



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113130
(43) 공개일자 2024년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/61 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/61 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2023-0005312

(22) 출원일자 2023년01월13일

심사청구일자 2023년01월13일

(71) 출원인

동서대학교 산학협력단

부산광역시 사상구 주례로 47(주례동,
동서대학교)

(72) 발명자

김동원

부산 해운대구 마린시티2로 38

문지연

경남 창원시 성산구 단정로98번길 9-15

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김종석

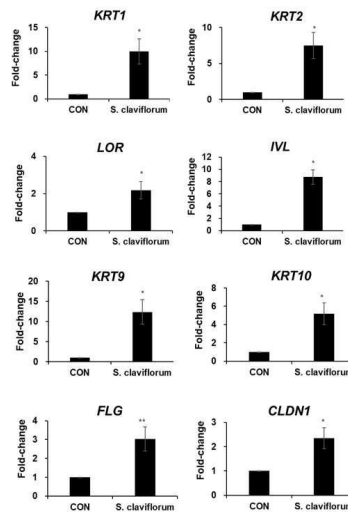
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 사이자이지움 클래비플로룸을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 사이자이지움 클래비플로룸(*Syzygium claviflorum*)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

서가연

전남 여수시 무선2길 27

박유경

부산 사상구 가야대로344번길 60

때 때 마 원

애비뉴 로드, 카마웃 타운쉽 11041, 양곤, 미얀마

탄 자 원

유니버시티로드, 힌타다, 미얀마

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711169965

과제번호

2020R1C1C1005206

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

개인기초연구(과기정통부)

연구과제명

엑소좀의 생합성 및 조직재생능에 미치는 TLR3 활성화 기전 연구

기 여 율

1/2

과제수행기관명

동서대학교

연구기간

2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1345356165

과제번호

LINC3.0-2022-60

부처명

교육부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

산학연협력고도화지원

연구과제명

3단계산학연협력선도대학육성사업(LINC3.0)(0.5)

기 여 율

1/2

과제수행기관명

동서대학교

연구기간

2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은

케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물.

청구항 4

사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*)을 메탄올에서 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 및

상기 조추출물을 여과 및 건조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*) 추출물의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조추출물을 얻는 단계는

사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*)과 메탄올을 혼합하고 초음파를 처리하여 추출하는 것을 특징으로 하는 사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*) 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum*)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 아토피 피부염은 피부 염증의 장기적인 유형으로, 자가면역질환의 일종이다. 아토피 피부염이 발병하면 피부가 건조해지고 비늘과 비슷한 느낌의 피부가 나타나며, 팔, 다리, 얼굴 및 목의 굴곡부에 붉은 반점이 형성되어 가려움을 유발한다. 일반적으로 어린 시절에 시작되며 수년에 걸쳐 심각도가 변화한다.
- [0003] 아토피 피부염의 원인은 명확히 밝혀지지 않았지만, 주된 원인은 면역 기능의 불균형으로 여겨지며, 이외에도 환경적, 사회적, 심리적 및 유전적 요인 등이 복합적으로 작용하는 만성 염증성 피부질환이다.
- [0004] 아토피 피부염의 환자는 꾸준히 증가하는 추세이며, 아토피 피부염의 치료방법은 약물제제 치료법, 보습제에 의한 피부 수분 공급 방법, 집먼지 진드기, 꽃가루, 바퀴벌레 등의 흡입 항원을 제거하여 아토피 피부염을 완화하는 방법, 우유, 계란, 땅콩 등 주요 음식물 항원 원인식품의 회피 방법 및 정서적 안정 등이 있으며, 아토피 피부염이 심한 경우에는 자외선치료, 스테로이드, 면역억제제, 인터페론 및 면역 글로불린 등의 치료를 하기도 한다.
- [0005] 그러나 스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제, 인터페론 및 면역글로불린 등의 약물제제를 장기적으로 사용하거나 남용하는 경우, 소아에서는 발육 부진의 발생을 야기할 수 있으며, 성인의 경우 당뇨나 고혈압이 생길 수 있다. 특히, 항생제의 경우, 오남용에 따라 많은 병원균이 항생제에 대한 내성을 갖고 있고 항생제의 수명 또한 짧아지고 있다. 따라서 아토피 피부염의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수하며, 안전성이 높아 피부에 부작용이 없는 천연 조성물에 대한 필요성이 커지고 있다.
- [0006] 한편, 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)은 Myrtaceae 가족의 나무로, 호주 대륙 북부와 열대 및 아열대 아시아가 원산지이다. 이는 주로 목재, 연료, 인간 및 가축의 음식, 염료 등으로 사용된다. 현재까지 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)으로부터 분리한 화합물을 포함하는 인간면역결핍바이러스(HIV)에 대한 항바이러스제는 개시된 바 있지만, 본 발명과 같은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해서는 개시된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2018-0054826호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 본 발명의 기재로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자

