



- (51) 국제특허분류:
A61K 36/71 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003867
- (22) 국제출원일: 2012년 5월 16일 (16.05.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0082023 2011년 8월 18일 (18.08.2011) KR
10-2012-0038977 2012년 4월 16일 (16.04.2012) KR
10-2012-0050532 2012년 5월 11일 (11.05.2012) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 재단법인 전라남도생물산업진흥재단 (JEONNAM BIO-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 520-330 전라남도 나주시 동수동 산 15-1, Jeollanam-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 최철웅 (CHOI, Chul Yung) [KR/KR]; 502-777 광주광역시 서구 풍암동 호반중흥아파트 105 동 203 호, Gwangju (KR). 반상오 (PAN, Sang O) [KR/KR]; 500-110 광주광역시 북구 문흥동 933-6 번지, Gwangju (KR). 설희진 (SEOL, Hee Jin) [KR/KR]; 503-759 광주광역시 남구 봉선 2 동 무등 2 차아파트 203 동 806 호, Gwangju (KR). 이규옥 (LEE, Gyu Ok) [KR/KR]; 529-805 전라남도 장흥군 장흥읍 우산리 16-1 번지 성은연립 102 동 103 호, Jeollanam-do (KR). 박가현 (PARK, Ka Hyon) [KR/KR]; 529-805 전

라남도 장흥군 장흥읍 우산리 16-1 번지 성은연립 102 동 103 호, Jeollanam-do (KR). 김희숙 (KIM, Hee Sook) [KR/KR]; 638-982 경상남도 고성군 개천면 봉치리 633 번지, Gyeongsangnam-do (KR). 장욱진 (JANG, Wook Jin) [KR/KR]; 529-801 전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 75-20 번지 동산빌라 102 동 402 호, Jeollanam-do (KR). 김현 (KIM, Hyun) [KR/KR]; 500-042 광주광역시 북구 중흥 2 동 261-17 번지, Gwangju (KR). 이동욱 (LEE, Dong Wook) [KR/KR]; 529-801 전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 670 번지 수창아트빌 203 호, Jeollanam-do (KR). 김선오 (KIM, Sun Oh) [KR/KR]; 500-755 광주광역시 북구 연제동 36-1 번지 현대아파트 101 동 605 호, Gwangju (KR). 김재갑 (KIM, Jae Gap) [KR/KR]; 422-714 경기도 부천시 소사구 송내 2 동 589 번지 삼익아파트 2 동 507 호, Gyeonggi-do (KR).

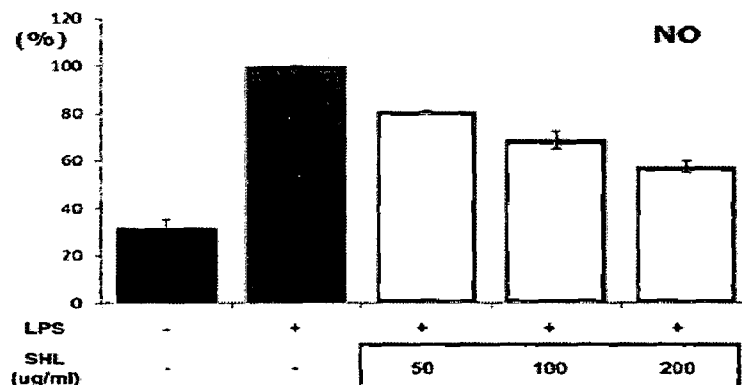
(74) 대리인: 특허법인 천지 (CHEON JEE INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 137-874 서울특별시 서초구 서초 3 동 1570-1 허브원빌딩 502 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MEDICAL COMPOSITION CONTAINING STAUNTONIA HEXAPHYLLA EXTRACT

(54) 발명의 명칭 : 멀꿀 추출물을 포함하는 의약 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a fever medicine containing a Stauntonia hexaphylla leaf extract as an active ingredient. The Stauntonia hexaphylla leaf extract according to the present invention does not have cytotoxicity, and is completed by verifying a superior fever alleviation effect even when compared to existing fever medicines having fever alleviation effects. The composition for alleviating fever containing the Stauntonia hexaphylla leaf extract as the active ingredient has an excellent fever alleviation effect.

(57) 요약서: 본 발명은 멀꿀 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열제에 관한 것이다. 본 발명은 상기 멀꿀 잎 추출물이 세포독성이 없을 뿐만 아니라, 기존 해열효과를 갖는 해열제와 비교하여서도 우수한 해열 효과를 가지는 것을 확인하여 완성한 것으로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 해열용 조성물은 그 해열효과가 매우 우수하다 할 것이다.



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙
48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 벌꿀 추출물을 포함하는 의약 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 벌꿀 추출물을 포함하는 조성물 및 벌꿀 추출물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 염증반응은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 또는 다양한 종류의 알레르기 유발물질 등과 같은 외부감염원을 포함한 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등에 노출되거나 상기 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등에 노출되는 등 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응을 의미한다.
- [3] 또한, 상기 염증을 유발하는 여러 요인으로 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.
- [4] 상기 염증반응은 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 메카니즘으로, 국소 혈관과 체액에 존재하는 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액침윤, 세포 이동, 조직 파괴, 흥반, 부종, 발열 또는 통증 등의 증상이 나타나며, 상기와 같은 증상에 의해 기능장애가 유발되기도 한다.
- [5] 상기 염증은 정상적인 경우에는 생체 내에서 염증반응을 통하여 외부 감염원을 제거하거나 발병 요인을 중화 또는 제거하고, 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는 작용을 한다. 하지만, 항원이 계속 제거되지 않거나 특정한 내부 물질이 원인이 되어 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되면, 과민성 질환이나 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증 반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암발생 과정(carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 효소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 수혈, 약물투여 또는 장기이식 등의 치료과정에서도 장애요인이 된다.
- [6] 생체에 있어서 염증반응은 다양한 생화학적인 현상이 관여하고 있으며, 특히, 면역세포에 의해 생산되는 염증 반응과 관련된 다양한 효소에 의해 반응이 개시되거나 조절된다.
- [7] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성화와 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하는 주 효소로서, 두 종류의

이성 효소인 COX-1과 COX-2가 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 COX-1은 위나 신장과 같은 조직에 일정하게 존재하며, 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, 상기 COX-2는 염증이나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다.

- [8] 또 하나의 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)는 NO 합성효소(NOS)에 의해 L-알지닌으로부터 생성되며, UV와 같은 외부 스트레스나 엔도톡신 또는 사이토카인과 같은 물질에 의해 많은 종류의 세포에서 생성된다. 상기와 같은 염증 자극들은 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 증가시키고, 이를 통하여 세포 내에서 NO 생성을 유도하여, 대식 세포를 활성화시킴으로써 염증 반응을 일으킬 수 있다.
- [9] 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 염증 질환 또는 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [10] 한편, 일상생활에 사용되는 화장품은 피부를 보호하고 미화 청결을 위해 사용되는 제품이지만 화장품 조성물을 살펴보면 피부 보호 목적과는 상이한 성분들이 제품 형성에 필수 불가결한 존재로서 사용된다. 예를 들어, 계면활성제, 방부제, 향료, 자외선 차단제, 색소 및 기타 효능이나 효과를 부여하기 위해 쓰이는 여러 가지 성분들을 들 수 있다. 상기 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분은 일반적으로 피부에 염증이나, 뾰루지 또는 부종 등과 여러 가지 부작용을 발생시키는 것으로 알려져 있다.
- [11] 또한, 체내로부터 배출되는 피지 성분, 땀 성분 및 화장품 성분 중의 지방산, 고급 알코올, 단백질 등이 피부 상에 존재하는 피부 상재 균들에 의해 독성이 강한 물질로 분해되면, 이들에 의해 피부 염증이 유발될 수도 있으며, 태양으로부터 나오는 자외선에 의해서도 피부 염증이 유발된다는 것은 잘 알려진 사실이다.
- [12] 이렇듯 화장품에 있어서 피부 부작용 유발요인은 항상 잠재되어 있으며 이를 해결 하고자 여러 가지 연구가 진행되어 왔다. 현재까지 홍반이나 부종 같은 자극완화 및 염증 완화 목적으로 이용되고 있는 물질로는 비스테로이드계로 플루페나믹산(flufenamic acid), 이부프로펜(ibuprofen), 벤지다민(benzydamine), 인도메타신(indomethacin) 등이 있고, 스테로이드계로는 프레드니솔론(prednisolone), 덱사메타손(dexamethasone) 등이 있으며, 알란토인, 아즈렌, ϵ -아미노키프론산, 하이드로코티존, 감초산 및 그 유도체(β -글리칠레친산, 글리칠레친산 유도체) 등이 항염증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

- [13] 그러나, 일반적으로 항염제로 쓰이는 상기 인도메타신은 화장품에는 사용할 수 없는 물질이고, 상기 하이드로코티손은 사용량이 제한되어 있으며, 감초산 및 그 유도체는 안정화시키기 어렵거나 용해도가 좋지 않아 실제 적용 시 농도의 제한으로 인하여 실질적인 효과를 거두기가 어려운 점이 있는 등 지금까지 알려진 항염제는 피부안전성 면이나 화장품 배합시의 안정성 면에서 대부분 문제점을 가지고 있어서 그 사용이 제한되고 있다.
- [14] 또한 최근 위염과 관련한 치료제의 기전은 2번째 히스타민 수용체(H2 receptor)를 막아서 위벽세포에서 위산의 분비를 감소시키는 H2 저해제(H2-Blockers)가 주를 이룬다. 위산이 줄어들므로 인해 이미 손상된 위벽세포(위궤양 등)의 추가적인 손상을 방지하게 된다. 이러한 H2 저해제는 간에서의 다른 약들의 대사를 방해하기 때문에(potent inhibitors of P-450) 다른 약과 같이 복용할 경우 주의가 필요하고, 항안드로겐(Anti-Androgen) 효과가 있어서 남성에게서 여성형유방(gynecomastia), 발기부전(impotence), 성욕 감소 등의 부작용이 발생할 수 있다. 또한 태반과 뇌혈관장벽을 통과하므로 임산부나 노인에게 부작용이 더 위험할 수 있고, 두통이나 혼동, 혼미, 어지럼증 등을 일으킬 수 있다.
- [15] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 효과적으로 NO의 생성을 억제할 수 있고, iNOS 및 TNF- α 의 발현도 억제할 수 있으며, COX-2 효소의 활성을 유효하게 억제할 수 있어 항염효과가 우수할 뿐만 아니라 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적어 그 사용 함량의 제한이 거의 없는 물질의 개발이 요구되고 있다.
- [16] 특히, 최근에는 소비자들의 욕구에 부응하기 위하여 천연 원료를 이용한 천연물 의약으로서 항염증제 또는 천연 소재를 이용한 화장품 또는 화장품 성분에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있는 실정이다.
- [17] 또한, 해열제(antipyretic drug)는 발열 상태의 체온을 하강시키는 작용을 하는 약제로, 일반적으로 진통 작용도 동시에 나타내므로 해열진통제라고 한다.
- [18] 상기 해열제와 관련된 작용기작으로 현재 주로 지지받고 있는 견해는 상기 해열제가 프로스타글란딘(prostaglandin; PG)의 생합성을 저해함으로써 발열을 진정시키고, 해열이 가능하게 한다는 것이다.
- [19] 구체적으로, 발열 시에는 시상하부 체온조절중추의 프로스타글란딘 농도가 상승하므로, 상기 체온조절중추의 프로스타글란딘 함량을 낮추는 경우에 발열 작용을 억제하여 해열효과를 발휘할 수 있다. 또한, 상기 프로스타글란딘은 통증 유발의 매개물질로 알려져 있다. 그러나, 이 외에도 발열 증상과 관련하여 다양한 메커니즘이 제시되고 있다.
- [20] 현재 처방되고 있는 해열제로는 아스피린 등의 살리실산 유도체, 아세톤아닐리드, 페나세틴 등의 아닐린 유도체, 안티피린, 아미노피린 또는 술피린 등의 파라조론 유도체 등이 있다. 또한, 항염증제 중에서 인도메탄신과 같은 비스테로이드계항염증제 중에도 해열진통작용을 가지는 것이 있다.

