를 파괴시킬 수 있으며, 이때 발생되는 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격효과로 높은 압력을 유도하여 시료에 함유된 물질과 용매의 혼합 효과를 높여주어 추출효율을 증가시키게 된다. 초음파 추출법에 사용할 수 있는 추출용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸 에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 진공 여과하여 여과액을 회수한 후 감압증발기로 제거하고, 동결 건조하는 통상의 추출물 제조방법을

통해 추출물을 얻을 수 있다. 또한, 복합 추출물을 구성하는 지모 추출물 또는 황련 추출물은 발효과정을 거친 추출물도 포함하는데, 예를 들어 지모의 발효 추출물은 다음과 같이 제조할 수 있다. 지모를 100~500 메쉬 정도로 미세하게 파쇄한 다음 통상적인 미생물용 배양액을 지모 농도가 1~50g/L가 되도록 첨가하고 여기에 효모 균주 또는 유산균 등의 미생물을 10,000~100,000 cfu/L의 양으로 첨가한다. 이후, 30~37℃의 배양 온도, 5~7의 pH와 같은 통상적인 미생물 배양조건으로 로 호기적 또는 혐기(anaerobic)적인 상태에서 약 5일 내지 10일간 배양한다. 이후, 숙성 및 여과를 통해 지모의 발효 추출물을 얻을 수 있다. 황련의 발효 추출물도 동일한 과정을 거쳐 제조될 수 있다.

[45] 또한, 상기 복합 추출물을 구성하는 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 각각 지모 추출물 및 황련 추출물로부터 얻어질 수 있다. 이때, 상기 가용성 분획물을 얻기 위해 사용되는 알코올은 탄소 수가 3 내지 8이고, 지모 추출물에 포함된 활성 물질 또는 황련 추출물에 포함된 활성 물질에 대한 가용성과 가용화 후의 감압 농축 공정 등을 고려할 때 탄소 수가 3 내지 6인 것이 바람직하고, 탄소 수가 3 내지 5인 것이 더 바람직하고 탄소 수가 4인 것이 가장 바람직하다. 본 발명에서 지모 추출물의 가용화 또는 황련 추출물의 가용화를 위해 사용되는 탄소 수 4의 알코올에는 n-부탄올, sec-부탄올, 이소부탄올, tert-부탄올 등이 있다. 상기 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 또는 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 지모 추출물 또는 황련 추출물에 포함된 성분들 중 탄소 수가 3 내지 8인 알코올에 가용 될 수 있는 성분들로 이루어진 것으로서, 이 경우 지모 추출물 또는 황련 추출물은 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출되는 것이 바람직하다. 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 또는 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 예를 들어 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합물인 함수 알코올을 추출용매로 사용하여 지모 추출물 또는 황련 추출물을 얻고, 여기에 물을 가하여 현탁시킨 후, 탄소 수가 3 내지 8인 알코올(예를 들어, 부탄올)을 첨가하고 분획하여 수득할 수 있다.

[46] 또한, 상기 지모 추출물 또는 이의 알코올 가용성 분획물은 바람직하게는 활성 물질로 만지페린(Mangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)을 포함한다. 본 발명에서 만지페린(Mangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)은 지모 추출물 또는 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물을 대신하여 복합 추출물을 구성하는 일 성분이 될 수 있다. 또한, 상기 황련 추출물 또는 이의 알코올 가용성 분획물은 바람직하게는 활성 물질로 베르베린(Berberine)을 포함한다. 아울러, 상기 황련 추출물 또는 이의 알코올 가용성 분획물은 활성 물질로 팔마틴, 콥티신, 컬럼바민 또는 자트로리진 등을 더 포함할 수 있다. 다만, 지모 추출물 또는 이의 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물 또는 이의 알코올 가용성 분획물에 포함된 활성 물질은 추출방법 또는 분획방법에 따라 구체적인 성분의 종류나 함량에 약간의 차이가 발생할 수 있다.

[47] 또한, 상기 복합 추출물을 구성하는 만지페린(Mangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)은 지모 등과 같은 식물에서 분리될 수 있다. 도 1은 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 화학 구조식을 나타낸 것이다. 도 1에서 보이는 바와 같이 네오만지페린은 만지페린과 동일한 아글리콘을 가지고 있으며, 배당체 화합물에서 아글리콘은 생리학적 활성을 지배하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 당해 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 만지페린의 항대장염 활성으로부터 네오만지페린의 항대장염 활성을 예측하는 것은 자명하다 할 것이다. 본 발명에서 만지페린(Mangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로는 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[48] 본 발명의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고, 조성물 내에서의 복합 추출물의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[49] 본 발명의 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 유효성분인 복합 추출물의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.1~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 복합 추출물 외에 약학적으로 허용가능한

담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 복합 추출물 외에 대장염 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효 성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분인 복합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 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, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 유효성분인 복합 추출물을 기준으로 할 때 0.1 내지 1000 ㎎/㎏인 것이 바람직하고, 1 내지 500 ㎎/㎏인 것이 더 바람직하며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[50] 또한, 본 발명의 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물에서 유효성분인 복합

추출물의 함량은 크게 제한되지 않으며, 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%일 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 복합 추출물 외에 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 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. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[51]

[52] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[53]

[54] **I. 지모 추출물 등, 황련 추출물 등 또는 이들의 병용에 의한 대장염 예방 또는 치료 효과 확인을 위한 1차 실험**

[55]

[56] **1. 지모 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[57]

[58] 제조예 1 : 지모 추출물의 제조

[59] 지모 500 g에 80% 메탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 1ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 지모 추출물 189g을 얻었다.

[60]

[61] 제조예 2 : 지모 추출물로부터 부탄올 가용성 분획물의 제조

[62] 제조예 1에서 얻은 지모 추출물 189g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로

분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 n-부탄올 가용성 분획물 41g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 지모를 기준으로 할 때 8.2% 이상이었고, n-부탄올 가용성 분획물에 함유된 만지페린(Mangiferin)의 함량은 10% 이상이었다.

[63]

[64] 제조예 3 : 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물로부터 화합물의 분리

[65] 제조예 2에서 얻은 n-부탄올 가용성 분획물 10g에 대하여 용출 용매(클로로포름:메탄올:물=65:35:10)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck, 10㎝×30㎝, 70~230 mesh)를 실시하여 9개의 소분획을 얻었다. 9개의 소분획 중 대장염 동물모델 시험에서 효과가 가장 우수했던 소분획인 Fr. VII에 대하여 25% 메탄올을 용출 용매로 MPLC(Medium pressure liquid chromatography; C_{18} reverse Merck, 3㎝×20㎝)를 실시하여 2개의 분획을 얻었다. 2개의 분획을 농축한 후 이를 각각 메탄올로 재결정하여 흰색 분말 형태의 화합물 2개를 얻었으며 질량 분석 및 ^{13}C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 확인한 결과, 만지페린(Mangiferin)과 네오만지페린(Neomangiferin)인 것으로 확인되었다. 도 2는 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 화학 구조식을 나타낸 것이다. 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 수율은 지모를 기준으로 할 때 각각 0.5% 이상 및 0.1% 이상이었다.

[66] <만지페린>

[67] ESI(-)-MS/MS 421, 301 $[M-Na]^-$

[68] ^{13}C NMR (100 MHz) peaks : 162.254 (C-1), 108.04 (C-2), 164.295 (C-3), 93.813 (C-4), 103.088 (C-5), 154.606 (C-6), 144.228 (C-7), 108.489 (C-8), 179.551 (C-9), 156.697 (C-4a), 151.286 (C-4b), 112.128 (C-8a), 101.772 (C-8b), 82.025 (2-glc C-1'), 73.564 (C-2'), 71.103 (C-3'), 70.724 (C-4'), 79.449 (C-5'), 61.961 (C-6').

[69] <네오만지페린>

[70] ESI(-)-MS/MS 421, 301 $[M-Na]^-$

[71] ^{13}C NMR (100 MHz) peaks : 162.5 (C-1), 108.3 (C-2), 164. 5 (C-3), 94.0 (C-4), 103.3 (C-5), 156.9 (C-6), 144.4 (C-7), 112.4 (C-8), 179.8 (C-9), 154.7(C-4a), 151.5 (C-4b), 108.8 (C-8a), 102.0 (C-8b), 73.8 (2-glc C-1'), 71.3 (C-2'), 79.7 (C-3'), 71.0 (C-4'), 82.2 (C-5'), 61.4 (C-6'), 103.4 (7-glc C-1") 73.5 (C-2"), 76.1 (C-3"), 69.6 (C-4"), 77.3 (C-5"), 60.7 (C-6").

[72]

[73] **2. 오배자 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[74]

[75] 제조예 4 : 오배자 추출물의 제조

[76] 오배자 500 g에 80% 메탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 1ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고

동결건조하여 오배자 추출물 190g을 얻었다.

[77]

[78] 제조예 5 : 오배자 추출물로부터 부탄올 가용성 분획물의 제조

[79] 제조예 4에서 얻은 오배자 추출물 190g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 n-부탄올 가용성 분획물 102g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 오배자를 기준으로 할 때 21% 이상이었고, n-부탄올 가용성 분획물에 함유된 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(glucose1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)의 함량은 30% 이상이었다.

[80]

[81] **3. 더덕 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[82]

[83] 제조예 6 : 더덕 추출물의 제조

[84] 건조된 더덕(Codonopsis lanceolata Trautv) 뿌리(경동시장, 서울, 대한민국) 2㎏에 80% 메탄올 수용액 4ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 2ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 더덕 추출물 185g을 얻었다.

[85]

[86] 제조예 7 : 더덕 추출물로부터 부탄올 가용성 분획물의 제조

[87] 제조예 6에서 얻은 더덕 추출물 185g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 n-부탄올 가용성 분획물 112g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 더덕을 기준으로 할 때 5.5% 이상이었고, n-부탄올 가용성 분획물에 함유된 란세마사이드 A(Lancemaside A)의 함량은 4% 이상이었다.

[88]

[89] **4. 천황련 추출물 및 이의 분획물의 제조**

[90]

[91] 제조예 8 : 천황련 추출물의 제조

[92] 건조된 천황련(*Coptis chinensis*) 뿌리(경동시장, 서울, 대한민국) 500g에 80% 메탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 1ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 천황련 추출물 123g을 얻었다.

[93]

[94] 제조예 9 : 천황련 추출물로부터 부탄올 가용성 분획물의 제조

[95] 제조예 8에서 얻은 천황련 추출물 123g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 n-부탄올 가용성 분획물 63g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 천황련을 기준으로 할 때 12.5% 이상이었다. n-부탄올 가용성 분획물에 대한 성분을 고성능액체크로마토그래피(HPLC; Waters Alliance 2695 모델)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 와이엠씨 하이드로스피어 C18(YMC Hydrosphere C18, S-5㎛, 120㎚, 4.6×250㎜ I.D)를 사용하였고 시료 온도는 25℃±1, 컬럼 온도는 30℃±1을 유지하였다. 시료 농도는 1㎎/㎖로 제조하여 10㎕ 주입하였으며 유속은 1.0㎖/min으로 분석하였다. 또한 표준물질은 베르베린, 팔마틴, 콥티신 등은 상용화되어 있는 것을 시그마사로부터 구입하여 사용하였고 컬럼바민과 자트로리진은 황련으로부터 분리, 정제하여 사용하였다. 이동상은 0.2% 인산용액(용매 A)과 메탄올(용매 B)의 gradient 조건으로 0분~60분(A:B=9:1~6:4), 60분~70분(A:B=6:4~5:5), 70분~90분(A:B=5:5~0:10)으로 분석하였다. 활성성분 함량의 계산은 각각의 표준물질에 대한 면적비를 중량 백분율로 나타내었다. 분석 결과, 천황련 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물은 베르베린 27~30%, 팔마틴 7~8%, 콥티신 5~6%, 컬럼바민 0.8~1.2%, 자트로리진 0.8~1.2% 정도를 함유하였다.

[96]

[97] **5. 복합 추출물의 제조**

[98]

[99] 제조예 10.

[100] 제조예 2에서 얻은 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부 및 제조예 5에서 얻은 오배자 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부를 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[101]

[102] 제조예 11.

[103] 제조예 2에서 얻은 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부 및 제조예 7에서 얻은 더덕 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부를 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[104]

[105] 제조예 12.

[106] 제조예 2에서 얻은 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부, 제조예 5에서 얻은 오배자 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부 및 제조예 7에서 얻은 더덕 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부를 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[107]

[108] 제조예 13.

[109] 제조예 2에서 얻은 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부 및 제조예 9에서 얻은 천황련 추출물의 부탄올 가용성 분획물 50 중량부를 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[110]

[111] **6. TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험을 통한 대장염 치료 효과 측정**

[112] (1) 실험동물의 준비

[113] 6주령 수컷 생쥐(C57BL/6, 18-22g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다. 모든 생쥐는 습도 50±10%, 온도 20~22℃의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 킨 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

[114]

[115] (2) TNBS에 의한 급성 대장염 유발 및 시료 투여

[116] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 급성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 가볍게 에테르로 마취한 후 NBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1㎖ 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1㎖ 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1㎖를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 약물 시료를 생리식염수에 녹여 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다. 이때, 약물 시료로 지모 추출물의 부탄올 분획물, 만지페린 및 복합 추출물을 사용한 실험은 각각 시간적 간격을 두고 별개의 실험으로 이루어졌으며, 약물 시료의 대장염 예방 또는 치료 효과는 각각의 실험 안에서 TNBS로 처리하지 않은 실험동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 정상군을 기준으로 분석하는 것이 합리적이다.

[117]

[118] (3) 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[119]

[120] 1) 체중 변화량 분석

[121] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물에 시료 투여를 종료하고 다음날에 실험동물의 체중을 측정한 후 최초 체중과 비교하여 체중 변화량을 산출하였다.

[122]

[123] 2) 외관 분석

[124] 적출한 대장은 그 길이와 외관을 관찰하여 하기 표 1의 기준(Hollenbach 등, 2005 대장염 정도에 대한 기준)에 따라 점수로 매겼다. 이때 양성 대조군으로 메살라진(Mesalazine; Sigma) 투여군을 사용하였다. 또한, 장내 미생물 분석을 위해 대장 내용물의 일부를 채취하여 영하 80℃에서 냉동보관하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리 식염수에 세척한 후 일부는 병리조직용 샘플로 사용하기 위해 4% 포름알데히드 고정액으로 고정하였으며, 나머지는 분자생물학적 분석을 영하 80℃에서 냉동보관하였다.

