

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2015/160219 A1

(43) 국제공개일
2015년 10월 22일 (22.10.2015)

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/22 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003881
- (22) 국제출원일: 2015년 4월 17일 (17.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0046105 2014년 4월 17일 (17.04.2014) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 오세량 (OH, Sei Ryang); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 안경섭 (AHN, Kyung Seop); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김승형 (KIM, Seung Hyung); 300-716 대전시 동구 대학로 62 대전대학교 동서생명과학연구원, Daejeon (KR). 신인식 (SHIN, In Sik); 305-806 대전시 유성

구 과학로 125, Daejeon (KR). 금항 (JIN, Hang); 650000 운남성 곤명시 오후구 백운로 761번지 7동 501호, Yunnan (CN). 김정희 (KIM, Jung Hee); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 류형원 (RYU, Hyung Won); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이만익 (LI, Wan Yi); 650000 운남성 곤명시 오후구 백운로 761번지 4동 601호, Yunnan (CN). 이상우 (LEE, Sang Woo); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이종구 (LEE, Joong Ku); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 최상호 (CHOI, Sang Ho); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

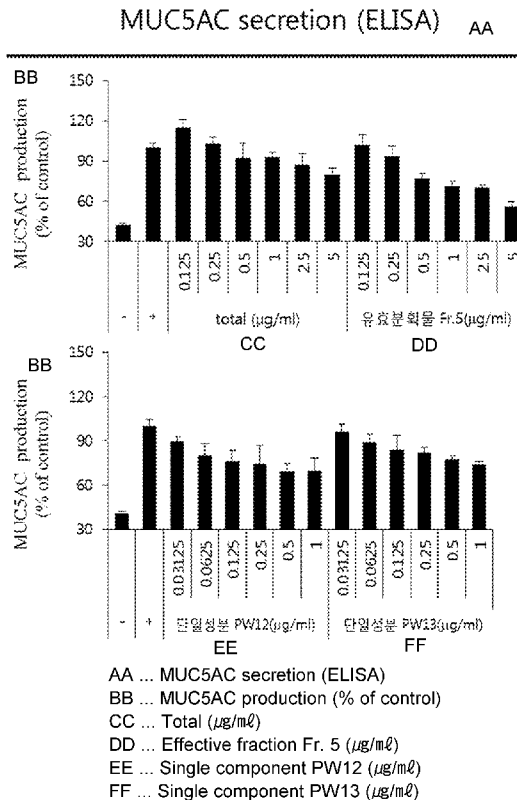
(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163, STX R&D 센터 6층 (한얼국제특허사무소), Seoul (KR).

(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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING *PISTACIA WEINMANNIFOLIA* EXTRACT, FRACTION OF SAME OR COMPOUND SEPARATED FROM SAME FOR PREVENTING OR TREATING CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)

(54) 발명의 명칭 : 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환(COPD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising a *Pistacia weinmannifolia* extract, a fraction of same or a compound separated from same for suppressing chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and, more particularly, to a pharmaceutical composition comprising a *Pistacia weinmannifolia* extract, a fraction of same or a compound separated from same for preventing or treating COPD, to a food composition for preventing or remedying COPD, and to the separated compound. The composition comprising a *Pistacia weinmannifolia* extract, a fraction of same or a compound separated from same, according to the present invention, is not toxic, suppressed the infiltration of inflammatory cells into the bronchial tube of a COPD-induced animal model, and effectively suppressed the expression of CXCL-1, TNF- α or MIP-2. In addition, by using proven safe medicinal plant as material, the present invention has the advantage of relieving various side effects of existing therapeutic agents for COPD, chronic obstructive bronchitis, chronic bronchiolitis, emphysema, multiple sclerosis and acute and chronic inflammation, and thus can be utilized as a composition for preventing, treating and remedying COPD.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/160219 A1



LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 상기 분리된 화합물에 관한 것이다. 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 조성물은 독성을 나타내지 않으며, 만성폐쇄성 폐질환 유도 동물 모델에서 기관지 내 염증세포 침윤을 억제할 뿐만 아니라, CXCL-1, TNF- α 또는 MIP-2의 발현을 억제하는 효과가 우수하였다. 또한, 안전성이 입증된 식물 생약을 원료로 함으로써 기존 COPD, 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 염증에 대한 치료제의 각종 부작용을 해소할 수 있는 장점이 있어 만성폐쇄성 폐질환 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물
또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 만성폐쇄성
폐질환(COPD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 상기 분리된 화합물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 천식과 함께 대표적인 폐질환의 하나인 만성폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)은 비가역적인 기도의 폐색을 동반한다는 점에서 천식과 다르며 현재 세계 사망률 4위를 차지하고 있고, 10대 질환 중 유일하게 그 발병률이 증가하는 중요한 질환이다. COPD는 기도 및 폐실질 염증에 의한 세기관지 및 폐실질의 병리학적 변화에 의해 발생하는 병으로, 폐쇄성 세기관지염 및 폐기종(폐실질 파괴)을 특징으로 한다.

만성폐쇄성폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease)의 종류에는 만성폐쇄성기관지염(Chronic obstructive bronchitis), 만성세기관지염(Chronic bronchiolitis) 및 폐기종(Emphysema)이 있다. COPD 원인 중 흡연은 가장 중요한 원인으로 생각되고 있다. 흡연은 폐 조직내 강한 독성물질로 작용하여, 산화물질, 전염증인자 및 화학주성인자의 생성을 촉진하게 되고, 이는 호중구와 같은 염증세포들의 과도한 이주를 촉진하게 된다. 폐 조직내로 이동된 염증세포는 역시 많은 염증성 매개물질을 분비하게 되어 폐 조직내 염증을 더욱 악화시키게 된다. 이러한 염증반응을 촉진하는 매개물질로는 TNF- α , MIP-1, CXCL-1 등이 주로 알려져 있으며, 담배연기로 인한 염증반응시 중요한 Marker로써 활용되고 있다. 현재 만성폐쇄성 폐질환에 사용되는 치료물질은 폐 조직내 염증을 개선하는 것을 중점적으로 개발되어 오고 있으며, 주로 스테로이드제제, 항염제 등이 사용되고 있다. 그러나 이러한 치료물질들은 면역억압 및 내성 등의 다양한 부작용을 야기하여 장기간 치료가 필요한 만성폐쇄성 폐질환 환자에게는 부적합하다.

[3]

- [4] 지금까지 천식을 비롯한 COPD의 경우 염증성 질환의 치료를 위해 항염증 작용이나 기관지확장 효과를 갖는 치료제를 이용하여 왔다. 그런 기존의 상당수 치료제들은 많은 부작용으로 사용시 주의를 요하고 있다. 대표적인 치료제는

글루코코르티코이드 (glucocorticoid), 루코트리엔 모디파이어(leukotriene modifiers), 테오필린(theophylline) 등이 있다. 글루코코르티코이드(glucocorticoid)는 효과 면에서는 강력하나 선택적으로 작용하는 것이 아니라 모든 면역반응과 항염증반응을 억제하기 때문에 경우에 따라서 필요한 면역반응까지 억제하는 문제점이 있으며, 약물부작용이 문제가 되어 흡입 치료를 시행하고 있다. 루코트리엔 모디파이어 (leukotriene modifiers)는 부작용은 적지만 효과 면에서 한계가 있어 단독으로 사용 시에는 천식을 조절할 수 없어, 대부분 보조적으로 사용하고 있는 문제점이 있다. 테오필린(theophylline)은 효과 면에서도 뛰어나지 못하며 부작용의 우려가 있는 문제점이 있다. 코르티코스테로이드 (corticosteroid) 제제는 뛰어난 치료 효과를 나타내지만 장기적으로 사용할 경우 용량과 사용시간에 비례하여 부신 억제, 골밀도 감소, 성장 장애, 눈과 피부의 합병증, 콜라겐의 합성 증가 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 살메테롤 (salmeterol)과 포르메테롤 (formeterol)과 같은 지속성 베타-2 길항제 (beta-2 agonist)는 발작에 대해 예방 효과를 나타내지만 경우에 따라서는 환자를 사망케 할 수도 있다고 경고된 바 있다. 이와 같은 다양한 부작용들로 인해 종래의 염증성 질환의 치료제들은 그 사용에 있어 신중한 고려가 필요하며, 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 이를 위해서는 COPD의 발생기전에 대한 정확한 이해가 필요하다.

[5] 한편, COPD와 관련하여 현재까지 정확한 발생기전은 거의 알려져 있지 않으며, 여러 가지 치료방법이 사용되고 있으나 발병 및 경과 진행을 근본적으로 치료할 수 있는 약제는 없는 실정이다. 따라서 COPD의 병인 기전 연구 및 이에 근거한 근본적 약제 개발이 절실한 실정이다.

[6] 다만, 최근 COPD와 관련한 연구논문에서는 MIP-2, CXCL-1과 같은 염증세포의 이주를 촉진하는 화학주성인자들이 COPD의 발병 및 발달에 있어 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다 (Lomas-Neira et al., 2005; Moriyama et al., 2010). COPD의 진행에 있어, MIP-2와 CXCL-1 같은 케모카인은 기도상피세포, 폐포세포 및 염증세포의 수용체와 결합하여 화학주성 효과를 나타내며, 폐 조직내 염증부위로 과도한 염증세포의 침윤을 유발하게 된다. 또한 케모카인은 염증세포를 활성화시켜, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 등과 같은 전염증인자들을 생산하여하게 되며, 특히 TNF- α 의 경우 NF- κ B, MAPK 등과 같은 염증성 신호전달체계를 활성화시켜 염증반응을 더욱 악화시킨다. 또한 케모카인은 전염증인자 뿐만 아니라 지속적인 염증반응, 폐실질조직의 손상, 폐조직내 섬유화를 일으키는 다양한 성장인자 및 활성산소종의 생산한다 (Lo et al., 2013). 이러한 일련의 반응으로 인해 COPD 환자의 가장 큰 특징인 현저한 폐기능 저하를 야기한다. 따라서, MIP-2와 CXCL-1과 같은 케모카인의 생성을 억제하는 것이 COPD의 치료에 있어 매우 중요한 방법으로 생각되고 있다. 실제, 많은 연구자들도 케모카인 억제를 중점으로 한 COPD 치료물질 개발에 힘쓰고 있다 (Buenestado et al., 2013).

[7]

[8] 한편, 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia* J. Poiss, Ex Franch)는 중국 운남성 부근에 널리 자생하고 있는 식물로서, 예로부터 이질, 장염, 독감을 비롯한 두통에 사용되어 왔다. 이전의 연구 보고에서는 이 식물에서 분리한 두 개의 화합물이 활성산소를 제거하는 능력이 있다고 보고되었다 (Zhao X. et al., *Biochim Biophys Acta*, 1725, 103-110, 2005). 그러나 이러한 보고를 제외하고, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물의 만성폐쇄성폐질환 치료 또는 예방 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명자들은 인체에 부작용을 유발하지 않으면서 만성폐쇄성 폐질환 치료에 유용한 천연물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물이 독성을 나타내지 않으면서 만성폐쇄성 폐질환 유도 마우스 모델에서 호중구의 수를 억제하고, 기관지 폐포 세척액 내 CD4+ 그리고 Neutrophils Gr-1+ 세포수를 경감시키며, CXCL-1의 생성을 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물이 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 및 TNF- α 의 양을 감소시키고, MIP-2를 감소시키는 효과를 가짐으로써 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명의 하나의 목적은, 피스타시아 웨인마니폴리아(*Pistacia weinmannifolia*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 피스타시아 웨인마니폴리아로부터 분리한 화합물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 만성폐쇄성 폐질환의 발병 가능성이 있거나 만성폐쇄성 폐질환을 앓고 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 조성물은 독성을 나타내지 않으며, 만성폐쇄성 폐질환 유도 동물 모델에서 기관지 내 염증세포 침윤을 억제할 뿐만 아니라, CXCL-1, TNF- α 또는 MIP-2의 발현을 억제하는 효과가 우수하였다. 또한, 안전성이 입증된 식물 생약을 원료로 함으로써 기존 COPD, 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 염증에 대한 치료제의 각종 부작용을 해소할 수 있는 장점이 있어 만성폐쇄성 폐질환 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 피스타시아 웨인마니폴리아의 추출물에 대하여 메탄올/물 용매를 이용해 유효 분획물을 분리하는 것을 나타낸 도이다.
- [17] 도 2는 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 유효 분획물에 대하여 UPLC-PDA-QTOF-MS 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [18] 도 3a는 피스타시아 웨인마니폴리아의 유효 분획물로부터 분리한 화합물인 피스타칼콘(PW12)에 대한 UPLC-PDA-QTOF-MS 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [19] 도 3b는 피스타시아 웨인마니폴리아의 유효 분획물로부터 분리한 화합물인 피스타칼콘 B(PW13)에 대한 UPLC-PDA-QTOF-MS 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [20] 도 4a는 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물, 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물을 제조하고, 에틸아세테이트 유효 분획물로부터 신규 화합물 피스타칼콘(PW12) 및 화합물 피스타칼콘 B(PW13)를 분리해내는 과정을 도식화한 모식도이다.
- [21] 도 4b는 유효 분획물로부터 아세트나이트릴/물 용매로 분획하여 UV 254, 280 mm의 파장에서 신규 화합물 피스타칼콘(PW12) 및 피스타칼콘 B(PW13)를 수득하는 분획 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 5는 피스타시아 웨인마니폴리아의 유효 분획물 1 내지 6과 분리한 피스타칼콘(PW12) 및 피스타칼콘 B(PW13)의 세포 독성을 확인한 도이다.
- [23] 도 6은 피스타시아 웨인마니폴리아의 추출물과 유효 분획물 5와 분리한 피스타칼콘(PW12) 및 피스타칼콘 B(PW13)의 세포 독성을 확인한 도이다.
- [24] 도 7은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 유효 분획물 5와 분리한 화합물 피스타칼콘(PW12) 및 피스타칼콘 B(PW13)의 TNF- α 에 의해 유도된 MUC5AC 생성 억제율을 측정된 결과를 나타낸 도이다. TNF- α 를 처리하지 않은 대조군(-) 및 TNF- α 를 처리한 대조군(+)을 비교군으로 확인하였다.

