



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0024090
(43) 공개일자 2010년03월05일

(51) Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/365 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0082778

(22) 출원일자 2008년08월25일

심사청구일자 2008년08월25일

(71) 출원인

중앙대학교 산학협력단

서울 동작구 흑석동 221

(주)뉴트라알앤비티

서울시 금천구 가산동 60-73 벽산디지털밸리5차 809호

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이민원

서울 동작구 사당3동 롯데 낙천대아파트 107동 1903호

최영욱

서울시 서초구 반포본동 주공아파트 112-105

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현, 김승진

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물의 유효성분인 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)는 호산성백혈구(eosinophile)의 수를 현저히 감소시키고, IL-4, 5, 13의 수준을 감소시키는 반면, IL-10의 수준을 증가시키며, MBD-1, 2, 3의 발현을 촉진하고, COX-2 및 iNOS의 발현은 강하게 억제하는 효능을 가져, 아토피성 피부염의 면역조절 치료제로 개발될 수 있다. 또한 본 발명의 화합물은 진달래 뿌리 추출물로부터 분리 정제된 천연화합물로서 인체에 매우 안전하다.

대표도 - 도3c



(72) 발명자

서성준

경기도 안양시 동안구 비산동 245번지 뉴타운아파트 9동 807호

김성규

서울시 구로구 구로동 429-225

최선은

서울시 금천구 시흥2동 230-55

박관희

전남 여수시 신월동 금호아파트 12동 604호

강경호

서울 서초구 서초4동 서초4차 현대아파트 201동 1102호

오철환

서울 강남구 일원동 716 목련타운 103-1501

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10574C093173

부처명 서울특별시

연구사업명 서울시 산학연 사업 - 기술기반구축사업

연구과제명 분자영상기반 난치병 치료 신기술 개발

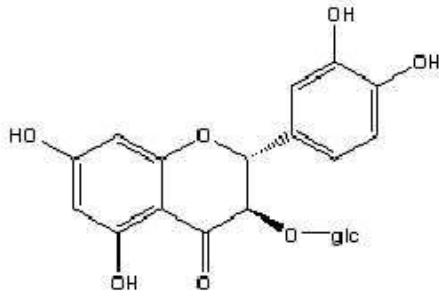
주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2005년 12월 1일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 하기 화학식 1으로 표시되는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 아토피성 피부염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.



[화학식 1]

청구항 2

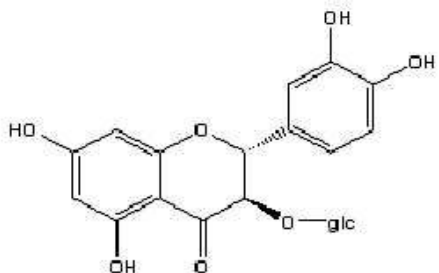
제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 피부 외용 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 피부 외용 제형은 파우더, 젤, 연고, 크림, 액체 또는 에어로졸 제형인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

(a) 하기 화학식 1으로 표시되는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)의 화장품학적 유효량; 및 (b) 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 아토피성 피부염 개선용 화장품학적 조성물.



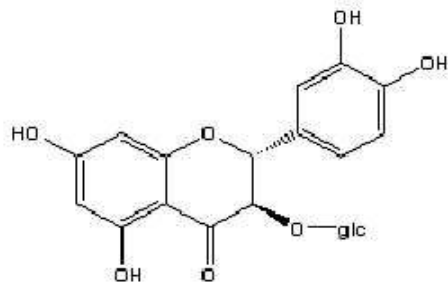
[화학식 1]

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 화장품학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1으로 표시되는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 개선용 기능성 식품 조성물.



[화합식 1]

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진달래(*Rhododendron mucronulatum*)는 진달래과(Ericaceae)에 속하는 *Rhododendron* 속 식물로 호주를 제외한 전 세계에 걸쳐 분포하며, 약 50 속 1300 여 종이 알려져 있다.

[0003] 예로부터 진달래 (*R. mucronulatum*)의 어린가지, 잎, 꽃을 고혈압 초기에 사용하는 것으로 알려졌으며, 만병초 (*R. brachycarpum*)의 잎을 이뇨제로 사용하였고, 철쭉나무 (*R. schlippenbachii*), 산철쭉나무 (*R. yedoense* var. *poukhanense*) 등의 잎을 고혈압의 치료에 응용하였다.¹⁻²⁾ 또한 일본에서는 민간적으로 진달래 꽃잎과 참쌀로 빚는 두견주(진달래술)는 향취가 좋은 술로 하루에 한, 두잔 마시면 혈액순환을 촉진시키고, 혈액속의 콜레스테롤을 낮추어 주며 진해(鎮海), 혈압강하, 피로회복, 류마티스 치료에 효과가 있다고 하였다. 또한 진달래의 꽃과 잎은 중국 의학에서 강장, 이뇨, 건위와 같은 약리학적 효능을 가진 것으로 알려져 왔다.³⁻⁴⁾

[0004] *Rhododendron*속 식물은 다양한 방법으로 연구가 진행되어져 왔으며, 대표적으로 본 속 식물의 특징 중 하나인 분포지역과 함유성분을 계통분류학적으로 해석하는 것으로 Harborne이 본 속 식물 52 종의 잎을 이용하여 함유된 플라보노이드(flavonoid)를 비교함으로써 분포지역에 따른 분류학적 특성을 고찰한 것이 있으며⁵⁾, 이와 더불어 Cooman 등은 *Rhododendron Simsii*의 꽃잎을 이용하여 플라보노이드의 생합성 과정을 추적함으로써 *Rhododendron* 속의 생합성과정을 밝혀 식물학적 특성을 밝히려는 시도도 하였다.⁶⁾

[0005] 본 속 식물로부터 얻어지는 성분 연구는 Hikino 등이 *Rhododendron japonicum*의 꽃으로부터 독성 디테르펜(toxic diterpene)인 로도자포닌(rhodojaponin) I-IV을 분리, 보고하였으며⁷⁻⁸⁾, Sakakibar 등은 *Rhododendron japonicum*의 잎과 줄기로부터 수종의 디테르펜 글리코사이드(diterpene glycoside)와 트리테르펜(triterpene) 화합물을 분리, 보고하였다⁹⁾. Li 등은 *Rhododendron molle*의 과실로부터 디테르펜(diterpene)인 로도몰레인(rhodomollein) XV-XVIII 를 분리, 보고하였고¹⁰⁾, Fan 등은 *Rhododendron latoucheae*의 잎으로부터 이리도이드류(Iridoids) 화합물인 rhodolatuside A 와 rhodolatuside B 를 분리, 보고하였다.¹¹⁾

[0006] 또한 *Rhododendron* 속 식물의 활성에 대한 연구로는 Bao 등이 *Rhododendron molle*의 뿌리로부터 수종의 디테르펜 글리코사이드(diterpene glycosides)와 페놀성 글리코사이드(phenolic glycosides)를 분리하여 각각의 화합물을 대상으로 세포독성(cytotoxicity)을 측정하였으며¹²⁾, Klocke 등은 *Rhododendron molle*의 꽃으로부터 분리한 디테르펜(diterpene) 화합물의 곤충에 대한 anti-feedant 활성 및 살충 활성을 측정하여 보고하였다.¹³⁾ 또한, Takahashi 등은 *Rhododendron simsii*의 잎으로부터 플라바논 글리코사이드(flavanone glycosides)와 ursane-type 트리테르펜(triterpene)을 분리하고, 항산화 활성을 측정하여 보고하였다.¹⁴⁾

[0007] 한편, 우리나라에 분포하는 *Rhododendron*속 식물에 관한 연구는 홍 등이 산철쭉(*R. yedoense* var. *poukhanens*

e)의 꽃으로부터 grayanotixin I, III, IV 및 2 α , 3 β -dihydroxylolean-12-ene, ursolic acid 등을 분리, 보고하였으며,¹⁵⁾ Chung 등이 진달래 (R. mucronulatum)의 꽃으로부터 향산화 물질로서 p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, 4, 5-O-dicaffeoylquinic acid, 3, 5-O-dicaffeoylquinic acid 등 6종의 페놀성 산(phenolic acids)을 분리, 보고 하였다.¹⁶⁻¹⁷⁾ 또 An 등이 진달래(R. mucronulatum) 꽃 추출물의 향산화, 항암 효과 및 티로시나아제(tyrosinase) 저해 활성 등을 분획 수준에서 확인하였으며,¹⁸⁾ Lee 등이 진달래(R. mucronulatum)의 줄기를 대상으로 분획 수준 활성에 관하여 보고 한 것 등만 있을 뿐¹⁹⁾ 기타 연구는 아직 자세히 이루어지지 못하였다.

[0008] 전통적으로 식용, 민간치료 및 약용으로 이용되어진 진달래는 상기 언급된 보고 내용에서 확인할 수 있듯 꽃, 잎, 줄기 등에서 분리된 성분이 테르페노이드(terpenoid) 및 플라보노이드(flavonoids)로 성분 연구가 한정되어져 있으며, 활성 연구도 꽃, 줄기에 대한 몇 편의 연구가 보고되었을 뿐 진달래 뿌리에 대한 활성연구는 미흡한 실정이다.

[0009] 아토피라는 용어는 어원상 "이상한" 또는 "부적절한"이란 의미를 갖는 용어이다. 아토피성 피부염은 대부분 유아기나 소아 때 발생하여 호전과 악화를 반복하는 비교적 흔한 만성 염증성 피부질환으로, 아토피의 개인 또는 가족력, 심한 가려움증 및 습진의 3가지 특징으로 진단할 수 있으며 감염, 정신적인 스트레스, 계절과 기후변화, 자극 및 알레르기에 의해 악화될 수 있다.

[0010] 아토피 피부염의 병인론은 아직 확실히 밝혀 있지 않지만, 현재까지의 연구에 의하면 IgE 항체의 증가에 따른 과감작 반응에 의하거나, 세포매개성 면역기능의 저하로 나타나는 T 림프구의 불균열 분화에 의한 기능적 결여, 피부에 존재하는 아드레날린 수용체의 차단 등이 발병의 원인이라는 설 등이 있다. 따라서, 아토피 피부염은 면역학적인 이상이 관여하는 유전적인 질환으로 생각되고 있다.

[0011] 아토피성 피부염의 치료 및 관리를 위해, 대부분의 피부과 진료 시 피부 표면의 수분을 유지시켜주는 보습제와 함께 염증반응을 호전시키기 위한 스테로이드 호르몬 즉, 국소 부신피질호르몬 제제를 동시에 처방하는 하는 것이 일반적이다. 하지만, 국소 부신피질호르몬을 장기간 사용하는 경우, 피부 위축, 혈관 확장, 색소 탈실 및 팽창 선조의 발생 등 다양한 피부 부작용을 야기 시킨다는 문제점이 있다. 따라서, 이러한 부작용을 나타내지 않으면서, 항염증 효능을 보유하는 아토피 치료용 원료나 제약의 개발 필요성이 꾸준히 대두되고 있는 상황이다.

[0012] 한편, 대한민국 공개특허 제2008-0057414호에서는 진달래 뿌리 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 자극 완화용 화장료 조성물이 개시되어 있으나, 단일 화합물 수준이 아닌 추출물 수준에서의 효과만을 개시하고 있고, 대한민국 등록특허 제10-0776695호에서도 진달래 추출물을 유효성분으로 하는 아토피성 피부염 개선용 화장료 조성물에 대해 개시되어 있으나, 역시 단일 화합물 수준이 아닌 추출물 수준에서의 효과만이 개시되어 있다. 지금까지 아토피성 피부염 치료 활성을 갖는 진달래 추출물로부터 분리된 화합물에 대한 연구는 심도있게 진행되어 있지 않은 실정이다.

