



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098001
(43) 공개일자 2018년09월03일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/53 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/23 (2006.01) A61K 36/539 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 36/53 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0024904
(22) 출원일자 2017년02월24일
심사청구일자 없음</p> | <p>(71) 출원인
한국콜마주식회사
세종특별자치시 전의면 덕고개길 12-11, 한국콜마</p> <p>(72) 발명자
조홍구
서울특별시 송파구 양재대로 1089, 1동 1005호(방이동, 잠실3차한양아파트)
구본암
서울특별시 강서구 화곡로13길 107, 105동 501호(화곡동, 화곡푸르지오)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
유미특허법인</p> |
|--|--|

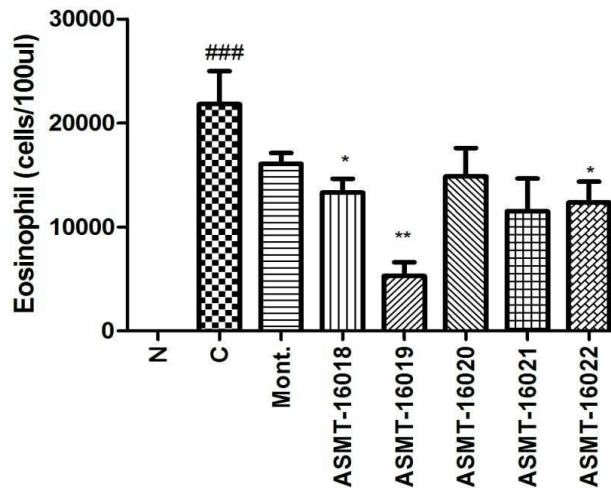
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 자소엽, 전호 및 황금 복합 생약 추출물을 포함하는 천식의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유효성분으로서 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 유효성분으로서 포함하는 천식의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물은 천식을 일으키는 염증 세포, 백혈구, 림프구 및 단핵구, 및 혈중 IgE를 효과적으로 감소시켜, 천식의 예방, 개선 및 치료에 있어서의 약학적 조성물, 기능성 식품 조성물 또는 식품에 첨가되는 기능성 물질로서 매우 유용하다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/23 (2013.01)

A61K 36/539 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/314 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

Y10S 514/826 (2013.01)

(72) 발명자

전효진

경기도 성남시 분당구 동판교로 275, 116동 103호
(삼평동, 봇들마을1단지풍성신미주아파트)

김슬기

세종특별자치시 달빛1로 206, 906동 901호(아름동,
범지기마을 9단지)

정주리

서울특별시 관악구 원신9길 9, 303호(신림동, 우일
그린빌라)

김예진

인천광역시 계양구 형제봉길 1, 301동 1404호(굴현
동, 계양센트레빌3단지)

최한석

경기도 광명시 금당로 13, 704동 702호(하안동, 하
안7단지고층주공아파트)

김상백

서울특별시 도봉구 도봉로 117길 54 (쌍문동)

임순민

세종특별자치시 마음안1로 167, 1704동 1403호(고
운동, 가락마을 17단지)

박지민

세종특별자치시 조치원읍 행복13길 6 비전오피스텔
306호

명세서

청구범위

청구항 1

자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 유효성분으로서 포함하는, 천식의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 복합 생약 추출물은 자소엽, 전호 및 황금을 각각, 물, 탄소수 1 내지 4개의 직쇄형 알코올, 탄소수 1 내지 4개의 분지형 알코올 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출하여 얻어진 조추출물을 혼합한 것이거나, 자소엽, 전호 및 황금의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4개의 직쇄형 알코올, 탄소수 1 내지 4개의 분지형 알코올 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출하여 얻어진 조추출물인 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용매는 탄소수 1 내지 4개의 직쇄형 또는 분지형 알코올로서, 알코올 함량이 30 이상 내지 100(v/v)% 미만의 알코올 수용액 또는 무수 알코올인 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 용매는 50(v/v)% 에탄올 수용액인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 염증 세포 감소, 백혈구, 림프구 및 단핵구 수준 감소 및 혈중 IgE 감소능을 갖는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 천식의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물 또는 천식의 예방 또는 개선용 식품 조성물인 것인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식품 조성물은 기능성 식품, 건강보조식품 또는 건강기능식품의 형태인 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생약의 복합 생약 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 자소엽, 전호 및 황금 복합 생약 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로 알레르기 관련 질환의 발병률이 크게 증가하고 있고, 특히 알레르기 질환의 80%를 차지하는 천식의 경우 그 발병율과 사망률에 상관성이 있어 예방적인 약물 치료 및 진행억제를 위한 연구에 투자가 절실한 실정이다(Masoli 등, Allergy 59, 469-478, 2004; Kim 등, Clin. Exp. Allergy 32, 1706-1712, 2002). 특히, 알레르기 질환 중, 천식은 숨 쉴 때 들어오는 여러 가지 자극 물질에 대한 기관지의 과민반응으로, 기관 지를 비롯한 기도점막에 염증이 생겨 부어오르며 기관지가 좁아져서 천명(쌩쌩거리는 호흡음)을 동반한 기침, 객담과 호흡곤란이 발작적으로 나타나는 질환으로, 천식을 가진 환자들의 기도에는 다양한 면역세포 특히, 비만 세포, 호중구 및 호염기구들이 과량 존재한다. 이러한 면역세포들은 정상인에게는 아무런 영향이 없는 외부의 자극물질에 대하여 민감하게 반응하고 과도한 작용을 도모하므로 상피세포의 손상, 점액과 분비, 혈관확장 및 기도개형의 증상을 나타내게 한다(Busse 등, N. Engl. J. Med. 344, 350-362, 2001; Davies 등, J. Allergy Clin.

