



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0120509
(43) 공개일자 2017년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/282 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/522 (2006.01) A61K 31/675 (2006.01)
A61K 36/739 (2006.01) A61K 36/9066 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/282 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0050372

(22) 출원일자 2017년04월19일

심사청구일자 2017년04월19일

(30) 우선권주장

1020160048705 2016년04월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김범준

서울특별시 강남구 압구정로 151, 117동 702호(압구정동, 신현대 아파트)

이장훈

서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 301동 502호(반포동, 미도아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

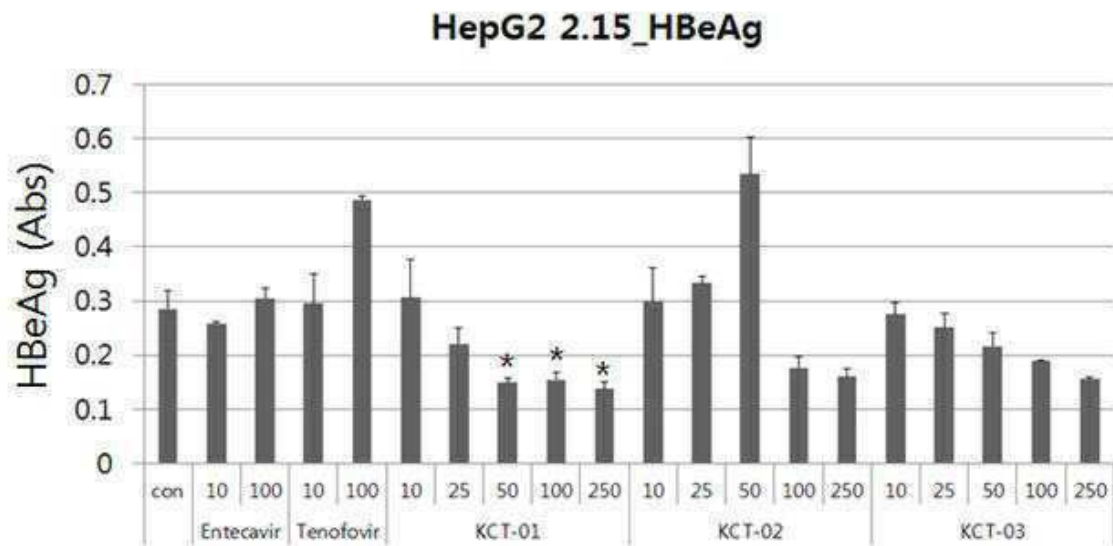
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 인진, 지유 및 울금 추출물 및 항바이러스제를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인진, 지유 및 울금 추출물 및 항바이러스제를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제의 병용 투여는 B형 간염 바이러스 e 항원을 억제하고, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 또는 TGF- β 의 발현을 효과적으로 저해하여, B형 간염의 치료 뿐 아니라 간경화 또는 간암의 억제 효과까지 기대할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/522 (2013.01)
A61K 31/675 (2013.01)
A61K 36/739 (2013.01)
A61K 36/9066 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

인경수

경기도 고양시 덕양구 서정마을로 46, 409동 701호

장은경

서울특별시 성동구 고산자로 164, 117동 602호

이경태

서울특별시 노원구 중계로 195, 103동 702호(중계동, 신안동진아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0955

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 양한방융합기반기술개발사업

연구과제명 양한방 병용투여를 통한 B형감염바이러스에 의한 만성간염 및 간암 신규 치료전략 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

인진, 지유 및 울금 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 인진, 지유 및 울금이 각각 3:1:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는, 간질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간질환은 지방간, 간염 또는 간경화로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 간질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 B형 간염의 항바이러스제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 간질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 B형 간염의 항바이러스제는 엔테카비어(entecavir), 테노포비어(tenofovir), 라미부딘(lamibudine), 아데포비어(adeфовir) 및 클레부딘(clebudine)에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 간질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TNF- α , IL-1 β , TGF- β , 콜라게나아제(collagenase) I 또는 콜라게나아제(collagenase) IV의 발현을 저해 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는, 간질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

인진, 지유 및 울금 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 및 개선용 건강기능성식품.

