



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월17일  
(11) 등록번호 10-0822760  
(24) 등록일자 2008년04월10일

(51) Int. Cl.  
A61K 36/185 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2006-0066866  
(22) 출원일자 2006년07월18일  
심사청구일자 2006년07월18일  
(65) 공개번호 10-2007-0011138  
(43) 공개일자 2007년01월24일  
(30) 우선권주장  
1020050064668 2005년07월18일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020030042123 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전 유성구 어은동 52번지  
(72) 발명자  
이형규  
대전 유성구 어은동 99 한빛아파트 111동 101호  
오세량  
대전 서구 관저동 신선마을아파트 210-1703  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 2 항

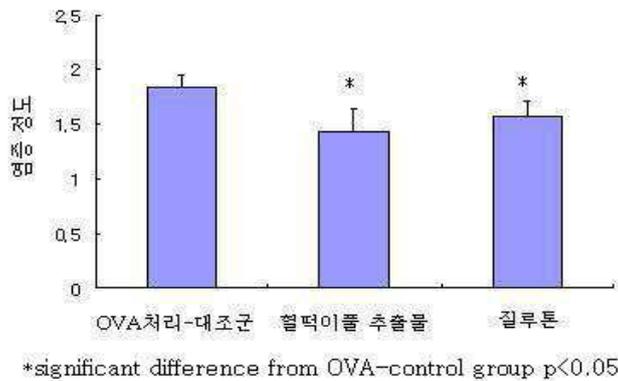
심사관 : 고태욱

(54) 항염, 항알레르기 및 항천식 활성을 갖는 혈떡이플추출물을 함유하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 항염, 항알레르기 및 항천식 활성을 갖는 혈떡이플(*Tiarella polyphylla*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 혈떡이플 추출물이 골수유래 비만세포 (bone marrow-derived mast cell, BMDC)의 시스테인 류코트리엔 (cysteinyl leukotriene) 생산과 난백알부민(ovalbumin) 유도 천식 동물 모델에서 기도 과민성 억제활성, 기관지 폐포세척액의 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-5 (IL-5) 및 인터루킨-13 (IL-13)의 생산억제 활성, 기관지 조직의 항염증 활성 및 카라기난-유도 동물모델에서 부종 억제활성을 나타냄으로서 상기 조성물은 항염, 항알레르기 및 천식의 예방 및 치료를 위한 약학조성물로서 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**안경섭**

대전 유성구 노은동 열매마을아파트 803-201

**이중구**

대전 유성구 전민동 엑스포아파트 109-603

**이상구**

대전 유성구 지족동 열매마을아파트 504-101

**박보영**

대전 유성구 전민동 나래아파트 105-101

**김두영**

대전 유성구 어은동 99 한빛아파트 126-208

**권옥경**

대전 유성구 송강동 청솔아파트 308-704

**전계화**

대전 유성구 어은동 52번지

**김정희**

대전 유성구 송강동 송강청솔아파트 207-1402

**김은아**

전남 나주시 금천면 원곡리 397-3번지

**최순자**

대전 유성구 송강동 송강청솔아파트 308-711

**김미진**

대전 유성구 신성동 161-6 201호

**심광해**

대전 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원

**민병선**

대전 서구 둔산동 1510 목련아파트 304동 706호

**한균희**

경기 화성시 태안읍 반월리 신영통현대아파트  
209-1702

**박혜영**

서울 강남구 압구정동 현대아파트 86-603

**김건철**

대전 유성구 전민동 엑스포아파트 506-1202

**김주현**

대전 유성구 신성동 대림두레아파트 102동 1006호

**김소영**

대전 동구 인동 한울아파트101-1504

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

혈떡이풀(*Tiarella polyphylla*)의 메탄을 추출물에 대한 부탄올 가용추출물을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 치료를 위한 약학조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

혈떡이풀(*Tiarella polyphylla*)의 메탄을 추출물에 대한 부탄올 가용추출물을 유효성분으로 함유하는 천식의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

