

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0029528 (43) 공개일자 2012년03월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/22 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)	(71) 출원인 전북대학교산학협력단 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14	
(21) 출원번호 10-2010-0091362	(72) 발명자 박병현	
(22) 출원일자 2010년09월17일 심사청구일자 2010년09월17일	전라북도 전주시 완산구 화산천변로 50, 107동 104호 (중화산동2가) 박진우 전라북도 전주시 덕진구 호성동1가 동신아파트 302동 106호 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인리온	

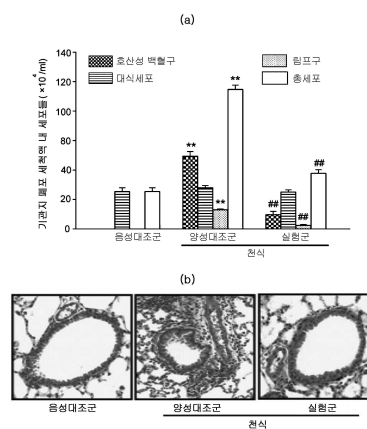
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 건강식품

(57) 요약

본 발명은 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물 및 이를 포함하는 건강식품에 관한 것으로, 상세하게는 옷나무 (*Rhus verniciflua*)로부터 분리, 정제한 셀퍼레틴을 유효성분으로 함유하고, 기도 염증 반응을 줄이고 천식 증상을 개선시키는 셀퍼레틴이 천식 치료 효과를 나타냄을 확인함으로써, 기관지 천식의 예방 및 치료에 유용한 조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

송미영

전라북도 전주시 완산구 새터로 95, 동아한일아파트 108동 814호 (서신동)

김윤철

대전광역시 서구 둔산로 155, 크로바아파트 103동 1501호 (둔산동)

정길생

전라북도 익산시 궁동로 129, 주공9단지 아파트 905동 603호 (부송동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2008-005-0000-0

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업 기초의약학분야(MRC)

연구과제명 당뇨질환연구센터

주관기관 전북대학교

연구기간 2008.09.01 ~ 2017.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

옻나무에서 분리된 셀퍼레틴(Sulfuretin)을 유효성분으로 포함하는 기관지 천식 예방 및 치료를 위한 조성물

청구항 2

옻나무에서 분리된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 사이토카인 면역반응 억제제

청구항 3

옻나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 NF- κ B 활성 억제제

청구항 4

옻나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 TNF- α 발현 억제제

청구항 5

옻나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 류신 과분비 억제제

청구항 6

옻나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 기도과민증(AHR) 예방 및 치료용 조성물

청구항 7

옻나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 기관지 천식 예방 및 치료용 건강식품

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 옻나무(*Rhus verniciflua*)로부터 분리된 셀퍼레틴을 유효성분으로 함유하는 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 건강식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 병태생리학적인 면에서 천식은 Th2 면역세포에서 생성하는 사이토카인에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도 주변 조직으로 이동, 침윤하여 나타나는 만성 염증질환으로 인식되고 있다(Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of Asthma., J. Clin. Invest., 111, pp291-297, 2003).
- [0003] 천식이 걸리게 되면, 환자의 기도 및 기도 주변 조직에서 활성화된 호산성백혈구, 비만세포, 폐포 대식세포 등의 염증세포는 다양한 염증매개인자들을 분비한다. 염증 매개인자로는 염증세포 활성화에 관여하는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인이 있다.
- [0004] 그에 따라, 천식과 같은 만성폐쇄성 폐질환의 치료를 위해 종래에는 항염증 작용을 갖는 치료제나 기관지확장 효과를 갖는 치료제를 이용하였다. 이러한 항염증 작용을 갖는 대표적인 치료제는 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 류코트리엔 모디파이어(leukotriene modifiers), 테오필린(theophylline) 등이 있다. 그러나 글루코코르티코이드는 효과가 강력하나 약물부작용이 있고, 필요한 면역반응까지 억제한다. 류코트리엔 모디파이어는 부작용은 적지만 효과 면에서 한계가 있어 단독으로 사용 시에는 천식을 조절할 수 없다. 테오필린은 효과가 뛰어나지 못하며 부작용의 우려가 있는 문제점이 있다. 따라서, 효과가 뛰어나고 부작용이 작은 치료제의 개발이 절실히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 효과가 우수하면서도 부작용이 작은 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물 및 이를 포함하는 건강식품을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 기관지 천식 예방 및 치료를 위한 조성물은 옷나무에서 분리된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 옷나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 사이토카인 면역반응 억제제를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 옷나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 NF- κ B 활성 억제제를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 옷나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 TNF- α 발현 억제제를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 옷나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 류신 과분비 억제제를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 옷나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 기도과민증(AHR) 예방 및 치료용 조성물이다.
- [0012] 또한, 본 발명은 옷나무에서 분리 및 정제된 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 기관지 천식 예방 및 치료용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 기관지 천식 예방 및 치료 조성물은 옷나무에서 분리된 셀퍼레틴을 포함함으로써, 염증성 세포의 침윤을 효과적으로 막고, 알레르기성 기도 감염을 약화시키고, NF- κ B 활동을 감소시켜 기관지 천식을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0014] 또한 본 발명의 유효 성분인 셀퍼레틴은 TNF- α 발현 억제와 같이 사이토카인의 레벨을 낮게 하고, 기관지 폐포 세척액 내 산호성 백혈구의 숫자를 줄어든게 하며, 기도 내 류신의 과도한 분비를 약화시키며, 기도 과반응성(AHR, Airway hyper-responsiveness)을 낮추는 효과를 나타낸다. 그에 따라, 본 발명의 셀퍼레틴을 유효성분으로 포함하는 건강 기능 식품은 기관지 천식 예방 및 치료효과를 가진다.
- [0015] 또한 본 발명에서는 셀퍼레틴을 옷나무에서 분리하여, 천연생약제로 사용하므로, 부작용이 적고, 복용하고자 하는 환자의 체질, 남녀, 연령의 제한 없이 사용할 수 있는 장점이 있다.
- [0016]

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 기관지 폐포 세척액 내 셀퍼레틴의 기도 염증 억제 효과를 보여주는 실험 결과 사진으로서, 도 1A는 오브알부민 감작으로 인한 호산성백혈구 및 림프구의 증가가 셀퍼레틴 처리시 감소됨을 나타내며, 도 1B는 셀퍼레틴 처리시 염증성 세포의 침윤이 감소됨을 보여준다.

