



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월07일  
(11) 등록번호 10-2763563  
(24) 등록일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/8888 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)  
A61K 36/076 (2006.01) A61K 36/535 (2006.01)  
A61K 36/54 (2006.01) A61K 36/9068 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 36/8888 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0159983

(22) 출원일자 2021년11월19일

심사청구일자 2021년11월19일

(65) 공개번호 10-2023-0073516

(43) 공개일자 2023년05월26일

(56) 선행기술조사문헌

CN107233540 A\*

정채영. 염증성 동물 모델에서 반하 추출물의 억제 효과. 경희대학교 의학과 박사학위논문. 2011년.\*

Mohammad Asif 외. Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: Perilla frutescens is a good example of plant oils. Orient Pharm Exp Med. 2011, Vol. 11, pp. 51-59\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국한의약진흥원

경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동, 한약진흥재단)

(72) 발명자

김정욱

대구광역시 달서구 월서로 51, 102동 905호(진천동, 월배역 포스코 더샵 아파트)

김세진

경상북도 경산시 강변서로 17, 301동 606호(옥곡동, 두리마을부영사랑으로)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 5 항

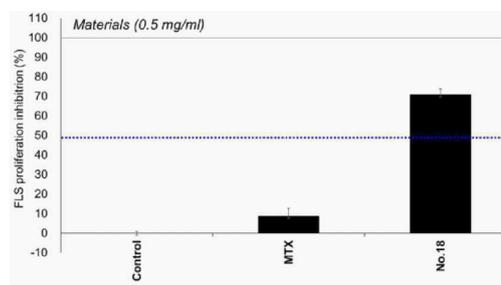
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명에 따른 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강을 포함하여 구성된 복합 추출물은 활막세포주의 증식 및 이동 억제, 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL2 및 CXCL2의 발현 또는 생성 억제 활성을 모두 가지고 있으며, 천연생약재 유래의 복합 추출물로서 부작용이 없기에 류마티스 관절염을 효과적으로 예방, 개선 및 치료하기 위한 의약품 및 건강기능식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

*A61K 36/076* (2013.01)

*A61K 36/535* (2013.01)

*A61K 36/54* (2013.01)

*A61K 36/9068* (2013.01)

*A61P 19/02* (2018.01)

*A61P 29/00* (2023.02)

*A23V 2002/00* (2023.08)

*A23V 2200/306* (2013.01)

*A61K 2300/00* (2023.05)

(72) 발명자

**남원희**

대구광역시 동구 신암로20길 39, 107동 906호(신암동, 신암 청아람)

**권현숙**

경상남도 진주시 북장대로 102(상봉동)

**임현희**

대구광역시 동구 안심로22길 76, 906동 704호(율하동, 율하 휴먼시아9단지)

**전영희**

경상북도 경산시 압량읍 부적길 3, 형제전기

**손수미**

경상북도 경산시 백천동로 5, 105동 1401호(백천동, 부영 초록마을)

**라채숙**

경상북도 경산시 경청로222길 34, 105동 405호(백천동, 경산 삼도 뷰엔빌w)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

활막세포의 증식에 대해 0.5 내지 0.6mg/ml 농도의 IC<sub>50</sub>값을 가지는, 반하(*Pinellia ternata*), 복령(*Wolfiporia extensa*), 후박(*Magnolia Officinalis*), 자소엽(*Perilla frutescens var. acuta*) 및 생강(*Zingiber officinale*)의 복합 물 추출물을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 복합 물 추출물은 활막세포의 이동에 대해 0.1 내지 0.4 mg/ml 농도의 IC<sub>50</sub>값을 가지는 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 복합 물 추출물은 건조시킨 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합물에 상기 복합물 중량 대비 10~12배의 정제수를 첨가하고 100~120℃의 온도에서 2~4시간 동안 가열하여 수득한 추출물을 여과한 후, 50~60℃에서 감압 농축하여 수득한 것임을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 복합 물 추출물은,

활막세포주의 증식 및 이동 억제;

염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1β, TNF-α, CCL2 및 CXCL2의 발현 또는 생성 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

활막세포의 증식에 대해 0.5 내지 0.6mg/ml 농도의 IC<sub>50</sub>값을 가지는, 반하(*Pinellia ternata*), 복령(*Wolfiporia extensa*), 후박(*Magnolia Officinalis*), 자소엽(*Perilla frutescens var. acuta*) 및 생강(*Zingiber officinale*)의 복합 물 추출물을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001] 본 발명은 반하(*Pinellia ternata*), 복령(*Wolfiporia extensa*), 후박(*Magnolia Officinalis*), 자소엽(*Perilla frutescens var. acuta*) 및 생강(*Zingiber officinale*)의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis; RA)은 유전자 요인, 환경적 요인, 면역학적인 요인 등이 서로 연관되어 다양한 임상 양상을 일으키는 자가면역질환이다. 특히 한 가지가 아닌 여러 유전자가 관여하는 복잡한 유전자 질환이라 할 수 있다.

