



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0174642
(43) 공개일자 2024년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/48 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 11/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/48 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0074141

(22) 출원일자 2023년06월09일

심사청구일자 2023년06월09일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정형상

서울특별시 성동구 고산자로 160, 108동 701호

손영주

서울특별시 강남구 역삼로 315-1, 501동 1601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

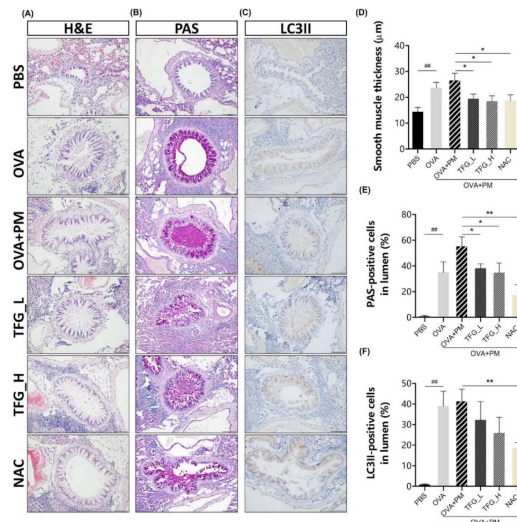
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 호로파 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 호로파 종자 추출물의 호흡기 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 본 발명의 호로파 종자 추출물이 ROS 생성을 억제하고, 염증성 사이토카인을 감소시키며, MAPK 및 자가포식 신호경로를 억제함으로써 천식, 특히, 미세먼지에 기인하여 악화된 천식을 예방 및 완화하였으므로, 이를 천식의 예방 또는 치료 용도, 특히, 미세먼지에 노출되어 악화된 천식의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/314 (2013.01)

(72) 발명자

김은영

경기도 성남시 중원구 은이로24번길 4, 302호

김업지

서울특별시 은평구 갈현로29길 14

박호연

경상북도 예천군 호명면 양지로 55, 103동 2501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711189201

과제번호 2020R1A2C2005836

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 (초)미세먼지 위해성 표준평가 시스템 구축 및 한약물의 미세먼지 유발질환 제어 효
과 및 기전 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

호로파(*Trigonella foenum-graecum* Linne) 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 추출물은 물, 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 용매로 추출된, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 추출물은 에탄올 추출물인, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 호로파 종자 추출물은 트리코넨린(Trigonelline)을 함유하는, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 호흡기 질환은 천식(asthma), 만성폐쇄성폐질환(COPD), 미만성 간질성 폐질환, 급성호흡곤란 증후군, 급성 폐손상, 낭성섬유증(cystic fibrosis), 세균성폐렴(bacterial pneumonia), 결핵(tuberculosis) 또는 수혈관련급성폐장애(transfusion-related acute lung injury)인, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 호흡기 질환은 중증도 천식인, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 미세먼지 노출에 의해 악화된 호흡기 질환인, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 호흡기 질환은 미세먼지 노출에 의해 유발되거나 중증도가 높아진 천식인, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 미세먼지는 평균 입자 크기 3 내지 7 μm 의 미세먼지인, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서, 미세먼지는 다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 질소-치환된 PAHs (nitro-PAHs), 다염화바이페닐(polychlorinated biphenyl, PCB) 동질체(congeners) 및 염소체(chlorinated pesticides)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 7항에 있어서, 미세먼지는 알루미늄(Aluminum, Al), 안티모니(Antimony, Sb), 비소(Arsenic, As), 브롬(Bromine, Br), 칼슘(Calcium, Ca), 카드뮴(Cadmium, Cd), 세슘(Cerium, Ce), 염소(Chlorine, Cl), 코발트

(Cobalt, Co), 크롬(Chromium, Cr), 구리(Copper, Cu), 철(Iron, Fe), 납(Lead, Pb), 망간(Magnesium, Mg), Manganese, Mn), 수은(Mercury, Hg), 니켈(Nickel, Ni), 포타슘(Potassium, K), Rubidium, Rb), 소듐(Sodium, Na), 스트론튬(Strontium, Sr), 황(Sulfur, S), 티타늄(Titanium, Ti), 바나듐(Vanadium, V) 및 아연(Zinc, Zn)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

호로과 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 호로과 종자 추출물의 호흡기 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증 반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생 하려고 하는 생체의 방어 반응과정이다. 따라서 이러한 일련의 반응에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포, 면역관여 세포 등이 포함된다. 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환이 사이토카인(cytokine)이라는 분자 수준에서의 이해가 시도되고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다. 알러지 반응은 그 반응 형태에 의해 I형, II형, III형 및 IV형의 4 가지 유형으로 분류될 수 있고, 또는 항원에 의한 재감작(感作) 후 발증까지의 시간에 의해서 I형, II형 및 III형 알러지는 즉시형 알러지라고 불리며, IV형 알러지는 지연형 알러지로 분류될 수 있다. 이 중, I형 알러지는 IgE 항체가 관여하는 반응으로서, 아나필락시형 알러지라고 불리우며, 여기에는 기관지 천식, 아토피성 질환(피부염, 장염 등), 화분증 등의 알러지성 비염, 알러지성 결막염, 음식물 알러지 등이 포함된다.

[0003] 천식(asthma)은 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민성을 그 특징으로 하는 질환으로, 기도 염증과 기도 과민증은 기침, 천명(喘鳴), 호흡 곤란, 가슴 답답함 등의 증상을 일으키며, 대부분의 천식은 알러지성이고, 만성 기도염증(chronic airway inflammation)과 기도 과민반응성(bronchial hyperresponsiveness)이 특징이다 (Minoguchi K and Adachi M. Pathophysiology of asthma. In: Cherniack NS, Altose MD, Homma I, editors. Rehabilitation of the patient with respiratory disease. New York: McGraw-Hill, 1999, pp97-104). 천식은 알레르기 질환의 특징적인 염증 양상을 보이는데, 알레르겐을 감지하면 활성화된 점막 비만세포는 히스타민(기관지 수축과 염증반응), 류코트리엔(leukotrienes), 프로스타글란딘D2(기관지 수축제)와 같은 기도수축 매개체를 분비한다. 활성화된 호산구와 자연살해 T세포(TCR invariant natural killer T cell)가 증가하며, 기도상피 세포에 손상을 주는 사이토카인(염증반응을 전반적으로 조절)과 케모카인(염증세포 동원) 등의 염증물질을 분비하여 증상이 유발된다. 평활근 세포의 비후(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)이 발생하는 것과 함께 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 같은 성장인자의 영향으로 기도 내 혈관이 증식되며 기도 벽의 두께가 증가한다. 천식은 TH2(T helper 2) 타입 면역세포가 생성하는 인터루킨-4, 5, 13에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도 주변 조직으로 이동, 침윤하기 때문에 만성 염증질환으로도 인식되고 있다 (Elias JA, et al., J. Clin. Invest., 111, pp291-297, 2003). Th2(T helper type 2) 타입의 면역반응이 항진되어 이에 따라 인터루킨(interleukin)-4, 5, 13 등의 분비가 증가되게 되며 (Liu et al., 2006; Williams et al., 2012), 이러한 반응과 연계하여 호산구를 비롯한 많은 염증세포들이 폐조직 내로 이동 및 침윤하게 된다 (Zhou et al., 2011). 또한 염증세포들은 다양한 전염증인자 및 화학주성인자들을 방출하여, 염증반응을 더욱 악화시키며, 기도 내 배상세포의 점액분비를 증가시키고, 기도 과민성을 야기하게 된다 (Chibana et al., 2008). 이러한 일련의 반응으로 인하여 천식환자들은 호흡곤란, 청색증 및 흉통 등의 임상증상을 나타내게 된다. 따라서 염증세포 활성화에 관여하는 IL-4, IL-5, IL-13 등 사이토카인 및 면역글로불린 E의 생산과 이들의 작용으로 호산구 등 염증세포에서 분비되는 시스테인 류코트리엔 생합성 등은 염증 및 알러지 반응과 이로 인한 천식을 유발하는 주요 원인이므로 이들의 생산을 억제하기 위한 약물을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

