



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월17일
 (11) 등록번호 10-1440489
 (24) 등록일자 2014년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0063738
 (22) 출원일자 2011년06월29일
 심사청구일자 2012년07월24일
 (65) 공개번호 10-2013-0002652
 (43) 공개일자 2013년01월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 EP01917967 A1*
 World Scientific Publishing Co. Pte.
 Ltd. [ISBN 981-256-341-5], pp.138-142(2006)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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

전체 청구항 수 : 총 4 항

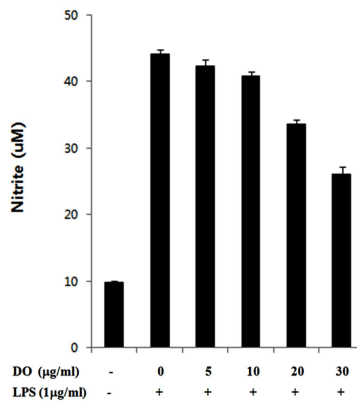
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **디프테로카퍼스 옵티시포리어스 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물은 염증 유발에 의해 급격히 증가한 NO 및 PGE₂의 생성을 억제하고, iNOS 및 COX-2 발현을 억제하는 활성을 가짐으로써 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
오세량
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
박지원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
박미정
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
이중구
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이형규
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
김정희
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
김두영
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
이상우
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 M11006000020-11A110-00110
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 과학기술국제화사업
 연구과제명 지구적 생물다양성 협력네트워크 구축사업
 기여율 1/1
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2010.10.01 ~ 2011.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

디프테로카퍼스 옵터시포리우스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.)의 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 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

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

디프테로카퍼스 옵터시포리우스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.)의 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 디프테로카퍼스 옵터시포리우스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 건강식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증(inflammation)이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 뜻한다. 구체적으로, 외부 세균이 특정 조직에 침입하여 증식을 하게 되면 생체의 백혈구가 이를 인지하여 증식된 외부 세균을 활발히 공격하게 되는데, 이 과정 중 발생하는 백혈구의 사해가 균에 의하여 침입받은 조직에 축적됨과 동시에 백혈구에 의하여 사멸된 침입균의 세포 파괴물이 침입받은 조직 내로 용해되어 농양이 형성된다. 염증에 의한 농양의 치료는 소염작용을 통하여 촉진될 수 있는데, 소염작용이란 항균제를 이용하여 침입균의 증식을 억제하거나 농양 중에 축적된 이물질들을 탐식하는 대식세포(macrophage)를 활성화하여 상기 이물질들을 소화 및 배설하는 대식세포의 기능을 향진시키는 등의 염증치료 촉진작용이다. 일반적으로 염증반응은 생체의 세포나 조직에 기질적 변화를 가져오는 침습으로 인한 손상을 수복 및 재생하기 위한 생체방어 반응과정이고, 이 반응과정에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포 및 면역세포 등이 작용한다. 정상적으로 외부 침입균에 의하여 유도되는 염증반응은 생체를 보호하기 위한 방어 시스템인 반면, 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되면 다양한 질환들이 나타나게 되는데, 이러한 질환들을 염증질환이라 한다. 상기 염증질환은 외부자극에 의하여 활성화된 표적세포로부터 분비되는 다양한 염증 매개물질이 염증을 증폭 및 지속시켜 인체의 생명을 위협하는 질환으로서 급성염증, 류마티스 관절염과 같은 관절 내에서의 질환, 건선 등의 형태로 나타나는 피부질환 및 알레르기성 비염 등의 알레르기성 염증질환 등이 있다.

[0003] 알레르기는 항원(antigen)이 코나 목의 내벽에 접촉하게 되면 내벽에서 면역글로블린(immunoglobulin E, IgE)이라는 항체(antibody)를 내보내는 반응이다. 면역글로블린이 히스타민(histamine), 류코트리엔(leukotriene), 프로스타글란딘(prostaglandin)과 같은 화학물을 내보내어 이 물질들로 인해 점액막(mucous membrane)에서 과도한 점액이 생산된다. 이로 인해 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염 같은 알레르기 증상이 나타나게 된다.

