(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0118838
(43) 공개일자 2018년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/618 (2014.01) *A23L 33/10* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/618 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0051494
(22) 출원일자 2017년04월21일
심사청구일자 2017년04월21일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
강다원
경상남도 진주시 새평거로 30 104동 2004호 (평거동, 엠코타운더프라하)
박시향
경상남도 통영시 한실4길 18
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

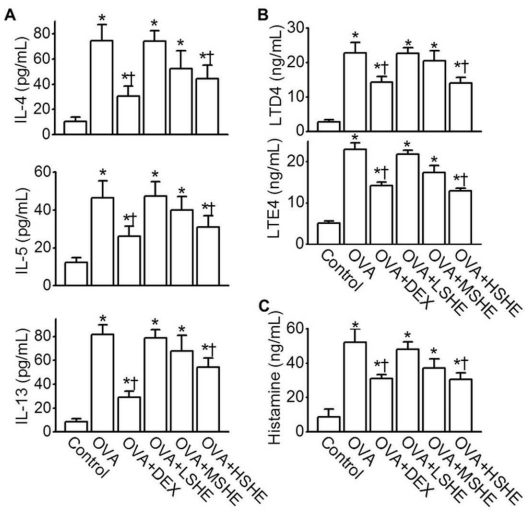
(54) 발명의 명칭 **군소 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 군소 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 군소 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 천식의 치료 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 군소 추출물은 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13), 염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-1ß), 류코트리엔(LTD4 및 LTE4) 및 히스타민의 분비를 감소시키고, 기관지 내에 존재하는 염증세포 또는 배상세포 수를 감소시키며, 평활근 세포의 수축을 감소시키는 효과를 나타내므로, 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/314 (2013.01)
A23V 2250/2042 (2013.01)
Y10S 514/826 (2013.01)
(72) 발명자
최영준
경상남도 통영시 미수해안로 36 103동 805호 (미수동,현대아파트)
강상수
경상남도 진주시 신안들말길 58 평거현대2차아파트 202동 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJT200671
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 해양수산생명공학기술개발사업
연구과제명 [KIMST-RCMS]해양바이오 지역특화 선도기술개발사업(해양무척추동물 소재 기능성 식품의 상용화 기술개발)
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교
연구기간 2016.08.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

군소 추출물을 유효성분으로 포함하는, 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 군소를 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출물은 군소의 에탄올 추출물의 침전물인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 군소 추출물을 총 조성물의 중량 대비 0.001 내지 80 중량%로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 인간을 제외한 천식 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 천식의 치료 방법.

청구항 7

군소 추출물을 유효성분으로 포함하는 천식의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 군소 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 군소 추출물을 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 천식의 치료 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 천식은 재발성 기침, 호흡 곤란, 천명음, 폐 기능 손상, 수면 장애 등의 다양한 임상 증후군을 유발하여 삶의 질을 저하시킨다. 2014년 세계 천식 보고서에 따르면, 세계적으로 천식 환자의 수는 약 3억 3천 4백만 명으로,

매년 25만 명 정도가 이로 인해 사망하고 있으며, 주요 선진국 인구의 약 8%가 천식환자로 분류되고 있음을 보고하였다. 한국의 경우에도, 인구 중 약 300만 명이 천식을 앓고 있으며, 대기오염 및 각종 화학물질에 대한 노출과 식생활의 서구화로 인하여 천식 환자의 수가 급격히 증가하고 있는 추세이다.

[0005] 천식의 원인 및 발병기전은 명확하게 밝혀지지 않은 상태이나, 일부 보고에 의하면 Th1(T helper cell type 1) 및 Th2(T helper cell type 2) 면역 반응의 불균형에 의해 유발된다고 알려져 있다. 또한, 폐에서 활성화된 Th2 세포가 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 다양한 염증성 사이토카인을 생성하여 IgE 생성을 촉진하고, 호산구의 분화, 성숙 및 이동을 유도하여 기도 과민성을 증가시키며, Th2 사이토카인에 의해 활성화된 비만 세포는 히스타민, 프로스타글란딘 D2(prostaglandins D2) 및 시스테닐 류코트리엔(cysteinyl leukotrienes)과 같은 많은 기관지 수축 매개체를 분비하여 천식을 야기하고 악화시킨다. 따라서, 기도 염증의 억제 및 천식 증상의 완화에는 상술한 Th2 사이토카인 및 기관지 수축 매개체를 감소시키는 것이 필수적인 것으로 생각되고 있다.

[0007] 이와 관련하여, 현재 사용되는 천식 치료 방법으로는 전술한 천식의 발병 기전을 응용한 기관지 확장제, 류코트리엔 개질제, 비만 세포 안정제 및 흡입용 글루코코르티코스테로이드(ICS) 등이 사용되고 있다. 그러나, 많은 환자들은 상술한 통상적인 약물에 대하여 부작용을 나타내고 있으며, 특히 다량의 ICS를 장기간 투여하면 전신 부작용이 유발될 수 있음이 보고되었다. 따라서, 장기적으로 안전하고 효과적인 치료법을 찾기 위해 천연물을 이용한 천식 치료제의 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 예로서 회양목 추출물 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물(한국 등록특허 제10-1715154호), 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환에 효과적인 포도근 추출물을 포함하는 조성물(한국 공개특허 제10-2009-0103239호) 등이 개발된 바 있다.

[0009] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연물을 이용한 안전한 천식 치료제를 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 군소 추출물이 천식 동물 모델에서 우수한 기관지 염증 감소 효과를 나타냄을 확인함에 따라, 군소 추출물은 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 군소 추출물을 유효성분으로 포함하는, 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 천식 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 천식의 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 군소 추출물을 유효성분으로 포함하는, 천식의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 군소 추출물을 유효성분으로 포함하는, 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 천식은 폐에서 활성화된 Th2 세포가 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 다양한 염증성 Th2 사이토카인을 생성하여 IgE 생성을 촉진하고, 호산구의 분화, 성숙 및 이동을 유도하여 기도 과민성을 증가시킴에 따라 발병한다. 또한, 상기 Th2 사이토카인에 의해 활성화된 비만 세포는 히스타민, 프로스타글란딘 D2(prostaglandins D2) 및 시스테닐 류코트리엔(cysteinyl leukotrienes)과 같은 많은 기관지 수축 매개체를 분비하여 천식을 악화시킨다고 알려져 있다. 따라서, 천식의 개선 및 치료에는 상기 Th2 사이토카인 및 기관지 수축 매개체의 수준을 감소시키는 것이

필수적이다.