청구항 8

인간을 제외한 간질환이 유발된 개체에 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제를 병용 투여하는 단계를 포함하는, 간질환 치료 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 B형 간염의 항바이러스제는 엔테카비어(entecavir), 테노포비어(tenofovir), 라미부딘(lamibudine), 아데포비어(adeфовir) 및 클레부딘(clebudine)에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 간질환 치료 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 간질환은 지방간, 간염 또는 간경화로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 간질환 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인진, 지유 및 울금 추출물 및 항바이러스제를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사람의 B형 간염 바이러스(HBV)는 급성 및 만성 간염을 유발하며, 자기제어성 급성 간염, 전격성 간염 또는 만성 활동성 간염 등의 병으로 진전될 수 있다. 만성 활동성 간염은 발전되어 간경변 및 간암 등을 유발하고, 간부전을 동반하는 심각한 급성으로 악화될 수 있다(Brechot, C., J. Hepatol., 4, 269-279, 1987). 만성 간염에 감염되었을 때 대부분의 환자들은 지속성 또는 활동성 간염 증세를 보이는 반면 일부 환자들은 증세를 보이지 않는다. 상기 바이러스성 간염의 발병 기전이 나 유발인자는 아직까지 명확히 밝혀지지 않은 실정이다. B형 간염 바이러스가 일으킨 간 손상은 숙주의 면역세포가 매개한다는 일부 증거가 제시된 이래(Milich, D. R. et al., J. Immunol., 143, 3141-3147, 1989) 간세포 괴사를 유발하는 바이러스 항원과 특정 B 세포 및 T 세포의 면역 반응 및 바이러스 단백질의 직접적인 세포 발병 기전 또는 중양 발병 기전에 대한 연구가 집중적으로 이루어졌다(R. Zschke, O. et al., Nature, 348, 252-254 (1990)). 그러나 여전히 환자마다 다양하게 나타나는 임상 경로의 원인은 분명하지 않다.

[0003] B형 간염은 그 증세의 심각성 때문에 그 치료에 많은 관심을 갖고 연구되어져 왔다. 현재 몇몇 약물과 백신이 개발되고 또 임상 전 실험과 임상 실험에서 좋은 평가를 받았으나 실제 치료제로 적용된 약은 거의 없는 상태로 지금까지 B형 간염 바이러스(HBV)성 간염 환자에게 시행되는 유일한 치료법은 인체 면역 체계에 의존하는 것이다. HBV에 대한 인체 면역 작용은 HBV입자를 제거하지만 다른 한편으로는 간세포를 파괴하기 때문에 이러한 면역 작용의 부작용으로 치명적인 질환이 유발되기도 한다. 또한, 이러한 문제는 질병의 진행을 예측하기 어렵게 하므로 빠르고 효율적인 간염 치료를 위해서는 항바이러스 요법과 면역 치료법을 복합적으로 사용하는 것이 바람직하다. 즉, 바이러스성 간염의 치료시 감염된 간세포는 T 임파구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)에 의해 파괴되고, 파괴된 간세포에서 방출된 바이러스 입자는 바이러스에 대한 중화 항체를 제거하여 간세포로의 재감염도 막으면서 바이러스의 증식도 억제하여야 한다. 지금까지 B형 간염 바이러스를 치료하기 위하여 인터페론, 핵산 유도제 또는 면역 조절물질 등 여러 방법이 시도되었으나 인터페론- α 만이 거의 유일하게 치료 효과가 있는 것으로 나타났으며 현재 인터페론- α 만이 미국에서 간염 치료제로 사용되고 있다.

[0004] 인터페론- α 는 스컬레드(Sculled) 등에 의하여 1970년대 중반 처음 만성 B형 간염 치료제로 시험 되었는데 HBV 복제를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려졌다. 그러나 인터페론- α 는 1주일에 3번씩 최소 3개월 동안 투여하였을 경우 평균 20%의 환자에서 바이러스 증식이 억제되는 치료 효과를 나타낼 뿐 지속적인 억제 효과를 보이지는 못하며, 특히 동양 사람에게 많은 모자간의 수직 감염에 의한 환자 또는 어린이들은 인터페론- α 에 내성을 나타내므로 그 치료 효과가 낮다. 또한, B형 간염 바이러스에 감염된 급성 및 만성 환자들 중 50% 이하만이 인터페론- α 치료법에 적합하다는 것이 최근 보고되었는데, 상기 환자들 중 바이러스에 대한 영향으로 간에서 생성되는 각종 효소들(AST, SGOT, ALT, SGPT 등)의 양이 증가하는 경우에만 이 인터페론- α 치료법이 효과를 기대할 수 있다고 한다. 따라서 인터페론- α 에 대해 내성을 가지는 환자들을 치료할 수 있는 B형 간염 바이러스 치료제의 개발이 시급한 실정이나 아직까지 그 연구가 미미하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제2000-0003489호