[0004] 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)는 아라키도닉산(arachidonic acid, AA)으로부터 생성되는 염증 매개체로서 특히, PGE₂는 사이클로 옥사이드 합성효소(COX-2; cyclooxygenase-2 enzyme)에 의해 생성되며 주로 대식세포와 단핵구세포에서 많이 생성되는데, 대식세포는 리포폴리사카라이드(LPS, Lipopolysaccharides)와 같은 염증성 제체에 의해 빠르게 유도된다는 것이 밝혀졌다. 따라서 염증세포 활성화로 호산구, 대식세포 등 염증세포에서 분비되는 시스테인, 류코트리엔, 프로스타글란딘 E₂(PGE₂) 등은 염증 및 알레르기 반응과 이로 인한 천식을 유발하는 주요 원인이므로 이들의 생산을 억제하기 위한 약물을 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

[0005]

[0006] 나이트릭 옥사이드(nitric oxide, NO)는 나이트릭 옥사이드 합성효소(NO synthase, NOS)에 의해 L-아르기닌(L-arginine)이 산화되어 생성되는데, 염증과정의 매개체로서 병원성 DNA를 손상시키는 방어작용을 함으로써 항상성을 유지하는 역할을 한다(Kou and Schroder, Annuals of Surgery 221, 220-235, 1995). NOS 중에서 유도성 나이트릭 옥사이드 합성효소(iNOS; inducible nitric oxide synthase)는 세포내에서의 NO 과생산에 아주 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 지금까지 인류가 개발한 약제 중 가장 강력한 항염, 항알레르기 작용을 지니고 있는 약제는 스테로이드 제제이다. 그러나 장기적으로 사용할 때 반드시 부작용을 수반하게 된다. 스테로이드제는 처음 사용할 때 놀라울 정도의 효과를 발휘하여 증상을 완전 소실시켜버리지만 이는 잠시일 뿐이고, 증상은 스테로이드 사용을 중지함과 함께 다시 나타나며 반복사용과 함께 증상은 더욱 심해져 간다. 스테로이드제의 부작용으로는 등근 다혈성의 얼굴, 체액의 저류, 부신억제, 감염에 대한 감수성의 증가와 기타 정신병, 백내장, 녹내장, 소화성 궤양, 창상 치유 지연, 초기 감염의 재활성화 등이 있다.

[0008] 따라서, 천연식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 의약품이나, 별도의 정제 과정 없이 안전하게 섭취할 수 있으며 염증을 억제할 수 있는 효과가 있고, 용이하게 식품에 이용할 수 있는 물질에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0009] 한편, 디프테로카퍼스 옵터시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.)는 디프테로카르파(DIPTEROCARPACEAE)에 속하는 식물로, 17개의 속과 500여개의 종이 있다. 인도와 버마, 태국, 캄보디아, 베트남, 라오스 등에 분포하고 있으며, 목재는 일반적인 건축에 사용된다. 이 식물과 몇 가지 식물을 혼합하여 오래 복용하여도 안전한 에이즈 치료제로 사용할 수 있다는 보고가 있었으며(WO 2006137122), 이 식물의 70% 에탄올 추출물이 콜라겐 분해효소를 100% 저해하기 때문에, 다른 여러 식물 추출물과 함께 로션, 크림, 샴푸, 치약 등에 이용될 수 있다는 보고가 있었다(JP 2010018546). 그러나, 디프테로카퍼스 옵터시포리어스 추출물과 염증 또는 알레르기 질환과의 관련성은 아직까지 알려지지 않았다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 해외식물추출물을 대상으로 염증활성에 관련한 스크리닝을 실시하였고, 이 추출물들 중에서 디프테로카퍼스 옵터시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물이 리포폴리사카라이드(LPS)로 대식세포에 염증반응을 유도하였을 때, 염증반응과 면역반응의 매개체인 NO와 프로스타글란딘 E₂의 생성에 뛰어난 저해활성을 가지고, iNOS와 COX-2의 발현을 억제함을 확인하였고, 이를 통해 염증성 질환 또는 알레르기성 질환의 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 디프테로카퍼스 옵터시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 디프테로카퍼스 옵터시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 디프테로카퍼스 옵터시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 디프테로카퍼스 옵터시포리어스 추출물은 LPS와 같은 염증인자에 의해서 유발되는 NO와 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)의 분비를 효과적으로 감소시키며, NO와 PGE₂를 합성하는 유도성 나이트릭 옥사이드 합성효소(iNOS; inducible nitric oxide synthase)와 사이클로 옥사이드 합성효소(COX-2; cyclooxygenase-2 enzyme)의 발현을 효과적으로 억제할 수 있어, 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 LPS를 이용하여 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포에서 NO 생성에 대한 디프테로카퍼스 옵터시포리어스

