



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0092058

(43) 공개일자 2013년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/752 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0013525

(22) 출원일자 2012년02월10일

심사청구일자 2013년01월09일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

(72) 발명자

안광석

서울특별시 성북구 하월곡동 228번지 꿈의숲 푸르지오 106동 1307호

김소미

제주특별자치도 제주시 오등동 579-4

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

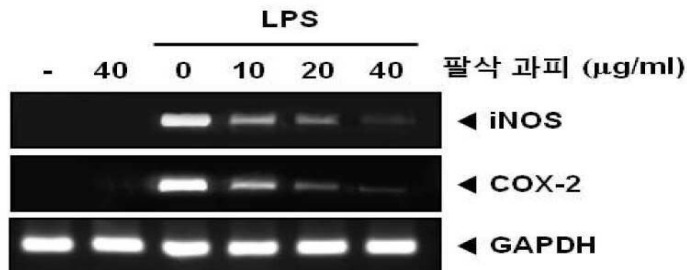
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 염증 질환 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

정승원

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 14 금화마을1
단지대우현대아파트 109동 1001호

김종찬

경기도 용인시 기흥구 사은로 274-22 써니밸리아파
트 101동 801호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0006220
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초의과학연구센터(MRC)
연구과제명	암세포 사멸 유도 및 항암제 독성완화/내성 억제 효능 한방소재 개발
주관기관	경희대학교
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	110137-3
부처명	농림수산식품부
연구사업명	바이오연구사업단
연구과제명	재래굴 유래 항염증(anti-inflammatory) 천연활성물질 발굴 및 제품화
주관기관	제주대학교
연구기간	2010.12.29 ~ 2013.12.28

특허청구의 범위

청구항 1

제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 팔삭 추출물은 팔삭 과피 추출물인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 팔삭 과피 추출물은 팔삭 과피의 초임계 추출물인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 팔삭 과피의 초임계 추출물은 동결건조 후 분쇄한 팔삭 과피 분말을 2시간 동안 CO₂ 초임계 추출기로 280~320 bar, 45~55℃에서 초임계 추출법으로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 팔삭 추출물은 iNOS, COX-2, TNF- α 또는 IL-6의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 팔삭 추출물은 팔삭 과피의 초임계 추출물인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 팔삭 과피의 초임계 추출물은 동결건조 후 분쇄한 팔삭 과피 분말을 2시간 동안 CO₂ 초임계 추출기로 280~320 bar, 45~55℃에서 초임계 추출법으로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 팔삭 추출물은 iNOS, COX-2, TNF- α 또는 IL-6의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품.

