



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0120448
(43) 공개일자 2016년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/49 (2006.01) A61K 31/37 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/4973 (2013.01)
A61K 31/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0049441
(22) 출원일자 2015년04월08일
심사청구일자 2015년04월08일

(71) 출원인
주식회사 오비엠텔
대전광역시 서구 갈마역로 155, 102호 (월평동,
둔산아파트형공장)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
대전대학교 산학협력단
대전광역시 동구 대학로 62 (용운동, 대전대학교)
(72) 발명자
김창덕
대전광역시 중구 계백로1716번길 40, 101동 101호
노석선
대전광역시 유성구 지족로 362, 310동 1404호
이민호
대전광역시 유성구 지족동로 123, 603동 603호
(74) 대리인
오국진

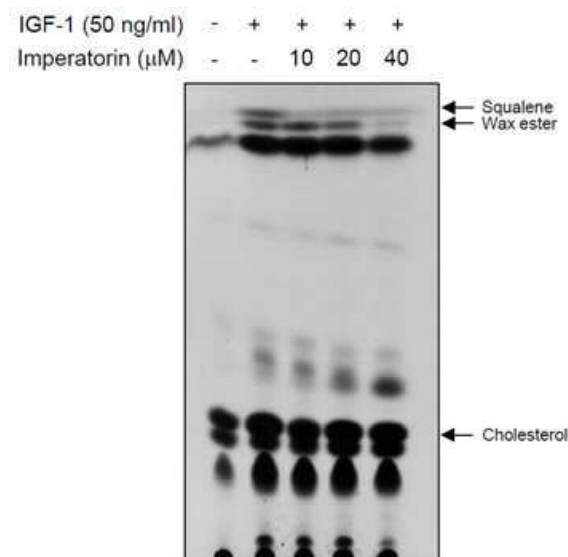
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 임페라토린을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 화장료 조성물; 및 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/498 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0615

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 한의약선도기술개발사업

연구과제명 한방 피지분비 조절제 및 한방 여드름화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.15 ~ 2016.05.14

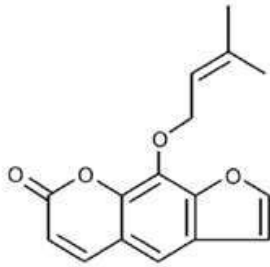
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 화장품 조성물.

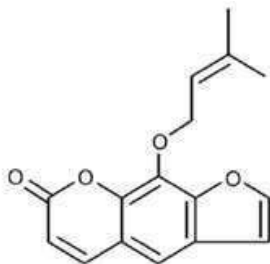
<화학식 1>



청구항 2

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

<화학식 1>



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 임페라토린을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 화장품 조성물; 및 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피지선(sebaceous gland)의 피지세포(sebocytes)에서 분비되는 피지는 피부 외부의 유해 물질의 침투를 막아주고 유수분을 조절하는 순기능을 한다. 그러나 사춘기 호르몬의 변화, 스트레스 등에 의해 피지(sebum)가 과잉으로 분비될 경우, 역기능을 초래하여 다양한 피부장애를 야기하게 된다. 피지 과다분비(seborrhea)는 피지의 과도한 분비를 특징으로 하는 피지선의 질환 또는 피부 트러블(skin troubles)로서, 피부 상에 번들거림(oily coating), 피딱지(crusts 혹은 scales) 등을 야기한다. 또한, 피지 과다분비는 지루성 습진(seborrheic eczema)으로도 칭해지는 지루성 피부염(seborrheic dermatitis)을 야기한다.

[0003] 피지 과다분비 및 지루성 피부염의 억제 또는 개선은 주로 개인적인 비누 세안, 샴푸 사용 등의 위생적인(hygienic) 방법에 의해 이루어지고 있는 실정이다. 약물 치료법으로서 셀레늄 설페이드, 아줄게 화합물, 소듐 설페사트라마이드, 터비나핀 등의 항진균제, 스테로이드 등의 항염증제가 지루성 피부염 환자에게 사용되고 있으나, 이는 증상의 경감을 위한 것으로 피지 과다분비 및 지루성 피부염을 근본적으로 억제, 개선, 또는 치료할

수는 없다.