- [21] 상기한 바와 같이, 해열진통작용과 항염 효과 즉 소염효과와 관련하여 일부 연관성이 발견되는 경우도 있기는 하나, 항염증 작용은 거의 없으면서도 해열 작용에는 강력한 약제도 있는 반면, 해열 작용은 거의 없으나 항염 효과는 우수한 물질도 있으므로, 항염 효과와 해열 및 진통 효과가 반드시 상호 직접적인 연관관계가 있는 것은 아닌 것으로 판단된다.
- [22] 따라서, 급성중독증을 일으키는 아닐린제 등과 같이 최근에 여러 가지 부작용이 문제되는 화합물질 유래 성분이 아닌 천연물 유래 성분으로 해열작용이 우수할 뿐만 아니라 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 거의 없는 물질의 개발이 요구되고 있다.
- [23] 특히, 최근에는 소비자들의 욕구에 부응하기 위하여 천연 원료를 이용한 천연물 의약으로서 해열제에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [24] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 부작용과 관련된 문제가 발생될 가능성이 적은 식물 추출물을 유효성분으로 하는 항염 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [25] 또한, 본 발명은 상기 요구에 부응하기 위하여, 부작용과 관련된 문제가 발생될 가능성이 적은 식물 추출물을 유효성분으로 하는 해열용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [26] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 멸꿀 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 제공한다. 상기 항염 조성물은 의약품 조성물일 수 있고, 일 예로 소염진통제일 수 있다. 또한, 상기 항염 조성물은 염증을 억제하기 위한 목적으로 화장료 조성물의 유효성분으로 제공될 수 있다.
- [27] 또한, 본 발명은 멸꿀 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제를 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 멸꿀 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 개선 또는 완화용 화장료 조성물을 제공한다.
- [29] 또한, 본 발명은 멸꿀 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열용 조성물을 제공한다. 상기 해열용 조성물은 의약품 조성물일 수 있고, 일 예로 해열제 또는 해열진통제일 수 있다.
- [30] 본 발명자들은 천연물 유래 항염에 대해 연구하던 중, 멸꿀 추출물이 우수한 항염 효과를 가진다는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로, 멸꿀 추출물은 NO 분비를 효과적으로 억제할 수 있고, NO의 생성과 관련된 iNOS의 발현을 억제할 수 있으며, 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하여 염증 반응을 진행시키는 COX(cyclooxygenase) 효소 활성을 저해할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 추가로 상기 멸꿀 잎 추출물의 여러 용매 분획 중에서 에틸아세테이트 분획은 독성이 문제되지 아니한 범위에서 다른 분획에

비하여 NO 생성량도 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 COX 효소 활성화도 유효하게 저해할 수 있다는 것이 확인되었다.

- [31] 또한, 본 발명자들은 본 발명자들은 천연물 유래 해열진통 소재에 대해 연구하던 중, 멸꽃 추출물은 해열 효과가 우수하다는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로, 멸꽃 추출물은 다른 항염 효과가 있는 식물 추출물이 해열 효과가 없거나 미비한 것과 달리 현저하게 뛰어난 해열 효과가 있다는 것을 확인하였다. 또한, 추가로 상기 멸꽃 추출물의 여러 용매 분획 중에서 에틸아세테이트 분획은 독성이 문제되지 아니한 범위에서 다른 분획에 비해 해열 효과가 우수하다는 것이 확인되었다.
- [32] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [33] 본 발명은 멸꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.
- [34] 상기 멸꽃(*Stauntonia hexapillya*)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 으름덩굴과의 상록 덩굴 식물으로, 멸꽃나무라고도 한다.
- [35] 상기 멸꽃은 암수 한그루이다. 상기 멸꽃의 잎은 어긋나며 5개 내지 7개의 작은잎으로 된 손바닥모양 겹잎이다. 상기 멸꽃의 꽃은 5월에 피고, 황백색이며 총상꽃차례에 달린다. 상기 멸꽃의 열매는 장과로 달걀모양 또는 타원형이고 길이가 5 cm 내지 10 cm이며, 10월에 적갈색으로 익고 과육은 으름보다 맛이 좋다. 종자는 달걀모양의 타원형으로 흑색이다. 상기 멸꽃은 주로 한국, 일본, 타이완 또는 중국 등지에 분포한다. 우리나라에서는 주로 전라남도, 경상남도 및 충청남도 등의 남쪽지방의 계곡이나 숲 속에서 잘 생육한다.
- [36] 상기 멸꽃 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 멸꽃의 열매, 꽃, 잎, 가지, 줄기, 뿌리 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 멸꽃의 잎 또는 멸꽃의 열매, 더욱 바람직하게는 멸꽃의 잎에 추출용매를 가하여 추출함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다. 상기 멸꽃 잎의 경우 다른 부위에 비하여 수확량이 많아서 생산이 용이하며, 항염 효과도 우수하므로, 상기 멸꽃 추출물은 바람직하게 멸꽃 잎 추출물일 수 있다.
- [37] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 회석수, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 회석수는 알코올을 50%(v/v) 내지 99.9%(v/v)로 물에 회석한 것일 수 있다.
- [38] 본 발명의 멸꽃 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 회석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 물일 수

있다.

- [39] 상기 추출과정은 일 예로, 50°C 내지 150°C, 또는 75°C 내지 130°C, 또는 90°C 내지 120°C에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 또는 30분 내지 6시간, 또는 2시간 내지 4시간일 수 있다.
- [40] 본 발명의 멸균 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수추출법을 포함한 열 추출법, 냉침추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [41] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 에틸에테르, 아세톤, 부탄올, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다.
- [42] 상기 멸균 추출물의 분획물은 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물 또는 클로로포름 분획물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.
- [43] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.
- [44] 상기 멸균 추출물, 일 예로 멸균 잎 열수 추출물 및 멸균 열매 열수 추출물은 MTT 분석결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 처리한 경우에도 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.
- [45] 따라서 상기 항염 조성물은 염증을 억제하거나 염증을 치료, 개선, 완화 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다.
- [46] 상기 염증은 일반적인 염증질환을 포함하는 개념이며, 일 예로 상기 염증질환은 아토피성 피부염을 포함한 각종 피부염, 피부근염(dermatomyositis), 다발성 근염(polymyositis), 알레르기, 전신성 홍반성 낭창, 천포창, 아프타구내염, 망막염, 위염, 간염, 기관지염, 식도염, 장염, 췌장염, 대장염, 신장염, 욕창, 루푸스, 만성 갑상선염, 다발성 경화증과 같은 각종 만성 염증 질환, 패혈증(sepsis), 쇼크, 방사선 손상, 장기이식의 거부반응과 같은 각종 급성 염증 질환, 전신부종 및 국소부종으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [47] 따라서, 상기 항염 조성물은 상기 염증질환의 치료, 예방 또는 개선의 목적으로 사용가능하다.
- [48] 상기 알레르기는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis),

천식(asthma), 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염, 두드러기(urticaria), 곤충 알러지, 식품 알러지 및 약품 알러지를 포함한다.

- [49] 상기 전신부종은 구체적으로 울혈성 심부전, 교착성심낭염, 제한성 심장 근육 병증, 간경변, 신부전, 신증후군 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 상기 국소부종은 피부와 연부 조직의 일부가 부은 상태를 의미하며, 구체적으로 피부와 연부 조직에 염증이 발생하는 봉소염, 정맥이나 림프관의 환류 장애, 피부와 연부조직의 일부가 손실되는 화상, 벌레물림, 세균감염 등을 포함할 수 있다.
- [50] 따라서, 본 발명의 항염 조성물은 염증질환의 치료 또는 예방용 조성물로 응용되거나, 상기 염증질환의 예방 또는 개선용 식품조성물로 응용될 수 있다. 상기 식품조성물은 일 예로 상기 염증질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [51] 상기 건강기능식품은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [52] 본 발명의 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상기 멸균 추출물을 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 99.9 중량% 또는 0.01 중량% 내지 50 중량% 또는 0.1 중량% 내지 30 중량% 또는 0.1 중량% 내지 15 중량% 포함될 수 있다.
- [53] 상기 항염 조성물은 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용될 수 있고, 이러한 측면에서 상기 항염조성물은 의약용 조성물일 수 있으며, 일 예로 소염진통제일 수 있다.
- [54] 상기 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [55] 상기 멸균 추출물은 상기 항염 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 멸균 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 멸균 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [56] 이 경우 상기 조성물 내 멸균 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %,

0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

- [57] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 멸균 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [58] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 항염 효과가 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로 COX-2 저해제, NO 저해제 또는 항염증제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.
- [59] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [60] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [61] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS),

에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제-INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

- [62] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.
- [63] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [64] 본 발명은 또한, 상기 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 제공한다.
- [65] 또한, 본 발명은 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제를 제공한다.
- [66] 상기 멸균 추출물은 바람직하게는 멸균 잎 열수 추출물, 더욱 바람직하게는 멸균 잎 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.
- [67] 상기 항염증제는 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 항염증제 전체에 대해 0.1 중량% 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.001 중량% 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 일반적이다.
- [68] 상기 항염제는 루푸스, 다발성 경화증과 같은 각종 만성 염증 질환, 폐혈증, 쇼크, 장기이식의 거부반응과 같은 각종 급성 염증 질환, 안과질환, 기관지염, 또는 염증성 장질환의 예방 및 치료의 목적으로 사용가능하다.
- [69] 상기 담체 또는 부형제의 일 예로는 물, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 담체 또는 부형제는 2종이상 사용될 수 있다.
- [70] 또한 항염증제를 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있다.
- [71] 또한 본 발명의 항염증제는, 상기 유효성분 이외에 공지의 항염활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 유효성분 100 중량부에

대하여 각각 0.1 중량부 내지 99.9 중량부 또는 0.5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

- [72] 항염증제의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니먼트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있다.
- [73] 본 발명에 따른 항염증제는 경구 또는 비경구로 사용될 수 있으며, 예컨대 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내, 코안, 경막외 및 구강경로를 통하여 사용될 수 있으며, 이의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 항염증제는 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 mg/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나 상기한 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며 상기 범위에 한정되지는 않는다.
- [74] 본 발명은 또한, 상기 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [75] 상기 멸균 추출물은 천연물질 유래이므로 부작용이 문제되지 아니하고, 세포독성도 없을 뿐만 아니라, 염증 억제 효과가 뛰어나기 때문에 항염 및 항자극 활성이 뛰어나므로, 화장품에 포함된 성분들에 의해 유도되는 염증 및 외부 환경에 의해 유도되는 염증을 효과적으로 제어할 수 있다. 따라서, 상기 멸균 추출물은 염증 개선, 예방 및 완화효과를 갖는 화장료 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다. 이러한 측면에서 상기 화장료 조성물은 염증 개선 또는 완화용 화장료 조성물일 수 있다.
- [76] 상기 멸균 추출물은 바람직하게는 멸균 잎 열수 추출물, 더욱 바람직하게는 멸균 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.
- [77] 상기 화장료 조성물은 기초 화장료, 메이크업 화장료, 바디 화장료, 두발용 화장료, 두피용 화장료, 면도용 화장료 또는 구강용 화장료의 용도로 제공될 수 있다.
- [78] 상기 기초 화장료의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있고, 상기 메이크업 화장료의 예로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스카라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 상기 바디 화장료의 예로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있고, 상기 두발용 화장료의 예로는 샴푸, 린스, 헤어 트리트먼트, 헤어 무쓰, 헤어 리퀴드, 포마드, 헤어 칼라제, 헤어 블리치제 또는 칼라 린스 등이 있으며, 상기 두피용 화장료의 예로는 헤어 토닉 또는 스칼프 트리트먼트 등이 있고, 상기 면도용 화장료의 예로는 애프터셰이브로션 또는 셰이빙 크림 등이 있으며, 상기 구강용

화장료의 예로는 치약 또는 마우스 워셔 등이 있다.

