(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2010 년 12 월 9 일 (09.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/140832 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 36/73 (2006.01) *A61K 36/54* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003530

(22) 국제출원일: 2010 년 6 월 1 일 (01.06.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2009-0049626 2009 년 6 월 4 일 (04.06.2009) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **안국약품 주식회사 (AHN-GOOK PHARMACEUTICAL CO., LTD.)** [KR/KR]; 서울특별시 영등포구 대림 2 동 993-75, 150-072 Seoul (KR).

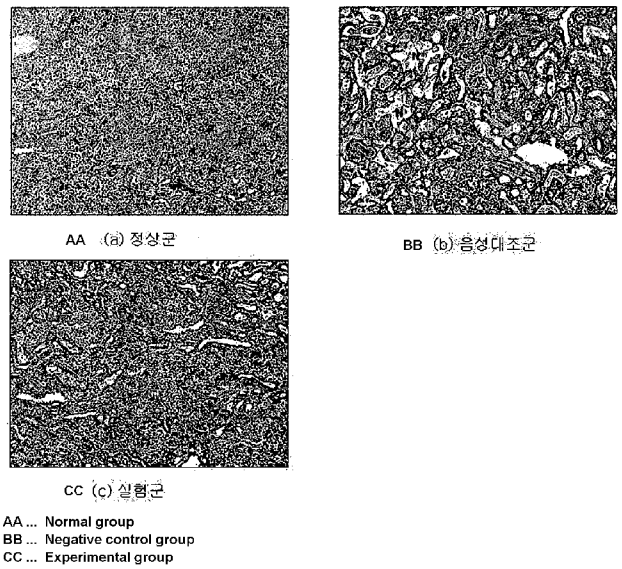
(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **어진 (AUH, Jin)** [KR/KR]; 서울특별시 강남구 압구정동 369-1 현대아파트 13 동 104 호, 135-110 Seoul (KR). **김창환 (KIM, Chang-Hwan)** [KR/KR]; 경기도 화성시 기안동 신일해피트리 101 동 1106 호, 445-772 Gyeonggi-do (KR). **한창균 (HAN, Chang-Kyun)** [KR/KR]; 서울특별시 영등포구 신길 4 동 삼성래미안아파트 106 동 1204 호, 150-778 Seoul (KR). **연성흠 (YEON, Sung-Hum)** [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 서둔동 188-2 청한주택 3 동 302 호, 441-856 Gyeonggi-do (KR). **최승인 (CHOE, Seung-In)** [KR/KR]; 서울특별시 중랑구 면목본동 121-16 건민유토빌 502 호, 131-816 Seoul (KR). **신영준 (SHIN, Young-June)** [KR/KR]; 경상남도 김해시 삼계동 분성마을 동원로얄듀크 305 동 2005 호, 621-770 Gyeongsangnam-do (KR). **한동오 (HAN, Dong-Oh)** [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 비산동 미륭아파트 6 동 201 호, 431-050 Gyeonggi-do (KR). **장수임 (CHANG, Soo-Im)** [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 권선동 벽산한성아파트 804 동 602 호, 441-714 Gyeonggi-do (KR). **이지혜 (LEE, Ji-Hye)** [KR/KR]; 경기도 안산시 단원구 고잔 2 동 주공아파트 711 동 1302 호, 425-724 Gyeonggi-do (KR). **이준석 (LEE, Jun-Seok)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 매탄 2 동 196-14 유당빌딩 307 호, 443-801 Gyeonggi-do (KR). **곽호영 (KWAK, Ho-Young)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 신동 340-25 601 호, 443-390 Gyeonggi-do (KR). **문효진 (MOON, Hyo-Jin)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 매탄 1 동 153-52 202 호, 443-800 Gyeonggi-do (KR). **이종욱 (LEE, Jong-Wook)** [KR/KR]; 경기도 수원시 장안구 율전동 163-8 203 호, 440-824 Gyeonggi-do (KR). **김성민 (KIM, Sung-Min)** [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 우만동 526-29 203 호, 442-819 Gyeonggi-do (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING HERBAL EXTRACTS FOR PREVENTING OR TREATING NEPHRITIS

(54) **발명의 명칭** : 생약 추출물을 함유하는 신장염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

【도 2】



(57) **Abstract**: The present invention relates to a novel use of herbal extracts in a pharmaceutical composition for preventing and treating nephritis. More specifically, the present invention provides: a pharmaceutical composition and health food for preventing and/or treating nephritis containing one or more herbal extracts selected from the group consisting of Crataegus oxyacantha, Cinnamomum cassia Blume, Prunella vulgaris and Equiseti Herba; a method for treating nephritis using the herbal extracts; and a use of the herbal extracts for manufacturing a composition for preventing and/or treating nephritis. The herbal extracts are useful in preventing and/or treating nephritis in drug-induced nephritis models such as those induced by gentamicin, cisplatin and the like, and have a high suppression activity for mesangial cell growth in the kidney.

(57) **요약서**: 생약 추출물의 신장염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서의 신규한 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 생약 추출물을 함유하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료용 약학 조성물, 및 건강기능식품, 상기 생약 추출물을 사용하는 신장염 치료 방법, 및 상기 생약 추출물의 신장염 예방 및/또는 치료용 조성물 제조에 있어서의 용도가 제공된다. 상기 생약 추출물은 겐타마이신, 시스플라틴 등의 약물 유발 신장염 모델에 대한 신장염 치료 효과와 신장 메산기움 세포(Mesangial Cell)에 대한 세포 성장 억제 활성이 우수하여 신장염 질환 예방 및/또는 치료에 매우 유용하다.

WO 2010/140832 A2

(74) **대리인**: **유미특허법인 (YOO ME PATENT & LAW FIRM)**; 서울특별시 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, 135-080 Seoul (KR).

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

【명세서】

【발명의 명칭】

생약 추출물을 함유하는 신장염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

【기술분야】

본 발명은 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생약 추출물을 함유하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료용 약학 조성물, 및 건강기능식품, 상기 생약 추출물을 사용하는 신장염 예방 및/또는 치료 방법, 및 상기 생약 추출물의 신장염 예방 및/또는 치료용 조성물 제조에 있어서의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

우리 몸의 신장은 여러 기능을 수행하는 기관으로 대표적 배설기관의 하나이다. 배설 기관으로서 수분 양 조절과 노폐물 배출, 전해질 농도 조절을 수행하며, 내분비 기관으로서 에리스로 포이에틴(적혈구 생산 호르몬)과 레닌(혈압 조절 기능)을 생산하며 비타민 D3의 대사를 조절하여 부갑상선 기능 및 칼슘 대사를 조절하는 기능을 수행한다. 아울러, 펩티드 호르몬 파괴와 저분자 단백질 재흡수, 포도당/지질 대사 조절 등 대사기관으로서의 기능도 수행한다. 이러한 신장에 발생하는 질환은 신장염, 신부전, 신장암 등이 있으며, 신장염이 가장 대표적인 질환이다. 신장염 환자의 경우 신장염이 지속될 경우, 신기능 상실에 의한 만성 신부전이나 고혈압 등의 질환이 유발되며, 기타 장기의 손상 및 대사 이상 등의 합병증을 유발한다. 또한, 신장은 기능의 70% 이상을 상실하기 까지 자각 증상이 없으므로, 치료 시기가 지나면 신부전이 유발되어 신장 투석이나 신장 이식으로만 치료가 가능하다. 국내의 경우 투석 환자의 수가 매년 4000~5000명씩 증가하는 추세이며, 이식 환자도 매년 증가하고 있는 추세이다. 특히, 투석의 경우 이식이 진행되기 전까지 지속적으로 진행해야 하므로, 환자의 고통이나 경제적 부담이 매우 크다. 또한,

이식의 경우도 신장 공여자가 많지 않은 관계로 장기간의 대기와 심지어 장기 밀매 등의 사회적 부작용까지 발생하고 있는 상황이다.

신장염의 70% 가량을 차지하는 면역복합체 매개 신장염의 경우, 체내/외의 항원에 의해 체내에서 발생한 항체가 결합하여 항원-항체 복합체를 형성하고, 이 복합체가 사구체의 기저막과 메산기움 세포 사이에 침착하여 염증 현상을 일으켜서 사구체 손상을 가져온다. 유사한 면역 반응에 의한 항사구체기저막항체신염의 경우, 체내에서 항사구체기저막 항체가 형성되어 사구체의 기저막에 침착되어 급격한 염증 반응을 나타내는 것으로 신장염 환자의 약 5% 가량이 이 환자군에 속한다. 기타 연쇄상 구균 등의 병원성 미생물이나 바이러스에 의해 요도나 방광 등의 비뇨기관이 감염되어 이로 인해 감염균이 신장에까지 침입하여 신장염을 유발하는 경우도 있다.

신장염 치료제는 면역억제제, 항염증제, 고혈압/혈관작용제 및 항생제 등이 있으며, 그 중 면역억제제는 신장염 발생의 원인인 항체 형성을 억제하여 사구체에 항원-항체 복합체의 침착을 억제함으로써 신장염 증상을 개선하는 역할을 하고, 항염증제는 염증의 원인보다는 염증 자체의 발생을 억제하여 신장염의 증상을 개선한다. 고혈압/혈관 작용제로 사용되는 안지오텐신 II 길항제들은 사구체의 여과기 역할을 하는 혈관 세포벽인 기저막의 생성을 촉진하여 신기능의 활성화 작용을 하며, 감염에 의한 신장염의 경우 침투한 원인 병원균을 퀴놀론계 항생물질을 이용하여 사멸함으로써 신장염을 치료한다.