도 2는 셀퍼레틴의 NF- κ B 활동 감소 효과를 보여주는 실험 결과 사진으로서, 도 2A는 양성대조군의 p50 과 p65 서브유닛들의 레벨증가 및 I κ B α 레벨감소와 실험군의 p50 과 p65 서브유닛의 레벨감소 및 I κ B α 강등의 완화 효과를 나타낸 웨스턴블로팅(Western blotting) 결과이며, 도 2B는 양성대조군의 증가된 DNA와 NF- κ B의 결합력이 실험군에서 낮아짐을 보여주는 전기 영동 상 변화 분석(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)결과이며, 도 2C는 양성대조군의 폐 조직 내 p50과 p65 서브유닛의 면역염색을 통해 증가된 핵전위가 실험군에서 감

소됨을 나타낸다.

도 3은 셀퍼레틴의 사이토카인 레벨 감소 효과를 보여주는 실험 결과 그래프로서, 도 3A는 양성대조군의 오브알부민 감작에 따른 TNF- α 레벨 증가와 실험군의 셀퍼레틴 치료로 TNF- α 레벨 감소를 나타내며, 도 3B는 양성대조군의 에오타신 레벨 증가 및 실험군의 에오타신 레벨 감소를 나타내며, 도 3C는 양성대조군의 IL-13 레벨 증가 및 실험군의 IL-13 레벨 감소를 나타내며, 도 3D는 양성대조군의 IL-5 레벨 증가 및 실험군의 IL-5 레벨 감소를 나타낸다.

도 4는 셀퍼레틴의 기도 내 뮤신 과분비 억제 효과를 보여주는 실험 결과 사진 및 그래프로서, 도 4A는 뮤신의 검출을 위해 염색제(Periodic Acid-Schiff)로 염색된 조직사진으로서 양성대조군의 배상세포 숫자의 증가 및 뮤신 제조 증가와 실험군의 배상세포 (goblet cell) 숫자의 감소 및 뮤신 분비 감소를 나타내며, 도 4B는 조직학 자료에 근거하여 셀퍼레틴 치료로 인한 뮤신 생산이 정상화됨을 그래프로 나타낸다.

도 5는 양성대조군의 메타콜린 흡입에 따른 기도과민증 발생과 셀퍼레틴을 처리한 실험군의 기도과민증 감소 및 회복을 나타낸 실험 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명자는 기관지 천식 예방 및 치료를 위한 천연물질을 연구하던 중, 셀퍼레틴이 세포신호전달에 관여하는 단백질인 NF- κ B의 활성을 억제하고, TNF- α 의 발현, 뮤신 과분비를 억제하여 기도과민증 또는 천식의 예방 및 치료할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 즉, 본 발명자는 윗나무로부터 분리된 셀퍼레틴이 오브알부민(ovalbumin, OVA)으로 야기된 천식 모델에서 기도 염증 반응과 천식 증상을 개선시키는 효과를 확인하여 본 발명에 이르렀다.
- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명에서 셀퍼레틴은 윗나무에서 분리하여 사용하는데, 윗나무는 셀퍼레틴의 함량이 높고, 타 식물보다 셀퍼레틴의 분리 및 정제가 용이하다.
- [0021] 이러한 윗나무는 어혈제거, 구충, 위장질환, 생리불순, 피로회복에 효과가 있음이 동의보감, 방약합편 등으로부터 알려져 있다.
- [0022] 최근에 이루어진 연구결과를 보면 윗나무의 주성분은 크게 우루시올과 플라보노이드로 나뉘는데, 윗나무의 수피 및 목부에서 추출된 플라보노이드 성분의 항암효과가 확인되었고 항산화, 위염억제효과도 있다는 것이 밝혀졌다. 특히, 윗나무의 목질부에는 다량의 플라보노이드가 함유되어 있으며, 그 중에서도 셀퍼레틴이 속취에 좋다고 보고되었다.
- [0023] 그러나, 천식의 치료에 대해서는 셀퍼레틴이나 윗나무의 치료상의 효용이 알려진 바는 없다.
- [0024] 알레르기성 기도 염증에 있어서 NF- κ B 활동의 중요한 역할 때문에 발명자는 윗나무로부터 셀퍼레틴을 분리 정제했고 오브알부민 (ovalbumin)으로 야기된 천식 모델에서 셀퍼레틴이 기도 염증을 일으키는 반응과 천식 증상을 개선시키는 효과성을 실험하여 본 발명에 이르렀다.
- [0025] NF- κ B는 다양한 염증성 매개체의 전사를 유도함으로써 폐의 알레르기성 염증에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0026] 본 발명자는 셀퍼레틴이 NF- κ B 활동을 억제함으로써 기도염증반응을 약화시킬 것이라는 가정을 하였다.
- [0027] 이러한 가정을 증명하기 위해서 발명자는 핵 전위와 오브알부민 감작 후 폐 조직 내의 NF- κ B의 DNA 결합 정도를 측정하였다. (실험예 2-1 참조)
- [0028] 그리고, 기관 세지의 뮤신 축적은 천식환자의 기도 폐쇄, 호흡 곤란, 기침을 동반할 수 있다.
- [0029] 그러므로 발명자는 기관 세지의 배상 세포로부터 뮤신 분비에 셀퍼레틴이 영향을 미치는지를 평가했다. (실험예 4-1 참조)
- [0030]
- [0031] 본 발명의 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 셀퍼레틴을 0.1 중량% 내지 99 중량%, 바람직하게는 1 내지 50 중량% 포함할 수 있다.