추출물의 저해 효과를 나타낸 그래프이다:

음성대조군: 0.15 % DMSO만 투여한 군;

LPS: 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 염증이 유도된 양성대조군; 및

DO: 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물을 처리한 후 LPS로 염증이 유도된 군.

도 2는 LPS를 이용하여 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포에서 iNOS의 핵산발현과 단백질발현에 대한 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물의 억제 효과를 나타낸 결과이다:

음성대조군: 0.15 % DMSO만 투여한 군;

LPS: 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 염증이 유도된 양성대조군;

DO: 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물을 처리한 후 LPS로 염증이 유도된 군;

a: 핵산증폭분석; 및

b: 웨스턴 블랏팅.

도 3은 LPS를 이용하여 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포에서 PGE₂ 생성에 대한 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물의 저해 효과를 나타낸 그래프이다:

음성대조군: 0.15 % DMSO만 투여한 군;

LPS: 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 염증이 유도된 양성대조군; 및

DO: 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물을 처리한 후 LPS로 염증이 유도된 군.

도 4는 LPS를 이용하여 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포에서 COX-2의 핵산발현에 대한 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물의 억제 효과를 나타낸 결과이다:

음성대조군: 0.15 % DMSO만 투여한 군;

LPS: 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 염증이 유도된 양성대조군; 및

DO: 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 추출물을 처리한 후 LPS로 염증이 유도된 군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017]

본 발명의 유효성분인 디프테로카퍼스 옵터시포리우스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다:

[0018]

1) 디프테로카퍼스 옵터시포리우스에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0019]

2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0020]

3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하는 단계; 및

[0021]

4) 단계 3)의 농축물을 동결 건조하는 단계.

[0022]

상기 디프테로카퍼스 옵터시포리우스는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0023]

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 용매의 양은 디프테로카퍼스 옵터시포리우스 건조 중량의 5 내지 15배로 하는 것이 바람직하고 7 내지 10배로 하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0024]

상기 방법에 있어서, 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 방법에 있어서, 추출시 온도는 10 °C 내지 100 °C인 것이

바람직하며 상온인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시간은 10분 내지 3시간이 바람직하고, 15분이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 횟수는 하루에 5 ~ 10회인 것이 바람직하고 10회인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 추출방법을 3일간 반복하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 단계 4)의 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조 하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0026] 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 염증성 질환은 피부염, 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 어느 하나인 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 또한 상기 알레르기 질환은 알레르기성 비염, 아토피, 알레르기성 결막염, 및 급성 및 만성 알레르기성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물이 염증 반응으로 인한 NO의 생성을 저해하는지 알아보기 위해, 대식세포에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide; LPS)를 처리하여 인위적으로 유발시킨 염증에 의한 NO의 생성량을 관찰한 결과, 리포폴리사카라이드를 처리한 군에 비해 디프테로카퍼스 옵티시포리어스 추출물을 처리한 군에서 농도의존적으로 NO 생성량이 감소하는 것을 확인하였다(도 1 참조).

[0030] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물이 NO의 과생산 효소인 iNOS의 리보핵산과 단백질의 발현 억제 효과를 가지는지 알아보기 위해, 대식세포에 리포폴리사카라이드(LPS)를 처리하여 인위적으로 유발시킨 염증에 의한 iNOS의 발현 정도를 핵산증폭법 및 웨스턴 블랏으로 측정한 결과, LPS만 처리한 군에 비해 LPS와 함께 디프테로카퍼스 옵티시포리어스 추출물을 처리한 군에서 처리 농도에 따라 iNOS의 핵산 발현과 단백질 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 2a, 도 2b 참조).

