(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 36/65 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년03월10일
(11) 등록번호 10-0558921
(24) 등록일자 2006년03월02일

(21) 출원번호 10-2004-7005837(분할)
(22) 출원일자 2004년04월20일
(62) 원출원 특허10-1996-0707282
원출원일자 : 1996년12월19일
번역문 제출일자 2004년04월20일
(86) 국제출원번호 PCT/GB1995/001471
국제출원일자 1995년06월23일

(65) 공개번호 10-2004-0063127
(43) 공개일자 2004년07월12일
심사청구일자 2000년06월23일
(87) 국제공개번호 WO 1996/00078
국제공개일자 1996년01월04일

(81) 지정국 국내특허 : 아일랜드, 오스트레일리아, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 아이슬랜드, 일본,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 벨라루스, 키르키즈스탐,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장 9412755.2 1994년06월24일 영국(GB)

(73) 특허권자
파이토테크 리미티드
영국,캠스,피이18 8에이치쥐,갓맨체스터,웨스트 스트리트 9,코르퍼스 크리스티 하우스

(72) 발명자
브로스토프조나단
영국 런던 떠블유1피 9피지 19 피츠로이 스퀘어

위틀브라이언앤서니
영국 이스트 요크셔 에치유18 1알티 혼씨 홀 로드 미어클로즈

랫츠만이베뜨
영국 에섹스 아이지8 0디엘 우드포드 그린 92 글렌갈 로드

(74) 대리인
리앤목특허법인
이영필
목영동

심사관 : 여호섭

(54) 한약재 추출물

요약

본 발명은 하기 약초 조합 즉, (a) 적작약 (Radix Paeonia rubra), 감초 (Radix Glycyrrhiza), 및 지황 (Radix Rehmannia) ; (b) 백선피 (Cortex Dictamni), 적작약 (Radix Paeonia rubra), 감초 (Radix Glycyrrhiza), 지황 (Radix Rehmannia), 방풍 (Radix Ledebouriella), 및 백질려 (Fructus Tribuli); 또는 (c) 적작약 (Radix Paeonia rubra), 감초 (Radix Glycyrrhiza), 및 형개 (Spika Schizonepetae) 중 하나 이상의 세트의 달임물 또는 추출물을 포함하는 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용 조성물을 제공한다.

대표도

도 1a

색인어

약초, 아토피성 질병, 습진

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a 는 아토피성 습진 환자의 단핵세포를 사용하여, PSE222 용 검정 (●) 및 위약성 약초 (placebo herbs)의 혼합물 (○) 에 대한 검정에 사용된 테스트 재료의 농도에 대한 CD14 + CD23 + 단핵세포의 퍼센트를 좌표로 나타낸 것이다.

도 1b는 도 1a 와 동일한 데이터를, y 축이 CD23 발현 억제의 퍼센트인 히스토그램으로 나타낸 것이다. 빗금친 블록은 PSE222 데이터를 나타내며 빗금치지 않은 블록은 위약성 대조구를 나타낸다.

도 1c는 정상인의 단핵세포상의 CD23 발현에 PSE222이 끼치는 영향을 도 1a 에서와 같이 나타낸 좌표이다.

도 1d는 도 1c의 데이터를 도 1b와 같은 형태인 히스토그램으로 나타낸 것이다.

도 2는 셀룰로즈 크로마토그래피의 스트립을 물로 추출시켜 얻은 30 개의 분획물 각각에 대한 시험관 내 인간 단핵세포 CD23에 대한 발현 억제 퍼센트를 나타낸다.

도 3은 셀룰로즈 크로마토그래피의 스트립을 메탄올로 추출시켜 얻은 30 개의 분획물 각각에 대하여 시험관 내 인간 단핵세포 CD23에 대한 발현 억제 퍼센트를 나타낸다.

도 4는 PSE222 의 헥산 추출물이 시험관 내 CD23 발현에 끼치는 영향을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 전통 한약재 (Chinese herb)로부터 유도된 물질 및 아토피성 질병, 구체적으로는 아토피성 습진 및 비-아토피성 습진 (non-atopic eczema) 및 건선과 같은 기타 피부 질환 치료에 유용한 상기 물질을 함유하는 약제 조성물에 관한 것이다.

한약재라는 용어는 통상적으로, 중국 한의사에 국한되지 않는 전통 한의사가 사용하는 약초를 의미한다고 이해되어야 한다.

전통 한의사들은 서양에서 사용되는 시스템과는 전혀 다른 해부학 및 진단 시스템을 사용하여 질병을 치료한다. 처방되는 치료제는 통상적으로 달이는 방법 (decoction) 즉, 물에서 한약재를 끓이는 방법을 통하여 사용되도록 조제된 여러 가지 한약재들이다. 이 중 약초를 제거하고 남은 물만 환자에게 경구적 (oral), 비경구적 (parenteral) 또는 국소적 (topical)으로 적절히 투약한다.

상기와 같은 종류의 치료법에 사용되는 처방에는 10 가지 이상의 한약재를 조합하여 사용할 필요가 있으며, 전통 한의학은 균형있는 처방을 위해서는 모든 종류의 약초들이 필요하다고 가르친다. 상이한 징후 및 질환의 증세를 치료하는데 있어서, 상이한 기능을 하는 약초들를 함유함으로써, 처방은 전체적으로 균형있는 것으로 보인다.

