



- (51) 국제특허분류:
A61K 8/68 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002190
- (22) 국제출원일: 2012 년 3 월 26 일 (26.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0027198 2011 년 3 월 25 일 (25.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 다미화학 (DAMY CHEMICAL CO., LTD.) [KR/KR]; 서울특별시 금천구 가산동 481-10 호 벽산/경인디지털밸리 2 차 308 호, 153-803 Seoul (KR). (주)코리어나 화장품 (COREANA COSMETICS CO., LTD.) [KR/KR]; 충청남도 천안시 서북구 성거읍 정촌리 204-1, 331-833 Chungcheongnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김광년 (KIM, Kwang-Nyeon) [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 풍덕천 2 동 진산마을 삼성 5 차아파트 523-1104, 448-172 Gyeonggi-do (KR). 심지영 (SHIM, Ji-Young) [KR/KR]; 서울특별시 영등포구 도림동 122 번지, 150-080 Seoul (KR). 손주현

(SON, Ju-Hyun) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 삼전동 163-14 번지 601 호, 138-180 Seoul (KR). 조정민 (CHO, Jung-Min) [KR/KR]; 경기도 부천시 원미구 역곡 2 동 45-26 번지 화이트락빌 304 호, 420-102 Gyeonggi-do (KR). 이권국 (LEE, Kun-Kook) [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 죽전동 454 길훈 1 차 아파트 101 동 1002 호, 448-160 Gyeonggi-do (KR). 이광식 (LEE, Kwang-Sik) [KR/KR]; 충청남도 천안시 쌍용동 현대 6 차 홈타운 아파트 114-704, 331-731 Chungcheongnam-do (KR). 이정표 (LEE, Jeong-Pyo) [KR/KR]; 충청남도 천안시 서북구 직산읍 삼은리 세광엔리치빌 1 차 아파트 101 동 1503 호, 331-816 Chungcheongnam-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 대아 (DAE-A INTERNATIONAL IP & LAW FIRM); 서울특별시 강남구 역삼동 830-71 한양빌딩 3,4 층, 135-936 Seoul (KR).

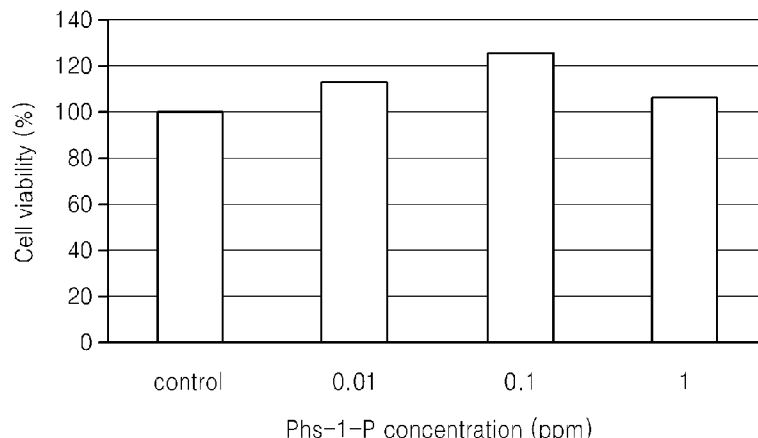
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COSMETIC COMPOSITION CONTAINING PHYTOSPHINGOSINE-1-PHOSPHATE AS AN EFFECTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a cosmetic composition containing phytosphingosine-1-phosphate as an effective ingredient, and more particularly, to a cosmetic composition which contains phytosphingosine-1-phosphate as an effective ingredient, and can thus prevent skin aging and improve anti-wrinkle properties through the delay of cellular senescence, the promotion of fibroblast proliferation, and the promotion of migration and differentiation of keratinocyte.

(57) 요약서: 본 발명은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함함으로써 피부 재생, 세포 노화 지연, 섬유아세포 증식 촉진 및 각질 형성세포의 이동 및 분화 촉진을 통하여 피부의 노화를 억제하고 주름을 개선하는 효과가 있는 화장료 조성물에 관한 것이다.





SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함함으로써 피부 재생, 세포 노화 지연, 섬유아세포 증식 촉진 및 각질형성세포의 이동 및 분화 촉진을 통하여 피부의 노화를 억제하고 주름을 개선하는 효과가 있는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 피부는 표피, 진피, 피하지방으로 이루어져 있으며, 가장 외각에는 각질층이 존재한다. 각질층은 75~150 μ m의 두께로 피부 내부로부터의 수분 손실 방지, 각종물질의 투과 및 자외선 등의 자극으로부터 신체 보호, 피부의 장벽기능을 수행한다.
- [4] 이러한 각질층은 각질세포와 각질세포간 지질로 구성되어 있다. 즉, 인간의 피부의 표면은 기저층으로부터 분화되어 성숙된 각질형성세포(keratinocyte)가 퇴화된 각질세포(corneocyte)로 이루어져 있으며, 이들 각질세포들은 각질층에 다량 존재하는 세라마이드(ceramide)의 이중사슬 라멜라 구조에 의해 결합되어 있어서 탄력있는 피부를 유지하게 한다.
- [5] 그러나 나이가 들어 피부의 노화가 진행될수록 각질층 내의 세라마이드의 함량이 감소되어 각질세포의 결합력이 감소하며 결국 각질층이 보호받지 못하게 된다. 즉, 각질층 내의 세라마이드의 함량이 감소함에 따라 피부수분의 손실, 자외선이나 화학물질 등의 외부 자극에의 노출 및 각질세포의 박리현상이 발생하여 피부표면은 거칠어지게 된다.
- [6] 외부에서 세라마이드를 공급하는 경우, 피부 각질의 지질층의 재생이 촉진되면서 손상된 피부가 회복되고, 표피 투과 수분량이 조절되며, 피부 수화력이 향상되고, 외부자극에 대한 방어능력이 커지게 되면서 상기와 같은 증상은 개선된다.
- [7] �핑고신-1-포스페이트는 세라마이드의 전구체로서 세라마이드보다 빠르게 피부층에 흡수되어 피부 세포가 직접 세라마이드를 합성할 수 있게 촉진하며, 그 자체로도 피부 보습과 항균 작용 및 피부 진정 작용이 있는바, 결과적으로 손상된 피부를 건강한 상태로 복원시켜줌으로써 탄력 있는 피부로 만들어 준다.
- [8] 이에 본 발명자들은 세라마이드의 전구체인 �핑고신-1-포스페이트의 유사체로서 지질 신호 전달 물질인 피토스핑고신-1-포스페이트를 개발하였다.
- [9] 피토스핑고신-1-포스페이트는 �핑고신-1-포스페이트보다 훨씬 저렴하지만,

- 스핑고신-1-포스페이트처럼 생물학적 유효기능을 다양하고 광범위하게 발휘할 수 있고, 생물학적 효능과 화학적 물성이 스핑고신-1-포스페이트보다 뛰어나다.
- [10] 따라서, 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 함유함으로써, 피부 재생, 세포 노화 지연, 섬유아세포 증식 촉진, 각질형성세포의 이동 및 분화 촉진효과가 있는 화장료 조성물의 개발이 필요한 실정이었다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 상기와 같은 요구를 해결하기 위하여 안출된 것으로, 상세하게는 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함함으로써 세포막에 존재하는 수용기에 결합되어 일련의 신호전달을 활성화하고, 세포의 노화를 지연시키며, 단백질 대사 및 섬유아세포 증식 촉진시키고 각질형성세포의 이동 및 분화 촉진함으로써 피부를 재생하는 효과가 있는 화장료 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [15] 여기에서, 상기 피토스핑고신-1-포스페이트는 전체 화장료 조성물 중 0.001~10,000 $\mu\text{g/ml(ppm)}$ 인 것을 특징으로 한다.
- [16] 한편, 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효 성분으로 포함함으로써, 피부 재생 효능을 갖는 것을 포함한다.
- [17] 또한 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효 성분으로 포함함으로써, 세포 노화 지연 효능을 갖는 것을 포함한다.
- [18] 또한 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효 성분으로 포함함으로써, 주름개선 효능을 갖는 것을 포함한다.
- [19] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함함으로써, 섬유아세포 증식 촉진능을 갖는 것을 포함한다.
- [20] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함함으로써, 각질형성세포의 이동 또는 분화 촉진능을 갖는 것을 포함한다.
- [21]
- [22] 이하에서 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [23] 본 발명의 화장료 조성물은 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효 성분으로 포함하는데, 상기 피토스핑고신-1-포스페이트는 하기와 같은 작용을 한다.
- [24]
- [25] <신호 전달 활성화 작용>