명 세 서

기술분야

- [0001] 본 발명은 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 염증 질환 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 최근 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 기능은 식품이나 식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있으며, 보다 건강하게 오래 살고자 하는 인류의 필요에 따라 근래에 이르러 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 다양한 자원으로 부터 다양한 생리기능을 가진 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그 중에서도 특히 식물자원에 포함된 화합물에 많은 관심이 집중되고 있다 (Lee, SE *et al.*, *Korean J. Medcinal Crop Sci.* 12:73-78. 2004). 이러한 식물자원 중 제주 자생 재래 감귤은 각종 질환의 예방과 치료에 효능을 갖는 것으로 나타나 현재 많은 연구를 필요로 하고 있다.
- [0003] 염증 반응에서 대식세포 (macrophage)는 염증을 유도하고, 염증 반응을 유지하기 위하여 병원체에 반응하여 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (interleukin-6) 및 IL-1 β 와 같은 염증유발인자 (pro-inflammatory cytokine)를 생성하고, iNOS (inducible nitric oxide synthase)와 COX-2 (cyclooxygenase-2)를 합성하여 NO (nitric oxide) 및 PGE2 (prostaglandin E2)를 생성한다 (Jin HJ *et al.*, *J Ethnopharmacol* 127(3):589-595. 2010). NO는 생리학적으로 매우 중요한 항상성 조절자이며, 장내의 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 염증이 발생하면 염증 관련 세포의 iNOS 발현량이 증가하여 다량의 NO가 생성되며, 과도하게 생성된 NO에 의해 조직 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등이 발생하고, 혈관 투과성이 증가되어 부종이 유발된다. 염증 반응이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 PGE2가 생성되는데 이것은 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 인자이다 (Wang MT *et al.*, *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4):525-534. 2007). 따라서, 염증 반응에서 생성되는 NO 및 COX-2와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다.
- [0004] iNOS, COX-2, IL-6 및 TNF- α 의 발현을 포함하는 NF- κ B (nuclear factor kappa B) 활성은 NF- κ B가 iNOS, COX-2, IL-6 및 TNF- α 유전자의 업스트림 프로모터 지역을 공유하기 때문이다. 이러한 유전자 산물은 염증 반응의 중요한 구성요소이며, 여러 염증관련 질병의 발병 원인이라는 것이 보고되어있다 (Ahn KS *et al.*, *Curr Mol Med* 7:619-637. 2007). 본 발명자는 그동안 식물에서 얻어진 물질이 NF- κ B 신호 경로의 억제를 통한 항염증 효과에 영향을 미친다는 것을 확인하였고, 본 발명에서 LPS (lipopolysaccharide)로 자극한 RAW264.7 대식세포를 이용하여 팔삭 과피 추출물의 항염증 효과를 규명하고자 한다.
- [0005] 한편, 한국공개특허 제2008-0113478호에는 '항염활성을 갖는 미성숙 감귤 정유추출물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2011-0134742호에는 '진귤 과피 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리메톡시플라본을 유효성분으로 함유하는 염증 예방 또는 치료용 조성물'이 개시되어 있다. 그러나 본 발명에서와 같이, 제주 재래 감귤인 팔삭의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대해서는 개시된 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 LPS (lipopolysaccharide)로 자극한 RAW 264.7 대식세포에 처리하여 항염증 효과를 조사하였는데, 팔삭 과피 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NF- κ B (nuclear factor kappa B) p65의 인산화를 억제하고 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 IL-6 (interleukin-6)의 발현을 억제하는 것을 확인함으로써, 상기 팔삭 추출물의 염증 질환에 대한 치료 효과 및 다양한 유용성을 밝히는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품을

제공한다.

발명의 효과

[0009]

본 발명에 따르면, 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물은 생식용으로 상품성이 낮기 때문에 점차 사라져가고 있는 재래 감귤의 효용성을 의약품 조성물 및 식품가공 소재로서 재조명하였다. 본 발명의 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염용 약학조성물은 천연재료로부터 얻어진 물질로 세포독성이 없으며, 염증 반응 관련 유전자의 발현 억제 효과가 뛰어나, 염증 질환 예방 및 치료를 위한 약학조성물 또는 염증 질환 예방 및 개선을 위한 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010]

도 1은 RAW 264.7 대식세포의 세포 생존도에 대한 팔삭 과피 추출물의 영향을 나타낸다. 세포에는 24시간 동안 팔삭 과피 추출물 (0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$)이 처리되었고, 세포 생존도는 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) 분석으로 측정되었다. 독립적인 실험의 결과는 평균을 구했고, 무처리 대조구 세포의 생존도와 비교하여 세포 생존율로 나타내었다. 모든 데이터는 적어도 세 번의 실험의 평균±표준편차로 나타내었다.

도 2는 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 NO에 대한 팔삭 과피 추출물의 영향을 나타낸다. 나이트라이트(nitrite) 생성은 재료 및 방법에 기재된 것처럼 Griess 반응 분석 방법으로 측정되었다. 세포는 다양한 농도의 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 되었고, 22시간 동안 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. 얻어진 값은 DMEM 배지에 용해된 소듐 나이트라이트의 표준 농도와 비교되었고, 샘플이 처리된 세포의 조건 배지(conditioned media) 안의 나이트라이트의 농도가 계산되었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험으로부터 얻어졌고, 평균±표준편차로 나타내었다. *** $P < 0.001$ 은 LPS 처리 그룹의 유의차를 나타낸다. ### $P < 0.001$ 은 비자극 대조구 그룹의 유의차를 나타낸다.

