(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0135344
(43) 공개일자 2024년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/15 (2015.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 8/98 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
A61P 17/16 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/15 (2023.05)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0165797
(22) 출원일자 2023년11월24일
심사청구일자 2023년11월24일
(30) 우선권주장
1020230028715 2023년03월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
우소연
서울특별시 동대문구 한빛로 49, 104동 303호
조경아
서울특별시 송파구 송이로 257
권지윤
서울특별시 은평구 통일로 610, 104동 102호
(74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 15 항

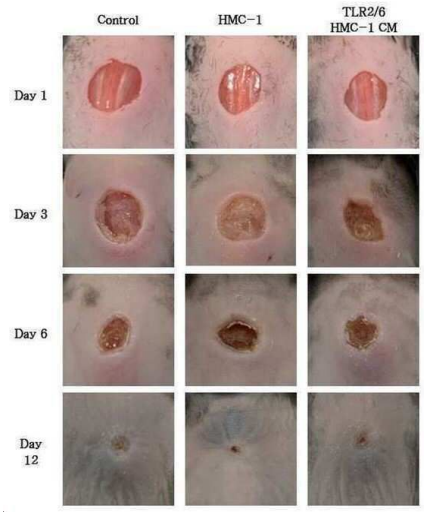
(54) 발명의 명칭 **비만세포의 조정 배지를 포함하는 창상 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 비만세포의 조정배지를 유효성분으로 포함하는 피부 창상 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 비만세포 조정배지 또는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포 조정배지는 사람 피부 각질세포의 세포이동을 촉진시키는 효과를 가지며, 창상 치유 과정 중 특히 염증 단계에서 우수한 치료 효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 8/981 (2013.01)
A61P 17/02 (2018.01)
A61P 17/16 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/204 (2013.01)
A61K 2800/74 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711180583
과제번호 2021R1A2C1012551
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 세포치료제의 림프구 이동과 분화 억제 기전
기 여 율 60/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345353882
과제번호 2022R1I1A1A01066175
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 줄기세포 엑소좀을 이용한 비만세포 매개 피부항상성 조절 기전 연구
기 여 율 40/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2022.06.01 ~ 2025.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 창상 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비만세포는 사람 유래 비만세포인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비만세포의 조정배지는 피부 각질세포의 세포 이동을 촉진하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비만세포의 조정배지는 트립타제(tryptase)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 비만세포는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포인 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 2와 6 작용제는 FSL-1, MALP-2, CBLB613, 디아실화된 지질단백질 및 디아실화된 리포펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포는 비만 세포를 1 내지 100 시간 동안 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 전처리한 것인 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 10 내지 200 ng/ml 농도로 전처리한 것인 약학 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 2와 6으로 자극된 비만세포의 조정배지는 트립타제를 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 피부 창상은 온도 손상, 외상, 버거병, 혈관 및 림프관 손상, 수술 후 창상, 장루, 욕창, 압박성 궤양, 당뇨병성 궤양·탈저(脫疽), 대상포진 후 궤양, 약물성 궤양, 피부 궤양, 피부염에 의한 손상, 방사선 손상, 및 화학적 손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 약학 조성물.

청구항 11

비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 외용제 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 비만세포는 사람 유래 비만세포인 피부 외용제 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 비만세포는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포인 피부 외용제 조성물.

청구항 14

비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 창상 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 비만세포는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포인 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비만세포의 조정 배지를 포함하는 피부 창상 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만세포(mast cell)는 염증 반응에 관여하는 세포로서, IgE 항체가 활성화되고 외부의 다른 항원이나 알레르겐(allergen)에 의해서 교차(crosslink)되면, 여러 가지 다양한 신호기작(signalling pathway)에 의해 비만세포의 과립 안에 포집되어 있던 히스타민, 베타-헥소사미니다아제(β-hexosaminidase), 류코트리엔과 같은 염증유발 물질 등을 세포 외막(plasma membrane)으로 방출한다. 이렇게 방출된 염증유발 물질들은 염증을 유발하는 수용체와 사이토카인 등을 활성화시킴으로써 그 염증을 더욱 심화시키는 작용을 한다.

[0003] 특히, 비만세포에서 이러한 물질들의 방출은 알레르기성 질환 등과 밀접한 연관이 있으며, 알레르기성 질환은 보편적으로 유전학적/면역학적으로 IgE 항체가 관련되고 후천적 요소 즉 환경적, 정신적 요인 인자들이 항원에 접촉, 노출에 의해 감작되어 발병되는 것으로 알려져 있다. 이 중 면역학적 요인은 현재 치료의 타겟이 되고 있으며, 면역학적 측면에서 이러한 알레르기성 물질들의 세포 외막으로의 방출을 제어함으로써 알레르기성 질환 치료제로 적용 가능하다고 할 것이다.

[0004] 그러나 현재까지 이들 비만세포의 방출 물질들이 사람 피부 각질 세포의 세포 이동을 촉진시킴으로써 피부 창상 치료에 우수한 효과가 있다는 것은 알려지지 않았다.

[0005] 이에 본 발명자들은 비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 창상 치료용 조성물이 창상 마우스 모델에서 우수한 상처 회복 능력을 가지며, 특히 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 처리한 비만세포의 조정배지는 창상 치유 능력이 더욱 향상되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 창상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명은 비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 외용제 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명은 비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 창상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 비만세포의 조정배지를 포함하는 피부 창상 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서, "비만세포의 조정배지"는 비만세포를 배양하여 수득된 배양액으로부터 비만세포가 제거된 배양액 또는 이의 상층액을 의미하며, "비만세포 배양 상층액", "비만세포 조건 배양액" 또는 "비만세포 배양 배지"와 호환적으로 사용될 수 있다.

[0011] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 비만세포 조정배지의 투여로 피부 창상의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 비만세포 조정배지의 투여로 피부 창상의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 "개선"이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 피부 창상의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 피부 창상은 구체적으로, 화상, 열화상, 열화상성 궤양, 동상 등의 온도 손상, 열상(裂傷),

찰과상, 절창, 자상, 좌창(挫創), 교창(咬創) 등의 외상, 버거병, 림프부종, 하퇴궤양 등의 혈관 및 림프관 손상, 채피창(採皮創), 봉합창 등의 수술 후 창상, 장루, 욕창, 압박성 궤양, 당뇨병성 궤양·탈저(脫疽), 대상포진 후 궤양, 약물성 궤양, 피부 궤양, 피부염에 의한 손상, 방사선 손상, 화학적 손상, 및 기타의 피부창상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 상기 비만세포는 사람 유래 비만세포일 수 있다.

[0014] 본 발명의 비만세포의 조정배지는 피부 세포, 바람직하게 피부 각질 세포의 세포 이동을 촉진시킬 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 비만세포의 조정배지는 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포의 조정배지를 포함하며, 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 피부 창상에 사용될 수 있다.