발현이 증가하는 것을 특징으로 한다.

- [0014] 본 발명은 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*)을 메탄올에서 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 및 상기 조추출물을 여과 및 건조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 조추출물을 얻는 단계는 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*)과 메탄올을 혼합하고 초음파를 처리하여 추출하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물은 아토피성 피부염 환자에게서 저하되는 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1) 유전자의 발현을 증가시킴으로써 피부장벽 기능을 개선하는 의약품으로 활용될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물은 아토피 및 건선 피부의 소양증 완화용 화장품으로 활용될 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 청구범위의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 DPPH assay를 통해 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 항산화 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 ABTS assay를 통해 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 항산화 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 세포독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물에 의한 피부각질세포 분화 유전자들의 발현 변화를 나타내는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 사이자이지움 클레비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 필라그린(FLG) 단백질 발현 회복 효과를 나타낸 웨스턴 블롯(Western blot) 결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0023] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0024] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소

의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0026] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0028] **사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법**

[0029] 본 발명은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)을 메탄올에서 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 및 상기 조추출물을 여과 및 건조하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 제조방법은 필요에 따라 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)을 메탄올에 추출하기 전에 건조하여 분말화하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 분말화를 위한 건조방법에는 그늘건조, 동결건조, 열풍건조, 감압건조, 진공건조, 비등건조 또는 분무건조 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 그늘에서 건조하는 방법이 이용될 수 있다.

[0031] 상기 메탄올에서 추출하여 조추출물을 얻는 단계는 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)을 메탄올에서 추출하여 조추출물을 얻는 단계로, 상기 메탄올은 90 내지 100% 메탄올일 수 있다. 상기 추출방법으로는 용매 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등이 사용될 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 초음파 추출법이 사용될 수 있다. 상기 초음파 추출법은 상온에서 30 내지 60 KHz, 1300 내지 1700 W로 5 내지 25분 동안 초음파 처리하고 100 내지 140분 동안 방치하는 단계를 반복하는 방법일 수 있으며, 상기 반복횟수는 20 내지 40번일 수 있다. 상기 추출 반복횟수는 20번 미만으로 추출할 경우, 추출 수율이 좋지 않으며, 40번을 초과하여 추출할 경우, 추출수율 대비 공정시간이 길어질 수 있다.

[0032] 상기 조추출물을 여과 및 건조하는 단계는 상기 추출용매를 통해 추출한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 조추출물을 여과 및 건조하는 단계로, 상기 여과에는 상압여과, 감압여과 및 가압여과, 여과지, 여과포, 메시망, 필터 또는 원심분리 등을 이용할 수 있으며, 상기 여과 후 건조방법으로는 동결건조, 열풍건조, 감압건조, 진공건조, 비등건조 또는 분무건조 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 감압건조가 이용될 수 있다.

[0033] 상기 추출, 여과 및 건조 단계를 통해 제조된 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물은 증류수, 에탄올, 메탄올 또는 DMSO(dimethylsulfoxide)에 희석해서 사용될 수 있으며, 바람직하게는 DMSO에 희석해서 사용될 수 있다.

