

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 1월 4일 (04.01.2018)



(10) 국제공개번호

WO 2018/004068 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/44 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61K 8/06 (2006.01)

A61K 8/36 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2016/010591

(22) 국제출원일:

2016년 9월 22일 (22.09.2016)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0083516 2016년 7월 1일 (01.07.2016) KR

(71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77 (용봉동), Gwangju (KR).

(72) 발명자: 김성진 (KIM, Seong Jin); 61496 광주시 동구의재로86번길 20 (소태동), Gwangju (KR). 임명 (IM, Myung); 34818 대전시 중구 목동로 37, 107동 801호 (목동, 목양마을아파트), Daejeon (KR). 손경철 (SOHN, Kyung Cheol); 34818 대전시 중구 목동로 37, 112동 1102호 (목동, 목양마을아파트), Daejeon (KR). 정유라 (JUNG, Yu Ra); 35235 대전시 서구 둔산남로 30, 111동 1001호 (둔산동, 녹원아파트), Daejeon (KR). 김창덕

(KIM, Chang Deok); 34957 대전시 중구 계백로1716번길 40, 101동 101호 (문화동, 문화마을금호어울림아파트), Daejeon (KR). 이중훈 (LEE, Jeung Hoon); 34124 대전시 유성구 엑스포로339번길 320, 10동 402호 (원촌동, 싸이언스빌), Daejeon (KR).

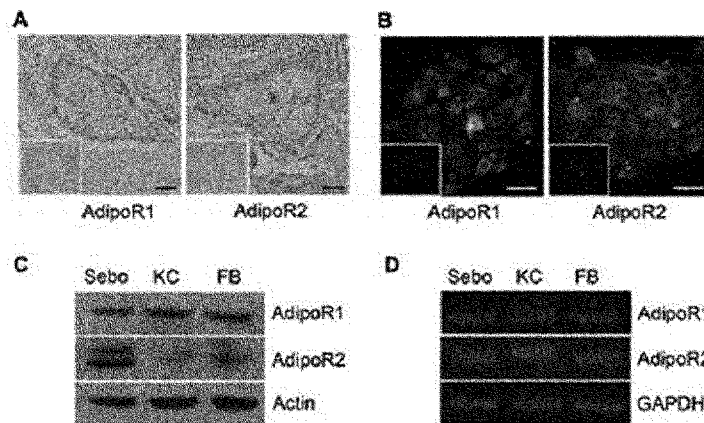
(74) 대리인: 두호특허법인 (DOOHO IP LAW FIRM); 06628 서울시 서초구 강남대로 51길 1, 7층 (서초동, 대현블루타워), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING SEBUM SECRETION

(54) 발명의 명칭: 피지 분비 촉진용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to an external-use skin preparation composition for promoting sebum secretion, the external-use skin preparation composition for promoting sebum secretion containing adiponectin, thereby promoting the differentiation of the sebaceous glands and increasing sebum secretion so as to enable improving or reinforcing functions such as a skin barrier, and enabling an increase in the synthesis of proteins and enzymes associated with the synthesis of skin lipids, and an increase in the production of lipids performing a skin barrier function.

(57) 요약서: 본 발명은 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 아디포넥틴을 포함함으로써, 피지선의 분화를 촉진하고, 피지 분비를 증가시켜 피부장벽 등의 기능을 개선 또는 강화할 수 있으며, 피부의 지질 합성에 관여하는 단백질 및 효소의 합성 및 피부 장벽기능을 수행하는 지질의 생성을 증가시킬 수 있는, 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 헤치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예
외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 피지 분비 촉진용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 아디포넥틴을 포함하는 피부의 지질 합성을 촉진시키는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피부는 외부로부터 개체를 보호하는 장벽기능이라는 매우 중요한 역할을 수행한다. 장벽기능은 화학 물질, 대기오염 물질, 건조한 환경, 자외선 등과 같은 외부로부터의 다양한 자극과 체내수분의 과도한 발산을 막는 보호기능이며, 이러한 보호기능은 각질형성세포 (Keratinocyte)로 구성된 각질층 (Stratum corneum, horny layer)이 정상적으로 형성되어 있을 경우에만 그 기능이 유지될 수 있다.
- [3] 여기에서, 피부장벽 기능 유지에 중요한 역할을 하고 있는 것은 피부의 지질로서, 피부의 지질은 각질세포에서 합성되어 분비되는 지질인 각질세포간 지질과 피지선 세포에서 분비되는 피지로 이루어져 있다.
- [4] 각질세포간 지질은 표피의 각질형성세포가 분화되면서 생성되는 지질이며, 이러한 지질의 성분에는 주로 세라마이드, 유리지방산, 콜레스테롤이 대표적이고, 피지선 (sebaceous gland)의 활성화에 의해 합성되는 독특한 지질은 스쿠알렌, wax ester 등이 있다.
- [5] 피지선 중 모발 옆에 위치한 피지선의 경우 지질을 피부표면으로 배출하지만 여드름을 유발하는 주요 인자로 연구가 많이 될 뿐, 피부장벽 기능을 개선하는 역할은 거의 알려져 있지 않다.
- [6] 한편, 아디포넥틴은 지방세포 (피하지방)에서 특이적으로 분비되는 단백질 호르몬인 아디포카인(adipokine)의 일종으로서, 비만, 당뇨, 고지혈증의 내과적 질환, 발모효과, 상처재생 등의 피부과 질환을 치료하는 물질로 알려져 있을 뿐, 피부장벽을 보호하는 물질로는 알려진 바가 없다.
- [7] 본 발명자들은 피지선 조직과 피지선 세포 (sebocyte)에 아디포넥틴 수용체 (adiponectin receptor 1, 2)가 존재함과 아디포넥틴 수용체에 결합하는 물질을 처리하여 피지 분비의 증가를 유도하였을 때 피부장벽 기능이 개선된다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 피지선 분화를 촉진시켜 피부의 지질 합성을 촉진시키는 조성물의 제공을 목적으로 한다.
- [9] 본 발명은 인체에 작용시 피지선 분화를 효과적으로 증가시키는 올리고머 아디포넥틴을 포함한 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[10] 본 발명은 아디포넥틴의 발현을 증가시키는 물질을 포함한 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[11] 본 발명은 피부장벽 기능을 강화하는 화장품 또는 외용연고의 제공을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[12] 1. 아디포넥틴을 포함하는 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물.

[13] 2. 위 1에 있어서, 상기 조성물은 피지선 세포의 증식을 촉진하는 피부 외용제 조성물.

[14] 3. 위 1에 있어서, 상기 조성물은 지질 합성을 증가시키는 피부 외용제 조성물.

[15] 4. 위 1에 있어서, 스쿠알란, 트리글리세라이드 및 팔미트산으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는 것인, 피부 외용제 조성물.

[16] 5. 위 1에 있어서, 인볼루크린 (involucrine) 또는 필라그린 (filaggrin)을 더 포함하는 것인, 피부 외용제 조성물.

[17] 6. 위 1에 있어서, L-아라비노스, 시링산, 크로몬, (-)카테킨, S-아릴 시스테인, 아르기닌(arginine), L-카르니틴(L-carnitine), 카페인(caffeine), 디하이드로캡사이신 및 이소플라본으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는, 피부 외용제 조성물.

[18] 7. 위 1에 있어서, 상기 아디포넥틴은 올리고머인, 피부 외용제 조성물.

[19] 8. 위 7에 있어서, 상기 올리고머는 단량체가 2 내지 12개가 중합된 것인, 피부 외용제 조성물.

[20] 9. 위 1에 있어서, 상기 아디포넥틴을 40 ng/ml 내지 250 ng/ml로 포함하는 것인, 피부 외용제 조성물.

발명의 효과

[21] 본 발명에 따른 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물은 피지 분비를 증가시켜 피부장벽 등의 기능을 개선 또는 강화할 수 있다.

[22] 본 발명에 따른 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물은 피부의 지질 합성에 관여하는 단백질 및 효소의 합성을 증가시킬 수 있다.

[23] 본 발명에 따른 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물은 피부 장벽기능을 수행하는 지질의 생성을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 인간의 피지샘과 피지선 세포에 있는 아디포넥틴 수용체의 발현을 나타낸 것이다.

[25] 도 2은 재조합 인간 아디포넥틴을 농도 의존적으로 피지선 세포에 처리 후의 세포 증식을 MTT assay와 $[3H]$ -thymidine incorporation로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[26] 도 3은 인간 피지선 세포에서 지질 합성에 대한 아디포넥틴의 효과를 나타낸 것이다.

