(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0014265
(43) 공개일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0107313
(22) 출원일자 2015년07월29일
심사청구일자 2015년07월29일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
안동현
부산광역시 남구 분포로 113, 201동 204호(용호동, 엘지메트로 시티)
김꽃봉우리
부산광역시 사하구 낙동대로355번길 23, 크로바 109호
김민지
부산광역시 기장군 정관면 방곡로 39, 103동 205호(가화만사성정관타워)
(74) 대리인
위병갑

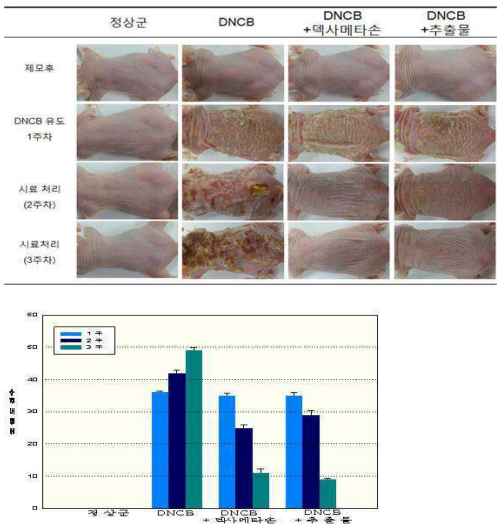
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I 화합물은 효과적으로 사이토카인 분비 조절을 하고, 아토피 마우스 동물모델에서 아토피 억제 효능을 나타내므로 아토피의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 8/02 (2013.01)
A61K 8/498 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2800/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A6A1028677
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 해산식물 유래 항노화 소재 개발 및 분자 작용 메커니즘
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 외톨개 모자반 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 1, 3-부틸글리콜 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매를 통해 추출되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

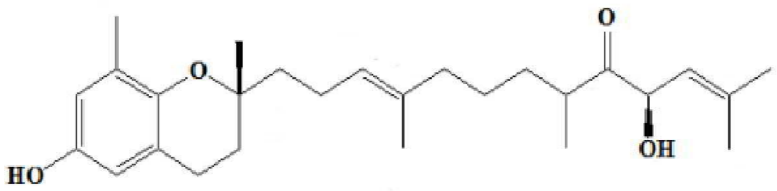
제1항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 에센스, 화장수, 영양화장수 및 영양크림으로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 함유하는 아토피 개선용 화장료 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 사가크로마놀 I는 외톨개 모자반 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

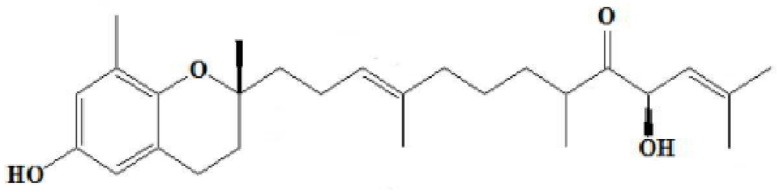
청구항 6

외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아토피는 심한 가려움증을 가지는 재발성 만성피부염으로, 어린이의 약 10 ~ 15%가 아토피성 피부염을 가지고 있으며, 90%는 5년 내 저절로 호전되는 것으로 보고되어 있다. 이러한 아토피는 성인기에는 대체로 호전되어 약 30 ~ 40%는 외관상으로 피부염이 재발되지 않으나, 나머지는 성인이 되어서도 피부 건조, 자극성 물질에 의한 피부자극, 주부습진 등의 피부염으로 어려움을 겪는 것으로 알려져 있다. 또한, 민감성 피부의 경우, 수분 보유력 및 그 회복력이 낮고, 피부 각질화, 가려움증 등이 나타나기 쉽기 때문에 아토피성 피부로 될 확률이 높다.

[0003] 아토피의 정확한 병리 생리는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않지만 유전적 소인과 함께 면역학적, 비면역학적 기전이 관여한다고 보고 있다. 아토피의 대부분을 차지하는 외인성 아토피는 IgE와 연관된 면역 기전에 의해 발생되는데 특정 알레르겐(알레르겐(allergen))에 대한 즉시형 면역 반응보다는 T 세포 이상에 의한 지연성 면역 반응이 관여한다는 보고들이 많다. 또한, 요즘은 B세포로 부터 IgE의 생성을 유도하는 IL-4 등 Th2 관련 사이토카인(cytokine)들이 아토피의 원인이라고 보고되고 있다(JS Kang et al., Inhibition of atopic dermatitis by topical application of silymarin in NC/Nga mice. intl immunopharm. (2008) 8. 1475-1480).

[0004] 이러한 아토피를 치료하기 위하여, 종래 세라마이드, 리놀레산, 식물유 또는 광물성 오일 등의 성분들, 하이드로코티손(hydrocortisone) 등의 스테로이드(steroid) 제제 또는 이들에 항균 및 항염 기능을 강화한 물질, 자외선 요법을 통한 DNA 합성 억제제, 세포 과증식 억제제, 염증 및 가려움증 억제제 등이 제안된 바 있다. 그러나 상기 스테로이드 제제는 표피의 성장억제나 부작용 등의 역효과를 유발할 수 있으며, 우레아 퍼록사이드 등은 피부의 과다 자극을 야기할 수 있고, 항히스타민제 등의 항생물질은 균의 내성(resistance) 및 광과민 등의 부작용을 유발할 가능성이 높은 문제점이 있다. 또한, 장기간 피부에 적용 시 모세 혈관 확장증 및/또는 각질층의 두께 증가 내지 확장을 유발하는 등의 심각한 부작용을 발생시킬 염려가 있으며, 최근 아토피 완화에 많이 쓰이는 감마-리놀레산(한국특허공개 2000-0046633호)은 쉽게 산화되므로 안정성이 열등함과 아울러, 피부 자극성이 비교적 강하여 민감한 피부에는 사용하기 곤란한 등의 문제점이 있다.

[0005] 이에 최근에는 아토피에 효과를 갖는 천연물질을 탐색하는데 초점을 맞추고 있다. 대표적으로, 쑥 추출물(대한민국 특허등록 제10-0377262호), 영지버섯, 유근피, 감초, 백봉령, 백지마 및 백년초의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0517465호), 달맞이유, 알로에, 목초액, 제비꽃, 대추, 송이버섯, 두릅, 인삼, 녹차, 두충, 복분자, 오미자, 쑥, 포공영, 삼백초, 황기, 하고초, 해송, 황금 및 우슬의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0451444호), 청자소엽과 적자소엽의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0454752호), 건률, 의이인, 오미자, 길경, 나복자, 맥문동 및 석창포의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0483539호), 라벤더, 유칼립투스 및 티트리 오일(대한민국 특허등록 제10-0597997호) 등이 있고, 그 외에도 상기생, 합환피, 창이자, 맥아 등이 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 상기 천연물질들은 그 효능이 미미하거나, 효과는 있더라도 민감성 피부에 있어서는 알레르기 과민반응을 보여 그 사용이 제한되는 단점이 있었다.

