



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월07일

(11) 등록번호 10-1794935

(24) 등록일자 2017년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2017-0051710
- (22) 출원일자 2017년04월21일
 심사청구일자 2017년04월21일
- (56) 선행기술조사문헌
 J. Agric. Food Chem. 2015, 63, 5459-5467*
 Phytother. Res. 26: 1948-1956 (2012)*
 KR1020120103324 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 부산대학교 산학협력단
 부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
- 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
 김형우
 경상남도 양산시 물금읍 오봉로 29, 101동 1101호(범어덕산타운)
- 양버들
 전라남도 목포시 동부로46번길 7 (용당동)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 광희찬

(54) 발명의 명칭 4'-O-메틸알피늄 이소플라본을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 4'-O-메틸알피늄 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 피부 외용제에 관한 것이다. 4'-O-메틸알피늄 이소플라본은 염증성 시토카인 및 케모카인의 생성을 억제함으로써 표피의 이상과증식과 해면화 현상을 억제하고 항염증 작용을 수행할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/498 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

김관희

대전광역시 유성구 은구비남로 56, 901동 1805호
(노은동, 열매마을 아파트 9단지)

이동호

서울특별시 강남구 삼성로 212, 23동 1402호 (대치동, 은마아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201406900004

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터육성사업(기초의과학분야)

연구과제명 건강노화 한의과학 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 부산대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

4'-0-메틸알피늄 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 각화증, 결절성홍반, 땀띠, 비강진, 스트로폴루스, 안창 및 피부염으로 이루어지는 군에서 선택되는 피부 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 치료는 염증성 시토카인 및 케모카인 분비량을 억제하는 것에 의해 달성되는 것인 피부 질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

4'-0-메틸알피늄 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 각화증, 결절성홍반, 땀띠, 비강진, 스트로폴루스, 안창 및 피부염으로 이루어지는 군에서 선택되는 피부 질환 치료용 피부 외용제.

청구항 5

삭제

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 치료는 염증성 시토카인 및 케모카인 분비량을 억제하는 것에 의해 달성되는 것인 피부 질환 치료용 피부 외용제.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 피부 외용제는 외용산제, 외용액제, 연고제, 크림제, 겔제, 경고제, 드레싱제, 패취제 및 스프레이제로 이루어지는 군에서 선택되는 제형으로 제형화되는 것인 피부 질환 치료용 피부 외용제.