[0031] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 염증반응 유도시 대식세포에서 분비되어 알레르기성 염증반응을 유도하는 것으로 알려진 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂)의 생성 저해 효과를 가지는지 알아보기 위해, 프로스타글란딘 측정 키트를 사용하여 실험을 진행하였고, 그 결과 처리한 디프테로카퍼스 옵티시포리어스 추출물을 처리한 군에서 농도의존적으로 프로스타글란딘 E₂의 생성량이 감소하는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0032] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물이 프로스타글란딘 E₂의 생산 효소인 사이클로 옥사이드 합성효소(COX-2)의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 대식세포에 리포폴리사카라이드(LPS)를 처리하여 인위적으로 염증을 유발시키고 COX-2의 발현 정도를 핵산증폭법으로 측정한 결과, LPS만 처리한 군에 비해 LPS와 함께 디프테로카퍼스 옵티시포리어스 추출물을 처리한 군에서 처리 농도에 따라 COX-2의 핵산 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0033] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물의 안전성을 확인하기 위해 세포독성 실험을 수행한 결과, 30 ug/ml의 농도까지 독성이 없음을 확인하였다(표 1 참조).

[0034] 따라서, 본 발명의 디프테로카퍼스 옵티시포리어스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물이

LPS에 의해 염증반응이 유도된 대식세포에서 염증과정의 매개체인 NO 및 PGE₂의 생성을 저해하고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 효과를 가지며 세포독성이 거의 없으므로, 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

- [0035] 본 발명의 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 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.
- [0036] 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, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 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.
- [0037] 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 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0038] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [0039] 아울러, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 디프테로카퍼스 옵티시포리우스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 및 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강 식품을 제공한다.
- [0040] 상기 염증성 질환은 피부염, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 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 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 또한 상기 알레르기 질환은 알레르기성 비염, 아토피, 알레르기성 결막염, 및 급성 및 만성 알레르기성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물은 염증 유발에 의해 급격히 증가한 NO 및 PGE₂의 생성을 억제하고, iNOS 및 COX-2 발현을 억제하는 활성을 가짐으로써, 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

- [0043] 본 발명의 건강식품은 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0044] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물을 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.
- [0045] 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, 슈크로스나 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 g 이다.
- [0046] 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.
- [0047] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0048] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0049] **<실시예 1> 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물 제조**
- [0050] 본 발명자들은 한국생명공학연구원에 소재한 해외생물소재허브센터에서 디프테로카퍼스 유타시포리어스 100% 메탄올 추출물을 구입하여 DMSO로 그 농도가 20 mg/ml이 되도록 제조한 다음, 농도별로 희석하여 이후 실험에 사용하였다.
- [0051] **<실시예 2> 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물의 세포독성 확인**
- [0052] 본 발명의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물의 세포독성 여부를 확인하기 위하여 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물을 이용하여 MTT 분석을 수행하였다.
- [0053] 구체적으로, 생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 1×10^5 세포/ml의 농도로 현탁하여 100 uℓ씩 96웰 플레이트(96 well plate)에 접종하여 부착하였다. 세포를 부착 한지 4시간 후에 상기 <실시예 1>에서 준비된 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물을 5, 10, 20 및 30 ug/ml 농도로 처리하였다. 추출물을 처리하고, 24시간 동안 배양한 후, 5 mg/ml의 MTT용액을 웰당 10 uℓ씩 첨가하여 4시간 더 배양한 다음, 상등액을 제거하였다. 이후, DMSO를 100 uℓ씩 첨가하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 DMSO를 0.15% 처리한 음성 대조군을 100%로 하여 하기 수학적식에 따라 계산하였다.