(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 제2000-7014443호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 인진, 지유 및 울금 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 인진, 지유 및 울금 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 및 개선용 건강기능성식품을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 인간을 제외한 간질환이 유발된 개체에 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제를 병용 투여하는 단계를 포함하는, 간질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인진, 지유 및 울금 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 인진, 지유 및 울금이 각각 3:1:1의 중량비로 혼합된 것일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간질환은 지방간, 간염 또는 간경화로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 B형 간염의 항바이러스제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 B형 간염의 항바이러스제는 엔테카비어(entecavir), 테노포비어(tenofovir), 라미부딘(lamibudine), 아데포비어(adeфовir) 및 클레부딘(clebudine)에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 TNF- α , IL-1 β , TGF- β , 콜라게나아제(collagenase) I 또는 콜라게나아제(collagenase) IV의 발현을 저해 또는 억제시킬 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 인진, 지유 및 울금 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 및 개선용 건강기능성식품을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 간질환이 유발된 개체에 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제를 병용 투여하는 단계를 포함하는, 간질환 치료 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 B형 간염의 항바이러스제는 엔테카비어(entecavir), 테노포비어(tenofovir), 라미부딘(lamibudine), 아데포비어(adeфовir) 및 클레부딘(clebudine)에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간질환은 지방간, 간염 또는 간경화로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제의 병용 투여는 B형 간염 바이러스 e 항원을 억제하고, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 또는 TGF- β 의 발현을 효과적으로 저해하여, B형 간염의 치료 뿐 아니라 간경화 또는 간암의 억제 효과까지 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 인진, 지유 및 울금의 70% 에탄올 추출물과 B형 간염의 항바이러스제의 병용 투여에 의한 HBV HBeAg 억제 정도를 확인한 결과이다.
- 도 2는 인진, 지유 및 울금의 30% 에탄올 추출물의 투여 후 HBV HBsAg (A) 및 HBV HBeAg 억제(B) 정도를 확인하였고, 상기 추출물과 B형 간염의 항바이러스제(ETV)의 병용 투여에 의한 HBV HBsAg (C) 및 HBV HBeAg 억제(D)

정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 인진, 지유 및 울금의 30% 에탄올 추출물의 투여 후 pgRNA 의 양을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 급성 B형 간염 유도 마우스에서의 HBV 비리온 생성억제를 통한 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제의 병용 투여에 의한 효능을 확인한 결과이다.

도 5는 급성 B형 간염 유도 마우스에서 인진, 지유 및 울금의 30% 에탄올 추출물과 B형 간염의 항바이러스제 (ETV)의 병용 투여 후 cccDNA 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 급성 B형 간염 유도 마우스에서의 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제의 병용 투여에 의한 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 7은 급성 B형 간염 유도 마우스에서의 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제의 병용 투여에 의한 간섬유화와 관련된 인자인 TGF- β , 콜라게나아제(collagenase) I, 콜라게나아제(collagenase) IV 억제 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 있다. 본 발명의 인진, 지유 및 울금 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0023] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0024] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 인진, 지유 및 울금 추출물 및 B형 간염의 항바이러스제는 조성물 총중량에 대하여 0.1 ~ 50 중량%로 포함될 수 있다.
- [0026] 이러한 본 발명의 인진, 지유 및 울금 추출물이 치료, 예방, 개선할 수 있는 상기 간질환은 이에 제한되지는 않으나, 지방간, 간염 또는 간경화일 수 있으며, 가장 바람직하게는 B형 간염이다.
- [0027] 나아가 본 발명의 조성물은 간질환 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물 이외에도 식품 조성물로 사용될 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0028] 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 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어

레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0030] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물 외에 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, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용은 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 건강기능식품은 간손상을 개선 및 예방하기 위한 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0034] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0035] 상기 “식품 첨가물 공전”에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0036] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0037] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 인진, 지유 및 울금 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0038] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0039] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 인진, 지유 및 울금 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0040] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태로 제조될 수 있으며, 예로 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 간질환이 유발된 개체에 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제를 병용 투여하는 단계를 포함하는, 간질환 치료 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 간질환 치료 방법은 인진, 지유 및 울금 추출물과 B형 간염의 항바이러스제를 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반건강 상태,

