

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0114212

(43) 공개일자 2022년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) A61K 36/428 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61K 36/428 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0017442

(22) 출원일자 2021년02월08일

심사청구일자 2021년02월08일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

김민호

충청남도 천안시 동남구 서부대로 252, 202동 905호(신방동, 신방동두레현대아파트2단지)

(74) 대리인

위병갑

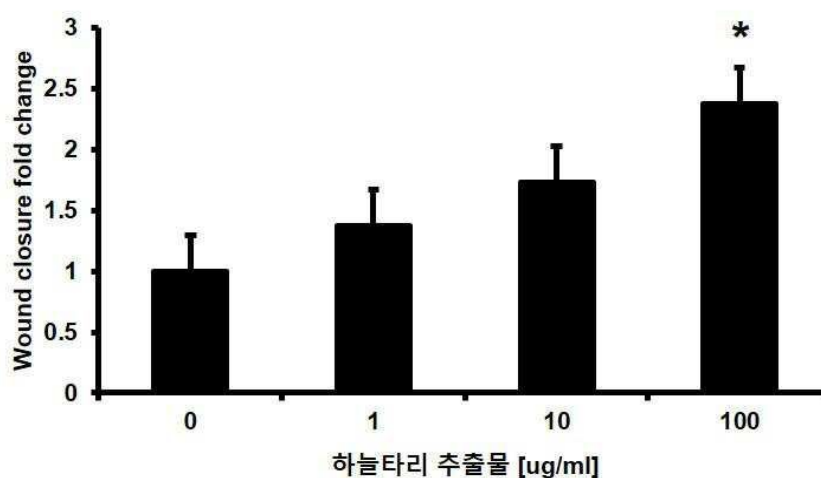
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 하늘타리 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 하늘타리 추출물(*Trichosanthes kirilowii* extract)을 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 세포 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 하늘타리 추출물은 자연 식물에서 유래한 천연 추출물을 유효성분으로 포함하므로 인체에 대한 독성이 낮고, 케라틴 세포의 성장 및 이동에 효과적이어서 피부 재생용 화장품 조성물 또는 상처 치료용 피부 외용제 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 9/0014 (2013.01)

A61P 17/02 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20200187
과제번호	2020238B10-2021-0001
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림융복합 전문인력 양성(대학(원)생 창의도전 아이디어 연구지원)
연구과제명	산림 생명자원을 이용한 상처치유물질 개발 및 작용 메카니즘 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 열수 추출법을 이용하여 추출한 것인, 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 하늘타리 추출물이 1 내지 100 μ g/ml로 포함되는 것을 특징으로 하는, 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 케라틴 세포에서 활성화된 단백질 키나제(MAPK)인 ERK1/2의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 6

하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부 외용제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체의 최외측에 존재하여 외부환경으로부터 몸을 보호하는 면역 역할 및 인체의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 피부의 상처가 발생시, 외부 병원물질은 인체에 침입하기 쉬워지며, 상처치유가 느려지거나 상처치유과정에 문제가 생길 시 병원물질에 대한 노출 시간 증가로 인한 위험성 및 상처회복 후에도 흉터와 같은 외관상 문제를 남길 가능성이 커진다. 따라서 피부상처치유의 촉진은 매우 중요하다.

[0003] 사람의 피부 조직은 바깥쪽부터 표피, 진피, 피하 조직 순으로 구성되어 있다. 이중 표피는 피부 중에서도 최외측이며, 각질층(Stratum Corneum)으로 보호받고 있다. 각질층은 죽은 케라틴 세포(keratinocyte) 들이 납작한 육각형 모양을 형성하며 생성된다. 각질층 밑에는 케라틴 세포들이 층을 이루고 있으며, 케라틴 세포의 끊임없는 분열로 항상 일정한 두께의 표피층 및 각질층을 형성, 외부물질로부터 인체를 보호한다. 따라서 피부의 상처는 표피층에 손상으로 생각 할 수 있으며, 상처가 발생하면 빠른 세포생장에 의한 상처치유 및 피부 층의 복구

과정이 매우 중요하다.

