



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0025689
(43) 공개일자 2018년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/756 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/484 (2006.01) A61K 36/489 (2006.01)
A61K 36/538 (2006.01) A61K 36/896 (2006.01)
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/756 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0112686

(22) 출원일자 2016년09월01일

심사청구일자 2016년09월01일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

고성규

서울특별시 강남구 도곡로 404 롯데캐슬리베아파트 101동 702호

최인화

서울특별시 강남구 압구정로 201 65동 604호 (압구정동, 현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

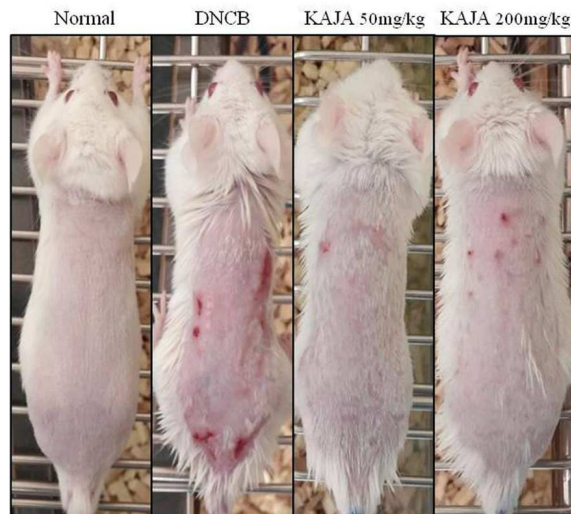
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 생약 혼합 추출물을 포함하는 아토피 피부염의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 생약 혼합 추출물을 포함하는 아토피 피부염의 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 의약품 조성물, 화장품 조성물, 및 상기 약학적 조성물을 이용한 아토피 피부염의 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 36/484 (2013.01)
A61K 36/489 (2013.01)
A61K 36/538 (2013.01)
A61K 36/896 (2013.01)
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

윤영희

경기도 하남시 더우개로 6 (창우동, 은행아파트)
 114동 302

홍세향

경상남도 함안군 가야읍 가야15길 26 남경아파트
 102동 1306호

구진모

인천광역시 남구 학익소로 61길 132 신동아아파트
 24동 202호

남궁원

경기도 성남시 분당구 정자일로156번길 12, 타임브
 랫지 909호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0530

부처명 보건산업진흥원

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 한의학선도기술개발사업

연구과제명 아토피피부염의 대한 한의학적 지표 타당성 검증 및 한방 외용제의 효과 검증을 위한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.15 ~ 2017.05.14

명세서

청구범위

청구항 1

황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분획물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 헥산(Hexane), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 제조한 것인, 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 혼합물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동을 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5의 중량비로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물을 총 조성물의 중량 대비 0.001 내지 80 중량%로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 경피흡수제, 겔제, 로션제, 연고제, 크림제, 첩부제, 카타폴라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 현탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 붕대 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가지는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 인간을 제외한 아토피 피부염 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 아토피 피부염의 치료 방법.

청구항 9

황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염 개선용 식품 조성물.

청구항 10

황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

청구항 11

황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 생약 혼합 추출물을 포함하는 아토피 피부염의 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 의약품 조성물, 화장품 조성물, 및 상기 약학적 조성물을 이용한 아토피 피부염의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 아토피 피부염(Atopic dermatitis; AD)은 흔하게 발생하는 만성적인 염증 피부질환으로서, 종종 음식 알러지, 천식 또는 비염 등의 알러지 질환으로 진행되기도 한다. AD는 호산구의 수를 증가시키고, 혈청 IgE 수준을 증가시키며, TNF- α , 케모카인 등을 포함하는 전염증 사이토카인을 증가시키는 것이 특징이다(Simon D. et al., Allergy, 2004, 59, 561-570; Rousset F. et al., J Allergy Clin Immunol., 1991, 87, 58-69). 상기 IgE는 비만세포 활성화를 유도하는데, 이에 따라 히스타민(histamine) 전구체, 케모카인(chemokine)과 사이토카인(cytokine) 등을 포함하는 면역 매개자 등이 비만세포로부터 방출된다. 이러한 사이토카인은 AD의 급성기에 피부 병변에서 관찰되는 Th2-아형 T 세포 반응을 촉진하며, 이러한 Th2 및 Th1 반응의 조합에 의하여 AD의 만성기 동안 면역반응이 조절된다.
- [0003] 이러한 급성 AD에 대한 표준 치료제로서 국소 코르티코스테로이드(corticosteroids)가 사용되고 있으나, 피부 유전자(atrophogenic)에 부작용을 야기함이 보고되고 있어(Lubach D. et al., Dermatologica, 1989, 179, 67-72), 스테로이드를 포함하지 않고 오랜 기간 사용하여도 안전한 항염증 인자의 개발이 필요한 실정이다. 이와 관련하여, 현재는 국소 면역억제제인 타크로리무스(tacrolimus)가 AD의 치료에 사용되고 있다. 타크로리무스는 상대적으로 작은 분자크기를 가짐에 따라 피부에 효과적으로 침투하므로, 국소 연고 제제의 형태로 사용되고 있다(Akhavan A. et al., Semin Cutan Med Surg., 2008, 27, 151-155). 코르티코스테로이드에 의한 부작용의 일종인 콜라겐 합성 또는 피부 경화증을 야기하지 않으며, 얼굴 또는 목 등과 같이 피부가 얇고 매우 취약한 부분에도 안전하게 사용할 수 있다. 그러나, 타크로리무스를 오랜 기간 사용하면 효과가 반감되며, 부작용이 발생할 수 있다는 연구가 보고되고 있음에 따라, AD를 치료하기 위한 새로운 약제의 개발이 요구되고 있다.
- [0004] 이에 따라, 천연물을 이용한 아토피 피부염 치료제의 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 진세노사이드 Rd가 강화된 발효 인삼 또는 홍삼 추출물을 포함하는 아토피 피부염 개선용 조성물(한국 공개특허 2016-0019190), 두충과 원지 추출물을 함유하는 아토피 피부용 화장품(한국 공개특허 2015-0065250), 좁쌀 추출물을 함유하는 아토피 피부염 개선용 조성물(한국 공개특허 2014-0063165) 등이 개발된 바 있다.
- [0005] 한편, 황백(*Phellodendri Cortex*), 형개(*Schizonepetae Spica*), 고삼(*Sophorae Radix*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 또는 맥문동(*Liriopsis Tuber*)은 한의학에서 사용되는 약재로서, 폐경, 간경, 소화작용, 향균작용, 자궁출혈, 월경 장애, 이질, 대하, 음부소양증 등에 치료 효과가 있음이 알려져 있다. 그러나, 이의 조합을 약재로 사용한 바는 없었으며, 상기한 조합의 아토피 피부염에 대한 효과 또한 알려진 바 없었다.
- [0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연물을 이용한 아토피 피부염의 치료제를 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물이 면역반응을 억제함으로써 아토피 피부염을 치료할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 아토피 피부염 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는 아토피 피부염의 치료 방법을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명에서는, 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물은 아토피 피부염의 증상을 효과적으로 감소시킴을 확인함으로써, 상기 추출물은 아토피 피부염 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다. 상기 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 조합이 아토피 피부염에 대하여 치료효과를 나타냄은 이전에 알려진 바 없었으며, 본 발명자들에 의하여 처음으로 규명되었다.
- [0014] 본 발명의 용어, "황백"(黃柏)은 황벽나무의 껍질을 말린 약재로서, 생약명 *Phellodendri Cortex*, 학명 *Phellodendron wilsonii*을 갖는다. 맛은 쓰고 성질은 찬 것이 특징이며, 신경, 방광경, 대장경, 심포경 등에 사용한다고 알려져 있다.
- [0015] 본 발명의 용어, "형개"(荊芥)는 꿀풀과 식물인 형개의 전초를 말린 것으로, 생약명 *Schizonepetae Spica*, 학명 *Schizonepeta tenuifolia*을 갖는다. 맛은 쓰고 성질은 따뜻한 것이 특징이며, 폐경, 간경 등에 작용하고 소화작용, 향균작용 등을 나타낸다고 알려져 있다.
- [0016] 본 발명의 용어, "고삼"(苦參)은 고삼의 주피를 벗긴 뿌리로, 생약명 *Sophorae Radix*, 학명 *Sophora flavescens*을 갖는다. 특이한 냄새가 있고 잔류성이며 약성은 매우 쓰고 찬 것이 특징이며, 하초습열로 인한 이질, 대하, 음부소양증, 피부가려움증 등에 사용하고 방광열로 인하여 통증이 있을 때 사용한다고 알려져 있다.
- [0017] 본 발명의 용어, "감초"(甘草)는 감초의 뿌리 또는 줄기를 말린 것으로, 생약명 *Glycyrrhizae Radix*, 학명 *Glycyrrhiza glabra*을 갖는다. 특이한 냄새가 나며 맛은 단 것이 특징이다. 감초는 모든 약의 독성을 조화시켜서 약효가 잘 나타나게 하고, 장부의 한열과 사기를 다스리고 모든 혈액의 소통을 잘 시키며, 근육과 뼈를 튼튼히 한다고 알려져 있다.
- [0018] 본 발명에서, 상기 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물은 "KAJA" 또는 "KHU-ATO-JIN-A"와 혼용되어 명명될 수 있다. 상기 혼합 추출물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합물의 추출물일 수 있으며, 또한 황백, 형개, 고삼, 감초 또는 맥문동 추출물의 혼합물일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서, 상기 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 추출물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합물을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 용어, "추출물"이란, 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합물을 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물에 있어서, 상기 혼합물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 조음과 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 혼합물을 추출하는 데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있고, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있으며, 구체적으로 물이 사용될 수 있다. 알코올을 용매로 사용하는 경우에는 구체적으로 탄소수 1 내지 4의 알코올을 사용할 수 있다.

