



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월23일
(11) 등록번호 10-1718854
(24) 등록일자 2017년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) A61K 36/232 (2006.01)
A61K 36/481 (2006.01) A61K 36/63 (2006.01)
A61K 36/752 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61K 36/232 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0050117
(22) 출원일자 2015년04월09일
심사청구일자 2015년04월09일
(65) 공개번호 10-2016-0121635
(43) 공개일자 2016년10월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130077361 A
CN102397435 A

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단
경상북도 경주시 동대로 123 (석장동)
(72) 발명자
이중훈
대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320, 10동
402호 (원촌동, 싸이언스빌)
김장덕
대전광역시 중구 계백로1716번길 40, 101-101(문
화동, 문화마을금호어울림아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 8 항

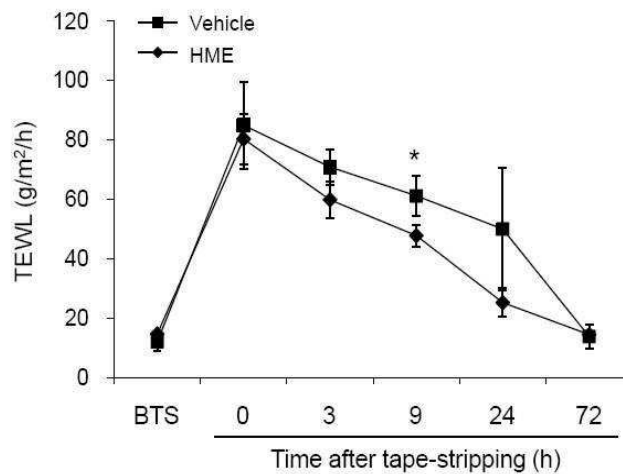
심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 여정자, 황기, 귤피 및 백지 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu* Markovich), 백지(*Angelica dahurica* root) 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물, 피부 보습용 피부 외용제 및 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 혼합 추출물은 웨스턴 블롯(western blot) 및 루시페레이즈 리포터 분석(luciferase reporter assay)을 통해서 각질세포 분화에 관련된 인자들의 단백질 발현 및 프로모터(promoter)활성이 증가 됨을 확인하고, 표피 수분 손실(trans epidermal water loss, TEWL) 실험을 통해 유의한 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명의 혼합 추출물을 피부 보습용 화장품 조성물, 피부 보습용 피부 외용제 및 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 36/481 (2013.01)
A61K 36/63 (2013.01)
A61K 36/752 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

김동일

경기도 고양시 일산동구 동국로 27 일산한방병원
(식사동, 동국대)

(72) 발명자

최대경

대전광역시 동구 대전로 646(효동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HN10C0062
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 대한화장품산업연구원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 한방화장품 실증 연구
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교산학협력단
연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu* Markovich) 및 백지(*Angelica dahurica* root) 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 혼합 추출물 전체 100 중량부에 대하여 여정자 40 ~ 50 중량부, 황기 20 ~ 25 중량부, 귤피 20 ~ 25 중량부, 백지 10 ~ 15 중량부 인것을 특징으로 하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 각질세포 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

여정자, 황기, 귤피 및 백지 혼합 추출물을 유효 성분으로 함유하는 피부 보습용 피부 외용제.

청구항 7

여정자, 황기, 귤피 및 백지 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 건선(psoriasis) 및 아토피(atopic dermatitis)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 피부질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 각질세포 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 건선(psoriasis) 및 아토피(atopic dermatitis)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 피부질환 예방 또는 치료용 약학적 조

성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu* Markovich) 및 백지(*Angelica dahurica* root) 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물, 피부 보습용 피부 외용제 및 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 각질세포(keratinocyte)는 표피(epidermis)의 구조와 항상성을 유지시키는 기능을 하는 중요한 세포이다. 복잡한 분화 과정을 통해, 표피 각질 세포는 생명 유지에 필수 장벽의 초기 구성물질인 각질화 세포 외피(cornified cell envelope)라고 불리는 딱딱한 불용성의 구조를 구성한다(L. Eckhart, S. Lippens et al, Biochim. Biophys. Acta., 2013, 1833, 3471-3480). 각질세포 분화는 세포 주기 정지(cell cycle arrest) 및 수 많은 유전자들의 발현 개시의 과정을 포함한다. 예를 들면, 케라틴 5(keratin 5) 및 케라틴 14의 발현은 감소하고, 반면 케라틴 1, 케라틴 10, 인볼루크린(invulocrin), 로리크린(loricrin) 및 필라그린(fillagrin)과 같은 분화 관련 유전자들은 시간 의존적으로 발현이 증가한다고 알려져있다(P.M. Elias, J. Invest. Dermatol., 2005, 125, 183-200, P.M. Steinert, L.N. marekov et al, J. Biol. Chem, 1995, 270, 17702-17711).

