



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0058830
(43) 공개일자 2012년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/38 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0120314
(22) 출원일자 2010년11월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강로2가 181
(72) 발명자
심중현
경기도 용인시 기흥구 고매로43번길 32-2, 벽산
블루밍아파트 104동 1401호 (공세동)
김지현
경기도 용인시 기흥구 금화로11번길 10, 상갈주
공아파트 308동 1905호 (상갈동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
임희택, 김영철, 김 순 영

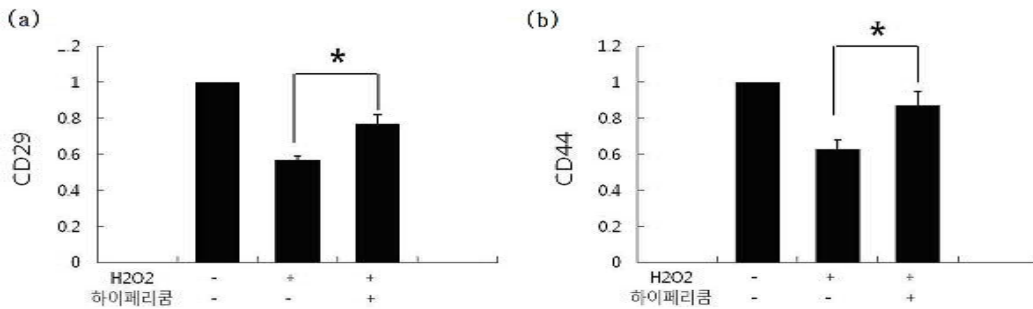
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 하이페리쿰 추출물을 함유하는 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 및 피부세포 증식용 조성물

(57) 요약

본 발명은 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물 및 피부세포 증식용 조성물을 제공한다. 본 발명의 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 지방유래 줄기세포 재생을 촉진시키고 표피의 재생에 관여하는 피부 표피 기저층의 전이-중폭 세포의 증식을 촉진시켜, 피부 볼륨감을 증진시키고 손상된 피하지방의 기능을 회복시켜 주므로, 피부 볼륨감 증대용 피부 미용 및 성형용 조성물 및 피부 볼륨감 증대용 피부외용제 조성물에 적용 가능하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김지영

서울특별시 동작구 동작대로45길 22, 101동 602호
(동작동, 이수교KCC스위첸아파트)

민대진

서울특별시 성동구 용답25길 17-23 (용답동)

모상현

경기도 용인시 기흥구 보라동 617 한보라마을휴먼
시아5단지아파트 502동 803호

서효현

인천광역시 연수구 함박퇴로 250, 풍림1차아파트
103동 1403호 (연수동)

김한곤

경기도 수원시 영통구 매탄로126번길 66, 201동
903호 (매탄동, 주공그린빌)

이태룡

경기도 용인시 기흥구 동백평촌로 39, 동보노빌리
티아파트 1201동 1602호 (동백동)

노민수

서울특별시 서초구 신반포로23길 41, 110동 606호
(잠원동, 신반포2지구아파트)

신동욱

서울특별시 서대문구 독립문로 10, 독립문 삼호아
파트 102동 501호 (영천동)

특허청구의 범위

청구항 1

하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 지방유래 줄기세포는 인간의 지방유래 줄기세포(human adipose derived stem cells: hADSCs)인 줄기세포성 증진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 지방 조직을 증가시켜 피부 볼륨감을 증가시키는 것을 특징으로 하는 줄기세포성 증진용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 지방유래 줄기세포 표지마커인 CD29 및 CD44의 발현량을 증가시키는 작용을 하는 것으로 하는 줄기세포성 증진용 조성물.

청구항 5

하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부세포 증식용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 피부세포는 전이-증폭 세포(Transit-Amplifying cell: TA cell)인 피부세포 증식용 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 조성물은 피부를 재생시키고 피부 노화를 방지시키는 것을 특징으로 하는 피부세포 증식용 조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 조성물은 전이-증폭 세포 표지 마커인 CD71의 발현량을 증가시키는 작용을 하는 것을 특징으로 하는 피부세포 증식용 조성물.

청구항 9

제 1항 또는 제 5항에 있어서,

상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 하이페리쿰 추출물을 0.0001 내지 10중량% 함유하는 것인 조성물.

