



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0127053
(43) 공개일자 2019년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/40 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 1/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/40 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0051120

(22) 출원일자 2018년05월03일

심사청구일자 2019년05월03일

(71) 출원인

대한민국(환경부 국립생물자원관장)

인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

강재진

서울특별시 강남구 삼성로 212, 27동 1202호 (대
치동, 은마아파트)

전미정

인천광역시 서구 고산로40번길 12, 104동 1001호
(원당동, 원당e편한세상아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 태웅

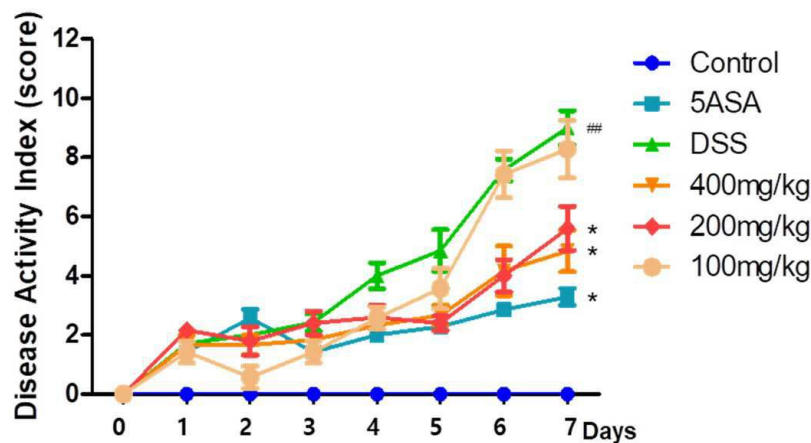
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 코르너스 오블롱가 추출물을 이용한 궤양성 대장염 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은, DSS(Dextran Sulfate Sodium Salt)로 궤양성 대장염을 유발한 실험동물에 투여될 때, 실험동물의 체중 감소를 억제하고, 질병활성도(Disease activity index)의 증가가 억제하며, 대장 길이의 감소를 억제할 뿐만 아니라 비장의 비대가 억제하는 효과를 지닌 코르너스 오블롱가 추출물을 이용한 궤양성 대장염 개선용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 1/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

(72) 발명자

니니초

미얀마 네피도 자부티리 타운십 자야테이디 빌딩
#544/2

원나이토

미얀마 네피도 산림부 빌딩 #39

전성호

경기도 과천시 관문로 166, 1018동 201호(중앙동,
주공아파트)

이상희

서울특별시 금천구 벚꽃로 316, 511호(가산동)

김영동

강원도 춘천시 지석로 97, 101동 802호(석사동, 현
진에버빌1차)

임순성

강원도 춘천시 후석로 325, 105동 302호(후평동,
춘천더샵아파트)

석기태

강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1302호(반곡동,
원주반곡아이파크)

명세서

청구범위

청구항 1

코르너스 오블롱가 추출물을 유효성분으로 포함하는 궤양성 대장염 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 코르너스 오블롱가의 잎을 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코르너스 오블롱가(*Cornus oblonga*) 추출물을 이용한 궤양성 대장염 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 궤양성 대장염(Ulcerative colitis disease; UC)은 특정한 병인 없이 소화기계에서 반복적으로 재발하는 염증으로 인한 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease; IBD)으로 생활수준의 향상 및 그에 따른 식생활의 다양화로 인해 지난 수십 년 동안의 발병률이 크게 증가하였다(Cosnes J. et al., Gastroenterology 2011, 140(6):1785-1794.).

[0003] 궤양성 대장염의 발병기전은 아직까지 명확하지 않으나, 식습관, 흡연 등과 같은 외부요인과, 장내세균군집의 분포, 가족력과 같은 유전적인 요인, 비 정상적인 염증반응으로 인한 전염증성 사이토카인의 생성이 원인이라는 연구가 있다(Fiocchi C. et al., Gastroenterology 1998, 115(1):182-205.). 원래 궤양성 대장염은 육식을 주로 하는 유럽과 북미지역에서 발병률이 높은 질환이었으나 최근에는 서구화된 식습관으로 인해 우리나라를 포함한 동아시아지역에서 발병률이 증가하고 있다(Prideaux L. et al., Journal of gastroenterology and hepatology 2012, 27(8):1266-1280.).

