



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년05월07일  
 (11) 등록번호 10-1392333  
 (24) 등록일자 2014년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 36/45 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
 A61P 17/00 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0066296  
 (22) 출원일자 2012년06월20일  
 심사청구일자 2012년06월20일  
 (65) 공개번호 10-2013-0001140  
 (43) 공개일자 2013년01월03일  
 (30) 우선권주장  
 1020110061164 2011년06월23일 대한민국(KR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020080038482 A  
 조세련. 조선대학교 보건대학원 석사학위논문. "만병초 잎 추출물의 항균, 항염 효과" (2008년)  
 N. Erdemoglu et al. Journal of Ethnopharmacology. 2008, Volume 119, Issue 1, Pages 172-178

(73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (72) 발명자  
 오세량  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 안경섭  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 이원희

전체 청구항 수 : 총 11 항

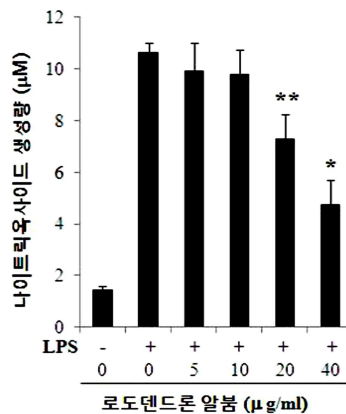
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 로도덴드론 알BUM 추출물이 염증 관련 인자인 사이토카인 IL-1beta의 분비를 억제하며, 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생산 및 유도성 나이트릭옥사이드 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)의 단백질 발현을 억제하고, p65의 핵 전이를 저해하며, 카라기난으로 유도된 마우스 족부종을 억제하는 효과를 나타내었으며, 또한 로도덴드론 알BUM의 에틸아세테이트 분획물이 나이트릭옥사이드 생산을 억제하고, 마우스 족 부종을 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서, 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**권옥경**

대전광역시 유성구 과학로 125

**박지원**

대전광역시 유성구 과학로 125

**이중구**

대전광역시 유성구 과학로 125

**이형규**

대전광역시 유성구 과학로 125

**장하영**

대전광역시 유성구 과학로 125

**백진협**

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K20402010430-10A1001-00930

부처명 교육과학기술부

연구사업명 과학기술국제화사업

연구과제명 지구적 생물다양성 협력네트워크 구축사업

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.10.01 ~ 2011.09.30

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

로도덴드론 알BUM(*Rhododendron Album* Blume)의 물, C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제 1항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

**청구항 4**

제 1항에 있어서, 상기 분획물은 상기 로도덴드론 알BUM 추출물에 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올을 가하여 추출한 분획물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

**청구항 5**

제 4항에 있어서, 상기 분획물은 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

**청구항 7**

로도덴드론 알BUM의 물, C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 피부 외용제.

**청구항 8**

제 7항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 피부 외용제.

**청구항 9**

로도덴드론 알BUM의 물, C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물.

**청구항 10**

제 9항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물.

**청구항 11**

로도덴드론 알BUM의 물, C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강식품.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강식품.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 염증 반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려고 하는 생체의 방어 반응과정이다. 염증 반응에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포, 면역관련 세포 등이 포함된다. 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환이 사이토카인(cytokine)이라는 분자 수준에서 이해가 시도되고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다.

[0003] 염증반응과 관련된 주요 인자로서 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)와 나이트릭옥사이드 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)가 있다. NO에 의한 산화적 스트레스로 인해 세포내의 NF-κB(Nuclear Factor Kappa B, NF-κB)가 활성화되고, 활성화된 NF-κB가 핵안으로 들어가서 염증반응을 일으키는 유전자 발현을 촉진하므로 염증반응이 가속화된다. 주로 NO는 대식세포와 단핵구세포에서 많이 생산되며, 대식세포는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)와 같은 염증성 제제에 의해 염증 관련 반응이 빠르게 유도된다. NOS에 의해 L-아르기닌(L-arginine)이 산화되어 NO가 생산되며, NOS중에서 유도성 나이트릭옥사이드 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)는 세포내에서 NO의 과생산에 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

- [0004] 염증유발을 위해 동물모델에서 사용되는 물질들은 adjuvant, collagen II, carrageenan 등이 있는데, 해조류의 일종인 *Chondrus crispus*에서 추출한 carrageenan은 면역반응 억제 외에도 급성 염증 및 만성염증유발, DIC유발, 종양의 성장 촉진, Hageman factor와 kinin의 활성화, 보체의 불활성화 등 다양한 생물학적 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Chan WY *et al.*, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 147: 48, 1965).
- [0005] 대부분의 염증 질환의 치료제로서 널리 사용되고 있는 제제는 스테로이드제이다. 그러나 장기적으로 사용할 때 반드시 부작용을 수반하게 된다. 스테로이드제는 처음 사용할 때 증상을 완전히 소실시키는 효과를 보이지만, 효과가 지속되지 않는다. 스테로이드 사용을 중지하면 증상이 다시 나타나며 반복사용으로 인하여 증상은 악화된다. 스테로이드제의 부작용으로는 동근 다혈성의 얼굴, 체액의 저류, 부신억제, 감염에 대한 감수성의 증가와 기타 정신병, 백내장, 녹내장, 소화성 궤양, 창상 치유 지연, 초기 감염의 재활성화 등이 있다.
- [0006] 염증 반응 치료에 쓰이는 스테로이드제에 대한 부작용을 해결하고자 천연물의 항염작용 효과에 대한 연구가 진행되고 있다. 예로써 후박나무(*Machilus thunbergii* 'Hubak tree')로부터 분리한 주오닌비는 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 일산화질소(nitrogen oxide, NO), 프로스타글란딘E<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)의 생산을 억제하고 유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)와 사이클로옥시제나제-2(cyclooxygenase-2, COX-2) 발현 및 NF-κB의 활성을 억제하는 효과가 확인된 바 있다. 검양꽃나무 미숙과 추출물은 질소산화물(NO) 생산 억제, 유도성 질소산화물 합성효소(iNOS) 발현 억제 및 전-염증성 사이토카인인 인터루킨-1β(IL-1β) 활성 억제 및 발현 억제 활성을 통하여 항염증 효과를 나타내었다.
- [0007] 로도덴드론 알BUM은 진달래과에 속하는 인도네시아의 토속 식물이다. 이 식물은 백색이며, 변종의 경우 옅은 자색을 띄기도 한다. 수술은 오렌지 또는 분홍색을 띈다 (Bay Science Foundation, 2008). 이 식물의 서식환경은 벌목, 농작물 경작, 기반시설의 확장등의 이유로 서식지의 감소로 인해 종의 위협을 받고 있다(Whitten *et al.* 1996). 또한, 이 식물은 미적 가치가 높은 이유로 전 세계, 특히 미국에서는 변종, 대표적으로 *Rhododendron cawtabiense* var. *album* 같은 식물을 개발하여 조경산업에 활용하고 있다(Paghat, 2008). 그러나, 현재 Ericaceae과에 속하는 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물의 염증 억제 효과 및 염증 관련 효과는 보고된 바 없다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 독성 및 부작용이 없는 천연물 유래의 염증성 질환용 약제를 개발하기 위해 연구하던 중, 로도덴드론 알BUM 추출물 및 이의 분획물이 생쥐의 대식세포인 RAW264.7에서 염증 반응에 관여하는 NO의 생산 및 iNOS의 발현을 억제하고, 염증신호에 관여하는 p65단백질의 핵전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하였으며, 카라기난으로 유도된 마우스 염증모델에서 족부종 억제 효과를 나타냄으로써 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명의 목적은 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 피부외용제, 화장품 조성물 및 건강식품을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 피부 외용제를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

