

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 5월 24일 (24.05.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/067447 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 31/706 (2006.01) A61K 31/7042 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/008805

(22) 국제출원일: 2011년 11월 17일 (17.11.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0114672 2010년 11월 17일 (17.11.2010) KR
10-2011-0120160 2011년 11월 17일 (17.11.2011) KR

(71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)
[KR/KR]; 대전시 유성구 과학로 111, 305-806 Daejeon
(KR).

(72) 발명자: 곽

(75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 안경섭 (AHN, Kyung
Seop) [KR/KR]; 대전시 유성구 어은동 52번지, 305-
806 Daejeon (KR). 장하영 (JANG, Ha Young) [KR/KR];

대전시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).
오세량 (OH, Sei Ryang) [KR/KR]; 대전시 유성구 어은
동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 이형규 (LEE,
Hyeong Kyu) [KR/KR]; 대전시 유성구 어은동 52번지,
305-806 Daejeon (KR). 권옥경 (KWON, Ok-Kyoung)
[KR/KR]; 대전시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Dae-
jeon (KR). 김세미 (KIM, Semi) [KR/KR]; 대전시 유성
구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 서울시 강남구 역삼
동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 135-080 Seoul (KR).

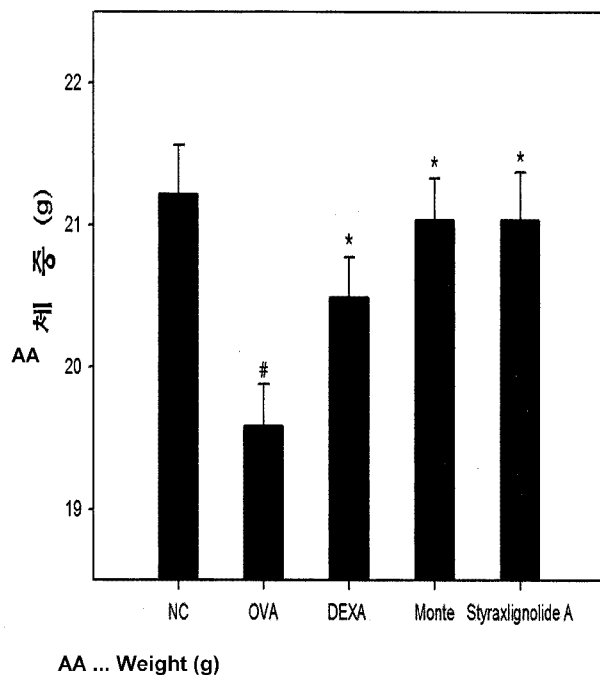
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING STYRAXLIGNOLIDE A OR THE AGLYCON THEREOF AS AN ACTIVE IN-
GREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING ASTHMA

(54) 발명의 명칭: 스티락스리그놀리드 A 또는 이의 비당체를 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a pharma-
ceutical composition containing styraxlignolide A or the
aglycone thereof as an active ingredient for preventing or
treating asthma. More particularly, the styraxlignolide A
compound is separated from the stem and bark of *Styrax*
japonica, and the styraxlignolide A or homoeogonol, which is
the aglycone of styraxlignolide A and which has improved
safety, has the effect of attenuating weight loss and hyper-
sensitivity of the airway, inhibiting the generation of active
oxygen in the airway, inhibiting the generation of IgE, TGF-
 α 1, and IL-17 in the serum and bronchoalveolar lavage fluid,
inhibiting inflammatory cell infiltration in the bronchial
tubes, and inhibiting the formation of a mucous plug and
subepithelial fibrosis in an asthmatic mouse model. There-
fore, the above-described styraxlignolide or homoeogonol can
be effectively used as the active ingredient of a pharmaceu-
tical composition for preventing or treating bronchial asthma
in which airway remodeling has progressed.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2012/067447 A2



(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, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 또는 이의 비당체(aglycone)를 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 때죽나무(*Styrax japonica*)의 줄기 및 껍질에서 분리한 것으로서, 상기 스티락스리그놀리드 A, 또는 이의 비당체로서 안전성을 증가시킨 호모에고놀(homoegonol)은 천식 유도 마우스 모델에서 체중 감소 및 기도과민성을 경감시키고, 기도내 활성 산소 발생량을 억제시키며, 혈청 및 기관지폐포 세척액내 IgE, TGF- β 1 및 IL-17 생성을 억제시킬 뿐만 아니라, 기관지내 염증세포 침윤을 억제하고, 점액마개(mucous plug) 및 기저막하부 섬유화(subepithelial fibrosis)를 억제시키는 효과를 나타내므로, 상기 스티락스리그놀리드 또는 호모에고놀은 기도개형이 진행된 기관지 천식의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물의 유효 성분으로서 유용하게 이용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

스티락스리그놀리드 A 또는 이의 비당체를 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 스티락스리그놀리드 A 또는 이의 비당체를 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

10 **【배경기술】**

전 세계적으로 그 발병률이 증가하고 있는 알러지성 질환에는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 및 천식(asthma), 아토피성 피부염(atopic dermatitis) 및 두드러기(urticaria)가 있다(Wuthrich B. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 90, pp3-10, 1989).

- 15 이러한 알러지성 질환 중 천식(asthma)은 우리나라 인구 중 약 300만명이 고통받고 있다고 추정되고, 기침과 함께 숨소리가 쉼쉼거리는 천명, 숨이 차거나 가슴이 답답한 증상을 특징으로 하는 만성 염증성 호흡기 질환으로 최근들어 대기오염의 심화와 식생활의 서구화로 환자가 급증세를 보이고 있다. 천식은 미국, 영국 등의 선진국에서는 제일 흔한 질환으로 전 인구의 20~30%, 우리나라에서는
- 20 초등학교 학동기 아동의 16%, 성인의 경우 약 5%, 전체 400만 명 이상의 환자가 있다고 추정되고 있으며, 유소아부터 노인까지 전연령층에서 볼 수 있는 질병으로 전체 인구의 10%가 앓고 있을 정도로 흔한 질병이다. 그 원인으로는, 가족 내 알레르기 성향을 유발하는 아토피 체질이 기본적으로 작용함이 밝혀졌고, 기도 과민성과 기도의 호산구염증, 및 Th2 면역반응의 향진이 천식을 일으키는 기본적
- 25 요인으로 보고되었다. 천식으로 인하여 숨쉬기가 힘들고, 심한 기침과 더불어 천명음(숨쉴 때 쉼쉼거리는 소리가 들림)이 나타나며, 2000년도 WHO의 특별보고서에 따르면 전세계적으로 1억 5천만명의 환자가 천식으로 고통받고 있으며 1년에 18만명이 기관지 천식으로 목숨을 잃는다고 한다. 아울러, 질환의 유병율과 중증도가 계속 증가 추세에 있고, 천식으로 인한 의료, 사회적 비용은 폐결핵과
- 30 에이즈의 비용을 합한 것 보다 더욱 크다고 WHO의 특별보고서는 언급하고 있다.

우리나라의 경우에도 80년대 초에 3~4%에 불과하던 소아천식의 유병율이 2배이상 증가하였다. 지난 1998년 발표된 'ISAAC(International Study of Asthma and Allergy in Childhood)' 연구에 따르면 우리나라 소아천식 유병율은 6~7세는 13.3%, 13~14세는 7.7%로 나타났다. 소아 전체로 보면 100명 중 10명이 천식을 앓고 있으며 이 중 50%인 5명은 평생 천식을 앓는다. 더욱 큰 문제는 질환의 유병율뿐만 아니라 질환의 심한 정도도 더욱 증가하고 있다는 데에 문제의 심각성이 있다.

일반적으로 천식은 TH2 타입 면역세포가 생성하는 인터루킨-4, 5, 13에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도주변 조직으로 이동, 침윤하여 나타나는 만성 염증질환으로 인식되고 있다(Elias JA, et al., *J. Clin. Invest.*, 111, pp291-297, 2003). 이 경우 활성화된 호산구, 비만세포, 폐포 대식세포 등의 염증세포가 다양한 염증매개인자들(시스테인 류코트리엔, 프로스타글란딘 등)을 분비하면서 강력한 기관지 수축작용이 과정에서 중요한 역할을 한다(Maggi E., *Immunotechnology*, 3, pp233-244, 1998; Pawankar R., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 1, pp3-6, 2001; Barnes PJ, et al., *Pharmacol Rev.*, 50, pp515-596, 1998).

따라서 염증세포 활성화에 관여하는 IL-4, IL-5, IL-13 등 사이토카인 및 면역글로불린 E의 생산과 이들의 작용으로 호산구 등 염증세포에서 분비되는 시스테인 류코트리엔 생합성 등은 염증 및 알러지 반응과 이로 인한 천식을 유발하는 주요 원인이므로 이들의 생산을 억제하기 위한 약물을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

현재 다양한 치료제가 상용되고 있으나 상당수의 치료제들은 못지 않은 부작용으로 사용시 주의를 요하고 있다. 흡입형 코르티코스테로이드(corticosteroid) 제제가 아직도 제일 중요한 치료제이며 뛰어난 효과를 나타내지만 장기적으로 사용할 경우 용량과 사용시간에 비례하여 부신 억제, 골밀도 감소, 성장 장애, 눈과 피부의 합병증 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 코르티코스테로이드는 오히려 콜라겐의 합성을 증가시킬 수 있다는 보고도 있다(Warshmana GS, et al., *Am J Physiol* 274, 499-507, 1998). 따라서, 만성 지속성 천식환자에 대한 수년간의 코르티코스테로이드 치료에도 불구하고 기도과민성이

정상화되는 천식환자는 드물다. 베타-2 작용물질(agonist)의 장기간 투여도 기도재구성을 억제하지 못하는 것으로 알려져 있으며(Jeffery PK, et al., *Am Rev Respir Dis* 145: 890-0, 1992), 살메테롤(salmeterol) 및 포르메테롤(formeterol)과 같은 지속성 베타-2 작용물질은 천식발작을 예방하면서 오히려 천식환자를 사망케 할 수 있다는 사실도 경고된 바 있다. 이와 같은 다양한 부작용들이 보고되고 있으나 천식 증상을 완화하는 효과가 부작용 위험보다 크다는 판단 아래 계속 처방되고 있다. 그러나, 부작용에 민감한 어린이 천식환자의 성장율을 측정한 결과, 경구용 류코트리엔 길항제(leukotriene antagonist, montelukast)를 복용한 어린이 천식환자의 성장율이 흡입용 코르티코스테로이드제를 사용한 경우보다 1년에 최고 1 cm까지 우수한 것으로 나타났다(Garcia Garcia ML, et al., *Pediatrics* 116(2): 360-9, 2005). 성장기에 천식이 조절되지 않으면 폐는 물론 신체 전반의 성장이 저해될 수 있으므로 꾸준한 치료로 정상적인 폐기능을 유지하는 것이 성장에 필수적이긴 하지만 지속적인 치료에 안전한 약물을 이용, 기도의 염증을 잘 관리하는 것이 무엇보다 중요하다는 것이 밝혀짐으로써 치료제 선택에 있어 천식완화 효과와 더불어 부작용에 대한 신중한 고려가 필요하다. 그러나, 류코트리엔 길항제는 부작용의 빈도가 낮다고 알려져 천식의 예방 및 지속적인 치료에 새로이 사용되고 있지만 천식완화 효과가 다른 약물에 비해 약하고 환자의 삼분의 일에서만 현저한 효과를 보이고 있다. 따라서, 독성이 없고 안전하며 약물 내성을 방지할 수 있는 신규한 천식 치료제의 개발이 요구된다.

매죽나무(*Styrax japonica*)는 진달래목 매죽나무과의 나무로서. 한국, 중국, 일본에 원산이며 갈잎 큰키나무이다. 10~15 m쯤 자라며 추위와 공해에 매우 강하다. 나무껍질은 어두운 갈색이고, 잎은 어긋나고 달걀 모양이거나 긴 타원 모양이며 끝이 뾰족하다. 열매는 핵과인데 9월에 여물며 타원 모양이고 익으면 껍질이 불규칙하게 갈라진다. 매죽나무의 성분은 열매껍질에 약 10%의 에고사포닌이 있고, 종자에는 여러 종류의 글리세리드와 지방유, 에고놀이 들어있으며, 꽃에는 사포닌 성분이 함유되어 있다. 매죽나무는 매마등, 제돈과라 하며 약용하고, 한방에서는 구충, 살충, 흥분성거담, 후두염, 방부제 등에 사용하며, 청화, 거풍제습의 효능이 있어 후통, 아통, 치통, 풍습과절염, 사지통 등을 치료한다고 알려져 있다.

이에, 본 발명자들은 생체 내 부작용 및 안전성 등을 고려하여 생약에 대한 관심을 가지고, 그 중에서도 장기적인 사용이 가능하면서 기도재구성 억제 효과가 있는 천식 치료제 개발에 연구를 진행하던 중, 때죽나무로부터 분리한 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 또는 이의 비당체인 호모에고놀(homoegonol)이 천식 유도 모델에 있어서 현재 천식 치료제로 널리 사용되는 약물보다 뛰어난 기도과민반응 억제 효과, 기관지내 염증세포 침윤억제 효과 및 기도개형(기관지 상피세포 비후, 점액 분비세포의 과증식, 섬유화 진행) 진행의 억제 효과를 가짐을 확인하여, 상기 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀은 천식 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

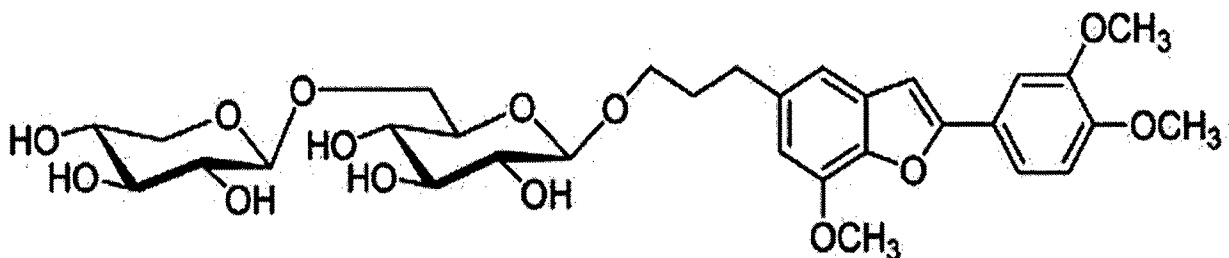
【기술적 과제】

본 발명의 목적은 스티락스리그놀리드 A, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

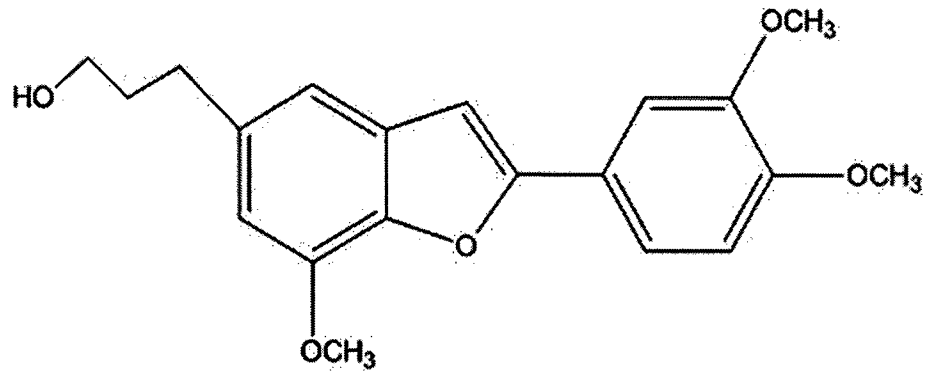
【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 기재되는 스티락스리그놀리드 A 화합물, 하기 화학식 2로 기재되는 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

【화학식 1】



【화학식 2】



아울러, 본 발명은 상기 화학식 1로 기재되는 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 화합물, 상기 화학식 2로 기재되는 이의
 5 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명은 종래의 기술에서 밝혀지지 않은
 10 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 화합물 또는 이의 비당체인 호모에고놀(homoegonol)의 천식에서의 신규한 효과를 밝힌 것으로서, 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀은 천식 유도 모델에 있어서 현재 천식 치료제로 널리 사용되는 약물인 텍사메타손 또는 몬테루카스트 보다 뛰어난
 15 기도과민 반응 억제 효과, 기관지내 염증세포 침윤 억제 효과 및 기도개형(기관지 상피세포 비후, 점액분비 세포의 과증식, 섬유화진행) 진행의 억제 효과를 가짐을 확인하였으므로, 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀은 독성이 낮아 스테로이드에 내성을 보이는 경우, 기도개형이 진행된 경우, 또는 장기적인 천식치료제의 사용이 요구되는 경우와 같은 기관지 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

20

【도면의 간단한 설명】

도 1은 정상 대조군(NC), 천식 유도군(OVA), 텍사메타손이 투여된 천식 유도군(DEXA), 몬테루카스트가 투여된 천식 유도군(Monte) 및 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A가 투여된 천식 유도군(Styraxlignolide

A)에 대한 체중 측정 결과를 나타낸 그래프이다(이하, #: 정상 대조군(NC)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우($p<0.05$), *: 천식 유도군(OVA)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우($p<0.05$)).

도 2는 각각의 실험군에 대한 기도과민성 여부를 기도 저항 정도인 Penh(enhanced pause) 수치로 나타낸 그래프이다.

도 3은 각각의 실험군에 대한 기관지 폐포 세척액 내 염증세포의 수를 나타낸 그래프이다.

도 4는 각각의 실험군에 대한 혈청 내 또는 기관지 폐포 세척액 내 난백알부민 특이 IgE의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 각각의 실험군에 대한 기관지 폐포 세척액 내 활성산소 발생량을 나타낸 그래프이다

도 6은 각각의 실험군에 있어서, 간에 대한 독성을 측정한 그래프이다(이하, **: 텍사메타손 투여군(DEXA)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우 ($p<0.05$)).

도 7은 각각의 실험군에 대한 기도점막내 염증세포 침윤 및 염증지수를 나타낸 그림이다.

도 8은 각각의 실험군에 대한 배상세포(goblet cell) 비율을 나타낸 그림이다.

도 9는 각각의 실험군에 대한 기저막하부 섬유화 부위를 나타낸 그림이다.

도 10은 정상 대조군(SAL+SAL), 천식 유도군(OVA+SAL), 텍사메타손이 투여된 천식 유도군(OVA+Dex), 몬테루카스트가 투여된 천식 유도군(OVA+M) 및 7.5 mg/kg의 호모에고놀(homoegonol)이 투여된 천식 유도군(OVA+hE7.5), 15 mg/kg의 호모에고놀이 투여된 천식 유도군(OVA+hE15) 및 30 mg/kg의 호모에고놀이 투여된 천식 유도군(OVA+hE30)에 대한 체중 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 각각의 실험군에 대한 기도과민성 여부를 기도 저항 정도인 Penh(enhanced pause) 수치로 나타낸 그래프이다.

도 12는 각각의 실험군에 대한 혈청 내 난백알부민 특이 IgE의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 13은 각각의 실험군에 대한 기관지 폐포 세척액 내 난백알부민 특이 IgE의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 14는 각각의 실험군에 대한 기관지 폐포 세척액 내 염증세포의 수를

나타낸 그래프이다.

도 15는 각각의 실험군에 대한 기관지 폐포 세척액 내 TGF- β 1의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 16은 각각의 실험군에 대한 기관지 폐포 세척액 내 IL-17의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 17은 각각의 실험군에 대한 기도점막내 염증세포 침윤 및 염증지수를 나타낸 그림이다.

도 18은 각각의 실험군에 대한 배상세포 비율을 나타낸 그림이다.

도 19는 각각의 실험군에 대한 기저막하부 섬유화 부위를 나타낸 그림이다.