[125] 표 1

[Table 1]

외관 점수(Macroscopic Score)	기준
0	어떠한 궤양과 염증도 발견되지 않음
1	출혈이 없는 충혈이 발견됨
2	충혈이 있는 궤양이 발견됨
3	한 곳에서만 궤양과 염증이 발견됨
4	궤양과 염증이 2곳 이상에서 발견됨
5	궤양이 2㎝ 이상으로 확대되어 있음

[126]

[127] 3) 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[128] 대장조직 100㎎에 lysis buffer 200㎕를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 Mouse MPO assay ELISA kit(Hbt HK210, USA)을 사용하여 MPO 활성을 측정하였다. 상층액 100㎕를 96 well plate에 넣은 다음 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 희석된 tracer를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 희석된 streptavidin-peroxidase conjugate를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 TMB substrate solution을 첨가하고 plate를 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그리고 100㎕의 정지 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader를 이용하여 450㎚에서 흡광도를 측정하였다.

[129]

[130] 4) 체중 변화량, 대장의 외관, 대장의 길이 및 MPO 활성 측정 결과

[131] 도 2는 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고, 도 3은 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 2 및 도 3에서 "N" 또는 "NOR"은 정상군을 나타내고, "TNBS"는 TNBS에 의해 급성 대장염을 유발한 모델동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 군을 의미하고, "A" 또는 "AJ"는 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 의미한다. 또한, "A10" 및 "A20"는 각각 약물 시료 "A"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 2 및 도 3에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 2 및 도 3에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물은 농도 의존적으로 TNBS에 의해 유도된 급성 대장염을 완화하거나 개선하는 효과를 나타내었다.

[132] 도 4는 약물 시료로 제조예 3에서 수득한 만지페린(Mangiferin)을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 점수, 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 4에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "MF"는 만지페린(Mangiferin)을 의미한다. 또한, "MF10" 및 "MF20"는 각각 약물 시료 "MF"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 4에서 "MS"는 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 4에서 보이는 바와 같이 만지페린(Mangiferin)은 농도 의존적으로 TNBS에 의해 유도된 급성 대장염을 완화하거나 개선하는 효과를 나타내었다.

[133] 도 5는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 6은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 5 및 도 6에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 5및 도 6에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 5 및 도 6에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준의 급성 대장염 억제 효과를 나타내었고, 특히 지모 추출물의 분획물

및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[134]

[135] (4) 염증 반응 지표 물질의 발현에 미치는 영향 분석

[136] 1) 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현에 미치는 영향

[137] 모델동물의 대장조직 100㎎에 protease inhibitor cocktail이 함유된 250 ㎕의 RIPA buffer를 첨가하여 균질화 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 80℃에서 보관하면서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)에 해당하는 IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현량과 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)에 해당하는 IL-10의 발현량을 96-well ELISA plate kits(Pierce Biotechology, Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

[138] 도 7은 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 8은 약물 시료로 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이다. 도 7 및 도 8에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "A"는 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 의미한다. 또한, "A10" 및 "A20"는 각각 약물 시료 "A"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 7 및 도 8에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 7 및 도 8에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 대장조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)에 해당하는 IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현량이 약물 투여량에 의존적으로 감소하였고, 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)에 해당하는 IL-10의 발현량이 약물 투여량에 의존적으로 증가하였다.

[139] 도 9는 약물 시료로 제조예 3에서 수득한 만지페린(Mangiferin)을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현량을 나타낸 그래프이다. 도 9에서 "MF"는 만지페린(Mangiferin)을 의미하고, "MS"는 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 9에서 보이는 바와 같이 만지페린(Mangiferin)을 투여하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물의 대장조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)에

해당하는 IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현량이 약물 투여량에 의존적으로 감소하였고, 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)에 해당하는 IL-10의 발현량이 약물 투여량에 의존적으로 증가하였다.

[140] 도 10은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 11은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 TNBS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이다. 도 10 및 도 11에서 "N" 또는 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 10 및 도 11에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 10 및 도 11에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 감소시켰고 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현을 증가시켰다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[141]

[142] 2) 염증 반응 지표 물질의 발현 억제 여부

[143] 모델동물의 대장조직 0.3 g에 protease inhibitor cocktail이 함유된 1㎖의 RIPA buffer(Gibco사)를 첨가하여 균질화 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 80℃에서 보관하면서 COX-2, iNOS, p65(NF-카파B), p-p65(phosphor-NF-카파B) 및 β-actin의 발현량을 Western blotting 방법으로 측정하였다. 먼저 상층액 50㎍을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로스지에 100V, 400㎃의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀로로스지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

[144] 도 12는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 제조예 2에서 수득한 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여하였을 때 모델동물의

대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 12에서 "A"는 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 의미하고, "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 약물 시료의 투여 단위는 ㎎/마우스 ㎏ 이다.

[145] 도 13은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 제조예 3에서 수득한 만지페린(Mangiferin)을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 13에서 "MF"는 만지페린(Mangiferin)을 의미하고, "MS"는 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다.

[146] 도 14는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 14에서 "N"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 14에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 14에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 반응 물질인 COX-2, iNOS, p-p65(phosphor-NF-카파B) 등의 발현을 억제하였다. 특히 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[147]

[148] (5) TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험 결과 요약

[149] 하기 표 2는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 투여된 약물 시료의 대장염 완화 내지 개선 효과를 요약한 것이다. 하기 표 2에서, 분석 항목의 값은 TNBS로 처리하지 않은 실험동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 정상군의 측정값에 대한 백분율로 나타내었다.

[150] 하기 표 2에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물 또는 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물을 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 투여하였을 때 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물, 더덕 추출물의 분획물 또는 황련 추출물의 분획물을 각각 단독으로 투여하였을 때보다 크게 향상된 대장염 완화 내지 개선 효과를 나타내었다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및

더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다. 이는, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물이 각각 대장염 완화 내지 치료와 관련된 서로 다른 타겟에서 작용하여, 병용 시 높은 시너지 효과를 보이는 것으로 판단된다. 또한, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 대장염 완화 내지 개선 효과는 지모 추출물의 분획물을 지모 추출물이나 지모로부터 분리된 화합물인 만지페린으로 대체하거나 천황련 추출물의 분획물을 천황련 추출물로 대체하는 경우에도 동일하게 발휘될 것으로 기대된다.

[151] 표 2

[Table 2]

실험군 구분			분석항목 값(TNBS 처리없이 생리식염수를 공급한 정상군에 대한 백분율, %)							
TNBS 처리 여부	투여 약물 시료	약물 시료 1회 투여량 (㎎/㎏)	Body weight	Macroscopic score	Colon length	MPO 활성	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-10
-	vehicle	-	100	100	100	100	100	100	100	100
+	vehicle	-	82.1	900.9	58.0	2325.6	826.4	2040.8	714.3	12.5
+	제조예 2	20	92.0	600.9	66.7	1214.0	246.3	608.2	425.7	56.3
+	제조예 5	20	93.4	650.5	66.7	1011.6	267.8	695.9	449.3	49.6
+	제조예 7	20	91.1	700.9	62.3	1516.3	305.8	734.7	533.6	31.7
+	제조예 9	20	90.2	650.5	66.7	1618.6	240.5	679.6	415.0	45.5
+	제조예 11	20	92.9	600.9	66.7	1111.6	244.6	589.8	392.1	57.1
+	제조예 13	20	95.8	350.5	92.8	707.0	206.6	385.7	167.9	71.9
+	제조예 10	20	91.6	550.5	69.6	1111.6	236.4	657.1	323.6	65.6
+	제조예 12	20	93.4	450.5	72.5	909.3	268.6	610.2	201.4	54.5
+	메살라진	10	93.2	550.5	89.9	1111.6	304.1	618.4	190.0	53.1

[152]

[153] 다만, 지모 추출물의 분획물과 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물 또는 지모 추출물의 분획물과 오배자 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물을 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 투여하는 경우 지모

추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물, 더덕 추출물의 분획물 또는 황련 추출물의 분획물을 각각 단독으로 투여하였을 때와 비교하였을 때 대장염 완화 내지 개선 효과 측면에서 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

[154]

[155] **7. DSS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험을 통한 대장염 치료 효과 측정**

[156] (1) 실험동물의 준비

[157] 6주령 수컷 생쥐(C57BL/6, 18-22g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다. 모든 생쥐는 습도 50±10%, 온도 20~22℃의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 킨 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

[158]

[159] (2) DSS에 의한 급성 대장염 유발 및 시료 투여

[160] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium; 분자량 : 36~50 kDaltons)으로 급성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 음용수로 물 대신 2.5%(w/v) 덱스트란황산나트륨 수용액을 7일간 음용하게 하여 급성 대장염이 유도된 모델동물을 제작하였다. 반면, 정상군에는 음용수로 물을 공급하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 약물 시료를 생리식염수에 녹여 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다.

[161]

[162] (3) 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[163]

[164] 1) 체중 변화량 분석

[165] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 체중 변화량을 분석하였다.

[166]

[167] 2) 외관 분석

[168] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 대장의 외관을 분석하였다.

[169]

[170] 3) MPO 활성 측정

[171] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 측정하였다.

[172]

[173] 4) 체중 변화량, 대장의 외관, 대장의 길이 및 MPO 활성 측정 결과

[174] 도 15는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 16은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 15 및 도 16에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 15 및 도 16에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 15 및 도 16에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준의 급성 대장염 억제 효과를 나타내었고, 특히 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[175]

[176] (4) 염증 반응 지표 물질의 발현에 미치는 영향 분석

[177] 1) 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현에 미치는 영향

[178] 약물 시료를 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에 투여하였을 때 대장 조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현량을 TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

[179] 도 17은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 18은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이다. 도 17 및 도 18에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 17 및 도 18에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 17 및 도 18에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 유발

사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 감소시켰고 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현을 증가시켰다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[180]

[181] 2) 염증 반응 지표 물질의 발현 억제 여부

[182] 약물 시료를 DSS에 의해 급성 대장염이 유발된 모델동물에 투여하였을 때 대장 조직에서 COX-2, iNOS, p65(NF-카파B), p-p65(phosphor-NF-카파B) 및 β-actin의 발현량을 TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

[183] 도 19는 DSS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 19에서 "N"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 19에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 18에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 반응 물질인 COX-2, iNOS, p-p65(phosphor-NF-카파B) 등의 발현을 억제하였다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[184]

[185] **8. 옥사졸론(Oxazolone)에 의해 만성 대장염이 유도된 모델동물 실험을 통한 대장염 치료 효과 측정**

[186] (1) 실험동물의 준비

[187] 6주령 수컷 생쥐(C57BL/6, 18-22g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다. 모든 생쥐는 습도 50±10%, 온도 20~22℃의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 킨 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

[188]

[189] (2) 옥사졸론에 의한 만성 대장염 유발 및 시료 투여

[190] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는

옥사졸론으로 만성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 생쥐의 등에 있는 털을 깍고 약 1.5㎝×1.5㎝의 면적에 3%(w/v) 옥사졸론 용액 0.2㎖를 발라 감작시켰다. 8일 후에 생쥐를 마취하고 1% 옥사졸론 용액 0.1㎖를 직장을 통해 대장 내로 투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 15일간 약물 시료를 생리식염수에 녹여 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다.

[191]

[192] (3) 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[193]

[194] 1) 체중 변화량 분석

[195] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 체중 변화량을 분석하였다.

[196]

[197] 2) 외관 분석

[198] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 대장의 외관을 분석하였다.

[199]

[200] 3) MPO 활성 측정

[201] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 측정하였다.

[202]

[203] 4) 체중 변화량, 대장의 외관, 대장의 길이 및 MPO 활성 측정 결과

[204] 도 20은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 21은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 20 및 도 21에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "OXA"는 옥사졸론으로 만성 대장염을 유발시킨 후 생리식염수만을 경구투여한 실험군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC-10" 및 "AC-20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 20 및 도 21에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 20 및 도 21에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준의 만성 대장염 억제 효과를

나타내었고, 특히 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[205]

[206] (4) 염증 반응 지표 물질의 발현에 미치는 영향 분석

[207] 1) 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현에 미치는 영향

[208] 약물 시료를 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물에 투여하였을 때 대장 조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현량을 TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

[209] 도 22는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 23은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이다. 도 22 및 도 23에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "OXA"는 옥사졸론으로 만성 대장염을 유발시킨 후 생리식염수만을 경구투여한 실험군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC-10" 및 "AC-20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 22 및 도 23에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 22 및 도 23에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 감소시켰고 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현을 증가시켰다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[210]

[211] 2) 염증 반응 지표 물질의 발현 억제 여부

[212] 약물 시료를 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물에 투여하였을 때 대장 조직에서 COX-2, iNOS, p65(NF-카파B), p-p65(phosphor-NF-카파B) 및 β-actin의 발현량을 TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

[213] 도 24는 옥사졸론에 의해 만성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이

억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 24에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "Oxa"는 옥사졸론으로 만성 대장염을 유발시킨 후 생리식염수만을 경구투여한 실험군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 24에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 24에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 반응 물질인 COX-2, iNOS, p-p65(phosphor-NF-카파B) 등의 발현을 억제하였다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[214]

[215] **9. DSS에 의해 만성 대장염이 유도된 모델동물 실험을 통한 대장염 치료 효과 측정**

[216] (1) 실험동물의 준비

[217] 6주령 수컷 생쥐(C57BL/6, 18-22g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다. 모든 생쥐는 습도 50±10%, 온도 20~22℃의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 킨 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

[218]

[219] (2) DSS에 의한 만성 대장염 유발 및 시료 투여

[220] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 덱스트란황산나트륨(dextran sulfate sodium; 분자량 : 36~50 kDaltons)으로 만성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 음용수로 물 대신 3%(w/v) 덱스트란황산나트륨 수용액을 1차로 7일간 음용하게 하고, 다시 음용수로 물을 5일간 음용하게 하고, 3%(w/v) 덱스트란황산나트륨 수용액을 2차로 3일간 음용하게 한 후, 다시 음용수로 물을 3일간 음용하게 하였다. 반면, 정상군에는 음용수로 물만을 공급하였다. 또한, 약물 시료는 생리식염수에 녹여 2차로 덱스트란황산나트륨 수용액을 음용하게 한 날부터 매일 1회씩 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다.

