(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 36/515 (2006.01)
A61K 36/752 (2006.01)
A61K 36/718 (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년05월21일
(11) 등록번호 10-0720671
(24) 등록일자 2007년05월15일

(21) 출원번호 10-2006-0017526
(22) 출원일자 2006년02월23일
심사청구일자 2006년02월23일
(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 유명철
서울 동대문구 이문동 346-73

양형인
서울 동대문구 이문동 311번지 삼성래미안2차 104동 304호

박동석
서울 송파구 문정2동 훼미리아파트 210동 1503호

한정수
서울 서초구 반포동 12 신반포 15차아파트 43동 403호

김경수
서울 양천구 목6동 902 219동 1502호

유미현
서울 동대문구 장안4동 105-2

박은경
경기 광명시 광명1동 10-53

김영훈
충남 당진군 당진읍 5구 592번지

이연아
서울 동대문구 제기동 현대아파트 102-2303

이상훈
경기 고양시 일산구 식사동 SK APT 302동 1203호

홍승재
서울 동대문구 이문3동 대림 e-편한세상아파트 104동 902호

김남재
서울 도봉구 방학동 ESA 아파트 105동 802호

조용백
경기 안양시 동안구 평촌동 꿈마을 아파트 101동 1105호

한창균
서울 영등포구 신길4동 삼성래미안아파트 106동 1204호

이해인
경기 수원시 장안구 정자3동 870-1 백설마을현대아파트 597동1203호

정기원
경기 수원시 장안구 정자2동 두견마을 한솔아파트 321동 1305호

(74) 대리인 특허법인다래

(56) 선행기술조사문헌
KR1020000043996 A
KR1020040030371 A
JP07-215848 A
KR1020030056579 A
KR1020050101942 A
JP01-128933 A

심사관 : 여호섭

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 진교, 진피 및 황련 추출물을 함유하는 제Ⅳ형 알레르기 및염증 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 제IV형 알레르기 및 염증 억제 및 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 세포독성 없이 활성화된 면역세포의 증식을 억제하고, 염증 유발 사이토카인의 생성을 억제하며 부종을 억제하는 등 항염효과가 탁월하여 제IV형 알레르기 및 염증 질환의 치료제로 사용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 제IV형(지연형) 알레르기 억제 및 치료용 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 진교, 진피 및 황련 추출물을 4~8 : 2~6: 1~3의 건조중량비로 함유하는 제IV형(지연형) 알레르기 억제 및 치료용 조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 제IV형(지연형) 알레르기는 접촉성 피부염, 하시모토갑상선염, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병(IDDM), 감염알레르기, 장기이식의 거부반응, 금속 알레르기 질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 제IV형(지연형) 알레르기 억제 및 치료용 조성물.

청구항 4.

진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 항염증 조성물.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 진교, 진피 및 황련 추출물을 4~8 : 2~6: 1~3의 건조중량비로 함유하는 항염증 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 제IV형 알레르기 및 염증 억제 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

알레르기 반응은 I~IV형의 4 가지 유형으로 분류되어 있고, 항원에 의한 재감작(感作) 후 증상 발생 시간에 따라 I~III형 알레르기는 즉시형 알레르기라고 불리며, IV형은 지연형 알레르기라고 불리고 있다.

I형 알레르기는 IgE 항체가 관여하는 반응으로서, 아나필락시형 알레르기라고 불리우며, 여기에는 기관지 천식, 아토피성 질환(피부염, 장염 등), 화분증 등의 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 음식물 알레르기 등이 있다. II형 알레르기는 세포 상해형 또는 세포 용해형 알레르기, 또는 기능 항진형 알레르기라고 불리고, 혈액형 부적합 수혈에 기인한 조직 장해, 자기 면역성 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판 감소증, 중증 근무력증, 갑상선 중독증 등의 질환의 발병에 관여하고 있다. III형 알레르기는 면역 복합물형 또는 알투스형 알레르기라고 불리고 있고, 혈청병, 급성 사구체 신장염, 루푸스성 신장염, 과민성 폐장염 등이 주된 질환이다. 상기 유형의 알레르기는 혈액 중의 IgG 항체 또는 IgM 항체가 가용성 항원과 결합하여 면역 복합체를 형성하는 것으로 조직 등에 침착하고, 그 결과로서 생기는 보체나 식세포의 활성화에 따르는 조직 장애이다.

또한, IV형 알레르기는 지연형 또는 세포 매개형 알레르기라고 불리고, 접촉성 피부염, 일부의 자가면역성질환(하시모토갑상선염(Hashimoto's disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 제1형 당뇨병(Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) 등), 감염알레르기, 장기이식의 거부반응, 금속 알레르기, 투베르클린 반응 등이 포함된다. 항체 형성 없이 세포 특히 T 세포에 의하여 매개되는 면역반응으로 세균, 바이러스, 진균 등의 감염에 동반되어 일어나는 지연형의 반응 또는 금속, 화장품, 옻 등에 의한 접촉성 피부염 등이 여기에 속한다. 항원 감작 후 24-72시간 후에 홍반(紅斑), 경결(硬結)을 특징으로 하는 염증 증상을 나타낸다. 이러한 염증 반응은 붉어짐, 따끔거림, 화끈거림, 팽윤(swelling), 조직의 변화와 같은 5 가지 현상으로 나타나는데, 이는 해로운 주위 환경, 즉 세균과 같은 외부 이물질의 침입과 기계적 손상으로부터 생체를 보호하려는 생리적인 반응이다. 조직세포가 손상되거나 파괴되었을 때 여러 종류의 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)와 면역 물질의 많은 증가를 초래하며, 이처럼 증가된 세포들은 염증성 세포 산물인 다양한 종류의 단백질 분해효소와 사이토카인(cytokine) 등을 분비하여 근처의 모세혈관을 확장시키고 혈관벽의 투과성을 증가시킨다. 비만세포(mast cell)나 호염구(basophil)에서 분비되는 히스타민(histamine)은 혈관반응을 빠르게 유도하고 혈청의 알파-2-글로블린(α-2-globuline)으로부터 생성되는 혈청의 키닌(kinin)은 혈액응고 기작을 통해 계속적인 혈관반응을 일으킨다. 모세혈관의 확장은 혈액의 흐름을 증가시켜 열을 발생시키고 홍반을 일으킨다. 모세혈관의 증가된 투과성으로 인하여 혈액, 단백질, 혈구세포들이 주변조직으로 삼출되어 붓게 된다. 삼출은 세포를 더욱 파괴하고 증가된

용액의 압력은 근처의 신경을 자극하여 통증을 발생시키며 이는 키닌과 산성물질들에 의해 통증이 더욱 증가된다. 이외에도 조직에서 분비되는 매개물질에는 세로토닌(serotonin), 프로스타글란딘(prostaglandin), 면역보조체계(complement system)의 반응물질, T-세포에서 분비되는 림포카인(lymphokine)들이 있다.

