(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월28일
(11) 등록번호 10-2343912
(24) 등록일자 2021년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/16 (2016.01) *A61K 33/00* (2006.01)
A61K 35/02 (2015.01) *A61K 8/19* (2006.01)
A61K 8/96 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/16 (2016.08)
A61K 33/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0035651
(22) 출원일자 2021년03월19일
심사청구일자 2021년03월19일
(56) 선행기술조사문헌
JP5847396 B2*
WO2013073644 A1*
KR101705319 B1
KR1020170065851 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
강상수
경상남도 진주시 신안들말길 58, 201동 806호(신안동, 평거2차현대아파트)
(74) 대리인
최규환

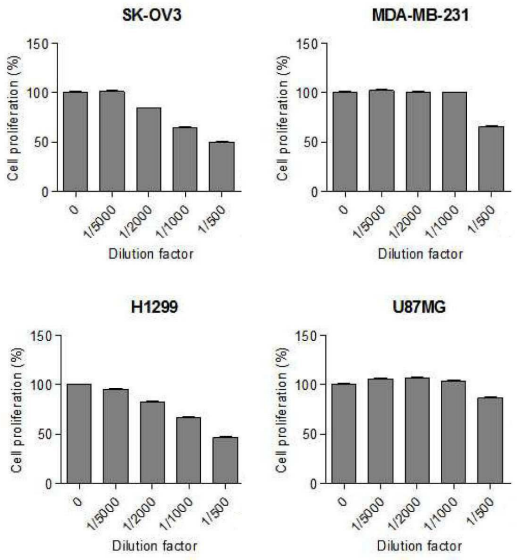
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 **복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항염증 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물 및 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 피부 염증의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A61K 35/02 (2013.01)
A61K 8/19 (2013.01)
A61K 8/965 (2013.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/005 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 난소암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로서,

상기 복합 이온미네랄 용액은 철광석을 100~300 매쉬(mesh) 범위의 분말로 분쇄하고, 상기 분말 1-15 중량%에 무기산 15-30 중량%와 잔량은 물로 하여 100 중량%를 이룬 후, 50-80℃ 범위에서 24시간 내지 72시간 동안 교반한 후 여과한 여액(filtrate)이며,

상기 조성물은 난소암의 증식 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 난소암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽, 발포정 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 난소암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 복합 이온미네랄 용액은 철광석을 100~300 매쉬(mesh) 범위의 분말로 분쇄하고, 상기 분말 1-15 중량%에 무기산 15-30 중량%와 잔량은 물로 하여 100 중량%를 이룬 후, 50-80℃ 범위에서 24시간 내지 72시간 동안 교반한 후 여과한 여액(filtrate)이며,

상기 조성물은 난소암의 증식 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 복합 이온미네랄 용액 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 및 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 난소암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항염증 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 국내의 경우, 질병 사망원인 중 제1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라, 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.

[0003] 염증(inflammation)은 물리적인 상처나 미생물에 감염되었을 때 일어나는 정상적인 생체 방어기전(defense mechanism)의 일종이며, 이 염증작용을 통하여 발병요인을 중화시키거나 제거하고, 손상된 조직을 복구시켜 정상적인 구조와 기능을 하게 한다. 염증을 동반하는 대부분의 질환은 조직의 손상, 통증 및 가려움증과 같은 삶의 질을 떨어뜨리는 결과를 초래한다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1199897호에는 '천연 광물 및 이의 용해물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2035481호에는 '점토광물 복합체를 포함하는 염증성 대장염의 예방, 개선 및 치료용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항염증 조성물'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 천연광물로부터 추출된 복합 이온미네랄 용액을 다양한 암 세포주에 처리한 결과 폐암 및 난소암 세포주가 다른 암종과 비교해 복합 이온미네랄 용액에 처리에 따른 세포 증식 억제 활성이 높게 나타났음을 확인하였고, 폐암 세포주를 이용한 분자기전 연구 결과 복합 이온미네랄 용액이 암세포에서 활성산소종의 생산을 증가시켜 철 의존성 세포자살을 유도하여 암세포를 사멸시키는 것을 알 수 있었으며, 난소암 세포주를 이용한 연구 결과 복합 이온미네랄 용액이 암세포의 종괴(colony) 형성, 이동(migration) 및 침윤(invasion)을 저해하는 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 복합 이온미네랄 용액은 대식세포에서 염증 유발원 처리에 의한 일산화질소(NO) 생성을 효과적으로 저해할 수 있어 항염 활성이 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 항염증용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 피부 염증의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 복합 이온미네랄 용액은 천연광물 유래로 세포독성이 없으며, 우수한 항암 및 항염 활성을 가지고 있으므로, 암 또는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 비소세포폐암 세포주(A549, H460, H1299, H358, H23, H1975)에 복합 이온미네랄 용액을 농도별로 처리한 후 48시간 배양하여 세포 생존 능력을 확인한 결과이다.

도 2는 H460 및 H1975 세포주에서 복합 이온미네랄 용액 처리에 따른 세포주기의 변화를 유세포분석기를 통해 확인한 결과이다.

도 3은 H460 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1)을 48시간 동안 처리한 후 세포주기와 관련된 단백질 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과이다. A.U.: arbitrary unit.

도 4는 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1)을 48시간 동안 처리한 후 세포주기와 관련된 단백질 변화를 웨스턴블랏을 통해 확인한 결과이다.

도 5는 H460 및 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1)을 처리하고 Annexin V/PI를 염색하여 유세포분석기를 통해 세포사멸 변화를 분석한 결과이다.

도 6은 H460 및 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1)을 48시간 동안 처리한 후 세포사멸과 관련된 단백질 변화를 웨스턴블랏을 통해 확인한 결과이다.

도 7은 H460 및 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1)을 48시간 동안 처리한 후 철 의존성 세포사멸과 관련된 단백질 변화를 웨스턴블랏을 통해 확인한 결과이다.

도 8은 H460 및 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1), 또는 과산화수소(H_2O_2)를 48시간 동안 처리한 후 carboxy-H_2DCFDA로 염색한 후 유세포분석기를 통해 활성산소종 생산 변화를 분석한 결과이다.

도 9는 H460 및 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액(K1) 단독 또는 복합 이온미네랄 용액과 페롭토시스(ferroptosis) 억제제인 Ferrostatin-1을 동시에 처리하고 48시간 후 carboxy-H_2DCFDA로 염색한 후 유세포분석기를 통해 활성산소종 생산 변화를 분석한 결과이다.

도 10은 폐암 세포주(H1299), 난소암 세포주(SK-OV3), 유방암 세포주(MDA-MB-231), 대장암 세포주(SW620) 및 뇌종양 세포주(U87MG)에서 복합 이온미네랄 용액의 세포 증식 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 11은 난소암 세포주(SK-OV3)를 이용한 종괴형성능력 평가(colony formation assay) 결과로, 복합 이온미네랄 용액(K1) 처리 농도에 따라 종괴 형성이 저해되고 있음이 확인되었다.

도 12는 복합 이온미네랄 용액(K1)이 난소암 세포의 이동(migration)에 미치는 영향을 분석하기 위한 상처회복 분석(wound healing assay) 결과이다.

도 13은 난소암 세포의 침윤(invasion)에 미치는 복합 이온미네랄 용액의 영향을 Matrigel matrix을 이용하여 분석한 결과이다.