- [27] 도 4는 인간 피지선 세포에서 AMP-activated protein kinase(AMPK) 시그널링을 활성화시킴으로써 아디포넥틴에 의한 지질 합성이 유도되는 것을 나타낸 것이다.
- [28] 도 5는 인간 피지선 세포의 3차원 배양에서 아디포넥틴의 영향을 나타낸 것이다.
- [29] 도 6은 palmitic acid, squalene을 처리한 각질형성세포에서 피부장벽기능에 관여하는 단백질 involucrin, filaggrin 등과 지질대사에 중추적인 역할을 하는 HMG CoA 효소가 잘 형성되거나 유도됨을 나타낸 것이다.
- [30] 도 7는 피지분비가 왕성한 젊은사람의 피지세포에서의 아디포넥틴은 지질합성을 증가시키지 않음을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [31] 본 발명은 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 아디포넥틴을 포함함으로써, 피지선의 분화를 촉진하고, 피지 분비를 증가시켜 피부장벽 등의 기능을 개선 또는 강화할 수 있으며, 피부의 지질 합성에 관여하는 단백질 및 효소의 합성 및 피부 장벽기능을 수행하는 지질의 생성을 증가시킬 수 있는, 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.
- [32] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [33] 본 발명의 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물은 아디포넥틴을 포함한다.
- [34] 피부장벽은 피부를 구성하는 구조 중 표피의 가장 바깥쪽에 위치하는 각질층에 존재하며, 수분 증발과 외부로부터 이물질의 침입을 막아줌으로써 인체를 보호하는 기능을 하는데, 이를 피부장벽 기능이라고 한다.
- [35] 피부장벽 기능 유지에 중요한 역할을 하고 있는 것은 피부의 지질로서, 피부 지질은 피지선 세포에서 분비되는 피지에 의해 합성이 촉진된다.
- [36] 피지선 세포에서 분비되는 피지에는 wax ester, 스쿠알렌 등의 지질이 포함되어 있으며, 이들은 피부 지질의 합성을 유도하는 역할을 한다.
- [37] 따라서 피지의 분비가 증가되면 피부장벽기능을 향상시킬 수 있다. 본 발명자들은 피지의 분비를 증가시킬 수 있는 물질로서 아디포넥틴을 고안해냈다.
- [38] 기존에는 아디포넥틴은 아디포카인 중 하나로 주로 지방세포에서 생성되며 체내 전반에 걸쳐 인슐린 전달 기전이나 에너지 대사 조절, 염증 등에 관하여 영향을 미치는 것으로 알려져 있었다.
- [39] 본 발명자들의 연구결과에 따르면, 아디포넥틴 수용체인 Adipo1 및 Adipo2가 피지선 세포에 위치하고 있으며, 이에 아디포넥틴을 피지선 세포에 처리하면 피지선 세포의 분화를 유도하여 피지의 분비를 증가시킬 수 있고, 이렇게 증가된 피지의 분비는 피부 지질 합성을 유도하여 피부장벽기능 개선 등의 효과를 발생시킨다.
- [40] 본 발명의 아디포넥틴은 아디포넥틴의 전체 아미노산 서열에 대하여 70%

이상의 아미노산 상동성을 나타내는 것으로서, 바람직하게는 75% 이상 또는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 또는 97%까지의 서열 상동성을 나타는 것이다.

- [41] 또한, 아디포넥틴은 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실 또는 이들의 조합 중 어느 하나에 해당하는 아디포넥틴의 변형물을 포함할 수 있다.
- [42] 아디포넥틴 수용체는 세포막 상에 존재하는 단백질이며, 아디포넥틴과 형태적 특이성에 따라 선택적으로 결합하는 물질이다.
- [43] 피부 외용제 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유중수형 또는 수중유형의 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 또는 스프레이 제형으로 제조될 수 있다.
- [44] 이와 같이 피부 외용제 조성물은 다양한 제형으로 제조될 수 있으며, 이때, 복합분체를 유효성분으로 포함하는 것 이외에, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들, 예를 들면, 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및/또는 담체를 포함할 수 있다. 각각의 제형에 따른 이용 가능한 담체를 설명하면 하기와 같다.
- [45] 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로 히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체가 추가로 이용될 수 있다.
- [46] 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용될 수 있는데, 그 예로는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르 등을 들 수 있다.
- [47] 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 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.
- [48] 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.
- [49] 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트,

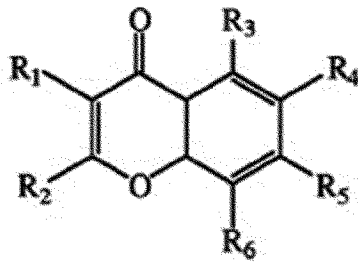
지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

- [50] 또한, 피부 외용제 조성물은 외용연고일 수 있으며, 외용연고에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있는데, 이러한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [51] 외용연고의 1일당 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [52] 본 발명의 피부 외용제 조성물은 스쿠알란, 트리글리세라이드 및 팔미트산으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [53] 스쿠알란, 트리글리세라이드 및 팔미트산 중 적어도 하나를 아디포넥틴과 같이 사용하는 경우, 표피 분화 단백질인 인볼루크린 (involucrine), 필라그린 (filaggrin), 유리지방산 및 HMG-CoA reductase의 합성을 효과적으로 촉진시킬 수 있어, 피부 지질의 합성을 더욱 효과적으로 증가시킬 수 있다.
- [54] 스쿠알란은 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane의 화학식을 가지며, 불포화 탄화수소인 스쿠알렌에 비해 풍부한 사용성, 안전성과 함께 보습 효과가 우수한 고급 유성 원료이고, 또 피부 피지 구성 성분으로 피부 지질과의 친화력이 높아 경피 흡수율이 우수한 장점이 있다.
- [55] 트리글리세라이드는 인공적으로 합성되거나 천연의 트리글리세라이드가 사용될 수 있다. 카프릴릭산 및 카프로산의 트리글리세라이드는 수분이 피부에 결합하는 것을 돕는 역할을 할 수 있으며, 지질 합성 전사 인자를 활성화시켜 피부 지질 합성을 유도할 수 있다.
- [56] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 피부 외용제 조성물은 인볼루크린 (involucrine) 또는 필라그린 (filaggrin)을 더 포함할 수 있다.
- [57] 인볼루크린 (involucrine) 및 필라그린 (filaggrin)은 표피 분화 단백질로서, 피부 장벽에 중요한 역할을 담당하는 물질이며, 각질형성세포를 분화시켜 각질세포간 지질의 합성을 유도하는 물질이다. 따라서 아디포넥틴과 동시에 사용하였을 경우, 피부 지질 합성을 효과적으로 유도할 수 있다.
- [58] 올리고머 아디포넥틴은 2개 내지 12개의 아디포넥틴 단량체로부터 형성되는 단백질 복합체를 의미하며, 공유결합이 아닌 아디포넥틴 단량체 간의 상호작용에 의해 형성될 수 있다.
- [59] 인체 내 존재하는 아디포넥틴은 단량체가 아닌 올리고머로, 올리고머 아디포넥틴을 사용할 경우 대장균 등의 원핵생물에서 유래된 아디포넥틴 단량체를 사용하는 경우보다 피지선 분화 효과가 우수하여 지질 합성을 더욱

효과적으로 촉진할 수 있다.