Immunol. 111, 215-225, 2003). 천식을 야기하는 요인으로는 크게 유전적인 요인과 환경적인 요인으로 나눌 수 있다. 유전적인 요인에는 기도와민성, 성별, 인종 등이 포함될 수 있으며, 환경적인 요인으로는 집먼지, 진드기, 대기오염, 흡연, 식이 등이 포함될 수 있다.

[0003] 기관지 천식치료제로는 조절제(controller) 및 증상완화제(Reliever)로 크게 구분되고 있다. 조절제는 흡입용 스테로이드계 약물(Inhaled glucocorticosteroids), 항알레르기성 약물(Anti-allergic drug), 지속성 기관지 확장제(Long acting bronchodilators)등이 장기적으로 천식의 악화를 방지하는데 이용되고 있다. 증상완화제는 기관지 확장제를 사용하는데, 급성천식 발작이나 기관지 경색 등의 증상을 시급히 완화할 때 이용되고 있다. 어느 경우든지 가벼운 천식 질환의 증상을 완화하는데는 큰 문제가 없으나, 중기나 말기의 천식을 치료하는데 상당한 문제점이 있고, 고용량의 흡입용 스테로이드계 약물 사용시의 심각한 부작용이나 사용불편에 대한 문제가 대두 되고 있다. 천식질환의 특성상 장기간 약물복용이 불가피하지만, 종래의 스테로이드제나 평활근 이완제와 같은 천식치료제들은 면역능 저하, 감염, 심장에 대한 작용 등의 많은 부작용을 나타내므로 약물의 부작용이 거의 없고, 근원적 병상 개선 또는 치료 효과를 갖는 새로운 약물 개발이 시급히 요구되므로 종래의 약물이 갖는 부작용을 저감 또는 해소할 수 있는 천식치료제가 요구되고 있다.

[0004] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 독성이 상대적으로 적은 천연물 유래의 물질로부터 천식의 예방, 개선 또는 치료에 효과적인 활성성분을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물이 난백알 부민으로 천식이 유도된 마우스 모델에서 탁월한 염증 세포 감소 효과, 백혈구, 림프구 및 단핵구 수준 감소 효과 및 혈중 IgE 감소 효과를 나타내어 천식의 예방, 개선 및 치료에 유용함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 유효성분으로서 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 유효성분으로서 포함하는 천식의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 유효성분으로서 포함하는, 천식의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0008] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명한다.

[0010] 본 발명에 따른 천식의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 유효성분으로서 포함되는 복합 생약 추출물은 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물로서, 구체적인 일 양태에서, 상기 '추출물'은 용매 조추출물, 특정 용매 가용 추출물(용매 분획물), 및 용매 조추출물의 용매 분획물을 모두 포함하며, 상기 복합 생약 추출물은 용액, 농축물 또는 분말 상태일 수 있다.