도 3은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 iNOS, COX-2 유전자 산물에 대한 팔삭 과피 추출물의 저해를 나타낸다. RAW 264.7 세포는 다양한 농도의 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 되었고, 22시간 동안 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. 동량의 총 단백질 (25 $\mu\text{g/레인}$)은 8% SDS-PAGE (iNOS) 및 10% SDS-PAGE (COX-2)가 수행되었고, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현은 특이적 항-iNOS 및 항 COX-2 항체를 사용하여 웨스턴블롯으로 검출되었다. β -액틴은 로딩 대조구로 사용되었다.

도 4는 RAW264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현에 대한 팔삭 과피 추출물의 저해를 나타낸다. RAW 264.7 세포는 표시된 농도의 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 되었고, 22시간 동안 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. 총 RNA가 분리되었고, iNOS 및 COX-2 mRNA 발현은 RT-PCR 분석으로 조사되었다. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 PCR은 샘플의 유사한 초기 cDNA 함량을 대조하기 위해 수행되었다.

도 5는 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 IL-6 생성에 대한 팔삭 과피 추출물의 저해를 나타낸다. 세포는 다양한 농도의 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 되었고, 22시간 동안 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. IL-6 분비량은 재료 및 방법에 기재된 것처럼, IL-6 항체가 코팅된 ELISA 키트로 측정되었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험으로부터 얻어졌고, 평균±표준편차로 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ 은 LPS 처리 그룹의 유의차를 나타낸다. ### $P < 0.001$ 은 비자극 대조구 그룹의 유의차를 나타낸다.

도 6은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 TNF- α 생성에 대한 팔삭 과피 추출물의 저해를 나타낸다. 세포는 다양한 농도의 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 되었고, 22시간 동안 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. TNF- α 분비량은 재료 및 방법에 기재된 것처럼, TNF- α 항체가 코팅된 ELISA 키트로 측정되었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험으로부터 얻어졌고, 평균±표준편차로 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ 은 LPS 처리 그룹의 유의차를 나타낸다. ### $P < 0.001$ 은 비자극 대조구 그룹의 유의차를 나타낸다.

도 7은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 NF- κB 활성화에 대한 팔삭 과피 추출물의 저해를 나타낸다. 세포는 팔삭 과피 추출물 40 $\mu\text{g/ml}$ 로 2시간 동안 처리되었고, 표시된 시간 동안 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. 핵 추출물이 준비되었고, SDS-PAGE로 분리하여 니트로셀룰로오스 막으로 이동시킨 후, 인산 특이적 항-p65 (ser276) 항체를 사용하여 웨스턴블롯이 수행되었다. 라민(lamin) B 단백질은 로딩 대조구로 사용되었다. 제시된 결과는 세 번의 독립적인 실험을 대표한다.

