



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월09일
(11) 등록번호 10-1295079
(24) 등록일자 2013년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/36 (2006.01) A61K 36/48 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0026444
(22) 출원일자 2011년03월24일
심사청구일자 2012년03월12일

(65) 공개번호 10-2012-0111756
(43) 공개일자 2012년10월11일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Ethnopharmacology (2013), 146(3), 773-793
W02012128496 A2

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자
이형규
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
안경섭
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이원희

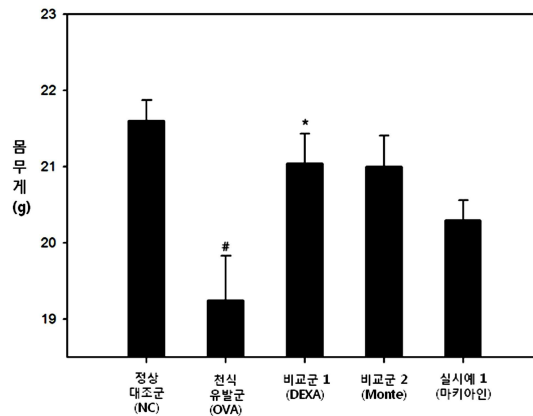
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **마키아인을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 마키아인을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 마키아인은 생체내실험(in vivo)에서 천식 발생의 원인으로 문제가 되는 기도과민성을 경감시키고, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제시키며, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제할 뿐만 아니라, 혈청과 기관지 폐포 세척액 내의 난 알부민, 특히 IgE 생성을 억제하고, 폐에서 Th2 사이토카인의 발현을 억제하는 효과가 우수하므로 천식 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장하영

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

김세미

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

오세량

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

김두영

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

김정희

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM2241012

부처명 과학기술부

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 만성질환 치료용 전임상 후보물질 개발

주관기관 한국생명공학연구원

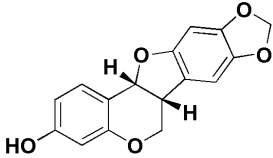
연구기간 2010.01.01 ~ 2010.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 천식은 기관지성 천식, 알러지성 천식, 아토피형 천식, 비아토피형 천식, 운동유발 천식, 아스피린 천식, 심인성 천식 또는 폐포성 천식인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 마키아인은 기도과민성 경감, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제 또는 기관지 내 염증세포 침윤 억제 효과가 있는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

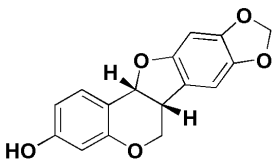
청구항 4

제1항에 있어서, 상기 마키아인은 기관지 내 염증세포의 수 감소, 혈청 내 IgE 항체의 농도 감소 또는 Th2 싸이토카인의 발현 억제 효과가 있는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 6

제5항에 있어서, 상기 천식은 기관지성 천식, 알러지성 천식, 아토피형 천식, 비아토피형 천식, 운동유발 천식, 아스피린 천식, 심인성 천식 또는 폐포성 천식인 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 마키아인은 기도과민성 경감, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제 또는 기관지 내 염증세포 침윤 억제 효과가 있는 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 마키아인은 기관지 내 염증세포의 수 감소, 혈청 내 IgE 항체의 농도 감소 또는 Th2 싸이토카인의 발현 억제 효과가 있는 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마키아인을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 천식이란 숨 쉴 때 들어오는 여러 가지 자극 물질에 대한 기관지의 과민반응으로, 기관지를 비롯한 기도점막에 염증이 생겨 부어오르며 기관지가 좁아져서 천명(쌉쌉거리는 호흡음)을 동반한 기침과 호흡곤란이 발작적으로 나타나는 질환으로, 기관지 천식치료제로는 조절제(controller) 및 증상완화제(Reliever)로 크게 구분되고 있다.

[0003] 조절제는 흡입용 스테로이드계 약물(Inhaled glucocorticosteroids), 항알레르기성 약물(Anti-allergic drug), 지속성 기관지 확장제(Long acting bronchodilators)등이 장기적으로 천식의 악화를 방지하는데 이용되고 있다. 증상완화제는 기관지 확장제를 사용하는데, 급성천식 발작이나 기관지 경색 등의 증상을 시급히 완화할 때 이용되고 있다. 어느 경우든지 가벼운 천식 질환의 증상을 완화하는데는 큰 문제가 없으나, 중기나 말기의 천식을 치료하는데 상당한 문제점이 있고, 고용량의 흡입용 스테로이드계 약물 사용시의 심각한 부작용이나 사용불편에 대한 문제가 대두 되고 있다.

[0004] 천식질환의 특성상 장기간 약물복용이 불가피하지만, 종래의 스테로이드계나 평활근이완제와 같은 천식치료제들은 면역능 저하, 감염, 심장에 대한 작용 등의 많은 부작용을 나타내므로 약물의 부작용이 거의 없고, 근원적 병상 개선 또는 치료 효과를 갖는 새로운 약물 개발이 시급히 요구되므로 종래의 약물이 갖는 부작용을 해소할 수 있는 천식치료제가 요구되고 있다.

[0005] 따라서, 천식 치료제로 현재 장기 또는 속성형 $\beta 2$ -효능제 또는 코르티코스테로이드(corticosteroids) 계열의 흡입제가 단지 증상완화를 위해 사용되고 있으므로 보다 근원적 천식 치료를 위해 새로운 작용점에 근거한 부작용이 적은 신약 개발이 필요하다.

[0006] 최근 들어 전 세계적으로 근본적인 알레르기 치료의 일환으로써 면역 조절제를 통한 치료를 시도하고 있다. 이는 알레르기 환자에게서 흔히 보이는 과도한 Th2 면역에 의해 억제되어 있는 Th1 면역반응을 활성화시키고, IgE를 감소시키는 것이 핵심이다. 그 예로 2003년 8월에 시판에 들어간 anti-IgE 항체를 이용한 천식 치료제, 졸레어를 들 수 있으며, 그 외에도 Th1 면역반응을 강력하게 활성화시키는 것으로 알려진 박테리아의 특정 DNA인 CpG ODN(oligodeoxy- nucleotide)이 현재 임상시험 중에 있다. 이외에도 알레르기 질환에서 특징적으로 나타나는(면역체계의 불균형 때문에 생산되는) 다양한 종류의 사이토카인 및 케모카인에 대한 항체 등을 이용한 제품 개발이 시도되고 있다.

[0007] 현재 천식/COPD 치료제 부문에서 GSK의 Advair/Seretide, 머크의 Singulair, 베링거인겔하임의 Spiriva, 아스

트라제네카의 Symbicort 등이 블록버스터급 약물의 위치를 차지하고 있는 것으로 나타났다.

[0008] 그러나 일부 치료제의 경우 특허만료로 인한 제너릭 경쟁에 직면해 매출 감소가 불가피할 전망이며 시장의 성장과 함께 제너릭 출시 경쟁 및 신약 출시 경쟁이 심화 될 것으로 예상된다.

[0009] 세계 인구 10%가 앓고 있는 알레르기성 염증질환인 천식은 환경오염 속도에 따라 꾸준히 증가하고 있는 대표적인 알레르기성 질환으로, 미국 국립 심폐혈관연구소와 유럽 호흡기 학회에 의하면, 천식에 관한 연간 비용은 미국에서 161억 달러, EU에서 163억 달러로 예측되며, 천식질환의 특성상 장기간 약물복용이 불가피하지만, 종래의 스테로이드제나 평활근 이완제와 같은 천식치료제들은 면역능 저하, 감염, 심장에 대한 작용 등의 많은 부작용을 나타내므로 약물의 부작용이 거의 없고, 근원적 병상 개선 또는 치료 효과를 갖는 새로운 약물 개발이 시급히 요구되므로 종래의 약물이 갖는 부작용을 해소할 수 있는 천식치료제가 요구되고 있으며, 따라서, 식물유래 추출물을 대상으로 한 천식 치료 효과를 나타내는 논문 및 특허권이 많이 보고되고 있는 실정이다.

