



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0015676
(43) 공개일자 2016년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/37 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0098221

(22) 출원일자 2014년07월31일

심사청구일자 2014년07월31일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

안동현

부산광역시 남구 분포로 111, LG메트로시티아파트
203동 2202호

김꽃봉우리

부산광역시 사하구 낙동대로355번길 23, 크로바맨
션 109호

김민지

부산광역시 기장군 일광면 이천10길 37, 가화일광
타워 102동 2002호

(74) 대리인

특허법인 하나

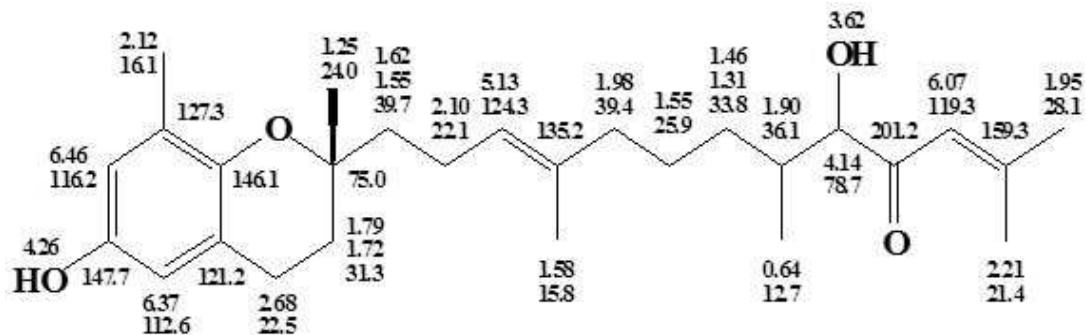
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 항아토피 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 IFN- γ 및 IL-4의 분비량을 80% 이상 감소시킴으로써 아토피의 예방 및 치료에 효과적이다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345204021

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 해산식물 유래 향노화 소재 개발 및 분리작용 메커니즘

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

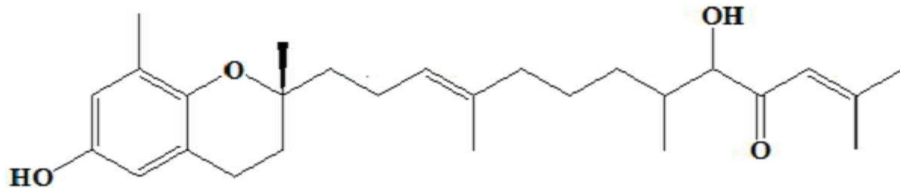
연구기간 2012.09.01 ~ 2021.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

외톨개 모자반 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 아토피 예방 또는 치료용 조성물의 제조 방법으로,

- (1) 외톨개 모자반으로부터 모자반크로마놀 b를 추출하는 단계;
- (2) 모자반크로마놀 b를 추출물을 여과하는 단계; 및
- (3) 모자반크로마놀 b를 추출물을 동결 건조 하는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 추출은 열수추출법, 용매추출법, 초임계추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법 및 압착법으로 이루어진 군으로부터 1종 이상을 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 단계 (1)은 C1 내지 C4의 저급 알코올을 이용하여 외톨개 모자반 조추출물을 수득하는 단계; 및 상기 외톨개 모자반 조추출물을 비극성 용매를 이용하여 외톨개 모자반 비극성 용매 가용성 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 비극성 용매는 n-헥산 (n-hexane), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate) 및 부탄올 (butanol)로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 제조 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

모자반크로마놀 b 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (Silica gel column chromatography), 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피 (Sephadex LH-20 column chromatography), 얇은 박막 크로마토그래피 (TLC, Thin Layer chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High performance liquid chromatography)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 방법으로 정제하는 단계를 더욱 포함하는 것인, 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 외톨개 모자반 추출물로부터 분리한 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 IFN- γ 및 IL-4의 분비량을 80% 이상 감소시킴으로써 아토피의 예방 및 치료에 효과적이다.

배경기술

[0002]

아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 주로 유아와 소아기에 발병하며 호전과 악화를 반복하는 비교적 흔한 질병으로 개인 가족력, 심한 가려움증 및 습진의 3가지 특징으로 진단할 수 있으며, 감염이나 정신적 스트레스, 계

절과 기후변화, 자극 및 알레르기 반응에 의해 악화될 수 있다. 주로 비정상적인 피부혈관 반응과 면역학적 반응을 동반하고 홍반, 부종, 소양증, 피부 건조증, 습진을 동반하는 피부질환이다. 특히 5세 이하의 영, 유아에서 높은 발생 빈도를 보이며, 약 10-20%의 유병률을 지니는 것으로 알려져 있고, 일반적으로 성인이 되면서 감소하는 것으로 나타나고 있으나, 성인에서도 1-3%의 유병률이 나타나는 것으로 알려져 전체 인구의 약 2-5%가 아토피 피부염을 앓고 있는 것으로 나타났다.