[0004] 천식은 만성적이고 재발이 많은 질환으로, 치료 방법으로는 증상을 완화시키고 재발을 방지하기 위한 약제를 사용하는 약물요법과, 천식의 원인 물질을 찾아 원인 알레르겐 노출을 최소화하고 악화인자로부터 회피하는 회피

요법이 있다. 또한 원인 물질을 소량씩 주사하여 알레르기 체질을 개선하는 면역요법 등의 치료방법들이 있다. 그 중 약물요법에 사용하는 천식 치료 약물은 좁아진 기관지를 짧은 시간 내에 완화시키는 증상 완화제와 기관지의 알레르기 염증을 억제하여 천식발작을 예방하는 질병 조절제로 구분한다. 대표적인 증상 완화제로 베타2 항진제(작용제), 테오필린(theophylline)으로 대표되는 잔틴(xanthine)계 약물, 부교감신경 차단제(anticholinergics; 항콜린제) 등이 널리 사용되고 있으며, 질병 조절제로는 부신피질스테로이드와 류코트리엔 조절제 등이 사용되고 있다.

[0005] 그러나, 베타2 항진제와 같은 증상 완화제는 근본적인 천식을 근본적으로 치료하지 못하기 때문에 규칙적으로 사용해야 하며 이로 인한 신체 부작용을 유발할 수 있다. 스테로이드 또한 오랫동안 사용하는 경우 혈당 상승, 혈압 상승, 체중 증가, 기분 변화, 골다공증, 위궤양 등과 같은 심각한 부작용이 생길 수 있으며, 또 전체 천식 환자 중에서 약 5% 정도가 약에 대한 내성이 생겨서 약물이 천식에 전혀 반응하지 않아 상당히 위험한 상태에 빠질 수가 있다.

[0006] 한편, 미세먼지 (Particulate Matter, PM)는 대기오염으로 인한 대기오염물질 중 하나로 알레르기 질환의 주범으로 지목되고 있으며, 천식 환자의 기도 염증 반응을 악화시키고 천식 증상을 악화시켜 천식의 유병률과 중증도(severity)를 높이는 것으로 알려져 있다. 미세먼지는 황사와 달리, 공장, 자동차 등에서 사용하는 화석연료에 의한 인위적인 오염물질로서, 질산염(NO_3^-), 암모늄(NH_4^+), 황산염(SO_4^{2-}) 등의 이온 성분과 탄소화합물, 금속 화합물 등을 포함하며, 우리나라 및 동북아시아 국가들의 급격한 산업화가 미세먼지의 주요 발생 원인으로 보고되고 있다 (Myung, 2016). 오랜시간 미세먼지에 노출될 경우 면역력이 급격히 저하하여, 감기, 천식, 기관지염 등의 호흡기 질환을 불러일으키며, 이외에 심혈관질환, 피부질환, 안구질환 등의 각종 질병을 유발한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 아울러, 본 발명의 목적은 호흡기 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 호로과 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 호로과 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 본 발명의 호로과 종자 추출물이 ROS 생성을 억제하고, 염증성 사이토카인을 감소시키며, MAPK 및 자가포식 신호경로를 억제함으로써 천식, 특히, 미세먼지에 기인하여 악화된 천식을 예방 및 완화하였으므로, 이를 천식의 예방 또는 치료 용도, 특히, 미세먼지에 노출되어 악화된 천식의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 호로과 추출물 (TFG)의 LC-MS 분석 결과를 나타낸 도이다:

A: 트리코넬린; 및

B: 호로과 추출물.

도 2는 PM(particulate matter, 미세먼지) 처리한 세포에서 TFG 처리에 의한 ROS, 염증성 사이토카인, MAPK 신호전달 경로 및 AKT/mTOR 신호전달 경로의 변화를 확인한 도이다:

A: 세포 생존율;

B: ROS 생성;

- C: TFG 전처리 후 PM 처리한 세포에서 염증성 사이토카인 수준;
D: TFG 전처리 후 IL-4/TNF- α 처리한 세포에서 염증성 사이토카인 수준;
E: TFG 전처리 후 PM+IL-4/TNF- α 처리한 세포에서 염증성 사이토카인 수준;
F: MAPK 신호전달 경로 단백질의 발현;
J: AKT/mTOR 신호전달 경로 단백질의 발현;
G, H 및 I: PM 처리된 세포에서 t-ERK에 대한 p-ERK, t-JNK에 대한 p-JNK, 및 t-p38에 대한 p-p38의 밀도 비율; 및
K 및 L: PM 처리된 세포에서 β -actin에 대한 p-AKT 및 p-mTOR의 밀도 비율.
- 도 3은 PM 처리된 세포에서 DNA 손상에 대한 TFG의 영향을 확인한 도이다.
- 도 4는 PM 노출에 의해 악화된 OVA-유도 알러지성 천식 동물모델에 PM 및 TFG 처리 일정을 나타낸 도이다.
- 도 5는 PM에 노출되어 악화된 천식 마우스 모델에서 TFG 투여에 의한 장기 무게 변화를 확인한 도이다:
- A: 마우스 체중;
B, C 및 D: ALT, AST 및 간 무게; 및
E, F 및 G: 신장, 폐 및 비장 무게.
- 도 6은 PM에 노출되어 악화된 천식 마우스 모델의 BALF에서 TFG 투여에 의한 혈청 IgE 수준 및 염증성 사이토카인 수준의 변화를 확인한 도이다:
- A: 혈청 내 총 IgE;
B: 혈청 내 OVA-특이적 IgE 수준;
C 내지 F: BALF 상등액 내 염증성 사이토카인 수준;
G: BALF 내 총 세포수;
H: BALF 내 대식세포 수;
I: BALF 내 림프구 수; 및
J: BALF 세포 이미지.
- 도 7은 PM에 노출되어 악화된 천식 마우스 모델의 폐 조직에서 TFG 투여에 의한 평활근 두께 및 자가포식 정도의 변화를 확인한 도이다:
- A: H&E 염색을 통해 확인한 평활근;
B: PAS 염색으로 확인한 내강 내 기도 점액 분비;
C: 자가포식 마커 단백질 LC3II의 발현;
D: H&E 염색을 통해 확인한 평활근 두께;
E: PAS 염색으로 확인한 내강 내 기도 점액 분비율; 및
F: 자가포식 마커 단백질 LC3II 양성 세포 비율.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0014] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용

