



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105705155 B

(45)授权公告日 2020.07.31

(21)申请号 201480048284.X

(22)申请日 2014.07.01

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105705155 A

(43)申请公布日 2016.06.22

(30)优先权数据  
10-2013-0076696 2013.07.01 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.03.01

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/KR2014/005844 2014.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/002430 KO 2015.01.08

(73)专利权人 韩国生命工学研究院  
地址 韩国大田广域市

(72)发明人 安境燮 吴世滢 权玉京 申寅植  
柳亨杭 李尚雨 李重求 李炯圭  
崔常镐 金斗英 金正姬 李晚宜  
金航

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所  
11410

代理人 石宝忠

(51)Int.Cl.  
A61K 36/22(2006.01)  
A61P 29/00(2006.01)  
A61P 11/06(2006.01)

(56)对比文件  
JP 2004262905 A,2004.09.24,  
JP 2004262905 A,2004.09.24,  
Kumiko Minami et al..Isolation and  
identification of histamine-release  
inhibitors from Pistacia weinmannifolia  
J. Pisson ex. Franch.《Journal of Natural  
Medicines》.2005,第60卷

Xingyu Zhao et al..Antioxidant  
properties of two gallotannins isolated  
from the leaves of Pistacia  
weinmannifolia.《Biochimica et Biophysica  
Acta》.2005,第1725卷

审查员 杨秦

权利要求书1页 说明书13页 附图8页

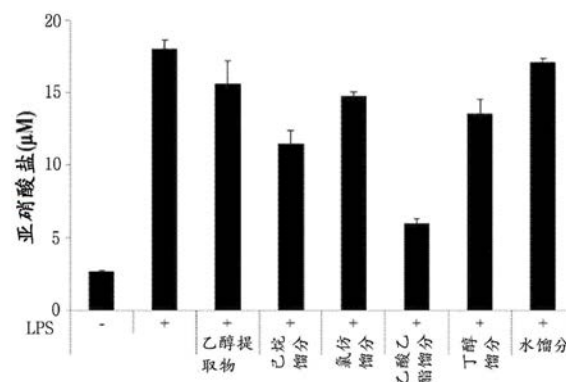
(54)发明名称

用于预防或治疗哮喘的包括清香木提取物或其馏分的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及用于预防或治疗哮喘的组合物,其包括清香木提取物或其馏分。根据本发明的清香木提取物或其馏分未表现出毒性,抑制NO, IL-4, IL-5, 和IL-13的产生以及反应性氧种在支气管中的产生,并且已显著地诱导气道高反应性的缓解、炎症细胞浸润到支气管的抑制和在卵蛋白诱发哮喘鼠模型中的支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的减少。此外,根据本发明的清香木提取物或其馏分有效抑制血清中免疫球蛋白的分泌、支气管中黏液的分泌和炎症细胞浸润到肺组织中并因此能够有用地用作预防和治疗哮喘的安全

制剂。



1. 药物组合物用于制备预防或治疗哮喘的药物的用途, 该组合物包括清香木 (*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch) 提取物或该提取物的馏分作为活性成分, 其中所述提取物通过使用乙醇或乙醇与水的混合物提取而得到, 并且所述馏分通过使用水、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>醇、氯仿、乙酸乙酯、己烷、丁醇、或其混合物分馏而得到。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述提取物通过使用乙醇提取而得到。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述提取物或该提取物的馏分表现出以下活性:

- (a) 抑制NO (一氧化氮) 生成在巨噬细胞中的活性;
- (b) 缓解气道高反应性的活性;
- (c) 减少嗜酸性粒细胞和炎症细胞的数量活性;
- (d) 减少血清IgE水平的活性;
- (e) 抑制反应性氧种的生成的活性;
- (f) 抑制白细胞介素-4, 5, 13的生成的活性;
- (g) 抑制炎症细胞的发炎和浸润的活性; 或
- (h) 抑制气道中黏液分泌的活性。

4. 清香木 (*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch) 提取物或该提取物的馏分用于制备预防或治疗哮喘的药物的用途, 其中所述提取物通过使用乙醇或者乙醇与水的混合物提取而得到, 并且所述馏分通过使用水、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>醇、氯仿、乙酸乙酯、己烷、丁醇、或其混合物分馏而得到。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其中所述提取物通过使用乙醇提取而得到。

## 用于预防或治疗哮喘的包括清香木提取物或其馏分的药物组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗哮喘的包括清香木 (*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch) 提取物或其馏分为活性成分的药物组合物和所述提取物或其馏分用于预防或治疗哮喘的用途。

### 背景技术

[0002] 哮喘为引起呼吸困难的呼吸系统疾病,并且大约300万韩国人患有哮喘。哮喘为伴有起因于严重情况下缺氧的喘鸣、呼吸困难、打喷嚏和发绀和胸痛的疾病。近年来,起因于空气污染、接触各种化学品和西化的饮食,哮喘的发病率快速增加,而且特别地,儿童哮喘的患病率正在增加。

[0003] 哮喘为由释放白细胞介素-4,5,13的TH<sub>2</sub>(T-辅助细胞2)型驱动免疫反应引起的疾病,导致包括嗜酸性粒细胞的各种炎症细胞对气道和血管周围组织的募集和浸润。由此生成的各种炎症介质进一步增加炎症应答,致使黏液分泌及气道高反应性的增加。

[0004] 随着近年来分子生物学的发展,对在分子水平上理解细胞活素类在哮喘中的作用已经做了很多尝试,而且此病的影响因素已经被逐一证明。该因素中,一氧化氮(NO)为炎症介质,其通过破坏致病DNA而起防御作用,从而维持动态平衡。NO为由L-精氨酸通过一氧化氮合酶(NOS)的三个名为nNOS(神经元型NOS)、eNOS(内皮型NOS)和iNOS(诱导型NOS)的主要同型生成。通过同型的iNOS生成的过量NO参与各种病理生理学过程,其包括炎症和癌症。

[0005] 至今,已经开发了很多用于治疗哮喘的治疗剂,如类固醇、支气管扩张剂、抗炎药等,但是大部分治疗剂引起多种副作用并因此该试剂的使用需要谨慎处理。使用最广泛的吸入皮质类固醇表现出优异的治疗效果,但已知长期使用其引起肾上腺抑制、骨密度降低、生长阻滞、在眼睛和皮肤上的并发症和胶原合成增加,与使用剂量和使用时间成比例。进一步地,长效β-2激动剂如沙美特罗和福莫特罗表现出对哮喘发作的预防作用,但可能导致一些患者死亡。起因于所述各种副作用,对现有哮喘治疗剂的使用应该给出慎重考虑。对开发带有强疗效和较少副作用的用于哮喘的预防或治疗剂有不断的需求。

[0006] 同时,清香木 (*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch) 为广泛存在于中国云南省的植物而且传统上其已经使用于痢疾、肠炎、流感或头痛。以前的研究报道,从此植物中分离得到的两种化合物具有清除反应性氧种的能力(Zhao X等, *Biochim Biophys Acta*, 1725, 103-110, 2005)。除了此报道,没有关于清香木提取物、其馏分或从其分离的化合物的抗哮喘作用的报道。

[0007] 本发明的详细说明

### 发明内容

[0008] 本发明的发明人为了找出对预防或治疗哮喘有用而不对人体引起副作用的天然

物质已经做出很多努力,结果,他们发现清香木提取物或其馏分地抑制一氧化氮在动物细胞中生成、缓解哮喘诱导鼠模型中的气道高反应性和抑制反应性氧种在气道中的产生而无毒性。本发明的发明者还发现清香木提取物或其馏分减少支气管肺泡灌洗液中的炎症细胞的数量和白细胞介素的水平、抑制IgE在血清中生成和炎症细胞浸润肺组织、并且减少气道中黏液分泌,所以其对预防或治疗哮喘有用,从而完成本发明。

[0009] 技术方案

[0010] 本发明的目的为提供用于预防或治疗哮喘的药物组合物,该组合物包括清香木(*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch)提取物或其馏分作为活性成分。

[0011] 本发明的再一个目的为提供清香木提取物或其馏分在制备用于预防或治疗哮喘的药物中的用途。

[0012] 本发明的再一个目的为提供治疗哮喘的方法,该方法包括给予疑有哮喘的受试者该药物组合物。

[0013] 本发明的效果

[0014] 根据本发明的清香木提取物和其馏分未表现出细胞毒性,抑制炎症介质、NO、IL-4、IL-5和IL-13的生成和气道中反应性氧种的产生,并显著诱导气道高反应性的减少和卵蛋白诱导小鼠模型中炎症细胞浸润气道的抑制以及支气管肺泡灌洗液中的炎症细胞的减少。进一步地,本发明的清香木提取物和其馏分有效抑制血清中免疫球蛋白的分泌、气道中黏液分泌、和炎症细胞浸润到肺组织,从而被安全地用作哮喘的预防剂或治疗剂。

## 附图说明

[0015] 图1示出清香木的己烷馏分的UPLC(超高效液相色谱)分析的结果;

[0016] 图2示出清香木的乙酸乙酯(EtOAc)馏分的UPLC分析的结果;

[0017] 图3a示出清香木的乙醇提取物(Total)、己烷馏分(Hexane)、氯仿馏分( $\text{CHCl}_3$ )、乙酸乙酯馏分(EA)、丁醇馏分(BuOH)和水馏分(Aq)对巨噬细胞中LPS诱导一氧化氮(NO)生成的影响的测定结果;

[0018] 图3b示出清香木的己烷馏分的活性馏分1-7(Hex 1-7)和清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分1-7(EA 1-7)对巨噬细胞中LPS诱导一氧化氮(NO)生成的影响的测定结果;

[0019] 图3c示出清香木的己烷馏分的活性馏分1-7(Hex 1-7)和清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分1-7(EA 1-7)对巨噬细胞的细胞存活度的影响的测定结果;

[0020] 图4示出清香木的总提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分对卵蛋白敏化哮喘动物模型中气道高反应性影响的测定结果,

