



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월01일
(11) 등록번호 10-1902425
(24) 등록일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/744 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0120695
(22) 출원일자 2011년11월18일
심사청구일자 2016년10월31일
(65) 공개번호 10-2013-0055129
(43) 공개일자 2013년05월28일
(56) 선행기술조사문헌
JP2000007574 A*
KR1020060034470 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
(72) 발명자
김수나
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, 아모레퍼시픽기술연구원 (보라동)
박필준
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, 아모레퍼시픽기술연구원 (보라동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 임희택, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 5 항

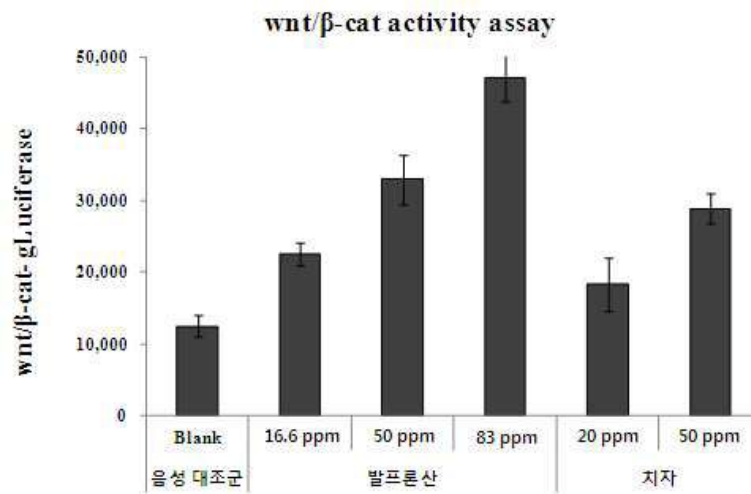
심사관 : 김범수

(54) 발명의 명칭 치자 추출물을 포함하는 재생 촉진제

(57) 요약

본 발명은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 재생 촉진제 및 모유두 활성 촉진제를 개시한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김아름

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, 아모레퍼시픽기술연구원 (보라동)

서정아

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, 아모레퍼시픽기술연구원 (보라동)

박원석

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, 아모레퍼시픽기술연구원 (보라동)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

치자 추출물을 유효 성분으로 포함하고, 안드로겐에 의한 남성형 탈모가 아닌 탈모 개체의 모낭 줄기세포에서 윈트 신호(Wnt signal)를 활성화하는 모유두 활성 촉진제.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 2 항에 있어서,

촉진제는 탈모를 방지하고, 발모 및 양모를 촉진하는 촉진제.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

치자 추출물은 촉진제 전체 중량을 기초로 0.01 내지 10 중량%로 포함되는 촉진제.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 2 항에 따른 촉진제를 포함하는 화장료 조성물.

청구항 8

제 2 항에 따른 촉진제를 포함하는 탈모 개선, 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 치자 추출물을 포함하는 피부 재생 및 모유두 활성 촉진제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

탈모는 성장 주기에 따라 휴지기성 탈모와 성장기성 탈모로 구분할 수 있으며, 휴지기성 탈모로는 안드로겐에 의한 남성형 탈모, 여성의 산후 탈모 또는 내분비 질환에 의한 탈모를 들 수 있고, 성장기성 탈모로는 원형 탈모, 반흔성 탈모 또는 두부 백선에 의한 탈모 등을 들 수 있다. 또한 국소 감염, 내분비 장애, 유전 인자 및 자

가 면역 등에 의해서도 탈모가 발생하는 것으로 알려져 있다.

- [0003] 현재 대표적인 탈모 방지제로는 미국 FDA에서 승인한 프로페시아와 미녹시딜이 있다. 이러한 약물은 임상적으로 분명한 효과를 보이거나 성기능 장애 및 피부 자극 등 부작용 또한 나타낼 뿐만 아니라 여성은 사용이 불가능하거나 극히 제한적인 함량으로만 사용이 가능하다. 따라서 상기와 같은 단점을 가지지 않도록 새로운 기전을 통하여면서도 성별 제한 없이 안전하게 사용할 수 있는 천연물 제제에 대한 관심이 높아지고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0004] (비특허문헌 0001) Fathke et al., "Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing", BMC Cell Biology 2006, 7:4

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 우수한 피부 재생 촉진 효과를 가지는 피부 재생 촉진제 및 뛰어난 모유두 활성 촉진 효과를 가지는 모유두 활성 촉진제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명의 일측면은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 재생 촉진제 및 모유두 활성 촉진제를 제공한다.