청구항 10

제 1항 또는 제 5항에 있어서,

상기 조성물은 피부 미용용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1항 또는 제 5항에 있어서,
상기 조성물은 성형용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 1항 또는 제 5항에 있어서,
상기 조성물은 피부외용제 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 피부에 처리하는 단계를 포함하는 피부 미용 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,
상기 하이페리콤 추출물은 하이페리콤을 끓는 물에 녹여 필터링하여 얻은 추출물인 것인 피부 미용 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 하이페리콤 추출물을 함유하는 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 및 피부세포 증식용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부는 인체를 구성하고 있는 기관 중 가장 큰 기관으로, 우리 몸 부피의 약 16%를 차지하고, 면적이 1.8 m², 두께가 2~4mm, 무게가 약 3kg이며, 표피, 진피 및 피하지방층으로 구성되어 있다. 이러한 피부는 외부 환경과 직접 접하고 있으면서 인체 유해 미생물과 같은 다양한 유해인자들과 자외선 등과 같은 외부 자극으로부터 인체를 보호하는 중요한 보호막 역할을 담당하는 동시에 전신의 대사에 필요한 생화학적 기능을 영위하는 생명 유지에 필수 불가결한 기관이다. 특히, 진피 아래에 존재하는 피하지방층은 지방세포(adipocyte)의 소엽으로 구성되어 있는데, 외부의 열에 대해 피부 내부 기관의 보호 및 충격을 흡수하는 쿠션 역할을 하며 영양 성분을 트리글리세라이드(Triglyceride)의 형태로 지방체(Lipid droplet)라는 세포 소기관에 저장하여 필요시 에너지원으로 사용하기도 한다. 그러나 나이가 들어감에 따라 자연적인 요인과 각종 외부 자극에 의해 피부는 손상을 입게 되는데, 특히 진피에서 탄력을 담당하는 교원섬유(콜라겐), 탄력섬유(엘라스틴)의 활성 및 발현이 저하되며 탄력이 줄어들고 동시에, 피하지방에서도 지방 생성이 감소함으로써 결국에는 피부 전반적으로 각 구성 세포들의 본래 기능이 제대로 이루어지지 않게 된다. 그래서, 현재 널리 사용되고 있는 방법이 지방이식수술로, 이는 튜립 니들(tulip needle) 모양의 끝이 날카롭지 않은 바늘을 갖는 주사기를 이용하여 자신의 지방을 채취해 탄력이 떨어져 보이는 피부의 각 부위에 이식하는 수술이다. 그러나 지방이식수술 이후에 이식 부피의 40~60%가 다시 인체 내에 흡수된다는 것이 보고된 바 있고, 피부가 얇고 피하지방이 적은 부위에서의 지방이식수술은 세포 덩어리가 만져지는 등의 문제가 제기되며, 실제로 이식한 지방의 생존율과 생존기간이 기대에 미치지 못해 재이식이 필요한 경우가 발생한다.

[0003] 이에, 이러한 문제점들이 있는 지방이식수술을 대체하면서 피하지방층을 충분히 증가시킬 수 있는 조성물에 대한 요구가 높아지고 있다. 최근 피부 탄력 감소의 원인인 콜라겐과 엘라스틴의 감소를 억제하려는 목적으로 개발되어 사용되고 있는 레티놀과 레티노익산 등의 레티노이드는 탁월한 피부 탄력 개선 효과를 나타내지만, 소량만을 피부에 적용하여도 자극이 나타난다는 단점을 가진다. 따라서 최근 들어 이러한 원료들의 피부 자극 문제를 해소하기 위해 보다 안전하고 피부에 자극이 없는 원료를 이용한 화장품 개발에 대한 요구가 높아지고 있다.

[0004] 피부의 기본적인 구조는 피하지방조직에 의해서 유지되고, 이러한 피하지방조직은 피부의 볼륨감과 강도를 좌우하는 역할을 하므로, 지방조직의 부피를 증가시키는 것이 피부의 볼륨감 유지에 좋은 해결책이 될 수 있으므로, 피부의 볼륨감 유지 및 증진을 위해 피부 자극이 없으면서 지방조직의 부피를 증가시킬 수 있는 조성물

의 개발이 필요한 실정이었다.

[0005] 한편, 피부의 가장 바깥에 위치하는 표피(epidermis)에서 재생능력을 보이는 것으로 알려진 것은, 기저층에 존재하는 피부의 각질 줄기세포(Keratinocyte stem cells, KSC)이다. 각질 줄기세포가 지속적으로 분열하여 크게 두 가지 세포를 생성하는데, 하나는 자기 복제(self-renewal)를 하여 만드는 똑같은 줄기세포이고, 다른 하나는 전이-증폭 세포(Transit-Amplifying Cells, TA cells)이다. 전이-증폭 세포들은 더욱 증폭하고, 초기 분화하여 각질 세포(Keratinocyte cells)가 되고, 계속 분화가 진행되어 이들은 피부 표면으로 밀려 올라간다. 이 과정에서 각질 세포는 분화(Differentiation)와 각화(Keratinazation)를 일으키면서 각질층을 이루게 되며, 3~4주 후에는 각질층에서 떨어져 나간다.