[0003] 아토피 피부 질환의 정확한 병태생리는 아직까지 명확하게 밝혀진 바 없으나, 현재까지의 연구에 의하면 immunoglobulin E (IgE) 항체의 증가에 따른 고감작 반응에 의하거나, 세포 매개성 면역기능의 저하로 나타나는 T 림프구의 불균형 분화 및 피부 아드레날린 수용체의 차단 등이 원인으로 추정되고 있다.

[0004] 상기와 같이 현재까지 알려진 아토피 피부염의 병인, 기전, 증상을 감안하여 아토피 피부염에 대한 치료제가 개발되고 있으나, 기존의 아토피 피부염에 대한 치료제로 사용되는 스테로이드제제와 항히스타민제 등은 증상을 일시적으로 완화시켜주는 효과는 있으나, 다양한 알레르기와 아토피 등의 아토피 반응 기전에 복합적으로 작용하지 못하는 단점을 가지고, 국소 및 전신 부작용으로 인해 임상적으로 문제가 되고 있어 이러한 단점을 보완하고 근본적으로 아토피 증상을 치료할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 천연물로부터 분리 및 정제된 물질은 비교적 독성이 적어 의약품에 비해 장기 섭취에도 안전하여 최근 천연물로부터 효과적이고 부작용이 적은 치료제를 찾기 위한 연구가 시도되고 있으며, 현재 천연물을 이용한 아토피성 염증 반응 완화에 대한 연구로는 단삼, 다래, 참소리쟁이, 뱀딸기, 먼나무, 파프리카, 더덕 발효 추출물 등으로 육상식물 및 한약재가 주를 이루고 있다.

[0006] 한편, 지구 표면의 약 70%를 차지하는 해양에는 육상 생물과는 다른 대사작용과 생체 방어계를 가진 다양한 해양 생물이 서식하고 있다. 그 중 해조류는 다량의 무기질과 비타민이 함유되어 있고, 다당류의 함량이 높아 체내 중금속 제거 효과도 탁월하며, 또한 높은 페놀 함량과 유리 라디칼 소거능을 통한 항산화 효과를 가지는 등 여러 가지 생리 활성을 가지는 것으로 알려져 현재 여러 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다.

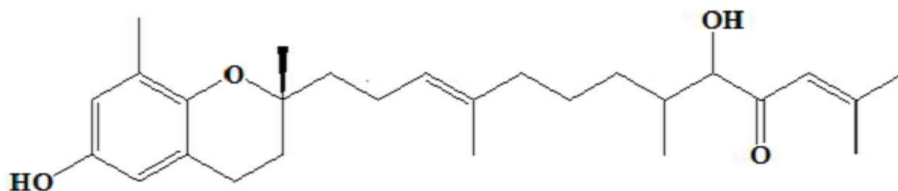
[0007] 외톨개 모자반(Myagropsis myagroides)은 모자반과에 속하는 갈조류로 다년생이며 봄에 성숙하고 주로 우리나라 남해안과 일본에 서식한다. 현재까지 외톨개 모자반에 대한 연구로는 항고혈압활성, 간손상보호, 항응혈성 효과 등이 보고된 바 있으나, 아토피와 같은 면역 질환에 대한 연구는 미비한 실정이다.

발명의 내용

[0008] 이에, 본 발명자들은 이제까지 알려지지 않은 천연물들에 있어서 아토피의 예방 및 치료에의 유용성을 검토한 결과, 천연생물자원인 외톨개 모자반을 선정하고, 이로부터 추출된 모자반크로마놀 b가 IFN- γ 및 IL-4의 분비량을 감소시킴으로써 아토피의 예방 및 치료에 매우 효과적임을 발견하게 되었다.

[0009] 본 발명의 제1측면에 따르면, 외톨개 모자반 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물이 개시된다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 본 발명의 제2측면에 따르면,

- [0013] a) 외톨개 모자반으로부터 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 추출하는 단계;
- [0014] b) 모자반크로마놀 b를 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0015] c) 모자반크로마놀 b를 추출물을 동결 건조 하는 단계를 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물에 사용하기 위한 모자반크로마놀 b 추출물의 제조 방법이 개시된다.

[0016] 본 발명의 제3측면에 따르면, 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물의 약제학적 조성물, 식품 조성물, 또는 건강기능식품으로서의 용도가 개시된다.

[0017] 본 발명의 제4측면에 따르면, 포유동물에게 50 μ g/mL 내지 300 μ g/mL 농도의 모자반크로마놀 b를 투여하는 것을 포함하는 아토피의 예방 또는 치료방법이 개시된다.

