



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0092947

(43) 공개일자

2014년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 36/82 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0158273

(22) 출원일자

2012년12월31일

심사청구일자

2012년12월31일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(주)에이지아이

강원도 춘천시 후평동 198-53 (재)춘천바이오

산업진흥원 320호

(72) 발명자

강영희

강원도 춘천시 한림대학길 1 한림대학교 생명과학

관 8513호

조인희

강원도 춘천시 한림대학길 1 한림대학교 생명과학

관 8512호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김지형

전체 청구항 수 : 총 4 항

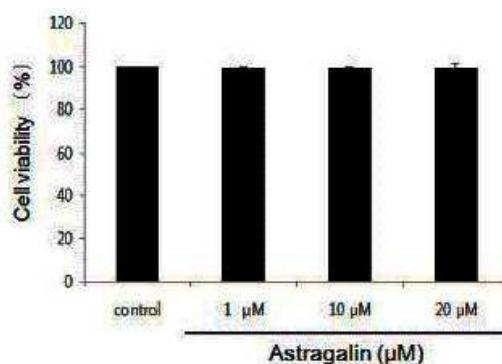
(54) 발명의 명칭 녹차씨에서 유래한 알레르기성 천식 완화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아스트라갈린(Astragalin: kaempferol-3-O-glucopyranoside)을 유효성분으로 하는 알레르기성 천식을 예방, 치료 및 완화용 약학조성물에 관한 것이다. 상기 아스트라갈린은 녹차씨로부터 추출한 카멜리아사이드 A를 효소가수분해하여 얻을 수 있다.

상기 아스트라갈린은 산화스트레스에 의한 알레르기성 천식의 예방과 치료용 약학조성물, 화장품 소재 및 기능성 식품 신소재로 활용된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

공주현

강원도 춘천시 한림대학길 1 한림대학교 생명공학
관 8512호

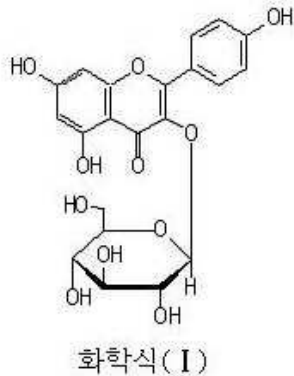
박상재

경기도 용인시 수지구 만현로 25 , 107-1702(상
현동, 만현마을1단지 롯데캐슬아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식(I)의 성분을 함유하는 알레르기성 천식 완화용 조성물.



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 알레르기성 천식 완화용 조성물은 녹차씨 추출물을 효소가수분해해서 얻어지는 것을 특징으로 하는 알레르기성 천식 완화용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아스트라갈린 조성물은 고사리, 감잎, 적포도로부터 추출한 알레르기성 천식 완화용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 알레르기성천식 완화용 조성물은 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 소, 돼지, 염소를 포함하는 포유동물의 천식 완화용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알레르기성 천식을 예방, 완화시키는 조성물에 관한 것이다. 알레르기성 천식은 알레르겐에 대한 과민반응으로 발생하는 기도 염증성 질환이다. 노출된 알레르겐의 자극을 받은 기도상피세포는 염증신호전달을 활성화 시키고 세포 내 활성산소종의 생성을 증가시킨다. 활성산소와 염증신호와의 상호작용은 다양한 염증 매개 인자의 분비를 유발시키며, 나아가 세포사멸작용을 유도하여 결국 알레르기성 천식의 만성화를 초래한다.