- [0007] 본 발명의 다른 일측면은 상기 촉진제를 포함하는 화장품 조성물 및 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0008] 본 발명에 따른 제제는 치자 추출물을 유효 성분으로 포함함으로써, 윈트/베타-카테닌(Wnt/beta-catenin) 신호 전달을 촉진하여 우수한 피부 재생 효과, 구체적으로 뛰어난 피부 상처 치유 및 흉터 감소 효과를 나타낼 수 있다. 또한 상기 제제는 윈트/베타-카테닌 신호 전달을 촉진할 뿐만 아니라, 모유두 세포의 줄기세포를 활성화하고 모낭의 모유두 세포의 증식을 촉진하므로 우수한 모유두 활성 촉진 효과, 나아가 탈모 방지, 발모 및 양모 촉진 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 치자 추출물이 줄기세포의 윈트/베타-카테닌(Wnt/beta-catenin) 신호 전달을 촉진함을 보여주는 그래프이다.

도 2는 치자 추출물이 모유두 세포의 줄기세포성을 유지 및 활성화시킴을 보여주는 그래프이다.

도 3은 치자 추출물의 모낭 모유두 세포 증식 촉진 효과를 보여주는 그래프이다.

도 4는 치자 추출물의 모발 생성 촉진 효능을 보여주는 육안 평가 결과 그래프이다.

도 5는 치자 추출물의 모발 생성 촉진 효능을 보여주는 헤어 무게 결과 그래프이다.

도 6은 치자 추출물 도포 후 발모 결과를 보여주는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 명세서에서 "피부"라 함은, 동물의 체표를 덮는 조직을 의미하는 것으로서, 얼굴 또는 바디 등의 체표를 덮는 조직뿐만 아니라, 두피를 포함하는 광범위한 개념이다. 본 명세서에서 "모발"은 체모(體毛)와 두발(頭髮)을 총칭하는 것으로 헤어(hair)로도 기재될 수 있다. 상기 모발은 사람 및 동물의 것을 모두 포함한다. 본 명세서에서 "양모 촉진"은 새로운 모발의 생성을 촉진하는 것뿐만 아니라 기존 모발이 굵고 건강하게 자라도록 하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 "추출물"은 추출 방법, 추출 용매, 추출된 성분 또는 추출물의 형태를 불문하고, 천연물의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 모두 포함하는 광범위한 개념이다.
- [0011] 인체의 각 조직에는 그 조직을 구성하는 세포들을 생산하는 성체 줄기세포가 존재한다. 피부 또는 모발을 만들어내는 세포 또한 피부 또는 모낭에 존재하는 줄기세포에서 유래한다.
- [0012] 줄기세포는 일반적으로, 어떤 조직으로든 발달할 수 있는 전능세포(pluripotent cell)를 지칭한다. 이는 반복 분열하여 자신을 만들어 내는 자기 재생산(self-renewal) 능력 및 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 가진다. 이러한 줄기세포는 크게 배아 줄기세포(embryonic stem cells)와 성체 줄기세포(adult stem cells)로 나눌 수 있다.
- [0013] 배아 줄기세포는 남성의 생식세포인 정자와 여성의 생식세포인 난자의 수정으로 생성된 수정란에서 유래한다. 이는 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가져 전분화능 줄기세포라고도 한다. 배아 줄기세포는 대량 증식 및 거의 모든 신체 세포로의 분화가 가능하며, 면역 거부 반응이 없어 타인뿐만 아니라 타종에게도 이식이 가능하다는 장점을 가진다. 그러나 분화 조절이 어려워 암세포로 될 가능성이 있으므로 기술의 정밀함을 요하며, 수정란의 파괴가 수반되므로 윤리적으로 문제가 될 수도 있다.
- [0014] 성체 줄기세포는 일반적으로, 필요한 때에 특정한 조직의 세포로 분화하는 세포를 의미하며, 신체 각 조직에 대개 극히 소량만이 존재한다. 즉, 골수세포의 성체 줄기세포는 혈구세포로, 피부 성체 줄기세포는 피부로, 후각 신경세포의 성체 줄기세포는 후각신경세포로만 분화되도록 정해져 있다. 이러한 성체 줄기세포는 분화가 안정적 이어서 암세포로 될 가능성이 거의 없으며, 배아 줄기세포와는 달리 수정란을 파괴시키지 않으므로 윤리적으로도 문제되지 않는다.
- [0015] 모낭 줄기세포는 모낭에 존재하면서 피부 및 모발을 구성하는 세포를 만들어내는 성체 줄기세포이며, 이는 별지 줄기세포(Bulge stem cell)라고도 불리는 상피 세포의 유래가 될 수 있는 모낭 줄기세포, 간엽 줄기세포 유래의 모낭 모유두 세포 및 신경 줄기세포 유래의 멜라닌 형성 줄기세포라는 크게 세 가지 종류로 나눌 수 있다.
- [0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명의 일측면은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 재생 촉진제를 제공한다.
- [0018] 윈트/베타-카테닌(Wnt/beta-catenin) 신호 전달은 생명체의 발생과 관련 있는 신호 전달 체계이며, 피부 생성 및 모낭의 발생에 작용하는 것으로 알려져 있다. 나이가 피부에 상처가 생기면 피부 조직 회복 과정에서 윈트 신호 전달이 필수적으로 발현되어 상피 세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Fathke et al., "Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing", BMC Cell Biology 2006, 7:4). 따라서 윈트 신호 전달이 촉진되면 상피 세포의 분화가 촉진되어 피부 재생이 촉진될 수 있고, 나이가 피부 상처의 치유가 촉진될 수 있다. 치자 추출물은 줄기세포의 윈트/베타-카테닌(Wnt/beta-catenin) 신호 전달을 촉진한다. 따라서 이를 포함하는 제제는 피부 재생을 촉진할 수 있으며, 구체적으로 피부 상처의 치유를 촉진할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 일측면은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 모유두 활성 촉진제를 제공한다.
- [0020] 모유두 세포의 줄기 세포가 활성화되면 모유두 세포의 활성이 촉진되어 모발 성장이 촉진될 수 있다. 치자 추출물은 모유두 세포의 줄기 세포를 활성화시킬 뿐만 아니라 모낭 모유두 세포의 증식을 촉진한다. 따라서 치자 추출물을 포함하는 제제는 모유두의 활성을 촉진하여 모발 성장을 촉진하고, 나이가 탈모 방지 및 양모 촉진의 효과를 가질 수 있다.
- [0021] 한편, 모발은 성장기-퇴행기-휴지기의 주기를 거치면서 성장과 탈락을 반복한다. 그 중 성장기에 모낭 줄기세포들이 분화하면서 새로운 모발이 형성된다. 한편, 윈트 단백질을 마우스에 처리하면 모발 성장이 촉진되고, 윈트