[0010] 종래의 천식의 예방 및 치료용 조성물로는 대한민국 공개특허 제2008-023570호에서는 단삼(Salvia miltiorrhiza BUNGE)의 조추출물, 극성용매 가용추출물 또는 비극성용매 가용추출물을 유효성분으로 함유하는 천식 및 알러지성 질환용 조성물을 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제2004-097820호 알파 리포산을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료용 조성물을 개시하고 있다. 또한, 대한민국 공개특허 제2010-062450호에서는 케피어 그레인(Kefir grain)에서 분리한 균주인 클루베라마이세스(Kluyveromyces marxianus)를 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있는 등 다양한 종류의 추출물, 화합물 또는 균주 등이 천식을 치료하고자 연구되고 있으나, 천식의 치료에 유용한 신규 치료제의 개발이 여전히 요구되고 있는 실정이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 천연물 유래의 새로운 천식 치료제를 개발하기 위하여 연구하던 중 마키아인 화합물이 생체 내실험(in vivo)에서 기도과민성을 경감시키고, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제시키며, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제하여 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

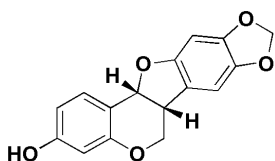
[0012] 본 발명의 목적은 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] [화학식 1]



[0016] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 마키아인은 생체내실험(in vivo)에서 천식 발생의 원인으로 문제가 되는 기도과민성을 경감시키고, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제시키며, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제할 뿐만 아니라, 혈청과 기관지 폐포 세척액 내의 난 알부민, 특히 IgE 생성을 억제하고, 폐에서 Th2 사이토카인의 발현을 억제하는 효과가 우수하므로 천식 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

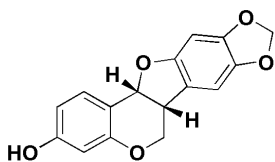
도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 마우스의 몸무게 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 Penh 수치를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 혈청 내의 IgE 농도를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 농도를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 기관지 폐포 세척액 내의 염증세포 수를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 기관지 폐포 세척액 내의 Th2 사이토카인의 발현 정도를 나타내는 형광도면이다.
- 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 기관지 폐포 세척액 내의 Th2 사이토카인의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 활성 산소 발생 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 세기관지 및 혈관 주위의 염증 유무를 나타내는 도면이다.
- 도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 세기관지 및 혈관 주위의 염증 수치를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 마키아인(Maackiain) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

화학식 1



- [0021]
- [0022] 본 발명에 따른 마키아인은 추출하여 사용하거나 제조하여 사용할 수 있고, 판매되는 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 고삼(*Sohpora flavescens*)의 뿌리에서 분리 및 동정하여 사용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0023] 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 기관지 천식에 있어서 발병기전과 새로운 약물의 효능연구에 보편적으로 사용되고 있고, 난백알부민 항원에 대한 반응이 우수하여 난백알부민을 항원으로 유발한 BALB/c 마우스 기도 염증 모델을 사용하였고(헤르즈 U, et al., *Immunol Cell Biol*, **74**, 209-15, 1996), 상기 마우스 천식 모델은 폐의 호산구성 염증 및 기도 과민 반응이라는 두 가지 측면에 있어서, 사람에서의 기관지 천식과 유사하여 약물에 대한 반응 연구도 다양하게 진행되고 있다(이동근, 소아과:제46권, 제10호, 952-957, 2003).

- [0024] 본 발명에 따른 마키아인을 투여한 마우스에서 천식의 특징 중 기도 과민성, 기관지 폐포 세척액 내 염증세포의 수 및 혈청 내 IgE 항체의 농도를 천식 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났고, 폐의 Th2 세포에서 분비되는 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-6(IL-6) 및 인터루킨(IL-13)을 포함하는 Th2 사이토카인의 발현을 우수하게 억제하며, 활성 산소 발생량을 억제하고, 기도 점막 내 염증 세포의 침윤을 감소시키는 효과를 나타내었다.
- [0025] 구체적으로, 메타콜린을 흡입시켜 폐활량이 줄어드는 정도를 알아보는 검사로 천식 위험 여부를 확인할 수 있는 기도과민성을 메타콜린 농도 증가에 따른 Penh 수치로 측정된 결과, 천식 유도군에서는 Penh 수치가 급격히 증가하는 반면, 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 Penh 수치가 1.6905 ~ 2.6916로 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다(표 1 및 도 2 참조).
- [0026] 또한, IgE는 기관지 천식에서 중요한 역할을 한다. 알레르겐에 감작이 되면 특이 IgE 항체가 형성되어 혈중에 존재하거나 비만세포, 호염구 세포 표면에 부착하게 된다. 특이 알레르겐에 다시 노출되면 이 알레르겐이 비만세포에 붙어 있는 IgE에 결합되면서 많은 염증매개 물질이 분비되어 기도 염증 및 기관지 수축을 일으킨다. 이전 연구들에서 혈중 IgE 농도가 기관지 천식의 중증도와 상관관계가 있음이 보고됨에 따라(Noah TL, et al., Clin Immunol 2000;97:43-49) 기관지 천식 발생에 IgE의 중요성이 인식되고 있다.
- [0027] 이에, 본 발명에 따른 혈청 및 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 항체의 농도를 측정된 결과, 혈청 내 IgE 항체 농도는 천식 유발군(23139.51±484.45 ng/ml)에 비해 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 19102.47±1383.76 ng/ml로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났고, 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 항체 농도는 천식 유발군(19.02±2.43 ng/ml)에 비해 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 10.31±1.17 ng/ml로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(표 2, 3 및 도 3, 4 참조).
- [0028] 나아가, 최근, 천식환자들에게서 기관지 폐포 세척술을 수행하여 기도 염증을 확인한 결과, 기관지 폐포 세척에는 림프구, 비만세포, 호산구 및 활성화된 대식세포 등이 증가해 있음이 확인되었다. 이에, 천식이 기도 염증 질환이라고 일반화되고, 여러 염증 세포들이 대부분 활성화되어 각종 매개물질들을 분비하여 천식을 유발하는 것으로 알려져 있어, 염증세포의 감소는 천식의 치료와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Haley KJ, et al., Am J Respir Crit Care Med, 1998;158:565-72).
- [0029] 이에, 본 발명에 따른 염증세포(대식세포, 비만세포, 호산구, 림프구)의 수를 측정된 결과, 천식 유발군에서 524.30±43.22인 반면, 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 117.60±14.26으로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.
- [0030] 특히, 조직에 침투하여 세포성매개 면역에 주로 관여하는 세포로 세포, 비장 및 호흡기 등에 걸쳐 퍼져 있고, 염증성 단백질을 함유하고 있어, 기도상피세포에 직접 손상을 주고, 기도과민성을 증가시키며 비만세포의 탈 과립을 유발하여 천식 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 호산구의 수는 천식 유발군에서 71.75±4.63인 반면, 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 25.40±3.65로 감소하는 것으로 나타났다(표 4 및 도 5 참조).
- [0031] 또한, 항원제시세포에 의해 항원이 Th2세포에 제시되면, Th2-세포가 활성화되어 Th2 사이토카인 인자인 인터루킨-4, 5, 6, 9, 13(IL-4, 5, 6, 9, 13)등을 분비하고, 이들은 알레르기성 기도 염증을 유발시킨다. 특히, IL-4 및 IL-13은 B-세포를 자극하여 IgE의 생산을 증가시키고, IL-6은 염증반응을 증폭시키는 것으로 알려져 있다(Wills-Karp M, et al., Science 1998;282:2258-2261).
- [0032] 이에, 본 발명에 따른 폐에서 사이토카인의 발현 정도를 분석 한 결과, IL-4, IL-6 및 IL-13의 발현은 천식 유발군에 비해 본 발명에 따른 마키아인을 투여한 군에서 각각 15.96%, 10.73% 및 16.59% 감소하는 것으로 나타나, Th2 사이토카인을 억제하는 것으로 나타났다(표 5 및 도 6, 7 참조).

