



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월08일  
(11) 등록번호 10-1732365  
(24) 등록일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/28 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 36/28 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2015-0106316  
(22) 출원일자 2015년07월28일  
심사청구일자 2015년07월28일  
(65) 공개번호 10-2017-0013543  
(43) 공개일자 2017년02월07일  
(56) 선행기술조사문헌  
안대성. 토아산(瑣兒傘, *Syneilesis palmata*)의 생리활성에 관한 연구. 대한한의대학교 한방산업대학원 석사학위 논문(2009.02.)\*  
한국식품영양학회지. 2013. 제26권 제2호, pp.287-294.\*  
Plos One. 2009. Vol.4, Issue 8, e6503.  
약학회지. 2003. 제47권제2호, pp.69-77.  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
건국대학교 글로컬산학협력단  
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로컬캠퍼스)  
(72) 발명자  
이광호  
충청북도 충주시 남산2길 21 남산빌리지  
한지원  
경기도 군포시 고산로539번길 7-12, 941동 1302호(산본동, 롯데아파트)  
(74) 대리인  
위병갑

전체 청구항 수 : 총 8 항

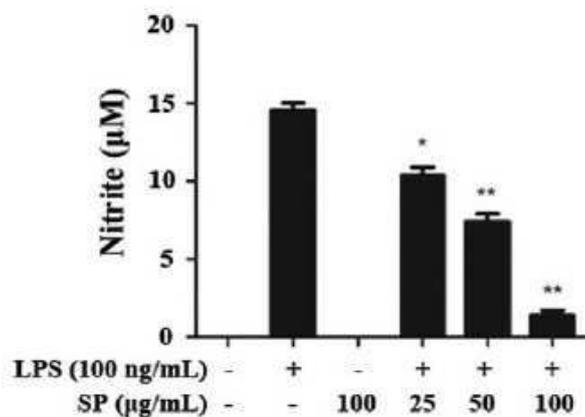
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 우산나물 추출물의 염증 질환 치료 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 염증 질환 개선용 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 우산나물 추출물은 염증 매개인자인 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 이러한 염증 매개인자들의 발현 억제 기작이 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )-의존성 신호 및 인플라마좀(inflammasomes) 활성 조절을 통해 이루어지는바, 이러한 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 염증성 질환 및 NLRP3 인플라마좀-매개된 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품 소재로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히 우산나물은 천연소재로서 식용 가능하므로 이로부터 유래한 추출물을 포함하는 본 발명의 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물은 장기간 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대표도



(52) CPC특허분류

A23V 2200/30 (2013.01)

A61K 2236/33 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014A4190015

부처명 교과부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 (3차) IL-1 $\beta$  생산억제를 통한 염증제어 소재 개발과 작용기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

공지예외적용 : 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 급성 패혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 추출물은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 물 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서,

상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서,

상기 우산나물 추출물은 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )-의존성 신호 및 인플라마좀(inflammasomes) 활성 조절을 통해 염증 매개인자인 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시키는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서,

상기 추출물은 조성물에 10 내지 100  $\mu$ g/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 급성 패혈증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 추출물은 메탄올 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 9**

제7항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 김류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 우산나물 추출물의 염증 질환 치료 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 염증 질환 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 염증반응은 병원체에 의한 감염이나 조직의 손상과 같은 다양한 요인에 의해 일어나는 생체방어반응으로, 감염 부위나 손상부위에만 피해를 국한시키기 위한 초기 보호 작용을 수행한다. 대부분의 경우, 이러한 염증반응은 내재면역의 구성 요소를 이용한 병원성 요인의 제거 및 특이적 적응면역의 유도 등으로 이어진다. 염증이 수반되는 특징으로 알려진 발적 (rubor), 부종 (tumor), 열 (calor), 통증 (dolor) 등은 염증부위에서의 염증 매개체와 사이토카인 등의 작용에 의한 혈관의 확장에 따른 국소혈류의 증가 및 국소혈류속도의 감소, 혈관의 투과성증가에 따른 혈장성분의 혈관 외 유출 증가, 혈관내피세포의 순환면역세포에 대한 부착성 증가에 따른 면역세포의 혈관 외 유출 증가 및 화학주성에 의한 감염부위로의 이동 증가와 같은 연속적인 면역반응들의 결과이다.

[0003] 일반적으로 급성염증반응은 빠르게 진행되고 짧은 기간 유지되며, 급성염증에는 급성기 반응이라는 전신성 반응이 동반된다. 한편 감염이나 자가면역질환과 같은 일부 질환과 관련하여 지속적인 면역활성화의 결과로 만성염증이 유발될 수 있으며, 대식세포(macrophages)의 축적과 활성화는 만성염증반응의 증거가 된다. 그러나 지속적인 만성염증반응의 경우, 숙주세포나 조직에 심각한 손상을 유발할 수 있다.

[0004] 감염부위에서의 염증반응은 병원체에 대한 대식세포의 반응에 의해 개시된다. 병원체에 의해 활성화된 대식세포가 생성하는 반응성 활성산소종 및 활성질소종(예를 들어 NO), 프로스타글란딘, 루코트리엔 등과 같은 염증매개체, 그리고 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-8 등과 같은 염증 유발성 사이토카인 등이 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 산화질소(nitric oxide: NO)는 인체의 대식세포(macrophage)에서 산화질소 합성효소(nitric oxide synthetase, 이하 NOS라 칭한다)에 의해 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 생성된다. 인체의 NOS에는 내피세포 구성형 NOS (endothelial constitutive NOS, 이하 ecNOS라 칭한다), 신경세포 구성형 NOS (neuronal constitutive NOS, 이하 ncNOS라 칭한다) 및 유도성 NOS(inducible NOS, 이하 iNOS라 칭한다)의 3가지 이성체가 존재한다. 이중 ecNOS와 ncNOS는 각각 내피세포와 신경외피세포에서 발현되며, 칼슘 및 칼모듈린 (calmodulin)에 의존적인 반면, iNOS는 병원균의 세포막 성분인 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, 이하 LPS라 칭한다), IL-1, TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인 (cytokine), 방사선 등의 면역 자극제에 의해 세포가 활성화될 때에만 여러 세포에서 많은 양이 발현되며 칼슘 및 칼모듈린에 비의존적이다. NO는 높은 농도에서는 중앙세포와 병원균에 대해서 방어 기능을 하며, 혈관내피세포에서 생성된 낮은 농도의 NO는 혈압조절작용을, 신경세포에서 생성되는 NO는 신경전달물질(neurotransmitter), 학습, 기억 등에 관련된 다양한 생리반응을 수행한다. 유도형이 아닌 구성형 NOS (cNOS)는 인체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데, ecNOS에 의해 생성된 NO는 혈관계에 작용하여 혈관확장, 혈소판 부착이나 응집을 억제시키며, ncNOS에 의해 생성된 NO는 신경계에 작용하여 기억능력에 중요한 장기 기억능력을 상승시키거나 신경전달물질로서 우울증을 일으킬 뿐만 아니라, 소화기관의 운동성이나 음경의 발기에도 관여한다.

