



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월16일
(11) 등록번호 10-2717836
(24) 등록일자 2024년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/535 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/191 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/535 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0056874
(22) 출원일자 2021년04월30일
심사청구일자 2021년04월30일
(65) 공개번호 10-2022-0149352
(43) 공개일자 2022년11월08일
(56) 선행기술조사문헌
Pharmacology & Therapeutics, 207,
2020.3., 107452
Inflammation, 39(3), 2016.6., pp.1151-1159

(73) 특허권자
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)
중앙대학교 산학협력단
서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)
(72) 발명자
박소영
충청남도 천안시 동남구 만남로 9, 신부동 1608호(신부동)
황광우
서울특별시 강남구 학동로64길 7, 102동 407호(삼성동, 한솔아파트)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

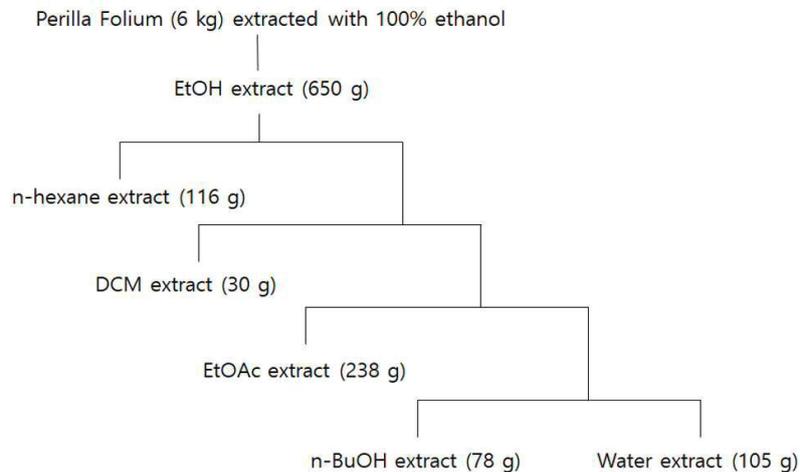
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 자소엽에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방, 치료 및 개선용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/191 (2013.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415171151
과제번호	P0004697
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	광역협력권산업육성(R&D)
연구과제명	유산균 및 지역자원을 활용한 장건강 고령친화식품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)유담
연구기간	2020.01.01 ~ 2021.03.31

공지예외적용 : 있음

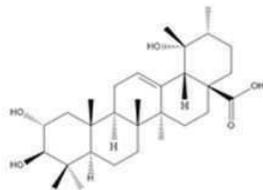
명세서

청구범위

청구항 1

자소엽 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하며 IL-17A 발현을 억제하여 류마티스 관절염 및 염증성 장 질환 중에서 선택되는 자가면역질환 예방 또는 치료에 사용되는 것인 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 자소엽 추출물의 추출용매는 물, C₁ 내지 C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 자소엽 추출물에 물, C₁ 내지 C₅의 직쇄 또는 분지형 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하여 분리되는 것인 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 자소엽 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하여 분리되는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 자소엽 에탄올 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 순차적으로 첨가하여 분리되는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 분리는 디클로로메탄으로 분획하여 얻어진 디클로로메탄층을 실리카젤 컬럼크로마토그래피법을 통해 분리하는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 실리카젤 컬럼크로마토그래피법은 용매의 농도구배법(gradient method)을 통해 분리하는 것인 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 염은 무기산, 유기산, 무기 염기 또는 유기 염기와 생리학적으로 허용되는 염인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상이며,

상기 유기산은 구연산 (citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (tartaric acid), 말레인산, 푸마르산 (fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상인 것인 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 희석제 또는 담체를 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 경구형 제제 또는 비경구형 제제로 제형화된 것인 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 경구형 제제는 정제, 캡슐제, 환제, 산제, 과립제, 현탁화제 또는 시럽제이고, 상기 비경구형 제제는 크림제, 로션제, 연고제, 액제, 겔제, 카타플라스마제, 패취제, 에어로솔제, 유동액스제, 엘릭서제, 침제, 향낭, 또는 주사제인 것인 약학적 조성물.

청구항 13

자소엽을 50 %(v/v) 내지 100 %(v/v) 에탄올로 추출하는 단계;

상기 단계로부터 얻어진 에탄올 추출물을 30 %(v/v) 내지 99 %(v/v) 디클로로메탄으로 분획하는 단계; 및

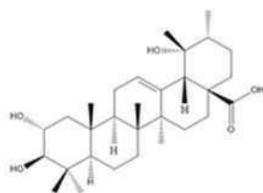
상기 단계로부터 얻어진 디클로로메탄 분획물을 실리카젤 컬럼크로마토그래피법으로 분리하여 청구항 1의 화학식 1의 화합물을 얻는 단계;를 포함하는

청구항 1에 따른 IL-17A 발현을 억제하여 류마티스 관절염 및 염증성 장 질환 중에서 선택되는 자가면역질환 예방 또는 치료에 사용되는 것인 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 14

자소엽 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하며 IL-17A 발현을 억제하여 류마티스 관절염 및 염증성 장 질환 중에서 선택되는 자가면역질환 예방 또는 개선에 사용되는 것인 식품용 조성물:

[화학식 1]



청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 자가면역질환은 염증성 장 질환인 것인 약학적 조성물.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론병인 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

자소엽 (Perilla leaves, *Perilla frutescens* var. *acuta*)에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 자가면

[0001]

역질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 자소엽 추출물로부터 분리한 화합물을 유효 성분으로 포함하고 Th17 세포로의 분화 및 IL-17의 생성을 억제하여 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료에 사용될 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] CD4⁺ T세포는 특정 사이토카인과 전사인자의 발현에 따라 Th1 (T helper type1), Th2 (T helper type2), CD4⁺CD25⁺ 면역조절 T세포 (regulatory T cell)와 Th17 세포 (T helper 17 cell) 등의 아형으로 구분될 수 있다. 이 중 IL-17을 생산하는 Th17 세포는 동물모델과 인간세포 연구 결과들을 통해 염증 및 자가면역 병인에 직접적인 역할과 병원에 대한 숙주 방어 또는 이상 면역반응 유도 등의 역할이 규명되었다. IL-17과 Th17 세포가 염증과 자가면역질환에서 주요 병인 역할이 규명되면서 이들에 대한 억제와 조절이 질환 치료를 위한 중요 전략으로 제안되었고, Th17 세포계열 사이토카인의 억제, 중화 및 특이 전사인자들의 억제 조절을 통한 잠재적 표적 치료 방법 등이 연구되고 있는 상황이다.
- [0004] 류마티스 관절염은 신체 여러 조직 및 장기에 영향을 미치는 자가면역질환이다. 그 증상으로 손가락 마디 등의 관절에 심각한 통증을 야기하고 관절 이외에 근육, 폐, 심장, 피부, 혈관, 신경 및 눈 등의 여러 장기에도 이상을 초래한다. 비록 상기 증상이 현저하게 나타나지 않더라도 시간의 변화에 따라 점차적으로 진행되어 관절 손상 및 기능적 이상을 초래하는 질환으로 발전된다.
- [0005] 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 그 증상으로 복통, 설사등이 빈발하고 중증의 경우 발열, 하혈 등이 나타난다.
- [0006] 류마티스 관절염과 크론병 등의 자가면역질환은 TH17의 분화에 따른 IL-17의 발현량의 증가가 그 원인의 하나로 보고되어 있다. 실제로 IL-17는 G-CSF와 GM-CSF의 발현 촉진을 통해 과립백혈구 형성 (granulopoiesis)을 향상시키며 종자중심 (germinal center) 형성과 자가항체 생산을 촉진하는 효과가 관찰된다. 이와 관련하여 염증성 자가면역질환인 류마티스 관절염 환자의 경우 혈청에서 IL-17이 높게 검출되며 IL-17A는 류마티스 관절염 환자의 활막세포 내 IL-1 β 와 IL-6의 발현을 유도시킨다. 또한, IL-17의 주요기능으로 연골세포와 조골세포 (osteoblasts) 내 기질 생산을 억제시켜 관절 손상을 일으키고 조직재생의 결핍에 이르게 한다고 알려져 있다.
- [0007] 류마티스 관절염이나 크론병과 같은 자가면역질환은 현재까지도 그 치료 또는 예방제가 제공되지 않아 많은 환자가 고통을 겪고 있다. 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 자가면역질환의 예방 및 치료제의 개발이 절실히 요구된다.
- [0008] 본 발명의 연구자들은 류마티스 관절염이나 염증성 장질환, 크론병과 같은 자가면역질환의 예방 및 치료제를 개발하던 중 자소엽 추출물과 이로부터 분리한 화합물인 토멘트산 (tormentic acid)이 이와 같은 질병에 유효하게 적용될 수 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 10-1970457 호

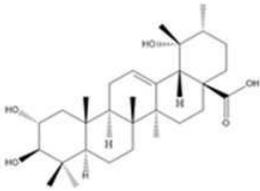
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 일 양상은 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 다른 일 양상은 상기 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0012] 다른 일 양상은 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 개선용 식품학적 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 다른 일 양상은 상기 조성물을 이용한 자가면역질환의 예방, 치료, 또는 개선 방법에 관한 것이다.