[0035] **아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물**

[0036] 본 발명은 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미하며, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0038] 본 발명에 따른 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물은 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명에 따른 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개

선 또는 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물은 상기에서 기술한 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0042] 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물

[0043] 본 발명은 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에 따른 상기 화장품 조성물은 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물에 있어서, 상기 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물은 상기에서 기술한 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 화장수, 토너, 에센스, 크림, 팩, 젤, 로션, 연고, 패취, 폼, 스프레이, 파우더, 비누, 입욕제, 분무제, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선펜크림, 자외선차단용 화장품, 클렌징밀크, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제, 크림비누, 페이스워시, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔 또는 치약 등의 형태로 제형화되어 사용될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 상기 화장품 조성물은 통상적으로 화장품 조성물의 제조에 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제, 증점제, 향산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.

[0049] 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물

[0050] 본 발명은 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명에 따른 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물은 상기에서 기술한 사이자이지움 클라비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 또는 음료의 형태로 제형화되어 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.

[0057] **실시예 1. 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 제조**

[0058] 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 제조하기 위해 실시예 1을 실시하였다. 상기 실시예 1에서 사용한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)은 학명이 *S. claviflorum*(Roxb.) Wall. ex A.M. Cowan & Cowan인 식물 샘플을 미얀마 오크타다(Oaktada) 마을에서 채집한 뒤, MM0072로 기록된 바우처 표본으로 한국생명공학연구원(대전, 대한민국)의 식물표본관에 기탁하여 사용하였다.

[0059] 상기 기탁한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)의 잎, 줄기, 열매 및 꽃 부위를 그늘에서 건조하여 분말화하였으며, 상기 분말화한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 분말 67g을 99.9% 메탄올 1L에 넣고 초음파 추출기를 이용하여 상온에서 40 KHz, 1500 W로 15분 동안 초음파 처리하고 120분 동안 방치하는 단계를 30번 반복하여 추출하였다. 상기 추출하여 얻은 조추출물을 여과 및 감압 건조하여 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물 15.57 g을 얻었다. 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 분말을 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여서 25 mg/ml의 농도로 제조하였다.

[0061] **실험예 1. 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 항산화 효과**

[0063] **1-1. DPPH assay**

[0064] 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 실험예 1-1에서 DPPH assay를 실시하였다. 상기 실시예 1에서 DMSO에 녹인 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 농도별로 1, 5, 10 또는 50 μ g로 준비하였으며, 상기 실험예 1-1에서 사용한 DPPH powder는 95% 에탄올을 이용하여 0.2 mM의 농도로 준비하였다.

[0065] 상기 농도별로 준비한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물 1 μ l와 상기 0.2 mM DPPH 시약 200 μ l을 96 well plate에 넣고 빛이 차단된 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 상기 흡광도를 측정한 결과를 도 1에 그래프로 나타내었고, 상기 도 1의 자유라디칼 소거능(%)은 하기 식 1으로 계산하여 기재하였다.

[0067] [식 1]

$$\text{자유라디칼소거능(\%)} = \left[\frac{\text{대조군(DMSO)의 흡광도} - \text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군(DMSO)의 흡광도}} \right] \times 100$$

[0068]

[0070] 본 실험예 1-1의 결과, 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 농도별로 처리함에 따라 DPPH assay의 자유라디칼 소거능(%)이 증가하는 것을 확인하였다.

[0072] **1-2. ABTS assay**

[0073] 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 실험예 1-2에서 ABTS assay를 실시하였다. 상기 실시예 1에서 DMSO에 녹인 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 농도별로 1, 5, 10 또는 50 μ g로 준비하였으며, 상기 실험예 1-2에서 사용한 ABTS 시약은 증류수를 이용하여 7 mM의 농도로 준비하였다. 상기 7 mM ABTS 시약을 2.45 mM 과황산칼륨과 1:1의 비율로 섞고 빛이 차단된 상온에서 16시간 동안 반응시켜 혼합액을 제조하였다. 상기 혼합액은 흡광도가 734 nm에서 측정했을 때, 0.7($\pm$ 0.02)가 되도록 10% 에탄올로 희석하였다. 상기 희석한 혼합액 200 μ l와 상기 농도별 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 1 μ l을 96 well plate에 넣고 빛이 차단된 상온에서 5분 동안 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 흡광도를 측정할 때, 대조군으로 DMSO 1 μ l와 상기 희석한 혼합액

200 μ l을 혼합한 샘플을 사용하였다. 상기 측정된 흡광도를 도 2에 그래프로 나타내었으며, 상기 도 2의 자유라디칼 소거능(%)은 하기 식 1으로 계산하여 기재하였다.