[0006] 반면에, 특정 사이토카인이나 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현에 의해 생성되는 NO는 염증발현이나 숙주방어기전 등에 작용한다. 또한, 균체내독소 (endotoxin)의 자극에 의해 대식세포 (macrophage)에서 전사인자 NF- $\kappa$ B가 활성화 되어 iNOS 발현이 유도되고, 이로부터 NO의 생성이 증가되기도 한다. LPS, 염증유발인자, 방사선조사 등의 외부 자극에 의해 iNOS의 발현이 유도되면 많은 양의 NO가 4~6 시간 동안 계속적으로 생성되고, 이는 인체에 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 쥐의 경우 LPS의 외부 자극에 의해 대식세포에서 많은 양의 iNOS mRNA와 단백질이 발현되고 여기서 합성된 NO는 미생물 살균 작용과 항종양 작용을 수행한다. 그러나 필요 이상의 과다한 NO의 생성은 관절염, 패혈증 등의 염증질환과 조직이식거부반응, 자가면역질환 당뇨병 등의 면역질환 및 신경세포의 사멸을 야기시키는 것으로 알려져 있다.

[0007] 따라서 iNOS 활성화 억제제의 개발은 이러한 질병치료제로서의 개발가능성이 높으며, 이러한 관점에서 iNOS에 의한 NO 생성을 억제하는 소재는 인체의 다양한 염증질환의 치료제로 이용될 수 있다.

[0008] 한편, 우산나물(Syneilesis palmata (Thunb.) Maxim)은 숲 속의 그늘진 곳에 자라는 여러해살이풀로서 우리나라 전역에 자생하며 어리순은 나물로 먹는다. 우산나물은 수세기 동안 한국에서 전통적인 의약품으로 널리 사용되어 왔으며, 생약명은 토아산, 산파초, 파양산, 우산채라고도 하며, 뿌리를 포함하여 모든 부분을 약재로 사용 가능하다. 이러한 우산나물은 진통, 거풍, 소종, 해독에 좋고, 악성 종기에 효과가 있으며, 독사에 물렸을 때

해독약으로 사용되기도 한다.

[0009] 그러나 우산나물의 항염증 활성 및 이의 세부적인 메카니즘에 대한 연구는 없는 실정이다.

[0010] 이에 본 발명자는 인체에 부작용이 없이 NO, iNOS 생성을 효과적으로 억제할 수 있는 천연 물질 소재를 찾고자 모색하던 중, 우산나물 추출물이 세포내 NO 및 iNOS 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있으며, 또한 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시킬 수 있음을 확인하였고, 이러한 염증 매개인자들의 발현 억제 기작이 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )-의존성 신호 및 인플라마솜(inflammasomes) 활성 조절을 통해 이루어진다는 사실을 최초로 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2010-0033573호  
 (특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2005-0058635호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 생체에 부작용이 없으면서 항염증 활성이 우수하여 염증 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또한 본 발명의 다른 목적은 생체에 부작용이 없으면서 항염증 활성이 우수하여 염증 질환을 효과적으로 개선할 수 있는 건강기능식품을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0015] 본 발명은 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 물 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 메탄올일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 우산나물 추출물은 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )-의존성 신호 및 인플라마솜(inflammasomes) 활성 조절을 통해 염증 매개인자인 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시키는 효과를 가진다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 조성물에 10 내지 100  $\mu$ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증 질환은 관절염, 류머티즘성 관절염, 류마티스성 다발성 근육통, 동맥경화증, 염증성 내장 질환, 궤양성 대장염, 골다공증, 크론(Crohn) 병, 뇌척수염, 수막염, 궤양염, 복막염, 골수염, 뇌염, 뇌막염, 비염, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 맥관염, 임파구 맥락수막염, 사구체신염, 포도막염, 회장염, 간 염증, 신장 염증, 천식, 통증, 패혈성, 국소 빈혈, 궤양, 다중경화증, 경화증, 출혈성쇼크, 아나필락틱 쇼크, 화상, 감염, 박테리아성 감염, 비루스성 감염, 진균성 감염 및 기생성감염, 건선, 아토피성피부염, 레이슈마니아증, 주혈흡충증, 혈액투석증, 발작, 심폐 혈관이식, 국소 빈혈, 재환류 질환, 혈색소증, 혈색소병증, 당뇨병, 알츠하이머(Alzheimer) 병, 파킨슨(Parkinson) 병, 타가이식거부증 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 메탄올 용매 추출물일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌

류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

**발명의 효과**

[0024]

본 발명의 우산나물 추출물은 염증 매개인자인 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 이러한 염증 매개인자들의 발현 억제 기작이 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )-의존성 신호 및 인플라마솜(inflammasomes) 활성 조절을 통해 이루어지는바, 이러한 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 염증성 질환 및 NLRP3 인플라마솜-매개된 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품 소재로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히 우산나물은 천연소재로서 식용 가능하므로 이로부터 유래한 추출물을 포함하는 본 발명의 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물은 장기간 사용에도 안전한 이점을 가진다.

**도면의 간단한 설명**

[0025]

도 1은 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 농도별로 처리에 따른 세포생존율을 MTT assay로 측정된 결과이다. SN은 우산나물 추출물을 의미한다.

도 2a는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)를 처리하여 24시간 반응시킨 다음 세포 배양 상등액에서 아질산염(nitrite) 수준을 측정된 결과이다.

도 2b는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)를 처리하여 16시간 반응시킨 다음 세포 배양 상등액에서 iNOS 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 2c는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)를 처리하여 16시간 반응시킨 다음 세포 배양 상등액에서 IL-6 단백질 발현 수준을 ELISA로 측정된 결과이다.

도 2d는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)를 처리하여 16시간 반응시킨 다음 세포 배양 상등액에서 TNF- $\alpha$  단백질 발현량을 ELISA로 측정된 결과이다.

도 2e는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)로 자극하여 시간 경과에 따른 IFN- $\beta$  mRNA 발현량을 RT-PCR로서 측정된 결과이다.

도 2f는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)로 자극하여 시간 경과에 따른 IRF-3의 인산화 수준을 웨스턴 블랏 및 ELISA 분석을 통해 측정된 결과이다.

도 2g는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)로 자극하여 시간 경과에 따른 IFN- $\beta$  단백질 발현량을 ELISA로 측정된 결과이다.

도 2h는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)로 자극하여 시간 경과에 따른 STAT1 인산화 수준을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 2i는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 100U/ml 농도의 IFN- $\beta$ 를 처리하여 시간 경과에 따른 STAT1 인산화 수준을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 2j는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 100U/ml 농도의 IFN- $\beta$ 를 처리하여 시간 경과에 따른 JAK1 인산화 수준을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 2k는 대식세포(RAW 364.7)에 우산나물 추출물을 100  $\mu$ g/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(100ng/ml)로 자극하여 시간 경과에 따른 IL-6의 단백질 발현량을 ELISA로 측정된 결과이다.