낮은 독성을 가졌으며 동시에, 특정 질환에 대하여 임상적으로 허용될 만한 활성을 가진 약초는, 수년에 걸쳐 관찰 및 시행착오를 통하여 확인되어 왔다. 어떤 경우에는 전통 한약재에 의한 처방으로 양약 처방만으로 잘 치료되지 않던 질병이 효과적으로 치료할 수 있다.

다수의 한약재 사용에 반응하는 것으로 보이는 질병은 그 원인이 모호하고 복잡한 질병들이다. 상기 질병의 특정예로서, 여러 가지의 다양한 매개물질 (이들 중 소수만이 알려졌을 뿐임) 에 의하여 시작되고 지속되는 만성 피부 염증인 아토피성 습진을 들 수 있다. 상기 매개물질 중 일부는 항원-항체 반응과 관련이 있다. 기타 많은 매개물질도 그러할 것으로 의심되나, 아직까지 밝혀지지는 않았다. 프로스타글란딘과 같은 특이 염증 매개물질과 반응하는 비-스테로이드성 항-염증 약품과 같은 단일 치료제만으로는 심한 아토피성 습진 치료에는 효과적이지 못하다. 다른 한편으로 코르티코스테로이드는 다중적인 약동학 (藥動學) 적 작용을 하며 습진에 효과적이다. 따라서 심한 아토피성 습진 치료에는 수많은 병리학적 병소 (病巢) (아마 세포 및 체액내의 면역 과정에 관한 병소일 것임) 를 동시에 공격해야 하는 것으로 보인다. 코르티코스테로이드 및 임의의 면역 억제제는 이러한 공격에 요구되는 광범위한 활성을 갖지만, 이들의 사용은 그 독성으로 인하여 제한된다. 습진 치료에 관하여 공지된 전통 한약 치료제에는 코르티코스테로이드 및 면역 억제제에 요구되는 활성은 있는 것으로 보여지나 상기 물질이 지닌 독성은 없는 듯하다.

약물학적 명칭으로 나타내거나 또는 이에 해당하는 북경식 명칭들로 나타낸 하기의 약초들 중에서 선택된 약초인 한약재의 처방은 아토피성 습진 및 건선의 치료에 효과적으로 사용되어 왔다. : 방풍 (Radix Ledebouriella: 防風), 백질려 (Fructus Tribuli: 白疾黎), 위릉채 (Herba Potentilla chinensis: 萎陵菜), 목통 (Caulis Clematis armandii: 木通), 지황 (Radix Rhemania: 地黃), 감초 (Radix Glycyrrhiza: 甘草), 적작약 (Radix Paeonia rubra: 赤芍藥), 백선피 (Cortex Dictamni radicis: 白鮮皮), 죽엽 (Herba Lopatheri: 竹葉) 및 형개 (Spika Schizonepetae: 荊芥). 아토피성 습진이 있는 아이들에 대한 상기 처방의 임상학적 효능은 쉬한 (Sheehan) 등이 British Journal of Dermatology (1992) 126 의 179-184 쪽에 기술되어 있으며, 어른의 경우도 쉬한 (Sheehan) 등이 The Lancet (1992) July 4th 의 13-17 쪽에 기술되어 있다. 아토피성 습진 및 기타 피부 염증 질환 치료에 사용되는 상기 10 가지 약초의 추출물을 조제하는 특정 방법은 GB-A-2254783에 기술되어 있다.

병의 치료에는 상기된 10 가지 약초를 달인 추출물이 효과적이라고 공지되어 있으나, 여러 가지 약초들을 함유하는 복합 처방전의 사용에는 비용이 매우 많이 들기 때문에, 활성 및/또는 안전성의 손상없이 처방될 수 있다면 처방전을 간단히 하는 것이 바람직하다. 중국에서 수입된 약초에 의존하기 보다는 영국 또는 유럽에서 재배될 수 있는 약초에 처방전을 한정하는 것 또한 바람직하다. 따라서 전통 한의학 처방전의 규칙을 밝히려는 많은 시도가 있었다. 그러나 습진의 경우, 천연 약초로 제조한 순수한 물질 또는 그 분획물의 임상학적 활성을 확인하기 위하여 사용할 수 있는 유효한 동물 또는 시험관내 (in vitro) 표본이 없었기 때문에 이를 규명하는 것은 어려운 것으로 알려졌다.

그러나 이제는 아토피성 습진 및 다른 아토피성 질환의 임상학적 효험을 예측할 수 있는 것으로 보이는 시험관 내 검정법 (in vitro assay)이 개발되었으며, 이를 이용하여 본 발명자는 상기 10 가지 약초의 동결-건조된 달임물 (decoction) 내의 활성 성분 (이하 PSE222 로 칭함)을 검출할 수 있었다.

전통적인 중국의 학설에서는 여러 가지 약초가 필요하다고 하나, 본 시험관 내 방법 및 생체 내 임상 실험에 의한 입증 결과, 이 10 가지의 약초의 조합 (subset) 및 이에 포함된 각각의 성분에 의하여 의도하는 임상적 효과가 나타날 수 있음이 밝혀지게 되었다. 더우기, 상기 방법으로써, 아토피성 상태를 악화시키기 시작할 수 있으며 따라서 약제학적 용도를 위해 추출물로부터 제거되는 것이 바람직한 PSE222에 포함되어 있는 성분들도 밝혀내었다.

