

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0092025
(43) 공개일자 2021년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/28 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0005495

(22) 출원일자 2020년01월15일

심사청구일자 2020년01월15일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김연주

경기도 성남시 분당구 동판교로 275, 107동 801호(삼평동, 붓들마을1단지)

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)

(뒷면에 계속)

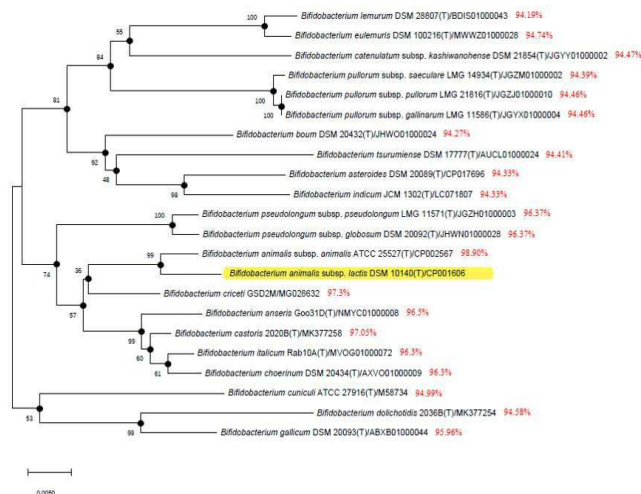
(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **영경귀 발효물 제조방법 및 이의 방법으로 제조된 항염증용 조성물****(57) 요약**

본 발명은 프로바이오틱스 균주 *B.Lactis*로 발효한 영경귀 추출물 (CJ)이 생체 내에서 LPS-자극된 신경 염증에 보다 효과적인 효과를 나타냄을 확인하였다. 영경귀 발효물 (BCJ)의 항염증 효과는 BV2 미세아교세포 및 RAW 264.7 대식세포에서 M1 표현형의 하향 조절 및 M2 표현형의 상향 조절을 통해 이루어지고, 이러한 결과는 생물 변형된 영경귀 추출물 (CJ)의 약리학적 효과에 대한 이해를 넓히고 영경귀 추출물 (BCJ)이 미세아교세포 / 대식세포 분극 관련 염증성 질환에 이용 될 수 있음을 나타낸다.

대표도 - 도2

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)

이상현

경기도 평택시 평남로 671, 108동 502호(비전동,
 비전 경남아너스빌)

(72) 발명자

천범민

서울특별시 성북구 지봉로23길 36, 4층(보문동2가)

유영

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교
 실험연구동 B, 113호(서천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20190541
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구
연구과제명	신장 및 간세포에서 uric acid 축적을 억제하는 신규 희귀사포닌 금나노 곤충 펩타이드 결합체 대량생산 및 작용메카니즘 규명(1/3)

기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1A2A2A05069493
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업(후속)
연구과제명	헌팅틴질환 동물모델에서 미세아교세포 활성화의 병리 기능 및 치료기술 연구

AAV/DJ 벡터와 shRNA 활용

기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.09.01 ~ 2020.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

영경귀 분말을 용매로 추출하는 단계 (1단계);

상기 1단계의 추출물을 초음파 처리하는 단계 (2단계);

상기 2단계의 초음파 처리된 추출물을 필터를 통해 여과하는 단계 (3단계);

비피도박테리움 아니말리스 락티스를 MRS 배지에 접종하는 단계 (4단계); 및

상기 3단계의 영경귀 추출물을 상기 4단계의 비피도박테리움 아니말리스 락티스가 접종된 MRS 배지에서 함께 배양하여 발효시키는 단계 (5단계);를 포함하는, 영경귀 발효물 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 1단계의 용매는 정제수, 메탄올 (methanol), 에탄올 (ethanol), 프로판올 (propanol), 이소프로판올 (isopropanol), 부탄올 (butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤 (acetone), 에테르 (ether), 벤젠 (benzene), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 메틸렌클로라이드 (methylene chloride), 헥산 (hexane) 및 시클로헥산 (cyclohexane) 중 어느 하나 이상인, 영경귀 발효물 제조 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 2단계의 초음파 처리하는 단계는 35 내지 450Hz에서 40 내지 50분 동안 초음파 처리하는 것인, 영경귀 발효물 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 3단계의 여과하는 단계는 0.20 내지 0.25 μ m 필터 막을 통해 여과하는 것인, 영경귀 발효물 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 4단계의 비피도박테리움 아니말리스 락티스를 접종하는 단계는 인큐베이터에서 교반하지 않고 35 내지 40℃에서 24시간 동안 0.03 내지 0.07% L-cysteine-HCl 용액이 보충된 멸균 MRS 배지에 혐기적으로 접종하는 것인, 영경귀 발효물 제조방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 영경귀 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 염증성 질환은 크론병, 홍반병, 당뇨병, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성

폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 근막 질환, 바이러스 감염(에컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 및 궤양성 대장으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 DPPH 라디칼 소거 활성 효과를 가지는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 iNOS, COX-2, IL-1 β 및 IL-6 mRNA의 발현을 감소시키는 효과를 가지는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 ERK 및 p38 활성을 억제시키는 효과를 가지는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 NF- κ B 활성을 억제시키는 효과를 가지는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum* var. *maackii*) 발효물의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 항염증용 (anti-inflammatory) 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 엉겅퀴는 국화과에 속하는 여러해살이풀이다. 한국, 일본, 중국 북동부에 분포하며, 가시나물 또는 항가새라고도 한다. 높이는 50-100cm이고 전체에 흰 털과 더불어 거미줄 같은 털이 있다. 뿌리잎은 꽃필 때까지 남아 있고 줄기잎보다 크다. 줄기잎은 피침상 타원형으로 깃처럼 갈라지고 밑은 원대를 감싸며 갈라진 가장자리가 다시 갈라지고 결각상의 톱니와 더불어 가시가 있다. 꽃은 6-8월에 피고 자주색에서 적색이다. 총포의 포편은 7-8열로 배열하고 안쪽일수록 길어진다. 열매는 수과이며 관모는 길이 16-19mm이다. 잎이 좁고 녹색이며 가시가 다소 많은 것을 좁은잎 엉겅퀴, 가시가 많은 것을 가시엉겅퀴라고 한다.

[0003] 한편, 발효에 사용되는 균주 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *B. lactis*)는 대장에 주로 서식하며 작용하는 프로바이오틱스로 면역력 향상, 염증 완화, 소화 개선, 콜레스테롤 감소 등의 효능이 있다. 비피도박테리움 아니말리스 락티스의 면역반응 조절은 장 세포에서 면역반응을 조절하는 신호물질 (Cytokines) 생성, 수지상세포 (Dendritic Cell)와 대식세포 (Macrophage) 활성화, 면역세포인 T 세포 (T Cell)와 B 세포 (B Cell)의 증식과 항체 생성 자극 등을 통해 이루어 진다.

[0004] 한편, 염증은 자가 면역질환으로 비 이상적인 면역관련 인자의 생성과 작용으로 발생한다. 지속적인 염증반응은

조직의 손상을 촉진하고 관절염, 당뇨병, 동맥경화 등과 퇴행성 면역질환의 원인이 된다. 특히, 만성적인 염증은 치료가 어려운 만성 및 퇴행성 질환의 원인이 되므로, 암, 심혈관 질환, 치매, 당뇨, 비만 등의 치료가 어려운 다양한 만성 및 퇴행성 질환 치료에 있어 '염증반응의 조절을 통한 접근'이 새로운 패러다임으로 부각되고 있다 (Aggarwal, et al., Biochemical Pharmacology, 72:1605-1621, 2006; Coussens, et al., Nature, 420:860-867, 2002, Hwang, et al., Biochemical pharmacology, 54:87-96, 1997, Turini, et al., Annual Review of Medicine, 53:35-57, 2002). 염증반응 시 IL-6 (interleukin-6), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 IL-1 β 등의 염증 매개 사이토카인의 생성은 염증반응에 관여하며, 염증반응을 조절하는 주요한 효소인 iNOS (inducible NOS) 및 COX-2 (cyclooxygenase-2)가 NO (nitric oxide) 및 PGE2 (prostaglandin E2)와 같은 다양한 염증매개들을 생산하여 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있고, 이들을 억제함으로써 염증질환을 억제할 수 있음이 보고되고 있다 (Moran EM. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 21(2):193-201. 2002).

