(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0136518
(43) 공개일자 2011년12월21일

(51) Int. Cl.
A61K 36/48 (2006.01) *A61K 36/28* (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0056593
(22) 출원일자 2010년06월15일
심사청구일자 2010년06월15일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
주식회사 바이피엘
강원도 춘천시 신북읍 율문리 334-1 강원테크노파크 춘천벤처공장 201호
(72) 발명자
최수영
강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706
박진서
강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

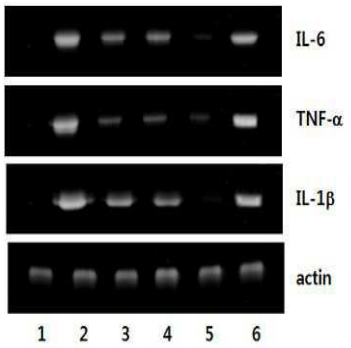
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 소목, 회첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 포함하는 항염증 피부외용제 조성물

(57) 요 약

본 발명은 항염증 피부외용제 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 소목 추출물, 회첨 추출물 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



1, Aceton; 2, TPA; 3, 소목+HSP27, 4, 회첨+HSP27; 5, 소목+회첨+HSP27; 6, HSP27.

(72) 발명자

음원식

강원 춘천시 후평2동 904번지 포스코더샵아파트 112동 802호

김대원

서울특별시 강남구 대치동 316 은미아파트 19동 103호

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 그린타운아파트 102-401

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가동 353-21 302호

박준원

서울 서초구 잠원동 73 신반포2차@ 112-306

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812 / 00037527

부처명 교육과학기술부, 한국연구재단 / 중소기업청

연구관리전문기관

연구사업명 대학중점연구소 지원사업 / 산학공동기술개발사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 / 기능성 마스크 팩 신소재 개발

기여율

주관기관 한림대학교 / 한림대학교

연구기간 2009년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일 / 2009년 06월 01일 ~ 2010년 05월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

소목(*Caesapinia sappan* L.) 추출물, 희첨(*Siegesbeckia glabrescens Makino*) 추출물 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 포함하는 항염증 피부외용제 조성물

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포침투성 HSP27 융합단백질은 Pep-HSP27 융합단백질임을 특징으로 하는 항염증 피부외용제 조성물

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 약학 조성물 또는 화장료 조성물임을 특징으로 하는 조성물

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 토닉, 로션, 유액(乳液), 크림, 연고, 젤, 스프레이, 무스, 마스크팩, 캡슐제, 액상제 및 첩부제 중 1종으로 제형화됨을 특징으로 하는 조성물

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항염증 피부외용제 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 소목, 희첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부질환은 국내의 경우 약 20% 이상의 높은 발생빈도를 보이며, 다른 질환에 비해 경제적, 사회적 비용이 많이 소요된다. 선진국에서도 전 인구의 약 30% 이상의 피부질환 환자 발생이 보고되었으며 선진국의 경우 치료비용이 년 약 2조원에 이르며 국내에서는 수천억 원 이상의 규모로서, 피부질환의 예방 및 치료에 막대한 경제적 손실이 발생하고 있다. 피부질환은 발병 후 지속적인 장기간의 치료가 요구되며, 피부질환 환자는 타인과 어울리기 싫어하는 대인 기피증을 갖고 있어 사회생활에 막대한 지장을 초래한다. 최근 외모나 미용에 대한 사회적 관심이 급격히 증가하는 추세에 있지만 산업화와 환경오염 및 다변화, 전문화된 사회 구조로 인하여 다양한 피부질환이 급증하여 사회 건강 문제로 대두되고 있다. 피부질환은 특히 미용과 관련된 분야의 경우 대중적 관심이 매우 높지만, 만성 질환 치료제와 마찬가지로 아직까지 뚜렷하게 증상을 치유하는 약품이 없는 실정이다.

[0003] 피부질환의 예방 및 치료를 위해서는 기존의 치료제와 다른 치료제의 개발이 요구된다. 현재 체내에 존재하는 생리활성 단백질을 이용한 단백질 치료법의 중요성 인식이 확대되고 있다.