아토피성 질병 및 특히 아토피성 습진에서는, 피부 세포 및 인간의 말초 혈액에서 얻어지는 단핵세포는 세포 표면 마커 항원 (cell surface marker antigen)인 CD23을 발현시키고, 습진이 성공적으로 치료되는 경우 CD23의 발현이 억제 또는 감소된다는 연구 결과가 있으며, [Takigawa 외 다수, Clin. Exp. Immunol. (1991) 84 275-282쪽 참조], 상기한 시험관 내

효능 테스트는 그러한 연구 결과를 근거로 하는 것이다. 또한 인간의 단핵세포를 시험관 내에서 싸이토카인 인터루킨 4 (IL 4)에 노출시켜 CD23의 발현이 유도될 수 있으며, 동시에 상기 타키가와 (Takigawa)의 논문에 기재된 생체 내 실험 조건에서 아토피성 질병에 효과적이라고 알려진 화합물에 의하여 CD23 발현 유도가 억제될 수 있다. 따라서 이러한 연구 결과가 인간의 말초 혈액에서 얻어지는 단핵세포를 IL4 및 테스트될 활성화제와 동시에 접촉시키는 간단한 시험관내 검정법의 기초가 된다. CD23의 발현량은 CD23에 대한 표지된 단일클론 항체 (monoclonal antibody)의 양을 측정함으로써 측정되며, 시험 물질을 염수 또는 위약 (placebo) 약초 조제물로 대체시킨 대조구에 대한 CD23의 발현 억제율로서 나타내어진다. 상기 시험관 내 테스트에서 CD23의 발현이 상당히 억제되는 것으로부터, 임상 효능을 예측할 수 있는데, 이러한 임상 효능은 아토피성 습진에 임상적이고 효과적으로 사용되어온 상기 나열된 10 가지 약초로 제조한 PSE222 추출물이 검정 결과 CD23의 발현을 50-60 % 억제하는 것으로 나타난다는 사실로부터 설명된다.

본 발명자는 상기 검정법을 사용하여 일반적인 아토피성 질병 및 비-아토피성 습진 및 건선과 같은 특정 질병에도 임상적으로 사용하기에 적당한 PSE222에 함유된 성분을 밝혔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 약제학적 조성물을 이용한 인간이 아닌 동물에서 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

따라서 본 발명의 제1 양상에 의하면, 하기의 한약재들로 이루어진 혼합물의 동결-건조된 달임물에서 추출될 수 있는 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선의 치료에 적당한 재료를 제공하는데:-

방풍 (Radix Ledebouriella)

백질려 (Fructus Tribuli)

위릉채 (Herba Potentilla chinensis)

목통 (Caulis Clematis armandii)

지황 (Radix Rehmannia)

감초 (Radix Glycyrrhiza)

적작약 (Radix Paeonia rubra)

백선피 (Cortex Dictamni radicis)

죽엽 (Herba Lopatheri)

형개 (Spika Schizonepetae)

상기 재료는 상기 동결-건조된 달임물을 수용액 내에서 희석시켜 10 시간 동안 부탄올, 에탄올 및 물을 4:1:1의 비율로 혼합시킨 용매를 사용하여 Whatman 2cm x 55cm 3MM 셀룰로즈 스트립 (strip) 상에서 크로마토그래피 시킨 결과, 동결-건조된 달임물 내에 존재하고 Rf 수치가 0.00-0.100, 0.167-0.300, 0.400-0.533, 0.700-0.833 또는 0.900-0.967의 범위에 있는 성분을 하나 이상 포함한다.

바람직하게는 상기 재료는 Rf 수치가 0.00-0.100의 범위인, 동결-건조된 달임물에 존재하는 상기 성분을 하나 이상 포함한다.

셀룰로즈 스트립을 따라 용매 전단부가 30 cm 정도까지 상승되게 한 후에, 셀룰로즈 스트립을 다시 물로 추출하여 얻은 물로 추출된 성분 물질들은 Rf 수치가 대략 상기된 바와 같고, 이들은 시험관 내에서 처리된 IL4로 처리된 인간 단핵세포상의 CD23 항원을 상당히 감소시킨다. 이 후 셀룰로즈 스트립을 메탄올로 추출하는 경우, Rf 수치가 대략 0.700-0.833 또는 0.900-0.967의 범위에 있는 상기 성분의 메탄올 추출물 또한 시험관 내 조건에서의 CD23의 발현을 상당히 억제시킨다.

더우기 놀라운 것은, 셀룰로즈 스트립을 물로 추출한 후, 메탄올로 추출하였을 때, Rf 수치가 0.067-0.333 및 0.533-0.700의 범위에 있는 메탄올로 추출된 성분들은, CD23 검정법에서 테스트한 결과, 대조구에 비하여 CD 23 항원의 발현을 강화 또는 증가시킨다. 아토피성 또는 비-아토피성 습진 또는 다른 아토피성 질병의 치료제 제조에 있어서 "강화제(enhancer)"의 활성의 존재는 분명히 바람직하지 못하며, 따라서 임상적 활성은 이를 제거시킴으로써 강화될 수 있을 것이다. 상당량의 "강화제" 활성은 PSE222 추출물 또는 상기된 10 가지 약재의 기타 제조물을 헥산과 같은 무극성 용매로 추출함으로써 제거될 수 있다.

