(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0055232
(43) 공개일자 2022년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/31 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/8962 (2006.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61K 8/9794 (2017.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/31 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0139499
(22) 출원일자 2020년10월26일
심사청구일자 2020년10월26일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이원종
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호(전민동, 엑스포아파트)
유제영
경기도 양주시 백석읍 꿈나무로 39-8, A동 403호(태성아트빌2차A동)
강수진
경기도 안산시 상록구 안산천서로4길 14, 402호(월피동, 중앙맨션)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 15 항

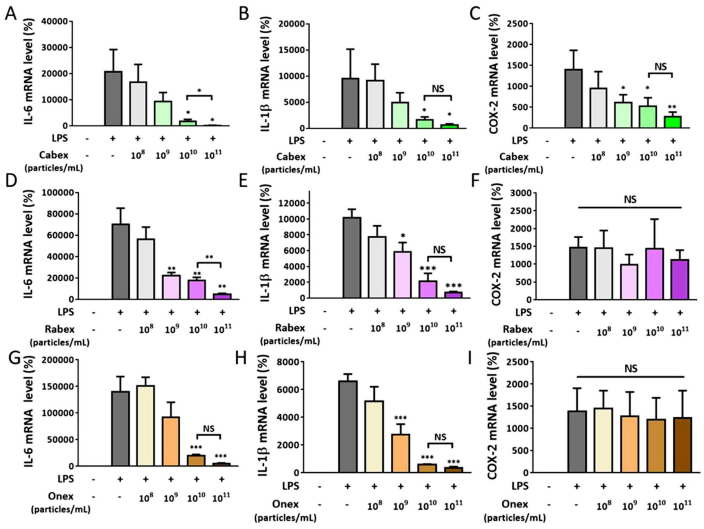
(54) 발명의 명칭 **배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체는 세포 내 투과가 잘 이루어지고, 전달된 세포밖 소포체가 IL-6(interleukin-6), IL-1β(interleukin-1 beta) 및 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현을 억제하는 효능을 가지고 있으므로, 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 36/8962 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/9794 (2017.08)
A61P 29/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2300/34 (2013.01)
A61K 2800/805 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 50 내지 150 nm인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포밖 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리된 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포밖 소포체는 IL-6(interleukin-6), IL-1β(interleukin-1 beta) 및 COX-2(cyclooxygenase-2) 중에서 선택되는 어느 하나의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 피부염, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 홍채염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 췌장염, 위염, 크론병, 염증성 장질환, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 루프스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선, 류마티스 관절염, 골관절염, 골다공증, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 및 다발성 경화증 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 여드름, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 아토피 피부염 및 건선 중에서 선택되는 어느 하나의 염증성 피부질환인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 9

제1항에 따른 상기 세포밖 소포체를 제조하는 방법으로서,

(1) 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액을 제조하는 단계;

(2) 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액에 대하여 한외여과를 수행하는 단계; 및

(3) 상기 여과액에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 세포밖 소포체의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

(2) 단계의 상기 한외여과는 5 내지 15 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것을 특징으로 하는, 세포밖 소포체의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

(3) 단계의 상기 크기 배제 크로마토그래피는 pH 6 내지 pH 8의 인산완충액(PBS)으로 평형화된 것을 특징으로 하는, 세포밖 소포체의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

(3) 단계의 상기 크기 배제 크로마토그래피는 정지상(stationary phase)의 포어(pore) 평균 직경이 30-75 ㎚인 것을 특징으로 하는, 세포밖 소포체의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 정지상은 수퍼덱스, 세파크릴, 세파덱스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요펄 및 Bio-Gel 중에서 선택되는 어느 하나의 겔 여과 매질인 것을 특징으로 하는, 세포밖 소포체의 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피의 용리액은 pH 6 내지 pH 8의 PBS 완충액인 것을 특징으로 하는, 세포밖 소포체의 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여, 50 내지 150 ㎚의 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수하는 것을 특징으로 하는, 세포밖 소포체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포밖 소포체는 다양한 크기를 가지며, 특히 이중 크기가 가장 작은 엑소좀(exosome)은 50 내지 150 ㎚의 작은 세포막성 수포이다. 세포밖 소포체는 인간과 동물은 물론, 곤충, 식물, 미생물 세포에서 분비된다. 특히 이들은 세포가 갖고 있는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하고 있으며, 지질이중층으로 둘러싸여 있어 이들 분자들을 안정적으로 보호하면서, 분비 후 다른 세포로 이들을 전달할 수 있는 특징이 있다. 생체 내 혈액, 소변, 침 등과 같은 체액에서 고농도로 발견되는 세포밖 소포체는 이런 특징으로 인해 새로운 생물학적

소재로서 가능성을 갖고 있다.

[0003] 상기 세포밖 소포체는 1) 천연물질로 부작용 이슈가 매우 적으며; 2) 경구투여를 통해 대장 도달이 가능할 뿐 아니라; 3) 음식으로 직접 식용하는 것에 비해 편의성이 높아 유아나 소아 대상으로 적용이 가능하고; 4) 식물로부터 대량 생산이 가능하여 건강기능식품의 새로운 패러다임 선도할 수 있으며; 5) 약리성분을 탑재하여 대장까지 전달할 수 있는 효율적인 약물 전달체로 적용이 가능하다는 장점이 있다.

[0004] 그럼에도 아직 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체의 생물학적 기능 및 응용은 물론, 이들의 추출 및 정제 방법에 대한 연구 역시 체계적으로 이뤄지지 않았다. 일반적으로 세포밖 소포체 분리에 사용되는 초고속원심분리법의 경우, 불순물 농도가 상대적으로 높고, 강한 원심력에 의해 세포밖 소포체의 물리적 파쇄가 유발될 수 있다. 상용화되어 판매되는 ExoQuick(SBI사) 등의 폴리머 침강법 역시 불순물의 농도가 매우 높으며, PEG(polyethylene glycol)을 사용하기 때문에 이로 인한 오염문제를 갖고 있다. 따라서, 세포밖 소포체의 산업적 활용을 위해서는 이들을 효율적으로 대량 분리할 수 있는 새로운 기술의 개발이 요구된다.

[0005] 한편, 세포밖 소포체는 분비하는 기원 세포(공여 세포)의 상태를 반영하며, 어떤 세포에서 분비되었는가에 따라 다양한 생물학적 활성을 나타내고, 세포들 사이에 유전 물질과 단백질을 옮기면서 세포 간 상호작용에 중요한 역할을 한다.

[0006] 이러한 세포밖 소포체를 종래에는 주로 바이오마커로 사용하여 왔을 뿐이고, 세포밖 소포체 자체의 효능을 이용하여 세포밖 소포체를 특정 용도로 사용하는 기술은 아직 개발이 미흡한 실정이다.

[0007] 따라서, 본 발명자는 배추속 식물 또는 파속 식물 유래의 세포밖 소포체가 염증 억제 효과를 갖는 의약품, 식품, 화장품 등의 제조에 응용할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0028281 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0015] 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 50 내지 150 ㎚일 수 있다.

[0016] 상기 세포밖 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리된 것일 수 있다.

[0017] 상기 세포밖 소포체는 IL-6(interleukin-6), IL-1β(interleukin-1 beta) 및 COX-2(cyclooxygenase-2) 중에서 선택되는 어느 하나의 발현을 억제할 수 있다.

[0018] 상기 염증성 질환은 피부염, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 홍채염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 췌장염, 위염, 크론병, 염증성 장질환, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 루프스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선, 류마티스 관절염, 골관절염, 골다공증, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 및 다발성 경화증 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0019] 상기 염증성 질환은 여드름, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 아토피 피부염 및 건선 중에서 선택되는 어느 하나의 염증성 피부질환일 수 있다.

[0020] 또한, 상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0022] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 세포밖 소포체의 제조방법은 (1) 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액을 제조하는 단계; (2) 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액에 대하여 한외여과를 수행하는 단계; 및 (3) 상기 여과액에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0023] (2) 단계의 상기 한외여과는 5 내지 15 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가질 수 있다.

[0024] (3) 단계의 상기 크기 배제 크로마토그래피는 pH 6 내지 pH 8의 인산완충액(PBS)으로 평형화된 것일 수 있다.

[0025] (3) 단계의 상기 크기 배제 크로마토그래피는 정지상(stationary phase)의 포어(pore) 평균 직경이 30-75 ㎚일 수 있다.

[0026] 상기 정지상은 수퍼덱스, 세파크릴, 세파덱스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요펄 및 Bio-Gel 중에서 선택되는 어느 하나의 겔 여과 매질일 수 있다.