- [60] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 아디포넥틴의 함량은 40 ng/ml 내지 250 ng/ml일 수 있다.
- [61] 아디포넥틴의 함량이 40 ng/ml 미만인 경우, 피지 분비 촉진 효과가 충분하지 않아 피지 분비에 의한 지질 생성이 유도되기 어렵다는 문제점이 있다.
- [62] 아디포넥틴의 함량이 250 ng/ml를 초과한 경우, 세포 독성 효과가 나타나며, 과도한 양의 피지가 분비되어 여드름 유발 등의 피부 질환이 발생할 수 있다.
- [63] 본 발명의 피부장벽 기능 강화용 조성물은 L-아라비노스 (L-arabinose), 시링산 (syringic acid), 크로몬 (chromone), (-)카테킨, S-아릴 시스테인, 아르기닌 (arginine), L-카르니틴 (L-carnitine), 카페인 (caffeine), 디하이드로캡사이신 (dehydrocapsaicin) 및 이소플라본 (isoflavones)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [64] L-아라비노스, 시링산, 크로몬, (-)카테킨, S-아릴 시스테인, 아르기닌, L-카르니틴, 카페인, 디하이드로캡사이신 및 이소플라본은 아디포넥틴의 발현을 증가시키는 물질로, 이들 중 적어도 하나 이상이 아디포넥틴과 같이 사용될 경우, 지질 생성을 유도할 수 있는 충분한 피지의 분비가 이루어질 수 있으며, 더 나아가 피부장벽기능을 개선 및 강화할 수 있다.
- [65] L-아라비노스는 (3R,4S,5S)-oxane-2,3,4,5-tetrol의 화학식을 가지는 물질로, 설탕에 가까운 맛을 가지지만, 잘 흡수되지 않는 성질을 가져 칼로리가 없는 당질이다. 자연계에서는 고등 식물의 헤미셀룰로오스 중에 아라비난, 아라비녹실레인 또는 아라비노갈락탄 등 다당체의 구성당 등으로서 존재하고 있다.
- [66] 시링산은 페놀성 화합물 중 하나로, IUPAC명은 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조산(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid)이다.
- [67] 시링산은 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid의 화학식을 가지는 물질로, 시킴산 경로(shikimic acid pathway)에 의하여 합성되는 페놀 화합물이며, 수수(sorghyllum bicolor), 아사이베리(Euterpe oleracea) 등의 식물 중에서 추출, 분리 및 정제되거나, 화학적으로 합성 제조된 상품(예를 들어, Sigma-aldrich사의 syringic acid)일 수 있다.
- [68] 크로몬은 그들의 주요 골격 형태로서 하기 화학식2로 나타낸 벤조피란-4-온을 갖는 방향족 화합물, 이량체, 삼량체 및 다른 중합 크로몬의 특정 유형이다:
- [69] [화학식 2]

[70]



[71] 화학식 2에서, R1, R2, R3, R4, R5 및 R6는 -H, -OH, -CH3, -SH, 알킬, 알케닐, 옥소알킬, 옥소알케닐, 하이드록시알킬, 하이드록시알케닐, -OCH3, -SCH3, -OR, -SR, -NH2, -NRH, -NR2, -NR3+X-, 갈레이트, 아세테이트, 신나모일 및 하이드록실-신나모일 에스테르, 트리하이드록시벤조일 에스테르 및 카페오일 에스테르로 구성된 그룹으로부터 선택된 에스테르; 및 헥소오스 또는 펜토오스로 구성된 그룹에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 헥소오스 또는 펜토오스는 탄소, 질소, 황 또는 산소에 의해 크로몬에 연결되며, 헥소오스 또는 펜토오스는 알도펜토오스, 메틸 알도펜토오스, 알도헥소오스, 케토헥소오스 및 이들의 화학적 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택되고;

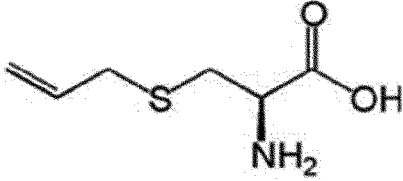
[72] 알킬 및/또는 알케닐 그룹은 이중 결합과 -OH, =O 및 -OR로 구성된 그룹으로부터 선택된 치환 그룹(들)을 상이한 위치에서 갖거나/갖지 않는 탄소수 1 내지 20의 직쇄 및/또는 분지쇄이며;

[73] X는 하이드록실, 염화물, 요오드화물, 설페이트, 포스페이트, 아세테이트, 플루오르화물, 탄산염 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 약제학적으로 허용되는 반대 음이온의 그룹으로부터 선택되며;

[74] R은 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 알킬 그룹이다.

[75] (-)카테친은 IUPAC 화학명이

(2R,3R)-2-(3,4-다이하이드록시페닐)크로만-3,5,7-트라이올이며, 녹차 (*Camellia sinensis*), 큰등골쥔신나무(*Agrimonia eupatoria* L.) 등으로부터 얻을 수 있다.

[76] S-아릴 시스테인은 의 화학식을 가지는

물질이다.

[77] 아르기닌은 (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid의 화학식을 가지는 물질로, 단백질을 구성하는 아미노산의 하나이다.

[78] 카르니틴은 3-hydroxy-4trimethylammoniumbutanoate의 화학식을 가진 물질로, 아미노산 라이신(amino acids lysine)과 메티오닌(methionine)으로부터 생합성되는 4급 암모늄 화합물(quaternary ammonium compound)이며, L-카르니틴은 생물학적으로 활성 형태인 카르니틴이다.

[79] 카페인은 1,3,7-Trimethylpurine-2,6-dione의 화학식을 가진 물질이다.

- [80] 디하이드로캡사이신은 N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnonanamide의 화학식을 가진 물질이다.
- [81] 이소플라본은 3-Phenyl-4H-chromen-4-one의 화학식을 가진 물질이다.
- [82] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이들은 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [83] **도면의 상세한 설명**
- [84] 도 1은 사람의 피지선과 피지선 세포 (sebocytes)에 있는 아디포넥틴 수용체의 발현을 나타낸 것이다. (A)는 immunohistochemistry를 통해 아디포넥틴 수용체 AdipoR1 및 AdipoR2가 인간의 피지선에 존재하는지를 분석한 것이다. Inset, isotype control. (B)는 인간의 피지선 세포에서 AdipoR1 및 AdipoR2 (녹색)의 면역형광 라벨을 나타낸 것으로, 핵은 DAPI (파란색)으로 대조한 것을 나타낸 것이다. Inset, isotype control. (C, D)는 피지선 세포 용해물의 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 나타낸 것으로, AdipoR1 및 AdipoR2를 발현하는 인간 각질세포 (keratinocytes) 및 섬유아세포 (fibroblasts)를 양성 대조군으로 사용하였다. Scale bars = 20 μ m. Sebo, sebocytes; KC, keratinocytes; FB, fibroblasts.
- [85] 도 2는 인간의 피지선 세포에서 세포 증식에 대한 아디포넥틴의 효과를 나타낸 것이다. (A)는 피지선 세포 생존에 대한 아디포넥틴의 효과를 MTT 분석으로 조사한 것을 나타낸 것이고, (B)는 다양한 용량의 아디포넥틴을 처리한 피지선 세포에서의 [3H]-thymidine incorporation 비율을 아디포넥틴이 처리되지 않은 세포에서의 [3H]-thymidine incorporation 비율의 백분율로 계산한 것을 나타낸 것이다. (C)는 피지선 세포 증식에서의 용량 의존성 효과를 현미경을 사용하여 low cell seeding assay로 조사한 것을 나타낸 것이다. Scale bars = 400 μ m. Data represent means $\pm$ SEM (n = 6). Data were analyzed using Student's t test (*P < 0.05).
- [86] 도 3은 인간의 피지선 세포에서 지질 생산에 대한 아디포넥틴의 효과를 나타낸 것이다. (A)는 아디포넥틴이 처리된 피지선 세포를 Oil Red O 및 Nile red 염색하여 현미경을 통해 세포간 지질 (intracellular lipids)이 생성된 것을 나타낸 것이다. Scale bars = 20 μ m. (B)는 다양한 용량의 아디포넥틴으로 처리된 피지선 세포에서 생성된 지질 수치를 아디포넥틴이 처리되지 않은 세포에서 생성된 지질 수치 값의 백분율로 계산한 것을 나타낸 것이다. (C)는 주요 지질층의 상대적인 양을 thin-layer chromatography에 의해 결정한 것을 나타낸 것으로, 아디포넥틴을 인간 피지선 세포에 처리한 후 [14C]-acetate의 존재 하에서 성장한 인간 피지선 세포에서의 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 왁스 에스테르 및 스쿠알렌과 같은 특정 지질 성분의 변화를 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM을 의미한다(N = 8). 데이터는 Student's t test를 이용하여 분석하였다(* P < 0.05, ** P < 0.01).
- [87] 도 4는 단백질 키나아제 (AMPK)의 신호를 활성화시키는 APPL1-AMP 전자전달계가 아디포넥틴의 처리에 의해 활성화되어 인간의 피지선 세포에서 지질 합성을 유도하는 것을 나타낸 것이다. (A)는 피지선 세포가 아디포넥틴으로

처리된 후, 전체 세포 용해물을 제조하여 웨스턴 블롯으로 분석한 것을 나타낸 것으로, 블롯을 특이적인 항체와 함께 배양하였다. (B)는 이러한 신호 단백질의 농도 분석은 actin 대조군의 농도에 대하여 표준화되었다. (C)는 아디포넥틴 (AD / Adipo) 또는 LacZ (control) 및 관련된 유전자를 발현하는 아테노바이러스로 형질도입한 피지선 세포를 웨스턴 블롯으로 분석한 것을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM을 의미한다(N = 5). 데이터는 Student's t test로 분석하였다(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

[88] 도 5는 인간의 피지선 세포의 3 차원 (3D) 배양에 대해 아디포넥틴이 미치는 영향을 나타낸 것이다. 피지선 세포를 Matrigel 층에 파종하고 7 일간 아디포넥틴 (200 NG / ml)으로 처리 하였다. 3D 배양된 피지선 세포의 Organoid 구조를 hematoxylin and eosin (H&E), Nile red, SREPB 및 epithelial membrane antigen (EMA)으로 염색한 결과를 나타낸 것이다. Scale bars = 20 μ m.