따라서 본 발명의 제2 양상에 의하면, 상기 나열된 10 가지 약초를 포함하는 혼합물의 달임물 또는 추출물을 포함하는 아토피성 습진, 비-아토피성 습진 또는 건성 치료용 재료로서, 상기 달임물 또는 추출물에서 헥산 또는 다른 무극성 용매로 추출가능한 성분이 제거된 상기 재료를 제공한다. 상기와 같이 처리된 추출물 및 달임물은 잠재적인 임상 효능을 나타내는 상기 기재되 바와 같은 시험관 검정법에서 인간 단핵세포상의 CD23의 발현을 상당히 억제시키는 것으로 입증된다.

상기 나열된 10 가지 약초들에서 각각 얻어진 달임물의 CD23 발현 억제 능력을 시험관 내에서 테스트하여, 이로부터 양호한 임상 효능을 가질 것으로 예상되는 약초들의 조합들을 밝혀내었다.

본 발명의 제3 양상에 의하면, 실질적으로 기타 다른 한약재 없이, 하기 하나이상의 한약재 조합 (subset)들의 추출물 또는 달임물로 이루어진 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용 재료를 제공한다.

(a) 적작약 (Radix Paeonia rubra)

감초 (Radix Glycyrrhiza)

지황 (Radix Rehmannia)

(b) 백선피 (Cortex Dictamni)

적작약 (Radix Paeonia rubra)

감초 (Radix Glycyrrhiza)

지황 (Radix Rehmannia)

방풍 (Radix Ledebouriella)

백질려 (Fructus Tribuli)

또는

(c) 적작약 (Radix Paeonia rubra)

감초 (Radix Glycyrrhiza)

형개 (Spika Schizonepetae)

바람직하게는 상기 달임물 또는 추출물은 헥산 또는 다른 무극성 용매로 추출될 수 있는 상기 성분들이 제거되도록 처리된다. 상기 (a) 및 (c) 에 특정된 약초의 조합은 모두 유럽에서도 재배될 수 있다는 이점을 갖는다.

본 발명의 제4 양상에 의하면, 다른 한약재들은 실질적으로 포함하지 않고 백선피 (Cortex Dictamni), 적작약 (Radix Paeonia rubra), 지황 (Radix Rehmannia), 감초 (Radix Glycyrrhiza) 또는 형개 (Spika Schizonepetae) 중 하나 이상의 한약재에서 얻어진 추출물 또는 달임물로 이루어진 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 및 건선 치료용 재료를 제공한다. 또한, 바람직하게는 상기 추출물 또는 달임물은 헥산과 같은 무극성 용매로 추출된다.

동결-건조된 달임물과 시판되고 있는 적당한 품질의 섬유성 셀룰로즈를 접촉시킨 후, 상기 부탄올/에탄올/물의 혼합물 또는 부탄올/IMS/물이 4:1:1의 비율로 혼합된 혼합물과 같은 적당한 용매와 혼합시켜 다량의 불활성 재료들을 제거시켜, PSE222 활성 성분을 상업적 규모로 생산할 수 있다. 상기 혼합물을 원심분리시키면, 침전물이 생성되는데, 상기 침전물을 상기 용매 혼합물로 몇 회 재추출한 후, 건조시켜 물과 혼합시켜 약제학적 제조물로서의 조제물용 활성 성분을 추출할 수 있다.

본 발명의 제1, 제2, 제3 및 제4의 양상에 의한 재료들이 상기된 바와 같이 상업적 방법으로 생산되는지에 관계없이, 상기 재료는 업계에 널리 공지된 임의의 적당한 약학적 담체 (carrier) 또는 희석제 (diluent)와 혼합되어 바람직하게는 약제 조성물로서 조제된다. 일반적인 아토피성 질병, 특히 아토피성 습진, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료에 적당한 조성물은 일반적으로 경구적, 국소적 또는 비경구적 투약용으로 조제될 수 있다. 경구적 제제는 예를 들어, 정제, 분말 또는 과립상과 같은 단위 복용 형태 (unit dosage form) 이거나 또는 음용 액체 조제물일 수 있다.

상기 기재된 바와 같은 시험관 내 검정법 (in vitro assay)은 아토피성 습진 및 피부염 치료에 임상적으로 활성을 띄는 것처럼 여겨지는 모든 화합물 또는 조제물 (지리학적 또는 식물학적 기원과는 무관한)에 대한 지표로서 사용될 수 있다.