- [0032] 셀퍼레틴이 0.1 중량% 미만일 경우에는 기관지 천식 예방 및 치료용 효과가 미약하고, 셀퍼레틴의 함량이 50%를 초과하더라도 셀퍼레틴이 나타내는 기관지 천식 예방 및 치료용 효과의 차이가 작으므로 경제성이 떨어지기 때문이다.
- [0033]
- [0034] 본 발명의 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물은 상기 셀퍼레틴을 단독 유효성분으로 포함하거나, 해당 질병 치료에 유효한 성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다. 또한, 이외 제형 형태, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분 즉, 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 보다 상세하게는 본 발명의 기관지 천식 예방 또는 치료용 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 기관지 천식 예방 및 치료용 조성물을 약제화하는 경우에는 통상의 증진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있다.
- [0037] 구체적인 제형의 예로는 과립제, 산제, 시럽제, 액제, 현탁제, 정제, 주사제, 주정제, 카타플라스마제(cataplasma), 캡셀제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 예방 또는 치료용 조성물의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039]
- [0040] 본 발명은 셀퍼레틴을 유효성분으로 하는 기관지 천식 예방 및 치료용 건강식품을 제공한다.
- [0041] 본 명세서에서 식품이라 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 통상의 식품, 음료, 식품 첨가제, 음료 첨가제, 건강기능성 식품 등을 모두 포함하는 의도이다.
- [0042] 본 발명의 식품은 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능 음료를 포함하는 의도이다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0044]
- [0045] 이하, 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0046]
- [0047] **실시예 1 : 셀퍼레틴 제조**
- [0048] 옷나무(R. verniciflua)의 심재는 옴니허브사(서울, 한국)에서 구입하고, 그 동일성은 한국의약품시험연구소(서울, 한국)에서 확인하였다. 사용한 옷나무 심재의 증거표본(WK-2009-42)은 원광대학교의 약학대학에 있는 식물표본집에 보관하였다.
- [0049] 건조한 옷나무(1 kg)의 심재를 각각 2시간 동안 뜨거운 메탄올(1:1)로 2번 추출했다.
- [0050] 그 후, 메탄올 추출물 37.78g을 동일 함량의 물(부피비 1:1)에 혼합하여 혼합 용액을 수득한다.

- [0051] 물에 용해된 메탄올 추출물은 각각의 노르말헥산(부피비 1:1)과 아세트산에틸(부피비 1:1)에 분배된다.
- [0052] 그 아세트산에틸에 용해된 분획(8.71 g)은 이동상으로 노르말헥산/아세톤(3:1)을 사용하는 실리카겔 컬럼(6.5 × 60 cm) 크로마토그래피를 수행하여, 2개의 분획(A와 B)을 수득하였다. 2가지 분획물 중 A는 극성이 낮은 부분을 가리키며, B는 극성이 높은 부분을 의미한다.
- [0053] 극성이 높은 B 분획물(660 mg)을 50% 수용성 메탄올 용매를 사용한 역상의 중압 액체 크로마토그래피(MPLC, 컬럼: ODS-S-50 B, 120 Å, 50 μm)를 이용하여 셀퍼레틴(550 mg, 0.055 w/w %)을 수득하였다.
- [0054]
- [0055] 순수 셀퍼레틴은 280-285° C의 녹는점을 나타내는 비결정질의 노란색 파우더로 형성되며 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD)의 스펙트럼 정보는 다음과 같다.
- [0056] δ: 7.50 (1H, d, J=8.25Hz, H-4), 7.42(1H, br s, H-2'), 7.13(1H, d, J=7.3Hz, H-6'), 6.74(1H, d, J=8.25Hz, H-5'), 6.62~6.58(3H, m, H-5, H-7, H-10); ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) δ: 183.1(C-3), 168.5(C-6), 167.2(C-8), 148.0(C-4'), 146.4(C-2), 145.4(C-3'), 125.5(C-4), 125.0(C-6'), 124.2(C-1'), 117.6(C-2'), 115.3(C-5'), 113.4(C-9), 113.3(C-10), 112.8(C-7), 98.0(C-5); (-)-ESI-MS m/z: 269[M-H]⁻.
- [0057]
- [0058] **실험예 1 : 셀퍼레틴의 기도 감염 억제 효과 입증**
- [0059] <동물 관리 조건>
- [0060] 실험 동물인 무균 수컷 BALB/c 쥐(이하, '실험 대상 쥐')는 샘타코사(오산, 한국)로부터 구입하였다. 층류의 캐비닛에 수용했고 표준화된 실험실에서 자유롭게 먹이를 먹도록 유지했다. 각각의 실험은 7~8주 된 쥐로 시작하였다. 모든 실험용 동물들은 전북대학교의 실험동물관리위원회에 의해 승인된 조약 하에 이번 연구에 사용되도록 유지했다.
- [0061]
- [0062] <실험군 및 양성대조군 및 음성대조군의 면역>
- [0063] 시험시작일에(0일째) 실험대상 쥐의 복막에 20 μg의 오브알부민(grade V, Sigma, St. Louis, MO, USA)과 2.25 mg의 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide) 면역보강제 투여로 면역시키고 방치하였다. 14일째에는 수산화 알루미늄 없이 20 μg의 오브알부민을 단독으로 처리하였다.
- [0064]
- [0065] <음성대조군의 면역 후 식염수 처리>
- [0066] 음성대조군은 상기의 면역 단계를 통해 면역된 쥐를 에어로졸화된 식염수에 실험 28일과 35일째에 노출시켰다.
- [0067] 구체적으로, 식염수의 에어로졸화는 면역된 쥐를 초음파 분무기(NE-U12, Omron, Tokyo, Japan; output 0.8 ml/min)를 사용하여 플렉시글래스 노출 챔버(24.5 × 40.5 × 15.0 cm) 안에서 20분 동안 식염수에 노출시켜 수행했다.
- [0068]
- [0069] <양성대조군 및 실험군의 오브알부민 감염>
- [0070] 상기의 면역 단계를 통해 면역된 쥐는 에어로졸화된 오브알부민에 실험 28일과 35일째에 노출시켰다.
- [0071] 구체적으로, 오브알부민의 에어로졸화는 면역된 쥐를 초음파 분무기(NE-U12, Omron, Tokyo, Japan; output 0.8 ml/min)를 사용하여 플렉시글래스 노출 챔버(24.5 × 40.5 × 15.0 cm) 안에서 20분 동안 오브알부민 (1.5%)에 노출시켜 수행했다.
- [0072] 양성대조군 및 실험군은 면역단계 후 오브알부민 감염단계를 거쳐 기도감염이 유발되었다.
- [0073]

