



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월19일
(11) 등록번호 10-1809848
(24) 등록일자 2017년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/804 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/539 (2006.01) A61K 36/65 (2006.01)
A61K 36/736 (2006.01) A61K 36/79 (2006.01)
A61K 36/8965 (2006.01) A61K 36/904 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/804 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0103670

(22) 출원일자 2016년08월16일

심사청구일자 2016년08월16일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100103999 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

배현수

서울특별시 서초구 반포대로 316 21동 218호 (잠원동, 한신시티21오피스텔)

조재호

서울특별시 마포구 상암산로1길 52 508동 305호 (상암동, 상암월드컵파크5단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김미화

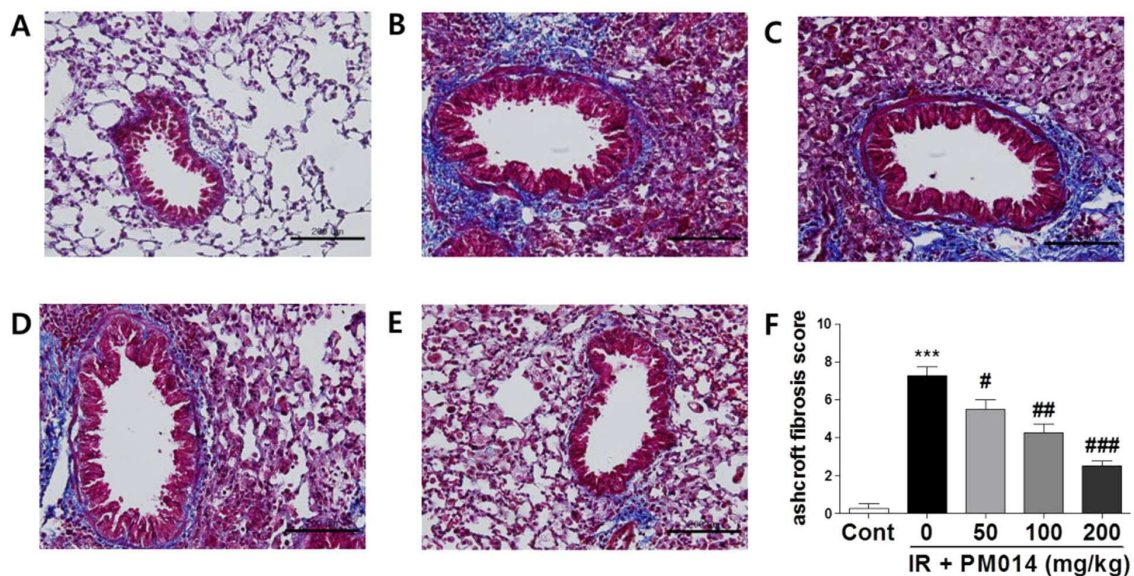
(54) 발명의 명칭 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 방사선 유도성 폐섬유화증을 예방, 치료 또는 개선하는 효능을 가지고 있어 방사선 치료나 원자력 발전소의 이상 등으로 인해 폐섬유화증이 진행된 환자의 치료 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/539 (2013.01)

A61K 36/65 (2013.01)

A61K 36/736 (2013.01)

A61K 36/79 (2013.01)

A61K 36/8965 (2013.01)

A61K 36/904 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

신다솜

경기도 안양시 만안구 석수로 178번길 14 302호

김동욱

서울특별시 노원구 중계로 195 105동 1501호 (중계동, 신안동진아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0214010016

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한의약선도기술사업

연구과제명 방사선 폐렴 세포 실험 모델 개발 및 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2019.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)로 이루어지는 혼합 생약의 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방사선 유도성 폐섬유화증은 개체의 암세포 제거를 위한 신체 방사선 치료(SBRT)에 의한 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혼합 생약 추출물 100중량부에 대하여, 숙지황 20 내지 35중량부, 천문동 10 내지 20중량부, 오미자 10 내지 20중량부, 목단피 10 내지 20중량부, 황금 5 내지 15중량부, 행인 5 내지 15중량부 및 백부 5 내지 10중량부를 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 혼합 생약 추출물은 상기 혼합 생약을 용매로 추출하여 제조되는 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 혼합 생약 추출물은 상기 혼합 생약을 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 제조되는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 혼합 생약 추출물은 상기 혼합 생약을 물로 열수 추출하여 제조되는 것인, 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 열수 추출은 80 내지 150℃에서 2 내지 4시간 동안 추출하여 이루어지는 것인, 약학 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 혼합 생약 추출물은 상기 혼합 생약을 70% 에탄올로 1 내지 2시간 동안 환류추출하여 제조되는 것인, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 혼합 생약을 구성하는 숙지황, 천문동, 오미자, 목단피, 황금, 행인, 백부의 중량비는 8:4:4:4:3:3:2인 것

인, 약학 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 방사선 유도성 폐섬유화증 치료 방법.

청구항 11

숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 이를 이용한 방사선 유도성 폐섬유화증 치료 방법 및 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 흉부 방사선 치료는 유방암 및 폐암 등 다양한 흉부암에 사용되어오고 있다. 특히 최근에는 3차원 좌표계를 이용하여 표적인 암세포를 정확히 정렬한 뒤 치료에 필요한 양의 방사선을 여러 방향에서 표적에 집중적으로 조사하는 정위 신체 방사선 치료(SBRT: stereotactic body radiation therapy)가 암 치료에 널리 사용되고 있다. 다만, 상기 SBRT 치료가 유방암, 폐암 등에 사용되는 경우에는 방사선 폐렴, 방사선 유도성 폐섬유화증을 야기하는 등 부작용이 발생될 수 있음이 보고되고 있다(참조: Marks, L.B., et al., Radiation-induced lung injury. *Semin Radiatr Oncol* 13, 333-345).