된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [0016] 일 측면에서, 본 발명은 호로파(*Trigonella foenum-graecum* Linne) 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 일 구현예에서, 추출물은 물, 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 용매로 추출될 수 있으며, 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 헥산(n-헥산), 에테르, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 사이클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 벤젠 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 에탄올인 것이 더욱 바람직하며, 30% 에탄올인 것이 가장 바람직하다.
- [0018] 일 구현예에서, 본 발명의 호로파 종자 추출물은 트리코넬린(Trigonelline)을 함유할 수 있다.
- [0019] 일 구현예에서, 호흡기 질환은 천식(asthma), 만성폐쇄성폐질환(COPD), 미만성 간질성 폐질환, 급성호흡곤란증후군, 급성 폐손상, 낭성섬유증(cystic fibrosis), 세균성폐렴(bacterial pneumonia), 결핵(tuberculosis) 또는 수혈관련급성폐장애(transfusion-related acute lung injury)일 수 있으며, 미세먼지 노출에 의해 악화된 호흡기 질환일 수 있다.
- [0020] 일 구현예에서, 호흡기 질환은 중증도 천식일 수 있고, 미세먼지 노출에 의해 유발되거나 중증도가 높아진 천식일 수 있다.
- [0021] 일 구현예에서, 상기 미세먼지 (SRM 1648a, NIST)는 평균 입자 크기 3 내지 7 μm 의 미세먼지일 수 있다.
- [0022] 일 구현예에서, 상기 미세먼지는 다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 질소-치환된 PAHs (nitro-PAHs), 다염화바이페닐(polychlorinated biphenyl, PCB) 동질체(congeners) 및 염소체(chlorinated pesticides)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0023] 일 구현예에서, 상기 미세먼지는 알루미늄(Aluminum, Al), 안티모니(Antimony, Sb), 비소(Arsenic, As), 브롬(Bromine, Br), 칼슘(Calcium, Ca), 카드뮴(Cadmium, Cd), 세슘(Cerium, Ce), 염소(Chlorine, Cl), 코발트(Cobalt, Co), 크롬(Chromium, Cr), 구리(Copper, Cu), 철(Iron, Fe), 납(Lead, Pb), 망간(Magnesium, Mg), Manganese, Mn), 수은(Mercury, Hg), 니켈(Nickel, Ni), 포타슘(Potassium, K), Rubidium, Rb), 소듐(Sodium, Na), 스트론튬(Strontium, Sr), 황(Sulfur, S), 티타늄(Titanium, Ti), 바나듐(Vanadium, V) 및 아연(Zinc, Zn)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0024] 일 구현예에서, 본 발명의 호로파 종자 추출물은 천식 유발시 ROS 생성을 억제하고, 염증을 억제하며, DNA 손상을 억제할 수 있다.
- [0025] 일 구현예에서, 본 발명의 호로파 종자 추출물은 미세먼지 노출에 의한 천식 악화시 ROS 생성을 억제하고, 염증을 억제하며, DNA 손상을 억제할 수 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 본 발명의 호로파 종자 추출물은 천식 유발시 기관지에서 면역세포의 침윤을 감소시키고, 기관지에서 점액 생성을 억제하며, 기관지 평활근의 두께를 감소시킬 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 본 발명의 호로파 종자 추출물은 미세먼지 노출에 의한 천식 악화시 기관지에서 면역세포의 침윤을 감소시키고, 기관지에서 점액 생성을 억제하며, 기관지 평활근의 두께를 감소시킴으로써 천식 환자에서 천식의 급성 악화의 횟수 및 중증도를 감소시킬 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용된 용어 "호로파(胡蘆巴, *Trigonellae* Semen)"는 콩과에 속한 1년생 초본식물로, 한의학에서는 이의 종자를 말린 것도 호로파라고도 명칭하나, 본 발명에서는 이를 구별하여 호로파 종자 추출물, 즉, TFG는 호로파(*Trigonellae* Semen, *Trigonella foenum-graecum* Linne, 胡蘆巴)의 성숙한 종자를 건조한 것을 추출한 추출물을 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어 "추출물(extract)"이란 천연물로부터 분리된 활성성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물질을 의미한다. 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할 수 있으며,

추출물 이의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출 과정을 거친 추출물을 분획한 것도 포함된다. 추출물의 추출 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 교반 추출, 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법으로 추출될 수 있다. 추출 용매로는 물, C₁-C₄의 저급 알코올과 같은 극성 용매나 헥산, 클로로 포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매, 또는 이들 중 2 이상의 혼합물을 사용할 수도 있다.

[0030] 본 발명의 조성물은 호로과 종자 추출물 뿐 아니라 이와 동일 또는 유사한 기능을 지닌 다른 유효성분을 추가로 함유하거나, 또는 상기 성분들과 상이한 기능을 지닌 다른 유효성분을 추가로 함유함으로써, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0031] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 호흡기 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물성분의 투여로 호흡기 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0032] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 호흡기 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 호흡기 질환의 종류, 호흡기 질환의 발병 원인, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 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 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 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 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 과라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학 조

성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 호흡기 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 일 측면에서, 본 발명은 호로과 종자 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0040] 일 구현예에서, 상기 추출물은 에탄올 추출물일 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물을 식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 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 향신제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반약품과는 달리 천연물을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 호흡기 질환의 예방 또는 치료제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0044] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 호로과 종자 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0046] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시예 1. 호로파 종자 추출물 제조**

[0049] 호로파(Trigonellae Semen, *Trigonella foenum-graecum* Linne, 胡蘆巴) (Human Herb, Daegu, Korea)의 종자 100 mg을 30% 에탄올 (Daejung, Siheung, Korea) 1L에 넣고 1시간씩 3번/주, 2주 동안 초음파 추출하였다. 추출물을 필터 종이로 여과하고 감압 농축기 (N-1110S, EYELA, Shanghai, China)로 농축하고 24시간 동안 동결건조하여, 13.0 g의 호로파 추출물 (TFG)를 얻어 (수율: 13.0%) -20 °C에서 보관하였다.

[0051] **실시예 2. 호로파 종자 추출물 분석**

[0052] 상기 실시예 1에서 제조한 호로파 종자 추출물의 성분을 분석하기 위해 LC-MS 분석을 수행하였다. 구체적으로, ACQUITY QDa 검출기(Waters, Milford, MA, USA) 및 Prodigy™ODS (150x4.6mm, 5 μm) 컬럼이 장착된 e2695 시스템을 사용하여 TFG (주입 부피: 10 μl)의 표준 성분을 분석하였으며, 100% 아세토나이트릴 (용매 A) 및 0.1% 포름산 (용매 B)을 이동상용 용매로 사용하였다 (유속: 0.3 ml/분). 용매 B의 비율은 0분, 95% B; 0-5분, 95% B; 5-20분, 95-82% B; 20-40분, 82-30% B; 40-60분, 30-10% B로 설정하였다. 전자분무 이온화 질량 분석기 (electrospray ionization mass spectrometer)를 포지티브 스캔 모드 (질량 범위: 100 300 m/z)로 작동하였고 콘 전압(cone voltage)은 15V로, 모세관 전압(capillary voltage)은 0.8kV로 설정하였다.