수학식 1

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{추출물처리한 OD570nm값}}{\text{음성대조군 OD570nm값}} \times 100$$

[0054]

[0055]

표 1

[0056]

시료 (ug/ml)	세포생존율 (%)
음성대조군	100.00 ± 4.99
본 발명의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물 5	100.14 ± 3.12
본 발명의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물 10	102.18 ± 1.30
본 발명의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물 20	110.50 ± 0.47
본 발명의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물 30	117.24 ± 1.19

[0057]

그 결과, [표 1]에서 보는 바와 같이, 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물은 Raw264.7 세포에서 30 ug/ml의 농도까지 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0058]

<실험예 1> Raw264.7세포에서 나이트릭옥 사이드 생성 저해 효과 확인

[0059]

Raw264.7 세포에 리포폴리사카라이드(LPS)를 처리하여 인위적으로 유발시킨 염증에 대한 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물의 억제 효과를 확인하기 위하여 유도성 나이트릭 옥사이드의 생성량을 측정하였다.

[0060]

구체적으로, 페놀레드(phenol-Red)가 들어있지 않은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가하고, 세포를 2.5×10^5 세포/ml 농도로 현탁하여 96웰 플레이트(96 well plate)에 200 ul씩 접종하였다. 상기 접종한 세포를 4시간 동안 부착시킨 후, 상기 <실시예 1>의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물을 0, 5, 10, 20 및 30 ug/ml의 농도로 처리하여 1시간 동안 배양한 후에 1 ug/ml의 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide, Sigma사)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상층액 100 μl를 회수하여 새로운 96웰 플레이트에 넣고, 그리스 시약(Griess reagent, Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기(microplate reader, Bio-Rad사)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 소듐 나이트라이트(sodium nitrite)를 이용하여 검량선을 작성하고, 이를 기준으로 배양액 내의 나이트릭 옥사이드 생성량을 구하였으며, 리포폴리사카라이드를 처리한 군의 나이트릭 옥사이드 생성량을 100%로 하여 각 군의 나이트릭 옥사이드의 저해율을 계산하였다.

[0061]

그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, LPS 처리군에 비해 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물을 처리한 군에서 농도의존적으로 나이트릭 옥사이드 생성량이 감소하는 것을 확인하였다. 특히 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물 30 ug/ml을 처리한 군에서는 나이트릭 옥사이드의 생성 저해율이 $41.00 \pm 2.48\%$ 임을 확인하였다(도 1).

[0062]

<실험예 2> Raw264.7 세포에서 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물의 iNOS 발현 억제 효과 확인

[0063]

<2-1> iNOS 유전자의 발현 억제 효과 확인(RT-PCR)

[0064]

본 발명의 디프테로카퍼스 유타시포리어스 추출물이 나이트릭 옥사이드의 생성에 관여하는 유도성 나이트릭 옥사이드 합성효소의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0065]

구체적으로, 5×10^4 의 Raw264.7 세포에 <실험예 1>과 동일한 방법으로 추출물을 처리한 다음, RNA를 추출하고, 추출된 RNA에서 역전사 효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 얻은 cDNA를 주형으로 하고, iNOS 프라이머

(forward 5'-GGA GCG ACT TGT GGA TTG TC-3', reverse 5'-GTG AGG GCT TGG CTG AGT GAG-3')(서열번호 1, 2)를 혼합하고, PCR Premix(바이오니아, 대전, 한국)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0066] 그 결과, 도 2a에서 보는 바와 같이, LPS 처리군에서는 iNOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물을 처리한 군에서는 처리 농도에 따라 iNOS의 핵산 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 2a).

[0067] <2-2> iNOS 단백질의 발현 억제 효과 확인(Western blotting)

[0068] 구체적으로, 상기 <실험예 2>와 동일한 방법으로 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물을 처리한 Raw264.7 세포에서 단백질을 추출하고, SDS-PAGE를 통해 전기영동된 단백질을 PVDF 막에 부착시켰다. 이후, 상기 막을 5% 탈지분유로 차단(blocking)시킨 다음, 1차 항체로 항-iNOS 항체(1:100, Santa Cruz Biotechnology, 미국) 및 2차 항체(항토끼-IgG-HPR; Jackson ImmunoResearch, 미국)를 순차적으로 결합시킨 후, ECL 검출 키트(Amersham Biosciences, UK)로 발광반응을 유발하고, X-ray 필름에 노출시켜 감광하였다.

