



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0107069
(43) 공개일자 2024년07월08일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/352</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2022.01)
 <i>A61K 31/366</i> (2006.01) <i>A61K 36/81</i> (2006.01)
 <i>A61K 8/49</i> (2006.01) <i>A61P 29/00</i> (2023.01)
 <i>A61Q 19/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/352</i> (2023.05)
 <i>A23L 33/10</i> (2022.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0081014(분할)
 (22) 출원일자 2024년06월21일
 심사청구일자 2024년06월21일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2021-0133035
 원출원일자 2021년10월07일
 심사청구일자 2021년10월07일</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 심인섭
 경기도 성남시 분당구 정자일로 27, B동 1105호</p> <p>(74) 대리인
 위병갑</p> |
|--|---|

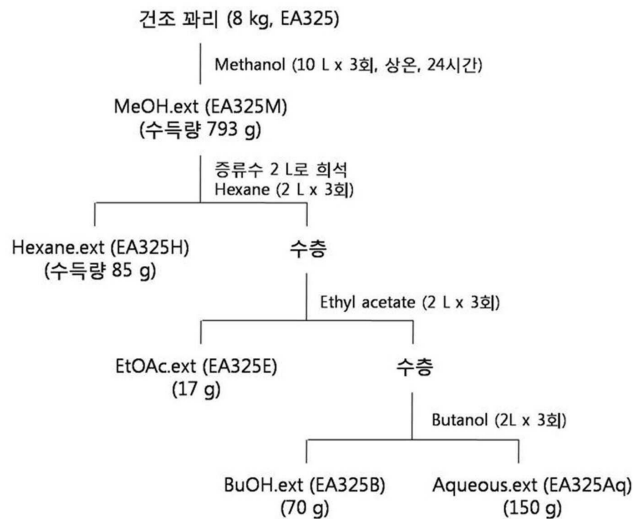
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **파리 추출물로부터 분리된 정제물 또는 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 파리 추출물로부터 정제 및 분리된 분획물 또는 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 파리 추출물로부터 분리된 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본, 피살린 B 및 이소피살린 B 화합물은 LPS에 의해 유도된 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 TNF- α 의 발현 증가를 현저히 감소하는 효과를 나타내므로, 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/366 (2013.01)

A61K 36/81 (2013.01)

A61K 8/498 (2013.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2800/74 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

3,4',5-트리히드록시-3'',7-디메톡시-플라본(3,4',5-trihydroxi-3'',7-dimethoxy-flavone), 피살린 B(physalin B) 및 이소피살린 B(isophysalin B)로부터 선택된 어느 하나 이상의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물로부터 분리된 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 3,4',5-트리히드록시-3'',7-디메톡시-플라본은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 헥산 분획물로부터 분리된 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 피살린 B 및 이소피살린 B는 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리된 것인, 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항의 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출된 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 피부염, 부종, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 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 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 조성물.

청구항 7

3,4',5-트리히드록시-3'',7-디메톡시-플라본(3,4',5-trihydroxi-3'',7-dimethoxy-flavone), 피살린 B(physalin B) 및 이소피살린 B(isophysalin B)로부터 선택된 어느 하나 이상의 화합물 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

3,4',5-트리히드록시-3'',7-디메톡시-플라본(3,4',5-trihydroxi-3'',7-dimethoxy-flavone), 피살린 B(physalin

B) 및 이소피살린 B(isophysalin B)로부터 선택된 어느 하나 이상의 화합물 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 파리(*Physalis alkekengi* var. *francheti* (Masters) Hort) 추출물로부터 분리된 정제물 또는 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

염증은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 염증 반응은 면역계를 동원 하는 생체의 방어와 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐 아니라 많은 질병의 병리작용에 관련되어 있는 대단히 중요한 과정이다. 염증을 일으키는 원인을 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다. 또한, 염증 반응 시, 면역세포인 macrophage는 interleukin-1 β (IL-1 β)나 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine류 또는 nitric oxide (NO)나 prostaglandin (PG) 등의 다른 inflammatory mediator를 생산함으로써 반응 진행과정에서 중요한 역할을 수행한다. Macrophage에 의한 이런 매개체의 생산은 많은 염증성 조직에서 발견된다. 예를 들어 생체가 bacterial endotoxin인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 외부 면역 자극 물질에 노출되면 생체신호전달 경로를 거쳐 면역세포들이 활성화되며 동시에 이들 세포에 의한 염증 유발 인자들의 발현양이 증가하게 되는데, 이 과정의 첫 단계로 해당 인자의 mRNA 발현이 증가하게 된다. 또한, 증가된 IL-1 β , TNF- α , iNOS, COX-2 등과 같은 사이토카인이나 생체 효소들은 염증(inflammation), 통증조절(pain control), 세포사멸(apoptosis), 종양생성(tumorigenesis), 자가면역반응(autoimmune response) 등의 약리학적 또는 생리학적 생체반응에서 중요한 역할을 수행 한다. 염증 매개 인자의 과생산은 류마티스성 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 만성 간염, 폐섬유화증 등과 같은 많은 염증성 질환에서 쉽게 발견되며 이들 질환의 병리현상에 대한 주요인이 된다. 따라서, 이러한 염증 유발 매개 인자에 대한 유전자 발현의 저해방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 억제할 수 있는 치료원리 및 방법이 될 수 있다.