- [0004] 피부 층의 복구는 여러 신호전달 물질에 의해 조절이 되며, 표피층을 이루고 있는 케라틴 세포는 표피와 진피 사이의 기저층(basement membrane)에서 활발한 증식을 시작하여 위쪽으로 이동하게 된다. 증식 및 이동으로 인해 일정 수준의 세포의 양이 채워지면 케라틴 세포의 성숙을 통해 상처 이전의 형태로 복구가 이루어진다. 결론적으로 케라틴 세포의 증식과 이동은 상처 치유과정에서 상처 부위를 봉합하는 중요한 역할을 한다.
- [0005] 상처의 회복에는 케라틴 세포만 중요한 것은 아니며, 케라틴 세포 외에도 섬유아세포, 혈관세포, 대식세포, 혈소판 및 여러 세포의 기질들이 상호작용하며 성장인자 및 사이토카인과 같은 신호전달물질을 생성 및 분비 하여 복합적인 세포 증식 및 상처치유가 일어나게 된다.
- [0006] 이와 같은 세포증식을 촉진하는 신호전달물질은 세포막에 존재하는 여러 수용체에 리간드로서 작용하여 활성화 시키게 되고, PI3K-AKT pathway, MAP kinase pathway등 세포증식을 촉진시키는 것으로 알려진 pathway를 활성화 시킨다.
- [0007] MAP(mitogen-activated protein) kinase pathway는 ERK1/2, JNK1/2/3, p38, ERK5등 여러 주요 kinase들이 포함된 신호전달 경로로서, 세포 증식 및 분화, 이동, 스트레스 반응, 세포 사멸 등 매우 다양한 세포의 fate를 결정하는 주요 pathway로 알려져 있다. 세포 증식에 관련해서도 앞에 언급한 모든 kinase들이 관여가 되어있지만, 특히 ERK1/2의 활성화(인산화)는 세포 증식에 관련된 전사인자 및 세포주기를 직접 조절하는 Cyclin과 CDK의 발현에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 세포 분열이 활발한 상태에서 ERK1/2의 활성화는 매우 중요한 것으로 알려져 있다.
- [0008] 피부 상처 치유 및 피부 재생을 촉진하기 위해 종래에는 호르몬제 또는 화합물 제제를 이용한 치료법이 있었으나 이는 신체에 부작용을 일으킬 수 있다는 한계가 있다. 따라서 인체에 무해하면서도, 부작용이 적고 피부 상처 치유 및 피부 재생 촉진에 뛰어난 효능을 가지는 새로운 물질을 개발하는 것이 필요한 실정이다.
- [0009] 한편, 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*)는 박과에 속하는 여러해살이 덩굴식물로, 한국, 중국, 일본, 몽골 등 동북아시아에 널리 서식한다. 한방에서는 전통적으로 열매와 종자를 화상과 동상을 치료하거나, 거담제·진해제로 이용 또는 찜질약의 재료로 사용되었다. 최근에는 항암효능도 있는 것으로 알려졌다. 하지만 피부의 상처 특히 창상 등의 외부자극에 의해 벌어진 상처에 대한 치료 효능 및 케라틴 세포의 증식에 관련된 효능은 밝혀지지 않았다.
- [0010] 이에 본 발명자들은 상처 치료에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세포 중 최외측에 존재하는 케라틴 세포에 주목하여, 인체 위험성이 적은 천연 식물을 재료로 하여 추출물을 생성하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 10-2018-0077596

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 일반적으로 상처 치료에 쓰이는 화학 복합물 대신 인체에 상대적으로 무해한 자연 유래의 하늘타리 식물 추출물을 이용한 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동을 증진시키며 이로 인해 상처 치료까지 가능한 하늘타리 추출물을 피부 재생용 화장료 조성물 또는 상처 치료용 피부 외용제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 ‘추출물’은 열수 추출법을 이용하여 추출한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 ‘조성물’은 하늘타리 추출물이 1 내지 100 μ g/ml로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 ‘조성물’은 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동을 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 ‘조성물’은 케라틴 세포에서 활성화된 단백질 키나제(MAPK)에 의한 ERK1/2의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 ‘조성물’은 케라틴 세포에서 세포 증식과 관련된 유전자들의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0019] 아울러, 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 하늘타리 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물은 자연유래 식물에서 추출한 추출물로서 인체에 대한 독성이 낮고, 케라틴 세포의 증식 촉진 능력이 효과적이어서 피부 재생용 화장료 조성물 또는 상처 치료용 피부 외용제 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 5, 10, 50 및 100 μ g/ml) 세포 독성 및 증식률을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 상처 회복 활성도(wound healing activity)를 확인한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 본 발명 도 2의 결과를 대조군 대비 fold change로 표현한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 5 및 10 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 신호 전달 단백질의 변화를 확인한 웨스턴 블롯 사진이다.
- 도 5는 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 proliferation marker들에 대한 quantitative real-time PCR 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 cyclin, cdk들에 대한 quantitative real-time PCR 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 케라틴 단백질들에 대한 quantitative real-time PCR 결과이다.
- 도 8은 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 성장인자들에 대한 quantitative real-time PCR 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 하늘타리 추출물의 농도별(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 세포 영향 메커니즘을 확인하기 위하여 AP-1 transcription factor들에 대한 quantitative real-time PCR 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분을 포함하는 피부 재생 또는 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

- [0025] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본

발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

- [0026] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0027] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0029] 일 측면에서, 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*)으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 화장품학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.
- [0031] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0032] 본 발명의 “화장료 조성물”은 상술한 본 발명의 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*)에서 추출한 추출물의 화장품학적 유효량(cosmetically effective amount) 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “화장품학적 유효량”은 상술한 본 발명의 조성물의 피부 재생 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0034] 화장료 조성물의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 또한 포말(foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일 및 바디에센스 등의 화장품으로 제형화될 수 있

다.