[0006] 따라서, 종래 알려진 아토피 예방 또는 개선제에 비하여 보다 효과가 뛰어나고 안전한 물질을 개발하는 것이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록 제10-0483539호,

(특허문헌 0002) 대한민국 특허등록 제10-0451444호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 다양한 연구를 진행하던 중, 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물인 사가크로마놀에서 아토피가 유도된 동물모델에서 아토피 개선 효능이 매우 뛰어남을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물에서 분리한 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0012] 나아가 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물에서 분리한 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

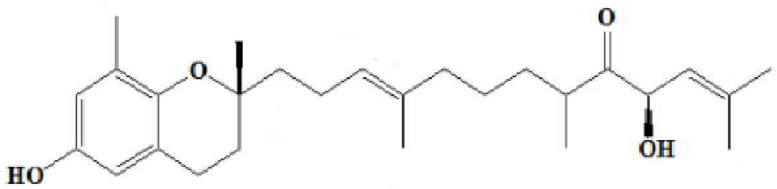
[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 외톨개 모자반 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 1, 3-부틸글리콜 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매를 통해 추출할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장료 조성물은 에센스, 화장수, 영양화장수 및 영양크림으로 구성된 군으로부터 선택되는 제형일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 사가크로마놀 I은 외톨개 모자반 추출물로부터 분리한 것일 수 있다.

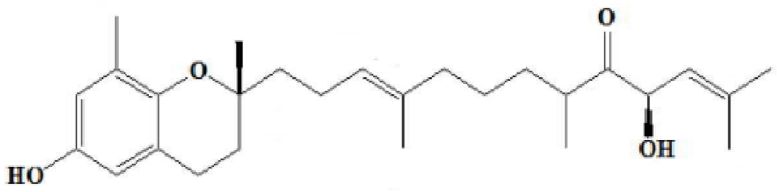
[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장료 조성물은 에센스, 화장수, 영양화장수 및 영양크림으로 구성된 군으로부터 선택되는 제형일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0022] 나아가, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 함유하는 아토

피 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0023] [화학식 1]



[0024]

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I 화합물은 효과적으로 사이토카인 분비 조절을 하고, 아토피 마우스 동물모델에서 아토피 억제 효능을 나타내므로 아토피의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 외톨개 모자반 n-헥산층으로부터 활성 물질의 분리 및 정제 과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 외톨개 모자반 메탄올 추출물 처리된 DNCB 유도 아토피 피부염 동물 모델의 육안평가 및 중증도 점수 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 외톨개 모자반 메탄올 추출물 처리된 DNCB 유도 아토피 피부염 동물 모델의 등조직을 관찰한 결과이다.

도 4는 외톨개 모자반 메탄올 추출물이 DNCB-유도 아토피 피부염 동물 모델에서 비장세포 증식능에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 5는 외톨개 모자반 메탄올 추출물이 DNCB-유도 아토피 피부염 동물 모델에서 혈청 사이토카인 및 총 IgE 분비량에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 6은 외톨개 모자반으로부터 분리 된 화합물 sargachromanol I의 화학구조 및 1H NMR, 13C NMR 피크를 확인한 결과이다.

도 7은 외톨개 모자반 용매별 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN-γ 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 8은 외톨개 모자반 용매별 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 9는 n-헥산 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN-γ 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 10은 n-헥산 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 11은 TLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN-γ 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 12는 TLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 13은 HPLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN-γ 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 14는 HPLC 분획물 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

도 15는 sargachromanol I 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IFN-γ 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서

확인한 결과이다.

도 16은 sargachromanol I 첨가에 따른 마우스 비장세포의 IL-4 분비량-아토피 억제 정도를 *In-vitro* 상에서 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물인 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

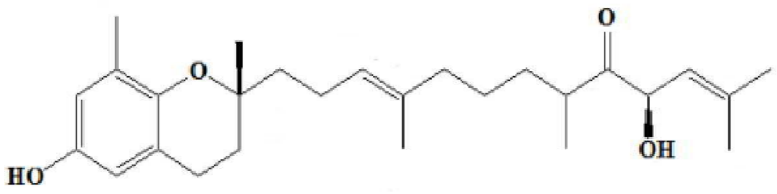
[0028] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 외톨개 모자반 추출 시 추출 용매는 천연물 추출에 사용되는 용매이면 제한 없이 사용할 수 있으나, 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 1, 3-부틸글리콜 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매를 통해 추출하는 것이 바람직하고, 메탄올을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0029] 상기 추출 용매의 양은 외톨개 모자반 중량의 2 내지 200배로 함이 바람직하고, 10 내지 30배로 하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 상기 외톨개 모자반의 추출물을 추출하는 방법은 열수 추출, 침지 추출, 초임계 추출, 아임계 추출, 고온 추출, 고압 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있으며, 가온하여 환류 추출 또는 상온에서 추출하는 것이 바람직하다.

[0031] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0032] [화학식 1]



[0033] .

[0034] 상기 화학식 1의 사가크로마놀 I 화합물은 본 발명에 따른 외톨개 모자반 추출물의 추출 단계 및 분획단계를 수행하여 얻어진 외톨개 모자반 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하고 정제하는 단계를 추가로 진행하여 얻을 수 있다.

[0035] 구체적으로, 상기 실리카겔 컬럼 크로마토그래피는 1 내지 수회 반복수행하는 것이 바람직하다. 이동상으로는 클로로포름: 메탄올을 사용할 수 있다. 이때, 사용한 용매는 비극성에서 극성으로 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식으로 용출 분리하며, 수집된 분리물의 아토피 치료 효과를 측정하여 원하는 활성 분획을 얻는다.

[0036] 본 발명의 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 아토피 예방 또는 개선을 위한 화장료 조성물로 사용할 수 있으며, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 형태로 제제화될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 가장 바람직하게는 에센스, 화장수, 영양화장수 및 영양크림으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0037] 또한, 상기 화장료 조성물은 본 발명의 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물에 추가로 지방물질, 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.

[0038] 본 발명의 외톨개 모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 피부 외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방

향제, 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.

[0039] 나아가 본 발명은 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물인 사가크로마놀 I(sargachromanol I)을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0040] 본 발명의 외톨개 모자반을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 mL를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0042] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제 등의 형태를 포함한다.

[0043] 따라서 또한, 본 발명은 아토피의 예방 및 개선 효과를 갖는 외톨개 모자반추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.