- [79] 상기 화장료 조성물에는 유효성분 외에 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 통상 화장료 조성물에 배합되고 있는 성분, 일 예로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등을 추가로 배합될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 약물 또는 유효성분을 피부조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.
- [80] 상기 화장료 조성물의 제형은 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 일 예로 수용액제, 가용화제, 유화제, 유액제, 겔제, 페이스트제, 연고제, 에어졸제, 물-기름 2층제 또는 물-기름-분말 3층제일 수 있으며, 상기 제형의 예는 단순한 예시일 뿐, 상기 예시에 의해 본 발명의 화장료 조성물의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.
- [81] 상기 유효성분은 상기 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하기로는 0.01 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 상기 함량은 제형 또는 화장료 조성물에 함유되는 유효성분외의 성분의 함량에 따라 적절히 조절할 수 있으며, 상기 함량에 의해 본 발명에 포함되는 유효성분의 함량이 제한되는 것은 아니다.
- [82] 또한, 본 발명은 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열용 조성물에 관한 것이다.
- [83] 상기 멸균 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 멸균의 잎, 가지, 줄기, 뿌리 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 멸균의 잎에 추출용매를 가하여 추출함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.
- [84] 상기 멸균 잎의 경우 다른 부위에 비하여 수확량이 많아서 생산이 용이하며, 해열 효과도 우수하므로, 상기 멸균 추출물은 바람직하게 멸균 잎 추출물일 수 있다.
- [85] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 회석수, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다.
- [86] 본 발명의 멸균 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 회석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 물일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 50°C 내지 150°C, 또는 75°C 내지 120°C, 또는 90°C 내지 115°C에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 또는 30분 내지 8시간,

또는 2시간 내지 6시간일 수 있다.

[87] 본 발명의 멸균 및 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수추출법을 포함한 열 추출법, 냉침추출법, 온침추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[88] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 아세톤, 부탄올, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다.

[89] 상기 제조된 멸균 용매 추출물의 분획물, 구체적으로 멸균 및 열수 추출물의 분획물은 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물, 또는 부탄올 분획물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물 또는 클로로포름 분획물일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.

[90] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[91] 상기 해열용 조성물은 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용될 수 있고, 이러한 측면에서 상기 해열용 조성물은 의약용 조성물일 수 있으며, 일 예로 해열제 또는 해열진통제일 수 있다.

[92] 상기 해열용 조성물이 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 해열용 조성물은 이상 발열을 억제하거나 질병에 수반된 이상 발열을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다.

[93] 이러한 측면에서, 본 발명은 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열용 조성물에 관한 것일 수 있다. 상기 멸균 추출물, 바람직하게는 멸균 및 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열용 조성물은 이상 발열 또는 질병이나 질환에 수반된 이상 발열을 억제하거나 치료, 개선 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있으며, 구체적으로 해열제 또는 해열진통제일 수 있다.

[94] 상기 멸균 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열용 조성물에 있어서, 상기 멸균 추출물은 멸균 및 열수추출물, 바람직하게는 멸균 및 열수 추출물의 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 또는 부탄올 분획물, 더욱 바람직하게는 멸균 및 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물 또는 클로로포름 분획물, 더더욱 바람직하게는 멸균 및 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.

- [95] 상기 이상 발열이란 체온이 비정상적으로 높은 것을 의미한다.
- [96] 상기 해열제는 해열 또는 이상 발열을 해소하기 위해 사용되는 약으로, 체온이 비정상적으로 높아졌을 때 열을 내리기 위해 사용되는 의약품을 말하며, 기존 보고된 해열제로는 안티피린(antipyrin), 안티페브린(antifebrin), 아스피린(aspirin) 또는 살리피린(salipyrin) 등이 있다. 상기 해열제는 대개는 진통완화 효력도 있으므로, 해열진통제라 불리우기도 한다.
- [97] 상기 벌꿀 추출물을 유효성분으로 포함하는 해열용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [98] 상기 벌꿀 추출물은 상기 해열용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [99] 보다 상세하게는, 상기 벌꿀 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 벌꿀 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [100] 이 경우 상기 조성물 내 벌꿀 추출물의 함량은 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 추출물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [101] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 담체 또는 부형제는 2종이상 사용될 수 있다.
- [102] 또한, 상기 해열용 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 벌꿀 및 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [103] 또한, 본 발명의 해열용 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 해열효과가 있는 것으로 인정된 물질을 더욱 포함할 수 있다.

- [104] 또한 본 발명의 해열제는, 상기 유효성분 이외에 공지의 해열작용을 하는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 유효성분 100 중량부에 대하여 각각 0.1 중량부 내지 99.9 중량부 또는 0.5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.
- [105] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [106] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [107] 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [108] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제-INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.
- [109] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.
- [110] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

- [111] 본 발명의 멸꿀 추출물은 식용으로 사용되는 식물 유래 추출물로서 부작용이나

안전성에 대한 문제가 없고, MTT 분석 결과, 세포 독성이 매우 낮을 뿐만 아니라, 항염 효과 및 해열효과가 우수하므로, 항염 효과가 요구되는 의약 또는 화장품 및 해열 효과가 요구되는 의약품에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [112] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물과 상기 열수추출물의 용매 분획물을 제조하는 과정을 나타내는 모식도이다.
- [113] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물과 상기 열수추출물의 용매 분획물을 제조하는 과정을 나타내는 모식도이다.
- [114] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균 및 추출물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 +는 LPS($1 \mu\text{g/mL}$) 또는 추출물을 처리한 것을 의미하고, -는 처리하지 않은 것을 의미하며, 가로축의 SHL수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 나타내는 수치이고, 세로축은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군 대비 세포 독성을 나타낸 수치(%)이다.
- [115] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW 264.7 세포주를 이용하여, 멸균 및 열수추출물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 +는 LPS($1 \mu\text{g/mL}$) 또는 추출물을 처리한 것을 의미하고, -는 처리하지 않은 것을 의미하며, 가로축의 SH 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 나타내는 수치이다.
- [116] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, NO 분비량을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS($1 \mu\text{g/mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 SHL수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 의미하고, 세로축은 LPS만 처리한 대조군 대비 NO 분비량의 상대값(%)을 의미한다.
- [117] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증관련 사이토카인 iNOS mRNA 수준을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS($1 \mu\text{g/mL}$) 또는 용매 분획물을 처리한 것을 의미하고, -는 시료를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 의미한다.
- [118] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, iNOS 및 COX-2의 발현 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS($1 \mu\text{g/mL}$) 또는 용매 분획물을 처리한 것을 의미하고, -는 시료를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 수치는 멸균 및 열수추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 의미한다.
- [119] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 대식세포(Macrophage primary cell)을 이용하여, 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증과 관련된

사이토카인의 mRNA 전사량을 RT-PCR법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 상기 사진에서 +는 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축은 멸균 열매 열수 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 나타내는 수치이고, 세로축은 사이토카인의 종류를 나타내는 것이다.

[120] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대식세포(Macrophage primary cell)을 이용하여, 멸균나무 열매 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증과 관련된 사이토카인 중, TNF- α 의 생산량을 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 +는 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미하고, -는 LPS를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축은 멸균 열매 열수 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 나타내는 수치이고, 세로축은 TNF- α 의 생산량을 나타내는 것이다.

[121] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균 열수 추출물의 분획물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 +는 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$) 또는 용매 분획물을 처리한 것을 의미하고, -는 시료를 처리하지 않은 것을 의미하며, 가로축의 각 수치는 멸균 열수추출물의 각 분획 용매별 분획물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)을 나타내는 수치이고, 세로축은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군 대비 세포 독성을 나타낸 수치(%)이다.

[122] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 멸균 열수추출물의 분획물의 항염효과를 확인하기 위하여, NO 분비량을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, +는 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$) 또는 용매 분획물을 처리한 것을 의미하고, -는 시료를 처리하지 않았다는 것을 의미하며, 가로축의 문자 및 수치는 멸균 열수추출물의 각 분획 용매별 분획물의 종류 및 투여량(50 $\mu\text{g/mL}$)을 의미하고, 세로축은 LPS만 처리한 대조군 대비 NO 분비량의 상대값(%)을 의미한다.

[123] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른, 멸균 열수추출물의 각 용매별 분획물의 항염효과를 확인하기 위하여, COX-2의 활성을 통하여 COX-2의 저해활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 각 그래프를 구분한 용매는 분획용매를 의미하고, 가로축은 처리 후 경과 시간을 세로축은 COX-2의 활성을 의미한다.

[124] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른, 실험동물을 이용하여, 멸균 열수추출물의 해열효과를 확인하기 위하여, LPS에 의해 유도된 발열을 해열시킨 결과를 나타낸 그래프로, 가로축의 수치는 시료 투여 후 경과된 시간(hour, h)을 의미하고, 세로축의 수치는 측정된 체온을 의미한다.

[125] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른, 실험동물을 이용하여, 멸균 열수추출물의 분획물의 해열효과를 확인하기 위하여, LPS에 의해 유도된 발열을 해열시킨 결과를 나타낸 그래프로, 가로축의 수치는 시료 투여 후 경과된 시간(hour, h)을 의미하고, 세로축의 수치는 시료 투여 전 측정된 체온으로부터

변동된 체온의 변화 즉, 해당 시간에 측정된 실험동물의 체온에서 시료 투여 전 측정된 실험동물의 체온을 뺀 값을 의미한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [126] 이하, 본 명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 보다 명확하게 이해시키기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 보호범위는 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하고, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [127] <실시예 1> 멸균 추출물 및 분획물의 제조
- [128] 1-1. 멸균 추출물 제조
- [129] 멸균(*Stauntonia hexaphylla*) 잎 열수 추출물은 멸균의 잎 10 kg을 열수로 이용하여 110°C에서 도 1에 기재된 열수추출법을 수행하는 방법으로 제조하였다. 또한, 멸균 열매 열수 추출물은 멸균의 열매 2,100g을 열수 40L를 이용하여 100°C에서 도 2에 기재된 열수추출법을 수행하는 방법으로 제조하였다.
- [130] 보다 구체적으로, 증류수로 수세한 멸균 잎 10 kg에 증류수 200L를 가한 후, 전기약탕기를 이용하여 100°C에서 3시간 동안 가열하면서, 열수추출을 수행하였다. 또한, 증류수로 수세한 멸균 열매 2,100 g에 증류수 40L를 가한 후, 전기약탕기를 이용하여 100°C에서 3시간 동안 가열하면서, 열수추출을 수행하였다.
- [131] 상기 추출을 수행한 후, 각각의 추출물은 400 메쉬 여과포로 여과한 다음, 수득한 여액을 감압회전농축기를 이용하여 각각 농축하였다. 여과 후, 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압과정을 수행하였다.
- [132] 상기 과정을 통해 제조된 멸균 잎 열수 추출액과 멸균 열매 열수 추출액을 동결건조기(Freeze dryer)에서 동결건조하였다. 상기 동결건조를 통하여, 1 kg의 멸균 잎 열수추출물을 수득하였으며, 이로 인해 상기 멸균 잎 열수 추출법에 의한 수율이 10%인 것으로 확인되었다. 또한, 상기 동결건조를 통하여, 148 g의 멸균 열매 열수추출물을 수득하였으며, 이로 인해 상기 멸균 열매 열수 추출법에 의한 수율이 7%인 것으로 확인되었다.
- [133] 1-2. 멸균 추출물의 분획물 제조
- [134] 멸균 잎 열수추출물 및 멸균 열매 열수추출물의 분획물 제조는 도 1 또는 도 2에 나타난 제조방법에 의해 수행하였다.
- [135] 구체적으로, 상기 멸균 잎 열수추출물 250g을 5 L의 증류수에 완전히 용해시킨 후, 분획여두에 넣고 헥산(Hexane) 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 헥산 가용성층인 헥산층과 헥산 불용성층인 수층을 분리하고, 헥산층만을

수득함으로써, 헥산 분획액을 제조하였다.