[0027] 상기 크기 배제 크로마토그래피의 용리액은 pH 6 내지 pH 8의 PBS 완충액일 수 있다.

[0028] 상기 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여, 50 내지 150 ㎚의 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체는 세포 내 투과가 잘 이루어지고, 전달된 세포밖 소포체가 IL-6(interleukin-6), IL-1β(interleukin-1 beta) 및 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현을 억제하는 효능을 가지고 있으므로, 염증성 질환의 치료, 개선 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 배추속 식물 유래 세포밖 소포체를 제외한 불순물이 포함된 배추속 식물 착즙액을 농축 및 정제한 시료의 모습을 보여주는 그림이다.

도 2는 크기배제 크로마토그래피를 통해 배추속 식물 유래 착즙액을 로딩하는 과정을 보여주는 그림이다.

도 3은 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 유래 착즙액의 분획물을 보여주는 그림이다.

도 4는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 적배추 유래 착즙액의 분획물을 보여주는 그림이다.

도 5A는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 유래 착즙액의 분획물에 함유된 세포밖 소포체의 농도(세포밖 소포체 입자수/mL)를 나타내는 그래프이고, 도 5B는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 적배추 유래 착즙액의 분획물에 함유된 세포밖 소포체의 농도(세포밖 소포체 입자수/mL)를 나타내는 그래프이다.

도 5C는 크기배제크로마토그래피(SEC), 도 5D는 폴리머 침강(PEG), 도 5E는 초원심분리(UC) 방법에 따라 회수한 양배추 유래 착즙액의 분획물에 대한 크기 분포도이다.

도 5F는 크기배제크로마토그래피(SEC), 도 5G는 폴리머 침강(PEG), 도 5H는 초원심분리(UC) 방법에 따라 회수한 적배추 유래 착즙액의 분획물에 대한 크기 분포도이다.

도 5I~도 5K는 폴리머 침강(PEG), 초원심분리(UC), 크기배제크로마토그래피(SEC) 방법에 따라 회수한 양배추 유래 착즙액의 분획물에 대한 크기 분포도(I), 수율(J) 및 순도(K)를 분석한 결과 그래프이다.

도 5L~도 5N는 폴리머 침강(PEG), 초원심분리(UC), 크기배제크로마토그래피(SEC) 방법에 따라 회수한 적배추 유래 착즙액의 분획물에 대한 크기 분포도(L), 수율(M) 및 순도(N)를 분석한 결과 그래프이다.

도 6A는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex)를 투과전자현미경(TEM)으로 촬영한 이미지이고, 도 6B는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex)를 투과전자현미경(TEM)으로 촬영한 이미지이다.

도 6C는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex) 및 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex)의 제타 전위값을 나타낸 그래프이다.

도 6D~도 6F는 PKH67로 표지된 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex) 및 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex)를 각각 세포 배양액에 첨가한 후 공초점 현미경으로 촬영하여 세포밖 소포체의 세포 내 투과 여부를 확인하기 위한 이미지로서, 대조군(D), 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 유래 세포밖 소포체(E), 및 적배추 유래 세포밖 소포체(F)를 촬영한 이미지이다.

도 7은 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex) 및 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex)의 HaCaT, HDF 및 RAW 264.7 세포에서의 세포 증식 및 세포 독성 효과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex), 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex) 및 양파 유래 세포밖 소포체(Onex)의 IL-6, IL-1β 및 COX-2의 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex), 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex) 및 양파 유래 세포밖 소포체(Onex)의 IL-6, IL-1β 및 COX-2의 발현 억제 효과를 나타내는 ELISA 및 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0032] 본 발명은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "배추속 식물(Brassica Species)"은 배추속에 속하는 식물로, 구체적으로 양배추, 적배추, 브로콜리, 콜리플라워, 콜라비, 콜라드 및 브르셀 스프라우트 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있고, 보다 바람직하게는 양배추 또는 적배추일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "파속 식물(Allium Species)"은 파속에 속하는 식물로, 구체적으로 양파, 마늘, 생강, 파, 대파, 쪽파, 부추, 달래 및 삼채 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 양파일 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 용어 "세포밖 소포체(extracellular vesicle)"는 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭을 의미하며, 대략 30-1,000 nm범위의 직경을 가지고, 다낭체와 원형질막의 융합을 통해 세포 밖 환경으로 방출된다.

[0036] 본 명세서에서 "유효성분으로 포함하는"이란 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체의 효능이나 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명은 천연식물재료인 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체로서, 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 상기 세포밖 소포체가 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 통상의 기술자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 40 내지 200 nm인 엑소좀일 수 있고, 바람직하게는 50 내지 150 nm, 더욱 바람직하게는 80 내지 120 nm일 수 있다. 상기 엑소좀은 생체 유래 나노베지클(nanovesicle)로서, 그 세포막에 있는 MHC가 면역세포들을 회피하도록 돕기 때문에 그 자체로 다른 고분자 또는 무기질 나노입자에 비하여 면역거부 반응이 덜하다. 이에 따라 혈액 속에서도 오랫동안 분해되지 않고 순환하면서 CTC(circulating tumor cell)까지 전달될 수 있다.

[0038] 또한, 엑소좀은 그 막 표면에 다양한 수용체(receptor)와 단백질들이 존재하기 때문에 엑소좀과 유사한 지질 이중막(bilayer lipid)을 갖는 리포솜(liposome)보다 세포에 더 잘 흡수(uptake)되며, 독성 또한 낮은 것으로 이미 밝혀진 바 있다. 이에 따라, 엑소좀의 전달체로서의 기능은 리포솜과 다른 양상으로 일어나며, 효율에서도

차이가 크다. 또한, 리포솜에는 엑소좀의 세포막에 존재하는 다양한 리셉터 또는 단백질들이 존재하지 않기 때문에 상기한 이점을 가질 수 없다.

[0039] 본 발명의 세포밖 소포체는 배추속 식물 또는 파속 식물의 조직 또는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 수득한 것일 수 있다.

[0040] 본 발명자들은 배추속 식물 또는 파속 식물로부터 세포밖 소포체를 효율적으로 수득할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 종래에 통상적으로 이용되는 폴리머 침강법 또는 초고속원심분리법에서 벗어나 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제를 수행할 경우 불순물 함량을 크게 낮추면서도 소포체에 가해지는 물리적 파쇄도 없으면서 고유의 약리학적 및 약물전달적 활성을 그대로 유지하는 고순도, 고품질의 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체를 수득할 수 있음을 발견하였다.

[0041] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료(biological sample)"는 생물학적 활성을 유지하는 배추속 식물체 또는 파속 식물체로부터 채취, 분리하거나, 또는 이로부터 유래한 관심 성분의 유효량을 함유하고 있는 가공되지 않거나 또는 전처리된 시료를 의미한다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 생물학적 시료는 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액이다.

[0042] 본 명세서에서 용어 "배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액" 은 배추속 식물 또는 파속 식물에 열이나 효소를 가하지 않고 기계적, 물리적인 힘을 가하여 배추속 식물 또는 파속 식물의 내부에 포함된 유용성분을 외부로 유출시켜 얻어진 액상의 유체를 의미하는 것으로, 특별히 한정되지 않으나, 구체적으로 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액은 하기의 방법으로 제조된 것일 수 있다.

[0043] 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액을 제조하기 위하여, 배추속 식물 또는 파속 식물을 준비한 후, 배추속 식물 또는 파속 식물을 가압하여 착즙액을 제조할 수 있다. 상기 배추속 식물 또는 파속 식물은 가압하기 전에 세척하는 과정을 추가로 진행할 수 있다.

[0044] 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 세척은 흐르는 물을 이용하여 상기 준비된 식물을 세척하는 것일 수 있으나, 예를 들어 PBS 또는 탄산수소나트륨이 용해된 정제수를 이용하여 수행될 수도 있다. 상기 탄산수소나트륨은 식품첨가물로 널리 사용되는 것으로 독성이 없기 때문에 배추속 식물 또는 파속 식물의 세척과정에 사용할 수 있다.

[0045] 상기 배추속 식물 또는 파속 식물에 함유되어 있는 영양성분이 용이하게 착즙되도록, 상기 세척단계와 착즙단계 사이에 상기 배추속 식물 또는 파속 식물을 평균 직경이 1 내지 50 ㎜로 분쇄되는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0046] 상기 분쇄된 배추속 식물 또는 파속 식물을 2 내지 3 kgf/㎠의 압력으로 가압하여 착즙함으로써, 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 유용성분이 충분하게 침출된 배추속 식물 착즙액을 제조할 수 있다.