[0044] 본 발명의 추출물을 첨가 가능한 식품형태는 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류인 식품 등을 포함한다.

[0045] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 외톨개 모자반 추출물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.

[0046] 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0047] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0048] 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **<실시예 1>**

[0051] **본 발명 실험을 위한 재료 및 방법**

[0052] **<1-1> 외톨개 모자반 추출물 제조방법**

[0053] 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*)은 부산 송정에서 2011년도에 채취하여 담수로 깨끗이 씻은 후 동결 건조하여 잘게 분쇄시킨 뒤 -20℃에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 분말 상태의 외톨개 모자반에 메탄올(methanol)을 가한 후 셰이커 (shaker: H-0802, Dongwon science co., Busan, Korea)로 실온에서 24시간 동안 교반하여 추출하였다. 이를 원심분리기 (UNION 32R, Hanil., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하고 잔사는 동일한 방법으로 10배의 메탄올을 가해 2회 반복 추출하였다. 추출한

상층액은 여과지로 여과하여 회전 증발기 (Rotary evaporator: RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 37℃에서 건조하였다. 건조된 시료는 20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

[0054] **<1-2> 아토피 피부염 유발 및 시료 처리**

[0055] 생후 4주령의 수컷 BALB/c 마우스를 오리엔트바이오 (Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 온도 20±2℃, 습도 50± 10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 예비사육한 후 실험에 이용하였다.

[0056] BALB/c(n=5)는 정상군, DNCB 처리군, DNCB+추출물 처리군으로 총 3군으로 나누어 다음과 같이 실험을 진행하였다. 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모한 후, 미세상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 아세톤과 올리브 오일(3:1, v/v)을 혼합한 용액으로 1% DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 제조하여 일주일에 3번 마우스의 귀 뒤쪽과 등 부위에 200 μL를 도포하고, 일주일 후부터는 0.3% DNCB 200 μL를 하루에 한 번 동일한 부위에 고르게 도포하였다. 추출물은 0.3% DNCB 용액과 12시간 간격으로 하루에 한 번, 200 μL씩 2주 동안 마우스의 귀 뒤쪽과 등 부위에 고르게 도포하였다.

[0057] **<1-3> 마우스 비장세포 분리 및 배양**

[0058] 마우스를 디에틸에테르(diethyl ether)로 마취하여 희생시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장은 RPMI 1640 배지로 세척한 후, 조직마쇄기 (tissue grinder)로 균질화하여 세포를 유리시켰다. 세포 현탁액을 4℃, 1,800 rpm에서 5분간 원심분리 한 후, RBC lysis 버퍼 (Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH_4Cl, pH 7.2)에 10분간 정치시켜 적혈구를 제거하였다. 그 후, 10% FBS-RPMI 1640 배지를 첨가하여 2×10^6 cells/mL 농도로 희석된 비장세포 현탁액에 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), concanavalin A (ConA, 3 μg/mL) 및 외톨개모자반 메탄올 추출물 및 각 분획물을 농도별(50, 100 μg/mL)로 첨가하여 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 72시간 배양하였다.

[0059] **<1-4> 마우스 비장세포의 사이토카인 분비량 측정**

[0060] 상기 비장세포 배양액을 2,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 (Micro 17RT, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 분리한 후, ELISA-키트 (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 IFN-γ 및 IL-4 항체를 분주하여 코팅시키고, 10% FBS 용액으로 블로킹하였다. 배양액을 넣고 비오틴이 부착된 항-마우스 (biotinylated anti-mouse) IFN-γ, IL-4 항체와, 비오틴과 결합할 수 있는 스트렙타비딘 (streptavidin)이 부착된 스트렙타비딘 호스라디쉬 페록시다아제 컨쥬게이트 (streptavidin horseradish peroxidase conjugate)를 순차적으로 첨가하였다. OPD (σ-phehylenediamine) 용액을 첨가하여 암반응 시킨 후, 마이크로플레이트 리더기 (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0061] **<1-5> 마우스 비장세포 증식능**

[0062] 비장세포 현탁액을 2×10^6 cells/mL 농도로 96 well-plate에 분주한 후, 37℃, CO_2 incubator에서 70시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL MTT(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액을 첨가하고 2시간 재 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 이를 2,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리 한 후, 상층액을 제거하고 DMSO(Dimethyl sulfoxide, Sigma Chemical Co.)를 첨가하고 micro-plate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비장 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

[0063] Proliferation Index (%) = (Sample의 흡광도/ Control의 흡광도) × 100

[0064] **<1-6> 혈액 채취**

[0065] 실험 종료일에 마우스를 디에틸에테르(diethyl ether)로 마취시키고 대동맥으로부터 disposable syringe(Sungshim medical Co., LTD, Bucheon, Korea)를 이용해서 혈액을 대략 1.0 mL 채취하였다. 혈액은 10,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

[0066] **<1-7> 마우스 혈청의 사이토카인 분비량 및 총 IgE 함량 측정**

[0067] 마우스 혈청 내 total IgE, IL-4 cytokine은 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구매한 ELISA kit를 이용하였다. 각각 BD Bioscience와 R&D Systems 사가 제공하는 방법에 준하여 측정하고 정량하였다.

[0068] **<1-8> 피부 임상 중증도 점수 평가 및 등조직 관찰**

[0069] 시험 물질 도포 후 0, 7, 14, 21일이 되는 시점에 실시하였다. 본 평가 방법은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가 방법으로써 아토피성 피부염의 심각성 정도를 다음의 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반(erythema), 가려움과 건조피부(pruritus & dry skin), 부종과 혈종(edema & excoriation), 짓무름(erosion) 및 태선화(lichemification)로 나누었고 각각의 항목을 없음(0), 약함(1), 보통(2), 심함(3)으로 채점한 후 합산함으로써 최소 0점에서 최고 15점 사이의 점수를 부여하였다. 등조직 관찰은 종료일에 등조직을 절제하여 10% formaldehyde 용액에서 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 및 톨루이딘블루(toluidine-blue) 염색을 하여 조직 두께 및 비만세포의 침윤 정도를 관찰하였다.

[0070] **<1-9> 용매별 계통분획**

[0071] 외톨개모자반 메탄올 추출물을 농축하여 메탄올을 제거한 후, 극성이 낮은 용매에서 높은 용매 순으로 순차적으로 분배 추출하였다. 즉, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 이용하여 분배 추출하였으며 비극성 용매의 경우, magnesium sulfate를 부가하여 용매 층의 수분을 제거하였다. 각 추출물을 농축하여 무게를 측정한 결과, hexane 층 13 g, chloroform 층 11 g, ethyl acetate 층 0.5 g, butanol 층 4.4 g이었다(도 1).