도 14는 RAW 264.7 세포에서 복합 이온미네랄 용액의 세포 독성을 분석한 결과이다.

도 15는 RAW 264.7 세포에서 염증유발원(LPS)에 의한 일산화질소(NO) 생산에 미치는 복합 이온미네랄 용액(A)의 영향을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 복합 이온미네랄 용액은 철광석, 일메라

이트(Ilmenite), 맥반석, 견운모 중에서 선택되는 천연 광물을 100~300 매쉬(mesh) 범위의 분말로 분쇄하고, 상기 분말 1-15 중량%에 무기산 15-30 중량%와 잔량은 물로 하여 100 중량%를 맞춘 후, 50-80℃ 범위에서 24시간 내지 72시간 동안 교반한 후 여과한 여액(filtrate)일 수 있다.

[0015] 상기 무기산은 황산, 염산, 질산, 인산 등일 수 있으며, 바람직하게는 황산일수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명에 따른 복합 이온미네랄 용액은 황, 철, 알루미늄, 아연, 코발트, 구리, 바나듐, 칼슘, 칼륨, 스트론튬, 마그네슘, 나트륨, 티타늄, 망간, 규소, 인, 붕소, 니켈, 크롬, 비소, 납 및 몰리브덴 성분이 포함될 수 있다.

[0017] 본 발명의 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 복합 이온미네랄 용액은 암세포에서 활성산소종의 생산을 증가시켜 철 의존성 세포자살을 유도하여 암 세포를 사멸시키는 효과가 있으며, 암 세포의 종괴(colony) 형성, 이동(migration) 및 침윤(invasion)을 저해하는 효과가 있다.

[0018] 본 명세서에서 사용된 "암(cancer)"이라는 용어는 고체 종양 및 혈액 종양(blood born tumor)을 포함하는 일반적인 암 질환을 말하며, 바람직하게는 폐암, 난소암, 대장암, 유방암, 뇌종양, 간암, 위암, 결장암, 피부암, 방광암, 전립선암, 자궁경부암, 갑상선암, 신장암, 섬유육종, 흑색종 및 혈액암일 수 있고, 더욱 바람직하게는 폐암 또는 난소암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 상기 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽, 발포정 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 건강기능식품 조성물은 항암 활성을 증가시키기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 복합 이온미네랄 용액을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 복합 이온미네랄 용액을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 복합 이온미네랄 용액은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양의로 첨가된다. 그러나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 안전성 면에서 아무런 문제가 없는 범위의 양으로 사용될 수 있다.

[0021] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 상기 음료는 탄산음료, 기능성이온음료, 쥬스(예를 들어, 사과, 배, 포도, 알로에, 감귤, 복숭아, 당근, 토마토쥬스 등), 식혜 등을 포함한다.

[0022] 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한, 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 복합 이온미네랄 용액은 전술한 것과 같다.

[0025] 또한, 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 암은 전술한 것과 같다.

[0026] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 조성물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당하는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한, 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 항염증용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에 따른 항염증용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 복합 이온미네랄 용액은 전술한 것과 같다.

[0032] 본 발명의 항염증용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 복합 이온미네랄 용액은 염증유발원에 의해 유도되는 일산화질소(NO)의 생산을 감소시켜 염증을 완화시키는 효과가 있다.

[0033] 본 발명은 또한, 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명에 따른 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 염증성 질환은 알레르기, 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 의미할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 상기 담체는 전술한 것과 같다.

[0036] 본 발명은 또한, 복합 이온미네랄 용액을 유효성분으로 함유하는 피부 염증의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 일 구현 예에 따른 화장료 조성물에 있어서, 상기 피부 염증용 화장료 조성물은 스킨, 스킨소프트너, 스킨 토너, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이크림, 모이스처크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징워터, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌져, 비누 및 파우더 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 각 제형으로 이루어진 화장료 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기제와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다.

[0038] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카,

알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판-부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 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.

[0041] 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.

[0042] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 아세티오네이트, 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.

[0043] 본 발명의 화장료 조성물은 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 단백질, 용해화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물 등을 포함하는 부형제를 추가로 함유할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **제조예 1. 복합 이온미네랄 용액의 제조**

[0048] 천연광물인 철광석을 150 매쉬 이하의 분말로 분쇄하고, 그 분말 10 중량%를 황산 25 중량%와 잔량은 물로하여 100 중량%로 조정한 후, 60℃에서 48시간 교반하고, 상온으로 냉각한 후 수 시간 정치 후 상등액을 취하고 잔량은 여과지로 여과하여 여액을 취하였다. 상기 여액은 외관은 연한 노랑색 투명 용액상태로 상기 여액을 복합 이온미네랄 용액으로 명명하였다.

[0049] 상기 복합 이온미네랄 용액을 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 성분 분석을 실시하였고, 그 결과 복합 이온미네랄 용액은 황, 철 및 알루미늄을 주성분으로 하여, 아연, 코발트, 구리, 바나듐, 칼슘, 칼륨, 스트론튬, 마그네슘, 나트륨, 티타늄, 망간, 규소, 인, 붕소, 니켈, 크롬, 비소, 납 및 몰리브덴의 성분으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

[0050] 또한, 한국화학융합시험연구원과 한국화학연구원(안전성평가연구소)에서 수행한 독성시험 결과 본 발명의 복합 이온미네랄 용액은 생체에 무해한 것으로 확인되었다.

표 1

[0051] 복합 이온미네랄 용액의 독성 분석

구분	반수치사량 (㎎/㎏)	자극성 평가점수	비고
급성경구독성	> 5,000	-	사망 실험동물 "0"
급성경피독성	> 4,000	-	사망 실험동물 "0"
피부자극성	-	0.0	
피부감작성	-	0.0	
안점막자극	-	0.0	
어류독성	> 10	-	사망 실험동물 "0"
물벼룩 급성유영저해	> 100	-	사망 실험동물 "0"
조류경구독성	> 2,000	-	사망 실험동물 "0"
아급성경구독성	> 1,000	-	사망 실험동물 "0"
아급성경피독성	> 1,000	-	사망 실험동물 "0"
유전독성(복귀돌연변이시험)	> 5,000	-	유전자 변이 "0"

[0053] **실시예 1. 복합 이온미네랄 용액의 항암 효과: 폐암**

[0054] 상기에서 제조한 복합 이온미네랄 용액의 항암 효과를 평가하기 위해, 비소세포 폐암 세포주 (A549, H460, H1299, H358, H23, H1975)에 복합 이온미네랄 용액을 48시간 처리한 후 MTT 분석을 통해 세포 생존 능력을 확인하였다. 간단하게, 96 웰 플레이트에 $5x10^4$ 세포/웰의 밀도로 분주한 다음 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양시킨 후 각 복합 이온미네랄 용액을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 복합 이온미네랄 용액의 농도별 처리 시, 희석은 생리식염수(0.9% saline)를 사용하였다. 배양 종료 4시간 전에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 용액을 각 웰에 100 ㎕씩 넣고 4시간 동안 배양한 다음 상층액을 제거하고 DMSO (dimethylsulfoxide)를 100 ㎕로 첨가하여 형성된 포마잔(formazan)을 녹인 후 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 시료 첨가구와 무첨가 구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

[0055] 그 결과 6가지의 비소세포 폐암 세포주 모두 1,000 ppm의 복합 이온미네랄 용액 처리에 의해 복합 이온미네랄 용액 무처리구 대비 세포 생존능이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었고(도 1), 특히 H460, H1299, H23 및 H1975 세포주에서는 100 ppm의 복합 이온미네랄 용액 처리구에서부터 무처리구 대비 유의성 있는 세포 생존능 감소가 관찰되었다. 본 발명자는 H460 및 H1975 세포주를 선택하여 이후 실험을 진행하였으며, 복합 이온미네랄 용액의 처리 농도를 200 및 400 ppm으로 고정하여 실험을 진행하였다.

