

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 23일 (23.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/147440 A2

- (51) 국제특허분류:
A23L 1/30 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A23L 2/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003983
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 18일 (18.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0054579 2009년 6월 18일 (18.06.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):
(주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 한강로 2가 181,
140-777 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 심범 (SHIM, Beom) [KR/KR]; 서울특별시 마포구 성산동 56-2 호, 121-250 Seoul (KR). 김선영 (KIM, Sun-Young) [KR/KR]; 서울특별시 서초구 서초 3 동 1562-8 두성빌라 B-302, 137-873 Seoul (KR). 김혁 (KIM, Hyuk) [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 구미동 무지개마을 1208 동 1401 호, 463-500 Gyeonggi-do (KR). 고재영 (KO, Jaeyoung) [KR/KR]; 서울특별시 동작구 상도 4 동 221-1 현진빌라 C-203, 156-842 Seoul (KR). 윤정훈 (YOON, Jeong

Hoon) [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 성북동 벽산첼시빌 509 동 401 호, 448-140 Gyeonggi-do (KR). 서정아 (SEO, Jung A) [KR/KR]; 대구광역시 북구 서변동 1795 월드메르디앙 701 동 1106 호, 702-798 Daegu (KR). 윤준원 (YUN, Jun-Won) [KR/KR]; 경기도 부천시 원미구 역곡동 대림이편한세상 301 동 502 호, 420-100 Gyeonggi-do (KR). 임경민 (LIM, Kyung Min) [KR/KR]; 경기도 화성시 반송동 시범다온마을 포스코더샵 아파트 320 동 1205 호, 445-724 Gyeonggi-do (KR). 주영협 (JOO, Yung Hyup) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 중동 백현마을 동일하이빌 2108-1901, 446-753 Gyeonggi-do (KR). 박영호 (PARK, Young-Ho) [KR/KR]; 서울특별시 동작구 사당 3 동 대림아파트 3 동 1201 호, 156-775 Seoul (KR). 이창석 (LEE, Chang Seok) [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 영통동 1013-11 번지 코쿤하우스 301 호, 443-470 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 서울특별시 종로구 수송동 80-6 석탄회관빌딩 10 층, 110-727 Seoul (KR).

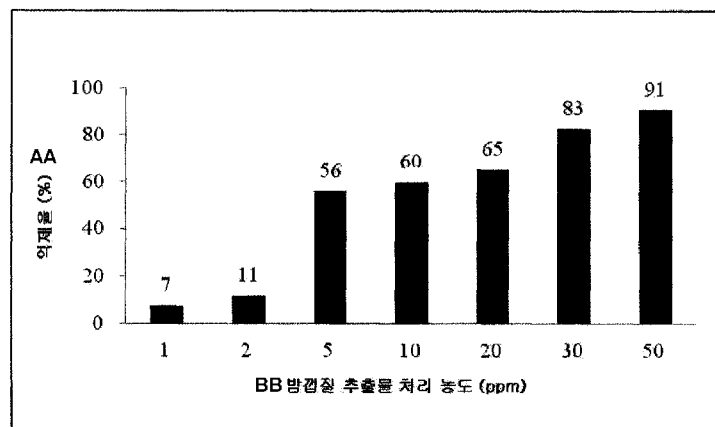
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HEALTH FOOD OR PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING CHESTNUT SHELL EXTRACT

(54) 발명의 명칭 : 밤껍질 추출물을 포함하는 건강 식품 또는 약학 조성물

[Fig. 1]



AA ... Percentage suppression (%)

BB ... Chestnut shell extract treatment concentration (ppm)

(57) Abstract: The present invention relates to a health food or pharmaceutical composition for alleviating or suppressing pruritus, comprising chestnut shell extract as an active ingredient. In one example of the present invention, the chestnut shell extract comprised in the health food or pharmaceutical composition of the present invention can suitably be used as the active ingredient of a health food or pharmaceutical composition for alleviating or suppressing pruritus as it has been confirmed that it can exhibit an outstanding effect in alleviating or suppressing pruritus by suppressing the activity of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) which is a source of stimulation in pruritus.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2010/147440 A2



KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 건강 식품 또는 약학 조성물에 포함되는 밤껍질 추출물은 본 발명에 따른 하나의 실시예에서, 가려움의 자극원인 단백분해효소 활성 수용체-2(Proteinase-Activated Receptor-2: PAR-2)의 활성을 억제함으로써, 우수한 가려움증 완화 또는 억제 효과를 발휘할 수 있음이 확인되었는 바, 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물의 유효 성분으로 적합하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 밤깍질 추출물을 포함하는 건강 식품 또는 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 밤깍질 추출물을 포함하는 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 가려움은 긁고 싶은 욕구를 유발하는 불유쾌한 피부 감각으로 정의 되어 있으며, 통증, 촉각, 차가움 또는 뜨거움과 같은 생리적 자기 방어기전으로서, 피부가 외부로부터의 해로운 자극에 노출되었을 때, 이를 인지하도록 하여 피부를 보호하는 역할을 한다.
- [3] 가려움증은 다양한 피부 질환 또는 전신 질환에서 흔히 나타나는 공통된 증상 중 한가지로, 두드러기나 여러 약물들의 부작용에 따른 급성 가려움증은 쉽게 치유될 수 있으나, 담도 폐쇄나 신장질환 또는 아토피 질환과 같은 중증의 만성 가려움증은 그 치료가 매우 어려운 실정이다.
- [4] 가려움은 염증이나 압, 대사성 질환, 감염, 정신과적 질병, 약물투여 또는 스트레스 등 다양한 원인에 의해 유발되며, 최근의 여러 연구결과는 피부와 말초신경계 및 중추신경계의 유기적 연결이 가려움을 유발시키는 자극에 대한 반응과 조절에 깊게 관여함을 밝히고 있다.
- [5] 최근, 특정 감각신경세포와 그들의 수용체들이 가려움에 특이적으로 반응함이 밝혀져, 가려움이 더 이상 통증의 하위 양상이 아닌 감각신경계의 개별적 감각으로 받아들여지고 있으며, 서로 다른 가려움 매개 물질들과 그 수용체들이 다양한 가려움 유발 질환들에 관여할 것으로 여겨지고 있다(Steinhoff et al., Journal of Investigative Dermatology, 126, pp1705-1718, 2006).
- [6] 지금까지의 가려움증 연구를 위한 실험에서 주로 히스타민이 사용되어 왔지만, 아토피와 같은 만성 가려움증에서는 히스타민 의존적 경로(pathway)에 의해서라기 보다는, 신경성 원인에 따를 것이라는 주장이 제기되고 있으며, 이는 왜 항히스타민이 아토피 질환의 가려움증에 효과적이지 못한지를 설명하고 있다(Stander et al., Experimental Dermatology, 11, pp12-24, 2002).
- [7] 또한, 일세대 항히스타민제는 주로 전신 투여하여 사용하는데, 항부교감 작용이 있어서 진정작용을 나타내고, 1 세대 항히스타민제인 클로르페니라민은 국소 투여시 아토피성 피부염 환자의 가려움을 억제시키지 못하는 것으로 알려져 있으며(Munday et al., Dermatology, 205, pp40-45, 2002), 피부 과민반응의 위험이 있기 때문에 아토피성 피부염에 국소 항히스타민제의 사용은 권장되지 않는다. 진정작용이 없는 2 세대 항히스타민제 에바스틴과 티페나딘은 사이토크롬(cytochrome) P450 활성을 저해하는 약물(ketoconazole,

erythromycin)과 함께 복용하면 부정맥을 일으킬 수 있어(Hey et al., Arzneimittelforschung, 46, pp159-163, 1996), 이와 관련된 부작용이 나타난다.

- [8] 따라서, 효과적이면서도 부작용이 적어 안전한 가려움증 치료제, 특히 아토피와 같은 만성 가려움증에 유효한 치료제의 개발에 대한 필요성이 시급한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 따라서, 본 발명은 과거로부터 요청되어 온 기술적 과제를 해결하는 것을 목적으로 한다. 구체적으로 본 발명의 일실시에 따른 목적은 밤껍질 추출물을 포함하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물, 피부 장벽 개선용 건강 식품 또는 약학 조성물 및 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 이러한 목적에 따라, 본 발명에 따른 일실시예는 종래의 가려움증 치료제들이 갖는 부작용을 줄이면서도, 탁월한 가려움증 억제 또는 완화 효과가 있는 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [11] 본 발명에 따른 일실시예는 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 장벽 기능 개선용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [12] 본 발명에 따른 일실시예는 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [13] 본 발명에 따른 일실시예는 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 아토피 피부염의 개선 또는 치료용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 조성물은 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함함으로써, 가려움의 자극원인 단백분해효소 활성 수용체-2(Proteinase-Activated Receptor-2: PAR-2)의 활성을 억제할 통해, 우수한 가려움증 완화 또는 억제를 발휘할 수 있으며, 가려움증으로 인해 유발되는 피부 장벽 파괴를 유의하게 개선할 수 있을 뿐 아니라, 밤껍질 추출물의 면역 억제활성을 통해 가려움증을 유발하는 원인이 될 수 있는 면역 과민성 반응을 근본적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 PAR-2 활성 억제 효과(트립신 처리)의 측정 결과를 나타낸 그래프이다;
- [16] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 PAR-2 활성 억제 효과(SLIGKV 처리)의 측정 결과를 나타낸 그래프이다;
- [17] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물의 PAR-2 활성 억제 효과(트립신, SLIGKV 처리)의 측정 결과를 나타낸 그래프이다;

- [18] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물의 가려움증(트립신 처리) 억제 효과를 나타낸 그래프이다;
- [19] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물의 가려움증(SLIGRL 처리) 억제 효과를 나타낸 그래프이다;
- [20] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 에탄올 추출물의 가려움증(SLIGRL 처리) 억제 효과를 나타낸 그래프이다;
- [21] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 에탄올 추출물 경구투여의 가려움증(SLIGRL 처리) 억제 효과를 나타낸 그래프이다;
- [22] 도 8은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 TNF- α 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [23] 도 9는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 IL-6 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [24] 도 10은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 IL-1 α 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [25] 도 11은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 IL-8 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [26] 도 12는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 GM-CSF 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [27] 도 13은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 IL-6 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [28] 도 14는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 IL-8 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [29] 도 15는 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 추출물의 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 GM-CSF 분비 감소 효과를 나타낸 그래프이다;
- [30] 도 16은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 에탄올 추출물의 피부 보습 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [31] 도 17은 본 발명의 일실시예에 따라 밤껍질 에탄올 추출물의 과각질화 개선 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [32] 도 18은 본 발명의 일실시예에 따라 NC/Nga모델에서 밤껍질 에탄올 추출물의 가려움증 개선 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [33] 도 19는 본 발명의 일실시예에 따라 NC/Nga모델에서 밤껍질 에탄올 추출물의 IgE 감소 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [34] 도 20은 본 발명의 일실시예에 따라 밤의 내피(속껍질) 및 외피(겉껍질) 추출물에 따른 PAR-2 활성 억제 효과의 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 본 발명은 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 출원의 발명자들은

단백분해효소 활성 수용체-2(Proteinase-Activated Receptor-2: PAR-2)를 가려움증 치료의 타겟으로 하여, 밤깍질 추출물에 의한 PAR-2의 활성 억제 정도를 측정한 결과, 하기 실시예에 입증된 바와 같이 시험관 내에서 우수한 PAR-2 길항 작용을 보임을 확인하였고, 또한 PAR-2를 특이적으로 활성화시키는 펩타이드인 SLIGRL, SLIGKV 또는 단백질분해효소인 트립신(Trypsin)에 의해 유발된 가려움 억제실험에서, PAR-2의 활성을 유의하게 억제하여 매우 우수한 가려움 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