[0013] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

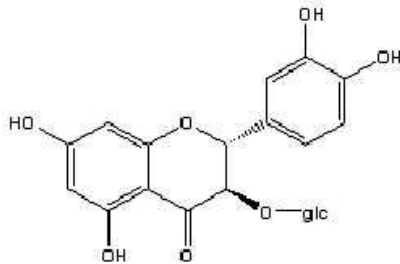
[0014] 본 발명자들은 진달래 뿌리 추출물로부터 아토피성 피부염 치료 활성을 갖는 화합물을 분리하여 그 효능을 확인하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 플라보노이드계 화합물인 택시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O- β -D-Glucopyranoside)가 아토피 피부염 유발 Nc/Nga 마우스를 사용한 실험 및 다양한 인 비보(in vivo) 실험에서 매우 우수한 아토피성 피부염 치료 또는 개선 효능을 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 택시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0016] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하기 화학식 1로 표시되는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 아토피성 피부염 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.



[0018] [화학식 1]

[0019] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 화학식 1로 표시되는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 화장품학적 유효량; 및 (b) 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 아토피성 피부염 개선용 화장품학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명자들은 진달래 뿌리 추출물로부터 아토피성 피부염 치료 활성을 갖는 화합물을 분리하여 그 효능을 확인하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 플라보노이드계 화합물인 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)가 아토피 피부염 유발 Nc/Nga 마우스를 사용한 실험 및 다양한 인 비보(in vivo) 실험에서 매우 우수한 아토피성 피부염 치료 또는 개선 효능을 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 포함되는 화학식 1으로 표시되는 화합물 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 진달래의 뿌리로부터의 추출물로부터 아토피성 피부염의 치료 활성이 있는 화합물을 활성 추적 분리법에 의해 분리하여 동정한 화합물이다.

[0023] 본 발명의 화합물 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 천연추출물로부터 분리된 화합물이므로 인체에 부작용이 없는 안전한 성분이다.

[0024] 본 발명의 진달래 뿌리 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.

[0025] 본 발명의 진달래 뿌리 추출물을 분리하기 위한 추출 용매로는 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있는데, 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출되는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 아토피성 피부염의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100 mg/kg(체중)이다.

[0028] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로

도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물이 아토피성 피부염의 치료를 위해 적용되는 점을 감안하면, 조성물의 투여는 피부에 국소적으로 도포되어 이루어지는 것이 바람직하다.

- [0029] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 화학식 1의 화합물의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 약제학적 조성물은 피부외용 제형을 갖는다. 피부외용 제형은 특별히 한정되지 않으며 바람직하게는 파우더, 젤, 연고, 크림, 액체 또는 에어로졸 제형이다.
- [0032] 본 발명의 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 아토피성 피부염 개선용 화장품학적 조성물에 유효성분으로 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "화장품학적 유효량"은 상술한 본 발명의 화합물이 아토피성 피부염 개선 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0037] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분과 담체 성분 이외에, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 화합물 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 아토피성 피부염 개선용 기능성 식품 조성물에서 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서의 택시폴

린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물은 아토피성 피부염의 증상을 개선하는데 이용된다. 본 명세서에서 용어 "아토피성 피부염의 증상의 개선"은 아토피성 피부염의 치료, 경감 및 완화를 모두 포괄하는 의미를 갖는다.

[0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0044] (i) 본 발명의 조성물의 유효성분인 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 아토피성 피부염의 치료 활성을 갖는 성분이다.

[0045] (ii) 본 발명 조성물의 유효성분인 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 아토피성 피부염 동물모델에서 아토피성 피부염의 현저한 치료효능을 보였다.

[0046] (iii) 유효성분 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 동물모델의 혈액내에서 IL-4, 5, 13의 수준은 증가시킨 반면, IL-10의 수준은 감소시켰다.

[0047] (iv) 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 항미생물 작용을 하는 펩타이드인 beta-defensin MBD-1, 2, 3의 발현을 강하게 증가시켰고, 반면, COX-2 및 iNOS의 발현은 억제하였다.

효 과

[0048] 본 발명은 진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물의 유효성분인 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 호산성백혈구(eosinophile)의 수를 현저히 감소시키고, IL-4, 5, 13의 수준을 감소시키는 반면, IL-10의 수준을 증가시키며, MBD-1, 2, 3의 발현을 촉진하고, COX-2 및 iNOS의 발현은 강하게 억제하는 효능을 가져, 아토피성 피부염의 면역조절 치료제로 개발될 수 있다. 또한 본 발명의 화합물은 진달래 뿌리 추출물로부터 분리 정제된 것으로 인체에 매우 안전하다.

[0049]

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0051] **실시예**

[0052] **실험방법**

[0053] **1. 실험재료**

[0054] 본 발명의 실험에 사용한 진달래(*Rhododendron mucronulatum*) 뿌리는 2007년 8월 경남 거창군에서 채집하여 식물학적 감정을 거친 후 사용하였다.

[0055] **2. 기기 및 시약**

[0056] 본 발명의 실험에 사용한 기기 및 시약은 다음의 표 1에 정리하였다.

[0057] [표 1] 본 발명의 실험에 사용한 기기 및 시약

Balance	Sartorius AC211S (Germany)
Centrifuge	Eppendorff 5415D (Germany)
Liquid chromatography mass spectrometer	API 3000 triple quadrupole liquid chromatography mass spectrometry (Canada)

[0058]

¹ H-NMR spectrometer	Varian Gemini 2000, 300MHz (USA) Bruker AMX-500, 500MHz (Germany) Solvent: DMSO- <i>d</i> ₆ , D ₂ O, Acetone- <i>d</i> ₆ Internal standard: TMS
¹³ C-NMR spectrometer	Varian Gemini 2000, 75MHz (USA) Bruker AMX-500, 125MHz (Germany) Solvent : DMSO- <i>d</i> ₆ , D ₂ O, Acetone- <i>d</i> ₆ Internal standard : TMS
TLC Adsorbent	Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Merck, Germany)
TLC Solvent(v/v)	CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O = 70 : 30 : 4 CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O = 6 : 4 : 1 Benzene : Ethylformate : Formic acid = 1 : 7 : 1
TLC Detection	Ethanolic-FeCl ₃ solution 10%-H ₂ SO ₄ in ethanol (heating) UV-lamp (254nm)
Gels	Sephadex LH-20 (25-100μm, Pharmacia, Sweden) MCI gel CHP 20P (75-150μ. Mitsubishi. Japan) YMC-gel ODS-A (230/70, 400/230, 500/400 mesh, YMC. Japan)
Low pressure liquid column chromatography	pump: Gilson minipuls 3 detector: Gilson 112 UV/VIS (254nm) gel: YMC-gel ODS-A (500/400 mesh, YMC Co., Japan) data system: Autochro-Win 3.0 plus (Young-lin Co., Korea)

[0059]

[0060]

3. 추출물의 제조 및 활성 성분의 분리

[0061]

음건한 진달래 뿌리(3.2 kg)를 80% 아세톤(acetone)으로 실온에서 24 시간 동안 3회 추출하여 여과 후 그 추출액을 감압 농축하여 추출물(276.2g)을 얻었다. 이 추출물을 물(H₂O)에 현탁하여 감압 여과한 후 수용성 부분에 대하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 실시하였다. 용매는 물에서부터 메탄올을 10%씩 올려 100% 까지 농도를 높였으며, TLC 방법으로 확인하여 총 4개의 서브 분획(subfraction)으로 나누었다.

[0062]

활성추적법을 사용하여 아토피성 피부염 치료 활성을 갖는 화합물을 동정하였다. 활성추적방법으로는 자유 라디칼(Free radical) 소거능을 DPPH 방법으로 측정하였으며 양성대조군으로는 자유 라디칼 소거능이 우수한 것으로 잘 알려진 아스코르브산(L-Ascorbic acid)를 사용하였다. 일반적으로 항산화 효과는 NF-κB의 활성화, AP-1의 전사, iNOS의 발현 등 염증 반응과 관련된 반응성 산소종 (ROS, Reactive oxygen species)를 제거해 주는 효과로서 항염증 반응의 중요한 메커니즘으로 알려져 있으므로 활성추적 방법으로 항산화 효과를 측정하였다.

[0063]

분획 수준에서 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드가 포함된 분획 2 (Fr. 2)(IC₅₀ = 38.1 ug/ml)에서 DPPH 활성은 양성대조군 아스코르브산(L-Ascorbic acid) (IC₅₀=20.9 ug/ml)와 비교하였을때 비교적 우수한 활성을 나타내었다. 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 TLC 반응을 나타낸 분획 2 (Fr. 2)에 대해서 MCI-gel CHP 20P (20→80% methanol, gradient system)와 low pressure liquid column chromatography (0% MeOH →100% MeOH, gradient system)를 실시하여 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 5700 mg을 얻었다.

[0064]

택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 단일 화합물 수준에서 DPPH 활성을 측정하였다. DPPH 활성 측정 결과, 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(IC₅₀ = 549.75 uM)가 양성대조군인 아스코르브산(L-Ascorbic acid)(IC₅₀ = 525.15 uM)와 비교 하였을때 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

[0065]

도 1a에 진달래 뿌리로부터 추출물을 얻고 이 추출물로부터 활성성분을 분리하는 과정을 나타내었다. 도 1b는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드에 HPLC 분석 크로마토그래피를 보여준다.

4. 활성성분의 구조동정

타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드는 연 노란색의 무정형 분말이며, TLC에서 UV lamp 254 nm 파장에서 흡수에 의한 스팟(spot)을 나타내었고, FeCl₃ 분무에 의해서 양성으로, 10% H₂SO₄를 분무하고 가열시 노란색으로 발색한다. Negative LC-MS spectrum에서 m/z 475.5 [M-H]⁻의 피크(peak)를 나타내었다(도 2a).

¹H-NMR 스펙트럼의 δ 11.67 (1H, s)에서 플라보노이드(flavonoid)의 전형적인 5-OH 시그널(signal)이 나타났고, δ 6.69~6.87 (3H, br. d, H-2', 5', 6')에서 B ring의 ABX type인 3,4-디하이드록실레이션(dihydroxylation) 패턴(pattern)의 구조로 추정되는 피크들이 넓게 나타났으며, δ 5.93 (2H, s, H-6 및 H-8), 5.39 (1H, d, J=8.4 Hz, H-2)와 4.73 (1H, d, J=8.4 Hz, H-3)을 통해 플라바노놀(flavanonol) 구조로 추정하였고, δ 4.68 (1H, d, J=7.5 Hz, glc H-1)에서 당의 어노메릭 수소(anomeric proton)가 나타나, 3', 4', 5, 7-테트라하이드록시 플라바노놀 글루코사이드(3', 4', 5, 7-tetrahydroxy flavanonol glucoside)로 추정하였다(도 2b).

¹³C-NMR 스펙트럼에서는 모핵인 타시폴린(taxifolin)과 비교하였을 때 C-3 이 3.4 ppm 업필드 천이(upfield shift)되고, C-2가 1.9 ppm 다운필드 천이(downfield shift) 되는 것으로 보아 C-3에 당이 붙었음을 알 수 있었고, 1 몰(mole)의 글루코오스(glucose)에 의한 피크가 δ 102.6, 71.9, 75.4, 69.9, 75.3, 62.1에서 나타나 이는 3', 4', 5, 7 테트라하이드록시 플라노놀 글루코시드(3', 4', 5, 7 tetrahydroxy flavanonol glucoside)로 추정되었으며, 문헌의 데이터와 비교하여 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(taxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside)로 최종 확인, 동정하였다.

5. 아토피성 피부염 동물 모델

진달래 뿌리 추출물로부터 분리한 활성성분 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 아토피성 피부염 치료 활성을 실험하기 위해 공지된 아토피성 피부염 동물 모델인 NC/Nga 마우스를 사용하였다.