[0003] 특히, 방사선 유도성 폐섬유화증(RILF: radiation-induced lung fibrosis)은 목표 종양에 전달될 방사선의 양을 제한시켜 종양 제거를 더디게 할 수 있으며, 근섬유아세포(myofibroblast) 또는 섬유아세포(fibroblast)의 수가 과도하게 침착되어 염증세포의 침윤 및 콜라겐과 같은 세포외 기질 단백질의 축적이 증가됨으로써 결국 조직에 흉터가 생기고 폐 기능이 손상되는 심각한 문제를 일으킨다.

[0004] 이에, 방사선 치료시 방사선 유도성 폐섬유화증의 부작용이 유발될 수 있음을 인식하고 있으나, 이를 치료하기 위한 연구는 미비한 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 방사선 유도성 폐섬유화증을 억제할 수 있는 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 조성물이 방사선 유도성 폐섬유화증에 대한 우수한 치료 효능을 가짐을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Marks, L.B., Yu, X., Vujaskovic, Z., Small, W., Jr., Folz, R., and Anscher, M.S. (2003). Radiation-induced lung injury. *Semin Radiat Oncol* 13, 333-345.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)로 이루어지는 혼합 생약의 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 방사선 유도성 폐섬유화증 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 구체적으로, 상기 조성물은 혼합 생약 추출물 100중량부에 대하여, 숙지황 20 내지 35중량부, 천문동 10 내지 20중량부, 오미자 10 내지 20중량부, 목단피 10 내지 20중량부, 황금 5 내지 15중량부, 행인 5 내지 15중량부 및 백부 5 내지 10중량부를 포함한다.

[0012] 상기 혼합 생약 추출물은 상기 7종 혼합 생약을 용매로 추출하여 제조되며, 상기 용매로는 이에 제한되지는 않지만, 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올 또는 이들의 혼합용매인 것이 바람직하며, 특히, 상기 7종 혼합 생약을 물로서 열수 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 상기 열수 추출은 80 내지 150℃에서 2 내지 4시간 동안 추출될 수 있으며, 특히, 100℃에서 2 내지 4시간 추출되는 것이 바람직하다.

[0013] 또한, 상기 조성물은 상기 7종 혼합 생약을 70% 에탄올로 1 내지 2시간 동안 환류추출한 추출물을 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에서 상기 혼합 생약을 구성하는 숙지황, 천문동, 오미자, 목단피, 황금, 행인, 백부의 중량비는 8:4:4:4:3:3:2일 수 있다.

[0015] 이하, 본 발명에 따른 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대하여 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명의 용어, "숙지황(熟地黃, Root of *Rehmannia glutinosa*)"이란, 지황의 뿌리를 썬서 말린 한약재이다. 지황은 현삼과에 딸린 여러해살이 약용식물로 그 뿌리가 한방에서 약재로 이용된다. 상기 숙지황은 목구멍이 따르고, 기침, 가래가 나오는 증상을 치료하는데 효과가 있다.

[0017] 본 발명의 용어, "천문동(天門冬, Root of *Asparagus cochinchinensis*)"이란, 백합과 비짜루속에 속하는 덩굴성 여러해살이 식물로 그 뿌리가 한방에서 약재로 이용된다. 상기 천문동은 목안이 붓고 아픈 증상, 기침을 하면서 가래침이 나오는 증상에 많이 사용된다.

[0018] 본 발명의 용어, "오미자(五味子, Fruit of *Schizandra chinensis*)"란, 산골짜기 암반지대에서 자라는 낙엽성 덩굴식물의 열매를 말하는 것으로 이 열매가 한방에서 약재로 이용된다. 상기 오미자는 호흡 증추를 자극하여 호흡수와 호흡강도를 높이고, 진해, 거담작용이 있으며, 오미자의 성분 중 하나인 gomisin C는 호흡기의 산화적 파괴현상을 억제한다. 또한, 스킴잔드린(schizandrin)이 본 발명에 따른 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 오미자의 지표성분으로서 이용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어, "목단피(牡丹皮, Cortex of *Paeonia Suffruticosa*)"란, 작약과의 모란의 뿌리껍질로 만든 약재를 말한다. 상기 목단피는 항염증 작용과 항알러지 작용을 하며, 진통을 목적으로 사용된다. 주성분인 paeonol이 히스타민과 TNF-의 유리를 억제한다고 알려져 있다. 또한, 파에오니플로린(paeoniflorin)이 본 발명에 따른 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 목단피의 지표성분으로서 이용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어, "황금(黃芩, Root of *Scutellaria baicalensis*)"이란, 꿀풀과에 속하는 여러해살이 식물로 그