염증 생성 과정의 핵심 물질은 자극에 의해 활성화된 포스포리파아제 A2 (phospholipase A2, PLA2)라는 효소에 의해 세포막 지질로부터 아라키돈산 (arachidonic acid)이 생성되며, 생성된 아라키돈산은 다시 싸이클로옥시게나아제 (cyclooxygenase, 이하 "COX"로 약칭) 또는 리폭시게나아제(lipooxygenase)의 2 가지 경로를 거쳐 염증 매개체인 프로스타글란딘류, 류코트리엔류 (leukotrienes)로 대사되어 다양한 염증 반응을 매개한다. COX 경로에 의해 형성된 다양한 사이토카인 및 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2) 등이 부종 형성과 혈관 확장에 관여하여 염증과 통증의 원인이 된다고 알려져 있다.

상기의 염증반응을 완화시키기 위한 여러 형태의 화학물질들을 총칭하여 항염증작용약물이라 분류되며, 이들 약물은 염증세포들의 생성과 삼출을 억제할 수 있는 약재와 중간 매개물질의 분비를 감소시킨다.

현재 염증에 사용되는 약물은 진통효과를 함께 나타내는 비스테로이드성 약물과 스테로이드성 약물로 나눌 수 있는데, 스테로이드 및 그 유도체를 제외한 약물들을 비스테로이드성 소염제 (NSAID, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)라 부르며 아라키돈산으로부터 프로스타글란딘의 생성을 억제하는 기작을 가지고 있으며 여러 염증 치료에 광범위하게 사용되었으나, 소화장애, 위장관 장애 및 신장기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아지므로 노년층 환자 치료 시 장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있다.

또한, 염증에 사용되는 코르티코스테로이드(corticosteroids)는 프로스타글란딘 생성을 억제할 뿐 아니라 백혈구의 베타아드레너직 수용체(β-adrenergic receptor)에 작용하여 인터루킨(IL)의 분비를 억제하고 혈관의 투과성을 감소시켜 혈액 및 염증세포들의 삼출을 억제한다. 또한 골다공증 및 모세혈관의 약화를 촉진시키며, 혈압상승 및 위궤양 등이 생기는 부작용이 있다.

또한, 퇴행성 관절염이나 류마티스성 관절염 등의 관절의 염증치료에 사용되는 항관절염제제(disease modifying anti-rheumatic drugs; DMARDs)는 관절염의 진행과정을 억제하거나 완화시키기 위한 목적으로 사용되고 있으며, 메토트렉세이트(methotrexate), 디-페니실아민(D-penicillamine), 설파살라진(sulfasalazine), 항말라리아제 및 금(金)염 등 매우 다양한 약물들이 포함되어 있다. 이들 약물 역시 관절염의 진행을 다소 감소시키지만 혈액이상, 위염, 설사, 구토, 불면, 졸음, 이명, 발열, 간장장애, 신장장애 등의 심각한 부작용을 동반할 수 있다.

따라서, 염증성 질환 치료에 있어서 무엇보다도 장기복용에 따른 부작용이 없이 우수한 치료효과를 얻을 수 있으며, 상기한 약물을 대체할 수 있는 천연물에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있고 다양한 적용이 시도되고 있다.

이에 발명자는 상기의 문제점을 해결하며 제IV형(지연형) 알레르기 및 염증질환 치료제를 개발하기 위하여, 오래전부터 사용해오던 생약을 대상으로 면역 과민반응 억제 및 염증 억제 효과를 조사하였다.

한편, 진교(용담(龍膽))는 용담초과(Gentianceae)의 다년생 초본 식물로 용담(Gentiana scabra var. buergeri) 또는 큰잎용담(*Gentiana macrophylla* pallas)의 뿌리를 건조한 것이다. 상기 진교 및 동속근연식물에 함유된 유효 성분으로는 라이콕토닌(lycoctonine), 아바드하리딘(avadharidine), 셉텐트리오딘(septentriodine)이 알려져 있으며, 이외에는 겐티아닌(gentianine), 겐티아니신(gentianicine) 등의 알카로이드류와 메틸-n-(3-카바모일프로피오닐)안트라니레이트, 메틸-n-(2-아세트아미노벤조일)안트라니레이트 등의 방향족 화합물이 알려져 있다. 약리적으로 소염, 해열작용, 진통 및 진경작용이 있고, 관절염을 억제하며, 뇌하수체 자극을 통하여 항종양작용을 한다고 알려져 있으며, 한방에서는 고미건위제(苦味健胃劑)로 사용한다.

진피(陣皮, Citrus unshiu Marcor)는 운향과에 속한 상록소교목인 귤나무 및 동속 근연식물의 성숙한 과피로, 귤이 익기 전에 껍질을 벗겨서 말린 것을 청피(靑皮)라 하고, 익은 뒤에 말린 것은 진피(陳皮) 또는 귤피(橘皮)라고 한다. 성분은 헤스페리딘(hesperidin), 나린진(naringin) 등 바이오플라보노이드(bioflavonoid)이 포함되어 있다. 방향성 건위약으로 위염, 소화 불량 등에 쓰며진토(鎭吐), 진해, 거담제로서 사용된다.

