



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0012974
(43) 공개일자 2011년02월09일

(51) Int. Cl.

A61K 36/605 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0070918

(22) 출원일자 2009년07월31일

심사청구일자 2009년07월31일

(71) 출원인

건국대학교 산학협력단

서울 광진구 화양동 1 건국대학교내

(72) 발명자

최완수

서울특별시 강남구 개포동 660-1 주공13동 101호

김주동

경상북도 포항시 북구 학산동 우방청운타운 102-901

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

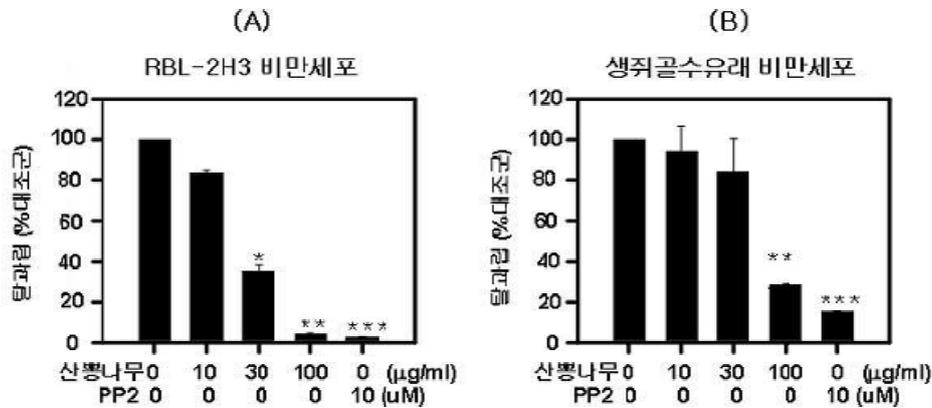
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 산뽕나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항-알레르기 효과를 갖는 산뽕나무(*Morus bombycis*)추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 산뽕나무 추출물은 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비를 억제함과 동시에 알레르기성 반응에 관여하는 종양괴사인자 알파(TNF- α) 및 인터루킨-4(IL-4)의 생성을 억제하는 효과를 나타내므로, 본 발명의 산뽕나무 추출물을 포함하는 조성물은 독성 또는 부작용 없이 비만세포를 매개로 하여 발생하는 알레르기성 질환의 근본적인 예방 및 치료를 위한 건강기능식품 및 의약품 등으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
김지완
서울특별시 강동구 둔촌동 둔촌주공아파트 122-302

김영미
서울특별시 강남구 개포동 159-11

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009A4190030
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관
연구사업명 한국학술진흥재단
연구과제명 Functional genomics를 통한 항앨러지 선도화합물 도출 및 산업적 이용
기여율
주관기관 건국대학교 산학협력단
연구기간 2009. 04. 01 ~ 2010. 03. 31

특허청구의 범위

청구항 1

산뽕나무 (*Morus bombycis*) 물 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 비만세포를 매개로 발생하는 알레르기성 질환인 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 천식, 알레르기성 피부염, 알레르기성 두드러기(Allergic urticaria), 자가면역성 간염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (allergic bronchopulmonary aspergillosis), 또는 알레르기성 구내염(allergic stomatitis)인 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 4

산뽕나무 (*Morus bombycis*) 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 저급알코올인 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 비만세포를 매개로 발생하는 알레르기성 질환인 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 7

제4항 또는 제6항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 천식, 알레르기성 피부염, 알레르기성 두드러기(Allergic urticaria), 자가면역성 간염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (allergic bronchopulmonary aspergillosis), 또는 알레르기성 구내염(allergic stomatitis)인 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 8

산뽕나무의 물 또는 C₁ 내지 C₄로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 알코올 추출물을 유효성분을 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물.

청구항 9

- a) 산뽕나무를 열탕에서 가열하여 추출물을 수득하는 단계; 및
- b) 상기 추출물을 여과 및 농축하여 농축액을 얻는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 열탕 추출은 100 ~ 120℃의 열탕에서 2 ~ 3 시간 동안 가열하는 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 제조방법.