도 8은 LPS로 유도된 p38, ERK 및 JNK 활성화에 대한 팔삭 과피 추출물의 영향을 나타낸다. 총 세포 추출물이 준비되었고, SDS-PAGE로 분리하여 니트로셀룰로오스 막으로 이동시킨 후, 인산 특이적 항-p38, 인산 특이적 항-ERK 및 인산 특이적 항-JNK 항체를 사용하여 웨스턴블롯이 수행되었다. 동일한 막에 항-p38, 항-ERK 및 항-JNK 항체를 다시 블롯팅하였다. 제시된 결과는 세 번의 독립적인 실험을 대표한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제주 채래 감굴인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학조성물에서, 상기 팔삭 추출물은 바람직하게는 동결건조시킨 팔삭의 과피, 과육, 통과 추출물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동결건조시킨 팔삭 과피 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학조성물에서, 상기 팔삭 과피 추출물은 바람직하게는 팔삭 과피의 초임계 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학조성물에서, 상기 팔삭 과피의 초임계 추출물은 동결건조 후 분쇄한 팔삭 과피 분말을 1~2시간 동안 CO₂ 초임계 추출기로 280~320 bar, 45~55℃에서 초임계 추출법으로 추출하여 제조될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동결건조 후 분쇄한 팔삭의 과피 분말을 2시간 동안 CO₂ 초임계 추출기로 300 bar, 50℃에서 초임계 추출법으로 추출하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명의 초임계 추출법은 초임계 유체 추출법이며, 종래의 증류와 추출기술의 원리가 복합된 추출 시스템이다. 초임계 추출 시스템은 물질을 초임계 유체의 용해력을 이용하여 추출하는 것을 말한다.
- [0016] "초임계 유체"란 물질에 열과 압력을 가할 때, 특정 온도 (임계 온도)와 압력 (임계 압력)을 넘어서면, 그 이상으로 열과 압력을 가해도 그 상태가 변하지 않는 물질이 되는데 이를 초임계 유체라고 한다. 초임계 유체는 액체와 기체의 상태를 구별할 수 없는 상태이며, 일반적인 액체나 기체와는 다른 고유의 특성을 가진다. 초임계 유체는 압축성 유체로 기체와 액체의 중간 정도의 물성을 가져 기체처럼 확산이 잘되고 액체처럼 다른 물질을 잘 용해시킬 수 있고, 또한 압력과 온도를 변화시킴으로써 물성을 원하는 상태로 조절할 수 있다.
- [0017] 초임계 유체의 대표적인 예로는 이산화탄소, 물, 메탄, 에탄, 프로판, 에틸렌, 프로필렌, 메탄올, 에탄올, 아세톤 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 식품 및 의약품에서 사용하기 위한 초임계 유체의 조건으로는 화학적으로 안전하고, 장치에 부식이 없으며, 임계 온도 및 압력이 낮으면서 용해도가 좋아야 한다.
- [0018] 이러한 점에서 공정에 이산화탄소가 주로 사용되는데 초임계 이산화탄소는 비교적 가격이 저렴하고, 인체에 무해할 뿐 아니라 불연성이고 화학적으로 안정하다. 또한, 낮은 임계점 (73.8bar, 31.1℃)으로 물성 변화가 쉽고, 재순환하여 사용할 수 있다. 초임계 이산화탄소의 물리적 특징은 기체와 액체의 중간 정도의 물성을 가지고 있다는 점이며 온도와 압력의 조절로서 밀도, 용해도 등의 물성을 변화시킬 수 있다. 확산수가 크고 표면장력이 낮아 미세한 공간으로의 침투가 가능하고, 물질 전달이 용이하며 액체와 동등한 비중과 밀도를 가지기 때문에 용해력도 우수하다. 특히 초임계 이산화탄소는 낮은 분자량이 가지는 비극성 물질을 잘 용해하고, 극성 및 고분자 물질에 대해서는 제한적으로 용해되기 때문에 혼합물에서 원하는 단 한가지의 물질을 분리하여 추출할 수 있다. 또한 초임계 이산화탄소는 다른 용매에 비해 임계점이 낮고 확산 계수가 10배에서 100배 더 높기 때문에 추출할 원료의 영약학적 가치를 파괴하지 않고 추출이 가능하며, 추출 시 이산화탄소는 기화되어 용질만 남기 때문에 용매에 의한 2차 오염이 없는 친환경적인 용매로 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학조성물에서, 상기 팔삭 추출물은 염증 반응 관련 유전자로 알려진 iNOS, COX-2, TNF- α 또는 IL-6의 발현을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학조성물에서, 상기 염증 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 (sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은, 약학조성물 총 중량에 대하여 상기 팔삭 추출물을 0.02

내지 80 중량%, 바람직하게는 0.02 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 팔삭 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 팔삭 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 팔삭 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 약학조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카가오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 팔삭 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 팔삭 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 팔삭 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품에서, 상기 팔삭 추출물은 바람직하게는 동결건조시킨 팔삭의 과피, 과육, 통과 추출물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동결건조시킨 팔삭 과피 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품에서, 상기 팔삭 과피 추출물은 바람직하게는 팔삭 과피의 초임계 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품에서, 상기 팔삭 과피의 초임계 추출물은 동결건조 후 분쇄한 팔삭 과피 분말을 1~2시간 동안 CO₂ 초임계 추출기로 280~320 bar, 45~55℃에서 초임계 추출법으로 추출하여 제조될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동결건조 후 분쇄한 팔삭의 과피 분말을 2시간 동안 CO₂ 초임계 추출기로 300 bar, 50℃에서 초임계 추출법으로 추출하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품에서, 상기 팔삭 추출물은 염증 반응 관련 유전자로 알려진 iNOS, COX-2, TNF- α 또는 IL-6의 발현을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품에서, 상기 염증 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염,

건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군 (sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 상기 식품은 항염 활성을 증가시키기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 상기 팔삭 추출물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 팔삭 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 추출물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0035] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 팔삭 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0036] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 추출물 100 ml당 일반적으로 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g이다.