- [136] 나머지 용액(수층)에 클로로포름 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 클로로포름 가용성층인 클로로포름층과 클로로포름 불용성층인 수층을 분리하고, 클로로포름층만을 수득함으로써, 클로로포름 분획액을 제조하였다.
- [137] 나머지 용액(수층)에 에틸아세테이트 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 에틸아세테이트 가용성층인 에틸아세테이트층과 에틸아세테이트 불용성층인 수층을 분리하고, 에틸아세테이트층만을 수득함으로써, 에틸아세테이트 분획액을 제조하였다.
- [138] 나머지 용액(수층)에 부탄올 5 L를 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 부탄올 가용성층인 부탄올층과 부탄올 불용성층인 수층을 분리하고, 부탄올층만을 수득함으로써, 부탄올 분획액을 제조하였다.
- [139] 상기 부탄올 가용성층을 분획 분리 후 남은 부탄올 불용성층을 농축하여 남아있는 유기용매를 제거함으로써, 물분획액을 제조하였다.
- [140] 상기 얻어진 각각의 분획액을 감압여과장치로 여과하여 농축한후, -20°C에서 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다. 상기 과정을 통하여 0.02 g의 헥산 분획물(0.015%), 0.67 g의 클로로포름 분획물(0.27%), 2g의 에틸아세테이트 분획물(1.05%), 68.75 g의 부탄올 분획물(27.5%)을 얻어 시료로 사용하였다.
- [141] 상기 제조공정에서 헥산 분획물의 경우 수율이 너무 낮아서 산업화에 있어서 공정상의 문제가 발생될 수 있으므로, 부적절한 것으로 평가하였다. 상기 수득한 추출물 및 분획물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다. 또한, 부탄올 분획과 물 분획의 경우에는 우수한 수율이 확인되어, 분획물 제조의 효율에 있어서 높은 수율로 인해 경제성이 인정되므로 산업적으로 효과가 우수할 것으로 평가된다.
- [142] 또한, 상기 멸균 열매 열수추출물의 분획물은 상기 멸균 열매 열수추출물 40g을 1 L의 증류수에 완전히 용해시킨 후, 분획여두에 넣고 상기와 같은 방법으로 각각의 분획용매 즉, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 1 L를 각각 첨가하고 섞은 후에 분획하여, 용매 가용성층을 분리하는 방법으로 제조하였다.
- [143] 상기 얻어진 멸균 열매 열수추출물의 분획액을 감압여과장치로 여과하여 농축한후, -20°C에서 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다. 상기 과정을 통하여 0.1 g의 헥산 분획물, 0.6 g의 클로로포름 분획물, 2g의 에틸아세테이트 분획물, 15 g의 부탄올 분획물을 얻어 시료로 사용하였다.
- [144] <실시예 2> 추출물 및 분획물의 세포독성 실험
- [145] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 잎 열수추출물, 멸균 열매 열수 추출물 및 멸균 잎 열수추출물의 분획물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다.

- [146] 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium / Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-글루타민(L-glutamine) 및 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.
- [147] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린스트렙토마이신 및 1% L-글루타민을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37°C 습윤한 CO₂배양기(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다.
- [148] 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양시킨 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.
- [149] 상기 배양한 세포는, 50,000 cells/well의 밀도로 48 well-plate에 분주하여, 24시간 더 배양하였다. 상기 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않고 LPS만 처리한 대조군과 LPS와 상기 실시예 1의 멸균 잎 추출물 및 분획물을 세포 생존에 별 다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하여 다양한 농도로 제조된 멸균 잎 추출물 및 분획물을 처리한 실험군으로 나누어, 24시간 동안 더 배양시킨 후, 배양액을 제거하고 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 상기 MTT 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [150] 우선, 세포배양배지를 제거한 후 MTT를 1 mg/ml로 포함하는 DMEM/F12 배지를 웰당 1 ml씩 처리하고, 37°C 습윤한 CO₂배양기에서 4시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, tetrazoliumbromide salt를 제거하고, DMSO 200 μ l를 분주하여 각 웰에 생성된 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트 리더(BIO-RAD)에서 540 nm 파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.
- [151] 상기 멸균 잎 추출물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균값으로 도 3에 나타내었고, 상기 멸균 열매 열수추출물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균값으로 도 4에 나타내었으며, 상기 멸균 잎 열수추출물의 분획물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균값으로 도 10에 나타내었다.
- [152] 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1-1에서 제조된 멸균 잎 열수추출물을 다양한 농도, 구체적으로 멸균 잎 열수추출물을 50 μ g/ml 내지 200 μ g/ml까지 농도 별로 처리하고 24시간을 경과한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않고, LPS만 처리한 대조예와 비교하여 모두 세포의 증식에 별 다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 멸균 잎 추출물은 200 μ g/ml까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.
- [153] 또한, 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1-1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 다양한 농도, 구체적으로 10 μ g/ml 내지 200 μ g/ml까지 농도별로 처리하고, 24시간을 처리한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않고 LPS만

처리한 대조예와 비교한 결과, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 다양한 농도로 처리한 경우 모두 세포의 증식에 큰 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 멸균 열매 추출물은 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

- [154] 또한, 상기 도 10에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1-2에서 제조된 멸균 열매 추출물의 분획물의 경우, 핵산 분획물에서는 25 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 실험군에서 세포 생존률이 유의적으로 감소하는 것이 확인되어 세포독성이 있는 것으로 확인되었다. 또한, 에틸아세테이트 분획물에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 실험군에서 유의적이지 않으나, 다소 세포생존률이 감소되었고, 추가로 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 실험군에서 세포생존률이 유의적으로 감소되어, 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 안전한 것으로 확인되었다. 이 외에 다른 용매의 경우에도 50 $\mu\text{g/ml}$ 또는 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포생존률이 유지되어, 핵산을 제외한 다른 용매를 분획용매로 사용한 분획물의 경우, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 경우에는 세포독성이 없고, 안전한 것으로 확인되었다.
- [155] <실시예 3> 멸균 열매 추출물 및 분획물의 항염효과 측정
- [156] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물 및 분획물의 항염효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 배양한 RAW 264.7 세포를 이용하였다.
- [157] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물 또는 멸균 열매 추출물의 용매 분획물과 LPS를 함께 첨가한 후, 상기 실시예 2의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양하였다. 상기 배양한 배양액을 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하여, 상기 분리된 상층액에 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylene diamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid, Promega, USA)을 처리하여 반응시킨 후, NO의 분비량을 540nm에서 측정하였으며, 그 결과를 도 5 및 도 11에 나타내었다.
- [158] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군의 경우 낮은 NO 분비량이 확인되었다. 반면, LPS를 첨가한 실험군의 경우 LPS로 인해 염증이 유발됨으로써 NO의 함량이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물을 처리한 경우 농도의존적으로 NO 분비량이 감소되었고, 특히 멸균 열매 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 약 80%로 NO 분비량이 감소하였고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때, LPS로 인해 염증을 유발시킨 대조군의 70% 미만으로 NO 분비량이 감소하여, 멸균 열매 추출물의 항염효과를 확인할 수 있었다.
- [159] 상기 멸균 열매 추출물은 상기 실시예 2에서 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때도 세포 생존에 영향을 미치지 아니하여, 세포독성이 없는 것으로 확인되었으므로, 본 발명의 멸균 열매 추출물은 세포독성이 없고 안전한 뿐만 아니라, 항염효과도 우수한 것으로 확인되었다.
- [160] 또한, 상기 도 11에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 모든 종류의 분획물이

안전한 것으로 확인된 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때, 물 분획의 경우 NO 분비량이 거의 감소되지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 부탄올 분획의 경우에도 대조군 대비 60%의 NO 분비량이 확인되어 항염 효과가 인정되었다. 한편, 멸균 및 열수추출물의 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 대조군 대비 NO 분비량이 20% 미만인 것으로 확인되어, 세포독성이 문제되지 아니한 농도에서 에틸아세테이트 분획물 및 클로로포름 분획물은 현저하게 우수한 NO 생성억제효과를 갖는 것으로 확인되었다.

- [161] <실시예4> 염증관련 사이토카인 mRNA 수준 측정을 통한 항염효과 확인
- [162] 상기 실시예 3에서 NO 분비량을 통하여 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 및 열수추출물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine), 구체적으로 iNOS의 mRNA 함량의 변화를 대식세포(primary cell)를 이용하여 확인하였다.
- [163] 상기 대식세포(primary cell)를 수득하기 위하여, 체중이 15 g 내지 20 g 된 4주령의 수컷생쥐(ICR mouse, male)와 Sprague-Dawley 쥐를 샘타코사(대한민국)에서 각각 32마리씩 구입하여, 각각 16군으로 나누고, 각 군당 4마리씩 배치하여 사육하였다. 상기 실험동물의 사육은 20°C 내지 24°C의 온도조건, 60% 내지 70%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고형사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.
- [164] 상기 실험동물로부터 수득한 대식세포(Macrophage primary cell, 2×10^6 cells/ml)를 serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, LPS(0.5 mg/ml) 또는 LPS(0.5 mg/ml)와 다양한 농도의 멸균 및 열수추출물로 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포로부터 RNA를 분리하였다. 상기 RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [165] 구체적으로, 상기 배양한 세포를 GIT solution(easy BLUE Total RNA extraction kit, (주)인트론바이오테크놀로지, 대한민국)으로 용해(lysis)시키고, 실온에서 10,000 rpm 조건으로 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 펠렛(pellet)을 수득하였다. 상기 펠렛에 0.1% DEPC solution(Sigma, USA) 1 ml을 첨가하고, 12,000 rpm 조건으로 2분간 다시 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후, 펠렛을 수득하였다. 상기 수득한 펠렛에 구아니디늄(guanidinium) 0.5 ml을 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하였다. 추가로, phenol/chloroform/iso-amylalcohol 혼합용액(25:24:1)을 0.5 ml 첨가하고, 볼텍싱한 후, 12,000 rpm의 조건으로 3분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액과 동량의 이소프로필알코올(iso-propylalcol)을 첨가하고 잘 혼합한 후, -20°C에서 30분간 방치시켰다. 이 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 후, 펠렛을 70% 에탄올 수용액으로 씻어 내고(washing), 진공하에 건조시켜

RNA를 분리하였다.

[166] 상기 분리된 RNA는 0.1% DEPC용액 1 ml에 녹여 염증 관련 사이토카인의 mRNA함량을 측정하기 위해 사용하였다. 상기 염증관련 사이토카인인 iNOS의 mRNA 함량 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[167] 상기 분리된 RNA 3 µg에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고, 42°C에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70°C에서 15분 동안incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 1에 기재하였다.