[0006] 상기 각질 줄기세포 및 전이-증폭세포는 보통 기저층 세포들의 약 4-7% 정도로 극히 적은 수로 분포되며, 각질 줄기세포의 수를 증가시키는 것은 전이-증폭 세포의 수를 증가시키는 것보다 쉽지 않으며, 상대적으로 더 넓은 지역에 분포되어 있지 않아 연구에 많은 어려움이 따른다. 그래서 각질 줄기세포 및 전이-증폭 세포의 증식 능력을 보이는 조성물의 개발이 필요한 실정이었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 피부에 자극이 없으면서 지방조직을 증가시킬 수 있는 하이페리쿰 추출물을 함유하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한 본 발명은 지방유래 줄기세포의 줄기세포성을 증진시키고 피부 볼륨감을 증가시킬 뿐 아니라, 각질 세포의 전이-증폭 세포를 증식시키고 피부세포 재생 능력을 나타내는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물을 제공할 수 있다.

[0009] 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부세포 증식용 조성물을 제공할 수 있다.

[0010] 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 볼륨감 증대용 피부 미용 및 성형용 조성물을 제공할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 볼륨감 증대용 피부외용제 조성물을 제공할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예는 피부에 하이페리쿰 추출물을 처리하는 것을 포함하는 피부세포 증식 촉진에 의한 피부 미용 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 지방유래 줄기세포 재생을 촉진시키고 표피의 재생에 관여하는 피부 표피 기저층의 전이-증폭 세포의 증식을 촉진시켜, 피부 볼륨감을 증진시키고 손상된 피하지방의 기능을 회복시켜 주므로, 피부 볼륨감 증대용 피부 미용, 성형용 조성물 및 피부 볼륨감 증대용 피부외용제 조성물에 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 조성물의 농도에 따른 지방유래 줄기세포의 세포독성을 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 조성물의 농도에 따른 피부 각질 세포의 세포독성을 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 산화 스트레스를 가한 지방유래 줄기세포에 처리했을 때, CD29 및 CD44 유전자의 발현양상을 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 자외선을 가한 피부 각질 세포에 처리했을 때, CD71 유전자의 발현양상을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 산화 스트레스를 가한 지방유래 줄기세포에 처리했을 때, (a) CD29, (b) CD44 단백질의 발현을 비교하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하에서는, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명의 바람직한 실시예에 관하여 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.
- [0016] 본 발명은 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0017] 하이페리쿰(Hypericum)은 물레나물과의 한 속으로, 세인트존스워트, 물레나물, 망종화, 갈퀴망종화, 고추나물 등 약 400종의 현화식물을 포함하는 속이다. 과(family)는 Clusiaceae, 아과(subfamily)는 Hypericoideae로 알려져 있다. 하이페리쿰은 열대 저지방, 사막, 극지방을 제외한 전세계에 분포되어 있다.
- [0018] 본 발명에서 하이페리쿰은 하이페리쿰 속에 속하는 어떠한 식물이라도 사용될 수 있으며, 바람직하게는 세인트존스워트(Hypericum perforatum)를 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 하이페리쿰 추출물은 하이페리쿰을 열수 추출 또는 에탄올 추출하여 얻을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 하이페리쿰 추출물은 상업적으로 구입하여 사용할 수도 있다. 예컨대, 한국의 바이오 에프디엔 씨(Bio-FD&C)에서 구입하여 사용할 수 있다.
- [0020] 상기 '줄기세포성 (stemness)'이란 줄기세포의 자기재생능력과 항상성을 지니며 줄기세포의 활성이 있는 상태를 말하며 줄기세포성 증진이란 줄기세포의 활성이 증가하는 것을 의미한다.
- [0021] 상기 지방유래 줄기세포(Adipose derived stem cell: ADSC)는 인간의 지방유래 줄기세포(human adipose derived stem cells, hADSCs)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물은 지방유래 줄기세포 표지마커인 분화 클러스터 29, 인테그린 베타 1(cluster of differentiation 29, integrin beta 1: 이하 CD29) 및 분화 클러스터 44(이하 CD44)의 발현량을 증가시킬 수 있다. CD29와 CD44의 발현량 증가는 지방유래 줄기세포의 활성이 증가된다는 것을 의미한다. 따라서 상기 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물은 지방조직을 증가시켜서 피부에 볼륨감을 증가시키는 효능을 가질 수 있다.
- [0023] 상기 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 하이페리쿰 추출물 0.0001 내지 10중량% 함유할 수 있고, 상세하게는 0.0001 내지 0.01중량%을 함유할 수 있다. 0.0001중량% 미만이면 효과가 미미하고, 10중량% 이상이면 세포독성을 나타내는 문제가 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부세포 증식용 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 피부세포는 전이-증폭 세포(Transit-Amplifying cell, 이하 TA cell)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 피부세포 증식용 조성물에 의하면 전이-증폭 세포의 증식 촉진에 의해 피부 표피를 재생시킬 수 있으며, 전이-증폭 세포는 각질 줄기세포와 함께, 끊임없는 세포 분열을 통해 각질세포 탈락에 의한 표피 손실을 극복하고, 표피를 재생시키는 역할을 할 수 있다. 따라서 상기 피부세포 증식용 조성물은 피부를 재생시키거나 피부 노화를 방지할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에 사용된 용어 '피부 재생'은 전반적인 피부 노화 및 피부 표피 등에 유발된 상처 등에 대응하여 새로운 각질세포를 생성하는 능력을 포함하는 광의의 개념이다. 구체적으로, 피부 재생은 피부 표피의 기저층에 존재하는 각질 줄기세포의 분열에 의해 생성된 전이-증폭 세포들이 더욱 증폭하고, 초기 분화하여 각질

