

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2019년 12월 5일 (05.12.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호  
WO 2019/231211 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/268 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)  
A61K 36/346 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)  
A61K 36/54 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/006382

(22) 국제출원일: 2019년 5월 28일 (28.05.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2018-0060665 2018년 5월 28일 (28.05.2018) KR

(71) 출원인: 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로14길 5, Seoul (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR). 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED

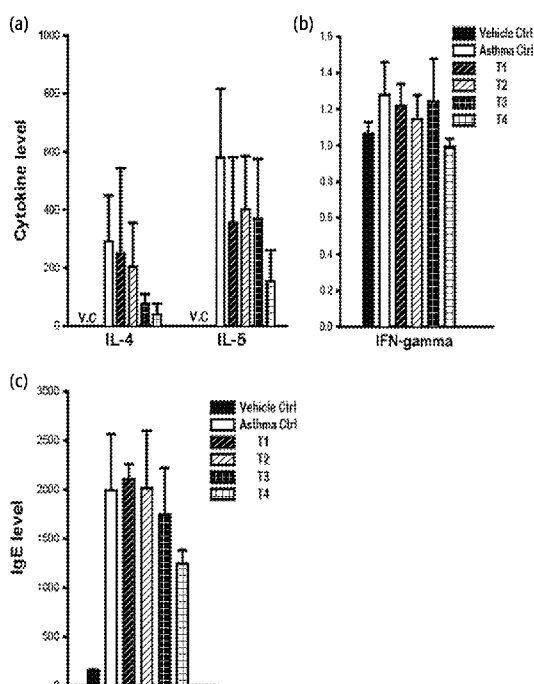
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 양현옥 (YANG, Hyun Ok); 25451 강원도 강릉시 사임당로 679, Gangwon-do (KR). 강건욱 (KANG, Keon Wook); 05502 서울시 송파구 올림픽로 135, 242동 2803호, Seoul (KR). 권성원 (KWON, Sung Won); 16420 경기도 수원시 장안구 화산로 85, 116동 502호, Gyeonggi-do (KR). 박정일 (PARK, Jeong Hill); 05502 서울시 송파구 올림픽로 135, 255동 3301호, Seoul (KR). 김호철 (KIM, Hocheol); 02447 서울시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 한의과대학 658호, Seoul (KR). 오명숙 (OH, Myung Sook); 06291 서울시 강남구 삼성로 151, 1동 305호, Seoul (KR). 장대식 (JANG, Dae Sik); 06363 서울시 강남구 광평로 10길 50, 109동 104호, Seoul (KR). 이도현 (LEE, Doheon); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 권학철 (KWON, Hak Cheol); 25451 강원도 강릉시 사임당로 679, Gangwon-do (KR). 정병화 (JUNG, Byung Hwa); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로 135 대명타워 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ALLERGIC DISEASES CONTAINING MIXED EXTRACT OF TWO OR MORE AMONG ASIASARUM ROOT, PLATYCODON ROOT, AND CINNAMOMI RAMULUS AS ACTIVE INGREDIENTS

(54) 발명의 명칭: 세신, 길경 및 계지 중 2 종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention pertains to: a pharmaceutical composition for preventing or treating allergic diseases, the pharmaceutical composition containing a mixed extract of two or more selected from the group consisting of asiasarum root, platycodon root, and Cinnamomi Ramulus as active ingredients; a method for preventing or treating allergic diseases by using the pharmaceutical composition; and a health functional food and a feed composition for alleviating allergic diseases. The composition containing a mixed extract of two or more selected from the group consisting of asiasarum root, platycodon root, and Cinnamomi Ramulus as active ingredients according to the present invention specifically inhibits Th2 cell differentiation, and can thus be useful as a composition for preventing or treating allergic diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 약학 조성물을 이용한 알레르기성 질환의 예방 또는 치료방법, 알레르기성 질환 개선용 건강기능식품 및 사료 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 Th2 세포 분화를 특이적으로 억제하여 알레르기성 질환에 대한 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.



(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

## 명세서

### 발명의 명칭: 세신, 길경 및 계지 중 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 약학 조성물을 이용한 알레르기성 질환의 예방 또는 치료방법, 알레르기성 질환 개선용 건강기능식품 및 사료 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 알레르기성(allergy) 질환은 개체에 어떤 종류의 물질(항원 또는 알레르겐(알레르기의 원인 인자))이 들어왔을 때 이것에 대하여 항체가 만들어지고, 그 후 다시 동일물질인 항원이 체내로 들어왔을 때 생기는 항원항체반응인 알레르기가 원인이 되어 발생하는 질환이다(영양학사전, 1998. 3. 15., 채범석, 김을상). 주된 질환은 호흡기 질환, 피부염(아토피 피부염 포함), 약진, 약제 알레르기, 혈청병 등이고, 알레르겐의 종류나 알레르기 반응을 일으키는 조직에 따라 여러 가지 병의 유형을 나타낸다. 알레르기 질환의 진단에는 가족이나 환자의 그때까지의 경과, 발병시기나 생활환경, 섭취한 식사내용 등이 참고가 된다.
- [4] 알레르기성 호흡기 질환은 알레르기 반응이 관여하는 질환 중 호흡기 질환을 뜻하며, 대표적으로 기관지 천식, 기관지염 또는 알레르기성 비염이 있다. 기관지 천식(bronchial asthma)은 폐 속에 있는 기관지가 아주 예민해진 상태로, 때때로 기관지가 좁아져서 숨이 차고 기침을 심하게 하는 증상을 나타내는 병을 말하며, 기관지의 알레르기 염증 반응 때문에 발생하는 알레르기 질환이다. 최근 서구화 및 식습관의 변화에 따라 기관지 천식의 유병률은 증가하고 있는 추세이며, 이에 따른 진료 및 치료비용 역시 증가하고 있다. 시장조사/컨설팅기관 그랜드 뷰 리서치의 보고에 의하면 기관지 천식 환자가 전세계에 약 3억 명 정도에 달하는 것으로 추정하고 있으며, 4.83%의 발병률로 공중보건학 측면에서 세계적인 관심 질환이다. 2012년 보건복지부의 국민건강통계에 따르면 2010년 기준으로 만 19세 이상의 기관지 천식 유병률은 3.1%로, 2001년 1.4%에서 계속 증가하고 있다. 또한 2010년 초등학교생의 기관지 천식 유병률은 10.2%로 소아기 발병이 가장 높으며, 70대 이상의 기관지 천식 유병률은 6.7%로 만성 폐쇄성 폐질환과 함께 일부 사망의 원인이 되고 있다. 우리나라에서 2004년 기관지 천식으로 인한 총 사회적 비용이 연간 약 4조원으로 많은 비용이 소모되고 있는데 반해 기관지 천식 치료 상황은 상당히

저조한 편이다. 따라서 기관지 천식 질환의 효과적인 관리가 시급하다.

- [5] 기관지염(bronchitis)은 폐의 기관지에 생기는 염증으로, 90 % 이상의 원인이 바이러스 감염인 급성 기관지염과 달리, 대기 오염이나 석탄 채굴, 곡물 처리, 식물 제조, 축산, 금속 주조 등의 직종에서 자극이 강한 먼지의 만성 흡입 등이 원인으로 작용하는 만성 기관지염은 운동 시의 천명음과 호흡 곤란, 낮은 산소 포화도를 나타내며, 2년이 넘도록 가래, 기침이 끊이지 않고, 매년 3개월 이상 지속된다. 45 세 이상의 사람, 흡연자, 대기 오염이 심한 지역에 거주하는 사람과 천식이 있는 사람은 만성 기관지염에 걸릴 위험이 더 높은 것으로 알려져 있다.
- [6] 알레르기성 비염(allergic rhinitis)은 코 점막이 특정 물질에 대하여 과민반응을 나타내는 것으로 알레르기를 일으키는 원인 물질(알레르겐 또는 항원)이 코 점막에 노출된 후 자극 부위로 비만세포, 호산구를 비롯한 여러 종류의 IgE 항체를 매개로 하는 염증세포가 몰려들어 이들이 분비하는 다양한 매개물질에 의하여 염증반응이 발생하는 질환이다. 연속적으로 일어나는 발작적인 재채기, 맑은 콧물, 코막힘 등의 세 가지 주요 증상을 특징으로 하며, 이 세 가지 증상 중 두 가지 이상의 증상을 가지고 있을 때 알레르기 비염을 의심할 수 있다. 특징적인 증상 외에도 코 주위 가려움, 두통, 후각 감퇴 등의 증상이 동반될 수 있으며 합병증으로 중이염, 부비동염, 인후두염 등이 동반될 수 있다.
- [7] 아토피 피부염(Atopic Dermatis, AD)은 영유아기부터 발병이 시작되어 가려움을 동반하는 만성재발성 습진질환이다. 대식세포(macrophage)와 과립세포 (granulocyte)로 불리는 호염구(basophil), 호산구(eosinophil), 호중구(neutrophil), 비만세포(mast cell), 그리고 Th2 세포 등 면역반응에 관여 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며(Sicherer SH et al., 1999), 외부 항원에 대한 혈중 IgE (immunoglobulin E)의 증가로 나타나는 복합적 질환이라고 할 수 있다(Rousset F et al., 1991; Kleij HP et al., 2004). AD는 환자와 그 주위사람에게 삶의 질과 가치를 악화시키는 질환이며, 세계적으로 환자 발생률이 증가하고 있다. 치료제로서 스테로이드 제제 또는 항히스타민제 등이 사용되나 이를 통한 완치는 기대하기 어려우며 오히려 장기사용 시 부작용이 발생하여 사용이 매우 제한적인 실정이다.
- [8] 이와 같은 알레르기성 질환은 유전적인 인자와 환경적인 인자가 상호 작용하여 발병하며, 대개의 경우 완치가 쉽지 않은 대표적인 난치성 만성 질환이다. 숙주 요인으로 유전 인자, 비만, 성별 등이 있으며, 환경인자로 먼지 진드기, 꽃가루, 애완동물, 호흡기 감염바이러스, 운동, 아스피린 등의 약물, 흡연, 대기오염, 화학물질, 식품, 스트레스가 원인이 되고 있다. 알레르기 피부 단자검사, 알레르기 특이항체검사, 알레르겐 기관지 천식유발 검사 등의 방법으로 원인을 찾을 수 있으나, 원인 규명을 완전하게 해내는 것은 어렵다.
- [9] 이러한 알레르기성 질환 중 기관지 천식은 다양한 발병 기전 중에 Th2(T helper type 2) 타입의 면역반응이 항진되어 이에 따라 인터루킨(interleukin)-4, 5, 13 등의 분비가 증가되게 되며(Liu et al., 2006; Williams et al., 2012), 이러한 반응과

연계하여 호산구를 비롯한 많은 염증세포들이 폐 조직 내로 이동 및 침윤하게 된다(Zhou et al., 2011). 또한 염증세포들은 다양한 전염증인자 및 화학주성인자들을 방출하여, 염증반응을 더욱 악화시키며, 기도 내 배상세포의 점액분비를 증가시키고, 기도 과민성을 야기하게 된다(Chibana et al., 2008). 이러한 일련의 반응으로 인하여 기관지 천식 환자들은 호흡곤란, 청색증 및 흉통 등의 임상증상을 나타내게 된다. 아토피 피부염 또한 Th2 매개성 면역질환으로 알려져 있다.

- [10] 현재, 알레르기성 질환의 치료에 사용되고 있는 약물은 스테로이드 제제, 항히스타민제, 기관지 확장제 또는 항생제 등이 있다. 스테로이드 제제와 항생제의 경우, 면역반응 및 염증반응 억제를 통하여 알레르기성 질환의 치료에 사용되고 있으며, 기관지 확장제의 경우, 호흡곤란 등의 임상증상 발현 시에 이를 상쇄시킴으로써 사용되고 있다. 그러나, 이러한 약물은 면역억압, 골수생성억제 등의 부작용을 비롯한 항생제 내성, 그리고 장기사용 시 부작용이 발견되어 치료제로서 사용이 매우 제한적이다. 따라서 이러한 부작용들을 극복하고 독성이 적으며, 치료 효과가 탁월한 천연물 혹은 새로운 화합물의 개발이 필요한 실정이다.

[11]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 알레르기성 질환에 우수한 치료효과를 가지는 천연물 소재를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 세신, 길경 또는 계지 추출물이 알레르기성 질환에 대해 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 세신, 길경 및 계지 중 2종 이상의 추출물을 혼합할 경우 더욱 우수한 알레르기성 질환 치료 효과를 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[13]

### 과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 하나의 목적은 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 다른 하나의 목적은 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의

예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[18]

### 발명의 효과

[19] 본 발명에서 제공하는 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 Th2 세포 분화를 특이적으로 억제하여 알레르기성 질환에 대한 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[20]

### 도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 BS012 기도 노출에 따른 기관지 침출물 및 혈청 IgE의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[22] 도 2는 BS012 비부 호흡 노출에 따른 기관지 침출물의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[23] 도 3은 Th1의 분화조건 및 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 Th1의 분화 수준을 분석한 그래프이다.

[24] 도 4는 Th2의 분화조건 및 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 Th2의 분화 수준을 분석한 그래프이다.

[25] 도 5는 Th17의 분화조건 및 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 Th17의 분화 수준을 분석한 그래프이다.

[26] 도 6은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 기관지 천식 모델의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

[27] 도 7은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 기관지 천식 모델의 폐 무게 변화를 나타낸 그래프이다.

[28] 도 8은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 혈청 IgE 및 사이토카인의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[29] 도 9는 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 백혈구 백분율 산정 결과를 나타낸 그래프이다.

[30] 도 10은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 아토피 피부염 모델의 체중 변화 및 간, 비장, 신장의 무게를 나타낸 그래프이다.

[31] 도 11은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 아토피 피부염 모델의 피부 표면 변화를 나타낸 사진이다.

[32] 도 12는 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 아토피 피부염 모델의 피부 표면 scoring index를 나타낸 그래프이다; control: 아토피 피부염을 유발하지 않고 아무 처리 하지 않은 대조군, AD: 아토피 피부염을 유발하고 아무 처리 하지 않은 대조군.

[33] 도 13은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 아토피 피부염 모델의 긁는 횟수를 나타낸 그래프이다; control: 아토피 피부염을 유발하지 않고

아무 처리 하지 않은 대조군, AD: 아토피 피부염을 유발하고 아무 처리 하지 않은 대조군.

[34] 도 14는 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 혈청 IgE 및 아토피 피부염 관련 사이토카인의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[35] 도 15는 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 피부조직의 H&E 염색 현미경 사진이다.

[36] 도 16은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 피부조직의 톨루이딘 블루 염색 현미경 사진이다.

[37] 도 17은 세신, 길경 및 계지의 추출물 및 혼합물 처리에 따른 피부조직의 (A) 표피 과형성(epidermal hyperplasia), (B) 비만세포 수의 평균, (C) 염증 수준을 나타낸 그래프이다.

[38]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[39] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[40]

[41] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[42] 본 발명에서의 용어, "세신"은 쥐방울덩굴과에 속하는 다년생 식물인 민족두리풀(*Asiasarum heterotropoides*)과 족두리풀(*Asiasarum sieboldi*)의 뿌리를 말린 약재로 족두리풀뿌리라고도 한다. 민족두리풀은 각지의 깊은 산 그늘진 습지에서 자라고, 족두리풀은 한국 중부 이남의 산에 널리 분포한다. 맛은 맵고 약성은 온화하다. 효능은 감기, 풍한으로 머리가 아프고 코가 막히고 열이 나며 가래, 기침이 나고 숨이 찰 때 쓴다. 약리실험에서 해열작용, 국소마취용, 억균작용 등이 있음이 밝혀졌다.

