



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0113431
(43) 공개일자 2023년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/35 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/60 (2006.01)
A61K 36/8994 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61K 8/9794 (2017.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/35 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0008994

(22) 출원일자 2022년01월21일

심사청구일자 2022년01월21일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

안광석

서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교

이석근

서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

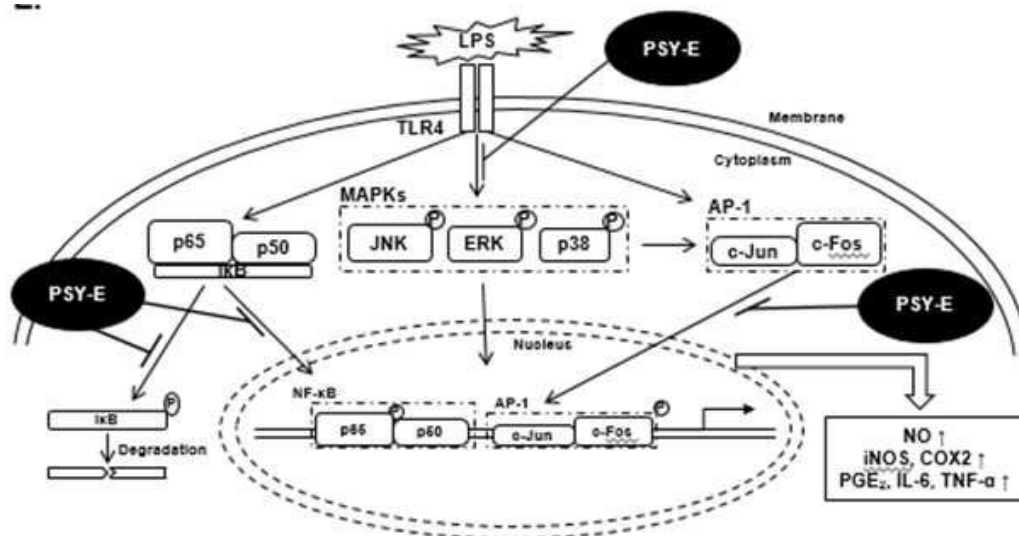
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는 항염증용 조성물

(57) 요약

본 발명은 패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radiceis cortex*) 추출물을 포함하는 항염증용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 패장초, 의이인 및 상백피 추출물은 염증 매개인자, 염증성 사이토카인, 산화질소의 생성 등을 억제하고 급성 패혈증에서 염증 완화 효과를 나타내므로 염증성 질환에 대해 안전하면서도 효과적인 예방 또는 치료제로 활용할 수 있다. 또한, 기능성 식품, 화장품, 사료 등의 다양한 항염증용 기능성 제제의 개발에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 36/60 (2013.01)

A61K 36/8994 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

A61K 8/9794 (2017.08)

A61P 29/00 (2023.02)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

하인진

서울특별시 동대문구 경희대로 23 경희의료원

이준희

서울특별시 동대문구 경희대로 23 경희의료원

김나영

서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교

명세서

청구범위

청구항 1

패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 탄소수 1 내지 4의 알코올은 70 내지 100%(v/v)의 에탄올인 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 궤양성 대장염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 폐혈증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 염증성 피부질환, 습진 및 다발성 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 염증성 피부질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성 피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지 및 피부과민증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 7

패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물을 포함하는, 항염증용 건강기능성 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을

추출한 것인, 식품 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 식품 조성물.

청구항 10

패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물을 포함하는, 항염증용 화장료 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것인, 화장료 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 화장료 조성물.

청구항 13

패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물을 포함하는, 항염증용 사료 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것인, 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물을 포함하는 항염증용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 물리 화학적 자극, 박테리아, 곰팡이, 바이러스에 의한 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 의하여 야기되는 병리적 상태에 대응하여 나타나는 생체의 면역 방어 반응이다. 염증은 손상된 조직과 이동하는 세포로부터 생산되는 다양한 염증 매개 인자에 의하여 촉발된다. 염증 반응 시에는 염증 부위에 혈장이 축적되어 세균이 분비한 독성을 희석시키며, 혈류가 증가하고, 홍반, 통증, 부종, 발열 등의 증상이 수반되게 된다. 상기 염증을 유발하는 여러 요인에는 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학 물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

[0003] 염증은 정상적인 경우에 생체는 염증 반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키지만, 그렇지 못한 경우에는 만성 염증과 같은 질병 상태로 진행되기도 한

다. 이러한 만성 염증은 여러 질환에 이르게 하는 경우가 많다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증 반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암 발생 과정 (carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 효소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 최근 연구에 의하면, 체내에서의 이러한 염증 반응에는 다양한 생화학적 현상이 관여하는데, 특히 산화질소 합성효소(NOS, nitric oxide synthase)와 다양한 프로스타글란딘(Prostaglandins)의 생합성과 관련되는 사이클로 옥시제나제-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)가 염증 반응의 중요한 매개체로 알려져 있다.

[0005] NOS의 이성질체중 하나인 iNOS는 지질다당류(LPS, lipopolysaccharide)와 같은 세균의 내독소나 TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12와 같은 여러 염증성 사이토카인에 의해 유도되며, L-아르기닌으로부터 강력한 염증 매개물인 산화질소(Nitric Oxide, NO)를 합성하는 효소로 알려져 있다. 세포내 NO 생성은 대식세포를 활성화시켜 염증반응을 일으킨다. COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(Mitogen) 또는 사이토카인(Cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다. 따라서 산화질소, 프로스타글란딘, 염증성 사이토카인 등의 생성의 억제제는 염증 질환 치료제로서 활용될 수 있다.

[0006] 그러나 신경 펩타이드계 성분에 대한 길항제, 브라디키닌 등 키닌류에 대한 길항제, 사이클로옥시제나제 억제제 등은 부작용 때문에 장기적으로 사용하기가 곤란하며, 결과적으로 현재까지의 치료법에 부작용의 심각성이 너무 크기 때문에 새롭거나 개선된 치료제 개발이 시급하다.

[0007] 최근에는 민간에서 사용되어지는 천연물에서 염증 치료 물질을 개발하려는 노력이 진행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 건강기능성 식품조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radice cortex*) 추출물을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것일 수 있다.

[0014] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[0015] 상기 탄소수 1 내지 4의 알코올은 70 내지 100%(v/v)의 에탄올일 수 있다.

[0016] 상기 염증성 질환은 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 궤양성 대장염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 폐혈증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글란딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 염증성 피부질환, 습진 및 다발성 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0017] 상기 염증성 피부질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성 피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지 및 피부과민증으로 이루어지

는 균으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 건강기능성 식품조성물을 제공한다.

[0019] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것일 수 있다.

[0020] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 화장료 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것일 수 있다.