- [0036] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 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.
- [0039] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 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, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물은 스킨, 로션, 크림, 에센스, 팩, 파운데이션, 색조화장품, 선크림, 투웨이케이크, 페이스파우더, 콤팩트, 메이크업베이스, 스킨커머, 아이섀도우, 립스틱, 립글로스, 립픽스, 아이브로우 펜슬, 화장수 등의 화장품 및 샴푸, 비누 등의 세정제에 적용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 화장료 조성물에는 상기 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*)에서 추출한 추출물 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물은 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 화장료 조성물에는 또한, 상기 기능성 첨가물과 더불어 필요에 따라 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분을 배합해도 된다. 이외에 포함되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 상처 치료용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 조성물에 포함되는 성분은 상기 하늘타리 추출물 이외에 피부 외용제 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다. 의약품에 적용할 경우에는 본 발명에 따른 하늘타리 추출물을 유효성분으로 하고, 통상 사용되는 무기 또는 유기 담체를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 비경구 투여제로 제제화할 수 있다. 본 발명의 유효성분을 제제화하기 위해서는 상법에 따라서 실시하면 용이하게 제제화할 수 있으며 계면활성제, 부형제, 착색료, 향신료, 보존제, 안정제, 완충제, 현탁제, 기타 상용화하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유클렌징, 오일, 분말파운데이션, 유탁액파운데이션, 왁스파운데이션, 팩, 마사지크림 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0048] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 과라판, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질알코올, 벤질벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜오일, 글리세롤지방족에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의지방산에스테르가 있다.
- [0050] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴알코올, 폴리옥시에틸렌소르비톨에스테르 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성셀룰로오스, 알루미늄메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로 히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산아미드에테르설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족알코올, 지방산글리세리드, 지방산디에탄-5-올아미드, 식물성유, 라놀린유도체 또는 에톡실화글리세롤 지방산 에스테르등이 이용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물은 단독 또는 중복하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 조성물과 중복하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용 횟수를 달리할 수 있다.
- [0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0057] <실시예 1> 하늘타리 추출물의 제조
- [0058] 건조된 하늘타리(원산지: 제주도)를 분쇄하여 추출 용기에 넣고 정제수를 15배수로 넣은 후 60℃에서 3시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출액은 여과지로 여과한 후 여액이 완전히 증발할 때까지 50℃에서 감압 농축하여 하늘타리 추출물을 제작하였다. 이에 따른 수율은 약 10.0%로 나타났다. 하늘타리 추출물은 10mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 사용하였다.
- [0060] <실시예 2> 세포 독성 및 증식 평가(MTT assay)
- [0061] 하늘타리 추출물의 세포에 대한 독성 및 증식 촉진 효과를 확인하기 위해 케라틴 세포에서 MTT assay를 진행하였다.
- [0062] 구체적으로, 하늘타리 추출물에 의한 세포 독성을 확인하기 위해 하늘타리 추출물을 농도(0, 1, 5, 10, 50 및 100 μ g/ml)에 따라 HaCaT cell에 각각 처리하고 MTT assay를 수행하였다. 각 10³ cells를 96-well tissue culture plates(SPL)의 각 well에 넣고 24시간 배양 후 Serum free media로 교체 후 DMSO에 용해된 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. DMSO의 최종 농도는 동일하게 맞추었다(0.1%). 24시간 경과 후 100 μ l 5 mg/ml MTT(sigma Cat. M2128)을 투입한 후, 3시간 동안 37℃ 반응시킨 후 배지를 제거 후 0.1ml의 DMSO를 투입하고 15분 동안 반응 시킨 후 microplate reader (BioTek Instruments, Korea)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.
- [0063] 그 결과, 하늘타리 추출물 농도(0, 1, 5, 10, 50 및 100 μ g/ml)에 따라 세포의 양이 대조군에 비하여 감소하지 않았다. 또한, 농도가 증가함에 따라 cell viability가 증가하는 것을 확인하였다. 즉 세포에 독성은 없으며 오

히려 성장을 증진시킴을 확인하였다(도 1).

[0065] <실시예 3> 상처 회복 실험(*In vitro* wound-healing assay)

[0066] 상기 하늘타리 추출물을 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 및 이동에 대한 효과를 확인하기 위해 *In vitro* wound-healing assay를 진행하였다.

[0067] 하늘타리 추출물을 농도(0, 1, 10 및 100 μ g/ml)에 따라 HaCaT cell 에 처리하고 *In vitro* scratch assay를 수행하였다.

[0068] 구체적으로, HaCaT cell 을 6-well cell culture plates(SPL)의 각 well에 cell을 90~100% confluence로 배양 후 White tip (Sorenson)을 이용하여 각 well에 상하로 상처를 낸 다음, PBS를 이용해 well을 씻어준 뒤 serum-free media를 각 well에 3ml 투입하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해된 각 물질을 표시된 농도로, 최종적인 DMSO농도가 일정하도록 추가해주었다. Microscopy(Thermo fisher scientific, USA)를 이용해 각 well의 상처 난 부분을 촬영하고 24시간 배양 뒤 다시 같은 부위에 대하여 촬영하였으며, 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0069] 그 결과, 대조군(0 μ g/ml)에 비해 하늘타리 추출물을 추가해 줌에 따라 상처부위가 더 많이 감소한 것을 확인하였다(도 2, 도 3).

[0071] <실시예 4> 세포 증식관련 신호 전달 단백질 변화 분석(Western blot assay)

[0072] 하늘타리 추출물의 케라틴 세포(keratinocyte)의 성장 촉진에 대한 메커니즘을 확인하기 위해 세포 성장 및 이동에 관여하는 단백질에 대해 Western blot assay를 진행하였다.