[0056] H460 또는 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액을 48시간 동안 처리한 후 PI (propidium iodide) 또는 EdU/SYTOX (Thermo Fisher Scientific, 미국)를 염색하여 유세포분석기(flow cytometry)를 통한 폐암 세포의 세포주기 변화를 확인하였다. 그 결과, H460 세포는 복합 이온미네랄 용액 무처리구 대비 처리구에서 G0/G1기의 정지 비율이 증가되고, H1975 세포는 복합 이온미네랄 용액 무처리구 대비 처리구에서 G2/M기의 정지 비율이 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 2). 본 발명자는 상기 복합 이온미네랄 용액의 세포주기 정지 유발의 분자기전을 확인하기 위해, H460 또는 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액을 48시간 동안 처리한 후 단백질을 추출하여 세포주기를 조절하는 단백질의 발현 수준 변화를 웨스턴블랏을 통해 확인하였다. 그 결과, H460 세포에서는 Rb의 인산화 형태(p-Rb)가 감소되었고 p21 단백질의 발현은 증가되었으며, cyclin D1 및 cyclin E1의 발현이 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 복합 이온미네랄 용액 처리에 의해 H460 세포에서 G0/G1기의 정지 유발이 뒷받침되었다(도 3). 또한, H1975 세포의 경우 Rb의 인산화가 감소하였으며 p21, cyclin D1 및 cyclin E1 단백질의 발현이 증가되었음을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 H1975에서는 복합 이온미네랄 용액의 처리에 의해 G0/G1의 정지가 일어나지 않는 것을 뒷받침할 수 있었다(도 4).

[0057] 또한, H460 또는 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액을 48시간 동안 처리한 후 Annexin V/PI를 염색하여 유세포분석기를 통해 세포사멸 변화를 분석하였다. 그 결과, H460 및 H1975 세포주 모두 세포사멸이 증가되었음을 확인할 수 있었고(도 5), 웨스턴블랏을 통해 세포사멸을 조절하는 단백질의 발현 수준 변화를 분석한 결과, 복합 이온미네랄 용액 처리에 의해 cleaved-caspase 8은 발현이 증가되었으나 cleaved-caspase 9, cleaved-caspase 3 및 cleaved-PARP의 발현은 변화 없음을 알 수 있었다(도 6). 본 발명자는 추가로 철 의존성 세포사멸 즉, 페롭토시스(ferroptosis)와 관련된 단백질의 발현 변화를 웨스턴블랏으로 확인하였다. 그 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 H460 및 H1975 세포주 모두 복합 이온미네랄 용액 처리에 의해 페리틴(Ferritin) 단백질의 발현이 증가하는 것이 확인되었고, 이를 통해 세포 내 철의 함량이 증가되었음을 유추할 수 있었다. 또한, HO-1 (heme oxygenase-1)의 단백질 수준은 증가하고 S1R (sigma-1 receptor) 및 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)의 발현은 변화하지 않았음을 알 수 있었다. 또한, H460 세포주의 경우 p53의 발현 감소가 확인되었으며, H460 및 H1975 세포주 모두 GPX4 (glutathione peroxidase 4) 단백질의 수준이 감소되었다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 복합 이온미네랄 용액이 철 의존성 세포사멸을 유도할 것이라 예상되었다.

[0058] 페롭토시스(ferroptosis)는 최종 산물로 활성산소종을 생산한다. 이에, 본 발명자는 복합 이온미네랄 용액 처리에 따른 폐암 세포주의 활성산소종 생산 변화를 분석해보았다. 간단하게, H460 및 H1975 세포주에 복합 이온미네랄 용액, 또는 과산화수소(H_2O_2)를 48시간 동안 처리한 후 carboxy-H_2DCFDA로 염색하고 유세포분석기를 통해 활성산소종 생산 변화를 분석한 결과, 두 세포주 모두에서 활성산소종 생산이 무처리구 대비 현저하게 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 8). 또한, 페롭토시스(ferroptosis) 억제제인 Ferrostatin-1을 복합 이온미네랄 용액과 동시에 처리하고 분석한 결과, 복합 이온미네랄 용액 단독 처리에 의해 증가되었던 활성산소종의 생산량이 Ferrostatin-1과의 동시 처리에 의해 현저하게 저해되었음을 확인할 수 있었다(도 9). 상기 결과는 복합 이온미네랄 용액이 철 의존성 세포사멸을 통해 폐암 세포의 사멸을 유도한다는 것을 시사하였다.

[0060] **실시예 2. 복합 이온미네랄 용액의 항암 효과: 난소암**

[0061] 본 발명자는 제조예 1에서 제조한 복합 이온미네랄 용액의 항암 효과를 폐암 세포주(H1299)를 비롯한, 난소암

세포주(SK-OV3), 유방암 세포주(MDA-MB-231) 및 뇌종양 세포주(U87MG)에 다양한 희석 농도로 처리한 후 각각의 암 세포주의 세포 증식을 MTT 어세이를 통해 확인하였다. MTT 검정 방법은 실시예 1에 개시된 방법과 동일하게 수행하였다. 분석 결과, 도 10에서와 같이 난소암 세포주 및 폐암 세포주는 복합 이온미네랄 용액의 처리 농도 의존적으로 세포 증식이 억제되는 것이 관찰되었으나, 유방암 및 뇌종양 세포주에서는 암세포 증식 억제 효과가 우수하지 않음을 알 수 있었다. 이의 결과를 통해 복합 이온미네랄 용액이 암 종류에 따라 항암 효능에 차이가 있음을 유추할 수 있었다.

[0062] 본 발명자는 복합 이온미네랄 용액이 암화능(tumorigenicity)에 미치는 영향을 평가하기 위해서, 난소암 세포주를 이용하여 종괴형성능력 평가(colony formation assay)와 암세포의 이동(migration) 평가 분석을 수행하였다. 종괴형성능력 평가는 100 mm 세포배양접시 또는 한천(agar)을 굳힌 겔 위에서 종양세포들이 덩어리를 형성하는 능력을 평가하는 것으로, 다음과 같은 방법을 통해 수행하였다. 먼저, 10 ㎖의 이차증류수(ddH_2O)와 0.24 g의 한천을 혼합하여 완전히 녹인 후, 42℃에서 약 10~20분간 데워 준비하였다. 혈청 및 항생제가 들어있지 않은 RPMI-1640 배지 3 ㎖을 37℃에서 10~20분간 데워 준비하였다. 상기에서 준비한 한천 용액과 배지 용액을 혼합한 후 42℃에서 10~30분간 워밍하고 60 mm 디쉬에 분주하여 완전히 굳혀 bottom agar를 준비하였다. 그 후, 1 ㎖의 이차증류수와 0.006 g의 한천을 혼합하여 완전히 녹인 후, 42℃에서 약 10~20분간 데워 준비하고, $5x10^4$ 세포/㎖로 준비된 난소암 세포를 FBS (fetal bovine serum albumin) 및 항생제를 포함하는 배지에 분주하여 37℃에서 10~20분간 워밍시켰다. 상기 0.006 g/㎖ 한천 용액 1 ㎖과 $5x10^4$ 세포 1 ㎖을 혼합한 후, 상기에서 준비한 bottom agar 위에 분주하였다. 그 후, 37℃에서 배양한 후 트립판 블루로 염색하여 종괴(colony)의 형성을 분석하였다.