[0004] 열충격 단백질(Heat shock protein; HSP)은 분자 쉐퍼론(molecular chaperone) 및 항 자기사멸(anti-apoptotic) 단백질로 잘 알려져 있고, 대부분의 세포에서 발현되며 보존도가 높다(highly conserved). 열충격 단백질은 아미노산 서열과 분자량에 따라 100-110kDa 패밀리, 83-90kDa 패밀리, 66-78kDa 패밀리, 60kDa 패밀

리, 15-30kDa 패밀리와 같이 다섯 개의 패밀리로 구분된다. HSP27은 분자량이 가장 작은 패밀리에 속하며 근육 및 신경조직을 포함한 포유류 조직에서 발현되며, 운동 뉴런(motor neuron)과 감각 뉴런(sensory neuron)에 풍부하게 존재한다. HSP27은 세포 내에서 다양한 기능을 하는 단백질로 세포손상, 암 및 염증 등 다양한 질환에서 HSP27를 치료목적으로 이용하려는 관심이 매우 높아지고 있다.

[0005] 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는데 있어 목표 단백질을 세포막을 거쳐 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 단백질은 크기나 여러 가지 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우 어렵다. 일반적으로 분자량 600 달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다. 최근, 단백질의 운반 방법 중 하나로 PEP-1 펩타이드를 이용하여 자연상태의 이형단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것이 밝혀졌다. PEP-1 펩타이드는 21개의 아미노산 (KETWWETWWTEW SQP KKKRKV)으로 이루어졌고, 세 개의 도메인(소수성 도메인, 스페이서, 친수성 도메인)을 갖고 있다. 지금 까지 PEP-1 펩타이드를 이용한 연구에서는 PEP-1 펩타이드와 외부 단백질을 동시에 세포에 투여하였을 경우 자연상태로 단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것만 밝혀졌다. 또한, PEP-1 펩타이드는 HIV Tat 단백질에 비해 단백질 치료제로서의 여러 가지 장점(효율적으로 단백질의 세포 내 투과, 생리학적인 완충액에서의 안정성, 독성의 결여, 혈청에 대한 민감성의 결여 등)을 나타낸다고 알려져 있다. 그러나, 현재까지 단백질을 PEP-1에 융합시킨다고 하여 모든 단백질이 생체에서 세포 내로 원활히 도입된다거나, 도입 이후 활성을 나타낸다는 증거는 없다.

[0006] 공개특허 제10-2009-0055261호는 "소목 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름의 개선 및치료용 조성물"을 개시하고 있다. 또한, 공개특허 10-2009-0048149호는 “희첨의 추출물을 함유하는 천연 항균 방부제 및 이를함유하는 화장료 조성물”을 개시하고 있다. 또한, 본원 출원인의 선등록 특허 제835880호는 “세포 도입성 열충격 단백질 27 융합 단백질”에 대해 개시하고 있다.

[0007] 그러나, 본 발명은 각 성분의 효과보다 현저히 우수한 효과를 나타내는 혼합 조성물에 관한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 종래 피부 염증 치료제의 문제점을 해결하고, 부작용이 적으면서도 치료 효과가 우수한 피부 염증 치료제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

[0009]

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 다양한 한약재 및 융합단백질을 조합하고 피부 염증에 우수한 효과를 나타내는지를 실험하여 여러 조합 중 소목, 희첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질의 조합이 피부 염증 개선에 현저한 효과가 있음을 확인하여 본 발명에 이르게 되었다.

[0011] 소목(*Caesapinia sappan* L.)은 콩과에 속한 낙엽 소교목 혹은 관목인 소목의 심재를 건조한 것으로 소방목, 소방, 적목, 홍자 등으로 불리기도 한다. 연중 수시로 채취하여 수피와 변재를 제거하고 중심부분만 취하여 건조하여 사용한다. 소목의 주요성분으로는 헤마톡실린과 플라보노이드 및 원색소인 브라질린이 함유되어 있으며, 브라질린은 공기중에 산화되어 브라질레인이 된다. 브라질린은 혈압, 칼슘조절과 혈당저하 작용이 알려져 있으며, 지금까지 소목 열수 추출물의 항균 효능에 대하여는 많은 연구가 진행되어 왔다.

[0012]

[0013] 희첨(*Siegesbeckia glabrescens Makino*)은 한국, 중국, 일본 등 아시아 지역에 분포하고 있으며, 국화과의 다년생 초목으로 진득찰, 징계초 등 다른 이름으로 불린다. 희첨은 약용으로 마비, 근육통, 급성간염, 고혈압, 당뇨 등을 치료하는 목적으로 이용되어 왔다.