6. 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 포함 제형의 제조

6-1. HPLC 분석 조건 및 검량선의 작성

진달래 뿌리 추출물로부터 분리, 정제한 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(taxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside)를 증류수에 용해시켜 스탁용액(stock solution)(100 μg/ml)을 조제하고, 이를 희석하여 1, 5, 10, 25, 50 μg/ml의 농도의 표준용액을 조제하였다. 이동상은 아세트니트릴과 0.3% 초산액의 혼합액 (20 : 80 v/v)을 사용하였으며, 검출파장은 291 nm, 주입용량은 20 μl, 유속은 1 ml/min으로 하였다. 이 조건에서 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 보유시간(retention time)은 3.67 분이였다. HPLC 분석을 통해, 각 농도와 피크영역(peak area)를 바탕으로 검량선을 작성하였으며, 농도범위 1-50 μg/ml에서 양호한 직선성(R²=0.999)을 나타내었다.

6-2. 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 주사제형의 제조

피하주사(subcutaneous injection)를 통한 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 효능 평가 시험을 위해 0.1, 1.0%(w/v) 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 포함하는 수성 주사제를 표 1의 구성에 따라 제조하였다. 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 10, 100 mg을 각각 칭량하여 적당량의 주사용 멸균 증류수에 각각 용해시켰다. 이어서 NaOH 용액을 소량 가하여 pH를 6.5-7.4 사이로 보정하고 주사용 멸균 증류수를 가하여 최종 10 ml로 제조하였다. 약물의 함량은 HPLC 분석법을 통해 확인하였다.

[표 1] 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 포함 수성 주사제 조성

성분	함유량(%)
타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드	0.1-1.0
NaOH	q.s.
주사용수	q.s.
전체	100

6-3. 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 연고제형의 제조

타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 함량은 1%(w/w)로 고정하였다. O/W 크림 연고를 제조하였다. O/W 크림의 조성은 표 2의 성분비율로 제조하였다. 폴리글리세릴-3-메틸글루코오스디스테아레이트, 스테아린산, 세탄올 및 유동 파라핀을 조성에 따라 첨가하고, 65℃ 에서 가온하여 유상을 제조한 후, 글리세린, 정제수, 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 넣고 65℃ 에서 가온하여 완전히 용해시켜 수상을 제조하였다. 같은 온도에서 유상을 수상에 가하고 균질기(homogenizer)를 사용하여 수 분간 유화시킨 후 냉각하여 O/W 크림을 제조하였다.

[표 2] 타시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 O/W 크림제형의 조성

성분(Ingredients)	함량(Formulation)(%)
Polyglyceryl-3 methylglucose distearate	3
Stearic acid	5
Cetyl alcohol	2
Mineral oil	7
Glycerin	10
Water	73

7. 호산성 백혈구 계수(Eosinophil Count)

모세관 튜브(Capillary tube)에 마우스 혈액을 채취하고, 마우스 전혈 30 μl에 식염수(saline) 150 μl를 첨가하여 6배 희석하였다. Sysmex XE-2100 hematology analyzer를 이용하여 호산백혈구(eosinophil)를 계수하였다. 호산백혈구의 산출은 말초혈액 도말 슬라이드를 제작하고, Wright-Giemsa 염색을 한 후 200개의 백혈구를 감별 계산하여 행하였다.

8. ELISA 측정법

혈청은 대동맥의 혈액을 채취하여 준비하였다. 비장(spleen)으로부터 림프구(lymphocyte)를 채취한 후 이를 배양하였다. 간략하게 설명하면, 비장을 적출하여 분쇄한 후 메쉬(mesh)를 통과시켜 단일 세포로 분리하였다. 적혈구 용해 완충액(RBC lysis buffer)를 첨가하여 적혈구를 용해시킨 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 1×10^6 세포를 RPMI 배지(1 ml)에서 24 웰 플레이트에서 배양하였다. 3일 후에 배양된 세포를 포함하는 배지를 사용하여 실험을 진행하였다.

9. Real-time PCR의 수행

Real-time PCR 실험에 사용된 프라이머는 다음과 같다.

프라이머	서열
MBD-1 (362bp)	5'-ACA TAA AGG ACG AGC GAT GG-3' (sense)
	5'-TGC AGA TGG GGT GTC ATA GA-3' (anti-sense)
MBD-2 (199bp)	5'-GCC ATG AGG ACT CTC TGC TC-3' (sense)
	5'-AGG GGT TCT TCT CTG GGA AA-3 (anti-sense)
MBD-3 (169bp)	5'-TCA GAT TGG CAG TTG TGG AG-3' (sense)
	5'-GCT AGG GAG CAC TTG TTT GC-3' (anti-sense)
iNOS (203bp)	5'-CTG ATG CCT CTT CCA GGT GT-3' (sense)
	5'-GAG GGA GCC CTT TCT GAA TC-3' (anti-sense)
COX-2 (593bp)	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3' (sense)
	5'-GGT GCT GCT TGT TAG GAG GTC AAG TAA AGG GC-3' (anti-sense)
GAPDH (598bp)	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3' (sense)
	5'-CCC TGT TGC TGT AGC CGT AT-3' (anti-sense)

총 RNA(total RNA)는 다음의 단계를 통해 제조하였다. 조직에 TRIzol 시약 1ml을 처리하고 클로로포름(Chloroform) 200μl를 넣고 4℃에서 15 분간 12,000 rpm에서 원심분리(centrifugation) 한 후, 상층액을 새로운 튜브에 넣고 1/2의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가한 후 4℃에서 15분간 12,000rpm에서 다시 원심분리하였다. 이어서, 상층액을 버린후 분리한 총 RNA에 DEPC water을 첨가하였다.

cDNA는 다음의 단계를 거쳐 제조하였다. 제조한 총 RNA를 DEPC-DW 30 μl에 용해시키고 3 μg의 총 세포 RNA를, 1 μl의 역전사효소(reverse transcriptase), 2 μl의 10X 완충액, 2 μl의 10mM dNTP (dNTP mix), 1 μl의

oligo dT primer, 0.5 μ l의 RNase 억제제, 4 μ l의 25 mM MgCl₂를 포함하는 20 μ l 부피의 반응혼합액에서 역전사 반응을 수행하였다.

[0093] 제조한 cDNA 각 2 μ l를 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 반응은 59℃에서 1분을 행하고, 94℃에서 1분의 45 사이클 행한 후, 최종 연장(extension)단계는 72℃에서 1 분간 행하였다.

[0094] 10. 웨스턴 블로팅 (Western Blotting)

[0095] 피부세포를 포함하는 피부 조직을 용해시키고 이를 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후 상등액을 취하여 이에 대해 15% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 행하였다. MBD-1,2,3, COX-2 및 iNOS를 분석하기 위해, 젤 전기영동상에서 분리된 단백질들을 니트로셀룰로오스막으로 이동시켰고 1차 항체 (1:1000 in BSA, goat polyclonal anti-MBD(mouse beta defensin) 1, 2, or 3 antibody, rabbit polyclonal anti-COX-2 antibody, rabbit polyclonal iNOS antibody; Chemicon, CA, USA) 및 2차 항체 (1:2000 in BSA, anti-goat IgG, anti-rabbit IgG; Chemicon, CA, USA)와 순차적으로 반응시켰다.

[0097] 실험결과

[0098] 1. 동물모델에서의 아토피성 피부염의 치료 효과

[0099] 아토피성 피부염에 대한 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드의 치료 효능을 조사하기 위해 아토피성 피부염을 발생시킨 동물모델 NC/Nga 마우스에 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 4주 동안 복강내 투여 또는 도포를 행한 후에, 아토피성 피부염 발생 부위의 외관 관찰에 의해 피부염의 호전여부를 검사하였다.

[0100] 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 투여하고 도포한 그룹에서 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 투여하지 않은 음성대조군과 비교하여 아토피성 피부염이 호전되는 결과를 얻었다. 즉, 주사제 형태로 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드 0.1% 및 1% 투여한 경우(도 3b, 도 3c)가 음성대조군인 PBS를 주사한 경우(도 3a)에 비해 아토피성 피부염이 현저히 향상되는 결과를 확인하였다.

[0101] 또한, 연고제 형태로 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드 0.1% 및 1%를 피부에 도포 적용시킨 경우(도 4b)가 음성대조군 바세린(baseline) 도포의 경우(도 4a)에 비해 아토피성 피부염이 현저히 향상되는 결과를 얻었다.

[0102] 2. 호산성백혈구(eosinophile) 수 측정

[0103] 아토피성 피부염을 발생시킨 동물모델 NC/Nga 마우스에 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 4주 동안 복강내 투여 또는 도포 전 및 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 호산성백혈구(eosinophile)의 수를 측정하였다. 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드의 투여 전에 비해, 투여 후에 호산성 백혈구의 수가 급격히 줄어든 것을 확인하였다(도 5 참조).

[0105] 3. 인터루킨(interleukin)-4, 5, 10, 13의 수준 측정

[0106] 아토피성 피부염을 발생시킨 동물모델 NC/Nga 마우스에 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 4주 동안 복강내 투여 또는 도포한 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청 및 비장세포(splenocyte)에서의 인터루킨 IL-4, 5, 10 및 13의 수준을 측정하였다.

[0107] 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 투여한 그룹에서 IL-4, 5, 및 13의 수준이 음성대조군에 비해 낮게 측정되었다(도 6, 7, 및 9 참조). 그러나, IL-10의 경우 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 투여한 그룹이 음성대조군에 비해 IL-10의 수준이 증가하였다.

[0108] IL-4는 활성화된 B 세포 및 T 세포의 증식을 촉진하며 초기(naive) T 세포(CD4+ T 세포)의 Th2 세포로의 분화를 촉진하는 작용을 한다. 아토피성 피부염 환자에서 IL-4 수준은 증가하는데, 본 발명의 활성성분 타시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드는 IL-4 수준을 감소시킴으로써 알러지(allergy) 반응을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0109] IL-5는 B 세포의 성장을 자극하여 면역글로블린의 분비를 촉진하는 작용을 하며, 호산성백혈구(eosinophil)의 활성화에 핵심 매개자로 역할하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 타시폴린 3-O- β -D-글루코피

라노사이드는 IL-5 수준을 감소시킴으로써 아토피성 피부염 환자에서 높게 나타나는 호산성백혈구의 수를 감소시킬 수 있는 효과를 가짐을 확인하였다.

[0110] IL-10은 인간 사이토카인(cytokine) 합성 억제자(human cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF)로도 알려진 항-염증성 사이토카인이며, 대식세포(macrophage) 및 T 헬퍼 타입 1(Th 1) 세포에서 만들어지는 IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF α 및 GM-CSF와 같은 친-염증 사이토카인의 합성을 억제한다. 본 발명의 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드는 IL-10 수준을 증가시킴으로써 항 염증 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0111] IL-13은 다양한 세포 타입에서 분비되며 특히 T 헬퍼 타입 2 (Th2) 세포에서 주로 분비되며, 알러지성 염증 질환에서 중요한 매개자로 작용한다. 본 발명의 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드는 IL-13 수준을 감소시킴으로써 아토피성 피부염과 같은 알러지성 염증 질환의 치료 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0112] 4. Real time PCR에 의한 MBD-1, 2, 3, COX-2, iNOS 발현양 측정

[0113] 아토피성 피부염을 발생시킨 동물모델 NC/Nga 마우스에 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 4주 동안 복강내 투여 및 도포한 후의 마우스 피부 세포를 채취하여 MBD-1, 2, 3, COX-2, iNOS 의 발현 수준을 Real time PCR을 이용하여 측정함으로써 이 화합물의 면역반응 조절 효능을 확인하였다.