[43] 본 발명에서의 용어, "길경"은 초롱꽃과의 도라지(*Platycodon grandiflorum*)의 뿌리 또는 주피를 제거하여 만든 약재로 폐에 작용하여 해수와 가래가 많고 호흡이 불편한 증상을 치료하며, 폐를 맑게 하고 답답한 가슴을 풀어주며 뱃속의 찬 기운을 풀어주어 기침을 멈추고 담을 없앤다. 소변을 잘 보지 못하여 전신부종이 있고 소변양이 적을 때도 쓴다. 인후통, 감기로 인한 기침, 가래, 코막힘, 기관지 천식, 기관지염증, 흉막염, 두통, 오한, 편도선염 등에 사용한다. 약리작용으로 거담작용, 혈당강화작용, 콜레스테롤 강하작용, 개선균 억제 작용이 보고되었다.

[44] 본 발명에서의 용어, "계지"는 육계나무(*Cinnamomum cassia* Blume; 肉桂) 또는

기타 동속 근연식물의 어린 가지를 사용해 만든 약재로 초기 감기에 피부의 땀구멍을 열어 땀을 내며, 어깨와 등의 통증, 사지관절의 동통을 완화시켜 주며 기혈의 순환을 촉진 시키고 양기부족을 치료한다. 약리작용으로는 발한(發汗) 작용, 해열 작용, 진통 작용, 강심 작용, 항바이러스 작용, 항균 작용 등이 보고되었다.

- [45] 본 발명에서의 용어, "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.
- [46] 본 발명에서의 용어, "혼합 추출물"은 상기 추출물을 혼합하여 그 효과를 향상시키는 목적으로 사용되는 것일 수 있다.
- [47] 상기 혼합 추출물은 세신, 길경 및 계지의 3종을 혼합한 혼합 추출물일 수 있으며, 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종의 혼합물일 수 있다.
- [48] 상기 혼합 추출물은 각각의 재료에서 추출물을 수득한 후 혼합한 것일 수 있으며, 재료단계에서 혼합하여 일괄 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [49] 상기 세신, 길경 및 계지 혼합 추출물은 3종 혼합 추출물의 경우, 세신, 길경 및 계지를 각각 0.1~2:0.1~4:0.1~4, 구체적으로는 0.5~1.5:0.5~3:0.5~3, 보다 구체적으로는 0.7~1.5:0.7~2.5:0.7~2.5의 혼합비로 혼합한 것일 수 있으며, 2종 혼합 추출물의 경우, 세신 및 길경을 각각 0.1~2:0.1~4, 세신 및 계지를 각각 0.1~2:0.1~4, 길경 및 계지를 각각 0.1~4:0.1~4, 구체적으로는 세신 및 길경을 0.5~1.5:0.5~3, 세신 및 계지를 0.5~1.5:0.5~3, 길경 및 계지를 각각 0.5~3:0.5~3, 보다 구체적으로는 세신 및 길경을 0.7~1.5:0.7~2.5, 세신 및 계지를 0.7~1.5:0.7~2.5, 길경 및 계지를 0.7~2.5:0.7~2.5의 혼합비로 혼합한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 상기 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물은 세신, 길경 및 계지 조추출물뿐 아니라 추출물의 추가적인 가공에 의한 모든 형태를 의미한다.
- [51] 상기 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물, 구체적으로는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 메탄올 또는 에탄올로 추출하는 것일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 에탄올로 추출하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 식물의 건조 중량의 2 내지 10 배로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [52] 상기 추출 방법은 열수추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등 의

추출 방법을 사용할 수 있다. 추출시 온도는 구체적으로 10°C 내지 100°C일 수 있으며, 보다 구체적으로 상온일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시간은 구체적으로 30분 내지 1일일 수 있고, 보다 구체적으로 1시간 내지 20시간일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[53] 본 명세서에서 세신, 길경 및 계지 3종 혼합 추출물은 BS012와 혼용될 수 있다.

[54]

[55] 본 발명에서 사용되는 용어, “알레르기성 질환”은 개체에 어떤 종류의 물질(항원 또는 알레르겐(알레르기의 원인 인자))이 들어왔을 때 이것에 대하여 항체가 만들어지고, 그 후 다시 동일물질인 항원이 체내로 들어왔을 때 생기는 항원항체반응인 알레르기가 원인이 되어 발생하는 질환을 의미하며, 구체적으로는 알레르기성 호흡기 질환 또는 아토피 피부염일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[56] 본 발명에서 사용되는 용어, “알레르기성 호흡기 질환”은 알레르기 반응이 관여하는 질환 중 호흡기 질환을 뜻하며, 대표적으로 기관지 천식, 기관지염, 또는 알레르기성 비염이 있다.

[57] 본 발명에서 사용되는 용어, “기관지 천식(bronchial asthma)”은 폐 속에 있는 기관지가 아주 예민해진 상태로, 때때로 기관지가 좁아져서 숨이 차고 가랑가랑하는 숨소리가 들리면서 기침을 심하게 하는 증상을 나타내는 병을 말하며, 기관지의 알레르기 염증 반응 때문에 발생하는 염증성 질환의 하나이다.

[58] 본 발명에서 사용되는 용어, “기관지염(bronchitis)”은 폐의 기관지에 생기는 염증으로 90 % 이상의 원인이 바이러스 감염인 급성 기관지염과 달리, 대기 오염이나 석탄 채굴, 곡물 처리, 직물 제조, 축산, 금속 주조 등의 직종에서 자극이 강한 먼지의 만성 흡입 등이 원인으로 작용하는 만성 기관지염은 운동 시의 천명음과 호흡 곤란, 낮은 산소 포화도를 나타내며, 2년이 넘도록 가래, 기침이 끊이지 않고, 매년 3개월 이상 지속된다.

[59] 본 발명에서 사용되는 용어, “알레르기성 비염(allergic rhinitis)”은 코 점막이 특정 물질에 대하여 과민반응을 나타내는 것으로 알레르기를 일으키는 원인 물질(항원)이 코 점막에 노출된 후 자극 부위로 비만세포, 호산구를 비롯한 여러 종류의 IgE 항체를 매개로 하는 염증세포가 몰려들어 이들이 분비하는 다양한 매개물질에 의하여 염증반응이 발생하는 질환이다. 연속적으로 일어나는 발작적인 재채기, 맑은 콧물, 코막힘 등의 세 가지 주요 증상을 특징으로 하며, 이 세 가지 증상 중 두 가지 이상의 증상을 가지고 있을 때 알레르기 비염을 의심할 수 있다. 특징적인 증상 외에도 코 주위 가려움, 두통, 후각 감퇴 등의 증상이 동반될 수 있으며 합병증으로 중이염, 부비동염, 인후두염 등이 동반될 수 있다.

[60] 본 발명에서 사용되는 용어, “아토피 피부염(Atopic Dermatis, AD)”은 영유아기부터 발병이 시작되어 가려움을 동반하는 만성재발성 습진질환이다. 대식세포와 과립세포로 불리는 호염구, 호산구, 호중구, 비만세포, 그리고 Th2 세포 등 면역반응에 관여 세포들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있으며, 외부

항원에 대한 혈중 IgE의 증가로 나타나는 복합적 질환이다.

- [61] 상기 알레르기성 질환은 유전적인 인자와 환경적인 인자가 상호 작용하여 발병하며, 대개의 경우 완치가 쉽지 않은 대표적인 난치성 만성 질환이다. 숙주 요인으로 유전 인자, 비만, 성별 등이 있으며, 환경인자로 먼지 진드기, 꽃가루, 애완동물, 호흡기 감염바이러스, 운동, 아스피린 등의 약물, 흡연, 대기오염, 화학물질, 식품, 스트레스가 원인이 되고 있다. 그 중 기관지 천식의 경우, 다양한 발병 기전 중에 Th2 타입의 면역반응이 항진되어 이에 따라 인터루킨-4, 5, 13 등의 분비가 증가되게 되며, 이러한 반응과 연계하여 호산구를 비롯한 많은 염증세포들이 폐조직 내로 이동 및 침윤하게 된다. 또한 염증세포들은 다양한 전염증인자 및 화학주성인자들을 방출하여, 염증반응을 더욱 악화시키며, 기도 내 배상세포의 점액분비를 증가시키고, 기도 과민성을 야기하게 된다. 이러한 일련의 반응으로 인하여 기관지 천식 환자들은 호흡곤란, 청색증 및 흉통 등의 임상증상을 나타내게 된다. 아토피 피부염 또한 Th2 매개성 면역질환으로 알려져 있다.
- [62] 본 발명의 조성물은 Th2 세포 분화 억제를 통해 알레르기성 질환을 치료하는 것일 수 있다.
- [63] 본 발명의 구체적인 일실시예에서는, T 세포를 Th2 세포로 분화할 수 있는 조건에서 배양하면서 BS012를 처리한 결과, 대조군과 비교하여 현저한 Th2 분화 억제 효과를 나타내었다(도 4).
- [64] 또한, 본 발명의 조성물은 Th2 특이적 분화 억제를 통해 알레르기성 질환을 치료하는 것일 수 있다.
- [65] 본 발명의 구체적인 일실시예에서는, T 세포를 각각 Th1, Th2, Th17으로 분화할 수 있는 조건에서 배양하면서 BS012를 처리한 결과, Th2에서는 현저한 분화 억제를 나타냈으나, Th1 또는 Th17에서는 그 효과가 미미하거나 없는 수준으로 나타났다(도 3 내지 5).
- [66] 또한, 본 발명의 구체적인 일실시예에서는, 본 발명에 따른 혼합 추출물을 튜브를 통해 경구 투여하고 Th2 관련 사이토카인을 분석한 결과, BS012가 Th2 관련 사이토카인을 억제하는 것을 확인하였다(도 14).
- [67] 이로부터 BS012가 Th2 특이적인 분화 억제 효과를 나타낸다고 판단할 수 있다.
- [68] 상기 Th1은 주로 세포 매개 면역 및 자가면역질환과 관련되어 있으며, Th17은 자가면역질환 및 류마티스 관절염과 같은 염증반응과 관련되어 있는 것으로 알려져 있는 반면, Th2는 알러지 반응과 관련이 있으며, 특히 알레르기성 질환, 구체적으로는 알레르기성 호흡기 질환과 아토피 피부염과 관련이 있으므로, 본 발명에서 제공하는 BS012는 Th2 세포 분화 억제를 통해 알레르기성 질환, 특히 알레르기성 호흡기 질환과 아토피 피부염을 치료할 수 있다고 판단할 수 있다.
- [69]
- [70] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 혼합 추출물을 개체에 투여하여 알레르기성 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를

의미할 수 있다.

- [71] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 알레르기성 질환 발병 의심 개체에 투여하여 알레르기성 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [72] 본 발명에서 사용된 용어 "약학 조성물"이란, 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각의 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 점안투여하기 적합한 형태, 예를 들어, 점안제, 크림제, 연고제, 젤제 또는 로션제로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [73] 상기 본 발명의 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 창상 예방 또는 치료용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.
- [74] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [75] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 상업 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [76]
- [77] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의

예방 또는 치료방법을 제공한다.

[78] 상기 용어, “세신”, “길경”, “계지”, “혼합물”, “알레르기성 질환”, “예방” 및 “치료”는 전술한 바와 같다.

[79] 본 발명에서의 용어, “개체”란, 알레르기성 질환이 발병하였거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[80] 본 발명의 상기 예방 또는 치료방법은 구체적으로, 알레르기성 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[81] 본 발명에서의 용어, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 목적하는 바에 따라 점안 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여 될 수 있고, 구체적으로 경구 투여 및 비내 투여일 수 있으며, 더욱 구체적으로 기도 내 투여, 인후두 흡입 노출 및 비부 흡입 노출일 수 있다. 약학 조성물의 유효성분은 투여받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1 mg/kg/day 내지 1000 mg/kg/day, 0.5 mg/kg/day 내지 900 mg/kg/day, 1 mg/kg/day 내지 800 mg/kg/day, 2 mg/kg/day 내지 700 mg/kg/day, 5 mg/kg/day 내지 600 mg/kg/day, 10 mg/kg/day 내지 500 mg/kg/day, 20 mg/kg/day 내지 400 mg/kg/day, 30 mg/kg/day 내지 300 mg/kg/day, 40 mg/kg/day 내지 250 mg/kg/day 보다 구체적으로는 50 mg/kg/day 내지 200 mg/kg/day이 될 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[82] 본 발명의 구체적인 일실시에에서는, 본 발명에 따른 혼합 추출물의 투여 경로에 따른 효과 차이를 확인하기 위해 기도 내 투여 및 비부 흡입 노출을 통해 추출물을 투여하고 기관지 침출액 및 혈청 IgE를 분석하였다. 그 결과, 두 가지 투여 경로 모두 Th2 관련 사이토카인을 특이적으로 억제하여 BS012가 두 가지 투여 경로 모두에서 알레르기성 호흡기 질환 치료 효과를 가짐을 확인하였다(도 1 및 2).

[83] 또한, 본 발명의 구체적인 일실시에에서는, 본 발명에 따른 혼합 추출물을 튜브를 통해 경구 투여하고 혈청 IgE 및 Th2 관련 사이토카인을 분석하였다. 그 결과, BS012가 혈청 IgE 및 Th2 관련 사이토카인을 억제하여 아토피 피부염 치료 효과를 가짐을 확인하였다(도 14).

[84]

[85] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[86] 상기 용어, “세신”, “길경”, “계지”, “혼합물”, “알레르기성 질환” 및 “예방”은 전술한 바와 같다.

[87] 본 발명의 건강기능식품은 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물을 포함하는 침출차, 액상차, 음료, 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 또는 건강보조식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.

[88] 본 발명에서의 용어, “개선”은 상기 조성물을 투여하여 알레르기성 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[89] 본 발명의 건강기능식품은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[90] 본 발명의 혼합 추출물을 포함하는 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 알레르기성 질환 개선 효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[91] 상기 식품보조첨가제는 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 그 종류가 제한되는 것은 아니다.

[92] 이때, 상기 식품에 포함되는 추출물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 구체적으로는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.

[93] 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1 내지 30g, 구체적으로는 3 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산,

데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 탈색제(아질산나트륨, 아초산나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[94] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[95]

[96] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 세진, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[97] 상기 용어, “세진”, “길경”, “계지”, “혼합물”, “알레르기성 질환”, “예방” 및 “개선”은 전술한 바와 같다.

[98] 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[99] 본 발명에서 용어, “사료”는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다.

[100] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[101]

### 발명의 실시를 위한 형태

[102] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[103]

[104] **실시예 1. 세신, 길경 및 계지 중 2종 이상의 혼합 추출물의 제조**

[105] 세신, 길경 및 계지를 세척 후 완전 건조한 후, 각 시료를 분쇄기에 분쇄하고 70% 에탄올로 60~70°C에서 3시간 동안 2회 감압 추출하여 70% 에탄올 추출물을 제조 후 냉동 건조하였다. 건조된 각 생약 추출물을 중량비 (세신, 길경 및 계지, 1:2:2)로 조제하여 BS012를 수득하였다. 또한, 이와 동일한 방법을 사용하여 세신 및 길경 (1:2 중량비), 세신 및 계지 (1:2 중량비), 길경 및 계지 (2:2 중량비) 혼합 추출물을 수득하였다.

[106]

[107] **비교예 1. 세신, 길경 또는 계지 단독 추출물의 제조**

[108] 각 추출물의 효과를 비교하기 위해, 실시예 1과 동일한 방법을 사용하여 세신, 길경 또는 계지 각각에 대한 단독 추출물을 제조하였다.

[109]

[110] **실시예 2. 기관지 천식 동물 모델 제조**

[111] 기관지 천식을 가진 마우스 모델을 제조하기 위해, 다음과 같은 방법을 이용하였다. 먼저, 감작 (sensitization)을 위해 PBS 100 $\mu$ l에 용해된 2 $\mu$ l의 수산화 알루미늄으로 유화시킨 OVA (ovalbumin) 75 $\mu$ g을 마우스에 복강 내 투여하여 0일 및 14일에 2회 감작시켰다. 두번째 감작 이후, 공격유발 (challenge)를 위하여 27 내지 30일에 4회에 걸쳐 50 $\mu$ g의 OVA를 전신흡입노출을 통해 투여함으로써 기관지 천식을 유도하였다.