[0021] NC:气道未敏化的正常对照组

[0022] OVA:卵蛋白敏化气道的哮喘诱导组

[0023] Mon:给予孟鲁司特的对比组

[0024] Total:给予清香木的总提取物的实验组

[0025] EA5:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分5的实验组

[0026] EA6:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分6的实验组

[0027] Hex7:给予清香木的己烷馏分的活性馏分7的实验组

[0028] #:与正常对照组(NC)相比,认为统计学上显著( $p < 0.05$ )

- [0029] \*:与哮喘诱导组(OVA)相比,认为统计学上显著( $p<0.05$ );
- [0030] 图5示出清香木的总提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分对卵蛋白敏化哮喘动物模型中支气管肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和全部细胞的数目影响的测定结果,
- [0031] NC:气道未敏化的正常对照组
- [0032] OVA:卵蛋白敏化气道的哮喘诱导组
- [0033] Mon:给予孟鲁司特的对比组
- [0034] Total:给予清香木的乙醇提取物的实验组
- [0035] EA5:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分5的实验组
- [0036] EA6:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分6的实验组
- [0037] Hex7:给予清香木的己烷馏分的活性馏分7的实验组
- [0038] #:与正常对照组(NC)相比,认为统计学上显著( $p<0.05$ )
- [0039] \*:与哮喘诱导组(OVA)相比,认为统计学上显著( $p<0.05$ );
- [0040] 图6示出清香木的总提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分对卵蛋白敏化哮喘动物模型中产生反应性氧种影响的测定结果,
- [0041] NC:气道未敏化的正常对照组
- [0042] OVA:卵蛋白敏化气道的哮喘诱导组
- [0043] Mon:给予孟鲁司特的对比组
- [0044] Total:给予清香木的乙醇提取物的实验组
- [0045] EA5:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分5的实验组
- [0046] EA6:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分6的实验组
- [0047] Hex7:给予清香木的己烷馏分的活性馏分7的实验组;
- [0048] 图7示出清香木的总提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分对卵蛋白敏化哮喘动物模型中炎症细胞浸润影响的测定结果,
- [0049] NC:气道未敏化的正常对照组
- [0050] OVA:卵蛋白敏化气道的哮喘诱导组
- [0051] Mon:给予孟鲁司特的对比组
- [0052] Total:给予清香木的乙醇提取物的实验组
- [0053] EA5:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分5的实验组
- [0054] EA6:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分6的实验组
- [0055] Hex7:给予清香木的己烷馏分的活性馏分7的实验组;和
- [0056] 图8示出清香木的总提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分对卵蛋白敏化哮喘动物模型中气道中黏液分泌影响的测定结果,
- [0057] NC:气道未敏化的正常对照组
- [0058] OVA:卵蛋白敏化气道的哮喘诱导组
- [0059] Mon:给予孟鲁司特的对比组
- [0060] Total:给予清香木的乙醇提取物的实验组
- [0061] EA5:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分5的实验组
- [0062] EA6:给予清香木的乙酸乙酯馏分的活性馏分6的实验组

[0063] Hex7:给予清香木的己烷馏分的活性馏分7的实验组。

### 具体实施方式

[0064] 一方面,本发明提供用于预防或治疗哮喘的药物组合物,该组合物包括清香木提取物或其馏分作为活性成分。

[0065] 对于本发明的目的,根据本发明的清香木提取物或其馏分用于预防或治疗哮喘。

[0066] 如本文中使用的术语“清香木(*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch)”为广泛存在于中国云南省的植物而且传统上其已经用于痢疾、肠炎、流感或头痛。然而,没有关于清香木提取物、其馏分或从其分离的化合物的抗哮喘作用的报道。

[0067] 如本文中使用的术语“清香木提取物”是指通过使用适当溶剂提取清香木而得到的提取物。本发明中,清香木提取物可包括一种或多种通过使用适当溶剂提取清香木而得到的液体提取物、该液体提取物的稀释液或浓缩液、通过干燥该液体提取物而得到的干燥产品和其粗纯化产品或其纯化产品。

[0068] 本发明的清香木提取物可以通过本领域中常用的提取方法制备,如超声提取法、过滤法和回流提取法,并且清香木可以从市售来源购买,或从自然界中收集或在自然界中生长。

[0069] 进一步地,清香木的任一部分,例如,茎可以无特别限制地被使用,只要其表现出抗哮喘功效。

[0070] 根据本发明的清香木提取物可以根据本领域中已知的从天然物质中制备提取物的常规方法分离,即,通过在常温常压条件下使用常规溶剂。

[0071] 在制备根据本发明的清香木提取物中,可以使用水、无水或含水C1-C4低级醇、或其混合溶剂,但不限于此。具体地,可以使用甲醇或乙醇制备清香木提取物。

[0072] 根据本发明的具体实施方式,在制备清香木提取物中,所收集的清香木的茎先被干燥,再被粉碎。基于其干燥重量,将2-20倍体积的乙醇加到该粉碎的粉末样品中,然后可以在20-30℃下进行提取,具体地,在室温下5-15天,更具体地,10天。随后,在减压下进行过滤和浓缩以得到清香木的乙醇提取物。此提取过程可以重复2-3次,并且可以进一步进行过滤、浓缩、冷冻干燥等过程。

[0073] 如本文中使用的术语“馏分”是指通过从这样制备的清香木提取物中分离特定组分或特定组的分馏法得到的产物。

[0074] 为了得到根据本发明的清香木馏分,可以使用本领域中已知的常规分馏溶剂,例如,极性溶剂,包括水、或者无水或含水C1-C4低级醇例如乙醇或甲醇等,非极性溶剂例如己烷、乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷等,或其混合溶剂,但不限于此。

[0075] 本发明的清香木馏分可以包括通过进一步应用提纯过程得到的产物。通过各种附加的提纯方法,例如通过将根据本发明的清香木提取物通过具有给定分子量截止的超滤膜分离或通过各种色谱系统分离(根据尺寸、电荷、疏水性或亲和性分离而制造)得到的馏分可以也包括在本发明的清香木馏分中。

[0076] 在本发明的具体实施方式中,得到的清香木的乙醇提取物在蒸馏水中悬浮,并加入等量的己烷以分离出己烷层和水层。此工序重复三遍,接着在减压下过滤和浓缩以得到己烷馏分。此后,去除己烷馏分,将等量的氯仿加到剩余水层以同样的方式得到氯仿馏分。

将等量的乙酸乙酯加到剩余水层以同样的方式得到乙酸乙酯馏分。将等量的丁醇加到由此得到的水层以同样的方式得到丁醇馏分。

[0077] 在本发明的具体实施方式中,这样得到的清香木提取物和其馏分对哮喘的治疗效果被调查。结果,发现根据本发明的清香木的乙醇馏分、己烷馏分和乙酸乙酯馏分显著减少一氧化氮在LPS处理的巨噬细胞中的生成(见图3a-3c)并减少由乙酰甲胆碱浓度的增加引起的气道高反应性(见图4)。

[0078] 在本发明的具体实施方式中,还发现根据本发明的清香木的乙醇提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分显著减少支气管肺泡灌洗液中炎症细胞数(见图5),显著减少血清中IgE抗体水平和卵蛋白特异性IgE抗体水平(见表1),并有效抑制反应性氧种的生成(见图6)。

[0079] 在本发明的具体实施方式中,还发现根据本发明的清香木的甲醇提取物、己烷馏分和乙酸乙酯馏分显著抑制支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-4,5,13的生成(见表2),炎症细胞浸润气道(见图7),和呼吸道中黏液的生成(见图8)。

[0080] 这些结果表明根据本发明的清香木提取物和其馏分可以有用地应用于预防或治疗哮喘。

[0081] 因此,本发明提供用于预防或治疗哮喘的组合物,该组合物包括清香木提取物或其馏分作为活性成分,并进一步包括药学上可接受的载体。

[0082] 哮喘为一种由支气管气道的过敏性炎症反应引起的过敏性疾病,一般由肺部中气道的超敏性引起。过敏为当身体暴露于外来物时出现与正常反应不同的反应的现象,具体地,过敏涉及各种炎症细胞对气道和血管周围组织的募集和浸润,而且由此生成的各种炎症介质进一步增加炎症应答,致使黏液分泌和呼吸道高反应性的增加。

[0083] 如本文中使用的术语“预防”意指所有通过给予根据本发明的组合物抑制或阻止哮喘发生的行为。

[0084] 如本文中使用的术语“治疗”意指所有通过给予根据本发明的组合物哮喘症状已好转或变好的行为。

[0085] 本发明的药物组合物可以单独使用或制为制剂,其包括同意具有抗哮喘效果的药剂和所述提取物或其馏分。

[0086] 术语“药学上可接受的”意指对给予化合物的生物体不引起显著的刺激并不取消该化合物的生物活性和性能。

[0087] 本发明的包括药学上可接受载体的药物组合物可以制成各种制剂如口服或肠胃外制剂。该组合物的制剂可以涉及使用常规稀释剂或赋形剂如填料、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等。用于口服的固体制剂可以包括片剂、药丸、粉末、颗粒、胶囊等。该固体制剂可以通过将一种或多种化合物与至少一种赋形剂如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等混合而制成。除了所述的简单的赋形剂,还可以使用润滑剂如硬脂酸镁或滑石粉。用于口服的液体制剂可以包括悬浮液,内用溶液,乳液、糖浆等。除了常用的简单稀释剂如水和液体石蜡,还可以使用不同的赋形剂,例如,润湿剂、香精、香料、防腐剂等。用于肠胃外给药的制剂可以包括无菌水溶液、非水溶剂、悬浮液、乳液、冻干制剂和栓剂。非水溶液和悬浮液可以包括丙二醇、聚乙二醇、蔬菜油如橄榄油、可注射的酯如油酸乙酯等。栓剂的基质可以包括甘油三月桂酸酯(witepsol)、聚乙二醇、吐温61、可可脂、甘油三月桂酸酯

(laurin butter)、甘油明胶等。

[0088] 该药物组合物可以具有选自由片剂、药丸、粉末、颗粒、胶囊、悬浮液、内用溶液、乳液、糖浆、无菌水溶液、非水溶剂、悬浮液、乳液、冻干制剂和栓剂组成的组中的任一制剂。

