



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월27일
(11) 등록번호 10-1515067
(24) 등록일자 2015년04월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/045 (2006.01) **A61K 31/05** (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01) **A61P 11/06** (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0044045
(22) 출원일자 2012년04월26일
심사청구일자 2013년05월10일
(65) 공개번호 10-2013-0120849
(43) 공개일자 2013년11월05일
(56) 선행기술조사문헌
Planta Medica, 2001, vol.67, no.2, pp.132-135
- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
안경섭
대전광역시 유성구 과학로 125
오세량
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 유준석

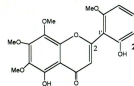
(54) 발명의 명칭 **스켈캡플라본 II 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 스켈캡플라본 II 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상기 스켈캡플라본 II 화합물은 천식으로 인해 유발되는 체중 감소를 억제하고, 기도과민반응을 경감시킬 수 있으며, 혈청 및 기관지 폐포 세척액 내 IgE, 난백알부민 특이 IgE, 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9의 생성, 기관지 주위의 콜라겐 침식, 기관지 내 염증세포 침윤 및 기관지 내 점액 분비를 억제할 수 있고 낮은 간 독성을 가질 뿐만 아니라, 나아가, TGF-β1의 농도를 감소, Smad7 발현을 증가 및 pSmad2/3 농도를 억제함으로써 기관지 천식의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

황금 E3-PR-13 (스켈캡플라본 II)
 문헌: Chem. Pharm. Bull.(1980), 28(3), 708-716



NO.	¹³ C (문헌) (DMSO-d ₆)	¹³ C(E3-PR-13) (DMSO-d ₆)	¹ H(E3-PR-13) (DMSO-d ₆)
2	162.1	162.35	
3	111.7	111.90	6.32 (s)
4	182.2	182.49	
5	146.0	146.23	
6	135.5	135.78	
7	152.2	152.54	
8	132.2	132.55	
9	148.2	148.53	
10	108.9	108.89	
1'	106.3	106.28	
2'	156.4	156.61	
3'	106.1	106.28	6.62 (d, J=8.4 Hz)
4'	132.1	132.51	7.32 (t, J=8.2 Hz)
5'	101.9	102.25	6.62 (d, J=8.4 Hz)
6'	158.1	158.29	
OCH ₃	55.8, 60.2 61.4, 61.4	55.87, 60.56, 61.46, 61.70	3.79 (s), 3.80 (s) 3.82 (s), 4.01 (s)
OH			10.14(brs), 12.67(s)

(72) 발명자

장하영

대전광역시 유성구 과학로 125

권옥경

대전광역시 유성구 과학로 125

김두영

대전광역시 유성구 과학로 125

김정희

대전광역시 유성구 과학로 125

박미정

대전광역시 유성구 과학로 125

이형규

대전광역시 유성구 과학로 125

진영원

경기도 고양시 일산동구 식사동 777 동국대학교 약
학대학

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM2241012

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 주요사업(일반개발과제)

연구과제명 만성질환 치료용 전임상 후보물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.01.01 ~ 2010.12.31

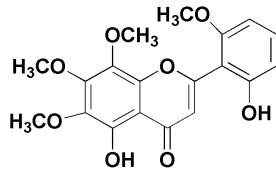
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 기재되는 스컬캡플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 화학식 1의 스컬캡플라본II 화합물은 황금(Scutellariae Radix)으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화학식 1의 스컬캡플라본II 화합물은 황금의 뿌리로부터 분리된 것을 특징으로 하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

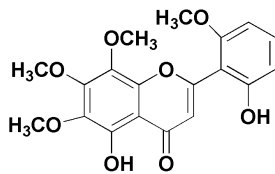
청구항 13

삭제

청구항 14

하기 화학식 1로 기재되는 스컬캡플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물:

[화학식 1]



발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 스컬캡플라본II 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로 그 발병률이 증가하고 있는 알러지성 질환에는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 두드러기(urticaria) 등이 있다.

[0003] 이러한 알러지성 질환 중 천식은 우리나라 인구 중 약 300만명이 고통받고 있다고 추정되고, 기침과 함께 숨소리가 쉼쉼거리는 천명 및 숨이 차거나 가슴이 답답한 증상을 특징으로 하는 만성 염증성 호흡기 질환으로 최근 들어 대기오염의 심화와 식생활의 서구화로 환자가 급증세를 보이고 있다. 천식은 미국, 영국 등의 선진국에서는 제일 흔한 질환으로 전 인구의 20 - 30%가 천식 환자이고, 우리나라에서는 초등학교 학동기 아동의 16% 및 성인의 약 5%가 천식 환자로서 전체 400만 명 이상의 환자가 있다고 추정되고 있으며, 유소년부터 노인까지 전 연령층에서 볼 수 있는 질병으로 전체 인구의 10%가 앓고 있을 정도로 흔한 질병이다. 그 천식의 발병에 가족 내 알레르기 성향을 유발하는 아토피 체질이 기본적으로 작용함이 밝혀졌고, 기도 과민성, 기도의 호산구 염증 및 Th2 면역반응의 항진 등이 천식을 일으키는 기본적 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 및 사회적 비용은 폐결핵 및 에이즈의 비용을 합한 것보다 더욱 크다고 WHO의 특별보고서는 언급하고 있다.

[0004] 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% 및 13 - 14세는 7.7%로 나타났다. 소아 전체로 보면 100명 중 10명이 천식을 앓고 있는

며 이 중 50%인 5명은 평생 천식을 앓는다. 더욱 큰 문제의 심각성은 질환의 유병율뿐만 아니라 질환의 중증도도 더욱 증가하고 있다는 데에 있다.

[0005]

일반적으로 천식은 TH2 타입 면역세포가 생성하는 인터루킨-4, 5 및 13에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도 주변 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 분비함으로써 인한 강력한 기관지 수축작용이 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).

[0006]

인터루킨-4는 B림프구에서 IgE로 동형 전환을 유도하는데 가장 중요한 역할을 한다(Barrett NA, Austen KF. *Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. Immunity.* 2009;31:425-37). 인터루킨-13은 상피세포 및 평활근 세포에 다양한 효과를 통하여 기도로의 호산구의 집합을 조절할 수 있다(Wills-Karp M. *Interleukin-13 in asthma pathogenesis. Immunol Rev.* 2004;202:175-90). 인터루킨-5는 천식에서 호산구성 염증 및 기도과민반응을 유도하는 것과 관계가 있다. 또한, 천식성 폐의 기도과민반응을 조절하는 메커니즘에 있어서, 호산구, 인터루킨-4,5 및 13 사이에는 밀접한 관계가 있다(Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, et al. *Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. J Clin Invest.* 2004;113:551-60). IgE가 매개하는 비만세포의 활성화는 많은 염증매개인자 및 싸이토카인을 생산함으로써 기도과민반응에 기여한다. 따라서 염증세포 활성화에 관여하는 인터루킨-4, 5, 13 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.

[0007]

TGF- β 1은 천식의 병태생리에 관련이 있다고 알려진 다기능 싸이토카인이다. 이의 발현은 천식과 같은 인간 만성 폐질환에서 증가하고(Chu HW, Trudeau JB, Balzar S, Wenzel SE. *Peripheral blood and airway tissue expression of transforming growth factor beta by neutrophils in asthmatic subjects and normal control subjects. J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:1115-23), 증가한 농도는 기관지 주위 섬유화의 정도 및 질병의 중증도와 상관관계가 있다(Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, et al. *Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17:326-33). TGF- β 1 신호 전달 경로는 보통 TGF- β 1 유형 I 및 II 수용체의 활성화, 후속되는 세포 내 영향인자, Smad2 및 Smad3의 인산화 및 이들의 핵으로의 전달과정을 포함하며, 이 영향인자들은 핵에서 유전자의 전사를 조절할 수 있다. 또 다른 관련 인자인 Smad7는 TGF- β 패밀리의 멤버에 의해 빠르게 유도되고 음성 피드백 루프를 제공하는 세포 내 억제자이다(Bartram U, Speer CP. *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. Chest.* 2004;125:754-65). Smad7의 발현에 의한 성숙 T세포에서 TGF- β /Smad 신호의 차단은 기도 염증 및 기도 반응을 높이는데, 이것은 TGF- β 에 의해 T세포를 조절하는 것이 염증 반응의 음성 조절에 중요함을 시사한다(Nakao A, Miike S, Hatano M, Okumura K, Tokuhisa T, Ra C, et al. *Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. J Exp Med.* 2000;192:151-8). 또한, TGF- β 1은 근섬유모세포 활성화 및 세포외기질의 합성을 유도하는 강한 섬유화 인자이고, 최근의 다양한 연구들은 TGF- β 1 및 반복적 염증 반응으로 인한 기도의 구조적 변화인 기도개형(airway remodeling) 사이의 관계에 대해 진행되고 있다(Bartram U, Speer CP. *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. Chest.* 2004;125:754-65, Kim JH, Jain D, Tliba O, Yang B, Jester WF Jr., Panettieri RA Jr., et al. *TGF-beta potentiates airway smooth muscle responsiveness to bradykinin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L511-20). 기도개형은 기관지 상피세포 비후, 점액분비 세포의 과증식, 기도상피세포하 섬유화 등의 소견을 보인다(심정연, 천식에서 기도평활근의 증식과 합성 반응에 대한 최신 지견, *Korean Journal of Pediatrics* Vol. 48, No. 6, 2005). 그러므로 콜라겐의 생성을 감소시키기 위해 TGF- β 1의 생산을 억제하거나 이의 생체 활성을 차단하는 것이 기도개형의 치료를 위한 강력한 방법 중의 하나로 간주된다(Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, et al. *Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol*

Biol. 1997;17:326-33, Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Matsuoka H, et al. Sputum levels of transforming growth factor-beta1 in asthma: relation to clinical and computed tomography findings. J Investig Allergol Clin Immunol. 2008;18:202-6.).

[0008]

현재 다양한 천식 치료제가 상용되고 있으나 상당수의 치료제들은 부작용으로 인해 사용시 주의를 요하고 있다. 흡입형 코르티코스테로이드(corticosteroid) 제제가 여전히 가장 중요한 천식 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 기도개형을 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 부작용의 위험보다 크다는 판단 아래 계속 처방되고 있다. 그러나 부작용에 민감한 어린이 천식환자의 성장율을 측정된 결과, 경구용 류코트리엔 길항제인 몬테루카스트를 복용한 어린이 천식환자의 성장률이 흡입용 코르티코스테로이드제를 사용한 경우보다 1년에 최고 1cm까지 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 필수적이다. 하지만 지속적인 치료에 있어서, 안전한 약물을 이용하고 기도의 염증을 잘 관리하는 것이 무엇보다 중요하다는 것이 밝혀짐으로써 치료제를 선택할 때 천식을 완화하는 효과와 더불어 부작용에 대한 신중한 고려가 필요하다. 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.

[0009]

종래, 특허문헌 1에서는 유근피, 진피, 감초, 오미자, 의이인, 어성초, 황기, 맥문동, 삼백초, 계지, 황금, 방학 및 백출을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 비염과 감기의 예방 및 치료용 건강식품 및 그 제조 방법이 개시되어 있다.

[0010]

또한, 특허문헌 2에서는 숙지황, 산약, 산수유, 백복령, 목단피, 택사, 오미자, 천문동, 맥문동, 폐모, 과루인, 행인, 반하, 지실, 길경, 황금, 황련, 감초로 이루어지는 한약 조성물을 유효성분으로 함유하는 천식 유지치료용 조성물이 개시되어 있다.