[식 1]

$$\text{자유라디칼 소거능(\%)} = \left[\frac{\text{대조군(DMSO)의 흡광도} - \text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군(DMSO)의 흡광도}} \right] \times 100$$

본 실험에 1-2의 결과, 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 농도별로 처리함에 따라 ABTS assay의 자유라디칼 소거능(%)이 증가하는 것을 확인하였다.

실험예 2. 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 세포독성 평가

상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 실험예 2를 실시하였다. 상기 실험예 2에서 사용한 세포는 Neonatal human epidermal keratinocytes (NHEK)으로 Lonza Bioscience(Walkersville, USA)에서 제공받은 피부각질세포를 사용하였으며, 상기 NHEK 세포는 KGM Bullet kit에 포함된 Keratinocyte basal medium(CC-3101)에 bovine pituitary extract 2.00 mL, hEGF 0.50 mL, recombinant human Insulin 0.50 mL, Hydrocortisone 0.50 mL, gentamicin 및 amphotericin-B 0.50 mL이 포함된 KGM SingleQuotsTM supplements(CC-4131)를 섞어 완전배지(complete medium)로 사용하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 2일 간격으로 배지를 교환하였다. 상기 NHEK 세포가 배양조건에서 75% 밀집도로 성장하였을 때, 배양 배지를 제거하고, Reagent Pack(CC-5032, Lonza)에 있는 HEPES Buffered saline solution으로 1회 세척하였다. 이후 상기 세척한 세포에 2 mL의 Trypsin/EDTA를 처리하고 세포배양 조건에서 7분 동안 반응시킨 후, 부착된 NHEK를 수거하였다. 상기 Trypsin/EDTA의 활성을 멈추기 위해 4 mL의 Trypsin Neutralizing Solution(TNS)을 넣고, 원심분리를 4,000 rpm에서 5분 동안 실시하였다. 상기 원심분리한 세포의 상층액은 제거하고, 상기 세포의 pellet을 계대배양 및 실험에 사용하였다.

상기 배양한 NHEK 세포를 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well만큼 분주한 뒤, 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 상기 배양한 세포에 KGM 배양배지에 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 농도별로 혼합하여 0, 1, 2, 5 또는 10 μ g/mL의 농도로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 처리한 세포의 배지는 제거하였으며, KGM 배지와 CCK-8 시약(CK04, Dojindo)을 9:1의 비율로 섞어 총 100 μ l씩 각 well에 분주하였고, 3시간 동안 배양하였다. 이후 450 nm 파장에서 INNO-M microplate spectrophotometer(LTek)를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 상기 흡광도를 측정된 결과를 도 3에 그래프로 나타내었다. 상기 도 3에서 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물에 의한 세포 독성(%)은 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 처리하지 않은 대조군에 대비하여 계산하였다.

본 실험예 2의 결과, 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 0 내지 5 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 세포독성이 나타나지 않았으나, 10 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 세포독성이 나타났다. 이에, 본 발명에서는 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 5 μ g/mL 이하의 농도로 처리하여 실험하였다.

실시예 2. 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물에 의한 피부각질세포 분화 유전자 발현 변화

상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 아토피 피부염 예방, 개선 또는 치료 효과를 확인하기 위해 실시예 2를 실시하였으며, 상기 실시예 2에서 피부각질세포가 분화할 때 발현되는 대표적인 유전자 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. 상기 실시예 2에서 사용한 세포는 상기 실

험에 2와 동일한 NHEK 세포를 동일한 방법으로 배양하여 사용하였다.