세포가 되고, 피부 표면으로 밀려 올라가 분화(Differentiation)와 각화(Keratinization)를 일으키면서 각질층을 이루게 되는 모든 과정을 의미한다. 그 중에서 피부 재생의 핵심 과정은 기저층에 존재하는 각질 줄기세포와 이 세포의 딸세포인 전이-중폭 세포의 증식에 있다. 피부의 겉부분만이 소실되는 찰과상, 긁혔을 때 나타나는 열상, 불에 의한 화상 등 외부의 물리적, 화학적 환경에 의해 일어나는 피부 손상이 일어났을 때, 이를 빠른 시간에 회복하기 위해서는 피부 기저층에 존재하며 피부 재생을 담당하고 있는 각질 줄기세포와 전이-중폭세포들의 활발한 증식이 필요하다. 보통 어릴 때는 피부 손상이 일어나더라도 흉터가 남지 않는 반면, 나이가 들어 피부 손상이 일어나게 되면 흉터가 남는 이유도 피부 재생에 필요한 각질 줄기세포와 전이-중폭 세포의 증식의 수준 정도가 나이 정도에 따라 현저하게 낮아지기 때문이다. 즉, 노화가 진행하게 되면, 이러한 세포들의 증식 정도가 낮아지게 되며, 이는 피부 재생 능력이 감퇴하는 것으로, 상처 등의 회복이 지연되거나, 피부 탄력 감소가 심화될 수 있다.