[25]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

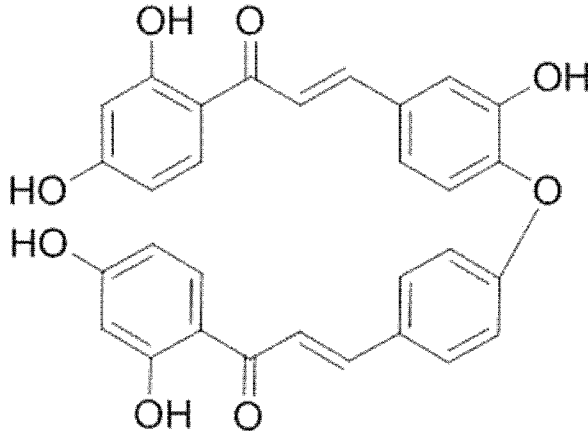
- [26] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아(*Pistacia weinmannifolia*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터

분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[27] 본 발명의 상기 화합물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

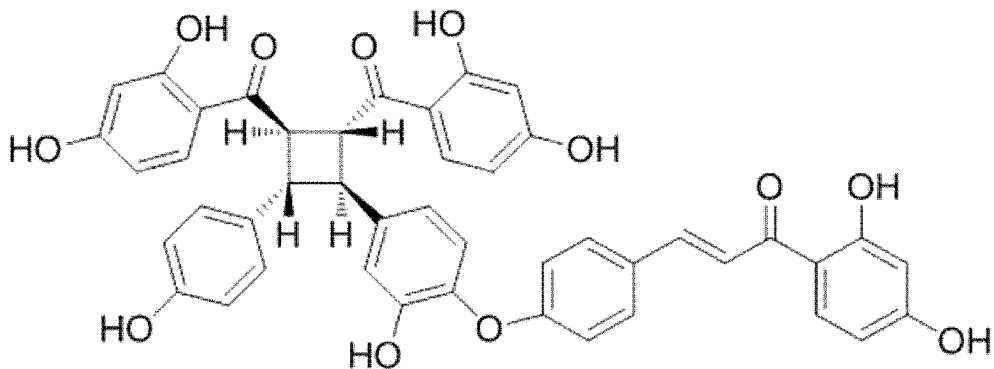
[28] [화학식 1]

[29]



[30] [화학식 2]

[31]



[32] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[33]

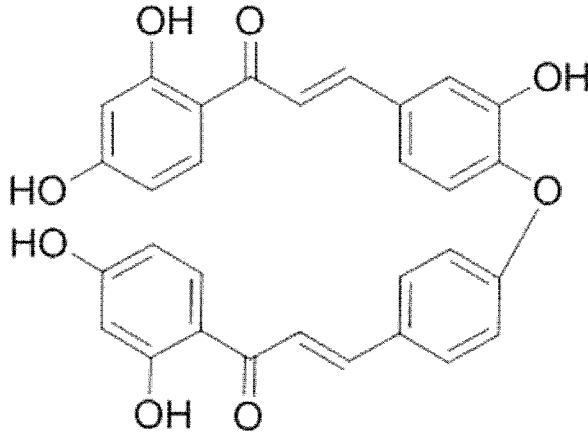
[34] 만성폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)은 비가역적인 기도의 폐색을 동반한다는 점에서 천식과 다르며 기도 및 폐실질 염증에 의한 세기관지 및 폐실질의 병리학적 변화에 의해 발생하는 병으로, 폐쇄성 세기관지염 및 폐기종(폐실질 파괴)을 특징으로 한다. 만성폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease)의 종류에는 만성폐쇄성 기관지염(Chronic obstructive bronchitis), 만성 세기관지염(Chronic bronchiolitis) 및 폐기종(Emphysema)이 있다. 본 발명의 조성물의 대상질환은 바람직하게는 만성폐쇄성 폐질환일 수 있으나, 본 발명이 적용가능한 비가역적인 기도의 폐색을 동반하며 기도 및 폐실질 염증에 의한 세기관지 및 폐실질의 병리학적 변화에 의해 발생하는 병에 제한되는 것은 아니다.

[35]

- [36] 본 발명의 목적상, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 만성폐쇄성 폐질환을 예방 또는 치료하기 위하여 사용된다.
- [37] 본 발명의 용어, "피스타시아 웨인마니폴리아 추출물"은 피스타시아 웨인마니폴리아의 뿌리, 잎, 줄기 등으로부터 적합한 용매를 사용하여 추출하여 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들의 조정제물 또는 정제물의 형태를 모두 포함한다. 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 특히, 피스타시아 웨인마니폴리아의 줄기로부터 수득한 추출액 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [38] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물은 초음파 추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계에서 통상적인 추출방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 피스타시아 웨인마니폴리아는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.
- [39] 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물은 천연물로부터 추출물을 제조하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.
- [40] 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물의 제조에는 물, C1-C4의 알코올(무수 또는 함수 저급 알코올), 또는 이들의 혼합 용매가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 메탄올을 사용하여 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물을 제조할 수 있으며, 특히 70 내지 95% 메탄올을 추출 용매로 이용할 수 있다. 또한 용매로 추출시 추출은 가열 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 또는 초음파 추출로 수행될 수 있다. 이러한 추출은 실온에서 수행할 수도 있으며, 저온 또는 가온 조건 하에서 수행할 수도 있다. 이어서 추출물을 여과 및/또는 감압농축 하여, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물을 수득할 수 있으며, 상기 추출 과정은 2 내지 3회 반복할 수 있으며, 여과, 농축, 동결건조 등의 과정을 추가적으로 거칠 수 있다.
- [41] 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 채집된 피스타시아 웨인마니폴리아의 줄기를 건조시킨 후 분쇄하였다. 분쇄된 분말 시료에 이의 건조 중량을 기준으로 메탄올을 20배 부피로 가한 후 상온에서 70 내지 95%의 메탄올 추출물을 수득하였다. 이어서 여과 및 감압농축 후, 피스타시아 웨인마니폴리아 메탄올 추출물을 수득하였다.
- [42]
- [43] 본 명세서에서 사용된 용어, "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명에서는 상기와 같이 제조된 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.

- [44] 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 분획물을 얻기 위하여 당업계에서 공지된 통상적인 분획 용매, 예를 들어 물, 에탄올, 메탄올과 같은 C1~C4의 무수 또는 함수 저급 알코올 등의 극성 용매 및 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성 용매, 또는 이들의 혼합 용매가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [45] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 분획물은 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함될 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획물, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등으로 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획물도 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 분획물에 포함된다.
- [46] 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 상기에서 얻어진 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물에 증류수를 가하여 현탁한 후 동량의 헥산을 가하여 헥산층과 물층으로 분리하였다. 이를 3회 반복 실시한 후 여과, 감압농축하여 헥산 분획물을 수득하였다. 그런 다음, 상기 헥산 분획물을 제거하고 남은 물층에 클로로포름을 동량 가하여 동일한 방법으로 클로로포름 분획물을 수득하고, 다시 남은 물층에 에틸아세테이트를 동량 가하여 동일한 방법으로 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다. 이로부터 다시 남은 물층에 부탄올을 동량 가하여 동일한 방법으로 부탄올 분획물을 수득하였다.
- [47]
- [48] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물을 로딩하고, 메탄올/물 [0:100 -> 100:0 (v/v)]을 용매로 하여 용리 속도 9 ml/분으로 분획물을 수득하였다. 이를 통해 활성 분획물 1 내지 7을 수득하였다.
- [49] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 피스타시아 웨인마니폴리아 유효 분획물 6종을 농도별로 처리하여, 세포 생존율을 조사해 본 결과, 1 μ M 이하에서는 세포 독성이 없음을 확인하였다(도 5, 표 3).
- [50] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 피스타시아 웨인마니폴리아 유효 분획물 6을 농도별로 처리하여, MUC5AC 단백질 생성 억제 효과를 확인한 결과 추출물보다 우수한 억제효과를 확인하였다(도 7, 표 4).
- [51]
- [52] 또한, 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물은 대표적인 활성 성분으로 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다.
- [53] [화학식 1]

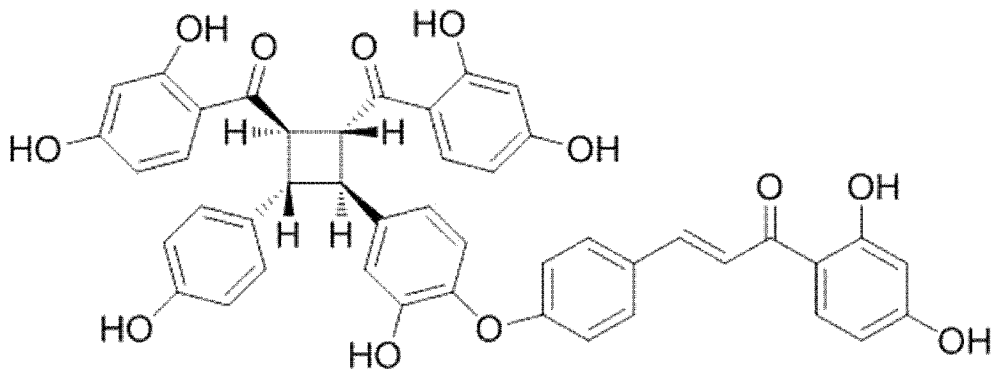
[54]



[55]

[화학식 2]

[56]



[57]

[58] 본 발명의 일 실시예에서는, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물로부터 만성폐쇄성 폐질환(COPD)의 염증 반응을 억제하는 3종의 신규 유효 화합물을 분리하였다. 구체적으로 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 유효 분획물 5를 재차 메탄올/물[10:90->100:0 (v/v)]를 용매로 용리 속도 14 ml/분로 소분획을 수득하였다. 해당 소분획 중에서 상기 화학식 1로 표시되는 신규 화합물 PW12 및 화학식 2로 표시되는 신규 화합물 PW13을 분리하였다.

[59]

[60] 구체적으로, 2종의 신규 유효 화합물 중에서 화학식 1의 화합물(PW12)은 분자식 $C_{30}H_{22}O_8$ 으로 IUPAC 명명어로 2',4'3'',2''',4'''-펜타하이드록시-4-O-3''-바이칼콘 (2',4'3'',2''',4'''-pentahydroxy-4-O-3''-bichalcone)이고, 본 발명자들은 이를 피스타칼콘으로 명명하였다. 화학식 2의 화합물(PW13)은 분자식 $C_{45}H_{34}O_{12}$ 으로 IUPAC 명명어로 디-(2,4-디하이드록시벤조일)-(3,4-디하이드록시페닐)-(4-하이드록시페닐)-사이클로부탄-3-O-4'-바이칼콘 (di-(2,4-dihydroxybenzoyl)-(3,4-dihydroxyphenyl)-(4-hydroxyphenyl)-cyclobutane-3-O-4'-bichalcone)이고, 본 발명자들은 이를 피스타칼콘 B로 명명하였다.

[61]

- [62] 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물로부터 추출한 화합물 2종을 농도별로 처리하여, 세포 생존율을 조사해 본 결과, 1 μ M 이하에서는 세포 독성이 없음을 확인하였다(도 6, 표 3).
- [63] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물로부터 추출한 화합물 3종을 농도별로 처리하여, MUC5AC 단백질 생성 억제 효과를 확인한 결과 추출물보다 우수한 억제효과를 확인하였다(도 7, 표 4).
- [64]
- [65] TNF- α 와 같은 사이토카인과 MIP-2와 같은 CXC 케모카인은 폐혈관 순환에서부터 폐포로까지의 호중구의 트래피킹(trafficking) 활성화에 관여하는 것으로 알려져있다. 이들은 모두 염증과 관련된 사이토카인 또는 케모카인들로서, 만성폐쇄성 폐질환의 경우, 호중구 수가 증가하며, 상기 사이토카인 또는 케모카인이 분비된다. 이에 기도에 염증이 생기고, 근육벽이 두꺼워지며, 점액 분비가 증가하여 기관지 폐쇄가 나타난다. 기관지가 폐쇄되면 폐포는 확장되고 손상되어 산소와 이산화탄소의 교환능력이 손상을 받게 되고, 호흡부전발생이 높아지게 된다. 특히, 이들 사이토카인 또는 케모카인은 COPD를 앓고 있는 환자들에게서 발현이 증가됨이 밝혀져, 만성폐쇄성 폐질환과의 연관성이 알려졌다.
- [66] 따라서, 상기 CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 분비를 억제시킴으로써 만성폐쇄성 폐질환 반응을 억제시킬 수 있다.
- [67]
- [68] 한편, CD4+ 세포는 면역을 촉진하는 세포로 알려져 있으며, 상기 세포가 과도하게 증가할 경우 자가면역이 발생할 수 있다. 만성폐쇄성 폐질환 환자의 경우 정상인보다 CD4+ 세포 수가 현저하게 증가하는 것으로 알려져 있다(Proceedings of the American Thoracic Society, Vol. 4, No. 7 (2007), pp. 512-521.).
- [69] 한편, 만성폐쇄성 폐질환의 경우, Neutrophils Gr-1+세포 수 또한 증가한다(Eur Respir J 2011; 38: 285-294.; Nikota et al. Respiratory Research 2011, 12:39).
- [70] 따라서, 상기 CD4+ 및 Neutrophils Gr-1+세포를 감소시킴으로써 만성폐쇄성 폐질환 반응을 억제시킬 수 있다.
- [71]
- [72] 정리하면, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 하기의 활성을 나타내는 것일 수 있다.
- [73] (a) 기관지 또는 혈관 주위의 염증세포 수 및 호중구의 수 감소;
- [74] (b) CD4+ 또는 Neutrophils+Gr-1+ 세포 수 감소;
- [75] (c) CXCL-1의 생성 억제;
- [76] (d) TNF- α 의 생성 억제;
- [77] (e) MCP-2의 생성 억제.

[78]

[79] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기와 같이 수득된 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물과 이의 분획물의 COPD 억제 효과를 확인한 결과, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물이 표준담배 추출물이 흡입된 동물모델에서 호중구의 수가 현저히 억제시켰고 (표 5 참조), CD4+ 그리고 Neutrophils Gr-1+ 세포수 (표 6 참조), CXCL-1 (표 7 참조), TNF- α (표 8 참조), MIP-2 (표 9 참조)를 감소시킴을 확인하였다.

[80] 상기 결과로부터 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물과 이의 분획물은 COPD 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[81]

[82] 따라서 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이의 화합물을 유효성분으로 포함하고, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 COPD의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[83]

[84] 상기 COPD는 만성폐쇄성기관지염(Chronic obstructive bronchitis), 만성세기관지염(Chronic bronchiolitis) 및 폐기종(Emphysema)등의 다발성 경화증, 급성 및 만성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 만성폐쇄성폐질환일 수 있으나, 본 발명이 적용가능한 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환이 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[85] 본 발명에서 용어, "만성폐쇄성 폐질환"은 유해한 입자나 가스의 흡입에 의해 폐에 비정상적인 염증 반응이 일어나면서 이로 인해 점차 기류 제한이 진행되어 폐 기능이 저하되고 호흡곤란을 유발하게 되는 호흡기 질환을 말한다. 만성폐쇄성 폐질환의 주된 증상은 만성적인 기침 또는 만성적인 가래(객담)을 비롯하여 호흡곤란 등이 있으며, 베타항진제, 항콜린제, 메틸잔틴계 등의 기관지 확장제 또는 부신피질 호르몬 흡입제 등이 대표적인 치료제로 사용된다. 본 발명에서 상기 만성폐쇄성 폐질환은 바람직하게는 만성 기관지염(chronic bronchitis) 또는 폐기종(emphysema)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[86] 본 발명에서 용어, "만성 기관지염(chronic bronchitis)"이란, 2년 연속, 1년에 3개월 이상 가래가 있고 기침이 지속되는 질환을 의미한다. 흡연, 대기오염, 직업적 노출 등의 자극에 의한 기관지 손상이 원인으로 추정되고 있으며, 주요 증상으로는 만성 기침, 가래, 운동시 호흡곤란 등이 있다. 또한, 만성폐쇄성 폐질환의 특징인 급성 악화가 있을 수 있으며, 이때에는 수시간에서 수일 사이 호흡곤란이 빠르게 악화되고 가래의 양이 늘어나거나 가래의 성상이 점액성에서 화농성으로 변하면서 진한 노란색이나 푸르스름한 색을 띠게 되고 점도가 높아져 뱉어내기 힘들어진다.