[0023] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 사료 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합한 혼합물을 추출한 것일 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 패장초, 의이인 및 상백피 추출물은 염증 매개인자, 염증성 사이토카인, 산화질소의 생성 등을 억제하고 급성 패혈증에서 염증 완화 효과를 나타내므로 염증성 질환에 대해 안전하면서도 효과적인 예방 또는 치료제로 활용될 수 있다. 또한, 기능성 식품, 화장료, 사료 등의 다양한 항염증용 기능성 제제의 개발에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 패장초, 상백피 및 의이인의 에탄올 추출물(PSY-E)과 패장초, 상백피 및 의이인의 물 추출물(PSY-W)의 세포독성 결과 및 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 염증인자 아질산염(nitrite), iNOS 및 COX-2에 대한 억제 효과를 나타낸 것이다. 도 1A는 PSY-E 및 PSY-W에 대한 마우스 대식세포의 생존능력, 도 1B는 PSY-E 및 PSY-W의 농도별 아질산염에 대한 반응, 도 1C는 PSY-E 및 PSY-W의 농도별 iNOS 및 COX-2의 발현 정도, 도 1D는 PSY-E 및 PSY-W의 농도별 iNOS 및 COX-2의 발현 억제 여부이다.

도 2는 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 패장초, 상백피 및 의이인 에탄올 추출물(PSY-E) 처리군의 염증인자 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 에 대한 반응을 나타낸 것이다. 도 2A는 PSY-E의 농도별 PGE₂ 생성량, 도 2B는 PSY-E의 농도별 IL-6 생성량, 도 2C는 PSY-E의 농도별 TNF- α 생성량이다.

도 3은 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 패장초, 상백피 및 의이인 에탄올 추출물(PSY-E) 처리군의 염증관련 신호전달 경로인 p38/ERK/JNK에 대한 반응을 나타낸 것이다. 도 3A는 인산-특이적 항-ERK 항체를 사용한 단백질 발현 분석, 도 3B는 인산-특이적 항-JNK 항체를 사용한 단백질 발현 분석, 도 3C는 인산-특이적 항-p38 항체를 사용한 단백질 발현 분석이다.

도 4는 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 패장초, 상백피 및 의이인 에탄올 추출물(PSY-E) 처리군의 전사인자 NF- κ B 및 AP-1에 대한 억제 효과를 나타낸 것이다. 도 4A는 PSY-E의 농도별 처리군의 NF- κ B의 활성화, 4B는 PSY-E의 농도별 처리군의 AP-1의 활성화, 도 4C는 PSY-E(30 μ g/ml)의 시간별 처리군의 I κ B- α 의 발현, 도 4D는 PSY-E(30 μ g/ml)의 시간별 처리군의 항p-p65, 항p65, 항c-Jun 및 항c-Fos 항체를 사용한 반응이다.

도 5는 급성 패혈증이 유도된 마우스 모델에서 패장초, 상백피 및 의이인 에탄올 추출물(PSY-E) 처리군의 생존 시간 및 염증인자 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 에 대한 반응을 나타낸 것이다. 도 5A는 PSY-E 미처리군, PSY-E(50mg/kg) 처리군 및 PSY-E(100mg/kg) 처리군의 생존 시간, 도 5B는 PSY-E 미처리군, PSY-E(50mg/kg) 처리군 및 PSY-E(100mg/kg) 처리군의 TNF- α 생성량, 도 5C는 PSY-E 미처리군, PSY-E(50mg/kg) 처리군 및 PSY-E(100mg/kg) 처리군의 PGE₂ 생성량, 도 5D는 PSY-E 미처리군, PSY-E(50mg/kg) 처리군 및 PSY-E(100mg/kg) 처리군의 IL-6 생성량이다.

도 6은 세포내 염증을 조절하는 PSY-E의 항염증 효과를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 달리 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖고 있다.
- [0029] 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 갖는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0031] 본 발명자들은 항염증 효능을 가지는 동시에 부작용이 적은 천연물 유래 소재를 개발하고자 여의 연구 노력한 결과, 패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물이 COX-2 및 iNOS의 발현을 억제하고 NF- κ B의 신호전달을 억제하며, 산화질소 및 염증성 인자의 분비를 억제함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0033] 본 발명은 패장초(*Patriniae radix*), 의이인(*Coicis semen*) 및 상백피(*Mori radidis cortex*) 추출물을 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명에서 용어 “패장초(*Patriniae radix*)”란 여러해살이 풀인 마티리과(*Valerianaceae*)에 속한 다년생 초본인 마타리(*Partinia scabiosaefolia* Fisch.ex Link)의 뿌리를 붙인 전초를 건조한 것이다. 독이 없고 맵고 쓴 맛을 가진 것이 특징이다.
- [0035] 본 발명에서 용어 “의이인(*Coicis semen*)”이란 벼과(*Poaceae*)에 속하는 일년생 또는 다년생 본초인 율무속(*Coix lachyma-jobi* var. *ma-yuen* STAPF)의 잘 익은 씨로서 씨껍질을 제거한 것이다. 담백하고 약간 단 맛을 가진 것이 특징이다.
- [0036] 본 발명에서 용어 “상백피(*Mori radidis cortex*)”란 뽕나무(*Morus alba* L.)의 뿌리 껍질로 특이한 냄새를 가지며 단 맛을 가진 것이 특징이다.
- [0037] 본 발명은 상기 패장초, 의이인 및 상백피를 각각 37.5g, 37.5g 및 22.5g 혼합한 혼합물을 추출한 추출물이 항염 효능을 나타냄을 확인하였다.
- [0038] 따라서, 상기 추출물은 패장초, 의이인 및 상백피를 1 내지 2 : 1 내지 2 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 혼합된 혼합물을 추출한 것일 수 있고, 바람직하게는 1:1:0.6의 중량비로 혼합된 혼합물을 추출한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 패장초, 의이인 및 상백피를 상기와 같은 중량비로 각각 추출한 추출물을 혼합한 추출물을 포함할 수 있으며, 패장초, 의이인 및 상백피를 상기 중량비로 혼합한 후 동시에 추출한 추출물을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 용어 “패장초, 의이인 및 상백피 추출물”은 적절한 용매를 이용하여 패장초, 의이인 및 상백피의 혼합물로부터 추출한 것이며, 예를 들어 패장초, 의이인 및 상백피의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 추출물은 당업계에서 공지된 추출, 분리 및 분획하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출, 분리 및 분획하여 수득한 것을 사용할 수 있다.
- [0041] 상기 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 수득하기 위한 적절한 용매로는 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하다. 예를 들어, 상기 용매로는 물, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등의 탄소수 1 내지 4의 알코올 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 추출물은 바람직하게는 70 내지 100%(v/v)의 에탄올 또는 물을 용매로 추출한 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 90 내지 100%(v/v) 에탄올 또는 물을 용매로 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에서 제조한 패장초, 의이인 및 상백피를 물을 용매로 추출한 PSY-W 추출물 및 에탄올을 용매로 추출한

PSY-E 추출물은 모두 세포독성을 나타내지 않았으며, PSY-E 추출물은 모든 염증 반응에서 탁월한 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

