



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0068121
(43) 공개일자 2025년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23K 10/30 (2016.01)
A61K 36/23 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2023-0154221

(22) 출원일자 2023년11월09일

심사청구일자 2023년11월09일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이의주

서울특별시 광진구 광나루로 458, 105동 601호(구의동, e편한세상 광진그랜드파크)

안광석

서울특별시 성북구 길음로 33, 809동 1802호(길음동, 길음뉴타운)

하인진

서울특별시 동작구 여의대방로10길 14, 101동 802호(신대방동, 경남교수아파트)

(74) 대리인

최승욱, 성익재

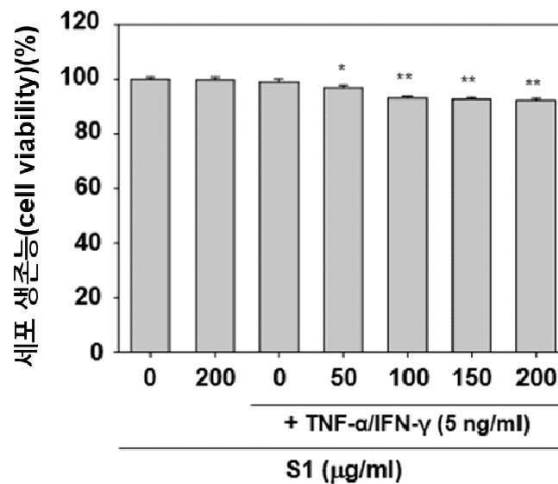
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물의 지상부 추출물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 갯기름나물(*Peucedanum japonicum*)의 지상부 추출물을 포함하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 갯기름나물 추출 전 열처리를 적용하여 세포독성이 낮고, 과민성피부면역 반응에 대한 완화 효과가 우수한 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 36/23 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 37/02 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

갯기름나물 지상부를 열처리하는 단계;

상기 열처리된 갯기름나물 지상부를 추출용매로 추출하는 단계; 및

상기 추출된 갯기름나물 지상부를 여과하여 갯기름나물 지상부 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 갯기름나물 지상부는 잎, 줄기, 꽃 및 열매를 포함하는 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 열처리는 40℃ 내지 150℃에서 진행하는 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출용매는 증류수, 탄소수가 1 내지 4인 저급 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 추출용매는 증류수인 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 추출용매는 30 v/v% 내지 70 v/v% 에탄올 수용액인 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 추출은 냉침추출법, 가열추출법, 초음파추출법, 환류냉각추출법 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 열처리로 블랜칭(blanching)을 수행하는 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 열처리로 가수 로스팅(roasting)을 수행하는 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법.

청구항 10

제1항으로부터 제조된 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 과민성피부면역 질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지 및 과민증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 갯기름나물 지상부 추출물은 사이토카인 및 케모카인의 생성을 억제하여 상기 과민성피부면역 질환에 효능을 나타내는 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 갯기름나물 지상부 추출물은 IL-6와 MDC 및 TARC의 분비를 억제하고, MAPK의 신호전달 및 NF- κ B의 신호전달을 억제하여 상기 과민성피부면역 질환에 효능을 나타내는 것을 특징으로 하는 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 갯기름나물 지상부 추출물은 식품 조성물, 약학 조성물, 의약외품 조성물 및 화장품 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에 포함되는 것을 특징으로 하는 민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물(*Peucedanum japonicum*) 지상부 추출물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 갯기름나물의 지상부 추출물을 포함하는 과민성피부면역 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물, 약학 조성물, 의약외품 조성물, 화장품 조성물 또는 사료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아토피성 피부염은 피부발진 및 심한 소양증 등이 특징으로, 흔히 태열이라 불리는 유아습진의 가장 흔한 형태로 나타나기도 하는 일련의 알러지 면역질환이다. 아토피 피부염은 피부의 면역 과민 반응을 특징으로 가지고 있다. 전세계 인구의 10-20% 정도가 가지고 있는 질환으로, 특히 산업화 및 도시화가 진행되고 있는 나라에 더 많은 아토피성 피부염 질환이 증가하고 있다. 즉, 서구화되고 산업이 발달한 나라에서 흔히 나타나는 질환으로 성인은 1-3%, 소아는 10-20% 정도의 유병률을 보이고 있으며 우리나라에도 유사한 유병률을 보이고 있다.

[0004] 아토피 피부염의 원인은 다양하며, 발생기전도 다양한 호전과 악화를 반복하는 만성질환으로 장기간의 꾸준한 치료가 필요하고 재발을 반복하는 특성상 성인이 된 이후까지 난치화 및 중증화되는 경우가 많다. 아토피 피부염 환자들의 70-80%는 가족력, 즉 유전적인 요인으로 인하여 해당 질환을 가지는 것으로 알려져 있지만, 환경적인 요인도 강하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 유전적인 요인으로는 필라그린(filaggrin)의 유전자 변이로 인한 원인이 있고, 후천적 요인으로는 다양한 유발 물질의 자극 및 면역학적인 원인 등이 있다. 이러한 원인들은 복잡한 상호작용을 통해 피부장벽 손상을 일으킨다.

[0005] 현재까지 사용되고 있는 아토피 피부염 치료제는 스테로이드 계열이나 비특이적 면역억제제 및 항히스타민제를 처방하여 사용하고 있다. 스테로이드 계열의 치료제가 가장 많이 사용되고 있으나, 지속적인 사용은 피부장벽기능 손상, 팽창선, 피부 위축 등의 부작용을 일으킨다. 따라서 오랜 기간 사용하여도 부작용이 적으며 효과적인 새로운 형태의 천연물을 이용한 아토피 피부염 치료제 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 제10-1470087호, "면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제를 포함하는 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선용 조성물"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 갯기름나물의 지상부 추출물을 주성분으로 포함하는 항과민성피부면역 작용을 하는 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 갯기름나물의 지상부 추출물을 포함하는 과민성피부면역 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 갯기름나물의 지상부 추출물을 포함하는 과민성피부면역 질환의 예방 또는 치료용 약

학 조성물을 제공하는 것이다.

- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 갯기름나물의 지상부 추출물을 포함하는 과민성피부면역 증상의 완화 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 갯기름나물의 지상부 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 과민성피부면역 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명에 따른 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법은 갯기름나물 지상부를 열처리하는 단계, 상기 열처리된 갯기름나물 지상부를 추출용매로 추출하는 단계 및 상기 추출된 갯기름나물 지상부를 여과하여 갯기름나물 지상부 추출물을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0015] 일 실시형태에 따라서는, 상기 갯기름나물 지상부는 잎, 줄기, 꽃 및 열매를 포함할 수 있다.
- [0016] 일 실시형태에 따라서는, 상기 열처리는 40℃ 내지 150℃에서 진행할 수 있다.
- [0017] 일 실시형태에 따라서는, 상기 추출용매는 증류수, 탄소수가 1 내지 4인 저급 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0018] 일 실시형태에 따라서는, 상기 추출은 냉침추출법, 가열추출법, 초음파추출법, 환류냉각추출법 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0019] 일 실시형태에 따라서는, 상기 추출용매는 증류수일 수 있다.
- [0020] 일 실시형태에 따라서는, 상기 열처리로 블랜칭(blanching)을 수행할 수 있다.
- [0021] 일 실시형태에 따라서는, 상기 추출용매는 30 v/v% 내지 70 v/v% 에탄올 수용액일 수 있다.
- [0022] 일 실시형태에 따라서는, 상기 열처리로 가수 로스팅(roasting)을 수행할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물은 본 발명에 따른 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법으로부터 제조된다.
- [0024] 일 실시형태에 따라서는, 상기 과민성피부면역 질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지 및 과민증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0025] 일 실시형태에 따라서는, 상기 갯기름나물 지상부 추출물은 사이토카인 및 케모카인의 생성을 억제하여 상기 과민성피부면역 질환에 효능을 나타낼 수 있다.
- [0026] 일 실시형태에 따라서는, 상기 갯기름나물 지상부 추출물은 IL-6와 MDC 및 TARC의 분비를 억제하고, MAPK의 신호전달 및 NF-κB의 신호전달을 억제하여 상기 과민성피부면역 질환에 효능을 나타낼 수 있다.
- [0027] 일 실시형태에 따라서는, 상기 갯기름나물 지상부 추출물은 식품 조성물, 약학 조성물, 의약외품 조성물 및 화장품 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 갯기름나물 지상부 추출물은 MAPK 신호전달 체계 활성을 저하시키고 NF-κB 활성화에 밀접한 관련이 있는 IL-6, MDC 및 TARC의 생성 및 분비를 감소시켜 과민성피부면역 질환을 개선 완화 및 개선하는 효과를 가진다.
- [0030] 본 발명의 갯기름나물의 지상부 추출물은 세포독성을 나타내지 않으면서도, 염증반응을 일으키는 TNF-α/IFN-γ에 의해 유도된 과민성피부면역 반응에서 IL-6, MDC 및 TARC의 생성 및 분비를 억제하고, TNF-α/IFN-γ에 의해 유도된 MAPK 신호전달 체계를 억제할 수 있으며, NF-κB 신호전달 과정 억제를 통해 결과적으로 과민성피부면역 질환의 예방, 개선 및 치료에 주목할 만한 효과를 나타낼 수 있다.

[0031] 본 발명의 갯기름나물 지상부 추출물은 안전하면서도 효과적인 과민성피부면역 질환의 예방 및 과민성피부면역 질환의 치료제 또는 개선용 조성물의 개발에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1a 내지 도 1f는 MTT assay를 통해 갯기름나물 지상부 추출물 농도에서 세포생존율을 측정한 그래프이다.

도 1g 및 도 1h는 갯기름나물 지상부에 있어 가열전처리 및 분쇄여부에 따른 추출 수율 및 지표성분을 비교한 그래프이다.

도 2는 HaCaT cell에 갯기름나물 지상부 추출물을 처리한 후 IL-6 발현 양을 나타낸 그래프이다.

도 3은 HaCaT cell에 갯기름나물 지상부 추출물을 처리한 후 MDC의 발현 양을 나타낸 그래프이다.

도 4는 HaCaT cell에 갯기름나물 지상부 추출물을 처리한 후 TARC의 발현 양을 나타낸 그래프이다.