청구항 8

4'-0-메틸알피늄 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 각화증, 결절성홍반, 땀띠, 비강진, 스트로폴루스, 안창 및 피부염으로 이루어지는 군에서 선택되는 피부 질환 개선용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 피부 질환 개선용 조성물은 화장료 조성물 또는 식품 조성물인 피부 질환 개선용 조성물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 4'-0-메틸알피늄 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 피부 질환 중 피부염은 흔히 습진이라고도 알려져 있다. 이는 임상적으로 가려움증, 홍반, 비늘과 군집된 구진, 수포를 나타내고, 조직학적으로는 표재성 피부염으로서 표피에는 해면화, 진피에는 혈관주변에 염증세포가 침윤된 염증성 피부반응을 나타내는 피부질환군을 통칭한다. 피부염은 크게 아토피피부염과 접촉 피부염으로 나눌 수 있으며, 접촉 피부염은 습진성 피부염(eczema)의 한 종류로 그 이름에서 알 수 있듯이, 외부 물질과의 접촉에 의하여 발생하는 일련의 피부염을 뜻한다. 접촉 피부염은 다시 자극 접촉 피부염(irritant contact dermatitis)와 알레르기 접촉 피부염(allergic contact dermatitis)의 두 가지 종류로 나눌 수 있다.
- [0003] 이 중 접촉 피부염의 경우 현대사회의 도시화, 공업화로 인한 공해의 증가, 생활 수준 향상 등의 원인으로 발병률이 증가하고 있으며, 직업성 피부질환에서 제일 먼저 언급되는 질병이기도 하다. 또한 대기오염, 식품공해, 흡연인구의 증가, 대형건물 및 지하생활권 확대 등으로 생활 환경이 복잡다단해짐에 따라, 알레르기 질환(알레르기성 비염, 아토피 피부염, 알레르기성 피부염 및 피부면역 관련 염증질환)을 앓고 있는 환자도 최근 급증하고 있다. 2005년 국내에서 International Study of Asthma and Allergies in Childhood(ISAAC) 연구의 설문지를 사용하여 시행된 아토피 피부염 유병률 조사에서는 29.2%의 유병률 값이 조사되어, 1995년의 16.6%에 비해 10%이상 증가한 결과를 보였다.
- [0004] 일반적으로 피부염은 첩포 검사 등을 통하여 유발 물질을 알아내고, 원인 물질과의 접촉을 피하는 것이 가장 좋은 방법이다. 그러나 직업성 피부 질환과 같은 경우는 원인 물질이 밝혀졌다고 할지라도 이를 피하기가 어려워 다양한 약물 치료가 필요하다. 이러한 약물은 항염증 효과를 보이는 경우가 많으며, 가장 대표적인 항염증 제제로 스테로이드를 들 수 있다. 그러나 스테로이드는 몇 가지의 치명적인 부작용을 갖고 있어, 스테로이드 사용을 줄이거나 대체하고자 하는 연구가 시도되고 있다. 어느 정도의 안전성을 확보하고 있는 천연물이나 천연물에서 추출한 유효성분에서 그 해답을 찾고자 하는 시도 역시 이러한 추세에 일종이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 피부 외용제를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 약학적 조성물에 의한 치료는 염증성 시토카인 및 케모카인 분비량을 억제하는 것에 의해 달성된다.
- [0010] 또한, 본 발명은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 피부 질환 치료용 피부 외용제에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명이 제공하는 피부 외용제는 외용산제, 외용액제, 연고제, 크림제, 젤제, 경고제, 드레싱제, 패취제 및 스프레이제로 이루어지는 군에서 선택되는 제형으로 제형화 될 수 있다.
- [0012] 또한, 본 발명은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명이 제공하는 피부 질환 개선용 조성물은 화장품 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명이 제공하는 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 염증성 시토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)의 생성을 억제하고 그 결과 표피의 이상과증식과 해면

화 현상을 억제하여 항염증 작용을 할 수 있다.

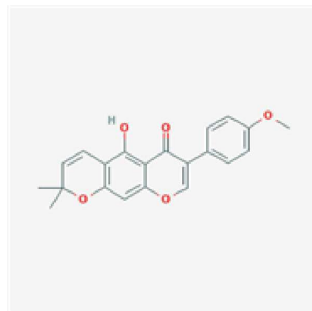
도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 및 알피눔 이소플라본의 세포 독성을 MTT 방법을 이용하여 비교한 결과를 도시한 것이다. A는 악성흑색종 세포, B는 인간 유래 각질화 세포를 이용한 것이다.
- 도 2는 실험의 개괄적인 내용을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 정상군(A), 피부염 대조군(B), 4'-O-메틸알피눔 이소플라본을 투여한 군(C), 텍사메타손을 투여한 군(D)의 피부 표면 증상을 관찰한 것이다.
- 도 4는 실험 마지막 날 생쥐의 등 피부 조직을 절편하여 두께(A)와 무게(B)를 측정한 결과이다.
- 도 5는 생쥐 피부 표면 색조에 미치는 영향을 관찰한 것으로 A는 홍반 지수, B는 멜라닌 지수를 측정한 것이다.
- 도 6은 4가지 실험군의 생쥐들의 조직병리학적 소견을 관찰한 것이다.
- 도 7은 피부염 조직 내의 시토카인 및 케모카인 분비량을 관측한 것으로 A는 TNF- α , B는 IL-6, C는 MCP-1에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 발명자들은 4'-O-메틸알피눔 이소플라본이 다이니트로플로로벤젠(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)에 의하여 유발되는 피부염을 억제한다는 것과, 4'-O-메틸알피눔 이소플라본의 항피부염 기전에는 염증성 시토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)의 생성을 억제함으로써 표피의 이상과증식과 해면화 현상이 억제된다는 사실을 밝혀내어 본 발명을 완성하였으며 이를 실험적으로 증명하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명에서는 4'-O-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 4'-O-메틸알피눔 이소플라본은 하기 화학식 1의 구조를 갖는다:

화학식 1



- [0019]
- [0020] 본 발명에 있어서 “피부 질환”은 피부계통에 영향을 미치는 병을 통칭한다. 상기 “피부계통”은 인체의 전 표면을 포함하는 범위의 기관계로, 피부, 털, 손톱, 발톱, 관련한 근육 및 분비선을 지칭한다. 피부 질환의 구체적 예로는 각화증, 결절성홍반, 땀띠, 비강진, 스트로폴루스, 안창, 피부염 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 피부 질환은 피부염인 것이 바람직하다. 피부염은 초기에 가려움과 함께 물집 구진, 홍반, 부기 등이 관찰되며 만성기에는 부기, 물집이 줄어들어 대신 피부 주름이 두드러지거나 피부가 두꺼워지는 태선화, 비늘, 색소침착 등을 보이는 피부 질환의 일종이다. 피부염은 접촉 피부염, 아토피 피부염 등을 포함한다.
- [0022] 상기 “접촉 피부염”은 외부 물질과의 접촉을 원인으로 국지적인 발진이나 자극을 발생시키는 모든 피부 질환을 통칭한다. 접촉 피부염은 자극 접촉성 피부염, 알레르기 접촉성 피부염, 광접촉성 피부염을 포함한다.
- [0023] 상기 “아토피 피부염”은 아토피 체질인 사람에게 발생하는 피부 병변으로, 원인이 불명인 경우가 많다. 내인

성 습진이라고도 한다.

- [0024] 본 발명의 약학적 조성물은 염증성 시토카인 및 케모카인 분비량을 억제할 수 있다. 4'-0-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 염증성 시토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)의 생성을 억제함으로써 표피의 이상과증식과 해면화 현상을 억제하여 항염증 작용을 수행한다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 과립제, 환제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 좌제 및 산제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 제형으로 제형화될 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 4'-0-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외에도 피부 질환의 치료에 사용될 수 있는 다른 화합물을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물은 일반적으로 약물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제를 포함할 수 있고, 사용될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에이스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐리롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유를 들 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물을 제제화하는 경우 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 웨텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0030] 본 발명에서 “약학적으로 유효한 양”은 질환을 치료하기에 충분하고, 위험은 충분히 낮은 양을 의미하며, 구체적인 값은 투여 대상의 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.
- [0031] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 피부 질환의 치료에 사용되는 종래의 다른 약물과 병용하여 사용할 수 있다. 종래의 다른 약물과 병용하는 경우, 순차적으로 혹은 동시에 투여될 수 있으며, 이는 통상의 기술자에게 용이하게 결정될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 “치료”는 질환의 완치뿐만 아니라, 증세의 부분적 완치, 호전 및 경감을 포함한다.
- [0034] 본 발명은 4'-0-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 질환 치료용 피부 외용제를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 피부 외용제는 외용산제, 외용액제, 연고제, 크림제, 젤제, 경고제, 드레싱제, 패취제 및 스프레이제로 이루어지는 군에서 선택되는 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 피부 외용제는 본 발명의 치료적 효과를 저해하지 않는 범위 내에서, 사용 및 취급이 용이하도록 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 보조제, 착색제, 안정화제, 착향제, 계면활성제, 유분, 보습제, 알코올, 점증제, 산화방지제, pH 조절제, 또는 자외선 차단제 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 4'-0-메틸알피눔 이소플라본 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는

피부 질환 개선용 조성물을 제공한다.