- [36] 상기 가려움증은 소양증이라고도 하며, 이러한 가려움증의 유발 원인 또는 형태는 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 염증성 피부염, 아토피성 피부염, 살갓의 거칠어짐으로 인한 피부염, 땀띠, 진무름, 동상, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 건선 및 유건선으로 이루어진 피부염 중 하나 이상으로부터 유발되는 것일 수 있다.
- [37] 가려움증의 경우, 계속되는 가려움으로 인해 지속적으로 피부를 문지르거나 긁거나, 또는 꼬집게 된다. 이에 의해, 피부의 진무름, 찰과상, 태선, 양진, 파색소 침착 또는 색소 침착의 감소 등 2차적인 피부손상이 유발되며, 피부에서 염증반응을 유도하는 여러 물질들이 분비되고, 이러한 분비는 다시 가려움을 증가시켜 가려움-긁기의 순환고리를 형성하게 된다.
- [38] 그러나, 본 발명에 따른 건강 식품 또는 약학 조성물에 포함된 밤깍질 추출물은 효과적인 피부 장벽 기능 개선 효과를 나타내는 바, 가려움에 의해 유발된 2차적인 피부 손상을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [39] 상기 조성물은 예를 들어, 아토피성 피부염으로부터 유래된 가려움에 의해 발생한 2차적인 피부 손상에 대하여, 피부 장벽 손상의 완화 또는 피부 장벽의 회복력 개선에 유의한 효과를 보이며, 이를 통해 유의하게 피부 장벽을 개선시킬 수 있다.
- [40] 상기 조성물은 특히, 피부 보습 증진 또는 피부 과각질화 방지를 통해 피부 장벽을 개선시킬 수 있으며, 하기 실시예를 통해 입증된 바와 같이 본 출원의 발명자들은 무모 생쥐(Hairless mice)에 옥사졸론(oxazolone)을 처리한 알러지 모델에서 실험을 진행하였고, 경표피수분손실(transepidermal water loss, TEWL)과 피부두께(skin thickness)를 측정한 결과, 밤깍질 추출물이 효과적인 피부 보습 증진 또는 과각질화 방지 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [41] 더욱이, 본 발명은 밤깍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 예를 들어 아토피, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 또는 크론씨병(Crohn's disease)의 치료를 위한 건강 식품 또는 약학 조성물일 수 있으며, 그 중에서도 면역 과민성 반응인 아토피 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물일 수 있다.
- [42] 아토피 질환이 피부의 손상 등으로 인한 급성 단계에서 만성질환단계로 발전할 때 면역매개물질들의 다양한 분비양상 변화가 관찰 되는데, 아토피질환을 앓고 있는 환자들의 손상된 피부에서 다수의 인터루킨(Interleukin)들의 농도가

증가하게 된다. 또한, 과립구 대식세포 집락 자극인자(GM-CSF)는 아토피 피부질환 환자들의 손상된 피부에서 그 분비량이 증가하여, 만성염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 아토피 환자의 면역체계의 불균형을 일으키게 된다(Matsubara et al., FEBS Letters, 566, pp195-200, 2004).

- [43] 이와 관련하여, 본 출원의 발명자들은 밤껍질 추출물이 면역 과민성 반응과 관련된 종양 괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-1 α (IL-1 α), 인터루킨-8(IL-8) 또는 과립구 대식세포 집락 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor: GM-CSF)의 발현을 유의하게 감소시킬 수 있음을 확인하였는 바, 밤껍질 추출물은 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물의 유효 성분에 적합하다.
- [44] 특히, 본 발명은 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하여 아토피 피부염의 개선 또는 치료용 화장료 조성물의 유효 성분에 적합하다.
- [45] 또한, 상기 인터루킨-6(IL-6) 및 인터루킨-8(IL-8)은 아토피질환에서 가려움을 유발하는 인자로도 알려져 있어, 밤껍질 추출물이 아토피 질환 유래의 가려움증 예방 및 치료를 위해 효과적으로 사용될 수 있다.
- [46] 상기 밤껍질은 밤나무의 과실을 싸고 있는 짙은 갈색의 껍질을 의미하며, 본 명세서에서 사용되는 밤껍질 추출물은 밤의 내피(율피), 외피 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 추출물을 의미하는 것일 수 있다.
- [47] 상기 밤껍질은 어떠한 종류의 밤으로부터 유래된 껍질이라도 무관하며, 특별히 제한되지 않으나 예를 들어, 밤(*Castanea crenata* S. et Z., *Castanea mollissima* Bl., *Castanea bulgaris*), 약밤(*Castanea Bungeana* Bl) 및 상두밤(*Castanea crenata* for. *multicarpa* (Uyeki) Chung)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 밤의 껍질일 수 있다. 밤껍질로는 밤의 내피(율피)가 사용될 수 있고, 밤의 외피(밤의 겉껍질)가 사용될 수 있으나, 특히 밤의 외피(밤의 겉껍질) 추출물을 처리한 군에서 우수한 PAR-2 길항 작용을 보임을 확인하였다.
- [48] 상기 밤껍질 추출물의 추출 방법은 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 1, 3-부틸글리콜 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매를 통해 추출될 수 있으며, 상기 용매는 예를 들어 물, 메탄올, 에탄올, 1, 3-부틸글리콜, 부탄올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 예를 들어 상기 밤껍질 추출물은 10~100% 알코올수용액 또는 10~100% 1, 3-부틸글리콜에서 추출될 수 있고, 구체적으로 밤껍질 20~90% 에탄올 수용액 추출물 또는 10~70% 1,3-부틸글리콜 추출물일 수 있으며, 더욱 구체적으로 밤껍질 40~90% 에탄올 수용액 추출물 또는 10~50% 1,3-부틸글리콜 추출물일 수 있으며, 더욱 구체적으로 밤껍질 60~90% 에탄올 수용액 추출물 또는 20~40% 1,3-부틸글리콜 추출물일 수 있다.
- [49] 상기 조성물에 포함되는 밤껍질 추출물의 함량은 특별히 제한되지 않으나, 조성물 총 중량을 기준으로 0.005 내지 80 중량%의 함량으로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.01 내지 30중량%로 포함될 수 있다. 상기 밤껍질 추출물의

함량이 너무 적으면, 효과가 미미할 수 있고, 너무 많으면 제형의 안정도가 낮아질 수 있다.

- [50] 경우에 따라서, 가려움증 완화 또는 억제, 피부장벽 개선 및 면역 억제를 위해 밤깍질 추출물과 항히스타민, 스테로이드, 국소마취, 면역 억제제 중 하나 또는 그 이상의 물질들과의 병용 또한 가능하다.
- [51] 종래 아토피성 피부염 및 가려움증 완화를 위한 기술은 항히스타민제의 복용이나 스테로이드제제를 외용제로 도포하는 것이었으나, 이들 제제의 경우 일시적 치료효능을 보이더라도 곧 재발한다는 단점을 갖고 있고, 아울러 이들 약물들을 복용 하였을 경우, 중추신경 장애, 소화기 장애 등의 부작용이 보고되고 있다. 부신피질호르몬인 스테로이드제제는 강력한 소염작용과 면역억제작용으로 효과가 우수하지만 부작용 또한 심각하며, 면역 억제제인 타크롤리무스 수화물 연고가 아토피성 피부염의 치료에 유효한 것으로 보고되고 있으나, 피부암을 유발 하거나, 피부손상 부위에 다량으로 체내 흡수되었을 때에는 신장 장애를 유발할 염려가 있어서 안전성 측면에서 장기적 사용이 어려운 실정이다.
- [52] 이에, 밤깍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물과 항히스타민, 스테로이드, 국소마취, 면역억제제 중 하나 또는 그 이상을 적절히 병용 할 경우, 가려움증 완화 또는 억제, 피부장벽 개선 및 면역 억제 등에 부작용을 동반하지 않고 안전하게 큰 효과를 나타낼 수 있다.
- [53] 상기 약학 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 상용되는 무기 또는 유기 담체를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 경구 투여 하거나, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있으며, 특히 경구 투여가 바람직하다.
- [54] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있으며, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [55] 또한, 상기 비경구 투여제는 예를 들어, 피부 외용제일 수 있으며, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 상기 건강식품 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제,

과립제, 드링크제, 카라멜, 다이어트바 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 건강식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

- [57] 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 약물의 1일 투여 용량은 투여하고자 하는 대상의 미만 진행 정도, 발병 시기, 연령, 건강상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라지지만, 성인을 기준으로 할 때 일반적으로는 상기 조성물 1 내지 500mg/kg, 바람직하게는 30 내지 200 mg/kg을 1일 1 내지 2회 분할하여 투여할 수 있으며, 상기 투여량은 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[58]

- [59] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범주가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[60] **[실시예 1] 밤겉질 추출물의 제조**

[61] **1-1) 밤겉질 1,3-부틸글리콜 추출물의 제조**

- [62] 밤겉질을 30% 1,3-부틸글리콜(1,3-buthylene glycol)을 이용하여 상온에서 3일간 침출시켰다. 이어, 250 메쉬, 3 μ m, 1 μ m, 0.5 μ m 크기의 여과기로 순차적으로 여과하였다. 이후, 0~4°C에서 3일간 방치(Standing)한 다음, 0.5 μ m, 0.3 μ m, 0.2 μ m 크기의 여과기로 순차적으로 여과하여 밤겉질 1,3-부틸글리콜 추출물을 얻었다.

[63] **1-2) 밤겉질 에탄올 추출물의 제조**

- [64] 밤겉질을 70% 에탄올을 이용하여 상온에서 3일간 침출시켰다. 이어, 250 메쉬, 3 μ m, 1 μ m, 0.5 μ m, 0.3 μ m, 0.2 μ m 크기의 여과기로 순차적으로 여과하였다. 이후 60°C에서 용액을 농축시킨 후 30°C에서 18시간 동안 진공 건조를 실시하여 밤겉질 에탄올 추출물을 분말 형태로 얻었다.

[65]

[66] **[시험예 1] 밤겉질 에탄올 추출물의 PAR-2 활성 억제 효과(in vitro, Trypsin 처리, HEK: Human Epidermal Keratinocyte)**

- [67] 실험 하루 전 각질형성세포(세포주명: HaCaT 입수처: ATCC)를 96 웰(well) 플레이트에 4X10⁴cell/well이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, HBSS(Hanks'Balanced Salt solution) 버퍼로 96 웰 플레이트를 2회 세척(washing) 후, 반응 버퍼(reaction buffer: 2uM Fluo-4-AM, 20% pluronic acid, 2.5mM probenecid)를 세포에 넣어주었다. 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 30분, 상온에서 30분간 반응시킨 후, HBSS 버퍼로 2회 세척(washing)하고 밤겉질 에탄올 추출물을 세포에 각각 1ppm, 2ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm 및 50ppm의 농도로 처리하였다. 10분간 반응시킨 후, 2U/ml 트립신(Trypsin)을 처리하고 80초간 세포 내 Ca²⁺ 농도 변화를 측정하였다. 세포 내 Ca²⁺ 농도 변화 측정은 플렉스테이션3(FlexStation3: Molecular Device, USA)를 이용하였다.

밤껍질 에탄올 추출물과 트립신(Trypsin) 처리 후, 80초간 플렉스(flex)를 측정하여 얻어낸 값의 최소값과 최대값의 차를 구한 후, 그 값을 트립신(Trypsin) 처리 시의 최소 값과 최대값의 차와 비교하여 억제율을 구하였다.

- [68] 도 1을 참조하면, 트립신에 의해 PAR-2의 N-말단에서 세린 시퀀스(sequence)를 잘라 PAR-2가 활성화되는 경우, 세포 내로 칼슘 이온들이 유입되는데, 밤껍질 추출물을 처리한 군의 경우 PAR-2 활성화가 억제되어 칼슘 이온의 유입이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있다.

[69]

- [70] **[시험예 2] 밤껍질 에탄올 추출물의 PAR-2 활성 억제효과(in vitro, SLIGKV 처리, HEK: Human Epidermal Keratinocyte)**

- [71] 실험 하루 전 각질형성세포(세포주명: HaCaT 입수처: ATCC)를 96 웰(well) 플레이트에 4×10^4 cell/well이 되도록 분주한 후 37°C , 5% CO_2 인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, HBSS(Hanks' Balanced Salt solution) 버퍼로 96 웰(well) 플레이트를 2회 세척(washing) 후, 반응 버퍼(reaction buffer: 2uM Fluo-4-AM, 20% pluronic acid, 2.5mM probenecid)를 세포에 넣어주었다. 37°C , 5% CO_2 인큐베이터(incubator)에서 30분, 상온에서 30분간 반응시킨 후, HBSS 버퍼로 2회 세척(washing)하고 밤껍질 에탄올 추출물을 세포에 각각 1ppm, 2ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm 및 50ppm의 농도로 처리하였다. 10분간 반응시킨 후, 5uM PAR-AP(SLIGKV)을 처리하고 80초간 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화 측정은 플렉스테이션3(FlexStation3: Molecular Device, USA)를 이용하였다. 밤껍질 에탄올 추출물과 5uM PAR-AP(SLIGKV) 처리 후 80초간의 플렉스(flex)를 측정하여 얻어낸 값의 최소값과 최대값의 차를 구한 후, 그 값을 5uM PAR-AP(SLIGKV)처리 시의 최소 값과 최대값의 차와 비교하여 억제율을 구하였다.

- [72] 도 2를 참조하면, 활성화 펩타이드인 SLIGKV(Human)가 직접적인 리간드로 작용하여 PAR-2가 활성화되면, 세포 내로 칼슘 이온들이 유입되는데, 밤껍질 추출물을 처리한 군의 경우 PAR-2 활성화가 억제되어 칼슘 이온의 유입이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있다.

