



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월18일
(11) 등록번호 10-2034436
(24) 등록일자 2019년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 36/185 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 36/185 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0021280
(22) 출원일자 2018년02월22일
심사청구일자 2018년02월22일
(65) 공개번호 10-2019-0101215
(43) 공개일자 2019년08월30일
(56) 선행기술조사문헌
CN107638478 A*
KR1020060118809 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 에이치피앤씨
서울특별시 강남구 영동대로71길 12 (대치동)
(72) 발명자
최형철
충청북도 청주시 서원구 1순환로1137번길 83, 90
5동 1301호(분평동, 대원아파트)
김홍숙
서울특별시 성북구 성북로4길 52, 112동 1103호(
돈암동, 한신한진아파트)
(74) 대리인
김정수

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 최인선

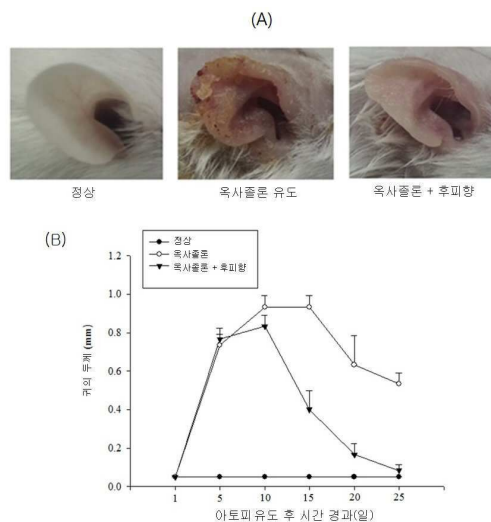
(54) 발명의 명칭 베트남 후피향 추출물을 포함하는 아토피 피부염 치료 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 베트남 후피향(*Ternstroemia Kwangtungensis Merr.*) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 아토피 피부염의 예방 및 개선용 조성물을 제공한다.

본 발명의 베트남 후피향 추출물을 함유하는 조성물은 산화적 스트레스 감소와 관련된 ARE를 유도시키고 Nfr2 유전자 발현을 증가시키며, 염증 유전자 iNOS, COX2, TNF- α 및 TSLP의 발현을 감소시켜 아토피 예방 또는 치료에 우수한 효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명의 조성물은, 후피향 소재의 참신함은 물론, 저자극성의 천연 화장품이면서도 유전자 발현 조절이라는 과학적인 메커니즘을 가져, 기존에 출시된 항아토피 화장품과는 차별화된 우수한 항아토피 기능성 제품으로 사용될 것이라 기대된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0351652

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 첫걸음기술개발사업

연구과제명 아토피 억제 효능을 갖는 후피향 기반 코스메슈티컬 화장품 개발

기 여 율 70/100

주관기관 동국대학교산학협력단

연구기간 2015.11.12 ~ 2016.11.11

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0003751

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 경제협력권산업육성사업-사업화신속지원 비R&D-충북

연구과제명 충북협력산업 사업화신속지원사업

기 여 율 30/100

주관기관 (재)충북테크노파크

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

베트남 후피향(*Ternstroemia Kwangtungensis Merr.*) 잎의 에탄올과 물의 혼합 용매 추출물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 및 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 베트남 후피향 추출물이 0.1~500 $\mu\text{g/ml}$ 로 함유되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 로션, 스킨 소프너, 스킨 토너, 로션, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이크 및 메이크업베이스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