도 5a 및 도 5b는 갯기름나물 지상부 추출물이 p-ERK 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 6a 및 도 6b는 갯기름나물 지상부 추출물이 p-JNK 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 7a 및 도 7b는 갯기름나물 지상부 추출물이 p-p38 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 8a 및 도 8b는 후보물질이 NF- κ B의 DNA 결합 활성(DNA binding activity)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 9a 및 도 9b는 갯기름나물 지상부 추출물이 세포질 추출물에서 I κ B- α 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 10a 내지 도 10c는 갯기름나물 지상부 추출물이 핵 추출물에서 p65 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 11은 갯기름나물의 줄기와 잎을 로스팅 열처리하는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하 첨부 도면들 및 첨부 도면들에 기재된 내용들을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명하지만, 본 발명이 실시예에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자는 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 "실시예", "예", "측면", "예시" 등은 기술된 임의의 양상(aspect) 또는 설계가 다른 양상 또는 설계들보다 양호하다거나, 이점이 있는 것으로 해석되어야 하는 것은 아니다.

[0037] 또한, '또는'이라는 용어는 배타적 논리합 'exclusive or'이기보다는 포함적인 논리합 'inclusive or'를 의미한다. 즉, 달리 언급되지 않는 한 또는 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 'x가 a 또는 b를 이용한다'라는 표현은 포함적인 자연 순열들(natural inclusive permutations) 중 어느 하나를 의미한다.

[0038] 또한, 본 명세서 및 청구항들에서 사용되는 단수 표현("a" 또는 "an")은, 달리 언급하지 않는 한 또는 단수 형태에 관한 것이라고 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 일반적으로 "하나 이상"을 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0039] 아래 설명에서 사용되는 용어는, 연관되는 기술 분야에서 일반적이고 보편적

[0040] 인 것으로 선택되었으나, 기술의 발달 및/또는 변화, 관례, 기술자의 선호 등에 따라 다른 용어가 있을 수 있다. 따라서, 아래 설명에서 사용되는 용어는 기술적 사상을 한정하는 것으로 이해되어서는 안 되며, 실시예들을 설명하기 위한 예시적 용어로 이해되어야 한다.

[0041] 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당 되는 설명 부분에서 상세한 그 의미

를 기재할 것이다. 따라서 아래 설명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌 그 용어가 가지는 의미와 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 이해되어야 한다.

- [0042] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다.
- [0044] 한편, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는, 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 그리고, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.
- [0046] 본 발명에서 "식방풍"은 "갯기름나물"이라고도 칭하며, 산형과에 속한다. 잎의 가장자리는 둔한 톱니로 구성되어 있으며, 그 밖의 부분은 넓고 평평하다. 또한 잎은 어긋나고 2~3회 갈라진 깃꼴겹잎이며, 잎자루는 길고 회록색인 것이 특징이다.
- [0047] 한편, 방풍(*Saposhnikovia divaricata* Schischkin)은 식방풍과 명칭이 유사하나 서로 다른 식물에 해당한다. 방풍은 다년생초본으로 높이는 30~100cm이다. 뿌리는 굵고 길며 끝부분이 구부러져 있다. 줄기 기부가 갈색이고 가지가 많다. 뿌리잎 모여나고 삼각 난형으로 2~3회 우상복엽이며 잎집이 있다. 줄기잎 어긋나고 3회 우상복엽으로 끝이 3개로 갈라지며 뾰족하다.
- [0048] 본 발명에서 "지상부"는 잎, 줄기, 순을 포함하는 부분으로 뿌리를 제외한 부분을 의미한다.
- [0049] 본 발명에서 "추출물"이란 추출 대상을 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간동안 추출하여 수득한 액상성분과, 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다.
- [0050] 과민성피부면역 반응 억제 활성을 갖는 갯기름나물 지상부 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하다.
- [0051] 본 발명자들은 과민성피부면역에 효능을 가지는 동시에 부작용이 적은 천연물 유래 소재를 개발하고자 연구한 결과, 갯기름나물의 지상부 추출물이 IL-6와 MDC 및 TARC의 분비를 억제하고 MAPK 신호전달의 활성화를 억제하고, NF- κ B의 신호전달을 억제하여 과민성 피부 면역에 효능을 가지는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0053] 본 발명에서 "과민성피부면역 질환의 예방 또는 개선"은 과민성피부면역 반응을 억제하는 작용을 의미하는 것으로, 과민성피부면역반응은 생체 내 복구체계의 증강 및 손상을 감소시키기 위한 것으로 알려져 있다. 그러나 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 과민성피부면역반응이 지속되면, 많은 양의 과민성피부면역 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 IL-6 및 과민성피부면역 케모카인(proinflammatory chemokines)인 TARC 및 MDC가 MAP 키나아제(kinases) 신호 전달 체계와 NF- κ B 신호전달체계의 활성화에 의해 생성된다. 과민성피부면역반응은 다양한 과민성피부면역 피부 질환을 유발하는 원인으로써, 본 발명의 갯기름나물 지상부 추출물을 포함하는 조성물은 상기 IL-6, TARC, MDC 또는 신호전달 체계 및 전사인자 등의 억제 작용을 통해 다양한 피부 과민성피부면역 질환에 대한 예방 및 개선 효과를 가질 수 있다.
- [0054] 본 발명에서의 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 갯기름나물 지상부 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 과민성피부면역 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0055] 본 발명에서의 용어, "개선"은 상기 조성물을 투여하여 과민성피부면역 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0056] 상기 과민성피부면역 질환의 예방 또는 개선은 사이토카인 및 케모카인의 생성을 억제하는 것에 의해 달성되는 것일 수 있다.

- [0058] 본 발명에 따른 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법은 갯기름나물 지상부를 열처리하는 단계, 열처리된 갯기름나물 지상부를 추출용매로 추출하는 단계 및 추출된 갯기름나물 지상부를 여과하여 갯기름나물 지상부 추출물을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0059] 갯기름나물 지상부 추출물은 피부 관련 과민성 면역 질환에 있어서 우수한 효과를 발현할 수 있다. 갯기름나물 지상부 추출물은 인간 피부 각질 세포인 HaCaT 세포(cell)에서 사이토카인 및 케모카인의 생성을 억제할 수 있고, 또한 HaCaT 세포주(cell line)에서 IL-6와 MDC 및 TARC의 분비를 억제하며, MAPK 신호전달의 활성화를 억제하고, NF- κ B의 신호전달을 억제함으로써 과민성 면역 질환, 특히 피부의 과민성 면역 증상에 효능을 가진다고 할 수 있다.
- [0061] 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법은 추출된 갯기름나물 지상부를 여과하는 단계 이후 농축하는 단계, 건조하는 단계를 더 포함하여 갯기름나물 지상부 추출물을 수득할 수 있다.
- [0063] 일 실시형태에 따라서는, 갯기름나물 지상부는 잎, 줄기, 순, 꽃 및 열매를 포함할 수 있다. 바람직하게는 갯기름나물의 순, 줄기, 잎을 식품 원료로 사용할 수 있다. 식방풍이라고도 불리는 갯기름나물의 뿌리는 약용 부위로 한약재로 분류되어 식품 사용에 제한이 있다.
- [0065] 갯기름나물 지상부는 추출 전처리 단계로 열처리하여 건조하는 단계를 수행할 수 있다. 열처리를 통해 갯기름나물의 세포벽을 유연하게 하여 세포벽 내부의 유효성분이 더 잘 추출될 수 있게 한다.
- [0067] 일 실시형태에 따라서는, 열처리는 40℃ 내지 150℃에서 진행할 수 있다. 바람직하게는 열처리는 45℃ 내지 90℃에서 진행할 수 있다. 더욱 바람직하게는 60℃ 내지 90℃에서 진행할 수 있다.
- [0068] 열처리로는 블랜칭(blanching), 로스팅(볶음, roasting), 가수 로스팅, 열풍건조 중 어느 한 가지 방법을 사용할 수 있다.
- [0069] 상기 블랜칭을 통한 열처리는 40℃ 내지 100℃에서, 바람직하게는 60℃ 내지 90℃의 증류수에서 30초 내지 3분 동안 데칠 수 있다. 블랜칭 온도가 40℃ 미만이거나 30초 미만으로 블랜칭을 수행하면 갯기름나물의 조직 내 갯기름나물 세포벽의 강한 본딩을 약하게 하기 힘들 수 있으며, 100℃를 초과하거나 3분을 초과하여 블랜칭 열처리하면 끓는물에 갯기름나물의 유효성분들이 과도하게 용출되어 결과적으로 유효성분의 손실이 일어나고 추출효율이 낮아지는 문제가 발생할 수 있다.
- [0070] 한편, 로스팅을 통한 열처리는 회전식 드럼에 원물(갯기름나물의 지상부)을 투입하여 원물을 볶는 방식을 사용할 수 있다. 로스팅은 40℃ 내지 150℃에서 3분 내지 20분 동안 열처리할 수 있다. 바람직하게는 로스팅 열처리는 45℃ 내지 90℃에서 진행할 수 있고, 더욱 바람직하게는 60℃ 내지 90℃에서 진행할 수 있다. 로스팅 온도가 상기 범위 미만이면 갯기름나물 세포벽의 강한 결합을 약화시키기 어려워 추출 효율이 저하될 수 있다. 반면 로스팅 온도가 상기 범위를 초과하면 갯기름나물의 표면이 타거나 수분이 과도하게 증발하여 열에 안정성이 낮은 성분이 손실될 수 있다. 또한, 과도한 열처리에 의해 갯기름나물의 수분 함량이 낮아져 부스러기가 발생하는 등 공정상 로스가 발생할 수 있다.
- [0072] 갯기름나물을 로스팅 처리하면 이후 추출 효율을 높일 수 있다는 장점이 있으나, 수분이 급격하게 증발하여 갯기름나물 원물이 수축되어 원형의 형태를 유지하기 힘들기 때문에 로스팅 효율이 저하될 수 있다. 또한, 로스팅 공정 중 드럼 내부에 눌러 붙거나 타는 현상이 발생할 수 있다.
- [0073] 이에 바람직하게는 상기 로스팅은 가수 로스팅으로 수행할 수 있다. 즉, 드럼 내부에 로스팅 공정동안 증류수를 지속적으로 투입하여 갯기름나물이 함유하는 수분이 급격히 증발하거나 타는 현상을 방지할 수 있다. 가수 로스팅은 회전식 드럼에 원물을 투입하여 1차 로스팅한 후, 회전식 드럼 내에 증류수를 지속적으로 분사하며 로스팅 수행 온도를 승온하면서 2차 로스팅하는 방법을 사용할 수 있다.
- [0074] 1차 로스팅 시 회전식 드럼의 회전수는 350~750(rpm)회/분이고, 1차 로스팅은 50~70℃에서 5~20분 동안 수행할

수 있다. 드럼의 회전수가 350회 미만이면 원료의 균일한 열전달이 되지 않는다. 2차 로스팅 구간에서 정체 현상으로 원료가 탈 수 있고, 750회를 초과하면 원료들간의 충돌로 원료 손상, 또는 빠른 회전으로 로스터 히팅장치에 의한 전달 효율이 떨어질 수 있다. 1차 로스팅 온도가 50℃ 미만이면 로스팅 효율이 너무 낮으며 온도가 150℃를 초과하면 로스팅이 과도하게 진행되어 갯기름나물의 유효성분이 손실될 수 있다.