유전자를 녹-다운(Knock-down) 시킨 마우스에서는 모발 성장이 저해된다고 알려진 바 있다. 이는 모낭 줄기세포에 존재하는 윈트/베타-카테닌 신호 전달을 촉진하는 물질이 모발 성장을 촉진할 수 있음을 의미한다. 이러한 메커니즘을 통해 모발 성장을 촉진하는 물질은 남성 호르몬 및/또는 혈액 순환 조절을 통해 모발 성장 촉진에 관여하는 것이 아니므로, 남성 호르몬을 억제하거나 혈액 순환을 촉진하는 방법으로는 해결되지 않았던 심한 탈모 및 여성형 탈모를 개선할 수 있을 것이다. 치자 추출물은 줄기세포의 윈트/베타-카테닌(Wnt/beta-catenin) 신호 전달을 촉진하여 모발 성장을 촉진할 수 있다. 따라서 치자 추출물을 포함하는 제제는 모발 성장을 촉진하며, 나아가 탈모를 방지하고 양모를 촉진할 수 있다. 또한 치자 추출물을 포함하는 제제는 기존의 모발 성장 촉진제로 알려진 미녹시딜보다 우수한 모발 성장 촉진, 탈모 방지 및 양모 촉진 효과를 가질 수 있으며, 성기능 장애 또는 피부 자극과 같은 부작용을 거의 나타내지 않으며, 성별을 불문하고 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일측면에서, 치자(梔子)는 쌍떡잎식물 합판화군 꼭두서니목 꼭두서니과의 상록관목인 치자나무(*Gardenia jasminoides* var. *grandiflora*)의 열매이다. 치자 열매에는 사포닌, 그로신 등이 함유되어 있고, 꽃에는 다량의 꽃기름(향기)이 함유되어 있어, 피로 회복, 취면, 건위, 이뇨, 정장, 해열, 식욕 증진 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0023] 본 발명의 일측면에서, 치자 추출물은 건조한 치자를 용매 추출하여 수득할 수 있다. 상기에서 용매는 물, 유기 용매 및 물과 유기 용매의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함한다. 상기에서 물은 증류수 또는 정제수를 포함하고, 유기 용매는 C₁~C₅의 저급 알코올을 예로 들 수 있는 알코올, 아세톤, 에테르, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, 에틸메틸케톤 및 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 일측면에 따른 촉진제는 촉진제 전체 중량을 기초로 0.01 중량% 내지 10 중량%, 구체적으로 0.1 중량% 내지 5 중량%, 더 구체적으로 0.5 중량% 내지 3 중량%의 치자 추출물을 포함할 수 있다. 상기 범위로 포함할 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기 위해 적절한 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다. 구체적으로 치자 추출물이 0.01 중량% 미만인 경우 충분한 피부 재생 및 모발 성장 촉진 효과를 얻을 수 없고, 10 중량%를 초과하는 경우 안전성 및 제형 안정성이 낮아질 수 있다.

[0025] 본 발명의 일측면은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 피부 재생 효과를 가지며, 구체적으로 상처를 치유하고 흉터를 감소시킬 수 있다. 또한 상기 화장료 조성물은 모유두 활성을 촉진하여 모발 성장을 촉진하며, 나아가 탈모를 방지하고 양모를 촉진할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 고체, 젤, 분말, 페이스트, 마이크로 니들, 포말(foam) 또는 에어로졸 조성물의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장료 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 더 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일측면은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 피부 재생 효과를 가지며, 구체적으로 상처를 치유하고 흉터를 감소시킬 수 있다. 또한 상기 약학 조성물은 모유두 활성을 촉진하여 모발 성장을 촉진하며, 나아가 탈모를 방지하고 양모를 촉진할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투

여될 수 있다.