- <3> 본 발명은 항염, 항알레르기 및 항천식 활성을 갖는 혈떡이풀 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학조성물에 관한 것이다.
- <4> 천식 (asthma)이란 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민성을 그 특징으로 하는 질환으로 기도의 광범위한 협착에 의해 발생하는 천명 (喘鳴), 호흡곤란, 기침 등의 임상 증세들은 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전될 수 있다. 대부분의 천식은 알레르기성이며, 만성 기도염증 (chronic airway inflammation)과 기도 과민반응성 (bronchial hyperresponsiveness)이 특징이다(Minoguchi K and Adachi M. Pathophysiology of asthma. In: Cherniack NS, Altose MD, Homma I, editors. Rehabilitation of the patient with respiratory disease. New York: McGraw-Hill, 1999, pp97-104).
- <5> 알레르기성 천식 환자는 세계인구의 약 10 %를 차지하는 것으로 알려져 있으며 (2억 7500만 명, 1995년), 미국에만 1700만 명이 천식으로 고생하고 있고, 이 중 500만 명이 청소년이라고 보고 되어 있다. 2000년도에 알레르기성 천식 치료제의 미국 시장 규모가 약 64억 \$ 이었으며, 한국 시장도 약 10억 \$로 전체 한국 의약품 시장의 20 % 정도를 차지한다고 보고 되었다.
- <6> 천식은 그 원인에 따라 외인성 천식과 내인성 천식으로 나누어질 수 있다. 외인성 천식의 경우 원인 항원에 노출되었을 때 증상이 나타나는 천식을 말한다. 원인 항원에 대한 피부시험이나 기관지 유발시험이 양성반응을 보이며 발병 연령이 젊은 것이 보통이다. 집 먼지, 진드기가 가장 많은 원인 항원이며, 그밖에 꽃가루, 동물의 상피, 곰팡이 등이 원인 항원으로 작용한다. 내인성 천식의 경우에는 상기도 감염, 운동, 정서불안, 한랭 기후 및 습도의 변화 등이 천식을 유발하거나 악화시키는 경우인데, 성인형 천식에서 흔히 볼 수 있다. 그 외에도 약물에 의해 유발되는 천식, 운동 유발성 천식 및 직업성 천식 등이 있다.
- <7> 병태생리학적인 면에서 천식은 Th2 면역세포에서 생성하는 사이토카인에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도주변 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). 이 경우 활성화된 호산구, 비만세포, 폐포 대식세포 등의 염증세포는 다양한 염증매개인자들

을 분비하는데 , 그 중 시스테인 류코트리엔 (cysteinyl leukotrienes; LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>)은 가장 강력한 기관지 수축작용과 호산구증가를 유도하는 물질이다(Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: An update., *Pharmacol Rev.*, 50, pp515-596, 1998). 염증세포에서 시스테인 류코트리엔의 생성은, 먼저 세포막의 인산지질 (phospholipid)에서 유리된 아라키돈산 (arachidonic acid)이 핵막에서 5-리폭시게나제 (5-lipoxygenase, 5-LO)와 5-리폭시게나제활성단백질 (Five Lipoxygenase Activating Protein, FLAP)의 작용으로 5-HPETE (5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid)을 거쳐 류코트리엔 A<sub>4</sub> (leukotriene A<sub>4</sub>)으로 전환된 후, LTC<sub>4</sub> 합성효소 (LTC<sub>4</sub> synthase)의 작용으로 LTA<sub>4</sub>에 글루타치온이 결합하여 LTC<sub>4</sub>가 생성된다(Nicosia S, Capra V, Rovati GE. Leukotrienes as mediators of asthma., *Pulm Pharmacol Thr*, 14, pp3-19, 2001). 세포질에서 생성된 LTC<sub>4</sub>는 세포 밖으로 배출되는데 감마글루타미트란스펩티다아제 (γ-glutamyltranspeptidase)와 디펩티다아제 (dipeptidase)에 의해 글루타민산 (glutamic acid)과 글리신 (glycine) 잔기가 차례로 가수분해 되어 각각 LTD<sub>4</sub>와 LTE<sub>4</sub>가 생성된다(Peters-Golden M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, ppS227-S232,1998 ; Bisgaard H. Role of leukotrienes in asthma pathophysiology., *Pediatr. Pulmonol.*, 30, pp166-176, 2000).

<8> 알레르기, 찬 공기, 운동 및 화학적 자극 등 다양한 자극을 받아 염증세포로부터 분비되는 시스테인 류코트리엔은 호산구의 기도유입 및 집적과 직접적인 관계가 있다(Busse WW, Leukotrienes and inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, ppS210-S213, 1998). 호산구 역시 다량의 시스테인 류코트리엔을 생산하므로 이들의 기도 조직 및 기관지폐포액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서의 증가는 천식을 악화시키는 중요한 요인이 된다(Underwood DC et al., Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the guinea pig, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154, pp850-857, 1996).