- [0028] 상기 피부세포 증식용 조성물을 이용해 증식된 피부세포를, 각질 줄기세포를 필요로 하는 개체에 이식할 수 있다.
- [0029] 본 발명자들은 하기의 시험예를 통해 입증된 바와 같이, 본 발명에 따른 하이페리쿰 추출물을 유효 성분으로 함유하는 피부세포 증식용 조성물을 피부 각질 세포에 적용하여, 전이-중폭세포 표지 마커의 발현이 유효하게 증가함을 밝혀내었다.
- [0030] 상기 각질 줄기세포는 앞서 언급한 바와 같이 표피를 재생시키는 데 중요한 역할을 담당한다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물에 의한 각질 줄기세포수의 증가를 통해, 상처 회복을 위한 피부 재생 능력을 향상시키고, 피부 재생 능력 감퇴로 인한 피부 탄력 감소 및 피부 노화의 심화를 방지할 수 있다.
- [0031] 상기 조성물은 분화 클러스터 71(Cluster of Differentiation 71: 이하 CD71)을 발현하는 전이-중폭 세포의 표지 마커의 발현을 증가시킬 수 있으며, 상기 CD71은 전이-중폭 세포에 특이적인 표지 마커 단백질들이다.
- [0032] 상기 CD71 단백질은 트랜스페린(Transferrin) 수용체라고도 하며, 기저층에만 존재한다. 구체적으로, 상기 CD71 단백질은 세포 혈류를 타고 흐르는 철분과 결합되는 트랜스페린(transferring) 단백질과 상호작용을 하여, 수용체 매개 트랜스페린 함입(receptor mediated transferrin endocytosis)이라는 과정을 거쳐, 세포 내에 철분을 공급하는 역할을 한다. 활성화되고 있는 세포나, 증식하는 세포는 세포 내에 철분을 많이 필요로 하는데, 이때 CD71 단백질의 발현이 증가할 수 있다.
- [0033] 상기 피부세포 증식용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 하이페리쿰 추출물을 0.0001 내지 10중량% 함유할 수 있고, 상세하게는 0.0001 내지 0.01 중량%를 함유할 수 있다. 0.0001중량% 미만이면 효과가 미미하고, 10 중량% 이상이면 세포독성을 나타내는 문제가 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 볼륨감 증대용 피부 미용 및 성형용 조성물을 제공한다.
- [0035] 상기 조성물은 비제한적인 예로 지방 조직 형성을 통한 가슴 확대, 미세지방 이식술, 자가지방 이식술 등 얼굴에 피부 볼륨감을 증진시켜 팔자 주름 및 미간주름 제거 및 탄력 유지를 목적으로 사용할 수도 있다.
- [0036] 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 투여할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제 또는 국소 투여용 제제 등이 바람직하다. 주사용 제형은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 그러나, 이때, 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 함께 사용할 수 있다.
- [0037] 이렇게 제조된 본 발명의 제제는 통상의 방법에 따라 비경구적으로, 예를 들면 특정 부위에 직접 투여할 수 있다. 이때, 조성물의 주입은 주사기를 이용하여 이루어진다. 상기 조성물의 1일 투여량은 1×10^5 내지 1×10^7 세포/kg 체중, 바람직하게는 5×10^5 내지 5×10^6 세포/kg 체중이며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 분화 및 증식시키고자 하는 지방세포의 양, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0038] 또한, 본 발명의 일실시예는 하이페리쿰 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 볼륨감 증진용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 피부 외용제 조성물은 화장품 조성물 또는 약학 조성물일 수 있다.
- [0040] 상기 화장품 조성물의 제형은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어 유연 화장수, 영양화장수, 마사지 크림, 에센스, 영양크림, 팩 등의 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 상기 약학 조성물은 로션, 연고, 겔, 크림, 패취 또는 분무제와 같은 경피 투여형 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 각 제형에 의한 피부 외용제 조성물에 있어서, 상기한 본 발명의 조성물 이외의 다른 성분들을 기타 피부 외용제의 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승효과가 일어날 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명에 의한 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우에, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 약학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다.
- [0044] 유효성분의 실제 투여량은 증상의 중증도, 선택된 투여 경로, 대상의 연령, 성별, 체중 및 건강상태 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0045] 일반적으로 유효성분의 투여량은 0.001mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.5mg/kg/일 내지 2.5mg/kg/일이다.
- [0046] 또한, 본 발명의 일실시예는 피부에 하이페리쿰 추출물을 함유하는 조성물을 처리하는 단계 포함하는 피부세포 증식 촉진에 의한 피부 미용 방법을 제공한다. 상기 하이페리쿰 추출물은 하이페리쿰을 끓는 물에 녹여 필터링 하여 얻은 추출물인 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명에 의한 조성물의 적용 부위는 신체의 모든 지방 조직을 포함하며, 특정 부위에 한정하지는 않지만, 예를 들면, 지방층이 적은 얼굴 부위를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 조성물에 의한 피부세포 증식은 생체 외에서 수행될 수 있고, 증식된 피부세포는 각질 줄기세포를 필요로 하는 개체에 이식될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 조성물에 의한 지방조직의 증가 효과로, 피부 볼륨감 증가 효과 외에도 피부 탄력 증대 효과, 피부 주름 개선 효과, 피부 재생 효과, 피부 노화 방지 효과 등이 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0050] 이하 하기 실시예 및 시험예를 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0051] [실시예 1] 하이페리쿰 추출물을 함유하는 조성물의 제조
- [0052] 바이오 에프디엔씨(Bio-FD&C)에서 세인트존스워트(Hypericum perforatum)를 구입하였다. 이 세인트존스워트(Hypericum perforatum)의 분말을 끓는 물에 녹인 후, 0.2 μ m 시린지 필터로 필터링하였고, 필터링한 액체를 하이페리쿰 추출물로 사용하였다.
- [0053] [시험예 1] 하이페리쿰 추출물의 세포독성
- [0054] 상기 실시예 1에 따른 하이페리쿰 추출물 함유 조성물의 세포독성을 파악하기 위하여 인간 지방유래 줄기세포 및 피부 각질 세포에 대한 세포독성 실험을 수행하였다.
- [0055] (1) 인간 지방유래 줄기세포에서의 세포독성

