

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 9일 (09.01.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/009503 A1

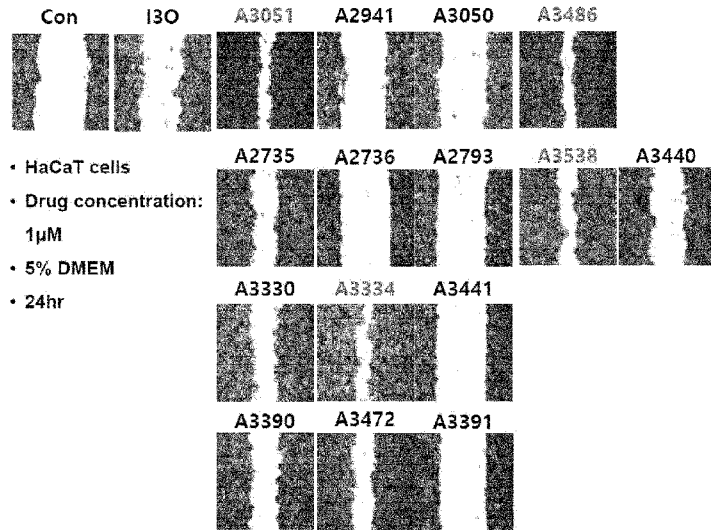
- (51) 국제특허분류:

<i>A61K 31/404</i> (2006.01) <i>A61K 36/75</i> (2006.01) <i>A61K 31/7048</i> (2006.01) <i>A61K 8/49</i> (2006.01) <i>A61K 8/9789</i> (2017.01)	<i>A61K 8/60</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01) <i>A61P 17/02</i> (2006.01) <i>A61Q 19/00</i> (2006.01)
--	---
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/008235
- (22) 국제출원일: 2019년 7월 4일 (04.07.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:

10-2018-0078585	2018년 7월 6일 (06.07.2018)	KR
10-2019-0080244	2019년 7월 3일 (03.07.2019)	KR
- (71) 출원인: 주식회사 씨케이바이오텍 (CK BIOTECH) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, 416호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최강열 (CHOI, Kang-Yell); 03168 서울시 종로구 사직로8길 4, 105동 309호, Seoul (KR). 김은환 (KIM, Eunhwan); 15623 경기도 안산시 상록구 감골2로 11, 510동 203호, Gyeonggi-do (KR). 서철화 (SEO, Seol Hwa); 03773 서울시 서대문구 북아현로1길 17, 202동 1203호, Seoul (KR). 윤민근 (YOON, Minguen); 03787 서울시 서대문구 연세로 7길 44, 204호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING INDIRUBIN DERIVATIVE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating wounds, wherein the composition according to the present invention comprises, as an active ingredient, an indirubin derivative alone, or one or more selected from the group consisting of an indirubin derivative, an extract of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus*, methyl vanillate, hesperidin, and quercitrin, and thus can be used as a pharmaceutical composition capable of promoting wound healing and reducing scarring, not only in a normal state, but also in a diabetic state. Furthermore, the composition exhibits excellent effects in healing diabetic wounds as well as general wounds, and thus can be used in a beneficial way as a pharmaceutical composition, a cosmetic composition, and a food composition for alleviating, preventing, or treating general wounds or diabetic wounds, or as a veterinary composition for treating diabetic wounds.



WO 2020/009503 A1

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 상처 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 인디루빈 유도체 단독 또는 인디루빈 유도체 또는 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 복합물을 유효성분으로 함으로써, 정상상태뿐만 아니라 당뇨상태에서의 상처 회복을 촉진하고, 흉터를 개선할 수 있는 약학 조성물로 유용하게 이용할 수 있고, 일반적인 상처 치유를 비롯하여 당뇨병성 상처 치유에서도 우수한 효능을 발휘하므로, 상처 또는 당뇨병성 창상에 대한 개선, 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물, 화장료 조성물, 식품 조성물 또는 당뇨병성 창상 치료용 동물용 약학 조성물 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 상처 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 포함하는 상처 예방 또는 개선용 화장료 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피부는 신체를 보호하는 방어막 역할을 수행하는 것으로, 미생물의 침입을 방어하는 등, 신체의 1차 방어선이라 할 수 있다. 상처 치유 및 회복은 상처, 화상, 찰과상 및 피부에 대한 기타 외상성 손상이나 외과적 절차 후에 조직 온전성 및 기능 복원의 기초가 된다. 만일 상처 치유가 지연되거나 외과적 상처 개열이 발생할 경우에는 유의적인 임상 문제가 발생하게 된다.
- [3] 현재 국내에서 주로 사용되는 상처 치료제는 동국제약사의 '복합 마데카솔'(1985년 출시)과 동화약품사의 '후시딘'(1980년 출시)이 있다. 두 제제의 효능은 대체로 비슷하지만, 후시딘은 항균력에, 마데카솔은 흉터 완화에 조금 더 강점을 가지고 있다.
- [4] 기존의 스테로이드 연고는 소염작용, 면역억제기능, 알레르기성 질환 등에 효과적이지만, 부작용으로 곰보자국, 피부주름, 모낭염 등을 유발하며, 무좀 등의 세균성 질환에는 효과가 없다. 또한, 항생제를 포함하는 연고는 내성을 가질 수 있으며 아이들과 같은 연약한 피부 상처에 사용할 경우 여러 가지 부작용을 유발할 수 있다. 따라서, 스테로이드 연고나 항생연고가 가지는 한계점을 극복하기 위해 상처치유 기전을 기반으로 한 상처치료제가 국내시장에서 선보이고 있다. 또한, 일상에서의 피부 상처보다 더 심각한 사고 상해, 펠라노마와 같은 피부질환 수술 후 생기는 큰 상처, 당뇨병과 같은 타 질환과 연계된 상처 등은 치유에 시간이 걸릴 뿐 아니라 종종 흉터를 유발하는 등 큰 문제가 되고 있다. 대웅제약사에서 일반의약품으로는 국내 최초로 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF)를 함유하고 있는 상처치료제 '이지에프 새살연고'를 출시했다. 상피세포 성장인자가 상처부위의 살갓을 덮고(재상피화) 새살을 만들어내는 것(육아조직 증식)을 촉진해 흉터 예방에 도움이 된다. 하지만, 상피세포 성장인자는 단백질인 만큼 생산에 드는 비용과 노력이 매우 큰 것이 단점이다.
- [5] 이러한 한계점을 극복하기 위하여 상처치료용 물질로 줄기세포를 제안한 바 있으나, 줄기세포 자체를 이용할 경우, DNA transfer에 의한 발암 가능성이 있고, 줄기세포 자체의 큰 사이즈로 인해 혈관 폐색이나 심근경색을 유발할 수 있으며,

제대혈과 같은 동종세포를 사용하여 이식할 경우 세포 표면 항원으로 인한 거부반응이 발생하는 문제가 있다. 또한 줄기세포와 같은 세포 치료제는 제조공정이 까다롭고 보관운송에 제약이 많다는 단점이 있다. 이와 같이 세포치료제가 갖고 있는 원천적인 문제를 해결하면서, 최소한의 부작용으로, 최대의 치료효과를 가질 수 있는 방안이 요구되고 있는 실정이다.

- [6] 이에, 본 발명자들은 인체에 부작용이 없으면서도, 그 작용이 일반적으로 온화하고 지속적이며 이용성이 우수한 상처치료제를 개발하기 위해 노력한 결과, 상처 부위에 미생물의 감염을 막고, 상처 회복과 더불어 흉터(재상피화 및 육아조직 증식)을 예방하는 상처 및 창상 치유를 위한 신규 조성물을 제공하는 것이 매우 요망된다.

발명의 상세한 설명

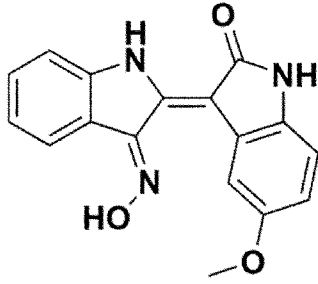
기술적 과제

- [7] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하여 인체에 대한 부작용이 없으며, 우수한 상처 치유 효과를 갖는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 하는 것이다.
- [8] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 창상 치료 또는 개선을 위한 인간을 제외한 동물용 약학 조성물을 제공하고자 하는 것이다.
- [9] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 식품조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 인간, 또는 인간을 제외한 동물에게 상기 조성물을 경피 투여하는 상처 치료방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 상처 치료용 의약, 또는 동물용 의약 제조를 위한 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체의 신규 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여, 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [14] [화학식 1]

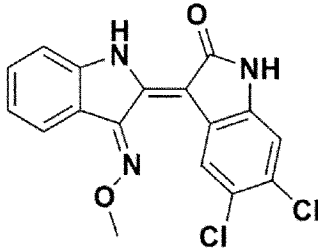
[15]



[16]

[화학식 2]

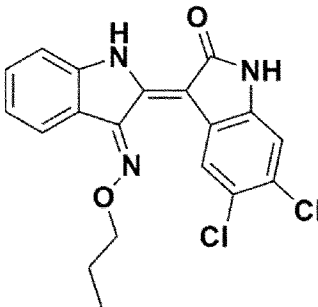
[17]



[18]

[화학식 3]

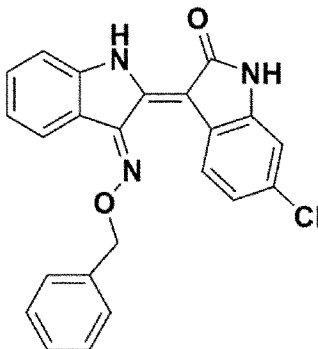
[19]



[20]

[화학식 4]

[21]



[22]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 쉰나무 추출물을 더 포함하거나, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[23]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 상처는 화상, 궤양, 외상, 외과적 수술(post-surgical), 출산, 만성적 상처(chronic wound), 당뇨병성 창상, 또는 피부염(sermatitis)에 의한 손상일 수 있다.

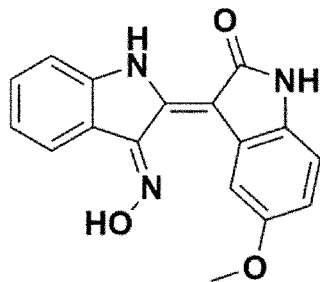
[24]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 약학 조성물은 피부 국소 도포용일 수 있다.

- [25] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형으로 제형화된 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형일 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함하는 것일 수 있다.
- [29] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다. 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부일 수 있다.
- [32] 또한 본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 함유하는 상처 치료 또는 개선을 위한 인간을 제외한 동물용 약학 조성물을 제공한다.
- [33] 또한 본 발명은 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

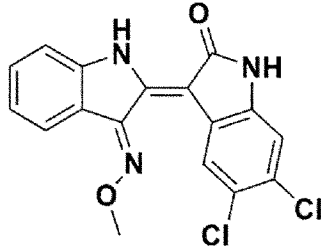
[34] [화학식 1]

[35]



[36] [화학식 2]

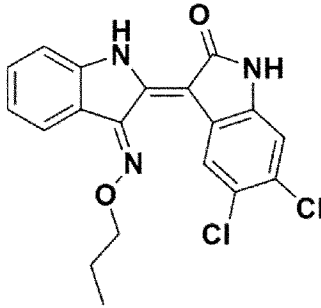
[37]



[38]

[화학식 3]

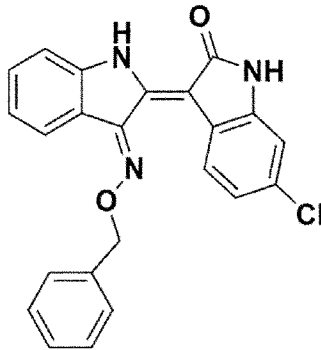
[39]



[40]

[화학식 4]

[41]



[42]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 쉰나무 추출물을 더 포함하거나, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[43]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 화장료 조성물은 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 젤, 파우더, 파운데이션 및 세정제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[44]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형일 수 있다.

[45]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있다.

[46]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함하는 것일 수 있다.

[47]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan

monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

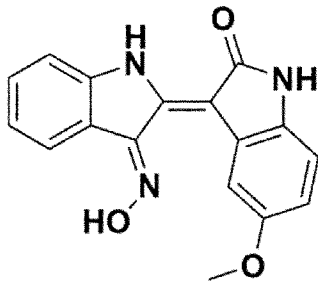
[48] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[49] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다. 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부일 수 있다.

[50] 또한 본 발명은 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

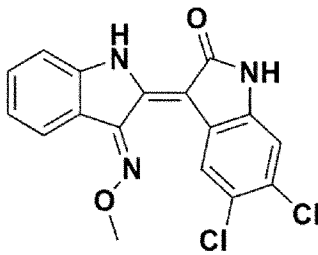
[51] [화학식 1]

[52]



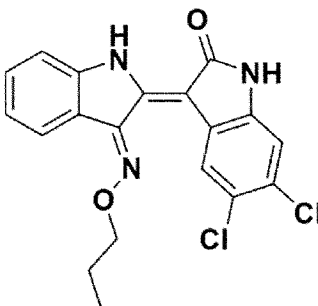
[53] [화학식 2]

[54]



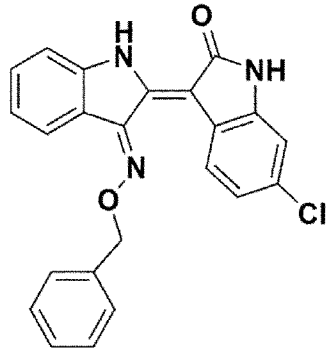
[55] [화학식 3]

[56]



[57] [화학식 4]

[58]



[59] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 쉬나무 추출물을 더 포함하거나, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[60] 본 발명의 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 정상상태 뿐만 아니라 당뇨상태에서도 상처 치료 속도를 촉진함으로써 당뇨병성 창상을 포함하는 상처 개선, 예방 또는 치료 효과가 우수하므로, 상처 개선, 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물, 화장품 조성물, 식품 조성물 또는 당뇨병성 창상 치료용 동물용 약학 조성물 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

[61] 또한 본 발명에 따른 쉬나무 추출물 또는 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린은 독성이 거의 없고, 이를 인디루빈 유도체와 혼합하여 사용할 경우, 종래 스테로이드 약물과 달리 인체에 부작용을 나타내지 않으며, 단독 조성물에 비해 상처회복, 치유 및 탄력 향상 등에 대해 높은 효과를 나타내는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[62] 도 1은 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체의 처리에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트에서 세포의 이동능을 나타낸 사진이다. 이때 대조군(control)은 인디루빈 유도체를 처리하지 않은 케라티노사이트 세포를 의미한다.

[63] 도 2는 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체의 처리에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트 세포에서 세포의 이동률을 정량적으로 나타낸 그래프이다.

[64] 도 3은 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스 급성 상처 조직에 대하여, 시간(0일째, 14일째)별로 촬영한 사진 및 염색결과를 나타낸 것이다. 또한 도 3의 하단(collagen staining)에 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스 급성 상처 조직을 Masson's trichrome과, picrosirius red로 염색한 결과가 나타나 있다.

[65] 도 4는 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및

- EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스 급성 상처 조직에 대하여, 시간별(1, 3, 5, 9, 12 일) 측정된 재상피화 정도를 정량화하여 나타낸 그래프이다.
- [66] 도 5는 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스에서, 14일째 상처 크기(cm^2)를 측정한 그래프이다.
- [67] 도 6a는 실시예 2의 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트에서 세포의 이동능을 나타낸 사진이다.
- [68] 도 6b는 실시예 2의 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트 세포에서 세포의 이동률을 정량적으로 나타낸 그래프이다.
- [69] 도 7은 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물, EGF(양성 대조군)을 마우스 급성 상처에 각각 처리하고, 시간별(0일째, 12일째)로 촬영한 사진 및 염색결과를 나타낸 것이다. 또한 도 7의 하단 좌측 그래프는 본 발명에 따른 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물, EGF(양성 대조군)을 마우스 급성 상처에 각각 처리하고, 시간별(0일째, 12일째)로 재상피화 정도를 정량화하여 나타낸 그래프이다. 도 7의 하단 우측 그래프는 본 발명에 따른 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물, EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스에서, 1일째와 12일째 상처 크기(mm)를 측정한 그래프이다.
- [70] 도 8a는 대조군(con), 실시예 8로부터 제조된 쉰나무 추출물($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 단독으로 처리한 것(쉰나무 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), 양성 대조군(VPA $100 \mu\text{M}$)을 케라티노사이트에 각각 처리하고 18시간 후, 세포의 이동능을 촬영한 사진이다.
- [71] 도 8b는 실시예 1의 인디루빈 유도체($0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$), 실시예 2의 인디루빈 유도체($0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$), 실시예 12 및 13의 복합물(쉰나무 추출물 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ 의 인디루빈 유도체를 각각 혼합함)을 케라티노사이트에 각각 처리하고 18시간 후, 세포의 이동능을 촬영한 사진이다.
- [72] 도 8c는 도 8a, b로부터 세포의 이동률을 계산하여 도시한 그래프이다.
- [73] 도 8d는 실시예 3의 인디루빈 유도체($0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$), 실시예 14의 복합물(쉰나무 추출물 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ 의 인디루빈 유도체를 각각 혼합함) 및 실시예 8의 쉰나무 추출물(쉰나무)을 각각 케라티노사이트에 처리하고 18시간 후, 세포의 이동률을 계산하여 도시한 그래프이다.
- [74] 도 9a는 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 12 및 13의 복합물, 대조군(con), 실시예 8의 쉰나무 추출물(쉰나무),

- 양성 대조군(EGF 및 VPA)을 처리한 마우스 급성 상처 조직에 대하여, 시간별(0일째, 12일째)로 촬영한 사진 및 염색결과를 나타낸 것이다.
- [75] 도 9b는 도 9a에서 1 일째 측정된 각 군의 마우스 급성 상처의 크기(mm²)를 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [76] 도 9c는 도 9a에서 12 일째 측정된 각 군의 마우스 급성 상처의 크기(mm²)를 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [77] 도 10은 당뇨병 동물모델에서, 시간별 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군의 상처 부위를 촬영한 사진이다.
- [78] 도 11은 당뇨병 동물모델에서, 시간별 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군의 상처 부위의 면적을 통해 상처 치료 정도(Wound closure rate, %)를 측정하여 도시한 그래프이다.
- [79] 도 12는 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군으로부터 채취한 상처 부위 조직을 헤마톡실린(보라색)과 에오신(분홍색)으로 염색한 H&E 이미지이다.
- [80] 도 13은 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군으로부터 채취한 상처 부위 조직의 콜라겐 합성 정도를 평가하기 위하여 Van Gieson 염색, Picrosirius red 염색을 실시한 이미지이다.
- [81] 도 14는 당뇨병 동물모델에서, 14일 후 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군의 상처 부위를 촬영한 사진과 이로부터 채취한 상처 부위 조직을 헤마톡실린(보라색)과 에오신(분홍색)으로 염색한 H&E 이미지이다.
- [82] 도 15는 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 채취한 상처 부위 조직의 콜라겐 합성 정도를 평가하기 위하여 Van Gieson 염색, Masson's Trichrome 염색을 실시한 이미지이다.
- [83] 도 16은 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 채취한 상처 주변 부위 신생혈관을 관찰한 것이다.
- [84] 도 17은 본 발명의 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체를 상기 다양한 오일 또는 계면활성제에 각각 용해시켜 제조된 에멀전 용액의 사진이다.
- [85] 도 18a는 Tween 80와 PEG 400를 2:1의 비율 혼합된 계면활성제로 제조된 에멀전 용액에 대한 삼원(ternary) 상 다이어그램이고, 도 18b는 Tween 80와 PEG 400를 1:1의 비율 혼합된 계면활성제로 제조된 에멀전 용액에 대한 삼원(ternary) 상 다이어그램이고, 도 18c는 Tween 80와 PEG 400를 1:2의 비율 혼합된 계면활성제로 제조된 에멀전 용액에 대한 삼원(ternary) 상 다이어그램이다. 도 18의 삼원 상 다이어그램에는 안정한 에멀전을 형성하는 지역을 적색의 점으로 표시하였다.
- [86] 도 19는 상온(25 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 용해도% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [87] 도 20은 저온(4 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 용해도% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[88] 도 21은 상온(25 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 wnt reporter activity% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[89] 도 22는 저온(4 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 wnt reporter activity% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

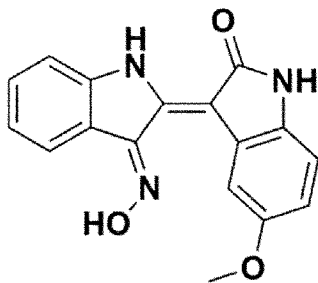
[90] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[91] 본 발명의 발명자들은 일반 동물모델 또는 당뇨병이 유발된 동물모델에 창상을 낸 뒤, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 창상부위에 피부 투여하여, 시간에 따른 상처면적, 조직학적 구조, 콜라겐 양 등을 평가한 결과, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체의 피부 투여에 의한 창상 치유, 피부 재생 효능을 확인하였다.

[92] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

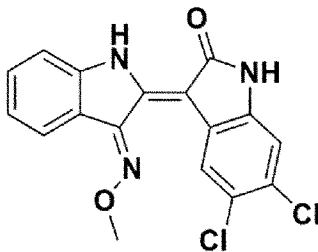
[93] [화학식 1]

[94]



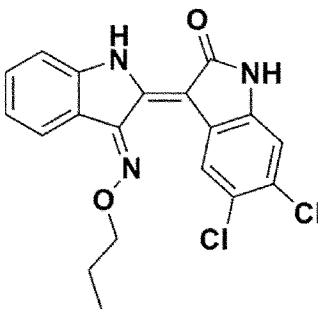
[95] [화학식 2]

[96]



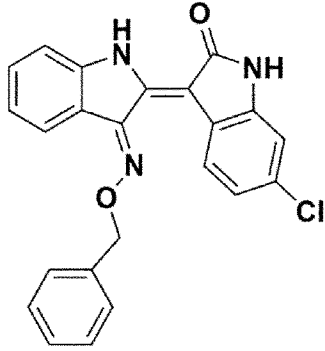
[97] [화학식 3]

[98]



[99] [화학식 4]

[100]



[101] 상기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 장기간 세포에 처리하여도 세포에 의한 독성이 거의 나타나지 않는 물질로, 탁월한 세포 재생, 상처 치유 및 콜라겐 생성 효과를 나타냄을 확인함으로써 상처 예방 또는 상처 치료 가능성을 갖는 약학, 식품, 화장품 등의 다양한 분야에 적용이 가능함을 알 수 있다. 또한 상기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 당뇨 상태에서 유발된 창상에 대해 탁월한 세포 재생, 창상 치유 및 콜라겐 생성 효과를 나타냄을 확인함으로써 당뇨병 창상 예방 또는 치료 효능을 갖는 약학, 식품, 화장품 등의 다양한 분야에 적용이 가능함을 알 수 있다.

[102] 상기 인디루빈 유도체로는 5-메톡실인디루빈-3'-옥심, 5-메톡실인디루빈-3'-메톡심, 인디루빈-3'-옥심, 6-브로모인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-메톡심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-프로필옥심, 6-클로로-5-니트로인디루빈, 6-클로로-5-니트로인디루빈-3'-옥심, 6-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-옥심, 5-브로모인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-에틸옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심프로필옥심 및 6-클로로인디루빈-3'-벤질옥심 등 다양한 인디루빈 유도체들이 존재하나, 이 중에서 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 가장 우수한 상처 치료 및 회복에 유의한 효과가 확인되었다.

[103] 한편, 생체 외(*in vitro*) 실험을 통해 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 처리하는 것이 종래의 다른 인디루빈 유도체를 처리하는 경우에 비해 Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(1.5 배, 2.0 배)를 갖고 있으며, 가장 빠르게 상처가 치유되고 있음을 확인하였다.

[104] 또한, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나의 인디루빈 유도체를 마우스의 상처에 도포한 결과, 마우스에 생긴 급성 상처가 양성대조군인 EGF와 동등하거나 더 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되고, 다양한 종류의 콜라겐 조직의 상처 치유 마커들이 증가함을 확인할 수 있다. 구체적으로 화학식 1의 인디루빈 유도체(A3334)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 약간 더 우수한

상처회복 효과를 나타내나, 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지않도록 피부의 표피층이 균일하게 회복되는 '흉터 개선'에 더 효과적이라는 것을 확인하였다.

- [105] 또한 화학식 2의 인디루빈 유도체(A3051)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 동일한 시기에 2배 내지 6배 이상의 상처회복 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 상처를 보다 빠르게 회복시킴을 알 수 있다. 게다가, 양성 대조군인 EGF를 처리하였을 때보다 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지않도록 피부의 표피층이 깨끗하고 균일하게 회복되는 것을 확인하였는 바, EGF를 사용한 것보다 '흉터 개선'에도 매우 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [106] 즉 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 종래 상처치료제 또는 인디루빈 유도체와 달리, 상처 치유뿐만 아니라, 피부 표피층의 균일한 회복을 유도하는 흉터 개선이라는 예상치 못한 현저한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [107] 한편, 당뇨병 상태에서는 여러 가지 원인들로 인해 궤양 등의 상처가 발생할 경우 상처 치유가 현저히 지연되는 현상이 발생하며, 후술하는 실험예를 통해 실질적으로 확인하였다. 그러나 화학식 1 내지 4 중에서 어느 하나의 인디루빈 유도체를 처리하는 경우, 종래 윈트 신호전달계 활성화제인 VPA 보다 당뇨병성 창상 치료, 개선 또는 예방 효능이 현저히 뛰어남을 확인하였다.
- [108] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 상처 치유(wound healing)와 더불어 당뇨병성 창상에 대한 치유 효과를 갖는 약학 조성물 및 화장품 조성물 등으로 이용할 수 있다.
- [109] 본 발명에 따른 조성물은 정상 상태 및 당뇨 상태에서 유발된 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 하는 케라티노사이트와 섬유아세포에서, 세포의 운동성을 극대화할 뿐만 아니라 콜라겐 축진 및 축적도 증가시키는 효과를 갖는다.
- [110] 특히, 케라티노사이트(keratinocytes)는 외피 세포에서 발견되는 세포의 한 유형으로 외피세포의 기저층을 형성하고, 피부의 표면에 각질화된 성숙한 세포층을 형성하기까지, 케라티노사이트는 구조의 확대와 변형에 의해 외피층(각질층, corneal stratum)을 형성한다. 상처 치유 속도는 몇몇 인자들 중 케라티노사이트의 증식 및 이동 속도에 의해 영향을 받는데, 본 발명에 따른 조성물이 케라티노사이트의 이동속도를 증가시키는 것으로 보아 상처 치유에 유효한 효과를 나타내고 있음을 알 수 있다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 앞서 설명한 바와 같이 우수한 상처 치유 효과를 비롯하여, 피부의 표피층을 균일하게 회복되도록 유도하는 '흉터 개선' 효과도 가지고 있음을 알 수 있다. 대다수의 상처치료제가 상처 치료에 국한되어 있고, 상처 치료 과정에서 생긴 흉터는 추후 흉터치료제로 별도로 치료해야하며, 흉터치료제를 상처치료에 사용할 경우 염증 등의 2차적인 문제가 발생할 수 있기 때문에 상처치료와 흉터치료가

동시에 이루어질 수 없다는 점을 고려한다면, 상처치료와 흉터 개선 효과를 동시에 가지고 있다는 것은 매우 현저한 효과라 할 것이다.

- [111] 다시 말해 본 발명에 따른 조성물은 종래 다양한 인디루빈 유도체 중에서 현저한 상처 예방 또는 치유 효과(약 2배)를 갖는 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도를 유효성분으로 하는 것일 수 있다(실험예 1). 상기 조성물은 앞서 설명한 바와 같이 급성 상처가 빠르게 재상피화되며, 다양한 종류에 대한 콜라겐 생성을 촉진하고 이의 축적 및 수축을 활성화하는 효과를 갖는 장점이 있으며, 섬유아세포의 이동과 증식을 활성화하는 효과를 나타내는 등 매우 현저한 창상 치유 효과를 나타낸다.
- [112] 본 발명은 쉬나무 추출물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있다.
- [113] 먼저, 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 추출물을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(2 배)를 갖고 있음을 확인하였다.
- [114] 특히, 쉬나무 추출물만을 단독으로 처리하였을 때와 인디루빈 유도체를 단독으로 처리하였을 때보다, 이들의 복합물을 처리하였을 때 약 1.5~2배 더 높은 수치를 나타냈다. 즉, 본 발명의 상처 치료용 조성물은 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 각각 사용하는 것보다 현저한 효과를 가지며, 이는 각각의 조성물로부터 얻는 수치를 단순히 합한, 예상가능한 수치를 넘어선 것임을 확인하였다.
- [115] 또한, 동물실험을 통해서도 쉬나무 추출물 또는 인디루빈 유도체 단독보다 인디루빈 유도체와의 복합물이 현저한 효과를 가지고 있으므로, 보다 바람직하다는 것을 알 수 있다.
- [116] 상기 추출물은 쉬나무의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것일 수 있고, 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [117] 본 발명은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 함께 처리하였을 때, 화학식 1

내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(1.4~2.3 배)를 갖고 있으며, 6시간 더 빠르게 상처가 치유되고 있음을 확인하였다. 다시 말해 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상과 함께 인디루빈 유도체가 사용되는 것이 가장 바람직함을 실험을 통해 확인하였다.