[0018] 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b 추출물은 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 IFN- γ 분비 억제 효과 및 IL-4의 분비 억제 효과를 가지므로, 아토피의 예방 및 치료를 위한 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 외톨개 모자반 n-헥산층으로부터 활성 물질의 분리 및 정제 과정의 모식도를 나타낸다.
- 도 2는 외톨개 모자반 용매별 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN- γ 분비량을 나타낸다.
- 도 3은 외톨개 모자반 용매별 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량을 나타낸다.
- 도 4는 n-헥산 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN- γ 분비량을 나타낸다.
- 도 5는 n-헥산 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량을 나타낸다.
- 도 6은 TLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN- γ 분비량을 나타낸다.
- 도 7은 TLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량을 나타낸다.
- 도 8은 HPLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN- γ 분비량을 나타낸다.
- 도 9는 HPLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량을 나타낸다.
- 도 10은 외톨개 모자반으로부터 분리된 화합물 모자반크로마놀 b의 화학구조 및 ¹H NMR, ¹³C NMR 피크를 나타낸다.
- 도 11은 모자반크로마놀 b 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN- γ 분비량을 나타낸다.
- 도 12는 모자반크로마놀 b 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0021] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"는 제한적이지 않다.

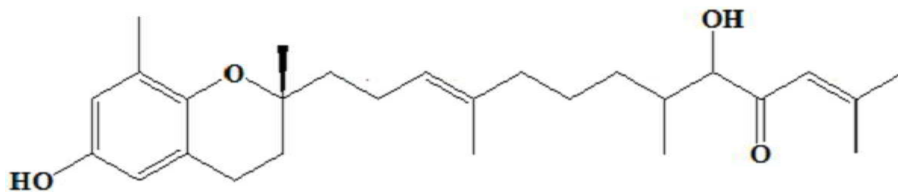
[0022] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0023] 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0024] 1. 아토피 예방 또는 치료용 조성물

[0025] 제1구현예에 따르면, 외톨개 모자반 추출물로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된 용어 "아토피(atopy)" 또는 "아토피 증후군"은 알레르기 항원에 대한 직접 접촉 없이 신체가 극도로 민감해지는 알레르기 반응을 의미한다. 아토피의 증상으로는 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염 및 천식이 포함될 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 아토피가 억제되거나 진행이 지연되는 모든 행위를 의미한다.

[0030] 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 아토피의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 위한다.

[0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "외톨개 모자반"은 해조류 갈조류 길조식물문 이형세대강 원포자강 모자반목 모자반과에 속하는 2년생 해조로서, 체색은 적색을 띤 황색이며 저조선 부근의 바위에 분포하고, 키틴, 키토산 및 불포화지방산을 다량 함유하는 것으로 알려져 있다.

[0032] 상기 구현예에 따르면, 외톨개 모자반 추출물은 외톨개 모자반을 C1 내지 C4의 저급 알콜로 추출한 외톨개 모자반 조추출물일 수 있다. 바람직하기는, 상기 외톨개 모자반 추출물은 외톨개 모자반 메탄올 추출물일 수 있다.

[0033] 상기 구현예에 따르면, 외톨개 모자반 추출물은 외톨개 모자반 조추출물을 n-헥산 (n-hexane), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate) 및 부탄올 (butanol)로 이루어진 군으로부터 선택된 비극성 용매로 추출한 외톨개 모자반 비극성 용매 가용성 추출물일 수 있다. 바람직하기는, 상기 외톨개 모자반 추출물은 외톨개 모자반 n-헥산 추출물일 수 있다.

[0034] 2. 아토피 예방 또는 치료용 조성물의 제조 방법

[0035] 제2구현예에 따르면, 화학식 1로 표시되는 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법이 제공된다. 상기 제조방법은:

[0036] (1) 외톨개 모자반으로부터 모자반크로마놀 b를 추출하는 단계;

