

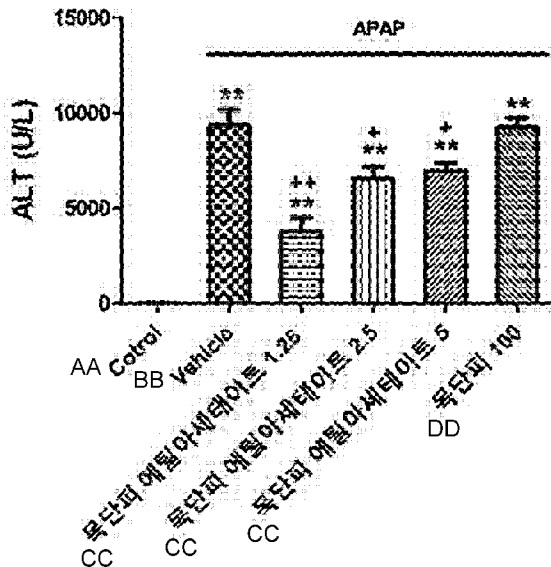


- (51) 국제특허분류: A61K 36/65 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/011647
- (22) 국제출원일: 2016년 10월 17일 (17.10.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0145335 2015년 10월 19일 (19.10.2015) KR
10-2016-0119284 2016년 9월 19일 (19.09.2016) KR
- (71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이선미 (LEE, Sun-Mee); 06617 서울시 서초구 서초대로 385, 5-404 호, Seoul (KR). 조홍익 (CHO, Hong-Ik); 08097 서울시 양천구 목동동로 50, 1216 동 405 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF LIVER DISEASES, CONTAINING FRACTION OF MOUTAN RADICIS CORTEX EXTRACT

(54) 발명의 명칭: 목단피 추출물의 분획물을 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Control
BB ... Vehicle
CC ... Moutan Radicis Cortex ethylacetate
DD ... Moutan Radicis Cortex

(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing a fraction of a *Moutan Radicis Cortex* extract, which can be advantageously used in the prevention or treatment of liver diseases. In the present invention, it was specifically verified that the use of the composition can effectively reduce the blood ALT concentration, inhibit the increase of TLR4 or IL-1 β protein expression in the liver, and also inhibit the lipid peroxidation in the liver, and thus, it is expected that the composition can attain target therapy through a more fundamental approach in the prevention or treatment of liver diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 간질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 분획물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서는 상기 조성물을 이용하여 혈중 ALT 농도를 효과적으로 감소시키고, 간장 내 TLR4 또는 IL-1 β 단백질 발현의 증가를 억제시키며, 간장 내 지질과산화 또한 억제시킬 수 있음을 구체적으로 확인하였는바, 간질환의 예방 또는 치료에 있어서, 보다 근본적으로 접근하여 타겟 치료할 수 있는 것으로 기대된다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 목단피 추출물의 분획물을 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 목단피 (*Moutan Cortex Radicis*) 추출물의 분획물을 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물로서, 보다 구체적으로 목단피 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 간은 우리 몸에서 지질 등의 대사 작용, 해독, 담즙의 배설, 각종 영양소의 저장, 조혈이나 혈액 응고, 및 순환 혈액량의 조절 등 다양한 역할을 담당하고 있으며, 생명 유지를 위한 필수적인 장기 중 하나이다. 간의 기능을 보다 구체적으로 살펴보면, 우선, 에너지 대사를 관리하는 기능이 있어 음식물에서 흡수된 모든 영양소들이 간에서 에너지를 생산할 수 있는 물질로 대사되어 전신에 공급되거나 저장된다. 둘째, 간은 약 2,000 여종의 효소, 알부민, 응고 인자들의 혈청 단백질, 담즙산, 인지질, 콜레스테롤 등의 지방 등을 합성하고 저장하며 분배하는 기능이 있다. 셋째, 해독 및 분해 기능으로서 약물, 술, 독성물질 등을 해독시키는 기능, 각종 대사산물을 십이지장으로 배설하는 기능 및 면역 기능이 있어 생명 유지에 중요한 역할을 하고 있다.
- [3] 한편, 일반적으로 간에 염증이 생기는 간염이 간질환의 대부분을 차지하며, 양상에 따라 급성 간염과 만성 간염, 원인에 따라 바이러스성 간염, 알코올성 간염, 약물성 간염 등으로 나눌 수 있다. 또한, 이런 이상으로 유발되는 간질환에는 지방간, 간염, 간경변증, 간암 등이 있다. 간질환의 진행 과정의 기전은 완전히 밝혀지지 않는으나 일차적으로 지방간이 발생된 후 이차적인 세포 손상이 수반되어 지방간 및 간경화 등의 진행성 간질환으로 발전하는 것으로 알려져 있다. 또한, 간질환은 초기에 자각 증상이 없어 상당히 진행되어서야 발견되기 때문에, 국내뿐만 아니라 세계적으로 사망 원인의 수위를 차지하고 있다.
- [4] 현재, 일반적으로 이용되고 있는 간질환의 치료방법은 크게 식이요법과 약제요법으로 구분되며, 대부분의 경우에 이 두 가지 방법을 병용하고 있다. 간질환에 대한 약제요법에서는 간질환의 발병 원인 및 종류에 따라 다양한 작용기전을 갖는 약제들이 이용될 수 있는데, 예를 들면, 우루소데옥시콜린산 (ursodexoycholic acid), 실리마린 (silymarine), 바이페닐디메틸디카복실레이트 (biphenyldimethyldicarboxylate, DDB), 글루타티온 (glutathione), 오로트산 카르니틴 (carnitine orotate), 글리시르히진 (glycyrrhizin), 종합 비타민제 등과 같은 간세포 재생 촉진제 및 간 기능 보조제, 아시클로바 (acyclovir)와 같은

항바이러스제, 코티코스테로이드 (corticosteroid), 6-머캅토피린 (6-mercaptopurine, 6-MP), 아자티오프린 (azathioprine) 등과 같은 면역억제제, D-페니실아민 (penicillamine)과 같은 섬유화 억제제 등의 약제가 일반적으로 사용되고 있다. 그러나 이들 약제들의 제한적인 간 보호 효과와 부작용 등에 의해 근본적인 간질환 치료에 어려움을 겪고 있다. 이에, 오늘날 생체 적합성이 우수하고, 부작용의 우려가 적은 천연물 유래 간질환 치료제에 대한 관심이 고조되고 있으며, 주요한 과제의 대상이 되고 있으나 (한국공개 특허 10-2015-0098161), 대다수의 천연물의 경우, 유효 용량뿐만 아니라 정확한 약리효과에 대한 기초 연구결과가 미약하여 간질환 치료제로의 이용에 어려움을 겪고 있다.

- [5] 한편, 목단피는 작약과 (Paeoniaceae)에 속하는 목단 (*Paeonia suffruticosa* Andrews)의 뿌리껍질로 한의학적으로 청열양혈, 활혈산어, 퇴허혈 작용을 가지고 있어 널리 이용되어 왔다. 목단피 추출물은 생체 외에서 케모카인 (chemokine)의 일종인 IL-8 및 MCP-1의 유리를 억제하며, 또한 염증 매개인자인 iNOS 및 COX-2 발현을 억제하는 활성이 보고되었다. 목단피의 추출물이 HIV 인테그레이즈 (HIV integrase)에 대하여 억제 활성이 매우 우수하다고 알려졌으며, 목단피의 주성분인 파에오놀 (paeonol)은 잔틴 옥시다아제 (xanthine oxidase)를 억제하여 활성산소의 생성을 억제 시키며, 염증매개인자인 TNF- α 의 유리를 억제한다고 알려져 있다.
- [6] 이와 같은 배경 하에서, 본 발명자들은 간질환의 예방 또는 치료제로서 천연물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 간장 허혈 및 재관류로 인한 혈류장애, galactosamine/lipopolysaccharide (GalN/LPS)에 의한 급성 간부전 및 acetaminophen (APAP)에 의한 약물 간손상을 포함하는 다양한 간손상에 목단피 추출물의 분획물을 처리한 경우, 우수한 간 보호 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 목단피 추출물의 분획물 처리에 의한 혈중 ALT 농도의 감소, 간장 내 TLR4 단백질 발현의 억제, 간장 내 IL-1 β 단백질 발현의 억제, 및 간장 내 지질과산화 억제 효과를 확인하고 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [8] 이에, 본 발명의 목적은 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 다른 목적은 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.
- [13] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 분획물은 목단피 추출물을 헥산, 부탄올, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 분획한 것일 수 있으며, 상기 용매는 바람직하게는 물, 헥산, 부탄올, 또는 에틸아세테이트일 수 있고, 보다 바람직하게는 에틸아세테이트이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 간질환은 간염, 간독성, 담즙울체, 지방간, 간경변, 간허혈, 알코올성 간질환, 간 농양, 간성 혼수, 간 위축증, 및 간암으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 혈중 ALT (alanine aminotransferase)의 농도 증가를 억제시킬 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 간장 내 TLR (Toll-like receptor) 4 또는 IL-1 β (Interleukin 1 beta) 단백질의 발현양 증가를 억제시킬 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 간장 내 지질과산화를 억제시킬 수 있다.
- [18] 본 발명은 목단피 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [20] 본 발명은 간질환 치료제 제조를 위한 목단피 추출물의 분획물에 대한 신규한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [21] 본 발명에 따른 조성물은 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하며, 상기 조성물을 이용하여 간 손상의 지표인 혈중 ALT 농도를 효과적으로 감소시키고, 간장 내 TLR4 또는 IL-1 β 단백질 발현의 증가를 억제시키며, 간장 내 지질과산화 또한 억제시킬 수 있음을 구체적으로 확인하였다. 따라서 본 발명은 천연물 유래 활성 성분을 이용함으로써, 우수한 간 보호 효능을 나타냄과 함께 독성 및 부작용이 거의 없어 장기간 체내에