[0072] **<1-10> 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (Silica gel column chromatography)**

[0073] 외톨개모자반의 메탄올 추출물을 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)로 각각 분배 추출한 후, 활성이 강한 hexane 층을 감압 농축하였다. 농축한 hexane 층은 chloroform 및 chloroform-methanol(100:1→1:1, stepwise, v/v)을 용출용매로 이용하여 flash silica gel column chromatography를 수행하였다.

[0074] **<1-11> 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피 (Sephadex LH-20 column chromatography)**

[0075] 활성을 나타낸 chloroform-methanol(50:1, v/v) 분획물을 농축한 후 chloroform-methanol(1:1, v/v)을 용출용매로 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다.

[0076] **<1-12> 얇은 박막 크로마토그래피 (TLC, Thin Layer chromatography)**

[0077] Sephadex LH-20 column chromatography 후의 용출물은 silica gel TLC(hexane-ethyl acetate = 2:1, v/v) 분석을 통하여 두 개의 분획, tube 7~15(Fr. 1)과 tube 16~24(Fr. 2)로 나누었다. Fr. 2는 60~90% aqueous methanol을 용출용매로 이용하여 ODS Sepak cartridge를 이용한 chromatography를 수행하였으며, 그 결과 Fr. 3, Fr. 4, Fr. 5, Fr. 6, Fr. 7의 분획물을 확보하였다.

[0078] **<1-13> High performance liquid chromatography (HPLC)**

[0079] 각 분획물은 HPLC 분석(ODS column i.d. 4.6 x 150 mm, 50→100% aqueous methanol gradient, 1 mL/min)을 통하여 여섯 개의 분획 Fr. 4-1, Fr. 4-2, Fr. 4-3, Fr. 4-4, Fr. 4-5, Fr. 4-6)으로 나누었다. 최종적으로 Fr. 4-1 및 Fr. 4-2을 preparative HPLC(ODS column, i.d. 20 x 150 mm, 70% aqueous methanol, 9 ml/min)로 분취하여 retention time 60분대의 Mm-2 (52 mg)를 정제하였다.

[0080] **<1-14> 아토피 억제 활성 물질의 동정**

[0081] Fr. 4-2을 preparative HPLC(ODS column, i.d. 20 x 150 mm, 70% aqueous methanol, 9 mL/min)로 분취하여 retention time 60분대의 sargachromanol I (52 mg)를 정제하고 NMR 분광분석으로부터 본 화합물의 화학구조를 규명하였다. 또한 mass 분석을 통해 이를 확인하였다.

[0082] **<실험 예 1>**

[0083] **외톨개 모자반 메탄올 추출물의 항아토피 활성 측정**

[0084] **<1-1> 외톨개 모자반 메탄올 추출물 육안평가, 중증도 점수 평가 및 등조직 관찰**

[0085] 본 발명의 외톨개 모자반 메탄올 추출물에 항아토피 활성이 있는지 여부를 알아보기 위하여 DNCB 유도 아토피 피부염 동물모델에 도포한후 육안평가 및 중증도 점수를 평가하였다.

[0086] 그 결과, DNCB 단독 처리군은 아토피 피부염 증상인 건조, 짓무름, 홍반, 부종 등과 같은 증상이 지속적인 도포에 의해 심화되었다. 하지만 스테로이드제인 덱사메타손과 외톨개 모자반 메탄올 추출물을 2주간 도포시에는 정상군과 유사하게 아토피 피부염 증상이 회복되었음을 알 수 있었다(도 2 참조).아토피 피부염 증상 5가지에 대한 총 점수 합산 결과에서도, DNCB 단독 처리군은 유의적인 증가를 보였으나, 덱사메타손과 외톨개 모자반 메탄올 추출물 처리군은 총 점수가 상당히 낮아짐을 확인하였다(도 2 참조).

[0087] 등조직 관찰에서도 DNCB 단독 처리군은 경피 두께가 정상군에 비해 상당히 증가하였으나, 메탄올 추출물 처리군은 덱사메타손 처리군과 유사한 정도로 경피의 두께가 감소한 것을 확인하였다. 진피에서의 비만세포 침윤정도 관찰 결과에서도 DNCB 단독 처리군은 진피에 비만세포의 침윤이 증가하였으나, 메탄올 추출물 처리군은 덱사메탄손과 유사한 정도로 비만세포의 침윤이 감소한 것을 알 수 있었다(도 3 참조).

[0088] 따라서, 상기 결과로 보아 본 발명의 외톨개 메탄올 추출물은 아토피 증상의 완화에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0089] **<1-2> 외톨개 모자반 메탄올 추출물이 총 IgE 및 사이토카인 분비량에 미치는 영향 분석**

[0090] DNCB 유도 아토피 피부염 모델에서 덱사메타손과 외톨개 메탄올 추출물의 비장세포에 대한 증식능을 실험한 결과, 두 샘플 모두 정상군과 유사한 결과를 보여 세포에는 독성이 없는 것으로 확인되었다(도 4 참조).

[0091] 또한, 혈청에서 사이토카인 및 총 IgE 분비량 측정 결과, DNCB 단독 처리군에서는 분비량이 정상군에 비해 증가하였으며, 외톨개 메탄올 추출물 처리군에서는 DNCB 단독 처리구와 비교시 분비량이 감소하였고, 덱사메타손과 비슷한 감소 결과를 보여, 항아토피 효과가 있음을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0092] 따라서, 상기의 결과로 미루어 보아 본 발명의 외톨개 모자반 메탄올 추출물은 면역 반응 조절을 통해 DNCB로 유도된 아토피 피부염 증상 완화에 효과적인 것으로 사료된다.

[0093] **<실험 예 2>**

[0094] **외톨개 모자반 유래의 항아토피 활성 물질 분리**

[0095] **<2-1> 외톨개 모자반 메틴올 추출물 및 용매별 분획물의 항아토피 활성**

[0096] 외톨개 모자반 메탄올 추출물을 ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 IFN-γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 살펴본 결과, 모든 농도에서 억제 효과가 있었지만 특히 IFN-γ에 대해 100 μg/mL의 농도로 처리 시 99% 이상의 분비 억제율을 보여(도 7 및 8 참조), 매우 우수한 항아토피 효과가 있음을 확인하였다.

[0097] 이후 메탄올 추출물로 용매간의 극성차를 이용하여 *n*-헥산 (*n*-hexane), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 부탄올 (butanol) 및 물 분획으로 용매별 계통분획을 통해 순차적으로 분획물을 얻었다. 각 분획물을 ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 IFN-γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 살펴본 결과, 모든 농도에서 억제 효과가 있었지만 특히 *n*-헥산 추출물이 IFN-γ 분비를 100 μg/mL에서 98% 이상 억제하여 항아토피 효과가 우수함을 확인하였다(도 7 및 8 참조).

