(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 1 월 8 일 (08.01.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/002430 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/22 (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005844

(22) 국제출원일: 2014 년 7 월 1 일 (01.07.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0076696 2013 년 7 월 1 일 (01.07.2013) KR

(71) 출원인: **한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)** [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **안경섭 (AHN, Kyung Seop)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **오세량 (OH, Sei Ryang)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **권옥경 (KWON, Ok Kyoung)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **신인식 (SHIN, In Sik)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **류형원 (RYU, Hyung Won)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이상우 (LEE, Sang Woo)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이중구 (LEE, Joong Ku)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이형규 (LEE, Hyeong Kyu)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **최상호 (CHOI, Sang Ho)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **김두영 (KIM, Doo Young)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **김정희 (KIM, Jung Hee)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

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

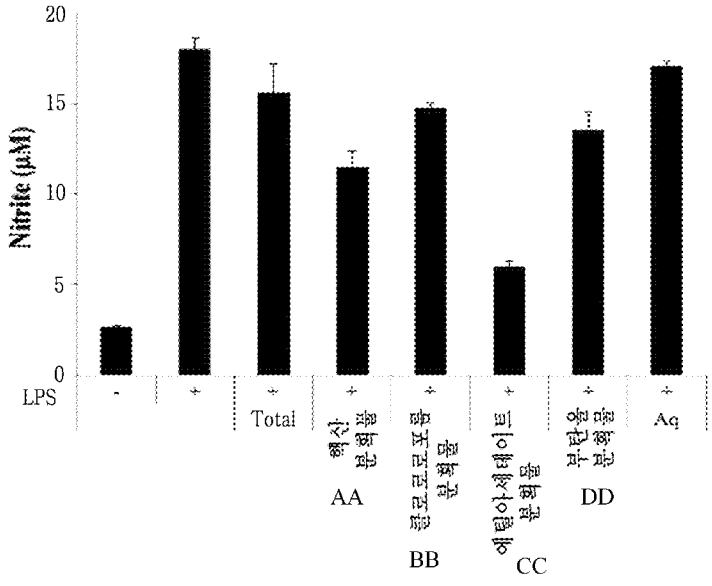
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, 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.

(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ASTHMA COMPRISING *PISTACIA WEINMANNIFOLIA J. POISS. EX FRANCH* EXTRACT OR FRACTION THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학 조성물



AA ... Nucleic acid fraction
BB ... Chloroform fraction
CC ... Ethyl acetate fraction
DD ... Butanol fraction

(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition for preventing or treating asthma comprising a *Pistacia weinmannifolia J. Poiss. ex Franch* extract or a fraction thereof. The *Pistacia weinmannifolia J. Poiss. ex Franch* extract or the fraction thereof according to the present invention does not exhibit toxicity, inhibits the generation of NO, IL-4, IL-5, and IL-13 and the generation of reactive oxygen species in the bronchial tubes, and has significantly induced the alleviation of airway hyperresponsiveness, inhibition of the infiltration of inflammatory cells into the bronchial tubes, and reduction of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in an ovalbumin-induced asthma mouse model. In addition, the *Pistacia weinmannifolia J. Poiss. ex Franch* extract or the fraction thereof according to the present invention effectively inhibits the secretion of immunoglobulins in serum, secretion of mucus in the bronchial tubes, and infiltration of inflammatory cells into lung tissue and thus can be usefully used as a safe preparation for preventing and treating asthma.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/002430 A1

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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia J. Poiss. Ex Franch*) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물은 독성을 나타내지 않으며, NO, IL-4, IL-5 및 IL-13 의 생성 및 기관지 내 활성산소의 발생을 억제하고, 난백알부민-유도 천식 마우스 모델에서 기도과민성 경감 및 기관지 내 염증세포 침윤 억제, 기관지폐포 세척액 내 염증세포 감소를 현저히 유도하였다. 또한, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 이의 분획물은 혈청 내 면역글로불린 분비, 기관지 내 점액 분비, 및 폐 조직 내 염증세포의 침윤을 효과적으로 억제하여 천식의 예방 및 치료에 안전한 제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia J. Poiss. Ex Franch*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 상기 추출물 또는 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품, 및 천식의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 추출물 또는 분획물의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 천식은 호흡곤란을 야기하는 호흡기 질환으로 우리나라 인구 중 약 300만 명이 천식을 앓고 있다. 천식은 색색거리는 천명, 호흡곤란, 재채기, 심한 경우 산소부족으로 인한 청색증 및 흉통을 나타내는 질환으로 최근 들어 대기오염 및 각종 화합물질에 대한 노출과 식생활의 서구화로 인하여 급격히 증가하고 있으며, 특히 소아에서 발병률이 증가하고 있다.

[4] 천식은 TH_2(T-helper2)타입 면역반응의 항진에 의하여 생성된 인터루킨-4, 5, 13에 의해 호산구(Eosinophil)를 비롯한 다양한 염증세포들이 기관지 및 혈관주위 조직으로 이동, 침윤하게 되고, 이들로부터 생성된 다양한 염증 매개 인자들에 의해 염증반응이 더욱 악화되면서, 점액분비의 증가 및 기도과민성을 증가시키게 되는 질환이다.

[5]

[6] 최근 분자생물학의 발달과 더불어, 천식을 사이토카인 (cytokine)이라는 분자 수준에서 이해하고자 하는 시도가 이루어지고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다. 이러한 인자 중에서, 질소산화물 (NO; nitric oxide)은 염증 매개 인자로서 병원성 DNA를 손상시키는 방어작용을 함으로써 항상성을 유지하는 역할을 한다. NO는 세 가지 주요한 질소산화물 합성효소 (NOS) 이성질체인 nNOS (neuronal NOS), eNOS (endothelial NOS), 및 iNOS (inducible NOS)에 의해 L-아르기닌 (L-arginine)으로부터 생성된다. 이들 중에서 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에 관여한다.

[7]

[8] 지금까지 천식을 비롯한 천식의 치료를 위해 스테로이드, 기관지 확장제, 염증 억제제 등의 다양한 치료제가 개발되었으나 상당수의 치료제들은 많은 부작용으로 사용시 주의를 요하고 있다. 현재 가장 광범위하게 사용되고 있는 흡입형 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. 또한, 살메테롤 (salmeterol)과 포르메테롤 (formeterol)과 같은 지속성 베타-2 길항제 (beta-2 agonist)는 천식 발작에 대해 예방 효과를 나타내지만 경우에 따라서는 환자를 사망케 할 수도 있다고 경고된 바 있다. 이와 같은 다양한 부작용들로 인해 종래의 천식의 치료제들은 그 사용에 있어 신중한 고려가 필요하며, 효능이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 천식의 예방 또는 치료용 제제의 개발이 꾸준히 요구되고 있다.

[9]

[10] 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 항천식 효능에 대해서는 알려진 바가 없다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명자들은 인체에 부작용을 유발하지 않으면서 천식의 예방 및 치료에 유용한 천연물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물이 독성을 나타내지 않으면서 동물세포에서 산화질소 생성을 억제하고, 천식 유도 마우스 모델에서 기도과민성을 경감시키며, 기도 내 활성산소 발생을 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물이 기관지폐포 세척액 내 염증세포 및 인터루킨의 양을 감소시키고, 혈청 내 IgE 생성 및 폐 조직 내 염증세포의 침윤을 억제하며, 기관지 내 점액 분비를 감소시키는 효과를 가짐으로써 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 목적은 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia J. Poiss, Ex Franch*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의

분획물을 천식의 예방 또는 치료를 위한 의약품의 제조에 사용하는 용도를 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학 조성물을 천식이 의심되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 천식의 치료방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

[19] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 이의 분획물은 독성을 나타내지 않으며, 염증 매개인자인 NO, IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성 및 기관지 내 활성산소의 발생을 억제하고, 난백알부민-유도 천식 마우스 모델에서 기도과민성 경감 및 기관지 내 염증세포 침윤 억제, 기관지폐포 세척액 내 염증세포 감소를 현저히 유도하였다. 또한, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 이의 분획물은 혈청 내 면역글로불린 분비, 기관지 내 점액 분비, 및 폐 조직 내 염증세포의 침윤을 효과적으로 억제하여 천식의 예방 및 치료에 안전한 제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 (Hexane) 분획물을 UPLC (Ultraperformance Liquid Chromatography)로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 2는 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 (EtOAc) 분획물을 UPLC로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[23] 도 3a는 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물 (Total), 헥산 분획물 (Hexane), 클로로포름 분획물 ($CHCl_3$), 에틸아세테이트 분획물 (EA), 부탄올 분획물 (BuOH) 및 물 분획물 (Aq)이 대식세포에서 LPS로 유도된 질소산화물 (NO) 생성에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[24] 도 3b는 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 1 내지 7 (Hex 1-7) 및 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 1 내지 7 (EA 1-7)이 대식세포에서 LPS로 유도된 질소산화물 (NO) 생성에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[25] 도 3c는 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 1 내지 7 (Hex 1-7) 및 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 1 내지 7 (EA 1-7)이 대식세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[26] 도 4는 난백 알부민으로 감작된 천식 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 총 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 기도과민성에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[27] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

[28] OVA: 난백 알부민으로 기도 감작한 천식 유도군;

[29] Mon: 몬테루카스트를 투여한 비교군;

[30] Total: 피스타시아 웨인마니폴리아의 Total 추출물을 투여한 실험군

[31] EA5: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 5를 투여한 실험군

[32] EA6: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 6을 투여한 실험군

[33] Hex7: 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 7을 투여한 실험군

[34] #: 정상 대조군 (NC)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$)

[35] *: 천식 유도군 (OVA)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$)

[36] 도 5는 난백 알부민으로 감작된 천식 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 총 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 기관지폐포 세척액 내 호산구, 대식세포, 림프구, 중성구 및 총 세포의 개수에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[37] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

[38] OVA; 난백 알부민으로 기도 감작한 천식 유도군;

[39] Mon: 몬테루카스트를 투여한 비교군;

[40] Total: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물을 투여한 실험군

[41] EA5: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 5를 투여한 실험군

[42] EA6: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 6을 투여한 실험군

[43] Hex7: 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 7을 투여한 실험군

[44] #: 정상 대조군 (NC)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$)

[45] *: 천식 유도군 (OVA)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$)

[46] 도 6은 난백 알부민으로 감작된 천식 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 총 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 활성산소 발생에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

[47] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

[48] OVA: 난백 알부민으로 기도 감작한 천식 유도군;

[49] Mon: 몬테루카스트를 투여한 비교군;

[50] Total: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물을 투여한 실험군

[51] EA5: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 5를 투여한 실험군

[52] EA6: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 6을 투여한 실험군

[53] Hex7: 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 7을 투여한 실험군

[54]

[55] 도 7은 난백 알부민으로 감작된 천식 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 총 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 염증세포의 침윤에 미치는 영향을 관찰한 결과이다.