국내.외에서의 신장염 환자의 대부분은 자가 면역 반응에 의한 사구체 신염 환자가 주를 이루고 있으며, 이의 치료를 위하여 면역억제제, 항염증제, 혈관/고혈압 작용제를 위주로 처방되고 있다. 이외에 감염에 의해 발생하는 신우신염의 경우에는 퀴놀론계 항생제가 사용되고 있다. 면역억제제로는 타크롤리무스(tacrolimus), 에쿨리주맙(eculizumab), 마이코페놀레이트 모페르틸(mycophenolate mofetil), 사이클로스포린 에이(cyclosporine A) 등이 신장염 치료 의약품으로 사용되고 있으며,

항염증제로는 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone) 등이 사용되고 있다. 또한, 혈관/고혈압 작용제로 칸데사르탄(candesartan)과 항종양 활성이 있는 리툭시맙(rituximab)과 아바타셉트(abatacept)도 사구체 신염의 치료제로서 사용되고 있다. 또한, 신우신염의 치료제로서는 퀴놀론계의 레보플록사신(levofloxacin)과 가티플록사신(gatifloxacin)이 대표적으로 사용되고 있다. 국외의 경우 신장염 치료제로서 면역억제제의 처방 비율이 가장 높으며, 특히 타크롤리무스(tacrolimus)와 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil), 에쿨리주맙(eculizumab)의 시장 점유율이 높은 편이지만, 국내의 경우 항염증제 시장 점유율이 가장 높은 편이며, 최근 면역억제제 사용이 증가되는 추세이다.

하지만, 면역억제제나 항염증제는 장기간 사용할 경우 궤양, 부종, 감염증 증가, 고혈압, 간 독성 등의 부작용이 발생하여 사용이 제한된다. 따라서, 기존 신장염 치료제보다 부작용을 줄이고, 안전성이 확보된 효과가 우수한 신규 신장염 치료제 개발의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

이러한 필요성에 의해서 최근에는 천연물을 활용한 신규 신장염 치료제의 개발이 수행되고 있다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에, 본 발명자들은 신장염 예방 및 치료용 조성물을 개발하기 위하여 연구한 결과, 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생약 추출물이 신장염 질환의 예방과 치료에 효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 일례는 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료용 조성물과 관련된 것이다.

또 다른 예는 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서

선택된 하나 이상의 생약 추출물을 치료적 유효량으로 신장염의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료 방법과 관련된 것이다.

또 다른 예는 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생약 추출물의 신장염 질환 예방 및/또는 치료에 있어서의 용도를 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생약추출물이 겐타마이신, 시스플라틴 등에 의하여 유발되는 신장염 모델에 대한 치료 효과와 신장 메산기움 세포에 대한 세포 성장 억제 활성이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명은 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장염 질환 예방 및 치료 용도를 특징으로 한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

우선, 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다. 또 다른 예는 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 추출물을 신장염 질환 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 필요로 하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다. 또 다른 예는 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 추출물의 신장염 질환 예방 및/또는 치료 또는 신장염 질환 예방 및/또는 치료용 약학 조성물 제조에 있어서 용도를 제공한다.

서양산사(Crataegi Fructus)는 장미과(Rosaceae)로 산사나무(*Crataegus pinnatifida*) 및 동속 근연식물에 속하며 보통 서양에서는 Hawthorn이라 불린다. 산지에서 자라며 높이는 3~6m이고

나무껍질은 잿빛이고 가지에 가시가 있다. 잎은 어긋나고 달걀 모양에 가까우며 길이 6~8cm, 나비 5~6 cm이다. 가장자리가 깃처럼 갈라지고 밑부분은 더욱 깊게 갈라지고, 양면 맥 위에 털이 나고 가장자리에 불규칙한 톱니가 있으며 잎자루는 길이 2~6 cm이다. 서양산사는 혈관확장작용, 혈압강하 작용, 항균 작용 및 항산화 작용 등의 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

육계(Cinnamomi Cortex)는 녹나무과(Lauraceae)로 계수나무(*Cinnamomum cassia*) 및 동속 근연식물의 수간피이다. 관상교목으로 높이는 8m 이상 자라고 가지와 잎이 무성하며 가지는 녹색이고 꽃은 연한 녹색으로 꽃받침은 짧게 6개로 갈라져서 2줄로 배열되는 형태이다. 이 약은 혈관확장 작용, 혈액순환 촉진 작용, 건위작용, 항균 작용, 진정 작용 및 항산화 작용 등의 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 한방에서는 예로부터 두통, 발열, 신경성심계항진, 진통 및 감기 등을 치료하는 목적으로 사용되어 왔다. 또한, 대한민국 특허공개 제2006-0030535호(2006. 4. 11.)는 항불안 활성을 갖는 육계 추출물 및 이를 함유하는 조성물에 관한 것으로, 여기에서의 육계 추출물은 다양한 뇌신경계의 이상으로 인한 불안증을 예방 및 치료하는 효과를 갖는 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다고 공지되어 있다.

하고초(Prunella Spica)는 꿀풀과(Labiatae)로 꿀풀(*Prunella vulgaris*) 및 동속 근연식물의 다년생 초본이다. 높이는 20~30 cm이고 전체에 흰색 털이 있으며 원줄기는 네모지고 꽃이 진 다음 밑에서 가지가 뻗으며 잎은 곧게 생장하고 길이가 2~5 cm이며 가장자리는 밋밋하거나 톱니가 약간 있다. 여름에 과수가 반쯤 시들면 채취하여 햇볕에 말려 약재로 사용하여 온 무독한 한방 생약이다. 이 약은 이뇨 작용, 항균 작용, 혈압강하 작용, 항종양 작용 및 항산화 작용 등의 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 한방에서는 만성적인 종기, 두창, 급성 유선염 및 임파선 결핵 등에 이용되어 왔으며 아랫배에 담음이나 어혈로 생긴 덩어리를 파괴하며 각기를 제거하고 온몸이 저리고 마비되는 것을 치료하는데

사용되어 왔다.

목적(Equiseti Herba)은 속새과(Equisetaceae)로 속새(*Equisetum hiemale*) 및 동속 근연식물의 다년생 초본이다. 높이는 20 cm 이상이며 근경은 짧고 포복하며 마디에서는 흑갈색의 긴 뿌리가 뻗는다. 줄기는 단단하며 원형으로 지름 4~8 cm이며 마디 사이에는 10~20개의 선이 있고 곧추서며 가지가 없는 것이 특징이다. 이 약의 바깥 면은 회록색~황록색이고 세로로 8~30개의 움푹한 홈이 있고 질은 무르며 무게는 가볍다. 이 약은 이뇨 작용 및 항산화 작용 등의 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 한방에서는 두통, 해열, 장출혈 및 지혈제 등으로 사용하여 왔다.

그러나, 서양산사 추출물, 육계 추출물, 하고초 추출물 및 목적 추출물 각각이 신장염 질환의 예방 및/또는 치료 효과가 있다는 것과 관련하여서는 아직까지 밝혀진 바가 없다.

본원에서 정의되는 '추출물'은 서양산사, 육계, 하고초 및 목적 중에서 선택된 1종 이상을 추출하여 얻어진 추출물 및 이를 통상적인 방법으로 농축 및/또는 건조하여 얻어진 농축물 및/또는 건조물을 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 추출물이 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상의 추출물인 경우, 상기 2종 이상의 추출물은 선택된 2종 이상의 생약을 동일하거나 상이한 추출 용매를 사용하여 각각 추출하여 얻어진 각각의 추출물을 혼합한 '생약 추출물의 혼합물' 또는 선택된 2종 이상의 생약을 혼합한 후 추출하여 얻어진 '생약 혼합물의 추출물'일 수 있다. 하기의 실험예1에서 확인되는 바와 같이, 생약 추출물의 혼합물과 생약 혼합물의 추출물은 그 효과면에서 큰 차이 없이 모두 우수한 신장염 질환 예방 및/또는 치료 효과를 나타내므로, 이들은 모두 본원발명의 범위에 포함된다.

본원에서 정의되는 추출물은 물, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액 또는 이의 혼합물로 추출된 것이 바람직하고, 바람직하게는, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10

내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 에탄올 수용액이 적합하다.

이하, 본 발명의 추출물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

본 발명의 서양산사, 육계, 하고초 및 목적의 추출물은, 건조된 각각의 생약을 세절하여 무게(g)의 약 3배 내지 20배, 바람직하게는 약 5배 내지 15배의 물, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올, 알코올 수용액(예컨대, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액, 바람직하게는 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 에탄올 수용액) 또는 이의 혼합물로, 40 내지 110 ℃, 바람직하게는 55 내지 90 ℃의 추출온도에서 약 0.5 내지 20시간, 바람직하게는 약 1 내지 10시간 동안 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 또는 환류 냉각 추출방법을 이용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 및/또는 건조하여 추출물을 수득할 수 있다.

여기서 상기 추출용매의 양을 건조된 생약의 중량 대비 3배 이하로 할 경우에는 교반이 어렵게 되고 추출물의 용해도가 낮아져 추출효율이 떨어지게 되고, 추출용매의 양을 건조물 대비 20배 이상으로 할 경우에는 다음 정제단계에서 사용되는 저급 알코올의 사용량이 많아져 경제적이지 못하여 취급상 문제가 발생할 수 있다. 또한, 추출용매로서 알코올 수용액을 사용하는 경우, 알코올의 함량이 10%(v/v)보다 낮은 추출용매를 사용할 경우 생약으로부터 당류 등의 극성물질이 과다하게 추출되어 후공정인 여과 공정상에 문제를 발생시키며, 알코올의 함량이 90%(v/v)보다 높으면 상대적으로 추출용매의 비극성이 높아져 원하는 활성 물질의 추출 효율이 낮아지는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 추출온도를 40 ℃ 미만으로 할 경우에는 추출 효율이 낮아지는 문제가 있고, 110 ℃를 초과하면 추출 효율의 한계로 추출비용만 상승하게 되어 비경제적이며,

추출 시간을 30분 미만으로 추출할 경우에는 추출 효율이 낮아지는 문제가 있고, 20시간을 넘을 경우에는 불필요한 불순물이 추출되어 순도가 낮아지는 문제가 있어 바람직하지 못하다.