- [0037] (2) 모자반크로마놀 b를 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0038] (3) 모자반크로마놀 b를 추출물을 동결건조 하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 구현예에 따르면, 추출단계는 (a) C1 내지 C4의 저급 알콜을 이용하여 외톨개 모자반 조추출물을 수득하는 단계; 및 (b)상기 외톨개 모자반 조추출물을 비극성 용매를 이용하여 외톨개 모자반 비극성 용매 가용성 추출물을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 추출단계는 열수추출법, 용매추출법, 초임계추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법 및 압착법으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 C1 내지 C4의 저급 알콜을 메탄올, 에탄올 또는 부탄올, 바람직하기는 메탄올을 포함할 수 있다. 상기 C1 내지 C4의 저급 알콜과 외톨개 모자반은 1:1 내지 20:1의 부피비, 바람직하기는 10:1의 부피비로 혼합될 수 있다.
- [0042] 상기 비극성 용매는 조추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올, 바람직하기는 n-헥산을 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 구현예에 따르면, 외톨개 모자반으로부터 추출된 모자반크로마놀 b는 여과 단계 및 동결 건조 단계에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [0044] 상기 구현예에 따르면, 상기 동결 건조된 모자반크로마놀 b 추출물은 추가 정제될 수 있다. 상기 정제방법은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (Silica gel column chromatography), 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피 (Sephadex LH-20 column chromatography), 얇은 박막 크로마토그래피 (TLC, Thin Layer chromatography), 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High performance liquid chromatography)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기에서 수득된 모자반크로마놀 b 추출물의 항아토피 활성을 확인하기 위하여, 외톨개 모자반 메탄올 추출물의 마우스 비장세포에 대한 IFN- γ 및 IL-4 사이토카인 분비량에 대한 억제 효과를 알아본 결과, 상기 구현예에 따른 모자반크로마놀 b 추출물을 포함하는 조성물이 IFN- γ 및 IL-4의 분비를 억제함을 확인하였다.
- [0046] **3. 아토피 예방 또는 치료용 조성물의 용도**
- [0047] 제3구현예에 따르면, 외톨개 모자반 추출물로부터 분리한 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물의 약제학적 조성물, 식품 조성물, 또는 건강기능식품으로서의 용도가 제공된다.
- [0048] 상기 구현예에 따르면, 약제학적 조성물은 투여를 위해서 본 발명에 따른 유효성분 모자반크로마놀 b 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제제화될 수 있다.
- [0049] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제, 흡입제 또는 주사 가능한 액제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위한 유효성분으로서 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커겐스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트 또는 소듐 클로라이드를 포함할 수 있다. 붕해제는 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트 또는 잔탄 겔을 포함할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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. 또

한 회석제, 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 제제화 할 수 있다.

[0050] 상기 구현예에 따르면, 식품 조성물은 투여를 위해서 본 발명에 따른 유효성분 모자반크로마놀 b 이외에 추가로 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 천연 탄수화물 또는 향미제를 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 예를 들면 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들면 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들면 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들면 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들면, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 식품 조성물은 모자반크로마놀 b 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (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. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명의 유효성분인 모자반크로마놀 b는 천연물질로서 인체에 독성 및 부작용은 거의 없으므로 아토피의 예방 및 치료 목적으로 장기간 흡입 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0054] 상기 구현예에 따르면, 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 식품 첨가물 공전에 수재된 품목으로는 예를 들면, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 포함할 수 있다.

[0055] 예를 들면, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 모자반크로마놀 b를 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 모자반크로마놀 b를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 백운풀 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 모자반크로마놀 b 이외에 부형제, 결합제, 봉해제를 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 모자반크로마놀 b와 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0056] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 또는 건강보조식품류를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] **4. 아토피 예방 또는 치료 방법**

- [0058] 제4구현예에 따르면, 포유동물에게 50 $\mu\text{g/mL}$ 내지 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 모자반크로마놀 b를 투여하는 것을 포함하는 아토피 예방 또는 치료방법이 제공된다.
- [0059] 본 명세서에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간을 포함할 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 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.
- [0061] 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 50 $\mu\text{g/mL}$ 내지 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 모자반크로마놀 b를 1일 1회 내지 수회 투여시, 1mg/kg 내지 250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0062] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 모자반크로마놀 b를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 복강내, 국소, 피내, 흡입 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] <실시예>
- [0065] 실시예 1. 외톨개 모자반 추출물의 제조
- [0066] 본 실험에 사용된 외톨개 모자반(Myagropsis myagroides)은 부산 송정에서 채취한 것으로 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후, 이를 분말화 하고 진공 포장하여 -20°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다.
- [0067] 분말 상태의 외톨개 모자반에 메탄올 (methanol)을 가한 후 셰이커 (shaker: H-0802, Dongwon science co., Busan, Korea)로 실온에서 24시간 동안 교반하여 추출하였다. 이를 원심분리기 (UNION 32R, Hanil., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하고 잔사는 동일한 방법으로 10배의 메탄올을 가해 2회 반복 추출하였다. 추출한 상층액은 여과지로 여과하여 회전 증발기 (Rotary evaporator: RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 37°C 에서 건조하였다. 건조된 시료는 -20°C 에서 보관하며 실험에 사용하였다.
- [0068] 실시예 2. 마우스 비장세포 분리 및 배양
- [0069] 생후 6주령의 암컷, BALB/c 마우스를 오리엔트바이오 (Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 예비사육한 후 실험에 이용하였다.
- [0070] 마우스를 경추탈골법으로 희생시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장은 RPMI 1640 배지로 세척한 후, 조직마쇄기 (tissue grinder)로 균질화하여 세포를 유리시켰다. 세포 현탁액을 4°C , 1,800 rpm에서 5분간 원심분리 한 후, RBC lysis 버퍼 (Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH_4Cl , pH 7.2)에 10분간 정치시켜 적혈구를 제거하였다. 그 후, 10% FBS-RPMI 1640 배지를 첨가하여 2×10^6 cells/mL 농도로 희석된 비장세포 현탁액에 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), concanavalin A (ConA, 3 $\mu\text{g/mL}$) 및 외톨개 모자반 메탄올 추출물 및 각 분획물을 농도별(50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 첨가하여 37°C , 5% CO_2 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 72시간 배양하였다.
- [0071] 실시예 3. 마우스 비장세포의 cytokine 분비량 측정