[0003]

생체 조직의 손상에 대한 능동적인 생체 방어 과정으로 설명되는 염증반응은 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 시작하여 손상을 극소화시키고, 손상된 부위를 복구시키려는 일련의 생체과정을 일으키게 된다. 염증 반응 시, 면역세포인 대식세포(macrophage)는 interleukin-1 β (IL-1 β)나 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine류 또는 nitric oxide (NO)나 prostaglandin (PG) 등의 다른 inflammatory mediator를 생산함으로써 반응 진행과정에서 중요한 역할을 수행한다. Macrophage에 의한 이런 매개체의 생산은 많은 염증성 조직에서 발견된다. 예를 들어 생체가 bacterial endotoxin인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 외부 면역 자극 물질에 노출되면 생체신호전달 경로를 거쳐 면역세포들이 활성화되며 동시에 이들 세포에 의한 염증 유발 인자들의 발현양이 증가하게 되는데, 이 과정의 첫 단계로 해당 인자의 mRNA 발현이 증가하게 된다. 따라서, TNF- α , NO, 프로스타글란딘 또는 IL-1 β 의 생성을 억제하는 물질을 탐색하면, 부종 또는 피부염과 같은 염증성 질환에 효과적인 물질로 판명할 수 있을 것이다.

[0004]

대부분의 염증 질환의 치료제로서 널리 사용되고 있는 제제인 비스테로이드성 소염제(non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDS)는 시클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)라고 하는 아라키돈산(arachidonic acid)로부터 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성에 관여하는 효소 활성을 억제함으로써, 항염증 작용을 나타내는데, 주 치료작용 외에 위장관 장애, 간장애, 신장애 등의 심각한 부작용을 야기하기므로 장기간의 사용에 있어서 제약이 따르는 실정이다(Rajakariar R et al. 2006). 따라서 부작용이 거의 없어 장기간 사용하는데 무리가 없으면서 항염증 효능에 탁월한 새로운 소염 진통제의 개발이 널리 요구되고 있으며, 이는 최근 천연 자원에서부터의 효능 검증을 통한 소재 개발 연구가 활성화되고 있는 이유이기도 하다.

[0005]

파리(*Physalis alkekengi* var. *francheti* (Masters) Hort)는 우리나라 각지에 재배하는 다년생 초본으로 해발 600m 이하의 숲 가장자리에 자라는 다년초로서 높이 60~90 cm 정도이다. 지하에는 옆으로 가는 긴 근경이 있다. 잎은 호생하며 광란형으로 끝이 날카롭고 치아식의 거치가 있으며 절마다 2매씩 난다. 꽃은 엽액에서 나오며 흰색으로 1개씩 달리며 소화경은 길이 3~4cm이고, 꽃받침은 짧은 통형이며, 끝이 얇게 5개로 갈라지고 가장자리에 털이 있다. 과실은 구형의 액과로 적색으로 익는다. 생약으로는 전초를 사용하며 산장 (Physalis Herba), 등룡이라고도 한다. 성분으로는 전초에 피살린 A, B, C (physalin A, B, C), 사포닌 (saponin), 플라보노이드 (flavonoid), 알칼로이드 (alkaloid)가 있으며 열매에는 0.12% 카로티노이드 (carotenoid)인 붉은 색소, 아스

코르빈산, 수지, 펙틴, 탄닌, 쓴맛물질, 카로틴, 알칼로이드, 퀘르세틴 (quercetin), 카페인산, 시나민산, 페룰라산 등이 있고 뿌리에는 3-알파-티글로옥시트로판, 피살린, 제아크산틴이 함유되어있고 씨에는 리놀레인을 주성분으로 하는 기름이 함유되어 있다. 그러나, 파리로부터 정제된 분획물 또는 화합물의 항염증 작용에 대한 실험적 연구는 아직 보고된 바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 파리 추출물로부터 분리된 분획물과 화합물의 염증 유발 사이토카인 발현에 대한 억제 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-1172595호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 염증성 질환의 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0013] 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 나아가, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0016] 더 나아가, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0017] 본 발명에서, 상기 추출물은 메탄올로 추출된 것일 수 있다.

[0018] 본 발명에서, 상기 분획물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획한 것일 수 있고, 바람직하게는 물, 부탄올, 에틸아세테이트 및 헥산을 사용하여 분획한 것일 수 있다.

[0019] 본 발명에서, 상기 화합물은 3,4',5-트리히드록시-3'',7-디메톡시-플라본(3,4',5-trihydroxy-3'',7-dimethoxy-flavone), 피살린 B(physalin B) 및 이소피살린 B(isophysalin B)로부터 선택된 어느 하나 이상의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 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 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 파리 추출물로부터 정제 및 분리된 분획물, 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본, 피살린 B 및 이소피살린 B 화합물은 대식세포(RAW264.7)에서 LPS에 의한 염증반응 유도 후 증가된 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 TNF- α 의 mRNA 발현을 현저히 감소하는 효과를 나타내므로, 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 파리 추출물 및 분획물의 제조방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 파리 메탄올 추출물(EA325M) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 파리 헥산 분획물(EA325H) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 파리 부탄올 분획물(EA325B) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 파리 물 분획물(EA325Aq) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 6은 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 파리 에틸아세테이트 분획물(EA325E) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 이소피살린 B(EA325E-34-15-K4) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 8은 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 피살린 B(EA325E-34-6-K4) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 9는 LPS를 이용한 염증반응에서 본 발명에 따른 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본(EA325H-34-11-K8) 처리 후 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 용어, "파리 추출물"은 파리의 과실(열매), 뿌리, 잎, 줄기 등으로부터 적합한 용매를 사용하여 추출하여 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들의 조정제물 또는 정제물의 형태를 모두 포함한다. 상기 파리 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 특히, 파리의 과실(열매)로부터 수득한 추출액 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 파리 추출물은 초음파 추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 파리는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 파리 추출물은 천연물로부터 추출물을 제조하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 파리 추출물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출된 것일 수 있다. 예를 들어, 70 내지 99.9 부피%의 메탄올 수용액 또는 메탄올을 추출 용매로 이용할 수 있고, 바람직하게는 메탄올로 추출된 것일 수 있다. 또한 용매로 추출시 추출은 건조된 파리를 분쇄기로 분쇄한 후, 상기 분쇄물의 약 1배 내지 20배, 바람직하게는 약 1배 내지 15배의 추출용매를 가하여, 가열 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 또는 초음파 추출로 수행될 수 있다. 이러한 추출은 12시간 내지 1주일, 바람직하

게는 20시간 내지 72시간 동안, 상온 또는 실온 조건에서 수행할 수도 있으며, 저온 또는 가온 조건 하에서 수행할 수도 있다. 이어서 추출물을 여과 및/또는 감압농축 하여, 파리 추출물을 수득할 수 있으며, 상기 추출 과정을 2 내지 4회 반복할 수 있으며, 여과, 농축, 동결건조 등의 과정을 추가적으로 거칠 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어, "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명에서는 상기와 같이 제조된 파리 추출물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0032] 본 발명에 따른 파리 분획물을 얻기 위하여 당업계에서 공지된 통상적인 분획 용매, 예를 들어, 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 순차적으로 계통 분획하여 수득한 분획한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 물, 부탄올, 에틸아세테이트 및 헥산을 사용하여 분획한 것일 수 있다.

