



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0103391
(43) 공개일자 2024년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/28 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0185511

(22) 출원일자 2022년12월27일

심사청구일자 2022년12월27일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정길생

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152,
804동 1701호(오송힐데스하임아파트)

이현수

대구광역시 북구 대현남로6길 20, 302동 1902호(
대현동, 센트럴파크 대현)

김은남

대전광역시 유성구 문화원로 133(봉명동,
스톤빌), 505호

(74) 대리인

특허법인 공간

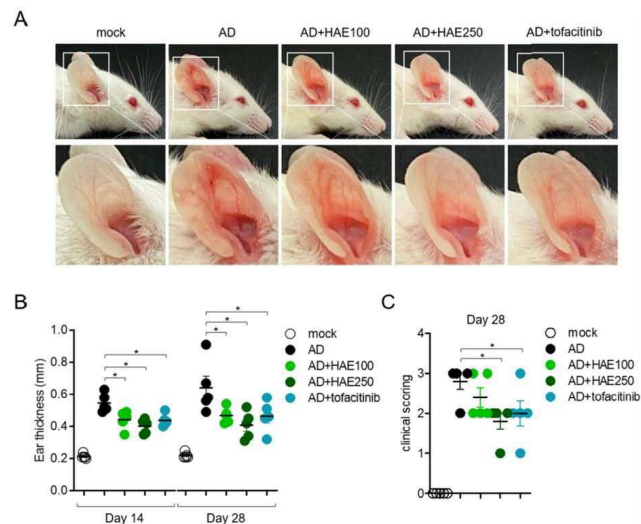
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 해바라기(Helianthus annuus L.) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 해바라기 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 활성화된 T 세포를 조절함으로써 아토피 피부염 동물 모델에서 피부 발적 및 종창을 완화하고, 피부 비후를 포함하는 아토피 피부염 증상을 개선하여 아토피 피부염의 예방 또는 치료에 기여할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61Q 19/005 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711174955
과제번호	2022R1A5A7085156
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	라이프사이클 기반 시니어헬스 융합연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2022.09.01 ~ 2029.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 100% 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 정제, 액제, 현탁액제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 경구 제제인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 연고제, 크림제, 로션제, 액제, 드레싱제, 패취제, 수포제, 테이프제, 연무제, 외용산제 및 스프레이제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 피부 외용제인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능 식품.

청구항 8

해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해바라기(*Helianthus annuus* L.) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아토피성 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 피부 조직의 만성 염증성 질환으로 이질적이고 복잡한 병인을 특징으로 한다. 최근 보고에 따르면 선진국에서는 성인의 2~10%와 최소 어린이의 15%가 AD로 고통받고 있다.

[0003] 피부 조직은 면역계의 기관으로서 여러 알레르겐, 항원 및 감염성 미생물에 대한 1차 방어를 제공하기 때문에 전신 면역에 영향을 미친다. 알레르겐이 피부 조직에 노출되면 랑게르한스 세포에 포획되어 항원 처리 과정이 진행되며, 나이브 T 세포는 이후 TCR 매개 활성화 신호에 따라 IL-4, IL-13 및 IL-31 생산을 위해 프라이밍되고 Th2 이펙터 세포로 분화된다. 최근에는 AD에 대한 약물 개발 전략에서 T 세포 활성화의 중요성이 점차 증가하고 있다. 변형 성장 인자 β -활성화 키나아제 1(transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)은 세포 분화, 생존 및 증식의 조절에서 중추적인 역할을 하는 트레오닌/세린 키나아제로, TCR 매개 자극은 인산화에 의해 TAK1의 활성을 강화하고 IKK α 를 인산화한다. 이 TCR 매개 신호는 활성화된 T 세포에서 NF- κ B 및 MAPK 경로로 변환된다. TAK1은 접촉 과민 반응, 림프구 감소증 관련 대장염 및 조절 T 세포 유지에서 중심 분자로 작용하는 것으로 보고되었다. 그럼에도 불구하고 TAK1 관련 경로는 T 세포 생물학 및 T 세포 매개 질병에 중요하며 T 세포 활성화에 대한 천연물을 사용하는 TAK1 활성화의 조절이 여전히 필요하다.

[0004] 한편, 국화과에 속하는 해바라기(*Helianthus annuus* L.)는 관상용, 약용 및 식용에 사용하며 상업적 목적으로 널리 재배되는 식물이다. 특히, 해바라기의 종자는 일반적으로 팥, 콩, 유채꽃에 이어 세계 4위의 식용유로 사용되고 있다. 해바라기의 종자가 항산화, 항염증, 항균, 상처 치유 및 항고혈압에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Fowler, 2006), 전통적으로 심장 질환, 후두 및 폐 감염, 감기 및 기침을 포함한 다양한 장애를 개선하는 데 사용되었다(Bashir, 2015). 이에 반하여 해바라기 잎을 포함하는 지상부는 해바라기 종자 채취 후, 대부분 퇴비 등에 사용되거나 버려져왔다. 이에 해바라기 잎 추출물에서 유용 성분을 분리하려는 여러 노력이 보고되었지만 아직 이에 대한 연구는 미진한 실정이다.

[0005] 한국공개특허 제10-2012-0123064호에는 해바라기(*Helianthus annuus* L.)의 잎, 머리 또는 줄기로부터의 총 플라보노이드의 추출물을 수득하여 고혈압 질병의 예방 및 치료에 사용하는 방법이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-2421280호에는 해바라기 잎과 줄기와 꽃을 만개 후 수확하여 발효 숙성 후 한우용 해바라기 조사료로 사용하는 방법이 기재되어 있다. 또한 한국등록특허 제10-2181220호에는 해바라기 줄기를 포함하는 혼합 약제로부터 유래된 추출물을 항암용 약학적 조성물로 사용하는 점이 기재되어 있다. 그러나 해바라기 잎 추출물을 이용한 아토피 피부염에 대한 효과에 대한 연구는 아직 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0123064호, 해바라기 추출물을 포함한 약학 조성물, 그의 제조 방법 및 용도, 2012년11월07일. 공개.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-2421280호, 반추동물용 해바라기 조사료, 이의 제조방법 및 해바라기 조사료를 이용한 반추동물 사육방법, 2022년07월12일. 등록.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-2181220호, 생약 추출물을 포함하는 항암용 약학적 조성물, 2020년11월16일. 등록.

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Fowler, M.W., 2006. Plants, medicines and man. J. Sci. Food Agric. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2598>.

(비특허문헌 0002) Bashir, T., 2015. Chemistry, pharmacology and ethnomedicinal uses of *Helianthus annuus* (Sunflower): a review. Pure Appl. Biol. 4, 226-235. <https://doi.org/10.19045/bspab.2015.42011>.

(비특허문헌 0003) Lee, H.S., Jeong, G.S., 2021. Therapeutic effect of kaempferol on atopic dermatitis

by attenuation of T cell activity via interaction with multidrug resistance-associated protein 1. Br. J. Pharmacol. 178, 1772-1788. <https://doi.org/10.1111/BPH.15396>.

(비특허문헌 0004) Weidinger, S., Novak, N., 2016. Atopic dermatitis. Lancet 1109-1122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X). Lancet Publishing Group.

(비특허문헌 0005) Nunomura, S., Gon, Y., Yoshimaru, T., Suzuki, Y., Nishimoto, H., Kawakami, T., Ra, C., 2005. Role of the FcεRI β-chain ITAM as a signal regulator for mast cell activation with monomeric IgE. Int. Immunol. 17, 685-694. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh248>.