- [0030] 경구 투여를 위한 제형은 정제(錠劑), 환제(丸劑), 연질 및 경질 캡셀제, 과립제(顆粒劑), 산제, 세립제, 액제, 유탁제(乳濁濟) 또는 펠렛제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 제형은 유효 성분 이외에 희석제(예: 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 폴리에틸렌 글리콜), 또는 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유할 수 있다. 경우에 따라 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 또는 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0031] 비경구 투여를 위한 제제는 주사제, 점적제, 로션, 연고, 젤, 크림, 현탁제, 유제, 좌제(坐劑), 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1mg/kg/일 내지 100mg/kg/일, 보다 구체적으로는 5 mg/kg/일 내지 50 mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 일측면은 치자 추출물을 유효 성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 피부 재생 효과를 가지며, 구체적으로 상처를 치유하고 흉터를 감소시킬 수 있다. 또한 상기 식품 조성물은 모유두 활성을 촉진하여 모발 성장을 촉진하며, 나아가 탈모를 방지하고 양모를 촉진할 수 있다. 상기 식품 조성물은 기호 식품 또는 건강 식품 조성물을 포함한다.
- [0034] 상기 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 드링크제와 같은 액제, 캐러멜, 젤, 바 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- [0035] 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 50 mg/kg/일 내지 500 mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [0036] 이하, 실시예 및 시험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예 및 시험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0037] [실시예] 치자 추출물의 제조
- [0038] 건조한 치자(*Gardenia jasminoides*) 1 kg을 정선하여 대한약전 통칙 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고, 5 내지 10배 가량의 물을 넣어 90 내지 100℃에서 2 내지 3시간 침출시킨다. 침출한 액을 감압 농축시킨 후 침출액 대비 약 1/3 부피의 에탄올을 가하여 냉소에서 하룻밤 방치한다. 이후 대한약전 제제총칙 엑스제의 제법에 따라 연조 엑스로 제조하여 약 330g의 연조 엑스 형태의 치주 추출물을 수득하였다. 연조 엑스 약 1g은 원생약 약 3.03g에 해당한다.
- [0039] [시험예 1] 줄기세포의 윈트/베타 카테닌 신호 전달 촉진 효과 평가
- [0040] 줄기세포에 Wnt 신호가 주어지면 세포 내 베타-카테닌(beta-catenin)을 억제하고 있는 단백질 복합체(GSK3, APC, Axin)가 저해되면서 베타-카테닌이 세포 핵 내로 이동하고 발생 및 모발 성장에 관여하는 다양한 유전자가 발현된다.
- [0041] 베타-카테닌은 전사 조절인자로서 염색체의 특정 염기 서열에 부착하는데, 이러한 베타-카테닌 부착 염기 서열 뒤에 가우시아 루시페라제(*Gaussia luciferase*) 유전자 염기 서열을 인위로 조합한 플라스미드 벡터를 제작하여

HEK293(인간 배아 신장 세포주)에 트랜스펙션(transfection)한다. 이렇게 제작한 형질전환 세포주는 G418 항생제에 저항성이 있어, G418이 포함된 배지에 배양할 경우 형질전환 세포주만 선택적으로 배양이 가능하다. 이와 같이 수득한 윈트/베타 카테닌 신호 전달 체계를 보유한 형질전환 HEK293 세포주에 실시예의 치자 추출물을 처리한 후 가우시아 루시페라제 분석 키트(Gaussia luciferase assay kit, BioLabs)로 가우시아 루시페라제의 발현 증가 여부를 확인하였다.

[0042] 구체적으로, 형질전환 HEK293 세포를 10% 소혈청 세럼(Fetal bovine serum) (FBS)과 G418 500 μ g/ml이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 5% CO₂, 37℃의 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 96-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양한 세포에 각각 20 ppm 및 50 ppm의 치자 추출물을 처리한 후 다시 48시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 양성 대조군으로는 글리코겐 신타제 키나제 3- β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β) 저해제로 널리 사용되고 있는 소듐 발프로산(Sodium valproic acid, VPA) 16.6 ppm, 50 ppm 및 83 ppm을 사용하였다. 가우시아 루시페라제 분석 키트를 이용하여 배양한 세포의 루시페라제 발현 정도를 측정하여 치자 추출물이 윈트/베타 카테닌 신호 전달에 미치는 효과를 평가하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0043] 도 1에서 볼 수 있듯이, 치자 추출물은 줄기세포의 윈트/베타 카테닌 신호 전달을 촉진한다. 이를 통해 치자 추출물은 피부 재생 및 모발 성장을 촉진하는 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0044] [시험예 2] 알카라인 포스파타아제 활성능 평가

[0045] 치자 추출물이 인간 모유두 세포주의 줄기세포성을 유지시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 생체 외(in vitro) 시스템을 적용하여 치자 추출물 적용 후 세포주의 줄기세포성 유지와 관련있는 알카라인 포스파타아제 효소의 활성을 평가하였다.