[0005] 또한, 이처럼 다양한 염증 매개체들의 발현은 전사인자인 NF- κ B (nuclear factor-kappaB), MAPK (mitogen activated protein kinase)를 포함한 여러 가지 염증매개 신호 네트워크의 활성화를 통하여 외래인자의 탐식작용을 활성화시키고 염증반응에 관여하게 된다. 따라서 이들의 생성을 저해하고 조절할 수 있는 물질은 염증 질환을 치료하거나 예방하는 자원으로 활용될 수 있다.

[0006] 따라서, 본 발명에서는 전통적으로 이뇨제, 지혈제 및 해독제로 사용되고 있는 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum* var. *maackii*; CJ) 추출물 (E-CJ)을 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *B. lactis*)로 발효시켜 엉겅퀴 발효물 (B-CJ)을 제조하였고, 이는 in vivo 및 in vitro에서 미세아교세포/대식세포 분극을 조절하여 항염증과 신경보호 효과의 향상을 확인하였다. 즉, 이를 통해 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물로 사용될 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum* var. *maackii*; CJ) 추출물 (E-CJ)의 발효 최적화 조건을 제공하는 것이다. 더욱 구체적으로는 프로바이오틱스 균주인 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *B. lactis*)를 활용하여 엉겅퀴 발효물 (B-CJ)을 생산하고, 이의 제조방법에 대해 제공하는 것이다.

[0008] 아울러, 본 발명의 목적은 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 엉겅퀴 분말을 용매로 추출하는 단계 (1단계); 상기 1단계의 추출물을 초음파 처리하는 단계 (2단계); 상기 2단계의 초음파 처리된 추출물을 필터를 통해 여과하는 단계 (3단계); 비피도박테리움 아니말리스 락티스를 MRS 배지에 접종하는 단계 (4단계); 및 상기 3단계의 엉겅퀴 추출물을 상기 4단계의 비피도박테리움 아니말리스 락티스가 접종된 MRS 배지에서 함께 배양하여 발효시키는 단계 (5단계);를 포함하는, 엉겅퀴 발효물 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 1단계의 “용매”는 정제수, 메탄올 (methanol), 에탄올 (ethanol), 프로판올 (propanol), 이소프로판올 (isopropanol), 부탄올 (butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤 (acetone), 에테르 (ether), 벤젠 (benzene), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 메틸렌클로라이드 (methylene chloride), 헥산 (hexane) 및 시클로헥산 (cyclohexane) 중 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 2단계의 “초음파 처리하는 단계”는 35 내지 450Hz에서 40 내지 50분 동안 초음파 처리하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 3단계의 “여과하는 단계”는 0.20 내지 0.25 μ m 필터 막을 통해 여과하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 4단계의 “비피도박테리움 아니말리스 락티스를 접종하는 단계”는 인큐베이터에서 교반하지 않고 35 내지 40℃에서 24시간 동안 0.03 내지 0.07% L-cysteine-HCl 용액이 보충된 멸균 MRS 배지에 혐기적으로 접종하는 것 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기의 제조방법으로 제조된 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “염증성 질환”은 크론병, 홍반병, 당뇨병, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 근막 질환, 바이러스 감염(에컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 및 궤양성 대장으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 DPPH 라디칼 소거 활성 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 iNOS, COX-2, IL-1 β 및 IL-6 mRNA의 발현을 감소시키는 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 ERK 및 p38 활성을 억제시키는 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 NF- κ B 활성을 억제시키는 효과를 가지는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 아울러, 본 발명은 상기의 제조방법으로 제조된 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따르면, 프로바이오틱스 균주 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *B. lactis*)로 발효하여 엉겅퀴 추출물 (*Cirsium japonicum* var. *maackii*; CJ)을 엉겅퀴 발효물 (BCJ)로 제조하였고, 이는 생체 내에서 LPS-자극된 신경 염증에 보다 효과적인 효과를 나타냄을 확인하였다. 엉겅퀴 발효물의 항염증 효과는 BV2 미세아교세포 및 RAW 264.7 대식세포에서 M1 표현형의 하향 조절 및 M2 표현형의 상향 조절을 통해 이루어지고, 이러한 결과는 생물 변형된 엉겅퀴 추출물 (CJ)의 약리학적 효과에 대한 이해를 넓히고 발효엉겅퀴 (BCJ)가 미세아교세포 / 대식세포 분극 관련 염증성 질환에 이용 될 수 있음을 나타낸다. 즉, 상기 방법으로 제조된 엉겅퀴 발효물의 항염증효과를 확인하여 엉겅퀴 발효물을 포함하는 항염증 조성물로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 엉겅퀴 추출물 (A) 및 엉겅퀴 추출 발효물 (B)의 HPLC 데이터를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *B. lactis*) 균주의 계통 발생 트리를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 CJ (엉겅퀴 추출물) 및 BCJ (엉겅퀴 발효물)의 DPPH 라디칼 소거 활동 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 CJ (엉겅퀴 추출물) 및 BCJ (엉겅퀴 발효물)의 세포 생존력을 분석한 도이다.
- 도 5는 본 발명의 CJ (엉겅퀴 추출물) 및 BCJ (엉겅퀴 발효물)의 아질산염 (NaNO₂)의 생성정도를 확인한 도이다.
- 도 6은 본 발명의 헤마에서 Iba-1에 대한 형광면역염색 결과 및 이를 정량적 그래프로 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 해마에서 염증성 사이토 카인인 IL-6, iNOS, COX-2 및 IL-1 β mRNA 수준의 RT-PCR 결과 및 이를 정량적 그래프로 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 BCJ (영경귀 발효물)로 전처리하고 LPS 또는 IL-4로 처리하여 RAW 264.7 및 BV2 세포에서 M1 유형 (염증성) 또는 M2 유형 (항 염증성)을 유도한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 LPS-자극된 RAW 264.7 세포에서 반응성 산소종 (ROS, 녹색) 및 미토콘드리아 과산화물 (MitoSOX, 적색) 생성에 대한 BCJ의 영향을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 RAW 264.7 세포에서 LPS-자극된 MAPK 활성화에 대한 BCJ의 효과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 RAW 264.7 세포에서 LPS-자극된 NF- κ B 활성화에 대한 BCJ의 효과를 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명의 RAW 264.7 대식세포에서 핵인자- κ B (NF- κ B)의 LPS-자극 핵 전좌에 대한 BCJ의 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0029] 일 측면에서, 본 발명은 영경귀 추출물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0030] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 영경귀로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 영경귀로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올 (methanol), 에탄올 (ethanol), 프로판올 (propanol), 이소프로판올 (isopropanol), 부탄올 (butanol) 등을 포함하는 탄소 수 1 내지 4의 알코올, 아세톤 (acetone), 에테르 (ether), 벤젠 (benzene), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 메틸렌클로라이드 (methylene chloride), 헥산 (hexane) 및 시클로헥산 (cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0031] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출

물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피 (thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분리된 화합물, 분획 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0033] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 항염증 조성물에 관한 것이다.

[0034] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0035] 일 구현예에서, 염증성 질환은 크론병, 홍반병, 당뇨병, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디션씨 병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로 증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 근막 질환, 바이러스 감염 (예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 중증 근무력증, 메니에르 증후군 (Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군 (Guilian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군 (Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 및 궤양성 대장으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0037] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 주사 제형이 더욱 바람직하다.

[0038] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 염증 또는 염증성 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콜디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될

수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 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 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0044] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0045] 본 발명의 약학 조성물은 기존의 항염 조성물과 함께 투여함으로써, 항염증 효과를 증가시킬 수 있다. 병용 투여는 기존의 항염 조성물과 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다.

[0047] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0048] 본 발명의 엉겅퀴 발효물을 건강기능식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 엉겅퀴 발효물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 양염증 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0051] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 엉겅퀴 발효물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔

디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0052] 본 발명의 엉겅퀴 추출물의 엉겅퀴는 국화과에 속하는 여러해살이풀이며, 이를 인체에 무해한 프로바이오틱스 균주를 이용하여 엉겅퀴 발효물로 제조하므로 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 사용할 경우에 일반적인 합성 화합물에 비하여 부작용이 덜할 수 있으므로, 안전하게 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 포함 되어 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] 준비예 1. 화학물질 및 시약 준비

[0057] MRS (deMan, Rogosa, and Sharp) 배지 (broth)와 아가 (agar)는 Becton, Dickinson and Company (BD, San Jose, CA USA)에서 구입했다. MEM 배지, 페니실린-스트렙토마이신 (penicillin-streptomycin) 및 소태아혈청 (fetal bovine serum; FBS)은 GenDEPOT (Katy, TX, USA)에서 구입하였다. cirsimarin, hispidulin 및 cirsimaritin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. 2,2-디페닐-1-피크릴하이드라질 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH), 디메틸 설펝사이드 (dimethyl sulfoxide; DMSO) 및 3-(4,5-디메틸디아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입 하였다.