[0069] 그 결과, 도 2b에서 나타내는 바와 같이, 대식세포에 LPS와 본 발명의 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물을 동시에 처리한 경우 농도의존적으로 iNOS의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 2b).

[0070] <실험예 3> Raw264.7세포에서 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물의 프로스타글란딘 E₂ 생성 저해 효과 확인

[0071] 본 발명의 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물의 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂) 생성 저해 효과를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다.

[0072] 구체적으로 상기 <실험예 1>의 방법으로 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물과 리포폴리사카라이드를 처리한 Raw264.7 세포의 배양 상층액을 취하여 프로스타글란딘 측정 키트(PGE₂ assay kit; R&D systems, Minneapolis, 미국)를 사용하여 프로스타글란딘 E₂(Prostaglandin E₂)의 생성 저해 효과를 측정하였다.

[0073] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, LPS 처리군에 비해 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물을 처리한 군에서 농도의존적으로 프로스타글란딘 E₂의 생성량이 감소함을 확인하였고, 특히 30 ug/ml에서는 56.78%의 프로스타글란딘 E₂ 생성 저해율을 나타냄을 확인하였다(도 3).

[0074] <실험예 4> Raw264.7 세포에서 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물의 COX-2 유전자의 발현 억제 효과 확인

[0075] 본 발명의 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물이 사이클로옥시게네이스(COX-2)의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0076] 구체적으로, 상기 <실험예 1>과 동일한 방법으로 얻은 cDNA를 주형으로 하고, COX-2 프라이머(forward 5'-GAA GTC TTT GGT CTG GTG CCT G-3', reverse 5'-GTC TGC TGG TTT GGA ATA GTT GC-3')(서열번호 3, 4)를 혼합하고, PCR Premix(바이오니아, 대전, 한국)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0077] 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, LPS 처리군에서는 COX-2의 발현이 증가하는 반면, 디프테로카퍼스 옵티시포리우스 추출물을 처리한 군에서는 처리 농도에 따라 COX-2의 핵산 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 4).

[0078] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0079] <1-1> 산제의 제조

[0080] 실시예 1의 추출물 2 g

[0081] 유당 1 g

[0082] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

- [0083] <1-2> 정제의 제조
- [0084] 실시예 1의 추출물 100 mg
- [0085] 옥수수전분 100 mg
- [0086] 유 당 100 mg
- [0087] 스테아린산 마그네 2 mg
- [0088] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0089] <1-3> 캡슐제의 제조
- [0090] 실시예 1의 추출물 100 mg
- [0091] 옥수수전분 100 mg
- [0092] 유 당 100 mg
- [0093] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0094] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0095] <1-4> 환의 제조
- [0096] 실시예 1의 추출물 1 g
- [0097] 유당 1.5 g
- [0098] 글리세린 1 g
- [0099] 자일리톨 0.5 g
- [0100] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0101] <1-5> 과립의 제조
- [0102] 실시예 1의 추출물 150 mg
- [0103] 대두추출물 50 mg
- [0104] 포도당 200 mg
- [0105] 전분 600 mg
- [0106] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0107] <제조예 2> 식품의 제조
- [0108] <2-1> 밀가루 식품의 제조
- [0109] 본 발명의 실시예 1의 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0110] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0111] 본 발명의 실시예 1의 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수

프 및 육즙을 제조하였다.

[0112] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0113] 본 발명의 실시예 1의 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0114] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0115] 본 발명의 실시예 1의 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0116] <2-5> 전식의 제조

[0117] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0118] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0119] 본 발명의 실시예 1의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0120] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 실시예 실시예 1의 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0121] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0122] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0123] 실시예 1의 추출물(3 중량부),

[0124] 영지(0.5 중량부),

[0125] 지황(0.5 중량부)

[0126] <제조예 3> 음료의 제조

[0127] <3-1> 건강음료의 제조

[0128] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 실시예 1의 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0129] <3-2> 야채 주스의 제조

[0130] 본 발명의 실시예 1의 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0131] <3-3> 과일 주스의 제조