[87] 본 발명에서 용어, "폐기종(emphysema)"이란, 종말 세기관지(terminal bronchiole) 원위부 공기공간(airspace)의 파괴로 인하여 비정상적이며 영구적인 말초기도 및 폐포의 확장상태를 의미한다. 유해 입자와 가스의 흡입에 의하여

발생하며, 임상적으로 가장 의미있는 위험인자는 흡연으로 알려져 있다. 주요 증상으로는 만성적인 기침과 가래, 호흡곤란 등이 있다.

- [88] 본 발명에서 사용된 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 만성폐쇄성폐질환을 비롯한 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [89] 본 발명에서 사용된 용어, "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 만성폐쇄성폐질환을 비롯한 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [90] 본 발명의 약학적 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있으며, 공인된 만성폐쇄성폐질환 및 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있다.
- [91] 상기 "약학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [92] 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 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, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [93] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [94] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및

기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따른 약학적 조성물은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 약학적 조성물에 0.001 내지 1500 $\mu\text{g/ml}$ 로 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.001 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 으로 포함될 수 있다. 또는, 본 발명에 따른 조성물은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 1 내지 10 중량% 포함하는 것일 수 있으며, 특히 5 내지 10 중량% 포함하는 것일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명에서 피스타시아 웨인마니폴리아로부터 분리한 화합물, 예를 들어 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 0.01 내지 10 중량% 포함하는 것일 수 있다.

[95]

[96] 다른 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 COPD의 예방 또는 치료가 필요한 개체에 투여하여 COPD를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[97] 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[98] 상기 COPD는 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 COPD일 수 있으나, 본 발명이 적용가능한 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 염증질환이 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[99] 본 발명에서 상기 개체는 만성폐쇄성 폐질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 만성폐쇄성 폐질환 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 COPD 및 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환등의 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[100] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[101] 본 발명의 COPD 및 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성

경화증, 급성 및 만성 폐질환의 치료방법은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 즉, 본 발명의 COPD 및 만성폐쇄성 기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환의 치료방법은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 본 발명의 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다.

- [102] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으나, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 조성물은 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 개체에나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함한다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[103]

- [104] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공한다.

[105]

- [106] 또 다른 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [107] 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

- [108] 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 및 만성폐쇄성 폐질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [109] 상기 식품 조성물은 COPD 및 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 또는 만성 폐질환 억제에 도움을 주는 기능을 가질 수 있다.
- [110] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [111] 상기 식품 조성물에는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 이외에도 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환 억제활성에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [112] 본 발명에서 사용된 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [113] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [114] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능성 식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능성 식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.
- [115] 본 발명의 조성물을 건강기능식품에 포함하여 사용할 경우, 상기 조성물을

그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물은 원료 조성물 중 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 5 ~ 10 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

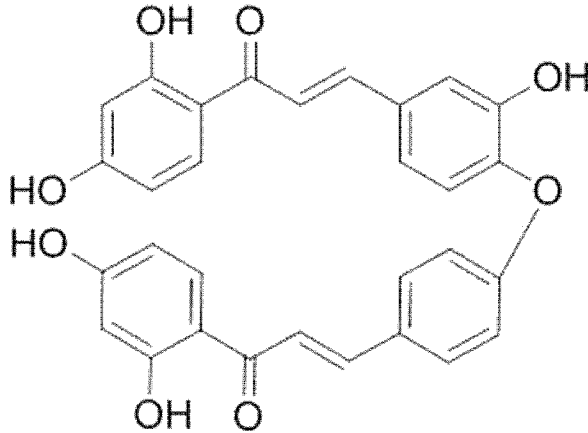
- [116] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성 식품을 모두 포함한다.
- [117] 본 발명에서 용어, "개선"은 상기 조성물을 이용하여 만성폐쇄성 폐질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [118]
- [119] 본 발명의 조성물을 포함할 수 있는 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 구체적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있으며, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품을 포함할 수 있다.
- [120] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스과 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨과 같은 당알콜일 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 조성물 100 ml 당 바람직하게는 약 0.01 내지 0.04g, 보다 바람직하게는 0.02 내지 0.03g일 수 있다. 상기 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제 및 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제일 수 있다.
- [121] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[122]

[123] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아, 이의 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리한 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 제공한다.

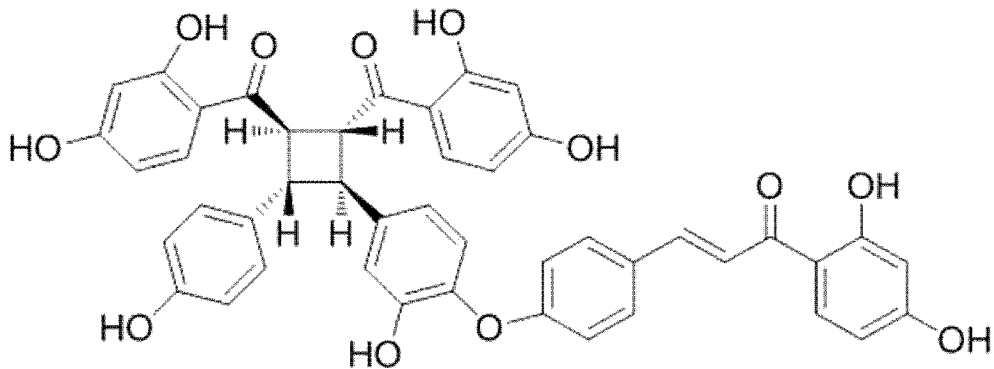
[124] [화학식 1]

[125]



[126] [화학식 2]

[127]



[128]

[129] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물로부터 만성폐쇄성 폐질환(COPD)의 염증 반응을 억제하는 2종의 신규 유효 화합물을 분리하였다. 구체적으로 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 유효 분획물 5를 재차 메탄올/물[10:90->100:0 (v/v)]를 용매로 용리 속도 14 ml/분로 소분획을 수득하였다. 해당 소분획 중에서 상기 화학식 1로 표시되는 신규 화합물 PW12 및 화학식 2로 표시되는 신규 화합물 PW13을 분리하였다. 본 발명자는 상기 화학식 1로 표시되는 신규 화합물 PW12는 피스타칼콘으로 명명하였으며, PW13은 피스타칼콘 B으로 명명하였다.

발명의 실시를 위한 형태

[130] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 제제예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[131]

[132] 실시예 1. 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 및 화합물 제조

[133]

[134] 1-1. 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 제조[135] 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia* J. Poiss. Ex Franch)의 메탄올 추출물은 한국생명공학연구원 해외생물소재허브센터의 해외식물추출물은행에서 구입하였다.

[136] 추출과정을 살펴보면, 피스타시아 웨인마니폴리아의 줄기 (20) kg을 채집하여 건조기 (50 내지 55°C)를 자연건조(음건) 사용해 수분을 제거한 후 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료의 건조 중량을 기준으로 메탄올 (30) l를 가한 후 상온에서 추출하였다. 그런 다음 여과 및 감압농축 후, 피스타시아 웨인마니폴리아 메탄올 추출물 542.2 g을 수득하였다. 이후의 실험에서는 수득된 피스타시아 웨인마니폴리아 메탄올 추출물을 총 (total) 추출물로 지칭하였다.

[137]

[138] 1-2. 피스타시아 웨인마니폴리아 분획물 제조

[139] 상기 실시예 1-1에서 수득한 피스타시아 웨인마니폴리아 총 추출물 542.2 g에 물 5L를 가하여 현탁시키고 동량의 헥산을 넣어 물 층과 헥산 층으로 분리하였다. 이 과정을 동일한 방법으로 3회 더 반복 실시하고 여과, 감압농축하여 헥산 분획물 (48.5 g)을 분리하였다. 같은 방법으로 상기 헥산 층을 분리하고 남은 물 층에 동량의 클로로포름을 가하여 상기와 같은 방법으로 분리하여 클로로포름 분획물 (16.3 g)을 수득하였다. 같은 방법으로 상기 클로로포름 층을 분리하고 남은 물 층에 동량의 에틸아세테이트를 가하여 상기와 같은 방법으로 분리하여 에틸아세테이트 분획물 (53.7 g)을 수득하였다. 같은 방법으로 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 물 층에 동량의 부탄올을 가하여 상기와 같은 방법으로 분리하여 부탄올 분획물 (114 g)을 수득하였다. 남은 물 층을 농축하여 물 분획물 (186.5 g)을 수득하였다.

[140]

[141] 1-3. 피스타시아 웨인마니폴리아 유효 분획물 제조[142] MPLC 분석을 위해 MPLC 기기(Interchim)에 칼럼(20 mm x 250 mm; Resin; Zeoprep C18, 10 μ m)을 장착한 후 메탄올 추출물을 2 g의 양으로 반복 로딩하였다. 이때, 용매로는 메탄올/물 [0:100 -> 100:0 (v/v)]를 사용하고, 용리속도는 9 ml/분이었으며, UV 200-400 nm의 파장에서 검출하여 활성 분획물(Fr.1 내지 7)을 수득하였다. 분석 시간은 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 120분으로 하였다.

[143] 상기 MPLC 분석 결과를 도 1 및 표 1에 나타내었다.

[144]

[145] 표 1

[Table 1]

분획물		용매조건	번호(bottle number)	무게(mg)
Fr.1	분획물 1	0-26	1-12	32.1
Fr.2	분획물 2	26-40	13-18	253.7
Fr.3	분획물 3	40-53	19-24	400.2
Fr.4	분획물 4	53-65	25-29	85.9
Fr.5	분획물 5	65-100	30-45	65.3
Fr.6	분획물 6	100	46-60	27.5

[146]

[147] 1-4. 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 분석

[148] 상기 실시예 1-2에서 수득한 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성 분획을 조사하기 위하여 이들을 액체 크로마토그래피인 UPLC (ultra performance liquid chromatography)로 분석하였다.

[149] 먼저, UPLC 분석을 위해 에틸아세테이트 분획물 (53.7 g)을 UPLC용 0.25 mm 멤브레인 필터로 1회 여과하였다. UPLC 기기 (Waters UPLC-Q-TOF)에 칼럼 (Waters BEH C18 column, 2.1 × 100 mm, 1.7 mm)을 장착한 후 여과된 각각의 분획물을 0.3 μ l의 양으로 로딩(loading)하였다.

[150] 이때, UPLC 분석에 사용된 용매로는 아세토니트릴 + 0.1 % 포름산/ 물 + 0.1 % 포름산 [10 : 90 -> 100 : 0 (v/v)]을 사용하고, 용리 속도는 0.4 ml/분으로 하였다. 검출기로 UV 200 내지 400 nm의 파장과 MS(Mass spectrometry)를 이용하여 UPLC로부터 유효 분획물 및 분리되어진 물질들을 크로마토그래피 형식으로 물질의 분리도를 확인하였다.

[151] 상기 UPLC-PDA-QTOF-MS 분석 결과를 도 2 및 도3a-b에 나타내었다.

[152]

[153] 1-5. 피스타시아 웨인마니폴리아 유래 화합물 추출

[154] 상기 실시예 1-3에서 수득한 분획물 Fr.5에서 하기와 같은 방법으로 신규 화합물을 분리하였다.

[155] 구체적으로, 유효 분획물 Fr.5(821 mg)을 MPLC 기기(YMC Lc-Forte/R)에 칼럼 (YMC-DispoPack AT, 40 x 500 mm, 45 μ m)을 장착한 후 유효 분획물을 로딩하였다. 이때, 용매로는 메탄올/물 [10:90 -> 100:0 (v/v)]를 사용하고, 용리 속도는 14 ml/분이었으며, UV 254, 280, 320 mm의 파장에서 검출하여 소분획 (Fr.5A-G)을 수득하였다.[156] 상기 소분획 Fr.5E(297 mg) Prep-HPLC 기기 (Gilson)에 칼럼 (YMC-Pack ODS AQ-HG, 250 x 20 mm, 5 μ m)을 장착한 후 유효 분획물을 10 mf/ml의 양으로

로딩하였다. 이때, 용매로는 아세트나이트릴/물 [10:90 -> 100:0 (v/v)]를 사용하고, 용리 속도는 14 ml/분이었으며, UV 254, 280 mm의 파장에서 수행하여 하기 물성치를 화학식 1로 표시되는 신규구조의 화합물 PW12(15.3 mg)을 수득하였다(표 2 및 도 4b).

- [157] 상기 소분획 Fr.5F(156 mg) Prep-HPLC 기기 (Gilson)에 칼럼 (YMC-Pack ODS AQ-HG, 250 x 20 mm, 5 μ m)을 장착한 후 유효 분획물을 10 mg/ml의 양으로 로딩하였다. 이때, 용매로는 아세트나이트릴/물 [10:90 -> 100:0 (v/v)]를 사용하고, 용리 속도는 14 ml/분이었으며, UV 254, 280 mm의 파장에서 수행하여 하기 물성치를 화학식 2로 표시되는 신규구조의 화합물 PW12(20.5 mg)을 수득하였다(표 2 및 도 4b).