[0047] 이후, 상기 배추속 식물 또는 파속 식물의 착즙액을 여과하여 고형물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 고형물은 1 ㎜ 이상의 평균 직경을 갖는 것일 수 있다.

[0048] 또한, 상기 고형물이 제거된 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙액의 여과물을 원심분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 원심분리 단계는 7,000 내지 9,000 x g로 1차 원심분리 후 이의 상층액을 19,000 내지 21,000 x g로 2차 원심분리 함으로써 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 원심분리 단계는 7,500 내지 8,500 x g로 1차 원심분리 후 이의 상층액을 19,500 내지 20,500 x g로 2차 원심분리 함으로써 수행되는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙액에 대해 한외여과를 수행하는 단계를 임의의 순서로 추가적으로 포함할 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 용어 "한외여과"는 비균질 혼합용액을 구성하는 각각의 물질을 압력 또는 농도구배에 의해 반투과성 막을 따라 분리시키는 막-기반분리공정을 의미한다. 한외여과 막은 일정한 컷오프 값을 갖는 기공 크기를 갖는다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용하는 한외여과는 3 내지 100 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지며, 보다 구체적으로는 5 내지 50 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지며, 가장 바람직하게는 5 내지 15 kDa의 컷오프(cutoff) 값을 가진다.

[0051] 본 발명의 방법에 한외여과를 수행하는 단계가 추가적으로 포함될 경우, 이는 크기배제 크로마토그래피 전에 수행될 수도 있으며, 크로마토그래피 완료 후에 수행될 수도 있다.

[0052] 보다 구체적으로는, 본 발명의 방법은 상기 한외여과를 수행하는 단계와 상기 크기배제 크로마토그래피를 수행하는 단계를 순차적으로 포함한다. 이와 같이 한외여과 후 크기배제 크로마토그래피를 수행할 경우 한외여과를 통한 농축으로 시료의 부피가 감소한 뒤 크기배제 크로마토그래피가 적용되어 보다 효율적인 분리공정이 이루어질 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "크기배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography, SEC)"는 비균질 혼합물을 구성하는 각각의 물질 중 정지상의 비드 포어(bead pore) 직경보다 크기가 작은 물질은 포어에 진입하여 상대적으로 느리게 용출되고, 크기가 큰 물질은 포어에 진입하지 않고 이동상을 따라 빠르게 용출됨으로써, 이로부터 유발되는 각 물질의 크기에 따른 이동속도 차이에 기반하여 물질을 분리하는 크로마토그래피를 의미한다.

[0054] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용하는 크기배제 크로마토그래피는 정지상(stationary phase)의 포어(pore) 평균 직경은 30 내지 75 nm인 것일 수 있다. 바람직하게 상기 정지상의 포어 평균 직경은 65 내지 75 nm인 것일 수 있다.

[0055] 구체적으로 상기 정지상은 수퍼덱스, 세파크릴, 세파덱스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요펄 및 Bio-Gel로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 겔 여과 매질일 수 있고, 보다 바람직하게는 Izon science 사로부터 생산된 qEVoriginal(Cat.No: SP1)를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 상기 크기 배제 크로마토그래피는 당해 업계의 통상의 방법이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 하기 단계들을 통해 수행되는 것일 수 있다.

[0057] (a) 상기 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙액을 로딩하는 단계; 및

[0058] (b) 용리액으로 분획물을 수득하는 단계.

[0059] 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙액을 로딩하기 전에, 불순물을 제거하고 정지상과의 평형 상태를 형성하여 효율적인 분리공정을 이루기 위해, 상기 크기 배제 크로마토그래피는 평형 완충액을 통해 평형화된 것일 수 있다.

[0060] 상기 평형 완충액과 용리액은 pH 6 내지 pH 8의 인산완충액(posphate buffered saline; PBS)일 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 크기 배제 크로마토그래피에 배추속 식물 착즙액을 로딩하고 용리액을 전개시키면 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙액 중 세포밖 소포체와 같이 큰 분자가 선택적으로 용출되고 나머지 크기가 작은 물질은 상기 크기 배제 크로마토그래피 내부에 머무르게 되어 크기가 큰 세포밖 소포체를 시료로부터 분리할 수 있다. 일반적으로 세포밖 소포체는 분자의 크기가 1,000 kDa 이상으로 다른 불순물에 비해 크기가 큰 입자에 속하기 때문에 용리액에 의한 용출과정에서 우선적으로 용리액과 함께 용출된다. 용출되는 물질의 분자량은 다공성 정지상의 크기 및 구멍 크기, 컬럼의 길이, 이동상의 유속 등에 따라 상이하며, 동일한 조건에서는 용출되는 분자의 크기가 일정하다.

[0062] 본 발명의 세포밖 소포체는 평균 직경이 500 nm 이하일 수 있고, 바람직하게는 20 nm 내지 200 nm, 더욱 바람직하게는 50 내지 150 nm일 수 있다.

[0063] 따라서 상기 세포밖 소포체의 분리효율을 극대화하기 위해서는 용리된 분획물의 입도를 분석하여 상기 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수하는 것이 보다 바람직하다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에서는 Izon science 사로부터 제조된 qEVoriginal로 채워진 컬럼(70 nm)에 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4)을 첨가하여 평형시킨 정지상에, 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙액을 로딩하고, 해당 컬럼에 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4)을 용리액으로 주입하여 분획물을 0.5 mL씩 회수한 다음, 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)로 분석하였다.

[0065] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 세포밖 소포체에 대해 염증성 사이토카인 억제 활성을 in vitro 상에서 분석을 수행하였다.

[0066] 그 결과, 본 발명의 세포밖 소포체가 염증성 사이토카인인 IL-6(interleukin-6), IL-1β(interleukin-1 beta) 및 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현을 효과적으로 억제하는 활성이 있는 것으로 확인되었다.

[0067] 따라서 본 발명자들은 이러한 실험결과를 통해, 본 발명의 세포밖 소포체를 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0068] 본 명세서의 용어 "염증성 질환"은 염증으로 인해 발병될 수 있는 질환이라면 모두 포함할 수 있고, 구체적으로 이에 제한되지는 않으나, 피부염, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 홍채염, 인후염, 편도염, 폐렴,

위궤양, 췌장염, 위염, 크론병, 염증성 장질환, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 루프스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선, 류마티스 관절염, 골관절염, 골다공증, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 및 다발성 경화증 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는, 상기 염증성 질환은 여드름, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 아토피 피부염 및 건선 중에서 선택되는 어느 하나의 염증성 피부질환일 수 있다.

[0069] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명의 세포밖 소포체를 포함하는 조성물의 투여로 염증성 질환의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0070] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 세포밖 소포체를 포함하는 조성물의 투여로 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다.

[0071] 본 발명의 조성물은 배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체를 포함하는 유효성분이 염증성 질환을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.

[0072] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0073] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 염증성 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0075] 상기 약학 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.

[0076] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0077] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다.

[0079] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001 내지 10 g/kg, 바람직하게는 10 내지 300 mg/kg, 더욱 바람직하게는 100 내지 200 mg/kg을 1일 1 내지 4회 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0080] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는

안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0081] 한편, 본 발명의 세포밖 소포체의 1일 투여량은, 10 내지 1,000 mg/kg일 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 500 mg/kg일 수 있고, 더욱 바람직하게는 50 내지 500 mg/kg일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 100 내지 500 mg/kg일 수 있고, 더욱 바람직하게는 100 내지 300 mg/kg 또는 200 내지 500 mg/kg일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 200 내지 400 mg/kg일 수 있고, 가장 바람직하게는 200 내지 300 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 세포밖 소포체의 투여량의 상기 하한치 미만인 경우에는 염증성 사이토카인 발현 억제 효과가 원하는 정도로 나타나지 않을 수 있고, 상기 상한치를 초과하는 경우에는 투여량이 증가하는 만큼 염증성 사이토카인 발현 억제 효과가 증가하지 않을 수 있다. 세포밖 소포체는 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 세포밖 소포체의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0082] 또한, 본 발명은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0083] 본 발명에서의 용어, "배추속 식물", "파속 식물", "세포밖 소포체", "염증성 질환"은 상기에서 기재한 바와 같다.

[0084] 본 발명의 용어 "개선"이란, 본 발명의 세포밖 소포체를 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 것을 의미한다.