뿌리가 한방에서 약재로 이용된다. 상기 황금의 유효 성분인 바이칼린(baicalin)은 alveolar type II에서 분비되는 폐의 계면활성제(pulmonary surfactant)인 surfactant protein A gene의 발현을 농도 의존적으로 증가시켜 호흡기질환 개선작용을 하며, 항알러지 작용을 한다. 또한, 상기 바이칼린은 본 발명에 따른 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 황금의 지표성분으로서 이용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어, "행인(杏仁, Seed of *Prunus armeniaca*)"이란, 장미과의 낙엽소교목인 살구나무의 열매를 말하는 것으로, 상기 행인은 기침을 그치게 하고, 가슴이 더부룩하여 가래가 많거나 기침을 할때, 숨이 가쁜 증상에 사용된다. 또한, 호흡중추에 작용하여 호흡운동을 안정시켜 진해, 평천 작용을 나타낸다. 아미그달린(amygdalin)이 본 발명에 따른 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물에서 행인의 지표성분으로서 이용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어, "백부(百部, Root of *Stemona sessilifolia*)"란, 백부과 식물인 선백부와 덩굴백부, 마주난잎백부의 덩이뿌리를 말린 것으로서, 상기 백부는 폐렴균의 성장을 억제하며, 백부의 성분인 alkaloid는 동물의 호흡중추의 흥분성을 감퇴시킨다.

[0023] 이와 같이, 본 발명의 조성물에 사용되는 재료들의 효능은 각각 다르나, 상기 재료들을 적절한 조성비율로 혼합한 후 방사선 유도성 폐섬유화증을 유발시킨 동물을 대상으로 실험한 결과, 콜라겐 등의 세포외 기질의 생산을 촉진하면서 조직의 섬유화를 촉진시키는 TGF- β 등의 사이토카인의 생성이 본 발명의 조성물에 의해 현저히 감소됨을 확인하여, 본 발명의 조성물이 방사선 유도성 폐섬유화증을 예방하고 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 밝혀냈다.

[0024] 본 발명의 용어, "방사선 유도성 폐섬유화증(RILF: radiation-induced lung fibrosis)"이란, 방사선 치료 등의 원인으로 인해 폐의 간질조직(interstitial tissue)들이 섬유처럼 굳어져 버리는 질환을 말하며, 중증의 호흡곤란을 유발한다.

[0025] 본 발명의 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 폐가 섬유화되는 경우에 많이 방출되는 TGF- β , IL-1 β 등의 다양한 사이토카인의 발현을 억제함으로써 폐섬유화를 예방 및 치료하는 역할을 한다.

[0026] 본 발명의 용어, "예방"이란, 상기 조성물의 투여에 의해 폐섬유화를 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 폐섬유화가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명의 용어, "혼합 생약 추출물"이란, 식물과 같은 천연물, 본 발명의 목적상 숙지황, 천문동, 오미자, 목단피, 황금, 행인 및 백부를 혼합한 다음, 하나 이상의 용매로 추출하여 수득한 추출물의 형태이거나 상기 천연물 각각을 용매로 추출하여 수득한 추출물들을 서로 혼합한 형태를 의미한다. 상기 혼합 생약 추출물에서 상기 생약을 추출하는 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 6인 알코올, 바람직하게는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 및 이들의 혼합 용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 상기 혼합 생약 추출물은 숙지황, 천문동, 오미자, 목단피, 황금, 행인 또는 백부 각각을 분쇄한 다음, 정제수를 5 내지 10배 부피, 바람직하게는 10배로 넣고, 80 내지 150℃, 바람직하게는 100℃에서 2 내지 4시간 동안 1회 추출한 다음, 여과한 액을 저온(40 내지 50℃) 감압 농축하여 건조하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 혼합 생약 추출물을 포함하는 조성물이 약학적 조성물인 경우, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 또한, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제에는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 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 위

테프솔(Witepsol), 마크로콜, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0029] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 용어, "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경우 또는 비 경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥 내, 복강 내, 근육 내, 동맥 내, 경피, 비측 내, 흡입 또는 피내 경로를 통하여 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 기억 장애 질환의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 방사선 유도성 폐섬유화증 치료 방법을 제공한다.
- [0033] 구체적으로, 본 발명의 치료 방법은 상기 조성물을 약학적 유효량으로 폐섬유증의 발병이 의심되는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 경구, 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 비 경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다.
- [0034] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0035] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 오미자(*Schizandra chinensis*), 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 행인(*Prunus armeniaca*) 및 백부(*Stemona sessilifolia*)의 혼합 생약 추출물을 포함하는 방사선 유도성 폐섬유화증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 숙지황, 천문동, 오미자, 목단피, 황금, 행인, 백부, 혼합 생약 추출물, 방사선 유도성 폐섬유화증 및 예방의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0036] 본 발명의 용어, "개선"이란, 본 발명의 혼합 생약 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 용어 "식품"이란, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0038] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 혼합 생약 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 친환경적이며 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 혼합량에 큰 제한은 없다.
- [0039] 본 발명의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 방사선 유도성 폐섬유화증에 대한 개선 효과를 기대할 수 있으므로, 건강 증진 목적으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0040] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법

에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 방사선 유도성 폐섬유화증에 대한 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0041] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강보조식품의 용어는 호용된다.

[0042] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[0043] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있고, 비자연적인 담체를 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐 산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0045] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산 화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 내지 0.03 g이 될 수 있다.