[0002] 아스트라갈린(Astragaloside: kaempferol-3-O-glucopyranoside)은 녹차씨에서 유래한 생리활성 성분으로 항염, 항노화, 항암 등에 예방 효과가 있다고 알려져 있지만 항 알레르기 예방 효과에 대해선 알려진 바가 없다. 본 발명은 기도상피세포에 알레르겐 및 H_2O_2 의 산화적인 손상에 의한 염증신호전달에 있어서 아스트라갈린의 항산화적 억제효과를 규명하였다. 인간 기도상피세포에 아스트라갈린 처리 후 24시간 배양한 경우 세포 독성에 영향을 미치지 않았다. 또한 아스트라갈린은 H_2O_2 에 의한 산화적 스트레스 유발 시 산화독성을 경감시키고, 세포생존률의

증가로 아스트라갈린의 항산화능을 확인하였다. 그리고 2 μ g/mL 리포다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 처리한 경우 DCF-DA 측정법을 이용하여 활성산소를 측정한 결과 활성산소의 생성량이 증가함을 확인할 수 있었으며, 이때 아스트라갈린은 활성산소 및 p22/p47 발현을 감소시켰고 리포다당류에 의한 산화스트레스 유발 MAP kinase 신호전달경로의 활성화도 억제 또는 증가 시켰다. 알레르기성 천식에서 특이적으로 발현되는 염증매개인자인 에오타신(eotaxin) 단백질 역시 아스트라갈린 처리 시 유의적으로 감소하였다. 이로써 아스트라갈린은 부작용이 없으면서도 알레르겐에 의한 산화스트레스 그리고 알레르기 염증반응을 억제시킬 수 있는 알레르기성 천식의 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 기관지 천식은 한번 이환되면 일평생 치료를 지속해야 하는 만성질환으로 국민 보건상 부담이 큰 질환을 특징으로 한다. 특히 고혈압, 당뇨 등의 다른 만성질환은 중년 이상의 성인에서 발생하는 것과 달리 기관지 천식은 그 발생이 소아부터 노년층에 이르기까지 전 연령층에서 일어나는 질환이다. 그 중 알레르겐에 의해 유발되는 알레르기성 천식은 최근 20년 사이에 2~3배 이상으로 급격히 증가하였고, 특히 어린이 중 5~10%가 알레르기성 천식이 발병됨이 보고되었다. 현재 알레르기성 천식이 급속한 산업화로 인한 생활환경의 변화 등으로 유병률이 지속적으로 증가하고 있고 2조원에 육박하는 막대한 사회적 비용이 소요되는 것으로 추정된다. 또한 지구 온난화로 인한 지구의 온도, 이산화탄소 수치가 상승함에 따라 인간에게 알레르기를 일으킬 수 있는 식물이 다양해져 꽃가루 알레르기과 천식에 걸릴 위험도 높아진다고 보고되어 진다. 따라서 알레르기성 천식은 병의 원인이 확실치 않아 환경요법, 기관지 확장제와 알레르기 염증을 치료하는 항염증제제를 이용한 약물요법, 알레르기 체질을 개선하는 면역요법 등이 시도되나 만성적이고 재발성이어서 치료가 쉽지 않다.

[0004] 알레르기성 천식은 알레르겐에 의하여 기관지가 과민하게 반응함으로써 기관지 수축, 점액 과분비 등에 의해 호흡곤란이 생기는 질환이다. 최근 들어 산화 스트레스가 단순히 세포와 조직에 해를 끼치는 역할 뿐만 아니라 세포의 성장, 생존 및 기능을 조절하는 물질로서 중요한 역할을 수행한다. 우리 몸의 여러 장기 중 특히 호흡기계는 가장 높은 정도의 산화 스트레스에 노출되어 있으며, 호흡기에 발생하는 대표적인 만성 기도 질환인 만성 폐쇄성질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)과 기관지천식의 병인 기전에도 산화 스트레스가 중요한 역할을 한다. 특히, 노출된 알레르겐의 자극을 받은 기도상피세포는 염증신호전달을 활성화 시키며, 이로 인해 활성산소(reactive oxygen species; ROS)를 생산하는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드 인산화 효소(NADPH oxidase)의 활성이 유도되어 세포 내 활성산소가 증가하게 된다. 기도 내의 활성산소 증가는 Th2 우세면역 반응을 유도하여 알레르기 반응을 일으킨다. 그 중 NADPH oxiase 분자들은 MAPK(mitogen activated protein kinase), JAK-STAT(Janus kinase-signal transducers and activators of transcription) 신호전달 경로, NF- κ B, AP-1(activator protein 1)과 같이 세포의 성장, 분화 등과 관련된 세포 내 물질들의 작용에 밀접하게 관여한다. 즉, 산화 스트레스는 염증신호와의 상호작용으로 다양한 염증 매개인자의 분비를 유발시키며, 나아가 세포사멸작용을 유도하여 알레르기성 천식의 만성화를 초래하게 된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 등록특허공보 제10-0756972호(B1) (2007. 9. 7.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본원 발명은 알레르기성 천식을 예방, 완화시키기 위한 것이다. 기도 내 증가된 산화 스트레스는 기관지 세포를 직접적으로 자극하고 활성화시켜 다양한 염증성 화학매체의 생성을 유도하며, 기관지 염증 및 기도과민증을 악화시켜 객담 발생을 증가시키는 등 천식의 각종 특징적인 임상 양상에 악영향을 미친다.