[0018] 본 발명에서는, 군소 추출물은 천식이 유도된 마우스에 대하여 천식 유발 물질인 기관지 폐포 세척액 내에 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13), 류코트리엔(LTD4 및 LTE4) 및 히스타민뿐만 아니라, 염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-1ß)의 분비를 감소시키고, 또한 기관지 내에 존재하는 염증세포 또는 배상세포 수를 감소시키며, 평활근 세포의 수축을 감소시키는 효과를 나타냄을 확인함에 따라, 상기 군소 추출물은 천식의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0020] 본 발명의 용어, "군소"(Sea hare, *Aplysia kurodai*)는 연체동물 복족류에 속하는 동물을 의미한다. 껍질이 없고 천천히 움직이는 해양 연체 동물로서, 바위가 많은 해변에서 흔하게 발견되며 일본과 한국에서는 식용으로 사용된다. 군소는 껍질이 없는 것을 보완하기 위한 방어 메커니즘으로 다양한 생리 활성 물질을 분비한다고 알려져 있으며, 군소 및 이에 포함된 생체 활성 분자가 항종양, 항균 및 항박테리아 등의 다양한 기능을 나타냄이 공지된 바 있다. 그러나, 군소의 천식의 예방, 치료 및 개선 효과는 알려진 바 없으며, 본 발명자들에 의해 처음으로 규명되었다.

[0022] 본 발명의 추출물은 군소를 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, "추출물"은 군소를 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액 또는 농축액, 상기 추출액을 침전하여 얻어지는 침전물, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0024] 상기 군소 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0025] 또한, 상기 군소의 추출에 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있고, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있으며, 구체적으로 물 또는 에탄올이 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 군소의 에탄올 추출물의 침전물일 수 있다.

[0027] 본 발명의 군소 추출물은 추출 전 군소를 분해하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 구체적인 본 발명의 군소 추출물은 군소에 물, 단백질 분해효소 및 산을 첨가하여 배양하는 제1단계; 상기 배양물에 에탄올을 첨가한 후 에탄올 침전물을 수득하는 제2단계를 포함하여 제조될 수 있다. 보다 구체적으로, 제1단계 후 단백질 분해효소를 불활성화시킨 후, 배양물을 여과, 농축시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 상기 용어, "단백질 분해효소"(proteinase)는 단백질과 펩티드 등의 펩티드 결합을 가수 분해하는 효소로서, 군소 몸체를 분해하는 물질을 의미한다. 본 발명에서, 상기 단백질 분해효소는 추출물의 수율을 향상시키기 위하여 사용될 수 있으며, 상기 단백질 분해효소의 최대 활성을 위한 pH, 온도 조건 등은 당업계에 알려진 내용을 사용할 수 있다. 상기 단백질 분해효소의 구체적인 예는 플라보자임(flavourzyme)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 용어, "천식"은 기관, 기관지, 세기관지, 그리고 폐포로 이어지는 기도의 염증반응과 이로 인한 기도 조직의 손상 및 변화를 특징으로 하는 여러 가지 질환들을 통칭하는 포괄적인 질환명이다. 천식은 기관지의 알레르기 염증 반응에 의해 발생하는 알레르기 질환으로서, 폐 속에 있는 기관지가 예민해지며 기관지가 좁아져서 숨이 차고 가랑가랑하는 숨소리가 들리면서 기침을 심하게 하는 증상을 나타낸다. 대표적인 치료제로는 좁아진 기관지를 짧은 시간 내에 완화시키는 증상 완화제(기관지 확장제) 또는 기관지의 알레르기 염증을 억제하여 천식발작을 예방하는 질병 조절제(항염증제, 류코트리엔 조절제) 등이 사용된다. 본 발명에서, 상기 천식은 기관지성 천식, 알러지성 천식, 아토피형 천식, 비아토피형 천식, 운동유발 천식, 아스피린 천식, 심인성 천식 또는 폐포성 천식일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 용어, "예방"은 상기 군소 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 천식을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 군소 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 천식의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0036] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 군소 추출물은 기관지 내에 존재하는 염증세포 및 배상세포의 수를 감소시키고(도 2), Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13), 류코트리엔(LTD4 및 LTE4) 및 히스타민의 수준을 감소시키며(도 3), 기관지 평활근세포의 수축 정도를 감소시키고(도 4), 군소에서 추출한 다당류에 비하여 염증성 사이토카인의 수준을 더욱 현저하게 감소시키며(도 6), 특히 전술한 항염증 효과를 독성 없이 달성할 수 있음을 확인하였다(도 5). 이는, 상기 군소 추출물을 포함하는 본 발명의 조성물은 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 군소 추출물을 0.001 내지 80, 구체적으로 0.001 내지 70, 더욱 구체적으로 0.001 내지 60 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 구체적인 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 또한, 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있으며, 상기 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제 등이 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 또는 좌제 등이 사용될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 천식 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 천식의 치료 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 상기 군소 추출물을 포함하는 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[0045] 본 발명의 용어, "개체"는 천식이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0048] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0049] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여할 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0050] 또한, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 약학적 조성물은 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.05 내지 200 mg/kg, 가장 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0052] 다른 하나의 양태는 군소 추출물을 유효성분으로 포함하는, 천식의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0054] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 우수한 천식 개선 효과를 기대할 수 있으며, 일반 약품과는 달리 천연물을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있으므로, 천식의 예방 또는 개선 목적으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 용어, "개선"은 상기 군소 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0058] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0059] 상기 건강기능(성)식품(health functional food)은 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)'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 호용될 수 있다.

[0060] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 본 발명의 군소 추출물을 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.

[0062] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 식품으로 인정되는 제형이면 다양한 형태의 제형으로 제한 없이 제조될 수 있다.

[0063] 또한, 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 있다.