상기 추출물을 여과하여 여액을 모으고, 남은 잔사에 생약 원료 중량의 4 내지 7배의 물, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올, 알코올 수용액(예컨대, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액, 바람직하게는, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 에탄올 수용액)을 다시 가하여 가온(예컨대, 55 내지 90 ℃) 후, 2~5시간 재 추출(2차 추출)하고 여과하여 여액을 취하여 이전의 여액과 혼합함으로써 추출효율을 높일 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서는 1차 추출 후 다시 재 추출하는 방법을 채택하였는데, 생약 추출물을 대량 생산하는 경우 효과적으로 여과를 한다 하더라도 생약 자체의 수분 함량이 높기 때문에 손실이 발생하게 되어 1차 추출만으로는 추출효율이 떨어질 수 있으므로 이를 방지하기 위함이다. 그러나, 이와 같은 2차에 걸친 추출은 추출효율을 고려한 것일 뿐이며 얻어진 추출물의 약리 효과에는 영향이 없으므로, 본 발명의 유효성분인 생약 추출물이 이와 같은 제조 방법에 의하여 제한되는 것은 아니다.

또한, 각 단계별 추출효율을 검증한 결과 2차 추출에 의해 전체 추출량의 80 내지 90% 정도가 추출되는 것으로 밝혀졌고, 3차 이상의 다단계 추출도 가능하지만 경제성이 없는 것으로 판단된다. 2차 추출 후 합한 여액은 50~60℃에서 감압 농축하여 시료 중에 잔존하는 용매를 제거하며, 감압농축이 완료된 시료에 대하여 농축물 총량의 25~50배의 물로 2~3회 공비 농축하고, 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 동결건조를 실시하여 최종 추출물을 얻을 수 있다. 이와 같이 농축 건조 시 물로 공비 농축하는 이유는 얻어진 생약 추출액을 의약품 원료로 사용하기 위해 잔존하는 저급 알코올의 함량을 효과적으로 조절하고자 함이다.

바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사 및 육계의

추출물이 10:1 내지 1:5, 바람직하게는 5:1 내지 1:5, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:5(서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5(서양산사 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:5(서양산사 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 육계 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5, 바람직하게는 1:1 내지 1:3(육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 육계 및 목적의 추출물이 7:1 내지 1:7(육계 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 하고초 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:10(하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사, 육계 및 하고초의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5(서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사, 육계 및 목적의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5(서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:5(서양산사 추출물 중량:하고초 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 육계, 하고초 및

목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:7(육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

또 다른 바람직한 구현예로, 상기 생약 추출물은 서양산사, 육계, 하고초 및 목적의 추출물이 5:1:1:1 내지 1:1:1:5, 바람직하게는 (서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 중량비로 혼합된 조성물을 포함한다.

상기 추출물 간의 중량비는 추출물의 건조 중량을 기준으로 하는 것으로; 상기 '추출물의 건조 중량'은 추출물에서 용매를 제거한 건조물의 중량을 의미하는 것이다 (이하 동일하다).

본원에서 정의되는 신장염 질환은 사구체 신염, 신우신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 당뇨병성 신증, 단백뇨, 세관위축, 사구체 경화, 신부전증 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

본 발명의 신장염 질환의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 대상 질환 종류 및 진행 정도, 환자 상태, 목적하는 효과 등에 따라서 적절하게 조절될 수 있다.

본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로서는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들

수 있다. 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 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

예컨대, 바람직한 효과를 위해서, 상기 추출물의 건조 중량 기준으로 1일 1 내지 1000 mg/kg, 바람직하게는 50 내지 500 mg/kg, 보다 바람직하게는 150 내지 300 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 상기 투여는 하루에 한번 투여 하거나, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 상기한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 당업자에 의해 적절하게 조절될 수 있으며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 조성물의 투여 대상 환자는 모든 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 설치류, 가축, 인간 등일 수 있고, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다. 투여 경로는 특별한 제한은 없고, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다.

또 다른 예에서, 본 발명은 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장염 질환의 예방 및/또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 신장염 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 건강기능식품 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

본 발명의 추출물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

이때, 건강기능식품 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물로서 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물로서 100ml을 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

상기 건강기능식품 중 건강음료 조성물의 경우는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 등의 디사카라이드 및 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 폴리사카라이드 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및

중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

또 다른 예는,

서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 생약에 대하여 무게(g) 기준으로 약 3 내지 20배, 바람직하게는 약 5배 내지 15배의 물, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액(10 내지 90%(v/v), 바람직하게는 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게는 50 내지 70%(v/v)의 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액, 바람직하게는, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 에탄올 수용액) 또는 이의 혼합물로, 40 내지 110 ℃, 바람직하게는 55 내지 90 ℃의 추출온도에서 약 0.5 내지 20시간, 바람직하게는 약 1 내지 10시간 동안 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 또는 환류 냉각 추출방법으로 추출하여 생약 추출물을 수득하는 단계(제1 추출)

를 포함하는 신장염 질환 예방 및/또는 치료용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

바람직한 일례에서, 상기 방법은, 상기 제1 추출 이후에,

상기 제1 추출에서 얻어진 추출물을 여과하여 여액을 모으는 단계: 및

상기 여액을 제외하고 남은 잔사에 4 내지 7 중량배의 물, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올, C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액(예컨대, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게는 10 내지 70%(v/v), 더욱

바람직하게는 50 내지 70%(v/v)의 C_1 내지 C_6의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액, 바람직하게는, 10 내지 90%(v/v), 바람직하게 10 내지 70%(v/v), 더욱 바람직하게 50 내지 70%(v/v)의 에탄올 수용액)을 다시 가하여 가온(예컨대, 55 내지 90 ℃) 후, 2~5시간 재추출하는 단계(제2 추출); 및

상기 제2 추출에서 수득된 추출물을 여과하여 얻어진 여액을 상기 제1 추출의 여액과 혼합하는 단계

를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

이와 같이, 제1 추출과 제2 추출 단계를 거침으로써, 추출 효율이 높아져서 생약 추출물의 대량 생산에 유리하다는 이점이 있다.

상기 추출물이 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상의 생약에 대한 추출물인 경우, 상기 추출물은 각각의 생약에 대하여 상기한 방법으로 추출물을 제조한 후 혼합하거나, 상기 2종 이상의 생약을 혼합한 후 이 혼합물에 대하여 상기한 방법으로 추출물을 제조하는 방법에 의하여 제조할 수 있다. 상기 생약 추출물의 혼합비는 앞서 설명한 바와 같다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 겐타마이신 유발 신장염 모델에서 단독생약 추출물의 신장염 억제 활성을 나타낸 것이다.

도 2는 겐타마이신 유발 신장염 모델의 조직 병리학적 검사 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 시스플라틴 유발 신장염 모델에서 단독생약 추출물의 신장염 억제 활성을 나타낸 것이다.

도 4는 시스플라틴 유발 신장염 모델의 조직 병리학적 검사 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 자세하게 설명하나, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 이들에 의하여 본 발명의 범위가

어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[실시예 1: 단독 생약 추출물의 제조 (A)]

1.1: 서양산사 추출물의 제조

서양산사(Crataegi Fructus, 경동시장)의 잎과 꽃을 물로 세척하여 협잡물을 제거하고 완전히 건조시켰다. 이와 같이 준비된 서양산사 250g에 60%(v/v) 에탄올 수용액 2.0 ℓ를 가하고, 80 ℃에서 3시간씩 2회 열수 추출한 뒤, 추출액을 여과 후 감압 농축하였다. 대부분의 물이 증발된 상태에서 0.2 ℓ의 물을 가하여 공비 농축한 후, 다시 2회 반복하고, 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후, 동결 건조시켜서, 분말상태의 서양산사 추출물 45.0 g(원 생약 대비 18.0% 수율)을 얻었다.

1.2: 육계 추출물의 제조

육계(Cinnamomi Cortex, 경동시장)를 물로 세척하여 협잡물을 제거하고 완전히 건조시켰다. 이와 같이 준비된 육계 250g에 60%(v/v) 에탄올 수용액 2.0 ℓ를 가하고, 80 ℃에서 3시간씩 2회 열수 추출한 뒤, 추출액을 여과 후 감압 농축하였다. 대부분의 물이 증발된 상태에서 0.2 ℓ의 물을 가하여 공비 농축한 후, 다시 2회 반복하고, 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 동결 건조시켜서, 분말상태의 육계 추출물 28.5 g(원 생약 대비 11.4% 수율)을 얻었다.

1.3: 하고초 추출물의 제조

하고초(Prunella Spica)를 물로 세척하여 협잡물을 제거하고 완전히 건조시켰다. 이와 같이 준비된 하고초 250g에 60%(v/v) 에탄올 수용액 2.0 ℓ를 가하고, 80 ℃에서 3시간씩 2회 열수 추출한 뒤, 추출액을 여과 후 감압 농축하였다. 대부분의 물이 증발된 상태에서 0.2 ℓ의 물을 가하여 공비 농축한 후, 다시 2회 반복하고, 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 동결 건조시켜서, 분말상태의 하고초 추출물 27.3 g(원 생약

대비 10.9% 수율)을 얻었다.

1.4: 목적 추출물의 제조

목적(Equiseti Herba)을 물로 세척하여 협잡물을 제거하고 완전히 건조시켰다. 이와 같이 준비된 목적 250g에 60%(v/v) 에탄올 수용액 2.0 ℓ를 가하고, 80 ℃에서 3시간씩 2회 열수 추출한 뒤, 추출액을 여과 후 감압 농축하였다. 대부분의 물이 증발된 상태에서 0.2 ℓ의 물을 가하여 공비 농축한 후, 다시 2회 반복하고, 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 동결 건조시켜서, 분말상태의 목적 추출물 52.0 g(원 생약 대비 20.8% 수율)을 얻었다.