[0063] 그 결과, 복합 이온미네랄 용액의 희석액 처리구는 무처리구(control) 대비 종괴 형성이 감소되어 있음을 관찰할 수 있었다(도 11). 특히, 복합 이온미네랄 용액의 1/500 희석액 및 1/1,000 희석액 처리구에서는 암세포의 종괴 형성이 현저히 저해되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0064] 또한, 본 발명자는 복합 이온미네랄 용액이 암세포의 이동(migration)에 미치는 영향을 분석하기 위해 상처회복 분석(wound healing assay)을 수행하였다. 간단하게, 암 세포주를 배양 접시에 confluent하게 키운 후, 실험용 파이펫 팁(tip)으로 스크래치(scratch)를 낸 후 세포들이 다시 움직여 해당 스크래치 면적을 채우는 것을 시간 경과에 따라 사진을 찍어 관찰하고 면적을 계산하여 분석하였다. 상기 분석 결과, 본 발명의 복합 이온미네랄 용액은 무처리구 대비 암세포의 이동을 현저하게 저해시키는 것을 알 수 있었다(도 12).

[0065] 상기 상처회복 실험 외 암세포의 침윤(invasion)에 미치는 복합 이온미네랄 용액의 영향을 Matrigel matrix을 이용하여 분석한 결과, 복합 이온미네랄 용액의 처리 농도에 의존적으로 난소암 세포의 침윤능이 현저하게 저해되는 것을 관찰할 수 있었다(도 13). 이상의 결과를 통해 본 발명의 복합 이온미네랄 용액은 난소암 세포의 사멸을 효과적으로 유도하며, 종괴의 형성, 암세포의 이동 및 침윤까지 억제하는 효과가 우수하므로, 항암 치료를 위한 소재로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상되었다.

[0067] **실시예 3. 복합 이온미네랄 용액의 항염 효과**

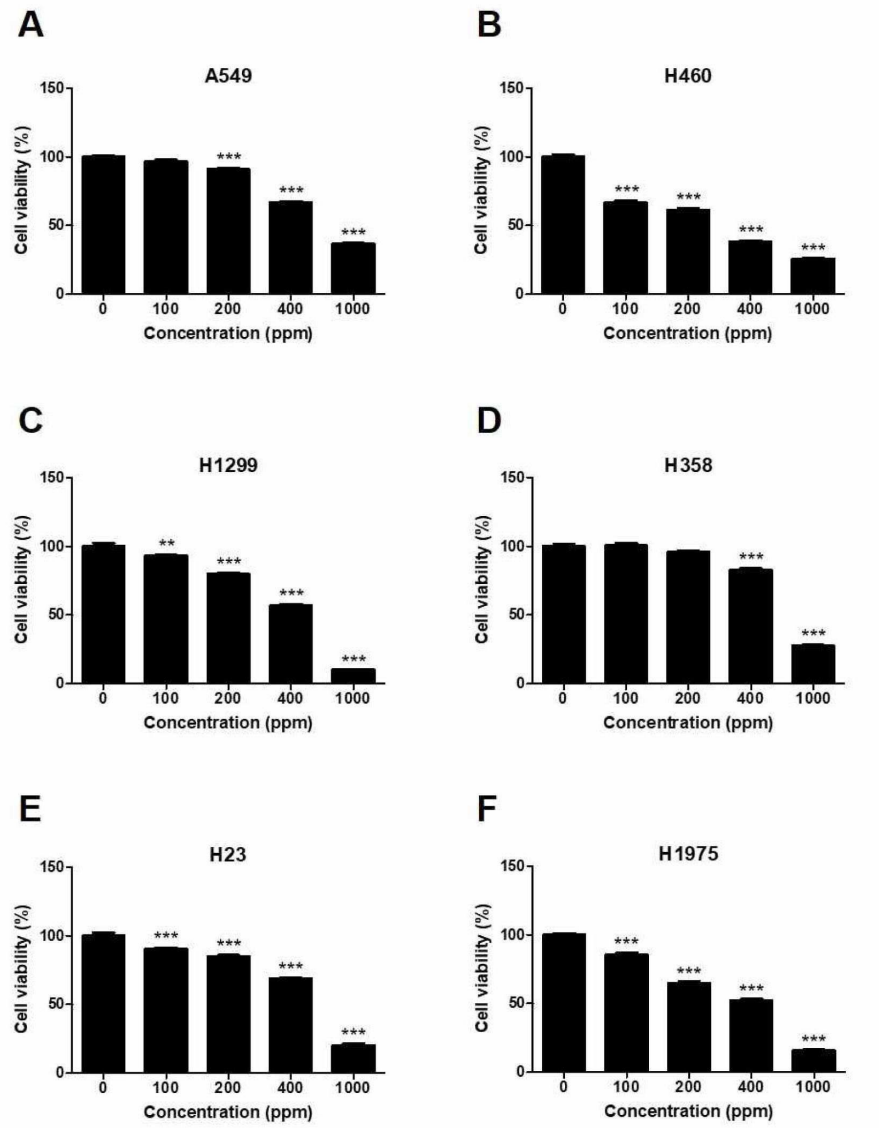
[0068] 본 발명자는 제조예 1에서 제조한 복합 이온미네랄 용액의 항염 효과를 테스트하였다. 먼저, 복합 이온미네랄 용액의 독성을 분석하였다. RAW 264.7 세포 ($2x10^5$ cells/㎖)를 96 웰 플레이트에 100 ㎕의 DMEM 배지에서 하룻밤 배양한 다음, 복합 이온미네랄 용액의 희석액을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 각 웰에 MTT 용액을 10 ㎕ 씩 넣은 후 30분 동안 배양하고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 세포만 배양한 무처리군을 생존률 100%로 기준하여 시료 처리군의 상대적인 세포 생존률을 계산하였다. 그 결과, 무처리 대조군과 비교하여 1/1000 또는 1/500 희석액 처리군은 세포의 증식이 증가된 경향을 나타내었으나, 1/200 또는 1/100 희석액 처리군은 세포 독성이 있는 것으로 관찰되었다(도 14). 다만, 상기 독성은 처리 시료의 낮은 pH로 인한 세포 사멸인 것으로 판단되며, 전술한 표 1의 독성테스트 결과에서 보듯이 본 발명에 따른 복합 이온미네랄 용액은 일반적인 적용농도에서는 세포 독성이 없음을 알 수 있다. 더욱이, 도 14의 결과를 통해 본 발명의 복합 이온미네랄 용액이 저농도에서 면역세포의 활성 증가에 사용될 수 있음을 유추할 수 있었다.