[0073] 구체적으로, 하늘타리 추출물의 농도(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 차이에 대한 세포 성장 및 이동과 관련된 단백질의 변화를 확인하기 위해 western blot assay를 사용하였다. HaCaT cell을 6well culture dish(SPL)에서 배양하였다. 각 well에 3×10^5 Cells 만큼 subculture 24시간 배양 후 serum-free media를 3ml 넣어주고 추출물을 각 Plate 당 0, 1, 10 및 100 μ g/ml 농도로 주입해주고 24시간 동안 추가 배양해준다. 각 샘플 당 DMSO의 농도는 동일하게 맞춰준다. Cell scraper(SPL)를 이용하여 세포를 plate에서 분리한 뒤 세포를 tube에 모아준다. RIPA buffer(25mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2mM EDTA)를 이용해 세포를 깬 후에 단백질을 모아 정량한 뒤 20 μ g을 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)에 적재한다. ECL은 Bio-Rad 제품을 이용하였으며 항체는 santa cruz biotechnology와 cell signaling technology 제품을 사용하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0074] 그 결과, 하늘타리 추출물은 p38, JNK, ERK5와 AKT 그리고 이들의 인산화 (phosphorylation)에 대해서는 화합물의 농도에 상관없이 단백질의 양의 변화 및 활성화 정도의 차이가 보이지 않았다. 하지만 ERK1/2의 경우 전체적인 양에서는 큰 차이가 보이지 않았지만, 처리한 하늘타리 추출물의 농도가 증가함에 따라 ERK1/2의 인산화 형태는(phosphorylation form, p-ERK1/2) 증가하였다. 이를 통해 다양한 세포 성장과 이동에 관여하는 단백질 중 MAP kinase pathway 중 ERK1/2가 하늘타리 추출물의 농도에 따라 활성화에 차이가 생기는 것을 확인하였다(도 4).

[0076] <실시예 5> 세포 증식 관련 유전자 발현 분석(quantitative Real-Time PCR)

[0077] 하늘타리 추출물의 케라틴 세포(keratinocyte)의 유전자 발현 변화를 확인하기 위해 quantitative Real-Time PCR을 진행하였다.

[0078] 구체적으로, 하늘타리 추출물의 농도(0, 1, 10 및 100 μ g/ml) 차이에 대한 성장 촉진에 대한 유전자 발현 조절 메커니즘을 확인하기 위해 세포 성장 조절 및 ERK1/2에 의해 조절되는 유전자들(Cyclins, CDKs, keratins, growth factors and AP-1 transcription factors)에 대해 quantitative Real-Time PCR을 진행하였다. HaCaT cell을 6well culture dish(SPL)에서 배양하였다. 각 well에 3×10^5 Cells 만큼 subculture 24시간 배양 후 serum-free media를 3ml 넣어주고 추출물을 각 Plate 당 0, 1, 10 및 100 μ g/ml 농도로 주입해주고 24시간 동안 추가 배양해준다. 각 샘플 당 DMSO의 농도는 동일하게 맞춰준다. Trizol (Thermo Fisher) 0.5ml을 각 well에

처리하여 세포를 수확 후, Total RNA를 추출하였다. 1 μ g의 total RNA sample을 이용하여 Thermo Reverse Transcriptase(NANOHELIX) cDNA를 합성하였다. 아래 표 1(Quantitative Real-Time PCR 분석에 사용된 올리고머의 서열)의 올리고머를 사용하여 quantitative Real-Time PCR(CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)을 실시하였다.

표 1

[0080]