청구항 11

- a) 산뽕나무를 C₁ 내지 C₄로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 저급 알코올에 침지시켜 알코올 추출물을 얻는 단계; 및
- b) 상기 알코올 추출물을 농축하여 농축액을 얻는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 알코올 추출은 산뽕나무를 저급 알코올에 침지시켜 초음파 추출기로 2 ~ 3주 처리하여 알코올 추출물을 얻는 것을 특징으로 하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 항-알레르기 효과를 갖는 산뽕나무 (*Morus bombycis*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비를 억제함과 동시에 알레르기성 반응에 관여하는 종양괴사인자 알파 (TNF- α) 및 인터루킨-4 (IL-4)의 생성을 억제함으로써, 독성 또는 부작용 없이 비만세포를 매개로 하여 발생하는 알레르기성 질환의 근본적인 예방 및 치료를 위해 사용되는 산뽕나무 추출물을 유효성분으로 하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 알레르기는 과민반응(hypersensitivity reaction)이라고 하는 면역반응의 여러 가지 분류들 중의 하나인데 알레르기는 항원인 알레르겐으로 작용하는 외부 물질에 반응하는 인체의 면역체계에 의해 유발되어지는 데 알레르기 질환이 발생하려면 알레르겐에 반복적으로 접촉되어 기억 세포에 의한 과도한 면역반응이 발생해야 한다. 알레르기 반응의 주된 원인은 여러 자극인자들에 의해 IgE 특이 항체가 비정상적으로 증가하여 비만세포 표면에 부착된 상태로 존재하다가 외부에서 항원이 들어오게 되면 항원-항체 반응에 의해서 비만세포 내에 저장되어 있던 여러 화학매개체들(히스타민, 헤파린, ECF-A, NCF, TNF- α)이 유리되는 것이다. 이들 화학매개체들의 생물학적 작용의 결과로 과민반응, 염증 및 천식이 일어나게 된다.

[0003] IgE는 조직의 비만세포의 Fc ϵ RI에 결합하여 비만세포의 탈과립을 유도하게 되는데 비만세포의 탈과립은 히스타민, 헤파린, 루코트리엔, 프로스타글라딘 및 다른 과민증인자 등을 분비되는 것이다. 이렇게 분비된 면역활성인자들이 면역체계를 활성화시키며 염증 및 알레르기 반응을 발생시키는 원인이 된다.

[0004] 비만세포는 IgE와 알레르겐의 결합을 통해 활성화되면 다양한 화학매개체를 분비하여 점막부종, 기관지 평활근

수축, 점액분비 증가 등을 일으킴으로써 초기 알러지 반응에 기여한다. 그러나 비만세포는 이러한 초기반응에만 국한되어 작용하는 것이 아니라 후기반응이나 만성 알러지 반응에도 깊이 연관되어 있음이 밝혀지고 있다.

[0005] 즉 비만세포에서 생성되어 분비되는 TNF- α 는 혈관내피세포의 점착분자의 발현을 증가시켜 호산구 및 T 림프구의 표적기관으로의 유입을 촉진시킨다. 또한 트립타아제, PAF, PGD₂, IL-5, GM-CSF 등을 분비하여 호산구에 대한 화학주성, 증식 등을 도와준다. 비만세포에서 생산되는 IL-4, IL-13, IL-6 등은 Th2 세포의 반응을 증가시키고 결국 IgE의 생산을 증가시킴으로써 만성 알러지 반응에 기여한다.

[0006] 천식에서의 기관지과민성은 호산구 뿐만 아니라 평활근 내로 침윤되는 비만세포의 수에 비례해서 나타난다는 보고도 있다(SJ Galli et al, Nature, 454(24): 445-454, 2008). 이외에도 비만세포에서 분비되는 TGF- β 등은 섬유아세포의 유입 및 활성을 증가시키고 콜라겐 합성을 촉진함으로써, 기도의 리모델링에도 관여하는 것으로 보인다.

[0007] 이와 같이 비만세포는 IgE와 Fc ϵ RI 그리고 알레르겐으로부터 시작하여 알러지 염증을 일으키고 지속시키는 데에 중요한 역할을 하고 있다.

[0008] 알레르기 반응에 의한 질환으로는 천식, 비염, 두드러기, 아나필락시스 등이 있으며(SJ Galli et al, Nature, 454(24): 445-454, 2008)., 일부 알레르기 반응은 특정 알레르기 항원에 대한 유전적 결합에 의해 유발되는 알레르기 천식 및 습진 등을 포함한다. 이러한 알레르기는 일반적으로 무해한 물질(꽃가루, 곰팡이, 동물의 털 및 비듬, 먼지, 진드기 및 땅콩 등)에 의해서 유발된다는 점이 특징이다.

[0009] 현재 개발된 알레르기성 질환 치료제로는 알레르겐에 의해 비만세포 등에서 분비된 히스타민이나 류코트리엔 등의 수용체에 대한 길항제들이 주를 이루고 있다. 그러나 이러한 약물은 환자에게서 투여 후 단기간 내에 내성을 보이기 때문에 환자들의 증상호전을 위한 경우가 대부분인 것으로 질병의 원인을 원천적으로 차단하기에는 미비할 뿐만 아니라, 약제들에 의한 부작용도 심각한 상황이다 (Rabe KF, et al., Eur Respir J Suppl., 34:34s-40s, 2001).