**발명의 효과**

[0014] 본 발명의 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물은 염증 관련 인자인 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 생산 및 유도성 나이트릭옥사이드 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)의 발현을 억제하고, 염증 신호에 관여하는 p65 단백질의 핵 전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 염증모델에서 족 부종 억제 효과를 나타내며, 또한, 상기 로도덴드론 알BUM의 에틸 아세테이트 분획물은 나이트릭옥사이드 생산을 억제하고, 마우스 족 부종을 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서 탁월한 항염효과를 나타낸 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물이 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0015] 도 1은 Raw264.7세포에서 LPS로 유도된 나이트릭옥사이드(nitric oxide, NO)의 대한 로도덴드론 알BUM 추출물의 억제효과를 나타낸 도이다:

- ; DMSO만 투여한 음성대조군;
- +; LPS 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유도된 양성대조군;
- 5; 로도덴드론 알BUM 추출물을 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 후 LPS로 유도;
- 10; 로도덴드론 알BUM 추출물을 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 후 LPS로 유도;
- 20; 로도덴드론 알BUM 추출물을 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 후 LPS로 유도; 및
- 40; 로도덴드론 알BUM 추출물을 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 후 LPS로 유도,
- \*: 양성대조군에 대한 P값이 0.001 이하; 및
- \*\* : 양성대조군에 대한 P값이 0.05 이하.

도 2는 LPS로 유도된 iNOS의 단백질 발현에 대한 로도덴드론 알BUM 추출물의 억제 효과를 나타낸 도이다:

- a; 웨스턴 블랏팅; 및
- b; 면역형광분석,
- 대조군; DMSO만 처리한 음성대조군;
- LPS; 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 처리한 양성대조군; 및
- LPS+RA; 로도덴드론 알BUM 추출물 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 후 LPS로 유도.

도 3은 LPS로 유도된 p65 핵전이에 대한 로도덴드론 알BUM 추출물의 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 LPS로 유도된 IL-1beta 사이토카인 분비에 대한 로도덴드론 알BUM 추출물의 억제 효과를 나타낸 도이다 (\*; LPS처리군에 대한 P값이 0.005 이하)

도 5는 카라기난(carrageenan)으로 유도된 마우스 족부종에 대한 로도덴드론 알BUM 추출물 및 분획물의 저해 효과를 나타낸 그래프이다(\*; 카라기난 처리군에 대한 P값이 0.001이하):

- 대조군; PBS 투여군;
- 카라기난; 1% 카라기난으로 족부종 유도한 군;
- RA-40; 로도덴드론 알BUM 추출물 40 mg/kg 투여후 카라기난으로 유도;
- RA-80; 로도덴드론 알BUM 추출물 80 mg/kg 투여후 카라기난으로 유도;

RAE-40; 로도덴드론 알BUM 에틸아세테이트 분획물 40 mg/kg 투여후 카라기난으로 유도;  
 RAE-80; 로도덴드론 알BUM 에틸아세테이트 분획물 80 mg/kg 투여후 카라기난으로 유도; 및  
 인도메타신; 인도메타신 5mg/kg 투여후 카라기난으로 유도.

도 6은 로도덴드론 알BUM 추출물과 분획물 제조과정을 나타낸 도이다.

도 7은 로도덴드론 알BUM 추출물과 분획물의 TLC(Thin Layer Chromatography)를 나타낸 그림이다:

- T: 로도덴드론 알BUM 추출물;
- H: 로도덴드론 알BUM n-헥산 분획물;
- C: 로도덴드론 알BUM 클로로포름 분획물;
- E: 로도덴드론 알BUM 에틸아세테이트 분획물;
- B: 로도덴드론 알BUM 부탄올 분획물; 및
- W: 로도덴드론 알BUM 물 분획물.

도 8은 로도덴드론 알BUM 추출물 및 이의 분획물의 CAD(Charge Aerosol Detector)를 나타낸 그림이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0016] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 용어 "염증"이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발 물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "알레르기"는 어떤 외래성 물질과 접한 생체가 그 물질에 대하여 정상과는 다른 반응을 나타내는 현상을 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 염증성 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 염증에 효과가 있는 로도덴드론 알BUM(*Rhododendron album* Blume) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0027] 1) 로도덴드론 알BUM에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;



- [0028] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0029] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.
- [0030] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 로도덴드론 알BUM은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 로도덴드론 알BUM은 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하다.
- [0032] 상기 로도덴드론 알BUM은 물, C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출하는 것이 바람직하고, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 로도덴드론 알BUM 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 30 내지 100℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 횟수는 3 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물의 분획물은 상기 로도덴드론 알BUM 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 상기 유기용매로는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 분획물로는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 단계적으로 첨가한 후, 각 용매 첨가 단계에서 가용성 분획을 획득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물, 및 상기 부탄올 분획물을 제거하고 남은 물층을 농축한 물 분획물이 모두 사용가능하나, 에틸아세테이트 분획물인 것이 가장 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물은 염증 관련 인자인 나이트리옥사이드(nitric oxide, NO)의 생산 및 유도성 나이트리옥사이드 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)의 발현을 억제하고, 염증 신호에 관여하는 p65 단백질의 핵 전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하고, 카라기난으로 유도된 마우스 염증모델에서 족 부종 억제 효과를 나타내며, 또한, 상기 로도덴드론 알BUM 추출물의 분획물은 나이트리옥사이드 생산을 억제하고, 마우스 족 부종을 억제함으로써, 상기 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 및 만성 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직 하나 이에 한정하지 않는다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 한국생명공학연구원 소재한 해외생물소재허브센터에서 로도덴드론 알BUM의 추출물을 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 20 mg/ml이 되도록 제조한 후, 농도별로 희석하여 사용하였다.
- [0039] 본 발명자들은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물에 대한 세포독성을 확인하기 위해, 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 96웰 플레이트(well plate)에 접종하여 부착한 후, 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 다양한 농도로 처리하여 배양한 후, 흡광도를 측정하였으며, 세포생존물은 DMSO를 처리한 음성대조군을 100%로 하여 계산한 결과, 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 에틸아세테이트 분획물은 20 µg/ml의 농도까지 독성이 없음을 확인하였다(표 1 참조).
- [0040] 또한, 본 발명자들은 나이트리옥사이드 생산에 관한 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물의 억제 효과를 확인하였다. RAW264.7 세포에 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 다양한 농도로 처리한 후 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하여 인위적으로 염증을 유발시킨 후, 상기 세포의 배양액 내의 나이트리옥사이드 생산을 구하였으며, 리포폴리사카라이드를 처리한 군의 나이트리옥사이드 생산을 100%로 하여



각 시료의 저해율을 계산한 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 리포폴리사카이드를 처리한 군에 비해 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 에틸아세테이트 분획물을 처리한 군에서 농도의존적으로 나이트릭옥사이드 생산이 감소하는 것을 확인하였다(표 2 및 도 1 참조).

[0041] 또한, 본 발명자들은 로도덴드론 알BUM 추출물의 iNOS 단백질의 발현 억제 효과를 확인하였다. 상기 나이트릭옥사이드 생산에 관한 로도덴드론 알BUM 추출물의 억제 효과를 확인하는 방법과 동일하게 처리한 세포한 후 iNOS 단백질의 발현 수준을 웨스턴블랏 및 면역형광분석을 통해 분석하였다. 그 결과, 도 2a 및 도 2b에서 보는 바와 같이 대식세포에 리포폴리사카라이드와 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물을 동시에 처리한 경우 농도의존적으로 iNOS의 단백질 발현이 감소함을 확인하였다(도 2a 및 도 2b 참조).