(비특허문헌 0006) Cohen, E.S., Dobson, C.L., Kaczk, H., Wang, B., Sims, D.A., Lloyd, C.O., England, E., Rees, D.G., Guo, H., Karagiannis, S.N., O'Brien, S., Persdotter, S., Ekdahl, H., Butler, R., Keyes, F., Oakley, S., Carlsson, M., Briand, E., Wilkinson, T., Anderson, I. K., Monk, P.D., Wachenfeldt, K., Eriksson, P.O.F., Gould, H.J., Vaughan, T.J., May, R. D., 2014. A novel IgE-neutralizing antibody for the treatment of severe uncontrolled asthma. MAbs 6, 756-764. <https://doi.org/10.4161/mabs.28394>.

(비특허문헌 0007) Gauvreau, G.M., Arm, J.P., Boulet, L.P., Leigh, R., Cockcroft, D.W., Davis, B.E., Mayers, I., FitzGerald, J.M., Dahlen, B., Killian, K.J., Laviolette, M., Carlsten, C., Lazarinis, N., Watson, R.M., Milot, J., Swystun, V., Bowen, M., Hui, L., Lantz, A.S., Meiser, K., Maahs, S., Lowe, P.J., Skerjanec, A., Drollmann, A., O'Byrne, P.M., 2016. Efficacy and safety of multiple doses of QGE031 (ligelizumab) versus omalizumab and placebo in inhibiting allergen-induced early asthmatic responses. J. Allergy Clin. Immunol. 138, 1051-1059. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.027>.

(비특허문헌 0008) Presta, L.G., Lahr, S.J., Shields, R.L., Porter, J.P., Gorman, C.M., Fendly, B.M., Jardieu, P. M., 1993. Humanization of an antibody directed against IgE. J. Im.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 추출물이다. 바람직하게는 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올이며, 더욱 바람직하게는 상기 해바라기(*Helianthus annuus L.*) 잎 추출물은 100% 에탄올 추출물이다. 100% 에탄올 추출물은 추출된 고형물의 수득량 및 T 세포 활성화에 대한 효과에서 가장 좋은 용매 범위이며, 100% 보다 낮은 농도의 에탄올 농도에서는 추출물 수득량이 떨어지거나 T 세포 활성화에 대한 효과가 감소하여 효율적이지 못하다.

[0011] 상기 해바라기 잎 추출물은 해바라기의 건조 잎을 65℃의 100% 에탄올 10L로 3시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 감압 농축한 추출물일 수 있다.

[0012] 본 발명의 해바라기 잎 추출물은 활성화된 T 세포를 조절함으로써 아토피 피부염을 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 해바라기 잎 추출물은 활성화된 T 세포 활성 조절은 활성화된 T 세포의 IL-2 생성을 억제하는 것일 수 있다. 또한 활성화된 T 세포의 표면 분자 CD69 또는 CD25의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 해바라기 잎 추출물은 휴지 또는 활성화된 T 세포에서 세포독성을 나타내지 않으며, 세포 사멸 또는 세포자멸사와 무관하게 활성화된 T 세포의 활성을 조절한다.

[0014] 상기 해바라기 잎 추출물의 활성화된 T 세포 조절은 TAK1-IKKα-NFκB 경로를 통한 MAPK 경로 단백질의 인산화를 조절함으로써 수행될 수 있다. 해바라기 잎 추출물은 활성화된 T 세포에서 TAK1 및 IKKα의 인산화 수준을

감소시킬 수 있으며, I κ B α 및 pI κ B α 의 인산화 수준을 감소시키고 활성화에 의해 증가된 p65의 핵 전좌를 감소시킬 수 있다.

- [0015] 상기 해바라기 잎 추출물은 아토피 피부염 동물 모델에서 피부 발적 및 종창을 완화하고, 피부 비후, 부전각화증(parakeratosis) 및 극세포증(acanthosis)을 포함하는 아토피 피부염 증상을 개선할 수 있다. 특히 해바라기 잎 추출물은 아토피 피부염이 진행되는 피부의 진피 또는 표피 두께를 감소시킴으로써 아토피 피부염의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0016] 상기 해바라기 잎 추출물은 혈청 내 IgE의 수준 및 비만세포 수준을 감소시킬 수 있다.
- [0017] 상기 아토피 피부염의 예방 또는 치료는 아토피 피부염에 의한 홍반(Erythema), 출혈(Hemorrhage), 부종(Edema), 찰상(찰과상), (Excoriation), 벗겨짐(Erosion), 건조(Dryness) 및 흉터(Scarring)를 완화하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 해바라기 잎 추출물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 해바라기 잎 추출물은 전체 약학 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~90중량%, 더 바람직하게는 0.001~70중량%, 가장 바람직하게는 0.001~50중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0020] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 해바라기 잎 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 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.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 해바라기 잎 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0023] 상기 조성물은 상기 해바라기 잎 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0024] 상기 건강기능식품은 해바라기 잎 추출물이 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~99중량%, 더 바람직하게는 0.001~70중량%, 가장 바람직하게는 0.001~50중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0025] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

[0026] 본 발명은 해바라기(*Helianthus annuus* L.) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 화장품 조성물은 크림, 스킨, 로션, 에센스, 유액, 젤, 립스틱, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 비누, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이크 또는 메이크업베이스의 제형으로 제공될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 해바라기 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 활성화된 T 세포를 조절함으로써 아토피 피부염 동물 모델에서 피부 발적 및 종창을 완화하고, 피부 비후를 포함하는 아토피 피부염 증상을 개선하여 아토피 피부염의 예방 또는 치료에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 HAE이 활성화된 T 세포에서 IL-2의 생성에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. (A) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE를 1시간 처리한 Jurkat T를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체(7 $\mu\text{g/ml}$, 좌측), PMA(100nM) 및 A23187-(1 μM , 중간) 또는 SEE 로드된 Raji B 세포(우측)로 6시간 자극한 후, RT-qPCR로 측정된 IL-2의 mRNA 수준 (B) ELISA로 측정된 IL-2 단백질 수준 (C) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 6시간 동안 자극 후, 생성된 IL-2의 웨스턴 블롯 분석 결과 (검출된 IL-2는 액틴의 강도로 정규화됨) (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 2는 HAE이 활성화된 T 세포에서 표면 분자 발현에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. (A) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 16시간 동안 자극 후, APC 접합된 항-CD69 항체로 염색하여, 유세포분석을 통해 평균 형광 강도를 나타냄. 검은색 점선은 모의 처리된 세포의 평균 형광, 빨간색 점선은 항-CD3/28 항체의 평균 형광. (B) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 24시간 동안 자극 후, APC 접합된 항-CD25 항체로 염색하여, 유세포분석을 통해 평균 형광 강도를 나타냄. (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 3은 HAE이 휴지 및 활성화된 T 세포의 세포 독성 여부를 보여주는 결과이다. (A) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포의 MTT 분석 결과 (B) IncuCyte 이미지 시스템으로 얻은 휴지 Jurkat T 세포의 AnnexinV 이미지 사진 (C) 휴지 Jurkat T 세포의 AnnexinV/PI 유세포 분석 결과 (D) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 24시간 동안 자극 후, MTT 분석 결과 (E) IncuCyte 이미지 시스템으로 얻은 활성화된 Jurkat T 세포의 AnnexinV 이미지 사진 (F) 활성화된 Jurkat T 세포의 AnnexinV/PI 유세포 분석 결과 (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 4는 HAE이 TAK1-IKK α -NF κ B 경로를 통한 MAPK 인산화에 미치는 효과를 나타낸 것이다. (A) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 24시간 동안 자극 후, pTAK1, TAK1, IKK α 및 pIKK α 의 웨스턴 블롯팅 결과 및 TAK1와 IKK α 의 인산화 수준 (B) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 1시간 동안 자극 후, 세포질의 pI κ B α 및 I κ B α 의 웨스턴 블롯팅 결과 및 I κ B α 의 인산화 수준 (C) 및 핵과 세포질의 p65의 웨스턴 블롯팅 결과 (D) 0~50 $\mu\text{g/ml}$ HAE로 1시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 항체 30분 동안 자극 후, pERK, ERK, pp38, p38, pJNK 및 JNK의 웨스턴 블롯팅 결과 및 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준 (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 5는 HAE의 처리가 아토피 동물 모델에 미치는 효과를 나타낸 것이다. (A) 각 실험군 마우스 귀 대표 사진 (B) 아토피 피부염 유도 후, 14일(좌측) 및 28일(우측)째의 각 실험군 마우스의 귀 두께 (C) 아토피 피부염 유도 후 28일째 각 실험군 마우스의 임상 점수. (결과는 5마리 마우스의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 6은 HAE의 처리가 아토피 동물 모델의 아토피염 조직 및 생리학적 변화에 미치는 효과를 나타낸 것이다. (A) 각 실험군 마우스의 염색된 귀 조직의 대표 사진 (B) 각 실험군 마우스의 진피(좌측) 및 표피(우측) 두께 (C) 각 실험군 마우스 혈청 내 IgE 및 진드기-특이적 IgE 수준 (D) 각 실험군 마우스의 혈청 내 비만세포 수준. (결과는 5마리 마우스의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 7은 HAE의 처리가 아토피 동물 모델의 T 세포 활성 조절에 따른 배액 림프절에 미치는 효과를 나타낸