사용할 수 있는 장점을 가지는바, 간질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 간장 허혈 및 재관류로 인한 혈류장애에 대하여, 목단피 추출물 처리 (30, 100 및 300 mg/kg)에 따른 ALT (alanine aminotransferase) 활성 변화를 비교한 결과이다.
- [23] 도 2a는 간장 허혈 및 재관류로 인한 혈류장애에 대하여, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25, 2.5 및 5 mg/kg)에 따른 ALT 활성 변화를, 도 2b는 헥산 분획물 처리 (1, 5 및 25 mg/kg)에 따른 ALT 활성 변화를, 2c는 부탄올 분획물 처리 (1, 5 및 25 mg/kg)에 따른 ALT 활성 변화를 2d는 물 분획물 처리 (1, 5 및 25 mg/kg)에 따른 ALT 활성 변화를 비교한 결과이다.
- [24] 도 3a는 간장 허혈 및 재관류로 인한 혈류장애에 대하여, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25 및 2.5 mg/kg)에 따른 TLR4 단백질 발현양을, 도 3b는 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25 및 2.5 mg/kg)에 따른 IL-1 β 단백질 발현양 변화를 비교한 결과이다.
- [25] 도 4는 GalN/LPS로 인한 급성 간부전에 대하여, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25, 2.5 및 5 mg/kg)에 따른 ALT 활성 변화를 비교한 결과이다.
- [26] 도 5는 GalN/LPS로 인한 급성 간부전에 대하여, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25, 2.5 및 5 mg/kg)에 따른 TLR4 또는 IL-1 β 단백질 발현양 변화를 비교한 결과이다.
- [27] 도 6은 APAP로 인한 약물 간손상에 대하여, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25, 2.5 및 5 mg/kg)에 따른 ALT 활성 변화를 비교한 결과이다.
- [28] 도 7은 APAP로 인한 약물 간손상에 대하여, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물 처리 (1.25, 2.5 및 5 mg/kg)에 따른 말론디알데히드 (malondialdehyde, MDA) 양 변화를 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명은 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 포함한다.
- [30] 특히, 본 발명은 천연물로부터 추출하여 장기간 복용해도 종래 치료제가 지닌 부작용이 미미하며, 간세포 괴사 및 간 손상에 대한 억제 효과를 가지므로 효과적으로 간질환을 예방하거나 치료할 수 있다.
- [31] 본 발명에서 사용되는 용어, "목단피 (*Moutan Radicis Cortex*)"는 작약과의 목단 (*Paeonia suffruticosa* Andrews)의 뿌리껍질로 만든 약재를 말하며, 혈열로 인한 생리불순, 생리통, 멍들었을 때, 토혈, 코피, 반점이 나타나는 증상, 허혈로 인해 뺨끝이 썩시는 증상, 혈압상승, 어혈제거, 타박상, 소염 진통, 종기치료, 맹장염

초기 등에 사용되어 왔다. 목단피의 주요한 약리작용으로는 진통, 진정, 해열, 항경련, 항염증, 항혈전, 항알레르기, 위액 분비 억제, 자궁점막출혈, 항균작용 등이 보고되어 있다.

[32] 본 발명에서, 추출 용매를 이용하여 목단피로부터 목단피 추출물을 제조한 후, 이를 분획함으로써, 본 발명의 목단피 추출물의 분획물을 제조한다.

[33] 이때, 목단피 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 본 발명에서 목단피 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 목단피 추출물을 추출하는 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 통하여 추출할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 또한, 상기 제조된 추출물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 감압 농축기, 건조는 동결 건조법 등을 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 부탄올, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 분획과정을 실시한다. 바람직하게는 물, 헥산, 부탄올, 및 에틸아세테이트일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에틸아세테이트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 한편, 본 발명의 조성물에 의한 개선, 예방 또는 치료 대상 질병인 "간질환"은 간이 수행하는 여러 가지 기능 중 한 가지 이상의 기능에 문제가 생겨 정상적으로 대사를 수행할 수 없는 것을 말한다. 간질환에서 가장 많이 나타나는 것은 간염으로 급성 간염과 만성 간염으로 나뉘며, 일반적으로는 급성 간염이 치료하기 쉽고 양성에 속한다. 급성간염은 원인별로 바이러스성 간염, 알코올성 간염, 중독성 간염 등이 있으며, 간질환 중 현재 가장 많이 발견되는 것은 바이러스에 의한 간염이다. 상기 간질환은 바람직하게 간염, 간독성, 담즙울체, 지방간, 간경변, 간허혈, 알코올성 간질환, 간농양, 간성 혼수, 간 위축증 및 간암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[37] 본 발명의 목단피 추출물의 분획물은 간세포에서 혈중 ALT (alanine aminotransferase)의 농도 증가를 억제시킬 수 있다.

[38] 본 발명에서 사용되는 용어 "ALT (alanine aminotransferase)"는 알라닌 아미노전이효소라고도 하며, 간세포에 다량 존재하는 효소로 간질환에 특이적인 지표가 되는 효소이다. ALT의 정상범위는 혈청 1 리터당 7~56 단위이다. 상기 효소는 아미노 그룹을 공여 분자에서 수여분자로 전이시키는 세포내의 화학반응을 촉매하며, 간세포에 다량 존재하므로 간 상태를 나타내는 특이적인 지표로 이용된다.

- [39] 본 발명의 목단피 추출물의 분획물은 간 조직에서 TLR (Toll-like receptor) 4 단백질 발현양 증가를 억제시킬 수 있다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 용어 "TLR (Toll-like receptor) 4 단백질"은 세균, 바이러스, 기생충 등의 병원체에 대한 초기단계의 생체방어의 자연면역에서 병원체를 구성하고 있는 성분의 특유한 분자패턴을 직접, 인식하는 수용체의 하나로서, 그람음성세균-유래 지질다당 (LPS)을 인식하는 지표로 이용된다.
- [41] 본 발명의 목단피 추출물의 분획물은 간 조직에서 IL-1 β 단백질 발현양 증가를 억제시킬 수 있다.
- [42] 본 발명에서 사용되는 용어 "IL-1 β (Interleukin 1 beta) 단백질"은 단핵구 및 대식세포에 의해 생산되는 모노카인인 인터류킨-1의 패밀리 중 하나로, 염증성 사이토카인에 해당하며, 간 내 염증을 인식하는 지표로 이용된다.
- [43] 본 발명의 목단피 추출물의 분획물은 간 조직에서 지질과산화를 억제시킬 수 있다.
- [44] 본 발명에서 사용되는 용어 "지질과산화"는 지질 성분인 불포화지방산에 산소가 첨가되어 지질이 과산화되는 것으로, 생체 내에서 생긴 과산화지질은 생체막계에 상해를 주고, 또 효소, 단백, 호르몬, 비타민 등을 변성시켜 세포의 기능저하나 괴사를 야기하므로, 임상적으로 간질환의 지표로 이용될 수 있다.
- [45] 한편, 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [46] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [47] 본 발명의 실시예에서는, 간장 허혈 및 재관류로 인한 혈류장애, galactosamine/lipopolysaccharide (GalN/LPS)에 의한 급성 간부전 및 acetaminophen (APAP)에 의한 약물 간손상을 포함하는 다양한 간손상 동물모델에 목단피 추출물 또는 추출물의 분획물을 처리함으로써, 간 손상에 따른 치료 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과, 목단피 추출물의 분획물을 처리한 군에서, 간 손상을 나타내는 지표인혈중 ALT 농도가 유의적으로 감소하였으며, 상기 결과는 목단피 추출물을 처리한 군과 비교하여 현저하게 우수하였으며, 특히 에틸아세테이트 용매를 사용한 분획물의 경우, 다른 용매 군과 비교시 보다 우수한 효과를 나타내며, 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다 (실시예 2 내지 5 참조).
- [48] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산

마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[49] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[50] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 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 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[51] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 100 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[52] 또한, 본 발명은 목단피 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[53] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 건강기능식품 조성물은 간질환의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.

[54] 본 발명의 건강기능식품 조성물에서 유효성분을 식품에 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 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위

이하일 수 있다.

[55] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 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 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[56] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[57] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환의 치료방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[58]

[59] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] [실시예]

[62] 실시예 1. 실험준비 및 실험방법

[63] 1-1 목단피 추출물 및 이의 분획물 추출

[64] 표준품 규격의 목단피 (약초약업사) 300 g을 준비하였다. 상기 목단피를 70 % 에탄올을 추출용매로 하여 5시간동안 환류하에서 온침 (55~60°C)을 실시하여 2회 추출하였다. 추출 후 얻어진 여액을 감압 농축하여 70 % 에탄올을 제거하고 목단피 추출물을 수득하였다. 최종 목단피 추출물은 55.8 g으로 수득률이 18.6%였다. 이후, 70 % 에탄올 추출물 40 g을 증류수 400 ml에 현탁하고 동량의 헥산, 에틸아세테이트 (EA), 부탄올 및 물 용매를 사용하여 각각 3회 반복 순차적으로 분배 추출하였다. 얻어진 모든 용매 분획은 감압 하에서 농축하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 각각 2.1, 5.3, 4.2 및 17.6 g 얻었다.

[65]

[66] **1-2. 실험 동물**

[67] 실험 동물은 (주) 대한바이오링크로부터 ICR계 웅성 생쥐 (21-23 g)를 공급받아 1주일 동안 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험 동물은 온도 및 12 시간 간격으로 명암이 조절되는 실험실에서 순화하였으며, 고형 사료 (대한바이오링크) 및 물은 자유롭게 섭취시켰다. 모든 동물 실험은 성균관대학교 약학 대학 동물 실험 윤리위원회의 승인을 받았으며, National Institutes of Health의 가이드라인 (NIH publication No. 86-23, revised 1985)에 따라 실험하였다.

[68]

[69] **1-3. 간장 허혈 및 재관류 손상**

[70] 마우스를 18 시간 동안 절식시킨 후 케타민 (ketamine, 6 mg/kg) 및 자일라진 (xylazine, 8 mg/kg)으로 마취시켰으며, 복부 정중선을 따라 개복하여 문맥의 왼쪽분지와 간장 내 산소 공급에 주된 역할을 하는 간동맥 및 담관을 클램핑하여 60 분간 허혈을 유발시킨 후 클램프를 제거하여 재관류를 일으켰다. 재관류 5 시간에 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽 및 중앙엽을 적출하여 -80°C에 보관 후 분석에 사용하였다. 대조군 (sham)은 문맥의 왼쪽 분지, 간동맥 및 담관에 클램프만을 놓지 않고 모든 시험법을 위와 동일하게 시행하였다.

[71] 목단피 추출물 또는 이의 분획물은 수술 2 일 전부터 1 일 1 회 동일한 시각에 2회 경구 투여하였으며 (간장 허혈 수술 전 48 시간 및 24 시간), 수술 당일에는 수술 1 시간 전에 1회 경구 투여하였다.