[0042] 또한, 본 발명자들은 로도덴드론 알BUM 추출물의 p65 핵전이 저해 효과를 확인하였다. LPS를 처리한 대식세포에 로도덴드론 알BUM 추출물을 처리한 후 항-p65 항체를 이용한 면역형광염색 방법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 LPS만 처리한 세포에서는 p65가 세포질과 핵에서 모두 관찰된 반면, LPS와 로도덴드론 알BUM 추출물을 전처리한 세포에서는 p65가 대부분 세포질에서 관찰되어 로도덴드론 알BUM 추출물이 LPS에 의한 p65의 세포질에서 핵내로의 전이를 저해한다는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0043] 또한, 본 발명자들은 로도덴드론 알BUM 추출물의 사이토카인 생성 저해 효과를 확인하였다. LPS를 처리한 Raw264.7 세포에 로도덴드론 알BUM 추출물을 처리한 후 L-1beta의 생성량을 효소면역학적 분석 키트를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 도 4에서 나타낸 바와 같이 LPS를 처리한 군에서 IL-1beta의 양이 증가한 반면, LPS에 의해 증가된 IL-1beta의 양이 처리된 로도덴드론 알BUM 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소함을 확인하였다(도 4 참조).

[0044] 아울러, 본 발명자들은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물의 족 부종 억제 효과를 확인하였다. 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 전처리한 마우스에 카라기난 용액을 원발에 주사한 후 캘리퍼를 이용하여 발의 두께 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 5에서 나타낸 바와 같이 카라기난에 의해 염증이 유도된 군은 발의 두께가 0.98±0.12 mm까지 증가하였으나, 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 에틸아세테이트 분획물을 전처리한 군은 농도의존적으로 부종이 유발된 발의 두께가 감소함을 확인하였다(도 5 참조).

[0045] 따라서, 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 비해 현저히 뛰어난 염증 억제 효과가 있음을 확인하였으므로, 본 발명에 따른 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 로도덴드론 알BUM 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 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, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 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.

- [0049] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0050] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 로도덴드론 알BUM 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 염증성 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 방법을 제공한다.
- [0054] 상기 분획물로는 로도덴드론 알BUM 추출물에 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 단계적으로 첨가한 후, 각 용매 첨가 단계에서 가용성 분획을 획득한, n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물, 및 상기 부탄올 분획물을 제거하고 남은 물층을 농축한 물 분획물이 모두 사용가능하나, 에틸아세테이트 분획물인 것이 가장 바람직하다.
- [0055] 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 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, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 NO 생성을 현저하게 저해하고, iNOS 단백질의 발현을 유의적으로 억제하며, 염증 신호에 관여하는 p65 단백질의 핵 전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하고, 즉 부종 억제 효과를 나타내며, 특히 식물에서 유래한 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 염증관련 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0060]
- [0061] 또한, 본 발명은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 피부외용제를 제공한다.
- [0062] 상기 분획물로는 로도덴드론 알BUM 추출물에 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 단계적으로 첨가한 후, 각 용매 첨가 단계에서 가용성 분획을 획득한, n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물, 및 상기 부탄올 분획물을 제거하고 남은 물층을 농축한 물 분획물이 모두 사용가능하나, 에틸아세테이트 분획물인 것이 가장 바람직하다.
- [0063] 상기 염증성 질환에는 알레르기, 부종, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴,

위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직 하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명의 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 피부 외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 피부용 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0065] 상기 피부 외용제에 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물의 투여량은 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 투여기간, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0066] 본 발명의 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 NO 생성을 현저하게 저해하고, iNOS 단백질의 발현을 유의적으로 억제하며, 염증 신호에 관여하는 p65 단백질의 핵 전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하고, 즉 부종 억제 효과를 나타내며, 특히 식물에서 유래한 세포 독성이 없는 안전한 물질이므로, 알레르기를 포함하는 다양한 염증성 질환 예방 및 치료용 피부외용제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명은 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0068] 상기 분획물로는 로도넨드론 알BUM 추출물에 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 단계적으로 첨가한 후, 각 용매 첨가 단계에서 가용성 분획을 획득한, n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물, 및 상기 부탄올 분획물을 제거하고 남은 물층을 농축한 물 분획물이 모두 사용가능하나, 에틸아세테이트 분획물인 것이 가장 바람직하다.

[0069] 상기 염증성 질환에는 알레르기, 부종, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직 하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명의 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 화장품 조성물로 사용하는 경우, 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[0071] 상기 화장품 조성물은 본 발명의 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0072] 본 발명의 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 NO 생성을 현저하게 저해하고, iNOS 단백질의 발현을 유의적으로 억제하며, 염증 신호에 관여하는 p65 단백질의 핵 전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하고, 즉 부종 억제 효과를 나타내며, 특히 식물에서 유래한 세포 독성이 없는 안전한 물질이므로, 염증성 질환 예방 및 개선용 화장품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

- [0073] 아울러, 본 발명은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0074] 상기 분획물로는 로도덴드론 알BUM 추출물에 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 단계적으로 첨가한 후, 각 용매 첨가 단계에서 가용성 분획을 획득한, n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물, 및 상기 부탄올 분획물을 제거하고 남은 물층을 농축한 물 분획물이 모두 사용가능하나, 에틸아세테이트 분획물인 것이 가장 바람직하다.
- [0075] 상기 염증성 질환에는 알레르기, 부종, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직 하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명의 건강식품은 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0077] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0078] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 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 g 이다.
- [0079] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 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 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.
- [0080] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물은 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 NO 생성을 현저하게 저해하고, iNOS 단백질의 발현을 유의적으로 억제하며, 염증 신호에 관여하는 p65 단백질의 핵 전이를 억제하며, 사이토카인 IL-1beta의 생성을 억제하고, 즉 부종 억제 효과를 나타내며, 특히 식물에서 유래한 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 다양한 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품의 성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0081] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0082] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0083] <실시예 1> 로도덴드론 알BUM 추출물 제조
- [0084] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 100% 메탄올 추출물은 한국생명공학연구원 해외생물소재허브센터의 해외식물추출물은행에서 구입하였으며, 한국생명공학연구원 식물표본관(KRIB, Herbarium of the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)에 증거표본(KRIB 0019989)이 보관되어 있다. 이를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 20 mg/ml의 농도가 되도록 용해시킨 후, 농도별로 희석하여 사용하였다(이하 로도덴드론 알BUM 추출물이라 함).



[0085] <실시예 2> 로도텐드론 알BUM의 용매 분획물 제조

[0086] 상기 <실시예 1>에서 얻어진 로도텐드론 알BUM 추출물 중 360 mg 에 증류수를 첨가하여 현탁시키고, 동량의 n-헥산을 가하여 혼합 후 n-헥산가용성 분획부와 물가용성 분획부를 분리하였으며, 이를 3회 실시하여 여과, 감압농축하여 n-헥산 분획물 17.2 mg을 수득하였다. 그런 다음, 상기 n-헥산 분획물을 제거하고 남은 물층에 클로로포름을 동량 가하여 같은 방법으로 클로로포름 분획물 21.0 mg 수득하였고, 다시 남은 물층에 에틸아세테이트를 동량 가하여 같은 방법으로 에틸아세테이트 분획물 14.0 mg을 수득하였으며, 또 다시 남은 물층에 부탄올을 동량 가하여 동일한 방법으로 부탄올 분획물 47.3 mg을 수득하였으며, 남은 물층을 농축하여 물 분획물 235.5 mg을 수득하였다(도 6).