- [0056] 인간의 지방유래 줄기세포(human adipose derived stem cells, hADSCs)를 론자社(Lonza, Inc. Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 상기 인간 지방유래 줄기세포를 75cm² T-flask에 계대배양(passage)하여, CO₂ 배양기(CO₂ Incubator)에서 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양을 하였다. 통상적으로 두 번째 또는 세 번째에서 세포의 계대배양을 진행하였다.
- [0057] 상기 하이페리쿰 추출물을 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10%의 농도로 상기 지방유래 줄기세포에 처리하고, 지방유래 줄기세포에서의 세포독성 정도를 CCK-8키트(Dojindo)를 이용하여 확인하였다.
- [0058] 상기 실험 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 하이페리쿰 추출물이 상기 농도에서 세포독성이 없거나 극히 미미함을 확인할 수 있었다.
- [0059] (2) 피부 각질 세포에서의 세포독성
- [0060] 인간의 피부 각질 세포(keratinocyte)를 론자社(Lonza, Inc. Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 상기 피부 각질 세포를 75cm² T-flask에 계대배양(passage)을 하여, CO₂ 배양기(CO₂ Incubator)에서 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양을 하였다. 통상적으로 두 번째 또는 세 번째에서 세포의 계대배양을 진행하였다.
- [0061] 상기 실시예 1에 따른 하이페리쿰 추출물을 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10%의 농도로 피부 각질세포에 처리하고, 피부 각질세포에서의 세포독성 정도를 CCK-8키트(Dojindo)를 이용하여 확인하였다.
- [0062] 상기 실험 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 농도에서 세포독성이 없거나 극히 미미함을 확인할 수 있었다.
- [0063] [시험예 2] 하이페리쿰 추출물의 세포 표지 마커 유전자의 발현량 측정
- [0064] 상기 실시예 1에 따른 하이페리쿰 추출물 함유 조성물의 효과를 파악하기 위하여 인간 지방유래 줄기세포 및 전이-증폭세포 각각의 표지 마커 유전자의 발현 수준을 측정하였다. 지방유래 줄기세포(human adipose derived stem cells, hADSCs) 및 피부 각질세포(keratinocyte)는 론자社(Lonza, Inc. Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다.
- [0065] (1) 지방유래 줄기세포의 CD29, CD44 발현량 측정
- [0066] 지방유래 줄기세포의 줄기세포성 증진효과를 파악하기 위해서 하이페리쿰 추출물을 0.01%로 배지에 첨가하였다. 지방유래 줄기세포의 산화스트레스는 과산화수소수(H₂O₂)를 200 μM 농도로 24시간 처리하였다.
- [0067] 2ml의 인산염 완충액(Phosphate Buffered Saline, PBS)으로 세포를 세척한 다음, 트리졸 시약(Trizol reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포 내의 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 키아젠사의 RNA 키트(QIAGEN RNeasy kt, QIAGEN, Valencia, CA)로 한번 더 정제한 후, 애질런트社의 바이오어널라이저 2100 모델 기기(Agilent 2100 BioAnalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 RNA의 질(quality)을 확인하였다. 인비트로젠社의 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) kit, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간 역전사 증합 효소 연쇄반응(real time-reverse transcription polymerase chain reaction, Q-RT-PCR)을 통해 정량적으로 분석하였다.
- [0068] 지방유래 줄기세포에서 CD29, CD44 유전자의 발현 패턴 변화를 어플라이드바이오시스템社의 택맨 유전자 발현 시스템(TaqMan gene expression assay kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) (CD29 유전자 프라이머: Hs00559595_m1, CD44 유전자 프라이머: Hs01075861_m1)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 3((a)CD29, (b)CD44)에 나타내었다.
- [0069] (2) 피부 각질 세포의 CD71 발현량 측정
- [0070] 피부 각질 세포에 UVB를 100mJ/cm²로 조사한 후 하이페리쿰 추출물 0.001%를 처리하였다.
- [0071] 2ml의 인산염 완충액(Phosphate Buffered Saline, PBS)으로 세포를 세척한 다음, 트리졸 시약(Trizol reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포 내의 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 키아젠사의 RNA 키트(QIAGEN RNeasy kt, QIAGEN, Valencia, CA)로 한번 더 정제한 후, 애질런트社의 바이오어널라이저 2100 모델 기기(Agilent 2100 BioAnalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 RNA의

질(quality)을 확인하였다. 인비트로젠社의 역전사키트(Superscript Reverse Transcriptase (RT) kit, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 실시간 역전사 중합 효소 연쇄반응(real time-reverse transcription polymerase chain reaction, Q-RT-PCR)을 통해 정량적으로 분석하였다.