도 3a는 BMDM 세포에 우산나물 추출물을 1시간 동안 전처리한 후 ATP(5mM)로 1시간 동안 자극하여 세포 배양 상등액에서 잘려진 IL-1 $\beta$ (p17) 및 caspase-1의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 3b는 BMDM 세포에 우산나물 추출물을 1시간 동안 전처리한 후 니제리신(10 $\mu$ M)으로 1시간 동안 자극하여 세포 배양 상등액에서 잘려진 IL-1 $\beta$ (p17) 및 caspase-1의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 3c는 BMDM 세포에 우산나물 추출물을 1시간 동안 전처리한 후 MSU(250 $\mu$ g/ml)로 6시간 동안 자극하여 세포 배양 상등액에서 잘려진 IL-1 $\beta$ (p17) 및 caspase-1의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과이다.

도 3d 및 3e는 C57BL/6 마우스에 우산나물 추출물(50mg/kg)을 복강 주사하고 이후 E-coli BL21를 처리하여 폐혈

증을 유도한 다음, 1시간이 경과한 시점에 경과한 복막투석을 통해 수득한 복막투석액에서 IL-1 $\beta$  단백질 발현량(도 3d)과 IL-6 단백질 발현량(도 3e)을 ELISA로 측정된 결과이다. 이때, 우산나물 추출물은 E-coli 처리 12시간 전 및 2시간 전에 순차적으로 주사하였으며, zVAD는 양성대조군으로 사용된 범 카스파제 억제제를 의미한다.

도 4는 C57BL/6 마우스에 우산나물 추출물(10mg/kg 또는 50mg/kg) 및 LPS(40mg/kg)를 복강 주사한 후 시간 경과에 따른 마우스 생존율을 측정한 결과이다.

도 5는 우산나물 추출물의 구성성분을 분석하기 위하여 HPLC 핑거프린팅을 수행한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0026] 본 발명은 우산나물(*Syneilesis palmata* (Thunb.) Maxim) 추출물의 염증 질환 치료 용도에 관한 것으로서, 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0027] 본 발명의 우산나물(*Syneilesis palmata* (Thunb.) Maxim)은 숲 속의 그늘진 곳에 자라는 여러해살이풀로서 우리나라 전역에 자생하며 어리순은 나물로 먹는다. 우산나물은 수세기 동안 한국에서 전통적인 의약품으로 널리 사용되어져 왔으며, 생약명은 토아산, 산파초, 파양산, 우산채라고도 하며, 뿌리를 포함하여 모든 부분을 약재로 사용 가능하다.
- [0028] 이와 같은 우산나물은 진통, 거풍, 소종, 해독에 좋고, 악성 종기에 효과가 있다고 알려져 있으나, 우산나물의 항염증 활성 및 이의 세부적인 메카니즘에 대한 연구는 밝혀진바 없다.
- [0029] 본 발명자들은 우산나물 추출물이 염증 매개인자인 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 이러한 염증 매개인자들의 발현 억제에 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-)-의존성 신호 및 인플라마솜(inflammasomes) 활성 조절에 이루어진다는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0030] 그러므로 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 염증성 질환 및 NLRP3 인플라마솜-매개된 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 "염증 질환"이란 염증유발인자 또는 방사선조사 등 유해한 자극으로 인해 인체 면역체계를 과도하게 항진시켜 대식세포와 같은 면역세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor-), IL-1(interleukin-1), IL-6, 프로스타글란딘(prostaglandin), 루코트리엔(luecotriene) 또는 산화질소(nitric oxide, NO)와 같은 염증 유발물질(염증성 사이토카인)에 의해 유발되는 질환을 말한다.
- [0032] 본 발명에서 "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 치료란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 면역질환의 "치료" 또는 "치료요법"은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0033] (1) 염증질환의 발달을 저지시킴,
- [0034] (2) 염증질환의 확산을 예방함,
- [0035] (3) 염증질환을 경감시킴,
- [0036] (4) 염증질환의 재발을 예방함 및
- [0037] (5) 염증질환의 증상을 완화함(palliating)
- [0038] 본 발명에서 상기 우산나물 추출물은 당업계에서 공지된 추출물 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 분리하여 수득한 우산나물 추출물일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 정의된 추출물은 적절한 용매를 이용하여 우산나물로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 우산나물의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0040] 상기 우산나물로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산

(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올(주정)을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 99.9% 메탄올을 사용할 수 있다.

- [0041] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 우산나물 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0042] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 우산나물 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다.
- [0043] 상기와 같은 과정을 통해 수득한 우산나물 추출물은 다시 유기용매인 헥산을 이용하여 분획화하는 과정을 통해 본 발명의 우산나물 추출물로 제조될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일구체예에 따른 우산나물 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- [0045] 먼저 우산나물 전초를 건조하고 분말화하여 메탄올 용매를 이용 속슬레법 추출 기술로 45에서 3일 통한 추출하고, 이렇게 수득한 추출물을 감압 농축한 뒤 동결 건조하여 최종적으로 본 발명의 우산나물 추출물을 제조할 수 있다.
- [0046] 상기의 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0048] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0049] 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, 율활제, 봉해제 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. 봉해제는 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 회석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 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.
- [0050] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 우산나물 추출물은 조성물에 10 내지 100g/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 또한 본 발명의 우산나물 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95중량%로 포함될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 염증 질환으로는, 관절염, 류머티즘성 관절염, 류마티스성 다발성 근육통, 동맥경화증, 염증성 내장 질병, 궤양성 대장염, 골다공증, 크론(Crohn) 병, 뇌척수염, 수막염, 척장염, 복막염, 골수염, 뇌염, 뇌막염, 비염, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 맥관염, 임파구 맥락수막염, 사구체신염, 포도막염, 회장염, 간 염증, 신장염증, 천식, 통증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 국소 빈혈, 궤양, 다중경화증, 경화증, 출혈성쇼크, 아나필락틱 쇼크, 화상, 감염, 박테리아성 감염, 비루스성 감염, 진균성 감염 및 기생성감염, 건선, 아토피성피부염, 레이슈마니아증, 주혈흡충증, 혈액투석증, 발작, 심폐 혈관이식, 국소 빈혈, 재환류 질환, 혈색소증, 혈색소병증, 당뇨병,

알츠하이머(Alzheimer) 병, 파킨슨(Parkinson) 병, 타가이식거부증 및 자가면역질환 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0052] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 우산나물 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0053] 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.
- [0054] 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 건강 보조식품류 등이 있다.
- [0055] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 우산나물 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.
- [0056] 본 발명의 유효성분인 우산나물 추출물은 천연물질로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 염증 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또한 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 질환 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 건강기능식품은 염증 질환 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 건강기능식품이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능을 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.
- [0060] 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.
- [0061] 상기 식품 첨가물 공전에 수제된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결절셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 우산나물 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.
- [0063] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 우산나물 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 우산나물 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.
- [0064] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 우산나물 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0065] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 우산나물 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

- [0066] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 동일 수 있다.
- [0067] 또한 본 발명은 염증 질환 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 염증 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0068] 또한 본 발명은 포유동물에게 우산나물 추출물을 투여하는 것을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0069] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0070] 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 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 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.
- [0071] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 우산나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0072] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] **<실시예>**

[0074] **실험재료**

[0075] IL-6, IFN-1 $\beta$  ELISA Set(BD OptEIA TMSer) 및 TMB Substrate Reagent Set는 BD Biosciences(Franklin Lakes, SD, USA)로부터 구입하였다. LPS; 및 iNOS, IFN-1 $\beta$ , IRF-3, JAK1, STAT1 및  $\beta$ -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)로부터 구입하였다.