[0011]

나아가, 특허문헌 3에서는 피부 보습 및 항균 효과가 있는 황금 및 황련 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물이 개시되어 있다.

[0012]

그러나, 아직까지 황금으로부터 분리한 스컬캡플라본II의 천식 치료 용도에 관한 발명은 보고된 바 없다.

[0013]

황금(Scutellariae Radix)은 꿀풀과에 속하는 여러해살이 초본식물인 황금(Scutellaria baicalensis GEORGE)의 뿌리를 건조한 것이다. 한국·중국·몽골 및 시베리아 동부 등지에 분포하며 산지의 풀밭에서 자라고, 높이는 20~60 cm이다. 여러 대가 나와 포기로 자라고 털이 있으며 가지가 갈라진다. 잎은 마주나고 바소꼴이며 가장자리가 밋밋하다. 꽃은 7~8 월에 피고 자주빛이 돌며 총상꽃차례로 한쪽으로 치우쳐서 달린다. 화관(花冠)은 밑부분에서 꼬부라져 곧게 서고, 통형이며 길이는 1.5~2.5 cm이고 모양은 입술 모양이고 꽃받침은 종 모양이다. 4개의 수술 중 2개는 길고 암술은 1개이며 씨방은 4개로 깊게 갈라진다. 열매는 9월에 결실하며 둥근 모양으로 꽃받침 안에 들어 있고 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색인 특징이 있다. 한방에서는 뿌리를 해열, 이뇨, 지사, 이담제 등으로 이용해 왔다. 황금은 바이러스성간염, 췌장염 등의 치료, 더욱 최근에는 중앙 등을 포함하는 다

양한 질병의 치료에 널리 사용되는 중요한 약제로서 취급되어 왔다.

[0014]

이에, 본 발명자들은 생체 내 부작용 및 안전성 등을 고려하여 생약에 대한 관심을 가지고 천식 치료제 개발에 연구를 진행하던 중, 황금으로부터 분리한 스컬캅플라본II가 천식 유도 마우스 모델에 있어서 천식의 주 임상증상인 기도 과민 반응의 경감, 폐에서 Th2 사이토카인인 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9 생성 억제, 혈중 IgE와 난백알부민 특이 IgE 생성 억제, 낮은 간 독성, 기관지 내 염증세포 침윤 억제, 기관지 내 점액 분비 억제, 기관지 주위 콜라겐 침식 억제, TGF-β1 농도의 감소, Smad7의 발현의 증가 및 pSmad2/3(인산화된 Smad2/3)의 농도 억제 효과가 있음을 알아내고, 상기 스컬캅플라본II를 천식 예방 또는 치료에 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015]

(특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 공개특허 제2005-0010942호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 대한민국 공개특허 제2006-0061855호

(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 대한민국 등록특허 제2010-0723370호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016]

본 발명의 목적은 생체 내 부작용이 없이 안전하게 천식치료에 사용할 수 있는 새로운 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것에 있다. 본 발명의 다른 목적은 천식의 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물을 제공하는 것이다.

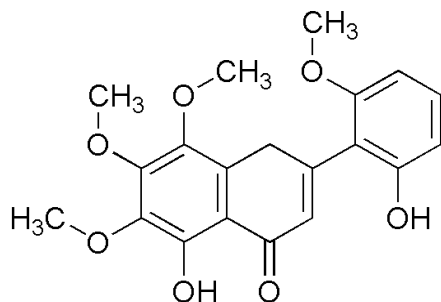
과제의 해결 수단

[0017]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 기재되는 스컬캅플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0018]

[화학식 1]



[0019]

[0020]

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 기재되는 스컬캅플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021]

본 발명은 종래 알려지지 않은 스컬캅플라본II 화합물을 천식의 예방 또는 치료에 사용할 수 있음을 새롭게 제

시하는 것으로서, 본 발명의 스킴캡플라본II는 천식 유도 모델에 있어서 뛰어난 기도과민반응 억제 효과, 폐에서 Th2 사이토카인인 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9의 생성을 억제하는 효과, 혈중 IgE와 난백알부민 특이 IgE 생성을 억제하는 효과, 낮은 간 독성 효과, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제하는 효과, 기관지 내 점액 분비를 억제하는 효과, 기관지 주위 콜라겐 침식을 억제하는 효과, TGF-β1의 농도를 감소시키는 효과 및 Smad7의 발현을 증가시키고 pSmad2/3의 농도를 억제하는 효과가 있음이 확인되었다. 그 결과 본 발명의 스킴캡플라본II는 독성이 낮아 스테로이드에 내성을 보이는 경우 또는 장기적인 천식치료제의 사용이 요구되는 경우와 같은 기관지 천식의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022]

- 도 1은 본 발명의 제조에 1에 따른 스킴캡플라본II 화합물의 핵자기공명 분광 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 2은 본 발명에 따른 스킴캡플라본II의 체중 감소 억제 효과를 나타낸 그래프이다(실험군의 종류: 정상 대조군(NC), 천식 유도군(OVA), 텍사메타손이 투여된 천식 유도군(Dex), 몬테루카스트가 투여된 천식 유도군(Monte) 및 스킴캡플라본II가 투여된 천식 유도군(SII10, SII30), +: 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 3는 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 기도과민성 여부를 측정하기 위해, 기도 저항 정도인 펜(Penh) 수치를 메타콜린의 농도를 변화시키면서 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 기관지 폐포 세척액 내 염증세포의 수를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 혈청 내 IgE 및 난백알부민 특이 IgE의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6는 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 간 독성을 측정하기 위해, 간 효소인 ALT, AST의 활성을 나타낸 그래프이다(**: 텍사메타손이 투여된 천식 유도군(Dex)과 비교하여 통계적 유의성이 인정된 경우(p<0.05)).
- 도 7은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 기관지 폐포 세척액 내 인터루킨-4, 13, MMP-9 및 액틴의 발현(상) 및 인터루킨-4, 13 및 MMP-9의 상대 밀도(하)를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 기관지 폐포 세척액 내 인터루킨-4(상), 인터루킨-5(중) 및 인터루킨-13(하)의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 9은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 세기관지 주위 및 혈관 주위의 염증세포 침윤 사진(상) 및 염증지수(하)를 나타낸 그래프이다.
- 도 10는 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 기관지 내 배상세포의 증식 정도를 측정하기 위해, PAS 염색을 통해 감별된 배상세포의 사진(상) 및 기관지 상피세포에서 배상세포가 차지하는 비율(하)을 나타낸 그래프이다.
- 도 11은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 기관지 주위 콜라겐 침식 억제 효과를 측정하기 위해, 트리크롬이 염색된 폐의 단면 사진(상) 및 기관지 주위 섬유화 정도로서 염색된 부위의 면적을 나타낸 그래프(하)이다.
- 도 12은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 폐조직 내 TGF-β1 및 액틴의 발현(상), 액틴에 대한 TGF-β1의 상대 밀도(중) 및 기관지 폐포 세척액 내 TGF-β1의 농도(하)를 나타낸 그래프이다.
- 도 13은 본 발명에 따른 실시예 1에서 사용된 각각의 실험군과 동일한 조건의 실험군에 대해 폐조직 내 Smad7, pSmad2/3 및 액틴의 발현(상), 액틴에 대한 Smad7(중) 및 pSmad2/3(하)의 상대밀도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 발명에서 사용되는 용어를 설명한다.

[0024]

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

[0025]

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

[0026]

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

[0027]

본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 천식의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개 등을 포함하는 포유 동물을 의미한다.

[0028]

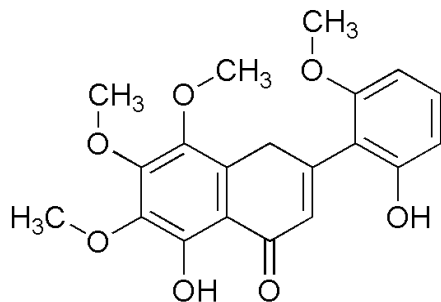
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029]

본 발명은 하기 화학식 1로 기재되는 스킴칼플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0030]

[화학식 1]



[0031]

[0032]

상기 스킴칼플라본II 화합물은 황금으로부터 분리한 것을 사용하는 것이 바람직하나, 화학적으로 합성한 것을 배제하지 않는다. 또한, 상기 스킴칼플라본II는 황금의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매 등으로부터 분리하여 사용할 수 있으나 바람직하게는 황금의 뿌리로부터 분리된 것을 사용한다.

[0033]

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

[0034]

본 발명의 상기 화학식1의 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 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프

로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 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 만텔레이트를 포함한다.

[0035] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 본 발명의 상기 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0036] 동량의 화학식 1로 기재되는 상기 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0037] 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(예를 들어, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0038] 본 발명에 따른 화학식 1의 스킵캅플라본II 화합물은 천연물로부터 분리하거나 또는 유기 합성 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의해 합성될 수 있다. 바람직하게는 천연물로부터 분리하여 사용할 수 있다. 상기 천연물로는 황금을 사용할 수 있고, 황금의 뿌리, 줄기, 잎, 열매의 모든 부위로부터 분리된 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는 황금의 뿌리로부터 분리된 것을 사용할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 화학식 1의 스킵캅플라본II를 황금으로부터 분리하는 경우 다음과 같은 방법에 의해 분리할 수 있다.

[0039] 황금의 뿌리(황금 지하부) 시료 3 kg을 메탄올로 4회 추출하여 총 추출액 250 g을 얻었다. 이를 물 2 L에 현탁시킨후 헥산(n-hexane) 및 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 각각 1L씩 3회 가하여 각각 헥산분획 13.8 g 및 에틸아세테이트 분획 167.0 g을 얻었다. 이 중 에틸아세테이트 분획 160 g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시(CHCl₃/MeOH가 30/1 → 5/1의 농도 구배를 갖는 단계형 크로마토그래피)하여 총 10개 분획으로 나누었으며 이 중 3번째 분획(E3-P, 7.5 g)을 재차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(hexane/CHCl₃/MeOH, 3/1/0.1)를 실시하여 14개의 소분획을 얻었으며 이 중 13번째 분획(E3-PR-13)의 물질을 메탄올에서 재결정하는 방법을 통하여 최종 분획물을 순수 분리(1.51 g)하였다. 분리한 물질에 대하여, NMR(PMR, CMR, HSQC)을 사용하여 구조 분석을 실시하였고, 기존의 논문(Chem. Pharm. Bull (1980), 28(3), 708-716)을 참조한 결과 스킵캅플라본II로 동정되었다(도 1 참조).

[0040] 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 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은 문헌에 기재된 내용을 참고할 수 있다 (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.).

[0041] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의

조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, 머크 인덱스(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 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, 유탕액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 나아가, 당 분야의 적절한 방법으로 문헌(예를 들면, Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0042] 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.

[0043] 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, 배설율 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 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0044] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 스킴캅플라본II를 함유하는 약학적 조성물은 천식에 의해 유발되는 체중 감소를 억제할 수 있다. 스킴캅플라본II의 천식 유도 마우스에 대한 체중 감소 억제 효과를 확인하기 위한 본 발명의 실시예 1을 참조하면, 상기 화학식 1의 스킴캅플라본II를 경구투여한 천식 유도군의 체중은 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서 19.66±0.30 g 및 30 mg/kg 용량으로 군에서 20.14±0.67 g으로 체중 감소 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 천식이나 기관지 염증 치료에 주로 사용되는 합성 스테로이드제인 덱사메타손(dexamethasone; Dex) 투여군 및 기준에 천식치료제로 흔히 사용되고 있는 몬테루카스트(montelukast; Monte) 투여군과 대비하여 정상 대조군에 가까운 체중 회복 효과를 나타낸 것으로써, 동등한 정도로 천식에 의한 체중 감소를 억제하는 것이다(표 1 및 도 2 참조).