- [26] 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트는 내피세포(endothelial cell: EC) 내에서 스핑고신 키나아제에 의하여 인산화되고, 외부로 빠져나간 후, 세포막에 존재하는 EDG(dendothelial differentiation gene)-1 수용기에 결합되어 일련의 신호전달(signaling cascade)을 촉진한다.
- [27]
- [28] <세포 노화 지연 작용>
- [29] 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트는 EDG-1 수용기에 결합하여 VEGF(vascular endothelial growth factor), FGF(Fibroblast growth factor) 등의 생성이 증가하게 되고, 이로써 섬유아세포의 세포막의 기능을 유지하여 세포의 노화를 지연시킨다.
- [30]
- [31] <피부 재생능 촉진 작용>
- [32] 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트는 상처발생시 혈소판에서 분비되어 각질형성세포(keratinocyte)의 이동(migration) 및 분화를 촉진하며, 섬유아세포(fibroblast)의 증식을 촉진하여 피부 재생 효과가 발현된다.
- [33]
- [34] 상기한 작용을 하는 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트는 화장품 조성물 전체 중량 중 0.001~10,000 $\mu\text{g/ml(ppm)}$ 인 것이 바람직하다. 피토스핑고신-1-포스페이트가 0.001 $\mu\text{g/ml(ppm)}$ 미만인 경우에는 의도한 효과를 나타내기 어려우며, 10,000 $\mu\text{g/ml(ppm)}$ 를 초과하는 경우에는 함량 대비 효과가 높지 않고 화장품 조성물로 제제화하기 쉽지 않기 때문이다.
- [35] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 상기한 피토스핑고신-1-포스페이트 이외에, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [36] 본 발명의 화장품 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.
- [37] 보다 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [38] 본 발명의 화장품 조성물에 함유된 화장품학적으로 유효한 담체는 제형에 따라, 당업계에서 통상적으로 이용되는 담체가 이용될 수 있다.
- [39] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이

이용될 수 있다.

- [40] 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 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [41] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질알코올, 벤질벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜오일이 있으며, 특히 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨오일, 글리세롤 지방족에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [42] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌소르비톨에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [43] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 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.
- [44] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있다.
- [45] 더욱이, 본 발명의 화장품 조성물은 담체 이외에 다른 보조제를 포함할 수 있는데, 예를 들면 보습제, 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료 등을 포함할 수 있다.
- [46]

발명의 효과

- [47] 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물에 의하면, 피토스핑고신-1-포스페이트가 내피세포(endothelial cell: EC) 내에서 스팅고신 키나아제에 의하여 인산화되고, 외부로 빠져나간 후, 세포막에 존재하는 EDG(dendothelial differentiation gene)-1 수용기에 결합되어 일련의 신호전달(signaling cascade)을 촉진하는 효과가 있어, 주름개선 및 노화방지에 탁월한 효과가 있다.

[48] 또한, 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트는 EDG-1 수용기에 결합하여 VEGF(vascular endothelial growth factor), FGF(Fibroblast growth factor) 등의 생성이 증가하게 되고, 이로써 섬유아세포의 세포막의 기능을 유지하여 세포의 노화를 지연시킨다. 또한, 본 발명의 피토스핑고신-1-포스페이트는 상처발생 시 각질형성세포(keratinocyte)의 이동 및 분화를 촉진하며, 섬유아세포(fibroblast)의 증식을 촉진하여 피부 재생 효과를 나타낸다.

[49]

도면의 간단한 설명

[50] 도 1은 Balb/c 마우스를 이용하여 본 발명의 화장료 조성물의 상처 치유능을 시험한 것으로, 대조군(a)과 시험군(b)에 대한 상처 치유 정도를 비교하기 위하여 도포 후 10일, 15일 경과된 상처 부위를 촬영한 사진이다.

[51] 도 2는 계대배양 17번에 도달한 세포에 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리하고 48시간 후 세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과를 촬영한 사진(a)과 세포 생장율(b)을 나타낸 도표이다.