[0010] 또한, 알레르기성 질환의 치료를 위한 치료법으로서, 알레르기 환자가 앓고 있는 알레르기에 대한 알레르겐(allergen)을 규명한 후 이를 소량씩 수년간 투여하여 그 알레르기를 점차 감소시키는 방법이 있다. 그러나, 이러한 치료법은 치료기간이 수년이 걸린다는 단점이 있으며, 아나필락틱 쇼크 등을 유발시킬 수 있다는 문제점이 있다. 이 외에 DNA 백신을 이용하는 방법, IgE가 비만세포의 수용체에 결합하는 것을 차단하는 치료법 및 알레르기를 유발하는 사이토카인인 IL-4에 대한 항체 치료법 등이 있으나 이러한 치료법들은 비용이 많이 들거나 아직 완전히 그 치료 효과가 규명되지 않았다는 단점이 있다.

[0011] 산뽕나무 (*Morus bombycis*)는 아시아 전역에서 두루 발견되고 있으며 각 나라마다 약용으로 많이 쓰이고 있는 자생식물이다. 뽕나무에 대해서는 생리활성에 관한 연구가 많이 진행되어 있지만, MBE(*Morus bombycis* extract)에 대해서는 체계적인 연구가 거의 전무한 상태이다.

[0012] 이에 따라 MBE(*Morus bombycis* extract)의 항알러지 반응의 확인과 함께 그 억제 메커니즘에 대해서도 알아 볼 필요가 있다.

[0013] 이에 본 발명자들은 다양한 알레르기 질환을 근원적인 방법으로 부작용 없이 치료할 수 있는 물질을 확보하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명의 산뽕나무 추출물이 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비를 근본적으로 억제함을 확인하고, 상기 산뽕나무 추출물의 알레르기성 질환의 치료제로서의 용도를 제공함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 알레르기성 질환의 치료 및 예방을 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 식물체로부터 추출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산뽕나무 (*Morus bombycis*) 물 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 비만세포를 매개로 발생하는 알레르기성 질환인 것이 바람직하고, 상기 알레르기성 질환은 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 천식, 알레르기성 피부염, 알레르기성 두드러기(Allergic urticaria), 자가면역성 간염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (allergic bronchopulmonary aspergillosis), 또는 알레르기성 구내염(allergic stomatitis) 등인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 또한 본 발명은 산뽕나무 (*Morus bombycis*) 유기용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 저급알코올인 것이 바람직하고, 에탄올인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 산뽕나무의 물 또는 C₁ 내지 C₄로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 알코올 추출물을 유효성분을 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 a) 산뽕나무를 열탕에서 가열하여 추출물을 수득하는 단계; 및 b) 상기 추출물을 여과 및 농축하여 농축액을 얻는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 열탕 추출은 100 ~ 120℃의 열탕에서 2 ~ 3 시간 동안 가열하는 조건에서 수행하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 또한 본 발명은 a) 산뽕나무를 C₁ 내지 C₄로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 저급 알코올에 침지시켜 알코올 추출물을 얻는 단계; 및 b) 상기 알코올 추출물을 농축하여 농축액을 얻는 단계를 포함하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 상기 제조방법의 일 구체예에 있어서, 상기 알코올 추출은 산뽕나무를 저급 알코올에 침지시켜 초음파 추출기로 2 ~ 3주 처리하여 알코올 추출물을 얻는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다
- [0025] 이하, 본 발명을 설명한다.
- [0026] 본 발명은 항-알레르기성 효과를 갖는 산뽕나무 추출물 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 산뽕나무 추출물은 추출방법에 따라 열수 추출물과 유기용매 추출물로 구분할 수 있으며, 산뽕나무 열수 추출물의 제조방법의 일 구체예는,
- [0028] (1) 산뽕나무를 증류수로 세척하여 잘게 분쇄한 후, 100 ~ 120℃의 열탕에서 2 ~ 3 시간 동안 가열하여 추출물을 수득하는 단계;
- [0029] (2) 상기 추출물을 여과 및 농축하여 농축액을 얻는 단계; 및
- [0030] (3) 상기 농축액을 냉동시킨 후 -80℃에서 동결건조하여 산뽕나무 열수 추출물 분말을 수득하는 단계;를 포함한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 열수 추출시 산뽕나무와 물의 비율은 특별히 한정되지 않으나, 산뽕나무 분말에 물을 3 ~ 20배 (중량기준)로 첨가할 수 있으며, 바람직하게는, 추출효율을 증가시키기 위해서 산뽕나무 분말에 대하여 물을 5 ~ 10배 (중량기준)로, 더욱 바람직하게는 산뽕나무 분말 100g 당 1ℓ를 첨가할 수 있다. 또한, 일정한 온도를 유지하고 증기로의 손실을 막기 위하여 냉각기를 설치하는 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 본 발명의 산뽕나무 유기용매 추출물의 제조방법의 일 구체예는,
- [0033] (1) 산뽕나무를 저급 알코올에 침지시켜 초음파 추출기로 2 ~ 3주 처리하여 알코올 추출물을 얻는 단계;
- [0034] (2) 상기 알코올 추출물을 농축하여 농축액을 얻는 단계; 및
- [0035] (3) 상기 농축액을 냉동시킨 후 -80℃에서 동결건조하여 산뽕나무 유기용매 추출물 분말을 수득하는 단계;를 포함한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등으로 특별히 한정되지 않으나, 바람