[0069] 또한, 염증유발원인 LPS (lipopolysaccharide) 처리에 대한 복합 이온미네랄 용액의 항염 효과를 확인하였다. RAW 264.7 세포 ($1x10^6$ cells/㎖)를 24 웰 배양 플레이트에 500 ㎕의 DMEM 배지에서 12시간 배양한 다음, 시료 처리하고 여기에 LPS (1 ㎍/㎖)를 각각 주입한 다음 RAW 264.7을 18시간 동안 배양하였다. 배양한 대식세포주의

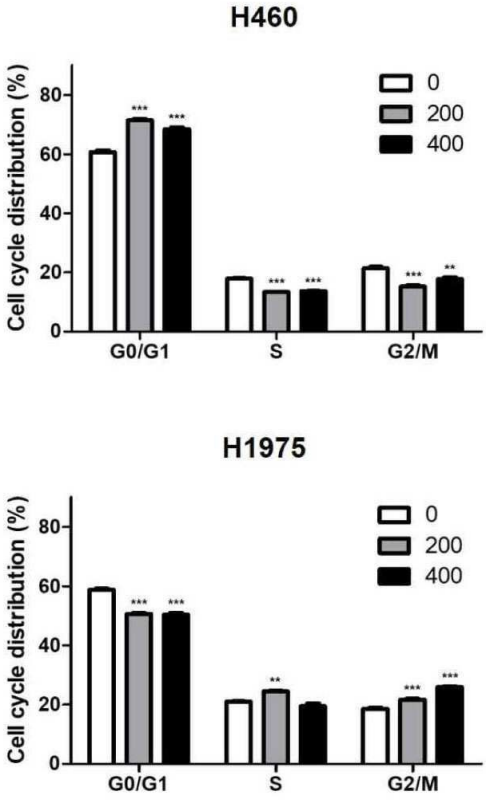
상층액을 수집하여 Griess reagent (Promega, USA)를 동량으로 첨가한 후 10분간 실온에서 방치한 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 질화나트륨(sodium nitride)의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 일산화질소(NO) 농도를 계산하였다. LPS 처리군의 NO 함량을 100%로 하여 시료 처리군의 상대적인 NO 함량을 나타내었다. 분석 결과, LPS만 처리한 군에 비해 복합 이온미네랄 용액을 함께 처리한 실험군의 NO 생성이 처리 농도 의존적으로 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 15). 이를 통해 본 발명의 복합 이온미네랄 용액은 항염 활성이 있음을 알 수 있었다.

도면

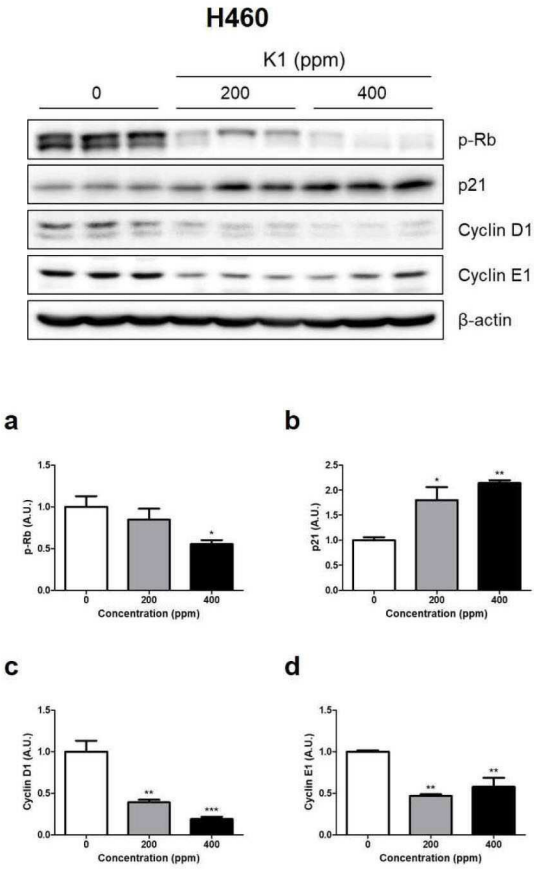
도면1



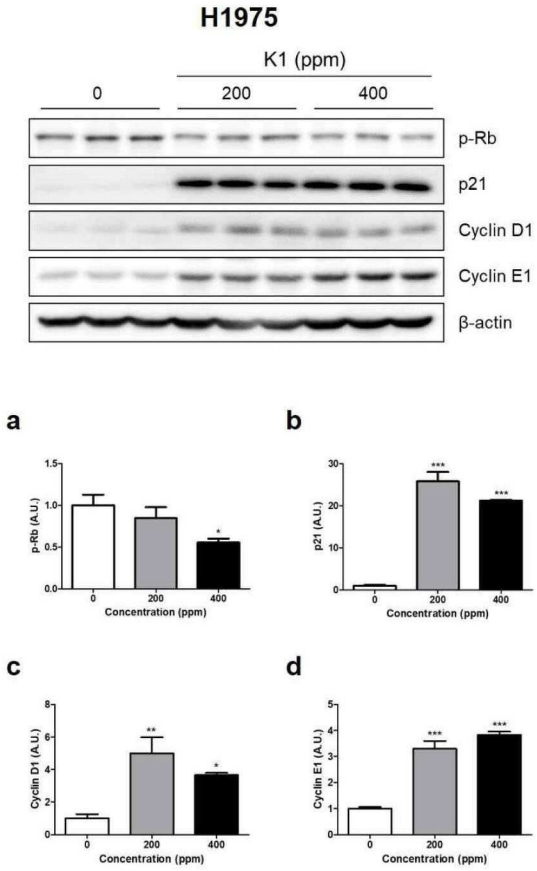
도면2


H460
Cell cycle distribution (%)
0
200
400
G0/G1
S
G2/M
H1975
Cell cycle distribution (%)
0
200
400
G0/G1
S
G2/M