[0085] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0086] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 또는 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0087] 상기 건강기능식품이란, 상기 세포밖 소포체를 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리 또는 바(bar) 형태로 제제화 한 것일 수 있고, 또는 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하여 일반 식품 형태로 제조한 것으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

[0088] 상기 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강기능식품에 있어서의 세포밖 소포체의 첨가량은, 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리 또는 바(bar) 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.

[0089] 상기 건강기능식품은 유효성분으로서 세포밖 소포체뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0090] 예컨대, 본 발명의 건강기능식품이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 세포밖 소포체 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0092] 또한, 본 발명은 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0093] 본 발명에서의 용어, "배추속 식물", "파속 식물", "세포밖 소포체", "염증성 질환"은 상기에서 기재한 바와 같다.

[0094] 구체적인 일 실시예에서, 각질형성세포에 LPS를 처리하여 염증성 사이토카인을 인위적으로 과발현시킨 후, 본

발명의 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 처리한 결과, 상기 과활성화된 염증성 사이토카인이 유의하게 감소됨을 구체적으로 확인하였다.

[0095] 이와 같이 과활성화된 염증성 사이토카인의 발현이 억제되는 경우, 염증성 피부질환이 완화될 수 있다.

[0096] 즉, 본 발명의 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 염증성 피부질환을 완화시킬 수 있다.

[0097] 본 발명의 상기 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 피부학적으로 허용가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물 (화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물 (화운데이션, 립스틱, 마스카라, 메이크업 베이스), 두발 또는 두피 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0098] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 본 발명의 바이아릴아미드 유도체를 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형 (O/W)의 크림베이스에 본 발명의 바이아릴아미드 유도체를 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.

[0099] 또한, 본 발명은 상기 배추속 식물 또는 파속 식물에서 유래된 세포밖 소포체(extracellular vesicles)의 제조방법을 제공한다.

[0100] 이하, 본 발명에 따른 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 실시예 및 비교예를 들어 상세히 설명하기로 한다.

[0101] **<실시예>**

[0102] ***배추속 식물 및 파속 식물 유래 세포밖 소포체 분리를 위한 착즙***

[0103] 1) 배추속 식물인 적배추, 양배추, 및 파속 식물인 양파로부터 세포밖 소포체를 분리하기 위하여 무게를 측정한 후 흐르는 수돗물로 1 차적으로 식물의 농약을 제거하였다. 다음으로 흐르는 초순수 증류수를 이용하여 수돗물과 농약을 2차적으로 제거하였다. 이후 과도를 이용하여 가로 40 ㎜, 세로 30 ㎜ 이하로 토막을 낸 후 착즙기를 이용하여 즙을 낸 다음 즙 내에서 큰 물질을 제거하기 위하여 면 주머니 가로 1 ㎜, 세로 1 ㎜ 이하의 덩어리만을 여과하였다.

[0104] 최종적으로 면 주머니로 걸러진 용액에서 단백질 및 세포벽을 제거하기 위해 8,000 x g로 1시간 동안, 4℃에서 원심분리를 진행 후 상층액만을 다시 20,000 x g에서 1시간 동안 4℃에서 다시 원심분리하였다. 이러한 과정으로 수득한 상층액은 추후 실험을 진행하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0105] ***배추속 식물 및 파속 식물 유래 세포밖 소포체 분리 및 정제 방법***

[0106] 1) 고순도의 배추속 식물 유래 세포밖 소포체 및 파속 식물 유래 세포밖 소포체를 얻기 위해서는 배추속 식물 및 파속 식물 각각에 포함된 단백질을 포함한 불순물들을 제거해야 한다. 착즙물을 원심분리한 후에도 상층액에는 세포밖 소포체 이외의 단백질 불순물들이 다수 포함되고 있는데, 초고속원심분리 방법과 폴리머를 기반으로 한 침강방법으로는 이들 불순물 단백질들을 제거하는 데 한계가 있다. 따라서 이러한 세포밖 소포체 이외의 물질을 제거한 후 순도를 높이기 위하여 세포밖 소포체 분리 및 정제 방법을 크기배제 크로마토그래피 방법을 이용하였으며, 효율적 분리 및 정제를 위해 한외여과(ultrafiltration)를 동반하여 분리 효율 및 순도를 높이고자 하였다.

[0107] 2) Amicon Ultra-15 10kDa Centrifugal filter (Merck Millipore, Cat. No: UFC901024)에 착즙 용액 13 mL를 넣어주고 5,000 x g로 3시간 동안 4℃에서 원심분리를 진행한 후 얻어진 상층액 0.5 mL를 200nm 시린지 필터에 가하여 Eppendorf 튜브 1.5 mL (SPL, Cat. No: 50015)에 옮겼다(도 1).

[0108] 3) 실험 클램프 스탠드에 qEV original/70 nm(Izon science, Cat.No: SP1)을 클램프에 고정한 후 qEV original 컬럼에 있던 PBS 용액을 제거한 후 1X PBS (pH7.4) 용액으로 중력으로 10 mL 평형을 진행하였다. 다음으로 이전 단계에서 여과된 배추속 식물 또는 파속 식물 착즙 용액 0.5 mL를 qEV original 컬럼에 주입하고 용액이 모두 크기배제 크로마토그래피 비드로 넘어가게 되면 PBS 용액을 넣어주었다. 이때 크기배제 크로마토그래피가 받는

중력의 힘을 일정하게 유지하기 위하여 PBS가 2 mL이 넘지 않도록 계속하여 주입하였다. 내려오는 용액을 하나의 Eppendorf 튜브 1.5 mL에 500 mL씩 담아 결과적으로 총 33개의 튜브를 얻었다(도 1 내지 도 4).

[0109] ***배추속 식물 유래 세포밖 소포체 크기 분포도 및 농도와 순도***

[0110] 1) 배추속 식물 유래 세포밖 소포체의 농도와 순도를 결정하기 위하여 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)과 단백질을 정량화하는 BCA(Bicinchoninic acid) 어세이를 이용하였다. 우선 분리한 배추속 식물 유래 세포밖 소포체의 튜브를 각각 PBS로 1:100로 희석시킨 후 NTA를 이용하여 배추속 식물 유래 세포밖 소포체(양배추 유래 세포밖 소포체: 'Cabex', 적배추 유래 세포밖 소포체: 'Rabex')의 농도와 크기 분포도를 측정하였다.

[0111] 다음으로 크기배제 크로마토그래피를 거친 용액의 단백질 농도를 확인하기 위하여 BCA 어세이를 통해 각 분획의 단백질 농도를 정량화하였다. 단백질의 농도희석을 두 가지로 측정하게 되며 처음으로 희석없이 해당 용액을 바로 찍는 과정(도 4)과 PBS와 배추속 식물 유래 세포밖 소포체를 9:1의 중량비로 희석한 샘플을 측정하여 BSA 표준곡선 내에 들어오는 단백질의 농도를 확인하였다(도 5A 및 도 5B). 도 5A는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 유래 착즙액의 분획물에 함유된 세포밖 소포체(이하, Cabax)의 농도(세포밖 소포체 입자수/mL)를 나타내는 그래프이고, 도 5B는 크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 적배추 유래 착즙액의 분획물에 함유된 세포밖 소포체(이하, Rabax)의 농도(세포밖 소포체 입자수/mL)를 나타내는 그래프이다.

[0112] ***배추속 식물 유래 세포밖 소포체의 분리 및 정제 방법에 따른 수율 및 순도의 비교***

[0113] 1) 세포밖 소포체 분리는 현재 주로 초고속원심분리법과 폴리머 침강법에 의해 이루어지고 있다. 하지만 초고속원심분리법의 경우 강한 원심력이 작용하여 물리적인 힘에 세포밖 소포체의 파쇄가 발생할 수 있으며 폴리머 침강법의 경우 세포밖 소포체 이외의 불순물을 다량으로 포함하기 때문에 순도 면에서 바람직하지 않다.

[0114] 2) 크기배제 크로마토그래피(SEC), 초고속원심분리법(UC), 폴리머 침강법(PEG)은 모두 동일한 양의 양배추 또는 적배추 착즙액 13 mL을 이용하여 배추속 식물유래 세포밖 소포체를 나노입자 추적 분석장치를 이용하여 크기 분포도를 수득하고, BCA 어세이를 통해 단백질 농도를 측정함으로써 수율, 농도 및 순도를 단백질 1 mg 당 세포밖 소포체의 양으로 계산하여 비교를 진행하였다.

[0115] 폴리머 침강법(PEG)과 초고속원심분리법(UC)의 경우 다양한 크기의 피크들이 관찰됨에 반하여 크기배제크로마토그래피(SEC)에 의해 분리된 세포밖 소포체는 적은 수의 피크를 보여, 입자 크기가 균일한 것을 알 수 있다(도 5C 내지 도 5H, 도 5I 및 도 5L).