또한, 황련(Coptis chinensis)은 미나리아제비과 다년생 초본식물의 뿌리줄기로서, 황련의 주요 약리성분으로는 베르베린 외에 콥티신(coptisine), 팔마틴, 베르베라스틴(berberastine), 자트로리진, 에피오베르베린(epioberberine), 콜룸바민

(columbamin) 등을 함유하고 있다. 이외에도 펠로덴드린, 마그노플로린(magnoflorine) 등을 함유하고 있다. 황련은 항미생물작용, 혈압강하작용, 소염작용 등의 약리효과 있는 것으로 알려져 있으며, 한방에서는 건위제, 중추신경계, 이담, 자궁, 방광, 기관지 및 신경계 작용제로 알려져 있다.

국내 특허공개 특2000-43996호에는 진교로부터 유효 활성 성분을 추출 및 정제하여 그 추출물을 함유한 소염 진통제 등의 생약 조성물에 대해 개시되어 있고, 국내 특허공개 특2003-63106호에는 우슬, 방풍, 천마, 진교, 진피 등 23가지 생약재를 적정비로 혼합하여 추출 농축함으로써 관절연골 보호효과를 가지는 관절염 치료법 및 치료를 위한 조성물에 관해 개시되어 있다. 그리고 국내특허공개 10-2003-56582호에는 감초, 대추, 배, 백출, 생강, 소엽, 진피 및 총백의 추출물을 함유하는 면역증강용 조성물이 개시되어 있다.

이에 본 발명자는 진교, 진피 및 황련 추출물을 최적의 조성으로 배합한 결과 본 발명의 조성물이 제IV형 (지연형) 알레르기 억제 및 염증 억제에 우수한 작용효과를 나타냄을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 제IV형 (지연형) 알레르기 억제용 조성물 및 염증 억제용 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 구성

본 발명은 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 제IV형(지연형) 알레르기 억제용 조성물을 제공한다.

상기 제IV형(지연형) 알레르기는 접촉성 피부염, 일부의 자가면역성질환(하시모토갑상선염, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병(IDDM) 등), 감염알레르기, 장기이식의 거부반응, 금속 알레르기 질환을 포함한다.

또한, 본 발명은 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 항염증 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물에 함유되는 진교 추출물, 진피 추출물 및 황련 추출물을 4~8 : 2~6: 1~3의 건조중량비로 함유하는 것이 바람직하다.

본 발명의 조성물에 함유되는 생약은 통상적인 건조 방법에 따라 생약 자체를 건조시켜 건조물 상태 또는 상기 건조물을 세절 또는 분말 형태로 하여, 통상적인 추출 방법, 예를 들면 열수 추출 또는 유기용매로 추출하여 사용할 수도 있고, 이미 상품으로 시판되는 추출물 분말을 구입하여 사용할 수도 있다.

본 발명의 조성물에 사용하는 생약은 건조한 것, 건조하지 않은 것 또는 이들을 서로 혼합한 상태의 것을 추출에 사용할 수 있다.

본 발명의 조성물에 함유되는 추출물은 생약을 세절한 후, 생약 무게의 약 3배 내지 20배의 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 또는 유기용매로, 바람직하게는 30 내지 80%(v/v) 에탄올로, 실온 내지 100 ℃의 추출온도에서 약 6시간 내지 10일 동안 열수추출, 냉침추출, 초음파 추출 또는 환류냉각 추출 등의 추출방법에 의하여 1회 내지 5회 반복하여 추출한 후, 추출물을 여과, 감압농축 또는 동결건조하여 제조될 수 있다.

상기 저급알콜은 C1 내지 C4의 탄소수를 갖는 저급알콜을 포함하며, 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄과 같은 비극성 용매를 포함하고, 용매를 생약 무게의 3배 이상을 사용하는 것이 바람직한 추출효과를 나타내며, 20배 이상을 사용할 때는 용매가 추출량에 비하여 많이 소요되는 경향이 있다.

본 발명의 조성물에 함유되는 추출물의 함량은 제한되지는 않으나, 본 발명의 추출물은 조성물 총 100 중량부에 대하여 0.1 내지 약 95 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

상기와 같이 제조된 본 발명의 조성물은 증식시킨 비장 T 세포에서 기존의 면역억제제인 덱사메타존보다 더 우수한 T 세포 증식억제 효과를 나타낸다.

또한, 본 발명의 조성물은 옥사졸론으로 유도된 지연성 과민반응에서 지연성 과민반응으로 나타나는 귀 부종을 억제한다.

또한, 본 발명의 조성물은 염증을 유발한 생쥐 복강 내 염증성 대식세포에서 염증을 유도하는 NO 생성을 억제한다.

또한, 본 발명의 조성물은 IL-6, TNF-알파, PGE2와 같은 염증성 사이토카인 생성 및 염증성 케모카인인 MCP-1의 생성을 효과적으로 억제한다.

또한, 본 발명의 조성물은 카라키난으로 유발된 발 부종 실험, 크로톤 오일로 유발된 귀 부종실험 및 코튼 펠렛 실험, 염증으로 인한 혈관투과성 측정 실험에서 기존 항염제와 유사한 염증 억제효과를 나타낸다.

따라서 본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효성분으로 하는 약학조성물은 면역과민 반응억제용 조성물로서 제IV형(지연형) 알레르기의 억제 또는 치료를 위한 의약품, 식품 등으로 유용하게 사용할 수 있고, 또한, 염증성 질환의 예방, 경감 및 치료를 위한 의약품, 식품 등으로 유용하게 사용할 수 있다.

본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물의 투여량은 제IV형 알레르기 및 염증반응을 억제 또는 치료하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 진교, 진피 및 황련 추출물을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~100㎎/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물을 함유하는 조성물은 독성이 거의 없으므로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다

또한, 본 발명의 조성물은 제IV형 알레르기 및 염증 예방 및 경감을 위한 식품에 다양하게 이용할 수 있다. 본 발명의 조성물은 식품으로 복용할 수 있는 어떠한 제형으로도 적용하여 사용할 수 있으며 그 예로 분말, 과립제, 정제, 환제, 캅셀제, 연질캅셀제 또는 액제 등을 포함한다. 이러한 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 각종 식품류, 육류, 차 등의 음료수, 스넥류, 과자류, 라면류, 기타 면류, 캔디, 초콜릿, 아이스크림류, 껌, 비타민 복합제, 건강 기능 식품류 등이 있다.