- [0074] <실험군의 셀퍼레틴 처리>
- [0075] 쥐는 셀퍼레틴이 나타내는 기도 감염의 치료 효과를 실험하기 위해서 실험 35일째 오브알부민 감염으로부터 2시간 후에 셀퍼레틴의 1회(1회 복용량 : 40 μ g/kg) 복강 내 주사를 맞았다.
- [0076] 셀퍼레틴의 기도 내 염증세포의 치료 효과를 실험하기 위해서 기관지 폐포 세척액 내 전체 및 감별 세포 계산을 수행하였다.
- [0077] 상기 기관지 폐포 세척액은, 기관지 폐포 세척(BAL, Bronchoalveolar lavage)을 통해 획득하였다.
- [0078] 기관지 폐포 세척은 실험군을 실험 35일째 에어로졸화된 오브알부민 감염한지 36시간 후에 기관지 폐포 세척을 수행하였다. 구체적으로, 쥐를 마취시켰고 기관에 흉부를 약하게 마사지하는 동안 캐놀러를 삽입했다. 폐를 0.7 ml PBS로 세척하여 기관지 폐포 세척액 샘플을 수집했고 100 μ l 부분표본 당 세포들의 숫자는 혈구계산기를 사용하여 결정했다. 나머지 샘플은 원심분리했고, 표면에 뜬 것은 사이토카인 분석이 수행될 때까지 -70°C에 저장했다. 펠렛은 PBS 내에 재부유시키고, 사이토스핀(cytospin)을 준비하여 기관지 폐포 세척한 세포들을 디큐(International reagents Corp., Bobs, Japan)염색하였다.
- [0079]
- [0080] <실험군의 셀퍼레틴 처리를 통한 기도감염 억제 효과>
- [0081] 음성대조군과 비교해 볼 때, 양성대조군은 오브알부민으로 감염된 결과, 호산성백혈구의 증가가 두드러지며 약간의 림프구의 증가가 나타났다. (도 1A 참조)
- [0082] 그러나, 실험군은 오브알부민 감염 후의 셀퍼레틴 처리에 따라, 호산성백혈구와 림프구의 증가($p < 0.01$)가 상당히 약화되었다.
- [0083]
- [0084] 기도 내 주화성의 감소와 폐의 조직학적 변화는 서로 밀접한 관련이 있다.
- [0085] 양성대조군의 폐는 넓게 편 혈관주위와 세기관지 주위의 염증성 세포의 침윤을 보여준다.(도 1B참조) 이 경우, 침윤된 염증을 일으키는 세포들의 대다수는 호산성백혈구다.
- [0086] 그러나 셀퍼레틴으로 처리한 실험군의 경우, 염증세포 침윤이 상당히 감소하였음을 알 수 있었다.(도 1B참조)
- [0087] 이러한 결과는 셀퍼레틴으로 치료시 효과적으로 염증세포들의 침윤을 막고 알레르기성 기도 감염을 약화시킴을 나타낸다.
- [0088]
- [0089]
- [0090] **실험예 2 : 셀퍼레틴의 NF- κ B의 활성 감소 입증실험**
- [0091] **실험예 2-1 : 전기영동의 이동성 측정 방법**
- [0092] 실험예 1의 음성대조군, 양성대조군, 실험군 쥐의 폐 조직으로부터 핵 추출물을 준비하고 내인성의 프로테아제 활동을 막기 위해서 1 Mm PMSF을 가하였다.
- [0093] κ -사슬 결합자리(κ B, 5' -CCGGTTAACAGAGGGGCTTCCGAG-3')를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 프로브로 사용하였다. 이를 위해, 2개의 상보적인 가닥을 풀고 [α -³²P]dCTP로 라벨을 붙였다. 라벨이 붙여진 올리고뉴클레오타이드들(10,000 cpm), 10 μ g의 핵 추출물들, 그리고 결합 버퍼(binding buffer) (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM KCl, 10 mM EDTA, 50% glycerol, 100 ng poly(dI?dC), 1 mM DTT)를 20 μ l의 최종부피로 하여 상온에서 30분 동안 배양하였다.
- [0094] 다음에 반응 혼합물은 0.5 $\times$ 트리스붕산(Tris-borate)버퍼 내 4% 폴리아크릴아미드 겔의 전기영동에 의해 분석하였다. 겔을 건조시킨 후 방사선 사진 촬영하였다.
- [0095] **실험예 2-2 : 웨스턴 블롯 분석 방법**
- [0096] 실험예 1의 음성대조군, 양성대조군, 실험군의 폐 조직을 프로테아제, 포스파타제 억제제 및 준비된 단백질 추출 용액(PRO-PREP, iNtRON, Sungnam, Korea)으로 균질화되었다.