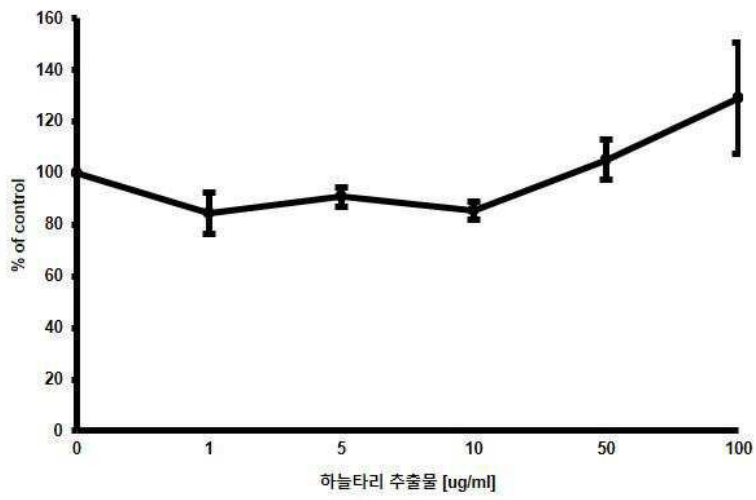
Gene	Direction	Sequence (5' -3')
PCNA	Forward	AACCTCACCAGTATGTCCAA
	Reverse	ACTTTCTCCTGGTTTGGTG
MCM2	Forward	AATCTATGGCGACAGGCAG
	Reverse	ATCACATAGTCCCGCAGAT
KI67	Forward	CCAAAGAAGGCTGAGGACAA
	Reverse	CCCTTAAGCAGACTGACAGC
Cyclin D1	Forward	CTGTGCTGCGAAGTGAAACC
	Reverse	GACGATCTTCCGCATGGAC
Cyclin B1	Forward	TAAGGCGAAGATCAACATGG
	Reverse	GCTTCCTTCTTCATAGGCAT
Cyclin E1	Forward	ACACCATGAAGGAGGACG
	Reverse	CACAGACTGCATTATGTCCC
CDK1	Forward	CAGGTCAAGTGGTAGCCATG
	Reverse	ACCTGGAATCCTGCATAAGC
CDK2	Forward	TTCTCATCGGGTCCTCCACC
	Reverse	TCGGTACCACAGGGTCACCA
CDK4	Forward	CTGAGAATGGCTACCTCTCG
	Reverse	CGAACTGTGCTGATGGGAAG
CDK6	Forward	CCGAAGTCTTGCTCCAGTCC
	Reverse	GGGAGTCCAATCACGTCCAA
KRT5	Forward	AGCAGTGGTACGCTTGTGATT
	Reverse	GCCTGGACTCAGAGCTGAGAA
KRT14	Forward	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTAC
	Reverse	CACTGTGGCTGTGAGAATCTTGT
KRT6	Forward	CTGAGGCTGAGTCTGGTAC
	Reverse	GTTCTTGGCATCCTTGAGG
KRT17	Forward	GCTGCTACAGCTTTGGCTCT
	Reverse	TCACCTCCAGCTCAGTGTG
fos-B	Forward	TTCTGACTGTCCCTGCCAAT
	Reverse	CGGGGTCAGATGCAAAATAC
c-fos	Forward	GGAGGAGGGAGCTGACTGATA
	Reverse	GCAATCTCGGTCTGCAA
c-jun	Forward	TTCTATGACGATGCCCTCAACGC
	Reverse	GCTCTGTTTCAGGATCTTGGGGTTAC
Fra-1	Forward	GGGCATGTCCGAGACTTC
	Reverse	GCACCAGGTGGAACCTCTG
Elk1	Forward	TGACCCCATCCCTGCTTCTTA
	Reverse	GAAGTGAATGCTAGGAGGCAGCG
FGF2	Forward	AAAAACGGGGCTTCTTCCT
	Reverse	AGCCAGGTAACGGTTAGCAC
EGF	Forward	AGTCCGTGACTTGCAAGAGG
	Reverse	CCTCTTCTTCCCTAGCCCCT
TGF	Forward	TGGTGAAACCCACAACGAA
	Reverse	GAGCAACACGGGTTTCAGGTA
CTGF	Forward	GTTTGGCCCAGACCAACTA
	Reverse	GGCTCTGCTTCTCTAGCCTG
VEGF	Forward	CTTGCTTGCTGCTCTACCT
	Reverse	GCAGTAGCTGCGCTGATAGA
GAPDH	Forward	GTGAAGGTCGGAGTCAACG

	Reverse	TGAGGTCAATGAAGGGGTC
--	---------	---------------------

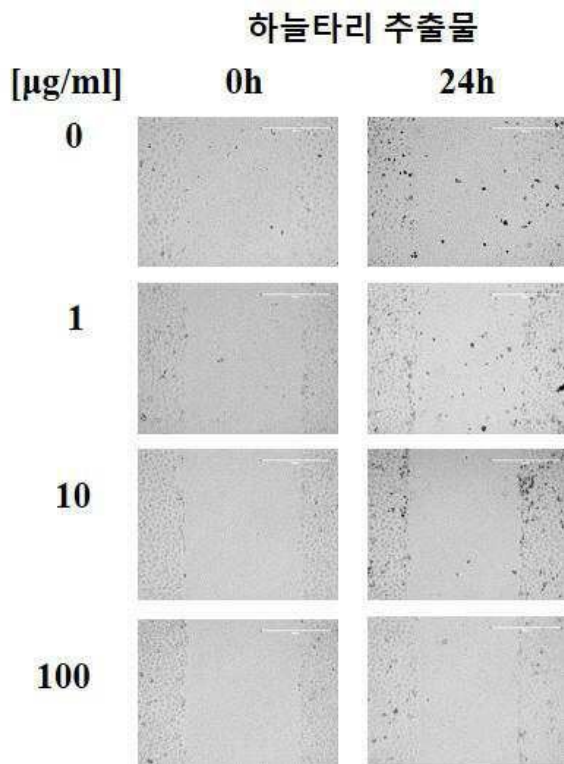
- [0082] 그 결과, 하늘타리 추출물은 세포 증식 시 발현량이 증가하는 세포 증식의 Marker 유전자인 PCNA, MCM2, KI67 등 세 가지 유전자에 대해 발현량을 증대시킨 것을 확인함으로써 세포 증식이 유도된 것을 다시 한 번 확인하였다(도 5).
- [0083] 세포 분열 주기를 조절한다고 알려진 Cyclin과 CDK들에 대한 결과에서는 대체적으로 모든 Cyclin과 CDK의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 6).
- [0084] 케라틴세포(Keratinocyte)에서 특이적으로 발현하는 케라틴 단백질 유전자들, 특히 Basal keratinocyte에서 발현되는 KRT5/KRT14와 hyperproliferative cellular response에 반응하는 KRT6/KRT17 유전자에 대해 발현변화를 확인하였다. 결론적으로 KRT5/KRT14의 발현 보다는 KRT6/KRT17의 발현이 하늘타리 추출물에 의해 증가한 것을 확인하였다(도 7).
- [0085] 다음으로 Growth factor들의 발현변화를 확인하였다. 성장인자는 세포의 증식을 조절하는 앞에서 소개한 MAP kinase pathway와 같은 pathway를 활성화시킬 수 있는 세포의 외부 신호에 반응하는 receptor의 ligand로써 행동한다. 성장인자 단백질은 세포증식의 원인이 되기도 하지만, 세포 증식 촉진 후, 근처에 있는 다른 세포에게도 전달되어 다른 세포의 성장에도 영향을 줄 수 있다. 따라서 증식이 활성화된 세포에서 유전자 발현이 증가하기도 한다. 하늘타리 추출물에 의해서 성장인자들의 유전자 발현이 달라졌으며, 특히 CTGF는 추출물의 처리에 따라 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있다(도 8).
- [0086] 마지막으로 Western blot assay에 이어, 하늘타리 추출물에 의해 활성화되는 ERK1/2에 의해 조절되는 Transcription factor 유전자들에 대해 확인해보았다. fos-B, c-fos, c-jun, Fra-1, Elk1은 AP-1 transcription factor로, ERK1/2의 활성화에 의해 발현량이 조절되어, 세포 주기 및 다양한 세포 생존 관련 하위 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자들이다. 이들의 발현량도 전반적으로 증가하였으며, 특히 c-fos의 발현량이 하늘타리 추출물의 처리 농도에 비례하여 증가한 것을 확인할 수 있다(도 9).
- [0088] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