도 20은 호모에고놀의 제조 과정을 나타낸 그림이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

본 발명에서 사용되는 용어를 설명한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "추출물"은 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 하기 분획물도 포함한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "분획물"은 추출 시 이용한 용매와 다른 용매를 이용하여 본 발명에서 목적으로 하는 활성을 분획하여 얻은 활성 분획물(fraction)을 의미한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 천식을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 천식의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

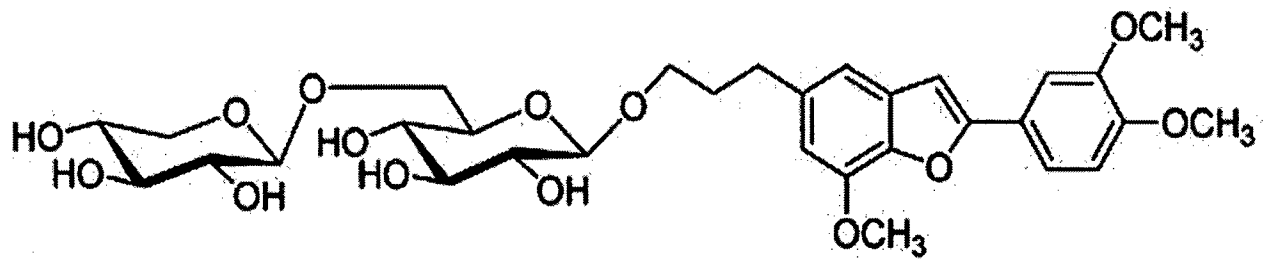
본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 천식의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

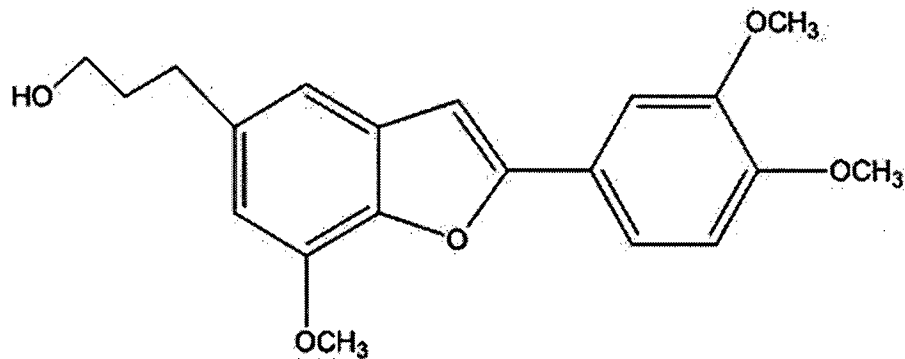
- 5 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 하기 화학식 1로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[화학식 1]



- 10 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물의 비당체는 하기 화학식 2로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[화학식 2]



- 15 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 때죽나무(*Styrax japonica*)로부터 분리한 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 화학적으로 합성한 것을 사용할 수 있다.

상기 때죽나무는 전초를 사용할 수 있고, 줄기 및 나무껍질을 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- 20 상기 천식은 기도개형이 진행된 천식인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명은 상기 화학식 1로 기재되는 화합물, 상기 화학식 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물을 모두 포함한다.

본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 본 발명의 상기 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

동량의 화학식 1 또는 2로 표시되는 상기 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을

흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

상기 화학식 1로 기재되는 스티락스리그놀리드 A 화합물은 하기와 같은 방법으로 분리되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

1) 때죽나무(*Styrax japonica*)를 물, C_1 - C_2 의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 추출물을 추가로 헥산 및 에틸아세테이트를 차례로 가하여 계통분획하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)에서 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 수용액 층에 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 상기 화학식 1로 기재되는 화합물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

이하, 본 발명의 상기 제조방법을 단계별로 설명한다.

먼저, 단계 1)은 때죽나무(*Styrax japonica*)를 물, C_1 - C_2 의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 단계이다.

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 때죽나무는 재배한 것, 채취한 것 또는 시판되는 것 등을 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 때죽나무는 줄기 및 나무껍질을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물, 바람직하게는 C_1 내지 C_2 의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 상기 C_1 - C_2 의 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 더욱 바람직하고, 메탄올인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 추출 용매의 양은 비 건조 중량의 1 내지 50 배인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 방법은 열수추출, 침지추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등 당업계의 통상적인 추출방법은 모두 사용될 수 있으며, 1회 내지

5회 추출될 수 있다. 추출시 온도는 10°C 내지 100°C 인 것이 바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시간은 1일 내지 7일인 것이 바람직하고, 3일인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 때죽나무 추출물을 제조하는 방법은 초임계추출, 아임계추출, 고온추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있으며, 가온하며 환류 추출 또는 상온에서 추출하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 수득한 추출액의 농축은 감압농축의 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조, 상온건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

다음으로, 단계 2)는 단계 1)에서 수득한 추출물로부터 유기용매를 가하여 물 분획물을 수득하는 단계이다.

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 유기용매는 헥산 또는 에틸아세테이트인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 분획물은 때죽나무 추출물을 물에 현탁시킨 후, 헥산, 에틸아세테이트로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 또는 물 분획물 중 어느 하나인 것이 바람직하며, 물 분획물인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 분획물은 상기 때죽나무 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

다음으로, 단계 3)은 단계 2)에서 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 수용액 층에 Diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피 및 RP C-18 컬럼 크로마토그래피를 순차적으로 수행하여 상기 화학식 1의 스티락스리그놀리드 A 화합물을 수득하는 단계이다.

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 크로마토그래피는 메탄올 용매를 사용하여 수행되며 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도
5 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc.에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분
10 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라
15 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어
25 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명에서는 매죽나무(*S. japonica* Sieb. Et Zucc)의 줄기 및 나무껍질 부위를 100% 메탄올로 추출하여 매죽나무 메탄올 추출물을 제조하였다. 이를 추가적으로 물에 현탁한 후 핵산을 가하여 핵산층을 분리하였고, 남은 물층에 다시 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 층을 분획하였으며, 남은 물층을

5 컬럼크로마토그래피를 이용하여 활성분획을 용출하여 본 발명의 스티락스리그놀리드 A를 분리하였다. 그런 다음, 상기 스티락스리그놀리드 A로부터 당류가 제거된 비당체(aglycone)인 호모에고놀(homoeegonol)을 제조하였다(도 20 참조).

본 발명자들은 상기 분리한 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀의 천식 유도 마우스에 대한 체중 감소 억제 효과를 확인하기 위하여, 정상 대조군, 천식 유도군, 천식 유도군의 천식 치료 약물 투여군(덱사메타손 또는 몬테루카스트), 및 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여군의 체중 변화를 측정하였다. 그 결과, 스티락스리그놀리드 A를 경구투여한 천식 유도군(21.04 ± 0.34 g), 및 호모에고놀을 경구투여한 천식 유도군(22.10 ± 0.13 g(7.5 mg/kg), 21.23 ± 0.43 g(15 mg/kg), 및

15 21.98 ± 0.47 g(30 mg/kg))의 경우, 천식이나 기관지 염증 치료에 주로 사용되는 합성 스테로이드제인 덱사메타손(dexamethasone; DEXA) 투여군, 및 기존에 천식치료제로 흔히 사용되고 있는 몬테루카스트(montelukast; Monte) 투여군과 유사하게 정상 대조군에 가까운 체중 회복 효과를 나타냄으로써, 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀은 천식에 의한 체중감소를 효과적으로 억제함을 확인하였다(도 1 및 10

20 참조).

본 발명자들은 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여에 따른 천식 발생에 의한 기도과민성 여부를 확인하기 위하여, 기도 저항 정도인 Penh(enhanced pause) 수치를 측정하였다. 그 결과, 정상 대조군에서는 메타콜린 농도 증가에 따른 완만한 Pehn 수치 증가를 확인할 수 있었는데 반해, 천식 유도군에서는

25 유의적으로 급격히 증가한 Pehn 수치를 확인하였고, 덱사메타손 투여군과 몬테루카스트 투여군에서는 천식 유도군에 비해 유의적으로 감소된 pehn 수치가 나타났으나, 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여군에서는 모든 농도의 메타콜린 처리에 있어서 상기 비교 약물군보다 현저히 감소된 pehn 수치를 확인할 수 있었다(도 2, 표 1 및 도 11 참조).

본 발명자들은 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여에 따른 기관지 폐포 세척액 내의 염증세포수를 분석한 결과, 호산구의 수는 천식 유도군에 비해 약물 투여군에서 모두 유의성있게 감소하였으나, 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여군에서 가장 강력하게 호산구 침윤을 억제하는 것을 확인하였다.

- 5 그 외의 염증세포 수를 포함한 총 염증세포의 수도 천식 유도군에 비해 약물 투여군에서 모두 유의성있게 감소하였다(도 3, 표 4 및 도 14 참조). 또한, 혈청 또는 기관지 폐포 세척액 내 난백알부민 특이 IgE의 농도를 측정한 결과, 혈청 내 총 IgE 농도는 천식 유도군에 비해 호모에고놀 투여군에서 유의적으로 감소하였고(표 2 및 도 12 참조), 기관지 폐포 세척액 내 난백알부민 특이 IgE
- 10 농도는 천식 유도군에 비해 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여군에서 유의성 있게 감소하였다(도 4, 표 3 및 도 13 참조). 기관지 폐포 세척액 내 TGF- β 1 및 IL-17의 생성 역시 호모에고놀 투여군에서 유의적으로 억제되었다(표 5, 도 15 및 16 참조). 아울러, 본 발명자들은 기관지 폐포 세척액으로부터 활성 산소의 발생량을 측정한 결과, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서의 활성 산소
- 15 발생량은 천식 유도군보다 27.90% 감소하였고, 이는 텍사메타손 또는 몬테루카스트 투여군보다 현저히 우수한 활성 산소 생성 억제 효과를 나타내는 것이었다(도 5 참조).

- 본 발명자들은 상기 스티락스리그놀리드 A의 간에 대한 독성을 평가하기 위해, 혈청내 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase, ALT) 및
- 20 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase, AST)를 측정하였다. 그 결과, 혈청 ALT 및 AST의 농도는 천식 유도군에서 보다 텍사메타손 투여군에서 현저하게 증가하였고, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서는 텍사메타손 투여군보다 현저히 낮은 농도를 나타냈다(도 6 참조).

- 본 발명자들은 기도개형이 진행된 천식에 대한 스티락스리그놀리드 A 또는
- 25 호모에고놀의 효과를 알아보기 위하여, H&E 염색 및 조직 절편의 염증지수를 측정하여 점막내 염증세포 침윤, 배상 세포(goblet cell), 기저막하부 섬유화를 확인하였다. 그 결과, 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여군에서 가장 강력하게 염증 세포 침윤을 억제하는 것을 확인하였고(도 7, 표 6 및 도 17 참조), 배상 세포의 비율이 가장 큰 폭으로 감소하는 것으로 나타남으로써
- 30 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀은 가장 강력하게 점액 분비를 억제하는 것을

알 수 있었다(도 8, 표 7 및 도 18 참조). 또한, 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀 투여군에서 가장 현저하게 기저막하부 섬유화가 감소하여 강력하게 기도재구성을 억제하는 것을 알 수 있었다(도 9, 표 8 및 도 19 참조).

따라서, 스티락스리그놀리드 A 또는 호모에고놀은 난백알부민에 의한 천식
 5 유도 동물 모델에서 현재 천식 치료제로서 널리 사용되는
 덱사메타손(dexamethasone) 보다 뛰어난 기도과민 반응 억제 효과를 나타냈고,
 기관지내 염증세포의 침윤을 억제하며, 기도개형(기관지 상피세포 비후, 점액분비
 세포의 과증식 및 섬유화)의 진행을 현저하게 억제하였으나 간에 미치는 독성은
 10 덱사메타손 보다 훨씬 낮으므로, 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체인
 호모에고놀 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 천식 예방 및 치료용 약학적
 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용할 수 있다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의
 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적
 15 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 천식의 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의
 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적
 조성물을 천식에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 천식의 치료 방법을
 제공한다.

20 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.00001 내지 10 mg/kg이고, 바람직하게는
 0.0001 내지 1 mg/kg이나 이에 한정하지 않는다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령,
 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될
 수 있다.

상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는
 25 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는
 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시
 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사,
 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.

30 상기 천식은 기도개형이 진행된 천식인 것이 바람직하나 이에 한정되지

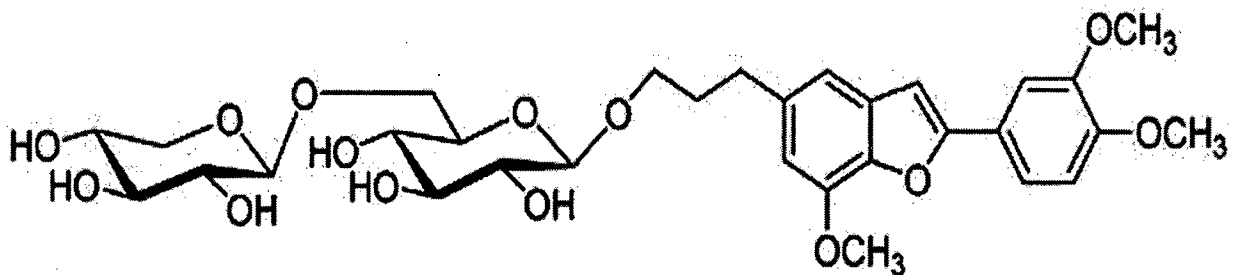
않는다.

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 또는 이의 비당체인 호모에고놀은 천식 유도
 마우스 모델에서 체중감소 및 기도과민성을 경감시키고, 기도내 활성산소 발생량 및
 기관지내 염증세포의 침윤을 억제시키며, 점막내 염증세포 침윤, 배상세포 비율 및
 5 기저막하부 섬유화(subepithelial fibrosis)를 억제시키는 효과를 나타내는 반면에
 간에 대한 독성은 기존의 천식치료제보다 현저히 낮음을 확인하였으므로, 천식의
 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

아울러, 본 발명은 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의
 10 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 개선용
 건강식품용 조성물을 제공한다.

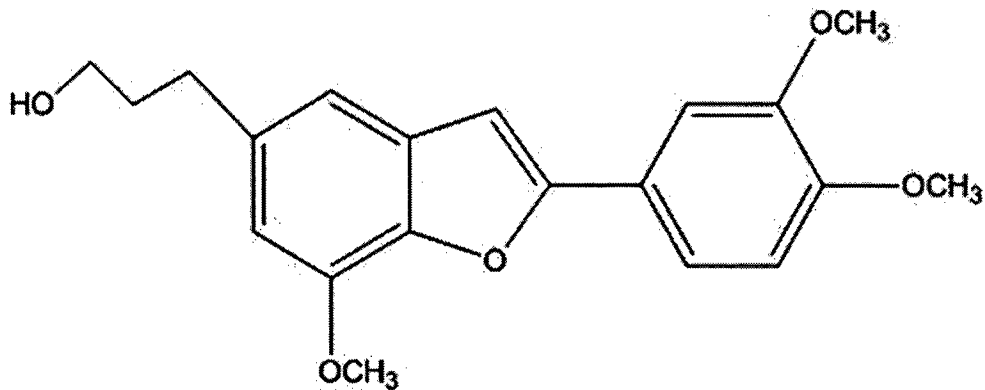
상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 하기 화학식 1로 기재되는 것이
 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[화학식 1]



상기 스티락스리그놀리드 A 화합물의 비당체는 하기 화학식 2로 기재되는
 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[화학식 2]



상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 때죽나무(*Styrax japonica*)로부터 분리한 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 화학적으로 합성한 것을 사용할 수 있다.

- 5 상기 때죽나무는 전초를 사용할 수 있고, 줄기 및 나무껍질을 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 천식은 기도개형이 진행된 천식인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- 10 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 또는 이의 비당체를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

본 발명의 건강식품용 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다.

- 15 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물, 또는 이의 비당체를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- 20 본 발명의 건강음료용 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은

천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

상기 외에 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 또는 이의 비당체는 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 또는 이의 비당체는 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

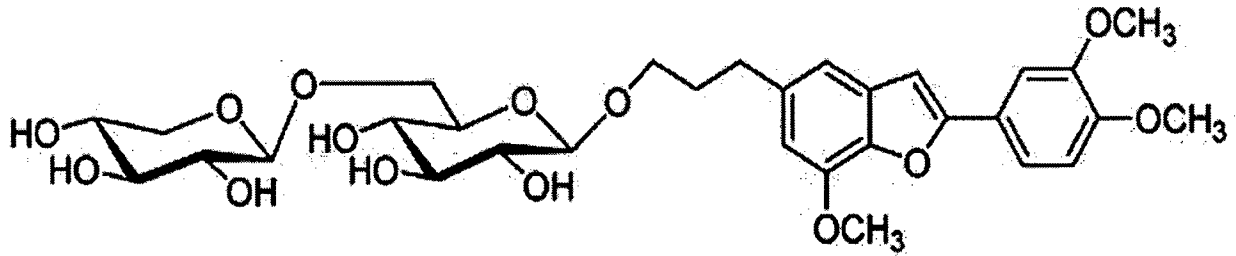
본 발명의 스티락스리그놀리드 A 또는 이의 비당체인 호모에고놀은 천식 유도 마우스 모델에서 체중감소 및 기도과민성을 경감시키고, 기도내 활성산소 발생량 및 기관지내 염증세포의 침윤을 억제시키며, 점막내 염증세포 침윤, 배상세포 비율 및 기저막하부 섬유화(subepithelial fibrosis)를 억제시키는 효과를 나타내는 반면 간에 대한 독성은 기존의 천식치료제보다 현저히 낮음을 확인하였으므로, 천식의 예방 또는 개선을 위한 건강식품용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용할 수 있다.

또한, 본 발명은 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물에 사용하기 위한 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

아울러, 본 발명은 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물에 사용하기 위한 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

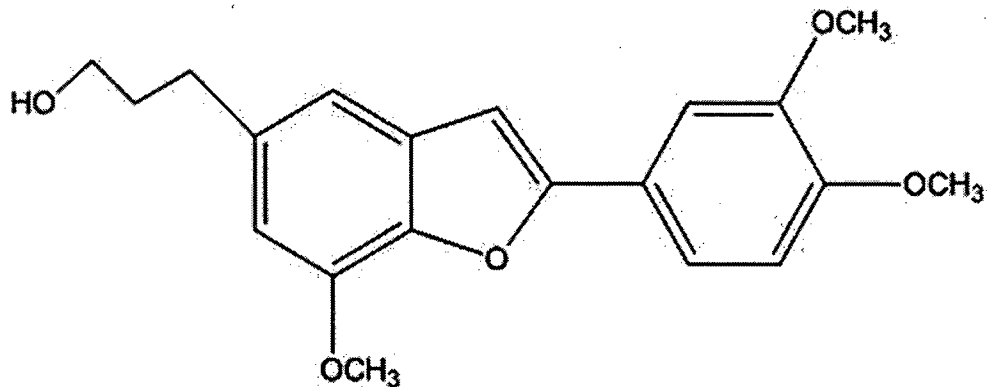
상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 하기 화학식 1로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[화학식 1]



상기 스티락스리그놀리드 A 화합물의 비당체는 하기 화학식 2로 기재되는
5 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[화학식 2]



본 발명의 스티락스리그놀리드 A 또는 이의 비당체인 호모에고놀은 천식 유도
마우스 모델에서 체중감소 및 기도과민성을 경감시키고, 기도내 활성산소 발생량 및
10 기관지내 염증세포의 침윤을 억제시키며, 점막내 염증세포 침윤, 배상세포 비율 및
기저막하부 섬유화(subepithelial fibrosis)를 억제시키는 효과를 나타내는 반면
간에 대한 독성은 기존의 천식치료제보다 현저히 낮음을 확인하였으므로, 천식의
예방 또는 개선을 위한 건강식품용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용할 수
있다.

15

이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 제조예에 의해 보다 상세하게 설명한다.

단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의
범위가 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

20

<실시예 1> 스티락스리그놀리드(Styraxlignoid) A의 제조

매죽나무(*S. japonica* Sieb. Et Zucc., Styracaceae) 줄기 및 나무껍질 120 kg을

채취하여(제주, 대한민국), 5 l의 메탄올(MeOH)로 4회 추출하였다. 추출액을
수득하여 증류수로 현탁한 뒤 다시 헥산(hexane)을 가하여 헥산층을 분리하였고,
남은 물층에 다시 에틸아세테이트(EtOAc)를 가하여 에틸아세테이트층을 분리하여,
남은 물층을 Diaion HP-20 컬럼에 통과시켜 증류수 8 l, 50% MeOH 및 100% MeOH에
5 녹여서 분리하였다. 수득한 메탄올 용해 분획물(MeOH-soluble fraction)은 RP C-18
컬럼 크로마토그래피를 거쳐 50% MeOH, 25% MeOH, 100% MeOH로 녹여서
스티락스리그놀리드(Styraxlignoid) A를 분리하였다.