- [0044] 추출방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 다양한 방법이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 초음파추출법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 폐장초, 의이인 및 상백피 추출물은 당업계에서 알려진 통상의 방법으로 상온에서 냉침, 가열 및 여과하여 액상물을 얻을 수 있으며, 또는 추가로 용매를 증발, 분무 건조 또는 동결건조 할 수도 있다. 또한 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수도 있다.
- [0046] 또한 상기 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gelcolumn chromatography), 박층크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획으로도 얻을 수 있다.
- [0047] 따라서 본 발명에서 사용되는 상기 폐장초, 의이인 및 상백피 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출물, 분획물 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0048] 또한, 상기 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출할 수 있다.
- [0049] 따라서, 상기 추출물은 폐장초, 의이인 및 상백피 각각의 뿌리, 전초, 줄기, 잎, 씨, 꽃, 또는 열매로부터 수득한 원료의 혼합물로 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에서 용어 "염증성 질환"은 염증을 주병변으로 하는 질환의 총칭으로, 염증은 다양한 염증성 질환을 유발하는 원인이 된다. 상기 염증성 질환은 염증 반응 조절에 의해 예방, 개선 또는 치료될 수 있으나, 염증 반응의 조절은 대단히 복잡한 것으로 알려져 있다. 염증 반응은 생체 내 복구 체계의 증강 및 손상을 감소시키기 위한 것이나, 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 염증 반응이 지속되면, 염증 관련 세포에서 ROS와 RNS가 과다 생성되고 그 결과로 영구적인 유전자의 변형이 야기된다. 이처럼 ROS와 RNS는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증 반응과 깊이 관련되어 있다.
- [0051] 염증 반응 과정 중에는 많은 양의 염증성 사이토카인(Proinflammatory cytokines), 산화질소(Nitric oxide, NO) 그리고 프로스타글란딘(Prostaglandin E2, PGE₂)이 유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)와 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase-2, COX-2)에 의해 생성된다. 이러한 염증 반응 매개인자들의 조절하면 다양한 염증성 질환을 유발하는 염증 반응을 통제할 수 있다(도 6).
- [0052] 본 발명의 일 실시예에서, 폐장초, 의이인 및 상백피의 추출물이 상기 산화질소를 억제하고 염증성 사이토카인 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 의 발현을 현저히 감소시키며 염증성 매개 물질 분비를 억제하여 염증 반응을 조절할 수 있음을 통해 본 발명의 추출물이 다양한 염증성 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.
- [0053] 따라서, 상기 염증성 질환의 예방 또는 치료는 산화 질소 생성을 억제, 염증성 사이토카인 억제 또는 염증 매개전사인자를 억제하는 것에 의해 달성되는 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 폐장초, 의이인 및 상백피의 추출물에 의해 예방 또는 치료 효과를 가지는 염증성 질환은 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 궤양성 대장염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 패혈증, 과민성 대장증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글란딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 염증성 피부질환, 습진 및 다발성 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 염증성 피부질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성 피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지 및 피부과민증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에서 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 폐장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는 조성물의 투여로

염증성 질환의 발생, 확산 또는 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

- [0057] 본 발명에서 용어 "치료"란 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 염증성 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한한의 학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본 발명의 조성물이 효과가 있는 질환의 기준을 알고 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0058] 본 발명의 일실시예에서, 지질다당류(LPS)에 의해 급성패혈증이 유도된 마우스 대식세포 및 마우스 생체모델에 서 추출물 처리군은 추출물 미처리군에 비교하여 PGE₂, IL-6 및 TNF-α에 대한 생성량이 농도의존적으로 현저히 감소되어 염증인자들의 분비를 억제하고 급성패혈증 마우스 모델의 생존 시간을 연장시켜 본 발명의 패장초, 의 이인 및 상백피 추출물은 염증성 질환의 치료 유효성분으로 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [0059] 본 발명에 있어서, "약학 조성물"은 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 약학 조성물은 패장초, 의이인 및 상백피 추출물과 같은 유효성분 이외에 해당 기술 분야에서 통상적으로 약제학적으로 허용되 는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 약학 조성물의 총 중량에 대하여 패장초, 의이인 및 상백피 추출물 또는 분획물은 바람직하게는 0.01 내지 95중량%로 포함되고, 더욱 바람직하게는 1 내지 80중량% 로 포함될 수 있다.
- [0060] 상기 담체, 부형제, 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스 리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메 틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에 이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.
- [0061] 상기 약학적 조성물을 제제화나 제형화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0062] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비 수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마 크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 성분들은 유효성분 즉, 패장초, 의이인 및 상백피 추출물 또는 분획물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0063] 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외 용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 해당 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문 헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명에 따른 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0065] 상기 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 연구자, 의사, 또는 기타 임상에서 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도 하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있 으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되 는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여 될 수 있다. 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설 하 또는 국소 투여할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0066] 본 발명의 약학 조성물은 1 내지 10,000mg/kg/일, 바람직하게는 1 내지 2000mg/kg/일 로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하에 투여될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 약학 조성물은 염증성 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0068] 본 발명은 다른 양태로, 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 건강기능성 식품조성물에 관한 것이다.
- [0069] 상기 "패장초, 의이인 및 상백피 추출물"은 전술한 바와 같다.
- [0070] 본 발명에서 용어 "항염증용"이란 염증 매개인자를 억제하고 염증반응 관련 기전을 억제하는 효과에 의해 염증성 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 항염증 활성 용도를 의미한다.
- [0071] 상기 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는 식품조성물은 산화 질소 생성을 억제하고 염증성 사이토카인 억제 또는 염증 매개 전사인자를 억제하여 항염증 활성을 나타내는 조성물일 수 있다.
- [0072] 본 발명에 있어서 "식품조성물"은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강기능(성)식품(health functional food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0073] 상기 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마멀레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옛, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용 식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0074] 상기 건강기능(성)식품(health functional food)은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [0075] 구체적으로, 상기 건강기능(성)식품은 본 발명의 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [0076] 본 발명의 식품조성물 중 상기 패장초, 의이인 및 상백피 추출물의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들어 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 80 중량%일 수 있으며, 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 50 중량%일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 식품으로 인정되는 제형이면 다양한 형태의 제형으로 제한 없이 제조될 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노 산을 포함할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표 백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시안니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루 타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팡향제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제

(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별하고 적절한 양으로 사용할 수 있다.

[0078] 본 발명은 또 다른 양태로, 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 향염증용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0079] 상기 "패장초, 의이인 및 상백피 추출물"은 전술한 바와 같다.

[0080] 상기 "향염증용"은 전술한 바와 같다.

[0081] 상기 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는 화장료 조성물은 산화 질소 생성을 억제하고 염증성 사이토카인 억제 또는 염증 매개 전사인자를 억제하여 항염증 활성을 나타내는 조성물일 수 있다.

[0082] 본 발명에 있어서, "화장료 조성물"은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 스프레이 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 가질 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 사용될 때에는 화장수, 에멀전, 크림, 에센스, 젤, 팩 및 클렌징크림으로부터 선택되는 기초 화장료; 화운데이션 등의 메이크업 화장료로 구성되는 군으로부터 선택되는 제형으로 제조될 수 있다.

[0084] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0087] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0088] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0089] 또한 본 발명의 화장료 조성물은 각각의 제형에 상기 기재한 성분들 이외에 일반 피부화장료에 배합되는 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 또는 향료 등을 필요에 따라 적절히 배합하여 사용할 수 있다.