[168] 표 1

[Table 1]

확인대상 mRNA	primer sequence		Annealing Tm(°C)
iNOS	sense	CAGAGGACCCAGAGACAA G	50.8
	anti-sense	ACCTGATGTTGCCATTGTTG	

[169] 상기 real-time PCR 결과는 β-actin 함량과 함께 비교하여 사진으로 촬영한 결과를 도 6에 나타내었다.

[170] 상기 도 6에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인 iNOS의 mRNA가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 iNOS의 mRNA가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 잎 열수추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 iNOS의 mRNA함량이 감소되는 것이 확인되었다. 상기 멸균 잎 열수추출물이 처리되는 경우 농도 의존적으로 iNOS의 mRNA 함량이 감소된 결과로부터, 상기 멸균 잎 열수추출물은 우수한 항염 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

[171] <실시예5> 염증 관련 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성확인

[172] 상기 실시예 3 및 실시예 4에서 NO 분비량 및iNOS의 mRNA 함량 감소효과를 통하여 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 잎 열수추출물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, iNOS 및 COX2 발현 억제 활성을 확인하였다.

[173] 구체적으로, 상기 실시예 4에서 수득한 대식세포(Macrophage primary cell)를 DMEM 배지를 이용하여 1 X 10⁵ cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양하였다. 상기 배양 후, 멸균 잎 열수추출물을 농도별(0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml 및 200µg/ml)별로 처리하고, 1시간 배양 후 LPS(1µg/ml)를 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 phosphate buffered saline(PBS)로 세척 한 후 세포 용해버퍼(50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 μ g/ml aprotinin, 25 μ g/ml leupeptin)를 첨가하여 30분간 4°C에서 용해시킨 후 4°C 및 15,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다.

[174] 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 분리된 단백질 20 μ g를 10% mini gel SDS-PAGE에 로딩하고 변성 분리하여, 이를 nitrocellulose 멤브레인(membrane, BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 350 mA 조건에서 1시간 동안 이동(transfer)시켰다. 상기 단백질을 이동시킨 멤브레인(membrane)의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다.

[175] iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (Calbiochem, La Jolla, USA)를, COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2(BD Biosciences Pharmingen, SanJose, USA)를 TTBS 용액에서 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech, LittleChalfont, UK)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 30초 간 반응 후 화학발광이미지 시스템(Chemiluminescence imaging system, ATTO AE-9150 EZ-Capture II, Japan) 을 이용하여 발현 양을 측정하였다. 상기 발현량을 측정한 결과를 도 7에 나타내었다.

[176] 상기 도 7에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 단백질 즉, iNOS 및 COX-2가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 iNOS 및 COX-2가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 잎 열수추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 iNOS 및 COX-2함량이 감소되는 것이 확인되었다. 상기 멸균 잎 열수추출물이 처리되는 경우 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2 함량이 감소된 결과로부터, 상기 멸균 잎 열수추출물은 우수한 항염 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

[177] <실시예 6> 염증관련 사이토카인 mRNA 수준 측정을 통한 항염효과 확인

[178] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 잎 열수 추출물의 항염효과를 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine)의 mRNA 함량의 변화를 primary cell을 이용하여 확인하였다.

[179] 상기 primary cell을 획득하기 위하여, 체중이 15 g 내지 20 g된 4주령의 수컷 생쥐(ICR mouse, male)와 Sprague-Dawley 쥐를 샘타코 사에서 각각 32마리씩 구입하여, 각각 16군으로 나누고, 각 군당 4마리씩 배치하여 사육하였다. 상기 실험동물의 사육은 20°C 내지 24°C의 온도 조건, 60% 내지 70%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명 조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게

섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고형사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

- [180] 상기 실험동물로부터 수득한 대식세포(Macrophage primary cell, 2×10^6 cells/ml)를 serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, LPS(0.5 mg/ml) 또는 LPS(0.5 mg/ml)와 다양한 농도의 멸균 열수 추출물로 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포로부터 RNA를 분리하였다. 상기 RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [181] 구체적으로, 상기 배양한 세포를 GIT solution(easy BLUE Total RNA extraction kit, (주) 인트론바이오테크놀로지)으로 용해(lysis)시키고, 실온에서 10,000 rpm 조건으로 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 펠렛(pellet)을 수득하였다. 상기 펠렛에 0.1% DEPC solution(Sigma, USA) 1 ml을 첨가하고, 12,000 rpm 조건으로 2분간 다시 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후, 펠렛을 수득하였다. 상기 수득한 펠렛에 구아니디늄(guanidinium) 0.5 ml을 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하였다. 추가로, phenol/chloroform/iso-amylalcohol 혼합용액(25:24:1)을 0.5 ml 첨가하고, 볼텍싱한 후, 12,000 rpm의 조건으로 3분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액과 동량의 이소프로필알코올(iso-propylalcol)을 첨가하고 잘 혼합한 후, -20°C 에서 30분간 방치시켰다. 이 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 후, 펠렛을 70% 에탄올 수용액으로 씻어 내고(washing), 진공 하에 건조시켜 RNA를 분리하였다.
- [182] 상기 분리된 RNA는 0.1% DEPC용액 1 ml에 녹여 염증 관련 사이토카인의 mRNA 함량을 측정하기 위해 사용하였다.
- [183] 상기 염증 관련 사이토카인인 IL- 1β , IFN- γ 및 TNF- α 의 mRNA 함량 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [184] 상기 분리된 RNA 3 μg 에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고, 42°C 에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70°C 에서 15분 동안 incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 2에 기재하였다.
- [185] 표 2

[Table 2]

확인대상 mRNA	Primer sequence		Annealing Tm(°C)
TNF- α	sense	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	62.2
	anti-sense	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	
IFN- γ	sense	GCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	50
	anti-sense	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGG	
IL-1 β	sense	TGCAGAGTTCCTACATGGTCAAC	55
	anti-sense	GTGCTGCCTAATGTCCCCTTGAA	

[186] 상기 real-time PCR 결과는 β -actin 함량과 함께 비교하여 사진으로 촬영한 결과를 도 8에 나타내었다.

[187] 상기 도 8에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인 IL-1 β 의 mRNA, IFN- γ 의 mRNA 및 TNF- α 의 mRNA가 전혀 확인되지 아니한 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 IL-1 β 의 mRNA, IFN- γ 의 mRNA 및 TNF- α 의 mRNA가 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 IL-1 β 의 mRNA, IFN- γ 의 mRNA 및 TNF- α 의 mRNA 함량이 감소되는 것이 확인되었고, 특히 IL-1 β 의 mRNA 함량은 현저하게 감소되는 것으로 확인되었다.

[188] <실시예 7> 염증관련 사이토카인 TNF- α 수준 측정을 통한 항염효과 확인

[189] 상기 실시예 6에서 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine)의 mRNA 함량의 변화를 통하여 항염 효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 열매 열수 추출물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, 염증반응과 관련된 사이토카인(cytokine) 중, TNF- α 의 변화를 primary cell을 이용하여 확인하였다.

[190] 상기 primary cell은 상기 실시예 6과 같은 방법으로 실험동물을 사육하고 수득하였다. 상기 실험동물로부터 수득한 대식세포(Macrophage primary cell, 2×10^6 cells/ml)는 상기 실시예 5와 같은 방법으로 배양하였다. 상기 TNF- α 의 생산량 변화의 측정은 UVITEC 형광이미지시스템에서 제공되는 이미지 분석 프로그램(UViband)을 사용하여 수행하였다.

[191] 구체적으로, 아가로스 젤 전기영동으로부터 분리된 TNF- α 와 β -actin

밴드를 UVITEC 형광이미지시스템을 통해 이미지 스캔하였다. 상기 스캔된 이미지로부터 이미지 분석 프로그램(UViband)을 이용하여 정상군, LPS로 유도된 대조군, 그리고 멸균 열매 추출물을 농도별로 처리한 실험군의 TNF- α band와 β -actin band의 volume(intensity)을 정량하였다. 상기 측정된 값은 정상군에서 발현된 β -actin에 대한 TNF- α 의 상대적인 함량(relative %, TNF- α / β -actin)을 나타내는 방법으로 TNF- α 의 함량을 측정하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

- [192] 상기 도 9에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리하지 않은 대조군은 염증과 관련된 사이토카인(cytokine)인 TNF- α 의 mRNA가 소량 확인된 반면, LPS만을 처리한 경우 현저하게 높은 TNF- α 함량이 확인되었다. 또한, LPS 처리에도 불구하고 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 추출물이 처리되는 경우 농도의존적으로 TNF- α 의 함량이 감소되는 것이 확인되었다.
- [193] <실시예8> 분획물의 COX-2(시클로옥시게나아제 효소-2) 저해효과 확인
- [194] 상기 실시예 3에서 NO 분비량을 통하여 항염효과가 우수한 것으로 확인된 멸균 잎 열수추출물의 분획물의 항염효과를 다시 확인하기 위하여, COX-2 효소 저해활성을 확인하였다.
- [195] 우선, 5주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐((주)샘타코, 대한민국)를 1주일간 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 상기 실험동물의 사육은 20°C 내지 24°C의 온도조건, 50% 내지 55%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고형사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.
- [196] 상기 실험동물(SD 수컷 흰쥐)의 복강에 4% thioglycolate 10ml를 투여하고 3일 동안 복강대식세포를 증식시킨 후, 경추탈골하였다. 경추탈골하여 준비된 SD 수컷 흰쥐로부터 복강 대식세포를 수집하였다.
- [197] 구체적으로, 복강에 HBSS 10 ml를 주입한 다음 시린지(syringe)를 이용하여 복강 대식세포를 취한 다음 코니칼튜브(conical tube)에 옮겼다. 복강 대식세포를 13,000rpm 조건에서 5분간 원심분리하고 DMEM 배지로 2회 세척 후 직경 60mm petri dish에 분주한 다음 CO₂ 세포 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 후, 부유 세포들을 제거하고 부착된 세포들을 24시간 안정화 시킨 후, 단백질을 분리하여 사용하였다.
- [198] 상기 실시예 1에서 얻어진 멸균 잎 열수추출물의 분획물 각각 50 mg/ml을 분리된 단백질에 처리하고, 30분 동안 안정화 시킨 후, COX Fluorescent Activity Assay Kit(Cayman Chemical Company, Item No. 700200)에 준하는 방법으로 시클로옥시게나아제 효소 활성을 측정하였다. 상기 측정한 효소 활성 측정 결과를 도 12에 나타내었다.
- [199] 상기 도 12에 나타낸 바와 같이, 멸균 잎 열수추출물의 물 분획물의 경우에는 전혀 저해 효과가 없는 것으로 확인되었고, 헥산 분획과 부탄올 분획의 경우에도

저해활성이 떨어지는 것으로 확인된 반면, 에틸아세테이트 분획 및 클로로포름 분획은 저해 활성이 현저하게 우수한 것으로 확인되었다. 특히, 시간이 경과함에 따라 그 저해 활성의 차이가 현저하게 나타나는 것으로 확인되었다. 특히, 멸균 잎 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물이 COX-2 저해활성이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다.

[200] <실시예 9> 추출물 및 분획물의 해열효과 측정

[201] 9-1. 멸균 잎 추출물의 해열효과 확인

[202] 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 잎 추출물 및 분획물의 해열효과를 확인하기 위하여, 실험동물을 이용하였다.