[0016] 비만세포 배양액은 비만세포를 배양하여 수득된 배양액으로부터 비만세포가 제거된 배양액 또는 이의 배양 상층액 또는 이의 농축물이거나 이의 동결건조물일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 비만세포 배양액은 비만세포를 혈청 배지에서 계대 배양한 후, 무혈청 배지에서 배양하여 수득될 수 있다.

[0018] 비만세포 배양액은 비만세포를 무혈청 배지에서 계대 배양하여 수득될 수 있다.

[0019] 비만세포는 세포 배양용 배지를 사용하여 통상적으로 배양될 수 있다. 비만세포 배양액은 비만세포를 혈청 배지에서 계대배양한 후, 무혈청 배지에서 계대 배양하여 수득되고, 이를 그대로 사용하거나 또는 원심분리나 필터를 이용한 여과에 의해 비만세포 및 거대분자를 제거한 후에 수득된 상층액을 사용할 수 있다. 또한, 수득된 상층액은 그대로 사용하거나 또는 농축하여 수득된 농축물로 사용할 수 있다.

[0020] 비만세포의 배양을 위한 배양용 배지 및 배양 조건은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 통상의 지식을 가진 자가 적절하게 선택하거나 변형하여 이용할 수 있다.

[0021] 상기 혈청 배지는 비만세포와 동일한 세포형을 유지하고 보관하는데 적합한 배지로서, 혈청이 보충된 IMDM 배지일 수 있다. 혈청은 우태아혈청(FBS)일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 혈청 배지의 총 중량에 대해 1 내지 20 중량%일 수 있다. 필요에 따라, 항생제, 항진균제 및 마이코플라스마 억제제 등을 포함할 수 있으며, 이들은 배지의 총 중량에 대해 1 내지 5 중량%일 수 있다. 항생제는 페니실린-스트렙토마이신 등 세포 배양에서 통상적으로 사용되는 항생제를 포함하고, 항진균제는 암포테리신-B(fungizone) 등을 포함하며, 마이코플라스마 억제제는 겐타마이신, 시프로플록사신, 타일로신 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 상기 무혈청 배지 중에서의 배양은 혈청 배지에서의 배양액을 제거하고, 세포를 인산염 완충용액으로 세척한 후에 수행될 수 있다.

[0023] 바람직하게, 상기 혈청 배지는 10% 우태아혈청 및 1%의 항생제가 보충된 IMDM 배지일 수 있다.

[0024] 바람직하게, 상기 무혈청 배지는 IMDM 배지일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 비만세포 배양액은 비만세포 배양액을 원심분리나 여과시켜 세포를 제거하는 단계에 의해 수득될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 비만세포는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포일 수 있다.

[0027] 상기 톨 유사 수용체 2와 6 작용제는 비만세포의 톨 유사 수용체 2와 6을 활성화시키고 탈과립을 촉진하는 작용제(agonist)로써, FSL-1, MALP-2, CBLB613, 디아실화된 지질단백질 및 디아실화된 리포펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0028] 상기 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포는 비만 세포를 1 내지 100 시간 동안, 바람직하게 24시간 내지 72시간 동안 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 전처리한 것일 수 있다. 또한, 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 10 내지 200 ng/ml 농도로 전처리한 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 상기 비만세포 조정배지는 트립타제(tryptase)를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 상기 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포의 조정배지는 트립타제(tryptase)를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 트립타제(tryptase)는 비만세포 또는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포에서 분비되며 사람 피부 각질세포의 세포이동 촉진의 주요 인자이다.

[0032] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액, 에멀젼, 로션, 연고, 동결건조제 등 다양한 제형으로 제제화될 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 피부 창상 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 비만세포의 조정 배지 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제로는 이에 한정되지 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다. 이외에도, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소투여용 제제의 경우에는 기제(base), 부형제, 윤활제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동 보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife®) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.

[0034] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및/또는 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 경구 투여, 카테터를 이용한 비외과적 투여, 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 다양한 투여 방법이 이용될 수 있다. 투여량은 농축 정도에 따라 그 투여량이 달라질 수 있으나 10 μl/kg 내지 1 ml/kg을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0035] 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 본 발명은 또한 비만세포의 조정 배지를 포함하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 피부 외용제 조성물은, 피부의 국소 표면에 유효성분을 직접 투여할 수 있는 제형이면 특히 한정되지 않는데, 예를 들면 연고제, 연고첩부제, 액제(현탁제, 유제, 로션제 등), 습포제(cataplasms), 테이프제, 외용 분말 및, 에어로졸제 등의 제제로서 이용할 수가 있다. 본 발명의 외용제 조성물에 사용되는 배합성분으로는, 통상의 외용제 조성물에 사용되는 배합성분이면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0038] 연고제·크림제·겔제·로션제의 경우, 백색 바셀린, 황색 바셀린, 라놀린, 표백밀랍, 세틸 알콜, 스테아릴 알코올, 스테아린산, 경화유(hydrogenated oil), 탄화수소 겔, 폴리에틸렌글리콜, 액상 파라핀, 스쿠알렌 등의 기제, 올레산, 이소프로필 미리스테이트, 글리세릴 트리이소옥타노에이트, 크로타미톤, 디에틸 세바케이트, 디이소프로필 아디페이트, 헥실 라우레이트, 지방산, 지방산 에스테르, 지방족 알콜, 식물성 유지 등의 용매 및 용해보조제, 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸화 히드록시 아니솔 등의 산화방지제, p-히드록시벤조에이트 등의 방부제, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 히알루로네이트소듐 등의 보습제, 폴리옥시에틸렌 유도체, 지방산의 글리세롤 에스테르, 지방산의 슈크로스 에스테르, 지방산의 소르비탄 에스테르, 지방산의 프로필렌 글리콜 에스테르, 레시틴 등의 계면활성제, 카르복시 비닐폴리머, 크산탄 검, 카르복시메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스 소듐, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 등의 증점제(增粘劑), 액화 석유가스, 액화 이산화탄소, 디메틸 에테르, 질소, 등유, 이산화탄소 등의 분사제, 안정제, 보존제, 흡수촉진제 등과 기타 적당한 첨가제가 배합될 수 있다.

[0039] 습포제의 경우, 폴리아크릴산, 폴리아크릴산 코폴리머 등의 점착부여제, 황산알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 염화알루미늄, 마그네슘 알루미노메타실리케이트, 디히드록시 알루미늄 아세테이트 등의 가교제, 폴리아크릴산 나트륨, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 알긴산 나트륨, 카르복시메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스 소듐, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 등의 증점제, 글리세린, 폴리에틸렌 글리콜(마크로골), 프로필렌 글리콜, 1, 3-부탄디올 등의 다가 알콜류, 폴리옥시에틸렌 유도체 등의 계면활성제,

1-멘톨 등의 향료, p-히드록시벤조에이트 등의 방부제, 정제수, 및 기타 적당한 첨가제가 배합될 수 있다.