- [0097] 단백질의 30 μ g을 포함하는 호모제네이트는 10% SDS-PAGE로 분리되며 나이트로셀룰로오스 시트로 이동하였다.
- [0098] p50, p65, I κ B α , PCNA(proliferating cell nuclear antigen), 또는 β -actin (Santa Cruz Biochemicals, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 제1의 항체의 1 μ g/ml과 함께 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0099] 접합 알칼리성 인산분해 효소 안티-토끼 IgG(Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG, Santa Cruz Biochemicals) 은 2차 항체로 사용하였다.
- [0100] 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 양성대조군의 폐 조직으로부터 얻어진 핵 내 NF- κ B의 p50과 p65 서브유닛들의 레벨은 증가되었음을 확인할 수 있었다.(도 2A참조) 게다가 NF- κ B와 폐 핵 추출물의 결합이 증가했고, 이러한 결과는 음성대조군과 비교된다.(도 2B참조)
- [0101] NF- κ B 에 대한 DNA-단백질 상호작용의 특이성은 라벨이 붙지 않은 올리고뉴클레오티드(도 2B참조, lane 4)를 50배 초과 사용하여 경쟁적 억제를 통해 증명된다.
- [0102] 폐 조직 내 p50 과 p65 서브유닛들의 면역염색은 또한 p50 과 p65 서브유닛들의 핵 전위를 뒷받침한다.(도 2C참조) 그러나, 셀퍼레틴 처리된 쥐(실험군)로부터 준비된 핵 추출물은 핵 전위가 억제되고, NF- κ B와 DNA 결합이 감소한다.(도 2참조)
- [0103] 발명자는 시토솔(cytosol)분획 내 I κ B α 레벨의 변화를 또한 확인하였다. 음성대조군 폐의 유사한 분획과 비교했을 때, 오브알부민 감염된 쥐(양성대조군)로부터 얻어진 폐 조직들은 시토솔 내 I κ B α 단백질 레벨이 감소하였다.(도 2A 참조)
- [0104] 그러나 오브알부민 감염의 결과로서 I κ B α 의 강등은, 셀퍼레틴 치료시 두드러지게 억제됨을 또한 확인하였다.(도 2A참조)
- [0105]
- [0106] **실험예 3 : 셀퍼레틴의 사이토카인 레벨의 감소**
- [0107] 사이토카인 분석 시험에 있어서 TNF- α , IL-5, IL-13, 그리고 기관지 폐포 세척액 내 에오타신의 수치는 ELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)로 확인하였다.
- [0108] 이 때, 사이토카인의 검출의 낮은 한계는 다음과 같다.
- [0109] TNF- α 의 검출한계는 >5.1 pg/ ml이고, IL-5의 검출한계는 >5 pg/ml이고, IL-13의 검출한계는 >1.5 pg/ml이고, 에오타신의 검출한계는 >3 pg/ml이었다.
- [0110] 본 실험은 셀퍼레틴이 사이토카인 레벨에 미치는 영향을 확인하기 위하여 기관지 폐포 세척액 내 분비된 사이토카인의 레벨을 평가했다.
- [0111] 사이토카인 레벨 평가에 실험예 1의 기관지 폐포 세척액 중 -70 $^{\circ}$ C에 저장해 놓은 샘플들을 사용하였다.
- [0112] 양성대조군은 오브알부민의 감염으로 TNF- α 가 14.8배 증가하였음이 확인되었다. 그리고 실험군은 셀퍼레틴의 치료로 오브알부민 감염-매개 TNF- α 생성이 상당히 감소됨이 확인되었다.(도 3A참조)
- [0113] 그리고 셀퍼레틴에 의해 T세포의 반응이 영향을 받는지 여부를 시험하기 위해서 Th2 사이토카인(IL-5 과 IL-13)의 레벨을 측정했다.
- [0114] 오브알부민 감염된 양성대조군의 기관지 폐포 세척액 내의 IL-5 과 IL-13이 각각 11.4- 과 4.1-배 증가하였음이 확인되었다. (도 3C참조 및 도 3D참조)
- [0115] 그리고 셀퍼레틴 처리된 실험군의 경우, IL-5 과 IL-13이 각각 63.9% 과 62.6%로 상당히 감소시킴이 확인되었다. (도 3C참조 및 도 3D참조)
- [0116] 또한, 호산성백혈구의 점증을 위한 사이토카인을 분석했다.
- [0117] 셀퍼레틴으로 처리된 실험군의 기관지 폐포 세척액내 에오타신 레벨은 양성대조군 보다 상당히 낮추어 진다. (도 3B참조)
- [0118] 그 결과 셀퍼레틴 주사된 쥐의 기관지 폐포 세척액 내 감소된 호산성백혈구의 숫자가 유지된다. (도 1참조)
- [0119]