[56] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

[57] OVA: 난백 알부민으로 기도 감작한 천식 유도군;

[58] Mon: 몬테루카스트를 투여한 비교군;

[59] Total: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물을 투여한 실험군

[60] EA5: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 5를 투여한 실험군

[61] EA6: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 6을 투여한 실험군

[62] Hex7: 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 7을 투여한 실험군

[63] 도 8은 난백 알부민으로 감작된 천식 유도 동물 모델에서 피스타시아 웨인마니폴리아의 총 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 기관지 내 점액 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과이다.

[64] NC: 기도 감작하지 않은 정상 대조군;

[65] OVA: 난백 알부민으로 기도 감작한 천식 유도군;

[66] Mon: 몬테루카스트를 투여한 비교군;

[67] Total: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물을 투여한 실험군

[68] EA5: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 5를 투여한 실험군

[69] EA6: 피스타시아 웨인마니폴리아의 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 6을 투여한 실험군

[70] Hex7: 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물의 활성분획 7을 투여한 실험군

[71]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[72] 하나의 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 천식의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[73] 본 발명의 목적상, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물은 천식을 예방 또는 치료하기 위하여 사용된다.

[74] 본 발명에서 용어 "피스타시아 웨인마니폴리아(*Pistacia weinmannifolia J. Poiss, Ex Franch*)는 중국 운남성 부근에 널리 자생하고 있는 식물로서, 예로부터 이질, 장염, 독감을 비롯한 두통에 사용되어 왔다. 그러나, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물의 항천식 효능에 대해서는

알려진 바 없다.

[75] 본 명세서에서 사용된 용어, "피스타시아 웨인마니폴리아 추출물"은 피스타시아 웨인마니폴리아를 적절한 용매로 추출하여 수득한 것을 말한다. 본 발명에서 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물은 피스타시아 웨인마니폴리아로부터 적합한 용매를 사용하여 추출하여 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 및 이들 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[76] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물은 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적은 추출방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 피스타시아 웨인마니폴리아는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

[77] 또한, 항천식 효능을 나타낼 수 있는 한, 피스타시아 웨인마니폴리아의 사용부위는 특별히 제한되지 않으며, 그 예로 줄기를 사용할 수 있다.

[78] 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.

[79] 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물의 제조에는 물, C_1~C_4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는 메탄올 또는 에탄올을 사용하여 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물을 제조할 수 있다.

[80] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물의 제조에 있어 먼저, 채집된 피스타시아 웨인마니폴리아의 줄기를 건조시킨 후 분쇄한다. 분쇄된 분말 시료에 이의 건조 중량을 기준으로 에탄올을 2 내지 20배 부피로 가한 후 20 내지 30 ℃에서, 구체적으로는 상온에서 5 내지 15일, 더욱 구체적으로는 10일간 추출할 수 있다. 이어서 여과 및 감압농축 후, 피스타시아 웨인마니폴리아 에탄올 추출물을 수득한다. 상기 추출 과정은 2 내지 3회 반복할 수 있으며, 여과, 농축, 동결건조 등의 과정을 추가적으로 거칠 수 있다.

[81] 본 명세서에서 사용된 용어, "분획물"은 상기와 같이 제조된 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[82] 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, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성 용매, 또는 이들의 혼합 용매가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[83] 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 포함될 수 있다.

[84] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 상기에서 얻어진 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물에 증류수를 가하여 현탁한 후 동량의 헥산을 가하여 헥산층과 물층으로 분리하고, 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.

[85]

[86] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기와 같이 수득된 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물과 이의 분획물의 천식 치료 효과를 확인한 결과, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 LPS 처리된 대식세포에서 질소산화물의 생성을 현저히 감소시키고 (도 3a 내지 3c 참조), 메타콜린 농도 증가에 따른 기도과민성을 감소시킴 (도 4 참조)을 확인하였다.

[87] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 기관지폐포 세척액 내 염증세포의 수를 현저히 감소시키고 (도 5 참조), 혈청 내 IgE 항체 농도 및 난백알부민 특이적 IgE 항체 농도를 상당히 저하시키며 (표 1 참조), 활성산소 발생을 효과적으로 억제함 (도 6 참조)을 확인하였다.

[88] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아의 메탄올 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 기관지폐포 세척액 내 인터루킨-4, 5, 13의 생성을 상당히 억제하고 (표 2 참조), 기관지 내 염증세포의 침윤을 현저히 저해하고 (도 7 참조), 기관지 내 점액 분비를 크게 저하시킴 (도 8 참조)을 확인하였다.

[89] 상기 결과로부터 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물과 이의 분획물은 천식의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[90] 이에 따라 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물과 이의 분획물을 유효성분으로 포함하고, 추가적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[91] 천식은 통상 폐 속의 기관지가 예민해진 상태로 기관지의 알레르기 염증 반응 때문에 발생하는 알레르기 질환의 일종이며, 알레르기는 어떤 외래성 물질과 접한 생체가 그 물질에 대하여 정상과는 다른 반응을 나타내는 현상이다. 구체적으로, 다양한 염증세포들이 기관지 및 혈관주위 조직으로 이동, 침윤하게

되고, 이들로부터 생성된 다양한 염증 매개 인자들에 의해 염증반응이 더욱 악화되면서, 점액분비 및 기도과민성이 증가하게 된다.

[92] 본 발명에서 사용된 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 천식의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[93] 본 발명에서 사용된 용어, "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 천식의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[94] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있으며, 공인된 항천식 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있다.

[95] 상기 "약학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[96] 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 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 액상 제제로는 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 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[97] 상기 약학 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.

[98] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 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 약학 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. 구체적으로는 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물은 약학 조성물에 0.001 내지 1500 ㎍/㎖로 포함될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 0.001 내지 1000 ㎍/㎖로 포함될 수 있다.

[99]

[100] 다른 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학 조성물을 천식의 예방 또는 치료가 필요한 개체에 투여하여 천식을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[101] 상기 개체는 천식 또는 천식 관련 질환의 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 인간뿐만 아니라 천식 또는 천식 관련 질환 및 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

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

[103] 본 발명의 천식의 치료방법은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단 범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 또한, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는 지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용할 수 있다.

[104]

[105] 또 다른 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[106] 상기 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물에 관해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[107] 상기 식품 조성물은 천식의 발생 억제에 도움을 주는 기능을 가질 수 있다.

[108] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.

[109] 상기 식품 조성물에는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물 이외에도 항천식 및 항염증 활성에 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.

[110] 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 충진제, 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.

[111] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 덱스트린, 시클로덱스트린 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.

[112] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능성 식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능성 식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 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 뛰어날 수 있다.

[113] 유효성분의 혼합양은 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 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[114] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성 식품을

모두 포함할 수 있다.

[115]

[116] 또 다른 양태로서, 본 발명은 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 천식의 예방 또는 치료를 위한 의약품의 제조에 사용하는 용도를 제공한다. 상기 의약품은 천식의 예방 또는 치료를 위한 개체에 경구투여 또는 비경구투여 할 수 있으며, 개체의 특성에 따라 적절한 제형의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 상기 추출물 또는 분획물을 필요에 따라 적절한 함량으로 포함하여 의약품을 제조할 수 있다.

[117]

[118] 또한, 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 천식이 의심되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 천식의 치료방법을 제공한다.

[119] 본 발명의 일 실시예에서는 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물을 동물 모델에 투여하여, 혈청 내 면역글로불린 분비, 기관지 내 점액 분비, 및 폐 조직 내 염증세포의 침윤을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였는바(도 4 내지 도 8), 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하여, 효과적으로 천식을 치료할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

[120]

발명의 실시를 위한 형태

[121] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[122]

[123] **<제조예 1> 피스타시아 웨인마니폴리아 줄기의 추출물 제조**

[124] 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia J. Poiss. Ex Franch*)는 2013년에 중국 운남성 (Shilin county, Shilin town, Sanjia village)에서 채집 및 동정하였으며 (한국생명공학연구원, 이상우 박사), YAAS (Yunnan academy of agricultural sciences)에서 에탄올 추출물을 제조하여 한국생명공학연구원 해외생물소재 허브센터로 전달하였다. 본 발명자는 이 센터의 해외식물추출물은행에서 시료를 수득하여 아래 실험을 진행하였다.