- [0024] 본 발명의 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이들의 조합 등이 있다. 구체적으로, 본 발명의 단풍나무 잎을 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매; 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 상기 추출물 또는 분획물은 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있지만, 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서, 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합물은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동을 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5 : 0.5 내지 1.5의 중량비, 구체적으로 0.7 내지 1.3 : 0.7 내지 1.3 : 0.7 내지 1.3 : 0.7 내지 1.3 : 0.7 내지 1.3의 중량비, 더욱 구체적으로 1 : 1 : 1 : 1 : 1의 중량비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 용어, "아토피 피부염"(Atopic dermatitis; AD)은 자가면역 피부질환의 일종으로서, 피부의 부스럼, 습진, 간지러움을 동반하는 질병이다. 상기 아토피의 발병에는 환경적 요인 및 유전학적 요인 모두가 관여하는 것으로 알려져 있으나, 정확한 발병기전은 규명되지 않았다. 본 발명에서, 상기 아토피 피부염은 "AD"와 혼용되어 명명될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 용어, "예방"은 상기 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 아토피 피부염을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 아토피 피부염의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물은 아토피 피부염의 임상적인 증상인 홍반/출혈, 부종, 인설/건조, 찰과상/미란 등을 우수한 정도로 개선하며(도 4); 염증세포 또는 비만세포가 표피 및 진피에 침투하는 것을 저해하며(도 5 및 6); 백혈구의 수를 감소시키며(도 8); 혈청 IgE를 비롯하여 IL-6, IL-10 및 IL-12의 염증 사이토카인의 수준을 감소시킴을 확인하였다(도 9 및 10). 이는, 상기 추출물은 아토피 피부염의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.001 내지 80, 구체적으로 0.001 내지 70, 더욱 구체적으로 0.001 내지 60 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 경피흡수제, 젤제, 로션제, 연고제, 크림제, 침부제, 카타플라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 현탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 붕대 또는 좌제의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 고형제

제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0036] 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 아토피 피부염 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는 아토피 피부염의 치료 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 상기 추출물을 포함하는 조성물을 도입하는 것을 의미한다.
- [0038] 본 발명의 용어, "개체"는 아토피 피부염이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물은 1일 0.01 내지 500 mg/kg으로, 구체적으로 10 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0040] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0042] 또 다른 하나의 양태는 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 이때, 상기 황백, 형개, 고삼, 감초, 맥문동, 추출물, 분획물 및 아토피 피부염의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0044] 본 발명의 용어, "개선"은 상기 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0046] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 아토피 피부염 개선 효과를 기대할 수 있으므로, 건강 증진 목적으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0047] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 천연물을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 아토피 피부염

개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

- [0048] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.
- [0049] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 화합물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [0050] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 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), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클라메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기조제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.
- [0054] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0055] 또 다른 하나의 양태는 목적은 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0056] 이때, 상기 황백, 형개, 고삼, 감초, 맥문동, 추출물, 분획물, 아토피 피부염, 예방 및 개선의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0057] 본 발명의 용어, "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 피부 외용제 및 개인위생용품도 포함한다.
- [0058] 본 발명의 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물은 아토피의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가할 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라

적합하게 결정될 수 있다.

- [0059] 상기 의약외품 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 개인위생용품, 피부외용제, 소독청결제, 샤워폼, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 마스크 또는 연고제를 포함한다. 상기 피부외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젼의 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 상기 개인위생용품에는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 비누, 물티슈, 휴지, 샴푸, 치약, 모발 손질 제품, 에어프레쉬너 겔 또는 세정 겔일 수 있다.
- [0060] 또 다른 하나의 양태는 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0061] 이때, 상기 황백, 형개, 고삼, 감초, 맥문동, 추출물, 분획물, 아토피 피부염, 예방 및 개선의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0062] 상기 황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물은 상기 조성물에 대하여 약학적 조성물과 마찬가지로 상기 추출물을 조성물 총 중량에 대하여 0.1 중량% 내지 20 중량%의 비율로 포함할 수 있다. 구체적으로 조성물 총 중량에 대하여 0.1 중량% 내지 5 중량%, 더욱 구체적으로 0.4 내지 0.6 중량%, 더더욱 구체적으로 0.5 중량%의 비율로 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분으로는 상기 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어 물, 계면활성제, 보습제, 저급알코올, 킬레이트제, 살균제, 산화방지제, 방부제, 색소 및 향료로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 화장료 조성물은 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 유탁액, 현탁액, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 파우더, 스프레이, 계면활성제-함유 클린징, 오일, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 파운데이션, 메이크업베이스, 에센스, 화장수, 폼, 팩, 유연수, 선스크린 크림 또는 선오일 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0066] 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 메타히드록시드, 벤토나이트, 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0069] 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 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0070] 또한, 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0071] 본 발명의 복합 생약 추출물은 아토피 피부염의 증상인 홍반/출혈, 부종, 인설/건조, 찰과상/미란을 우수한 정도로 감소시키며, 염증 반응을 감소시키는 효과를 나타내므로, 아토피 피부염을 예방, 개선 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0072]

도 1은 KAJA(황백, 형개, 고삼, 감초 및 맥문동의 혼합 추출물)의 아토피 피부염 치료 효과를 확인하기 위한 실험의 개략도이다. DNCB를 이용하여 아토피 피부염을 유도한 이후, KAJA를 경구투여하였다.