[0011] 본 발명에 따른 추출물에서 원료 생약으로서 사용되는 생약 중 자소엽은 꿀풀과(labiatae)에 속하는 소엽(Perilla frutescens BRITT. var acuta KUDO) 또는 주름소엽(Perilla frutescens BRITT. var crispa DECNE)의 잎으로서, 알려진 성분으로서, 페릴라알데히드(perillaldehyde), 리모넨(limonene), 아르기닌(arginine), 쿠민산(cumic acid), 이소에고마케톤(isoegomaketone), 페릴라 알콜(perilla alcohol) 등의 성분이 알려져 있으며 오한, 한기 등의 치료에 사용되다고 알려진 바 있다(정보섭 외 1인, 향약 대사전, 영림사, pp.855~857, 1998년). 또한, 전호는 산형과인 백화전호(Peucedanum praeruptorum Dunn)에 속하는 뿌리를 지칭하는 것으로, 상기 전호의 주성분으로는 대부분 쿠마린을 기본 골격으로 하는 물질들로서, 프라에립토린 A(praeruptorin A, Pd-a), 프라에립토린 B(praeruptorin B, Pd-) 등이 속해 있는 디하이드로세세린(dihydroseselin) 계열이 가장 많은 비중을 차지하였고, 움벨리페론(umbelliferone)이 속해 있는 하이드로쿠마린(hydrocoumarin) 계열, 디하이드로솔라렌(dihydropsoralen), 솔라렌(psoralen), 디하이드로안젤리신(dihydroangelicin), 안젤리신(angelicin), 디하이드로잔틸레틴(dihydroxanthyletin) 계열 등으로 분류되는 성분을 함유하고 있는 천연물이다. 나아가, 황금(생약명: Scutellariae Radix, 학명: Scutellaria baicalensis Georgi)은 주피를 제거한 뿌리를 건조하여 사용하는 것이 좋고, 성미(性味)는 고한(苦寒)하고, 귀경(歸經)은 폐(肺) 담(膽) 위(胃) 대장(大腸) 소장경(小腸經)이며, 효능은 청열조습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒), 지혈(止血), 안태(安胎)하여

습온(濕溫), 서온흉민구오(暑溫胸悶嘔惡), 습열비만, 사리(瀉利), 황달(黃疸), 폐열해수(肺熱咳嗽), 고열번갈(高熱煩渴), 혈열토류, 용종창독, 태동불안(胎動不安), 붕루(崩漏), 열림(熱淋) 등의 증을 치료하는 것으로 알려져 있다.

- [0012] 상기 자소엽, 전호 및 황금 생약들은 추출 전 적절히 세척, 건조 등의 공정을 거쳐, 적절한 크기로 절단(세절)된 형태로 사용될 수 있으며, 잎, 뿌리, 전초, 줄기 등 다양한 부위를 제한없이 사용할 수 있다.
- [0013] 본 발명에 따른 복합 추출물의 제조를 위해, 상기 자소엽, 전호 및 황금을 각각 별개의 추출공정을 거쳐 제조된 단독 생약 추출물을 적절한 비율로 혼합하여 제조되거나, 상기 3종의 생약들을 적절한 비율로 혼합하여 이들 생약 혼합물을 추출하여 제조될 수 있다. 상기 생약 또는 단독 추출물의 비율은 적절히 조절할 수 있으나, 바람직하게는 1:1:1 내지 1:2:1, 3:1:1, 2:2:1, 2:1:2 또는 2:1:1, 보다 바람직하게는 2:1:1의 중량비일 수 있다.
- [0014] 상기 복합 생약 추출물은 일반적으로 식물 또는 생약의 추출에 사용되는 추출 용매를 제한없이 사용하여 추출될 것일 수 있으나, 구체적으로, 물, 탄소수 1 내지 4개의 직쇄 또는 분지형 알코올, 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출하여 얻어진 조추출물일 수 있다.
- [0015] 바람직하게, 조추출물 제조에 사용되는 용매로서, 무수 알코올 또는 알코올 수용액, 즉, 물과 알코올의 혼합물을 사용할 수 있다. 물과 알코올의 혼합물을 사용하는 경우에 그 혼합비에 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 예를 들어, 10% 이상 내지 100%(v/v)미만, 20%이상 내지 100%(v/v)미만, 30%이상 내지 100%(v/v)미만, 40%이상 내지 100%(v/v)미만, 50%이상 내지 100%(v/v)미만, 60%이상 내지 100%(v/v)미만, 또는 70%이상 내지 100%(v/v)미만의 탄소수 1 내지 4개의 직쇄 또는 분지형 알코올 수용액일 수 있다. 또한, 상기 알코올 수용액은 메탄올 수용액, 에탄올 수용액, 프로판올 수용액, 및 부탄올 수용액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 바람직하게는 에탄올, 더욱 바람직하게는 50%(v/v) 에탄올이다.
- [0016] 한편, 본 발명에 따른 추출물은 용매 조추출물을 추가의 용매로 분획한 용매 분획물일 수 있으며, 바람직하게는 상기 용매 조추출물에 에틸에테르, 아세트산에틸, 및 부탄올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용한 용매 분획물일 수 있다. 예를 들면, 물 및 탄소수 1 내지 4개의 직쇄 또는 분지형 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 용매 조추출물을, 에틸에테르, 아세트산에틸, 및 부탄올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 분획한 용매 분획물일 수 있다.
- [0017] 추출 온도는 특별한 제한은 없지만 40 내지 110, 바람직하게는 70 내지 90인 것이 좋다. 추출공정은 1회 또는 수회 반복할 수 있으며, 본 발명의 한 바람직한 예에서는 1차 추출 후 다시 재추출하는 방법을 채택할 수 있는데, 이는 생약추출물을 대량 생산하는 경우 효과적으로 여과를 한다 하더라도 생약 자체의 수분 함량이 높기 때문에 손실이 발생하게 되어 1차 추출만으로는 추출효율이 떨어지므로 이를 방지하기 위함이다. 이와 같이 2차에 걸친 추출 및 각각의 추출 후 얻어진 여과액을 혼합함으로써 추출 효율을 높일 수 있으나, 본 발명의 추출물이 상기와 같은 추출 회수에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 이와 같이 얻어진 추출물은 의약품 또는 식품 원료로 사용하기에 적합하도록 잔존하는 추출 용매의 함량을 조절하기 위하여 농축물 총량의 약 10 내지 30배, 바람직하게는 15 내지 25배, 보다 바람직하게는 약 20 중량배의 물로 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 3회 공비 농축하고 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태의 복합 생약 추출물로서 제조될 수도 있다.
- [0019] 본 발명에 사용된 추출 방법은 통상적으로 식물 또는 생약의 추출에 사용되는 모든 방법을 제한없이 사용할 수 있으며, 예컨대, 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 퍼콜레이션법 또는 환류 냉각 추출법일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 구체적인 본 발명의 일 실시예에서는, 자소엽, 전호 및 황금을 각각 비율별로 혼합하여, 시료 중량의 7배의 양의 50% 에탄올 수용액을 가하여 80에서 3시간 환류추출 하였으며, 수득한 추출액은 여과한 뒤 동결건조하여 분말상태로 제조하였다.
- [0021] 본 발명의 복합 생약 조성물은 탁월한 염증 세포 감소 효과, 백혈구, 림프구 및 단핵구 수준 감소 효과 및 혈중 IgE 감소능을 가지며, 이로 인해 천식을 예방, 개선 및 치료할 수 있다. 이러한 본 발명에 따른 복합 생약 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [0022] 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 포함하는, 천식의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 따른 조성물 내의 유효성분으로서의 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물의 함량은 사용 형태