[125] 추출과정을 살펴보면, 피스타시아 웨인마니폴리아의 줄기 10 ㎏을 채집하고 자연 건조 (음건)하여 수분을 제거한 후 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료를 각각 5 ㎏씩 용기에 담고 에탄올 (95%)을 각각 10ℓ씩 가한 후, 상온 (20℃)에서 10일간 간헐적으로 교반 하면서 침전 추출하였다. 그런 다음 추출물을 거름종이를 통해 여과하였고, 40 ℃ 이하의 온수에서 중탕을 통한 잔류 용매와 수분을 감압농축하여, 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물 542.2g을 수득하였다. 이후의 실험에서는 수득된 피스타시아 웨인마니폴리아 에탄올 추출물을 총 추출물 (Total 추출물)로 명명하였다.

[126]

[127] **<제조예 2> 피스타시아 웨인마니폴리아 분획물 제조**

[128] 상기 제조예 1에서 수득한 피스타시아 웨인마니폴리아의 총 추출물 542.2g에 물 5L를 가하여 현탁시키고 동량의 헥산을 넣어 물층과 헥산층으로 분리하였다. 이 과정을 동일한 방법으로 3회 더 반복 실시하고 여과, 감압농축하여 헥산 분획물 (48.5 g)을 분리하였다. 같은 방법으로 상기 헥산층을 분리하고 남은 물층에 동량의 클로로포름을 가하여 상기와 같은 방법으로 분리하여 클로로포름 분획물 (16.3 g)을 수득하였다. 같은 방법으로 클로로포름층을 분리하고 남은 물층에 동량의 에틸아세테이트를 가하여 상기와 같은 방법으로 분리하여 에틸아세테이트 분획물 (53.7 g)을 수득하였다. 같은 방법으로 에틸아세테이트층을 분리하고 남은 물층에 동량의 부탄올을 가하여 상기와 같은 방법으로 분리하여 부탄올 분획물 (114 g)을 수득하였다. 남은 물층을 농축하여 물 분획물 (186.5g)을 수득하였다.

[129]

[130] **<제조예 3> 피스타시아 웨인마니폴리아 분획물의 활성분획 분석**

[131] 상기 <제조예 2>에서 수득한 피스타시아 웨인마니폴리아의 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 활성분획을 조사하기 위하여 이들을 각각 2종의 액체 크로마토그래피인 UPLC (ultra performance liquid chromatography) 및 MPLC (Medium pressure liquid chromatography)로 분석하였다.

[132] 먼저, UPLC 분석을 위해 헥산 분획물 (48.5g) 및 에틸아세테이트 분획물 (53.7g)을 UPLC용 0.25 ㎜ 멤브레인 필터로 1회 여과하였다. UPLC 기기 (Waters UPLC-Q-TOF)에 칼럼 (Waters BEH C18 column, 2.1 × 100 ㎜, 1.7 ㎜)을 장착한 후 여과된 각각의 분획물을 0.3㎕의 양으로 로우딩하였다. 이때, 용매로는 아세토니트릴 + 0.1% 포름산/물 + 0.1% 포름산 [10:60→100:0 (v/v)]을 사용하고, 용리 속도는 0.4 ㎖/분이었으며, UV 200-400 ㎚의 파장에서 검출하였다.

[133] 또한, MPLC 분석을 위해 MPLC 기기 (Interchim)에 칼럼 (20 ㎜ × 250 ㎜; Resin: Zeoprep C18, 10 m)을 장착한 후 헥산 및 에틸아세테이트 분획물 각각을 1 g의 양으로 로우딩하였다. 이때, 용매로는 헥산/에틸아세테이트 [10:90→100:0 (v/v)]를 사용하고, 용리 속도는 9 ㎖/분이었으며, UV 200-400 ㎜의 파장에서 검출하였다. 분석 시간은 헥산 분획물의 경우에는 110분, 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 120분으로 하였다.

[134] 상기 UPLC 및 MPLC 분석 결과를 도 1 및 2에 나타내었으며, 각 도면의 상단은 UPLC 분석 결과를, 하단은 MPLC 분석 결과를 나타내는 것이다.

[135]

[136] **<실시예 1> LPS로 유도된 대식세포에서 항염증 효과 평가**

[137] **<1-1> 질소산화물 (NO) 생성 억제 효과**

[138] 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 염증 억제 효과를 알아보기 위하여, 생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포에서 리포폴리사카라이드 (LPS)로

유도된 질소산화물 (Nitric oxide; NO)의 생성량을 측정하였다.

[139] 구체적으로, 페놀-레드 (phenol-Red) 무함유 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 소태아혈청 (Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가하고, 세포를 2.5 × 10^5개/㎖농도로 현탁한 후 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 200㎕씩 접종하였다. 4시간 동안 세포 부착을 유도한 후, 시료를 각각 20㎍/㎖의 농도로 처리하여 1시간 동안 배양하였고, 이어서 0.5㎍/㎖의 LPS를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 상층액 100㎕를 회수하여 새로운 96-웰 플레이트에 분주하고, 그리스 시약 (Griess reagent, Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기 (microplate reader, Bio-Rad사)로 540㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨 (sodium nitrite)을 이용하여 검량선을 작성하고, 이를 기준으로 배양액 내 질소산화물의 생성량을 계산하였으며, LPS를 처리한 군의 질소산화물의 생성량을 100%로 하여 각 시료의 저해율을 계산하였다. 이때, 시료로는 상기 제조예 1 및 2에서 수득된 에탄올 추출물 (Total), 헥산 분획물 (Hexane), 클로로포름 분획물 ($CHCl_3$), 에틸아세테이트 분획물 (EA), 부탄올 분획물 (BuOH), 물 분획물 (Aq)을 사용하였다.

[140] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, LPS만 처리한 세포에서는 질소산화물의 생성량이 급격히 증가한 반면, 에탄올 추출물 및 각종 분획물을 전처리한 후 LPS를 처리한 세포에서는 질소산화물의 생성량이 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 헥산 분획물 (36.24±5.01% 저해) 및 에틸아세테이트 분획물 (66.71±1.71% 저해)을 전처리한 경우, 질소산화물의 생성량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[141] 또한, 도 3b에 나타난 바와 같이, 제조예 3에서 확인된 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물의 활성분획 중에서는 헥산 분획물의 3 내지 7번 활성분획이, 에틸아세테이트 분획물의 2 내지 6번 활성분획이 질소산화물의 생성을 감소시키는 것으로 확인되었다.

[142]

[143] **<1-2> 세포생존율에 미치는 영향**

[144] 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물이 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <1-1>에서와 같이 Raw264.7 세포를 소태아혈청 (Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 1 × 10^5개/㎖의 농도로 현탁한 후 100㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하여 부착하였다. 4시간 후에 시료를 각각 20 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 5㎎/㎖의 MTT 용액을 웰당 10㎕씩 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고, DMSO를 100㎕씩 첨가한 후, 570㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 DMSO를 0.2% 처리한 음성대조군의 값을 100%로 하여 하기 수학식 1에 따라 계산하였다.

[145]

[146] 수학식 1

$$\text{세포생존율}(\%)=\frac{\text{추출물처리한}OD570nm\text{값}}{\text{음성대조군}OD570nm\text{값}}\times 100$$

[147]

[148] 그 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이, 80% 이상의 세포생존율을 나타낸 활성분획은 헥산 분획물의 1, 2 및 7번 활성분획과, 에틸아세테이트 분획물의 1, 2, 및 5 내지 7번 활성분획이었다.

[149] 이에 본 발명자들은 질소산화물 생성 억제 효과가 우수하면서 독성이 낮아 높은 세포생존율을 나타내는 헥산 분획물의 7번 활성분획 (62.84±19.61% 저해)과 에틸아세테이트 분획물의 5 및 6번 활성분획 (각각 64.42±11.2% 및 78.88±11.20% 저해)을 선발하여 이후의 효과 실험에 사용하였다.

[150]

[151] **<실시예 2> 난백 알부민으로 감작된 천식 동물 모델에서 천식 완화 효과 평가**

[152] **<2-1> 실험동물 및 기관지 천식 유도**

[153] 본 실험에서는 평균 체중 20g 내외의 6주령 Balb/c 암컷 생쥐를 실험동물로 사용하였다. 1주간의 적응기간을 가진 후에 기본적인 신체검사상에서 이상이 관찰되지 않는 동물을 대상으로 하였다. 2㎎의 수산화알루미늄 (A8222, Sigma, St. Louis, MO)과 난백 알부민 20㎍ (A5503, Sigma, St. Louis, MO)을 인산염 완충용액 (pH 7.4) 200㎕에 현탁한 후 이를 생쥐의 복강에 주입하여 감작시켰다. 첫 번째 난백 알부민 복강 투여 후 21일부터 23일까지 1% 난백 알부민을 초음파분무기를 이용하여 30분간 흡입시켰다. 마지막 항원 흡입 후 24시간 뒤에 기도과민성을 측정하였고 48시간 뒤에 치사량의 펜토바비탈 (엔토발, 한림제약주식회사)을 투여한 뒤 체중을 측정하고 기관지 절개를 하여 총 1.2㎖의 생리식염수로 기관지폐포 세척을 한 뒤 검체를 수거하였다. 정상 대조군 (NC)으로 난백 알부민을 투여, 흡입하지 않은 군, 천식 유도군 (OVA)으로 난백 알부민을 투여, 흡입하여 기관지 천식을 유도한 군, 비교군 (Mon)으로 난백알부민 흡입 1시간 전에 몬테루카스트 (montelukast, 30㎎/㎏, PO)를 경구 투여한 군, 실험군으로 난백 알부민 흡입 1시간 전에 에탄올 추출물 (30㎎/㎏, PO; Total), 에틸아세테이트 분획물의 5번 활성분획 (30㎎/㎏, PO; EA5), 에틸아세테이트 분획물의 6번 활성분획 (30㎎/㎏, PO; EA6), 및 헥산 분획물의 7번 활성분획 (30㎎/㎏, PO; Hex7)을 각각 경구 투여한 군으로 실험을 진행하였으며, 각 군당 7 마리의 흰쥐를 사용하였다.