- [158] 표 2

[Table 2]

신규 화합물의 UPLC-PDA-QTOF-MS 분석 결과 데이터

구분	데이터
PW12(화학식 1)	Amorphous powder; HRESIMS m/z 509.1236 [M-H] ⁻ ; ¹ H-NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.73 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-2), 6.98 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-3), 6.98 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.73 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6), 6.28 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-3'), 6.40 (1H, dd, J = 8.8, 2.3 Hz, H-5'), 7.94 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6'), 7.64 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-α), 7.80 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-β), 7.50 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2''), 7.04 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5''), 7.53 (1H, d, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6''), 6.28 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-3'''), 6.40 (1H, dd, J = 8.8, 2.3 Hz, H-5'''), 7.94 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6'''), 7.64 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-α'), 7.80 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-β'); ¹³ C-NMR (100 MHz, MeOD) δ. 130.6, 131.6, 117.8, 161.8, 117.8, 131.6, 114.7, 167.6, 103.8, 166.5, 109.2, 193.3, 133.5, 120.2, 144.6, 129.0, 123.4, 144.2, 153.5, 118.8, 128.6, 114.7, 167.5, 103.8, 166.4, 109.2, 133.5, 119.7, 144.7, 193.4
PW13(화학식 2)	Amorphous powder; HRESIMS m/z 765.1972 [M-H] ⁻ . ¹ H-NMR (400 MHz, MeOD) δ 6.86 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.98 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 7.15 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6), 3.64 (1H, dd, J = 9.2, 8.8 Hz, H-7), 4.45 (1H, dd, J = 8.8, 7.8 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-12), 6.06 (1H, dd, J = 8.8, 2.3 Hz, H-14), 7.31 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-15), 7.64 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2',6'), 6.85 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3',5'), 6.28 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-9'), 6.41 (1H, dd, J = 8.8, 2.3 Hz, H-11'), 7.98 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-12'), 7.66 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-α), 7.79 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-β), 7.12 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2'',6''), 6.74 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3'',5''), 3.71 (1H, dd, J = 9.2, 8.8 Hz, H-7''), 4.45 (1H, dd, J = 8.8, 7.8 Hz, H-8''), 6.23 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-12''), 6.15 (1H, dd, J = 8.8, 2.3 Hz, H-14''), 7.31 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-15''); ¹³ C-NMR (100 MHz, MeOD) δ 134.7, 122.4, 143.8, 149.7, 118.8, 125.6, 150.2, 47.7, 203.2, 113.1, 167.0, 109.1, 167.0, 103.7, 134.3, 130.5, 131.4, 117.9, 161.7, 114.6, 167.4, 109.5, 167.6, 103.9, 133.5, 120.2, 144.7, 193.3, 133.2, 129.6, 116.5, 157.8, 49.6, 47.7, 202.9, 113.1, 167.0, 109.3, 167.0, 103.8, 134.3.

[159]

[160]

실시예 2. 세포독성 실험

[161]

[162] 실시예 1에서 제조 및 추출한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물의 세포독성을 확인하기 위하여 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 실험하였다 (Ishiyama et al., Talanta, 44, pp.1299-1305, 1997; Tominaga et al., Anal. Commun., 36, pp.47-50, 1999).

[163]

[164] 2-1. 세포 준비 및 배양

[165] H292(CRL-1848)을 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. H292 세포는 10% 우태아혈청 및 항생제가 첨가된 RPMI 배지(SH30027.01, RPMI 1640, Gibco)에서 배양하였으며, 가습된(humidified) 5% CO₂ 대기 조건 하 37°C에서 배양하였다. TNF- α 는 회사(300-01A, Peprotech, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[166]

[167] 2-2. 세포생존율 어세이법 (Cell viability assay)

[168] 상기 세포들을 배지(GM) 중 96-웰플레이트에 밀도(1×10^3 세포/웰)로 위치하였다. 24시간 후에, 세포를 시료와 함께 1일간 같이 배양하였다. 세포 생존율을 제조사 메뉴얼에 따라 판독 키트(Cell Counting Kit-8, CK04-01, Dojindo Molecular Technologies, ML)를 이용하여 삼중치로 판독하였다. 흡광도(Absorbance)는 판독기(VERSAmix microplate reader, SMP500-14915, Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하고 측정된 흡광도는 표준곡선(standard curve)으로 세포수로 변환하였다.

[169]

[170] 2-3. 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물의 세포독성 평가

[171]

[172] 인간의 폐암점막세포인 H292 세포를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 10% 첨가한 RPMI 배지(Gibco)에 5×10^4 세포/ml의 농도로 현탁하여 100 μ l씩 96 웰-플레이트에 접종하여 12시간 동안 부착하였다. 피스타시아 유효분획물 6과 3종의 단일 화합물(PW11, PW12, PW13)을 농도별로 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 세포 수를 셀 수 있는 CCK-8(Dojindo사) 키트에서 설명한 대로, 배지 90 μ l에 CCK-8 용액을 10 μ l 혼합하여 웰당 100 μ l씩 첨가하였고, 최소 30분에서 최대 4시간까지 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 DMSO를 0.2% 처리한 음성대조군을 100%로 하여 상기 수학적 식 1에 따라 계산하였고, 그 결과는 하기 표 3에 나타낸 바와 같다.

[173]

[174] 수학적 식 1

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{추출물처리한 OD}_{570\text{nm}}}{\text{음성대조군 OD}_{570\text{nm}}} \times 100$$

[175] 표 3

[Table 3]

시료	농도	H292 세포 생존율(% , 평균 ± 편차)
음성대조군	0	99.99±3.79
피스타시아 웨인마니아폴리아 추출물(μg/mL)	0.125	96.46±1.50
	0.25	91.61±6.12
	0.5	103.14±1.47
	1	103.68±2.89
	2.5	106.45±1.60
	5	103.84±1.42
피스타시아 웨인마니아폴리아분획물 6(μg/mL)	0.125	92.61±1.39
	0.25	96.30±3.57
	0.5	99.68±2.31
	1	107.06±6.47
	2.5	81.93±2.31
	5	52.72±0.48
화합물 PW11(μM)	0.125	97.60±1.83
	0.25	98.05±0.93
	0.5	104.65±0.79
	1	90.24±4.34
화합물 PW12(μM)	0.125	95.80±2.90
	0.25	96.47±3.21
	0.5	104.50±1.32
	1	115.88±0.50
화합물 PW13(μM)	0.125	104.80±2.34
	0.25	103.53±3.07
	0.5	126.28±7.75
	1	71.92±5.47

[176]

[177] 본 실험 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 피스타시아 웨인마니아폴리아 추출물,

이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물의 농도에 따른 H292 세포의 세포 생존율을 조사해본 결과, 1 μ M 이하에서는 세포독성이 없음을 확인하였다.

[178]

[179] 실시에 3. MUC5AC 단백질 생성 저해 효과

[180]

[181] 실시예 1에서 제조 및 추출한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물의 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)과 같은 염증성 질환의 예방 또는 치료 효과를 분석하기 위하여, 관련 단백질인 MUC5AC 단백질 분비 저해 효과를 확인하고자 하였다. 이에, MUC5AC 단백질 생성에 대한 실시예 시료들의 저해 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 문헌에 기재된 방법을 응용하여 실험하였다(Sikder, MA. et al., Phytotherapy research : PTR. 28, 62-8, 2014).

[182]

[183] 3-1. 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물들에 의한 MUC5AC 단백질 생성 저해 효과

[184]

[185] 생성된 MUC5AC의 면역분석(immunoassay)을 위해서 회수한 상등액 50 μ l를 96 웰-플레이트에 분주하고 50 $^{\circ}$ C로 설정된 항온기에서 건조시켰다. 1% BSA가 첨가된 PBS로 세척한 다음, MUC5AC 항체(ab3649, abcam사)와 상온에서 1시간 반응하고, 2차 항체를 분주하여 1시간 동안 반응시켰다. 세척한 후 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine peroxide solution(54827-17-7, Sigma-aldrich)를 20분간 반응시킨 다음, 황산용액으로 반응을 정지시킨 후, 마이크로 플레이트 측정기(VERSAmx microplate reader, SMP500-14915, Molecular Devices, USA)로 450 nm에서 발색 정도를 측정하였고, 그 결과는 하기도 1의 그래프로 나타내고, 이를 표 4에 나타내었다.

[186]

[187] 표 4

[Table 4]

TNF- α 에 의해 유도된 MUC5AC 생성을 억제하는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물의 억제 효과

시료	농도(μ M)	TNF- α (20 ng/ml)	MUC5AC 분비량 (TNF- α 처리군에 대한 상대적 %)	저해율(%)
음성대조군	0	-	42.58 \pm 1.38	57.42
TNF- α 처리군	0	+	100.00 \pm 3.24	0
피스타시아웨인 마니폴리아추출 물	5	+	79.93 \pm 4.79	20.07
	2.5	+	87.35 \pm 8.13	12.65
	1	+	92.82 \pm 3.90	7.18
	0.5	+	92.34 \pm 10.81	7.66
	0.25	+	103.16 \pm 4.96	0
	0.125	+	115.21 \pm 5.93	0
피스타시아 웨인마니폴리아 분획물 6	5	+	56.20 \pm 3.24	43.80
	2.5	+	69.95 \pm 2.35	30.05
	1	+	71.29 \pm 3.80	28.71
	0.5	+	76.76 \pm 3.75	23.24
	0.25	+	93.43 \pm 7.90	6.57
	0.125	+	102.07 \pm 7.66	0
화합물 PW11	1	+	76.95 \pm 8.13	23.05
	0.5	+	79.67 \pm 1.14	20.33
	0.25	+	86.64 \pm 3.99	13.36
	0.125	+	88.18 \pm 9.42	11.82
화합물 PW12	1	+	69.74 \pm 8.56	30.26
	0.5	+	69.50 \pm 5.37	30.50
	0.25	+	74.23 \pm 12.98	25.77
	0.125	+	75.77 \pm 7.66	24.23

화합물 PW13	1	+	73.76±2.68	26.24
	0.5	+	77.30±2.33	22.70
	0.25	+	82.39±3.10	17.61
	0.125	+	83.92±9.77	16.08

[188]

[189] 실시예 4. 표준담배추출물로 유도된 만성폐쇄성 폐질환(COPD) 동물모델 효과 평가

[190]

[191] 4-1. 실험 동물 및 기관지 만성폐쇄성 폐질환 유도

[192] 본 실험에서는 평균 체중 20 g 내외의 8주령 BALB/c 스킷 생쥐를 실험동물로 사용하였다. 1주간의 적응기간을 가진 후에 기본적인 신체검사 상에서 이상이 관찰되지 않는 동물을 대상으로 하였다.

[193] 표준담배 CM7 (Coresta Monitoring Cigarette 7, Heirn Borgwaldt, Germany) 60 개피 및 isopropanol, ethanol (Merck, Germany), n-heptadecane (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였으며, 실험장비는 Automatic smoking machine (ISO 3308 규격품, 자동흡연장치, 모델 : RM20, Heirn Borgwaldt)를 사용하였다.

[194] 구체적으로, 표준담배 CM7 (Coresta Monitoring Cigarette 7, Heirn Borgwaldt, Germany) 연기응축물 포집은 ISO3402 규정에 의거하여 흡연실 (온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$)에서 실시하였으며, ISO3308 규정에 의거 RM20 (Heirn Borgwaldt, Germany) 자동흡연장치 (ISO3308 규격품)를 이용하여 흡연부피 $35.0 \pm 0.3 \text{ mL}$, 흡연주기 $60 \pm 0.5 \text{ 초}$, 흡연시간 $2.00 \pm 0.02 \text{ 초}$, 그리고 꽂초길이 tip paper길이 + 3 mm (overwrap + 3 mm) ISO 표준 흡연 방법으로 켈런담배를 연소시키고, 92 mm cambridge filter (ISO3308 규격품)로 담배연기응축물을 포집하였다 (ISO3308, 2000).

[195] 담배연기응축물이 포집된 cambridge filter를 cigarette holder에서 분리하여 각각 100 mL 삼각플라스크에 넣고 추출용매 isopropanol 50 mL씩을 가하여 잘 흔든 다음, 실온에서 8시간 이상 방치하여 추출하였다. 추출 후 여과하고 감압여과 농축기로 농축하였으며 3개의 삼각플라스크에 들어있는 농축액을 scintillation vial에 모으고 질소 가스를 이용하여 완전 농축하였다. 7% chloral hydrate로 마취한 후 LPS + CS (LPS $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 와 표준담배 추출물 (Cigarette smoking; CS) $4 \text{ mg}/\text{mL}$ 을 1:1로 섞음)를 주 1회 3주간 코에 $100 \mu\text{L}$ 를 i.t 흡입시켜 만성폐쇄성 폐질환 모델을 만들었다. 구체적으로, 약하게 마취를 시킨 후 움직임이 없을 때 생쥐의 앞니를 고무밴드로 고정시킨 상태에서 코와 입에 LPS + CS 혼합물을 각각 $50 \mu\text{L}$ 씩 합 $100 \mu\text{L}$ 를 i.t 흡입시켰다.

[196] 실험군은 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군 (NC), (ii) LPS + CS를 처리한 대조군 (COPD), (iii) LPS + CS를 처리 1시간 전 *P. weinmanifolia*를 $30 \text{ mg}/\text{kg}$

경구투여한 실험군 (*P. weinmanifolia*)으로 나누었다. 실험 종료 후 각 군 생쥐의 혈액, 폐세척액 및 폐조직을 분리하였다.

[197]

[198] 4.2. 총 입자상물질 측정

[199] 담배연기응축물이 포집된 camberidge filter를 cigarette holder에서 분리하여 각각 100 mL 삼각플라스크에 넣고 추출용매 isopropanol 50 mL씩을 가하여 잘흔든 다음, 실온에서 8시간 이상 방치하여 담배연기응축물에 포함된 물질을 추출하였다. 추출 후 여과하고 감압여과 농축기로 농축하였으며 3개의 삼각플라스크에 들어있는 농축액을 scintillation vial에 모으고 질소 가스를 이용하여 완전 농축하였다. 표준담배 주류연 중 TPM의 함량은 하기 수학적 2를 이용하여 계산하였다.

[200] 수학적 2

$$TPM(mg/cig) = \frac{W_{FHA} - W_{FHB}}{N}$$

[201] 상기 수학적 2에서 TPM은 총 입자상 분진 물질, W_{FHA} 는 흡연 후 Filter holder의 무게, W_{FHB} 는 흡연 전 Filter holder의 무게, N은 한 Trap당 흡연한 개피 수(cig.)이다.

[202]

[203] 실시예 5. 기관지 폐포세척액 내 염증 세포수의 생성 억제 효과

[204]

[205] 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물의 기관지 폐포세척액 분비 및 총 세포수 측정하기 위하여, 생쥐의 기관지에 ACK 용액을 37 °C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 FBS-free/DMEM 배양액으로 세척한 후 0.04% 트립판블루(trypsin blue)로 염색한 후 총 세포수를 측정하였다.

[206] 구체적으로, 혈액 채혈 후 해부하여 폐포 세척액(BALF)으로부터 세포를 분리하기 위해 FBS-free/DMEM 배양액 1 mL을 넣은 주사기를 기관지 (trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환시켜 분리하여 ACK (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ in 1L 탈염수(demineralized water) + 0.1 mM EDTA) 용액을 37 °C에서 5분동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 FBS-free/DMEM 배양액으로 세척한 후 0.04 % 트립판 블루로 염색한 후 총 세포수를 측정하였다. 이때, 시료로는 상기 제조예 1에서 수득된 메탄올 총 추출물을 사용하였다.