및 목적, 환자 상태, 증상의 종류 및 경증 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 전체 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 또는 0.1 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%, 또는 0.1 내지 40 중량% 일 수 있다. 그러나 이는 투약자의 필요에 따라 증감할 수도 있고, 식생활, 영양 상태, 천식으로 인한 기관지 또는 폐의 손상 정도, 천식의 진행 정도 등과 같이 다양한 인자에 따라 적절하게 증감할 수 있으므로, 상기 범위에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명에 따른 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구 또는 비경구(예를 들어, 피부, 정맥, 근육 내, 피하) 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 액제, 현탁제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 좌제, 연고제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 상기 혼합 추출물 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다. 예를 들어, 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 제제화할 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 체중, 천식으로 인한 기관지 또는 폐의 손상 정도, 질환의 진행 정도 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6회 투여될 수 있다.

[0027] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 포함하는, 천식의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 식품이란 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 첨가하는 것도 포함된다. 본 발명의 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 상기 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.1 내지 90 중량부, 바람직하게는 1 내지 60 중량부 첨가될 수 있다. 상기 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 천식의 개선 또는 개선된 상태의 유지를 위한 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 포함하는 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 식품의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물을 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, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합 생약 추출물은 천식을 일으키는 염증 세포, 백혈구, 림프구 및 단핵구, 및 혈중 IgE를 효과적으로 감소시켜, 천식의 예방, 개선 및 치료에 있어서의 약학적 조성물, 기능성 식품 조성물 또는 식품에 첨가되는 기능성 물질로서 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합생약추출물과 대조약인 몬테루카스트를 난백알부민으로 감작된 마우스 모델에 처리하였을 때의 총염증세포수를 확인한 그래프이다.