[221]

[222] (3) 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 및

미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[223]

[224] 1) 체중 변화량 분석

[225] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 체중 변화량을 분석하였다.

[226]

[227] 2) 외관 분석

[228] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 대장의 외관을 분석하였다.

[229]

[230] 3) MPO 활성 측정

[231] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 측정하였다.

[232]

[233] 4) 체중 변화량, 대장의 외관, 대장의 길이 및 MPO 활성 측정 결과

[234] 도 25는 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 체중 변화 및 대장의 외관 점수를 나타낸 그래프이고 도 26은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장 길이 및 MPO 활성 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 25 및 도 26에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC-10" 및 "AC-20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 25 및 도 26에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 25 및 도 26에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준의 만성 대장염 억제 효과를 나타내었고, 특히 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[235]

[236] (4) 염증 반응 지표 물질의 발현에 미치는 영향 분석

[237] 1) 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현에 미치는 영향

[238] 약물 시료를 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물에 투여하였을 때 대장 조직에서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현량을 TNBS에 의해 대장염이

유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

[239] 도 27은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 IL-1 베타 및 IL-10의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 28은 약물 시료로 복합 추출물을 사용하였을 때 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물의 대장조직에서 TNF-알파 및 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이다. 도 27 및 도 28에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC-10" 및 "AC-20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 27 및 도 28에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 27 및 도 28에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 감소시켰고 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 발현을 증가시켰다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[240]

[241] 2) 염증 반응 지표 물질의 발현 억제 여부

[242] 약물 시료를 DSS에 의해 만성 대장염이 유발된 모델동물에 투여하였을 때 대장 조직에서 COX-2, iNOS, p65(NF-카파B), p-p65(phosphor-NF-카파B) 및 β-actin의 발현량을 TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물 실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

[243] 도 29는 DSS에 의해 만성 대장염이 유도된 모델동물에 복합 추출물을 투여하였을 때 모델동물의 대장조직에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 29에서 "NOR"은 정상군을 나타내고, "AC"는 제조예 13에서 제조한 복합 추출물을 의미하고, "ALG"는 제조예 12에서 제조한 복합 추출물을 의미한다. 또한, "AC10" 및 "AC20"은 각각 약물 시료 "AC"의 1회 투여량이 10㎎/마우스 ㎏ 및 20㎎/마우스 ㎏인 것을 의미한다. 또한, 도 29에서 "M"은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)을 의미한다. 도 29에서 보이는 바와 같이 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물과 지모 추출물의 분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 양성 대조 약물로 사용한 메살라진(mesalazine)과 유사한 수준으로 염증 반응 물질인 COX-2, iNOS, p-p65(phosphor-NF-카파B) 등의 발현을 억제하였다. 특히, 지모 추출물의 분획물 및 천황련 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물은 그 효과가 지모 추출물의

분획물, 오배자 추출물의 분획물 및 더덕 추출물의 분획물로 이루어진 복합 추출물보다 더 우수하였다.

[244]

[245] **II. 지모 추출물 등, 황련 추출물 등 또는 이들의 병용에 의한 대장염 예방 또는 치료 효과 확인을 위한 2차 실험**

[246]

[247] **10. 지모 추출물 및 이의 분획물의 제조**

[248]

[249] 제조예 14 : 지모 에탄올 추출물의 제조

[250] 지모 500g에 80% 에탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 2ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 지모 에탄올 추출물 158g을 얻었다.

[251]

[252] 제조예 15 : 지모 물 추출물의 제조

[253] 지모 500g에 증류수 2.5ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 증류수 2ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 지모 물 추출물 164g을 얻었다.

[254]

[255] 제조예 16 : 지모 에탄올 추출물로부터 부탄올 가용성 분획물의 제조

[256] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물 158g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 n-부탄올 가용성 분획물 42g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 지모를 기준으로 할 때 8.4% 이상이었다.

[257]

[258] **11. 천황련 추출물 및 이의 분획물의 제조**

[259]

[260] 제조예 17 : 천황련 에탄올 추출물의 제조

[261] 건조된 천황련(*Coptis chinensis*) 뿌리(경동시장, 서울, 대한민국) 500g에 80% 에탄올 수용액 2.5ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 2ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 천황련 에탄올 추출물 107g을 얻었다.

[262]

[263] 제조예 18 : 천황련 물 추출물의 제조

[264] 건조된 천황련(*Coptis chinensis*) 뿌리(경동시장, 서울, 대한민국) 500g에 증류수

2.5ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 증류수 2ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 천황련 물 추출물 122g을 얻었다.

[265]

[266] 제조예 19 : 천황련 에탄올 추출물로부터 부탄올 가용성 분획물의 제조

[267] 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물 107g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하고 동결건조하여 n-부탄올 가용성 분획물 64g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 천황련을 기준으로 할 때 12.8% 이상이었다.

[268]

[269] **12. 복합 추출물의 제조**

[270]

[271] 제조예 20.

[272] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물과 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물을 1:3의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[273]

[274] 제조예 21.

[275] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물과 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물을 1:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[276]

[277] 제조예 22.

[278] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물과 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물을 3:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[279]

[280] 제조예 23.

[281] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물과 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물을 5:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[282]

[283] 제조예 24.

[284] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물과 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물을 7:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[285]

[286] 제조예 25.

[287] 제조예 14에서 얻은 지모 에탄올 추출물과 제조예 17에서 얻은 천황련 에탄올 추출물을 10:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[288]

[289] 제조예 26.

[290] 제조예 15에서 얻은 지모 물 추출물과 제조예 18에서 얻은 천황련 물 추출물을 1:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[291]

[292] 제조예 27.

[293] 제조예 16에서 얻은 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 제조예 19에서 얻은 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 1:3의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[294]

[295] 제조예 28.

[296] 제조예 16에서 얻은 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 제조예 19에서 얻은 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 1:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[297]

[298] 제조예 29.

[299] 제조예 16에서 얻은 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 제조예 19에서 얻은 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 3:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[300]

[301] 제조예 30.

[302] 제조예 16에서 얻은 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 제조예 19에서 얻은 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 5:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[303]

[304] 제조예 31.

[305] 제조예 16에서 얻은 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 제조예 19에서 얻은 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 7:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[306]

[307] 제조예 32.

[308] 제조예 16에서 얻은 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 제조예 19에서 얻은 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 10:1의 중량비로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였다.

[309]

[310] **13. TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험을 통한 대장염 치료 효과 측정**

[311] (1) 실험동물의 준비

[312] 6주령 수컷 생쥐(C57BL/6, 18-22g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다.

모든 생쥐는 습도 50±10%, 온도 20~22℃의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 킨 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

[313]

[314] (2) TNBS에 의한 급성 대장염 유발 및 시료 투여

[315] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 급성 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 가볍게 에테르로 마취한 후 NBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1㎖ 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1㎖ 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1㎖를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 약물 시료를 생리식염수에 녹여 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다. 이때, 약물 시료로 지모 에탄올 추출물, 천황련 에탄올 추출물, 지모 에탄올 추출물과 천황련 에탄올 추출물을 혼합한 복합 추출물 및 지모 물 추출물과 천황련 물 추출물을 혼합한 복합 추출물을 사용한 실험(이하, '추출물 기반 실험'이라 한다)과 약물 시료로 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물, 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물, 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 혼합한 복합 추출물을 사용한 실험(이하, '분획물 기반 실험'이라 한다)은 시간적 간격을 두고 별개의 실험으로 진행하였다. 동물실험의 특성을 고려할 때 약물 시료의 대장염 예방 또는 치료 효과는 각각의 실험 안에서 평가되어야 하고, 기준으로 TNBS로 처리하지 않은 실험동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 정상군을 사용하는 것이 합리적이다.

[316]

[317] (3) 모델동물의 체중 변화, 대장의 외관 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[318]

[319] 1) 체중 변화량 분석

[320] TNBS에 의해 대장염이 유발된 모델동물에 시료 투여를 종료하고 다음날에 실험동물의 체중을 측정한 후 최초 체중과 비교하여 체중 변화량을 산출하였다.

[321]

[322] 2) 외관 분석

[323] 적출한 대장은 그 길이와 외관을 관찰하여 하기 표 3의 기준(Hollenbach 등, 2005 대장염 정도에 대한 기준)에 따라 점수로 매겼다. 이때 양성 대조군으로

메살라진(Mesalazine; Sigma) 투여군을 사용하였다. 또한, 장내 미생물 분석을 위해 대장 내용물의 일부를 채취하여 영하 80℃에서 냉동보관하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리 식염수에 세척한 후 일부는 병리조직용 샘플로 사용하기 위해 4% 포름알데히드 고정액으로 고정하였으며, 나머지는 분자생물학적 분석을 영하 80℃에서 냉동보관하였다.

[324] 표 3

[Table 3]

외관 점수(Macroscopic Score)	기준
0	어떠한 궤양과 염증도 발견되지 않음
1	출혈이 없는 충혈이 발견됨
2	충혈이 있는 궤양이 발견됨
3	한 곳에서만 궤양과 염증이 발견됨
4	궤양과 염증이 2곳 이상에서 발견됨
5	궤양이 2㎝ 이상으로 확대되어 있음

[325]

[326] 3) 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[327] 대장조직 100㎎에 lysis buffer 200㎕를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 Mouse MPO assay ELISA kit(Hbt HK210, USA)을 사용하여 MPO 활성을 측정하였다. 상층액 100㎕를 96 well plate에 넣은 다음 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 희석된 tracer를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 희석된 streptavidin-peroxidase conjugate를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 TMB substrate solution을 첨가하고 plate를 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그리고 100㎕의 정지 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader를 이용하여 450㎚에서 흡광도를 측정하였다.

[328]

[329] 4) 체중 변화량, 대장의 외관, 대장의 길이 및 MPO 활성 측정 결과

[330] 하기 표 4는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험 중 추출물 기반 실험의 결과를 요약한 것이다. 하기 표 4에서 분석 항목의 값은 TNBS로 처리하지 않은 실험동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 정상군의 측정값에 대한 백분율로 나타내었다. 하기 표 4에서 보이는 바와 같이 지모 에탄올 추출물과 천황련 에탄올 추출물을 혼합한 복합 추출물을 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 투여하였을 때 지모 에탄올 추출물 또는 천황련 에탄올 추출물을 각각 단독으로 투여했을 때보다 향상된 항대장염 효과를 보였다. 또한, 지모 에탄올 추출물과 천황련 에탄올 추출물을 혼합한 복합 추출물의 항대장염 효과는 지모 에탄올 추출물과 천황련 에탄올 추출물의 혼합 중량비가 3:1일 때 가장 크게 상승하였고, 다음으로 5:1 및 1:1의 순서였다. 또한, 지모 에탄올 추출물과 천황련 에탄올 추출물을 혼합한 복합 추출물은 동일 투여량을 기준으로 할 때 현재 대장염 치료 약물로 사용되고 있는 메살라진보다 항대장염 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

[331] 표 4

[Table 4]

실험군 구분			분석항목 값(TNBS 처리없이 생리식염수를 공급한 정상군에 대한 백분율, %)			
TNBS 처리 여부	투여 약물 시료	약물 시료 1회 투여량(㎎/㎏)	Body weight change	Colon length	Macroscopic score	MPO 활성
-	vehicle	-	100	100	100	100
+	vehicle	-	-89.3	75	950	1180
+	제조예 14	20	71.43	87.5	475	420
+	제조예 20	20	67.86	93.65	434	420
+	제조예 21	20	82.14	95.31	300	280
+	제조예 22	20	85.71	98.44	225	180
+	제조예 23	20	89.29	96.88	350	260
+	제조예 24	20	85.71	93.75	450	320
+	제조예 25	20	78.57	89.06	450	320
+	제조예 17	20	53.57	84.38	525	500
+	제조예 26	20	64.86	57.41	480	550
+	메살라진	10	59.46	89.06	420	360
+	메살라진	20	78.38	90.63	420	360
+	메살라진	50	75.68	90.63	450	390

[332]

[333] 또한, 하기 표 5는 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험 중 분획물 기반 실험의 결과를 요약한 것이다. 하기 표 5에서 분석 항목의 값은

TNBS로 처리하지 않은 실험동물에 별도의 약물 시료 대신 생리식염수를 공급한 정상군의 측정값에 대한 백분율로 나타내었다. 하기 표 5에서 보이는 바와 같이 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 혼합한 복합 추출물을 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물에 투여하였을 때 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물 또는 천황련 에탄올 추출물의 가용성 분획물을 각각 단독으로 투여했을 때보다 향상된 항대장염 효과를 보였다. 또한, 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 혼합한 복합 추출물의 항대장염 효과는 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물의 혼합 중량비가 3:1일 때 가장 크게 상승하였고, 다음으로 5:1 및 1:1의 순서였다. 또한, 지모 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물과 천황련 에탄올 추출물의 부탄올 가용성 분획물을 혼합한 복합 추출물은 동일 투여량을 기준으로 할 때 현재 대장염 치료 약물로 사용되고 있는 메살라진보다 항대장염 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

[334] 표 5

[Table 5]

실험군 구분			분석항목 값(TNBS 처리없이 생리식염수를 공급한 정상군에 대한 백분율, %)			
TNBS 처리 여부	투여 약물 시료	약물 시료 1회 투여량(㎎/㎏)	Body weight change	Colon length	Macroscopic score	MPO 활성
-	vehicle	-	100	100	100	100
+	vehicle	-	-100	74.6	1233	1020
+	제조예 16	20	66.67	87.3	667	410
+	제조예 27	20	67.86	89.48	597	340
+	제조예 28	20	96.3	93.65	533	233
+	제조예 29	20	93.65	96.83	400	200
+	제조예 30	20	85.19	95.24	500	250
+	제조예 31	20	70.37	88.89	567	283
+	제조예 32	20	66.67	88.89	633	300
+	제조예 19	20	70.37	85.71	700	383
+	메살라진	10	59.46	90.48	500	300
+	메살라진	20	78.38	92.06	500	300
+	메살라닌	50	75.68	92.06	600	317

[335]

[336] (4) 염증 반응 지표 물질의 발현에 미치는 영향 분석

[337] 모델동물의 대장조직 100㎎에 protease inhibitor cocktail이 함유된 250 ㎕의 RIPA buffer를 첨가하여 균질화 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 80℃에서 보관하면서 염증 유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)에 해당하는 IL-6 및 TNF-알파의 발현량과

항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)에 해당하는 IL-10의 발현량을 96-well ELISA plate kits(Pierce Biotechology, Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

[338] 하기 표 6은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험 중 추출물 기반 실험의 염증 반응 지표 물질 분석 결과를 요약한 것이다.