[0053] 그 결과, TFG의 주성분은 트리코넬린(Trigonelline) (138.02m/z)인 것으로 확인되었으며, TFG에 108.2 mg/g의 트리코넬린이 포함된 것으로 확인되었다 (도 1).

[0055] **실시예 3. 호로파 종자 추출물의 세포 독성 확인**

[0056] TFG의 세포 독성을 확인하기 위해, 기관지 상피 세포인 BEAS-2B 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 cells/well로 분주하고 표준화된 성장 인자 세트 (BEGM™BulleKit™가 보충된 BEBM 배지에서 배양하고 TFG를 각각 다른 농도 (50, 100, 200 및 400 μg/mL)로 첨가하고 24시간 동안 반응시킨 뒤, 세포 독성을 CCK-8 분석 키트를 이용하여 Versamax 마이크로플레이트 리더 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

[0057] 그 결과, TFG는 어떤 농도에서도 독성을 나타내지 않았으며 (도 2A), 따라서 이 후의 실험에서도 100, 200 및 400 μg/mL 농도의 TFG를 사용하였다.

[0059] **실시예 4. 호로파 종자 추출물의 PM에 의한 ROS 생성 억제 효과 *in vitro***

[0060] TFG가 PM에 의해 증가하는 ROS 생성을 억제하는지 확인하기 위해, BEAS-2B 세포를 12웰 플레이트에 5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 TFG (100, 200 및 400 μg/mL)를 처리하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이 후, IL-4/TNF(tumor necrosis factor)-α (40 ng/mL) 및 PM (12 μg/cm²) (SRM 1648a) (National Institute of Standards and Technology, NIST)를 동시에 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 세포들을 DPBS로 세척한 뒤 trypsin-EDTA로 세포를 떼어내고 4 °C에서 4000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세포만 분리하였다. 이 후, 제조사의 가이드에 따라 과산화수소/과산화효소(hydrogen peroxide/peroxidase) 분석 키트를 사용하여 세포를 용해하고 마이크로플레이트 리더 (540nm)를 사용하여 ROS 수준을 분석하였다.

[0061] 그 결과, ROS 수준은 PM 처리된 군에서 무처리군에 비해 현저하게 증가했으며, TFG 200 및 400 μg/mL가 PM에 의해 증가된 ROS 생성을 현저하게 억제하는 것으로 나타났다 (도 2B).

[0063] **실시예 5. 호로파 종자 추출물의 PM에 의한 염증 억제 효과 *in vitro***

[0064] 5-1. PM-유발 염증 모델

[0065] TFG가 PM에 의해 유발된 염증 모델에 미치는 영향을 확인하기 위해, BEAS-2B 세포에 TFG를 1시간 동안 처리한 후, PM을 $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 처리하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 후, 세포 배지를 4°C 에서 4000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 분리한 뒤, GM-CSF, IL-6, MCP-1 및 IL-8의 수준을 ELISA 키트와 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정함으로써 확인하였다.

[0066] 그 결과, TFG가 PM 처리에 의해 증가된 IL-6, GM-CSF 및 MCP-1의 발현을 억제하고, PM에 의해 감소된 IL-8의 발현을 더 감소시키는 것으로 나타났다 (도 2C).

[0068] 5-2. IL-4/TNF- α -유발 염증 모델

[0069] TFG가 IL-4/TNF- α 에 의해 유발된 염증 모델에 미치는 영향을 확인하기 위해, BEAS-2B 세포에 TFG를 1시간 동안 처리한 후, IL-4/TNF- α ($40 \text{ ng}/\text{ml}$)를 처리하고 24시간 동안 인큐베이션한 뒤, 상기 실시예에서와 같이 ELISA 분석을 수행하였다.

[0070] 그 결과, TFG가 IL-4/TNF- α 처리에 의해 증가된 IL-6, GM-CSF, MCP-1 및 IL-8의 발현을 억제하는 것으로 나타났다 (도 2D).

[0072] 5-3. PM-유발 염증 악화 모델

[0073] TFG가 PM-유발 염증 악화(inflammation exacerbation) 모델에서 염증 억제 효과를 가지는지 확인하기 위해, BEAS-2B 세포를 12웰 플레이트에 $5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{well}$ 로 분주하여 24시간 동안 배양하고 TFG (100 , 200 및 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이 후, IL-4/TNF- α $40 \text{ ng}/\text{mL}$ 및 PM $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 처리하고 24시간 동안 반응시키고, 상기 실시예에서와 같이 ELISA 분석을 수행하였다.

[0074] 그 결과, IL-4/TNF- α +PM-처리군에 비해 TFG를 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군 및 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서 IL-6 및 GM-CSF의 수준이 감소하는 경향을 나타냈고, TFG $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 IL-6 및 GM-CSF의 수준이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 2E). IL-4/TNF- α +PM-처리군에 비해 TFG를 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서는 MCP-1의 수준이 약간 감소한 반면, TFG를 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군 및 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서는 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 2E). 또한, IL-4/TNF- α +PM-처리군에 비해 TFG를 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군 및 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서 IL-8 수준이 약간 감소한 반면, TFG를 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서는 현저하게 IL-8 수준이 감소하는 것으로 나타났다 (도 2E).

[0076] 5-4. MAPKs 경로에 미치는 영향 확인

[0077] TFG가 면역 조절 및 염증 활성화 경로인 MAPK 경로에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 실시예에서와 같이 ELISA 분석을 수행하고, 하기와 같이 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로, BEAS-2B 세포 1×10^6 개를 60 mm 배양 디쉬에 분주하여 24시간 동안 배양한 뒤, TFG를 100 , 200 및 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각각 1시간 동안 처리한 후, IL-4/TNF- α $40 \text{ ng}/\text{mL}$ 및 PM $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 동시에 처리하였다. 6 h 후, DPBS로 반응을 종료시켰다. 세포를 방사면역침강 분석 버퍼 (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate 및 0.1% SDS)로 파쇄한 뒤, 세포 파쇄물을 BCA 분석 키트로 정량하여 동일한 양의 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-PAGE)으로 분리하고, 나이트로 셀룰로오스 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 블로킹 버퍼 (5% 스킵 밀크)로 1h 동안 블로킹하고, 1% BSA 용액에 희석된 T-ERK, P-ERK, T-JNK, P-JNK, T-p38, P-p38 및 actin에 대한 항체를 처리하여 4°C 에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 멤브레인을 2차 항체와 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1h 동안 인큐베이션한 뒤, ECL 용액 (Mahmood and Yang, 2012)으로 반응시키고 X-선 필름을 이용하여 단백질을 검출하였다. 표적 단백질의 강도는 ImageJ (Ver. 1.80, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 정량하였다.

[0078] IL-4/TNF- α 및 PM을 함께 처리하면, PM이 ERK, JNK 및 P38의 인산화를 더욱 증가시켜 MAPK의 인산화 기전을 PM이 더욱 활성화시키는 것으로 나타났다 (데이터 미도시). 이를 바탕으로 TFG가 PM으로 활성화된 BEAS-2B 세포

의 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과, IL-4/TNF- α +PM 처리에 의해 현저히 증가된 ERK, JNK 및 P38의 인산화가 TFG 400 μ g/mL 처리에 의해 현저하게 감소되는 것으로 나타났다 (도 2F 내지 I).