- [118] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 혼합된 복합물은 후술하는 실험예에서와 같이, 상기 저분자 화합물을 단독 또는 화학식 2로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 혼합한 복합물에 의한 세포 이동성을 분석한 결과 18 시간 만에 세포 이동성이 회복됨을 확인하였다. 특히 메틸 바닐레이트와 인디루빈 유도체(A3051)를 혼합할 경우에는, 아무것도 처리하지 않은 대조군(세포)에 비해 5배 더 높은 결과를 나타냄을 확인하였다.
- [119] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물은 쉐나무 추출물, 지구자 추출물, 감귤 추출물, 편축 추출물, 여뀌 추출물 및 어성초 추출물에 포함되어 있는 성분으로, 상기 추출물은 쉐나무, 지구자, 감귤, 편축, 여뀌 및 어성초로부터 선택되는 어느 하나 이상의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [120] 상기 메틸 바닐레이트는 지구자 추출물에 주로 존재하고, 상기 헤스페리딘은 쉐나무 추출물, 감귤 추출물에 존재하며, 상기 퀘르시트린은 여뀌 추출물, 편축 추출물, 어성초 추출물에 주로 존재할 수 있다.
- [121] 상기 본 발명에 사용된 인디루빈 유도체는 유리 물질로서 뿐만 아니라 그의 약학적으로 허용가능한 염, 약학적으로 허용가능한 용매화물, 약학적으로 허용가능한 다형체 또는 약제학적으로 허용 가능한 전구약물로서 제공될 수 있다. 상기 인디루빈 유도체의 염에 있어서는 의약 또는 화장품 내에서 배합할 수 있는 형태이면 특별히 제한되지 않는다. 무기염 또는 유기염을 포함하며, 산성염 또는 알칼리성염일 수 있다. 특히 양이온에 의한 염인 경우 나트륨염이나 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘염, 마그네슘염 및 바륨염 등의 알칼리토류 금속염; 아르기닌이나 라이신 등의 염기성 아미노산염; 암모늄염이나 트리시클로헥실암모늄염 등의 암모늄염; 모노에탄올아민염, 디에탄올아민염, 트리에탄올아민염, 모노이소프로판올아민염, 디이소프로판올아민염 및 트리아이소프로판올아민 등의 각종 알칸올 아민염일 수 있다. 바람직하게 상기

- 염은 알칼리 금속염이며, 더욱 바람직하게는 테트라소듐염일 수 있다.
- [122] 본 발명에 따른 조성물은 상처 치료 능력 및 흉터 개선에 뛰어난 효과를 나타내고, 세포손상이 일어날 경우 세포 손상을 치유할 수 있는 것으로, 상처 치료 및 피부 회복 및 흉터를 개선할 수 있으므로 피부 상처 예를 들면 화상, 궤양, 외상, 외과적 수술(post-surgical), 출산, 만성적 상처(chronic wound), 당뇨병성 창상, 또는 피부염(sermatitis)의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있다.
- [123] 본 발명에서 당뇨병성 창상(diabetic wound)"이라 함은 당뇨병 환자에 발생하는 만성 창상(chronic wound)을 말하며, 상기 만성이라 함은 당뇨로 인한 말초혈관의 손상으로 혈액순환 장애가 동반하여 상처 치유가 지연되는 창상을 말한다. 본 명세서에서 창상과 상처는 동등한 의미로 사용된다.
- [124] 구체적으로 상기 당뇨병성 창상은 당뇨 상태에서 발생한 피부의 표피, 진피 또는 피하조직의 화상, 궤양, 외상, 외과적 수술(post-surgical), 성형, 임플란트, 출산, 만성적 상처(chronic wound), 또는 피부염(sermatitis)에 의한 손상을 의미할 수 있으며, 보다 바람직하게는 당뇨병성 족부궤양(diabetic foot ulcers), 당뇨병성 혈관병증(diabetic angiopathy) 및 당뇨병성 족부감염(diabetic foot infections)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 본 개발품은 패치에 탑재할 경우 의료용구로 활용 될 수 있다.
- [125] 또한, 상기 화상은 태양, 화학적, 방사선 또는 열에 의한 화상인 것이 바람직하고, 상기 궤양은 당뇨성 궤양인 것이 바람직하며, 상기 만성적 상처는 욕창 또는 압력성 궤양인 것이 바람직하고, 상기 피부염은 농가진(impetigo), 간찰진(intertrigo), 모낭염(folliculitis) 및 습진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [126] 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 본 발명의 피부에서의 상처를 치료하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.
- [127] 본 발명에서, "개선"이란 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있고, "예방"은 상태의 완화 또는 치료 또는 지연과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [128] 상기 조성물에서 인디루빈 유도체는 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 내지 80 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 예방 또는 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 80 중량%를 초과할 경우 과도하게 포함되어 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [129] 상기 조성물에 쉬나무 추출물이 더 포함되는 경우에는, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 추출물의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 추출물과 인디루빈 유도체는 상기 추출물의 건조 중량부 10을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 5 내지 15 중량부로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의

증가가 미미해질 수 있다.

- [130] 또한, 상기 조성물에 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물이 더 포함되는 경우, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체는 상기 저분자 화합물 1 몰을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 1 내지 20 몰 비로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.
- [131] 상기 조성물에 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물이 포함되는 농도는 당업계에서 일반적인 범위라면 특별히 제한되지 않으나, 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물은 조성물 전체 중량에 대하여 건조 중량으로 0.001 내지 5 중량% 또는 액상 중량으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 5 중량%(건조 중량) 또는 50 중량%(액상 중량)을 초과할 경우 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [132] 본 발명의 상처 예방 또는 치료용 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 피부 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 피부 투여 또는 경피 투여이다.
- [133] 상기 약학 조성물, 의약의 사용량은 환자 또는 치료대상 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 질환의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성에 의존적일 것이다.
- [134] 상기 약학 조성물은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자 또는 치료대상의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일 0.1 내지 1,000mg/kg, 바람직하게는 1 내지 500mg/kg, 더욱 바람직하게는 5 내지 250mg/kg, 가장 바람직하게는 10 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.
- [135] 본 발명의 조성물이 경구 또는 주사제 투여방식일 경우, 본 발명에 따른 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다.
- [136] 상기 조성물은 개별적으로 예방제 또는 치료제로서 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수

있다.

- [137] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [138] 제형화 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [139] 상기 조성물이 액제, 크림제, 로션제, 겔제 또는 에어로졸제의 형태로 비경구로 투여되도록 제형화되는 경우에는 적합한 통상적인 첨가제, 예를 들어 보존제, 의약 침투를 보조하는 용매, 연고 및 크림의 경우 연화제 등을 포함할 수 있다. 상기 국부 제제는 또한 상용가능한 통상적 담체, 예를 들어, 크림 또는 연고베이스 및 로션용으로는 에탄올 또는 올레일 알코올을 함유할 수 있다. 상기 담체는 제제의 약 1 내지 약 98%를 구성할 수 있고, 더욱 일반적으로는 제제의 약 80% 까지를 구성할 수 있다.
- [140] 본 발명에 따른 조성물은 피부, 상처에 직접 도포 또는 산포하는 등의 방법에 의해 투여할 수 있는 제형, 예를 들어, 크림, 로션, 연고, 에어로졸, 겔, 또는 팩의 제형을 갖는 것일 수 있다. 각각의 제형에 적합한 배합성분이나 제제를 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 당업자들은 이들 제제를 제조할 때, 통상의 외용제를 제조하는 데에 사용되는 각종 배합 성분을 적절히 선택하여 사용할 수 있다.
- [141] 그러한 성분으로는 연고제, 크림제, 겔제, 로션제 등의 경우에 있어서는, 백색 바셀린, 황색 바셀린, 라놀린, 표백밀랍, 세탄올, 스테아릴알코올, 스테아르산, 경화유, 겔화 탄화수소, 폴리에틸렌글리콜, 유동 파라핀, 스쿠알란 등의 기제가

있고, 올레산, 미리스트산이소프로필, 트라이소옥탄산글리세린, 크로타미톤, 세바크산디에틸, 아디프산디이소프로필, 라우르산헥실, 지방산, 지방산 에스테르, 지방족 알코올, 식물유 등의 용제 및 용해 보조제가 있으며, 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸하이드록시톨루엔, 부틸하이드록시아니솔 등의 산화 방지제, 파라하이드록시벤조산에스테르 등의 방부제, 글리세린, 프로필렌글리콜, 히알루론산나트륨 등의 보습제, 폴리옥시에틸렌유도체, 글리세린 지방산 에스테르, 자당 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 프로필렌글리콜 지방산 에스테르, 레시틴 등의 계면 활성제, 카르복시비닐 폴리머, 잔탄검, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨염류, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 증점제 등이 있다.

- [142] 에어로졸제의 경우에 있어서는, 연고제, 크림제, 겔제, 현탁제, 유제, 액제, 로션제 등의 조제에 사용되는 상기 성분 외에 추가로 각종 안정제, 완충제, 교미제, 현탁화제, 유화제, 방향제, 보존제, 용해 보조제, 그 밖의 적당한 첨가제를 배합할 수 있다.
- [143] 상기 조성물의 제형으로 바람직하게는 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형일 수 있다.
- [144] 상기 에멀전 제형에 있어서, 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 상기 에멀전 제형의 조성은 에멀전 시스템의 조성을 결정하는 통상의 방법에 따라 작성된 유사 3상 다이어그램에 의해 결정될 수 있다. 구체적으로 오일 상(폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL)) 및 계면활성제(예를 들어 트윈(tween) 80 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합물)를 특정 비율 범위의 상이한 중량비율로 완전히 혼합한 후, 물을 각 비율의 오일 및 계면활성제 혼합물에 첨가하면서 에멀전 형성 영역에 해당하는 점을 표시함으로써 유사 3상 다이어그램을 작성할 수 있다. 작성된 유사 3상 다이어그램에서 에멀전 영역을 결정하여 이 영역에 포함되는 조성 중 특정 조성을 선택하여, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물 또는 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 복합물)을 용해시키는 에멀전 제형의 조성으로 결정할 수 있다.
- [145] 만약 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물 또는 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 혼합된 복합물)은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.
- [146] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유화제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기 위해 p-당단백질 억제제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의

계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품 의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

[147] 또한, 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가 된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

[148] 본 발명의 실시예에서 사용한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)이고, 폴리에틸렌글리콜은 PEG 400으로, 이는 양친매성 성질을 가지고, 물에서 분산가능한 비-이온성으로, 난용성 유효성분(화학식 1 내지 4 중 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체; 및 쉐나무 추출물 또는 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물의 복합물을 포함하는 유효성분)에 최적화된, 에멀전 제형을 제공할 수 있다.

[149] 상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[150] 상기 조성물은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다. 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부일 수 있다.

[151] 상기 에멀전 제형은 3 달째에 측정했을 때 온도 4 내지 25°C 조건하에 증류수에서 wnt 활성 및 용해도의 변화가 나타내지 않는 안정한 제형으로, 유효성분의 활성을 오랜기간 유지할 수 있게 하며, 생체 내로의 흡수를 효과적으로 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

[152]

[153] 또한, 상기 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 에멀전 조성물의 제조방법은 다음과 같다.

- [154] 1) 오일, 계면활성제와 폴리에틸렌글리콜을 혼합하여 제1 용액을 제조하는 단계;
- [155] 2) 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 제2 용액을 제조하는 단계;
- [156] 3) 상기 제1 용액에 제2 용액을 혼합하여 에멀전 조성물을 제조하는 단계;를 포함한다.
- [157] 상기 제2 용액에는 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [158] 상기 제2 용액은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다.
- [159] 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가 된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안정한 물질이다.
- [160] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유화제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기 위해 p-당단백질 억제제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품 의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안정한 물질이다.
- [161] 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 만약, 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 혼합된 복합물)은 조성물 총

중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.

- [162] 본 발명의 에멀전 조성물에 물을 첨가하여 현미경 사진을 찍어 비교한 결과, 본 발명의 에멀전은 완전히 용해되어 용액 상태의 에멀전 제형(F8)을 형성하였다. 또한 본 발명의 에멀전을 안정성을 관측한 결과, 액적이 구상 형태이고, 평균 지름이 20 내지 1500 nm, 바람직한 지름은 30 내지 50 nm로 측정되어 나노-크기의 액적을 형성하였으며, 좁은 범위의 크기 분포를 나타내었다.
- [163] 또한 본 발명의 에멀전은 실온에서 3 달 동안 용해도 변화와 유효성분의 활성 변화가 없어 안정성을 장기간 유지하는 것으로 확인되었다. 나아가 본 발명 에멀전 제형을 경구 투여 또는 국소 부위에 도포한 경우, 흡수를 효과적으로 개선시킬 수 있다.
- [164]
- [165] 또한 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 함유하는 상처 예방 또는 개선을 위한 인간을 제외한 동물용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [166] 또한 본 발명은 인간, 또는 인간을 제외한 동물에게 상기 조성물을 경피 투여하는 상처 치료방법을 제공한다.
- [167] 또한 본 발명은 상처 치료용 의약, 또는 동물용 의약 제조를 위한 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체의 신규 용도를 제공한다.
- [168] 본 발명에 따른 조성물은 상처 치료 능력 및 흉터 개선에 뛰어난 효과를 나타내고, 세포손상이 일어날 경우 세포 손상을 치유할 수 있는 것으로, 상처 치료 및 피부 회복 및 흉터를 개선할 수 있으므로 피부 상처 예를 들면 화상, 궤양, 외상, 외과적 수술(post-surgical), 출산, 만성적 상처(chronic wound), 당뇨병성 창상, 또는 피부염(sermatitis)의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있다.
- [169] 본 발명에서 당뇨병성 창상(diabetic wound)"이라 함은 당뇨병 환자에 발생하는 만성 창상(chronic wound)을 말하며, 상기 만성이라 함은 당뇨로 인한 말초혈관의 손상으로 혈액순환 장애가 동반하여 상처 치유가 지연되는 창상을 말한다. 본 명세서에서 창상과 상처는 동등한 의미로 사용된다.
- [170] 구체적으로 상기 당뇨병성 창상은 당뇨 상태에서 발생한 피부의 표피, 진피 또는 피하조직의 화상, 궤양, 외상, 외과적 수술(post-surgical), 성형, 임플란트, 출산, 만성적 상처(chronic wound), 또는 피부염(sermatitis)에 의한 손상을 의미할 수 있으며, 보다 바람직하게는 당뇨병성 족부궤양(diabetic foot ulcers), 당뇨병성 혈관병증(diabetic angiopathy) 및 당뇨병성 족부감염(diabetic foot infections)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 본 개발품은 패치에 탑재할 경우 의료용구로 활용 될 수 있다.
- [171] 상기 '의약', '동물용 약학 조성물' 또는 '동물용 의약'은 유효성분으로 화학식 1 내지 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체 이외에, 약학 조성물

등의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

- [172] 상기 '담체'는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물이다. 상기 '희석제'는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물이다.
- [173] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어, 유당, 포도당, 설탕, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다.
- [174] 상기 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약의 사용량은 환자 또는 치료대상 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 질환의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성에 의존적일 것이다.
- [175] 상기 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자 또는 치료대상 동물의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일 0.1 내지 1,000mg/kg, 바람직하게는 1 내지 500mg/kg, 더욱 바람직하게는 5 내지 250mg/kg, 가장 바람직하게는 10 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화 된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.
- [176] 상기 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 개별적으로 예방제 또는 치료제로서 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [177] 상기 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다. 제형화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [178] 상기 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약의 제형화는 상기 약학 조성물을 참고할 수 있다.
- [179] 상기 상처의 치료방법은 인간, 또는 인간을 제외한 동물, 특히 포유동물에게 상기 조성물을 비경구 투여 하는 것으로, 예를 들어 정상 또는 당뇨병 상태에서 상처가 유발된 치료대상 개체에게 상기 조성물을 피부 투여 또는 경피 투여하는 것이다.
- [180] 상기 치료를 위한 투여량, 투여 방법 및 투여 횟수는 상기 약학 조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약의 투여량, 투여 방법 및 투여 횟수를

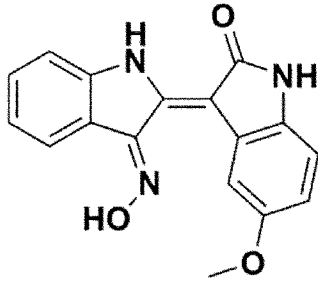
참고할 수 있다.

[181]

[182] 또한 본 발명의 다른 측면은 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

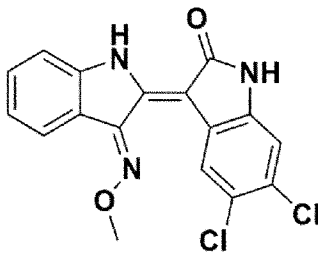
[183] [화학식 1]

[184]



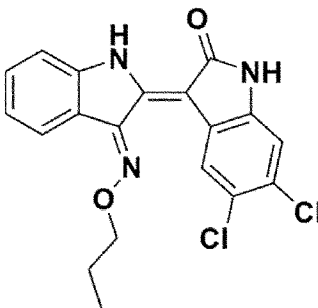
[185] [화학식 2]

[186]



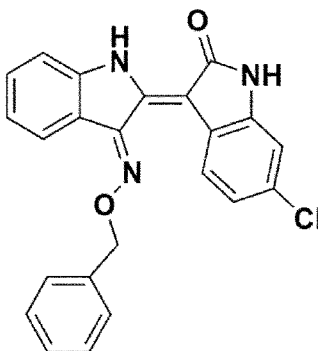
[187] [화학식 3]

[188]



[189] [화학식 4]

[190]



[191] 본 발명의 인디루빈 유도체는 장기간 세포에 처리하여도 세포에 의한 독성이 거의 나타나지 않는 물질로, 탁월한 세포 재생, 상처 치유 및 콜라겐 생성 효과를

나타냄을 확인함으로써 상처 예방 또는 상처 치료를 통한 미용 효과를 부여할 수 있다. 또한, 당뇨 상태에서 유발된 창상에 대해 탁월한 세포 재생, 창상 치유 및 콜라겐 생성 효과를 나타냄을 확인함으로써 당뇨병 창상 예방 또는 치료 효능을 통해 미용 효과를 부여할 수 있다.

- [192] 상기 인디루빈 유도체로는 5-메톡실인디루빈-3'-옥심, 5-메톡실인디루빈-3'-메톡심, 인디루빈-3'-옥심, 6-브로모인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-메톡심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-프로필옥심, 6-클로로-5-니트로인디루빈, 6-클로로-5-니트로인디루빈-3'-옥심, 6-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-옥심, 5-브로모인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-에틸옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심프로필옥심 및 6-클로로인디루빈-3'-벤질옥심 등 다양한 인디루빈 유도체들이 존재하나, 이 중에서 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 상처 치료 및 회복과 더불어 당뇨 상태에서의 창상 치료 및 회복에 유의한 효과가 확인되었다(실험예 1).
- [193] 한편, 생체 외(*in vitro*) 실험을 통해 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 처리하는 것이 종래의 다른 인디루빈 유도체를 처리하는 경우에 비해 Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(1.5 배, 2.0배)를 갖고 있으며, 가장 빠르게 상처가 치유되고 있음을 확인하였다.
- [194] 또한, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나의 인디루빈 유도체를 마우스의 상처에 도포한 결과, 마우스에 생긴 급성 상처가 양성대조군인 EGF와 동등하거나 더 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되고, 다양한 종류의 콜라겐 조직의 상처 치유 마커들이 증가함을 확인할 수 있다. 구체적으로 화학식 1의 인디루빈 유도체(A3334)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 약간 더 우수한 상처회복 효과를 나타내나, 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지 않도록 피부의 표피층이 균일하게 회복되는 '흉터 개선'에 더 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [195] 또한 화학식 2의 인디루빈 유도체(A3051)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 동일한 시기에 2배 내지 6배 이상의 상처회복 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 상처를 보다 빠르게 회복시킴을 알 수 있다. 게다가, 양성 대조군인 EGF를 처리하였을 때보다 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지 않도록 피부의 표피층이 깨끗하고 균일하게 회복되는 것을 확인하였는 바, EGF를 사용한 것보다 '흉터 개선'에도 매우 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [196] 즉 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 종래 상처치료제 또는 인디루빈 유도체와 달리, 상처 치유뿐만 아니라, 피부 표피층의

- 균일한 회복을 유도하는 흉터 개선이라는 예상치 못한 현저한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [197] 한편, 당뇨병 상태에서는 여러 가지 원인들로 인해 궤양 등의 상처가 발생할 경우 상처 치유가 현저히 지연되는 현상이 발생하며, 후술하는 실험예를 통해 실질적으로 확인하였다. 그러나 화학식 1 내지 4 중에서 어느 하나의 인디루빈 유도체를 처리하는 경우, 종래 윈트 신호전달계 활성화제인 VPA 보다 당뇨병성 창상 치료, 개선 또는 예방 효능이 현저히 뛰어난 것을 확인하였다.
- [198] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 상처 치유(wound healing)와 더불어 당뇨병성 창상에 대한 치유 효과를 갖는 화장료 조성물로 이용할 수 있다.
- [199] 본 발명에 따른 조성물은 정상 상태 및 당뇨 상태에서 유발된 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 하는 케라티노사이트와 섬유아세포에서, 세포의 운동성을 극대화할 뿐만 아니라 콜라겐 축진 및 축적도 증가시키는 효과를 갖는다.
- [200] 상기 조성물에서 인디루빈 유도체는 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 내지 80 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 예방 또는 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 80 중량%를 초과할 경우 과도하게 포함되어 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [201] 본 발명은 쉬나무 추출물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있다.
- [202] 먼저, 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 추출물을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(2 배)를 갖고 있음을 확인하였다.
- [203] 특히, 쉬나무 추출물만을 단독으로 처리하였을 때와 인디루빈 유도체를 단독으로 처리하였을 때보다, 이들의 복합물을 처리하였을 때 약 1.5~2배 더 높은 수치를 나타냈다. 즉, 본 발명의 상처 치료용 조성물은 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 각각 사용하는 것보다 현저한 효과를 가지며, 이는 각각의 조성물로부터 얻는 수치를 단순히 합한, 예상가능한 수치를 넘어선 것임을 확인하였다.
- [204] 또한, 동물실험을 통해서도 쉬나무 추출물 또는 인디루빈 유도체 단독보다 인디루빈 유도체와의 복합물이 현저한 효과를 가지고 있으므로, 보다 바람직하다는 것을 알 수 있다.
- [205] 상기 추출물은 쉬나무의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것일 수 있고, 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기

저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.

- [206] 본 발명은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(1.4~2.3 배)를 갖고 있으며, 6시간 더 빠르게 상처가 치유되고 있음을 확인하였다. 다시 말해 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상과 함께 인디루빈 유도체가 사용되는 것이 가장 바람직함을 실험을 통해 확인하였다.
- [207] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 혼합된 복합물은 후술하는 실험예에서와 같이, 상기 저분자 화합물을 단독 또는 화학식 2로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 혼합한 복합물에 의한 세포 이동성을 분석한 결과 18 시간 만에 세포 이동성이 회복됨을 확인하였다. 특히 메틸 바닐레이트와 인디루빈 유도체(A3051)를 혼합할 경우에는, 아무것도 처리하지 않은 대조군(세포)에 비해 5배 더 높은 결과를 나타냄을 확인하였다.
- [208] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물은 쉰나무 추출물, 지구자 추출물, 감귤 추출물, 편측 추출물, 여뀌 추출물 및 어성초 추출물에 포함되어 있는 성분으로, 상기 추출물은 쉰나무, 지구자, 감귤, 편측, 여뀌 및 어성초로부터 선택되는 어느 하나 이상의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [209] 상기 메틸 바닐레이트는 지구자 추출물에 주로 존재하고, 상기 헤스페리딘은 쉰나무 추출물, 감귤 추출물에 존재하며, 상기 퀘르시트린은 여뀌 추출물, 편측 추출물, 어성초 추출물에 주로 존재할 수 있다.
- [210] 상기 조성물에 쉰나무 추출물이 더 포함되는 경우에는, 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 추출물의

혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 추출물과 인디루빈 유도체는 상기 추출물의 건조 중량부 10을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 5 내지 15 중량부로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.

- [211] 상기 조성물에 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 경우, 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체는 상기 저분자 화합물 1 몰을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 1 내지 20 몰 비로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.
- [212] 상기 조성물에 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물이 포함되는 농도는 당업계에서 일반적인 범위라면 특별히 제한되지 않으나, 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물은 조성물 전체 중량에 대하여 건조 중량으로 0.001 내지 5 중량% 또는 액상 중량으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 5 중량%(건조 중량) 또는 50 중량%(액상 중량)을 초과할 경우 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [213] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상처 개선을 통한 미용 효과를 상승시킬 수 있는 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [214] 본 발명은 쉬나무 추출물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있다.
- [215] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 젤, 파우더, 파운데이션 또는 세정제 제형으로 제조될 수 있고, 예를 들어 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제화장용, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누비의료용, 크림비누, 페이스셜 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [216] 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜,

지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.

- [217] 상기 오일은 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸텔릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.
- [218] 상기 지방산은 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며, 상기 지방산 에스테르는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 또한, 상기 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비 이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.
- [219] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 항산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.
- [220] 본 발명의 화장료 조성물은 바람직하게 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형일 수 있다.
- [221] 상기 에멀전 제형에 있어서, 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 상기 에멀전 제형의 조성은 에멀전 시스템의 조성을 결정하는 통상의 방법에 따라 작성된 유사 3상 다이어그램에 의해 결정될 수 있다. 구체적으로 오일 상(폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL)) 및 계면활성제(예를 들어 트윈(tween) 80 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합물)를 특정 비율 범위의 상이한 중량비율로 완전히 혼합한 후, 물을 각 비율의 오일 및 계면활성제 혼합물에 첨가하면서 에멀전 형성 영역에 해당하는 점을 표시함으로써 유사 3상 다이어그램을 작성할 수 있다. 작성된 유사 3상 다이어그램에서 에멀전 영역을 결정하여 이 영역에 포함되는 조성 중 특정 조성을 선택하여, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 케르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 복합물)을 용해시키는 에멀전 제형의 조성으로 결정할 수 있다.
- [222] 만약 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 케르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 혼합된 복합물)은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.
- [223] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유화제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기

위해 p-당단백질 억제제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품 의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안전한 물질이다.

[224] 또한, 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가 된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안전한 물질이다.

[225] 본 발명의 실시예에서 사용한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)이고, 폴리에틸렌글리콜은 PEG 400으로, 이는 양친매성 성질을 가지고, 물에서 분산가능한 비-이온성으로, 난용성 유효성분(화학식 1 내지 4의 인디루빈 유도체 또는 이와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 복합물을 포함하는 유효성분)에 최적화된, 에멀전 제형을 제공할 수 있다.

[226] 상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[227] 상기 조성물은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다. 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부일 수 있다.

[228] 상기 에멀전 제형은 3 달째에 측정했을 때 온도 4 내지 25°C 조건하에 증류수에서 wnt 활성 및 용해도의 변화가 나타내지 않는 안전한 제형으로, 유효성분의 활성을 오랜기간 유지할 수 있게 하며, 생체 내로의 흡수를 효과적으로 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

[229]

[230] 또한, 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 개선용 에멀전 화장료

조성물의 제조방법은 다음과 같다.