[0047] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 숙지황 등을 포함한 7가지 혼합 생약 추출물은 방사선 유도성 폐섬유화증을 예방 및 치료하는 효능을 가지고 있어 방사선 치료나 원자력 발전소의 이상 등으로 인해 폐섬유화가 진행된 환자의 치료 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은, 75Gy의 방사선에 조사된 마우스의 2주 경과 후의 폐섬유화에 대한 본 발명의 조성물(PM014)의 영향을 보여주는 사진이다(A: 처리하지 않은 군, B: 방사선 조사 후 PBS 투여군, C: 방사선 조사 후 본 발명의 조성물

50mg/kg 투여군, D: 방사선 조사 후 본 발명의 조성물 100mg/kg 투여군, E: 방사선 조사 후 본 발명의 조성물 200mg/kg 투여군, F: 섬유증 병소의 정량 그래프).

도 2는, 75Gy의 방사선에 조사된 마우스의 2주 경과 후의 폐 조직에서 발현된 TGF- β 1에 미치는 본 발명의 조성물(PM014)의 영향을 보여주는 사진이다(A: 처리하지 않은 군, B: 방사선 조사 후 PBS 투여군, C: 방사선 조사 후 본 발명의 조성물 50mg/kg 투여군, D: 방사선 조사 후 본 발명의 조성물 100mg/kg 투여군, E: 방사선 조사 후 본 발명의 조성물 200mg/kg 투여군, F: TGF- β 1 발현 병소의 정량 그래프).

도 3은, 75Gy의 방사선에 조사된 후 2주 경과된 마우스를 대상으로 폐섬유화 관련 유전자의 발현에 미치는 본 발명 조성물(PM014)의 농도에 따른 영향을 나타낸 그래프이다.

도 4는 상피-간엽세포 전환(EMT: epithelial-mesenchymal transition)을 억제하는 본 발명 조성물(PM014)의 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 본 발명을 하기 제조에 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 제조에 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 제조에 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] **제조예: 혼합 생약 추출물의 제조**

[0052] 경희 허브팜에서 구입하고 한림 팜에서 가공한, 혼합 생약 추출물을 구성하는 7종의 한약재를 하기 표 1과 같은 비율로 분쇄 및 혼합하였으며, 총 중량은 2100g이었다.

표 1

[0053]

본 발명 조성물의 구성 성분	양(g)	화학 지표
숙지황(Root of <i>Rehmannia glutinosa</i>)	600	5-HMF
천문동(Root of <i>Asparagus cochinchinensis</i>)	300	Asparagine
오미자(Fruit of <i>Schizandra chinensis</i>)	300	Schizandrin
목단피(Cortex of <i>Paeonia suffruticosa</i>)	300	Paeoniflorin
황금(Root of <i>Scutellaria baicalensis</i>)	225	Baicalin
행인(Seed of <i>Prunus armeniaca</i>)	225	Amygdalin
백부(Root of <i>Stemona sessilifolia</i>)	150	Stemonine
합계	2,100 g	

[0054] 상기 숙지황, 천문동, 오미자, 목단피, 황금, 행인 및 백부의 비율을 8:4:4: 4:3:3:2로 하여, 이들 혼합물을 2100mL의 정제수가 담긴 플라스크에 넣고 90~100℃에서 3시간 동안 환류방법으로 열수 추출하였다. 그 후 25 μ m sieve로 여과한 후 여과액을 증발 시스템을 사용하여 60℃, 진공조건에서 농축하였다. 상기 농축물과 260g의 건조 옥수수전분을 혼합하고 60℃에서 진공 건조하여 분말을 얻었으며, 이 분말을 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시켜 최종적으로 혼합 생약 추출물을 얻었다. 최종 추출물 1g을 분석한 결과, 파에오니플로린>0.43mg, 스킴산드린>0.12mg, 바이칼린>7.26mg 및 아미그달린>2.48mg이 각각 검출되었다.

[0055] **실험예 1: 방사선 유도성 폐섬유화증 질병의 유발 및 조직분석을 통한 이의 확인**

[0056] **실험예 1-1: 실험동물 및 사육조건**

[0057] 동물은 C57BL/6 암컷 6주령 마우스를 사용하였으며 오리엔트바이오에서 구입하였다. 마우스는 각 케이지당 5마리로 사육하였으며 방사선 조사 전 1주간 환경에 익숙해지도록 하였고, 병원체가 없는 환경에서 실험하는 동안 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

[0058] **실험예 1-2: 방사선 유도성 폐섬유화증(RILE) 질병 유발**

[0059] 각 군당 6-8마리로 무작위로 배정하였으며, 하기와 같이 총 5개의 군으로 나누어 실험하였다. 방사선 조사장치로는 X-RAD 320(Precision, North Branford, CT, USA)을 사용하였으며, 마우스의 좌측 폐에 방사선을 20분간 75Gy의 방사선으로 조사하였다. 방사선을 조사하지 않고 PBS만을 경구투여한 군을 음성대조군, 방사선 조사 후 PBS를 투여한 군을 양성대조군, 방사선 조사 후 본 발명의 조성물을 50mg/kg, 100mg/kg 및 200mg/kg 투여한 군을 각각 실험군 1, 실험군 2 및 실험군 3으로 하였다. 상기 PBS 및 본 발명의 조성물은 2주간 6회 경구투여하였

으며, 구체적으로, 방사선 조사 후 3, 5, 7, 9, 10 및 13일째에 투여하였다.