[0004] 정상적인 대장 조직은 점막, 점막 하조직, 근육층, 장막의 4층으로 나뉘어져 있으며, 궤양성 대장염의 발생에 따라 점막과 점막 하조직에서 병리학적인 변화가 나타난다. 궤양성 대장염의 주요 증상으로는 복통, 설사, 직장출혈, 몸무게 감소가 나타나고 결장의 점막층에 염증과 궤양이 생기며 이후에는 결장의 원위부 및 근위부까지 확장되어 결장의 길이가 짧아지고 조직 내 염증세포들이 침윤되어 분포하는 현상을 확인할 수 있다(Mosli MH et al., Inflamm Bowel Dis 2014, 20(3):564-575.; Baumgart DC AND Carding SR. Lancet 2007, 369(9573):1627-

1640.). 또한 궤양성 대장염은 만성염증에 의한 질환으로 장기간 지속되면 대장암으로 이어 질 수 있는 큰 위험 요소이다(Ordas I. et al., Lancet 2012, 380(9853):1606-1619.).

[0005] 궤양성 대장염 개선 활성을 확인을 위해서는 마우스, 흰쥐 또는 햄스터에서 dextran sulfate sodium (DSS)로 유발시킨 궤양성 대장염 동물모델이 주로 이용된다. 유발 초기에는 혈변, 체중감소, 대장의 축소 및 점막 궤양 등이 생기며 조직학적으로 소장 및 대장 상피세포에 손상을 유발해 상피층의 장샘이 염증 없이 떨어져 가는 것이 특징이다. 급성기에는 면역 매개반응이 일어나지 않다가 만성으로 발전할 경우에는 점막 내에 여러 면역물질의 양이 증가해서 장관의 염증을 유발하는 것으로 보인다. 관련된 염증 인자로는 IL-6, IL-1 β , TNF- α 등이 있다. 이러한 양상은 사람의 궤양성 대장염과 흡사한 부분이 많고, 무엇보다도 현재까지는 모델의 유발율이 높고 편리하여 널리 이용되고 있다(Ishioka T. et al., Crit Rev Toxicol 1987, 17:215-244.; Frank K. et al., Int J Colorectal Dis 2001, 16:238-246.).

[0006] 궤양성 대장염 치료의 목표는 증상과 점막의 염증을 호전 시켜 관해를 유도하고 가능하면 오랜 기간 동안 관해를 유지하여 삶의 질을 높이는 것이다. 대부분의 환자는 치료를 받지 않으면 혈변과 설사 등의 증상이 지속되므로 적절한 치료가 요구된다. 현재 사용되는 궤양성 대장염의 치료법으로는 5-aminosalicylicacid(5-ASA)제제, 면역 억제제, 스테로이드제제와 같이 항염증 및 면역 반응을 조절하는 약물이 사용되고 있다. 그러나 이러한 요법은 장기적으로 복용시에 소화 불량, 식욕 부진, 구토, 수면 및 기분 장애와 같은 부작용의 위험이 높다(Bryant RV. et al., Scand J Gastroenterol 2015, 50(1):90-112.; Ng SC et al., Aliment Pharmacol Ther 2011, 33(4):417-427.). 그렇기 때문에 기존의 치료요법의 부작용을 최소화 할 수 있는 새로운 천연물 소재의 치료물질의 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 코르너스 오블롱가 추출물을 이용한 궤양성 대장염 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되는 바와 같이, 코르너스 오블롱가 추출물을 DSS(Dextran Sulfate Sodium Salt)로 궤양성 대장염을 유발한 실험동물에 투여하였을 때, 실험동물의 체중 감소가 억제되고, 질병활동도(Disease activity index, 염증성 대장염의 주요한 임상 징후인 체중 감소, 설사, 직장 출혈의 종합적 지표)의 증가가 억제되며, 대장 길이의 감소가 억제될 뿐만 아니라 비장의 비대가 억제되고 결장 조직의 손상을 억제하며 염증성 사이토카인의 생성을 억제함 확인함으로써 완성된 것이다.

[0010] 전술한 바의 실험 결과를 고려할 때, 본 발명의 궤양성 대장염 개선용 조성물은 코르너스 오블롱가 추출물을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.