[0003] 류마티스 관절염은 관절을 침범하는 만성 전신성 염증성 질환으로 병리학적으로 활막(synovium)의 비후 및 염증

세포 침윤과 이로 인한 관절의 파괴를 특징으로 한다. 초기에는 면역반응에 의해 T 세포가 활성화되고 이로 인해 염증반응이 시작되는 것으로 알려졌지만 질환이 진행되어 말기로 갈수록 T 세포의 영향력은 감소하고 활막세포(synovocyte)의 비정상적 증식 및 활성화로 인해 나타나는 연골파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화로 인해 관절 파괴가 지속적으로 나타나게 된다. 활막에 존재하는 세포는 림프구를 비롯하여, 대식세포, 단핵구, 섬유모세포, 중성구, NK세포, 비만세포 등 매우 다양하다. 류마티스 관절염의 발생은 이런 다양한 세포와 염증 유발 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17 등)의 상호 작용에 의해 복잡하게 일어나고 이것이 류마티스 관절염의 다양한 증상과 관련이 있다고 알려져 있다.

[0004] 류마티스 관절염의 증상은 손가락, 발가락, 손목 등 말초 관절의 활막에 염증 및 면역세포의 침윤, 신생혈관의 생성 등 활막염(synovitis)이 발생하고, 관절 연골의 파괴 및 뼈 손상이 진행되어 관절의 기능 손상과 변형이 나타난다. 관절 증상 외에도 장기 침범(폐, 신장, 심장), 골다공증, 혈관염 등을 동반하기도 하며 전형적으로 여러 관절에 통증, 강직, 종창 등의 증상이 수 주에 걸쳐 서서히 나타난다. 약 2/3의 환자에서는 피로감, 식욕 부진, 전신 쇠약감, 모호한 근골격계 증상이 선행하며 이어 활막염이 발생한다.

[0005] 한편, 류마티스 관절염의 치료제로는 항염증 스테로이드제(예컨대 프레드니솔론)나 비스테로이드계 항염증제(예컨대 인도메타신, 아스피린), 면역 억제제 [예컨대 사이클로스포린 A, 타크롤리무스(FK506), 메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 아자티오프린], 질환 수식성 항류마티즘제(예컨대 금 염 제제)가 사용되고 있다.

[0006] 그러나 항염증제는 염증을 조절하고, 증상을 일부 완화시킬 수 있지만, 진행자체를 저지하는 것은 어려우며, 비스테로이드계 항염증제도 관절부위 연골 손실이나 질병의 진행을 막을 수 없을 뿐만 아니라, 장기간 사용 시 위 십이지장 궤양 등의 소화기 부작용이 문제가 될 수 있다. 스테로이드 호르몬제도 염증을 조절해 주는 약제이나 얼굴이 둥그렇게 되고, 체중이 늘며, 당뇨병, 고혈압 등이 발병될 수 있는 부작용이 있다.

[0007] 따라서 현재까지 개발된 류마티스 관절염의 약물치료는 대부분 통증을 감소시키는 목적으로만 사용되고 있을 뿐 근본적인 치료효과를 주는 약물이나 수술법은 현재까지 없는 실정이다. 그러므로 부작용을 유발하지 않으면서 예방 및 치료 효과가 우수한 새로운 류마티스 관절염의 치료제 개발이 필요하다.

[0008] 이에 본 발명자들은 천연 생약재들을 이용하여 부작용 없이 효과적으로 류마티스 관절염을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 새로운 치료제를 개발하기 위해 연구한 결과, 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 생약재들을 이용한 복합 추출물이 류마티스 관절염을 효과적으로 개선 및 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-1271054

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010] 본 발명의 목적은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0012] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합 추출물은 정제수를 이용하여 수득한 물 추출물일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합 추출물은 건조시킨 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합물에 상기 복합물 중량 대비 10~12배의 정제수를 첨가하고 100~120℃의 온도에서 2~4시간 동안 가열하여 수득한 추출물

을 여과한 후, 50~60℃에서 감압 농축하여 수득한 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합 추출물은, 활막세포주의 증식 및 이동억제; 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1β, TNF-α, CCL2 및 CXCL2의 발현 또는 생성 억제 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0017] 본 발명에 따른 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강을 포함하여 구성된 복합 추출물은 활막세포주의 증식 및 이동억제, 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1β, TNF-α, CCL2 및 CXCL2의 발현 또는 생성 억제 활성을 모두 가지고 있으며, 천연 생약재 유래의 복합 추출물로서 체내 부작용이 없으므로 류마티스 관절염을 효과적으로 예방, 개선 및 치료하기 위한 의약품 및 건강기능식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0018] 도 1은 류마티스 관절염 환자에서 분리된 활막세포주(FLS)에 본 발명의 복합 추출물 및 류마티스 관절염 치료제인 메토틀렉세이트(Methotrexate: MTX)를 각각 처리시 증식 억제효과 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 메토틀렉세이트(Methotrexate: MTX) 및 본 발명의 복합 추출물에 대한 각 농도별 처리시 세포 밀집도 및 형광 강도 분석을 통해 세포 증식억제 활성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 메토틀렉세이트(Methotrexate: MTX) 및 본 발명의 복합 추출물에 대한 각 농도별 처리시 세포 밀집도를 측정하여 활막세포의 이동억제를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 복합 추출물 처리시 염증매개 인자들인 IL-6, IL-1β, CCL2 유전자의 RNA 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 복합 추출물 처리시 염증매개 인자인 IL-6의 ELISA 결과를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0020] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 특징이 있다.