[0075] 1차 로스팅 온도로부터 2차 로스팅 온도인 50~150℃까지 20℃분씩 승온시킬 수 있다. 이와 같이 온도를 점진적으로 상승시키면 갯기름나물의 유효성분의 변성을 최소화하면서도 균일하게 로스팅하여 이후 추출 수율을 향상시킬 수 있다. 2차 로스팅 온도가 90℃ 미만이면 로스팅되기 위한 온도로 충분치 않아 갯기름나물이 부분적으로 로스팅될 수 있고, 로스팅 온도가 150℃를 초과하면 갯기름나물의 유효성분이 파괴될 수 있다.

[0076] 2차 로스팅시 회전식 드럼의 회전수는 750회/분이고, 2차 로스팅은 5~20분 동안 수행할 수 있다. 드럼의 회전수가 750회 미만이면 원료가 타며, 750회를 초과하면 원료들의 열전달 효율이 떨어질 수 있다. 로스팅 시간이 5분 미만이면 로스팅이 충분히 일어나기에 부족하며, 로스팅 시간이 20분을 초과하면 갯기름나물의 유효성분이 손실될 수 있다.

[0078] 상기 열풍건조는 40℃ 내지 150℃의 오븐(실험용, 산업용 소형, 대형 열풍건조기 포함)에서 열처리하는 방법이다. 바람직하게는, 열풍건조는 60℃ 내지 90℃에서 수행할 수 있다.

[0079] 열풍건조를 수행하는 온도가 60℃ 미만이면 열이 충분히 가해지지 않아 추출 수율을 높이기 위한 전처리를 하는 의미가 퇴색될 수 있고, 90℃를 초과하면 수분이 과도하게 날라가 부스러지며 이에 따라 공정 로스가 발생할 수 있다.

[0081] 갯기름나물 지상부를 열처리하여 건조물을 얻은 후, 이를 분쇄할 수 있다. 이때 대형분쇄기, 업체용분쇄기, 가정용 블랜더를 포함하는 분쇄기를 사용하여 분쇄할 수 있다. 이와 같이 갯기름나물 지상부를 작은 입자로 분쇄하면 이후 추출 공정 수행시 추출용매와 추출대상 간에 접촉 단면적이 증가하여 더 짧은 추출 시간 및 높은 추출 수율을 달성할 수 있다. 다만, 갯기름나물에 대한 다양한 열처리 방법 중 로스팅을 수행할 경우 분쇄 단계를 생략하여도 추출 효율 및 효능평가결과에 있어서 동일한 결과가 나올 수 있다. 추출 효율성이 유지된다는 전제하에 분쇄 단계를 최소화할수록 분쇄 단계에 소요되는 시간 및 비용을 절약할 수 있다.

[0083] 이후, 열처리 또는 열처리 및 분쇄된 갯기름나물 지상부를 추출, 여과, 농축 및 건조 단계를 거쳐 갯기름나물 지상부 추출물을 얻을 수 있다.

[0085] 일 실시형태에 따라서는, 추출용매는 증류수, 탄소수가 1 내지 4인 저급 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0086] 바람직하게는 추출용매로 물 또는 30 v/v% 이상, 50 v/v% 이상, 55 v/v% 이상, 60 v/v% 이상, 65 v/v% 이상, 70 v/v% 이상, 75 v/v% 이하, 80 v/v% 이하, 85 v/v% 이하, 90 v/v% 이하의 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 더욱 바람직하게는 60 v/v% 내지 80 v/v% 에탄올 수용액을 사용할 수 있고, 가장 바람직하게는 70%(v/v)의 에탄올 수용액을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0088] 일 실시형태에 따라서는, 추출은 열수추출법, 냉침추출법, 가열추출법, 초음파추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 용출법 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 수행할 수 있다. 바람직하게는 환류냉각추출 또는 초음파 추출을 할 수 있다. 더욱 바람직하게는 초음파 추출을 할 수 있다.

[0089] 추출 공정으로는, 물 또는 유기용매를 이용하여 추출물을 얻은 다음, 당업계에서 알려진 통상의 방법으로 적절한 온도(예컨대, 상온)에서 냉침, 가열 및 여과하여 액상의 추출물을 얻을 수 있다. 아울러, 상기와 같이 추출된 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 추출용매를 증발시킨으로써 분말 상태로 제조할 수도 있다.

- [0091] 본 발명에 따른 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물은 본 발명에 따른 과민성피부면역 질환 예방 및 개선용 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법에 따라 제조된다.
- [0092] 일 실시형태에 따라서는, 과민성피부면역 질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성피부염, 습진성 피부염, 광선피부염, 지루피부염, 포진성피부염, 편평태선, 경화태선, 괴저성 농피증, 천포창, 수포성 표피박리증, 알러지 및 과민증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0094] 일 실시형태에 따라서는, 갯기름나물 지상부 추출물은 사이토카인 및 케모카인의 생성을 억제하여 상기 과민성피부면역 질환에 효능을 나타낼 수 있다.
- [0095] 일 실시형태에 따라서는, 갯기름나물 지상부 추출물은 IL-6와 MDC 및 TARC의 분비를 억제하고, MAPK 신호전달 및 NF- κ B의 신호전달을 억제하여 상기 과민성피부면역 질환에 효능을 나타낼 수 있다. 즉, 과민성피부면역 질환의 예방 또는 개선은 사이토카인 중 IL-6와 케모카인 중 TARC, MDC의 생성 및 분비를 억제하는 것에 의해 달성될 수 있다. 또한, 과민성피부면역 질환의 예방 또는 개선은 NF- κ B의 활성 억제 및 MAP 키나아제(kinase) 신호전달 체계의 억제에 의해 달성될 수 있다. 다시 말하면, 갯기름나물 지상부 추출물은 IL-6(Interleukin-6)의 분비를 억제할 수 있고, TARC의 분비를 억제할 수 있으며, MDC의 분비를 억제할 수 있다.
- [0097] 본 발명에서는 갯기름나물 추출 전 로스팅을 포함하는 열처리를 적용하여 세포독성이 낮고, 피부에 있어서 면역과민반응 완화 효과가 더 우수한 갯기름나물 지상부 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0099] 일 실시형태에 따라서는, 갯기름나물 지상부 추출물은 식품 조성물, 약학 조성물, 의약외품 조성물, 화장품 조성물 및 사료 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에 포함되는 것일 수 있다.
- [0100] 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물을 포함하는 침출차, 액상차, 음료, 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 또는 건강보조식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0101] 본 발명의 갯기름나물의 열처리 추출물을 포함하는 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 갯기름나물 추출물 외에 치료 효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0102] 상기 식품보조첨가제는 각 제형의 식품 조성물을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향신료, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 그 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0103] 갯기름나물 지상부 추출물은 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 중량% 내지 100 중량%로 포함될 수 있다. 바람직하게는 1 중량% 내지 80 중량%로 포함될 수 있으나, 식품 조성물에 포함되는 갯기름나물 지상부 추출물의 함량은 이에 제한되지는 않는다.
- [0104] 또한, 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1g 내지 30g 포함될 수 있고, 바람직하게는 3g 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시안니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제

(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 이와 같은 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[0105] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

[0107] 본 발명에서의 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 갱기름나물 지상부 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 상기 과민성피부면역 질환이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.

[0108] 본 발명에서 사용된 용어 "약학 조성물"이란, 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각의 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 점안투여하기 적합한 형태, 예를 들어, 점안제, 크림제, 연고제, 젤제 또는 로션제로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0109] 상기 본 발명의 약학 조성물은, 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 과민성피부면역 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 약학적으로 허용되는 것일 수 있다.

[0110] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0111] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 상업 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0112] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여할 수 있으며, 약학 조성물의 유효성분은 투여받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1 mg/g/일 내지 100 mg/g/일, 보다 구체적으로는 5 mg/g/일 내지 50 mg/g/일이 될 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0114] 한편, 갱기름나물 지상부 추출물은 과민성피부면역 질환이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 개체에 투여하여 과민성피부면역 질환의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다.

[0115] 본 발명에서의 용어, "개체"란, 과민성피부면역 질환이 발병하였거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼

지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0116] 본 발명의 상기 예방 또는 치료방법은 구체적으로, 과민성피부면역 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0117] 본 발명에서의 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 목적하는 바에 따라 점안 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피 패치 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등의 경로를 통해 투여 될 수 있고, 구체적으로 경구 투여의 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0119] 본 발명에서 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미한다. 예를 들어, 약사법에 따른 의약품은 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람/동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0120] 구체적으로, 상기 의약품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 또는 연고제일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0121] 본 발명에 따른 상기 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0123] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0124] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0125] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [0126] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리이미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0128] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0129] 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 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이

이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0130] 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 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0131] 본 발명의 화장료 조성물에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다. 구체적으로, 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유키 및 무기 안료, 유키 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 증류수 등을 들 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0133] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예] 갯기름나물 지상부 추출물(S1 ~ S16)

[0136] 갯기름나물의 잎과 줄기 부위를 준비하였고, 전처리로 이들을 열처리하거나 열처리하지 않았다. 열처리를 수행한 경우에는 아래의 방법들 중 하나를 택하여 수행하였다.

[0137] 수도물 또는 정제수에서 갯기름나물의 잎과 줄기를 100℃에서 1분 30초~ 2분 초 동안 블랜칭하였다(데쳤다).

[0138] 또는 코모츠사의 로스팅 장비인 GRTM을 사용하여 갯기름나물의 잎과 줄기를 45~60℃에서 20분 동안 로스팅하였다. 도 11은 갯기름나물의 줄기와 잎을 가수 로스팅하는 사진이다.

[0139] 또는 60℃의 오븐에서 갯기름나물의 잎과 줄기를 12시간 동안 열풍건조하였다.

[0140] 이후, 열처리되거나 열처리되지 않은 갯기름나물의 잎과 줄기를 가정용 블렌더를 사용하여 분쇄하거나 분쇄하지 않았다.

[0141] 이후, 갯기름나물 잎과 줄기에 추출용매(증류수, 30 v/v% 에탄올 수용액 또는 70 v/v% 에탄올 수용액)를 가한 후 30초간 볼텍싱 또는 교반기를 활용하여 혼합하였다. 그리고 환류냉각추출 또는 초음파 추출을 진행하였다. 이때 두가지 추출 모두 1시간씩 2회 반복 추출하였다.