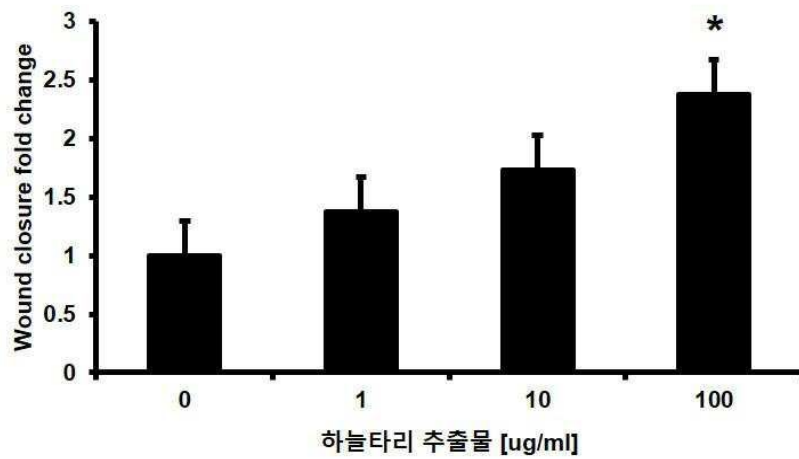
도면1



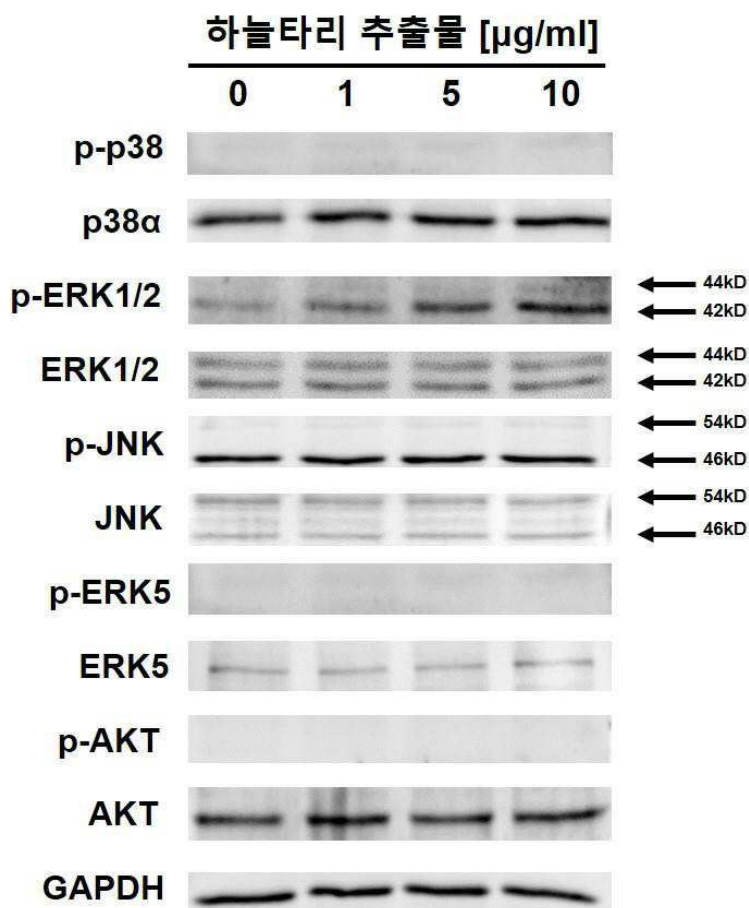
도면2



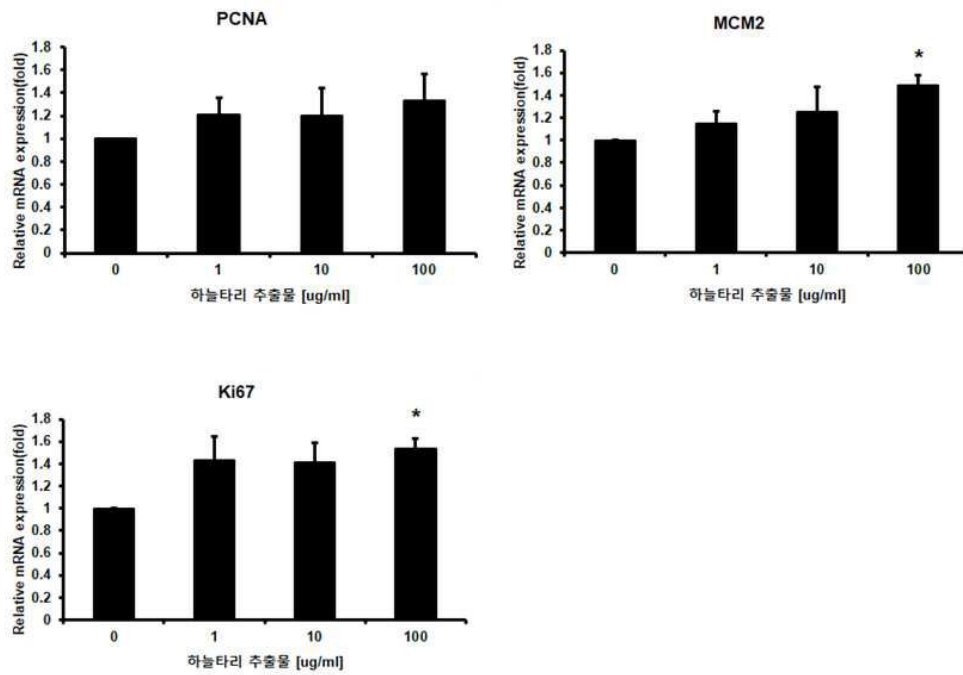