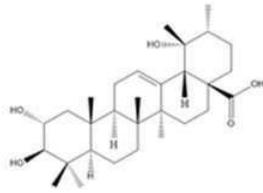
과제의 해결 수단

- [0015] (1) 자소엽 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
- [0016] [화학식 1]



- [0017]
- [0018] (2) 상기 자소엽 추출물의 추출용매는 물, C₁ 내지 C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물인 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0019] (3) 상기 화합물은 자소엽 추출물에 물, C₁ 내지 C₅의 직쇄 또는 분지형 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하여 분리되는 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0020] (4) 상기 화합물은 자소엽 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하여 분리되는 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0021] (5) 상기 화합물은 자소엽 에탄올 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 순차적으로 첨가하여 분리되는 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0022] (6) 상기 분리는 디클로로메탄으로 분획하여 얻어진 디클로로메탄층을 실리카젤 컬럼크로마토그래피법을 통해 분리하는 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0023] (7) 실리카젤 컬럼크로마토그래피법은 용매의 농도구배법(gradient method)을 통해 분리하는 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0024] (8) 상기 염은 무기산, 유기산, 무기 염기 또는 유기 염기와 생리학적으로 허용되는 염인 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0025] (9) 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 유기산은 구연산 (citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (tartaric acid), 말레인산, 푸마르산 (fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상인 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0026] (10) 상기 약학적 조성물은 희석제 또는 담체를 더 포함하는 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0027] (11) 경구형 제제 또는 비경구형 제제로 제형화된 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0028] (12) 상기 경구형 제제는 정제, 캡슐제, 환제, 산제, 과립제, 현탁화제 또는 시럽제이고, 상기 비경구형 제제는 크림제, 로션제, 연고제, 액제, 겔제, 카타플라스마제, 패취제, 에어로솔제, 유동액스제, 엘릭서제, 침제, 향낭, 또는 주사제인 것인 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0029] (13) 자소엽을 50 %(v/v) 내지 100 %(v/v) 에탄올로 추출하는 단계;
- [0030] 상기 단계로부터 얻어진 에탄올 추출물을 30 %(v/v) 내지 99 %(v/v) 디클로로메탄으로 분획하는 단계; 및
- [0031] 상기 단계로부터 얻어진 디클로로메탄 분획물을 실리카젤 컬럼크로마토그래피법으로 분리하여 청구항 1의 화학식 1의 화합물을 얻는 단계를 포함하는, 상기 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법.
- [0032] (14) 자소엽 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 식품용 조성물:

[0033] [화학식 1]



[0034]

발명의 효과

[0036] 일 양상에 따른 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염은 IL-17의 생성을 억제하고, 보다 구체적으로는 Th17 세포의 분극화 (polarization)를 억제하여 IL-17의 발현을 효과적으로 억제할 수 있다. 이에 따라 상기 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자가면역질환 예방, 개선, 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 자소엽 추출물의 용매 분획 과정 (scheme)을 나타낸다.
- 도 2A는 자소엽, 천년초 열매, 천년초 줄기, 및 구절초의 각 에탄올 추출물의 독성 평가에 따른 세포 생존률 (%)를 나타내고, 도 2B는 자소엽, 천년초 열매, 천년초 줄기, 구절초, 및 녹차의 각 에탄올 추출물의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- 도 3A는 자소엽 분획물의 독성 평가에 따른 세포 생존률(%)를 나타내고, 도 3B는 자소엽 분획물의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- 도 4A는 자소엽 디클로로메탄 (DCM) 분획물의 독성 평가에 따른 세포 생존률(%)를 나타내고, 도 4B는 상기 DCM 분획물의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- 도 5는 자소엽 디클로로메탄 (DCM) 각 서브 분획물의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- 도 6은 PFD4-2 서브 분획물 (subfraction)의 TLC 결과를 나타낸다.
- 도 7A는 PFD4-2-5-6의 ¹H-NMR 스펙트럼(400MHz, CD₃OD) 결과를 나타낸다.
- 도 7B는 PFD4-2-5-6의 ¹³C-NMR 스펙트럼(100MHz, CD₃OD) 결과를 나타낸다.
- 도 7C는 자소엽 디클로로메탄 분획물로부터 활성 성분으로 분리한 화합물인 토멘트산의 구조를 나타낸다.
- 도 8은 자소엽 에탄올 추출물의 디클로로메탄 분획물로부터 토멘트산의 분리 과정을 나타낸다.
- 도 9는 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산)과 로즈마린산을 이용하여 측정된 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- 도 10은 자소엽 에탄올 추출물, 자소엽으로부터 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산), 토멘트산 표준품, 및 PFD 2-3-2-2 (우르솔산)을 이용하여 측정된 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- 도 11은 DSS 유발 염증성 장염 모델에 자소엽 추출물과 이로부터 분리한 토멘트산의 처치 과정을 나타낸다.
- 도 12A 및 12B는 DSS 유발 염증성 장염 동물 모델에서 자소엽 추출물, 토멘트산, 메살라진 처치 후 장의 길이 변화를 측정된 결과를 나타낸다.
- 도 13A 및 13B는 DSS 유발 염증성 장염 동물 모델에서 장의 조직학적 변화를 나타낸다.
- 도 14A, 14B, 14C는 각각 비장 (Spleen), 장간막림프절(mesenteric lymph nodes, MLN), 점막 고유층 백혈구 (lamina propria leukocytes, LPL)에서 CD4⁺ IL-17⁺ 세포 발현률(%)을 나타낸다.

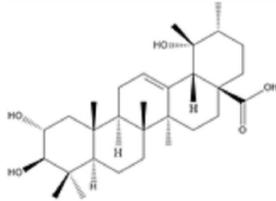
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 전체가 참고로 통합된다.

[0042] 일 양상은 자소엽 추출물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0043] [화학식 1]



[0044]

[0046] 본 명세서에서 사용된 용어 "자가면역질환"은 면역계의 이상으로 자기 세포를 공격하거나 자가 기관에 이상반응을 일으키는 질환을 말한다. 예를 들어, 류마티스 관절염, 크론병, 전신성 경피증 (Progressive systemic sclerosis, Scleroderma), 전신 홍반성 낭창 (lupus), 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 자가면역성 용혈성 빈혈 (Autoimmune hemolytic anemia), 중증 근무력증 (Myasthenia gravis), 그레이브씨 갑상선 항진증 (Grave's disease) 또는 염증성 장질환을 들 수 있다.

[0047] 일 구체 예에서, 상기 자가면역질환은 염증성 장 질환이다. 크론병, 궤양성 대장염 등으로 나타나는 염증성 장 질환은 점막의 과도한 염증으로 발생하는 만성 염증성 자가면역질환이다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 용어 "추출"은 생약의 성분을 약학적 조성물에 편입하기 위하여 분리하는 것을 의미한다. 다만, 단계별 구체적인 내용에 따라 생약에서 유효성분을 분리하는 최초 단계의 의미로 선택 될 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 "자소엽 (Perilla leaves, *Perilla frutescens* var. *acuta*)"은 꿀풀과에 속하는 1년생 초본인 차조기 (*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO.)의 잎을 지칭한다.

[0051] 상기 자소엽 추출물의 추출 용매는 물 또는 유기용매, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 유기용매는 예를 들어, C₁ 내지 C₄의 알코올, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 또는 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다.

[0052] 상기 알코올은 1 내지 100% (v/v)일 수 있다. 또는 상기 알코올은 알코올의 희석수 예컨대 알코올을 1 내지 99%(v/v)로 물에 희석하여 제공될 수 있다.

[0053] 일 구체 예에서, 상기 자소엽 추출물의 추출용매는 물, C₁ 내지 C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물이다. 일 구체 예에서, 상기 추출용매는 에탄올일 수 있다.

[0054] 일 구체 예에 따른 에탄올은 자소엽 추출물로부터 토멘트산을 높은 함량으로 추출하기에 바람직한 추출용매이다. 예를 들어, 물 추출 시에는 토멘트산이 거의 포함되지 않으므로 에탄올 추출이 보다 바람직하다. 또한, 메탄올 추출 시에는 메탄올로 인한 독성이 있으므로 약학적 조성물 또는 식품용 조성물로 사용하기 위해 에탄올 추출이 보다 바람직하다.

[0055] 충분하고 효과적인 유효 성분 추출을 위하여 상기 추출 용매는 자소엽 중량을 기준으로 1 내지 30배 부피 배, 바람직하게는 2 내지 10 부피 배일 수 있다. 상기 "부피 배"란 자소엽의 중량과 대비한 용매의 부피, 즉, g 당 ml에 대응하는 배수를 의미한다.

[0056] 상기 추출물의 추출온도는, 4℃ 내지 120℃에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 추출시간은 12시간 내지 120시간일 수 있다. 상기 추출온도가 4℃보다 낮은 경우 추출이 잘 안 될 수 있으며, 120℃를 넘는 경우 추출물이 변성될 수 있다. 상기 추출시간이 12시간보다 낮은 경우 유효성분이 일부 추출되지 않을 수 있으며, 120시간을 넘길 경우 유효성분 이외의 불순물 성분이 함께 추출될 수 있으므로 바람직하지 않다. 또는 상기 추출온도는 상온일 수

있다.