[0011] 본 명세서에서, "코르너스 오블롱가 추출물"이란 추출 대상인 코르너스 오블롱가의 줄기, 잎, 열매, 꽃, 뿌리 등을 물, 탄수소 1 내지 4의 저급 알콜(메탄올, 에탄올, 부탄올 등), 메틸렌클로라이드, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 침출하여 얻어진 추출물, 이산화탄소, 펜탄 등 초임계 추출 용매를 사용하여 얻어진 추출물 또는 그 추출물을 분획하여 얻어진 분획물을 의미하며, 추출 방법은 활성물질의 극성, 추출 정도, 보존 정도를 고려하여 냉침, 환류, 가온, 초음파 방사, 초임계 추출 등 임의의 방법을 적용할 수 있다. 분획된 추출물의 경우 추출물을 특정 용매에 현탁시킨 후 극성이 다른 용매와 혼합·정지시켜 얻은 분획물, 상기 조추출물을 실리카겔 등이 충전된 칼럼에 흡착시킨 후 소수성 용매, 친수성 용매 또는 이들의 혼합 용매를 이동상으로 하여 얻은 분획물을 포함하는 의미이다. 또한 상기 추출물의 의미에는 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조 등의 방식으로 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물이 포함된다. 바람직하게는 추출용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매, 특히 60% 내지 90%의 에탄올 수용액으로 추출(침지 또는 증류)하여 얻어진 것을 의미한다.

[0012] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0013] 또 본 명세서에서, "궤양성 대장염 개선"은 궤양성 대장염의 개선(증상의 경감), 치료, 그러한 질환의 발병 억

제 또는 지연을 포함하는 의미이다.

- [0014] 본 발명의 조성물은 그 유효성분을 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 치료를 의도하는 궤양성 대장염의 개선 활성 등을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 조성물이 투여될 때, 궤양성 대장염의 개선, 치료, 또는 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연 등 의도한 의리적·약리학적 효과를 나타낼 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로서 파악할 수 있다. 본 발명의 궤양성 대장염 개선용 조성물이 식품 조성물로 파악될 경우, 본 발명의 식품 조성물의 용도는 대장 기능 장애의 개선 특히 궤양성 대장염에 의한 대장 기능 장애의 개선으로 이해될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 껌류, 떡, 한과, 빵, 과자, 면 등의 식품류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다.
- [0017] 또 본 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 떨 수 있다. 예컨대 한국 「건강기능식품에관한법률」에 따른 건강기능식품이거나, 한국 「식품위생법」의 식품공전(식약처 고시 「식품의 기준 및 규격」)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 식품첨가물이 포함될 수 있다. 식품첨가물은 일반적으로 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가되어 혼합되거나 침윤되는 물질로서 이해될 수 있는데, 식품과 함께 매일 그리고 장기간 섭취되므로 그 안전성이 보장되어야 한다. 식품의 제조·유통을 규율하는 각국 법률(한국에서는 「식품위생법」임)에 따른 식품첨가물공전에는 안전성이 보장된 식품첨가물이 성분 면에서 또는 기능 면에서 한정적으로 규정되어 있다. 한국 식품첨가물공전(식약처 고시 「식품첨가물 기준 및 규격」)에서는 식품첨가물이 성분 면에서 화학적 합성품, 천연 첨가물 및 혼합 제제류로 구분되어 규정되어 있는데, 이러한 식품첨가물은 기능 면에 있어서는 감미제, 풍미제, 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등으로 구분된다.
- [0019] 감미제는 식품에 적당한 단맛을 부여하기 위하여 사용되는 것으로, 천연의 것이거나 합성된 것 모두 본 발명의 조성물에 사용할 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.
- [0020] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.
- [0021] 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등이 사용될 수 있고, 또 유화제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있으며, 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등이 사용될 수 있다. 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.
- [0022] 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등이 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 식품 조성물은 전술한 바의 식품첨가물 이외에, 기능성과 영양성을 보충, 보강할 목적으로 당업계에 공지되고 식품첨가물로서 안정성이 보장된 생리활성 물질이나 미네랄류를 포함할 수 있다.
- [0024] 그러한 생리활성 물질로서는 녹차 등에 포함된 카테킨류, 비타민 B1, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B12 등의 비타민류, 토코페롤, 디벤조일티아민 등을 들 수 있으며, 미네랄류로서는 구연산 칼슘 등의 칼슘 제제, 스테아린 산마그네슘 등의 마그네슘 제제, 구연산철 등의 철 제제, 염화 크롬, 요오드칼륨, 셀레늄, 게르마늄, 바나듐, 아연 등을 들 수 있다.