[0064] 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), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크륨(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0065] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(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 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별하고 적절한 양으로 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0067] 본 발명에 따른 군소 추출물은 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13), 염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-1ß), 류코트리엔(LTD4 및 LTE4) 및 히스타민의 분비를 감소시키고, 기관지 내에 존재하는 염증세포 또는 배상세포 수를 감소시키며, 평활근 세포의 수축을 감소시키는 효과를 나타내므로, 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 천식 마우스 모델을 제작하기 위한 실험의 개략도이다. 감작(sensitization)을 위하여, 0일과 7일에 PBS 100 ㎕에 용해된 2 mg의 수산화알루미늄으로 유화시킨 OVA 75 ㎍를 복강 내(intraperitoneal; IP) 투여하였다. 두 번째 감작 이후, 공격유발(challenge)을 위하여, 14, 15, 21 및 22일에 4회에 걸쳐 50 ㎍의 OVA를 마우스 비강 내(intranasally; IN) 투여하였다. 덱사메타손(Dexamethasone; DEX)은 OVA를 이용한 공격유발 1시간 전에 3 mg/kg/일 용량으로 투여하였다. 군소 추출물(Sea Hare Extract; SHE)은 용량에 따라 세 그룹(0.1 g/kg, 0.5 g/kg 및 1.0 g/kg)으로 나누어 14일에서 22일까지 매일 구강 투여하였다.

도 2는 천식 마우스 모델에서, SHE의 염증 감소 효과를 보여주는 도면이다. A는 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 내 존재하는 세포의 총 수를 나타내는 그래프이고, B는 BALF 내 존재하는 백혈구 세포의 수를 나타내는 그래프이다. 이때, Mac은 대식세포(Macrophage), Lym은 림프구(Lymphocyte), Neu는 호중구(neutrophil), Eos는 호산구(eosinophil)를 의미한다. 모든 값은 '평균 ± SE'로 나타내었다. 대조군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 *, OVA군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 †로 표시하였다. 또한, C는 폐 조직의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 이미지이며, D는 배상 세포(Goblet cells)의 요오드산-시프(PAS) 염색 이미지이다. 눈금 막대(scale bar)는 200 ㎛를 나타낸다. 이때, Control, OVA, DEX, LSHE, MSHE 및 HSHE는 각각 정상 대조군, 오브알부민(ovalbumin), 덱사메타손(dexamethasone), 0.1 g/kg의 군소 추출물, 0.5 g/kg의 군소 추출물 및 1.0 g/kg의 군소 추출물을 의미한다.

도 3은 천식 마우스 모델에서, SHE의 염증 유발 물질 수준의 감소 효과를 보여주는 도면이다. A는 Th2 사이토카인(Th2 cytokine)인 IL-4, IL-5 및 IL-13, B는 류코트리엔(leukotrien)인 LTD4 및 LTE4, C는 히스타민(histamine) 수준을 나타내는 그래프이다. 모든 값은 '평균 ± SE'로 나타내었다. 대조군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 *, OVA군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 †로 표시하였다.

도 4는 천식 기관지 평활근세포(sthmatic bronchial smooth muscle cells; ABSMCs)에서, SHE의 Ca^{2+} 농도 및 세포 수축 감소 효과를 보여주는 도면이다. A는 히스타민에 의해 증가된 Ca^{2+}의 수준(Control), 및 SHE 투여에 의한 감소된 Ca^{2+}의 수준(SHE)을 보여주는 그래프이다. 막대 그래프는 각 물질의 투여 전후에 따른 세포의 Ca^{2+} 농도를 보여준다. 화살표는 100 μM 히스타민(histamine; HIS)을 추가한 시점을 나타내며, FI는 형광 강도를 의미한다. B는 세포 수축 감소 효과를 보여주는 이미지이다. 아세틸콜린(acetylcholine; ACh) 또는 2,3-부탄다이온 모노옥심(2,3-butanedione monoxime; BDM)은 각각 양성 대조군 또는 음성 대조군으로 사용하였다. 막대 그래프

는 각 물질의 투여 전후에 따른 세포의 수축 정도를 보여준다. 모든 값은 '평균 ± SE'로 나타내었다. 대조군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 *, 히스타민에 대하여 $p < 0.05$인 경우 †로 표시하였다.

도 5는 천식 마우스 모델에서, SHE의 비장(spleen) 및 흉선(thyme) 무게 변화에 대한 영향을 보여주는 도면이다. A는 비장 및 흉선의 크기 변화를 보여주는 이미지이고, B는 비장 및 흉선의 무게를 보여주는 그래프로서 체중에 대한 비율로 나타내었다. 모든 값은 '평균 ± SE'로 나타내었다. 대조군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 *, OVA군에 대하여 $p < 0.05$인 경우 †, 및 OVA+DEX에 대하여 $p < 0.05$인 경우 #으로 표시하였다.

도 6은 LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에서, SHE 또는 SHEP의 염증성 사이토카인의 분비량 감소 효과를 보여주는 그래프이다. A는 TNF-α, B는 IL-1ß 수준을 나타내는 그래프이다. CTL은 LPS가 처리되지 않은 정상 대조군, LPS는 LPS가 처리된 음성 대조군을 의미하며, +SHE 또는 +SHEP는 각각 LPS가 처리된 대식세포에 SHE 또는 SHEP를 처리한 실험군을 의미한다. 모든 값은 '평균 ± SE'로 나타내었다. 정상 대조군(CTL)에 대하여 $p < 0.05$인 경우 *, 음성 대조군(LPS)에 대하여 $p < 0.05$인 경우 †로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1. 군소 추출물(Sea Hare Extract; SHE)의 제조 방법**

[0073] 군소(Sea hare; *Aplysia kurodai*)는 한국 통영에서 구입하였다. 내장을 제거한 후 세척하여 10분 동안 물이 없는 상태로 데쳤고, 이를 분쇄기(M-12S, 한국수제산업(주), 수원, 한국)를 사용하여 분쇄하였다. 상기 군소 분쇄물에 2배 부피의 물과 플라보자임(flavourzyme, 2%)을 첨가하였으며, 구연산(citric acid) 분말을 이용하여 pH 6.0으로 조정한 뒤 60℃에서 15시간 동안 항온 배양하였다. 이후, 100℃에서 10분간 가열하여 효소 반응을 불활성화시켰으며, 상기 용액을 200 메쉬(mesh) 체를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액을 진공증발기(WCR-P6, 대한과학, 원주, 한국)를 사용하여 브릭스(Brix) 50으로 농축시켰다. 상기 농축액에 3배 부피의 에탄올을 첨가하였고, 이를 교반하여 침전물이 형성될 때까지 12시간 동안 방치하였다. 형성된 상기 침전물을 동결 건조시켰고, 분말로 분쇄하여 -70℃에서 보관하였다. 최종적으로 수득한 상기 분말을 DW에 적정 농도로 용해시켜 사용하였다.