[0072] 상기 제조에 2에 따른 비장세포 배양액을 2,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 (Micro 17RT, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 분리한 후, ELISA-키트 (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 IFN- γ 및 IL-4 항체를 분주하여 코팅시키고, 10% FBS 용액으로 블로킹하였다. 배양액을 넣고 비오틴이 부착된 항-마우스 (biotinylated anti-mouse) IFN- γ , IL-4 항체와, 비오틴과 결합할 수 있는 스트렙타비딘 (streptavidin)이 부착된 스트렙타비딘 호스라디쉬 페록시다아제 컨쥬게이트 (streptavidin horseradish peroxidase conjugate)를 순차적으로 첨가하였다. OPD (σ -pheylenediamine) 용액을 첨가하여 암반응 시킨 후, 마이크로플레이트 리더기 (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0073] <실험예>

[0074] 실험예 1. 외톨개 모자반의 추출 용매에 따른 항아토피 활성 평가

[0075] (1) 용매별 계통분획

[0076] 외톨개 모자반 메탄올 추출물을 농축하여 메탄올을 제거한 후, 극성이 낮은 용매에서 높은 용매 순으로 순차적으로 분배 추출하였다. 즉, n-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 butanol을 이용하여 분배 추출하였으며 비극성 용매의 경우, magnesium sulfate를 부가하여 용매 층의 수분을 제거하였다. 각 추출물을 농축하여 무게를 측정한 결과, hexane 층 13 g, chloroform 층 11 g, ethyl acetate 층 0.5 g 및 butanol 층 4.4 g이었다. 이를 도 1에 나타내었다.

[0077] (2) 항아토피 활성 측정

[0078] 상기 외톨개 모자반 메탄올 추출물 및 용매별 분획물을 ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 농도로 처리한 후, IFN- γ 및 IL-4 분비 억제 효과를 측정하였다. 그 결과를 도 2 및 3에 나타내었다.

[0079] 도 2 및 3으로부터 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 외톨개 모자반 메탄올 추출물 및 용매별 분획물이 IFN- γ 및 IL-4의 분비를 효과적으로 억제한다는 것이 확인되었다. 그 중에서도, n-헥산 추출물을 100 μ g/mL의 농도로 처리한 경우, IFN- γ 및 IL-4의 분비를 모두 약 98% 이상 억제함으로써, 가장 우수한 효과를 가짐이 확인되었다.

[0080] 실험예 2. 외톨개 모자반의 정제 방법에 따른 항아토피 활성 평가

[0081] (1) 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 분획물

[0082] 상기 실험예 1에 따른 n-헥산 분획물을 각각 클로로포름 (chloroform)과 메탄올 (methanol)을 용매계로 하여 비율별(100:1, 50:1, 20:1, 5:1, 1:1)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 분획물을 획득하였다. 그 다음, ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 농도로 처리한 후, IFN- γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 측정하였다. 그 결과를 도 4 및 5에 나타내었다.

[0083] 상기 도 4 및 5로부터 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 외톨개 모자반 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 분획물이 IFN- γ 및 IL-4의 분비를 약 98% 및 52% 억제한다는 것이 확인되었다. 그 중에서도, 클로로포름과 메탄올을 용매 50:1로 하여 분획한 경우, 가장 우수한 효과를 가짐이 확인되었다.

[0084] (2) 박막 크로마토그래피 분획물

[0085] 상기 실험예 2에서 가장 높은 항아토피 활성을 나타낸 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 50:1 분획물을 박막 크로마토그래피(헥산-에틸아세테이트 = 2:1, v/v)를 이용해 6개의 분획물을 얻었다. ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 농도로 처리한 후, IFN- γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 측정하였다. 그 결과를 도 6 및 7에 나타내었다.

[0086] 도 6 및 7로부터 알 수 있듯이, 박막 크로마토그래피를 이용한 6개의 분획물 중에서 4번 분획물이 가장 우수한 IFN- γ 효과가 있음이 확인되었다.