베트남 후피향 잎의 에탄올과 물의 혼합 용매 추출물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 외용제 형태는 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 베트남 후피향(*Ternstroemia Kwangtungensis Merr.*) 추출물을 포함하는 아토피 피부염 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 베트남 후피향 식물의 잎 추출물을 포함하는 아토피 피부염 예방, 개선 및 치료용 화장품 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 아토피 피부염(Atopic Dermatitis)은 과도한 면역 반응에 의하여 생성이 되는 질환으로, 인체 방어 시스템을 자극하는 외부 환경의 각종 감염성 미생물 (세균, 바이러스, 집먼지 진드기 등), 이종 대사물 및 대기 오염 물질 등이 피부에 유입되어 생체의 면역 반응을 자극하여 발생하는 질환이다. 아토피 피부염은 특정 부위의 발진이나 염증이 수반되어 매우 가려운 증상을 나타내며, 영유아에 주로 발병하는 것으로 알려져 있는데, 주로 피부 시험이나 혈액 검사를 통한 알레르기 반응으로 검진을 하고 있다.
- [0003] 피부 아토피 환자는 정상인과 비교하여 피부에서 높은 수분 증발이 일어나며 이로 인한 건조함이 증가하여 피부 각질이 유도된다. 또한 박테리아 또는 알레르기를 일으킬 수 있는 화학적 인자의 피부 내 침입이 일어나 피부에서 강한 알레르기 반응을 촉진하고 이를 통하여 최종적으로 피부 아토피가 발생한다.
- [0004] 아토피 피부염의 복잡한 발생원인 때문에 환자유형에 따라 각기 다른 치료방법이 필요하며, 이에 따라 현재 시장이 커버하지 못하는 심각한 난치 인구에 대한 치료 수요 충족의 필요성이 강조되고 있다.
- [0005] 위와 같은 상황을 고려하여 정부차원에서 아토피 질환극복을 위하여 관련대책을 마련하는 등 관심을 보이고 있으며 아토피 시장에서는 아토피 관련 상품이 호황을 누리고 있고, 특히 화장품 시장에서는 화장품과 의약품의 합성어인 코스메슈티칼(Cosmeceuticals)을 표방하며 아토피 화장품을 출시하고 있다.
- [0006] 기존의 아토피 치료제로서, 저자극성의 천연 화합물 또는 천연 추출물 첨가 제품들이 국내에서 출시되고 있으나, 이들은 세포 메커니즘을 고려하지 않고 경험치에 의존한 것으로 과학적으로 제조된 화장품이라 보기 어렵다.
- [0007] 또한, 단일 성분에 기인한 스테로이드, 면역억제제, 항히스타민제, 항생제 등이 해외에서 출시되고 있으나, 강력한 아토피 치료 효과에 비해, 환자 간의 편차가 크고 내성이 생길 우려가 있었다.
- [0008] 또한, 적극적인 약리 작용이 아닌 보습 효과를 높임으로서 아토피에 작용하는 화장품으로는, 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 또는 콜레스테롤계의 성분을 주로 함유하고 있다. 이러한 화장품은 비록 부작용은 거의 없으나 중증 아토피 피부에 거의 듣지 않는다는 단점이 있었다.
- [0009] 본 발명자들은 기존에 거의 연구가 되어 있지 않은 베트남 후피향 식물 (Ternstroemia Kangtungensis Merr.)의 항아토피 효과를 선행 연구를 통하여 확인하고, 이를 이용한 항아토피성 화장료 또는 피부 외용제를 개발하고자 하였다.
- [0010] 이전에 후피향 나무에 대한 특허출원으로는 후피향 나무의 잎으로부터 분리된 신규 화합물 및 이를 이용한 항산화제(특허문헌 1)에 관한 것이 있으나, 아토피 치료 효과에 대한 내용은 기재되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-0736456호 (2007. 06. 29 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자는 선행 연구에서 베트남 후피향 식물의 추출물이 산화적 스트레스를 감소시키는 ARE(antioxidant response element) 유도 및 Nrf2 유전자 발현 증가 효과를 갖는 것을 발견하고, 이 효과를 이용하는 항염증 및 항아토피 제제를 개발하고자 하여 본 발명에 이르렀다.
- [0013] 따라서, 본 발명은 베트남 후피향 추출물을 포함하는 아토피 예방, 개선 및 치료용 화장료 조성물 및 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] Nrf2는 세포에서 항산화 반응 요소(ARE)라고 하는 특이 서열에 결합하여 아토피 및 여러 질환을 유발하는 산화 스트레스를 제거하는 인자로, 본 발명의 후피향 추출물을 포함하는 조성물은 Nrf2 유전자의 발현을 증가시켜 우수한 아토피 치료 효과를 가질 수 있다.
- [0015] 본 발명자들은 선행 연구에서 렌티바이러스 리포터(lentivirus reporter) 시스템을 이용하여 인간 피부 세포인 HaCaT 세포에서 ARE-루시페라제 활성을 루시페라제 기반으로 모니터링할 수 있는 시스템 및 누드 마우스에서의

아토피 유발 방법을 확립하였고, 본 발명에서는 이를 이용하여 후피향 추출물의 Nrf2 유전자 발현 증가 및 동물 모델 수준에서의 아토피 개선 효과를 확인하고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 베트남 후피향 추출물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0017] 일 실시예에서, 상기 후피향 추출물은 후피향 식물의 잎 추출물일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에서, 상기 후피향 추출물은 물, C₁₋₄ 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택된 1종의 용매 추출물일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에서, 상기 화장품 조성물은 베트남 후피향 추출물을 0.1~500 µg/ml로 함유할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에서, 상기 화장품 조성물은 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 로션, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케어크 및 메이크업베이스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한 베트남 후피향 추출물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0022] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화될 수 있다.
- [0024] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물의 외용제 제형은 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 베트남 후피향 추출물을 유효 성분으로 함유하는 조성물은 산화적 스트레스 감소와 관련있는 ARE를 유도하고 Nrf2 유전자 발현을 증가시키며, 염증 유전자 iNOS, COX2, TNF-α 및 TSLP의 발현을 감소시켜 아토피 치료에 우수한 효과를 나타내었다.
- [0026] 따라서, 본 발명의 조성물은 후피향 소재의 참신함은 물론, 저자극성의 천연 화장품이면서도 유전자 발현 조절이라는 과학적인 메커니즘을 지녀, 기존에 출시된 항아토피 화장품과는 차별화된 우수한 항아토피성 제제로서 널리 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 일반 피부와 아토피성 피부의 차이에 대해 나타낸 것이다. 도 1(A) 및 도 1(B)는 보통 피부와 아토피성 피부의 피부 장벽의 차이 및 이에 의한 증상을 나타낸 것이다. 도 1(C)는 아토피 피부염의 통상의 원인에 대해 나타낸 것이고, 도 1(D)는 아토피에 의한 표피층 내부에 대한 영향을 나타내었고, 도 1(E)는 아토피 피부염의 환부를 나타낸 것이다.

도 2는 후피향 식물 잎의 50% 에탄올 추출물을 사용한 세포 독성 시험 결과이다. 도 2(A)는 HaCaT 세포주에 대한 후피향 추출물(0~200 µg/ml)의 세포 독성 시험 결과를 나타내며, 도 2(B)는 LPS로 염증을 유발한 마우스 대식 세포주 Raw 264.7에 대한 후피향 추출물의 농도별(0~200 µg/ml) 세포 독성 시험 결과를 나타낸다. 대조군은 LPS를 처리하지 않은 세포이다.