[207] 하기 표 5은 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물 (Total)이 표준담배추출물로 유도된 COPD 동물모델에서 기관지 폐포세척액 내 총 염증세포수 중 호중구의 생성에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[208] NC: 기도 감각하지 않은 정상 대조군;

[209] COPD 유도: 표준담배추출물로 유도된 COPD 유도군;

[210] *P. Weinmannifolia* 추출물 처리 후 COPD 유도: 피스타시아 웨인마니폴리아의

메탄올 추출물을 투여한 실험군.

[211] 표 5

[Table 5]

그룹	면역 세포 수			
	총 세포	저해율(%)	중성구 (Neutrophil)	저해율 (%)
NC	20.1 ± 4.41	-	0.5 ± 0.12	-
COPD 유도	95.4 ± 16.99	-	202.8 ± 24.48	-
<i>P. weinmannifolia</i> 추출물 처리 후 COPD 유도	28.0 ± 5.50	70.6	116.8 ± 37.43	59.8

[212]

[213] 상기 표 5에서 확인할 수 있듯이, 표준담배추출물을 처리한 동물 모델에서는 호중구의 수가 급격히 증가한 반면, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 메탄올 추출물을 전처리한 후 표준담배추출물을 처리한 동물모델에서는 기관지 폐포세척액 내 총 염증세포수 및 염증세포 가운데 호중구의 수가 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 메탄올 추출물을 전처리한 경우, 총 염증세포수 (70.6 %, $P < 0.05$)와 호중구의 생성량 (59.8 %, $P < 0.05$)이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[214]

[215] **실시예 6. 기관지 폐포세척액 내 CD4+ 및 Neutrophils Gr-1+ 세포수 억제 효과**

[216]

[217] 상기 실시예 5에서 분리한 BAL 세포들을 5×10^5 세포를 조정 한 후 4 °C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD4 (553047, BD Pharmingen) 및 PE-anti-Gr-1 (553128, BD Pharmingen)을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램 (643274, BD Pharmingen)을 이용하여 CD4+ 및 Gr-1+ Neutrophil 세포 빈도를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수(total cells)를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포수(absolute number)를 산출하였다.

[218] 하기 표 6는 COPD 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물이 기관지 폐포세척액 내 CD4+ 그리고 Neutrophils Gr-1+ 세포수에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[219] NC: 기도 감각하지 않은 정상 대조군;

[220] COPD 유도: 표준담배추출물로 유도된 COPD 유도군;

[221] *P. Weinmannifolia* 추출물 처리 후 COPD 유도: 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물을 투여한 실험군.

[222] 표 6

[Table 6]

그룹	세포 수			
	CD4 ⁺ 세포 (10 ⁴)	저해율(%)	Neutrophil+Gr-1 ⁺ (10 ⁴)	저해율 (%)
NC	7.5 ± 1.49	-	0.4 ± 0.08	-
COPD 유도	510.1 ± 157.65	-	33.9 ± 8.19	-
<i>P. weinmannifolia</i> 추출물 처리 후 COPD 유도	152.8 ± 66.25	70.3	4.7 ± 1.14	86.2

[223] 상기 표 6에서 확인할 수 있듯이, COPD 유도군은 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포수가 정상 대조군에 비하여 모두 크게 증가하였다. 반면, 약물 투여군인 *P. Weinmannifolia* 30 mg/kg 투여군은 COPD 유도군에 비교하여 CD⁺ 세포수 증가가 70.3 % (P < 0.05), Neutrophil Gr-1⁺ 세포수 증가가 86.7 % (P < 0.05) 억제되었다.

[224]

[225] 실시예 7. 기관지폐포 세척액 내 CXCL-1, TNF- α , MCP-2 억제 효과

[226]

[227] 생쥐에서 분리한 BALF에서 CXCL-1, TNF- α 및 MCP-2 수준을 ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay)로 측정하였다. CXCL-1, TNF- α 및 MCP-2의 각각의 항체를 coating 완충용액 (291195, R&D System)에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후에 혈청(10배 희석)을 100 μ l씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated (DY998, R&D System) 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader (Emax, Molecular Devices) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[228] 하기 표 7은 COPD 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물이 기관지폐포 세척액 내 CXCL-1의 생성에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[229] NC: 기도 감각하지 않은 정상 대조군;

[230] COPD 유도: 표준담배추출물로 유도된 COPD 유도군;

[231] *P. Weinmannifolia* 추출물 처리 후 COPD 유도: 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물을 투여한 실험군.

[232] 표 7

[Table 7]

그룹	CXCL-1 (pg/mL)	저해율 (%)
NC	71.9 ± 15.93	-
COPD 유도	312.6 ± 63.16	-
<i>P.weinmannifolia</i> 추출물 처리 후 COPD 유도	103.2 ± 11.06	67.0

[233]

[234] 상기 표 7에서 확인할 수 있듯이, COPD 유도군은 기관지폐포 세척액 내 CXCL-1의 생성이 정상 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 하지만, *P. Weinmannifolia* 30 mg/kg 투여군은 COPD 유발군에 비교하여, CXCL-1의 생성이 67.0 % ($P < 0.05$) 억제되었다.

[235]

[236] 아울러, 하기 표 8는 COPD 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물이 염증인자인 TNF- α 에 미치는 영향을 측정된 결과이다.

[237] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

[238] COPD 유도: 표준담배추출물로 유도된 COPD 유도군;

[239] *P. Weinmannifolia* 추출물 처리 후 COPD 유도: 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물을 투여한 실험군.

[240]

표 8

[Table 8]

그룹	TNF- α (pg/mL)	저해율 (%)
NC	1.5 ± 0.34	-
COPD 유도	35.0 ± 9.68	-
<i>P.weinmannifolia</i> 추출물 처리 후 COPD 유도	13.0 ± 3.50	62.8

[241]

[242] 상기 표 8에서 확인할 수 있듯이, COPD 유도군은 기관지폐포 세척액 내 TNF- α 의 생성이 정상 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 하지만, 약물 투여군인 *P. Weinmannifolia* 30 mg/kg 투여군은 COPD 유발군에 비교하여, TNF- α 의 생성이 62.8 % ($P < 0.05$) 억제되었다.

[243]

[244] 아울러, 하기 표 9는 COPD 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물이 기관지폐포 세척액내 MCP-2의 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과이다.

[245] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

- [246] COPD 유도: 표준담배추출물로 유도된 COPD 유도군;
 [247] *P. Weinmannifolia* 추출물 처리 후 COPD 유도: 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물을 투여한 실험군.
 [248] 표 9

[Table 9]

그룹	MCP-2 (pg/mL)	저해율 (%)
NC	12.0 ± 1.75	-
COPD 유도	48.7 ± 15.02	-
<i>P.weinmannifolia</i> 추출물 처리 후 COPD 유도	17.6 ± 4.07	62.8

- [249]
 [250] 상기 표 9에서 확인할 수 있듯이, COPD 유도군은 기관지폐포 세척액 내 TMCP-2의 생성이 정상 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 하지만, 약물 투여군인 *P.Weinmannifolia* 30 mg/kg 투여군은 COPD 유발군에 비교하여, MCP-2의 생성이 62.8 % ($P < 0.05$) 억제되었다.
 [251]
 [252] 또한, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물은 COPD 및 만성폐쇄성 기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환의 예방 또는 치료용 효과를 유도하는 농도에서 대체적으로 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. 이는 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물이 인체에 부작용을 유발하지 않으면서 만성폐쇄성 폐질환 치료에 유용한 천연물질임을 확인한 것으로, COPD 및 만성폐쇄성 기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 기능성 사료 등에 안전하게 사용될 수 있음을 보여준다.
 [253]
 [254] 상기 결과를 종합하면, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물이 높은 COPD 및 만성폐쇄성 기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 다발성 경화증, 급성 및 만성 폐질환의 억제 활성을 가지는 것을 확인하였다.
 [255]
 [256] 하기에는 본 발명의 조성물을 의한 제제예를 예시한다.
 [257]
 [258] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**
 [259]
 [260] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물을 포함하는 약학적 제제는 다음과 같이 통상적인 방법에 따라 제조하였다.
 [261]

- [262] ※ 산제의 제조
- [263] - 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 2 g 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.002 내지 2 g(0.01 내지 10 중량%).
- [264] - 유당 1 g.
- [265] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [266]
- [267] ※ 정제의 제조
- [268] - 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 100 mg 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.1 내지 100 mg(0.01 내지 10 중량%).
- [269] - 옥수수 전분 100 mg.
- [270] - 유당 100 mg.
- [271] - 스테아린산 마그네슘 2 mg.
- [272] 상기 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [273]
- [274] ※ 캡슐제의 제조
- [275] - 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 100 mg 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.1 내지 100 mg(0.01 내지 10 중량%).
- [276] - 옥수수 전분 100 mg.
- [277] - 유당 100 mg.
- [278] - 스테아린산 마그네슘 2 mg.
- [279] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [280]
- [281] ※ 환제의 제조
- [282] - 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 1 g 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.1 내지 100 mg(0.01 내지 10 중량%).
- [283] - 유당 1.5 g.
- [284] - 글리세린 1 g.
- [285] - 자일리톨 0.5 g.
- [286] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [287]
- [288] ※ 과립의 제조
- [289] - 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아

추출물, 분획물 150 mg 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.1 내지 100 mg(0.01 내지 10 중량%).

[290] - 대두 추출물 50 mg.

[291] - 포도당 200 mg.

[292] - 전분 600 mg.

[293] 상기 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[294]

[295] 제제예 2. 식품 조성물 또는 식품의 제조

[296]

[297] 2-1. 밀가루 식품의 제조

[298] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 0.5 내지 5.0 중량% 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.01 내지 10 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 식품을 제조하였다.

[299]

[300] 2-2. 유제품 (dairy products)의 제조

[301] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 5 내지 10.0 중량% 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.01 내지 10 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[302]

[303] 2-3. 전식의 제조

[304] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 용액을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[305] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[306]

[307] 곡물류 (현미 30 중량%, 율무 15 중량%, 보리 20 중량%),

[308] 종실류 (들깨 7 중량%, 검정콩 8 중량%, 검정깨 7 중량%),

[309] 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물의 건조분말 (3 중량%) 또는

- 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) (1 중량%),
- [310] 영지 (0.5 중량%),
- [311] 지황 (0.5 중량%)
- [312]
- [313] 제제예 3. 음료의 제조
- [314]
- [315] 3-1. 건강음료의 제조
- [316] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 1000 mg 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 1 내지 1000 mg(0.01 내지 10 중량%).
- [317] 구연산 1000 mg.
- [318] 올리고당 100 g.
- [319] 매실 농축액 2 g.
- [320] 타우린 1 g.
- [321] 정제수를 가하여 전체 900 ml.
- [322] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [323] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [324]
- [325] 3-2. 야채 주스의 제조
- [326] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 5 g 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.05 내지 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채 주스를 제조하였다.
- [327]
- [328] 3-3. 과일 주스의 제조
- [329] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 분획물 1 g 또는 화합물 피스타칼콘(PW12) 또는 피스타칼콘 B(PW13) 0.01 내지 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일 주스를 제조하였다.
- [330]
- [331] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만

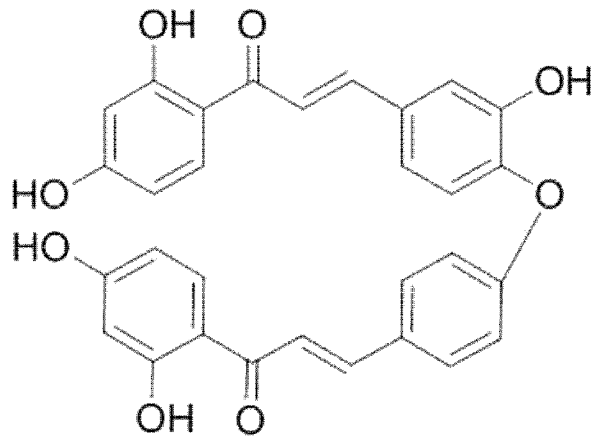
한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

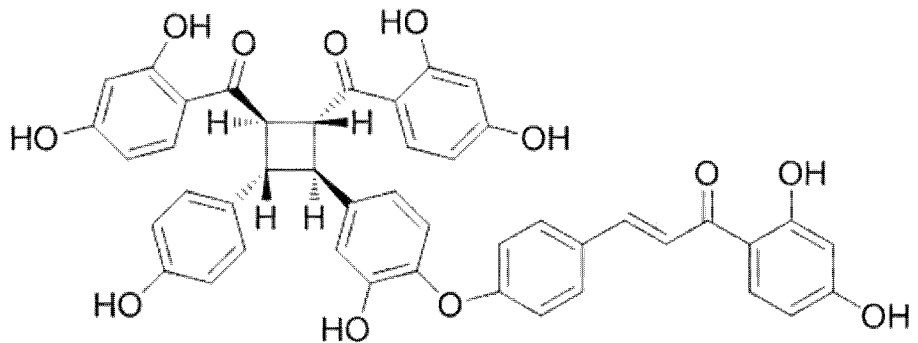
[청구항 1] 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하고 만성폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것인 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



[청구항 3] 제1항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

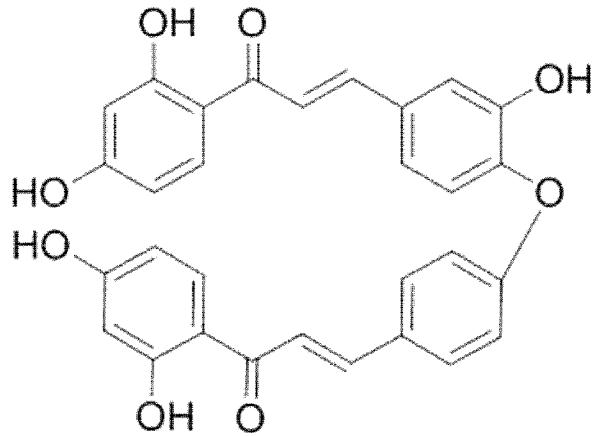
[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 ~ C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출된 것인 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출된 것인 약학적 조성물.