[0098] **<2-2> 외톨개 모자반 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 분획물의 항아토피 활성**

[0099] 실시예 <2-1>에서 가장 높은 항아토피 활성을 보인 *n*-헥산 (*n*-hexane) 분획물을 각각 클로로포름 (chloroform)과 메탄올 (methanol)을 용매계로 하여 비율별(100:1, 50:1, 20:1, 5:1, 1:1)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 분획물을 얻었다.

[0100] ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 IFN-γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 살펴본 결과, 각각 98%, 52%로 IFN-γ 및 IL-4의 분비량을 억제하여 50:1 분획물이 가장 높은 효과를 가짐을 확인하였다(도 9 및 10 참조).

[0101] **<2-3> 외톨개 모자반 얇은 박막 크로마토그래피 분획물의 항아토피 활성**

[0102] 가장 높은 항아토피 활성을 보인 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 50:1 분획물을 박막 크로마토그래피를 이용해 6개의 분획물을 얻었다. ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 IFN-γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 살펴본 결과, 4번 분획물을 100 μg/mL 농도로 처리 시 특히 IFN-γ 분비량을 ConA 처리구에 비해 96% 이상 억제함을 확인하였다(도 11 및 12 참조).

[0103] **<2-4> 외톨개 모자반 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분획물의 항아토피 활성**

[0104] TLC 분획물 중 가장 높은 항아토피 활성을 보인 4번 분획물을 HPLC를 이용해 6개의 peak를 얻었다. 각 peak를 분획물로 얻어 ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 IFN-γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 살펴본 결과, 4-2번 분획물을 100 μg/mL 농도로 처리 시 97% 및 45%의 사이토카인 분비 억제 효과를 보여 항아토피 효과가 있음을 확인하였다(도 13 및 14 참조).

[0105] **<2-5> 외톨개 모자반으로부터 얻은 항아토피 활성물질의 구조 확인**

[0106] 4-2번 분획물을 preparative HPLC로 분취하여 60분대의 peak를 정제하여 NMR을 이용해 구조동정을 한 결과, 도 6과 같은 구조를 가지는 단일물질 sargachromanol I를 분리하였다.

[0107] **<2-6> sargachromanol I의 항아토피 활성**

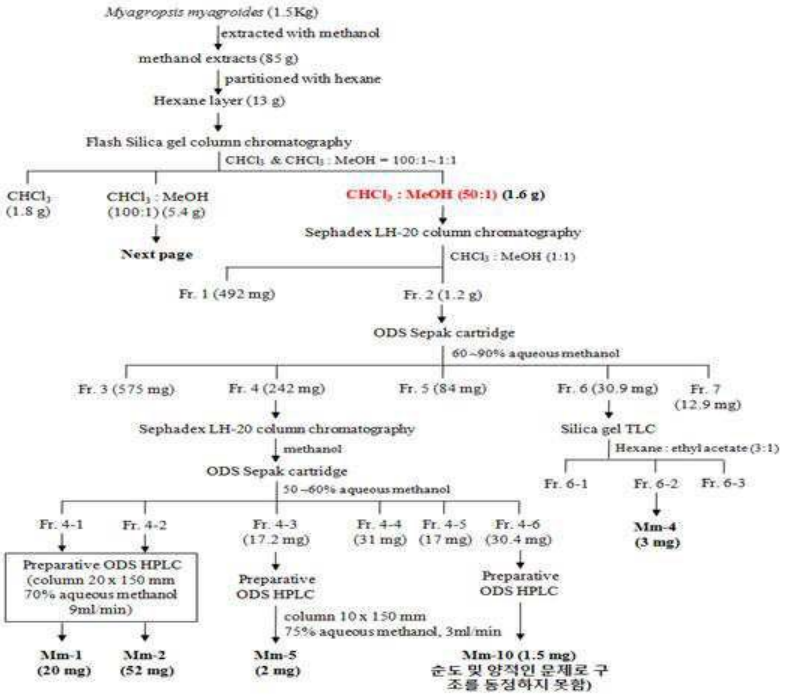
[0108] 본 발명자들은 상기 실시예 <2-5>의 방법으로 분리한 sargachromanol I에 아토피 억제 활성이 있는지 유무를 확인하기 위하여, ConA로 아토피 반응이 유발된 비장세포에 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 IFN-γ 및 IL-4의 분비 억제 효과를 살펴본 결과, 100 μg/mL 농도로 처리 시 IFN-γ 및 IL-4 분비를 각각 90%, 61% 억제하여 우수한 항아토피 효과가 있음을 확인하였다(도 15 및 16 참조).

[0109] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고

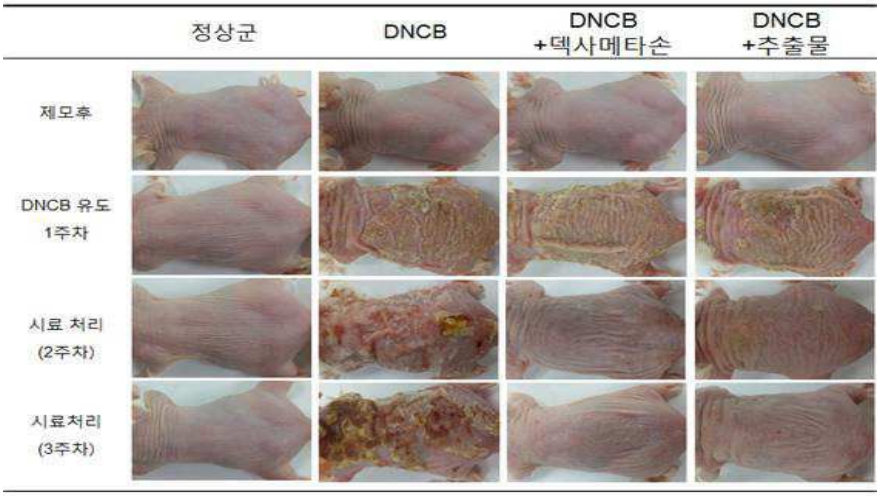
려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