[0089] 本发明的药物组合物可以包括药学上有效量的清香木提取物或其馏分。如本发明中使用的术语“药学上有效量”是指足以治疗疾病的量，以可应用于任何医疗的合理的利益/风险比。有效剂量水平可取决于受验者和严重性的种类、年龄、性别、药剂活性、对药剂的敏感性、给药时间、给药途径和排泄率、治疗持续时间、同时使用的药剂，以及医疗领域已知的其他因素。本发明的药物组合物可单独给药或与其他治疗剂组合给药，并可以与现有的治疗剂按顺序或同时给药。该组合物可以以单剂量或多剂量的形式给予。考虑到所有上述因素，给予能够表现出最大效果的最小量的该组合物而不引起副作用是重要的。本领域技术人员可以容易地确定。根据本发明的清香木提取物或其馏分可以以具体地，0.001-1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，更具体地，0.001-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的量包括在药物组合物中。

[0090] 另一方面，本发明提供预防或治疗哮喘的方法，该方法包括给予需要预防或治疗哮喘的受验者药物组合物，该药物组合物包括根据本发明的清香木提取物或其馏分。

[0091] 所述受验者可以是需要预防或治疗哮喘或哮喘相关疾病的受验者，并且可以是但不限于，人和哺乳动物，如牛、马、羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗、猫等，以及需要治疗哮喘或哮喘相关疾病和与其类似症状的人。

[0092] 如本文中使用的术语“给予”意指通过某种适合的方法将本发明的药物组合物引入病人中。只要其到达靶组织，可以采取不管是口服还是肠胃外的任何途径用于给予本发明的组合物。

[0093] 本发明的治疗哮喘的方法可以包括以治疗有效量给予清香木提取物或其馏分。对本领域技术人员来说，显然每日总剂量能够由医生通过适当的医学判断来决定。进一步地，该组合物可以一次或几次给予。对于本发明的目的，对于任何特定的病人的具体治疗有效剂量水平可以取决于医疗领域公知的各种因素变化，包括所获得响应的种类和程度、根据是否与其他药剂一起使用的具体组合物、病人年龄、体重、健康状况、性别和饮食、给药时间和途径、组合物的分泌速率、疗程、与具体组合物组合或同时使用的其他药剂和医疗领域公知的相似因素。

[0094] 另一方面，本发明提供清香木提取物或其馏分在用于预防或治疗哮喘的药物制备中的用途。该药物可以对受验者口服或肠胃外给药以用于预防或治疗哮喘，并且可以根据受验者特征以适当制剂的形式提供。进而，如有必要，该药物可以通过包括适量的所述提取物或馏分而制备。

[0095] 另一方面，本发明提供治疗哮喘的方法，该方法包括给予疑有哮喘的受验者所述药物组合物。

[0096] 本发明的实施方式中，发现给予动物模型清香木提取物有效抑制血清中免疫球蛋白的分泌，气道中黏液分泌，和炎症细胞浸润到肺组织(图4-8)，从而提供通过给予受验者清香木提取物或其馏分而有效治疗哮喘的方法。

[0097] 在下文中，本发明的构成和效果参考实施例将被更详细地描述。然而，这些实施例仅用于例示目的，并且本发明的范围不打算被这些实施例限制。

[0098] <制备例1>清香木茎提取物的制备

[0099] 在中国云南省(石林县石林镇三甲村)收集清香木(*Pistacia weinmannifolia* J.Poiss.Ex Franch)并于2013年鉴定其(韩国生物科学和生物技术研究院,Sang Woo Lee 博士),而且在YAAS(云南省农业科学院)制备其乙醇提取物并将其送到韩国生物科学和生物技术研究院,国际生物材料研究中心。本发明的发明者在所述中心从植物提取物库得到样品并进行以下实验。

[0100] 根据提取过程,收集清香木的茎10kg,并自然干燥(阴凉干燥)以去除水分,接着是粉碎。将各5kg这样粉碎的粉末样品放入容器中,并加入10L乙醇(95%),接着在室温(20℃)下间歇搅拌10天而沉淀提取。此后,通过滤纸过滤该提取物,剩余溶剂和水通过在40℃或更低的温水中加热而在减压下浓缩以得到542.2g清香木的乙醇提取物。在随后的实验中,得到的清香木的乙醇提取物被称为Total提取物。

[0101] <制备例2>清香木馏分的制备

[0102] 将5L水加到542.2g制备例1中得到的清香木的Total提取物,然后悬浮。加入等量的己烷以分离出水层和己烷层。此工序进一步以相同的方式重复三次,并在减压下进行过滤和浓缩以分离出己烷馏分(48.5g)。对于以相同的方式分离出己烷层之后剩余的水层,将等量的氯仿加入并以如上述相同的方式进行分离以得到氯仿馏分(16.3g)。对于以相同的方式分离出氯仿层之后剩余的水层,将等量的乙酸乙酯加入并以如上述相同的方式进行分离以得到乙酸乙酯馏分(53.7g)。对于以相同的方式分离出乙酸乙酯层之后剩余的水层,将等量的丁醇加入并以如上述相同的方式进行分离以得到丁醇馏分(114g)。浓缩剩余水层以得到水馏分(186.5g)。

[0103] <制备例3>清香木馏分的活性馏分的分析

[0104] 为了调查在<制备例2>中得到的清香木的己烷馏分和乙酸乙酯馏分的活性馏分,用两种类型的液相色谱,UPLC(超高效液相色谱)和MPLC(中压液相色谱)分析这些馏分。

[0105] 首先,对于UPLC分析,使用0.25mm膜滤器过滤己烷馏分(48.5g)和乙酸乙酯馏分(53.7g)马上用于UPLC。将色谱柱(Waters BEH C18 柱,2.1×100mm,1.7mm)置于UPLC仪器(Waters UPLC-Q-TOF)中,然后将各个过滤馏分以0.3μl的量载入。在这方面,乙腈+0.1%甲酸/水+0.1%甲酸[10:60→100:0(v/v)]用作溶剂,洗脱速率为0.4ml/min并在200-400nm紫外波长下进行检测。

[0106] 对于MPLC分析,将色谱柱(20mm×250mm;树脂:Zeoprep C18,10 μm)置于MPLC仪器(Interchim)中,然后将各1g己烷馏分和乙酸乙酯馏分载入。在这方面,己烷/乙酸乙酯[10:90→100:0(v/v)]用作溶剂,洗脱速率为9ml/min并在200-400nm紫外波长下进行检测。对于己烷馏分进行分析110分钟而且对于乙酸乙酯馏分进行分析120分钟。

[0107] UPLC和MPLC分析的结果如图1和图2中所示,并且UPLC的分析结果在各个图的上面示出而MPLC的分析结果在各个图的下面示出。

[0108] <实施例1>LPS诱导巨噬细胞中抗炎症效果的评价

[0109] <1-1>对一氧化氮(NO)生成的抑制效果

[0110] 为了调查清香木提取物和其馏分的抗炎症效果,测定了小鼠巨噬细胞中脂多糖(LPS)刺激一氧化氮(NO)生成,RAW 264.7。

[0111] 详细地,将细胞接种并以 $2.5 \times 10^5$ 个细胞/ml的密度悬浮在用5%胎牛血清补充

的无酚红DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium,Gibco)中,并将其200 $\mu$ l接种在96孔板中。诱导细胞粘附4小时后,各用20 $\mu$ g/ml的样品处理该细胞,然后再孵育1小时。随后,细胞用0.5 $\mu$ g/ml的LPS处理,并进一步培养24小时。此后,收集100 $\mu$ l上清液并分装在新的96孔板中,并将等量的格里斯试剂(Sigma)加入其并被允许在室温下反应10分钟。然后,用酶标仪(Bio-Rad)测定在540nm下的吸光度。用亚硝酸钠绘制标准曲线,并在此曲线的基础上计算培养中一氧化氮的生成量。LPS-处理组的NO生成量被视为100%以计算各个样品的抑制率。在这方面,该样品为制备例1和制备例2中得到的乙醇提取物(Total)、己烷馏分(Hexane)、氯仿馏分( $\text{CHCl}_3$ )、乙酸乙酯馏分(EA)、丁醇馏分(BuOH)和水馏分(Aq)。

[0112] 如图3a中所示,在仅用LPS处理的细胞中NO的生成快速增加,然而在用乙醇提取物或各种馏分预处理再用LPS处理的细胞中NO的生成减小。特别地,当用己烷馏分(36.24 $\pm$ 5.01%抑制)或乙酸乙酯馏分(66.71 $\pm$ 1.71%抑制)预处理细胞时,NO的生成显著减小。

[0113] 如图3b中所示,在制备例3中调查的己烷馏分和乙酸乙酯馏分的活性馏分中,发现己烷馏分的活性馏分3-7和乙酸乙酯馏分的活性馏分2-6减小NO的生成。

[0114] <1-2>对细胞存活度的效果

[0115] 为了调查清香木提取物和馏分对细胞存活度的效果,如实施例<1-1>中那样,将Raw264.7细胞接种并以 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的浓度悬浮在用5%胎牛血清补充的DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium,Gibco)中,并将其100 $\mu$ l接种在96孔板中。诱导细胞粘附4小时后,各用20 $\mu$ g/ml的样品处理细胞,然后再培养24小时。随后,将10 $\mu$ l的5mg/ml的MTT溶液加到各个孔中,进一步培养4h。此后,弃去上清液并添加100 $\mu$ l的DMSO。然后,测定在570nm下的吸光度。通过下式1计算细胞存活度,当0.2%DMSO处理的阴性对照组的值被视为100%时。

[0116] [式1]

[0117] 细胞存活度(%) = [提取物处理组的OD<sub>570nm</sub>值/阴性对照组的OD<sub>570nm</sub>值]  $\times$  100

[0118] 如图3c中所示,示出80%或更多的细胞存活度的活性馏分为己烷馏分的活性馏分1,2和7和乙酸乙酯馏分的活性馏分1,2和5-7。

[0119] 因此,本发明者选出己烷馏分的活性馏分7(62.84 $\pm$ 19.61%抑制)和乙酸乙酯馏分的活性馏分5和6(各为64.42 $\pm$ 11.2%和78.88 $\pm$ 11.20%抑制),其示出对NO生成优异的抑制效果和起因于低毒性的高细胞存活度,并且他们在随后的实验中使用所述馏分。