도면3



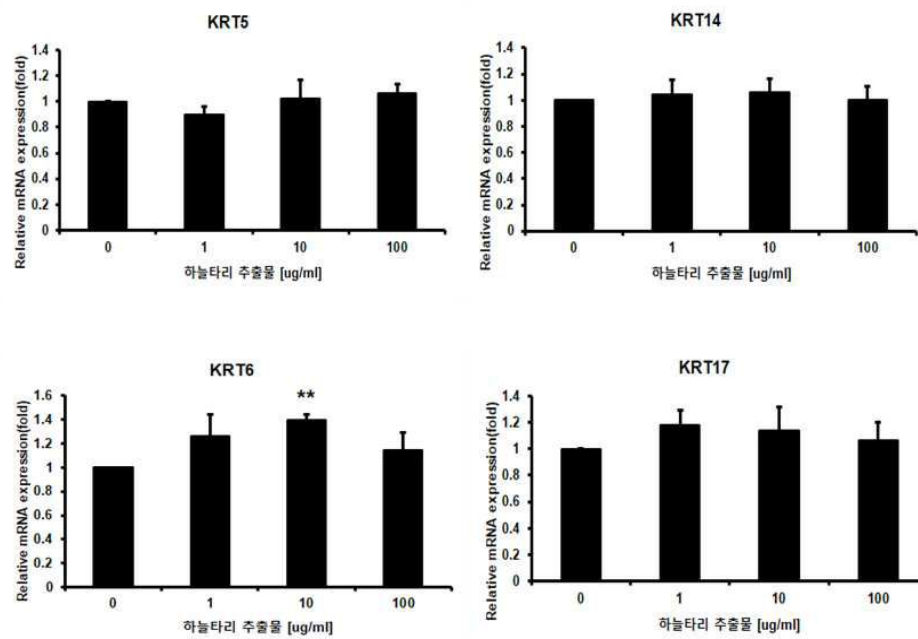
도면4



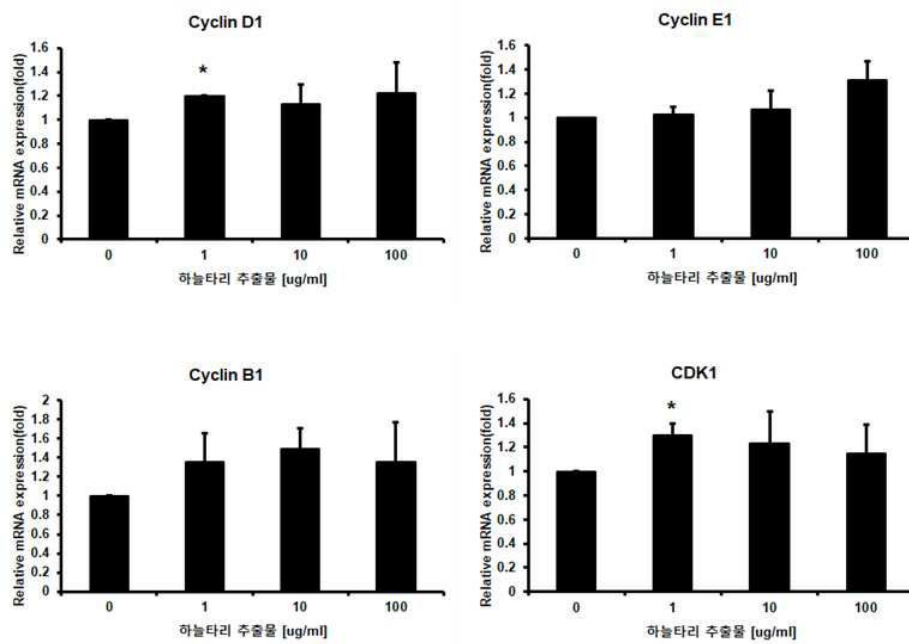
도면5