[203] 상기 실험동물은 5주령의 Sprague-Dawley(SD) 수컷 흰쥐((주)샘타코, 대한민국)를 구입하여 이용하였다. 상기 실험동물의 사육은 20°C 내지 24°C의 온도조건, 50% 내지 60%의 습도조건 및 12시간 주기의 주야조명조건으로 수행하였고, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 식이는 고형사료(삼양사료, 대한민국)를 이용하였다. 상기 실험동물은 상기 조건으로 7일간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

[204] 상기 실험동물을 이용한 해열작용 효능을 확인하기 위한 미생물 독소(bacterial endotoxin)인 lipopolysaccharide(LPS) 유도성 발열(LPS-induced fever) 실험은 Vilela FC 등의 방법(Vilela FC *et al*, Anti-inflammatory and antipyretic effects of Sonchus oleraceus in rats. *J Ethnopharmacol.* 17;127(3):737-41(2010))을 응용하여 수행하였다.

[205] 구체적으로, 상기 실험동물 중 임의로 5마리를 선택하여 1군으로 하고, lipopolysaccharide(LPS, Sigma, USA) 500 µg/kg을 복강 주사하여 발열을 유도시켰다. 상기 체온 측정은 직장체온측정기(Portable Thermocouple Thermometer(Physitemp Instruments, USA) 및 Stainless Steel Rectal Probe for Rats(Physitemp Instruments, USA))를 이용하여 직장체온을 측정하였으며, 실험 전 흰쥐의 체온을 세 차례 측정하여 온도 측정 스트레스로 인한 온도 상승을 최소화하였다.

[206] 우선, 멸균 잎 열수추출물의 해열효과를 확인하기 위하여, 아무런 시료를 투여하지 않은 음성대조군(LPS)과 기존 해열효과가 확인된 아세트아미노펜(Acetaminophen, APAP, Sigma, USA)을 50mg/kg 경구투여한 제1 양성대조군(APAP) 및 덱사메타손(Dexamethasone, Sigma, USA)을 1mg/kg 경구투여한 제2 양성대조군(Dexamethasone)을 이용하였다.

[207] 우선, 상기 온도 측정 스트레스로 인한 온도 상승을 최소화하기 위한 준비를 마친 실험동물에 발열물질(LPS)을 500 µg/kg을 복강 주사 (i.p.)하여 투여한 다음, 실험군의 종류에 따라 아무런 시료를 투여하지 않거나(LPS), 멸균 잎 열수추출액 200 mg/kg을 경구투여(SHL-200), 아세트아미노펜을 50 mg/kg 경구투여(APAP) 및 덱사메타손(Dexamethasone)을 1 mg/kg 경구투여(Dexamethasone)하였다. 또한, 상기 멸균 잎 열수추출액 200 mg/kg을 상기 발열물질 투여 후, 1시간이 경과한

다음 경구투여(SHL-200(1h))하고, 발열물질 투여 후 8시간 동안 1시간, 4시간 및 8시간 경과 시점에서 직장체온을 측정하였다. 상기 측정결과를 도 12 및 하기 표 3에 나타내었다. 하기 표 3의 수치는 각 시간별로 측정된 체온(°C)을 의미한다.

[208] 표 3

[Table 3]

	Normal	LPS	SHL 200	SHL 200(1h)	Dexamethasone	APAP
0h	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2
1h	37.55±0.21	38.2±0.68	36.65±0.69	38.23±0.41	37.3±0.52	36.58±0.67
4h	37.65±0.07	37.85±0.33	37.20±0.45	36.95±0.54	37.6±0.12	37.53±0.59
8h	37.55±0.07	37.6±0.61	37.7±0.14	37.73±0.22	37.73±0.13	37.78±0.13

[209] 상기 도 13 및 표 3에 나타낸 바와 같이, 발열물질(LPS)을 투여한 경우, 1시간이 경과된 시점에서 체온이 약 1°C 내지 1.8°C이상 급격하게 증가하였다. 그러나, 본 발명의 멸균 잎 열수추출액(SHL-200)을 투여한 경우, 오히려 현저하게 체온이 감소하였으나, 이러한 감소 정도는 덱사메타손(Dexamethasone)을 1 mg/kg 경구투여(Dexamethasone)한 경우보다 더 우수할 뿐만 아니라, 해열제로 널리 사용되고 있는 아세트아미노펜을 50 mg/kg 경구투여(APAP)한 경우가 거의 유사한 정도를 나타내어 우수한 해열 효과를 나타내었으며, 4시간이 경과된 시점에서는 아세트아미노펜을 50 mg/kg 경구투여(APAP)한 경우보다 체온이 증가되지 아니하여 지속성도 우수한 것으로 확인되었다.

[210] 또한, 발열물질(LPS)을 투여한 후 1시간이 경과된 시점에서 멸균 잎 열수추출액 200 mg/kg을 경구투여(SHL-200(1h))한 경우, 대조군과 같이 체온이 급격하게 증가하였다 다시 현저하게 감소되어, 4시간이 경과된 시점에서는 발열물질과 함께 아세트아미노펜을 50 mg/kg 경구투여(APAP)한 것과 유사한 정도로 감소되어, 시점에서 멸균 잎 열수추출액은 발열이 시작된 이후 즉, 일정 수준 체온이 상승된 후에도 유효하게 작용하는 것으로 확인되었다.

[211] 9-2. 멸균 잎 추출물의 분획물의 해열효과 확인

[212] 상기 실시예 1-2에서 제조된 멸균 잎 추출물의 분획물의 해열효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 9-1의 방법으로 사육된 실험동물(5주령의 SD 수컷 흰쥐((주)샘타코, 대한민국))을 이용하였다.

[213] 상기 실험동물을 이용한 해열작용 효능을 확인하기 상기 실시예 9-1과 같이, 실험은 Vilela FC 등의 방법을 응용하여 미생물 독소(Lipopolysaccharide(LPS) from *E. coli* 0111:B4(Sigma, USA))를 이용한 미생물 독소 유도성 발열(LPS-induced fever) 후, 직장체온측정기로 체온을 측정하였다.

[214] 상기 우선, 멸균 잎 열수추출물의 해열효과를 확인하기 위하여, 아무런 시료를 투여하지 않은 음성대조군(LPS)과 기존 해열효과가 확인된

이브프로펜(대웅제약, 대한민국)을 20 mg/kg 경구투여한 양성대조군(Ibuprofen)을 이용하였다. 또한, 실험군으로, 헥산 분획물(Hx), 클로로포름 분획물(CHCl_3), 에틸아세테이트 분획물(EA) 및 부탄올 분획물(BuOH)을 20 mg/kg을 투여하였다.

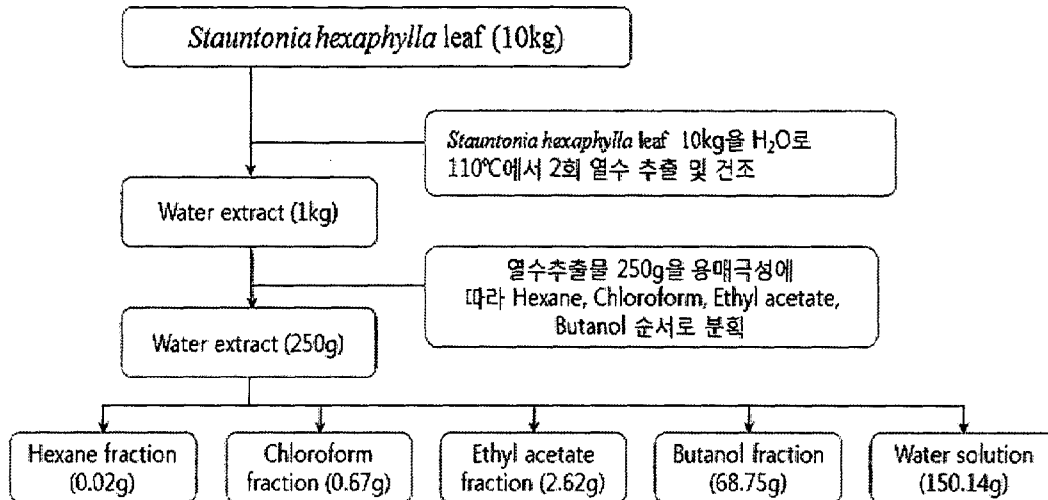
- [215] 우선, 실험 전 실험동물의 체온을 체온계(Portable Thermocouple Thermometer, physitemp, USA)를 이용하여, 직장체온을 측정하는 방법으로 3 번 측정하여 온도 측정 스트레스로 인한 온도 상승을 최소화한다.
- [216] 상기 온도 측정을 한 실험동물에 상기 발열물질인 미생물 독소(LPS)를 투여 5분 전에 각 시료를 함량 별로 경구투여한 후, 5분이 경과한 뒤 미생물 독소를 500 $\mu\text{g/kg}$ 을 복강 주사(i.p.)로 투여하고, 2시간 동안 30분 간격으로 실험동물의 직장체온을 측정하였다. 상기 측정결과를 도 14에 나타내었다.
- [217] 상기 도 14에 나타낸 바와 같이, 아무런 시료를 투여하지 않은 정상군(Normal)의 경우, 거의 체온 변화가 없었으나, 발열물질(LPS)을 투여한 경우, 30분 경과시점부터 체온이 급격하게 상승하여 1°C 이상 체온이 상승되었고, 1시간이 경과된 시점에서도 체온이 약 1°C 정도 증가된 체온이 유지되었고, 2시간이 경과된 시점에서도 약 0.5°C 가량 증가되는 것으로 확인되었다. 한편, 본 발명의 멸균 잎 열수추출액의 헥산 분획을 투여한 경우에는 발열물질을 투여한 경우에 비하여 온도 증가폭은 낮으나, 2시간이 경과된 시점에서 최종 온도는 오히려 높았으며, 부탄올 분획의 경우에도 헥산 분획에 비하여 온도 상승폭은 낮으나 전체적으로 체온상승 효과가 낮은 것으로 확인되었다. 한편, 클로로포름 분획을 투여한 경우에는 초기에는 온도가 상승되나, 2시간이 경과된 시점에서 거의 체온이 정상으로 돌아와서, 체온 증가 억제 효과 즉 해열효과를 갖는 것으로 확인되었고, 에틸아세테이트 분획물은 1시간 경과된 시점에서 체온이 정상으로 돌아왔고, 2시간 경과시점에서는 오히려 체온이 초기 온도보다 낮아져, 해열제로 널리 사용되고 효과가 검증된 이브프로펜과 거의 유사한 정도의 현저하게 우수한 해열효과를 갖는 것으로 확인되었다.