[339] 표 6

[Table 6]

실험군 구분			대장조직 내 염증 반응 지표 물질 농도(pg/㎎)		
TNBS 처리 여부	투여 약물 시료	약물 시료 1회 투여량(㎎/㎏)	TNF-α	IL-6	IL-10
-	vehicle	-	13.3	20.9	17.3
+	vehicle	-	102.7	83.6	7.3
+	제조예 14	20	49.4	32.8	11.3
+	제조예 21	20	33.3	25.3	16.3
+	제조예 22	20	27.3	17.9	18.3
+	제조예 23	20	37.7	24.3	15.2
+	제조예 24	20	47.91	28.3	13.2
+	제조예 25	20	45.1	27.6	10.7
+	제조예 17	20	53.3	43.3	10.3
+	메살라진	50	42.5	38.2	10.9

[340]

[341] 또한, 하기 표 7은 TNBS에 의해 급성 대장염이 유도된 모델동물 실험 중 분획물 기반 실험의 염증 반응 지표 물질 분석 결과를 요약한 것이다.

[342] 표 7

[Table 7]

실험군 구분			대장조직 내 염증 반응 지표 물질 농도(pg/㎎)		
TNBS 처리 여부	투여 약물 시료	약물 시료 1회 투여량(㎎/㎏)	TNF-α	IL-6	IL-10
-	vehicle	-	14.8	23.5	17.5
+	vehicle	-	92.5	85.5	7.5
+	제조예 16	20	38.5	28.3	10.1
+	제조예 28	20	32.5	25.7	11.7
+	제조예 29	20	28.4	23.8	14.6
+	제조예 30	20	29.4	23.6	11.9
+	제조예 31	20	32.7	24.5	10.2
+	제조예 32	20	38.1	26.4	9.7
+	제조예 19	20	40.8	29.8	10.7
+	메살라진	50	42.5	38.2	10.9

[343]

[344] **Ⅲ. 약학 조성물 및 식품 조성물 등의 제조**

[345]

[346] **14. 약학 조성물의 제조**

[347] 하기 약학 조성물의 제조에서 제조예 13의 복합 추출물은 제조예 20 내지 제조예 32의 복합 추출물로 대체가 가능하다.

[348]

[349] <14-1> 산제의 제조

[350] 제조예 13의 복합 추출물 2 g

[351] 유당 1 g

[352] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[353]

[354] <14-2> 정제의 제조

[355] 제조예 13의 복합 추출물 100 ㎎

[356] 옥수수전분 100 ㎎

[357] 유 당 100 ㎎

[358] 스테아린산 마그네 2 ㎎

[359] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[360]

[361] <14-3> 캡슐제의 제조

[362] 제조예 13의 복합 추출물 100 ㎎

[363] 옥수수전분 100 ㎎

[364] 유 당 100 ㎎

[365] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[366] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[367]

[368] <14-4> 환의 제조

[369] 제조예 13의 복합 추출물 1 g

[370] 유당 1.5 g

[371] 글리세린 1 g

[372] 자일리톨 0.5 g

[373] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[374]

[375] <14-5> 과립의 제조

[376] 제조예 13의 복합 추출물 150 ㎎

[377] 대두추출물 50 ㎎

[378] 포도당 200 ㎎

[379] 전분 600 ㎎

[380] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[381]

[382] <14-6> 주사제의 제조

[383] 제조예 13의 복합 추출물 100 ㎎

[384] 소디움 메타비설파이트 3.0 ㎎

[385] 메틸파라벤 0.8 ㎎

[386] 프로필파라벤 0.1 ㎎

[387] 주사용 멸균증류수 적량

[388] 상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2㎖를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[389]

[390] **15. 식품 조성물의 제조**

[391] 하기 식품 조성물의 제조에서 제조예 13의 복합 추출물은 제조예 20 내지 제조예 32의 복합 추출물로 대체가 가능하다.

[392]

[393] <15-1> 밀가루 식품의 제조

[394] 제조예 13의 복합 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루 100 중량부에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[395]

[396] <15-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[397] 제조예 13의 복합 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[398]

[399] <15-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[400] 제조예 13의 복합 추출물 10 중량부를 그라운드 비프 100 중량부에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[401]

[402] <15-4> 유제품(dairy products)의 제조

[403] 제조예 13의 복합 추출물 5~10 중량부를 우유 100 중량부에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[404]

[405] <15-5> 선식의 제조

[406] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[407] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[408] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 제조예 13의 복합 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[409] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[410] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[411] 제조예 13의 복합 추출물(3 중량부),

[412] 영지(0.5 중량부),

[413] 지황(0.5 중량부)

[414]

[415] <15-6> 건강음료의 제조

[416] 액상과당(0.5g), 올리고당(2g), 설탕(2g), 식염(0.5g), 물(75g)과 같은 부재료와

제조예 13의 복합 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[417]

[418] <15-7> 야채 주스의 제조

[419] 제조예 13의 복합 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[420]

[421] <15-8> 과일 주스의 제조

[422] 제조예 13의 복합 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[423]

[424] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 지모 추출물, 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물, 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염에서 선택된 1종 이상 및 황련 추출물 또는 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 지모 추출물, 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물, 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 약학적으로 허용가능한 염에서 선택된 1종 이상 대 황련 추출물 또는 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물에서 선택된 1종 이상의 중량비는 10:1 내지 1:10인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 대장염은 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 지모 추출물의 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물은 지모 추출물에 물을 가하여 현탁시킨 후, 탄소 수가 3 내지 8인 알코올을 첨가하고 분획하여 수득한 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물은 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 지모 추출물 또는 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물은 만지페린(Mangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)을 포함하는 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 황련은 천황련(*Coptis chinensis*)인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 9] 제 1항에 있어서, 상기 황련 추출물의 추출 용매는 물, 탄소 수가 1

내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 황련 추출물에 물을 가하여 현탁시킨 후, 탄소 수가 3 내지 8인 알코올을 첨가하고 분획하여 수득한 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 황련 추출물의 부탄올 가용성 분획물인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 12] 제 1항에 있어서, 상기 황련 추출물 또는 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 베르베린(Berberine)을 포함하는 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 13] 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유효성분은 지모 추출물 및 황련 추출물이고, 지모 추출물 대 황련 추출물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 14] 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유효성분은 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물이고, 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 대 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 15] 지모 추출물, 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물, 만지페린(Mangiferin), 만지페린(Mangiferin)의 식품학적으로 허용가능한 염, 네오만지페린(Neomangiferin) 또는 네오만지페린(Neomangiferin)의 식품학적으로 허용가능한 염에서 선택된 1종 이상 및 황련 추출물 또는 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 황련은 천황련(*Coptis chinensis*)인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 17] 제 15항에 있어서, 상기 지모 추출물의 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매이고 상기 황련 추출물의 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합 용매인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 18] 제 17항에 있어서, 상기 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물은 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물이고, 상기 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물은 황련 추출물의 부탄올 가용성 분획물인

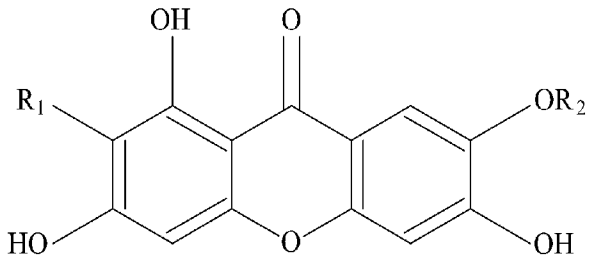
것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 19] 제 15항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유효성분은 지모 추출물 및 황련 추출물이고, 지모 추출물 대 황련 추출물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 20] 제 15 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유효성분은 지모 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물 및 황련 추출물의 탄소 수가 3 내지 8인 알코올 가용성 분획물이고, 지모 추출물의 알코올 가용성 분획물 대 황련 추출물의 알코올 가용성 분획물의 중량비는 1:1 내지 5:1인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

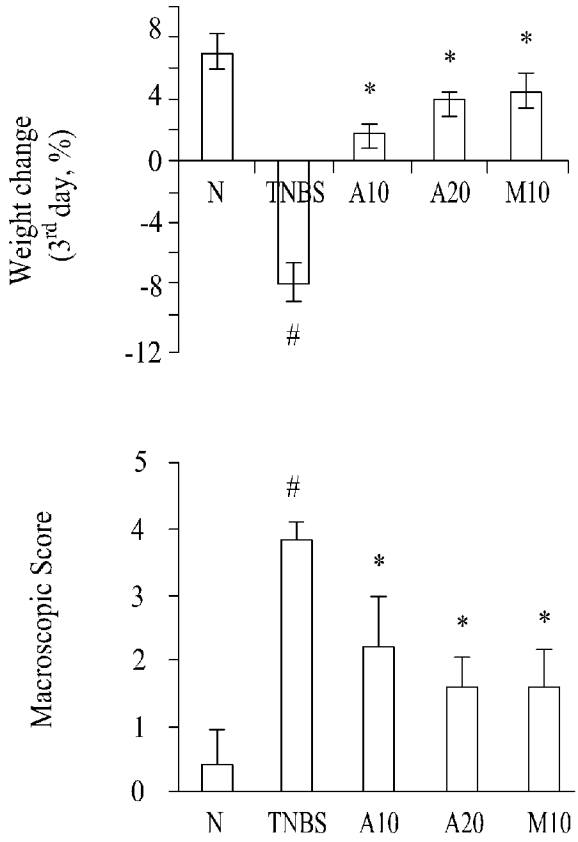
[청구항 21] 개체에 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대장염 예방 또는 치료 방법.

[Fig. 1]

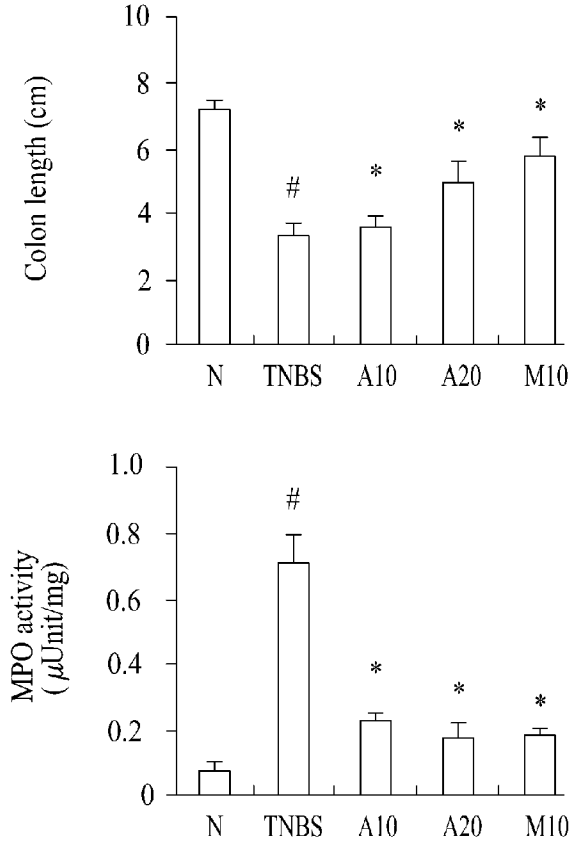


만지페린 R_1=Glc R_2= H
네오만지페린 R_1=Glc R_2= Glc

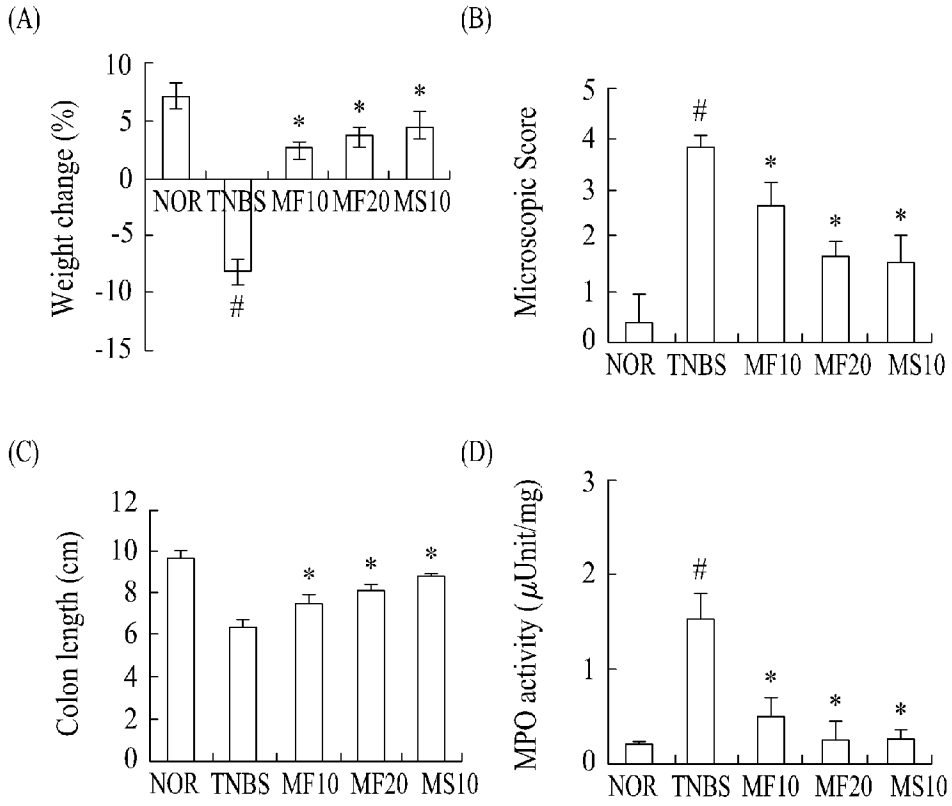
[Fig. 2]