[112] 또한, 실험군의 경우, 4회의 공격유발과 동일한 시점에 실시예 1에서 수득한 BS012를 농도별(1.5, 5, 15, 50 mg/head)로 기도 내 투여하였다.

[113]

[114] **실험예 1. 혼합 추출물을 처리한 기관지 천식 모델의 기관지 침출물 및 혈청 IgE분석**

[115] **1-1. BS012의 기도 노출에 따른 기관지 침출물 및 혈청 IgE 분석**

[116] 혼합 추출물의 기관지 천식 관련 효과를 확인하기 위해, T 헬퍼 2형 세포 (T helper type 2 cell; Th2)에 의해 생성되며 기관지 천식의 기도 과민성과 호산성 염증반응에 중요한 매개역할을 하는 사이토카인인 IL-4 및 IL-5, Th1 세포에 의해 매개되며 자가면역에 영향을 주는 IFN- $\gamma$  및 염증반응에서 기초적인 단계에 작용하는 IgE의 수준을 분석하였다.

[117] 실시예 2의 동물 모델의 기도에 도관을 삽입하고 1ml의 dPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)를 주입하여 세척한 후 0.75ml의 기관지 침출물(Bronchoalveolar lavage fluid; BALF)을 수득하였다. 수득한 BALF를 4°C에서 5000rpm으로 10분간 원심분리하여 사이토카인 분석에 사용할 상등액을 수득하였고 이를 -20°C에 동결시켜 보관하였다. 혈청의 경우, 마우스에서 혈액을 수득한 후 상온에서 30분 반응시키고 원심분리하여 혈청을 수득하였다.

[118] BALF 내에 존재하는 Th2 사이토카인 (IL-4 및 IL-5) 및 Th1 매개 사이토카인 (IFN- $\gamma$ )의 농도는 ELISA 키트를 이용하여 정량화하였다. 각각 항-IL-4, 항-IL-5,

항-IFN- $\gamma$  항체로 미리 코팅한 웰 플레이트에 50 $\mu$ l의 BALF를 넣고 실온에서 2시간 동안 배양한 뒤, 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 이후, 마우스 IL-4, IL-5 및 IFN- $\gamma$  접합체 100 $\mu$ l를 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 배양한 뒤, 3회 세척하였다. 마지막으로, 100 $\mu$ l의 종결용액을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 혈청에서 IgE의 수준을 확인하는 방법 또한 ELISA 분석을 이용하였다.

- [119] 상기 방법으로 검출한 플레이트 내의 사이토카인 및 혈청 IgE의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기로 450nm에서 측정하였다.
- [120] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 실시예 2의 농도별 BS012(1.5 mg/head(T1), 5 mg/head(T2), 15 mg/head(T3), 50 mg/head(T4))의 기도 노출에 따른 기관지 침출물 및 혈청 IgE 분석 결과에서 IL-4 및 IL-5는 BS012의 처리에 의해 그 수준이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있는 반면, IFN- $\gamma$ 는 BS012에 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있다. 또한, IgE는 BS012에 의해 그 수준이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [121] 이는, BS012가 IgE를 억제함으로써 염증 반응을 억제하는 경향을 보이거나, Th2에 의해 생성되는 IL-4 및 IL-5는 감소한 반면, Th1의 매개로 인해 생성되는 IFN- $\gamma$ 에 영향을 받지 않았다는 점에서 BS012가 Th2 기전에 특이적으로 영향을 준 것으로 판단된다.
- [122]
- [123] **1-2. BS012의 비부 흡입 노출에 따른 기관지 침출물 및 혈청 IgE 분석**
- [124] BS012의 투여 경로에 따른 효과 차이를 확인하기 위해, 실시예 2와 동일한 방법으로 기관지 천식 모델을 제조한 후, 실험군의 경우, 4회의 공격유발과 동일한 시점에 실시예 1에서 수득한 BS012를 농도별(9, 27, 80 mg/m<sup>3</sup>)로 비부 흡입 노출을 통해 기관지 천식유도물질 노출 3시간 전에 투여하였다. 양성대조군으로 덱사메타손(Dexamethasone) 1.5 mg/kg을 기관지 천식유도물질 노출 1시간 전에 복강 내 투여하였다.
- [125] BALF 및 혈청 IgE의 분석 방법은 실험예 1-1과 동일한 방법을 사용하였다.
- [126]
- [127] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 농도별 BS012(9 mg/head(T1), 27 mg/head(T2), 80 mg/head(T3)) 및 덱사메타손(Dexamethasone) 1.5 mg/kg(T4)의 비부 흡입 노출에 따른 기관지 침출물 및 혈청 IgE 분석 결과에서 Th2에 의해 생성되는 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13은 BS012에 의해 유의적인 감소를 나타낸 반면, Th1 및 Th17 매개 사이토카인인 IFN- $\gamma$  및 IL-17의 경우, 농도에 따른 유의적인 효과를 나타내지 않는 것을 확인하였다.
- [128] 이는, 비부 흡입 노출의 형태로 BS012를 처리하여도 Th2 기전 특이적인 억제 효과를 나타내는 것으로 판단할 수 있다.

[129]

[130] **실험예 2. 혼합 추출물에 따른 T 세포의 세포 분화 억제 효과 분석**

[131] 면역에 대한 반응 기작 중에서도 Th2가 기관지 천식에 영향을 준다는 것은 잘

알려져 있다. 이에, 본 발명자들은 본 발명의 세신, 길경 및 계지 중 2종 이상의 혼합 추출물이 T 세포의 세포 분화 과정에 어떤 영향이 있는지 확인하기 위해, 면역 반응에 관여하는 Th1, Th2 및 Th17에 대한 분화 수준을 분석하였다. 또한, 추출물간의 효과를 비교하기 위해, 실시예 1 및 비교예 1에서 수득한 세신, 길경 및 계지 중 2종을 혼합한 추출물 및 단독 추출물을 각각 처리하여 그 효과를 분석하였다.

[132]

[133] **2-1. Th1 세포 분화 수준 분석**

[134] 마우스의 대퇴골과 경골을 분리하여 골수 세포를 얻은 후 GM-CSF 20 ng/mL이 포함된 RPMI-1640 배지 (10 % 소태아혈청, 1 % 페니실린/스트렙토마이신, 25 mM HEPES)에서 7-8 일간 분화하여 수지상세포를 수득하였다. 마우스 비장과 림프절을 100  $\mu$ m 메쉬로 분쇄하여 단일 세포로 만든 후 CD4 마이크로비드를 이용하여 양성 선택(positive selection)을 수행하였다. 그 후 BD FACS ARIA III를 이용하여 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD25<sup>lo</sup>CD44<sup>lo</sup> 집단 (naive CD4<sup>+</sup> T 세포)을 분리하였다. Th1으로의 분화를 위하여  $\alpha$ -CD3 2  $\mu$ g/mL, 지질다당류(lipopolysaccharide) 300 ng/mL,  $\alpha$ -IL-4 5  $\mu$ g/mL이 포함된 배지에 Vehicle 또는 시험물질을 처리하고 수지상 세포 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 개와 naive CD4<sup>+</sup> T 세포 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 개를 넣어 72 시간 배양하였다. 그 후 Phorbol myristate acetate 100 nM, ionomycin 1  $\mu$ g/mL, Brefeldin A 5  $\mu$ g/mL, Monensin 2  $\mu$ M을 처리하고 4 시간 후 세포를 얻어 고정한 후 세포 내 사이토카인에 대하여 염색하였다. 이를 BD FACS LSR Fortessa를 이용하여 검출하고, FlowJo™ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[135] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, CD4<sup>+</sup> T 세포의 Th1으로의 분화를 촉진하는 조건에서 BS012는 억제효과가 나타나지 않았다. 2종 혼합 추출물 중에서는 길경 + 세신의 혼합 추출물이 유의적인 억제 효과를 나타냈으나 미미한 수준이었으며, 세신, 길경 및 계지의 단독 추출물의 경우 30% 가량의 분화 억제 효과를 나타내었다.

[136] 단독 추출물 처리시 분화 억제 효과가 나타나는 것은 혼합물과 비교하여 개별 물질의 농도가 높은 것이 원인일 것으로 판단된다.

[137]

[138] **2-2. Th2 세포 분화 수준 분석**

[139] Th1에서와 같이 수지상 세포와 naive CD4<sup>+</sup> T cell을 수득하였다. Th2으로의 분화를 위하여  $\alpha$ -CD3 2  $\mu$ g/mL, IL-2 20 ng/mL, IL-4 10 ng/mL,  $\alpha$ -IFN $\gamma$  5  $\mu$ g/mL이 포함된 배지에 Vehicle 또는 시험물질을 처리하고 수지상 세포 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 개와 naive CD4<sup>+</sup> T 세포 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 개를 넣어 72시간 배양하였다. 그 후 Phorbol myristate acetate 100 nM, ionomycin 1  $\mu$ g/mL, Brefeldin A 5  $\mu$ g/mL, Monensin 2  $\mu$ M을 처리하고 4 시간 후 세포를 얻어 고정한 후 세포 내 사이토카인에 대하여 염색하였다. 이를 BD FACS LSR Fortessa를 이용하여 검출하고, FlowJo™ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[140] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, CD4+ T 세포의 Th2로의 분화를 촉진하는 조건에서 BS012가 가장 우수한 분화 억제 효과를 나타내었다. 길경 + 계지를 제외하면, 2종 혼합 추출물이 그 다음으로 높은 분화 억제 효과를 나타내었으며, 단독 추출물에서도 계지를 제외한 길경과 세신에서 유의적인 분화 억제 효과를 나타내었다. 단독의 효과와 비교하여 동일한 농도에서 2종 혼합물 및 3종 혼합물의 Th2 분화 억제 효과가 높아지는 것을 통해 각각의 추출물이 혼합되어 상승적인 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있다.

[141]

[142] **2-3. Th17 세포 분화 수준 분석**

[143] Th1에서와 같이 수지상 세포와 naive CD4+ T cell을 수득하였다. Th17으로의 분화를 위하여  $\alpha$ -CD3 2  $\mu$ g/mL, LPS 200 ng/mL, TGF $\beta$  5 ng/mL,  $\alpha$ -IL-4 5  $\mu$ g/mL,  $\alpha$ -IFN $\gamma$  5  $\mu$ g/mL이 포함된 배지에 Vehicle 또는 시험물질을 처리하고 수지상 세포  $1 \times 10^4$  개와 naive CD4+ T 세포  $1 \times 10^5$  개를 넣어 72 시간 배양하였다. 그 후 Phorbol myristate acetate 100 nM, ionomycin 1  $\mu$ g/mL, Brefeldin A 5  $\mu$ g/mL, Monensin 2  $\mu$ M을 처리하고 4 시간 후 세포를 얻어 고정한 후 세포 내 사이토카인에 대하여 염색하였다. 이를 BD FACS LSR Fortessa를 이용하여 검출하고, FlowJo™ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[144] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, CD4+ T 세포의 Th17로의 분화를 촉진하는 조건에서 모든 혼합물 또는 단독 추출물은 Th17의 분화에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

[145]

[146] 종합하면, BS012는 Th2 특이적으로 상승적인 분화 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 면역 반응 중 알레르기 질환, 대표적으로 알레르기성 호흡기 질환에 대한 치료 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

[147]

[148] **실시예 3. 혼합 추출물을 경구 투여한 기관지 천식 모델 제조**

[149] 혼합 추출물 BS012를 반복 경구 투여함에 따른 항기관지 천식 효과를 확인하기 위해, 19일 동안 1일 1회 혼합 추출물 BS012, 양성대조군으로 덱사메타손(Dexamethasone, Dex)을 하기 표 1에 따라 경구 투여하였다.

[150] 경구 투여와 동시에, 마우스 모델에 기관지 천식을 유도하기 위해, PBS 100 $\mu$ l에 용해된 2 $\mu$ l의 수산화 알루미늄으로 유화시킨 OVA (ovalbumin) 75 $\mu$ g을 마우스에 복강 내 투여하여 0일 및 7일째에 2회 감작시켰다 (sensitization). 두번째 감작 이후, 공격유발 (challenge)를 위하여 14 내지 17일째에 4회에 걸쳐 50 $\mu$ g의 OVA를 전신흡입노출을 통해 투여함으로써 기관지 천식을 유도하였다. 19일째에 마지막으로 경구 투여하고 다음날 부검하였다.

[151]

[152] [표1]

| 실험군                             | 동물수 | 동물 ID | 천식 유도 | 시험 약물 | 투여량(mg/kg/day) |
|---------------------------------|-----|-------|-------|-------|----------------|
| Vehicle<br>대조군(Vehicle control) | 6   | 1-6   | X     | -     | -              |
| 시험약-1(T1)                       | 6   | 7-12  | O     | BS012 | 50             |
| 시험약-2(T2)                       | 6   | 13-18 | O     | BS012 | 100            |
| 시험약-3(T3)                       | 6   | 19-24 | O     | BS012 | 200            |
| 대조약(T4)                         | 6   | 25-30 | O     | Dex   | 1.5            |
| 천식<br>대조군(Asthma control)       | 6   | 31-36 | O     | -     | -              |

[153]

[154] 실험예 3. 혼합 추출물의 경구 투여에 따른 기관지 천식 모델의 항기관지 천식 효과 분석

[155] **3-1. 체중 변화 분석**

[156] 혼합 추출물을 경구 투여하는 기간 동안 기관지 천식 모델의 체중을 1주에 2~3회 측정된 결과, 도 6과 같이 혼합 추출물 및 다른 실험군의 경구 투여는 기관지 천식 모델의 체중 증감에 있어 별다른 영향을 나타내지 않았다.

[157]

[158] **3-2. 기관 무게 변화 분석**

[159] 동물 모델의 폐 좌엽을 적출하고 그 무게를 측정한 결과, 도 7과 같이 기관지 천식 대조군에 비해 폐 좌엽 무게가 적게 나타났으며, 혼합 추출물 투여군 간에는 큰 차이가 없었다.

[160]

[161] **3-3. 혈청 IgE, 사이토카인 및 Th2 세포 분화 수준 분석**

[162] 폐 우엽으로부터 채취한 시료의 BALF 및 혈청 IgE 분석 방법은 실험예 1-1과 동일한 방법을 사용하였다.

[163] 그 결과, 도 8과 같이 Th2에 의해 생성되는 사이토카인인 IL-5 및 IL-13, Th1 및 Th17 매개 사이토카인인 IFN- $\gamma$  및 IL-17은 BS012에 의해 유의적인 감소를 나타내었다. 특히, IgE는 농도에 따른 유의적인 효과를 나타내는 것을

확인하였다.

[164] 또한, 백혈구 백분율 산정(differential cells count) 결과, 도 9와 같이 BS012은 T 세포 분화과정에서 Th2 선택적인 반응을 억제하며, 200 mg/kg 투여용량에서 텍사메타손과 동등도 이상의 활성이 나타났다.

[165]

[166] 종합하면, BS012는 OVA에 의해 유도된 기관지 천식모델에서, 흡입시 뿐만 아니라 경구 투여시에도 용량의존적으로 호산구 유입 및 Th2 반응을 억제하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다. 특히, 200 mg/kg 투여용량에서 강력한 스테로이드인 텍사메타손과 동등도 이상의 활성이 나타나, 기존 기관지 천식 조절제 시장의 부신피질호르몬 제제를 대체 할 수 있는 천연물의약품 후보물질로 사용할 수 있음을 시사하였다.