직하게는 에탄올, 더욱 바람직하게는 95% 에탄올을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0037] 본 발명은 상기 방법에 의해 수득된 산뽕나무 열수 추출물 및 유기용매 추출물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 산뽕나무 추출물은 알레르기성 질환을 치료 및 예방하는 효과를 가지고 있다. 상기 알레르기성 질환은 비만세포를 매개로 하여 발생하는 질환으로 구체적으로 예를 들면, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 천식 및 알레르기성 피부염을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 산뽕나무 추출물의 항-알레르기 효과는 비만세포에 대한 알레르기 유발물질 분비의 억제효과, 알레르기 동물 모델에서 항-알레르기 효과, 비만세포에 대한 사이토카인 생성 억제효과 및 비만세포 내 알레르기 유발의 원인이 되는 다양한 신호전달경로의 활성화 억제효과 등을 조사함으로써 확인하였다.
- [0040] 본 발명의 산뽕나무 추출물은 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비를 저농도에서 유의적으로 억제하였으며, 고농도에서는 거의 90% 이상 탁월하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 비만세포에서 분비되는 사이토카인으로 잘 알려진 종양괴사인자- α (TNF- α) 및 인터루킨-4(IL-4)의 생성을 유의적이며 농도-의존적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 체내에서 알레르기를 유발하는 비만세포 내 알레르기 유발의 원인이 되는 다양한 신호전달경로 중 인산화에 의해 신호를 전달하는 Syk (Spleen tyrosine kinase)의 인산화를 억제하였으며, 체내 사이토카인 생성의 중요한 역할을 하는 MAP (Mitogen-activated protein) 키나아제 또한 유의적이고 농도-의존적으로 억제하는 것으로 나타났다.
- [0041] 따라서, 본 발명의 산뽕나무 추출물은 종래의 증상 회복 위주의 알레르기성 질환의 치료제와는 달리, 비만세포에서의 알레르기 유발 물질의 분비를 근원적으로 차단함으로써 알레르기성 질환의 치료 및 예방 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0042] 본 발명의 산뽕나무 추출물은 천연물 유래의 물질로서 독성 및 부작용이 거의 없다.
- [0043] 본 발명은 상기 산뽕나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만세포를 매개로 발생하는 알레르기성 질환의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 약학 조성물은 생약 추출물 그 자체만으로 포함할 수 있지만, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 제형, 예를 들면, 분말, 정제, 과립, 캡슐 또는 주사제 등의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0045] 상기 담체 또는 부형제로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드, 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물류가 있으며, 이들은 1종 이상 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체 및 부형제는 모두 사용 가능하다. 또한 조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 산뽕나무 추출물을 통상적인 방법에 의해 정제로 제형화할 경우, 기제로 사용되는 락토오스, 미세결정 셀룰로오스, 스테아린산 마그네슘 등을 합한 것과 상기 산뽕나무 추출물을 1 : 1의 비율로 사용하는 것이 바람직하다.
- [0047] 또한, 본 발명에 따른 산뽕나무 추출물은 예로부터 식용 및 약용으로 사용되어 온 것으로 그 투여용량에 특별한 제약은 없으며, 체내 흡수도, 체중, 환자의 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 산뽕나무 추출물은 체중 1 kg 당 1일 0.001 ~ 10,000mg으로, 바람직하게는 0.1 ~ 1,000 mg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 산뽕나무 추출물은 쥐, 생쥐, 가축 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.
- [0049] 본 발명은 알레르기성 질환의 예방 및 개선효과를 갖는 상기한 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를

들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

- [0050] 또한, 알레르기성 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 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.
- [0051] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제등의 형태를 포함한다.
- [0052] 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.
- [0053] 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 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0054] 상기 외에 본 발명의 추출물은 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 추출물들은 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 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