[0059] 실시예 1. 엉겅퀴 추출물 (CJ 또는 ECJ)을 이용한 엉겅퀴 발효물 제조방법

[0060] 1.1 엉겅퀴 추출물 (CJ) 제조

[0061] 건조된 엉겅퀴 샘플 (*Cirsium japonicum* var. *maackii*)은 Imsil Herbal Medicine (Imsil-gun, Jeollabuk-do, Korea)에서 입수했다. 건조된 샘플을 10배 부피의 70% 에탄올로 추출하고, 혼합물을 65℃에서 3시간 동안 환류 시켰다. 그 후, 25℃에서 진공 여과 한 후 여과액으로서 총 엉겅퀴 추출물을 얻었다. 상기 엉겅퀴 추출물에 상 청액을 합하고 회전 증발기로 45℃에서 감압하에 증발시켜 점성 잔류물을 수득 하였다. 마지막으로 0℃의 오븐 에서 건조시켰고, 엉겅퀴 추출물은 추가 사용까지 -20℃에서 냉장고에 보관하였다.

[0063] 1.2 엉겅퀴 추출물 (CJ)의 HPLC (High-performance liquid chromatography) 분석 및 LC-MS 조건

[0064] 엉겅퀴 잎 및 줄기의 분말을 0.45mm 체를 통해 체로 쳤다. 총 0.5 μg의 건조 된 분말을 정확하게 칭량하고 25ml 메탄올로 추출 하였다. 현탁액을 45분 (40Hz) 동안 초음파 처리 하였다. 이어서, 샘플을 0.22 μm 필터 막을 통해 여과 하였다. 각각의 샘플을 2회 분석하고, 본 실험에서 5개의 생물학적 복제물을 제조 하였다. Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에서 HPLC 분석을 수행하였다. 엉겅퀴 에탄올 추출물의 성분을 조사하기 위해 Agilent TC C18 컬럼 (4.6mm x 250mm, 5 μm)을 사용하였다. 이원 구배 용리 시스템은 용매 A (acetonitrile solution) 및 용매 B (0.05% phosphoric: water solution)로 구성되었다. 또한, 다음의 용리 구배를 사용하여 분리 공정을 수행 하였다 : 0-5분, 10% A; 5-10분, 10-15% A; 10-15분, 15-20% A; 15-28분, 20-25% A; 28-33분, 25-30% A; 33-68분, 30-35% A; 68-81분, 35-50% A; 81-91분, 50-90% A; 91-96분, 90% A; 96-115분, 10% A. 유속은 1mL/min이고 주입량은 20 μL였고, UV 검출 파장은 203nm였다. 엉겅퀴 추출물의 HPLC 분석 데이터는 도 1의 A에 나타내었다. 정량 분석은 외부 보정 방법으로 구성되었다. 15개의 기준 화합물을 함유하는 원액을 제조하고 보정 곡선의 구성을 위해 적절한 농도로 희석 하였다. 피크 면적 대 각 분석 물의 농도를 플롯팅하여 교정 곡선을 생성 하였다. 신호 대 잡음비 3을 생성하는 검출 한계 및 현재 크로 마토 그래피 조건 하에서 정량화하는 신호 대 잡음비 ≥ 10을 생성 하였다. 각 표준은 3회 작성되었다. 이 방법의 복구는 표준 추가 방법을 사용하여 달성되었다. 3개의 상이한 농도 수준 (100ng/mL, 1,000ng/mL, 2,000 ng/mL)의 표준 물질을 샘플에 3회 첨가 하였다. 평균 회수율은 다음 공식에 의해 결정되었다 : 회수율 (%) = (관찰 량 - 최초량) / 스파이크량 × 100%, 상대 표준 편차 (%) = (표준 편차 / 평균) × 100 %.

[0066]

1.3 영경귀 발효물 (BCJ) 제조 및 HPLC 분석

[0067]

요거트에서 분리된 프로바이오틱스 균주 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *B. lactis*)는 한국 회사로부터 입수하였으며, 확인된 16S rRNA 서열은 NCBI GenBank에 수탁 번호 CP001606으로 기탁되었다. 구축된 계통 발생 수는 도 2에 나타내었다. 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*B. lactis*)를 먼저 활성화시킨 다음 인큐베이터에서 교반하지 않고 37℃에서 24시간 동안 0.05% L-cysteine-HCl 용액 (Sigma-Aldrich, Singapore)이 보충된 멸균 MRS 배지에 혐기적으로 접종 하였다. 영경귀 추출물 (최종 농도 0.7, 1.32 및 4.1 mg/mL)을 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*B. lactis*)와 배양하여 37℃에서 발효시키고, 24, 48 및 72시간에 분석을 위해 샘플을 수집 하였다. 박테리아 세포를 첨가하지 않고 비피도박테리움 아니말리스 락티스 (*B. lactis*)에 대해 MRS 배지 중의 영경귀 추출물 (CJ) 및 0.05% L-cysteine-HCl로 이루어진 음성 대조군을 각 농도로 포함시켰다. 대조군의 배양 조건은 박테리아가 첨가 된 발효 샘플의 배양 조건과 일정하게 유지되었다. 각각의 규정된 발효 시점에 도달했을 때, 발효된 샘플 및 이들의 대조군을 30분 동안 초음파 처리하고 원심 분리 (3,000rpm, 4℃, 10분)하여 발효를 정지시키고 추가 연구를 위해 상청액을 수집 하였다.

[0068]

발효된 샘플 및 각각의 시점에서의 제어는 사전 조정된 C-18 Sep-Pak 카트리지에 개별적으로 로딩되었다. Zhang 등 (2012)의 변형된 방법을 사용하여, 50mL의 증류수를 사용해 카트리지를 세척하고 인산염 (phosphate) 완충액을 제거 하였다. 그 후, 대사물을 HPLC 분석을 위해 진공하에 10mL로 농축시켰다. 영경귀 발효물의 HPLC 분석 데이터는 도 1의 B에 나타내었다. 이를 통해 발효전의 주요지표물질인 cirsimarín의 분해되어 소수성 (hydrophobic) 물질로 바뀌었고 추출된 발효후 물질의 지표물질은 기존 분석으로는 peak가 미검출되었으며 발효 전환후 물성이 완전히 바뀌었음을 확인할 수 있었다.

[0070]

실시예 2. 영경귀 발효물의 항염증 효과 분석

[0071]

2.1 DPPH 라디칼 소거 활동 분석

[0072]

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 약간의 변형을 갖는 전술 한 방법에 따라 결정되었다. 40 μ L의 샘플 용액을 96-웰 플레이트에서 160 μ L의 0.2mM DPPH 용액과 혼합 하였다. 어두운 곳에서 30분 동안 배양한 후, 분광 광도계 마이크로 플레이트 리더 (SpectraMax® ABS plus; San Jose, CA, USA)를 사용하여 혼합물의 흡광도를 517nm에서 측정하였다. 갈산 (Gallic acid)은 표준 항산화 제로 사용되었습니다. 활성은 하기 식에 따라 DPPH 라디칼 소거의 백분율 형태로 나타내었다 : 억제 (%) = [(제어의 흡광도-시험의 흡광도) / 제어의 흡광도] $\times$ 100

[0073]

항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능 분석에 의해 결정되었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 1, 2 및 4mg/mL에서 CJ (영경귀 추출물)의 DPPH 라디칼 소거 활성은 32.98%, 40.46% 및 62.76%를 보여 주었고 BCJ (영경귀 발효물)은 73.50%, 75.55% 및 88.01%를 나타냈다. 비교를 위한 양성 대조군 갈산 (1mg/mL)의 항산화 활성은 95.05%였다. 특히, BCJ의 DPPH 라디칼 소거 활성은 1mg/mL에서 CJ (영경귀 추출물)보다 40% 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 추가 연구를 위해 1mg/mL의 BCJ (영경귀 발효물)를 수집 하였다.