도 2는 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합생약추출물과 대조약인 몬테루카스트를 난백알부민으로 감작된 마우스 모델에 처리하였을 때의 호산구수를 확인한 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합생약추출물과 대조약인 몬테루카스트를 난백알부민으로 감작된 마우스 모델에 처리하였을 때의 백혈구를 분석한 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합생약추출물과 대조약인 몬테루카스트를 난백알부민으로 감작된 마우스 모델에 처리하였을 때의 림프구를 분석한 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합생약추출물과 대조약인 몬테루카스트를 난백알부민으로 감작된 마우스 모델에 처리하였을 때의 단핵구를 분석한 그래프이다

도 6은 본 발명에 따른 자소엽, 전호 및 황금의 복합생약추출물과 대조약인 몬테루카스트를 난백알부민으로 감작된 마우스 모델에 처리하였을 때의 혈청내 OVA-특이적 IgE를 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] <제조예 1> 재료 및 시료 추출

[0031] 자소엽, 전호 및 황금을 각각 비율별로 혼합하여, 시료 중량의 7배의 양의 50% 에탄올 수용액을 가하여 80℃에서 3시간 환류추출 하였으며, 수득한 추출액은 여과한 뒤 동결건조하여 분말상태로 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다. 자소엽, 전호, 황금 복합 생약의 추출물을 제조하여 본 실험을 수행하였다.

표 1

[0033]

추출물 코드	생약비율 (자소엽:전호:황금)	제조 방법
ASMT-16018	1:1:1	50% 에탄올 7배수를 넣고 80℃에서 3시간 환류추출
ASMT-16019	2:1:1	50% 에탄올 7배수를 넣고 80℃에서 3시간 환류추출
ASMT-16020	3:1:1	50% 에탄올 7배수를 넣고 80℃에서 3시간 환류추출
ASMT-16021	2:1:2	50% 에탄올 7배수를 넣고 80℃에서 3시간 환류추출
ASMT-16022	2:2:1	50% 에탄올 7배수를 넣고 80℃에서 3시간 환류추출

[0034] <실시에 1> OVA-특이적 천식을 유도한 생쥐에서 조성물 투여에 의한 기관지폐포세척액 내의 total 세포, 호산구 억제, 및 혈청 OVA-특이 IgE 억제 효과

[0035] <실시에 1-1> 실험동물의 준비

[0036] 실험동물은 대한바이오링크에서 특정 병원체 부재(specific pathogen free) BALB/c 마우스 (약 20g) 6주령 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 사육상자당 4개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 생쥐는 1~2주일간 온도 20±2℃, 습도 55±10%의 환경에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 순화 및 사육하여, 생후 7~8주의 생쥐를 실험에 사용하였다.

[0038] <실시에 1-2> 실험동물의 기도 감작과 천식 유발

[0039] 제조예 1에서 제조된 50% EtOH 추출물 및 에탄올 농도 별 추출물을 이용하여, Balb/c 마우스 천식 모델에서 천식질환과 관련된 여러 지표들의 변화를 측정하였다.

[0041] 순화 1주일 후부터 2 mg 수산화알루미늄(Thermo 77161)과 난백알부민 20 µg(Sigma A5503)을 현탁한 인산완충용액 (pH 7.4) 100 µl을 1주 간격으로 3회 복강주사하여 감작시켰다. 실험 시작 후 표 2와 같이 군을 나누어 21 일(Day 21)부터 매일 7일간 Day 27까지 제조예 1의 50% EtOH 추출물 400mg/kg을 마우스에 경구투여 하였고, 대조약물인 montelukast의 농도는 50mg/kg 으로 경구투여 하였다. 경구투여 한 시간 뒤 초음파 분무기를 사용하여 1% 난백알부민을 첨가한 인산완충용액을 50분간 마우스가 들어있는 용기에 분무하여 천식 유발을 시켰다. 마지막 천식 유발 후 24시간 뒤에 졸레틸과 림폰을 투여하여 마취시키고 혈액을 채취한 후 기관지폐포세척액을 수득하였다. 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)은 기관에 카눌라(cannula) 삽입방법으로 0.5 ml씩 3회 흡입하여 수득하였다.

표 2

군	감작(Sensitization)	천식 유발 (Challenge)	처리(treatment)
미유발 군	PBS	PBS	0.5% CMC
유발군	OVA+Alum	OVA	0.5% CMC
OVA + Montelukast			50mg/kg
OVA + ASMT16018			400mg/kg
OVA + ASMT16019			
OVA + ASMT16020			
OVA + ASMT16021			
OVA + ASMT16022			

[0044] <실시에 1-3> 난백알부민으로 감작된 동물모델에서 기관지폐포세척액의 total cell 분석

[0045] 상기 실시예 1-2에서 수득한 각 실험군의 기관지폐포액을 suspension한 후 희석하여 트리판블루(Trypan blue)로 염색하여 죽은 세포를 제외한 총 세포 수를 헤모사이토미터를 이용하여 계산하였다. 통계학적인 분석은 t-test으로 수행하였으며, P<0.05에서 유의수준을 하였다.