- [0057] 필요에 따라 추출과정은 1 내지 10회, 예를 들어 2 내지 5회 반복할 수 있다.
- [0058] 상기 자소엽 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [0059] 상기 자소엽 추출물은 추출 용매로 추출 후, 자소엽 찌꺼기를 제거하고, 필터 페이퍼로 여과한 후 여액을 진공회전농축기 또는 진공건조기를 사용하여 농축한 후, 실온에서 보관할 수 있다.
- [0061] 더 나은 유효 활성 물질을 얻기 위해서, 혹은 불순물을 제거하기 위해서 분획과정이 추가될 수 있다. 상기 분획이란 추출물에 분획 용매를 가하여 분리하는 수단을 의미한다. 추출에 이은 분획물은 자소엽 추출물에 분획 용매를 가하여 분획하여 얻어지며, 예컨대, 상기 얻어진 자소엽 추출물에 물, C₁ 내지 C₅의 직쇄 또는 분지형 알코올, 헥산, 디클로로메탄 에틸아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 에테르 및 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 분획 용매를 가하여 분획하여 얻어진 것일 수 있다.
- [0062] 상기 분획 용매로서 2종 이상을 사용하는 경우, 분획물은 2종 이상의 분획 용매를 동시 또는 순서에 따라 사용하여 용매 분획을 수행하여 얻어진 각각의 용매 분획물일 수 있다. 예컨대, 분획물은 n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물의 순서에 따라 용매 분획을 수행하여 얻어진 각각의 용매 분획물일 수 있다.
- [0063] 상기 분획 용매는 예를 들어, 10 %(v/v) 내지 99 %(v/v) 수용액이거나 또는 농도 100%(v/v)의 용매일 수 있다.
- [0064] 일 구체 예에서, 상기 화학식 1의 화합물은 자소엽 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 클로로포름으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 유기용매 또는 물을 이용하여, 동시 또는 순차적으로 분획 과정을 더 실시하여 분획물로 얻어질 수 있다.
- [0065] 일 구체 예에서, 상기 화합물은 자소엽 추출물에 물, C₁ 내지 C₅의 직쇄 또는 분지형 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하여 분리된다 .
- [0066] 일 구체 예에서, 상기 화합물은 자소엽 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하여 분리된다.
- [0067] 일 구체 예에서, 상기 화합물은 자소엽 에탄올 추출물에 헥산, 디클로로메탄, 및 에틸아세테이트를 순차적으로 첨가하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 자소엽 에탄올 추출물의 디클로로메탄 (dichloromethane, DCM) 분획물로부터 분리될 수 있다.
- [0068] 상기 분획온도는 4℃ 내지 120℃에서 수행될 수 있다. 또는, 상기 분획온도는 상온일 수 있다.
- [0070] 필요한 경우 당업계에 공지된 여과, 농축, 동결건조 방법이 추가적으로 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용된 추출물 및/또는 분획물의 건조물 또는 농축물은 위와 같이 공지된 방법으로 건조 또는 농축된 것을 의미한다.
- [0071] 필요에 따라 분획과정은 1 내지 10회, 예를 들어 2 내지 5회 반복할 수 있다.
- [0072] 필요에 따라 분획과정 전에 추출물의 현탁 과정을 거칠 수 있다.
- [0073] 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획추출물은 진공회전농축기 또는 진공건조기를 사용하여 농축한 후, 실온에서 보관할 수 있다.
- [0075] 일 구체 예에서, 상기 분리는 디클로로메탄으로 분획하여 얻어진 디클로로메탄층을 실리카겔 컬럼크로마토그래피법을 통해 분리할 수 있다.
- [0076] 일 구체 예에서, 실리카겔 컬럼크로마토그래피법은 용매의 농도구배법(gradient method)을 통해 분리할 수 있다.
- [0077] 일 구체 예에서, 상기 염은 무기산, 유기산, 무기 염기 또는 유기 염기와의 생리학적으로 허용되는 염일 수 있다.
- [0078] 일 구체 예에서, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 유기산은 구연산 (citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (tartaric acid), 말레인산, 푸마르산 (fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산,

글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 또는 아스파르트산으로 이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