[0040] 테이프제의 경우, 스티렌-이소프렌-스티렌 블록 코폴리머 및 아크릴수지 등의 점착제, 지환족(脂環族) 포화-탄화수소계 수지, 로진계 수지, 테르펜계 수지 등의 점착부여제, 액상고무, 액상 파라핀 등의 연화제, 디부틸히드록시톨루엔 등의 산화방지제, 프로필렌 글리콜 등의 다가알콜, 올레산 등의 흡수촉진제, 폴리옥시에틸렌 유도체 등의 계면활성제, 및 기타 적당한 첨가제가 배합될 수 있다. 또한, 폴리아크릴산 나트륨 또는 폴리비닐알콜과 같은 물을 함유할 수 있는 폴리머와 소량의 정제수를 가해 수성 테이프제로 제조될 수도 있다.

[0041] 외용 분말의 경우, 감자 전분, 쌀 전분, 옥수수 전분, 탈크, 산화아연 등의 부형제(賦型劑) 및 기타 적당한 첨가제가 배합될 수 있다.

[0042] 에어로졸제의 경우, 연고제 · 크림제 · 겔제 · 현탁제 · 유제 · 액제 · 로션제 · 외용 분말 등에 쓰이는, 백색 바셀린, 황색 바셀린, 라놀린, 표백밀랍, 세틸 알콜, 스테아릴 알코올, 스테아린산, 경화유, 탄화수소 겔, 폴리에틸렌글리콜, 액상 파라핀, 스쿠알렌 등의 기제, 올레산, 이소프로필 미리스테이트, 디이소프로필 아디페이트, 디이소프로필 세바케이트, 글리세릴 트리이소옥타노에이트, 크로타미톤, 디에틸 세바케이트, 헥실라우레이트, 지방산, 지방산 에스테르, 지방족 알콜, 식물성 유지 등의 용매 및 용해보조제, 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸화 히드록시아니솔 등의 산화방지제, p-히드록시 벤조에이트 등의 방부제, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 히알루로네이트 소듐 등의 보습제, 폴리옥시에틸렌 유도체, 지방산의 글리세롤 에스테르, 지방산의 슈크로스 에스테르, 지방산의 소르비탄 에스테르, 지방산의 프로필렌 글리콜, 레시틴 등의 계면활성제, 카르복시 비닐 폴리머, 크산탄 검, 카르복시메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 소듐, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 등의 증점제(增粘劑), 감자 전분, 쌀 전분, 옥수수 전분, 탈크, 산화아연 등의 부형제, 액화 석유가스, 액화 이산화탄소, 디메틸 에테르, 질소, 등유, 이산화탄소 등의 분사제, 완충제, 교미제(correctives), 현탁화제, 유화제, 방향제, 보존제, 용해보조제, 또는 기타 적당한 첨가제가 배합될 수 있다.

[0043] 한편, 본 발명의 피부 외용제 조성물은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유하여 피부 국소 도포용으로 제형화될 수 있다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로서, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 폼(foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 피부 외용제 조성물은 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 상기 보조제는 화장품학 또는 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.

[0045] 본 발명은 또한 비만세포의 조정 배지를 포함하는 피부 창상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0048] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0049] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0050] 본 발명의 식품 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 비만세포의 조정배지를 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 5

내지 90 중량%로 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 피부 창상의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0052] 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 본 발명에 따른 비만세포의 조정배지, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 본 발명에 따른 식품 조성물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0053] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).

[0054] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0055] 본 발명은 비만세포의 조정배지를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 창상의 치료방법을 제공한다.

[0056] 본 발명에 "비만세포의 조정배지", "피부 창상", "투여" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0057] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 비만세포의 조정배지를 이용한 치료로 유익한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 피부 창상의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.

[0058] 본 발명은 또한 피부 창상의 치료를 위한 약제의 제조에서 비만세포의 조정배지의 용도를 제공한다.

[0059] 본 발명은 또한 피부 창상의 치료에 사용하기 위한 비만세포의 조정배지를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명은 또한 피부 창상의 치료를 위한 비만세포의 조정배지의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 피부 창상 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 비만세포 조정배지를 포함하며, 사람 피부 각질세포의 세포이동을 촉진하고 창상 치유 과정 중 특히 염증의 개선 효과가 우수하여 창상 치료제로 활용 가치가 높다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 Scratch assay 이미지를 통해 사람 유래 비만세포의 조정배지가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 2는 Scratch assay 정량화를 통해 사람 유래 비만세포의 조정배지가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향 확인한 결과이다. (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

도 3은 Transwell migration assay 이미지를 통해 사람 유래 비만세포의 조정배지가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 4는 Transwell migration assay 정량화를 통해 사람 유래 비만세포의 조정배지가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다. (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

도 5는 Scratch assay 이미지를 통해 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 처리한 사람 유래 비만세포의 조정배지가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 6은 Scratch assay 정량화를 통해 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 처리한 사람 유래 비만세포의 조정배지가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다. (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

도 7은 세 그룹의 마우스 창상 모델(Control, HMC-1 CM, TLR2/6 HMC-1 CM)의 치유 과정 이미지를 통해 창상 치유 효과를 비교한 결과이다.

도 8은 세 그룹의 마우스 창상 모델(Control, HMC-1 CM, TLR2/6 HMC-1 CM)의 치유 정도 정량화를 통해 창상 치유 효과를 비교한 결과이다. (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

도 9는 세 그룹의 마우스 창상 모델(Control, HMC-1 CM, TLR2/6 HMC-1 CM)의 피부조직에서 H&E 염색을 수행한

결과이다.

도 10은 비만세포 유래 조정배지(HMC-1 CM)과 TLR2/6 작용제로 자극된 비만세포의 조정배지 (T2/6 HMC-1 CM), 피부 각질 세포주 유래 조정배지(HaCaT CM), 단핵구 세포주 유래 조성배지(THP-1 CM), 완전한 음성 대조군으로서 IMDM 배지(IMDM)에서의 트립타제(tryptase) 함유량을 ELISA assay 통해 확인한 결과이다. (****p<0.0001)

도 11은 Scratch assay 이미지를 통해 트립타제(tryptase)가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 12는 Scratch assay 정량화를 통해 트립타제(tryptase)가 사람 피부 각질세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과이다. (****p<0.0001)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0064] **<실시예 1> 사람 유래 비만세포 조정배지의 제조**

[0065] 사람 유래 비만세포로부터 조정배지를 얻기 위하여 10%의 혈청, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 IMDM으로 사람 유래 비만세포를 배양하였다. 100mm cell culture plate에 confluency 80%가 되었을 때 세포를 걷어낸 후 다시 $1x10^7$개의 세포에 무혈청 IMDM 배지를 첨가하였다. 48시간 후, 배지를 걷어 5300 xg에서 1시간 30분동안 원심분리한 후 상층액을 여과하였다. 여과된 배지는 centrifugal filter (cut-off of 3K, Millipore)로 1/5로 농축하여 실험에 이용하거나 -80℃에서 보관하였다. 이를 통해 비만세포 조정배지를 제조하였다.