[0076] **통계분석**

[0077] 실험 결과는 평균표준편차(n=3)로 나타내었다. 통계분석은 Students t-test를 이용하여 수행하였으며, p<0.05는 통계적으로 유의한 결과로 간주하였다.

[0078] **실험방법**

[0079] **1. 우산나물 추출물 제조**

[0080] 우산나물 식물은 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB)로부터 구입하였으며, 한국생명공학연구원 분류학자인 강신호 박사에 의해 증명되었다. 대조표본(KRIB 028-086)은 미래 참고자료를 위한 한국 식물 추출물 은행의 표본집에 기탁하였다.

[0081] 우산나물 추출물 제조를 위해 우산나물 전초를 건조하고 분말화하여 메탄올 용매를 이용 속슬레법 추출 기술로 45 $^{\circ}$ C에서 3일 통한 추출하였다. 추출물은 45 $^{\circ}$ C 온도에서 감압 농축한 후 동결 건조하였다. 최종수율이 18.5%(w/w)였으며, 이를 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 동결건조된 파우더는 10% 디메틸 설펝사이드(DMSO)에서 용해시켜

0.22 μm 멤브레인에 필터링을 진행한 후 보관하면서 하기 실험을 위한 시료로 사용하였다.

[0082] 2. 세포배양

[0083] RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, MD, USA)로부터 수득하였으며, 10% 열-불활성화된 FBS 및 100M 농도의 2-메르캅토에탄올(Mercaptoethanol)이 보충된 DMEM 배지에서 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기 하에서 37 °C에서 유지하였다.

[0084] C57BL/6 마우스(8주령) 유래의 골수세포는 멸균된 대퇴골 및 정강이뼈를 플러싱에 의해 수집하였으며, 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 30% L929 세포-조절된 배지(대식세포 분화를 위한 BMDM 세포)로 보충된 RPMI 1640에서 7일 동안 배양하였다.

[0085] 3. 동물

[0086] 암컷 C57BL/6(22-25g, 6주령) 마우스는 Orient Bio Co.(korea)로부터 구입하였으며, 평균 조건(22±2°C, 습도 55±5%, 12시간 명/암 주기) 하에서 사료 및 물을 자유식으로 급여하였다. 모든 실험은 건국대학교 실험 동물 위원회의 가이드라인에 따라 수행되었다.

[0087] 4. E-coli로 유된 급성 폐혈증 동물 모델

[0088] 급성 복막염을 유도하기 위하여, E-coli BL21 세포주 5×10<sup>8</sup> CFU를 이용하였다. 우산나무 추출물 또는 zVAD(양성대조군: 범 카스파제 억제제)를 E-coli 처리 전 12 시간 전 및 2시간 전에 순차적으로 복강 주입하였으며, 복강 주사 후 2시간을 안정화시켰다. 이후 E.coli를 마리당 5×10<sup>8</sup> 개씩 복강 주사하여 감염시켰다. 1시간 후 마우스를 희생하여 복강세척액으로 단백질 발현량을 측정하였다.

[0089] 5. 세포생존율 검사

[0090] 우산나물 추출물이 RAW 264.7 세포에 미치는 독성을 알아보기 위해 96웰 플레이트에서 1×10<sup>4</sup> cell/50μl/well의 농도로 분주하여 세포에 우산나물 추출물을 농도별(25, 50, 100 μg/ml)로 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 상층액을 제거하고 100 μL의 MTT(500 μg/mL)를 각각의 웰에 첨가하고 37°C 에서 2 시간 동안 배양하였다. 2 시간 후 상층액을 제거하고 DMSO를 각각의 웰에 넣어 각 웰에 있는 포르마잔을 녹였다. 흡광도는 550 nm에서 측정하였고, 값은 대조군과 비교하여 계산하였다.

[0091] 6. NO 생성량 측정

[0092] Raw 264.7 cell로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO-의 형태로써 Griess(0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% conc) 시약을 이용하여 측정하였다.

[0093] 자세하게는, Raw 264.7 세포를 24 웰 플레이트에 1×10<sup>5</sup> cell/500μl/well의 농도로 overnight 해서 부착시킨 후, 우산나물 추출물을 25, 50, 100 μg/ml의 농도로 각각 처리하고 1시간 동안 배양하였다. 그리고 LPS를 100ng/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한다. 그리고 배양 상층액을 100μl씩 96웰 플레이트에 옮기고 Griess 시약을 100μl를 혼합한 후 10분 동안 반응시키고 발색 azo-유도체 분자의 흡광도를 550 nm에서 마이크로플레이트 reader로 측정하였다. 신선한 배양 배지를 모든 실험에서 블랭크로 사용하였다. 아질산 나트륨의 희석 범위를 각 샘플의 아질산염의 양으로 표준 곡선을 위하여 사용하였다.

[0094] 7. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

[0095] 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α) 및 STAT1 단백질 발현양은 ELISA를 이용하여 측정하였다.

[0096] 인 비트로(*in vitro*) 실험에서는 대식세포(Raw 264.7)를 24웰 플레이트 웰 당  $2 \times 10^5$  분주하고 여기에 우산나물 추출물을 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 1시간 동안 전처리한 다음, 100 ng/ml LPS를 처리하여 자극하였다. LPS 처리 후 일정 시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 사이토카인 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, 사이토카인으로 코팅된 96 웰 플레이트에 50 $\mu\text{l}$ 씩 overnight시켰다. 세척 버퍼(Washing buffer)로 3회 세척하고 100 $\mu\text{l}$ 의 biotinylated antibody reagent를 각각의 웰(well)에 처리해서 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음 100 $\mu\text{l}$ 의 streptavidine-HRP solution을 각각의 웰(well)에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 세척 버퍼(Washing buffer)로 3회 세척하였다. 그리고 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate(TMB) 기질을 100 $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후, 100 $\mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리하고 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0097] 인 비보(*in vivo*) 실험에서는 C57BL/6 마우스에 먼저 우산나물 추출물(50mg/kg)을 복강 주사한 다음, 이후 E-coli를 복막 주사 처리하였다. 이때, 우산나물 추출물은 E-coli 처리 12시간 전 및 2시간 전에 순차적으로 주사하였다. E-coli 처리 후 1시간이 경과한 시점에 마우스를 희생한 다음 복강세척액을 수거하여 사이토카인 측정에 이용하였다. 이후 과정을 상기 인 비트로(*in vitro*) 실험에서와 동일하게 진행하였다.