- [0079] 상기 염은 약학적으로 허용 가능한 염 또는 식품학적으로 허용 가능한 염일 수 있다. 용어 "약학적으로 허용 가능한 염" 또는 "식품학적으로 허용 가능한 염"은 일반적으로 안전하며, 무독성이고, 생물학적으로도 다른 측면으로도 부적합하지 않아 약학적 및 식품학적 조성물의 제조에 사용가능함을 말한다.
- [0081] 상기 화학식 1의 화합물은 시험관적으로 합성되거나 생약에서 추출될 수 있다. 생약에서 추출할 경우 자소엽으로부터 분리 추출할 수 있다.
- [0082] 상기 화학식 1의 화합물은 토멘트산 (tormentic acid)으로 지칭될 수 있다.
- [0083] 상기 화학식 1로 표시되는 토멘트산 화합물 또는 그의 염은 세포의 분화 조절에 관여하여 Th17 관련 사이토카인 및 전사인자인 IL-17A 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0084] Th17 세포는 점막 표면에 축적되고 숙주를 박테리아 및 곰팡이 감염으로부터 보호하는 필수 T 세포 하위 집합이다. 또한, 보호 면역 기능 외에도 자가면역 염증의 중요한 이펙터(effector) 역할을 한다. Th17 세포는 IL-17A, IL-17F, IL-21, 및 IL-22 사이토카인의 분비를 특징으로 한다. Th17 세포가 조절되지 않거나 부적절한 활성화는 여러가지 염증 병리에서 중요한 역할을 한다.
- [0085] 상기 화학식 1로 표시되는 토멘트산 화합물 또는 그의 염은 IL-17의 생성을 억제하고, 보다 구체적으로는 Th17의 분극화 (polarization)를 억제하여 IL-17의 발현을 효과적으로 억제할 수 있다. 이에 따라 상기 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자가면역질환 예방, 개선, 또는 치료에 이용될 수 있다.
- [0086] 본 명세서에서 사용된 용어 "T 도움 17 세포 (Th17, Th17 cells, T helper 17 cells)"는 염증 전 도움 T 세포 중에서 인터루킨17 (IL-17)을 생성하는 집단을 말한다. 이들은 조절 T 세포와 관련되며, Th17s를 분화시켜 실제 조절 T세포 분화를 억제하는 신호들과 관련된다. Th17s는 발달상에 있어서 Th1, Th2와는 구별된다. Th17 세포는 점막 장벽을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 점막 표면에서 병원체를 없애는데 기여하지만, 또한 자가면역 질환과 염증성 질병과 연관된다. 점막 표면에서 Th17 세포가 줄어드는 것은 만성 염증과 미생물이 전이되는 것 과도 연관된다.
- [0087] 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 자가면역질환 예방, 개선 또는 치료에 탁월한 용도를 제공한다.
- [0089] 상기 약학적 조성물 중의 화학식 1의 화합물은 이의 유도체, 이성질체, 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물로 제공될 수 있다.
- [0090] 상기 유도체 (derivative)는 상기 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 말한다. 용어 "치환"은 유기 화합물 중의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자단으로 치환하여 유도체를 형성한 경우 수소 원자 대신에 도입되는 것을 말하고, "치환기"는 도입된 원자단을 말한다. 치환기는 예를 들면, 히드록시기, 할로젠 원자(예, 불소(F), 염소(Cl), 브롬(Br), 및 요오드(I)), C₂ 내지 C₁₀ 알케닐기, C₂ 내지 C₁₀ 알킬기, C₁ 내지 C₁₀ 헤테로알킬기, C₆ 내지 C₁₀ 아릴기, C₆ 내지 C₁₀ 헤테로아릴기, C₁ 내지 C₁₀의 알콕시, 니트로기, 시아노기, 아미노기, 카르복실기나 그의 염, 술폰닐기, 술포모일(sulfamoyl)기, 술폰산기나 그의 염, 인산이나 그의 염, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0091] 상기 이성질체는 구조 이성질체 또는 입체이성질체일 수 있다.
- [0092] 상기 용매화물 (solvate)은 유기 또는 무기 용매에 용매화된 화합물을 말한다. 상기 용매화물은 예를 들어, 수화물이다.
- [0094] 일 구체 예에서, 상기 약학적 조성물은 희석제 또는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 희석제 또는 담체는 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 부형제는 미결정 셀룰로오스, 유당, 또는 저치환도 히드록시셀룰로오스 등으로 예시 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 붕해제는 전분글리콜산 나트륨, 또는 무수인산일수소 칼슘 등으로 예시 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 또는 히드록시프로필셀룰로오스 등으로 예시 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 활택제는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 또는 탈크 등으로 예시 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0095] 상기 희석제 또는 담체는 조성물 100 중량부당 예컨대 0.001 내지 90 중량부의 범위에서 적절하게 선택될 수 있다.
- [0097] 일 구체 예에서, 경구형 제제 또는 비경구형 제제로 제형화될 수 있다.
- [0098] 일 구체 예에서, 상기 경구형 제제는 정제, 캡슐제, 환제, 산제, 액제, 건조시럽제, 과립제, 현탁화제 또는 시럽제로 예시될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 비경구형 제제는 크림제, 로션제, 연고제, 액제, 겔제, 카타플라스마제, 패취제, 에어로솔제, 유동엑스제, 엘릭서제, 침제, 향낭, 주사제, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대 등으로 예시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0099] 상기 조성물의 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피 (transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하 투여와 같은 경로로, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.
- [0101] 다른 일 양상은, 자소엽을 50 %(v/v) 내지 100 %(v/v) 에탄올로 추출하는 단계;
- [0102] 상기 단계로부터 얻어진 에탄올 추출물을 30 %(v/v) 내지 99 %(v/v) 디클로로메탄으로 분획하는 단계; 및
- [0103] 상기 단계로부터 얻어진 디클로로메탄 분획물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피법으로 분리하여 상기 화학식 1의 화합물을 얻는 단계;를 포함하는, 상기 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0105] 다른 일 양상은, 자소엽 추출물로부터 분리된 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 식품용 조성물을 제공한다.
- [0106] 상기 식품용 조성물은 예를 들어 자가면역질환을 앓고 있는 환자 또는 자가면역질환을 앓을 수 있는 사람에 대한 의약품, 보조제, 건강 식품 또는 기능성 식품으로 이용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 우유, 요플레 등의 각종 낙농제품, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등의 식음료, 빵, 초코렛, 캔디류, 과자류 등의 스낵류를 포함하여, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0107] 상기 식품 조성물은 보조식품, 건강기능식품으로도 제공될 수 있다.
- [0109] 또 다른 일 양상은 자소엽 추출물로부터 분리된 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 방법을 제공한다.
- [0110] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 개체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0111] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 개체에서 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제 (b) 질환 또는 질병의 경감 및 (c) 질환 또는 질환의 제거를 의미한다.
- [0112] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개선"은 개체에서 질환 또는 질병의 증세가 호전되는 모든 행위를 의미한다.
- [0113] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 상기 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이, 래트, 마우스, 침팬지 등의 포유동물을 의미한다.
- [0114] 본 명세서에서 사용된 용어 "유효성분으로 포함"은 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 내 유효성분의 함량은 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [0116] 일 구체 예에서, 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 약학적 조성물 전체 중량을 기초로 1 내지 80 중량%의 양으로 포함될 수 있으며, 용매화물 또는 약학적으로 허용가능한 염 형태로 제공될 수도 있다.
- [0117] 일 구체 예에서, 자소엽 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 식품 조성물 전체 중량을 기초로 1 내지 80 중량%의 양으로 포함될 수 있으며, 용매화물 또는 식품학적으로 허용가능한 염 형태로 제공될 수도 있다.
- [0118] 또한, 조성물 중에서는 상기 유효성분 이외에 공지의 자가면역질환 치료제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0120] 상기 조성물 중 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 약학적으로 또는 식품학적으로 유효한 함량으로 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 조성물 중 0.001 내지 1000 nM의 농도로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물 중 5 nM, 10 nM, 25 nM, 30nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 75 nM, 100 nM, 또는 이들 수치를 상한 또는 하한으로 하는 범위로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물 중 1 내지 10 M의 농도로 존재할 수 있다.
- [0121] 또는 상기 조성물 중 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 0.001 내지 200 µg/mL, 예를 들어 0.5, 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 µg/mL 또는 이들을 상한 또는 하한으로 하는 범위 예컨대 0.5 내지 30 µg/mL, 1 내지 20 µg/mL, 4 내지 15 µg/mL, 7 내지 10 µg/mL, 0.1 내지 100 µg/mL 일 수 있다.
- [0122] 또는 상기 조성물 중 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 0.1 µg/mL 이상으로 포함될 수 있다.
- [0123] 예를 들어, 상기 조성물 중 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 자가면역질환 예방, 치료, 또는 개선을 위해 필요한 1일 투여량의 전부, 1/2, 또는 1/3의 양으로 포함될 수 있다.
- [0125] 또는 상기 조성물 중 자소엽 에탄올 추출물 또는 이로부터 분리된 디클로로메탄 분획물은 0.001 내지 100 µg/mL, 예를 들어 0.5, 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 15, 20, 30 µg/mL 또는 이들을 상한 또는 하한으로 하는 범위 예컨대 0.5 내지 30 µg/mL, 1 내지 20 µg/mL, 4 내지 15 µg/mL, 7 내지 10 µg/mL 일 수 있다.
- [0126] 또는 상기 조성물 중 자소엽 에탄올 추출물 또는 이로부터 분리된 디클로로메탄 분획물은 0.1 µg/mL 이상으로 포함될 수 있다.
- [0128] 상기 조성물은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용가능한 첨가제 또는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0129] 상기 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사 등은 소망하는 치료, 예방 또는 개선에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 일 구체 예에 따르면, 상기 조성물의 1일 투여량은 0.001 내지 10 g/kg일 수 있다.
- [0130] 예를 들어, 자가면역질환 치료용 약학적 조성물의 투여량은 유효성분의 흡수도, 불활성물 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0131] 예를 들어, 자소엽 에탄올 추출물, 이의 디클로로메탄 분획물, 또는 이로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이들의 혼합물은 10 내지 100 mg/kg(체중), 20 내지 80 mg/kg(체중), 또는 25 내지 50 mg/kg(체중)으로 투여될 수 있다.
- [0133] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0135] **실시예 1. 자소엽 에탄올 추출물의 제조**
- [0137] 자소엽을 6 kg (국내산, 영천)을 구매하여 100% 에탄올로 추출하였다. 에탄올 추출물 650 g을 수득 하였다. 이 과정을 3번 반복 하고, 농축액은 사용할 때까지 4℃에서 보관하였다.
- [0139] **실시예 2. 자소엽 에탄올 추출물로부터 분획물의 제조**
- [0141] 실시예 1에서 제조된 자소엽 에탄올 추출물을 극성 차이를 이용하여 섞이지 않는 용매로 분획하였다. 구체적으로 상기 에탄올 추출물을 n-헥산, 디클로로메탄 (DCM), 에틸아세테이트 (EtOAc), 부탄올 및 물을 이용하여 극성별로 분획을 진행하여 헥산 층, DCM 층, EtOAc 층, 부탄올층 및 물층을 얻었다. 이 과정을 3번 반복 하고, 농축액은 사용할 때까지 4℃에서 보관하였다.
- [0142] 도 1은 자소엽 추출물의 용매 분획 과정 (scheme)을 나타낸다.
- [0143] 보다 구체적으로 도 1은 자소엽 에탄올 추출물의 n-헥산, 디클로로메탄 (DCM), 에틸아세테이트 (EtOAc), 부탄올 및 물을 이용한 용매 분획 과정을 나타낸다.