것이다. (A) 각 실험군 마우스의 배액 림프절(drainng lymph nodes, dLNs) 대표 사진 (B) 각 실험군 마우스의 배액 림프절의 길이 및 무게 (C) 각 실험군 마우스의 배액 림프절의 *il4*, *il13* 및 *il13I*의 mRNA 수준. (D) 각 실험군 마우스의 배액 림프절의 pERK, ERK, pp38, p38, pJNK 및 JNK의 웨스턴 블롯팅 결과 및 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준 (결과는 5마리 마우스의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0031] <실시예 1. 해바라기 잎 추출물의 제조>

[0032] 본 발명에서 사용된 해바라기 잎은 전라남도 해남군 마산면 노하리에서 채집하여 충남대학교 약학대학 정길생 교수가 동정하였다. 검체는 충남대학교 약학대학 천연물 연구실(CPE-2018-0047)에 보관되었다. 해바라기의 건조 잎 270.85 g을 65℃의 00%(w/w) 에탄올 10L로 3시간 동안 2회 추출하였다. 상기에서 얻은 에탄올을 합하여 여과한 후 회전 감압 농축하여 해바라기잎 에탄올 추출물 66.79 g을 얻었다.

[0033] <실시예 2. HAE가 T 세포의 IL-2 생성에 미치는 효과 확인>

[0034] HAE가 T 세포 활동에 억제 효과가 있는지 확인하였다. 활성화된 T 세포로부터의 IL-2 생성은 T 세포 활성화의 대표적인 마커로 알려져 있다. 이에 따라 항-CD3/CD28 항체 및 PMA/A23187로 T 세포를 자극한 후, IL-2의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서 조사하였다.

[0035] Jurkat T 세포(KCLB 번호: 40152)는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서, Raji B(ATCC cat#. CCL-86) 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입했다. 세포를 페니실린 G(100 units/ml), 스트렙토마이신(100 μ g/ml), 10% 우태아혈청(FBS), L-그루타민(2 mM)이 첨가된 RPMI 배지(웰진, 경산, 대한민국)에서 배양하였다. 두 세포주 모두 10세대 내에서 유지되었고 5% CO₂와 95% 공기가 포함된 37℃ 가습 배양기에서 성장시켰다.

[0036] T 세포 자극은 Lee and Jeong(2021)의 방법에 따라 3가지 방법으로 수행하였다. 첫째, Jurkat T 세포의 자극을 위하여 항-CD3 항체(20 μ g/ml)로 코팅된 플레이트에 Jurkat T 세포를 시딩하고 항-CD28 가용성 항체(7 μ g/ml)로 처리하였다. 둘째, '우회 자극' 방법을 사용하기 위해 Jurkat T 세포를 100nM PMA 및 1 μ M A23187과 동시에 배양했습니다. 마지막으로 셋째, Raji B 세포와의 공동 배양 시스템을 사용하여 시험관 내에서 Jurkat T 세포를 자극했다. 이때 Raji B 세포는 SEE(staphylococcal enterotoxin E) 초항원(1g/mL)으로 미리 펠싱되었으며, 동일한 수의 Raji B 세포와 1시간 동안 공동 배양하였다. 은 양성 대조군으로 사용하였다.

[0037] 상기 배양한 Jurkat T 세포를 5×10^5 /well 로 12-well 플레이트에 시딩한 후, 0, 6, 12, 25 및 50 μ g/ml 의 HAE 및 양성대조군 토파시티닙(Tofacitinib, tofa) 1 μ M를 1시간 처리하였다. 이후, 항-CD3 항체(20 μ g/ml) 및 항-CD28 가용성 항체(7 μ g/ml) 또는 PMA (100 nM) 및 A23187 (1 μ M) 또는 SEE (1 μ g/ml) 펠싱된 Raji B 세포와 함께 6 시간동안 자극한 후, 실시간 정량적 PCR(RT-qPCR)을 통해 IL-2의 mRNA 수준을 확인하고 이를 도 1A에 나타내었다. RT-qPCR을 위해 Jurkat T 세포 자극 후 세포를 수득하여 TRIZOL 시약으로 용해시킨 다음, 총 RNA를 분리하였다. RNA의 역전사는 RT PreMix kit(Enzynomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하였다. 본 발명에 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다. PCR 증폭은 1 μ L의 cDNA/대조군 및 유전자 특이적 프라이머로, SYBR Premix Ex Taq를 사용하여 DNA Engine Opticon 1 연속 형광 검출 시스템(MJ Research, Waltham, MA, USA)에서 수행되었다. 각각의 PCR 반응조건은 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 및 40 cycle에서 플레이트 판독(형광 생성물 검출)을 실시하였으며, 용융 곡선 분석은 0.2℃ 간격으로 수집된 형광 데이터와 함께 온도를 60℃에서 95℃까지 천천히 상승(0.1℃/s)하여 dsDNA 생성물을 특징화하고, 유전자의 mRNA 수준은 GAPDH로 정규화하였다. 유전자 발현은 하기 방정식 [유전자 발현 = $2^{-\Delta\Delta CT}$], 여기서 $\Delta\Delta CT = (CT \text{ 표적} - CT \text{ GAPDH})$]을 사용하여 계산하였다.