[72]

[73] **1-4. Galactosamine/lipopolysaccharide (GalN/LPS) 유도 급성 간부전**

[74] 마우스를 18 시간 동안 절식시킨 후 GalN (800 mg/kg) 및 LPS (40 µg/kg)를 복강 내 투여하였다. GalN/LPS 투여 후 6 시간에 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽 및 중앙엽을 적출하여 80 °C에 보관 후 분석에 사용하였다. 대조군은 생리적 식염수만을 복강 내 투여하고 모든 시험법을 위와 동일하게 시행하였다.

[75] 실험물질은 GalN/LPS 투여 2일 전부터 1일 1회 동일한 시각에 2회 경구 투여하였으며 (GalN/LPS 투여 전 48 시간 및 24 시간), GalN/LPS 투여 당일에는 투여 전 1시간에 1회 경구 투여하였다.

[76]

[77] **1-5. Acetaminophen (APAP) 유도 약물 간손상**

[78] 마우스를 18 시간 동안 절식시킨 후 APAP (400 mg/kg)를 복강 내 투여하였다. APAP 투여 후 24 시간에 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽 및 중앙엽을 적출하여 -80°C에 보관 후 분석에 사용하였다. 대조군은 생리적 식염수만을 복강 내 투여하고 모든 시험법을 위와 동일하게 시행하였다.

[79] 실험물질은 APAP 투여 2일 전부터 1 일 1 회 동일한 시각에 2회 경구 투여하였으며 (APAP 투여 전 48 시간 및 24 시간), APAP 투여 당일에는 투여 전

1 시간에 경구 투여하였다.

[80]

[81] **1-6. 혈중 alanine aminotransferase (ALT) 활성 확인**

[82] 혈중 ALT 활성은 IVDLab kit (아이비디랩, 한국)를 사용하여 분광광도계 (spectrophotometer, UV-1601, Simadzu, 일본)로 측정하였다.

[83]

[84] **1-7. 간 조직 내 TLR4 및 IL-1 β 단백질 발현량 확인**

[85] 간 조직을 RIPA 단백질 추출 용액 (CellNest, 한국)에 10 배 부피로 균질화하여 단백질을 추출한 후 13,000 x g, 4 °C에서 6 분간 원심분리하여 상층액만을 취하였다. 채취한 상층액을 BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, IL, 미국)를 이용하여 정량한 후, 2 x Western sample buffer와 1:1로 혼합하여 끓는 물에서 7 분 동안 가열 및 변성시켰다. 단백질 샘플 (16 μ g)을 SDS-PAGE로 분리한 후 Semi-Dry Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, CA, 미국)을 이용하여 polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, MA, 미국)에 전기영동 하였다. 전기영동한 멤브레인을 TBS/T로 세척한 후 5% (w/v) skim milk를 넣은 TBS/T로 상온에서 1 시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체와 4 °C에서 12 시간, 2차 항체와 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후, ECL 검출 시스템 (iNtRON Biotechnology Inc.)을 이용하여 발색시켰다.

[86] 각각의 밴드는 TOTALLAB TL 120 소프트웨어 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, 영국)를 이용하여 정량하였으며, 사용한 1차 항체는 다음과 같다: TLR4 (1:10000 희석, Santa cruz biotechnology Inc., CA, 미국), IL-1 β (1:2500 희석, BioVision, CA, 미국) 및 β -actin (1:5000 희석, Sigma Aldrich, MO, 미국). 측정 결과는 β -actin으로 표준화하였다.

[87]

[88] **1-8. 간 조직 내 지방과산화 확인**

[89] 지방과산화의 최종 산물인 말론디알데히드 (malondialdehyde, MDA) 양의 측정을 위해 균질화된 간 조직의 현탁액에 티로바르비탈산 (thiobarbituric acid)을 처리하여 반응시킨 후, 1,1,3-3 테트라에톡시 프로판 (Sigma Aldrich)을 표준물질로 사용하여 535 nm에서 분광광도적으로 측정하여 분석하였다.

[90]

[91] **1-9. 통계분석**

[92] 모든 실험결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 이에 대한 통계학적인 분석은 one-way ANOVA를 시행하여 $P < 0.05$ 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

[93]

[94] **실시예 2. 간장 허혈 및 재관류 손상에 대한 목단피 추출물이 혈중 ALT 활성에 미치는 영향 확인**

[95] 본 실시예에서는, 간세포 손상의 지표인 혈중 ALT 활성을 비교함으로써,

목단피 추출물의 처리에 따른 간 보호 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-3 및 실시예 1-6의 방법으로 실험하였다.

- [96] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 간장 허혈 수술 전 마우스 (sham)의 혈중 ALT 활성은 63.1 ± 7.4 U/L였으나, 재관류 5 시간 경과 후, 대조군 (vesicle)의 혈중 ALT 활성이 간장 허혈 수술 전 마우스에 비해 163.1배 증가하였으며, 이를 통해 간장 허혈 수술을 통한 간세포 손상을 확인하였다. 목단피 70% 에탄올 추출물을 100 mg/kg 처리한 군은 대조군과 비교하여 혈중 ALT 활성을 현저히 억제시켰으며, 목단피 70% 에탄올 추출물을 30 또는 300 mg/kg 처리한 군은 대조군과 비교하여 혈중 ALT 활성을 경미하게 억제시키는 경향을 보였다.

[97]

[98] **실시예 3. 간장 허혈 및 재관류 손상에 대한 목단피 추출물 분획물의 보호 효과**

- [99] 본 실시예에서는, 목단피 추출물의 분획물 처리에 따른 간 보호 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-3, 1-6 및 1-7의 방법으로 목단피 70% 에탄올 추출물의 물, 부탄올, 헥산 또는 에틸아세테이트 (EA) 분획물에 대하여, 혈중 ALT 활성 및 간장 내 TLR4 또는 IL-1 β 단백질 발현양을 비교하였다.

[100]

[101] **3-1. 혈중 ALT 활성**

- [102] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 목단피 추출물의 물, 헥산 및 부탄올 분획물을 처리한 군에서, 대조군과 비교하여 혈중 ALT 활성에 별다른 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 이와는 달리, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 처리한 군 (1.25, 2.5 및 5 mg/kg)에서는, 대조군과 비교하여 혈중 ALT 활성을 모든 용량군에서 현저하게 억제시켰을 뿐만 아니라, 상기 실시예 2의 목단피 70% 에탄올 추출물을 처리한 군과 비교하였을 때에도 (수득률 13.3% 고려 시), 보다 적은 투여량에도 불구하고 현저히 우수한 혈중 ALT 활성 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[103]

[104] **3-2. 간장 내 TLR4 및 IL-1 β 단백질 발현량**

- [105] 간 조직 내 TLR4 단백질 발현량은 허혈 및 재관류 시 대조군에 비해 1.6배로 현저히 증가하였으나, 도 3A에 나타난 바와 같이, 목단피 70% 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획물 1.25 및 2.5 mg/kg 및 70% 에탄올 추출물 100 mg/kg 투여 시 그 발현을 현저히 억제시켰음을 확인하였다. 간 조직 내 IL-1 β 단백질 발현량은 허혈 및 재관류 시 대조군에 비해 1.7배로 현저히 증가하였으나, 도 3B에 나타낸 바와 같이, 목단피 70% 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획물 1.25 및 2.5 mg/kg 투여 시 그 발현을 현저히 억제시켰으며, 목단피 70% 에탄올 추출 100 mg/kg 투여는 그 발현을 감소시키는 경향만을 나타냄을 확인하였다.

[106]

- [107] 상기 내용을 종합한 결과, 목단피 70% 에탄올 추출물에 비하여, 이의 물, 부탄올, 헥산 또는 에틸아세테이트 (EA) 분획물이 보다 우수한 혈중 ALT 활성

억제 효과 및 간장 내 TLR4 또는 IL-1 β 단백질 발현 억제 효과를 나타냈으며, 특히 이들 중 에틸아세테이트 분획물이 가장 우수한 효과, 즉 가장 우수한 간 보호 효과를 나타냄을 확인하였다. 이에 하기 실시예는 에틸아세테이트 분획물에 대하여 보다 심층적인 실험을 실시하였다.

[108]

[109] **실시예 4. GalN/LPS로 인한 급성 간부전에 대한 목단피 추출물 에틸아세테이트 분획물의 보호 효과**

[110] 본 실시예에서는, 상기 실시예들로부터 확인한 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 GalN/LPS로 인한 급성 간부전에도 효과를 나타내는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-3, 1-4, 1-6 및 1-7의 방법으로 실험하였다.

[111]

[112] **4-1. 혈중 ALT 활성**

[113] 그 결과, 분획물 처리 전 혈중 ALT 활성은 대조군 (control)에서 45.0 ± 8.7 U/L이었으며, GalN/LPS 투여 후 6시간에서, 대조군에 비해 16.7 배 증가하였으나, 도 4에 나타낸 바와 같이, 목단피 70% 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획물 1.25, 2.5 및 5 mg/kg 투여 시, GalN/LPS로 인한 ALT 증가를 현저히 억제시켰으며, 특히 분획물 1.25 및 2.5 mg/kg 투여는 목단피 70% 에탄올 추출물 100 mg/kg 투여와 비교해 볼 때 (13.3% 수득물 고려 시) 우수한 ALT 활성 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[114]

[115] **4-2. 간장 내 TLR4 단백질 발현량**

[116] 또한, 분획물 처리 전 GalN/LPS 처치 시 간 조직 내 TLR4의 단백질 발현량은 대조군에 비해 2.1 배로 현저히 증가하였으나, 도 5에 나타낸 바와 같이, 목단피 70% 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획물 1.25 및 2.5 mg/kg 투여 시, 그 발현을 현저히 억제시켰으며, 70% 에탄올 추출물 100 mg/kg 투여는 그 발현을 감소시키는 경향만을 나타냄을 확인하였다.

[117]

[118] **실시예 5. APAP로 인한 약물 간손상에 대한 목단피 추출물 분획물의 보호 효과**

[119] 본 실시예에서는, 상기 실시예들로부터 확인한 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 APAP로 인한 약물 간손상에도 효과를 나타내는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-3, 및 1-5 내지 1-7의 방법으로 실험하였다.