[0114] MBD (mouse beta-defensin) 표피, 기관지 및 비뇨생식기 조직의 상피세포에서 주로 발현되고 비만세포(mast cell)를 자극하여 히스타민(histamin)과 프로스타글란딘 D2(prostaglandin D2)의 방출을 촉진하며, 상피에서 세균의 번식을 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. COX (Cyclooxygenase)는 프로스타노이드(prostanoid)라고 불리는 생물학적 매개물질의 형성에 관여하는 효소이다. COX의 발현을 억제하면 염증과 통증으로부터 발생하는 증상을 완화시키는 효과를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)는 미생물 침입에 대한 최초의 면역반응에 중요한 역할을 하는 대식세포(macrophage)를 조절하는 NO (nitric oxide)를 생성하는 효소이다.

[0115] 실험결과 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 투여한 마우스의 경우 MBD-1, 2, 3의 발현이 증가되었고(도 10, 11, 12 참조), 반면 COX-2 및 iNOS의 발현은 감소하였음(도 13 및 14 참조)을 확인하였다.

[0116] 5. 웨스턴 블로팅(western blotting)에 의한 MBD-1, 2, 3, COX-2, iNOS 발현양 측정

[0117] 아토피성 피부염을 발생시킨 동물모델 NC/Nga 마우스에 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 4주 동안 복강내 투여 및 도포한 후의 마우스 피부 세포를 채취하여 MBD-1, 2, 3, COX-2, iNOS 의 발현 수준을 웨스턴 블로팅을 이용하여 측정함으로써 이 화합물의 면역반응 조절 효능을 확인하였다.

[0118] Real time PCR에 의한 측정결과와 동일하게, 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드를 투여한 마우스의 경우 MBD-1, 2, 3의 발현이 증가되었고(도 15, 16, 17 참조), 반면 COX-2 및 iNOS의 발현은 감소하였음(도 18 및 19 참조)을 확인하였다.

[0119] 이상의 실험결과에 의해 본 발명 조성물의 유효성분인 탁시폴린 3-O- β -D-글루코피라노사이드는 MBD-1, 2, 3의 발현을 증가시키고 COX-2 및 iNOS의 발현은 감소시킴으로써 아토피성 피부염의 치료 효능을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0120] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0121] 참고문헌

- [0122] 1. 임록재, 조선약용식물지 II - 현대의학 약용식물편, 한국 문화사, 서울, 58-61 (1999).
- [0123] 2. 임록재, 조선약용식물지 III - 현대의학 약용식물편, 한국 문화사, 서울, 151 (1999).
- [0124] 3. 國家中醫藥管理局, 中華本草編纂委員會, 中華本草 6卷, 上海科學技術出版社, 上海, 20-45 (1999).
- [0125] 4. Hiroshi, M., Illustrated medicinal plants of the world in color - 原色牧野和漢藥草大圖鑑, Hokuryukan Co., LTD, Japan, 380 (1988).
- [0126] 5. Harborne, J. B. : Flavonoid patterns and phytochemistry : The genus Rhododendron section vireya. *Phytochemistry*, **25**, 1641-1643 (1986).

- [0127] 6. Cooman, L. D., Everaert, E. S. W., Fache, P., Castele, K.V. and Sumere, C. F., Flavonoid biosynthesis in petals of *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*, **33**, 1419-1426(1993).
- [0128] 7. Hikino, H., Ito, K., Ohta, T. and Takemoto, T., Stereostructure of rhodojaponin I, II, and 3, toxins of *Rhododendron japonicum*, and of asebotoxin 3, toxin of *Pieris japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1078-1079 (1969).
- [0129] 8. Hikino, H., Shoji, N., Koriyama, S., Ohta, T., Hikino, Y. and Tasemoto, T., Stereostructure of *Rhododendron japonicum*, and of Grayanotoxin V, VI and VII, toxins of *Leucothoe grayana*. *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2357-2359 (1970).
- [0130] 9. Sakakibara, J. and Kaiya, T., Terpenoids of *Rhododendron japonicum*. *Phytochemistry*, **22**, 2547-2552 (1983).
- [0131] 10. Li, C. J., Wang, L. Q., Chen, S. N. and Qin, G. W., Diterpenoids from the Fruits of *Rhododendron molle*. *J. Nat. Prod.*, **63** 1214-1217 (2000).
- [0132] 11. Fan, C. Q., Zhao, W. M., Ding, B. Y. and Qin, G. W., Constituents from the leaves of *Rhododendron latoucheae*. *Fitoterapia*, **72**, 449-452 (2001). 12. Bao, G. H., Wang, L. Q., Cheng, K. G., Feng, Y. H., Li, X. Y. and Qin, G. W., Diterpenoid and phenolic glycosides from the roots of *Rhododendron molle*. *Planta Med.*, **69**, 434-439 (2003).
- [0133] 13. Klocke, A. J., Hu, M. Y., Chiu, S. F. and Kubo, I., Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle*. *Phytochemistry*, **30**(6), 797-1800 (1991).
- [0134] 14. Takahashi, H., Hirata, S., Minami, H. and Fukuyama, Y., Triterpene and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*, **56**, 875-879 (2001).
- [0135] 15. Hong, Y. H., Song, M. C., Han, J. T., Jang, T. O., Lee, Y. H., Kim, S. H., Kim, S. A., Park, M. H. and Baek, N. I., Isolation and identification of Terpenoids from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense*. *J. Korean Soc. Agrc. Chem. Biotechnol.*, **46**, 144-149 (2003).
- [0136] 16. Chung, T. Y., Kim, M. A. and Jones, A. D., Antioxidative activity of flavonoids isolated from Jindalrae flowers (*Rhododendron mucronulatum*). *Agrc. Chem. Biotechnol.*, **39**, 320-326 (1996).
- [0137] 17. Chung, T. Y., Kim, M. A. and Jones, A. D., Antioxidative activity of phenolic acids isolated from Jindalrae flowers (*Rhododendron mucronulatum*). *Agrc. Chem. Biotechnol.*, **39**, 506-511 (1996).
- [0138] 18. An, B. J., Lee, C. E., Son, J. H., Lee, J. Y., Choi, G. H. and Park, T. S., Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **48**(3), 280-284 (2005).
- [0139] 19. Lee, J. H., Jeon, W. J., Yoo, E. S., Kim, C. M. and Kwon, Y. S., The chemical constituents and their antioxidant activity of the stem of *Rhododendron mucronulatum*. *Nat. Prod. Sciences*, **11**(2), 97-102 (2005).

도면의 간단한 설명

- [0140] 도 1a는 진달래뿌리 추출물 및 이 추출물로부터 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드(Taxifolin 3-O-β-D-Glucopyranoside)를 분리 정제하는 과정을 도시한 도면이다.
- [0141] 도 1b는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 HPLC (high performance liquid chromatography)의 분석 결과이다.
- [0142] 도 2a는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 LC-MS 스펙트럼이다.
- [0143] 도 2b는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 ¹H-NMR 스펙트럼(300 Mhx, DMSO-d₆)측정 결과이다.
- [0144] 도 2c는 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 ¹³C-NMR 스펙트럼 (300 Mhx, DMSO-d₆)측정 결과이다.

- [0145] 도 3a는 음성대조군으로서 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 PBS를 주사제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0146] 도 3b는 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 0.1%를 주사제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0147] 도 3c는 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 1%를 주사제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0148] 도 3d는 양성대조군으로서 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 덱사메타손(dexamethasone)을 주사제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0149] 도 4a는 음성대조군으로서 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 바세린(baseline)을 도포제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0150] 도 4b는 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드 1%를 도포제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0151] 도 4c는 양성대조군으로서 아토피성 피부염을 유발시킨 NC/Nga 마우스에 프란콜(plancol)을 도포제 형태로 투여한 후에 피부염 치료 효능을 검사한 사진이다.
- [0152] 도 5는 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여하기 전 및 투여한 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 호산성 백혈구(eosinophile)의 수를 측정된 결과를 나타낸다.
- [0153] 도 6은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여하기 전 및 투여한 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청과 림프구에서 IL-4의 발현 수준을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸다.
- [0154] 도 7은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여하기 전 및 투여한 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청과 림프구에서 IL-5의 발현 수준을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸다.
- [0155] 도 8은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여하기 전 및 투여한 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청과 림프구에서 IL-10의 발현 수준을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸다.
- [0156] 도 9은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여하기 전 및 투여한 후의 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청과 림프구에서 IL-13의 발현 수준을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸다.
- [0157] 도 10은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 MBD-1의 발현 수준을 Real-time PCR로 측정된 결과를 보여준다.
- [0158] 도 11은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 MBD-2의 발현 수준을 Real-time PCR로 측정된 결과를 보여준다.
- [0159] 도 12은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 MBD-3의 발현 수준을 Real-time PCR로 측정된 결과를 보여준다.
- [0160] 도 13은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 덱사메타손

(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 COX-2의 발현 수준을 Real-time PCR로 측정한 결과를 보여준다.

[0161] 도 14은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 텍사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 iNOS의 발현 수준을 Real-time PCR로 측정한 결과를 보여준다.

[0162] 도 15은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 텍사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 MBD-1의 발현 수준을 웨스턴 블로팅으로 측정한 결과를 보여준다.

[0163] 도 16은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 텍사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 MBD-2의 발현 수준을 웨스턴 블로팅으로 측정한 결과를 보여준다.

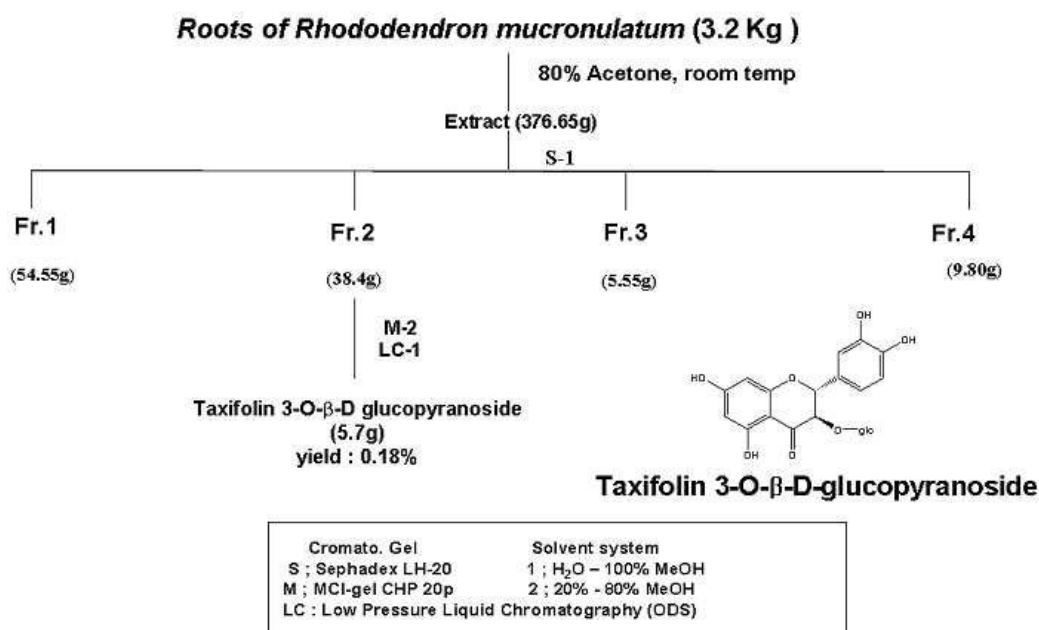
[0164] 도 17은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 텍사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 MBD-3의 발현 수준을 웨스턴 블로팅으로 측정한 결과를 보여준다.

[0165] 도 18은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 텍사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 COX-2의 발현 수준을 웨스턴 블로팅으로 측정한 결과를 보여준다.