[154]

[155] **<2-2> 기도과민성의 측정**

[156] 천식 발생에 의한 기도과민성 여부는 단일 챔버 체적변동 측정기 (one chamber plethysmography; All Medicus, Seoul)를 이용하여 기도 저항을 측정하여 판단하였으며, 기도 저항의 정도는 수학적으로 계산된 기도의 폐색을 반영하는

수치인 enhanced pause (Penh)을 측정하여 평가하였다. Penh의 측정은 정상 호흡 상태에서 기저값을 측정한 후 PBS를 초음파분무기를 이용하여 3분간 흡입시킨 후 3분간 측정하였다. 이후 메타콜린 (A2251, Sigma, St. Louis, MO)을 12, 25, 50㎎/㎖의 농도로 점차 증가시키면서 흡입시킨 후 Pehn을 측정하였다. 결과 수치는 하기 수학식 2에 나타난 바와 같이 계산하였고, 기저 Penh값 (PBS challenge)을 100%로 하여, 각 농도의 메타콜린 흡입 후 Penh의 증가율을 백분율로 표현하였다.

[157]

[158] 수학식 2

$$Penh = \left[\frac{Te}{RT-1} \right] \times \left(\frac{PEF}{PIF} \right)$$

[159]

[160] Te: expiratory time (sec) (흡기에서 다음 흡기까지 걸리는 시간)

[161] RT: relaxation time (호기 동안 호기량이 일 회 호흡량의 30%가 남을 때까지 걸리는 시간)

[162] PEF: Peak expiration flow

[163] PIF: Peak inspiration flow

[164]

[165] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 정상 대조군 (NC)에서는 메타콜린 농도 증가에 따른 완만한 Pehn 수치 증가가 확인되었으나, 천식 유도군 (OVA)에서는 유의성 있게 Pehn 수치가 급격하게 증가하였다. 반면, 몬테루카스트를 투여한 비교군 (M)과 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물을 투여한 실험군 (Total, EA5, EA6, Hex7)에서는 천식 유도군 (OVA)에 비해서 유의성 있게 감소된 Pehn 수치가 나타났으며, 농도 의존적으로 더욱 감소하는 양상을 확인할 수 있었다.

[166]

[167] **<실시예 3> 혈청 내 IgE 및 난백 알부민 특이 IgE 항체 측정**

[168] 혈청 내 IgE 및 난백 알부민 특이 IgE의 측정을 위하여 면역효소법을 이용하였다. IgE의 농도는 시판되는 키트 (Biolegend Ins., CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 난백 알부민 특이 IgE의 농도 측정을 위하여, 96-웰 ELISA 플레이트 (96-well flat bottom ELISA plate)에 OVA를 20㎍/㎖의 농도로 0.1 M $NAHCO_3$ 완충액 (pH 8.3)에 녹여 4 ℃에서 밤새 코팅한 후 1% 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin)이 함유된 PBS로 처리하여 비특이적 반응을 차단하였다. 혈청 검체를 1:400으로 희석하여 상기 웰 플레이트에 첨가한 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 웰 플레이트를 잘 세척한 후 300배로 희석된 항-마우스 IgE 단일클론 항체 (Biolegend Ins., CA, USA)를 첨가하고 2시간 동안 반응시켰다.

페록시다아제 (peroxidase)가 결합된 HRP-접합 염소 항-생쥐 IgG 다중클론 항체 (Biolegend Ins., CA, USA)를 4000배 희석한 후 상기 웰 플레이트에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 세척하였다. 발색을 위해 웰 플레이트에 3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘 (tetramethylbenzidine) 기질을 첨가하여 반응시킨 후 450 nm에서 분광 흡광도를 측정하였다. 이때 통계학적 분석을 위해 여러 변수에 따른 평균값과 표준오차 (Mean±S.E.)를 계산하였고, 각 집단 간의 비교는 SPSS 10.0을 이용하여 만-휘트니 U 검정 (Mann-whitney U 검정)을 수행하여 분석하였다. 통계적으로 p 값이 0.05 미만인 경우에 유의적 차이가 있다고 판정하였다.

[169] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 혈청 내 IgE 항체 농도는 정상 대조군 (NC) (0.2±0.16μg/mℓ)에 비해 천식 유도군 (OVA)(2.4±0.34 μg/mℓ)에서 많이 증가하였으며, 몬테루카스트 투여군 (Mon)(1.8±0.28 μg/mℓ)은 천식 유도군 (OVA)에 비해 유의성 있게 감소하였다. 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우, 혈청 내 IgE 항체 농도는 Total 투여군에서 1.8±0.19μg/mℓ, EA5 투여군에서 1.68±0.43μg/mℓ, EA6 투여군에서 1.5±0.24μg/mℓ, Hex7 투여군에서 2.0±0.41μg/mℓ로 천식 유도군 (OVA)에 비해 현저하게 감소하였으며, 특히 EA6 투여군에서 이러한 감소가 두드려졌다. 또한, 난백 알부민 특이 IgE 항체 농도의 경우, 천식 유도군 (OVA) (368±90.6 ng/mℓ)에 비해 Total 투여군에서 237±41.9ng/mℓ, EA5 투여군에서 169±55.8ng/mℓ, EA6 투여군에서 195±67.6ng/mℓ, Hex7 투여군에서 196±52ng/mℓ로 나타나 천식 유도군 (OVA)에 비해 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물 처리군에서 난백 알부민 특이 IgE 항체 농도가 현저히 감소함을 확인하였다.

[170]

[171] 표 1

[Table 1]

Group	IgE (μg/mℓ)	OVA-특이적 IgE (ng/mℓ)
NC	0.2±0.16	-
OVA	2.4±0.34#	368±90.6#
Mon	1.8±0.28*	198±83.0*
Total	1.8±0.19*	237±41.9*
EA5	1.7±0.43*	169±55.8*
EA6	1.5±0.24*	195±67.6*
Hex7	2.0±0.41	196±52.1*

[172] #정상 대조군 (NC)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$),

[173] *천식 유도군 (OVA)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$).

[174]

[175] **<실시예 4> 기관지폐포 세척액 내 염증세포 분석**

[176] 각 개체의 기관지폐포 세척액은 회수된 즉시 트리판 블루 (Trypan blue)로 염색하여 죽은 세포를 제외한 총 세포 수를 혈구계 (hemocytometer)를 이용하여

계산하였다. 이어서 사이토스핀 II (Cytospin II)으로 표본 도말 후 Diff-Quick 염색 (Sysmex, Switzerland)을 실시하여 호산구와 그 외의 염증세포를 감별 계산하였다.

[177] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 호산구의 수는 정상 대조군 (NC)(0±0)에 비해, 천식 유도군 (OVA)에서 (74±16.0) x 10^5 개로 많이 증가한 반면, 몬테루카스트 투여군 (Mon)은 (36±20.4) x 10^5 개로 감소하였다. 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우, 호산구의 수는 Total 투여군에서 (32±14.1) x 10^5 개로, EA5 투여군에서 (42±6.1) x 10^5 개로, EA6 투여군에서 (23±7.4) x 10^5 개로, Hex7 투여군에서 (41±10.7) x 10^5 개로 나타나 천식 유도군 (OVA)에 비해 모두 현저하게 감소하였으며, 이러한 감소는 비교군인 몬테루카스트 투여군 (Mon)과 유사하거나 더욱 현저하였다. 특히 이러한 감소는 EA6 투여군에서 크게 나타났다.

[178] 그 외의 염증세포 수를 포함한 총 염증세포의 수는 정상 대조군 (NC)(9±2.0) x 10^5 개에 비해, 천식 유도군 (OVA)에서 (180±22.2) x 10^5 개로 많이 증가하였으며, 몬테루카스트 투여군 (Mon)에서는 (98±19.3) x 10^5 개로 천식 유도군 (OVA)에 비해 유의성 있게 감소하였다. 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우, 총 염증세포의 수는 Total 투여군에서 (126±16.3) x 10^5 개로, EA5 투여군에서 (140±20.3) x 10^5 개로, EA6 투여군에서 (83±17.7) x 10^5 개로, Hex7 투여군에서 (133±11.6) x 10^5 개로 나타나, 천식 유도군 (OVA)에 비해 현저한 감소가 관찰되었으며, 특히 EA6 투여군에서 현저하게 나타났다.

[179]

[180] **<실시예 5> 활성산소 발생 억제 효과**

[181] 각 개체의 일부 기관지폐포 세척액을 인산염 완충 식염수 (PBS)로 세척한 뒤 10 mM의 2,7-다이클로로플루오르세인 다이아세테이트 (2,7-Dichlorofluorescein diacetate, 35845, Sigma, St. Louis, MO)를 첨가하여 10분간 상온 암실에서 방치한 뒤 형구계로 측정하였다 (Ex = 480 ㎚, Em = 522 ㎚).

[182] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 천식 유도군 (OVA)은 정상 대조군 (NC)에 비해 활성산소 발생량이 많이 증가하였다. 반면, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우 활성산소 발생량이 천식 유도군 (OVA)에 비해 Total 투여군은 42.7%, EA5 투여군은 25.4%, EA6 투여군은 46.3%, Hex7 투여군은 36.1%로 감소하였음을 확인하였다.