- [231] 1) 오일, 계면활성제와 폴리에틸렌글리콜을 혼합하여 제1 용액을 제조하는 단계;
- [232] 2) 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 제2 용액을 제조하는 단계;
- [233] 3) 상기 제1 용액에 제2 용액을 혼합하여 에멀전 조성물을 제조하는 단계;를 포함한다.
- [234] 상기 제2 용액에는 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [235] 상기 제2 용액은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)를 포함할 수 있다.
- [236] 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가 된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안정한 물질이다.
- [237] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유효제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기 위해 p-당단백질 억제제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품 의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안정한 물질이다.
- [238] 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 만약, 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로

이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 혼합된 복합물)은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.

[239] 본 발명의 에멀전 조성물에 물을 첨가하여 현미경 사진을 찍어 비교한 결과, 본 발명의 에멀전은 완전히 용해되어 용액 상태의 에멀전 제형(F8)을 형성하였다. 또한 본 발명의 에멀전을 안정성을 관측한 결과, 액적이 구상 형태이고, 평균 지름이 20 내지 1500 nm, 바람직한 지름은 30 내지 50 nm로 측정되어 나노-크기의 액적을 형성하였으며, 좁은 범위의 크기 분포를 나타내었다.

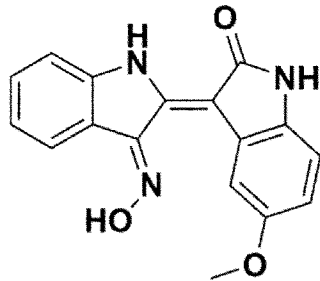
[240] 또한 본 발명의 에멀전은 실온에서 3 달동안 용해도 변화와 유효성분의 활성 변화가 없어 안정성을 장기간 유지하는 것으로 확인되었다. 나아가 본 발명 에멀전 제형을 경구 투여 또는 국소 부위에 도포한 경우, 흡수를 효과적으로 개선시킬 수 있다.

[241]

[242] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

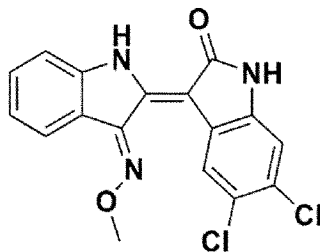
[243] [화학식 1]

[244]



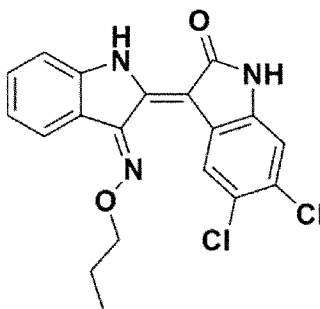
[245] [화학식 2]

[246]



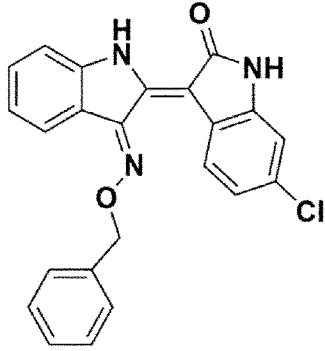
[247] [화학식 3]

[248]



[249] [화학식 4]

[250]



[251] 상기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 장기간 세포에 처리하여도 세포에 의한 독성이 거의 나타나지 않는 물질로, 탁월한 세포 재생, 상처 치유 및 콜라겐 생성 효과를 나타냄을 확인함으로써 상처 예방 또는 상처 치료 가능성을 갖는 약학, 식품, 화장품 등의 다양한 분야에 적용이 가능함을 알 수 있다. 또한 상기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 당뇨 상태에서 유발된 창상에 대해 탁월한 세포 재생, 창상 치유 및 콜라겐 생성 효과를 나타냄을 확인함으로써 당뇨병 창상 예방 또는 치료 효능을 갖는 약학, 식품, 화장품 등의 다양한 분야에 적용이 가능함을 알 수 있다.

[252] 상기 인디루빈 유도체로는 5-메톡실인디루빈-3'-옥심, 5-메톡실인디루빈-3'-메톡심, 인디루빈-3'-옥심, 6-브로모인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-메톡심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-프로필옥심, 6-클로로-5-니트로인디루빈, 6-클로로-5-니트로인디루빈-3'-옥심, 6-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-옥심, 5-브로모인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-에틸옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심프로필옥심 및 6-클로로인디루빈-3'-벤질옥심 등 다양한 인디루빈 유도체들이 존재하나, 이 중에서 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 가장 우수한 상처 치료 및 회복에 유의한 효과가 확인되었다.

[253] 한편, 생체 외(*in vitro*) 실험을 통해 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 처리하는 것이 종래의 다른 인디루빈 유도체를 처리하는 경우에 비해 Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(1.5 배, 2.0배)를 갖고 있으며, 가장 빠르게 상처가 치유되고 있음을 확인하였다.

[254] 또한, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나의 인디루빈 유도체를 마우스의 상처에 도포한 결과, 마우스에 생긴 급성 상처가 양성대조군인 EGF와 동등하거나 더 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되고, 다양한 종류의 콜라겐 조직의 상처 치유 마커들이 증가함을 확인할 수 있다. 구체적으로 화학식 1의 인디루빈 유도체(A3334)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 약간 더 우수한

상처회복 효과를 나타내나, 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지않도록 피부의 표피층이 균일하게 회복되는 '흉터 개선'에 더 효과적이라는 것을 확인하였다.

- [255] 또한 화학식 2의 인디루빈 유도체(A3051)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 동일한 시기에 2배 내지 6배 이상의 상처회복 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 상처를 보다 빠르게 회복시킴을 알 수 있다. 게다가, 양성 대조군인 EGF를 처리하였을 때보다 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지않도록 피부의 표피층이 깨끗하고 균일하게 회복되는 것을 확인하였는 바, EGF를 사용한 것보다 '흉터 개선'에도 매우 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [256] 즉 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 종래 상처치료제 또는 인디루빈 유도체와 달리, 상처 치유뿐만 아니라, 피부 표피층의 균일한 회복을 유도하는 흉터 개선이라는 예상치 못한 현저한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [257] 한편, 당뇨병 상태에서는 여러 가지 원인들로 인해 궤양 등의 상처가 발생할 경우 상처 치유가 현저히 지연되는 현상이 발생하며, 후술하는 실험예를 통해 실질적으로 확인하였다. 그러나 화학식 1 내지 4 중에서 어느 하나의 인디루빈 유도체를 처리하는 경우, 종래 윈트 신호전달계 활성화제인 VPA 보다 당뇨병성 창상 치료, 개선 또는 예방 효능이 현저히 뛰어남을 확인하였다.
- [258] 본 발명에 따른 조성물은 정상 상태 및 당뇨 상태에서 유발된 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 하는 케라티노사이트와 섬유아세포에서, 세포의 운동성을 극대화할 뿐만 아니라 콜라겐 축진 및 축적도 증가시키는 효과를 갖는다.
- [259] 본 발명은 쉬나무 추출물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있다.
- [260] 먼저, 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 추출물을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(2 배)를 갖고 있음을 확인하였다.
- [261] 특히, 쉬나무 추출물만을 단독으로 처리하였을 때와 인디루빈 유도체를 단독으로 처리하였을 때보다, 이들의 복합물을 처리하였을 때 약 1.5~2배 더 높은 수치를 나타냈다. 즉, 본 발명의 상처 치료용 조성물은 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 각각 사용하는 것보다 현저한 효과를 가지며, 이는 각각의 조성물로부터 얻는 수치를 단순히 합한, 예상가능한 수치를 넘어선 것임을 확인하였다.

- [262] 또한, 동물실험을 통해서도 쉬나무 추출물 또는 인디루빈 유도체 단독보다 인디루빈 유도체와의 복합물이 현저한 효과를 가지고 있으므로, 보다 바람직하다는 것을 알 수 있다.
- [263] 상기 추출물은 쉬나무의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것일 수 있고, 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [264] 본 발명은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(1.4~2.3 배)를 갖고 있으며, 6시간 더 빠르게 상처가 치유되고 있음을 확인하였다. 다시 말해 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상과 함께 인디루빈 유도체가 사용되는 것이 가장 바람직함을 실험을 통해 확인하였다.
- [265] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 혼합된 복합물은 후술하는 실험예에서와 같이, 상기 저분자 화합물을 단독 또는 화학식 2로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 혼합한 복합물에 의한 세포 이동성을 분석한 결과 18 시간 만에 세포 이동성이 회복됨을 확인하였다. 특히 메틸 바닐레이트과 인디루빈 유도체(A3051)를 혼합할 경우에는, 아무것도 처리하지 않은 대조군(세포)에 비해 5배 더 높은 결과를 나타냄을 확인하였다.
- [266] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물은 쉬나무 추출물, 지구자 추출물, 감귤 추출물, 편축 추출물, 여뀌 추출물 및 어성초 추출물에 포함되어 있는 성분으로, 상기 추출물은 쉬나무, 지구자, 감귤, 편축, 여뀌 및 어성초로부터 선택되는 어느 하나 이상의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.

- [267] 상기 메틸 바닐레이트는 지구자 추출물에 주로 존재하고, 상기 헤스페리딘은 쉬나무 추출물, 감귤 추출물에 존재하며, 상기 케르시트린은 여뀌 추출물, 편측 추출물, 어성초 추출물에 주로 존재할 수 있다.
- [268] 상기 조성물에 쉬나무 추출물이 더 포함되는 경우에는, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 추출물의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 추출물과 인디루빈 유도체는 상기 추출물의 건조 중량부 10을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 5 내지 15 중량부로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.
- [269] 또한, 상기 조성물에 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 케르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 경우, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 케르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체는 상기 저분자 화합물 1 몰을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 1 내지 20 몰 비로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.
- [270] 상기 조성물에 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물이 포함되는 농도는 당업계에서 일반적인 범위라면 특별히 제한되지 않으나, 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물은 조성물 전체 중량에 대하여 건조 중량으로 0.001 내지 5 중량% 또는 액상 중량으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 5 중량%(건조 중량) 또는 50 중량%(액상 중량)을 초과할 경우 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [271] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 식물추출물로 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [272] 본 발명의 상기 인디루빈 유도체가 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.001 내지 80%의 비율로 첨가할 수 있다.
- [273] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)

등을 들 수 있다.

- [274] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [275] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [276] 상기 식품 조성물은 바람직하게 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형일 수 있다.
- [277] 상기 에멀전 제형에 있어서, 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 상기 에멀전 제형의 조성은 에멀전 시스템의 조성을 결정하는 통상의 방법에 따라 작성된 유사 3상 다이어그램에 의해 결정될 수 있다. 구체적으로 오일 상(폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL)) 및 계면활성제(예를 들어 트윈(tween) 80 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합물)를 특정 비율 범위의 상이한 중량비율로 완전히 혼합한 후, 물을 각 비율의 오일 및 계면활성제 혼합물에 첨가하면서 에멀전 형성 영역에 해당하는 점을 표시함으로써 유사 3상 다이어그램을 작성할 수 있다. 작성된 유사 3상 다이어그램에서 에멀전 영역을 결정하여 이 영역에 포함되는 조성 중 특정 조성을 선택하여, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 케르시트린의 복합물)을 용해시키는 에멀전 제형의 조성으로 결정할 수 있다.
- [278] 만약 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 케르시트린의 복합물)은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.
- [279] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유화제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기 위해 p-당단백질 억제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품

의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

[280] 또한, 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

[281] 본 발명의 실시예에서 사용한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)이고, 폴리에틸렌글리콜은 PEG 400으로, 이는 양친매성 성질을 가지고, 물에서 분산가능한 비-이온성으로, 난용성 유효성분(인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유효성분)에 최적화된, 에멀전 제형을 제공할 수 있다.

[282] 상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[283] 상기 조성물은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다. 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부일 수 있다.

[284] 상기 에멀전 제형은 3 달째에 측정했을 때 온도 4 내지 25°C 조건하에 증류수에서 wnt 활성 및 용해도의 변화가 나타내지 않는 안정한 제형으로, 유효성분의 활성을 오랜기간 유지할 수 있게 하며, 생체 내로의 흡수를 효과적으로 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

[285]

[286] 또한, 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 개선용 에멀전 식품 조성물의 제조방법은 다음과 같다.

[287] 1) 오일, 계면활성제와 폴리에틸렌글리콜을 혼합하여 제1 용액을 제조하는 단계;

[288] 2) 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 제2 용액을 제조하는 단계;

[289] 3) 상기 제1 용액에 제2 용액을 혼합하여 에멀전 조성물을 제조하는 단계;를 포함한다.

[290] 상기 제2 용액에는 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수

있다.

[291] 상기 제2 용액은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다.

[292] 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가 된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

[293] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유화제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기 위해 p-당단백질 억제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품 의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

[294] 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 만약, 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린의 복합물)은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.

[295] 본 발명의 에멀전 조성물에 물을 첨가하여 현미경 사진을 찍어 비교한 결과, 본 발명의 에멀전은 완전히 용해되어 용액 상태의 에멀전 제형(F8)을 형성하였다. 또한 본 발명의 에멀전을 안정성을 관측한 결과, 액적이 구상 형태이고, 평균 지름이 20 내지 1500 nm, 바람직한 지름은 30 내지 50 nm로 측정되어 나노-크기의 액적을 형성하였으며, 좁은 범위의 크기 분포를 나타내었다.

[296] 또한 본 발명의 에멀전은 실온에서 3 달동안 용해도 변화와 유효성분의 활성 변화가 없어 안정성을 장기간 유지하는 것으로 확인되었다. 나아가 본 발명 에멀전 제형을 경구 투여 또는 국소 부위에 도포한 경우, 흡수를 효과적으로

개선시킬 수 있다.

[297]

[298] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체는 피부 재생뿐만 아니라, 월등히 우수한 콜라겐 합성 촉진 효과를 나타내므로, 피부 재생 및 탄력 증진을 위한 의약품, 화장품, 건강식품 등의 유효성분으로 사용할 수 있다.

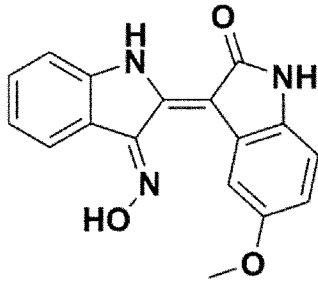
[299]

따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 하는 피부 재생 및 탄력 증진용 조성물에 관한 것이다.

[300]

[화학식 1]

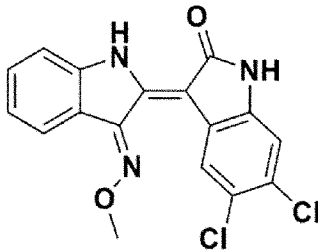
[301]



[302]

[화학식 2]

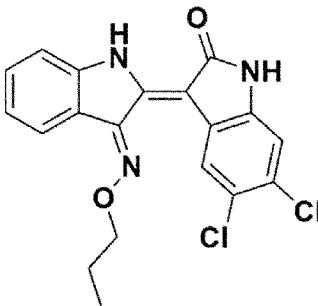
[303]



[304]

[화학식 3]

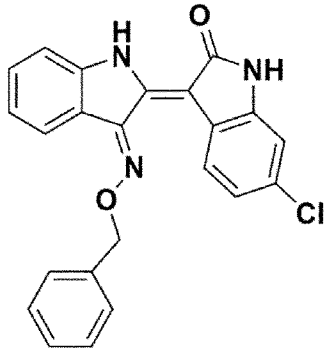
[305]



[306]

[화학식 4]

[307]



[308] 본 발명의 인디루빈 유도체는 장기간 세포에 처리하여도 세포에 의한 독성이 거의 나타나지 않는 물질로, 정상 상태 뿐만 아니라 당뇨 상태에서도 탁월한 세포 재생, 상처 치유 및 콜라겐 생성 효과를 나타냄을 확인함으로써 상처 예방 또는 상처 치료 뿐만 아니라, 피부 재생 및 탄력 증진 기능을 갖는 약학, 식품, 화장품 등의 다양한 분야에 적용이 가능함을 알 수 있다.

[309] 본 명세서에서, '피부 재생'이라 함은 피부의 손상을 경감, 제거, 완화, 개선하는 것을 의미하는 것이고, '탄력 증진'이라 함은 피부의 탄력과 관련된 능력을 유지 및 강화시키는 것을 의미한다. 이는 피부 진피층의 교원섬유인 콜라겐(collagen)이 그러한 역할을 하는 주요 단백질로서 피부 탄력을 주관하는데, 콜라겐의 생합성은 피부의 내, 외적 영향을 받게 된다. 구체적으로, 피부세포는 자연 노화로 인하여 세포 활성이 감소되면 콜라겐 섬유의 감소가 일어나거나, 또는 외적요인으로서 자외선의 과량 조사되거나 피수가 손상되거나, 스트레스 등에 의해 생성된 활성 산소가 단백질의 티올기(thiol: -SH)와 반응하여 효소 활성을 저해하거나, 콜라겐 등의 분해 효소의 발현을 증가시켜 피부의 주름을 증가시키고 탄력을 감소시켜 피부 노화가 진행된다.

[310] 상기 인디루빈 유도체로는 5-메톡실인디루빈-3'-옥심, 5-메톡실인디루빈-3'-메톡심, 인디루빈-3'-옥심, 6-브로모인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-메톡심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-프로필옥심, 6-클로로-5-니트로인디루빈, 6-클로로-5-니트로인디루빈-3'-옥심, 6-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-클로로인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-옥심, 5-브로모인디루빈-3'-메톡심, 5-브로모인디루빈-3'-에틸옥심, 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심프로필옥심 및 6-클로로인디루빈-3'-벤질옥심 등 다양한 인디루빈 유도체들이 존재하나, 이 중에서 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 가장 우수한 상처 치료 및 회복에 유의한 효과가 확인되었다.

[311] 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 마우스의 상처에 도포한 결과, 마우스에 생긴 급성 상처가 양성대조군인 EGF와 동등하거나 더 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되고, 다양한 종류의 콜라겐 활성이 증진됨을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 조성물은 상처 치유에

있어서 중요한 역할을 하는 케라티노사이트와 섬유아세포에서, 세포의 운동성을 극대화할 뿐만 아니라 콜라겐 축진 및 축적도 증가시키는 효과를 가짐을 확인하였는 바, 피부 재생 및 탄력 증진을 위한 의약품, 화장품, 건강식품 등의 유효성분으로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

- [312] 또한, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 당뇨병 동물모델의 상처에 도포한 결과, 빠르게 재상피화되고, 콜라겐 활성을 증진하며, 케라티노사이트와 섬유아세포에서 세포의 운동성을 극대화함을 확인하였다. 이는 종래 윈트 신호전달계 활성화제인 VPA 보다 당뇨병 상태에서 피부 재생 및 탄력 증진 효능이 현저히 뛰어남을 확인하였다.
- [313] 상기 본 발명에 사용된 인디루빈 유도체는 유리 물질로서 뿐만 아니라 그의 약학적으로 허용가능한 염, 약학적으로 허용가능한 용매화물, 약학적으로 허용가능한 다형체 또는 약제학적으로 허용 가능한 전구약물로서 제공될 수 있다. 상기 인디루빈 유도체의 염에 있어서는 의약 또는 화장품 내에서 배합할 수 있는 형태이면 특별히 제한되지 않는다. 무기염 또는 유기염을 포함하며, 산성염 또는 알칼리성염일 수 있다. 특히 양이온에 의한 염인 경우 나트륨염이나 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘염, 마그네슘염 및 바륨염 등의 알칼리토류 금속염; 아르기닌이나 라이신 등의 염기성 아미노산염; 암모늄염이나 트리시클로헥실암모늄염 등의 암모늄염; 모노에탄올아민염, 디에탄올아민염, 트리에탄올아민염, 모노이소프로판올아민염, 디이소프로판올아민염 및 트리아이소프로판올아민 등의 각종 알칸올 아민염일 수 있다. 바람직하게 상기 염은 알칼리 금속염이며, 더욱 바람직하게는 테트라소듐염일 수 있다.
- [314] 상기 조성물에서 인디루빈 유도체는 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 내지 80 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 예방 또는 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 80 중량%를 초과할 경우 과도하게 포함되어 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [315] 본 발명은 쉬나무 추출물을 더 포함한 복합물일 수 있고, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물을 더 포함한 복합물일 수 있다.
- [316] 먼저, 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 상처 치유에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 추출물을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 치유 효과(2 배)를 갖고 있음을 확인하였다.
- [317] 특히, 쉬나무 추출물 또는 인디루빈 유도체를 단독으로 처리하였을 때, 각각을 합한 것보다, 이들의 복합물을 처리하였을 때 약 1.5~2배 현저히 유의한 수치를 나타냈다.
- [318] 또한, 동물실험을 통해서도 쉬나무 추출물 또는 인디루빈 유도체 단독보다

인디루빈 유도체와의 복합물이 현저한 효과를 가지고 있으므로, 보다 바람직하다는 것을 알 수 있다.

- [319] 상기 추출물은 쉬나무의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로 한 것일 수 있고, 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.
- [320] 상기 조성물에 쉬나무 추출물이 더 포함되는 경우에는, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체와 상기 추출물의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 추출물과 인디루빈 유도체는 상기 추출물의 건조 중량부 10을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 5 내지 15 중량부로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.
- [321] 본 발명은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함한 복합물일 수 있고, 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린과 인디루빈 유도체를 일정 비율로 혼합한 복합물일 경우, 피부 재생 및 탄력 증진에 대해 탁월한 효과를 나타낸다. 구체적으로 생체 외(in vitro) 실험에서 상기 인디루빈 유도체와 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린을 함께 처리하였을 때, 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에 비해, Wound closure rate(%)가 향상되고, 상처 치유 효과 역시 단순한 상승효과 이상의 피부 재생 효과(1.4~2.3 배)를 갖고 있으며, 6시간 더 빠르게 캐라티노사이트의 운동성을 증진하고 있음을 확인하였다. 다시 말해 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린 중에서 어느 하나 이상과 함께 인디루빈 유도체가 사용되는 것이 가장 바람직함을 실험을 통해 확인하였다.
- [322] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린과 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체가 혼합된 복합물은 후술하는 실험예에서와 같이, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린 단독 또는 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 혼합한 복합물에 의한 세포 이동성을 분석한 결과 18 시간 만에 세포 이동성이 회복됨을 확인하였다. 특히 메틸 바닐레이트와 인디루빈 유도체(A3051)를 혼합할 경우에는, 아무것도 처리하지 않은 대조군(세포)에 비해 5배 더 높은 결과를 나타냄을 확인하였다.
- [323] 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물은 쉬나무 추출물, 지구자 추출물, 감귤 추출물, 편축 추출물, 여뀌 추출물 및 어성초 추출물에 포함되어 있는 성분으로, 상기 추출물은 쉬나무, 지구자, 감귤, 편축, 여뀌 및 어성초로부터 선택되는 어느 하나 이상의 줄기, 잎, 과실, 이의 분쇄물 및 이의 혼합물을 원료로

한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 상기 원료를 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 및 1,3-부틸렌글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 추출용매로 사용하여 추출한 것일 수 있다.

- [324] 상기 메틸 바닐레이트는 지구자 추출물에 주로 존재하고, 상기 헤스페리딘은 쉬나무 추출물, 감귤 추출물에 존재하며, 상기 퀘르시트린은 여뀌 추출물, 편축 추출물, 어성초 추출물에 주로 존재할 수 있다.
- [325] 상기 조성물에 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 경우, 화학식 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상으로 표시되는 인디루빈 유도체과 상기 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 저분자 화합물과의 혼합 중량비는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 저분자 화합물과 인디루빈 유도체는 상기 저분자 화합물 1 몰을 기준으로 상기 인디루빈 유도체가 1 내지 20 몰 비로 혼합되는 것이 바람직하고, 상기 범위를 벗어날 경우 상처 치유 효과의 증가가 미미해질 수 있다.
- [326] 상기 조성물에 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물이 포함되는 농도는 당업계에서 일반적인 범위라면 특별히 제한되지 않으나, 상기 쉬나무 추출물 또는 저분자 화합물은 조성물 전체 중량에 대하여 건조 중량으로 0.001 내지 5 중량% 또는 액상 중량으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있는데, 만약 0.01 중량% 미만이면 충분한 상처 치유 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 5 중량%(건조 중량) 또는 50 중량%(액상 중량)을 초과할 경우 피부 자극이 유발될 수 있다.
- [327] 본 발명에 따른 상기 화장료 조성물에 있어서, 상처 개선을 통한 미용 효과를 상승시킬 수 있는 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [328] 본 발명에 따른 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 젤, 파우더, 파운데이션 또는 세정제 제형으로 제조될 수 있고, 예를 들어 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워젤, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제화장용, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누비의료용, 크림비누, 페이스 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [329] 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수

있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.

- [330] 상기 오일은 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸텔릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.
- [331] 상기 지방산은 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며, 상기 지방산 에스테르는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 또한, 상기 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비 이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.
- [332] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 항산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.
- [333] 그러나 본 발명의 조성물은 피부에 직접 도포 또는 산포하는 등의 방법에 의해 사용될 수 있다.
- [334] 본 발명은 또한 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 하는 피부 재생 및 탄력 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 식품 조성물이란, 상기 인디루빈 유도체를 포함하는 조성물을 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리 또는 바(bar) 형태로 제제화 한 것일 수 있고, 또는 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하여 일반 식품 형태로 제조한 것으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.
- [335] 상기 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 식품 조성물에 있어서의 상기 인디루빈 유도체의 첨가량은, 대상인 식품 조성물의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.001 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리 또는 바(bar) 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.
- [336] 상기 식품 조성물은 유효성분으로서 상기 인디루빈 유도체뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는

모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.

- [337] 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 건강기능식품이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 조성물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [338] 본 발명의 피부 재생 또는 탄력 증진 조성물은 바람직하게 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형일 수 있다.
- [339] 상기 에멀전 제형에 있어서, 상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5일 수 있고, 더욱 바람직하게는 10-20 : 1 : 2-2.5일 수 있다. 상기 에멀전 제형의 조성은 에멀전 시스템의 조성을 결정하는 통상의 방법에 따라 작성된 유사 3상 다이어그램에 의해 결정될 수 있다. 구체적으로 오일 상(폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL)) 및 계면활성제(예를 들어 트윈(tween) 80 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합물)를 특정 비율 범위의 상이한 중량비율로 완전히 혼합한 후, 물을 각 비율의 오일 및 계면활성제 혼합물에 첨가하면서 에멀전 형성 영역에 해당하는 점을 표시함으로써 유사 3상 다이어그램을 작성할 수 있다. 작성된 유사 3상 다이어그램에서 에멀전 영역을 결정하여 이 영역에 포함되는 조성 중 특정 조성을 선택하여, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린의 복합물)을 용해시키는 에멀전 제형의 조성으로 결정할 수 있다.
- [340] 만약 상기 조성물이 에멀전 제형일 경우, 상기 유효성분(인디루빈 유도체 또는 인디루빈 유도체와 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린의 복합물)은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.
- [341] 상기 계면활성제는 트윈 계열의 비이온성 계면활성제로 보조용해제 역할을 하며, 제약에서는 경구나 비경구 제제의 유화제 또는 습윤제로 사용되고, 화장품이나 식품에서도 첨가물로 사용된다. 또한 약물의 생체이용률을 높이기 위해 p-당단백질 억제제를 위한 물질로 사용되기도 한다. 트윈 계열의 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을

포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 트윈 계열의 계면활성제는 미국 식품 의약국에서 인체의 정맥주사에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

- [342] 또한, 상기 폴리에틸렌글리콜은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 상기 폴리에틸렌글리콜은 저분자량일 경우에는 액체이지만 분자량이 커지면서 고체가된다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 PEG 150, 300, 400, 1000, 6000, 8000, 10000, 20000, 30000 및 40000로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다, 이때, 상기 PEG300 이란 분자량이 300인 폴리에틸렌글리콜을 의미하며, 분자량이 10,000을 초과하는 폴리에틸렌글리콜은 폴리에틸렌옥사이드(PEO)라고 칭하기도 한다. 이들 중에서 PEG400은 액체의 형태로 존재하며, 각종 난용성 약물의 가용화에 빈번히 사용되고 있고, 특히 미국 식품 의약국(FDA)에서 인체의 경구 및 비경구(정맥주사, 피하주사, 근육주사 등)에 사용을 허가한 안정한 물질이다.

- [343] 본 발명의 실시예에서 사용한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)이고, 폴리에틸렌글리콜은 PEG 400으로, 이는 양친매성 성질을 가지고, 물에서 분산 가능한 비-이온성으로, 난용성 유효성분(인디루빈 유도체, 쉬나무 추출물, 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유효성분)에 최적화된, 에멀전 제형을 제공할 수 있다.

- [344] 상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [345] 상기 조성물은 더 높은 가용화를 위해 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 포함할 수 있다. 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부일 수 있다.