성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

- [0043] 상기 개체는 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 제조예 1. 인진, 지유, 울금 복합 한방 70% 에탄올 추출물 제조방법
- [0048] 본 발명자들은 인진, 지유, 울금을 물로 깨끗이 세척하여 그늘에서 건조한 후, 곱게 분말화시켰다. 분말화된 인진 45g, 지유 15g, 울금 15g의 비율로 혼합된 150g을 70% 에탄올에 넣고 실온에서 3일간 냉침 추출한 후, 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 실온에서 에탄올 용매를 제거한 후 추출된 잔사로서 인진, 지유, 울금의 조추출물 29.45g을 수득하였다.
- [0049] 하기의 실험을 위하여 수득된 인진, 지유, 울금의 조추출물을 DMSO에 10mg/ml로 녹여서 사용하였다.
- [0051] 제조예 2. 인진, 지유, 울금 복합 한방 30% 에탄올 추출물 제조방법
- [0052] 인진 12 kg, 지유 4 kg, 울금 4 kg 각각의 생약을 30 mm의 파쇄기를 이용하여 적당한 크기로 파쇄한 후, 원료약품의 분량대로 생약을 달아 추출기에 넣고 10 배의 30% 에탄올(KP)을 넣어 80 ~ 90 ℃에서 3 시간 추출하여 추출액을 5 μ m 크기의 마이크로필터를 이용하여 여과하고 잔사를 동일 조건으로 2차 추출하고 여과 후 60 ℃이하에서 감압농축한 후 건조엑스 3.74~4.56 kg을 수득하였다. 평균수득률은 약 20.75 % 이었다.
- [0054] 실시예 1. 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물 및 B형 간염 항바이러스제 처리에 따른 B형 간염 e항원 억제 효과 확인
- [0055] 본 발명에서 KCT-01 군은 제조예 1의 방법으로 제조된 본 발명의 인진, 지유 및 울금의 복합 추출물이고, KCT-02 군은 인진, 지유, 울금, 단삼 및 복분자가 각각 45 : 15 : 15 : 12 : 12의 혼합비로 섞여 추출된 추출물이며, KCT-03 군은 인진청간탕을 추출한 추출물을 의미한다.
- [0056] 본 발명자들은 HepG2.2.15 HBV 포함 세포주에 엔테카비어(Entecavir) 혹은 테노포비어(Tenofovir)를 200 μ g/ml의 농도로 처리하고, KCT-01, KCT-02, KCT-03을 10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml의 농도로 추가 처리한 후 24시간 배양하고 배양액을 회수하여 HBeAg ELISA를 수행하여 HBeAg의 농도를 측정하였다.
- [0057] 그 결과, 엔테카비어(Entecavir) 혹은 테노포비어(Tenofovir)를 처리한 군에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 HBeAg가 억제되지 않았으나, 본 발명의 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물 및 B형 간염 항바이러스제를 병용 투여한 KCT01 처리군에서는 농도의존적으로 HBeAg 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 1 참조).
- [0058] 제조예 2의 방법으로 제조한 KCT-01에 대해서도, HepG2.2.15 HBV 포함 세포주에 31.5, 62.5, 125, 250 μ g/ml의 농도로 처리하고 배양액을 회수하여 HBsAg ELISA와 HBeAg ELISA를 수행하여 HBsAg과 HBeAg의 농도를 측정한 결과 농도의존적으로 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 엔테카비어(Entecavir)만 처리한 군과 비교하였을 때, 본 발명의 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물과 B형 간염 항바이러스제를 병용 투여하였을 때 농도의존적으로 HBsAg과 HBeAg 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 2 참조).
- [0059] 따라서, 기존 B형 간염 항바이러스제 단독 투여에서는 B형 간염 e항원이 억제되지 않았으나, 본 발명의 한방 복합 추출물을 B형 간염 항바이러스제와 병용 투여하였을 때에는 B형 간염 e항원이 효과적으로 억제되어, 본 발명의 방법은 B형 간염을 비롯한 다양한 간질환의 치료에 사용될 수 있는 효과가 있다.

[0061] 실시예 2. 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물의 B형 간염 항바이러스 pg RNA 억제 효과 확인

[0062] 본 발명자들은 HepG2.2.15 HBV 포함 세포주에 제조예 2의 방법으로 제조한 KCT-01을 0, 25, 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 추가 처리한 후 48시간 배양하고 배양액을 회수하여 버린 후 남아 있는 세포로부터 RNA를 추출하고 실시간 유전자증폭법 (Real-time RT-qPCR)법을 사용하여 pgRNA의 농도를 측정하였다.

[0063] 그 결과, 본 발명의 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물인 KCT-01 처리군에서 농도의존적으로 HepG2.2.15 HBV 포함 세포주에서의 pgRNA 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0065] 실시예 3. 급성 B형 간염 유도 마우스를 이용한 *in vivo* 효력 시험 확인

[0066] 본 발명자들은 유체역학 주입법(Hydrodynamic injection)으로 HBV DNA를 주입하여 급성 B형간염과 유사한 징후를 나타내도록 만든 C57BL6 마우스를 이용하여 엔테카비어(Entecavir)를 단독으로 투여했을 때와 엔테카비어(Entecavir) 및 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물을 병용 투여하였을 때의 혈중 HBsAg 농도를 측정하였다.