[0087] <실시예 3> 로도텐드론 알BUM 추출물 및 분획물의 TLC 조사

[0088] 상기 <실시예 1>과 <실시예 2>에서 얻어진 로도텐드론 알BUM 추출물과 분획물을 10mg/ml의 농도로 메탄올에 녹인 후 실리카겔 역상 크로마토그래피(TLC Silica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S, Merck)를 실시하였다. 전개용매는 메탄올 50%로 하였다(도 7).

[0089] <실시예 4> 로도텐드론 알BUM 추출물 및 분획물의 UPLC 분석

[0090] 상기 <실시예 1>과 <실시예 2>에서 얻어진 로도텐드론 알BUM 추출물과 분획물을 10mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.2 um의 membrane filter로 여과하였다. UPLC는 Waters Acquity UPLC 시스템을 이용하였으며, 컬럼은 ACQUITY UPLC™ BEHC<sub>18</sub>(10mmX 2.1 mm, i.d., 1.7 μm, waters, USA)을 35℃에서 사용하였으며, 이동상 A는 물과 formic acid (100:0.1, v/v)로 이동상 B는 acetonitril과 formic acid (100:0.1,v/v)로 하여 초기에 이동상 B를 0%로부터 10%까지 1분까지 증가시킨 후, 45%로 5분까지, 100%로 7.5분까지 이동상 B를 10%로 1분 동안 유지시킨 후, 5분까지 45%로 증가, 7.5분까지 100%로 이동상 B를 증가시켜 분석한 후, 이동상 B를 100%로 9분까지 유지시키고, 9.5분까지 이동상 B를 10%로 낮추고 11분까지 10%로 안정화시켜 분석에 사용하였다. 이동상의 유속량은 0.4 ml/min 그리고 시료 주입량은 3 μl로 하였다.

[0091] CAD(Charge Aerosol Detector)는 UPLC로부터 분리되어진 물질들에 전하(Charge)를 붙여주어 그 전하를 측정하는 detector로써 크로마토그래피 형식으로 물질의 상대적 함량과 분리도를 확인해 볼 수 있다(도 8).

[0092] <실험예 1> RAW264.7 세포에서의 로도텐드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물에 대한 세포독성실험

[0093] 로도텐드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물의 세포 독성을 알아보기 위하여, RAW264.7 세포에 로도텐드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다.

[0094] 더욱 구체적으로, 생쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum) 5% 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 1×10<sup>5</sup>/ml의 농도로 현탁하여 100 μl씩 96웰 플레이트(96 well plate)에 접종하여 부착하였다. 4시간 후에 로도텐드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물을 20 μg/ml 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 5 mg/ml의 MTT 용액을 웰 당 10 μl씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후, 상등액을 제거하고, DMSO를 100 μl씩 첨가한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포생존률은 DMSO를 0.25% 처리한 음성대조군를 100%로 하여 하기 수학적식에 따라 계산하였다.

수학식 1

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{추출물처리군 } OD_{570nm}}{\text{음성대조군 } OD_{570nm}} \times 100$$

[0095]

표 1

[0096]

시료 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	세포생존율 (%)
음성대조군	100.00 $\pm$ 3.34
로도넨드론 알BUM 추출물	93.47 $\pm$ 2.67
로도넨드론 알BUM의 n-HEXAN 분획물	62.06 $\pm$ 1.00
로도넨드론 알BUM의 클로로포름 분획물	44.08 $\pm$ 4.03
로도넨드론 알BUM의 에틸아세테이트 분획물	108.61 $\pm$ 2.15
로도넨드론 알BUM의 부탄올 분획물	71.36 $\pm$ 2.98
로도넨드론 알BUM의 물 분획물	97.54 $\pm$ 0.76

[0097]

그 결과, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 로도넨드론 알BUM 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 물분획물은 독성이 거의 없음을 확인하였고, n-HEXAN, 클로로포름, 부탄올 분획물은 세포생존율을 일부 저해하는 활성이 있음을 확인하였다 (표 1).

[0098]

<실험예 2> 나이트리옥사이드 생산에 관한 로도넨드론 알BUM 추출물 또는 이의 분획물의 억제 효과

[0099]

<2-1> RAW264.7세포에서의 나이트리옥사이드 생산 저해 실험

[0100]

RAW264.7 세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하여 인위적으로 유발시킨 염증에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여, 유도성 나이트리옥사이드의 생산을 측정하였다. 페놀레드(phenol-Red)가 들어있지 않은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가하고, 세포를  $2.5 \times 10^5/\text{ml}$  농도로 현탁하여 96웰 플레이트(96 well plate)에 200  $\mu\text{l}$ 씩 접종하였다. 4시간 동안 부착시킨 후, 로도넨드론 알BUM 추출물을 0, 6.25, 12.5, 25 및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 처리하거나, 또는 로도넨드론 알BUM 추출물 및 이의 분획물을 각각 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 1시간 동안 배양한 후에 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide, Sigma사)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상층액 100  $\mu\text{l}$ 를 회수하여 새로운 96웰 플레이트에 넣고, 그리스 시약(Griess reagent, Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기(microplate reader, Bio-Rad사)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 소듐 나이트라이트(sodium nitrite)를 이용하여 검량선을 작성하고, 이를 기준으로 배양액 내의 나이트리옥사이드 생산을 구하였으며, 리포폴리사카라이드를 처리한 군의 나이트리옥사이드 생산을 100%로 하여 각 시료의 저해율을 계산하였다.

표 2

[0101]

시료 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	나이트리옥사이드 생성저해율 (%)
로도넨드론 알BUM 추출물	31.77 $\pm$ 8.30
로도넨드론 알BUM의 n-HEXAN 분획물	51.70 $\pm$ 13.69
로도넨드론 알BUM의 클로로포름 분획물	39.70 $\pm$ 9.50
로도넨드론 알BUM의 에틸아세테이트 분획물	33.47 $\pm$ 9.82
로도넨드론 알BUM의 부탄올 분획물	60.30 $\pm$ 1.52
로도넨드론 알BUM의 물 분획물	25.85 $\pm$ 7.79

[0102]

그 결과, 표 2에서 보는 바와 같이, 리포폴리사카라이드만을 처리한 군에 비해서 로도넨드론 알BUM 추출물 및 에틸아세테이트 분획물 처리한 군에서 각각  $31.77 \pm 8.30\%$  및  $33.47 \pm 9.82\%$ 의 나이트리옥사이드 생성저해율을 나타내

었다(표 2). n-헥산, 클로로포름, 부탄올 분획물이 더 높은 나이트릭옥사이드 생성저해율을 나타내었으나, 이는 세포독성 때문에 나타나는 현상으로 확인되었다(표 1 및 2).

[0103] 또한, 도 1에서 보는 바와 같이, 리포폴리사카이드만을 처리한 군에 비해 로도덴드론 알BUM 추출물을 처리한 군에서는 농도의존적으로 나이트릭옥사이드 생산이 감소하는 것을 확인하였다(도 1).

[0104] <실험예 3> iNOS 단백질의 발현 억제 실험

[0105] <3-1> 웨스턴 블라팅(Western blotting)

[0106] 로도덴드론 알BUM 추출물의 iNOS 단백질의 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0107] 구체적으로, 상기 <실험예 2>와 동일한 시료의 농도로 처리한 세포에서 배지를 제거한 다음에 세포를 배양용기로부터 떼어내어 단백질 분해효소 저해제(Protease inhibitor cocktail, Roche, USA)를 함유한 단백질 용출용액(CelLytic™-MT Tissue Lysis Reagent, Sigma, USA)을 사용하여 균질화하였다. 추출액은 20분 동안 14,000 rpm에서 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한, 상등액을 5× SDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)와 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료에서 20 μg 단백질을 SDS 4-12% SDS-PAGE 겔에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 전기영동하여 분자량에 따라 분리하였고, 상기 단백질을 겔 한 장당 100 mA의 조건으로 1시간 동안 전기영동 하여 PVDF 막으로 옮겼다. 이 막에 1차 항체로 항-iNOS 항체(1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 결합시킨 후, 감광하여 분석하였다.