[0066] TLR2/6 작용제를 처리하는 경우에는 $1x10^7$개의 세포에 TLR2/6 작용제를 50 ng/ml 농도로 처리 후 혈청 IMDM 배지에서 24시간 배양하였다. 그후 원심분리로 상층액을 걷어내고 $1x10^7$개의 세포를 무혈청 IMDM 배지에서 48시간 배양 후 배지를 걷어 5300 xg에서 1시간 30분동안 원심분리한 후 상층액을 여과하였다. 여과된 배지는 centrifugal filter (cut-off of 3K, Millipore)로 1/5로 농축하여 실험에 이용하거나 -80℃에서 보관하였다. 이를 통해 TLR2/6 작용제로 전처리된 비만세포의 조정 배지를 제조하였다.

[0067] **<실시예 2> 비만세포 조정배지에 의한 상처 이동 분석 (Scratch assay)**

[0068] 사람 유래 비만세포 조정배지의 세포 이동 촉진효과를 확인하기 위해 Scratch assay를 실시하였다.

[0069] 먼저, 사람 피부 각질세포를 12 웰 규격의 세포 배양 접시의 confluency 90% 까지 37℃, 5% CO_2 조건의 세포 배양기에서 배양하였다. 멸균된 200 ul 마이크로 파이펫 팁을 이용하여 배양 접시 바닥을 긁어 세포가 부착되지 않은 스크래치 상처를 만들었다. 떨어진 세포와 배지를 제거한 후 실시예 1에서 얻은 사람 유래 비만세포 조정배지를 100 ul 첨가하였다. 대조군의 경우 비만세포 조정배지 대신 무혈청의 IMDM 배지를 100 ul 첨가하였다. 배지 첨가 이후 0시간, 24시간, 48시간이 지났을 때 상처의 이미지를 얻었으며, 이를 도 1에 나타내었다. 또한 각 이미지에서 상처의 열린 간격을 측정하였으며, 이를 도 2에 나타내었다.

[0070] 도 1 및 2에서 사람 유래 비만세포 조정배지를 첨가한 경우 상처의 간격이 더 빨리 가까워지는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 사람 유래 비만세포 조정배지에 사람 각질 세포의 세포이동을 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0071] **<실시예 3> 비만세포 조정배지에 의한 생체 외 세포 이동 분석 (Transwell migration assay)**

[0072] 사람 유래 비만세포 조정배지의 세포 이동 촉진효과를 확인하기 위해 직경이 0.4 um인 다공성 막을 갖는 트렌스웰 플레이트를 이용해 Transwell migration assay를 실시하였다.

[0073] 트렌스웰의 상층 챔버에는 사람 피부 각질세포 $2x10^5$개를, 하층 챔버에는 사람 유래 비만세포 조정배지 50 ul와 2% 우태아혈청을 포함하는 IMDM 배지 550ul를 첨가한 후, 37℃, 5% CO_2 조건의 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 후 24시간 또는 48시간이 지났을 때 세포를 고정시키고 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 현미경 이미지를 얻었으며, 이를 도3에 나타내었다. 또한 각 이미지에서 염색된 세포의 면적을 측정하였으며, 이를 도 4에 나타내었다.

[0074] 도 3 및 4에서 사람 유래 비만세포 조정배지를 첨가한 경우 염색된 면적이 더 넓은 것을 확인할 수 있었으며,

이를 통해 사람 유래 비만세포 조정배지에 사람 각질 세포의 세포이동을 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0075] **<실시예 4> 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 처리된 비만세포 조정 배지에 의한 상처 이동 분석 (Scratch assay)**

[0076] 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 처리된 사람 유래 비만세포 조정배지의 세포 이동 촉진효과를 확인하기 위해 Scratch assay를 실시하였다.

[0077] 실험 방법은 실시예 2와 동일하나, 스크래치 상처에 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 처리된 사람 유래 비만세포 조정배지를 100 ul 첨가하였다. 대조군의 경우 무혈청의 IMDM 배지를 100 ul 첨가하였다. 배지 첨가 이후 0시간, 48시간이 지났을 때 상처의 이미지를 얻었으며, 이를 도 5에 나타내었다. 또한 각 이미지에서 상처의 열린 간격을 측정하였으며, 이를 도 6에 나타내었다.

[0078] 도 5 및 6에서 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 처리한 사람 유래 비만세포 조정배지를 첨가한 경우 48시간 안에 상처 간격이 100% 닫히는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 톨 유사 수용체 2와 6 작용제를 처리한 사람 유래 비만세포 조정배지가 사람 각질 세포의 세포 이동 능력을 가장 크게 향상시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] **<실시예 5> 창상 마우스 모델에서의 창상 치유 효과 비교**

[0080] 창상 마우스 모델에서 상처 치유 효과를 비교하기 위해 C57BL/6J (암컷, 9주령) 마우스를 아래 표 1과 같이 세 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

표 1

[0081]

Control 군	마우스 창상에 무혈청 IMDM 배지를 처리한 그룹
HMC-1 CM 군	마우스 창상에 비만세포 조정 배지를 처리한 그룹
TLR 2/6 HMC-1 CM 군	마우스 창상에 TLR 2/6 agonist를 처리한 비만세포 조정 배지를 처리한 그룹

[0082] 모든 마우스에 직경 8mm의 창상을 유발한 후, 무혈청 IMDM 배지 60ul를 처리한 그룹을 Control 그룹(n=5)으로, 비만세포 조정 배지 60ul($1.3x10^6$/마우스)를 처리한 그룹을 HMC-1 CM 그룹(n=5)으로, 또는 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포 조정배지 60ul($1.3x10^6$/마우스)를 처리한 그룹을 TLR 2/6 HMC-1 CM 그룹(n=5)으로 분류하였다. 실험 시작일로부터 3일 후에 각 군에 해당하는 물질을 추가 주입하였으며, 총 12일 동안 마우스의 몸무게와 창상 회복 과정 등을 관찰하였다. 실험 기간동안 그룹별 마우스의 창상 이미지를 도 7에 나타내었다. 또한 각 이미지에서 상처의 열린 간격을 측정하였으며, 이를 도 8에 나타내었다.도 7 및 8에서 HMC-1 CM군 및 TLR 2/6 HMC-1 CM군의 경우 12일차의 상처 회복 면적이 100%에 가까운 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 HMC-1 CM 및 TLR 2/6 HMC-1 CM이 우수한 창상 치료 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] **<실시예 6> H&E Staining을 통한 창상 치유 효과 비교**

[0084] 창상 마우스 모델에서 상처 치유 효과를 비교하기 위해 동물실험 종료 후 H&E staining을 수행하였다.