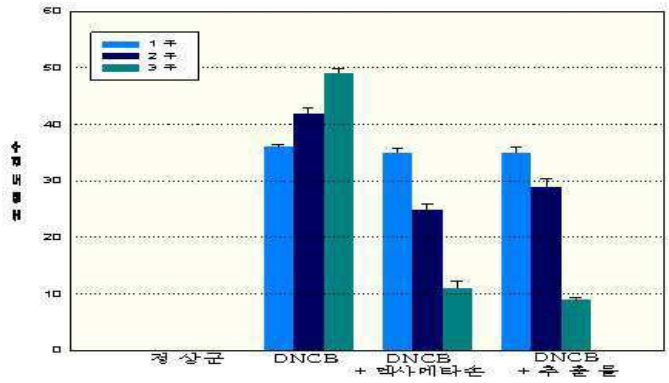
도면

도면1

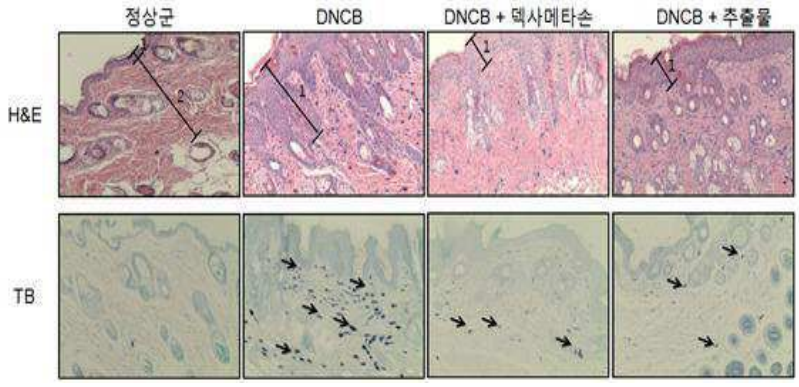


도면2

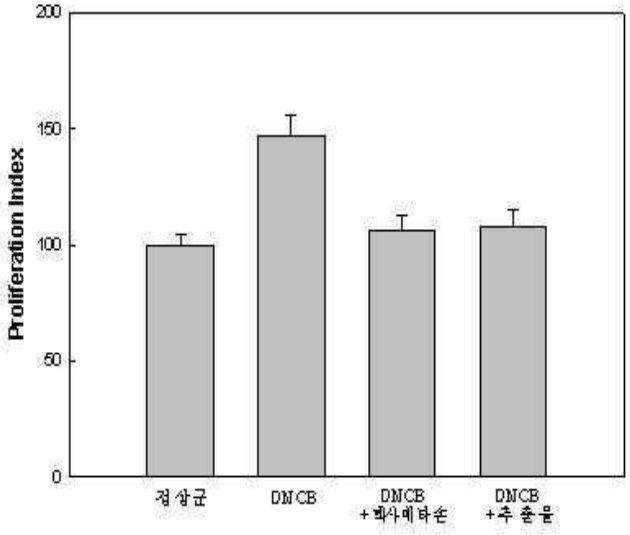

정상군
DNCB
DNCB +덱사메타손
DNCB +추출물
제모후
DNCB 유도 1주차
시료 처리 (2주차)
시료처리 (3주차)


60
50
40
30
20
10
0
1 주
2 주
3 주
정 상 군
DNCB
DNCB + 덱사메타손
DNCB + 추 출 물

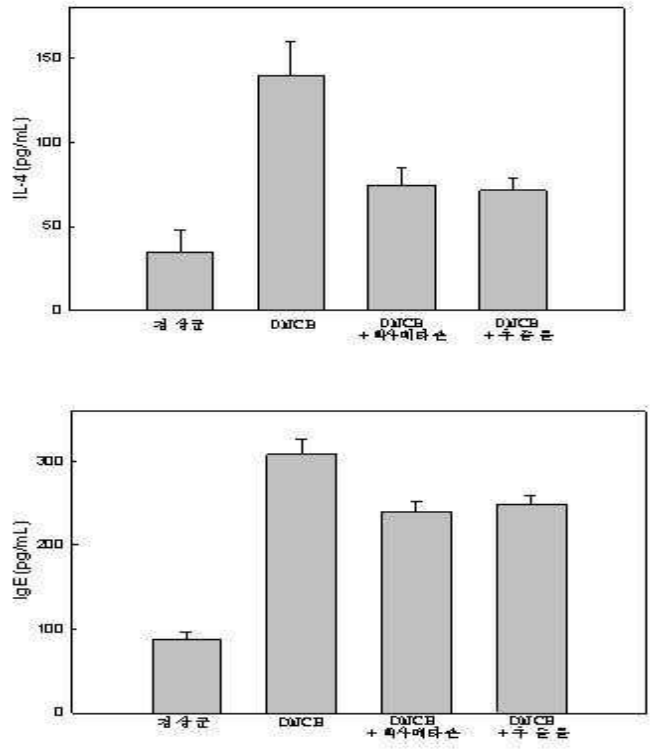
도면3


정상군
DNCB
DNCB + 덱사메타손
DNCB + 추출물
H&E
TB

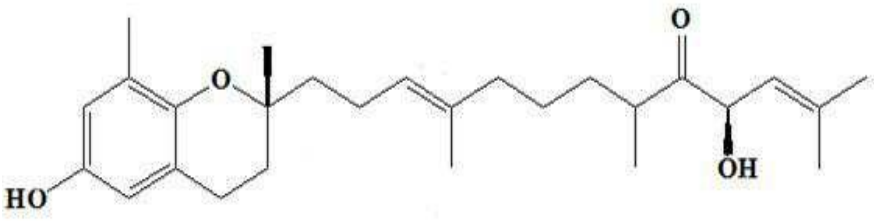
도면4


Proliferation Index
200
150
100
50
0
정상군
DNCB
DNCB
+ 파세이타손
DNCB
+추 출물

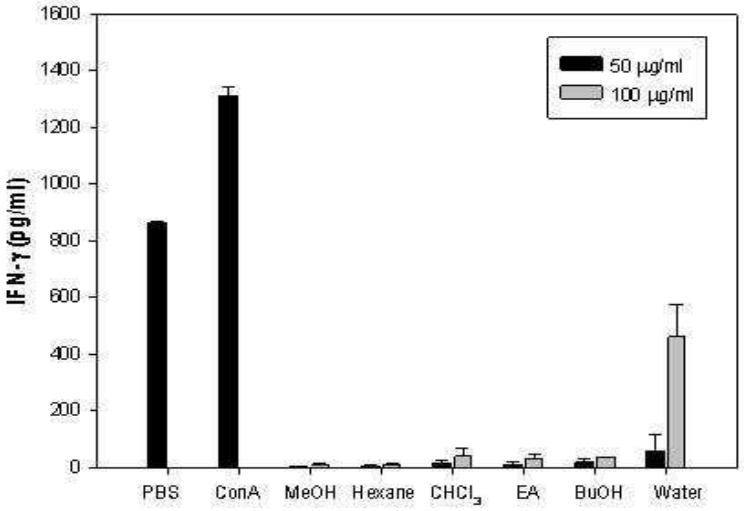
도면5


IL-4 (pg/mL)
150
100
50
0
정상군
DNCB
DNCB
+ 파세이타손
DNCB
+추 출 물
IgE (pg/mL)
300
200
100
0
정상군
DNCB
DNCB
+ 파세이타손
DNCB
+추 출 물