본 발명의 상기 추출물은 제IV형 알레르기 및 염증 예방 및 경감을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 % 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예1] 본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물 함유 조성물의 면역과민반응 억제 효과 확인

1) 진교, 진피 및 황련 추출물 함유 조성물의 조성 및 제조

1-1) RAH14-1의 조성 및 제조 1

본 발명의 진교, 진피 및 황련은 경희대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선한 것을 사용하였으며, 조성물의 배합비는 진교, 진피 및 황련 3:2:1로 하였다.

상기 진교 125 g, 진피 83.3 g 및 황련 41.7 g 을 약 1.0cm 정도의 크기로 세절하여 250 g을 고루 섞은 후, 둥근 플라스크에 2 리터의 50%(v/v) 에탄올을 가해 잘 교반한 다음 6시간 동안 가열하였다. 가열하여 얻은 여액을 분리하고 같은 방법으로 잔사에 1.5리터의 30%(v/v) 에탄올을 가해 3시간 동안 재 가온 추출하였다. 상기 추출 여액을 모두 모아 여과한 다음, 로터리 진공 증류기에서 감압 하에 1리터로 농축하였고, 동결건조기에서 12시간 동안 동결 건조하였다. 그 결과로, 본 발명의 진교, 진피 및 황련의 복합생약 조성물인 RAH14-1 조성물 40.75 g을 얻어 본 발명의 시료로 사용하였다(도 1 참조).

1-2) RAH14-2의 조성 및 제조 2

본 발명의 진교, 진피 및 황련의 배합비는 2:1:1로 하였다.

상기 진교 200g, 진피 100 g 및 황련 100 g 을 약 1.0cm 정도의 크기로 세절하여 400 g을 고루 섞은 후, 상기 1-1)과 동일한 추출방법으로 RAH14-2 조성물 67.5 g을 얻어 본 발명의 시료로 사용하였다.

1-3) RAH14-3의 조성 및 제조 3

본 발명의 진교, 진피 및 황련의 배합비는 4:3:1로 하였다.

상기 진교 200 g, 진피 및 150 g 및 황련 50 g 을 약 1.0cm 정도의 크기로 세절하여 400 g을 고루 섞은 후, 상기 1-1)과 동일한 추출방법으로 RAH14-3 조성물 62.7 g을 얻어 본 발명의 시료로 사용하였다.

본 발명의 조성물의 비교예로서 진피 단독 추출물(비교예 1), 진교 단독 추출물(비교예 2) 및 황련 단독 추출물(비교예 3)을 상기 1-1)과 동일한 추출방법으로 추출하여 하기에서 비교예로 사용하였다.

또한, 상기 RAH14-1, RAH14-2, RAH14-3, 비교예 조성물을 동물 실험 시에는 0.5% 카르복시메틸셀룰로우스(CMC)에 녹여 사용하였으며, in vitro 실험 시에는 DMSO에 용해시켜 사용하였다.

2) 본 발명의 조성물의 생쥐의 비장세포 증식능 억제 효과 확인

생후 5-6주된 16-18g의 웅성 Balb/c 마우스를 (주)오리엔트로부터 분양받아 사용하였다. 모든 동물은 플라스틱 케이지에 넣고 표준화된 사료(purina Lab Chow, 한국)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였으며 사육실의 온도는 21-24℃, 습도는 40-60%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 12시간씩으로 하였다.

Balb/c 생쥐로부터 멸균상태에서 적출한 비장을 세포 메쉬(70 ㎛)를 이용하여 분쇄하고 거른 후 식염수로 2회 세척하고, 10% FBS, 100단위/ml 페니실린과 100 ㎍/ml 스트렙토마이신이 함유한 RPMI 1640 배지에 세포를 부유시킨 후 원심 분리하였으며, 가라앉은 세포를 적혈구 용혈 배지에 부유시켜 적혈구를 용혈시켰다. 이를 다시 식염수로 2회 세척한 후 RPMI 1640 배지에서 부유시킨 다음, 세포수를 측정하여 96 웰 실험용 플레이트에 한 웰 당 1×10^5 세포가 되도록 분주하였다.

그 다음 T 세포 마이토젠인 콘카나발린 A(concanavalin A; Con-A)와 T 세포 수용체의 항체인 anti-CD3e 항체((BD pharmingen, cat#145-2C11)를 각 웰에 5 ㎍/ml로 분주하여 비장의 T세포를 증식시킨 다음, 본 발명의 RAH14-1, 2, 3 조성물을 100 ㎍/ml 농도로 처리하였다. 양성대조군으로 덱사메타존(Dexamethasone) 10μM 농도를 가하였다. 이러한 세포를 CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양한 후 비방사선 세포증식 분석 키트(CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit, MTS)를 이용하여 세포 증식 반응을 측정하였다. MTS 2 ml와 PMS(Phenazine Methosulfate, Sigma cat# P9625) 100 ㎕를 혼합한 용액을 각 웰 당 20 ㎕씩 분주한 후 3시간 동안 CO_2 배양기에서 배양하고, 비장세포의 증식반응을 엘리자 리더(ELISA reader)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포증식 억제율(%) 계산은 하기 수학식 1과 같다.

수학식 1

$$\%\ \text{증식 억제율} = (A_{540}(\text{대조군})-A_{540}(\text{시료})/A_{540}(\text{대조군}))\times100$$

[표 1]

비장세포 증식 억제율 (%)							
시료	덱사메타존	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1	비교예 2	비교예 3
Con A 처리	65 ±3.0	82.0 ±4.0	88.3 ±2.5	70.0 ±4.0	15.9 ±4.3	20.5 ±4.5	49.5 ±2.3
CD3e 처리	28.9 ±1.0	49.5 ±2.0	55.1 ±2.0	43.5 ±1.5	5.0 ±2.0	7.0 ±3.0	20.4 ±2.0
평균 ±표준편차							

본 발명의 RAH14-1, 2, 3 조성물의 비장세포 증식 억제율(%)은 세포독성이 없는 100 ㎍/mL 농도에서 종래 면역억제제로 사용되고 있는 덱사메타존의 T세포 증식 억제율보다 더 우수한 증식억제효과를 나타냄을 알 수 있었다.