[120]

[121] **5-1. 혈중 ALT 활성**

[122] 그 결과, 분획물 처리 전 혈중 ALT 활성은 대조군 (control)에서 35.2 ± 8.0 U/L이었으며, APAP 투여 후 24 시간에서, 혈중 ALT 활성은 대조군에 비해 249.0 배 증가하였으나, 도 6에 나타낸 바와 같이, 목단피 70% 에탄올 추출물

에틸아세테이트 분획물 1.25 mg/kg 투여 시, APAP로 인한 ALT 증가를 현저히 억제시켰으며, 2.5 및 5 mg/kg 투여는 APAP로 인한 ALT 증가를 억제시키는 경향을 나타내었다. 그러나 이와는 달리 목단피 70% 에탄올 추출물 100 mg/kg 투여는 APAP로 인한 ALT 증가에 영향을 주지 않았음을 확인하였다.

[123]

[124] **5-2. 간장 내 지질과산화**

[125] 또한, 분획물 처리 전 지방과산화의 최종 산물인 말론디알데히드 (malondialdehyde, MDA)의 간장 내 농도는 대조군에서 0.26 ± 0.01 nmol/mg 단백질이었으며, APAP 투여 후 24 시간에서, 간장 내 MDA 농도는 대조군에 비해 2.4 배 증가하였으나, 도 7에 나타낸 바와 같이, 목단피 70% 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획물 1.25 mg/kg 투여 시, APAP로 인한 MDA 증가를 현저히 억제시켰으나, 목단피 70% 에탄올 추출물 100 mg/kg 투여는 APAP로 인한 MDA 증가에 영향을 주지 않았음을 확인하였다.

[126]

[127] 상기 내용을 종합한 결과, 목단피 70% 에탄올 추출물에 비하여, 에틸아세테이트 분획물이 현저하게 우수한 간 보호 효과를 나타냄을 확인하였는 바, 간질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[128]

[129] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

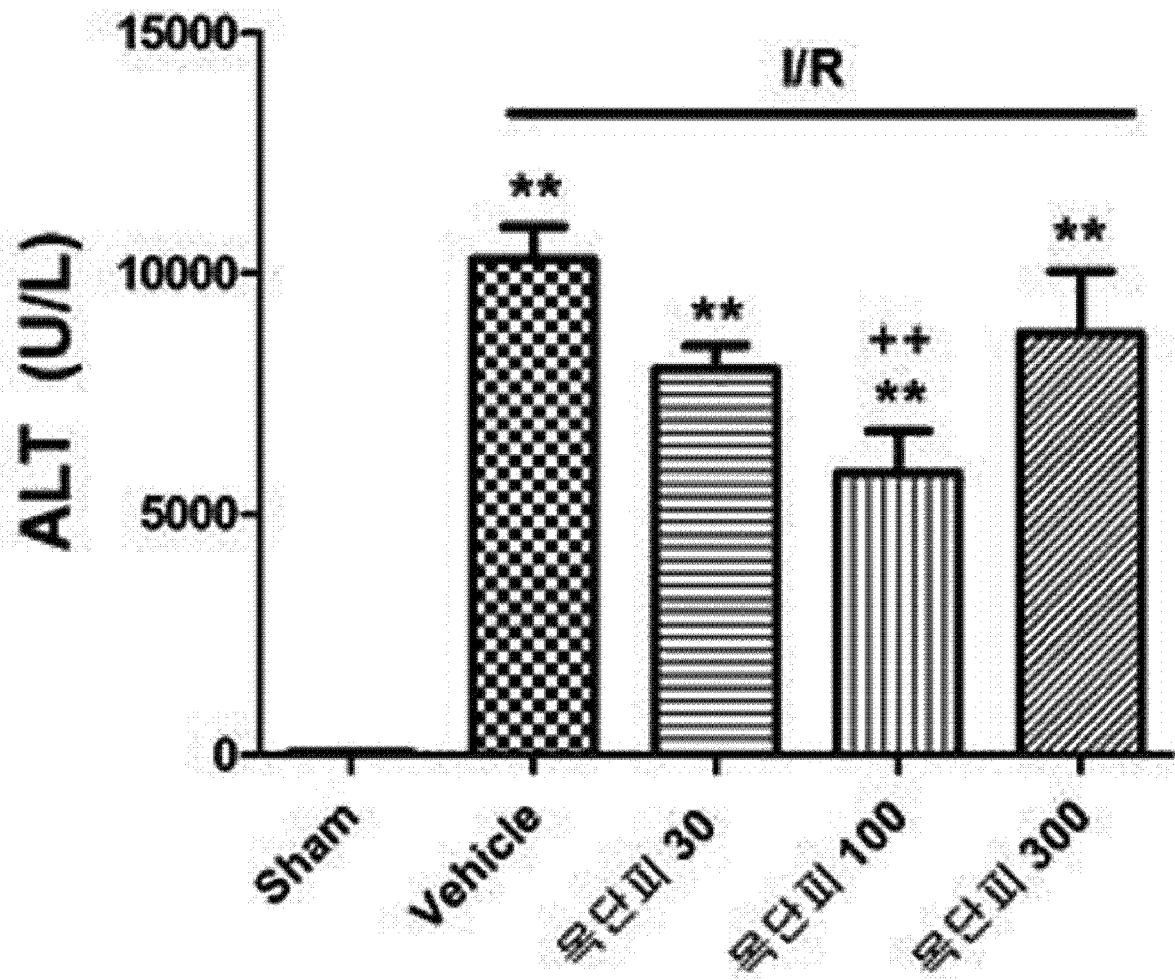
산업상 이용가능성

[130] 본 발명에 따른 조성물은 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하며, 상기 조성물을 이용하여 간 손상의 지표인 혈중 ALT 농도를 효과적으로 감소시키고, 간장 내 TLR4 또는 IL-1 β 단백질 발현의 증가를 억제시키며, 간장 내 지질과산화 또한 억제시킬 수 있음을 구체적으로 확인하였다. 따라서 본 발명은 천연물 유래 활성 성분을 이용함으로써, 우수한 간 보호 효능을 나타냄과 함께 독성 및 부작용이 거의 없어 장기간 체내에 사용할 수 있는 장점을 가지는바, 간질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

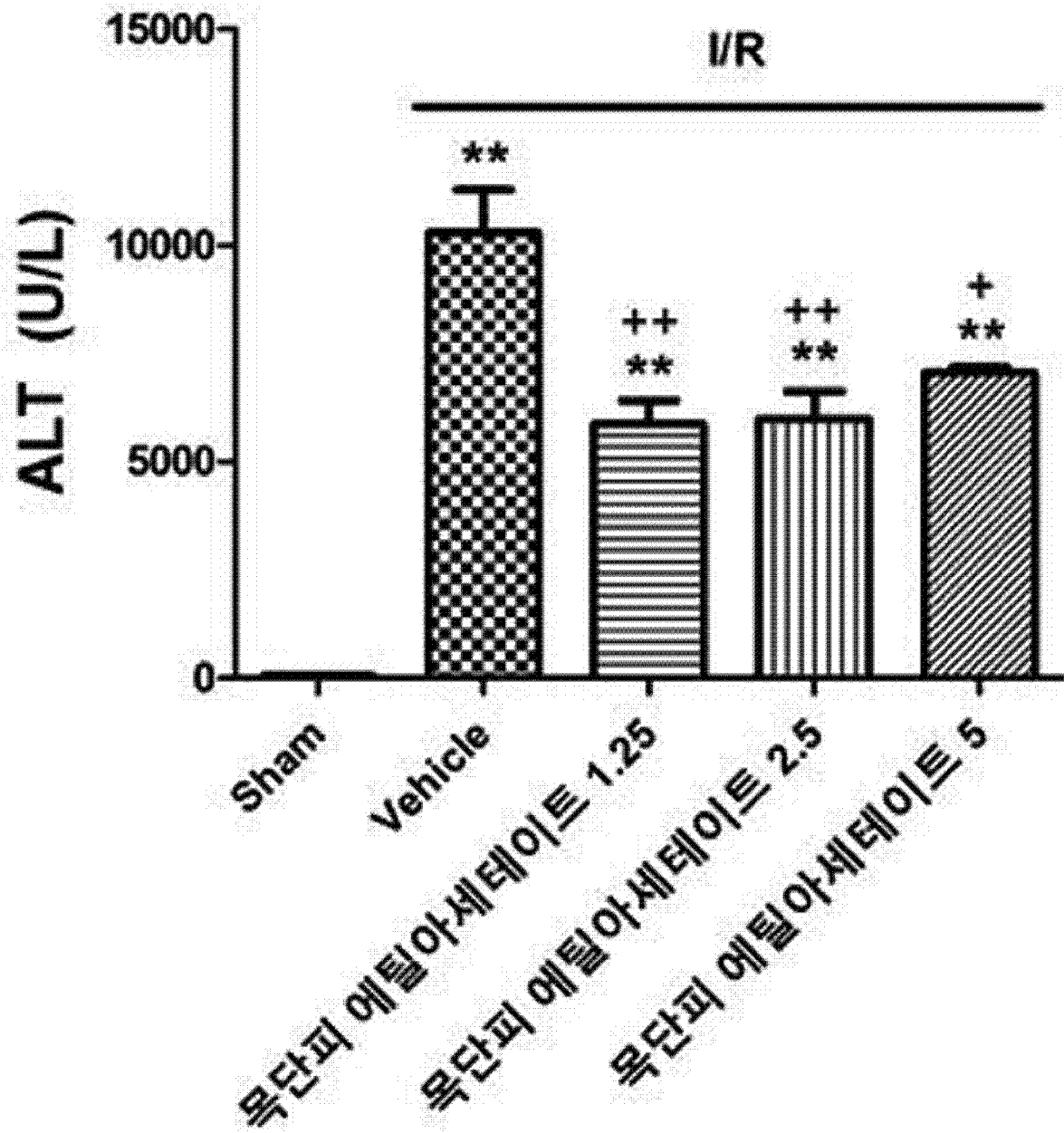
청구범위

- [청구항 1] 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 간질환은 간염, 간독성, 담즙울체, 지방간, 간경변, 간허혈, 알코올성 간질환, 간 농양, 간성 혼수, 간 위축증, 및 간암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 혈중 ALT (alanine aminotransferase)의 농도 증가를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 간장 내 TLR (Toll-like receptor) 4 또는 IL-1 β (Interleukin 1 beta) 단백질의 발현양 증가를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 간장 내 지질과산화를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7] 목단피 (*Moutan Radicis Cortex*) 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는, 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 8] 제1항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 9] 간질환 치료제 제조를 위한 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 용도.