<9> 따라서 염증세포 활성화에 관여하는 인터루킨-4, 인터루킨-5, 인터루킨-13 등의 사이토카인 및 면역글로불린 E의 생산과 이들의 작용으로 호산구 등 염증세포에서 분비되는 시스테인 류코트리엔 생합성 등은 염증 및 알레르기 반응과 이로 인한 천식을 유발하는 주요 원인이므로 이들의 생산을 억제하기 위한 약물을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

<10> 혈떡이풀(*Tiarella polyphylla*)은 범의귀과 (Saxifragaceae)의 혈떡이풀속 식물로서 한국, 중국, 일본 등에 분포하는 다년생 초본으로, 우리나라에서는 유일하게 울릉도에서만 자생하는 식물이다. 울릉도 지역 민간에서는 혈떡이풀 추출물을 "천식약풀"이라 하여 기침, 천식에 사용한 바 있으나 서식 분포가 제한적인 관계로 그리 널리 알려진 식물은 아니다. 혈떡이풀의 성분 및 활성화에 관한 연구로는 항보체 활성을 나타낸 올레아놀릭산 배당체가 분리, 보고된 바 있고(Park SH et al., *Arch. Pharm. Res.*, 22(4), pp428-431, 1999), 루판 골격의 트리테르페노이드 화합물로서 티아렐릭산 (tiarellic acid), 코로솔릭산 (corosolic acid) 및 토르멘틱산 (tormentic acid) 등의 성분이 분리된 바 있으며 바 있으며 (Park SH et al., *Arch. Pharm. Res.*, 25(1), pp57-60, 2002), 조직배양된 섬유아세포에 자외선 조사로 유도한 MMP-1의 발현 및 제1형 procollagen의 발현 억제활성 (Moon HI et al., *J. Ethnopharmacol.*, 98, pp185-189, 2005)이 보고된 바 있다. 그러나 실제로 상기한 문헌들 및 연구 보고들에서 항염, 항알레르기 및 항천식 활성을 나타낸다는 것을 교시하거나 개시된 바는 없다.

<11> 본 발명자들은 혈떡이풀 추출물이 골수유래 비만세포 (bone marrow-derived mast cell, BMMC)의 시스테인 류코트리엔 (cysteinyl leukotriene) 생산과 난백알부민으로 감작된 천식 동물 모델에서 기도 과민성 억제활성, 기관지 폐포세척액의 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-5 (IL-5) 및 인터루킨-13 (IL-13)의 생산을 억제하는 활성, 기관지 조직의 항염증 활성 및 카라기난-유도 동물모델에서 부종 억제활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

<12> 본 발명은 항염, 항알레르기 및 항천식 활성을 갖는 혈떡이풀 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증질환, 알레르기 및 천식의 예방 또는 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

**발명의 구성 및 작용**

<13> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항염, 항알레르기, 항천식 활성을 갖는 혈떡이풀 조추출물 또는 유기용매 가용추출물을 유효성분으로 함유하는 염증질환, 알레르기 및 천식질환의 예방 또는 치료를 위한 약학조

성물을 제공한다.

- <14> 상기 조추출물 또는 유기용매 가용추출물은 물, 에탄올, 메탄올과 같은 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 등의 극성용매 및 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- <15> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- <16> 본 발명의 혈떡이플 조추출물은 혈떡이플을 채집, 음긴한 다음 마쇄하여 분말화한 후, 혈떡이플 시료 중량의 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 물 및 메탄올, 에탄올, 부탄올 등과 같은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 저급알코올의 극성 용매 또는 이들의 약 1: 0.1 내지 1: 10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 바람직하게는 메탄올을 가하여 20 내지 50 ℃에서 약 10시간 내지 48일, 바람직하게는 20시간 내지 30시간 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 2 내지 5회, 바람직하게는 2-3회 추출한 후에, 이를 통상의 방법에 따라 여과, 농축 및 건조하여 조추출물을 얻을 수 있다.
- <17> 또한, 본 발명의 극성용매 가용추출물은 상기 조추출물을 증류수에 현탁한 후, 상기 현탁액의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올과 같은 극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 1회 내지 5회 극성용매 가용층을 추출, 분리하여 수득할 수도 있으며, 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다.
- <18> 본 발명은 상기 제조방법으로 수득된 혈떡이플 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증질환, 알레르기 및 천식질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물을 제공한다.
- <19> 상기와 같은 방법으로 얻어진 혈떡이플 추출물의 항염, 항알레르기 및 항천식 활성의 효능을 확인하여 본 결과, 본 발명의 혈떡이플 조추출물이 골수유래 비만세포 (bone marrow-derived mast cell, BMMC)의 시스테인 류코트리엔 (cysteinyl leukotriene) 생산과 난백알부민으로 감작된 천식 동물 모델에서 기도 과민성 억제활성, 기관지 폐포세척액의 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-5 (IL-5) 및 인터루킨-13 (IL-13)의 생산을 억제하는 활성, 기관지 조직의 항염증 활성 및 카라기난-유도 동물모델에서 부종 억제활성을 확인하였다.
- <20> 본 발명의 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.
- <21> 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <22> 본 발명에 따른 혈떡이플 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 화합물을 포함하는 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 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 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 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 (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, 비수성용제, 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <23> 본 발명에서 화합물의 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 화합물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/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.