- [0145] **비교예 1. 천년초 열매, 천년초 줄기, 구절초, 및 녹차의 에탄올 추출물 제조**
- [0147] 실시예 1에 기재된 자소엽 에탄올 추출물의 제조 방법과 동일한 방법으로 천년초 열매, 천년초 줄기, 구절초, 및 녹차로부터 각 에탄올 추출물을 수득하였다.
- [0149] **시험예 1. 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 에탄올 추출물의 독성 평가 및 IL-17A의 발현량 측정**
- [0151] 실시예 1에서 수득한 자소엽 에탄올 추출물과 비교예 1에서 수득한 천년초 열매, 천년초 줄기, 구절초, 및 녹차의 각 에탄올 추출물을 이용하여 독성 평가 및 IL-17A의 발현량을 측정하였다.
- [0153] (1) 독성 평가 (세포 활성 측정)
- [0154] B6 마우스 6주령에서 채장을 꺼낸 후 CD4-beads를 이용하여 MACS positive separation으로 CD4⁺ T 세포만을 분리하였고, 96-multi well plate에 5 x 10⁵ 세포를 seeding하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양 하였다. 배양된 세포에 자소엽, 천년초 열매, 천년초 줄기, 및 구절초의 각 에탄올 추출물 (2, 5, 10 µg/mL)을 각각 처리한 다음, 1일간 배양한 후 MTT를 추가하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 이후 0.04N HCl in isopropanol 100 ul를 넣어 formazan을 녹여낸 후 570 nm에서 microplate reader (Emax, Molecular Devices)를 이용하여 흡광도를 측정하여 세포활성을 측정하였다. 대조군은 DMSO 처리군으로 하였다.
- [0155] 도 2A는 자소엽, 천년초 열매, 천년초 줄기, 및 구절초의 각 에탄올 추출물의 독성 평가에 따른 세포 생존률 (%)를 나타낸다.
- [0156] 보다 구체적으로 도 2A는 상기 각 에탄올 추출물을 2, 5, 10 µg/mL 로 농도를 달리하여 측정한 독성 평가 결과를 나타낸다.
- [0157] 도 2A에서 보는 바와 같이 각 에탄올 추출물은 세포 독성을 보이지 않았다.
- [0159] (2) IL-17A 발현률(%) 측정 (IL-17A 억제 효과 측정)
- [0160] B6 마우스 6주령에서 채장을 꺼낸 후 CD4-beads를 이용하여 MACS positive separation으로 CD4⁺ T 세포만을 분리하였고, 분리한 CD4⁺ T 세포를 anti-CD3, CD28 (각 1 µg/ml) 항체를 코팅한 12-multi well plate에 1.2 x 10⁶ 세포를 seeding하고 Th17으로의 분화를 위하여 IL-6, TGF-β를 각각 25 ng/ml 및 2.5 ng/ml 의 농도로 처리 하였다. 배양된 세포에 자소엽, 천년초 열매, 천년초 줄기, 구절초, 및 녹차의 각 에탄올 추출물 (5, 10 µg/mL)을 처리한 다음, 1-3일간 배양한 후 CD4-APC와 IL-17A-PE intracellular staining kit로 염색한 후 FACS로 IL-17A 발현량을 측정하였다. 대조군은 DMSO 처리군으로 하였다.
- [0161] 도 2B는 자소엽, 천년초 열매, 천년초 줄기, 구절초, 및 녹차의 각 에탄올 추출물의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- [0162] 보다 구체적으로 도 2B는 상기 각 에탄올 추출물을 5, 10 µg/mL 로 농도를 달리하여 측정한 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- [0163] 도 2B에서 보는 바와 같이 자소엽 에탄올 추출물은 5, 10 µg/mL 농도에서 모두 IL-17A 발현을 효과적으로 억제 하였다.
- [0165] **시험예 2. 실시예 2에서 제조한 자소엽 분획물의 독성 평가 및 IL-17A 발현량의 측정**
- [0167] 실시예 2에서 자소엽 에탄올 추출물로부터 수득한 헥산 분획물 (HEX FR.), 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.), 에틸아세테이트 분획물 (EA FR.), 부탄올 분획물 (BuOH FR.), 물 분획물 (Water FR.)을 이용하여 독성 평가 및 IL-17A의 발현량을 측정하였다.
- [0169] (1) 독성 평가 (세포 활성 측정)
- [0170] B6 마우스 6주령에서 채장을 꺼낸 후 CD4-beads를 이용하여 MACS positive separation으로 CD4⁺ T 세포만을 분리하였고, 96-multi well plate에 5 x 10⁵ 세포를 seeding하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양 하였다. 배양된 세포에 자소엽 에탄올 추출물의 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 각각 10, 20, 50, 100 µg/mL 의 농도로 처리한 다음, 1일간 배양한 후 MTT를 추가하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 이후 0.04N HCl in isopropanol 100 ul를 넣어 formazan을 녹여낸 후 570 nm에서 microplate reader (Emax, Molecular Devices)를

이용하여 흡광도를 측정하여 세포활성을 측정하였다. 대조군은 DMSO 처리군으로 하였다.

[0171] 도 3A는 자소엽 핵산 분획물 (HEX FR.), 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.), 에틸아세테이트 분획물 (EA FR.), 부탄올 분획물 (BuOH FR.), 물 분획물 (Water FR.)의 독성 평가에 따른 세포 생존률(%)을 나타낸다.

[0172] 보다 구체적으로 도 3A는 상기 각 자소엽 분획물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 농도를 달리하여 측정한 독성 평가 결과를 나타낸다.

[0174] (2) IL-17A 발현률(%) 측정 (IL-17A 억제 효과 측정)

[0175] B6 마우스 6주령에서 채장을 꺼낸 후 CD4-beads를 이용하여 MACS positive separation으로 CD4+ T 세포만을 분리하였고, 분리한 CD4⁺ T 세포를 anti-CD3, CD28 (각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 항체를 코팅한 12-multi well plate에 1.2 x 10⁶ 세포를 seeding하고 Th17으로의 분화를 위하여 IL-6, TGF- β 를 각각 25 ng/ml 및 2.5 ng/ml 의 농도로 처리하였다. 배양된 세포에 자소엽 에탄올 추출물의 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 각각 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 다음, 1-3일간 배양한 후 CD4-APC와 IL-17A-PE intracellular staining kit로 염색한 후 FACS로 IL-17A 발현량을 측정하였다. 대조군은 DMSO 처리군으로 하였다.

[0176] 도 3B는 자소엽 핵산 분획물 (HEX FR.), 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.), 에틸아세테이트 분획물 (EA FR.), 부탄올 분획물 (BuOH FR.), 물 분획물 (Water FR.)의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.

[0177] 보다 구체적으로 도 3B 상기 각 자소엽 분획물을 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 농도를 달리하여 측정한 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.

[0178] 도 3B에서 보는 바와 같이, 자소엽 디클로로메탄 분획물은 IL-17A 발현을 특히 효과적으로 억제하였다.

[0180] **시험예 3. 실시예 2에서 제조한 자소엽 디클로로메탄 분획물의 독성 평가 및 IL-17A 발현량의 측정**

[0182] 실시예 2에서 자소엽 에탄올 추출물로부터 수득한 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.)을 이용하여 농도를 달리하여 독성 평가 및 IL-17A의 발현량을 측정하였다.

[0184] (1) 독성 평가 (세포 활성 측정)

[0185] 배양된 세포에 자소엽 에탄올 추출물로부터 수득한 디클로로메탄 분획물을 1, 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 시험예 2의 독성 평가와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0186] 도 4A는 자소엽 디클로로메탄 (DCM) 분획물의 독성 평가에 따른 세포 생존률(%)을 나타낸다.

[0187] 보다 구체적으로 도 4A는 대조군(100% 자소엽 에탄올 추출물, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 1, 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 자소엽 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.)을 이용하여 측정한 독성 평가 결과를 나타낸다.

[0188] 도 4A에서 보는 바와 같이 자소엽 디클로로메탄 분획물은 1, 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 모두 세포 독성을 보이지 않았다.

[0190] (2) IL-17A 발현률(%) 측정 (IL-17A 억제 효과 측정)

[0191] 배양된 세포에 자소엽 에탄올 추출물로부터 수득한 디클로로메탄 분획물을 1, 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 시험예 2의 IL-17A 발현률(%) 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

[0192] IL-6, TGF- β 만 추가하여 분화를 최대한 유도한 경우를 Th17로 하였다.

[0193] 도 4B는 대조군, Th17, 자소엽 에탄올 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (양성대조군)과 자소엽 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.)을 이용하여 측정한 IL-17A의 발현량 측정 결과를 나타낸다.

[0194] 보다 구체적으로 도 4B는 자소엽 디클로로메탄 분획물 (DCM FR.)을 0.1, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 농도를 달리하여 측정한 IL-17A의 발현량 측정 결과를 나타낸다.

[0195] 도 4B에서 보는 바와 같이, 자소엽 디클로로메탄 분획물은 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상 농도에서 모두 IL-17A 발현을 효과적으로 억제하였다.

[0197] **실시예 3. 자소엽 디클로로메탄 서브 분획물의 분리**

[0199] 실시예 2의 방법으로 자소엽 에탄올 추출물로부터 얻은 디클로로메탄 분획물 으로부터 활성 성분 유래 분리 (bioassay-guided isolation) 방법을 이용하여 활성 성분의 분리를 진행하였다. 먼저 자소엽 디클로로메탄 분획

물을 Silica Open Column Chromatography (chloroform : methanol = 100 : 1 ~ 50 : 1 ~ 20 : 1 ~ 10 : 1 ~ 5 : 5 ~ 0 : 1)를 실시하여 7개의 분획 (fraction)으로 나누고, 각 분획들의 활성을 확인하였다.