따라서 본 발명의 제5 양상에 의하면,

(a) 시험관 내에서 말초 혈액 단핵세포, 인터루킨 4 (IL4) 및 활성이 테스트되어야 하는 화합물 또는 조제물을 동시에 또는 순차적으로 배양하는 단계 ;

(b) 상기 단핵세포상의 세포 표면 마커인 CD23의 발현정도를 측정하는 단계 ; 및

(c) 상기 화합물 또는 조제물이 존재하는 경우의 IL4로 유도된 CD23의 발현과 상기 화합물 또는 조제물이 존재하지 않는 경우의 CD23의 발현을 비교함으로써, 상기 화합물 또는 조제물의 아토피성 습진 또는 피부염에 대한 잠재적인 임상 효능을 나타내는 표지로써 단계 (b)에서 얻은 측정치를 사용하는 단계

로 이루어진 아토피성 습진 및 피부염에 대한 화합물 또는 조제물의 임상적 활성을 나타내는 방법을 제공한다.

CD23 발현 억제가 25% 이상인 것은 통계학적으로 상당한 것이며, 화합물 또는 조제물이 임상적으로 유용할 수 있음을 나타내는 것이다.

지금부터 본 발명은 다음의 실시예 및 도면으로 기술될 것이다.

실시예 1

총 중량이 38.8 g 인 다음의 약초들을 1 시간 30 분 동안 300 ml의 물에서 끓였다 :

방풍 (Radix Ledebouriella)

백질려 (Fructus Tribuli)

위릉채 (Herba Potentilla chinensis)

목통 (Caulis Clematis armandii)

지황 (Radix Rehmannia)

감초 (Radix Glycyrrhiza)

적작약 (Radix Paeonia rubra)

백선피 (Cortex Dictamni radicis)

죽엽 (Herba Lopatheri)

형개 (Spika Schizonepetae)

상기 약초를 제거한 후, 달임물을 최종 부피가 50 ml가 될 때까지 끓여서 농축시킨 후 동결-건조시켰다. 동결-건조된 추출물인 PSE222 에서, 1 g의 건조된 추출물은 약 5 g의 약초의 물 추출물을 함유하였다.

아토피성 습진에 대해 공지된 효능이 없는 "위약성 (placebo)" 약초의 달임물을 상기한 바와 동일한 방법으로 조제하였다.

PSE222 및 위약 달임물의 활성을 하기와 같이 수행되는 CD23 억제 검정법 (CD23 inhibition assay) 통해 측정하였다.

헤파린에 저장된 헌혈 지원자들의 혈액을 모아, 피콜 구배 (Ficoll gradient)로 분리하여 말초 혈액의 단핵세포 (mononuclear cell ; monocyte) 를 분리해 냈다. 이후 RPMI 내에서 단핵 세포를 IL4 와 함께 PSE222 또는 위약 조제물이 존재하거나 존재하지 않는 조건 하에서 배양하였다.

이후 단핵세포를 씻어낸 후, 단핵세포 항원인 CD14 및 CD23에 대한 단일클론 항체로써, 플루오레세인으로 표지된 (fluorescein-levelled) 것을 이중으로 착색시켰다. CD14는 현재 단핵세포의 존재를 확인에 유용한 마커이다. 플루오레세인의 수준을 FACScan 분석으로 측정하였으며, 그것은 단핵세포에 의한 CD23의 발현 정도를 나타내 주는 것이다.

결과를 도 1a 내지 도 1d에 나타내었다. 도 1a 및 도 1c에 명백히 나타난 바와 같이, 아토피성 습진 환자 (1a) 및 정상인 (1c)의 단핵세포 모두에서 PSE222는 IL4에 의하여 유도되는 CD23 발현을 억제시켰다. 더우기, 상기 효과는 투여량에 의존하였으며, PSE222를 처리한 경우와 위약을 처리한 경우는 통계학적으로 중요한 차이가 있었다. ($P<0.001$) 도 1b 및 도 1d는 아토피성 습진 환자의 단핵세포에 대해서, 0.125 mg/ml 정도로 PSE222 농도가 낮은 경우 25-30 %라는 통계학적으로 상당한 수치의 CD23 발현 억제가 나타남을 확인하였다. 정상인의 단핵세포의 경우는 PSE222 농도가 약 0.25 mg/ml로 될 때까지 통계학적으로 상당한 억제율은 나타내지 않았다.

상기 결과들에 기초하여, 25-30 % 의 CD23 발현의 억제율은, 이와는 다른 테스트 조제물의 임상적 활성을 예상 및 평가할 수 있는 기준으로 사용된다.

심한 아토피성 습진 환자에 대하여 수행된 임상적 연구에 있어서, 위약성 조제물이 아닌, PSE222 조제물 의하여, 2/3 내지 3/4 의 환자에 대하여 습진의 심한 정도가 60-80 % 감소된다고 나타났다. 이 결과는 통계학적으로 중요하다. ($P = 0.01$)

실시예 2

하기 표 1에 나타낸 각각의 약초들의 달임물 (decoction)을 실시예 1에 기술된 방법으로 조제하여, 각각의 약초에서 건조된 추출물을 제조하였다. 각각의 추출물 1mg (생 약초로는 5mg에 해당하며 PSE222 조제물에서는 이와 동일한 농도로 희석됨) 을 또한 실시예 1에 기술된 방법으로 시험관 내에서 CD23 발현 억제를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타냈으며, 제시된 각각의 수치들은 5 번 실시된 실험의 평균값이다.