[0022] 반하후박탕은 한의학에서 소화관에 정체된 수분 및 체액의 병리적 산물인 담이 역류되어 인후, 식도부위에 정체되어 있는 것을 제거하고 신진대사를 잘되게 하는 대표적인 처방으로, 반하(半夏), 복령(茯苓), 후박(厚朴), 자소엽(紫蘇葉) 및 생강(生薑)의 총 5종의 천연물로 구성된 복합처방이며, 현재 반하후박탕 자체는 현재 연하 장애를 포함한 다양한 소화기 장애 개선 효과와 함께 정신장애 개선 효과가 비교적 잘 알려져 있다.

[0023] 그러나 아직까지 반하후박탕이 류마티스 관절염의 치료 효과가 있다는 연구는 보고된 바가 없다.

[0024] 이에 본 발명자들은 반하후박탕의 구성 약재인 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물이 류마티스 관절염에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과가 있음을 in vitro에서 세포주를 이용한 실험을 통해 확인하였다.

[0025] 상기 반하는 천남성목 천남성과의 여러해살이풀이며, 밭에서 자라고, 높이는 30cm 정도이다. 알뿌리에 독성이 있으나 에페드린과 콜린 등의 유효성분이 있어 거담, 이뇨, 두통 등에 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 또한

기침을 멈추게 하는 진해작용과 위장기능 조절 및 이담작용이 있으며 구가의 성약으로 알려질 만큼 구토를 멈추게 하는 작용으로 유명하다.

- [0026] 상기 복령은 담자균류 민주름버섯목 구멍장이버섯과의 버섯으로서, 땅속에서 소나무 등의 나무뿌리에 기생한다. 균핵(菌核) 크기는 10~30cm이며 둥근 모양 또는 길쭉하거나 덩어리 모양이다. 표면은 적갈색, 담갈색 또는 흑갈색이고 꺼칠꺼칠한 편이며, 때로는 근피(根皮)가 터져 있는 것도 있다. 살은 백색이고 점차 담홍색으로 변한다. 백색인 것을 백복령(白茯苓), 적색인 것을 적복령(赤茯苓)이라 한다. 또 복령 속에 소나무 뿌리가 꿰뚫고 있는 것을 복신(茯神)이라고 한다. 모두 한약재로 강장, 이뇨, 진정 등에 효능이 있어 신장병, 방광염, 요도염에 이용한다.
- [0027] 상기 후박은 한국과 일본, 그리고 중국에서 오랜 기간 건위제로 사용되어 왔으며, 후박 잎은 한국과 일본에서 식용으로도 사용되어져 왔으며 후박나무에는 알파, 베타-유데스몰( $\alpha, \beta$ -eudesmol), 마그놀올(magnolol), 호노키올(honokiol), 오보바톨(obovatol) 등이 포함되어져 있는 것으로 알려져 있다. 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 상록교목으로서 한방에서는 나무껍질을 후박피(厚朴皮)라고 하며 천식과 위장병에 쓴다.
- [0028] 상기 자소엽은 순형과(꿀풀과)의 일년초인 차조기의 잎을 말한다. 줄기는 사각형이고 곧게 서며 높이는 20-80cm이다. 잎은 광란형으로 들깨와 비슷하지만 자색을 띠고 강한 향기가 있으며, 가장자리에 톱니가 있다. 한방에서 잎을 자소엽이라 하여 뿌리를 비롯한 전초를 빈혈, 발한, 해열, 진통, 기관지염, 해수, 천식, 거담, 위장염, 소화촉진, 현기증과 신체의 통증, 코막힘 및 콧물, 물고기에 의한 중독 때 해독제로 사용한다.
- [0029] 상기 생강은 새양 또는 새양이라고도 불리며, 뿌리줄기는 옆으로 자라고 다육질이며 덩어리 모양이고 황색이며 매운 맛과 향긋한 냄새가 있고, 뿌리줄기의 각 마디에서 잎집으로 만들어진 가짜 줄기가 곧게 서고 높이가 30~50cm에 달하며 윗부분에 잎이 2줄로 배열되며, 잎은 어긋나고 줄 모양의 바소꼴이며 양끝이 좁고 밑 부분이 긴 잎집이 된다. 한국에서는 꽃이 피지 않으나 열대 지방에서는 8월에 잎집에 싸인 길이 20~25cm의 꽃줄기가 나오고 그 끝에 꽃이삭이 달리며 꽃이 핀다. 꽃은 포 사이에서 나오고 길이가 4~7.6cm이며, 받침은 짧은 통 모양이고 화관의 끝 부분은 3개로 갈라지며 갈라진 조각은 끝이 뾰족하다. 우리나라에서는 고려시대 문헌인 《향약구급방》에 약용 식물로 기록돼 있으며, 뿌리줄기는 말려 갈아서 빵 과자 카레 소스 피클 등에 향신료로 사용하고, 껍질을 벗기고 끓인 후 시럽에 넣어 절이기도 하며 생강차와 생강주 등을 만들기도 한다. 한방에서는 뿌리줄기 말린 것을 건강(乾薑)이라는 약재로 쓰는데, 소화불량 구토 설사에 효과가 있고, 혈액 순환을 촉진하며, 항염증과 진통 효과가 있다.
- [0030] 본 발명은 상기 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강을 함께 혼합하고 추출한 복합 추출물에 대한 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0031] 한편, 약리활성을 갖는 생약재들은 무수히 많이 있으나, 복합 생약재들을 사용할 경우, 목적하는 약리활성의 확인은 반드시 실험을 통해서만 확인할 수 있다. 이는 단일 식물 또는 단일 약용작물의 추출물에도 수많은 성분이 포함되어 있으며, 아직까지 규명되지 않은 성분이 많이 있는데, 서로 다른 생약재를 혼합할 경우, 복합물 내에 존재하는 서로 다른 식물 유래의 유용성분들이 예기치 못한 화학적 반응 등에 의해 오히려 약리활성이 저해되는 결과가 발생할 수 있고, 체내 유해한 부작용이 발생할 수도 있다.
- [0032] 이러한 점에서 본 발명자들은 다양한 생약재들의 조합에 따른 약리활성을 스크리닝한 결과, 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물이 다른 한약재들로 구성된 복합 추출물에 비해 세포 독성은 유발하지 않으면서 류마티스 관절염에 대한 치료 활성이 가장 우수함을 확인하였고, 따라서 새로운 류마티스 관절염 치료제로서 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 생약재를 선택하였다.
- [0033] 또한, 본 발명에서는 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강을 이용한 복합 추출물이 활막세포의 증식억제 및 이동억제 활성을 통해 류마티스 관절염을 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.
- [0034] 류마티스 관절염은 활막세포의 염증과 증식을 특징으로 하는데, 활막세포는 류마티스 관절염을 앓는 환자에서 암 세포와 같이 비정상적으로 증식하는 특징이 있고, 비정상적으로 증식된 활막세포는 주변 연골과 뼈를 파괴하여 류마티스 관절염을 더욱 악화시킨다. 또한, 염증성 사이토카인(cytokine)과 케모카인(chemokine)은 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )와 IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta)와 관련되어 있으며, 이런 염증성 사이토카인에 대한 반응으로 활막세포는 급증하게 되면서 판누스(Pannus)라는 조직들을 형성하게 되고 이는 연골과 관절뼈를 파괴시킨다.
- [0035] 따라서 본 발명의 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물은 활막세포의 증식 및 이동억제 활성이 있