- [346] 상기 에멀전 제형은 3 달째에 측정했을 때 온도 4 내지 25°C 조건하에 증류수에서 wnt 활성 및 용해도의 변화가 나타내지 않는 안정한 제형으로, 유효성분의 활성을 오랜기간 유지할 수 있게 하며, 생체 내로의 흡수를 효과적으로 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

발명의 실시를 위한 형태

- [347] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

- [348] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

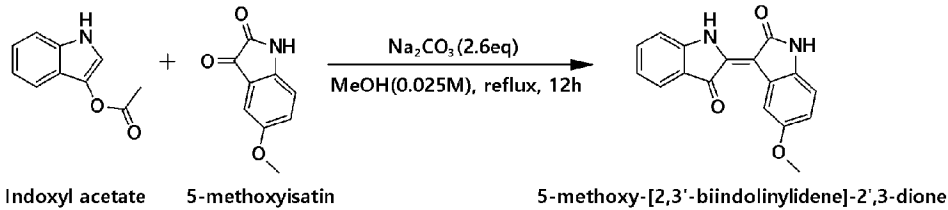
[349]

[350] 실시에 1. 5-메톡실인디루빈-3'-옥심(A3334)의 합성

[351] ① 중간체

5'-메톡시-[2,3'-바이인돌리닐리딘]-2',3-다이온(5'-methoxy-[2,3'-biindolinylidene]-2',3-dione)의 합성

[352]



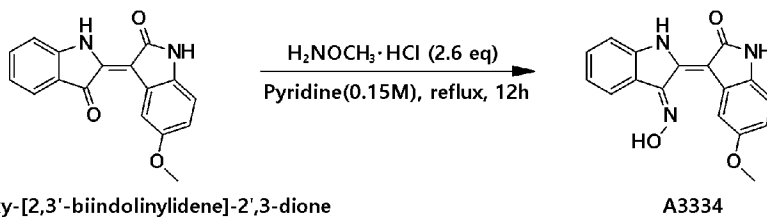
[353]

250 ml 둥근바닥 플라스크에 5-메톡시이사틴(5-methoxyisatin)(1000 mg, 5.65 mmol)을 넣고 메탄올(MeOH)(225 ml)에 녹인 뒤, 인독실아세테이트(indoxyl acetate)(989 mg, 5.65 mmol) 과 탄산나트륨(Na_2CO_3)(1496 mg, 14.11 mmol)을 첨가하여 65 °C에서 12시간 동안 교반 한다. TLC($R_f=0.4$,에틸아세테이트/헥산 = 1/2 (v/v))를 이용하여 반응의 종결을 확인하고, 생성물을 얼음에서 결정 덩어리가 생길 때까지 식혀준다. 결정체가 생기면 여과시켜 용매를 제거한 후, 여과액은 버리고 생성물을 용매(에탄올/물 = 1/1(v/v))로 여러 번 씻어 준다. 생성물을 여과하여 진공 펌프에서 건조시킨 다음 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[354]

② A3334의 합성

[355]



[356]

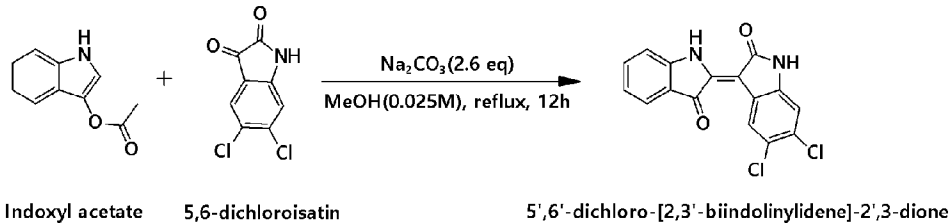
100 ml 둥근바닥 플라스크에 5'-메톡시-[2,3'-바이인돌리닐리딘]-2',3-다이온(5'-methoxy-[2,3'-biindolinylidene]-2',3-dione)(670 mg, 2.29 mmol)을 넣고 피리딘(pyridine)(27 ml)에 녹인 다음 $\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$ (3186 mg, 45.85 mmol)을 첨가한 후, 120 °C에서 12시간 동안 교반 한다. TLC($R_f=0.5$, 에틸아세테이트/헥산= 1/1 (v/v))를 이용하여 반응의 종결을 확인하고 반응 용액의 온도를 실온으로 낮춘다. 생성물의 피리딘 용매를 모두 증발한 뒤 물과 에틸아세테이트를 넣어 30분 동안 초음파를 이용하여 생성물을 용해 한 뒤, 에틸아세테이트로 두 번에 걸쳐 추출하고 중조(NaHCO_3) 포화용액으로 씻어준다. 추출한 용액을 무수황산마그네슘으로 탈수 한 뒤, 용매를 증발시키고 메탄올과 헥산을 이용해 재결정 해 준다. 생성물을 진공펌프에서 건조시키면 붉은색 고체 A3334를(420 mg) 59%의 수율로 얻을 수 있다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.52 (s, 1H), 11.79 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 8.35 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 7.08 - 7.00 (m, 1H), 6.82 - 6.71 (m, 2H), 3.78 (s, 3H).

[357]

[358] 실시예 2. 5,6-디클로로인디루빈-3'-메톡심(A3051)의 합성.

[359] ① 중간체 5',6'-다이클로로-[2,3'-바이인돌리닐리덴]-2',3-다이온(5',6'-dichloro-[2,3'-biindolinylidene]-2',3-dione)의 합성

[360]



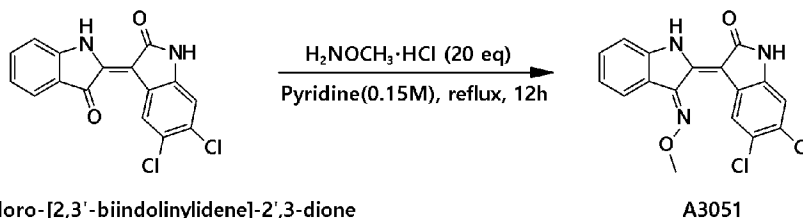
[361]

250 ml 둥근바닥 플라스크에 5,6-다이클로로이사틴(5,6-dichloroisatin) (500 mg, 2.32 mmol)을 넣고 메탄올(MeOH)(92.80 ml)에 녹인 뒤, 인독실아세테이트(indoxyl acetate)(405.48 mg, 2.315 mmol) 과탄산나트륨(Na_2CO_3)(637.83 mg, 6.02 mmol)을 첨가하여 65 °C에서 12시간 동안 교반한다. TLC($R_f=0.4$, 에틸아세테이트/헥산 = 1/2 (v/v))를 이용하여 반응의 종결을 확인하고, 생성물을 얼음에서 결정 덩어리가 생길 때까지 식혀준다. 결정체가 생기면 여과시켜 용매를 제거한 후, 여과액은 버리고 생성물을 용매(에탄올/물 = 1/1(v/v))로 여러 번 씻어 준다. 생성물을 여과하여 진공 펌프에서 건조시킨 다음 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[362]

② A3051의 합성

[363]



[364]

100 ml 둥근바닥 플라스크에 5',6'-다이클로로-[2,3'-바이인돌리닐리덴]-2',3-다이온(5',6'-dichloro-[2,3'-biindolinylidene]-2',3-dione)(600 mg, 1.81 mmol)을 넣고 피리딘(pyridine)(151 ml)에 녹인 다음 $\text{H}_2\text{NOCH}_3\cdot\text{HCl}$ (3026.4 mg, 36.24 mmol)을 첨가한 후, 120 °C에서 12시간 동안 교반 한다. TLC($R_f=0.4$, 에틸아세테이트/헥산 = 1/1 (v/v))를 이용하여 반응의 종결을 확인하고 반응 용액의 온도를 실온으로 낮춘다. 생성물의 피리딘 용매를 모두 증발한 뒤 물과 에틸아세테이트를 넣어 30분 동안 초음파를 이용하여 생성물을 용해 한 뒤, 에틸아세테이트로 두 번에 걸쳐 추출하고 중조(NaHCO_3) 포화용액으로 씻어준다. 추출한 용액을 무수황산마그네슘으로 탈수 한 뒤, 용매를 증발시키고 메탄올과 헥산을 이용해 재결정 해 준다. 생성물을 진공펌프에서 건조시키면 붉은색 고체 A3051을(326 mg) 47.94%의 수율로 얻을 수 있다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.36 (s, 2H), 8.80 (s, 1H), 8.08 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.46 - 7.41 (m, 2H), 7.07 - 6.99 (m, 2H), 4.38 (s, 3H).

[365]

- [366] 실시예 3 및 4. 화학식 3 및 화학식 4의 인디루빈 유도체의 제조
- [367] 화학식 3의 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심프로필옥심(A3486)과 화학식 4의 6-클로로인디루빈-3'-벤질옥심(A3538)은 상기 5,6-디클로로인디루빈-3'-메톡심 또는 5-메톡심인디루빈-3'-옥심과 동일한 방식으로 합성되었고, 이는 황화디메틸(DMSO)에 녹여 실험에 적용하였다.
- [368]
- [369] 실시예 5. 메틸 바닐레이트(methyl vanillate) 준비
- [370] 메틸 바닐레이트(Methyl vanillate)를 sigma aldrich에서 구입하여 사용하였다.
- [371]
- [372] 실시예 6. 헤스페리딘(hesperidin) 준비
- [373] 헤스페리딘(hesperidin)을 sigma aldrich에서 구입하여 사용하였다.
- [374]
- [375] 실시예 7. 퀘르시트린(Quercitrin) 준비
- [376] 퀘르시트린(Quercitrin)를 sigma aldrich에서 구입하여 사용하였다.
- [377]
- [378] 실시예 8. 쉬나무 추출물 제조
- [379] 쉬나무 추출물을 한국식물추출물은행(KOREA PLANT EXTRACT BANK)에서 구입하여 사용하였다.
- [380]
- [381] 실시예 9 내지 11. 복합물 제조.
- [382] 상기 실시예 5로부터 제조된 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린과 실시예 2의 화학식 2로 표시되는 인디루빈 유도체(A3051)를 적정 비율로 혼합하여 복합물을 제조하였다.
- [383]
- [384] 실시예 12. 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체(A3334)의 복합물 제조
- [385] 실시예 8로부터 제조된 쉬나무 추출물 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml 와 실시예 1의 화학식 1로 표시되는 인디루빈 유도체(A3334) 0.1 μM , 1 μM , 0.5 mM 로 혼합하여 복합물을 제조하였다. 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체 혼합비는 각각의 실험예에 기재하였다.
- [386]
- [387] 실시예 13. 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체(A3051)의 복합물 제조
- [388] 실시예 8로부터 제조된 쉬나무 추출물 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml 와 실시예 2의 화학식 2로 표시되는 인디루빈 유도체(A3051) 0.1 μM , 1 μM , 0.5 mM 로 혼합하여 복합물을 제조하였다. 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체 혼합비는 각각의 실험예에 기재하였다.
- [389]
- [390] 실시예 14. 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체(A3486)의 복합물 제조
- [391] 실시예 8로부터 제조된 쉬나무 추출물 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml 와 실시예 3의

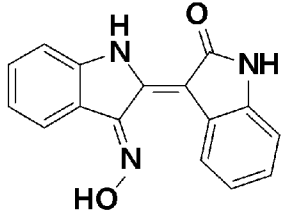
화학식 3으로 표시되는 인디루빈 유도체(A3486) 0.1 μ M, 1 μ M, 0.5 mM로 혼합하여 복합물을 제조하였다. 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체 혼합비는 각각의 실험에 기재하였다.

[392]

[393] **비교예 1. 인디루빈-3'-옥심(I3O 또는 IO)**

[394] [화학식 5]

[395]

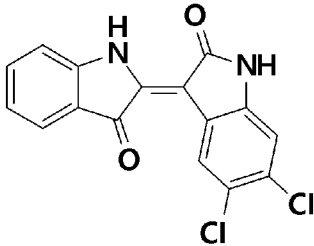


[396]

[397] **비교예 2. 5,6-디클로로인디루빈(A2941)**

[398] [화학식 6]

[399]



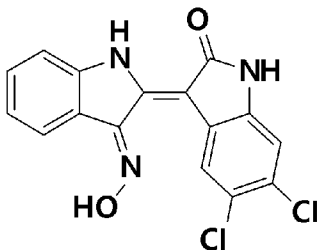
[400] 화학식 6의 5,6-디클로로인디루빈은 실시예 2의 인디루빈 유도체(화학식 2)의 중간체로, 실시예 2-①의 합성과정과 모두 동일하게 하여 제조된 것을 사용하였다.

[401]

[402] **비교예 3. 5,6-디클로로인디루빈-3'-옥심(A3050)**

[403] [화학식 7]

[404]

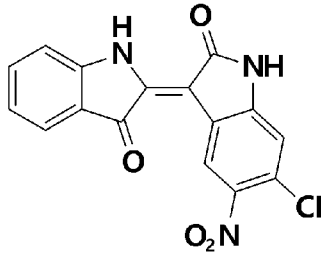


[405]

[406] **비교예 4. 6-클로로-5-니트로인디루빈(A2735)**

[407] [화학식 8]

[408]

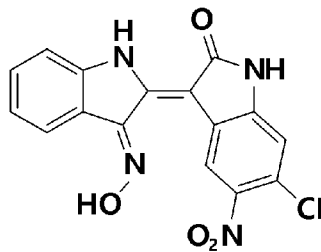


[409]

[410] 비교예 5. 6-클로로-5-니트로인디루빈-3'-옥심(A2736)

[411] [화학식 9]

[412]



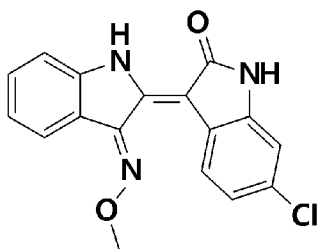
[413] 50ml 둥근바닥 플라스크에 6-클로로-5-니트로인디루빈(A2735)(350mg, 1.02mmol)을 넣고 피리딘(7 ml)에 녹인 다음 $\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$ (711.78 mg, 10.24 mmol)를 첨가한 후, 120 °C 이상에서 12시간 정도 환류시킨다. TLC($R_f=0.5$, 에틸아세테이트/헥산= 1/1(v/v))를 이용하여 반응의 종결을 확인하고 반응 용액의 온도를 실온으로 낮춘다. 생성물의 피리딘 용매를 모두 증발한 뒤 물과 에틸아세테이트를 넣어 30분 동안 초음파를 이용하여 생성물을 용해 한 뒤, 에틸아세테이트로 두 번에 걸쳐 추출하고 중조(NaHCO_3) 포화용액으로 씻어준다. 추출한 용액을 무수황산마그네슘으로 탈수한 뒤, 용매를 증발시키고 메탄올과 헥산을 이용해 재결정하였다. 생성물을 진공펌프에서 건조시키면 빨간색고체 A2736(284 mg)를 78%의 수율로 얻을 수 있다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.81 (s, 1H), 11.77 (s, 1H), 11.30 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 2H), 7.04 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H).

[414]

[415] 비교예 6. 6-클로로인디루빈-3'-메톡심(A2793)

[416] [화학식 10]

[417]

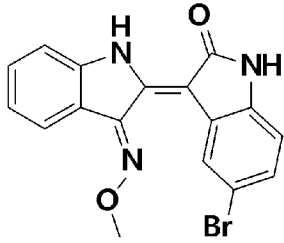


[418]

[419] 비교예 7. 5-브로모인디루빈-3'-메톡심(A3391)

[420] [화학식 11]

[421]

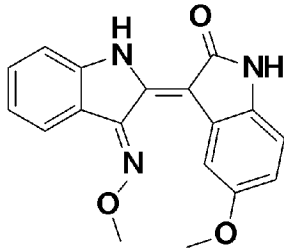


[422]

[423] 비교예 8. 5-메톡실인디루빈-3'-메톡심(A3441)

[424] [화학식 12]

[425]

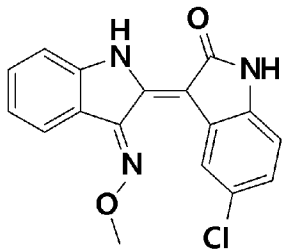


[426]

[427] 비교예 9. 5-클로로인디루빈-3'-메톡심(A3440)

[428] [화학식 13]

[429]

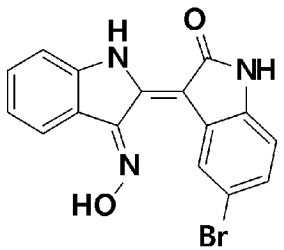


[430]

[431] 비교예 10. 5-브로모인디루빈-3'-옥심(A3390)

[432] [화학식 14]

[433]

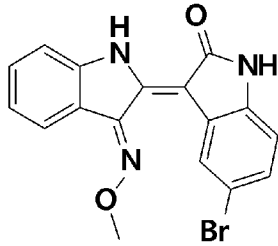


[434]

[435] 비교예 11. 5-브로모인디루빈-3'-에틸옥심(A3472)

[436] [화학식 15]

[437]

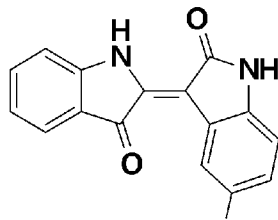


[438]

[439] 비교예 12. 5-메틸인디루빈(A3330)

[440] [화학식 16]

[441]



[442]

[443] 실험예 1. 세포의 운동성 확인.

[444] 실시예 1 내지 실시예 4로부터 제조된 인디루빈 유도체, 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체에 의한, 세포의 이동능을 비교하고자 하였다.

[445] 상처 치유에 있어, 중요한 역할을 하는 HaCaT 세포 즉, 케라티노사이트(human keratinocyte cell)를 12-well plate에서 24 시간 배양하였다. 이 때, 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하였다. 24 시간의 배양 후에 5% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배지를 교환한 다음, 1000p(blue) tip끝을 이용해 세포 가운데에 스크래치를 냈다. 그 후, 스크래치를 낸 부분에 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 12의 인디루빈 유도체를 각각 5 µg/ml, 1 µM 농도로 처리하고 24시간 후 세포의 운동성을 관찰하였다.

[446] 도 1은 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체의 처리에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트에서 세포의 이동능을 나타낸 사진이고, 도 2는 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체의 처리에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트 세포에서 세포의 이동률을 정량적으로 나타낸 그래프이다. 이때 대조군(control)은 인디루빈 유도체를 처리하지 않은 케라티노사이트 세포를 의미한다.

[447] 도 2에서 Wound closure rate(%)는 상처 치유에 중요한 역할을 하는 케라티노사이트에 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체를 각각 처리하였을 때의 결과(도 1)를, 세포의 이동률로 정량화하여 나타낸 것이다.

[448] 도 1에 나타난 바와 같이, 비교예 1 내지 12로부터 제조된 인디루빈 유도체는 대조군 세포와 비교하여 세포의 운동성에 차이가 없음을 확인하였다.

- [449] 이에 반해 실시예 1 내지 실시예 4로부터 제조된 인디루빈 유도체를 각각 처리한 세포에서의 운동성이 대조군 세포에서의 운동성보다 최대 1.5~2배 이상 향상된 것을 확인할 수 있다. 게다가 실시예 1 내지 4의 인디루빈 유도체 A3334, A3051, A3486, A3538을 각각 처리할 경우, 상처치유에 중요한 역할을 하는 케라티노사이트의 세포의 운동성이 다른 유사 인디루빈 유도체에 비해 2 배 이상 향상된 것을 확인하였다.
- [450] 즉, 실시예 1 내지 4의 인디루빈 유도체는, 종래 매우 유사한 구조의 인디루빈 유도체와 비교하였을 때, 전혀 예상할 수 없었던 효과를 나타내고 있음을 확인하였고, 이는 예상되는 효과를 넘어선 현저히 우수한 효과 즉, 유의적 효과의 상승이라 할 것이다.
- [451]
- [452] **실험예 2. 동물실험을 통한 상처 치유 효능 및 콜라겐 축진 효능 확인**
- [453] 실시예 1 및 2로부터 제조된 인디루빈 유도체와 비교예 1의 인디루빈 유도체(IO) 및 종래 상처치료제로 알려진 EGF를 양성대조군으로 하여, 동물실험을 통해 상처 치유축진 효과를 확인하고자 하였다.
- [454] 휴지기에 들어간 7 주령된 C3H 마우스의 등 부위의 모발을 제거하고 모발이제거된 부위에 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 의 상처를 만들었다. 대조군에는 vehicle(10% DMSO, 45% 에탄올, 18% 프로필렌글라이콜, 27% 물)을, 비교군에는 비교예 1의 인디루빈 유도체(IO)를 $20 \mu\text{l}$ 씩 12 일간 매일 1회 도포하였으며, 양성대조군에는 EGF $100 \mu\text{M}$ 를 12일간 매일 1회 도포하였으며, 제1 실험군에는 실시예 2의 인디루빈 유도체(A3051로 표시)를 $20 \mu\text{l}$ 씩 12 일간 매일 1회 도포하였고, 제2 실험군에는 실시예 1의 인디루빈 유도체(A3334로 표시)를 $20 \mu\text{l}$ 씩 12 일간 매일 1회 도포하였다.
- [455] 각각의 실험한 마우스의 조직을 4% 파라포름알데하이드에 담가 고정한 후 파라핀에 포매하고 $4 \mu\text{m}$ 두께로 박편하였다. 박편된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한후 콜라겐의 합성 정도를 평가하기 위해 Masson's trichrome 염색, picosirius red 염색을 실시하였다. Masson's trichrome 염색의 경우, 슬라이드를 Weigert's Iron Hematoxylin Solution에 10분, Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin과 Aniline Blue에 각각 5분 두었다. picosirius red 염색의 경우, Weigert's solution에 8분, picosirius red에 1시간 두었다.
- [456]
- [457] 도 3은 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스 급성 상처 조직에 대하여, 시간의 흐름(0일째, 14일째)에 따라 촬영한 사진 및 염색결과를 나타낸 것이다. 또한 도 3의 하단(collagen staining)에본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스 급성 상처 조직을 Masson's trichrome과, picosirius red로 염색한 결과가 나타나 있다.

- [458] 도 4는 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스 급성 상처 조직에 대하여, 시간의 흐름(1, 3, 5, 9, 12 일)에 따라 측정된 재상피화 정도를 정량화하여 나타낸 그래프이다.
- [459] 도 5는 본 발명에 따른 실시예 1, 실시예 2의 인디루빈 유도체, 비교예 1의 인디루빈 유도체 및 EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스에서, 14일째 상처 크기(cm^2)를 측정한 그래프이다.
- [460]
- [461] 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 실시예 1 및 2로부터 제조된 인디루빈 유도체를 각각 처리하였을 때, 대조군, 비교예 1 및 양성대조군에 비해 마우스 모델에서 급성 상처가 빠르게 치유되는 것을 확인하였다. 즉, 실시예 1 및 2의 인디루빈 유도체를 마우스의 상처에 도포한 결과, 마우스에 생긴 급성 상처가 양성대조군인 EGF와 동등하거나 더 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되고, 다양한 종류의 콜라겐 조직의 상처 치유 마커들이 증가함을 확인할 수 있다.
- [462] 특히 실시예 1의 인디루빈 유도체(A3334)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 약간 더 우수한 상처회복 효과를 나타내나, 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지 않도록 피부의 표피층이 균일하게 회복되는 '흉터 개선' 효과도 나타나는 것을 확인하였다.
- [463] 실시예 2의 인디루빈 유도체(A3051)의 경우에는 양성 대조군인 EGF보다 동일한 시기에 2배 내지 6배 이상의 상처회복 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 상처를 보다 빠르게 회복시킴을 알 수 있다. 게다가, 양성 대조군인 EGF를 처리하였을 때보다 상처가 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지않도록 피부의 표피층이 깨끗하고 균일하게 회복되는 것을 확인하였는 바, EGF를 사용한 것보다 '흉터 개선'에도 매우 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [464] 다시 말해 실시예 1 및 2의 인디루빈 유도체는 종래 상처치료제 또는 인디루빈 유도체와 달리, 상처 치유뿐만 아니라, 피부 표피층의 균일한 회복을 유도하는 흉터 개선이라는 예상치 못한 현저한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [465] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, Masson's trichrome staining, picrosirius red staining, van Gieson staining은 각각 콜라겐의 종류와 양을 확인하기 위한 염색 방법으로서, 실시예 1, 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체, 비교예 1로부터 제조된 인디루빈 유도체와 EGF(양성대조군)을 처리한 마우스의 급성 상처 조직을 상기 두가지 염색 방법으로 확인한 결과, 실시예 1 및 2의 인디루빈 유도체를 처리하였을 때가 세포의 창상 회복도 빠를 뿐만 아니라 콜라겐의 양이 대조군, 비교예 1, 양성대조군에 비해 현저히 증가하였음을 확인할 수 있다.
- [466] 실시예 2로 처리한 마우스 모델과 동일하게 상피세포 성장인자(EGF)로 처리하여 제조된 마우스 모델을 2 가지 염색(Masson's Trichrome, Picrosirius Red)을 통해 비교한 결과, 실시예 1, 2로부터 제조된 인디루빈 유도체를 사용한

것이, 종래 상피세포 성장인자(EGF)를 직접적으로 처리한 경우와 비교예 1의 인디루빈 유도체를 처리한 경우보다 우수한 상처 치유 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다.

[467]

[468] 실험예 3. 인디루빈 유도체(화학식 1 또는 2)의 복합물을 유효성분으로 하는 조성물의 상처치유 효능 분석

[469] 상처치유 효능을 분석하고자, 실시예 2으로부터 제조된 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물들을 처리하였을 때, 세포의 이동능을 비교하고자 하였다.

[470] 상처 치유에 있어, 중요한 역할을 하는 HaCaT 세포 즉, 케라티노사이트(human keratinocyte cell)를 12-well plate에서 24 시간 배양하였다. 이 때, 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하였다. 24 시간의 배양 후에 5% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배지를 교환한 다음, 1000p(blue) tip끝을 이용해 세포 가운데에 스크래치를 냈다. 그 후, 스크래치를 낸 부분에 실시예 2으로부터 제조된 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물을 각각 1 μ M 또는 5 μ M 농도로 처리하고 18시간 후 세포의 운동성을 관찰하였다.

[471] 구체적으로 실시예 2으로부터 제조된 인디루빈 유도체, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린은 1 μ M를 사용하였고, 실시예 5의 메틸 바닐레이트는 5 μ M을 사용하였으며, 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물은 1 μ M 인디루빈 유도체에, 5 μ M 메틸 바닐레이트, 1 μ M 헤스페리딘 또는 1 μ M 퀘르시트린을 혼합하여 제조한 것을 사용하였다.

[472] 도 6a는 실시예 2으로부터 제조된 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물의 처리에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트에서 세포의 이동능을 나타낸 사진이고, 도 6b는 실시예 2으로부터 제조된 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물의 처리에 따른 세포의 이동능을 확인하기 위하여, 케라티노사이트 세포에서 세포의 이동률을 정량적으로 나타낸 그래프이다. 이때 대조군(control)은 아무것도 처리하지 않은 케라티노사이트 세포를 의미한다. Wound closure rate(%)는 상처 치유에 중요한 역할을 하는 케라티노사이트에 실시예 2으로부터 제조된 인디루빈 유도체, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린 및 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물들을 각각 처리하였을 때의 결과(도 6)를, 세포의 이동률로 정량화하여 나타낸 것이다.

[473] 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린을 단독으로 처리한 것과 대조군 세포와 비교하였을 때,

세포의 운동성에 차이가 없음을 확인하였다.

[474] 이에 반해 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물을 처리한 세포에서의 운동성이 대조군 세포에서의 운동성보다 최대 2.5~4배 이상 향상된 것을 확인할 수 있다.

[475] 본 실험은 세포에 각각의 유효성분을 처리하고, 앞선 도 1의 실험보다 6시간 더 빠른 18시간이 지난 후 측정된 것으로, 실시예 2의 인디루빈 유도체 A3051를 단독으로 세포에 처리하였을 때보다도 실시예 9 내지 11로부터 제조된 복합물을 처리한 경우가, 상처치유에 중요한 역할을 하는 케라티노사이트의 세포의 운동성을 더 빠르고, 더 많이(1.4~2.3 배 이상) 향상시켰음을 확인하였다.