도 3은 상기 후피향 잎 추출물의 아토피 억제 유전자의 mRNA 발현에 대한 영향을 나타내는 그래프이다(실시간 PCR). 도 3(A) 내지 (C)에서 후피향 식물 잎 추출물은 차례로 Nrf2, HO-1 및 NQO1 유전자 발현을 증가시킴을 알 수 있다.

도 4는 LPS로 염증 유발된 세포에서의 후피향 추출물의 농도별 영향을 나타낸 그래프이다(실시간 PCR). 도 4(A) 내지 (D)에서 후피향 식물 잎 추출물은 차례로 iNOS, COX-2, TNF-α 및 TSLP 유전자 발현을 증가시킴을 알 수 있다.

도 5는 후피향 추출물의 아토피 억제 및 항염증 유전자 단백질 발현에 대한 영향을 나타내는 웨스턴 블로팅 결과이다. 도 5(A)는 후피향 추출물이 아토피 억제 Nrf2, HO-1 및 NQO1 유전자에 대해 시간의 경과에 따라 단백질 발현을 증가시키고, 도 5(B)는 LPS 염증 유발된 세포에서의 후피향 추출물의 염증 억제 iNOS, COX-2 단백질 발현 증가 효과를 나타낸다.

도 6은 후피향 추출물의 Nfr2 유전자에 대한 루시페라제 시험(luciferase assay) 결과에 관한 것으로, 도 6(A)는 상기 루시페라제 시험에 사용된 벡터의 구조를 나타낸 것이고, 도 6(B)는 후피향 추출물의 각 부위(줄기, 잎)의 추출 방법 및 사용 농도에 따른 Nfr2 발현 정도를 나타낸 그래프이다. 대조군은 아무 것도 처리하지 않은 HaCaT 세포이고, SFN은 브로콜리 추출물인 설포라판(sulforaphane)으로, 강한 항산화능을 갖는 공지 물질이다.

도 7은 옥사졸론(oxazolone)으로 아토피 유도된 누드 마우스 모델에서의 후피향 추출물의 아토피 억제 효과를 나타내는 것으로, 도 7(A)는 실제 아토피 유도된 마우스 모델의 귀(ear) 사진이며, 도 7(B)는 후피향 추출물을 처리한 후 시간 경과에 따른 상기 아토피 마우스 귀 두께의 변화 추이를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 베트남 후피향 추출물을 포함하도록 제조된 크림의 입도 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 베트남 후피향 추출물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0029] 베트남 후피향은 우리나라 남해안 제주도, 중국, 일본, 필리핀, 베트남 등에 자생하는 상록 활엽수로, 붉은 열매가 아름답고 잎이 윤택이 나며 온도나 채광에 따라 붉게 물들기도 하여 주로 정원수나 관상용 나무로 사용되었다. 후피향은 급제 및 치질에 대한 약용되고 있으며, 후피향 잎에 항산화 성분이 포함된 것으로 알려져 있다.
- [0030] 아토피 피부염은 과도한 면역 반응에 의하여 생성이 되는 질환으로, 건조함이 증가하여 피부 각질이 유도된다. 또한 박테리아 또는 알레르기를 일으킬 수 있는 화학적 인자의 피부 내 침입이 일어나 피부에서 강한 알레르기 반응을 촉진하고 이를 통하여 최종적으로 피부 아토피가 발생한다.
- [0031] 일 실시예에서, 상기 후피향 추출물은 후피향 식물의 잎 또는 줄기 추출물, 바람직하게는 잎 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 일 실시예에서, 상기 후피향 추출물은 물, C₁₋₄ 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택된 1종의 추출 용매로 추출하는 단계를 포함하는 추출 공정을 수행하여 얻어질 수 있고, 바람직하게는 50% 에탄올의 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 추출 공정은 후피향의 중량에 대하여 약 5배 내지 30배, 바람직하게는 약 10배 내지 20배, 가장 바람직하게는 15배의 상기 추출 용매, 바람직하게는 50% 에탄올로 추출함으로써 수행할 수 있고, 상기 추출은 20~100 °C의 온도, 바람직하게는 40~60 °C의 온도에서 1~10 시간 동안, 바람직하게는 2~5 시간 동안 추출하였다. 추출 방법은 냉침, 열수 추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등 통상의 용매 추출에 사용되는 방법이면 제한되지 않는다.
- [0034] 상기 추출 용매로 추출을 수행하여 얻어진 추출물은 여과하여 불순물을 제거한 액상 형태의 추출물을 통상의 방법에 따라 감압 농축 및/또는 건조하여 분말 형태로 얻을 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 추출공정은 필요에 따라, 유효성분의 함량이 높은 분획을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 추출 공정은 상기 1차 추출용매로 추출하여 얻어진 추출물을 물에 분산시킨 후, 수포화 부탄올(2차 추출 용매)로 추출하는 단계를 추가로 포함함으로써, 얻어지는 추출물 중의 유효성분 함량을 더욱 높일 수 있다.
- [0036] 일 실시예에서, 상기 화장품 조성물은 베트남 후피향 추출물을 0.1~500 µg/ml, 바람직하게는 20~200 µg/ml로 함유할 수 있다.
- [0037] 일 실시예에서, 상기 화장품 조성물은 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 로션, 스킨 소프너, 토너, 로션, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케어 및 메이크업베이스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0038] 상기 화장품 조성물은 높은 안정성, 보습 효과, 매우 작은 입자로 피부 흡수가 뛰어나 유효 성분에 의한 피부

개선 효과가 매우 우수하며, 피부 장벽 기능을 극대화시켜 보습력이 우수하다.