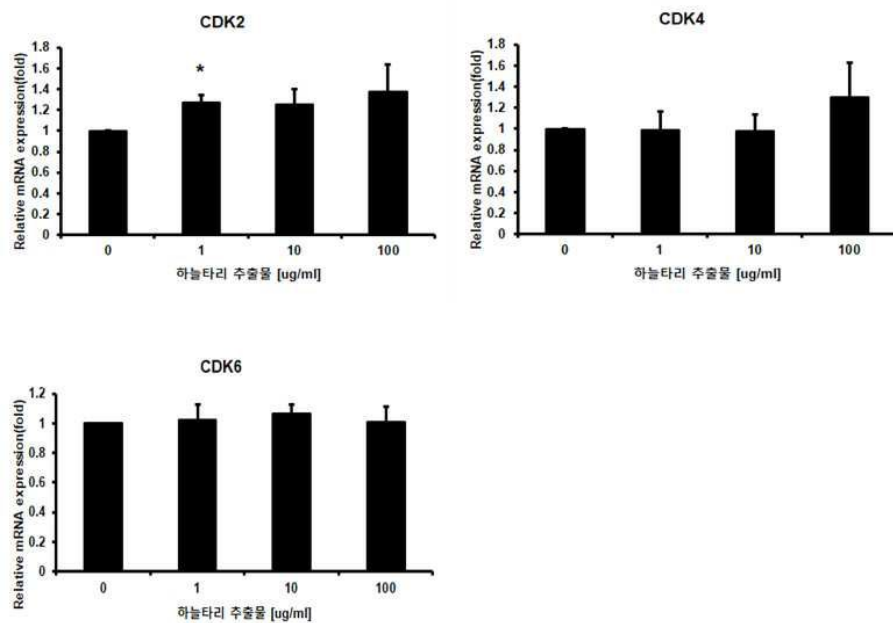
도면6



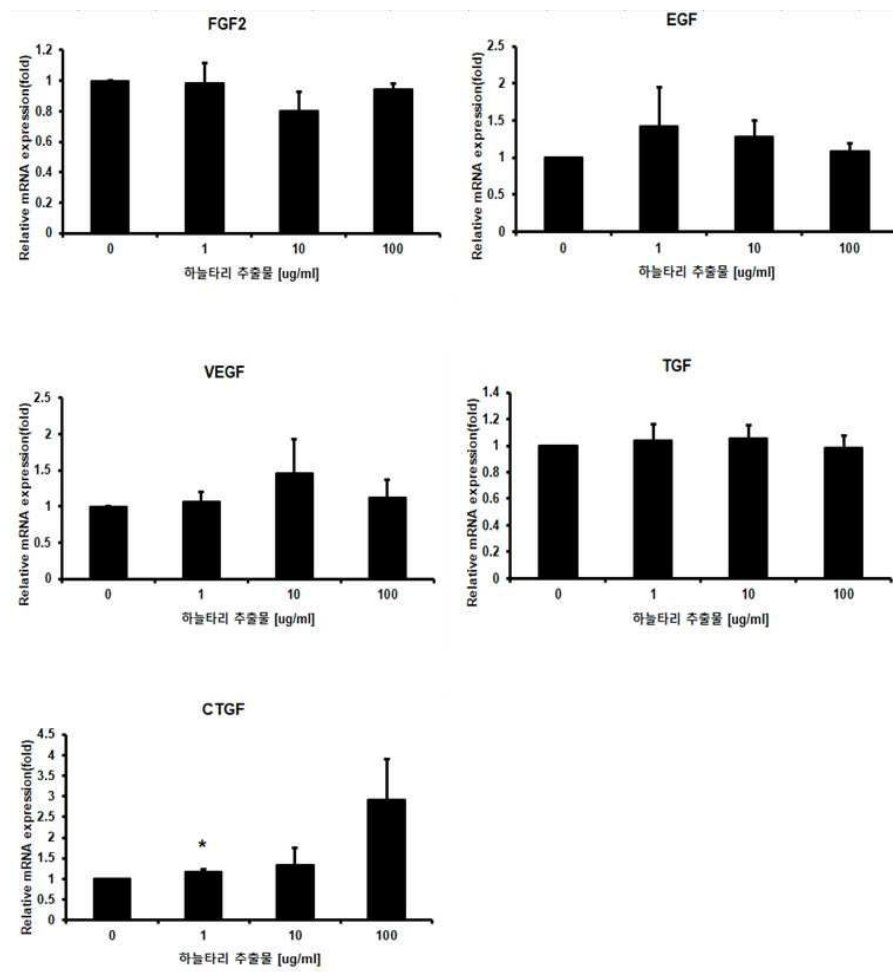
도면7a



도면7b



도면8



도면9