[0046] 상기 평가를 위해 인간 모유두 세포(Human dermal papilla cell)를 Simian virus 40 large T(SV40T)와 c-myc를 포함하는 벡터로 형질 도입(transduction)하여 제조한 불멸화된 모유두 세포인 iDPc(Human immortalized dermal papilla cell)를 사용하였다. 상기 세포주를 10% 소혈청 세럼(FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 5% CO₂, 37℃의 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한 후 각각 50ppm 및 100ppm의 치자 추출물을 처리하였다. 음성 대조군으로는 DMSO를 사용하였으며, 양성 대조군으로는 글리코겐 신타제 키나제 3- β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β) 저해제로 널리 사용되고 있는 소듐 발프로산(Sodium valproic acid, VPA) 83 ppm과 166 ppm을 사용하였다. 시험 물질을 처리하고 48시간 후 세포들을 얼음 위에서 PBS 생리식염수(Phosphate buffered saline)로 2회 세척한 다음, 세포 위에 300 μ l ALP 분석 버퍼(ALP assay kit, BioVision, Catalog #K412-500)를 넣고 스크래퍼로 긁어 에펜도르프 튜브(eppendorf tube)에 모았다. 모은 세포들을 얼음 위에서 프로브 소니케이터(probe sonicator)로 깨어, 4℃, 12,000 rpm에 5분 동안 원심 분리하고 상층액을 취하였다. 로우리법(Lowry's method)을 기본으로 한 바이오-라드 DC 단백질 키트(Bio-rad DC protein kit)(Biorad, cat.no. 500-0111)를 사용하여 제조자의 권장 방법에 따라, 상층액에 포함된 세포 단백질의 농도를 측정하였다. 측정된 농도 값을 환산하여 시험 물질의 알카라인 포스파타아제 활성을 평가하였다.

[0047] 구체적으로, 알카라인 포스파타아제 효소의 기질인 니트로페닐 포스페이트(nitrophenyl phosphate, pNPP)를 pNPP tab(ALP assay kit, BioVision, Catalog #K412-500) 분석 버퍼에 녹여 5mM 농도로 준비하고 세포 단백질과 반응하도록 넣어주었다. 1mM 농도로 녹인 pNPP를 4 ~ 20 μ l까지 농도 별로 넣고, ALP 효소를 넣어 pNPP의 효소 분해 반응이 일어나도록 하여 표준액을 준비하였다. 위의 효소 반응이 일어나도록 시험 물질과 표준액이 든 96-웰 플레이트를 25℃ 배양기에 1시간 동안 넣어준 다음, 정지 용액(stop solution)을 넣고, 405nm에서 흡광도를 측정하여 pNPP가 효소 반응에 의해 분해되어 생성되는 pNP의 양으로 효소의 활성 값을 구하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0048] 도 2에서 볼 수 있듯이, 치자 추출물은 모유두 세포 내의 알카라인 포스파타아제 활성능을 증가시켰다. 즉, 치자 추출물은 모유두 세포주의 줄기세포성을 유지 및 활성화시켜 모발 생성을 촉진할 수 있음을 알 수 있다.

[0049] [시험예 3] 모낭 모유두 세포 증식 효과 평가

[0050] 모발을 구성하는 케라틴 단백질은 모근부 케라틴형성세포(keratinocyte)에서 생성되며, 이 케라틴형성세포는

모유두 세포로부터 분화된다. 따라서 치자 추출물이 모유두 세포의 활성을 촉진한다면 그로부터 분화되는 케라틴형성세포의 활성을 촉진시킬 수 있고, 나아가 모발 생성을 촉진할 수 있을 것이다.

[0051] 치자 추출물의 모유두 세포 활성 촉진 효과를 평가하기 위하여 본 발명에서는 iDPc(Human immortalized dermal papilla cell) 세포주를 사용하였다. 본 세포주는 사람 모유두 세포(Human dermal papilla cell)를 Simian virus 40 large T(SV40T)와 c-myc를 포함하는 벡터로 형질 도입(transduction)하여 제조한 불멸화된 모유두 세포이다. 상기 세포주는 10% 소혈청세럼(FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 5% CO₂, 37℃가 유지되는 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한 후 각각 20ppm 및 50ppm의 치자 추출물을 처리하였다. 음성 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. 시험 물질 처리 24시간 경과 후에 WST-1 키트(Roche)을 사용하여 세포 증식능(%)을 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0052] 도 3에서 볼 수 있듯이, 치자 추출물은 모유두 세포의 증식을 유의차 있게 증가시켰다. 이를 통해 치자 추출물은 모유두 세포의 증식을 촉진시키고, 나아가 케라틴형성세포의 활성 및 모발 생성을 촉진할 수 있음을 알 수 있다.