또한 진교, 진피 또는 황련 단독 추출물 처리한 비교예보다 2배 이상의 T세포 증식 억제율을 나타냄을 확인할 수 있었고, 이는 본 발명에 따른 조성물이 진교, 진피 및 황련 각각의 효과를 합산한 상가적 효과가 아니라 각 유효성분의 상승적인 효과로 확인된다.

3) 본 발명의 조성물의 옥사졸론으로 유도된 지연성 과민반응(Oxazolone-induced delayed-type hypersensitivity) 억제 효과 확인

5주령의 Balb/c 생쥐의 흉복부 털을 면도칼을 이용하여 제거한 후 옥사졸론(4-ethoxymethylene-2-phenyloxazolone)을 아세톤(acetone)과 올리브 오일(olive oil)을 4:1로 혼합한 용액에 융해시켜 농도를 2%로 제조하여 25 ㎕씩 흉복부 피부에 감작하였다. 감작 6일 후 마우스 오른쪽 귀에 아세톤과 올리브오일에 융해시킨 0.5%의 옥사졸론을 20 ㎕씩 도포하여 면역화하고, 왼쪽 귀에는 음성대조를 위하여 아세톤과 올리브 오일의 혼합액 20 ㎕을 도포하였다. 면역화한 24시간 후에 캘리퍼 (Peacock dial caliper, 일본)로 좌우 귀 두께를 측정하였다.

지연성 과민반응에서 조성물의 억제효과 실험을 위하여 감작 후 1일, 3일, 그리고 5일째 되는 날에 0.5% 카르복시메틸셀룰로우스에 녹인 RAH14-1, 2, 3 조성물을 400 mg/kg 용량으로 경구투여 하였고, 음성대조군은 0.5% CMC, 양성대조군은 덱사메타존 1 mg/kg를 경구투여하여 억제효과를 비교하였다.

귀 부종(ear swelling) 억제율(%) 계산식은 다음과 같다.

수학식 2

% 귀 발염율(ear swelling) = [(우측 귀 두께-좌측 귀 두께)/좌측 귀 두께]×100

수학식 3

% 귀 부종 억제율 = [(음성대조군 발염율-본 발명의 조성물 투여군 발염율)/음성대조군 발염율]×100

그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

귀 부종 억제율 (%)						
덱사메타존	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
28.08 ±5.8	42.9 ±3.5	45 ±2.6	40 ±3.0	19.10 ±3.4	15.5 ±2.5	20.39 ±6.4

상기와 같이 귀 부종 억제율을 측정한 결과, RAH14-1, 2, 3을 경구투여한 군이 기존에 사용되던 면역억제제인 덱사메타존 또는 비교예 1, 2, 3을 경구투여한 군뿐만 아니라 비교예 1, 2, 3을 합산한 효과보다도 우수한 발염 억제율을 보였다. 이는 본 발명에 따른 조성물이 진교, 진피, 황련 각각의 효과를 합산한 상가적 효과가 아니라 세 유효성분의 효과가 상승적으로 나타남을 확인한 것이다.

따라서 본 발명에 의한 RAH14-1, 2, 3 조성물은 제IV형 알레르기(지연형 알레르기)와 같은 면역과민 반응 치료에 관련된 약물 및 건강식품에 유용하게 사용될 수 있다.

[실시예 2] 본 발명의 진교, 진피 및 황련 추출물 함유 조성물의 항염 효과 확인

2-1) 생쥐의 복강 대식세포를 이용한 항염증 효과 확인

<u>가) 생쥐 복강 내 염증성 대식세포 유발 및 분리</u>

고압 멸균된 3% 브루어 티오글리콜레이트(Brewer thioglycollate) 배지 1ml을 5주령의 Balb/c 생쥐 복강에 투여하여 염증을 유발한 후 3일 후에 복강 내 염증성 대식세포를 멸균상태에서 수집하였다.

먼저 경추탈골로 생쥐를 희생시킨 후 얼음 위에 생쥐를 눕힌 다음 복부 피부를 제거한 후에 10ml 주사기를 이용하여 냉장된 100 단위/ml 페니실린과 100 ㎍/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지 8 ml를 생쥐 복강에 주입하였다. 다시 주사기로 복강 내 DMEM 배지를 수거하여 2000rpm으로 5분간 원심 분리하여 대식세포를 수거하였다. 10% FBS, 100 단위/mL 페니실린과 100 mg/mL 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지로 2회 세척한 후, 세포수를 측정하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

<u>나) 니트릭 옥사이드 (nitric oxide, NO) 생성 억제 효과 확인</u>

상기 대식세포에 본 발명의 조성물 처리시 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시켜 염증을 유도하는 니트릭 옥사이드의 생성량에 미치는 효과를 측정하였다.

상기 기술한 대식세포 증식억제율 실험과 동일한 조건으로 세포에 RAH14-1, 2, 3 조성물 100 ㎍/mL과 양성대조군인 셀레콕시브 100nM을 처리하고 30분 후 LPS 1 ㎍/mL와 IFN-γ 1 ng/mL을 처리하였다. 그 다음 세포를 96시간 동안 CO_2 배양기에서 배양한 후, 배양 상층액에서 니트릭 옥사이드(NO)양을 Griess reagent을 이용하여 측정하였다. 배양배지 100 ㎕와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthylethyleme diamine 2HCl + 2.5% H_3PO_4) 100 ㎕를 혼합하여 새로운 96 웰 플레이트에 분주하고 570nm에서 10분 이내에 흡광도를 측정하였다. $NaNO_2$를 이용하여 표준 검량선을 작성하여 샘플에 의한 NO 생성량을 구하였다.