[0004] 따라서, 피지 과다분비 및 지루성 피부염을 근본적으로 억제, 개선, 또는 치료할 수 있는 방법을 개발하는 것이 당업계에 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 피지분비 세포로부터 피지분비를 억제할 수 있는 물질을 개발하기 위하여 안전성이 우수한 천연 식물 유래의 화합물을 다양하게 검색하였다. 놀랍게도, 백지(*Angelicae dahurica*)로부터 유래된 임페라토린이 피지세포에서의 피지 합성을 효과적으로 억제함으로써 피지 분비를 억제하며, 따라서 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제, 개선, 예방, 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 임페라토린을 유효성분으로 포함하는 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 화장품 조성물 혹은 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 태양에 따라, 임페라토린을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 화장품 조성물이 제공된다.

[0008] 본 발명의 다른 태양에 따라, 임페라토린을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0009] 백지(*Angelicae dahurica*)로부터 유래된 임페라토린이 피지 생성 관련 세포내 신호전달계의 억제 및 피지생성 관련 전사조절인자의 억제를 통하여 피지세포에서의 피지 합성을 효과적으로 억제함으로써 피지 분비를 억제한다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 따라서, 상기 임페라토린은 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제, 개선, 예방, 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 임페라토린의 세포 독성을 평가한 결과이다.

도 2는 IGF-1에 의한 세포내 지질 방출 형성에 미치는 임페라토린의 영향을 평가한 결과이다.

도 3은 IGF-1에 의한 피지 합성에 미치는 임페라토린의 영향을 평가한 결과이다.

도 4는 IGF-1에 의한 스쿠알렌 신테이즈 프로모터 활성화에 미치는 임페라토린의 영향을 평가한 결과이다.

도 5는 IGF-1에 의한 세포내 신호전달계 활성화에 미치는 임페라토린의 영향을 평가한 결과이다.

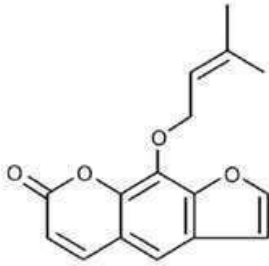
도 6은 IGF-1에 의한 전사조절인자 증가에 미치는 임페라토린의 영향을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 임페라토린을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 임페라토린을 유효성분으로 포함하는, 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 임페라토린(imperatorin)은 백지(*Angelicae dahurica*)로부터 유래된 화합물로서 하기 화학식 1의 구조를 갖는다. 임페라토린은 공지된 방법에 따라 백지(*Angelicae dahurica*)로부터 추출하거나 혹은 예를 들어 미국 Chromadex사 등으로부터 상업적으로 구입할 수 있다

[0013] <화학식 1>



[0014]

[0015] 본 발명자들은 사람의 두피로부터 얻어진 피지분비 세포를 사용하여, 천연식물 유래의 추출물 혹은 분획물을 대상으로 세포 독성 및 피지분비 억제 효능을 평가하였으며, 상기 화학식 1의 화학구조를 갖는 임페라토린이 피지 생성 관련 세포내 신호전달계의 억제 및 피지생성 관련 전사조절인자의 억제를 통하여 피지세포에서의 피지 합성을 효과적으로 억제함으로써 피지 분비를 억제한다는 것을 밝혀냈다. 따라서, 상기 임페라토린은 피지 과다 분비 또는 지루성 피부염의 억제, 개선, 예방, 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명은 다른 화장료 조성물은 예를 들어 기능성 화장료 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 상기 화장료 조성물은 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 상기 추출물을 함유하는 향장 제품, 화장수, 크림, 로오손 등의 형태로 제조될 수 있으며, 이는 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다. 상기 화장료 조성물에 있어서, 상기 조성물의 함량은 피지 과다분비 또는 지루성 피부염의 억제 또는 개선 효과를 달성하기에 유효한 양, 예를 들면 조성물 총 중량에 대하여 약 0.00001 ~ 1 중량%의 함량으로 함유될 수 있고, 바람직하게는 약 0.001 ~ 0.1 중량%의 함량으로 함유될 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 락토즈, 옥수수전분 등의 부형제, 마그네슘 스테아레이트 등의 윤활제, 공지되어 사용가능한 유화제, 현탁제, 완충제, 등장화제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여 형태, 바람직하게는 국소 피부적용 제제와 같은 비경구 투여형태로 제제화될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 다양한 피지 과다분비 또는 지루성 피부염을 앓고 있는 환자에게 1일 약 0.001 mg/kg ~ 0.1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량은 환자의 연령, 체중 및 증상에 따라 일반적으로 변경될 수 있다.