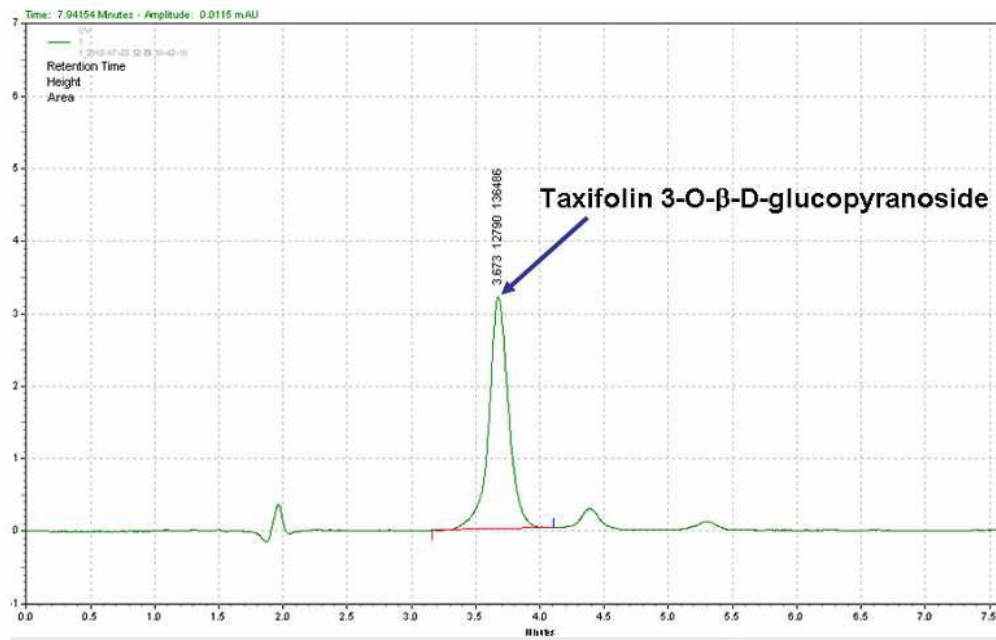
[0166] 도 19은 NC/Nga 마우스에 음성대조군 물질로 PBS 및 바세린(baseline), 양성대조군 물질로 텍사메타손(dexamethasone) 및 프란콜(plancol), 택시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드를 주사제 및 도포제의 형태로 각각 투여한 후의 마우스로부터 피부를 채취하여 iNOS-1의 발현 수준을 웨스턴 블로팅으로 측정한 결과를 보여준다.