[0108] 그 결과, 도 2a에서 나타내는 바와 같이 대식세포에 리포폴리사카라이드와 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물을 전처리한 경우 농도의존적으로 iNOS의 단백질 발현이 감소하였다(도 2a).

[0109] <3-2> 면역형광염색법(Immunofluorescence)

[0110] 약 2×10<sup>5</sup>/ml 세포를 퍼머녹스 챔버 플라스틱 슬라이드(Permanox chambered plastic slides; Nunc, USA)에 부착시키고, 상기 <실험예 2>에서와 같이 대식세포에 염증을 유도한 후, 상등액을 제거하고, 인산완충액(Phosphate buffered saline, PBS)으로 세척하였다. 이후 4℃에서 30분간 에탄올로 고정하였고, 세척한 후, 3% 소혈청알부민(bovine serum albumin)으로 실온에서 30분간 차단하였다. 차단 후 1차 항체[항-iNOS 항체(1:100)]를 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 인산완충액으로 3번 세척한 이후에 텍사스레드(Texas red; Santa Cruz Biotechnology, USA)가 연결된 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온의 암 조건에서 2시간 동안 반응하였다. 인산완충액으로 프로롱 골드 안티페이드 용액(ProLong Gold Antifade reagent, Invitrogen, USA)으로 3번 마운팅한 후 공초점 현미경(LSM510m Carl Zeiss, Germany)으로 촬영하였다.

[0111] 그 결과, 도 2b에서 보는바와 같이, 리포폴리사카라이드만 처리한 세포에서는 iNOS의 단백질 발현이 급격히 증가하는 반면, 로도덴드론 알BUM 추출물을 전처리한 세포에서는 단백질의 발현이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(도 2b).

[0112] <실험예 4> 로도덴드론 알BUM 추출물의 p65 핵전이에 대한 억제 효과

[0113] LPS를 처리한 RAW264.7 세포에서 p65가 핵으로 전이를 저해하는 효과를 면역형광염색법으로 확인하였다.

[0114] 구체적으로, 상기 <실험예 3-2>의 방법으로 대식세포에 로도덴드론 알BUM 추출물을 20μg/ml 농도로 1시간 처리한 후, 리포폴리사카라이드(0.5 μg/ml)를 처리하여 1시간 동안 배양한 후, <실험예 3-2>의 방법에 따라 제 1차 항체[항-p65 항체(1 : 100)]를 상온에서 3시간 동안 반응시켰고, 이어서 제 2차 항체로는 텍사스레드(Texas red; Santa Cruz Biotechnology, USA)가 연결된 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온의 암조건에서 2시간 동안 반응시켰다.

[0115] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 대조군에서는 p65가 세포질에서만 관찰되었으나, LPS만 처리한 세포에서는





- [0132] 유 당 100 mg
- [0133] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0134] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
  
- [0135] **<1-3> 캡슐제의 제조**
- [0136] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 100 mg
- [0137] 옥수수전분 100 mg
- [0138] 유 당 100 mg
- [0139] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0140] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
  
- [0141] **<1-4> 환의 제조**
- [0142] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 1 g
- [0143] 유당 1.5 g
- [0144] 글리세린 1 g
- [0145] 자일리톨 0.5 g
- [0146] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
  
- [0147] **<1-5> 과립의 제조**
- [0148] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 150 mg
- [0149] 대두추출물 50 mg
- [0150] 포도당 200 mg
- [0151] 진분 600 mg
- [0152] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
  
- [0153] **<제조예 2> 식품의 제조**
- [0154] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**
- [0155] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
  
- [0156] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**
- [0157] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
  
- [0158] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**
- [0159] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하

였다.

[0160] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0161] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0162] <2-5> 전식의 제조

[0163] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0164] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0165] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0166] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0167] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0168] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0169] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물(3 중량부),

[0170] 영지(0.5 중량부),

[0171] 지황(0.5 중량부).

[0172] <제조예 3> 음료의 제조

[0173] <3-1> 건강음료의 제조

[0174] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0175] <3-2> 야채 주스의 제조

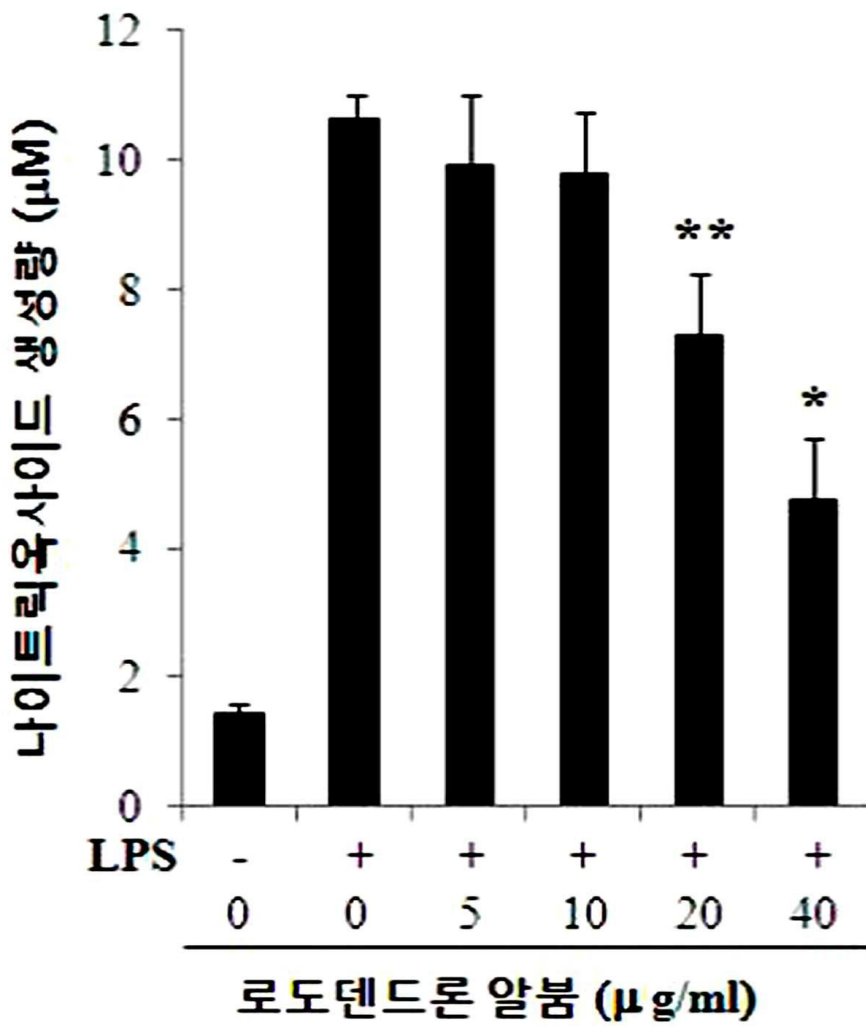
[0176] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0177] <3-3> 과일 주스의 제조