[0047] 그 결과, 표 3 및 도 1에서 보는 바와 유발 군에서는 총 염증세포수가 $106.9 \pm 11.7 \times 10^4$ cells/mouse으로 대조 군에 비해 증가하였음을 확인하였다. 그러나 본 발명의 추출물 400mg/kg 을 처리한 경우에는 총 염증세포 수가 ASMT-16018, ASMT-16019, ASMT-16020, ASMT-16021, ASMT-16022 각각 $63.1 \pm 7.9 \times 10^4$ cells/mouse, $38.8 \pm 2.2 \times 10^4$ cells/mouse, $73.2 \pm 7.6 \times 10^4$ cells/mouse, $77.1 \pm 5.0 \times 10^4$ cells/mouse, $72.9 \pm 4.8 \times 10^4$ cells/mouse으로 관찰하였다. Montelukast 50mg/kg 투여 군의 염증 세포 수($72.2 \pm 6.8 \times 10^4$ cells/mouse) 보다 감소하였고, 억제율(%)로 나타낸 결과는 아래의 표와 같으며, 특히 ASMT-16019 투여 군의 총 염증세포는 63.7 ± 2.6 %의 억제율을 나타내어 시험 물질 투여 군 중에서 가장 낮은 수준으로 감소하였으며, 대조 약물로 사용한 montelukast 보다 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

표 3

군	억제율(%)
유발군	0
OVA + Montelukast	32.4 ± 6.4
OVA + ASMT16018	41.0 ± 7.4
OVA + ASMT16019	63.7 ± 2.6
OVA + ASMT16020	31.6 ± 7.1
OVA + ASMT16021	27.9 ± 4.7
OVA + ASMT16022	31.8 ± 4.5

[0050] <실시에 1-4> 난백알부민으로 감작된 동물모델에서 기관지폐포세척액의 호산구 분석

[0051] 호산구 수는 디프-퀵(Diff-Quick) 시약(Sysmex, Cat No. 38721, Switzerland)으로 염색한 후 판별하였다. t-test으로 수행하였으며, P<0.05에서 유의수준을 하였다.

[0053] 그 결과, 표 4 및 도 2에서 보는 바와 같이 유발 군에서는 총 염증세포수가 $21,804 \pm 3,194 /100$ ul으로 미 유발 군에 비해 증가하였음을 확인하였다. 그러나 본 발명의 추출물 400mg/kg 을 처리한 경우에는 호산구 수가 ASMT-16018, ASMT-16019, ASMT-16020, ASMT-16021, ASMT-16022 각각 $13,310 \pm 1,326 /100$ ul, $5,282 \pm 1,326 /100$ ul, $14,874 \pm 2,705 /100$ ul, $11,508 \pm 3,150 /100$ ul, $12,362 \pm 1,997 /100$ ul 으로, 시험 물질 투여 군 중 가장 많이 감소 하였다. 억제율(%)로 나타낸 결과는 아래의 표와 같으며, ASMT-16019 투여 군이

75.8 ± 6.1 %의 억제율로 처리 군 중 가장 낮은 수준으로 확인되었고, montelukast 50mg/kg 투여 군의 억제율 (43.3 ± 14.7 %) 보다 높았다.

표 4

군	억제율(%)
유발군	0
OVA + Montelukast	43.3 ± 14.7
OVA + ASMT16018	39.0 ± 6.1
OVA + ASMT16019	75.8 ± 6.1
OVA + ASMT16020	31.8 ± 12.4
OVA + ASMT16021	47.2 ± 14.4
OVA + ASMT16022	43.3 ± 9.2

[0055]

[0056]

<실시에 1-5> 난백알부민으로 감작된 동물모델에서 기관지폐포세척액의 혈구 분석

[0057]

혈구분석은 혈구분석기(MS9-5, MELET SCHLOESING Laboratories)를 이용하여 분석하였고, 결과는 도 3, 도 4, 도 5와 같다. t-test으로 수행하였으며, P<0.05에서 유의수준을 하였다.

[0058]

도 3 내지 5에 나타난 바와 같이 ASMT-16019 BALF 내 WBC, LYM, MON 모두 다른 시료 투여 군에 비해 낮은 수준으로 확인되었다.

[0060]

<실시에 1-6> 난백알부민으로 감작된 동물모델에서 혈청 내 OVA-specific IgE 분석<

[0061]

OVA-specific IgE 분석은 Anti-Ovalbumin IgE(mouse) ELISA Kit(Cayman, Item No, 500480)을 사용하였다.