- <24> 본 발명의 화합물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <25> 본 발명은 항염, 항알레르기 및 항천식 활성을 갖는 상기 화합물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- <26> 또한, 항염, 항알레르기 및 천식 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- <27> 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제 등의 형태를 포함한다.
- <28> 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, 글리시리히진등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- <29> 상기 외에 본 발명의 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. 그밖에 본 발명의 화합물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- <30> 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <31> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <32> **실시예 1. 혈떡이플의 조추출물의 제조**
- <33> 혈떡이플 건조 1.1 kg을 건조, 분쇄하여 혈떡이플 건조 시료에 메탄올 5 l를 가한 후 상온에서 24시간 동안 교반하여, 진공여과에 의해 상층액을 회수하였다. 이 과정을 2회 반복하여 상층액을 모은 후, 감압농축하여 혈떡이플 메탄올 조추출물 100.5 g을 수득하였다.
- <34> **실시예 2. 혈떡이플 극성용매 가용추출물의 제조**
- <35> 상기 실시예 1에서 수득한 혈떡이플 조추출물을 증류수 1l에 현탁시키고, 1 l의 부탄올을 가하여 혼합 후 부탄올 가용 분획부와 수가용성 분획부를 분리한 후 여과, 감압농축하여 용매를 제거하여 혈떡이플 부탄올 가용추출물 80.0 g을 수득하였으며 부탄올 가용추출물을 실험의 시료로 사용하였다.
- <36>
- <37> **실험예 1. 실험동물의 기도 감각과 항원 투여**
- <38> 8주된 특정병원체 미감염 백서 암컷 (Balb/c)(무게: 약 20g)을 (주)오리엔트 (Seoul, Korea)에서 구입한 후, 2 mg 수산화알루미늄 (Sigma A8222)과 난백알부민 20 $\mu$ g (Sigma A5503)을 현탁한 인산완충용액 (pH 7.4) 100  $\mu$ l을 복강에 주입하여 감각시켰다. 그 후 11일째에 초음파분무기를 사용하여 1% 난백알부민을 첨가한 인산완충용액을 20분간 분무하였으며, 19, 20일째 상기 실시예 2에서 수득한 혈떡이플 추출물과 대조약물인 질루톤 (Zileuton, 상품명 Zyflo, Abbott Co.)을 인산완충용액에 각각 현탁한 후에 구강 투여하였고, 21, 22, 23일째에는 시료 구강투여와 함께 1% 난백알부민의 항원투여를 하였고, 24일째에는 약물투여, 25일째에는 1% 난백알부민

의 항원투여를 하였다. 음성 대조군으로 기도 감작을 일으키지 않은 마우스군 (5마리), 양성대조군으로는 기도 감작 후 동일한 실험일정에 따라 1% 난백알부민의 인산완충용액만을 분무한 군 (5마리)을 사용하였다.

<39> **실험예 2. 세포 생존도 실험**

<40> 세포 생존력 시험은 전골수성 (promyelotic) HL-60 세포주 (HC-18103, 한국유전자은행)를 사용하여 표준 MTT 방법으로 수행하였다(Wang Z. et al., Effects of two saponins extracted from the *Polygonatum Zanlanscianense* pamp on the human leukemia (HL-60) cells, *Biol., Pharm. Bull.*, 24, pp159-162, 2001). 상기 세포를 5% 우태아혈청(fetal bovine serume), 페니실린100 U/ml 및 스트렙토마이신 100 µg/ml 을 함유한 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 배지 (GibcoBRL)에  $5 \times 10^5$  cells/ml 에서 희석한 후, 96-마이크로티터 웰 (96-microtiter well)에서 37°C조건으로 24시간 배양하였다. 그 후 디메틸설폭시화물 (DMSO ; Dimethyl Sulfoxide)에 용해된 혈떡이플 추출물 시료와 인산완충용액에 용해한 MTT (5 mg/ml) 10µl를 가하여 동일한 배양조건에서 4시간동안 배양하고 반응용액 중 포르마잔 (formazan) 침전물을 얻기 위해 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리를 하였다. 원심분리 후 얻은 침전물을 디메틸설폭시화물 100µl에 용해시키고 마이크로플레이트 리더 (microplate reader, BIO-RAD, U.S.A.)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 본 발명의 티아렐릭산을 투여하지 않은 대조군에 대한 백분율로 세포 생존도를 계산하였다.