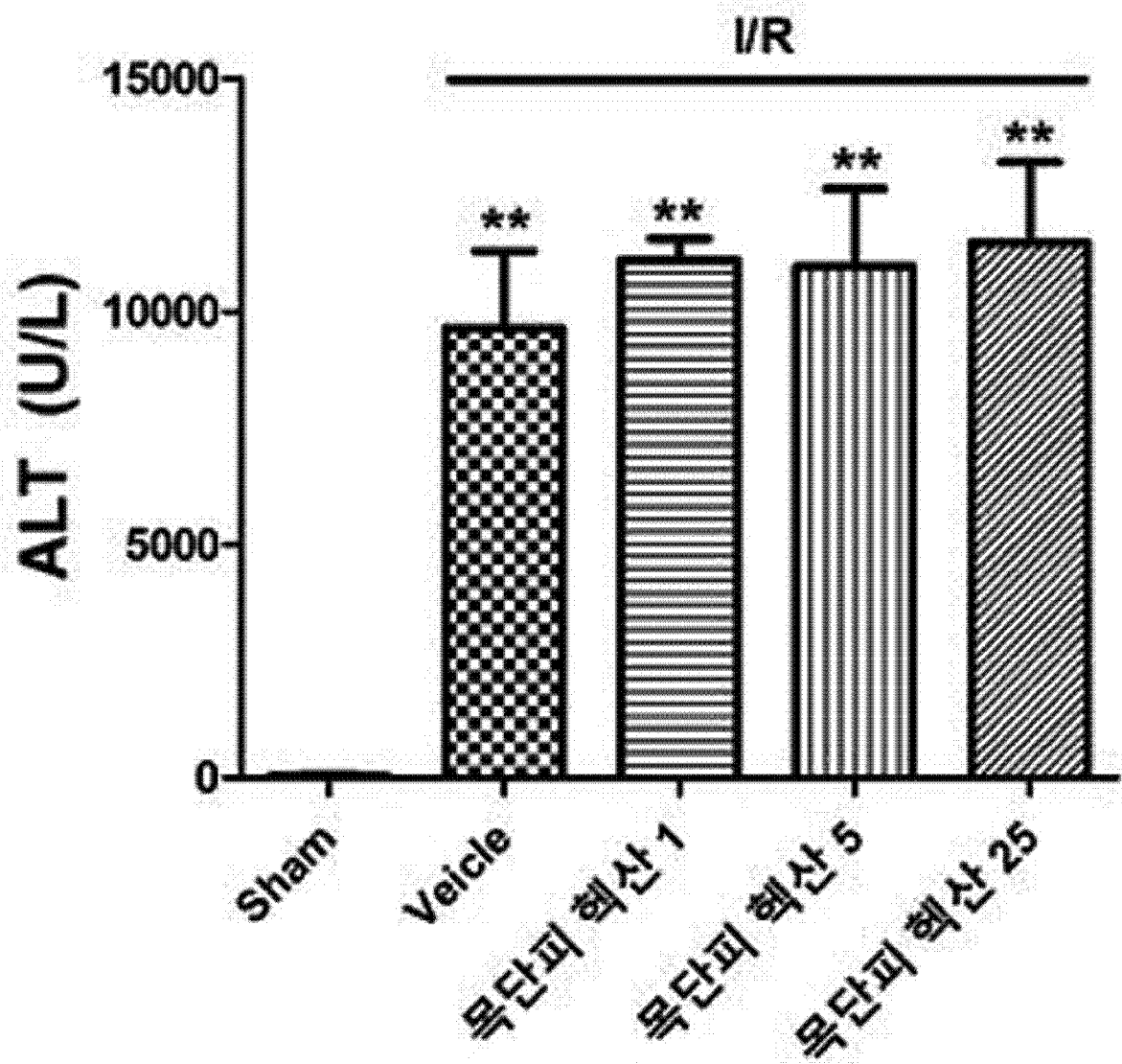
[도1]



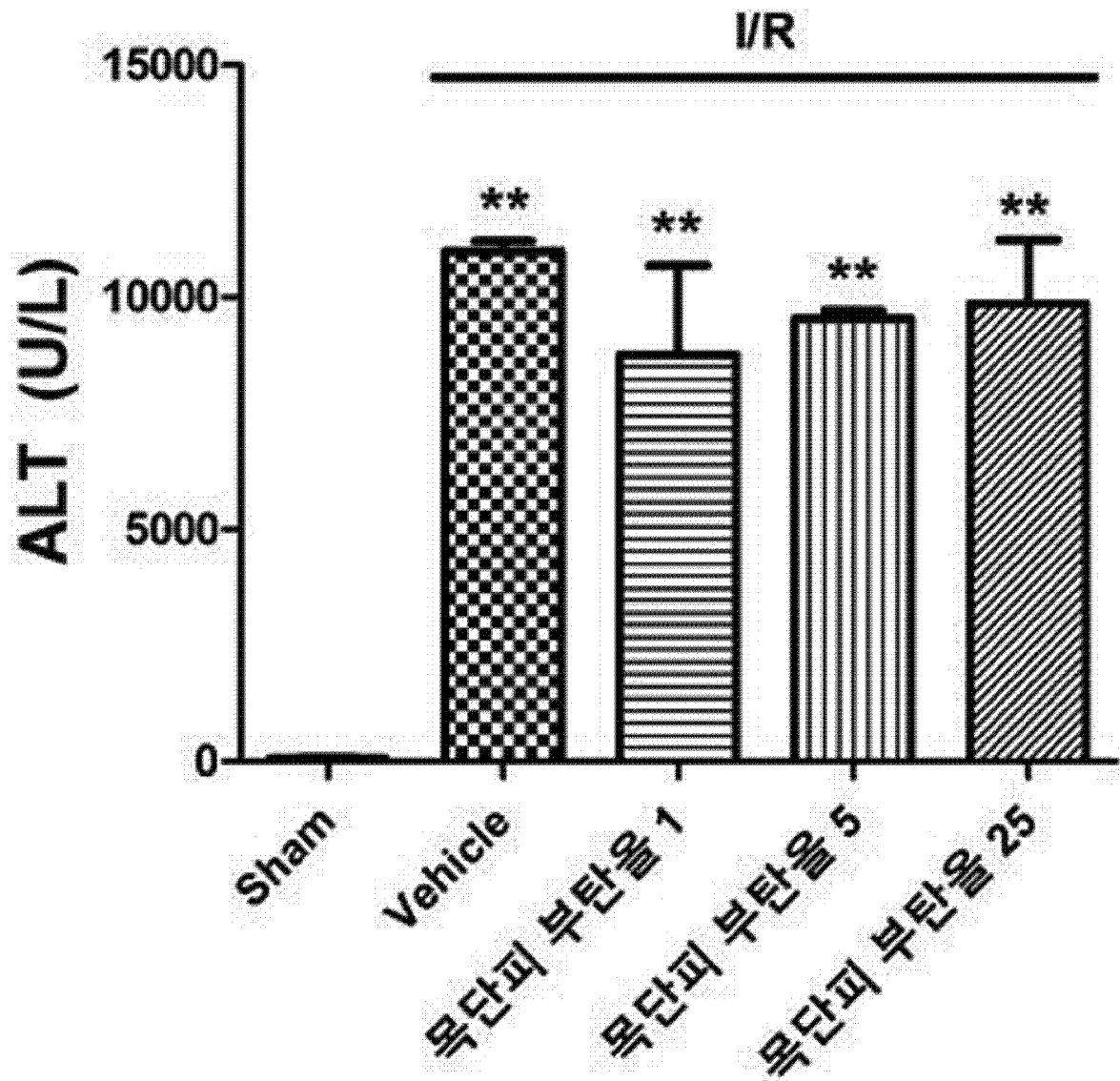
[도2a]



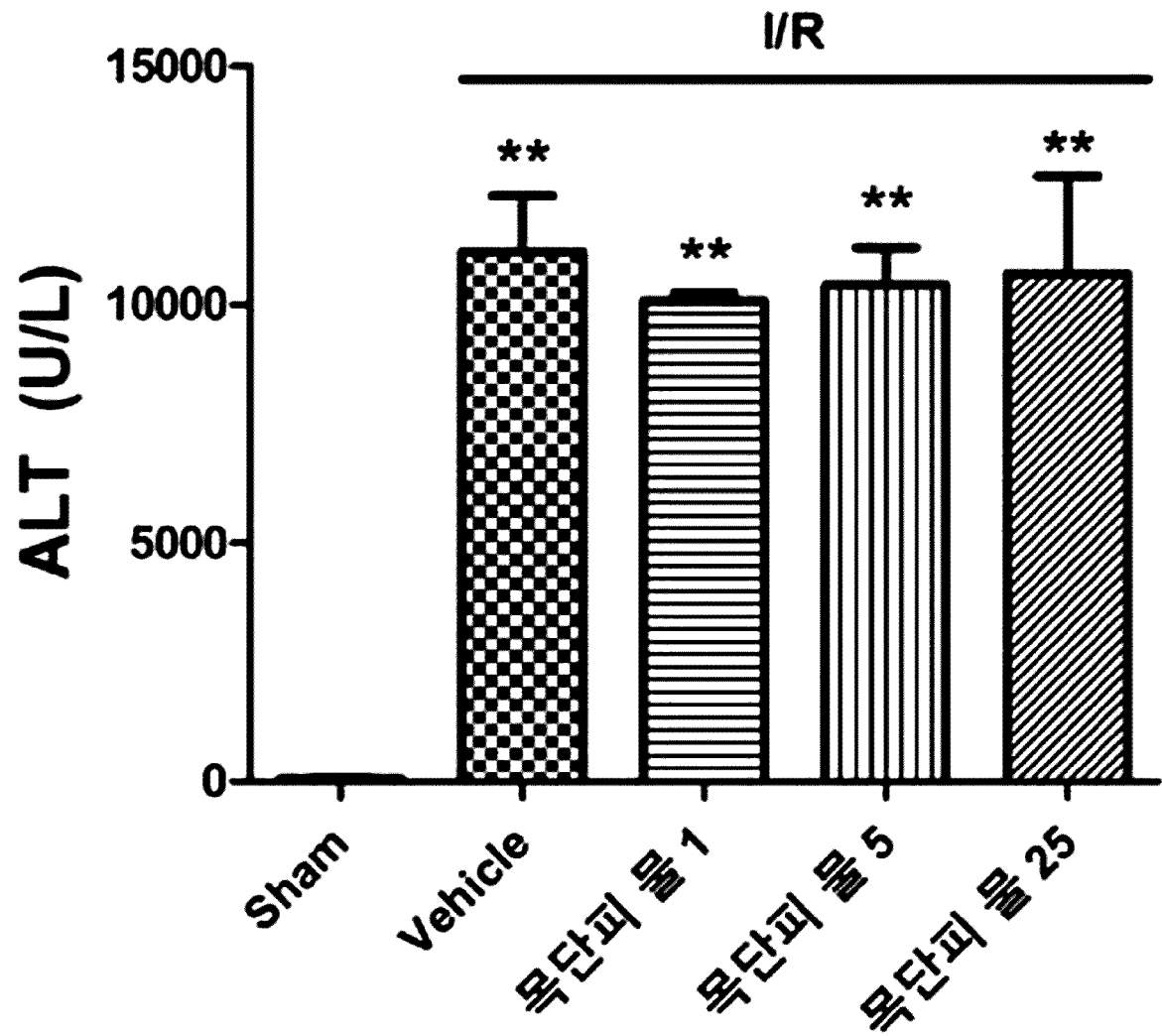
[도2b]



