



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월30일

(11) 등록번호 10-2493312

(24) 등록일자 2023년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9717 (2017.01) A61K 8/35 (2006.01)

A61K 8/42 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)

A61K 8/55 (2006.01) A61K 8/60 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9717 (2017.08)

A61K 8/35 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0015646

(22) 출원일자 2022년02월07일

심사청구일자 2022년02월07일

(30) 우선권주장

1020210191199 2021년12월29일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR101897488 B1*

Journal of Investigative Cosmetology, Vol.16,
No.4, pp.331-341(2020.12.31.) 1부.*

KR1020170066806 A

US20070265352 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교 산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

이숙영

광주광역시 남구 봉선중앙로 46, 108동 201호(봉선동, 삼익아파트)

김세윤

광주광역시 광산구 첨단중앙로 181번길 16 벽산아파트 103동 104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 5 항

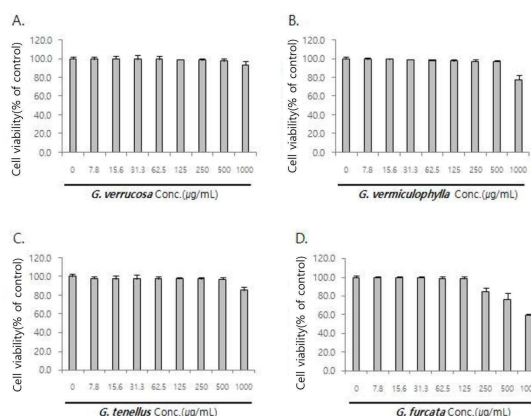
심사관 : 강신건

(54) 발명의 명칭 4종의 해조류 추출물을 포함하는 항염용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 4종의 해조류 추출물을 포함하는 항염용 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함함으로써 우수한 항염 효과를 나타낼 수 있고, 궁극적으로 피부 개선 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/42 (2013.01)
A61K 8/4946 (2013.01)
A61K 8/553 (2013.01)
A61K 8/60 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2800/5922 (2013.01)

(72) 발명자

김춘성

광주광역시 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002호(진월동, 대주아파트)

최다인

광주광역시 광산구 첨단중앙로181번길 42-14, 202동 1411호(월계동, 일신아파트)

이슬아

전라남도 목포시 연산백련로1번길 69, 102동 404호(연산동, 목포용해2지구모아엘가 에듀파크)

이재훈

광주광역시 남구 독립로54번길 29, 103동 701호(백운동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525011797
과제번호	202106562
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	빅데이터기반해양바이러스체어릿마린바이오틱스개발(R&D)
연구과제명	해조류 기반 바이오 헬스케어 유효성 소재 실증 지원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함하고,

포스포리피드, 글라이코스핑고리피드, 판테놀, 알란토인, 트레할로스, 피코스테롤, 1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론을 더 포함하는 항염용 화장품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 꼬시래기 추출물은 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 꼬물꼬시래기 추출물은 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 돌가사리 추출물은 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 불등풀가사리 추출물은 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물인, 항염용 화장품 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화장품 조성물은 보습용인, 항염용 화장품 조성물.

청구항 6

꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 혼합하여 추출 혼합물을 얻는 단계; 및

포스포리피드, 글라이코스핑고리피드, 판테놀, 알란토인, 트레할로스, 피코스테롤, 1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론을 상기 추출 혼합물에 첨가하는 단계;를 포함하는 항염용 화장품 조성물의 제조방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함하고,

포스포리피드, 글라이코스핑고리피드, 판테놀, 알란토인, 트레할로스, 피코스테롤, 1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론을 더 포함하는 항염용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부는 신체의 가장 큰 기관으로서 외부환경과 직접 접해 있으면서 신체 안으로 침입하려는 외부의 다양한 유해 인자, 예를 들면, 온도, 습도 및 자외선 등으로부터 신체를 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라, 몸의 체온을 조절 해주는 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 이러한 피부는 각종 오염물질, 강한 자외선, 스트레스 및 영양결핍 등으로 인해 피부 세포들이 손상을 입게 되고, 세포 증식이 제대로 이루어지지 않게 되어 피부에 주름, 탄력 손실 및 각질화 등의 문제가 발생하게 된다.

[0004] 염증은 체내의 세포가 인체를 보호하기 위하여 외부 자극에 의한 피부 손상에 대응하여 반응하는 현상으로, 피부 손상을 회복하기 위해 세포내 물질을 분비하여 나타나는 일종의 면역 반응으로 볼 수 있다. 피부염은 자외선 손상에 의한 피부염과 자극성 물질에 의한 접촉피부염, 특이 물질에 의한 알레르기성 피부염으로 구분할 수 있으며, 염증이 일어난 부위에서는 홍반, 부종, 수포 및 열감과 소양증 등의 증상이 나타나며 특히, 자외선에 의한 손상은 급성적인 염증 증상을 유발할 뿐만 아니라 세포 내에서의 DNA 손상과 피부암 및 피부 노화를 초래한다. 피부염은 피부에 생긴 염증을 말하며 이는 습진과 같은 의미로 사용되기도 한다. 염증의 원인은 불확실한 경우가 많으며 염증의 형태와 양상이 매우 다양하다. 피부염은 크게 급성, 아급성, 만성으로 나누는데 급성과 아급성 병변의 경우에는 홍반(빨간 반점), 구진(좁쌀이나 쌀알 크기로 튀어나는 것)을 거쳐 수포(작은 물집)가 나타나며 만성 습진의 경우에는 축축하기보다 마르고 건조하게 보인다. 피부염은 전체 피부병에서 차지하는 비율이 높고 그 종류도 다양한데 그중에 흔한 것들은 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 건성 피부염, 접촉 피부염, 화폐상 피부염 등이 있다. 자외선 자극에 의해 염증성 사이토카인의 농도가 높아진 피부조직은 염증세포들을 유인하여 손상된 세포를 제거하고 회복시키며, 이러한 과정에서 염증세포는 손상받은 조직이나 세포를 제거하기 위해 염증 유발 사이토카인과 염증 매개인자와 같은 다양한 물질들을 분비한다. 이와 같이 염증반응은 자외선을 비롯한 외부 자극으로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 하지만 이러한 과정이 반복되거나 정도가 과도할 경우 피부에 2차적인 손상을 입힐 수 있다. 예를 들어 자외선 손상에 의한 염증반응 과정에서 생성된 효소인 cyclooxygenase (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 각각 prostaglandin E2 (PGE2)와 nitric oxide (NO)를 생성하여 조직 손상 및 유전자변이를 일으킴과 동시에, 피부 속에 존재하는 콜라겐 섬유와 탄력 섬유를 분해하여 염증반응에 의한 광노화를 촉진시킨다. 이상과 같은 피부염 현상을 예방하거나 개선하기 위한 연구가 식물류를 중심으로 많은 연구가 수행되어왔으나 해조류를 소재로 한 항염활성 분석연구는 미미하다.

[0005] 한편, 해양 거대조류(macroalgae)인 해조류는 재생 가능한 다 세포 원생생물로, 바다의 깊이와 색소의 구성에 따라 녹조류 (green algae), 갈조류(brown algae), 홍조류(red algae)로 분류되며 구성성분의 차이가 있다. 그 중 가장 많이 연구되고 있는 갈조류는 전 세계 에 약 1,500종이 발견되어 있으며 해조류 중 가장 발달된 체계를 가지고 있다. 갈조류는 fucoidan, laminaran, alginic acid 등의 다당류 및 폴리페놀류와 같은 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 플로로탄닌(phlorotannin)이라는 독특한 폴리페놀 2차 대사산물을 함유하고 있어 해조류의 다양한 생리활성에 기여한다. 해조류는 열량이 낮고 식이섬유, 비타민, 무기질 등이 풍부하며 생리활성 물질을 다량 함유하고 있다. 최근에는 천연해양식물 중에 함유된 다양한 생리활성 물질에 관한 연구가 관심을 끌고 있으나 갈조류 기능성 물질 탐색이 주류를 이루어 홍조류의 항산화, 항염증, 항균 작용에 대한 연구는 미미한 실정이다.