[183]

[184] **<실시예 6> 기관지폐포 세척액 내 인터루킨-4, -5, 및 -13 생성 억제 효과**

[185] 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물이 기관지폐포 세척액 내 인터루킨-4, -5, 및 -13의 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 시판용 ELISA 키트 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다.

[186] 간략히 설명하면, 기관지폐포 세척액 100㎕를 웰 플레이트에 넣은 후 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나고 ELISA 키트 내 세척액을 이용하여 세척한 후 각

키트에 맞는 비오틴 접합체 (biotin conjugate)를 100 ㎕씩 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 웰 플레이트를 세척액으로 세척한 후 발색을 위해 각 키트 내 기질용액 100 ㎕를 넣은 후 30분 동안 반응시키고, 키트 내 정지용액 100 ㎕를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이때 통계학적 분석을 위해 여러 변수에 따른 평균값과 표준오차 (Mean±S.E.)를 계산하였고, 각 집단 간의 비교는 SPSS 10.0을 이용하여 만-휘트니 U 검정 (Mann-whitney U 검정)을 수행하여 분석하였다. 통계적으로 p 값이 0.05 미만인 경우에 유의적 차이가 있다고 판정하였다.

[187] 그 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 기관지폐포 세척액 내 인터루킨-4의 생성량은 천식 유도군 (OVA)에서는 67.6±11.51pg/㎖으로 정상 대조군 (NC)(27.7±5.68pg/㎖)에 비해 많이 증가하였다. 반면, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우, 인터루킨-4의 생성량은 Total 투여군에서 44.5±6.93pg/㎖, EA5 투여군에서 43.6±6.93pg/㎖, EA6 투여군에서 43.5±12.84pg/㎖, Hex7 투여군에서 64.6±6.34pg/㎖로 천식 유도군 (OVA)에 비해 감소하였다. 또한, 인터루킨-5 및 -13의 생성도 천식 유도군 (OVA)에 비해 Total 투여군, EA5 투여군, EA6 투여군, Hex7 투여군에서 현저하게 억제되었다.

[188]

[189] 표 2

[Table 2]

Group	IL-4 (pg/㎖)	IL-5 (pg/㎖)	IL-13 (pg/㎖)
NC	27.7±5.68	25.4±3.62	19.6±1.29
OVA	67.6±11.51#	67.3±13.39#	135.2±25.33#
Mon	34.6±6.52*	32.4±4.46*	65.7±18.86*
Total	44.5±6.93*	42.4±6.38*	75.6±9.48*
EA5	43.6±8.09*	44.0±8.11*	84.6±19.29*
EA6	43.5±12.84*	39.0±8.86*	68.4±15.99*
Hex7	64.6±6.34	53.4±9.10*	101.81±23.81*

[190] #정상 대조군 (NC)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$),

[191] *천식 유도군 (OVA)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$).

[192]

[193] **<실시예 7> 천식 동물 모델의 조직병리학적 검사**

[194] 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물이 폐 조직 내 염증반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 적출된 폐장을 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 4㎛ 두께로 영구조직 절편을 제작한 후 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 하여 폐 조직 내 염증반응을 평가하였다.

[195] 또한, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물이 기관지 내 점액 분비에 미치는 영향을 확인하기 위하여 과요오드산 쉬프 (Periodic Acid

Schiff) 염색 (IMEB Inc., San Marcos, CA)을 시행하였다.

[196] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 천식 유도군 (OVA)은 정상 대조군 (NC)에서 비하여 기관지 및 혈관 주위에 많은 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이에 반하여, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우, Total 투여군, EA5 투여군, EA6 투여군, Hex7 투여군은 천식 유도군 (OVA)에 비해 기관지 및 혈관 주위에 염증세포의 침윤이 현저하게 감소하였음을 확인하였다.

[197] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 천식 유도군 (OVA)은 정상 대조군 (NC)에 비하여 기관지 내 점액 분비가 현저하게 증가하였다. 반면, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 경우, Total 투여군, EA5 투여군, EA6 투여군, Hex7 투여군에서는 기관지 내 점액 분비가 천식 유도군 (OVA)에 비하여 많이 감소하였음을 확인하였다.

[198]

[199] **<실시예 8> 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 세포독성 측정**

[200] 상기 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물의 세포독성을 측정하기 위하여 BALB/c 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포주를 대상으로 하기 실험을 수행하였다.

[201] 먼저, 10% 소태아혈청 (FBS), 페니실린 (100U/㎖) 및 스트렙토마이신 (100 ㎍/㎖)이 첨가된 DMEM 배지를 RAW 264.7세포와 혼합하여 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^4 세포를 분주하고 4시간 동안 5% CO_2 및 37℃의 조건에서 배양하였다. 세포가 안정화된 후에 상기 제조예에서 각각 수득한 피스타시아 웨인마니폴리아의 에탄올 추출물과, 헥산 및 에틸아세테이트 분획물을 각각 5, 10, 20, 40㎍/㎖의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 18시간 동안 5% CO_2 /37℃의 조건에서 배양하였다. 배양 종료 후 WST-1 시약을 첨가하여 3시간 동안 5% CO_2 및 37℃의 조건에서 배양한 후 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

[202] 그 결과, 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물은 천식의 예방 또는 치료용 효과를 유도하는 농도에서 대체적으로 세포독성이 없는 것으로 확인되어 천식의 예방, 개선 또는 치료용 의약품, 건강기능성 식품, 기능성 사료 등에 안전한 물질로 사용될 수 있다.

[203] 이상의 결과를 통해 본 발명에 따른 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물이 높은 항천식과 항염증 활성을 보유함을 확인하였다.

[204]

[205] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

[206]

[207] **<제제예 1> 약학적 제제의 제조**

[208] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물을 포함하는 약학적 제제는 다음과 같이 통상적인 방법에 따라 제조하였다.

[209]

[210] **1. 산제의 제조**

[211] 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 및 분획물 2 g

[212] 유당 1 g

[213] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[214]

[215] **2. 정제의 제조**

[216] 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 100 ㎎

[217] 옥수수전분 100 ㎎

[218] 유당 100 ㎎

[219] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[220] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[221]

[222] **3. 캡슐제의 제조**

[223] 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 100 ㎎

[224] 옥수수전분 100 ㎎

[225] 유당 100 ㎎

[226] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[227] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[228]

[229] **4. 환의 제조**

[230] 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 1 g

[231] 유당 1.5 g

[232] 글리세린 1 g

[233] 자일리톨 0.5 g

[234] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[235]

[236] **5. 과립의 제조**

[237] 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 150 ㎎

[238] 대두 추출물 50 ㎎

[239] 포도당 200 ㎎

[240] 전분 600 ㎎

[241] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[242]

[243] **<제제예 2> 건강기능성 식품의 제조**

[244] 본 발명의 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물을 포함하는 건강기능성 식품들을 다음과 같이 통상적인 방법에 따라 제조하였다.

[245]

[246] **1. 밀가루 식품의 제조**

[247] 본 발명의 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 0.5 ~ 5.0 중량을 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[248]

[249] **2. 유제품 (dairy products)의 제조**

[250] 본 발명의 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 5 ~ 10 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[251]

[252] **3. 선식의 제조**

[253] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 본 발명의 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[254] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

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

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

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

[258] 영지 (0.5 중량%),

[259] 지황 (0.5 중량%)

[260]

[261] **<제제예 3> 음료의 제조**

[262] **1. 건강 음료의 제조**

[263] 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 1000 ㎎

[264] 구연산 1000 ㎎

[265] 올리고당 100 g

[266] 매실 농축액 2 g

[267] 타우린 1 g

[268] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[269] 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강 음료 조성물 제조에 사용한다.

[270] 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.

[271]

[272] **2. 야채 주스의 제조**

[273] 본 발명의 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 야채 주스를 제조하였다.

[274]

[275] **3. 과일 주스의 제조**

[276] 본 발명의 제조예 1 및 2에서 각각 제조한 피스타시아 웨인마니폴리아 추출물 또는 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 과일 주스를 제조하였다.

[277]

[278] 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 J. Poiss. Ex Franch*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 ~ C_4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출된 것인 약학 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 에탄올로 추출된 것인 약학 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 물, C_1 ~ C_4의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획한 것인 약학 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 추출물 또는 이의 분획물은 하기의 활성을 나타내는 것인 약학 조성물:

(a) 대식세포에서 NO (nitric oxide)의 생성 억제 활성;

(b) 기도과민성 완화 활성;

(c) 호산구 및 염증세포 수의 감소 활성;

(d) 혈청 내 IgE 농도 저하 활성;

(e) 활성산소 발생 억제 활성;

(f) 인터루킨-4, 5, 13 생성 억제 활성;

(g) 염증반응 및 염증세포 침윤 억제 활성; 또는

(h) 기관지 내 점액분비 억제 활성.