[0045] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 천식에 의한 기도과민반응을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 2를 참조하면, 정상 대조군에서는 메타콜린 농도 증가에 따라 완만하게 펜 수치가 증가하나, 천식 유도군에서는 유의적으로 급격히 Pehn 수치가 증가하는 것이 확인되었다. 반면 덱사메타손 및 몬테루카스트 투여군과 본 발명의 스킴캅플라본II 투여군에서는 메타콜린 농도에 상관없이 천식 유도군보다 유의하게 감소함을 확인할 수 있다. 이러한 차이는 저농도의 메타콜린보다는 고농도의 메타콜린을 흡입시켰을 때 더욱 뚜렷한 차이를 얻을 수 있다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 기도과민반응을 억제함으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 2 및 도 3 참조).

[0046] 나아가, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 천식의 중증도와 상관관계가 있는 혈청 및 기관지 폐포 세척액 내 IgE 및 난백알부민 특이 IgE 농도를 억제시킬 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 3을 참조하면, 혈청 내 IgE 항체 농도는 천식 유도군과 대비하여 본 발명의 스킴캅플라본II 투여군에서 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 혈청 내 난백알부민 특이 IgE 농도는 천식 유도군에 비해 본 발명의 스킴캅플라본II 투여군에서 유의성 있게 감소하는 것이 확인되었다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 IgE 및 난백알부민 특이 IgE의 농도를 억제함으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 3, 표 4 및 도 4 참조).

[0047] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 기관지 폐포 세척액 내 천식과 관련이 있는 염증세포 수를 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 4를 참조하면, 총 염증세포의 수는 천식 유도군과 대비하여 모든 약물 투여군에서 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다. 특히 조직에 침투하여 세포성 매개 면역에 주로 관여하는 세포로써, 세포, 비장 및 호흡기 등에 걸쳐 퍼져있고, 염증성 단백질을 함유하고 있어, 천식 발병에 중요한 역할을 하는 것

으로 알려진 호산구의 수는 천식 유도군과 대비하여 모든 약물 투여군에서 유의성 있게 감소하였음을 확인할 수 있다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 기관지 내 염증세포 수를 감소시킴으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 5 및 도 5 참조).

[0048]

나아가, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 간 독성을 최소화할 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 5를 참조하면, 간세포 손상의 지표로 알려져 있는 혈청 내 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase, ALT) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(Aspartate aminotransferase, AST)의 농도는 천식 유도군보다 텍사메타손 투여군에서 현저하게 증가하였다. 반면에, 몬테루카스트 투여군 및 본 발명의 스킴캅플라본II 투여군에서는 텍사메타손 투여군보다 유의적으로 낮은 농도 수치를 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 간에 대한 낮은 독성으로 인해 장기간의 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 6 및 도 6 참조).

[0049]

또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 기관지 폐포 세척액 내 천식과 관련이 있는 Th2 싸이토카인 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9의 생성을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 6을 참조하면, 인터루킨4, 5, 13 및 MMP-9의 발현은 천식 유도군과 대비하여 본 발명의 스킴캅플라본II 투여군에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 Th2 싸이토카인 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9의 생성을 억제함으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 7, 표 8, 도 7 및 도 8 참조).

[0050]

나아가, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 항원 야기 후, 기관지에서 관찰되는 호산구, 호중구 및 대식세포로 이루어진 염증성 세포의 침윤(Oh SW, et al., j., Immunol 2002;168:1992-2000)을 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 7을 참조하면, 세기관지 주변의 염증 지수는 천식 유도군과 대비하여 모든 약물 투여군에서 유의성 있게 감소하는 것으로 확인되었다. 또한, 혈관 주변의 염증지수는 몬테루카스트 투여군을 제외하고 모든 약물 투여군에서 천식 유도군과 대비하여 유의성있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 염증세포의 침윤을 억제함으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 9 및 도 9 참조).

[0051]

또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 천식의 병리학적 특징인 기관지에의 점액의 축적을 야기하는 점액분비세포인 배상세포(goblet cell)의 증식을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 8을 참조하면, 세기관지 상피세포에서 배상세포가 차지하는 비율은 정상 대조군과 대비하여 천식 유도군에서는 증가함을 확인할 수 있었다. 반면 모든 약물 투여군에서 유의성있게 감소하는 것을 확인하였다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 배상세포의 증식을 억제함으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 10 및 도 10 참조).

[0052]

나아가, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 기도개형의 병리학적 특징인 기도상피세포하 섬유화와 관련된 콜라겐의 침식을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 9를 참조하면, 트릭롬 염색 부위가 정상 대조군에 비해 천식 유도군에서 유의성있게 증가함을 확인할 수 있다. 스킴캅플라본II 투여군에서는 유의성있게 및 복용량-의존적으로 기관지 주위 섬유화 정도가 감소하였고 텍사메타손 및 몬테루카스트 투여군에서도 역시 기관지 주위 섬유화의 정도가 유의성있게 감소함을 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 기관지 주위 콜라겐의 침식을 억제함으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 11 및 도 11).

[0053]

또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 천식의 병태생리에 관련이 있는 TGF-β1, pSmad2/3의 생성을 억제하고 Smad7의 생성을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 10을 참조하면, 폐 조직 내 TGF-β1 농도는 정상 대조군과 대비하여 천식 유도군에서 유의성있게 증가하고 본 발명의 스킴캅플라본II 투여에 의해 TGF-β1 농도의 이러한 증가는 유의성있게 및 복용량-의존적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 유사하게, 기관지 폐포 세척액 내 TGF-β1 농도는 정상 대조군에 비해 천식 유도군에서 유의성있게 증가하고 증가된 TGF-β1 농도는 본 발명의 스킴캅플라본II 투여에 의해 유의성있게 및 복용량-의존적으로 감소했음을 확인하였다. 텍사메타손 및 몬테루카스트 투여군 또한 폐조직 및 폐포 세척액 내 TGF-β1 농도를 감소시킴을 확인하였다. 본 발명의 스킴캅플라본II 투여에 의한 천식 유도군의 폐에서 pSmad2/3 및 Smad7의 농도가 증가했고 이 농도는 본 발명의 스킴캅플라본II 및 텍사메타손의 투여에 의해 상당히 감소됨을 확인할 수 있었다. 대조적으로 Smad7의 농도는 본 발명의

스컬캡플라본II 및 텍사메타손으로 처리된 천식 유도군에서 처리되지 않은 천식 유도군과 대비하여 볼 때 현저한 증가가 확인되었다. pSmad2/3 및 Smad7의 농도 측면에서 본 발명의 스킨캡플라본II 및 텍사메타손으로 처리된 군 사이에 유의성 있는 차이는 발견되지 않았다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물은 TGF-β1 및 pSmad2/3의 생성을 억제하고 Smad7의 생성을 증가시킴으로써 천식 치료에 유용하게 사용될 수 있다(표 12, 표 13, 도 12 및 도 13 참조).

[0054] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 스킨캡플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 천식의 예방 방법을 제공한다.

[0055] 나아가, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 스킨캡플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 천식의 치료 방법을 제공한다.

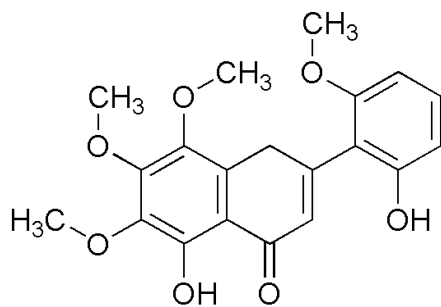
[0056] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.00001 내지 10 mg/kg이고, 바람직하게는 0.0001 내지 1 mg/kg이나 이에 한정하지 않는다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0057] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0058] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내주사에 의해 투여될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 또는 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다:

[0060] [화학식 1]



[0061] 본 발명에 따른 상기 건강식품용 조성물은 화학식 1의 스킨캡플라본II 화합물을 단독으로 또는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 건강식품용 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다.

[0064] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 스킨캡플라본II 화합물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품,

각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0065] 본 발명에 따른 건강음료용 조성물은 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 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 g이다.

[0066] 나아가, 본 발명에 따른 건강식품용 조성물은 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 건강식품용 조성물은 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.

[0067] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 본 발명의 스컬캡플라본II 화합물은 천식 유도 마우스 모델에서 체중감소 및 기도과민성을 경감시키고, 폐에서 Th2 사이토카인인 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9의 생성을 억제하는 효과, 혈중 IgE와 난백알부민 특이 IgE 생성을 억제하는 효과, 간에 대한 독성이 낮은 효과, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제하는 효과, 기관지 내 점액 분비를 억제하는 효과, 상피하의 콜라겐 침식을 억제하는 효과, TGF-β1 농도를 감소시키는 효과 및 Smad7 발현을 증가시키고 pSmad2/3 농도를 억제하는 효과가 있으므로 천식의 예방 또는 개선을 위한 건강식품용 조성물의 유효성분으로서 유용하게 이용할 수 있다.

[0068] 이하, 본 발명을 하기의 제조예 및 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다.

[0069] 단, 하기 제조예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 제조예 및 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0070] <제조예 1> 스컬캡플라본II 화합물의 제조

[0071] 황금의 뿌리(황금 지하부) 시료 3 kg을 메탄올로 4회 추출하여 총 추출액 250 g을 얻었다. 이를 물 2 L에 현탁시킨후 헥산(n-hexane) 및 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 각각 1L씩 3회 가하여 각각 헥산분획 13.8 g 및 에틸아세테이트 분획 167.0 g을 얻었다. 이 중 에틸아세테이트 분획 160 g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시(CHCl₃/MeOH가 30/1 → 5/1의 농도 구배를 갖는 단계형 크로마토그래피)하여 총 10개 분획으로 나누었으며 이중 3번째 분획(E3-P, 7.5 g)을 재차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(hexane/CHCl₃/MeOH, 3/1/0.1)를 실시하여 14개의 소분획을 얻었으며 이중 13번째 분획(E3-PR-13)의 물질을 메탄올에서 재결정하는 방법을 통하여 최종 분획물을 순수 분리(1.51 g)하였다. 분리한 물질에 대하여, NMR(PMR, CMR, HSQC)을 사용하여 구조 분석을 실시하였고, 기존의 논문(Chem. Pharm. Bull (1980), 28(3), 708-716)을 참조한 결과 스컬캡플라본II로 동정되었다 (도 1 참조).

[0072] 기관지 천식 유도 실험동물의 제작 및 화합물의 처리:

[0073] 기관지 천식 유도 실험동물을 제작하기 위하여, 평균 체중 20 g 내외의 6주령 Balb/c 암컷 생쥐를 실험동물로 사용하였다. 1 주 간의 적응기간을 가진 후에 기본적인 신체검사상에서 이상이 관찰되지 않는 개체를 대상으로 하였다. 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 ul을 복강에 주입하여 감각시켰다. 첫 번째 난백알부민(OVA) 복강투여 후, 28일부터 34일까지 7일 동안 1% 난백알부민을 초음파분무기를 이용하여 30분간 흡입시켰다. 마지막 항원 투여 후 24시간 뒤에 기도과민성을 측정하였고 48시간 뒤에 치사량의 펜토바비탈(엔토발, 한림제약주식회사)을 투여한 뒤 체중을 측정하였고, 기관지 절개를 실시하여 총 1.2 ml의 생리식염수로 기관지 폐포 세척을 실시한 뒤 검체를 수거하였다. 정상 대조군(NC)으로 난백알부민을 비투여 및 비흡입한 군, 천식 유도군(OVA)으로 난백알부민을 투여 및 흡입하여 기관지 천식을 유도한 군, 비교군1(DEXA)로 난백알부민 흡입 1시간 전에 덱사메타손(dexamethasone; 3 mg/kg, PO : D4902, Sigma, St. Louis, MO)을 경구투여한 군 및 비교군 2(Monte)로 난백알부민 흡입 1시간 전에 몬테루카스트(montelukast; 30 mg/kg, PO)를 경구투여한 군을 준비하였다. 한편 본 발명에 따른 스킴캅플라본II는 난백알부민 흡입 1시간 전에 각각 10 mg/kg(SII10)과 30 mg/kg(SII30)을 경구투여한 군을 준비하여 실험을 진행하였으며 각 군당 5마리의 흰쥐를 사용하였다.