[0033] 예를 들어, 본 발명의 파리 분획물은 상기에서 얻은 추출물에 물을 가한 후, n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올을 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 등의 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물; 및 부탄올, 물 등의 극성용매에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에서는, 대식세포(RAW264.7)에서 LPS에 의한 염증반응 유도 후, 파리 추출물에서 얻어진 분획물의 처리가 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 TNF- α 의 mRNA 발현 변화에 미치는 영향을 분석한 결과, 본 발명의 파리 메탄올 추출물의 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물이 파리 메탄올 추출물 대비 IL-1 β 및 TNF- α 발현 억제 효과가 우수함을 확인하였으며, 특히, 물 분획물이 상기 두 염증성 사이토카인 발현을 모두 감소시키는 효과가 뛰어남을 확인하였다(실시예 1 내지 3 참조).

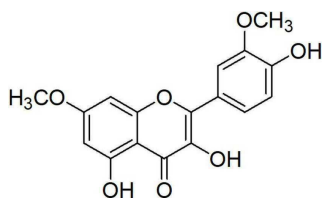
[0035] 또한 본 발명의 파리 분획물은 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함될 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 파리 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획물, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등으로 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획물도 본 발명의 파리 분획물에 포함된다.

[0036] 예를 들어, 본 발명의 화합물들은 상기 비극성용매 가용 분획물을 실리카겔 컬럼, 세파텍스 컬럼, 이온교환수지 등의 컬럼 크로마토그래피법 또는 재경화법 등의 정제법, 바람직하게는 전개용매 (클로로포름 및 물의 혼합용매를 극성을 올려 가면서 전개)를 이용한 실리카겔 컬럼 및 재결정법을 이용한 정제과정을 반복수행하는 공정을 통하여 본 발명의 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본, 피살린 B 및 이소피살린 B 화합물을 분리가능하다.

[0037] 본 발명의 상기 화합물은 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본(3,4',5-trihydroxy-3',7-dimethoxy-flavone), 피살린 B(physalin B) 및 이소피살린 B(isophysalin B)로부터 선택된 어느 하나 이상의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 상기 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본은 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있다.

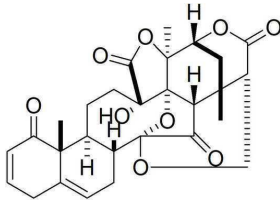
화학식 1



[0039]

[0040] 본 발명의 상기 피살린 B는 하기 화학식 2로 표시되는 것일 수 있다.

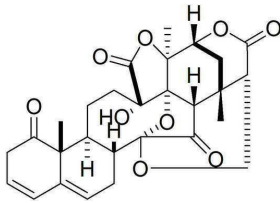
화학식 2



[0041]

[0042] 본 발명의 상기 이소피살린 B는 하기 화학식 3으로 표시되는 것일 수 있다.

화학식 3



[0043]

[0044] 본 발명의 일실시예에서는, 대식세포(RAW264.7)에서 LPS에 의한 염증반응 유도 후, 파리 추출물 및 이의 유래 화합물의 처리가 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 TNF- α 의 mRNA 발현 변화에 미치는 영향을 분석한 결과, 파리 메탄올 추출물에서는 발현 변화가 미약하게 나타난 반면에, 본 발명의 파리 메탄올 추출물의 분획물로부터 분리된 3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본, 피살린 B 및 이소피살린 B 화합물이 적은 농도에서도 IL-1 β 및 TNF- α 발현을 현저히 감소시키는 효과를 나타내므로, 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 탁월함을 확인하였다(실시예 1 내지 3 참조).

[0046] 본 발명에서, 상기 상기 염증성 질환은 피부염, 부종, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 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 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 염증성 질환의 "예방(prevention)" 및/또는 "치료(treatment)"의 용도를 갖는다. 예방적 용도에 있어, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에 기술된 질환, 장애, 또는 상태를 가지고 있거나 발병 위험이 있는 것으로 의심되는 개체에 투여된다. 치료적 용도에 있어, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에 기술된 장애를 이미 앓고 있는 환자와 같은 개체에 본 발명에 기술된 질병, 장애, 또는 상태의 증상을 치료하거나 적어도 부분적으로 정지시키기 위해 충분한 양으로 투여된다. 이러한 사용에 효과적인 양은 질환, 장애 또는 상태의 심각도 및 경과, 이전의 치료, 개체의 건강 상태와 약물에 대한 반응성, 및 의사 또는 수의사의 판단에 따라 달라질 수 있다.