[실시예 2: 생약 혼합물의 추출물 제조]

서양산사와 육계, 하고초를 물로 세척하여 협잡물을 제거하고 완전히 건조시켰다. 이와 같이 준비된 서양산사 97 g과 육계 153 g; 육계 92 g과 하고초 96 g 에 60% 에탄올 수용액 2.0 ℓ를 가하고, 80 ℃에서 3시간씩 2회 열수 추출한 뒤, 추출액을 여과 후 감압 농축하였다. 대부분의 물이 증발된 상태에서 0.2 ℓ의 물을 가하여 공비 농축한 후, 다시 2회 반복하고, 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁 시킨 후 동결 건조시켜서, 분말상태의 서양산사와 육계 혼합 추출물 35.2 g(원 생약 대비 14.1% 수율)과 육계와 하고초 혼합 추출물 22.0g(원생약 대비 11.7% 수율)을 얻었다.

[실시예 3: 생약 추출물의 혼합물 제조]

실시예 3.1: 서양산사 및 육계 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물과 실시예 1.2의 육계 추출물을 중량 기준으로 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3 및 1:5(서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하였다. 균질한 혼합이 되도록 하기 위하여 혼합 추출물에 2 내지 3 중량배 가량의 물을 첨가한 후 50 내지 60 ℃의

온도 하에서 감압농축을 하고, 얻어진 농축물에 다시 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 동결건조시켜, 분말상태의 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.2: 서양산사 및 하고초 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물과 실시예 1.3의 하고초 추출물을 중량 기준으로 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3 및 1:5(서양산사 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.3: 서양산사 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물과 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3 및 1:5(서양산사 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.4: 육계 및 하고초 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.2의 육계 추출물과 실시예 1.3의 하고초 추출물을 중량 기준으로 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 1:1, 1:3 및 1:5(육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.5: 육계 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.2의 육계 추출물과 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:3, 1:5 및 1:7(육계 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.6: 하고초 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.3의 하고초 추출물과 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 및 1:10(하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.7: 서양산사, 육계 및 하고초 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물, 실시예 1.2의 육계 추출물 및 실시예 1.3의 하고초 추출물을 중량 기준으로 10:1:1, 2:2:3, 및 1:1:5(서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.8: 서양산사, 육계 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물, 실시예 1.2의 육계 추출물 및 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 10:1:1, 2:5:2, 및 1:1:5로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.9: 서양산사, 하고초 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물, 실시예 1.3의 하고초 추출물 및 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 7:1:1, 3:2:4 및 1:1:5(서양산사 추출물 중량:하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.10: 육계, 하고초 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.2의 육계 추출물, 실시예 1.3의 하고초 추출물 및 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 7:1:1, 3:2:5 및 1:1:7(육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고,

상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

실시예 3.11: 서양산사, 육계, 하고초 및 목적 추출물의 혼합물 제조

상기 실시예 1.1의 서양산사 추출물, 실시예 1.2의 육계 추출물, 실시예 1.3의 하고초 추출물 및 실시예 1.4의 목적 추출물을 중량 기준으로 5:1:1:1, 3:2:2:2 및 1:1:1:5(서양산사 추출물 중량:육계 추출물 중량:하고초 추출물 중량:목적 추출물 중량)의 혼합비로 혼합하고, 상기 실시예 3.1과 동일한 방법으로 혼합물을 제조하였다.

[실험예: 약리 활성 시험]

실험예 1: 생약 추출물의 혼합물과 생약 혼합 추출물의 활성 비교

상기 실시예 2의 서양산사와 육계, 육계와 하고초의 생약 혼합물의 추출물과 실시예 3.1의 서양산사와 육계추출물의 1:1 혼합물과 실시예 3.4의 육계와 하고초추출물의 1:1 혼합물의 신장염 치료 효과 비교 평가하기 위해, Amin 등의 방법을 이용하여[Amin et al., Environmental Health Perspectives vol.112 No. 4, March, 2004. 465-479] 평가 실험을 수행하였으며, 그 결과는 다음 표 1로 작성하여 나타내었다.

실험은 양성 대조군 없이 정상군을 사용하였으며, 수컷 SD 랫트 (7주령, 195~205 g, 오리엔트)에 신장염 유발 인자로 겐타마이신(화일약품㈜)을 6일 동안 240 mg/kg 복강 투여하여 신장염을 유발시켰다. 이와 같이 신장염이 유발된 실험 동물 중 음성 대조군을 제외한 실험군에 상기 실시예 2에서 제조한 2가지 시험 약물과 실시예 3.1 및 3.4에서 제조된 시험 약물을 매일 400 mg/kg의 양으로 경구 투여하여 처리하였다. 시험 약물의 경구 투여 7일 후, 실험 동물을 부검하여 혈액 시료를 취하여 B.U.N.(blood urea nitrogen)과 크레아티닌(creatinine)을 측정하여 그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.

【표 1】

구 분	,투여 용량 (mg/kg)	B.U.N (mg/dl)	크레아티닌 (mg/dl)
서양산사, 육계 추출물 혼합물(실시예 3.1)	400	21.30	0.73
서양산사, 육계 혼합 추출물(실시예 2)	400	21.48	0.74
육계, 하고초 추출물 혼합물(실시예 3.4)	400	20.81	0.68
육계, 하고초 혼합 추출물(실시예 2)	400	20.89	0.69
음성대조군	-	91.16	1.80
정상군	-	20.41	0.66

상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 3.1 또는 실시예 3.4의 생약 추출물의 혼합물과 실시예 2의 생약 혼합추출물의 신장염 치료 효과는 모두 우수하였다. 특히, 제조방법에 따른 활성의 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

실험예 2: 겐타마이신 유발 신장염 모델에 대한 치료 효과 실험

상기 실시예 1의 단독 생약 추출물 및 실시예 3.1 내지 3.11에서 제조된 추출물의 혼합물에 대한 신장염 치료 효과를 평가하기 위해, Amin 등의 방법을 이용하여[Amin et al., Environmental Health Perspectives vol.112, No. 4, March, 2004. 465-479] 평가 실험을 수행하였으며, 실시예 1의 단독 생약 추출물의 결과는 도 1 및 다음의 표 2에 나타내었고, 추출물의 혼합물 결과는 표 2로 작성하여 나타내었다.

실험은 양성 대조군 없이 정상군을 사용하였으며, 수컷 SD 랫트 (7주령, 195~205 g, 오리엔트)에 신장염 유발 인자로 겐타마이신(화일약품㈜)을 6일 동안 240 mg/kg 복강 투여하여 신장염을 유발시켰다. 이와 같이 신장염이 유발된 실험 동물 중 음성 대조군을 제외한 실험군에 상기 실시예 1에서 제조한 4가지 시험 약물과 실시예 3에서 제조한 11가지 시험 약물을 매일 400 mg/kg 경구 투여하여 처리하였다. 시험 약물의 경구 투여 7일 후, 실험동물을 부검하여 혈액 시료를 취하여 B.U.N.(blood urea nitrogen)과 크레아티닌(creatinine)을

측정하였다.

【표 2】

구 분		투여 용량 (mg/kg)	B.U.N (mg/dl)	크레아티닌 (mg/dl)
실시예 1.1		400	30.55	0.78
실시예 1.2		400	23.05	0.75
실시예 1.3		400	45.06	0.98
실시예 1.4		400	37.57	0.82
실시예 3.1 (서양산사:육계)	10:1	400	25.11	0.77
	5:1	400	21.43	0.73
	3:1	400	21.13	0.72
	1:1	400	20.81	0.68
	1:3	400	20.87	0.69
	1:5	400	20.51	0.68
실시예 3.2 (서양산사:하고초)	10:1	400	31.94	0.80
	5:1	400	31.35	0.81
	3:1	400	31.17	0.80
	1:1	400	34.44	0.82
	1:3	400	36.61	0.82
	1:5	400	37.81	0.84
실시예 3.3 (서양산사:목적)	10:1	400	29.60	0.76
	5:1	400	30.63	0.78
	3:1	400	30.58	0.77
	1:1	400	31.13	0.79
	1:3	400	33.85	0.82
	1:5	400	33.90	0.82
실시예 3.4 (육계:하고초)	10:1	400	28.25	0.78
	5:1	400	21.80	0.70
	4:1	400	21.71	0.72
	3:1	400	21.55	0.69
	1:1	400	20.99	0.67
	1:3	400	21.02	0.68
	1:5	400	31.03	0.81
실시예 3.5 (육계:목적)	7:1	400	27.37	0.78
	5:1	400	26.77	0.77
	3:1	400	25.13	0.77
	2:1	400	24.74	0.75
	1:1	400	24.61	0.75

	1:3	400	28.11	0.79.
	1:5	400	30.98	0.80
	1:7	400	31.09	0.80
실시예 3.6 (하고초:목적)	10:1	400	40.46	0.89
	5:1	400	36.57	0.83
	3:1	400	35.93	0.82
	1:1	400	35.14	0.81
	1:3	400	36.14	0.83
	1:5	400	36.37	0.84
	1:10	400	36.10	0.82
실시예 3.7 (서양산사:육계:하고초)	10:1:1	400	28.81	0.78
	2:2:3	400	22.34	0.74
	1:1:5	400	30.35	0.78
실시예 3.8 (서양산사:육계:목적)	10:1:1	400	26.70	0.77
	2:5:2	400	20.07	0.68
	1:1:5	400	22.14	0.71
실시예 3.9 (서양산사:하고초:목적)	7:1:1	400	30.83	0.78
	3:2:4	400	31.41	0.82
	1:1:5	400	32.37	0.84
실시예 3.10 (육계:하고초:목적)	7:1:1	400	21.12	0.71
	3:2:5	400	28.78	0.76
	1:1:7	400	32.34	0.82
실시예 3.11 (서양산사:육계:하고초:목적)	5:1:1:1	400	23.14	0.73
	3:2:2:2	400	21.11	0.71
	1:1:1:5	400	28.17	0.77
음성대조군		-	89.20	1.79
정상군		-	19.84	0.63

상기 표 2에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1.1 내지 1.4의 단독 생약 추출물뿐만 아니라, 각 생약 추출물의 혼합물인 실시예 3.1 내지 3.11까지의 조성 비율에 따른 혼합 추출물의 신장염 치료 효과도 모두 우수하였다. 특히, 성분별 배합 비율에 따라 우수한 활성을 나타내는 조성을 확인할 수 있었고, 겐타마이신 유발 신장염 모델에서는 서양산사

또는 육계를 포함하는 혼합 약물이 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다.