- [0033] 나아가, 다른 염증질환과 마찬가지로, 천식에서도 산화적 스트레스가 증가되어 있으며, 대식세포와 호산구에서 활성산소물질을 생성한다. 산화적 스트레스의 증가는 중증도와 관련이 있으며, 염증반응을 더욱 증가시키고, 스테로이드에 대한 반응을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명에 따른 활성 산소 발생 억제 효과를 측정한 결과, 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서 천식 유발 군 보다 55.99% 감소하는 것으로 나타났다(표 6 및 도 8 참조).
- [0034] 또한, 항원 야기 후, 기관지에서는 호산구, 호중구 및 대식세포로 이루어진 염증성 세포의 침윤이 관찰된다(Oh SW, et al., J., Immunol 2002;168:1992-2000). 이에, 본 발명에 따른 기도 점막내 염증세포 침윤도를 평가한 결과, 천식 유발군에서는 세기관지 주변의 염증 지수가 3.60 ± 0.22 로 확인되었으나, 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 1.60 ± 0.22 로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났고, 혈관 주변에서는 천식 유발군(3.80 ± 0.18)에 비해 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 1.80 ± 0.18 로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(표 7 및 도 9, 10 참조).
- [0035] 따라서, 본 발명의 마키아인은 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 마키아인 화합물뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.
- [0037] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 마키아인 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, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0038] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1의 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.
- [0039] 동량의 화학식 1로 표시되는 마키아인 화합물 및 산 수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0040] 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, 비 용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다.
- [0041] 상기 본 발명의 마키아인 화합물을 포함하는 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 조성물을 0.1 내지 50 중량% 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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 및 광물유를 들 수 있다.

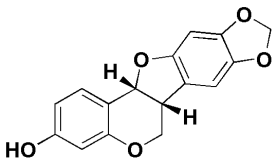
[0044] 제제 화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥 내 투여가 가장 바람직하다.

[0046] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 0.03 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 8 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0047] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 마키아인 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0048] [화학식 1]



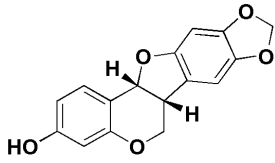
[0049] 상기 화학식 1로 표시되는 본 발명의 마키아인은 생체내실험(in vivo)에서 천식 발생의 원인으로 문제가 되는 기도과민성을 경감시키고, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제시키며, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제할 뿐만 아니라, 혈청과 기관지 폐포 세척액 내의 난 알부민, 특히 IgE 생성을 억제하고, 폐에서 Th2 사이토카인의 발현을 억제하는 효과가 우수하므로 천식 예방 및 개선용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다(표 1~7 및 도 1~10 참조).

[0051] 본 발명에 따른 마키아인은 천식 예방 및 개선용을 목적으로, 상기 마키아인 화합물을 식품, 음료 등의 건강보조 식품에 첨가할 수 있다.

- [0052] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0053] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 마키아인 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0055] 상기 외에 본 발명의 마키아인 화합물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 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 마키아인 화합물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0056] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 소석적려로부터 분리된 마키아인 화합물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0057] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0058] 하기 실시예는 본 발명을 설명하는 것일 뿐, 이에 한정되지 않는다.
- [0059] **<실시예 1> 마키아인의 제조**
- [0060] **단계 1: 고삼 뿌리 추출물의 제조**
- [0061] 건조된 고삼의 뿌리를 세절한 후, 1.0 kg에 10 L의 메틸 알코올을 가하여 상온에서 추출한 후 이를 3회 반복하여 메틸 알코올 추출물 161g 을 수득하였다.
- [0062] **단계 2: 고삼 뿌리 분획물의 제조**
- [0063] 상기 단계 1의 메틸 알코올 추출물을 물에 분산시키고, n-헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올을 이용하고, 순차적으로 분획하여 n-헥산 분획물 34 g, 에틸아세테이트 분획물 53 g, n-부탄올 분획물 54 g 및 물 분획물 20 g을 얻었다.
- [0064] **단계 3: 마키아인 화합물의 분리 및 동정**
- [0065] 상기 단계 2에서 수득한 에틸아세테이트 분획물 14.36 g 을 15/1(v/v) 내지 1/1(v/v)의 헥산/클로로포름(n-hexane/chloroform)을 기울기 용출용매로 이용하여 실리카 젤 컬럼크로마토그래피를 수행하고, 얻은 분획 중 마

키아인 함유분획을 클로로포름/메틸알코올 20/1(v/v) 내지 1/1(v/v)에서 용출한 후에 분리된 화합물을 결정을 유도하여 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물(160 mg)을 얻었으며, 구조분석을 위하여 NMR 분석 및 질량분석을 수행하였다. 그 결과 하기 화학식 1로 표시되는 화합물은 마키아인(Maackiain)으로 확인되었다(Journal of natural product-vol.58(12), 1966-1969 (1995)).

[0066] [화학식 1]



[0067]

[0068] 화합물명 : Maackiain

[0069] 분자식 : C₁₆H₁₂O₅

[0070] 분자량 : 284

[0071] ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.25 (1H, d, *J*=8.4Hz, H-1), 6.48 (1H, dd, *J*=8.4 and 2.4Hz, H-2), 6.96 (1H, s, H-7), 6.51 (1H, s, H-10), 6.26 (1H, d, *J*=2.4 Hz H-4), 5.93 (2H, d, *J*=10.5Hz, OCH₂O), 5.49 (1H, d, *J*=6.9Hz), 4.24 (1H, dd, *J* = 10.8 and 2.1Hz, H-6 α), 3.64 (1H, t, *J*=9.3Hz), 3.51(1H, m, H-6a).

[0072] ¹³C NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 132.0 (C-1), 109.6 (C-2), 158.7 (C-3), 105.3 (C-4), 156.3 (C-4a), 65.7 (C-6 α), 40.4 (C-6a), 118.4 (C-6b), 105.3 (C-7), 141.0 (C-8), 147.4 (C-9), 93.2 (C-10), 153.7 (C-10a), 77.9 (C-11a), 111.3 (C-11b), 101.0 (C-OCH₂O).

[0073] <제조예 1> 실험동물 및 기관지천식 유도

[0074] 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 평균 체중 20 g 내외의 6주령 Balb/c 암컷 생쥐를 실험동물로 사용하고, 1 주 간의 적응기간을 가진 후에 기본적인 신체검사상에서 이상이 관찰되지 않는 동물을 대상으로 준비하였다.

[0075] 2 주 간격으로 2 mg의 수산화알루미늄(A8222, Sigma, St. Louis, MO)과 난백알부민 20 μg(A5503, Sigma, St. Louis, MO)을 현탁한 인산완충용액(pH 7.4) 200 μl을 복강에 주입하여 감작시켰다. 첫 번째 난백알부민(OVA)복강투여 후, 28일부터 30일까지 1% 난백알부민을 초음파분무기를 이용하여 30분간 흡입시켰다.