[0067] 실험 방법을 보다 자세히 설명하면, 사용된 C57BL6 마우스는 Charles Liver Laboratory(MA, USA)로부터 20g 내외의 8주령 수컷을 사용하였으며, 모든 마우스는 adeno-associated virus에 HBV DNA 염기서열이 삽입된 pAAV/HBV 벡터를 실험동물 체중의 8% 부피로 마우스 꼬리 정맥을 통해 0.3 ml/min의 속도로 주사하여 급성 B형 간염을 유발하였으며, 24시간 후 PBS, 엔테카비어, 엔테카비어 및 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물을 마우스의 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 시험물질 주사 전(0시간), 주사 후 1일, 4일, 7일 및 10일째에 채혈하여 혈청을 분리하였으며 염소 혈청(goat serum)으로 10배 희석한 후 Genedia HBsAg ELISA 3.0 (녹십자 MS, 한국)을 이용하여 혈중 HBsAg 농도를 측정하였고, 주사 후 14일째에 liver tissue 조직을 갈아서 페놀과 클로로포름을 이용하여 DNA를 추출하고 cccDNA의 양을 실시간유전자증폭법(Real-time PCR)을 이용하여 측정하였다.

[0068] 그 결과, 대조군과 비교하였을 때 B형 간염 항바이러스제인 엔테카비어를 처리하였을 때 B형 간염 바이러스를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 엔테카비어와 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물을 병용 투여한 군에서는 동일양의 엔테카비어를 처리한 군에 비하여 더욱 효과적으로 혈중 내 HBsAg 농도 및 cccDNA 농도가 억제되었음을 확인할 수 있었다(도 4 및 도 5 참조).

[0070] 실시예 4. 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물 및 B형 간염 항바이러스제 처리에 따른 염증 억제 효과 확인

[0071] 본 발명자들은 치사된 급성 B형 간염 유도 마우스에서 간조직을 분리하였으며, 트리폴 용액 1 mL을 첨가하여 조직을 분쇄한 후, 4°C, 12,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 클로로포름(chloroform) 200 μl 을 첨가하고, 볼텍스(vortex) 하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 이소프로판올(isopropanol)과 상층액을 1:1 비율로 첨가하였다. 15초 세계 흔든 다음 실온에서 10분 동안 방치한 후, 12,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리시킨 후 상층액을 제거하고, 남은 침전물에 70 % 에탄올 1 mL을 가한 후, 7,500×g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하였다. 에탄올을 제거한 후 RNA 침전물이 담긴 튜브를 실온에서 5분 동안 건조시키고, 뉴클레아제 프리 워터(nuclease free water)를 사용하여 RNA 펠릿(pellet)을 용해시켰다. UV/VIS 분광분석기(Nanodrop, Thermo, 미국)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고 RT kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후 Real time PCR를 이용하여 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 간섬유화와 관련된 인자인 TGF- β , 콜라게나아제(collagenase) I 과 IV의 mRNA 발현 변화를 확인하였다. 본 발명에서 사용한 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다. cccDNA의 probe 서열은 5'-[FAM]-TCTCAATCGCCGTCGAGA-[TAMRA]-3' (서열번호 27)으로 수행하였다.

표 1

[0073]

	Forward	Reverse	reference	Genbank accession No.
m185	5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' (서열번호 1)	5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3' (서열번호 2)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2012	