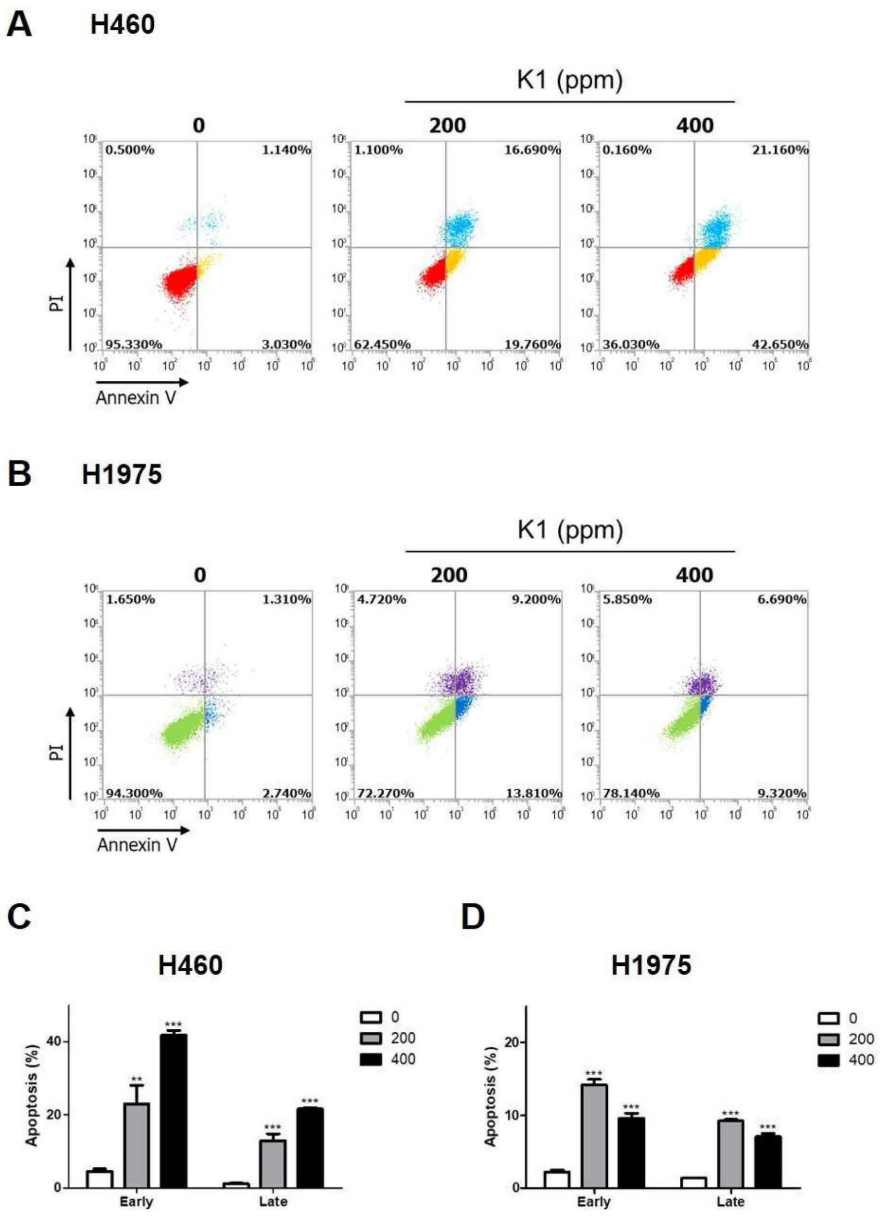
도면3


H460
K1 (ppm)
0
200
400
p-Rb
p21
Cyclin D1
Cyclin E1
β-actin
a
b
c
d
p-Rb (A.U.)
p21 (A.U.)
Cyclin D1 (A.U.)
Cyclin E1 (A.U.)
Concentration (ppm)

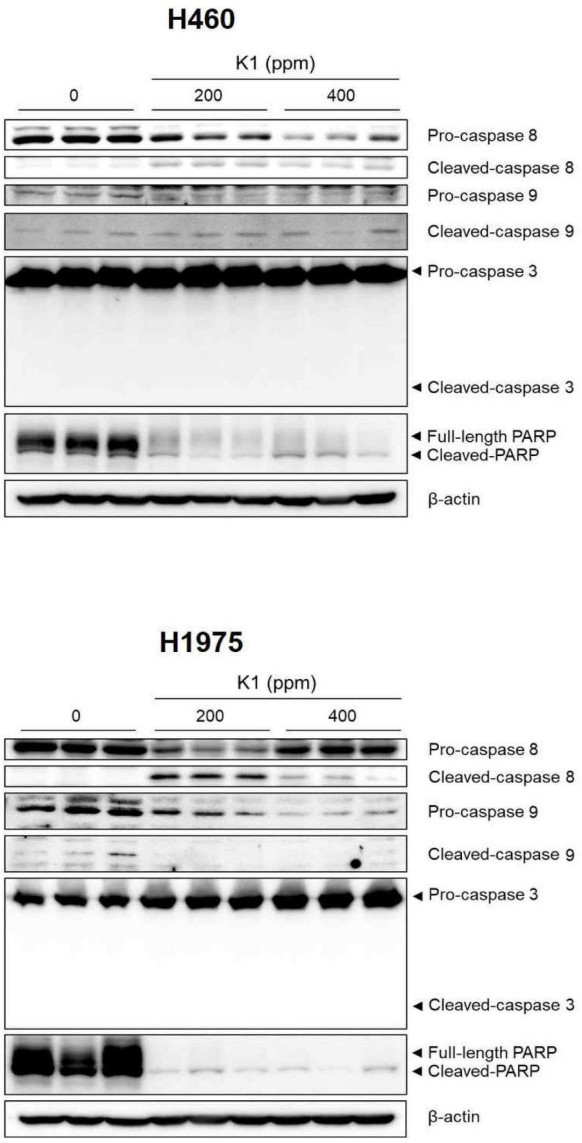
도면4


H1975
K1 (ppm)
0
200
400
p-Rb
p21
Cyclin D1
Cyclin E1
β-actin
a
b
c
d
p-Rb (A.U.)
p21 (A.U.)
Cyclin D1 (A.U.)
Cyclin E1 (A.U.)
Concentration (ppm)

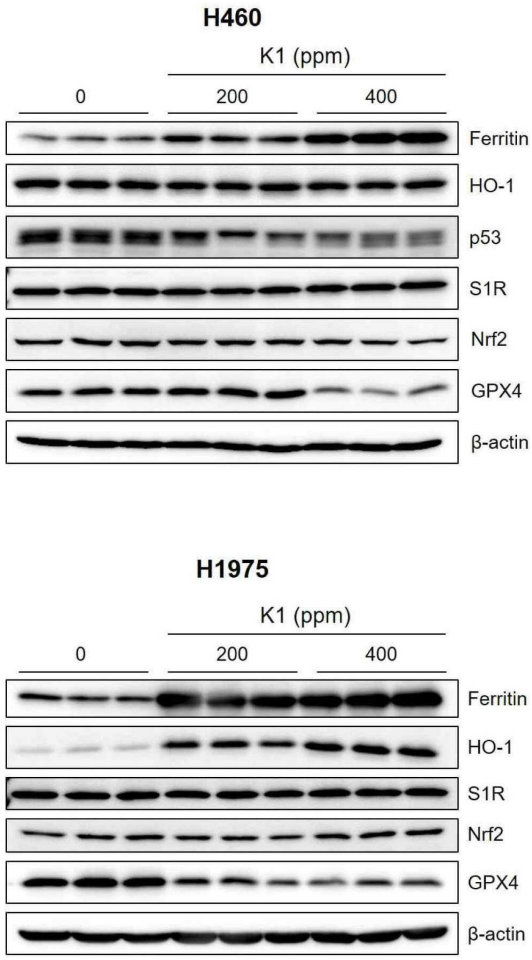
도면5


A
H460
K1 (ppm)
0
200
400
0.500%
1.140%
95.330%
3.030%
1.100%
16.690%
62.450%
19.760%
0.160%
21.160%
36.030%
42.650%
PI
Annexin V
B
H1975
K1 (ppm)
0
200
400
1.650%
1.310%
94.300%
2.740%
4.720%
9.200%
72.270%
13.810%
5.850%
6.690%
78.140%
9.320%
PI
Annexin V
C
H460
Apoptosis (%)
0
200
400
Early
Late
D
H1975
Apoptosis (%)
0
200
400
Early
Late