표 1

[0038]

구분	서열번호	서열
human <i>IL-2</i>	1	(Forward) 5'-CAC GTC TTG CAC TTG TCA C-3'
	2	(Reverse) 5'-CCT TCT TGG GCA TGT AAA ACT-3'

human <i>GAPDH</i>	3	(Forward) 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	4	(Reverse) 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
mouse <i>IL-4</i>	5	(Forward) 5'-ACA GGA GAA GGG ACG CCA T-3'
	6	(Reverse) 5'-GAA GCC GTA CAG ACG AGC TCA-3'
mouse <i>IL-6</i>	7	(Forward) 5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'
	8	(Reverse) 5'-GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA-3'
mouse <i>IL-13</i>	9	(Forward) 5'-GCA ACA TCA ACA GGA CCA GA-3'
	10	(Reverse) 5'-GTC AGG GAA TCC AGG GCT AC-3'
mouse <i>TSLP</i>	11	(Forward) 5'-GCA ACA TCA ACA GGA CCA GA-3'
	12	(Reverse) 5'-GTC AGG GAA TCC AGG GCT AC-3'
mouse <i>IL-31</i>	13	(Forward) 5'-TCG GTC ATC ATA GCA CAT CTG GAG-3'
	14	(Reverse) 5'-GCACAG TCC CTT TGG AGT TAA GTC-3'
mouse <i>GAPDH</i>	15	(Forward) 5'-GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT-3'
	16	(Reverse) 5'-GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA-3'

[0039] 도 1A에서 보는 바와 같이, IL-2의 mRNA 수준은 항-CD3/CD28 항체(좌측) 및 PMA/A23187(중간)로 자극된 T 세포에서 HAE로 전처리함으로써 상당히 감소되었음을 알 수 있다. 또한 초항원이 적재된 B 세포와의 공동 배양 결과(우측)에서도 IL-2의 mRNA 수준이 HAE 전처리에 의해 조절되는 것을 확인하였다.

[0040] 또한 HAE가 활성화된 T 세포로부터 IL-2의 방출을 억제하는지 확인하기 위하여 HAE를 농도별로 처리한 Jurkat T에서 방출된 IL-2의 양을 ELISA를 통해 확인하였다. Jurkat T 세포를 1×10^4 /well 로 96-well 플레이트에 시딩한 후, 0, 6, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 HAE 및 양성대조군 토파시티닙(Tofacitinib, tofa) 1 μM 를 1시간 처리하였다. 이후, 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 항-CD28 가용성 항체(7 $\mu\text{g/ml}$) 또는 PMA (100 nM) 및 A23187 (1 μM) 또는 SEE (1 $\mu\text{g/ml}$) 펄싱된 Raji B 세포와 함께 24 시간동안 자극한 후, 수득한 Jurkat T 세포에서 방출된 IL-2 단백질 발현량을 DuoSet® ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하고 이를 도 1B에 나타내었다. 도 1B에서 보는 바와 같이, 활성화된 T 세포로부터 방출된 IL-2는 HAE에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0041] 또한, HAE가 자극된 T 세포로부터 IL-2 생산을 차단하는지 여부를 조사하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 세포질 IL-2를 검출하고 그 결과를 도 1C에 나타내었다. 0, 6, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 HAE 및 양성대조군 토파시티닙(Tofacitinib, tofa) 1 μM 로 1 시간 동안 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$)로 6시간 자극하였다. 이후, 세포를 수득하여 RIPA 완충용액에서 용해시킨 후, 8~12% SDS-PAGE에서 전개시키고 PVDF 멤브레인(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 옮긴 다음, 멤브레인을 5% 탈지유(1시간)로 차단하였다. 이후, 멤브레인을 0.1% Tween 20(TBS-T) 및 3% 탈지유를 함유하는 TBS에서 IL-2 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션한 후, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 퍼옥시다제 표지된 2차 항체와 함께 2시간 동안 배양하고 ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 ECLWestern 블로팅 검출 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 밴드를 시각화하였다. 검출된 밴드는 β -액틴과 비교하여 배수 변화로 표시하였다. 도 1C에서 보는 바와 같이, HAE 전처리가 활성화된 T 세포에서 IL-2 생산을 농도의존적으로 하향 조절함을 보여주었다.

[0042] <실시예 3. HAE가 T 세포의 표면 분자 발현에 미치는 효과 확인>

[0043] CD69 및 CD25를 포함한 표면 분자의 발현이 활성화된 T 세포에서 향상된다고 알려져 있다. 따라서 HAE가 활성화된 T 세포에서 표면 분자의 상향조절을 억제하는지 여부를 모니터링하기 위해 CD69 및 CD25의 발현을 유동 세포 측정법으로 평가하였다.

[0044] 농도별 해바라기 잎 추출물로 전처리된 5×10^5 /well의 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$)로 16시간 자극하였다. 이후, 세포를 APC 접합된 항-CD69 항체 또는 APC 접합된 항-CD25 항체로 염색 후, 유세포분석을 통해 형광을 측정하여 도 2A 및 도 2B에 나타내었다. 도 2A 및 도 2B에서 보는 바와 같이, CD69의 강도는 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$) 자극에 의하여 급격히 증가하였으며, 이는 HEA 전처리에 의하여 현저하게 감소하였다. 또한 세포 표면에서 자극에 의하여 증가한 CD25의 발현 또한 HAE 전처리에 의하여 용량 의존적 방식으로 억제되었다. 이러한 결과는 HAE가 T 세포 활성화에 중요한 T 세포 상의 표면 분자의 발현을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0045] <실시예 4. T 세포에서 HEA의 세포독성 확인>

[0046] 세포독성은 면역조절제의 주요 인자로 간주되므로 HAE가 T 세포에 세포독성을 가지는지 확인하였다. Jurkat T 세포를 0, 6, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 HAE로 24 시간 동안 처리한 후, MTT(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)를 500 $\mu\text{g/mL}$ 첨가하여 2시간 동안 배양 후, 상등액을 버리고 바닥에 있는 formazan 결정을 200 μL 의 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해시켰다. 이후, 플레이트를 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 대조군(0 μM)에 대한 비교치(%)로 계산하여 도 3A에 나타내었다. 도 3A에서 보는 바와 같이, HAE가 용량을 증가시켜도 T 세포에서 세포독성을 나타내지 않았다. HAE가 T 세포에서 세포사멸 관련 세포 사멸을 유도하는지 여부를 평가하기 위해 IncuCyte를 사용하여 AnnexinV의 발현을 검출했다. Jurkat T 세포를 각 농도의 HAE로 24시간 처리 후, AnnexinV/PI apoptosis kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 AnnexinV 및 PI로 염색하였다. 이후, AnnexinV(녹색 형광) 검출을 위하여 도 3B와 같이 세포를 IncuCyte 이미징 시스템으로 스캔하였다. AnnexinV의 강도는 IncuCyte 소프트웨어에서 얻었으며 제어 또는 최대 백분율로 계산하여 도 3C에 나타내었다. 도 3B 및 도 3C에서 보는 바와 같이, 다양한 농도의 HAE와 함께 인큐베이션된 Jurkat T 세포의 AnnexinV는 유사한 강도를 나타내었다. 이러한 유세포 분석 결과는 HAE가 T 세포에서 세포사멸 반응을 겪지 않는다는 것을 나타낸다.

[0047] 또한 HAE가 활성화된 T 세포의 세포독성에 관여하는지 조사했다. 상기와 동일한 방법으로 다양한 농도의 HAE와 함께 인큐베이션된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$)로 24시간 자극하였다. 이후, 상기 Jurkat T 세포의 MTT 및 AnnexinV/PI로 염색으로 분석하여 그 결과를 도 3D 내지 도 3F에 나타내었다. 도 3D 내지 도 3F에서 보는 바와 같이, 활성화된 T 세포에서 세포 생존력이 감소하지만 HAE 처리에 의하여 변화가 없음을 보여주었다. 또한, 활성화된 T 세포에서 AnnexinV 및 AnnexinV/PI 양성 세포의 강도는 HAE 처리에 의해 차이를 나타내지 않았으며, 이는 HAE가 세포사멸 경로와 관련이 없음을 시사한다. 이러한 결과를 통해 HAE 처리가 활성화된 T 세포에서 세포 사멸 및 세포 자멸사 경로와는 관련 없음을 확인하였다.