[89] 도 6은 피지선 세포는 표피 지질 장벽과 관련된 유전자의 발현을 유도한 것을 나타낸 것이다. (A)는 각질 형성 세포와 공동 배양된 피지선 세포에서 발현된 다양한 유전자에 대해 수행한 정량적인 RT-PCR 분석을 나타낸 것이다. (B)는 인간의 피지선에서 피지의 주요 성분인 팔미트산 (palmitic acid)과 스쿠알렌 (squalene)을 처리 후, 각질 형성 세포의 유전자 발현의 변경을 나타낸 것으로, 데이터는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다(N = 6). 데이터는 Student's t test로 분석하였다(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001). KC = 각질 형성 세포 (keratinocytes); Sebo = 피지선 세포 (sebocytes); FAS = 지방산 합성효소 (fatty acid synthase); HMGCR = HMG-CoA 환원효소 (reductase).

[90] 도 7은 아디포넥틴은 잘 분화된 confluent sebocytes에 영향을 미치지 않은 것을 나타낸 것으로, (A)은 Oil Red O 염색 후 현미경을 사용하여 아디포넥틴으로 처리된 피지선 세포에서 세포간 지질을 검출하고 처리되지 않은 세포의 값을 백분율로 하여 계산한 것을 나타낸 것이다. Scale bars = 20 μ m. (B)는 thin-layer chromatography로 지질층의 상대적인 양의 변화를 분석한 것을 나타낸 것이다.

[91] 재료 및 방법

[92] 시약

[93] 제조합된 인간에서 유래한 전체 길이의 아디포넥틴은 Biobud (성남, 한국)에서 구입하였다. Western blotting과 immunohistochemical analysis를 위해, AdipoR1, Akt, sterol response element binding protein (SREBP)-1, actin (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), AdipoR2 (Phoenix, Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA), APPL, phospho-AMP activated protein kinase (AMPK), AMPK, phospho-Akt (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and adiponectin (Abcam, Cambridge, UK)에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하였다.

[94] Palmitic acid and squalene은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[95] 세포 배양

- [96] 피지선 세포 (sebocyte)의 일차 배양은 인간 피지선을 표피 조직으로부터 분리시키고 세포 배양 접시로 옮긴다. 10 % 소 태아 혈청 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 5 ng/mL 제조합 인간 상피 세포 성장 인자 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 포함된 Sebomed medium (Biochrom, Berlin, Germany)에서 5 % CO₂를 함유하는 습한 공기에서 37 °C로 세포를 배양하였다. 세포가 subconfluent된 후, 0.05 % 트립신 EDTA (Gibco BRL)로 계대 배양하여 수확하였다. 피지선 세포 배양용 샘플은 수술 받은 환자의 얼굴에서 수득하였다. 모든 실험은 충남 대학교 병원 임상 시험 감사위원회의 윤리위원회 승인 절차에 따라 수행되었다.
- [97] **피지선 세포와 각질 형성 세포의 공동 배양**
- [98] 초기 각질 형성 세포 (primary keratinocytes)의 배양을 위해, 인간의 피부 샘플을 4 °C에서 디스파아제 (dispase)로 밤새 처리하였다. 처리된 샘플에서 표피를 분리하고, 분리된 표피를 37 °C에서 15 분 동안 0.05 % 트립신 및 0.025 %의 EDTA를 함유하는 용액에 넣었다. 격렬한 pipetting 후, 세포를 펠릿 (pellet)화하고, 각질 형성 세포 성장배지 (KGM)에 재부유시켰다. inserts (0.4 µm의 pore inserts [Nunc A/S, Roskilde, Denmark] 당 5 × 10⁵)에 있는 초기 피지선 세포 (primary sebocytes)는 초기 각질 형성 세포와 함께 DMEM/Ham's F12 medium (Invitrogen)에서 배양되었다(2 × 10⁵ per well in six-well culture plates). 같은 조건에서 초기 각질 형성 세포를 sham inserts로 배양하여 대조군으로 사용하였다. 표피 장벽 마커를 평가하기 위하여 피지선 세포와 대조군인 sham inserts를 제거한 후에 트립신을 처리하여 well에서 각질 형성 세포를 떼어냈다.
- [99] **Immunohistochemistry**
- [100] 조직 샘플을 10 % 포름알데히드로 고정시키고 파라핀에 넣어 보관하였으며, 4 µm의 두께로 절단하였다. 각 부분을 자일렌으로 파라핀을 녹여내고, alcohol series로 재수화시켰다. citrate buffer (10 mM citric acid, pH 6.0)에서 4 분 동안 각 부분을 pressure-cooking하여 항원을 찾았다. 실온에서 30 분 동안 2 % 과산화수소로 각 부분을 배양하여 내인성 퍼옥시다아제 활성을 차단하였다. 일차 항체를 1:200로 희석시킨 다음, 실온에서 30분 동안 이차 항체로 배양하였다. 각 부분을 diaminobenzidine tetrachloride 용액으로 실온에서 5분 동안 배양하였고, 이를 Mayer의 hematoxylin으로 대조하였다.
- [101] **Immunocytofluorescence**
- [102] 일차 피지선 세포를 20 분 동안 4 % paraformaldehyde로 고정시켜 coverslip에서 키웠고, 실온에서 10 분 동안 PBS에서 0.1 % Triton X-100으로 투과 화하였다. 그다음 일차 항체와 4 °C에서 밤새 배양한 후, FITC와 접합된 이차 항체로 실온에서 1 시간동안 교반하였다. 마지막으로, 세포를 형광 현미경 (올림푸스 (주), 도쿄, 일본)으로 볼 수 있도록 하였다.
- [103] **Western blotting**
- [104] 세포를 Proprep 용액 (intron, 대전, 한국)으로 용해시켰다. 샘플을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분해하고

니트로셀룰로오스 막에 전사시킨 다음, 적절한 항체로 배양하였다. blot을 peroxidase가 접합된 이차 항체에서 배양한 다음 chemiluminescence (intron)에 의해 가시화하였다. 단백질의 강도는 IMT I-Solution 소프트웨어 (IMT, 대전, 대한민국)를 사용하여 정량화하였고, 얻어진 값은 액틴 신호에 대하여 표준화하였다.

[105] **Real-time PCR**

[106] RT 혼합물의 분취량 (aliquots)을 특정 프라이머 세트를 이용하여 정량적인 Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)로 분석하였다. 본 연구에서는 이하의 서열의 프라이머를 사용하였다.

[107] involucrin : forward 5'-CCACTGGCTCCACTTATTTTCG-3' and reverse 5'-GGACAGAGTCAAGTTCACAGA-3';

[108] filaggrin : forward 5'-CGAAGGAGCCAAAAATATAAA-3' and reverse 5'-GATGTGCTAGCCCTGATGTTG-3';

[109] fatty acid synthase : forward 5'-AGTACACACCCAAGGCCAAG-3' and reverse 5'-GGATACTTTCCCGTCGCATA-3';

[110] HMG-CoA reductase : forward 5'-GTCATTCCAGCCAAGGTTGT-3' and reverse 5'-CTTTGCATGCTCCTTGAACA-3'.

[111] 정량적인 Real-time RT-PCR는 SYBR Green real-time PCR master mix (Invitrogen)를 제조의 프로토콜에 따라 수행되었다.

[112] 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR)

[113] 유전자 발현을 평가하기 위해, 전체 RNA는 easy-BLUE RNA extraction kit (Intron)를 사용하여 추출하였다. 전체 RNA (2 µg의)는 역전사 효소인 M-MLV (ELPIS 생명 공학, 대전, 한국)를 사용하여 역전사되었다. 역전사 혼합물의 aliquots은 AdipoR1 정방향 5'-CTTCTACTGCTCCCCACAGC-3'과 역방향 5'-ACAAAGCCCTCAGCGATAG-3';

[114] AdipoR2 정방향 5'-CTTCTACTGCTCCCCACAGC-3'과 역방향 5'-ATGGCCAGCCTCTACATCAC-3'; 및

[115] GAPDH (control), 정방향 5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT-3'과 역방향 5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT-3'의 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[116] **Assessment of cell viability**

[117] 인간의 피지선 세포 (well 당 2×10^5 세포)를 six-well plate에 접종하였다. 다음날, 다양한 투여량의 아디포넥틴을 세포에 처리하였고, 그다음 24 시간동안 배양하였다. 2시간 동안 5 mg/ml의 MTT 시약 (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드)을 사용하여 세포 독성의 비율을 평가하였고, 침전된 formazan를 dimethyl sulfoxide로 녹인 후에 분광 광도계를 사용하여 optical density (OD)를 540 nm에서 측정하였다.