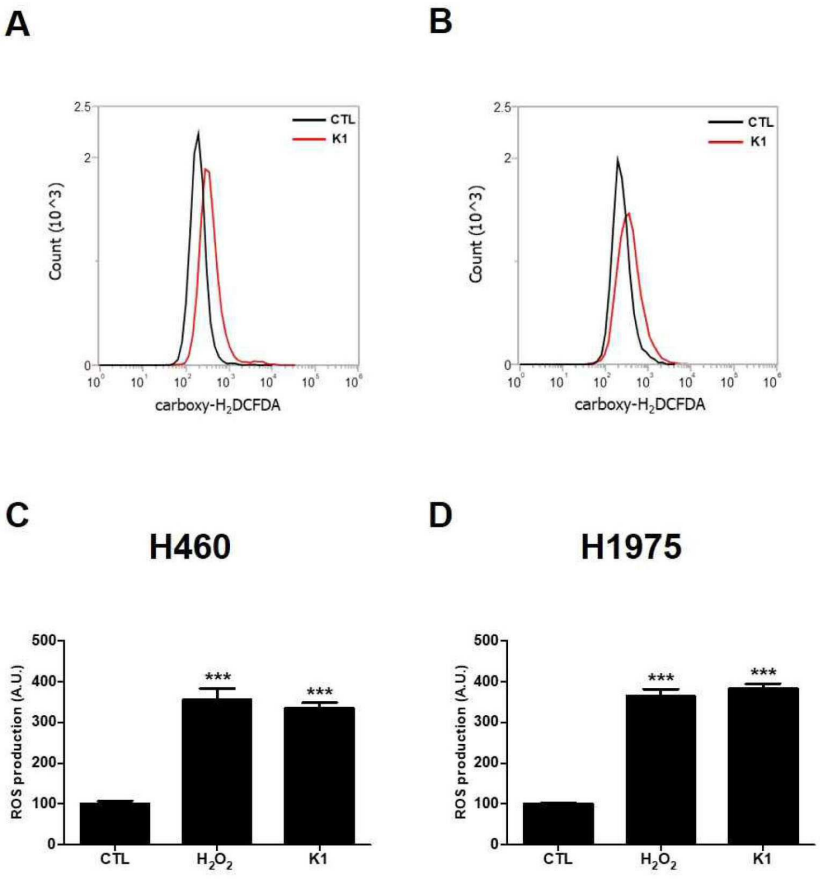
도면6


H460
K1 (ppm)
0
200
400
Pro-caspase 8
Cleaved-caspase 8
Pro-caspase 9
Cleaved-caspase 9
Pro-caspase 3
Cleaved-caspase 3
Full-length PARP
Cleaved-PARP
β-actin
H1975
K1 (ppm)
0
200
400
Pro-caspase 8
Cleaved-caspase 8
Pro-caspase 9
Cleaved-caspase 9
Pro-caspase 3
Cleaved-caspase 3
Full-length PARP
Cleaved-PARP
β-actin

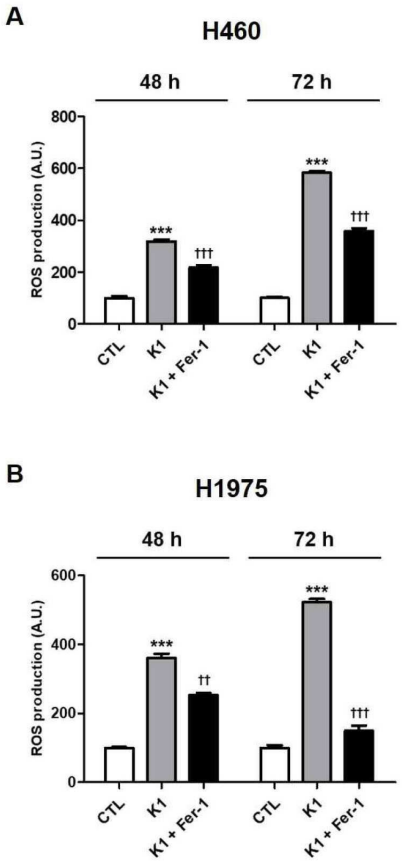
도면7


H460
K1 (ppm)
0
200
400
Ferritin
HO-1
p53
S1R
Nrf2
GPX4
β-actin
H1975
K1 (ppm)
0
200
400
Ferritin
HO-1
S1R
Nrf2
GPX4
β-actin

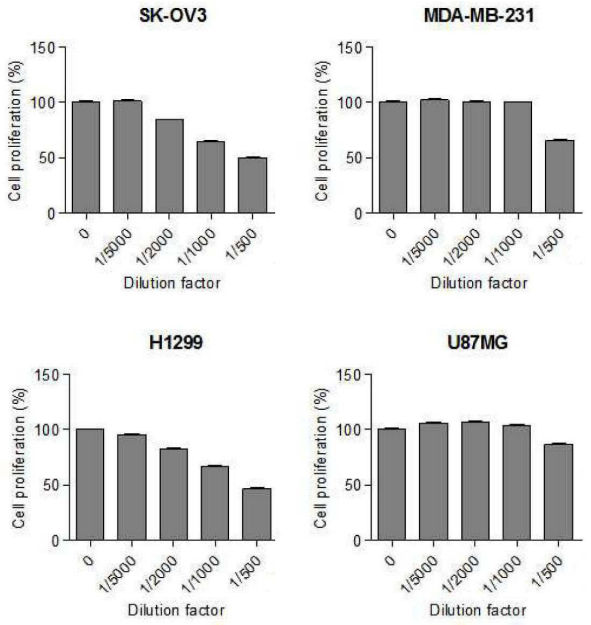
도면8


A
B
CTL
K1
Count (10^3)
carboxy-H2DCFDA
C
H460
D
H1975
ROS production (A.U.)
***
CTL
H2O2
K1

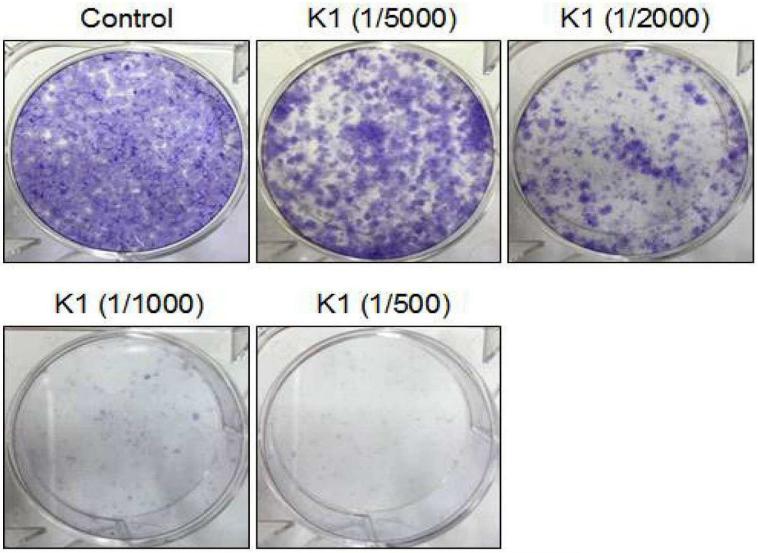
도면9


A
H460
48 h
72 h
ROS production (A.U.)
800
600
400
200
0
***
†††
***
†††
CTL
K1
K1 + Fer-1
CTL
K1
K1 + Fer-1
B
H1975
48 h
72 h
ROS production (A.U.)
600
400
200
0
***
††
***
†††
CTL
K1
K1 + Fer-1
CTL
K1
K1 + Fer-1