[0090] 예컨대, 유연화장수는 본 발명에 따른 조성물 이외에 다가알콜류(프로필렌글리콜, 글리세린 등) 1~10 중량% 및 계면활성제(폴리에틸렌올레일에테르, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유 등) 0.05~2 중량%를 함유하도록 제조할 수 있다. 또한, 영양화장수 및 영양크림은 본 발명에 따른 조성물 이외에 오일류(스쿠알란, 바셀린, 옥틸도데칸올 등) 5~20 중량% 및 왁스성분(세탄올, 스테아릴알콜, 밀납 등) 3~15 중량%를 함유하도록 제조할 수 있으며, 에센스는 본 발명에 따른 조성물 이외에 글리세린, 프로필렌글리콜 등의 다가알콜류 5~30 중량%를 함유하여 제조할 수 있다. 마사지 크림은 본 발명에 따른 조성물 이외에 유동파라핀, 바셀린, 이소노닐이소노나노에이트 등의 오일 30~70 중량%를 함유하여 제조되며, 팩은 본 발명에 따른 조성물 이외에 폴리비닐알콜 5~20 중량%를 함유하는

필 오프(peel off) 팩 또는 일반유화형 화장료에 본 발명에 따른 조성물 이외에 카올린, 탈크, 산화아연, 이산화티탄 등의 안료가 5-30 중량% 함유된 워시오프(wash off) 팩으로 제조할 수 있다.

[0091] 본 발명은 또 다른 양태로, 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는, 항염증용 사료 조성물에 관한 것이다.

[0092] 상기 "패장초, 의이인 및 상백피 추출물"은 전술한 바와 같다.

[0093] 상기 "항염증용"은 전술한 바와 같다.

[0094] 상기 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 포함하는 사료조성물은 산화 질소 생성을 억제하고 염증성 사이토카인 억제 또는 염증 매개 전사인자를 억제하여 항염증 활성을 나타내는 조성물일 수 있다.

[0095] 본 발명에 있어서 "사료 조성물"의 원료인 패장초, 의이인 및 상백피 추출물은 건조된 상태로 공급될 수도 있으며, 별도의 건조과정을 수행하지 않고 그대로 이용될 수도 있다. 상기 패장초, 의이인 및 상백피 추출물을 단독으로 사용할 수도 있으며, 종래 공지된 사료 첨가제 또는 사료와 병용하여 사용할 수도 있다. 또한 공지된 사료 첨가제 또는 사료에 첨가되는 각종 부형제들도 역시 포함될 수 있다.

[0096] 본 발명의 사료 조성물에는 동물사료에 통상적으로 사용되는 영양제, 방부제, 보존제, 향생제, 비타민 등의 미량 영양성분 등이 더 포함될 수 있다. 상기 영양제, 방부제, 보존제, 향생제, 미량 영양 성분 등은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자가 통상적으로 사료에 첨가하는 함량으로 임의 선택하여 사용할 수 있다.

[0098] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0100] 재료 및 방법

[0101] 추출물 제조

[0102] 우수의학품 제조 및 품질관리 기준(GMP)에 따른, 패장초(*Patriniae radix*; 동우당제약㈜ 제조번호:D1912035158C), 의이인(*Coicis semen*; 동우당제약㈜ 제조번호:D1705195044K) 및 상백피(*Morus alba* Linn; ㈜허브팜 수입, 원산지 중국, 제조번호:N180208077)를 정확히 감정한 후에 음건, 세절하여 사용하였다.

[0103] 마쇄된 패장초 37.5g, 의이인 37.5g 및 상백피 22.5g을 취하여 혼합한 혼합물에 99% 에탄올을 877.5ml가하여 90분동안 초음파 처리한 에탄올 추출물(이하 PSY-E)과 마쇄된 패장초 37.5g, 의이인 37.5g 및 상백피 22.5g을 취하여 혼합한 원료를 877.5ml의 증류수에서 90분동안 끓인 물 추출물(이하 PSY-W)을 준비하였다. 상기 추출물들을 SAVANT SPD2010 SpeedVacTM 농축기(써모 사이언티픽, Asheville, NC, USA) 또는 동결건조기를 사용하여 건조하였다. 건조 추출물의 수율은 에탄올 추출물의 경우 3.21%, 물 추출물의 경우 10.13%로 나타났다.

[0104] 상기 건조 추출물을 DMSO에 용해시켜 100mg/ml의 스톡 용액을 만들고, 세포 실험에서 농도를 5, 10, 20, 30 μ g/ml로 설정하고, RPMI-1640 세포배양 배지를 이용하여 희석하였다.

[0105] 시약

[0106] 트리스 염기(Tris base), 염화나트륨(NaCl, Sodium Chloride), 도데실 황산나트륨(SDS, Sodium dodecyl sulfate), 글리신(Glycine) 및 염산(HCl)은 시그마-알드리치(St. Louis, MO)에서 구입하였다. RPMI-1640 배지 및 태아 소 혈청(FBS)은 써모 피셔 사이언티픽(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 항-COX-2 및 항-iNOS 항체는 BD 바이오사이언스(Bergen County, NJ, USA)로부터 입수하였다. 항-ERK, 항-p-ERK, 항-JNK, 항-p-JNK, 항-p38 및 항-p-p38 항체는 셀 시그널링 테크놀로지(Danvers, Massachusetts, USA)에서 입수하였다. 항-I κ B- α , 항-p-p65, 항-p65, 항-c-Jun, 항-c-Fos, 항- β -actin 및 항-Lamin B 항체는 산타 크루즈 바이오테크(Dallas, 텍사스, 미국)에서 입수하고, LightShiftTM Chemiluminescent EMSA(Electrophoretic mobility shift assay) 키트는 써모 피셔 사이언티픽 Inc.(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. PGE₂ ELISA 키트는 인비트로젠(Vienna, Austria)에서 구입하고, IL-6 및 TNF- α ELISA 키트는 R&D 시스템즈(미국 미니애폴리스)에서 구입하였다. 아질산염 분석을 위한 Griess 시약은 시그마-알드리치(St. Louis, USA)에서 입수하였다.