[0007] 즉, 산화 스트레스는 염증신호와의 상호작용으로 다양한 염증 매개인자의 분비를 유발시키며, 나아가 세포사멸

작용을 유도하여 알레르기성 천식의 만성화를 초래하는 문제점이 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 아스트라갈린(Astragalín: kaempferol-3-O-glucopyranoside)을 유효성분으로 하는 알레르기성 천식을 예방, 치료 및 완화용 약학조성물을 제공하고자 한다. 이를 위해 녹차씨로부터 항염, 항노화, 항암 등에 예방 효과 외에 항 알레르기 예방 및 치료 효과가 있는 상기 아스트라갈린을 추출하였다.
- [0009] 상기 아스트라갈린은 산화스트레스에 의한 알레르기성 천식의 예방과 치료용 약학조성물, 화장품 소재 및 기능성 식품 신소재로 활용될 수 있다.
- [0010] 인체의 리포다당류(lipopolysaccharide)는 산화스트레스의 요인이며, 또한 알레르기성 천식의 주요 요인이다. 녹차씨에서 유래한 아스트라갈린은 $20\mu\text{M}$ 이하의 농도에서는 그 자체 독성이 없었고, H_2O_2 의 산화적 독성을 경감시킨다. 먼저 리포다당류가 활성산소의 발생 및 NADPH oxidase인 p22에 미치는 영향을 조사하기 위해 DCFH-DA와 western blot 실험을 하였다. $20\mu\text{g/ml}$ 의 리포다당류(LPS) 처리 시 활성산소의 발생량이 증가하였으며, p22 phox 역시 활성화되었으며, 이는 아스트라갈린에 의해 억제되었다. 즉, 리포다당류가 수용기(receptor)인 TLR4와 결합하게 되면 세포 내 $\text{pkc}\beta 2$ 를 활성화시켜 NADPH oxidase를 자극하고 H_2O_2 가 증가하게 된다. 이를 통해 리포다당류가 산화스트레스에 관여하여 알레르기성 천식을 악화시킬 수 있게 된다. 또한 MAP kinase 신호전달경로는 스트레스반응과 아포토시스(apoptosis) 등 세포 내 기능에 영향을 미치며, 이는 여러 자극에 의해 다양하게 나타난다. 특히 많은 전사인자들이 활성산소에 의한 산화스트레스에 의해 많이 생성된다. $20\mu\text{M}$ H_2O_2 처리 시 세포생존신호(cell survival signal)에 관여하는 p-ERK, p-AKT 단백질의 발현이 아스트라갈린의 농도에 따라 증가하였으나 산화스트레스로 유발되는 death signal에 영향을 미치는 p-38, p-JNK의 경우 감소되었다. 또한 염증성 물질인 에오탁신(Eotaxin)이 산화스트레스에 의해 발생하게 되고, 아스트라갈린 처리 시 억제되었다. 따라서 기도상피세포에 리포다당류 알레르겐 처리시 1차적 자극으로 인해 산화스트레스가 유도되고, H_2O_2 에 의한 2차적인 자극이 유도되면서 알레르기성 천식의 지표인자인 에오탁신(eotaxin)을 발현시켜 천식 발병을 초래함을 확인할 수 있었다. 이때 아스트라갈린은 알레르겐에 의한 산화적 손상에 있어서 세포생리학적으로 탁월한 방어기능을 지니고 있음을 실험 결과로 확인할 수 있었다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명은 알레르기성 천식의 예방, 치료 및 완화용 약학조성물에 관한 것이다. 녹차씨에서 유래한 아스트라갈린은 항염, 항노화, 항암 등에 예방 효과 외에 항 알레르기 예방, 치료 및 완화 효과가 있다. 상기 아스트라갈린은 산화스트레스에 의한 알레르기성 천식의 예방과 치료용 약학조성물, 화장품 소재 및 기능성 식품 신소재로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 아스트라갈린의 세포독성효과에 대한 결과를 보여주고 있다.
- 도 2는 아스트라갈린을 처리한 경우 활성산소의 양을 보여주고 있다.
- 도 3은 리포다당류 및 아스트라갈린 처리시 $\text{pkc}\beta 2$ 의 변화를 보여주고 있다.
- 도 4는 아스트라갈린 농도에 따른 p-ERK, p-AKT의 변화를 보여주고 있다.
- 도 5는 아스트라갈린 농도에 따른 p-p38, p-JNK의 변화를 보여주고 있다.
- 도 6 및 도 7은 인간의 기도상피세포에 리포다당류(LPS) 및 H_2O_2 로 자극을 하였을 때 Eotaxin의 발현이 증가하고, 아스트라갈린에 의해 억제되는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 아스트라갈린(Astragalín: kaempferol-3-O-glucopyranoside)을 유효성분으로 하는 알레르기성 천식