[0075] **실시예 2. 화합물의 사용**

[0076] 본 발명에 사용된 모든 화합물은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. OVA(50 mg/mL) 및 덱사메타손(dexamethasone; DEX, 5 mg/mL)의 스톡(stock) 용액은 각각 증류수(DW) 및 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해하여 준비하였다. DMSO를 용매로 사용하는 경우, 동등 농도의 DMSO 용액을 대조군으로 사용하였다.

[0078] **실시예 3. 실험 동물의 사용**

[0079] 암컷 C57BL/6 마우스(6주령)는 Koatech 사(동물사육센터, 평택, 한국)로부터 구입하였다. 마우스는 실험 전 1주일 동안 표준 실험 조건의 동물 시설에서 보관하였고, 음식과 물을 자유롭게 이용할 수 있는 특정 병원균이 없는 영역에서 12시간의 밝음/어두움 주기하에 보관하였다. 모든 동물 실험은 경상대학교 동물보호 및 사용위원회(GNU-151208-M0068)의 지침에 따라 수행하였다.

[0081] **실시예 4. 천식 동물모델의 제조 방법**

[0082] 천식을 앓는 마우스 모델을 제조하기 위하여, 다음과 같은 방법을 이용하였다. 먼저, 감작(sensitization)을 위하여 PBS 100 ㎕에 용해된 2 mg의 수산화 알루미늄(InvivoGen, San Diego, CA, USA)으로 유화시킨 OVA(Sigma, St. Louis, MO, USA) 75 ㎍를 마우스 복강 내(intraperitoneal; IP) 투여하여 0일 및 7일에 2회 감작시켰다. 두 번째 감작 이후, 공격유발(challenge)을 위하여 14, 15, 21 및 22일에 4회에 걸쳐 50 ㎍의 OVA를 마우스 비강 내(intranasally; IN) 투여하였다. 이때, 양성 대조군인 덱사메타손은 3 mg/kg/일 용량으로 OVA를 이용한 각

각의 공격유발 1시간 전에 투여하였다.

[0083] 이후, 치료를 위하여 상기 마우스에 군소 추출물(Sea Hare Extract; SHE)을 14일부터 22일까지 매일 0.1 g/kg/일, 0.5 g/kg/일 또는 1.0 g/kg/일 용량으로 경구투여하였다. 모든 마우스를 하기 표 1에 기재된 바와 같은 무작위의 6그룹으로 나누었다.

표 1

[0084]

	그룹 (n=10)	SHE 투여 용량
1	정상 대조군	-
2	OVA군 (음성 대조군)	-
3	OVA + 덱사메타손 처리 (양성 대조군)	3 mg/kg/일
4	OVA + 저용량의 SHE 처리 (LSH)	0.1 g/kg/일
5	OVA + 중간 용량의 SHE 처리 (MSHE)	0.5 g/kg/일
6	OVA + 고용량 SHE 처리 (HSHE)	1.0 g/kg/일

[0085] 상기 방법에 따른 감작, 공격유발 및 치료 프로토콜은 도 1에 나타내었고, 실제 SHE의 투여 용량은 실험 초기에 마우스의 무게에 따라 계산하였다. 마우스의 무게는 3주마다 측정하였으며, 희생 당일에도 측정하였다. 또한, 실험이 완료된 마우스의 비장(spleens)과 흉선(thyme)은 희생 당일에 적출하여 그 무게를 측정하였다.

[0087] **실시예 5. 기관지 폐포 세척액의 수집 및 백혈구 세포의 분석 방법**

[0088] 마지막 공격유발 24시간 후, 아버틴(avertin, 250 mg/kg)을 이용하여 마우스를 마취시키고 기관 절제술을 시행하였다. 이후, 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)을 얻기 위해 PBS 1 mL를 폐에 2회 주입한 후, 각 회마다 기관 삽관을 통해 주입한 PBS를 다시 빼내었다.

[0089] 수집한 BALF 내에 존재하는 백혈구 세포의 수는 슬라이드 위에 도말된 세포에 대해 세포원심분리기(Cyto-tek, Sakura-Finetek Europe, Zoeterwoude, Netherlands)를 사용하여 그 수를 세었다. 슬라이드 위에 도말된 세포는 라이트-김자(Wright-Giemsa) 용액으로 염색하였고, 슬라이드상의 세포를 정량하여 대식세포(macrophages), 림프구(lymphocytes), 호중구(neutrophils) 및 호산구(eosinophils)로 분류하였다.

[0091] **실시예 6. 헤마톡실린 및 에오신(H&E), 및 요오드산-시프(PAS) 염색 방법**

[0092] 폐의 염증은 헤마톡실린 및 에오신(Hematoxylin & eosin; H&E) 염색을 통해 분석하였다. 먼저, 0.1M PBS에 포함된 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 고정액으로 마우스를 관류하였다. 왼쪽 폐를 분리하여 상기 고정액이 들어있는 튜브에 넣고 4℃에서 밤새 배양하였다. 폐를 3회 세척한 이후, 파라핀 포매(embedding)하였으며, 5 ㎛ 두께의 절편으로 절단하였다. 상기 파라핀 절편을 젤라틴 코팅 슬라이드상에서 건조시켰고, 탈파라핀을 수행한 이후, 5분 동안 수돗물로 세척하였다. 상기 탈파라핀 절편을 헤마톡실린에 5분 동안 담그고, 수돗물에서 염색 여부를 확인하였다. 에오신 염색은 2분 동안 수행하였다.