고, 염증 매개인자들의 발현 및 생성을 억제하여 류마티스 관절염을 효과적으로 치료할 수 있다.

- [0036] 본 발명의 다른 일실시예에서는, 활막세포에 본 발명의 복합 추출물을 처리한 후, 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL2 및 CXCL2의 발현수준을 측정하였는데, LPS로 염증이 유도된 활막세포에서 본 발명의 복합 추출물 처리에 의해 상기 염증성 사이토카인들의 발현수준이 모두가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0037] 또한, 본 발명의 복합 추출물이 갖는 이러한 치료 효과는 류마티스 관절염 치료제로 사용되는 메토틀렉세이트 (Methotrexate: MTX)와 거의 유사한 수준인 것으로 나타났다.
- [0038] 따라서 본 발명자들은 다양한 실험을 통해 본 발명에서 제공하는 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 새로운 류마티스 관절염 치료제로 사용 가능함을 알 수 있었다.
- [0039] 상기 복합 추출물을 제조하는 공정은 당업계에서 공지된 천연물로부터 추출물을 수득하는 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있는데, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 물, 탄수소 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 정제수를 사용할 수 있다.
- [0040] 또한, 용매를 이용하여 추출물을 추출하는 방법은 열수추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 통하여 추출할 수 있지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 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 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 바람직하게는 건조시킨 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합물에 상기 복합물 중량 대비 10~12배의 정제수를 첨가하고 100~120 $^{\circ}$ C의 온도에서 2~4시간 동안 가열하여 수득한 추출물을 여과한 후, 50~60 $^{\circ}$ C에서 감압 농축하여 수득한 것을 본원발명의 복합 추출물로 사용하였다.
- [0043] 한편, 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 본 발명의 유효성분 이외에도 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.
- [0044] 상기 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0045] 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, 유효성분은 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 천연 당, 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 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 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.
- [0046] 본 발명의 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 30중량%로 포함될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 유효성분은 하나 이상의 치료제와 조합하여 치료 유효량으로 투여될 수 있다(제약 조합물). 예를 들어, 본 발명의 유효성분을 화학요법제와 조합하여 사용하는 경우 상승작용 효과가 발생할 수 있다. 본 발명의 유효성분을 다른 요법과 함께 투여하는 경우, 공동-투여된 화합물의 투여량은 물론 사용된 공동-약물의 유형, 사용된 구체적인 약물, 치료할 병태 등에 따라 달라질 것이다.