[0074] 이하, 본 발명의 실시예에서 하기 표시는 다음과 같은 의미로 공통적으로 사용된다.

[0075] SAL+SAL : 난백알부민을 비투여 및 비흡입시킨 정상 대조군(NC).

[0076] OVA+SAL : 난백알부민을 투여 및 흡입시킨 천식 유도군(OVA).

[0077] OVA+Dex : 난백알부민과 종래 천식치료제인 덱사메타손(Dex)을 3 mg/kg 용량으로 투여시킨 비교군 1(Dex).

[0078] OVA+M : 난백알부민과 종래 천식치료제인 몬테루카스트(Monte)를 30 mg/kg 용량으로 투여시킨 비교군 2(Monte).

[0079] OVA+SII10 : 난백알부민과 본 발명에 따른 스킴캅플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여시킨 실험군(SII10).

[0080] OVA+SII30 : 난백알부민과 본 발명에 따른 스킴캅플라본II를 30 mg/kg 용량으로 투여시킨 실험군(SII30).

[0081] <실시예 1> 스킴캅플라본II의 천식 유도 마우스에 대한 체중 감소 억제 효과

[0082] 본 발명에 따른 스킴캅플라본II의 천식 유도 마우스에 대한 체중 감소에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기에서 준비한 각각의 마우스의 체중을 측정하고 그 결과는 하기 표 1 및 도 2에 나타내었다. 이하 모든 측정값의 통계 분석은 여러 변수에 따른 평균값과 표준오차(평균±표준오차)를 계산하였고, 각 집단 간의 비교는 SPSS 10.0을 이용하여 만-휘트니(Mann-whitney) U 검정을 수행하여 분석하였다. 통계적으로 p값이 0.05 미만인 경우에 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

표 1

[0083]

구분	체중 (g)
실험군 (SII10)	19.66±0.30
실험군 (SII30)	20.14±0.67
정상 대조군 (NC)	19.83±0.40
천식 유도군 (OVA)	17.87±0.23
비교군 1 (Dex)	18.38±0.17
비교군 2 (Monte)	20.26±0.51

[0084]

그 결과, 표 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 대조군(NC)의 체중은 19.83±0.40 g 이었으나 천식 유도군(OVA)은 17.87±0.23 g으로 현저한 체중감소를 나타낸 반면 비교군 1(Dex)은 18.38±0.17 g, 비교군 2(Monte)은 20.26±0.51 g, 본 발명의 스킴캅플라본II 화합물을 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 19.66±0.30 g, 30 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 20.14±0.67 g으로 측정되었다. 이로부터, 약물을 투여한 군 중 비교군 1(De

x)을 제외하고 모두 정상대조군에 가까운 수준으로 체중이 회복됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킴캅플라본II는 체중 감소를 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<실시예 2> 스킴캅플라본II의 천식 발생에 의한 기도과민반응의 억제 효과

본 발명에 따른 스킴캅플라본II의 천식에 의한 기도과민반응에 미치는 효과를 확인하기 위하여 단일 챔버 체적 변동 측정기(one chamber plethysmography; All Medicus, Seoul)를 사용한 기도 저항을 측정하여 수학적으로 계산된 기도의 폐색을 반영하는 수치인 펜(Penh; Pause enhanced)수치를 측정하였고 그 결과는 하기 표 2 및 도 3에 나타내었다. 펜 수치는 정상 호흡 상태에서 기저값을 측정한 후 PBS를 초음파분무기를 이용하여 3 분간 흡입시킨 후 3분간 측정하였다. 이후, 기관지 천식을 진단하는 일반적인 방법에서 사용되는 히스타민제 메타콜린(A2251, Sigma, St. Louis, MO)을 12, 25 및 50 mg/ml 의 농도로 점차 증가시키면서 흡입시킨 후 펜 수치를 측정하였고, 각 농도의 메타콜린 흡입 후 펜 수치의 증가 백분율로 표현하고, 기저 펜 수치(식염수 흡입)는 100%로 표시하였다. 펜 수치의 계산 방법은 하기 수학적 식 1에 나타내었다.

수학적 식 1

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

Te : 호기 시간(expiratory time)(초)

흡기에서 다음 흡기까지

RT : 이완 시간(relaxation time)

호기 동안 호기량이일회호흡량의 30%가 남을 때까지 걸리는 시간

PEF : 최대 호기률(Peak expiration flow)

PIF : 최대 흡기률(Peak inspiration flow)

표 2

구분	펜 수치			
	0 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
실험군 (SII10)	0.5447±0.07150	1.1303±0.0965	1.2908±0.1232	1.3499±0.1549
실험군 (SII30)	0.4986±0.0378	1.0248±0.3163	1.0916±0.2894	1.2862±0.3313
정상 대조군 (NC)	0.4474±0.0275	0.7421±0.1600	0.8512±0.1182	1.3062±0.2379
천식 유도군 (OVA)	0.5304±0.0476	2.4787±0.4835	3.8479±0.7161	6.1304±0.9325
비교군 1 (Dex)	0.4458±0.0501	0.7733±0.1139	1.5526±0.2790	1.9719±0.3172
비교군 2 (Monte)	0.4830±0.0464	1.4258±0.3044	2.1006±0.4758	2.3576±0.1741

상기 표 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군(NC)에서는 메타콜린 농도 증가에 따른 완만한 펜 수치 증가를 확인하였으나, 천식 유도군(OVA)에서는 유의성 있게 급격한 펜 수치의 증가를 확인할 수 있었다. 반면, 상기 비교군 1(Dex), 비교군 2(Monte), 실험군(SII10) 및 실험군(SII30)의 약물 투여군에서는 메타콜린 농도에 상관없이 천식 유도군(OVA)보다 유의하게 감소 되었으며, 이러한 차이는 저농도의 메타콜린보다는 고농도의 메타콜린을 흡입시켰을 때 더욱 뚜렷한 차이를 나타내었다. 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킴캅플

라본II는 기도과민반응을 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0096] <실시예 3> 스킨캡플라본II의 혈청 내 세척액 내 IgE 억제 효과

[0097] 본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 천식의 중증도와 상관관계가 있는 IgE와 난백알부민 특이 IgE 농도에 미치는 효과를 확인하기 위하여 혈청에서 면역효소법을 이용하였고 그 결과는 도 4, 혈청 내 IgE 농도는 하기 표 3 및 혈청 내 난백알부민 IgE 농도는 하기 표 4에 나타내었다. 각 군에서 채취한 혈청 및 기관지 폐포 세척액을 96-웰 플레이트(ELISA 플레이트)에 난백알부민(OVA)을 20 ug/ml의 농도로 pH 8.3의 0.1 M NaHCO₃ 완충액에 녹여 4 ℃에서 밤샘 코팅시킨 후, 1% 소혈청 알부민이 함유된 PBS로 비특이반응을 억제 시킨 후, 혈청 검체를 1:400으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 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 4000 배 희석하여 실온에서 1 시간 반응시킨 후 세척하였다. 발색은 3,3',5,5'-테트라메틸벤자이딘(3,3',5,5'-tetramethylbezidine) 기질로 반응시킨 후, 650 nm에서 분광 흡광도를 측정하였다.

표 3

[0098]

	혈청 내의 총 IgE 농도 (ug/ml)
실험군 (SII10)	21.62±1.13
실험군 (SII30)	19.26±0.89
정상 대조군 (NC)	7.46±1.91
천식 대조군 (OVA)	30.18±2.18
비교군 1 (Dex)	16.34±2.29
비교군 2 (Monte)	21.22±2.30

[0099]

표 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 혈청 내의 IgE 항체의 농도를 측정한 결과, 혈청 내 IgE 농도는 천식 유도군(OVA)에서는 30.18±2.18 ug/ml인 것에 대비하여 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 21.62±1.13 ug/ml 및 30 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 19.26±0.89 ug/ml로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

표 4

[0100]

	혈청내의 난백알부민 특이 IgE 농도 (ng/ml)
실험군 (SII10)	196.20±4.91
실험군 (SII30)	191.60±15.43
정상 대조군 (NC)	61.40±3.28
천식 유도군 (OVA)	438.00±9.01
비교군 1 (DEXA)	202.20±14.84
비교군 2 (Monte)	170.20±7.69

[0101] 또한, 표 4 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 혈청 내 난백알부민 특이 IgE 농도는 천식 유도군(OVA)에서 438.00 ± 9.01 ng/ml인 것과 대비하여 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 196.20 ± 4.91 ng/ml 및 30 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 191.60 ± 15.43 ng/ml로 유의성있게 감소하였다. 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 IgE 및 난백알부민 특이 IgE 농도를 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0102] <실시예 4> 스킨캡플라본II의 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 억제 효과

[0103] 본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 수에 미치는 효과를 확인하기 위하여 상기에서 준비한 각각의 마우스의 기관지 폐포 세척액을 회수 한 즉시 트립판 블루(Trypan blue)로 염색하여 죽은 세포를 제외한 총 세포수를 혈구계수기(hemocytometer)을 이용하여 계산한 다음 싸이토스핀(Cytospin)II로 표본도말 후, 디프-퀵(Diff-Quick) 염색(Sysmex, Switzerland)을 수행하여 호산구와 그 외의 염증세포를 감별 계산하였고 그 결과를 하기 표 5 및 도 5에 나타내었다.

표 5

[0104]

구분	세포 수 ($\times 10^3$ 세포/마우스)		
	호산구 (eosinophil)	그 외 염증 세포 (other cell)	총 염증 세포 (total cell)
실험군 (S II 10)	85.56 ± 34.71	60.76 ± 21.69	191.08 ± 65.35
실험군 (S II 30)	41.84 ± 26.98	27.16 ± 13.58	89.96 ± 44.69
정상 대조군 (NC)	0.00 ± 0.00	0.76 ± 0.34	20.72 ± 2.71
천식 유도군 (OVA)	506.03 ± 132.47	157.80 ± 34.21	853.45 ± 191.26
비교군 1 (Dex)	1.44 ± 0.51	4.84 ± 0.77	64.36 ± 11.36
비교군 2 (Monte)	87.95 ± 41.17	60.20 ± 24.77	223.50 ± 85.61

[0105] 표 5 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 총 염증세포의 수는 정상 대조군(NC)에서 20.72 ± 2.71 , 천식 유도군(OVA)에서 853.45 ± 191.26 , 비교군 1(Dex)에서 64.36 ± 11.36 , 비교군 2(Monte)에서 223.50 ± 85.61 , 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서 191.08 ± 65.35 , 30 mg/kg 용량으로 투여한 군에서 89.96 ± 44.69 로 천식 유도군과 대비하여 모든 약물투여군에서 유의성있게 감소하였다. 특히, 호산구의 수는 정상 대조군에서 0.00 ± 0.00 , 천식 유도군(OVA)에서 506.03 ± 132.47 , 비교군 1(Dex)에서 1.44 ± 0.51 , 비교군 2(Monte)은 87.95 ± 41.17 , 본 발명의 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서 85.56 ± 34.71 , 30 mg/kg 용량으로 투여한 군에서 41.84 ± 26.98 로 천식 유도군(OVA)에 비해 모든 약물 투여군에서 유의성있게 감소하였다. 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 기관지 내 염증세포 수를 감소시킴으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0106] <실시예 5> 스킨캡플라본II의 간 독성 평가

[0107] 본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 간 독성을 확인하기 위하여, 시판용 ELISA 키트(Beckman Coulter, INC., Fullerton, CA, USA) 및 자동분석기(Beckman CX4, CA, USA)를 사용하여, 혈청 내 간 효소인 ALT 및 AST의 활성을 측정하였고 그 결과를 하기 표 6 및 도 6에 나타내었다.