[0076] 마지막 항원 투여 후 24 시간 뒤에 기도과민성을 측정하였고 48 시간 뒤에 치사량의 펜토바비탈(엔토발[®], 한림 제약주식회사)을 투여한 뒤 체중을 측정하고, 기관지 절개를 실시하여 총 1.2 ml의 생리식염수로 기관지폐포세척을 실시한 뒤 검체를 수거하였다. 정상 대조군(NC)으로 난백알부민을 투여, 흡입하지 않은 군, 천식 유발군(OVA)으로 난백알부민을 투여, 흡입하여 기관지 천식을 유도한 군, 비교군(DEXA)으로 난백알부민 흡입 1시간 전에 덱사메타손(dexamethasone; 3 mg/kg, PO : D4902, Sigma, St. Louis, MO)을 경구투여한 군, 비교군(Monte)으로 난백알부민 흡입 1시간전에 몬테루카스트(montelukast; 30 mg/kg, PO)를 경구투여한 군, 실험군(γ-mangostin)으로 난백알부민 흡입 1시간전에 상기 실시예 1의 마키아인(30 mg/ml, PO)을 경구투여한 군으로 실험을 진행하였으며 각 군당 5마리의 흰쥐를 사용하였다.

[0077] 정상 대조군의 체중은 21.60±0.25 g 이었으나 천식 유발군은 19.72±0.53 g 으로 현저한 체중감소를 보이는데 반해 덱사메타손 투여군(21.04±0.35 g), 몬테루카스트 투여군(21.08±0.36 g), 본 발명의 마키아인 투여군(20.30±0.23 g)으로 약물 투여군은 모두 정상 대조군에 가까운 체중회복을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0078] <실험예 1> 기도과민성의 측정

[0079] 본 발명에 따른 마키아인의 천식 발생에 의한 기도과민성 여부는 단일 챔버 체적변동 측정기(one chamber plethysmography; All Medicus, Seoul)를 이용하여 기도 저항을 측정하여 수학적으로 계산된 기도의 폐색을 반영하는 수치인 enhanced pause(Penh)를 측정하여 평가하였다. Penh의 측정은 정상 호흡 상태에서 기저값을 측정한 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/ml 의 농도로 점차 증가시키면서 흡입시킨 후 Penh를 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. 그 결과를 하기 표 1 및 도 2에 나타내었다.

수학적 식 1

[0080]
$$Penh = \left(\frac{Te}{RT-1} \right) \times \frac{PEF}{PIF}$$

[0081] Te : expiratory time(sec)

[0082] 흡기에서 다음 흡기까지

[0083] RT : relaxation time

[0084] 호기동안 호기량이 일회호흡량의 30%가 남을 때까지 걸리는 시간

[0085] PEF : Peak expiration flow

[0086] PIF : Peak inspiration flow

표 1

[0087]

구분	Penh 수치			
	0 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
실시에 1	0.4669±0.0235	1.4985±0.3003	1.7482±0.4341	2.0858±0.1481
정상군(NC)	0.4206±0.0217	0.5970±0.1024	0.6336±0.0682	0.6639±0.0682
대조군(OVA)	0.6299±0.0617	2.2917±0.3070	6.8642±0.8313	9.1854±1.6230
비교군 1(DEXA)	0.6486±0.1526	1.6750±0.0820	1.9963±0.1577	2.7864±0.4293
비교군 2(Monte)	0.4525±0.0313	1.5249±0.2432	2.1006±0.4758	2.3576±0.1741

[0088] 상기 표 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 대조군에서는 메타콜린 농도 증가에 따른 완만한 penh 수치 증가를 확인하였으나, 천식 유도군에서는 유의성 있게 급격한 penh 수치의 증가를 확인할 수 있었다.

[0089] 반면, 상기 비교군 1, 2 및 실시에 1의 약물 투여군(텍사메타손 투여군, 몬테루카스트 투여군, 마키아인 투여군)에서는 메타콜린 농도에 상관없이 천식군보다 유의하게 감소 되었으며, 이러한 차이는 저농도의 메타콜린 보다는 고농도의 메타콜린을 흡입시켰을 때 더욱 뚜렷한 차이를 나타내었다.

[0090] 따라서, 본 발명에 따른 마키아인은 천식의 원인인 기도과민성을 억제하므로 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0091] <실험예 2> 혈청과 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 측정

[0092] 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 천식의 중증도와 상관관계가 있는 IgE의 농도 측정을 혈청과 기관지 폐포 세척액 내 IgE의 농도를 면역효소법을 이용하여 측정하였다.

[0093] 각 군에서 채취한 혈청 및 기관지 폐포 세척액을 96-웰 플레이트(ELISA 플레이트)에 난백알부민(OVA)을 20 µg/ml의 농도로 pH 8.3의 0.1 M NaHCO₃ 완충액에 녹여 4 °C에서 밤샘 코팅시킨 후, 1% 소혈청 알부민이 함유된 PBS

로 비특이반응을 억제 시킨 후, 혈청 검체를 1:400으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다.

[0094] 잘 세척한 후 항-마우스 IgE 단일클론성 항체를 300배 희석하여 2시간 반응시킨 후 과산화효소가 결합 된 HRP-결합 염소 항-랫트 IgG 다중클로성 A(HRP-conjugated goat anti-rat IgG polyclonal A)를 4000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하였다.

[0095] 발색은 3.3' 5.5' -테트라메틸벤자이드인 기질로 반응시킨 후, 650 nm에서 분광 흡광도를 측정하였다. 혈청 내의 IgE 결과를 하기 표 2 및 도 3에 나타내었고, 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 결과를 하기 표 3 및 도 4에 나타내었다.

표 2

	혈청 내의 총 IgE 농도 (ng/ml)
실시예 1	19102.47±1383.76
정상군(NC)	90.12±239.06
대조군(OVA)	23139.51±484.45
비교군 1(DEXA)	15991.36±1194.92
비교군 2(Monte)	17176.54±2542.98

[0097] 표 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 혈청 내의 IgE 항체의 농도를 측정한 결과, 혈청 내 IgE 항체 농도는 천식 유발군(OVA)(23139.51±484.45 ng/ml)에 비해 본 발명의 마키아인을 투여한 군(실시예 1)에서는 19102.47±1383.76 ng/ml로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

표 3

	기관지 폐포 세척액 내의 총 IgE 농도 (ng/ml)
실시예 1	10.31±1.17
정상군(NC)	4.93±1.04
대조군(OVA)	19.02±2.43
비교군 1(DEXA)	10.15±1.38
비교군 2(Monte)	10.15±1.58

[0099] 또한, 표 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 기관지 폐포 세척액 내의 IgE 항체 농도는 천식 유발군(19.02±2.43 ng/ml)에 비해 본 발명의 마키아인을 투여한 군에서는 10.31±1.17 ng/ml로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

[0100] 따라서, 본 발명에 따른 마키아인은 천식과 관련 있는 IgE 농도를 억제하므로 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0101] <실험예 3> 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 분석

[0102] 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 천식과 관련이 있는 염증 세포 수의 증감을 측정하였다.

[0103] 각 군의 기관지 폐포 세척액을 회수 한 즉시 트리판 블루(Trypan blue)로 염색하여 죽은 세포를 제외한 총 세포 수를 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 계산한 다음 싸이토스핀(Cytospin) II로 표본 도말 후, 디프-퀵(Diff-Quick) 염색(Sysmex, Switzerland)을 수행하여 호산구와 그 외의 염증세포를 감별 계산하였다. 그 결과를 하기 표 4 및 도 5에 나타내었다.