[0049] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0050] 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 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 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [0051] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 좌제의 기제로는 위텍솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지,라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 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 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0055] 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 1,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 조성물은 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, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0058] 다른 일 측면에서, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효 성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0059] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0060] 본 발명에서 용어, "개선"은 본 발명의 파리 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물(또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 염증성 질환의 의심 및 발명 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0061] 본 발명의 식품학적으로 허용가능한 염은 식품학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가 염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리토 금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 반드시 이로 제한되지는 않는다.
- [0062] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0063] 본 발명의 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로 상기 본 발명의 유효성분을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 필수 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 개선, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

- [0064] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다.
- [0065] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0066] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0067] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함한다. 상기 건강기능(성)식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.
- [0069] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0070] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0071] 본 발명의 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0072] 또한, 상기 화장료 조성물은 본 발명의 유효성분 외에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 파리 추출물로부터 제조된 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물은 염증성 사이토카인인, 인터루킨-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 및 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)의 생산 또는 분비를 억제하고 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0075] 또 다른 일 측면에서, 본 발명은 파리(*Physalis alkekengi*) 추출물의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [0076] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0077] 본 발명에서 용어 "개체"는 염증성 질환이 발생하였거나 발생할 수 있는 가능성이 있는 모든 동물을 의미하며,

본 발명의 약학적 조성물을 염증성 질환의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.

[0078] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 염증성 질환의 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0079] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있으며, 상기 약학적으로 유효한 양은 전술한 바와 같다.

[0080] 본 발명의 약학적 조성물은 염증성 질환을 예방 또는 치료 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 복강, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.0001 내지 1000 mg/kg의 농도, 구체적으로는 0.001 내지 1000 mg/kg의 농도, 보다 구체적으로는 1 내지 200 mg/kg의 농도를 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0083] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 제제예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1. 파리 정제물의 제조

[0086] 1-1. 파리 조추출물의 제조

[0087] 경기도 이천시에서 채집된 긴조 파리(*Physalis alkekengi* L. var. *francheti*)를 초담채 회사로부터 구입하여, 파리 열매 8kg을 세척한 후 절단하고, 100% 메탄올 10L에 넣어 24시간 동안 상온에서 추출을 3회 반복 수행하였으며, 추출액을 모아 여과 및 농축하여 파리 추출물(조추출물, 이하 “EA325M” 라 명명 함) 793g을 수득하였다.

[0089] 1-2. 파리 비극성용매 및 극성용매 가용 정제물의 분리

[0090] 상기 실시예 1-1에서 얻은 조추출물 793g에 증류수 2L를 첨가하여 현탁하고, 헥산 2L를 첨가하여 혼합한 다음, 이를 분획여두에서 헥산층에 용해되는 성분만 분리하여 진공건조하는 분획을 3회 수행하여 헥산층을 얻었다. 남은 물층(수층)에 에틸아세테이트 2L를 첨가하여 분획여두에서 에틸아세테이트층에 용해되는 성분만 분리하여 진공건조하는 분획을 3회 수행하여 에틸아세테이트층을 얻었다. 이와 동일한 과정으로 남은 물층에 부탄올 2L를 첨가하여 3회 분획을 수행하여 부탄올층을 얻었다. 상기 분획과정을 거쳐 회수한 헥산층, 에틸아세테이트층, 부탄올층 및 남은 물층을 각각 동결건조하여 헥산 분획물 85g(이하, “EA325H” 라 함), 에틸아세테이트 분획물 17g(이하, “EA325E” 라 함), 부탄올 분획물 46g(이하, “EA325B” 라 함) 및 물 분획물 150g(이하, “EA325Aq” 라 함)을 얻고 이를 하기 실험을 위한 시료로 사용하였다. 파리 추출물로부터 각 분획물의 제조 과정은 도 1에 나타난 바와 같다.

[0092] 실시예 2. 파리 추출물로부터 화합물의 분리

[0093] 2-1. 3',7-디메틸퀘르세틴(dimethylquercetin) (1)의 분리

[0094] 상기 실시예 1의 헥산 가용 분획물(Hexane fraction, EA325H, 85g)을 용출용매(헥산:에틸아세테이트 혼합용매 농도구배 1:0→0:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(silica gel column chromatography; 실리카겔 60, 230내지 400 메쉬, Merck사)를 진행하여 14개의 소분획 EA325H-34-9-F1-F14을 얻었다. 이 소분획 중 첫 번째 칼럼으로부터 분리된 8번째 분획, 즉, EA325H-34-9-F8 (1.10 g)을 용출용매(헥산:아세톤 혼합용매 농도구

배 1:0→0:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(silica gel column chromatography; 실리카 겔 60, 230내지 400 메쉬, Merck사)를 진행하여 소분획 EA325H-34-11-1~10 및 하기 물성치를 나타내는 EA325H-34-11-K8 (40 mg)을 수득하였다. 이 EA325H-34-11-K8은 1D NMR (^1H and ^{13}C NMR)과 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC, HMBC NMR)을 이용하여 3',7-디메틸퀘르세틴 (3,4',5-트리히드록시-3',7-디메톡시-플라본; 3',7-dimethylquercetin; 3,4',5-trihydroxy-3',7-dimethoxy-flavone; 이하, "EA325H-34-11-K8"라 함)으로 구조 분석하였고, 또한 문헌과 비교하여 그 구조를 확인하였으며, *Physalis* 속 식물에서 처음 분리 보고된 화합물임을 확인하였다(A. K. Umbetova, Sh. Zh. Esirkegenova, I. M. Chaudri, V. B. Omurkamzinova, and Zh. A. Abilov, FLAVONOIDS OF PLANTS FROM THE GENUS *Tamarix*, *Chemistry of Natural Compounds*, 2004, 40(3), 297-298.).

[0095]

[0096] 3',7-디메틸퀘르세틴 (EA325H-34-11-K8; 3',7-dimethylquercetin) (1)

[0097] 분자식: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$

[0098] 분자량: 330

[0099] ^1H NMR (200MHz, CDCl_3) δ ppm: 12.13 (1H, s, OH), 7.92 (d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.85 (1H, dd, J = 8.8, 2.0 Hz, H-6'), 7.02 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5'), 6.72 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.33 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 3.94 (3H, s, OCH_3 -3'), 3.93 (3H, s, OCH_3 -7).