- [0038] 상기 피부 질환 개선용 조성물은 화장료 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [0039] 상기 피부 질환 개선용 조성물이 화장료 조성물로 사용되는 경우, 화장료 조성물에 통상적으로 첨가되는 성분, 예컨대 향산화제, 안정화제, 가용화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수 또는 영양 화장수 등과 같은 화장수, 웨이셜 로션, 바디로션 등과 같은 유액, 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등과 같은 크림, 에센스, 화장연고, 스프레이, 젤, 팩, 선 스크린, 메이크업 베이스, 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션, 파우더, 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 오일과 같은 메이크업 제거제, 클렌징 폼, 비누, 바디 워시 등과 같은 세정제 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이 경우 상기 화장료 조성물은 계면활성제, 유화제, 비누산, 용매, 착색제, 보존제, 향산화제, 소포제, 향균제, 향재침착제, 효소, 식물 또는 미네랄 오일, 지방, 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 보존제, 단백질, 실리콘, 용해화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물, 왁스 등을 포함하는 부형제를 함유할 수 있다.
- [0041] 상기 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0042] 상기 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 토스, 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.
- [0043] 상기 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 가용화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0044] 상기 화장료 조성물의 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, 아가 또는 트라가칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0045] 상기 화장료 조성물의 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, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0046] 상기 피부 질환 개선용 조성물이 식품 조성물인 경우, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0049] 실험예

[0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0052] 통계학적 처리

- [0053] 모든 통계학적 비교는 one way ANOVA test를 통하여 이루어졌고 군간 비교에는 Dunnett test를 이용하였으며, Prism 5 (Ver. 5.01, GraphPad Software Inc., CA, USA)이 사용되었다. 연구의 결과는 평균±표준편차의 형태로 표기 되었으며, P 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.
- [0055] **재료**
- [0056] 6주령된 수컷 Balb/c 생쥐를 샘타코 (인천, 한국)에서 구입하여, 일주일간 실험실환경에 적응시킨 후 온도 및 습도가 조절되는 환경($24\pm3^{\circ}\text{C}$, 12시간 주기 낮-밤)에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다. 실험동물은 정해진 규정에 의하여 다루었으며, 실험 프로토콜은 실험동물 위원회의 승인을 얻었다.
- [0058] 실험예 1. 세포 생존율 측정 실험
- [0059] 세포 생존율은 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 측정방법을 간단히 요약하면, 먼저 악성흑색종 세포와 각질화 세포를 24 well-plate에 5×10^4 /well로 분주하고 다음날까지 배양하여 부착 및 안정화를 시켰다. 다음날 4'-O-메틸알피늄 이소플라본과 알피늄 이소플라본을 다이메틸 설펍사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO)에 녹인 다음 최대 20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, MTT 용액을 첨가하고 4시간 동안 방치한 다음, 570 nm 파장에서 측정하였다.
- [0060] 그 결과 4'-O-메틸알피늄 이소플라본은 악성흑색종 세포 (B16F10, A)와 인간 유래 각질화세포 (HaCaT keratinocyte, B) 모두에서 심한 세포독성을 발견할 수 없었으나, 알피늄 이소플라본의 경우 세포독성이 관찰되었으며, 인간의 정상세포에서 더 심한 세포독성이 관찰되었다. 알피늄 이소플라본의 LD_{50} 은 악성흑색종 (암세포)에서 19.419 $\mu\text{g/ml}$, 각질화세포 (정상세포)에서 14.957 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 따라서, 이하 연구는 상대적으로 저농도에서도 세포독성을 가지고 있는 알피늄 이소플라본을 제외하고 4'-O-메틸알피늄 이소플라본만을 이용하여 진행하였다. 실험예 1의 결과는 도 1로 표시하였다.
- [0062] 실험예 2. 피부염 유발과 실험군 선정
- [0063] 디니트로플루오로벤젠(2,4-dinitroflouorobenzene, DNFB)를 이용한 피부염 유발은 기존 연구의 방법을 변형하여 시행하였다. 간단히 요약하면, DNFB를 아세톤과 올리브유 4:1 비율로 섞은 운반제(A00)에 0.1%로 녹인 다음, 생쥐의 양측 귀에 30 μl 씩 3일간 도포하여 감각하였다. 감각이 끝난 3일 후, 생쥐의 등을 제모하고 1일간 관찰한 후 실험 7일 제부터 2일 1회 (총 4회), 생쥐의 제모된 등에 0.2% DNFB를 50 μl 씩 도포하여 피부염을 유발 하였다. 4'-O-메틸알피늄 이소플라본은 DMSO에 녹여진 다음 0.1% 농도로 A00로 희석하여 6일간 도포 되었으며, 텍사 메타손 (Sigma, MO, USA)을 2.5% 농도로 6일간 도포한 군을 양성대조군으로 사용하였다. 실험의 개괄적인 내용은 도 2와 같다.
- [0065] 실험예 3. 피부 표면 증상 정도 관찰
- [0066] 실험 마지막 날, 피부 표면의 전반적인 증상정도 분석을 위하여 피부염 유발된 생쥐의 등 표면을 디지털 카메라 (Olympus, Japan)로 촬영하였다. 촬영 결과는 도 3과 같다.
- [0068] 실험예 4. 피부 두께와 무게 측정
- [0069] 피부 표면의 증상 정도를 분석한 후, 등 피부 조직 절편의 두께를 버니어 캘리퍼스 (Mitutoyo, Carros, Japan)로 측정하고, 동일한 크기의 (직경 5 mm)의 원형 조각 절편을 만들어 미량저울 (Sartorius, 서울, 한국)에서 무게를 측정하였다. 측정 결과는 도 4와 같다.
- [0070]
- [0071] 실험예 5. 피부 색조 측정
- [0072] 피부염이 유발된 부위의 붉은 정도 (Erythema index)와 검은 정도 (Melanin index)를 피부색차계를 이용하여 측정하였으며, 오차를 보정하기 위해 생쥐 1 마리 당 서로 다른 세 부위를 측정하여 평균값을 해당 생쥐의 값으로 하였다. 측정 결과는 도 5와 같다.
- [0074] 실험예 6. 조직병리학적 소견 관찰
- [0075] 생쥐로부터 적출된 폐 조직은 10% 포르말데히드 용액 내에서 고정된 후, 탈수 과정을 거쳐 파라핀 왁스에 포매되었다. 포매된 조직은 마이크로톰(Leica, Wetzler, Germany)을 이용하여 4 μm 두께로 절편된 다음, 슬라이드 글라스 위에 올려지고, 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)을 이용하여 염색되었다. 염색된 조직은 광학