[167]

[168] 혈중 IgE의 현저한 억제효과에 비추어 BS012는 Th2 매개성 타 면역질환인 아토피 피부염 등에도 적용 가능할 것으로 판단되어, 이후에서는 아토피 피부염에 대한 효과를 검정하였다.

[169]

[170] 실시예 4. 혼합 추출물을 경구 투여한 아토피 피부염 모델 제조

[171] NC/Nga mice는 중앙실험동물(서울, 대한민국)으로부터 구입하였으며, 일정한 온도( $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), 습도( $55\pm 15\%$ ) 및 조사량(12 시간) 하에서 주령 12주까지 사육하였다.

[172] DNCB(2, 4-dinitrochlorobenzene)는 아토피 피부염을 유발하는 약물로서 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. DNCB는 아세톤과 올리브오일이 3:1로 혼합된 용액에 0.5%와 1%로 희석한 다음 사용되었다. 실험 시작 5일 전 쥐의 등 부위를 제모한 후, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 1% DNCB 용액 200  $\mu\text{L}$ 를 등 부위에 도포하였고 4일 동안 면역반응을 유발한 후, 6주 동안 0.5% DNCB 용액 200  $\mu\text{L}$ 를 등 부위에 도포하여 아토피 피부염을 유도하였다.

[173] 이후 아토피 피부염이 유도된 동물 모델에 10일 동안 1일 1회 혼합 추출물 BS012(K6922; 50 mg/kg/day(low, L), 100 mg/kg/day(medium, M), 200 mg/kg/day(high, H)) 또는 양성대조군으로 텍사메타손(Dexamethasone, Dex; 0.5 mg/kg/day)을 튜브를 이용하여 경구 투여하였다.

[174]

[175] 실험예 4. 혼합 추출물의 경구 투여에 따른 아토피 피부염 모델의 아토피 피부염 개선 효과 분석

[176] **4-1. 체중 변화 분석**

[177] 혼합 추출물을 경구 투여하는 기간 동안 아토피 피부염 모델의 체중을 1주에 2~3회 측정한 결과, 도 10과 같이 혼합 추출물 및 다른 실험군의 경구 투여는 아토피 피부염 모델의 체중 증감에 있어 별다른 영향을 나타내지 않았다.

[178]

[179] **4-2. 피부 표면 관찰**

[180] 혼합 추출물을 경구 투여하는 기간 동안 아토피 피부염 모델의 피부 표면을 1일째, 3일째, 5일째, 10일째에 관찰한 결과, 도 11 및 도 12와 같이 아토피 피부염이 유발된 후 아무 처리를 하지 않은 대조군(AD)은 아토피 피부염과 관련된 피부 손상이 심하게 발생하였으나, 혼합 추출물 BS012 100, 200 mg/kg/day을 투여한 쥐의 피부에서는 피부 손상이 억제되었으며, 양성대조군인 텍사메타손과 동등도 이상의 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[181]

[182] **4-3. 긁는 횟수 분석**

[183] 혼합 추출물을 경구 투여하는 기간 동안 아토피 피부염 모델이 피부를 긁는 횟수를 1일째, 3일째, 5일째, 10일째에 측정한 결과, 도 13과 같이 BS012 100, 200 mg/kg/day을 투여한 쥐의 피부 긁는 횟수가 아토피 피부염이 유발된 후 아무 처리를 하지 않은 대조군(AD)에 비해 감소한 것을 확인하였다.

[184]

[185] **4-4. 혈청 IgE, 사이토카인 수준 분석**

[186] 아토피 피부염 모델에서 혈액을 수득한 후 상온에서 30분 반응시키고 원심분리하여 혈청을 수득하였다.

[187] 혈청 IgE, Th2 사이토카인인 IL-4 및 IL-5, Th1 및 Th17 매개 사이토카인인 IFN- $\gamma$  및 IL-17, IL-6, CD11c+ 골수 수지상세포(myeloid dendritic cell)를 유도하여 Th2 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있는 사이토카인인 TSLP(thymic stromal lymphopoietin)의 농도는 ELISA 키트를 이용하여 정량화하였다. 분석 방법은 실험예 1-1과 동일한 방법을 사용하였다.

[188] 그 결과, 도 14와 같이 아토피 피부염이 유발된 후 아무 처리를 하지 않은 대조군(AD)은 혈청 IgE 및 IL-4, IL-5, TSLP의 발현이 증가하고 IFN- $\gamma$ 의 발현이 감소하였으나, BS012 및 텍사메타손 투여군은 혈청 IgE 및 IL-4, IL-5, TSLP의 발현을 억제하고 IFN- $\gamma$ 의 발현을 증가시켰다.

[189]

[190] **4-5. 피부의 조직병리학적 변화 수준 분석**

[191] 아토피 피부염 모델의 피부 조직을 생검하여 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정한 후 파라핀으로 포맷하였고, 4  $\mu$ M 두께로 block을 만들었다. 이렇게 분리한 조직부분은 표피(epidermis), 진피(dermis), 각질형성세포(keratinocytes), 호중구(neutrophils), 호산구(eosinophil), 그 외 다른 세포 및 부종을 식별하는 H&E(hematoxyline/eosin) 염색과 비만세포를 염색하여 비만세포의 침윤을 확인할 수 있는 톨루이딘블루(toluidine blue) 염색하고, 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan, X100)으로 관찰하였다.

[192] 그 결과, 아토피 피부염을 유발된 후 아무 처리를 하지 않은 대조군(AD)의 표피 두께는 비후(hyperplasia)하게 확장되고(도 15) 비만세포의 침윤(도 16) 등이

정상군에 비하여 현저하게 증가하였으나, BS012 및 덱시메타손 투여군의 표피 두께는 대조군에 비하여 현저하게 줄어들었고 비만세포 침윤이 감소하였다. 이를 수치로 나타낸 도 17에서도 위와 상동한 결과를 확인하였다.

[193]

[194] 종합하면, BS012는 DNCB에 의해 유도된 아토피 피부염 모델에 경구 투여시 아토피 관련 바이오마커를 억제하고, 아토피 피부염으로 인한 표피 비후, 비만세포 침윤, 염증 정도를 감소시키는 것을 확인하였다. 특히, 100 및 200 mg/kg 투여용량에서 강력한 스테로이드인 덱사메타손과 동등도 이상의 활성이 나타나, 기존 아토피 피부염 치료제 시장의 부신피질호르몬 제제를 대체할 수 있는 천연물의약품 후보물질로 사용할 수 있음을 시사하였다.

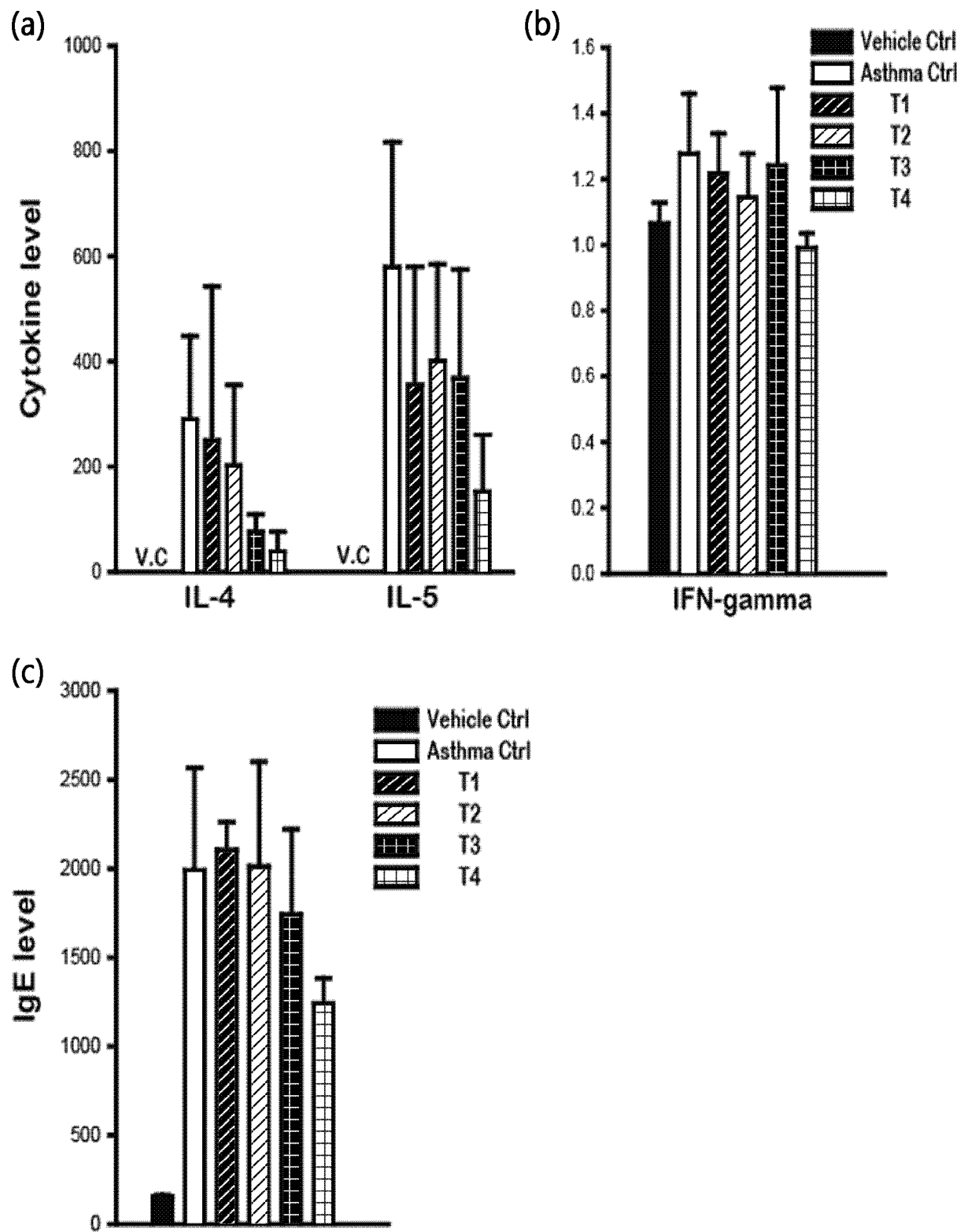
[195]

[196] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

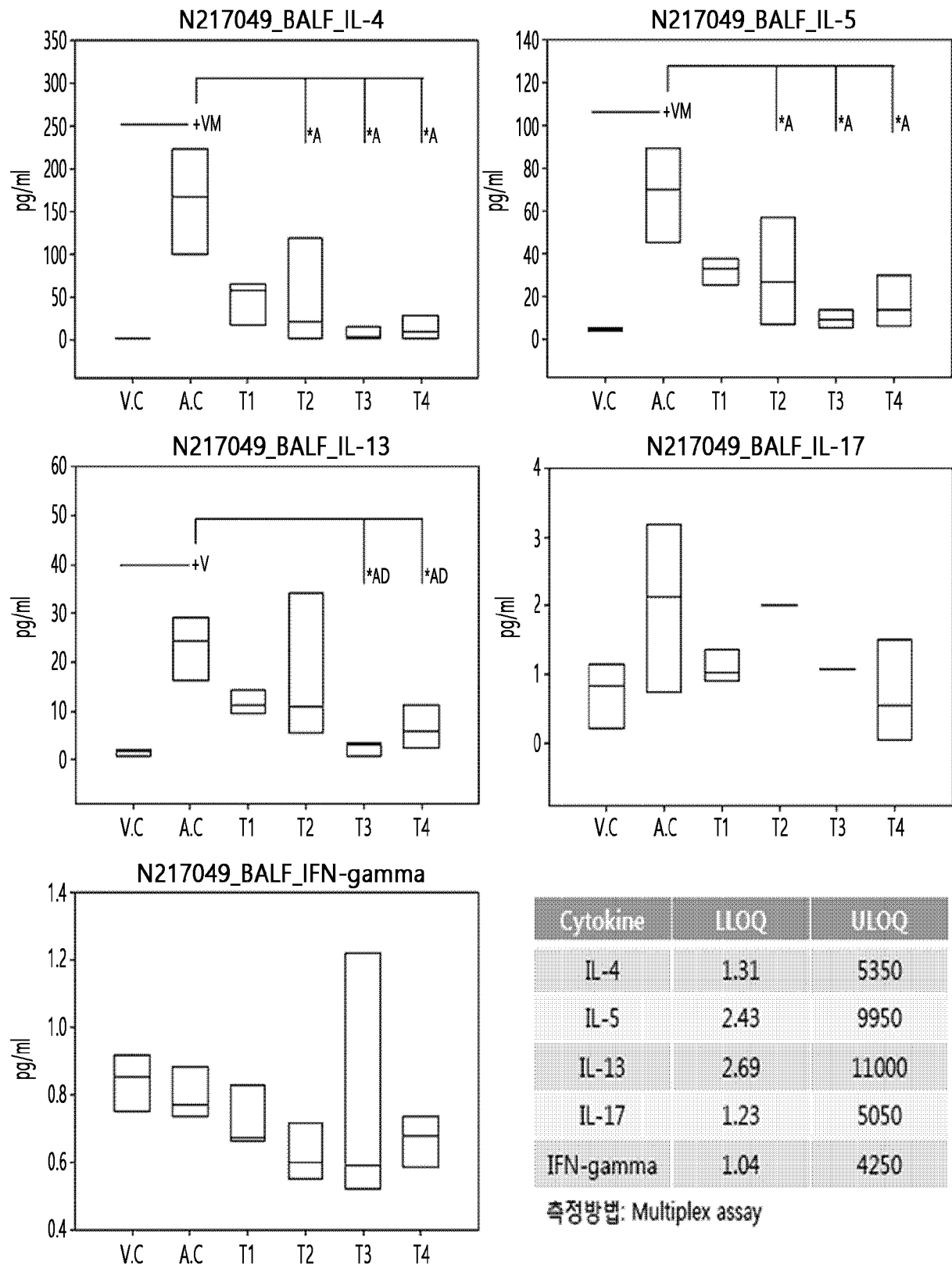
## 청구범위

- [청구항 1] 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 물, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 알코올 및 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 용매에 의한 추출물인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 용매는 에탄올인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 알레르기성 호흡기 질환 또는 아토피 피부염인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 알레르기성 호흡기 질환은 기관지염, 기관지 천식 또는 알레르기성 비염인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 알레르기성 질환의 예방 또는 치료는 Th2 세포 분화 억제제를 통해 달성되는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 7] 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 8] 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 9] 세신, 길경 및 계지로 이루어진 군에서 선택되는 2종 이상의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