- [0108] **세포배양**
- [0109] RAW 264.7 세포를 한국세포주은행(KCLB, Seoul National University, Korea)에서 입수하여, 페니실린 (100unit/ml)과 스트렙토마이신(100 μ g/ml), 10% 비활성화 FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지에서 37°C, 95% air 및 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.
- [0111] **세포 생존율 측정**
- [0112] 폐장초, 상백피 및 의이인 에탄올 추출물(이하 PSY-E) 및 폐장초, 상백피 및 의이인 물 추출물(이하 PSY-W)의 세포독성 유무를 알아보기 위하여 세포 카운팅 키트(Cell counting kit)-8 (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well 플레이트에 1 x 10⁴ cells/ml로 분주하고 24 시간 배양한 다음, PSY-E 및 PSY-W를 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 μ g/ml)로 2시간 동안 전처리한 후 LPS(1 μ g/ml)로 22시간동안 자극하였다. 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0114] **아질산염(nitrite) 분석**
- [0115] RAW 264.7 세포를 6개의 well 플레이트에 5 x 10⁵ cells/ml로 분주하고 24 시간 배양한 다음, PSY-E 및 PSY-W를 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 μ g/ml)로 2시간 동안 전처리한 후 LPS(1 μ g/ml)로 22시간동안 자극하였다. 그 다음, 배양 배지를 수집하고 Griess 시약을 사용하여 동일한 부피의 배양 배지를 혼합해 아질산염 농도를 비색 측정하였다. Griess 반응 후 각각의 샘플을 540nm에서 ELISA 플레이트 리더(Invitrogen, Vienna, Austria)로 흡광도를 검출하여, 아질산나트륨용액 표준곡선을 이용해 NO값을 산출하였다.
- [0116]
- [0117] **프로스타글란딘 E2(PGE₂) 및 사이토카인(IL-6 및 TNF- α) 측정**
- [0118] RAW 264.7 세포를 6개의 well 플레이트에 5 x 10⁵ cells/ml로 분주하고 24 시간 배양한 다음, PSY-E 및 PSY-W를 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 μ g/ml)로 2시간 동안 전처리한 후 LPS(1 μ g/ml)로 22시간동안 자극하였다. 그 다음, 배양 배지를 수집하고 배양액 내의 PGE₂ 분비를 측정하기 위해 샘플을 1:300으로 희석하고, 마우스 프로스타글란딘 E2 ELISA 키트(Invitrogen, Vienna, Austria)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. IL-6 및 TNF- α 분비 측정은 샘플을 1:200으로 희석하고, 각각 마우스 IL-6 듀오셋 ELISA 키트(R&D systems, Minneapolis, USA)와 마우스 TNF- α 듀오셋 ELISA 키트(R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.
- [0120] **웨스턴 블롯 분석**
- [0121] RAW 264.7 세포를 6개의 well 플레이트에 5 x 10⁵ cells/ml로 분주하고 24 시간 배양한 다음, PSY-E 및 PSY-W를 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 μ g/ml)로 2시간 동안 전처리한 후 LPS(1 μ g/ml)로 자극하였다. 얼음으로 차가운 인산완충생리식염수(PBS)로 2회 세척 후, 방사면역침강분석 버퍼(RIPA buffer)(25 mM 트리스·HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% 디옥시콜레이트 나트륨, 0.1% SDS, 프로테아제 억제제)를 넣어 얼음에서 30분간 반응시키고 전세포 용해물(Whole cell lysate)을 제조하여 20분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 각 시료의 단백질 정량은 브래드포드 단백질 분석(Brad-Ford, CA, USA)을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다. 동일한 양의 단백질(30 μ g)을 10% 도데실 황산나트륨(SDS)-폴리아크릴아마이드 겔로 분리한 후 iBlot 2 블로팅 시스템(Thermo Fisher, Waltham, MA USA)을 이용하여 변환하였다. 이 PVDF 멤브레인은 5% 탈지분유 블락 용액(non-fat milk block solution)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 일차항체(1:1000 dilution)를 4°C에서 밤새 유지시켰다. TBST 용액으로 3번 세척한 후, 이차항체는 호스래디쉬 퍼옥시다제 결합된 항 토끼 또는 항마우스 IgG(horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit, or anti-mouse IgG)(1:10000 희석)으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이어서 3회 세척 후 단백질은 ChemiDoc™ 이미징 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이

용하여 발현을 확인하였다.

[0123] **RNA분석을 위한 역전사 중합효소 연쇄 반응 분석**

[0124] RAW 264.7 세포를 6개의 well 플레이트에 5×10^5 cells/ml로 분주하고 24 시간 배양한 다음, PSY-E 및 PSY-W을 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 $\mu\text{g/ml}$)로 2시간 동안 전처리한 후 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)로 22시간동안 자극하였다. 이후 Trizol(Invitrogen, USA) 시약을 이용하여 모든 RNA를 분리하였다. 총 RNA를 정량하고, RT-PreMix(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 1 μg 의 각각의 모든 RNA로부터 각각의 cDNA를 합성하였다. 각 cDNA의 주형(template)과 iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 및 β -액틴의 프라이머를 이용하여 mRNA 발현을 확인하였다. 샘플을 Loading Star(Dyneobio, Korea)로 염색하고 1% 아가로스 젤에 로딩하였다.

[0126] **NF-kB 및 AP-1의 DNA 결합 반응 분석**

[0127] RAW 264.7 세포를 6개의 well 플레이트에 5×10^5 cells/ml로 분주하고 24 시간 배양한 다음, PSY-E를 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 $\mu\text{g/ml}$)로 2시간 동안 전처리한 후 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)로 22시간동안 자극하였다. 세포를 수확하고 핵 추출물을 제조하였다. 그런 다음 샘플을 AP-1 올리고뉴클레오티드, NF-kB 올리고뉴클레오티드 및 Oct-1 올리고뉴클레오티드와 함께 배양하였다. 단백질-DNA 복합체를 5% 폴리아크릴아미드 겔에서 분해하고 나일론 막으로 옮긴 다음 LightShiftTM Chemiluminescent EMSA 키트(Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 결합반응을 분석하였다.

[0129] **생존 분석**

[0130] 경희대학 동물관리위원회(KHUASP-21-040)에서 *in-vivo* 실험 프로토콜을 검토하고 승인하였다. 6주령 수컷 BALB/c 마우스 30마리를 나라바이오텍(서울, 한국)에서 구입하였다. 1주일의 안정화 기간 후에 마우스를 그룹당 10마리로 세 그룹으로 나누었다. PSY-E는 LPS 주입 전 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 용량으로 식도 카테터를 사용하여 24시간 및 2시간에 2회 경구 투여하였다. 그런 다음 LPS를 60 mg/kg의 용량으로 복강내 투여하고, 50시간 동안 관찰하여 생존율을 측정하였다.

[0132] **생체 내 마우스 모델**

[0133] 마우스에 LPS 주사 전에 50mg/kg 및 100mg/kg의 PSY-E를 두 번(24시간 및 2시간에) 경구 투여하였다. 마우스에 60 mg/kg의 LPS를 복강내 주사하였다. LPS 주입 후 2시간과 4시간이 경과되었을 때, 안와 뒤 신경총에서 혈액 샘플을 수집하고, PGE₂, IL-6 및 TNF- α 의 혈장 내 수준을 측정하기 위해 혈청을 분리하였다. PGE₂의 분비를 측정하기 위해 샘플을 1:30으로 희석하고 마우스 프로스타글란딘 E2 ELISA 키트(Invitrogen, Vienna, Austria)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 시료를 측정하였다. IL-6의 분비를 측정하기 위해 샘플을 1:10으로 희석한 다음 마우스 IL-6 듀오셋 ELISA 키트(R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 샘플을 검출하였다. TNF- α 의 분비를 측정하기 위해 시료를 1:6으로 희석한 후, 마우스 TNF- α 듀오셋 ELISA 키트(R&D systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 시료를 측정하였다.