- [0025] 본 발명의 식품 조성물에는 전술한 바의 식품첨가물이 제품 유형에 따라 그 첨가 목적을 달성할 수 있는 적량으로 포함될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 각국 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 파악될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 투여 경로는 국소 경로, 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육 내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하는 임의의 적절한 경로일 수 있으며, 두 가지 이상의 경로를 조합하여 사용할 수도 있다. 두 가지 이상 경로의 조합의 예는 투여 경로에 따른 두 가지 이상의 제형의 약물이 조합된 경우로서 예컨대 1차로 어느 한 약물은 정맥 내 경로로 투여하고 2차로 다른 약물은 국소 경로로 투여하는 경우이다.
- [0029] 약학적으로 허용되는 담체는 투여 경로나 제형에 따라 당업계에 주지되어 있으며, 구체적으로는 "대한민국약전"을 포함한 각국의 약전을 참조할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유, 에탄올, 그리세롤 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 적절한 결합제, 윤활제, 붕해제, 착색제, 희석제 등을 포함시킬 수 있다. 적절한 결합제로서는 전분, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페리스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 글루코스, 옥수수 감미제, 소듐 알지네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등을 들 수 있고, 윤활제로서는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 초산나트륨, 염화나트륨, 실리카, 탈콰, 스테아르산, 그것의 마그네슘염과 칼슘염, 폴리테틸렌글리콜 등을 들 수 있으며, 붕해제로서는 전분, 메틸 셀룰로스, 아가(agar), 벤토나이트, 잔탄 검, 전분, 알긴산 또는 그것의 소듐 염 등을 들 수 있다. 또 희석제로서는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스, 글라이신 등을 들 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 수성 등장 용액 또는 현탁액을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화할 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 담체로는 위텟솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 약제학적 조성물의 구체적인 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.001mg/kg ~ 10g/kg 범위, 바람직하게는 0.001mg/kg ~ 1g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

발명의 효과

- [0034] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 코르너스 오블롱가 추출물을 이용한 궤양성 대장염 개선용 조성물을 제공

할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 궤양성 대장염 개선 등의 용도로 식품, 약품 등으로 제품화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 체중 변화를 측정한 결과이다.

도 2는 DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 질병 활성도(DAI)의 변화를 측정한 결과이다.

도 3은 DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 대장 길이 변화를 측정한 결과이다.

도 4는 DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 비장 비대 변화를 측정한 결과이다.

도 5는 DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 결장 조직의 손상에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

도 6은 DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] <실시예> 코르너스 오블롱가 추출물 준비

[0039] 코르너스 오블롱가(*Cornus oblonga*)는 미얀마 현지에서 채집하였다. 채집한 코르너스 오블롱가의 건조된 잎(1.2kg)에 70% 에탄올 30L를 가하여 2시간 동안 환류 추출하고, 추출된 용액을 진공에서 증발시켜 223.2g의 추출물을 얻었다.

[0040] <실험예> 궤양성 대장염에 대한 동물실험

[0041] 1. 실험 방법

[0042] 1-1. 실험동물의 사육

[0043] 본 실험에 사용된 동물은 6주령 수컷 C57BL/6마우스 48마리를 대한바이오링크(Chungbuk, Korea)로부터 분양받아 한림대학교 사육실에서 사육하였고 실험 전 7일간 순응기간을 두어 고형사료와 식수를 자유롭게 섭취하게 하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$ 명암주기는 12시간으로 조절하였다.

[0044] 1-2. 궤양성 대장염(Ulcerative colitis disease; UC)의 유도

[0045] 순응기간 이후 정상대조군, 궤양 유발군, 실시예 시료 100mg/kg 투여군, 실시예 시료 200mg/kg 투여군, 실시예 시료 400mg/kg 투여군, 양성 대조군인 aminosalicic acid(5-ASA) 50mg/kg 투여군으로 총 6 실험군(n=8)으로 나누었다. 양성 대조군으로 사용한 5-ASA는 궤양성 대장염, 크론병과 같은 염증성대장 질환의 치료제로 사용되고 있는 약물이며 실시예 시료와의 약효 비교를 위해 사용하였다. 실시예 시료와 5-ASA는 궤양성 대장염 유발물질인 DSS(Dextran Sulfate Sodium Salt) 투여한 날부터 하루에 한 번씩 경구투여를 8일간 수행하였다. DSS의 투여는 8일동안 궤양 유발군, 시료 투여군, 양성 대조군에 5%(w/v)의 DSS를 포함한 물을 자유롭게 섭취하게 하여 급성궤양을 유도 하였다.