- [0120] **실험예 4 : 셸퍼레틴의 기도 내 뮤신 과분비 억제 실험**
- [0121] **실험예 4-1 : 셸퍼레틴의 기도 내 뮤신 과분비 억제**
- [0122] 도 4B에서 볼수 있는 바와 같이, 실험예1의 음성대조군은 최소한의 축내 뮤신이 관찰되었다. 반면에 오브알부민 감염된 양성대조군은 부분적이거나 완전한 기도 폐쇄로 야기된 과도한 뮤신을 함유함이 확인되었다.
- [0123] 오브알부민 감염된 양성대조군은 배상 세포의 숫자가 증가한다. (도 4A참조)
- [0124] 그러나, 셸퍼레틴의 치료한 실험군은 뮤신 생산이 정상 레벨 근처까지 효과적으로 약화되었음이 확인되었다. (도 4B 참조)
- [0125] 이러한 실험 결과, 셸퍼레틴과 뮤신 함량의 상관관계가 확인된다. (도 4B참조 및 실험예 4-2참조)
- [0126] **실험예 4-2 : 조직학 연구 및 뮤신 분석 방법**
- [0127] 10% 포르말린으로 실험예 1의 음성대조군, 양성대조군, 실험군의 폐를 고정하고, 각각의 폐 조직을 파라핀 안에 묻어 두었다. 4 μ m 로 잘려진 고정된 조직은 유리 슬라이드에 놓고 파라핀을 제거하였다. 광학현미경으로 관찰 하기 위해 조직을 H&E로 염색하였다.
- [0128] 뮤신의 검출을 위해 조직은 염색제(Periodic Acid-Schiff)로 염색된다.
- [0129] 뮤신 레벨의 정량화를 위해 음성대조군, 양성대조군, 실험군의 기관지 폐포 세척액을 모으고 세포들은 원심분리 기로 제거했다.(실험예 1의 기관지 폐포 세척액의 수득방법 참조)
- [0130] 폐 조직 레벨은 뮤신-결합 렉틴, 자칼린(Calbiochem)을 사용하여 측정하였다.
- [0131] 미세적정 플레이트(Immulon IV;FisherScientific,Pittsburgh,PA,USA)의 웰은 뮤신 표준의 2배 희석물로 미리 코팅하였다.
- [0132] 폐 조직 샘플들은 37°C에서 2시간 동안 PBS안에 희석하고, 그리고 나서 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS내에 0.2%I-block(AppliedBiosystems,FosterCity,CA,USA)로 봉쇄하였다.
- [0133] 플레이트들은 0.05%Tween20를 함유하는 PBS로 헹구고 나서 37°C에서 1시간 동안 PBS로 희석된 5 μ g/ml의 하나 또는 그 이상의 비오틴 잔여물과 결합된 자칼린(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 을 배양하였다.
- [0134] 플레이트들을 헹구며 30분 동안 상온에서 접합 스트렙트아비딘 알칼리성 인산분해 효소(streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, Jackson ImmunoResearchLaboratories,WestGrove,PA,USA)의 1/500 희석액을 배양하였다.
- [0135] 최종 세척 후에 플레이트 상에 알칼리 완충 용액 내 희석된 파라-니트로페닐 포스페이트(*p*-nitrophenylphosphate)가 생성되어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0136]
- [0137] **실험예 5 : 셸퍼레틴의 기도과민증(AHR)의 발생 억제 실험**
- [0138] **실험예 5-1 : AHR의 측정 방법**
- [0139] 기도과민증은 에어로졸화된 메타콜린을 기도로 투여한 후관찰되는 기도 기능의 변화로 평가된다.
- [0140] 실험예 1의 음성대조군, 양성대조군, 실험군은 컴퓨터로 통제되는 작은 동물 인공호흡기(flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canada)연결하였다. 그리고 각각의 쥐는 분 당 150 호흡의 빈도로 10 ml/kg의 명목 일회 호흡량으로 호흡한다. 그리고 2 cm H₂O로 얻어지는 호기말양압은 자연스럽게 호흡하는 동안 얻어지는 평균 폐 용량과 유사하다. 호기말양압은 물 컬럼으로 인공호흡기의 호기구를 연결함으로써 얻을 수 있다.
- [0141] 메타콜린 에어로졸은 직렬의 호흡보조기와 바로 처리된 인공호흡장치를 통해 발생시킨다.
- [0142] 메타콜린에 기도 반응의 차이를 결정하기 위해서 각각의 쥐는 에어로졸 형태로 메타콜린(2.5-50 mg/ml in saline)이 증가하는 농도로 검사했다.
- [0143] R_L을 계산하기 위해 필요한 자료는 끊임없이 각각의 메타콜린 검사에 따라 수집되었다.

[0144] R_L 최대 값은 기도 기능의 변화를 표현하기 위해 선택된다.

[0145] R_L 은 식염수 에어로졸 치료 후에 기준치로부터 퍼센트 변화로 나타낸다.

[0146] **실험예 5-2 : 셸퍼레틴의 AHR의 발생 억제**

[0147] 천식은 메타콜린에 대한 과민반응과 기관지수축을 일으킨다. 그러므로 발명자는 셸퍼레틴이 기도과민증의 치료 효과가 있는지 확인하였다.

[0148] 오브알부민이 감작된 양성대조군은 메타콜린 흡입에 대한 반응으로 기도과민증이 확인되었다. 그러나 셸퍼레틴 처리한 실험군은 기도과민증이 대략 52%($p<0.01$)까지 감소 됨을 확인하였다.

[0149] 즉, 양성대조군이 큰 R_L 값을 갖으나, 실험군은 작은 R_L 값을 갖음을 통해 셸퍼레틴 처리시 기도과민증 발생 억제 효과가 확인된다.(도 5참조)

[0150]

[0151] **통계적 분석 방법**

[0152] 실험예 1 및 실험예 5-2의 실험적인 자료는 $\pm$ SEM 평균값으로 표현하였다. 통계적인 비교는 one-way ANOVA 를 사용하여 수행한 후, Fisher test의 결과를 통해 이루어졌다. $p<0.05$ 의 값은 통계학적 유의성의 표시이다.

[0153]

[0154] **제제예 1: 정제**

[0155] 하기의 구성에 따라, 통상의 정제 제조방법으로 각각 제제화하였다.

[0156]

[0157] 1-1. 정제 조성물

[0158] 셸퍼레틴 500.0 mg

[0159] 유당 500.0 mg

[0160] 탈크 5.0 mg

[0161] 마그네슘 스테아레이트 1.0 mg

[0162]

[0163] 1-2. 정제 조성물

[0164] 셸퍼레틴 50.0 mg

[0165] 유당 50.0 mg

[0166] 탈크 0.5 mg

[0167] 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg

[0168]

[0169] **제제예 2: 캡슐제**

[0170] 하기의 구성에 따라, 다음과 같은 방법으로 캡슐제를 제조하였다.

[0171] 셸퍼레틴을 체질하여 부형제와 혼합한 후, 젤라틴 캡슐 중에 충전하여 캡슐을 제조하였다.

[0172]

[0173] 2-1. 캡슐제 조성물

[0174] 셸퍼레틴 500.0 mg

[0175] 전분 1500 10.0 mg

[0176] 스테아르산마그네슘 BP 100.0 mg

[0177]

[0178] 2-2. 캡슐제 조성물

[0179] 셀퍼레틴 50.0 mg

[0180] 전분 1500 1.0 mg

[0181] 스테아르산마그네슘 BP 10.0 mg

[0182]

[0183] **제제예 3: 시럽제**

[0184] 하기의 조성에 따라, 다음과 같은 방법으로 시럽제를 제조하였다.

[0185] 먼저 정제수에 백당을 용해시켰다. 파라옥시벤조에이트, 파라옥시프로필-벤조에이트 및 셀퍼레틴을 가하여 60℃에서 용해시킨 후 냉각하고, 정제수를 가하여 150 ml로 만들었다.