[0087] (3) 고성능 액체 크로마토그래피 분획물

[0088] 실험예 3에서 가장 높은 항아토피 활성을 나타낸 4번 분획물을 HPLC(ODS column i.d. 4.6 x 150 mm, 50→100%

메탄올 gradient, 1 ml/min)를 이용해 6개의 peak를 얻었다. ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 농도로 처리한 후, IFN- γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 측정하였다. 그 결과를 도 8 및 9에 나타내었다.

[0089] 도 8 및 9로부터 알 수 있듯이, 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 6개의 분획물 중에서 4-3번 분획물이 가장 우수한 IFN- γ 및 IL-4억제 효과가 있음이 확인되었다.

[0090] 실험예 3. 모자반크로마놀 b의 구조 및 이의 항아토피 활성 평가

[0091] (1) 모자반크로마놀 b의 구조 확인

[0092] 상기 실험예 2(3)에서 가장 높은 항아토피 활성을 나타낸 4-3번 분획물을 preparative HPLC(ODS 칼럼, i.d. 10 x 150 mm, 75% 메탄올, 3 ml/min)로 분취하여 38분대의 peak를 정제하여 NMR을 이용해 구조동정한 후, 이를 도 10에 나타내었다. 이를 모자반크로마놀 b로 명명하였다.

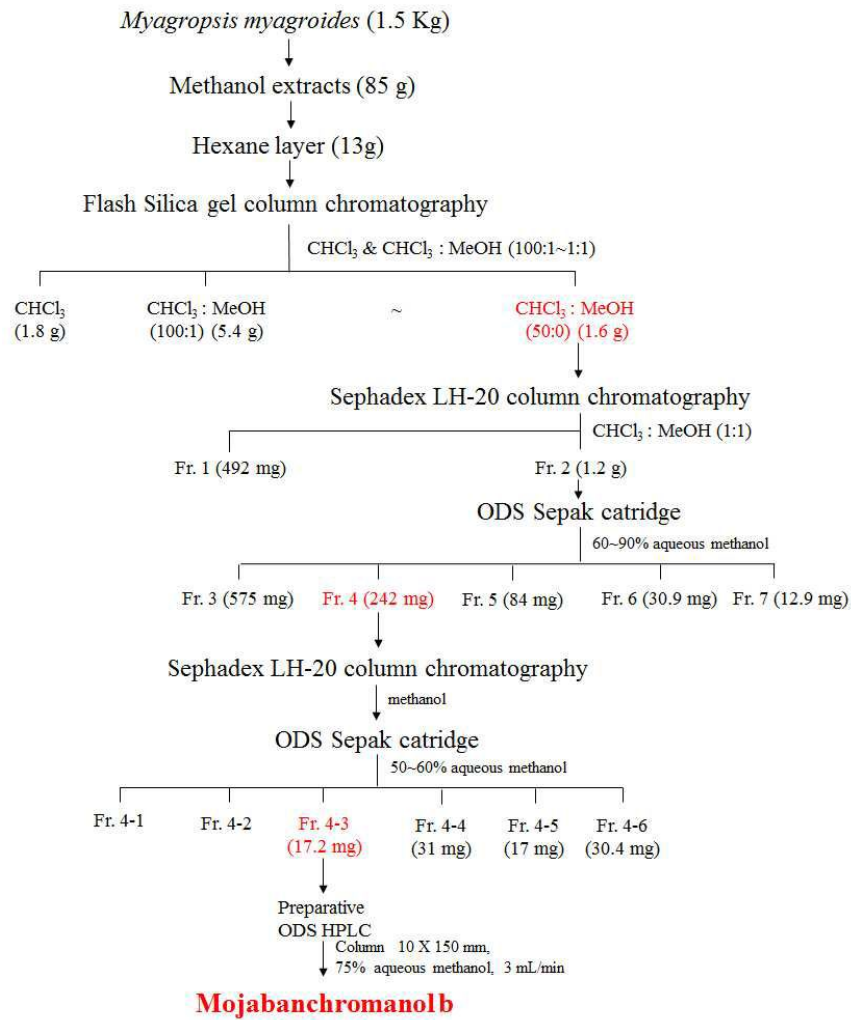
[0093] (2) 모자반크로마놀 b의 항아토피 활성 평가

[0094] 모자반크로마놀 b의 아토피 억제 활성을 측정하기 위해 ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 농도로 처리한 후, IFN- γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 측정하였다. 그 결과를 도 11 및 12에 나타내었다.