- [0200] 도 5는 자소엽 디클로로메탄 (DCM) 각 서브 분획물의 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- [0201] 그 결과 대체적으로 IL-17 발현 억제 활성이 높은 4번 fraction (PFD4)을 선택하였다.
- [0203] **실시에 4. 자소엽 디클로로메탄 분획물로부터 활성 성분의 분리**
- [0205] (1) 자소엽 DCM 분획물로부터 활성 성분의 분리
- [0206] 실시예 3의 방법으로 얻은 자소엽 디클로로메탄 분획물의 4번 분획 (PFD4) 선택하여 계속하여 유효성분을 분리하였다.
- [0207] PFD4 를 실리카젤을 고정상으로 사용한 오픈 컬럼크로마토그래피(chloroform : methanol = 100 : 1 ~ 20 : 1 ~ 1 : 1 ~ 0 : 1)에 적용하여 얻은 6개의 서브 분획 (subfraction) 중 얻었다. 이 중 가장 양이 많은 PFD4-2층을 선택하여 Silica Open Column Chromatography (chloroform : methanol = 100 : 1 ~ 0 : 1)를 실시하여 다시 7개의 서브 분획 (subfraction)을 확보하고 이 중 PFD4-2-5층(232 mg)을 선택하여 Silica Open Column Chromatography (chloroform : acetone = 4.5 : 1 ~ 3 : 1 ~ 1 : 1 ~ 0 : 1, methanol 100%)를 실시하였으며 그 결과 6번 분획 (4-2-5-6)의 단일물질을 활성 성분으로 확보하였다.
- [0208] 도 6는 PFD4-2 서브 분획물 (subfraction)의 TLC 결과를 나타낸다.
- [0210] (2) 자소엽 DCM 분획물로부터 분리된 활성 성분의 화합물 동정
- [0211] 도 7A는 PFD4-2-5-6의 ¹H-NMR 스펙트럼(400MHz, CD₃OD)를 나타낸다.
- [0212] 도 7B는 PFD4-2-5-6의 ¹³C-NMR 스펙트럼(100MHz, CD₃OD)를 나타낸다.
- [0213] 분리된 활성 성분인 화합물 1의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 결과를 문헌과 비교하여 토멘트산 (tormentic acid)으로 화합물 구조를 각각 동정하였다.
- [0215] **화합물 1** - White powder; C₃₀H₄₈O₅ MS *m/z* 489 [M+H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, Pyridine-*d*5): δ 5.52 (1H, brs, H-12), 4.04 (1H, ddd, *J*=10.5, 9.5, 4.5 Hz, H-2), 3.32 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 3.06 (1H, ddd, *J*=13.5, 12.5, 4.5 Hz, H-16), 2.98 (1H, s, H-18), 1.65 (3H, s, Me-27), 1.37 (3H, s, Me-29), 1.20 (3H, s, Me-23), 1.05 (3H, d, *J*=6.0 Hz, Me-30), 1.04 (3H, s, Me-26), 1.01 (3H, s, Me-24), 0.93 (3H, s, Me-25); ¹³C NMR (125 MHz, Pyridine-*d*5): δ 180.4 (C-28), 144.6 (C-13), 127.7 (C-12), 83.6 (C-3), 72.4 (C-19), 68.3 (C-2), 55.7 (C-5), 54.3 (C-18), 48.5 (C-17), 48.1 (C-9), 48.0 (C-1), 42.6 (C-20), 42.1 (C-14), 40.1 (C-8), 39.8 (C-4), 38.5 (C-10, C-22), 33.2 (C-7), 29.2 (C-23), 29.1 (C-15), 26.8 (C-29), 26.7 (C-21), 26.1 (C-16), 24.6 (C-27), 24.5 (C-11), 18.9 (C-6), 17.5 (C-24), 17.1 (C-26), 16.7 (C-25), 16.4 (C-30).
- [0217] 도 7C는 자소엽 디클로로메탄 분획물로부터 활성 성분으로 분리한 화합물인 토멘트산의 구조를 나타낸다.
- [0218] 도 8은 자소엽 에탄올 추출물의 디클로로메탄 분획물로부터 토멘트산의 분리 과정을 나타낸다.
- [0220] **시험예 4. Th17 억제 효과의 평가**
- [0222] 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산), PFD 2-3-2-2 (우르솔산), 표준품으로 구입한 토멘트산 (tormentic acid)과 별도로 구입한 로즈마린산 (Rosmarinic acid)을 이용하여 Th17 억제 효과를 측정하였다.
- [0223] IL-6, TGF-β으로 분화된 세포에 PFD 4-2-5-6, PFD 2-3-2-2, 표준품 토멘트산 또는 로즈마린산을 처리한 후 IL-17A 발현량을 측정하여 Th17 분화 억제 정도를 평가하였다.
- [0224] 도 9 및 도 10에서 Th0는 분화를 위한 IL-6, TGF-β를 처리하지 않은 군을 지칭한다. 또한, 도 9 및 도 10에서 Th17은 IL-6, TGF-β만 추가하여 분화를 최대한 군을 지칭한다.
- [0225] 도 9은 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산)과 로즈마린산을 이용하여 측정한 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다. 자소엽의 DCM층에 가장 많은 함유량을 차지하는 로즈마린산은 추출물 표준화를 위한 지표성분으로 활용하기 위해 그 효과를 함께 측정하였다.

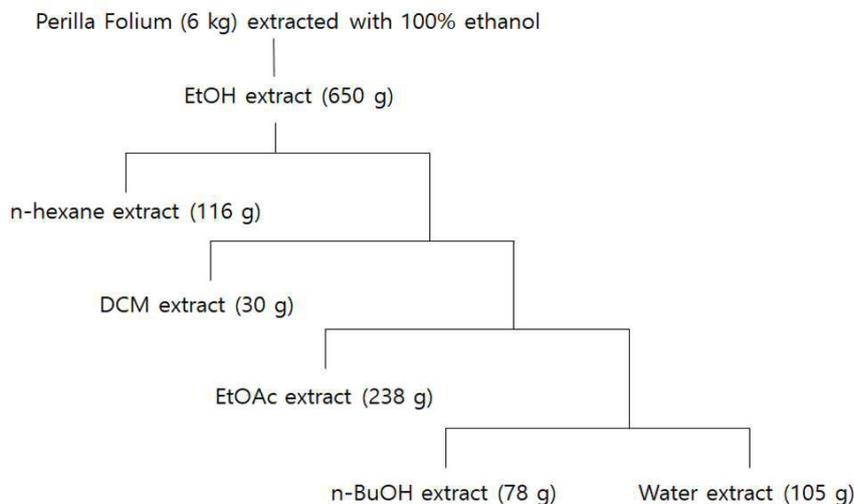
- [0226] 보다 구체적으로 도 9은 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산)과 별도로 Sigma에서 구입한 로즈마린산을 각각 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 하여 측정된 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- [0227] 도 9로부터 자소엽에서 분리한 토멘트산과 로즈마린산이 IL-17A 발현을 억제함을 확인하였고, 이로부터 Th17 억제 효능을 확인할 수 있었다.
- [0229] 도 10은 자소엽 에탄올 추출물, 자소엽으로부터 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산), 토멘트산 표준품 (토멘트산, Core Sciences에서 구입), 및 PFD 2-3-2-2 (우르솔산)을 이용하여 측정된 Th17A 발현률(%)을 나타낸다.
- [0230] 보다 구체적으로 도 10은 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 자소엽 에탄올 추출물, 1, 2, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산), 1, 2, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 토멘트산 (tormentic acid) 표준품, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 자소엽에서 분리한 PFD 2-3-2-2 (우르솔산)을 이용하여 측정된 IL-17A 발현률(%)을 나타낸다.
- [0232] 도 10로부터 자소엽 에탄올 추출물로부터 분리한 토멘트산 (PFD 4-2-5-6)이 IL-17A 발현을 억제함을 확인하였고, 이로부터 Th17 억제 효능을 확인할 수 있었다.
- [0234] 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 (토멘트산)은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 표준품으로 구매한 토멘트산은 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 유의한 IL-17A 발현을 억제 효과를 보이며 억제 비율에 대한 scale이 크게 상이하지 않아 자소엽에서 분리한 PFD 4-2-5-6 과 표준품으로 구매한 토멘트산이 동등한 정도의 효능을 보임을 확인하였다.
- [0236] **시험예 5. 덱스트란 설페이트 나트륨 (dextran sulfate sodium, DSS) 유발 염증성 장염 모델에서 자소엽으로부터 분리된 토멘트산의 효과 측정**
- [0238] 7주령의 C57BL/6 (male) 생쥐를 오리엔트바이오에서 구매하여 SPF 컨디션에서 순화과정을 거쳤다 ((IACUC number: #202000120). 장염증 유발을 위해 2.5% DSS 함유한 음용수를 7일간 제공하였으며, 물 소비량을 매일 체크하였다 (6마리씩 6 그룹으로 분리하여 실험함).
- [0239] 비히클 (vehicle, 콘 오일) 처리군을 음성 대조군으로 하였다. 또한, DSS만 처리한 군 (DSS 유발 및 약물 미 처리군)을 양성 대조군으로 하였다.
- [0240] DSS 및 자소엽 에탄올 추출물 50 mg/kg/day 처리군, DSS 및 토멘토산 25 mg/kg/day 처리군, DSS 및 토멘토산 50 mg/kg/day 처리군, DSS 및 메살라진 (mesalazine) (50 mg/kg/day p.o.) 처리군을 시험군으로 하였다.
- [0241] 7일 후 2.5% DSS 포함 물은 물로 대체하고 1일 후에 (8일째) 동물을 희생하여, 비장 (Spleen), 장간막림프절 (mesenteric lymph nodes, MLN) 및 창자 (intestine)를 적출하여 실험하였다.
- [0243] 도 11은 DSS 유발 염증성 장염 모델에 비히클, 자소엽 에탄올 추출물, 자소엽 추출물로부터 분리한 토멘트산, 그리고 메살라진의 처치 과정을 나타낸다.
- [0244] 도 12A 및 12B는 DSS 유발 염증성 장염 동물 모델에서 자소엽 에탄올 추출물, 토멘트산, 메살라진 처치 후 장의 길이 변화를 측정된 결과를 나타낸다.
- [0245] 도 12A는 비히클 처리군 (Control), DSS 유발 및 약물 미처리 군 (DSS), DSS 및 자소엽 에탄올 추출물 50 mg/kg/day 처리군 (P.F extracts 50 mg/kg), DSS 및 토멘토산 25 mg/kg/day 처리군 (Tormentic acid 25 mg/kg), DSS 및 토멘토산 50 mg/kg/day 처리군 (Tormentic acid 50 mg/kg), DSS 및 메살라진 (mesalazine) 50 mg/kg/day 처리군 (Mesalazine 50 mg/kg)을 처치 후 장의 길이 변화를 측정된 결과를 나타낸다. 또한, 도 12B는 이를 그래프로 표현한 것이다.
- [0246] 장염증이 심할수록 장의 길이가 짧아지며, 대조군 (Control)에 가까울수록 장염증이 개선된 것을 의미한다.
- [0247] 도 12A 및 도 12B에서 보는 바와 같이, DSS만 처리한 군 (DSS)은 비히클 처리군 (Control)에 비해 장의 길이가 현저히 줄어든 반면에 토멘트산 25 mg/kg를 투여한 생쥐의 경우 DSS에 의한 장 길이 감소가 현저히 억제되었다.
- [0248] 또한, 도 12A 및 도 12B에서 보는 바와 같이, 자소엽 추출물로부터 분리한 토멘트산이 DSS에 의해 유발된 염증성 장염으로 인한 장의 길이 감소를 유의미하게 억제하였다.
- [0250] 도 13A 및 13B는 DSS 유발 염증성 장염 동물 모델에서 장의 조직학적 변화를 나타낸다.
- [0251] 보다 구체적으로 도 13A는 생쥐에서 장(colon)의 조직학적 사진을 H&E 염색법으로 측정된 결과를 나타낸다. 비히클 처리군 (Control) 에 비해 DSS 처리군의 점막층 (mucosa layer)이 파괴된 것을 관찰할 수 있는데, 반면 토멘트산 25 mg/kg를 함께 처리한 군에서는 약간의 부종 (edema)이 관찰되나 DSS 처리군보다 점막층의 파괴가 현