[0098] 8. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

[0099] 12 웰 플레이트에서 대식세포(Raw 264.7)를 웰 당  $2 \times 10^5$  분주하고 여기에 우산나물 추출물을 농도별(25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ )로 1시간 동안 전처리한 후, 100 ng/ml LPS를 처리하여 2 시간 동안 반응시켰다. 배양한 후, 전체 RNA를 QIAzol lysis reagent (QIAGEN sciences, Maryland, USA)로 추출하였다. 2 $\mu\text{g}$ 의 전체 RNA를 First Strand cDNA Synthesis 키트 (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 cDNA로 전환하고, PCR를 주형으로 상기 제조된 cDNA를 사용하여 수행하였다. 전체 RNA를 제조업자의 지시에 따라서 TRIzol 시약을 사용하여 세포로부터 분리한 후, 2 $\mu\text{g}$ 을 Oligo (dT) 18 프라이머 및 AccuPower RT Premix를 사용하여 cDNA를 만들기 위해 역전사하였다. PCR 증폭은 제조업자의 지시에 따라서 수행되었고, 증폭은 Thermal cycler (Hercules, CA, USA)에서 다음의 조건 하에서 수행되었다. IFN- $\beta$ 를 사이클 동안 95 $^{\circ}\text{C}$  30초 변성, 65 $^{\circ}\text{C}$  40초 익스텐션. 변성 전 단계는 94 $^{\circ}\text{C}$  에서 3분간 수행하였고 최종 익스텐션은 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 수행하였다. PCR 산물들을 1.5 % 아가로스 젤에서 전기영동하고 EtBr(ethidium bromide)로 염색하였다.

[0100] 9. 웨스턴 블랏 분석

[0101] 우산나물 추출물(100  $\mu\text{g/ml}$  농도)의 전처리(1시간) 후 염증유발 물질(LPS: 100ng/ml, ATP: 5mM, 니체리신: 10  $\mu\text{M}$ , MSU: 250  $\mu\text{g/ml}$ )로 자극된 세포들을 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 % Nonidet P-40 (NP-40), 150 mM sodium chloride, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 프로테이즈 및 포스파테이즈 저해제 콕테일을 함유하는 버퍼에서 용해시켰다. 세포 파쇄액으로부터 동량의 샘플을 10 % SDS-PAGE 젤 전기영동에 의하여 분리하고 polyvinylidene fluoride (PVDF)로 트랜스퍼하였다. 그 막을 5 % 탈지분유를 함유하는 TBS로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 그 후에, 그 막을 4 $^{\circ}\text{C}$  에서 1차 항체로 하룻밤 배양하고 면역 복합체를 horseradish peroxidase-부착된 항체로 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. 2차 항체의 적용 후, 그 막을 Luminescent 이미지 분석 장치 (LAS-3000; Fujifilm, Tokyo, Japan)에 의하여 ECL 검출 키트를 사용하여 시각화하기 위해 현상하였다.

[0102] 10. 마우스 생존율 측정

[0103] C57BL/6 마우스에 복강 내로 우산나물 추출물(50mg/kg) 및 LPS(40mg/kg)를 처리한 뒤 시간 경과에 따른 마우스 생존율을 측정하였다.

[0104] 11. 우산나물 추출물의 HPLC와 finger printing 분석

[0105] 우산나물 추출물을 100 % 메탄올에 용해시키고, 핑거 프린트 분석을 위해 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE 일회용 필터 (Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)를 이용해 필터링하였다. 우산나물 추출물의 구성성분을 CBM-20A

communications bus module이 장착된 HPLC (Shimadzu, Kyoto, 211 Japan), LC-20AD 액체 크로마토그래피, SPD-M20A diod 분석 검출기, SIL-20AC 자동 샘플러, DGU-20A3 탈기, CTO-20AC 칼럼 오븐을 이용하여 분석하였다. 추출물의 성분은 Shim-packVP-ODS (4.6 mm 250 mm, 5 μm)를 이용해 유속 1.0 mL/분으로 분리하고 분자량은 IT-TOP system (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용해 결정하였다. 70 % 메탄올을 이동상으로 하고 0.2 mL/분의 유속으로 겹중량은 20 μL로 하여 분자량 범위 100~1,500 amu 사이에서 살펴보았다.

[0106] **실험결과**

[0107] 1. 우산나물 추출물의 세포독성 평가

[0108] 본 실험에서는 우산나물 추출물의 세포독성을 평가하기 위하여, MTT assay을 실시하였으며, 그 결과 도 1에서 나타낸 바와 같이 100 μg/ml의 농도까지는 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다. 그래서 이후 진행되는 항염증 관련 실험에서는 100 μg/ml를 최고 농도로 설정하고 실험하였다.

[0109] 2. 우산나물 추출물의 LPS-자극된 대식세포에서 염증성 매개자 생산 억제 효과

[0110] 본 발명자들은 우산나물 추출물의 LPS-자극된 대식세포에서 염증성 매개자 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, RAW 364.7 세포에 우산나물 추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 뒤 100ng/ml의 농도의 LPS로 처리하여 세포를 자극시킨 다음, 세포배양 상층액에서 아질산염(nitrite) 농도 수준, iNOS의 단백질 발현양, IL-6과 IFN-1β의 단백질 발현양, STAT1 단백질 발현량, STAT1와 JAK1의 인산화 수준 등을 조사하였다.

[0111] 그 결과 도 2a 내지 2d에서 나타낸 바와 같이, 우산나물 추출물을 전처리한 실험군에서 LPS 자극에 따른 NO 생성; iNOS 발현; 및 염증성 사이토카인 IL-6과 TNF-α의 발현이 두드러지게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] 또한, LPS 자극에 있어서 우산나물 추출물의 TLR4 신호 경로에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 먼저 IFN-β의 mRNA 발현 수준과 IRE3의 인산화 수준을 조사하였으며, 그 결과 도 2e에서 나타낸 바와 같이 우산나물 추출물을 처리한 경우 IFN-β의 mRNA 발현 수준에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며, 도 2f에서 나타낸 바와 같이 IRE3의 인산화 수준에도 영향을 미치지 못한 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 한편, 도 2g는 대식세포에 우산나물 추출물을 전처리한 후 LPS로 자극한 경우, LPS 처리 시간 경과에 따른 IFN-β 단백질 발현양을 ELISA를 통해 측정된 결과로서, IFN-β 단백질 분비는 LPS 자극 8시간 후 변화가 없었으나, 12시간 후에는 하향 조절되는 것으로 확인할 수 있었다.

[0114] 또한, 도 2h에서 나타낸 바와 같이 LPS 자극에 따른 STAT1 인산화가 우산나물 추출물을 전처리한 실험군에서 매우 두드러지게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 본 발명자는 상기 도 2h에서 나타내는 결과가 의미하는 바가 크다고 판단하였으며, 이에 우산나물 추출물 처리가 IFN-β 수용체로부터 신호 매개자에 미치는 영향을 평가하기 위하여, RAW 364.7 세포에 우산나물 추출물을 100 μg/ml 농도로 1시간 동안 전처리한 뒤 100U/ml 농도의 IFN-β를 처리하여 시간 경과에 따른 STAT1의 인산화 수준 및 JAK1의 인산화 수준을 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다. 그 결과 도 2i 및 2j에서 나타낸 바와 같이 우산나물 추출물은 IFN-β 유도된 STAT1 인산화 및 이의 상향 신호로서 JAK1 인산화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 우산나물 추출물이 IFN-β 수용체로부터 하위 신호에서 신호 매개자의 조절을 통해 LPS-유도된 염증성 반응을 억제하는 것을 가리킨다.