표 4

구분	세포 수 ($\times 10^3$ 세포/마우스)		
	호산구 (eosinophil)	그 외 염증 세포 (other cell)	총 염증 세포 (total cell)
실시예 1	25.40 \pm 3.65	92.20 \pm 23.86	117.60 \pm 14.26
정상군(NC)	0.00 \pm 0.00	19.24 \pm 1.01	19.24 \pm 1.22
대조군(OVA)	71.75 \pm 4.63	452.55 \pm 93.48	524.30 \pm 43.22
비교예 1(DEXA)	8.24 \pm 1.31	81.00 \pm 10.40	89.24 \pm 6.98
비교예 2(Monte)	27.88 \pm 2.80	130.12 \pm 9.22	167.68 \pm 8.80

[0105] 표 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 총 염증세포의 수는 정상 대조군에서 19.24 \pm 1.22, 천식 유발군에서 524.30 \pm 43.22, 텍사메타손 투여군(비교예 1)에서 89.24 \pm 6.98, 몬테루카스트 투여군(비교예 2)에서 167.68 \pm 8.80, 본 발명의 마키아인 투여군(실시예 1)에서 117.60 \pm 14.26로 천식 유발군에 비해 약물투여군에서 모두 유의성 있게 감소하였다.

[0106] 또한, 그 외의 염증세포 수는 92.20 \pm 23.86로 유의성 있게 감소하였다.

[0107] 특히, 조직에 침투하여 세포성매개 면역에 주로 관여하는 세포로써, 세포, 비장 및 호흡기 등에 걸쳐 퍼져있고, 염증성 단백질을 함유하고 있어, 천식 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 호산구의 수는 정상 대조군에서 0.00 \pm 0.00, 천식 유발군에서 71.75 \pm 4.63, 텍사메타손 투여군(비교예 1)에서 8.24 \pm 1.31, 몬테루카스트 투여군(비교예 2)은 27.88 \pm 2.80, 본 발명의 마키아인 투여군(실시예 1)에서 25.40 \pm 3.65로 천식 유발군에 비해 약물 투여군에서 모두 유의성 있게 감소하였다.

[0108] 따라서, 본 발명의 마키아인은 천식과 관련 있는 염증 세포를 감소시킬 뿐만 아니라, 특히 천식에 큰 영향을 주는 호산구의 수를 감소시키므로 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0109] <실험예 4> 싸이토카인 mRNA 분석

[0110] 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 천식과 관련이 있는 싸이토카인 mRNA를 측정하여 분석하였다.

[0111] 각 군별로 채취한 기관지 폐포 세척액의 상층액에서 Th2 싸이토카인인 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨(IL-6) 및 인터루킨(IL-13)의 발현 정도를 분석하기 위하여 적출된 폐장에서 트리졸®(Invitrogen)을 이용하여 RNA를 분리하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction, quantitative RT-PCR, Promega, WI)을 수행하여 발현수준이 가장 낮은 경우를 1이라고 평가하였을 때의 상대 값(relative densitometric value, RDV)으로 평가하여 억제효과를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 5 및 도 6, 7에 나타내었다.

표 5

	상대 밀도 수치(relative densitometric value, RDV)(%) (NC : NC = 100%)		
	IL-4	IL-6	IL-13
실시예 1 (마키아인)	129.35 \pm 16.03	114.44 \pm 6.86	156.27 \pm 17.97
정상 대조군 (NC)	100.00 \pm 7.86	100.00 \pm 9.02	100.00 \pm 12.28
천식 유발군 (OVA)	159.91 \pm 14.87	128.20 \pm 6.51	187.35 \pm 7.49
비교군 1 (DEXA)	139.60 \pm 13.34	121.37 \pm 6.78	176.55 \pm 16.13
비교군 2 (Monte)	138.86 \pm 19.52	112.39 \pm 7.16	157.67 \pm 16.60

[0112]

[0113] 표 5에 나타낸 바와 같이, 기관지 폐포 세척액의 상층액에서 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-6 및 IL-13의 발현은 천식 유발군에 비해 비교군 1, 2 및 본 발명의 마키아인을 포함하는 약물 투여군에서 모두 감소하였으나, 특히, 본 발명의 실시예 1의 마키아인을 투여한 군에서 가장 뛰어난 억제효과를 나타내었으며, 천식 유발군에 비해 각각 15.96%, 10.73%, 16.59% 감소하였다.

[0114] 따라서, 본 발명의 마키아인은 천식과 관련 있는 Th2 사이토카인 인자인 IL-4, IL-6, 및 IL-13의 농도를 감소시키므로 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0115] <실험예 5> 활성 산소 생성량(Reactive oxygen species) 측정

[0116] 산화적 스트레스의 증가는 스테로이드에 대한 반응을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 다른 염증질환과 마찬가지로, 천식에서도 나타나는 활성산소의 생성량 측정하였다.

[0117] 각 군의 일부 기관지 폐포 세척액을 인산완충식염수(PBS)로 세척한 뒤, 10 μM의 형광시약의 일종인 2,7-디클로로플루오르세인 디아세테이트(2,7-Dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA, 35845, Sigma, , St. Louis, MO)를 첨가하여 10 분간 상온 암실에서 방치한 뒤 분광형광측정기를 이용하여 측정하였고(Ex=480 nm Em=522 nm), 정상 대조군에 대한 백분율로 그 결과를 하기 표 6 및 도 8에 나타내었다.

표 6

	활성 산소 생성량 DCF 형광(NC : NC = 100%)
실시예 1 (마키아인)	84.90±8.09
정상 대조군 (NC)	100.33±4.76
천식 유발군 (OVA)	192.89±27.36
비교군 1 (DEXA)	116.55±9.28
비교군 2 (Monte)	104.48±9.80

[0119] 표 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 마키아인 투여군의 활성 산소 발생량은 천식 유발군 보다 55.99% 감소하였으며, 비교군 1(덱사메타손) 39.58 % 및 비교군 2(몬테루카스트) 45.84 %의 투여군 보다 뛰어난 억제효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0120] 따라서, 본 발명의 마키아인은 천식에서 나타나는 활성산소의 생성량을 감소시키는 효과가 우수하므로 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0121] <실험예 6> 조직병리학적 검사

[0122] 항원이 야기 된 기관지에서는 호산구, 호중구 및 대식세포로 이루어진 염증성 세포의 침윤이 관찰된다. 이에 본 발명에 따른 마키아인의 천식에 대한 효과를 알아보기 위하여 기관지 폐포 세척을 수행하지 않은 폐를 떼어내어 조직병리학적 검사를 수행하였다.

[0123] 각 군의 기관지 폐포 세척을 수행하지 않은 적출된 폐장은 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 4 μm 두께로 영구조직 절편을 제작하여 각각 H & E 염색을 수행하였다. H & E 염색 후 각 개체의 조직 절편당 무작위로 5개 부위의 염증지수를 측정하여 평균을 내었다.

[0124] 염증지수 0 은 기관지 주변에 염증세포가 발견되지 않은 경우, 염증지수 1 은 간헐적으로 염증 세포가 관찰되는 경우, 염증지수 2는 대부분의 기관지 주변에 한층에서 두세층사이의 얇은 염증세포층이 관찰되는 경우, 염증지수 3은 대부분의 기관지 주변에 두세층에서 다섯층 이하의 염증세포층이 관찰되는 경우, 염증지수 4 는 대부분의 기관지 주변에 다섯층 이상의 두꺼운 염증세포층이 관찰되는 경우로 평가하였다. 그 결과를 하기 표 7 및 도 9, 10에 나타내었다.

표 7

	염증 지수	
	세기관지 주위	혈관 주위
실시에 1 (마키아인)	1.60±0.22	1.80±0.18
정상 대조군 (NC)	0.00±0.00	0.00±0.00
천식 유발군 (OVA)	3.60±0.22	3.80±0.18
비교군 1 (DEXA)	1.75±0.19	1.50±0.22
비교군 2 (Monte)	2.25±0.22	2.50±0.25

[0126] 본 발명에 따른 천식 유발군에서는 세기관지 주변에 호산구를 비롯한 많은 염증세포가 침윤되어 있었으며 과다 증식된 상피 세포와 비후 된 기관지 평활근도 확인되었다.