도 2는 KAJA의 처리 동안에 마우스의 몸무게 변화를 보여주는 그래프이다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다(n=8).

도 3은 KAJA의 처리 동안에 마우스의 음식 섭취 변화를 보여주는 그래프이다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다(n=8).

도 4는 DNCB를 이용하여 아토피 피부염을 유도한 이후, KAJA를 처리한 후에 관찰한 마우스의 등 피부를 보여주는 이미지이다.

도 5는 KAJA를 처리한 이후의 등 피부 두께 및 지라의 무게를 나타내는 그래프이다. *, ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고,

도 6은 마우스의 등 피부 절편을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin 및 eosin; H&E)으로 염색한 이미지로서, 전염증세포의 피부 침투에 대한 KAJA의 영향을 보여준다. 염증세포는 보라색 점으로 표시하였다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, *, ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 7은 마우스의 등 피부 절편을 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색한 이미지로서, 비만세포의 피부 침투에 대한 KAJA의 영향을 보여준다. 비만세포는 보라색 점으로 표시하였다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, *, ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 8은 혈액 내 혈구 구성에 대한 KAJA의 영향을 보여주며, WBC, 호중구(neutrophils), 림프구(lymphocytes), 단핵백혈구(monocytes), 호산구(eosinophils) 및 호염구(basophils)의 수를 보여주는 그래프이다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, *, ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 9는 혈장 IgE의 발현량에 대한 KAJA의 영향을 보여준다. ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 10은 혈장 IL-6, IL-10 및 IL-12의 발현량에 대한 KAJA의 영향을 보여준다. ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 11은 마우스 등 피부 조직에서 전염증 사이토카인(IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF- α)의 mRNA 발현에 대한 KAJA의 영향을 보여준다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, *, ** 또는 ***는 DNCB 처리군 대비 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 12는 염증 관련 세포인 RAW264.7 대식세포(A) 또는 HMC-1 세포(B)의 생존율에 대한 KAJA의 영향을 보여준다. RAW264.7 세포에는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HMC-1 세포에는 PMA(5 ng/ml)와 이오노마이신(Ionomycin, 500 ng/ml)을 처리하여 1시간 동안 배양하였고, 다양한 농도의 KAJA를 24시간 동안 처리하였다. 처리 완료 후, WST 어세이를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, A 및 B에서 * 또는 ***는 염증대조군 대비 각각 $P < 0.05$ 또는 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 13은 혼합 생약 추출물(KAJA; A)과 단독 생약 추출물의 염증 세포의 생존율 감소 효과를 비교한 결과를 보여주며, A는 비활성화된 HMC-1 세포, B는 PMA(5 ng/ml)와 이오노마이신(500 ng/ml)에 의해 염증상태로 활성화된 HMC-1 세포에 대한 결과이다. HMC-1 세포의 생존율은 MTT 어세이를 통해 측정하였다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, ###는 정상대조군 대비 $P < 0.001$, *, ** 및 ***는 각각 염증대조군 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 및 $P < 0.001$ 임을 나타낸다.

도 14는 혼합 생약 추출물(KAJA; A)과 단독 생약 추출물의 염증 세포의 생존율 감소 효과를 비교한 결과를 보여준다. 황백, 맥문동, 고삼, 감초 또는 형개 단독 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 또는 KAJA(A, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 HMC-1 세포에 24시간 동안 처리하였다. HMC-1 세포의 생존율은 MTT 어세이를 통해 측정하였다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, * 는 음성대조군 대비 $P < 0.05$ 임을 나타낸다.

도 15는 혼합 생약 추출물(KAJA; A)과 단독 생약 추출물의 전염증 사이토카인의 발현 감소 효과를 비교한 결과

를 보여준다. 황백, 맥문동, 고삼, 감초 또는 형개 단독 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 또는 KAJA(A, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 24시간 동안 처리하였다. 활성화된 HMC-1 비만세포에서 전염증 사이토카인(IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF- α)의 mRNA 발현 양을 PCR을 통해 확인하였다. 이때, GAPDH를 로딩 컨트롤(loading control)로 사용하였다.

도 16은 KAJA를 구성하는 생약의 혼합 비율에 따른 염증 세포의 생존을 감소 효과를 보여준다. 그래프에서, A, A1 또는 A2는 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 각각 1:1:1:1:1, 1:1:1:2:1 또는 1:1:1:1:2의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물을 의미한다. HMC-1 세포의 생존율은 MTT 어세이를 통해 측정하였다. 결과값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었고, * 는 음성대조군 대비 $P < 0.05$ 임을 나타낸다.

도 17은 KAJA를 구성하는 생약의 혼합 비율에 따른 전염증 사이토카인의 발현 감소 효과를 보여준다. 그래프에서, A, A1 또는 A2는 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 각각 1:1:1:1:1, 1:1:1:2:1 또는 1:1:1:1:2의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물을 의미한다. 활성화된 HMC-1 비만세포에서 전염증 사이토카인(IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF- α)의 mRNA 발현을 확인하였으며, 이때 GAPDH를 로딩 컨트롤로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 제조예 1. KAJA의 제조

[0075] KAJA는 한풍제약(한국, 전주)에서 우수제조관리기준(good manufacturing practices; GMP)에 따라 제조하였다. KAJA는 황백(*Phellodendri Cortex*), 형개(*Schizonepetae Spica*), 고삼(*Sophorae Radix*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*) 및 맥문동(*Liriopis Tuber*)을 1:1:1:1:1의 중량비로 포함하는 혼합물의 열수 추출물로서, 물에서 추출한 후 감압농축기를 이용하여 용매를 모두 제거한 후, 동결 건조하여 추출 분말을 제조하였다. 수득한 상기 분말은 음수에 녹여 사용하였다.

[0076] 실시예 1. KAJA의 독성 확인

[0077] KAJA가 마우스에 독성 또는 스트레스를 야기하는지 확인하기 위하여, KAJA 경구투여에 의한 체중 및 식이 변화를 관찰하였다.

[0078] 구체적으로, 도 1에 나타낸 바와 같은 계획을 통해 실험을 수행하였다. 급성 알레르기 피부염을 유도하기 위하여 6주령 수컷 BALB/c 마우스의 등 피부조직에 1 x 1 cm 멸균거즈를 올려 2% DNCB 100 μl 를 일주일에 2회 도포 후, 추가적으로 0.2% DNCB 100 μl 를 1주일에 2회씩 3주간 처리하였다. 마우스와 관련한 모든 동물 실험은 경희대학교 실험동물윤리위원회(승인번호: KHUASP(SE)-14-014)의 승인을 받았으며, 사용한 6주령의 BALB/c 수컷 마우스(20 $\pm$ 2g)는 오리엔트(한국)에서 공급받았다. 1주일간 동물실 적응과정을 거친 후 실험에 사용하였고, 동물실의 사육환경은 온도 24 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$, 습도 40~60%, 12시간 주야 교대로 150~300Lux로 조절하였다. 마우스용 케이지에 4마리씩 수용하여 사육하였으며, 멸균 증류수와 고형 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험 종료 2주 전부터 KAJA를 매일 일정한 시각에 경구투여 하였으며, 주 2회 몸무게와 식이를 측정하였다.

[0079] 그 결과, 도 2 및 도 3에서 볼 수 있듯이, 정상 대조군, DNCB 처리군 및 KAJA 처리군 모두에서 눈에 띄는 체중 감소나 식이 감소가 확인되지 않았다. 상기 결과를 통해, KAJA는 독성 또는 스트레스를 유발시키지 않음을 알 수 있었다.