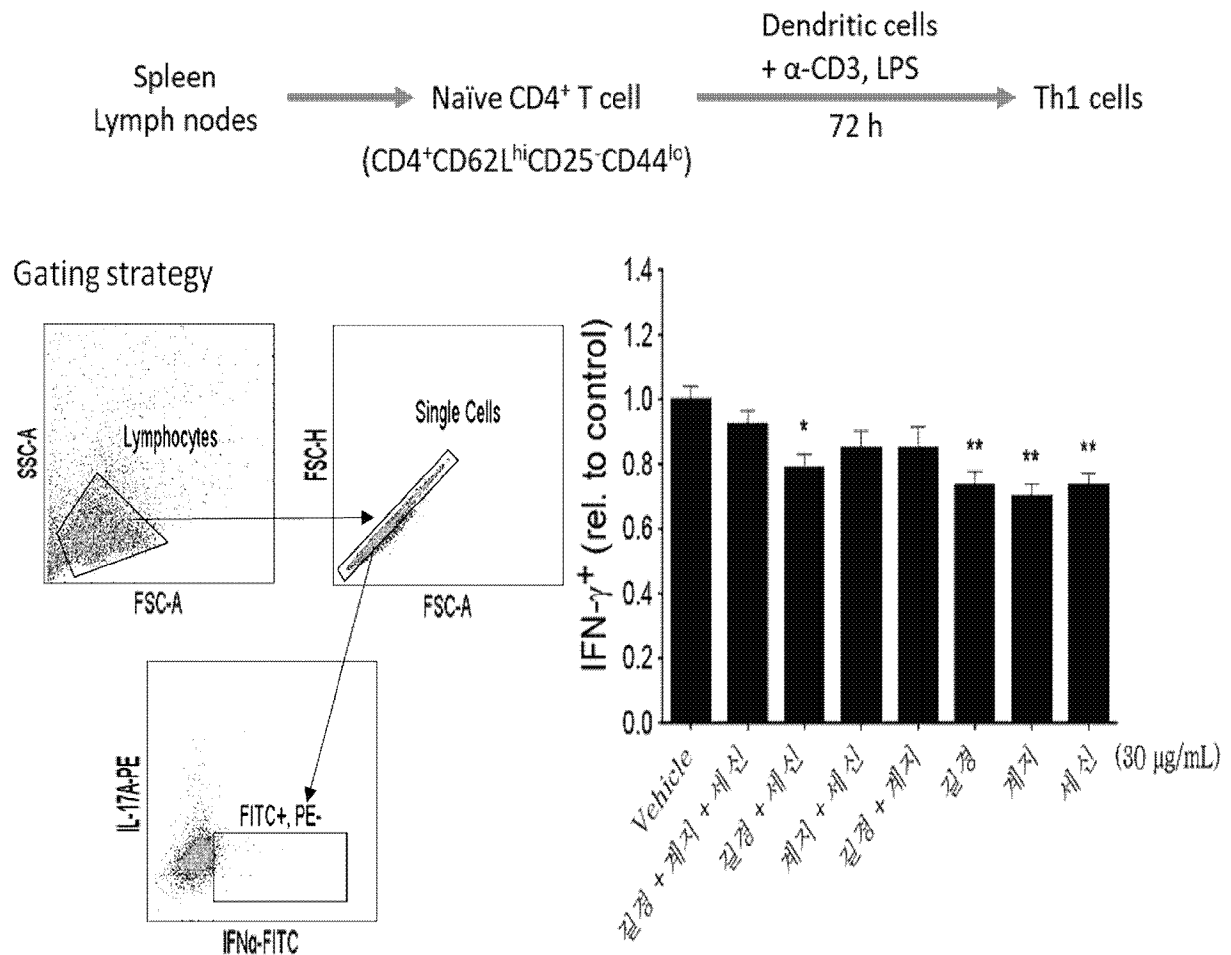
[도 1]



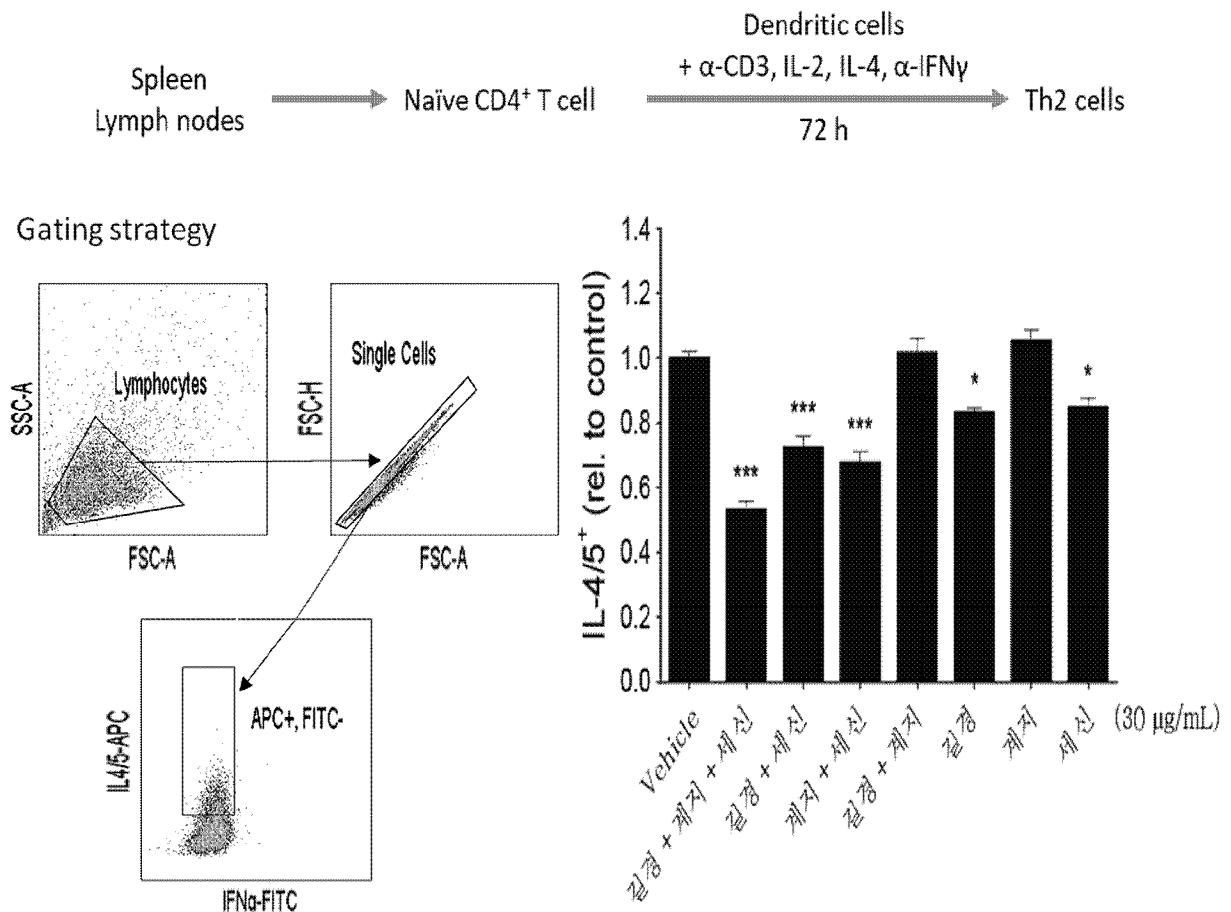
[도2]



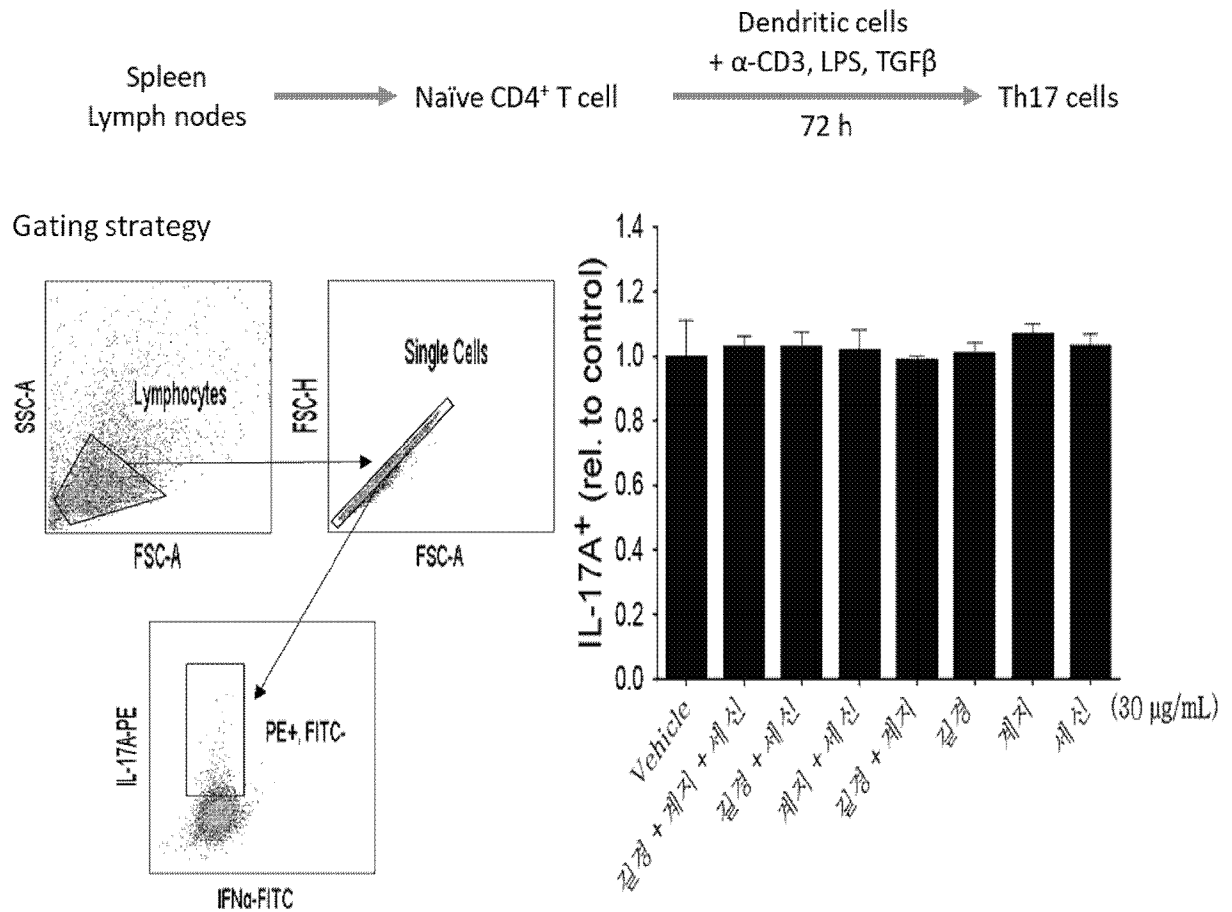
[도3]



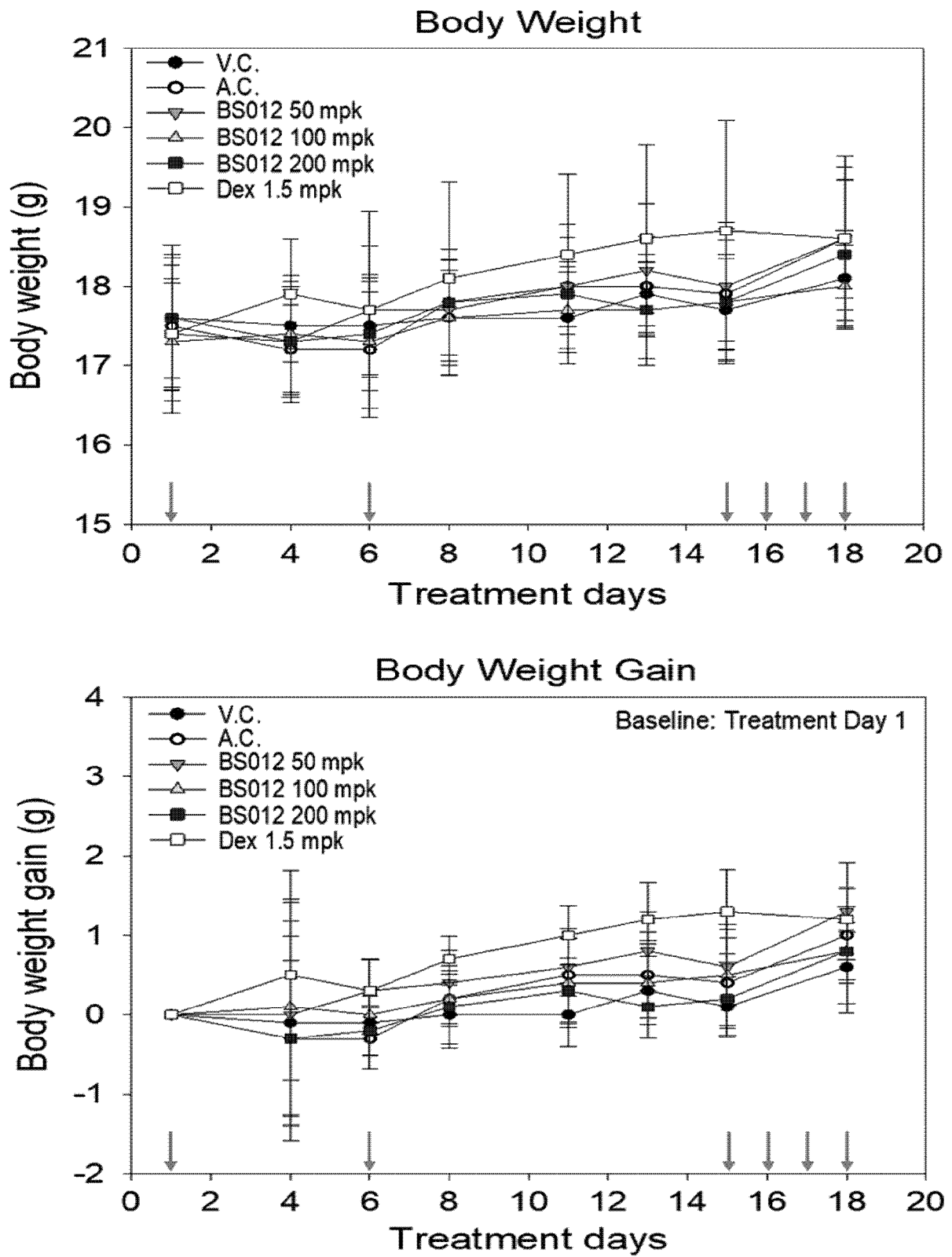
[도4]



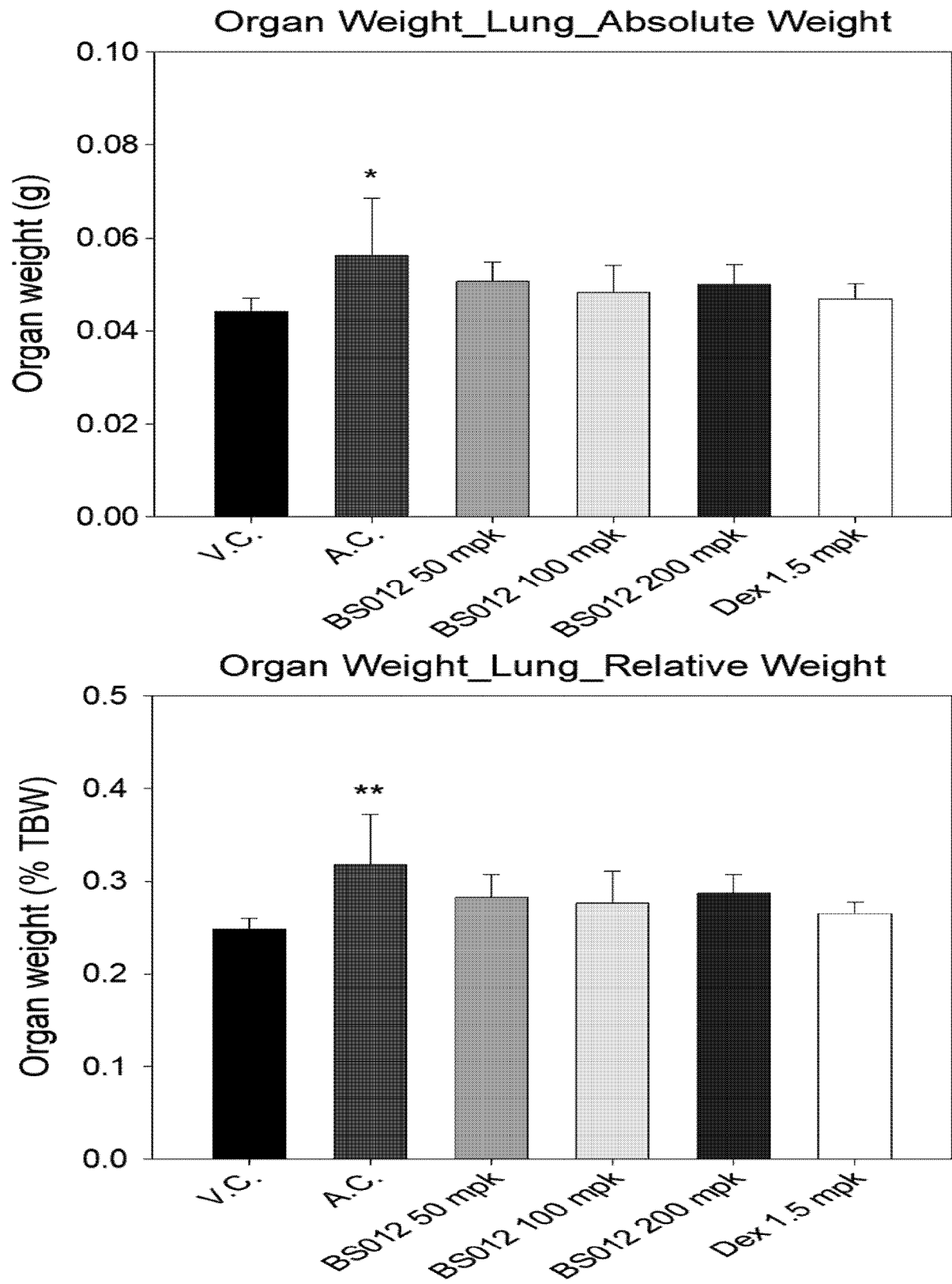
[도5]