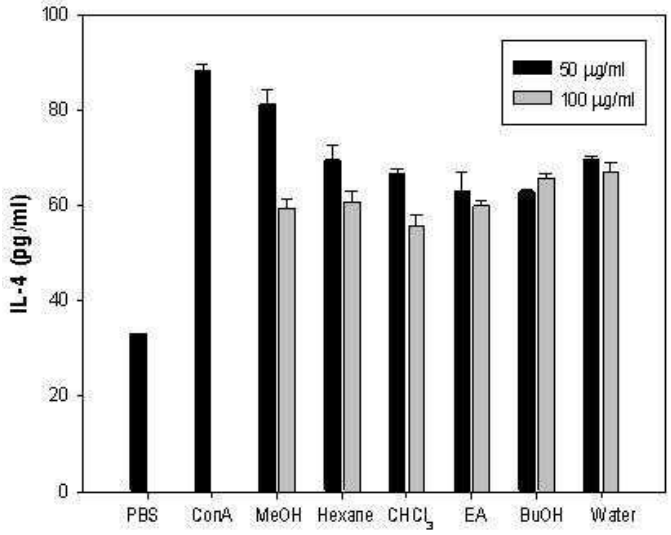
도면6


O
O
HO
OH

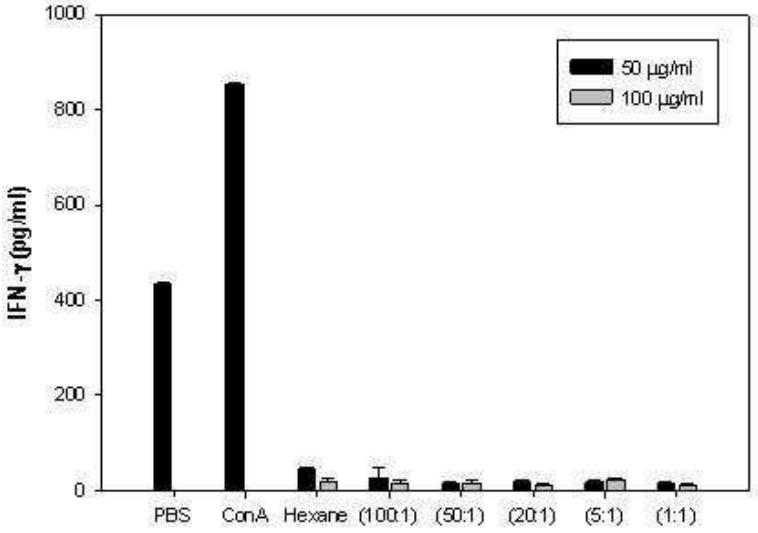
도면7


IFN-γ(pg/ml)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
50 μg/ml
100 μg/ml
PBS
ConA
MeOH
Hexane
CHCl3
EA
BuOH
Water

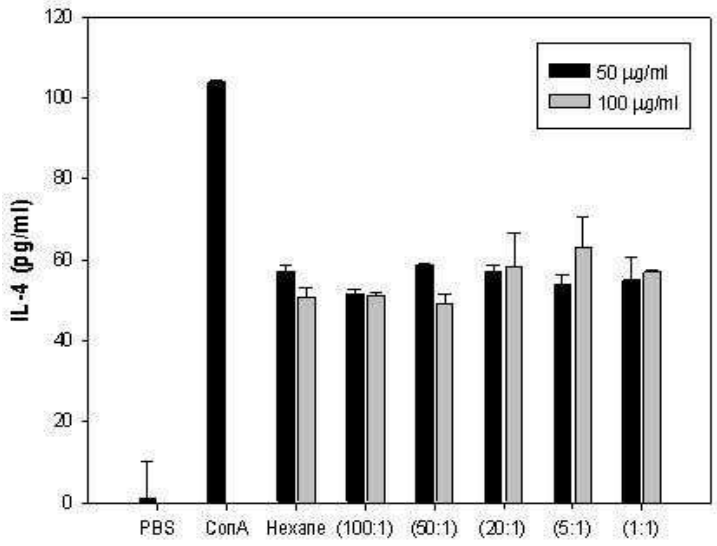
도면8


IL-4 (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
50 μg/ml
100 μg/ml
PBS
ConA
MeOH
Hexane
CHCl3
EA
BuOH
Water

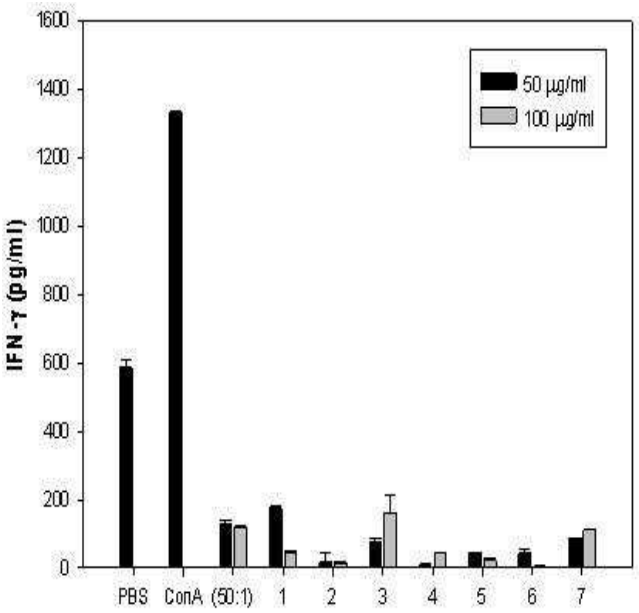
도면9


1000
800
600
400
200
0
IFN-γ (pg/ml)
50 μg/ml
100 μg/ml
PBS
ConA
Hexane
(100:1)
(50:1)
(20:1)
(5:1)
(1:1)