[0014] 세포침투성 HSP27 융합단백질은 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 4개 이상 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인이 열충격단백질 7의 적어도 일측 말단에 공유결합된 융합단백질을 말한다. 본 발명자들은 단백질을 세포 내로 운반하는 Pep-1 펩타이드를 외부단백질인 사람 HSP27에 융합시켰고, 융합 단백질을 대장균에서 과대발현시켰으며, 금속 킬레이팅 친화 크로마토그래피(metal-chelating affinity chromatography)로 쉽고 편리하게 정제하였으며, 정제된 융합 단백질이 효과적으로 생물학적인 활성을 지니고 세포 내로 운반되는 것을 세포 및 동물 실험을 통하여 확인하였다. 그리고 Pep-HSP27 융합 단백질이 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈(Superoxide Dismutase)의 활성을 더욱 증가시켜준다. 본 출원인의 특허 제835880호 세포도입성 열충격단백질 27 융합단백질에 자세한 구성 및 효과가 개시되어 있다. 본 발명의 상세한 설명 중 실시예에서는 HSP27의 N 말단에 Pep-1이 공유결합된 Pep-HSP27 융합단백질을 구체예로 제시하였으나, HSP27의 C 말단에 Pep-1이 공유결합하거나, 또는 HSP27의 N 및 C 말단에 Pep-1이 공유결합된 융합단백질도 Pep-HSP27 융합단백질과 비교하여 80% 내외의 세포침투 효과 및 세포 내에서 염증 억제 효과를 나타내었다(데이터 미기재). 따라서, 세포침투성 HSP27 융합단백질이 반드시 Pep-HSP27 융합단백질로만 한정되는 것이 아님은 당업자에게 자명하다. 뿐만 아니라, 소수성 도메인, 스페이서 및 친수성 도메인으로 구성된 Pep-1의 서열을 각 도메인의 3차 구조 및 각 도메인의 성질(친수성, 소수성)을 파괴하지 않는 범위 내에서 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합 단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0015] 소목 추출물, 희첨 추출물과 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 항염증 효능에 대한 연구는 이전에 제시된 바 없었으며, 본 발명자들은 천연물인 소목, 희첨과 세포침투성 단백질인 HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩을 동물모델에 처리하여 피부염에 대한 현저한 효능을 확인하여 본 발명에 이르게 되었다.

[0016] 본 발명자들은 염증 동물모델을 제조하고 본 발명의 조성물을 처리하여 마우스의 귀 무게와 두께를 측정하여 염증억제 효능을 확인한 결과, 본 발명의 조성물이 동물모델에서 염증을 억제함에 있어서 현저한 효능을 나타내었다(도 1, 도 2).

[0017] 또한, RT-PCR을 이용하여 염증반응에서 발현되는 싸이토카인 mRNA를 확인한 결과, 본 발명의 조성물을 처리하면 염증반응에서 일어나는 싸이토카인의 발현이 현저하게 감소하였다(도 3).

[0018] 조직염색을 통하여 본 발명의 조성물을 함유한 마스크팩의 염증 억제 효능을 확인한 결과, 본 발명의 조성물을 함유한 마스크팩이 염증반응에 의한 부종을 억제함을 확인하였다.

[0019] 또한, 도 1, 도 2, 도 3의 결과 등을 통하여 다른 조성보다, 본 발명의 조성 즉, 소목 추출물, 희첨 추출물 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유하는 조성물이 현저한 염증 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0020] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 소목 추출물 및 희첨 추출물은 열탕추출, 유기용매 추출, 초임계 추출, 소니케이션 등 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려진 통상의 방법으로 수행할 수 있으며, 이 추출물의 동결건조물을 형성하여 본 발명의 조성물에 사용할 수도 있다. 또한 상기 추출물은 통상의 분획법 또는 크로마토그라피에 의해 좀더 정제된 상태로 사용할 수 있으며, 이러한 분획물 또는 정제물 또한 본 발명의 범위에 속함은 자명하다.

[0021] 본 발명의 조성물은 각각의 성분을 단독으로 사용하는 것보다 세 가지 성분을 모두 혼합하여 사용할 경우 상승효과를 나타내어 실제 염증 유발 피부에서 염증을 억제하는 효과가 현저하게 나타났다.

[0022] 본 발명은 소목 추출물, 희첨 추출물과 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 항염증 피부외용제 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 조성물에서 소목 추출물, 희첨 추출물 및 세포침투성 HSP27 융합단백질은 각각 0.001~50중량% 함유됨을 특징으로 한다. 각 성분이 0.001중량% 미만으로 함유되면, 항염증 효능을 기대하기 어려우며, 50중량%를 초과하는 경우에는 함량을 증가시키더라도 효능이 증대되지 않으므로 비경제적이다.