[0116] 또한, 수율에서는 모든 방법이 통계적으로 유의성 없이 유사한 수준의 수율을 보였으나(도 5J 및 도 5M), 순도의 경우 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분리한 경우가 다른 방법에 비해 월등히 높았다(도 5K 및 도 5N).

[0117] ***배추속 식물 유래 세포밖 소포체의 세포 내 투과 확인***

[0118] 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분리된 배추속 식물 유래 세포밖 소포체의 형태를 분석하기 위하여 투과전자현미경(TEM)으로 촬영하였다. 그 결과, 상기 세포밖 소포체는 Cabex 및 Rabex 모두 평균 입자크기 50 내지 200 nm 범위의 둥근 모양을 나타내었다(도 6A 및 도 6B).

[0119] 또한, 물리적 특성을 평가하기 위하여 상기 세포밖 소포체의 순전하를 Zetasizer Nano ZS로 분석한 결과, Cabex의 제타전위는 -14.8 mV, Rabex의 제타전위는 -15.2 mV로 나타나, Cabex 및 Rabex 사이에 유의적인 차이가 없었다(도 6C).

[0120] 한편, 상술한 방법을 통해 분리된 배추속 식물 유래 세포밖 소포체가 인간 등의 세포에 작용하기 위해서는 세포에 투과되어 들어가는 과정이 필요하다. 이에, 본원발명의 방법으로 제조된 배추속 식물 유래 세포밖 소포체 역시, 세포내 투과 특성을 가지는지를 확인하고자 다음과 같이 분석하였다.

[0121] 우선, Cabex 및 Rabex를 염색하는 PKH67 염색약이 0.5%(v/v)와 상기 Cabex 및 Rabex 1 x 10^{11} particles/mL를 각각 22℃에서 15분간 반응 시킨 후 한외 여과(Ultrafiltration)을 통해 세포밖 소포체와 붙지 않은 PKH67을 여과하였고 다음으로 PKH67가 붙은 세포밖 소포체(Cabex 및 Rabex)를 실험에 이용한다.

[0122] 다음으로, 4-웰 챔버 슬라이드(4-well chambered coverglass w/non-removable wells)에 10% 소 태아 혈청(FBS)과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 인간 유래 각질 세포(HaCaT)을 2.5 x 10^{4}

cell/cm^2로 접종하였다. 48시간 이후에 세포의 배지를 제거한 후, 인산 완충액(PBS)으로 3차례 세척하였다. 모든 빛을 차단한 상태로, 엑소좀이 제거된 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 PKH67이 세포밖 소포체를 균질하게 섞은 후 다음으로 배추속 식물 유래 세포밖 소포체(크기배제 크로마토그래피를 통해 회수한 양배추 또는 적배추 유래 세포밖 세포체를 포함하는 분획물)를 첨가하여 6시간 동안 배양하였다.

[0123] 배양이 완료되면, 인산 완충액(PBS)으로 세포를 2회 세척하고, 2 μM Hoechst 33342와 Opti-MEM을 섞어 웰에 넣어준 다음, 37 ℃에서 15분간 배양하였다. 배지를 모두 제거하고, 인산 완충액(PBS)으로 2회 세척한 후 Opti-MEM을 500 μL 넣고, 공초점 현미경(Confocal microscope)을 이용하여 양배추 또는 적배추 유래 세포밖 소포체의 흡수 여부를 관찰하였다(도 6D 내지 도 6F).

[0124] 도 6D 내지 도 6F에서, 파란색은 세포 핵이고, 녹색은 양배추 유래 세포밖 소포체를 나타낸다(도 6D는 대조군; 도 6E는 Cabex; 도 6F는 Rabex). 도 6D 내지 도 6F에 나타난 바와 같이, 양배추 또는 적배추 유래 세포밖 소포체가 세포 내로 투과되어 세포질에 위치하는 것을 보여주고 있다. 이를 통해 본 발명의 양배추 또는 적배추 유래 세포밖 소포체를 투여할 경우, 세포 내로 용이하게 투과되어 흡수될 수 있음을 확인하였다.

[0126] ***다양한 세포(HaCaT, HDF, RAW 264.7 cell)에서의 세포 증식 및 세포 독성 분석***

[0127] 96웰 세포 배양 플레이트(96-well cell culture plate)에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 인간각질형성세포 (HaCaT), 정상섬유아세포(HDF) 및 대식세포(RAW264.7)를 각각 1 x 10^4 cell/cm^2로 접종하였다. 24시간이 지난 후, 각각의 세포로부터 배지를 제거하고 PBS로 세척하고, 하기와 같이 실험군과 대조군을 제조하였다.

[0128] 실험군에는 1 x 10^{11} particles/mL 농도로 양배추 식물 유래 세포밖 소포체(Cabex) 또는 적배추 식물 유래 세포밖 소포체(Rabex)를 넣어 배양하였으며, 대조군(CTRL)에는 세포밖 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다.

[0129] 세포의 증식은 WST-1 분석법(EZ-Cytox kit(대한민국 도겐 바이오))을 이용하여 분석하였고, 세포 독성 분석은 트리판 블루 배제 분석법을 이용하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1, **p<0.01 및 ***p<0.001; n = 4)로 표시하였다(도 7).

[0130] 도 7에 나타난 바와 같이, 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex) 또는 적배추 유래 세포밖 소포체를(Rabex) HaCaT, HDF 및 RAW264.7 세포 각각에 대한 배양 배지 첨가제로 사용한 경우, Cabex 또는 Rabex의 첨가에 의한 세포 증식 억제 및 세포 독성이 나타나지 않았다.

[0131] ***배추속 식물 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체의 항염증 효과***

[0132] 1) qRT-PCR 분석

[0133] Cabex, Rabex 또는 Onex(양파 유래 세포밖 소포체)의 항염증 활성을 전염증성 매개체인 COX-2와 전염증성 사이토카인(IL-1β 및 IL-6)의 발현에 미치는 영향으로 평가하였다.

[0134] 이를 위하여 6-웰 세포 배양 플레이트에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 RAW264.7 세포를 5 x 10^4 cell/cm^2로 분주하였다. 24시간이 지난 후, 각각의 세포로부터 배지를 제거하고 PBS로 세척하고, 하기와 같이 실험군과 대조군을 제조하였다.

[0135] 실험군에는 1 x 10^{11} particles/mL 농도로 Cabex, Rabex 또는 Onex(양파 유래 세포밖 소포체)를 넣어 배양하였으며, 대조군(CTRL)에는 세포밖 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다. 이어서, 0.1 ㎍/㎖의 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유도하고 24 시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 세포를 nuclease-free PBS로 두 번 세척하고 제조사의 매뉴얼에 따라 RNeasy Mini Kit(독일 Qiagen)를 이용하여 총 RNA를 분리하였으며, 분리된 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 주형으로 하여 SYBR 그린(green) 마스터 혼합물(THUNDERBIRD SYBR qPCR mix; Toyobo, Japan)과 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 qRT-PCR을 실시하여 전염증성 매개체 및 사이토카인의 발현을 측정하였다. GAPDH는 로딩 컨트롤로 사용하였다.

표 1

[0136]

프라이머	염기서열	
Murine GAPDH Forward	5' - CGGGGACCTGACTGACTACC - 3'	서열번호 1
Murine GAPDH Reverse	5' - AGGAAGGCTGGAAGAGTGC - 3'	서열번호 2
Murine IL-6 Forward	5' - GACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA - 3'	서열번호 3
Murine IL-6 Reverse	5' - CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC - 3'	서열번호 4
Murine IL-1β Forward	5' - CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG - 3'	서열번호 5
Murine IL-1β Reverse	5' - CTTCTTTGGGTATTGCTTGGGATC - 3'	서열번호 6
Murine COX-2 Forward	5' - GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCTG - 3'	서열번호 7
Murine COX-2 Reverse	5' - GTCTGCTGGTTTGGAATAGTTGC - 3'	서열번호 8

[0137] 도 8은 그 결과를 도시한 그래프로, 양배추 유래 세포밖 소포체(Cabex), 적배추 유래 세포밖 소포체(Rabex) 및 양파 유래 세포밖 소포체(Onex)은 LPS의 자극에 의해 증가된 전염증성 매개체인 COX-2 및 전염증성 사이토카인인 IL-1β 및 IL-6에 대하여 현저한 저해 효과를 나타내었다.