[표 1]

농도 (mg/ml)	약초/구성성분	CD23/CD14의 억제 %

	IL4 (대조구, 기준)	0
1	(a) IL4 + PSE222	55.8
1	(b) IL4 + 위약성 약초 (placebo herb)	3.4
0.12	(c) 백선피 (Cortex Dictamni)	43.6
0.11	(d) 적작약 (Radix Paeonia rubra)	48.0
0.05	(e) 감초 (Radix Glycyrrhiza)	47.0
0.30	(f) 지황 (Radix Rehmannia)	20.5
0.07	(g) 방풍 (Radix Ledebouriella)	3.0
0.06	(h) 백질려 (Fructus Tribuli)	4.6
0.08	(i) 위릉채 (Potentilla chinensis)	6.6
0.03	(j) 목통 (Clematis armandii)	16.0
0.04	(k) 형개 (Spika Schizonepetae)	43.6
0.15	(l) 죽엽 (Herba Lopatheri)	16.6

상기 표 1에 나열된 약초 (c) 내지 (l)의 임의의 조합의 임상적 효능을 테스트하여 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[표 2]

약초 조합	임상적 활성	통계학적 검정률
a (PSE222)	++++	P< 0.01
e	±	
d, e, f	+++	
c, d, e, f, g, h	++	P< 0.05
d, e, k	+++	P< 0.05

주의 : ++++ 총 습진 발병률의 70 % 이상 감소.

+++ 총 습진 발병률의 60-70 % 감소.

++ 총 습진 발병률의 60 % 이하 감소.

± 개선됨이 없음.

약초 (e)인 감초의 경우, 어떠한 성분이 국부적으로 적용되었을 경우 임상적 활성이 있다고 알려졌으나, 이것은 스테로이드성 역효과, 예를 들어, 전해액-교란 (electrolyte-disturbing) 과 같은 현상 때문에 이것만을 많은 양으로 경구투약할 수는 없다.

표 1 및 표 2에 나타난 결과로 시험관 내 CD23의 억제현상에 의하여 아토피성 습진에 대한 임상적 효능을 예견할 수 있다고 확증할 수 있다.

실시예 3

PSE222 75 mg을 PRMI 1640 배양 배지에 가한 후 부피를 10 ml로 맞추고 가끔 흔들면서 37 ℃에서 인큐베이팅한 후, 미세 재료 및 다른 조각들을 제거하기 위하여 원심분리하였다. 결과물로 얻은 용액을 1:10의 비율로 희석시킨 후, 500 μl 를 취하여 Whatman 3MM 2 cm × 55 cm 셀룰로즈 스트립에 로딩시켰다. 로딩된 스트립의 말단 부분을 부탄올/에탄올/물을 4:1:1의 비율로 혼합시킨 혼합물에 넣어 상기 용매 전단부가 약 30 cm 이동된 후의 시간인 10 시간 동안 모세관 현상에 의하여 용매를 이동시켰다. 상기 스트립을 밤새 건조시킨 후 2 × 1 cm의 조각으로 잘랐다. 이 조각들을 각각 20 μl/cm^2의

물로 용리시킨 후 상기 용리액을 증발시켜 날려버린 후 500 μl의 PRMI 1640 배양 배지에 재현탁시켜 CD23 검정법을 수행하였다 모두 29 개의 분획물이 제조되었으며 도 2에서는 PSE222 및 위약성 약초와 마찬가지로 각각의 CD23 억제 활성을 보여주고 있다. 이동된 용매의 전단부에 해당되는 스트립 30은 CD23 발현 검정법의 내부 표준물질로서 사용되었다.

도 2에서 나타난 바와 같이, 억제 활성의 최고점들은 특히 분획물 A0 (출발점)에서 관찰되며 이후 분획 1, 3, 6, 7, 8, 14, 15, 21, 25 및 29에서 관찰되는데, 분획물 번호는 출발점에서부터 떨어진 거리 (cm)를 나타낸다. 이러한 분획물들의 Rf 값은 각각 0.00, 0.033, 0.100, 0.200, 0.233, 0.267, 0.467, 0.500, 0.900, 0.833 및 0.967 이다.

2 × 1 cm의 조각을 물로 용리시켜, 용리액을 상기된 바와 같이 분석한 후, 상기 조각들을 건조시켜 20 μl/cm^2의 메탄올로 용리시켰다. 상기 용리액을 다시 증발시켜 날려버린 후, RPMI 1640 배양 배지 500 μl내에 재현탁시켜 CD23 검정법을 수행하였다. 메탄올에 의하여 추출된 각각의 분획물의 CD23 억제 활성 정도는 도 3에 나타내었다. 억제 활성 최고점은 각각의 Rf 값이 0.833, 0.900 및 0.967에 해당하는 25, 27 및 29 번에서 명확히 나타났다.

도 2 및 도 3에 나타낸 활성 분획물 성분들은 아토피성 습진 및 건선은 물론 다른 아토피성 질병의 치료를 위한 약제 조성물에 사용하기 적당하다.

흥미 있는 것은, 각각의 Rf 값이 0.067-0.300 및 0.533-0.700에 해당하는 상기 분획물 2-9 및 16-21 을 물로 추출한 후 메탄올로 추출한 추출물에 대하여 CD23 검정법을 수행하는 경우, CD23의 발현은 억제되기 보다는 상당히 강화되었다는 것이다.