[0024] 본 발명은 상기 피부외용제 조성물이 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형의 제형 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 피부외용제 조성물이 화장료 조성물 또는 약제학적 조성물임을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 소목 추출물, 희첨 추출물과 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 항염증 피부외용제 조성물은 캡슐제, 액상제, 연고제, 첩부제 또는 약학적으로 허용되는 담체를 이용한 서방화제제 등의 약학 조성물로 제제화할 수 있으며, 약리학적으로 허용되는 기제, 운반제, 부형제, 결합제(예: 전분, 트래거캔스 고무, 젤라틴, 당밀, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐에테르, 폴리비닐 피롤리돈, 히드록시프로필 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스), 분쇄제(예: 한천, 전분, 벨라틴 가루, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 카르복시메틸 셀룰로오스 칼슘, 결정 셀룰로오스, 탄산칼슘, 탄산수소나트륨 및 알긴산 나트륨), 윤활제(예: 스테아린산 마그네슘, 활석, 수첨 식물유) 및 착색제 등을 포함한다. 상기 운반제 및 부형제로는 젖당, 글루코오스, 수크로오스, 만니톨, 감자녹말, 옥수수녹말, 탄산칼슘, 인산칼슘 및 셀룰로오스 등을 사용한다.

[0027] 상기 외에도 안정화제, 용해보조제, 경피흡수 촉진제 등의 보조제 방향제, 방부제 등의 첨가제가 더 첨가될 수 있다.

[0028] 이와 같이 제조되는 약학 조성물은 증상에 따라 일일 1회 내지 수회 피부에 적용할 수 있으며 증상의 호전정도에 따라 적용을 조절할 수 있다. 본 발명 조성물의 투여량에 특별한 제한은 없으나, 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 조성물은 통상 1일 0.0001~100㎎/㎏으로, 바람직하게는 0.001~100㎎/㎏으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한 번 내지 수회 나누어 투여할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 소목 추출물, 희첨 추출물과 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 항염증 피부외용제 조성물을 의약품, 의약부외품 또는 화장품에 이용하는 경우, 그 제형은 본 발명의 효과를 발휘할 수 있는 제형이면 특별한 제한 없이 임의로 선택할 수 있으며, 예컨대 토닉, 로션, 유액(乳液), 크림, 연고, 젤, 스프레이, 무스, 마스크팩 등을 들 수 있다.

[0030] 그리고, 이러한 제제 중에는 본 발명에 관련된 소목 추출물, 희첨 추출물과 세포침투성 HSP27 융합단백질 외에 의약품, 의약부외품 또는 화장품의 분야에서 통상 배합가능한 성분을 배합할 수 있다. 예를 들면 혈행촉진작용을 갖는 비타민 E 및 그 유도체 등의 약제 등을 들 수 있다.

[0031] 또, 상기 의약품, 의약부외품, 화장품 등에는 세파란틴 등의 피부기능항진제; 헥사클로로펜, 운데실렌산, 트리클로로카르바니드, 비티오놀 등의 항균제; 아연 및 그 유도체; 락트산 또는 그 알킬에스테르; 시트르산 등의 유기산류; 트라네키사무산 등의 프로테아제 저해제 등을 배합할 수 있다.

[0032] 뿐만 아니라, 상기 의약품, 의약부외품, 화장품 등에는 에탄올, 이소프로필알콜 등의 알콜류; 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 등의 다가알콜류; 고급 지방산, 고급 알콜, 탄화수소유, 천연유지, 에스테르유, 실리콘유 등의 유분; 계면활성제; 향료; 킬레이트제; 1,3-부틸렌글리콜, 히알루론산 및 그 유도체, 말티톨, 아테로콜라겐, 락트산나트륨 등의 보습제; 카복시비닐폴리머 등의 증점제; 산화방지제; 자외선 흡수제; 색소; 물; 안정화제 등 통상 양모제에 배합되는 성분을 본 발명의 효과를 손상하지 않는 범위에서 배합할 수 있다.

[0033]

[0034] 이러한 본 발명의 조성물을 함유하는 제형 중 마스크팩의 제조방법에 대하여 일 실시예를 구체적으로 설명하면 소목 추출물 0.001 내지 30 중량부, 희첨 추출물 0.001 내지 30 중량부 및 세포침투성 Pep-HSP27 융합단백질 0.001 내지 30 중량부, 글리세린 7 내지 12 중량부, 정제수 85 내지 95 중량부, 카보머 0.04 내지 0.08 중량부 및 트리에탄올아민 0.1 내지 0.3 중량부를 포함한다.

[0035] 상기 글리세린은 피부보습제 용도로 사용되는 것이며, 글리세린 외에 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등의 통상의 글리콜 화합물을 추가적으로 사용할 수 있다. 상기 글리세린 함량은 용해도 등을 고려하여 전체 마스크팩 조성에 대하여 7 내지 12중량부로 사용한다.