실험예 3: 겐타마이신 유발 신장염 모델의 조직 병리학적 검사

상기 실시예 3.1의 서양산사 추출물과 육계 추출물이 5:1의 중량비로 혼합된 혼합물을 처리한 실험군에서 신장 조직을 채취하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

적출한 신장 조직을 포르말린으로 고정한 후, 일반적인 조직 처리방법에 따라 조직 절편을 제작하여 헤마톡실린(hematoxylin, Sigma)과 에오신(eosin, Sigma)으로 염색하여 관찰하였다. 조직병리학적 소견이 관찰되었을 경우, 병변의 정도를 극미한(minimal) 정도에서부터 현저한(marked) 정도까지 총 4단계로 구분하였다.

관찰된 신장 조직의 병리학적 변화를 도 2에 나타내었다. 도 2의 (a) 정상군에서 G는 사구체, T는 세뇨관으로, 신장 질환과 관련하여 주목할 만한 소견이 관찰되지 않았다. 도 2의 (b) 음성대조군(신장염 유발 시험 동물 중 시험 약물 미투여군)에서는 세뇨관 괴사(tubular necrosis, N), 세뇨관 재생(tubular regeneration, R), 간질성 염증(interstitial inflammation, asterisks)이 각각 두드러짐(marked, +4), 중도(moderate, +3), 중도(+3) 수준으로 관찰되었고, 세뇨관강에서 초자원주(hyaline casts, arrow)가 관찰되었으며, 그 밖에 세뇨관 확장(tubular dilation), 초자방울(hyaline droplet), 간질섬유조직 증식(interstitial fibrosis) 등의 소견이 관찰되었다. 실시예 3.1의 시험 약물을 투여한 실험군을 나타내는 도 2의 (c)에서는 괴사(tubular necrosis, N), 신장 재생(tubular regeneration, R), 간질성 염증(interstitial inflammation, asterisks)이 각각 극미(minimal, +1), 중도(+3), 경도(+2) 수준으로 관찰되었다.

도 2의 결과로부터, 조직병리학적 관찰 소견 상, 음성대조군에 비하여 실험군의 신장염 치료 효과가 뚜렷하게 개선됨을 확인할 수 있었다.

실험예 4: 시스플라틴 유발 신장염 모델에 대한 치료 효과 실험

상기 실시예 1의 단독 생약 추출물 및 실시예 3.1 내지 3.11에서 제조된 추출물의 혼합물에 대한 신장염 치료 효과를 평가하기 위해, Shirwaikar 등의 방법에 의하여[Shirwaikar et al., Journal of Ethnopharmacology 90, 2004, 81-86] 평가 실험을 수행하였으며, 실시예 1의 단독 생약 추출물의 결과는 도 3 및 아래의 표 3에 나타내고, 추출물의 혼합물 결과는 표 3에 나타내었다.

실험은 양성대조군 없이 정상군을 이용하였으며, 수컷 SD 랫트 (7주령, 195~205 g, 오리엔트)에 신장염 유발 인자로 시스플라틴(Sigma)을 3일간 3 mg/kg 복강 투여하여 신장염을 유발시켰다. 이와 같이 신장염이 유발된 실험 동물 중 음성 대조군을 제외한 실험군에 실시예 1에서 제조한 4가지 시험 약물(단독 추출물)과 실시예 3에서 제조한 11가지 시험 약물(추출물의 혼합물)을 매일 400 mg/kg 경구 투여하여 처리하였다. 시험 약물의 경구 투여 7일 후, 실험동물을 부검하여 혈액 시료를 취하여 B.U.N.(blood urea nitrogen)과 크레아티닌(creatinine)을 측정하였다.

【표 3】

구 분		투여 용량 (mg/kg)	B.U.N (mg/dl)	크레아티닌 (mg/dl)
실시예 1.1		400	43.95	0.91
실시예 1.2		400	70.75	1.09
실시예 1.3		400	45.60	0.88
실시예 1.4		400	36.84	0.82
실시예 3.1 (서양산사:육계)	10:1	400	48.42	0.90
	5:1	400	44.87	0.86
	3:1	400	45.11	0.88
	1:1	400	53.58	0.93
	1:3	400	60.09	0.95
	1:5	400	64.08	0.99
실시예 3.2 (서양산사:하고초)	10:1	400	43.15	0.90
	5:1	400	41.47	0.83
	3:1	400	38.81	0.82
	1:1	400	40.94	0.83
	1:3	400	43.90	0.89
	1:5	400	45.14	0.90

실시예 3.3 (서양산사:목적)	10:1	400	34.11	0.79
	5:1	400	31.07	0.73
	3:1	400	30.72	0.71
	1:1	400	28.99	0.69
	1:3	400	28.71	0.67
	1:5	400	27.43	0.65
실시예 3.4 (육계:하고초)	10:1	400	57.40	0.94
	5:1	400	46.34	0.88
	4:1	400	45.19	0.88
	3:1	400	38.46	0.84
	1:1	400	30.11	0.69
	1:3	400	23.11	0.66
	1:5	400	39.85	0.83
실시예 3.5 (육계:목적)	7:1	400	40.71	0.87
	5:1	400	38.84	0.83
	3:1	400	33.97	0.73
	2:1	400	28.91	0.67
	1:1	400	30.75	0.71
	1:3	400	30.99	0.71
	1:5	400	32.59	0.75
	1:7	400	33.47	0.76
실시예 3.6 (하고초:목적)	10:1	400	39.31	0.85
	5:1	400	37.71	0.82
	3:1	400	33.36	0.74
	1:1	400	34.01	0.74
	1:3	400	33.61	0.74
	1:5	400	32.86	0.73
	1:10	400	32.19	0.73
실시예 3.7 (서양산사:육계:하고초)	10:1:1	400	35.12	0.74
	2:2:3	400	34.81	0.74
	1:1:5	400	33.98	0.73
실시예 3.8 (서양산사:육계:목적)	10:1:1	400	35.74	0.75
	2:5:2	400	36.14	0.76
	1:1:5	400	32.83	0.74
실시예 3.9 (서양산사:하고초:목적)	7:1:1	400	31.61	0.71
	3:2:4	400	26.42	0.63
	1:1:5	400	28.94	0.65
실시예 3.10 (육계:하고초:목적)	7:1:1	400	42.79	0.83
	3:2:5	400	33.65	0.67
	1:1:7	400	32.57	0.65
실시예 3.11 (서양산사:육계:하고초:목적)	5:1:1:1	400	37.82	0.82
	3:2:2:2	400	31.10	0.71

	1:1:1:5	400	32.88	0.72
음성대조군		-	74.74	1.13
정상군		-	23.79	0.68

상기 표 3에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1.1 내지 1.4의 단독 생약 추출물뿐만 아니라, 각 생약 추출물의 혼합물인 실시예 3.1 내지 3.11의 조성 비율에 따른 혼합 추출물의 신장염 치료 효과도 모두 우수하였다. 특히, 성분별 배합 비율에 따라 우수한 활성을 나타내는 조성을 확인할 수 있었고, 급성 신장염 모델인 시스플라틴 유발 신장염 모델에서는 서양산사 또는 목적을 포함하는 혼합 약물이 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다.

실험예 5: 시스플라틴 유발 신장염 모델의 조직 병리학적 검사

상기 실험예 4의 실험에서 실시예 3.4의 육계 추출물과 하고초 추출물의 3:1, 1:1, 및 1:3 혼합물을 처리한 실험군에서 신장 조직을 채취하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

적출한 신장 조직을 포르말린으로 고정한 후, 일반적인 조직 처리 방법에 따라 조직 절편을 제작하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하였다. 조직병리학적 소견이 관찰되었을 경우, 병변의 정도를 극미한(minimal) 정도에서부터 현저한(marked) 정도까지 총 4단계로 구분하였다.

관찰된 신장 조직의 병리학적 변화는 도 4와 다음 표 4에 나타내었다.

【표 4】

Slide No.	Organ: Kidney		Histopathological findings
	Left-side	Right-side	
정상군	NM	NM	A) Tubular necrosis B) Tubular regeneration C) Tubular dilation D) Hyaline cast
음성대조군	A)1+, B)4+, C)2+ D)1+, E)2+, F)1+	A)1+, B)3+, C)2+ E)2+, F)1+	

실시예 3.4	3:1	A)1+, B)4+ C)1+, E)1+	A)1+, B)3+, C)1+	E) Interstitial inflammation F) Interstitial fibrosis NM: No microscopic findings 1+: Minimal 2+: Mild 3+: Moderate 4+: Marked
	1:1	A)1+, B)4+, C)1+	A)1+, B)3+	
	1:3	A)1+, B)1+, C)1+	A)1+, B)2+	

도 4의 정상군에서 G는 glomeruli, T는 renal tubules로, 신장 질환과 관련하여 주목할 만한 소견이 관찰되지 않았다. 도 4의 음성 대조군에서는 세뇨관 괴사가 극미하게 관찰되었으며 세뇨관 재생이 현저하게 관찰되었다. 그 외 세뇨관 확장, 간질부위 염증이 관찰되었고, 유리질 원주 및 간질부위 섬유화가 관찰되었다. 시료 투여군에서는 세뇨관 괴사와 재생, 확장이 관찰되었으나 그 정도가 음성대조군에 비해 약하였고, 유리질 원주 및 간질부위 섬유화는 관찰되지 않았다.