[0100] ^{13}C NMR (50MHz, CDCl_3) δ ppm: 176.8 (C-4), 166.8 (C-7), 162.0 (C-5), 157.8 (C-8a), 149.9 (C-4'), 148.4 (C-3'), 147.3 (C-2), 137.1 (C-3), 123.6 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.2 (C-5'), 112.2 (C-2'), 104.9 (C-4a), 98.5 (C-6), 92.9 (C-8), 56.5 (OCH_3 -3', OCH_3 -7).

[0102] 2-2. 피살린(physalin) B (2) 및 이소피살린(isophysalin) B (3) 분리

[0103] 상기 실시예 1의 에틸아세테이트 분획(EtOAc fraction, EA325E, 17g)을 용출용매(hexane-EtOAc=99:1 →1:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(silica gel column chromatography)를 진행하여 소분획 EA325H-34-9-F1~F14을 얻었으며, 이 소분획 중 EA325H-34-9-F8 (1.10 g)을 용출용매(hexane-acetone=4:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(silica gel column chromatography)를 진행하여 소분획 EA325H-34-11-1~10 및 하기 물성치를 나타내는 피살린(physalin) B(2, 90mg) 및 이소피살린(isophysalin) B (3, 7mg)으로 각각 수득하여 그 구조를 분석하였고, 또한 문헌과 비교하여 그 구조를 확인하였다.

[0104]

[0105] 피살린 B (EA325E-34-6-K4; physalin B)(2)

[0106] 분자식: $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{8}\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_9$

[0107] 분자량: 509

[0109] 이소피살린 B (EA325E-34-15-K4; isophysalin B)(3)

[0110] 분자식: $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{8}\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_9$

[0111] 분자량: 511

[0113] 참고예 1. 실험재료의 준비

[0114] 세포 배양액인 RPMI-1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), 10% (v/v) fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Welgene(LS202-02, S-001-04, LM001-01, Korea)에서 구입하였고 시약 Ezcytox는 Daeilab사(ez 3000, Korea)에서 구입하였다. Rotary evaporator는 (BUCHI, R-124,

German)에서 구입하였고, 동결 건조기는 Iishin사(FDU-2200, Korea)에서 구입하였으며, TRIzolTM은 GIBCO BRL 사(MD, USA)에서, ELISA reader는 Anthos (Multiread 400, Austria)에서, 분광분석기(Spectrophotometer)는 GE healthcare Life sciences (Ultraspec 2100 pro, sweden)에서, Primeacript Rtase는 TaKaRa사(Shiga, Japan)에서, PTC-100 Programmable Thermal ControllerTM는 MJ Research Waltham사(MA, USA)에, ImageMaster TotalLabTM는 Amersham Biosceinces사(Piscataway, NJ)에서 구입하였다.

실시예 3. LPS를 이용한 염증반응에서 사이토카인 (IL-1 β 및 TNF- α)의 mRNA 발현에 대한 효과

3-1. 세포 배양

쥐 대식세포주(Mouse macrophage cell line)인 RAW264.7은 ATCC으로부터 분양받았다. RAW264.7은 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 100U/ml와 streptomycin 100 μ g/ml의 항생제를 포함하는 High glucose DMEM 배지를 사용하여 실험실에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 공급조건을 갖춘 동물 세포 배양기에서 배양하였다.

3-2. 시료 처리

Raw 264.6 macrophage 세포는 6 well에 2 $\times$ 10⁶ cells/well로 넣고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 4시간 동안 무혈청(serum-free) 배지에서 배양 후 LPS (1 μ g/ml)을 처리 한 다음, 실시예 1 및 2에서 수득된 파리 추출물, 분획물 또는 이의 유래 화합물을 각각 1, 10 또는 100 μ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한다.

3-3. RNA 추출 및 PCR 분석

상기 실시예 1 및 2에서 얻은 파리 추출물, 분획물 및 이로부터 분리된 화합물 각각의 리포폴리싸카라이드(LPS)를 이용한 염증유발 사이토카인인 IL-1 β 및 TNF- α 에 대한 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

상기 실시예 3-1 및 3-2의 방법으로 배양된 RAW264.7 세포로부터 Total RNA는 TRIzolTM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 추출하였고, nano drop (NanoDrop 2000c; Thermo Scientific, Wilmington, DE)을 이용하여 정량한 후 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 2 μ g의 total RNA를 65 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 denaturation시킨 후, Primeacript Rtase 0.2 μ l (TaKaRa, Shiga, Japan)을 이용하여 최종 부피가 20 μ l인 반응 혼합액에서 역전사 반응을 수행하여 cDNA mixture를 얻었다. cDNA는 10X PCR buffer와 각 primer와 0.5 U Taq polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan)을 포함한 20 μ l의 반응 혼합액에서 PTC-100 Programmable Thermal ControllerTM (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 사용하여 증폭되었다. 각각의 primer는 Genbank에 기록된 염기서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 제작하였으며 각각의 염기서열 및 증폭 조건은 하기 표 1과 같다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다. gel 상의 band intensity는 ImageMaster TotalLabTM (Amersham Biosceinces, Piscataway, NJ)을 이용하여 분석하였고 내부 표준물질로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하여 유전자의 정량적 발현 수준을 보정하였다.