[0080] 실시예 2. KAJA의 아토피 피부염 개선 효능 평가

[0081] 아토피 피부염(Atopic dermatitis; AD)에 대한 KAJA의 영향을 조사하기 위하여, 상기 실시예 1의 아토피 피부염이 유도된 마우스에 2주간 KAJA를 경구투여한 후, 등 피부표면을 육안으로 관찰하고 두께를 측정하였으며, 지라의 무게를 측정하였다.

[0082] 구체적으로, 각 실험군별 마우스의 등 부위를 촬영한 이후, 마우스를 희생시켰다. 이후, 등 피부를 절제하여 디지털 캘리퍼(Mitutoyo, Japan)로 피부두께를 측정하였으며, 지라의 무게 또한 디지털 저울을 이용하여 측정하였다.

[0083] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있듯이, DNCB 처리군은 아토피 피부염 증상에서 관찰할 수 있는 홍반/출혈, 부종, 인설/건조, 찰과상/미란 등이 관찰되었으나, KAJA 처리군은 DNCB 처리군과 비교하여, 피부 과민증이 우수한 정도로 완화됨을 확인하였다.

- [0084] 또한, 도 5에서 볼 수 있듯이, KAJA 처리군은 DNCB 처리군과 비교하여, 등 피부 두께가 우수한 정도로 감소함을 확인하였고, 지라의 무게 또한 유의하게 감소함을 확인하였으며, 이러한 효과는 KAJA의 농도 의존적으로 나타남을 확인하였다.
- [0085] **실시예 3. KAJA의 염증세포 및 비만세포의 침투 억제 효과 확인**
- [0086] 염증세포 또는 비만세포의 피부에 대한 침투는 알러지 반응 및 염증을 유도함에 따라 피부의 과민증을 야기한다. 이에 따라, KAJA의 염증세포 및 비만세포의 침투 억제 효과를 확인하기 위하여, 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin; H&E) 및 톨루엔블루(toluidine blue; T.B) 염색을 수행하였다.
- [0087] 구체적으로, 피부 생검(biopsy)의 일부를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)로 고정한 후, 드라이아이스에서 냉동 색전 화합물(Frozen Section Compound, FSC22 Clear, Surgipath, Leica Biosystem, The Netherlands)을 이용하여 동결절편을 제작하였다. 염증 세포를 탐지하기 위하여 H&E로 염색하였고, 비만 세포를 탐지하기 위하여 T.B로 염색하였다. 염색한 조직을 광학현미경의 X1000 배율하의 5field/N(한 마리당 5 부위의 사진)의 High power fields(HPFs)를 계수하여 세포/HPFs로 나타냄으로써 염증세포 침윤 및 비만세포의 증감 정도를 확인하였다.
- [0088] 그 결과, 도 6 및 도 7에서 볼 수 있듯이, DNCB 처리에 의해 증가된 염증세포 및 비만세포의 수는 KAJA 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, KAJA는 알러지 반응에 있어 핵심 세포인 염증세포 및 비만세포의 수를 우수한 정도로 감소시킴에 따라, 아토피 피부염의 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [0089] **실시예 4. KAJA의 백혈구 수의 감소 효과 확인**
- [0090] 대부분의 아토피 피부염 환자에서 백혈구(white blood cells; WBCs)가 높은 수준으로 관찰된다. 이에, KAJA의 아토피 피부염 치료 효과를 확인하기 위하여 KAJA를 처리한 이후에 마우스 혈액 내에 존재하는 WBCs의 수를 분석하였다.
- [0091] 구체적으로, 마우스의 전체 혈액 샘플을 심장에서 채혈하였고, EDTA(BD science, NJ, USA)가 포함된 Vacutainer™ 튜브에 넣어 보관하였다. WBC, 호중구(neutrophils), 림프구(lymphocytes), 단핵백혈구(monocytes), 호산구(eosinophils) 또는 호염구(basophils)의 수는 혈액분석기(Drew Scientific, Inc., Oxford, USA)를 이용하여 분석하였다.
- [0092] 그 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, DNCB를 처리한 마우스는 WBC, 호중구, 림프구, 단핵백혈구, 호산구 및 호염구와 같은 모든 백혈구 수치가 전체적으로 증가됨을 확인하였다. 그러나, KAJA 경구투여 시 전술한 전체적인 백혈구 수치가 매우 우수한 정도로 감소됨을 확인하였고, 이러한 효과는 KAJA의 농도 의존적으로 나타남을 확인하였다. 상기 결과를 통해, KAJA는 백혈구 수치를 감소시킴에 따라, 아토피 피부염의 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [0093] **실시예 5. KAJA의 IgE 및 염증 사이토카인의 감소 효과 확인**
- [0094] **실시예 5-1. in vivo 혈액 분석**
- [0095] AD의 특징 중 하나는 혈중 IgE 및 염증 사이토카인이 높은 수준으로 발현하는 것이다. 이에, KAJA의 항염증 활성 메커니즘을 분석하기 위하여, DNCB를 처리한 마우스의 혈중 IgE 및 염증 사이토카인 수준을 분석하였다.
- [0096] 구체적으로, 혈액을 심장에서 채혈한 후, EDTA 튜브(Becton Dickinson Vacutainer system, USA)에 보관하였다. 2000rpm으로 10분간 원심분리 하여 혈액에서 혈장을 분리하였으며, 실험 전까지는 -80℃에 보관하였다.
- [0097] 혈액 내 IgE 및 사이토카인 수준을 확인하기 위하여, ELISA를 수행하였다. 코팅 버퍼(coating buffer)에 포함된 각각의 포획 항체(capture antibody)로 ELISA 플레이트를 코팅하였고, 4℃에서 하루 동안 보관하였다. 이후, 5% FBS로 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking) 과정을 거친 후, 준비한 혈장 샘플을 20배 희석하여 100 μ l의 부피로 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이때, 혈액 내 IgE 또는 사이토카인의 농도를 확인할 수 있는 IgE 또는 사이토카인 재조합 단백질도 함께 반응시켰다. 각 IgE 또는 사이토카인을 탐지하는 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후, 기질인 TMB 용액 100 μ l을 넣고 15분간 반응시켰으며, 50 μ l의 종결 용액을 넣어 실험을 종료하였다. 실험결과는 ELISA 리더기의 450nm의 필터에서 값을 측정하였다.
- [0098] 그 결과, 도 9 및 도 10에서 볼 수 있듯이, DNCB를 처리한 마우스는 IgE 뿐만 아니라, IL-6, IL-10 및 IL-12의 사이토카인 수준이 증가함을 확인하였다. 그러나, KAJA를 처리한 마우스는 상기 IgE 및 사이토카인의 수준이 우

수한 정도로 감소됨을 확인하였으며, 특히 IL-6, IL-10 및 IL-12의 사이토카인은 정상 대조군과 비슷한 정도로 감소됨을 확인하였다.

[0099] **실시예 5-2. in vivo mRNA 발현량 분석**

[0100] 상기 실시예 5-1을 통해 KAJA가 혈액 내 IgE 및 염증 관련 사이토카인의 단백질 발현량을 감소시킴을 확인함에 따라, KAJA가 전사 수준에서 사이토카인의 발현을 조절하는지 확인하기 위하여 mRNA 발현량을 분석하였다.