[0075]

2.2 실험군 및 전신 염증 모델 및 형광면역염색

[0076]

수컷 성인 C57BL/6J 마우스 (Narabiotec Co., Ltd., Seoul, South Korea; 무게 23-25g)를 12시간의 명암주기, 온도 (23 $\pm$ 2℃), 음식 및 물을 임의로 섭취할 수 있는 습도 조절된 주거시설에 수용 하였다. 이는 경희대학교 동물 관리위원회의 승인을 받아 동물 관리 및 절차를 진행하였다. 주거시설의 상태에 1주간 적응시킨 후, 동물을 6개의 그룹 (n=6/그룹)으로 나누었다. 컨트롤 그룹 (nonstress + saline), LPS 그룹 (LPS+ saline), 영경귀 발효물 BCJ 100 (LPS+ BCJ 100 mg/kg), BCJ 200 (LPS+ BCJ 200 mg/kg), 영경귀 추출물 CJ 100 (LPS+ CJ 100 mg/kg) 및 CJ 200 (LPS+ CJ 200 mg/kg). BCJ 및 CJ (100 및 200 mg/kg/day) 및 발열원이 없는 멸균 등장성 식염수를 2 일 동안 경구 투여하고 LPS (4 mg / kg)를 복강 내 투여하여 전신 염증을 유도 하였다. 이후, 마우스 뇌를 절제하고 슬라이스를 Iba-1 면역 형광, RT-PCR 및 웨스턴 블롯 연구 (western blot)에 사용 하였다.

[0077]

각 그룹으로부터의 마우스 (그룹당 n=5)에 4% 파라포름알데히드를 관류시켰다. 그들의 뇌를 제거하고 동일한 고정액 (4% 파라포름알데히드)으로 고정시켰다. 전전두엽 피질, 해마 또는 편도체의 뇌 절편을 크라이오스탯 CM3005 (Leica Instruments, Nussloch, Germany)를 사용하여 30 μ m 두께로 관찰적으로 제조 하였다. 형광면역

염색은 전술 한 바와 같이 수행 하였다. 간략하게, 자유 부유 뇌 섹션을 1차 항체로서 래빗 항-이온화 된 칼슘-결합 어댑터 분자 1 (Iba-1, 1:2000; Wako, Osaka, Japan)과 함께 인큐베이션 한 다음, 실온에서 2시간 동안 텍사스 레드-공액 항-래빗 IgG (1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA)와 인큐베이션 하였다. 면역 형광은 개인용 컴퓨터 모니터에 연결된 디지털 카메라 (DP71, Olympus, Tokyo, Japan)가 장착 된 Olympus BX51 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

2.3 세포 배양 및 세포 생존력 분석

마우스 미세아교세포주 BV2 및 대식세포 세포주 RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA)을 각각 10% 열-불 활성화 FBS 및 1% 페니실린-스트렙토 마이신을 함유하는 MEM에서 배양 하였다. 배양 조건은 5 % CO₂ 가습, 37 °C 배양기에 서 실시하였다. 세포에서 BCJ의 세포 독성은 MTT 분석에 의해 측정되었다. 간단히, BV-2 및 RAW 264.7 세포를 96-웰 플레이트에 1 x 10⁴ 세포/웰의 밀도로 별도로 시딩하고 밤새 배양 하였다. 도 4에 나타난 것과 같이 다양한 농도의 CJ (영경귀 추출물) 및 BCJ (영경귀 발효물) (0.1, 1, 10 및 50 µg/mL)를 24시간 동안 처리 한 다음, 100 µL MTT (0.5mg/mL)를 첨가하고 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션 하였다. 그 후, 생성 된 포르마잔 결정을 100 µL DMSO에 용해시키고 570nm에서의 흡광도를 측정 하였다 (SpectraMax® ABS plus).

BCJ의 세포 독성을 시험하기 위해, MTT 분석을 미세아교세포 (BV2) 및 대식세포 (RAW 264.7) 세포주에 적용 하였다. 도 4에 도시 된 바와 같이, LPS (1 µg/mL)는 BV2 세포 (89%) 및 RAW264.7 세포 (88%)의 세포 생존율을 약간 감소 시켰지만, 대조군과 유의 한 차이는 없었다. 그리고 BCJ를 0.1 내지 50 µg/mL로 전처리 한 결과, BV2 세포 및 RAW 264.7 세포의 생존율은 LPS 군과 크게 다르지 않았다.

2.4 아질산염 결정

BV-2 및 RAW 264.7 세포를 밤새 96-웰 플레이트 (1 × 10⁴ cells/well)에 개별적으로 플레이트하고 CJ (영경귀 추출물) 및 BCJ (영경귀 발효물) (0.1, 1, 10, 및 50 µg/mL)로 1 시간 동안 전처리 한 후 LPS (1 µg/mL)에 의해 추가 24 시간 동안 자극 하였다. 산화 질소 (NO) 산화의 안정적인 최종 생성물인 아질산염 (NaNO₂)의 생성은 프로토콜에 따라 Griess Reagent (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 결정되었다. 실온에서 30분 동안 인 큐베이션한 후, 분광 광도계 마이크로 플레이트 리더에서 548nm에서 흡광도를 측정 하였고, 도 5에 결과 데이터를 나타내었다.

2.5 ROS / Superoxide 생산

RAW 264.7 세포를 6-웰 플레이트에서 유리 슬라이드 상에 시딩하고 CJ (영경귀 추출물) 및 BCJ (영경귀 발효물) (1 및 10 µg/mL)로 LPS (1 µg/mL)로 24시간 동안 처리 하였다. 샘플 처리 된 RAW 264.7 세포에서 ROS 및 미토 콘드리아 슈퍼 옥사이드 생산은 지시에 따라 세포질 ROS/슈퍼 옥사이드 검출 분석 키트 (Abcam)에 의해 검출되 었다. 표준 플루오레세인 (Ex/Em = 490/525nm) 및 로다민 (Ex/Em = 550/620nm) 필터 세트를 갖는 Leica DMLB 형광 현미경 (Wetzlar, Germany)을 사용하여 형광을 측정 하였다.

2.6 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

제조사에 지시에 따라 TRIsure 시약 (Bioline)을 사용하여 총 RNA를 분리 하였다. PCR 생성물에 티뉘 브로마이드로 염색하고 2.0% 아가로스겔로 분리하고 UV 조명 하에서 검출 하였다. GAPDH는 내부 대조군으로 사용되었다. 사용 된 프라이머 서열은 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

Gene Name	Forward 프라이머 (5'-3')	Reverse 프라이머 (5'-3')
GAPDH (서열1 및 서열2)	5'-AGGTCATCCCAGAGCTGA ACG-3'	5'-CACCTGTTGCTGTAGCCGTAT-3'

iNOS (서열3 및 서열4)	5'-GGCAAACCCAAGGTCTAGGTT-3'	5'-TCGCTCAAGTTCAGCTTGGT-3'
COX-2 (서열5 및 서열6)	5'-CAGTATCAGAACCGCATTGCC-3'	5'-GAGCAAGTCCGTGTTCAGGA-3'
IL-1 β (서열7 및 서열8)	5'-TTGTGGCTGTGGAGAAGCTGT-3'	5'-AACGTCACACACCAGCAGGTT-3'
IL-6 (서열9 및 서열10)	5'-TCCATCCAGTTGCCTTCTTGG-3'	5'-CCACGATTTCCAGAGAACATG-3'

2.7 웨스턴 블로팅 (Western Blotting)

세포 용해물은 Pierce™ RIPA 완충제 (Thermo Scientific, Rockford, USA)를 사용하여 제조되었다. 동일한 양의 총 단백질 (50 μ g)을 10% SDS-PAGE 겔에 의해 분리하고 PVDF 막으로 옮겼다. 5% 탈지유로 차단 한 후, 막을 적절한 1차 항체로 4℃에서 밤새 탐침한 후, 서양고추냉이 퍼옥시다제-연결된 2차 항체 (염소 항 마우스/래빗 IgG 1 : 2000)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양 하였다. 마지막으로, 단백질 발현 수준을 Alliance Mini HD9 (UVItect, 영국 캠브리지 소재)에서 ECL 검출 시스템 (GenDEPOT, Barker, USA)으로 검출하고 ImageJ 소프트웨어 (National Institutes of Health, Maryland, USA)를 사용하여 밴드 강도를 정량화 하였다.