<실시예 2> 스티락스리그놀리드(Styraxlignoid) A로부터 호모에고놀의 제조

10 호모에고놀의 합성은 기존에 보고된 방법(Xue Fei Yang and Ling Yi Kong,
Chinese Chemical Letters 18, 2007, 380-382 참조)을 활용하되 신규한 단계(단계
3)를 추가하는 합성 경로를 통해 제조하였다. 먼저 단계 1에서 중간체 4를
합성하였고, 단계 2에서 중간체 4와 8을 축합한 후, 트리메톡시 에고놀(trimethoxy
egonol) 전구체인 화합물 10을 제조하였다. 마지막으로 단계 3에서 중간체 10의
15 카르복시산 에스터(carboxylic acid ester)를 알코올로 환원하여 원하는 최종화합물
11(호모에고놀)을 수득하였다(도 20).

<실시예 3> 기관지 천식 유도 실험동물의 제작 및 화합물의 처리

기관지 천식 유도 실험동물을 제작하기 위하여, 평균 체중 20 g 내외의 6주령
20 Balb/c 암컷 생쥐를 사용하였다. 1주간의 적응기간을 가진 후에 기본적인
신체검사상에서 이상이 관찰되지 않은 개체를 대상으로 하였다. 2주 간격으로
수산화알루미늄(A8222, Sigma, St. Louis, MO) 2 mg 및 난백알부민 20 µg(A5503, Sigma,
St. Louis, MO)을 현탁한 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.4)
200 µl를 복강에 주입하여 감작시켰다. 첫 번째 난백알부민 복강투여 후 28일부터
25 30까지 1% 난백알부민을 초음파분무기를 이용하여 30분간 흡입시켰다. 마지막 항원
투여 후 24시간 뒤에 기도과민성을 측정하였고, 48시간 뒤에 치사량의
펜토바비탈(엔토발®, 한림제약주식회사)을 투여한 뒤 체중을 측정하고 기관지
절개를 실시하여 총 1.2 ml의 생리식염수로 기관지 폐포세척을 실시한 뒤 검체를
수거하였다. 정상 대조군(NC)으로는 난백알부민을 투여 및 흡입하지 않은 군, 천식

유도군(OVA)으로는 난백알부민을 투여 및 흡입하여 기관지 천식을 유도한 군, 비교군 1(DEXA)로는 난백알부민 흡입 1시간 전에 덱사메타손(dexamethasone)(3 mg/kg, PO:D4902, Sigma, St. Louis, MO)을 경구투여한 군, 비교군 2(Monte)로는 난백알부민 흡입 1시간 전에 몬테루카스트(montelukast)(30 mg/kg, PO)를 경구투여한 군, 스티락스리그놀리드 A에 대한 실험군으로는 난백알부민 흡입 1시간 전에 스티락스리그노이드(Styraxlignoid) A(30 mg/ml, PO)를 경구투여한 군으로 실험을 진행하였으며 각 군당 8 마리의 흰쥐를 사용하였고, 호모에고놀에 대한 실험군으로는 난백알부민 흡입 1시간 전에 호모에고놀을 7.5 mg/kg 경구투여한 군(hE7.5), 15 mg/kg 경구투여한 군(hE15), 30 mg/kg 경구투여한 군(hE30)으로 실험을 진행하였으며 각 군당 5 마리의 흰쥐를 사용하였다.

<실험예 1> 스티락스리그놀리드 A의 천식 유도 마우스에 대한 체중 감소 억제 효과

스티락스리그놀리드 A의 천식 유도 마우스 체중 감소에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 <실시예 2>에서 제작한 각각의 마우스에 대한 체중을 측정하였다. 이하 모든 측정값의 통계 분석은 여러 변수에 따른 평균값과 표준오차(mean±S.E.)를 계산하였고, 각 집단 간의 비교는 SPSS 10.0을 이용하여 Mann-whitney U 검정을 수행하여 분석하였다. 통계적으로 p값이 0.05 미만인 경우에 유의적 차이가 있다고 판정하였다.

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군(NC)의 체중은 21.22 ± 0.3 g이었으나 천식 유도군(OVA)은 19.59 ± 0.27 g으로 현저한 체중감소를 보이는데 반해 덱사메타손 투여군인 비교군 1(DEXA)은 20.49 ± 0.29 g, 몬테루카스트 투여군인 비교군 2(Monte)는 21.04 ± 0.30 g, 스티락스리그놀리드 A 투여군은 21.04 ± 0.34 g으로 측정되어, 스티락스리그놀리드 A 투여군은 기존의 항천식용 약물 투여군과 유사한 체중회복 효과를 확인할 수 있었다(도 1).

<실험예 2> 스티락스리그놀리드 A의 천식 발생에 의한 기도과민성의 억제 효과

스티락스리그놀리드 A에 의한 천식 발생에 의한 기도과민성 여부는 단일 챔버 체적변동 측정기(one chamber plethysmography, All Medicus, 서울)를 사용한 기도 저항을 측정으로 확인하였으며, 기도 저항의 정도는 Penh(enhanced pause) 수치를 측정하여 평가하였다. Penh 수치의 측정은 정상 호흡 상태에서 기저값을 측정 후 PBS를 초음파분무기를 이용하여 3분간 흡입시킨 후 3분간 측정하였다. 이후, 기관지 천식을 진단하는 일반적인 방법에서 사용되는 히스타민제 메타콜린(A2251, Sigma, St. Louis, MO)을 12, 25, 50 mg/ml의 농도로 점차 증가시키면서 흡입시킨 후 Pehn 수치를 측정하였고, Penh 결과 수치는 하기 수학적 식 1에 나타내었고, 결과 수치는 각 농도의 메타콜린 흡입 후 Penh의 증가 백분율로 표현하고, 기저 Penh (saline challenge)은 100%로 표시하였다.

【수학적 식 1】

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

Te : 호기 시간(expiratory time)(초)

흡기에서 다음 흡기까지

RT : 이완 시간(relaxation time)

호기 동안 호기량이 일회호흡량의 30%가 남을 때까지 걸리는 시간

PEF : 최대 호기률(Peak expiration flow)

PIF : 최대 흡기률(Peak inspiration flow)

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군(NC)에서는 메타콜린 농도 증가에 따른 완만한 Pehn 수치 증가를 나타냈으나, 천식 유도군(OVA)에서는 유의적으로 급격히 증가하는 Pehn 수치를 확인할 수 있었다. 비교군 1(DEXA) 및 비교군 2(Monte)에서도 천식 유도군에 비해서 유의성적으로 감소된 pehn 수치를 확인하였으나, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서는 메타콜린 12.5, 25 또는 50 mg/ml의 농도에서 모두 비교군 보다 감소된 pehn 수치를 확인할 수 있었다(도 2).

<실험예 3> 스티락스리그놀리드 A의 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 억제 효과

상기 <실시예 2>의 각 실험군의 개체로부터 기관지 폐포 세척액을 회수하고, 회수된 즉시 트립판 블루(Trypan blue)로 염색하여 사멸 세포를 제외한 총 세포수를

5 혈구계수기(hemocytometer)를 사용하여 계산한 다음, 사이토스핀(Cytospin) II로 표본 도말 후 Diff-Quick 염색(Sysmex, Switzerland)을 실시하여 호산구와 그 외의 염증세포를 감별 계산하였다.

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 호산구의 수는 정상 대조군(NC)에서 0 ± 0 , 천식 유도군(OVA)에서 622.55 ± 74.18 , 비교군 1(DEXA)에서 41.88 ± 9.08 , 비교군

10 2(Monte)에서 60.67 ± 6.58 , 스티락스리그놀리드 A 투여군에서 20.77 ± 2.34 로 측정되어, 천식 유도군에 비해 약물 투여군에서 호산구 수는 모두 유의적으로 감소하였으나, 특히, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서 가장 강력하게 호산구 침윤을 억제하는 것으로 나타났다. 그 외의 염증세포 수를 포함한 총 염증세포의 수는 정상 대조군에서 10.15 ± 2.05 , 천식 유도군에서 1238.65 ± 101.01 , 비교군 1에서

15 153.48 ± 19.69 , 비교군 2에서 193.29 ± 19.99 , 스티락스리그놀리드 A 투여군에서 147.83 ± 12.61 로 측정되어, 천식 유도군에 비해 약물 투여군에서 모두 유의적으로 감소하였다(도 3).

<실험예 4> 스티락스리그놀리드 A의 기관지 폐포 세척액 내 난백알부민 특이 IgE 억제 효과

스티락스리그놀리드 A 투여에 의한 혈청 및 기관지 폐포 세척액의 난알부민 특이 IgE의 농도를 측정하기 위하여 면역효소법을 이용하였다. 난백알부민을 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 pH 8.3의 0.1 M NaHCO_3 완충액에 녹여 이를 96-웰 플랫 보텀(flat bottom) ELISA 플레이트에 넣어 4°C 에서 밤새 코팅시킨 후, 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin)이 함유된 PBS로 비특이 반응을 억제시키고, 혈청 검체를 1:400으로

25 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 이를 잘 세척한 후, 항-마우스 IgE 단일클론 항체(anti-mouse IgE monoclonal antibody)를 300배

회색하여 2시간 반응시켰다. 그리고 나서 퍼록시다제(oxidase)가 결합된 HRP-결합된 염소 항-랫드 IgG 다클론 항체(HRP-conjugated goat anti-rat IgG polyclonal antibody)를 4000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하였다. 발색은 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질로

5 반응시킨 후 650 nm에서 분광 흡광도를 측정하였다.

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 혈청내 난백알부민 특이 IgE 농도는 천식 유도군(462 ± 79.82 ng/ml)에 비해 스티락스리그놀리드 A 투여군(382 ± 60.60 ng/ml)에서 감소하였지만 유의적이지는 않았으나, 기관지 폐포 세척액 내 난백알부민 특이 농도는 천식 유도군(26.5 ± 2.96 ng/ml)에 비해 스티락스리그놀리드

10 A 투여군(15.4 ± 2.18 ng/ml)에서 유의성 있게 감소하였다(도 4).

<실험예 5> 스티락스리그놀리드 A의 활성산소 발생량 억제 효과

스티락스리그놀리드 A의 투여에 의한 반응성 산소 생성량((Reactive oxygen species)을 측정하기 위하여, 상기 <실시예 2>의 각 개체의 일부 기관지 폐포

15 세척액을 PBS로 세척한 뒤, $10 \mu\text{M}$ 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2,7-dichlorofluorescein diacetate)(35845, Sigma, , St. Louis, MO)를 첨가하여 10 분간 상온 암실에서 방치한 후, spectrofluorometer로 측정하였다($\text{Ex}=480 \text{ nm}$, $\text{Em}=522 \text{ nm}$).

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서의 활성

20 산소 발생량은 천식 유도군 보다 27.90% 감소하였으며, 텍사메타손 비교군 1 및 2 보다 뛰어난 활성 산소 발생량 억제 효과를 나타냈다(도 5).

<실험예 6> 스티락스리그놀리드 A의 간에 대한 독성 평가

스티락스리그놀리드 A의 간 독성을 확인하기 위하여, 시판용 ELISA

25 키트(BECKMAN Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)를 사용하여, 혈청 내 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase, ALT) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase, AST)를 측정하였다.

그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 혈청 ALT 및 AST 농도는 천식 유도군(ALT:

132±19.25 IU/ℓ, AST: 235.33±22.40 IU/ℓ) 보다 비교군 1(DEXA)(ALT: 274.67±12.12 IU/ℓ, AST: 369.33±31.27 IU/ℓ)에서 현저하게 증가하였다. 반면에, 비교군 2(Monte)(ALT: 122.50±14.94 IU/ℓ, AST: 205.00±27.17 IU/ℓ) 및 스티락스리그놀리드 A 투여군(ALT: 168.67±15.56 IU/ℓ, AST: 245.33±12.87 IU/ℓ)에서는 비교군 1 보다
 5 유의적으로 낮은 농도 수치를 확인할 수 있었다(도 6).

<실험예 7> 스티락스리그놀리드 A의 기도개형 억제 효과

<7-1> 기도점막 내 염증세포 침윤 억제

각각의 개체로부터 적출된 폐장은 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를
 10 거쳐 4 μm 두께로 영구조직 절편을 제작하여 헤마톡실린과 에이오신 (H&E) 염색을 실시하였다. H&E 염색 후 각 개체의 조직 절편당 무작위로 5개 부위의 염증지수를 측정하여 평균을 내었다. 염증지수 0 은 기관지 주변에 염증세포가 발견되지 않은 경우, 염증지수 1 은 간헐적으로 염증 세포가 관찰되는 경우, 염증지수 2는 대부분의 기관지 주변에 한층에서 두세층 사이의 얇은 염증세포층이 관찰되는 경우, 염증지수
 15 3은 대부분의 기관지 주변에 두세층에서 다섯층 이하의 염증세포층이 관찰되는 경우, 염증지수 4 는 대부분의 기관지 주변에 다섯층 이상의 두꺼운 염증세포층이 관찰되는 경우로 평가하였다.

그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 천식 유도군에서는 세기관지 주변에 호산구를 비롯한 많은 염증세포가 침윤되어 있었으며 과다 증식된 상피 세포와
 20 비후된 기관지 평활근도 확인할 수 있었다. 반면에 약물을 투여한 군에서는 염증세포의 침윤이 현저하게 감소되어 있었으며 이를 수치화하였을 때 천식 유도군은 세기관지 주변의 염증 지수가 4.00±0.00이었으나 비교군 1(DEXA)은 1.46±0.26, 비교군 2(Monte)는 2.00±0.23, 스티락스리그놀리드 A 투여군은 1.17±0.2로 모두 천식 유도군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 스티락스리그놀리드
 25 A 투여군에서 가장 강력하게 염증 세포 침윤을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 7).

<7-2> 배상세포(goblet cell) 억제

각각의 개체로부터 적출된 폐장은 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 4 μm 두께로 영구조직 절편을 제작하여 파요오드산쉬프(Periodic acid Schiff, PAS) 염색을 통해 감별된 배상세포(goblet cell)가 기관지 상피세포에서 차지하는 비율을 측정하여 배상세포 증식 정도를 평가하였다.

그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군에 있어서, 배상세포는 세기관지 상피세포에서 차지하는 비율이 $0.65 \pm 0.91\%$ 이었으나, 천식 유도군에서는 $57.52 \pm 6.19\%$ 로 증가하였으며 이는 비교군 1(DEXA)($34.96 \pm 6.86\%$), 비교군 2(Monte)($37.05 \pm 7.19\%$), 스티락스리그놀리드 A 투여군($29.52 \pm 8.02\%$)에서 유의적으로 감소하였으나, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서 가장 큰 감소폭을 보여 강력하게 점액분비를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

<7-3> 기관지 하부의 섬유화 억제

기관지 하부의 섬유화 정도를 측정하기 위하여, 각각의 개체로부터 적출된 폐장은 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 4 μm 두께로 영구조직 절편을 제작하여 Masson's trichrome 염색을 실시하여 기저막 하부에 염색되는 세포외기질(extracellular matrix) 부위의 면적을 측정한 뒤, 기저막 둘레의 길이 100 μm 당 섬유화 염색부위의 면적을 계산하였다. 모든 측정은 computerized image analyzer 프로그램을 이용하였다.

그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 기저막 둘레의 길이 100 μm 당 섬유화 염색부위의 면적은 정상 대조군에서 $371.25 \pm 100.39 \mu\text{m}^2$ 이었고, 천식 유도군에서는 $2173.88 \pm 275.27 \mu\text{m}^2$ 로 정상의 7배 가량 증가하였다. 섬유화는 비교군 1(DEXA)($639.59 \pm 106.96 \mu\text{m}^2$), 비교군 2(Monte)($991.75 \pm 108.35 \mu\text{m}^2$), 스티락스리그놀리드 A 투여군($495.69 \pm 98.62 \mu\text{m}^2$)에서 모두 유의적으로 감소하였으나, 스티락스리그놀리드 A 투여군에서 가장 많이 감소하여 강력하게 기도재구성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 9).

<실험예 8> 호모에고놀의 천식 유도 마우스에 대한 체중 감소 억제 효과

호모에고놀의 천식 유도 마우스 체중 감소에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 <실시예 2>에서 제작한 각각의 마우스에 대한 체중을 측정하였다. 이하 모든 측정값의 통계 분석은 여러 변수에 따른 평균값과 표준오차(mean±S.E.)를 계산하였고, 각 집단 간의 비교는 SPSS 10.0을 이용하여 Mann-whitney U 검정을 수행하여 분석하였다. 통계적으로 p값이 0.05 미만인 경우에 유의적 차이가 있다고 판정하였다.

그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군의 체중은 21.96 ± 0.25 g이었으나 천식 유도군은 18.52 ± 0.45 g으로 현저한 체중감소를 보이는데 반해, 비교군 1(DEXA)(19.98 ± 0.39 g), 비교군 2(Monte)(21.08 ± 0.57 g), 호모에고놀을 7.5 mg/kg 경구투여한 군 (22.10 ± 0.13 g), 15 mg/kg 경구투여한 군 (21.23 ± 0.43 g), 30 mg/kg 경구투여한 군 (21.98 ± 0.47 g), 비교군 1(DEXA)을 제외한 약물 투여군은 모두 정상 대조군에 가까운 체중회복을 확인할 수 있었다(도 10).

<실험예 9> 호모에고놀의 천식 발생에 의한 기도과민성의 억제 효과

호모에고놀의 천식 발생에 의한 기도과민성 여부를 확인하기 위하여, 상기 <실험예 2>의 방법에 Penh 값을 측정하였다.

그 결과, 표 1 및 도 11에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군에서는 메타콜린 농도 증가에 따른 완만한 penh 수치 증가를 확인하였으나, 천식 유도군에서는 유의성 있게 급격한 penh 수치의 증가를 확인할 수 있었다. 반면, 비교군 1(DEXA), 비교군 2(Monte) 및 호모에고놀 투여군(hE7.5, hE15 및 hE30)에서는 메타콜린 농도에 상관없이 천식 유도군 보다 유의하게 감소되었으며, 호모에고놀의 처리 농도가 증가함에 따라 더욱 감소하는 양상을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 차이는 저농도의 메타콜린 보다는 고농도의 메타콜린을 흡입시켰을 때 더욱 뚜렷한 차이를 나타내었다.

【표 1】

구분	Penh 수치			
	0 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml

hE7.5	0.6003 ± 0.0500	1.1399 ± 0.1279	1.4067 ± 0.1279	1.4317 ± 0.2094
hE15	0.4538 ± 0.0376	0.7989 ± 0.0736	1.0243 ± 0.1881	1.0918 ± 0.1914
hE30	0.4736 ± 0.0420	0.6516 ± 0.0914	0.9515 ± 0.1268	1.0576 ± 0.1582
정상 대조군(NC)	0.3231 ± 0.0351	0.3897 ± 0.0501	0.5210 ± 0.0710	0.6763 ± 0.0678
천식 유도군(OVA)	0.9621 ± 0.1292	4.5805 ± 0.4980	7.2499 ± 0.5919	8.8944 ± 0.9386
비교군 1(DEXA)	0.4407 ± 0.0422	0.7768 ± 0.1475	0.8900 ± 0.1619	1.1036 ± 0.4048
비교군 2(Monte)	0.6071 ± 0.0618	1.2979 ± 0.1537	1.4748 ± 0.1639	2.3069 ± 0.4225

<실험예 10> 호모에고놀의 혈청 및 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 측정

호모에고놀의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여, 천식의 중증도와 상관관계가 있는 IgE 농도를 측정하기 위해 상기 <실험예 4>의 방법에 따라 혈청 및
5 기관지 폐포 세척액 내 IgE를 측정하였다.