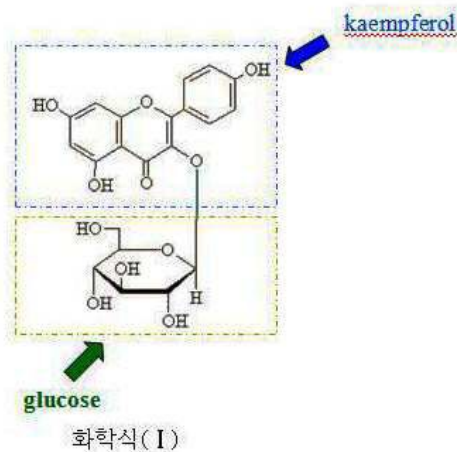
을 예방, 치료 및 완화용 약학조성물을 제공하고자 한다. 항염, 항노화, 항암 등에 예방 효과 외에 항 알레르기 예방 및 치료 효과가 있는 아스트라갈린은 산화스트레스에 의한 알레르기성 천식의 예방과 치료에 기능성 식품 신소재로 활용될 수 있다.

[0014] 본 발명에서 알레르기성 천식 예방, 완화용 조성물 및 치료용 약학조성물로 사용되는 녹차씨 등으로부터 유래된 아스트라갈린은 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 소, 돼지, 염소 등을 포함하는 포유동물의 천식 예방, 치료 및 완화용 조성물로 사용될 수 있다.

[0015] 상기 아스트라갈린은 녹차씨 추출물을 효소 가수분해하여 얻어진 생리활성성분이며, 녹차씨 이외에도 고사리, 감잎, 적포도 등에 함유되어 있는 주요한 폴리페놀 성분이다. 이는 항암 이외에도 항노화, 항염, 동맥경화 예방 효과가 있지만, 본원발명은 항 알레르기 예방 효과에 관한 것이다. 따라서 아스트라갈린의 생리활성에 근거를 두어 기도상피세포에 리포다당류 및 H_2O_2 자극 시 일어나는 산화적 손상이 염증신호전달에 미치는 영향과 아스트라갈린의 억제 효과에 관한 것이다.