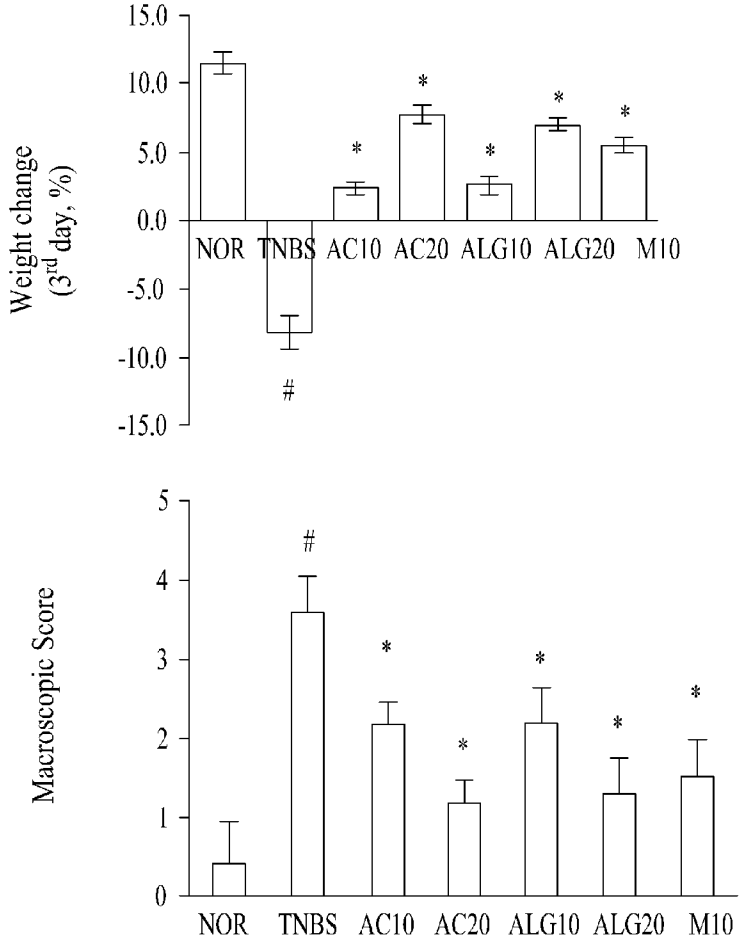
[Fig. 3]


Colon length (cm)
10
8
6
4
2
0
#
*
*
*
N
TNBS
A10
A20
M10
MPO activity (μUnit/mg)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
#
*
*
*
N
TNBS
A10
A20
M10

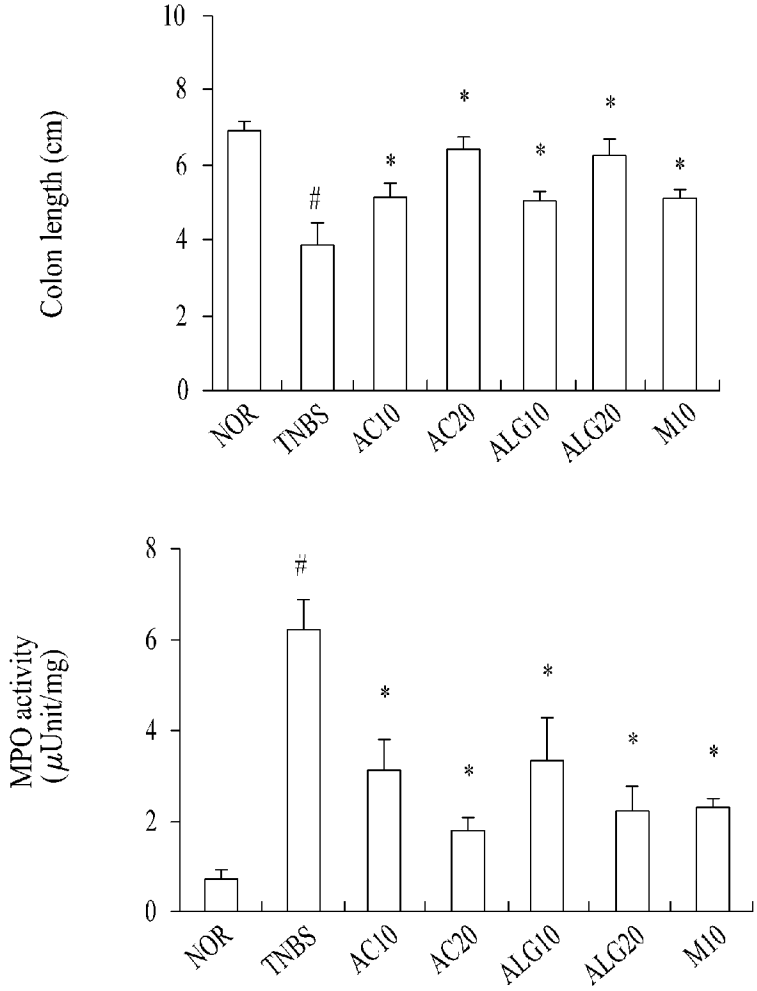
[Fig. 4]


(A)
Weight change (%)
10
5
0
-5
-10
-15
NOR
TNBS
MF10
MF20
MS10
(B)
Microscopic Score
5
4
3
2
1
0
NOR
TNBS
MF10
MF20
MS10
(C)
Colon length (cm)
12
10
8
6
4
2
0
NOR
TNBS
MF10
MF20
MS10
(D)
MPO activity (μUnit/mg)
3
2
1
0
NOR
TNBS
MF10
MF20
MS10

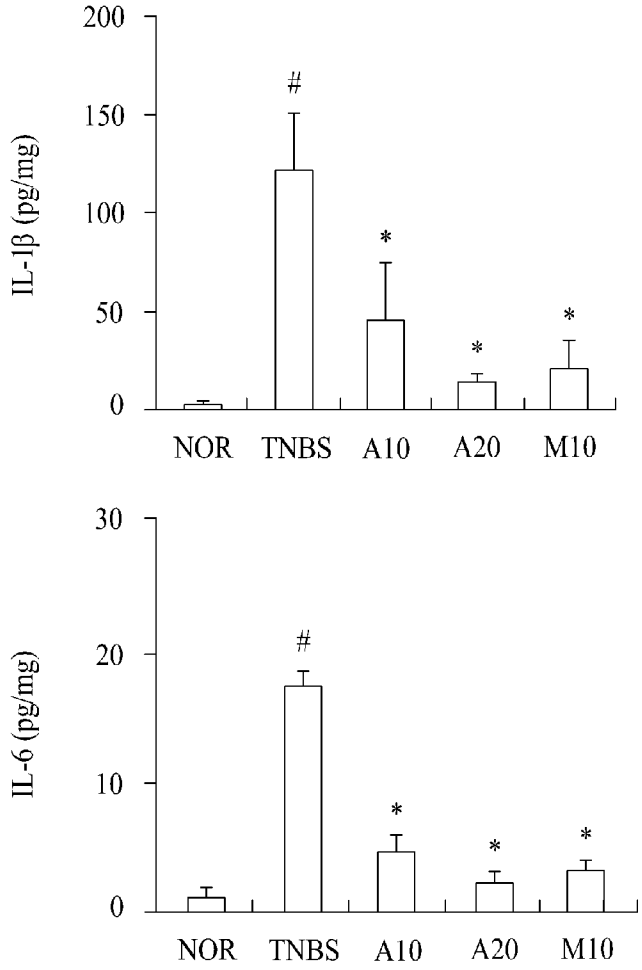
[Fig. 5]


Weight change
(3rd day, %)
15.0
10.0
5.0
0.0
-5.0
-10.0
-15.0
NOR
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
#
*
Macroscopic Score
5
4
3
2
1
0
NOR
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
#
*

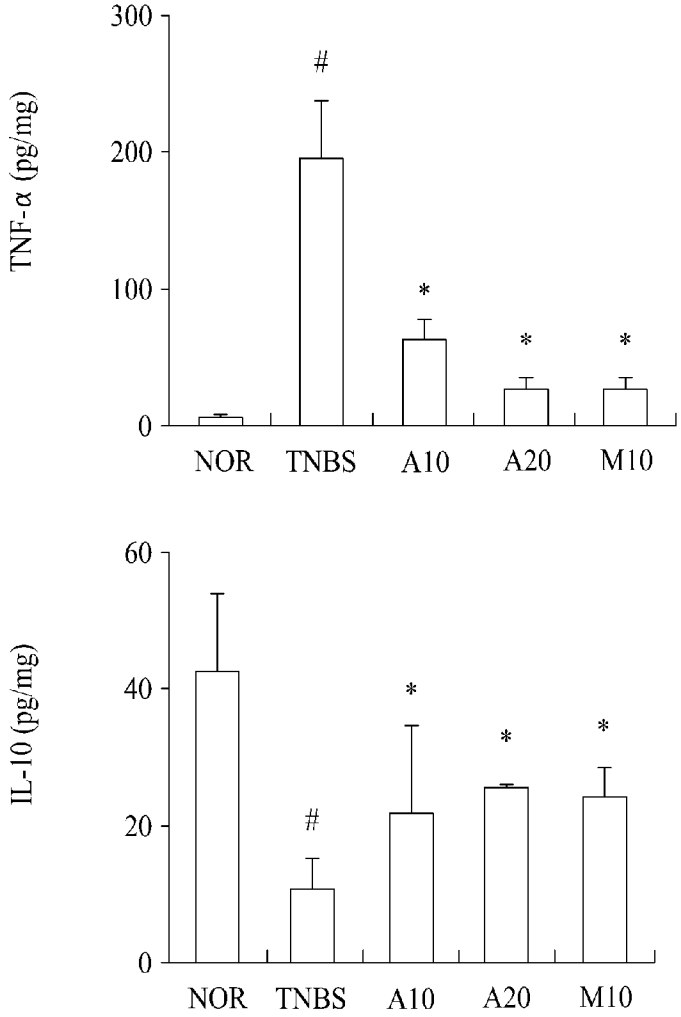
[Fig. 6]


Colon length (cm)
10
8
6
4
2
0
#
*
NOR
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
MPO activity
(μUnit/mg)
8
6
4
2
0
#
*

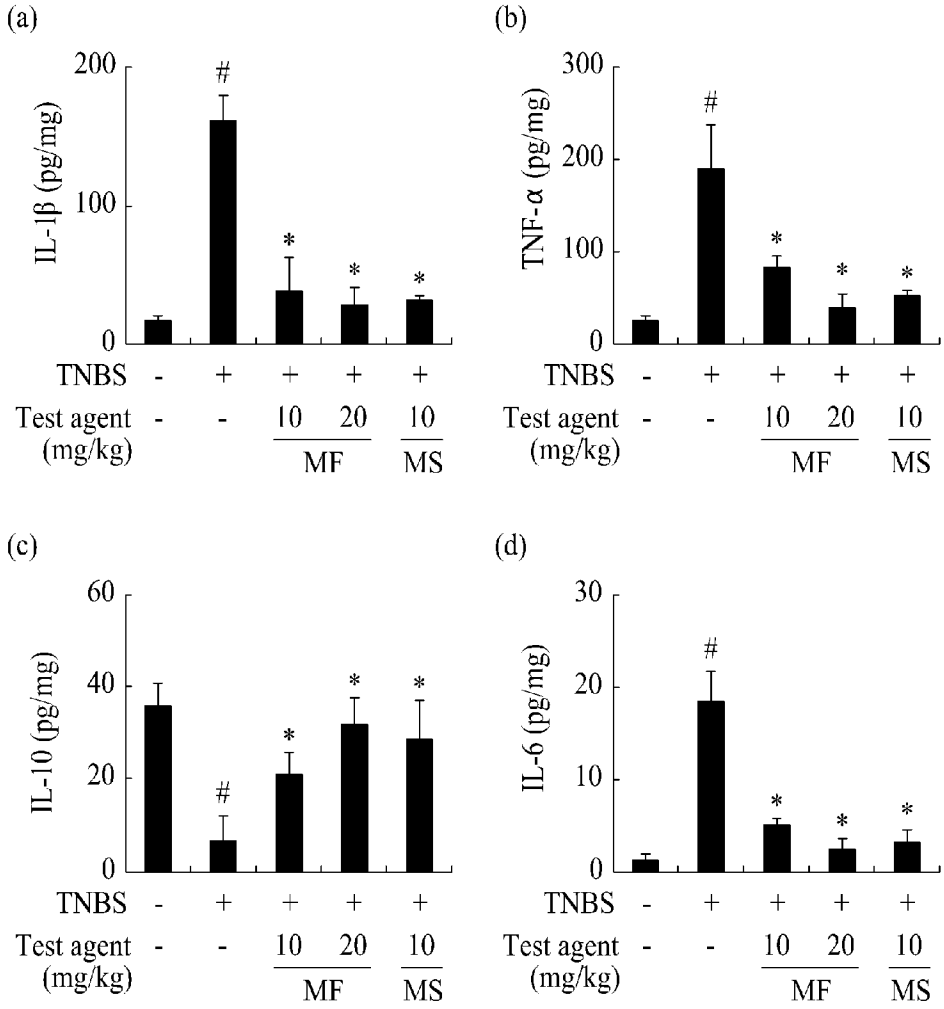
[Fig. 7]


IL-1β (pg/mg)
200
150
100
50
0
#
*
*
*
NOR
TNBS
A10
A20
M10
IL-6 (pg/mg)
30
20
10
0
#
*
*
*
NOR
TNBS
A10
A20
M10

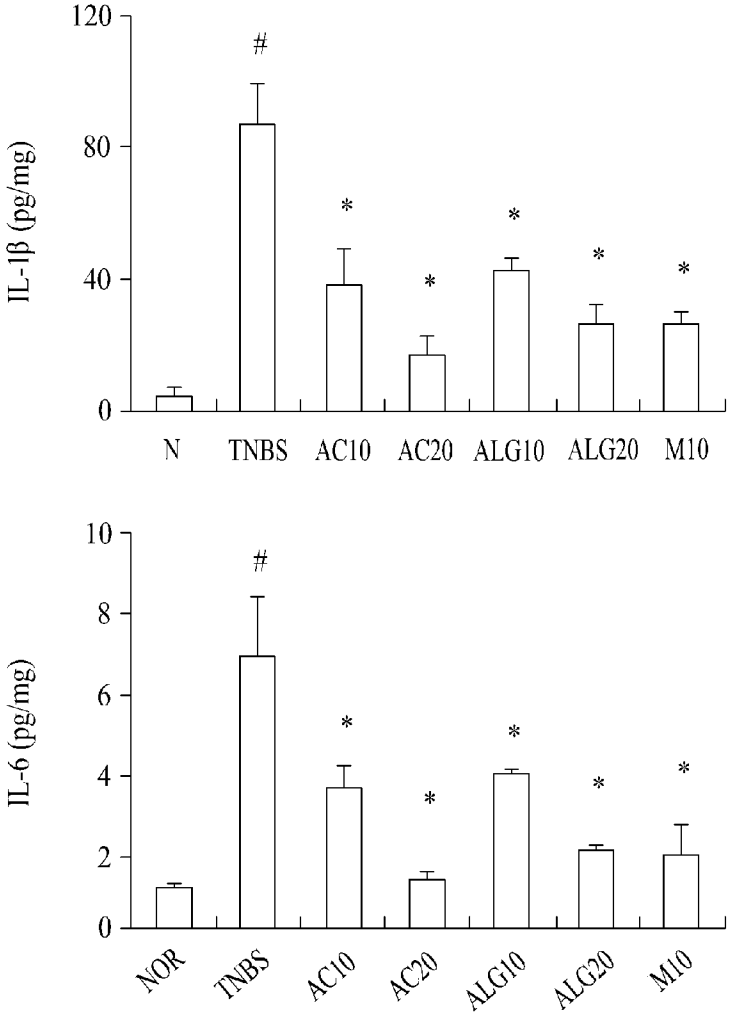
[Fig. 8]