[0142] 이후, 개별 추출액은 Whatman 4 종이필터를 사용하여 감압여과하고, 감압농축기를 이용하여 농축하였으며, 동결건조하여 갯기름나물 지상부 추출물을 분말(powder) 형태로 얻었다.

[0143] 이와 같이 다양한 방법으로 제조한 갯기름나물 지상부 추출물을 제조 방식에 따라 각 후보물질(S1 ~ S16)로 선정하여 표 1에 정리하였다.

[0144] 표 1에는 각 후보물질에 따른 추출수율을 함께 표시하였다. 표 1에서 "원물 무게"는 갯기름나물 지상부의 조건별 가열전처리 후 건조된 시료의 무게를 의미하고, "추출물 무게"는 갯기름나물 지상부의 추출물 무게로 동결건조 후 얻어진 분말 형태의 갯기름나물 지상부 추출물의 무게를 의미한다.

표 1

후보 물질	원물 무게(g)	가열전처리	분쇄 여부	추출용매	추출방식	추출물 무게(g)	추출 수율(%)
S1	20	블랜칭	0	증류수 180ml	환류냉각추출	6.0254	30.13
S2	10	블랜칭	0	증류수 90ml	초음파 추출	3.2897	32.90
S3	10	블랜칭	0	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	3.1447	31.45
S4	10	블랜칭	0	70% 에탄올 90ml	초음파 추출	2.490	24.90
S5	10	블랜칭	0	100% 에탄올 90ml	초음파 추출	0.5277	5.28
S6	10	블랜칭	X	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	0.6248	6.25

S7	10	45℃ 로스팅	0	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	3.1554	31.55
S8	10	50℃ 로스팅	0	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	3.0625	30.63
S9	10	55℃ 로스팅	0	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	3.1591	31.59
S10	10	60℃ 로스팅	0	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	3.2364	32.36
S11	10	60℃ 로스팅	X	30% 에탄올 90ml	초음파 추출	2.0425	20.43
S12	10	45℃ 로스팅	0	70% 에탄올 90ml	초음파 추출	2.4062	24.06
S13	10	50℃ 로스팅	0	70% 에탄올 90ml	초음파 추출	2.6985	26.99
S14	10	55℃ 로스팅	0	70% 에탄올 90ml	초음파 추출	2.9580	29.58
S15	10	60℃ 로스팅	0	70% 에탄올 90ml	초음파 추출	2.3798	23.80
S16	10	60℃ 로스팅	X	70% 에탄올 90ml	초음파 추출	1.8925	18.93

[0148] [실험예 1-1] 지표성분 분석

[0149] 아래 표 2는 후보물질에 대하여 갯기름나물의 3가지 지표성분 3',4'-diseneciolykhellactone, diosmin, hesperidin의 피크 면적(peak area)를 측정한 결과이다.

표 2

[0150]

후보물질	3', 4'-diseneciolykhellactone (15.81m) 피크 면적	Diosmin (9.52m) 피크 면적	Hesperidin (9.34m) 피크 면적
S1	62275	3944	1898
S2	8947	523	330
S3	220034	1327	765
S4	365893	3350	1148
S5	327511	1715	247
S6	319309	1257	248
S7	205817	1008	704
S8	231400	1226	869
S9	195506	1222	754
S10	179441	1313	906
S11	190315	1669	592
S12	382581	5689	1711
S13	374384	5687	1203
S14	360551	5457	1583
S15	321626	5519	1761
S16	299651	4166	907

[0152] 갯기름나물 지상부 추출물의 후보물질 중 S4, S6과 S15, S16을 비교하면 갯기름나물의 분쇄 여부에 따라 추출 수율 및 지표성분의 피크 면적이 변화하는 것을 확인할 수 있다. 이를 비교하여 아래 표 3 및 도 1g, h에 나타내었다.

표 3

[0153]

후보물질	가열전처리	분쇄 여부	추출 수율	3', 4'-diseneciolykhellactone (15.81m) 피크 면적	Diosmin (8.51m) 피크 면적	Hesperidin (8.56m) 피크 면적
S4	블랜칭	0	24.90	365893	3350	1148
S6	블랜칭	X	6.25	319309	1267	248
S15	60℃ 로스팅	0	23.80	321626	5519	1761
S16	60℃ 로스팅	X	18.93	299651	4166	907

[0154] 표 3, 도 1g 및 도 1h를 참고하면, 갯기름나물 지상부를 동일 온도에서 블랜칭한 것보다 가수 로스팅한 것이 추출 수율이 월등히 더 높았다. 또한, 가열전처리한 갯기름나물 지상부를 분쇄한 것이 분쇄하지 않은 것보다 추출

수율이 우수하였다. 블랜칭한 경우에는 분쇄 유무에 따른 추출 수율에 있어 결과값이 크게 차이났지만, 로스팅한 경우에는 분쇄 유무에 따른 추출 수율의 차이가 크지 않음도 확인할 수 있다.

[0156] 표 1의 추출 수율 및 표 2의 지표성분을 비교하여 우수한 후보군을 1차 선정한 후 아래의 효능평가를 통해 최적의 후보물질을 최종 선정하고자 하였다.

[0157] 이하 실험예에서는 세포 모델을 이용하여 후보물질 효능평가를 진행하였다. 보다 상세하게는 HaCaT(각질형성세포주)에서 갯기름나물 지상부 추출물의 후보물질별 면역과민반응 완화에 대한 효능평가를 진행하였다.

[0158] 피부는 피하지방, 진피, 표피로 구성되어 있으며, 표피층에서 대부분의 세포는 피부각질형성세포로 구성되어 있다. 피부각질형성세포는 피부 각질을 형성하고 여러 사이토카인이나 케모카인을 생성하여 다양한 피부 면역반응과 염증반응에 관여한다. 일상생활에서 피부각질형성세포가 생리적, 환경적 스트레스에 노출되면 피부염증반응이 일어나고, 이로 인해 염증에 관여하는 인자인 IL-6, MDC, TARC와 같은 여러 종류의 염증성 사이토카인이나 케모카인 등을 분비한다. 이러한 염증성 인자들은 피부각질형성세포의 증식 속도를 감소시키고, 기질형성을 하는 진피층에 영향을 미침으로서 손상된 피부의 회복 속도를 저하시킨다. 따라서 염증성피부질환에는 피부각질형성세포의 증식이 매우 중요한 역할을 하며, 건선, 피부의 노화, 아토피성 피부염 등과 같은 피부질환과 관련이 있다. 이하 실험예들에서는 HaCaT 각질형성세포주에 TNF- α 및 IFN- γ 를 처리하여 염증성피부질환을 유도하였다.

[0160] [실험예 1-2] 세포 생존능 평가

[0161] 갯기름나물 지상부 추출물의 효능을 평가하기 위해, 추출물의 처리 농도를 설정하기 위하여 농도 별 세포 생존율을 확인하였다. 추출물의 최고 처리 농도 확인을 위해 갯기름나물 지상부 추출물에 대한 인간 HaCaT 세포의 생존 능력과 TNF- α /IFN- γ 에 의해 유도된 과민성 면역 반응에 대한 생존율을 측정하였다.

[0162] HaCaT 세포는 96-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주(seeding)하여 37℃ 인큐베이터에 overnight 동안 배양하여 부착시켰다. 갯기름나물 지상부 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 150, 200 μ g/ml)로 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)와 함께 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이때 추출물의 농도는 HaCaT 세포 배양액 부피(ml) 당 추출물 질량(μ g)을 의미한다. 갯기름나물 지상부 추출물에 대한 세포의 생존율을 MTT 분석법으로 측정하였다. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 는 TNF- α /IFN- γ 로 과민성면역반응을 유도했지만 갯기름나물 지상부 추출물을 처리하지 않은 그룹으로부터 유의한 차이를 나타낸다.

[0164] 도 1a 내지 도 1f는 MTT assay를 통해 갯기름나물 지상부 추출물 농도에서 세포생존율을 측정한 그래프이다.

[0165] 아래 표 4는 도 1a 내지 도 1f를 수치화한 것으로 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 측정하여 나타낸 표이다.

표 4

갯기름나물 지상부 추출물 처리	-	200 μ g/ml	TNF- α & IFN- γ 처리				
			-	50 μ g/ml	100 μ g/ml	150 μ g/ml	200 μ g/ml
S1	100%	99.8%	99.0%	96.9%	93.1%	92.7%	92.3%
S4	100%	84.4%	99.0%	93.0%	87.4%	84.8%	82.1%
S5	100%	84.0%	98.5%	80.6%	62.6%	58.9%	60.4%
S6	100%	63.2%	98.5%	93.0%	73.9%	67.5%	63.5%
S15	100%	95.5%	98.7%	96.5%	92.4%	91.7%	91.5%
S16	100%	90.4%	98.7%	97.0%	93.5%	91.2%	89.8%

[0167] 갯기름나물 지상부 추출물의 후보물질 중 S1, S15, S16은 최고 농도(200 μ g/ml)처리시 HaCaT 세포의 생존율은 각각 99.8%, 95.5%, 90.4%로, 세포 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 S1, S15, S16을 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)처리로 인하여 과민성 면역반응이 유도된 HaCaT 세포에서도 생존율은 각각 92.3%, 91.5%, 89.8%로 세포 생존에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

[0168] 반면 후보물질 중 S4, S5, S6은 최고 농도(200 $\mu\text{g/ml}$)에서 HaCaT 세포주의 생존율은 각각 84.4%, 84%, 63.2%로 세포 생존에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 과민성 면역반응이 유도된 HaCaT 세포에서도 생존율은 각각 82.1%, 60.4%, 63.5%로 세포 생존에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

[0169] 이에 따라 후보물질 중 S4, S5, S6은 최고 처리 농도에서 세포 생존에 영향을 미치므로 효능 평가 부분에서 추출물만의 효능을 볼 수 없으므로 후보물질에서 제외하였다. S1, S15, S16을 후보물질로 설정하고 추후 실험에에서 갯기름나물 지상부 추출물의 처리 농도는 최대(200 $\mu\text{g/ml}$)의 농도로 설정하였다.

[0171] [실험예 2-1] IL-6 억제 효과 평가

[0172] 갯기름나물 지상부 추출물에 대한 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포의 TNF- α /IFN- γ 에 의해 유도된 IL-6(Interleukin 6)의 분비에 대한 감소효과를 측정하였다. 갯기름나물 지상부 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$)로 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)와 함께 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포에 24시간 처리하여 생성된 IL-6 양을 인간 IL-6 항체가 ELISA 키트를 사용해 IL-6 생성량을 검출하였다. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ 는 TNF- α /IFN- γ 를 처리하고 추출물을 처리하지 않은 그룹으로부터 유의한 차이를 나타낸다.