표 6

[0108]

	간 효소의 활성 (IU/L)	
	ALT	AST

실험군 (SII 10)	106.67	320.67
실험군 (SII 30)	46.00	136.00
정상 대조군 (NC)	48.67	89.33
천식 유도군 (OVA)	92.00	262.67
비교군 1 (Dex)	235.33	458.67
비교군 2 (Monte)	72.66	195.33

[0109]

표 6 및 도 6에 나타난 것과 같이 ALT 및 AST 활성은 천식 유도군(OVA)보다 비교군 1(Dex)에서 현저하게 증가하였다. 반면에, 비교군 2(Monte) 및 스킨캡플라본II를 투여한 군에서는 비교군 1(Dex)보다 유의적으로 낮은 농도 수치를 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 낮은 간 독성으로 인해 장기간의 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0110]

<실시예 6> 스킨캡플라본II의 기관지 폐포 세척액 내 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9 발현 억제 효과

[0111]

본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 천식과 관련이 있는 Th2 사이토카인 인터루킨-4, 13 및 MMP-9 발현에 효과를 확인하기 위하여 각 사이토카인의 mRNA를 이용하였고 그 결과를 하기 표 7 및 도 7에 나타내었다. 상기에서 준비한 각각의 마우스에서 채취한 기관지 폐포 세척액의 상층액의 인터루킨-4, 13 및 MMP-9의 발현 정도를 분석하기 위하여, 적출된 폐장에서 트리졸(Invitrogen)을 이용하여 RNA를 분리한 후 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction, quantitative RT-PCR, Promega, WI)을 수행하였다. 정상 대조군의 발현수준을 1이라고 평가하였을 때의 상대 밀도 수치(relative densitometric value, RDV)로 평가하여 측정하였다.

[0112]

하기 표 7 및 도 7에 나타난 바와 같이, 스킨캡플라본II를 투여한 군은 천식 유도군(OVA)에 비해 기관지 폐포 세척액 내의 인터루킨-4, 13 및 MMP-9의 발현을 유의성있게 억제하였다.

표 7

[0113]

	상대 밀도 수치(relative densitometric value, RDV) (NC : NC = 100%)		
	인터루킨-4	인터루킨-13	MMP-9
실험군 (SII 10)	1.76±0.02	1.42±0.17	0.93±0.16
실험군 (SII 30)	1.84±0.21	1.34±0.17	0.80±0.07
정상 대조군 (NC)	1.00±0.02	1.00±0.13	1±0.09
천식 유도군 (OVA)	2.19±0.09	2.06±0.21	1.13±0.04
비교군 1 (Dex)	1.82±0.10	1.64±0.18	0.94±0.07
비교군 2 (Monte)	1.91±0.14	1.50±0.13	0.93±0.05

[0114]

효소 면역 검정법에 의해 기관지 폐포 세척액 내 인터루킨-4, 5 및 13의 농도를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 8 및 도 8에 나타내었다. 마지막 난백알부민 투여 48 시간 후에 정상 대조군(NC)에 비해 천식 유도군(OVA)에서 유의성있게 증가하였다. 증가한 사이토카인의 농도는 스킨캡플라본II를 투여한 군에서 유의성있게 및 복용량-의

존적으로 감소했다. 또한, 비교군 1(Dex) 및 비교군 2(Monte)에서도 기관지 폐포 세척액 내에서 유의성있게 인터루킨-4, 5 및 13의 농도가 감소했다

표 8

[0115]

	농도 (pg/ml)		
	인터루킨-4	인터루킨-5	인터루킨-13
실험군 (SII10)	7.83	11.43	11.09
실험군 (SII30)	4.37	4.12	10.45
정상 대조군 (NC)	4.02	0	4.53
천식 유도군 (OVA)	27.40	56.11	29.64
비교군 1 (Dex)	8.79	4.39	5.30
비교군 2 (Monte)	2.4	10.65	14.00

[0116]

이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킵칼플라본II는 인터루킨-4, 5, 13 및 MMP-9의 생성을 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0117]

<실시예 7> 스킵칼플라본II 투여에 의한 조직병리학적 분석

[0118]

본 발명에 따른 스킵칼플라본II의 염증 세포의 침윤에 효과를 확인하기 위하여 상기에서 준비한 각각의 마우스의 기관지 폐포 세척을 수행하지 않은 폐를 떼어내어 조직병리학적 검사를 수행하였고 그 결과를 염증지수로 하기 표 9 및 도 9에 나타내었다.

[0119]

각 군의 기관지 폐포 세척을 수행하지 않은 적출된 폐장은 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 4 μm 두께로 영구조직 절편을 제작하여 헤마톡실린과 에이오신(H&E) 염색을 수행하였다. H&E 염색 후 각 개체의 조직 절편당 무작위로 5개 부위의 염증지수를 측정하여 평균을 내었다. 염증지수 0은 기관지 주변에 염증세포가 발견되지 않은 경우, 염증지수 1은 간헐적으로 염증 세포가 관찰되는 경우, 염증지수 2는 대부분의 기관지 주변에 얇은 염증세포층이 관찰되는 경우, 염증지수 3은 대부분의 기관지 주변에 두꺼운 염증세포층이 관찰되는 경우로 평가하였다.

표 9

[0120]

	염증 지수	
	세기관지 주위	혈관 주위
실험군 (SII10)	2.00±0.28	1.60±0.22
실험군 (SII30)	1.40±0.22	1.00±0.40
정상 대조군 (NC)	0.13±0.11	0.00±0.00
천식 유도군 (OVA)	2.86±0.13	2.71±0.17
비교군 1 (Dex)	0.80±0.18	0.40±0.22
비교군 2 (Monte)	1.60±0.36	2.00±0.28

[0121] 그 결과, 본 발명에 따른 천식 유도군(OVA)에서는 세기관지 주변에 호산구를 비롯한 많은 염증세포가 침윤되어 있었으며 과다 증식된 상피 세포와 비후된 기관지 평활근도 확인되었다. 반면, 표 9에 나타낸 바와 같이, 약물을 투여한 군에서는 염증 세포의 침윤이 현저하게 감소 되어 이를 수치화하였을 때 천식 유도군(OVA)은 세기관지 주위의 염증 지수가 2.86 ± 0.13 이었으나, 비교군 1(Dex)은 0.80 ± 0.18 , 비교군 2(Monte)는 1.60 ± 0.36 , 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군은 2.00 ± 0.28 , 30 mg/kg 용량으로 투여한 군은 1.40 ± 0.22 로 모두 천식 유도군(OVA)에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

[0122] 또한, 혈관 주위의 염증 지수는 천식 유도군(OVA)에서 2.71 ± 0.17 로 나타났으나, 비교군 1(Dex)은 0.40 ± 0.22 , 비교군 2(Monte)는 2.00 ± 0.28 , 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군은 1.60 ± 0.22 , 30 mg/kg으로 투여한 군은 1.00 ± 0.40 로 약물을 투여한 군 중 비교군 2(Monte)를 제외하고 모두 천식 유도군(OVA)에 비해 유의성있게 감소하는 것으로 나타났다.

[0123] 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 염증세포의 침윤을 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0124] <실시예 8> 스킨캡플라본II의 배상세포 억제 효과

[0125] 본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 배상세포 수에 미치는 효과를 확인하기 위하여 상기에서 준비한 각각의 마우스의 기관지 내 배상세포 증식 정도를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 10 및 도 10에 나타내었다. 각 군의 기관지 폐포 세척을 수행하지 않은 적출된 폐장은 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 4 μm 두께로 영구 조직 절편을 제작하여 과요오드산취프(Periodic acid Schiff, PAS) 염색을 통해 감별된 배상세포가 기관지 상피 세포에서 차지하는 비율을 측정하여 배상세포 증식 정도를 평가하였다.

표 10

	PAS + 세포/세기관지 (%)
실험군 (SII10)	28.47 ± 2.54
실험군 (SII30)	26.90 ± 3.10
정상 대조군 (NC)	1.44 ± 0.62
천식 유도군 (OVA)	55.02 ± 2.47
비교군 1 (Dex)	15.78 ± 3.27
비교군 2 (Monte)	30.12 ± 3.08

[0127] 표 10 및 도 10에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군(NC)에 있어서, 배상세포가 세기관지 상피세포에서 차지하는 비율은 $1.44 \pm 0.62\%$ 이었으나, 천식 유도군(OVA)에서는 $55.02 \pm 2.47\%$ 로 증가하였으며 이는 비교군 1(Dex)에서는 $15.78 \pm 3.27\%$, 비교군 2(Monte)에서는 $30.12 \pm 3.08\%$, 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 10 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 $28.47 \pm 2.54\%$, 30 mg/kg 용량으로 투여한 군에서는 $26.90 \pm 3.10\%$ 로 모두 유의성있게 감소하는 것으로 나타났다.

[0128] 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 배상세포의 증식을 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0129] <실시예 9> 스킨캡플라본II의 기관지 주위 콜라겐 침식 억제 효과

[0130] 본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 기관지 주위 콜라겐 침식에 미치는 효과를 확인하기 위하여, Masson's trichrome 염색을 실시하였다. Image Pro Plus (Media Cybernetics Company, Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 기도 기저막의 길이와 콜라겐이 염색된 면적을 측정하여 단위 면적당 염색 부위를 수치화하였다. 한 슬라이드당 무작위로 10개의 기도를 수치화하였고, 그 결과를 하기 표 11 및 도 11에 나타내었다.

표 11

[0131]

	트리카롬 염색 부위 (um ² /um)
실험군 (SII10)	384.43
실험군 (SII30)	296.26
정상 대조군 (NC)	211.42
천식 유도군 (OVA)	915.69
비교군 1 (Dex)	319.46
비교군 2 (Monte)	407.63

[0132] 표 11 및 도 11에 나타낸 바와 같이 트리카롬 염색 부위 면적이 정상 대조군(NC)에 비해 천식 유도(OVA)군에서 유의성있게 증가하였다. 본 발명에 따른 스킨캡플라본II를 투여한 군에서는 유의성있게 및 복용량-의존적으로 기관지 주위 섬유화 정도가 감소했다. 비교군 1(Dex) 및 비교군 2(Monte) 역시 기관지 주위 섬유화의 정도를 유의성있게 감소시켰다.