[0018] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 실시예

[0020] 하기 실시예에서 사용한 피지분비 세포는 사람의 두피로부터 분리해 일차배양(primary culture)하여 사용하였다. 두피조직을 70% 에탄올에 약 1분간 침적시켜 멸균한 후 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 3회 세척하여 조직 내에 잔류하는 에탄올을 제거하였다. 조직을 PBS가 담긴 페트리 디쉬로 옮기고 입체현미경 하에서 피지선을 날카로운 핀셋 및 수술용 칼로 적출하였다. 이를 새로운 페트리 디쉬에 옮긴 후 피지세포 배양액을 가했다. 이때 사용한 세포배양액은 Sebomed™ (Biochrom사, 독일)에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 5 ng/ml 재조합 인간표피성장인자(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF), 및 항생제를 첨가한 것을 사용하였다. 피지세포는 피지선 조직으로부터 약 일주일 이내에 뻗어나와 자랐으며, 약 2-3 주 정도 키운 후 트립신을 이용하여 배양 접시에서 떼어내고 새로운 배양 접시에 옮겨 계대배양을 실시하였다. 하기 실시예에서 사용한 피지세포는 3-7 계대의 세포를 사용하였다.

[0021] 실시예 1. 세포 독성

[0022] 임페라토린이 세포에 미치는 독성을 평가하기 위해 MTT 시험법을 이용하였다. 피지세포를 6-웰 플레이트에 2×10^5 cells 농도로 접종하여 하루 동안 배양하고, 임페라토린을 0, 10, 20, 및 40 μM 의 농도로 가한 후 48 시간 추가 배양하였다. 여기에 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드)를 2 mg/ml의 농도로 첨가하여 4 시간 반응시킨 후, 상층액을 버리고 살아 있는 세포에 의해 형성된 포르마잔 결정(formazan crystal)을 디메틸설폭사이드(DMSO)에 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다. 그 결

과는 도 1과 같다. 도 1의 결과로부터, 임페라토린은 40 μ M까지 세포독성이 없음을 알 수 있다

[0023] 실시예 2. 피지분비 억제 효능 평가

[0024] IGF-1(insulin-like growth factor-1)은 피지선에서 피지세포의 분열 및 피지의 과잉생산에 관여하는 것으로 알려져 있다(Exp Dermatol 2009;18:833-841). 피지분비 세포에 IGF-1를 가해 피지의 과잉 생산을 유도한 후, 임페라토린에 의해 피지 분비가 억제되는지의 여부를 평가하였다.

[0025] (1) 나일레드 염색(Nile red staining)

[0026] 피지세포를 세포배양용 커버 글라스 위에 24시간 배양한 후, 피지 합성을 유도하기 위하여 재조합 IGF-1을 50 ng/ml의 농도로 가하고 24시간 추가 배양하였다. 임페라토린의 효능 평가를 위하여 임페라토린을 30분간 전 처리한 후 IGF-1를 가하고 24시간 추가 배양하였다. 세포를 10% 포르말린으로 5 분간 고정하고, 나일레드 용액을 첨가하여 15 분간 염색시키고, PBS로 약 10회 세척한 후, 형광현미경 하에서 관찰하였으며, 그 결과는 도 2와 같다. 도 2의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, IGF-1을 처리한 피지세포는 IGF-1을 처리하지 않은 피지세포에 비해 세포내 지질 방울 형성(intracellular lipid droplet formation)이 증가하였다. 임페라토린을 IGF-1 처리 30 분전에 전처리한 경우 세포내 지질 방울 형성은 IGF-1만 처리한 세포에 비해 농도의존적으로 감소하였다.