[0101] 구체적으로, 마우스의 등 조직에서의 mRNA 발현량을 분석하였다. 실험 종료 후 적출한 등 조직을 균질기(IKA, China)로 분쇄한 뒤, RNA 분리 키트를 사용하여 RNA를 추출하였으며, Nanodrop으로 RNA 농도를 정량한 이후 1 μ g의 RNA로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 μ l와 하기 표 1에 나타낸 각각의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

표 1

[0102]

프라이머 타입	프라이머 이름	구분	프라이머 서열
마우스(mouse)	IL-2	서열번호 1	F: 5'-GCA GCT GTT GAT GGA CCT AC-3'
		서열번호 2	R: 5'-TCC ACC ACA GTT GCT GAC TC-3'
	IL-4	서열번호 3	F: 5'-TCG GCA TTT TGA ACG AGG TC-3'
		서열번호 4	R: 5'-GAA AAG CCC GAA AGA GTC TC-3'
	IL-6	서열번호 5	F: 5'-CAA GAG ACT TCC ATC CAG TTG C-3'
		서열번호 6	R: 5'-TTG CCG AGT TCT CAA AGT GAC-3'
	IL-13	서열번호 7	F: 5'-CGG CAG CAT GGT ATG GAG TG-3'
		서열번호 8	R: 5'-ATT GCA ATT GGA GAT GTT GGT CAG-3'
	TNF- α	서열번호 9	F: 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3'
		서열번호 10	R: 5'-TAC AGG CTT GTC ACT GGA ATT-3'
	GAPDH	서열번호 11	F: 5'-GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC-3'
		서열번호 12	R: 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3'

[0103] 그 결과, 도 11에서 볼 수 있듯이, DNCB를 처리한 마우스는 염증 관련 사이토카인인 IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF- α 의 수준이 모두 증가함을 확인하였다. 그러나, KAJA를 처리한 마우스는 상기 사이토카인의 mRNA 수준이 우수한 정도로 감소됨을 확인하였으며, 특히 IL-6의 발현량은 정상 대조군과 비슷한 정도로 감소됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, KAJA는 염증관련 사이토카인의 단백질 및 mRNA 발현을 감소시킴에 따라, 아토피 피부염의 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0104] **실시예 6. KAJA의 염증세포의 생존율 감소 효과 확인**

[0105] KAJA의 항염증 활성 효과를 확인하기 위하여, RAW 264.7 대식세포의 생존율을 WTS 어세이를 이용하여 분석하였다.

[0106] 구체적으로, RAW 264.7 세포를 1×10^4 세포/웰의 수로 96-웰 배양 플레이트에 분주하였고, 24시간 동안 배양하였다. 이후, 다양한 농도의 KAJA가 존재하거나 존재하지 않는 조건에서, 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 각 세포를 염증상태로 활성화시켰다. 24시간 동안 배양한 후, 10 μ l의 ez-cytox(DOGEN, Korea)를 각 웰에 첨가하였고, 플레이트를 추가의 1시간 동안 암조건에서 배양하였다. 이후, ELISA reader(Versa Max, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 광학밀도를 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 12의 A에서 볼 수 있듯이, KAJA는 LPS를 처리하지 않은 RAW 264.7 세포에 대하여 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 그러나, LPS를 처리하여 염증상태로 활성화된 RAW 264.7 세포에 KAJA를 처리하면, 농도 의존적으로 그 수가 감소함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, KAJA는 염증을 야기하는 세포의 수를 감소시킴으로써 아토피 피부염의 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0108] 한편, 도 12의 B에서 볼 수 있듯이, HMC-1 세포는 염증 야기 물질인 PMA 및 이오노마이신(Ionomycin)이 처리되어도 세포의 수가 증가하지 않음을 확인하였다. 이를 통해, HMC-1 세포는 염증 상태로 활성화 되더라도 세포의 수에는 유의한 변화가 야기되지 않는다는 기존의 연구 결과와 일치함을 확인하였다.

[0109] **실시예 7. 혼합 생약 추출물(KAJA)과 단독 생약 추출물의 염증 감소 효과 비교**

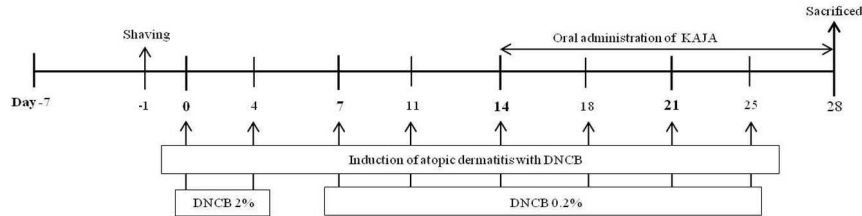
[0110] **실시예 7-1. 염증세포의 생존율 감소 효과 비교**

- [0111] KAJA의 항염증 효과를 확인하기 위하여, 염증상태로 활성화된 HMC-1 비만세포의 생존율 감소에 대한 효과를 KAJA를 구성하는 한약재 단독 추출물과 비교 분석하였다.
- [0112] 구체적으로, 비만세포인 HMC-1 세포에 황백, 맥문동, 형개, 고삼 또는 감초 단독 추출물, 또는 KAJA를 처리한 후, 5 ng/ml의 PMA 및 500 ng/ml의 이오노마이신을 처리하여 각 세포를 염증상태로 활성화시켰다. 24시간 동안 배양한 후, MTT 어세이를 통해 HMC-1의 생존율을 확인하였다.
- [0113] 그 결과, 도 13 및 14에서 볼 수 있듯이, 고삼을 제외한 황백, 맥문동, 형개 또는 감초 단독 추출물은 활성화된 HMC-1 세포의 수에 영향을 미치지 않은 반면, KAJA는 활성화된 HMC-1 세포의 수를 대조군에 비해 유의한 정도로 감소시킴을 확인하였다.
- [0114] **실시예 7-2. 염증세포의 전염증 사이토카인 발현량 감소 효과 비교**
- [0115] KAJA의 항염증 효과를 확인하기 위하여, 전염증 사이토카인의 발현량 감소에 대한 효과를 KAJA를 구성하는 한약재 단독 추출물과 비교 분석하였다.
- [0116] 구체적으로, HMC-1 세포에 황백, 맥문동, 형개, 고삼 또는 감초 단독 추출물, 또는 KAJA를 처리한 후, 5 ng/ml의 PMA 및 500 ng/ml의 이오노마이신을 처리하여 각 세포를 염증상태로 활성화시켰다. 24시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 5-2에 따른 방법으로 PCR을 수행하였다.
- [0117] 그 결과, 도 15에서 볼 수 있듯이, 황백, 맥문동, 형개, 고삼 또는 감초 단독 추출물에 비하여 KAJA는 염증 유발 사이토카인인 IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF- α 의 mRNA 발현량을 현저하게 감소시킴을 확인하였다.
- [0118] 상기 결과를 통해, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 황백, 맥문동, 형개, 고삼 또는 감초 단독 추출물에 비하여, 더 우수한 정도로 염증을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0119] **실시예 8. KAJA의 혼합 비율에 따른 염증 감소 효과 비교**
- [0120] **실시예 8-1. 염증세포의 생존율 감소 효과 비교**
- [0121] 가장 우수한 항염증 활성을 나타내는 황백, 맥문동, 형개, 고삼, 감초의 혼합 비율을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [0122] 구체적으로, 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 각각 1:1:1:2:1 또는 1:1:1:1:2의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물(A1 또는 A2)을 추가로 제조하였다. 이후, 500 μ g/ml의 혼합 생약 추출물이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서, HMC-1 세포에 5 ng/ml의 PMA 및 500 ng/ml의 이오노마이신을 처리하여 각 세포를 염증상태로 활성화시켰다. 24시간 동안 배양한 후, MTT 어세이를 통해 HMC-1 비만세포의 생존율을 확인하였다.
- [0123] 그 결과, 도 16에서 볼 수 있듯이, 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 각각 1:1:1:2:1 또는 1:1:1:1:2의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물(A1 또는 A2)은 활성화된 HMC-1 세포의 수에 영향을 미치지 않은 반면, 1:1:1:1:1로 포함하는 혼합 생약 추출물(KAJA; A)은 활성화된 HMC-1 세포의 수를 대조군에 비해 유의한 정도로 감소시킴을 확인하였다.
- [0124] **실시예 8-2. 염증세포의 전염증 사이토카인 발현량 감소 효과 비교**
- [0125] 가장 우수한 항염증 활성을 나타내는 황백, 맥문동, 형개, 고삼, 감초의 혼합 비율을 확인하기 위하여, 상기 실시예 8-1에 따른 방법과 같이 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 각각 1:1:1:2:1 또는 1:1:1:1:2의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물(A1 또는 A2)을 제조하여 HMC-1 세포에 처리하였다. 이후, 염증상태로 활성화시킨 후, 상기 실시예 5-2에 따른 방법으로 PCR을 수행하였다.
- [0126] 그 결과, 도 17에서 볼 수 있듯이, 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 1:1:1:1:1로 포함하는 혼합 생약 추출물(KAJA; A)은 각각 1:1:1:2:1 또는 1:1:1:1:2의 중량비로 포함하는 혼합 생약 추출물(A1 또는 A2)에 비하여 염증 유발 사이토카인인 IL-4, IL-6, IL-13 및 TNF- α 의 mRNA 발현량을 현저하게 감소시킴을 확인하였다.
- [0127] 상기 결과를 통해, 본 발명의 혼합 생약 추출물은 황백, 맥문동, 형개, 고삼 및 감초를 1:1:1:1:1의 중량비로 포함할 때, 염증 감소 효과가 우수함을 알 수 있었다.
- [0128] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범