[0127] 반면, 표 7에 나타낸 바와 같이, 약물을 투여한 군에서는 염증세포의 침윤이 현저하게 감소 되어 이를 수치화하였을 때 천식 유발군은 세기관지 주변의 염증 지수가 3.60±0.22이었으나, 비교군 1(DEXA)은 1.75±0.19, 비교군 2(Monte)는 2.25±0.22 및 본 발명의 실시예 1의 마키아인 투여군은 1.60±0.22로 모두 천식 유발군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

[0128] 또한, 혈관 주변의 염증 지수는 천식 유발군에서 3.80±0.18로 나타났으나, 비교군 1은 1.50±0.22, 비교군 2는 2.50±0.25 및 본 발명의 실시예 1의 마키아인 투여군은 1.80±0.18로 모두 천식 유발군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

[0129] 따라서, 본 발명의 마키아인은 항원이 야기 된 기관지에서는 호산구, 호중구 및 대식세포로 이루어진 염증성 세포를 감소시키는 효과가 우수하므로 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0130] <실험예 7> 통계분석

[0131] 모든 측정값은 평균±오차로 표시하였으며, 여러 변수에 따른 평균값과 표준오차(mean±S.E.)을 계산하였고, 각 집단간의 비교는 SPSS 10.0 을 이용하여 만-휘트니 U(Mann-whitney U) 검정을 수행하여 분석하였다. 통계적으로 p 값이 0.05 미만인 경우에 유의적 차이가 있다고 판정하였다.

[0132] 본 발명의 마키아인은 천식 발생의 원인으로 문제가 되는 기도과민성을 경감시키고, 기도 내 활성 산소 발생량을 억제시키며, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제할 뿐만 아니라, 혈청과 기관지 폐포 세척액 내의 난 알부민, 특히 IgE 생성을 억제하고, 폐에서 Th2 사이토카인의 발현을 억제하는 효과가 우수하므로 천식 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0133] <제제예 1> 약학적 제제의 제조

[0134] 1-1. 산제의 제조

[0135] 마키아인 500 mg

[0136] 유당 100 mg

[0137] 탈크 10 mg

[0138] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0139] **1-2. 정제의 제조**

[0140] 마키아인 500 mg

[0141] 옥수수전분 100 mg

[0142] 유당 100 mg

[0143] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0144] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0145] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0146] 마키아인 500 mg

[0147] 옥수수전분 100 mg

[0148] 유당 100 mg

[0149] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0150] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0151] **1-4. 주사제의 제조**

[0152] 마키아인 500 mg

[0153] 주사용 멸균 증류수 적량

[0154] pH 조절제 적량

[0155] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0156] **1-5. 액제의 제조**

[0157] 마키아인 100 mg

[0158] 이성화당 10 g

[0159] 만니톨 5 g

[0160] 정제수 적량

[0161] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸

균시켜 액체를 제조한다.

[0162] <제제예 2> 건강식품의 제조

[0163]	마키아인	1000 mg
[0164]	비타민 혼합물	적량
[0165]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0166]	비타민 E	1.0 mg
[0167]	비타민	0.13 mg
[0168]	비타민 B2	0.15 mg
[0169]	비타민 B6	0.5 mg
[0170]	비타민 B12	0.2 μ g
[0171]	비타민 C	10 mg
[0172]	비오틴	10 μ g
[0173]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0174]	엽산	50 mg
[0175]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0176]	무기질 혼합물	적량
[0177]	황산제1철	1.75 mg
[0178]	산화아연	0.82 mg
[0179]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0180]	제1인산칼륨	15 mg
[0181]	제2인산칼슘	55 mg
[0182]	구연산칼륨	90 mg
[0183]	탄산칼슘	100 mg
[0184]	염화마그네슘	24.8 mg

[0185] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0186] <제제예 3> 건강 음료의 제조

[0187]	마키아인	1000 mg
[0188]	구연산	1000 mg
[0189]	올리고당	100 g
[0190]	매실농축액	2 g
[0191]	타우린	1 g

[0192] 정제수를 가하여 전체 900 ml

[0193] 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다.

[0194] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호 도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0195] <제제예 4> 기타 건강식품의 제조

[0196] 4-1. 음료의 제조

[0197]	꿀	522 mg
[0198]	치옥토산아미드	5 mg
[0199]	니코틴산아미드	10 mg
[0200]	염산리보플라빈나트륨	3 mg
[0201]	염산피리독신	2 mg
[0202]	이노시톨	30 mg
[0203]	오르트산	50 mg
[0204]	마키아인	0.48~1.28 mg
[0205]	물	200 ml

[0206] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 음료를 제조하였다.

[0207] 4-2. 츄잉껌의 제조

[0208]	껌베이스	20 %
[0209]	설탕	76.36~76.76 %
[0210]	마키아인	0.24~0.64 %
[0211]	후르츠향	1 %
[0212]	물	2 %

[0213] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 츄잉껌을 제조하였다.

[0214] 4-3. 캔디의 제조

[0215]	설탕	50~60 %
[0216]	물엿	39.26~49.66 %
[0217]	마키아인	0.24~0.64 %

[0218] 오렌지향 0.1 %

[0219] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 캔디를 제조하였다.

[0220] **4-4. 밀가루 식품의 제조**

[0221] 마키아인 0.5 내지 5 중량부를 밀가루 100 중량부에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0222] **4-5. 유제품(dairy products)의 제조**

[0223] 마키아인 5 내지 10 중량부를 우유 100 중량부에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

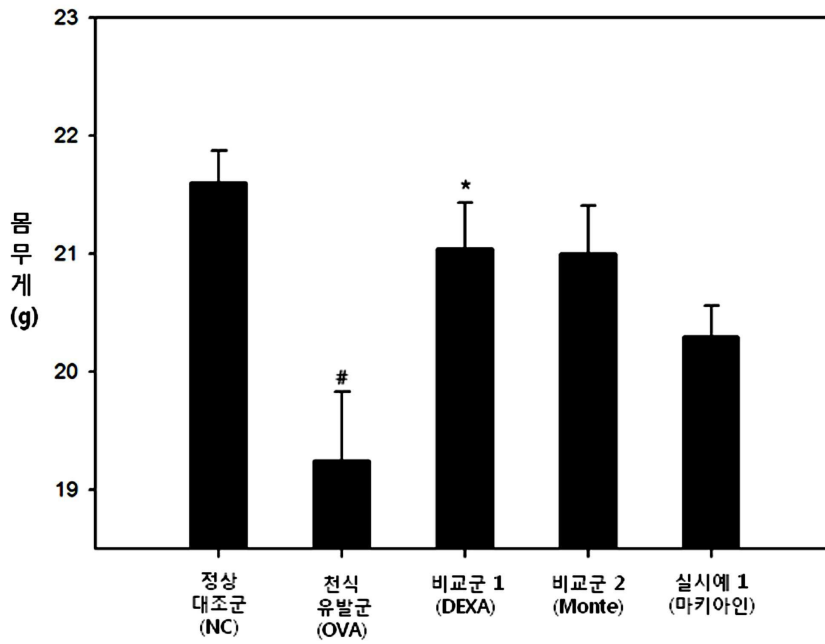
[0224] **4-6. 전식의 제조**

[0225] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화 시켜서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 검은콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 상기에서 제조한 곡물류 및 종실류와 본 발명의 마키아인을 다음과 같은 비율로 배합하여 제조하였다.