[0005] 각질세포 분화는 위해 환경(harmful environment)에 대항하여 적절한 피부 장벽을 제공하는 중추적인 과정이기 때문에, 각질세포 분화의 장애는 피부 질병과 직접적으로 연결이 되어있다. 예를 들면, 불완전한 각질세포 분화는 피부 장벽을 무너뜨리고 면역 약화를 유발시켜 건선 및 아토피를 일으킨다. 또한, 피부 장벽의 결함은 과도하게 건조한 피부를 만들어, 분화-관련 피부 질환을 유발시키는 또 다른 악화 요인이 될 수도 있다고 알려져 있다(M.A. Lowes, A.M. Bowcock et al, Nature, 2007, 445, 866-873, M. Leibold, L.G. Herrmann et al, Cutis, 2005, 76, 7-12). 분화와 연관된 피부 질병을 치료하기 위하여, 사이클론 스포린 A(cyclosporine A), 타크롤리머스(Tacrolimus) 및 프라임크롤리머스(primecrolimus)와 같은 면역조절성(immunomodulatory) 약물들이 초기 단계의 치료물질(first-line agent)로서 널리 사용되고 있고(F.O. Nestle, D.H. Kaplan, et al, N. Engl J. Med., 2009, 361, 496-509), 또한, 피부 보습이 질병의 상황을 완화 시키고 피부 질감을 강화하는 데에 이로운 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌다(C. Lynde, J. Drugs, Dermatol., 2008, 7, 1038-1043). 필라그린과 같은 각질세포 분화의 최종 산물은 자연적인 보습성 요인(natural moisturizing factor, NMF)을 제공하며, 건강한 피부를 유지하도록 한다는 것이 알려져 있다(P. Chandar, G. Nole et al, Cutis, 2009, 84, 2-15, S. Kezic, P.M. Kemperman, et al, J. Invest. Dermatol, 2008, 128, 2117-2119). 그러므로, 각질세포 분화를 촉진하는 치료법은 초기 단계 치료법과 함께 공동의 치료 양식으로 사용될 수 있다고 예상된다.

[0007] 여정자는 당광나무(*Ligustrum lucidum* Aiton) 또는 광나무(*Ligustrum japonicus* Thunberg)의 열매이다. 여정실이라 고도 한다. 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 달다가 쓰고 떫다. 겨울에 과실이 성숙하였을 때 따서 지엽을 제거하고 햇볕에 말리거나 과실을 가볍게 증류하여 햇볕에 말린 것을 이용하는데, 강심, 이뇨작용과 간기능 보호작용, 건강한 사람의 모세포 전환작용 촉진, 황색 포도상구균 및 이질간균, 인플루엔자균, 녹농균, 대장균을 억제하는 작용, 항암 효과에도 활성반응을 보인다고 알려져 있다.

[0009] 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge)는 산지에서 자라며 높이가 1m에 달하고 전체에 잔털이 있다. 잎은 6~11쌍의 소엽으로 구성된 기수1회우상복엽이다. 꽃은 7, 8월에 피고 길이 15 ~ 18 mm로서 연한 황색이며 긴 꽃대에 여러 개의 꽃이 어긋나며 피는 꽃차례를 이룬다. 뿌리는 약재로 이용하는데 약효성분은 폴리산(folic acid)·콜린(choline) 등이다. 동물실험에서는 중추신경계통의 흥분작용과 이뇨작용도 현저하였으며, 흰쥐에게 대량의 분말을 투여하였을 때에는 신염의 발생을 억제 시키고 단백뇨와 콜레스테롤혈증의 발생도 지연시켰으며, 혈압강하작용도 인정되었다. 또한, 자궁하수·위하수·탈홍·자궁출혈에도 널리 이용되며, 체력을 항진시켜 주고 전신 근육의 긴장도를 높여주기도 한다.