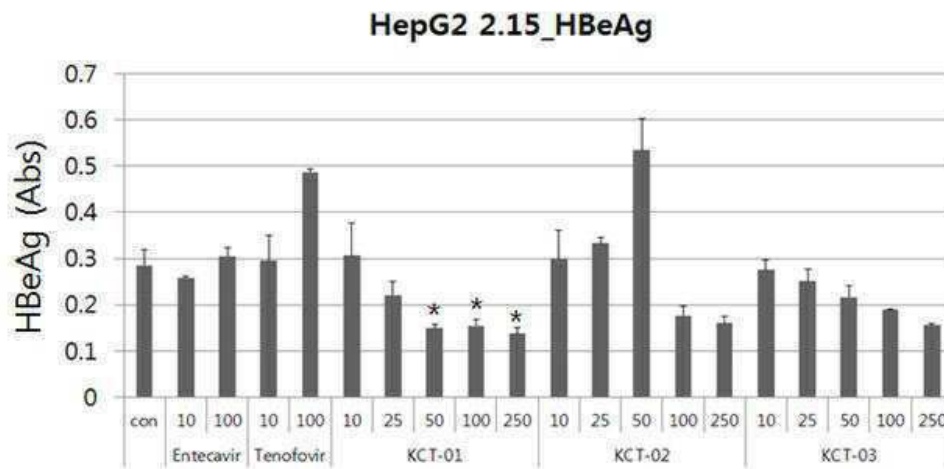
mF4/80	5'- CATAAGCTGGGCAAGTGGTA-3' (서열번호 3)	5'-GGATGTACAGATGGGGGATG-3' (서열번호 4)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
IL-1 β	5'- GGTCAAAGGTTTGAAGCAG-3' (서열번호 5)	5'-TGTGAAATGCCACCTTTTGA-3' (서열번호 6)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mTGF- β 1	5'- GTGGAAATCAACGGGATCAG-3' (서열번호 7)	5'-ACTTCCAACCCAGGTCCTTC-3' (서열번호 8)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mTNF- α	5'- AGGGTCTGGGCCATAGAAGT-3' (서열번호 9)	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' (서열번호 10)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mCCR2	5'- AGCACATGTGGTGAATCCAA-3' (서열번호 11)	5'-TGCCATCATAAAGGAGCCA-3' (서열번호 12)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mMCP-1	5'- ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3' (서열번호 13)	5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3' (서열번호 14)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mCD68	5'- ACCGCCATGTAGTCCAGGTA-3' (서열번호 15)	5'-ATCCCCACCTGTCTCTCTCA-3' (서열번호 16)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mIL-6	5'-GACAACCTTTGGCATTGTGG- 3' (서열번호 17)	5'-ATGCAGGGATGATGTTCTG-3' (서열번호 18)	Immunol Invest.2004 May;22(2):213-233	NM-031168
mCollagen α 1(I)	5'- TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3' (서열번호 19)	5'-ACATGTTACAGCTTGTGGACC-3' (서열번호 20)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
mCollagen α 1(IV)	5'- CACATTTTCCACAGCCAGAG-3' (서열번호 21)	5'-GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT- 3'(서열번호 22)	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310G1321,2 012	
pgRNA	5'-GGTCCCCTAGAAGAAGAACT CCCT-3' (서열번호 23)	5'- CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT-3' (서열번호 24)		
cccDNA	5'-GGTCCCCTAGAAGAAGAACT CCCT-3' (서열번호 25)	5'-CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT -3' (서열번호 26)		

[0075]

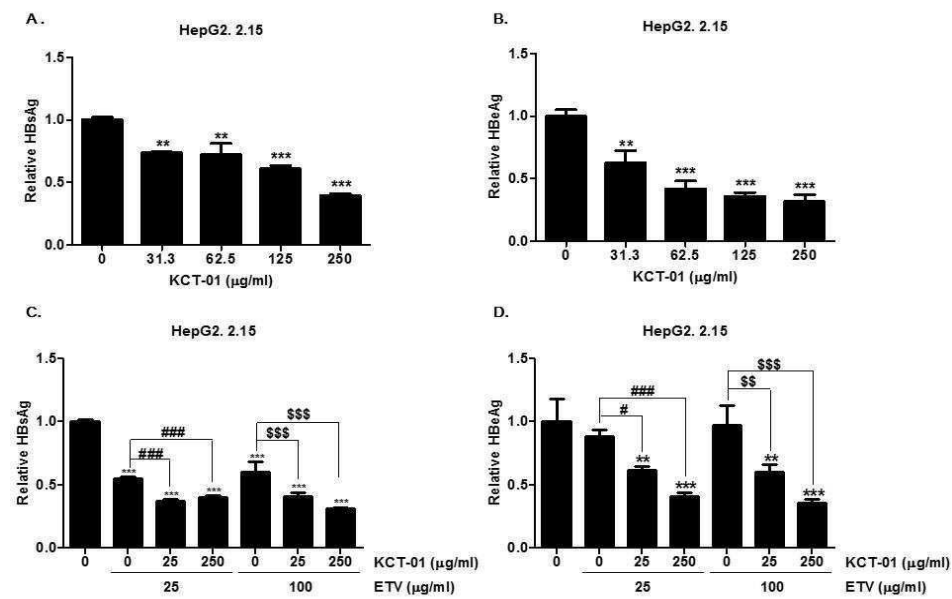
그 결과, 대조군과 비교하였을 때 B형 간염 항바이러스제인 엔테카비어를 처리하였을 때 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 간섬유화와 관련된 인자인 TGF- β 및 콜라게나아제(collagenase) I 과 IV가 억제되었음을 알 수 있었으며, 엔테카비어와 인진, 지유, 울금 복합 한방 추출물을 병용 투여한 군에서는 엔테카비어를 단독으로 처리한 군에 비하여 더욱 더 효과적으로 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 간섬유화와 관련된 인자인 TGF- β , 콜라게나아제(collagenase) I 과 IV가 억제됨을 확인할 수 있었다(도 6 및 7 참조).