[0006] 홍조류(紅藻類)는 조류로 분류되는 원생생물의 한 갈래로, 전 세계에 약 600속의 2,000종 정도가 알려져 있으며 김과 꼬시래기, 우뚝가사리가 대표적이다. 모두 분홍색이나 암홍색 색소체를 가지며, 엽록소 a, d와 카로틴(carotene), 크산토폴(xanthophyll), 피코빌린(phycobiline)이 주된 색소류이며, 광합성 작용에 의해 홍조 녹말을 만든다. 홍조류는 극히 일부가 단세포체이거나 군체를 이루고, 대부분은 다세포체이며, 지리적으로 온대 및 열대 해역에 많은 종류가 분포하며, 세포벽은 셀룰로오스(cellulose), 펙틴(pectin) 이외에 한천(agar), 카라기난(carrageenan)과 같은 콜로이드 물질로 되어 있다. 김이나 풀가사리 무리처럼 얇은 바다에서 생육하는 것도 있지만, 대부분의 홍조식물은 간조선보다 더 깊은 곳에서 자란다. 특히, 우뚝가사리는 약 10m 정도의 깊은 곳에서 많이 자라며, 이 밖에 100m 이상의 깊은 곳에서 자라는 종류도 매우 많다. 홍조식물이 이렇게 깊은 곳에서 자랄 수 있는 것은 체내에 있는 홍조소가 약 0.5 μ m 부근의 단파장 빛을 광합성에 이용하기 때문이다. 빛은

바다 수심이 깊어짐에 따라 적색·주황색·황색·자색·남색·녹색·청색의 순서로 흡수되므로, 가장 깊은 곳까지 도달될 수 있는 것은 청색과 녹색이다. 따라서, 홍조식물은 깊은 바다에 위치하면서 자신의 몸 빛깔과 보색 관계에 있는 청색이나 녹색빛을 광합성에 이용한다. 한편, 얕은 곳에서 자라는 진두발 등은 전체적으로 녹색을 띠므로, 홍조식물이 아니라고 생각되기도 하는데, 이것은 적색이나 황색의 장파장 빛을 광합성에 잘 이용한 결과 녹색 엽록소량은 늘어난 반면 홍조소는 감소된 보색 적응 현상 때문이다.

[0007] 홍조류를 구성하고 있는 성분들의 함량은 종류에 따라 다양하지만 일반적으로 탄수화물 40~60%, 단백질 26.4%, 지방 0.8%, 회분 17.5% 등으로 구성되어 있으며 카라기난과 비타민A, 식이섬유가 풍부하다. 갈조류와 녹조류의 탄수화물의 함량이 40~50%인데 반해, 우뚝가사리나 꼬시래기 같은 홍조류는 탄수화물 함량이 높아 바이오매스로 충분히 활용가능하며 전세계적으로 분포되어 있어 활발하게 연구되고 있다. 홍조류의 대표적인 탄수화물 저장형태는 한천, 셀룰로오스, 카라기난이다. 계절에 따라 홍조류의 한천 함량 변동이 있지만, 전체적으로 33~35% (건물기준) 정도이며 한천은 그 자체가 식품, 과자에 사용되기도 하지만, 여러 가지 용도로 광범위하게 사용되고 있다. 홍조류는 탄수화물, 무기질, 단백질 등이 풍부하여 장 활동을 원활하게 하고 중금속 배출, 혈관 내 콜레스테롤이 쌓이는 것을 방지하는 등의 효과가 있다. 이는 열량이 낮고 혈액순환을 돕기 때문에 다이어트를 할 때 먹어도 좋고, 칼륨이 풍부해 고혈압 환자에게도 도움이 된다. 또한 카라기난 성분은 항바이러스 작용과 면역력 증진에 효과가 있는 물질이다. 홍조류는 다른 해조류에 비해 건조중량당 칼슘함량이 50%이상으로 함유되어 있으며 해조칼슘은 무기, 무취하며 oil 및 수분흡수력이 우수한 벌집형의 다공질 구조이다. 다공질 구조의 특징은 소화흡수율이 우수하고 Buffering Capacity가 탁월하여 입안의 젖산을 중화하여 주므로 충치를 예방하고 이산화탄소 발생을 느리게 하고 식감(뽕가루를 씹는 듯한 이물감)이 전혀 없으며 식물성이라 여성에게 특히 좋다. 또한, 중금속함량(특히 납)이 매우 낮아 요즘 중금속 오염문제로 심각한 논란이 제기되고 있는 타 칼슘제의 대체 원료로도 각광받고 있다.

[0008] 홍조류에 속하는 해조류 중 하나인 꼬시래기는 한천의 주원료가 되고 있고, 열대에서 온대에 걸쳐 세계 각지에 생육하며 홍조식물문 홍조강 꼬시래기목 꼬시래기과에 속하며 전세계적으로는 110종이 알려져 있으며, 따뜻한 지역의 깊은 바다에서 서식하며, 조간대의 사니질 속에 묻혀 있는 돌, 조개 껍데기뿐만 아니라 조하대의 바위 위에서 생육한다. 국내의 경우, 주로 장흥과 완도, 해남, 진도 지역에서 자라나는 해초로, 우뚝가사리와 섞어 한천 재료로 사용하기도 하지만 해초 자체로도 훌륭한 식재료이다. 엽체는 원반상의 부착기에서 단독으로 생기며, 원주상으로 가는 끈과 같은 형태로 성장하며, 매우 촘촘하게 깃모양으로 분기하고 가지는 한쪽 면으로 편생하여 나며, 가지 기부는 가늘고, 정단부도 가는 형태이다. 엽체의 색은 자갈색이며 건조하면 암자색 또는 암갈색으로 되며, 크기는 10~30cm 정도이고, 굵기는 2~3mm 정도로 성장한다. 꼬시래기에는 단백질 1.8%, 지방 0.2%, 탄수화물 5.9%, 섬유질 0.3%, 무기질 2.7% 등이 함유되어 있으며 비타민A, 비타민 B2, 비타민C도 풍부하다. 본초강목에 나와있는 꼬시래기의 특성은 맛은 달며 성질은 차고 독이 없고 소변을 배출시키고 내열을 제거하는 것으로 기록되어 있다. 발육 촉진, 골다공증 예방, 체내 중금속 배출 등에도 효능이 있으며 고혈압, 당뇨 등의 성인병 예방과 변비에도 효과가 높다. 꼬시래기는 요오드 함량이 높으므로 갑상선 종양이나 갑상선기능 항진증에 사용해 왔고 체내의 중금속 배출 효과 또한 뛰어나다. 풍부한 식이섬유는 몸에 쌓인 과다지방 및 노폐물을 배출하는데 도움을 주고 낮은 칼로리로 인해 다이어트에 도움이 되면서도 골다공증이나 고지혈증 등에도 효과가 있다. 꼬시래기 유래 천연물은 화장품원료로 등재되어 있다.

[0009] 홍조류에 속하는 해조류 중 하나인 꼬물꼬시래기는 홍조식물문 꼬시래기목 꼬시래기과에 속하며, 엽체는 적갈색의 연골질로 꾸불꾸불한 채찍모양이며 길고 짧은 가지를 나선 모양으로 다발을 이룬다. 식물체의 크기는 30~40cm 이며 피층은 가름한 구슬모양의 세포가 1~2겹으로 쌓여 이루어졌고, 수조직은 대단히 크고 둥근 세포로 이루어졌다. 사분포자낭은 피층조직에 들어있으며 타원형으로 나누어지며 정자낭집은 수조직에 이르기까지 깊이 들어간 항아리 모양이며, 생육지 조간대의 모래밭 근처 돌에 붙어 자란다. 주요 용도는 초절임, 해초샐러드, 한천의 원료, 한약재로 이용되고 있으며, 주요 유효성분은 citrulline, taurine vercoyosin, lectin, prostaglandin을 함유하고 있으며, vercoyosin은 항 stress 계양 활성이 있고, lectin은 세포응집 활성, 혈압강하, 혈소판응집억제, 위액분비 억제, 장관운동 항진, 기관지 확장, 자궁 수축, 이뇨; 갑상선종, 폐결핵, 항균, 위장질환, 비뇨기질환, 수종에 효과가 있는 성분이다. 꼬물꼬시래기 유래 천연물은 화장품원료로 등재되어 있다.