2.8 통계 분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차 (SEM)로 표시되었다. 통계 분석은 SPSS 17.0 통계 (SPSS, Inc., 미국 일리노이 주 시카고)를 사용하여 수행하였다. 그룹간에 통계적으로 유의미한 것은 일원 분산 분석 (ANOVA)과 Dunnett의 검정을 사용하여 분석되었다. $P < 0.05$, $P < 0.01$ 및 $P < 0.001$ 은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

실시예 3. 영경귀 발효물의 항염증 효과 실험에 대한 결과

3.1 생체 내 미세아교세포 활성화의 평가

4mg/kg LPS의 복강 내 주사는 미세아교세포 활성화 마커 Iba-1을 형광면역염색으로 나타낸 바와 같이 해마에서 미세아교세포 활성화를 증가시켰다. LPS-자극된 미세아교세포는 확대 된 세포질 및 세포체, 불규칙한 형태 및 강화 된 Iba-1 염색을 나타냈다. BCJ (영경귀 발효물) 전처리 조건은 이러한 LPS-자극 증가를 억제했다. 또한, 이러한 효과는 도 6에서 나타난 것과 같이 같은 농도에서 CJ (영경귀 추출물)의 효과보다 더 좋은 것으로 확인되었다.

3.2 생체 내 염증 마커 생산에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 영향

해마에서의 iNOS, COX-2, IL-1 β 및 IL-6 mRNA의 발현은 LPS 노출 후 RT-PCR 분석에 의해 검출되었다. 이들 사이토 카인의 mRNA 수준은 대조군과 비교하여 LPS 쉼린지 후 상향 조절되었다 ($p < 0.01$). BCJ (200mg/kg)를 사용한 전처리는 이들 선택된 유전자의 mRNA 발현을 유의하게 감소시켰다 ($p < 0.05$). 이때, GAPDH를 대조군으로 사용 하였다 (도 7 참조).

3.3 BCJ (영경귀 발효물)의 Microglia / Macrophage M2 편광 시험관내에서의 촉진

미세아교세포/대식세포 분극에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 효과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 BV2 미세아교세포 및 RAW 264.7 대식세포를 배양 하였다. BV2 및 RAW 264.7 세포를 24시간 동안 LPS (1 μ g/mL)로 처리하여 M1 표현형 (염증성)을 유도하고, IL-4 (0.2 μ g/mL)를 동일한 기간 동안 M2 표현형 (항 염증성) 유도에 사용 하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, BCJ는 iNOS (M2 관련 단백질)의 발현을 하향 조절하고 BV2 및 RAW 264.7 세포

에서 NO의 방출을 감소시켰다. 그 동안 BCJ는 Arginase 1 (Arg1) 및 Nrf2와 같은 M2 관련 단백질 발현을 크게 상향 조절했다. 이때, 이때 GAPDH를 대조군으로 사용 하였다.

[0109] **3.4 RAW 264.7 세포에서 LPS-자극 ROS 및 과산화물 생산에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 영향**

[0110] 도 9에 나타난 바와 같이, LPS 처리는 대조군 세포와 비교하여 ROS 녹색 및 MitoSOX Red로의 염색 증가에 의해 명백한 바와 같이 RAW 264.7 세포에서 ROS 및 미토콘드리아 과산화물 생성을 유도하였다. 반면, BCJ (영경귀 발효물) 전처리 된 세포는 LPS 처리시 감소된 ROS 및 MitoSOX 염색을 나타냈다.

[0112] **3.5 RAW 264.7 세포에서 LPS-자극된 MAPK 활성화에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 효과**

[0113] 우리 염증 유발 물질 조절에 중요한 물질 활성화 단백질 kinases (MAPKs)의 LPS-자극 활성화에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 효과를 조사했다. BCJ의 존재 또는 부재하에 1시간 동안 LPS-자극된 RAW 264.7 세포에 웨스턴 블롯 분석을 수행 하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, 전처리 BCJ (0.1, 1, 10 μ g/mL)는 ERK 및 p38 MAPK의 LPS-자극 인산화 수준을 유의하게 억제하는 반면, LPS에 의해 자극된 JNK MAPK의 활성화는 BCJ에 의해 영향을받지 않았다.

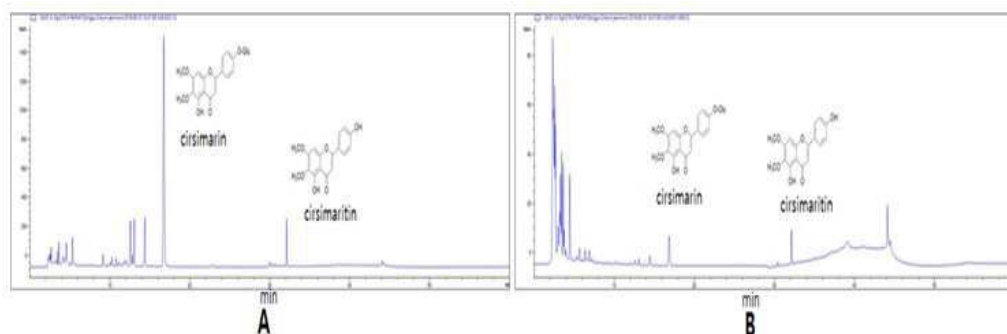
[0115] **3.6 RAW 264.7 세포에서 LPS-자극된 NF- κ B 활성화에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 효과**

[0116] 그런 다음 활성화 된 RAW 264.7 세포에 대한 BCJ (영경귀 발효물)의 항염증 효과가 NF- κ B 신호 전달 경로의 차단을 통해 매개되는지 여부를 평가했다. 도 11은 2시간 동안 LPS에 의한 자극이 I κ B α 및 NF- κ B의 상당한 인산화를 유도 하였음을 예시 하였다. 또한, 면역 형광 이미지 도 12는 LPS 자극이 RAW264 세포에서 NF- κ B p65의 핵 축적을 강하게 유도함을 보여 주었다. 그러나, BCJ로 전처리함으로써 세포질로부터 핵으로의 NF- κ B의 전좌가 완전히 억제되었다. 종합하면, 이들 결과는 BCJ 처리가 I κ B α 인산화 및 분해를 약화시킴으로써 LPS-자극된 NF- κ B 전위를 억제함을 시사한다.

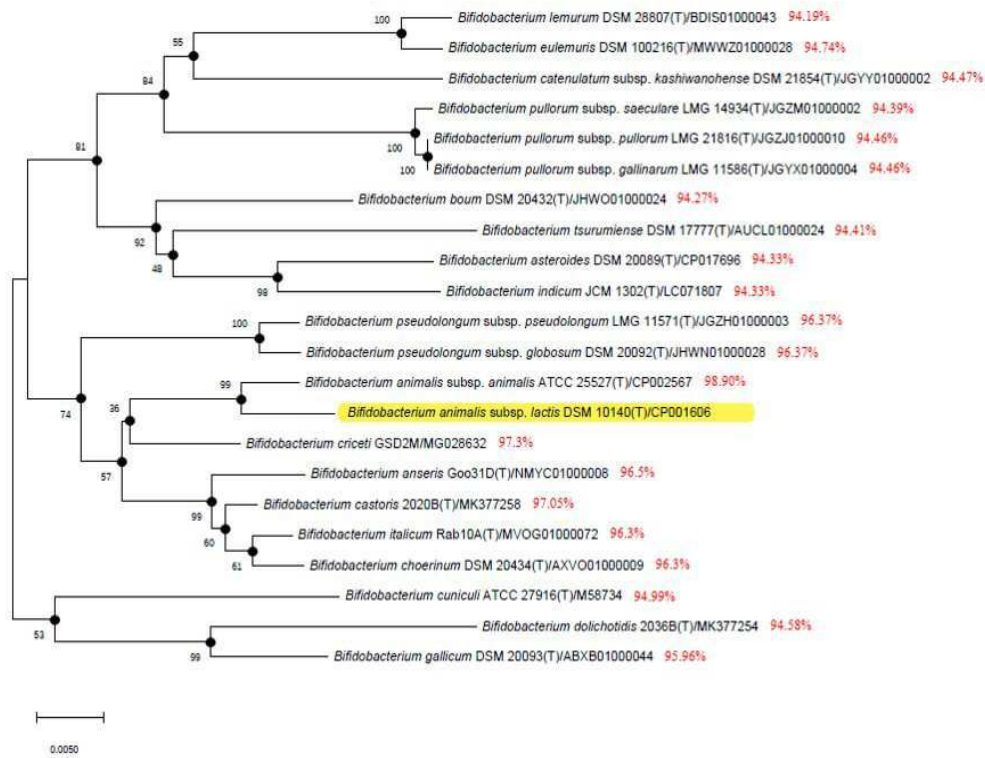
[0118] 즉, 본 발명은 영경귀 추출물 (CJ)을 프로바이오틱 *B.Lactis*로 발효하여 제조한 영경귀 발효물 (BCJ)은 생체 내에서 LPS-자극된 신경 염증에 보다 효과적인 효과를 나타내었다. 영경귀 발효물 (BCJ)의 항염증 효과는 BV2 미세아교세포 및 RAW 264.7 대식세포에서 M1 표현형의 하향 조절 및 M2 표현형의 상향 조절을 통해 이루어진다. 본 발견은 생물 변형된 영경귀 추출물 (CJ)의 약리학적 효과에 대한 이해를 넓히고 영경귀 발효물 (BCJ)이 미세아교세포/대식세포 분극 관련 염증성 질환에 이용 될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