[0060] 실험예 1-3: 조직 분석을 통한 폐섬유화의 진행 정도 비교

[0061] 상기 실험예 1-2의 실험군 1~3 및 대조군의 마우스들의 좌측 폐를 적출하여 조직 분석하였다. 상기 폐 조직을 4% 파라포름알데히드를 사용하여 24시간 고정시켰다. 그 뒤, 탈수과정을 거쳐 파라핀을 조직 안으로 들어가게 하였다. 파라핀 조직을 만든 것은 4 μ m의 두께로 section하여 슬라이드 글래스에 붙이고, 이후 잔존 파라핀을 제거한 후, 순차적으로 hematoxylin 및 eosin(H&E), Masson's trichrome(MT) 및 TGF- β 1을 위한 면역조직화학적염색법으로 염색하였다. H&E 및 MT로 염색된 폐 조직의 이미지는 Olympus BX51 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 얻었으며, 염증 및 폐섬유화의 양은 3명의 병리학자가 각각 블라인드 스코어를 매겼다. 염증에 대한 스코어는 모든 section에 대하여 다음과 같이 0-5의 점수를 사용하여 평가하였다(Sur et al., 1999).

[0062] 0 : 염증없음(정상)

[0063] 1: 매우 약함

[0064] 2: 약함

[0065] 3: 보통

[0066] 4: 현저함

[0067] 5: 중증의 염증

[0068] 폐섬유화의 양은 다음과 같이 0-8의 점수를 사용하여 평가하였다(Ashcroft et al., 1988).

[0069] 0: 정상 폐

[0070] 1: 폐포 또는 기관지 벽의 최소한의 섬유 두께

[0071] 2-3: 폐의 구조에 명백한 손상이 없는 정도의 보통 두께의 벽

[0072] 4-5: 폐 구조에 명백한 손상이 있을 정도의 증가된 섬유화 및 섬유성 띠 또는 작은 섬유 덩어리

[0073] 6-7: 중증의 폐 구조 손상 및 넓은 범위의 섬유 면적

[0074] 8: 전 범위의 섬유 폐색

[0075] Masson's trichrome으로 염색한 폐 단면을 도 1에 나타내었다. 2주간 본 혼합생약 추출물을 투여받은 실험군 1~3(도 1의 C, D, E)은 방사선 조사만 처리한 대조군(도 1의 B)에 비해 폐섬유화의 진행 정도가 늦거나 섬유화가 일어나지 않음을 알 수 있었다.

[0076] 실험예 2: 폐섬유화중 관련 사이토카인 TGF- β 1의 발현 양상 비교

[0077] TGF- β 1의 면역조직화학적 검출을 위하여, 섹션된 폐 조직을 0.3% H₂O₂-methanol에 넣고 20분간 세포 내 과산화효소 활성을 차단시켰다. 그 후, 항-TGF- β 1의 1차 항체(1:100 dilution; ab64715, Abcam)를 붙여 4℃에서 overnight하였다. 그 후 slide를 avidin-biotin 과산화효소 complex(ABC kit, Vector Laboratories, CA, USA)를 처리 및 정치하고 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride(DAB; Zymed Laboratories, CA, USA)를 사용하여 발색시켰다.

[0078] 면역조직화학적염색 후, 상기 slide를 1분간 Harris's hematoxylin으로 대비염색하고 Canada balsam(Show Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)으로 마운팅한 뒤, Olympus BX51 현미경으로 조사하였다. 상기 슬라이드를 dual rate semi-quantitative method에 따라 샘플이 무엇인지 알지 못하는 3인의 병리학자 각각에 의해 평가되었다(Dhillon et al., 2010). 각 슬라이드 당 무작위로 선택된 영역을 양성으로 염색된(갈색) 세포질 및 세포막의 면적 및 강도로 스코어를 매겼다. 강도 스코어는 하기와 같은 4군으로 나뉘어져 매겨졌다.