[0010] 홍조류에 속하는 돌가사리의 엽체는 길이 5~15cm, 너비 1~2mm이고, 납작한 원주상의 가지가 다수 어긋나기 또는 마주나기하며, 정단부는 뾰족하다. 몸은 자색 또는 홍자색이고, 연골질이며, 물속에서 형광을 내기도 한다. 낭과는 거의 구상이며 작고 자루가 없다. 조간대 하부에서 조하대에 걸쳐 암초 위에 생육하며, 연안 해조군집의 우점종으로 생태적으로 중요하다. 한국, 일본, 중국, 필리핀, 태평양 도서에 분포한다. 돌가사리는 해조샐러드

로 식용하거나 카라기난을 제조한다. 카라기난은 식용호료(食用糊料)로서 식품공업용의 유화제(乳化制) 안전제로서 널리 쓰인다. 함유성분으로 시트룰린(citrulline), 타우린(taurine) 등이 있다. 돌가사리 유래 천연물은 화장품원료로 등재되어 있다.

[0011] 홍조류에 속하는 불등풀가사리는 풀가사리과(Endocladaceae) 계통으로 조간대의 바위나 돌 위에서 자라며 한국, 일본, 미국 태평양 연등에 분포하고 있다. 불등풀가사리의 형태는 적갈색을 띠고 외부는 가죽질의 긴 막대 모양으로 속은 비어 있고 가늘다. 또한, 점액질이 풍부하며 풀가사리와 외형상 유사하나 줄기의 속이 비어 있는 차이점이 있다. 불등풀가사리에 주로 함유되어 있는 다당은 자연에 널리 분포하고 있으며 해양생물에 의해 생산되기도 하고 식물과 해조류로부터 파생된다. 불등풀가사리는 참풀가사리와 함께 가사리로도 불리며, 캐러기난이 있어서 끓이면 끈적끈적한 다당류가 나와서 오래 전에는 옷감의 풀 먹이는데 혹은 문풍지나 벽지 붙이는데 사용하기도 하였다. 불등풀가사리의 엽체는 곧봉 모양으로 소반상근에서 모여난다. 줄기는 매우 짧으며 속은 비어있고 갑작스레 팽배하여 원주상이다. 몸의 여기저기가 잘록하며 마디처럼 자라며 보통 가지는 없고 불규칙한 차상분지를 한다. 색은 자홍색이며, 질은 얇은 혁질로 강하며 건조하면 대지에 잘 붙는다. 조간대 상부에 군락을 이루어 분포하며, 노출 및 건조에 잘 적응하는 해조류이다. 봄철에서 초여름까지 출현하며, 크기는 4~10cm 정도로 성장한다. 불등풀가사리 유래 천연물은 화장품원료로 등재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2261149호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 항염용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 본 발명은 항염용 화장료 조성물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 1. 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 포함하는 항염용 화장료 조성물.

[0018] 2. 위 1에 있어서, 상기 꼬시래기 추출물, 상기 꼬물꼬시래기 추출물, 상기 돌가사리 추출물 및 상기 불등풀가사리 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함하는, 항염용 화장료 조성물.

[0019] 3. 위 1에 있어서, 상기 꼬시래기 추출물은 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 꼬물꼬시래기 추출물은 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 돌가사리 추출물은 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 불등풀가사리 추출물은 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물인, 항염용 화장료 조성물.

[0020] 4. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 포스포리피드: 글라이코스핑고리피드; 판테놀; 알란토인; 트레할로스; 피코스테롤; 및 1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는, 항염용 화장료 조성물.

[0021] 5. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 보습용인, 항염용 화장료 조성물.

[0022] 6. 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 혼합하여 추출 혼합물을 얻는 단계;를 포함하는 항염용 화장료 조성물의 제조방법.

[0023] 7. 위 6에 있어서, 포스포리피드: 글라이코스핑고리피드; 판테놀; 알란토인; 트레할로스; 피코스테롤; 및 1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 상기 추출 혼합물에 첨가하는 단계;를 더 포함하는 항염용 화장료 조성물의 제조방법.

[0024] 8. 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 항염용 의약품 조성물.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 조성물은 우수한 항염 효과를 나타낼 수 있고, 궁극적으로 피부 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 모두 포함함으로써 이들을 단독으로 포함하는 경우에 비해 우수한 항염 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 RAW 264.7 대식세포에서의 MTT분석을 통해 4종의 해조류 추출물 농도별로 세포생존율을 확인한 결과이다.

도 2는 HEK293 세포에서의 MTT분석을 통해 4종의 해조류 추출물 농도별로 세포생존율을 확인한 결과이다.

도 3은 웨스턴블랏을 통해 LPS 200ng/mL로 처리된 RAW 264.7 세포에서의 염증유발유전자 iNOS와 COX-2의 발현억제능을 확인한 결과이다.

도 4는 웨스턴블랏을 통해 LPS 200ng/mL로 처리된 RAW 264.7 세포에서의 염증유발유전자 p-NF-kBp65의 발현억제능을 확인한 결과이다.

도 5는 웨스턴블랏을 통해 LPS 50ng/mL로 처리된 RAW 264.7 세포에서의 염증유발유전자 iNOS와 COX-2의 발현억제능을 확인한 결과이다.

도 6은 웨스턴블랏을 통해 LPS 50ng/mL로 처리된 RAW 264.7 세포에서의 염증유발유전자 p-NF-kBp65의 발현억제능을 확인한 결과이다.

도 7은 일 실시예에 따른 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 복합물, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 조성물의 NO 발생 저해 효능을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 포함하는 항염용 화장품 조성물을 제공한다.

[0031] 본 출원의 발명의 설명 및 도면에서 꼬시래기는 *G. verrucosa* 또는 *G. verru*; 꼬물꼬시래기는 *G. vermiculophylla* 또는 *G. vermin*; 돌가사리는 *C. tenellus* 또는 *C. tene*; 불등풀가사리는 *G. furcata* 또는 *G. furc*으로도 표현될 수 있다.

[0032] 용어 “추출물”은 추출 대상 물질을 용매에 녹여 분리한 물질을 의미하고, 구체적으로 추출대상의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 동결건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등의 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성가능한 모든 제형의 추출물을 포함할 수 있다.

[0033] 추출방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 예컨대 추출방법은 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등일 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0034] 꼬시래기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 꼬물꼬시래기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 돌가사리 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 불등풀가사리 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있다.

[0035] 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 C1 내지 C4의 저급알코올과 물이 혼합된 혼합물인 C1 내지 C4의 저급 알코올 수용액일 수 있다. C1 내지 C4의 알코올 수용액은 10%이상 내지 100%(v/v)미만, 20%이상 내지 100%(v/v)미만,

30%이상 내지 100%(v/v)미만, 40%이상 내지 100%(v/v)미만, 50%이상 내지 100%(v/v)미만, 60%이상 내지 100%(v/v)미만, 70%이상 내지 100%(v/v)미만, 80%이상 내지 100%(v/v)미만 또는 90%이상 내지 100%(v/v)미만의 C1 내지 C4의 저급알코올 수용액일 수 있다.