상기의 결과에서 음성대조군에 비하여 실험군의 조직병리학적 관찰 소견 상, 신장염의 치료 효과를 확인하였고, 특히 실시예 3.4의 1:3 혼합물이 표 4의 결과와 같이 3:1 및 1:1 보다 우수한 활성을 나타내었다.

실험예 6: 사이클로스포린 A 유발 신장염 모델에 대한 치료효과 실험

상기 실시예 3.1, 3.3, 3.4 및 3.5의 3:1, 1:1, 및 1:3 혼합 비율의 혼합물에 대한 만성신장염 치료 효과를 평가하기 위해, So Young Lee 등의 방법에 의하여[So Young Lee et. al., Experimental transplantation 78, 2004, 1756-1764] 활성 시험을 수행하였다.

실험은 양성대조군 없이 정상군을 이용하였으며, 수컷 SD 랫트 (7주령, 195~205 g, 오리엔트)에 신장염 유발 인자로 사이클로스포린 A(cyclosporine A, CsA, 종근당)를 8주간 50 mg/kg 복강 투여한 후, 음성대조군을 제외한 실험군에 상기 실시예 3.1, 3.3, 3.4 및 3.5의 3:1, 1:1, 및 1:3 혼합 비율의 혼합물을 사이클로스포린 A 투여 3일 전부터 매일 400 mg/kg 경구 투여하여 처리하였다. 유발 8주 후, 실험동물을 부검하여 혈액 시료를 취하여 혈중 요소 질소 함량(B.U.N.)과 크레아티닌을 측정하였다.

【표 5】

구 분		투여용량 (mg/kg)	B.U.N (mg/dl)	크레아티닌 (mg/dl)
실시예 3.1	3:1	400	42.1	0.73
	1:1	400	40.4	0.73
	1:3	400	37.8	0.73
실시예 3.3	3:1	400	34.1	0.68
	1:1	400	39.4	0.75
	1:3	400	43.9	0.74
실시예 3.4	3:1	400	37.0	0.73
	1:1	400	34.3	0.68
	1:3	400	30.5	0.62
실시예 3.5	3:1	400	35.2	0.71
	1:1	400	39.1	0.72
	1:3	400	42.3	0.73
음성대조군		-	61.6	1.02
정상군		-	21.5	0.54

상기 표 5에서 확인되는 바와 같이, 사이클로스포린 A를 투여한 음성대조군와 시험군에서 혈중 요소질소와 크레아티닌 함량이 정상군에 비해 증가하였으나, 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 유의성 있게 혈중 요소질소와 크레아티닌 수치가 감소하였다. 특히, 만성 신장염 모델인 사이클로스포린 A 유발 신장염 모델에서는 실시예 3.4의 육계, 하고초의 혼합물 조성 중량비가 1:3인 시험 약물이 가장 우수한 활성을 나타내었다.

실험예 7: 시스플라틴 유발 신장염 모델에 대한 치료효과 실험

이상의 결과에서 우수한 결과를 나타내는 생약의 조합과 혼합 비율인 실시예 3.4의 3:1, 1:1, 1:3 혼합물의 시스플라틴 유발 급성 신장염 모델에 대한 치료효과를 평가하기 위해, Shirwaikar 등의 방법에 의하여[Shirwaikar et al., Journal of Ethnopharmacology 90, 2004, 81-86] 평가 실험을

수행하였으며, 다음 표 6에 나타내었다.

실험은 양성대조군 없이 정상군을 이용하였으며, 신장염 유발 인자로 시스플라틴을 3일간 3 mg/kg 복강 주사로 투여한 후(실험예 4 참조), 음성대조군을 제외한 실험군에 실시예 3.4의 3:1, 1:1, 1:3 혼합물을 매일 100, 200, 400 mg/kg 경구 투여하여 처리하였다. 경구 투여 7일 후, 실험동물을 부검하여 혈액 시료를 취하여 B.U.N.(blood urea nitrogen)과 크레아티닌(creatinine)을 측정하였다. 얻어진 결과를 아래의 표 6에 나타내었다.

【표 6】

구 분		투여용량 (mg/kg)	B.U.N (mg/dl)	크레아티닌 (mg/dl)
실시예 3.4	3:1	100	42.12	0.87
		200	40.79	0.85
		400	37.87	0.84
	1:1	100	34.65	0.75
		200	31.71	0.73
		400	29.77	0.70
	1:3	100	31.51	0.74
		200	25.14	0.67
		400	23.89	0.67
음성대조군		-	79.51	1.14
정상군		-	22.46	0.65

상기 표 6에서 확인되는 바와 같이, 실시예 3.4의 혼합 비율이 다양한 시험 약물의 신장염 치료 효과도 모두 우수하였다. 특히, 육계 추출물과 하고초 추출물의 혼합 비율이 1:3일 때 가장 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

실험예 8: 랫트 신장 메산기움 세포에 대한 세포 독성 실험

상기 실시예 1의 4종의 단독 생약 추출물 및 실시예 3에서 제조된

11종의 추출물의 혼합물에 대한 신장 메산기움 세포에 대한 세포 독성을 평가하기 위해, Wang 외의 방법을 이용하여[R. Wang et al., Life Sciences 80 (2007) 2481-2488] 평가 실험을 수행하였으며, 실시예 1의 단독 생약 추출물과 추출물의 혼합물은 다음 표 4로 작성하여 나타내었다.

실험은 실시예 1에서 제조한 단독 추출물 4가지와 실시예 3에서 제조한 11가지 혼합시험 약물을 각 10 mg 측정한 후, 적량의 DMSO로 용해하여 최종 농도가 40 mg/ml이 되도록 시료를 준비하였다. 96 웰 플레이트에서 배양한 메산기움 세포(1×10^4, 24시간)에 400 ㎍/ml을 최고농도로, 공비를 2로 하여 시료를 처리하였다. 24시간 배양 후, 최종 0.5 mg/ml MTT가 함유된 배지로 교체하였다. 4시간 후 100㎕의 DMSO로 교체하고, 15분 후 540 ㎚에서 흡광도를 측정하여 메산기움 세포에 대한 독성을 확인하였다.

【표 7】

구 분		$IC_{50}(\mu g/ml)$
실시예 1.1		338.8
실시예 1.2		309.1
실시예 1.3		288.4
실시예 1.4		218.2
실시예 3.1 (서양산사:육계)	10 : 1	321.2
	5 : 1	308.3
	1 : 5	307.9
실시예 3.2 (서양산사:하고초)	10 : 1	319.7
	3 : 1	296.5
	1 : 3	275.8
실시예 3.3 (서양산사:목적)	10 : 1	305.7
	5 : 1	284.8
	1 : 5	258.8
실시예 3.4 (육계:하고초)	10 : 1	327.4
	4 : 1	300.1
	1 : 5	272.5
실시예 3.5 (육계:목적)	7 : 1	273.6
	2 : 1	244.8
	1 : 7	218.1
실시예 3.6 (하고초:목적)	10 : 1	263.7
	3 : 1	224.3
	1 : 10	201.8
실시예 3.7 (서양산사:육계:하고초)	10 : 1 : 1	314.9
	2 : 2 : 3	305.4
	1 : 1 : 5	289.7
실시예 3.8 (서양산사:육계:목적)	10 : 1 : 1	302.4
	2 : 5 : 2	283.1
	1 : 1 : 5	232.8
실시예 3.9 (서양산사:하고초:목적)	7 : 1 : 1	289.3
	3 : 2 : 4	258.9
	1 : 1 : 5	216.4
실시예 3.10 (육계:하고초:목적)	7 : 1 : 1	274.9
	3 : 2 : 5	219.4
	1 : 1 : 7	204.3
실시예 3.11 (서양산사:육계:하고초:목적)	5 : 1 : 1 : 1	301.9
	3 : 2 : 2 : 2	270.1
	1 : 1 : 1 : 5	218.9

상기 표 7에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1의 4가지의 단독 생약 추출물뿐만 아니라, 각 생약 추출물의 혼합물인 실시예 3의 11가지 조성의

혼합물에 대한 신장 메산기움 세포 성장 억제 효과도 모두 우수하였다. 특히,성분별 배합 비율에 따라 우수한 활성을 나타내는 조성을 확인할 수 있었고, 하고초와 목적 또는 이들을 포함하는 혼합 약물이 전반적으로 신장 메산기움 세포 성장 억제 활성이 우수하였다.

실험예 9: 생약 추출물의 활성 분획 및 성분 규명

생약 추출물의 활성분획 및 성분규명을 위하여 마우스 귀 부종억제시험을 통한 activity-guided sub-fractionation을 실시하였다.

실시예 1에서 제조된 생약 추출물에 중량 기준으로 2배 내지 10배의 증류수를 넣고 현탁한 후, 현탁된 추출물에 2배 내지 5배(v/v)의 MC(methylene chloride), EA(ethyl acetate), BuOH(butanol)을 이용한 순차적 용매 분획을 2 내지 3회 실시하였다. 얻어진 활성분획의 패턴 분석은 HPLC를 이용하였으며, 그 분획의 활성성분 규명을 위해 실시예 1.2 추출물의 MC 분획에서 Hexane과 EA (10:1~1:10, v/v) 혼합용매로 silica gel column chromatography 및 MeOH를 용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 통하여 화합물1 과 화합물 2을 분리하였고, 실시예 1.3 추출물의 BuOH 분획에서 60% MeOH를 용매로 C18 column chromatography 및 CH_2Cl_2과 MeOH(1:1, v/v) 혼합용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 통하여 화합물 3을 분리하였다. 분리된 화합물은 LC-MS/MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, UV 분광광도계 등의 기기분석과 문헌적 확인을 통해 성분을 규명하여 다음의 표 8에 나타내었다.