도면

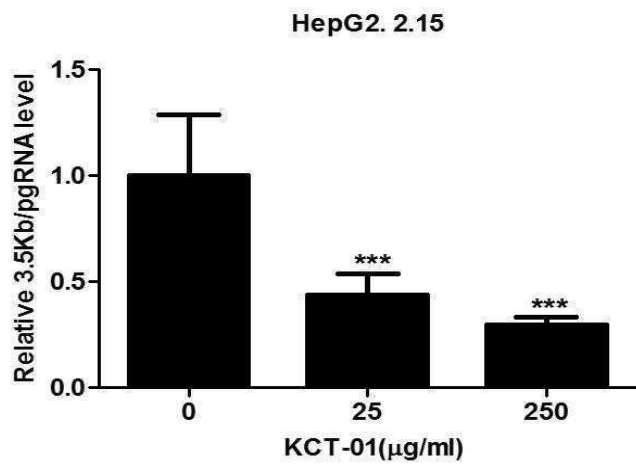
도면1



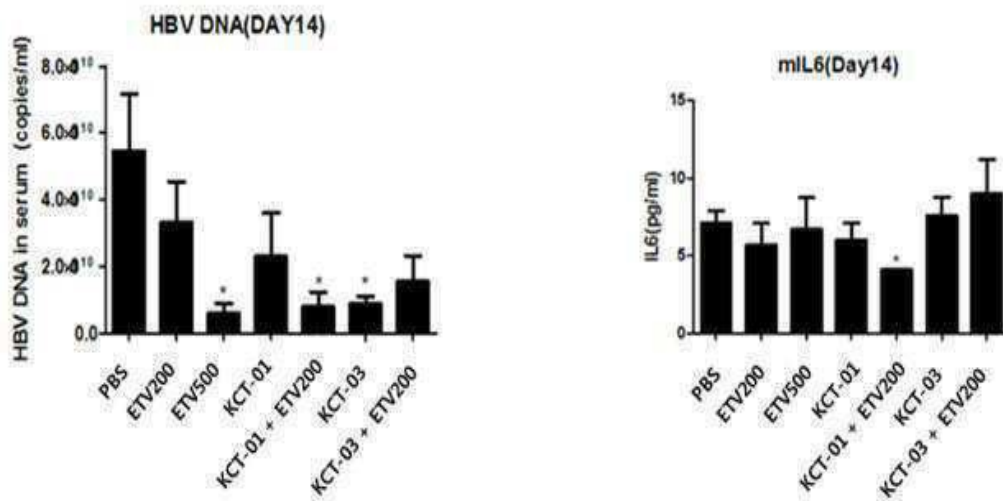
도면2



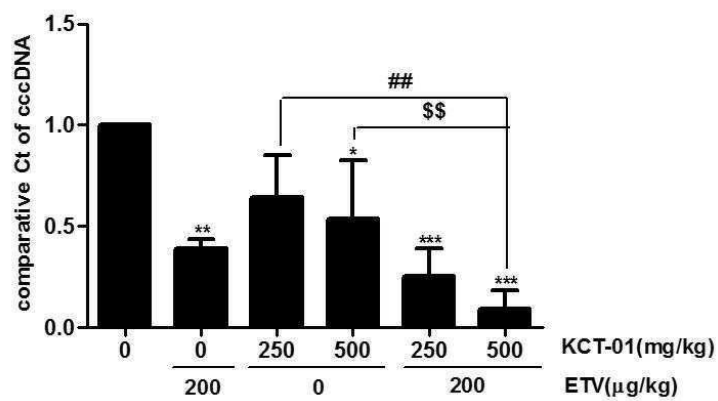
도면3



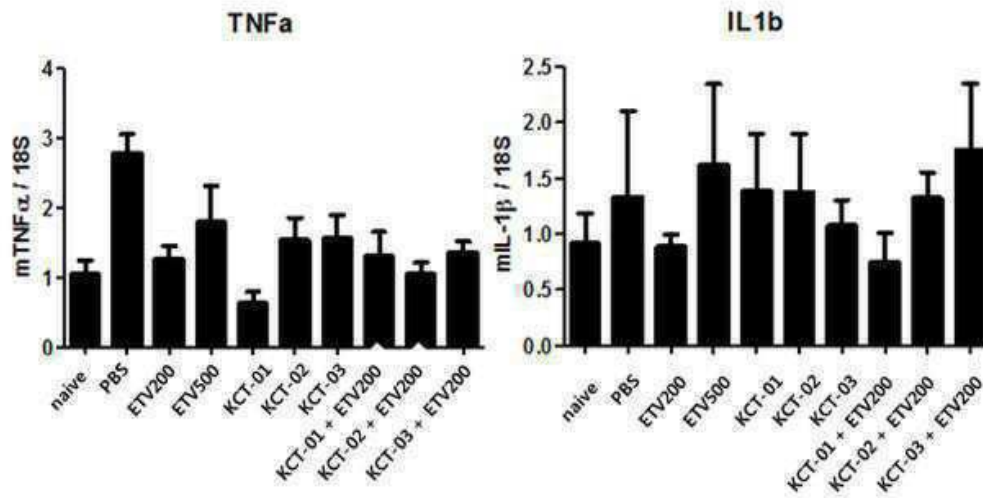
도면4



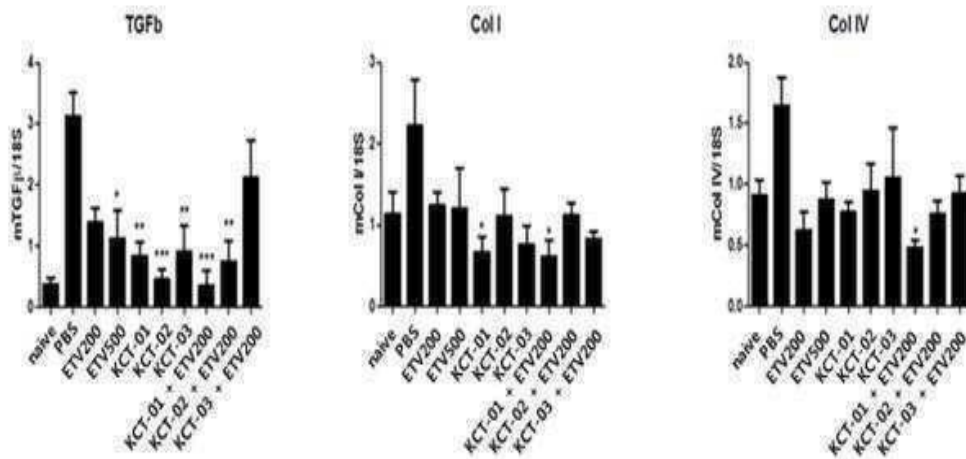
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Kyung Hee University
- <120> Composition for treatment or prevention of liver disease
comprising extract of *Artemisia capillaris*, *Sanguisorba officinalis* L. and *Curcuma longa* L. and antiviral agent
- <130> PN1704-152
- <150> KR 2016-0048705
- <151> 2016-04-21
- <160> 27
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	m185 forward	
<400>	1	
	agtcctgcc cttgtacac a	21
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	m185 reverse	
<400>	2	
	cgatccgagg gcctcacta	19
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mF4/80 forward	
<400>	3	
	cataagctgg gcaagtggta	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mF4/80 reverse	
<400>	4	
	ggatgtacag atgggggatg	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-1beta forward	
<400>	5	
	ggtcaaaggt ttggaagcag	20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1beta reverse
 <400> 6
 tgtgaaatgc caccttttga 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTGF-beta1 forward
 <400> 7

 gtggaaatca acgggatcag 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTGF-beta1 reverse
 <400> 8
 acttccaacc caggtccttc 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTNF-alpha forward
 <400> 9
 aggtctctggg ccatagaact 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTNF-alpha reverse

<400>	10	
ccaccacgct cttctgtcta c		21
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mCCR2 forward	
<400>	11	
agcacatgtg gtgaatcaa		20