- [73] **[시험예 3] 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물의 PAR-2 활성 억제효과(in vitro, SLIGKV 처리, HEK: Human Epidermal Keratinocyte)**

- [74] 실험 하루 전 각질형성세포(세포주명: HaCaT 입수처: ATCC)를 96 웰(well) 플레이트에 4×10^4 cell/well이 되도록 분주한 후 37°C , 5% CO_2 인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, HBSS(Hanks' Balanced Salt solution) 버퍼로 96 웰(well) 플레이트를 2회 세척(washing) 후, 반응 버퍼(reaction buffer: 2uM Fluo-4-AM, 20% pluronic acid, 2.5mM probenecid)를 세포에 넣어주었다. 37°C , 5% CO_2 인큐베이터(incubator)에서 30분, 상온에서 30분간 반응시킨 후, HBSS 버퍼로 2회 세척(washing)하고 밤껍질

1,3-부틸글리콜(BG) 추출물을 세포에 각각 0.1w/v%, 0.5w/v % 및 1 w/v%의 농도로 처리하였다. 10분간 반응시킨 후, 2U/ml 트립신(Trypsin) 또는 5uM PAR-AP(SLIGKV)을 처리하고 80초간 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화 측정은 플렉스테이션3(FlexStation3: Molecular Device, USA)를 이용하였다. 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물과 2U/ml 트립신(Trypsin) 또는 5uM PAR-AP(SLIGKV)처리 후 80초간의 플렉스(flex)를 측정하여 얻어낸 값의 최소값과 최대값의 차를 구한 후, 그 값을 2U/ml Trypsin 또는 5uM PAR-AP(SLIGKV)처리 시의 최소 값과 최대값의 차와 비교하여 억제율을 구하였다.

- [75] 도 3을 참조하면, 트립신 또는 PAR-2 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 세포 내 칼슘 이온들의 유입이 밤껍질 추출물의 농도를 높여줌에 따라 현저하게 감소됨을 확인할 수 있다.

[76]

- [77] [시험예 4] 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물의 트립신에 의해 유발된 가려움증 억제 효과

- [78] 무모 생쥐(Hairless mice)에서 트립신(in PBS buffer) 200 μ g/site 피내(ID) 주사 에 따른 스크래칭 행동 특성(scratching behavior)이 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물(in PBS buffer)을 각각 1w/v%, 10w/v % 및 20w/v%의 농도로 동시 주사하여 농도별로 억제됨을 관찰하였다. 각 측정치는 2회의 베이스라인(Baseline) 측정 평균값에 대한 % 변화로 표시하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

- [79] 도 4를 참고하면, 1,3-부틸글리콜(BG; vehicle) 처치군과 1% 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물 처치군은 트립신에 의해 유발된 가려움을 억제하는 효과는 없는 것이 관찰되었지만, 10%, 20% 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물 처치군은 억제효과가 매우 큰 것을 관찰할 수 있었다.

[80]

- [81] [시험예 5] 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물의 SLIGRL에 의해 유발된 가려움증 억제 효과

- [82] 무모 생쥐(Hairless mice)에서 SLIGRL(Murine PAR-2 활성 펩타이드 in PBS buffer) 50 μ g/site 피내(ID) 주사 에 따른 스크래칭 행동 특성(scratching behavior)이 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물(in PBS buffer)을 각각 1%, 10% 및 20%의 농도로 동시 주사하여 농도별로 억제됨을 관찰하였다. 각 측정치는 2회의 베이스라인(Baseline) 측정 평균값에 대한 % 변화로 표시하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

- [83] 도 5를 참고하면, 1% 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물 처치군에서부터 10%, 20% 밤껍질 1,3-부틸글리콜(BG) 추출물 처치군으로 밤껍질 추출물의 농도가 증가함에 따라 SLIGRL에 의해 유발된 가려움이 억제되는 정도가 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다.

[84]

[85] [시험예 6] 밤껍질 에탄올 추출물 피부 도포에 따른 SLIGRL에 의해 유발된 가려움증 억제 효과

[86]

각 시험군에 피부도포 처리한 밤껍질 추출물은 모두 물과 에탄올, 1,3 부틸글리콜을 5:3:2의 비율로 혼합한 용액에 녹여 사용하였으며, 시험 농도는 분말 형태의 밤껍질 에탄올 추출물을 1, 3 및 10w/v%의 농도로 사용하였다. 비히클(vehicle)군은 실시예1의 추출물을 첨가하지 않고 만든 제제를 사용하였으며, 가려움 유발 물질로는 PAR-2 활성 펩타이드(Activating Peptide(SLIGRL; 설치류 유래 펩타이드))를 PBS 버퍼에 녹여 50 μ g/site의 농도로 피내주사 하였다.

[87]

밤껍질 에탄올 추출물의 각 시료들을 200 μ l 취하여 무모생쥐의 등 부위에 넓게 펴 바르는 방식으로 처리하였다. 오전과 오후로 나누어 1일 2회 4일간 처리하였고, 5일째 오전 가려움 유발 물질 주사 30분 전에 마지막으로 처리하였다.

[88]

가려움 유발 물질(PAR-2 활성 펩타이드; SLIGRL)에 의한 가려움의 증가와 밤껍질 에탄올 추출물에 의한 가려움 감소 여부를 비교하기 위하여 밤껍질 에탄올 추출물의 피부도포 이전 2일간 매 측정당 40분 동안의 긁는 횟수를 측정하여 2일 간의 평균치를 계산한 값을 자극원 주입 후 40분간의 긁는 횟수와 비교하여, %변화 값으로 나타내었다.

[89]

가려움 실험은 가려움 유발 물질을 주사하기 20분 이전에 관찰용 투명 우리에 무모생쥐를 넣어 20분간 적응하는 시간을 주는 것으로 시작하였다. 적응 시간이 끝나면 가려움 유발 물질(PAR-2 활성 펩타이드; SLIGRL)을 적응이 끝난 시험용 무모생쥐의 등 부위 피부에 피내주사(intradermal injection)하였다. 주사가 끝나면 곧바로 다시 관찰용 우리에 무모생쥐를 넣은 후 40분간, 뒷다리로 가려움 유발 물질을 주사한 부위를 긁는 횟수를 측정하였다. 앞발로 긁거나 입으로 물어뜯는 행동은 제외하고 오직 뒷발로 주사부위를 긁는 행동만을 가려움 행동의 지표로 간주하여 측정하였다.

[90]

도 6을 참조하면, 밤껍질 에탄올 추출물(Chestnut Inner Bark Extract)을 피부에 도포해 준 후, 10% 농도에서는 가려움 자극을 주지 않은 정상 상태에서도 긁는 횟수가 감소하였으며, 가려움 자극을 준 경우는 1% 농도에서부터 긁는 횟수가 감소함을 확인할 수 있다.

[91]

[92] [시험예 7] 밤껍질 에탄올 추출물 경구투여에 따른 SLIGRL에 의해 유발된 가려움증 억제 효과

[93]

실시예 1에서 수득한 추출물을 8주령의 암컷 무모생쥐(Hairless mice)에게 경구 투여하여 가려움증 억제효과를 관찰하였다.

[94]

각 시험군에 경구투여 처리한 밤껍질 추출물은 모두 증류수와 섞어 현탁액으로 만들어 사용하였으며, 시험 농도는 분말 형태의 밤껍질 에탄올 추출물을 각각

200 및 500mg/Kg의 농도로 경구투여 하였다. 비히클(vehicle)군은 실시예1의 추출물을 첨가하지 않고 순수 증류수를 사용하였으며, 가려움 유발 물질로는 PAR-2 활성 펩타이드(Activating Peptide(SLIGRL; 설치류 유래 펩타이드))를 PBS 버퍼에 녹여 50 μ g/site의 농도로 피내주사 하였다.

[95] 경구투여는 상기 시료들을 적정량 취하여 1일 1회 5일간 투여하였고, 5일째 오전 가려움 유발 물질 주사 30분 전에 마지막으로 투여하였다.

[96] 가려움 유발 물질(PAR-2 활성 펩타이드; SLIGRL)에 의한 가려움의 증가와 밤껍질 에탄올 추출물의 경구투여에 의한 가려움 감소 여부를 비교하기 위하여 밤껍질 에탄올 추출물의 경구투여 이전 2일간 매 측정당 40분 동안의 긁는 횟수를 측정하여 2일 간의 평균치를 계산한 값을 자극원 주입 후 40분간의 긁는 횟수와 비교하여, %변화 값으로 나타내었다.

[97] 가려움 실험은 가려움 유발 물질을 주사하기 20분 이전에 관찰용 투명 우리에 무모생쥐를 넣어 20분간 적응하는 시간을 주는 것으로 시작하였다. 적응 시간이 끝나면 가려움 유발물질(PAR-2 활성 펩타이드; SLIGRL)을 적응이 끝난 시험용 무모생쥐의 등 부위 피부에 피내주사(intradermal injection)하였다. 주사가 끝나면 곧바로 다시 관찰용 우리에 무모생쥐를 넣은 후 40분간, 뒷다리로 가려움 유발 물질을 주사한 부위를 긁는 횟수를 측정하였다. 앞발로 긁거나 입으로 물어뜯는 행동은 제외하고 오직 뒷발로 주사부위를 긁는 행동만을 가려움 행동의 지표로 간주하여 측정하였다.

[98] 도 7을 참조하면, 밤껍질 에탄올 추출물을 경구투여해 준 후, 가려움 자극에 대한 밤껍질의 억제효과가 농도에 따라 감소함을 확인할 수 있다.

[99]

[100] **[시험예 8] 밤껍질 추출물의 TNF- α 분비 감소**

[101] 실험 하루 전 피부 각화상피세포(Normal human skin keratinocyte, NHEK, 입수처: Lonza)를 96 웰(well) 플레이트에 5X10⁴cell/well이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, PBS로 세포를 2회 씻어주고 세럼 프리 KBM(serum free KBM(keratinocyte basement media))으로 갈아주었다. 각각의 웰(well)에 밤껍질을 농도별로 처리하고(10, 25, 50ppm) 30분간 반응시킨 후, PGSA(10, 50ppm), LPS(1ppm)를 각각 처리하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 배양한 후 배양액을 취하여 TNF- α 에 대한 ELISA를 진행하였다. ELISA는 제조회사(BD science)의 실험방법을 이용하였다.

[102] 도 8을 참조하면, 밤껍질이 PGSA와 LPS에 의해 증가한 TNF- α 의 분비를 현저히 감소시켜 주는 것을 관찰할 수 있다.

[103]

[104] **[시험예 9] 밤껍질 추출물의 IL-6 분비 감소**

[105] IL-6에 대한 ELISA를 진행한 것을 제외하고는 시험예 8과 실질적으로 동일한 방법을 이용하였다.

- [106] 도 9를 참조하면, 밤껍질이 PGSA와 LPS에 의해 증가한 IL-6의 분비를 현격히 억제시키는 것을 관찰할 수 있다.
- [107]
- [108] **[시험예 10] 밤껍질 추출물의 IL-1 α 분비 감소**
- [109] IL-1 α 에 대한 ELISA를 진행한 것을 제외하고는 시험예 8과 실질적으로 동일한 방법을 이용하였다.
- [110] 도 10을 참조하면, 밤껍질이 PGSA와 LPS에 의해 증가한 IL-1 α 의 분비량을 농도에 따라서 감소시켜 주는 것을 관찰할 수 있다.
- [111]
- [112] **[시험예 11] 밤껍질 추출물의 IL-8 분비 감소**
- [113] IL-8에 대한 ELISA를 진행한 것을 제외하고는 시험예 8과 실질적으로 동일한 방법을 이용하였다.
- [114] 도 11을 참조하면, 밤껍질이 PGSA와 LPS에 의해 증가한 IL-8의 분비를 현저히 감소시켜 주는 것을 관찰할 수 있다.
- [115]
- [116] **[시험예 12] 밤껍질 추출물의 GM-CSF 분비 감소**
- [117] GM-CSF에 대한 ELISA를 진행한 것을 제외하고는 시험예 8과 실질적으로 동일한 방법을 이용하였다.
- [118] 도 12를 참조하면, 밤껍질의 농도가 증가함에 따라 PGSA와 LPS에 의해 분비되는 GM-CSF의 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있다.
- [119]
- [120] **[시험예 13] 밤껍질 추출물의 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 IL-6 분비 억제효과**
- [121] 실험 하루 전 피부 각화상피세포(Normal human skin keratinocyte, NHEK, 입수처: Lonza)를 96 웰(well) 플레이트에 5×10^4 cell/well이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후, PBS로 세포를 2회 씻어주고 세럼 프리 KBM(serum free KBM(keratinocyte basement media))으로 갈아주었다. 각각의 웰(well)에 밤껍질 추출물을 농도별로 처리하고(10, 50ppm) 30분간 반응시킨 후, 트립신(10nM) 또는 PAR-2 활성화 펩타이드(SLIGKV, 50 uM)를 각각 처리하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 배양한 후 배양액을 취하여 IL-6에 대한 ELISA를 진행하였다. ELISA는 제조회사(BD science)의 실험방법을 이용하였다.
- [122] 도 13을 참조하면, 밤껍질 추출물이 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 IL-6의 분비를 농도의존적으로 억제함을 관찰할 수 있다.
- [123]
- [124] **[시험예 14] 밤껍질 추출물의 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 IL-8 분비 억제효과**
- [125] IL-8에 대한 ELISA를 진행한 것을 제외하고는 시험예 13과 실질적으로 동일한

방법을 이용하였다.