[청구항 6] 피스타시아 웨인마니폴리아 (*Pistacia weinmannifolia J. Poiss. Ex Franch*) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 천식의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

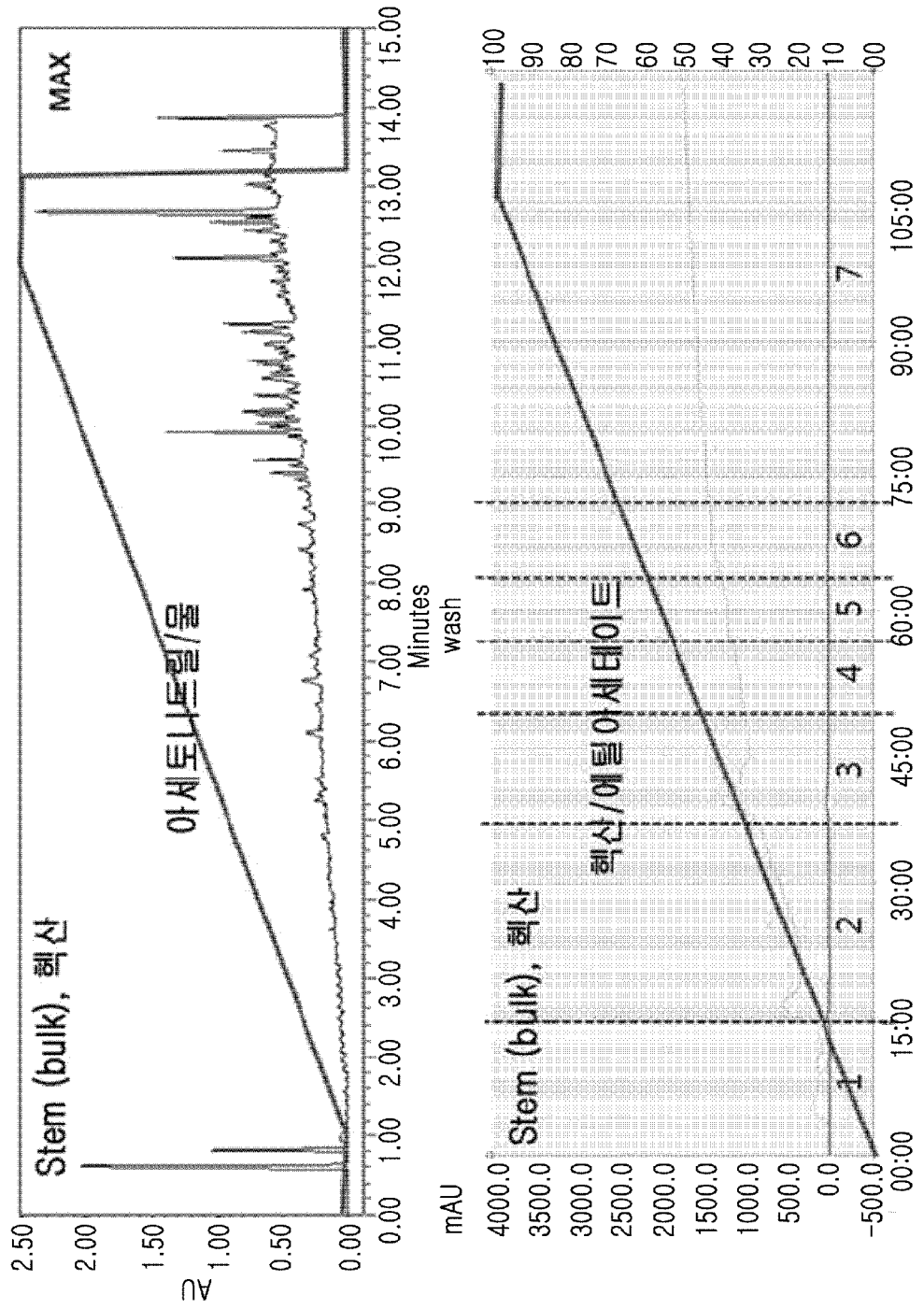
[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 ~ C_4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출된 것인 건강기능성 식품.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 추출물은 에탄올로 추출된 것인 건강기능성 식품.

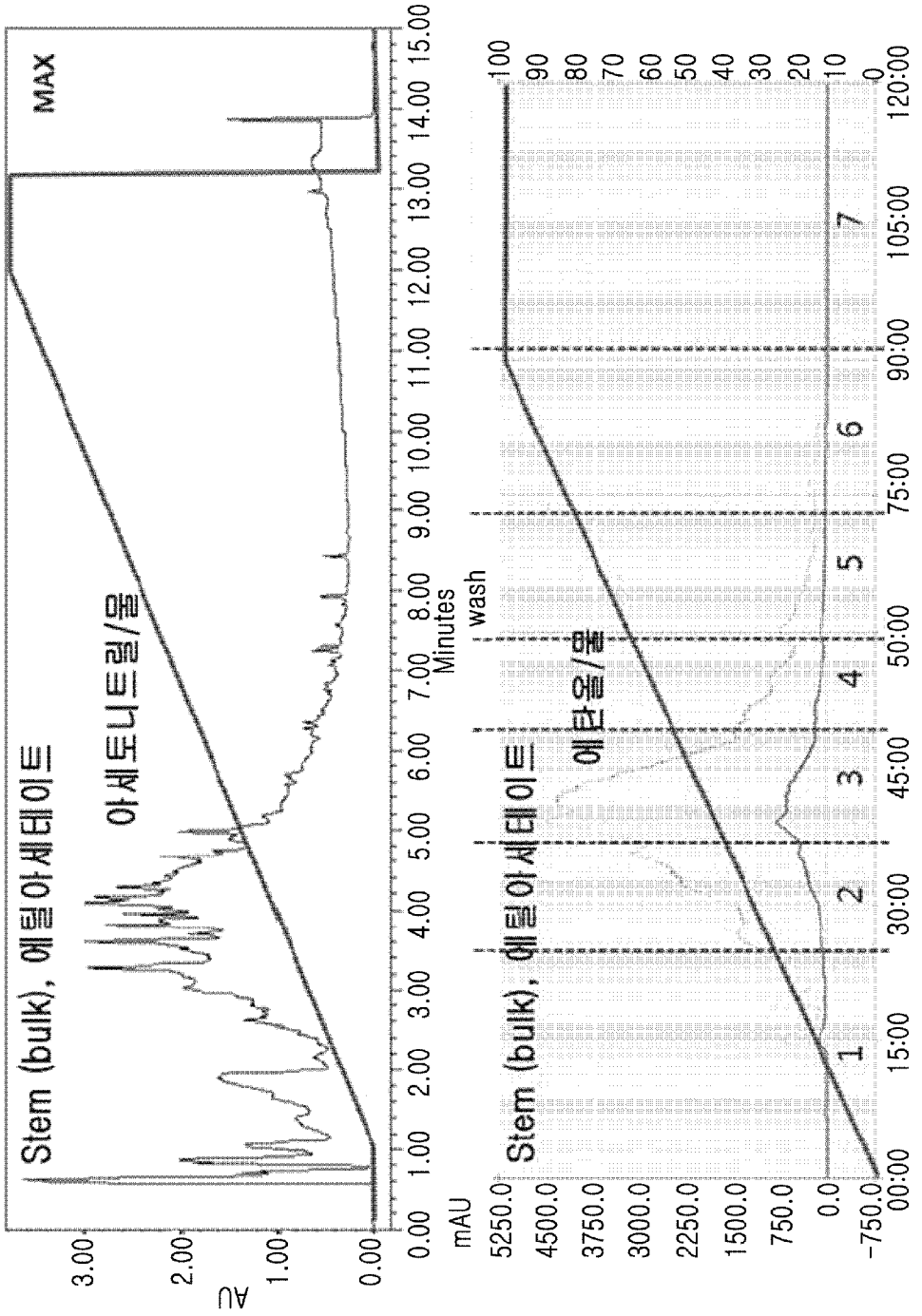
[청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 분획물은 물, C_1 ~ C_4의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획한 것인 건강기능성 식품.

[청구항 10] 제1항의 약학 조성물을 천식이 의심되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 천식의 치료방법.

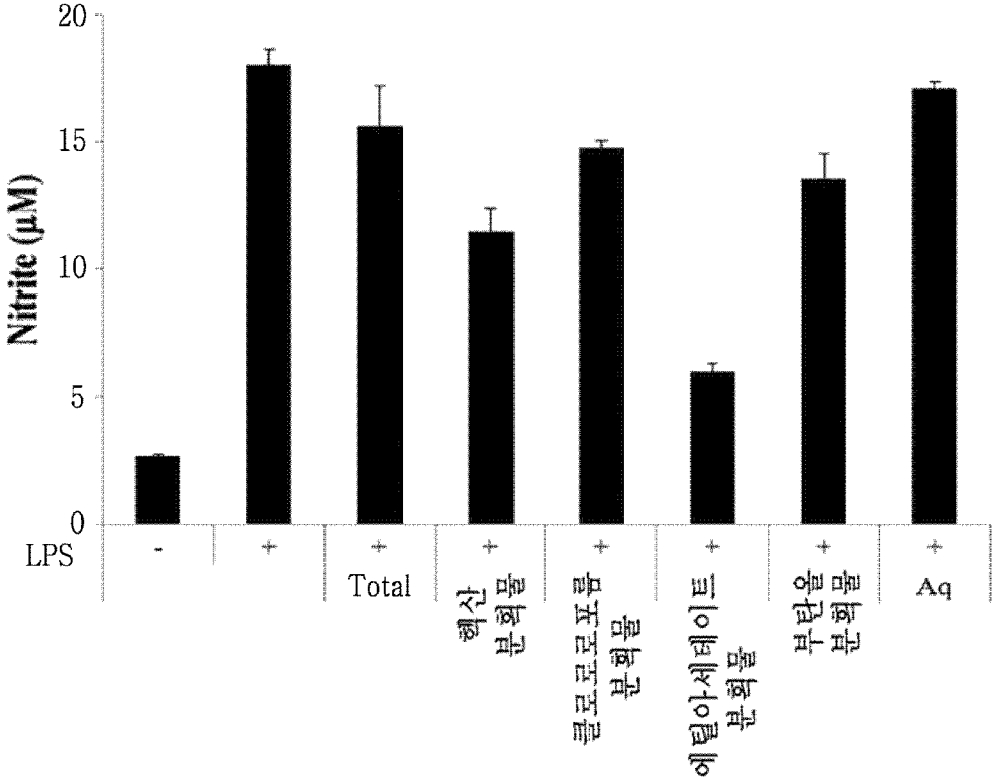
[Fig. 1]