현미경 (Olympus, Japan)를 이용하여 관찰되었다 ($\times 100$). 관찰 결과는 도 6에 나타난다.

[0077]

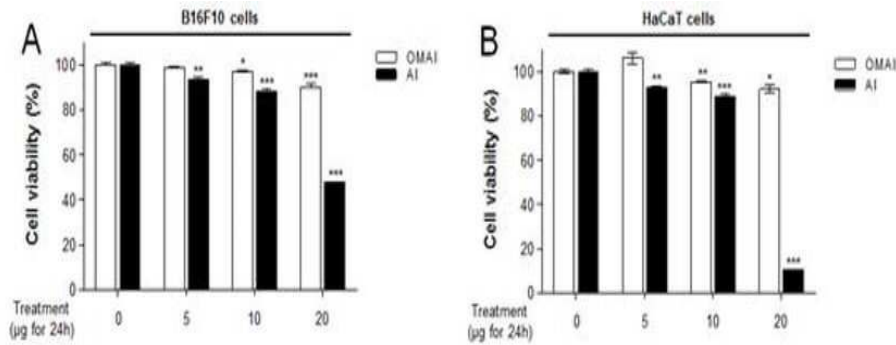
실험예 7. 시토카인 및 케모카인 분비량 관찰

[0078]

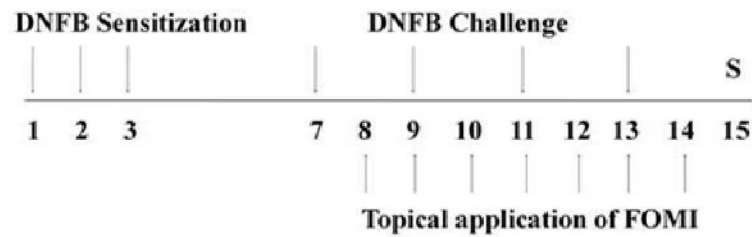
생쥐로부터 채취한 피부 조직을 분해 완충액(lysis buffer)와 조직파쇄기로 갈아서 단백질을 추출하였으며, 추출된 단백질은 BCA 방법을 이용하여 정량되었다. 정량된 단백질에서 TNF- α , IL-6 및 MCP-1의 검출은 혈구 계산 비드 어레이(Cytometric bead array, CBA) 방법을 이용하여 측정되었으며 한 시료 당 50 mg의 단백질을 이용하였다. 측정 결과는 도 7에 나타난다.