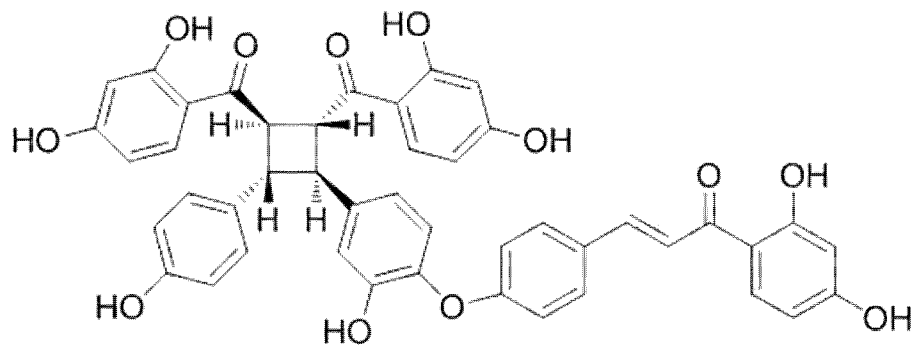
[청구항 6] 제1항에 있어서 상기 분획물은 물, C1 ~ C4의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획한 것인 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 만성폐쇄성 폐질환은 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종(Emphysema), 다발성 경화증, 급성 및

- 만성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 추출물, 분획물 및 화합물은 하기의 활성을 나타내는 것인 약학적 조성물:
- (a) 기관지 또는 혈관 주위의 염증세포 수 및 호중구의 수 감소;
 - (b) CD4⁺ 또는 Neutrophils+Gr-1⁺ 세포 수 감소;
 - (c) CXCL-1의 생성 억제;
 - (d) TNF- α 의 생성 억제;
 - (e) MCP-2의 생성 억제.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 1 내지 10 중량%; 또는 이로부터 분리한 화합물을 0.01 내지 10 중량%로 함유하는 것인 조성물.
- [청구항 10] 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능성 식품인 것인 식품 조성물.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 치료용 식품 조성물.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 ~ C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출된 것인 식품 조성물.
- [청구항 14] 제10항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출된 것인 식품 조성물.
- [청구항 15] 제10항에 있어서 상기 분획물은 물, C1 ~ C4의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획한 것인 식품 조성물.
- [청구항 16] 제10항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것인 조성물.
- [화학식 1]



[화학식 2]



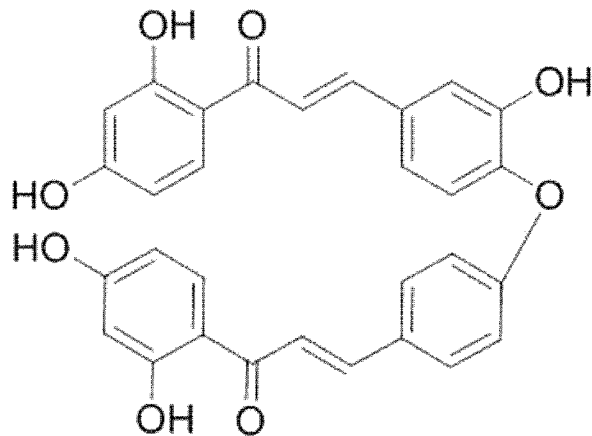
[청구항 17]

제10항에 있어서, 상기 만성폐쇄성 폐질환은 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종(Emphysema), 다발성 경화증, 급성 및 만성 염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 식품 조성물.

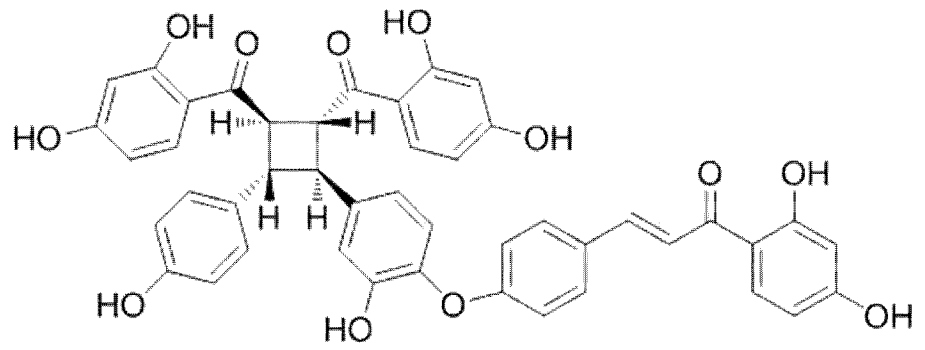
[청구항 18]

피스타시아 웨인마니폴리아, 이의 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리한 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물.

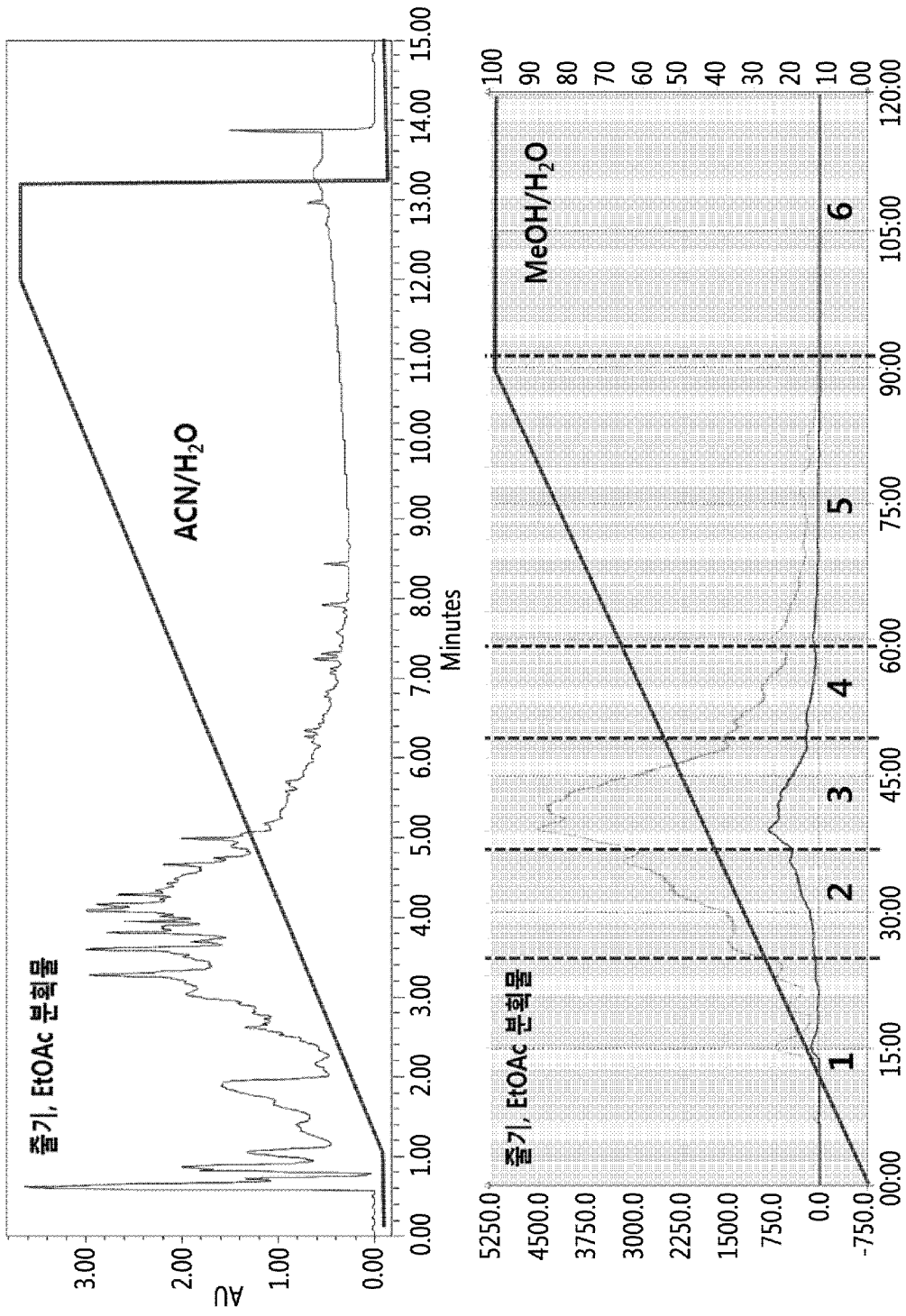
[화학식 1]



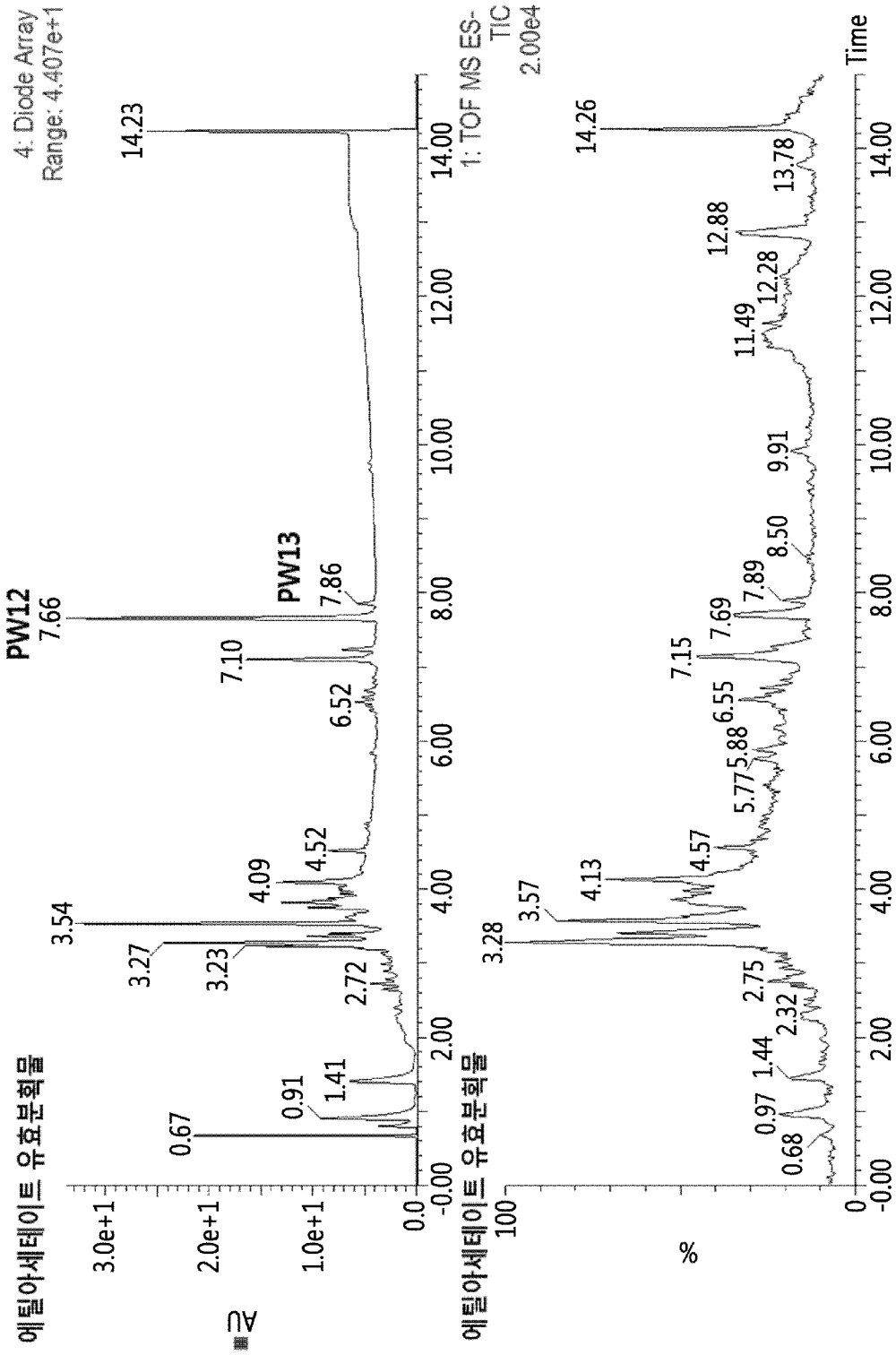
[화학식 2]



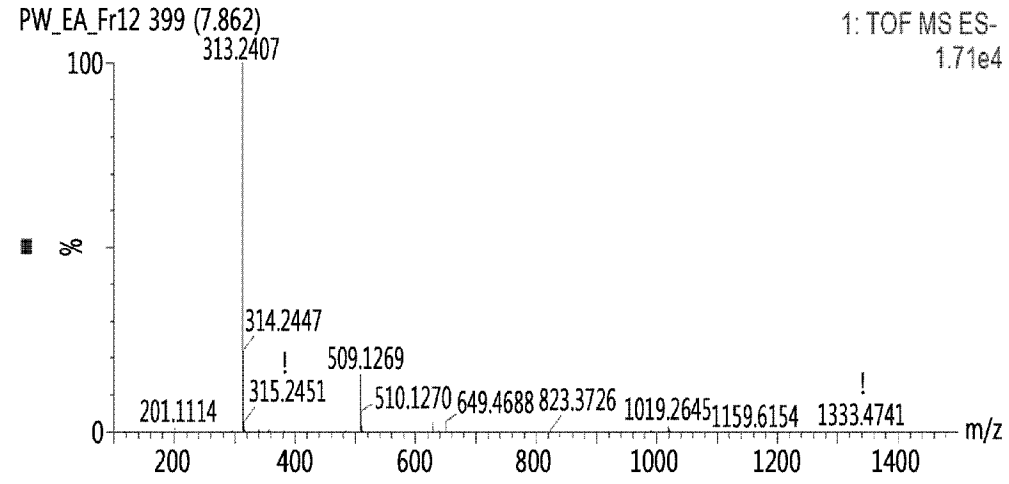
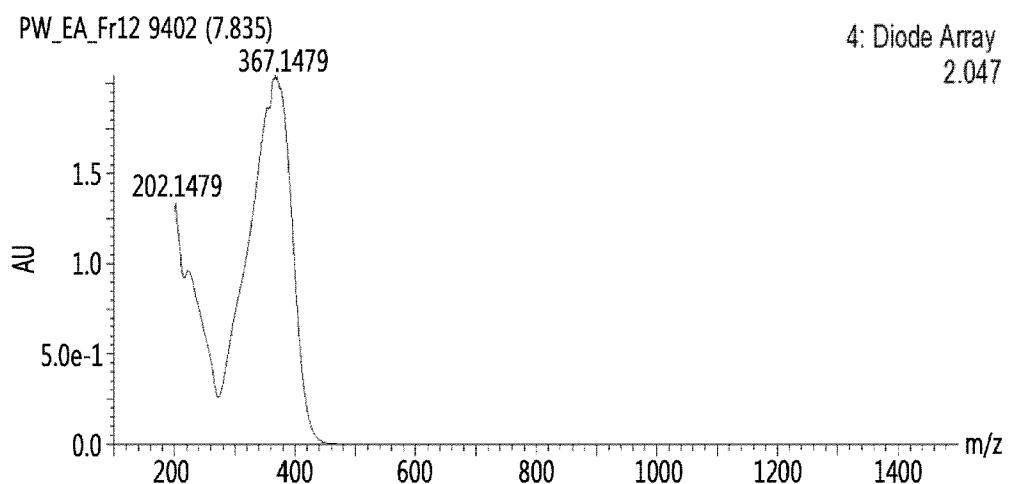
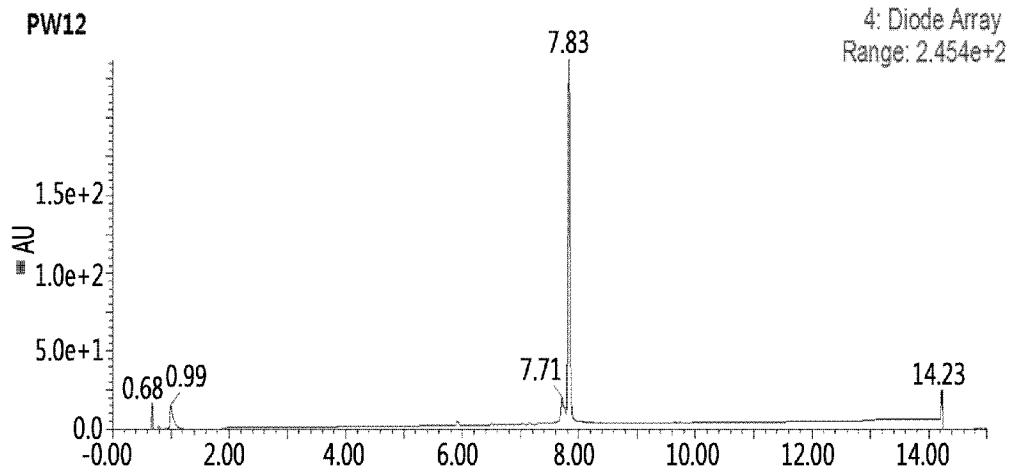
[Fig. 1]