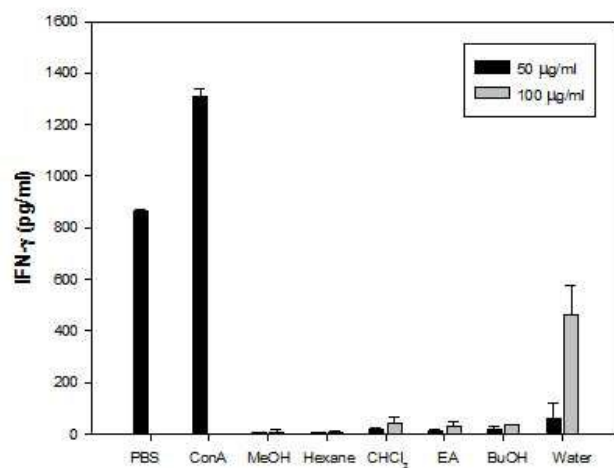
[0095] 도 11 및 12로부터 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 모자반크로마놀 b가 IFN- γ 및 IL-4 분비를 각각 100% 및 89% 억제함으로써, 매우 우수한 항아토피 효과를 가짐이 확인되었다.

도면

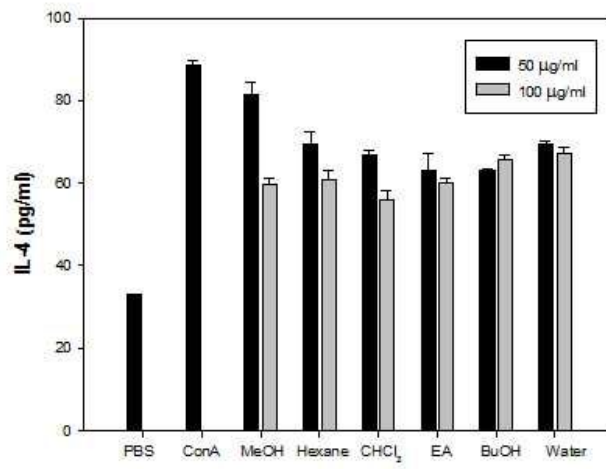
도면1



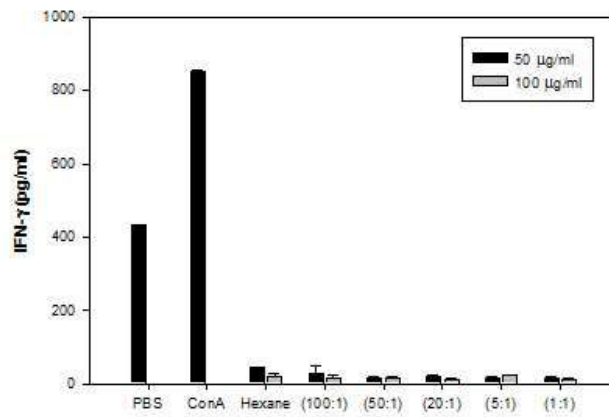
도면2



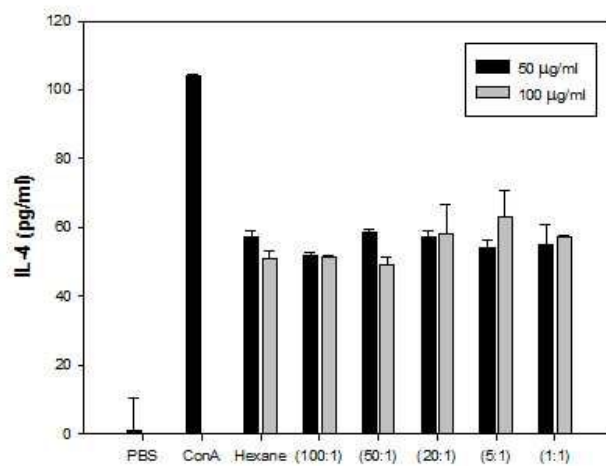