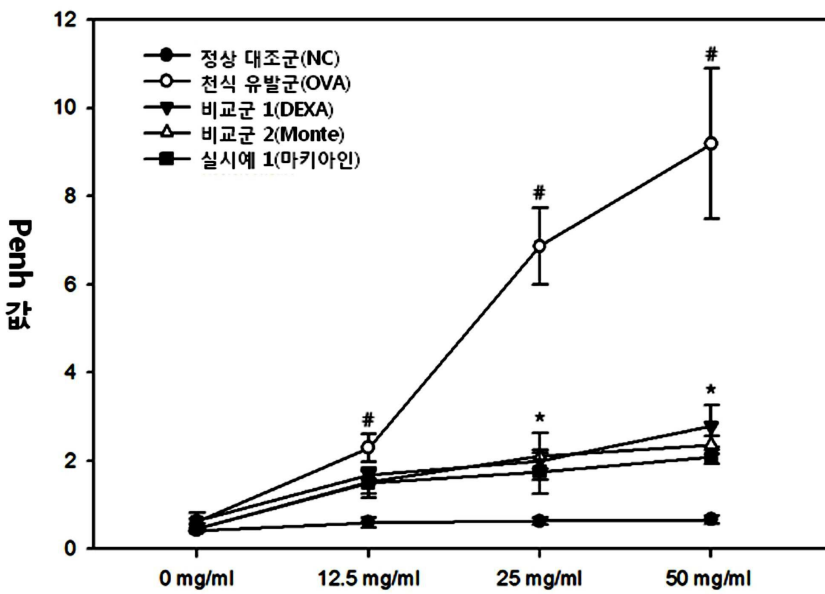
[0226]	현미	30 %
[0227]	울무	15 %
[0228]	보리	20 %
[0229]	들깨	7 %
[0230]	검정콩	7 %
[0231]	검은깨	7 %
[0232]	마키아인	3 %
[0233]	영지	0.5 %
[0234]	지황	0.5 %