[0053] [시험예 4] 마우스를 이용한 모발 성장 촉진 효과 평가

[0054] 7주령 C57BL/6 마우스 암컷을 이용하여 치자 추출물의 발모 효과를 확인하였다. 마우스 등의 헤어를 제모한 후 익일부터 1일 2회 50 μ l씩 8주간 1% 및 2%의 치자 추출물을 도포하였다. 음성 대조군으로는 용매, 양성 대조군으로는 발모 외용제 주성분인 2%의 미녹시딜을 각각 사용하였다. 시험 종료 시점에 표 1의 기준에 따른 육안 평가 및 제모 후 헤어 무게 측정을 통해 발모 효과를 평가하였다. 도 4 내지 6에 육안 평가 결과(도 4) 및 헤어 무게 측정 결과(도 5) 및 8주 시험 후 마우스의 사진 촬영 결과(도 6)를 나타내었다.

표 1

등급	상태	
0	변화없음	
1	작은 면적의 30% 미만이 피부색 겹게 변화	
2	작은 면적의 30~70%가 피부색 겹게 변화	
3	작은 면적의 70% 미만이 피부색 겹게 변화 또는 30% 미만이 발모	
4	작은 면적의 70% 넘게 피부색 겹게 변화 및 30~70%가 발모	
5	작은 면적의 70% 넘게 피부색 겹게 변화 및 70% 넘게 발모	
6	작은 면적의 90% 넘게 발모	

[0055]

[0056] 상기 결과에서 볼 수 있듯이, 2% 치자 추출물을 도포한 군에서 모발 성장기 유도 효과 및 초기 모발 성장 촉진 효과가 양성 대조군인 미녹시딜 보다 높게 나타났다. 도 4에서 볼 수 있듯이, 시험 5주차까지 2% 치자 도포군의 발모 효과가 미녹시딜을 앞섰다. 시험 6주부터는 미녹시딜의 발모 효과가 증가하면서 치자 도포군을 앞질렀으나, 8주 후 헤어 무게 측정 결과를 보면 도 5 및 도 6에서 볼 수 있듯이, 2% 치자 도포군의 헤어 무게가 무처리군보다 높았다. 즉, 치자 추출물은 전임상적으로도 우수한 모발 성장 촉진 효과를 가지며, 그 효과를 신속하게 발휘함을 알 수 있다.

[0057] 본 발명의 일측면에 따른 조성물의 제형예를 아래에서 설명하나, 다른 여러 가지 제형으로도 응용 가능하며, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0058] [제형예 1] 연고의 제조

[0059] 아래 표에 기재된 조성으로 통상의 방법에 따라 연고를 제조한다.

표 2

[0060]	<table><tr><th>성분</th><th>함량(중량%)</th></tr><tr><td>정제수</td><td>잔량</td></tr><tr><td>글리세린</td><td>8.0</td></tr><tr><td>부틸렌그리콜</td><td>4.0</td></tr><tr><td>유동파라핀</td><td>15.0</td></tr><tr><td>베타글루칸</td><td>7.0</td></tr><tr><td>카보머</td><td>0.1</td></tr><tr><td>치자 추출물</td><td>5.0</td></tr><tr><td>카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드</td><td>3.0</td></tr><tr><td>스쿠알렌</td><td>1.0</td></tr><tr><td>세테아릴 글루코사이드</td><td>1.5</td></tr><tr><td>소르비탄 스테아레이트</td><td>0.4</td></tr><tr><td>스테아릴 알코올</td><td>1.0</td></tr><tr><td>방부제</td><td>적량</td></tr><tr><td>향</td><td>적량</td></tr><tr><td>색소</td><td>적량</td></tr><tr><td>밀랍</td><td>4.1</td></tr></table>	성분	함량(중량%)	정제수	잔량	글리세린	8.0	부틸렌그리콜	4.0	유동파라핀	15.0	베타글루칸	7.0	카보머	0.1	치자 추출물	5.0	카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	3.0	스쿠알렌	1.0	세테아릴 글루코사이드	1.5	소르비탄 스테아레이트	0.4	스테아릴 알코올	1.0	방부제	적량	향	적량	색소	적량	밀랍	4.1
성분	함량(중량%)																																		
정제수	잔량																																		
글리세린	8.0																																		
부틸렌그리콜	4.0																																		
유동파라핀	15.0																																		
베타글루칸	7.0																																		
카보머	0.1																																		
치자 추출물	5.0																																		
카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	3.0																																		
스쿠알렌	1.0																																		
세테아릴 글루코사이드	1.5																																		
소르비탄 스테아레이트	0.4																																		
스테아릴 알코올	1.0																																		
방부제	적량																																		
향	적량																																		
색소	적량																																		
밀랍	4.1																																		

[0061] [제형예 2] 헤어 로션의 제조

[0062] 아래 표에 기재된 조성으로 통상의 방법에 따라 헤어 로션을 제조한다.