- [0036] 일 실시예에 따르면, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물은 꼬시래기, 꼬물꼬시래기, 돌가사리 및 불등풀가사리 건조 분말 각각에 95% 에탄올을 첨가하여 추출한 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 1.5 내지 6.5:1.5 내지 6.5:1:1 중량비, 2 내지 6: 2 내지 6:1:1의 중량비, 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비 또는 4:4:1:1 중량비로 포함할 수 있고, 구체적으로 2 내지 6: 2 내지 6:1:1의 중량비로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함할 수 있다.
- [0038] 일 구현예에 따르면, 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물 및 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물을 4:4:1:1의 중량비로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 화장료 조성물은 4종의 해조류 추출물 중 꼬시래기 추출물 및 꼬물꼬시래기 추출물을 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물 보다 높은 함량으로 포함함으로써 우수한 항염 효과를 나타낼 수 있다.
- [0040] 본 발명의 화장료 조성물은 전술한 4종의 해조류 추출물 외에 피부 친화 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0041] 피부 친화 성분은 피부 유사 성분 등을 포함할 수 있다. 피부 친화 성분은 포스포리피드 또는 글라이코스핑고리피드 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0042] 피부 친화 성분은 판테놀, 알란토인, 트레할로스 및 피코스테롤로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 피부 친화 성분은 Symdiol 68T를 더 포함할 수 있다. Symdiol 68T는 1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론의 혼합물일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 화장료 조성물에 포함될 수 있는 포스포리피드와 글라이코스핑고리피드는 피부 유사 성분으로서, 염증성 피부에 컨디셔닝을 부여하여 피부 활력 관리에 도움을 주고 수분 결합 능력을 회복시키고 피부 속 수분 손실을 막아 촉촉한 피부 유지에 도움을 줄 수 있다.
- [0045] 포스포리피드는 글리세린의 하이드록실기 중 하나가 포스포릭에씨드로 에스터화되고 두 개의 하이드록실기는 긴 사슬의 포화 혹은 불포화 지방산으로 에스터화 된 복합 지질로써 불포화 지방산을 풍부하게 함유하고 있으며 인체를 구성하는 성분으로 피부에 중요한 역할을 할 수 있다. 포스포리피드는 피부의 수분 저장 능력을 향상시켜 건조한 피부를 촉촉하게 유지 및 개선하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다.
- [0046] 글라이코스핑고리피드는 골격에 공유 결합된 탄수화물 그룹을 함유한 스펅고리피드 성분으로, 지질과 당으로 구성되어있는 글라이코스핑고리피드는 피부와 유사한 구조를 가지며 GLS라고 불리기도 한다.
- [0047] 본 발명의 화장료 조성물은 총 중량에 대하여 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물; 및 상기 피부 친화 성분;이 혼합된 복합물을 0.1 내지 10 중량%로 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 4종의 추출물 외에 피부 친화 성분을 더 포함함으로써 우수한 피부 장벽 보호 및 보습 유지 효과를 나타낼 수 있다.
- [0049] 본 발명의 화장료 조성물은 보습용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 당업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉 쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가적으로 함유할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 화장료 조성물은 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨, 로션, 크림, 에센스, 토너, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스과우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이크 및 메이크업베이스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0052] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 화장료 조성물은 화장수, 에센스, 크림, 클렌저, 손소독제일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 화장료 조성물은 천연물 추출물 또는 이로부터 분리된 성분을 유효성분으로 하기 때문에 거의 독성을 가지지 않으며, 인체에 무해하다.
- [0054] 본 발명의 화장료 조성물은 LPS로 유도된 염증세포모델에서 우수한 항염증 효과를 나타낼 수 있다.
- [0055] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 염증유발유전자인 iNOS와 COX-2 단백질 발현 및/또는 NF- κ B 단백질의 발현을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 COX-2, MMP-2, 전구염증매개 사이토카인 TNF- α 및/또는 IL-1 β mRNA의 발현을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 NO 생성 저해 효능을 나타낼 수 있다.
- [0056] 용어 "개선"은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0057] 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 화장료 조성물이 LPS로 유도된 염증세포모델에서 COX-2의 발현을 저해하는 것을 확인하였다.
- [0058] 또한, 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 4:4:1:1의 중량비로 포함하는 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 1:1:1:1의 중량비로 포함하는 화장료 조성물에 비해 LPS로 유도된 염증세포모델에서 COX-2의 발현 저해 효과가 통계적으로 유의하게 우수한 것을 확인하였다.
- [0059] 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 또는 불등풀가사리 추출물을 단독으로 포함하는 화장료 조성물에 비해 현저히 우수한 NO 생성 저해 효능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0061] 또한, 본 발명은 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물 및 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물을 포함하는 항염용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0062] 4종의 해조류 추출물, 항염에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [0063] 용어 “의약외품”은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람 또는 동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0064] 의약외품 조성물은 코팅제, 물티슈, 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 의약외품 조성물은 경구 또는 비경구의 여러가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 혼합하여 추출 혼합물을 얻는 단계;를 포함하는 항염용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0068] 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물, 항염, 화장료 조성물에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [0069] 상기 추출 혼합물을 얻는 단계는 상기 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 상기 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 상기 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물 및 상기 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물을 1.5 내지 6.5:1.5 내지 6.5:1:1 중량비, 2 내지 6: 2 내지 6:1:1의 중량비, 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비 또는 4:4:1:1의 중량비로 혼합하여 혼합물을 얻는 것일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 제조방법은 피부 친화 성분을 상기 추출 혼합물에 첨가하는 단계;를 더 포함할 수 있다. 상기 피부 친화 성분은 포스포리피드, 글라이코스핑고리피드, 판테놀, 알란토인, 트레할로스, 피코스테롤 및 Syndiol 68T(1,2-헥사네이디올, 1,2-옥타네이올 및 트로폴론의 혼합물)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0072] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0074] **1. 화장품 조성물 제조**

[0075] **(1) 4종의 해조류 추출물 제조**

[0076] 제주 연안 자생 홍조류인 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*), 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*), 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*), 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 4종의 건조 분말을 (주) 파라제주에서 구입하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 상기 4종의 홍조류의 건조 분말 각각에 에탄올을 첨가하여 에탄올 추출물을 수득하였다. 구체적으로, 각 홍조류 건조 분말 100g에 95% 에탄올 1000mL을 넣고 실온에서 24시간 추출하였다. 그 다음 감압농축기로 농축하여 동결건조 하였다. 최종적으로 얻어진 추출물(동결건조시료)의 수율은 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 돌가사리, 불등풀가사리에서 각각 1.80%, 2.31%, 1.24%, 0.03%로 확인되었다.

[0078] **(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조**

[0079] 아래의 표 1 및 2에 기재된 바와 같이 4종의 해조류 추출물(동결건조물) 사이의 중량비가 상이한 두 가지 복합 조성물(복합물 A 및 B)을 제조하였다.

[0080] 구체적으로, 위 '1(1) 4종의 해조류 추출물 제조'에서 수득한 4종의 해조류 유래 동결건조물(꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물)을 분말상태로 아래 표 1의 함량비로 미니 믹서기를 사용하여 혼합하였다. 분말상태의 혼합물을 막자사발에 옮겨 액체질소를 첨가한 다음 유봉으로 5분간 그라인딩하였다. 그라인딩되어 4종의 해조추출물이 고르게 안정적으로 혼합된 4종의 해조류 추출물의 분말 혼합물(powder mixture) 10g을 새로운 막자사발(50℃ 수조에서 워밍업 된 상태)에 옮겼다. 상기 막자사발에 옮겨진 분말 혼합물에 피부 친화 성분 복합물을 10mL 첨가한 후 분말 혼합물이 물리적으로 엉기지 않고, 공기흡수로 방울이 형성되지 않도록 유봉으로 천천히, 부드럽게 배합 용해 시켰다. 피부 친화 성분 복합물이 최종 90mL까지 첨가될 수 있도록 단계별(9단계)로 10mL씩 첨가하면서 배합, 용해 시켰다(총 용량이 50mL 이상인 단계에서는 유봉 대신에 소형 핸드믹서를 사용해도 됨). 용해가 완료된 복합 조성물이 물리화학적으로 안정될 수 있도록 하고 용해과정에서 형성된 기포를 제거하기 위하여, 용해물을 약 10℃에서 24시간 정치시킨 후 복합 조성물을 수득하였다.

표 1

[0081]

복합물 A			
구성성분		4종의 해조류 추출물 사이의 중량비	4종의 해조류 추출물과 피부 친화 성분 복합물 사이의 혼합비
4종의 해조류 추출물	꼬시래기 추출물	1	10g
	꼬물꼬시래기 추출물	1	
	돌가사리 추출물	1	
	불등풀가사리 추출물	1	
피부 친화 성분 복합물		-	90mL

표 2

[0082]

복합물 B			
구성성분		4종의 해조류 추출물 사이의 중량비	4종의 해조류 추출물과 피부 친화 성분 복합물 사이의 혼합비
4종의 해조류 추출물	꼬시래기 추출물	4	10g
	꼬물꼬시래기 추출물	4	
	돌가사리 추출물	1	
	불등풀가사리 추출물	1	
피부 친화 성분 복합물		-	90mL

[0083] 상기 복합 조성물에 포함되는 피부 친화 성분 복합물은 아래 표 3의 성분 비율로 혼합하여 제조하였다. 구체적으로, 화장품 원료로 사용 용도에 맞게 나온 포스포리피드 및 글라이코스핑고리피드를 피부 친화 성분 복합물에

포함시켰다. 피부 보호와 장벽 보습 강화를 위해 판테놀과 알란토인, 트레할로스, 피코스테롤을 보조제로 포함시켜 시너지 효과가 잘 이루어질 수 있도록 하였다. 또한, 방부 효과를 위해 Syndiol 68T를 전체 함량에서 0.5% 포함시켰다

표 3

성분	함량
포스포리피드	1000ppm
글라이코스핑고리피드	1000ppm
판테놀	0.8 중량%
알란토인	0.5 중량%
트레할로스	0.25 중량%
피코스테롤	0.02 중량%
정제수	잔량(to 100 중량%)
Syndiol 68T	0.5 중량%

2. 4종의 해조류 추출물의 세포 독성 확인

위 1.(1)에서 제조된 4종의 해조류 추출물이 세포 독성을 나타내는지 확인하기 위해 세포생존율 분석을 수행하였다.