[0085] 창상 마우스 모델의 피부 조직 채취하여 포르말린에 고정하였다. 이후 파라핀 포매 슬라이드를 제작하고 H&E 염색을 실시하였으며 그룹별 마우스의 염색된 피부 조직 이미지를 도 9에 나타내었다.

[0086] 도 9에서 HMC-1 CM군 및 TLR 2/6 HMC-1 CM군의 경우 상피화(epithelialization)와 육아조직형성(granulation tissue formation)이 관찰되었으며, 이를 통해 HMC-1 CM 및 TLR 2/6 HMC-1 CM이 우수한 창상 치료 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 실시예 1 내지 6의 결과로부터, 비만세포 조정 배지는 각질 세포의 세포 이동을 촉진하고 염증을 개선함으로써 피부 창상 치료에 우수한 효과를 갖는 것을 확인하였다. 또한, 상피화(epithelialization)와 육아조직형성(granulation tissue formation) 측면에서도 치료제 처리에 의해 개선된 효능을 나타내었다.

[0088] 더욱이, 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 비만세포를 자극할 경우, 조정배지의 피부 창상 치료 효과가 향상되는 것을 확인하였다.

[0089] **<실시예 7> 조정배지 종류에 따른 트립타제(tryptase) 함유량 확인 (ELISA assay)**

[0090] 세포의 종류에 따른 tryptase 함유량 차이를 확인하기 위해, 비만세포 유래 조정배지(HMC-1 CM)과 TLR2/6 작용

제로 자극된 비만세포의 조정배지 (T2/6 HMC-1 CM), 피부 각질 세포주 유래 조정배지(HaCaT CM), 단핵구 세포주 유래 조성배지(THP-1 CM), 완전한 음성 대조군으로서 IMDM 배지(IMDM)를 이용하여 ELISA assay를 실시하였다.

[0091] 구체적으로, 각 세포의 조정배지를 1/50로 희석한후 Human Tryptase Elisa kit (Innovative Research, Inc.)를 이용하여 시료 내에 존재하는 tryptase 농도를 측정하였으며, 이를 도 10에 나타내었다.

[0092] 도 10에서 HMC-1 CM, T2/6 HMC-1 CM, HaCaT CM, THP-1 CM, IMDM에서의 tryptase 함유량 차이를 확인할 수 있었으며, HMC-1 CM, T2/6 HMC-1 CM에서 tryptase 함유량이 다른 배지에서의 함유량 보다 높았으며, 이를 통해 HMC-1 세포는 자극이 없는 평상시에도 tryptase를 높게 분비하는 것으로 나타났다.

[0093] **<실시예 8> 비만세포 조정배지와 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포 조정배지의 tryptase에 의한 세포 이동 촉진 효과 분석 (Scratch assay)**

[0094] 비만세포 조정배지와 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포 조정배지에 의한 HaCaT 세포 이동 촉진에 있어서 tryptase의 영향을 확인하기 위해 Scratch assay를 실시하였다.

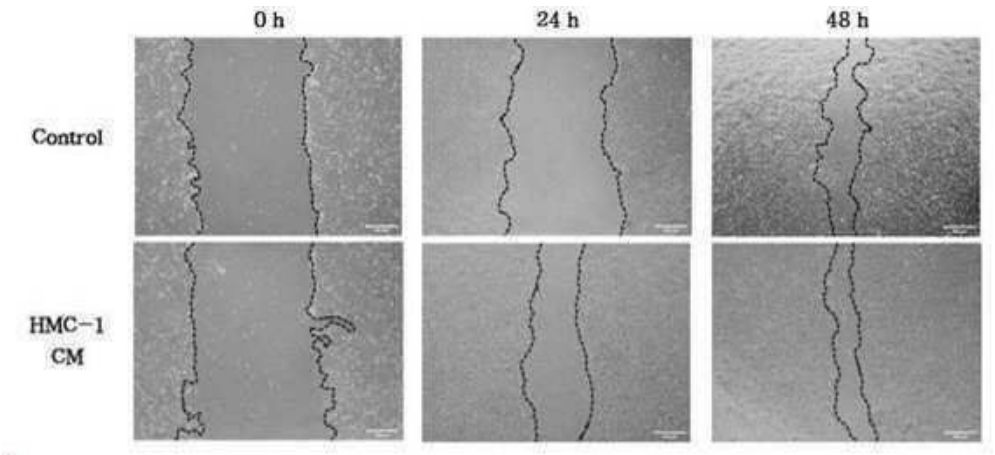
[0095] 구체적으로, 실시예 2와 동일한 방법으로 Scratch assay를 수행하되, 실험군은 대조군(control), 비만세포 조정배지(HMC-1 CM) 그룹 및 톨 유사 수용체 2와 6 작용제로 자극된 비만세포의 조정배지(T2/6 HMC-1 CM) 그룹과 각 그룹에 tryptase inhibitor(APC 366, trifluoroacetate salt, Sigma-Aldrich, SML2490)를 20 ug/ml 처리한 그룹(control+Inhibitor; HMC-1 CM+Inhibitor; 및 T2/6 HMC-1 CM+Inhibitor)으로 구성하였다. 각 그룹의 배지 첨가 이후 0시간, 24시간, 48시간이 지났을 때 상처의 이미지를 얻었으며, 이를 도 11에 나타내었다(40 배율). 또한 각 이미지에서 간격 길이를 여러 번 측정한 후 창상 봉합율을 정량화하였으며, 이를 도 12에 나타내었다.

[0096] 도 11 및 12에서 HMC-1 그룹 및 T2/6 HMC-1 CM 그룹은 시간이 지남에 따라 상처의 간격이 빠르게 가까워지는 것으로 나타났으며, tryptase inhibitor를 처리한 군(HMC-1 CM+Inhibitor; 및 T2/6 HMC-1 CM+Inhibitor)에서는 상처의 간격이 가까워지는 속도가 상대적으로 느려지는 것으로 나타났다. 즉, tryptase inhibitor 처리하는 경우 조정 배지에 의한 HaCaT 세포의 이동 촉진 효과가 제한되는 것으로 나타났다.