- [0039] 본 발명은 또한 베트남 후피향 추출물을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0040] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제, 바람직하게는 외용제의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0042] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물의 외용제 제형은 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.
- [0043] 일 실시예에서, 상기 약학 조성물은 베트남 후피향 식물 잎의 50% 에탄올 추출액을 전체 중량을 기준으로 20~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 함유되는 것일 수 있다.
- [0045] 이하에서 실시예 및 제조예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 이하의 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시할 뿐 본 발명의 권리범위를 한정하기 위한 것이 아니다.
- [0046] <실시예>
- [0047] 후피향 추출물의 제조
- [0048] 한국생명공학연구원에서 입수한 베트남 후피향(*Ternstroemia kwangtungensis* Merr.)의 잎에 중량 기준으로 15배의 정제수 또는 50% 에탄올을 첨가하고, 50℃ 3시간 동안 추출한 후, 0.3 μm 필터로 여과하여 60℃에서 농축하고형분을 얻었다. 0.5 중량%의 상기 농축 고형분에 30 중량%의 1,3-부티렌 글리콜을 첨가 및 희석하여 0.22 μm 필터로 여과한 것을 이하의 실험예 및 제조예에 사용하였다.
- [0050] <실험예>
- [0051] [실험예 1: 세포 독성 평가]
- [0052] 세포 배양
- [0053] 대식세포주인 RAW 264.7는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지를 이용하고, 상피세포주인 HaCaT는 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지를 이용하여, 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 70~80%의 밀집도로 배양하였다. 상기 배지들에는 항생제로서 페니실린(100 IU/ml) 및 스트렙토마이신(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하였다.
- [0055] 세포 생존률(cell viability) 실험
- [0056] 베트남 후피향 추출물의 세포 생존에 미치는 효과를 알아보기 위해, MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 시험법을 이용하여 분석하였다. 96-웰 플레이트에 1×10⁶개의 HaCaT 세포를 플레이트링(plating)한 후, 37℃에서 대조군(무처리), 50, 100 및 후피향 50% 에탄올 추출물(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 0, 24 및 48 시간 동안 처리하여 CO₂ 배양기에서 배양한다. 이후 100 μl MTT 용액 (스톡 농도: 5mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가 반응을 유도하였다. 반응 종료 및 포르마잔 결정(formazan crystal)의 용해를 위해, 각 웰에 100 μl MTT 정지 용액(0.01M HCl 중의 10% 소듐 도데실 설페이트)을 추가로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 포르마잔으로 환원된 양을 570nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD₅₇₀ 값을 통해 산출하였다.
- [0057] 또한, 마우스 대식세포주 Raw 264.7을 이용하여 상이한 농도(0, 20, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 후피향을 1시간 전 처리한 후, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 처리하고 24시간 배양하여 상기의 방법에 따른 MTT 시험도 실시하였다.
- [0059] [실험예 2: Nfr2 및 염증 관련 유전자의 발현 평가]
- [0060] 실시간-PCR을 이용한 mRNA 수준 평가
- [0061] 상기 배양된 HaCaT 세포에 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 후피향 추출물을 처리하여 각각 0, 2, 4 및 8 시간 후, HaCaT 세포로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 상기 제조된 cDNA에 Nfr2, HO-1 및 NQO1 유전자-특이적인 각각의 프라이머, 프로브 및 효소 등을 포함하는 시약을 첨가한 후, 염기 서열 탐지 시스템 장비(BIO-RAD, CFX384™ Optics Module)를 이용하여 기준 유전자 대비 표적 유전자의 발현량을 분석하였다. 각 유전자의 Ct(threshold cycle)와

기준 유전자(예를 들어, β -액틴)의 Ct를 이용하여, 해당 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.

[0062] 또한, Raw 264.7 세포에 상이한 농도(0, 20, 50, 100 및 200 μ g/ml)의 후피향을 1시간 전처리한 후, 2 μ g/ml의 LPS를 처리하고 24시간 배양하여 염증을 유도한 후, 상기의 방법으로 iNOS, COX2, TNF α , TSLP 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.

[0064] 웨스턴 블로팅에 의한 단백질 발현 분석

[0065] 상기 HaCaT 세포에 200 μ g/ml의 후피향 추출물을 처리하여 각각 0, 6, 12 및 24 시간 경과 후, HaCaT 세포로부터 아토피 및 염증 관련 단백질을 추출하여 이하의 웨스턴 블로팅에 제공하였다. BCA 키트 (Bio-Rad, Hercules)를 이용하여 아토피 관련 Nfr2, OH-1, NQO1 단백질 및 염증 관련 iNOS, COX2 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 PVDF 멤브레인(Bio-Rad)에 트랜스퍼하였다. 블롯은 5% 탈지 분유(skim milk)로 1시간 동안 블로킹한 후, 상기 단백질들의 일차 항체를 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시켰다. HRP가 결합된 이차 항체 (Santa Cruz)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL(GE healthcare Life Science)을 이용하여 화학발광법 (chemiluminescence, 후지 필름)으로 밴드를 확인하였다.

[0066] 또한, Raw 264.7 세포에 후피향을 1시간 전처리한 후, 2 μ g/ml의 LPS를 처리하고 24시간 배양하여 염증을 유도하고, 상기와 같은 방법으로 염증 마커 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 웨스턴 블로팅에 의해 확인하였다.

[0068] [실험예 3: 후피향 식물의 부위별 및 농도별 Nfr2 활성화도 시험]

[0069] 후피향을 부위별(줄기, 잎)의 정제수 또는 50% 에탄올 추출물에 대해, HaCaT-ARE-GFP-루시페라제 세포를 이용한 루시페라제 시험(Luciferase Assay)으로 상기 후피향의 줄기 또는 잎의 정제수 또는 에탄올 추출물에 대한 Nrf2 활성도를 각각 시험하였다. 브로콜리순 추출물인 설폴라판(Sulforaphane, SFN)은 양성 대조군으로, 70% 이상의 활성 유도 효과를 갖는 것으로 나타났다.