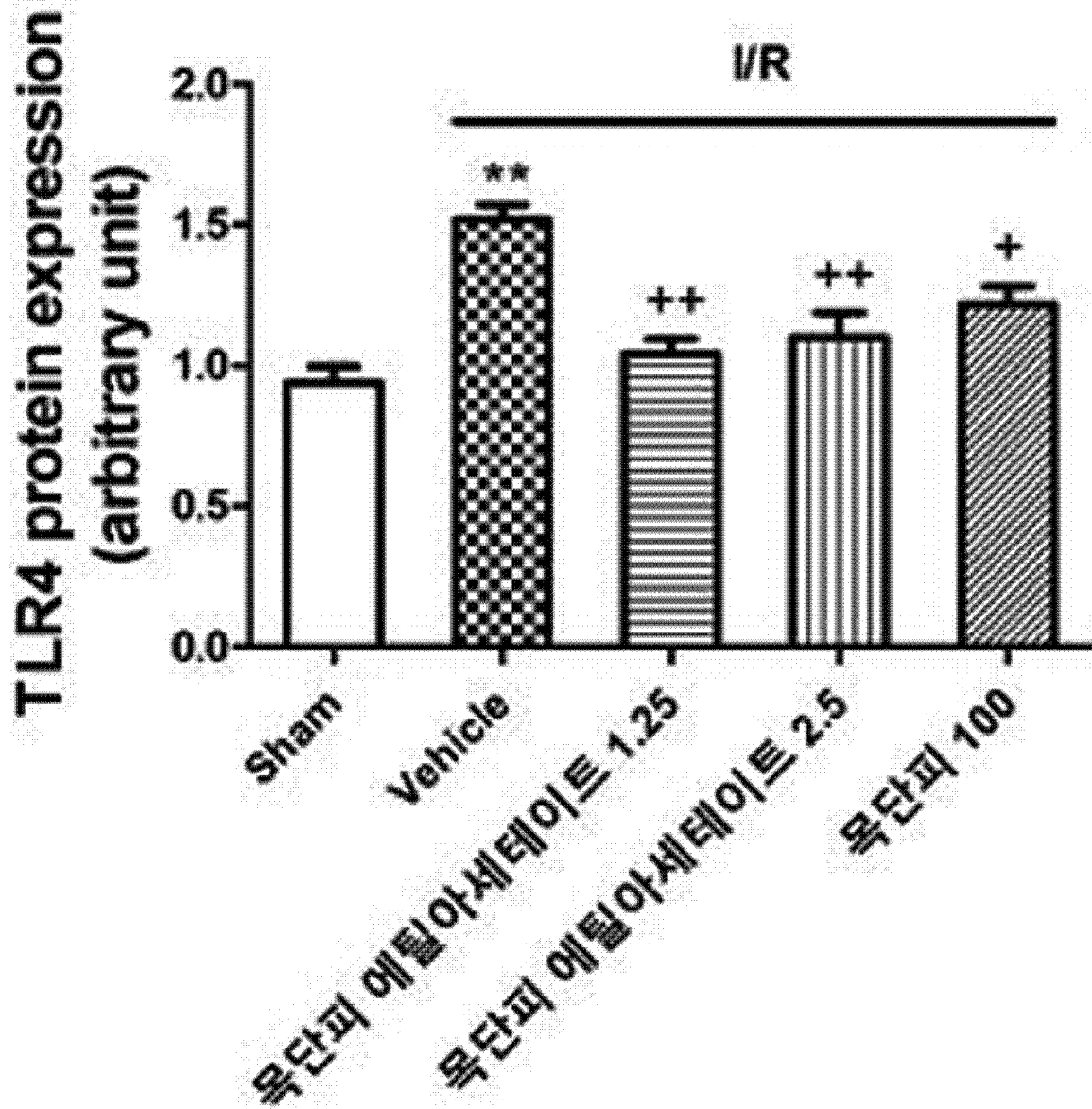
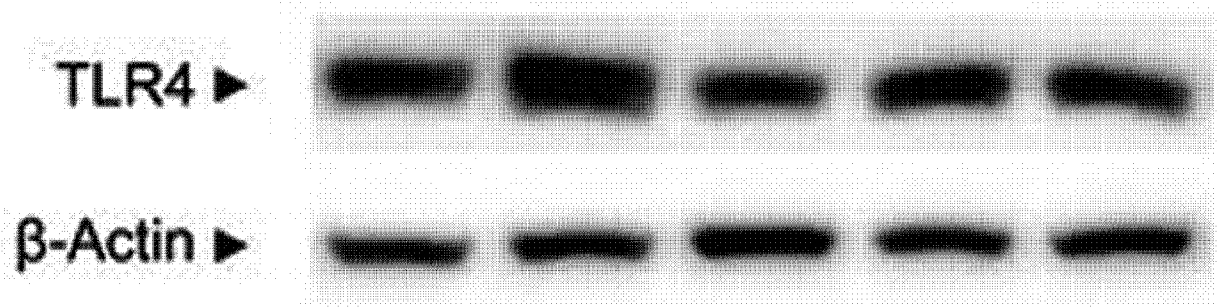
[도2c]



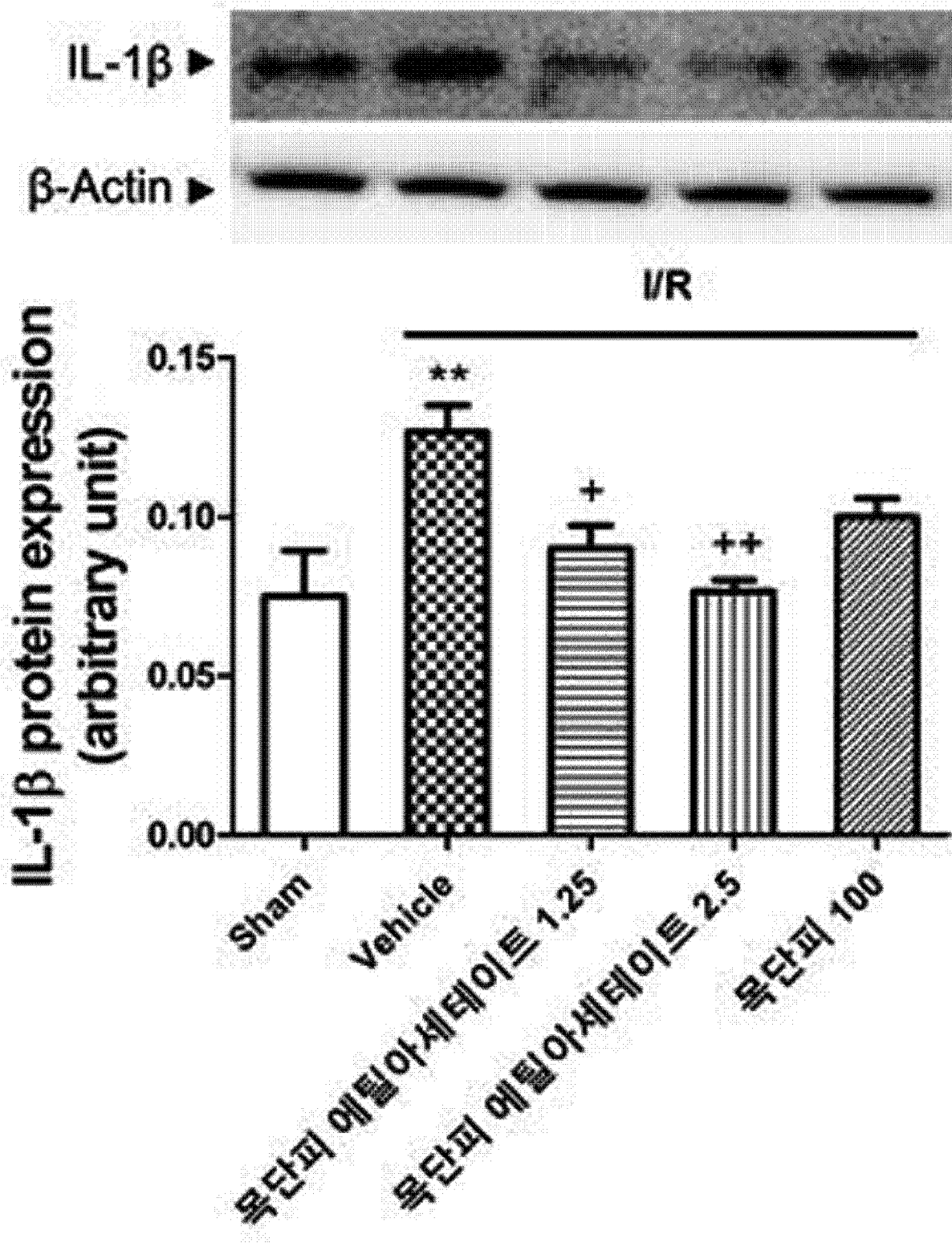
[도2d]