[476] 즉, 실시예 2의 인디루빈 유도체 또는 실시예 5의 메틸 바닐레이트, 실시예 6의 헤스페리딘, 실시예 7의 퀘르시트린을 각각 단독으로 처리하였을 때에 비해, 전혀 예상할 수 없었던 효과(세포의 운동성 회복 시간 단축과 운동성 회복(2.5~4배))를 나타내고 있음을 확인하였고, 이는 예상되는 효과를 넘어선 현저히 우수한 효과 즉, 유의적 효과의 상승이라 할 것이다.

[477]

[478] **실험예 4. 동물실험을 통한 복합물의 상처 치유 효능 확인**

[479] 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물(A3051 0.5 mM, Methyl vanillate 3 또는 5 mM) 및 종래 상처치료제로 알려진 EGF(양성 대조군1)과 PTD+VPA(Arg Lys Thr Gly His Gln Ile Cys Lys Phe Arg Lys Cys)으로 표시되는 세포 투과성 펩타이드와 발프로익산의 복합물, 양성 대조군2)를 동물모델에 처리하고, 이를 통해 상처 치유촉진 효과를 확인하고자 하였다.

[480] 휴지기에 들어간 7주령된 C3H 마우스의 등 부위의 모발을 제거하고 모발이 제거된 부위에 1.5 × 1.5 cm²의 상처를 만들었다. 양성 대조군에는 EGF 100 μM 또는 PTD+VPA를 12일간 매일 1회 도포하였으며, 실험군에는 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물을 20 μl씩 12일간 매일 1회 도포하였다.

[481] 각각의 실험한 마우스의 상처 크기를 측정하고, 상처 조직을 4% 파라포름알데하이드에 담가 고정한 후 파라핀에 포매하고 4 μm 두께로 박편하였다. 박편된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한 후 재상피화 정도를 분석하였다.

[482]

[483] 도 7은 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물, EGF(양성 대조군)을 마우스 급성 상처에 각각 처리하고, 시간별(0일째, 12일째)로 촬영한 사진 및 염색결과를 나타낸 것이다. 또한 도 7의 하단 좌측 그래프는 본 발명에 따른 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물, EGF(양성 대조군)을 마우스 급성 상처에 각각 처리하고,

시간별(0일째, 12일째)로 재상피화 정도를 정량화하여 나타낸 그래프이다. 도 7의 하단 우측 그래프는 본 발명에 따른 실시예 2의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물, EGF(양성 대조군)을 처리한 마우스에서, 1일째와 12일째 상처 크기(mm)를 측정한 그래프이다. 이때 대조군(con)은 시료가 첨가되지 않은 용액을 처리한 것으로, con(양성대조군 부형제)는 EGF를 제외한 증류수, propylene glycol, 에탄올 3 : 2 : 5 부피비로 구성된 부형제를 도포한 것이고, con(검체 부형제)는 Kollipore®EL:Tween 80:PEG400를 80:6:14 중량비로 혼합된 에멀전 용액을 도포한 것이다.

[484] 즉, 실시예 2, 5, 9는 해당 농도로 제조하기 위하여 '에멀전 용액'에 적절한 농도를 첨가하여 제형화한 것을 사용하였다.

[485] 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM)는 A3051로 표시되어 있고, 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM)을 처리한 군은 M2.5와 M5로 표시되어 있으며, 실시예 9로부터 제조된 복합물은 M2.5+A3051 또는 M5+A3051로 표시되어 있다.

[486] 도 7에 나타난 바와 같이, 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 5의 메틸 바닐레이트(2.5 mM, 5 mM), 실시예 9로부터 제조된 복합물을 각각 처리하였을 때, 대조군 및 양성대조군에 비해 마우스 모델에서 급성 상처가 빠르게 치유되는 것을 확인하였다. 상기 물질들을 각각의 실험동물에 처리하고 1일째에는 모두 상처의 크기가 동일하였으나, 12일이 지난 후에는 M5+A3051 복합물이 투여된 마우스가 양성대조군(EGF)보다 현저히 상처회복이 빠르고 흉터도 적으며, 더 빠르게 재상피화(re-epithelialization)됨을 확인하였다.

[487] 실시예 9의 복합물 중에서 M5+A3051 복합물은 양성 대조군(EGF)보다 동일한 시기에 4배 이상의 상처회복 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 상처를 보다 빠르게 회복시킴을 알 수 있다. 아울러서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지않도록 피부의 표피층이 깨끗하고 균일하게 회복되는 것을 확인하였다. 즉, 실시예 2의 인디루빈 유도체도 상처회복 효과를 가지지만 M5+A3051로 혼합된 실시예 9의 복합물이 가장 상처치료 및 흉터개선에 매우 효과적이라는 것을 확인하였다.

[488]

[489] 실험예 5. 동물실험을 통한 쉰나무 추출물과 인디루빈 유도체 복합물의 상처 치유 효능 확인

[490] 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.1 μM, 1 μM), 실시예 2 인디루빈 유도체(0.1 μM, 1 μM), 실시예 12 및 13의 복합물(쉰나무 추출물 1 μg/ml에 대하여 0.1 μM, 1 μM의 인디루빈 유도체를 각각 포함함)를 세포에 처리하고, 이의 이동능을 비교하고자 하였다.

[491] 본 실험에서의 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 세포(con), 실시예 8로부터 제조된 쉰나무 추출물(1 μg/ml)을 단독으로 처리한 것(쉰나무 1 μg/ml)과, 양성 대조군으로 VPA(발프로익산) 100 μM을 준비하였다.

- [492] 실험은 다음과 같이 수행하였다. 우선, 상기 HaCaT 세포를 12-well plate에서 24 시간 배양하였다. 상기 HaCaT 세포는 상처 치유 과정에 중요한 역할을 맡고 있는 것으로 알려져 있는, 케라티노사이트(human keratinocyte cell)이다. 이때, 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하였다. 24 시간의 배양이 완료된 후, 배지를 5% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환하고, 1000p(blue) tip끝을 이용해 세포 가운데에 스크래치를 냈다. 스크래치를 낸 부분에 시료를 처리하고 18시간 후 세포의 이동성 및 운동성을 관찰하였다.
- [493] 상기 시료로는 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.1 μM , 1 μM), 실시예 2 인디루빈 유도체(0.1 μM , 1 μM), 실시예 12 및 13의 복합물(쉬나무 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 0.1 μM , 1 μM 의 인디루빈 유도체를 각각 포함함)를 사용하였고, 도면에 시료의 명칭과 투여된 용량을 기입하였다.
- [494] 도 8a는 대조군으로 아무것도 처리하는 세포(con), 실시예 8로부터 제조된 쉬나무 추출물(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 단독으로 처리한 것(쉬나무 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과, 양성 대조군으로 VPA(발프로익산) 100 μM 을 각각 케라티노사이트에 처리하고 18시간 후, 세포의 이동능을 촬영한 사진이다.
- [495] 도 8b는 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.1 μM , 1 μM), 실시예 2 인디루빈 유도체(0.1 μM , 1 μM), 실시예 12 및 13의 복합물(쉬나무 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 0.1 μM , 1 μM 의 인디루빈 유도체를 각각 혼합함)을 각각 케라티노사이트에 처리하고 18시간 후, 세포의 이동능을 촬영한 사진이다. 도 8c는 도 8a, b로부터 세포의 이동률을 계산하여 도시한 그래프이다.
- [496] 도 8d는 실시예 3의 인디루빈 유도체(0.1 μM , 1 μM), 실시예 14의 복합물(쉬나무 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대하여 0.1 μM , 1 μM 의 인디루빈 유도체를 각각 혼합함)을 각각 케라티노사이트에 처리하고 18시간 후, 세포의 이동률을 계산하여 도시한 그래프이다.
- [497] 도 8a에 나타난 바와 같이, 쉬나무 추출물(실시예 8)을 단독으로 처리하거나, 도 8b에서와 같이 인디루빈 유도체(쉬나무 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 표기된 도면)만을 단독으로 처리한 경우에는 대조군(con)과 세포의 운동성 차이가 없음을 알 수 있다. 이는 세포 이동률을 나타낸 도 8c, d에서도 확인이 가능하다.
- [498] 한편, 본 발명의 실시예 12, 13, 14로부터 제조된 다양한 비율로 혼합된 복합물의 경우, 세포 운동성이 현저히 회복되었음을 확인하였으며, 이는 단독으로 처리하였을 때보다 약 2배 이상인 것을 알 수 있다.
- [499] 특히, 대조군 대비 회복된 세포 이동률(%)을 살펴보면, 쉬나무 추출물만을 단독으로 처리하였을 때 28% 상승하였고, A3051 인디루빈 유도체를 단독으로 처리하였을 때 각각 50%, 114% 였다. 반면 실시예 12의 복합물을 처리하였을 때는 71%, 246% 상승하였으며, 실시예 14의 복합물을 처리하였을 때는 34~126% 상승하였는 바, 이는 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 합한 것보다 약 1.5~2배 더 높은 수치임을 확인하였다. 즉, 본 발명의 창상 치료용 조성물은 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체를 각각 사용하는 것보다 현저한 효과를

가지며, 이는 각각의 조성물로부터 얻는 수치를 단순히 합한, 예상 가능한 수치를 넘어선 것임을 알 수 있다.

[500]

[501] 실험예 6. 동물실험을 통한 쉬나무 추출물과 인디루빈 유도체 복합물의 상처 치유 효능 확인

[502] 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 12 및 13의 복합물(쉬나무 추출물 1 mg/ml에 대하여 0.5 mM의 인디루빈 유도체를 각각 포함함)를 동물모델에 처리하고, 이를 통해 상처 치유촉진 효과를 확인하고자 하였다.

[503] 휴지기에 들어간 7 주령된 C3H 마우스의 등 부위의 모발을 제거하고 모발이 제거된 부위에 1.5 × 1.5 cm²의 상처를 만들었다. 실험동물의 상처부위에 시료를 12일간 매일 1회 도포하였다. 0일째, 12일째에 각 실험동물의 상처 크기를 측정하고, 상처 조직을 4% 파라포름알데하이드에 담가 고정한 후, 파라핀에 포매하고 4 μm 두께로 박편하였다. 박편된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한 후 재상피화 정도를 분석하여 비교하였다. 콜라겐의 합성 정도를 평가하기 위해 Masson's trichrome 염색, picosirius red 염색을 실시하였다. Masson's trichrome 염색의 경우, 슬라이드를 Weigert's Iron Hematoxylin Solution에 10분, Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin과 Aniline Blue에 각각 5분 두었다. picosirius red 염색의 경우, Weigert's solution에 8분, picosirius red에 1시간 두었다. β-카테닌을 비롯해 pCNA, keratin 14, 콜라겐 I은 상처 치유에 관련된 중요 마커들이다. 도 9a에서 사용한 피부조직 절편을 β-카테닌, PCNA, keratin 14, 콜라겐 I의 항체를 이용하여 형광염색하고 그 결과를 형광현미경을 통해 관찰하였다.

[504] 시료로는 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 12 및 13의 복합물(쉬나무 추출물 1 mg/ml에 대하여 0.5 mM의 인디루빈 유도체를 각각 포함함)을 비롯하여, 실시예 8로부터 제조된 쉬나무 추출물(1 mg/ml)을 단독으로 처리하거나(쉬나무 1 mg/ml), 양성 대조군으로 EGF 100 μM, VPA(발프로익산) 500 mM을 사용하였다. 이때 대조군(con)은 시료가 첨가되지 않은 용액을 처리한 것으로, 대조군(con1)은 아무것도 첨가되지 않은 물을 도포한 것이고, 대조군(con2)는 10% DMSO, 45% 에탄올, 18% 프로필렌글라이콜, 27% 물을 도포한 것이다.

[505] 도 9a는 본 발명에 따른 실시예 1의 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM), 실시예 12 및 13의 복합물, 대조군(con), 실시예 6의 쉬나무 추출물(쉬나무), 양성 대조군(EGF 및 VPA)을 처리한 마우스 급성 상처 조직에 대하여, 시간(0일째, 12일째)에 따라 촬영한 사진 및 염색결과를 나타낸 것이다.

[506] 도 9b는 도 9a에서 1 일째 측정된 각 군의 마우스 급성 상처의 크기(mm²)를 측정하여 나타낸 그래프이고, 도 9c는 도 9a에서 12 일째 측정된 각 군의 마우스

급성 상처의 크기(mm²)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

- [507] 도면에는 실험동물의 상처 부위에 처리한 시료에 따라, 그 시료의 명칭과 용량이 표기되어 있다. 예를 들어 실시예 2 인디루빈 유도체(0.5 mM)는 A3051 0.5 mM로 표기되어 있고, 실시예 13의 복합물은 A3051(0.5 mM) + 쉬나무 1 mg/ml로 표기되어 있으며, EGF(100 μM), VPA(500 mM) 등으로 표기되어 있다.
- [508] 도 9에 나타난 바와 같이, 실시예 12 및 13의 복합물의 경우, 인디루빈 유도체만을 단독으로 처리한 경우에는 양성 대조군(EGF, VPA)와 상처크기 회복 정도가 유사한 것을 확인하였다.
- [509] 다만 도 9에 나타난 바와 같이, 실시예 12 및 13의 복합물의 경우, 대조군 및 양성대조군에 비해 상처크기가 가장 많이 회복되었음을 육안과 상처크기를 통해 확인하였다.
- [510] 또한, 실시예 8의 쉬나무 추출물만 처리한 경우와 대조군(con)은 β-카테닌, PCNA, keratin 14, 콜라겐 I을 비롯하여 Picrosirius Red, Masson's Trichrome에 의한 콜라겐 염색 결과에 거의 차이가 없었다. 한편, 실시예 1 및 2의 인디루빈 유도체를 단독으로 처리한 경우에는 대조군(con)보다 β-카테닌, PCNA, keratin 14, 콜라겐 I 발현이 확인되었으나, 양성 대조군 보다는 다소 낮다는 것을 확인하였다.
- [511] 그러나, 동일한 농도의 인디루빈 유도체에 쉬나무 추출물을 혼합한 실시예 12, 13의 복합물을 처리한 급성 상처 조직은, 양성 대조군에 비해 현저히 증가된 β-카테닌, PCNA, keratin 14, 콜라겐 I 발현이 확인되었고, Picrosirius Red, Masson's Trichrome에 의한 콜라겐 염색 결과 역시 현저히 우수함을 확인하였다. 즉, 실시예 12, 13의 복합물은 β-카테닌, PCNA, keratin 14, 콜라겐 I 발현이 증가하면서, 아물면서 덧살이 생기거나 움푹 파이는 등의 흔적이 남지 않도록 피부의 표피층이 양성 대조군 보다 깨끗하고 균일하게 회복되는 것을 확인하였다.
- [512] 실시예 12, 13의 복합물은, 전혀 β-카테닌, PCNA, keratin 14, 콜라겐 I 발현에 효과를 나타내지 않던 쉬나무 추출물과 다소 효과를 갖는 실시예 1, 2의 인디루빈 유도체를 혼합하였는데, 흉터/상처 치유에 영향을 갖는 다양한 인자들의 발현이 개선되었음을 확인하였는 바, 이는 쉬나무 추출물 자체로는 효과를 나타내지 못하다가, 인디루빈 유도체와 혼합하여 사용할 경우, 효과의 증진을 도모하는 것으로 여겨진다.

[513]

[514] **실험예 7. 당뇨병 유발 동물모델 제조**

- [515] 마우스는 3주령 수컷 C57BL/6N(Koatech, South Korea)을 사용하였다. 마우스를 일주일 동안 일반사료로 적응시킨 후, 고지방 식이(High fat diet, Product Data - D12492; 60% kcal, 이하 HFD라 한다.)를 실험식으로 4주간 급여한 다음, 1일 1회 40 mg/kg씩 1주일동안 Streptozocin(Sigma)을 복강내로 주사하여 당뇨병 유발 동물모델을 제조하였다. 이때, 12/12시간 명암 주기로 일정한 온도(22±2°C)와

상대습도(40~60%)가 유지되는 사육실에서 사육하였다.

[516] 당뇨병을 유발하지 않은 정상 대조군으로 정상식이(Normal chow diet, Product Data - D12450B; 10% kcal, NCD라 한다.)를 실험식으로 4주간 급여한 다음 Citrate buffer(pH 4.5)을 1일 1회 40 mg/kg씩 1주일동안 복강내로 주사하여 제조하였다.

[517] 당뇨병 유발 동물모델에서 당뇨병이 제대로 유발되었는지를 확인하기 위하여 혈당을 2주간 측정된 결과, 정상 대조군의 혈당이 160-250 mg/dl인데 반해, 당뇨병 유발 동물모델의 경우 300 mg/dl이상으로 유지되는 것을 확인하였다.

[518]

[519] 실험예 8. 당뇨병 창상 동물모델에서의 상처 치유 효과

[520] 실험예 7의 정상 대조군 6마리와 당뇨병 유발 동물모델을 실험군당 6마리씩 준비하였다. 등 부위의 모발을 제거하고, 모발이 제거된 부위에 0.8 × 0.8 cm² 상처를 모두 동일하게 만들었다.

[521] 이후, 정상 대조군에는 에멀전 용액(Kollipore®EL:Tween 80:PEG400를 80:6:14 중량비)만을 1일 1회 20 μl씩 14일 동안 상처부위에 도포하였고, 음성 대조군에는 에멀전 용액(Kollipore®EL:Tween 80:PEG400를 80:6:14 중량비)만을 1일 1회 20 μl씩 14일 동안 상처부위에 도포하였으며, 실험군에는 제형화한 A3334(실시예 1)을 1일 1회 20 μl씩 14일 동안 상처부위에 도포하였다. 이후 0, 1, 3, 7, 10, 14일 동물모델의 상처 부위를 사진으로 찍고, 이로부터 상처의 면적을 측정하였다(도 10). 14일이 지난 후, 이산화탄소하에서 안락사 시키고 상처부위 조직을 채취하여 조직학적 구조를 관찰하였다.

[522] 상기 제형화한 A3334(실시예 1)은 Kollipore®EL:Tween 80:PEG400를 80:6:14 중량비로 혼합하여 에멀전 용액을 제조하고, 여기에 상기 실시예 1로부터 합성된 A3334 인디루빈 유도체 0.5mM 농도로 녹여 제조된 것이다.

[523] [표1]

그룹	투여	개체 수
정상 대조군(Normal)	NCD 4주 실험식이 + Citrate buffer(pH 4.5) 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 에멀전 용액 1일 1회 2주간 20 μl씩 도포	6
음성 대조군(Vehicle)	HFD 4주 실험식이 + Streptozocin 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 에멀전 용액 1일 1회 2주간 20 μl씩 도포	6
실험군(A3334)	HFD 4주 실험식이 + Streptozocin 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 제형화한 A3334(실시예 1) 1일 1회 2주간 20 μl씩 도포	6

[524]

[525] 도 10은 당뇨병 동물모델에서, 시간별 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군의 상처

부위를 촬영한 사진이고, 도 11은 당뇨병 동물모델에서, 시간별 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군의 상처 부위의 면적을 통해 상처 치료 정도(Wound closure rate, %)를 측정하여 도시한 그래프이다.

[526] 상기 상처 치료 정도(Wound closure rate, %)는 아래 식 1로 계산되었다.

[527] [식 1]

[528] 상처 치료 정도(Wound closure rate, %) = $[0일째의\ 최초\ 상처\ 면적 - 각\ 시기에\ 측정된\ 상처\ 면적] / [0일째의\ 최초\ 상처\ 면적] \times 100$

[529] 도 10, 11에 나타난 바와 같이 당뇨병이 유발되지 않은 정상 대조군은 상처가 14일 만에 정상적으로 아무는 것을 알 수 있다. 그러나 당뇨병이 유발된 음성 대조군은 14일이 지나도록 상처가 아물지 못하고, 약 60~70% 상처 부위가 남아있는 지연현상이 관찰되었다. 하지만 제형화한 A3334(실시예 1)을 투여한 마우스에서는 상처 부위의 치유가 정상 대조군과 크게 차이가 없을 정도로 촉진된 것을 확인할 수 있었다.

[530]

[531] 도 12은 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군으로부터 채취한 상처 부위 조직을 헤마톡실린(보라색)과 에오신(분홍색)으로 염색한 H&E 이미지이다. 구체적으로 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군으로부터 얻은 상처 부위 조직을 4% 파라포름알데히드에 담귀 고정하고, 파라핀에 포매하여 4 μm 두께로 박편화하였다. 박편화된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한 후 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 헤마톡실린(보라색)과 에오신(분홍색)으로 염색하였다.

[532] 이에 따르면 제형화한 A3334(실시예 1)을 도포하였을 때 가장 우수한 상처치유 개선효과를 나타냄을 확인하였다. 당뇨병 유발 동물모델인 음성 대조군은 14일이 지난 후에도 재상피화(re-epithelialization) 되지 못하였으나, 제형화한 A3334(실시예 1)이 도포된 경우에는 정상 대조군과 같이 당뇨병이 유발되었음에도 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되도록 함을 확인하였다.

[533]

[534] 도 13은 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군으로부터 채취한 상처 부위 조직의 콜라겐 합성 정도를 평가하기 위하여 Van Gieson 염색, Picrosirius red 염색을 실시한 이미지이다. 구체적으로 정상 대조군, 음성 대조군, 실험군으로부터 얻은 상처 부위 조직을 4% 파라포름알데히드에 담귀 고정하고, 파라핀에 포매하여 4 μm 두께로 박편화하였다. 박편화된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한 후 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 Van Gieson 염색, Picrosirius red 염색을 실시하였다. 이때, Van Gieson 염색의 경우, 박편화된 조직을 Weigert's solution에 10분, picro fuchsin solution에 2분 두었다. Picrosirius red 염색의 경우, 박편화된 조직을 Weigert's solution에 8분, picrosirius red에 1시간 두었다.

[535] 도 13에 나타난 바와 같이, 제형화한 A3334(실시예 1)는 정상 대조군(Normal)과 음성 대조군(Vehicle)보다 콜라겐의 양이 더욱 증가하였음을 확인하였다.

[536]

[537] 실험예 9. 당뇨병성 창상 치료 효과

[538] 실험예 7의 정상 대조군 6마리와 당뇨병 유발 동물모델을 실험군당 6마리씩 준비하였다. 등 부위의 모발을 제거하고, 모발이 제거된 부위에 $0.8 \times 0.8 \text{ cm}^2$ 상처를 만들었다.

[539] 이후, 정상 대조군에는 에멀전 용액(Kollipore®EL:Tween 80:PEG400를 80:6:14 중량비)만을 1일 1회 $20 \mu\text{l}$ 씩 14일 동안 상처부위에 도포하였고, 음성 대조군에는 에멀전 용액(Kollipore®EL:Tween 80:PEG400를 80:6:14 중량비)만을 1일 1회 $20 \mu\text{l}$ 씩 14일 동안 상처부위에 도포하였으며, 양성 대조군(VPA)은 에멀전 용액에 VPA 500 mM 혼합하여 제조한 조성물을 1일 1회 $20 \mu\text{l}$ 씩 14일 동안 상처부위에 도포하였다.

[540] 제1 실험군에는 제형화한 A3334(실시예 1)를 1일 1회 $20 \mu\text{l}$ 씩 14일 동안 상처부위에 도포하였고, 제2 실험군에는 제형화한 A3051(실시예 2)을 1일 1회 $20 \mu\text{l}$ 씩 14일 동안 상처부위에 도포하였다. 이후 14일 후 각 군의 상처 부위를 사진으로 찍고, 이로부터 상처의 면적을 측정하였다(도 14). 14일이 지난 후, 이산화탄소하에서 안락사 시키고 상처부위 조직을 채취하여 조직학적 구조를 관찰하였다.

[541] [표2]

그룹	투여	개체 수
정상 대조군(Normal)	NCD 4주 실험식이 + Citrate buffer(pH 4.5) 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 에멀전 용액 1일 1회 2주간 $20 \mu\text{l}$ 씩 도포	6
음성 대조군(Vehicle)	HFD 4주 실험식이 + Streptozocin 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 에멀전 용액 1일 1회 2주간 $20 \mu\text{l}$ 씩 도포	6
양성 대조군(VPA)	HFD 4주 실험식이 + Streptozocin 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 에멀전 용액+VPA 500 mM 1일 1회 2주간 $20 \mu\text{l}$ 씩 도포	6
제1 실험군(A3334)	HFD 4주 실험식이 + Streptozocin 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 제형화한 A3334(실시예 1) 1일 1회 2주간 $20 \mu\text{l}$ 씩 도포	6
제2 실험군(A3051)	HFD 4주 실험식이 + Streptozocin 40 mg/kg 1일 1회 1주간 복강투여 + 제형화한 A3051(실시예 2) 1일 1회 2주간 $20 \mu\text{l}$ 씩 도포	6

[542]

[543] 도 14는 당뇨병 동물모델에서, 14일 후 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군의 상처 부위를 촬영한 사진과 이로부터 채취한 상처 부위 조직을

헤마톡실린(보라색)과 에오신(분홍색)으로 염색한 H&E 이미지이다.

- [544] 구체적으로 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 얻은 상처 부위 조직을 4% 파라포름알데히드에 담귀 고정하고, 파라핀에 포매하여 4 μm 두께로 박편화하였다. 박편화된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한 후 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 헤마톡실린(보라색)과 에오신(분홍색)으로 염색하였다.
- [545] 도 14에 나타난 바와 같이 당뇨병이 유발되지 않은 정상 대조군은 상처가 14일 만에 정상적으로 아무는 것을 알 수 있다. 그러나 당뇨병이 유발된 음성 대조군은 14일이 지나도록 상처가 아물지 못하고, 약 70% 상처 부위가 남아있는 지연현상이 관찰되었다. 윈트 신호전달계를 활성화시켜 상처 치유 효과를 나타내는 것으로 알려진 VPA(발프로익산)를 투여한 결과, 음성 대조군과 크게 차이가 없을 정도로 상처 치유가 지연되었음을 알 수 있다. 하지만 제형화한 A3334(실시예 1) 및 제형화한 A3051(실시예 2)을 투여한 마우스에서는 상처 부위의 치유가 정상 대조군과 크게 차이가 없을 정도로 촉진된 것을 확인할 수 있었다.
- [546] 나아가, VPA로 처리되거나, 아무것도 처리되지 않은 음성 대조군은 14일이 지난 후에도 재상피화(re-epithelialization) 되지 못하였으나, 제형화한 A3334(실시예 1) 및 제형화한 A3051(실시예 2)이 도포된 경우에는 정상 대조군과 같이 당뇨병이 유발되었음에도 빠르게 재상피화(re-epithelialization)되도록 함을 확인하였다.
- [547]
- [548] 도 15는 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 채취한 상처 부위 조직의 콜라겐 합성 정도를 평가하기 위하여 Van Gieson 염색, Masson's Trichrome 염색을 실시한 이미지이다. 구체적으로 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 얻은 상처 부위 조직을 4% 파라포름알데히드에 담귀 고정하고, 파라핀에 포매하여 4 μm 두께로 박편화하였다. 박편화된 조직을 탈파라핀화 및 재수화한 후 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 Van Gieson 염색, Masson's Trichrome 염색을 실시하였다. 이때, Van Gieson 염색의 경우, 박편화된 조직을 Weigert's solution에 10분, picro fuchsin solution에 2분 두었다. Masson's Trichrome 염색의 경우, 슬라이드를 Weigert's Iron Hematoxylin Solution에 10분, Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin과 Aniline Blue에 각각 5분 두었다.
- [549] 도 15에 나타난 바와 같이, 제형화한 A3334(실시예 1) 및 제형화한 A3051(실시예 2)은 정상 대조군(Normal), 음성 대조군(Vehicle) 및 양성 대조군(VPA)보다 콜라겐의 양이 더욱 증가하였음을 확인하였다.
- [550]
- [551] 도 16은 당뇨병 동물모델에서, 정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 채취한 상처 주변 부위 신생혈관을 관찰한 것이다. 구체적으로

정상 대조군, 음성 대조군, 양성 대조군, 제1, 2 실험군으로부터 상처 부위 조직을 채취한 후, 4% 파라포름알데히드에 담궈 고정하고 신생혈관 유무를 육안으로 확인하였다.