<41> 상기 실험 수행의 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 혈떡이플 추출물을 투여한 실험군은 세포독성이 없는 것으로 나타났다.

**표 1**

시료	세포생존도 (%)	
	50 µg/ml	100 µg/ml
혈떡이플 추출물	100	102

<43> **실험예 3. 골수유래 비만세포 ( bone marrow-derived mast cells, 이하 BMMC)를 이용한 류코트리엔 합성저해 활성측정**

<44> 8주된 특정병원체 미감염 백서 수컷 (Balb/c)(무게: 약 20 g)을 (주)오리엔트(Seoul, Korea)에서 구입한 후, 하지의 넓적다리로부터 골수를 적출하였다. 골수세포로부터 비만세포를 선택적으로 얻기위하여, 골수용액을 10% FBS (fetal bovine serum)와 IL-3 (2ng/ml, Sigma I4144)가 첨가된 배지 (RPMI containing 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES buffer, 2 mg/ml sodium bicarbonate, 100 units/ml penicillin G, 100 mg/ml streptomycin sulfate, 0.25 mg/ml amphotericin B)에 넣고 3일마다 계대배양하면서 4주간 배양하였다. 3주차가 지나서 tuluidine blue로 염색하여 배양된 세포를 관찰하였을때, BMMC가 98%이상으로 배양되었음을 확인하였다. 그 후, BMMC( $1 \times 10^5$  cells/ml)에 stem cell factor (SCF, Sigma S9915)를 100 ng/ml 농도로 처리하고 이산화탄소 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 20분간 배양하여 류코트리엔의 생합성을 유도한 후, 배양 상등액으로 분비된 LTC<sub>4</sub>의 양을 LTC<sub>4</sub> 정량분석용 효소면역측정 키트 (Cyman Chemical, Ann Arbor, MI, U.S.A.)를 사용하여 계산하였다.

<45> 혈떡이플 추출물에 의한 LTC<sub>4</sub> 분비 저해활성 측정은, SCF로 류코트리엔 생합성을 유도하기 직전에 DMSO에 용해한 시료를 BMMC 배양액에 첨가하여 이산화탄소 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 에서 40분간 배양한 후, 상기한 방법으로 류코트리엔 생합성을 유도하여 분비된 LTC<sub>4</sub> 함량을 계산하고 DMSO만을 처리한 대조군에 비하여 저하된 생산량을 백분율로 계산하여 LTC<sub>4</sub>합성 저해 활성을 평가하였다.

<46>  
<47> **실험예 4. 혈떡이플 추출물에 의한 LTC<sub>4</sub> 분비 억제활성.**

<48> 상기한 실험예 3에서 기술한 바와 같이 BMMC에서 류코트리엔 생합성을 유도한 후, 혈떡이플 추출물에 의한 LTC<sub>4</sub> 분비 저해활성을 측정하였다. 배양한 BMMC ( $1 \times 10^5$  cells/ml)에 DMSO에 용해한 혈떡이플 추출물을

BMMC 배양액에 첨가하여 이산화탄소 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37℃) 에서 40분간 배양한 후, 상기한 방법으로 SCF를 처리하여 류코트리엔 생합성을 유도한 후 분비된 LTC<sub>4</sub> 함량을 계산하고 DMSO만을 처리한 대조구에 비하여 생산량 저하 정도를 백분율로 계산하여 LTC<sub>4</sub>합성 저해 활성을 평가하였다. 상기 실험 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 혈떡이플 추출물의 LTC<sub>4</sub> 분비 저해활성은 대조약물로 사용한 질루톤의 보다 낮았지만 높은 활성을 나타내었음을 확인하였다.