TNF-α (pg/mg)
300
200
100
0
#
*
*
*
NOR
TNBS
A10
A20
M10
IL-10 (pg/mg)
60
40
20
0
#
*
*
*
NOR
TNBS
A10
A20
M10

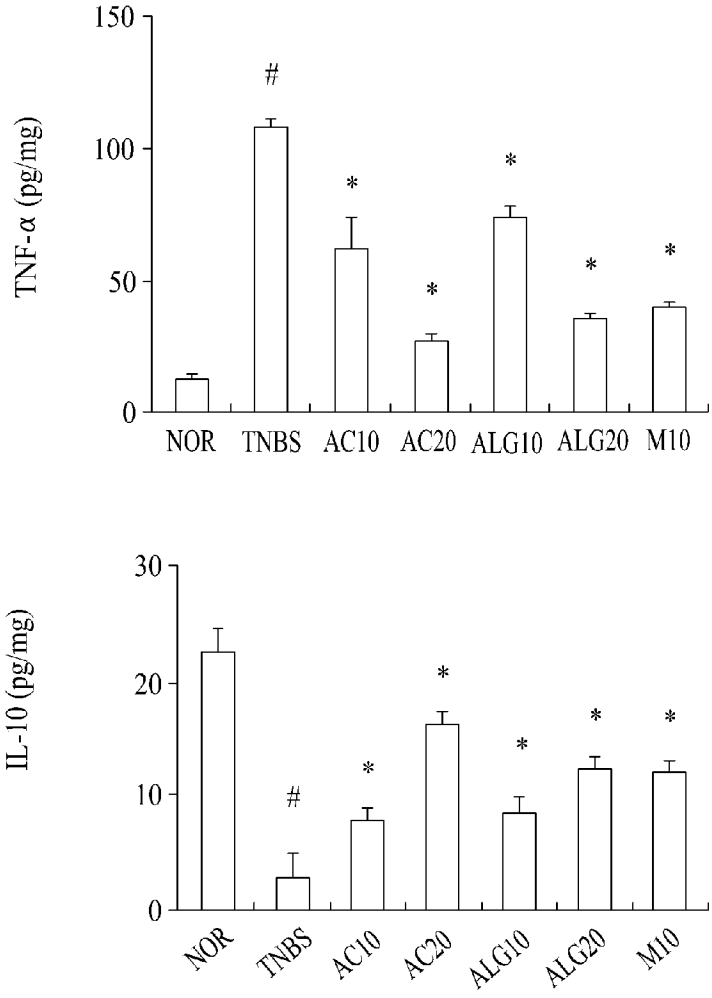
[Fig. 9]


(a)
IL-1β (pg/mg)
200
100
0
#
*
*
*
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
MF
MS
(b)
TNF-α (pg/mg)
300
200
100
0
#
*
*
*
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
MF
MS
(c)
IL-10 (pg/mg)
60
40
20
0
#
*
*
*
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
MF
MS
(d)
IL-6 (pg/mg)
30
20
10
0
#
*
*
*
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
MF
MS

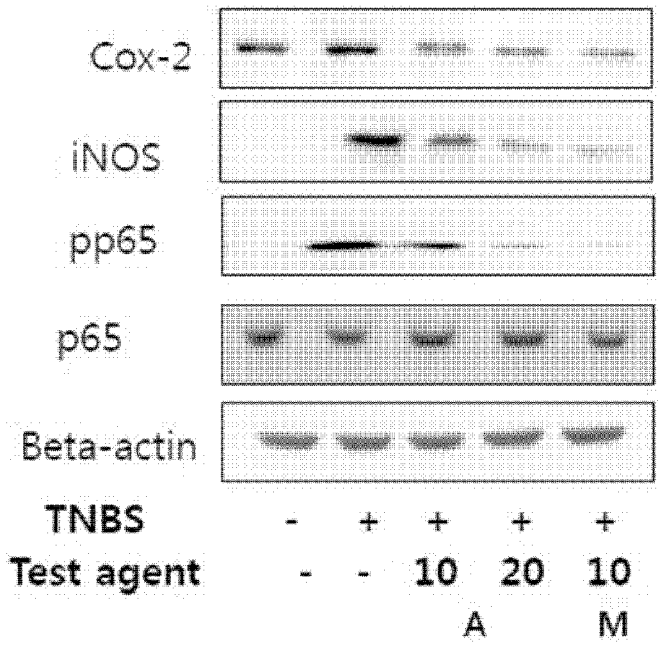
[Fig. 10]


120
80
40
0
IL-1β (pg/mg)
#
*
N
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
10
8
6
4
2
0
IL-6 (pg/mg)
NOR
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10

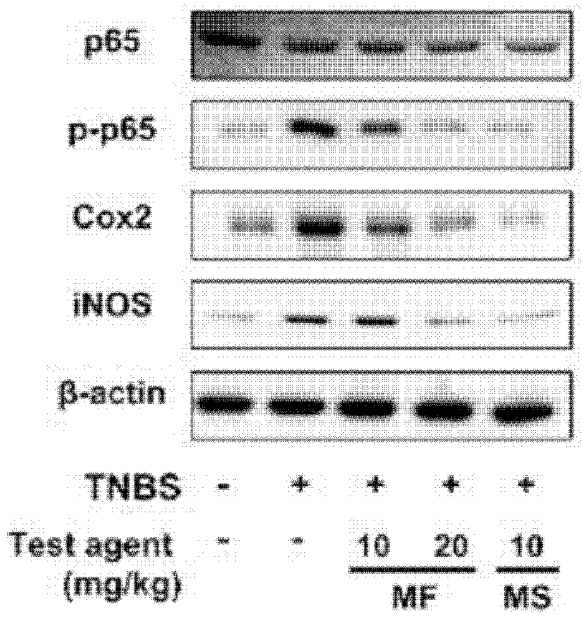
[Fig. 11]


TNF-α (pg/mg)
150
100
50
0
#
*
NOR
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
IL-10 (pg/mg)
30
20
10
0

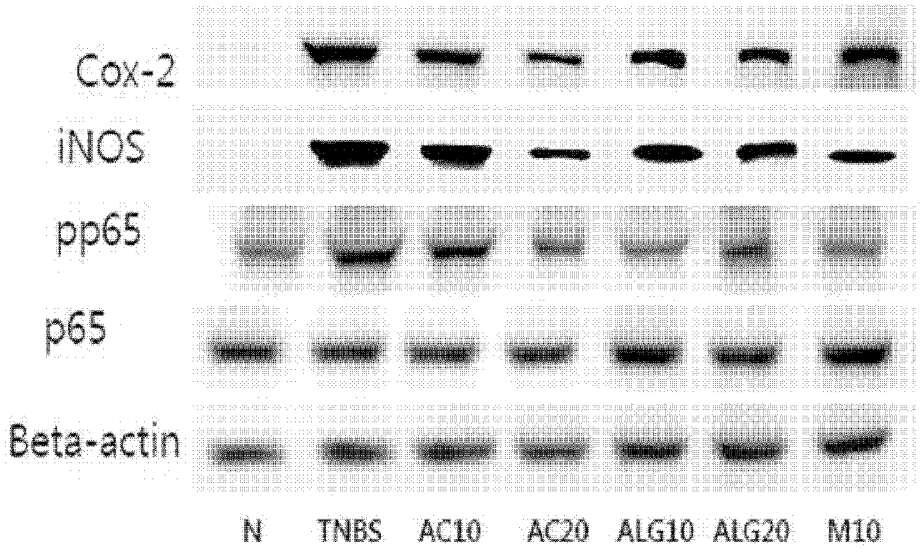
[Fig. 12]


Cox-2
iNOS
pp65
p65
Beta-actin
TNBS - + + + +
Test agent - - 10 20 10
A M

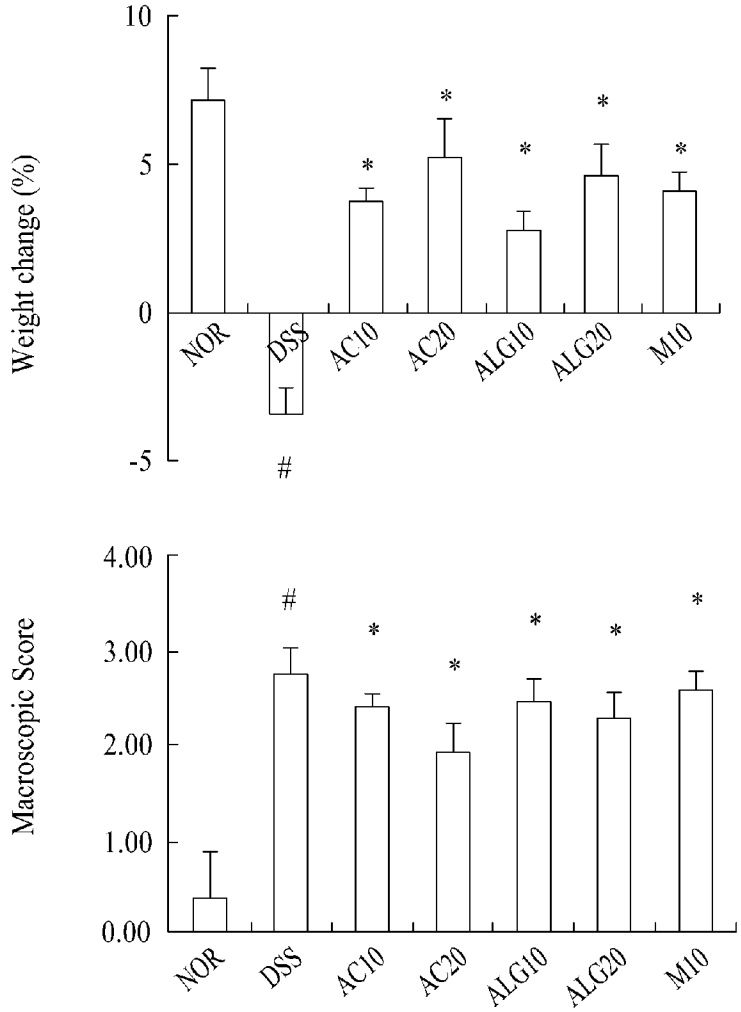
[Fig. 13]


p65
p-p65
Cox2
iNOS
β-actin
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
MF
MS

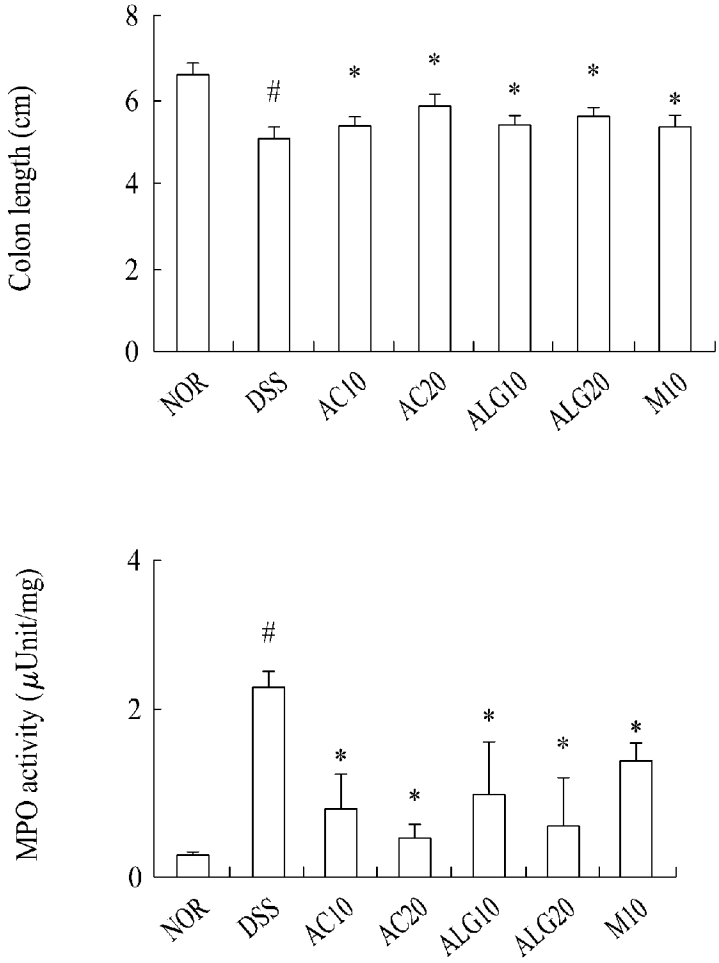
[Fig. 14]


Cox-2
iNOS
pp65
p65
Beta-actin
N
TNBS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10