그 결과, 하기 표 2 및 도 12에 나타난 바와 같이, 혈청 내의 IgE 항체의 농도를 측정한 결과, 혈청 내 IgE 항체 농도는 천식 유도군(OVA)($11.85 \pm 2.6994 \mu\text{g/ml}$)에 비해 본 발명의 호모에고놀을 투여한 군에서는 $19.22 \pm 4.9287 \mu\text{g/ml}$ (hE7.5), $10.74 \pm 3.4612 \mu\text{g/ml}$ (hE15), 및 $8.14 \pm 5.9682 \mu\text{g/ml}$ (hE30)로 측정되어
10 호모에고놀의 농도에 따라 유의성 있게 혈청 내 IgE 항체가 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 하기 표 3 및 도 13에 나타난 바와 같이, 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 항체 농도는 천식 유도군($146.5745 \pm 18.7560 \text{ ng/ml}$)에 비해 호모에고놀을 투여한 군에서는 $65.5957 \pm 11.6656 \text{ ng/ml}$ (hE7.5), $48.4894 \pm 4.1926 \text{ ng/ml}$ (hE15), 및 $23.8085 \pm 3.3515 \text{ ng/ml}$ (hE30)로 측정되어 호모에고놀 농도에 따라 기관지 폐포
15 세척액 내 IgE 항체가 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

【표 2】

	혈청 내의 총 IgE 농도 ($\mu\text{g/ml}$)
hE7.5	10.34 ± 6.0548
hE15	9.94 ± 5.0656
hE30	8.62 ± 2.4844

정상 대조군(NC)	5.98 ± 0.4775
천식 유도군(OVA)	20.58 ± 3.3923
비교군 1(DEXA)	9.14 ± 2.0591
비교군 2(Monte)	16.22 ± 2.6329

【표 3】

	기관지 폐포 세척액 내의 총 IgE 농도 (ng/ml)
hE7.5	65.5957 ± 11.6656
hE15	48.4894 ± 4.1926
hE30	23.8085 ± 3.3515
정상 대조군(NC)	7.2979 ± 2.6622
천식 유도군(OVA)	146.5745 ± 18.7560
비교군 1(DEXA)	24.3617 ± 4.8149
비교군 2(Monte)	104.7447 ± 9.7295

<실험예 11> 호모에고놀의 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 억제 효과

5 호모에고놀의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여, 상기 <실험예 3>의 방법에 따라 천식과 관련이 있는 염증세포 수의 증감을 측정하였다.

그 결과, 하기 표 4 및 도 14에 나타낸 바와 같이, 총 염증세포의 수는 정상 대조군에서 6.68 ± 0.7626 , 천식 유도군에서 225.00 ± 23.6323 , 비교군 1(DEXA)에서 20.04 ± 4.7744 , 비교군 2(Monte)에서 67.96 ± 15.0532 , 호모에고놀 투여군에서 각각
 10 42.80 ± 7.2060 (hE7.5), 39.72 ± 4.4400 (hE15) 및 33.88 ± 8.1589 (hE30)로 측정되어 천식 유도군에 비해 호모에고놀 투여군에서 모두 염증세포가 유의성 있게 감소하였다. 특히, 조직에 침투하여 세포성 매개 면역에 주로 관여하는 세포로서, 세포, 비장 및 호흡기 등에 걸쳐 퍼져있고, 염증성 단백질을 함유하고 있어, 천식 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 호산구의 수는 정상 대조군에서
 15 0.00 ± 0.00 , 천식 유도군에서 108.88 ± 14.09 , 비교군 1에서 1.32 ± 0.49 , 비교군 2는 19.12 ± 9.17 , 호모에고놀 투여군에서 각각 12.80 ± 2.50 (hE7.5), 6.32 ± 0.86 (hE15), 및 5.48 ± 2.02 (hE30)로 측정되어, 천식 유도군에 비해 호모에고놀 투여군에서 모두

유의성 있게 감소하였다.

【표 4】

구분	세포 수 ($\times 10^3$ 세포/마우스)		
	호산구 (eosinophil)	그 외 염증 세포 (other cell)	총 염증 세포 (total cell)
hE7.5	12.80 ± 2.50	33.40 ± 2.3467	42.80 ± 7.2060
hE15	6.32 ± 0.86	30.00 ± 2.8267	39.72 ± 4.4400
hE30	5.48 ± 2.02	28.4 ± 3.1739	33.88 ± 8.1589
정상 대조군(NC)	0.00 ± 0.00	6.68 ± 0.7626	6.68 ± 0.7626
천식 유도군(OVA)	108.88 ± 14.09	116.12 ± 5.9846	225.00 ± 23.6323
비교군 1(DEXA)	1.32 ± 0.49	18.72 ± 2.2919	20.04 ± 4.7744
비교군 2(Monte)	19.12 ± 9.17	48.84 ± 3.7377	67.96 ± 15.0532

5 <실험예 12> 호모에고놀의 기관지 폐포 세척액 내 TGF- β 1 및 IL-17 억제 효과

호모에고놀의 기도개형에 대한 효과를 알아보기 위하여 기관지 폐포 세척액내 TGF- β 1 및 IL-17 생성을 측정하였다.

10 그 결과, 하기 표 5, 도 15 및 도 16에 나타낸 바와 같이, 호모에고놀 투여군은 천식 유도군에 비해 기관지 폐포 세척액 내의 TGF- β 1 및 IL-17를 유의성 있게 억제하였다.

【표 5】

	기관지 폐포 세척액 내의 TGF- β 1 농도 (pg/ml)	기관지 폐포 세척액 내의 IL-17 농도 (pg/ml)
hE7.5	216.1875 ± 13.5904	70.3409 ± 14.2912
hE15	190.4375 ± 13.0702	43.5682 ± 2.9102
hE30	186.8125 ± 6.4551	27.3863 ± 5.7881

정상 대조군(NC)	50.6875 ± 44.8720	3.8863 ± 1.2613
천식 유도군(OVA)	376.8125 ± 24.2240	97.5682 ± 18.1885
비교군 1(DEXA)	159.2813 ± 12.9548	48.8409 ± 4.3738
비교군 2(Monte)	215.9375 ± 13.4334	15.8409 ± 2.5686

<실험예 12> 호모에고놀 투여에 의한 조직병리학적 분석

호모에고놀의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여, 기관지 폐포 세척을 수행하지 않은 폐를 분리하여 상기 실험예 <7-1>의 방법에 따라 조직병리학적 5 검사를 수행하였다. 이때, 항원이 야기된 기관지에서는 호산구, 호중구 및 대식세포로 이루어진 염증성 세포의 침윤이 관찰되므로, 이를 검출하고자 하였다.

그 결과, 천식 유도군에서는 세기관지 주변에 호산구를 비롯한 많은 10 염증세포가 침윤되어 있었으며 과다 증식된 상피세포와 비후된 기관지 평활근도 확인되었다. 반면, 표 6, 및 도 17에 나타낸 바와 같이, 약물을 투여한 군에서는 염증세포의 침윤이 현저하게 감소되어 이를 수치화하였을 때 천식 유도군은 세기관지 주변의 염증 지수가 2.75 ± 0.1083 이었으나, 비교군 1(DEXA)은 0.78 ± 0.1315 , 비교군 2(Monte)는 1.70 ± 0.2470 , 및 호모에고놀 투여군은 각각 1.67 ± 0.1491 (hE7.5), 1.40 ± 0.1549 (hE15), 및 1.00 ± 0.2449 (hE30)로 모두 천식 15 유도군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 혈관 주변의 염증 지수는 천식 유도군에서 32.81 ± 0.0976 로 나타났으나, 비교군 1(DEXA)은 0.44 ± 0.1571 , 비교군 2(Monte)는 2.20 ± 0.1897 , 및 호모에고놀 투여군은 1.89 ± 0.1791 (hE7.5), 1.70 ± 0.1449 (hE15), 및 1.30 ± 0.2025 (hE30)로 모두 천식 유도군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

20 【표 6】

	염증 지수	
	세기관지 주위	혈관 주위
hE7.5	1.67 ± 0.1491	1.89 ± 0.1791
hE15	1.40 ± 0.1549	1.70 ± 0.1449
hE30	1.00 ± 0.2449	1.30 ± 0.2025
정상 대조군(NC)	0.10 ± 0.0949	0.00 ± 0.00

천식 유도군(OVA)	2.75 ± 0.1083	2.81 ± 0.0976
비교군 1(DEXA)	0.78 ± 0.1315	0.44 ± 0.1571
비교군 2(Monte)	1.70 ± 0.2470	2.20 ± 0.1897

<실험예 13> 호모에고놀의 비상세포 억제 효과

상시 실험예 <7-2>의 방법에 따라, 과요오드산취프(Periodic acid Schiff) 염색을 통해 감별된 비상세포(goblet cell)가 기관지 상피세포에서 차지하는 비율을 측정하여 비상세포 증식 정도를 평가하였다.

그 결과, 표 7 및 도 18에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군에서 비상세포가 세기관지 상피세포에서 차지하는 비율은 $2.7741 \pm 0.7381\%$ 이었지만 천식 유도군에서는 $55.5196 \pm 1.3706\%$ 로 증가하였으며, 이는 비교군 1(DEXA)에서는 $18.7828 \pm 5.9397\%$, 비교군 2(Monte)에서는 $34.6476 \pm 11.5492\%$ 로 감소하였으며, 호모에고놀 투여군은 $36.5600 \pm 11.5613\%$ (hE7.5), $32.4109 \pm 10.8037\%$ (hE15), 및 $25.0956 \pm 3.4033\%$ (hE30)로 모두 천식 유도군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

【표 7】

	배상세포 % / 기관지 상피세포 단위
hE7.5	36.5600 ± 11.5613
hE15	32.4109 ± 10.8037
hE30	25.0956 ± 3.4033
정상 대조군(NC)	2.7741 ± 0.7381
천식 유도군(OVA)	55.5196 ± 1.3706
비교군 1(DEXA)	18.7828 ± 5.9397
비교군 2(Monte)	34.6476 ± 11.5492

<실험예 14> 호모에고놀의 기저막하부의 섬유화 억제 효과

상기 실험예 <7-3>의 방법에 따라, 기저막하부의 섬유화 정도를 측정하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 시행하여 기저막하부에 염색되는 세포외 기질(extracellular matrix) 부위의 면적을 측정한 뒤, 기저막 둘레의 길이 $100 \mu\text{m}$

당 섬유화 염색부위의 면적을 계산하였다.

그 결과, 표 8 및 도 19에 나타낸 바와 같이, 기저막 둘레의 길이 100 μm 당 섬유화 염색부위의 면적은 정상 대조군에서 $195.95 \pm 19.0464 \mu\text{m}^2$ 였고, 천식 유도군에서는 $1907.34 \pm 85.3287 \mu\text{m}^2$ 로 정상치의 10 배 가량 증가하였다. 섬유화는 비교군 1(DEXA)에서 $308.77 \pm 49.0266 \mu\text{m}^2$, 비교군 2(Monte)에서 $537.98 \pm 72.4581 \mu\text{m}^2$, 호모에고놀 투여군은 각각 $527.25 \pm 71.3953 \mu\text{m}^2$ (hE7.5), $425.64 \pm 64.6798 \mu\text{m}^2$ (hE15), 및 $320.99 \pm 46.2236 \mu\text{m}^2$ (hE7.5)로 측정되어 모두 천식 유도군에 비해 섬유화가 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

10 【표 8】

	$\mu\text{m}^2/\text{기저막의 } 100 \mu\text{m}$
hE7.5	527.25 ± 71.3953
hE15	425.64 ± 64.6798
hE30	320.99 ± 46.2236
정상 대조군(NC)	195.95 ± 19.0464
천식 유도군(OVA)	1907.34 ± 85.3287
비교군 1(DEXA)	308.77 ± 49.0266
비교군 2(Monte)	537.98 ± 72.4581

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

<1-1> 산제의 제조

15 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 2 mg
 유당 1 g
 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<1-2> 정제의 제조

20 본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 100 mg
 옥수수전분 100 mg
 유당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

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

5 <1-3> 캡슐제의 제조

본 발명의 호모에고놀 화합물 100 mg

옥수수전분 100 mg

유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

10 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<1-4> 환의 제조

본 발명의 호모에고놀 화합물 1 mg

15 유 당 1.5 g

글리세린 1 g

자일리톨 0.5 g

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

20

<1-5> 과립의 제조

본 발명의 호모에고놀 화합물 150 mg

대두 추출물 50 mg

포도당 200 mg

25 전분 600 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

<제조예 2> 식품의 제조

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<2-1> 밀가루 식품의 제조

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고,
5 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

10

<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

15

<2-4> 유제품(dairy products)의 제조

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<2-5> 선식의 제조

20

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

25

본 발명의 스티락스리그놀리드 A 화합물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 스티락스리그놀리드 A 화합물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

30

종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

스티락스리그놀리드 A 화합물(3 중량부),
영지(0.5 중량부),
지황(0.5 중량부)

5 <제조예 3> 음료의 제조

<3-1> 건강음료의 제조

액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은
부재료와 본 발명의 호모에고놀 5 mg을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를
유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

10

<3-2> 야채 주스의 제조

본 발명의 호모에고놀 화합물 5 mg을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에
가하여 야채 주스를 제조하였다.

15 <3-3> 과일 주스의 제조

본 발명의 호모에고놀 화합물 1 mg을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에
가하여 과일 주스를 제조하였다.

20

25

30

【청구의 범위】

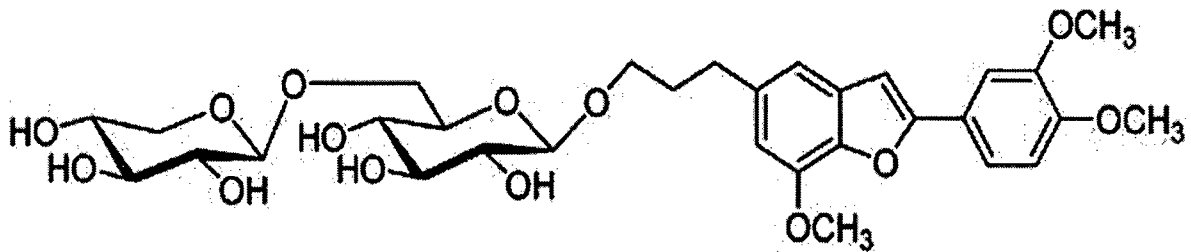
【청구항 1】

스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 화합물, 이의 비당체(aglycone) 또는
 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료용
 5 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 하기 화학식 1로
 기재되는 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물:

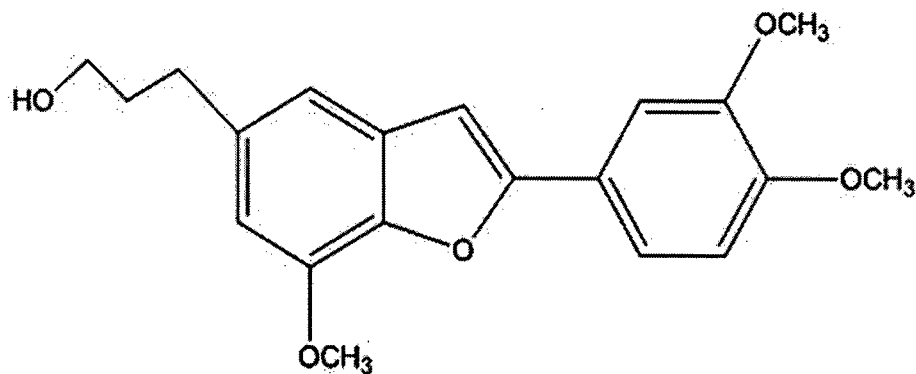
[화학식 1]



【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 비당체는 하기 화학식 2로 기재되는
 15 호모에고놀(homoegonol)인 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 치료용 약학적
 조성물:

[화학식 2]



【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 때죽나무(*Styrax japonica*)로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5 【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 천식은 기도개형이 진행된 천식인 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물.

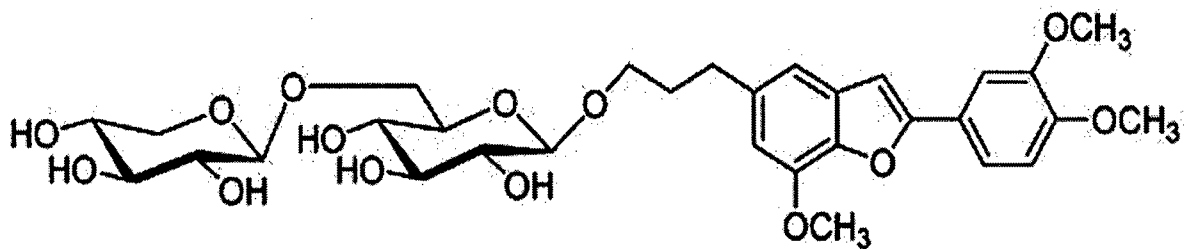
【청구항 6】

10 스티락스리그놀리드(Styraxlignolide) A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

【청구항 7】

15 제 6항에 있어서, 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 하기 화학식 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물:

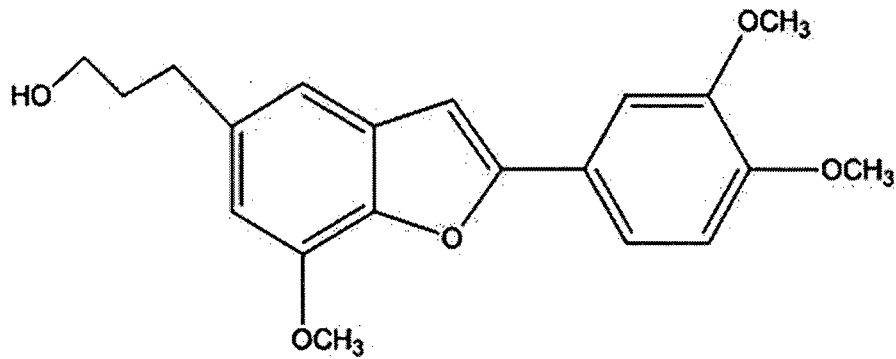
[화학식 1]



20 【청구항 8】

제 6항에 있어서, 상기 비당체는 하기 화학식 2로 기재되는 호모에고놀인 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물:

[화학식 2]



【청구항 9】

제 6항에 있어서, 상기 스티락스리그놀리드 A 화합물은 때죽나무(*Styrax japonica*)로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

【청구항 10】

제 6항에 있어서, 상기 천식은 기도개형이 진행된 천식인 것을 특징으로 하는 천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

【청구항 11】

약학적으로 유효한 양의 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 천식의 예방 방법.

【청구항 12】

약학적으로 유효한 양의 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 천식의 치료 방법.