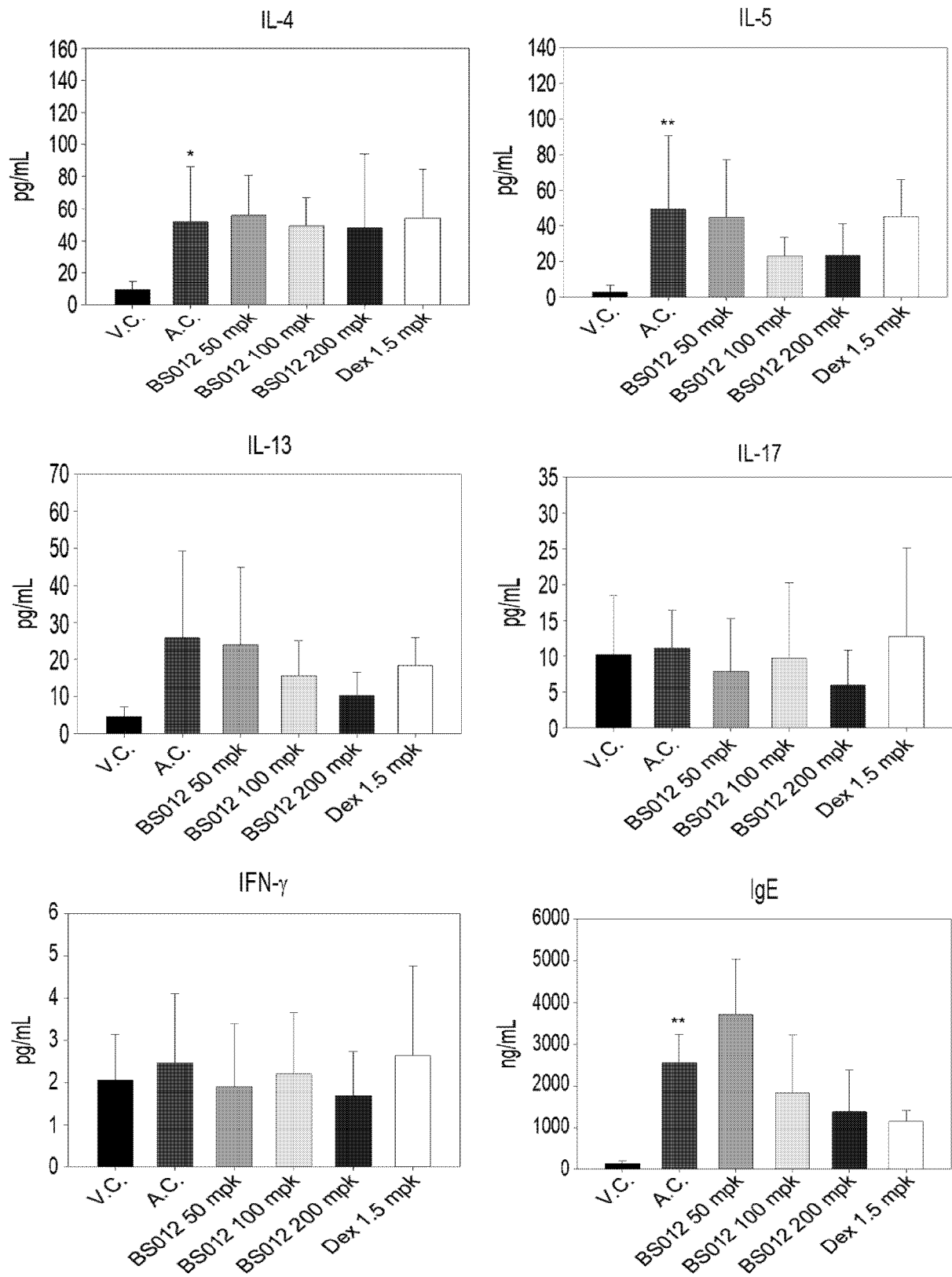
[도6]



[도7]

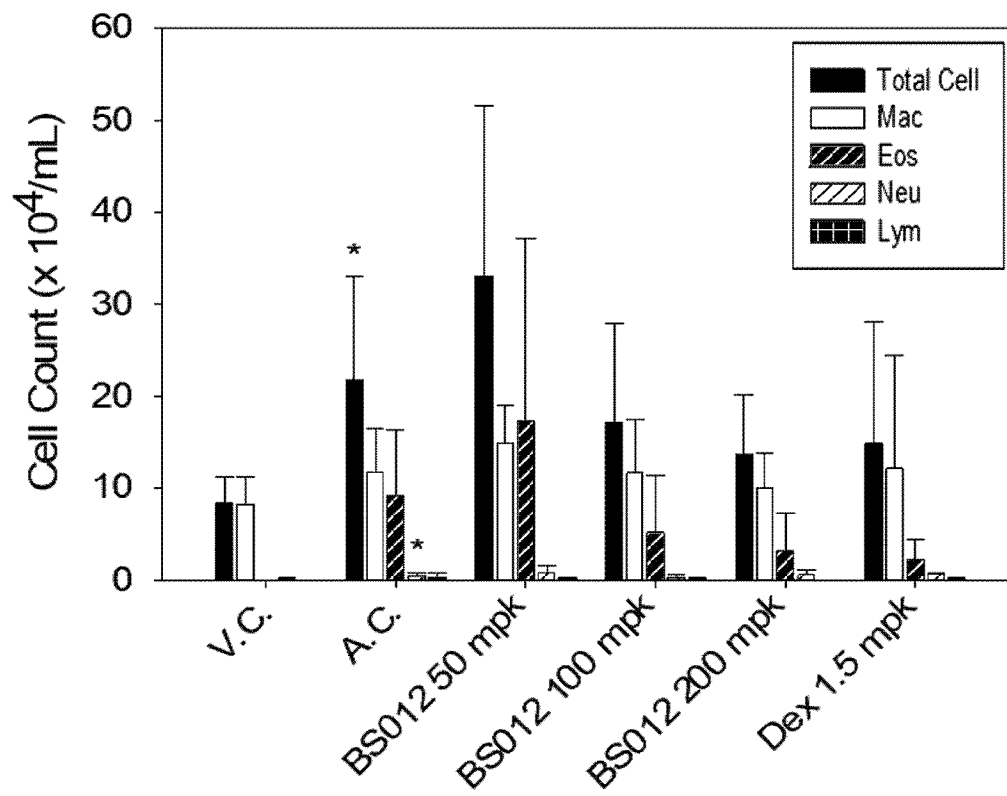


[도8]



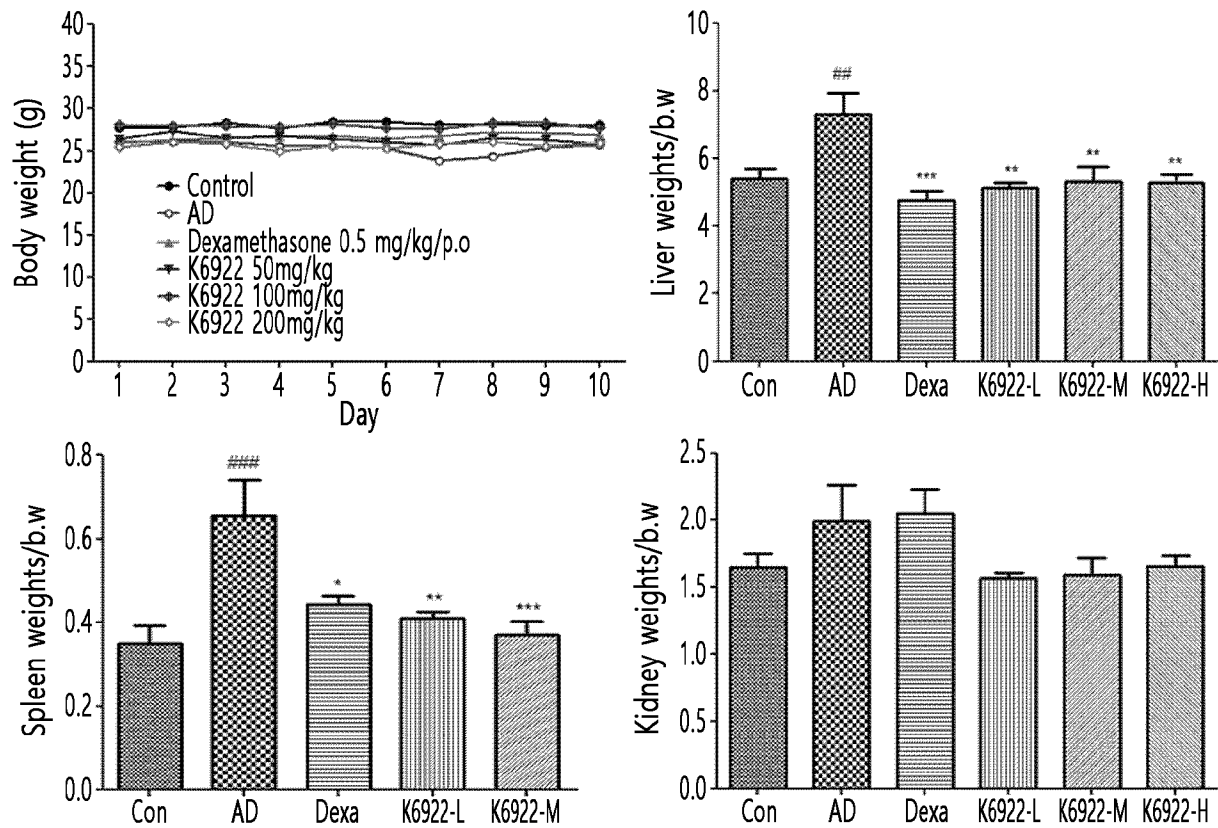
[도9]

## Differential Cell Count

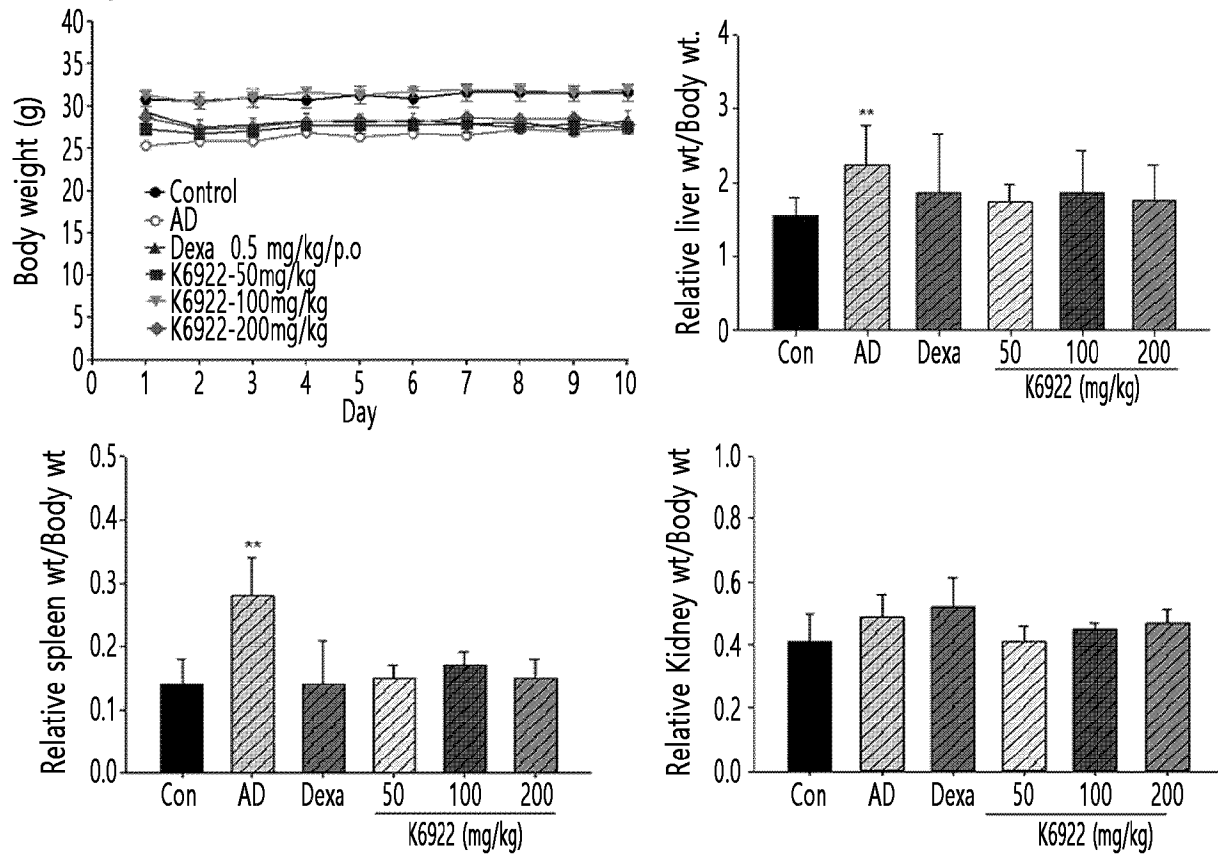


[도10]