【표 8】

구분	성분명
화합물 1	신남산 (Cinnamic acid)
화합물 2	쿠마린 (Coumarine)
화합물 3	로즈마릭산 (Rosmarinic acid)

상기 얻어진 동정 데이터는 다음과 같다:

신남산(Cinnamic acid): White powder. ^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.79 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7), 7.56 (2H, m, H-2, 6), 7.40 (3H, m, H-3, 4, 5),

6.45 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8); ^{13}C-NMR (63 MHz, $CDCl_3$) : δ 173.2 (C-9), 147.6 (C-7), 134.4 (C-1), 131.2 (C-4), 129.4 (C-3, 5), 128.8 (C-2, 6), 117.7 (C-8)

쿠마린(Coumarin): White powder.

^{1}H-NMR (250 MHz, CD_3OD) : δ 7.89 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-4), 7.51-7.58 (2H, m, H-5, 7), 7.25-7.31 (2H, m, H-6, 8), 6.46 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3); ^{13}C-NMR (63 MHz, CD_3OD) : δ 162.7 (C-2), 155.2 (C-9), 145.6 (C-4), 133.1 (C-7), 129.4 (C-5), 125.8 (C-6), 120.3 (C-10), 117.5 (C-3), 117.1 (C-8)

로즈마릭산(Rosmarinic acid): Yellowish amorphous powder.

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO) : δ 7.46 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7), 7.05 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, *J*=8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 6.67 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.63 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.52 (1H, dd, *J*=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.23 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8), 5.02 (1H, m, H-8'), 2.99 (1H, m, H-7'b), 2.90 (1H, m, H-7'a); ^{13}C-NMR (63 MHz, DMSO) : δ 170.7 (C-9'), 165.8 (C-9), 148.5 (C-4), 145.8 (C-7), 145.5 (C-3), 144.8 (C-3'), 143.9 (C-4'), 127.2 (C-1'), 125.3 (C-1), 121.5 (C-6), 120.0 (C-6'), 116.6 (C-2'), 115.7 (C-5'), 115.3 (C-5), 114.8 (C-8), 113.2 (C-2), 72.7 (C-8'), 36.1 (C-7')

실시예 1.2 및 1.3의 생약 추출물로부터 MC, EA, BuOH 분획 및 상기 성분이 규명된 3가지 화합물의 부종 억제 효능을 평가하기 위해, Hee Kee Kim 등의 방법에 의하여 [Hee Kee Kim er al.. Arch. Pharm. Res 16(1), 1993, 18-24] 활성 시험을 수행하였다.

실험은 양성대조군으로는 인도메타신(Indomethacin, Sigma) 20 mg/kg를 사용하였으며, MC, EA, BuOH 분획물의 농도는 모두 200 mg/kg로 하였고, 화합물 1, 2, 3은 20 mg/kg로 투여 하였다.

시험 약물 경구 투여 1시간 후 크로톤 오일(Croton oil, Sigma)을 수컷 ICR 마우스 (7 주령, 28~32 g, 오리엔트)의 한쪽 귀에 2.5%의 농도로 발라주어 급성 염증을 유발하였으며, 4시간 후 귀 부종의 두께를 측정하여

다음 표 9에 나타내었다.

【표 9】

구 분		투여용량 (mg/kg)	% Inhibition
실시예 1.2	MC 분획물	200	31.54
	EA 분획물	200	2.70
	BuOH 분획물	200	4.64
실시예 1.3	MC 분획물	200	3.68
	EA 분획물	200	30.64
	BuOH 분획물	200	40.85
화합물 1		20	42.40
화합물 2		20	38.79
화합물 3		20	28.90
양성대조군		20	38.81

상기 표 9에서와 같이, 양성대조군은 크로톤 오일로 유발한 급성 염증을 39% 억제하는 효능을 보였으며, 실시예 1.2의 MC와 실시예 1.3의 EA, BuOH 분획에서 30% 이상의 유의한 억제 효능을 보였다. 3종의 화합물에서 또한 급성염증을 억제하는 효능을 나타내었는데, 화합물 1, 2의 경우 42%와 39%로 높은 활성을 나타내었다.

실험예 10: 겐타마이신 유발 신장염 모델에 대한 치료효과 실험

상기 실험예 9의 화합물 3종의 신장염 치료 효과를 평가하기 위해 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 겐타마이신 유발 신장염 모델에서 혈중 요소 질소 함량(B.U.N.)과 크레아티닌을 측정하였다. 시료는 육계와 하고초 추출물의 활성분획인 화합물 1, 2, 3을 사용하였고 그 결과는 다음 표 10에 나타내었다.

【표 10】

구 분	투여용량 (mg/kg)	B.U.N (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
화합물 1	20	$47.7\pm5.7^{***}$	$0.81\pm0.07^{*}$
화합물 2	20	$50.9\pm4.7^{**}$	0.88 ± 0.06
화합물 3	20	63.1 ± 7.2	0.97 ± 0.06
음성대조군	-	83.0 ± 5.1	1.32 ± 0.12
정상군	-	12.4 ± 0.6	0.45 ± 0.01
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (음성대조군과 비교시)			

상기 표 10과 같이, 육계와 하고초의 혼합 추출물의 성분 중 신남산과 쿠마린이 겐타마이신 유발 신장염 동물모델에서 음성대조군에 비해 통계적으로 유의하게 혈중 요소 질소 함량(B.U.N.)을 감소시켰으며, 신남산의 경우 크레아티닌의 수치도 감소시켜 신장염 증상의 개선 효과에 가장 높은 활성을 보였다.

하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1: 산제의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	80 mg
유당	100 mg
탈크	10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

제제예 2: 정제의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	100 mg
옥수수전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

제제예 3: 캅셀제의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	100 mg
결정성 셀룰로오스	3 mg
락토오스	14.8 mg
마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

제제예 4: 주사제의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	10 mg
만니톨	180 mg
주사용 멸균 증류수	2974 mg
Na2HPO4,12H2O	26 mg

통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.

제제예 5: 액제의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	20 mg
이성화당	10 g
만니톨	5 g
정제수 적량	

통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

제제예 6: 건강기능식품의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	1000mg
비타민 A 아세테이트	70 ㎍
비타민 E	1.0 mg
비타민 B1	0.13 mg
비타민 B2	0.15 mg
비타민 B6	0.5 mg

비타민 B12	0.2 ㎍
비타민 C	10 ㎎
비오틴	10 ㎍
니코틴산아미드	1.7 ㎎
엽산	50 ㎍
판토텐산 칼슘	0.5 ㎎
무기질 혼합물 적량	
황산제1철	1.75 ㎎
산화아연	0.82 ㎎
탄산마그네슘	25.3 ㎎
제1인산칼륨	15 ㎎
제2인산칼슘	55 ㎎
구연산칼륨	90 ㎎
탄산칼슘	100 ㎎
염화마그네슘	24.8 ㎎

상기 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

제제예 7: 건강기능음료의 제조

실시예 1 내지 3의 추출물	1000 ㎎
구연산	1000 ㎎
올리고당	100 g
매실농축액	2 g
타우린	1 g
정제수를 가하여 전체	900 ㎖

통상의 건강기능음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능음료 조성물 제조에 사용하였다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

【청구의 범위】

1. 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장염 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

2. 제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6 개의 알코올, 탄소수 1 내지 6 개의 알코올 수용액 또는 이의 혼합물로 추출된 것인, 조성물.

3. 제 2 항에 있어서, 상기 알코올 수용액은 10 내지 90%(v/v)의 농도인 것인, 조성물.

4. 제 1 항에 있어서, 상기 추출물은

서양산사 및 육계의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계 및 목적의 추출물이 7:1 내지 1:7 의 중량비로 혼합된 혼합물;

하고초 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:10 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 육계 및 하고초의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 육계 및 목적의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:7 의 중량비로 혼합된 혼합물; 및

서양산사, 육계, 하고초 및 목적의 추출물이 5:1:1:1 내지 1:1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물

로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 조성물.

5. 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신장염 질환은 사구체 신염, 신우 신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 당뇨병성 신증, 단백뇨, 세관위축, 사구체 경화 및 신부전증으로 이루어진 군에서 선택된 것인 것을 특징으로 하는 조성물.

6. 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 1 일 투여량은 유효성분의 함량 기준으로 0.7 ~ 500 mg/kg 인 것을 특징으로 하는 조성물.

7. 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 함유하는 신장염 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

8. 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 추출물의 신장염 질환의 예방 또는 치료를 위한 용도.

9. 제 8 항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6 개의 알코올, 탄소수 1 내지 6 개의 알코올 수용액 또는 이의 혼합물로 추출된 것인, 용도.

10. 제 9 항에 있어서, 상기 알코올 수용액은 10 내지 90%(v/v)의 농도인 것인, 용도.

11. 제 8 항에 있어서, 상기 추출물은

서양산사 및 육계의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계 및 목적의 추출물이 7:1 내지 1:7 의 중량비로 혼합된 혼합물;

하고초 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:10 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 육계 및 하고초의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 육계 및 목적의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:7 의 중량비로 혼합된 혼합물; 및

서양산사, 육계, 하고초 및 목적의 추출물이 5:1:1:1 내지 1:1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물

로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 용도.

12. 제 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신장염 질환은 사구체 신염, 신우 신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 당뇨병성 신증, 단백뇨, 세관위축, 사구체 경화 및 신부전증으로 이루어진 군에서 선택된 것인 것을 특징으로 하는 용도.

13. 제 8 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물의 1 일 투여량은 0.7 ~ 500 mg/kg 인 것을 특징으로 하는 용도.

14. 서양산사, 육계, 하고초 및 목적으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 추출물을 신장염 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 신장염 질환의 예방 또는 치료 방법.

15. 제 14 항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6 개의 알코올, 탄소수 1 내지 6 개의 알코올 수용액 또는 이의 혼합물로 추출된 것인, 방법.

16. 제 15 항에 있어서, 상기 알코올 수용액은 10 내지 90%(v/v)의 농도인 것인, 방법.