[0071] [실험예 4: 동물 모델에서의 후피향 추출물의 아토피 치료 효과 분석]

[0072] 아토피 피부염 동물 모델

[0073] 6주령의 BALB/C 마우스의 귀에 옥사졸론(oxazolone)(아세톤에 5%로 녹여 20 μ l씩 도포함)을 투여하여 아토피 피부염을 유도하고, 정상 마우스(음성 대조군), 옥사졸론 유도 아토피 마우스(양성 대조군) 및 옥사졸론 투여 후 상기 후피향 추출물을 투여한 실험군에 대한 마우스 귀의 두께를 측정하여, 아토피 치료 효과를 평가하였다.

[0075] <결과 및 논의>

[0076] 후피향 추출물의 세포 독성

[0077] MTT 시험을 통한 세포 독성 측정 결과, 후피향 추출물은 200 μ g/ml 농도 이하에서는 HaCaT 세포에 대해 투여 48시간 후까지는 세포 독성을 나타내지 않았다(도 2(A) 참고). 또한, LPS에 의해 염증이 유발된 Raw 264.7 세포에 대해서도 200 μ g/ml 농도 이하의 후피향 추출물에서 세포 독성을 나타내지 않았다(도 2(B) 참고).

[0079] 후피향 추출물의 Nrf2 및 염증 인자의 mRNA 발현 효과

[0080] 산화적 스트레스 감소와 관련 있는 Nrf2 및 Nrf2의 전사인자 그리고 염증 마커들을 이용해 mRNA 발현이 어떻게 조절되는지 RT-PCR을 통하여 시험하였고, HaCaT 세포에서 후피향 추출물에 의하여 Nrf2 및 전사인자들의 mRNA 레벨이 증가한다는 것을 확인하였다(도 3 참고). 후피향 추출물이 염증 반응을 매개로 하는 iNOS, COX-2, TNF α , TSLP의 mRNA 발현을 저해하는 결과를 나타내었고(도 4 참고), 이를 통해 후피향 추출물이 항염 효과를 지닌 천연물질로서 가치가 있다는 것을 확인하였다.

[0082] 3. 후피향 추출물의 Nrf2 및 염증 인자의 단백질 발현 효과

[0083] 아토피 피부염을 유발하는 산화적 스트레스를 제거함으로써 아토피 억제 효과를 갖는 후피향 추출물의 메커니즘 검증에 의해, Nrf2 및 이와 관련된 전사인자들의 단백질 발현 정도를 HaCaT 세포주 모델을 이용하여 웨스턴 블로팅으로 확인하였다.

[0084] 또한, 마우스 대식세포주 Raw 264.7을 이용하여 후피향을 1시간 전처리한 후, 2 μ g/ml의 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하고 24시간 배양하여, LPS만을 처리한 대조군과 비교하였다(도 5(A)). 마찬가지로, 염증 마커로 많이 알려진 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 웨스턴 블로팅으로 확인하였다(도 5(B)).

[0086] 4. 루시페라제 시험을 이용한 Nrf2 활성 평가

[0087] 루시퍼라제 시험을 이용한 Nrf2 활성 평가 결과, 후피향의 잎을 에탄올(50%) 용매를 사용하여 추출한 추출물이 200 μ g/ml의 농도에서 현저하게 높은 반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 6(B)).

[0088] Nrf2의 활성의 증가는 외인성 활성 산소 및 피부 내에서 생성된 내인성 활성 산소를 phase II 효소의 유도를 통해 적극적으로 제거함으로써 피부를 보호할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 후피향 잎의 50% 에탄올 추출물은 Nrf2의 활성이 현저히 증가되었으므로, 산화적 스트레스를 제거하여 아토피 치료 및 예방 효과가 있을 것으로 기대된다.

[0090] 5. BALB/C 마우스를 이용한 아토피 치료 효과

[0091] BALB/C 마우스의 귀에 옥사졸론을 이용하여 피부 아토피를 유도한 후, 후피향의 50% 에탄올 추출물에 의한 항아토피 효과를 확인하였다. 도 7(A)에 나타난 바와 같이 후피향 추출물을 투여한 경우 외관상 귀의 염증이 매우 완화되었고, 도 7(B)에 나타난 바와 같이 아토피 유도 10일 경과 후부터 귀의 두께가 현저히 감소되어 항아토피 효과를 확인할 수 있었다.

[0093] <제조예: 후피향 추출물을 포함하는 크림의 제조>

표 1

성분	합량 (중량%)
정제수	40.6900
글리세린	30.0000
아데노신	0.0400
1,2-헥산디올	2.0000
소듐스테아로일글루타메이트	1.0000
나이아신아미드	2.0000
디메치콘	6.0000
밍크 오일	5.0000
이소세틸스테아레이트	5.0000
이소노닐이소노나노에이트	3.0000
스테아릴헵타노에이트	2.0000
피토스테롤	0.1000
올리고펩타이드-2	0.1000
향료	0.0700
후피향 추출물	3.0000
합계	100.000

[0095] 상기 표 1의 조성에 따라, 정제수, 글리세린, 아데노신, 1,2-헥산디올, 소듐스테아로일글루타메이트 및 나이아신아미드를 혼합하고 60~80 $^{\circ}$ C에서 용해하여 수상을 제조하는 한편, 디메치콘, 밍크오일, 이소세틸스테아레이트, 이소노닐이소노나노에이트 및 스테아릴헵타노에이트를 혼합하고 60~80 $^{\circ}$ C에서 용해하여 유상을 제조하였다. 상기 제조된 수상 및 유상에 추가로 피토스테롤, 올리고펩타이드, 향료 및 후피향 추출물을 표 1의 조성이 되도록 투입하고, 60~80 $^{\circ}$ C, 800~900 RPM 조건에서 호모 믹서로 처리하여 1차 에멀전을 제조한다. 그 후, 상기 1차 에멀전을 30~35 $^{\circ}$ C, 3,000~3,500 RPM 조건에서 고압 균질기를 통과시켜 나노에멀전을 제조한다.