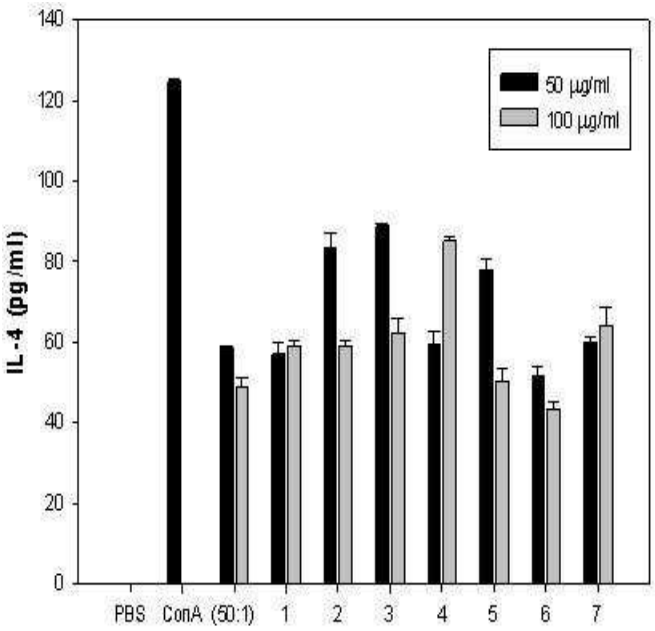
도면10


120
100
80
60
40
20
0
IL-4 (pg/ml)
50 μg/ml
100 μg/ml
PBS
ConA
Hexane
(100:1)
(50:1)
(20:1)
(5:1)
(1:1)

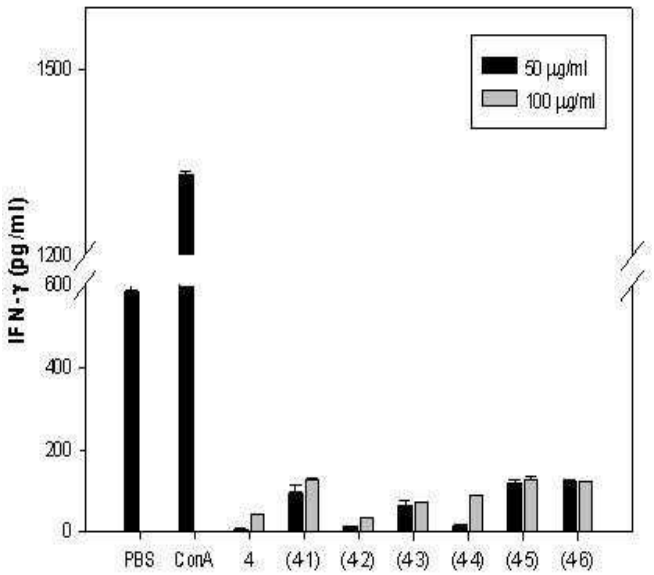
도면11


IFN-γ (pg/ml)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
50 μg/ml
100 μg/ml
PBS
ConA (50:1)
1
2
3
4
5
6
7

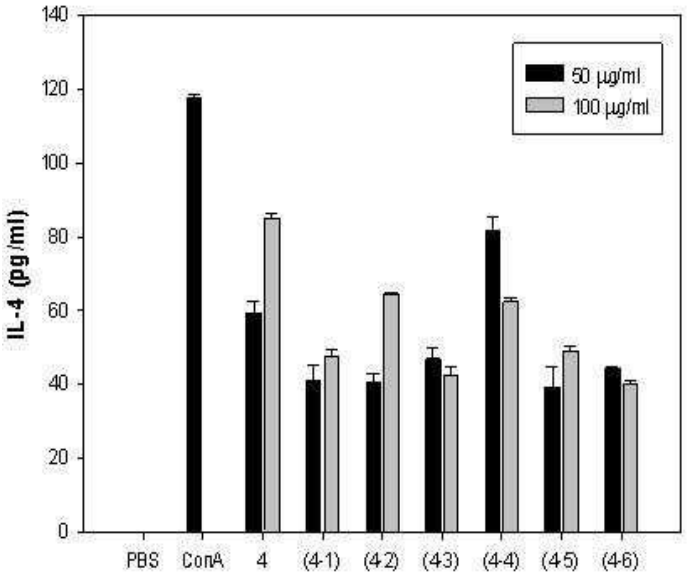
도면12


IL-4 (pg/ml)
140
120
100
80
60
40
20
0
50 μg/ml
100 μg/ml
PBS
ConA (50:1)
1
2
3
4
5
6
7

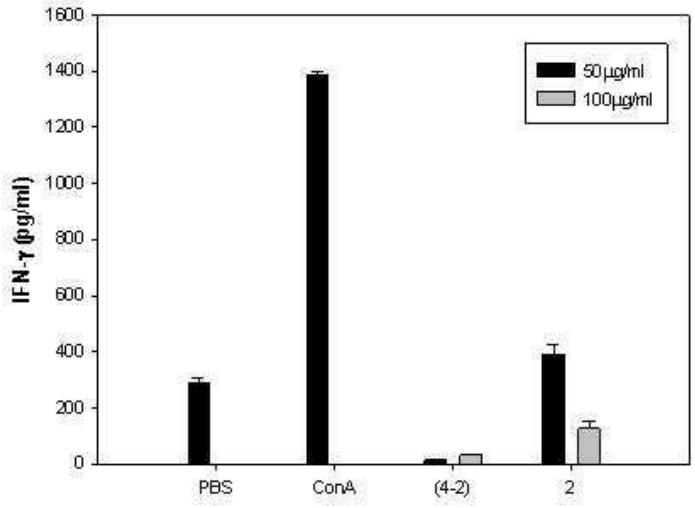
도면13


50 μg/ml
100 μg/ml
IFN-γ (pg/ml)
1500
1200
600
400
200
0
PBS
ConA
4
(4-1)
(4-2)
(4-3)
(4-4)
(4-5)
(4-6)

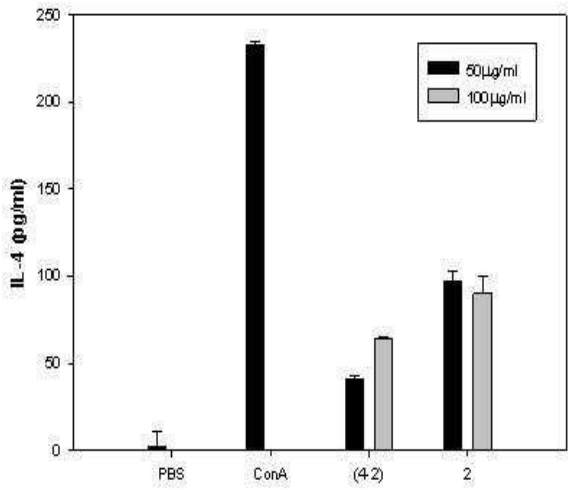
도면14


50 μg/ml
100 μg/ml
IL-4 (pg/ml)
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS
ConA
4
(4-1)
(4-2)
(4-3)
(4-4)
(4-5)
(4-6)

도면15


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IFN-γ (pg/ml)
50μg/ml
100μg/ml
PBS
ConA
(4-2)
2

도면16


250
200
150
100
50
0
IL-4 (pg/ml)
50μg/ml
100μg/ml
PBS
ConA
(4-2)
2