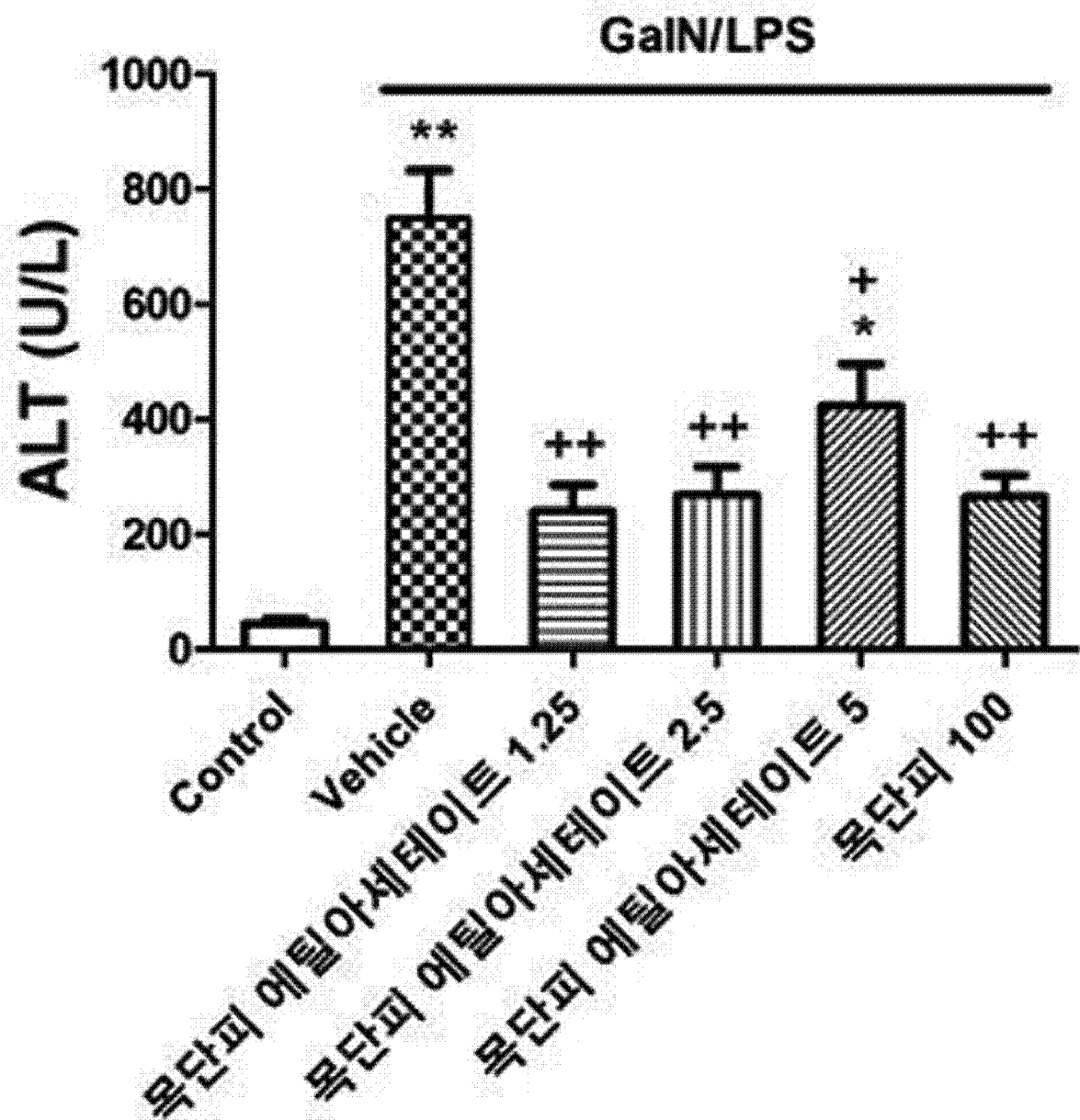
[도3a]



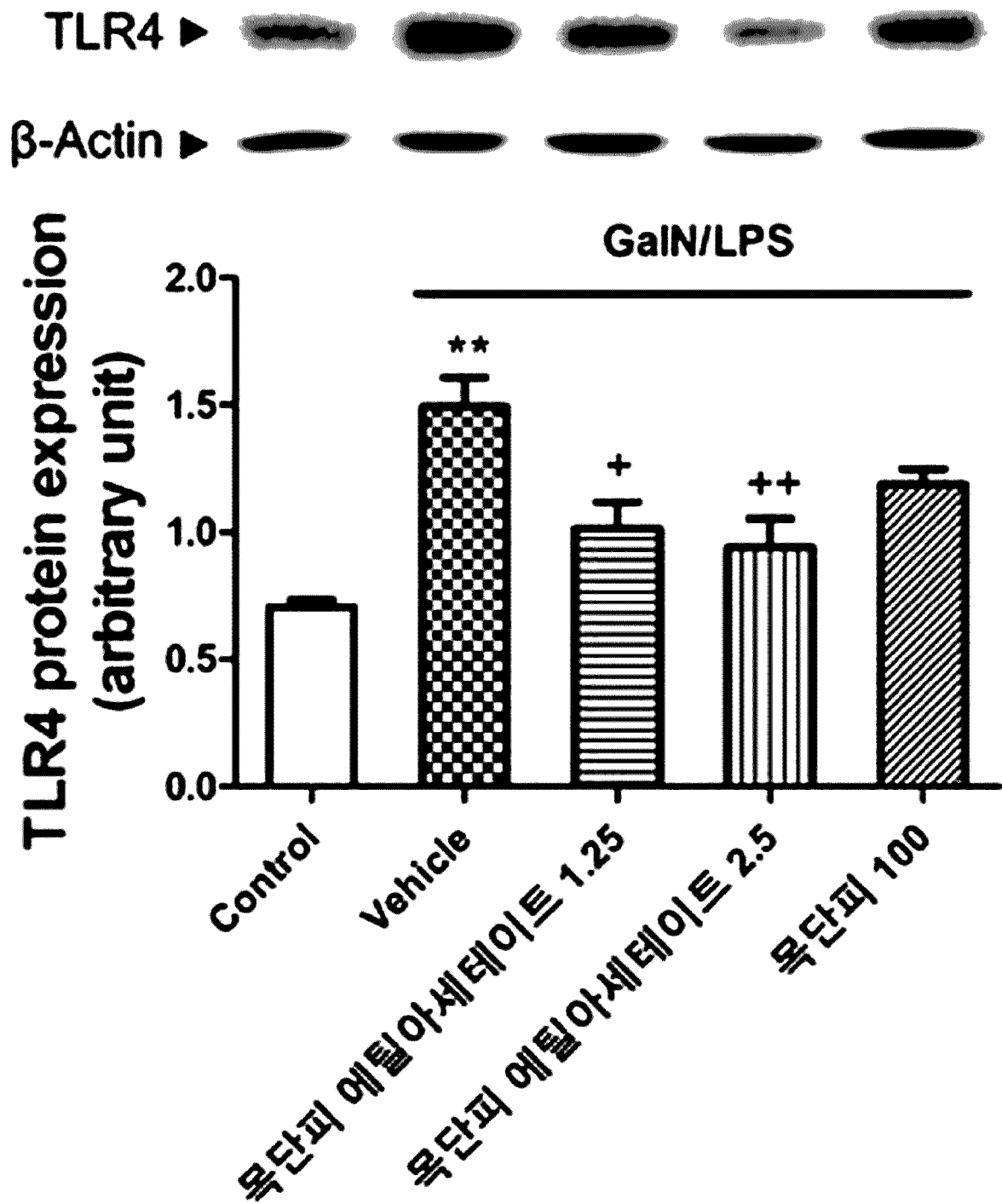
[도3b]



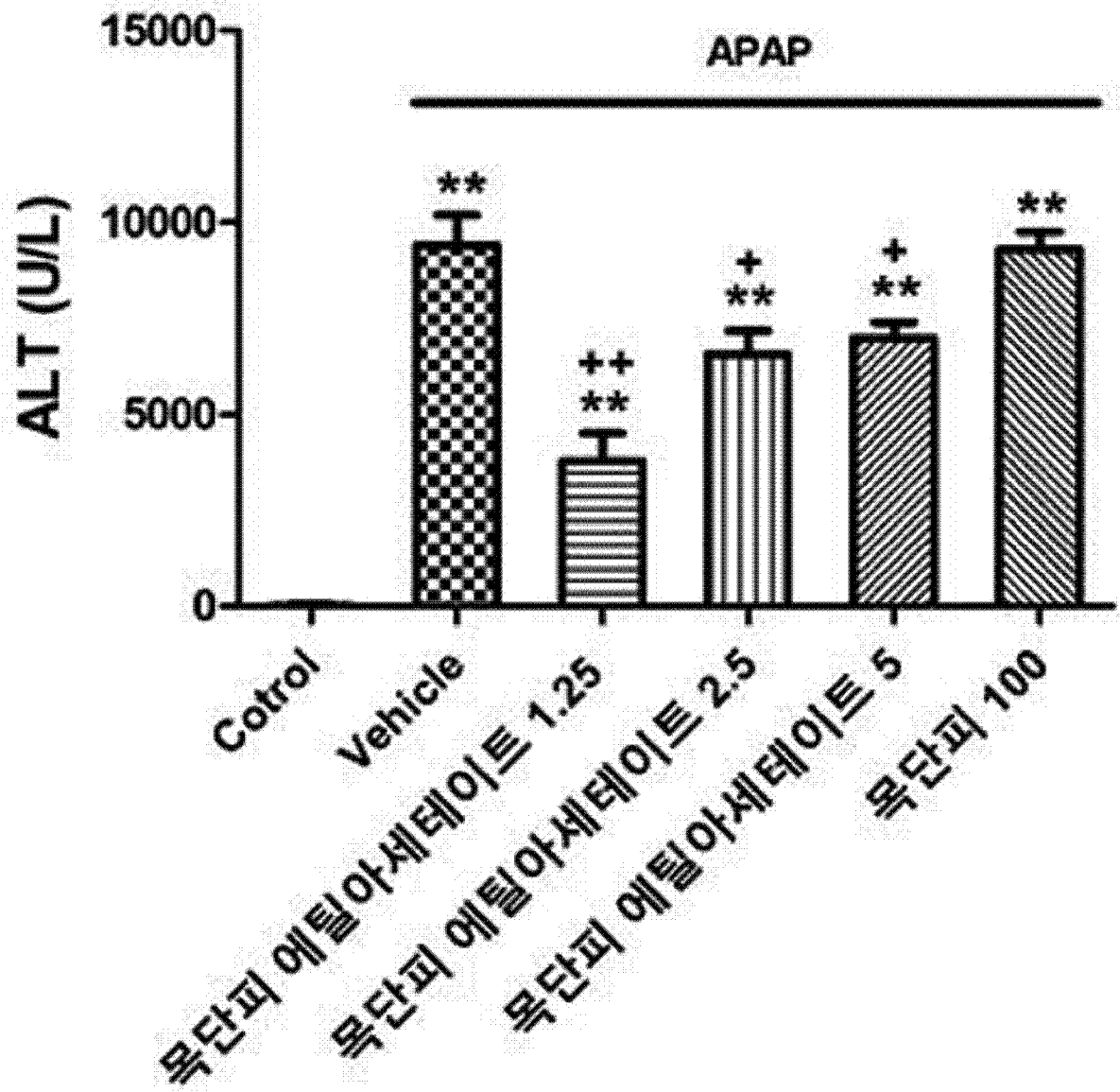
[도4]