실시예 4

실시예 1에서와 같이 준비된 PSE222 용액을 헥산으로 추출시켰다. 상기 헥산 분획물을 증발 날려버린 후, 상기된 바와 같이 재현탁시키고 CD23 검정법을 수행하였다. 상기 헥산 추출물은 대조구에 비하여 CD23의 발현을 상당히 증가시켰다. 그러나, 그 헥산으로 추출된 PSE222를 이후 물로 추출한 수추출물은 예상했던 CD23의 발현 억제시켰으며 그 결과를 도 4에 나타내었다.

본 실시예는 PSE222의 10 가지 약초 중의 어느 것을 무극성 용매로 추출시켜 임의의 잠재적인 약제 조성물에서 원치 않는 성분을 제거시키는 것의 유용성을 확증하였다.

실시예 5.

실시예 1에 기술된 바와 같은 미세한 분말인 동결-건조된 추출물 1 g을 섬유성 셀룰로즈 10 g과 완전히 혼합시켰다. 시그마 셀룰로즈 # 6663이 적당한 품등이다. 부탄올 ; Industrial Methylated Spirit ; 물 (BIW)을 4:1:1의 비율로 혼합시킨 혼합물 70 ml를 셀룰로즈 혼합물에 가한후 10 분 동안 교반시켰다. 상기 혼합물을 원심분리시켰다. (6000 rpm에서 5 분) 침전물을 30ml의 BIW 로 재현탁시킨후 다시 원심분리시켰다. 이러한 조작을 반복 수행하였으며 60-70 ℃의 진공 오븐에서 상기 침전물을 건조시켰다.

이후 건조된 셀룰로즈 혼합물을 증류수에서 재현탁시켰으며, 10 분동안 교반시킨후 원심분리시켰다. 이후 침전물을 동량의 물로 3 번 더 세척시켰으며 원심분리시킨후 상등액을 포집하였다. 혼합된 상등액을 증발 건조시켰더니 약 20 mg의 갈색 고체를 얻었다.

부형제 (excipient)를 가하여, 캡슐에 채운후 압축시켜 정제형태로 만들거나 또는 약리학적으로 사용가능한 부형약 (vehicle) 내에 용해시켜 제제화하는 경우, 본 재료는 심한 아토피성 습진 환자의 치료에 적당하다. 상기 실시예는 상업적 규모의 PSE222 활성성분의 약제 조제물을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명의 조성물에 의하면, 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물에 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용으로 효과적이다.

본 발명의 방법에 의하면, 인간이 아닌 동물에서 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선을 치료하는대 효과적이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 약초 조합 즉,

적작약 (Radix Paeonia rubra)

감초 (Radix Glycyrrhiza)

지황 (Radix Rehmannia)

의 달임물 또는 추출물을 포함하는 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용 조성물.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

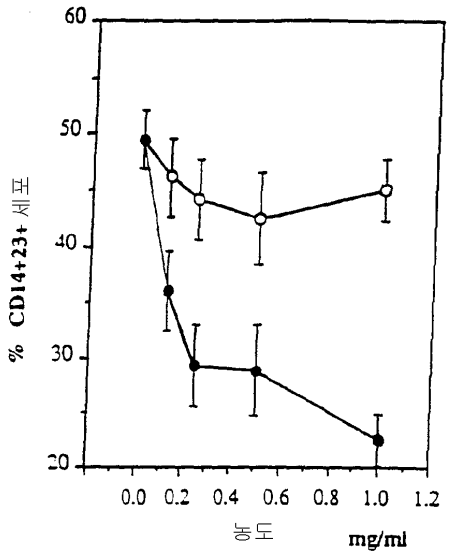
제1항에 따른 조성물과 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8.

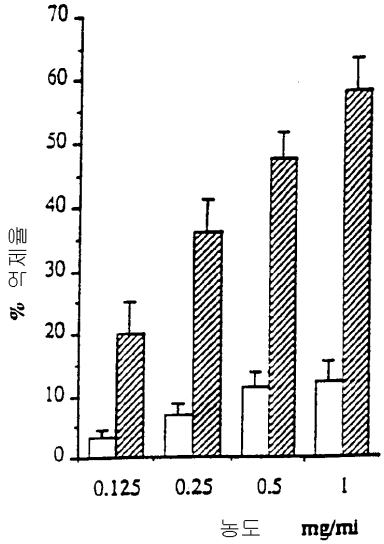
제7항에 따른 약제학적 조성물을 인간이 아닌 동물에 투여하는 단계를 포함하는, 인간이 아닌 동물에서 아토피성 질병, 비-아토피성 습진 또는 건선을 치료하는 방법.