【청구항 13】

천식 예방 및 치료용 약학적 조성물에 사용하기 위한 스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

【청구항 14】

천식 예방 및 개선용 건강식품용 조성물에 사용하기 위한
스티락스리그놀리드 A 화합물, 이의 비당체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

5

10

15

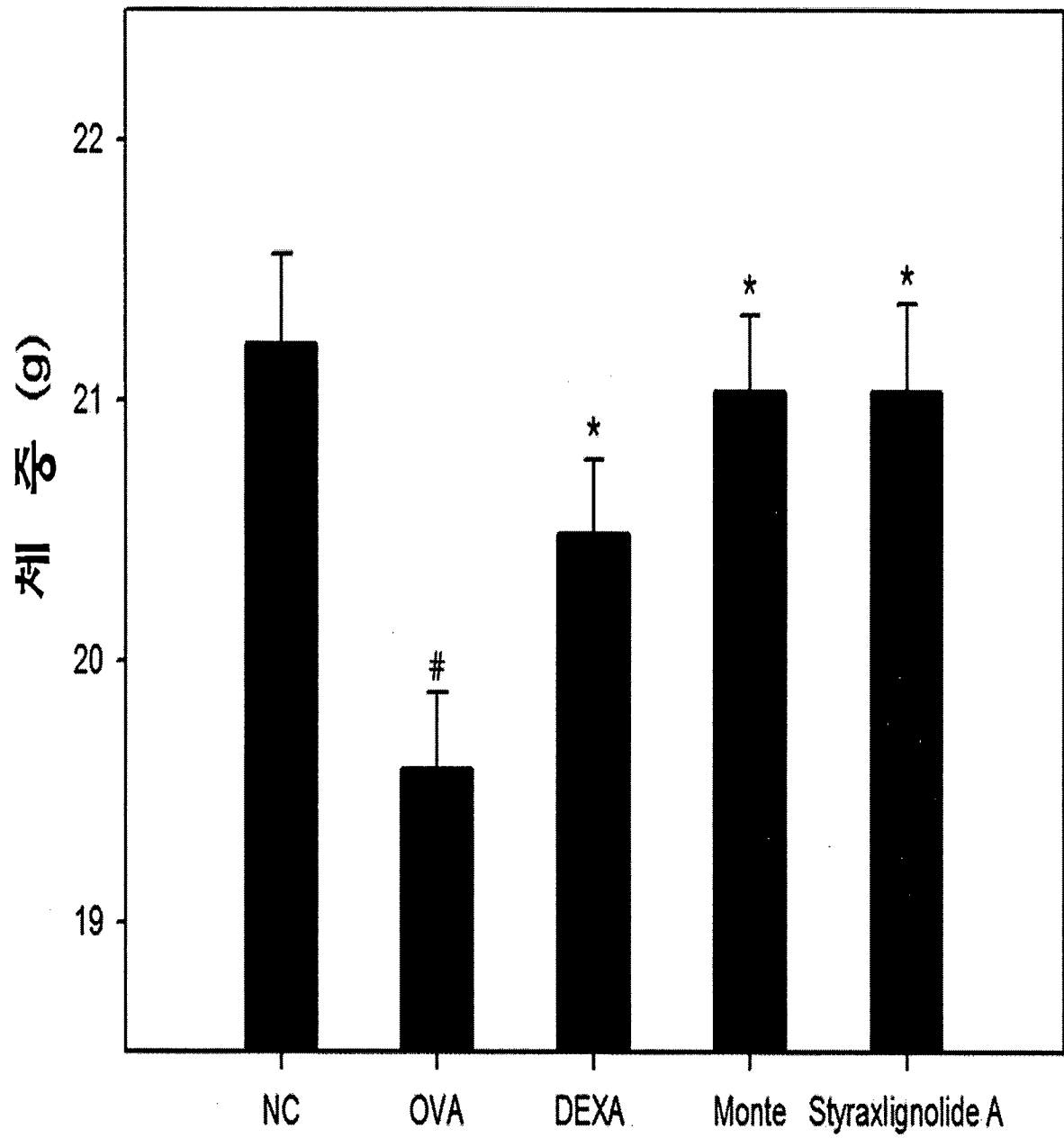
20

25

30

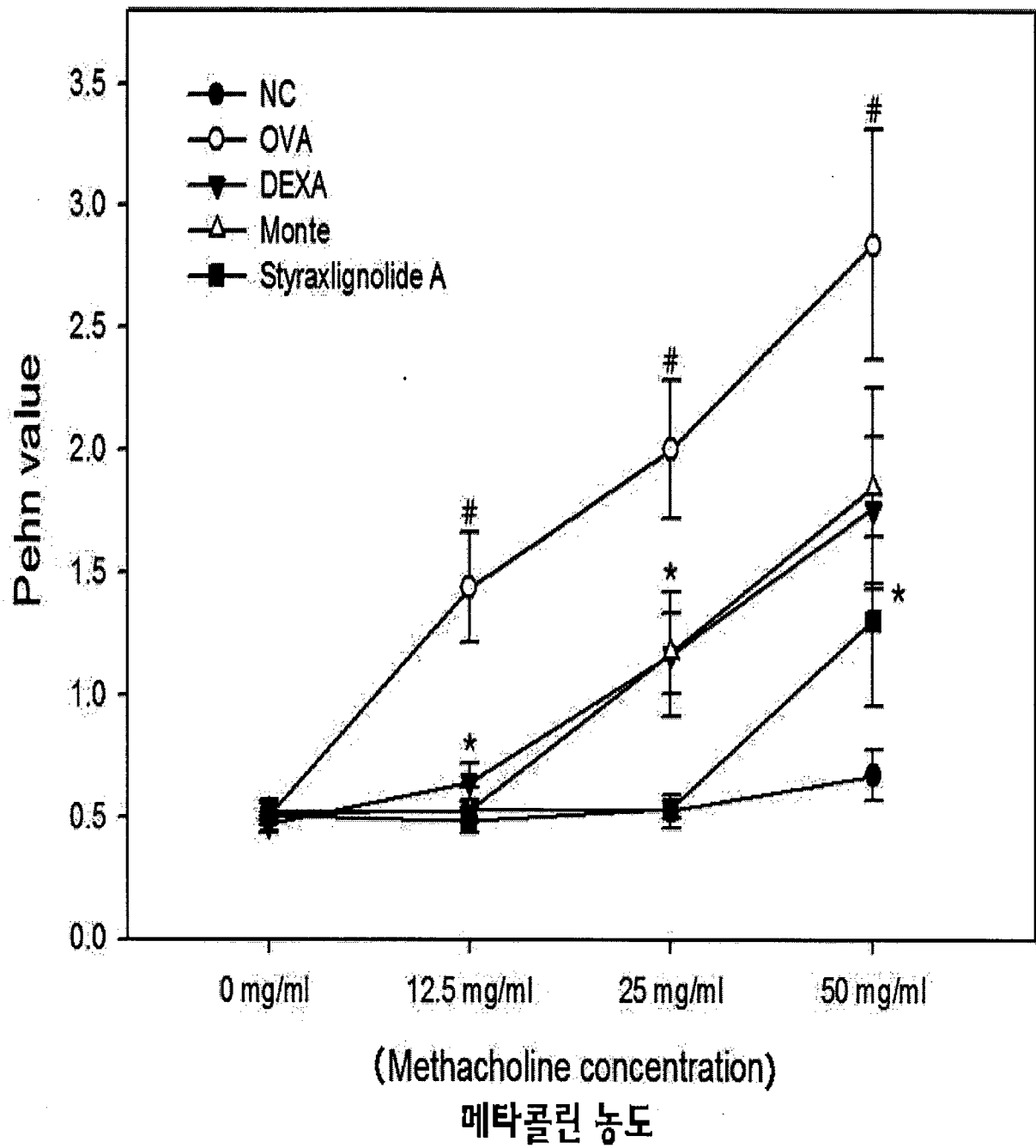
1/20

[도 1]



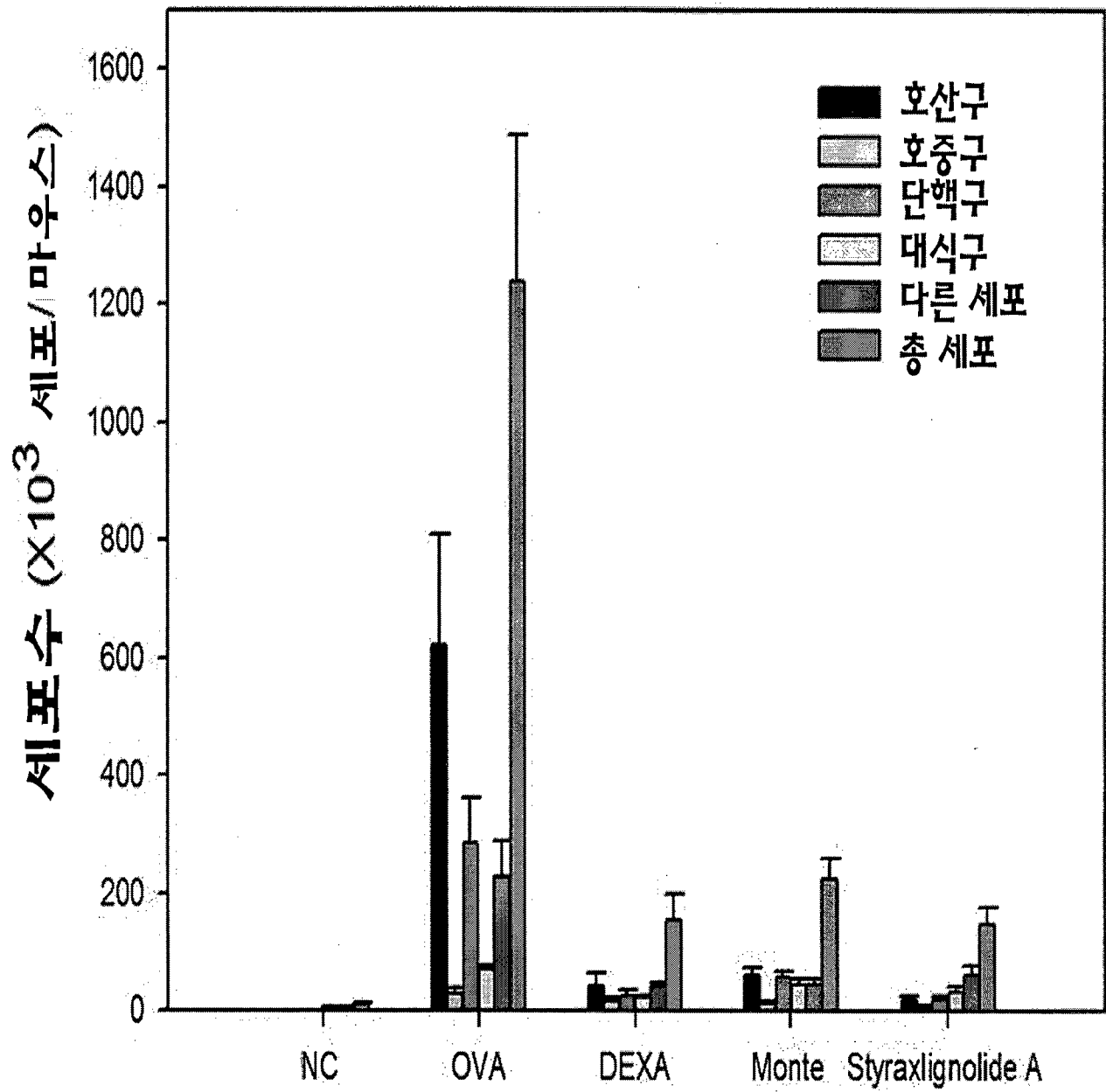
2/20

[도 2]



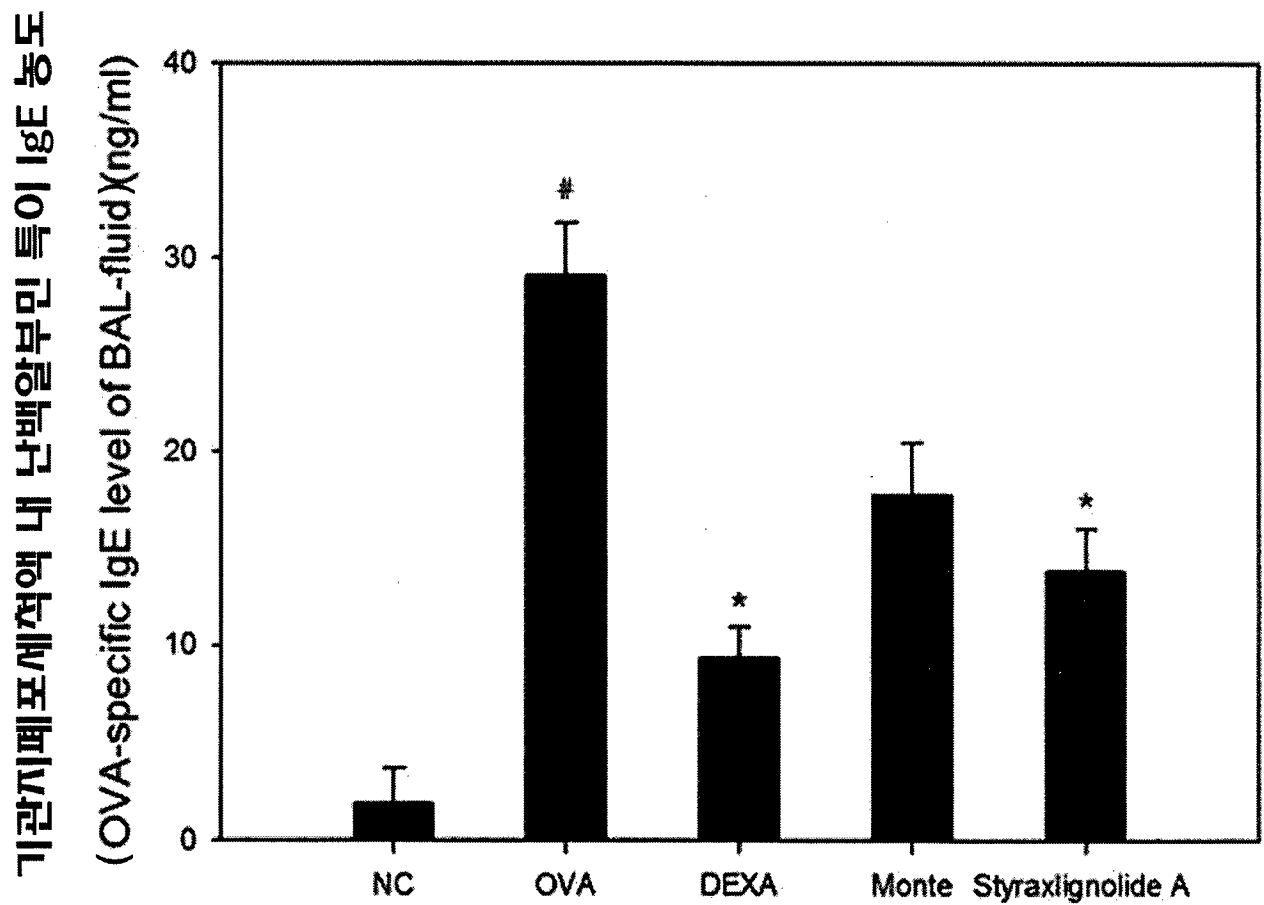
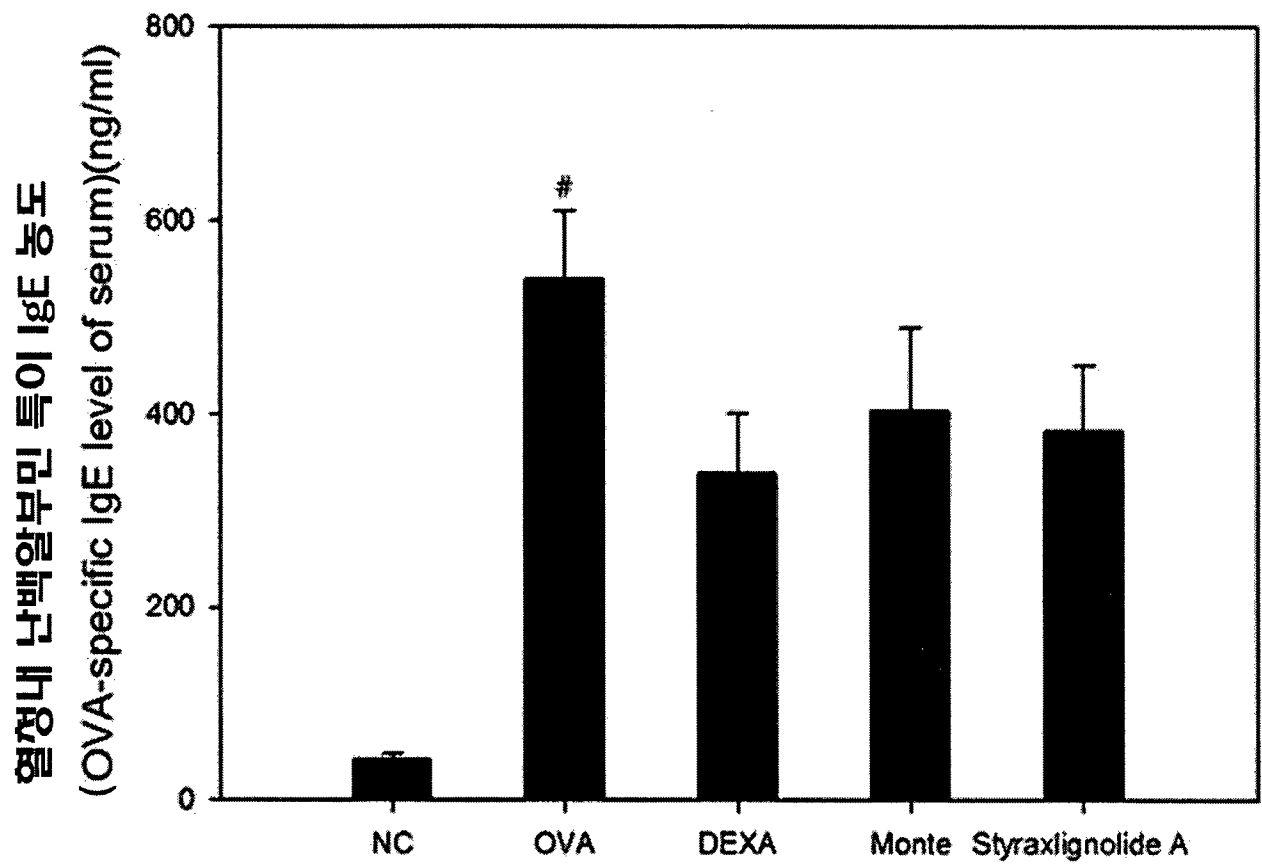
3/20

[도 3]



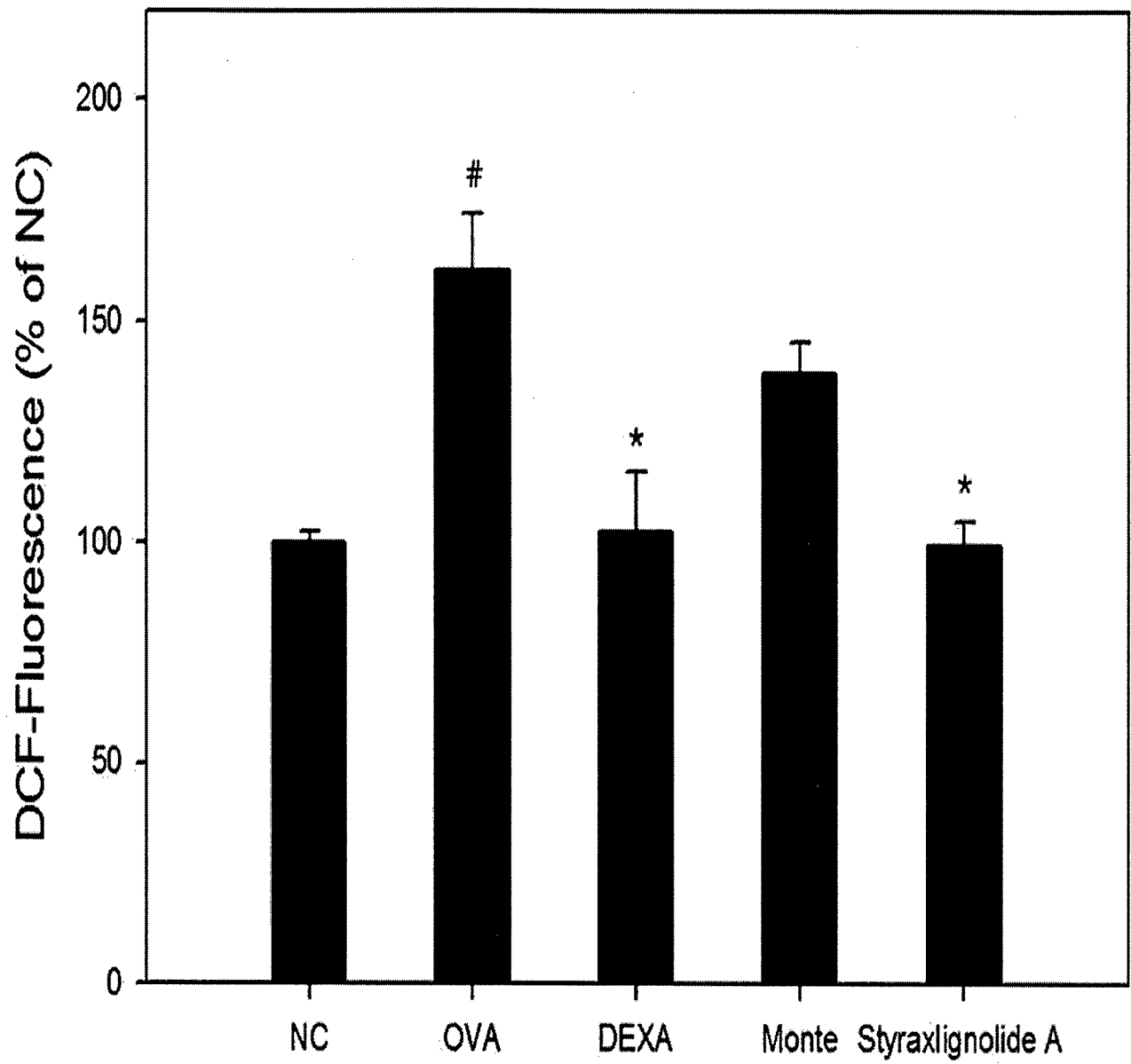
4/20

[도 4]