[52] 도 3은 1차 배양한 인간 섬유아세포에 0.01 ~ 1 ppm의 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리하였을 때 세포의 증식율을 나타내는 그래프이다.

[53] 도 4는 인서트(insert)를 이용하여 분리된 인간 각질형성세포에 0.001%의 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리하였을 때 세포의 위치 이동을 나타내는 사진이다.

[54]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[55] 이하, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다.

[56] 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[57] 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예의 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형에 들어 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[58]

[59] **실례 1 : Balb/c 마우스를 이용한 상처 치유 시험**

[60] Balb/c 마우스를 이용하여 피토스핑고신-1-포스페이트의 상처 치유능을 측정하였다.

[61]

[62] 실험방법

[63] 5-6 주령의 Balb/c 마우스의 옆구리 부분의 털을 일부 제거한 후 제모크림을 도포하여 기존의 털을 완전히 제거하였다. 제모한 부위에 강력한 비만세포 자극제인 C48/80을 피하 주사로 주입하여 염증과 상처를 유발시켰다. 이후 대조군에는 PBS buffer를, 시험군에는 1000ppm 피토스핑고신-1-포스페이트, 50ul를 1일 2회 도포하였다.

[64] 15일간 도포한 후 대조군과 시험군에 대한 상처 치유 정도를 비교하였다. 도포 후 10일, 15일 경과된 상처 부위를 촬영한 사진을 각각 도 1a(대조군), 도 1b(시험군)에 나타내었다.

[65]

[66] 결과

[67] 도 1의 결과에서 확인할 수 있는 바와 같이, 10일 경과 후 대조군에서는 비만세포 자극제 주입 부위를 중심으로 크고 작은 염증 병변이 넓게 분포하고 있는데 반해, 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리한 군에서는 자극제를 주입한 부위에만 염증 병변이 있고 깨끗한 피부상태를 나타내었다. 15일 경과 후 대조군에서는 발모가 덜 된 제모 부위에 작은 염증 병변이 남아있는 반면, 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리한 군에서는 자극제의 주입 부위를 확인할 수 없을 정도로 치유된 피부상태와 제모하지 않은 부분과 거의 구별이 되지 않을 정도의 모발의 성장을 확인할 수 있었다.

[68]

[69] 고찰

[70] 일반적인 환경 하에서 피부에는 자외선, 바람, 화학세제, 여드름, 마찰 등에 의한 작은 손상들이 축적된다. 이런 손상된 피부를 치유하는 과정에서 생긴 미세한 결함이 축적되어서 가시적인 노화가 생긴다. 어떤 원인에 의하여 피부가 손상된 경우 피부는 신속하고 효율적으로 손상을 복구할 수 있는 기작을 가지고 있으나, 노화현상이 시작되면 피부의 재생속도는 점점 저하되지만 피부의 손상은 지속적으로 발생하여 증가하게 된다.

[71] 따라서 이상의 실험 결과로부터 피토스핑고신-1-포스페이트는 손상된 피부의 치유 속도를 빠르게 증가시킴으로서 피부 재생력을 향상시키고 노화를 예방한다는 사실을 확인할 수 있었다.

[72]

[73] **실험예 2 : 인간 섬유아세포를 이용한 세포 노화지연 효능시험**

[74] 인간 섬유아세포를 이용하여 피토스핑고신-1-포스페이트의 노화 지연 정도를 측정하였다.

[75]

[76] 실험방법

[77] 인간 섬유아세포주에 FGM-2 Bullet Kit 배지를 적용하여 37°C, 5% CO₂

배양기에서 3일간 배양하였다. 계대배양 17번에 도달했을 때 2.5×10^5 cell/ml의 농도로 25T 플라스크에 분주하였다. 24시간 배양 후 0.03% 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리하였다. 48시간 후 현미경으로 세포의 형태를 관찰하고 세포수를 측정하였다. 현미경으로 관찰한 결과를 도 2a에, 세포 성장율을 도 2b에 나타내었다.