[0080] 5-5. AKT/mTOR 경로에 미치는 영향 확인

[0081] TFG가 자가포식(autophagy)을 매개하는 AKT/mTOR 경로에 미치는 영향을 웨스턴블롯 분석 및 ELISA 분석으로 확인하였다. 구체적으로, BEAS-2B 세포 1×10^6 개를 60 mm 배양 디쉬에 분주하여 24시간 동안 배양한 뒤, TFG를 100, 200 및 400 μ g/mL의 농도로 각각 1시간 동안 처리한 후, IL-4/TNF- α 40 ng/mL 및 PM 12 μ g/cm²를 동시에 처리하였다. 24 h 후, DPBS로 반응을 종료시키고, 상기 실시예 5-4에서와 같이 세포를 파쇄하고 P-AKT, P-mTOR 및 actin에 대한 1차 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0082] IL-4/TNF- α 및 PM과 함께 처리하였을 때 PM이 AKT/mTOR의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과, AKT의 인산화는 IL-4/TNF- α +PM 처리 후 6 h 및 24 h에 현저하게 증가하였으며, TFG 200 μ g/mL 처리에 의해 IL-4/TNF- α +PM 처리 후 6h에 AKT 인산화가 현저하게 감소되었다 (도 3J 및 3K). 또한, mTOR의 인산화는 IL-4/TNF- α +PM 처리 6h 후 감소하는 경향을 나타내고 24시간 후 현저하게 감소하였으나, TFG를 100 또는 400 μ g/mL 처리한 경우에는 IL-4/TNF- α +PM 처리 24h 후 mTOR의 인산화가 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 3J 및 L).

[0084] 실시예 6. 호로파 종자 추출물의 PM에 의한 DNA 손상 억제 효과 *in vitro*

[0085] PM 처리된 BEAS-2B 세포에서 TFG가 세포 형태 및 DNA 손상에 미치는 영향을 확인하기 위해 Hoechst 33342 및 액틴 형광 염색을 수행하였다. 구체적으로, BEAS-2B 세포 1×10^5 개 cells/well를 12-웰 플레이트에 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포에 TFG (100, 200 및 400 μ g/mL)를 1시간 동안 전처리하고, PM 12 μ g/cm²와 24시간 동안 반응시켰다. 이 후, 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고, 고정된 세포를 암조건에서 30분 동안 액틴-염색 488 14 μ M과 반응시켰다. 세포를 DPBS로 세척한 후 Hoechst 33342로 5분 동안 염색한 뒤, 형광 현미경을 사용하여 세포 형태를 분석하였다.

[0086] 그 결과, PM 처리군에서 무처리군에 비해 세포 사멸이 증가되었으며, IL-4/TNF- α +PM 처리군에서 IL-4/TNF- α -처리군에 비해 증가되어 있었으나, TFG 처리시 농도 의존적으로 IL-4/TNF- α +PM 처리군에 비해 세포 사멸이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 무처리군 (대조군)과 달리 IL-4/TNF- α 처리군 및 IL-4/TNF- α +PM 처리군 모두에서 비정상적인 세포 형태가 관찰되었으나, 이는 TFG 처리에 의해 감소되는 것으로 나타났다 (도 3).

[0088] 실시예 7. PM에 노출된 천식 동물모델에서 호로파 종자 추출물의 효과

[0089] 7-1. 천식 악화 동물모델 제작

[0090] 천식 동물모델 및 PM 노출에 의해 천식이 악화된 천식 악화 동물모델을 제작하기 위해, 마우스를 하기의 6개의 군으로 나누었다 (각 군당 12마리): i) PBS-처리군 (PBS); ii) OVA-처리군 (OVA); iii) OVA 및 PM-처리군 (OVA+PM); iv) TFG를 50 mg/kg 농도로 경구 투여한 OVA 및 PM-처리군 (TFG-L); v) TFG를 200 mg/kg 농도로 경구 투여한 OVA 및 PM-처리군 (TFG-H); 및 vi) NAC(N-acetylcysteine)을 400 mg/kg 농도로 경구 투여한 OVA 및 PM-처리군 (양성 대조군; NAC). 이 때, 한의학에서 TFG의 투여량은 건조 한약 기준으로 평균 성인(60kg)에 대해 1일 3~12g이고 (Schools, 2017), TFG의 수율을 고려하여 1일 저용량 TFG가 3 g/60 kg로 계산되고, 1회 용량이 26 mg/kg이므로, FDA 임상 시험 가이드라인 (Food and Administration, 2005)에 따라 하기 수확식 1을 사용하여 동물에서의 TFG의 저용량 투여량 (50mg/kg) 및 고용량 투여량 (200mg/kg)을 결정하였다. OVA(ovalbumin)로 천식을 유도하기 위해, 1일차 및 15일차에 AlOH₃ 200 μ L 및 OVA 20 μ g를 용해한 PBS 200 μ L를 복강내 감작시켰다. 약물 (TFG 또는 NAC)은 15일차의 OVA 감작 후 24시간 후 (즉, 16일차), 12일 동안 경구투여하였다. PM 처리군은 17일차 내지 27일차까지 마우스를 이소플루란으로 마취하고 PM 0.1 mg/25 μ L을 11일 동안 기관내 주사하였다. 약물과 PM을 같은 날에 투여하는 경우에는 약물을 PM 처리 2시간 전에 투여하였다. Schuco compressor nebulizer (Allied Healthcare Products, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 22일차 내지 27일차에 마우스들을 1 % OVA (10 mg/mL)로 20분 동안 재감작하였다 (도 4). OVA 감작과 PM 처리가 같은 날 실시된 경우에는 OVA 감작 후에 PM을 투여하였다. 28일차에 마우스를 5% 이소플루란으로 마취하고 호흡이 멈출 때까지 유지하여 희생시킨

후, 심장천자를 통해 혈액 1mL를 채취하였으며, DPBS에 용해된 5% FBS를 사용하여 기관 삼관을 통해 체액을 배출하여 BALF(기관지폐포세척액)를 수집하고, 장기를 적출하였다.

수학적 1

$$\text{HED(Human equivalent dose)} = \text{동물 투여량} \times 0.13$$

[0091]

[0092]

상기를 통해 제작된 동물모델 중 OVA-처리군은 OVA로 천식을 유도한 천식 동물모델군이며, OVA 및 PM-처리군은 OVA로 천식이 유도된 천식이 PM에 의해 악화된 천식 악화 동물모델이다. 천식 악화 동물모델은 MAPK 및 자가포식 경로를 통해 면역 불균형을 유발하고, 평활근 두께 및 점액 생성을 증가시켜 천식 동물모델에서 폐 기능을 감소시키고 천식을 악화시킨다 (데이터 미도시).