[0036] 상기 정제수는 통상의 화장료 조성물에 사용되는 것이면 모두 사용 가능하고, 그 함량은 유효 물질에 대한 농도를 고려하여 전체 마스크팩 조성에 대하여 85 내지 95 중량부로 사용한다.

[0037] 상기 카보머는 점도조절제로 사용되며, 마스크팩 에센스의 농도를 고려하여 전체 마스크팩 조성에 대하여 0.04 내지 0.08 중량부로 사용한다.

[0038] 상기 트리에탄올아민은 중화제로 사용된다. 트리에탄올아민 함량은 유화물질의 농도를 고려하여 전체 마스크팩 조성에 대하여 0.05 내지 0.3 중량부로 사용한다.

[0039] 또한, 본 발명의 마스크팩은 필요에 따라 추가적으로 가용화제, 방부제, 용제, pH 조절제 등 통상의 첨가제를 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 조성물을 함유한 마스크팩은 소목 추출물, 희첨 추출물, 세포침투성 HSP27 융합단백질을 정제수에 넣고, 55 내지 65℃의 온도에서 용해시킨 다음, 카보머를 첨가하고 다시 온도를 40℃로 낮춘 후 트리에탄올아민을 첨가하여 용해시킨 다음, 얻어지는 조성물을 바이오 셀룰로오스에 함침시킴으로써 제조할 수 있다.

[0041] 이렇게 제조된 본 발명의 마스크팩은 시트 및 패치의 형태를 포함하고, 모든 연령, 피부타입에 적용 가능하며, 사용시에는 기본적으로 세안 후 얼굴 또는 피부에 붙여 사용한다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 소목, 희첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 항염증 피부외용제 조성물은 염증에 의한 부종을 현저히 억제하고, 싸이토카인 발현을 억제함으로써 아토피 피부염, 여드름 등의 항염증 치료에 효과적으로 활용될 수 있을 것이다.

[0043] 또한, 본 발명의 항염증 피부외용제 조성물은 피부염증과 동일한 기작으로 발생하는 피부암 치료 및 진행 억제에도 응용 가능하다.

[0044] 본 발명의 항염증 피부외용제 조성물은 마스크팩 외에 다양한 피부외용제 및 화장료 제형으로 제조 가능하며, 아토피 피부, 여드름 피부 등에 사용하는 기능성 화장료 및 피부외용 약제로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 본 발명의 소목, 희첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩의 항염증 효능을 조직염색을 통하여 확인한 사진이다.

도 2는 TPA로 유도한 귀 부종에 대하여 본 발명의 소목, 희첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩의 억제 효능을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 소목, 희첨 및 세포침투성 HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩의 싸이토카인 억제 효능을 나타낸 사진이다.

도 1~3 중 "HSP-27"은 아래 실시예 3에 의하여 제조된 세포침투성 Pep-HSP27 융합단백질을 의미한다.

도 1~3 중 "Aceton"은 아세톤(Acetone)을 의미하며, 음성대조군 마스크팩으로서 20㎕ 아세톤을 가하여 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 좀더 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예 기재범위에 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0047] **1) 소목 추출물 제조**

[0048] 건조된 소목을 분쇄하여 분쇄물을 얻은 후, 분쇄물에 70% 에탄올을 10중량% 가하고 환류추출하였다. 침전물이 제거된 순수한 추출액을 필터(0.1~1㎛)로 여과하여 여과액을 획득하고, 감압회전 농축기를 이용하여 에탄올을 제거하였고, 동결 건조하여 분말상태의 소목 추출물을 획득하여 시료로 사용하였다.

[0049] **2) 희첨 추출물 제조**

[0050] 희첨을 분쇄하여 분쇄물을 얻은 후, 분쇄물에 70% 에탄올을 10중량% 가하고 환류추출하였다. 침전물이 제거된 순수한 추출액을 필터(0.1~1㎛)로 여과하여 여과액을 획득하고, 감압회전 농축기를 이용하여 에탄올을 제거하였고, 동결 건조하여 분말상태의 희첨 추출물을 획득하여 시료로 사용하였다.