[78]

[79] 결과

[80] 관찰 결과, 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리한 세포는 무처리군에 비해 세포 성장율이 50%이상 증가하였음을 확인할 수 있었다. 육안으로도 피토스핑고신-1-포스페이트 처리군과 무처리군의 세포 수의 현저한 차이를 확인할 수 있었다.

[81]

[82] 고찰

[83] 인간과 동물로부터 분리한 섬유아세포(fibroblast)는 세포배양에서 계속 자라지 못하고 제한된 수의 분열을 한 후 성장을 정지하는데 이를 *in vitro*의 세포 복제의 노화(replicative senescence)라고 일컫는다. 세포가 노화하면 세포막의 콜레스테롤의 함량이 증가하며 상대적으로 인지질은 감소한다. 뿐만 아니라 지질과산화 및 단백질 산화가 증가하며 이 때문에 지방갈색소(lipofuscin)가 축적되고 지질과 단백질이 중합체를 형성하게 되어 막의 유동성(fluidity)이 떨어지게 되고 이는 세포막 기능의 감소와 직, 간접적으로 관련되어 있다. 또한 유전자적 변형이 일어나는데 일례로 텔로미어(telomere)의 말단은 노화가 진행되면 그 길이가 줄어드는 경향이 있는 등 세포에서 노화에 따른 변화는 여러 부분에서 관찰된다. 따라서 이상의 실험 결과는 피토스핑고신-1-포스페이트는 섬유아세포의 노화를 지연시켜 세포막의 기능을 유지시킴으로써 주름개선 및 노화 방지에 효과적임을 의미한다.

[84]

[85] **실험 예 3 :** 피토스핑고신-1-포스페이트이 인간 섬유아세포 (Human Dermal Fibroblast Neonatal)의 증식에 미치는 효과 검증

[86]

[87] 실험방법

[88] 본 실시예에서는 배양된 인간 섬유아세포에 피토스핑고신-1-포스페이트를 농도별로 처리한 후 세포 생존율을 비교하여 피토스핑고신-1-포스페이트가 세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향을 검증하였다.

[89]

MTT물질이 세포내로 흡수되어 미토콘드리아내에서 숙신산탈수소효소에 의해 포르마잔을 형성하는데 이 물질의 세포 내 축적은 미토콘드리아의 활성화, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 증식을 평가할 수 있다. 96웰 플레이트에 배양된 세포를 0.01 ~ 1 ppm 농도의 피토스핑고신-1-포스페이트로 처리하고 48시간 동안 5% CO₂, 37°C배양기에서 배양하였다. MTT 솔루션에

3-4시간 반응시킨 후 ELISA 측정기로 540nm에서 O.D값을 측정하였다.
세포생존율 산출식은 다음과 같다.

[90]

[91] 세포 생존율 (%) = (시료첨가군의 O.D at 540nm)/시료 무첨가군의 O.D at 540nm)×100

[92]

[93] 결과

[94] DMSO 처리군을 대조군으로 하고 피토스핑고신-1-포스페이트를 첨가하여 실시한 시험 결과를 도 3에 나타내었다. 시험 결과, 상기 실시예 3에서의 피토스핑고신-1-포스페이트는 세포 생존율 120% 이상을 나타내었다.

[95]

[96] 고찰

[97] 진피는 미용과 가장 관계가 깊은 층으로 잔주름과 관계가 깊다. 진피는 표피 바로 맨 밑층으로 두께는 0.7 ~ 4.0 mm 정도로 표피보다 10~40배의 두꺼운 층으로 피부의 대부분을 차지하고 있다. 진피는 피부에서 가장 중요한 부분이라고 할 수 있으며 피부 전체의 탄력을 관장하고 있다. 진피에 있는 세포 중에 가장 중요한 것은 기질단백질 사이에 존재하는 섬유아세포이다. 이 세포는 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 피브릴린(fibrillin), 프로테오글라이칸(proteoglycan) 등의 기질단백질을 합성하여 분비하는 등 진피 내에서 뚜렷한 역할을 나타낸다. 그러므로 섬유아세포의 증식은 피부노화방지, 탄력 증진, 주름 개선 등의 기능을 나타낼 수 있는 매우 중요한 진피의 구성요소이다. 따라서 이상의 실험 결과는 피토스핑고신-1-포스페이트가 섬유아세포를 자극하여 각질층에 존재하는 단백질의 대사 및 세포활성 및 증식을 촉진 효능을 나타냄으로써 주름개선 및 노화 방지에 효과적임을 나타내고 있는 것이다.