[0138] 2) ELISA - IL-1β 및 IL-6 발현 억제 효능 평가

[0139] ELISA 키트를 사용하여 Cabex, Rabex 또는 Onex이 세포의 전염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향을 측정하였다.

[0140] 이를 위하여 6-웰 세포 배양 플레이트에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 RAW264.7 세포를 5 x 10^4 cell/cm^2로 분주하였다. 24시간이 지난 후, 각각의 세포로부터 배지를 제거하고 PBS로 세척하고, 하기와 같이 실험군과 대조군을 제조하였다.

[0141] 실험군에는 1 x 10^{11} particles/mL 농도로 Cabex, Rabex 또는 Onex를 넣어 배양하였으며, 대조군(CTRL)에는 세포밖 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다. 이어서, 0.1 ㎍/㎖의 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유도하고 24 시간 동안 배양하였다. 그 다음 각 웰의 상층액의 전염증성 사이토카인 발현 수준을 마우스 IL-6 DuoSet ELISA 키트(R&D 사)를 사용하여 정량하였다(도 9).

[0142] 도 9A 및 도 9B는 그 결과를 도시한 그래프로, Cabex, Rabex 및 Onex는 LPS의 자극에 의해 증가된 전염증성 사이토카인인 IL-1β 및 IL-6에 대하여 현저한 저해 효과를 나타내었다.

[0143] 3) 웨스턴 블롯 분석 - COX-2 발현 억제 효능 평가

[0144] 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 Cabex 및 Rabex가 세포의 전염증성 매개체인 COX-2 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0145] 이를 위하여 6-웰 세포 배양 플레이트에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 RAW264.7 세포를 5 x 10^4 cell/cm^2로 접종하고 배양하였다. 24시간이 지난 후, 각각의 세포로부터 배지를 제거하고 PBS로 세척하고, 하기와 같이 실험군과 대조군을 제조하였다.

[0146] 실험군에는 1 x 10^{11} particles/mL 농도로 Cabex 및 Rabex를 넣어 배양하였으며, 대조군(CTRL)에는 세포밖 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다. 이어서, 0.1 ㎍/㎖의 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유도하고 24 시간 동안 배양하였다. 그 다음 각 웰의 상층액의 전염증성 매개체인 COX-2의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 확인하였으며, 이를 ChemiDoc XRS + System(Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였다(도 9).

[0147] 도 9C 및 도 9D는 그 결과를 도시한 그래프로, Cabex 및 Rabex는 LPS의 자극에 의해 증가된 전염증성 매개체인 COX-2에 대하여 현저한 저해 효과를 나타내었다.

[0148] **결론**

[0149] 염증은 신체의 면역 반응 시스템이며, 외부에서 병원균을 제거하고 조직 항상성을 유지하는데 필수적인 역할을 한다. 그러나, 열과 두통과 같은 지속적인 만성 염증이 발생할 수 있으며, 폐렴으로 진행되기도 한다. 따라서 다양한 염증성 질환에서 만성 염증의 억제 기술이 필요한 실정이지만 첨가 물질의 안전성과 효율성 문제가 대두되고 있다.

[0150] 본 발명의 배추속 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체는 인체 내에 처리가 가능하게끔 크기배제 크로마토그래피

를 통해 고순도, 고효율로 정제한 것으로, 세포 내 투과가 잘 이루어진다. 또한, 세포 내로 전달된 세포밖 소포체가 염증의 주요 원인인 전염증성 매개체인 COX-2 및 전염증성 사이토카인인 IL-1β 및 IL-6의 발현을 모두 효과적으로 억제하는 것으로 나타나, 염증 질환의 개선, 치료 또는 예방을 위한 소재로 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0151] 따라서, 본 발명의 배추속 또는 파속 식물 유래 세포밖 소포체는 경구 투여가 가능하며 식물로부터 대량 생산이 가능하기 때문에 건강기능식품 또는 화장품의 제조에 적용이 가능하다. 또한, 약리성분을 탑재할 수 있어 위에 언급한 질병 치료 시 약물 전달체로 활용될 수 있다.

[0152] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한, 첨부된 청구범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