**표 2**

<49>

시료	LTC <sub>4</sub> 분비저해활성
혈떡이플 추출물	19.5 µg/ml
질루톤(zileuton)	0.11(µM)

<50>

**실험예 5. 기도 과민성 억제효과 분석**

<51>

상기 실험예 1에서 마지막 항원 투여 후 24시간 뒤에 기도과민성을 측정하였다. 기도과민성의 측정은 신체체적변동기록기 (whole-body plethysmography)를 사용하여 메타콜린 용액을 각각 0, 10, 20 및 30 mg/ml 농도로 분무한 후에 기관지 수축에 의한 호흡율을 기록하여 펜(Penh) 값으로 환산하였다. 상기실험 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이 혈떡이플 추출물은 난백알부민(OVA)을 처리한 동물군에 비하여 메타콜린 30 mg/kg 처리구에서 유의성 있는 펜(Penh) 값의 저하율을 나타내어 효과적으로 기도과민성을 감소시켰다.

**표 3**

<52>

시료	펜 값(Penh value)			
	메타콜린(metacholine, mg/ml)			
	0	10	20	30
OVA-처리 대조군	0.60±0.09	1.21±0.56	2.31±0.54	5.29±1.37
혈떡이플 추출물	0.60±0.06	1.79±0.47	3.25±0.75	2.54±0.57*

\* significant difference from OVA treated group, p<0.001

<53>

**실험예 6. 기관지폐포액의 사이토카인 분석**

<54>

상기 실험예 1 및 실험예 5를 실시한 후, 기관에 카놀라 삽입방법으로 0.5 ml씩 3회 흡입하여 기관지폐포액 (BALF)을 수득하였다. 기관지폐포액의 사이토카인 함량을 측정하기 위하여 IL-4, IL-5 및 IL-13 특이적 ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, USA)를 사용하였으며, 제조사의 방법에 따라 각 사이토카인의 함량을 측정하였다.

<55>

상기실험 결과 하기 표 4에서 나타난 바와 같이 난백알부민 (OVA)으로 감작된 실험군에서 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생산이 OVA + 혈떡이플 조추출물 30 mg/kg을 처리한 실험군에서 현저하게 저해되었음을 관찰하였다.

**표 4**

<56>

시료	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)
OVA-처리 대조군	363.4±28.1	518.4±25.6	85.8±16.1
OVA+혈떡이플 추출물 처리군 (저해율%)	294.7±38.2* (18.9%)	379.5±94.9* (26.8%)	32.3±9.7** (62.4%)
OVA+질루톤 처리군 (저해율%)	(18.7%)	(12.5%)	(10.3%)

\* significant difference from OVA treated group, p<0.05  
\*\* significant difference from OVA treated group, p<0.005

<57>

**실험예 7. 기관지 조직분석**

<58> 상기 실험에 1에서 각 실험군의 기관지 폐포 세척액을 수득한 직후 과량의 펜토바비탈 (pentobarbital, Sigma P3761)을 투여하여 치사시킨 후 기관지 절개를 수행하였다. 폐조직을 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 담가 고정 한 후에 조직을 파라핀에 끼워 6 $\mu$ m의 두께로 마이크로톰 (microtome, SLEE MAINZ, Germany)을 이용하여 절편을 제조하고, 그 절편을 헤마톡실린 (hematoxylin, Mayer's hematoxylin solution, Sigma, MHS-16)과 에오신 (Eosin Y solution ascoholic, Sigma, HT110-1-32)으로 염색하여 조직을 분석하였다.

<59> 상기 실험 수행의 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 폐 조직의 조직학 검사에서 기도 기관지 조직의 두께와 염증 세포 수와 비례관계가 있음을 확인할 수 있었다. 기도 감각되지 않은 정상 상태 (도 1a)보다 난백알부민으로 감각하고 이차항원을 투여한 쥐의 경우 기도와 혈관주변에 현저하게 많은 염증세포가 유입된 것을 확인할 수 있었 으며 (도 1b), 혈떡이플 조추출물을 30 mg/kg으로 처리한 실험구와 처리한 실험구에서 기도 주변의 염증세포의 유입이 현저하게 감소되었고 기관지 조직의 두께가 경감되었음을 확인할 수 있었다 (도 1c).

<60> 한편, 기관지 조직에서 염증활성도를 평가하였는데 염증정도는 기관지주변부와 혈관주변부의 염증정도를 0-3로 객관적 점수화하였다. 즉, 염증세포가 관찰되지 않은 경우는 0, 때때로 염증세포의 집락이 관찰되는 경우를 1, 대부분의 기관지 또는 혈관주변부에 얇은 염증세포의 띠 (one to five cells thick)를 형성하는 경우를 2, 대부분의 기관지 또는 혈관주변부에 두터운 염증세포의 띠 (more than five cells thick)를 형성하는 경우를 3으로 점수화하며, 폐 전체의 염증정도는 기관지와 혈관주변부의 염증정도에 대한 점수를 평균한 것으로 정의하였다.