- [552] 도 16에 나타난 바와 같이 제형화한 A3334(실시예 1) 및 제형화한 A3051(실시예 2)은 신생혈관이 정상 대조군(Normal) 및 음성 대조군(Vehicle)과 달리 증가하였음을 확인하였다. 이를 통해 제형화한 A3334(실시예 1) 및 제형화한 A3051(실시예 2)은 윈트신호 활성화제인 VPA보다 우수한 콜라겐, α -SMA 등의 활성화를 통한 조직재생 효과와 angiogenesis 활성화를 통한 상처 치유 시간 단축 등의 효과를 가지므로, 당뇨병성 창상에 있어서 종래 상처치료제보다 더욱 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[553]

[554] 실험예 10. 본 발명의 유효성분의 용해도 측정

- [555] 에멀전 용액을 선정하기 위하여 여러 가지 오일 및 계면활성제에 실시예 2의 인디루빈 유도체의 용해도를 측정하였다. 충분한 양의 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체 분말을 각 오일 또는 계면활성제(1 ml)에 넣은 후 30분간 vortexing 시켜주었다. 그 후 평형 상태에 이르게 하기 위하여 37 °C 배양조에서 50 rpm으로 72시간 동안 shaking한 후, 16,100 xg에서 5분간 원심분리한 상층액을 메탄올로 적당히 희석하여 LC/MS/MS로 분석하였다. 상기 오일 또는 계면활성제 종류와 측정된 용해도는 하기 표 3에 나타내었다.

- [556] 분석장비는 Waters xevo TQ MS-ACQUITY UPLC System을 사용하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC® BEH(C18, 1.7 μ m, 2.1x50 mm)을 사용하여 실온에서 분석하였다. 이동상은 0.1% formic acid를 함유하는 탈이온 증류수와 0.1% formic acid를 함유하는 아세토니트릴(30 : 70, v/v)을 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과한 후에 사용하였다. 유속은 0.25 ml/min이고 시료 0.5 μ l를 주입하여 분석하였다. Decursin 분석을 위한 LC/MS/MS 조건은 Cone이 38 V, Collision이 32 V였으며 모이온과 딸이온은 각각 329와 229의 m/z값으로 모니터링하였다.

[557] [표3]

종류	종류	용해도(Solubility)(mg/ml)
오일	올리브 오일Olive oil	0.83
	해바라기 오일Sunflower oil	1.35
	Kolliphor®EL	5.4
계면활성제	Tween 20	4.58
	Tween 80	4.92
공-계면활성제(Co-surfactant)	Transcutol P	1.15
	프로필렌글리콜Propylene glycol	0.25
	PEG 400	3.1

[558] 도 17은 본 발명의 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체를 상기 다양한 오일 또는 계면활성제에 각각 용해시켜 제조된 에멀전 용액의 사진으로, 도 17 및 표 3에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체는 유상의 용매 중에서 가장 용해도가 높은 Kolliphor®EL, Tween 20, Tween 80, PEG 400을 이용하여 에멀전 용액을 형성하는 조성을 1차적으로 확립하였다. 상기 Kolliphor®EL, Tween 20 또는 Tween 80, PEG 400은 인체에 무해하고 안전하므로 피부 투여를 포함하여 다양한 제제의 조성에 사용되고 있는 안정한 물질이다.

[559]

[560] 실험예 11. 삼원(ternary) 다이어그램 분석

[561] 용해도 실험 결과를 바탕으로 Kolliphor®EL를 에멀전 용액의 유상으로 선정하고, Tween 80 및 PEG 400의 혼합액을 계면활성제로 선정하였다. 이렇게 선정한 에멀전 용액의 조성으로 에멀전이 형성되는 영역을 확인하기 위하여 실온에서 H₂O titration method를 이용하여 ternary phase diagram을 완성하였다. 계면활성제는 Tween 80와 PEG 400를 1:1, 2:1, 1:2의 비율로 각각 혼합한 계면활성제 혼합물을 준비하고, 이를 오일상인 Kolliphor®EL와 다양한 비율(0.5:9.5, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 9.5:0.5)로 혼합하여 에멀전 용액을 제조하였다. 상기 에멀전 용액을 교반하면서 infusion pump를 이용하여 1 ml/min의 속도로 물을 적하하면서 육안으로 관찰할 때 균일하게 혼합된 상태를 유지하는 지역을 phase diagram에 에멀전으로 표시하였고, 상기 삼원 다이어그램을 도 18a, 18b, 18c에 도시하였다.

[562] 도 18a는 Tween 80와 PEG 400를 2:1의 비율 혼합된 계면활성제로 제조된 에멀전 용액에 대한 삼원(ternary) 상 다이어그램이고, 도 18b는 Tween 80와 PEG 400를 1:1의 비율 혼합된 계면활성제로 제조된 에멀전 용액에 대한 삼원(ternary)

상 다이어그램이고, 도 18c는 Tween 80와 PEG 400를 1:2의 비율 혼합된 계면활성제로 제조된 에멀전 용액에 대한 삼원(ternary) 상 다이어그램이다. 도 18은 삼원 상 다이어그램에는 안정적인 에멀전을 형성하는 지역을 적색의 점으로 표시하였다.

[563] 도 18a, b, c 중에서 Tween 80와 PEG 400이 1:2의 중량비로 혼합된 계면활성제를 사용한 에멀전 용액이 가장 가장 넓은 수치 범위를 가지고 있음을 확인하였고, 이를 선정하였다. 이후, 상기 계면활성제와 유상의 비율을 최종 선정하기 위하여, 다양한 비율로 제조된 에멀전 용액에서의 에멀전의 용해도와 액적 크기, 점성 및 제타포텐셜을 비교하고자 하였다.

[564]

[565] 실험예 12. 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형 개발

[566] 상기 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체를 일정한 용해도와 장기안정성을 갖도록 하는 수중유형 유화액 제형을 개발하고자 하였고, 이를 위해 계면활성제와 폴리에틸렌글리콜 및 오일을 혼합하여 가장 안정적인 에멀전 용액을 선정하고자 하였다.

[567] 실험예 11에서 선정된 계면활성제와 폴리에틸렌글리콜 및 오일 10:30:60 내지 90:3:7의 다양한 조성으로 에멀전 용액을 제조하였다. 본 발명의 유효성분을 함유한 에멀전을 제조하기 위해, 전체 조성물 총 중량에 대하여 10 중량%의 농도가 되도록 유효성분(실시예 2의 인디루빈 유도체 분말)을 에멀전 용액에 가하고 밤새 교반하여, 에멀전을 제조하였다(예를 들어, 최종 조성물의 중량이 100 g이면 실시예 2로부터 제조된 인디루빈 유도체 분말 20g을 상기 에멀전 용액 80g에 혼합함).

[568] 다만, 상기 조성물에는 가용화제인 사이클로덱스트린(cyclodextrin)를 더 포함할 수 있고, 본 실험에서는 인디루빈 유도체의 가용화를 높이기 위해 상기 인디루빈 유도체(유효성분) 100 중량부 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 중량부 추가한 것을 사용하였다.

[569] 상기 제조한 에멀전 제제는 육안으로 균일하게 혼합된 불투명한 적색이었고, 상기 각각의 에멀전 제제의 용해도, 액적 크기, 점성 및 제타포텐셜을 분석하여 표 4에 나타내었다.

[570] [표4]

구분	에멀전 용액(Kollipore @EL:Tween 80:PEG400)중 량비	용해도Solub ility(mg/ml)	Droplet size (nm)	점성Viscosit y (mPas)	Zetapotential (mV)
F1	10:30:60	2.99	1525.7	23.33	-5.14
F2	20:26:54	3.58	921.3	44.46	-6.87
F3	30:23:47	3.81	624.9	59.12	-7.23
F4	40:20:40	4.11	479.4	65.07	-6.94
F5	50:16:34	5.67	332.3	72.72	-7.99
F6	60:13:27	6.86	264.9	88.85	-9.72
F7	70:10:20	7.59	183.8	91.39	-10.83
F8	80:6:14	7.69	41.5	98.3	-20.38
F9	90:3:7	6.88	29.3	99.52	-20.99

[571] 표 4에 나타난 바와 같이, 오일의 함량이 증가할수록 액적의 크기가 줄어들었으며, 약학, 화장품 조성물로 사용하기에 모두 적절한 물리적 특성을 갖고 있는 것으로 확인되었으나, 가장 바람직한 크기, 점성, 제타포텐셜 및 용해도를 갖는 것은 F8임을 알 수 있다.

[572]

[573] **실험예 13. 에멀전 제제의 의존적 안정성 평가-1**

[574] 제조된 에멀전 제제의 안정도를 확인하기 위하여 실험예 12에서와 같은 제조과정을 통해 아래 표 5에서의 조성으로 F8, F10~12 에멀전 제제를 제조하였다. 상기 에멀전 제제의 안정도는 저온(4 °C) 및 상온(25 °C)에서의 상대적인 용해도% 변화를 근거로 측정하였다. 제조 직후부터 3개월까지 상대적인 용해도%를 도 19 및 도 20에 기록하였다.

[575] [표5]

구분	에멀전 조성물			유효성분실시 에 2의 인디루빈 유도체	가용화제(2-hydroxy β-cyclodex trin)	수상
	오일	계면활성 제	폴리에틸 렌글리콜			
DMSO 대조군	-	-	-	12.5 g	12.5 g	증류수 100 g
F8	Kollipore [Ⓜ] EL 80 g	Tween 80 6.7 g	PEG400 13.3 g	12.5 g	12.5 g	증류수 100 g
F10	-	-	PEG40010 0 g	12.5 g	12.5 g	증류수 100 g
F11	-	Tween 80100 g	-	12.5 g	12.5 g	증류수 100 g
F12	Kollipore [Ⓜ] EL100 g	-	-	12.5 g	12.5 g	증류수 100 g

[576] 도 19는 상온(25 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 용해도% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이고, 도 20은 저온(4 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 용해도% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[577] 도 19, 20 및 표 5에 나타난 바와 같이, 저온과 실온에서 3달 동안 방치한 후, 상대적인 용해도 변화를 살펴본 결과, 본 발명의 에멀전(F8)의 경우에는 제조직후와 3개월 후의 용해도% 변화가 크지 않은 반면에, 본 발명과 다른 에멀전 조성으로 제조된 에멀전(F12, 11, 10)의 경우에는 제조 직후와 3개월 후 저온과 상온 조건에서 용해도 변화가 40%이상 발생하였고, 특히 저온 보관 조건에서 용해도가 80% 이상 급격하게 낮아지게 된 것을 확인하였다.

[578]

[579] **실험예 14. 에멀전 제제의 의존적 안정성 평가-2**

[580] 실시예 2의 인디루빈 유도체의 유효성분이 에멀전 제제 내에서도 안정적으로 활성을 유지하고 있는지를 확인하기 위하여 실험예 13에서와 같은 제조과정을 통해 상기 표 5에서의 조성으로 F8, F10~12 에멀전 제제를 제조하였다. 상기 에멀전 제제내에서 인디루빈 유도체의 활성에 대한 안정성은 저온(4 °C) 및 상온(25 °C)에서의 상대적인 wnt reporter activity% 변화를 근거로 측정하였다. 제조 직후부터 3개월까지 상대적인 wnt reporter activity%를 도 21 및 22에 기록하였다.

[581] 상기 wnt reporter activity%는 다음과 같은 방법을 통해 측정하였다. 상기 wnt reporter activity는 HEKTOP 리포터 세포주에 에멀전 제제로 제조되어있는 유효성분을 처리 한 후 24시간 뒤에 측정하였다.

[582] 도 21은 상온(25 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 wnt reporter activity% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이고, 도 22는 저온(4 °C)에서, F8, F10~12 에멀전 제제의 상대적인 wnt reporter activity% 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[583] 도 21, 22에 나타난 바와 같이, 저온과 실온에서 3달 동안 방치하였을 때, 상대적인 wnt reporter activity% 변화를 살펴본 결과, 본 발명의 에멀전(F8)의 경우에는 제조 직후와 3개월 후의 wnt reporter activity% 변화가 크지 않은 반면에, 본 발명과 다른 에멀전 조성으로 제조된 에멀전(F12, 11, 10)의 경우에는 제조 직후와 3개월 후 저온과 상온 조건에서 wnt reporter activity이 40%이상 저하되었고, 특히 저온 보관 조건에서 용해도80% 이상 급격하게 낮아지게 된 것을 확인하였다.

[584]

[585] **제제예 1: 상처 예방 또는 치료용 크림형 화장료 조성물**

[586] 본 제제예에서는 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 혼합한 복합물을 유효성분으로 함유하는 상처 예방 또는 치료용 크림형 화장료 조성물을 제조하고자 하였다. 실시예 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 포함하는 성분들을 하기 함량에 따라, 혼합하여 크림형 화장료 조성물을 제조하였다.

[587] 실시예 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체 4.0 중량%

[588] 글리세린 2.0 중량%

[589] 파라벤 0.2 중량%

[590] 알란토인 2.0 중량%

[591] 베타인 3.0 중량%

[592] 히아루론산나트륨 1.0 중량%

[593] 초산토코페롤 5.0 중량%

[594] 웨어버터 2.0 중량%

[595] 트레할로스 1.0 중량%

[596] 방부제 및 향 적량의 중량%

[597] 정제수 to 100 중량%

[598] 합계 100 중량%

[599]

[600] **제제예 2: 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물(연고)**

[601] 본 제제예에서는 화학식 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 함유하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물(연고)을 제조하고자 하였다. 실시예 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 포함하는 성분들을 하기 함량에 따라, 혼합하여 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물(연고)을 제조하였다.

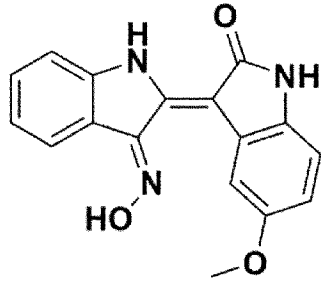
[602] 실시예 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체 10 중량%

- [603] 디에틸 세바케이트 8 중량%
- [604] 경납 5 중량%
- [605] 폴리옥시에틸렌올레일에테르 포스페이트 6 중량%
- [606] 벤조산 나트륨 적량의 중량%
- [607] 바셀린 to 100 중량%
- [608] 합계 100 중량%
- [609]
- [610] **제제예 3: 우유에의 적용**
- [611] 우유 99.9 중량%
- [612] 실시예 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체 0.1 중량%
- [613]
- [614] **제제예 4: 음료의 제조**
- [615] 실시예 1 내지 4 중에서 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체 10 mg
- [616] 젖산칼슘 50 mg
- [617] 구연산 5 mg
- [618] 니코틴산아미드 10 mg
- [619] 엽산리보플라빈나트륨 3 mg
- [620] 엽산피리독신 2 mg
- [621] 아르기닌 10 mg
- [622] 자당지방산에스테르 10 mg
- [623] 물 200 ml

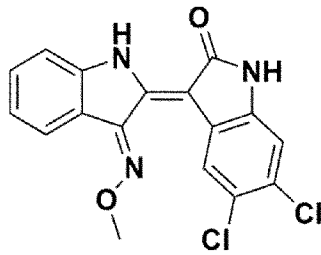
청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.

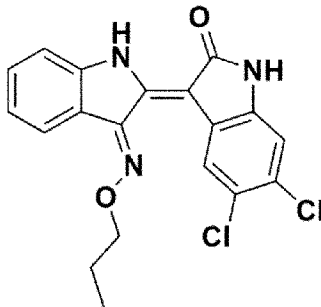
[화학식 1]



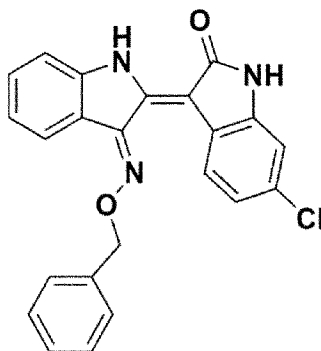
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 쉬나무 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

상기 조성물은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.

- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 상처는 화상, 궤양, 외상, 외과적 수술(post-surgical), 출산, 만성적 상처(chronic wound), 당뇨병성 창상, 또는 피부염(sermatitis)에 의한 손상인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 피부 국소 도포용인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제7항에 있어서,

상기 조성물은 사이클로덱스트린(cyclodextrin)를 더 포함하되, 상기 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부 포함되는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 13]

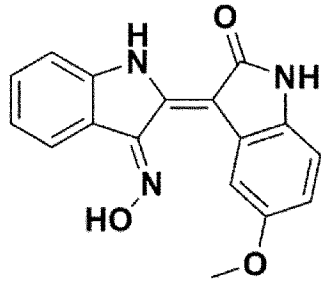
제7항에 있어서,

상기 에멀전 제형은 3 달째에 측정했을 때 온도 4 내지 25 °C 조건하에 증류수에서 wnt 활성 및 용해도의 변화가 나타내지 않는 안정한 제형인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 치료용 약학 조성물.

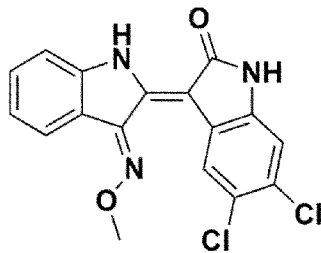
[청구항 14]

하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 함유하는 상처 치료 또는 개선을 위한 인간을 제외한 동물용 약학 조성물.

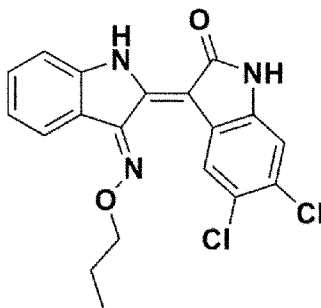
[화학식 1]



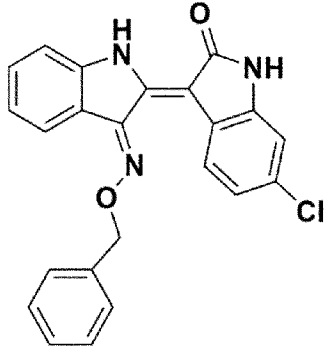
[화학식 2]



[화학식 3]

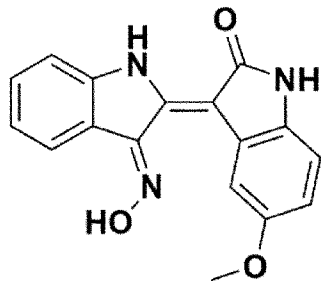


[화학식 4]

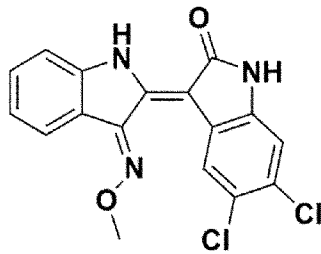


[청구항 15] 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈 유도체를 유효성분으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

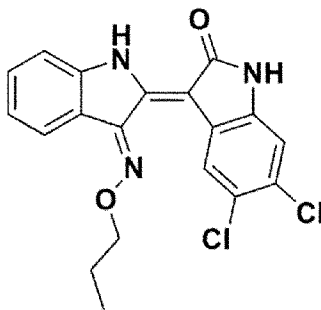
[화학식 1]



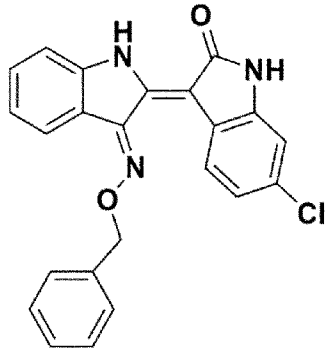
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]

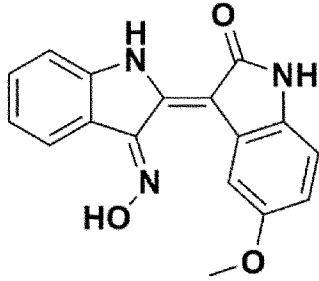


- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 조성물은 쉬나무 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 17] 제15항에 있어서,
상기 조성물은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 18] 제15항에 있어서,
상기 화장품 조성물은 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜을 더 포함하는 에멀전 제형인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 19] 제15항에 있어서,
상기 오일, 계면활성제 및 폴리에틸렌글리콜의 혼합중량비는 0.3-30 : 1 : 2-2.5인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 20] 제15항에 있어서,
상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 20 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 21] 제18항에 있어서,
상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(polyoxyethylene sorbitan monostearate, Tween 60) 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 올레이트(polyoxyethylene sorbitan oleate, Tween 80)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 22] 제18항에 있어서,
상기 오일은 폴리에톡실화된 피마자유(Kolliphor®EL), 해바라기 오일 및 올리브 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

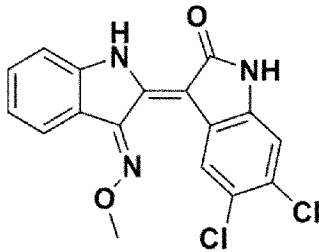
[청구항 23] 제18항에 있어서,
 상기 조성물은 사이클로덱스트린(cyclodextrin)를 더 포함하되, 상기
 조성물에 존재하는 유효성분 100 중량부를 기준으로
 사이클로덱스트린(cyclodextrin)이 100 내지 1000 중량부 포함되는 것을
 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

[청구항 24] 하기 화학식 1 내지 화학식 4 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 인디루빈
 유도체를 유효성분으로 포함하는 상처 예방 또는 개선용 식품 조성물.

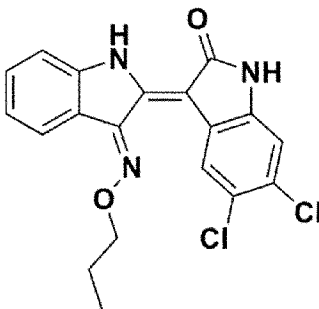
[화학식 1]



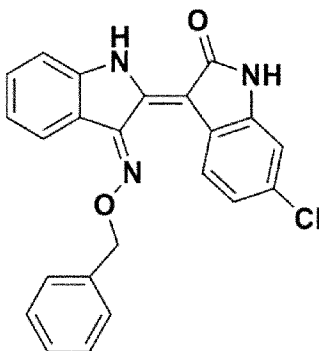
[화학식 2]



[화학식 3]

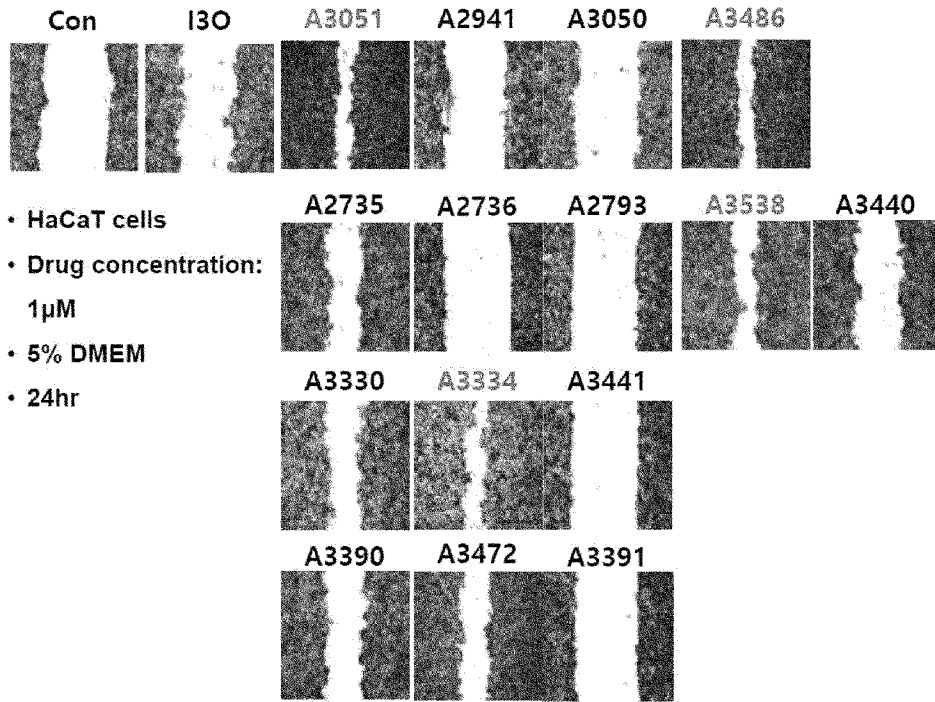


[화학식 4]

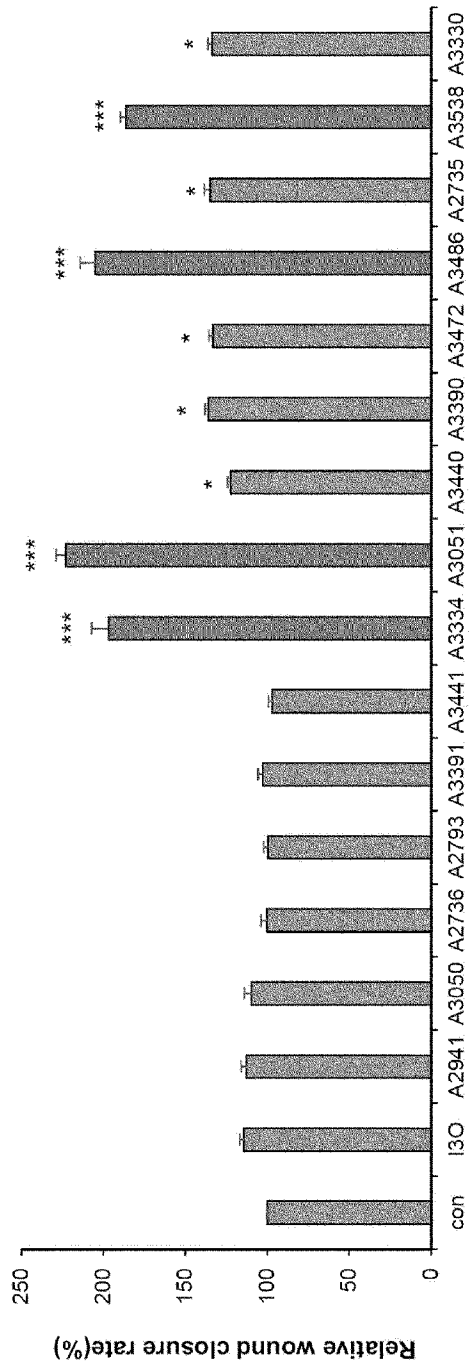


- [청구항 25] 제24항에 있어서,
상기 조성물은 쉬나무 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 26] 제24항에 있어서,
상기 조성물은 메틸 바닐레이트, 헤스페리딘 및 퀘르시트린로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상처 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[도 1]

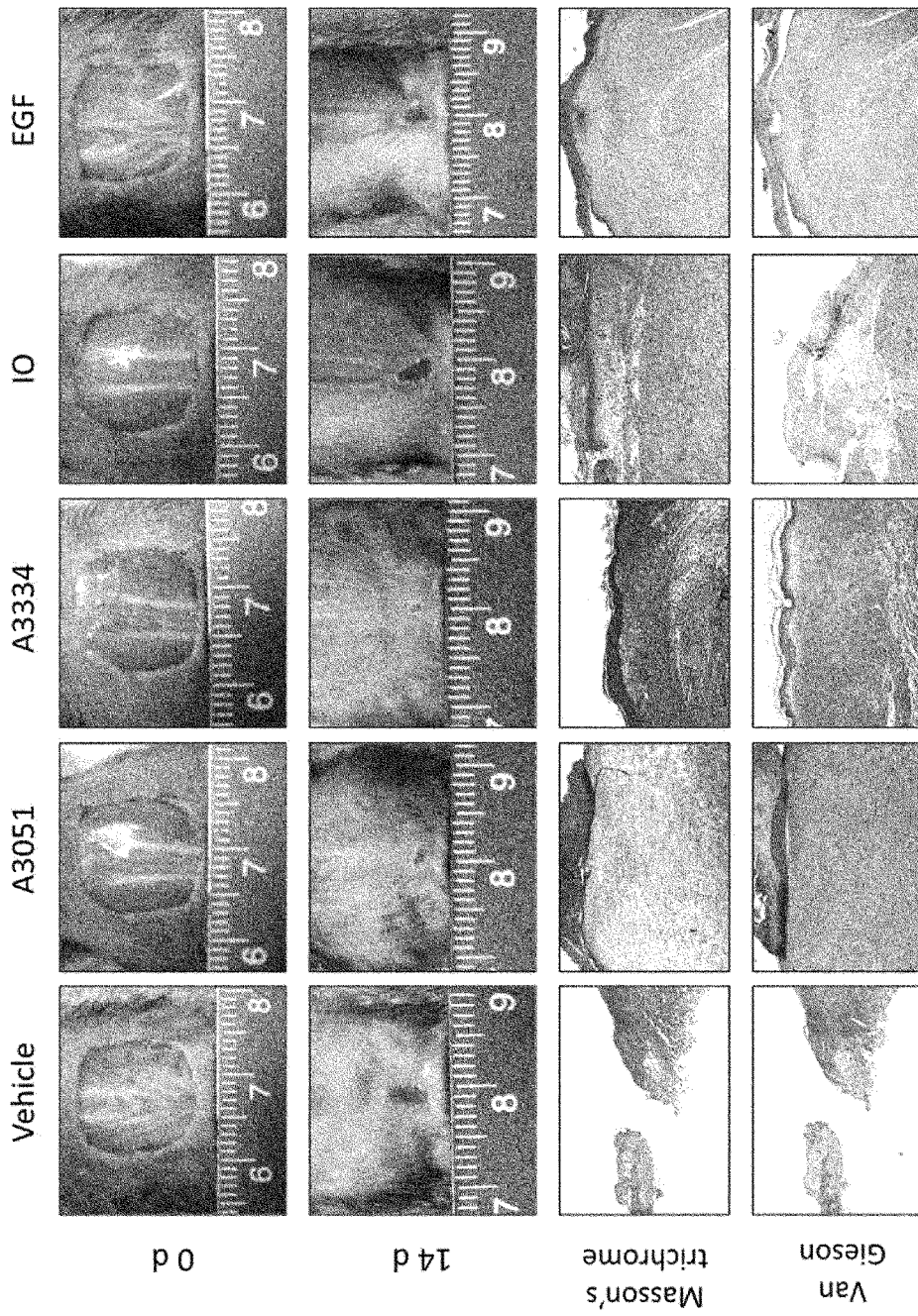


[도2]