MAX
Stem (bulk), 헥산
아세토니트릴/물
AU
Minutes
wash
mAU
Stem (bulk), 헥산
헥산/에틸아세테이트

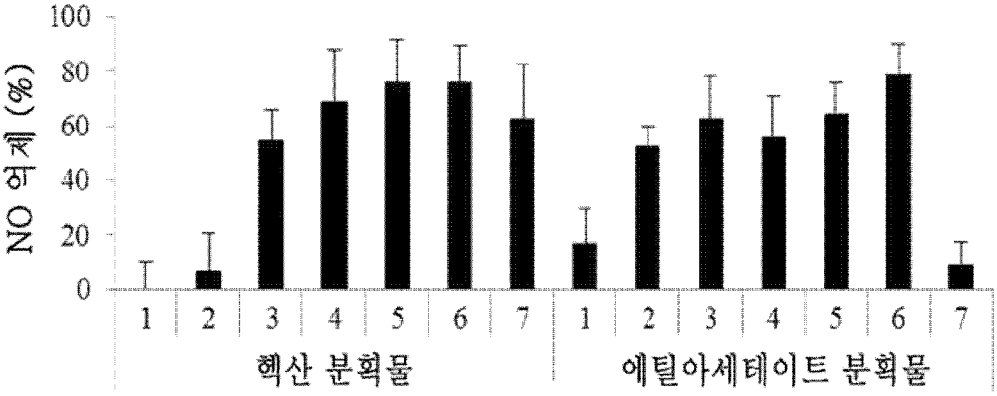
[Fig. 2]


MAX
Stem (bulk), 에틸아세테이트
아세토니트릴/물
AU
Minutes
wash
Stem (bulk), 에틸아세테이트
에탄올/물
mAU

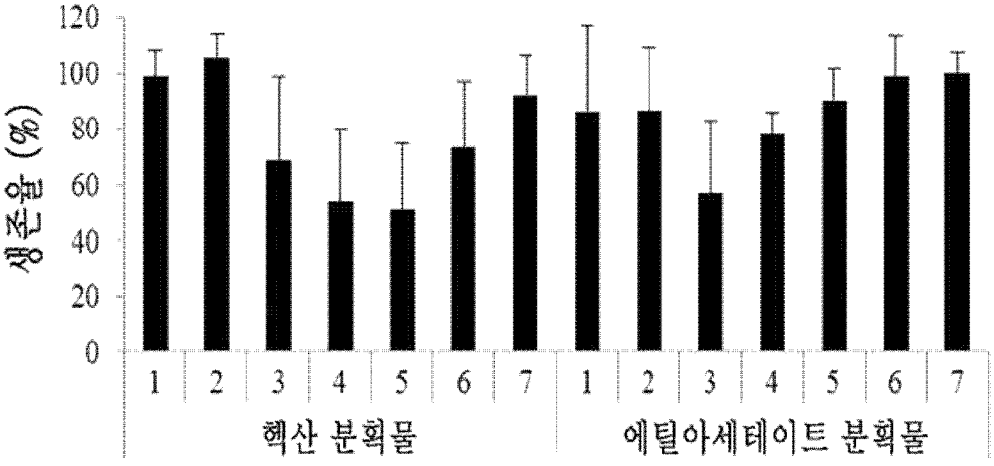
[Fig. 3a]



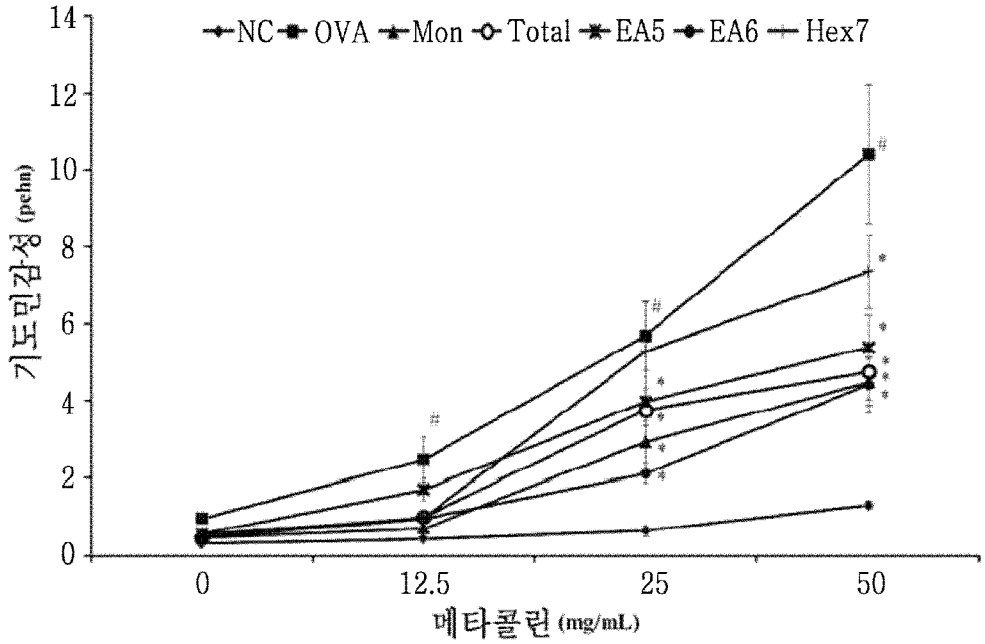
[Fig. 3b]



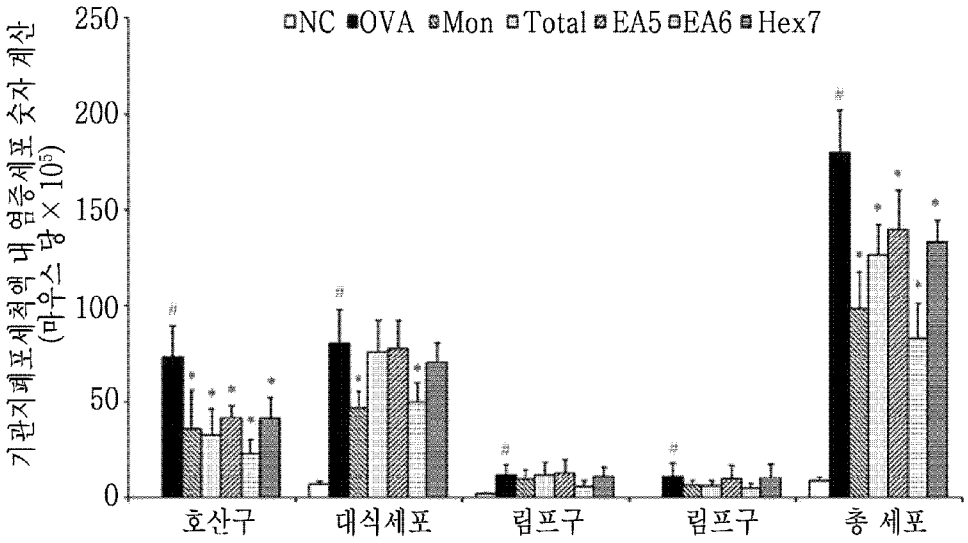
[Fig. 3c]



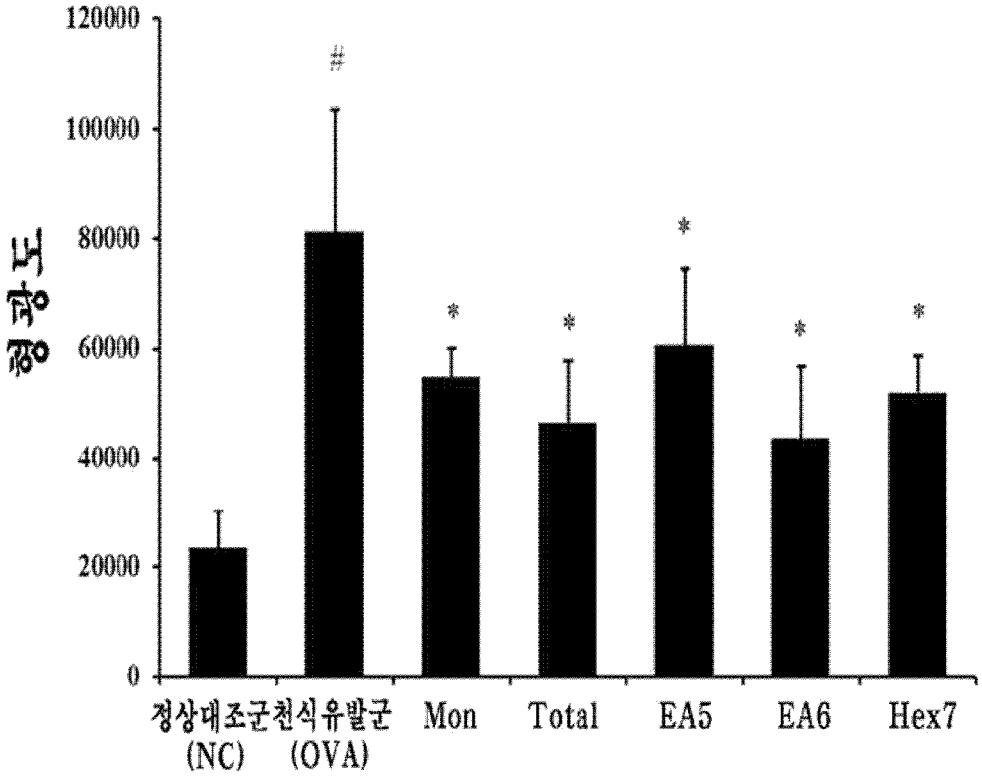
[Fig. 4]