[0079] 1: 눈에 띄는 염색 없음(음성) = 0

[0080] 2: 아주 약간 검출가능한 염색(약함) = 1

[0081] 3: 용이하게 검출가능한 갈색 염색(보통) = 2

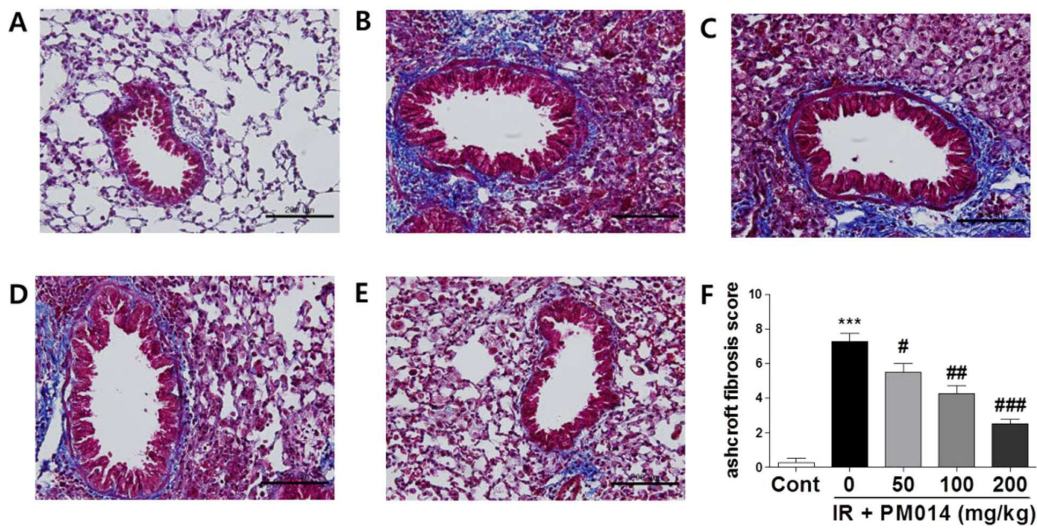
[0082] 4: 흑갈색 염색(강한 양성) = 3

- [0083] 양성 염색된 면적에 대한 스코어는 하기와 같은 4군으로 나뉘어져 매겨졌다.
- [0084] 1: 염색 없음 = 0
- [0085] 2: 염색된 세포가 <20% = 1
- [0086] 3: 염색된 세포가 20-50% = 2
- [0087] 4: 염색된 세포가 >50% = 3
- [0088] 전체 스코어는 면적 스코어와 강도 스코어를 곱하여 계산되었으며, 최종 스코어는 0 내지 9 사이의 값을 가졌다. 통계 분석을 위해 3 내지 9의 스코어는 양성 발현으로 정의되며, 0 내지 2의 스코어는 음성 발현으로 정의되었다.
- [0089] 이들 실험 결과를 도 2에 나타내었으며, 방사선 조사만 처리한 대조군(도 2의 B)에서 TGF- β 1이 가장 많이 발현됨을 확인할 수 있었으며, 실험군 1 내지 3(도 2의 C,D,E)에서는 농도 의존적으로 TGF- β 1의 발현이 감소함을 알 수 있었다.
- [0090] **실험예 3: 폐섬유화 관련 유전자를 대상으로 한 Real-time RT-PCR 분석**
- [0091] 방사선을 조사한 폐에서의 섬유화 및 염증 관련 유전자의 발현을 분석하였다. 구체적으로, 사이토카인의 유전자(I16, I113 및 I11b), 케모카인의 유전자(Mip1a, Mip1 및 Ccl4) 및 섬유화 관련 유전자(Col3a1 및 Fn1)의 발현을 정량 분석하였다.
- [0092] RNA는 RNeasy Mini Kit(Qiagen, CA, USA)을 사용하여 폐조직으로부터 분리하였으며, NanoDrop(ND-1000; NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)을 사용하여 정량하였다. Real-time RT-PCR 분석은 Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix 및 Light Cycler 480 real-time PCR machine(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 I16, I113, I11b, Ccl4, Col3a1, Fn1, Mip1a 및 Mip1의 발현을 정량하기 위해 행해졌다. 값들은 비교 CT method(2-deltaCT)를 사용하여 평가되었다. 정규화를 위해 β -액틴의 전사수준이 사용되었다. 결과는 정규화된 2-deltaCT의 log2-변형된 배수 변화로 기술되었다. 3개의 독립적인 실험으로부터 데이터를 얻었으며 평균±표준편차로 나타내었다. 마우스 프라이머들의 서열은 다음과 같다.
- [0093] I16 (F 5'-ccggagaggagacttcacag-3'; R 5'-tccacgatttcccagagaac-3'), I113 (F 5'-cagcatggatggagtgtgg; R 5'-aggccatgcaatatctctg), I11b (F 5'-gcccatcctctgtgactcat-3'; R 5'-aggccacaggtattttgtcg-3'), Ccl4 (F 5'-cccacttctctgtgtttctc-3'; R 5'-gtctgcctcttttggtcagg-3'), Col3a1 (F 5'-acaaaagggtgatgtggac-3'; R 5'-gacctcgtgtccagttagc-3'), Fn1 (F 5'-acagagctcaacctcctga-3'; R 5'-tgtgtctctctggttctcct-3'), Mip1a (F 5'-atgaaggtctccaccactgc-3'; R 5'-gatgaattggcgtggaatct-3'), Mip1 (F 5'-ccaatgagttaggtggaga-3'; R 5'-tctggacccattctcttctg-3') 및 β -actin (F 5'-gatctggcaccacaccttct-3'; R 5'-gggggtgtgaaggtctcaaa-3').
- [0094] 이들 실험 결과를 도 3에 나타내었는데, 방사선 조사만 처리한 대조군은 급격하게 상기 폐섬유화 관련 유전자들의 발현이 증가함을 알 수 있었고, Fn1 유전자를 제외한 나머지 폐섬유화 관련 유전자들의 발현은 본 발명 조성물의 농도에 의존적으로 감소함을 알 수 있었다.
- [0095] **실험예 4: 본 발명 조성물의 효과 비교**
- [0096] 본 발명 조성물(7종의 혼합 생약 추출 조성물)의 성분 및 혼합비율에 의한 시너지 효과를 비교하기 위해 본 발명 조성물과 유사한 후보약물군을 동일한 조건에서 실험하여 보았다.
- [0097] Bleomycin으로 폐섬유화를 유도한 후, i) 1군: 대조군(후보약물군을 처리하지 않은 군), ii) 2군: 청상보하탕, iii) 3군: 6종의 혼합 생약 조성물(숙지황:천문동:오미자:목단피:행인:황금=5:2:2:2:2), iv) 4군: 7종의 혼합 생약 조성물(숙지황:천문동:오미자:목단피:행인:황금:백부=5:2:2:2:1) 및 v) 5군: 본 발명의 혼합 생약 조성물(숙지황:천문동:오미자:목단피:행인:황금:백부=8:4:4:4:3:3:2) 각각에 대해 비교실험을 통해 본 발명 조성물의 우수성을 입증하고자 하였다.
- [0098] Bleomycin 유도 폐섬유화 질환에 대해 상기 5개군의 약물의 효능을 알아보고자 쥐의 상피세포주인 MLE12 세포를 사용하였다. 2% FBS(WELGENE, Korea)와 1% penicillin, streptomycin 첨가된 DMEM/F-12(WELGENE, Korea) 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 상기 MLE12 세포를 배양한 후, 210⁵ cells/well을 12 well plate에 동일하게 분주하여 배양하고 안정화시킨다음, 배지를 제거 하였다.