[98]

[99] **실험예 4 :** 피토스핑고신-1-포스페이트이 인간 각질형성세포 (Human epidermal keratinocytes, neonatal)의 이동(migration)에 미치는 효과 검증

[100]

[101] 실험방법

[102] 본 실시예에서는 배양된 인간 각질형성세포에 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리한 후 세포의 위치 이동을 관찰하여 피토스핑고신-1-포스페이트가 세포의 이동 및 증식에 미치는 영향을 검증하였다.

[103]

[104] 세포현탁액을 5×10^5 cells/ml의 농도로 준비하고 35Φ배양용기에 멸균한 족집계를 이용하여 인서트(insert)를 중앙에 두었다. 세포현탁액을 인서트의 각 웰(well)에 70ul씩 주입하고, 배양용기를 shaking하지 않았다. 5% CO₂, 37℃에서 24시간 배양한 후 세포가 부착되었음을 확인하고 인서트를 족집계로 떼어내었다. 배양용기에 0.001% 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리한 배지를

2ml 넣고 24시간 배양 후 현미경으로 관찰하고, 사진 촬영하였다. 결과를 도 4에 나타내었다. A는 대조군(control) 처리 5시간 후, B는 대조군 처리 24시간 후, C는 0.001% 피토스핑고신-1-포스페이트 처리 5시간 후, D는 0.001% 피토스핑고신-1-포스페이트 처리 24시간 후의 사진을 나타낸 것이다.

[105]

[106] 결과

[107] 관찰 결과, 피토스핑고신-1-포스페이트를 처리한 세포는 무처리군에 비해 세포 간격이 빠르게 좁아지면서 세포의 이동성이 향상되고 분화가 촉진됨을 확인할 수 있었다

[108]

[109] 고찰

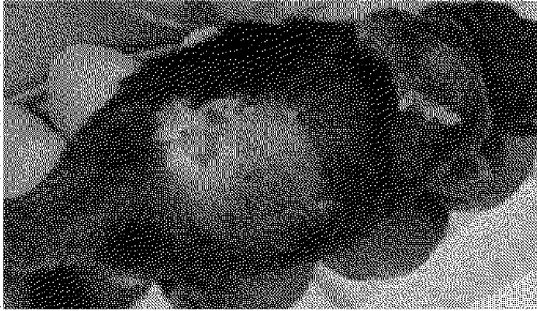
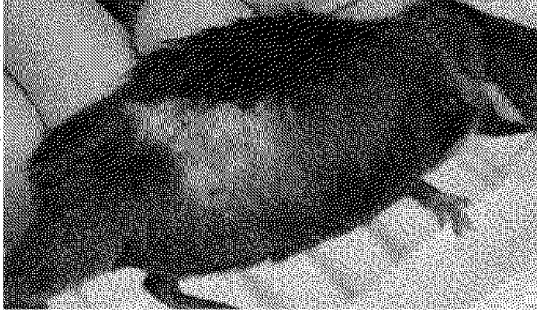
[110] 상처치유 과정은 상피화(epithelialization), 수축, 교원질의 합성, 그리고 육아조직의 생성에 의해 이루어진다. 상피화는 외상을 받은 부위에 남아있는 상피세포의 분화, 분열 및 이동에 의하여 이루어진다. 상피화 단계에서는 상처부위의 각질세포(keratinocytes)의 변화가 일어나는데 표피(epidermis)는 두꺼워지고 상처부위의 기저세포(marginal basal cells)가 커지고 상처의 결손부로 이동한다. 한 세포가 이동하기 시작하면 표피접촉(epidermal continuity)이 회복될 때까지 분열하지 않는다. 상처부위 가까운 곳에 있는 fixed basal cells은 계속 분열하고 daughter cells은 편평해지고 상처기질(wound matrix)위로 이동한다. 따라서 이상의 실험 결과로부터 피토스핑고신-1-포스페이트가 상처발생 시 혈소판에서 분비되어 각질형성세포(keratinocyte)의 이동 및 분화를 촉진하여 상처치유속도를 향상시키고 피부 재생에 효과적임을 확인할 수 있었다.