표 3

[0063]	<table><tr><th>성분</th><th>함량(중량%)</th></tr><tr><td>정제수</td><td>잔량</td></tr><tr><td>글리세린</td><td>3.0</td></tr><tr><td>부틸렌그리콜</td><td>3.0</td></tr><tr><td>유동파라핀</td><td>7.0</td></tr><tr><td>베타글루칸</td><td>7.0</td></tr><tr><td>카보머</td><td>0.1</td></tr><tr><td>치자 추출물</td><td>2.0</td></tr><tr><td>카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드</td><td>3.0</td></tr><tr><td>스쿠알렌</td><td>5.0</td></tr><tr><td>세테아릴 글루코사이드</td><td>1.5</td></tr><tr><td>소르비탄 스테아레이트</td><td>0.4</td></tr><tr><td>폴리솔베이트</td><td>1.2</td></tr><tr><td>방부제</td><td>적량</td></tr><tr><td>향</td><td>적량</td></tr><tr><td>색소</td><td>적량</td></tr><tr><td>트리에탄올 아민</td><td>0.1</td></tr></table>	성분	함량(중량%)	정제수	잔량	글리세린	3.0	부틸렌그리콜	3.0	유동파라핀	7.0	베타글루칸	7.0	카보머	0.1	치자 추출물	2.0	카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	3.0	스쿠알렌	5.0	세테아릴 글루코사이드	1.5	소르비탄 스테아레이트	0.4	폴리솔베이트	1.2	방부제	적량	향	적량	색소	적량	트리에탄올 아민	0.1
성분	함량(중량%)																																		
정제수	잔량																																		
글리세린	3.0																																		
부틸렌그리콜	3.0																																		
유동파라핀	7.0																																		
베타글루칸	7.0																																		
카보머	0.1																																		
치자 추출물	2.0																																		
카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	3.0																																		
스쿠알렌	5.0																																		
세테아릴 글루코사이드	1.5																																		
소르비탄 스테아레이트	0.4																																		
폴리솔베이트	1.2																																		
방부제	적량																																		
향	적량																																		
색소	적량																																		
트리에탄올 아민	0.1																																		

[0064] [제형예 3] 크림의 제조

[0065] 아래 표에 기재된 조성으로 통상의 방법에 따라 크림을 제조한다.

표 4

[0066]	<table><tr><th>성분</th><th>함량(중량%)</th></tr><tr><td>정제수</td><td>잔량</td></tr><tr><td>글리세린</td><td>8.0</td></tr><tr><td>부틸렌그리콜</td><td>4.0</td></tr><tr><td>유동파라핀</td><td>45.0</td></tr><tr><td>베타글루칸</td><td>7.0</td></tr></table>	성분	함량(중량%)	정제수	잔량	글리세린	8.0	부틸렌그리콜	4.0	유동파라핀	45.0	베타글루칸	7.0
성분	함량(중량%)												
정제수	잔량												
글리세린	8.0												
부틸렌그리콜	4.0												
유동파라핀	45.0												
베타글루칸	7.0												

카보머	0.1
치자 추출물	1.5
카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	3.0
밀랍	4.0
세테아릴 글루코사이드	1.5
세스퀴 올레인산 소르비탄	0.9
바세린	3.0
방부제	적량
향	적량
색소	적량
트리에탄올 아민	0.1

[0067] [제형예 4] 정제

[0068] 치자 추출물 10 mg, 대두 추출물 50 mg, 포도당 100 mg, 홍삼 추출물 50 mg, 전분 96 mg 및 마그네슘 스테아레이트 4 mg을 혼합하고 에탄올을 첨가하여 과립을 형성한 후 건조하고 정제로 타정한다.