[0094]

7-2. 독성 확인

[0095]

PM에 노출된 천식 마우스 모델에서 TFG 투여가 동물에 독성을 가지는지 확인하기 위해, 상기 실시예 7-1의 각 군의 마우스의 체중, 장기 무게 및 AST 및 ALT 수치 (DK Korea, Seoul, Korea)를 확인하였다. 그 결과, TFG 투여는 PM에 노출된 천식 동물모델의 체중을 변화시키지 않았으며 (도 5A), 혈청 내 AST 및 ALT 수치를 변화시키지 않는 것으로 나타났다 (도 5B 및 C). 또한, TFG-L군에서 간 무게가 감소하는 경향을 나타냈고, TFG-H군에서 간 무게가 현저히 감소되었으며, NAC 투여는 간 무게에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (도 5D). 또한, 신장 무게는 각 군간에 유의미한 변화가 없었으나 (도 5E), 폐 무게는 OVA군에 비해 OVA+PM군에서 현저하게 증가하였고, TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군에서는 폐 무게가 유의하게 감소하였다 (도 5F). 또한, OVA군에서 비장 무게가 PBS군에 비해 현저하게 증가한 반면, OVA+PM군은 OVA군에 비해 유의미한 변화를 나타내지 않았다 (도 5G). 아울러, TFG-L군 및 TFG-H군은 OVA+PM군에 비해 비장 무게가 현저하게 감소하였고, NAC군은 비장 무게에 변화가 없는 것으로 나타났다 (도 5G).

[0097]

7-3. 혈청 내 IgGE 수준 확인

[0098]

상기 실시예 7-1의 각 군의 마우스에서 분리한 혈청에서 IgE 및 OVA-특이적 IgE 수준을 ELISA로 분석하였다.

[0099]

그 결과, OVA군에서 IgE 수준이 PBS군에 비해 현저하게 증가하였으며, 총 IgE 수준은 TFG-H군이 OVA군에 비해 현저하게 낮은 것으로 나타났다 (도 6A). 또한, OVA-특이적 IgE 수준은 PBS군에 비해 OVA군에서 현저하게 증가하였으며, OVA-특이적 IgE 수준은 OVA+PM군 및 TFG-L군은 서로 유사한 정도로 나타났고, TFG-H군에서 약간 감소하는 것으로 나타났다 (도 6B).

[0101]

7-4. 염증성 사이토카인 수준 확인

[0102]

PM에 노출된 천식 동물에서 TFG 투여 후 BALF에서의 염증성 사이토카인 수준 변화를 확인하기 위해, 상기 실시예 7-1에서 수집한 BALF를 4℃에서 1400 rpm로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수집하고 ELISA로 분석하였다.

[0103]

그 결과, BALF에서 IL-6 수준은 PBS군 및 OVA군 간에 유의한 차이가 없었던 반면, OVA+PM군에서 OVA군에 비해 현저히 증가하였고, TFG-L군 및 TFG-H군에서는 OVA+PM군에 비해 현저히 감소된 것으로 나타났다 (도 6C). 또한, BALF에서 IFN- γ 의 수준은 PBS군과 OVA군 간에 유의한 차이가 없었던 반면, OVA군에 비해 OVA+PM군에서 현저하게 증가한 것으로 나타났고, OVA+PM군에 비해 TFG-H군에서는 현저한 감소를 나타냈다 (도 6D). 또한, BALF에서 IL-13의 수준은 PBS군에 비해 OVA군에서 현저히 증가하였으며, OVA+PM군에서는 OVA군에 비해 유의한 감소를 나타냈고, TFG-H군에서 IL-13의 수준이 OVA+PM군에 비해 현저히 낮게 나타났다 (도 6E). 아울러, BALF에서 IL-4 수준은 PBS군에 비해 OVA군에서 현저하게 증가하였으며, OVA군에 비해 OVA+PM군에서 현저히 감소하는 것으로 나타났고, TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군에서 IL-4 수준은 OVA+PM군과 유사한 정도로 나타났다 (도 6F).

[0105]

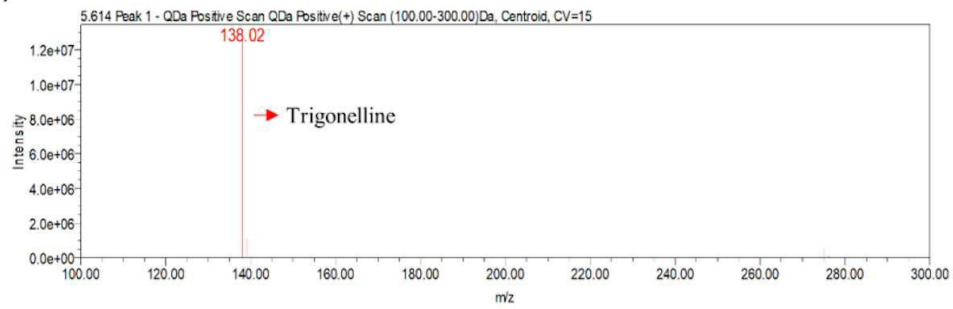
7-5. 면역세포 확인

- [0106] 상기 실시예 7-1에서 수집한 BALF를 4℃에서 1400 rpm로 10분 동안 원심분리하여 펠렛을 수집한 뒤, 이를 DMEM에 재현탁하고, 유리 슬라이드에 올려 건조 및 고정시켰다. 이 후, 제조사의 가이드에 따라 Diff-Quik®염색 시약 (Sysmex, Kobe, Japan)으로 염색하여, 각 군의 BALF에 존재하는 총 세포, 대식세포 및 림프구의 수를 계수하였다.
- [0107] 그 결과, BALF에서 총 세포수는 PBS군에 비해 OVA군에서 현저하게 증가하였으며, OVA+PM군은 OVA군에 비해 증가하는 경향을 나타낸 반면, TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군은 OVA+PM군에 비해 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 6G). 또한, BALF에서 대식세포의 수는 PBS군에 비해 OVA군에서 현저하게 증가하였으며, OVA+PM군에서는 OVA군에 비해 현저하게 증가한 것으로 나타났고, OVA+PM군에 비해 TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군에서 모두 현저히 감소되는 것으로 나타났다 (도 6H). 아울러, BALF에서 림프구의 수는 PBS군에 비해 OVA군에서 현저히 증가하였으며, OVA군에 비해 OVA+PM군에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났고, OVA+PM군에 비해 TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군에서 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 6I).
- [0109] 7-6. 폐의 조직학적 분석
- [0110] PM에 노출된 천식 동물모델에서 TFG 투여에 의한 폐의 조직병리학적 변화를 확인하기 위해, 상기에서 적출한 폐 조직을 10 % NBF(neutral buffered formalin)로 고정하고 파라핀 포매하여 제작한 파라핀 블록을 microtome (RM2125 RTS; Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 5 μm 두께로 섹션하였다. 평활근(smooth muscle)의 두께를 측정하기 위해 폐 조직을 H&E(hematoxylin and eosin)으로 염색하고, 기관지에서 점액 생성량을 확인하기 위해 기관지 내강을 PAS(periodic acid-Schiff)로 염색하였다. 염색된 조직을 탈수 및 밀봉하여 광학현미경 (BX 51, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 또한, 중증 알레르기성 천식 환자에서 더 높은 자가포식 정도를 나타내는 자가포식 마커 단백질인 LC3II의 발현을 폐 조직에서 분석하기 위해, IHC(Immunohistochemical) 염색을 수행하였다. 구체적으로, 0.01 M 구연산나트륨 버퍼 (pH 6.0)로 조직 섹션에서 항원을 회수하고, 메탄올로 희석한 0.3 % H₂O₂를 사용하여 퍼옥시데이즈 활성을 억제하였다. 비특이적 항체 결합을 방지하기 위해 10% 정상 고트 혈청 (Gibco, New York, NY, USA)으로 반응시키고, 항- LC3 II 항체와 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 이 후, 비오틴화된 IgG 이차 항체와 23 ± 2℃에서 30분 동안 반응시키고, ABC kit (Vector Laboratories)와 30분 동안 반응시킨 뒤, DAB substrate kit (Vector Laboratories)를 이용하여 현상하였다. 대조염색은 헤마톡실린을 이용하여 수행하였으며, 조직을 광학현미경으로 관찰하고 ImageJ 소프트웨어로 조직을 분석하였다.
- [0111] 그 결과, PBS군에 비해 OVA군에서 기관지 평관근의 두께가 현저히 증가된 것으로 나타났으며, OVA+PM군에 비해 TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군에서 기관지(bronchial) 평관근의 두께가 현저히 감소된 것으로 나타났다 (도 7A 및 D). 또한, 기관지 내강에서 PAS-양성 염색 영역을 측정한 결과, OVA군에서 PBS군에 비해 현저히 증가한 것으로 나타났으며, OVA군에 비해 OVA+PM군에서 약간의 증가가 나타났다. 또한, PAS-양성 영역은 OVA+PM군에 비해 TFG-L군, TFG-H군 및 NAC군에서 현저히 낮게 나타났다 (도 7B 및 E). 또한, 기관지 내강에서 LC3II-양성 영역이 PBS군에 비해 OVA군에서 현저하게 증가하였으며, OVA+PM군과는 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 또한, OVA+PM군에 비해 TFG-L군 및 TFG-H군에서 LC3II-양성 영역이 감소하였으며, NAC군은 현저하게 감소한 것으로 나타났다 (도 7C 및 F).