[0120] <实施例2>卵蛋白敏化哮喘动物模型中缓解哮喘效果的评价

[0121] <2-1>实验动物与诱导支气管哮喘

[0122] 本实验中,具有约20g平均体重的6周龄Ba1b/c雌性小鼠用作实验动物。驯化1周后,体检未示出异常结果的动物用作受验者。将2mg氢氧化铝(A8222,Sigma,St.Louis,MO)和20 $\mu$ g卵蛋白(A5503,Sigma,St.Louis,MO)悬浮在200 $\mu$ L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,然后注射到小鼠腹腔中用于敏化。第一次腹腔内给予卵蛋白后的第21-23天,使用超声波雾化器用1%的卵蛋白进行吸入激发30min。最近一次抗原给药后24小时,测定气道高反应性。48个小时后,给予致命剂量的戊巴比妥钠(Etobal, Hanlim Pharmaceutical Co.,Ltd.),进行体重测定和气管切开术,用总量为1.2mL的生理盐水进行支气管肺泡灌洗,然后收集样品。实验继续,正常对照组(NC)中小鼠未给予卵蛋白也未用卵蛋白吸入激发,哮喘诱导组(OVA)中小鼠给予卵蛋白也用卵蛋白吸入激发,诱导支气管哮喘,对比组(Mon)中鼠在卵

蛋白吸入前1h经口给予孟鲁司特(30mg/kg,P0),实验组中小鼠分别在卵蛋白吸入前1h经口给予乙醇提取物(30mg/kg,P 0;Total)、乙酸乙酯馏分的活性馏分5(30mg/kg,P0;EA5)、乙酸乙酯馏分的活性馏分6(30mg/kg,P0;EA6)和己烷馏分的活性馏分7(30 mg/kg,P0;Hex7)。七只白色小鼠用于各个组。

[0123] <2-2>气道高反应性的测定

[0124] 通过用一腔体积描记法(All medicus,首尔)测定气道阻力来调查由哮喘发生引起的气道高反应性并通过测定增强的表示数学计算气道阻塞的暂停(Penh)评价气道阻力程度。为了测定Penh,在正常的呼吸条件下测定基线值,然后使用超声雾化器吸入3分钟PBS,测定Penh值超过3分钟。然后逐渐增加乙酰甲胆碱(A2251,Sigma,St.Louis,MO)的吸入浓度(12,25和50mg/ml),然后测定Penh。根据下式2计算Penh值,吸入各个浓度的乙酰甲胆碱后Penh的增加率用百分数表达,当基线Penh(Penh激发)被视为100%时。

[0125] [式2]

$$[0126] \quad Penh = \left[ \frac{Te}{RT-1} \right] \times \left( \frac{PEF}{PIF} \right)$$

[0127] Te:呼气时间(sec)(从吸气到下一次吸气时间)

[0128] RT:弛豫时间(开始呼气和呼气过程中已达到剩余30%的潮气容积时的时刻之间经过的时间)

[0129] PEF:峰值呼气流量

[0130] PIF:峰值吸气流量

[0131] 结果,如图4中所示,正常对照(NC)组示出Penh值随着乙酰甲胆碱浓度的增加缓慢增加,而哮喘诱导组(OVA)示出Penh值急剧增加。然而,与哮喘诱导组(OVA)相比,在给予孟鲁司特的对比组(M)和给予清香木提取物和其馏分的实验组(Total、EA5、EA6、Hex7)中, Penh 值随浓度显著地减小。

[0132] <实施例3>测定血清IgE和卵蛋白特异性IgE抗体

[0133] 为了测定血清IgE和卵蛋白特异性IgE,使用免疫酶测定法。使用市售试剂盒(Biolegend Ins.,CA,USA)测定IgE水平。为了测定卵蛋白特异性IgE水平,将20μg/mL的卵蛋白溶解在0.1M NaHCO<sub>3</sub>缓冲液(pH 8.3)中,并置于96孔平底ELISA板内以在4℃下涂覆整夜。用含有1%牛血清白蛋白的PBS阻止非特异性结合。以1:400稀释血清样品并加到孔板上并允许在室温下反应2h。然后,将该板洗好,以1:300稀释抗鼠IgE单克隆抗体(Biolegend Ins.,CA,USA)并允许反应2h。然后,以1:4000稀释与过氧化物酶偶合的HRP接合山羊抗小鼠IgE多克隆抗体(Biolegend Ins.,CA,USA),加到孔板上,并允许在室温下反应1h,然后清洗。为了显色,3,3',5,5'-四甲基联苯胺基板被允许反应,并在450nm下测定光谱吸光度。在这方面,为了统计分析,根据一系列变量计算平均值和标准偏差(平均值±标准偏差),通过使用SPSS 10.0进行Mann-whitney U试验来分析各个组之间的对比。p<0.05被认为在统计学上显著地不同。

[0134] 如下表1中所示,与正常对照组(NC)(0.2±0.16μg/ml)相比,哮喘诱导组(OVA)(2.4±0.34μg/ml)中血清IgE抗体水平大大增加,而且与哮喘诱导组(OVA)相比,给予孟鲁司特组(Mon)(1.8±0.28μg/ml)显著地减少。当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,血清IgE抗体水平显著减少,Total给药组被测定为1.8±0.

19 $\mu$ g/ml,EA5给药组中为1.68 $\pm$ 0.43 $\mu$ g/ml,EA6给药组中为1.5 $\pm$ 0.24 $\mu$ g /ml和Hex7给药组中为2.0 $\pm$ 0.41 $\mu$ g/ml。特别地,EA6给药组中减少突出。与哮喘诱导组(OVA)(368 $\pm$ 90.6ng/ml)相比,卵蛋白特异性IgE抗体水平也减少,Total给药组中低至237 $\pm$ 41.9ng/ml,EA5给药组中低至169 $\pm$ 55.8ng/ml,EA6给药组中低至195 $\pm$ 67.6ng/ml和Hex7给药组中低至196 $\pm$ 52 ng/ml。结果,确认与哮喘诱导组(OVA)相比,用本发明的清香木提取物或其馏分处理的组中,卵蛋白特异性IgE抗体水平显著地减少。

[0135] [表1]

[0136]

组	IgE (ng/g1)	OVA特异性IgE (ng/ml)
NC	0.2 $\pm$ 0.16	-
OVA	2.4 $\pm$ 0.34 <sup>#</sup>	368 $\pm$ 90.6 <sup>#</sup>
Mon	1.8 $\pm$ 0.28 <sup>*</sup>	198 $\pm$ 83.0 <sup>*</sup>
Total	1.8 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup>	237 $\pm$ 41.9 <sup>*</sup>
EA5	1.7 $\pm$ 0.43 <sup>*</sup>	169 $\pm$ 55.8 <sup>*</sup>
EA6	1.5 $\pm$ 0.24 <sup>*</sup>	195 $\pm$ 67.6 <sup>*</sup>
Hex7	2.0 $\pm$ 0.41	196 $\pm$ 52.1 <sup>*</sup>

[0137] #:与正常对照组(NC)相比,认为统计学上显著(p<0.05),

[0138] \*:与哮喘诱导组(OVA)相比,认为统计学上显著(p<0.05)。

[0139] <实施例4>支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的分析

[0140] 从个体收集支气管肺泡灌洗液,并于采集后立即用台盼蓝对该液体染色。用血细胞计数器计算除去死细胞的细胞总数。随后,用Cytospin II 涂抹制剂后进行Diff-Quick染色(Sysmex,瑞士),而且嗜酸性粒细胞和其他炎症细胞分类计数。

[0141] 如图5中所示,与正常对照组(NC)(0 $\pm$ 0)相比,哮喘诱导组(OVA)中嗜酸性粒细胞的数目大大增加,其被测定为(74 $\pm$ 16.0) $\times$ 10<sup>5</sup>,然而,其在给予孟鲁司特组(Mon)中减少,被测定为(36 $\pm$ 20.4) $\times$ 10<sup>5</sup>。当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,嗜酸性粒细胞的数目显著减少,Total给药组中被测定为(32 $\pm$ 14.1) $\times$ 10<sup>5</sup>,EA5给药组中被测定为(42 $\pm$ 6.1) $\times$ 10<sup>5</sup>,EA6给药组中被测定为(23 $\pm$ 7.4) $\times$ 10<sup>5</sup>和Hex7给药组中被测定为(41 $\pm$ 10.7) $\times$ 10<sup>5</sup>。这些减少相似于或显著大于作为对比组的给予孟鲁司特组(Mon)。特别地,EA6给药组中减少突出。

[0142] 与正常对照组(NC),其被测定为(9 $\pm$ 2.0) $\times$ 10<sup>5</sup>相比,在哮喘诱导组(OVA)中被测定为(180 $\pm$ 22.2) $\times$ 10<sup>5</sup>,包括其他炎症细胞的总炎症细胞数目大大增加,然而,与哮喘诱导组(OVA)相比,给予孟鲁司特组(Mon)中显著地减少,被测定为(98 $\pm$ 19.3) $\times$ 10<sup>5</sup>。当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,总炎症细胞的数目显著减少,Total给药组中被测定为(126 $\pm$ 16.3) $\times$ 10<sup>5</sup>,EA5给药组中被测定为(140 $\pm$ 20.3) $\times$ 10<sup>5</sup>,EA6给药组中被测定为(83 $\pm$ 17.7) $\times$ 10<sup>5</sup>和Hex7给药组中被测定为(133 $\pm$ 11.6) $\times$ 10<sup>5</sup>。特别地,EA6给药组中减少突出。

[0143] <实施例5>对反应性氧种产生的抑制效果

[0144] 各个体的支气管肺泡灌洗液中的一部分用磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗,并将10mM的2,7-二氯荧光素二乙酸酯(35845,Sigma,St.Louis,MO)添加到其中。将该支气管肺泡灌洗液在常温下放在暗室中10min并使用血细胞计数器测定(Ex=480nm,Em=522nm)。

[0145] 因此,如图6中所示,与正常对照组(NC)相比,哮喘诱导组(OVA)中反应性氧种的产生量大大增加。而当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,反应性氧种的产生量减少,Total给药组中被测定为42.7%,EA5给药组中被测定为25.4%,EA6给药组中被测定为46.3%和Hex7给药组中被测定为36.1%。