[118] 세포 증식 분석

[119] [3H]-Thymidine uptake assay은 인간 피지선 세포의 증식에 대한 아디포넥틴의 효과를 확인하기 위해 수행되었다. 세포를 [3H]-Thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK) 1 μ Ci를 함유한 신선한 배지에서 배양하면서 총 6 일 동안 다양한 용량의 아디포넥틴을 2 일마다 12-well culture plate에 있는 피지선 세포에 처리하였고, 지정된 시간 동안 배양한 후, 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 상온에서 0.1 N NaOH로 배양하였다. 세포를 용해시킨 후, 세포 증식의 측정값으로 방사능의 농도를 액체 섬광 계수기를 사용하여 측정하였다. 또, low-density seeding assays을 수행하였다. six-well plate에 well 당 102 세포의 밀도로 세포를 접종시키고, 6 일 동안 성장시켰다. 상대적인 세포 성장률을 확인하기 위해 매일 현미경 사진을 찍었다.

[120] **Lipid detection**

[121] 피지선 지질을 검출하기 위해, 일차 sebocytes를 12-well culture plate 상에 well당 3×10^4 세포의 밀도로 접종하고, 밤새 배양하였으며, 총 6 일 동안 2 일마다 다양한 용량의 아디포넥틴을 처리하였다. 세포를 PBS로 세척하고 60 분 동안 실온에서 10 % 포르말데히드로 고정하였다. stock (0.5% Oil Red O in 99% isopropanol) 및 증류된 H₂O 혼합물을 6 : 4로 만들어 사용하기 직전에 고정된 세포는 filtered Oil Red O (Sigma) working 용액으로 60 분 동안 염색시켰다. 염색된 세포를 증류된 H₂O로 세척하고 hematoxylin으로 대조 염색한 다음, 현미경으로 관찰하였다. 세포 내 지질의 정량적 검출을 위해 Oil Red O를 100 % 이소프로판올로 세포를 배양하여 제거하고, 상층 액의 Oil Red O의 농도를 500nm에서 OD를 측정하여 결정하였다. 셀당 지질의 양을 계산하기 위해, OD 값을 세포 수에 대하여 표준화하였고, FACSCanto II™ Flow cytometer® 및 FACSDiva 소프트웨어 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 결정하였다. Nile red 염색을 위해, Nile red (Sigma-Aldrich; 1 mg/mL in acetone)의 stock 용액을 PBS에 1 μ g / ML의 최종 농도로 희석하였다. 세포를 실온에서 5 분간 4 % 포르말데히드로 고정하고 37 °C에서 15 분 동안 Nile red 용액으로 염색한 다음 PBS로 세척하였다. 염색된 세포를 485 nm의 여기 (excitation) 및 565 nm 방출 필터를 사용하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

[122] **Thin layer chromatography (TLC)**

[123] 주요 중성 지질을 포함하고 있는 sebocytes의 조성물을 TLC로 정제되지 않은 지질 추출물을 분리하여 조사하였다. [14C]-acetic acid (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) 2 μ Ci를 총 6 시간 동안 배지에 첨가하였다. 배지를 제거한 후, 세포를 분리하고, 분리된 세포를 클로로포름 / 메탄올 (2 : 1) 혼합물 200 μ l를 함유하는 1.5 mL 용량 튜브에 옮겼다. 세포 파편을 5 분 동안 13,000 rpm에서 원심 분리한 후, 튜브를 진공 증발기를 이용하여 건조시켰다. sebocytes로부터 추출한 지질 성분은 이전에 클로로포름으로 충전되었던 20 cm 실리카 겔 TLC 플레이트상에서 크로마토그래피로 분석하였다. 클로로포름에 녹인 지질 (40 μ L)을 spotting한 후, 다음과 같이 plate를 3번 현상하였다. (1) 헥산 상부, (2)

톨루엔 상부, (3) 상부에서 10cm 떨어진 헥산 / 에테르 / 아세트산 (70 : 30 : 1). 용매의 완전한 증발을 보장하기 위해 표준 흡 후드에서 30 분 동안 각각의 이동상 사이에서 건조하였다.

[124] 아데노바이러스 생성

[125] 역전사 (RT) 혼합물의 aliquot를 아디포넥틴 프라이머 세트 (정방향 5'-TTGGGATCCATGCTGTTGCTGGGAGCTG-3'과 역방향 5'-TGCCTCGAGTCAGTTGGTGTTCATGGTAG-3')로 PCR 사이클을 실시하였다. 증폭된 전체 길이의 아디포넥틴 cDNA를 Gateway destination vector (Invitrogen)로 위치 특이적 재조합을 하기 위해 attL 위치를 가진 pENT/CMVGFP 벡터로 서브클로닝 하였다. Virapower 아데노바이러스 발현 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 복제능력이 없는 아데노바이러스를 만들었다. entry vector와 아데노바이러스 destination vector 사이의 위치 특이적 재조합은 LR clonase (Invitrogen)로 수행되었다. Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 수득한 아데노바이러스 destination vector를 293A 세포에 감염시켰다. 80 % 세포 변성 효과를 볼 때까지 세포를 성장시킨 다음, 변성된 재조합 아데노바이러스를 수득하였다.

[126] 3 차원 배양

[127] Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007;3:716-724.에서 묘사된 방법에 따라 Matrigel (BD Technology, Durham, NC, USA)을 사용하여 인간 피지선 세포의 3차원 배양을 수행하였다. Matrigel (50-100 μ L)을 유리-바닥 접시 (직경 1 cm)에 첨가하였고, 얼음 위에서 20 분 동안 배양하는 동안에 셋팅이 가능하였다. 그 다음, 400 μ L의 배지 및 2 % Matrigel에 배양된 일차 sebocytes를 Matrigel층에 첨가하였다. 오버레이 배지는 7 일간 2 일마다 교체하였다.

[128] 통계 분석

[129] 모든 실험은 세포의 다른 batches를 갖는 적어도 3 회 반복하였다. 데이터는 student's t test를 이용하여 통계적으로 분석하였다. 모든 분석에서 $P < 0.05$ 는 통계적 유의성을 표시하였다.

[130] **Result**

[131] **Adiponectin** receptor expression in human sebaceous glands and primary sebocytes

[132] 예비 연구로 인간의 피지선에서 아디포넥틴 수용체인 AdipoR1과 AdipoR2의 발현을 조사하였다. 예비 연구에서 Immunohistochemical analysis을 통해 인간의 피지선에서 AdipoR1과 AdipoR2가 존재함을 확인하였다(도 1A). 그런 다음, 인간 피지선 세포에서 아디포넥틴 수용체의 존재를 평가하였다. immunocytochemical, Western blotting 및 RT-PCR analyses의 결과는 인간 피지선 세포가 단백질 및 mRNA 수준 (도 1B-D)에서 AdipoR1 및 AdipoR2를 발현시킨다는 것을 나타냈다. 양성 대조군으로, 인간 각질세포 (keratinocytes)와 섬유아세포 (fibroblasts)에서

아디포넥틴 수용체를 검출하였다.

[133] **Adiponectin induces proliferation of human sebocytes**

[134] 체외에서 아디포넥틴의 잠재적인 역할을 탐구하기 위해 일차 피지선 세포에 아디포넥틴 처리하였다. 우리는 먼저 MTT assay에 의해 피지선 세포에서 아디포넥틴의 세포 독성을 조사하였다. 배양된 피지선 세포에 아디포넥틴을 200 ng/mL까지의 다양한 용량을 첨가한 경우(그림 2A)에 세포 독성 효과가 없었다. 그런 다음 [3H]-thymidine incorporation assay에 의해 아디포넥틴에 의한 피지선 세포의 증식 효과를 조사하였으며, 그 결과 200 ng/mL의 아디포넥틴을 투여하였을 때 피지선 세포의 증식이 크게 유도된 것을 나타냈다(도 2B). low cell seeding assays에서 아디포넥틴은 200 ng/mL에서 인간의 피지선 세포의 성장 속도를 증가시켰다(도 2C). 이는 아디포넥틴이 생체 외에서 인간 피지선 세포의 증식을 효과적으로 유도한다는 것을 시사한다.