- [126] 도 14를 참조하면, 밤껍질 추출물이 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 IL-8의 분비를 농도 의존적으로 억제함을 관찰할 수 있다.

[127]

- [128] **[시험예 15] 밤껍질 추출물의 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 GM-CSF 분비 억제효과**

- [129] GM-CSF에 대한 ELISA를 진행한 것을 제외하고는 시험예 13과 실질적으로 동일한 방법을 이용하였다.

- [130] 도 15를 참조하면, 밤껍질 추출물이 트립신과 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 GM-CSF의 분비를 농도 의존적으로 억제함을 관찰할 수 있다.

[131]

- [132] **[시험예 16] 밤껍질 에탄올 추출물의 피부 보습 효과 측정**

- [133] 실시예 1의 밤껍질 에탄올 추출물의 장기간 피부손상으로 인한 피부장벽기능의 회복능력을 평가하였다. 우선, 출생 후 7 내지 8주가 경과한 젊은 무모생쥐(오리엔트, 한국)의 등(back)에 옥사졸론(oxazolone)을 1일 1회씩 6일동안 주기적으로 도포하여 실험동물의 피부장벽을 손상시켰다. 이후, 증발계(텔핀, 핀란드)로 경피수분손실량(Transepidermal Water Loss: TEWL)을 측정하여 시간당 50g/m² 이상의 경피수분손실을 나타내는 피부를 가진 실험동물을 군분리하여 1 및 5w/v%의 밤껍질 추출물 각각을 피부면적 5cm² 당 100 μ l 용량으로 1일 2회씩 10일간 연속 도포를 실시한 후, 실험동물의 경피수분손실량(TEWL)을 측정하였으며, 그 결과를 도 16에 나타내었다.

- [134] 도 16에 나타난 바와 같이, 무모 생쥐에 옥사졸론을 처리한 알러지 모델(Allergy model)에서 옥사졸론에 의해 유도된 피부염(atopic dermatitis)으로 인해 증가한 경피수분손실량은 밤껍질 추출물을 도포하는 것에 의하여 손상된 장벽기능을 회복시켜 정상피부로 되돌리는 기능이 있음을 알 수 있었다.

[135]

- [136] **[시험예 17] 밤껍질 에탄올 추출물의 과각질화 개선 효과 측정**

- [137] 실시예 1에서 밤껍질 에탄올 추출물의 피부 과각질화 개선효과를 평가하였다. 우선, 출생 후 7 내지 8주가 경과한 젊은 무모생쥐(오리엔트, 한국)의 등(back)에 옥사졸론(oxazolone)을 1일 1회씩 6일동안 주기적으로 도포하여 실험동물의 피부장벽을 손상시켰다. 이후, 증발계(텔핀, 핀란드)로 경피수분손실량(Transepidermal Water Loss: TEWL)을 측정하여 시간당 50g/m² 이상의 경피수분손실을 나타내는 피부를 가진 실험동물을 군분리하여 시험물질을 피부면적 5cm² 당 100 μ l 용량으로 1일 2회씩 10일간 연속 도포를 실시한 후, 등(back) 측정부위 좌우를 접어올려(two-folding measurement) 측미계(미쯔비시, 일본)를 이용하여 피부두께를 측정한 결과를 도 17에 나타내었다.

- [138] 도 17를 참조하면, 옥사졸론(oxazolone)에 의해 유도된 피부염으로 인해 증가한

피부 두께가, 밤껍질 추출물 분말 사용으로 피부 과각질화 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[139]

[140] [시험예 18] 밤껍질 에탄올 추출물의 NC/Nga 모델에서 IgE 감소와 가려움증 개선 효과 측정

[141] 실시예 1 에서 밤껍질 에탄올 추출물의 혈청내 IgE 감소와 가려움 개선효과를 NC/Nga 생쥐 모델로 평가하였다. 우선, 출생 후 7 내지 8주가 경과한 젊은 NC/Nga 생쥐의 등(back)부위를 클리퍼(clipper)를 이용하여 제모하고, 남아있는 털은 제모크림을 이용하여 완벽하게 제거하였다. 노출된 등 부위와 컷바퀴부위에 Df(dermatophagoides farinae) 100mg을 주 2회 3주간 4회 균일하게 도포하여, 아토피질환을 유발하였다. 주 5회 3주간 밤껍질 추출물을 100mg/kg 와 250mg/kg의 두 군으로 나누어 투여한 후, 가려움증 측정을 위해 관찰용 우리에 NC/Nga 생쥐를 넣은 후 2시간 동안, 뒷다리로 등 부위를 긁는 횟수를 측정하였다. 앞발로 긁거나 입으로 물어뜯는 행동은 제외하고, 오직 뒷발로 긁는 행동만을 가려움 행동의 지표로 간주하여 측정하였다. 혈청 IgE의 측정은 안와정맥총을 통해 채혈한 혈액샘플에서 혈청을 분리하여, BD 사이언스(BD science)의 옵트 IgE 키트(Opt IgE kit)를 이용하여 ELISA를 실시하여 측정하였다. 도 18에 250mg/kg 투여군에서 가려움이 비처리 군에 비해 감소한 것을 표시하였고, 도 19를 참조하면 IgE의 감소가 250mg/kg의 투여군에서 유의적으로 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[142]

[143] [시험예 19] 밤 겉껍질 에탄올 추출물과 밤 속껍질 에탄올 추출물의 PAR-2 활성 억제효과 비교(in vitro, SLIGKV 처리, HEK: Human Epidermal Keratinocyte)

[144] 밤의 겉껍질과 속껍질을 분리하여 건조한 후, 실시예 1-2)와 같은 방법으로 밤 겉껍질 추출물을 제조하였고, 밤 속껍질 추출물 또한 실시예 1-2)와 같은 방법으로 제조하였다. 시험예 2)에서와 같은 방법을 사용하여, 밤 겉껍질 에탄올 추출물과 밤 속껍질 에탄올 추출물의 PAR-2 활성 억제효과를 측정하여 하기 표 2 및 도 20에 나타내었다.

[145] [표 2]

[146]

	구분	농도	%억제율
PAR-AP(5uM)	밤 겉껍질	0.02%	3
		0.1%	9
		0.5%	88
		1%	100
	밤 속껍질	0.02%	5
		0.1%	8
		0.5%	2
		1%	-1

[147]

[148] **[시험예 20] 밤 겉껍질 에탄올 추출물과 밤 속껍질 에탄올 추출물의 PAR-2 활성 억제효과 비교(in vitro, SLIGKV 처리, HEK: Human Epidermal Keratinocyte)**

[149] 밤의 겉껍질(외피)과 속껍질(내피) 추출물의 농도를 하기 표 3에서와 같이 처리한 것을 제외하고는 시험예 19와 동일한 방법으로 PAR-2 활성 억제효과를 측정하였다.

[150] [표 3]

[151]

	구분	농도	%억제율
PAR-AP(5uM)	밤 겉껍질	5ppm	100
		10ppm	95
		50ppm	98
	밤 속껍질	5ppm	12
		10ppm	86
		50ppm	88

[152] 하기에 본 발명에 따른 조성물의 제형예를 설명하나, 약학 조성물 또는 건강식품 조성물은 여러 가지 제형으로 응용 가능하며, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[153]

[154] [제형예 1] 피부 외용제 중 연고

[155] 하기 표 1에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 연고를 제조하였다.

[156] [표 1]

[157]

배합 성분	함량 (중량 %)
실시에 1	0.1
글리세린	3.0
부틸렌글리콜	2.0
프로필렌글리콜	2.0
카르복시비닐폴리머	0.1
피이지-12 노닐페닐에테르	0.2
폴리솔베이트 80	0.4
에탄올	10.0
트리에탄올아민	0.1
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	잔량

[158]

[159] [제형예 2] 산제의 제조

[160] 실시예 1.....100 mg

[161] 유당.....100 mg

[162] 탈크.....10 mg

[163] 유지.....5 mg

[164] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[165] [제형예 3] 정제의 제조

[166] 실시예 1.....50 mg

[167] 옥수수전분.....100 mg

[168] 유당.....100 mg

[169] 스테아린산 마그네슘.....2 mg

[170] 비타민 C.....50 mg

[171] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[172]

- [173] [제형예 4] 캡슐제의 제조
 [174] 실시예 1.....50 mg
 [175] 옥수수전분.....100 mg
 [176] 유당.....100 mg
 [177] 스테아린산 마그네슘.....2 mg
 [178] 비타민 C.....50 mg
 [179] 세린.....50 mg
 [180] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

- [181]
 [182] [제형예 5] 액제의 제조
 [183] 실시예 1.....100 mg
 [184] 이성화당.....10 g
 [185] 만니톨.....5 g
 [186] 비타민 C.....50 mg
 [187] 세린.....50 mg
 [188] 유지.....적량
 [189] 정제수.....적량
 [190] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

- [191]
 [192] [제형예 6] 건강 식품의 제조
 [193] 실시예 1.....1000 mg
 [194] 비타민 혼합물
 [195] 비타민 A 아세테이트.....70 μ g
 [196] 비타민 E 1.0 mg
 [197] 비타민 B1.....0.13 mg
 [198] 비타민 B2 0.15 mg
 [199] 비타민 B6.....0.5 mg
 [200] 비타민 B12.....0.2 μ g
 [201] 비타민 C.....10 mg
 [202] 비오틴.....10 μ g
 [203] 니코틴산아미드.....1.7 mg
 [204] 엽산.....50 μ g
 [205] 판토텐산 칼슘.....0.5 mg
 [206] 무기질 혼합물

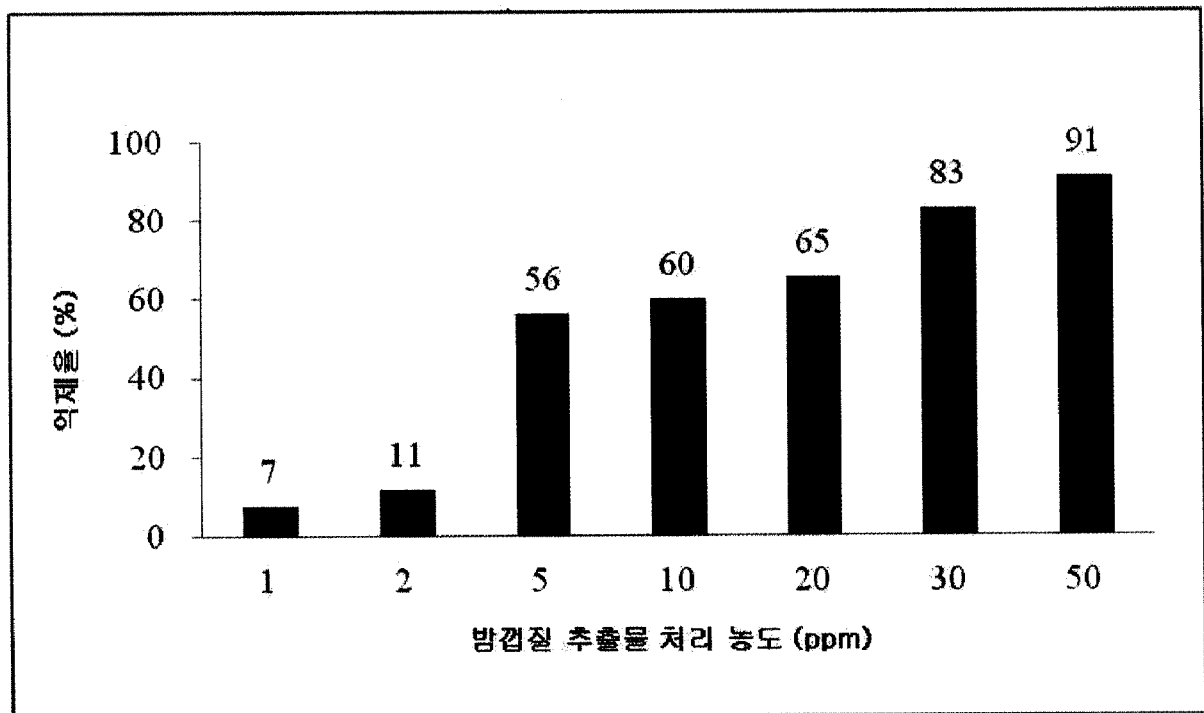
- [207] 황산제1철.....1.75 mg
- [208] 산화아연.....0.82 mg
- [209] 탄산마그네슘.....25.3 mg
- [210] 제1인산칼륨.....15 mg
- [211] 제2인산칼슘.....55 mg
- [212] 구연산칼륨.....90 mg
- [213] 탄산칼슘.....100 mg
- [214] 염화마그네슘.....24.8 mg
- [215] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [216]
- [217] [제형예 7] 건강 음료의 제조
- [218] 실시예 1.....1000 mg
- [219] 구연산.....1000 mg
- [220] 올리고당.....100 g
- [221] 매실농축액.....2 g
- [222] 타우린.....1 g
- [223] 정제수를 가하여 전체.....900 ml
- [224] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2°C용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [225] 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