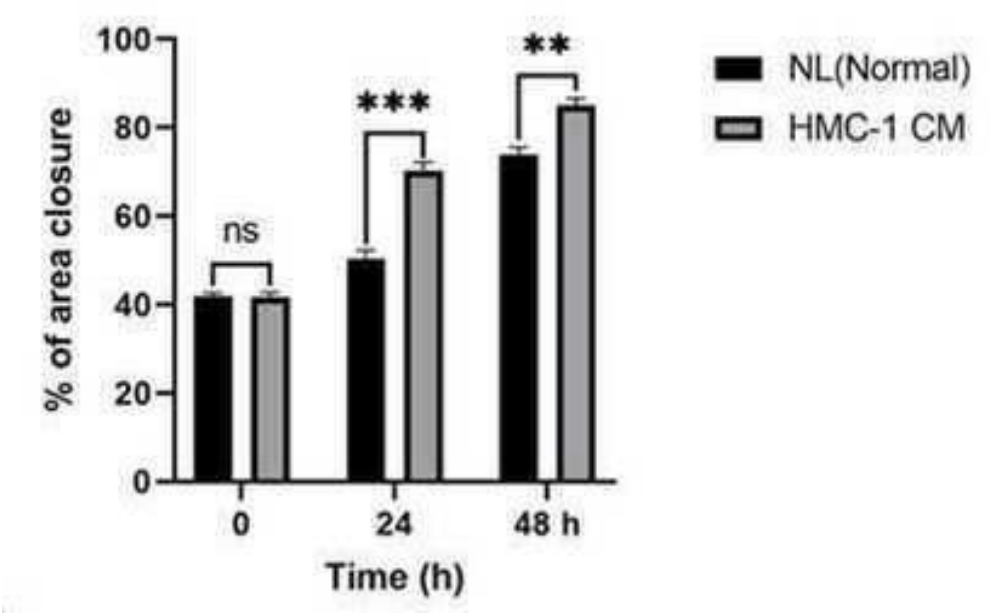
[0097] 이러한 결과를 통해, 본 발명의 비만세포 조정배지는 tryptase 작용 의존적으로 피부 상피세포의 이동을 촉진하는 것으로 나타났으며, 세포 이동을 촉진시키는데 있어서 tryptase가 주요 인자로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

도면

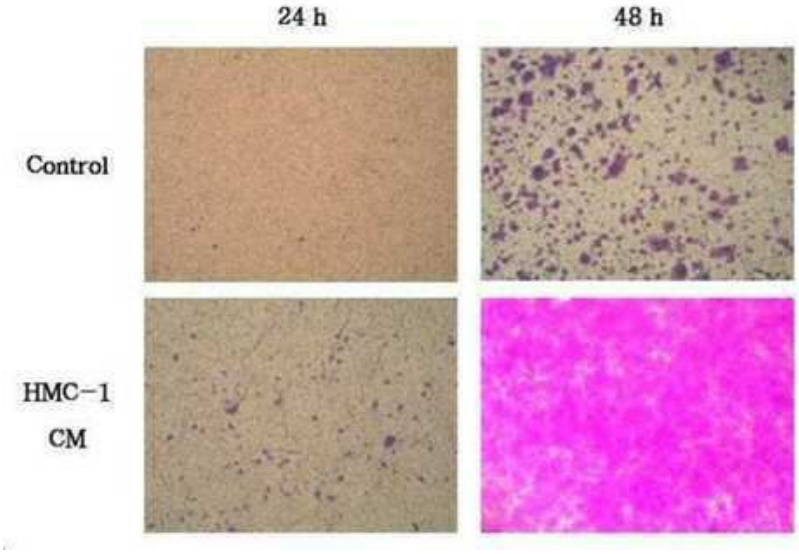
도면1



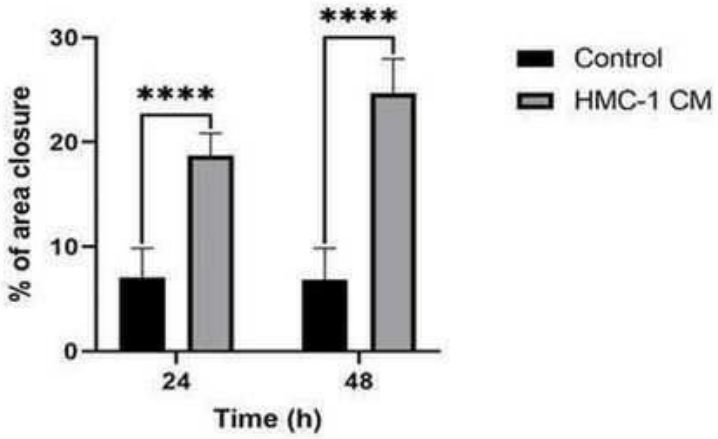
도면2


100
80
60
40
20
0
% of area closure
ns
***
**
0
24
48 h
Time (h)
NL(Normal)
HMC-1 CM