[0146] <实施例6>对支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-4,5和13生成的抑制效果

[0147] 为了测定本发明的清香木提取物或其馏分对支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-4,5和13产生的效果,使用了市售的ELISA试剂盒(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)。

[0148] 简单地说,将100 $\mu$ l支气管肺泡灌洗液加到孔板上并允许反应1h。反应后,使用ELISA试剂盒中的清洗液清洗该板,添加适合各试剂盒的生物素结合物并允许反应2h。反应完成后,使用清洗液清洗该孔板。为了显色,添加100 $\mu$ l各试剂盒中的基板溶液并允许反应30min,并添加100 $\mu$ l试剂盒中的终止液以终止反应。在450nm下测定吸光度。在这方面,为了统计分析,根据一系列变量计算平均值和标准偏差(平均 $\pm$ 标准偏差),通过使用SPSS 10.0进行Mann-whitney U试验来分析各个组之间的对比。 $p < 0.05$ 被认为在统计学上显著不同。

[0149] 因此,如下表2中所示,与正常对照组(NC) ( $27.7 \pm 5.68$ pg/ml)相比,在哮喘诱导组(OVA)中被测定为 $67.6 \pm 11.51$ pg/ml中,支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-4的生成量大大增加。而当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,白细胞介素-4的生成量减少,Total给药组中被测定为 $44.5 \pm 6.93$ pg/ml,EA5给药组中被测定为 $43.6 \pm 6.93$ pg/ml,EA6给药组中被测定为 $43.5 \pm 12.84$ pg/ml和Hex7给药组中被测定为 $64.6 \pm 6.34$ pg/ml。与哮喘诱导组(OVA)相比,Total给药组、EA5给药组、EA6给药组和Hex7给药组中的白细胞介素-5和13的生成量也被显著抑制。

[0150] [表2]

组	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)
NC	$27.7 \pm 5.68$	$25.4 \pm 3.62$	$19.6 \pm 1.29$
OVA	$67.6 \pm 11.51^{\#}$	$67.3 \pm 13.39^{\#}$	$135.2 \pm 25.33^{\#}$
Mon	$34.6 \pm 6.52^*$	$32.4 \pm 4.46^*$	$65.7 \pm 18.86^*$
Total	$44.5 \pm 6.93^*$	$42.4 \pm 6.58^*$	$75.6 \pm 9.48^*$
EA5	$43.6 \pm 8.09^*$	$44.0 \pm 8.11^*$	$84.6 \pm 19.29^*$
EA6	$43.5 \pm 12.84^*$	$39.0 \pm 8.86^*$	$68.4 \pm 15.99^*$
Hex7	$64.6 \pm 6.34$	$53.4 \pm 9.10^*$	$101.81 \pm 23.81^*$

[0152] #:与正常对照组(NC)相比,认为统计学上显著( $p < 0.05$ ),

[0153] \*:与哮喘诱导组(OVA)相比,认为统计学上显著( $p < 0.05$ )。

[0154] <实施例7>哮喘动物模型的组织病理学分析

[0155] 为了评价本发明的清香木提取物或其馏分对肺部组织中炎症的效果,摘取的肺部组织一般用福尔马林凝固,嵌入石蜡中并切片为4 $\mu$ m厚。该组织切片用H&E(苏木精和伊红)染色以评价肺部组织的炎症。

[0156] 为了评价本发明的清香木提取物或其馏分对气道中黏液分泌的效果,进行了过碘酸雪夫染色(IMEB Inc., San Marcos, CA)。

[0157] 因此,如图7中所示,与正常对照组(NC)相比,在哮喘诱导组(OVA)中观察到炎症细胞对气道和血管周围组织的明显浸润。而当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,在Total给药组、EA5给药组、EA6给药组和Hex7给药组中,炎症细胞对气道和血管周围组织的浸润显著减少。

[0158] 如图8中所示,与正常对照组(NC)相比,在哮喘诱导组(OVA)中气道中黏液分泌显著增加。而当本发明的清香木提取物或其馏分被处理时,与哮喘诱导组(OVA)相比,在Total给药组、EA5给药组、EA6给药组和Hex7给药组中,气道中的黏液分泌大大减少。

[0159] <实施例8>测定清香木提取物和其馏分的细胞毒性

[0160] 为了调查制备例1和制备例2中制备的清香木提取物和其馏分的细胞毒性,使用BALB/c小鼠源性RAW 264.7巨噬细胞进行以下实验。

[0161] 首先,将RAW 264.7巨噬细胞悬浮在用10%胎牛血清(FBS)、青霉素(100U/ml)和链霉素(100μg/ml)补充的DMEM中,并将该细胞以 $5 \times 10^4$ 个细胞的密度接种到96-孔板的各个孔内,然后在5%的CO<sub>2</sub>和37°C下培养4h。细胞稳定后,将培养基替换为含有浓度为5, 10, 20, 或40μg/ml在制备例中得到的清香木的乙醇提取物、清香木的己烷馏分或清香木的乙酸乙酯馏分的培养基,然后在5%的CO<sub>2</sub>和37°C下培养18h。培养完成后,添加WST-1试剂,然后在5%的CO<sub>2</sub>和37°C的条件下培养3h。在450nm下测定吸光度。

[0162] 综上所述,确认本发明的清香木提取物和其馏分具有高抗哮喘和抗炎活性。

[0163] 在下文中,将描述本发明的组合物的制剂实施例。

[0164] <制剂实施例1>医药制剂的制备

[0165] 根据如下常规方法制备包括本发明的清香木提取物或其馏分的医药制剂。

[0166] 1. 粉末的制备

[0167] 制备例1或2中制备的清香木提取物或其馏分2g

[0168] 乳糖1g

[0169] 将上述成分混合,并填充到密封袋中以制备粉末。

[0170] 2. 片剂的制备

[0171] 制备例1或2中制备的清香木提取物或其馏分100mg

[0172] 玉米淀粉100mg

[0173] 乳糖100mg

[0174] 硬脂酸镁2mg

[0175] 将上述成分混合,并根据常规片剂制备方法片化以制备片剂。

[0176] 3. 胶囊的制备

[0177] 制备例1或2中制备的清香木提取物或其馏分100mg

[0178] 玉米淀粉100mg

[0179] 乳糖100mg

[0180] 硬脂酸镁2mg

[0181] 将上述成分混合,并根据常规胶囊制备方法填充到明胶胶囊中以制备胶囊。

[0182] 4. 药丸的制备

[0183] 制备例1或2中制备的清香木提取物或其馏分1g

[0184] 乳糖1.5g

[0185] 甘油1g

[0186] 木糖醇0.5g

[0187] 将上述成分混合以根据常规制备方法制备药丸(每个药丸4g)。

[0188] 5. 小颗粒的制备

[0189] 制备例1或2中制备的清香木提取物或其馏分150mg

[0190] 大豆提取物50mg

[0191] 葡萄糖200mg

[0192] 淀粉600mg

[0193] 将上述成分混合,将100mg的30%乙醇添加到其中,在60℃下干燥该混合物以形成小颗粒,然后填充到袋内。

[0194] 基于以上描述,本领域技术人员将会理解本发明可以以不同的具体形式实现而不改变其技术精神或本质特征。因此,应该理解上述实施方式并非限制性的而是在所有方面中例示。本发明的范围由所附权利要求限定而不是由它们前面的说明书限定,因此在权利要求范围内的所有的改变和变形,或所述范围的等同物意在包括在权利要求中。