[0087] 상기 배양한 NHEK 세포를 12 well plate에 7.0×10^4 cells/well만큼 분주한 뒤, 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 1 µg/ml의 농도로 처리하고 KBM 조건에서 배양한 NHEK 세포의 전체 RNA는 Quick-RNA Micro Prep Kit(R1051; ZYMO Research, USA)를 사용해 분리하였다. 상기 분리된 RNA의 농도와 순도는 INNO-M microplate spectrophotometer(LTEK)를 이용하여 분석하였고, High-capacity cDNA Kit with RNase inhibitor Kit(4374966; ThermoFisher Scientific)의 매뉴얼에 따라 1 내지 2 µg의 RNA를 cDNA로 합성하였다. 상기 합성된 cDNA는 TaqMan™ Fast Advanced Master Mix(4444557; ThermoFisher Scientific, USA)와 Taqman Probe(ThermoFisher Scientific)와 함께 제조사의 지침에 따라 QuantStudio3(A28132, ThermoFisher Scientific) 기기에서 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)이 실행되었다. 상기 실시예 2에서 사용된 피부각질세포 분화 유전자는 사람KRT1(Hs00196158_m1), KRT2(Hs00166294_m1), KRT9(Hs00413861_m1), KRT10(Hs00166289_m1), LOR(Hs01894962_s1), IVL(Hs00846307_s1), FLG(Hs00856927_g1) 및 CLDN1 (Hs00221623_m1)를 사용하였으며, housekeeping gene인 ribosomal protein large P0(RPLP0, Hs00420895)를 loading control로 사용하였다. 상기 실시예 2에서 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)은 50°C에서 5분 동안 불활성화하고 95°C에서 20초 동안 pre-denaturation하고, 95°C에서 3초 동안 denaturation하고, 60°C에서 20초 동안 annealing/extension 과정을 40회씩 반복하였으며, 상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 cDNA를 증폭시켜 분석하였다. 상기 실시예 2의 결과는 도 4에 그래프로 나타내었으며, 상기 도 4에서 mRNA의 상대적 발현은 상기 피부각질세포 분화 유전자 역치 값(Ct)의 사이클로 분석하고, $\Delta \Delta Ct$ method로 표적을 정량하였다.

[0088] 본 실시예 2의 결과, 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물에 의해 상기 피부각질세포 분화 유전자인 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 로리크린(Loricrin; LOR), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 케라틴9(Keratin 9; KRT9), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 필라그린(Filaggrin; FLG) 및 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1)의 발현이 mRNA 수준에서 증가하는 것을 확인하였다.

[0090] 실험예 3. *In vitro* 아토피 모델에서 확인한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 아토피 치료 효과

[0091] 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 아토피 치료 효과를 *in vitro* 아토피 모델에서 확인하기 위해 실험예 3을 실시하였다. 상기 *in vitro* 아토피 모델에서 사용한 인터루킨(Interleukin; IL) 4 및 13은 아토피 피부염의 병태생리학적 특성에 관여하는 사이토카인으로, 상기 IL-4 및 IL-13을 과발현한 상태에서 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 아토피 치료 효과를 확인하였다.

[0092] 상기 실험예 3에서 사용한 NHEK 세포는 상기 실험예 2와 동일한 NHEK 세포를 동일한 방법으로 배양하여 사용하였다. 재조합 인간 IL-4 단백질(recombinant human IL-4; Cat# P05112, Lot# NCL0621011)은 bio-technie에서 제작된 것을 사용하였으며, 재조합 인간 IL-13 단백질(recombinant human IL-13; Cat# 200-13, Lot# 102123)은 Peprotech으로부터 공급받아 사용하였다.

[0093] 상기 NHEK 세포를 6 well plate에 1.5×10^5 cells/well만큼 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 실시예 1에서 제조한 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 1 µg/ml 농도로 처리하고 IL-4 및 IL-13을 10 ng/ml 농도로 함께 처리한 뒤, 96시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포의 단백질을 추출하여 필라그린(FLG) 유전자의 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯(western blot)을 통해 확인하였고, loading control로 베타-액틴(β -actin)을 사용하였다.