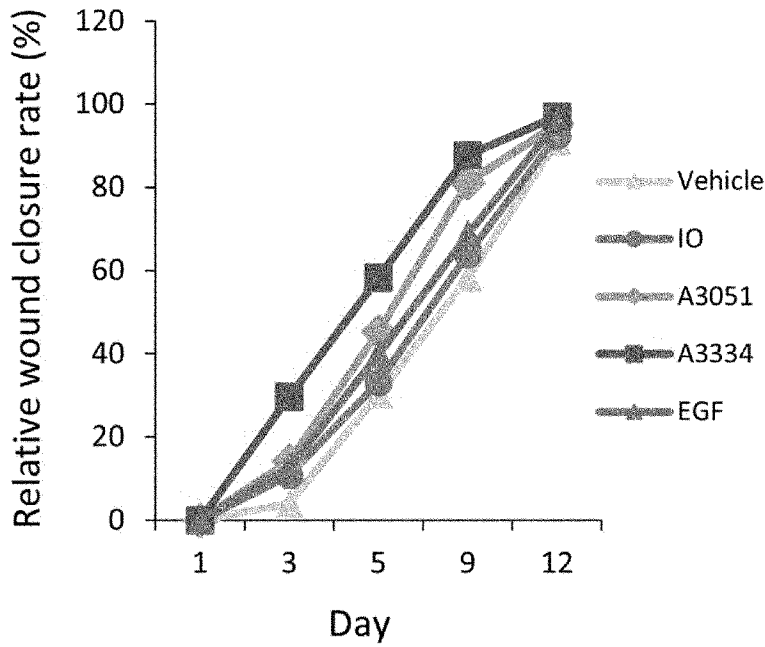


Quantification of Relative
Wound closure rate (n=3): 1 mM

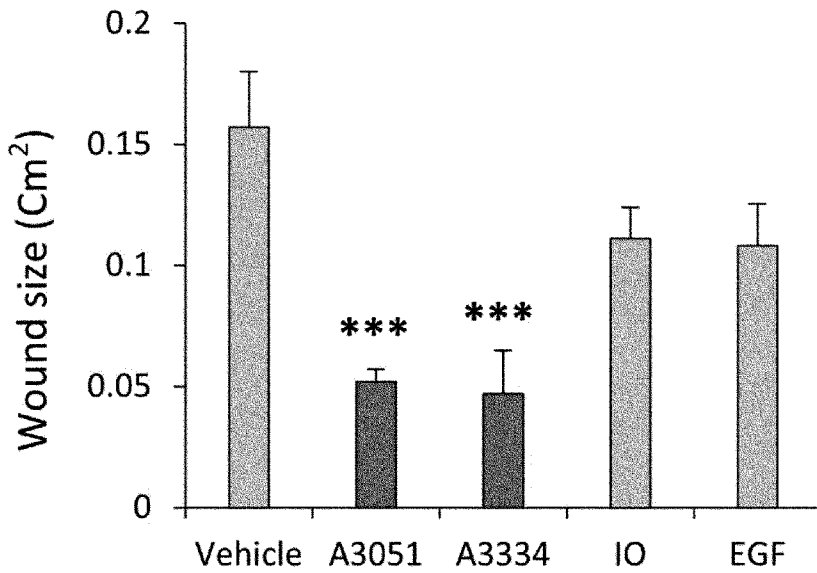
[도3]



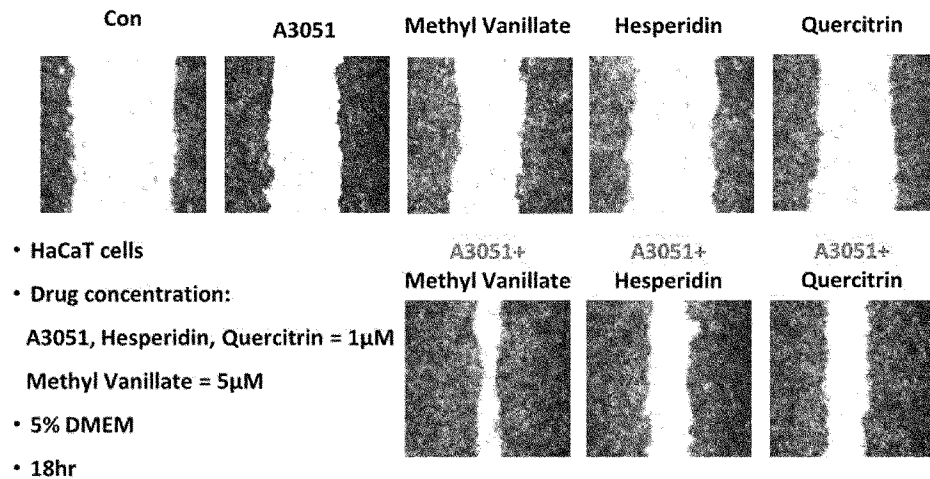
[도4]



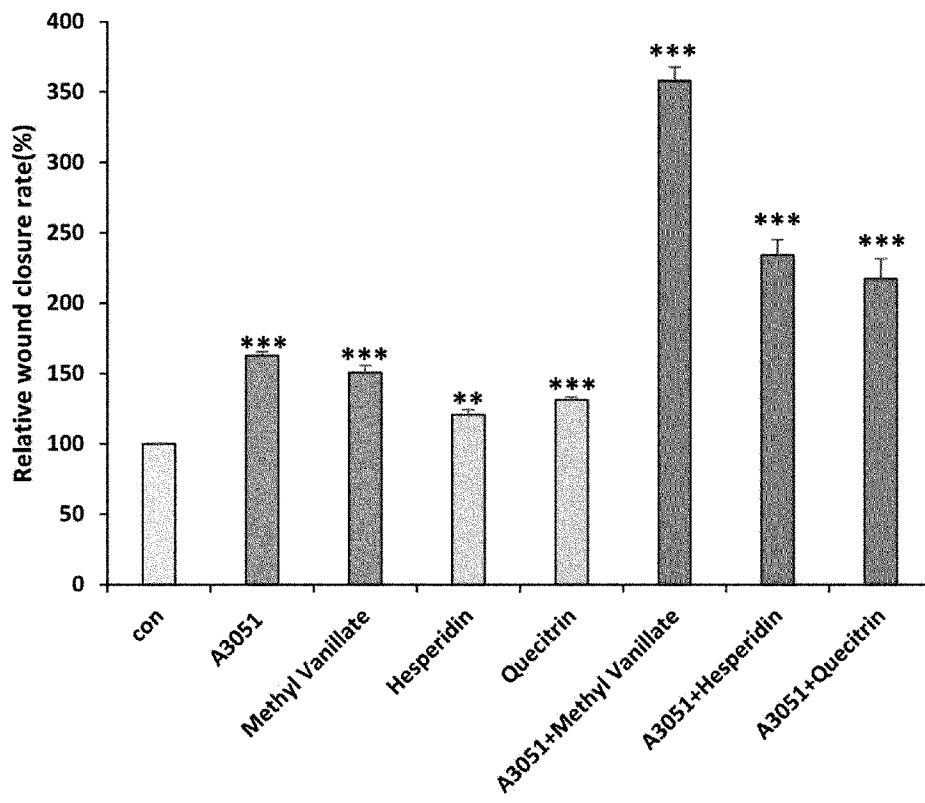
[도5]



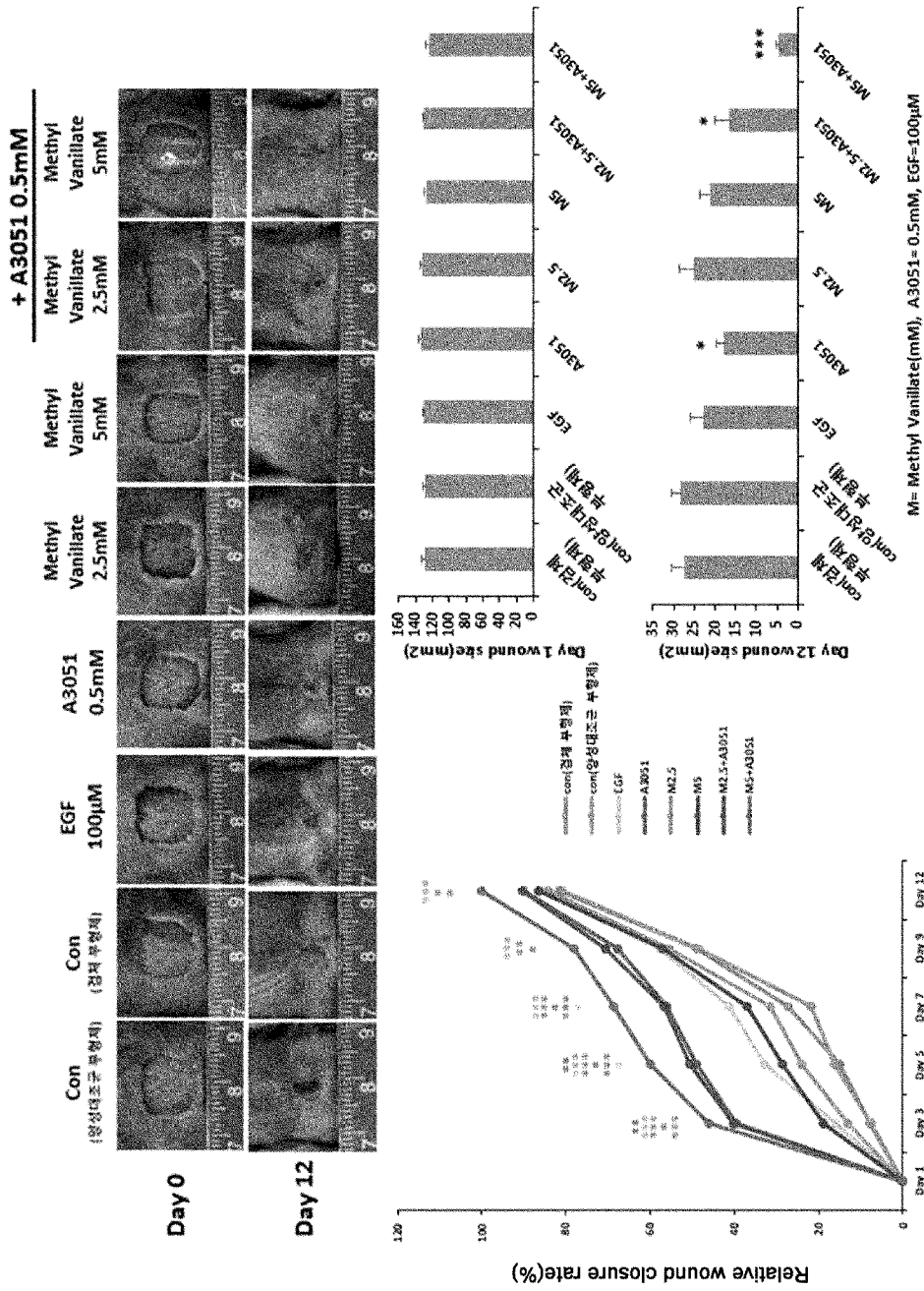
[도6a]



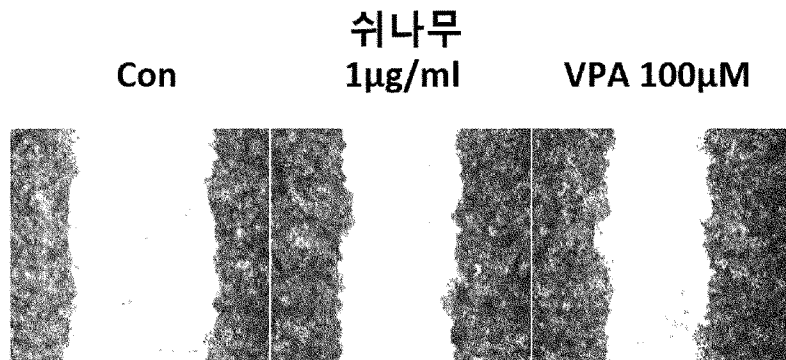
[도6b]



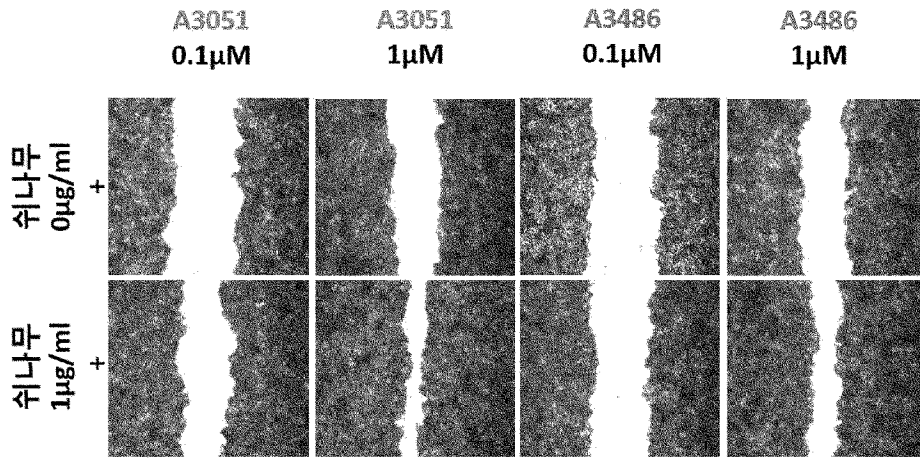
[도7]



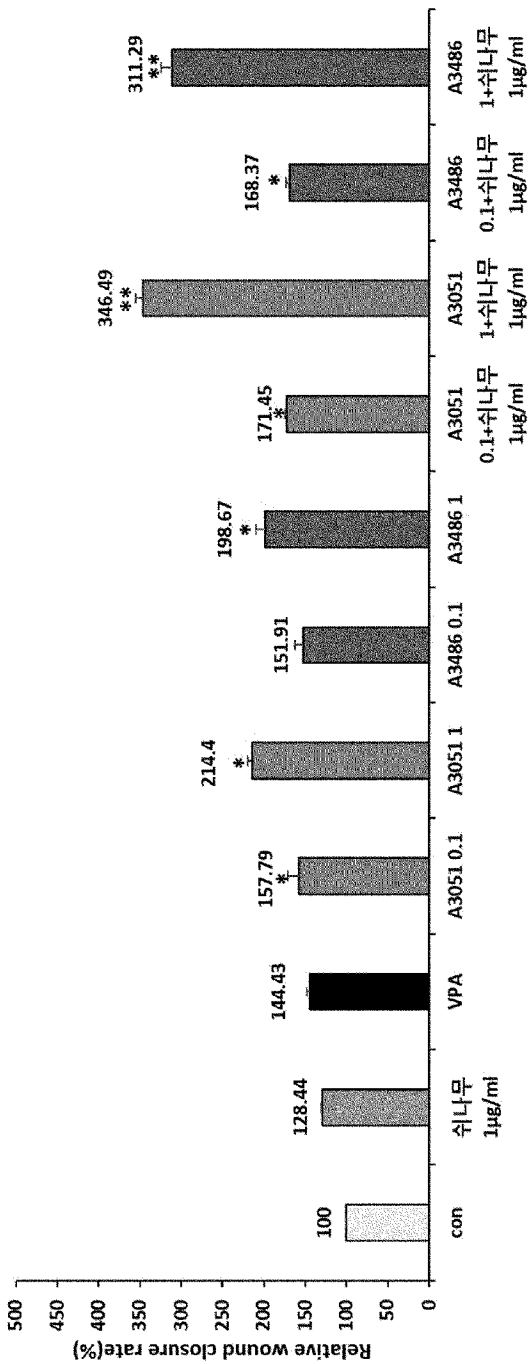
[도8a]



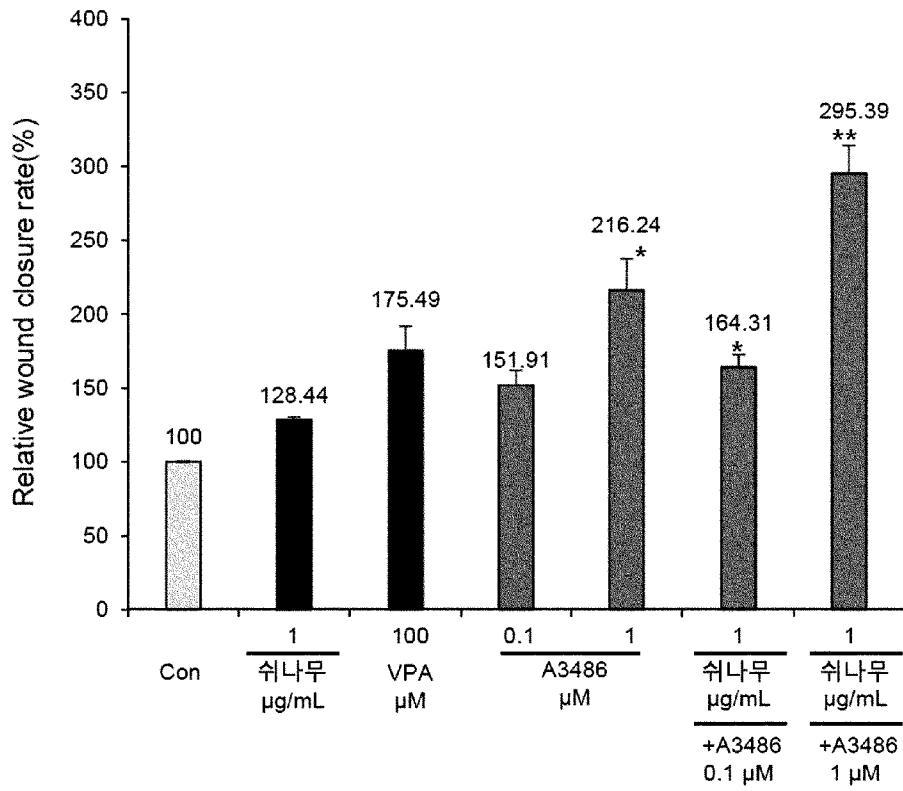
[도8b]



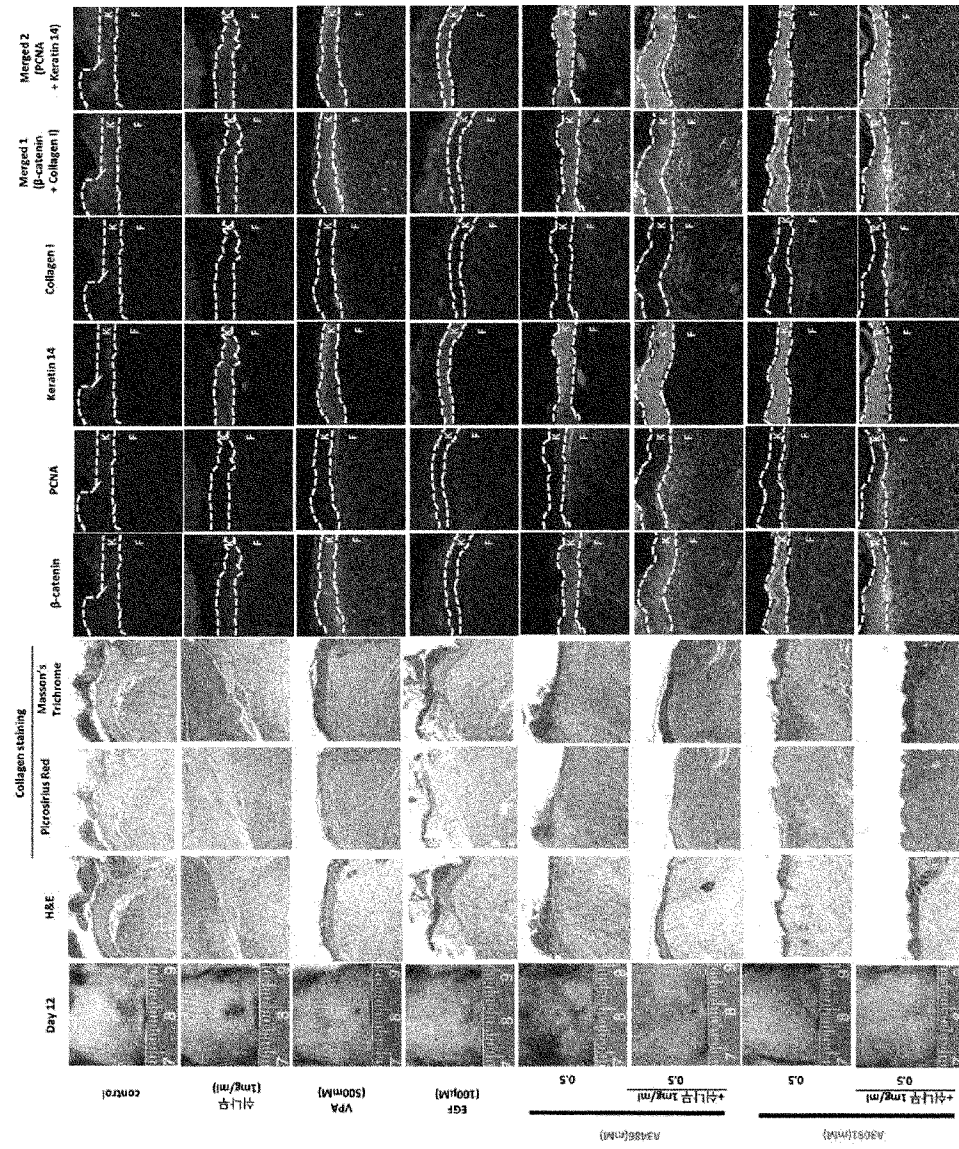
[도8c]



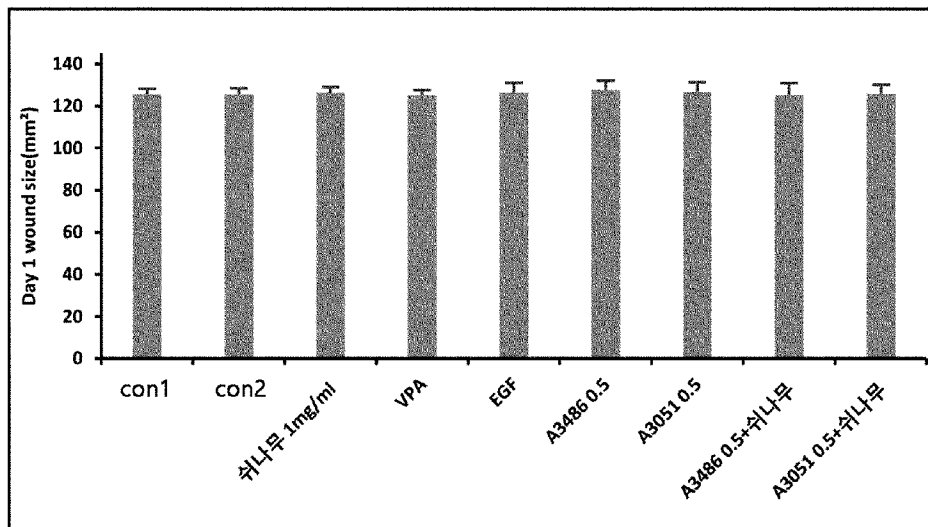
[도8d]



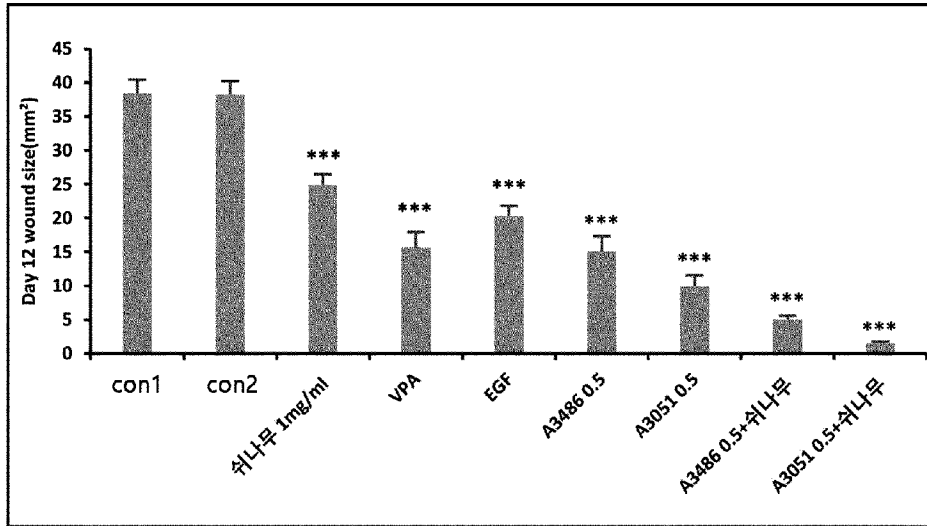
[도9a]



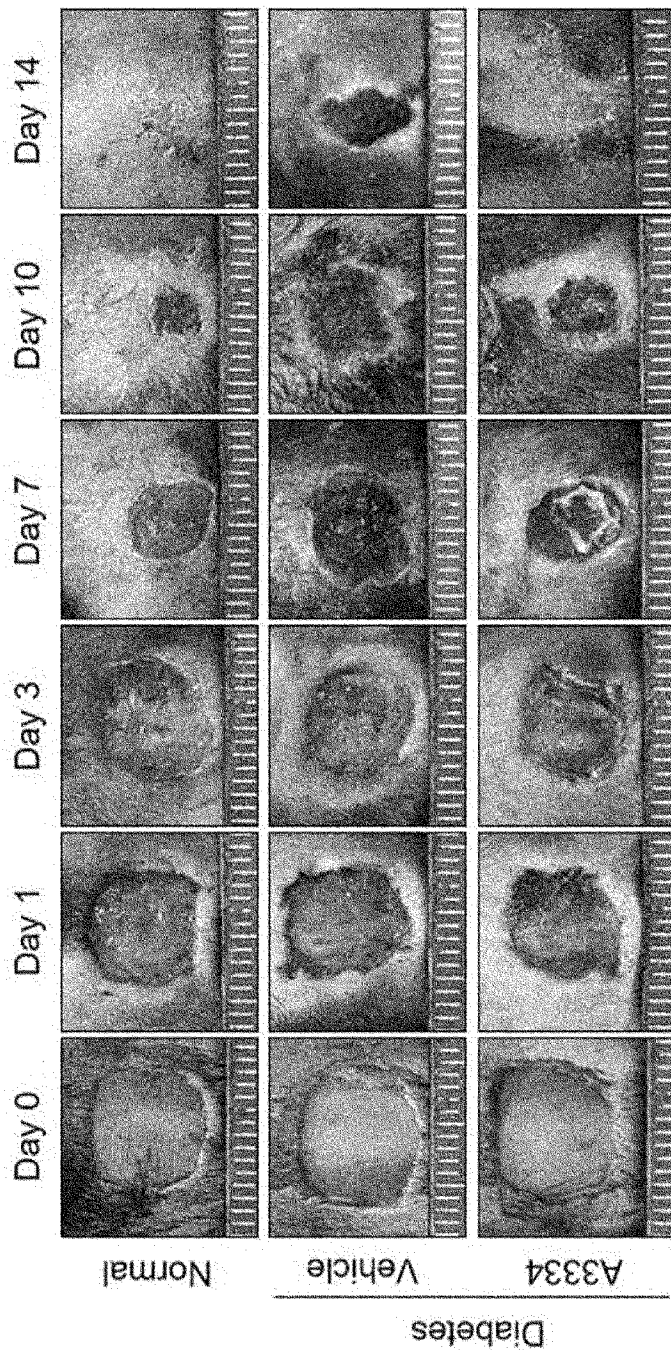
[도9b]