저히 개선되었다.

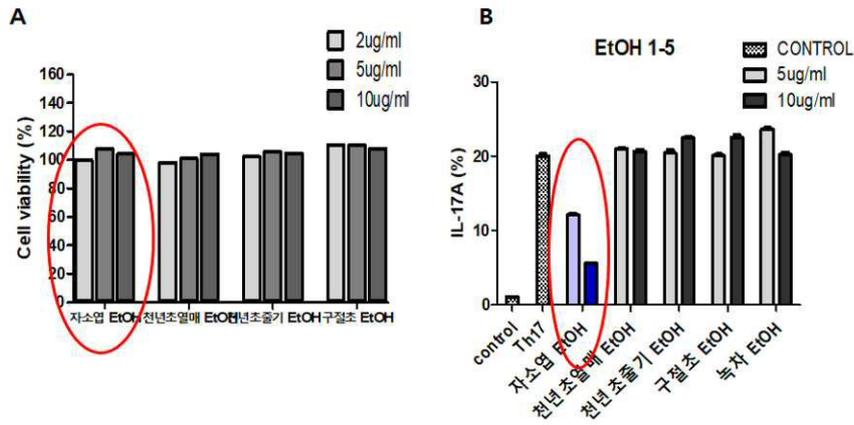
- [0252] 또한, 도 13B는 염색한 조직의 병리학적인 병증의 심각도를 수치로 표시한 것 것이다.
- [0253] 도 13A 및 13B는 자소염으로부터 분리된 토멘트산이 DSS에 의해 유발된 장의 조직학적 변화를 유의미하게 억제함을 나타낸다.
- [0254] 또한 토멘트산 25 mg/kg 또는 50 mg/kg 처리 군에서 DSS에 의해 유발된 장의 조직학적 변화가 메살라진 50 mg/kg 투여군 보다도 더 억제됨을 나타낸다.
- [0256] **시험예 6. 사이토카인 발현 억제 평가**
- [0258] 도 14A, 14B, 14C는 각각 실험생쥐의 비장 (Spleen), 장간막림프절 (mesenteric lymph nodes, MLN), 점막 고유층 백혈구 (lamina propria leukocytes, LPL)에서 분리한 CD4⁺ IL-17⁺ 세포 발현률(%)을 나타낸다.
- [0259] 즉, 각각 실험생쥐의 비장, MLN, LPL 에서 CD4⁺ T세포를 분리한 후 PMA, ionomycin 그리고 Golgi-plug 로 4시간 자극 (stimulation) 한 후 CD4⁺IL-17A⁺를 유세포 분석기 (flow cytometry)로 분석한 것이다.
- [0260] 도 14A, 14B, 14C로부터 DSS에 의해 유도된 염증성 장염 개선효과는 IL-17과 같은 사이토카인 발현 억제에 기인한 것으로 판단된다.
- [0262] **통계분석**
- [0263] 모든 자료와 도면은 평균 ± 표준 편차로 표현된다.
- [0265] 본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업 육성사업으로 수행된 연구결과입니다(P0004697).
- [0267] 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, 상기 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.
- [0270]