[0046] 1-3. DAI(Disease activity index)측정

[0047] 염증성 대장염의 주요한 임상 징후인 체중 감소, 설사, 직장 출혈은 실험 시작일로부터 종료일 까지 매일 같은 시간에 기록하였다. DAI 점수는 체중 감소, 대변의 일관성, 직장출혈의 점수를 합하여 결정 하였으며, DAI 측정 기준은 아래 표 1에 나타내었다.

[0048] 1-4. 궤양성 대장염 평가 및 조직학적 관찰

[0049] 실험 종료와 함께 동물실험윤리위원회에서 승인된 방법에 따라 마우스를 안락사 시키고, 대장을 적출하여 궤양성 대장염 발병으로 인한 대장길이의 변화를 확인 하였다. 또 전신성 염증반응에 의한 비장비대에 대한 실시예 시료의 효능을 분석하기 위해 비장을 적출하여 각 그룹별 비장무게를 측정하였다.

[0050] 대장 조직의 관찰을 위해 대장의 말단부위를 적출한 다음 10% 포르말린 용액을 넣어 고정시킨 후 파라핀에 포매하여 파라핀 조직표본을 제작 하였다. 이후 미세절단기(Sakura, Japan)를 이용하여 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편하였다. 조

직 절편은 조직학적 관찰을 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E)으로 염색하고 광학 현미경을 이용하여 100x, 200x의 배율에서 관찰 하였다.

1-6. 염증성 사이토카인의 측정

실험 종료와 함께 마우스를 안락사 시키고, 대장조직의 proximal부분(50mg)을 적출하였다. 적출한 대장은 RIPA buffer(Tris-HCl pH7.4, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 10% NP40, 10% sodium deoxycholate)를 넣어 tissue grinder를 이용해 갈아주고 13,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 단백질 정량은 BSA를 사용해서 표준화 하였고 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA)를 사용하여 정량하였다.

ELISA 분석은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 pink-ONE ELISA complete Kit(KomaBiotech, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 제공된 실험방법을 준수하여 사용하였다.

2. 실험 결과

2-1. DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 체중 변화

DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 나타나는 주된 임상증상 중 하나가 체중감소이다. 따라서 실시예의 시료가 체중변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3% DSS를 투여하여 궤양성 대장염을 유도하고, 동시에 실시예의 시료를 경구 투여하여 매일 일정한 시간에 체중 변화를 기록하였다. 그 결과 DSS를 투여하지 않은 음성대조군(control)의 체중은 지속적인 증가양상을 보였고 DSS 투여군은 전체적으로 음성대조군에 비해 체중이 감소하였으며 특히 실험 5일차부터 급격한 체중감소를 보였다. 반면에 5-ASA 투여군과 실시예 시료 투여군에서는 DSS 투여군에 비해 체중감소 정도가 억제되는 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다(도 1 참조).

2-2. DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 질병 활성도(DAI)의 변화

DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 실시예 시료가 질병활성도의 수준에 미치는 영향을 조사하기 위하여 체중 감소, 설사, 혈변을 특징으로 하는 임상적인 증상을 점수화 하여 매일 일정한 시간에 질병활성도 점수를 측정하였다. 질병활성도 점수는 임상적인 증상 각 부분을 점수화하여 총 합산하여 계산하였다. 그 결과 음성대조군(control)의 질병활성도 점수는 질병이 일어나지 않아 대장염 임상증상이 나타나지 않았지만 DSS 투여군은 음성대조군에 비해 질병활성도 점수가 통계적으로 유의 하게 증가하였다. 반면에 5-ASA 투여군과 실시예 시료 투여군(200, 400mg/kg)에서는 DSS 투여군에 비해 통계적으로 유의한 질병활성도의 감소를 나타냈다(도 2 참조).