[0116] 한편 우산나물 추출물 전처리 후 LPS 자극하여 시간 경과에 따른 IL-6 단백질 발현양을 ELISA로 분석한 결과, 도 1k에서 나타낸 바와 같이 LPS-유도된 IL-6 분비가 14시간 후에 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0117] 3. 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo) 상에서 우산나물 추출물 처리에 따른 인플라마솜(inflammasome) 유도된-IL-1β 분비 억제 효과

[0118] 인플라마솜은 세포의 감염이나 스트레스 등 선천적인 면역 방어체계(innate immune defenses)와 관련된 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인의 성숙을 유도하는 분자적 기작이 되는 물질이다. 가장 잘 알려진 인플라마솜은 NLRP3 인플라마솜이 있으며, 이는 NLRP3, ASC 및 pro-caspase-1로 구성되는 복합체 형태로서 요산염

(monosodium urate), ATP 및 니제리신(nigericin)과 같은 다양한 자극에 의해 유도되어 진다. 한편, NLRP3 인플라마좀 복합체를 형성하는 경우 신호 자극을 야기하여 카스파아제-1(caspase-1)을 활성화하고, 활성화된 카스파아제-1이 pro-IL-1 $\beta$ 에 작용하여 최종적으로 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 로 형성하는 일련의 메카니즘을 갖는다.

[0119] 따라서 본 실험에서는 우산나물 추출물의 IL-1 $\beta$  발현 조절 기작이 인플라마좀 활성 조절을 통해 이루어지는지 조사하기 위하여, 인 비트로(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*) 상에서 우산나물 처리에 따른 추출물을 잘려진 IL-1 $\beta$  (p17), 카스파아제-1(caspase-1), IL-6의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏 분석 및 ELISA를 이용하여 측정하였다.

[0120] 자세하게는, 인 비트로(*in vitro*) 실험에서는 BMDM 세포에 우산나물 추출물을 1시간 동안 전처리하고 이후 ATP(5mM), 니제리신(10  $\mu$ M) 및 MSU(250ug/ml) 각각을 처리하여 세포를 자극시킨 다음 세포 상등액 내의 잘려진 IL-1 $\beta$  (p17) 및 caspase-1의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다. 한편, pro-IL-1 $\beta$ , ASC, pro-caspase 1, 및  $\beta$ -actin은 내부 대조군으로 사용하여 인플라마좀 구성 단백질에 미치는 영향을 측정하였다.

[0121] 그 결과 도 3a 내지 3c에서 나타낸 바와 같이, 우산나물 추출물을 처리한 실험군의 경우 무처리군 대비 잘려진 IL-1 $\beta$  (p17) 및 caspase-1의 분비가 추출물 처리 농도에 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 우산나물 추출물이 pro-caspase-1 분비를 억제하고, 이에 NLRP3 인플라마좀 복합체 형성이 감소하며, caspase-1 활성을 완화시키는 일련의 메카니즘을 통해 최종적으로 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 의 형성을 조절할 수 있음을 가리키는 것이다.

[0122] 인 비보(*in vivo*) 실험에서는 우산나물 추출물(50mg/kg)을 C57BL/6 마우스 복강 주사(E-coli 처리 12시간 전 및 2시간 전에 순차적으로 주사)한 후 E-coli 처리하여 급성 폐혈증을 유도하였으며, E-coli 처리 후 1시간이 경과한 시점에 복막투석을 통해 수득한 복막투석액에서 IL-1 $\beta$  및 IL-6 단백질 양을 ELISA로 측정하였다. 도 3d 및 3e는 대장균-유도된 폐혈증 마우스모델에 우산나물 추출물을 전처리하고 복막투석에서 전염증성 사이토카인 수준을 측정한 결과로서, 우산나물 추출물을 복강 주사한 실험군에서 대장균-유도된 IL-1 $\beta$  생산이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, 우산나물 추출물이 급성 폐혈증에 대한 보호 효과를 가지며, 향후 폐혈증 치료를 위한 의약품 소재로서의 가능성을 시사해주었다.

[0123] 4. LPS-유도된 급성 폐혈증 동물모델에 있어서 우산나물 추출물 처리에 따른 마우스 생존율 측정

[0124] C57BL/6 마우스에 복강 내로 우산나물 추출물(50mg/kg) 및 LPS(40mg/kg)를 처리한 뒤 시간 경과에 따른 마우스 생존율을 측정하였다.

[0125] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 우산나물 추출물을 함께 처리해준 마우스들이 단지 LPS만을 주사한 마우스 대비 더욱 높은 생존율을 보여주었다.

[0126] 5. 우산나물 추출물의 주요성분 분석

[0127] 우산나물 추출물의 주요성분을 측정하기 위하여 HPLC 핑크프린팅 분석을 실시하였다.

[0128] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, 표준 대비 ent-oplopanone-10-O- $\beta$ -glucopyranose의 구별된 피크를 보여주었다.

[0129] 상기 실험결과를 종합한 결과, 본 발명의 우산나물 추출물은 염증 반응에서 중요한 염증성 매개자인 NO, iNOS 및 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시키고, 이러한 염증성 사이토카인의 발현 억제 기작은 TRIF-의존성 신호 및 인플라마좀 활성 조절을 통해 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

[0130] 따라서 이러한 실험 결과를 통해, 본 발명의 우산나물 추출물이 NLRP3 인플라마좀-매개된 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품 소재로서 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시한다.

[0131] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될

수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

**부호의 설명**

SP: 우산나물 추출물

LPS: lipopolysaccharide

NO: Nitric oxide

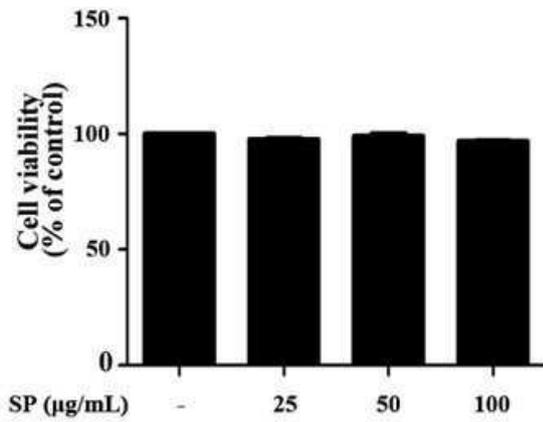
iNOS: inducible nitric oxide synthase

MTT: 3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5 -diphenyltetrazolium Bromide