도면

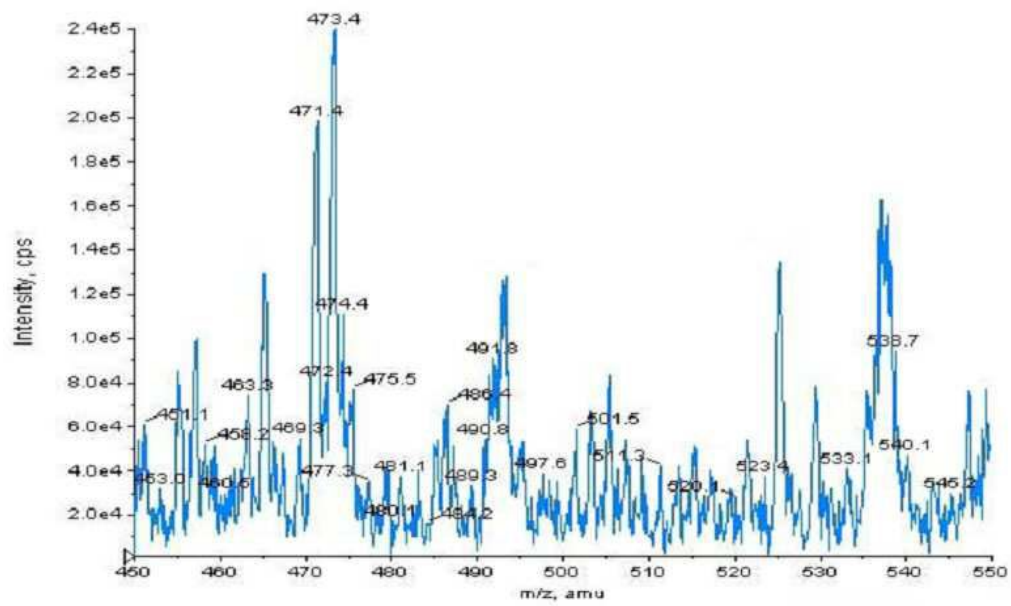
도면1a



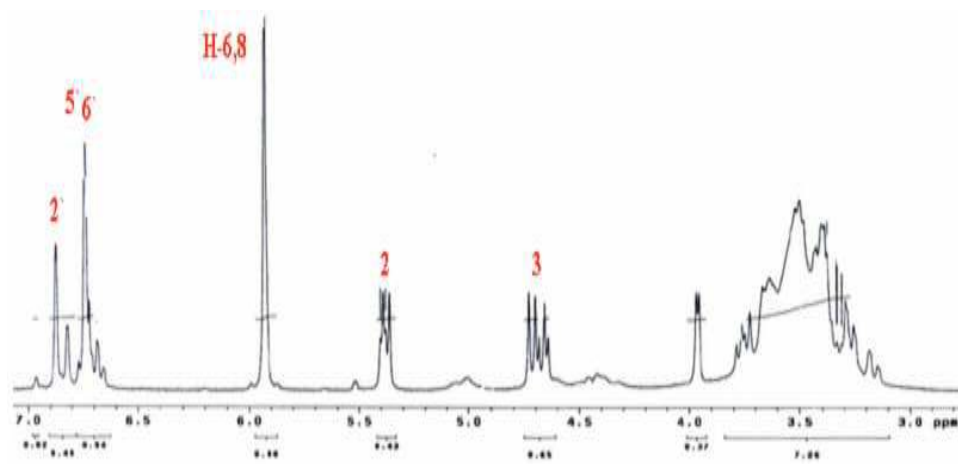
도면1b



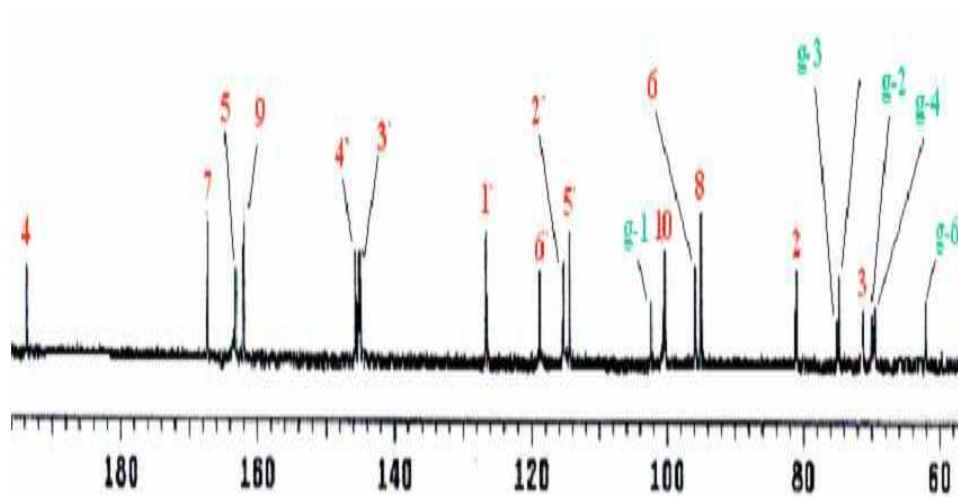
도면2a



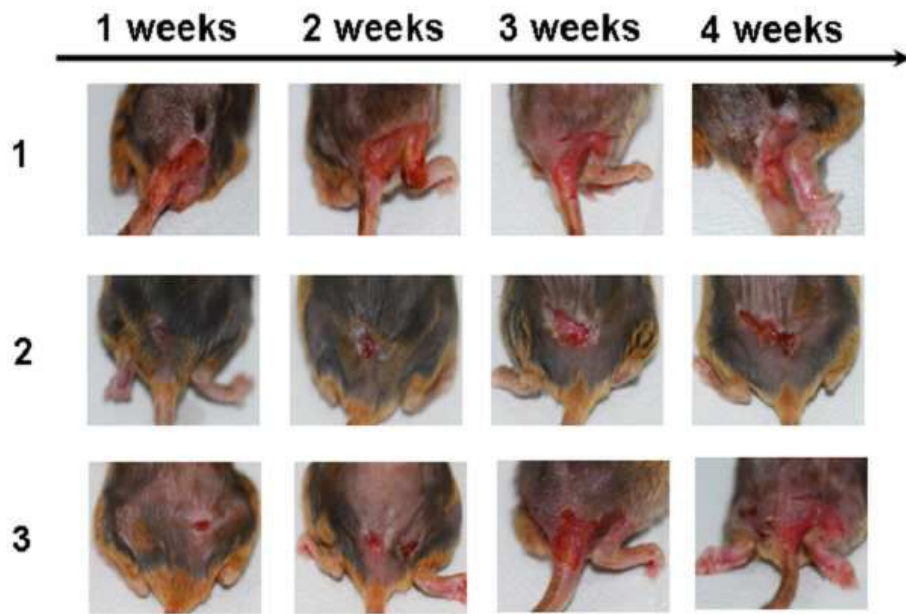
도면2b



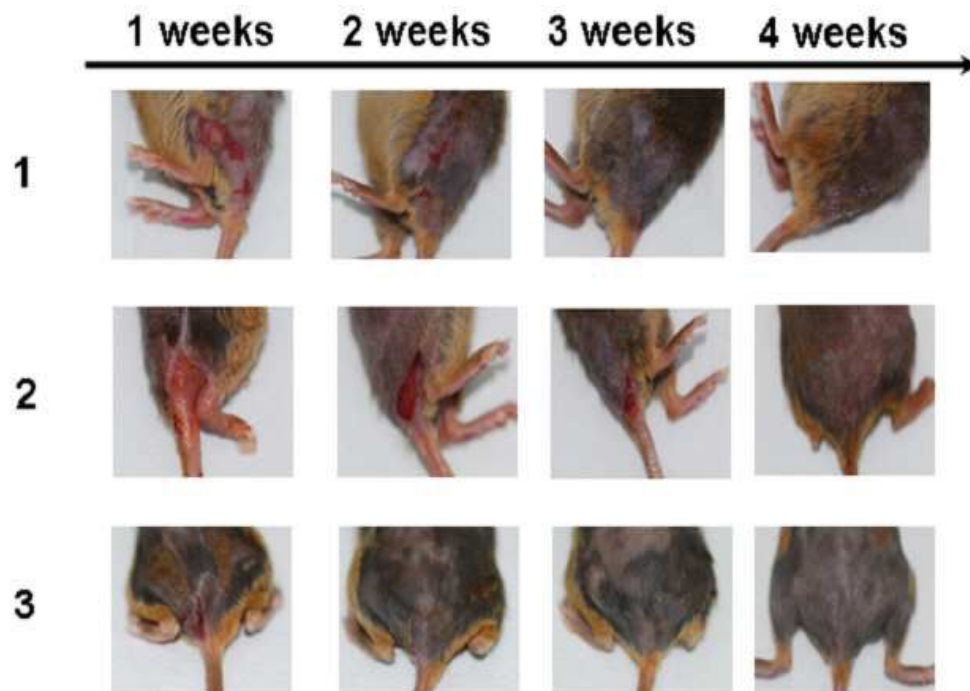
도면2c



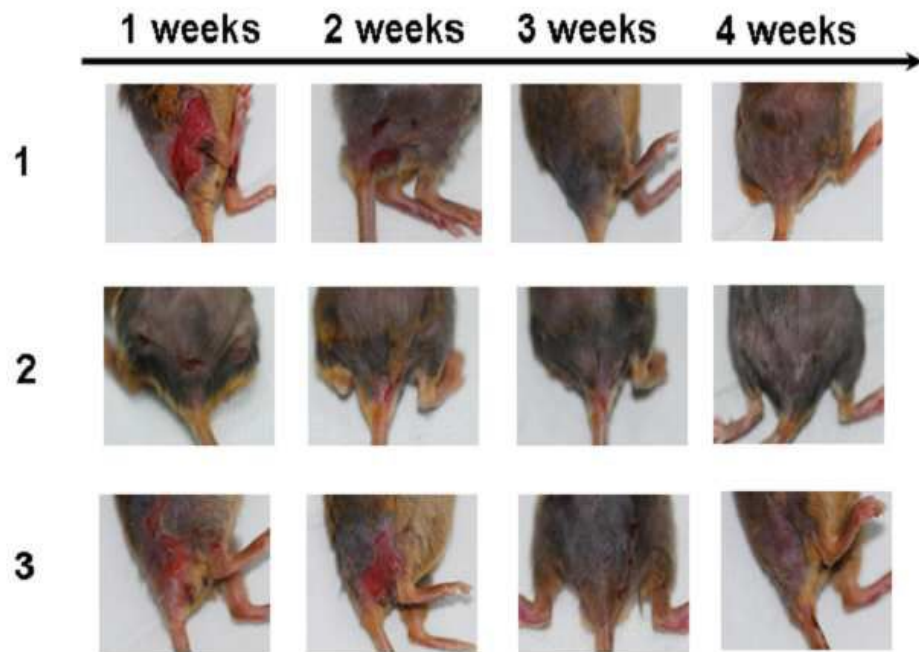
도면3a



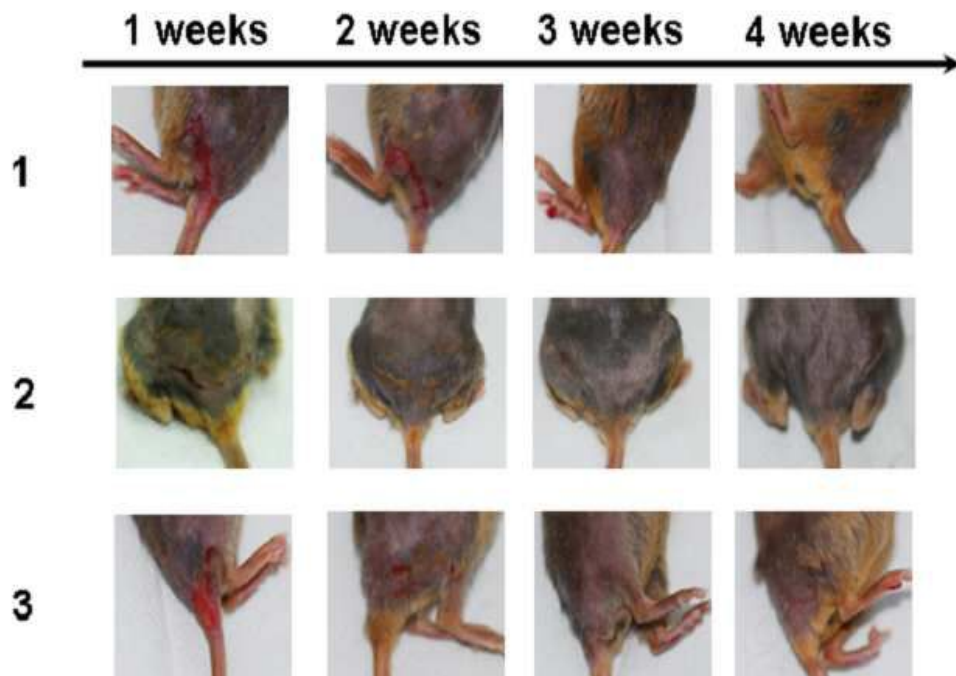
도면3b



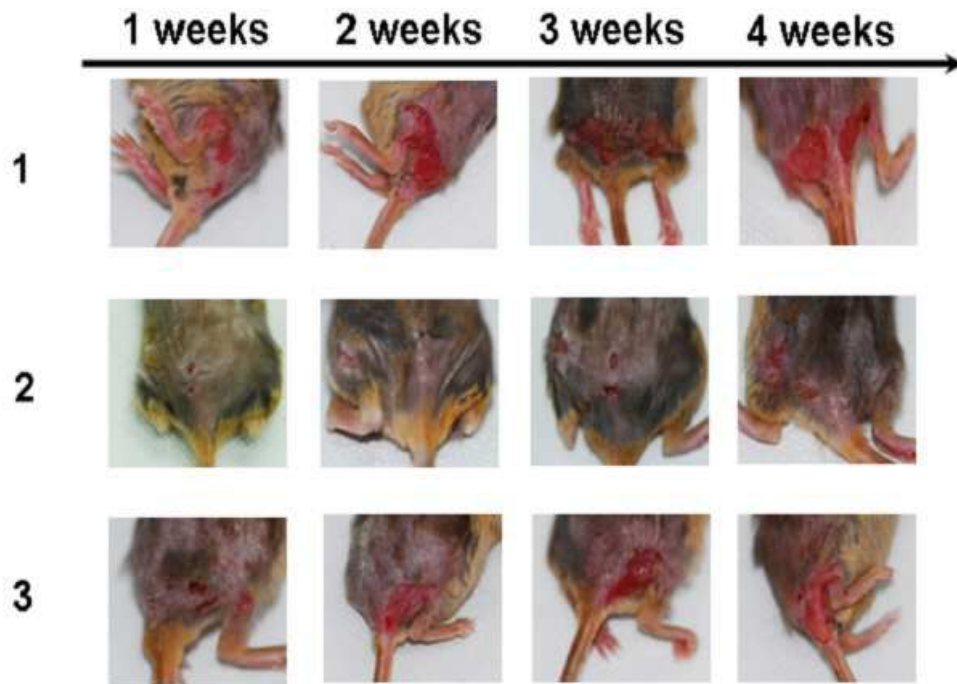
도면3c



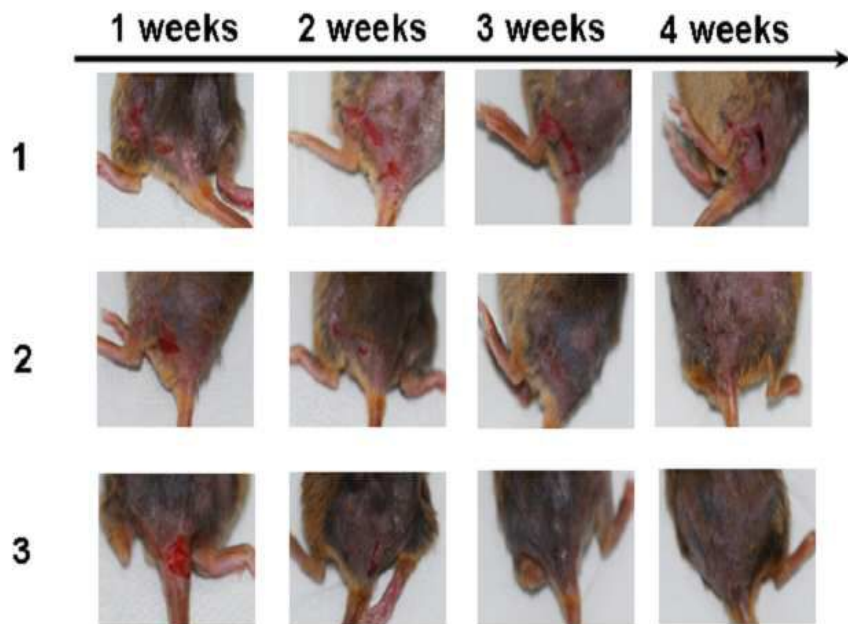
도면3d



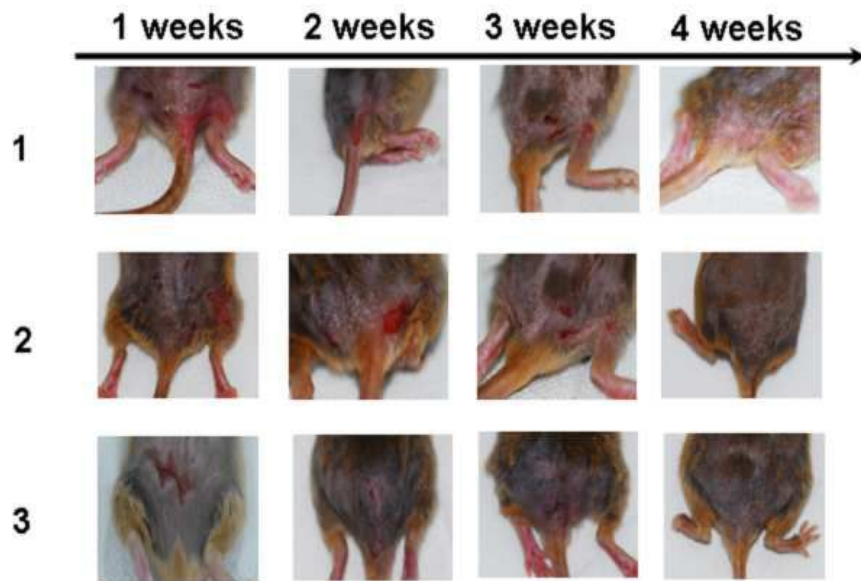
도면4a



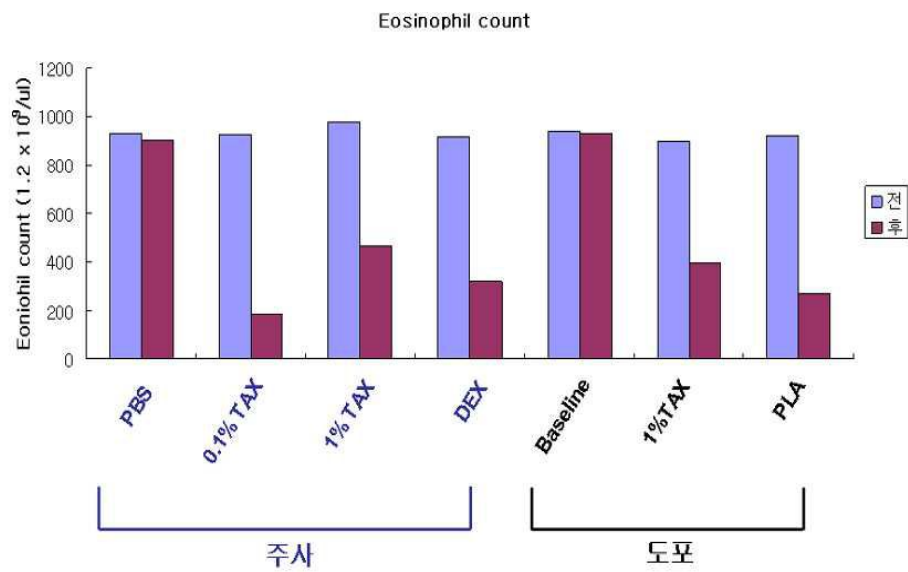
도면4b



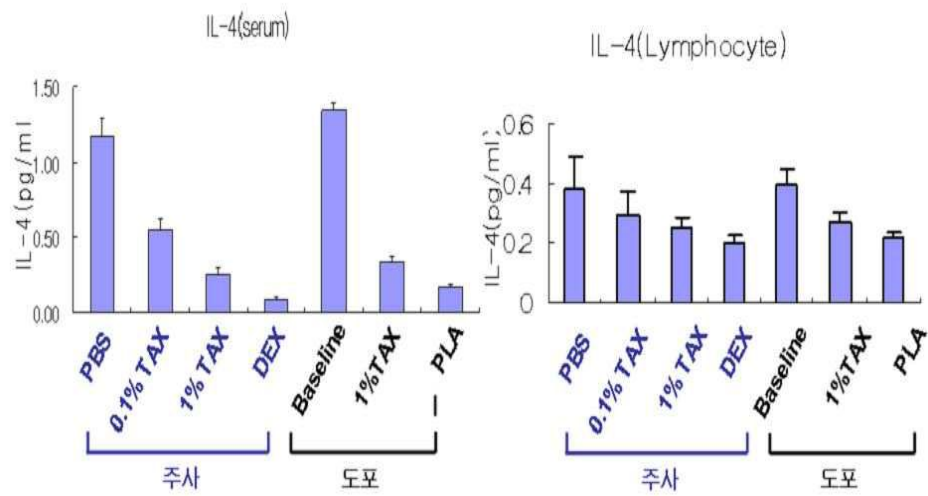
도면4c



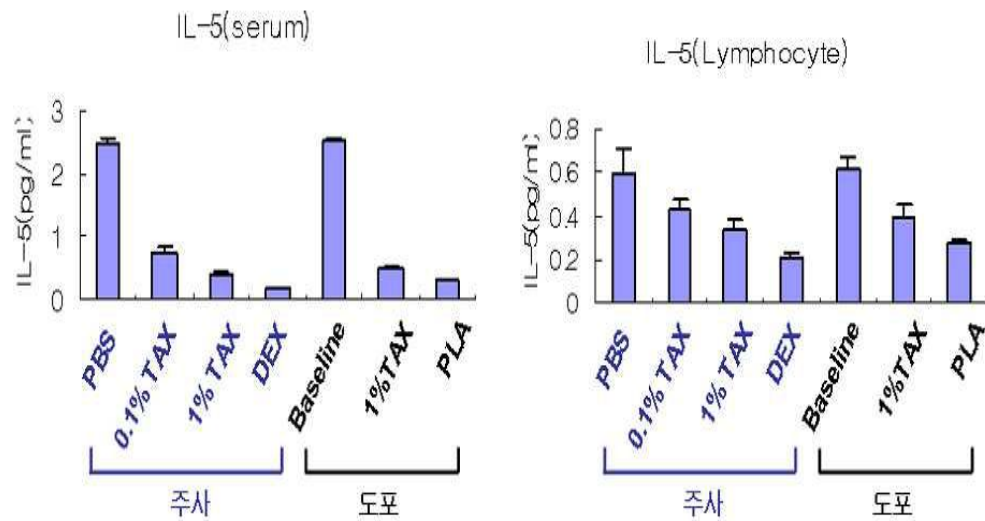
도면5



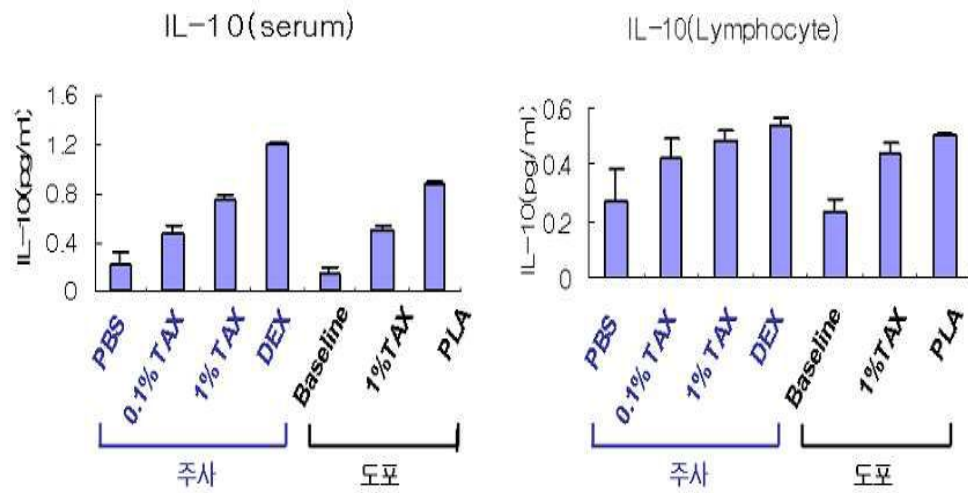
도면6



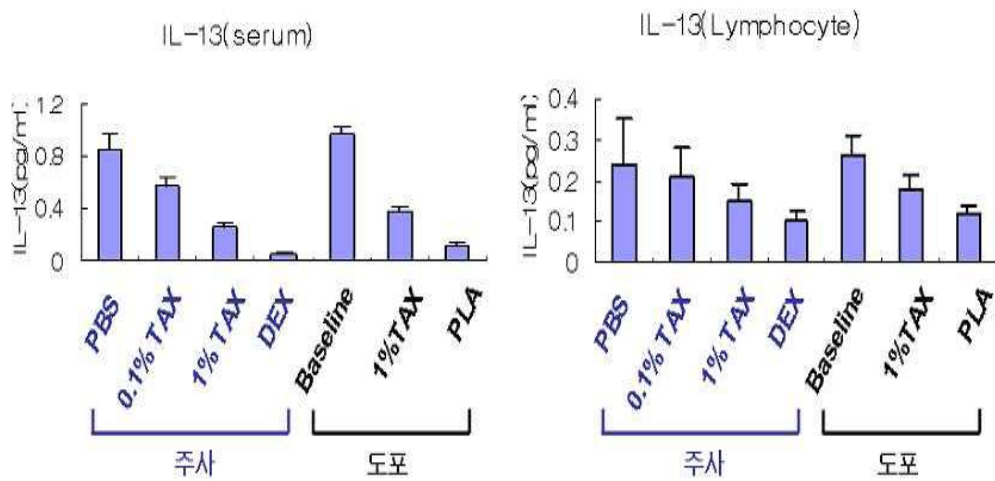
도면7



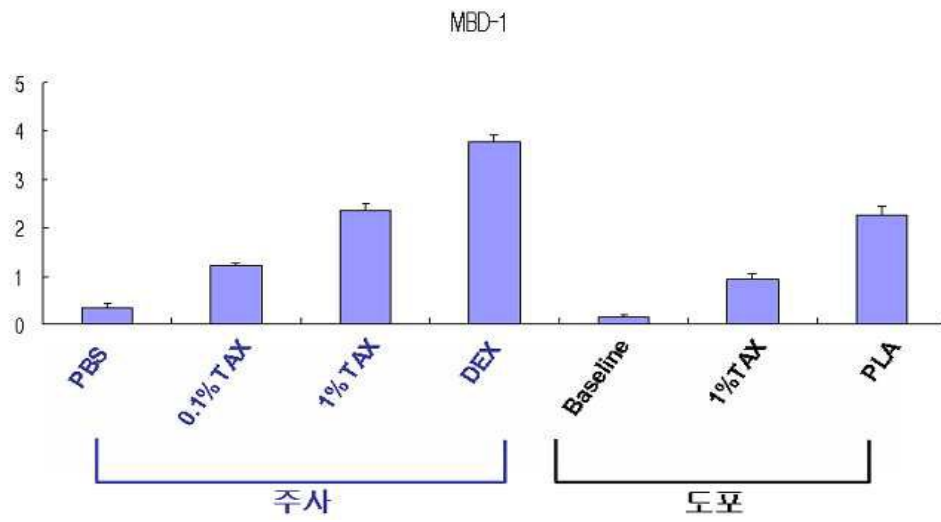
도면8



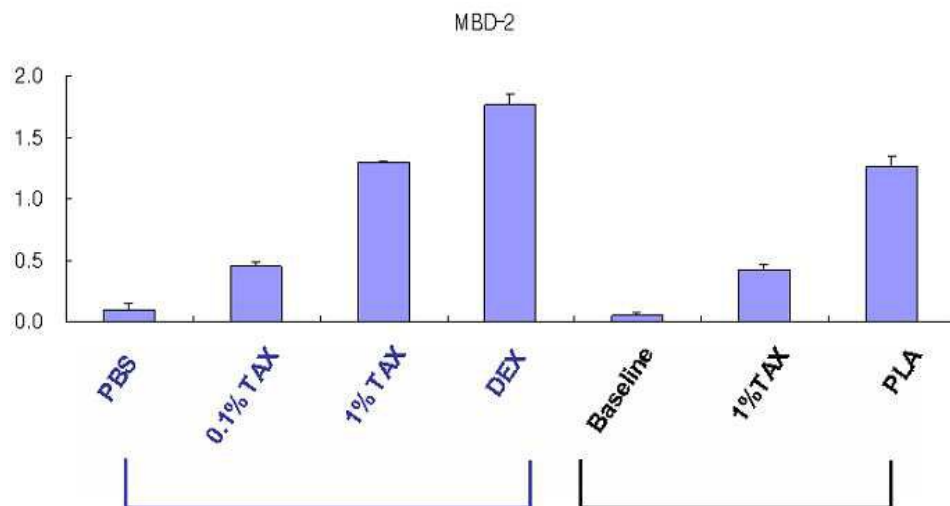
도면9



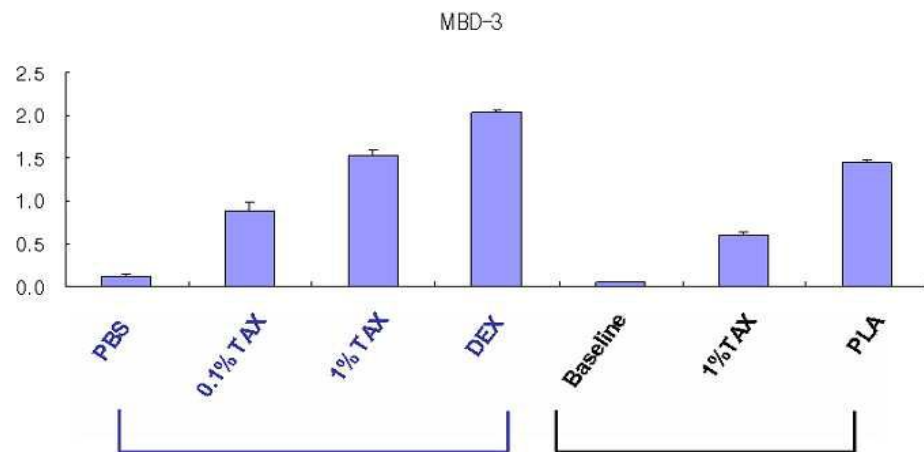
도면10



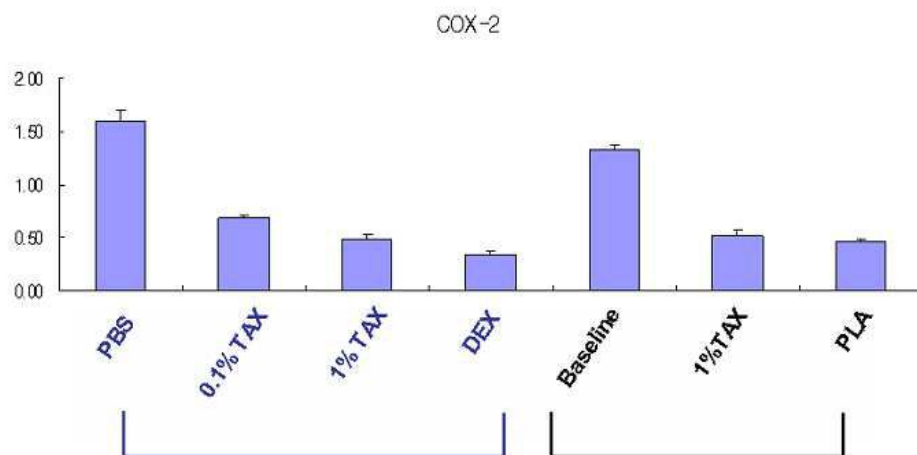
도면11