도면

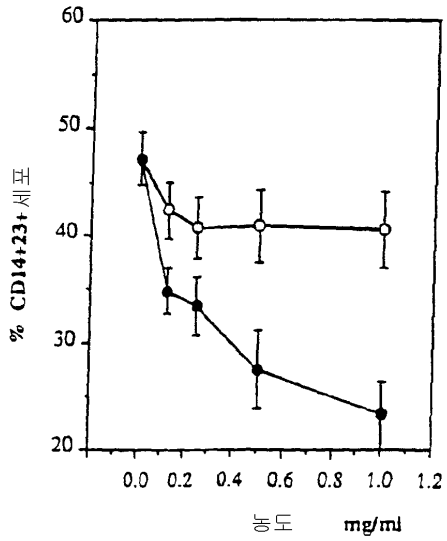
도면1a


60
50
40
30
20
% CD14+23+ 세포
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2
농도
mg/ml

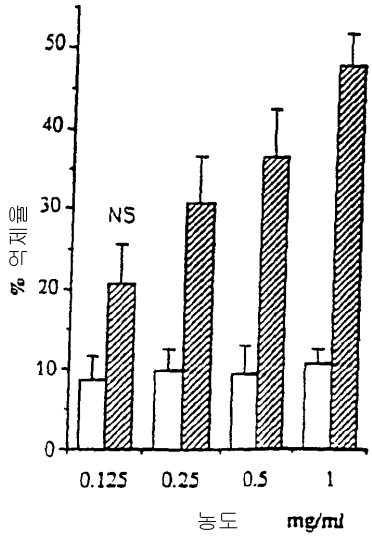
도면1b


70
60
50
40
30
20
10
0
% 억제율
0.125 0.25 0.5 1
농도
mg/ml

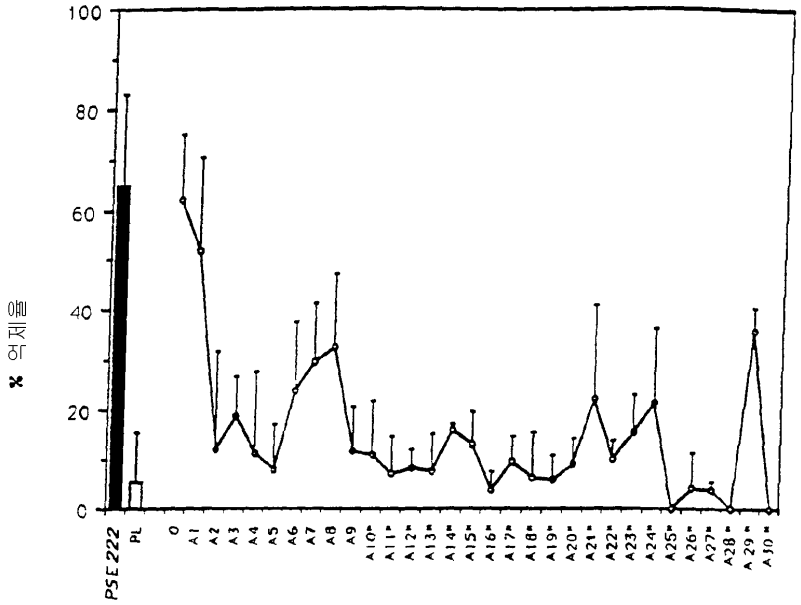
도면1c


60
50
40
30
20
% CD14+23+ 세포
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2
농도 mg/ml

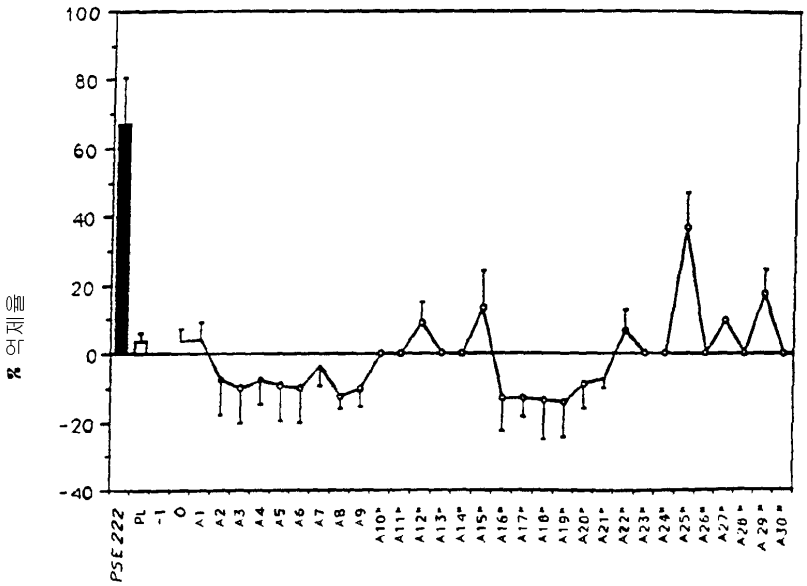
도면1d


50
40
30
20
10
0
% 억제율
NS
0.125 0.25 0.5 1
농도 mg/ml

도면2


% 억제율
100
80
60
40
20
0
PSE222
PL
0
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10*
A11*
A12*
A13*
A14*
A15*
A16*
A17*
A18*
A19*
A20*
A21*
A22*
A23*
A24*
A25*
A26*
A27*
A28*
A29*
A30*

도면3


% 억제율
100
80
60
40
20
0
-20
-40
PSE222
PL
-1
0
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10*
A11*
A12*
A13*
A14*
A15*
A16*
A17*
A18*
A19*
A20*
A21*
A22*
A23*
A24*
A25*
A26*
A27*
A28*
A29*
A30*

도면4