청구범위

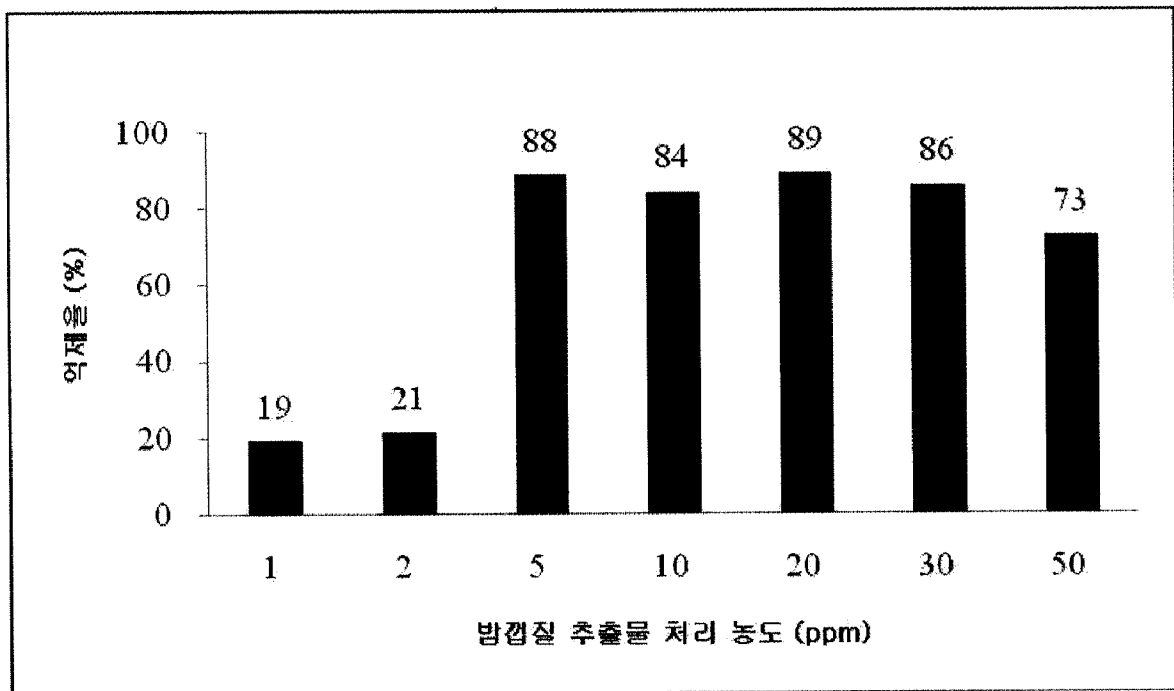
- [청구항 1] 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 염증성 피부염, 아토피성 피부염, 살갓의 거칠어짐으로 인한 피부염, 땀띠, 진무름, 동상, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 건선 및 유건선으로 이루어진 피부염 중 하나 이상으로부터 유발되는 가려움증을 완화 또는 억제하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 아토피성 피부염으로부터 유발되는 가려움증을 완화 또는 억제하는 가려움증 완화 또는 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 4] 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 장벽 기능 개선용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 조성물은 아토피성 피부염으로부터 유래된 피부 장벽 손상의 완화 또는 피부 장벽의 회복력 개선을 위한 것인 피부 장벽 개선용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 조성물은 피부 보습 증진 또는 피부 과각질화 방지를 위한 것인 피부 장벽 개선용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 7] 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 조성물은 아토피 질환의 예방 또는 치료를 위한 것인 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 9] 제 7 항에 있어서,
상기 조성물은 아토피의 치료를 위한 면역 억제용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 10] 밤껍질 추출물을 유효 성분으로 포함하는 아토피 피부염의 개선 또는 치료용 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 밤껍질 추출물은 조성물 총 중량을 기준으로 0.005 내지 80 중량%의 함량으로 포함되는 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 12] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 밤껍질은 밤의 내피, 외피 및 이들의 혼합물로 이루어진

- [청구항 13] 균에서 선택된 하나 이상인 건강 식품 또는 약학 조성물.
제 12 항에 있어서,
상기 밤껍질은 밤의 외피(겉껍질)인 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 14] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 밤껍질 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 1, 3-부틸글리콜 및 이들의 혼합 용매로부터 선택된 하나 이상의 용매를 통해 추출된 건강 식품 또는 약학 조성물.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 밤껍질 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 1, 3-부틸글리콜 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매를 통해 추출되는 건강 식품 또는 약학 조성물.

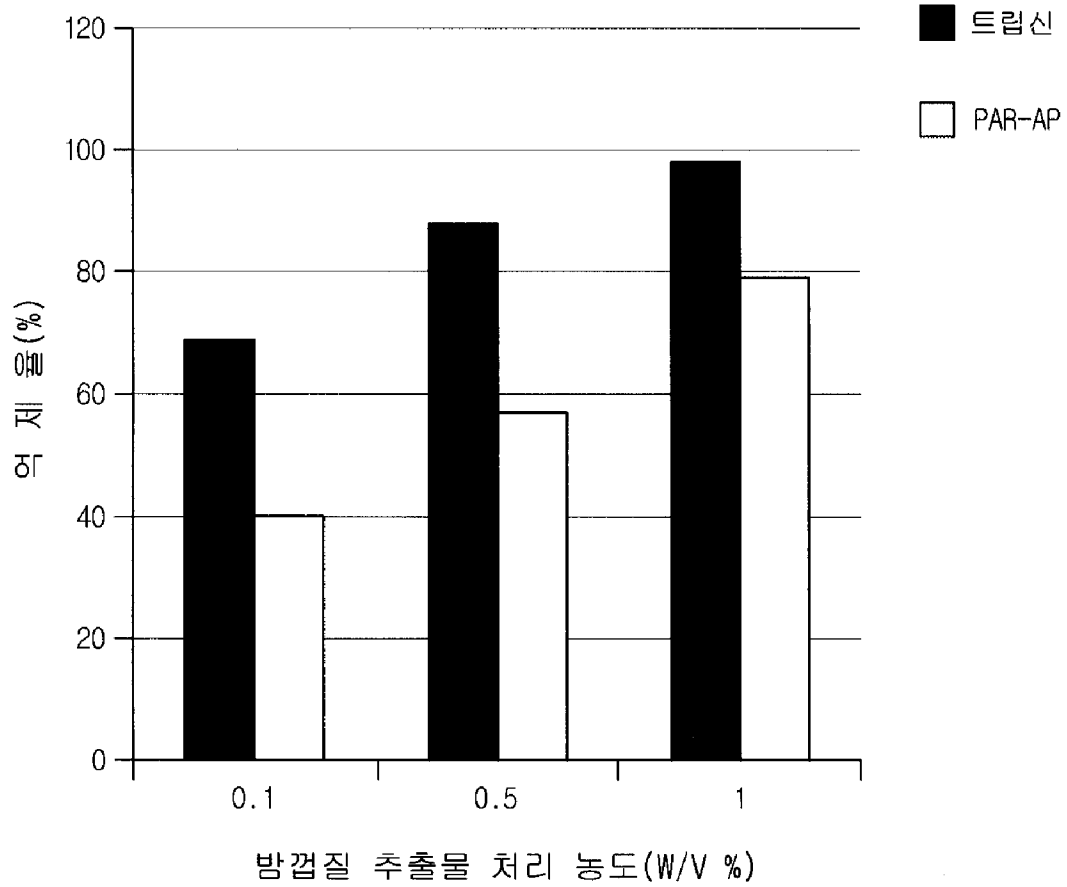
[Fig. 1]



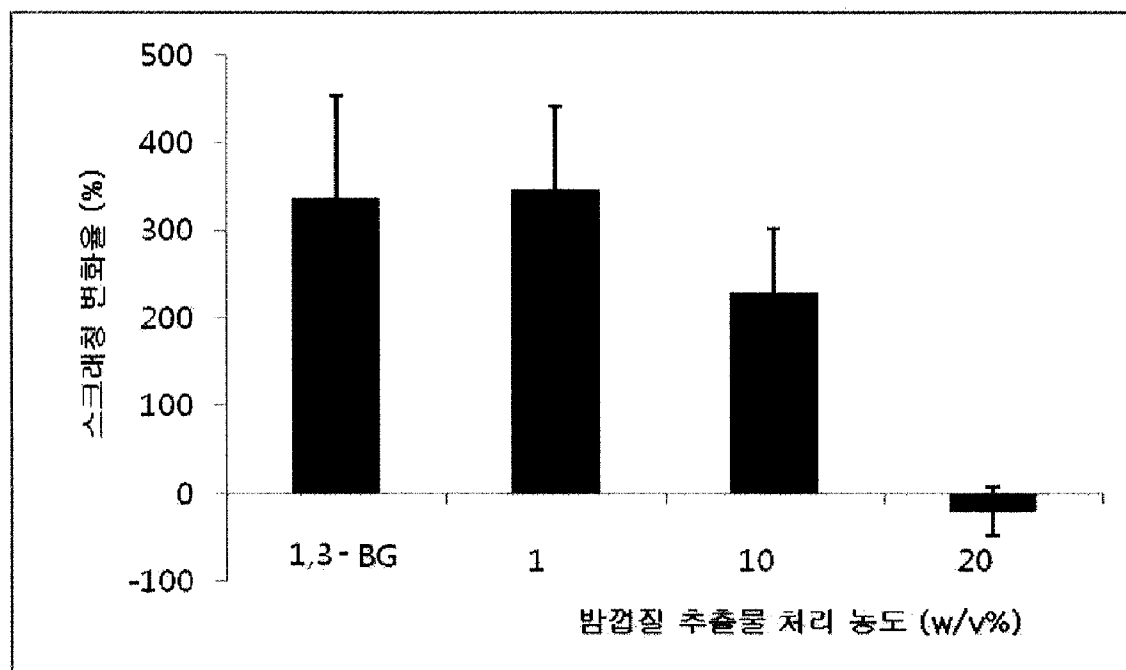
[Fig. 2]