[0037] 상기 외에 본 발명의 팔삭 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 팔삭 추출물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0038] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 재료 및 방법

[0040] 1. 시료 추출

[0041] 팔삭 성숙 과일은 2011년 1월 참여기업인 (e)제주 영농조합으로부터 확보하였고, 시료를 확보한 후 농약 및 기타 불순물의 제거를 위해 수확 즉시 물로 2회 세척하였다. 과육과 과피를 분리하고 -70℃ 초저온 냉동고 (deep freezer)에서 3일간 동결한 후, 72시간 동결건조 하였다. 초임계 추출을 위하여, 동결건조시킨 팔삭의 과피를 분쇄한 뒤, 2시간 동안 1 L 추출기로 300 bar, 50℃에서 초임계 추출법을 사용하여 추출하였다. 이후 추출물은 상온에서 암 조건에 보관하였고 사용 시 DMSO에 녹여 사용하였다.

[0042] 2. 시약

[0043] MTT와 LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.), Griess 시약, 소듐 나이트라이트 (sodium nitrite) 및 DMSO는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, FBS (fetal bovine serum)와 항생제는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, 항체는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA) 및 Santa Cruz biotechnology, Inc.에서 구입하였다. TNF-α 및 IL-6 ELISA 키트는 R&D system, Inc.에서 구입하였다.

[0044] 3. 세포배양

[0045] 쥐 대식세포주인 RAW 264.7은 한국 세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, DMEM (Gibco, Grand Island, NY)에 10% FBS, 100 units/mL 페니실린 및 100 mg/mL 스트렙토마이신을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂의 완전 습윤 조건의 CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 컨플루언스 (confluence)에서 실험하였고, 20회 계대 배양 (passage)을 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

[0046] 4. 세포 생존율 측정

[0047] 생존율 측정은 세포 배양관 (96-웰 플레이트)에 세포 (1×10^4 세포/웰)를 분주하여 24시간 동안 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 팔삭 과피 추출물을 농도별로 처리하고, MTT 용액 (2 mg/ml)을 배양액에 첨가하였다. 2시간 후 배지를 제거하고 생성된 포마잔 크리스탈 (formazan crystal)을 DMSO에 녹여 분광광도계 (ELISA reader, TECAN)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0048] 5. NO 분석

[0049] LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 팔삭 과피 추출물의 NO 생성 억제를 측정하기 위해 팔삭 과피 추출물을 각 농도별로 처리한 실험구와 대조구 세포를 24시간 배양 후 Griess 분석 방법을 이용하여 나이트라이트를 측정하였다. 96 웰 플레이트에 세포 배양 상등액과 Griess 시약을 1:1로 혼합하여 넣고 5분 동안 반응시킨 후 ELISA 마이크로플레이트 리더 (SoftMax Pro5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0050]

[0051] 6. 싸이토카인의 생성량 측정

[0052] RAW 264.7 대식세포를 배양하여 6-웰 플레이트에 세포 (1×10^6 세포/웰)를 분주하고 팔삭 과피 추출물을 농도별로 처리한 다음, 2시간 후에 LPS (1 µg/ml)를 처리하였다. LPS 처리 22시간 후에 세포 배양액을 취하여 싸이토카인을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -80℃에서 보관하였고, TNF-α와 IL-6 함량을 ELISA 키트를 사용하여 측정하였으며, TNF-α와 IL-6의 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

[0053]