(1) 세포 배양 및 세포생존율 검사 방법

RAW 264.7 cells을 10% heat-inactivated FBS와 1% penicillin 및 streptomycin을 포함한 DMEM에서 배양하였으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매일 계대 배양하였다. 또한, 신생아 포피로부터 분리된 대표적인 정상 피부세포 HEKn(1차 정상인간 표피각질세포)를 human keratinocyte growth supplement(HKGS) 및 antibiotics(100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin)를 함유한 basal keratinocyte growth media에서 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2nd-7th 세대를 실험에 사용하였다.

세포 배양 후 다양한 농도의 추출물들을 첨가한 후 세포생존율(cell viability)을 검사하기 위하여 Comin-Anduix et al(2002)의 방법으로 MTT assay를 시행하였다. 세포들을 96 well plate의 각 well에 3X10⁴/well로 seeding한 뒤 세포가 70~80% 자라면 각각의 추출물을 농도별(0~1000 ug/mL)로 처리한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 이후 5 mg/mL MTT 용액을 각 well당 10 µL씩 첨가하여 2~4시간 동안 37℃ incubator에서 배양한 후, tetrasodium bromide salt를 제거하고 DMSO를 100 µL씩 분주하여 well에 생성된 formazan 결정체를 용해시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포생존율은 다음 수학적 식 1에 의하여 환산하였다.

[수학적 식 1]

$$\text{세포생존율}(\%) = \left[\frac{\{\text{Exp} - \text{Blank}\}}{\text{Control}} \right] \times 100$$

(Exp: 세포를 포함한 추출물의 흡광도, Blank: 세포를 포함하지 않는 추출물의 흡광도, Control: 세포를 포함한 증류수의 흡광도)

(2) 세포생존율 분석 결과

1) RAW 264.7 대식세포의 세포생존율

RAW 264.7 대식세포는 꼬시래기(*G. verrucosa*) 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기(*G. vermiculophylla*) 에탄올 추출물, 돌가사리(*C. tenellus*) 에탄올 추출물 500 ug/mL의 농도에서 97% 생존하였고 세포독성이 관찰되지 않았다. RAW 264.7 대식세포는 불등풀가사리(*G. furcate*) 에탄올 추출물 125 ug/mL 농도에서 99% 생존하였으나, 250 ug/mL 이상의 농도에서 생존율이 감소하였다. 이에, 후속 실험은 RAW 264.7 cell의 세포생존율에 영향을 주지 않는 125 ug/mL 이하의 농도로 수행하였다(도 1 참조).

2) HEKn 세포의 세포생존율

HEKn 세포는 꼬시래기(*G. verrucosa*) 에탄올 추출물, 돌가사리(*C. tenellus*) 에탄올 추출물 250 ug/mL의 농도에서, 꼬물꼬시래기(*G. vermiculophylla*) 에탄올 추출물, 불등풀가사리(*G. furcate*) 에탄올 추출물 125 ug/mL의 농도에서 98% 이상 생존하였고, 이를 통해 이들 추출물은 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 따라서 후속

실험은 HEK293 세포 생존율에 영향을 주지 않는 125 ug/mL 이하의 농도로 수행하였다(도 2 참조).

3. 4종의 해조류 추출물의 항염 활성 확인

RAW 264.7 및 HEK293 세포 각각에 LPS 처리하여 수득한 LPS로 유도된 염증성세포(RAW 264.7 대식세포 및 HEK293 세포)에서 4종의 해조류 추출물의 항염 활성을 확인하였다.

(1) LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 항염 활성

1) RNA 추출 및 Real-time PCR

RNeasy mini kit(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 세포로부터 mRNA를 분리한 후 nanodrop (ND-1000)을 이용하여 정량(OD260/OD280)하고 정량 결과, ratio는 1.8 내지 2.0 사이에 있는 total RNA를 실험에 이용하였다. Omniscript RT kit(Qiagen, CA, USA)를 이용하여 mRNA에서 cDNA를 합성(1 µg RNA, 10X buffer, dNTP, oligo dT, inhibitor, reverse transcriptase, 37°C에서 1시간, 93°C에서 5분)한 뒤, 각각의 cDNA를 25ng/µL로 동일하게 희석하고 PCR-premixture kit(ELPIS, Taejeon, Korea)를 이용하여 PCR를 실행하였다.

qRT-PCR법의 결과는 GAPDH 발현량에 대한 상대적인 발현량으로 정량하고 real-time PCR법의 경우는 TaqMan Universal PCR Master Mix kit를 사용하여 comparative Ct method로 세포내 mRNA 함량을 측정 뒤 유전자 발현을 비교하였다. 대조 유전자로 house keeping gene(β -actin mRNA)를 사용하였으며 실험에 사용된 primers의 종류는 아래 표 4와 같다.

Δ Ct: 실험군(타겟관련인자) Ct - 대조군(house keeping gene) Ct

Ct 값: PCR product가 처음 증폭되는 cycle

표 4

유전자	Sense sequence(5'→3')	Anti-sense sequence(5'→3')	species
TNF- α	GCAGGCTACTTTGGAGTCAT(서열번호 1)	TCCCTTTCAGAAATCAGGAA(서열번호 2)	마우스
COX-2	GTATGCCACCATCTGGCTTC(서열번호 3)	CATGTTCCAGGAGGATGGAG(서열번호 4)	마우스
IL-1 β	CCCCAAAAGATGAAGGGCTG(서열번호 5)	GCCCAAGGCCACAGGTATTT(서열번호 6)	마우스
iNOS	CTGCAGCACTTGGATCAGGA(서열번호 7)	GAGTAGCCTGTGTGCACCTG(서열번호 8)	마우스
β -actin	TCATGAAGTGAGACGTTGACATCCGT(서열번호 9)	CCTAGAAGCACTTGCCTGTCACGATG(서열번호 10)	마우스
TNF- α	AGCCCATGTTGTAGCAAACC(서열번호 11)	TAGATGGGCTCATACCAGGG(서열번호 12)	인간
COX-2	CATTCTTTGCCAGCACTTCAC(서열번호 13)	GACCAAGCACCAGACCAAAGAC(서열번호 14)	인간
IL-1 β	GTCGCCATGGACAAGCTGAG(서열번호 15)	TTTGGTCCCTCCAGGAAGA(서열번호 16)	인간
MMP-2	GCTGGAGAACCAAAAGTCTGA(서열번호 17)	CAGTGCCCTCTTGAGACAGT(서열번호 18)	인간
β -actin	AACTACCTTCACTCCATCA(서열번호 19)	GAGCAATGATCTTGATCTTCA(서열번호 20)	인간

LPS를 처리한 세포에서는 전구 염증성 매개체인 iNOS, COX-2와 전구염증매개 사이토카인 TNF- α , IL-1 β mRNA의 발현이 높았으나, 4종의 해조류가 전처리된 세포에서는 농도 의존적으로 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 의 mRNA 발현이 저해되었다. 특히 꼬물꼬시래기(*G.vermiculophylla*) 에탄올 추출물과 불등풀가사리(*G.furcata*) 에탄올 추출물을 100ug/mL 처리한 경우 이들 mRNA 발현 저해 효율이 유의하게 높았다(표 5 참조, 표 5에서 각 추출물 농도는 100ug/mL임).

표 5

	LPS only	<i>G. verrucosa</i> + LPS	<i>G. vermiculophylla</i> + LPS	<i>C. tenellus</i> + LPS	<i>G. furcata</i> + LPS
iNOS	3.07±0.34	1.12±0.12*	1.24±0.38*	1.99±0.13	1.31±0.31*
COX-2	146.44±6.16	8.9±0.96*	7.60±0.74*	21.88±1.29*	8.53±0.62*
TNF- α	18.34±0.85	7.29±0.70*	4.79±1.65*	11.17±1.24	5.29±0.18*
IL-1 β	237.81±6.68	29.16±7.57*	15.13±4.69*	126.62±24.72	12.49±3.08*

Values represent means $\pm$ SD (n=3). Means are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (* p <0.05).