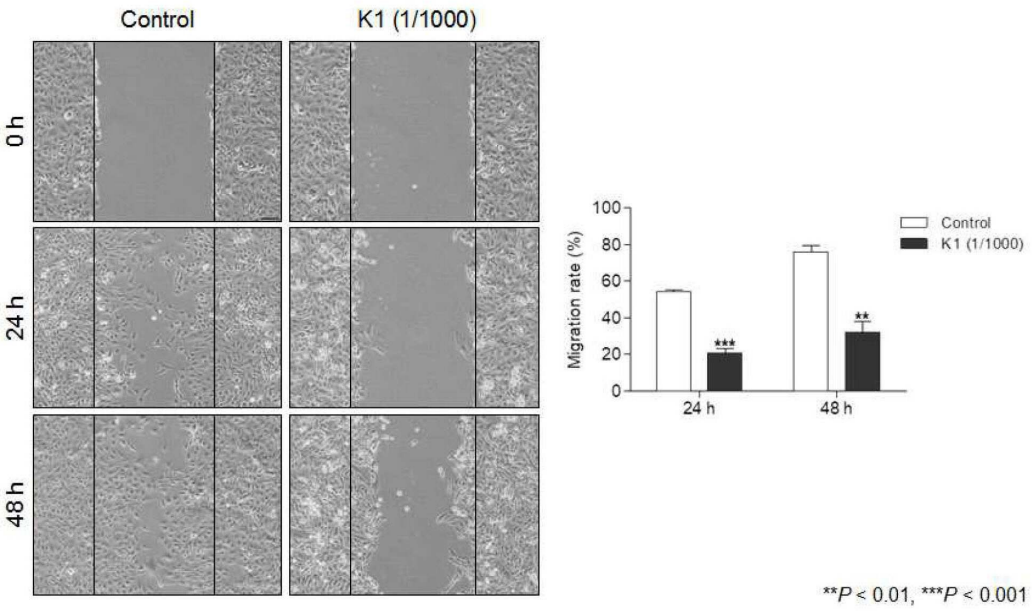
도면10


SK-OV3
MDA-MB-231
H1299
U87MG
Cell proliferation (%)
150
100
50
0
0
1/5000
1/2000
1/1000
1/500
Dilution factor

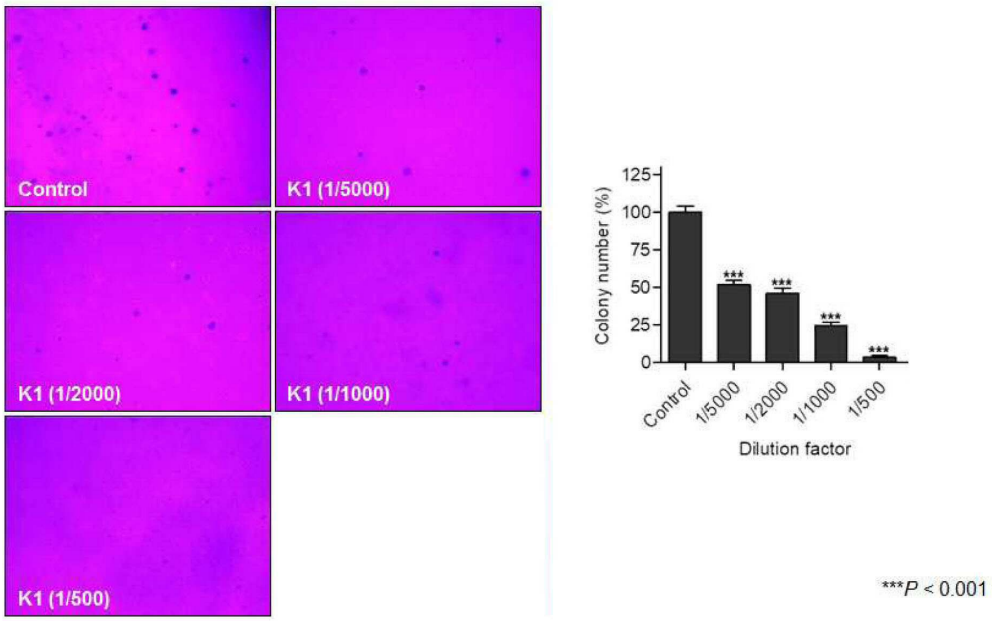
도면11


Control
K1 (1/5000)
K1 (1/2000)
K1 (1/1000)
K1 (1/500)

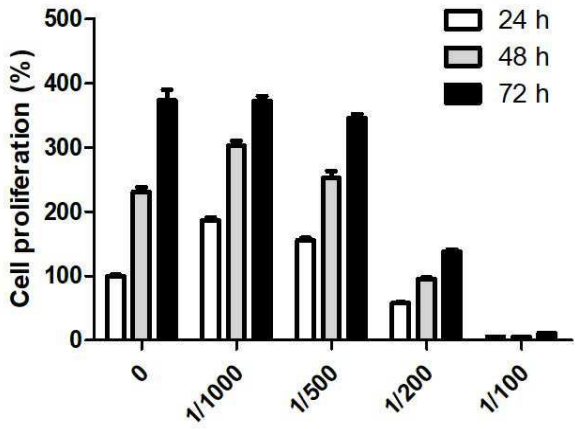
도면12


Control
K1 (1/1000)
0 h
24 h
48 h
Migration rate (%)
100
80
60
40
20
0
Control
K1 (1/1000)
***
**
24 h
48 h
**P < 0.01, ***P < 0.001

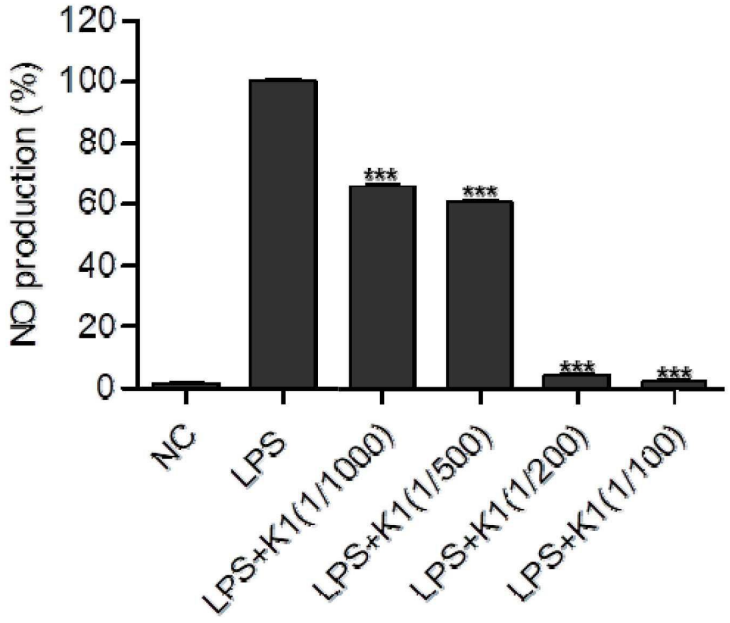
도면13


Control
K1 (1/5000)
K1 (1/2000)
K1 (1/1000)
K1 (1/500)
Colony number (%)
125
100
75
50
25
0
***
***
***
***
Control
1/5000
1/2000
1/1000
1/500
Dilution factor
***P < 0.001

도면14


Cell proliferation (%)
500
400
300
200
100
0
24 h
48 h
72 h
0
1/1000
1/500
1/200
1/100

도면15


NO production (%)
120
100
80
60
40
20
0
***
***
***
***
NC
LPS
LPS+K1(1/1000)
LPS+K1(1/500)
LPS+K1(1/200)
LPS+K1(1/100)