[0054] 7. 웨스턴블롯

[0055] 배양된 세포에 팔삭 과피 추출물을 일정 시간 처리한 후에 수거하여, 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액 (50 mM HEPES (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% 디옥시-콜레이트 (deoxy-cholate), 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 µg/ml 아프로티닌 (aprotinin))을 첨가하여 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 단백질 분석 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액 (단백질 30 µg)은 5×샘플 버퍼와 섞어 100℃에서 5분 동안 끓인 후에 8 ~ 12 % SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질은 세미-드라이 (semi-dry) 방법으로 4℃에서 90V 전하를 2시간 걸어주어 니트로셀룰로오스 막 상에 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막은 상온에서 5 % 탈지유와 2시간 동안 반응시켜 비 특이적 항체결합을 억제시켰다. 측정하고자 하는 항체는 0.1 %의 Tween-20이 포함된 5 % 탈지유에 1:1000으로 희석하여 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 이차항체인 항-토끼 IgG 결합-HRP를 1시간 동안 처리하였다. 그 후, ECL 키트 (enhanced chemiluminescence kit, Amersham, England)를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

[0056]

[0057] 8. 통계처리

[0058] 통계처리 방법은 ANOVA를 이용하여 분석한 후 Bonferroni 테스트를 사용하여 검정하였으며, p값이 0.01 미만일 때 통계학적인 유의성을 인정하였다.

[0059] 실시예 1. 팔삭 과피 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 세포독성에 미치는 영향

- [0060] 세포 생존도를 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 배양한 후 팔삭 과피 추출물을 다양한 농도 (0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$)로 24시간 동안 처리하여 MTT 분석을 이용해 생존도를 측정하였다. 그 결과, 팔삭 과피 추출물은 RAW 264.7 대식세포에 대해 비교적 적은 독성을 나타내는 것을 보여주었다 (도 1).
- [0061] **실시예 2. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향**
- [0062] 팔삭 과피 추출물에 의한 항염증 효과를 검증하기 위하여, LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 팔삭 과피 추출물이 NO의 생성에 영향을 미치는지 확인하였다. 검증 방법은 세포를 배양한 액체 배지에 축적된 나이트라이트를 Griess 시약으로 측정하는 방법을 사용하였다. 세포는 추출물을 처리하지 않은 대조구와 농도별 (0, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$)로 추출물을 2시간 동안 처리한 실험구를 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극하여 22시간 동안 배양하였다. 도 2에서 확인할 수 있듯이 LPS로 자극한 세포에서는 NO 생성량이 대조구에 비해 상당히 증가하였으며, 팔삭 과피 추출물을 농도별로 처리한 실험구에서는 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 NO의 생성량이 저하되었다.
- [0063] **실시예 3. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향**
- [0064] RAW 264.7 대식세포에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 팔삭 과피 추출물이 미치는 영향을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행했다. 도 3에 나타난 것과 같이, LPS로 자극받지 않은 세포에서는 극히 낮은 수준의 iNOS와 COX-2 단백질이 발현되었으나, LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 후 22시간이 지난 세포에서는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 매우 높게 증가하였다. 반면에 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리한 (0, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) 세포에서는 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2의 발현이 농도 의존적으로 억제되었다. 팔삭 과피 추출물의 단독 처리 (40 $\mu\text{g/ml}$)는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현에 영향을 주지 않음을 보였다.
- [0065] **실시예 4. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 iNOS 및 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향**
- [0066] 본 발명자는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 mRNA와 관계가 있는지 확인하였다. RAW 264.7 대식세포에 팔삭 과피 추출물을 2시간 동안 전처리 한 후, LPS를 처리하여 22시간 동안 자극한 세포에 대해 RT-PCR을 수행하여 iNOS와 COX-2 mRNA 발현을 확인하였다. LPS를 처리하여 22시간 동안 자극을 준 세포의 mRNA 수준은 증가하였고, LPS를 처리하지 않은 세포는 mRNA 발현이 관찰되지 않았다. 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리한 후 LPS로 자극한 세포의 RT-PCR 결과는 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 팔삭 과피 추출물 농도에 의존적으로 억제됨을 나타냈다 (도 4).
- [0067] **실시예 5. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 IL-6 분비에 미치는 영향**
- [0068] RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 IL-6의 생성에 대한 팔삭 과피 추출물의 잠재적인 항염증 능력을 측정하기 위하여, 세포를 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 (0, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) 한 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 22시간 동안 자극하였다. IL-6의 농도는 세포를 배양한 액체 배지를 ELISA 분석에 의해 측정하였다. 그 결과, 팔삭 과피 추출물이 IL-6의 생성에 대해 농도 의존적으로 억제 능력을 나타냈다 (도 5).
- [0069] **실시예 6. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 TNF- α 분비 억제에 미치는 영향**
- [0070] 추가로 RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 TNF- α 의 생성에 대한 팔삭 과피 추출물의 항염증 능력을 측정하기 위하여, 세포를 팔삭 과피 추출물로 2시간 동안 전처리 (0, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) 한 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 22시간 동안 자극하였다. TNF- α 의 농도는 세포를 배양한 액체 배지의 ELISA 분석으로 측정하였다. 그 결과, 팔삭 과피 추출물이 TNF- α 의 생성에 대해 농도 의존적인 억제 능력을 나타냈다 (도 6).
- [0071] **실시예 7. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 NF- κ B 활성 억제에 미치는 영향**
- [0072] 염증에 중요한 전사인자인 NF- κ B는 iNOS와 COX-2를 조절함으로써 염증 반응을 매개한다고 보고되어있다. 이에 본 발명에서는 NF- κ B의 서브유닛인 p65의 인산화 정도를 평가하였다. 그 결과 도 7에 나타난 것과 같이, LPS