<61> 상기 실험 수행의 결과, 도 2에서 나타낸 바와 같이 혈떡이플 조추출물은 기관지 조직의 염증을 유의성있게 억제하였음을 확인하였으며, 대조약물로 사용한 천식치료약물인 질루톤보다도 우수한 억제활성을 나타내었다.

<62> **실험예 8. 급성염증 억제활성 측정**

<63> ICR계 수컷마우스 6마리를 1군으로 하여 기염제로서 카라기난 1% 생리식염수 용액을 발바닥 중심부에 피하주사를 한 뒤에 기염제 투여 직전부터 5시간까지 매시간 발바닥 두께를 측정하여 족부종율을 계산하였다. 약물은 기염제 투여하기 1시간 전에 인산완충용액 500  $\mu$ l에 현탁한 후 50 mg/kg의 량을 경구투여 하였으며, 대조구로서 아스피린 50 mg/kg을 사용하였다. 상기 실험결과, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이 기염제 투여후 부종은 4시간까지 증가하다가 5시간째에는 감소하는 경향을 보였는데, 혈떡이플 추출물을 투여한 실험군에서는 2시간부터 4시간까지 부종 억제효과가 유의성있게 나타났으며, 억제율은 아스피린 투여군과 다소 높은 억제활성을 나타내었다.

**표 5**

<64> 혈떡이플 추출물의 급성염증 억제활성

	무처리군 족부종율 (%)	혈떡이플 추출물 처리군 (50 mg/kg)		아스피린 처리군 (50 mg/kg)	
		족부종율 (%)	저해율 (%)	족부종율 (%)	저해율 (%)
0 hr	100	-	-	-	-
1	119.2 $\pm$ 15.6	125.1 $\pm$ 1.5	-5.0 $\pm$ 1.3	139.3 $\pm$ 40.6	-16.8 $\pm$ 34.0
2	158.0 $\pm$ 9.0	146.4 $\pm$ 19.4	7.3 $\pm$ 12.3	170.4 $\pm$ 34.5	-7.8 $\pm$ 21.8
3	194.9 $\pm$ 12.4	166.8 $\pm$ 18.8	14.4 $\pm$ 9.7	180.6 $\pm$ 28.6	7.3 $\pm$ 14.7
4	205.9 $\pm$ 19.0	180.6 $\pm$ 26.9	12.3 $\pm$ 13.1	196.9 $\pm$ 15.4	4.3 $\pm$ 7.5
5	201.6 $\pm$ 5.1	193.4 $\pm$ 22.4	4.1 $\pm$ 11.1	198.5 $\pm$ 12.6	1.5 $\pm$ 6.3

<65> 본 발명의 추출물 또는 화합물을 포함하는 약학조성물 제제의 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<66> **제제예 1. 산제의 제조**

<67> 혈떡이플 조추출물 300 mg

<68> 유당 100 mg

<69> 탈크 10 mg

<70> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<71> **제제예 2. 정제의 제조**

<72>	혈떡이폴 조추출물	50 mg
<73>	옥수수전분	100 mg
<74>	유당	100 mg
<75>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<76> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<77> **제제예 3. 캡슐제의 제조**

<78>	혈떡이폴 조추출물	50 mg
<79>	옥수수전분	100 mg
<80>	유당	100 mg
<81>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<82> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<83> **제제예 4. 주사제의 제조**

<84>	혈떡이폴 조추출물	50 mg
<85>	주사용 멸균 증류수	적량
<86>	pH 조절제	적량

<87> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<88> **제제예 5. 액제의 제조**

<89>	혈떡이폴 조추출물	100 mg
<90>	이성화당	10 g
<91>	만니톨	5 g
<92>	정제수	적량

<93> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<94> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<95>	혈떡이폴 조추출물	1000 mg
<96>	비타민 혼합물	적량
<97>	비타민 A 아세테이트	70 $\mu$ g
<98>	비타민 E	1.0 mg
<99>	비타민	0.13 mg
<100>	비타민 B <sub>2</sub>	0.15 mg
<101>	비타민 B <sub>6</sub>	0.5 mg
<102>	비타민 B <sub>12</sub>	0.2 $\mu$ g

<103>	비타민 C	10 mg
<104>	비오틴	10 $\mu$ g
<105>	니코틴산아미드	1.7 mg
<106>	엽산	50 $\mu$ g
<107>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<108>	무기질 혼합물	적량
<109>	황산제1철	1.75 mg
<110>	산화아연	0.82 mg
<111>	탄산마그네슘	25.3 mg
<112>	제1인산칼륨	15 mg
<113>	제2인산칼슘	55 mg
<114>	구연산칼륨	90 mg
<115>	탄산칼슘	100 mg
<116>	염화마그네슘	24.8 mg
<117>	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.	