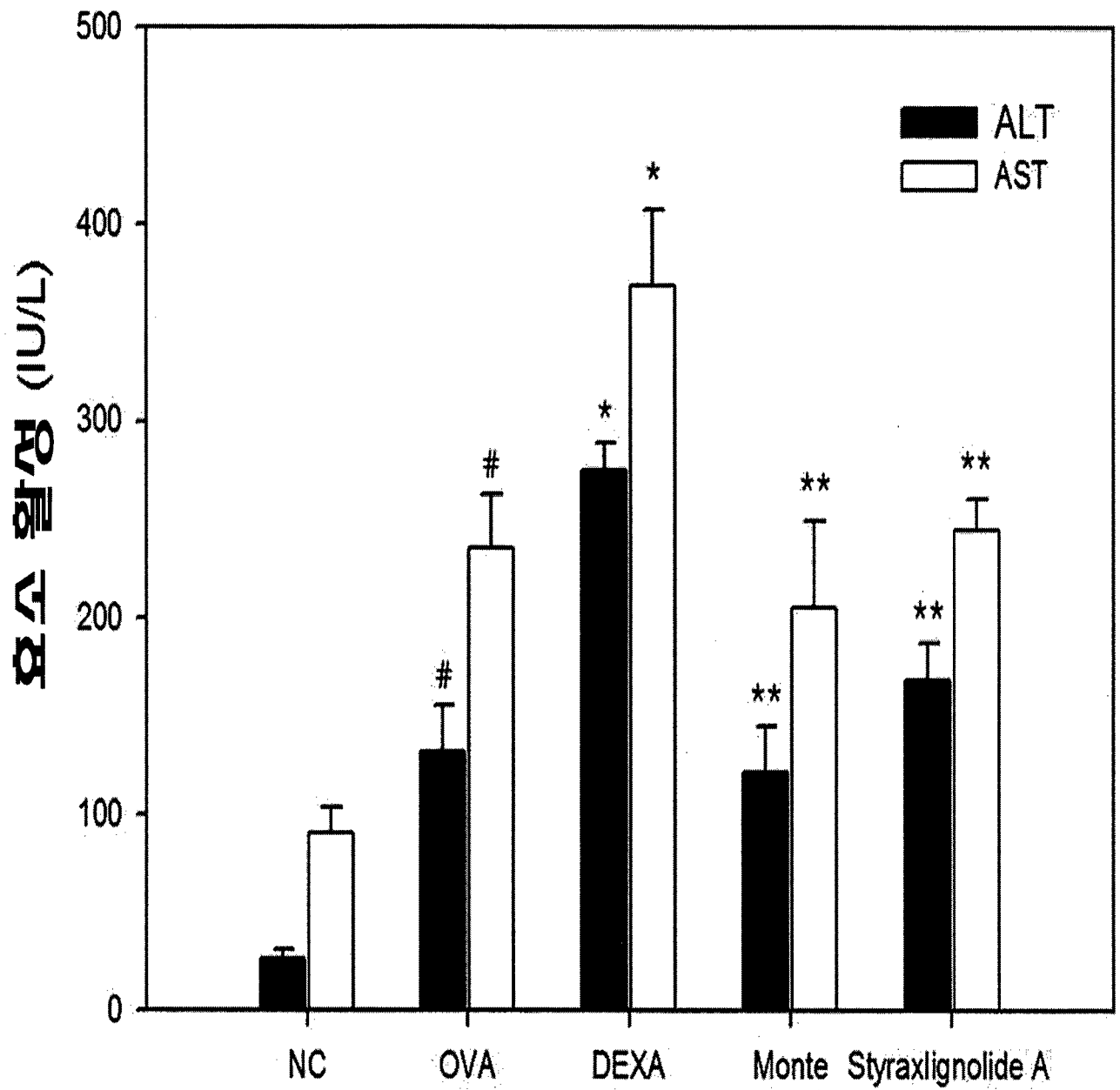
5/20

[도 5]



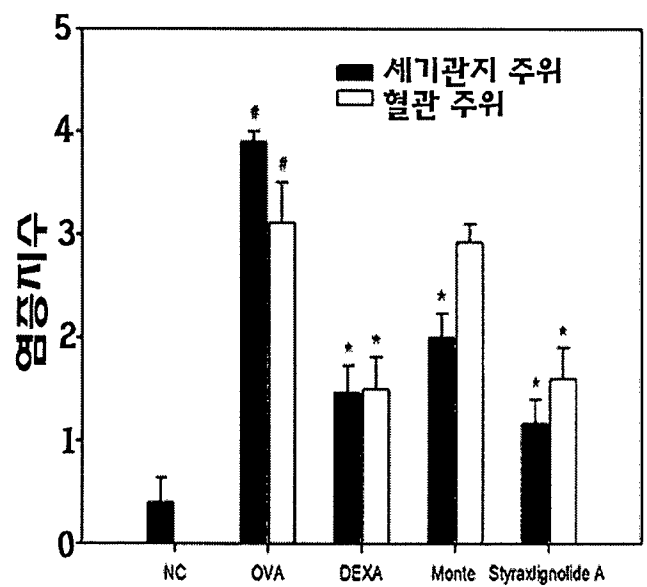
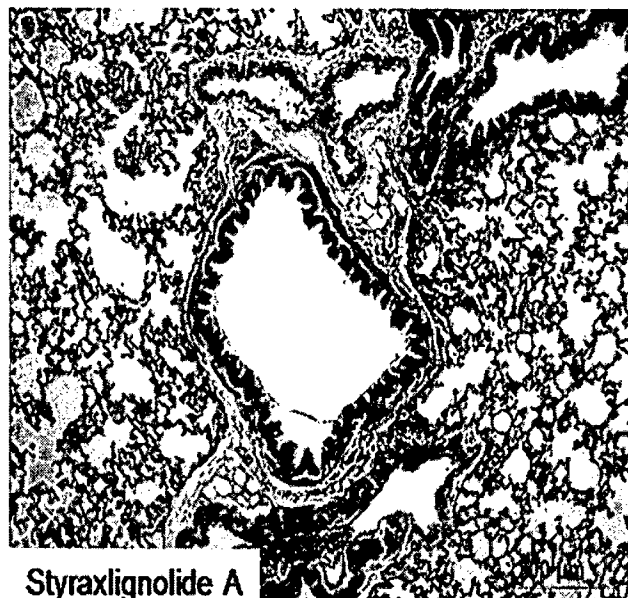
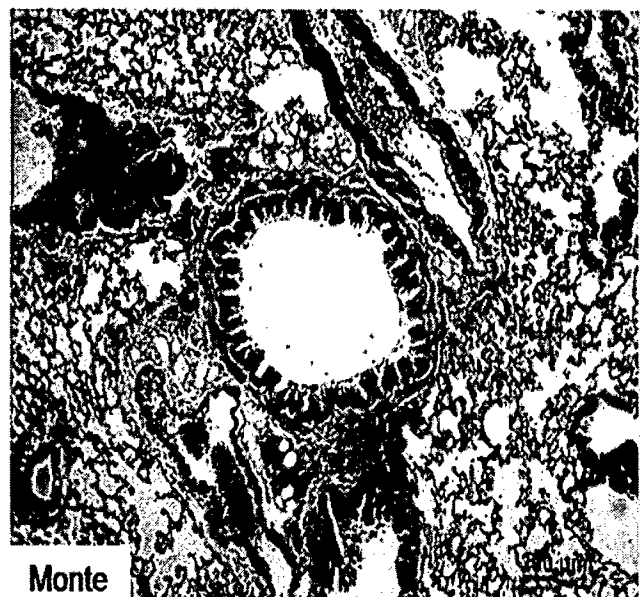
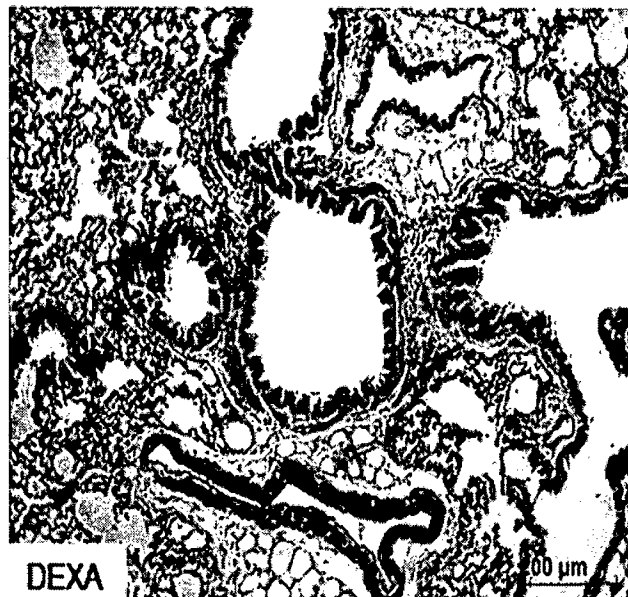
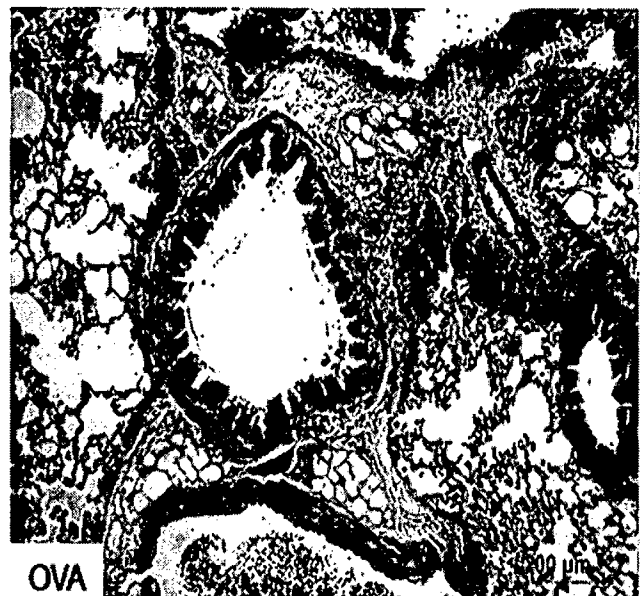
6/20

[도 6]



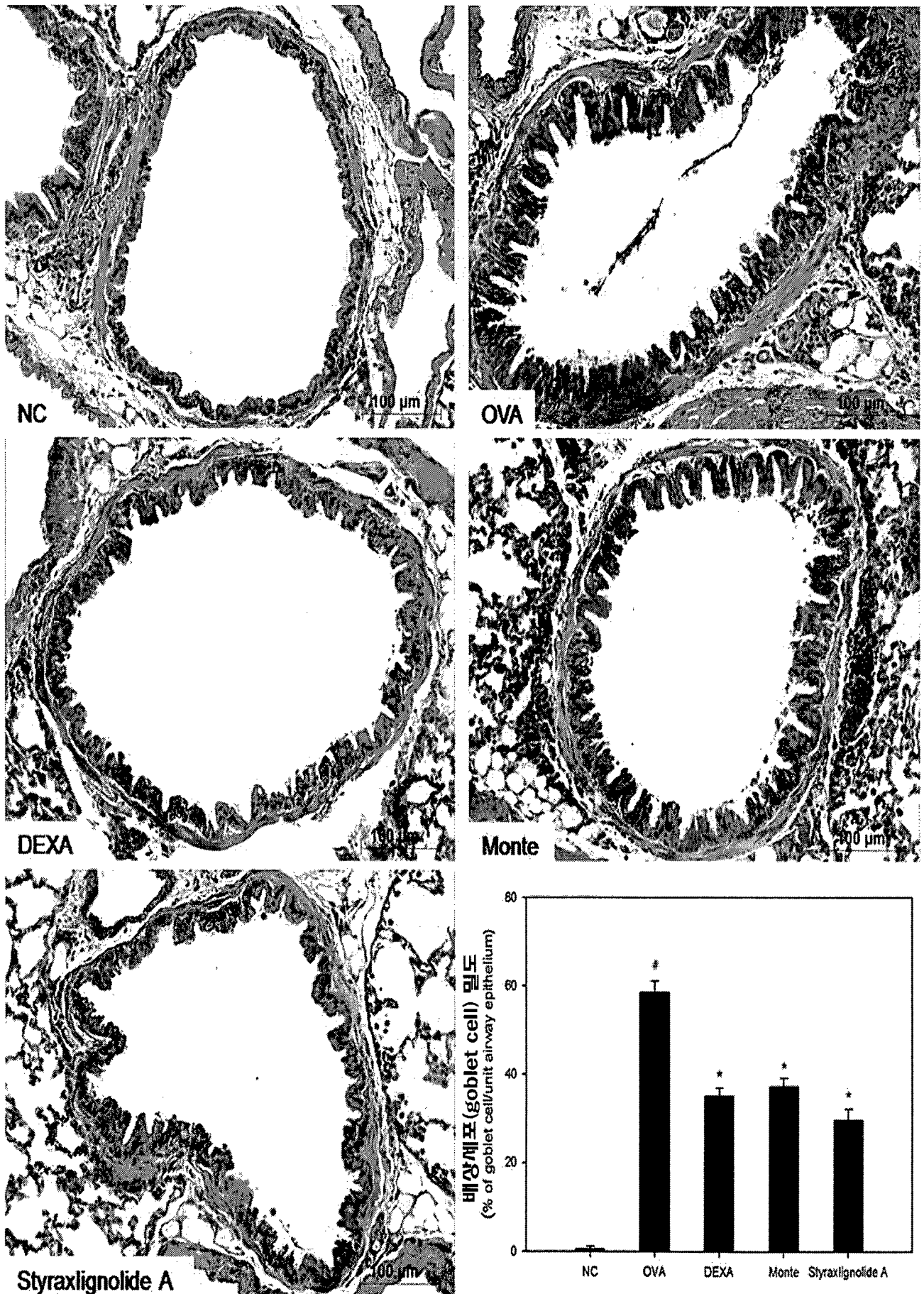
7/20

[도 7]



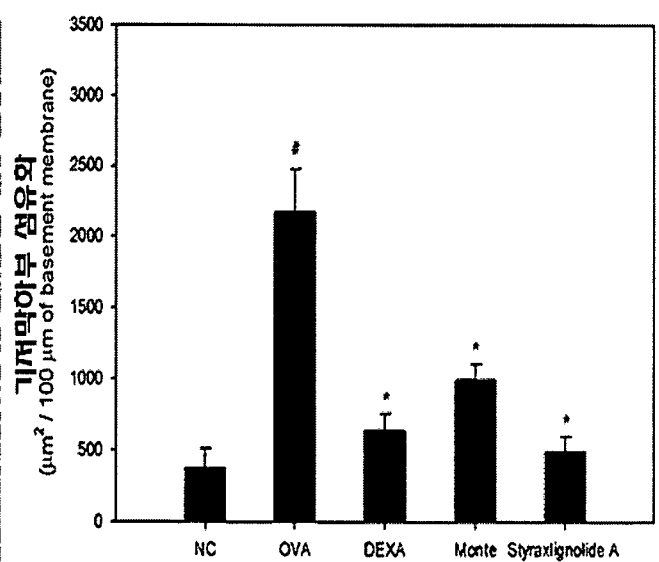
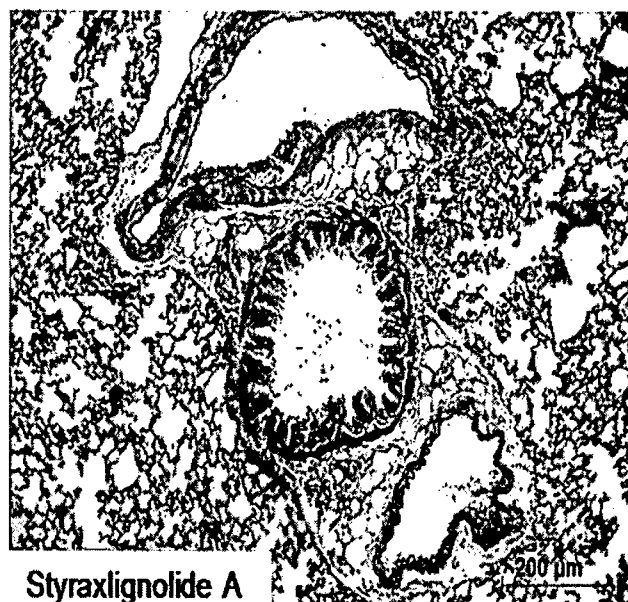
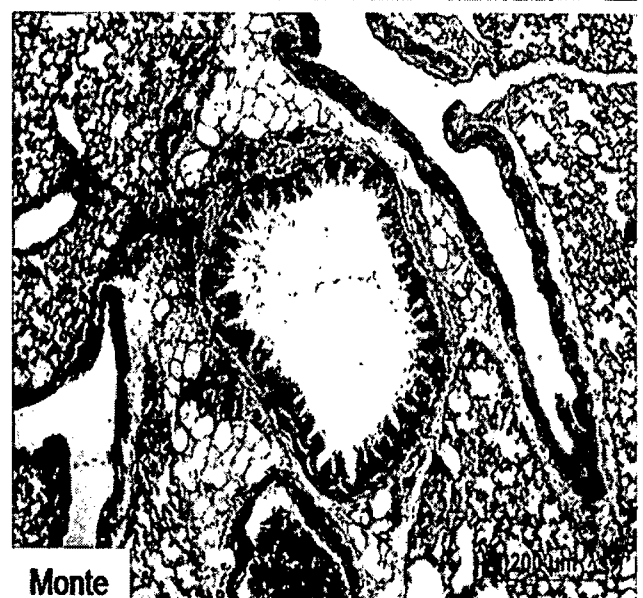
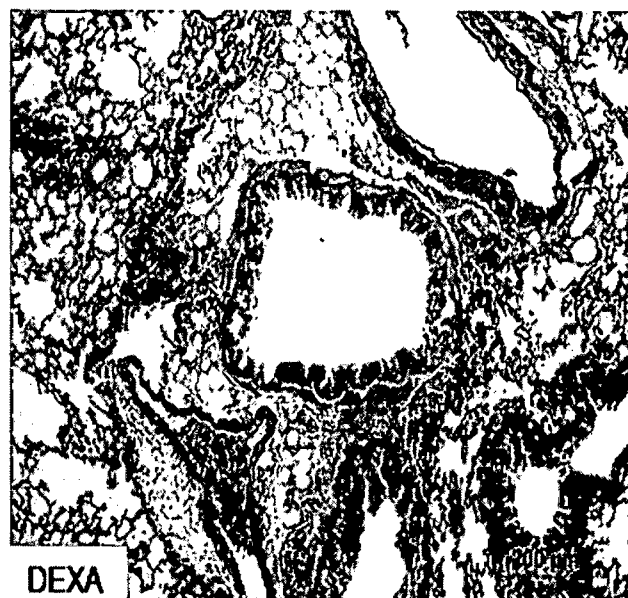
8/20

[도 8]