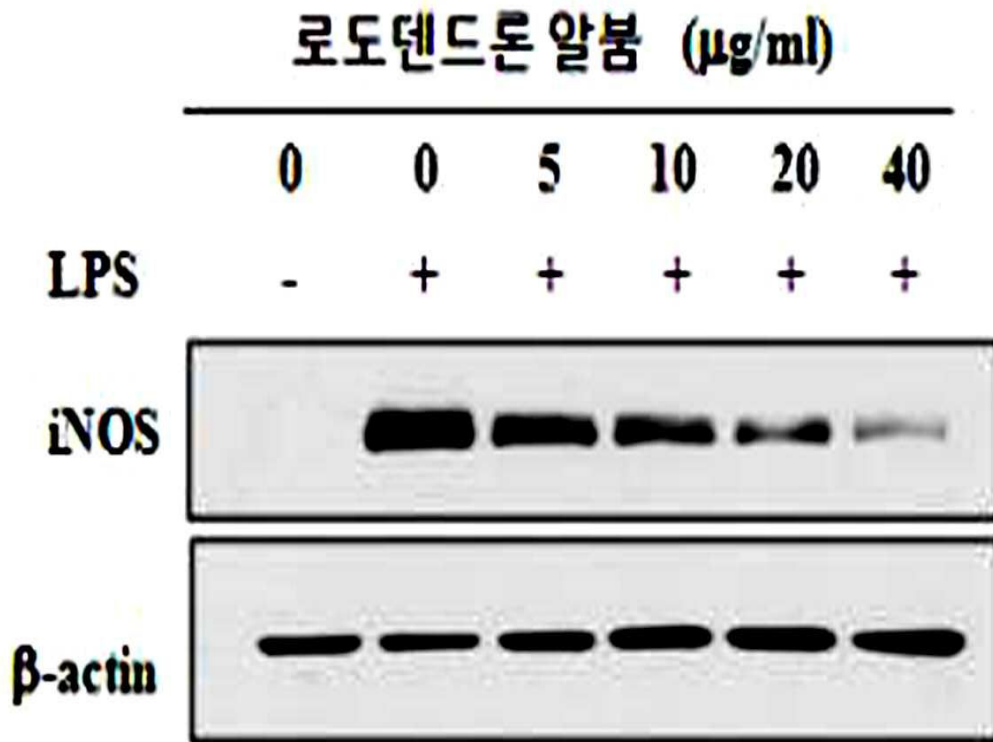
[0178] 본 발명의 로도덴드론 알BUM 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