도면

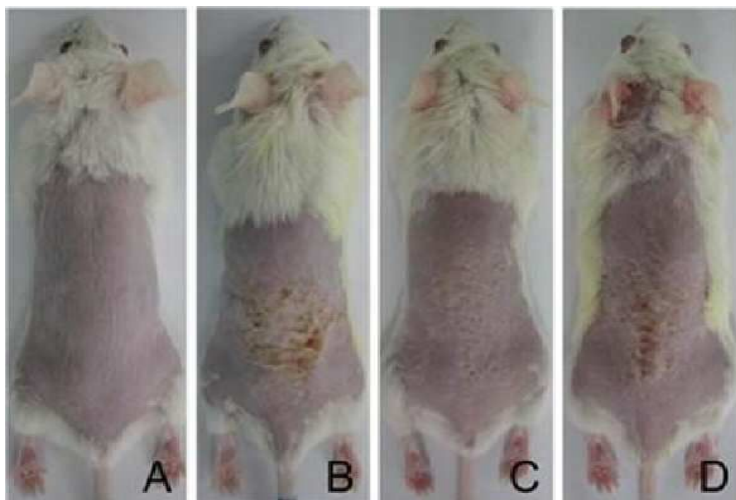
도면1



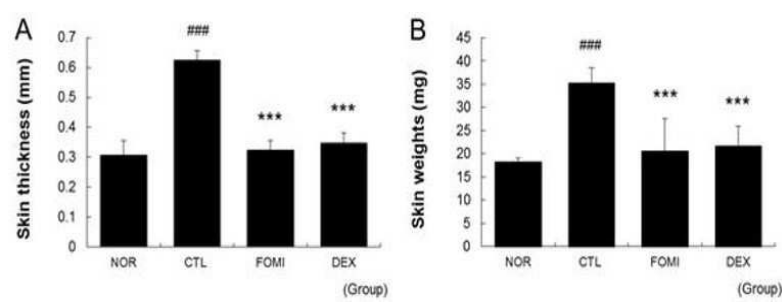
도면2



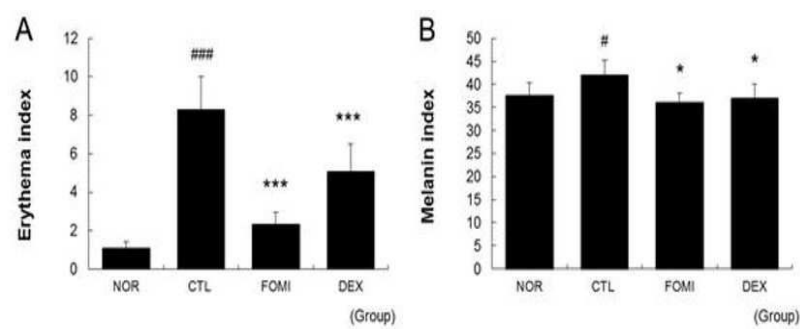
도면3



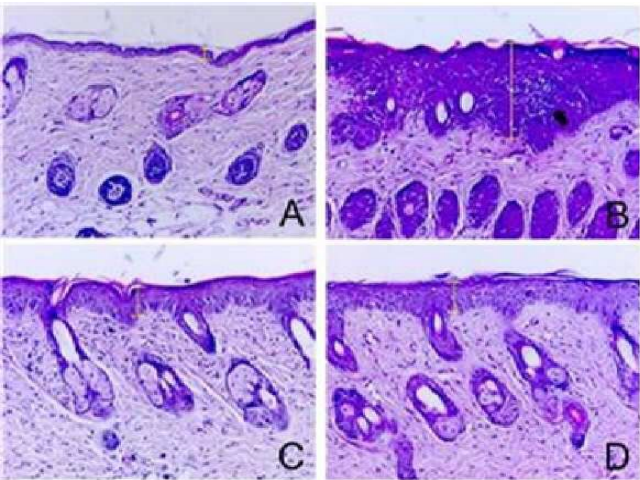
도면4



도면5



도면6



도면7