[135] **Adiponectin enhances lipid synthesis in human sebocytes**

[136] 이전 연구에서는 융합성 피지선 세포 (confluent sebocytes)가 분화된 피지선 세포보다 세포내 지질 방울을 더 많이 함유하는 것으로 나타났다. 그래서 본 발명자들은 피지선의 활동이 감소할 때 아디포넥틴의 역할을 탐구하기 위해 pre-confluent 미분화 피지선 세포를 사용했다. 피지선 세포에 200 ng/mL의 아디포넥틴을 처리했을 때, 세포질에서 증가된 지질의 축적을 Oil Red O 또는 Nile red (그림 3A) 염색을 통해 확인할 수 있었다. 또한, 아디포넥틴의 투여 용량이 증가할수록 세포 내 지질 수치도 증가된다는 것을 OD를 측정하여 알아냈다(도 3B). 다음으로, 주요 중성 지질의 상대적인 양을 조사하기 위해 TLC analysis를 사용하였다. 아디포넥틴은 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 왁스 에스테르 및 스쿠알렌을 포함한 모든 유형의 지질이 크게 증가되었다(도 3C).

[137] **Adiponectin increases lipid synthesis in human sebocytes via APPL1-AMPK signaling**

[138] 위 결과를 바탕으로 adiponectin 지질 합성을 강화하는 분자 메커니즘을 조사하였다. 다수의 연구는 AdipoR1 및 AdipoR2에 아디포넥틴의 결합은 다양한 유형의 세포에서 APPL1-AMPK 시그널링을 촉진하고 세포 표면에서 세포 내 표적으로 신호를 전달하는 것으로 나타났다. 인간의 피지선 세포에 있는 APPL1의 농도는 아디포넥틴 처리 후에 증가되었고, 인산화된 AMPK 발현 또한 아디포넥틴의 농도에 비례하여 증가하였다. 또한 더 나아간 연구에서 AMPK 시그널링에 의해 영향받는 세포 내 분자인 Akt를 조사한 결과, 인산화된 Akt의 수준이 아디포넥틴에 의해 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한, Akt를 활성화시켜 인간의 피지선 세포에서의 지방생합성의 촉진을 유도하는 SREBP-1의 수치는 아디포넥틴을 처리한 이후에 증가했다(도 4A 및 B). 이러한 분자 신호 경로를 확인하기 위해, 아디포넥틴을 발현하는 제조합 아데노바이러스를 만들어 인간의 피지선 세포에 도입하였다. 아디포넥틴이 과발현된 경우, APPL1-AMPK 신호 분자의 발현이 상당히 증가하였다(도 4C).

이러한 결과는 아디포넥틴이 APPL1-AMPK 시그널링을 증가시키며 APPL1-AMPK 시그널링에 관여하는 Akt / SREBP 등의 신호 분자의 발현이 증가하면 인간 미분화 피지선 세포에서 지방 생성이 촉진될 수 있다는 것을 의미한다.

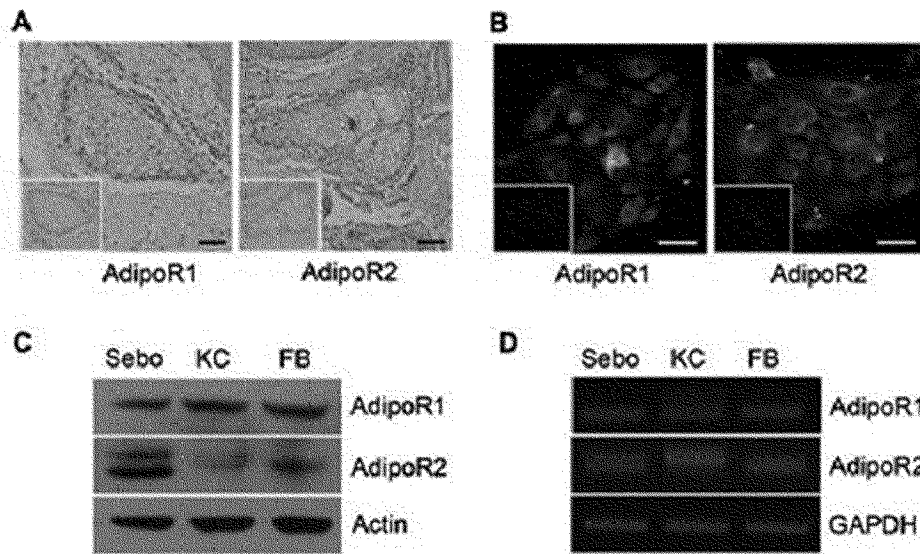
[139] **Adiponectin** induces lipid production in 3D culture of human sebocytes

[140] 생체 내에 있는 피지선 조직을 재현하기 위해, 본 발명자들은 Matrigel을 사용한 3D 배양 시스템을 개발했다. 인간 피지선 세포를 3D 배양 시스템에서 배양한 결과, 생체 내에 있는 피지선 조직을 모방한 Organoids를 형성했다. 아디포넥틴에 노출된 피지선 세포에서 형성된 Organoids는 더 크고 더 복잡한 구조를 보였으며, Nile red 염색을 통해 지질의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 또한, 인간 피지선 세포의 지질 생산을 확인할 수 있는 잠재적인 마커인 SREBP1 및 epithelial membrane antigen (EMA) 또한 adiponectin의 처리로 발현이 증가하였다(도 5).

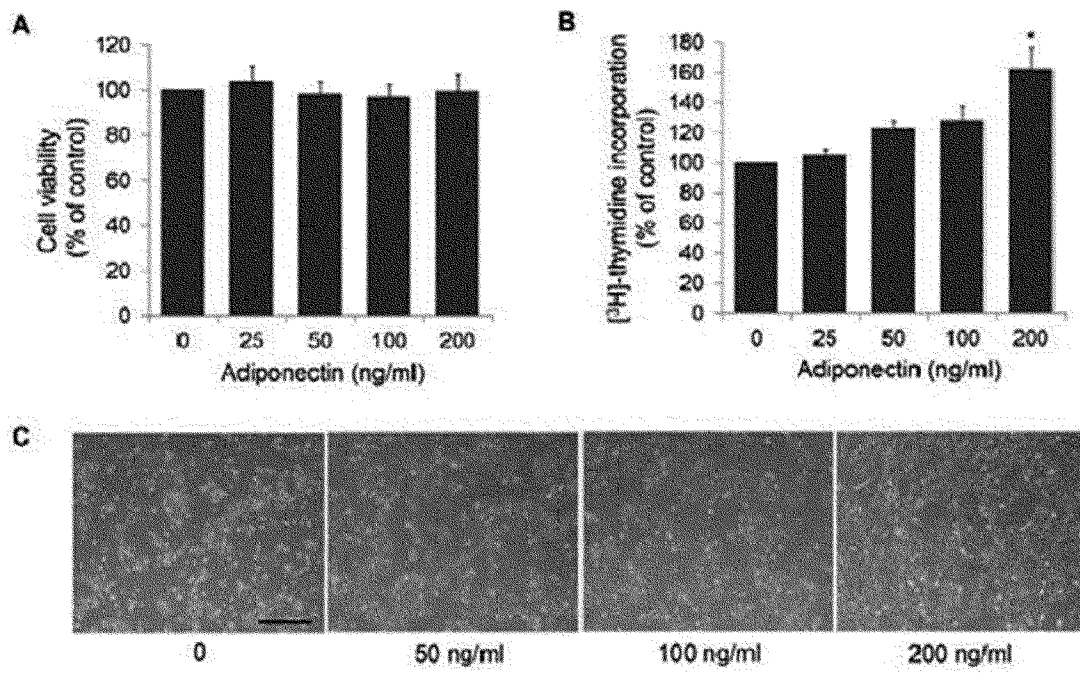
청구범위

- [청구항 1] 아디포넥틴을 포함하는 피지 분비 촉진용 피부 외용제 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 피지선 세포의 증식을 촉진하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 지질 합성을 증가시키는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 스쿠알란, 트리글리세라이드 및 팔미트산으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는 것인, 피부 외용제 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 인볼루크린 (involucrine) 또는 필라그린 (filaggrin)을 더 포함하는 것인, 피부 외용제 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, L-아라비노스, 시렁산, 크로몬, (-)카테킨, S-아릴 시스테인, 아르기닌(arginine), L-카르니틴(L-carnitine), 카페인(cafeine), 디하이드로캡사이신 및 이소플라본으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 더 포함하는, 피부 외용제 조성물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 아디포넥틴은 올리고머인, 피부 외용제 조성물.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 올리고머는 단량체가 2 내지 12개가 중합된 것인, 피부 외용제 조성물.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 아디포넥틴을 40 ng/ml 내지 250 ng/ml로 포함하는 것인, 피부 외용제 조성물.