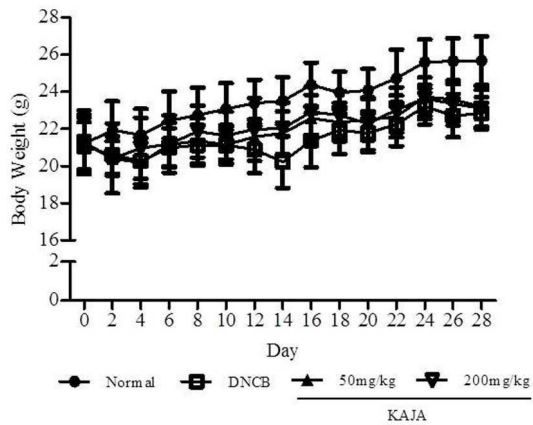
위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

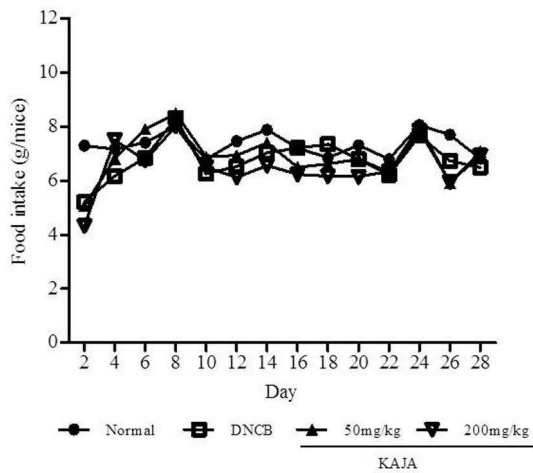
도면1



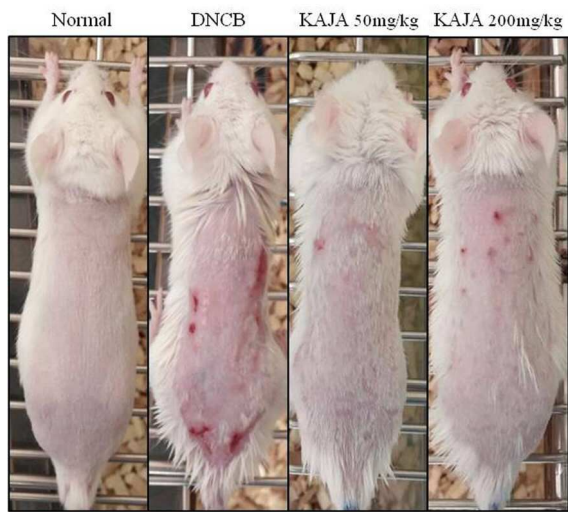
도면2



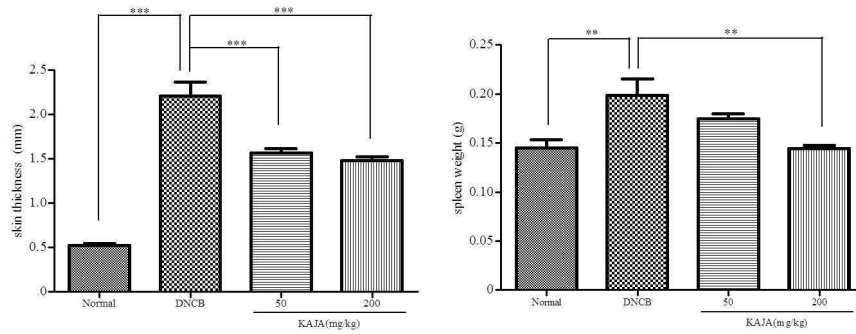
도면3



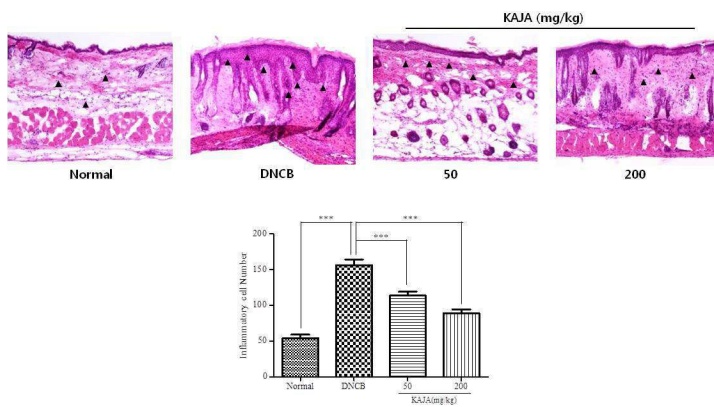
도면4



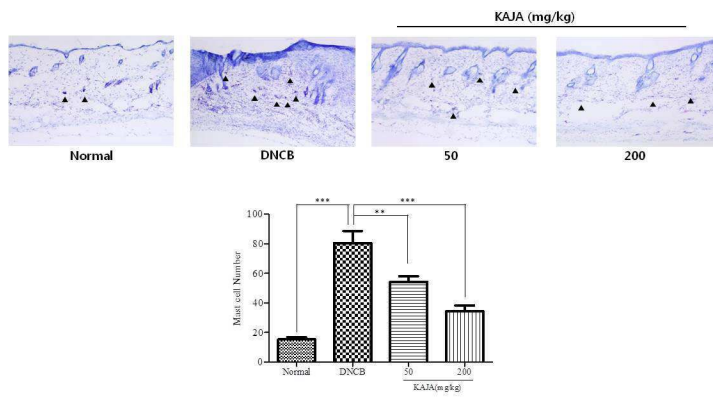
도면5



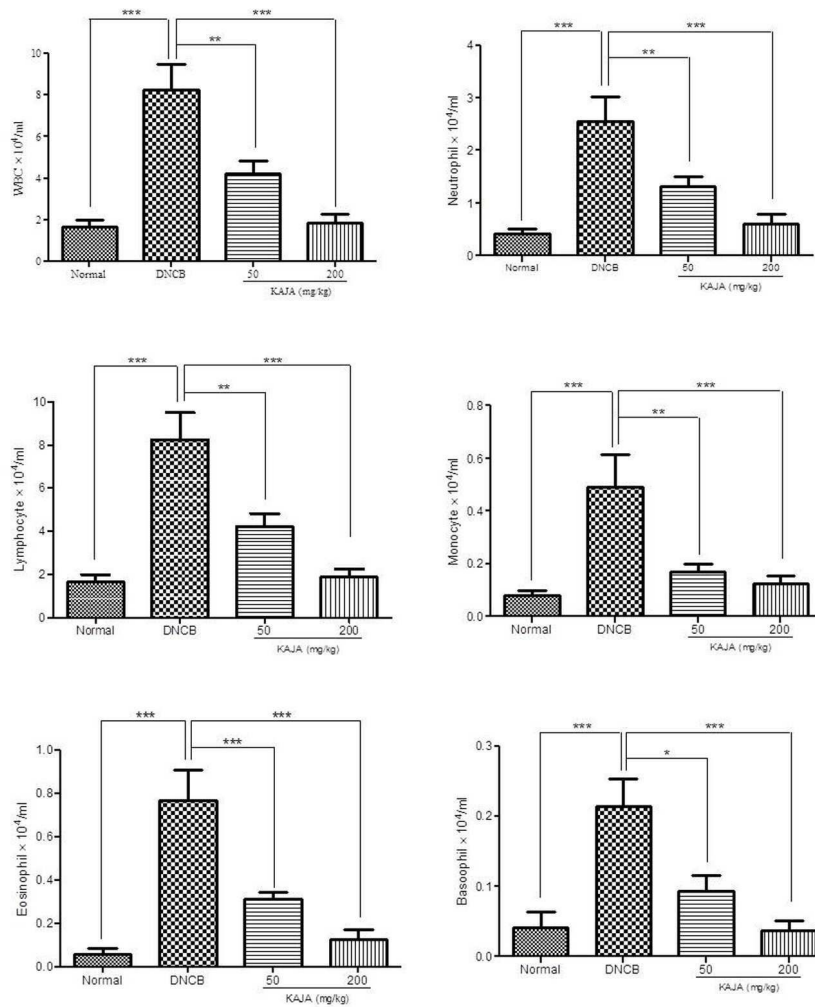
도면6



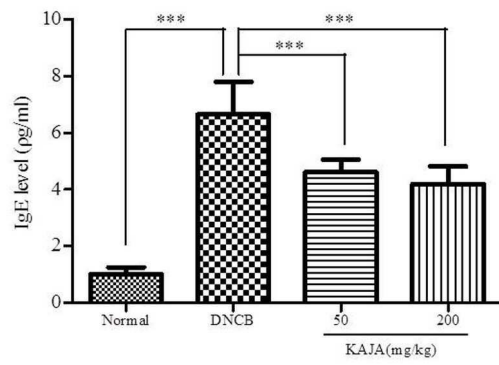
도면7



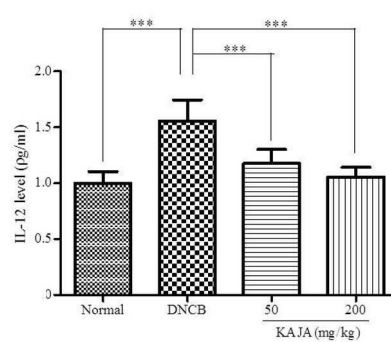
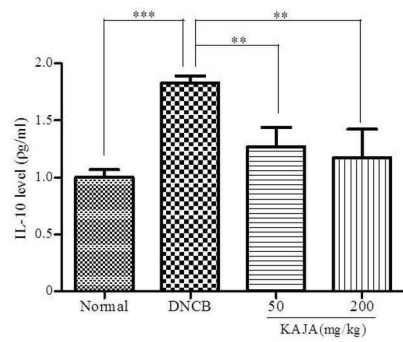
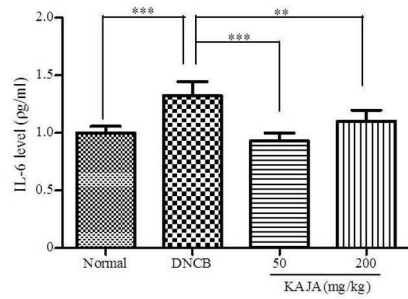
도면8