- [0055] 본 발명에 의한 산뽕나무 추출물은 천연물 유래의 물질로서 독성 및 부작용이 없이, 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비를 억제함과 동시에 알레르기성 반응에 관여하는 종양괴사인자 알파 (TNF-α) 및 인터루킨-4 (IL-4)의 생성을 억제함으로써, 근원적인 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 가능하게 하므로, 알레르기성 비염, 알레르기성 천식 및 알레르기성 피부염과 같은 비만세포를 매개로 발생하는 알레르기성 질환의 예방 및 치료를 위한 효과적이고 안전한 의약품 또는 알레르기성 질환의 예방 및 개선을 위한 식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0056] 이하, 실시 예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [0057] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] **실시예 1. 산뽕나무 열수 추출물의 제조**
- [0059] 산뽕나무 열수 추출물을 제조하기 위하여, 산뽕나무를 증류수로 세척하여 분쇄기로 잘게 분쇄한 후, 잘게 분쇄된 산뽕나무를 열탕에서 가열하여 산뽕나무 추출물을 얻었다. 이때, 산뽕나무 원료 각 100 g에 대하여 물 1.0 l를 첨가한 다음 100 ~ 120℃의 열탕에서 2 ~ 3 시간 동안 가열하여 추출하였으며 일정한 온도를 유지하고 증기로의 손실을 막기 위하여 냉각기를 설치하였다. 상기와 같이 수득된 산뽕나무 추출물을 여과 및 농축한 후, 농축액을 냉동시키고 -80℃에서 동결건조하여 산뽕나무 열수 추출물의 엑기스 분말을 제조하였다.
- [0060] **실시예 2. 산뽕나무 유기용매 추출물의 제조**
- [0061] 산뽕나무 유기용매 추출물을 제조하기 위하여, 산뽕나무 꽃봉오리를 저급 알코올에 침지시켜 초음파 추출기로 2 ~ 3주 동안 추출하여 알코올 추출물을 얻은 후 상층액만을 분리하여 이를 거즈에 걸러 이물질을 제거하였다. 알코올로는 95% 에탄올을 사용하였으며, 상기와 같이 수득된 산뽕나무 알코올 추출물을 농축기를 이용

하여 농축한 후 냉동시키고 -80℃에서 동결건조하여 산뽕나무 유기용매 추출물의 엑기스 분말을 제조하였다.

[0062] 실험예 1. 산뽕나무 추출물의 비만세포에 대한 알레르기 유발물질 분비 억제 효과 조사

[0063] 상기 실시예로부터 얻은 산뽕나무 추출물의 체내에서 알레르기를 유발하는 비만세포로부터 알레르기 유발 물질의 분비 억제 효과를 검색하기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.

[0064] RBL-2H3 세포는 글루타민, 항생제와 15% 우혈청이 보충된 최소배지에서 배양하였으며, 분비실험을 위한 세포는 트립신에 의해 수거 후 24-웰 배양기에 웰당 200,000개의 세포를 25 ng/ml DNP-특이적 IgE와 같이 배양하였다. 다음날 세포는 PIPES 완충액 (25 mM PIPES, pH 7.2, 159 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM 글루코오스 및 0.1% BSA)으로 세척한 후, 항원이 가해지기 전에 30분 동안 전배양하였다. 전 배양 후 항원이 최종농도 25 ng/ml로 자극하였으며, 알레르기 유도물질의 분비정도는 배지 중에 분비된 탈과립의 표식자인 헥소스아미니다제 (hexosaminidase)의 활성을 *p*-니트로페닐-아세틸-β-D-글루코사미나이드 (*p*-nitrophenyl- acetyl-β-D-glucosaminide)의 *p*-니트로페닐의 양으로 결정하였다. 생쥐 골수유래의 비만세포 (BMMC)는 4 ml 둥근바닥 튜브 (round bottom tube)에 세포를 각각 2.0 × 10⁶ 씩 분주한 다음, 500 ng/ml DNP-특이적 IgE가 포함되어 있는 배지와 함께 4시간 동안 배양하여 세포를 감작시킨 후 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상층액을 버리고 Tyrode 완충용액 (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 5.6 mM 글루코오스, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.05% BSA, pH7.4)으로 세포를 1회 세척한 다음 1.5 ml 튜브에 옮겨 10분 동안 37℃ 항온조에서 배양하였다. 그런 다음으로 25 ng/ml DNP-BSA (항원)로 15분 동안 세포를 자극시킨 후에 5분간 얼음에 두어 반응을 정지시키고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상층액을 E-튜브에 옮긴 다음, 튜브에 남아있는 세포는 0.1% 트립톤 X-100로 용해시켰다. 상층액과 용해된 세포는 96웰 플레이트에 1 mM *P*-니트로페닐-*N*-아세틸-β-D-글루코사미나이드 (*P*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide)와 각각 30 μl씩 섞은 다음 37℃ 항온수조 위에서 1시간 동안 배양시킨 후, 0.1 M 탄산염 완충액(Carbonate buffer)을 넣어, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0065] 그 결과를 도 1에 나타내었으며, 도 1에 나타낸 바와 같이 항원에 의한 골수 비만세포 및 RBL-2H3 비만세포로부터 알레르기 유발물질의 분비가 산뽕나무 추출물에 의해 저농도(IC₅₀: 약 30 μg/ml)에서도 유의하게 억제됨을 알 수 있었으며, 산뽕나무 추출물 100 μg/ml에서는 알레르기 유발물질의 분비가 90% 이상 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0066] 실험예 2. 알레르기 동물 모델에서 항-알레르기 효과 조사

[0067] 본 발명의 산뽕나무 추출물의 알레르기 동물 모델에서의 항-알레르기 효과를 조사하기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.