[0094] 이하, 상기 웨스턴 블롯(western blot)의 실험방법에 대해 상세히 설명한다. 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물 및 IL-4/IL-13을 처리한 세포의 단백질은 스크래퍼를 이용하여 수확하였으며, Xpert protease inhibitor Cocktail Solution이 포함된 RIPA Lysis and Extraction Buffer(89900, ThermoFisher Scientific)를 첨가하였고, Q125 sonicator (125 W, 20 kHz) (QSonica, USA)를 사용해 cell lysis를 진행하였다. 상기 lysis를 진행한 Cell lysate은 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리한 후, 상등액만 실험에 이용하였다. 상기 분리된 상등액은 BCA 분석(Pierce™BCA Protein Assay Kit, #Cat 23225) 매뉴얼에 따라서 정량하고 550 nm에서 INNO-M microplate spectrophotometer (LTek)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상기 단백질 정

량은 Bovine serum albumin(BSA)의 standard curve를 기반으로 샘플의 흡광도에 따른 단백질 정량을 계산하였다.

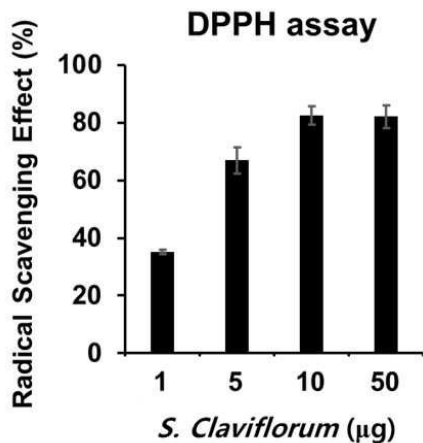
[0095] 상기 정량한 세포의 단백질 20 μg 을 NuPAGE™Sample Reducing Agent (NP0004, Invitrogen)와 Bolt™LDS Sample Buffer(B0007, Invitrogen)에 섞어 95℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 8 내지 10%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 이후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes(10600021, 0.2 μm , Cytiva)에 30 volt의 전류로 1 시간 동안 단백질을 transfer하였다. 상기 transfer한 membrane은 TBS-T (Tris-Buffered Saline with 1% Tween 20)에 5% Non-Fat Powdered Milk(NFDM, F141511-0250, Cellconic)을 이용해 1 시간 동안 blocking하고, 4℃에서 15시간 동안 1차 항체와 반응시켰다. 상기 1차 항체는 beta-Actin (C4)-mouse monoclonal antibody(sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) 및 FLG (AE21)- mouse monoclonal antibody(sc80609, Santa Cruz Biotechnology)을 사용하였다. 상기 1차 항체를 반응시킨 membrane은 TBS-T를 사용해 씻어내고 2차 항체를 결합시켜 1시간 동안 반응시켰다. 상기 2차 항체를 반응시킨 Membrane에 있는 단백질의 확인은 SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate(Cat# 34580, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 iBright imaging system (Invitrogen)에 의해 분석하였다. 상기 실험예 3의 결과를 도 5에 그림으로 나타내었다.

[0096] 본 실험예 3의 결과, IL-4/IL-13에 의해 필라그린(FLG)의 단백질 발현이 감소하였으며, 상기 IL-4/IL-13에 의해 감소한 필라그린(FLG)의 단백질 발현은 상기 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물에 의해 다시 회복하는 것을 확인하였다.

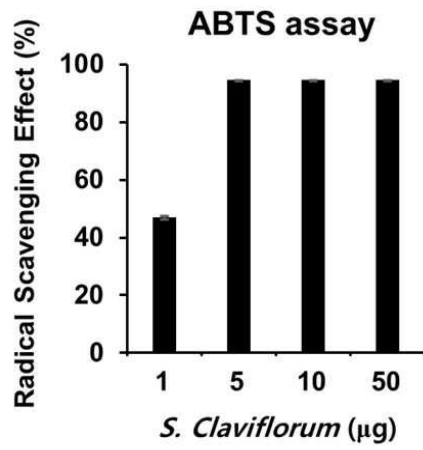
[0098] 이상 설명으로부터, 본 발명에 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다.