- [0048] 또한, 본 발명은 포유동물에게 상기 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다.
- [0049] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0050] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 유효성분을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.001mg/kg~1000mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으나, 특별히 그 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0051] 나아가 본 발명에 따른 복합 추출물은 한방에서 처방되고 있는 천연 생약제들로 구성된 것으로 체내 부작용 및 독성을 유발시키지 않아 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있으므로, 본 발명에 따른 상기 복합 추출물은 류마티스 관절염의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물로도 사용될 수 있다.
- [0052] 그러므로 본 발명은 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 식품 조성물은 류마티스 관절염의 예방 및 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.
- [0054] 본원에서 상기 "식품"이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0055] 본원발명에 따른 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 "기능성 식품"이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강기능식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0057] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 식품 조성물을 함유하는 식품은 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 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0058] 본원발명의 식품 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 유효성분의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 이하, 본 발명의 구성요소와 기술적 특징을 다음의 실시예들을 통하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나

하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0062] <실시예 1>

[0063] 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강 복합 추출물 제조

[0064] 시중에서 구입한 생약재인 반하 2.00 g, 복령 1.67 g, 후박 1.00 g, 자소엽 0.67 g 및 생강 1.33 g을 섞은 후, 5가지 생약재의 복합물 중량대비 10배의 정제수를 첨가하고 100℃에서 3 시간 추출하여 복합 추출액을 수득하였고, 이를 여과시켜 여액을 수득한 다음, 60℃ 이하에서 감압농축 후, 진공 또는 동결 건조하여 본 발명에 따른 반하(*Pinellia ternata*), 복령(*Wolfiporia extensa*), 후박(*Magnolia Officinalis*), 자소엽(*Perilla frutescens var. acuta*) 및 생강(*Zingiber officinale*)의 복합 건조엑스(복합 추출물)를 제조하였다.

[0066] <실시예 2>

[0067] 세포실험을 통한 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강 복합 복합 추출물에 대한 류마티스 관절염 개선 및 치료효과 분석

[0068] 본 발명자들은 상기 <실시예 1>에서 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강 생약재의 복합물로부터 수득한 복합 추출물에 대한 류마티스 관절염 개선 및 치료효과를 확인하기 위해, 류마티스 관절염 환자(1987 미국 류마티스 학회 분류기준을 만족하는 환자)로부터 분리된 활막세포주(Fibroblast like synovium, 이하 FLS)를 대상으로, 본 발명의 복합 추출물 처리에 따른 활막세포의 증식 및 이동에 미치는 영향과 염증 매개인자들의 발현에 미치는 영향을 다음과 같은 실험들을 통해 확인하였다.

[0070] 2-1. 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강 복합 복합 추출물에 대한 활막세포 증식 억제 활성 분석

[0071] 류마티스 관절염 환자로부터 분리된 활막세포주(Fibroblast like synovium, 이하 FLS)를 4~7회 계대배양하여 실험에 사용하였고, 이때 배양액으로는 10% 소태아혈청 및 2% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 사용하였으며, 세포 배양은 0.5% CO<sub>2</sub> 및 37℃의 온도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

[0072] 본 발명의 복합 추출물 처리에 따른 활막세포의 증식 변화 분석은 IncuCyte® S3 System(Essen bioscience)을 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 활막세포주(5 x 10<sup>3</sup>개/200 μl)에 본 발명의 복합 추출물(500 μg/ml)을 첨가하여 혼합한 후, 본 발명의 복합 추출물과 활막세포주의 복합물을 96-well 플레이트에 well당 200 μl씩 분주하였다. 이후 배양 시작과 동시에 3시간 마다 플레이트를 촬영하면서 세포 밀집도(confluence)를 관찰하였고, 배양 3일 후 세포 밀집도(confluence)를 분석하였다. 여기서 상기 본 발명의 복합 추출물은 100% DMEM 용액에 녹여 사용하였고, 음성대조군으로는 상기 세포 배양배지에 2% DMEM이 첨가된 용액 처리군을 사용하였으며, 양성 대조군으로는 류마티스 관절염 치료제로 사용되는 메토틱렉세이트(Methotrexate: MTX)를 처리한 군을 사용하였다.

[0073] 본 발명의 복합 추출물 처리에 따른 활막세포의 증식억제 분석은, 형광염색된 활막세포주를 사용하여 수행하였으며, 세포 증식은 세포 밀집도(confluence) 및 형광 강도(fluorescence intensity)를 통해 분석하였다.

[0074] 활막세포의 증식 정도(%)는, 음성 대조군(Control)에서 배양 72시간에 정상적으로 증식한 세포 밀집도를 100%로 하였을 때, 시험물질 처리군의 상대적 세포 밀집도를 계산한 값으로 나타내었다.

[0075] 또한, 활막세포의 증식 억제정도(%)는 음성 대조군(Control)의 72시간 후의 세포 밀집도를 세포증식 100%로 하고, 억제를 0%로 하였을 때, 시험물질 처리군의 상대적 억제(%)를 계산한 값으로 나타내었다.

[0077] \*그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 활막세포주에 대한 세포 밀집도 분석 결과, 음성 대조군은 72시간째에 세포 플레이트에 세포가 거의 100%에 가깝게 증식하여 높은 세포 밀집도를 보였고, 양성 대조군인 MTX를 처리한 군은 음성 대조군에 비해 세포 밀집도가 조금 감소하여 약 90%의 값을 보인 반면, 본 발명의 복합 추출물을 처리한 군은 음성 대조군 및 양성 대조군과 달리 세포 밀집도가 현저하게 감소한 것으로 나타났고 오히려 세포 증식이 억제된 것으로 나타났다. 이를 세포 증식 억제율로 다시 계산한 결과, 본 발명의 복합 추출물 처리군은 약 69.2%의 활막세포에 대한 억제 활성이 있는 것으로 나타났고, MTX 처리군은 약 10% 정도에 미치는 것으로 나타났다.