[0096] 상기와 같이 제조된 본 발명의 후피향 추출물을 함유하는 크림은 높은 안정성, 보습 효과, 매우 작은 입자로 피부 흡수가 뛰어나 유효 성분에 의한 피부 개선 효과가 매우 우수하고, 맑고 투명한 제형을 제공한다. 피부 피지 성분과 유사한 베이스오일이 피부 장벽 기능을 극대화시켜 보습력이 우수하다.

[0098] [실험예 5: 안정성 평가]

[0099] 입도 평가

[0100] 상기 제조된 본 발명의 크림 제형을 입도분석기(Microtrac.)를 이용하여 분석한 결과, 평균 입도는 40~50nm로 측정되었다.

[0102] 피부 첩포 안전성 평가

[0103] 만 20세에서 55세의 성인 남녀 30명을 대상으로, 한방바이오산업 임상지원센터에서 본 발명의 후피향 추출물 및 이를 포함하는 크림에 대해 피부 안정성 시험을 실시하였다.

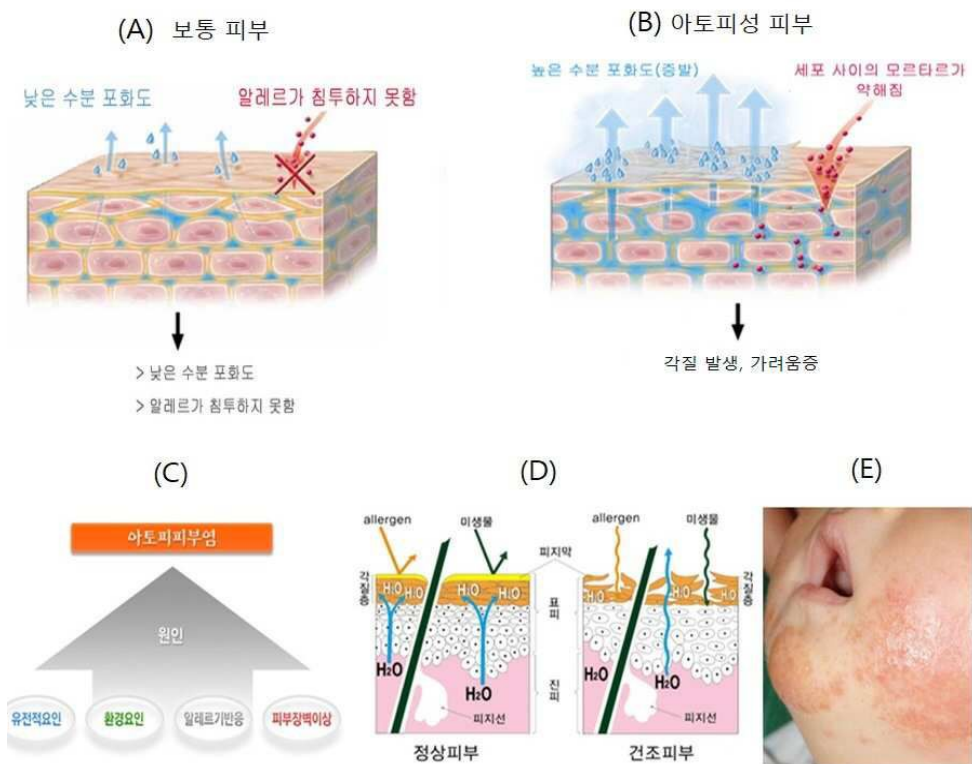
[0104] 측정 조건을 동일하게 하고자 시험 부위를 깨끗하고 마른 상태로 유지하였으며 최소 30분간 항온항습(22±2℃, 상대습도 40~60%)이 유지되는 곳에서 피부 안정을 취한 후 진행하였다. 시험부위를 70% 에탄올로 닦아낸 뒤 건조시킨 본 발명의 후피향 및 추출물 및 이를 포함하는 크림을 25 μ l씩 핀 챔버(Finn Chamber)에 적하시킨 후 피험자의 등 부위에 얹어 고정시켰다. 첩포는 24시간 후 제거하였으며, 첩포를 제거한 후에는 시험부위를 표시하여 30분, 24시간, 48시간 경과 후에 시험부위를 관찰하였다.

[0105] 본 발명의 후피향 및 추출물과 이를 포함하는 크림의 안전성 평가 결과, 평균 피부반응도는 0.00으로 2종의 시료가 모두 "무자극"으로 판정되었다.