도면

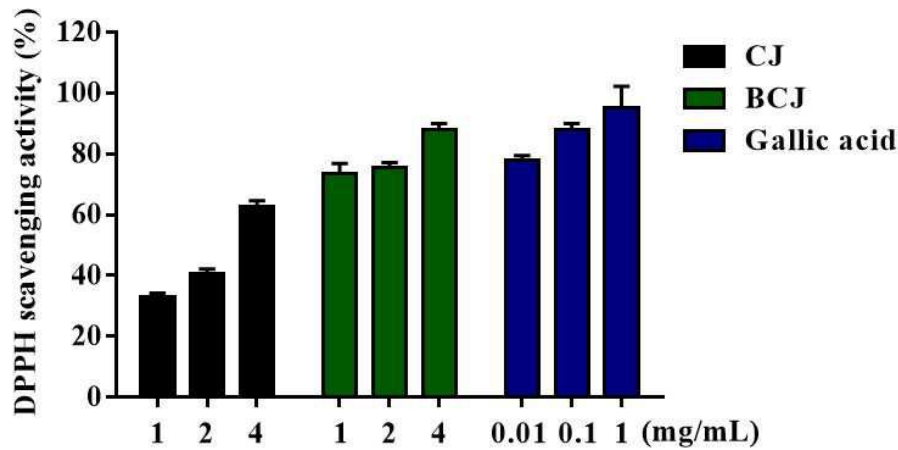
도면1



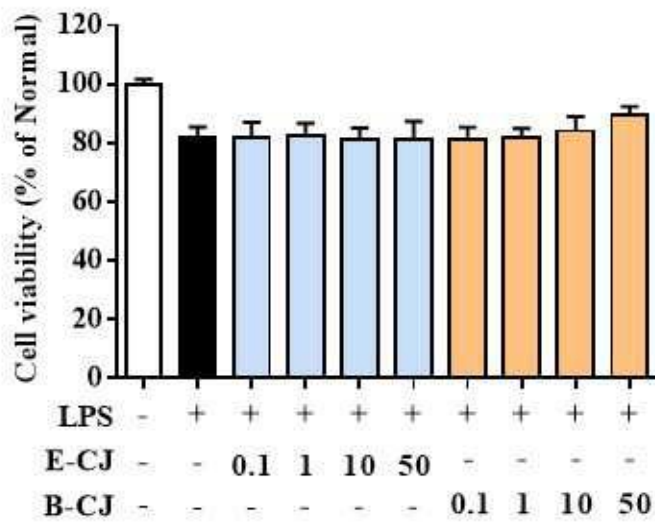
도면2



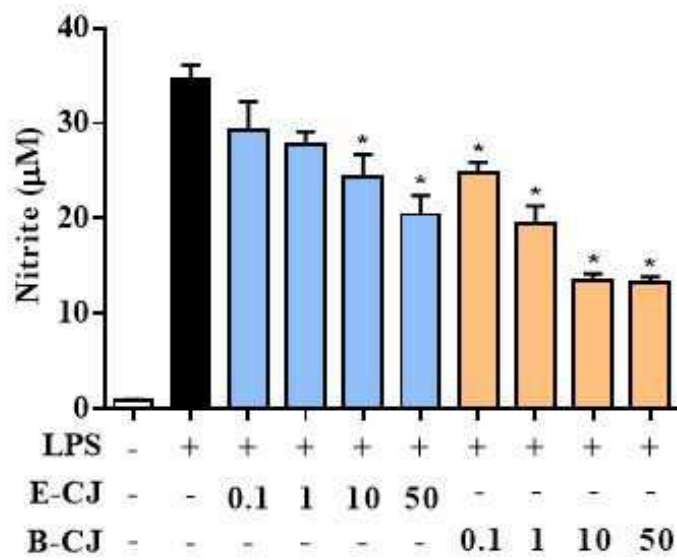
도면3



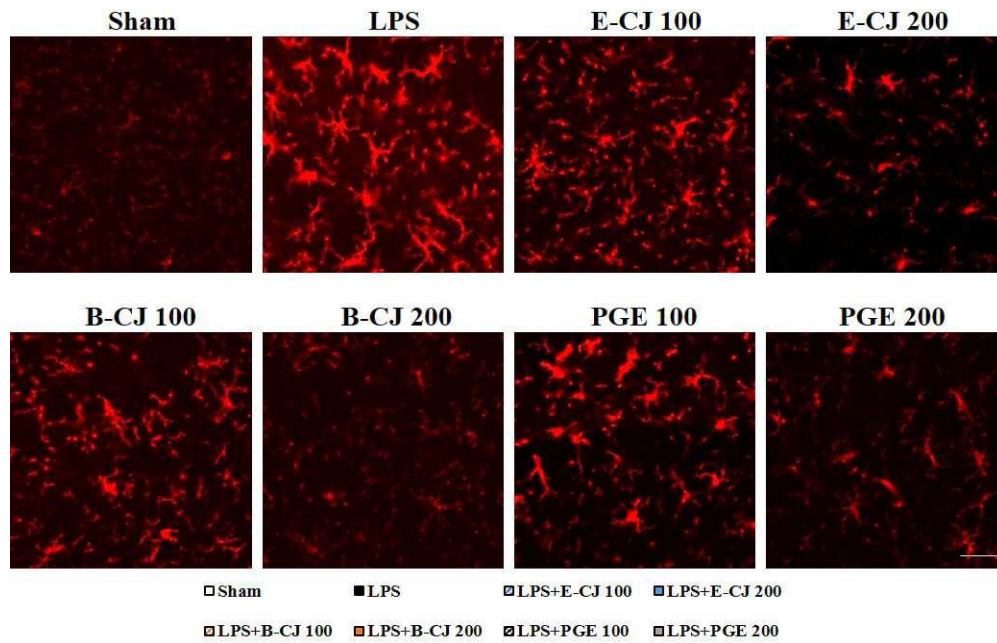
도면4



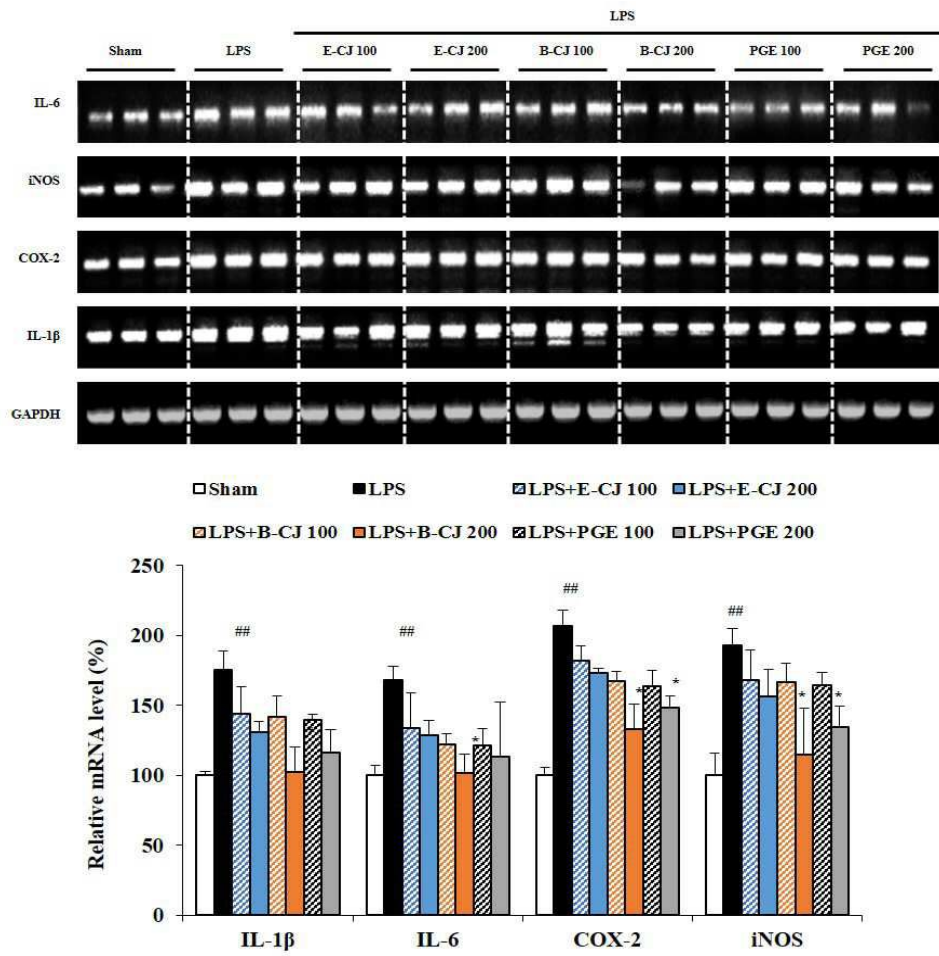
도면5



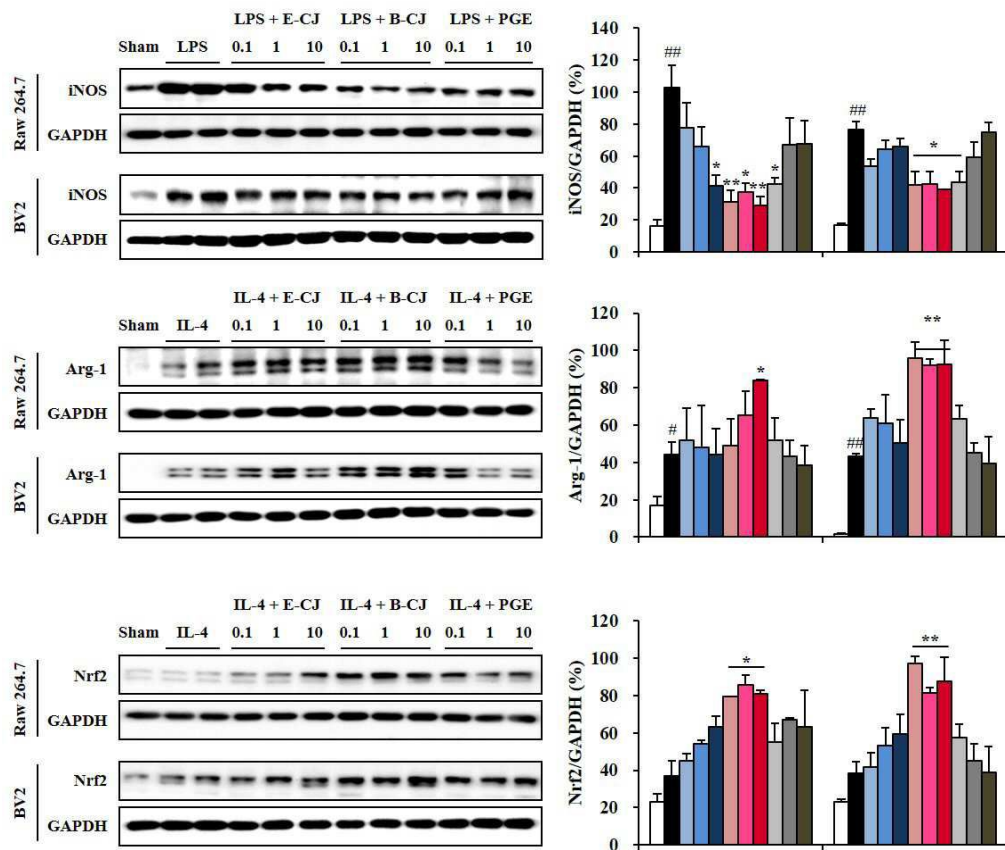
도면6



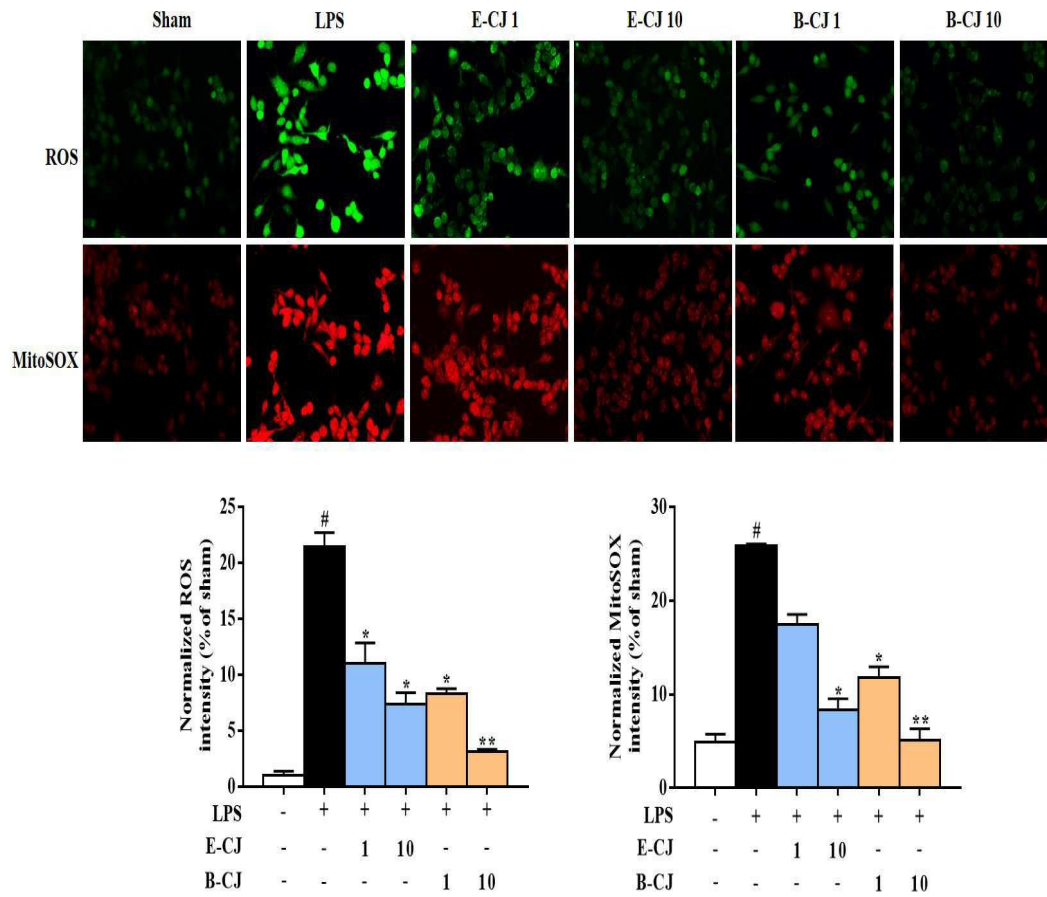
도면7



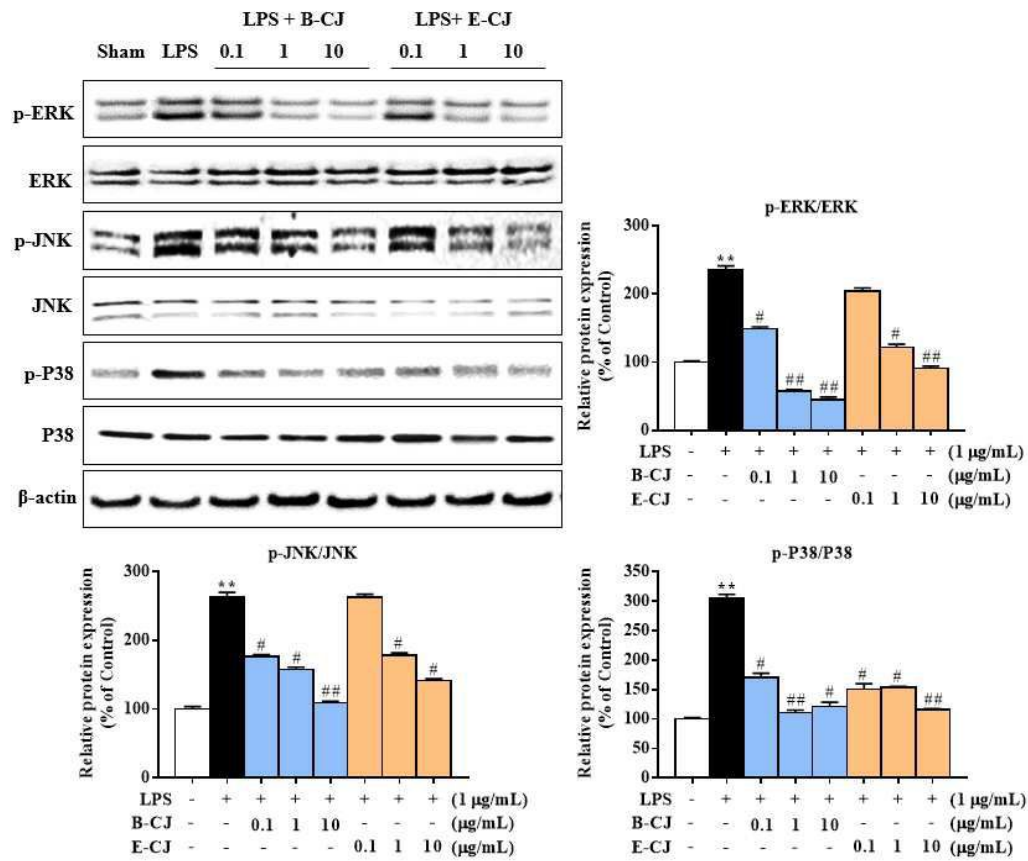
도면8



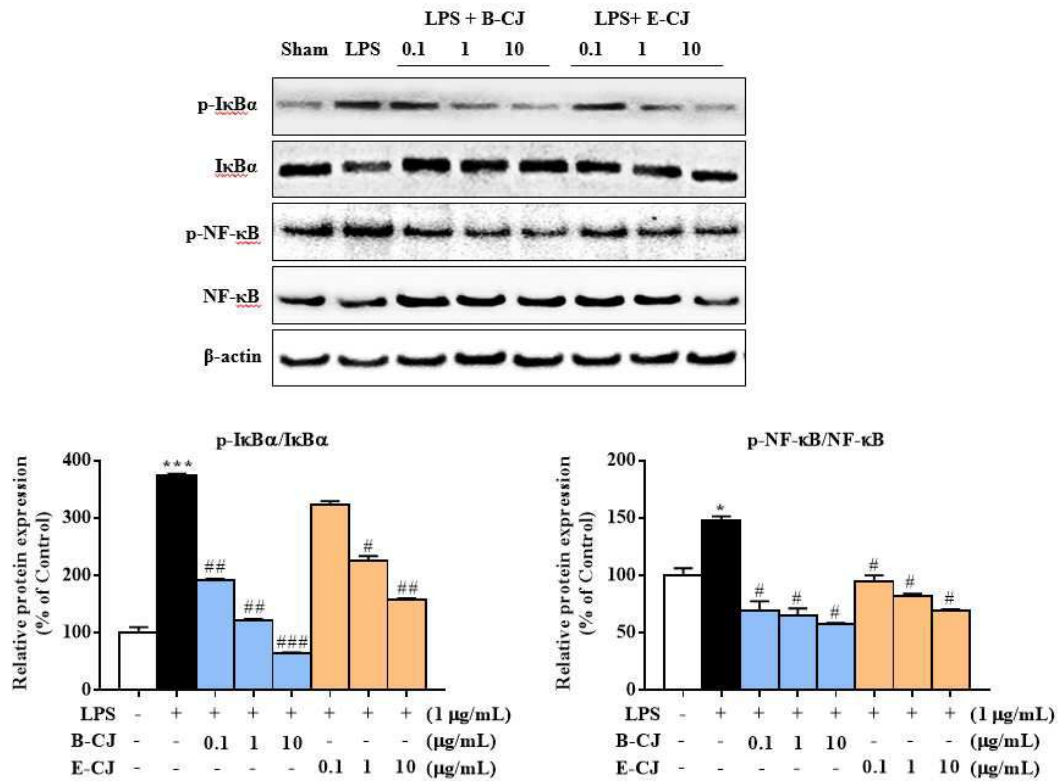
도면9



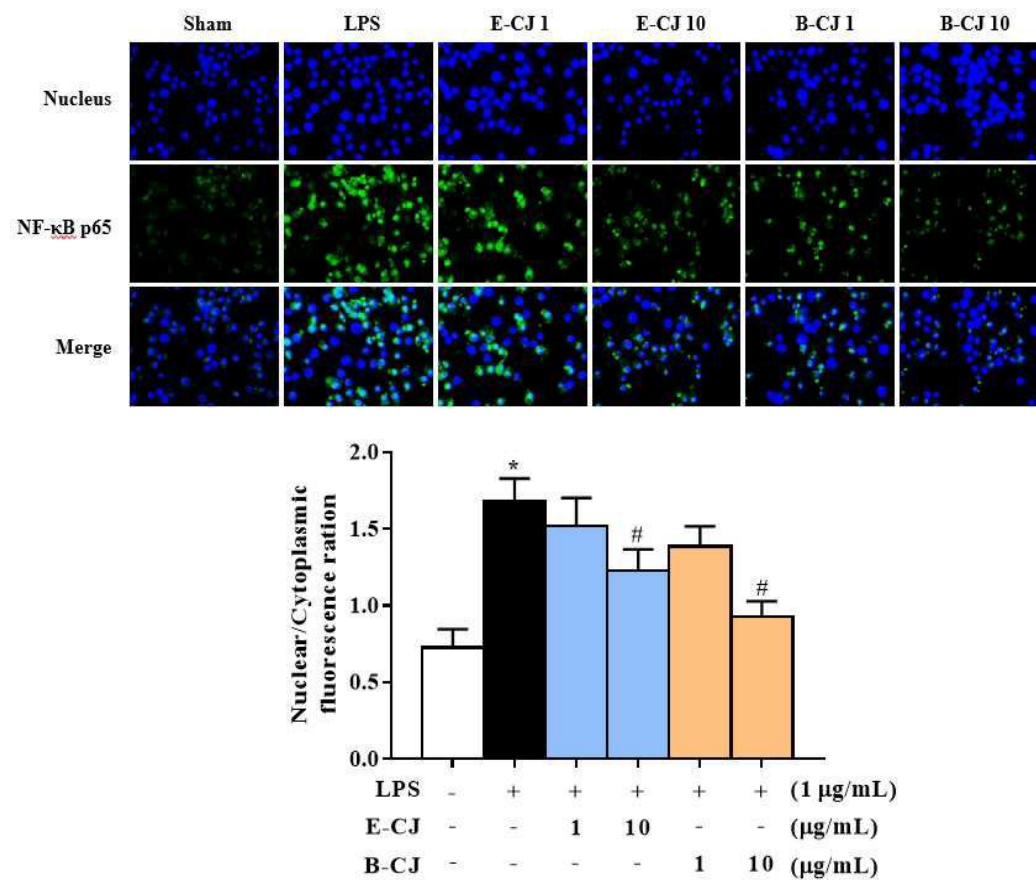
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Fermented *Cirsium japonicum* var. *maackii* production method and anti-inflammatory composition prepared by the method
- <130> PN1910-485
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH Forward primer
- <400> 1
- aggtcatccc agagctgaac g
- <210> 2
- <211> 22

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH Reverse primer	
<400>	2	
caccctgttg ctgtagccgt at		22
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS Forward primer	
<400>	3	
ggcaaaccca aggtctaggt t		21
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS Reverse primer	
<400>	4	
tcgctcaagt tcagcttggt		20
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX-2 Forward primer	
<400>	5	
cagtatcaga accgcattgc c		21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX-2 Reverse primer	
<400>	6	
gagcaagtcc gtgttcaagg a		21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1beta Forward primer

<400> 7
 ttgtggctgt ggagaagctg t 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1beta Reverse primer

<400> 8
 aacgtcacac accagcaggt t 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 Forward primer

<400> 9
 tccatccagt tgccttcttg g 21

<210> 10

<

211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 Reverse primer

<400> 10
 ccacgatttc ccagagaaca tg 22