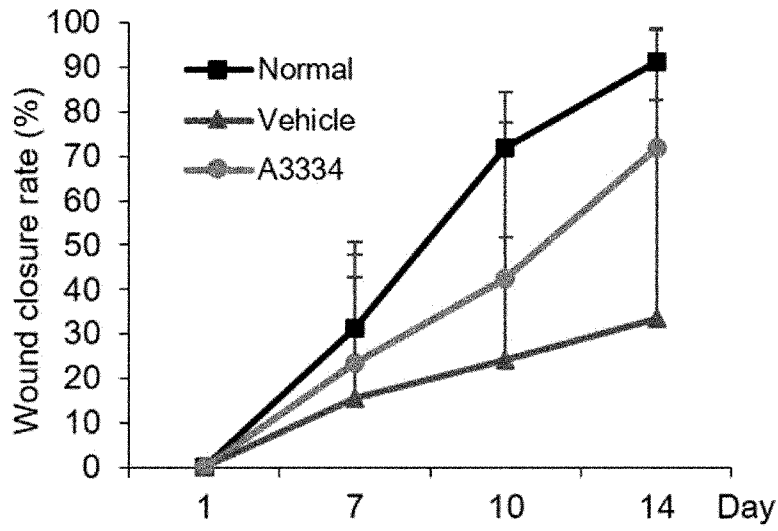
[도9c]



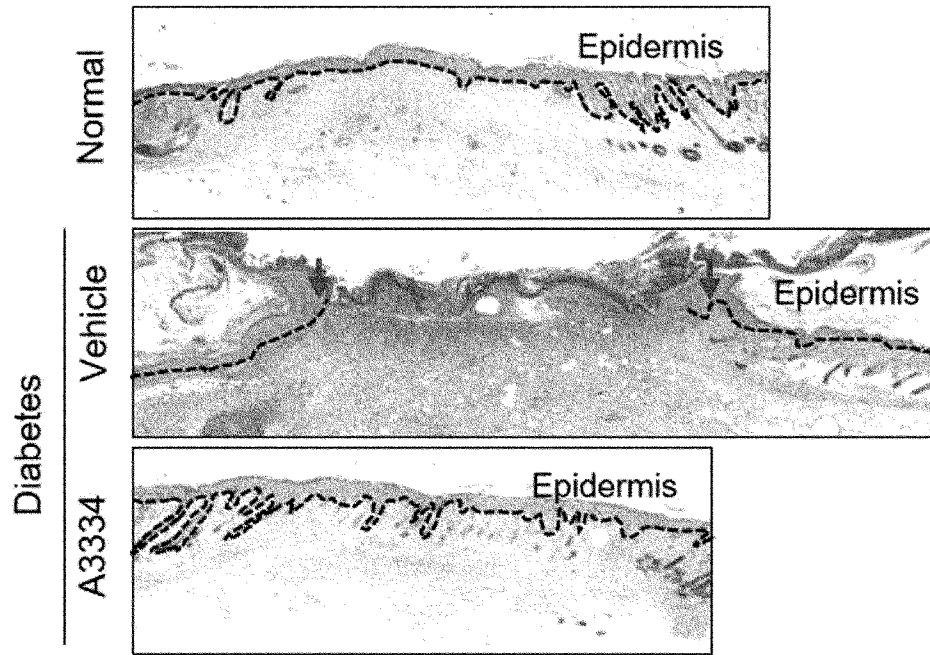
[도10]



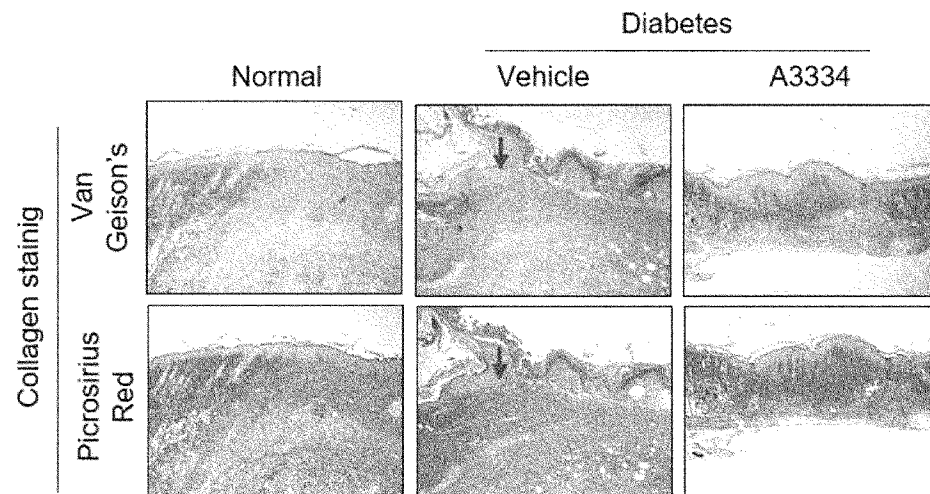
[도 11]



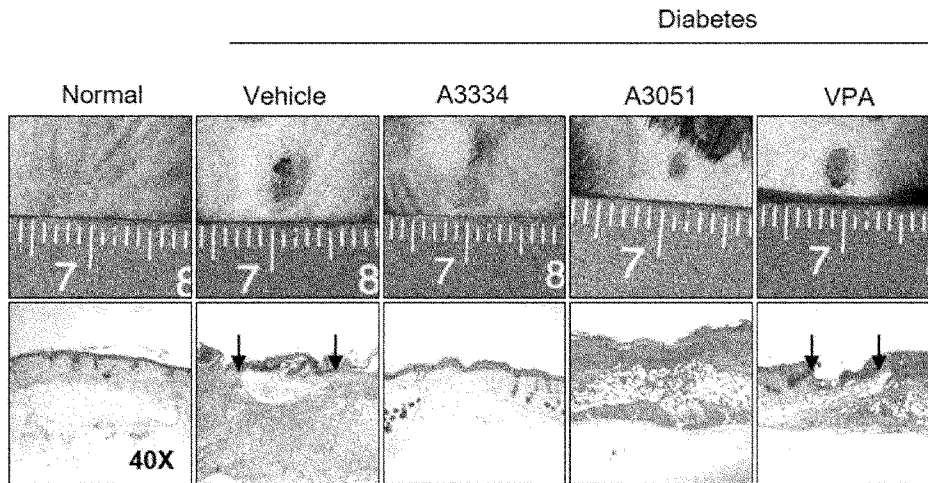
[도 12]



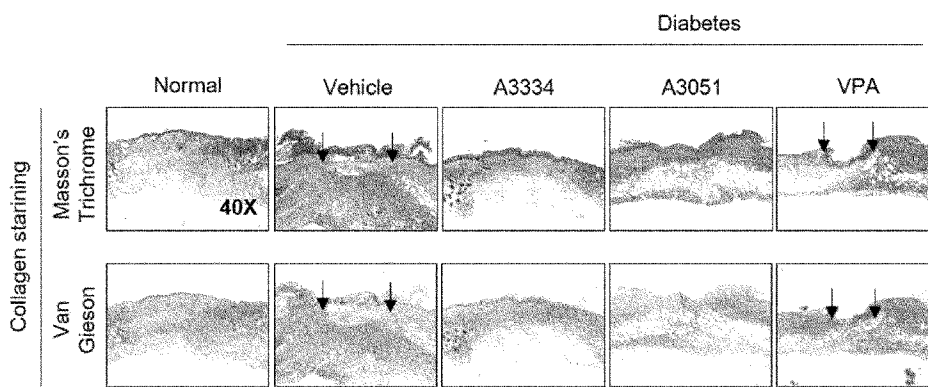
[도 13]



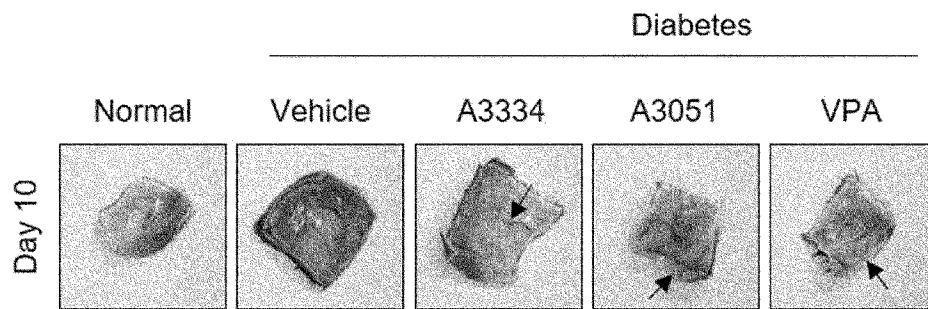
[도14]



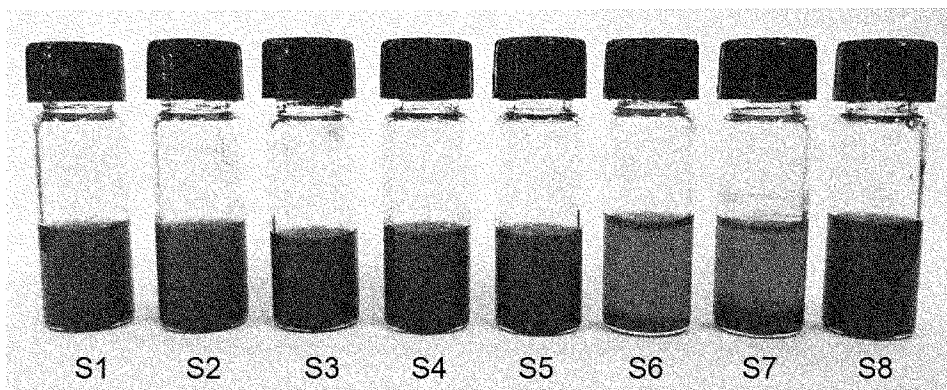
[도15]



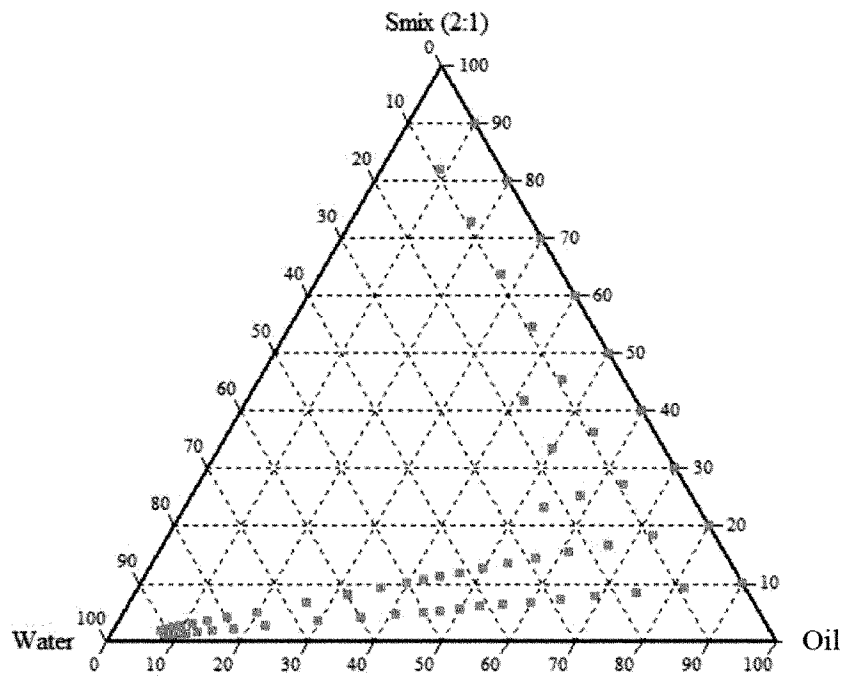
[도16]



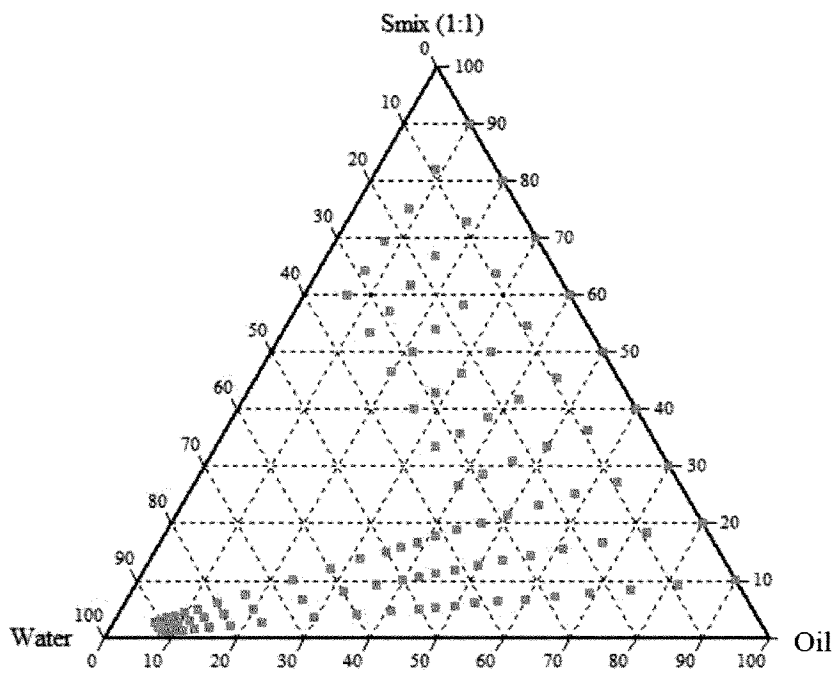
[도17]



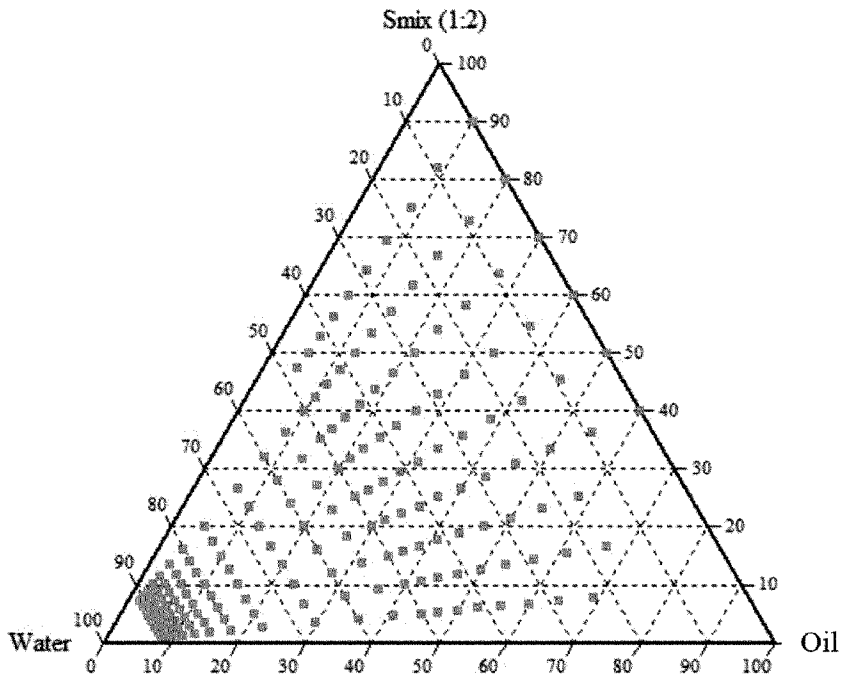
[도 18a]



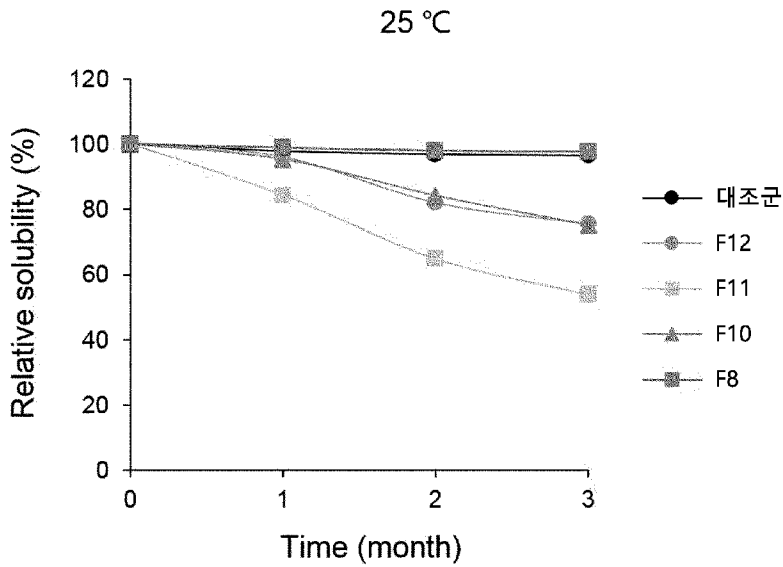
[도 18b]



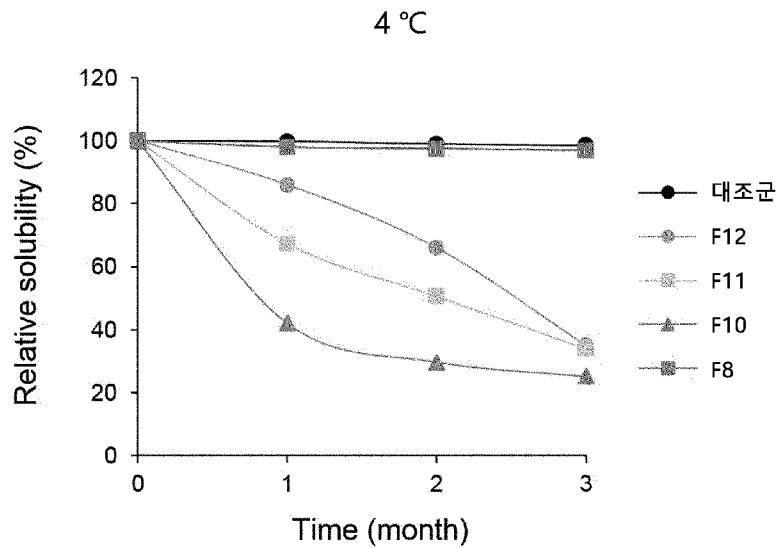
[도 18c]



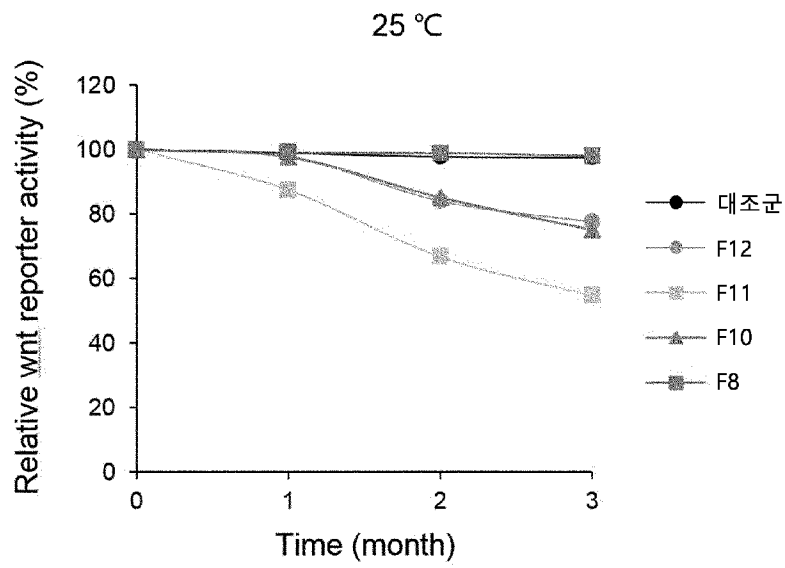
[도 19]



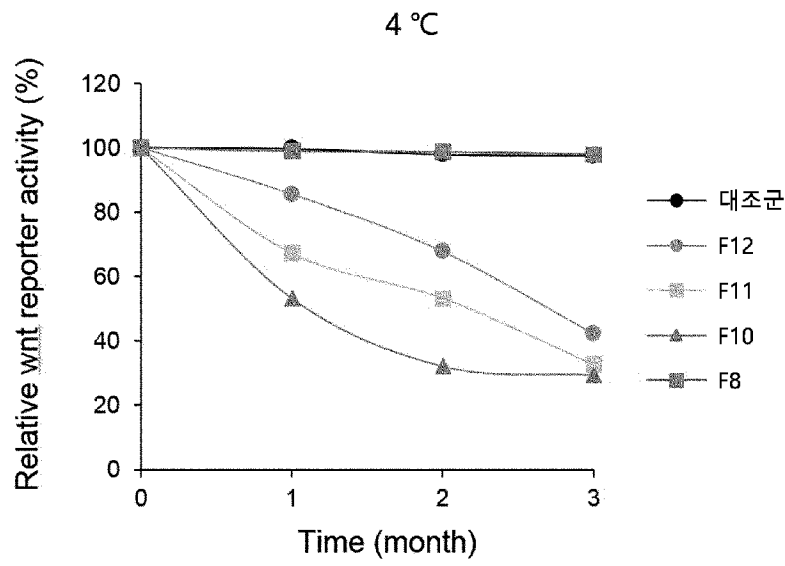
[도 20]



[도21]



[도22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/404(2006.01)i, A61K 36/75(2006.01)i, A61K 31/7048(2006.01)i, A61K 8/49(2006.01)i, A61K 8/9789(2017.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61P 17/02(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/404; A23L 1/30; A23L 33/10; A61K 31/557; A61K 38/08; A61K 38/10; A61K 8/97; A61K 36/75; A61K 31/7048; A61K 8/49; A61K 8/9789; A61K 8/60; A61P 17/02; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, CAplus), Google & Keywords: indirubin, wound, Evodia daniellii Hemsley

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT


Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1855423 B1 (CK BIOTECH) 09 May 2018 See claims 4, 6; paragraph [0122].	1-26
Y	KR 10-2015-0094900 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 20 August 2015 See claim 10; paragraphs [0010], [0030], [0032], [0033], [0041].	1-26
Y	임정아 등. 쉬나무(Evodia daniellii Hemsley) 종실류의 피부재생 및 약리효과에 관한 연구. 제51회 전국과학전람회. 2005, pages 1-43, non-official translation (LIM, Jeong Ah et al. The Research on Skin Regeneration and Pharmaceutical Effects of Evodia Daniellii Hemsley. The 51st National Science Contest). See pages 6, 16; table 1.	2,16,25
Y	KR 10-2016-0128764 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 08 November 2016 See claims 1, 2; paragraphs [0049]-[0055], [0066]-[0070].	1-26
A	WO 2008-070310 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION et al.) 12 June 2008 See pages 2, 3.	1-26
PX	KR 10-2018-0119941 A (CK BIOTECH) 05 November 2018 See claims 1, 2, 5-9, 12, 13; paragraphs [0062], [0063], [0068], [0069], [0071], [0073]-[0076], [0166]-[0179].	1-26

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 SEPTEMBER 2019 (27.09.2019)

Date of mailing of the international search report
01 OCTOBER 2019 (01.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR
 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
 Daejeon, 35208, Republic of Korea
 Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1855423 B1	09/05/2018	WO 2018-194309 A1	25/10/2018
KR 10-2015-0094900 A	20/08/2015	EP 2907520 A1 EP 2907520 B1 KR 10-1721028 B1 US 2015-0224167 A1 US 9763994 B2 WO 2015-122592 A1	19/08/2015 20/02/2019 29/03/2017 13/08/2015 19/09/2017 20/08/2015
KR 10-2016-0128764 A	08/11/2016	None	
WO 2008-070310 A2	12/06/2008	AU 2007-329725 A1 AU 2007-329725 B2 CA 2666972 A1 CA 2666972 C CN 101646425 A EP 2077826 A2 EP 2077826 B1 EP 2679221 A1 HK 1133394 A1 JP 2010-507592 A JP 2014-065723 A JP 2016-121180 A JP 5426389 B2 MX 2009004164 A RU 2009118942 A RU 2480213 C2 US 2011-0009370 A1 US 2016-0354385 A1 US 9402852 B2 WO 2008-070310 A3 ZA 200902948 B	12/06/2008 23/05/2013 12/06/2008 29/12/2015 10/02/2010 15/07/2009 04/09/2013 01/01/2014 06/12/2013 11/03/2010 17/04/2014 07/07/2016 26/02/2014 13/10/2009 27/11/2010 27/04/2013 13/01/2011 08/12/2016 02/08/2016 18/12/2008 30/06/2010
KR 10-2018-0119941 A	05/11/2018	KR 10-1932668 B1	26/12/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/404(2006.01)i, A61K 36/75(2006.01)i, A61K 31/7048(2006.01)i, A61K 8/49(2006.01)i, A61K 8/9789(2017.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61P 17/02(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/404; A23L 1/30; A23L 33/10; A61K 31/557; A61K 38/08; A61K 38/10; A61K 8/97; A61K 36/75; A61K 31/7048; A61K 8/49; A61K 8/9789; A61K 8/60; A61P 17/02; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, CAplus), Google & 키워드:인디루빈(indirubin), 상처(wound), 쉬나무(Evodia daniellii Hemsley)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1855423 B1 (주식회사 씨케이바이오텍) 2018.05.09 청구항 4, 6; 단락 [0122] 참조.	1-26
Y	KR 10-2015-0094900 A (연세대학교 산학협력단) 2015.08.20 청구항 10; 단락 [0010], [0030], [0032], [0033], [0041] 참조.	1-26
Y	임정아 등, “쉬나무(Evodia daniellii Hemsley) 종실류의 피부재생 및 약리효과에 관한 연구”, 제51회 전국과학전람회, 2005, 페이지 1-43 페이지 6, 16; 표 1 참조.	2,16,25
Y	KR 10-2016-0128764 A (주식회사 엘지생활건강) 2016.11.08 청구항 1, 2; 단락 [0049]-[0055], [0066]-[0070] 참조.	1-26
A	WO 2008-070310 A2 (CHILDREN`S MEDICAL CENTER CORPORATION 등) 2008.06.12 페이지 2, 3 참조.	1-26
PX	KR 10-2018-0119941 A (주식회사 씨케이바이오텍) 2018.11.05 청구항 1, 2, 5-9, 12, 13; 단락 [0062], [0063], [0068], [0069], [0071], [0073]-[0076], [0166]-[0179] 참조.	1-26

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

- “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
- “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
- “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
- “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
- “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
- “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
- “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
- “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
- “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
- “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일
2019년 09월 27일 (27.09.2019)

국제조사보고서 발송일
2019년 10월 01일 (01.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1855423 B1	2018/05/09	WO 2018-194309 A1	2018/10/25
KR 10-2015-0094900 A	2015/08/20	EP 2907520 A1 EP 2907520 B1 KR 10-1721028 B1 US 2015-0224167 A1 US 9763994 B2 WO 2015-122592 A1	2015/08/19 2019/02/20 2017/03/29 2015/08/13 2017/09/19 2015/08/20
KR 10-2016-0128764 A	2016/11/08	없음	
WO 2008-070310 A2	2008/06/12	AU 2007-329725 A1 AU 2007-329725 B2 CA 2666972 A1 CA 2666972 C CN 101646425 A EP 2077826 A2 EP 2077826 B1 EP 2679221 A1 HK 1133394 A1 JP 2010-507592 A JP 2014-065723 A JP 2016-121180 A JP 5426389 B2 MX 2009004164 A RU 2009118942 A RU 2480213 C2 US 2011-0009370 A1 US 2016-0354385 A1 US 9402852 B2 WO 2008-070310 A3 ZA 200902948 B	2008/06/12 2013/05/23 2008/06/12 2015/12/29 2010/02/10 2009/07/15 2013/09/04 2014/01/01 2013/12/06 2010/03/11 2014/04/17 2016/07/07 2014/02/26 2009/10/13 2010/11/27 2013/04/27 2011/01/13 2016/12/08 2016/08/02 2008/12/18 2010/06/30
KR 10-2018-0119941 A	2018/11/05	KR 10-1932668 B1	2018/12/26