[0173] 도 2는 HaCaT cell에 갯기름나물 지상부 추출물을 처리한 후 IL-6 발현 양을 나타낸 그래프이다.

[0174] 표 5은 도 2를 수치화한 것으로, IL-6의 발현 양을 나타낸 표이다.

표 5

TNF- α & IFN- γ /갯기름나물 지상부 추출물 처리	-/-	+/-	+S1	+S15	+S16
평균	1796.7 pg/ml	3053.8 pg/ml	2106.2 pg/ml	2453.8 pg/ml	2753.8 pg/ml
표준편차	128.0 pg/ml	54.1 pg/ml	78.7 pg/ml	177.5 pg/ml	91.8 pg/ml

[0177] IL-6의 발현은 피부염증반응 유도 물질인 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 1796.7 pg/ml에서 3053.8 pg/ml로 증가하여 유도 물질 처리로 인해 염증반응이 유도됨을 확인하였다. S1, S15, S16을 각각 처리하였을 때, IL-6의 발현은 2106.2 pg/ml, 2453.8 pg/ml, 2753.8 pg/ml로 감소하였다. S1에서 IL-6의 발현이 가장 많이 감소하여 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0179] [실험예 2-2] MDC 억제 효과 평가

[0180] 갯기름나물 지상부 추출물에 대한 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포의 TNF- α /IFN- γ 에 의해 유도된 MDC(Macrophage-derived chemokine)의 분비에 대한 감소효과를 측정하였다. 실험예 1-2와 동일한 조건으로 세포에 갯기름나물 지상부 추출물을 다양한 농도 (0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$)와 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml) 함께 처리하여 분비된 MDC의 양을 인간 MDC ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 는 TNF- α /IFN- γ 를 처리하고 추출물을 처리하지 않은 그룹으로부터 유의한 차이를 나타낸다.

[0181] 도 3은 HaCaT cell에 갯기름나물 지상부 추출물을 처리한 후 MDC의 발현 양을 나타낸 그래프이다.

[0182] 표 6은 도 3을 수치화 한것으로, MDC의 발현 양을 나타낸 표이다.

표 6

TNF- α & IFN- γ /갯기름나물 지상부 추출물 처리	-/-	+/-	+S1	+S15	+S16
평균	243.8 pg/ml	442.1 pg/ml	274.9 pg/ml	194.9 pg/ml	189.3 pg/ml
표준편차	57.2 pg/ml	81.1 pg/ml	21.7 pg/ml	9.4 pg/ml	56.1 pg/ml

[0185] MDC의 발현은 피부염증반응 유도 물질인 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 243.8 pg/ml에서 442.1 pg/ml로 증가하여 유도 물질 처리로 인해 염증반응이 유도됨을 확인하였다. S1, S15, S16을 각각 처리하였을 때, MDC의 발현은 274.9 pg/ml, 194.9 pg/ml, 189.3 pg/ml로 감소하였다. S15와 S16에서, 특히 S16에서 MDC의 발현이 가장 많이 감소하였다.

[0187] [실험예 2-3] TARC 억제 효과 평가

[0188] 갯기름나물 지상부 추출물에 대한 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포의 TNF- α /IFN- γ 에 의해 유도된 TARC(thymus and activation-regulated chemokine)의 분비에 대한 감소효과를 측정하였다. 실험예 1-2와 동일한 조건으로 처리 후 분비된 TARC의 양을 인간 TARC 키트를 사용하여 측정하였다. *** $p < 0.001$ 는 TNF- α /IFN- γ 를 처리하고 추출물을 처리하지 않은 그룹으로부터 유의한 차이를 나타낸다.

[0189] 도 4는 HaCaT cell에 갯기름나물 지상부 추출물을 처리한 후 TARC의 발현 양을 나타낸 그래프이다.

[0190] 표 7은 도 4를 수치화 한것으로, TARC의 발현 양을 나타낸 표이다.

표 7

TNF- α & IFN- γ /갯기름나물 지상부 추출물 처리	-/-	+/-	+S1	+S15	+S16
평균	50.1 pg/ml	100.3 pg/ml	58.0 pg/ml	43.3 pg/ml	42.1 pg/ml
표준편차	0.8 pg/ml	1.5 pg/ml	0.3 pg/ml	0.2 pg/ml	0.1 pg/ml

[0192]

[0193] TARC의 발현은 피부염증반응 유도 물질인 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 50.1. pg/ml에서 100.3 pg/ml로 증가하여 유도 물질 처리로 인해 염증반응이 유도됨을 확인하였다. S1, S15, S16을 각각 처리하였을 때, TARC의 발현은 58 pg/ml, 43.3 pg/ml, 42.1 pg/ml로 감소하였다. S15와 S16에서, 특히 S16에서 TARC의 발현이 가장 많이 감소하였다.

[0195] 실험예 2-1 ~ 실험예 2-3에서는 염증성 사이토카인 및 케모카인 생성량에 갯기름나물 지상부 추출물이 미치는 영향을 알아보았다.

[0196] 피부면역과민반응에는 다양한 면역 세포들이 관여하는데, 피부표피세포층에서는 여러 사이토카인 및 케모카인을 생산하여 면역반응과 염증반응에 관여한다. HaCaT 각질형성세포주에 TNF- α 및 IFN- γ 의 처리는 Th2 사이토카인인 IL-6의 분비 촉진과 염증부위로의 단핵구 등의 침윤을 증가시키는 케모카인인 TARC 및 MDC 등의 인자들이 비정상적인 발현을 유도한다. 따라서 면역과민반응을 유도시킨 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인(IL-6) 및 케모카인(TARC와 MDC)을 측정하였으며, 후보물질을 처리하여 염증성면역과민반응 완화 효능을 평가하였다.

[0197] 결과를 요약하면 후보물질 중 S1, S15, S16은 모두 염증성 인자인 IL-6, MDC, TARC의 발현 감소에 효능을 보였다. IL-6 발현 감소는 S1이 가장 효과가 좋았으나, 케모카인(chemokine) 계열인 MDC와 TARC의 발현 감소에서는 S15와 S16이 효과가 좋았고, 이중 S16이 가장 우수한 효능을 보였다.

[0199] [실험예 3] p38, ERK, JNK 억제 효과 평가

[0200] 후보물질의 면역과민반응 완화에 관여하는 작용기전을 파악하기 위해 면역과민반응을 유도하는 인자들의 생성 작용기전을 규명하였다. MAPK 경로(pathway)는 TNF- α /IFN- γ 등에 의해 유도될 수 있으며, ERK, JNK, p38 인자가 해당 경로에 관여하고 있는 것으로 알려져있다. 또한, MAPK 경로는 각종 염증 반응 조절에 중요한 역할을 하는 신호 전달 체계로 알려져있다.

[0201] 인간 피부표피세포 HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 유도된 p38, ERK 그리고 JNK에 있어서 갯기름나물 지상부 추출물에 의한 활성 저하를 측정하였다. 세포들에 갯기름나물 지상부 추출물 (200 μ g/ml)을 2시간동안 전처리 후, TNF- α /IFN- γ 5 ng/ml로 0.5 시간동안 자극하였다. 전체 세포 추출물로부터 동량의 총 단백질을

웨스턴 블롯을 통해 단백질 발현을 확인하였다. 인산-특이적 항-p38 항체, 인산-특이적 항-ERK 항체, 인산-특이적 항-JNK 항체를 사용하여 분석 후 동일한 멤브레인으로 항-p38 항체, 항-ERK 항체, 항-JNK 항체로 다시 블로팅하였다. β -actin은 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0202] 도 5a 및 도 5b는 갯기름나물 지상부 추출물이 p-ERK 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0203] 도 6a 및 도 6b는 갯기름나물 지상부 추출물이 p-JNK 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0204] 도 7a 및 도 7b는 갯기름나물 지상부 추출물이 p-p38 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0205] 도 5 내지 7을 참고하면, TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)를 30분 처리하였을 때, TNF- α /IFN- γ 미처리 군과 비교하여 TNF- α /IFN- γ 처리 후 갯기름나물 지상부 추출물은 미처리한 NT 군에서 p-ERK, p-JNK, p-p38의 발현이 모두 증가하여 염증 반응이 유도됨을 확인하였다. 도 5a 및 도 5b를 참고하면, p-ERK 인자는 S16이 가장 높은 발현 억제 효과를 보여줬으며, S15, S1 순으로 억제 효과를 보여주었다. 도 6a 및 도 6b를 참고하면, p-JNK 인자에서는 S16이 발현을 가장 많이 억제시켰으며, S1, S15 순으로 억제 효과를 보여주었다. 도 7a 및 도 7b를 참고하면, p-p38 인자에서는 S16이 가장 큰 억제 효과를, 그 다음으로 S15, S1 순으로 억제 효과를 보여주었다.

[0206] 이를 종합하면, 후보물질 S1, S15, S16 중 S16이 모든 인자에서 가장 많은 억제 효과를 보여주었으며, S1과 S15에서도 S15가 좀 더 나은 면역 억제 효과를 보여주었다.

[0208] NF- κ B는 TNF- α /IFN- γ 등에 의해 유도될 수 있으며, 각종 자극에 의해 활성화되는 전사인자이다. NF- κ B는 각종 염증반응에 관여하는 사이토카인 및 케모카인을 조절하는 전사인자로 작용한다. NF- κ B를 억제하는 것은 과민성 피부 면역 반응을 완화하는데 주요한 작용기전으로 알려져있다. I κ B, p65, p50으로 이루어진 NF- κ B의 활성화 기작은 I κ B kinase(IKK)에 의하여 I κ B를 인산화 시키며, 인산화된 I κ B는 유비퀴틴화되어 분해되며 인산화된 p65와 p50 복합체가 핵 안으로 이동되고, 핵 안으로 이동한 NF- κ B는 TARC 및 MDC 등 여러 염증관련 인자들의 프로모터에 작용하여 염증성 질환 발생을 유도한다. 따라서, NF- κ B의 활성을 일으키는 인산화된 I κ B의 유비퀴틴화와 인산화된 p65의 발현의 억제는 과민성 피부 면역질환의 개선에서 매우 중요하게 다루어진다.