그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

NO 생성량 (μM)							
농도	셀레콕시브 (nM)	RAH14-1 (㎍/ml)	RAH14-2 (㎍/ml)	RAH14-3 (㎍/ml)	비교예 1 진피단독 (㎍/ml)	비교예 2 진교단독 (㎍/ml)	비교예 3 황련단독 (㎍/ml)
0	59.4 ±5.5	56.0 ±1.7	57.7 ±2.5	58.5 ±3.4	55.0 ±4.3	57.0 ±3.9	49.0 ±3.7
100	49.7 ±2.7	30.9 ±2.6	26.1 ±2.2	33.4 ±2.9	49.0 ±4.4	45.0 ±3.2	36.9 ±2.6
평균 ±표준편차							

상기 실험결과, NO의 생성량에 있어서 본 발명의 RAH14-1, 2, 3 조성물 처리시, 기존의 염증치료제인 셀레콕시브 및 비교예 1, 2, 3에 비해 매우 탁월한 NO 생성 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

따라서 본 발명의 조성물이 NO의 생성량을 억제하여 염증성 사이토카인의 분비를 억제시켜 염증을 억제시키는데 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있다.

다) 염증성 매개인자(PGE2) 생성 억제 효과 확인

염증의 진행 정도와 밀접하게 관련되어 있는 사이클로옥시게나제-2(COX-2)의 활성에 의해 염증부위에서 과잉 생산되어 염증과 통증을 유발하는 PGE2의 생성량을 측정하였다.

상기 대식세포를 24 웰 플레이트에 각 웰 당 10^6 세포수가 되도록 분주한 후 RAH14-1, 2, 3 100 ㎍/mL과 양성 대조군인 셀레콕시브 100 nM을 처리하였다. 처리 30분 후 LPS 1 ㎍/mL 및 IFN-γ 1 ng/mL을 처리하여 24시간 동안 CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포를 2000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 수거하여 염증 매개 사이토카인 측정에 사용하였다. 수거한 상층액 내의 PGE2(R&D systems, USA)양은 상업적으로 판매되고 있는 키트를 이용하여 효소면역분석법으로 측정하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[표 4]

PGE2 생성량 (pg/ml) (생성량%)							
농도	셀레콕시브 (nM)	RAH14-1 (㎍/ml)	RAH14-2 (㎍/ml)	RAH14-3 (㎍/ml)	비교예 1 진피단독 (㎍/ml)	비교예 2 진교단독 (㎍/ml)	비교예 3 황련단독 (㎍/ml)
0	448.33 ±14.05 (100%)	476.42 ±9.41 (100%)	452.5 ±31.00 (100%)	468.0 ±25.50 (100%)	466.00 ±11.80 (100%)	450.00 ±34.00 (100%)	438.5 ±23.7 (100%)
100	37.71 ±11.33 (8.42%)	232.69 ±20.08 (48.8%)	208.3 ±15.20 (46.0%)	225.1 ±21.60 (48.1%)	491.00 ±63.50 (105.4%)	350.00 ±21.00 (77.8%)	346 ±15.00 (80.0%)

평균 ±표준편차

상기 결과를 보면, 선택적으로 COX-2를 억제시키는 기존의 염증치료제인 셀레콕시브가 확실하게 PGE2 생성량을 억제시켰으며, 비교예 1, 2, 3에 비해 RAH14-1, 2, 3 처리군도 더 우수하게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명에 따른 조성물이 진교, 진피, 황련 각각의 효과를 합산한 상가적 효과가 아니라 세 유효성분의 효과가 상승적으로 나타남을 확인한 것이다.

2-2) 사람 단핵구 세포주(THP-1)를 이용한 항염증 효과 확인

본 발명의 조성물이 인간 단핵구에서도 동일한 염증 억제 효능을 가지고 있는지 염증성 사이토카인 및 케모카인의 생성량을 측정하였다.

가) 단핵구(monocyte)로부터 대식세포(macrophage)로의 분화 유도

한국세포주은행으로부터 분양받은 사람 단핵구 세포주(THP-1 cell line)를 10% FBS, 100 단위/ml 페니실린과 100 ㎍/ml 스트렙토마이신이 함유한 RPMI 1640 배지로 증식시킨 후 실험에 사용하였다.

먼저 24 웰 플레이트에 각 웰 당 10^6 세포수가 되도록 단핵구를 분주한 후 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate, SIGMA, USA) 10 ng/ml을 24시간 동안 처리하여 단핵구에서 대식세포로 분화하도록 유도하였다.

나) 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-α)과 케모카인(MCP-1) 측정

상기에서 PMA에 의해 분화한 대식세포에 다시 10 ng/mL PMA, 0.5% FBS, 100 단위/ml 페니실린과 100 ㎍/ml 스트렙토마이신이 함유한 RPMI 1640 배지로 교체한 다음, RAH14-1, 2, 3 100 ㎍/mL과 양성대조군인 덱사메타존 1μM을 30분 동안 먼저 처리하고, 세포증식을 위해 마이토젠인 LPS 1 ㎍/mL를 처리하여 CO_2 배양기에 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 플레이트를 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 배양 상층액을 수거하였다. 배양액 중의 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-α, 염증성 사이토카인을 염증부위로 유도하고 단핵 세포와 대식세포의 활성화를 유도하는 인자인 MCP-1의 양을 상업적으로 판매되고 있는 키트(BD Pharmigen, USA)를 이용하여 효소면역분석법으로 측정하였다.

그 결과를 하기 표 5 내지 7에 나타내었다.