[0078] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 복합 추출물 및 MTX에 대한 각 농도별 구간을 설정하고, 활막세포주를 함께 배양하면서 3시간 마다 배양 플레이트를 촬영하면서 배양 72시간까지 세포 밀집도 및 형광 강도 분석을 수행하였고, 세포증식 억제에 대한 IC<sub>50</sub>값을 분석하였다. 세포증식 억제에 대한 IC<sub>50</sub>값은 분석 프로그램(Softmax pro

v5.4, Molecular Devices)을 이용하여 분석하였는데, IC<sub>50</sub>값은 음성 대조군에서의 세포 밀집도를 100%로 하였을 때, 세포 밀집도가 50%가 되는 시험물질의 처리 농도 값을 말한다.

[0079] 세포증식 억제에 대한 IC<sub>50</sub>값 분석 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, MTX 처리군은 3mg/ml의 농도로 처리해도 세포증식에는 큰 영향을 미치지 못한 반면, 본 발명의 복합 추출물은 0.56 ± 0.12 mg/ml의 농도에서 세포 밀집도가 50%로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물이 류마티스 관절염의 원인이 되는 활막세포의 비정상적인 증식 및 활성을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었고, 류마티스 관절염 치료제인 MTX에 비해 그 효과도 월등히 우수하다는 것을 알 수 있었다.

[0083] **2-2. 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물에 대한 활막세포 이동(migration) 억제 활성 분석**

[0084] 본 발명의 복합 추출물이 활막세포의 이동을 억제할 수 있는지 확인하기 위해, 형광 염색한 활막세포를 상처 치유 분석(wound healing assay) 전용 플레이트(Incucyte cell migration kit, essen bioscience)에서 confluent layer가 될 때까지 배양하였다. 이후 Wound maker(Incucyte cell migration kit, essen bioscience)를 이용하여 스크래치를 형성시켰고, 본 발명의 복합 추출물을 농도별로 처리한 후, 3시간 마다 배양 플레이트를 사진 촬영하면서 세포 밀집도를 분석하였다. 분석은 72시간 동안 수행하였고, 총 4회 반복 수행하였다.

[0085] 상기 세포 이동의 분석은 스크래치된 영역 내로 세포가 이동된 세포수의 측정으로 분석하였고, 음성 대조군에서의 정상적인 증식이 진행된 세포 밀집도를 100%로 하였을 때, 시험물질 처리군의 상대적인 세포 밀집도를 계산하였고, 세포이동 억제에 대한 IC<sub>50</sub>값을 분석하였다.

[0086] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, MTX를 처리한 군은 약 3 mg/ml 농도처리시 세포증식에는 큰 영향을 미치지 못하였으나 세포 이주 억제 효과(IC<sub>50</sub> = 0.04±0.02 mg/ml)는 뛰어난 반면, 본 발명의 복합 추출물은 MTX에 비해서는 억제효과가 낮았으나, 농도의존적인 이주억제효과(IC<sub>50</sub> = 0.22 ± 0.19 mg/ml)를 나타내었다.

[0088] **2-3. 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물에 대한 염증 매개 인자들의 발현억제 활성 분석**

[0089] 본 발명자들은 본 발명의 복합 추출물에 대한 염증 매개 인자들의 발현 억제 활성이 있는지를 분석하였다. 이를 위해 96-well 플레이트에 활막세포를 1x10<sup>5</sup> 세포/well로 분주하고, 밤새도록 배양하였다. 이후 24시간 동안 기아(starvation) 상태를 유지하였으며, 이후 본 발명의 복합 추출물(0.5 mg/mL)을 1시간 전처리한 다음, LPS(300 mg/mL) 및 PMA(Propidium Monoazide; 50 ng/mL)을 추가 처리한 다음, 4시간 배양 후 세포를 수집하고 세포 용해물을 수득하였다.

[0090] 그런 뒤, 세포용해물로부터 RNA를 추출 후, cDNA를 합성하여 IL-1β, IL-6, CCL-2 및 CXCL-2의 4가지 타겟 활성인자들의 발현정도를 ABI 7500(Applied Biosystems) 기기를 이용하여 상기 4가지 염증매개 인자들의 전사체(transcript) 수준을 측정하였다.

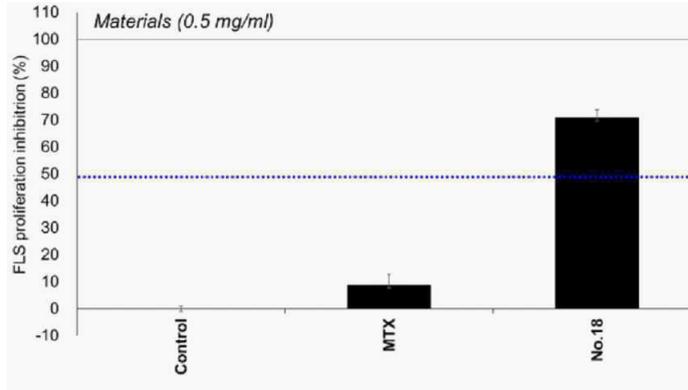
[0091] 또한, 염증성 사이토카인인 IL-6 단백질의 수준을 ELISA 키트를 이용하여 분석하였는데, 상기 활막세포 처리 과정에서 LPS(300 mg/mL) 및 PMA(50 ng/mL)을 추가 처리한 다음, 48시간 배양 후 세포배양액을 얻고, human IL-6 ELISA kit(cat. KAC1261) 및 iMark™ plate reader(Bio-Rad)를 이용하여 배양액에 함유된 IL-6 단백질의 함량을 측정하였다. 상기 실험에서 음성 대조군은 본 발명의 복합 추출물 대신 2% DMSO를 처리한 군을 사용하였다.