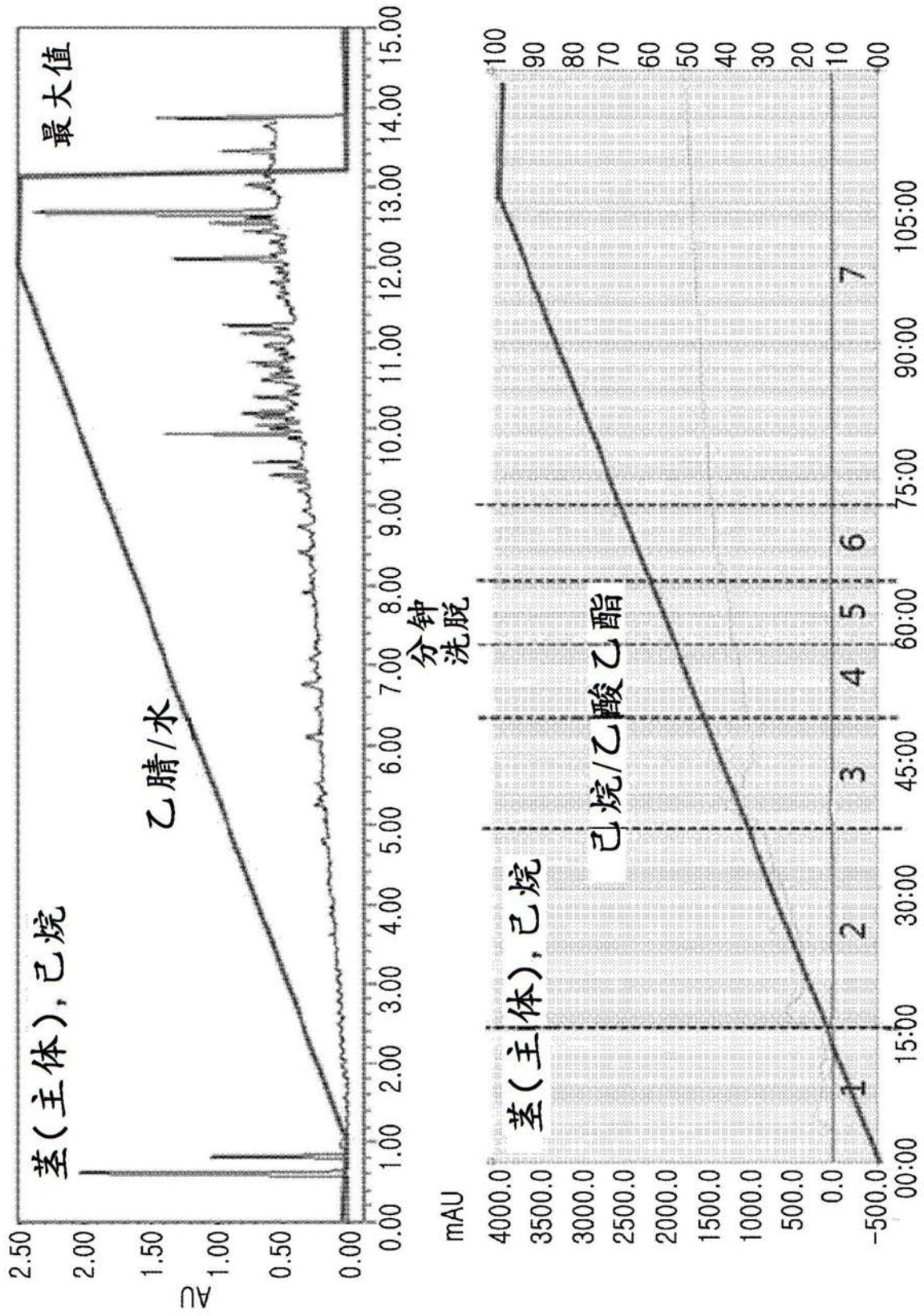


图1

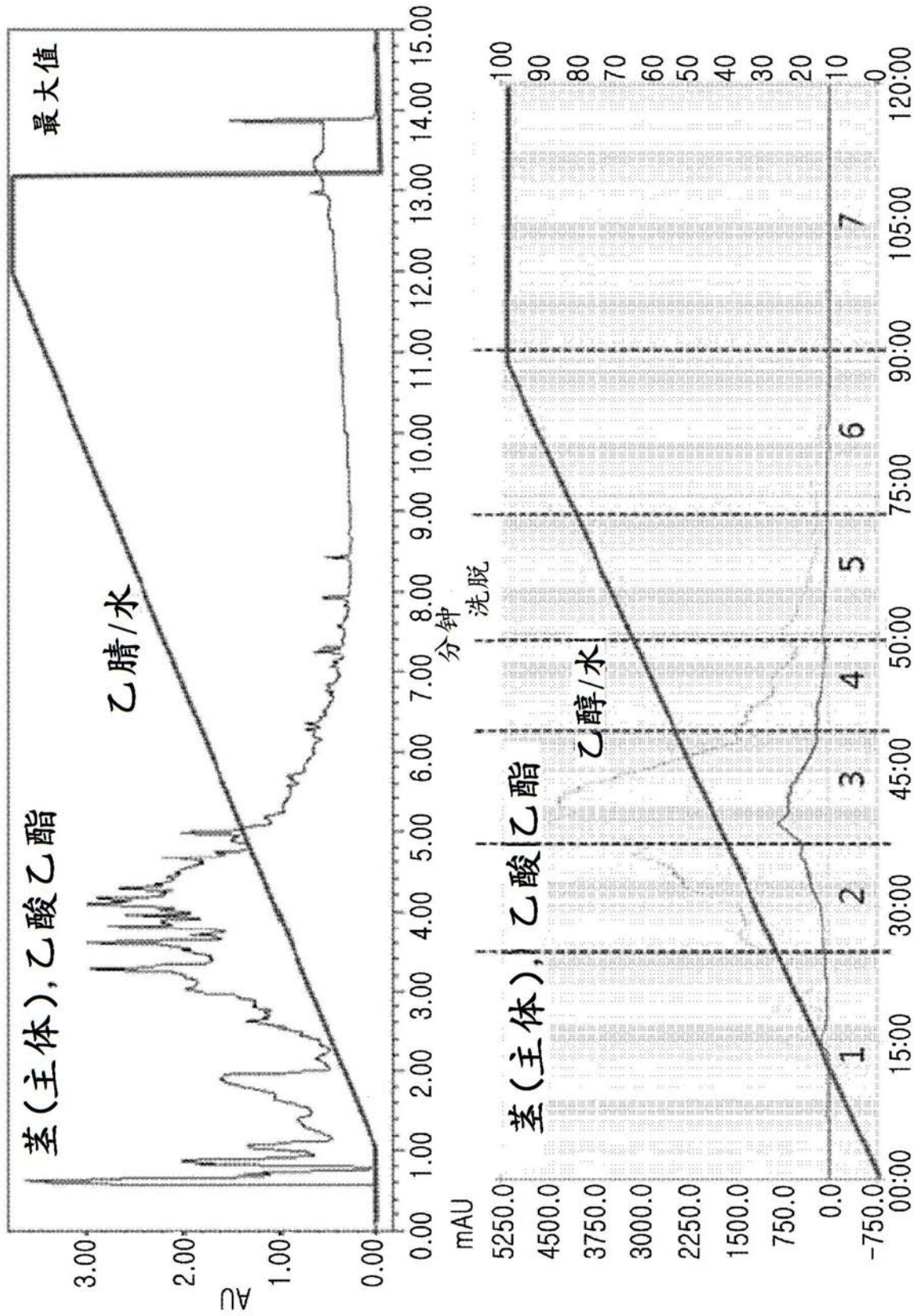


图2

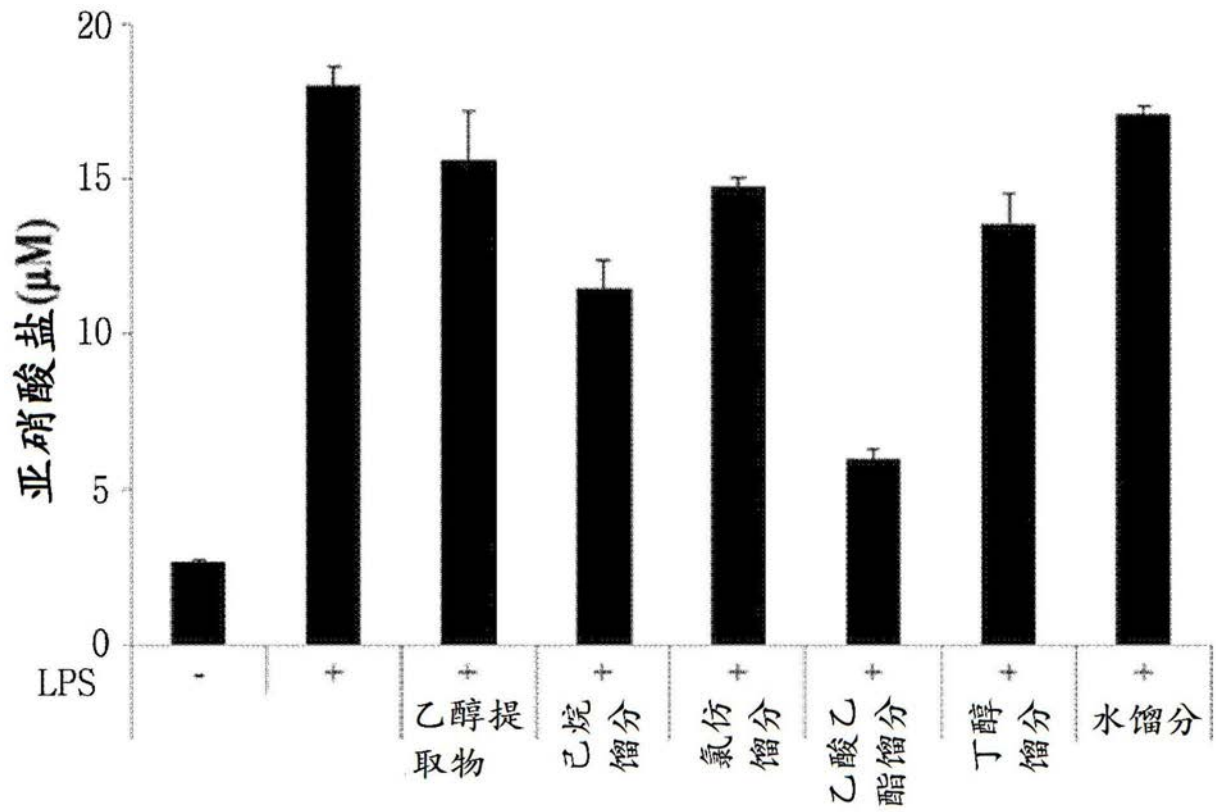


图3a