<118> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<119>	혈떡이플 조추출물	1000 mg
<120>	구연산	1000 mg
<121>	올리고당	100 g
<122>	매실농축액	2 g
<123>	타우린	1 g
<124>	정제수를 가하여 전체	900 ml

<125> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 °C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<126> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

**발명의 효과**

<127> 상술한 바와 같이, 본 발명의 혈떡이플 조추출물은 난백알부민 (ovalbumin) 유도 천식 동물 모델에서 골수유래 비만세포 (bone marrow-derived mast cell, BMDC)의 시스테인 류코트리엔 (cysteinyl leukotriene) 생산 억제 활성, 기도 과민성 억제활성, 기관지 폐포세척액의 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-5 (IL-5) 및 인터루킨-13 (IL-13)의 생산 억제 활성, 기관지 조직의 항염증 활성 및 카라기난-유도 동물모델에서 부종 억제활성을 나타냄으로서 혈떡이플 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증질환, 알레르기 및 천식의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 또는 건강기능식품으로서 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

<1> 도 1은 기도 감작한 후 기관지 폐포의 세포조직학을 분석한 것을 나타낸 도로서, 기도 감작하지 않은 경우 (a), 기도 감작 후 인산완충용액 처리한 경우 (b), 혈떡이플 추출물로 처리한 경우 (c) 기관지 조직에 미치는 영향을

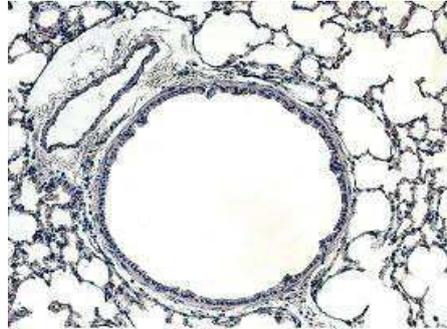
나타낸 도이고,

<2>

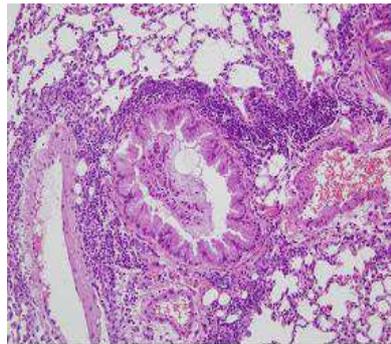
도 2는 기도 감작한 후 기관지 조직의 염증활성도를 종합적으로 평가한 결과를 나타낸 도로서, 혈떡이풀 추출물이 난백알부민으로 유도된 기관지 조직의 염증세포 유입을 유의성있게 억제하였음을 나타낸 도이다.

**도면**

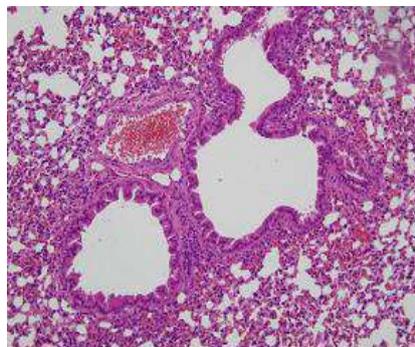
**도면1a**



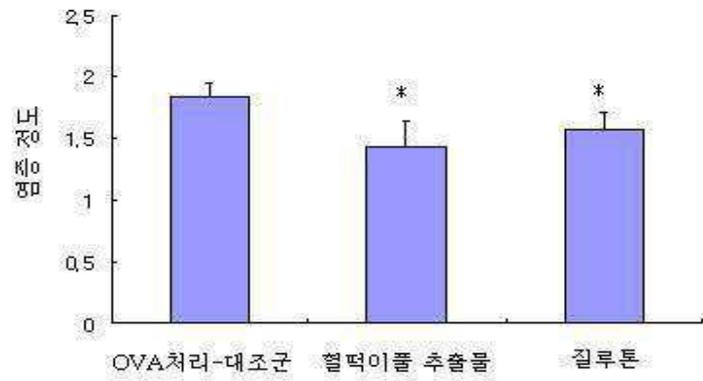
**도면1b**



**도면1c**



도면2



\*significant difference from OVA-control group p<0.05