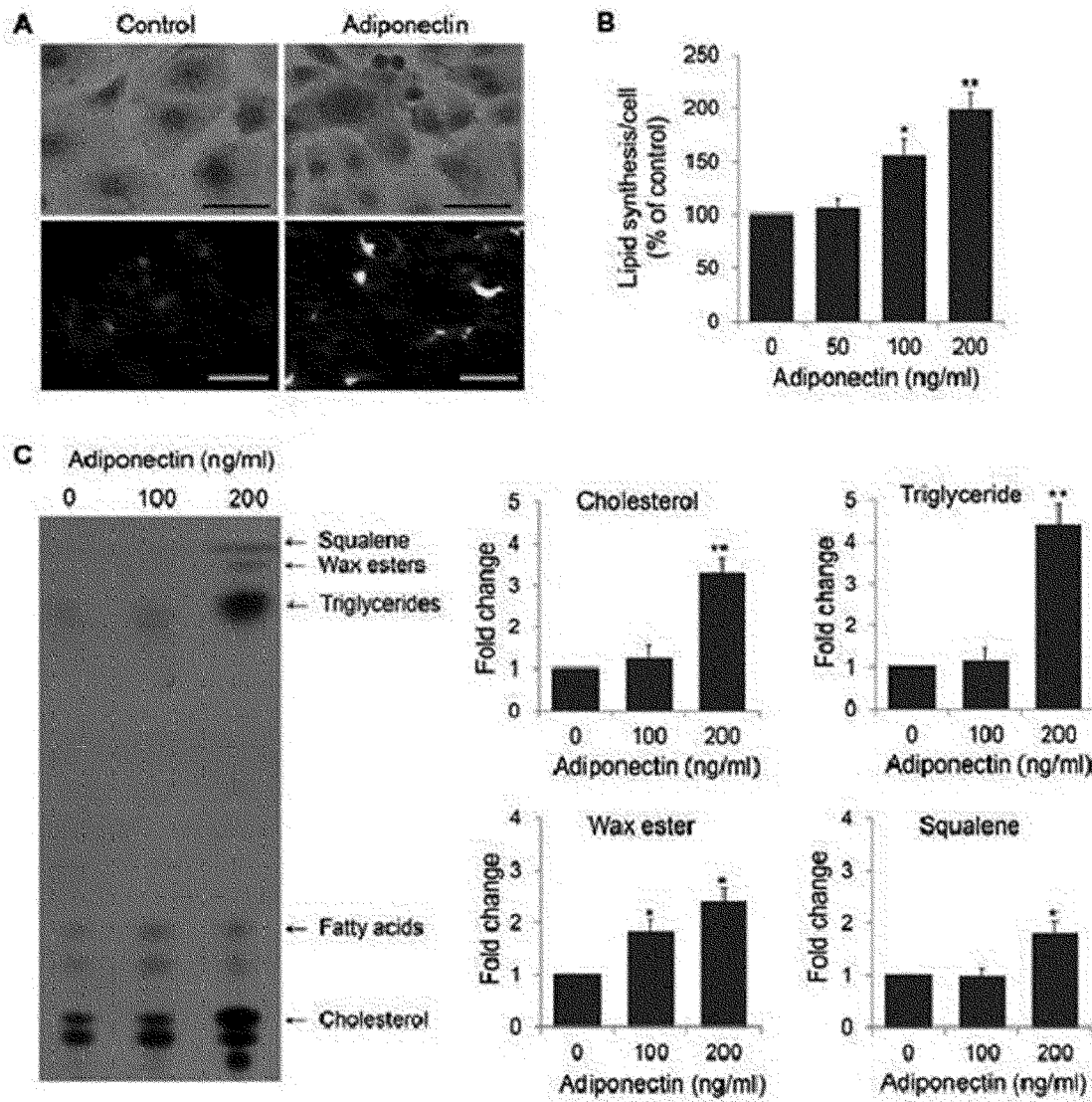
[도1]



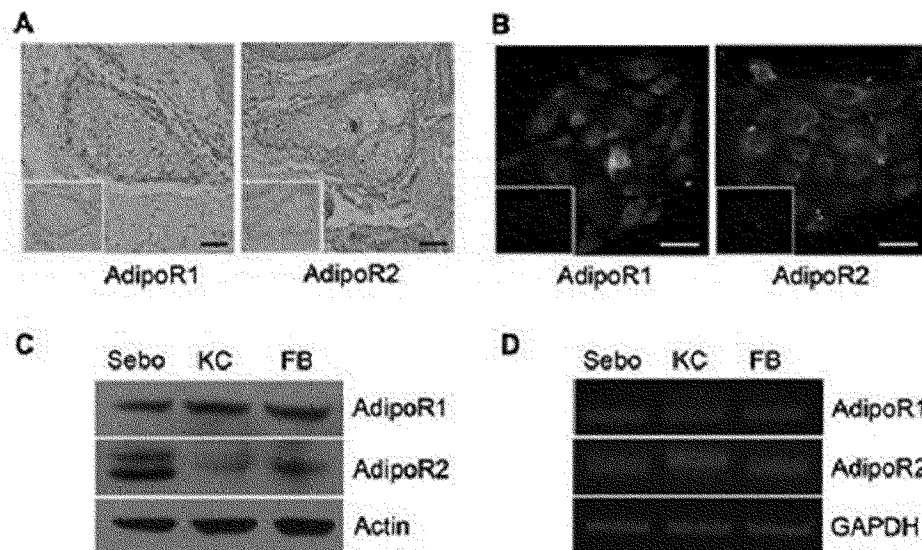
[도2]



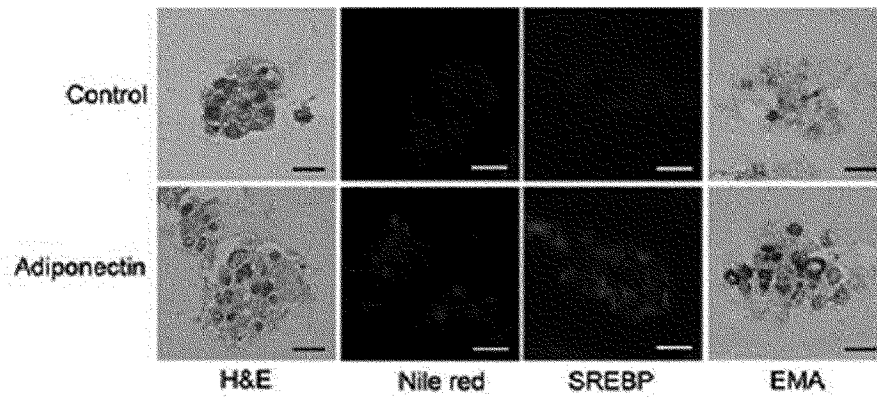
[도3]



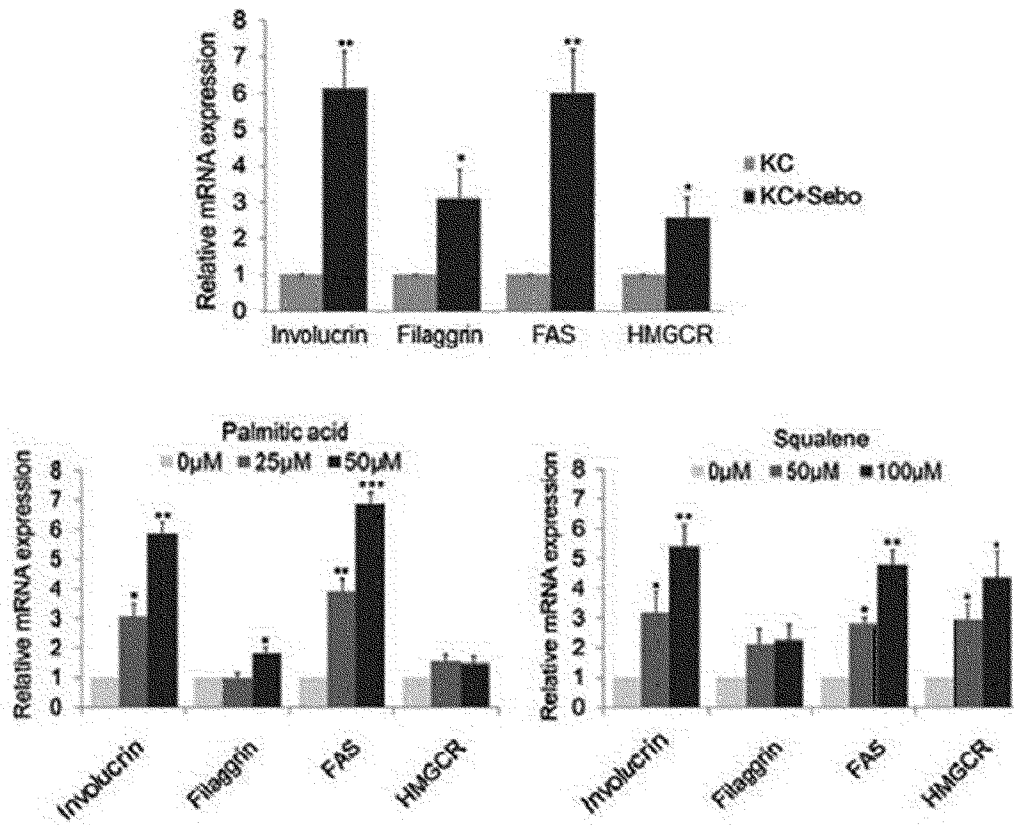
[도4]