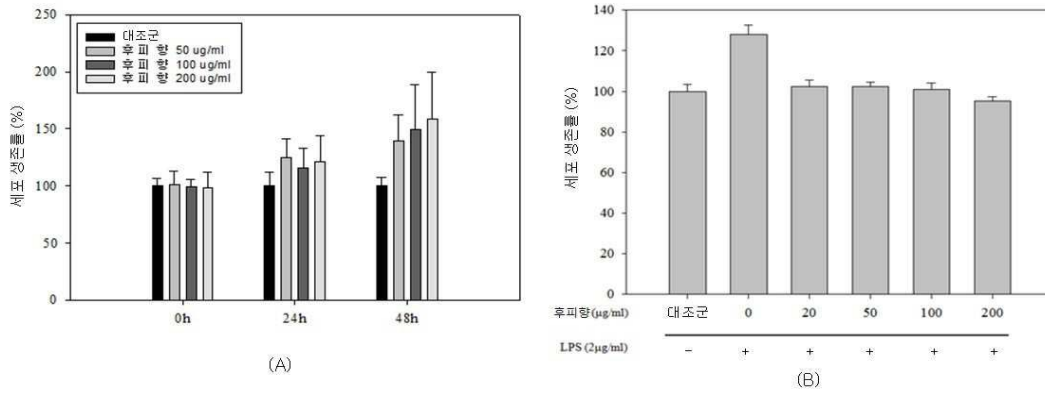
[0107] 상기 결과들을 종합하며, 본 발명의 후피향 및 50% 에탄올 추출물은 산화적 스트레스를 감소시키는 Nfr2 및 관련 전사 인자의 유전자 발현을 증가시키고, 염증 관련 iNOS, COX2, TNF α 등의 유전자 발현을 감소시켜, 우수한 아토피 억제 및 항염증 효과를 가질 것으로 기대된다. 또한, 상기 후피향 및 추출물을 포함하는 크림 제형은 입도 변화가 적고 피부에 무자극한 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 후피향 추출물을 포함하는 화장료는 후피향 소재의 참신함은 물론, 우수한 항아토피 효과를 갖는 저자극성 천연 화장료로 화장품 시장에서 수요가 높을 것으로 기대된다. 또한, 상기 후피향 추출물은 화장료 이외에도, 완치가 어려운 아토피 피부염의 특성상 아토피 피부염 치료 또는 예방을 위한 피부 의용제 용도로도 유망할 것으로 보인다.