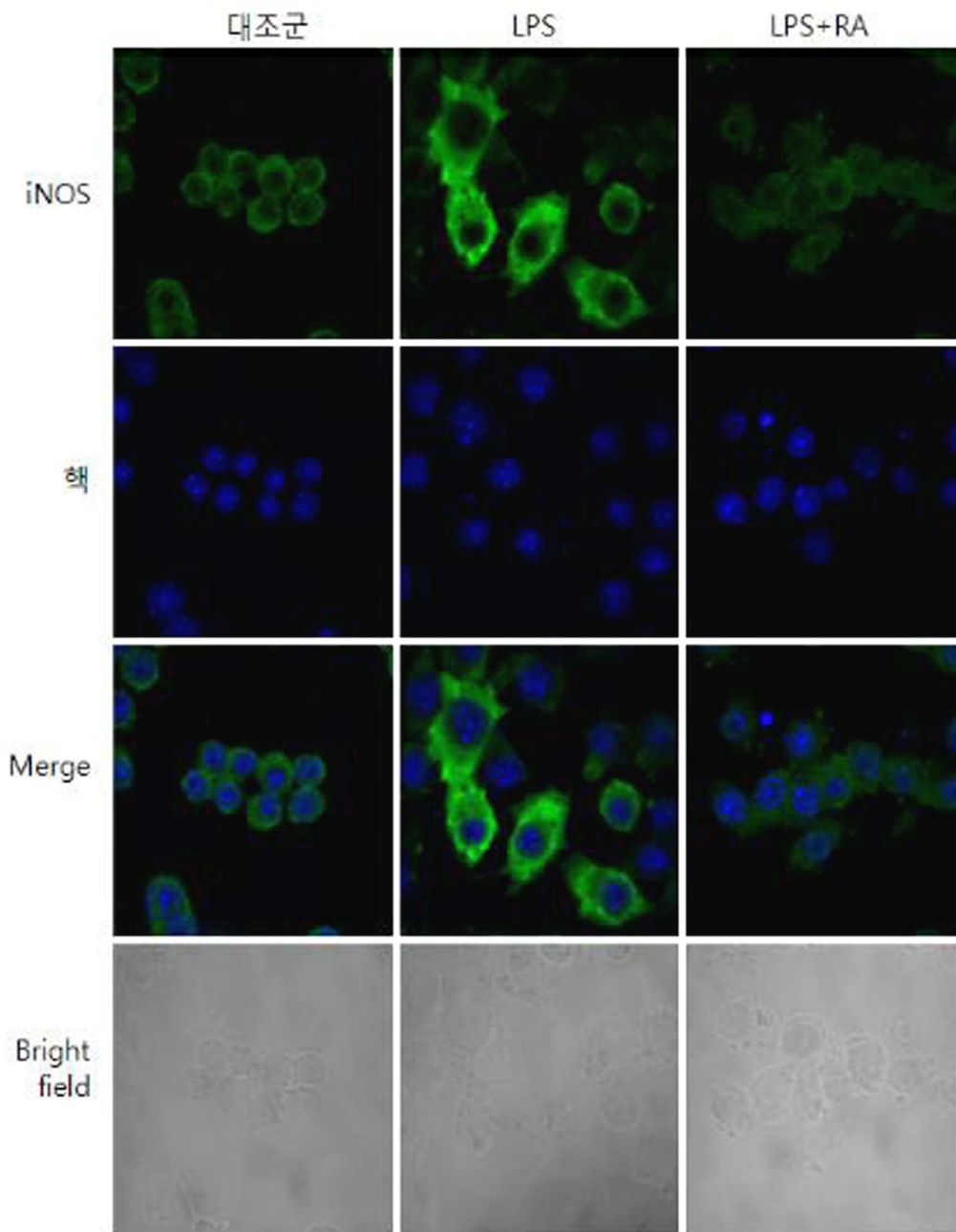
도면1



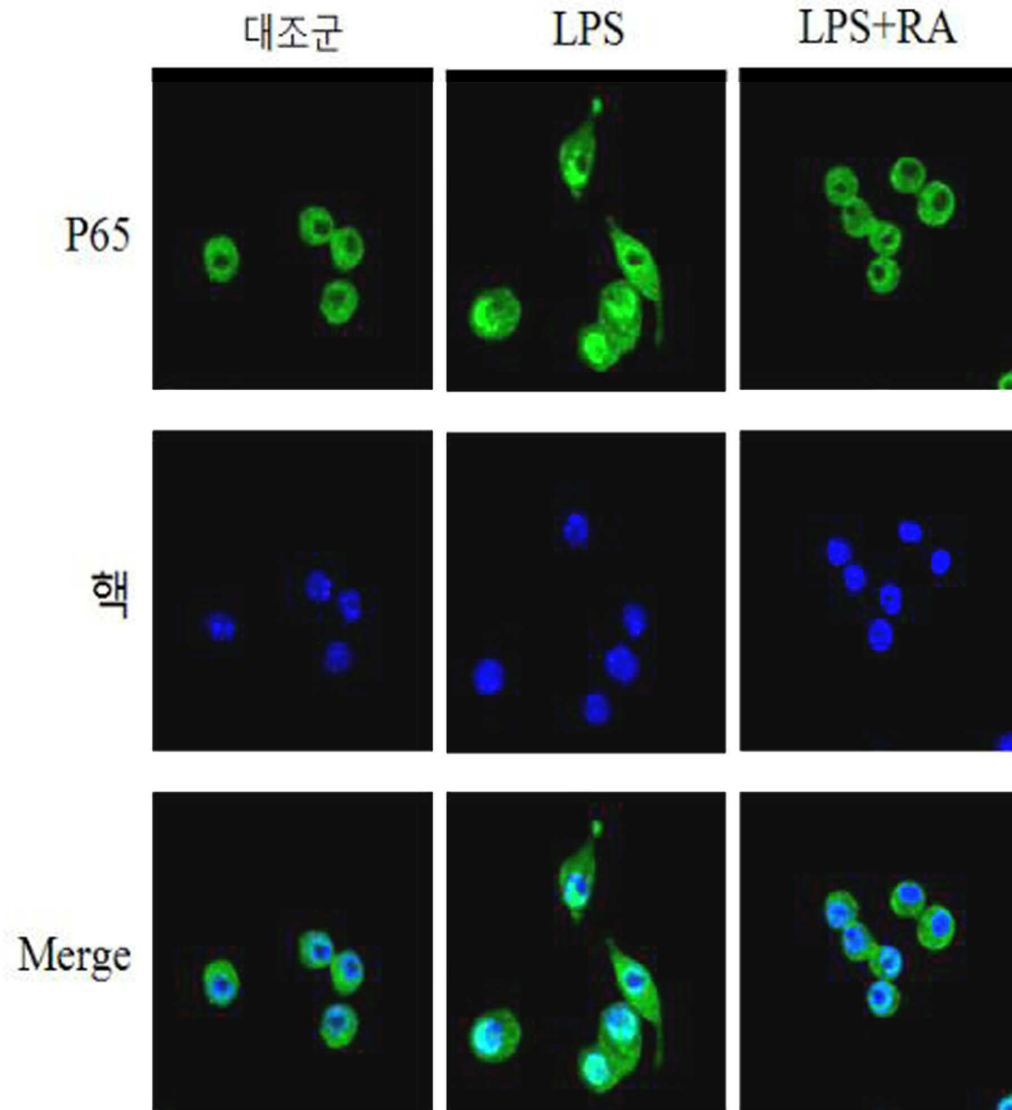
도면2a



도면2b

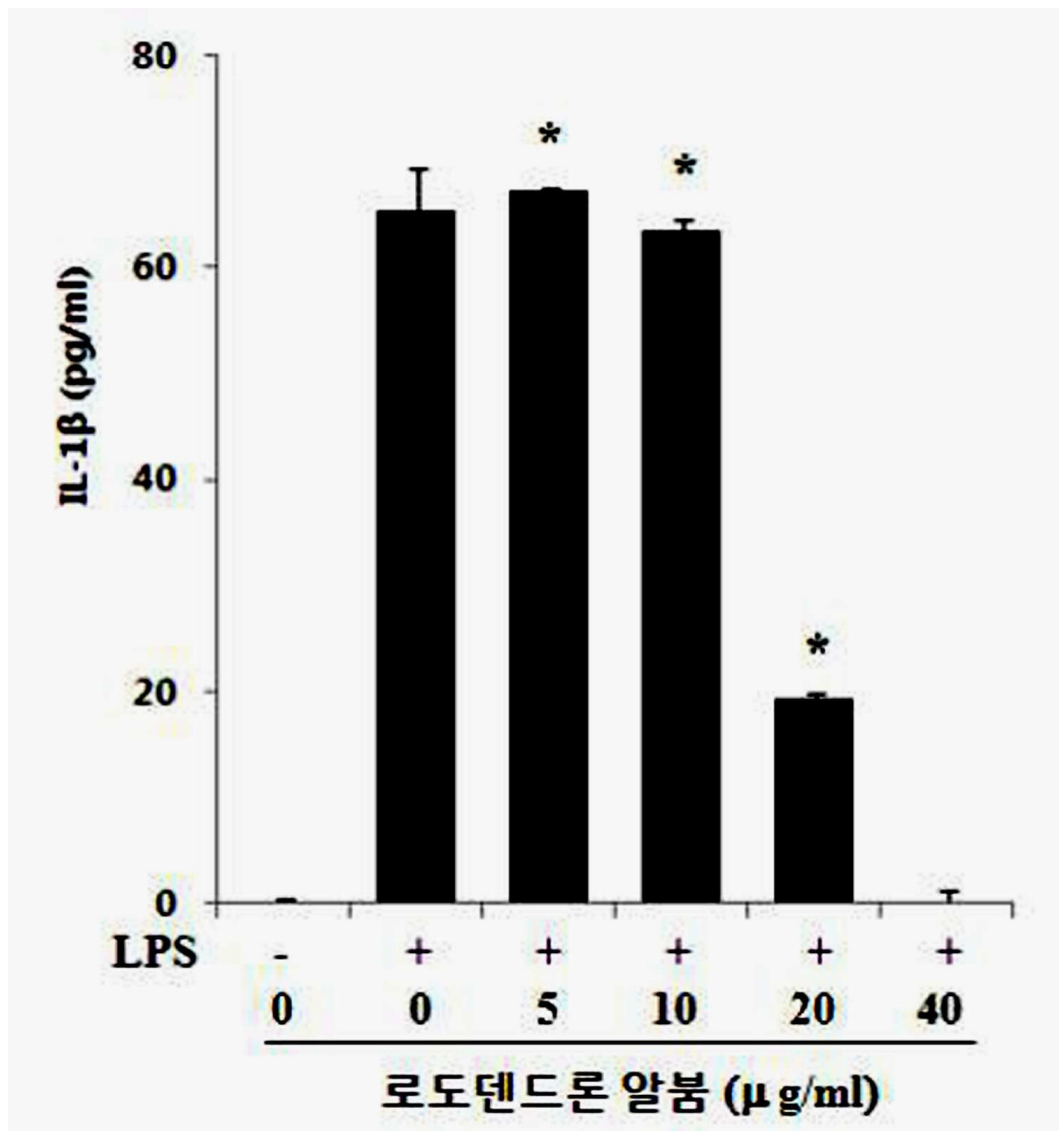


도면3