[0133] 이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 기관지 주위 콜라겐의 침식을 억제함으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0134] <실시예 10> 스킨캡플라본II의 TGF-β1 억제 효과 및 Smad 발현에의 효과

[0135] 본 발명에 따른 스킨캡플라본II의 TGF-β1 억제 효과 및 Smad 발현에의 효과를 알아보기 위하여 상기에서 준비한 각각의 마우스의 폐조직 내 TGF-β1의 액틴에 대한 상대 밀도, TGF-β1의 농도 및 Smad의 액틴에 대한 상대 밀도를 측정하였고 그 결과를 표 12, 표 13, 도 12, 도 13에 나타내었다. 폐 조직은 폐 단백질 추출물을 생산해 낼 수 있는 단백질분해효소(protease)억제제가 존재하는 상태에서 균질되었다. 단백질 농도는 브래드 포드 시약(Bradford reagent)(Bio-Rad Inc., Hercules, CA)을 사용해 결정되었고 샘플(레인(lane)당 30 ug의 단백질)은 10% SDS-PAGE에 의해 분석되었다. 분리된 단백질은 wet transfer method(250 mA, 90 분)에 의해 폴리비닐리덴 다이플로라이드(polyvinylidene difluoride)의 막 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겨졌다. 비특이적 결합은 트리스 버퍼 식염수 Tween 20(TBST; 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 에서 5%의 탈지우유로 2시간동안 처리하여 차단되었고, pSmad2/3, Smad7 또는 TGF-β1 항체(Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)와 함께 4 °C로 하룻밤 배양되었다. 항-토끼 겨자무과산화효소-결합 IgG(Anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG)가 2차 항체로 사용되었고, 결과는 사진필름에 노출시킨 다음에 증강 화학발광분석법에 의해 가시화되었다.

표 12

[0136]

	액틴에 대한 TGF-β1의 상대 밀도	TGF-β1의 농도 (pg/ml)
실험군 (SII10)	5.87	176.56

실험군 (SII30)	3.06	140.18
정상 대조군 (NC)	1.3364	106.06
천식 유도군 (OVA)	15.91	312.19
비교군 1 (Dex)	4.73	138.19
비교군 2 (Monte)	2.16	127.19

[0137]

표 12 및 도 12에 나타난 바와 같이 폐 조직에서 TGF-β1 단백질은 마지막 난백알부민 투여 48시간에 정상 대조군(NC)과 대비하여 천식 유도군(OVA)에서 유의성있게 증가하였다. 증가한 TGF-β1의 농도는 본 발명에 따른 스킨캡플라본II 투여에 의해 유의성있게 및 복용량-의존적으로 감소하였다. 유사하게, 효소 면역 검정법(enzyme immunoassay)으로 기관지 폐포 세척액 내 TGF-β1 농도는 마지막 난백알부민 투여 48시간에 정상 대조군(NC)과 대비하여 천식 유도군(OVA)에서 유의성있게 증가함을 밝혀냈다. 그러나 증가된 TGF-β1의 농도는 본 발명에 따른 스킨캡플라본II 투여에 의해 유의성있게 및 복용량-의존적으로 감소했다. 비교군 1(Dex) 및 비교군 2(Monte) 투여군 또한 폐조직 및 폐포 세척액 내에 TGF-β1의 농도를 감소시켰다.

표 13

[0138]

	액틴에 대한 Smad7의 상대 밀도	액틴에 대한 pSmad2/3의 상대 밀도
실험군 (SII10)	0.4199	0.351
실험군 (SII30)	0.6213	0.2715
정상 대조군 (NC)0.	0.6367	0.1645
천식 유도군 (OVA)	0.2617	0.7256
비교군 1 (Dex)	0.4325	0.3348
비교군 2 (Monte)	0.6298	0.2786

[0139]

표 13 및 도 13에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 스킨캡플라본II 투여에 의한 천식 유도군의 폐에서 pSmad2/3 및 Smad7의 농도를 분석한 결과, 난백알부민 투여 7일 후 pSmad2/3의 증가가 관찰되었고 이 농도는 스킨캡플라본II 및 텍사메타손의 투여에 의해 상당히 감소되었다. 대조적으로, Smad7의 농도는 스킨캡플라본II 및 텍사메타손으로 처리된 천식 유도군(실험군(SII10), 실험군(SII30) 및 비교군 1(Dex))에서 처리되지 않은 천식 유도군(OVA)과 대비하여 현저하게 증가하였다. pSmad2/3 및 Smad7의 농도 측면에서 스킨캡플라본II 및 텍사메타손을 투여한 군 사이에 유의성있는 차이는 발견되지 않았다.

[0140]

이로부터 본 발명에 따른 화학식 1로 기재되는 스킨캡플라본II는 TGF-β1 및 pSmad2/3의 생성을 억제하고 Smad7의 생성을 증가시킴으로써 천식 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0141]

<제제예 1> 약학적 제제의 제조

[0142]

<1-1> 산제의 제조

[0143]

본 발명의 스킨캡플라본II 화합물 2 mg

- [0144] 유 당 1 g
- [0145] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0146] **<1-2> 정제의 제조**
- [0147] 본 발명의 스킨캡플라본II 화합물 100 mg
- [0148] 옥수수전분 100 mg
- [0149] 유 당 100 mg
- [0150] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0151] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0152] **<1-3> 캡슐제의 제조**
- [0153] 본 발명의 스킨캡플라본II 화합물 100 mg
- [0154] 옥수수전분 100 mg
- [0155] 유 당 100 mg
- [0156] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0157] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0158] **<1-4> 환의 제조**
- [0159] 본 발명의 스킨캡플라본II 화합물 1 mg
- [0160] 유 당 1.5 g
- [0161] 글리세린 1 g
- [0162] 자일리톨 0.5 g
- [0163] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0164] **<1-5> 과립의 제조**
- [0165] 본 발명의 스킨캡플라본II 화합물 150 mg
- [0166] 대두 추출물 50 mg
- [0167] 포도당 200 mg
- [0168] 전분 600 mg
- [0169] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0170] **<제조예 2> 식품의 제조**
- [0171] 본 발명의 스킨캡플라본II 화합물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.
- [0172] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**
- [0173] 본 발명의 스킨캡플라본II 화합물 0.5 - 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크,

쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0174]

<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0175]

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

[0176]

<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0177]

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

[0178]

<2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0179]

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

[0180]

<2-5> 선식의 제조

[0181]

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

[0182]

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

[0183]

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

[0184]

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

[0185]

곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0186]

종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0187]

스킵캡플라본II 화합물(3 중량부),

[0188]

영지(0.5 중량부),

[0189]

지황(0.5 중량부)

[0190]

<제조예 3> 음료의 제조

[0191]

<3-1> 건강음료의 제조

[0192]

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

[0193]

<3-2> 야채 주스의 제조

[0194]

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

[0195]

<3-3> 과일 주스의 제조

[0196]

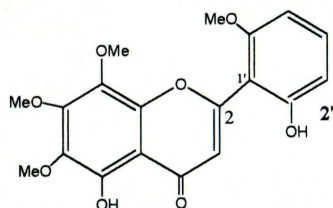
본 발명의 스킵캡플라본II 화합물 1 mg을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

도면1

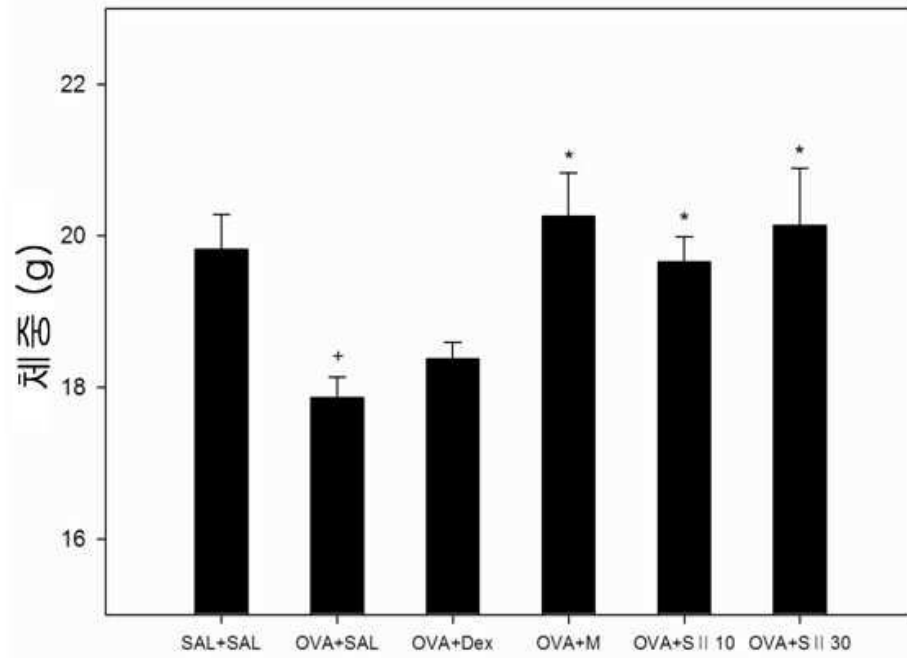
황금 E3-PR-13 (스컬캅플라본 II)

문헌: *Chem. Pharm. Bull.*(1980), 28(3), 708-716

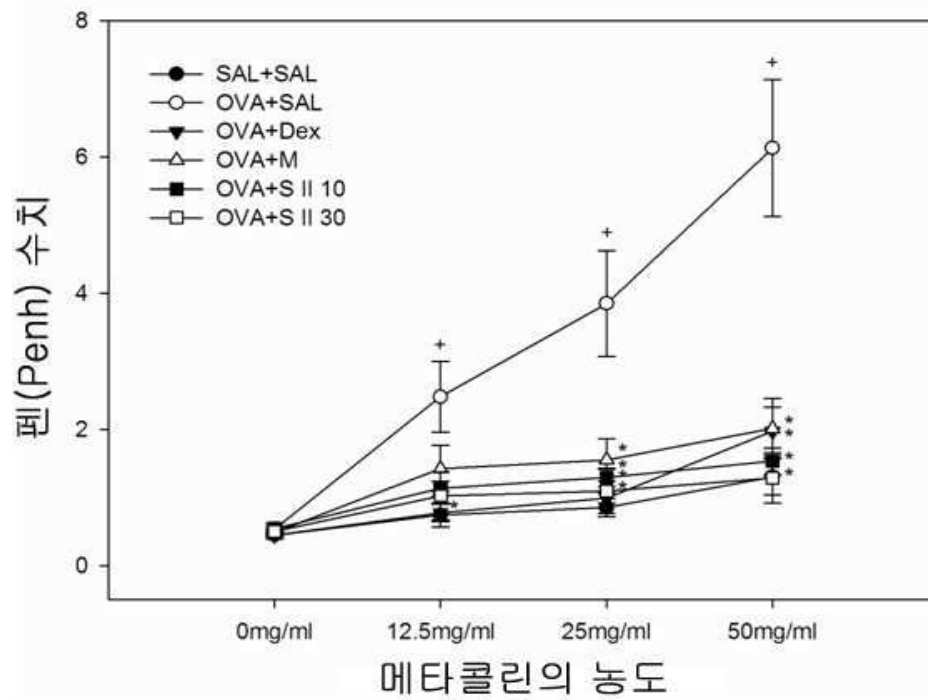


NO.	¹³ C(문헌) (DMSO-d ₆)	¹³ C(E3-PR-13) (DMSO-d ₆)	¹ H(E3-PR-13) (DMSO-d ₆)
2	162.1	162.35	
3	111.7	111.90	6.32 (s)
4	182.2	182.49	
5	146.0	146.23	
6	135.5	135.78	
7	152.2	152.54	
8	132.2	132.55	
9	148.2	148.53	
10	108.9	108.89	
1'	106.3	106.28	
2'	156.4	156.61	
3'	106.1	106.28	6.62 (d, <i>J</i> =8.4 Hz)
4'	132.1	132.51	7.32 (t, <i>J</i> =8.2 Hz)
5'	101.9	102.25	6.62 (d, <i>J</i> =8.4 Hz)
6'	158.1	158.29	
OCH ₃	55.8, 60.2 61.4, 61.4	55.87, 60.56, 61.46, 61.70	3.79 (s), 3.80 (s) 3.82 (s), 4.01 (s)
OH			10.14(brs), 12.67(s)