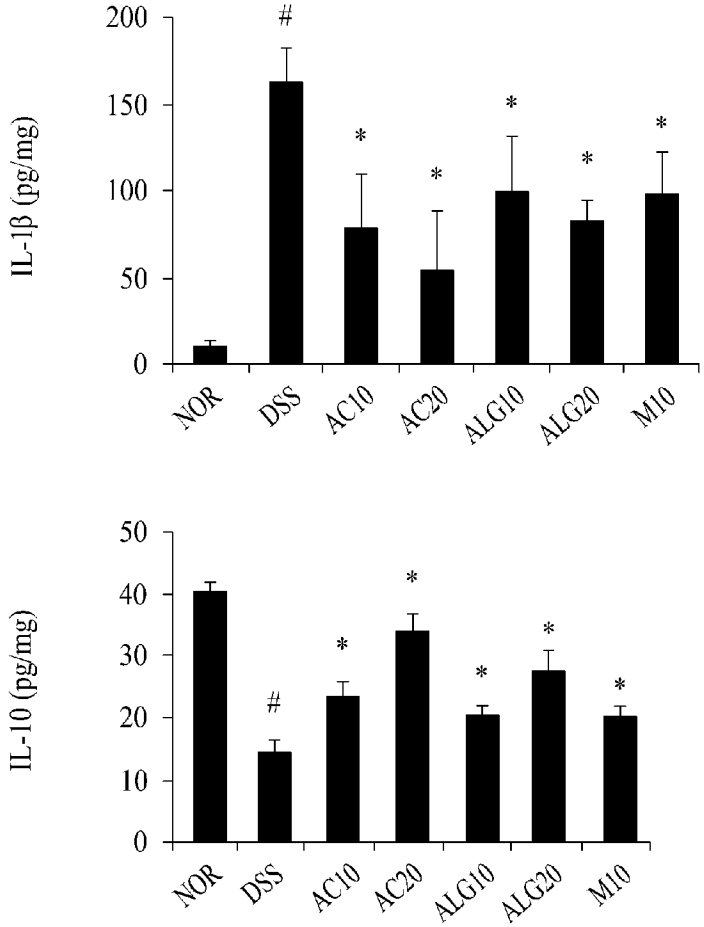
[Fig. 15]


Weight change (%)
10
5
0
-5
NOR
DSS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
#
*
Macroscopic Score
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
NOR
DSS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
#
*

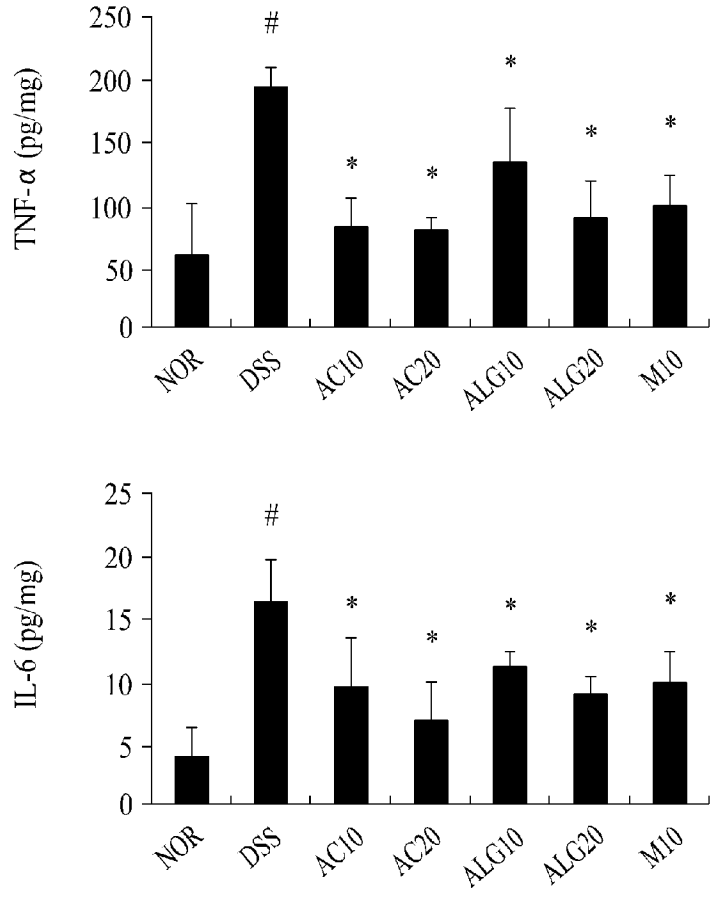
[Fig. 16]


Colon length (cm)
8
6
4
2
0
#
*
NOR
DSS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
MPO activity (μUnit/mg)
4
2
0
#
*
NOR
DSS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10

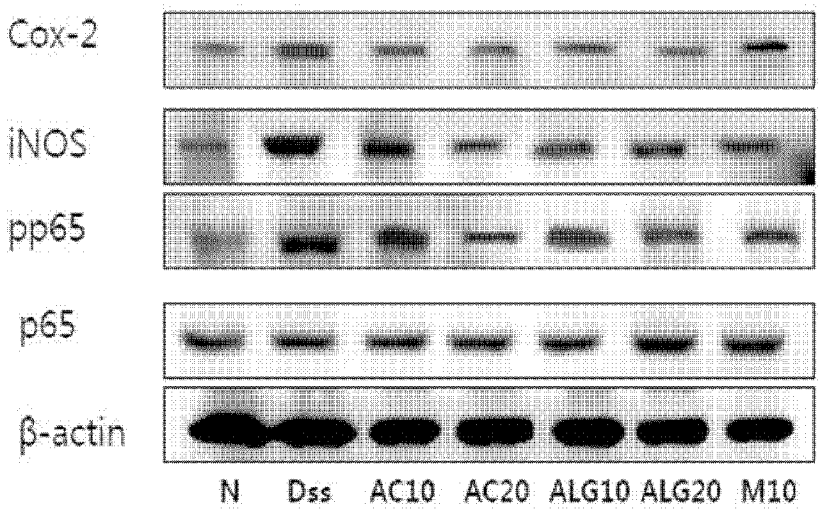
[Fig. 17]


IL-1β (pg/mg)
200
150
100
50
0
#
*
NOR
DSS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10
IL-10 (pg/mg)
50
40
30
20
10
0

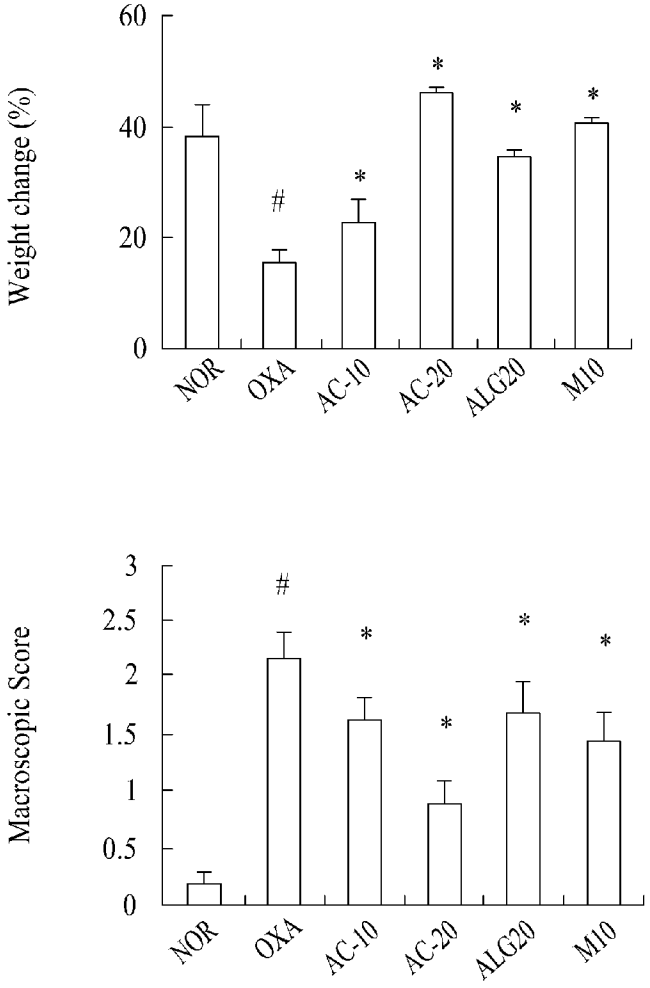
[Fig. 18]


TNF-α (pg/mg)
250
200
150
100
50
0
IL-6 (pg/mg)
25
20
15
10
5
0
#
*
NOR
DSS
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10

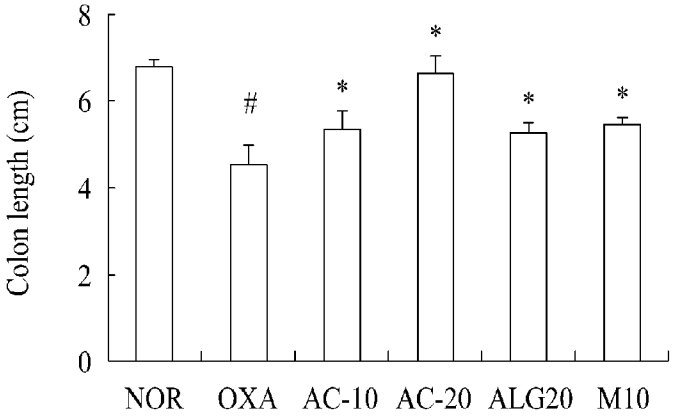
[Fig. 19]

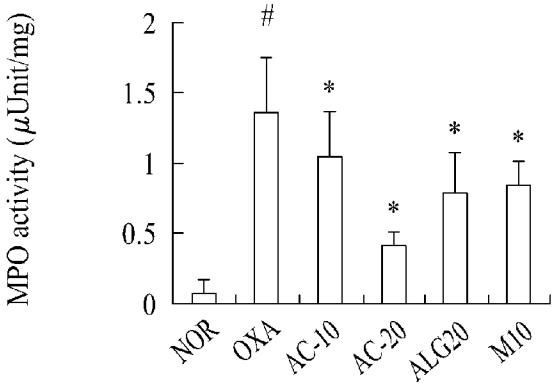

Cox-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
N
Dss
AC10
AC20
ALG10
ALG20
M10

[Fig. 20]

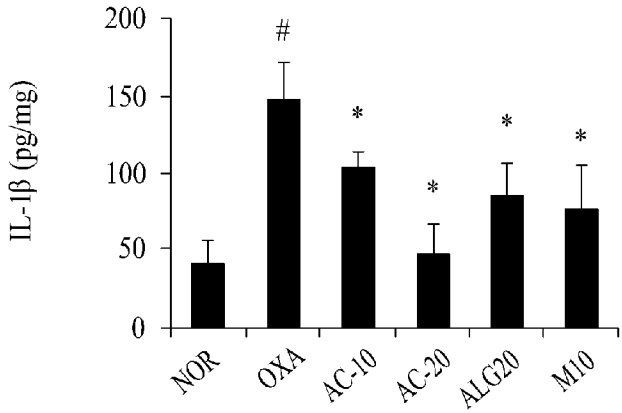

Weight change (%)
60
40
20
0
#
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10
Macroscopic Score
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0

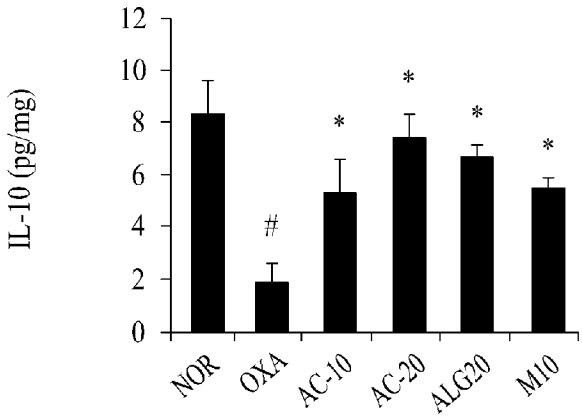
[Fig. 21]


Colon length (cm)
8
6
4
2
0
#
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10

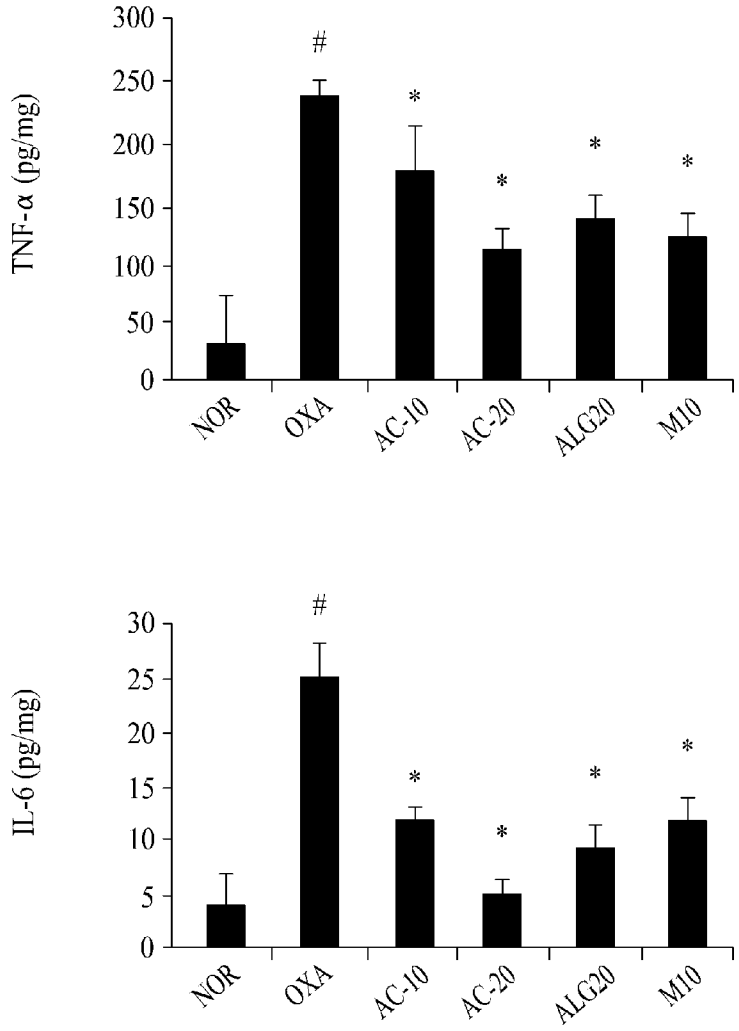

MPO activity (μUnit/mg)
2
1.5
1
0.5
0
#
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10

[Fig. 22]