[0093] 또한, 생성된 점액은 요오드산-시프(periodic acid-Schiff; PAS) 염색으로 분석하였다. 상기 탈파라핀 섹션을 과요오드산(Periodic Acid) 용액에 5분 동안 담근 다음, 시프 용액(Schiff's Reagent)에 15분 동안 담구었다. 이때, 헤마톡실린은 PAS 염색에서 대비염색제(counterstain)로 사용하였다. 염색한 절편을 농도별 알코올(70 내지 100% 에탄올)을 이용하여 각각 3분 동안 탈수시켰고, 크실렌(xylene)으로 세척한 뒤, 커버 슬립을 덮었다. BX-51 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 염색된 절편을 관찰하였고, 각 샘플당 다섯 영역을 확인하였다.

[0095] **실시예 7. 기관지 폐포 세척액(BALF) 내의 사이토카인 분석 방법**

[0096] 먼저, 수집한 BALF를 4℃에서 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 사이토카인 분석에 사용할 상등액을 수득하였고, 이를 -20℃에서 동결시켜 보관하였다.

[0097] BALF 내에 존재하는 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5 및 IL-13), 류코트리엔(LTD4 및 LTE4) 및 히스타민의 농도는

ELISA 키트를 이용하여 정량화하였다. Th2 사이토카인의 경우, 항-IL-4, 항-IL-5 또는 항-IL-13 항체로 미리 코팅한 96-웰 플레이트에 50 ㎕의 BALF를 넣었다. 플레이트를 접착 스트립으로 덮고, 실온에서 2시간 동안 배양한 뒤, 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 이후, 마우스 IL-4, IL-5 또는 IL-13 접합체 100 ㎕를 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 배양한 뒤, 3회 세척하였다. 마지막으로, 100 ㎕의 종결용액을 첨가하여 반응을 중단시켰다.

[0098] 류코트리엔의 경우, 항-LTD4 또는 항-LTE4 항체로 미리 코팅한 96-웰 플레이트에 BALF(100 ㎕)를 첨가하였고, 이를 밀봉하여 37℃에서 1.5시간 동안 배양한 뒤, 3회 세척하였다. 이후, 비오틴이 표지된 마우스 LTD4 또는 LTE4 항체(100 ㎕)를 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 배양한 뒤, 3회 세척하였다. 이후, 효소 접합체 100 ㎕를 첨가하고, 37℃에서 30분 동안 배양한 뒤, 5번 세척하였다. 발색용액(100 ㎕)을 첨가하여 37℃에서 현상하였으며, 마지막으로, 100 ㎕의 발색용액 C를 첨가하여 반응을 중단시켰다.

[0099] 히스타민의 경우, 100 ㎕의 BALF와 50 ㎕의 히스타민 추적자를 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 1시간 동안 진탕배양한 후, 3회 세척하였다. 이후, 200 ㎕의 HRP(horseradish peroxidase) 및 스트렙타비딘(streptavidin) 접합체(SA-HRP)를 첨가하고, 실온에서 30분 동안 진탕배양한 후, 3회 세척하였다. 마지막으로, TMB(tetramethylbenzidine) 기질 용액(200 ㎕)을 첨가하고 30분 동안 진탕배양한 후, 50 ㎕의 종결용액을 첨가하여 반응을 중단시켰다.

[0100] 상기 방법으로 검출한 플레이트 내의 Th2 사이토카인, 류코트리엔, 히스타민의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 측정하였다.

[0102] **실시예 8. 천식 기관지 평활근세포(ABSMCs)의 배양 방법**

[0103] 인간 천식 기관지 평활근세포(Human asthmatic bronchial smooth muscle cells; HABSMCs)는 Lonza 사(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 상기 HABSMC는 성장인자(hEGF, 인슐린, hFGF-B), 젠타마이신/암포테리신(gentamicin/amphotericin), 소 태아 혈청(FBS, Lonza)을 포함하는 SingleQuots® 키트가 보충된 SmBM®-2(Smooth Muscle Basal Medium-2) 배지를 이용하여 배양하였으며, 5% CO_2 및 37℃의 조건에서 배양하였다.

[0104] 마우스 천식 기관지 평활근세포(Mouse asthmatic bronchial smooth muscle cells; MABSMCs)를 분리하기 위하여, 다음과 같은 방법을 수행하였다. 구체적으로, 천식 모델 마우스의 기관을 절제하여 세척한 뒤, 0.05% 파파인(papain) 및 0.2% 콜라게나제 Ⅱ(collagenase Ⅱ)를 처리하여 37℃에서 30분 동안 분해하였다. 상기 조직을 방치한 뒤, 마이크로 원심 분리기(Eppendorf 5242R, 함부르크, 독일)를 이용하여 340 x g에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 수득하였다. MABSMCs를 포함하는 펠렛은 DMEM/Ham's F12(1:1)에 재현탁하였고, 이를 6-웰 플레이트에 도말하여 배양하였다. 실험에는 2 내지 4 단계(passages)의 MABSMC를 사용하였다.

[0106] **실시예 9. 세포 생존능 측정 방법**

[0107] 세포 생존능은 MTT 시약을 사용하여 측정하였다. 먼저, 지수기(exponential phase)의 세포를 24-웰 플레이트에 분주하였다($4x10^4$ 세포/ml). 히스타민 또는 SHE를 24시간 동안 처리한 후, 5 ㎎/㎖ MTT 용액 20 ㎕를 각 웰(0.1 ㎎/㎖)에 첨가한 뒤, 4시간 동안 배양하였다. 이후, 상층액을 제거하고, 각 웰의 포르마잔(formazan) 결정을 200㎕의 DMSO에 37℃에서 30분 동안 용해시킨 뒤, 마이크로 플레이트 판독기(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군에 대한 생존 세포의 백분율로 표시하였다.

[0109] **실시예 10. 세포 내 Ca^{2+} 측정 방법**

[0110] 세포 내 Ca^{2+} 농도는 fluo 3-AM 시약(Molecular probe, Eugene, Oregon, USA)과 공초점 레이저 주사 현미경(IX70 Fluoview, Olympus)을 이용하여 측정하였다. MASMCs를 커버 글라스 바닥(SPL, Pocheon, South Korea)에서 5 μM fluo 3-AM 시약과 함께 45분 동안 배양하였고, 무혈청 배지로 3회 세척하였다. 형광 이미지를 488 nm에서 여기 아르곤 레이저(excitation argon laser)로 530 nm에서 장파장 방출 필터(long pass emission filter)에서 5초마다 스캔하였다. 스캔한 상기 이미지를 이용하여 단일 세포 수준에서 $[Ca^{2+}]_i$의 변화를 분석하였다.