도면

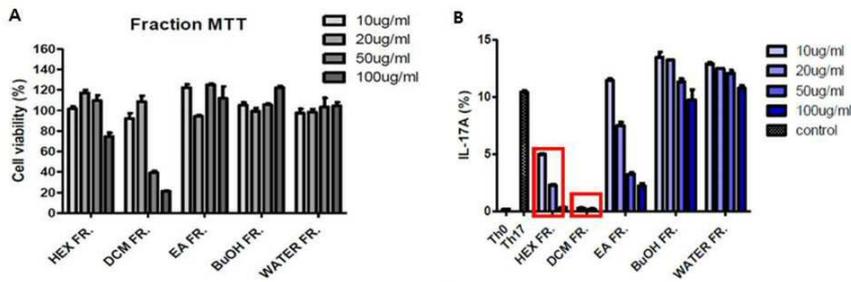
도면1



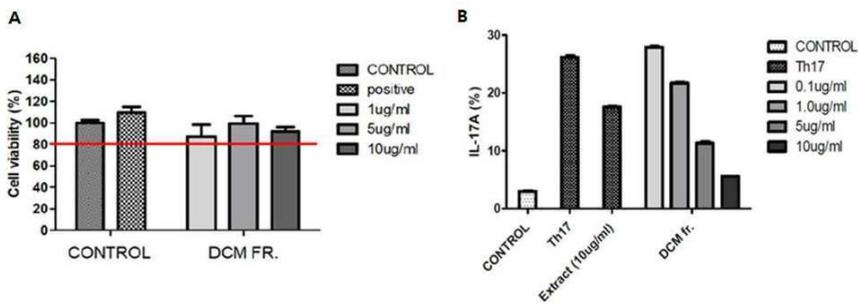
도면2



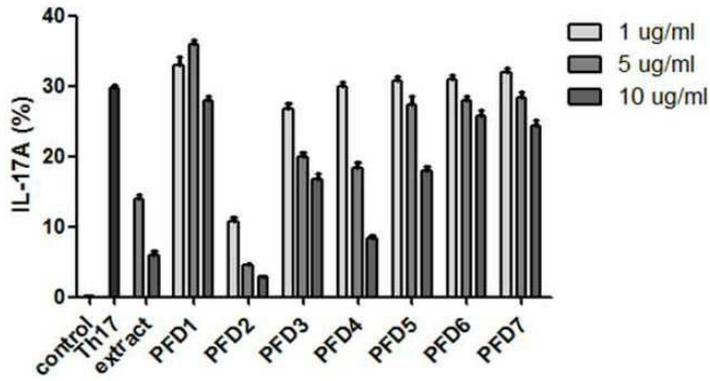
도면3



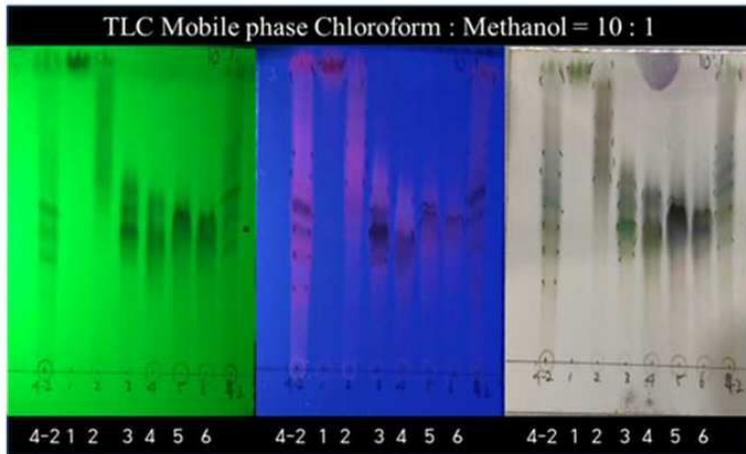
도면4



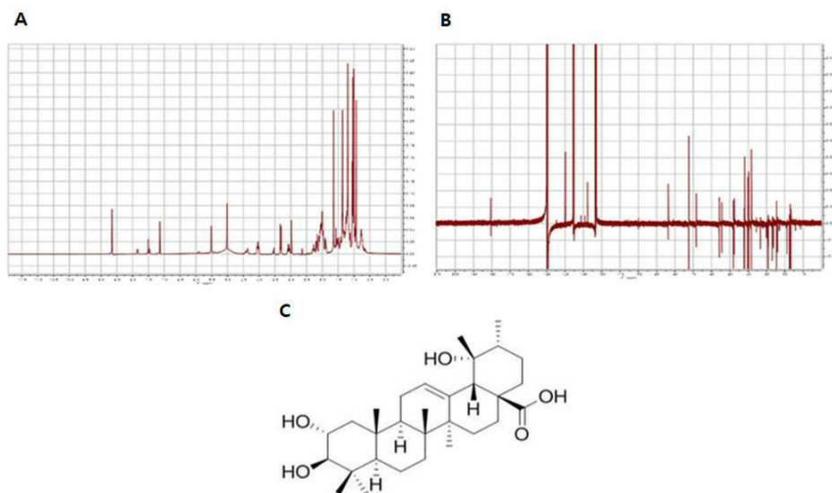
도면5



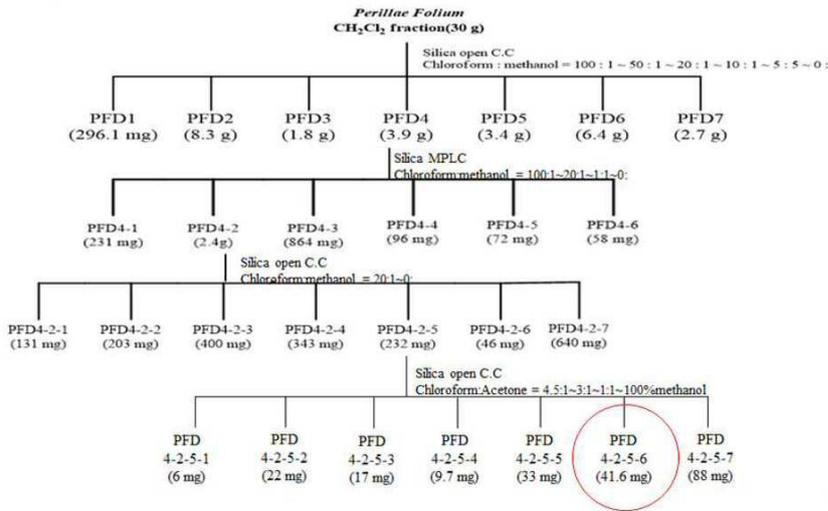
도면6



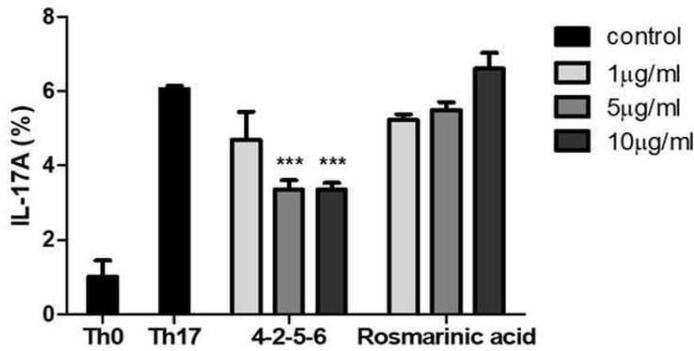
도면7



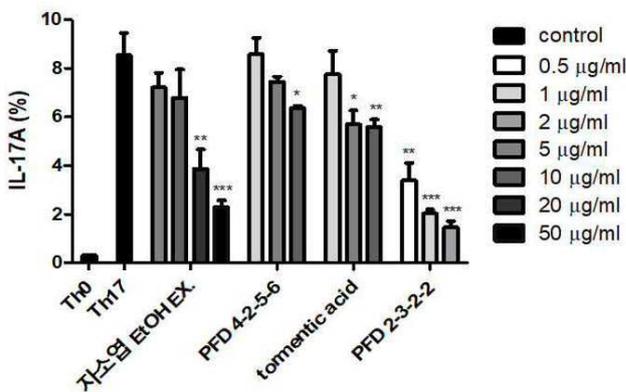
도면8



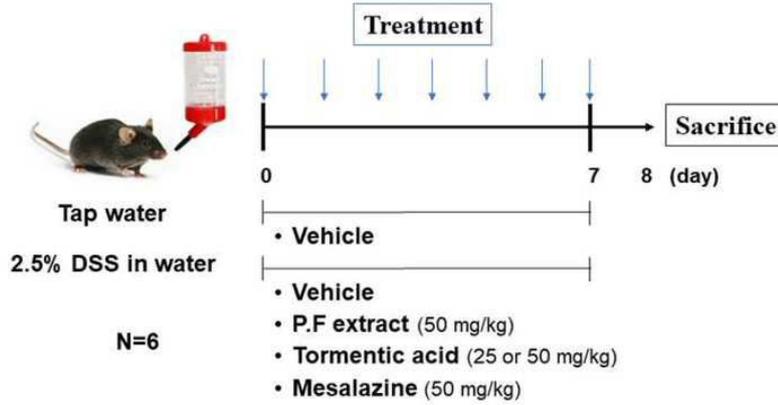
도면9



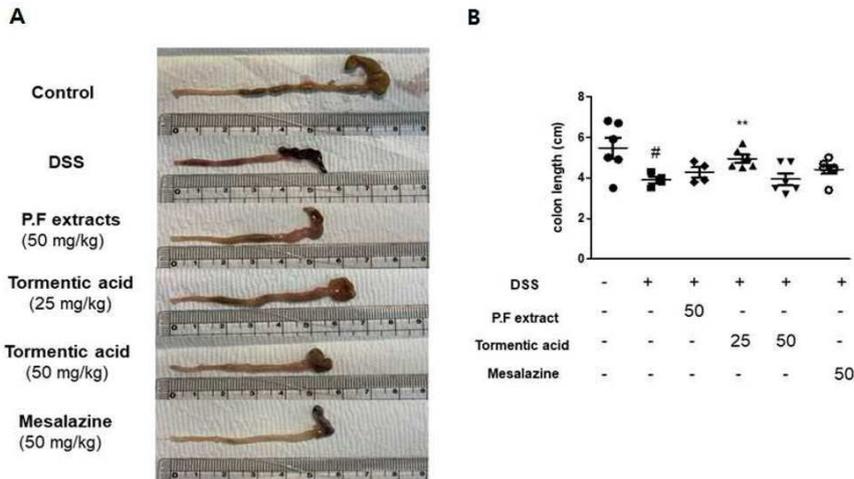
도면10



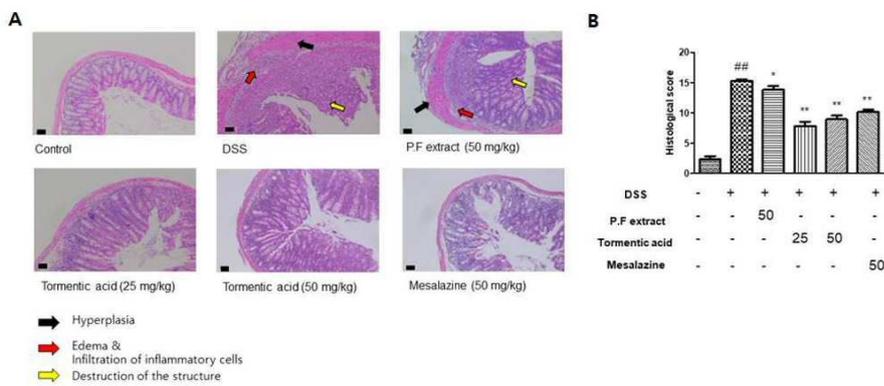
도면11



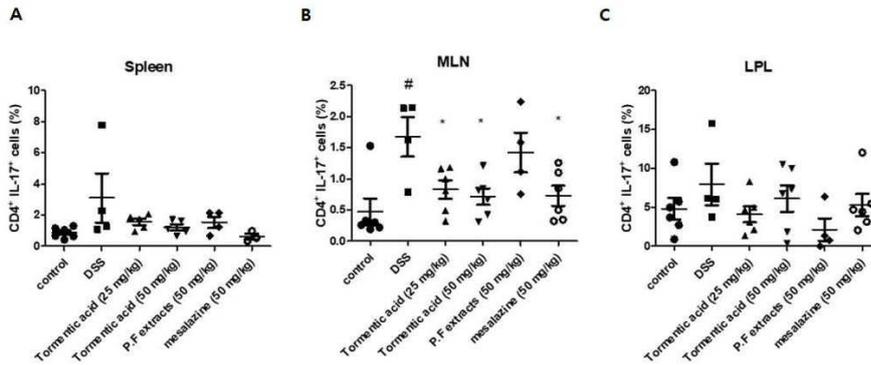
도면12



도면13



도면14



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

청구항 1에 있어서, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 유기산은 구연산 (citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (tartariac acid), 말레인산, 푸마르산 (fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상인 것인 약학적 조성물.

【변경후】

청구항 8에 있어서, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 유기산은 구연산 (citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (tartariac acid), 말레인산, 푸마르산 (fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산으로 이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상인 것인 약학적 조성물.