[0016] 하기 화학식 (I)로 표현되는 아스트라갈린은 kaempferol과 glucose가 결합된 것으로 천연에는 극미량 존재한다.

[0017] 산화스트레스에 대한 아스트라갈린의 억제효과를 보면, 기도 내 증가된 산화 스트레스는 기관지 세포를 직접적으로 자극하고 활성화시켜 다양한 염증성의 생성을 유도하여 기관지 염증 및 기도과민증을 악화시켜 객담 발생을 증가시키는 등 천식의 각종 특징적인 양상을 발현한다.



[0018]

[0019] 상기 화학식 (I)의 아스트라갈린은 녹차씨(Tea seed saponin) 중에 약 15wt%의 플라보놀 글리코사이드(flavonol glycosides)가 포함되어 있으며, kaempferol 분자구조에 당이 결합된 배당체에 따라 각각 Camelliaside A, B, C로 명명되며, 상기 아스트라갈린은 Camelliaside A가 효소가수분해되면서 만들어 진다.

[0020] 본 발명에서는 알레르겐인 리포다당류가 활성산소 생성에 미치는 영향과 아스트라갈린의 항산화 효과를 보여준다.

[0021] 도 1은 아스트라갈린의 세포독성효과에 대한 결과를 보여주고 있다. 인간의 기도상피세포를 24시간 배양 후 1, 10, 20 μ M 스트라갈린을 처리한 경우 독성이 나타나지 않았다.

[0022] 도 2는 리포다당류 2 μ g/mL와 아스트라갈린을 농도별로 8시간 처리 후 생성되는 활성산소 양을 측정(DCFH-DA)한 결과 활성산소가 증가하였으며, 아스트라갈린 처리 시 현저히 억제되었다.

[0023] 리포다당류에 의한 pkc β 2 활성화와 아스트라갈린의 억제효과를 보면, 리포다당류는 리포다당류 결합단백질(LPS-binding protein)과 결합되어 inducible nitric oxide synthase(INOS)의 유전자를 활성화 시켜 NO의 생성을 증가시키며, NO가 생성될 때 Ca^{2+} 의 농도 증가로 인해 superoxide anion(O_2^-)과 H_2O_2 가 함께 생성되어 세포 조직에 영향을 주게 된다. 따라서 본 연구에서는 NADPH oxidase의 발현 증가에 영향을 미치는 PKC β 2가 리포다당류에 의해 활성화 되는지와 아스트라갈린에 의한 억제효과를 확인하기 위해 기도상피세포(Human Bronchial

Epithelial cells)에 $2\mu\text{g/mL}$ 리포다당류와 농도별로 아스트라갈린을 처리한 다음 8시간 뒤에 실험을 시행하였다. 그 결과 도 3에서 보는 바와 같이 리포다당류 처리시 p38가 증가하였으며, 아스트라갈린 처리시 감소하였다.

[0024] 산화스트레스에 의한 MAP kinase활성화와 아스트라갈린의 억제 및 증가 효과를 보면, MAPK 신호전달 경로는 다양한 세포 내 여러 자극에 대한 변화로 스트레스반응과 아포프토시스(apoptosis) 등 세포 기능에 영향을 미친다. 특히 많은 전사인자들이 활성산소에 의한 산화스트레스에 의해 생성이 된다.

[0025] 인간의 기도상피세포에서 산화스트레스로 인한 MAPK 전달과정에 아스트라갈린이 미치는 영향은 MAP Kinase의 주요 단백질인 ERK, JNK, p38, AKT의 발현양으로 알 수 있다.