도면

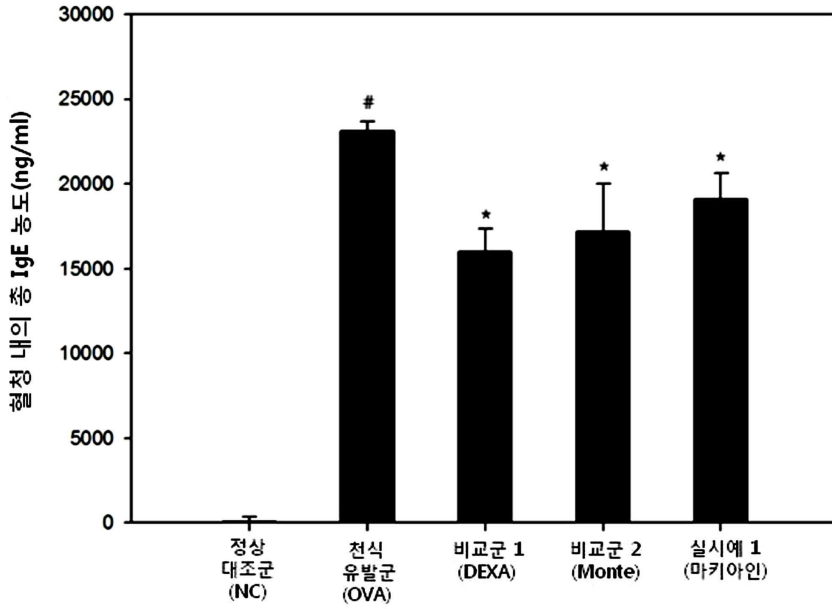
도면1



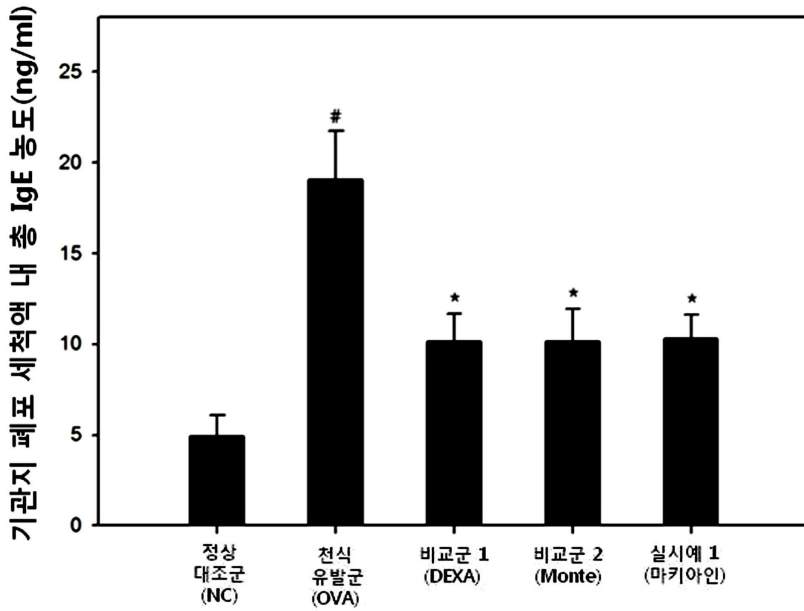
도면2



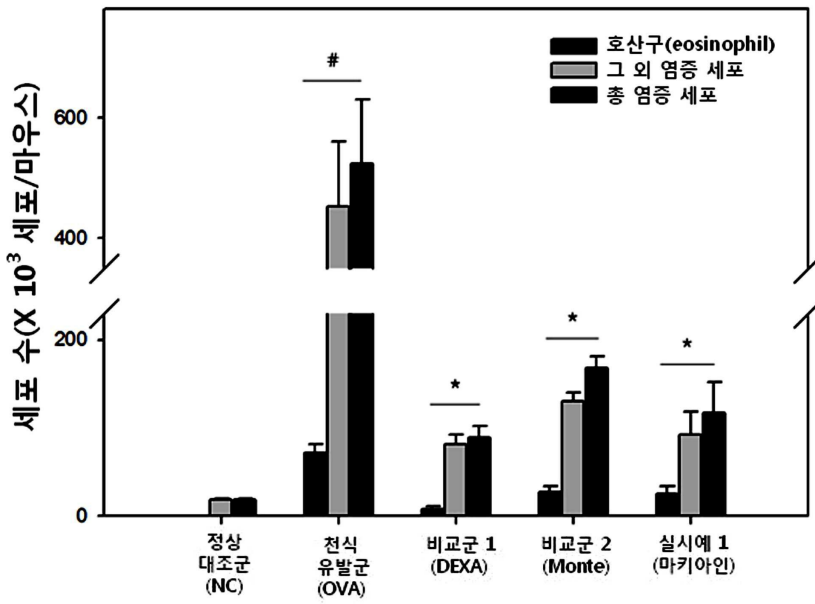
도면3



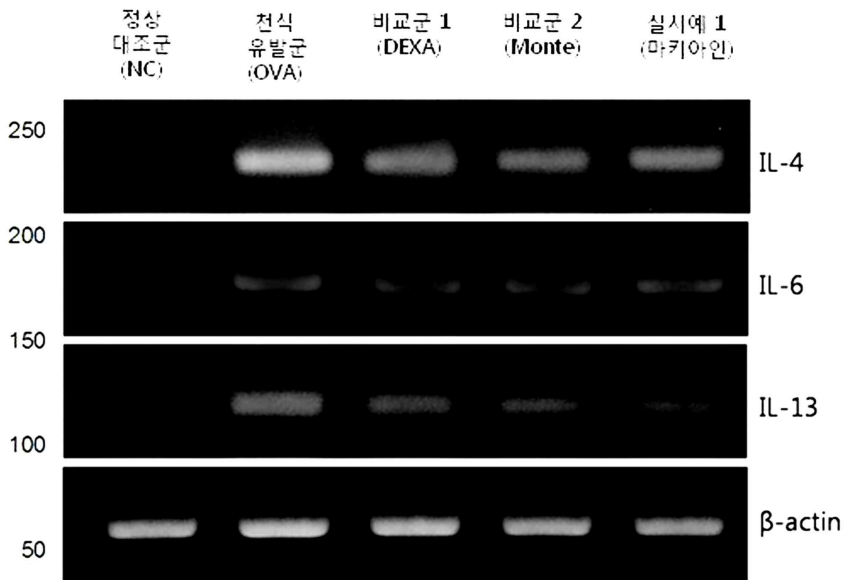
도면4



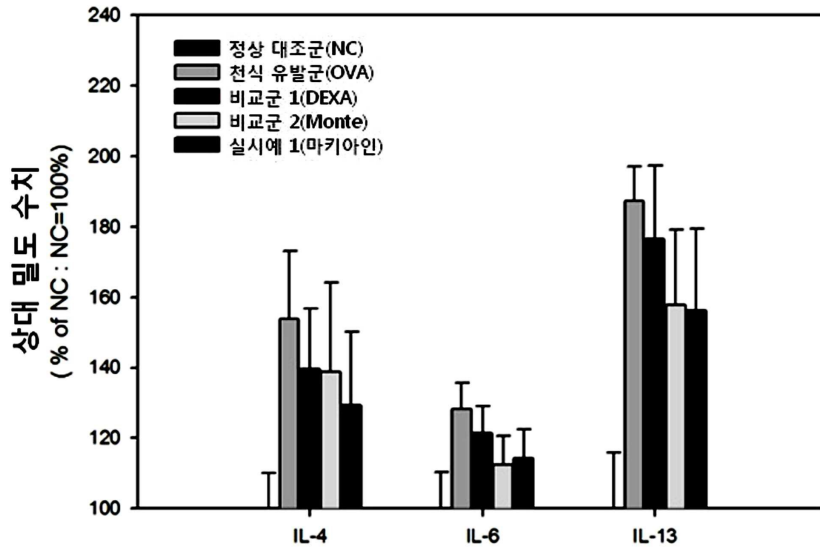
도면5



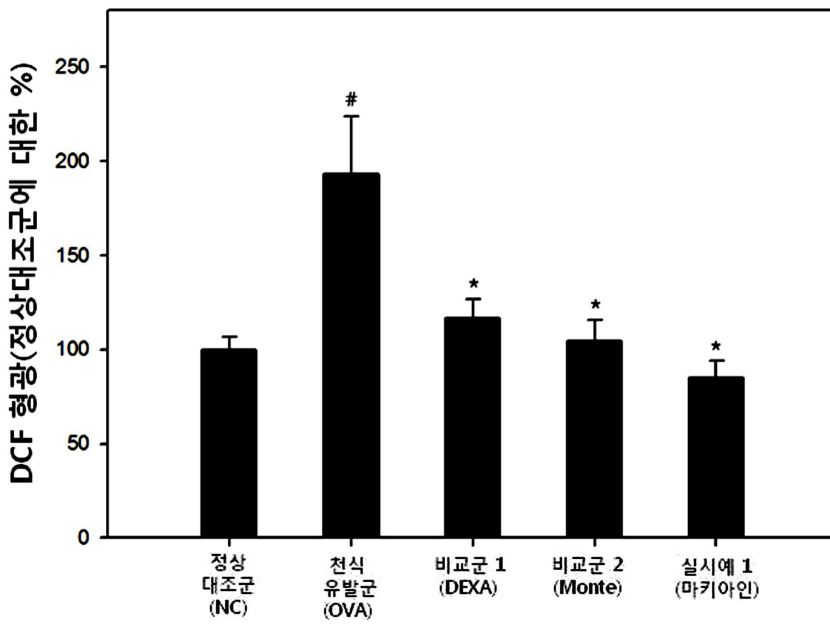
도면6



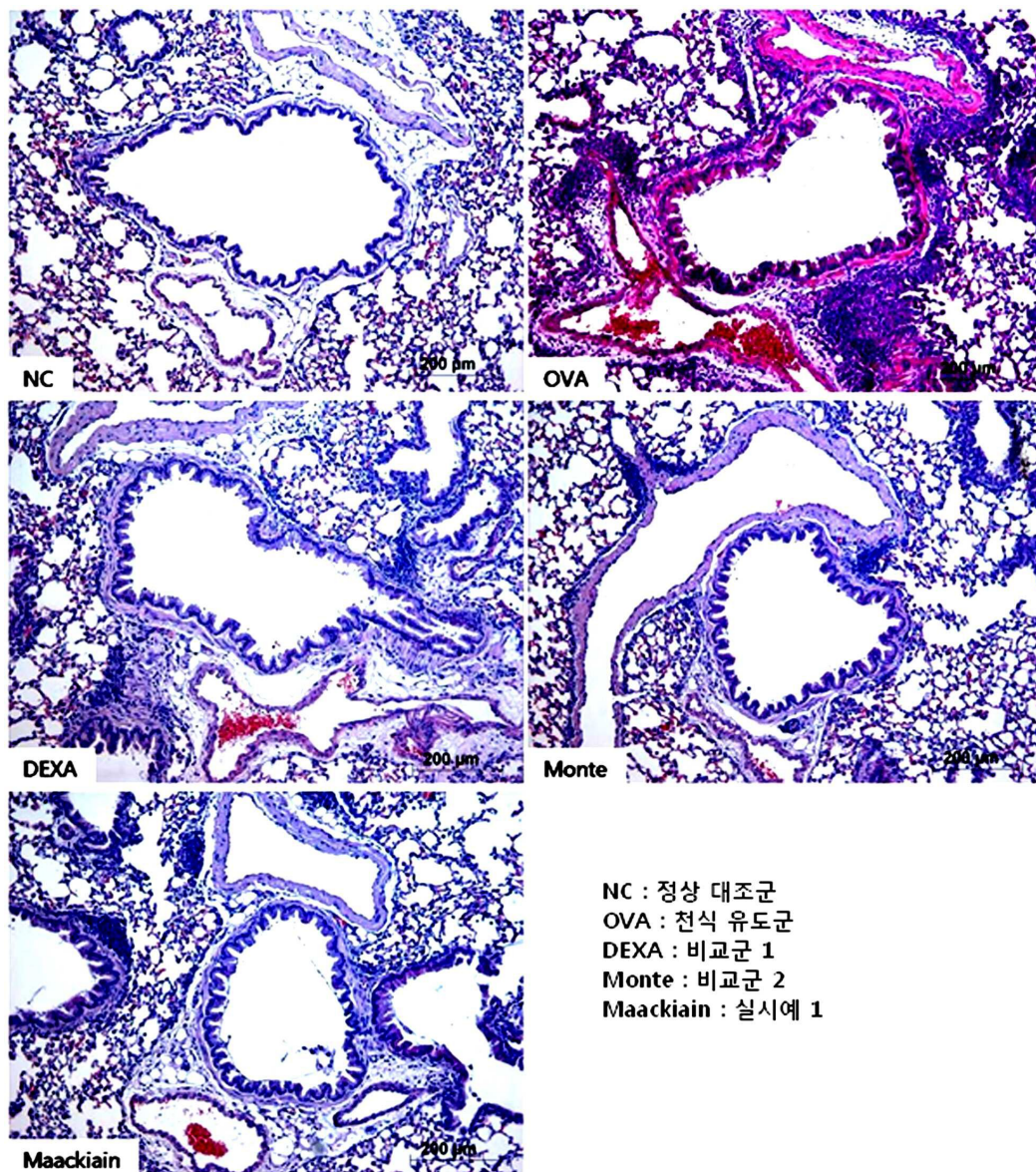
도면7



도면8



도면9



도면10