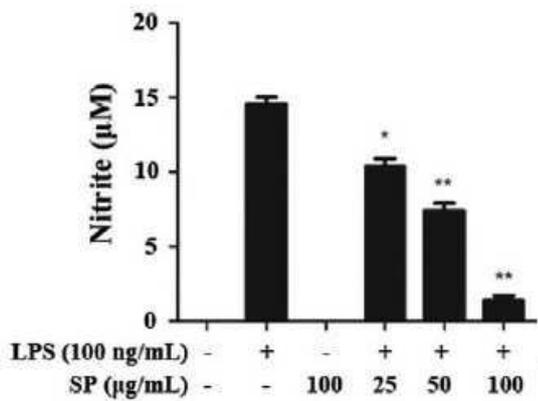
MSU: monosodium urate

**도면**

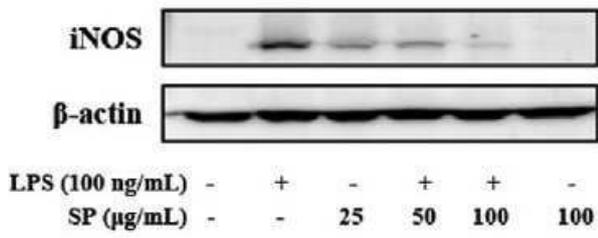
**도면1**



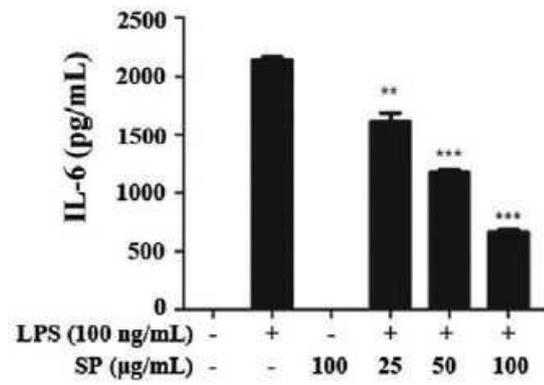
**도면2a**



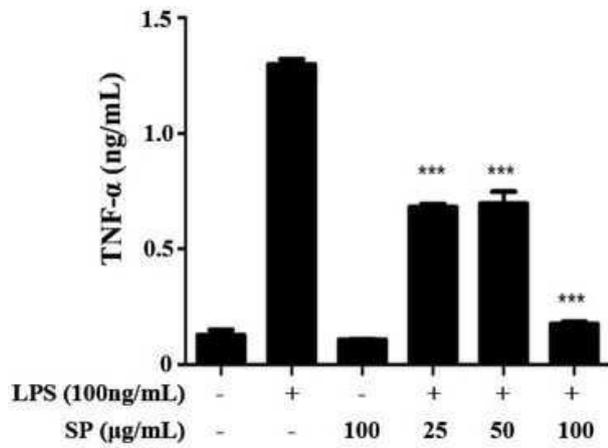
도면2b



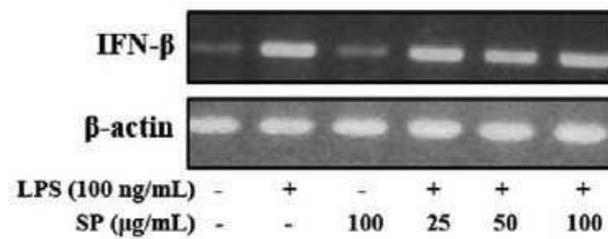
도면2c



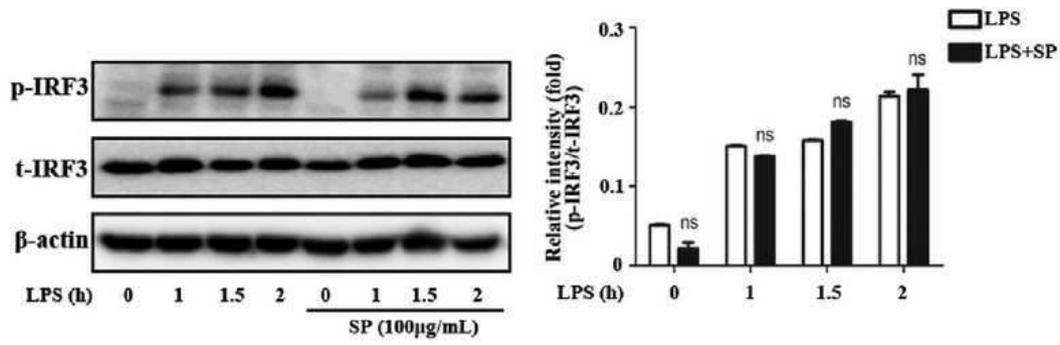
도면2d



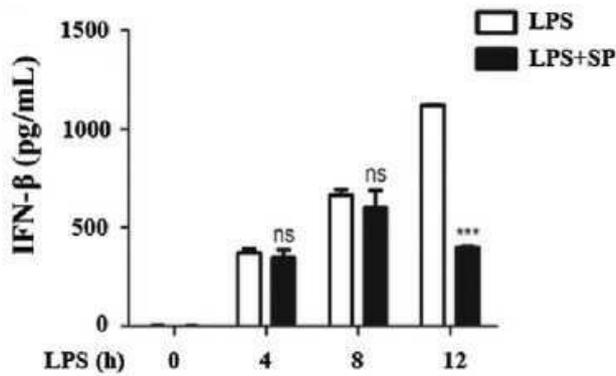
도면2e



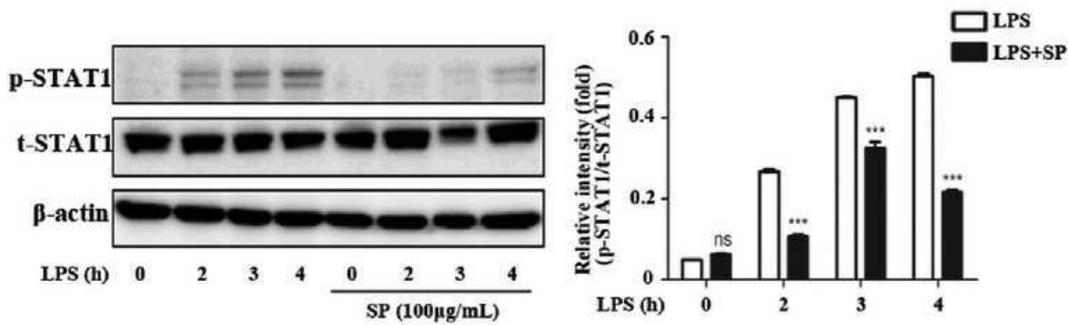
도면2f