청구범위

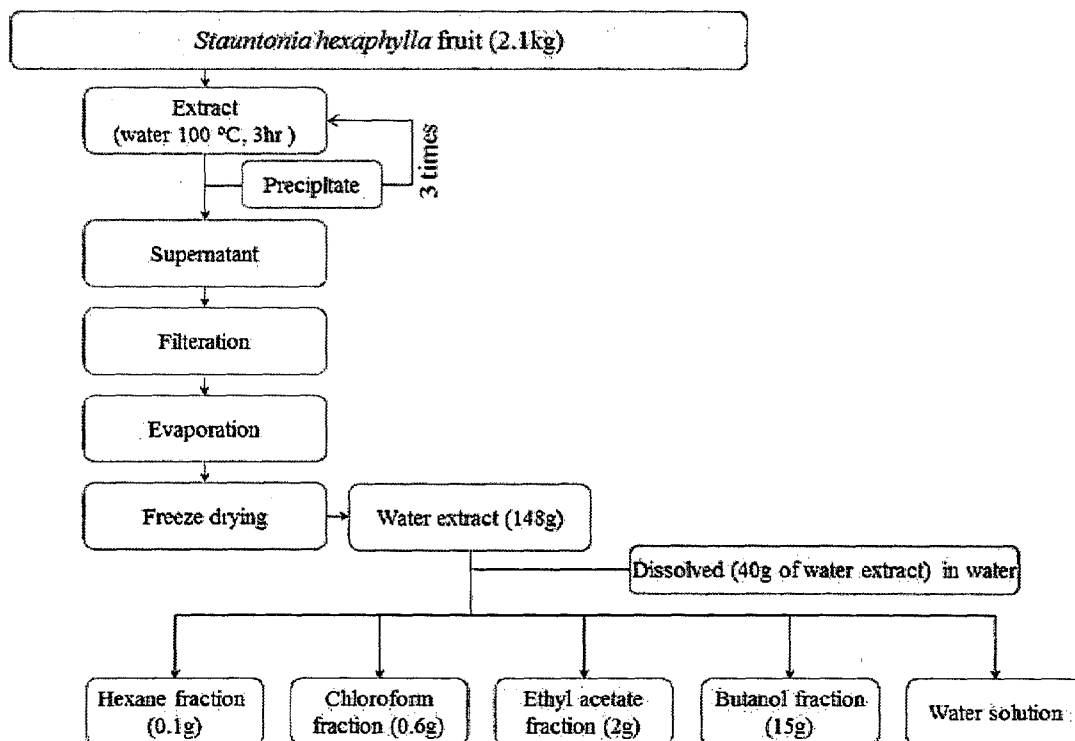
- [청구항 1] 멸꽃(*Stauntonia Hexaphylla*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 멸꽃 추출물은 멸꽃 잎 추출물 또는 멸꽃 열매 추출물인 항염 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 멸꽃 추출물은 상기 멸꽃 잎 또는 멸꽃 열매를 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 항염 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 멸꽃 추출물은 멸꽃 잎 열수추출물인 항염조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 멸꽃 잎 열수 추출물은 멸꽃 잎 열수추출물에 에틸아세테이트 또는 클로로포름을 분획용매로 분획한 분획물인 항염조성물.
- [청구항 6] 멸꽃(*Stauntonia Hexaphylla*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증질환 치료 및 예방용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 멸꽃 추출물은 멸꽃 잎 열수추출물에 에틸아세테이트 또는 클로로포름을 분획용매로 분획한 분획물인 염증질환 치료 및 예방용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 염증 질환은 피부염, 피부근염(dermatomyositis), 다발성 근염(polymyositis), 알레르기, 전신성 홍반성낭창, 천포창, 아프타구내염, 망막염, 위염, 간염, 기관지염, 식도염, 장염, 췌장염, 대장염, 신장염, 욕창, 루푸스, 만성 갑상선염, 다발성 경화증, 패혈증(sepsis), 방사선 손상, 장기이식의 거부반응, 전신부종 및 국소부종으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나인 염증질환 치료 및 예방용 약학 조성물.
- [청구항 9] 멸꽃(*Stauntonia Hexaphylla*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 완화 또는 완화용 화장료 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 멸꽃 추출물은 멸꽃 잎 열수추출물에 에틸아세테이트 또는 클로로포름을 분획용매로 분획한 분획물인 염증 완화 또는 완화용 화장료 조성물.
- [청구항 11] 멸꽃(*Stauntonia Hexaphylla*) 추출물을 유효성분으로 포함하는

- 해열용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 멸균 추출물은 멸균 잎을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및
이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로
추출한 것인 해열용 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 멸균 추출물은 멸균 잎 열수추출물에 클로로포름, 부탄올
또는 에틸아세테이트를 분획용매로 분획한 분획물인 해열용
조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 분획용매는 에틸아세테이트 또는 클로로포름인 해열용
조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 분획용매는 에틸아세테이트인 해열용 조성물.
- [청구항 16] 제11항에 있어서,
상기 해열용 조성물은 해열제 또는 해열진통제인 해열용 조성물.

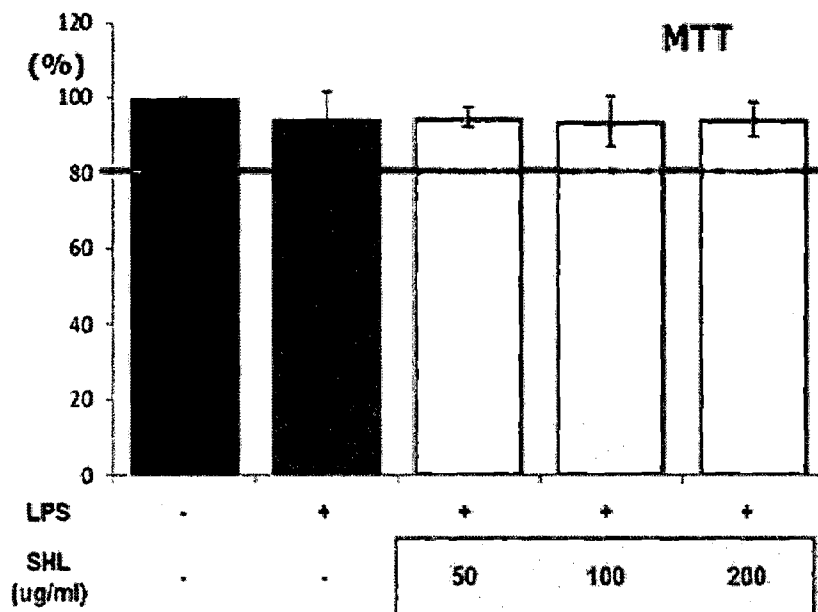
[Fig.1]



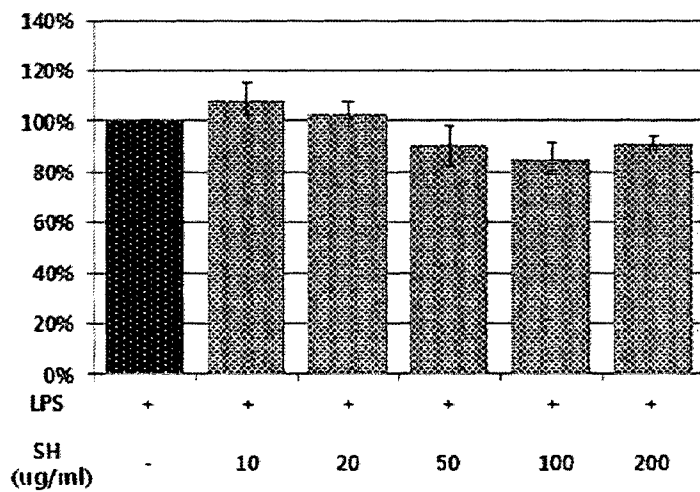
[Fig.2]



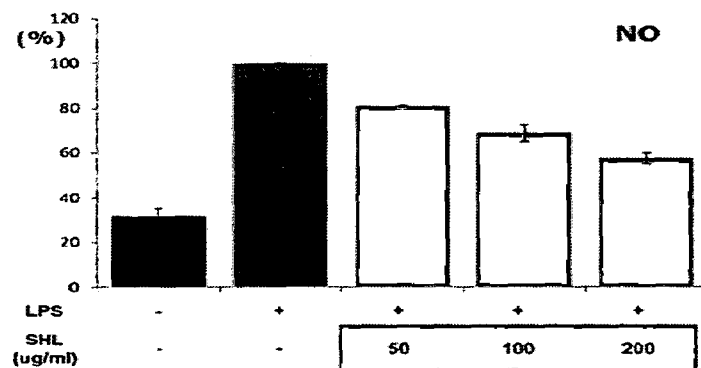
[Fig.3]



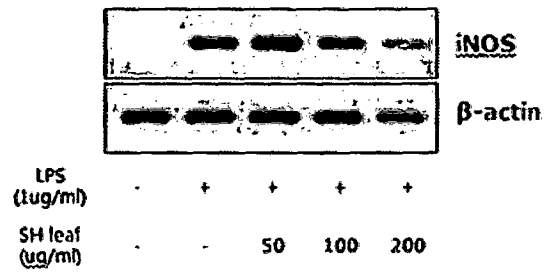
[Fig.4]



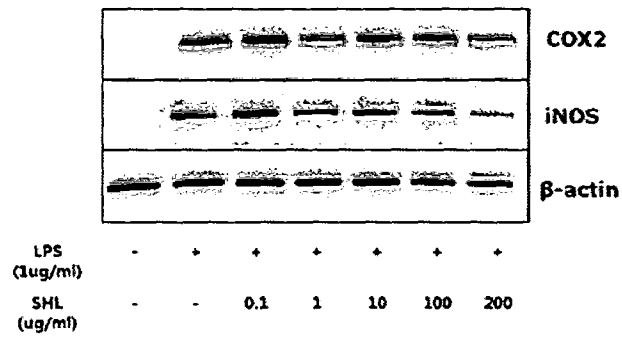
[Fig.5]



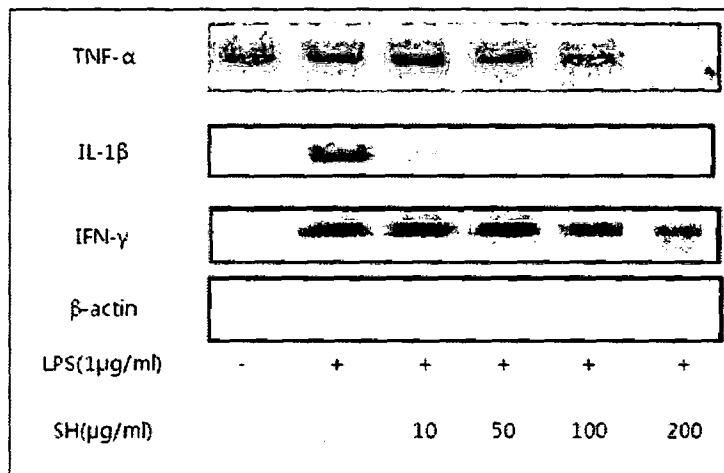
[Fig.6]



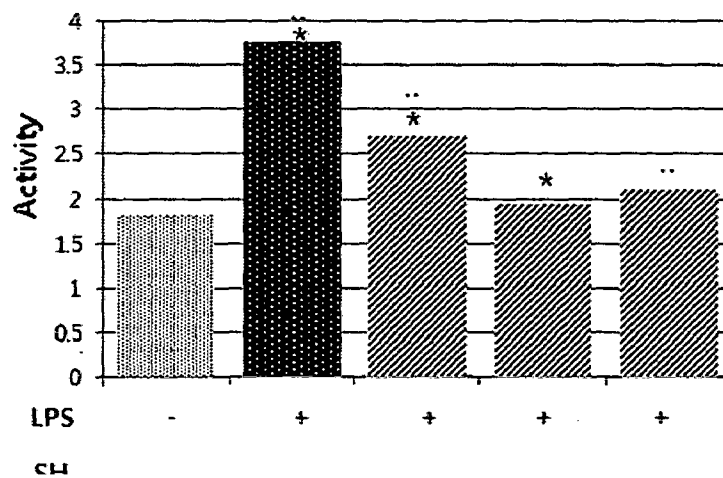
[Fig.7]