[0209] [실험예 4-1] NF- κ B 억제 효과 평가

[0210] 인간 피부표피세포 HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 유도된 NF- κ B 활성이 갯기름나물 지상부 추출물에 의해 저하되는 것을 측정하였다. 갯기름나물 지상부 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 150, 200 μ g/ml)로 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)와 함께 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포에 24시간 처리하여 핵 추출물을 준비하였다. NF- κ B의 DNA 결합 활성을 확인하기 위해 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다. Oct-1을 대조군으로 이용하였다.

[0211] 도 8a 및 도 8b는 후보물질이 NF- κ B의 DNA 결합 활성(DNA binding activity)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0212] 면역 반응 유도물질만을 처리한 NT 군과 아무 처리하지 않은 군과 비교 하였을 때 NF- κ B의 핵으로의 이동이 유도된 것을 확인 할 수 있어, 면역 반응이 유도됨을 확인하였다. NF- κ B의 핵으로의 이동은 S16이 가장 크게 억제했으며, S15, S1순으로 그 억제 효과를 보였다.

[0214] [실험예 4-2] I κ B- α 억제 효과 평가

[0215] 갯기름나물 지상부 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 150, 200 μ g/ml)로 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)와 함께 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포에 24시간 처리하여 세포질 내 단백질을 추출하였다. 전사인자 NF- κ B 관련 단백질인 I κ B- α 의 발현을 분석하여 확인하였다. β -actin은 로딩 대조군으로 사용하였다.

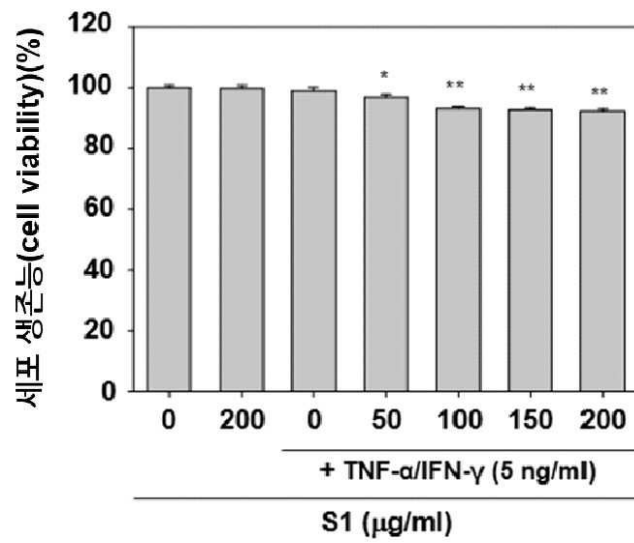
[0216] 도 9a 및 도 9b는 갯기름나물 지상부 추출물이 세포질 추출물에서 I κ B- α 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0217] 세포 추출물(cellular extract; CE)에서 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)를 처리한 NT 군과 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 I κ B- α 의 발현이 유비퀴틴화에 의해 줄어듦을 확인하여 면역 반응이 유도됨을 확인하였다. 유비퀴틴화로 인해 분해된 I κ B- α 의 발현은 S1, S15, S16순으로 다시 회복하여, S16에서 가장 큰 발현을 보였다.

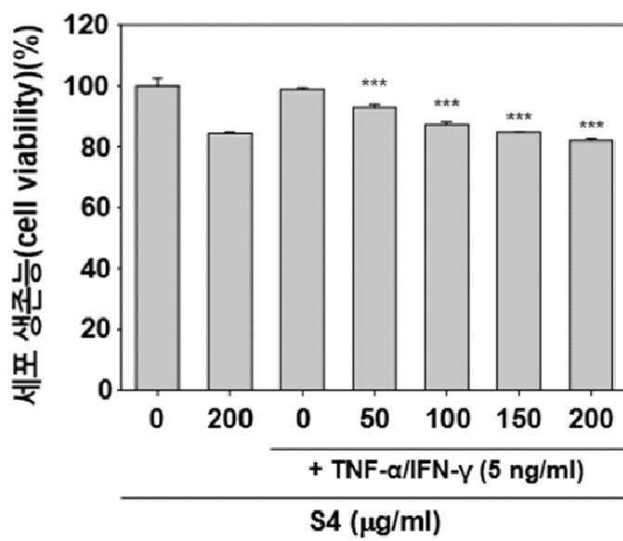
- [0219] [실험예 4-3] p-p65, p65 억제 효과 평가
- [0220] 갯기름나물 지상부 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$)로 TNF- α /IFN- γ (5 ng/ml)와 함께 인간 각질형성세포주 HaCaT 세포에 24시간 처리하여 핵 추출물(nuclear extract; NE)을 추출하였다. 웨스턴 블로팅을 수행 한 뒤 멤브레인에 항-p65, 항-p65항체를 반응시켜 분석하였다. Lamin B는 로딩 대조군으로 사용하였다.
- [0221] 도 10a 내지 도 10c는 갯기름나물 지상부 추출물이 핵 추출물에서 p65 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [0222] 핵 추출물에서 NF- α /IFN- γ (5 ng/ml)를 처리한 NT 군과 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 p65인자의 발현이 증가하는 것을 통해 면역 반응이 유도됨을 확인하였다. 핵 추출물에서 p-p65 및 p65의 발현 감소는 S16과 S15에서 가장 크게 감소하였고, S1에서 가장 적은 억제 효과를 보였다.
- [0224] 이를 종합하면, 전사인자로서의 NF- κB 의 역할을 S16이 가장 크게 억제하였으며, S15가 그 다음으로 억제하였으며, S1이 가장 낮은 억제 효과를 보여주었다. NF- κB 를 활성화 시키는 유비퀴틴화로 인하여 분해된 I κB - α 의 발현을 다시 회복시켰다는 것은 NF- κB 의 활성화를 억제시켰다는 의미이다. 따라서 S16이 가장 많이 I κB - α 의 발현을 회복시켰으므로, S16이 가장 많이 NF- κB 를 억제했으며, S1과 S15는 비슷한 수준의 억제 효과를 보였다. NF- κB 를 활성화 시키는 p-65 및 p65의 핵 추출물 발현 감소는 NF- κB 의 활성화를 억제시켰다는 의미이므로, S16과 S15에서 가장 많이 NF- κB 의 활성화를 억제했으며 S1은 상대적으로 적은 억제 효과를 보였다.
- [0226] 상기 실험예들의 결과를 요약하면, 세포독성평가를 통해 후보물질 S1, S4, S5, S6, S15, S16의 세포 생존을 평가하였고, S5와 S6에서 가장 큰 세포 생존율에 영향을 미쳤으며, S4에서도 세포 생존율에 영향을 미쳤다. 반면 S1, S15, S16에서는 세포 독성을 보이지 않아 상기 세가지 물질을 후보물질로 설정하고 실험을 전개하였다. S1은 환류 증류수 추출물이고, S15와 S16은 사전 열처리 중 로스팅공법을 통하여 70% 에탄올로 추출한 후보물질이다. S4, S5, S6은 사전 열처리 중 블랜칭을 실시하여 70% 또는 100%에탄올로 추출한 추출물이다. 생존율에 영향을 주는 후보물질과 아닌 후보물질들 간에 사전 열처리 과정 여부가 다르므로, 이를 통해 열처리 방법에 따라 세포 생존율에 영향을 미친다는 것을 시사한다.
- [0227] IL-6 ELISA 실험에서는 증류수 추출물인 S1의 억제효과가 가장 좋았지만, 다른 케모카인 계열의 인자인 MDC와 TARC ELISA 실험에서는 S16과 S15가 가장 억제 효과가 좋은 것으로 나타났다. MAPK 경로(pathway)에서도 S16이 가장 큰 억제 효과를 보였으며, S15는 두 번째로 억제효과를 보여주었다. NF- κB 의 활성화에 미치는 영향에서도 S16, S15, S1 순으로 가장 큰 억제 효과를 확인하였다. 갯기름나물 지상부 추출물에 대한 효능 평가의 최종 결론은 S16이 과민성 피부 면역 억제에 있어 가장 높은 효능을 보였으며, S15는 S1보다 억제 효능을 더 보임을 확인하였다. 갯기름나물 지상부 추출물은 과민성 피부 면역질환에 관여하는 인자들에 억제 효과를 나타내었다. 때문에 본 발명에 따른 갯기름나물 지상부 추출물은 잠재적인 항 과민성피부면역 인자로 작용할 수 있다. 또한, 가수 로스팅시 분쇄 여부 차이만 있는 S15와 S16의 효능이 비슷한 것으로 보아, 분쇄과정을 거치지 않아도 항 효율적으로 과민성피부면역 인자로 작용할 수 있음을 시사한다.
- [0229] 이상과 같이 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 그러므로, 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