[0068] ICR계 마우스의 한쪽 귀에 면역글로블린 E를 0.5 μg씩 피내주사 한 후, 12 시간 동안 감작시킨 다음, 5% 아라비아검 (arabic gum)에 현탁시킨 산뽕나무 추출물을 용량별로 경구 투여하고 1시간 후 항원 용액 250 μl (1 mg 항원 + 5 mg 에반스블루/ml PBS 용액)를 꼬리정맥을 통해 주입하였다. 주입 30분 후 마우스의 귀를 떼어내어 63℃ 700 μl의 포름아마이드 용액에서 12시간 이상 추출시키고, 추출된 에반스블루를 620 nm에서 흡광도를 측정하여 항-알레르기 효과를 확인하였다.

[0069] 그 결과를 도 2에 나타내었으며, 도 2에 나타낸 바와 같이 본 발명의 산뽕나무 추출물은 항원에 의한 알레르기 반응을 kg당 300 mg 투여군에서 47.5 %를 억제하였고, kg당 1,000 mg 투여군에서는 60 %를 억제하였다. 따라서, 본 발명의 산뽕나무 추출물이 항원에 의해 유도된 알레르기 동물 모델에서도 탁월한 항-알레르기 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0070] 실험예 3. 산뽕나무 추출물의 비만세포에 대한 사이토카인 생성 억제효과 조사

[0071] 본 발명의 산뽕나무 추출물의 비만세포에 대한 사이토카인 생성 억제효과를 알아보기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.

[0072] 알레르기에 관계된 비만세포에서 분비되는 사이토카인으로 잘 알려진 종양괴사인자-α (TNF-α)와 인터루킨-4(IL-4)에 대한 산뽕나무 추출물의 억제효과를 알아보기 위하여 각각의 사이토카인에 특이적인 프라이머

(primer)를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 우선 6웰 플레이트에서 자극시킨 RBL-2H3 세포를 trizol reagent (Invitrogen)로 용해시킨 후, 용해된 시료를 1.5 ml E-튜브에 옮긴 다음, 클로로포름 200 μ l 넣어 섞고, 12,000 g 에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 상기 상층액과 이소프로판올 (isopropanol)을 1:1로 섞은 후 -20°C에서 RNA를 한 시간 이상 침전시킨 후, 12,000 g에서 20 분간 원심분리하여 RNA를 완전히 침전시킨 다음 에탄올로 1회 세척하고 0.1% DEPC-water 50 μ l에 녹여서 전체 RNA를 얻었다. PCR (polymerase chain reaction)은 94°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 60초를 30회 반복하였으며, 프라이머는 랫트 TNF- α 는 forward 5' -CAC CAC GCT CTT CTG TCT ACT GAA C-3' (서열번호 1), reverse는 5' -CCG GAC TCC GTG ATG TCT AAG TAC T-3' (서열번호 2), IL-4는 forward 5' -CCG ATT ATG GTGTAA TTT CCT ATG CTG-3' (서열번호 3), reverse는 5' -GGC CAA TCA GCA CCT CTC TTC CAG-3' (서열번호 4)이고 랫트 GAPDH forward는 5' -GTG GAG TCT ACT GCGTC TTC-3' (서열번호 5), reverse는 5' -CCA AGG CTG TGG GCA AGG TCA-3' (서열번호 6)이었다.

[0073] 그 결과를 도 3에 나타내었으며, 도 3에 나타낸 바와 같이 산뽕나무추출물 30 μ g/ml에서 종양괴사인자 (TNF- α) 및 인터루킨-4 (IL-4)의 생성이 감소하기 시작하여 100 μ g/ml 이하에서 거의 억제됨을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 산뽕나무 추출물에 의해 사이토카인 생성이 유의적이며 농도-의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0074] **실험예 4. 산뽕나무 추출물의 비만세포에 대한 작용기전 조사**

[0075] 상기 실시예로부터 얻은 산뽕나무 추출물이 체내에서 알레르기를 유발하는 비만세포 내 알레르기 유발의 원인이 되는 다양한 신호전달경로 중 Syk-LAT에 대한 활성화 억제 효과를 조사하기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.