NC
OVA
Mon
Total
EA5
EA6
Hex7
기도민감성 (penh)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
12.5
25
50
메타콜린 (mg/mL)

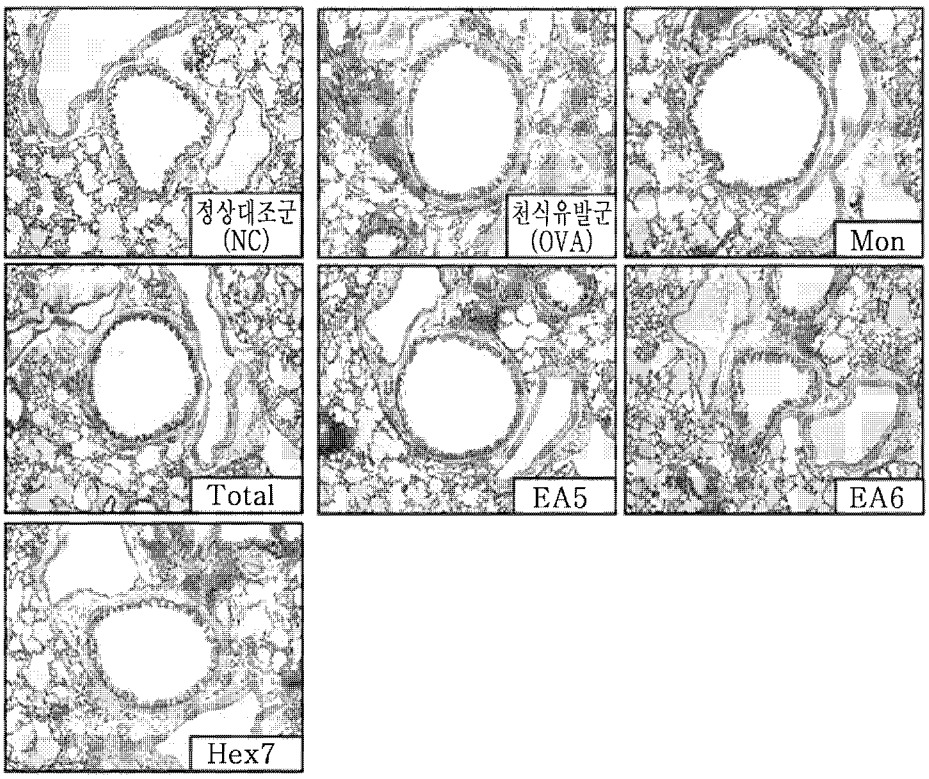
[Fig. 5]


NC
OVA
Mon
Total
EA5
EA6
Hex7
기관지폐포세척액 내 염증세포 숫자 계산
(마우스 당 × 10⁵)
250
200
150
100
50
0
호산구
대식세포
림프구
림프구
총 세포

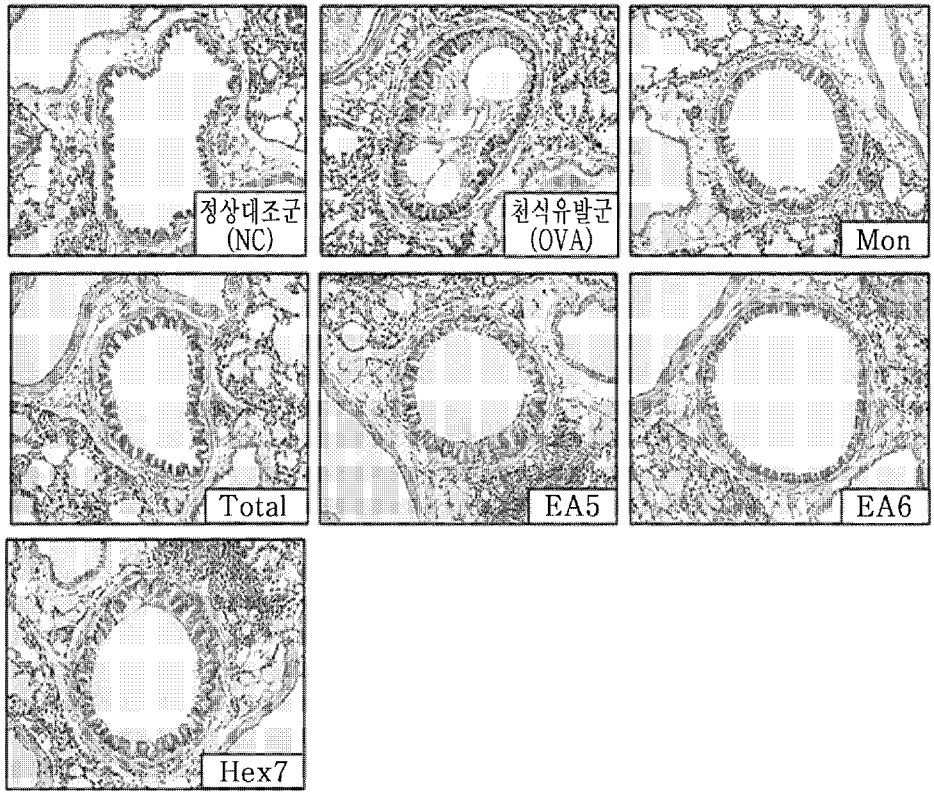
[Fig. 6]


120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
#
*
정상대조군 (NC)
천식유발군 (OVA)
Mon
Total
EA5
EA6
Hex7

[Fig. 7]


정상대조군 (NC)
천식유발군 (OVA)
Mon
Total
EA5
EA6
Hex7

[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/005844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/22(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 11/06(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 35/78; A61P 29/00; A61P 11/06

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(Pistacia weinmannifolia), asthma, active oxygen, inflammation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MINAMI, K. et al., "Isolation and identification of histamine-release inhibitors from Pistacia weinmannifolia J. Pisson ex. Franch", J. Nat. Med., 2006, vol. 60, pp. 138-140. See abstract and pages 138-139.	1-9
Y	KIM, S.-H. et al., "Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells", Toxicological Sciences, 2006, vol. 91, no. 1, pp. 123-131. See abstract.	1-9
A	ZHAO, X. et al., "Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of Pistacia weinmannifolia", Biochimica et Biophysica Acta, 2005, vol. 1725, pp. 103-110. See abstract and pages 107-109.	1-9
A	US 2004-0161477 A1 (WAGNER, R. et al.) 19 August 2004 See abstract and claims 1-6.	1-9
A	US 2003-0096020 A1 (BRINDAVANAM, N. B. et al.) 22 May 2003 See abstract and claims 1-4.	1-9

☐ 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
"T" 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	Date of mailing of the international search report
10 OCTOBER 2014 (10.10.2014)	**14 OCTOBER 2014 (14.10.2014)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/005844

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 10 pertains to a method for treatment of the human, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/005844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2004-0161477 A1	19/08/2004	AU 2002-13996 A1	22/04/2002
		AU 2002-20594 A1	15/04/2002
		CA 2424869 A1	11/04/2002
		CA 2424930 A1	04/04/2003
		EP 1326624 A1	16/07/2003
		EP 1326624 B1	08/09/2004
		EP 1333848 A1	13/08/2003
		EP 1333848 B1	05/04/2006
		JP 2004-510822 A	08/04/2004
		JP 2004-513092 A	30/04/2004
		US 2004-0033275 A1	19/02/2004
		US 7074436 B2	11/07/2006
		WO 02-28403 A1	11/04/2002
		WO 02-30436 A1	18/04/2002
US 2003-0096020 A1	22/05/2003	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/005844

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/22(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 11/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/22; A61K 35/78; A61P 29/00; A61P 11/06

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(Pistacia weinmannifolia), 천식, 활성산소, 염증반응

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MINAMI, K. 외, `Isolation and identification of histamine-release inhibitors from Pistacia weinmannifolia J. Pisson ex. Franch`, J. Nat. Med., 2006, 60권, 페이지 138-140. 요약 및 페이지 138-139 참조.	1-9
Y	KIM, S.-H. 외, `Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells`, Toxicological Sciences, 2006, 91권, 1호, 페이지 123-131. 요약 참조.	1-9
A	ZHAO, X. 외, 'Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of Pistacia weinmannifolia`, Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1725권, 페이지 103-110. 요약 및 페이지 107-109 참조.	1-9
A	US 2004-0161477 A1 (WAGNER, R. 외) 2004.08.19. 요약 및 청구항 1-6 참조.	1-9
A	US 2003-0096020 A1 (BRINDAVANAM, N. B. 외) 2003.05.22. 요약 및 청구항 1-4 참조.	1-9

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2014년 10월 10일 (10.10.2014)	2014년 10월 14일 (14.10.2014)

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

심사관
최승희
전화번호 +82-42-481-8740

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/005844

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/005844

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2004-0161477 A1	2004/08/19	AU 2002-13996 A1	2002/04/22
		AU 2002-20594 A1	2002/04/15
		CA 2424869 A1	2002/04/11
		CA 2424930 A1	2003/04/04
		EP 1326624 A1	2003/07/16
		EP 1326624 B1	2004/09/08
		EP 1333848 A1	2003/08/13
		EP 1333848 B1	2006/04/05
		JP 2004-510822 A	2004/04/08
		JP 2004-513092 A	2004/04/30
		US 2004-0033275 A1	2004/02/19
		US 7074436 B2	2006/07/11
		WO 02-28403 A1	2002/04/11
		WO 02-30436 A1	2002/04/18
US 2003-0096020 A1	2003/05/22	없음	