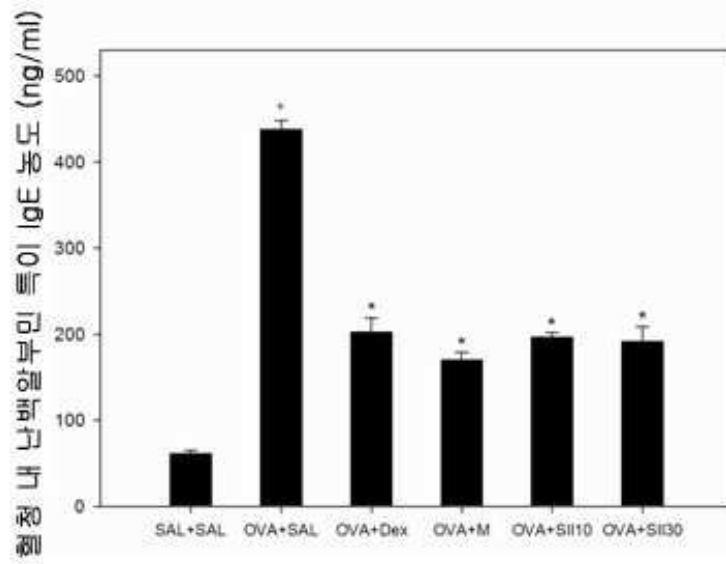
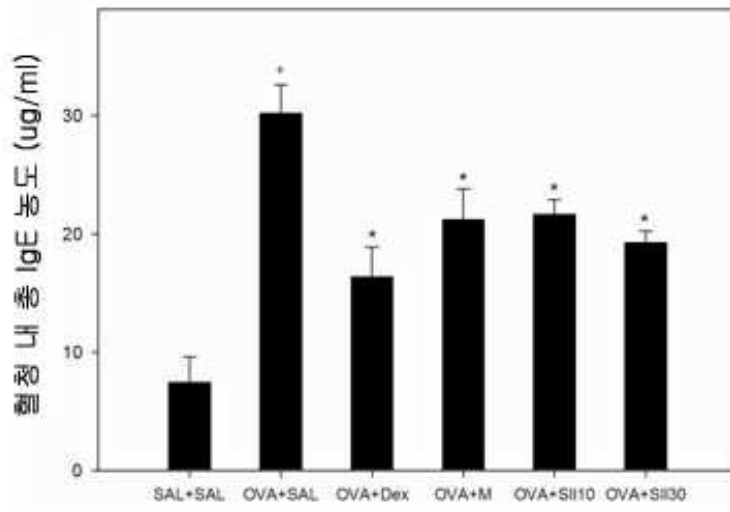
도면2



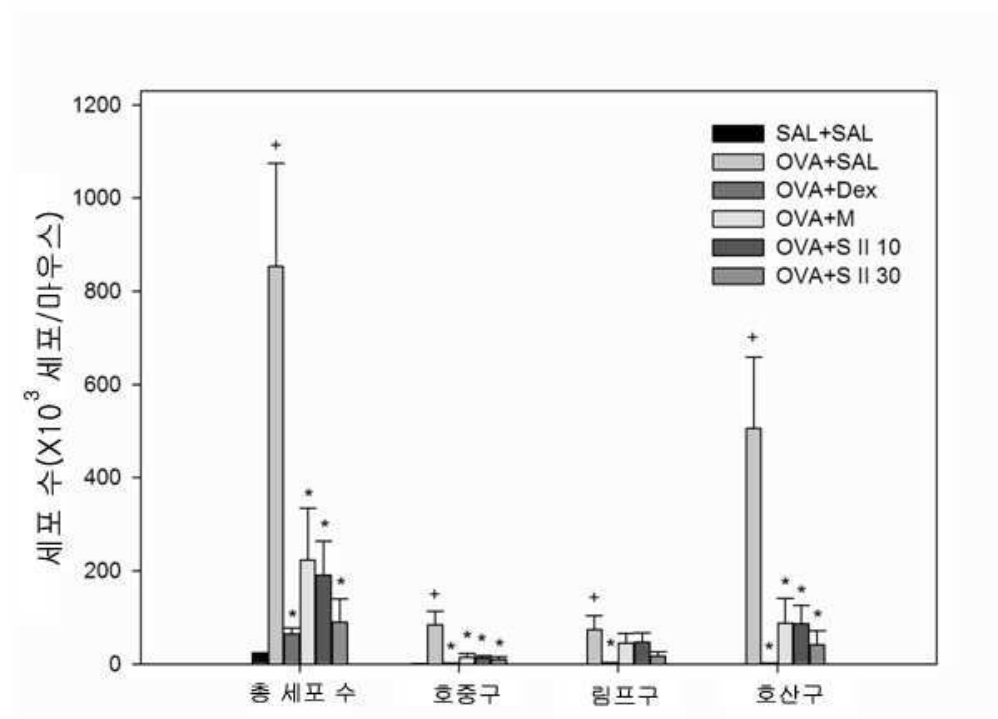
도면3



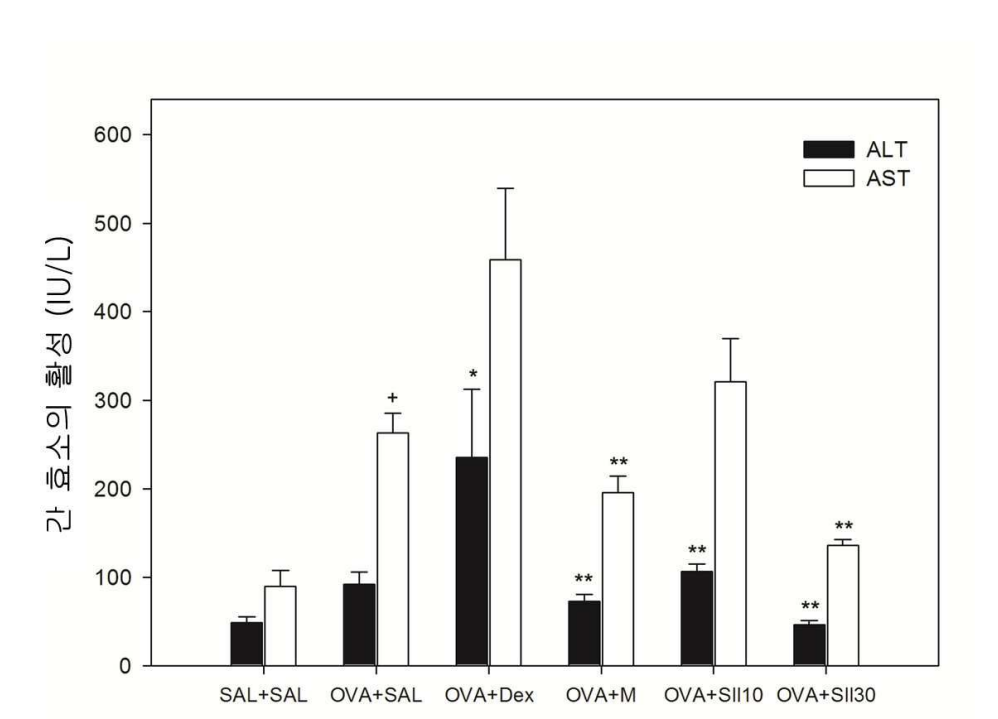
도면4



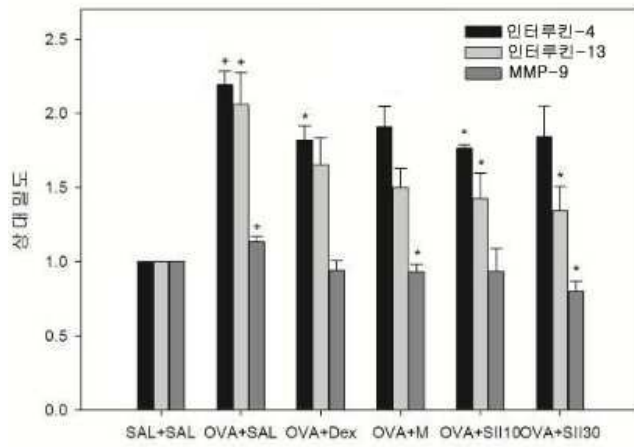
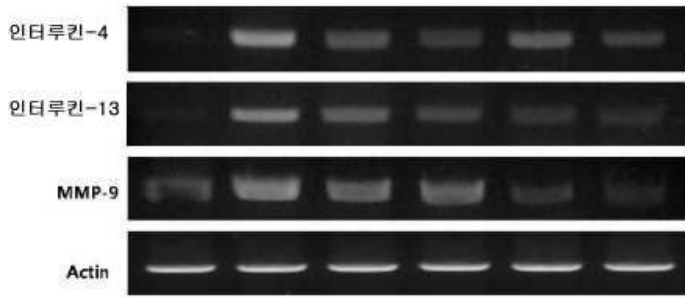
도면5