청구범위

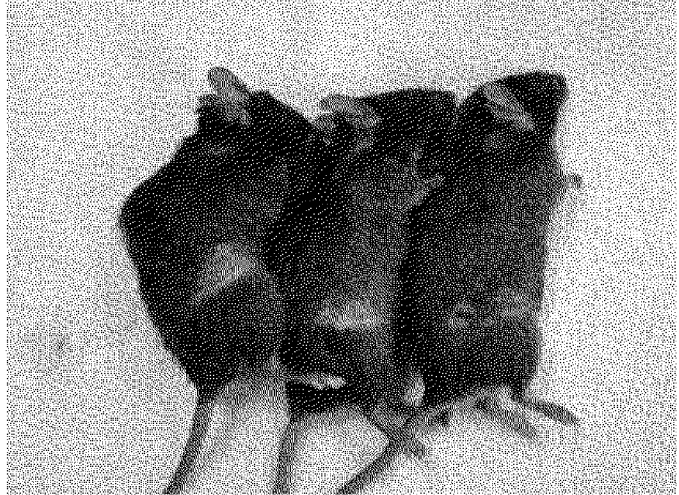
- [청구항 1] 피토스핑고신-1-포스페이트를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 피토스핑고신-1-포스페이트는 전체 화장료 조성물 중 0.001~10,000 $\mu\text{g/ml(ppm)}$ 인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 3] 제 1항의 조성물을 포함함으로써, 피부 재생 효능을 갖는 화장료 조성물.
- [청구항 4] 제 1항의 조성물을 포함함으로써, 세포 노화 지연 효능을 갖는 화장료 조성물.
- [청구항 5] 제 1항의 조성물을 포함함으로써, 섬유아세포 증식 촉진능을 갖는 화장료 조성물.
- [청구항 6] 제 1항의 조성물을 포함함으로써, 각질형성세포의 이동 또는 분화 촉진능을 갖는 화장료 조성물.

[Fig. 1a]

<10days>

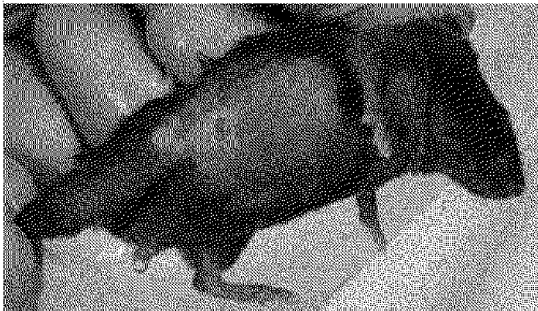
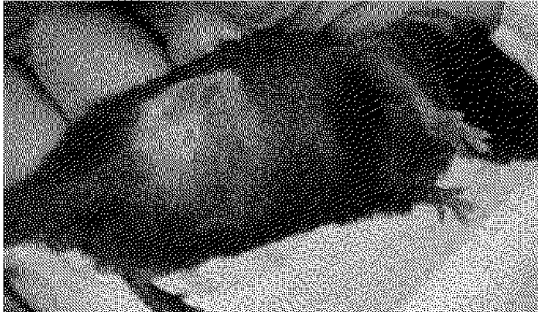


<15days>



[Fig. 1b]