[0072] 피부 각질 세포에서 유전자의 발현 패턴 변화를 어플라이드바이오시스템社의 택맨 유전자 발현 시스템(TaqMan gene expression assay kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) (CD71 유전자 프라이머: Hs00951083_m1)을 이용하여 평가하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0073] 통계는 양측 student t 테스트로 검증하였으며, p 값이 0.05 이하일 때 유의적인 차이가 있다고 표시하였다(*로 표시함).

[0074] 도 3 및 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 지방유래 줄기세포 및 피부 각질 세포의 각 유전자(CD29, CD44, CD71)의 발현양이 음성대조군 대비 약 1.35배, 1.38배, 1.67배 증가함을 확인하였다. 이러한 증가는 통계적으로 유의한 것이었다.

[0075] [시험예 3] 지방유래 줄기세포의 유세포 분석

[0076] 인간 지방유래 줄기세포를 0.25% 트립신(Trypsin-EDTA)으로 75cm² Ti 플라스크로부터 분리한 뒤 1500rpm에서 5분간 세포를 가라앉힌 다음, 배양액을 제거한 뒤에 3ml의 차단버퍼(Blocking buffer), 2% 우태아 혈청(Fetal calf serum: FCS), 2% 소의 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin(BSA) KGM-2)을 넣어주어 세포를 현탁하였다.

[0077] 4℃에서 15분 동안 세포 (약 10⁶ 개의 세포)를 적용시킨 다음, FITC (Fluorescein isothiocyanate)가 부착된 CD44 항체(Cat No. 560977)(BD Pharmingen, CA, US)와 PE-Cy(phycoerythrin-cyanine)가 부착된 CD29 항체(Cat No. 559882) (BD Pharmingen, CA, US)을 각각 100: 1로 넣어주어, 4℃ 하에서 45분 동안 반응시켰다. 한편, 음성대조군으로 사용되는 세포에는 FITC Rat IgG2a, k 아이소타이프(isotype)(Cat No. 555742)와 PE-Cy5 mouse IgG1 k 아이소타이프(Cat No. 555750)를 역시 100: 1로 넣어주어, 4℃ 하에서 45분 동안 반응시켰다.

[0078] 반응이 끝난 후 3ml의 워싱 버퍼(2% Bovine Serum Albumin (BSA) KGM-2)로 두 번 세척한 후, 세포를 현탁하였다. 이후 FACSCalibur(BD Bioscience, San Jose, CA, U.S)로 지방유래 줄기세포에서 CD29, 44을 발현하는 세포들의 활성의 변화를 관찰하고, 이를 도 5((a)CD29, (b)CD44) 및 표 1에 나타내었다.

표 1

	음성대조군	하이페리콥 추출물
CD29를 발현하는 지방유래 줄기세포(세포의 수)	3788	4708
	증가 %	24%
CD44를 발현하는 지방유래 줄기세포(세포의 수)	5163	5876
	증가 %	14%

[0080] 도 5 및 표 1에서 볼 수 있듯이, 음성대조군에 비해서 CD29는 24%, CD44는 14% 증가하였음을 확인할 수 있었다.

[0081] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제형예 및 제제예를 예시한다.

[0082] [제형예 1] 유연화장수

[0083] 상기 하이페리콥 추출물을 함유하는 유연화장수 제형을 하기 표 2에 나타낸 조성으로 통상의 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 2

[0084]

성분	함량(중량%)
베타인	3.0
낮토겍	3.0
셀룰로오스겍	0.005
에탄올	10.0
폴리옥시에틸렌경화피마자유	0.2
초산토코페롤	2.0
하이페리콤 추출물	10
방부제	미량
색소	미량
향	미량
정제수	잔량

[0085]

[제형예 2] 영양화장수

[0086]

상기 하이페리콤 추출물을 함유하는 영양화장수 제형을 하기 표 3에 나타난 조성으로 통상의 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 3

[0087]