[0135] **통계 분석**

[0136] 모든 수치는 평균 $\pm$ SD로 나타났다. 분산 분석을 위한 본페로니의 검정(ANOVA)은 데이터 다중 비교의 통계적 유의성을 위해 사용하였다. NS - 0.05 미만의 값은 유의한 것으로 간주하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[0138] **비교 실험예1: PSY-E 및 PSY-W의 세포독성 분석**

- [0139] 도 1A는 PSY-E 및 PSY-W의 세포독성 MTT 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 1A를 참고하면, 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 $\mu\text{g/ml}$) PSY-E 및 PSY-W 처리에 따른, 지질다당류(LPS) 비처리 RAW 264.7 세포 및 지질다당류(LPS) 처리 RAW 264.7 세포의 생존능력을 비교했을 때 각 농도별 두 그룹 간 모두 세포독성은 나타나지 않았다.
- [0141] **비교 실험예2: PSY-E 및 PSY-W의 NO생성 및 iNOS, COX-2 발현 분석**
- [0142] PSY-E 및 PSY-W의 항염 효과를 확인하기 위해 지질다당류(LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 및 유도성 산화질소 합성효소(iNOS), 사이클로옥시게나제-2(COX-2)에 대한 억제 여부를 분석하였다.
- [0143] 도 1B 내지 도 1C는 PSY-E 및 PSY-W의 아질산염(nitrite), iNOS 및 COX-2에 대한 억제 효과를 나타낸 것이다. 도 1B를 참고하면, PSY-E는 LPS 처리 RAW 264.7 세포에서 농도의존적으로 NO 생성을 감소시켰다. 그러나 PSY-W는 LPS 처리 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 억제하지 않았다.
- [0144] 또한, 도 1C 및 도 1D를 참고하면, PSY-E는 LPS 처리 RAW 264.7 세포에서 농도의존적으로 iNOS 및 COX-2의 단백질과 mRNA수준을 억제하였다. 그러나 PSY-W는 LPS 처리 RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현을 억제하지 않았다.
- [0146] 비교 실험예 1 및 2를 통해 PSY-E는 염증반응에 관여하는 아질산염, iNOS, COX-2의 분비 및 발현을 모두 억제하는 반면 PSY-W는 해당 인자들을 억제하지 못함에 따라, 염증인자를 억제하는 PSY-E를 항염증 인자로 설정하고, 해당 인자가 항염증 효과를 가지는지 확인하는 실험을 계속 진행하였다.
- [0148] **실시예1: 전염증성 사이토카인 생성에 대한 PSY-E의 효과**
- [0149] 염증 반응과 관련된 중요한 지질 매개체인 프로스타글란딘 E₂(PGE₂), 염증의 복합적 효과를 가지는 가용성 매개체 인터루킨-6 및 염증 반응의 가장 중요한 사이토카인으로 알려진 종양괴사인자 TNF- α 의 분비에 대한 PSY-E의 영향을 확인하였다.
- [0150] 도 2는 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 PSY-E 처리군의 염증인자 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 에 대한 반응을 나타낸 것이다. 도 2A 내지 도 2C를 참고하면, PSY-E를 처리하지 않은 LPS 유도군에서 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 의 발현이 유의하게 증가하고 PSY-E를 농도별로 처리한 LPS 유도군에서 농도의존적으로 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.
- [0152] **실시예2: 염증관련 신호 전달 경로 p38/ERK/JNK에 대한 PSY-E의 효과**
- [0153] 강한 염증반응을 일으키는 LPS에 의해 RAW 264.7 세포 표면의 TLR4이 자극되어 하부 세포신호전달경로인 MAPK(Mitogen-activated protein kinase)가 활성화된다. ERK(Extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinases), p38의 단백질을 포함하는 MAPKs에 대한 PSY-E의 영향을 확인하였다.
- [0154] 도 3은 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 PSY-E 처리군의 염증관련 신호전달 경로인 p38/ERK/JNK에 대한 반응을 나타낸 것이다. PSY-E 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 2시간동안 전처리한 LPS 유도군으로부터 추출한 동량의 총 단백질에서 웨스턴 블롯을 통해 단백질 발현을 확인하였다. 도 3A 내지 도 3C를 참고하면, 인산-특이적 항-ERK 항체, 인산-특이적 항-JNK 항체 및 인산-특이적 항-p38 항체를 사용한 단백질 발현 분석에서 PSY-E를 처리하지 않은 LPS 유도군과 비교하여 PSY-E 처리군은 발현이 현저하게 하향 조절되었으며, p-ERK, p-JNK 및 p-p38의 불활성화 상태인 ERK, JNK 및 p38의 발현에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
- [0155] 따라서, PSY-E는 MAPKs 활성화를 억제함으로써 항염증성 사이토카인, NO, 프로스타글란딘(PG)과 같은 여러 염증성 매개체들의 발현을 억제하는 효과를 나타냈다.
- [0157] **실시예3: NF- κ B 및 AP-1 활성화에 대한 PSY-E의 효과**
- [0158] 염증성 매개 물질 분비의 대표적인 경로인 핵 인자 카파 B(NF- κ B, Nuclear Factor- κ B) 및 염증반응에 대한

전사인자인 활성화제 단백질 1(AP-1)의 DNA 결합 활성화에 대한 PSY-E의 영향을 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay)를 수행하여 확인하였다.

[0159] 도 4는 지질다당류(LPS)에 의해 자극된 대식세포 내에서 PSY-E 처리군의 전사인자 NF- κ B 및 AP-1 활성화에 대한 반응을 나타낸 것이다.

[0160] 도 4A 및 도 4B를 참고하면, PSY-E를 농도별(0, 5, 10, 20 및 30 μ g/ml) 처리하였을 때 농도의존적으로 NF- κ B 및 AP-1의 활성이 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 도 4C를 참고하면, PSY-E(30 μ g/ml)의 시간별 처리군의 I κ B- α 의 분해가 뚜렷하게 나타났으며, 도 4D를 참고하면 항p-p65, 항p65, 항c-Jun 및 항c-Fos 항체를 사용한 반응에서 PSY-E(30 μ g/ml) 시간별 처리군이 하향 조절된 결과를 나타내어 PSY-E의 처리가 NF- κ B 및 AP-1의 핵 안으로의 이동(Translocation)을 억제하여 유전자 결합의 활성(DNA binding activity)을 억제함을 확인하였다.

[0162] 실시예4: *in vivo* 마우스 모델에서 PSY-E의 효과

[0163] 6주령 수컷 BALB/c 마우스 30마리를 1주일의 안정화 기간 후에 그룹당 10마리씩 세 그룹으로 나누었다. PSY-E를 투여하지 않은 1그룹군, 50mg/kg의 PSY-E를 투여한 2그룹군 및 100mg/kg의 PSY-E를 투여한 3그룹군에 대하여 생존 시간 및 염증성 인자의 분비를 분석하였다. PSY-E 투여는 지질다당류를 복강 내 투여하기 24시간 전에 1회, 2시간 전에 1회로 총 2회 경구 투여한 후, 60mg/kg의 지질다당류를 복강 투여하여 급성 패혈증을 유도하였다.

[0164] 도 5는 지질다당류(LPS)에 의해 급성 패혈증이 유도된 마우스 모델에서 PSY-E 미처리군과 PSY-E 처리군의 생존 시간 및 염증인자 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 에 대한 생성량 비교 결과를 나타낸 도이다.