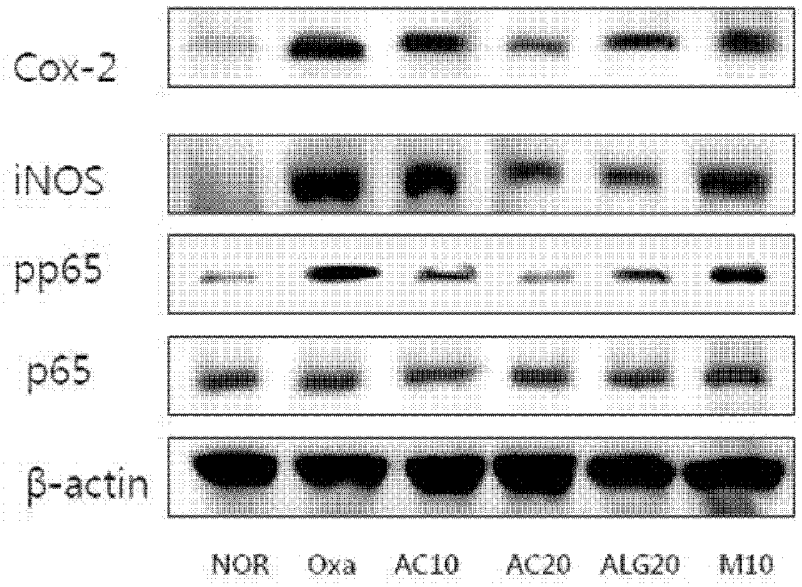

IL-1β (pg/mg)
200
150
100
50
0
#
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10


IL-10 (pg/mg)
12
10
8
6
4
2
0
#
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10

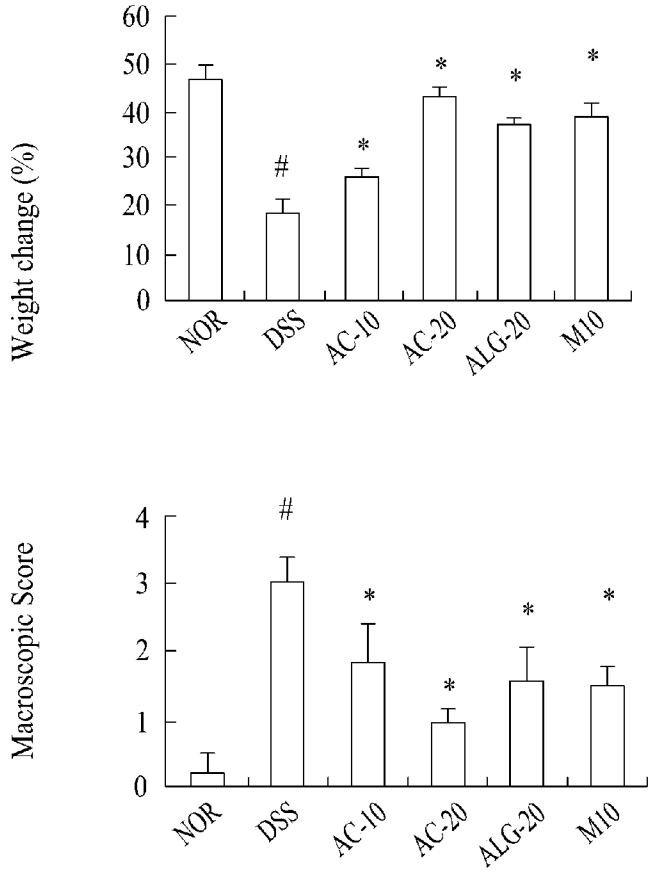
[Fig. 23]


TNF-α (pg/mg)
300
250
200
150
100
50
0
#
*
*
*
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10
IL-6 (pg/mg)
30
25
20
15
10
5
0
#
*
*
*
*
NOR
OXA
AC-10
AC-20
ALG20
M10

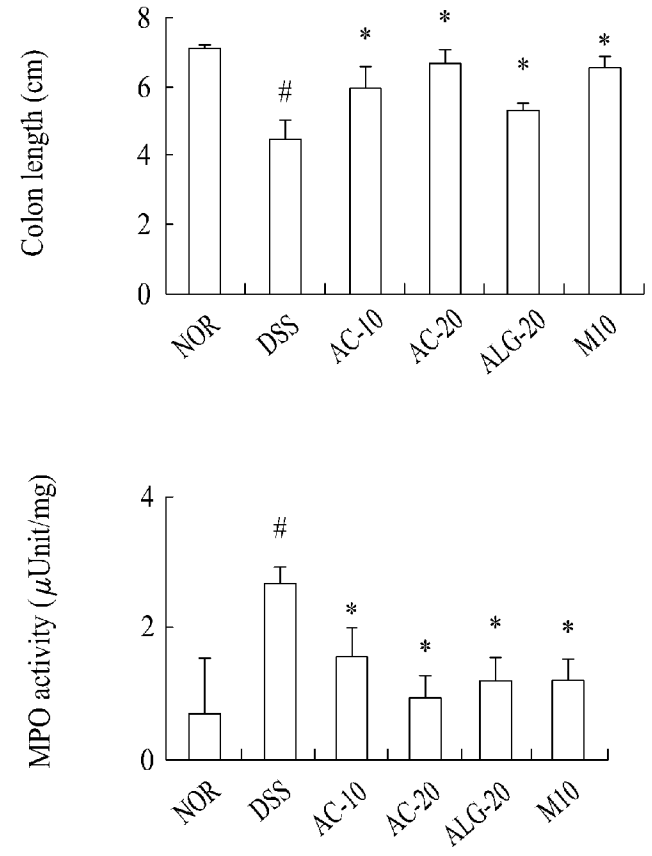
[Fig. 24]


Cox-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
NOR
Oxa
AC10
AC20
ALG20
M10

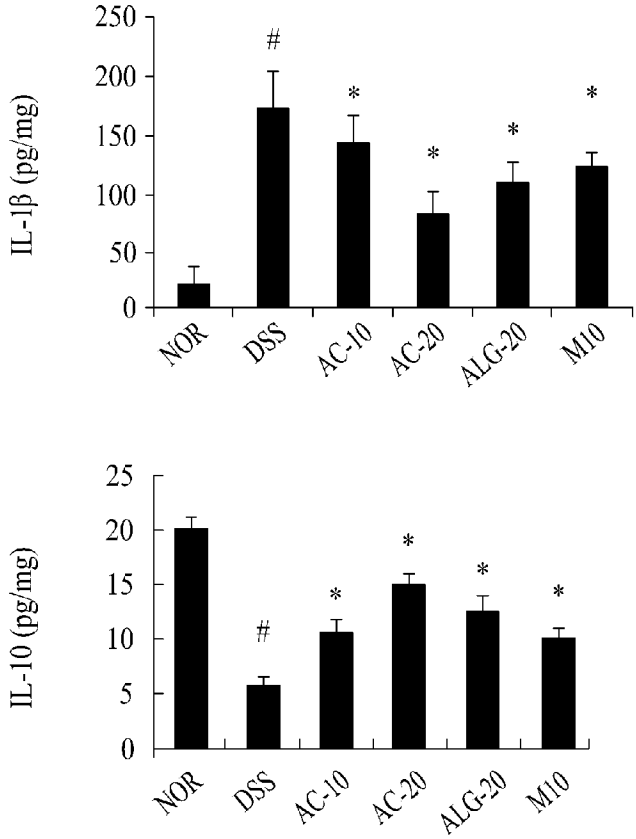
[Fig. 25]


Weight change (%)
60
50
40
30
20
10
0
#
*
NOR
DSS
AC-10
AC-20
ALG-20
M10
Macroscopic Score
4
3
2
1
0

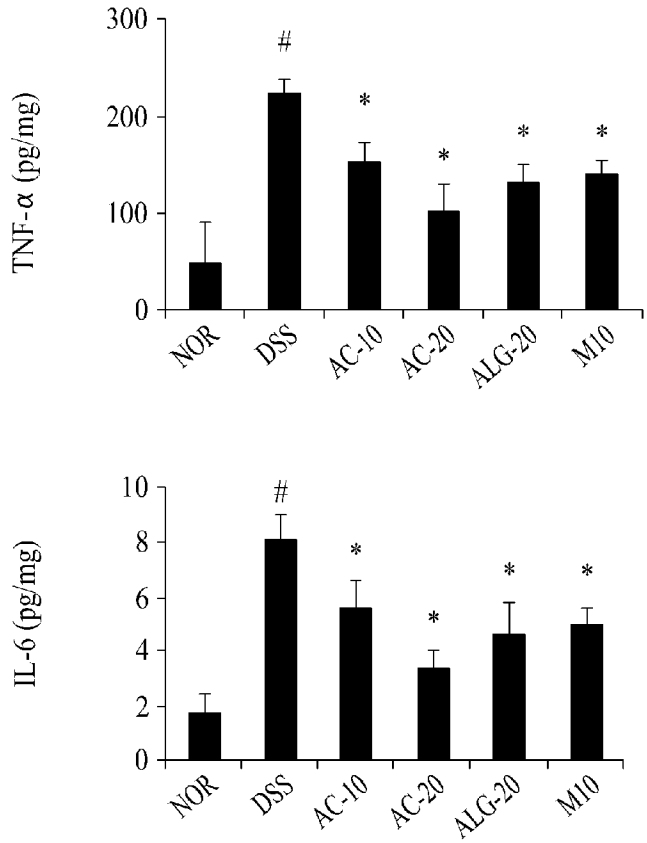
[Fig. 26]


Colon length (cm)
8
6
4
2
0
MPO activity (μUnit/mg)

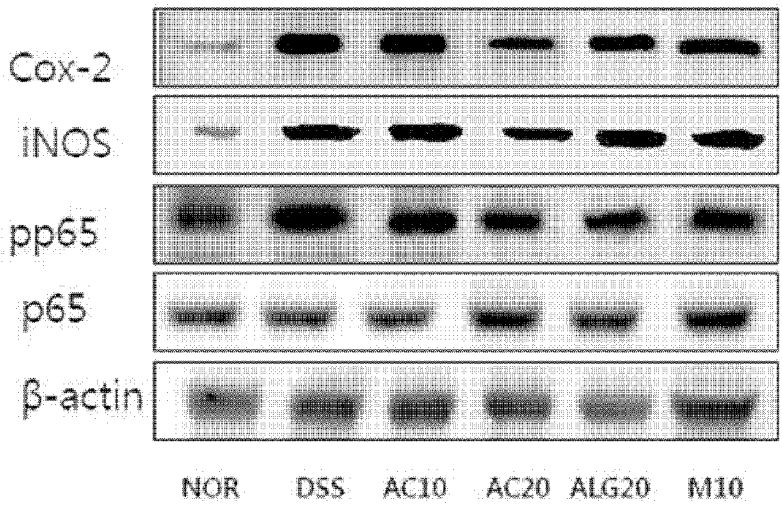
[Fig. 27]


IL-1β (pg/mg)
250
200
150
100
50
0
#
*
NOR
DSS
AC-10
AC-20
ALG-20
M10
IL-10 (pg/mg)
25
20
15
10
5
0

[Fig. 28]


TNF-α (pg/mg)
300
200
100
0
IL-6 (pg/mg)
10
8
6
4
2
0
NOR
DSS
AC-10
AC-20
ALG-20
M10

[Fig. 29]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/8964(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61K 36/718(2006.01)i, A61P 1/00(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 36/8964; A61K 31/70; A61K 36/718; A61P 1/00

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: Anemarrhena extracts, Coptis chinensis root extract, mangiferin, neomangiferin, berberine, colitis, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEIRO, J. et al., "Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin", International Immunopharmacology, 2004, vol. 4, pp. 763-778. See abstract and page 772.	1-20
Y	LI, N. et al., "Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an in vitro model of intestinal epithelial cells", European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, vol. 40, pp. 1-8. See abstract and pages 1 and 7.	1-20
Y	MIURA, T. et al., "Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin", Phytomedicine, 2001, vol. 8, no. 2, pp. 85-87. See abstract and page 85.	7,13,14,19,20
A	MORAIS, T. C. et al., "Mangiferin, a natural xanthone, accelerates gastrointestinal transit in mice involving cholinergic mechanism", World Journal of Gastroenterology, 2012, vol. 18, no. 25, pp. 3207-3214. See abstract and page 3208.	1-20

☒ 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	Date of mailing of the international search report
21 MAY 2014 (21.05.2014)	**22 MAY 2014 (22.05.2014)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TJONG, Y. et al., "Analgesic effect of Coptis chinensis rhizomes (Coptidis Rhizoma) extract on rat model of irritable bowel syndrome", Journal of Ethnopharmacology, 2011, vol. 135, pp. 754-761. See abstract and pages 754 and 755.	1-20
PX	JANG, S.-E. et al., "Anticolitic effect of the rhizome mixture of Anemarrhena asphodeloides and Coptidis chinensis (AC-mix) in mice", Biomolecules & Therapeutics, 30 September 2013, vol. 21, no. 5, pp. 398-404. See abstract and pages 401-404.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001252

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.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 21 pertains to a treatment method of the human, 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/KR2014/001252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001252

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/8964(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61K 36/718(2006.01)i, A61P 1/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/8964; A61K 31/70; A61K 36/718; A61P 1/00

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: 지모 추출물, 황련 추출물, 만지페린, 네오만지페린, 베르베린, 대장염, 염증성 대장 질환, 과민성 대장염 증후군

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LEIRO, J. 외 5명, `Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin`, International Immunopharmacology, 2004년, 4권, 페이지 763-778. 요약 및 페이지 772 참조.	1-20
Y	LI, N. 외 6명, `Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an in vitro model of intestinal epithelial cells`, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010년, 40권, 페이지 1-8. 요약 및 페이지 1 및 7 참조.	1-20
Y	MIURA, T. 외 10명, `Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin`, Phytomedicine, 2001년, 8권, 2호, 페이지 85-87. 요약 및 페이지 85 참조.	7,13,14,19,20
A	MORAIS, T. C. 외 7명, `Mangiferin, a natural xanthone, accelerates gastrointestinal transit in mice involving cholinergic mechanism`, World Journal of Gastroenterology, 2012년, 18권, 25호, 페이지 3207-3214. 요약 및 페이지 3208 참조.	1-20

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 05월 21일 (21.05.2014)	2014년 05월 22일 (22.05.2014)

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

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2014/001252

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	TJONG, Y. 외 6명, `Analgesic effect of Coptis chinensis rhizomes (Coptidis Rhizoma) extract on rat model of irritable bowel syndrome`, Journal of Ethnopharmacology, 2011년, 135권, 페이지 754-761. 요약 및 페이지 754 및 755 참조.	1-20
PX	JANG, S.-E. 외 4명, `Anticolitic effect of the rhizome mixture of Anemarrhena asphodeloides and Coptidis chinensis (AC-mix) in mice`, Biomolecules & Therapeutics, 2013년 9월 30일, 21권, 5호, 페이지 398-404. 요약 및 페이지 401-404 참조.	1-20

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001252

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: 21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제21항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/001252

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음