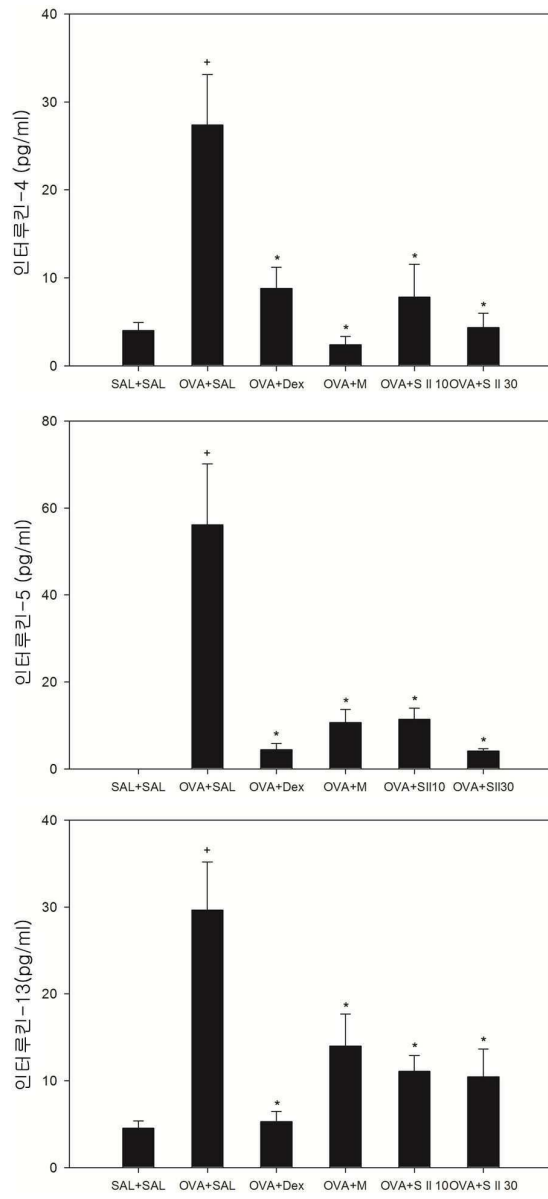
도면6



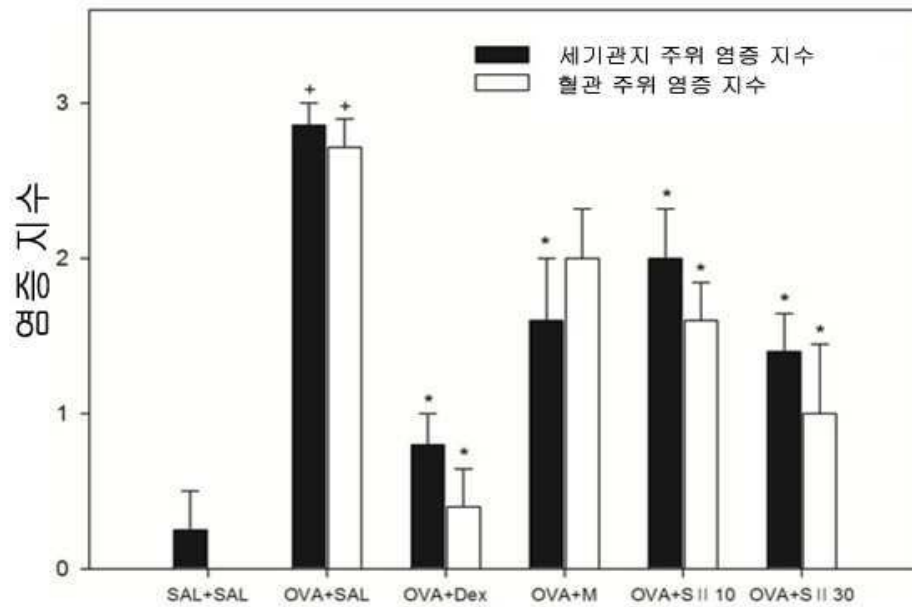
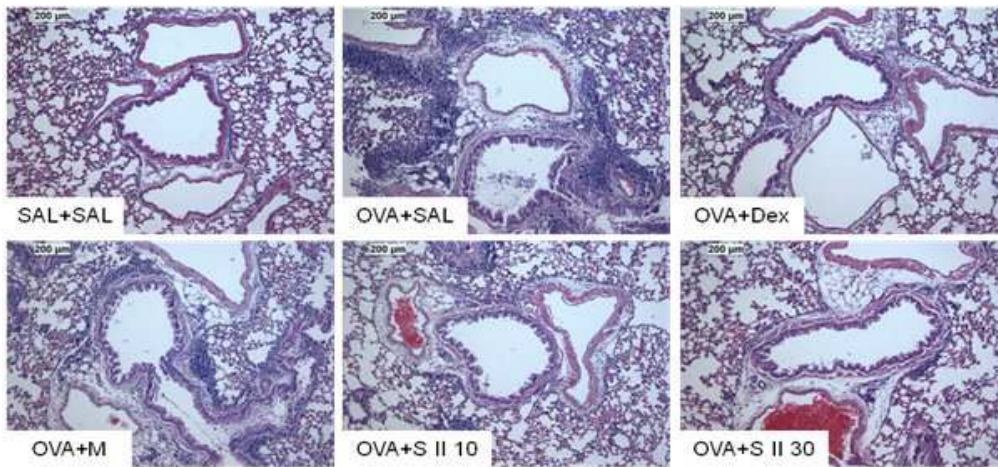
도면7



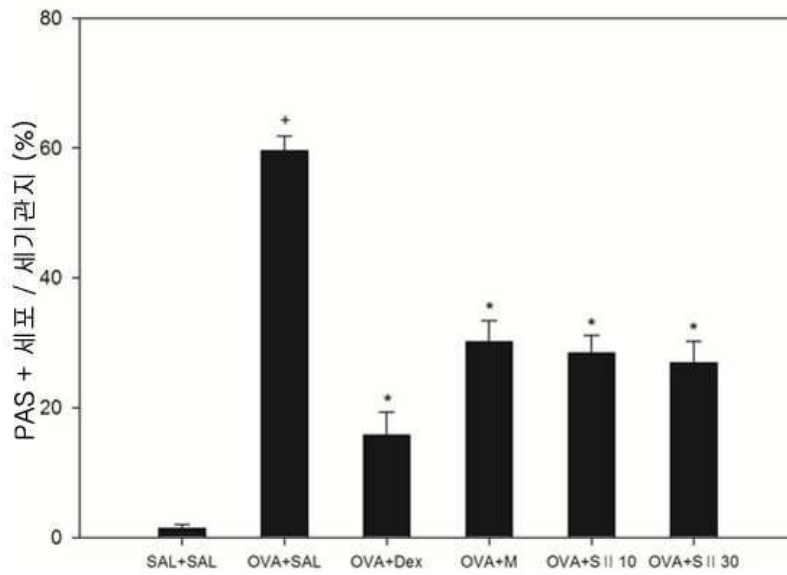
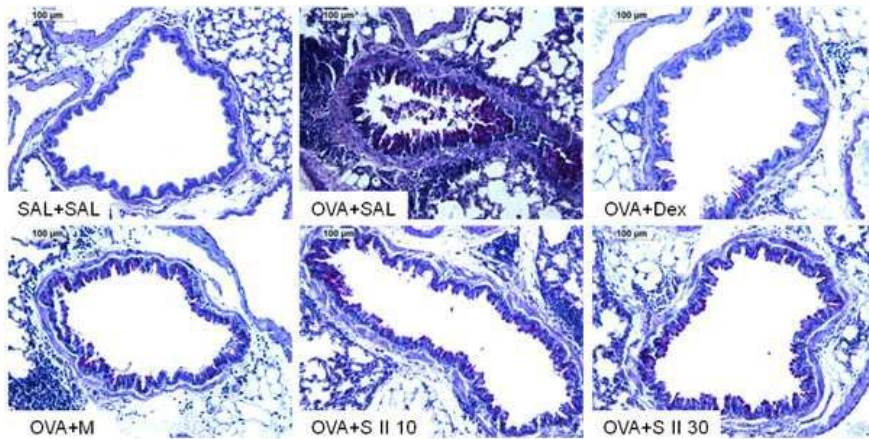
도면8



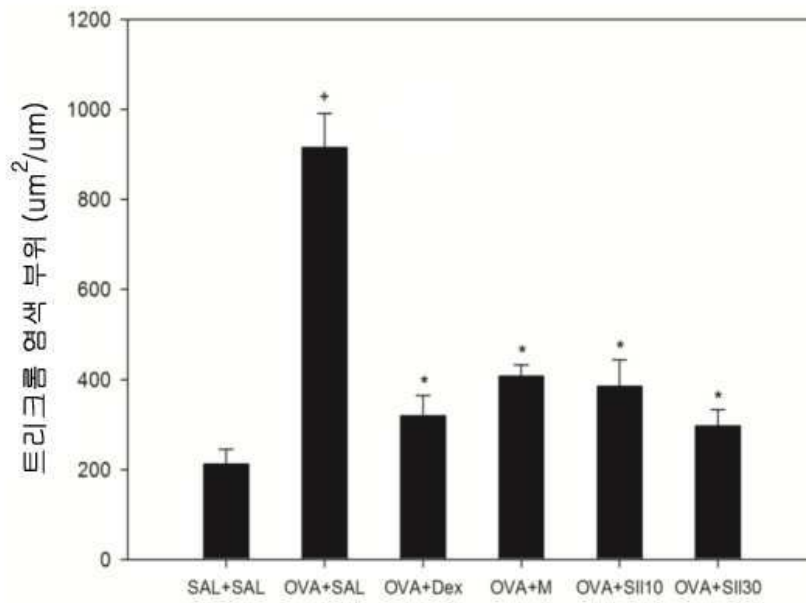
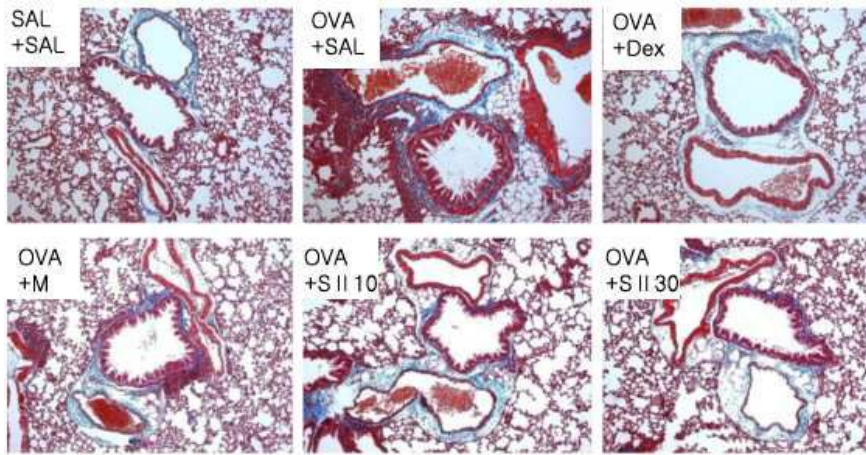
도면9



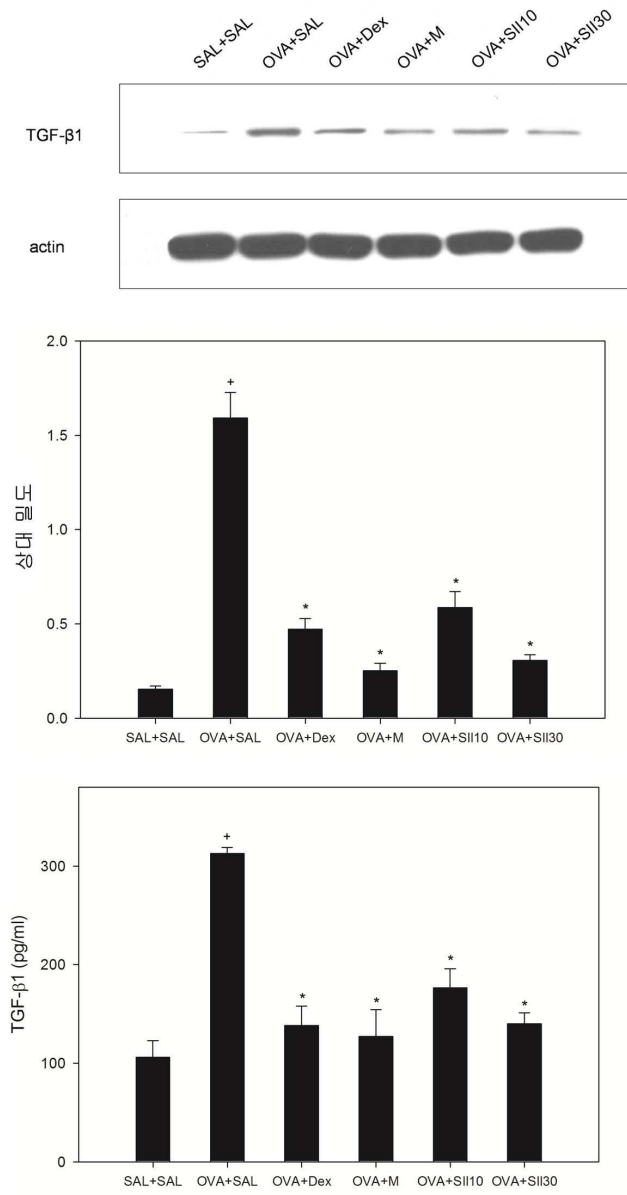
도면10



도면11



도면12



도면13