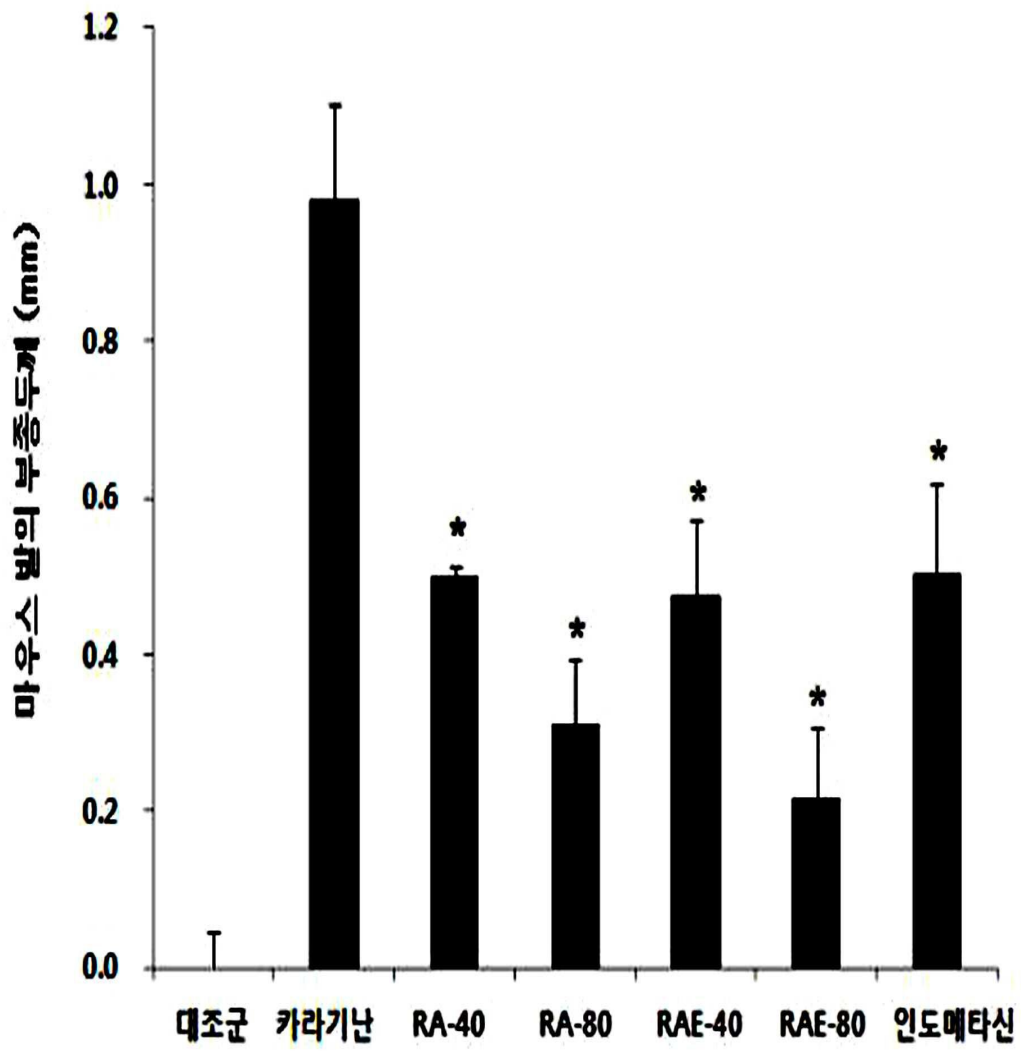




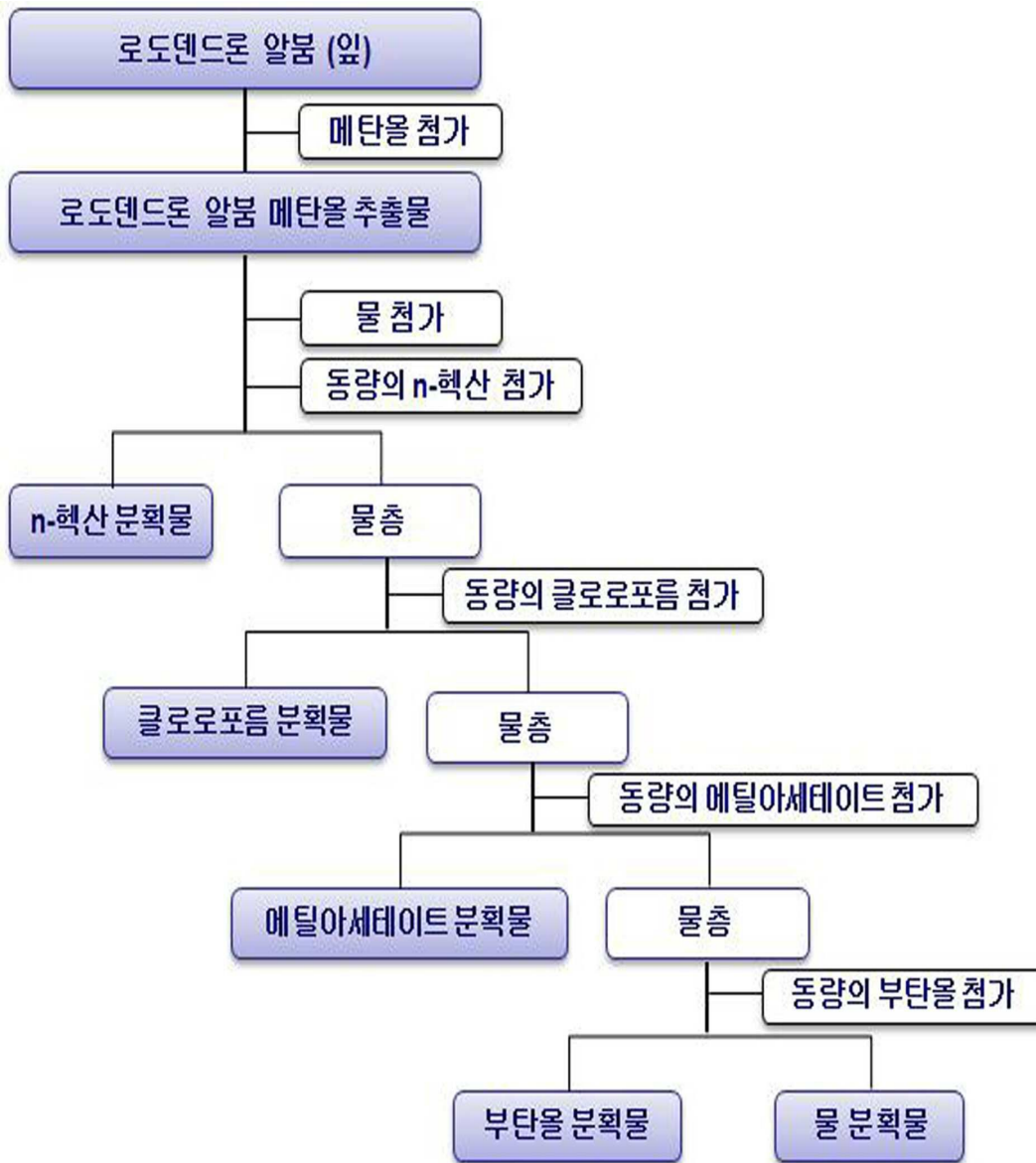
도면4



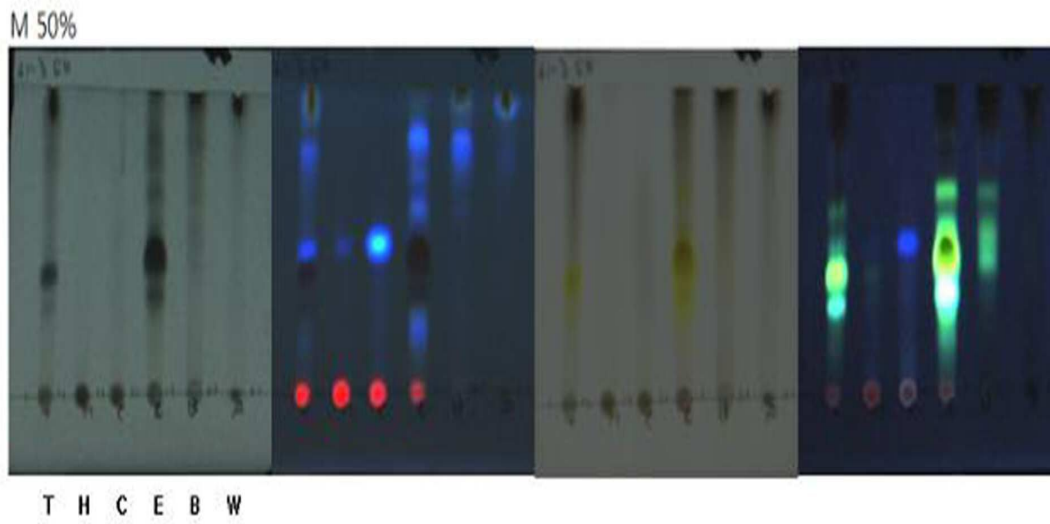
도면5



도면6



도면7



도면8