[0186]

[0187] 3-1. 시럽제 조성물

[0188] 셀퍼레틴 5.0 g

[0189] 백당 95.1 g

[0190] 파라옥시벤조에이트 80.0 mg

[0191] 파라옥시프로필벤조에이트 16.0 mg

[0192] 정제수 150 ml

[0193]

[0194] **제제예 4: 액제**

[0195] 하기의 성분을 통상의 액제 제제방법으로 제제화하고, 갈색병에 충전하여 액제를 제조하였다.

[0196]

[0197] 4-1. 액제 조성물

[0198] 셀퍼레틴 500.0 mg

[0199] 이성화당 20.0 g

[0200] 산화방지제 5.0 mg

[0201] 메틸 파라벤조산 2.0 mg

[0202] 정제수 100.0 ml

[0203]

[0204] **제제예 5. 산제**

[0205] 하기의 성분을 통상의 산제의 제조방법으로 혼합하고, 봉지에 넣어 밀봉한 후 산제를 제조하였다.

[0206]

[0207] 5-1. 산제 조성물

[0208] 셀퍼레틴 50.0 mg

[0209] 유당 100.0 mg

[0210] 탈크 5.0 mg

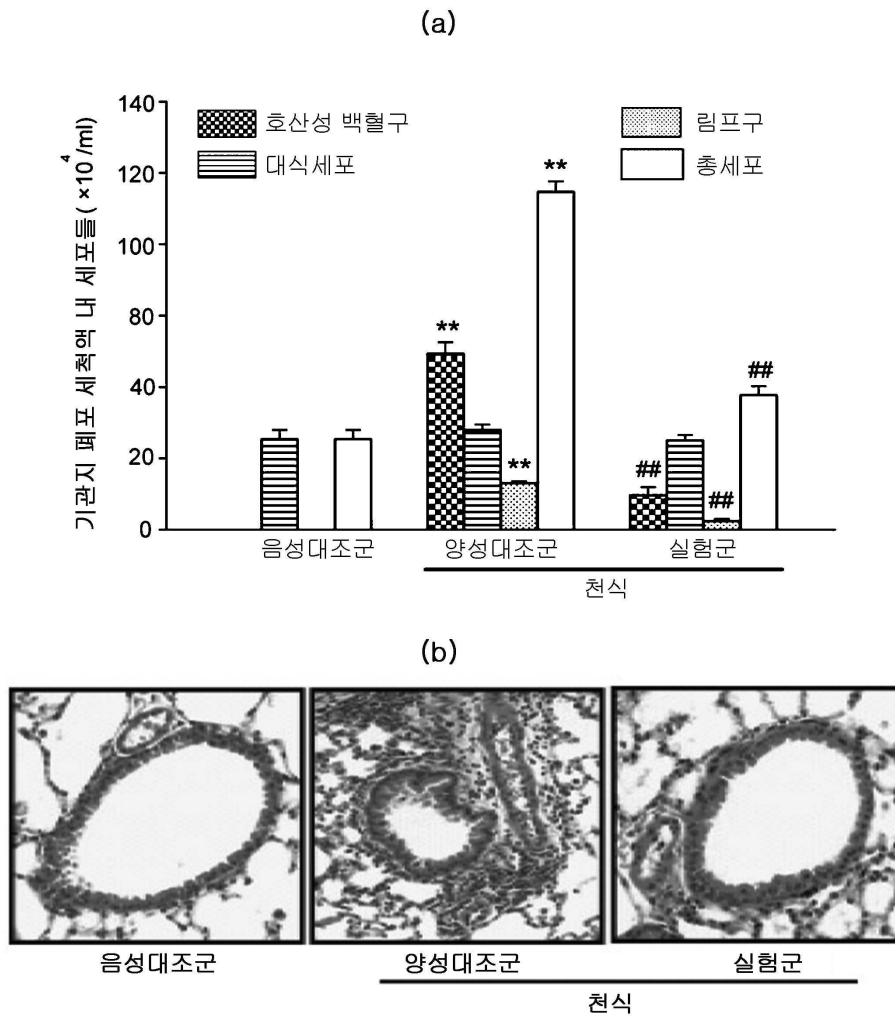
[0211]

[0212]

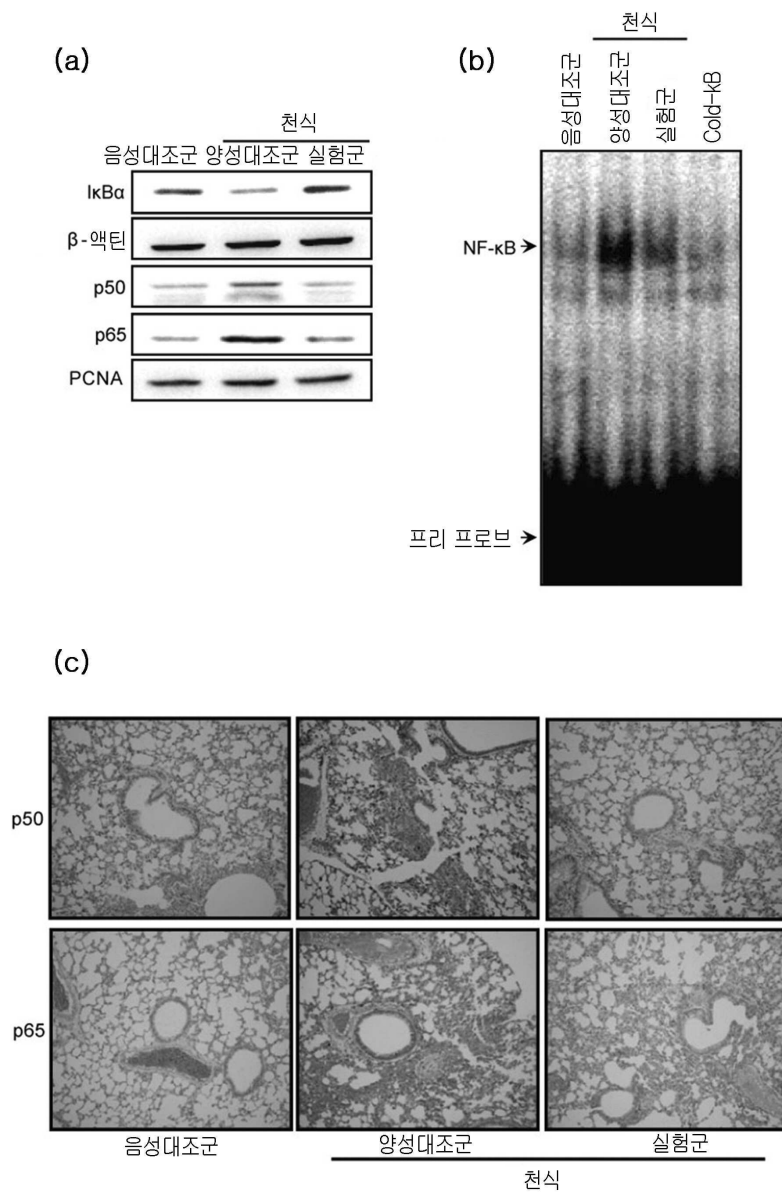
상기에서는 본 발명의 바람직한 실시 예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것이 아니고 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