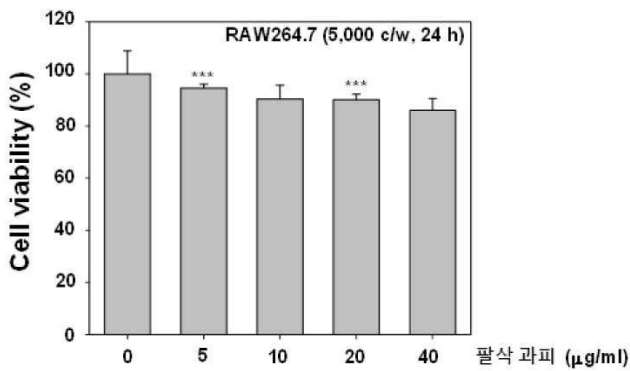
처리에 의해 p65는 15분 경과 후 최대로 인산화되었으며, 팔삭 과피 추출물을 전처리한 세포군에서는 p65의 인산화가 억제되었다. 따라서 팔삭 과피 추출물은 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성을 억제하고 결과적으로 iNOS와 COX-2을 발현을 억제하는 것으로 판단된다.

실시예 8. 팔삭 과피 추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 p38, ERK1/2 및 JNK의 인산화 반응 억제에 미치는 영향

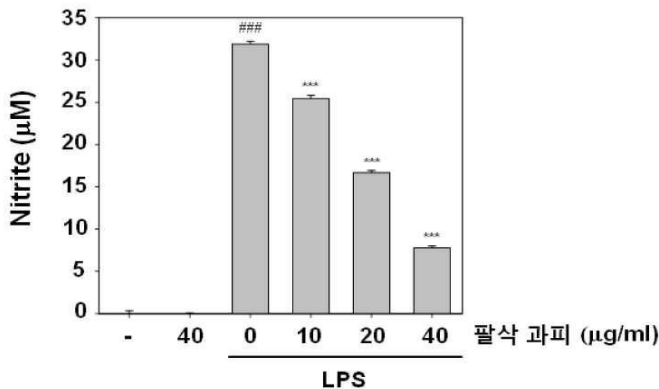
팔삭 과피 추출물에 의해 또 다른 염증인자 키나아제인 MAPKs (p38, ERK 및 JNK)의 인산화 정도가 억제되는지 확인하였다. 그 결과 도 8에서 확인할 수 있듯이, 팔삭 과피 추출물은 LPS에 의해 유도되는 어떠한 MAPKs (p38, ERK 및 JNK)의 인산화도 억제하지 않음을 확인할 수 있었다. 위의 결과로 팔삭 과피 추출물의 소염효과는 MAPKs (p38, ERK 및 JNK)의 인산화 억제를 통해서 일어나는 것이 아니라 NF- κ B의 활성억제를 통해서 일어난다는 것이 확인되었다.