도면1





도면2





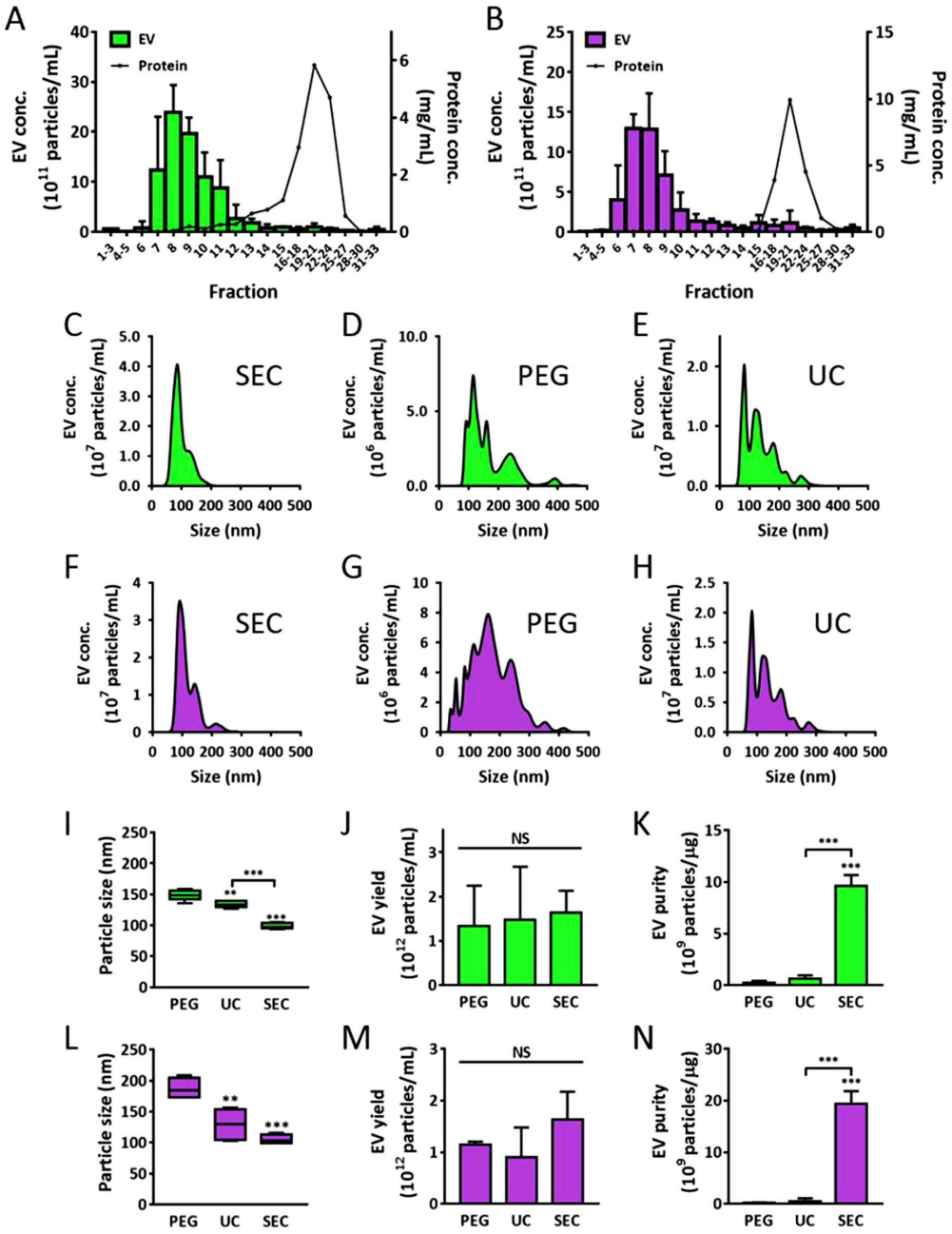

도면3



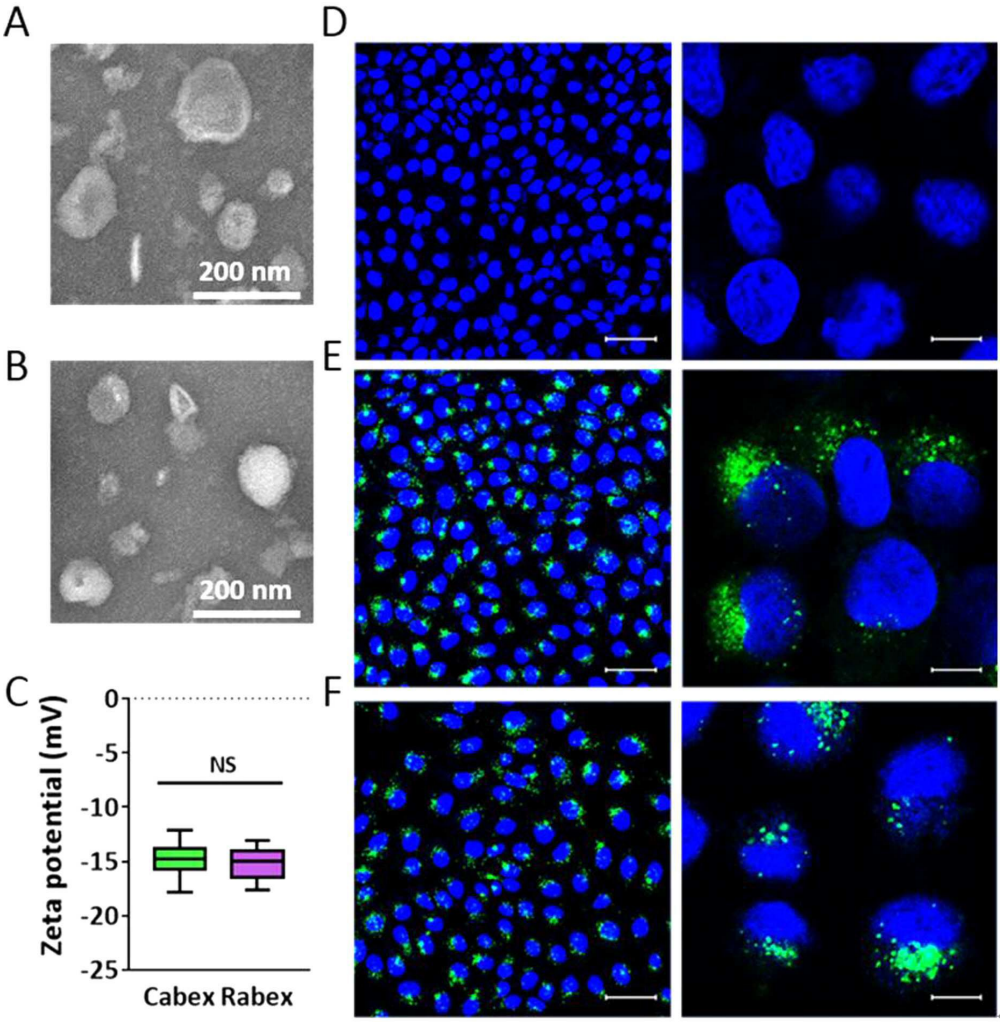
도면4



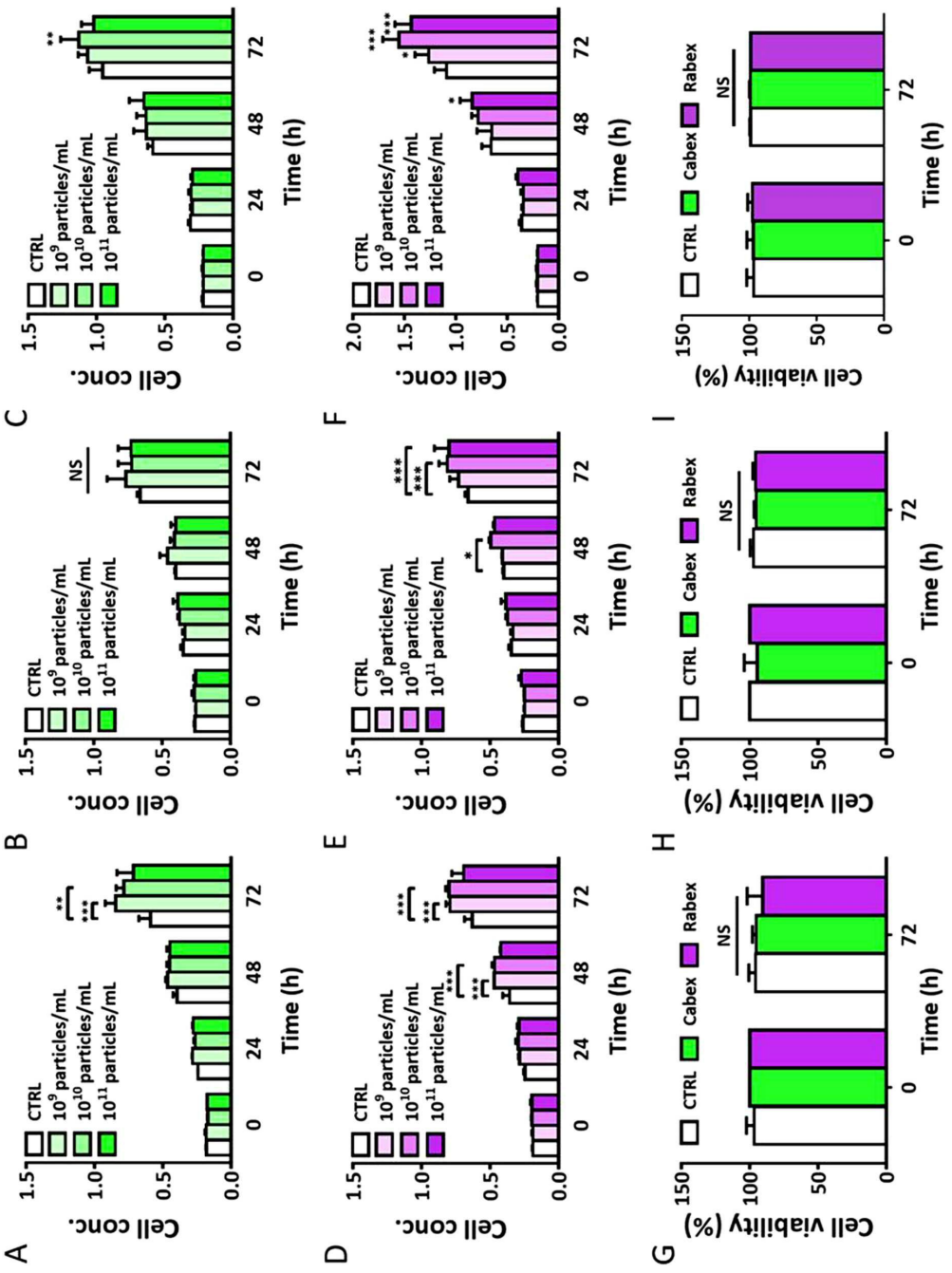
도면5


A
EV
Protein
EV conc. (10^11 particles/mL)
Protein conc. (mg/mL)
Fraction
B
EV
Protein
EV conc. (10^11 particles/mL)
Protein conc. (mg/mL)
Fraction
C
SEC
EV conc. (10^7 particles/mL)
Size (nm)
D
PEG
EV conc. (10^6 particles/mL)
Size (nm)
E
UC
EV conc. (10^7 particles/mL)
Size (nm)
F
SEC
EV conc. (10^7 particles/mL)
Size (nm)
G
PEG
EV conc. (10^6 particles/mL)
Size (nm)
H
UC
EV conc. (10^7 particles/mL)
Size (nm)
I
Particle size (nm)
PEG
UC
SEC
J
NS
EV yield (10^12 particles/mL)
PEG
UC
SEC
K
EV purity (10^9 particles/μg)
PEG
UC
SEC
L
Particle size (nm)
PEG
UC
SEC
M
NS
EV yield (10^12 particles/mL)
PEG
UC
SEC
N
EV purity (10^9 particles/μg)
PEG
UC
SEC