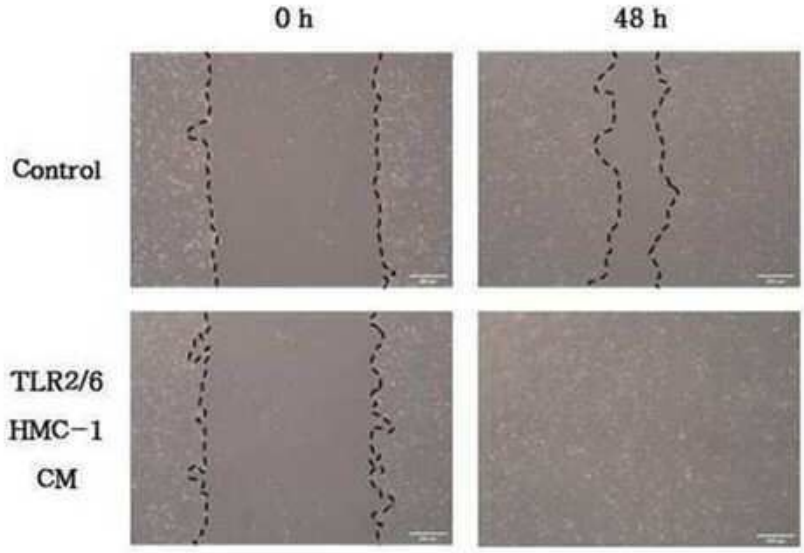
도면3


24 h
48 h
Control
HMC-1
CM

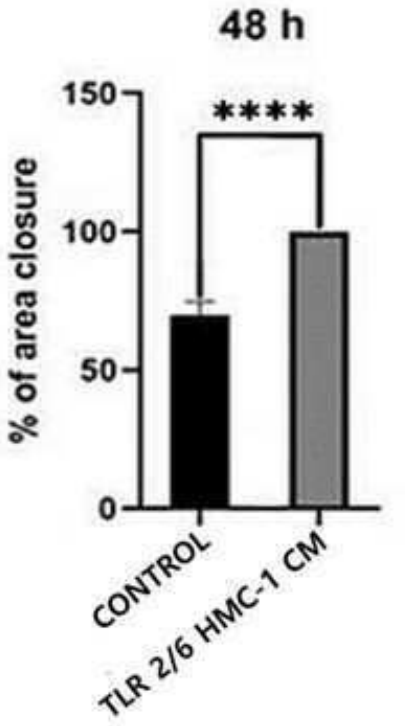
도면4


****
****
30
20
10
0
% of area closure
24
48
Time (h)
Control
HMC-1 CM

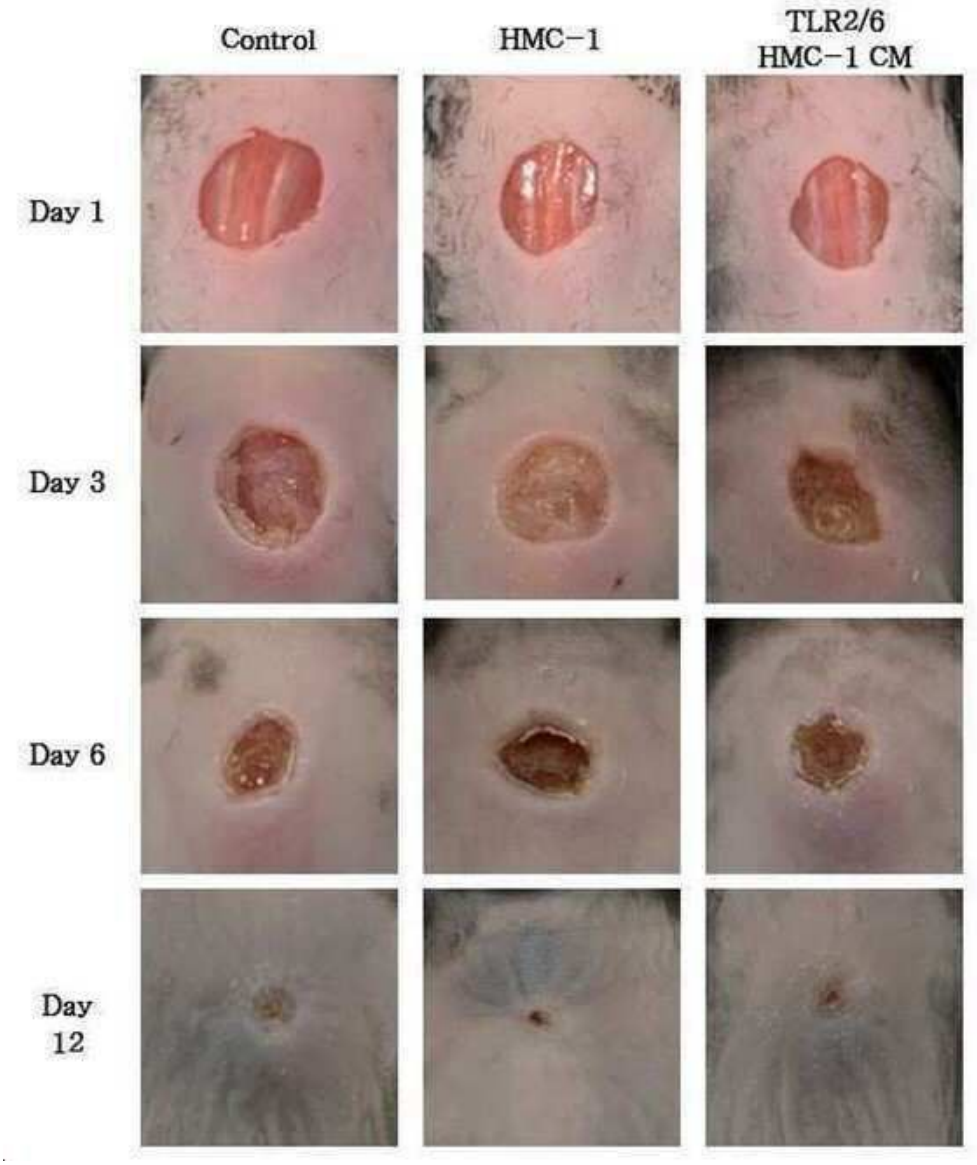
도면5


0 h
48 h
Control
TLR2/6
HMC-1
CM

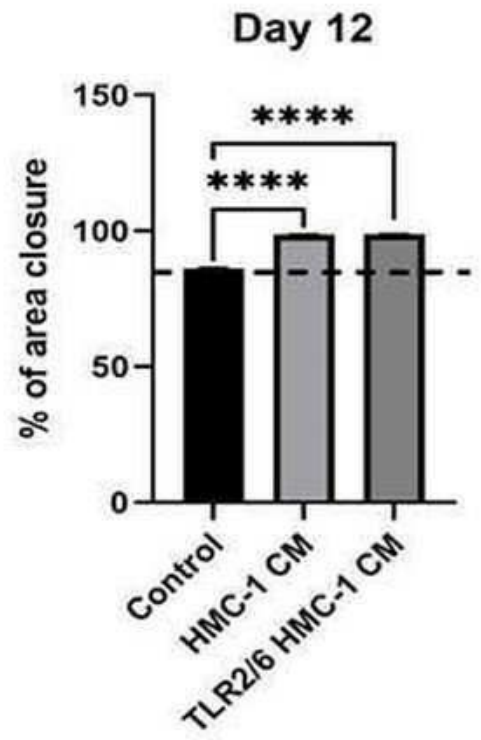
도면6



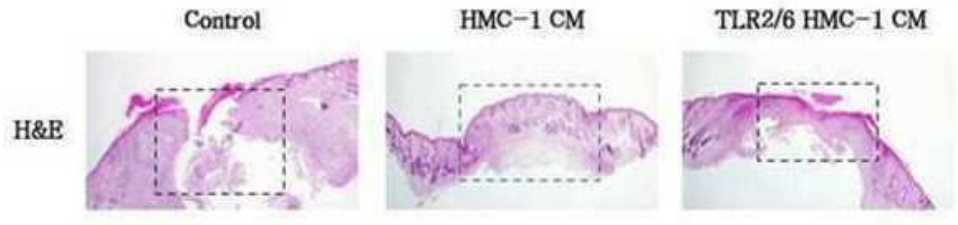
도면7



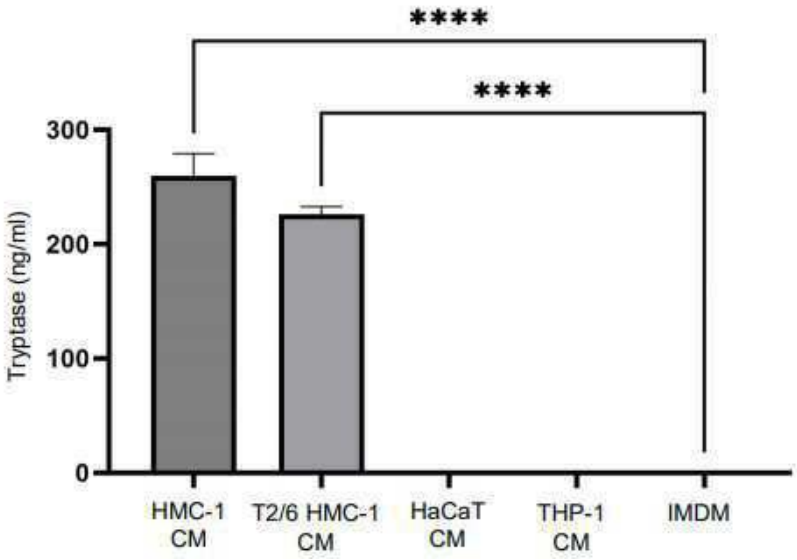
도면8


Day 12
150
100
50
0
% of area closure
****
****
Control
HMC-1 CM
TLR2/6 HMC-1 CM