[0027] (2) 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC)

[0028] 나일레드 염색은 피지세포 특이적 지질만을 대상으로 하지 않기 때문에 피지 특이적인 효과를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 지질 분석을 수행하였다. 피지세포에서 생성 분비되는 지질 중 스쿠알렌(squalene)은 다른 피부 부위에서는 합성되지 않고 오직 피지세포에서만 합성 분비되는 것으로 알려져 있다(Picardo et al, Dermatoendocrinol 2009;1:68-71). 따라서 피지세포에서 스쿠알렌 합성 정도는 피지분비 조절의 지표로 유용하게 활용되고 있다. 따라서, 스쿠알렌을 지표로 임페라토린의 피지분비 조절 효능을 평가하였다. 피지세포에서 피지 생성을 확인하기 위해 14 C-acetate incorporation assay (J Invest Dermatol., 2008)를 이용해 평가를 실시하였다. 즉, 피지세포를 100 mm 배양접시에 약 70% 콘플루언시까지 배양하고, 배지를 제거하고 FBS와 EGF가 첨가되지 않은 세포배양액에 희석한 시험물질을 가하여 48 시간을 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 배지에 2 μ Ci/ml 14 C-아세트산 나트륨염(미국 PerkinElmer사)을 첨가한 배양액을 가하여 6 시간 배양한 후, PBS로 2회 세척하고, 세포용해제(클로로포름 : 메탄올 = 2 : 1)를 가하여 세포를 용해를 시켰다. 흡 후드(Fume hood)에서 세포용해제를 날리고 남아있는 지질을 소량의 클로로포름로 다시 녹인 후 Merck사의 TLC silica gel 60 F₂₅₄를 이용해 TLC를 수행한 후, 방사선자동사진법(autoradiography)을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 도 3과 같다. 도 3의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, IGF-1은 콜레스테롤과 같이 모든 세포에서 합성되는 지질 이외에 스쿠알렌, 왁스 이스터(wax ester) 등과 같이 피지세포 특이적 지질의 합성을 현저히 증가시켰으며, 임페라토린은 IGF-1에 의해 증가되는 스쿠알렌의 합성을 현저하게 억제하였다.

[0029] (3) 스쿠알렌 신테이즈 프로모터 에세이(squalene synthase promoter assay)

[0030] 피지세포에서 스쿠알렌의 유전자 발현을 평가하기 위한 방법으로 스쿠알렌 신테이즈 프로모터 에세이를 확립하였다. 스쿠알렌 신테이즈 유전자의 프로모터 부위를 중합효소연쇄반응(PCR)으로 클로닝하였다. 이때 사용한 프라이머 세트는 센스: 5'-GGTACCGAGCCCTGTGGCAGTTAGAG-3'(서열번호 1), 안티센스:5'-AAGCTTCGACTTTACCTCTGCGGTG-3'(서열번호 2)이었다. 클로닝된 스쿠알렌 신테이즈 유전자의 프로모터 부위를 pGL3 벡터(미국 Promega사)에 서브클로닝하고, 이를 다시 pENTR 벡터(미국 Life Technologies Corporation사)로 서브클로닝한 후, Virapower adenoviral gateway 발현 키트(미국 Life Technologies Corporation社)를 이용하여 재조합 아데노바이러스를 제조하였다. 이 재조합 아데노바이러스를 피지세포에 감염시킬 경우 스쿠알렌 신테이즈 유전자의 프로모터가 활성화되면서 루시퍼레이스 효소가 증가하여 루미노미터를 이용하여 유전자 프로모터 활성정도를 평가할 수 있다.

[0031] 피지세포를 6-웰 플레이트에서 배양한 후, 재조합 아데노바이러스를 10 감염다중도(multiplicity of infection,

MOI) 양 만큼 처리하여 6 시간 배양하였다. 기존 배지를 제거하고, 새로운 배지와 임페라토린을 처리하고 48 시간 더 배양 한 후, 미국 Promega사의 루시퍼레이즈 키트를 이용해 루시퍼레이즈 활성을 측정하였으며, 그 결과는 도 4와 같다. 도 4의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 임페라토린은 IGF-1에 의해 증가하는 스쿠알렌 신테이스 프로모터 활성을 농도 의존적으로 억제하였다.