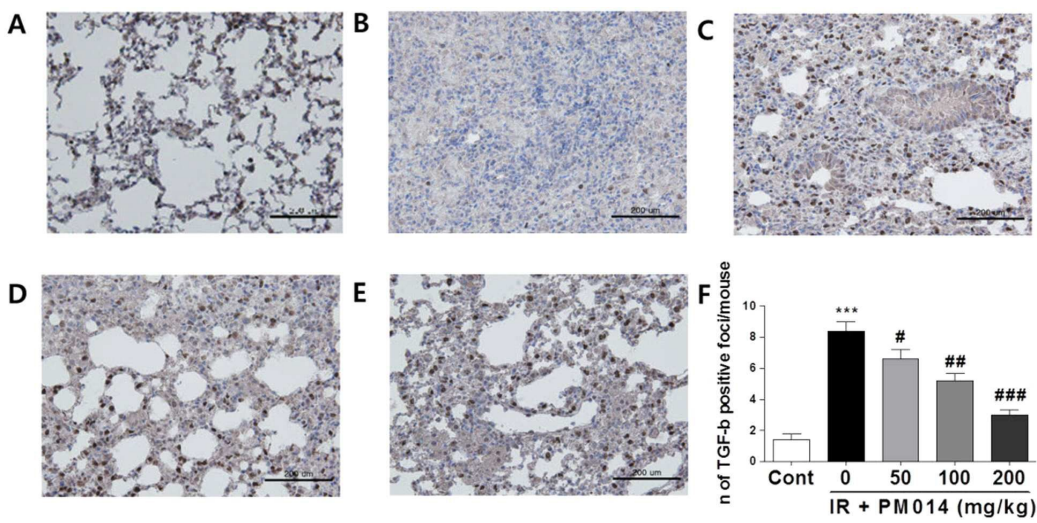
- [0099] Bleomycin(4 μ g/ml)을 모든 군에 처리하고, 1군을 제외한 나머지 2, 3, 4 및 5군은 각각 50 μ g/ml의 약물로 처리하여 96시간 배양 후, 세포를 수거하였다.
- [0100] 상피-간엽세포 전환(EMT: epithelial-mesenchymal transition) 정도를 확인하기 위해, MLE12 세포에 발현되는 상피세포 표지자 E-Catherin과 간엽세포 표지자 Vimentin 발현에 대한 약물효과를 qRT-PCR로 측정하였는데, 상기 수거한 세포를 5000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 Trizol 시약을 넣고 용해하였으며, 용해한 혼합액에 chloroform(CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 incubation 한 후 13,000 rpm에서 원심 분리하고 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔든 다음 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% 에탄올로 wash 한 다음 건조 후 추출한 RNA에 Rnase water를 20 μ l 넣고 55-65 $^{\circ}$ C에서 불활성화시켰다. 추출한 RNA 1 μ g와 oligo-(dT) primer, AccuPower RT PreMix (Bioneer) kit를 이용하여 25 $^{\circ}$ C에서 10 분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다.
- [0101] qRT-PCR은 Roche Diagnostics LightCycler 480(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 사용하여 수행하였다. 96 Well qPCR Plate에 SYBR Green I, cDNA template, β -actin, E-cadherin과 Vimentin Primer를 총 부피 20 μ l로 하여 95 $^{\circ}$ C 10분간 Pre denaturation시킨 다음 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 60 $^{\circ}$ C에서 5초, 72 $^{\circ}$ C에서 10초 동안 50회 증폭시켰다. 사용한 Primer 서열은 다음과 같다.
- [0102] **E-cadherin**
- [0103] Forward: CACCTGGAGAGAGGCCATGT (서열번호 1)
- [0104] Reverse: TGGGAAACATGAGCAGCTCT (서열번호 2)
- [0105] **Vimentin**
- [0106] Forward: CTTGAACGGAAAGTGAATCCT (서열번호 3)
- [0107] Reverse: GTCAGGCTTGGAACGTCC (서열번호 4)
- [0108] **β -actin**
- [0109] Forward: CGTATTGGGCGCCTGGTCAC (서열번호 5)
- [0110] Reverse: ATGATGACCCTTTTGGCTCC (서열번호 6)
- [0111] 상기 실험을 통하여 도 4와 같은 그래프를 얻었는데, 상피세포 표지자 E-Catherine과 간엽세포 표지자 Vimentin mRNA 발현양을 조사한 결과, Bleomycin만 처리한 군(1군)은 Bleomycin을 처리하지 않은 음성대조군(NC)에 비해 E-Catherine 발현양이 유의성 있게 감소한 것을 확인하였다. Bleomycin을 처리한 후, 상기와 같은 약물을 각각 50 μ g/ml 처리한 약물대조군 2군 내지 5군은 모두 Bleomycin만 처리한 군에 비해 E-Catherine 발현양이 감소되는 것을 억제함을 확인하였다. 또한 간엽세포 표지자 Vimentin 발현양은 NC군에 비해 Bleomycin만 처리한 군에서 유의성 있게 증가함을 보였고, 약물대조군 5군(본 발명의 조성물)에서만 Vimentin 의 발현을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0112] 이로써, 본 발명의 조성물은 다른 유사한 조성물에 비해 폐섬유화 예방 및 치료 효능이 우수함을 알 수 있었다.
- [0113] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 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 실시 예들은 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.