[0132] 본 발명의 실시예 1의 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

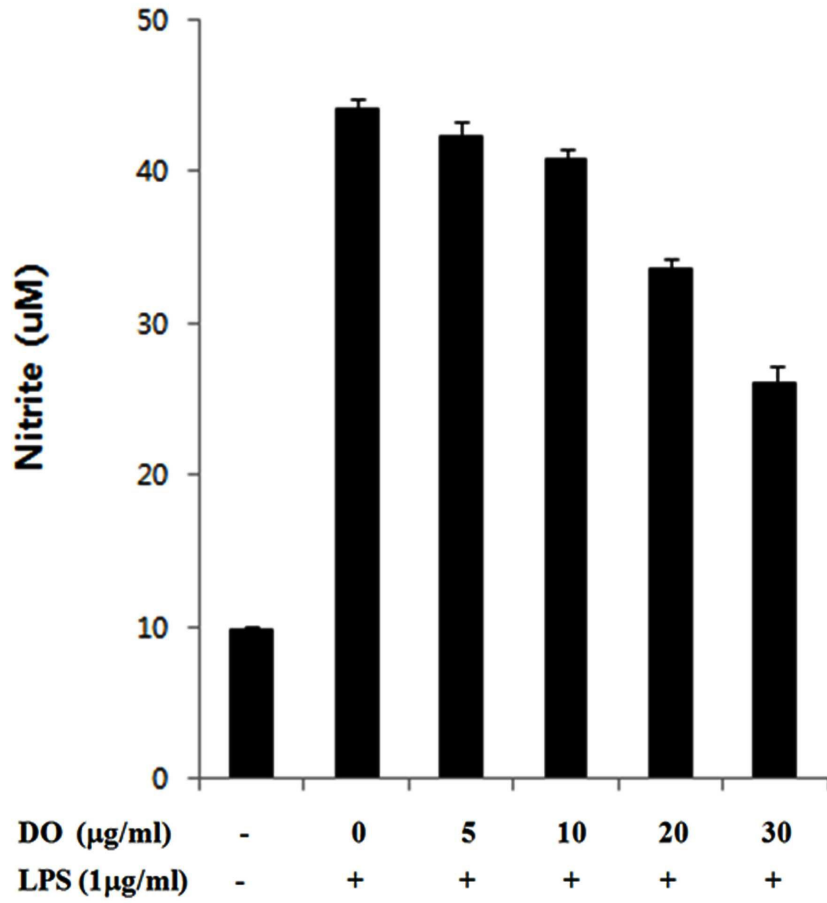
산업상 이용가능성

[0133] 상기에서 보는 바와 같이, 본 발명의 디프테로카퍼스 옵티시포리우스(*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq.) 추출물은 면역반응으로 인한 염증매개체들을 효과적으로 억제하는 효과를 나타내므로, 염증반응, 알레르기 등의 면역반응으로 인한 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 건강식품의 유효성분

으로 유용하게 이용될 수 있다.