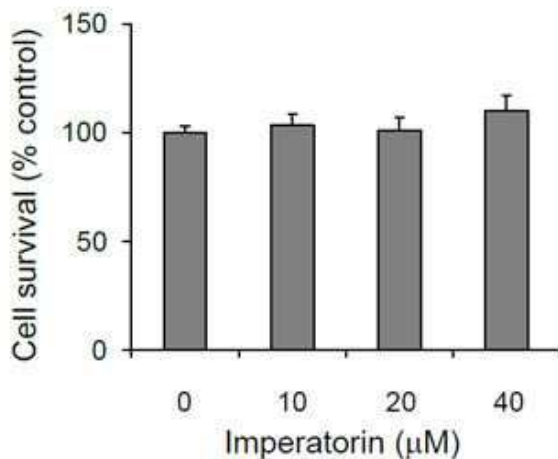
[0032] (4) 세포내 조절단백질들의 발현 평가

[0033] 피지세포에서 지질합성에 관여하는 여러 세포내 신호전달계(signal transduction)를 평가하기 위해 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 시행하였다. 피지세포를 세포용해제(lysis buffer)를 이용하여 파쇄한 후, SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 통하여 단백질을 분획하였다. 이를 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 일차항체 phospho AKT, total AKT, PPAR- γ , SREBP-1, beta actin(미국 Cell signaling Technology사) 및 이차항체(goat anti-rabbit IgG, 미국, Santacruz biotechnology사)를 연속적으로 반응시킨 후, 밴드(western band)를 화학발광측정법(chemiluminescence)으로 확인하였으며, 그 결과는 도 5와 같다. 도 5의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 피지세포에 IGF-1을 처리할 경우 Akt 단백질의 인산화가 현저히 증가하였으며, 임페라토린은 IGF-1에 의한 Akt 인산화를 현저하게 억제하였다. 동일한 시험법으로 피지세포에서 피지분비에 관여하는 전사조절인자(transcription factor)를 평가한 결과는 도 6과 같다. 도 6의 결과로부터, IGF-1은 피지생성에 중요한 역할을 담당하는 PPAR- γ 및 SREBP-1 전사조절인자를 증가시켰으며, 임페라토린은 IGF-1에 의한 전사조절인자 증가를 현저하게 억제함을 확인할 수 있다.

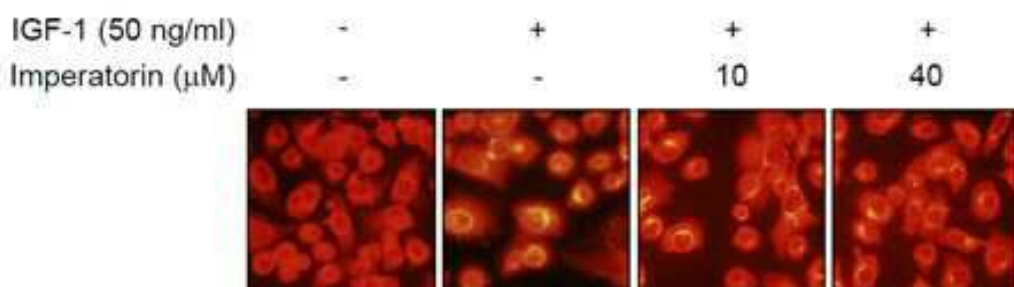
[0034] 상기 결과로부터, 임페라토린은 피지세포에서 IGF-1에 의해 유도되는 피지 합성을 현저히 억제하며, 이러한 피지 분비 억제 효과는 피지 생성 관련 세포내 신호전달계의 억제 및 피지생성 관련 전사조절인자의 억제를 통해 이루어짐을 확인할 수 있다.