[0112] **실시예 11. 세포 수축 어세이(Cell contraction assay) 방법**

[0113] 세포 수축 어세이를 수행하기 위하여, 키트(Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하였고, 다음과 같은 방법을 이용하였다.

[0114] 배양 배지에 재현탁시킨 ABSMCs(2×10^6 세포/㎖)를 콜라겐 겔 용액(소 유형 I)과 혼합하였다. 세포 콜라겐 혼합물을 24-웰 플레이트에 넣고 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 콜라겐 중합 후, 성장 인자 보충제가 없는 배양 배지를 콜라겐 겔 격자 상에 첨가하였다. 콜라겐 겔에 존재하는 세포가 평형을 이루도록 2일 동안 배양하였고, 겔을 배양 플레이트에서 제거하였다. 이때, 제거 1시간 전에 다양한 약제를 배지에 첨가하였다. 미오신 억제제인 BDM(3-butanedione monoxime)을 음성 대조군으로서 수축 저해제로 사용하였다. 겔의 이미지를 사진 스캐너(Epson Perfection 3170, Epson France, Levallois-Perret, France)로 스캔하였고, 겔 크기의 변화를 지정된 시간에 측정하였으며, 이미지 분석 소프트웨어(Fluoview software program, Olympus)를 사용하여 정량하였다. 각 조건에서, 콜라겐 수축은 적어도 4회 측정하였다.

[0116] **실시예 12. 통계 분석**

[0117] 그룹 간의 차이는 Tukey's test(SPSS18 software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 post-hoc 비교를 통한 일원 분산 분석(one-way ANOVA test)를 사용하여 분석하였다. 유의성은 $p<0.05$로 설정하였고, 결과값은 '평균 ± SE'로 나타내었다.

[0119] **실시예 1. 군소 추출물 기도 염증 완화 효과 확인**

[0120] 군소 추출물(Sea Hare Extract; SHE)의 천식 치료 효과를 확인하기 위하여, SHE의 기도 염증 완화 효과를 확인하였다.

[0121] 구체적으로, 상기 실시예에 따른 방법으로 천식 마우스 모델에 SHE를 투여한 후, 상기 마우스로부터 수집한 BALF 내에 존재하는 염증 세포를 확인하였다.

[0122] 그 결과, 도 2의 A에서 볼 수 있듯이, OVA의 투여에 의해 천식이 유도된 OVA군은 BALF 내 존재하는 총 세포의 수가 정상 대조군에 비해 현저히 높음을 확인하였다. 반면, 양성 대조군인 덱사메타손(Dexamethasone; DEX) 또는 SHE를 투여하는 경우에는 OVA 투여에 의해 증가된 총 세포의 수가 유의하게 감소됨을 확인하였다.

[0123] 또한, 도 2의 B에서 볼 수 있듯이, OVA군은 BALF 내 존재하는 백혈구 세포(대식세포; Macrophage, 호중구; neutrophil, 및 호산구; eosinophil)의 수가 정상 대조군에 비해 현저히 높음을 확인하였다. 반면, DEX 또는 SHE를 투여하는 경우에는 OVA 투여에 의해 증가된 백혈구 세포의 수가 유의하게 감소되며, 특히 SHE를 1.0 g/kg/일의 농도 고용량(HSHE)를 투여하는 경우에는 OVA 투여에 의해 증가된 백혈구 세포의 수가 유의하게 감소되어 DEX 투여 시와 유사한 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0124] 아울러, 도 2의 C에서 볼 수 있듯이, H&E 염색 결과, OVA군의 폐 조직은 정상 대조군과 비교하여 기관지 내 염증 세포의 침윤 정도가 높음을 확인하였다. 반면, DEX 또는 HSHE를 투여하는 경우에는 OVA 투여에 의해 증가된 염증 세포의 침윤을 현저하게 감소시킴을 확인하였다.

[0125] 마지막으로, 도 2의 D에서 볼 수 있듯이, PAS 염색 결과, OVA군의 폐 조직은 정상 대조군과 비교하여 점액을 분비하는 배상 세포(Goblet cells)가 유의한 정도로 증식함을 확인하였다. 반면, DEX 또는 HSHE를 투여하는 경우에는 OVA 투여에 의해 증가된 배상 세포의 증식이 감소됨을 확인하였다.

[0126] 상기 결과를 통해, 군소 추출물은 폐에 발생된 염증의 수준을 감소시킴으로써 천식 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0128] **실시예 2. 군소 추출물의 염증 물질 감소 효과 확인**

[0129] 군소 추출물(SHE)의 천식 치료 효과를 확인하기 위하여, SHE의 염증 물질 감소 효과를 확인하였다.

[0130] 구체적으로, 상기 실시예에 따른 방법으로 천식 마우스 모델에 SHE를 투여한 후, 상기 마우스로부터 수집한 BALF 내에 존재하는 염증 물질(Th2 사이토카인, 류코트리엔 및 히스타민)의 수준을 확인하였다.

[0131] 그 결과, 도 3의 A 내지 C에서 볼 수 있듯이, OVA군은 BALF 내에 존재하는 Th2 사이토카인의 일종인 IL-4, IL-5 및 IL-13; 류코트리엔의 일종인 LTD4 및 LTE4; 및 히스타민의 수준이 정상 대조군에 비하여 현저히 증가함을 확인하였다. 반면, DEX 또는 HSHE를 투여하는 경우에는 OVA 투여에 의해 증가된 상기 IL-4, IL-5, IL-13, LTD4, LTE4 및 히스타민의 수준이 현저하게 감소하며, 특히 HSHE는 DEX와 유사한 수준의 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0132] 상기 결과를 통해, 군소 추출물은 염증 유발 물질의 수준을 감소시킴으로써 천식 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0134] **실시예 3. 군소 추출물의 평활근 세포의 수축 감소 효과 확인**

[0135] 비만세포(mast cell)는 Th2 사이토카인에 의해 활성화되는데, 활성화된 비만세포에서 분비된 히스타민과 류코트리엔은 Ca^{2+}의 농도를 증가시키며, 또한 평활근 세포의 수축성을 증가시킴으로써 천식을 악화시킨다. 이에, 군소 추출물(SHE)의 천식 치료 효과를 확인하기 위하여, SHE의 천식 기관지 평활근세포 내 Ca^{2+}의 농도 감소 및 세포의 수축 감소 효과를 확인하였다.