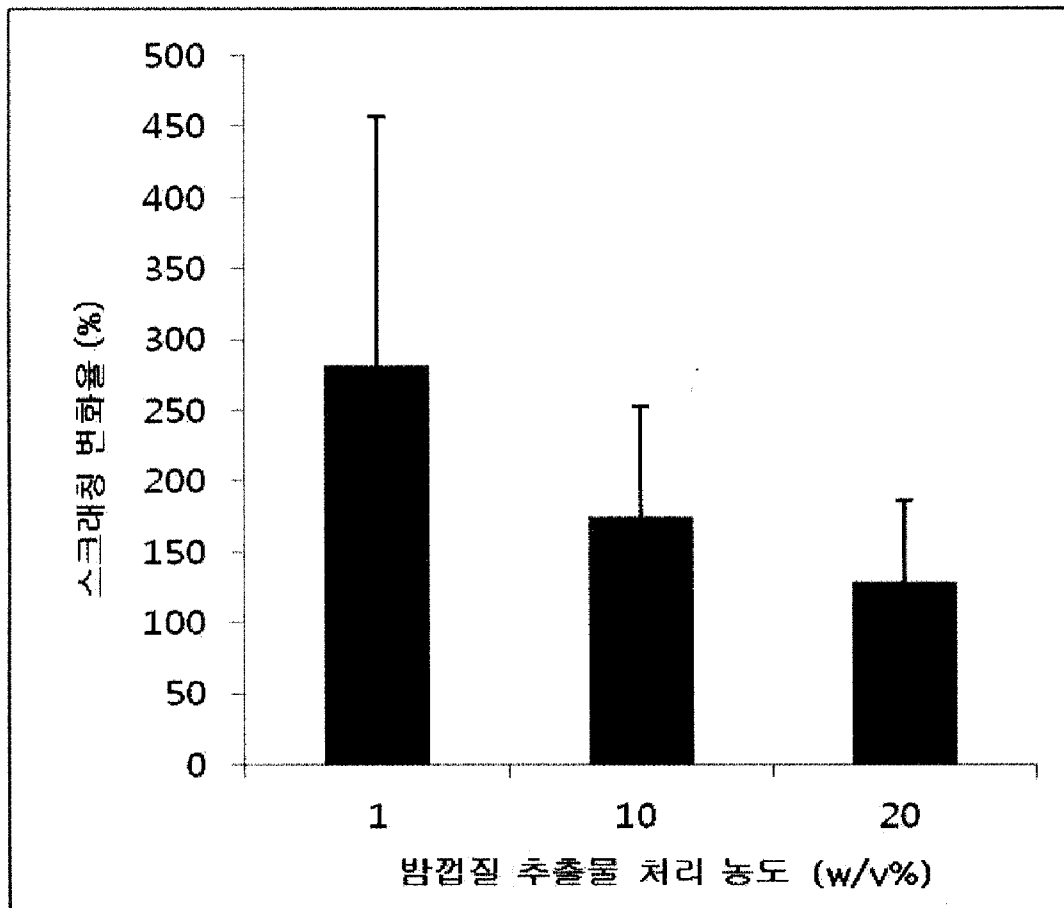
[Fig. 3]



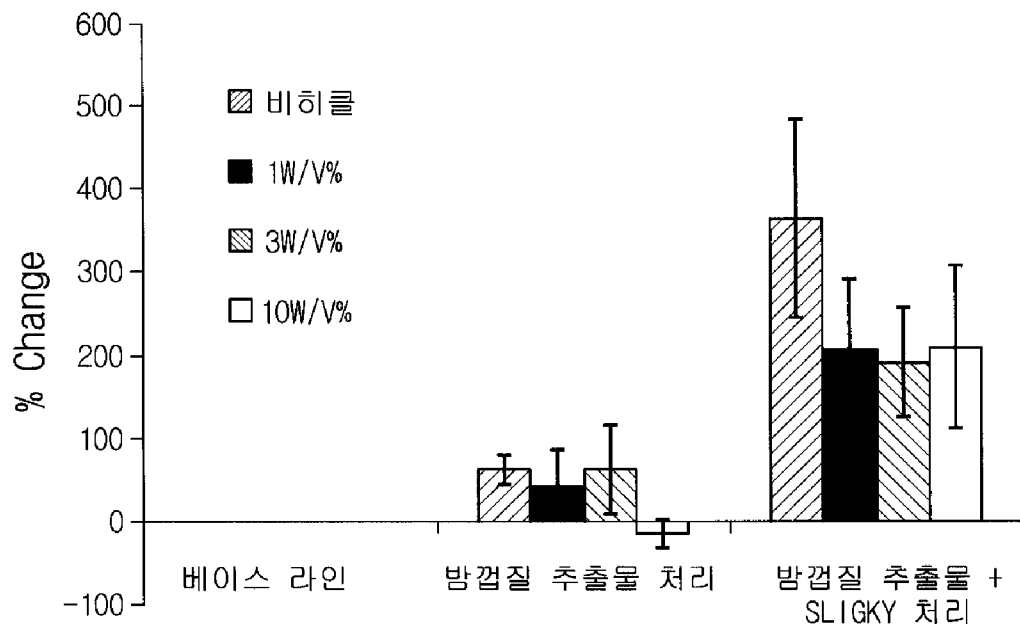
[Fig. 4]



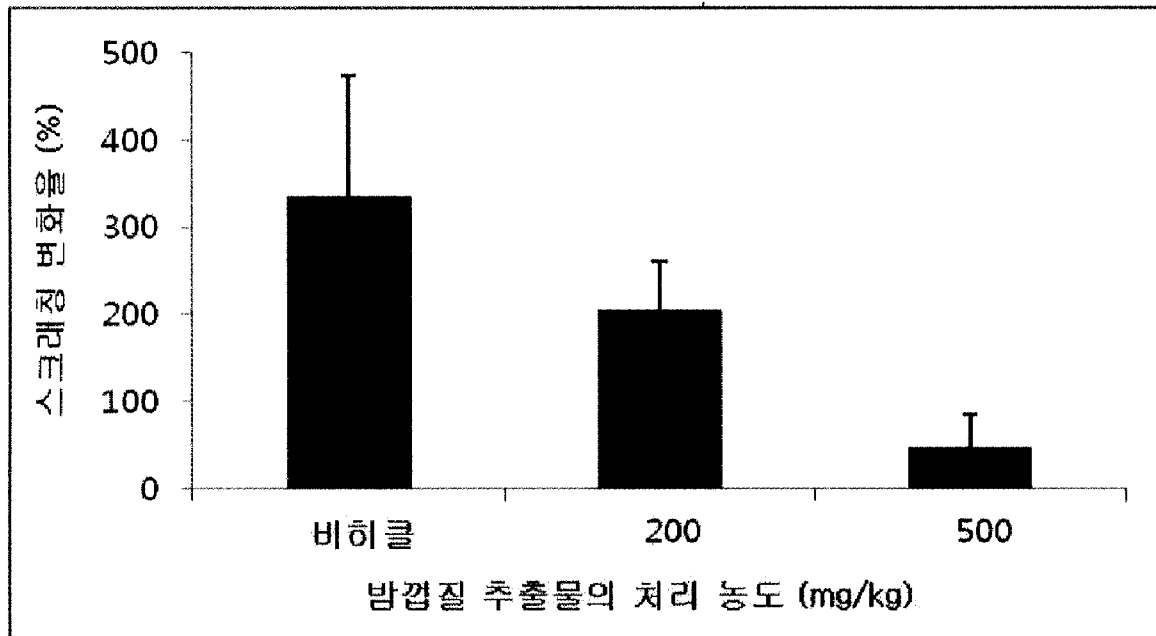
[Fig. 5]



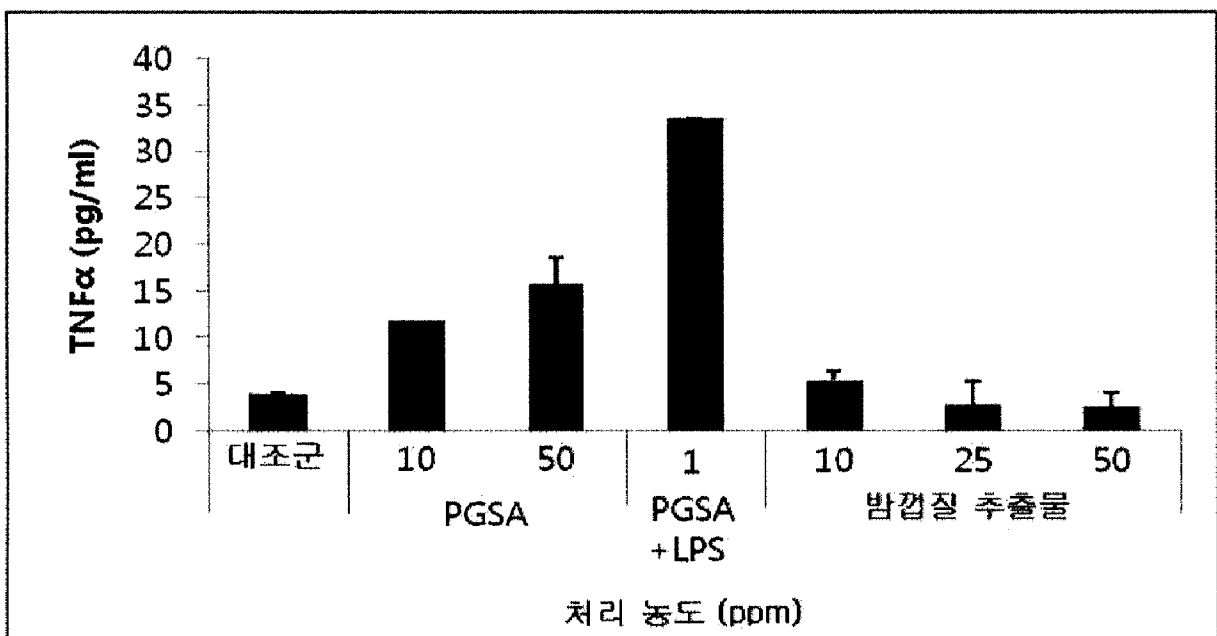
[Fig. 6]



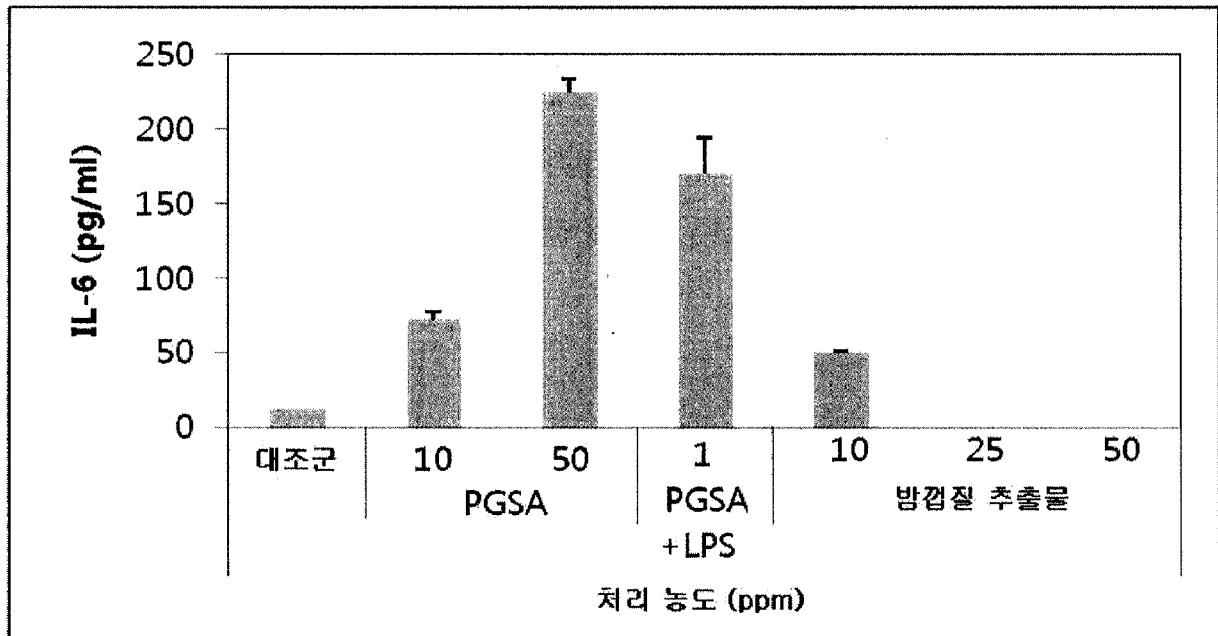
[Fig. 7]



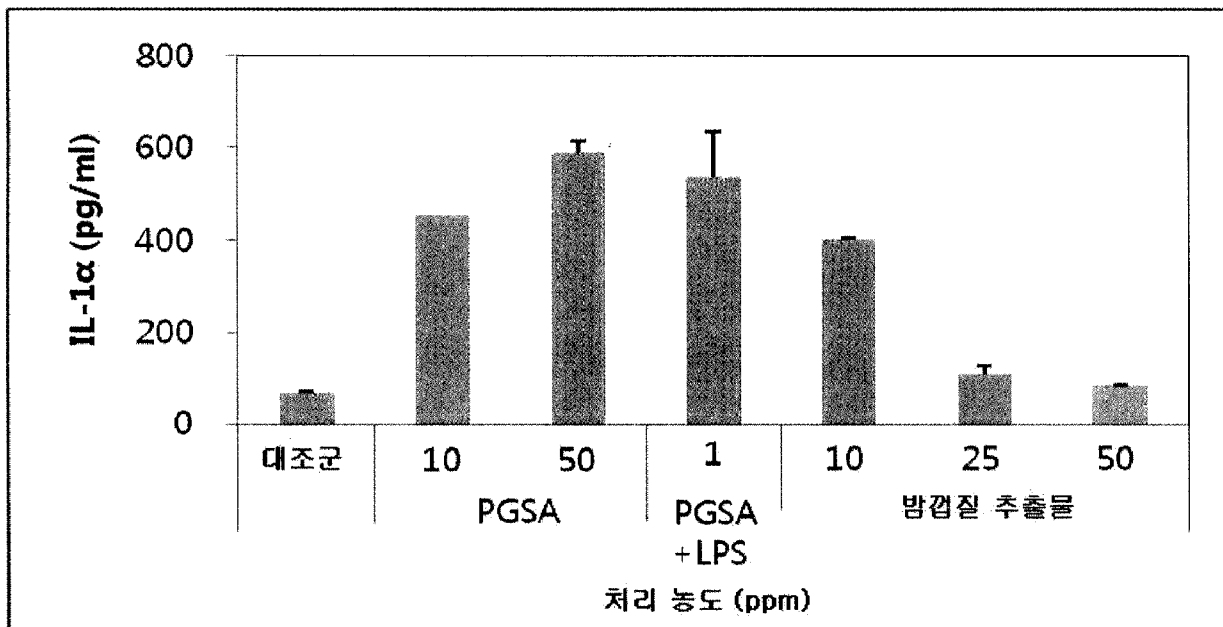
[Fig. 8]