[표 5]

IL-6 생성량(pg/ml) (대조군 대비 억제율%)							
대조군	덱사메타존	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
427.5 ±42.7	53.6 ±3.7 (87.5)*	37.0 ±1.4 (91.3%)*	36.8 ±2.5 (91.4%)*	40.5±3.0 (90.5%)*	226.5 ±13.4 (47.0%)	212.0 ±23.0 (50.5%)	195.4 ±5.6 (54.3%)
* <0.05							

[표 6]

TNF-α 생성량(pg/ml) (대조군 대비 억제율%)							
대조군	덱사메타존	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독

11732 ±2557	5401 ±509 (54.0%)*	1295 ±346 (89.0%)*	1181 ±346 (89.9%)*	1908 ±125 (83.7%)*	7708 ±758 (34.3%)	6457 ±340 (45.0%)	4786±534 (59.2%)
* <0.05							

[표 7]

MCP-1 생성량(pg/ml) (대조군 대비 억제율%)							
대조군	덱사메타존	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
810.8 ±81.8	182.2 ±15.2 (77.5%)*	132.0 ±15.0 (81.0%)*	131.5 ±11.5 (83.8%)	164.0 ±22.3 (79.8%)	781.0 ±148.0 (3.7%)	801 ±150.0 (1.2%)	431.7 ±19.9 (46.7%)
* <0.05							

상기와 같이, 본 발명의 조성물은 IL-6, TNF-α, MCP-1 모두에 대하여 기존에 사용되고 있던 면역억제제인 덱사메타존보다 우수한 억제효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 비교예 1, 2 및 3의 조성물에 비해 본 발명의 조성물은 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-α 및 염증성 케모카인인 MCP-1 생성 억제율이 탁월하여, 염증 억제 및 치료효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

2-3) In vivo 항염 효과 확인

가) 카라기난으로 유도된 발바닥 부종 실험(carrageenan-induced paw ederma test)

웅성 Wistar 백서를 수일간 순화시킨 후 실험시작 전날부터 절식시키고 체중 측정을 하여 실험군을 나누었고, 본 발명의 RAH14-1, 2, 3 조성물을 체중당 400mg/kg 농도로 경구투여하였다. 그 다음 카라기난을 식염수에 용해시켜 뒷다리 좌측 발바닥에 피하 주사하여 염증을 유발하였다. 일정시간 간격으로 부피측정기(plethysmometer)를 이용하여 카라기난을 주사하지 않은 우측 발바닥과 좌측 발바닥의 부종 정도를 측정하였다. 이때 발바닥에 이물질이 묻지 않도록 주의하였다. 또한 양성대조군으로 셀레콕시브를 체중당 100 mg/kg 농도로 경구 투여하여 셀레콕시브의 효력을 100으로 하였을 때 RAH14-1, 2, 3 조성물의 상대 효력을 실험결과로 나타내었다.

[표 8]

셀레콕시브 대비 항염효과						
셀레콕시브	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
100	105.4	112.5	114.0	57	75	89

상기와 같이 발바닥 부종을 측정한 결과, RAH14-1, 2, 3 조성물을 경구투여한 군에서 기존에 사용되던 항염 치료제인 셀레콕시브를 경구투여한 군보다 좀더 우수한 부종 억제 효과를 보였다. 또한, 비교예 1, 2, 3에 비하여 항염효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

나) 크로톤 오일로 유도된 귀 부종실험(Croton oil-induced ear edema)

웅성 ICR 생쥐를 수일간 순화시킨 후 실험시작 4시간 전에 절식시킨 후 군을 나누었다. RAH14-1, 2, 3 조성물을 체중당 400 mg/kg 농도로 경구투여한 후 크로톤 오일을 아세톤에 용해시켜 생쥐의 우측 귀에 도포하여 염증을 유발하였다. 4시

간 후 캘리퍼를 사용하여 생쥐의 좌·우측의 귀 두께를 측정하였다. 좌측 귀의 두께를 기준으로 우측 귀의 부종률을 계산하였다. 또한 양성대조군으로 셀레콕시브를 체중당 100 mg/kg 농도로 경구 투여하여 셀레콕시브의 효력을 100으로 하였을 때 RAH14-1, 2, 3의 상대 효력을 실험결과로 나타내었다.

[표 9]

셀레콕시브 대비 항염효과						
셀레콕시브	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
100	114	112.5	114.0	59	68	70.7

상기와 같이 크로톤 오일로 유도된 귀 부종을 측정한 결과, RAH14-1, 2, 3을 경구투여한 군이 기존에 사용되던 항염 치료제인 셀레콕시브를 경구투여한 군과 유사한 염증 억제율을 보였다. 또한, 비교예 1, 2, 3에 비하여 항염효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

다) 코튼 펠렛 실험 (Cotton pellet test)

웅성 ICR 생쥐를 수 일간 순화시킨 후 실험시작 4시간 전에 절식시킨 후 군을 나누었다. 생쥐의 등 부위의 털을 제거한 후 RAH14-1, 2, 3 조성물을 체중당 400mg/kg 농도로 경구투여하고 1시간 후 에테르로 마취시켰다. 마취된 상태에서 등 부위를 알코올로 소독한 다음 세로로 약간 절개하고 절개 부위를 살균한 후 멸균된 일정 무게의 코튼 펠렛을 삽입하고 멸균 봉합사로 절개 부위를 꿰맨다. 7일 후에 생쥐를 에테르로 과마취사 시킨 후 등 부위에 삽입했던 코튼 펠렛을 분리하여 젖은 무게(wet weight)를 측정한 후 건조기에서 건조시켰다. 다음날 건조시킨 코튼 펠렛의 건조무게(dry weight)를 측정하여 코튼 펠렛의 젖은 무게 대비 건조 무게 비율(%)로 계산하였다. 양성대조군으로 셀레콕시브를 체중당 100mg/kg 농도로 경구 투여하여 셀레콕시브의 효력을 100으로 하였을 때 RAH14-1, 2, 3의 상대 효력을 실험결과로 나타내었다.

[표 10]

셀레콕시브 대비 항염효과						
셀레콕시브	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
100	114.2	110.0	109.5	75	56	87

상기와 같이 코튼 펠렛 실험으로 염증성 세포의 유입을 측정한 결과, RAH14-1, 2, 3을 경구투여한 군이 기존에 사용되던 항염 치료제인 셀레콕시브를 경구투여한 군과 유사한 염증 억제효과를 보였다. 또한, 비교예 1, 2, 3에 비하여 항염효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

라) 아세트산으로 유도된 혈관투과성 실험(Acetic acid-induced vascular permeability test)

웅성 ICR 생쥐를 수일간 순화시킨 후 실험시작 4시간 전에 절식시킨 후 군을 나누었다. RAH14-1, 2, 3 조성물을 체중당 400mg/kg 농도로 경구투여하고 일정 시간 후 식염수에 녹인 브릴리언트 블루(brilliant blue) 용액을 생쥐 꼬리 미정맥에 투여하고 일정 시간 후 물에 용해시킨 아세트산을 복강 내 투여하고 생쥐를 에테르로 과마취사하여 복강을 절개한 후 식염수로 복강을 세척하였다. 세척한 식염수를 원심 분리하여 상등액을 취한 후 수산화나트륨(NaOH) 용액을 넣고 흔든 다음 96 웰 플레이트에 옮겨 담고 엘리자 리더로 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 셀레콕시브를 체중당 100 mg/kg 농도로 경구 투여하여 셀레콕시브의 효력을 100으로 하였을 때 RAH14-1, 2, 3의 상대 효력을 실험결과로 나타내었다.