[0048] <실시예 5. HEA의 TAK1-IKK α -NF κ B 경로를 통한 MAPK의 인산화 조절>

[0049] MAPK를 통한 TAK1-IKK α -NF κ B 경로는 T 세포 수용체 매개 자극에서 가장 중심적인 신호 전달 경로 중 하나로 알려져 있다. 따라서 HAE 처리의 조절 효과가 이 경로와 관련이 있는지 확인하였다.

[0050] Jurkat T 세포를 0, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 HAE로 1 시간 동안 처리한 후, 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$)로 10분간 자극하였다. 이후 1X 포스파타제 억제제를 포함하는 RIPA 버퍼에 세포를 용해시키고, pTAK1, TAK1, pIKK α 및 IKK α 에 대한 웨스턴 블롯팅을 상기 실시예 2와 같이 수행하여 그 결과 및 인산화 수준을 환산하여 도 4A에 나타내었다. 도 4A에서 보는 바와 같이, HAE의 처리가 TCR-매개 자극 동안 TAK1 및 IKK α 의 인산화 수준을 감소시킨다는 것을 보여주었다.

[0051] 또한, HEA가 IKK α 의 인산화 수준 및 p65의 핵 전좌에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Jurkat T 세포를 0, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 HAE로 1 시간 동안 처리한 후, 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$)로 1시간 자극하였다. 이후, NE-PER kit를 이용하여 세포를 용해시키고 핵 추출물 및 세포질 추출물을 분리한 다음, 세포질 추출물에서의 IKK α 및 pIKK α , 핵 추출물 및 세포질 추출물에서의 p65를 웨스턴 블롯팅으로 확인하고 그 결과를 도 4B 및 도 4C에 나타내었다. 도 4B 및 도 4C에서 보는 바와 같이, HAE 처리에 의하여 자극에 의하여 감소된 Jurkat T 세포의 세포질 내 IKK α 는 증가하였으며, pIKK α 는 감소하였다. 또한 이는 활성화된 T 세포에서 증가한 p65의 핵 전좌가 HEA 처리에 의하여 감소된 것으로 이어짐을 확인하였다.

[0052] Jurkat T 세포를 0, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 HAE로 1 시간 동안 처리한 후, 항-CD3 항체(20 $\mu\text{g/mL}$) 및 항-CD28 용해성 항체(7 $\mu\text{g/mL}$)로 30분간 자극하였다. 이를 수확하여 1X 포스파타제 억제제를 포함하는 RIPA 버퍼에 세포를 용해시키고, pERK, ERK, pp38, p38, pJNK 및 JNK에 대한 웨스턴 블롯팅을 상기 실시예 2와 같이 수행하여 그 결과 및 인산화 수준을 환산하여 도 4D에 나타내었다. 도 4D에서 보는 바와 같이, 자극된 T세포에서 증가된 ERK, p38 및 JNK의 인산화된 수준이 HAE로 전처리에 의해 용량 의존적으로 억제됨을 일관되게 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 T 세포 활성화에 대한 HAE의 조절 효과가 활성화된 T 세포에서 TAK1-IKK α -NF κ B 경로 및 MAPK 신호 경로를 통한 것임을 시사한다.

[0053] <실시예 6. 아토피 피부염 동물 모델에서 HAE의 효과 확인>

[0054] T 세포는 천식 및 아토피성 피부염을 비롯한 알레르기 질환의 주요 인자로 알려져 있다. 상기에서 HAE가 T 세포의 활성을 조절하는 점을 확인함에 따라 HAE가 AD에 조절 효과가 있는지 평가했다.

[0055] 집먼지 진드기 추출물과 2,4,-디니트로클로로벤젠(2,4,-dinitrochlorobenzene, DNCB)를 생쥐의 귀에 반복적으로

통증을 주어 아토피 피부염(AD)을 유발하였고 HAE의 개선 효과는 경구 투여로 모니터링하였다. 25마리의 6~8주령 Balb/c 암컷 마우스를 삼타코바이오(오산, 한국)에서 구입하여 SPF(Specific Pathogen-Free) 조건에서 사육하였다. 모든 동물 실험은 계명대학교 약학대학 동물관리이용위원회의 승인을 받았다(승인번호: KM2020-007, 2020년 7월 2일 승인). 상기 마우스를 25마리를 무작위로 5개 그룹(DMSO 또는 PBS를 투여군(mock), DNCB/진드기 추출물 투여군(AD), DNCB/진드기 추출물+HAE 100 mg/kg 투여군(AD+HAE100), DNCB/진드기 추출물+HAE 250 mg/kg 투여군(AD+HAE250) 및 DNCB/진드기 추출물+토파시티닙 투여군(AD+tofacinib))으로 나누고 AD 유발을 위해 수술용 테이프(서일화학, 화성, 한국)로 양쪽 귀의 표면을 5회 벗겨낸 후, 각 귀를 20 μ l의 DNCB(1%)로 도포하였다. 4일 후, 진드기 추출물(10 mg/ml) 20 μ l로 귀를 도포하였다. 이후, DNCB/진드기 추출물 투여를 4주 동안 매주 반복하였다. HAE 또는 토파시티닙은 5일 경구 투여 및 2일 비투여 방법으로 4주 동안 반복하였으며, 28일째 각 처리군 마우스의 대표적인 귀 사진을 도 5A에 나타내었다. AD 마우스는 귀에 피부 발적 및 종창을 나타내었지만, HAE를 투여한 AD 마우스는 HAE 용량 의존적으로 마우스는 귀에 피부 발적 및 종창이 개선된 것을 확인하였다.

[0056] 각 처리군 마우스의 귀 두께는 DNCB 또는 진드기 추출물을 국소 투여한 후 14일 및 28일째에 다이얼 두께 측정기(Kori Seiki MFG Co., Japan)를 사용하여 측정하여 도 5B에 나타내었다. AD 유도 후 14일 및 28일에 HAE를 투여한 AD 마우스의 귀 두께가 또한 AD 마우스의 귀 두께와 비교하여 감소되었음을 나타내었다.

[0057] 각 처리군 마우스의 임상 점수(clinical score)를 결정하였다. 임상 점수는 Goindi 등(2014)의 진단 기준방법에 따라 멍검 방식으로 귀 조직의 홍반 수준을 모니터링하여 결정하였다. 임상 점수의 결정방법은 0, 홍반 없음; 1, 약간의 홍반; 2, 중등도의 홍반; 3, 심한 홍반으로 결정하여 도 5C에 나타내었다. 도 5C에서 보는 바와 같이, HAE의 투여한 경우, AD 마우스의 임상 점수가 감소된 것을 확인하였다. 이러한 결과는 HAE가 생체 내에서 AD를 완화시킨다는 것을 시사한다.