도면

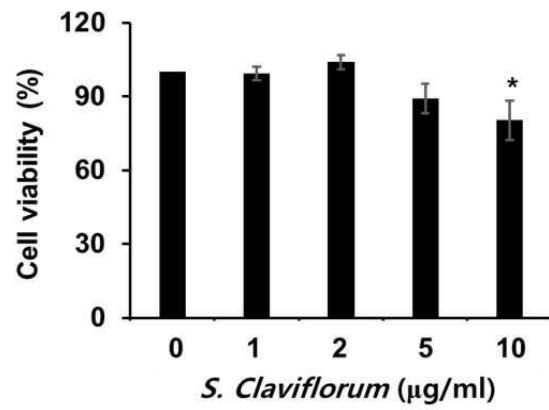
도면1



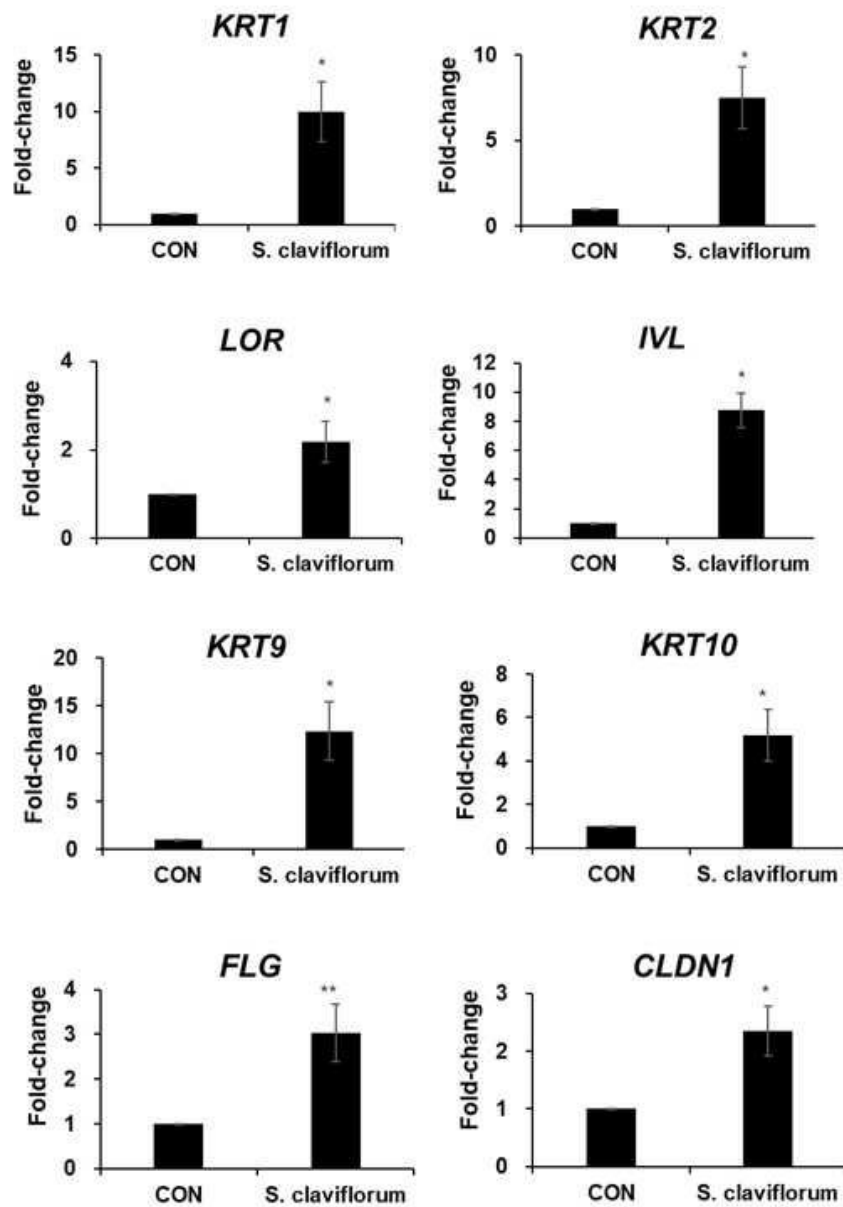
도면2



도면3



도면4



도면5