도면

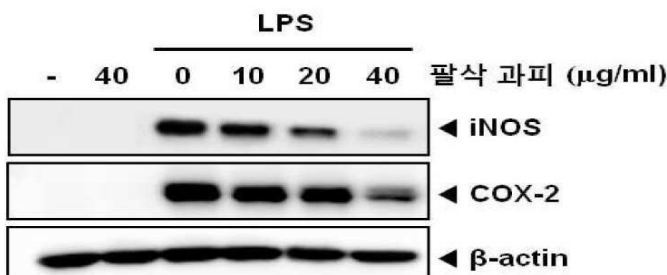
도면1



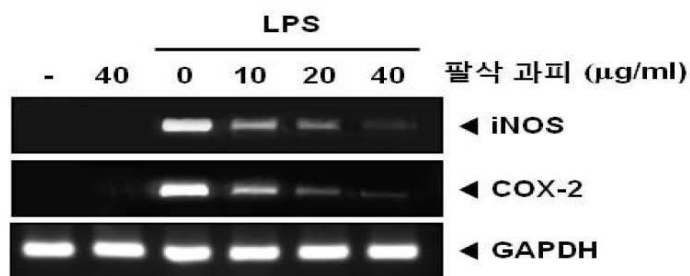
도면2



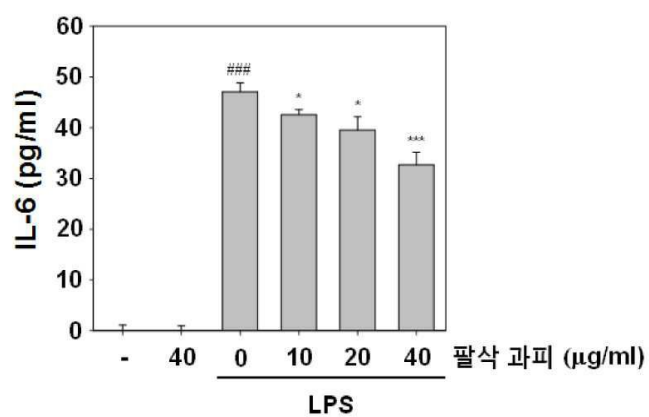
도면3



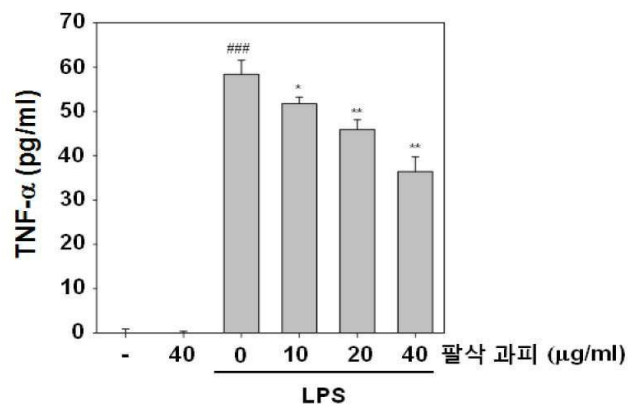
도면4



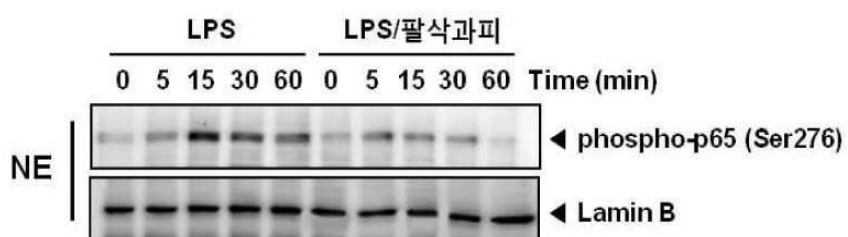
도면5



도면6



도면7



도면8