[0092] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, LPS 처리에 의해 현저하게 증가된 염증매개인자들인 IL-1β, IL-6, CCL-2 및 CXCL-2의 전사체의 수준이 본 발명의 복합 추출물 처리 시, IL-1β의 경우 시험물질의 처리로 거의 발현되지 않았고 IL-6의 경우 50% 이상 발현이 억제되었으며 CCL2의 경우 85% 이상 발현이 억제되는 것으로 나타났다. 또한, ELISA 분석에서도 IL-6의 생성이 90%이상 억제된 것으로 나타났다.

[0093] 이상, 활막세포주를 대상으로 시험관 내에서 반하, 복령, 후박, 자소엽 및 생강의 복합 추출물 처리에 따른 류마티스 관절염 억제 활성을 분석한 결과, 본 발명의 복합 추출물이 활막세포주의 증식을 억제하는 활성이 우수할 뿐만 아니라 염증매개 인자들의 전사체 수준 및 단백질 수준을 모두 효과적으로 억제할 수 있어, 류마티스 관절염을 예방, 개선 및 치료하는데 사용 가능함을 알 수 있었다.

도면

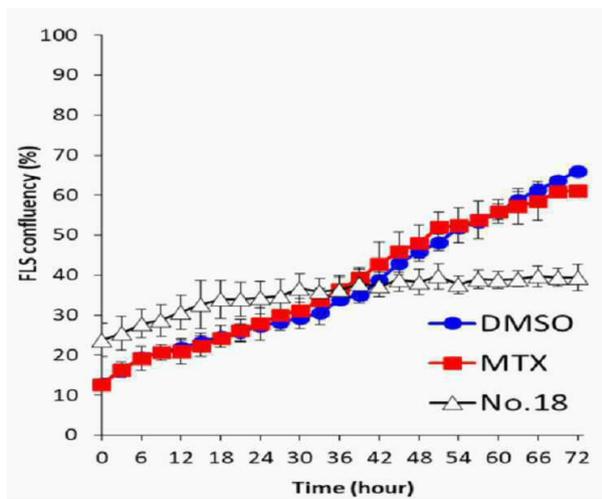
도면1a



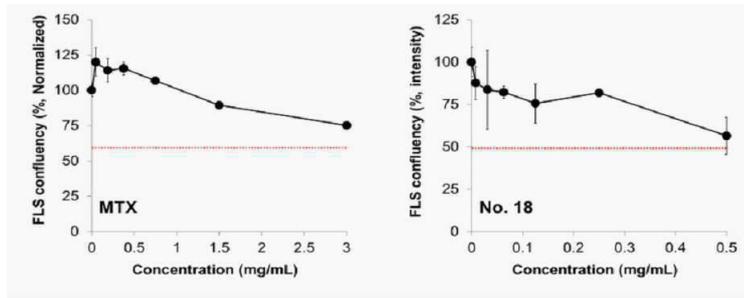
도면1b



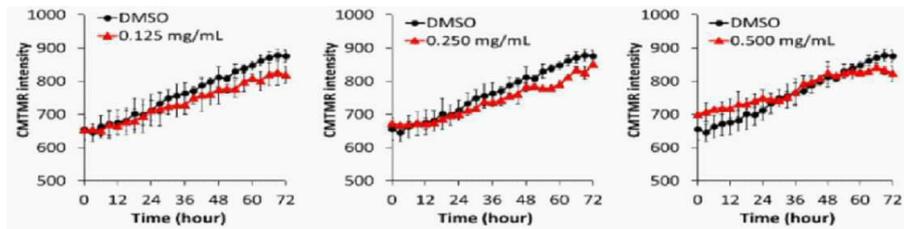
도면1c



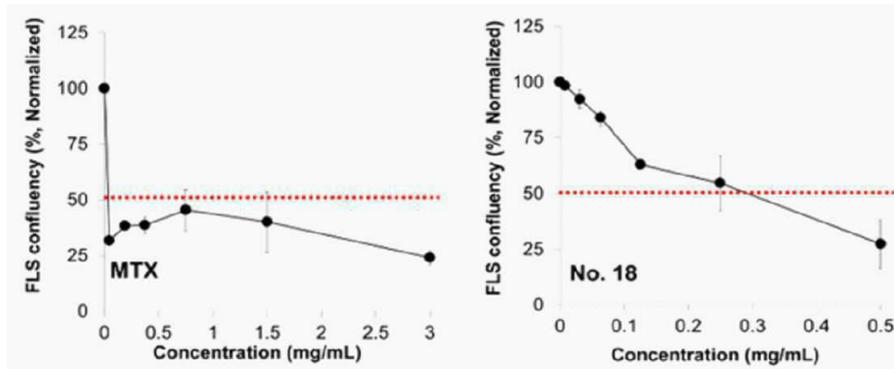
도면2a



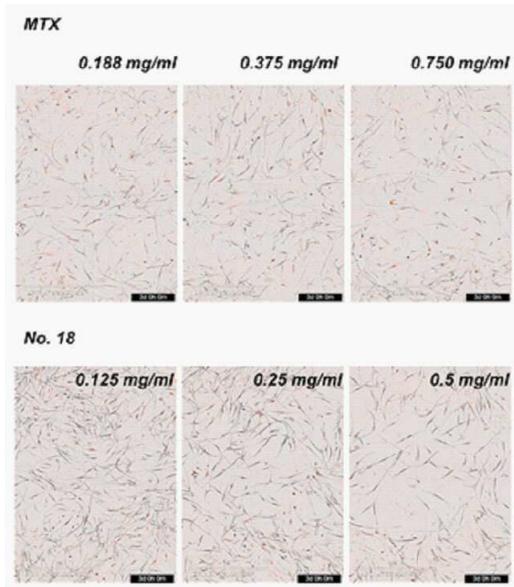
도면2b



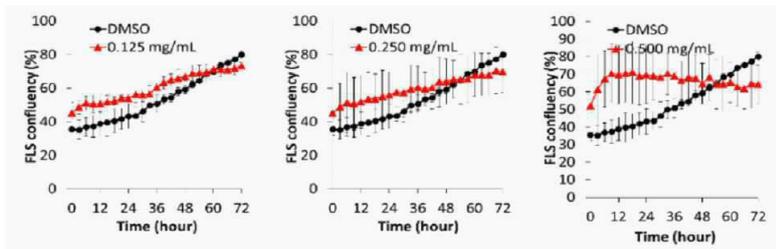
도면3a



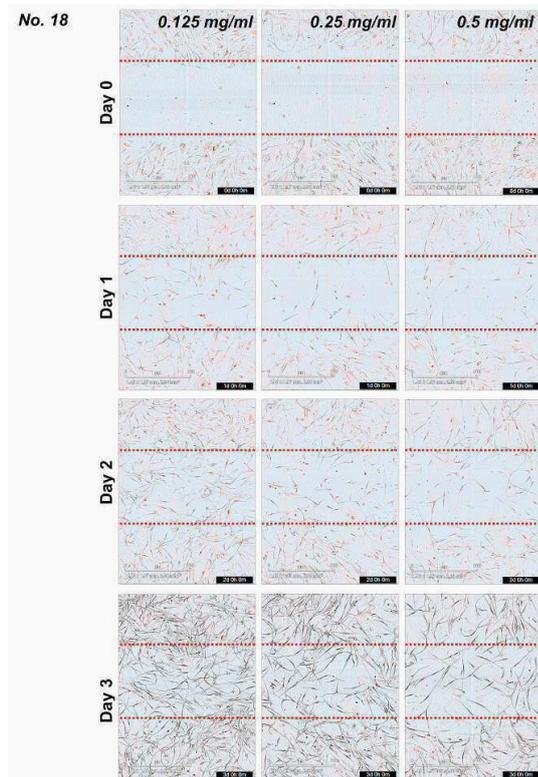
도면3b



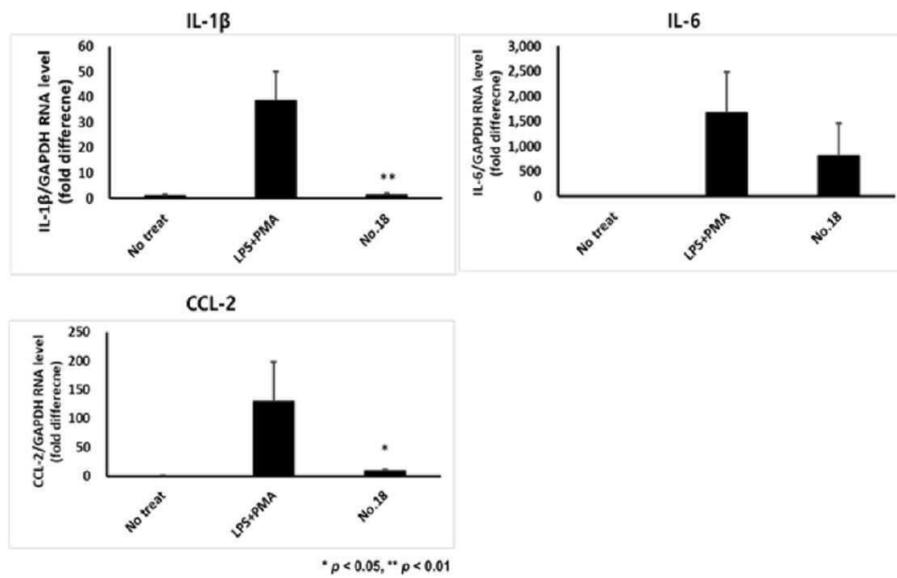
도면3c



도면3d



도면4



도면5