[0165] 도 5A를 참고하면, PSY-E 미처리군에 비교하여, PSY-E(50mg/kg) 처리군 및 PSY-E(100mg/kg) 처리군에서 생존 시간이 증가하였으며, PSY-E(100mg/kg) 처리군의 생존 시간이 현저히 높았다. 또한, 도 5B 내지 도 5C를 참고하면, 지질다당류 투여 후 2시간, 4시간 후의 마우스 혈액을 안와 채혈한 혈장에서 분석한 TNF- α 생성량 및 PGE₂ 생성량은 PSY-E 미처리군과 비교하여 PSY-E 처리군에서 농도의존적으로 현저하게 감소하였으며, 도 5D를 참고하면, IL-6 생성량 또한 PSY-E 처리군에서 농도의존적으로 감소함을 확인하였다.

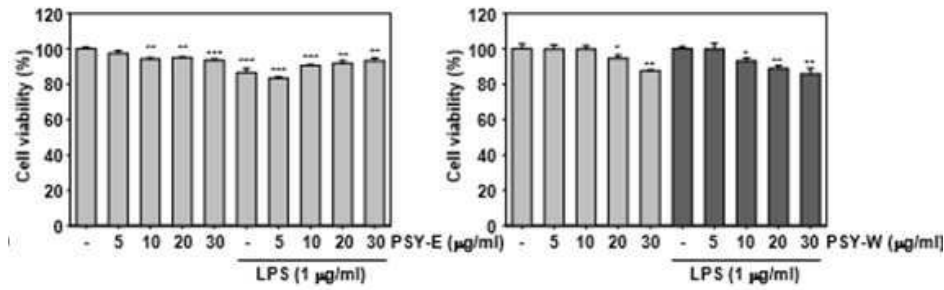
[0166] 따라서, PSY-E는 지질다당류(LPS)에 의해 염증이 유도된 마우스 대식세포 및 마우스 생체모델에서 염증인자들의 분비를 억제하고 생존 시간을 연장시킬 수 있음을 확인하였다.

[0167] 상기 실시예들에서 확인한 바, 본 발명의 패장초, 의이인 및 상백피를 에탄올을 용매로 추출한 추출물(PSY-E)은 항염증 효과를 가진 추출물로 염증성 질환의 조절에 중요하게 작용할 수 있으며, 관련 질환의 발병을 예방하거나 치료하는데 있어 효과적인 천연 항염증제로 이용할 수 있음을 확인하였다.

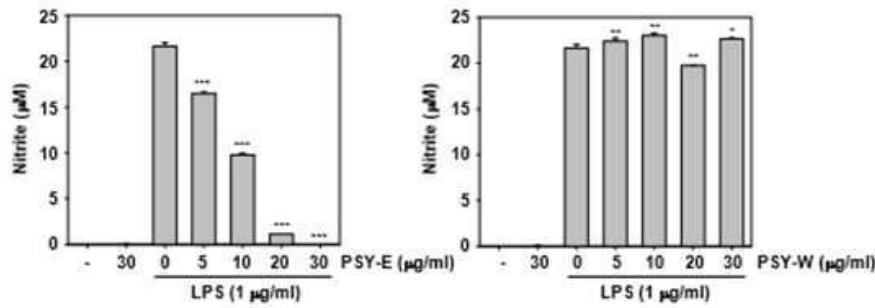
도면

도면1

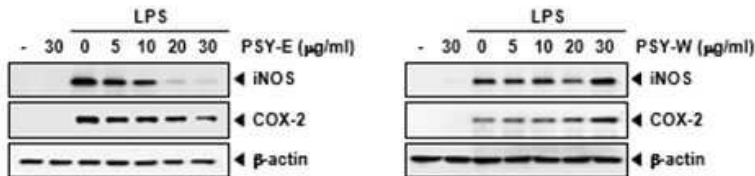
A.



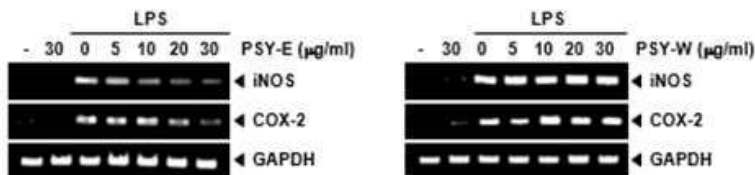
B.



C.

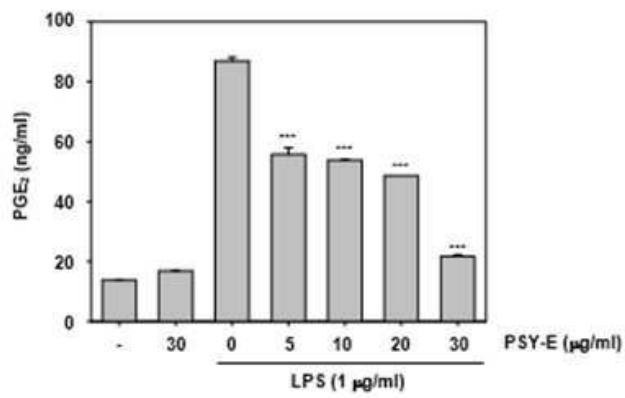


D.

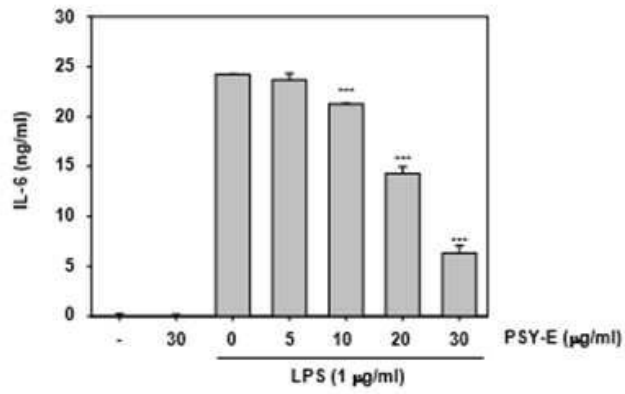


도면2

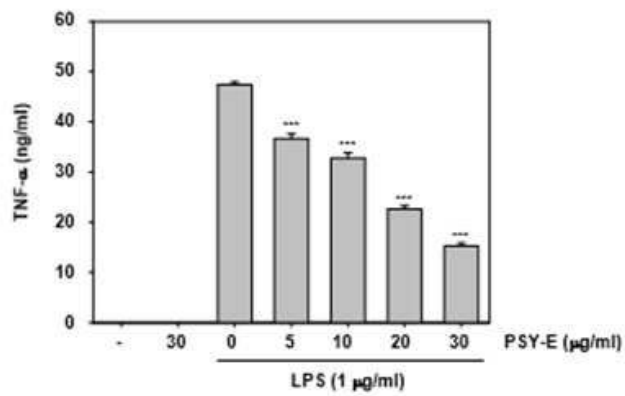
A.



B.

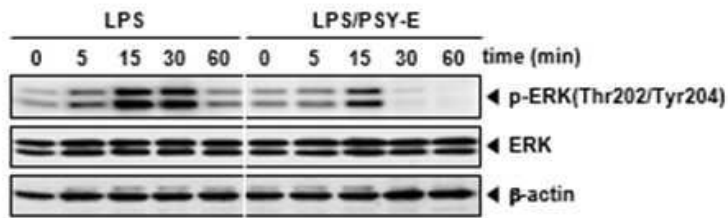


C.