2-3. DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 대장 길이 변화

DSS로 유도된 궤양성 대장염은 다양한 병변 증상을 동반하는데, 그 중 대장 길이의 감소는 대장염의 악화와 관련이 있다. 따라서 대장 길이의 변화의 측정은 병의 진행 상태나 염증의 진행 정도를 간접적으로 파악 할 수 있으므로, 이에 대한 실시예 시료의 영향을 확인하기 위해 대장 길이를 측정하였다. 그 결과 DSS 투여군의 대장길이는 3.7 ± 0.1 cm으로 DSS를 투여하지 않은 음성대조군(control) 6.7 ± 0.1 cm에 비해 유의적인 대장 길이의 감소를 나타냈다($p < 0.001$). 반면에 5-ASA 투여군과 실시예 시료 200, 400mg/kg 투여군에서는 대장 길이가 각각 5.2 ± 0.1 cm, 4.4 ± 0.1 cm와 5.0 ± 0.2 cm 으로 DSS 투여군과 비교하여 대장 길이가 유의성 있게 증가 하였다($p < 0.01$)(도 3 참조).

2-4. DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 비장 비대 변화

비장비대는 전신성 염증반응의 지표이며, 동물실험을 통해 대장염과 비장비대는 연관이 있음이 보고 되었다(*BioFactors (Oxford, England)* 2012, 38(3):226-233.). 따라서 DSS로 유도된 궤양성 대장염에서의 비장비대에 실시예 시료가 미치는 영향을 확인하기 위해 실험 종료일 쥐의 비장을 적출하여 각 실험군별 비장무게를 측정하였다. 그 결과 DSS 투여군의 비장 무게는 110.6 ± 11.1 mg으로 DSS를 투여하지 않은 음성대조군(control) 70.8 ± 3.0 mg에 비해 유의적인 비장무게의 증가를 나타냈다($p < 0.01$). 반면에 5-ASA 투여군과 실시예 시료 100, 200, 400mg/kg 투여군의 비장무게는 각각 80.4 ± 1.0 mg, 85.9 ± 6.1 mg, 79.0 ± 6.0 mg, 77.3 ± 2.3 mg 으로 DSS 투여군과 비교하여 비장의 무게가 통계적으로 유의하게 증가 하였다($p < 0.05$) (도 4 참조).

2-5. DSS로 유도된 궤양성 대장염 동물모델에서 결장 조직의 손상에 미치는 영향

DSS로 궤양성 대장염을 유도하면 결장의 점막층에 염증과 궤양이 생겨 손상을 입고, 조직 내 염증세포들이 침윤되어 분포하며 crypt의 구조가 붕괴된다(*Clin Exp Immunol* 1998, 114(3):385-391). 따라서 DSS로 유도된 궤양성 대장염 모델 마우스 결장조직의 조직병리학적 변화에 실시예 시료가 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 군의 결장조직을 H&E로 염색하고, 광학 현미경을 통해 관찰하였다(X100, X200). 그 결과 음성대조군(control)의 경우

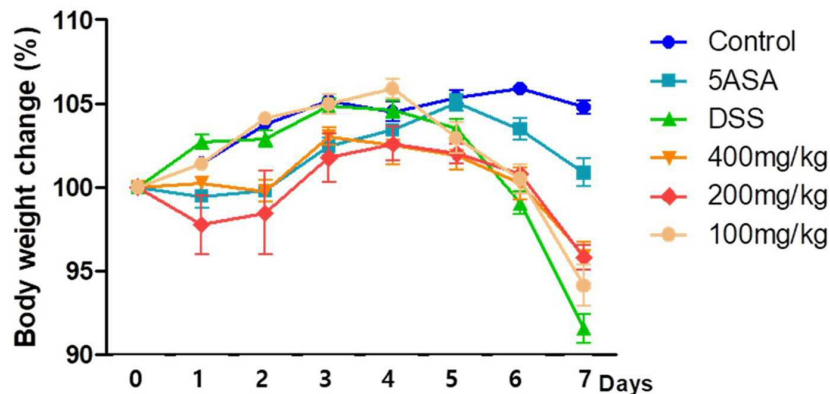
아무런 구조적 변화가 없는 정상 장점막에 해당 하였지만, DSS 투여군의 경우 궤양이 전체조직에 약 80%가 진행된 상태로 점막하층으로 많은 수의 면역세포가 침윤되었고, normal crypt구조는 붕괴되어 염증 및 육아조직으로 변해버린 상태를 확인 할 수 있었다(도 5). 그에 반해 5-ASA투여군과 실시예 시료(400mg/kg) 투여군은 결장조직의 궤양과 및 normal crypt의 구조가 붕괴되지 않았고, 염증세포의 침윤 또한 정상 장조직과 비슷한 수준의 상태를 보였다(도 5).