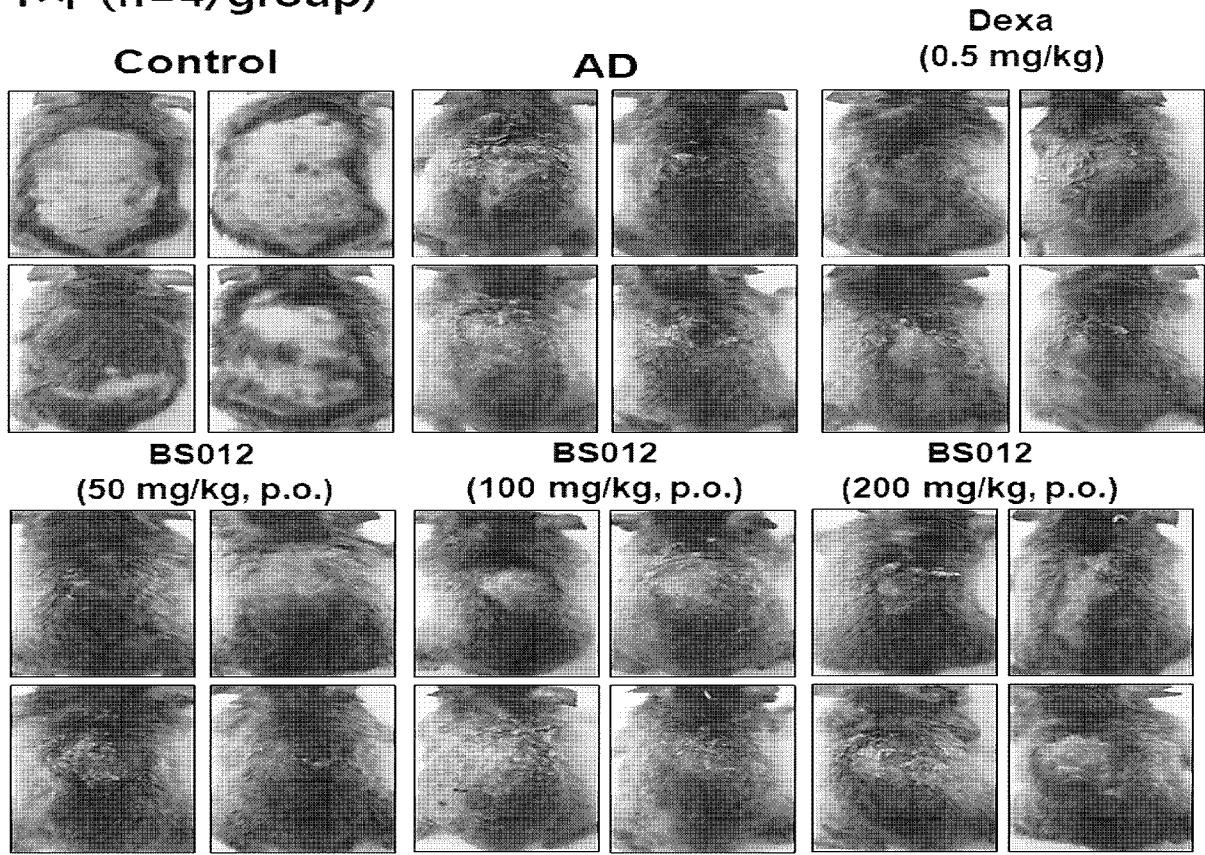
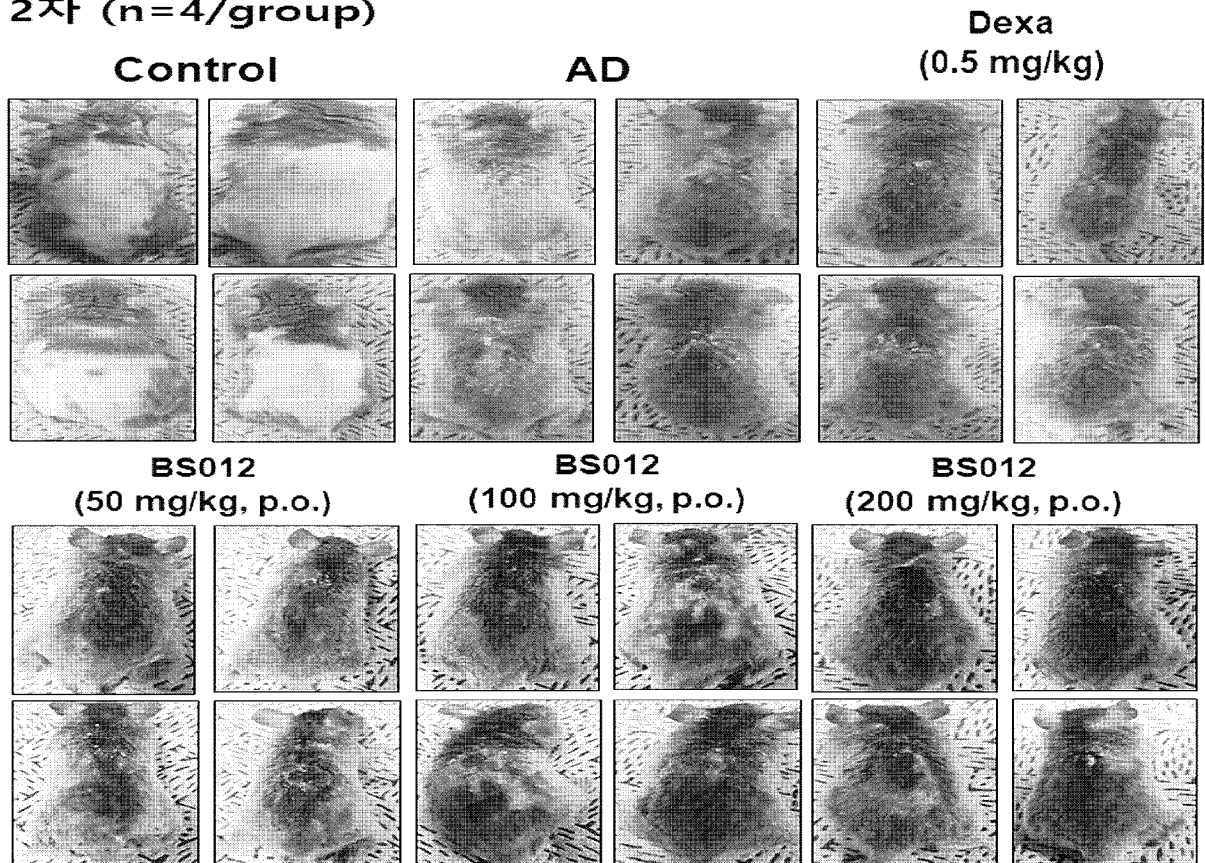
## A 1차 실험



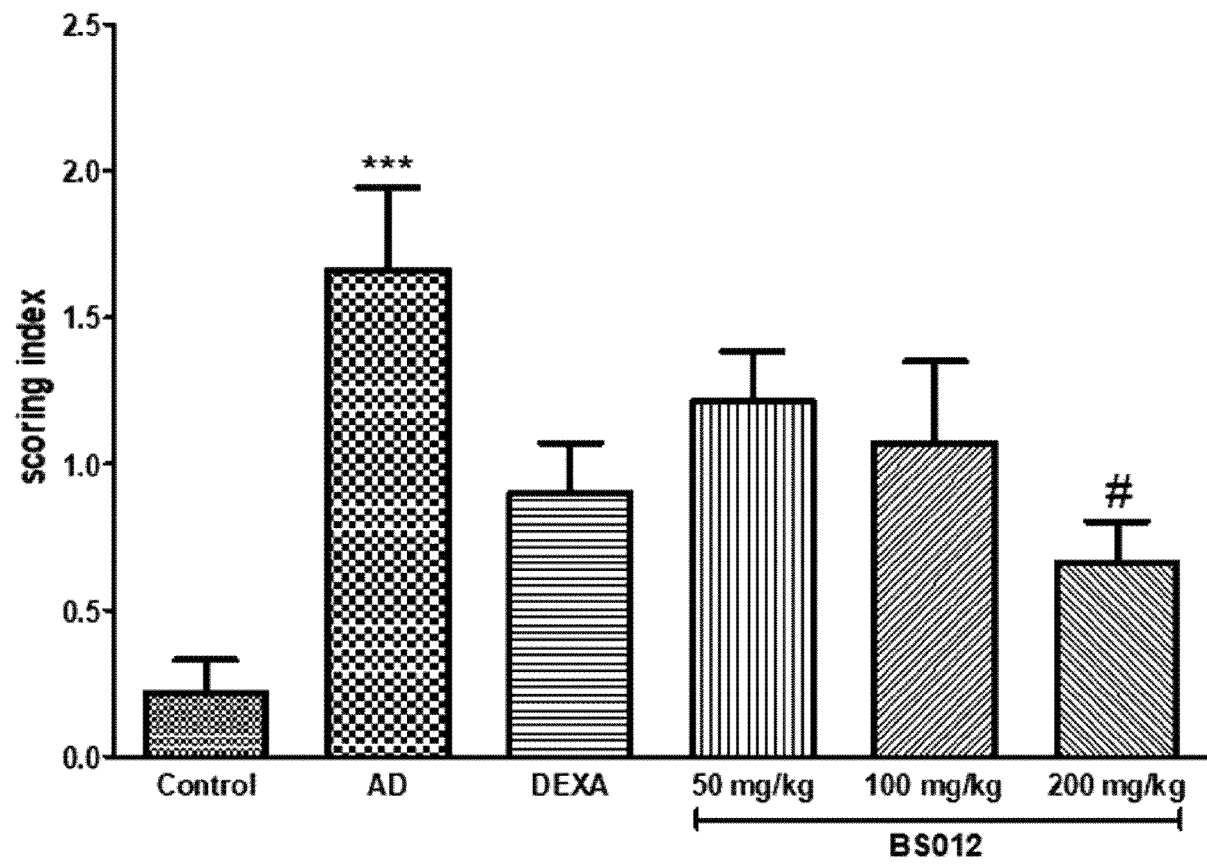
## B 2차 실험



[도11]

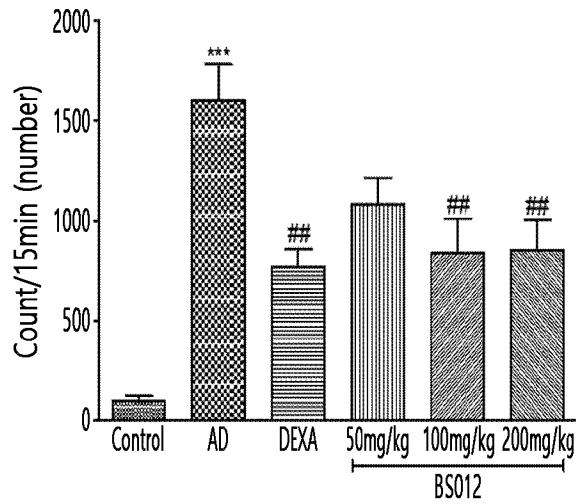
**1차 (n=4/group)****2차 (n=4/group)**

[도12]

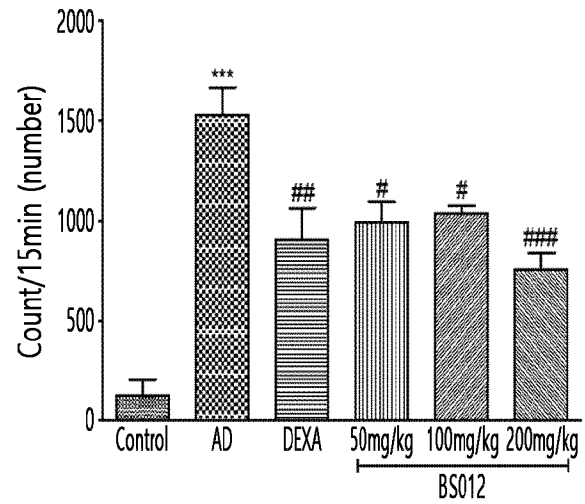


[도13]

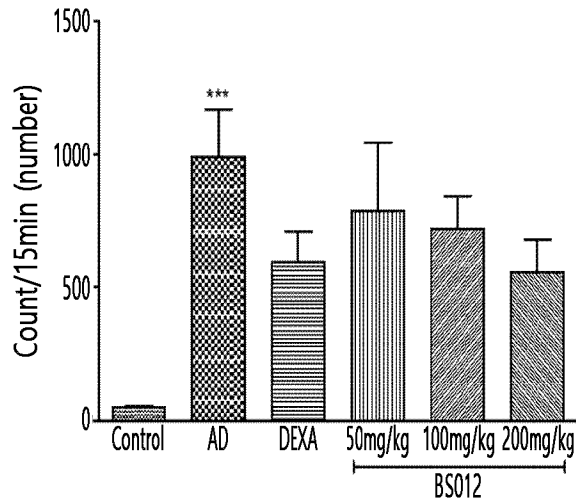
1Day



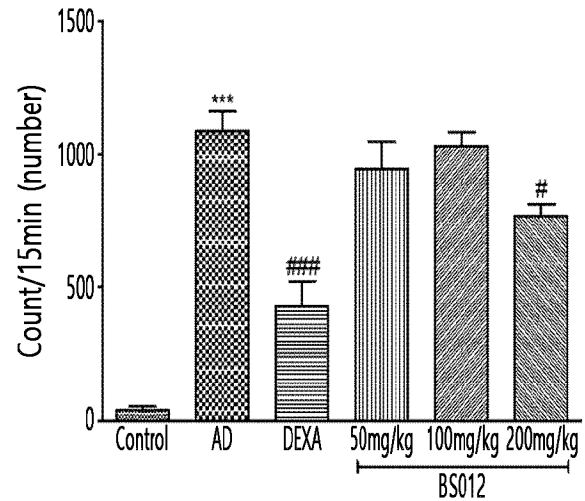
3Day



5Day

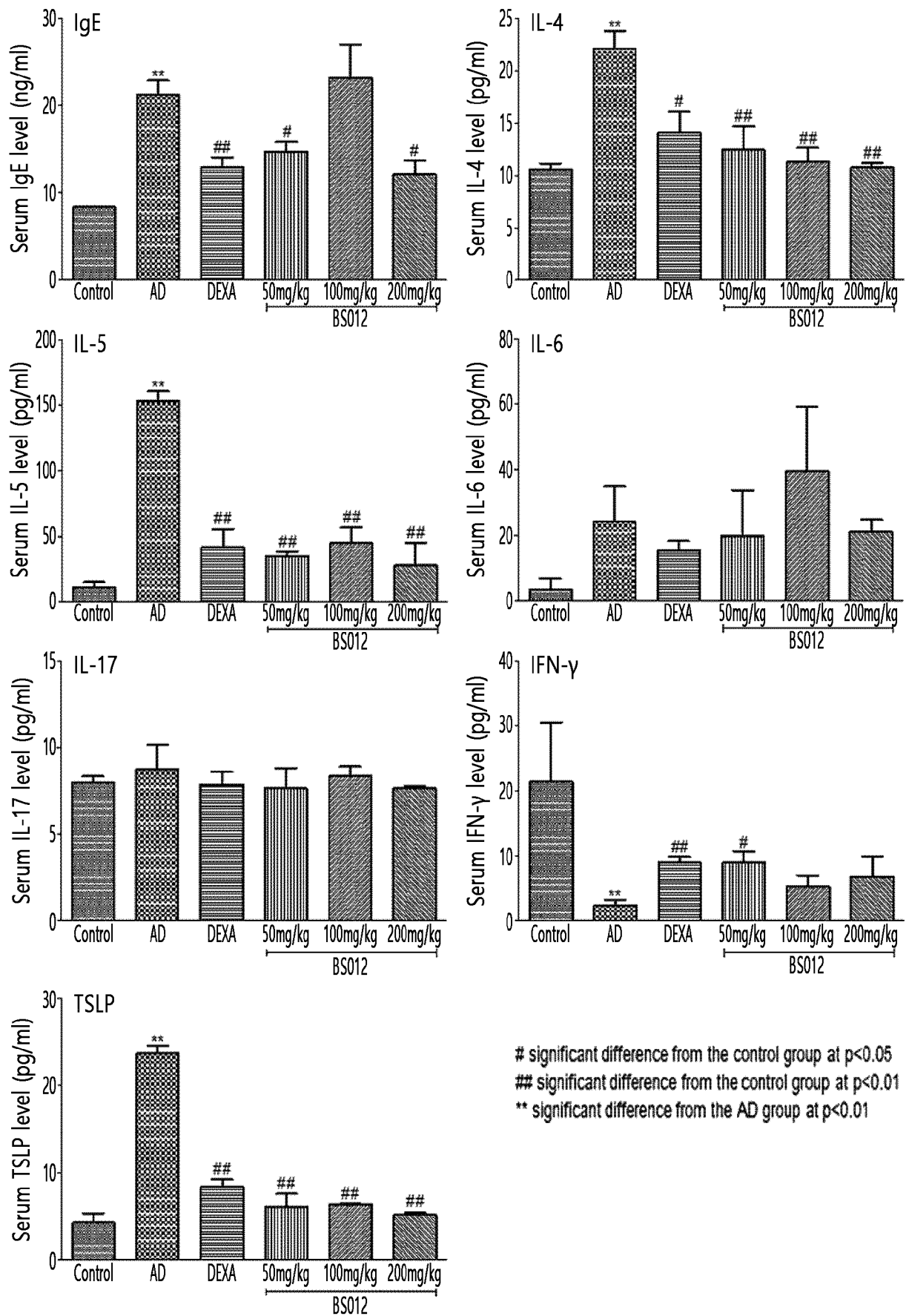


10Day



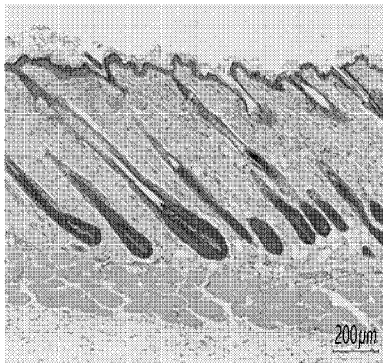
## significant difference from the control group at  $p < 0.01$   
 ### significant difference from the control group at  $p < 0.001$   
 \* significant difference from the AD group at  $p < 0.05$   
 \*\* significant difference from the AD group at  $p < 0.01$   
 \*\*\* significant difference from the AD group at  $p < 0.001$