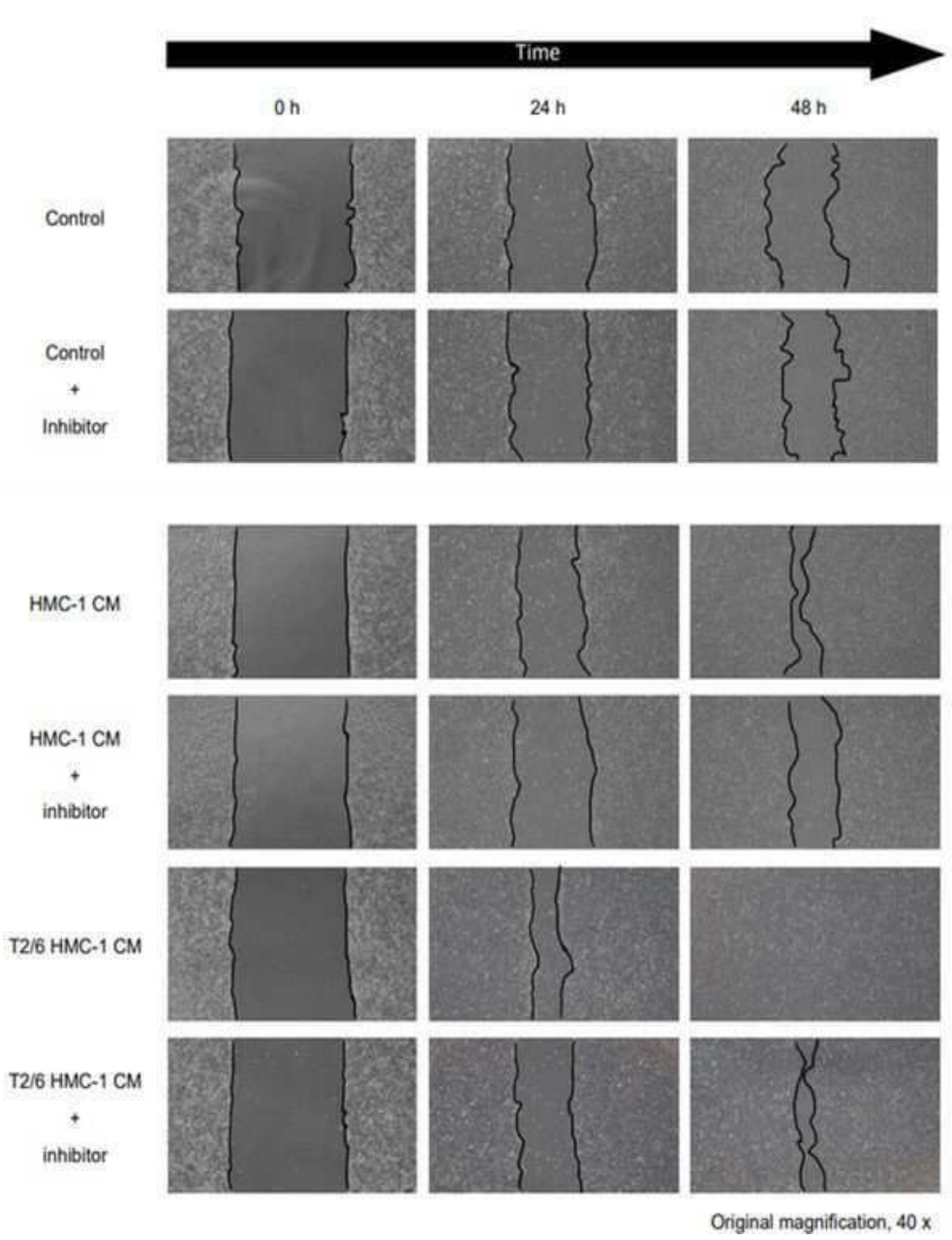
도면9


Control
HMC-1 CM
TLR2/6 HMC-1 CM
H&E

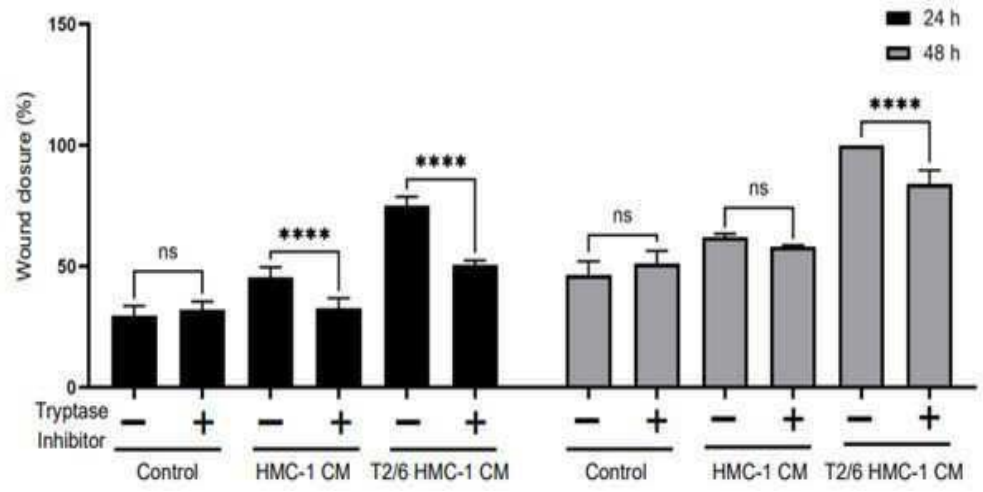
도면10


****
****
300
200
100
0
Tryptase (ng/ml)
HMC-1 CM
T2/6 HMC-1 CM
HaCaT CM
THP-1 CM
IMDM

도면11


Time
0 h
24 h
48 h
Control
Control
+
Inhibitor
HMC-1 CM
HMC-1 CM
+
inhibitor
T2/6 HMC-1 CM
T2/6 HMC-1 CM
+
inhibitor
Original magnification, 40 x

도면12


24 h
48 h
Wound closure (%)
150
100
50
0
ns
****
****
ns
ns
****
Tryptase Inhibitor
−
+
Control
HMC-1 CM
T2/6 HMC-1 CM
Control
HMC-1 CM
T2/6 HMC-1 CM