2-6. DSS로 유도된 궤양성 대장염 동모델에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

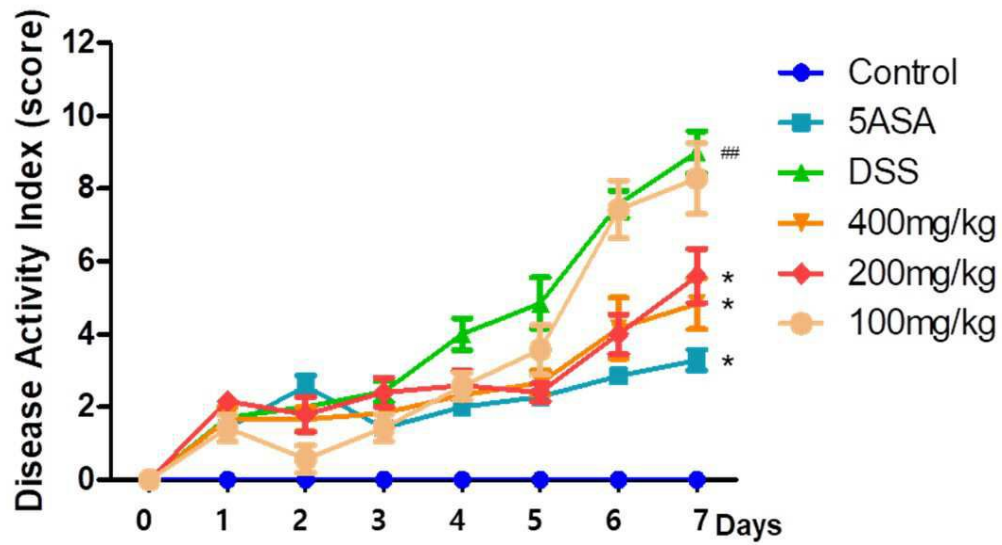
염증성 사이토카인의 과 생성은 대장염의 발병에 매우 중요한 역할을 한다는 연구가 있다(*Nature reviews Immunology* 2014, 14(5):329-342). 따라서 DSS로 유도된 궤양성 대장염 모델 마우스 결장조직에서의 염증성 사이토카인 생성에 실시예 시료가 미치는 영향을 확인하기 위해 각 군의 결장조직에서 단백질을 추출하고, ELISA를 통해 생성된 염증성 사이토카인의 양을 측정하였다. 그 결과 IL-1 β 의 경우 DSS 투여군의 IL-1 β 생성량은 2259.2 $\pm$ 369.4pg/mL으로 음성대조군(control)의 834.3 $\pm$ 20.8pg/mL에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다($p<0.05$). 반면에 5-ASA, 실시예 시료의 투여로 인해 IL-1 β 의 생성량은 DSS 투여군에 비해 감소하는 경향을 보였으며 특히 5-ASA투여군과 실시예 시료 200, 400mg/kg 투여군에서의 생성량은 각각 842.2 $\pm$ 63.1pg/mL, 883.3 $\pm$ 155.7pg/mL, 854.7 $\pm$ 107.7pg/mL으로 DSS투여군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다($p<0.05$)(도 6의 A). IL-6의 생성량은 DSS 투여군에서 2612.63 $\pm$ 494.0pg/mL으로 음성대조군(control)의 424.0 $\pm$ 26.1pg/mL에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다($p<0.05$). 반면에 5-ASA, 실시예 시료 투여로 인해 IL-6의 생성량은 DSS 투여군에 비해 감소하는 경향을 보였으며 특히 5-ASA 투여군과 실시예 시료 400mg/kg 투여군에서의 생성량은 각각 594.1 $\pm$ 20.0pg/mL, 733.3 $\pm$ 95.9pg/mL로 DSS 투여군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다($p<0.05$)(도 6의 B). TNF- α 의 생성량은 DSS 투여군에서 188.6 $\pm$ 42.0pg/mL으로 음성대조군(control) 54.5 $\pm$ 8.2pg/mL에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다($p<0.05$). 반면에 5-ASA, 실시예 시료의 투여로 인해 TNF- α 의 생성량은 DSS 투여군에 비해 감소하는 경향을 보였으며 특히 5-ASA 투여군과 실시예 시료 400mg/kg 투여군에서의 생성량은 각각 69.5 $\pm$ 9.3pg/mL, 76.0 $\pm$ 9.0pg/mL으로 DSS 투여군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다($p<0.05$)(도 6의 C).