[도 14]

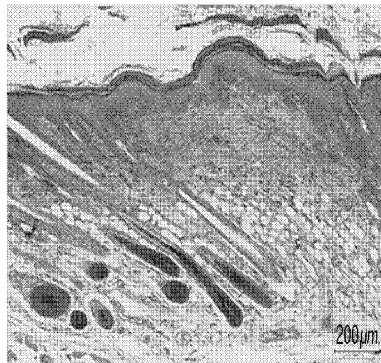


[도 15]

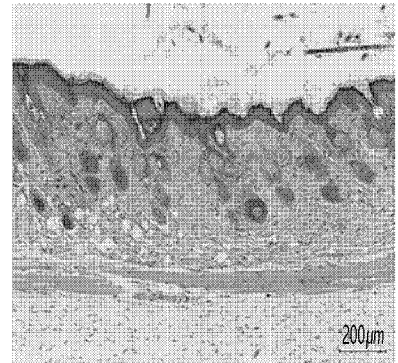
Control



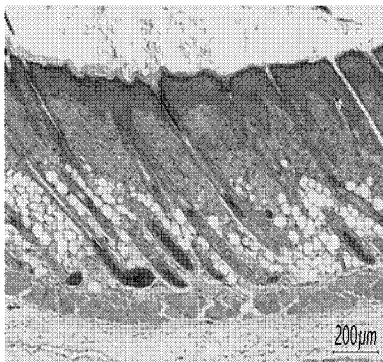
AD



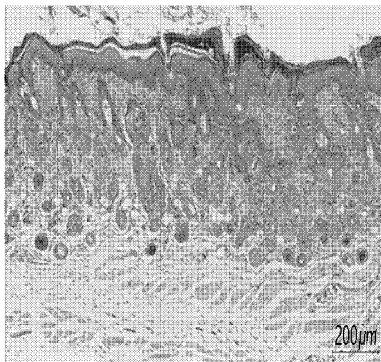
Dexa



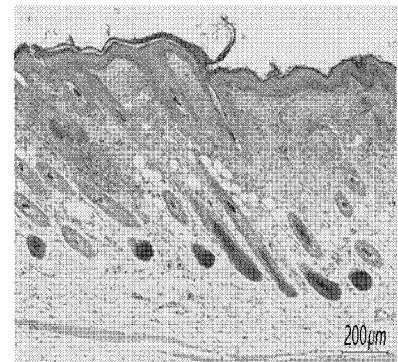
BS012 50 mg/kg



BS012 100 mg/kg

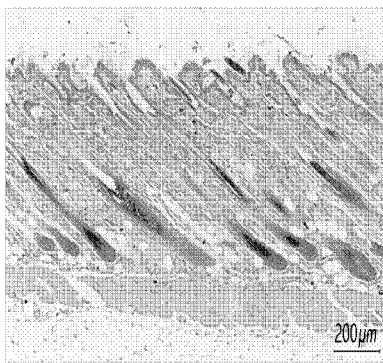


BS012 200 mg/kg

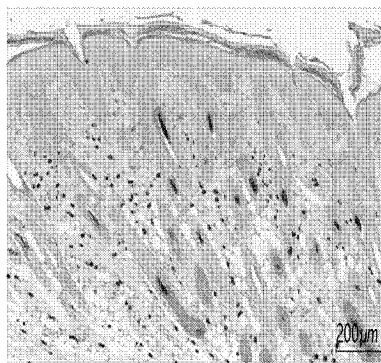


[도 16]

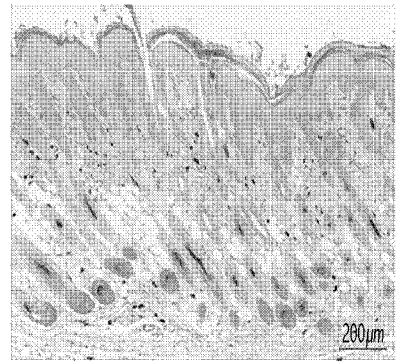
Control



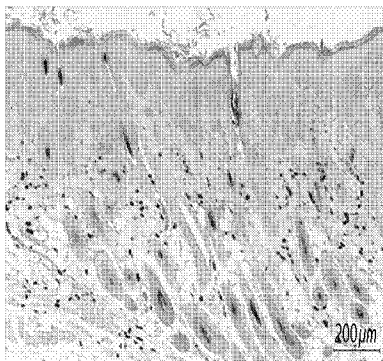
AD



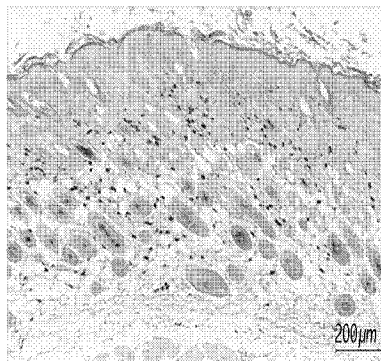
Dexa



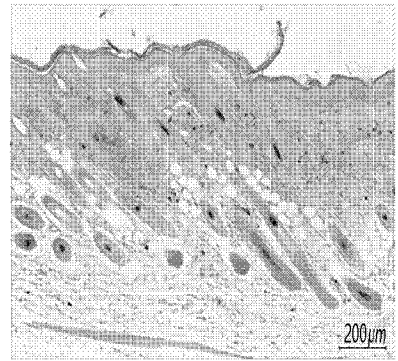
BS012 50 mg/kg



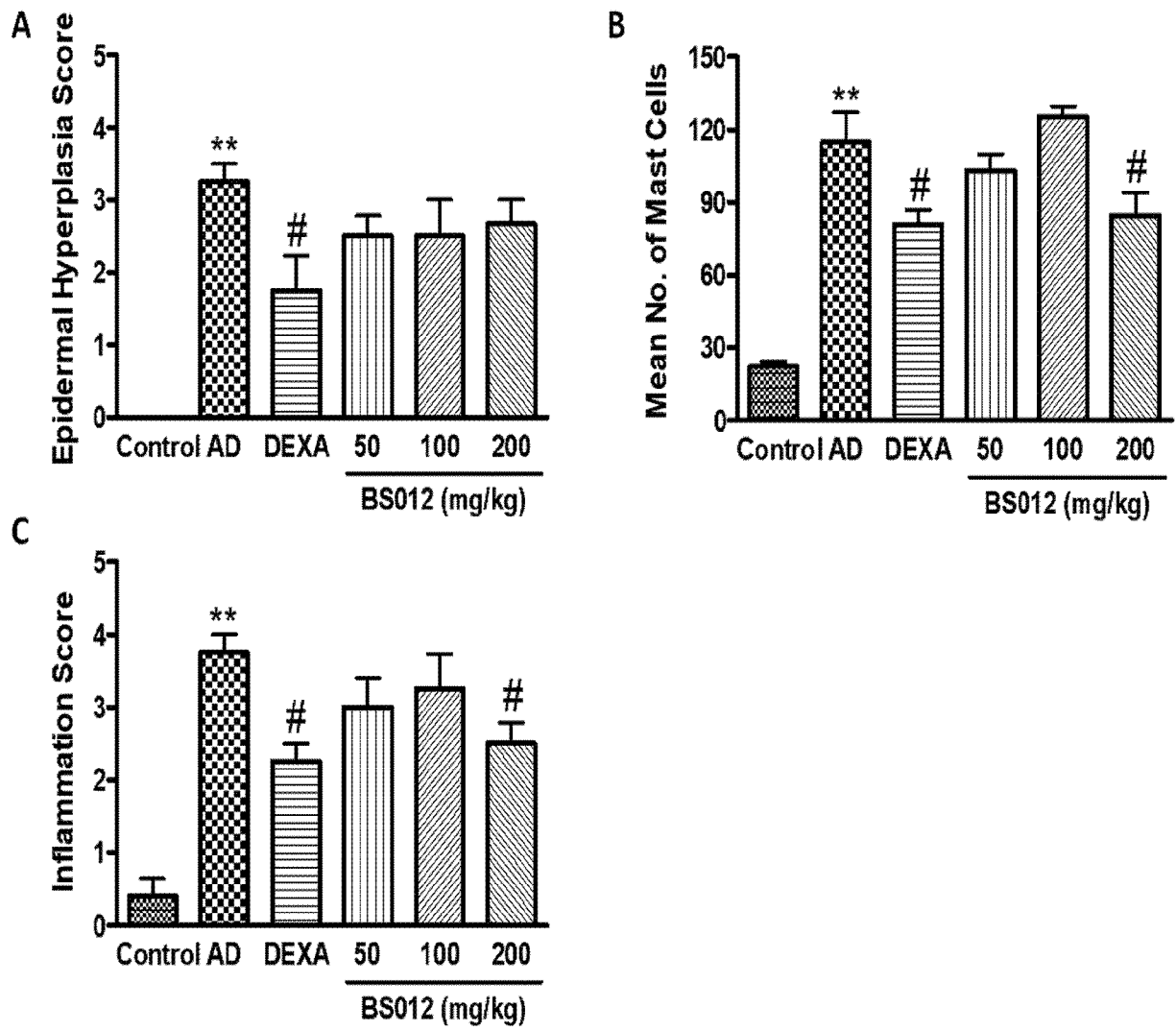
BS012 100 mg/kg



BS012 200 mg/kg



[도17]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006382

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 36/268(2006.01)i, A61K 36/346(2006.01)i, A61K 36/54(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i, A61P 37/08(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A23K 10/30(2016.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/268; A61K 35/78; A61K 36/34; A61K 36/346; A61K 36/605; A61K 36/8994; A61K 7/00; A61K 36/54; A61P 11/00; A61P 37/08; A23L 33/105; A23K 10/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Asiasari Radix, Platycodi Radix, Cinnamomi Ramulus, allergy, atopic, pharmaceutical composition

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KR 10-2003-0007243 A (Kim, Kyung Yeol) 23 January 2003<br>See abstract; technical objectives that the invention intends to achieve, first paragraph; experimental example 4; claim 1.                                     | 1-6,8,9               |
| X         | KO, E. et al. Traditional Korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell. Journal of Ethnopharmacology. 2004, vol. 92, no. 1, pages 121-128<br>See abstract; page 122, table 1. | 1-6,8,9               |
| X         | JP 2000-169383 A (ICHIMARU PHARCOS CO., LTD.) 20 June 2000<br>See abstract; paragraphs [0002], [0087], [0088], [0115]; claims 1-3.                                                                                        | 1-6,8,9               |
| X         | KR 10-2001-0068273 A (KIM, Hyung Min et al.) 23 July 2001<br>See abstract; claims 1-7.                                                                                                                                    | 1-6,8,9               |
| X         | KR 10-2001-0067653 A (KIM, Chan Ho et al.) 13 July 2001<br>See abstract; claims 1-3.                                                                                                                                      | 1-6,8,9               |
| A         | KR 10-2018-0055038 A (DONGSHIN UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) 25 May 2018<br>See the entire document.                                                                                                           | 1-6,8,9               |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 AUGUST 2019 (28.08.2019)

Date of mailing of the international search report

28 AUGUST 2019 (28.08.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006382

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 7 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2019/006382**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member                                                              | Publication<br>date                                  |
|-------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| KR 10-2003-0007243 A                      | 23/01/2003          | KR 10-0504767 B1<br>KR 10-0527834 B1<br>KR 10-2002-0089275 A<br>KR 10-2004-0030371 A | 29/07/2005<br>09/11/2005<br>29/11/2002<br>09/04/2004 |
| JP 2000-169383 A                          | 20/06/2000          | None                                                                                 |                                                      |
| KR 10-2001-0068273 A                      | 23/07/2001          | None                                                                                 |                                                      |
| KR 10-2001-0067653 A                      | 13/07/2001          | None                                                                                 |                                                      |
| KR 10-2018-0055038 A                      | 25/05/2018          | None                                                                                 |                                                      |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

A61K 36/268(2006.01)i, A61K 36/346(2006.01)i, A61K 36/54(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i, A61P 37/08(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A23K 10/30(2016.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/268; A61K 35/78; A61K 36/34; A61K 36/346; A61K 36/605; A61K 36/8994; A61K 7/00; A61K 36/54; A61P 11/00; A61P 37/08; A23L 33/105; A23K 10/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세신 (ASIASARI RADIX), 길경 (PLATYCODI RADIX), 계지 (CINNAMOMI RAMULUS), 알레르기 (allergy), 아토피 (atopic), 약학 조성물 (pharmaceutical)

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                               | 관련 청구항    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| X     | KR 10-2003-0007243 A (김경렬) 2003.01.23<br>요약; 발명이 이루고자 하는 기술적 과제, 첫번째 단락; 실험예 4; 청구항 1 참조.                                                                                                                | 1-6, 8, 9 |
| X     | KO, E. 등, "Traditional korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell",<br>Journal of Ethnopharmacology, 2004, 제92권, 제1호, 페이지 121-128<br>초록; 페이지 122, 테이블 1 참조 | 1-6, 8, 9 |
| X     | JP 2000-169383 A (ICHIMARU PHARCOS CO., LTD.) 2000.06.20<br>요약; 단락 [0002], [0087], [0088], [0115]; 청구항 1-3 참조.                                                                                           | 1-6, 8, 9 |
| X     | KR 10-2001-0068273 A (김형민 등) 2001.07.23<br>요약; 청구항 1-7 참조.                                                                                                                                               | 1-6, 8, 9 |
| X     | KR 10-2001-0067653 A (김찬호 등) 2001.07.13<br>요약; 청구항 1-3 참조.                                                                                                                                               | 1-6, 8, 9 |
| A     | KR 10-2018-0055038 A (동신대학교산학협력단) 2018.05.25<br>전체 문헌 참조.                                                                                                                                                | 1-6, 8, 9 |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 08월 28일 (28.08.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 08월 28일 (28.08.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 7  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 제7항은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(i v)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                               | 공개일                                                  |
|-----------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| KR 10-2003-0007243 A  | 2003/01/23 | KR 10-0504767 B1<br>KR 10-0527834 B1<br>KR 10-2002-0089275 A<br>KR 10-2004-0030371 A | 2005/07/29<br>2005/11/09<br>2002/11/29<br>2004/04/09 |
| JP 2000-169383 A      | 2000/06/20 | 없음                                                                                   |                                                      |
| KR 10-2001-0068273 A  | 2001/07/23 | 없음                                                                                   |                                                      |
| KR 10-2001-0067653 A  | 2001/07/13 | 없음                                                                                   |                                                      |
| KR 10-2018-0055038 A  | 2018/05/25 | 없음                                                                                   |                                                      |