[0051] **3) Pep-1-HSP27 융합단백질의 제조**

[0052] 세포침투성 Pep-1-HSP27 융합단백질(이하 "Pep-HSP27"과 혼용함)은 PCR 및 재조합 단백질 기술을 이용하여 제조하였다(본 출원인의 선등록 특허 제835880호 참조). 제조된 세포침투성 HSP27 융합단백질은 대장균에서 과대발현하여 Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우(Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid sepharose superflow) 컬럼과 PD-10 컬럼으로 정제하여 사용하였다. 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

[0053] **4) 마스크팩 제조**

[0054] 실시예 1의 소목 추출물 0.1중량부, 실시예 2의 희첨 추출물 0.1중량부, 실시예 3의 세포침투성 HSP27 융합단백질 0.1중량부, 글리세린 8중량부를 정제수 91.59중량부에 넣고, 60℃의 온도에서 용해시켰다. 이후, 상기 용액에 카보머 0.05중량부를 첨가하고, 다시 온도를 40℃로 낮추어 트리에탄올아민 0.06중량부를 첨가하여 용해시킨 후 얻어지는 조성물을 바이오셀룰로오스에 함침시켜 마스크팩을 제조하였다.

[0055] 비교예로서, 상기 본 발명의 마스크팩 조성 중 소목 추출물을 뺀 것을 희첨+HSP27로 도면에 표시하였고, 상기 본 발명의 마스크팩 조성 중 희첨 추출물을 뺀 것을 소목+HSP27로 표시하였다. 또한, 소목 추출물과 희첨 추출물을 뺀 것을 HSP27로 표시하였다.

[0056] 음성 대조군으로서 소목 추출물, 희첨 추출물 및 실시예 3의 세포침투성 HSP27 융합단백질을 모두 포함하지 않고, 아세톤을 20㎕ 가한 것을 사용하였다.

[0057]

[0058] **5) 염증동물 모델 제조**

[0059] TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) TPA 1㎍을 아세톤 20㎕에 녹인 후 6-8주 된 ICR 마우스 귀에 하루 한 번씩 3일 동안 발라 주었다. TPA를 처리한 후 직경 5㎜ 펀치를 이용하여 시료를 얻고, 귀의 두께와 무게를 측정하였다.

[0060] TPA 처리 후 24시간 경과한 후 하루 한 번씩 1시간 동안 각 시료(실시예 4의 마스크팩)를 3일간 처리하였다. 이후 귀의 두께와 무게를 위의 방법으로 측정하고, 면역조직염색 및 싸이토카인 분석을 수행하였다.

[0061] **6) 면역조직염색(Immunohistochemistry)**

[0062] 실험동물은 질소와 산소 혼합가스가 들어있는 3% 이소플루란스(isoflurance)로 마취시킨 후 관류 세척하였다. 관류 세척이 끝난 후, 적출된 장기는 파라포름알데히드를 함유한 0.1M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 고정하고 고정이 끝난 조직은 조직을 떼어내어 4% 파라포름알데히드 용액에 담가 보존하였다. 조직을 임배딩 배지(Reichert-Jung, Germany)로 포매하고 동결박절기(cryostat; Reichert-Jung, Germany)를 이용하여 5㎛ 절편으로 만든 다음 사용하였다.

[0063] 조직 절편은 0.01M PBS로 10분간 완충시킨 후 다시 증류수로 10분간 세척하였다. PBS로 7분씩 3회 세척한 후 비특이적 반응을 방지하기 위하여 조직을 PBS에 들어있는 5% 정상 염소 혈청에 30분간 반응시킨 다음 통상적인 헤마토자일린 및 에오신(hematoxyline and eosin) 염색을 하였다. 그 다음 현미경 관찰 후 사진촬영(Axioscope microscope; Carl Zeiss, Germany) 하였다.

[0064] **7) 싸이토카인 분석**

[0065] 시료에서 RNA를 분리한 후 각각의 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 염증반응에서 발현되는 싸이토카인(IL-6, IL-1β, TNF-α)을 측정하였다. 각각의 프라이머는 다음과 같다.

[0066] TNF-α 안티센스 프라이머: 5'-TGGCACCACTAGTTGGTTGTCTTT-3'

[0067] TNF-α 센스 프라이머: 5'-A AGTTCCCAAATGGCCTCCC-3'

[0068] IL-1β 안티센스 프라이머: 5'-GTGCTGCCTAATGTCCCCT TGAATC-3'

[0069] IL-1β 센스 프라이머: 5'-TGCAGAGTTCCCCAACTGGTACATC-3'

[0070] IL-6 안티센스 프라이머: 5'-TGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'

[0071] IL-6 센스 프라이머: 5'-CAAGAAAGA CAAAGCCAGAGTCCTT-3'

[0072] β-액틴 안티센스 프라이머: 5'-GGACAGTGAGGCCA GGATGG-3'

[0073] β-액틴 센스 프라이머: 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3'.