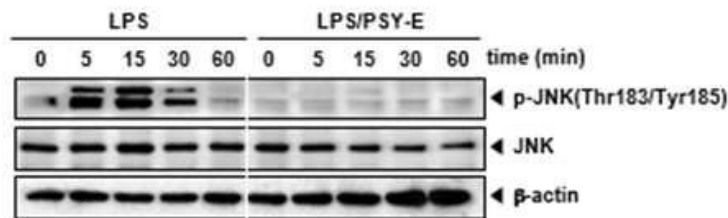


도면3

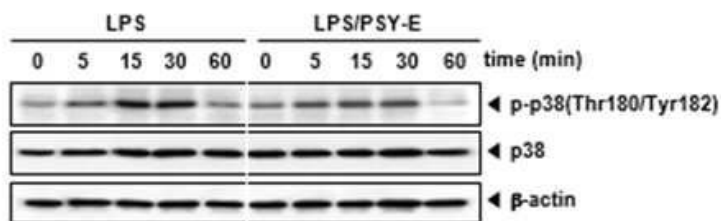
A.



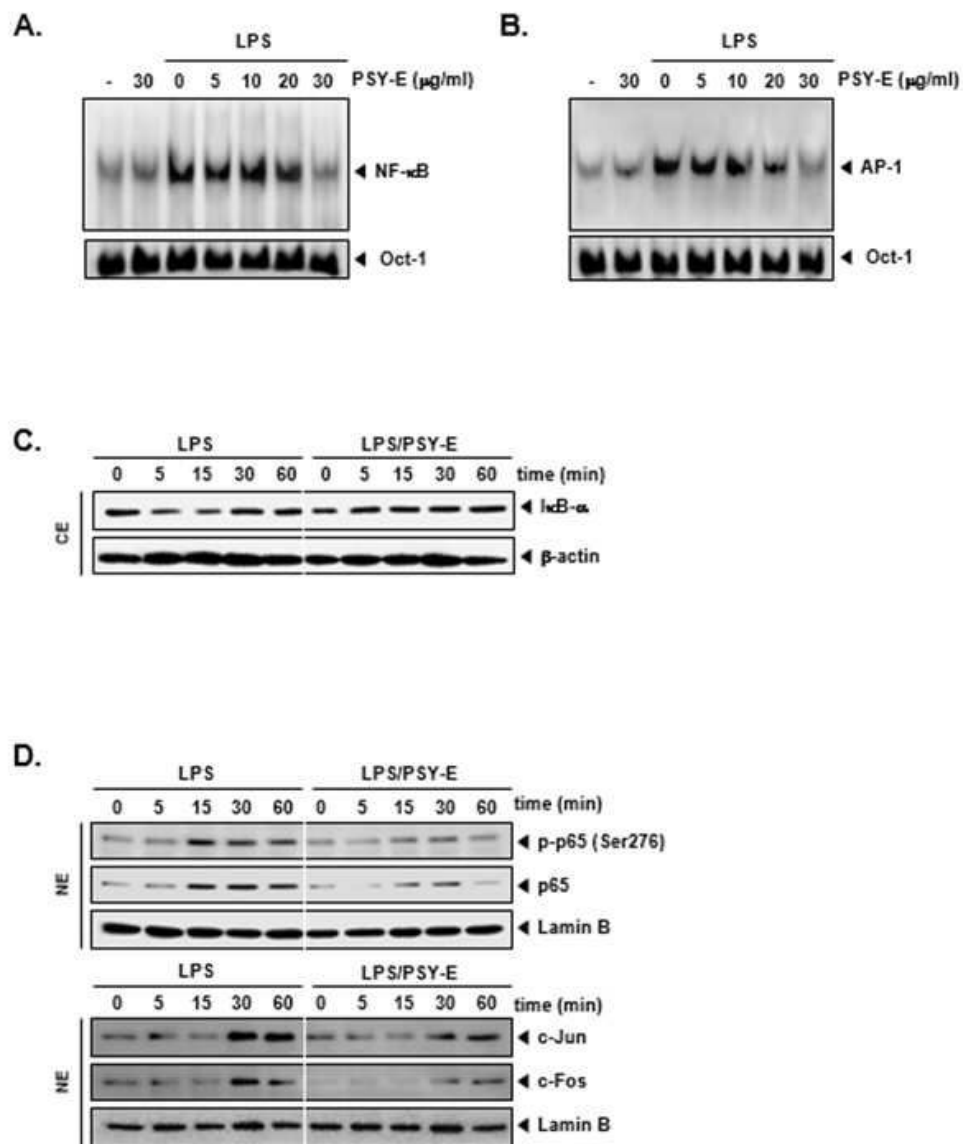
B.



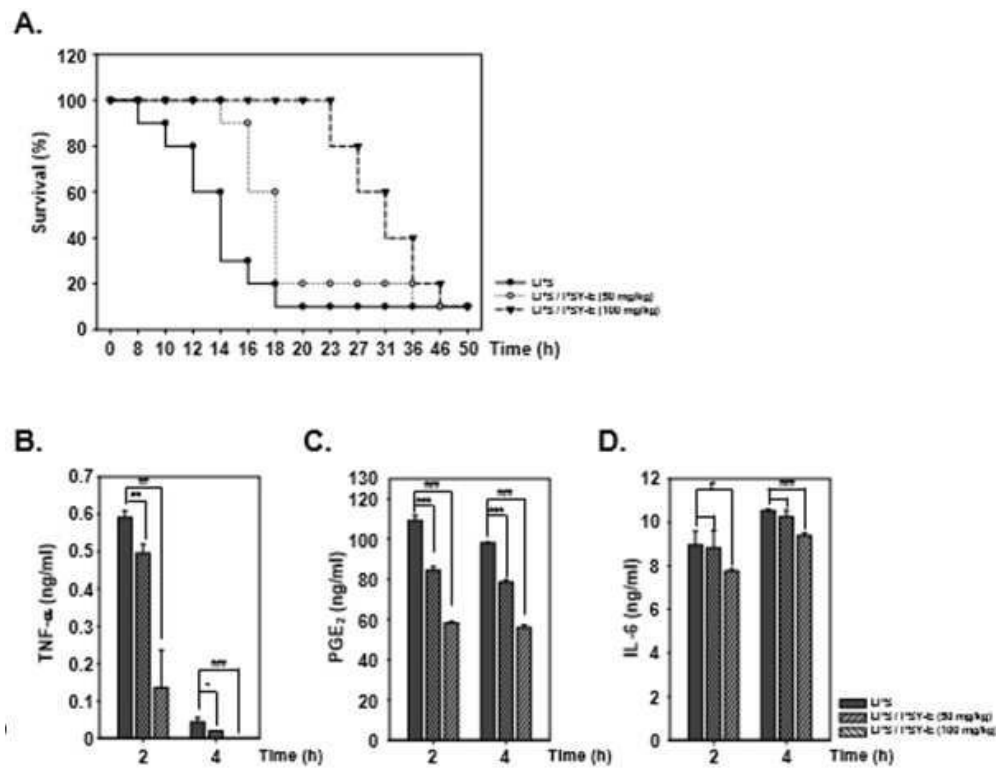
C.



도면4



도면5



도면6