도면3



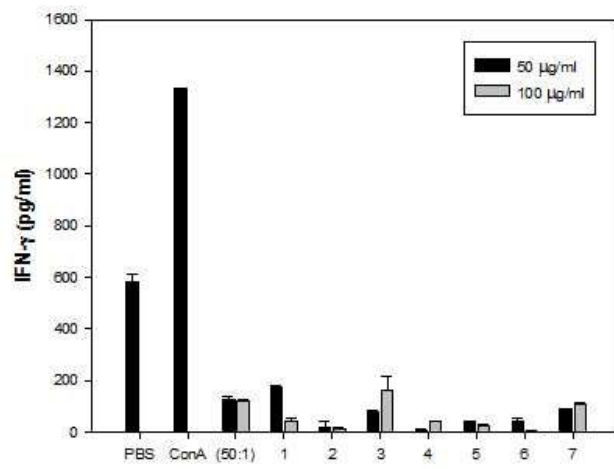
도면4



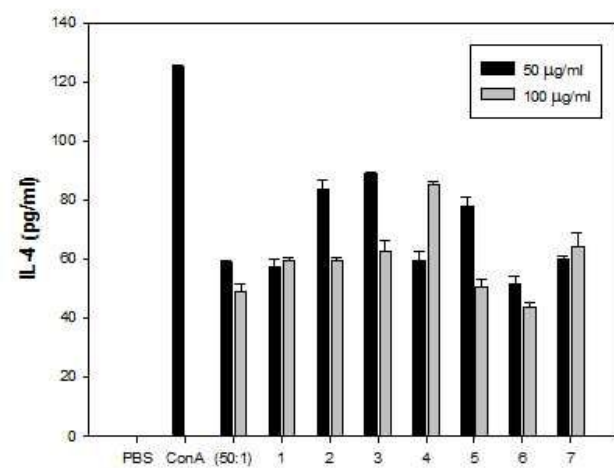
도면5



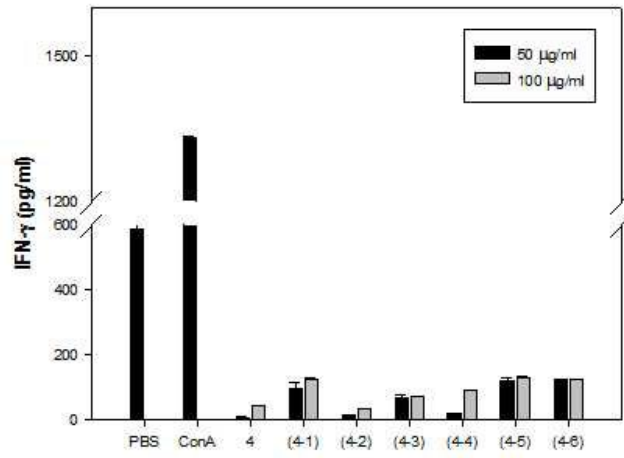
도면6



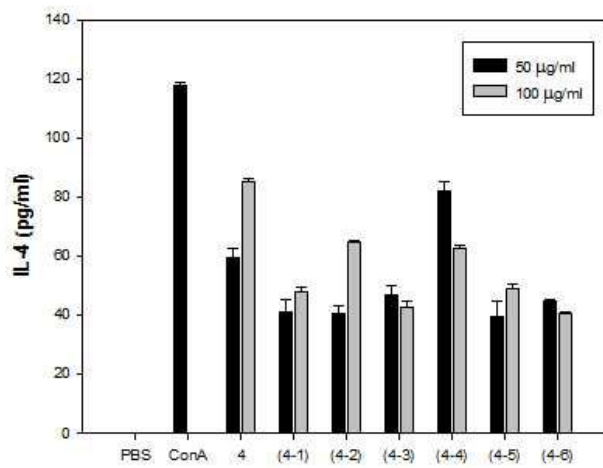
도면7



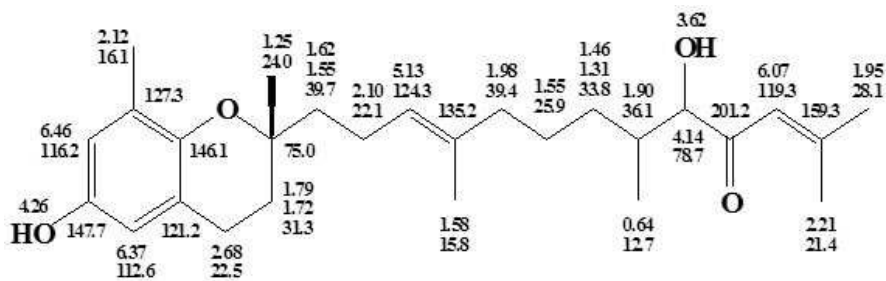
도면8



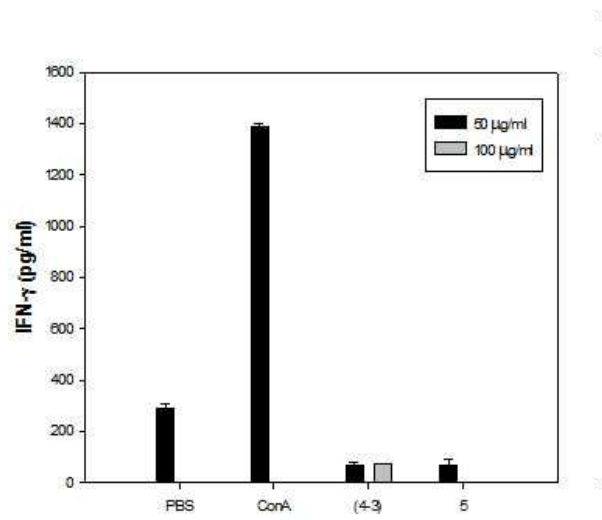
도면9



도면10



도면11



도면12