[표 11]

셀레콕시브 대비 항염효과						
셀레콕시브	RAH14-1	RAH14-2	RAH14-3	비교예 1 진피단독	비교예 2 진교단독	비교예 3 황련단독
100	100	99.5	99.6	79	78	88

상기와 같이 염증으로 인한 혈관 투과성을 측정한 결과, RAH14-1, 2, 3을 경구투여한 군이 기존에 사용되던 항염치료제인 셀레콕시브를 경구투여한 군과 유사하게 혈관투과성에 대한 효과를 나타내었다 . 또한, 비교예 1, 2, 3에 비하여 항염효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

상기 결과들은 본 발명에 따른 조성물이 진교, 진피, 황련 각각의 효과를 합산한 상가적 효과가 아니라 두 유효성분의 상승적인 효과의 확인이라 할 수 있다.

따라서 본 발명의 조성물은 염증 질환 치료에 관련된 약물 및 건강식품에 유용하게 사용될 수 있다.

[실시예3] 본 발명의 조성물의 간이 급성 독성 및 반복 독성 실험

1) 급성 독성 실험

웅성 ICR 생쥐를 실험 전날 저녁부터 절식하여 약물의 흡수가 용이하도록 하였고, 실험 당일 체중에 따라 군을 나누고 RAH14-1 조성물을 체중당 5 g/kg 농도로 경구투여하고 4시간 동안 행동에서의 이상 유무를 관찰하였다. 치사 개체가 발생하는 경우에는 즉각적으로 부검을 실시하였고, 치사개체가 발생하지 않더라고 약물 투여 다음날 에테르로 과마취사시켜 부검을 실시하여 대조군과 비교하여 장기에서의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

2) 반복 투여 독성 실험

웅성 ICR 생쥐를 실험 전날 저녁부터 절식을 하여 약물의 흡수가 용이하도록 하였고, 실험 당일 체중에 따라 군을 나누고 RAH14-1 조성물을 체중당 2 g/kg 농도로 경구투여하고 4시간 이상 동안 행동에서의 이상 유무를 관찰하고 5일간 약물을 경구 투여하였다. 치사 개체가 발생한 경우에는 즉각적으로 부검을 실시하였고, 치사개체가 발생하지 않더라도 약물투여 다음날 에테르로 과마취사 시켜 부검을 실시하여 대조군과 비교하여 장기에서의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

상기와 같이 실험한 결과 RAH14-1 조성물은 급성독성 실험과 반복투여 독성 실험에서 치사 개체가 발생하지 않았으며, 투여 시 부작용이나 부검 시 장기의 이상이 육안으로 관찰되지 않아 RAH14-1 조성물의 경구투여에 의한 독성은 발현되지 않는 것으로 나타났다.

발명의 효과

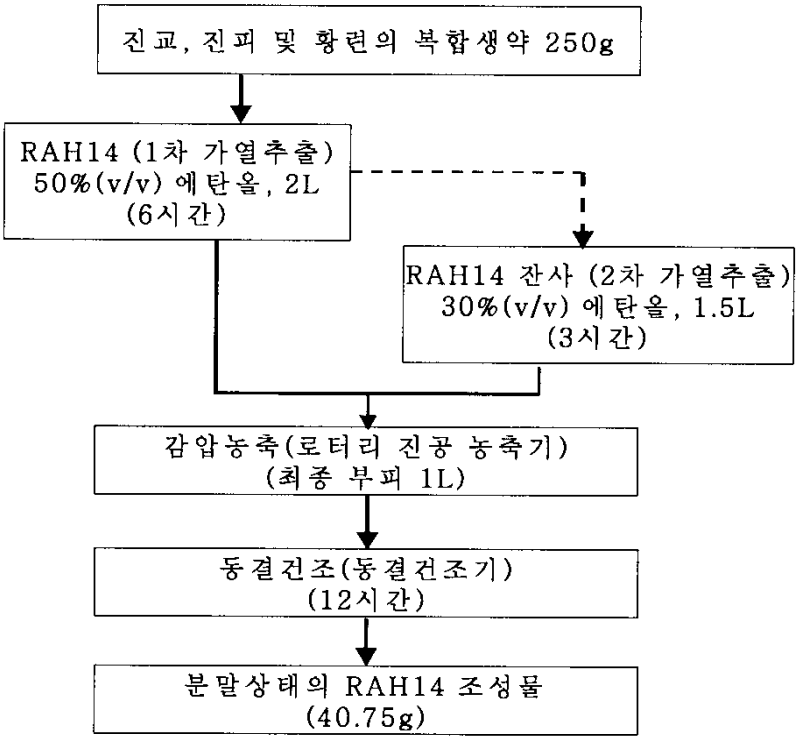
상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 조성물은 세포독성 없이 활성화된 면역세포의 증식을 억제하고, 염증 유발 사이토카인의 생성을 억제하며 부종을 억제하는 등 항염효과가 탁월하여 우수한 제IV형 알레르기 및 염증질환의 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 조성물의 제조단계를 나타낸 개략도이다.

도면

도면1


진교, 진피 및 황련의 복합생약 250g
RAH14 (1차 가열추출)
50%(v/v) 에탄올, 2L
(6시간)
RAH14 잔사 (2차 가열추출)
30%(v/v) 에탄올, 1.5L
(3시간)
감압농축(로터리 진공 농축기)
(최종 부피 1L)
동결건조(동결건조기)
(12시간)
분말상태의 RAH14 조성물
(40.75g)