[0058] <실시예 7. 아토피 피부염 동물 모델에서 HAE의 아토피 개선 효과 확인>

[0059] HAE가 AD 상태에 대한 귀 조직을 개선하는 방법을 조사하기 위해 조직학적 분석을 수행하였다. 상기 실시예 6의 DNCB 또는 진드기 추출물을 국소 투여한 후 28일째에 각 군의 마우스를 희생시키고 처리군의 대표적인 귀의 조직을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin & eosin, H&E) 염색하여 도 6A에 나타내었다. 또한 귀의 진피(dermal) 및 표피(epidermal) 두께를 측정하여 도 6B에 나타내었다. 도 6A 및 도 6B에서 보는 바와 같이, 비후된 조직, 부전각화증(parakeratosis) 및 극세포증(acanthosis)을 포함하는 AD의 전형적인 징후가 AD 마우스 그룹에서 나타났으며, HAE를 투여한 이러한 AD의 징후는 현저하게 감소되었다. 또한 HAE의 투여가 진피 및 표피 두께를 현저히 감소시켰다.

[0060] 약 80%의 AD 환자가 AD의 주요 특징으로 간주될 수 있는 혈청 내 IgE의 증가된 수준을 나타내는 것으로 알려져 있다(Weidinger and Novak, 2016). IgE는 주로 Th2 이펙터 T 세포에 의해 자극되는 B 세포에 의해 생성된다. 혈청에서 방출된 IgE는 고친화성 IgE 수용체(high affinity IgE receptors, Fc ϵ RI)에 의해 비만 세포를 포함한 다양한 면역 세포에 결합하고 비만 세포가 히스타민을 방출하도록 한다(Nunomura et al., 2005). 특히 IgE는 T 세포 매개 면역 반응에서 중요한 역할을 하기 때문에 표적으로서 IgE에 대한 중성 시약을 생성하고 혈액에서 IgE+ B 세포를 제거하기 위한 여러 약제학적 접근법이 보고되고 있다(Cohen et al., 2014; Gauvreau et al., 2016; Presta et al., 1993). 이에 따라, 본 발명은 HAE의 처리가 혈청 내 IgE 수치에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0061] 각 군의 마우스로부터 채취한 혈청으로부터 IgE 및 진드기-특이적 IgE의 수준을 상기 ELISA를 통해 확인하였다. 채취한 각 군의 마우스 혈액을 7000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 혈액에서 혈청을 채취했다. 상기 수득한 혈청을 1:100으로 희석하고 제조사의 지시에 따라 ELISA를 수행하고(BD biosciences, San Diego, CA, USA), 그 결과를 도 6C에 나타내었다. 도 6C에서 보는 바와 같이, HAE의 투여는 AD 마우스로부터의 IgE 및 진드기 특이적 IgE 생산을 유의적으로 감소시켰다. 또한, 혈액 내 비만세포의 수를 계수하여 도 6D에 나타내었다. 도 6D에서 보는 바와 같이, HAE는 AD 유도에 의해 증가된 비만 세포의 수를 효과적으로 하향 조절하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 HAE 추출물이 개선된 진피/표피 두께, 귀 조직의 AD와 관련된 IgE/진드기 특이적 IgE 수준을 포함하는 AD 발현을 개선함을 시사한다.

[0062] <실시예 8. 아토피 피부염 동물 모델에서 HAE의 T 세포 활동 조절 효과 확인>

[0063] HAE의 투여가 AD 진행 동안 T 세포 면역을 조절하여 전신적으로 영향을 미치는지 여부를 모니터링하기 위해, 상기 실시예에서 AD 유도 28일째에 희생된 마우스에서 분리한 각 군 마우스의 대표적 배액 림프절(drainig lymph

nodes, dLN)을 도 7A에 나타내고, 이의 길이 및 무게를 측정하여 도 7B에 나타내었다. 도 7A 및 도 7B에서 보는 바와 같이, AD 유도에 의하여 마우스의 dLN는 부풀어 오르고 확장되어 dLN의 길이 및 무게가 증가되었다. 그러나 HAE는 처리한 경우, 농도 의존적으로 증가된 dLN의 길이 및 무게가 감소하였다.

[0064] 아토피성 사이토카인 중 Th2-사이토카인은 대부분 dLN에서 활성화된 T 세포에서 생성되는 것으로 알려져 있다. 이에 마우스의 dLN에서 i14, i113 및 i131의 mRNA 수준을 상기 실시예 2와 같이 실시간 정량적 PCR로 검출하여 도 8C에 나타내었다. 도 8C에서 보는 바와 같이, HAE 투여는 dLN의 Th2-사이토카인 유전자 i14, i113 및 i131의 발현을 현저하게 감소시킴을 나타내었다.

[0065] 또한 HAE가 AD가 진행되는 동안 T 세포 활성화에 어떻게 개선 효과를 갖는지 설명하기 위해, dLN의 MAPK 단백질 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준을 웨스턴 블롯 분석으로 관찰하여 도 8D에 나타내었다. 도 8D에서 보는 바와 같이, HAE는 ERK, p38 및 JNK의 인산화를 감소시킴으로써 MAPK를 통한 T 세포 활성화를 억제하는 것을 확인하여 in vitro 결과와 일치하였다. 이를 통하여 HAE의 투여는 dLN에서 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준을 감소시킴으로써 MAPK 신호 전달 경로를 조절하여 T 세포 활성을 전신적으로 변화시킨다는 것을 확인하였다.

[0066] 본 발명에서 HAE는 T 세포 활동의 조절함으로써 AD의 개선 효과를 나타내는 것을 확인하였다. HAE 처리는 활성화된 T 세포에서 IL-2의 mRNA 수준을 감소시키고, 세포질 내 IL-2 및 IL-2 방출을 감소시켰으며, 활성화된 T 세포에서 CD69 및 CD25의 표면 발현을 억제하는 점을 확인하였다. 이러한 HEA의 활성화는 휴지 및 활성화된 T 세포의 세포사멸 또는 세포자멸사와는 관련없이 이루어지는 점을 확인하였으며, 활성화된 T 세포에서 TAK1-NF κ B-MAPK 신호 전달 경로를 통한 것임을 확인하였다.

[0067] 특히 AD 마우스 모델에서 HAE는 귀 두께, 혈청 내 IgE 수준, 팽창된 dLN 및 귀 및 dLN의 전염증성 사이토카인의 mRNA 수준을 포함한 AD의 증상을 완화한다는 것을 확인하였다. 해바라기(*H. annuus*)는 전통적으로 식용, 약용 및 관상 등의 목적으로 해바라기의 꽃과 씨앗을 수확하기 위해 재배되어 왔다. 특히, 해바라기 종자유는 식용으로 개발되어 항산화, 항염증, 항균, 상처치유, 항고혈압 등의 다양한 약용 효능이 있는 것으로 조사되었다(Fowler, 2006). 그러나 해바라기 잎의 대부분은 오랫동안 쓸모없는 부산물이나 쓰레기로 여겨져 왔다. 이에 우리는 해바라기의 잎이 처음으로 T 세포 활동을 조절함으로써 AD에 대한 면역 조절 효과가 있음을 확인하였고, 특히 T 세포 매개 질병의 새로운 치료제 개발을 위한 원료로 사용될 수 있는 점을 확인하였다.