표 1

Name	Primer sequence	Product size (bp)	Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	Cycle numbers
IL-1 β	5'-tgcagagttccccaactggtacatc-3'	387	60	30
	5'-gtgctgcctaattgtccccttgaatc-3'			
TNF- α	5'-cctgtagcccacgtcgtagc-3'	374	60	30
	5'-ttgacctcagcgctgagttg-3'			
GAPDH	5'-atcccatcaccatcttccag-3'	579	60	30
	5'-cctgcttcaccaccttcttg-3'			

3-4. 염증성 사이토카인 발현에 대한 파리 메탄올 추출물의 억제 효능

- [0128] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 파리 메탄올 추출물(EA325M) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 2에 나타난 바와 같다.
- [0129] 배지만 넣어진 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어진 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=191.8$, $P<0.001$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=159.8$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. 한편, 파리 메탄올 추출물 EA325M을 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우, LPS 처리군과 비교할 때, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 군에서의 IL-1 β 유전자 발현 감소를 제외하고는 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현에 큰 영향을 미치지 않았다.
- [0131] 3-5. 염증성 사이토카인 발현에 대한 파리 헥산 분획물의 억제 효능
- [0132] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 파리 헥산 분획물(EA325H) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 3에 나타난 바와 같다.
- [0133] 배지만 넣어진 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어진 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=120.2$, $P<0.01$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=128.4$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. 반면, 파리 헥산 분획물 EA325H를 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, 약물의 농도가 증가함에 따라 TNF- α 가 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인하였고, IL-1 β 유전자 발현도 감소됨을 확인하였다.
- [0135] 3-6. 염증성 사이토카인 발현에 대한 파리 부탄올 분획물의 억제 효능
- [0136] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 파리 부탄올 분획물(EA325B) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 4에 나타난 바와 같다.
- [0137] 배지만 넣어진 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어진 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=174.8$, $P<0.001$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=12.6$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다 ($F=25.1$, $P<0.01$). 반면, 파리 부탄올 분획물 EA325B를 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, TNF- α 유전자 발현이 EA325B를 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0139] 3-7. 염증성 사이토카인 발현에 대한 파리 물 분획물의 억제 효능
- [0140] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 파리 물 분획물(EA325Aq) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 5에 나타난 바와 같다.
- [0141] 배지만 넣어진 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어진 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=180.2$, $P<0.001$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=159.8$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다 ($F=25.1$, $P<0.01$). 반면, 파리 물 분획물 EA325Aq를 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현이 EA325Aq를 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0143] 3-8. 염증성 사이토카인 발현에 대한 파리 에틸아세테이트 분획물의 억제 효능
- [0144] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 파리 에틸아세테이트 분획물(EA325E) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 6에 나타난 바와 같다.
- [0145] 배지만 넣어진 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어진 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=13.3$, $P<0.01$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=65.1$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다 ($F=25.1$, $P<0.01$). 반면, 파리 에틸아세테이트 분획물 EA325E를 1, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, TNF- α 유전자 발현이 EA325E를 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인하였고, IL-1 β 유전자 발현도 감소됨을 확인하였다.
- [0147] 3-9. 염증성 사이토카인 발현에 대한 이소피살린 B의 억제 효능

- [0148] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 이소피살린 B(EA325E-34-15-K4) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 7에 나타난 바와 같다.
- [0149] 배지만 넣어준 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어준 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=52.7$, $P<0.001$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=435.6$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. 반면, 파리 유래 화합물인 이소피살린 B(EA325E-34-15-K4)를 1-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, TNF- α 유전자 발현이 EA325E-34-15-K4를 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0151] 3-10. 염증성 사이토카인 발현에 대한 피살린 B의 억제 효능
- [0152] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 피살린 B(EA325E-34-6-K4) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 8에 나타난 바와 같다.
- [0153] 배지만 넣어준 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어준 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=74.1$, $P<0.001$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=35.3$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. 반면, 파리 유래 화합물인 피살린 B(EA325E-34-6-K4)를 1-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, TNF- α 유전자 발현이 EA325E-34-6-K4를 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0155] 3-11. 염증성 사이토카인 발현에 대한 3',7-디메틸케르세틴의 억제 효능
- [0156] Raw 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증반응 유발 후 3',7-디메틸케르세틴(EA325H-34-11-K8) 처리에 따른 TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 결과는 도 9에 나타난 바와 같다.
- [0157] 배지만 넣어준 그룹에 비해 LPS를 같이 넣어준 그룹에서는 TNF- α ($F_{4,14}=423.5$, $P<0.001$) 및 IL-1 β ($F_{4,14}=243.0$, $P<0.001$) 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. 반면, 파리 유래 화합물인 3',7-디메틸케르세틴(EA325H-34-11-K8)을 1-100 $\mu\text{g/ml}$ 로 함께 처리한 경우에는 LPS 처리군과 비교할 때, TNF- α 및 IL-1 β 유전자 발현 모두 EA325H-34-11-K8을 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냄을 확인하였다.
- [0159] 하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0161] **제제예 1. 산제의 제조**
- [0162] 파리 유래 화합물 20 mg
- [0163] 유당 100 mg
- [0164] 탈크 10 mg
- [0165] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0167] **제제예 2. 정제의 제조**
- [0168] 파리 유래 화합물 10 mg
- [0169] 옥수수전분 100 mg
- [0170] 유당 100 mg
- [0171] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0172] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0174] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0175] 파리 유래 화합물 10 mg

[0176] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0177] 락토오스 14.8 mg

[0178] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0179] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0181] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0182] 파리 유래 화합물 10 mg

[0183] 만니톨 180 mg

[0184] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0185] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0186] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2mℓ) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0188] **제제예 5. 액제의 제조**

[0189] 파리 유래 화합물 20 mg

[0190] 이성화당 10 g

[0191] 만니톨 5 g

[0192] 정제수 적량

[0193] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100mℓ로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0195] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0196] 파리 유래 화합물 1000 mg