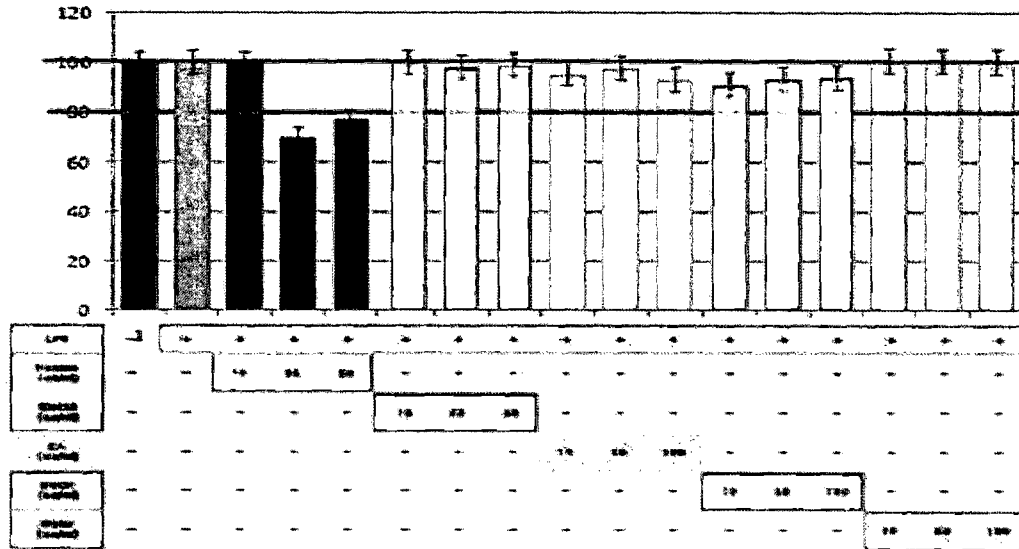
[Fig.8]



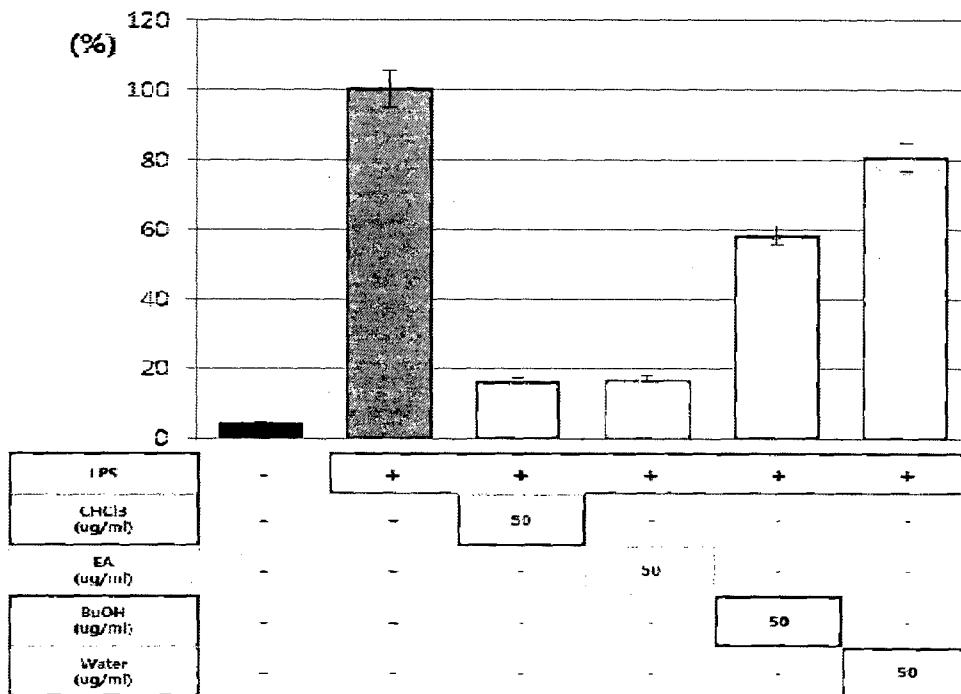
[Fig.9]



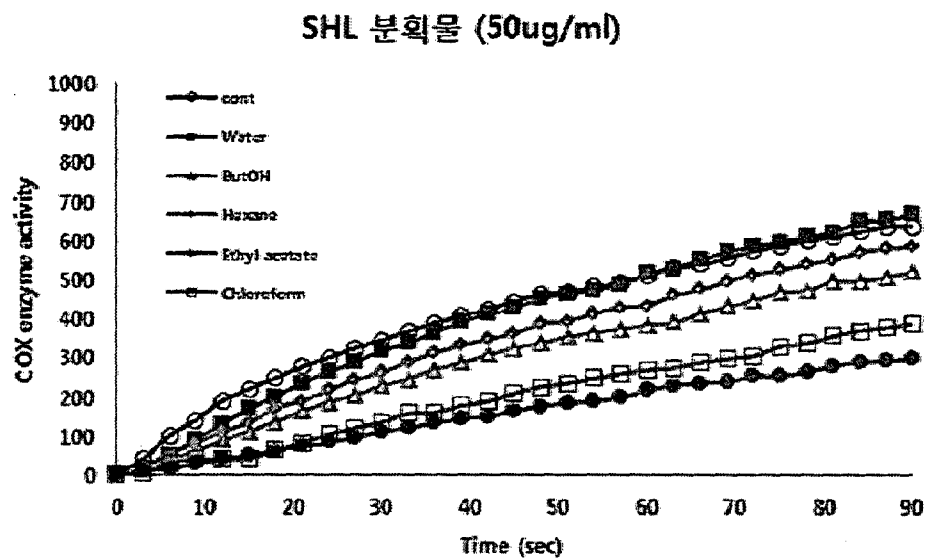
[Fig.10]



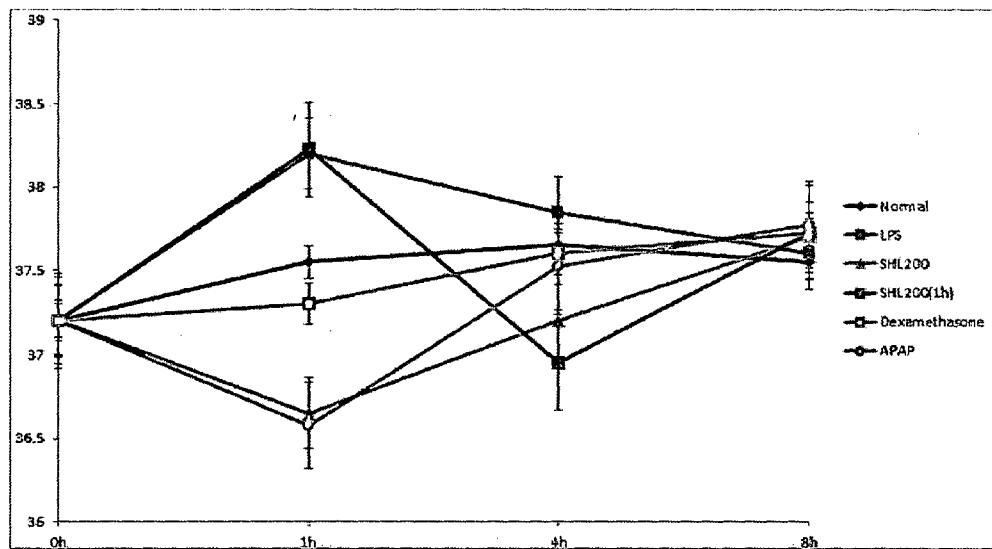
[Fig.11]



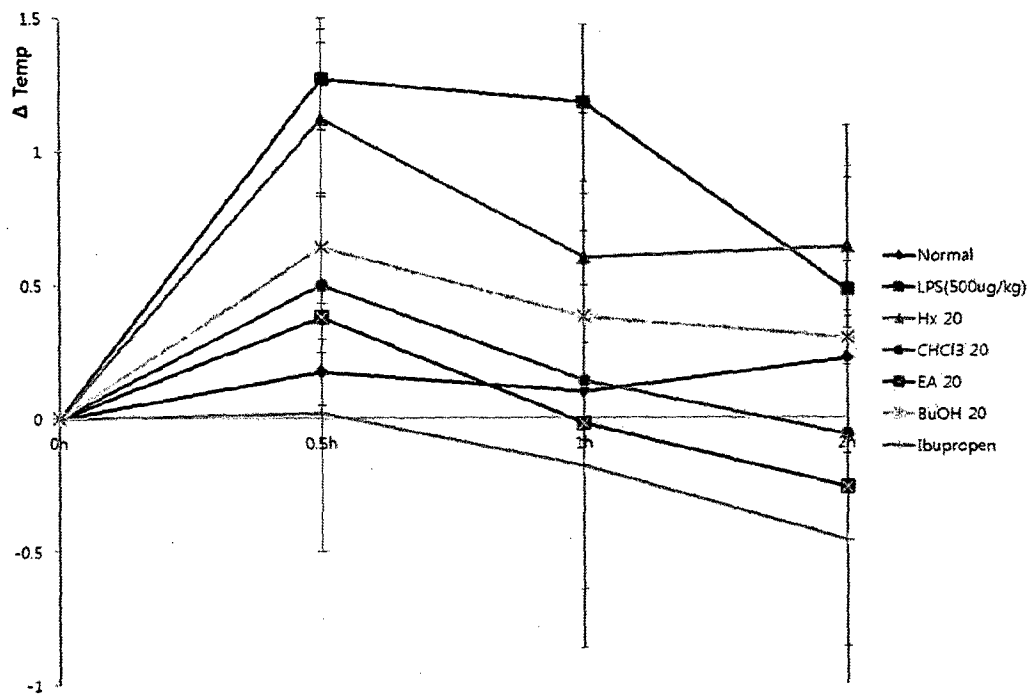
[Fig.12]



[Fig.13]



[Fig.14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/003867**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 36/71(2006.01)i, A61K 36/185(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/71; A61K 36/28; A61K 8/97; A61K 8/92; A61K 35/78; A61K 36/12; A61K 7/48

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: stauntonia hexapillya, anti-inflammation, ethyl acetate, antipyretic, Stauntonia Hexaphylla

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0068923 A (GYEONGGI INSTITUTE OF SCIENCE & TECHNOLOGY PROMOTION et al.) 22 June 2011 See abstract, [0004], [0014]-[0016], claims 1-5	1-16
X	Kim et al. "Antioxident activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea", Food chemistry 122, 2010, pp. 546-552 See abstract, introduction, figure 2 and pages 546-552	1-16
A	KR 10-2009-0048848 A (EASTHILL CO., LTD.) 15 May 2009 See the entire document	1-16
A	JP 2001-226249 A (ICHIMARU PHARCOS CO LTD) 21 August 2001 See the entire document	1-16



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

31 DECEMBER 2012 (31.12.2012)

Date of mailing of the international search report

02 JANUARY 2013 (02.01.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/003867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0068923 A	22.06.2011	NONE	
KR 10-2009-0048848 A	15.05.2009	NONE	
JP 2001-226249 A	21.08.2001	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/71(2006.01)i, A61K 36/185(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/71; A61K 36/28; A61K 8/97; A61K 8/92; A61K 35/78; A61K 36/12; A61K 7/48 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: 멸꿀, 향염, 에틸아세테이트, 해열, Stauntonia Hexaphylla		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0068923 A (재단법인 경기바이오센터 외 1명) 2011.06.22 요약, [0004], [0014]-[0016], 청구항 1-5 참조	1-16
X	Kim et al. `Antioxident activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea`, Food chemistry 122, 2010, pp 546-552 요약, 도입, 도면2 및 546-552 페이지 참조	1-16
A	KR 10-2009-0048848 A (이스트힐(주)) 2009.05.15 전체 문헌 참조	1-16
A	JP 2001-226249 A (ICHIMARU PHARCOS CO LTD) 2001.08.21 전체 문헌 참조	1-16
☐ 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 2012년 12월 31일 (31.12.2012)		국제조사보고서 발송일 2013년 01월 02일 (02.01.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 신영신 전화번호 82-42-481-8148 

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2011-0068923 A

2011.06.22

없음

KR 10-2009-0048848 A

2009.05.15

없음

JP 2001-226249 A

2001.08.21

없음