[0068] <제제예 1. 약학적 제제>

[0069] 제제예 1-1. 정제의 제조

[0070] 본 발명의 해바라기 잎 추출물 200mg을 락토즈 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활성 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0071] 제제예 1-2. 주사액제의 제조

[0072] 본 발명의 해바라기 잎 추출물 100mg, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0073] <제제예 2. 건강기능식품의 제조>

[0074] 제제예 2-1. 건강기능식품의 제조

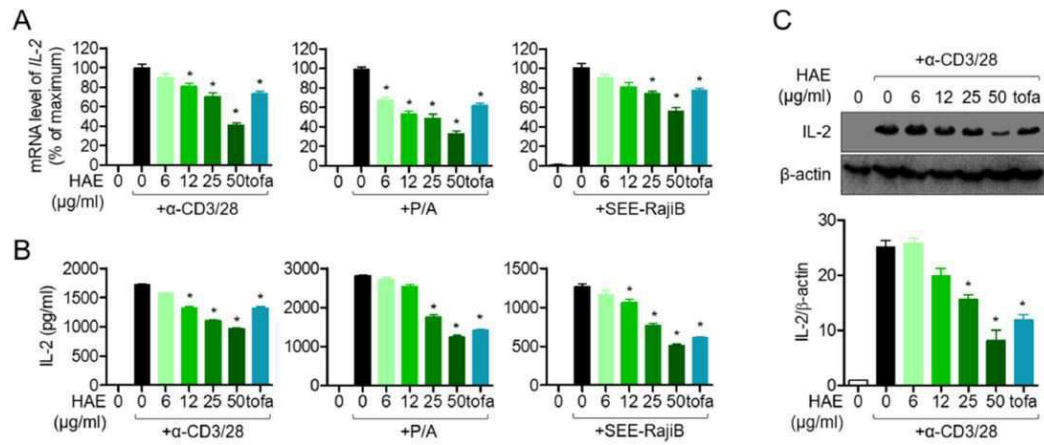
[0075] 본 발명의 해바라기 잎 추출물 2g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0076] 제제예 2-2. 건강기능성 음료의 제조

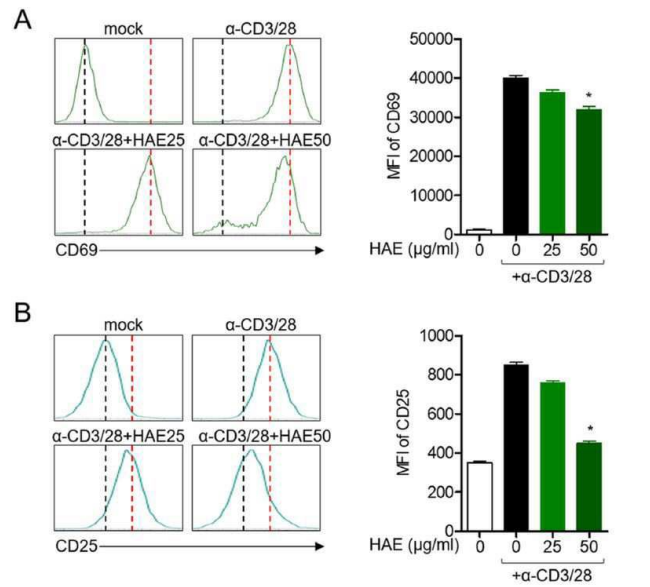
[0077] 본 발명의 해바라기 잎 추출물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