도면

도면1



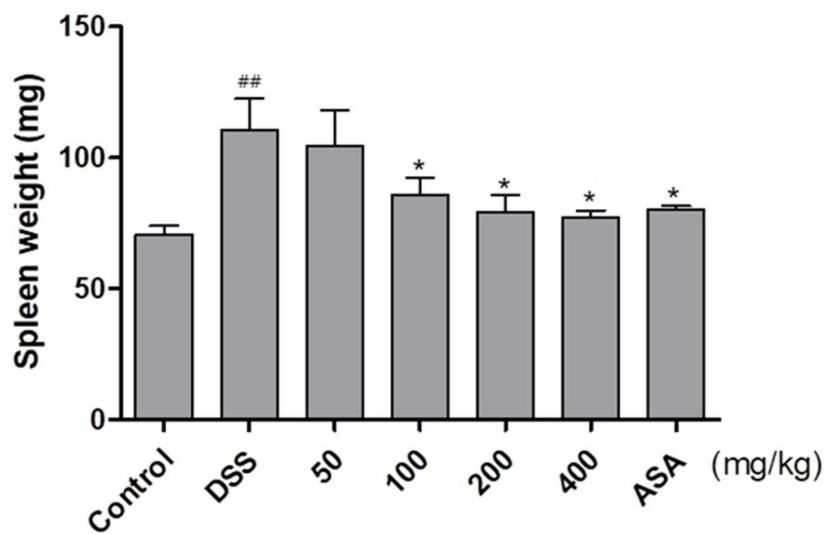
도면2



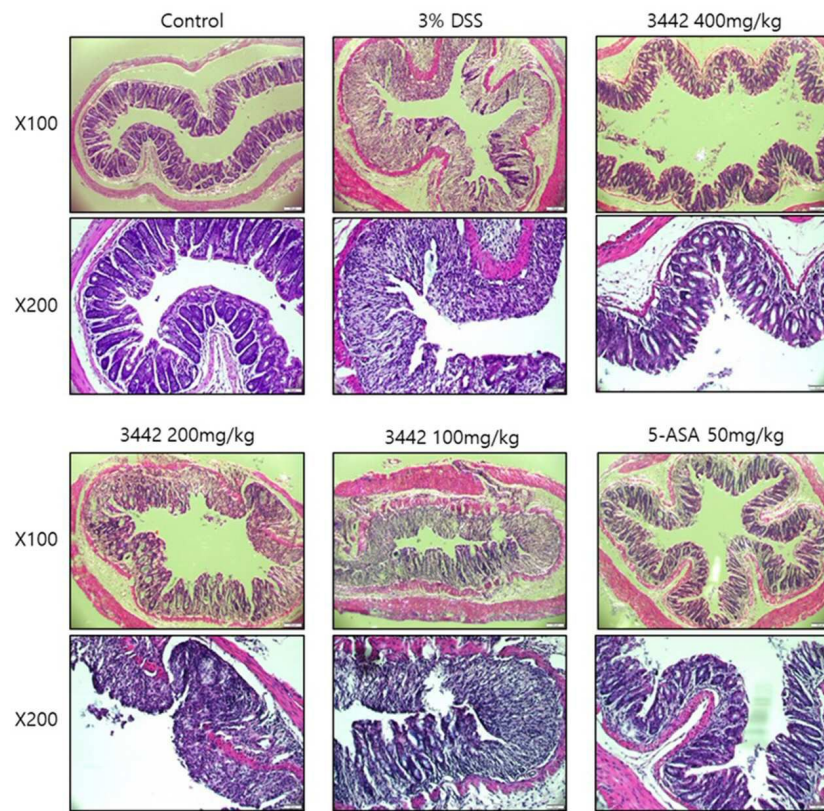
도면3



도면4



도면5



도면6