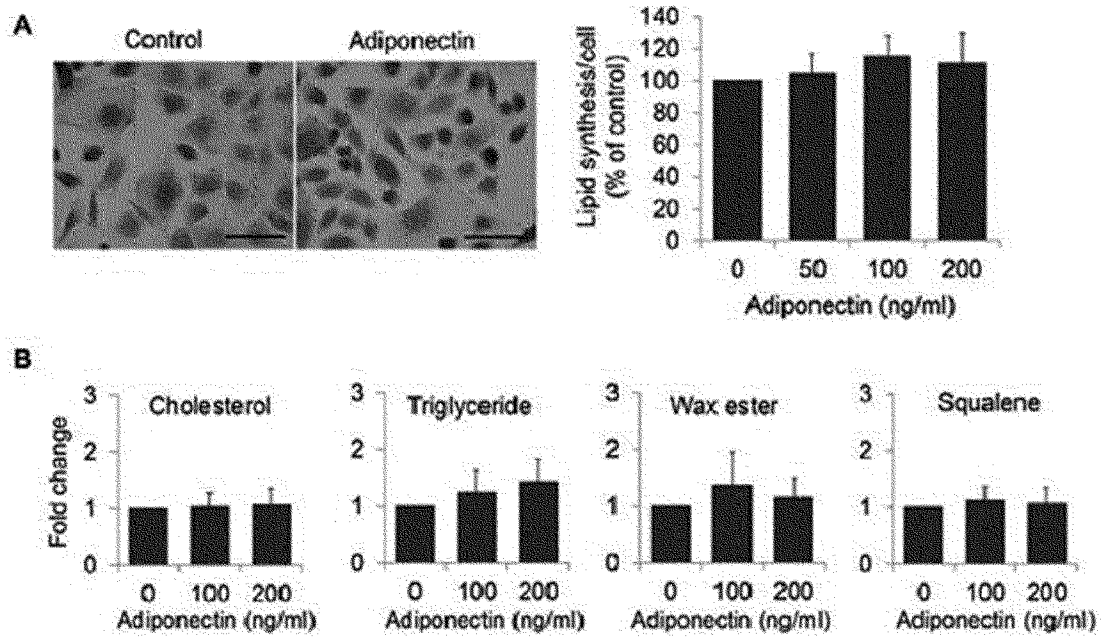
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 8/64(2006.01)i, A61K 8/98(2006.01)i, A61K 8/36(2006.01)i, A61K 8/44(2006.01)i, A61K 8/06(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 8/64; A61K 8/44; A61K 8/92; A61K 8/60; A61K 8/98; A61K 8/36; A61K 8/06; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: composition for skin external application, promotion of sebum production, adiponectin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHA, So-Yoon, "An Adiponectin-Derived Tripeptide Induces Lipogenesis in an Immortalized Human Sebocyte", Dongguk University Master's Thesis, February 2016, pages 1-49 See page 19, lines 9-18; page 28, lines 11-13; page 31, line 2-page 32, line 3; page 43, lines 11-12; page 44, lines 1-2, 20-23; and figure 7.	1-3,7-9
Y		4-6
Y	KR 10-1003847 B1 (CNP COSMETICS CO., LTD.) 23 December 2010 See paragraphs [0002], [0006]-[0007], [0014], [0016], [0029]; and claim 2.	4-5
Y	KR 10-2006-0116213 A (MARY KAY INC.) 14 November 2006 See abstract; paragraphs [0009], [0026]; claims 1, 7; and tables 1, 3.	6
A	AKAZAWA, Yumiko et al., "Adiponectin Resides in Mouse Skin and Upregulates Hyaluronan Synthesis in Dermal Fibroblasts.", Connective Tissue Research, 2011, vol. 52, no. 4, pages 322-328 See abstract; page 326, left column, line 16-right column, line 2; page 327, right column, lines 5-10; and figure 4.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 FEBRUARY 2017 (24.02.2017)

Date of mailing of the international search report

27 FEBRUARY 2017 (27.02.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010591

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JUNG, Yu-Ra et al., "Regulation of Lipid Production by Adiponectin in Human Sebocytes.", KSID Research Camp, 7th, 31 October 2015, page 52 See abstract.</p> <p>※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.</p>	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/010591

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1003847 B1	23/12/2010	NONE	
KR 10-2006-0116213 A	14/11/2006	AR 048051 A1	29/03/2006
		AU 2004-292956 A1	09/06/2005
		BR P10416686 A	06/02/2007
		CA 2545462 A1	09/06/2005
		CN 1901875 A	24/01/2007
		EA 200600996 A1	27/04/2007
		EP 1684701 A2	02/08/2006
		MX PA06005564 A	26/01/2007
		US 2005-0106194 A1	19/05/2005
		WO 2005-051288 A2	09/06/2005
		WO 2005-051288 A3	18/08/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 8/64(2006.01)i, A61K 8/98(2006.01)i, A61K 8/36(2006.01)i, A61K 8/44(2006.01)i, A61K 8/06(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 8/64; A61K 8/44; A61K 8/92; A61K 8/60; A61K 8/98; A61K 8/36; A61K 8/06; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 피부 외용제 조성물, 피지 분비 촉진, 아디포넥틴

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	차소윤, “아디포넥틴 유래의 트라이 펩타이드가 불멸화 피지세포의 지질합성에 미치는 영향에 관한 연구.”, 동국대학교 석사 학위논문, 2016.02, 페이지 1-49 페이지 19, 라인 9-18; 페이지 28, 라인 11-13; 페이지 31, 라인 2 - 페이지 32, 라인 3; 페이지 43, 라인 11-12; 페이지 44, 라인 1-2, 20-23; 및 도면 7 참조.	1-3, 7-9
Y		4-6
Y	KR 10-1003847 B1 (주식회사 씨애플차앤박화장품) 2010.12.23 단락 [0002], [0006]-[0007], [0014], [0016], [0029]; 및 청구항 2 참조.	4-5
Y	KR 10-2006-0116213 A (마리 케이 인코퍼레이션) 2006.11.14 요약; 단락 [0009], [0026]; 청구항 1, 7; 및 표 1, 3 참조.	6
A	AKAZAWA, YUMIKO 등, "Adiponectin Resides in Mouse Skin and Upregulates Hyaluronan Synthesis in Dermal Fibroblasts.", Connective Tissue Research, 2011, 52권, 4호, 페이지 322-328 요약; 페이지 326, 좌측 컬럼, 라인 16 - 우측 컬럼, 라인 2; 페이지 327, 우측 컬럼, 라인 5-10; 및 도면 4 참조.	1-9

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 02월 24일 (24.02.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 02월 27일 (27.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



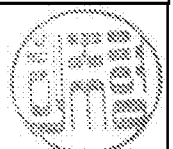
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	<p>JUNG, YU RA 등, "Regulation of Lipid Production by Adiponectin in Human Sebocytes.", KSID Research Camp, 7회, 2015.10.31, 페이지 52 요약문 참조.</p> <p>※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.</p>	1-9

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1003847 B1	2010/12/23	없음	
KR 10-2006-0116213 A	2006/11/14	AR 048051 A1	2006/03/29
		AU 2004-292956 A1	2005/06/09
		BR PI0416686 A	2007/02/06
		CA 2545462 A1	2005/06/09
		CN 1901875 A	2007/01/24
		EA 200600996 A1	2007/04/27
		EP 1684701 A2	2006/08/02
		MX PA06005564 A	2007/01/26
		US 2005-0106194 A1	2005/05/19
		WO 2005-051288 A2	2005/06/09
		WO 2005-051288 A3	2005/08/18