[0062]

구체적으로, 상기 실험예 <1-2>에서 수득한 각 혈액은 12000rpm, 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 회석하여 포획용(capturing) OVA specific IgE 항체가 붙어 있는 96-웰 플레이트(well plate)에 주입하여 2시간 동안 실온에서 항원-항체 반응을 유도하였다. 항원-항체반응이 끝나고 4회 세척한 후 Ovalbumin-biotin Conjugate solution을 100 μl씩 각각의 웰에 넣어 1시간 반응시켰다. 이어서 4회 세척한 후 Streptavidin-HRP solution 30분, TMB 기질 15분 반응으로 발색반응을 유도하였다. 최종적으로 stop solution을 주입하여 450nm 에서 흡광도를 측정하여 각 실험구의 혈청 내 면역글로불린 E의 함량을 측정하였다. t-test으로 수행하였으며, P<0.05에서 유의수준을 하였다.

[0064]

그 결과, 표 5 및 도 6에 나타난 바와 같이 OVA으로 감작된 쥐의 경우, 0.5% CMC만 투여한 유발군에서는 IgE의 함량이 급격하게 증가하였음을 확인하였으며, 시험 물질 투여 군에서는 유발군에 비하여 IgE의 생성이 약 74% 이상 현저하게 감소하였음을 확인하였다.

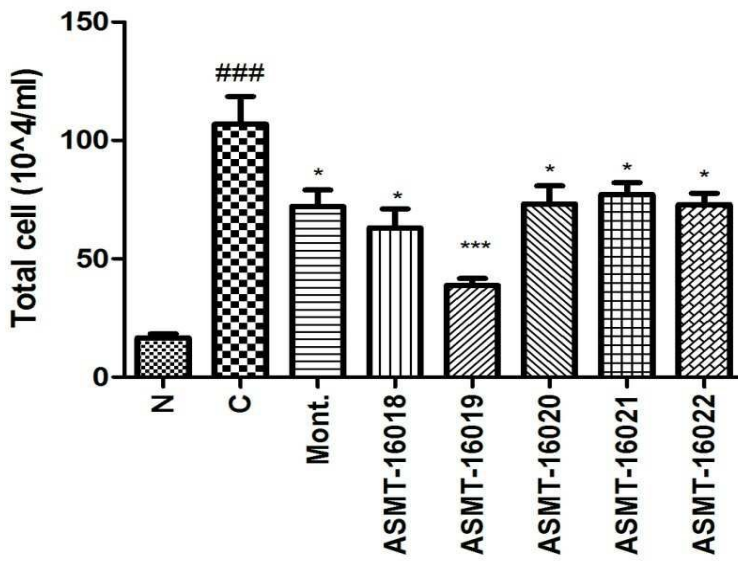
표 5

군	억제율(%)
유발군	0
OVA + Montelukast	23.4 ± 4.3
OVA + ASMT16018	41.2 ± 5.8
OVA + ASMT16019	73.6 ± 3.3
OVA + ASMT16020	42.7 ± 4.1
OVA + ASMT16021	37.0 ± 5.1
OVA + ASMT16022	48.5 ± 4.8

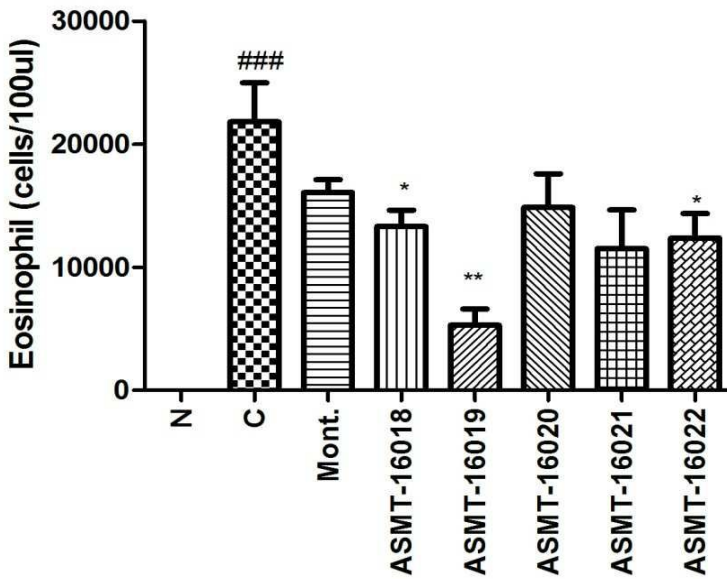
[0066]