도면

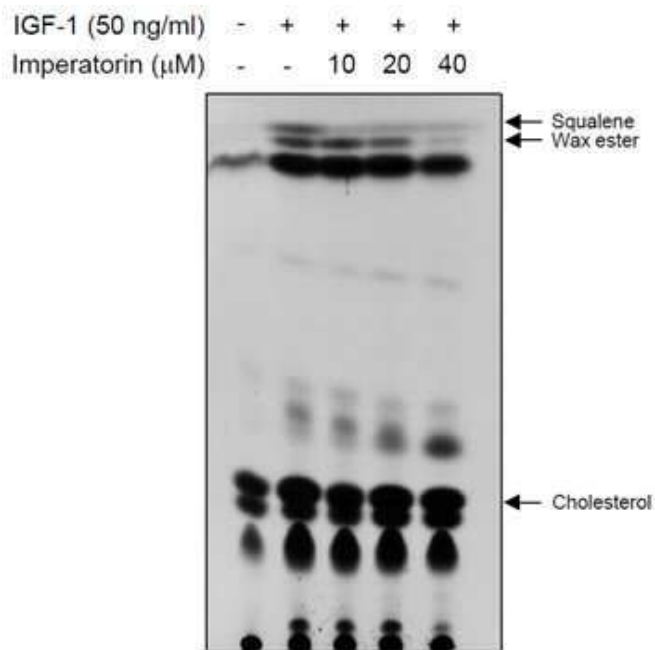
도면1



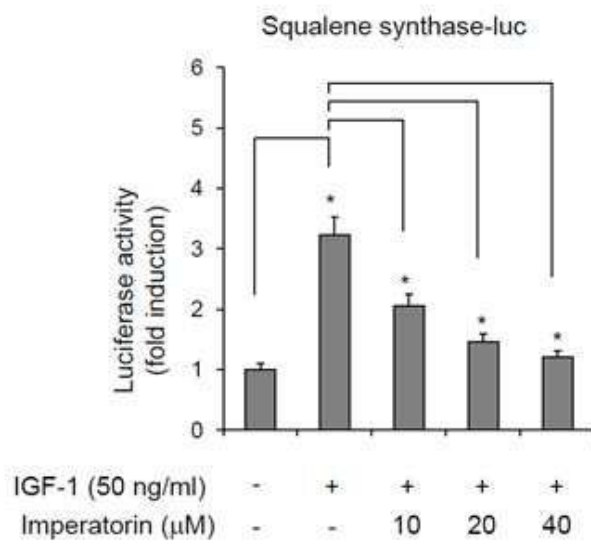
도면2



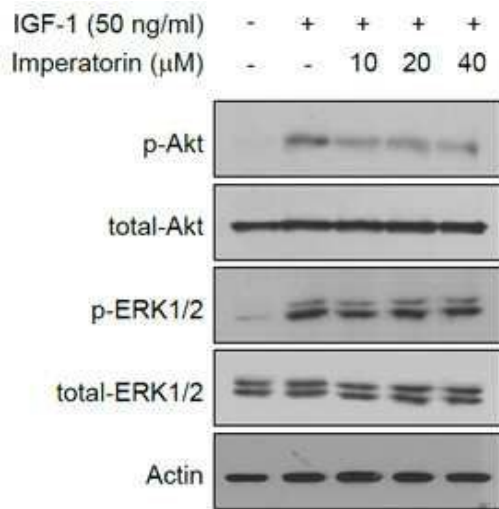
도면3



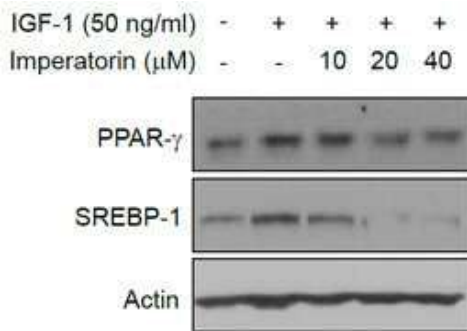
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> OBM LAB
The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
DAEJEON UNIVERSITY Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Composition for inhibiting or improving seborrhea or seborrheic dermatitis
- <130> PN0737
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Primer
- <400> 1

ggtaccgagc cctgtggcag ttagag

26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

aagcttcgac tttcacctct gcggtg

26