[0197] 비타민 혼합물 적량

[0198] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0199] 비타민 E 1.0 mg

[0200] 비타민 B1 0.13 mg

[0201] 비타민 B2 0.15 mg

[0202] 비타민 B6 0.5 mg

[0203] 비타민 B12 0.2 μg

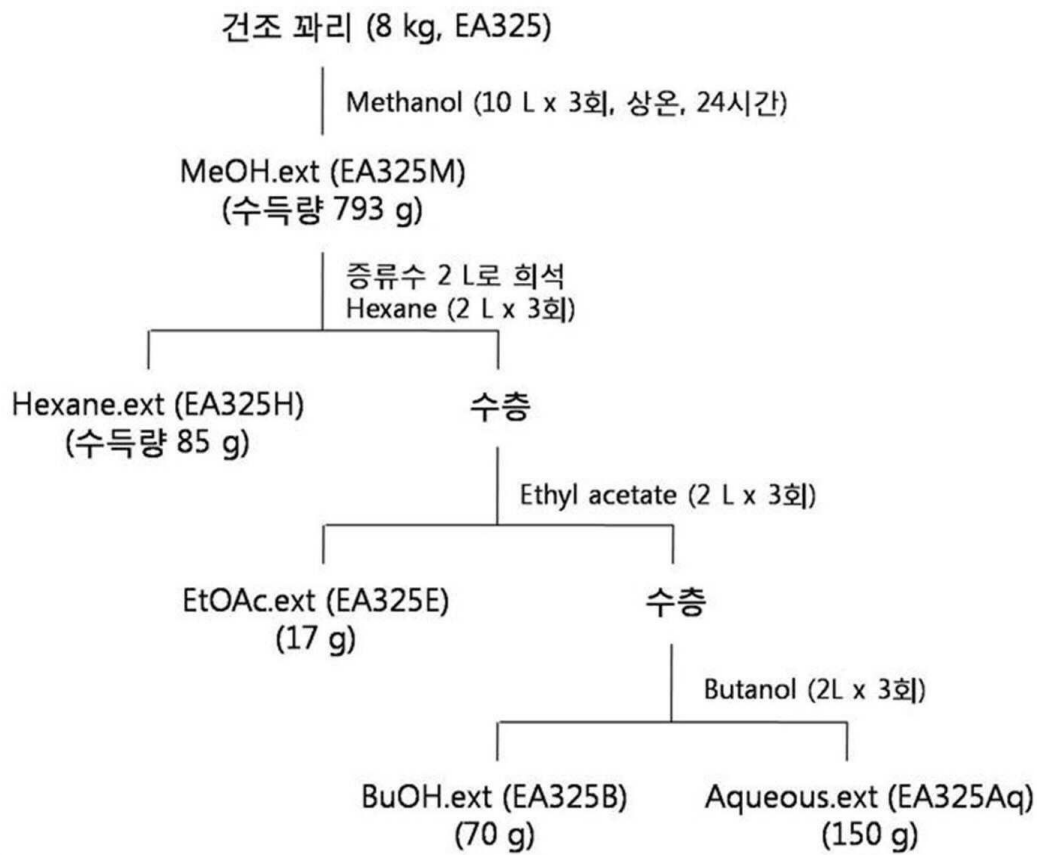
[0204] 비타민 C 10 mg

[0205] 바이오틴 10 μg

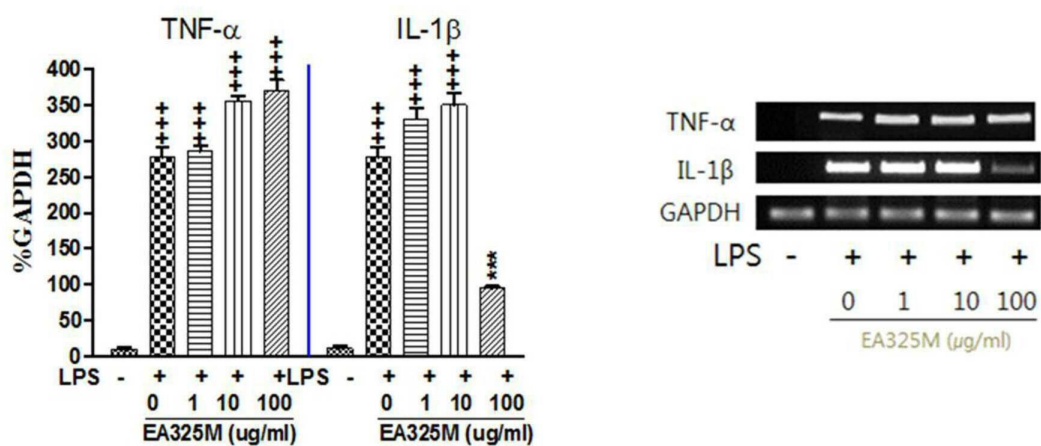
[0206]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0207]	엽산	50 μ g
[0208]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0209]	무기질 혼합물	적량
[0210]	황산제1철	1.75 mg
[0211]	산화아연	0.82 mg
[0212]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0213]	제1인산칼륨	15 mg
[0214]	제2인산칼슘	55 mg
[0215]	구연산칼륨	90 mg
[0216]	탄산칼슘	100 mg
[0217]	염화마그네슘	24.8 mg
[0218]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0220]	제제예 7. 건강 음료의 제조	
[0221]	파리 유래 화합물	1000 mg
[0222]	구연산	1000 mg
[0223]	올리고당	100 g
[0224]	매실농축액	2 g
[0225]	타우린	1 g
[0226]	정제수를 가하여	전체 900 ml
[0227]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0228]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

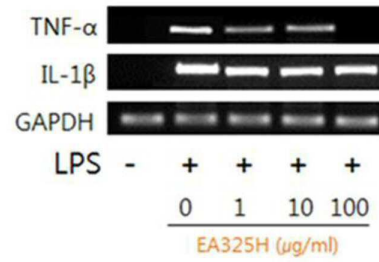
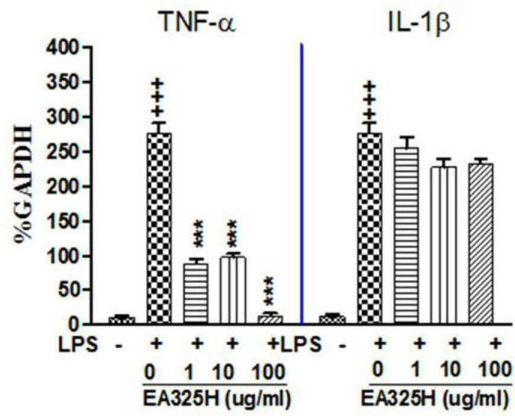
도면1