도면

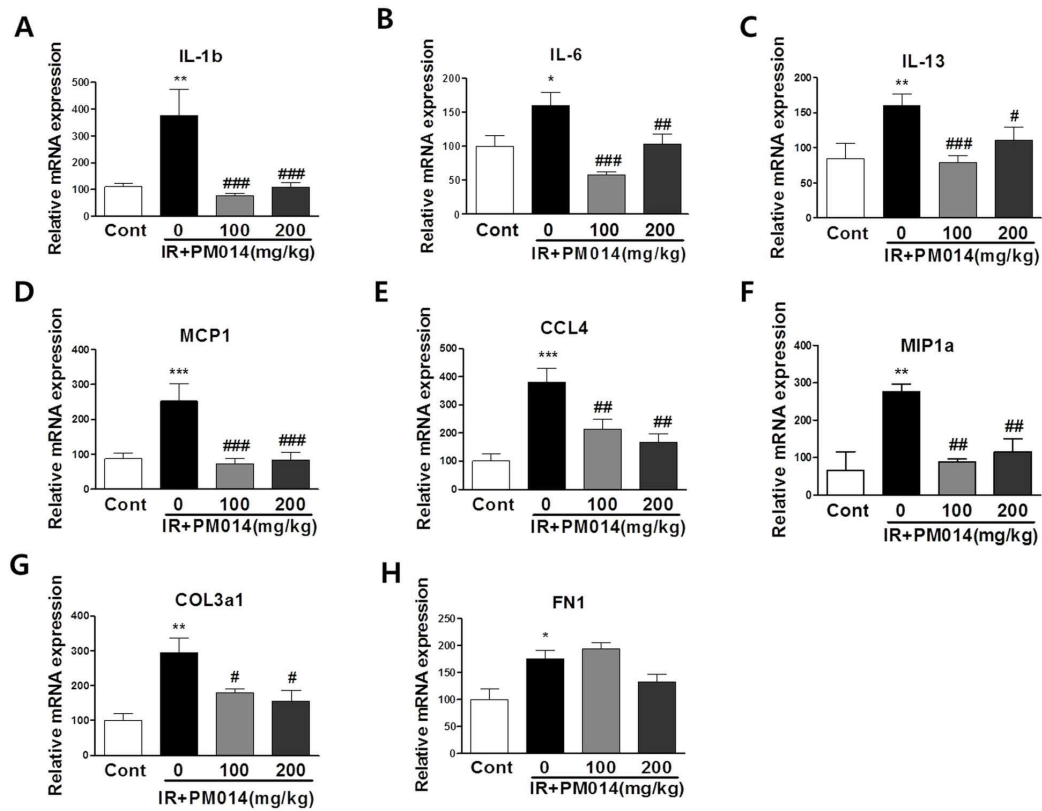
도면1



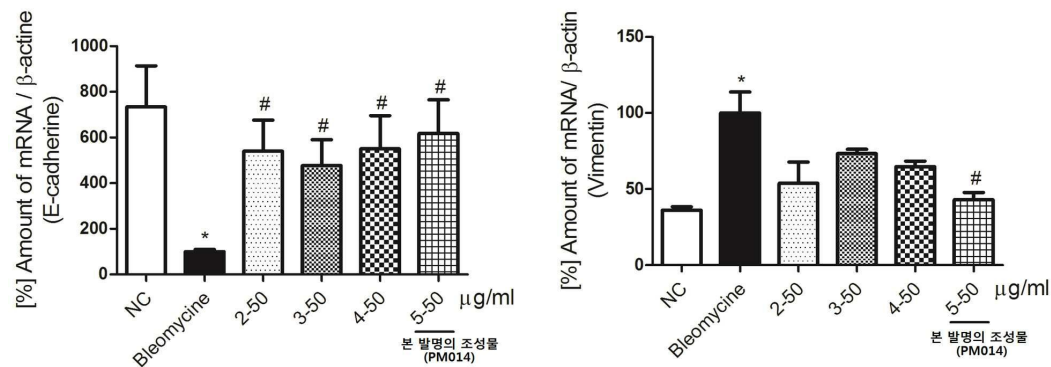
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Kyung Hee University Seoul Campus
- <120> A composition comprising a mixed herbal extract for prevention and therapy of radiation-induced lung fibrosis
- <130> KPA160416-KR
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E-cadherin forward primer
 <400> 1
 cacctggaga gaggccatgt 20
 <210> 2
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E-cadherin reverse primer
 <400> 2
 tgggaaacat gagcagctct 20
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Vimentin forward primer
 <400> 3
 cttgaacgga aagtggaatc ct 22
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Vimentin reverse primer
 <400> 4
 gtcaggcttg gaaacgtcc 19

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin forward primer
 <400> 5
 cgtattgggc gcctggcac 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin reverse primer
 <400> 6
 atgatgaccc ttttggtcc

20

【심사관 직권보정사항】
 【직권보정 1】
 【보정항목】 청구범위
 【보정세부항목】 청구항2
 【변경전】
 약학적 조성물
 【변경후】
 약학 조성물