[0136] 구체적으로, 상기 실시예에 따른 방법으로 천식 기관지 평활근세포에 수축 유도물질(아세틸콜린 또는 히스타민) 및 SHE를 투여한 후, 세포 내 Ca^{2+} 농도를 측정하고, 수축 정도를 확인하였다.

[0137] 그 결과, 도 4의 A에서 볼 수 있듯이, SHE를 투여하는 경우에는 히스타민 투여에 의해 증가된 Ca^{2+}의 수준이 감소됨을 확인하였다.

[0138] 또한, 도 4의 B에서 볼 수 있듯이, 세포의 수축을 야기하는 물질인 아세틸콜린(acetylcholine; ACh) 또는 히스타민(histamine; HIS)을 투여하는 경우 정상 대조군에 비하여 세포의 수축 정도가 현저히 증가함을 확인하였다. 반면, SHE를 투여하는 경우에는 히스타민 투여에 의해 증가된 세포의 수축 정도가 유의하게 감소되며, 그 정도는 정상 대조군과 유사함을 확인하였다.

[0139] 상기 결과를 통해, 군소 추출물은 세포의 수축을 감소시킴으로써 천식 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0141] **실시예 4. 군소 추출물의 독성 확인**

[0142] 항-천식 효과를 나타내는 군소 추출물(SHE)이 독성을 나타내어 면역 기관의 변화를 유발하는지 확인하기 위해, SHE가 투여된 천식 마우스 모델의 비장 또는 흉선의 무게를 측정하였다.

[0143] 구체적으로, 상기 실시예에 따른 방법으로 천식 마우스 모델에 SHE를 투여한 후, 상기 마우스로부터 비장과 흉선을 적출하여 그 무게를 측정하였다.

[0144] 그 결과, 도 5의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, 정상 대조군에 비하여 OVA군은 비장과 흉선의 크기 및 무게가 모두 증가하며, DEX를 투여하는 경우에는 그 크기와 무게가 오히려 현저하게 감소함을 확인하였다. 반면, SHE를 투여하는 경우에는 정상 대조군과 유사한 수준의 크기 및 무게를 가지고 있음을 확인하였다.

[0145] 상기 결과를 통해, 본 발명의 군소 추출물은 독성 없이 천식 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0147] **실시예 5. 군소 추출물 및 군소 추출 다당류의 천식 치료 효과 비교**

[0148] 기존 공지된 문헌(한국식품영양과학회지, 40(3), 372-378, 2011)에 따르면, 군소에서 추출한 다당류(sea hare extract polysaccharide; SHEP)는 면역조절 효과를 나타낸다고 알려져 있다. 면역 조절 치료는 천식 치료의 한 방법으로 사용되는바, 상기 SHEP와 본 발명의 군소 추출물(SHE)과의 천식 치료 효과를 비교하였다.

[0149] 구체적으로, SHE 및 SHEP의 염증성 사이토카인의 분비 감소 효과를 확인하였다. LPS를 처리하여 활성화된 RAW264.7 대식세포에 SHE 또는 SHEP를 16시간 동안 처리하였고, 이후 상기 세포에서 분비되는 염증성 사이토카

인(TNF-α, IL-1ß)의 양을 분석하였다.

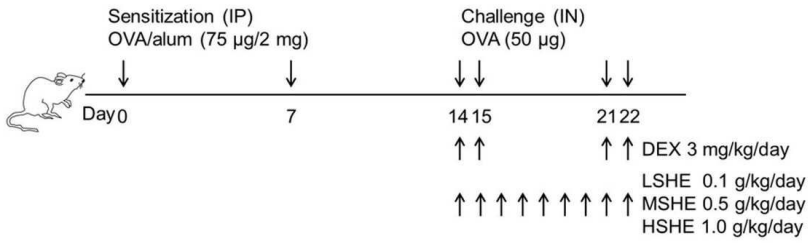
[0150] 그 결과, 도 6의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, 정상 대조군에 비하여 LPS로 자극된 대식세포에서는 TNF-α 및 IL-1ß의 분비량이 현저히 증가하지만, SHE를 처리하는 경우에는 상기 사이토카인의 분비량이 최대 절반 이상으로 감소함을 확인하였다. 다만, SHEP를 처리하는 경우에는 증가한 사이토카인의 분비량이 감소하지 않음을 확인하였다.

[0151] 상기 결과를 통해, 본 발명의 군소 추출물은 군소 추출 다당류보다 우수한 천식 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

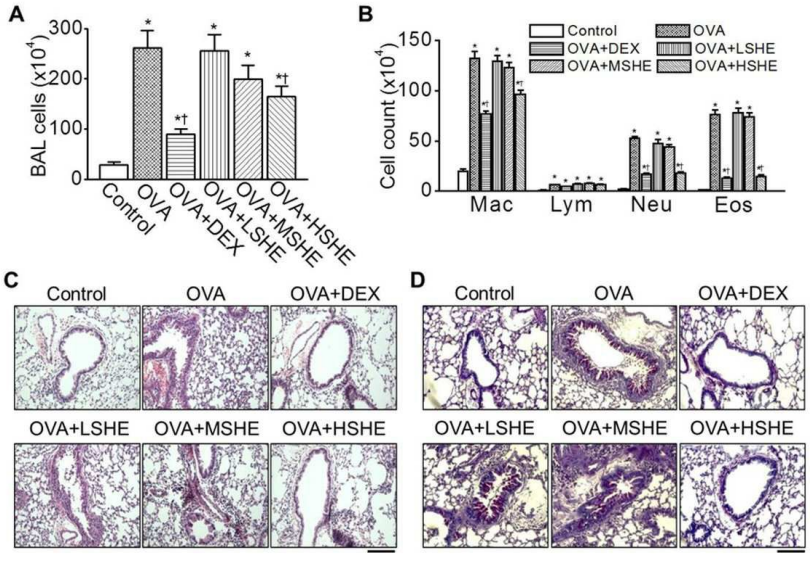
[0153] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