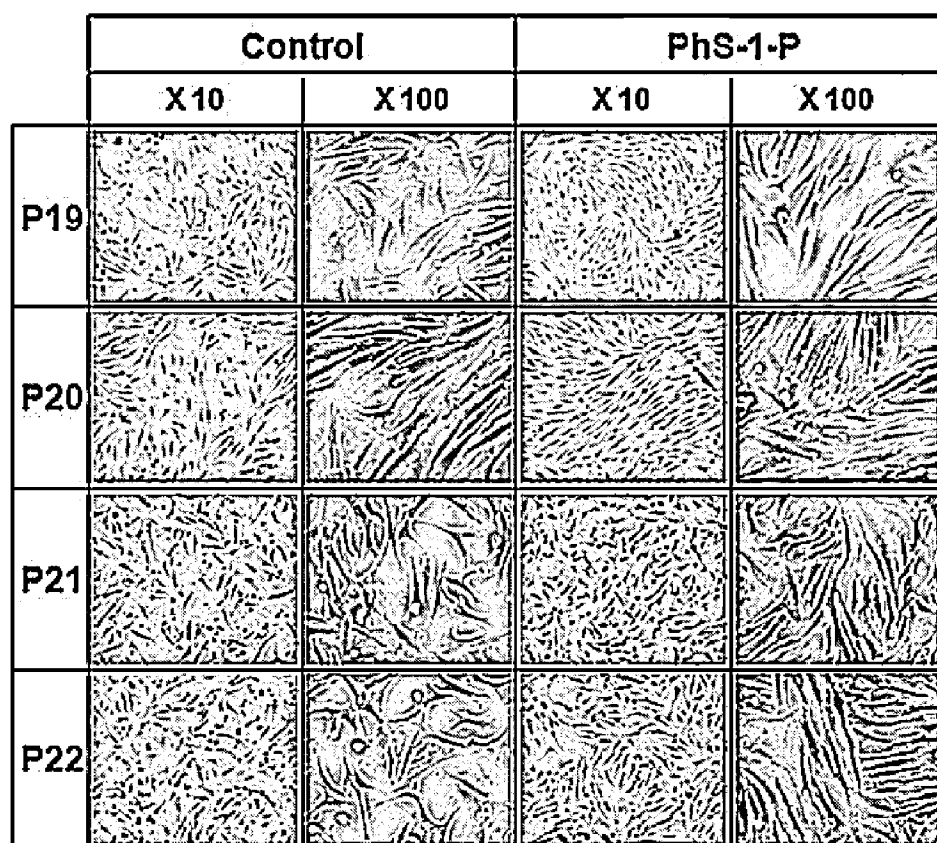
<10days>



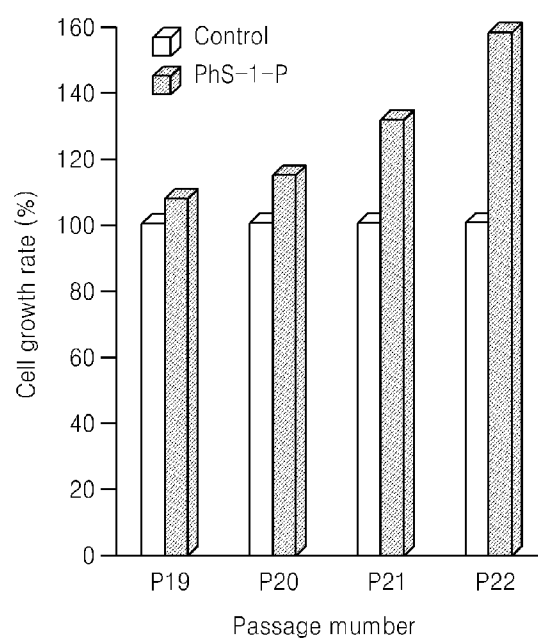
<15days>



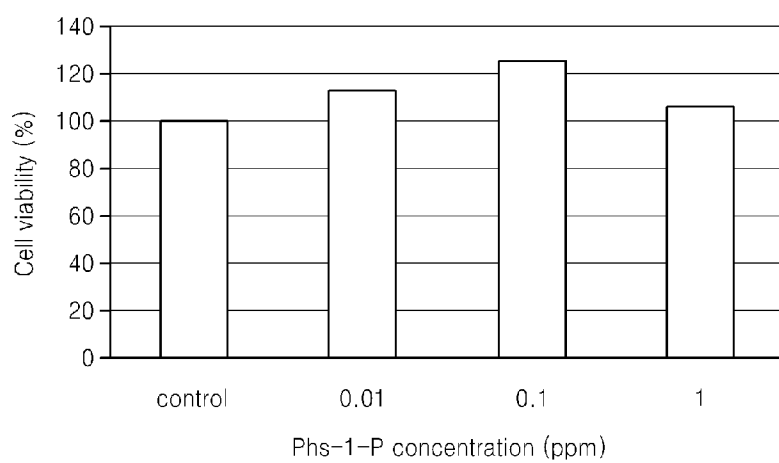
[Fig. 2a]



[Fig. 2b]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