도면

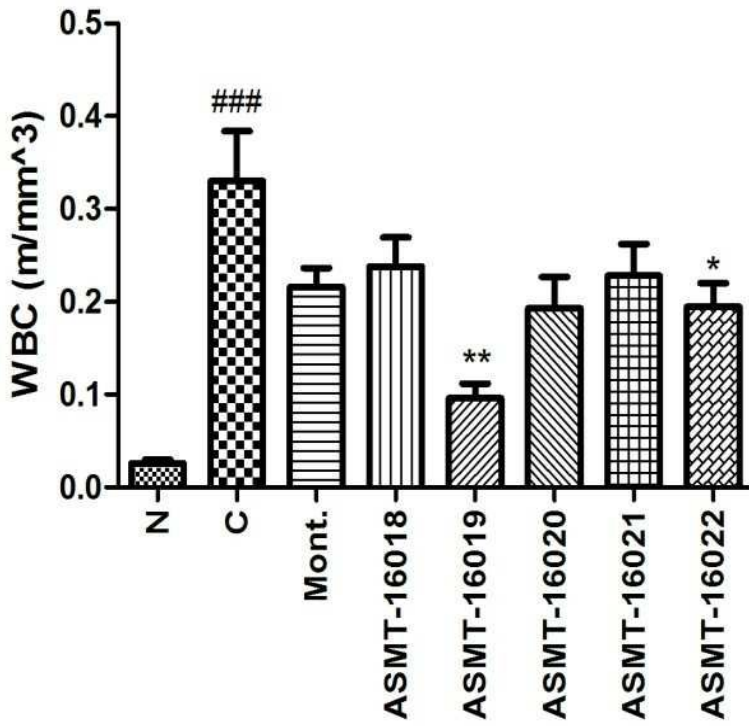
도면1



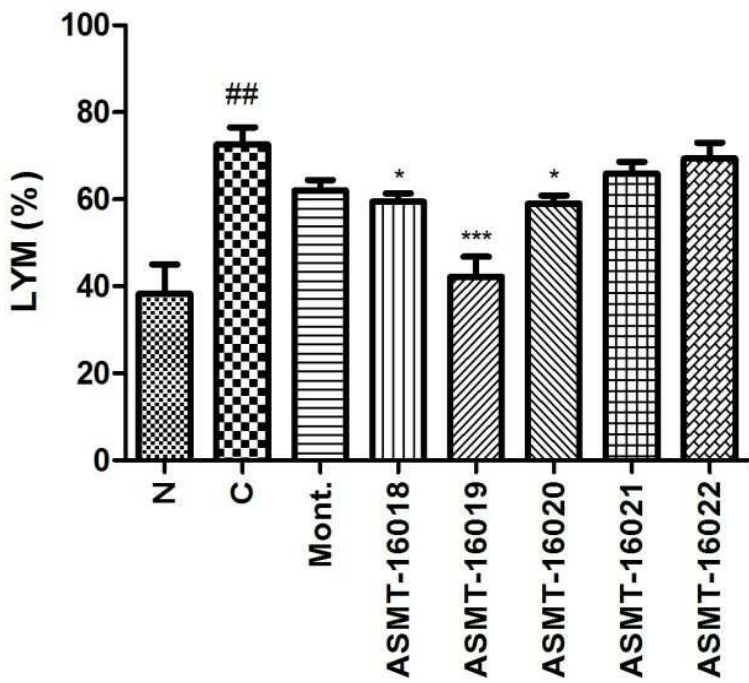
도면2



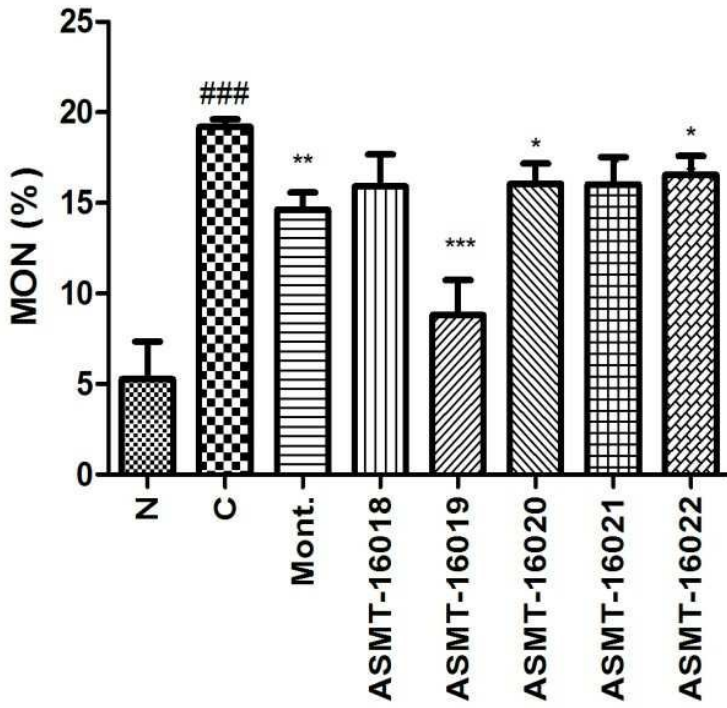
도면3



도면4



도면5



도면6