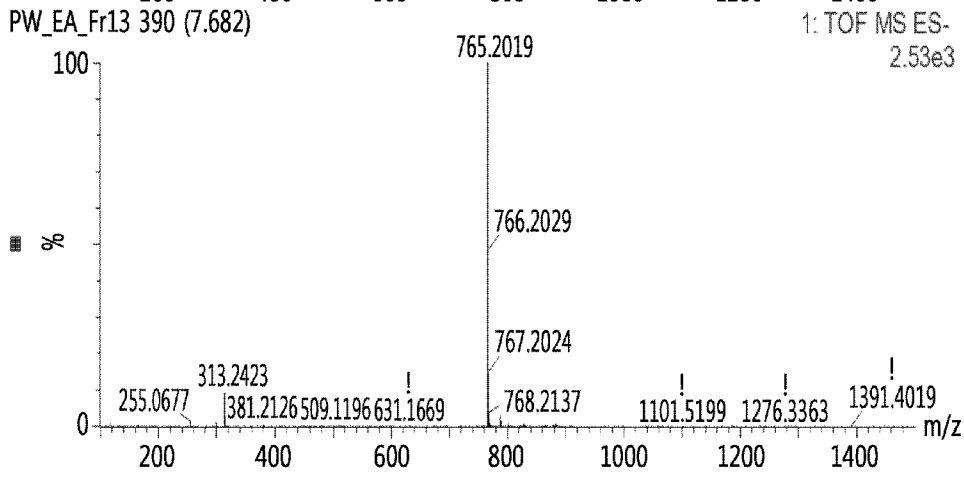
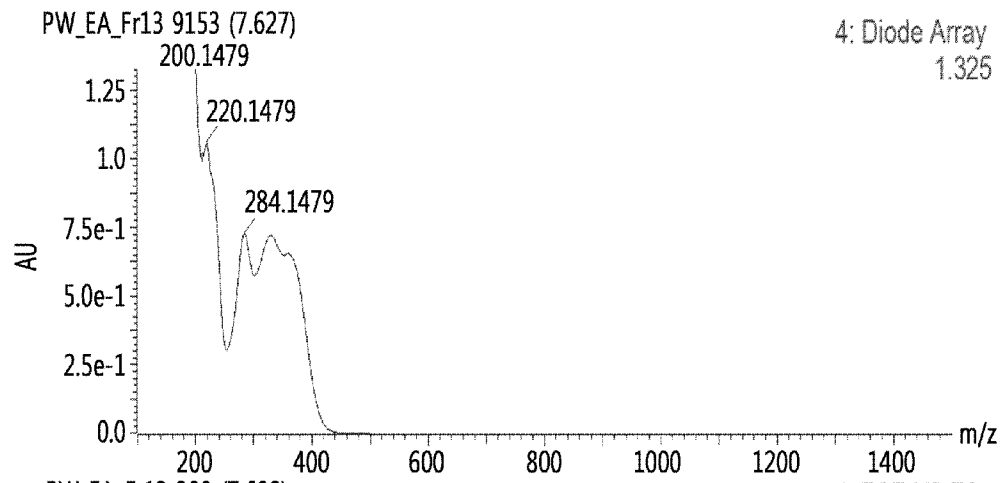
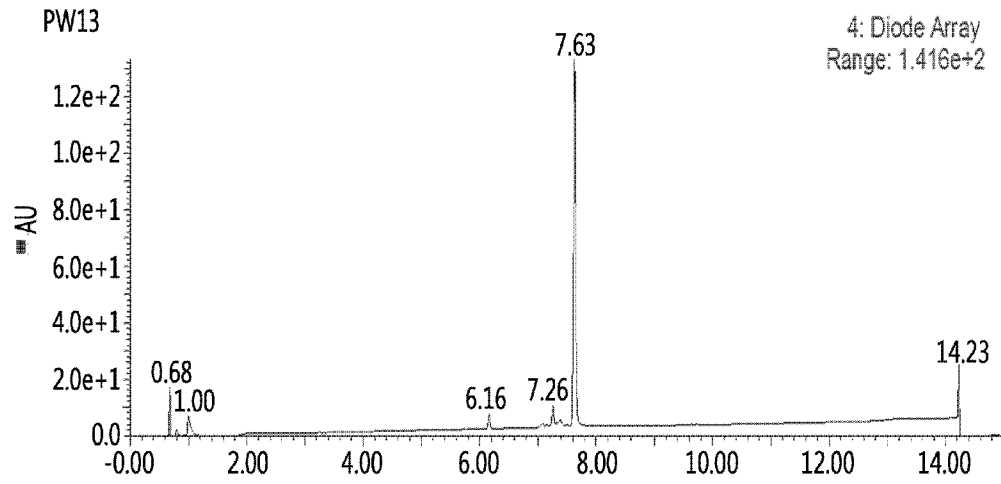
[Fig. 2]



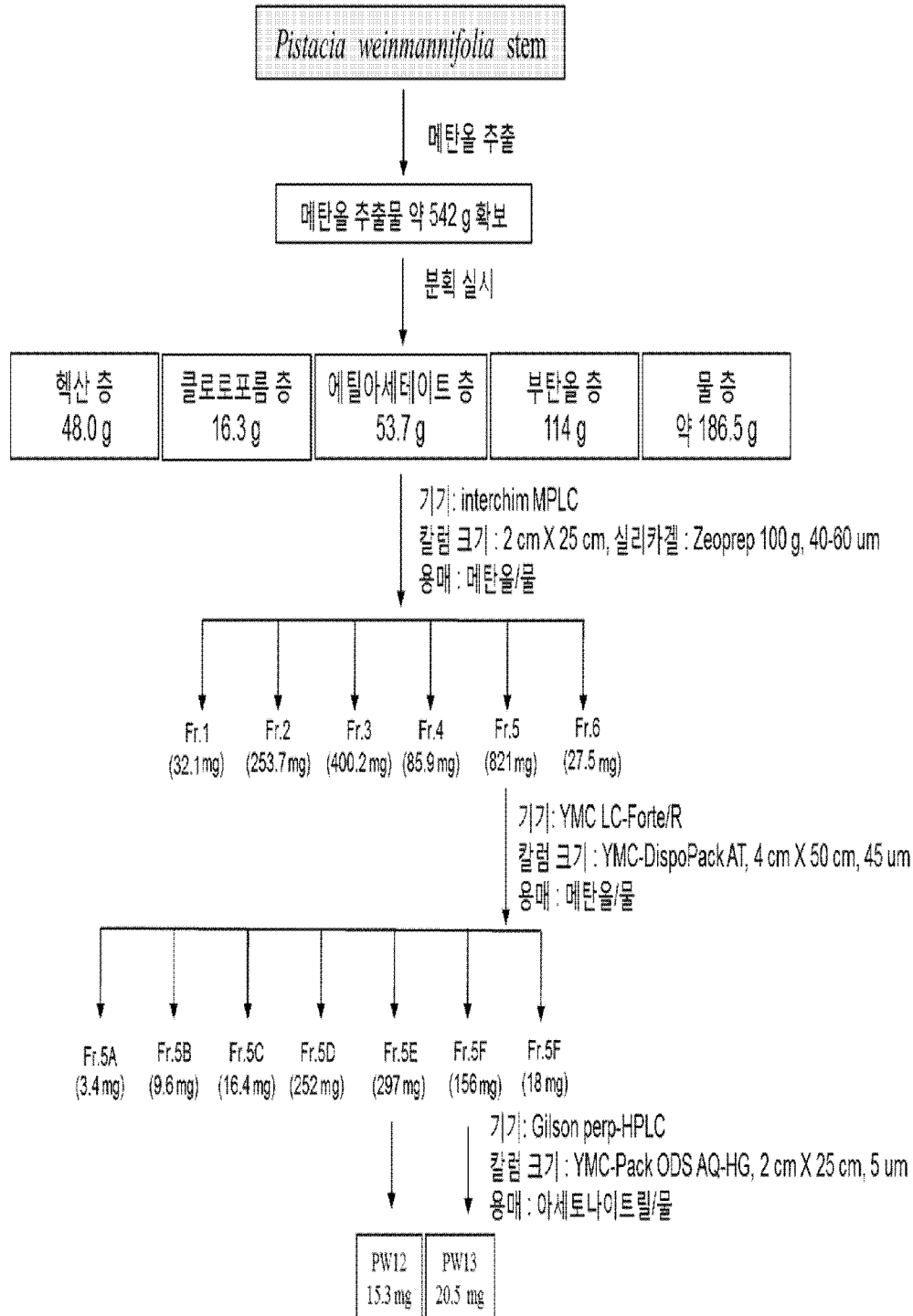
[Fig. 3a]



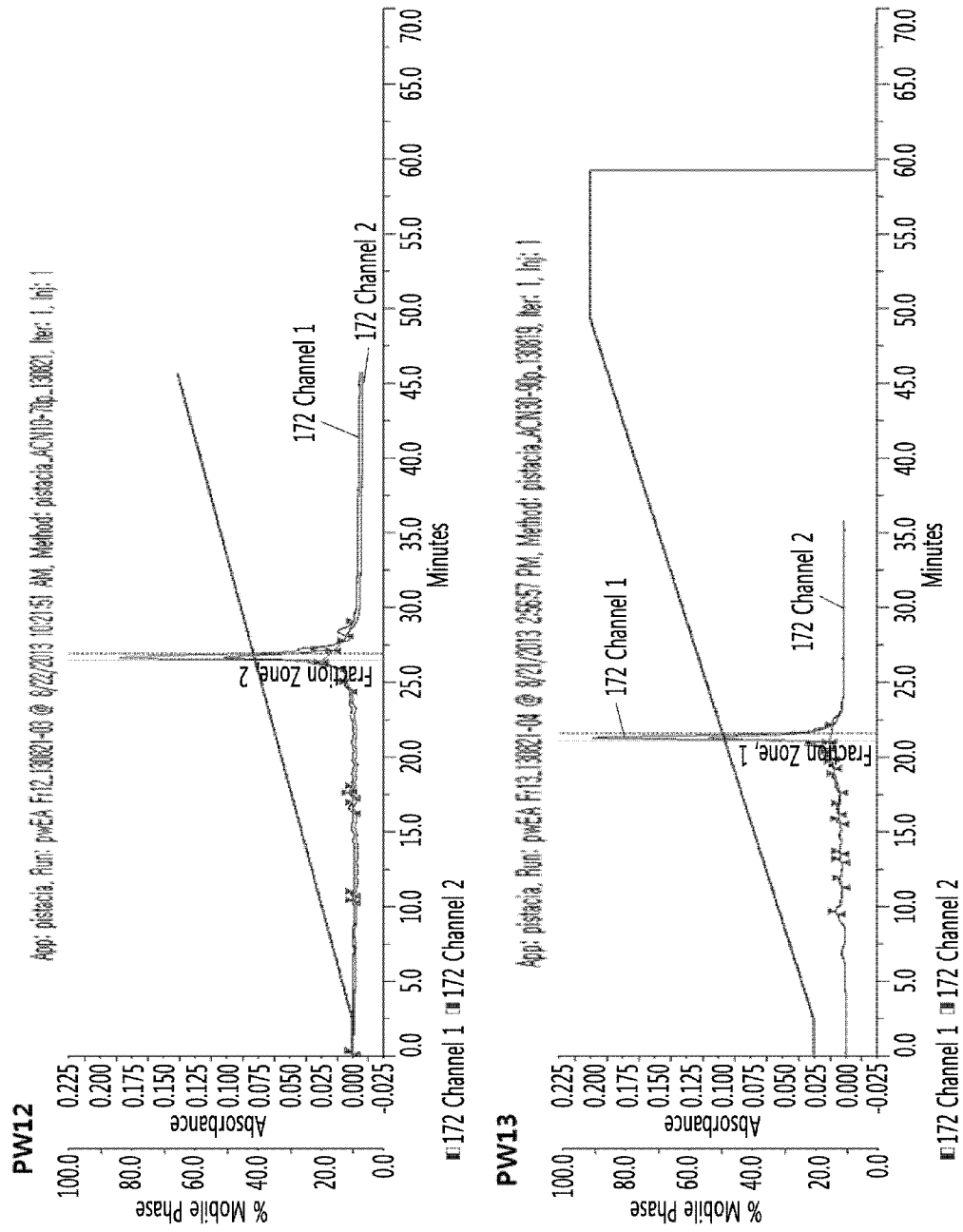
[Fig. 3b]



[Fig. 4a]