성분	함량(중량%)
세틸에틸렌헥사노에이트	4.0
세토스테아릴알콜	1.0
친유형모노스테아릴산스테아레이트	1.0
스쿠알란	0.5
하이페리콤 추출물	5.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
글리세린	5.0
트리에탄올아민	0.5
카르복시비닐폴리머	0.2
방부제	미량
색소	미량
향	미량
정제수	잔량

[0088]

[제형예 3] 크림

[0089]

상기 하이페리콤 추출물을 함유하는 크림 제형을 하기 표 4에 나타난 조성으로 통상의 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 4

[0090]

성분	함량(중량%)
글리세릴스테아레이트	3.0
폴리솔베이트 60	1.0
세토스테아레이트	2.5
밀납	1.0
스쿠알란	2.0
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
세틸에틸헥사노에이트	0.5
유동과라핀	5.0
유효성분혼합물	5.0
글리세린	3.0
프로필렌글리콜	3.0

하이페리쿰 추출물	5.0
방부제	미량
색소	미량
향	미량
정제수	잔량

[0091] [제제예 1] 정제

[0092] 본 발명에 따른 하이페리쿰 추출물 100mg, 락토오스 400mg, 옥수수 전분 400mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

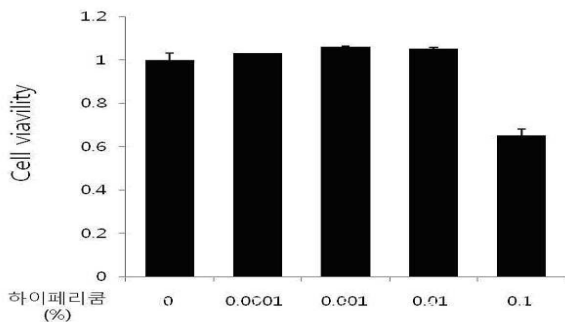
[0093] [제제예 2] 캡슐제

[0094] 본 발명에 따른 하이페리쿰 추출물 100mg, 락토오스 400mg, 옥수수 전분 400mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조 방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

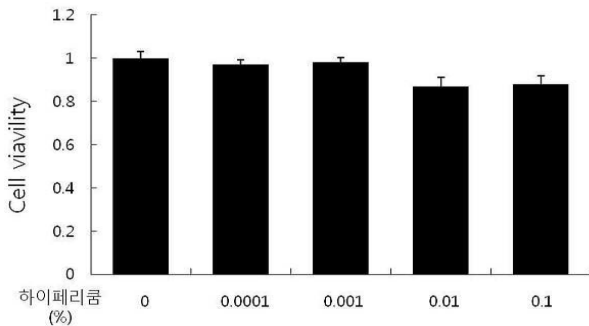
[0095] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

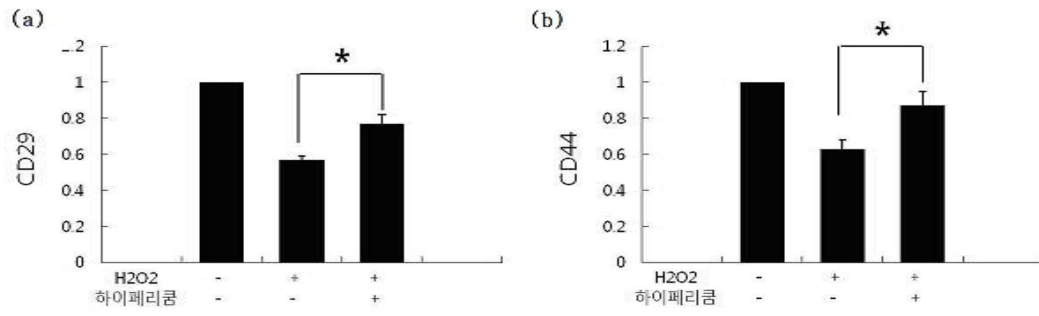
도면1



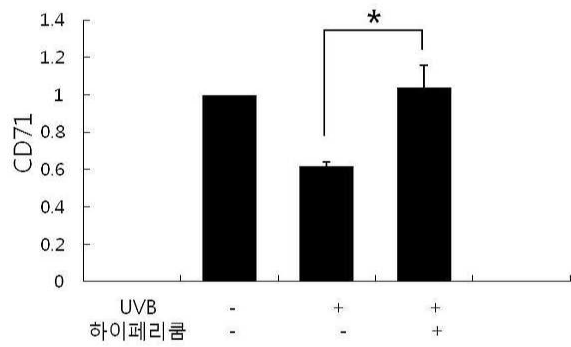
도면2



도면3



도면4



도면5