[0074] PCR을 수행한 후 아가로즈 전기영동으로 확인하였다.

[0075] **결과 1) 소목, 회첨 및 HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩의 항염증 효능**

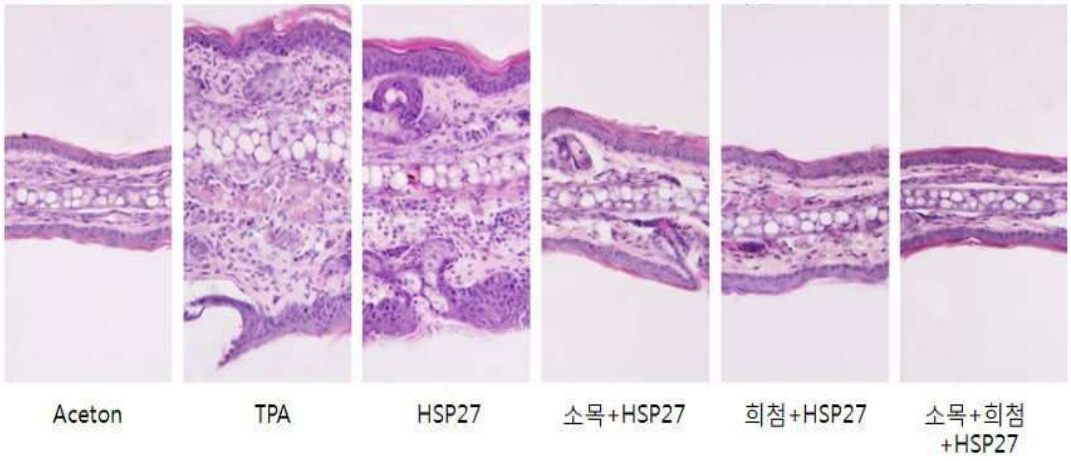
[0076] 소목 추출물, 회첨 추출물 및 Pep-HSP27 융합단백질이 각각 0.1중량% 함유된 습윤성 마스크팩을 실시예 4의 기재와 같이 제조하여 TPA로 유도한 마우스의 귀 부종 동물모델의 등 표면에 1시간 붙여 항염증 효능을 조직염색하고, 귀 두께와 무게를 측정하여 확인하였다. 조직염색에서 나타난 바와 같이 TPA로 귀의 부종을 유도하면 귀 조직이 상당히 커지면서 염증반응을 나타낸다(도 1). 그러나 여기에 세포침투성 Pep-HSP27 융합단백질이 함유된 마스크팩을 처리하면 부종이 조금 억제되며, 소목 추출물+Pep-HSP27 융합단백질, 회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질, 그리고 소목 추출물+회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질을 함유한 각 마스크팩을 처리하면 귀 부종이 억제되는 것을 확인하였다. 그 중에서도 소목 추출물+회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩은 거의 정상적인 피부와 비슷하게 부종이 억제되어 염증 억제에 현저한 효능을 나타내었다. 또한, 귀의 두께와 무게를 측정한 결과에서도 소목 추출물+회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩을 처리한 경우 부종에 의한 무게 및 두께가 현저히 감소되는 것을 알 수 있었다(도 2). 이러한 결과는 소목 추출물+회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질을 처리한 경우가 소목 추출물+Pep-HSP27 융합단백질, 회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질, 그리고 Pep-HSP27 융합단백질을 처리한 경우보다 더욱 항염증 효과가 뛰어남을 나타낸다.