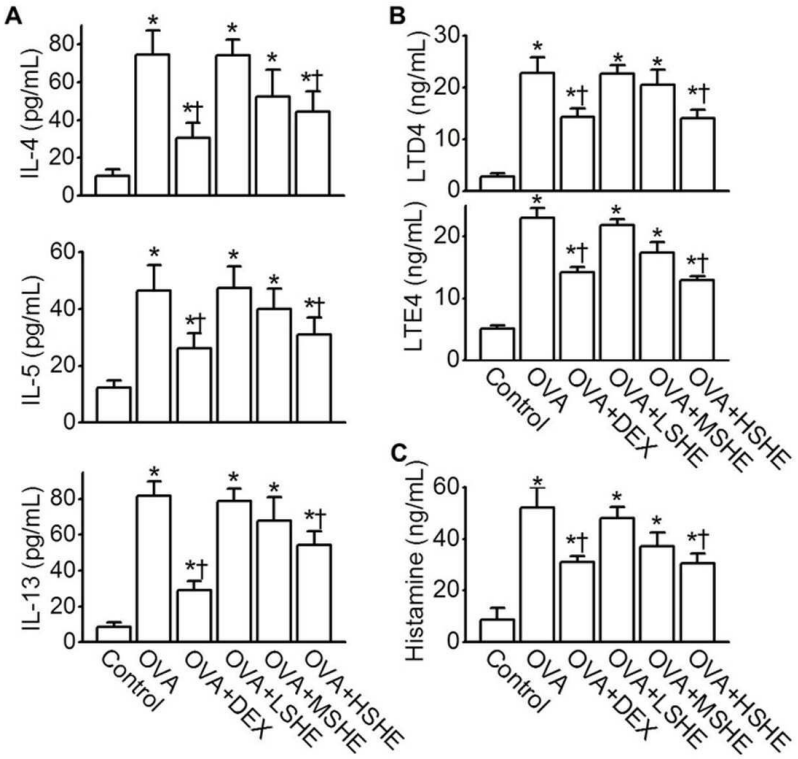
도면1



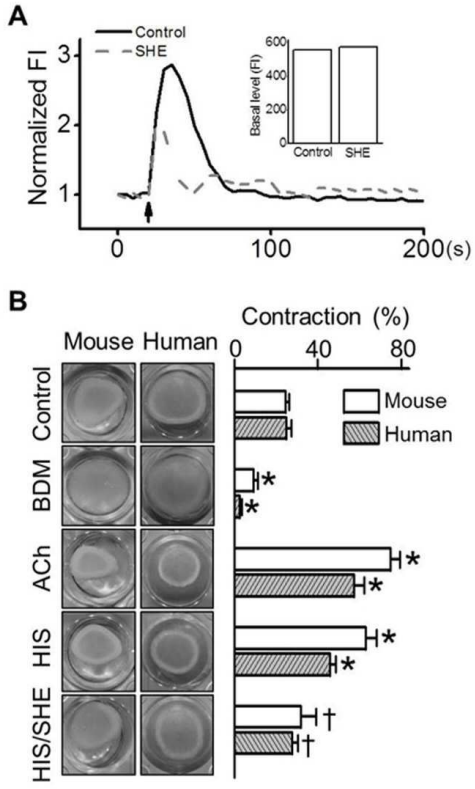
도면2



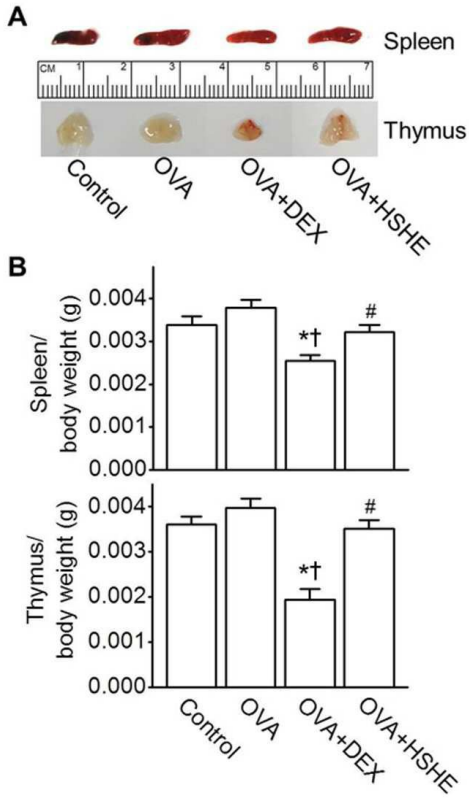
도면3


A
IL-4 (pg/mL)
IL-5 (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
B
LTD4 (ng/mL)
LTE4 (ng/mL)
C
Histamine (ng/mL)
Control
OVA
OVA+DEX
OVA+LSHE
OVA+MSHE
OVA+HSHE

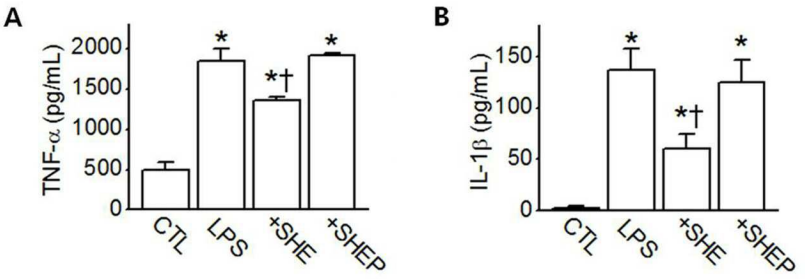
도면4


A
Control
SHE
Normalized FI
Basal level (FI)
0
100
200(s)
B
Mouse Human
Contraction (%)
Control
BDM
ACh
HIS
HIS/SHE
Mouse
Human

도면5


A
Spleen
Thymus
Control
OVA
OVA+DEX
OVA+HSHE
B
Spleen/ body weight (g)
Thymus/ body weight (g)
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
*†
#
Control
OVA
OVA+DEX
OVA+HSHE

도면6


A
TNF-α (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
*
*†
CTL
LPS
+SHE
+SHEP
B
IL-1β (pg/mL)
150
100
50
0