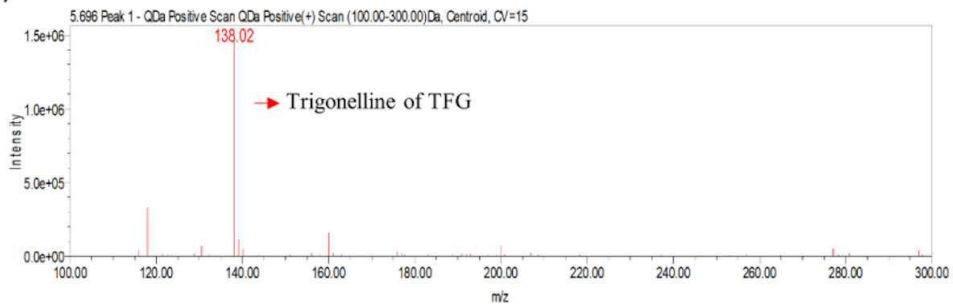
도면

도면1

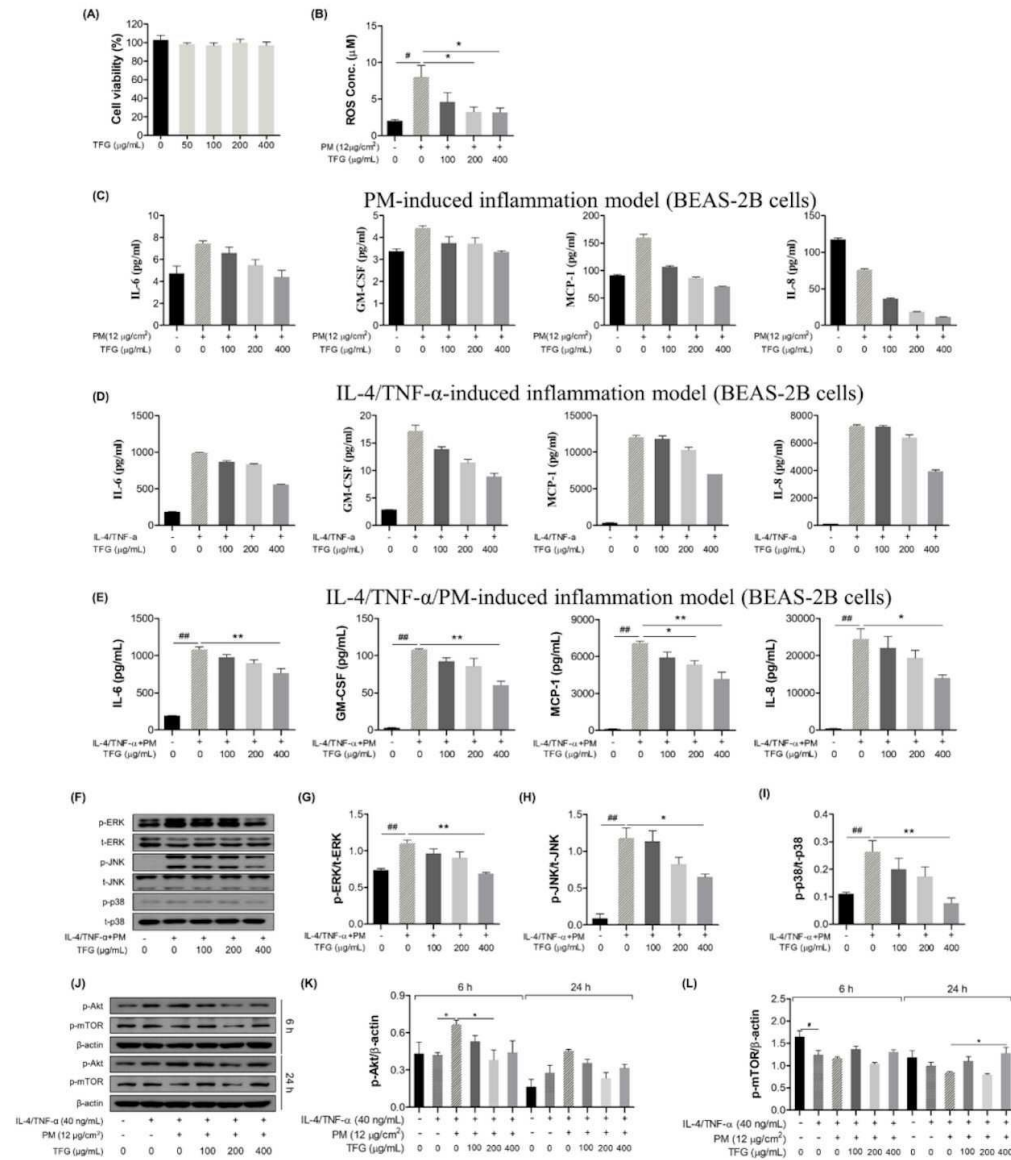
(A)



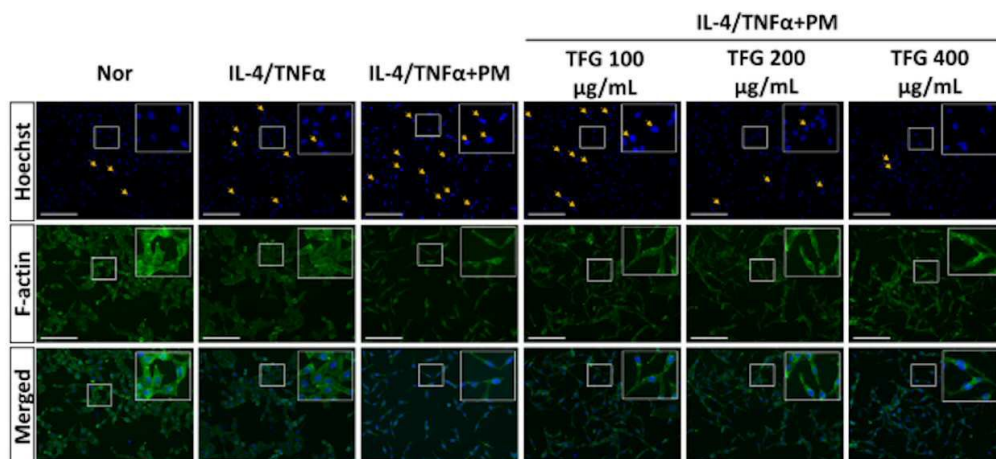
(B)