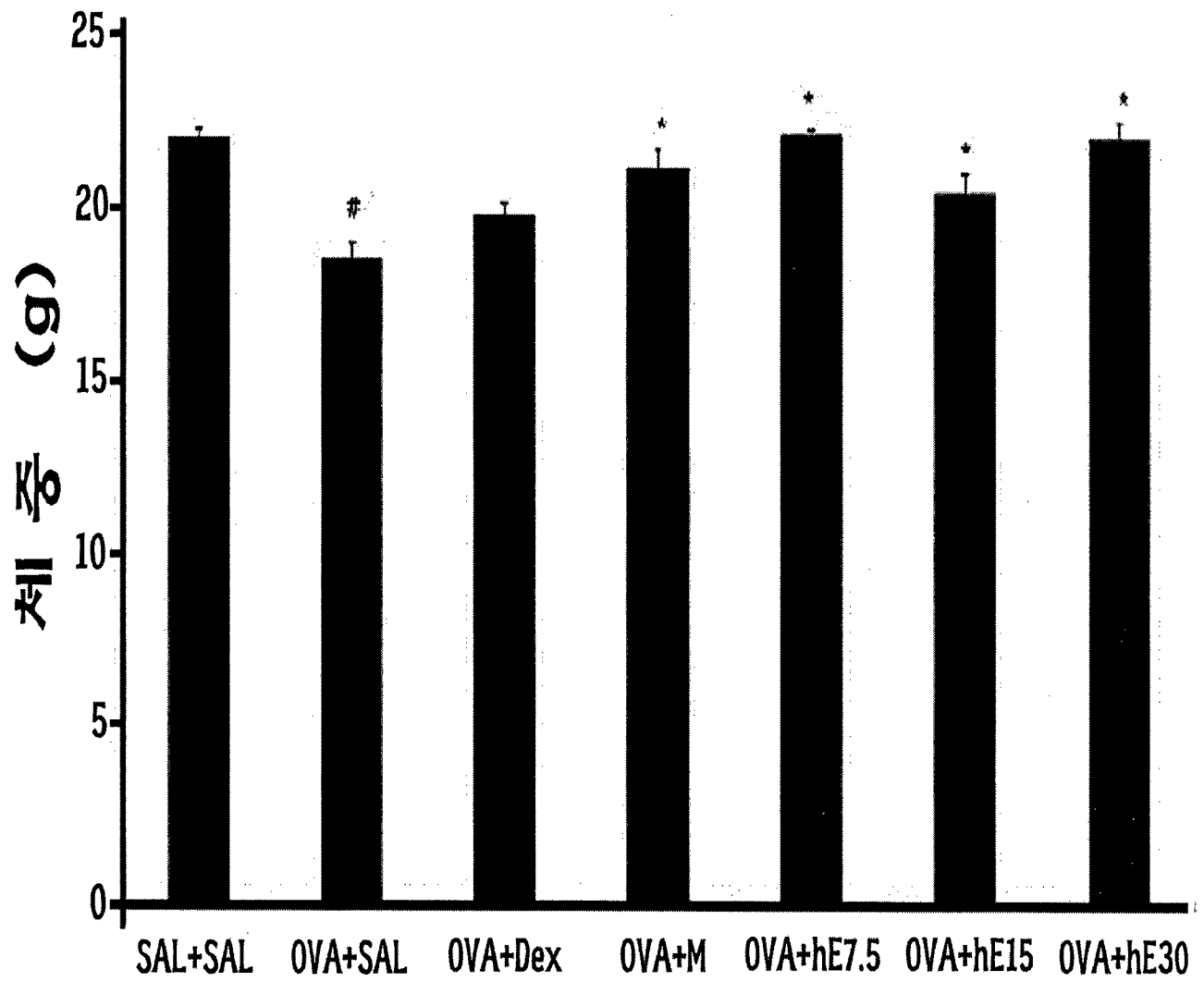
9/20

[도 9]



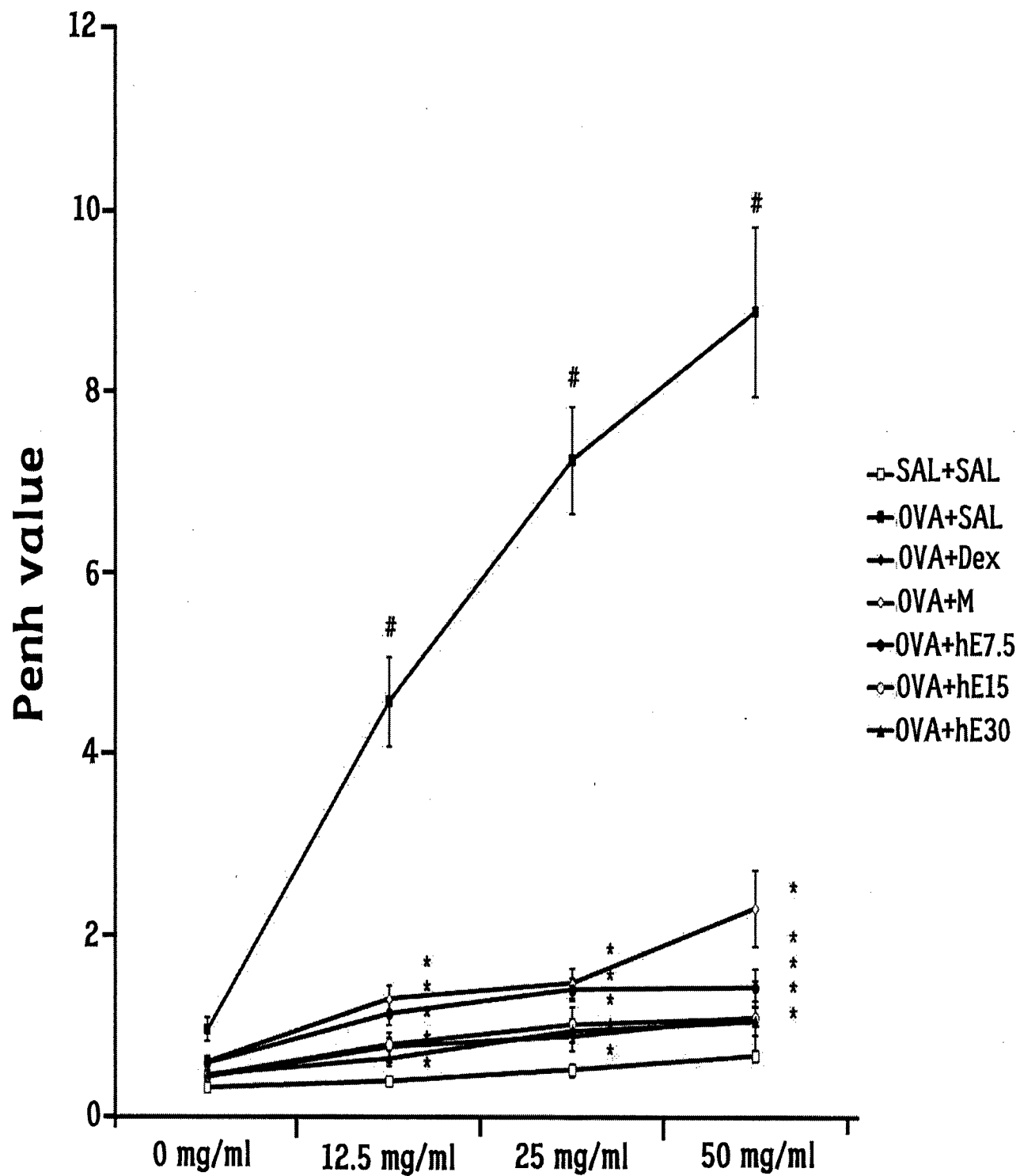
10/20

[도 10]



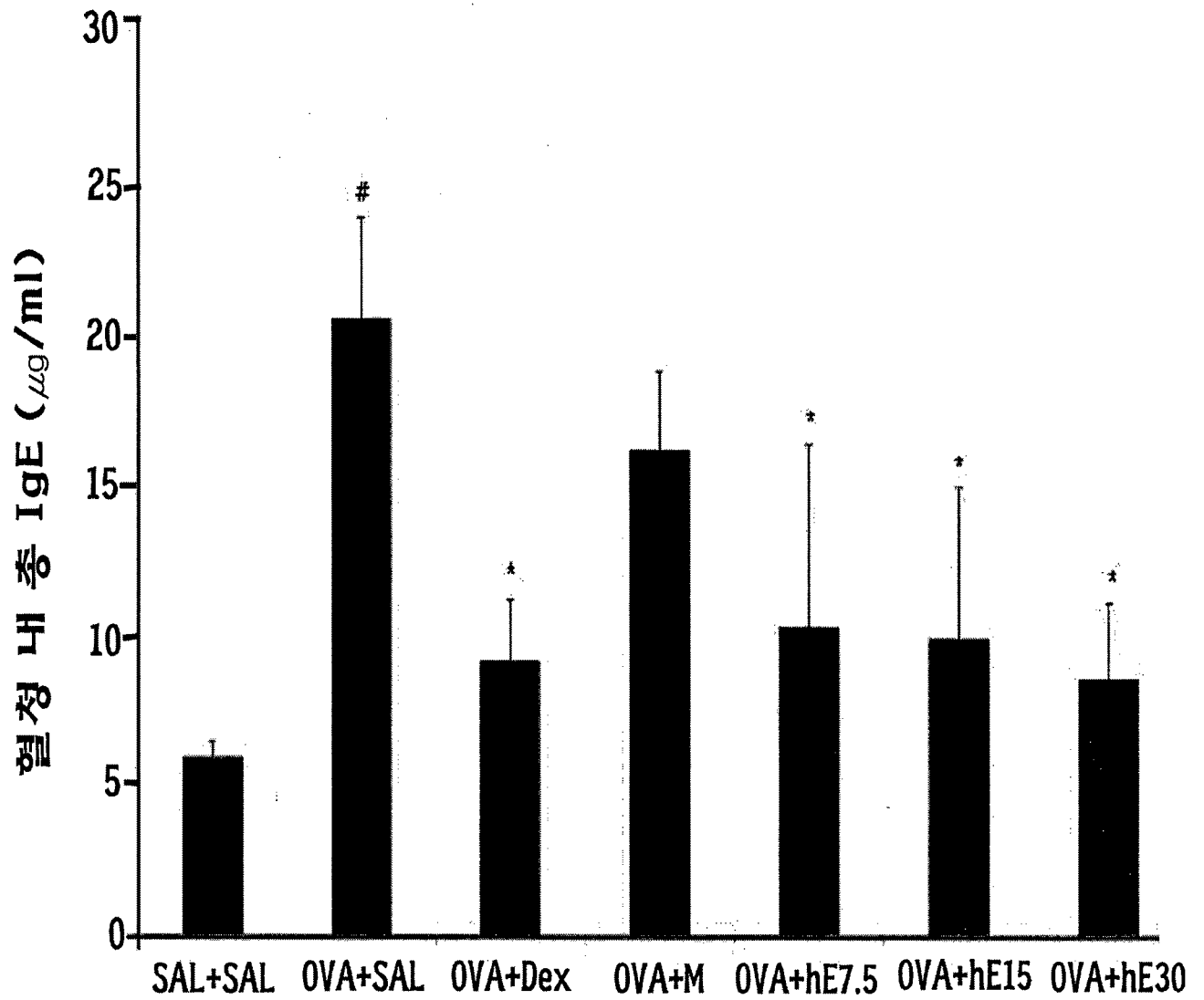
11/20

[도 11]



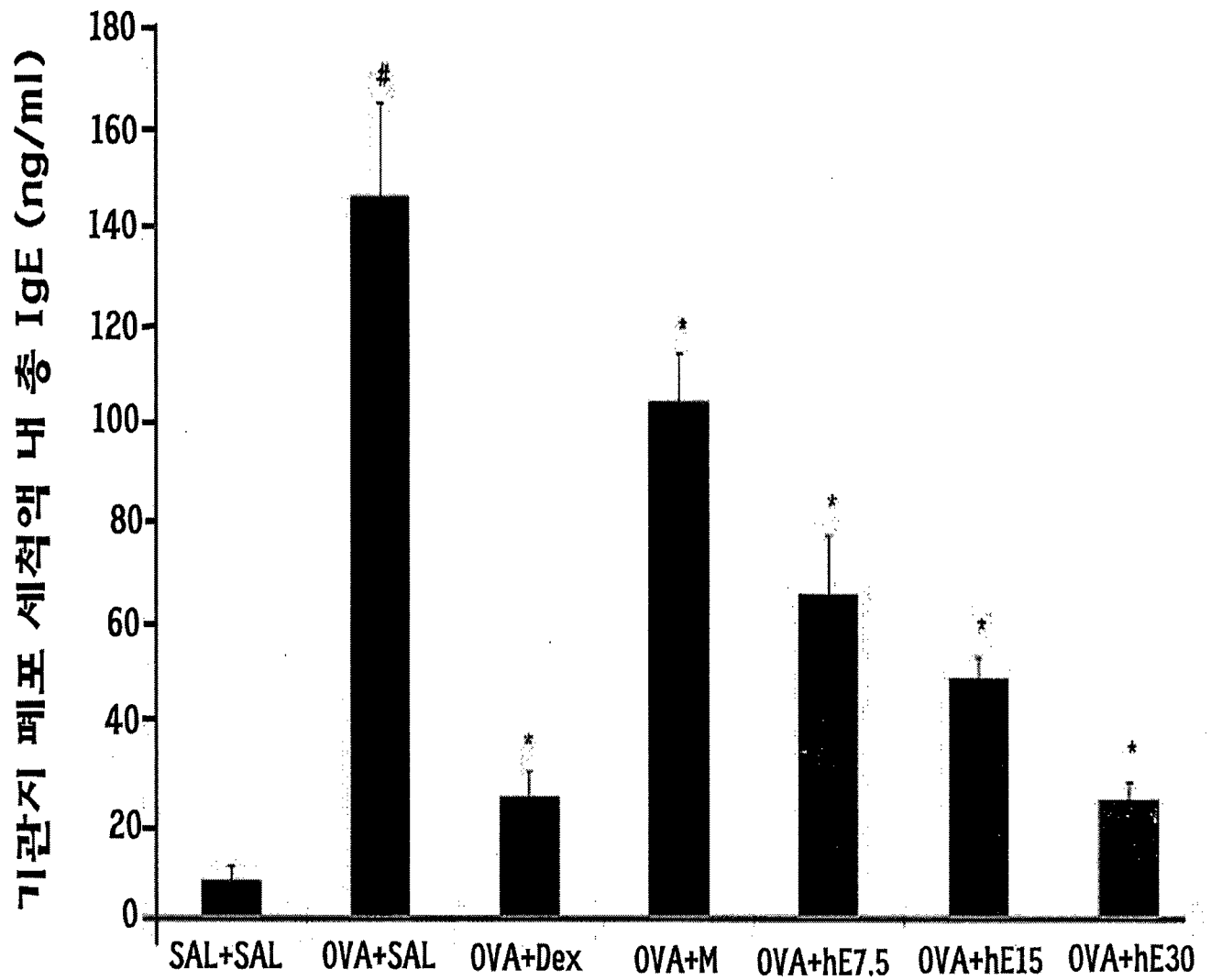
12/20

[도 12]



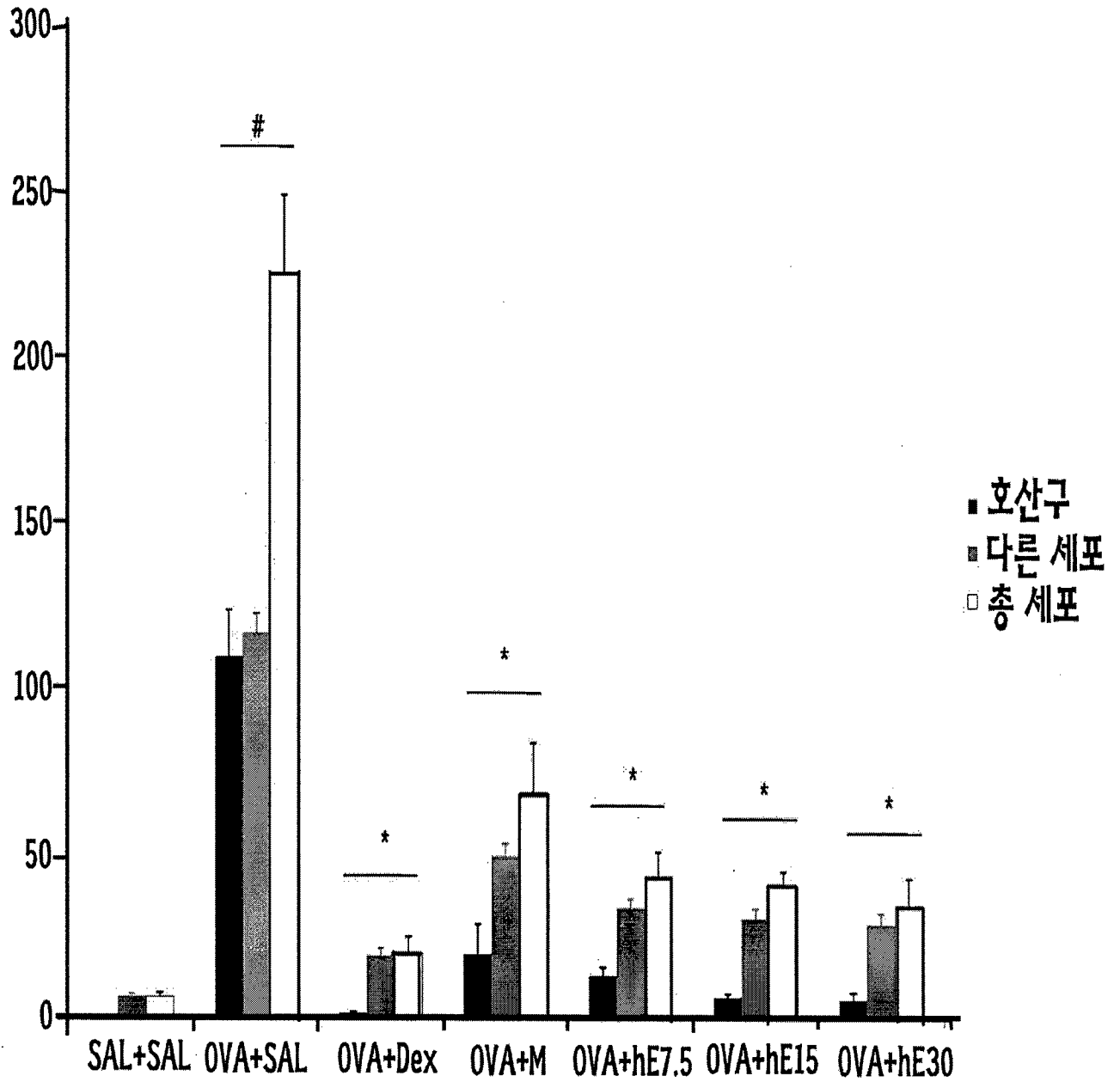
13/20

[도 13]



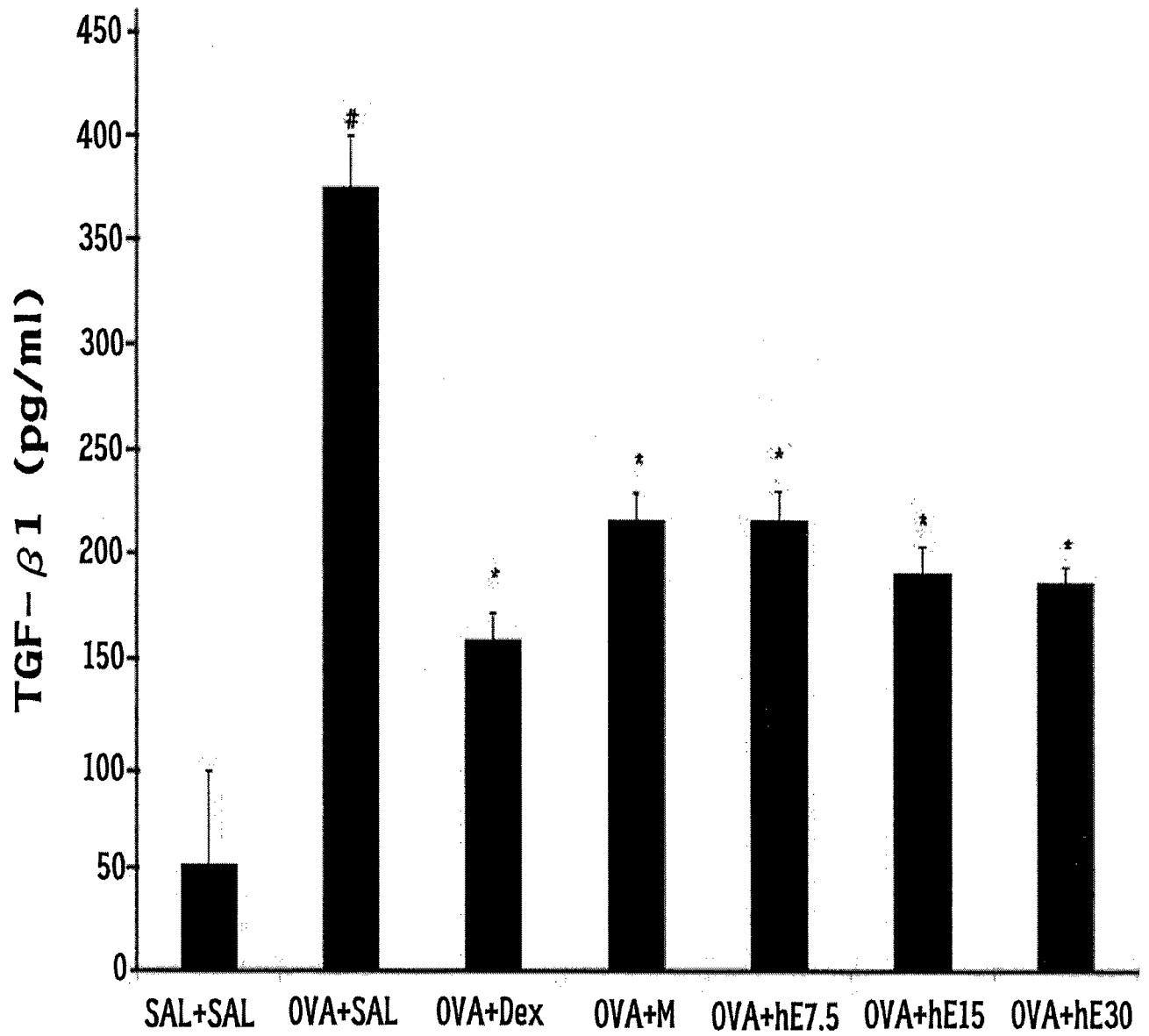
14/20

[도 14]