[0113] 2) 웨스턴블랏 분석

[0114] 세포를 lysis buffer(1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM EDTA, pH 8.0, protease inhibitor cocktail)로 현탁시킨 후, sonicator를 이용하여 세포를 파쇄하고 원심분리(4℃, 14,000 rpm)하여 세포 균질액을 획득하였다. Protein content를 BCA protein assay(Pierce, IL, USA)법으로 정량하고 20-40 mg의 단백질을 10 % SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 후 분리한 뒤 0.45 μm PVDF membrane(Millipore, MA, USA)으로 transfer하였다. 실온에서 blocking 용액 (5% skim milk, TBS, 0.1% tween-20, TBS-T)에 1시간 동안 반응시킨 후 1차 antibody를 4℃에서 overnight 반응한 후 TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated secondary antibody(1: 5,000 dilution)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. ECL kit(Amersham, UK)를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

[0115] LPS를 처리한 세포에서는 염증성 인자인 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 강하게 유도되었으나, 4종의 해조류가 전처리된 LPS 유도 세포에서는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량이 억제되는 것을 확인하였다. 특히, 꼬물꼬시래기(*G.vermiculophylla*) 에탄올 추출물과 불등풀가사리(*G.furcata*) 에탄올 추출물을 처리한 세포에서 염증성 인자의 단백질 발현이 현저히 억제되었다(도 3 참조). 또한, LPS를 처리한 세포에서는 염증반응에 의해 활성화되는 신호전달 물질인 NF-κB 발현이 현저히 증가되었으나, 4종의 해조류가 전처리된 세포에서는 NF-κB 발현이 저해되었다(도 4 참조).

[0117] (2) LPS로 유도된 HEK293 세포에서의 항염 활성

[0118] 1) RNA 추출 및 Real-time PCR

[0119] 위 3.(1).1)과 동일한 방법으로 RNA를 추출하고 Real-time PCR을 수행하였다. LPS를 처리한 세포에서는 전구 염증성 매개인자인 COX-2, MMP-2와 전구염증매개 사이토카인 TNF-α, IL-1β mRNA의 발현이 높았으나, 4종의 해조류가 전처리된 세포에서는 해조류 추출물의 농도 의존적으로 이들 mRNA 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 특히 꼬시래기(*G.verrucosa*) 에탄올 추출물과 꼬물꼬시래기(*G.vermiculophylla*) 에탄올 추출물을 100ug/mL 처리한 경우 이들 mRNA 발현 저해 효율이 현저히 높았다(표 6 참조, 표 6에서 각 추출물 농도는 100ug/mL임).

표 6

	LPS only	<i>G. verrucosa</i> + LPS	<i>G. vermiculophylla</i> + LPS	<i>C. tenellus</i> + LPS	<i>G. furcata</i> + LPS
COX-2	2.43±0.61	1.82±0.52	1.34±0.55	1.66±0.28	0.63±0.60*
MMP-2	1.53±0.38	0.95±0.05*	0.72±0.34*	0.99±0.18*	0.56±0.45*
TNF-α	5.56±0.92	2.90±0.20*	3.58±0.76*	3.96±0.43	3.80±0.31
IL-1β	1.88±0.05	1.10±0.16*	1.36±0.14	1.26±0.30	1.34±0.15

Values represent means ± SD (n=3). Means are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (*p<0.05).

[0120]

[0121] 2) 웨스턴블랏 분석

[0122] 위 3.(1).2)와 동일한 방법으로 웨스턴블랏을 수행하였다. LPS를 처리한 세포에서는 염증성 인자인 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 강하게 유도되었으나, 4종의 해조류가 전처리된 LPS 유도 세포에서는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량이 억제되는 것을 확인하였다. 특히, 꼬시래기(*G.verrucosa*) 에탄올 추출물을 처리한 세포에서 염증성 인자의 단백질 발현이 현저히 억제되었다(도 5 참조). 또한, LPS를 처리한 세포에서는 염증반응에 의해 활성화되는 신호전달 물질인 NF-κB 발현이 현저히 증가되었으나, 4종의 해조류가 전처리된 세포에서는 NF-κB 발현이 저해되었다(도 6 참조).

[0124] 4. 4종의 해조류 추출물을 포함하는 조성물의 항염 활성 확인

[0125] LPS로 유도된 염증성세포(RAW 264.7 대식세포)에서 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 복합 조성물(‘복합물 A’ 및 ‘복합물 B’)의 항염 활성을 확인하였다. 또한, 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 상기 복합 조성물과 효과 차이를 비교하기 위해서, 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물

을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)의 항염활성을 확인하였다.

[0126] 상기 4종의 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 4종의 해조류 추출물의 분말 혼합물(powder mixture) 대신 4종의 해조류 추출물 각각을 10g씩 사용하여 제조하였다. 구체적으로, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 꼬시래기 추출물 10g에 피부 친화 성분 복합물을 첨가하여 제조하였다. 꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 꼬물꼬시래기 추출물 10g에 피부 친화 성분 복합물을 첨가하여 제조하였다. 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 돌가사리 추출물 10g에 피부 친화 성분 복합물을 첨가하여 제조하였다. 불등돌가사리 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 불등돌가사리 추출물 10g에 피부 친화 성분 복합물을 첨가하여 제조하였다.

[0128] (1) 염증성 매개인자 COX-2의 발현량 측정

[0129] 위 '3.(1).1) RNA 추출 및 Real-time PCR'과 동일한 방법으로 RNA 추출 및 Real-time PCR을 수행하여 대표적인 전구 염증성 매개인자인 COX-2의 mRNA 발현 여부를 분석하여, 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물(복합물 A 및 B)의 항염활성을 확인하였다.

[0130] LPS만 처리한 세포에서는 COX-2 mRNA의 발현이 높았으나, 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합물(복합물 A 및 B)이 전처리(100 ug/mL)된 경우 COX-2 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)에 비해 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 복합 조성물을 처리한 경우 높은 mRNA 발현 저해 효율을 나타내었고, 특히 복합물 B가 복합물 A에 비해 2 배 이상의 mRNA 발현 저해 효율을 나타내었다(아래 표 7 참조, 표 7에서 처리된 시료의 농도는 100ug/mL임). 표 7은 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)의 COX-2 mRNA 발현량과 4종의 추출물을 모두 포함하는 복합 조성물(복합물 A 및 복합물 B)을 처리한 경우의 COX-2 mRNA 발현량을 비교한 표이다.

표 7

유전자	LPS only	꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물 + LPS	꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물 + LPS	돌가사리 추출물을 포함하는 조성물 + LPS	불등돌가사리 추출물을 포함하는 조성물 + LPS	복합물 A + LPS	복합물 B + LPS
COX-2	146.44 ± 6.16	8.9 ± 0.96*	7.60 ± 0.74*	21.88 ± 1.29*	8.53 ± 0.62*	10.72 ± 0.75*	5.25 ± 0.69*

[0132] (표 7에서 값은 평균 ± SD(n=3)를 나타냄. *p<0.05)

[0133] 전술한 실시예들에서 통계적 분석은 IBM SPSS Statistics software(ver. 23, IBM Co., NY, USA)를 이용하여 실험결과를 평균 ± 표준편차(mean ± SD)로 표기하였다. 각 실험군의 차이는 일원배치분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)과 사후검정으로 Turkey's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

[0135] (2) NO 생성 억제 효능 확인

[0136] LPS로 염증유발된 RAW 264.7 세포에서 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 농도를 측정하여, 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물(복합물 A 및 B)의 항염활성을 확인하였다. 구체적으로 RAW 264.7 세포에 LPS 1μg/ml와 복합 조성물(복합물 A 및 B), 및 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)을 각각 100μg/mL의 같은 농도로 처리하고 24시간 후 Griess reagent 시약을 사용하여 NO 생성량을 측정하였다.

[0137] 그 결과, 음성 대조군(5.8 ± 0.5 μM)에 비하여 LPS가 단독 처리된 경우 11.34 ± 0.42 μM로 NO 농도가 증가하였으며, 4종의 추출물을 단독으로 포함하는 조성물을 처리한 경우에 비해 복합물 처리시 NO 농도가 유의하게 저해되

었다(복합물 A: $7.1 \pm 0.72 \text{Mm}$, 복합물 B: $6.1 \pm 0.45 \text{Mm}$). 특히, 복합물 B 처리시 가장 우수한 NO 억제 효능을 나타냈으며 음성 대조군과 유사한 수준으로 억제되었다(도 7 참조). 결과 값은 3번의 독립적인 측정 후 Means $\pm$ S.D로 나타내었다(*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, vs LPS positive group).