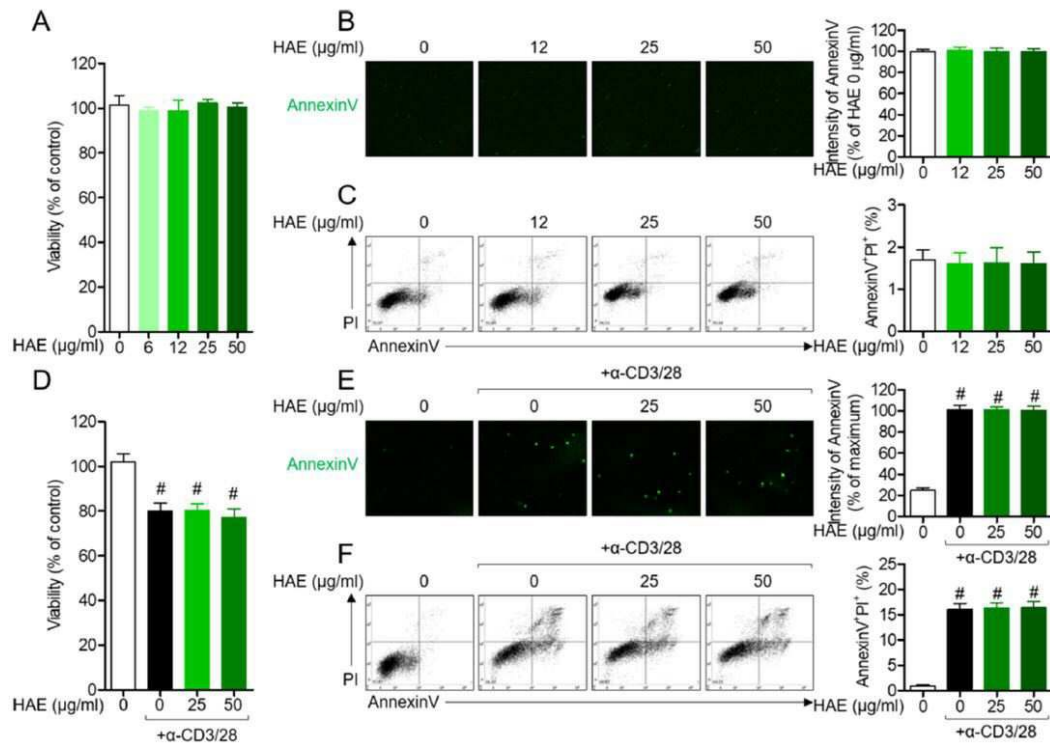
도면1



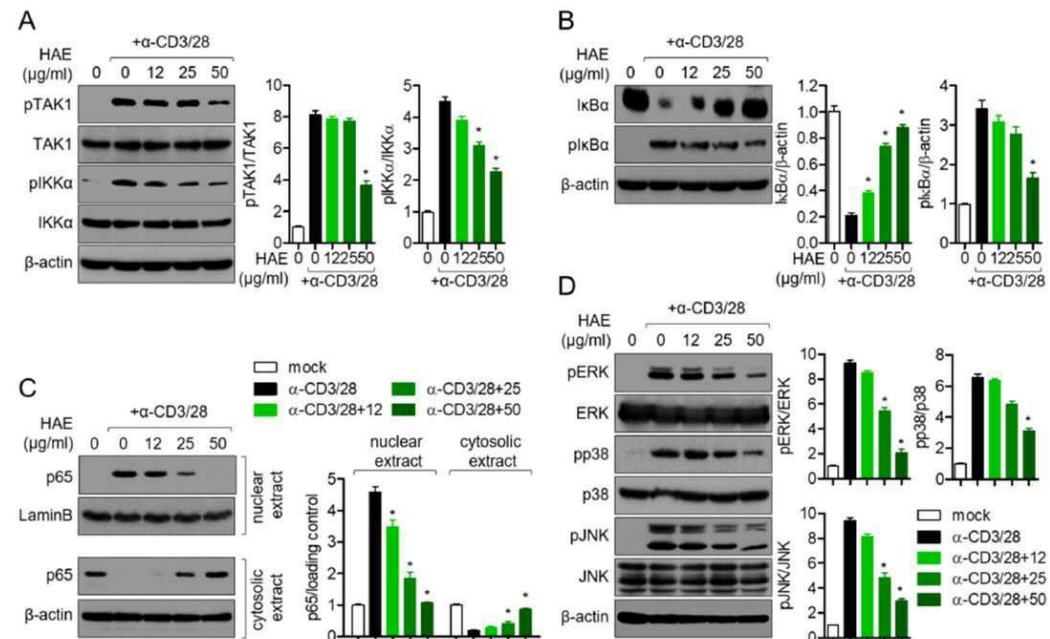
도면2



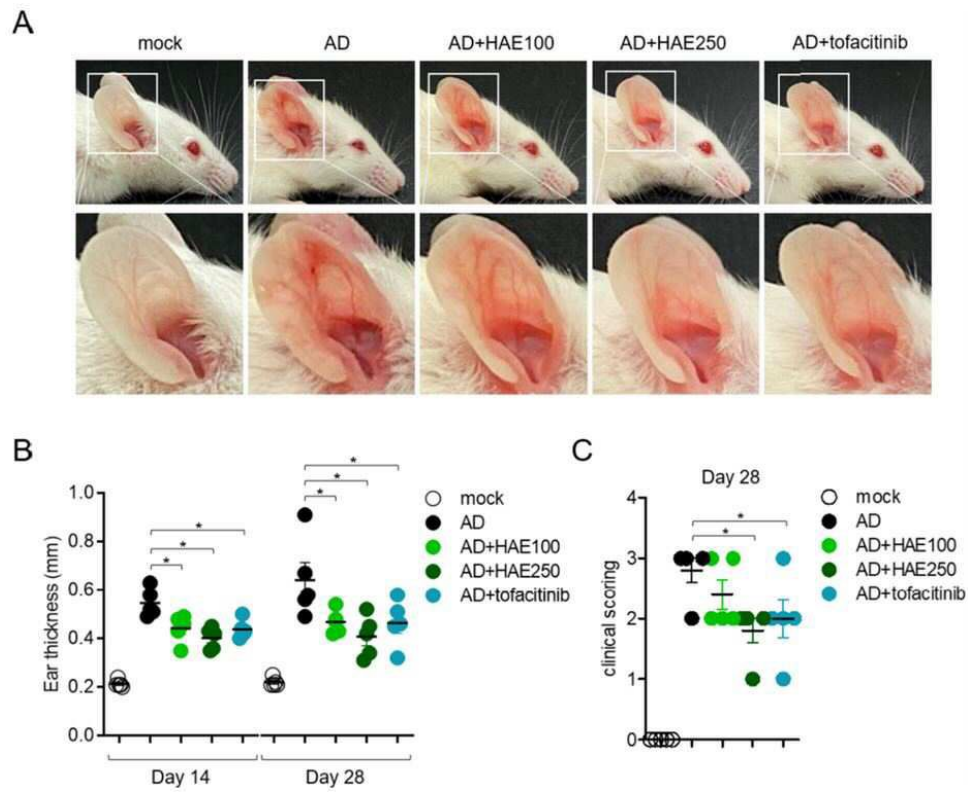
도면3



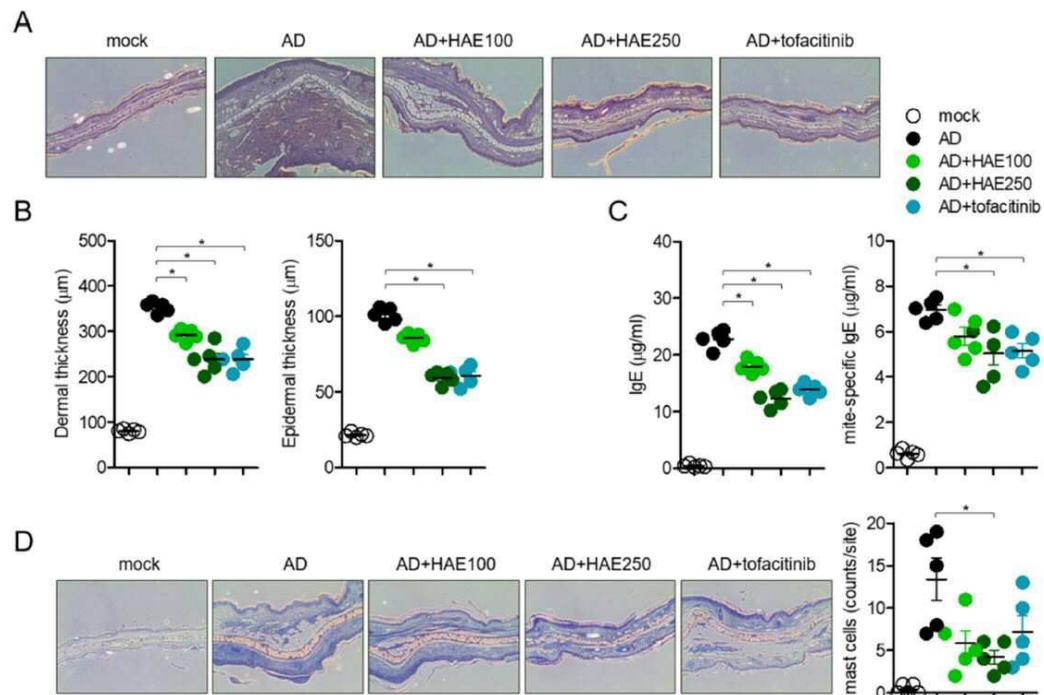
도면4



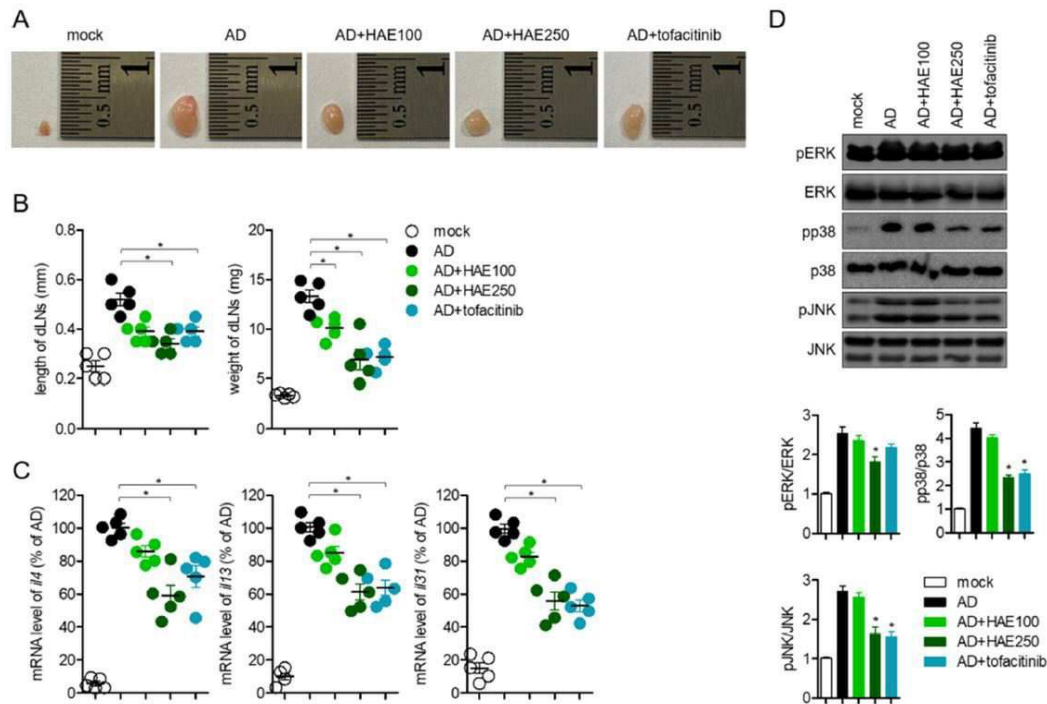
도면5



도면6



도면7



도면8