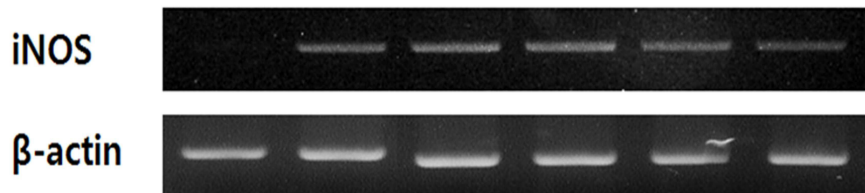
도면

도면1



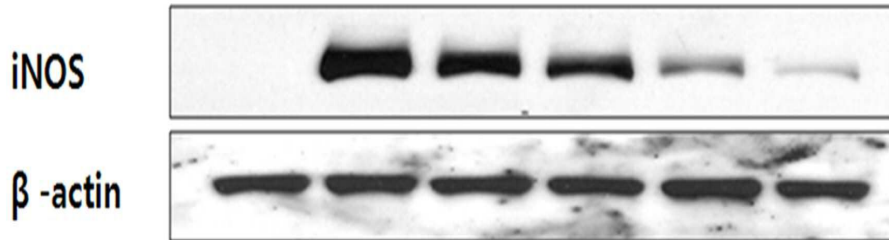
도면2a

DO ($\mu\text{g/ml}$)	-	0	5	10	20	30
LPS ($1\mu\text{g/ml}$)	-	+	+	+	+	+

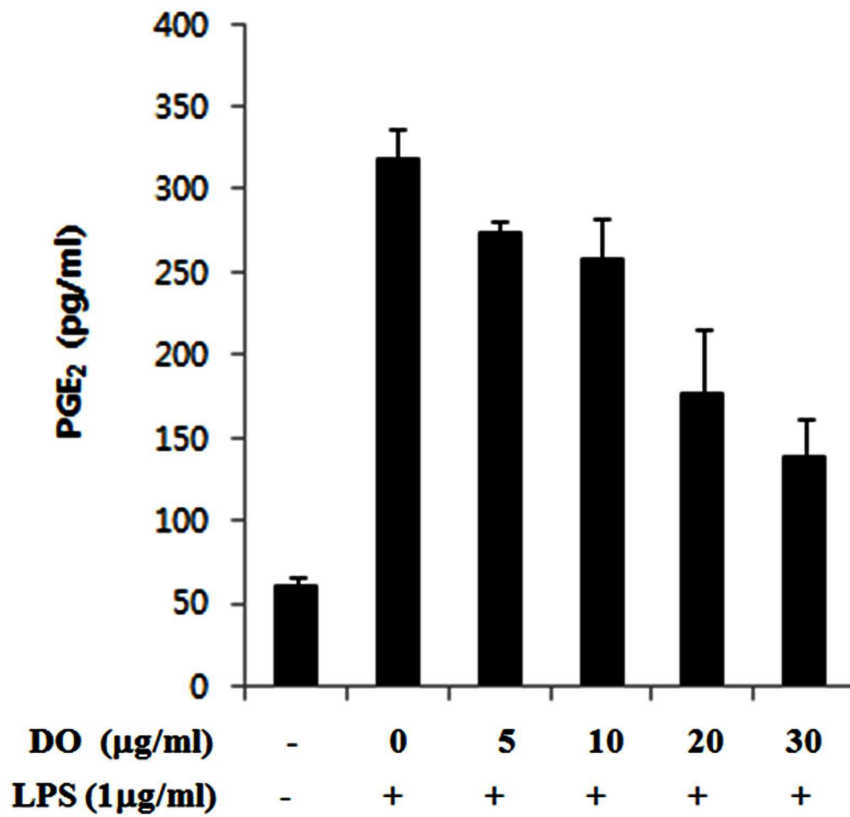


도면2b

DO ($\mu\text{g/ml}$)	-	0	5	10	20	30
LPS ($1\mu\text{g/ml}$)	-	+	+	+	+	+

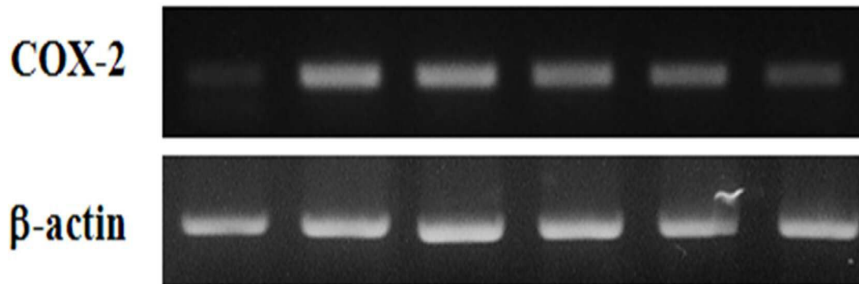


도면3



도면4

DO (µg/ml)	-	0	5	10	20	30
LPS (1µg/ml)	-	+	+	+	+	+



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> A pharmaceutical composition comprising extract of *Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. Ex Miq. for prevention and treatment of inflammatory diseases or allergic disease
- <130> 11P-03-62
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> iNOS forward primer
- <400> 1
- ggagcgactt gtggattgtc 20

- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> iNOS reverse primer
- <400> 2
- gtgaggcctt ggctgagtga g 21
- <210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 forward primer

<400> 3

gaagtctttg gtctggtgcc tg 22

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 reverse primer

<400> 4

gtctgctggt ttggaatagt tgc 23