도면

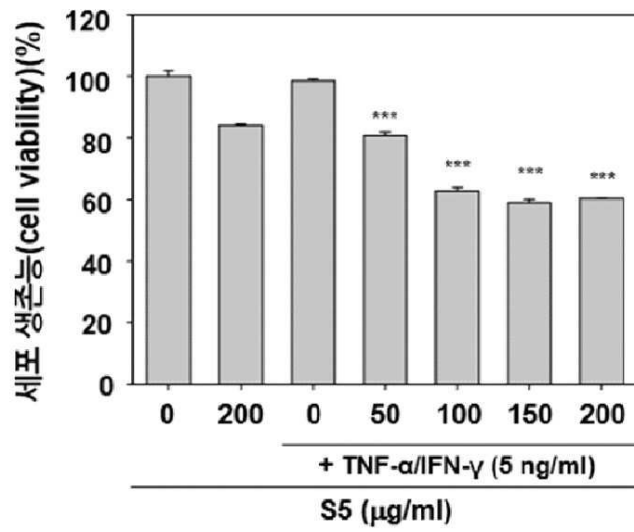
도면1a



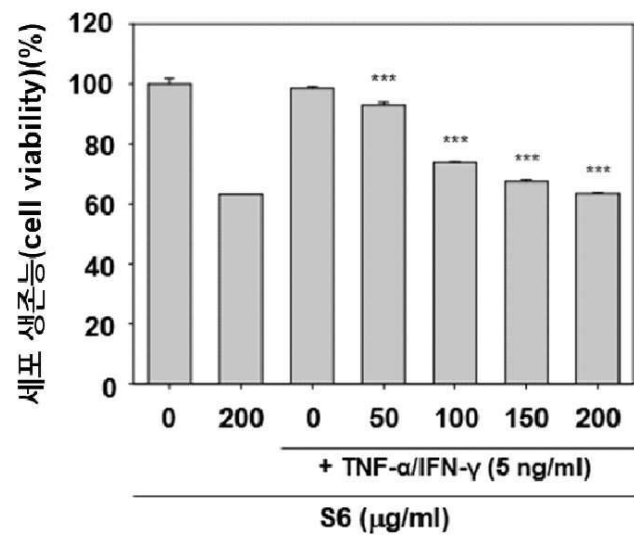
도면1b



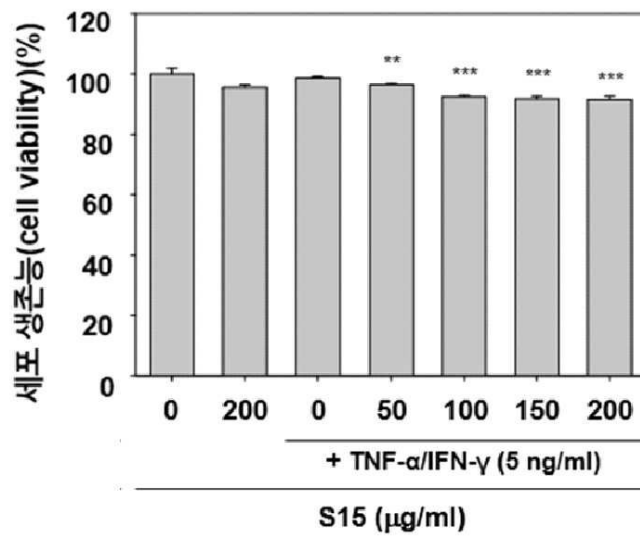
도면1c



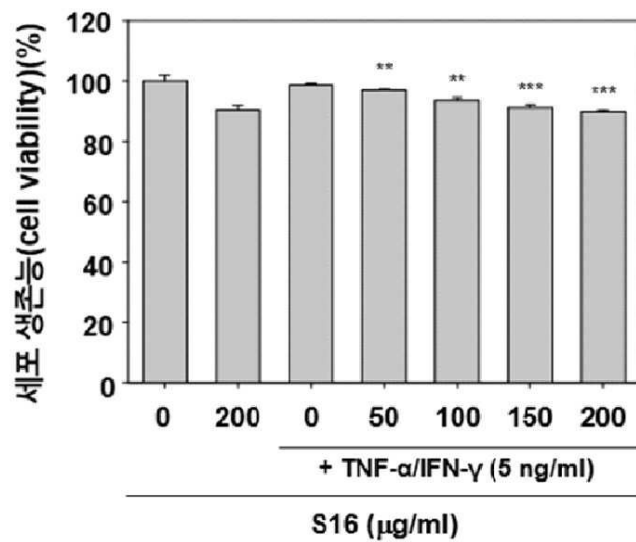
도면1d



도면1e



도면1f



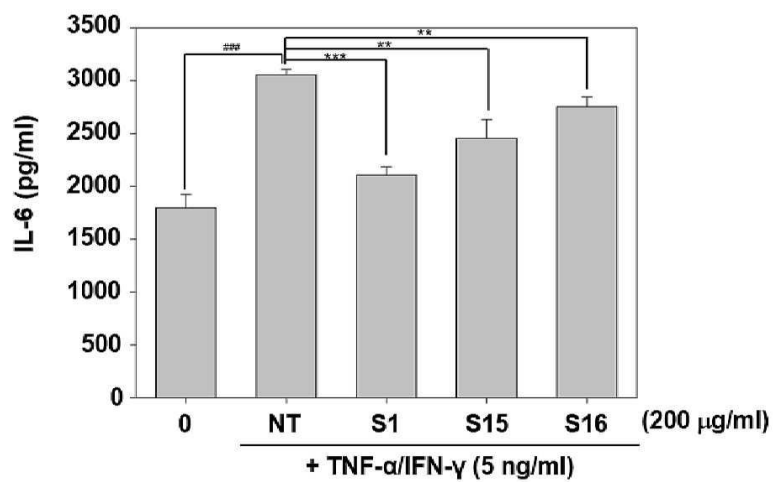
도면1g



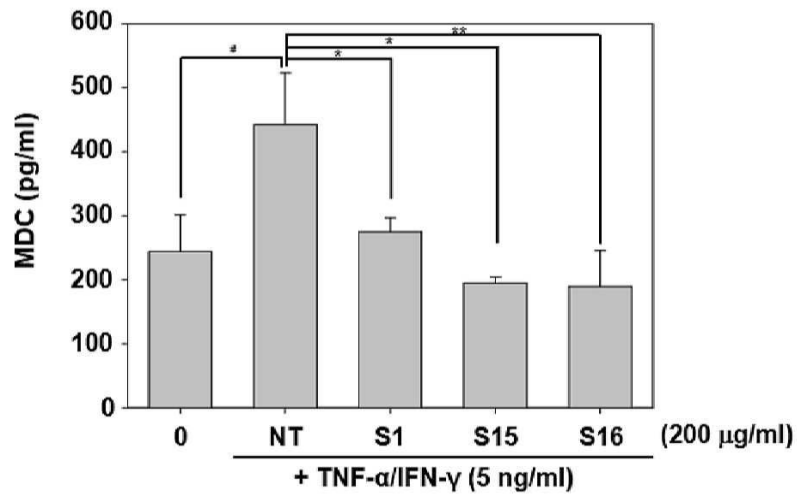
도면1h



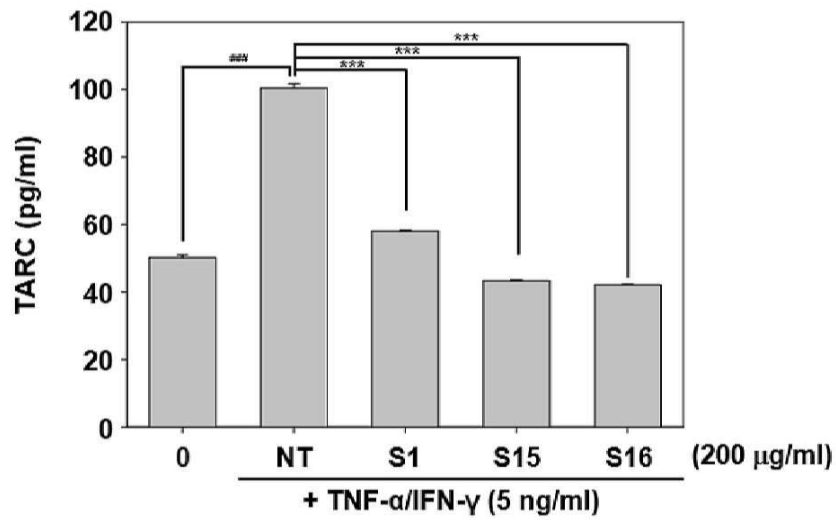
도면2



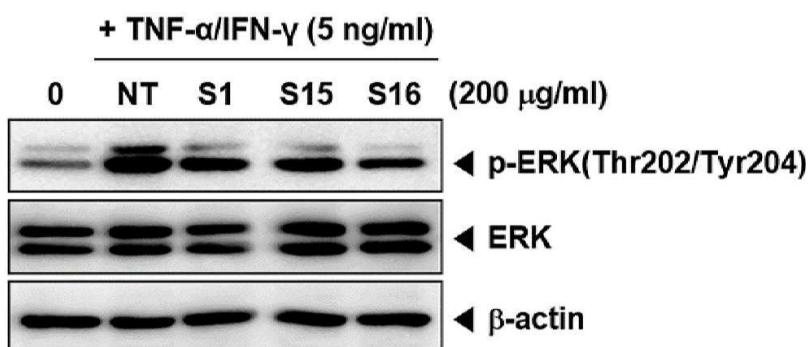
도면3



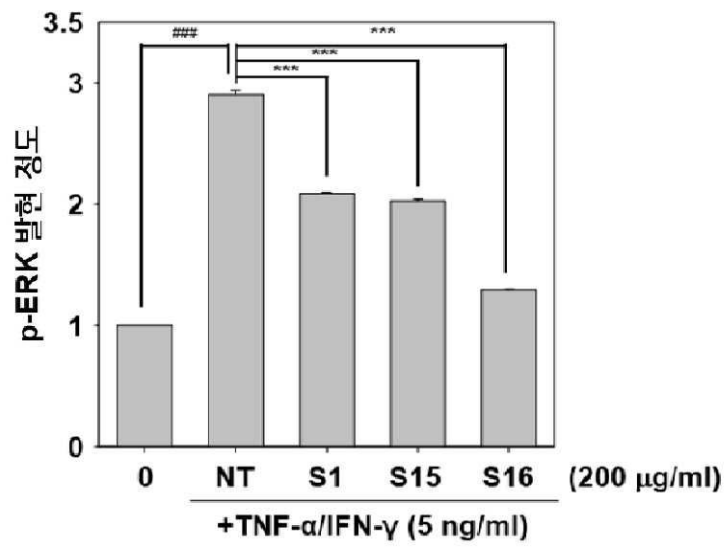
도면4



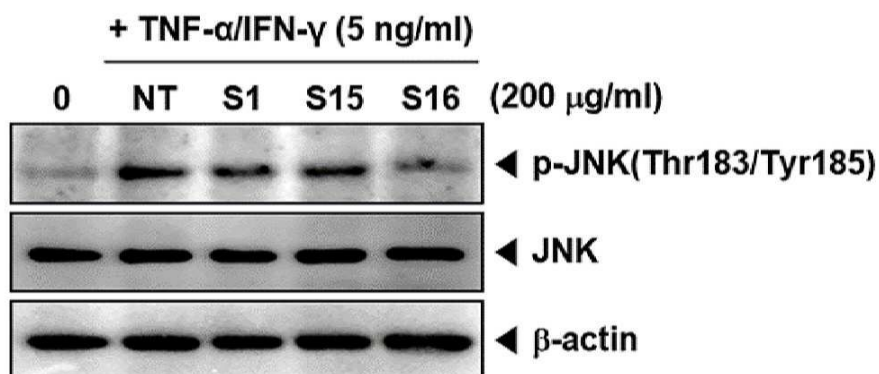
도면5a