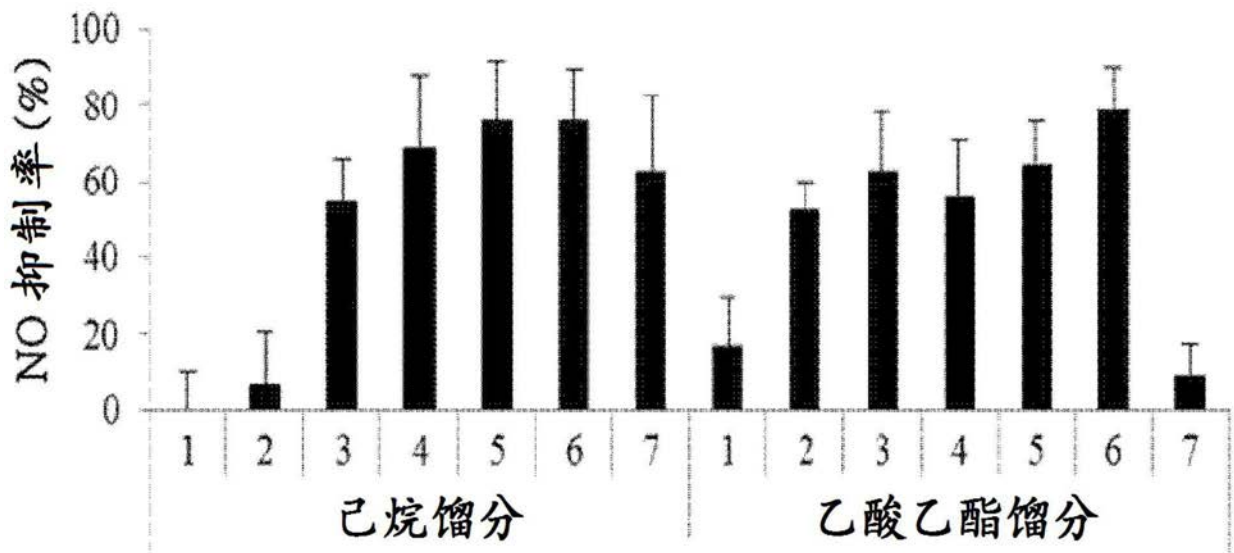


图3b

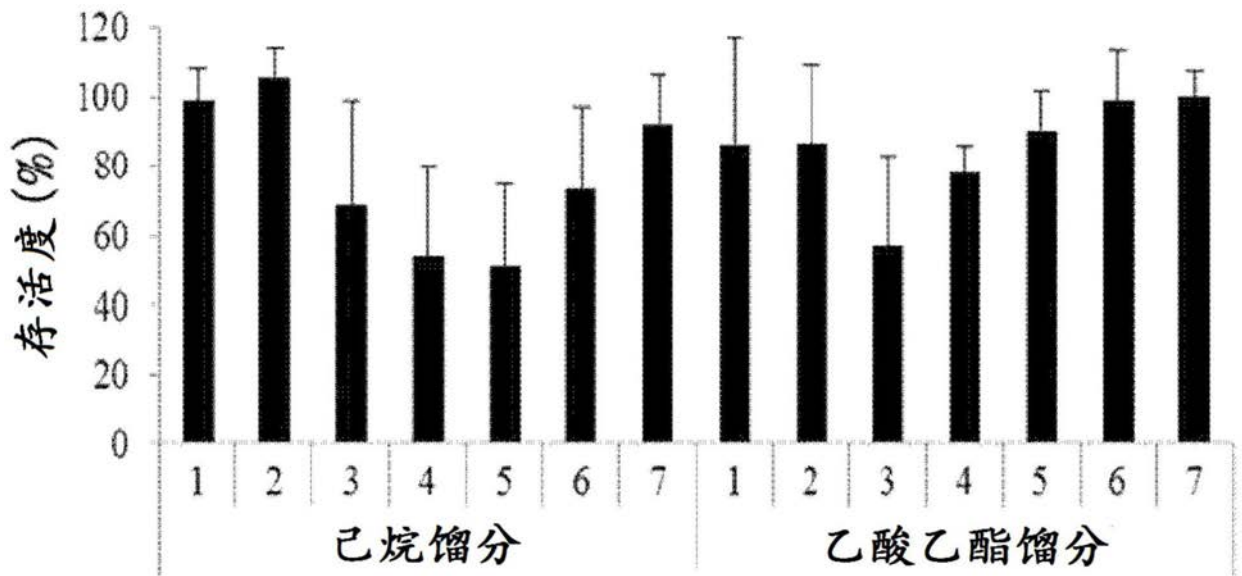


图3c

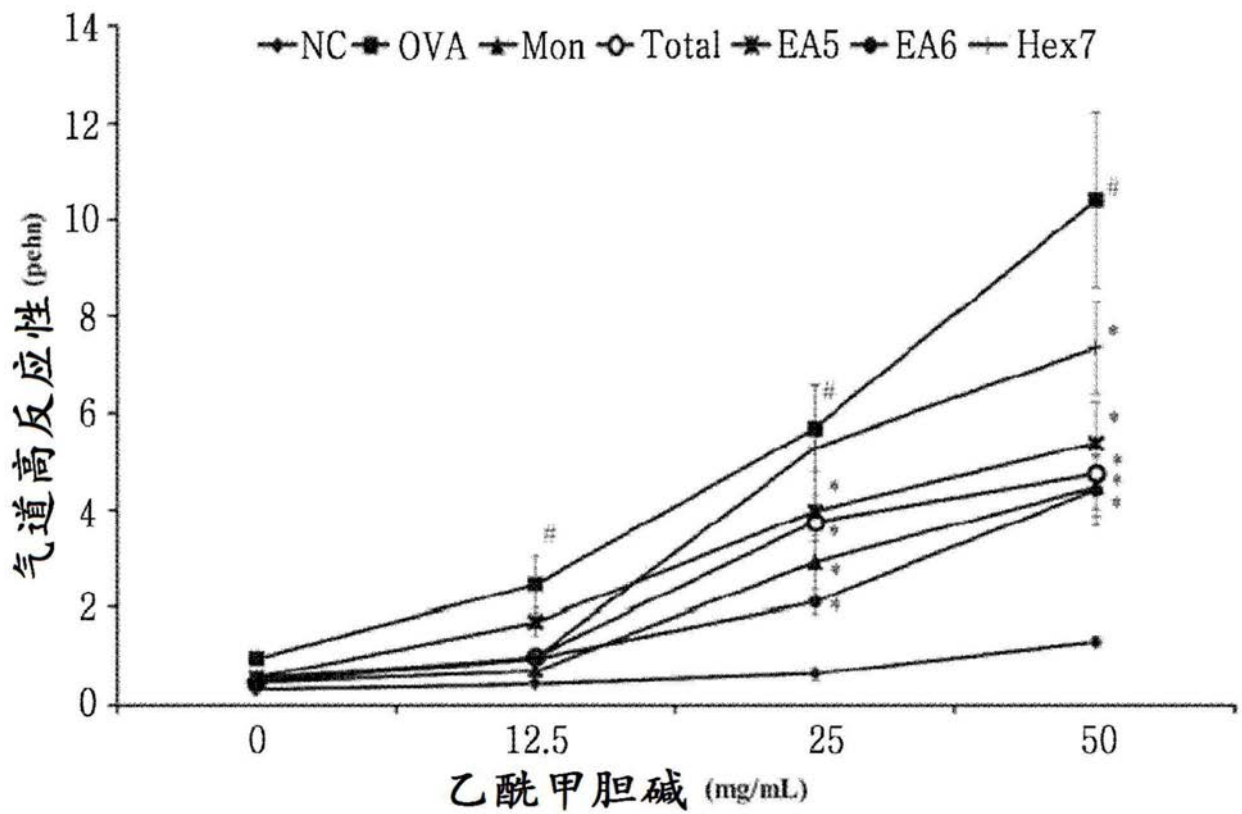


图4

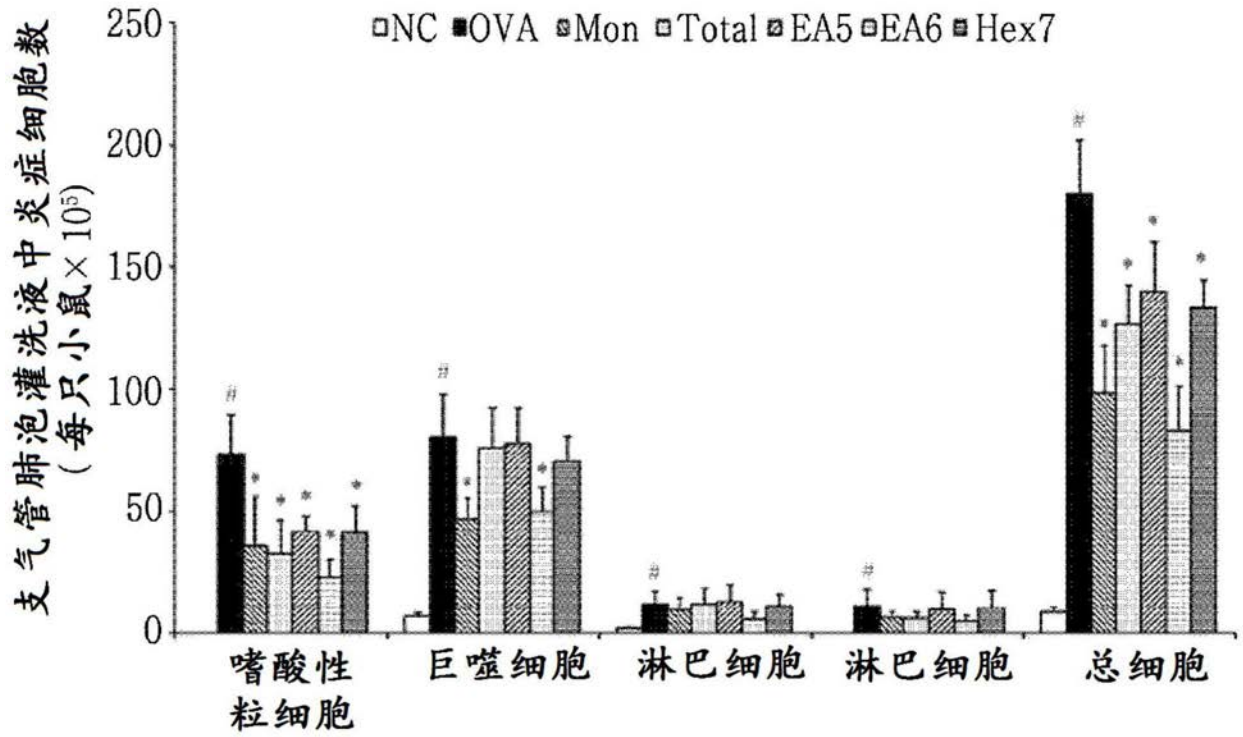