[0069] [제형예 5] 건강 음료

[0070] 치자 추출물..... 100 mg

[0071] 구연산..... 1000 mg

[0072] 올리고당..... 100 g

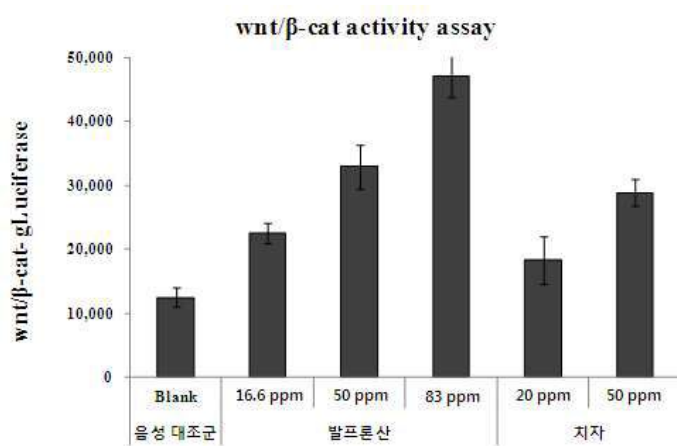
[0073] 타우린..... 1 g

[0074] 정제수..... 적량

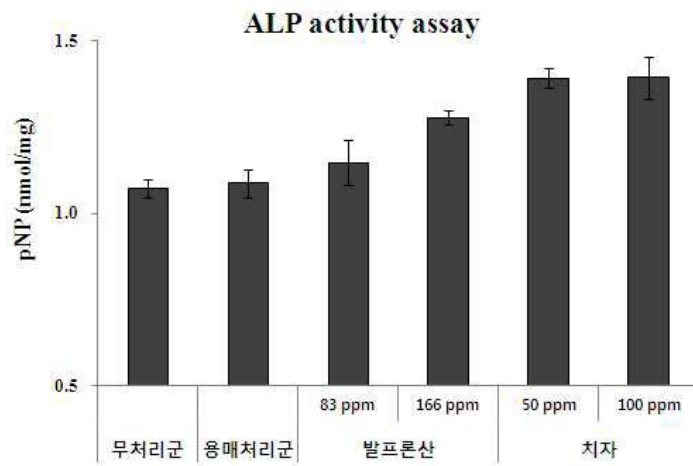
[0075] 통상의 건강 음료 제조 방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균한다.

도면

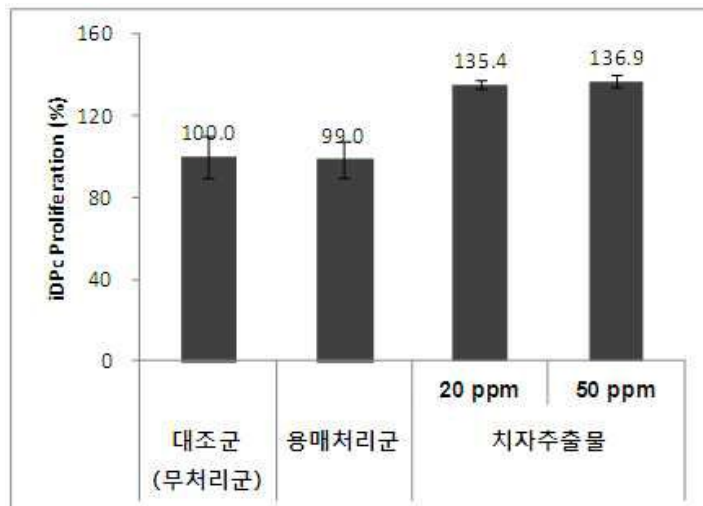
도면1



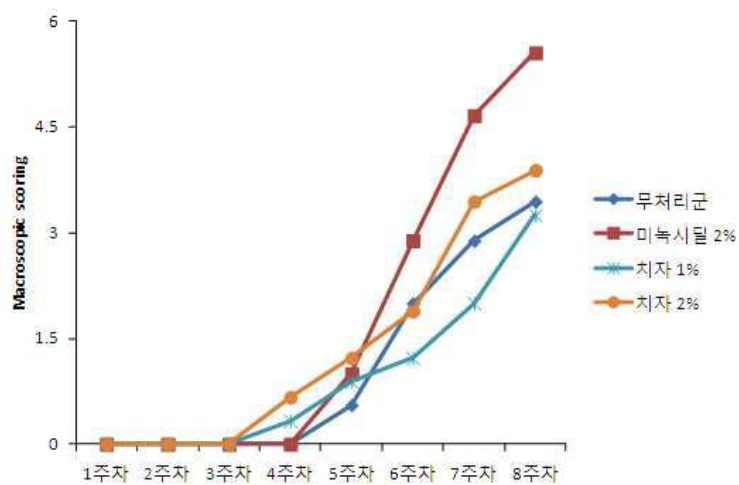
도면2



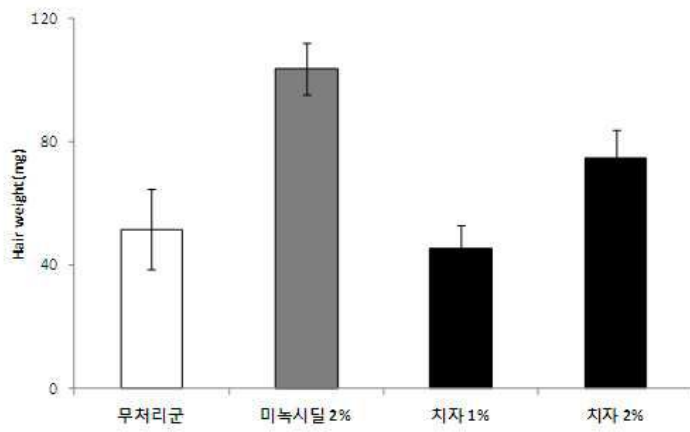
도면3



도면4



도면5



도면6