도면

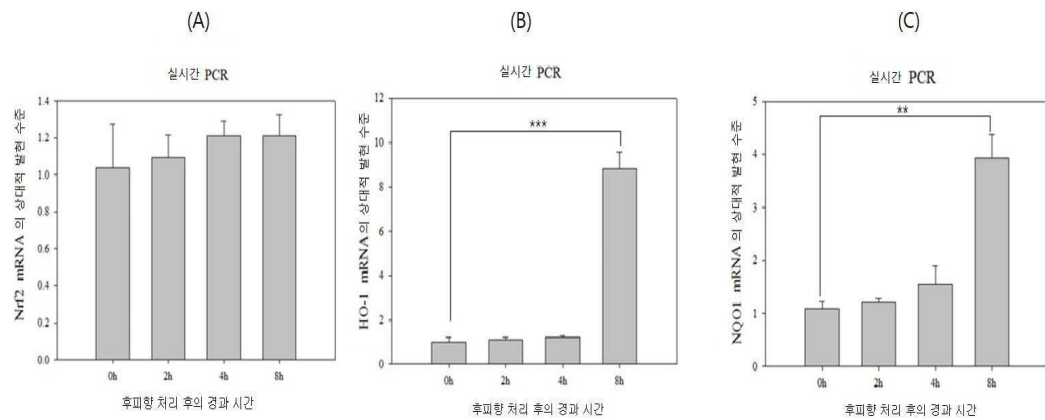
도면1



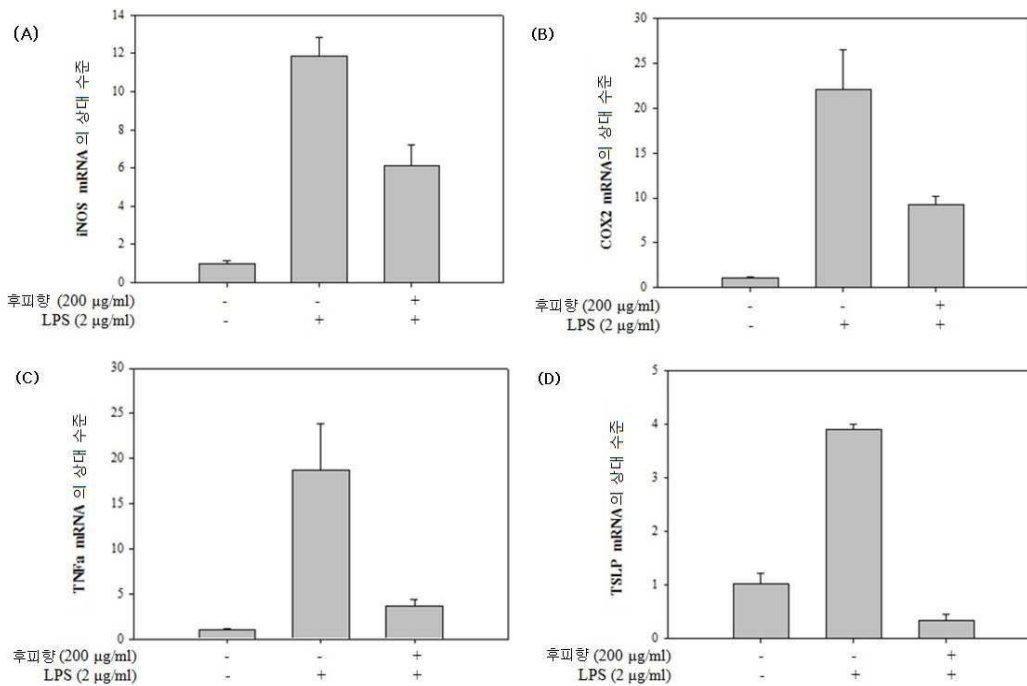
도면2



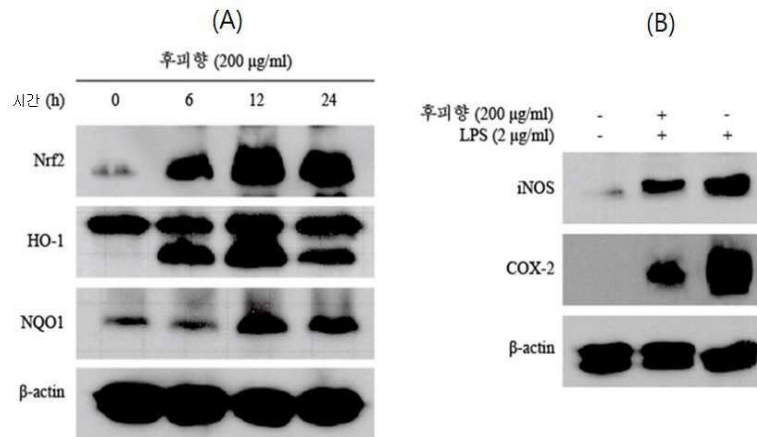
도면3



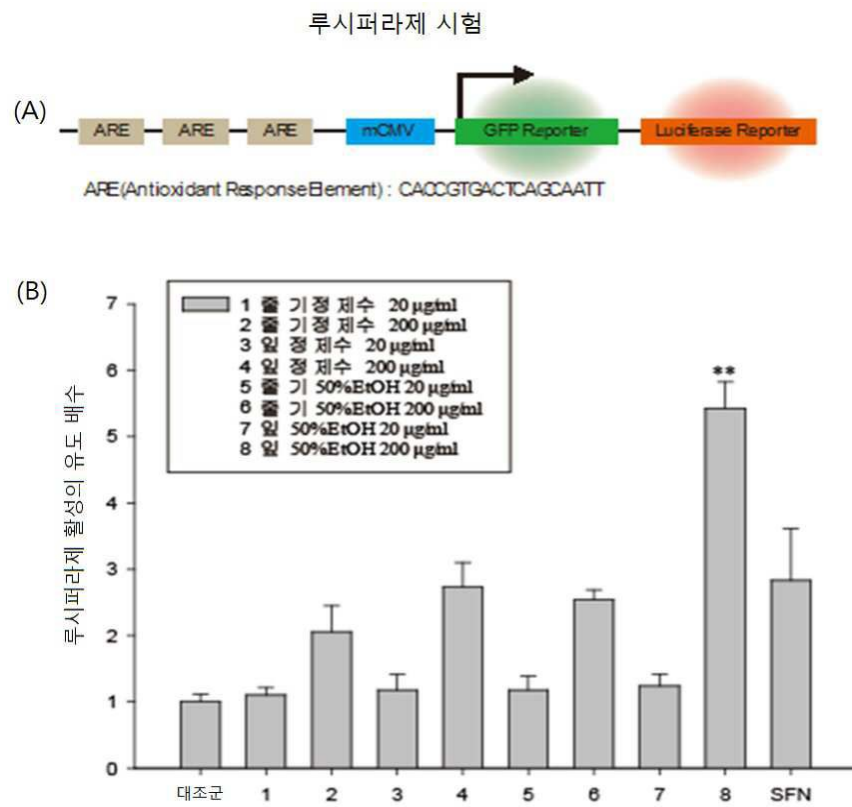
도면4



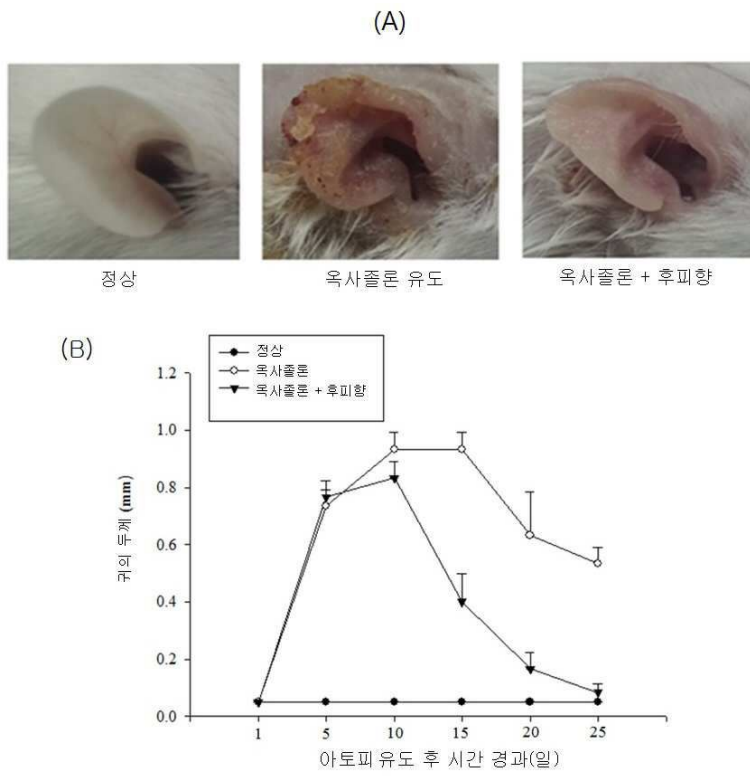
도면5



도면6



도면7



도면8