[0076] RBL-2H3 세포를 6웰 플레이트에 웰당 1.0×10^6 씩 분주한 후, 20 ng/ml DNP 특이적 면역글로블린 E가 포함되어 있는 MEM 배지에서 12시간 동안 배양하여 세포를 감작시켰다. 상기 세포를 산뽕나무 추출물로 30분 동안 전처리하고 항원으로 자극시킨 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후, 용해 완충액 (Lysis buffer; 20 mM HEES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p-40, 10% 글리세롤, 60 mM 옥틸- β -글루코사이드, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2.5 mM nitrophenylphosphate, 0.7 μ g/ml 펩스타틴 및 단백질 저해 정제)으로 용해시켰다. 다음으로, 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 2 \times 램니 시료 완충액 (laemli sample buffer)과 섞어 100°C에서 5분간 단백질 변성과정을 진행하였다. 이렇게 얻은 단백질시료를 10% 또는 12%의 폴리아크릴아미드 겔 (poly acrylamide gel; polyacrylamide:bis acrylamide = 29:1)을 사용하여 120 V에서 1시간 30분 동안 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 진행시킨 후, 300 mA로 1시간 30분 동안 니트로셀룰로오스 멤브레인 (nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell, BA85)으로 전이시켰다. TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 5% 탈지분유 (skim milk) 또는 5% BSA을 만들어 한 시간 동안 블로킹시킨 다음, 각각의 특이적인 항체와 한 시간 동안 반응시켰다. 그리고 HRP (horseradish peroxidase)가 붙은 단일클론 항체 또는 다클론 항체로 한 시간 동안 반응시킨 다음, 비특이적으로 남아있는 항체를 TBS-T로 씻어 제거해주고 ECL 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

[0077] 그 결과를 도 4에 나타내었으며, 도 4에 나타낸 바와 같이 본 발명의 산뽕나무 추출물 10 μ g/ml에서 Syk의 인산화 정도가 감소하기 시작하여 30 μ g/ml와 100 μ g/ml에서는 단백질의 인산화가 거의 억제됨을 알 수 있었다. 또한 체내 사이토카인 생성에 중요한 역할을 하는 MAP 키나아제도 산뽕나무 추출물에 의해 유의적이며 농도-의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1 은 본 발명의 산뽕나무 추출물의 비만세포에 대한 농도-의존적 억제 효과를 나타낸 사진으로, 도 1A는 RBL-2H3 비만세포에 대한 산뽕나무 추출물의 탈과립 억제 효과를 나타낸 것이며, 도 1B는 골수유래 비만세포에 대한 산뽕나무 추출물의 탈과립 억제 효과를 나타낸 것이다.

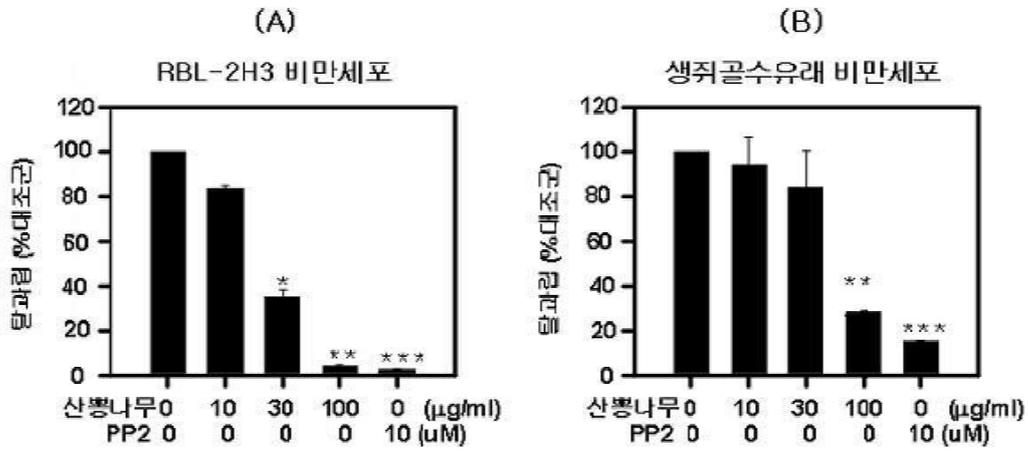
[0079] 도 2 는 국소성 알레르기 동물모델에 대한 본 발명의 산뽕나무 추출물의 알레르기 억제 효과를 나타낸 사진이다.

[0080] 도 3 은 활성화된 비만세포에서 염증성 사이토카인인 종양괴사인자 (TNF- α) 및 인터루킨-4 (IL-4)의 생성에 대한 본 발명의 산뽕나무 추출물의 억제 효과를 나타낸 사진이다.