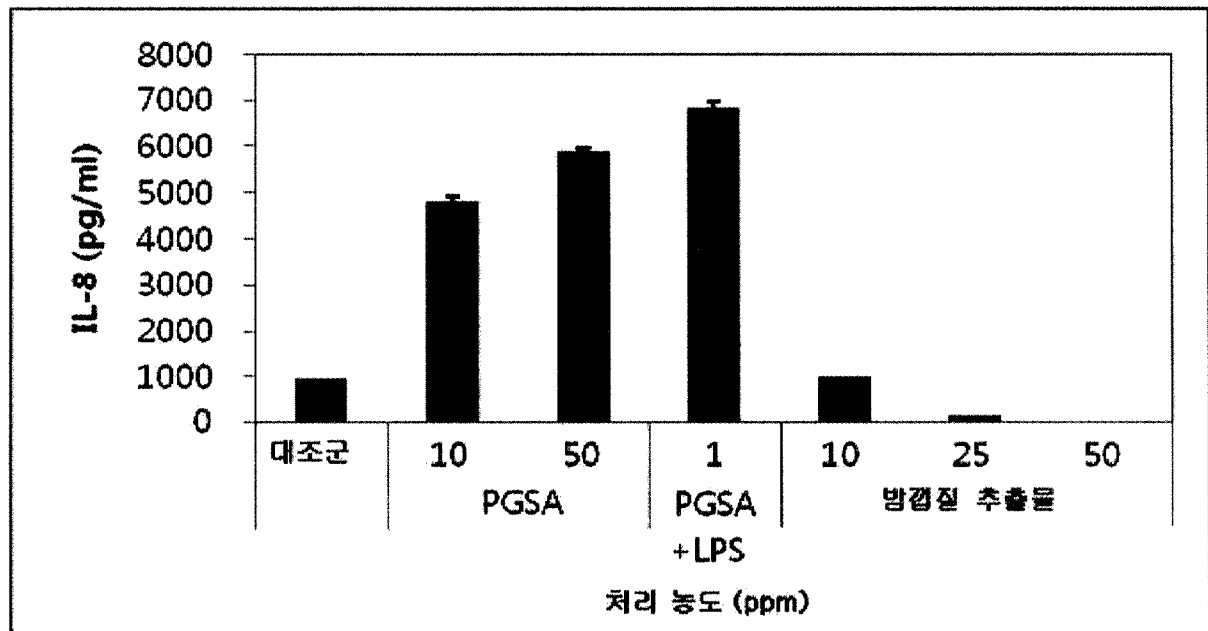
[Fig. 9]



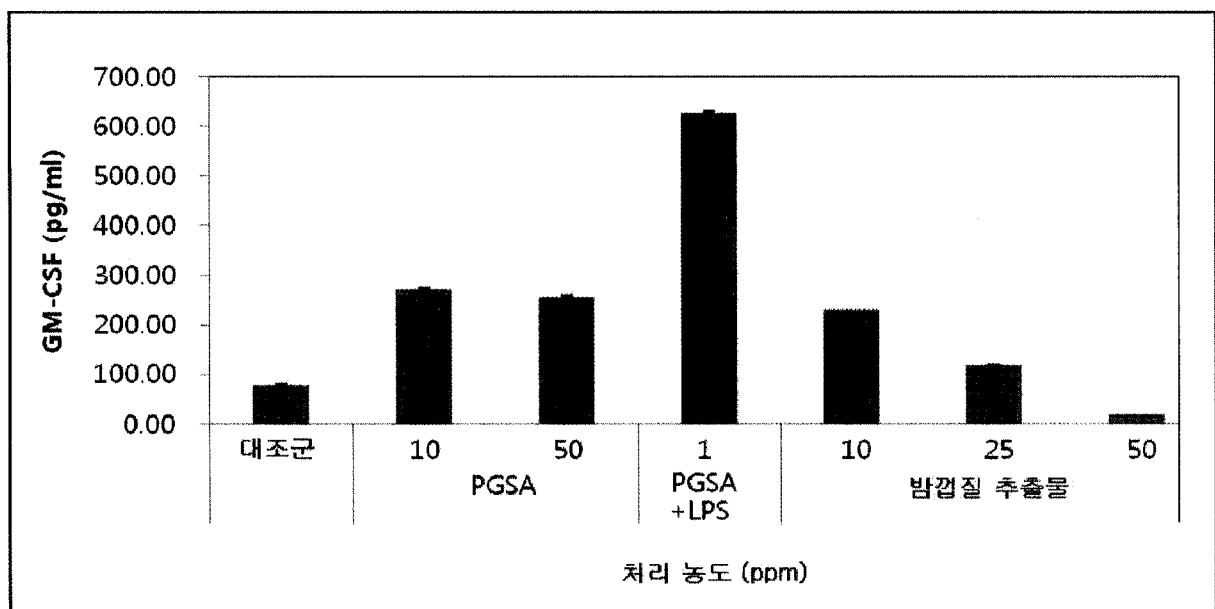
[Fig. 10]



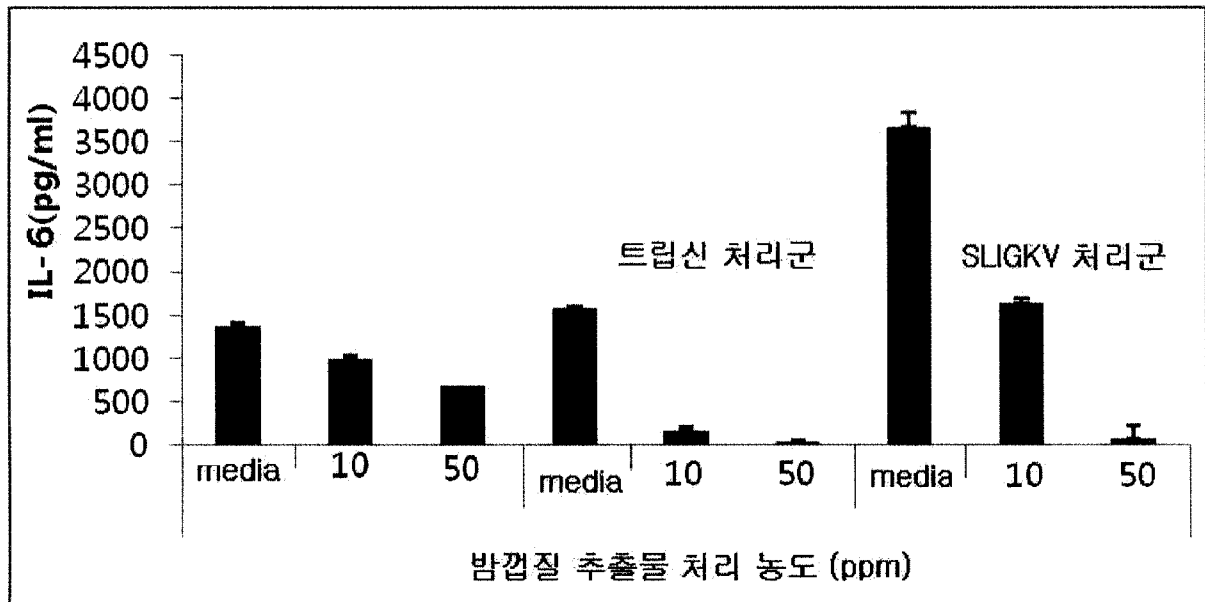
[Fig. 11]



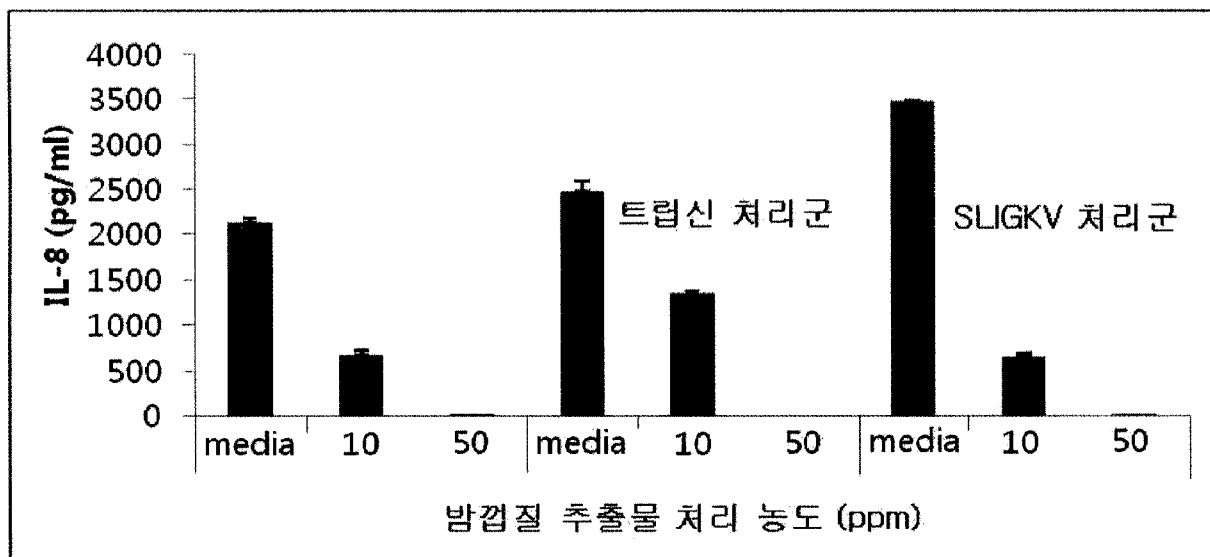
[Fig. 12]



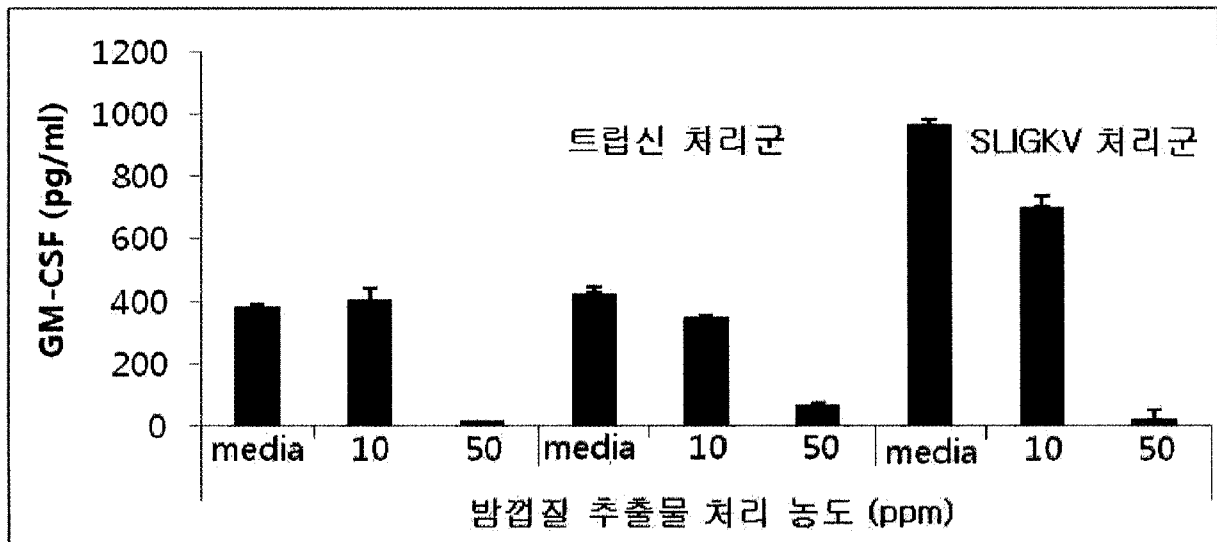
[Fig. 13]