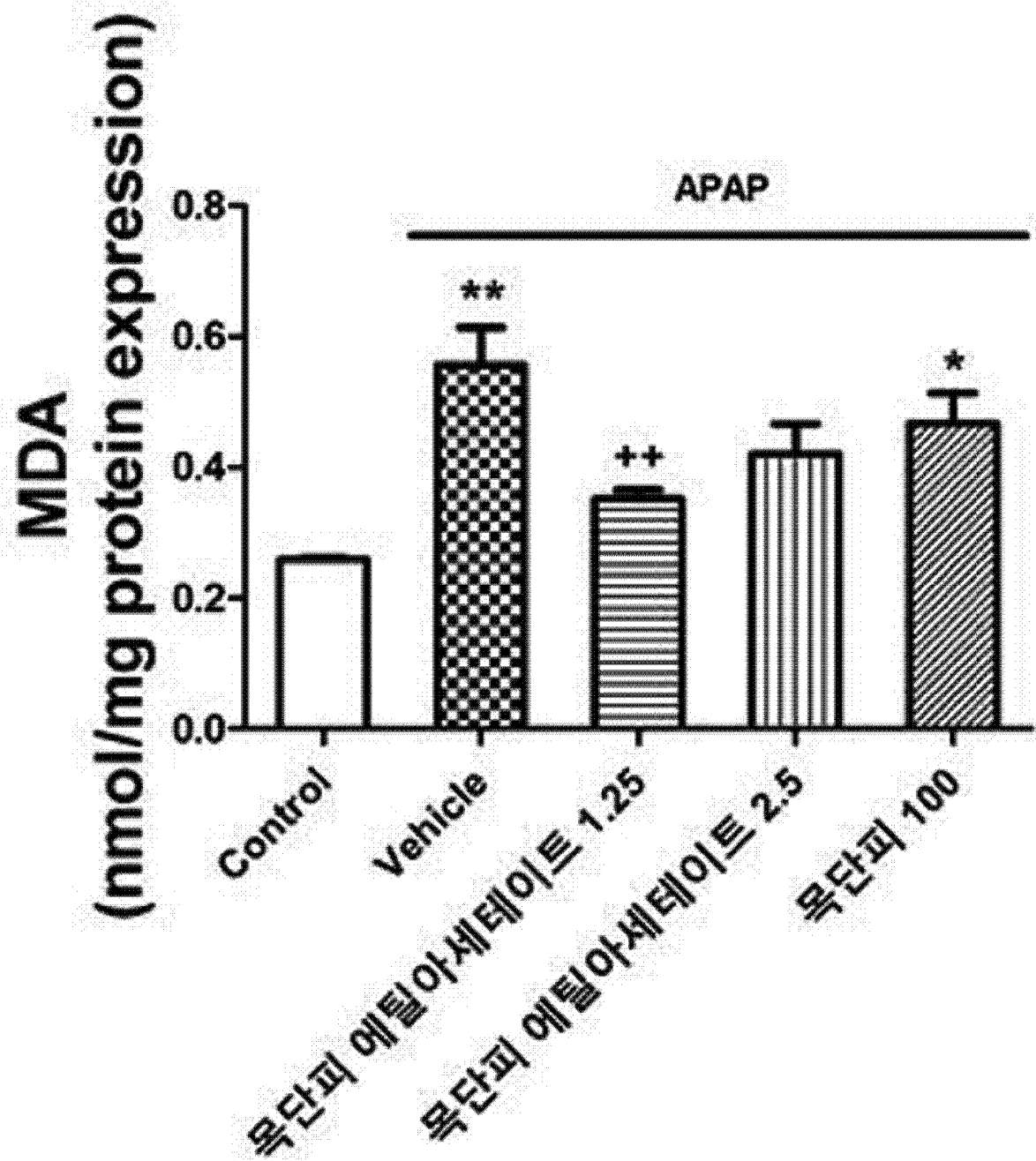
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011647**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 36/65(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/65; A61K 31/7048; A61P 1/16; A61P 9/12; A61K 31/045; A61K 36/24; A61K 31/047; A23L 33/105

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Moutan Cortex Radicis, moutan radicis cortex, liver complaint, hepatitis, hepatotoxicity, fatty liver, liver cirrhosis, alcoholic liver disease, blood ALT, alanine aminotransferase, extraction, acetate, ethyl acetate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0005617 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 17 January 2012 See claims 1-2, 4, 5, 7; paragraphs [0012]-[0015].	1-7,9
A	KR 10-2015-0024608 A (RESEARCH COOPERATION FOUNDATION OF YEUNGNAM UNIVERSITY) 09 March 2015 See claims 1-7.	1-7,9
A	HU, S. et al., "Paeonol, the Main Active Principles of Paeonia Moutan, Ameliorates Alcoholic Steatohepatitis in Mice", Journal of Ethnopharmacology, 2010, vol. 128, no. 1, pages 100-106 See abstract.	1-7,9
A	KR 10-2012-0061725 A (SINIL PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 13 June 2012 See claims 1-17.	1-7,9
A	KR 10-2007-0050998 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 17 May 2007 See claims 1, 2.	1-7,9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 JANUARY 2017 (25.01.2017)

Date of mailing of the international search report

25 JANUARY 2017 (25.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011647

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/011647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0005617 A	17/01/2012	KR 10-1256273 B1	18/04/2013
KR 10-2015-0024608 A	09/03/2015	KR 10-1528190 B1	12/06/2015
KR 10-2012-0061725 A	13/06/2012	CN 103327992 A	25/09/2013
		CN 103327992 B	12/10/2016
		EP 2658561 A1	06/11/2013
		JP 2013-545767 A	26/12/2013
		KR 10-1298243 B1	22/08/2013
		KR 10-1330142 B1	18/11/2013
		KR 10-2013-0011110 A	30/01/2013
		US 2014-0010899 A1	09/01/2014
		WO 2012-074183 A1	07/06/2012
KR 10-2007-0050998 A	17/05/2007	KR 10-0732886 B1	27/06/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/65(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/65; A61K 31/7048; A61P 1/16; A61P 9/12; A61K 31/045; A61K 36/24; A61K 31/047; A23L 33/105 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 목단피, moutan radidis cortex, 간질환, 간염, 간독성, 지방간, 간경변, 알코올성 간질환, 혈중 ALT, alanine aminotransferase, 추출, 아세테이트, 에틸아세테이트																				
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>KR 10-2012-0005617 A (성균관대학교산학협력단) 2012.01.17 청구항 1-2, 4, 5, 7; 단락 [0012]-[0015] 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>KR 10-2015-0024608 A (영남대학교 산학협력단) 2015.03.09 청구항 1-7 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>HU, S. 등, "Paeonol, the main active principles of Paeonia moutan, ameliorates alcoholic steatohepatitis in mice", Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128권, 1호, 페이지 100-106 초록 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>KR 10-2012-0061725 A (신일제약주식회사) 2012.06.13 청구항 1-17 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>KR 10-2007-0050998 A (한국화학연구원) 2007.05.17 청구항 1, 2 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-7,9</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KR 10-2012-0005617 A (성균관대학교산학협력단) 2012.01.17 청구항 1-2, 4, 5, 7; 단락 [0012]-[0015] 참조.	1-7,9	A	KR 10-2015-0024608 A (영남대학교 산학협력단) 2015.03.09 청구항 1-7 참조.	1-7,9	A	HU, S. 등, "Paeonol, the main active principles of Paeonia moutan, ameliorates alcoholic steatohepatitis in mice", Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128권, 1호, 페이지 100-106 초록 참조.	1-7,9	A	KR 10-2012-0061725 A (신일제약주식회사) 2012.06.13 청구항 1-17 참조.	1-7,9	A	KR 10-2007-0050998 A (한국화학연구원) 2007.05.17 청구항 1, 2 참조.	1-7,9
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	KR 10-2012-0005617 A (성균관대학교산학협력단) 2012.01.17 청구항 1-2, 4, 5, 7; 단락 [0012]-[0015] 참조.	1-7,9																		
A	KR 10-2015-0024608 A (영남대학교 산학협력단) 2015.03.09 청구항 1-7 참조.	1-7,9																		
A	HU, S. 등, "Paeonol, the main active principles of Paeonia moutan, ameliorates alcoholic steatohepatitis in mice", Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128권, 1호, 페이지 100-106 초록 참조.	1-7,9																		
A	KR 10-2012-0061725 A (신일제약주식회사) 2012.06.13 청구항 1-17 참조.	1-7,9																		
A	KR 10-2007-0050998 A (한국화학연구원) 2007.05.17 청구항 1, 2 참조.	1-7,9																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2017년 01월 25일 (25.01.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 01월 25일 (25.01.2017)																			
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353 																			

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 8항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/011647

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0005617 A	2012/01/17	KR 10-1256273 B1	2013/04/18
KR 10-2015-0024608 A	2015/03/09	KR 10-1528190 B1	2015/06/12
KR 10-2012-0061725 A	2012/06/13	CN 103327992 A	2013/09/25
		CN 103327992 B	2016/10/12
		EP 2658561 A1	2013/11/06
		JP 2013-545767 A	2013/12/26
		KR 10-1298243 B1	2013/08/22
		KR 10-1330142 B1	2013/11/18
		KR 10-2013-0011110 A	2013/01/30
		US 2014-0010899 A1	2014/01/09
		WO 2012-074183 A1	2012/06/07
KR 10-2007-0050998 A	2007/05/17	KR 10-0732886 B1	2007/06/27