[0077] **결과 2) 싸이토카인 발현 억제**

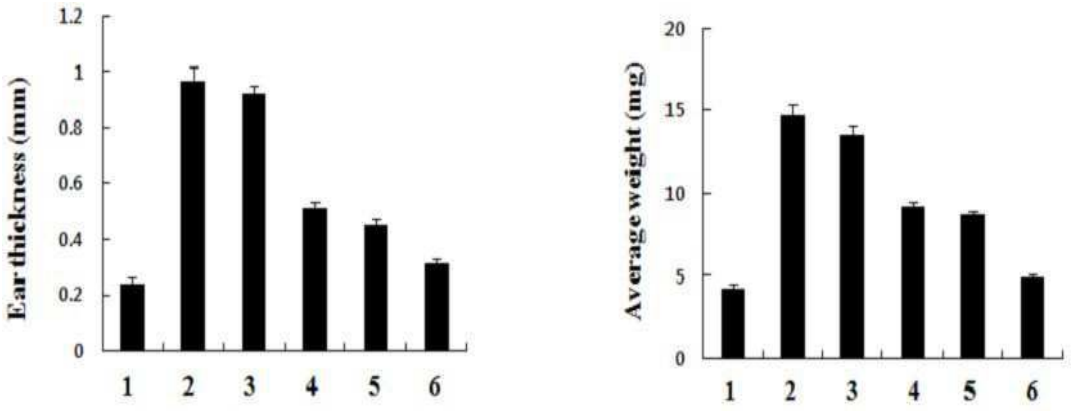
[0078] TPA로 유도한 마우스의 귀 부종 동물모델에서 염증반응에서 발현되는 싸이토카인의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. 싸이토카인 (IL-6, TNF-α, IL-1β)은 염증반응에 의해 발현이 증가된다는 것이 잘 알려져 있다. 도 3과 같이, 소목 추출물+회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질을 함유한 마스크팩을 처리한 경우 TPA에 의해 증가된 싸이토카인 발현이 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 소목 추출물+회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질을 처리한 경우가 소목 추출물+Pep-HSP27 융합단백질, 회첨 추출물+Pep-HSP27 융합단백질, 그리고 Pep-HSP27 융합단백질을 처리한 경우보다 더욱 항염증 효과가 뛰어남을 나타낸다.

도면

도면1

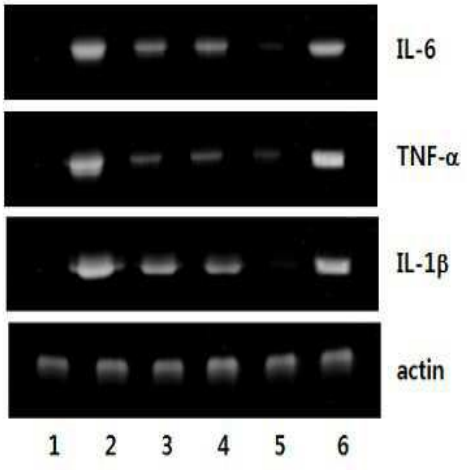


도면2



1, Aceton; 2, TPA; 3, HSP27; 4, 소목+HSP27, 5, 희첨+HSP27; 6, 소목+희첨+HSP27.

도면3



1, Aceton; 2, TPA; 3, 소목+HSP27, 4, 희첨+HSP27; 5, 소목+희첨+HSP27; 6, HSP27.

서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Anti-inflammatory skin composition containing Caesapinia sappan, Siegesbeckia glabrescens Makino, and cell-transducing heat shock protein 27 fusion protein

<130> hallym-wseum-100611

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein transducing domain called Pep-1

<400> 1

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 2

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pep-HSP27 fusion protein

<400> 2

Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Thr Glu Arg Arg Val Pro Phe Ser
20 25 30

Leu Leu Arg Gly Pro Ser Trp Asp Pro Phe Arg Asp Trp Tyr Pro His
35 40 45

Ser Arg Leu Phe Asp Gln Ala Phe Gly Leu Pro Arg Leu Pro Glu Glu
50 55 60

Trp Ser Gln Trp Leu Gly Gly Ser Ser Trp Pro Gly Tyr Val Arg Pro
65 70 75 80

Leu Pro Pro Ala Ala Ile Glu Ser Pro Ala Val Ala Ala Pro Ala Tyr
85 90 95

Ser Arg Ala Leu Ser Arg Gln Leu Ser Ser Gly Val Ser Glu Ile Arg
100 105 110

His Thr Ala Asp Arg Trp Arg Val Ser Leu Asp Val Asn His Phe Ala
115 120 125

Pro Asp Glu Leu Thr Val Lys Thr Lys Asp Gly Val Val Glu Ile Thr
130 135 140

Gly Lys His Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Gly Tyr Ile Ser Arg Cys
145 150 155 160

Phe Thr Arg Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Gly Val Asp Pro Thr Gln Val
165 170 175

Ser Ser Ser Leu Ser Pro Glu Gly Thr Leu Thr Val Glu Ala Pro Met
180 185 190

Pro Lys Leu Ala Thr Gln Ser Asn Glu Ile Thr Ile Pro Val Thr Phe
195 200 205

Glu Ser Arg Ala Gln Leu Gly Gly Pro Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu
210 215 220

Thr Ala Ala Lys

225

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tggcaccact agttggttgt cttt 24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aagttcccaa atggcctccc 20

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gtgctgccta atgtcccctt gaatc 25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tgcagagttc cccaactggt acatc 25

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tggatggtct tggtccttag cc 22

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

caagaaagac aaagccagag tcctt 25

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

ggacagtgag gccaggatgg 20

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

agtgtgacgt tgacatccgt aaaga 25