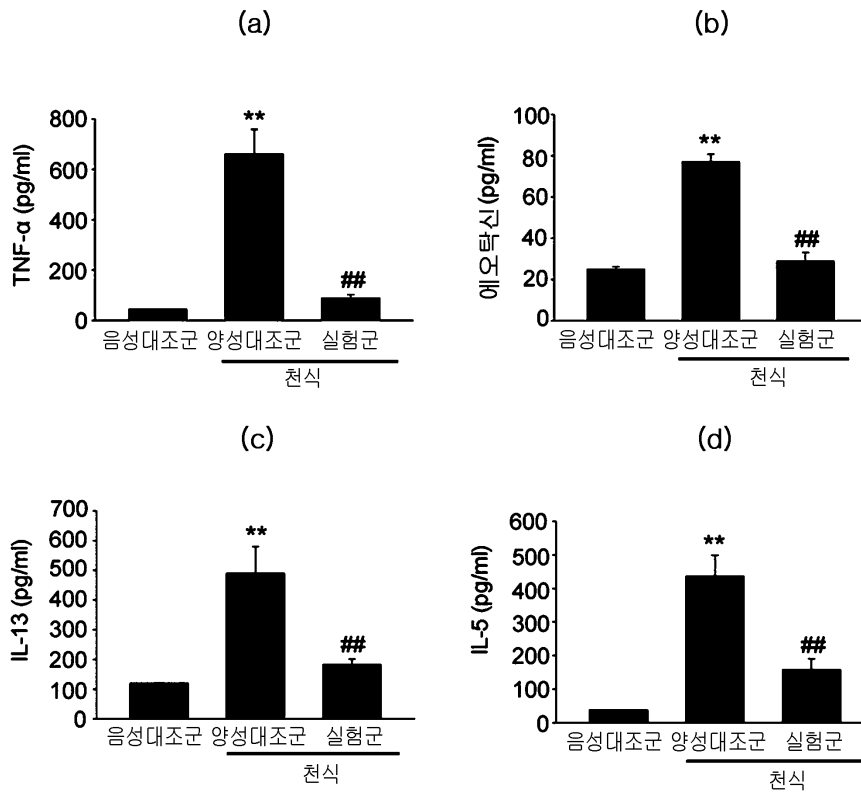
도면1



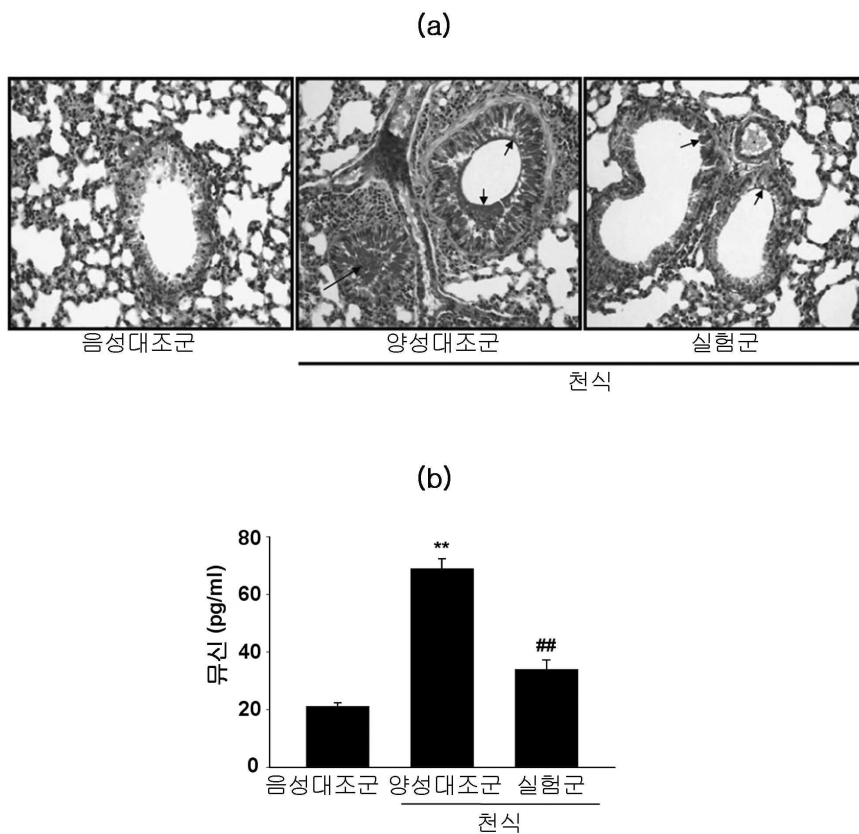
도면2



도면3



도면4



도면5