[0026] 도 4를 보면 기도상피세포의 성장, 분화에 관여하는 생존신호(survival signal)의 일종인 p-ERK, p-AKT의 경우 아스트라갈린 농도에 따라 증가하였으며, 도 5에서는 이와 반대로 산화스트레스로 인해 유발되는 소멸신호(death signal)에 관여하는 p-p38, p-JNK는 아스트라갈린 농도가 증가할수록 감소하였다.

[0027] 도 6과 도 7에는 리포다당류 및 H_2O_2 처리시 에오탁신(Eotaxin)의 발현과 아스트라갈린의 억제효과를 나타냈다. 알레르기성 천식에서 특이적으로 발생하는 단백질 chemokine의 일종인 Eotaxin에 대한 산화스트레스의 영향을 보면, 인간의 기도상피세포에 리포다당류(LPS) 및 H_2O_2 로 자극을 하였을 때 Eotaxin의 발현이 증가하였으며, 아스트라갈린에 의해 억제됨을 확인하였다.

[0028] 이 염증인자는 다시 기도상피세포에 영향을 미쳐 점액 과분비, 기도상피세포 탈락 뿐만 아니라 apoptosis에 영향을 미쳐 알레르기성 천식을 만성적으로 악화시킨다.

[0029] (실시예)

[0030] 1. 기도상피세포 배양실험

[0031] 기도상피세포는 10% fetal bovin serum(FBS), L-글루타민 2mmol/L , 페니실린, 100IU/L 인슐린 2.5mg/L 가 보충된 스트렙토마이신 100mg/L , 하이드로코르티손 0.361mg/L , 아포트랜스페린 2.5mg/L 과 상피성장인자 $20\mu\text{g/L}$ 가 포함된 25mmol/L 의 HEPES-buffered M199 배지에서 배양되었다. BEAS-2B cells은 37°C , $5\% \text{CO}_2$ incubator에서 배양하였으며, 48시간 주기로 배양액을 교체하였다.

[0032] 2. 세포사멸 유도실험

[0033] 분주하여 배양시킨 기도상피세포를 다양한 농도에서 아스트라갈린으로 전처리한 후에 다시 30분간 0.2mM H_2O_2 와 배양시켰다. 기도상피세포는 PBS로 세척하고 1, 10, $20\mu\text{M}$ 아스트라갈린이 첨가된 새 배지를 가하여 24시간 동안 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 에서 배양시켰다. 리포다당류의 경우 $2\mu\text{g/mL}$ 리포다당류와 아스트라갈린을 처리한 후 24시간 동안 배양한 다음 형태학적 관찰 및 생화학적인 분석 등을 수행하였다.

[0034] 3. 세포생존률 조사

[0035] 기도상피세포를 H_2O_2 와의 세포배양실험을 거친 후에, 세포 생존률을 측정하기 위하여 자동 microplate reader spectrophotometer를 이용한 MTT 분석이 이루어졌다. 이 분석법은 tetrazlium MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide)가 미토콘드리아 효소인 succinate dehydrogenase에 의하여 불용성의 formazan으로 변하는 과정을 이용하여 측정하였다.

[0036] 기도상피세포를 리포다당류 및 H_2O_2 로 배양실험을 거친 후 세척한 다음, MTT(5mg/mL stock solution)가 첨가된 phenol red가 들어있지 않는 배지에서 3시간 배양시켰다. 그 후에, isopropyl alcohol을 가하여 조심스럽게 흔들어 주면서 형성된 formazan을 용해시키고 $\lambda=560\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

[0037] 4. 웨스턴블랏팅

[0038] 기도상피세포를 10% SDS, 1% glycerophosphate, 0.1mol/L Na₃V04, 0.5mol/L NaF와 protease inhibitor cocktail이 포함된 1mol/L Tris-HCL (pH 6.8) lysis buffer로 세포용해물을 얻은 후 Bradford 방법을 이용하여 단백질정량을 하였다. 세포용해액은 5X dye와 혼합하여 95에서 10분간 끓인 후 8~15% SDS-polyacrylamide gel 에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 nitrocellulose membrane에 전이시켰다.