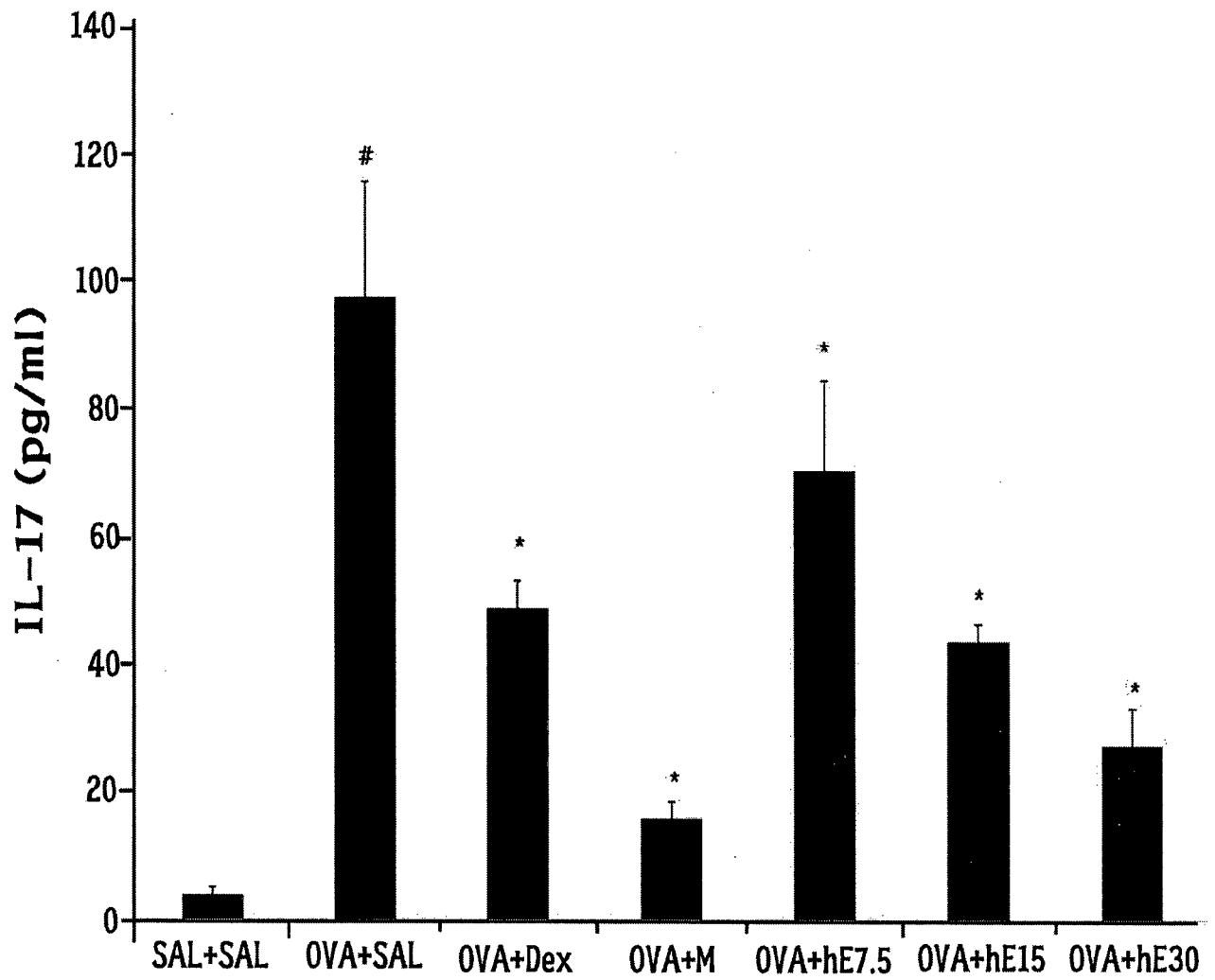
15/20

[도 15]



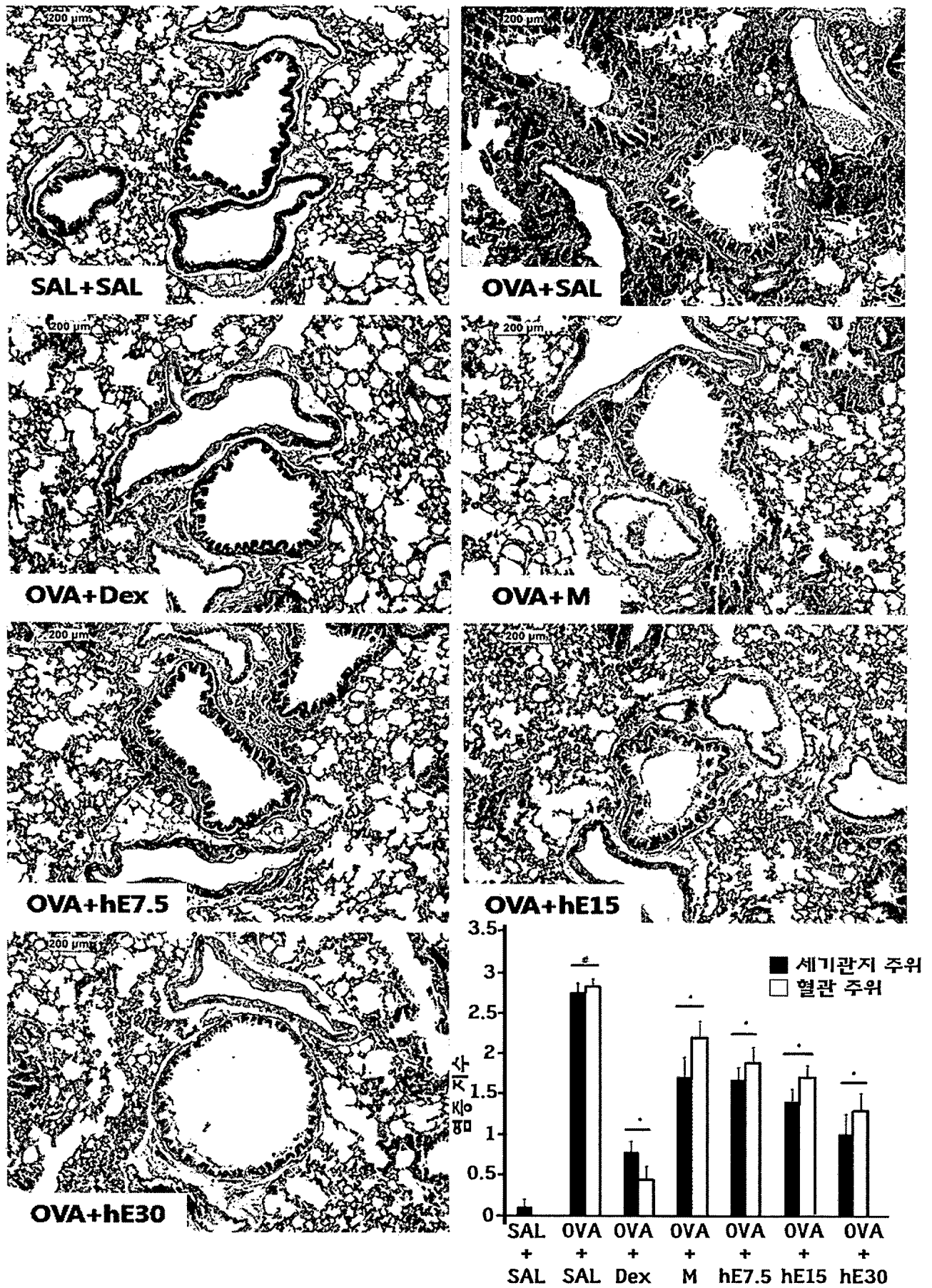
16/20

[도 16]



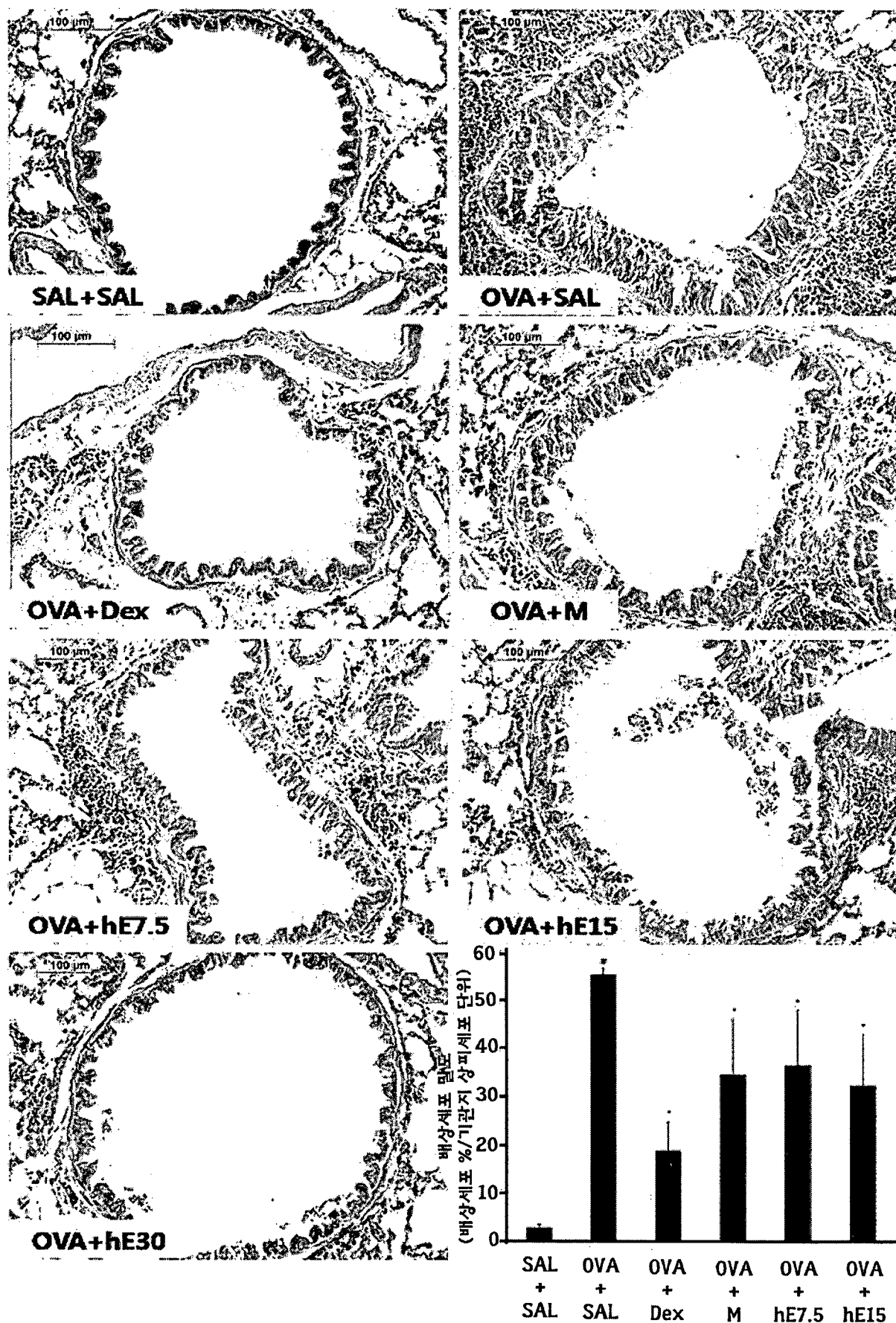
17/20

[도 17]



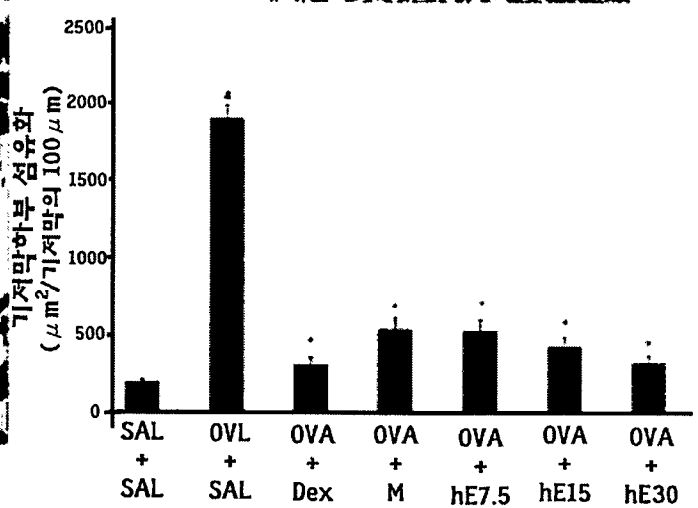
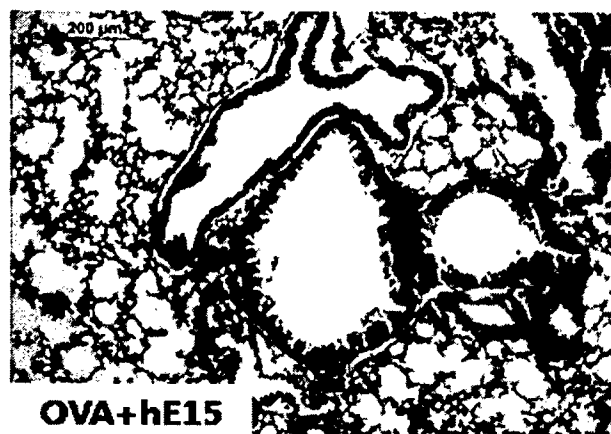
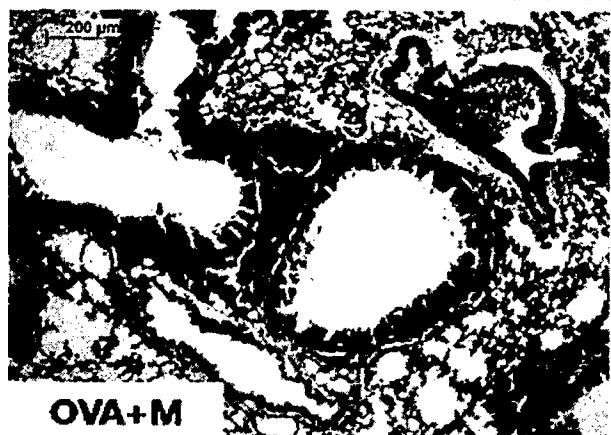
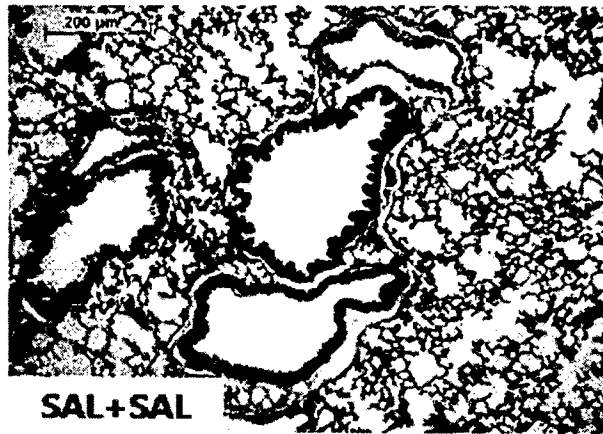
18/20

[도 18]



19/20

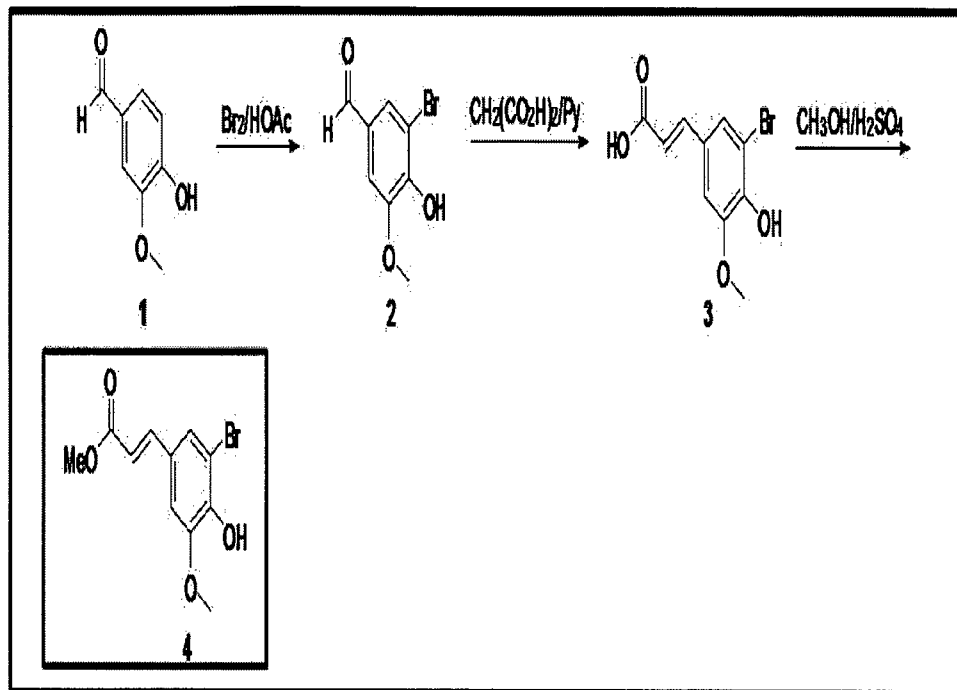
[도 19]



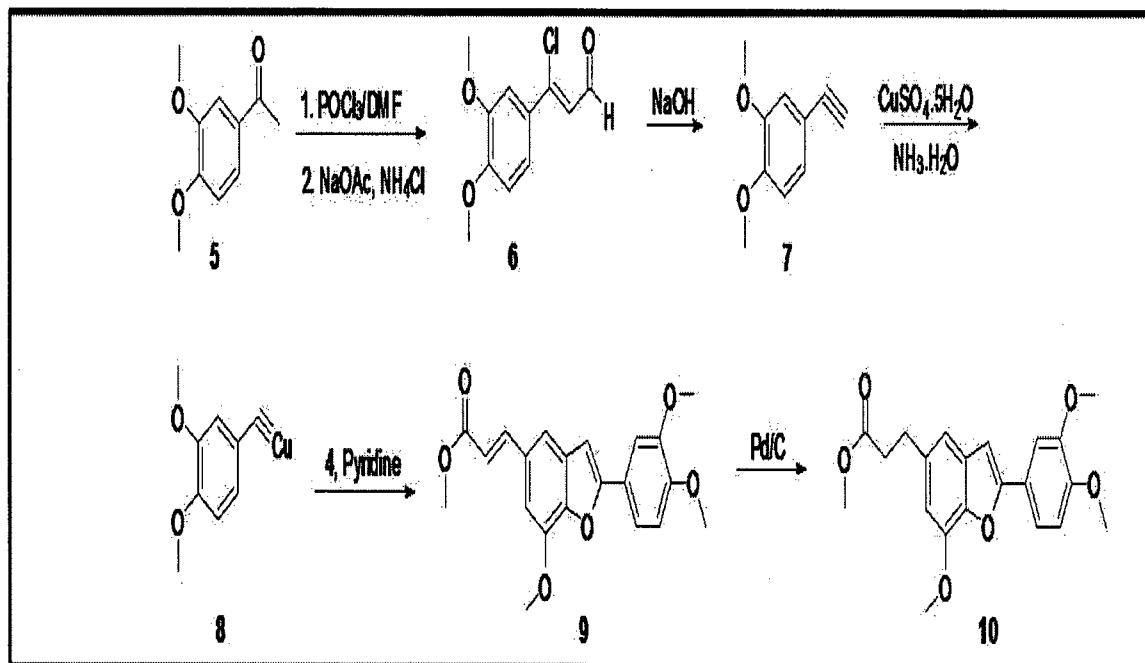
20/20

[도 20]

단계 1



단계 2



단계 3