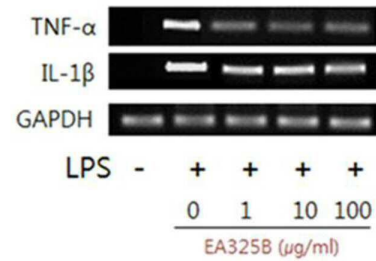
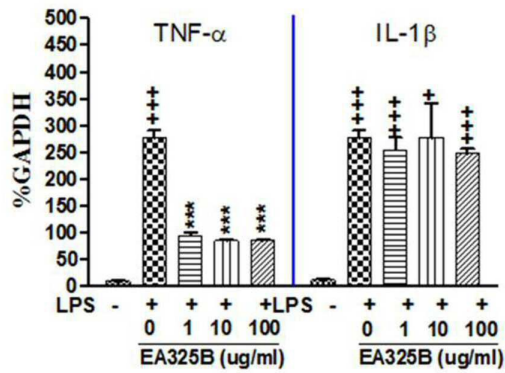
도면2



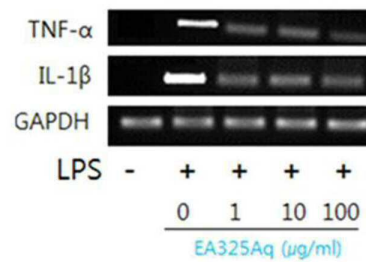
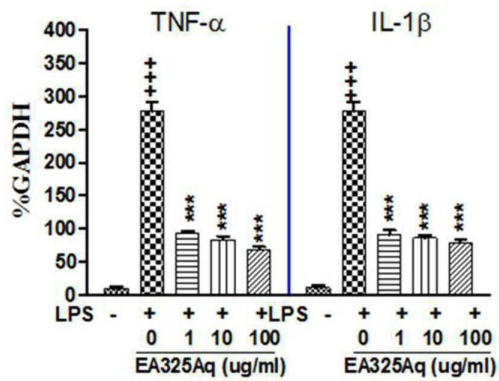
도면3



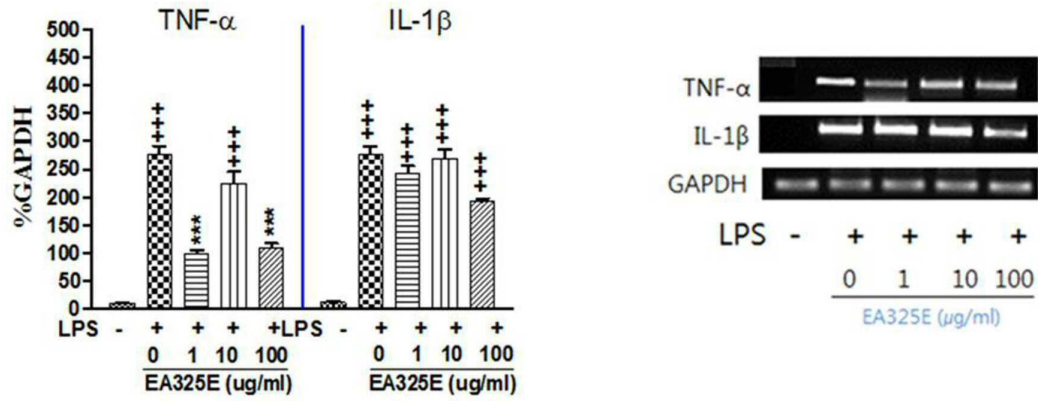
도면4



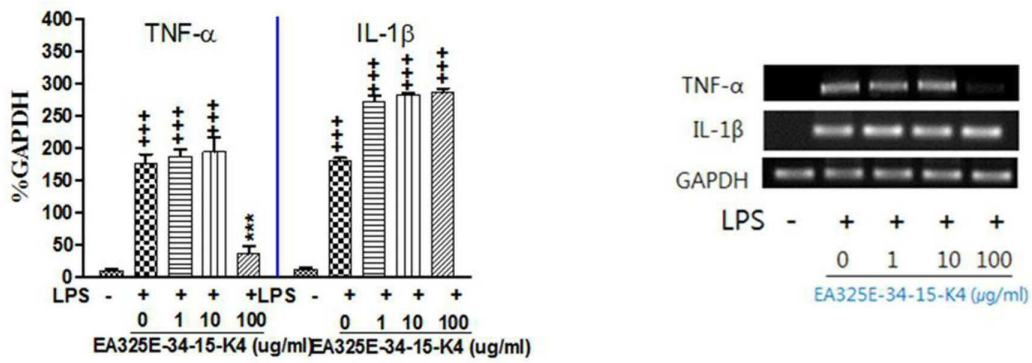
도면5



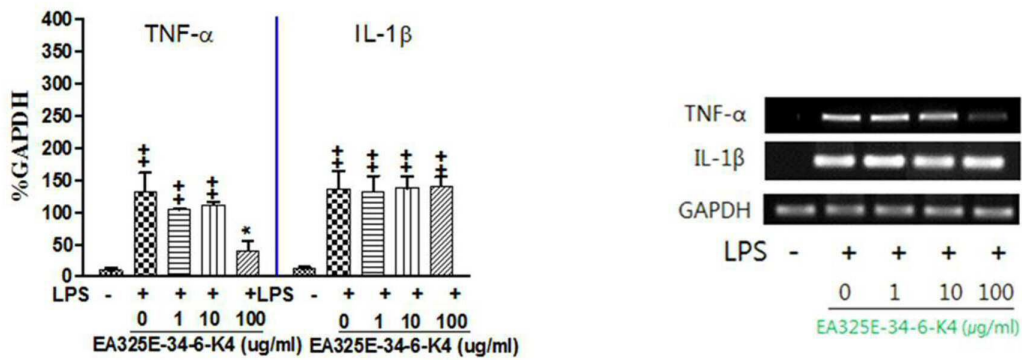
도면6



도면7



도면8



도면9