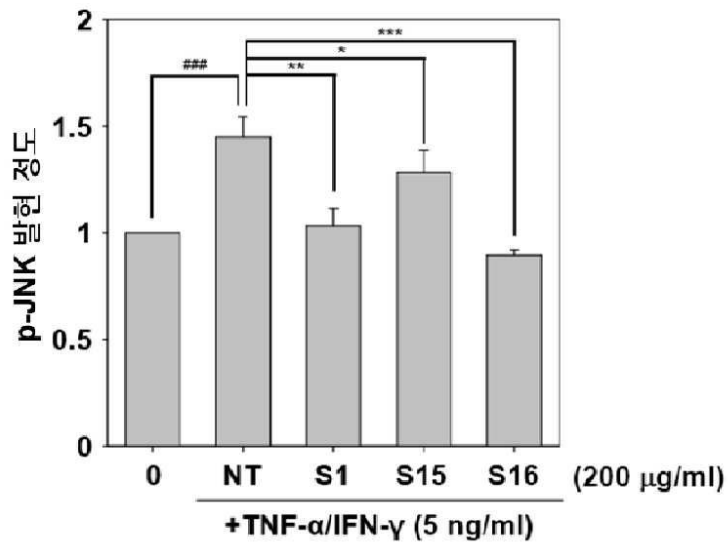
도면5b



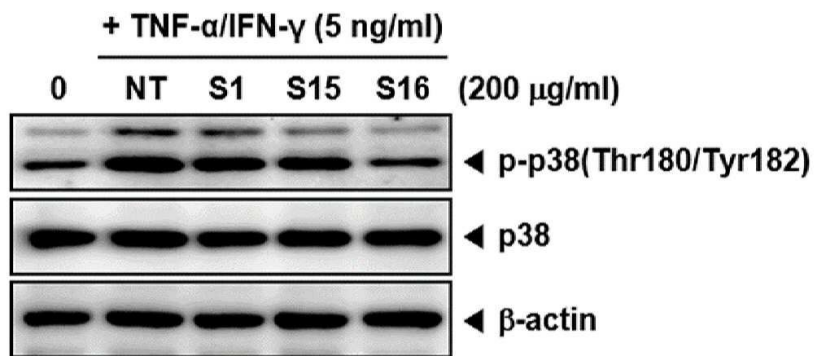
도면6a



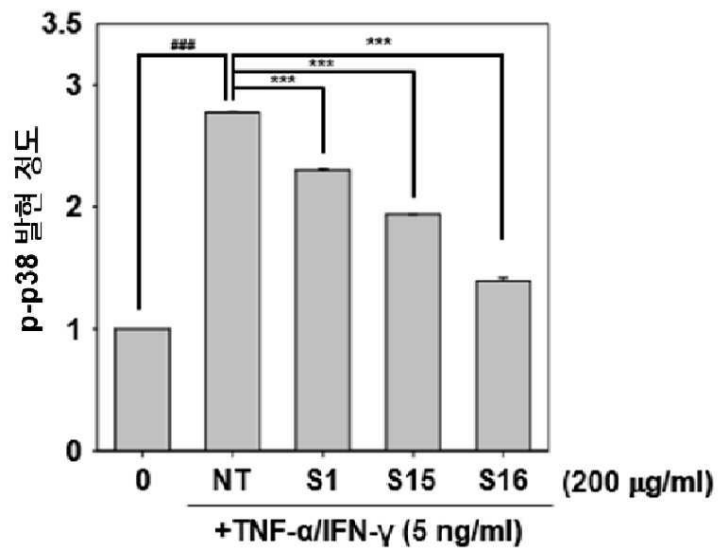
도면6b



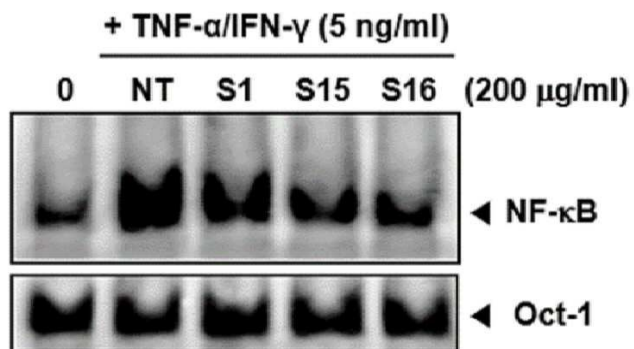
도면7a



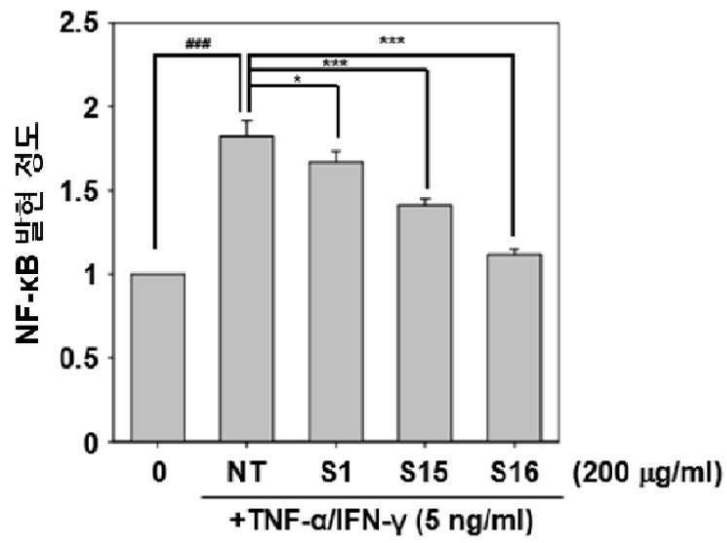
도면7b



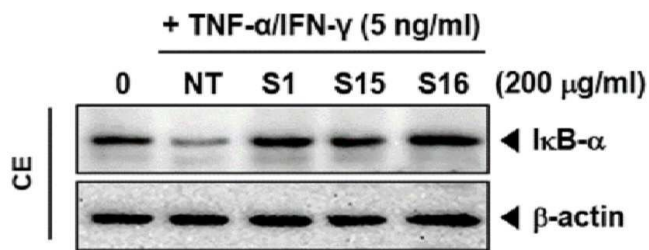
도면8a



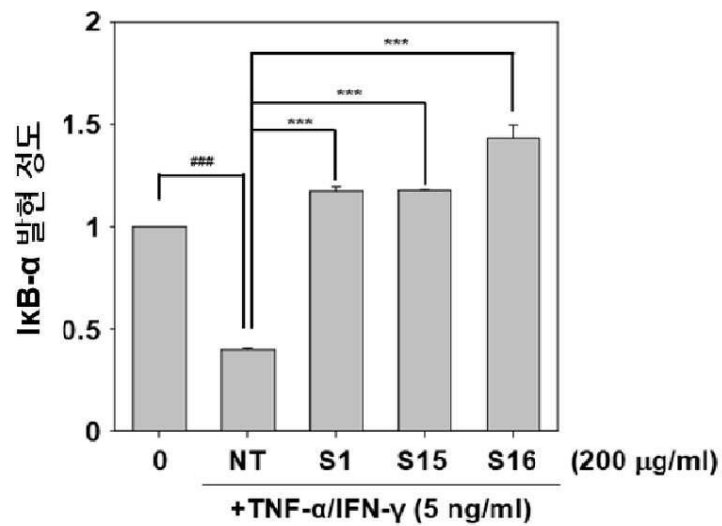
도면8b



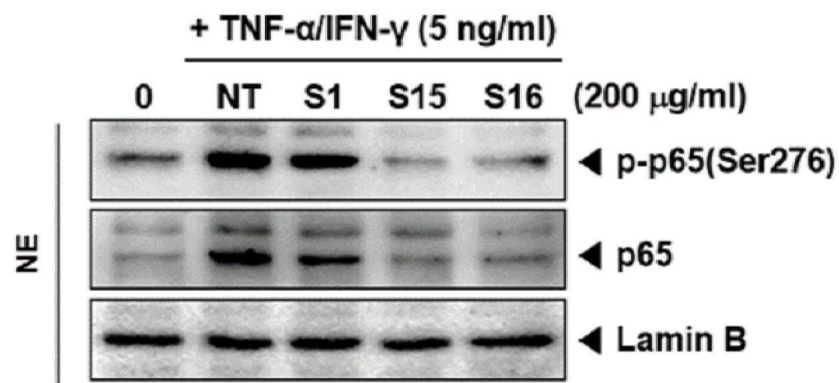
도면9a



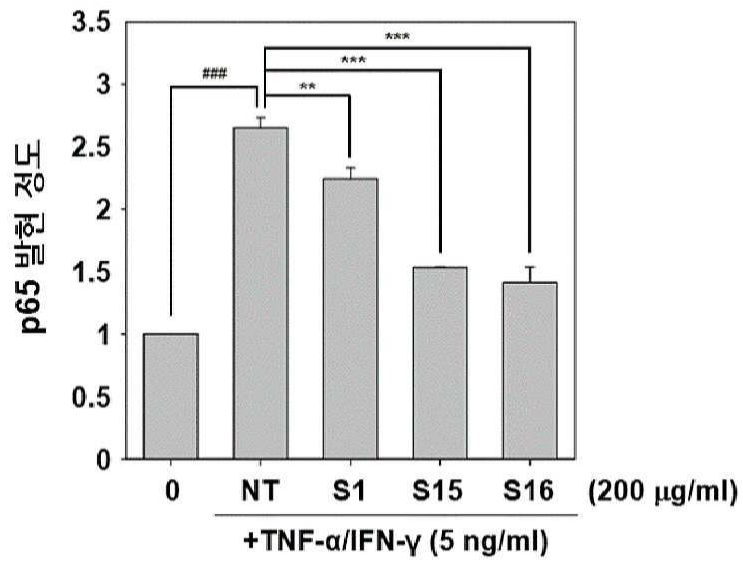
도면9b



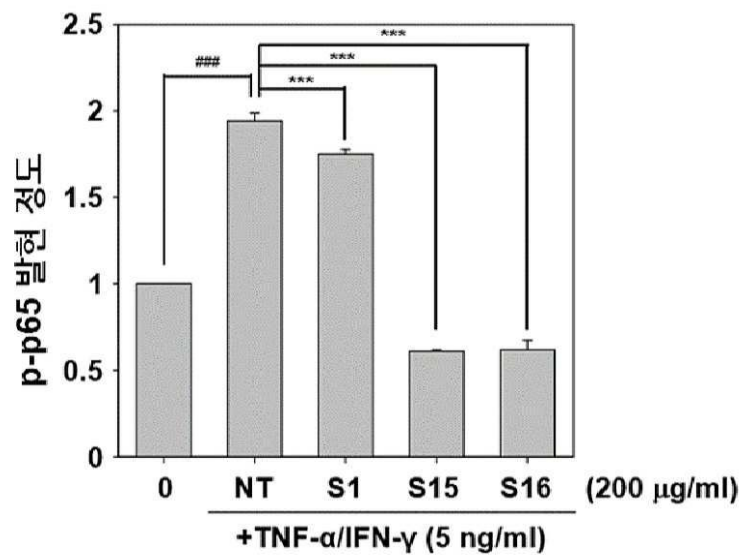
도면10a



도면10b



도면10c



도면11