[0039] Membrane은 5% nonfat dry milk에서 3시간 동안 blocking하고, 특정 1차 항체를 붙인 후 4℃에서 overnight하였다. TBST로 세척한 후 이차항체 anti-goat, anti-mouse, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시킨 후 Supersignal West Pico chemiluminescence detection reagents(Pierce Biotechnology)와 Agfa medical X-ray film blue(Agfa HealthCare)를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

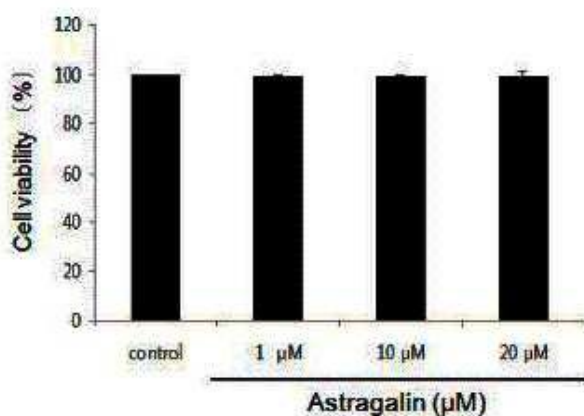
[0040] 5. DCFH-DA를 이용한 활성산소량 측정

[0041] 세포내 활성산소를 측정하기 위해 12 well plate에 세포를 25×10^4 cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 부착시킨 20μM H₂O₂처리 한 세포에 DCFH-DA(2',7' -dichloro-fluorescein diacetate)를 가하여 37℃에서 30분 동안 반응시켰다.

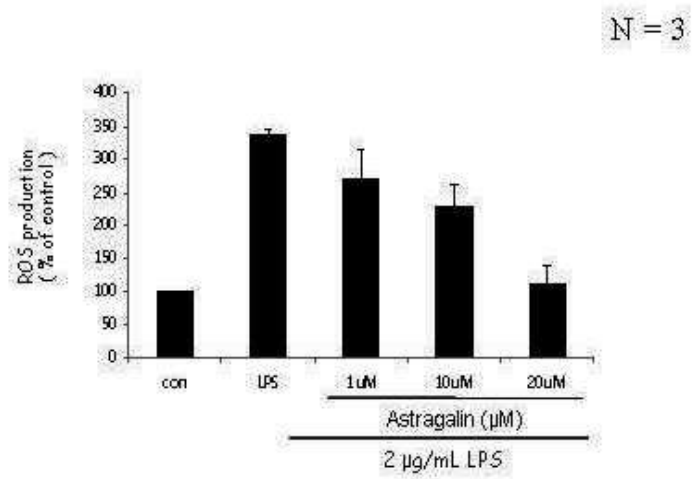
[0042] 다시 PBS로 세척 후 1 NaOH를 well당 400μL 넣어 세포를 분해시키고 일정량을 96 well black plate로 옮겨 480nm(Ex.) 및 530nm(Em.)에서 형광을 측정한 후 단백질(μg)당 흡광도를 대조군의 백분율로 나타내었다. 실험 결과는 Students' t-test로 통계 분석하여 유의성을 검증하였다.