5. 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합물을 포함하는 화장료 제형 제조

(1) 화장료 제형 제조

위 1.(2)에서 제조된 복합물을 가볍게 흔들어(10rpm으로 stirring) 침전현상을 해소시킨 후 화장료 조성물에 첨가하여, 아래 표 8 내지 12의 제형(제형예 1 내지 5)을 제조하였다.

표 8

제형예 1(화장수)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+피부 친화 성분 복합물)	2.00
디프로필렌글라이콜	5.00
피이지-60 하이드로제네이티드캐스터오일	0.60
잔탄검	0.10
글리세린	3.00
펜틸렌글라이콜	2.00
1,2-헥산다이올	2.00

표 9

제형예 2(에센스)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+피부 친화 성분 복합물)	2.00
소듐하이알루로네이트	0.50
글리세린	3.00
부틸렌글라이콜	1.00
카보머	0.35
알지닌	0.18
1,2-헥산다이올	2.00

표 10

제형예 3(크림)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+피부 친화 성분 복합물)	2.00
암모늄아크릴로일디메틸타우레이트/브이피코폴리머	0.03
카보머	0.60
펜틸렌글라이콜	2.00
비즈왁스	2.00
세테아릴알코올, 세테아릴글루코사이드	3.50
폴리솔베이트60	0.50
소르비탄세스퀴올리에이트	0.40
스쿠알란	0.50
해바라기씨오일	3.00
디메치콘	2.00
폴리아크릴레이트-13, 폴리아이소부텐, 폴리솔베이트20	0.50
알지닌	0.50
1,2-헥산다이올	2.00

표 11

[0145]

제형예 4(클렌저)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+피부 친화 성분 복합물)	2.00
소듐라우레스설페이트	35.00
글리세린	8.00
다이소듐이디티에이	0.10
다이소듐라우레스설퍼옥시네이트	5.00
피이지-120메틸글루코시도올리레이트	1.50
디프로필렌글라이콜	5.00
코카미도프로필베타인	10.00
염화나트륨	1.50

표 12

[0146]

제형예 5(손 소독제(젤))	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+피부 친화 성분 복합물)	2.00
에탄올	62.40
글리세린	5.00
폴리소르베이트60	1.00
카보머	0.50
트라이에탄올아민	0.40

[0147]

(2) 제형 안정성 테스트

[0148]

위 5.(1)에서 제조된 해조류 4종의 추출물을 포함하는 복합물을 2% 함유하는 제형예 1 내지 5의 안정성 시험을 진행하였다.

[0149]

안정성 시험은 2주 동안 실온의(1-30° C) 조건에서 성상(외관, 색상), pH, 점도 변화를 관찰하였다. 제조 후 3일의 숙성 기간 후 성상(외관, 색상) 기준과 pH 값의 범위를 설정하여 시험기준으로 정하였다 (변화 없음: ○, 조금 변화: △, 심하게 변화: ×). 그 결과 각 제형 모두 2주 동안 변화 없음으로 기준 범위 내에서 안정한 것을 확인하였다 (아래 표 13 내지 17 참조). 표 13 내지 17은 각각 순서대로 제형예 1 내지 5의 안정성 확인 결과이다.

표 13

[0150]

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 액상	실온(1-30°C)	○	○	○	○
pH (3회측정 평균값)	pH 7.0±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

표 14

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 액상	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 5000±300(cps) <S06, 30rpm, 10s> pH 6.3±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0151]

표 15

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	유색의 크림상	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 35000±3000(cps) <S07, 30rpm, 10s> pH 7.3±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0152]

표 16

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 점조성 겔	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 4000±500(cps) <S06, 30rpm, 10s> pH 6.2±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0153]

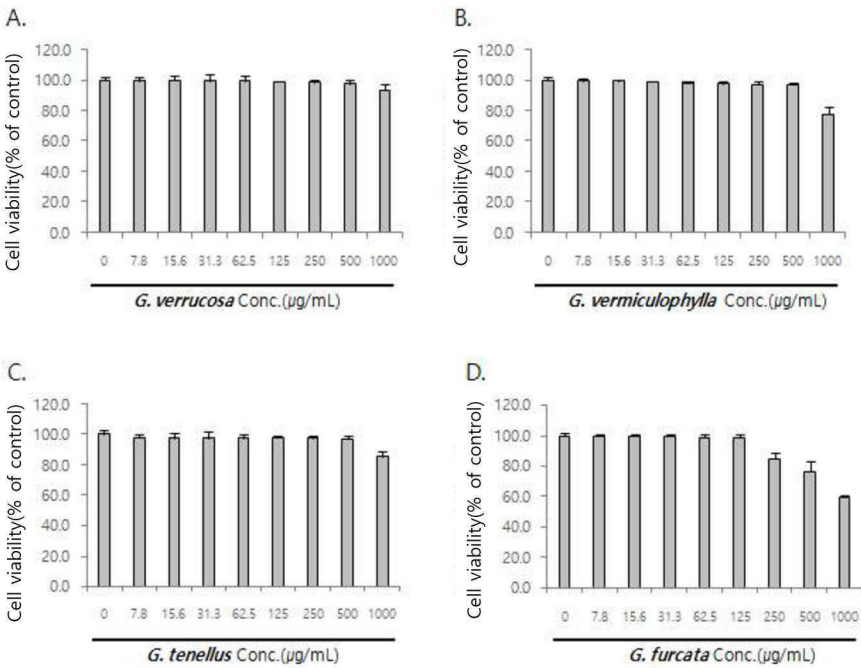
표 17

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 점조성 겔	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 4000±500(cps) <S06, 30rpm, 10s> pH 5.0±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

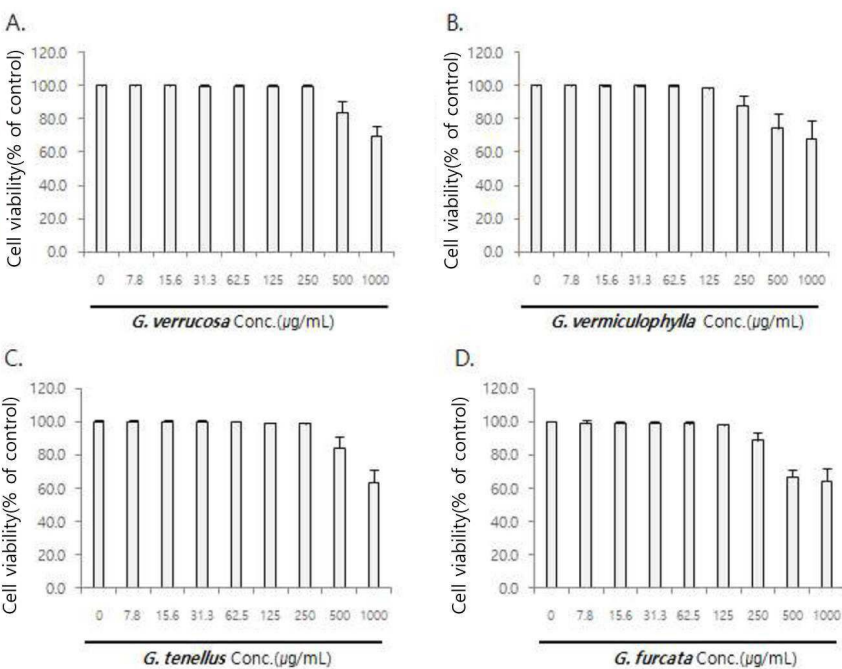
[0154]