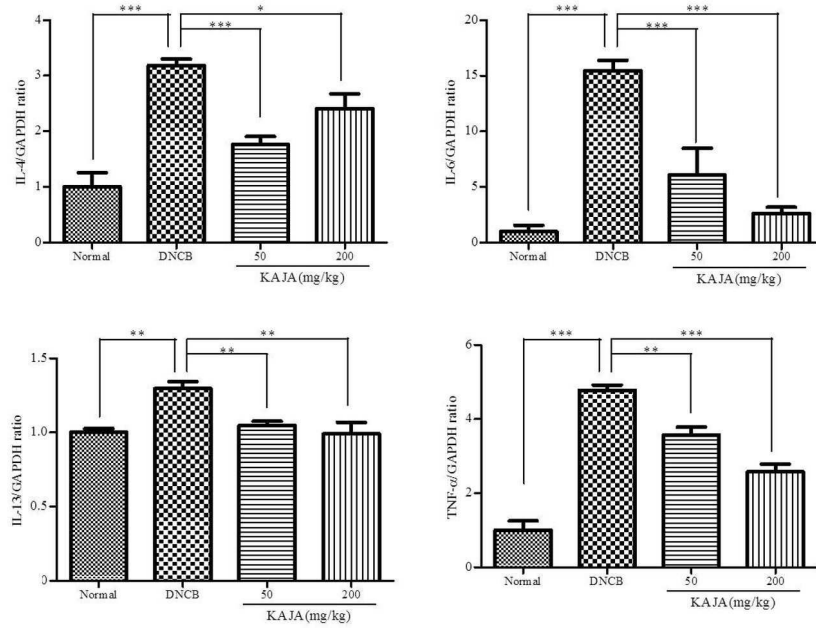
도면9



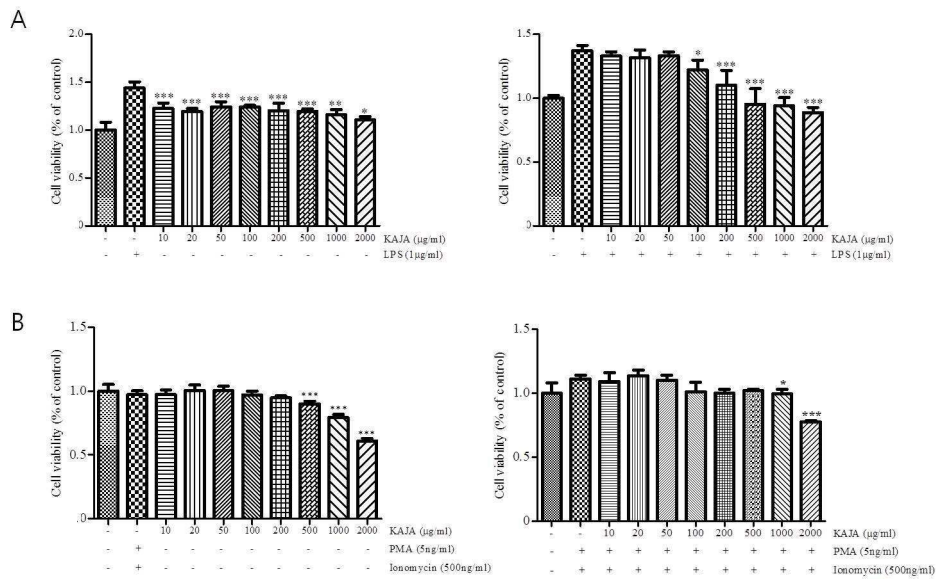
도면10



도면11

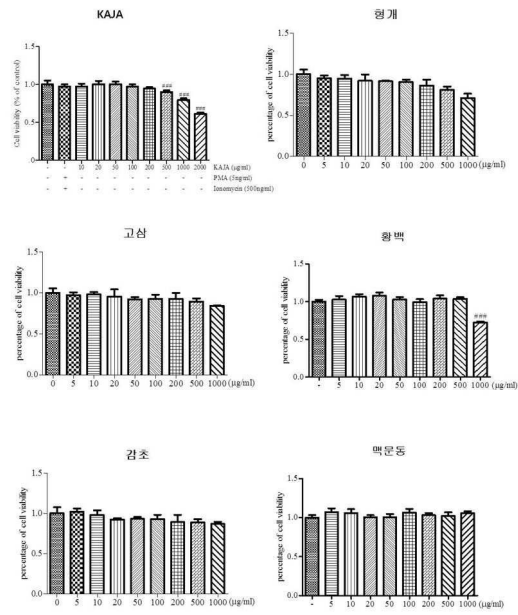


도면12

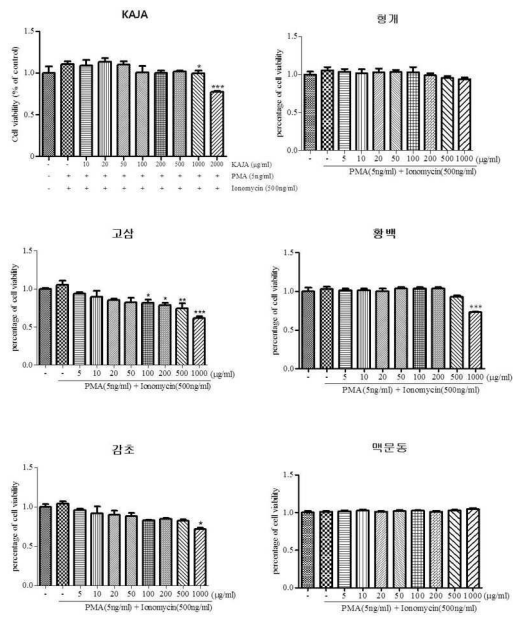


도면13

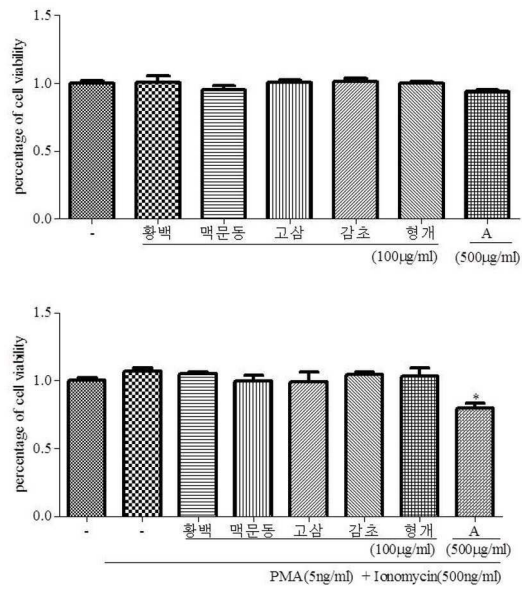
A



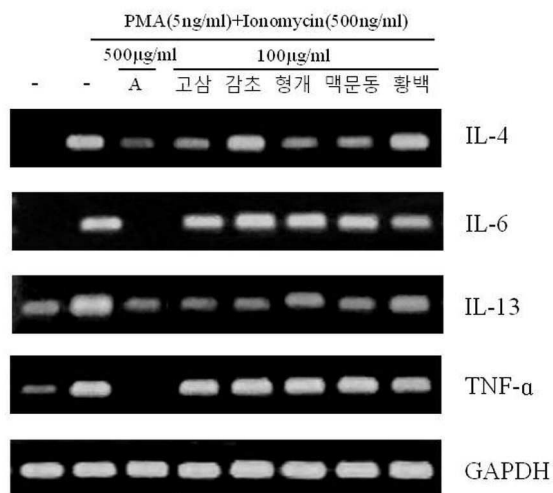
B



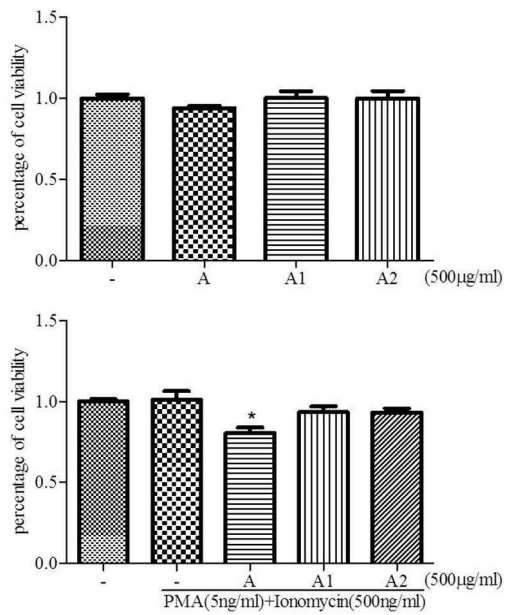
도면14



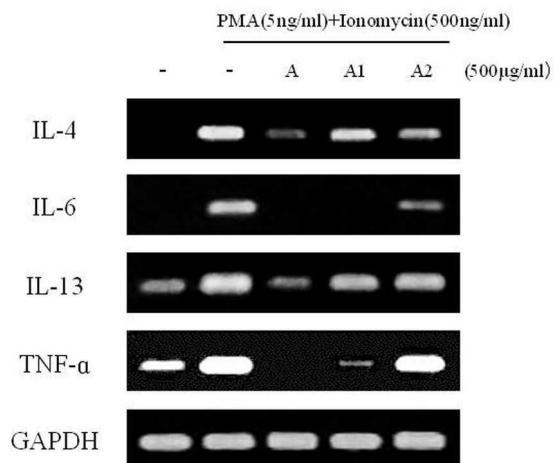
도면15



도면16



도면17



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A composition for treating atopic dermatitis comprising the extract of herbal mixture
- <130> KPA160282-KR
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 forward primer

<400> 1

gcagctgttg atggacctac

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 reverse primer

<400> 2

tccaccacag ttgctgactc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4 forward primer

<400> 3

tcggcatTTT gaacgaggtc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4 reverse primer

<400> 4

gaaaagcccg aaagagtctc

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6 forward primer

<400> 5

caagagactt ccatccagtt gc

22

<210> 6

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 reverse primer
 <400> 6
 ttgccgagtt ctcaaagtga c 21
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-13 forward primer
 <
 400> 7
 cggcagcatg gtatggagtg 20
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-13 reverse primer
 <400> 8
 attgcaattg gagatgttgg tcag 24
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-a forward primer
 <400> 9
 atgagcacag aaagcatgat c 21
 <210> 10
 <211
 > 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-a reverse primer
 <400> 10

tacaggcttg tcactggaat t	21
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH forward primer	
<400> 11	
gaggggccat ccacagtctt c	21
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH reverse primer	
<400> 12	
catcaccatc ttccaggagc g	21