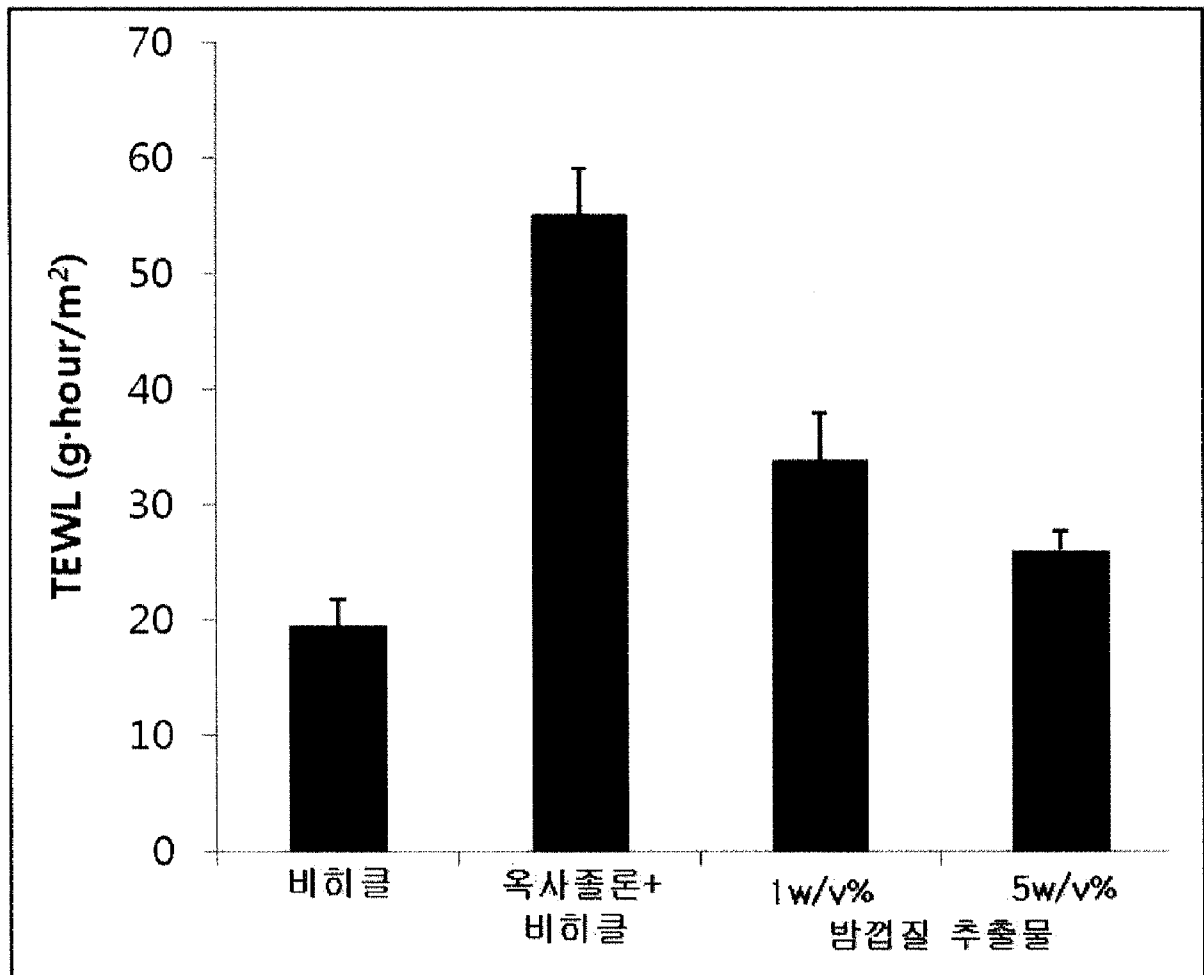
[Fig. 14]



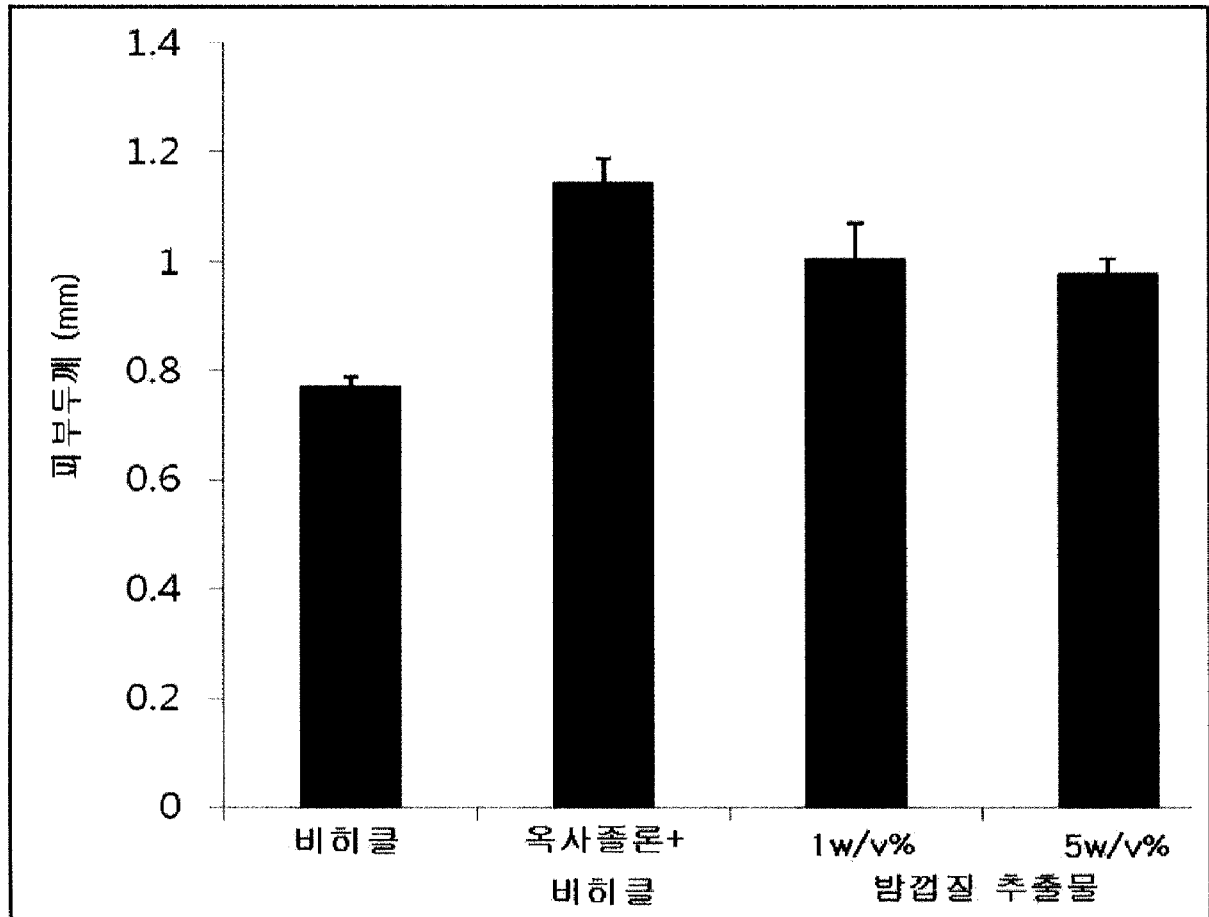
[Fig. 15]



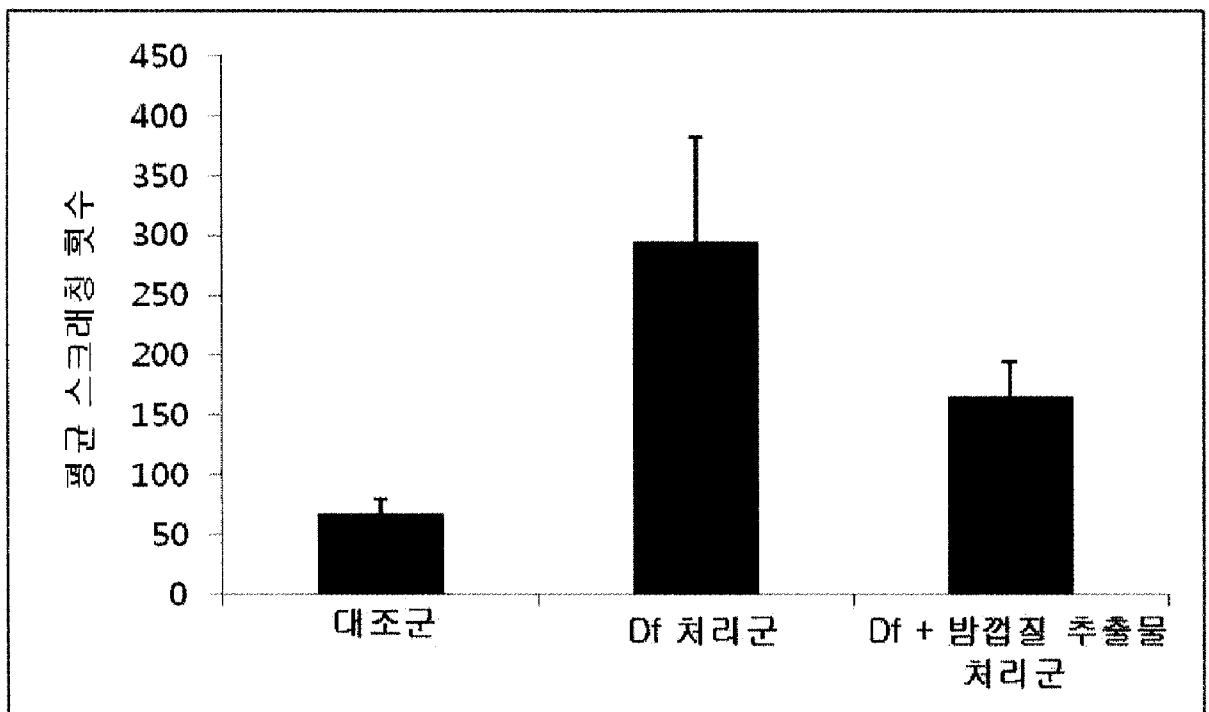
[Fig. 16]



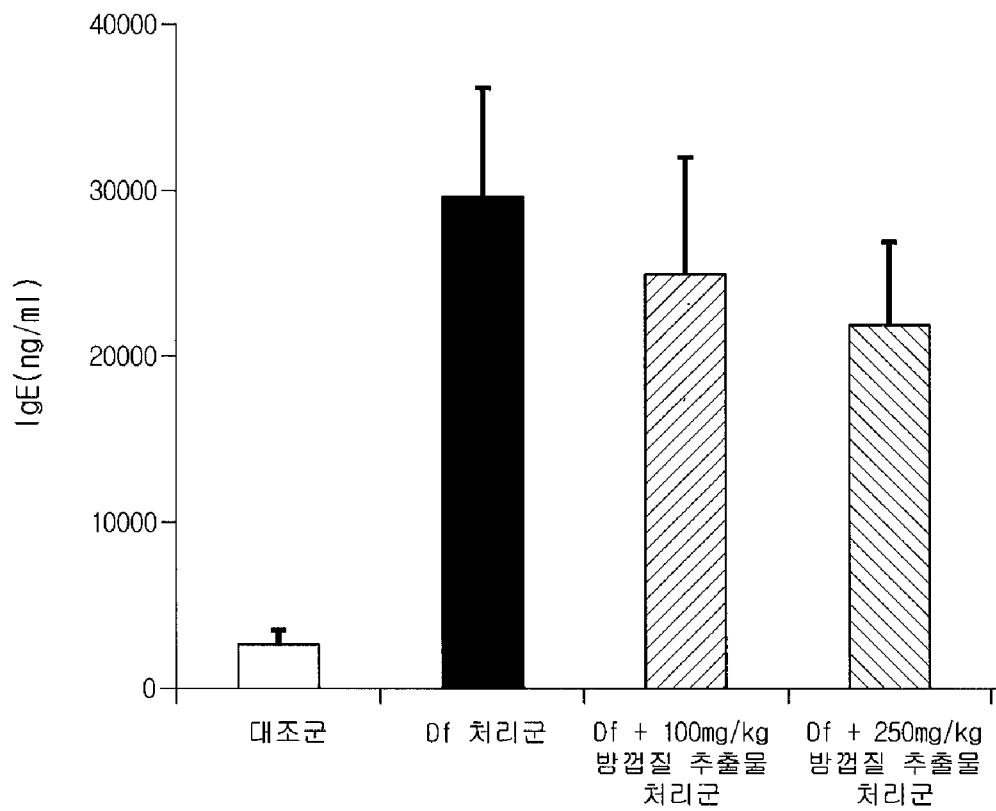
[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]