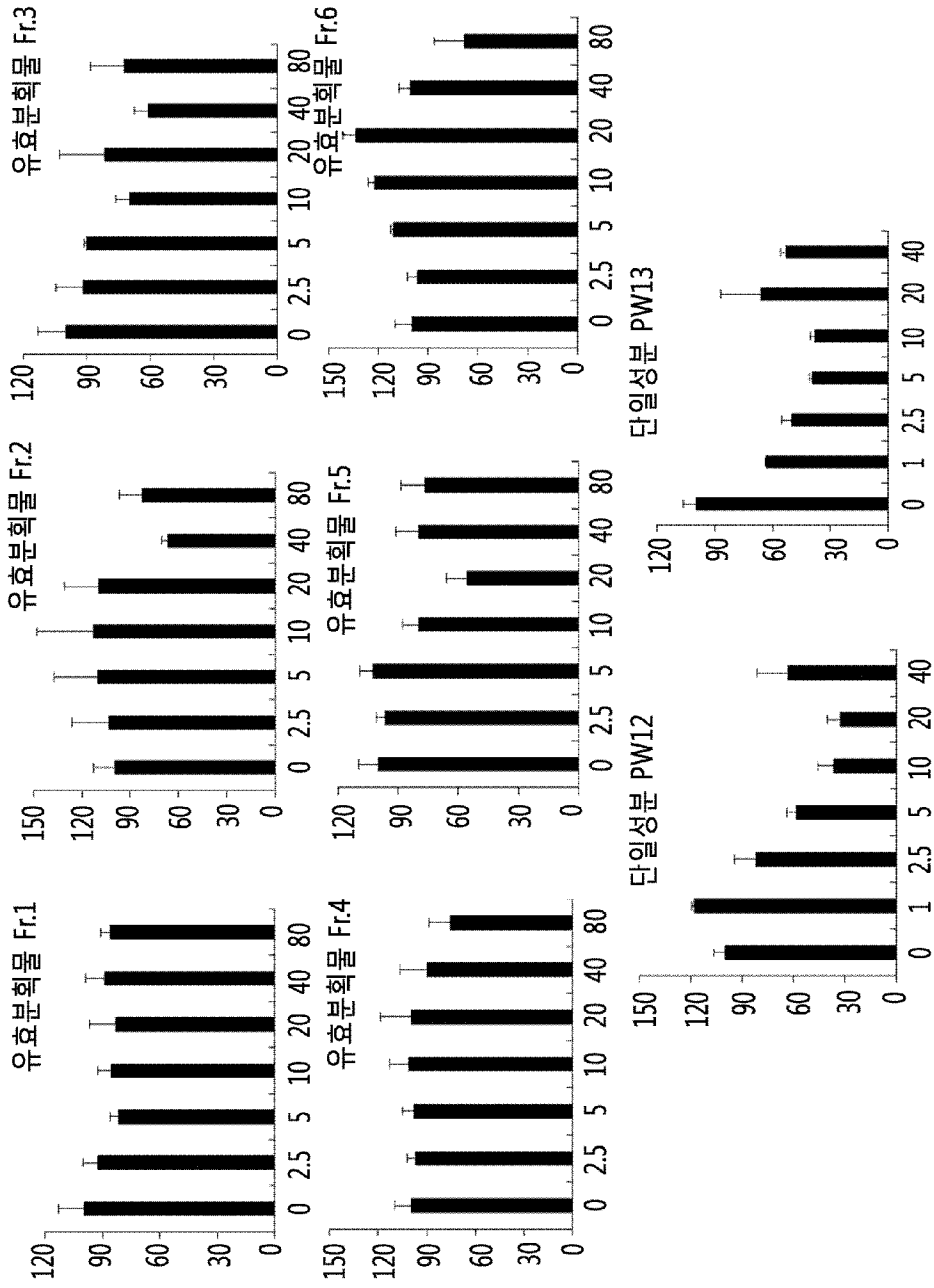


[Fig. 4b]



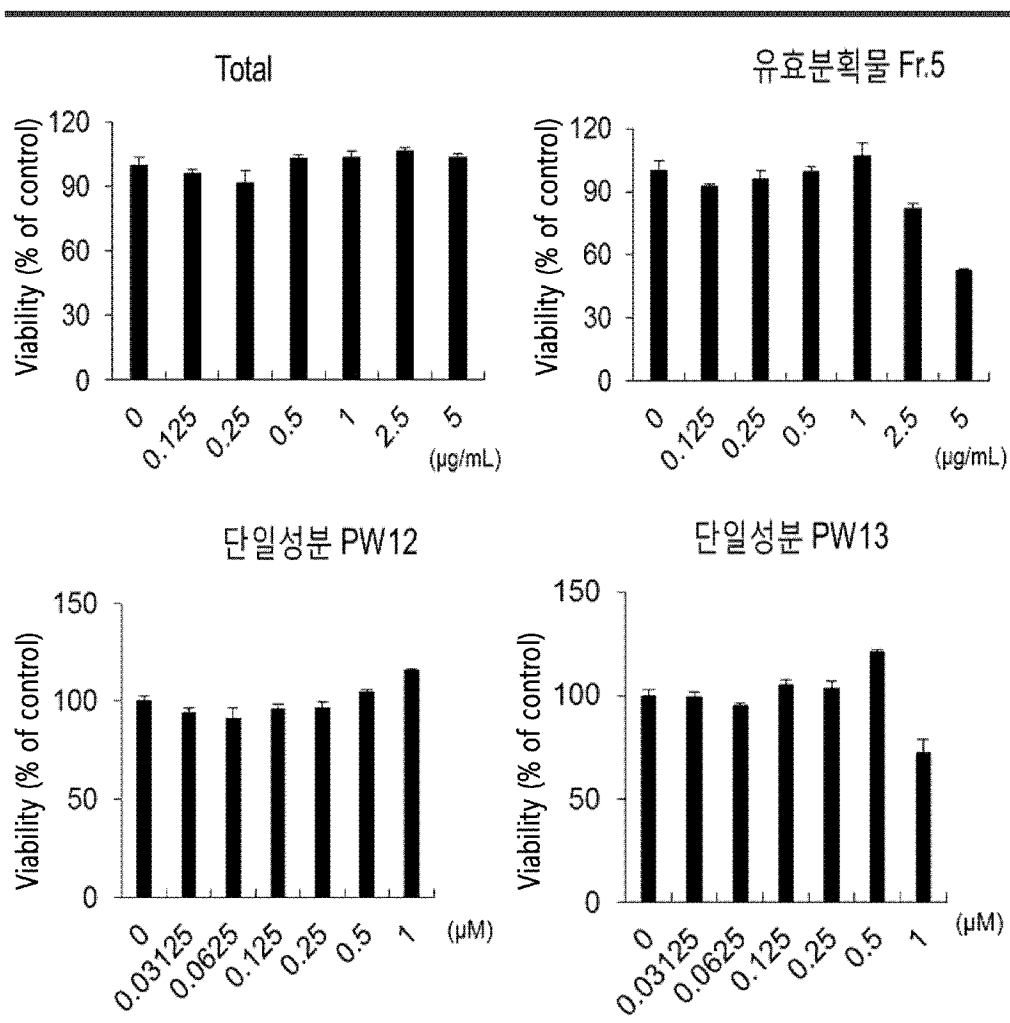
[Fig. 5]

Cell cytotoxicity(CCK-8) ; Pistacia



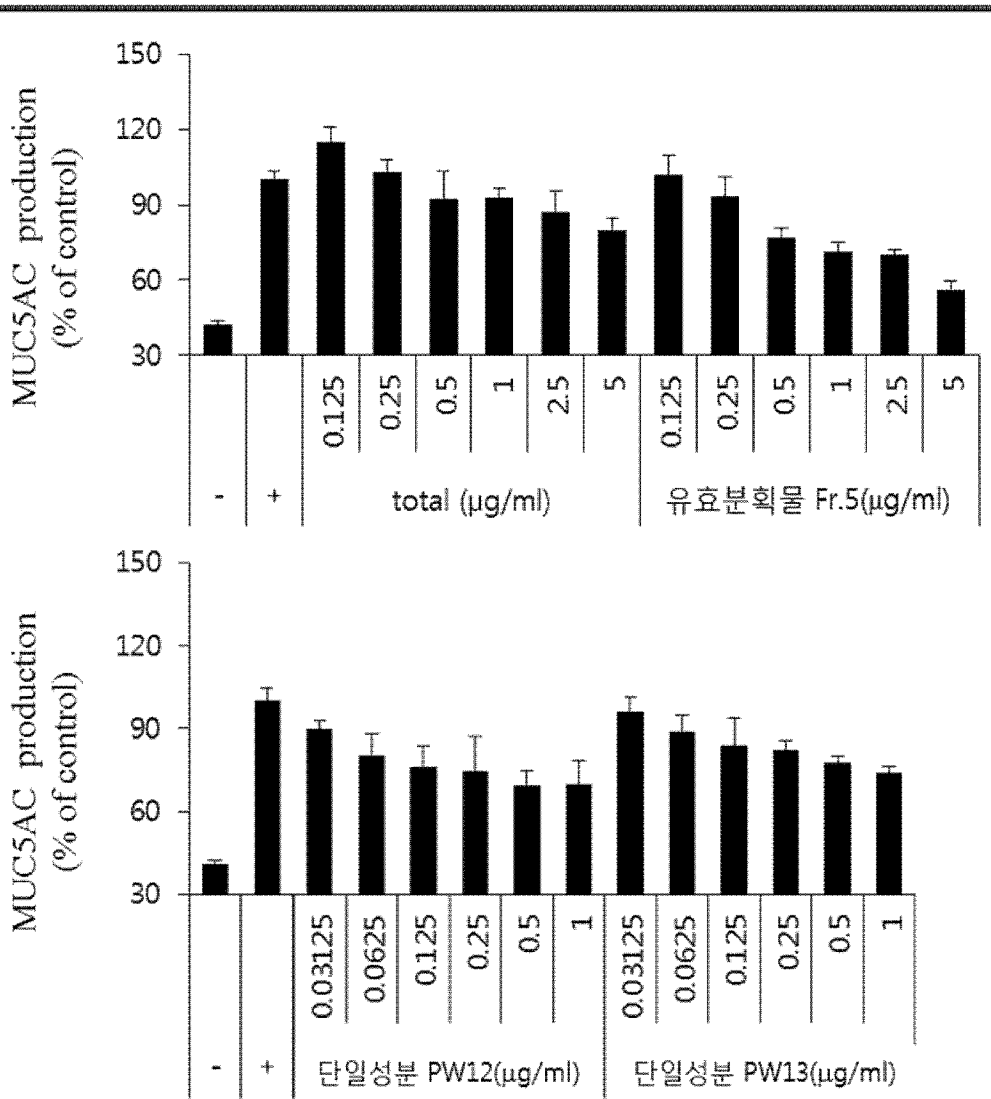
[Fig. 6]

Cell cytotoxicity(CCK-8) ; Pistacia



[Fig. 7]

MUC5AC secretion (ELISA)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/22(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/22; A61K 31/365; A61K 31/47; A61P 11/00

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: pistacia weinmannifolia, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, inflammation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHAO, X. et al., "Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of Pistacia weinmannifolia", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005, vol. 1725, pages 103-110 See abstract and pages 104, 109.	1,3-15,17
A		2,16,18
Y	RAHMAN, I., "Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2012, vol. 1822, pages 714-728 See abstract and page 715.	1,3-15,17
A	MDEE, L. K. et al., "Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from the root bark of Rhus pyroides", Journal of Natural Products, 2003, vol. 66, pages 599-604 See abstract and page 599.	1-18
A	MINAMI, K. et al., "Isolation and identification of histamine-release inhibitors from Pistacia weinmannifolia J. Pissou ex. Franch", Journal of Natural Medicines, 2006, vol. 60, pages 138-140 See the entire document.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 JULY 2015 (28.07.2015)

Date of mailing of the international search report

29 JULY 2015 (29.07.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003881

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2559434 A2 (MIKE, N. et al.) 20 February 2013 See abstract; paragraphs [0014], [0025]-[0056]; and claims 1-3.	1-18
A	QIN, S. et al., "Epigallocatechin-3-gallate reduces airway inflammation in mice through binding to proinflammatory chemokines and inhibiting inflammatory cell recruitment" The Journal of Immunology, 2011, vol. 186, pages 3693-3700 See the entire document.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/003881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
EP 2559434 A2	20/02/2013	EP 2037916 A2	25/03/2009
		EP 2126784 A2	02/12/2009
		EP 2170317 A1	07/04/2010
		EP 2170317 A4	23/03/2011
		EP 2526938 A2	28/11/2012
		EP 2526938 A3	12/06/2013
		EP 2559434 A3	29/05/2013
		US 2007-0238750 A1	11/10/2007
		US 2008-0207530 A1	28/08/2008
		US 2008-0219281 A1	11/09/2008
		US 2010-0144718 A1	10/06/2010
		US 2012-295933 A1	22/11/2012
		US 8207188 B2	26/06/2012
		US 8207292 B2	26/06/2012
		WO 2007-117704 A2	18/10/2007
		WO 2007-117704 A3	03/04/2008
		WO 2008-100536 A1	21/08/2008
		WO 2008-100537 A2	21/08/2008
		WO 2008-100537 A3	30/10/2008
		WO 2008-100539 A1	21/08/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 36/22(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 36/22; A61K 31/365; A61K 31/47; A61P 11/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 피스타시아 웨인마니폴리아, 만성폐쇄성 폐질환, 폐기종, 염증

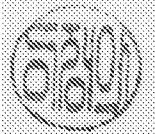
C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	ZHAO, X. 등, 'Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of Pistacia weinmannifolia', Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005년, 1725권, 페이지 103-110 요약 및 페이지 104, 109 참조.	1,3-15,17
A		2,16,18
Y	RAHMAN, I., 'Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD', Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2012년, 1822권, 페이지 714-728 요약 및 페이지 715 참조.	1,3-15,17
A	MDEE, L. K. 등, 'Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from the root bark of Rhus pyroides', Journal of Natural Products, 2003년, 66권, 페이지 599-604 요약 및 페이지 599 참조.	1-18
A	MINAMI, K. 등, 'Isolation and identification of histamine-release inhibitors from Pistacia weinmannifolia J. Pissou ex. Franch', Journal of Natural Medicines, 2006년, 60권, 페이지 138-140 전체 문헌 참조.	1-18

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2015년 07월 28일 (28.07.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 07월 29일 (29.07.2015)
--------------------------------------------	-------------------------------------------

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 이정아 전화번호 +82-42-481-8740	
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EP 2559434 A2 (MIKE, N. 등) 2013.02.20 요약; 단락 [0014], [0025]-[0056]; 및 청구항 1-3 참조.	1-18
A	QIN, S. 등, `Epigallocatechin-3-gallate reduces airway inflammation in mice through binding to proinflammatory chemokines and inhibiting inflammatory cell recruitment` The Journal of Immunology, 2011년, 186권, 페이지 3693-3700 전체 문헌 참조.	1-18

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 2559434 A2	2013/02/20	EP 2037916 A2	2009/03/25
		EP 2126784 A2	2009/12/02
		EP 2170317 A1	2010/04/07
		EP 2170317 A4	2011/03/23
		EP 2526938 A2	2012/11/28
		EP 2526938 A3	2013/06/12
		EP 2559434 A3	2013/05/29
		US 2007-0238750 A1	2007/10/11
		US 2008-0207530 A1	2008/08/28
		US 2008-0219281 A1	2008/09/11
		US 2010-0144718 A1	2010/06/10
		US 2012-295933 A1	2012/11/22
		US 8207188 B2	2012/06/26
		US 8207292 B2	2012/06/26
		WO 2007-117704 A2	2007/10/18
		WO 2007-117704 A3	2008/04/03
		WO 2008-100536 A1	2008/08/21
		WO 2008-100537 A2	2008/08/21
		WO 2008-100537 A3	2008/10/30
		WO 2008-100539 A1	2008/08/21