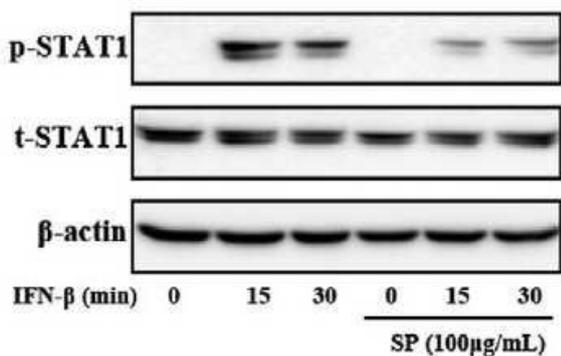
도면2g



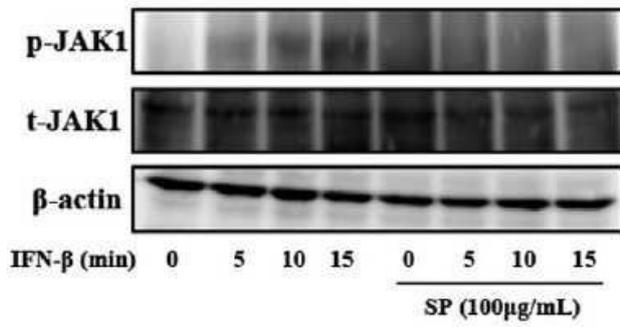
도면2h



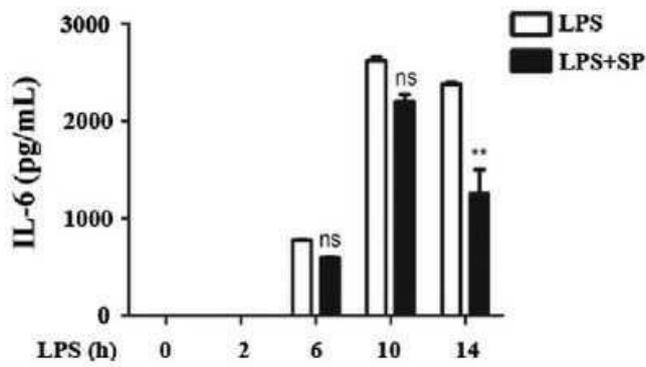
도면2i



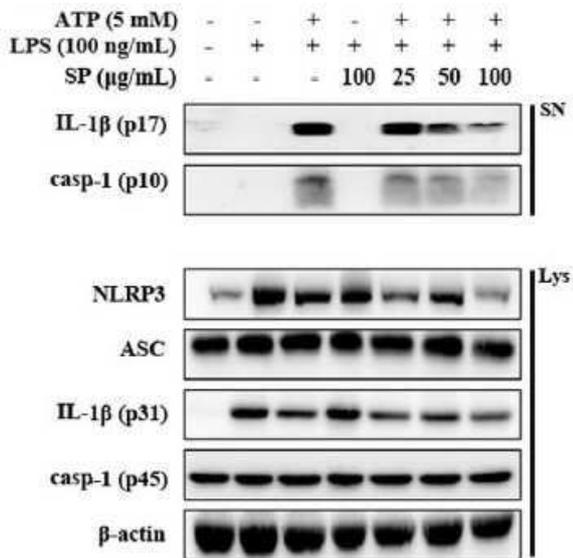
도면2j



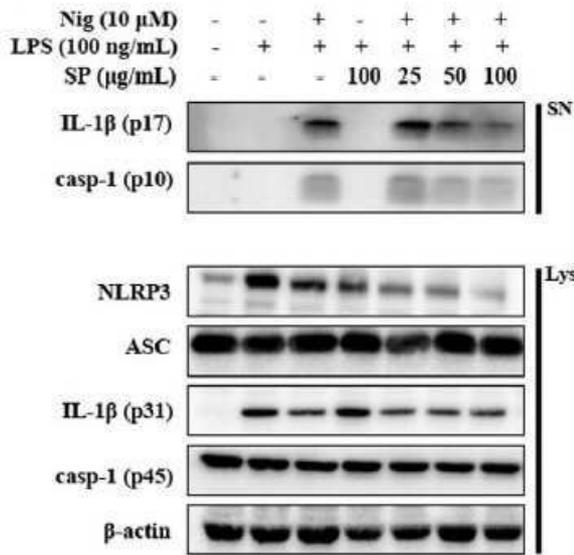
도면2k



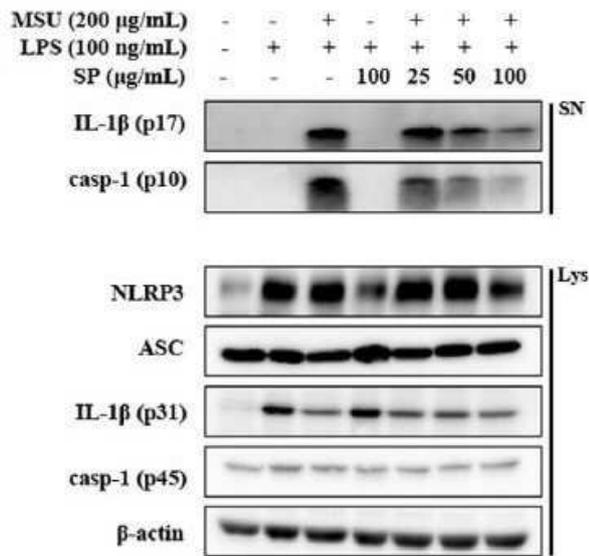
도면3a



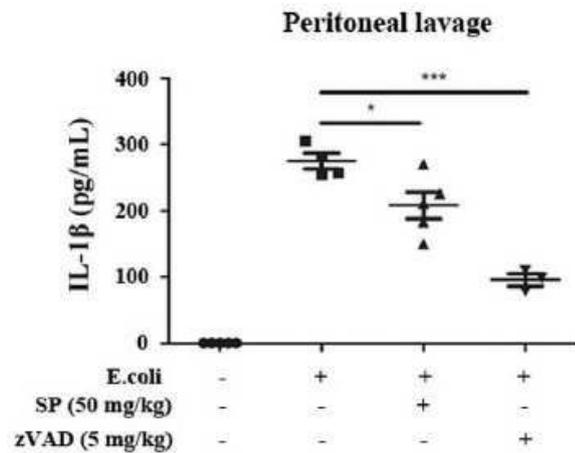
도면3b



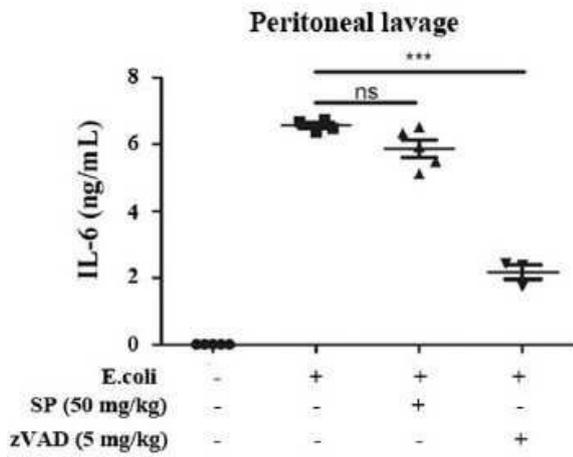
도면3c



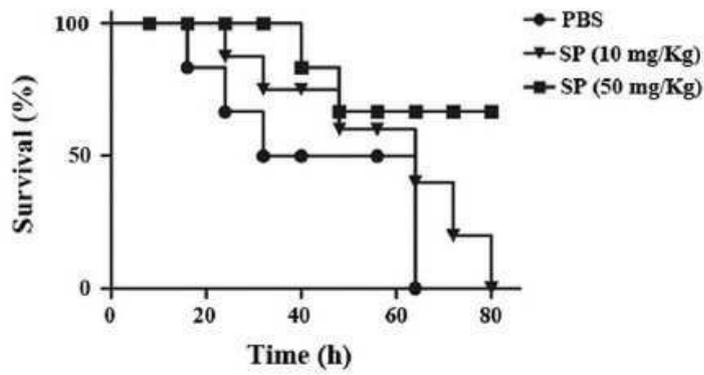
도면3d



도면3e



도면4



도면5