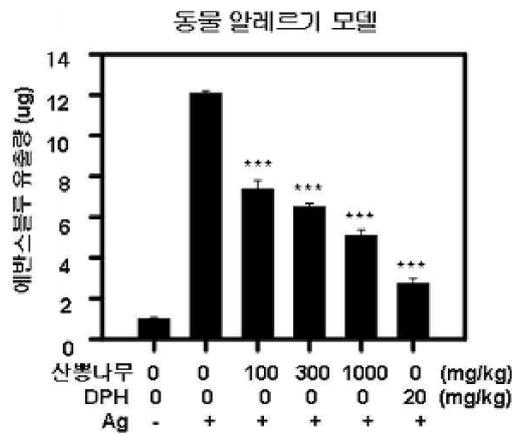
[0081] 도 4 는 본 발명의 산뽕나무 추출물의 약효기전에 대한 웨스턴 블롯팅 (Western Blotting)의 결과를 나타낸 사진이다.

도면

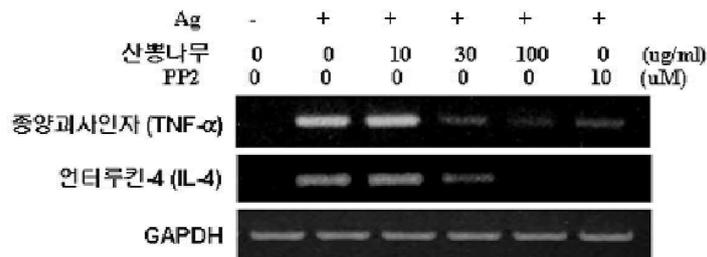
도면1



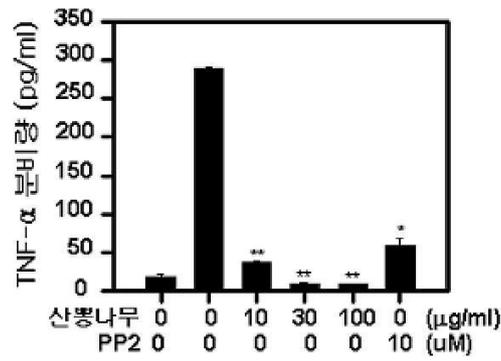
도면2



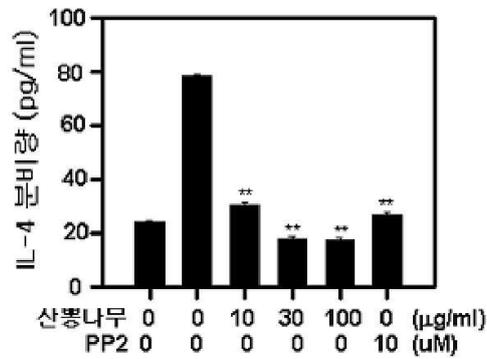
도면3a



도면3b

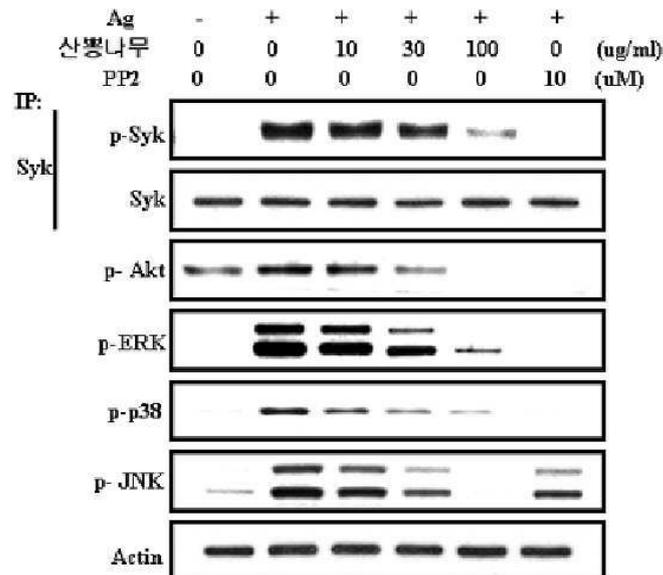


도면3c



도면4

산봉나무 추출물의 약효 작용점



서열 목록

- <110> Konkuk University Industrial Cooperatoin Corp.
 <120> A Pharmaceutical Composition For Preventing And Treating Of Allergic Diseases Comprising Extract Of Morus bombycis
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- <220>
 <223> primer
- <400> 1
 caccacgctc ttctgtctac tgaac 25
- <210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- <220>
 <223> primer
- <400> 2
 ccggactccg tgatgtctaa gtact 25
- <210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- <220>
 <223> primer

<400> 3
ccgattatgg tgtaatttcc tatgctg 27

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
ggccaatcag cacctctctt ccag 24

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
gtggagtcta ctggcgtctt c 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
ccaaggctgt gggcaaggtc a 21