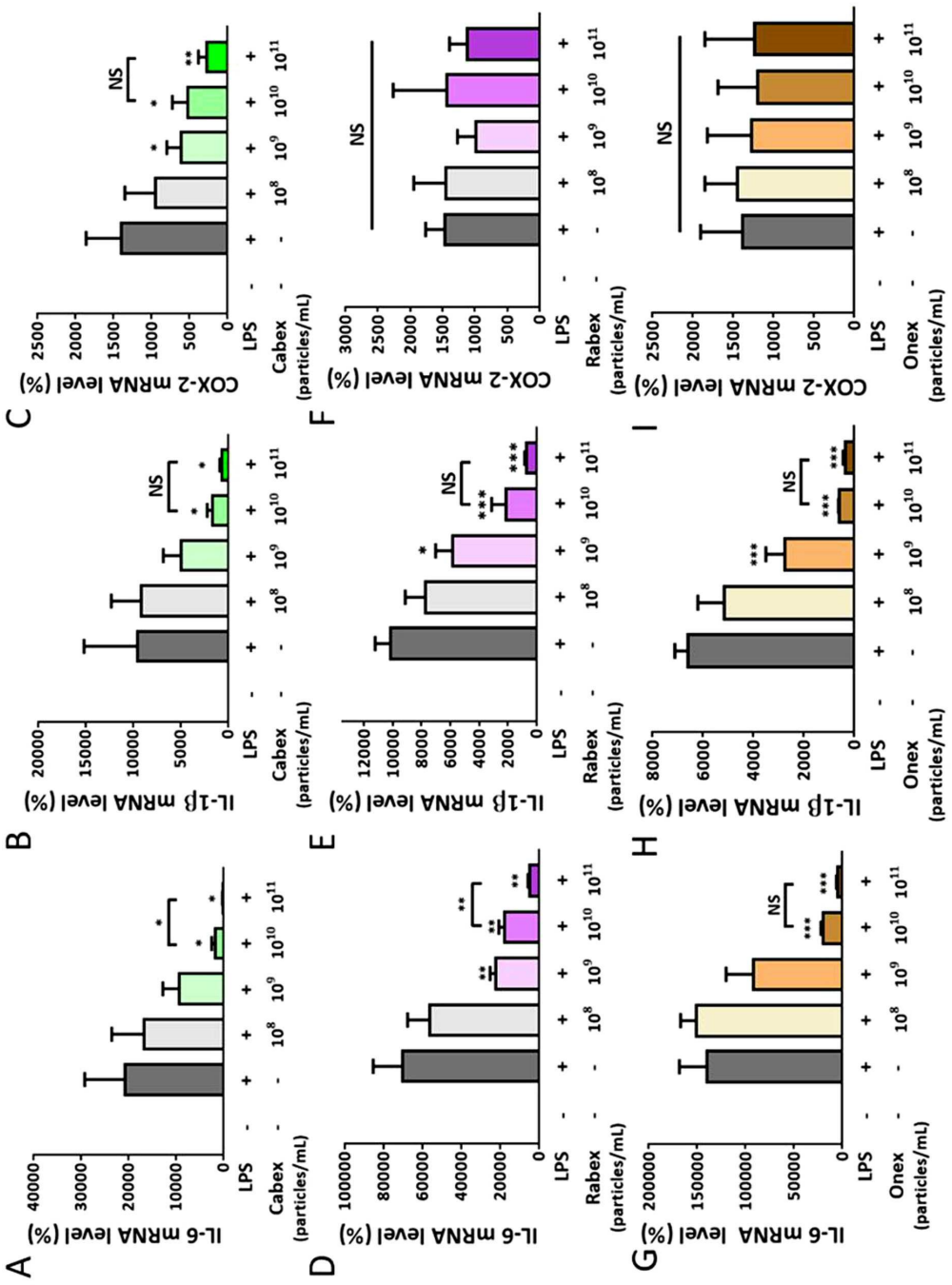
도면6


A
200 nm
B
200 nm
C
Zeta potential (mV)
0
-5
-10
-15
-20
-25
NS
Cabex Rabex
D
E
F

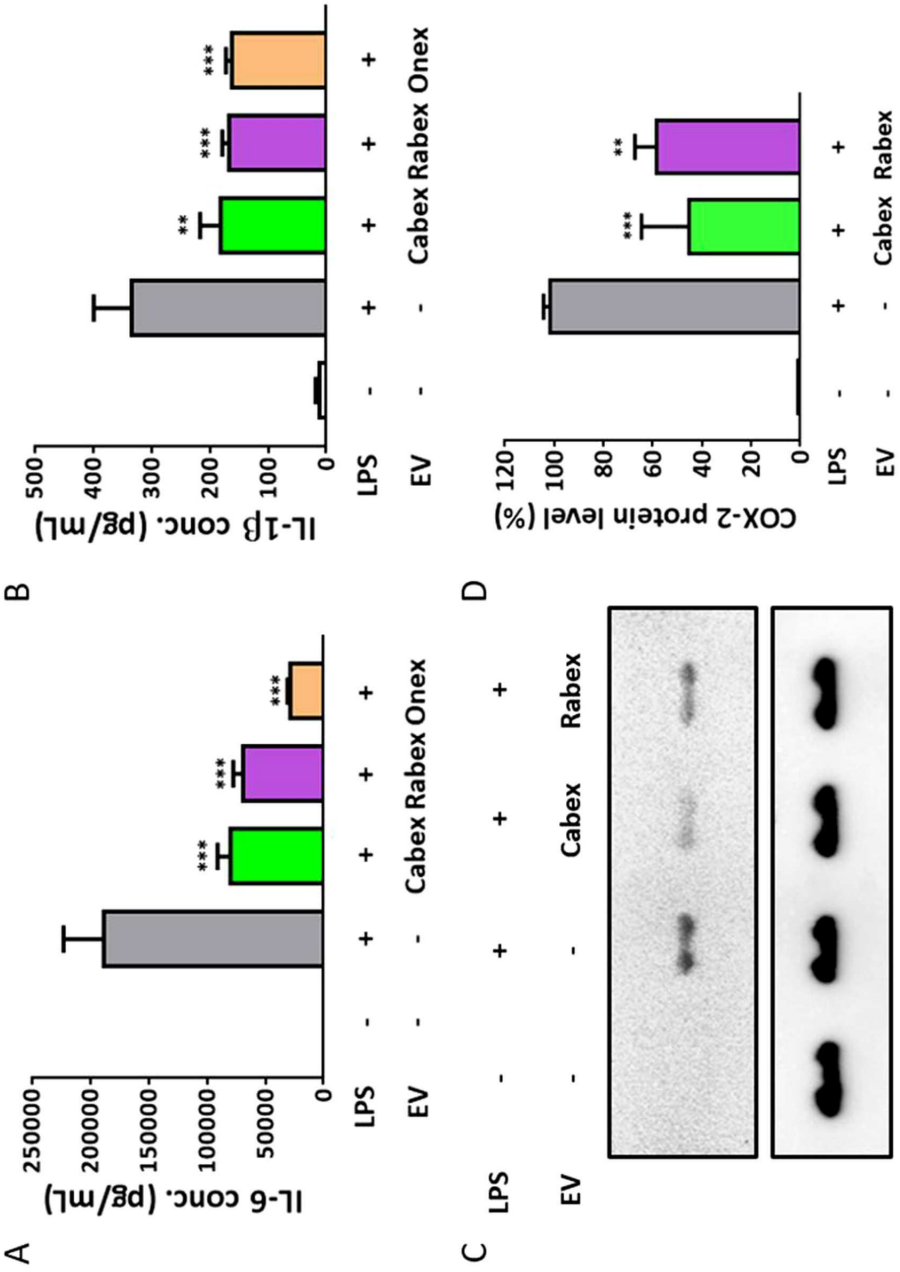
도면7


A
B
C
D
E
F
G
H
I
Cell conc.
Time (h)
CTRL
10^9 particles/mL
10^10 particles/mL
10^11 particles/mL
Cell viability (%)
Cabex
Rabex
NS

도면8


A
IL-6 mRNA level (%)
LPS
Cabex
(particles/mL)
B
IL-1β mRNA level (%)
C
COX-2 mRNA level (%)
D
IL-6 mRNA level (%)
Rabex
E
IL-1β mRNA level (%)
F
COX-2 mRNA level (%)
G
IL-6 mRNA level (%)
Onex
H
IL-1β mRNA level (%)
I
COX-2 mRNA level (%)
NS

도면9



서 열 목 록

<110> INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Composition for Preventing, Improving or Treating Inflammatory Diseases Comprising Brassica spp. or Allium spp.-Derived Extracellular Vesicles as Active Ingredients

<130> HP9548

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine GAPDH Forward

<400> 1

cggggacctg actgactacc 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine GAPDH Reverse

<400> 2

aggaaggctg gaagagtgc 19

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine IL-6 Forward

<400> 3

gacaaagcca gagtccttca gaga 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine IL-6 Reverse

<

400> 4

cactaggttt gccgagtaga tctc 24

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine IL-1B Forward

<400> 5

ccagcttcaa atctcacagc ag 22

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine IL-1B Reverse

<400> 6

cttctttggg tattgcttgg gatc 24

<210> 7

<211>

22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine COX-2 Forward

<400> 7

gaagtctttg gtctggtgcc tg 22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine COX-2 Reverse

<400> 8

gtctgctggt ttggaatagt tgc 23