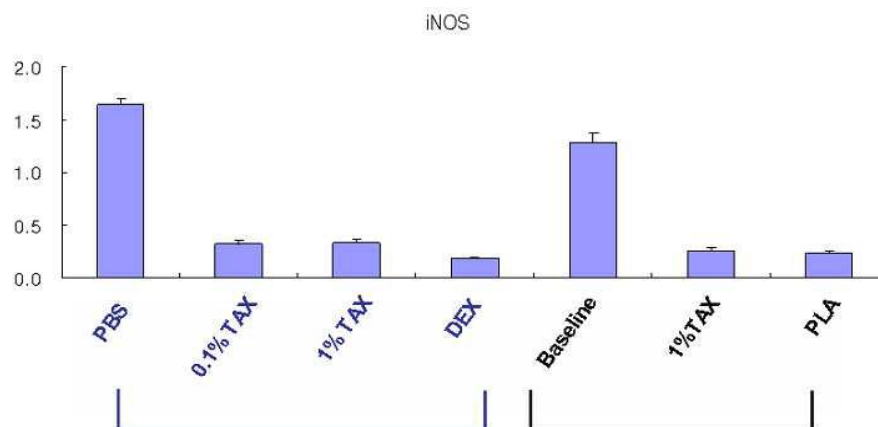
도면12



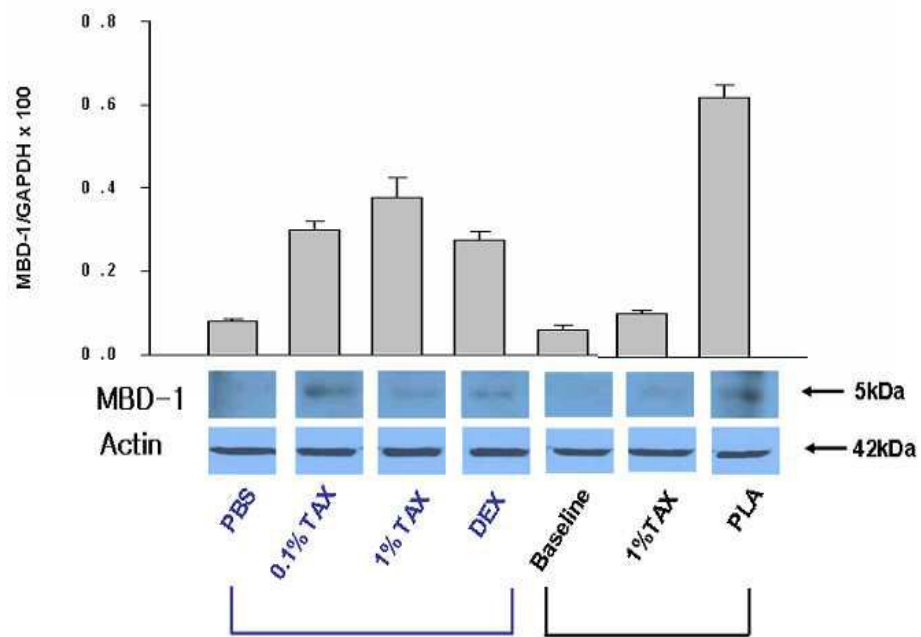
도면13



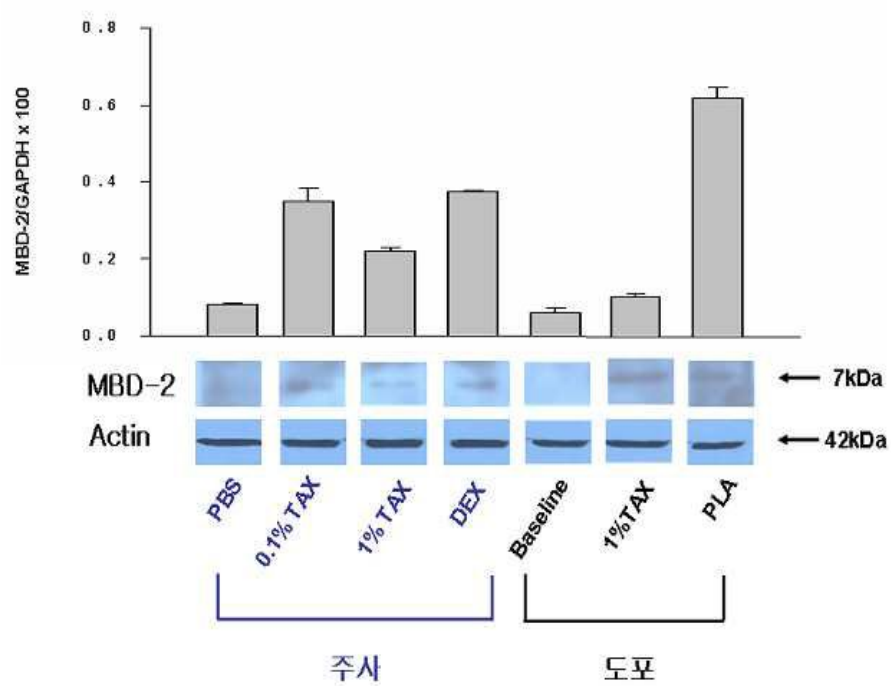
도면14



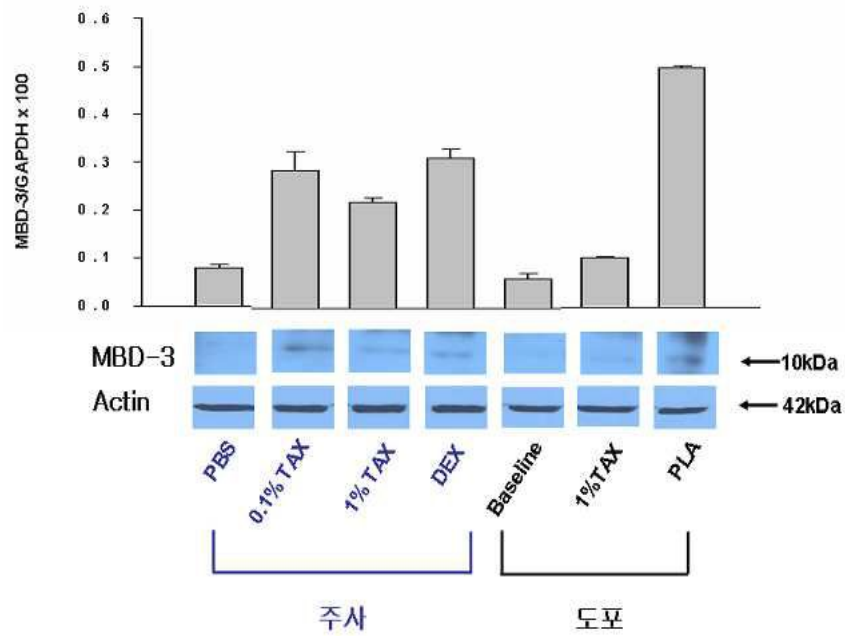
도면15



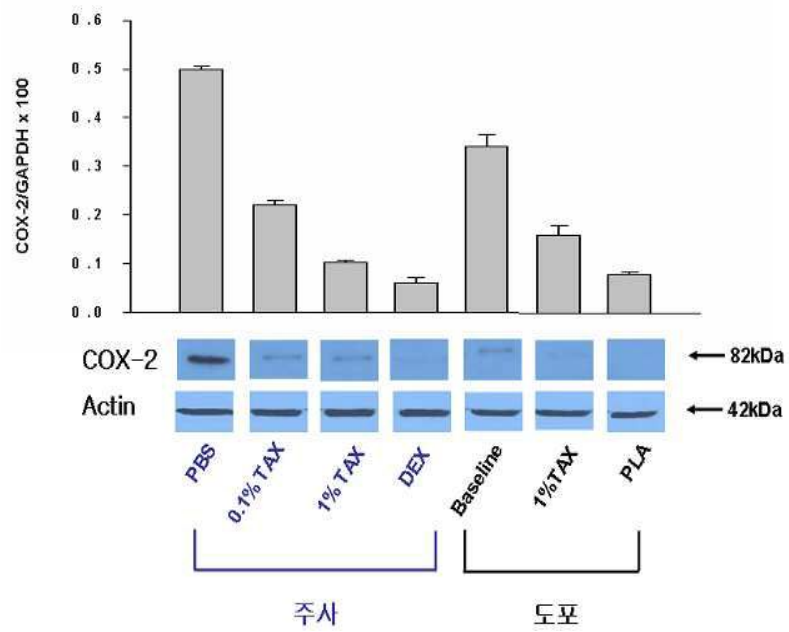
도면16



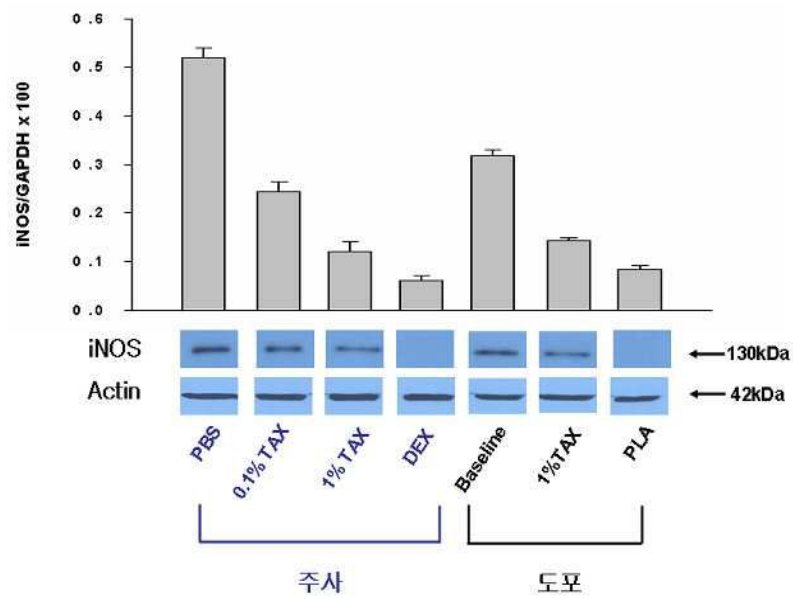
도면17



도면18



도면19



서열 목록

<110> Chung-ang University Industry Academic Cooperation Foundation
 <120> Composition for Treating Atopic Dermatitis Comprising Taxifolin
 3-O-beta-D-glucopyranoside Isolated from the Extract of the Roots
 of Rhododendron mucronulatum as an Active Ingredient

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer for MbD-1 (sense)

<400> 1

acataaagga cgagcgatgg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for MBD-1 (anti-sense)

<400> 2
tgcagatggg gtgtcataga 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for MBD-2 (sense)

<400> 3
gccatgagga ctctctgctc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for MBD-2 (anti-sense)

<400> 4
aggggttctt ctctgggaaa 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for MBD-3 (sense)

<400> 5

tcagattggc agttgtggag 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for MBD-3 (anti-sense)

<400> 6
gctagggagc acttgtttgc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for iNOS (sense)

<400> 7
ctgatgcctc ttccaggtgt 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for iNOS (anti-sense)

<400> 8
gagggagccc ttctgaatc 20

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for COX-2 (sense)

<400> 9
ccacccatgg caaattccat ggca 24

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for COX-2 (anti-sense)

<400> 10
ggtgctgctt gtaggaggt caagtaaagg gc 32

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for GAPDH

<400> 11
ccacccatgg caaattccat ggca 24

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer for GAPDH (anti-sense)

<400> 12
ccctgttgct gtagccgtat 20