도면

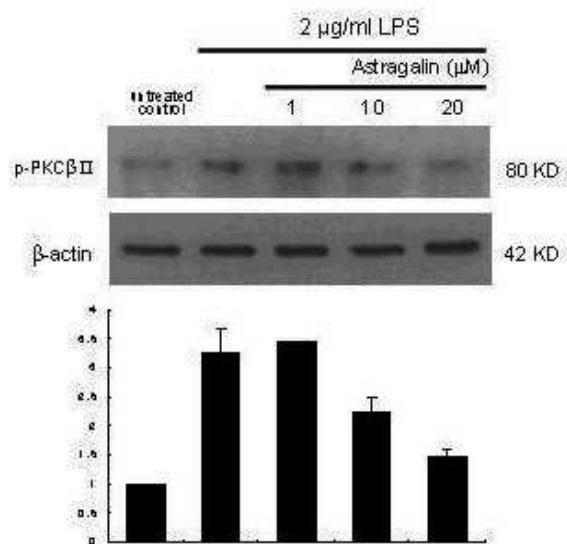
도면1



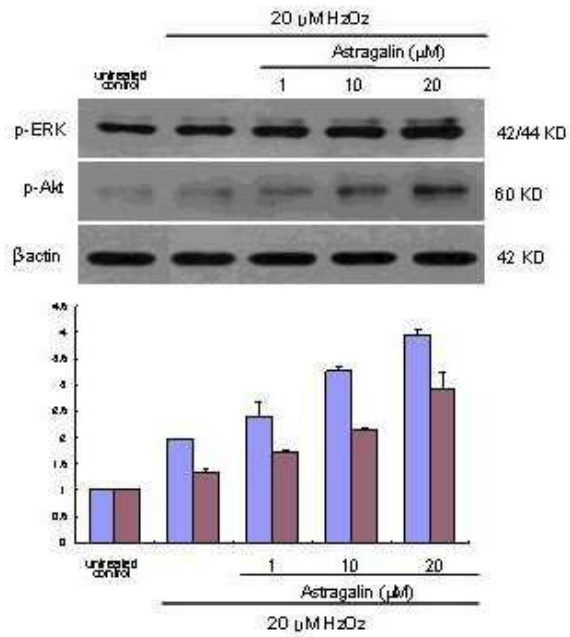
도면2



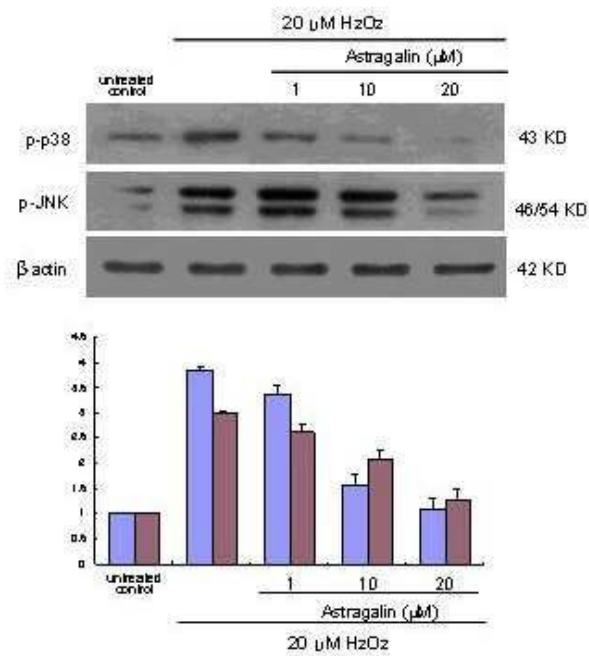
도면3



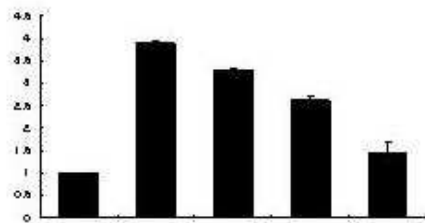
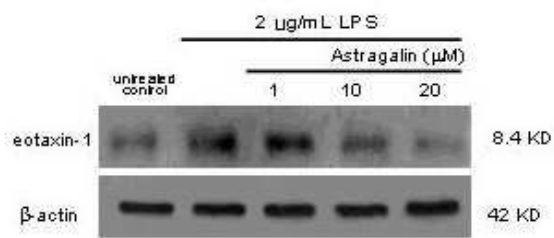
도면4



도면5



도면6



도면7