图5

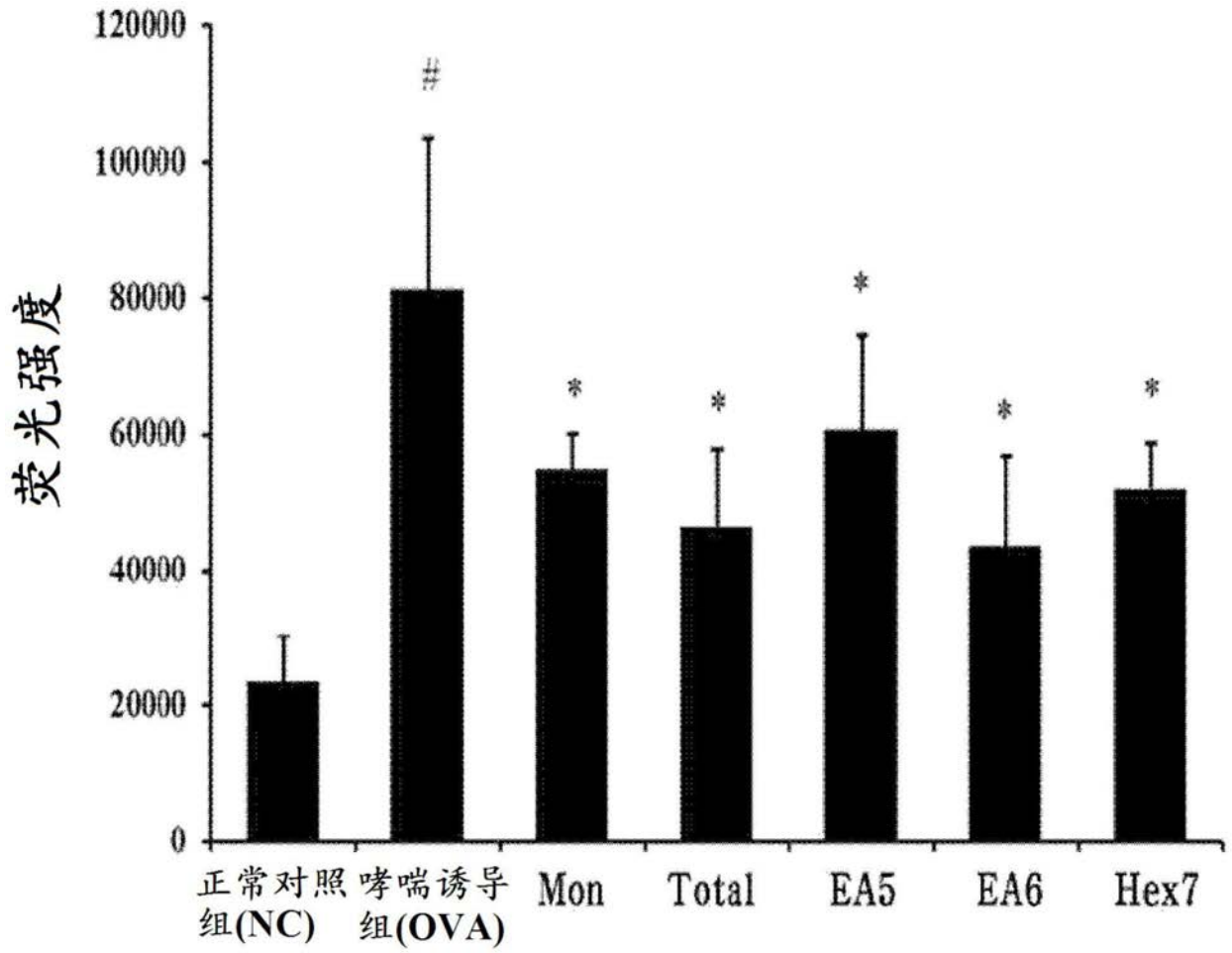


图6

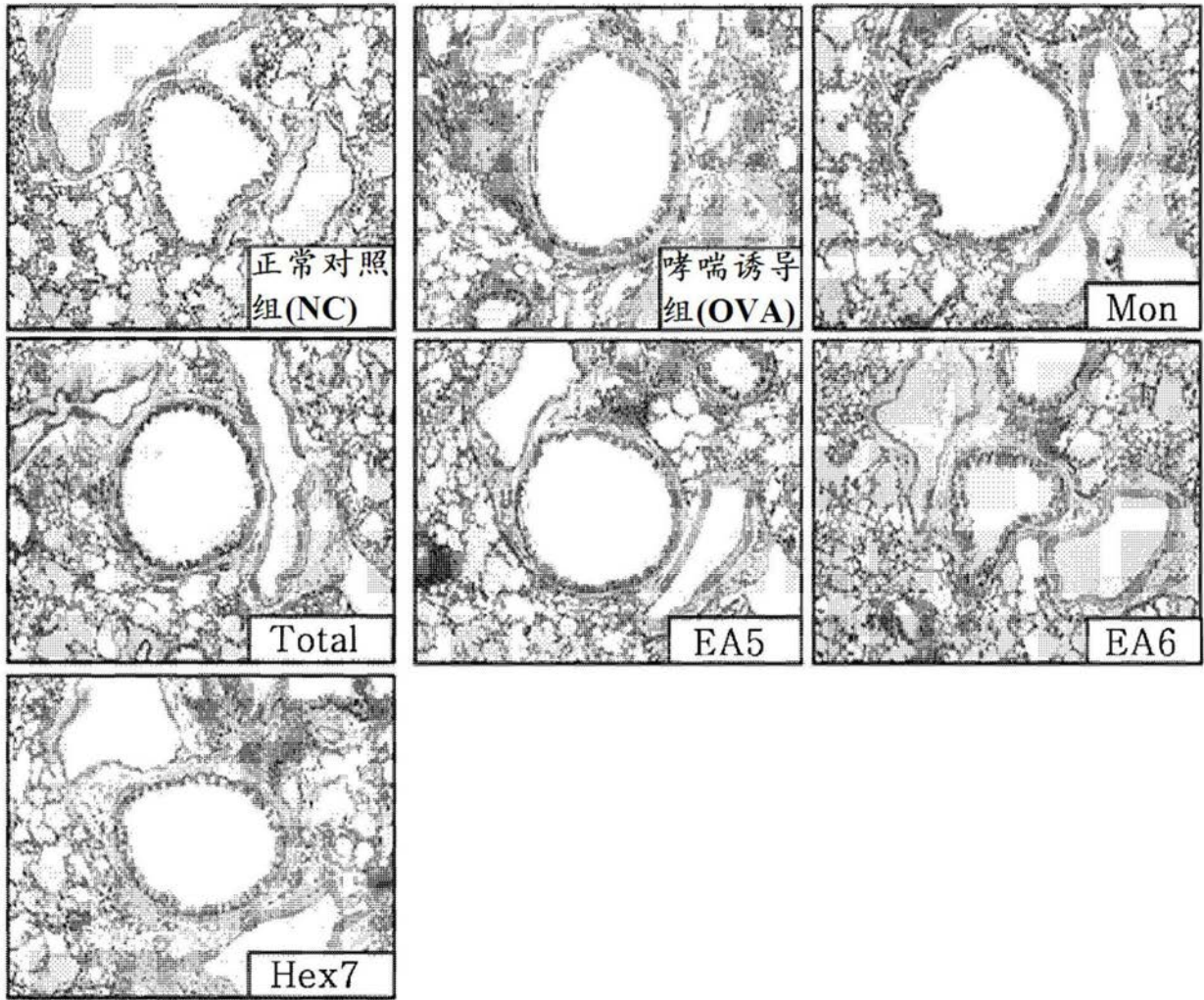


图7

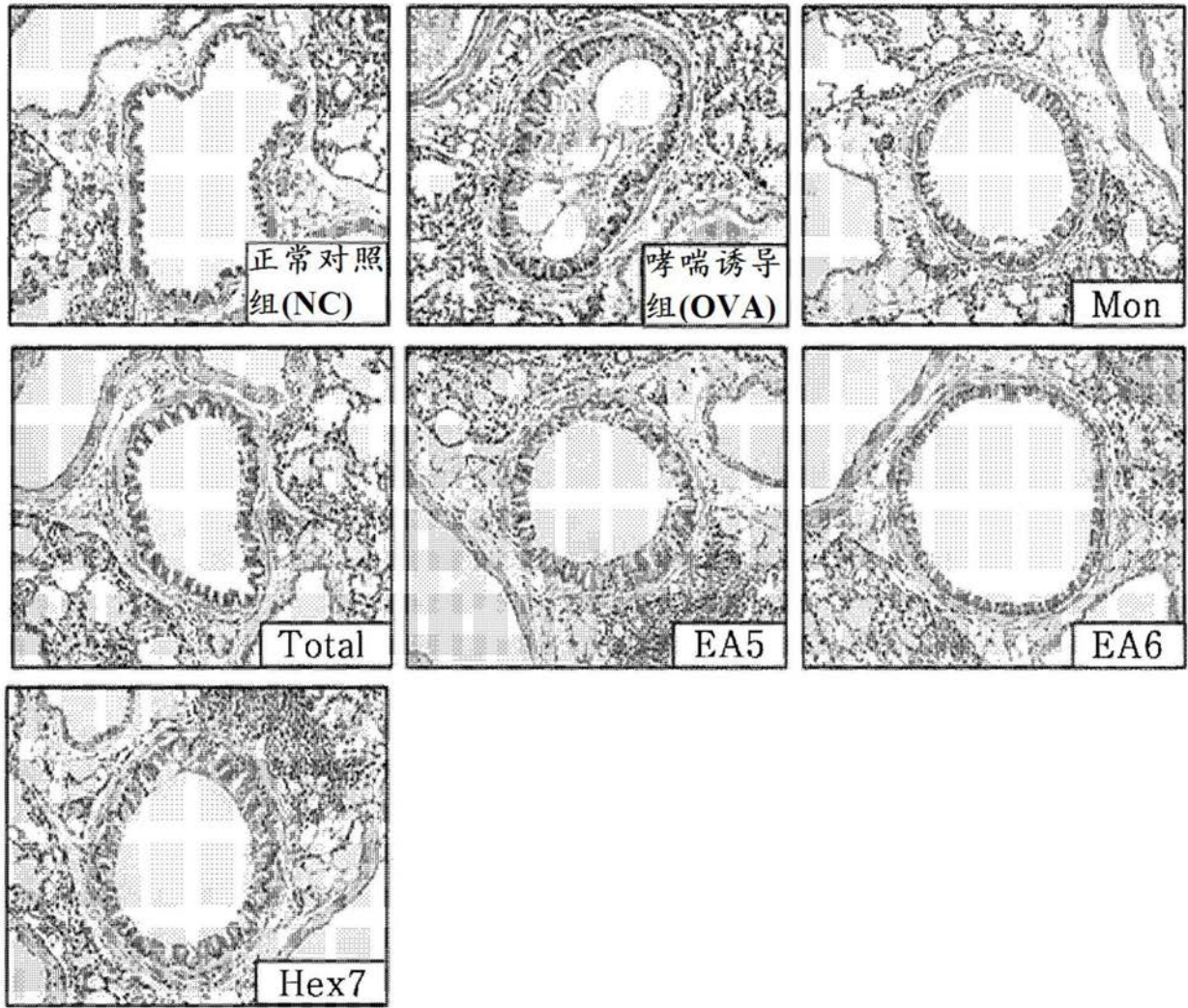


图8