도면

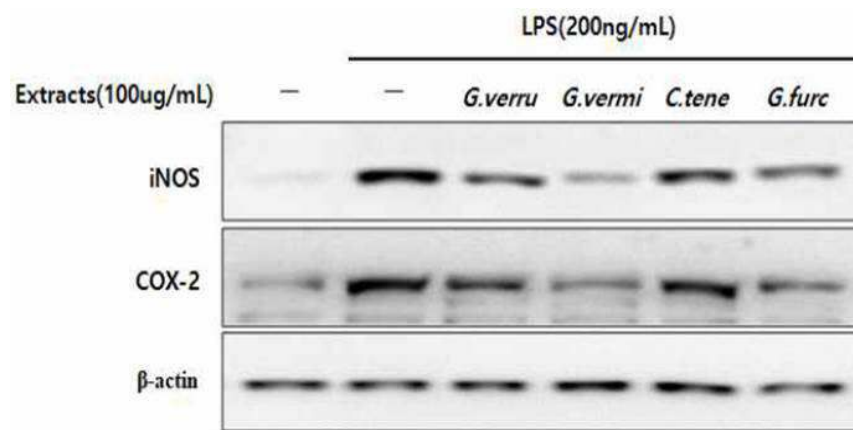
도면1



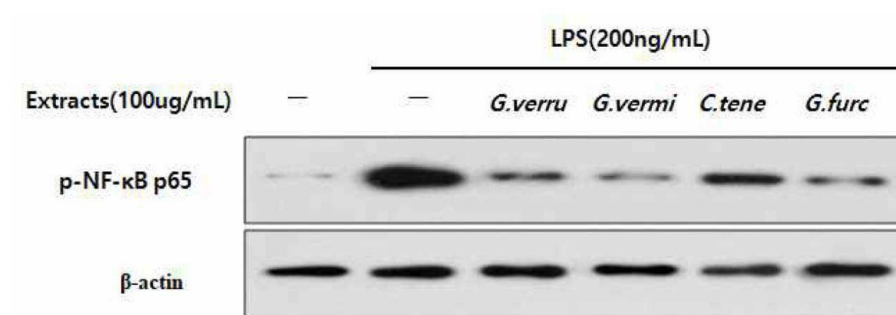
도면2



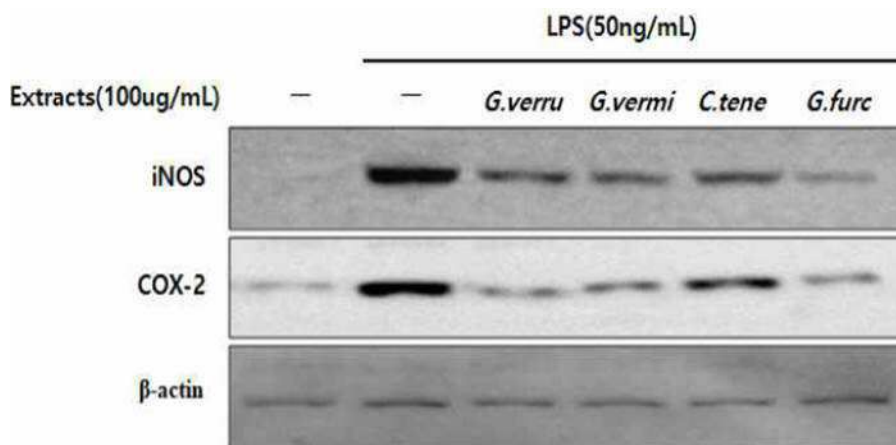
도면3



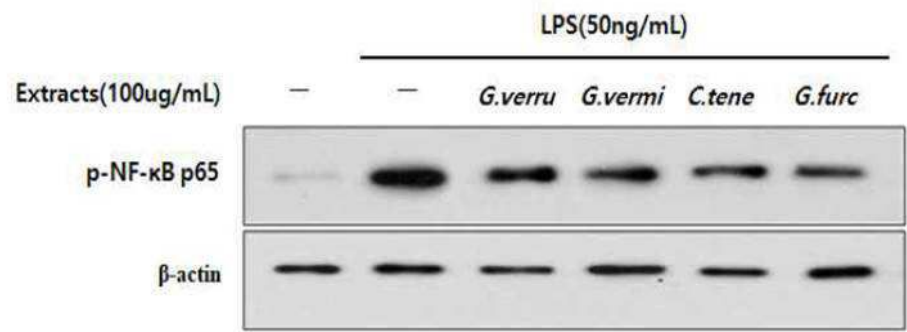
도면4



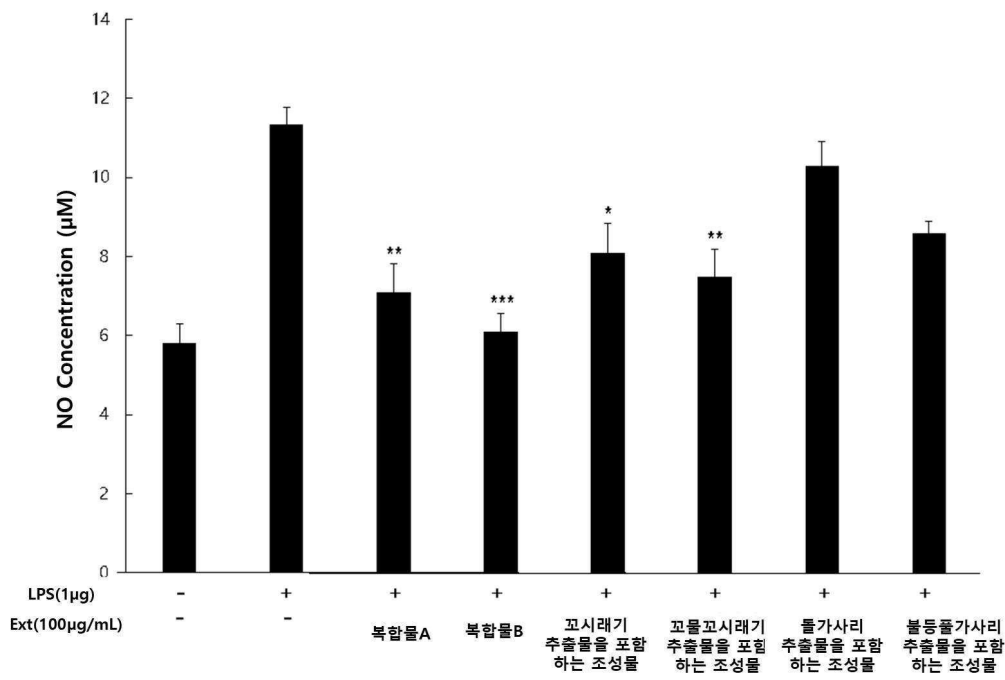
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION CHOSUN UNIVERSITY
- <120> Cosmetics composition for anti-inflammatory comprising four types of seaweed extracts
- <130> 21P12045
- <150> KR 10-2021-0191199
- <151> 2021-12-29
- <160> 20
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-a Sense sequence mouse

<400> 1

gcaggctctac ttggagtc a 21

<210> 2

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-a Anti-Sense sequence mouse

<400> 2

tccctttgca gaaatcagga a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 Sense sequence mouse

<400> 3

glatgccacc atctggcttc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 Anti-Sense sequence mouse

<400> 4

catgttccag gaggatggag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1B Sense sequence mouse

<400> 5

ccccaaaaga tgaagggtg 20

<210> 6

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1B Anti-Sense sequence mouse
 <400> 6
 gcccaaggcc acaggtattt 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> iNOS Sense sequence mouse
 <400> 7
 ctgcagcact tggatcagga 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> iNOS Anti-Sense sequence mouse
 <400> 8
 gagtagcctg tgtgcacctg 20

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B-actin Sense sequence mouse
 <400> 9
 tcatgaagtg agacgttgac atccgt 26

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B-actin Anti-Sense sequence mouse
 <400> 10

cctagaagca cttgcggtgc acgatg	26
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TNF-α Sense sequence human	
<400> 11	
agcccatggt gtagcaaacc	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TNF-α Anti-Sense sequence human	
<400> 12	
tagatgggct cataccaggg	20
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX-2 Sense sequence human	
<400> 13	
cattctttgc ccagcacttc ac	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX-2 Anti-Sense sequence human	
<400> 14	
gaccaggcac cagaccaaag ac	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> IL-1B Sense sequence human
 <400> 15
 gtcgcatgg acaagctgag 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1B Anti-Sense sequence human
 <400> 16
 ttggtccct cccaggaaga 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-2 Sense sequence human
 <400> 17
 gctggagaac caaaagtctg a 21
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-2 Anti-Sense sequence human
 <400> 18
 cagtgcctc ttgagacagt 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B-actin Sense sequence human
 <400> 19
 aactaccttc aactccatca 20
 <210> 20
 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B-actin Anti-Sense sequence human

<400> 20

gagcaatgat ctgaccttc a

21