<210>	12	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mCCR2 reverse	
<400>	12	
tgccatcata aaggagcca		19
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mMCP-1 forward	
<400>	13	
attgggatca tcttgctggt		20
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mMCP-1 reverse	
<400>	14	
cctgctgttc acagttgcc		19
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> mCD68 forward

<400> 15

accgcatgt agtccaggta

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCD68 reverse

<400> 16

atccccacct gtctctctca

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIL-6 forward

<400> 17

gacaactttg gcattgtgg

19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIL-6 reverse

<400> 18

atgcagggat gatgttctg

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mCollagen alpha1(I) forward

<400> 19

taggccattg tgtatgcagc

20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mCollagen alpha1(I) reverse
 <400> 20
 acatgttcag ctttgtggac c 21

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mCollagen alpha1(IV) forward
 <400> 21
 cacattttcc acagccagag 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mCollagen alpha1(IV) reverse
 <400> 22
 gtctggcttc tgctgctctt 20

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pgRNA forward
 <400> 23
 ggtcccctag aagaagaact ccct 24

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pgRNA reverse
 <400> 24
 cattgagatt cccgagattg agat 24

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cccDNA forward
 <400> 25
 ggtccctag aagaagaact ccct 24
 <210> 26
 <211> 24

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cccDNA reverse
 <400> 26
 cattgagatt cccgagattg agat 24
 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cccDNA probe
 <400> 27
 tctcaatcgc cgcgtcgag a 21