17. 제 14 항에 있어서, 상기 추출물은

서양산사 및 육계의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계 및 하고초의 추출물이 10:1 내지 1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계 및 목적의 추출물이 7:1 내지 1:7 의 중량비로 혼합된 혼합물;

하고초 및 목적의 추출물이 10:1 내지 1:10 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 육계 및 하고초의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 육계 및 목적의 추출물이 10:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

서양산사, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물;

육계, 하고초 및 목적의 추출물이 7:1:1 내지 1:1:7 의 중량비로 혼합된 혼합물; 및

서양산사, 육계, 하고초 및 목적의 추출물이 5:1:1:1 내지 1:1:1:5 의 중량비로 혼합된 혼합물

로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 방법.

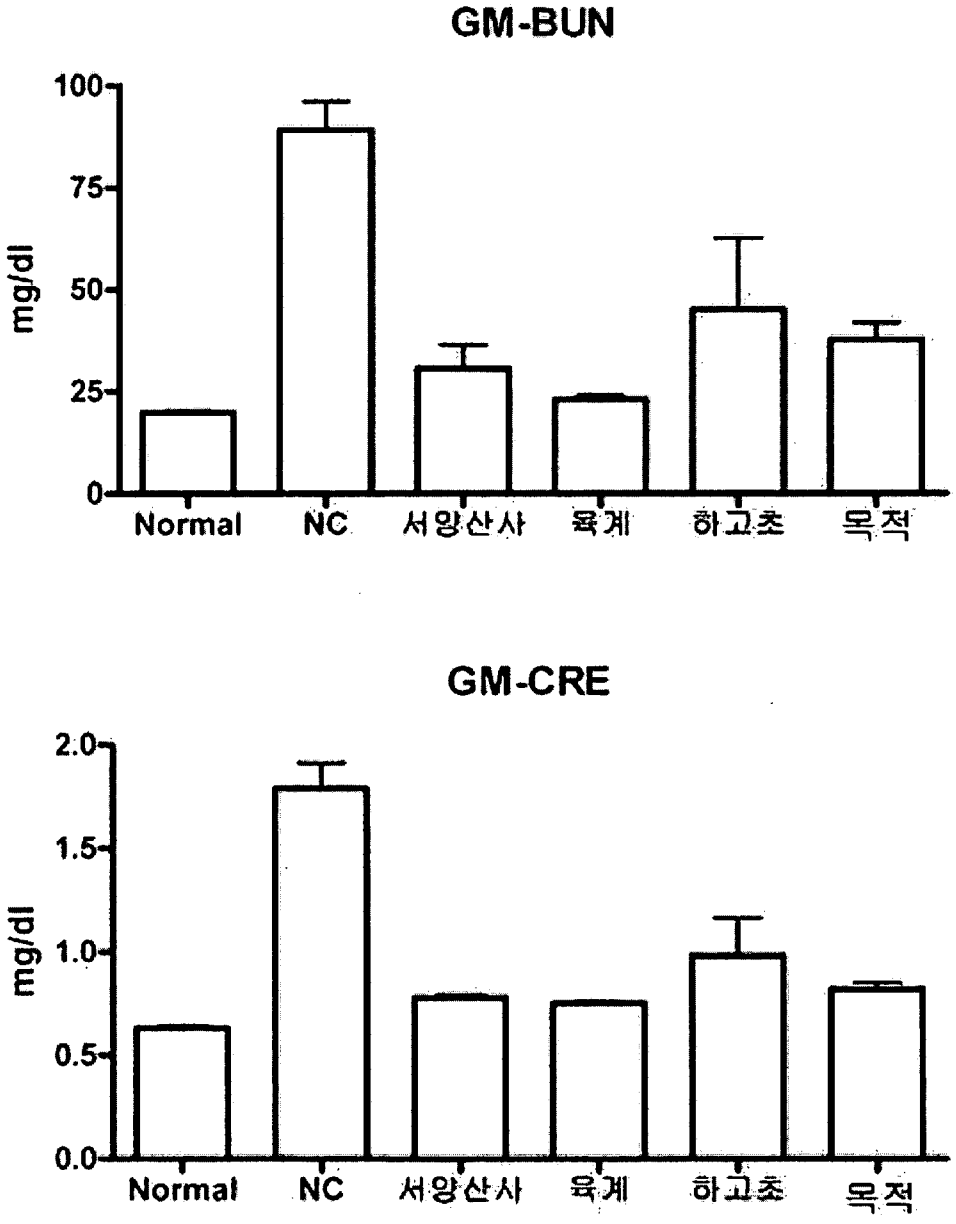
18. 제 14 항에 있어서, 상기 신장염 질환은 사구체 신염, 신우신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 당뇨병성 신증, 단백뇨, 세관위축, 사구체

경화 및 신부전증으로 이루어진 군에서 선택된 것인 것을 특징으로 하는 방법.

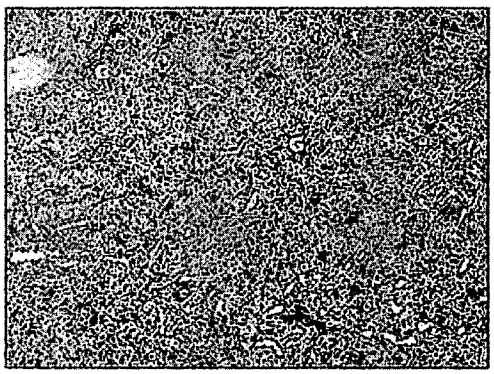
19. 제 14 항에 있어서, 상기 추출물의 1 일 투여량은 0.7 ~ 500 mg/kg 인 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

【도 1】


GM-BUN
mg/dl
100
75
50
25
0
Normal
NC
서양산사
육계
하고초
목적
GM-CRE
mg/dl
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Normal
NC
서양산사
육계
하고초
목적

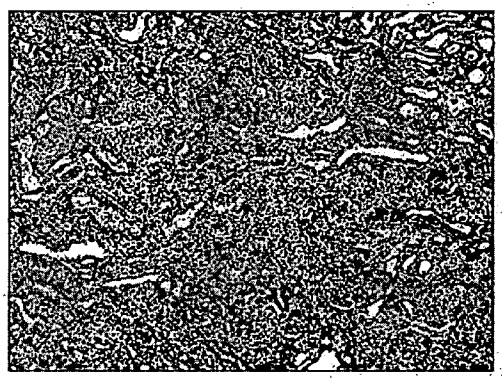
【도 2】



(a) 정상군

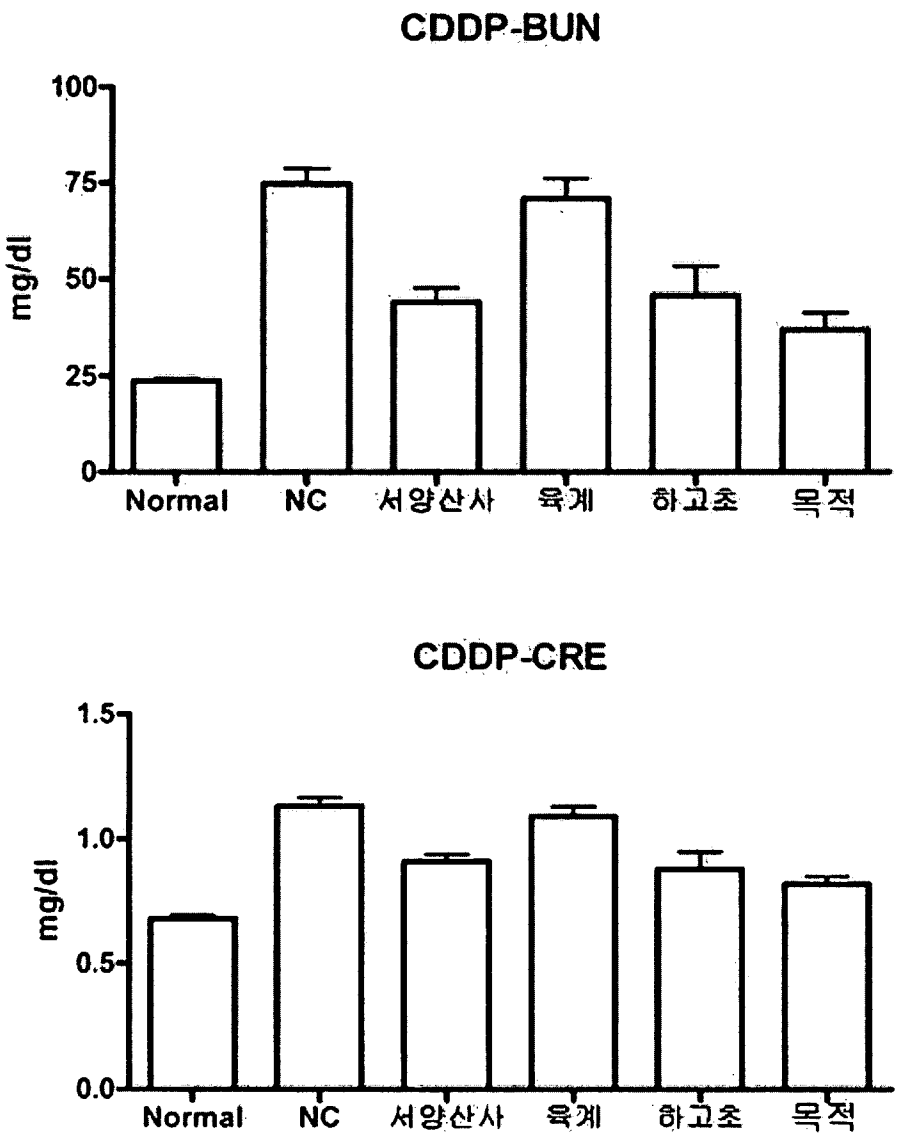


(b) 음성대조군



(c) 실험군

【도 3】


CDDP-BUN
mg/dl
100
75
50
25
0
Normal
NC
서양산사
육계
하고초
목적
CDDP-CRE
mg/dl
1.5
1.0
0.5
0.0
Normal
NC
서양산사
육계
하고초
목적

【도 4】