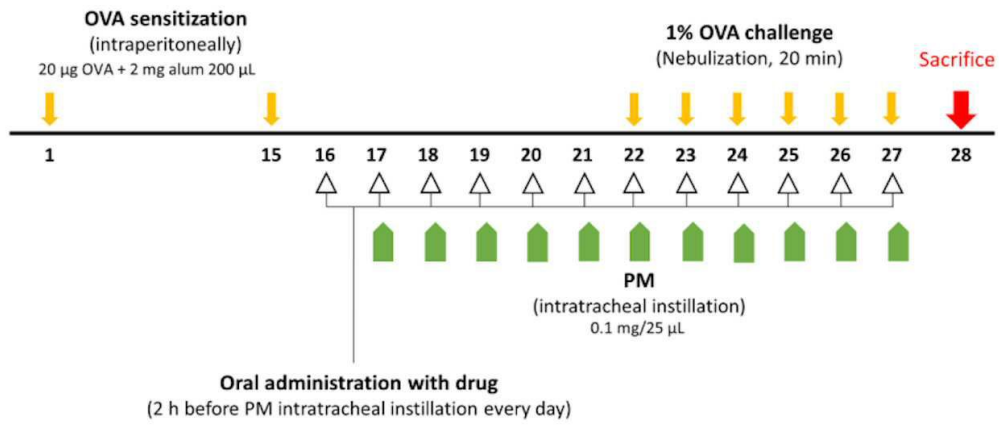
도면2



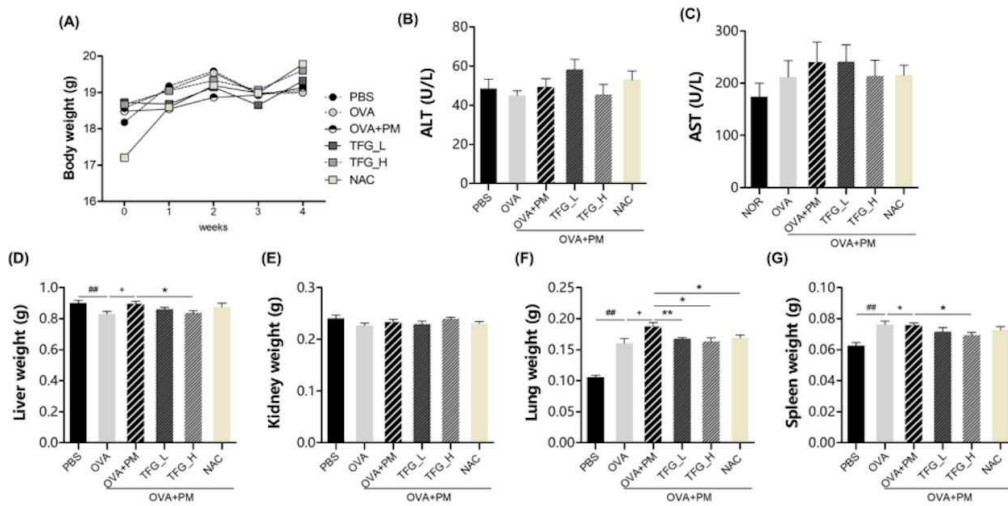
도면3



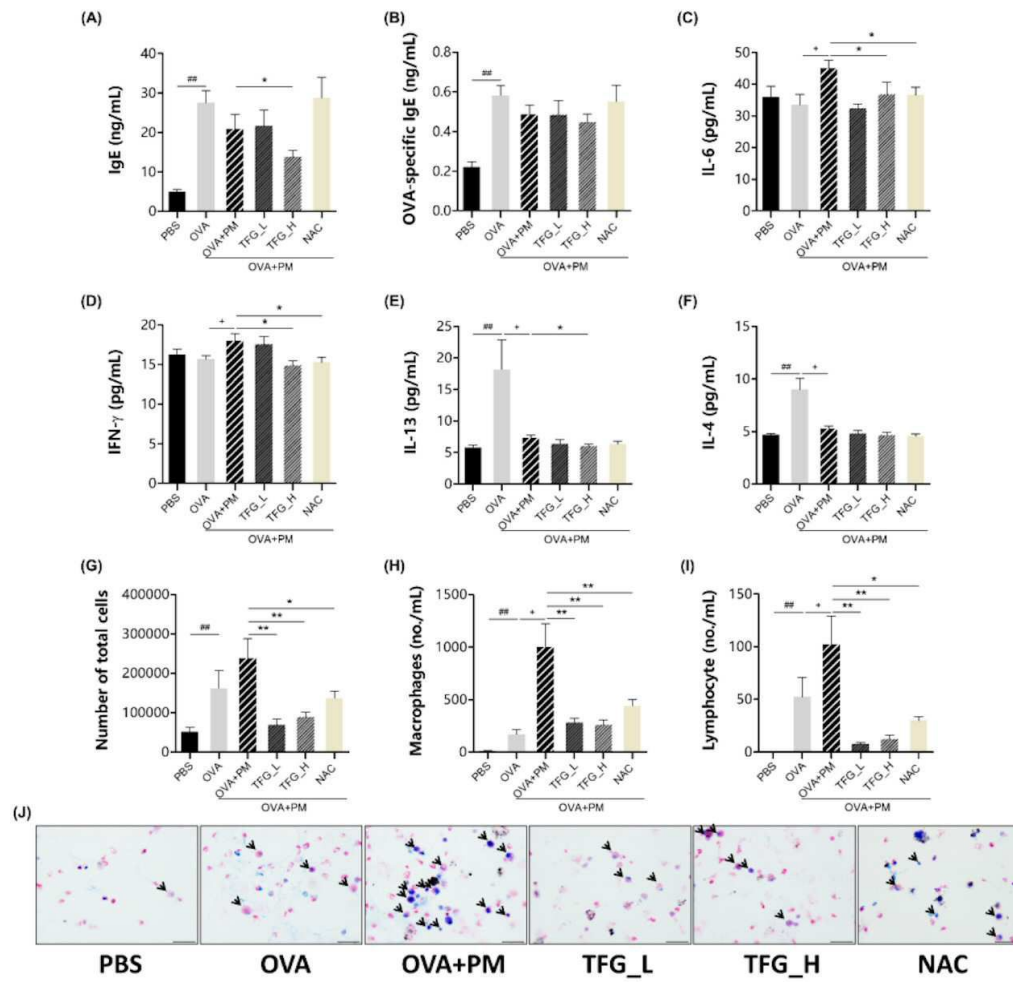
도면4



도면5



도면6



도면7