[0011] 귤피(*Citrus unshiu* Markovich)는 운향과의 귤 또는 동속 근연식물의 성숙한 과피를 말하고 익은 열매 껍질을 모아 햇볕에 말린다. 맛은 쓰고 매우며 성질은 따뜻하며, 폐경·비경에 작용한다. 기의 순환을 촉진하고 습사를 없애며 가래를 삭인다. 약리 실험에서 위액 분비 촉진 작용, 소화 작용 등이 밝혀졌으며, 식욕이 부진하고 소화가 안 되며 헛배가 부르고 아프며 토하거나 설사하는 데[위염], 습담이 있어 가슴이 답답하고 기침이 나

며 숨이 찬 데, 현기증, 두근거림, 임신 오조 등에 쓴다.

[0013] 백지(*Angelica dahurica* root)는 산형과의 구릿대(*Angelica dahurica* Bentham et Hooker)의 뿌리 부분을 지칭하는 생약명이다. 뿌리는 담황갈색인데 비대하고, 추대하면 목질화하여 죽는다. 생약으로는 1~2년생이 좋은데 꽃대가 올라오지 않은 것을 쓴다. 유행성 감기로 인한 두통, 코막힘, 콧물을 다스리는 진통약이며, 위장장애, 산전 산후두통, 어지럼증, 치통, 안면신경통, 마비 등에 유효하다. 또한 월경 뒤 하혈이나, 대하, 대변에 피가 섞여 나올 때, 축농증으로 인한 두통, 창양, 중독, 피부궤양 등에도 효과가 있다고 알려져 있다.

[0015] 한편, 여정자와 관련된 선행기술로서, 대한민국 공개 특허 제 2013-0068320호에는 제주광나무의 피부 장벽기능 회복 및 피부 보습력 증가 효과에 대해 개시하고 있으며, B. Hu에 따르면 여정자 추출물이 사이클린-의존적인 키나제(cyclin-dependent kinase, CDK)의 상향조절(upregulation)에 의해 간암세포(hepatocarcinoma cell)에서 세포 주기 정지를 유도한다고 한다(B. Hu, Q. Du, et al, *Oncol. Rep.*, 2014, 32, 1037-1042). 또한, 대한민국 공개 특허 제 2002-0025346호에는 백지 및 고본 추출물의 피부 미백효과, 피부 자극 완화 효과 및 면역 증강 효과에 대해 개시하고 있고, L. Lu, H. Ihara, 및 S.F. Xu 등은 황기, 귤피 및 백지 추출물이 항산화 활성이 있다는 것을 밝혔으나(L. Lu, et al, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, 61, 7-16/ H. Ihara, et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012, 1843-1848/ S.F. Xu, et al, *Chem. Biodivers.*, 2011, 8, 1121-1131), 여정자, 황기, 귤피 및 백지 혼합 추출물의 각질세포 분화 촉진에 따른 피부 보습에 대한 효과는 알려진 바 없다.

[0017] 이에, 본 발명자들은 전통적으로 사용되던 한약재를 사용하여 피부 보습 개선용 화장품 조성물을 개발하기 위하여 노력하던 중, 본 발명의 여정자, 황기, 귤피 및 백지의 혼합 추출물이 세포 성장을 저해하지 않으면서 각질 세포 분화를 촉진하고, 피부 장벽 기능 개선 효과를 나타냄을 확인함으로써, 상기 혼합 추출물을 피부 보습 개선용 화장품 조성물, 피부 보습용 피부 외용제 및 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu* Markovich), 백지(*Angelica dahurica* root) 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물, 피부 보습용 피부 외용제 및 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명은 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu* Markovich) 및 백지(*Angelica dahurica* root) 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 여정자, 황기, 귤피 및 백지 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습용 피부 외용제를 제공한다.

[0023] 아울러, 본 발명은 여정자, 황기, 귤피 및 백지 혼합 추출물을 함유하는 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu* Markovich), 백지(*Angelica dahurica* root) 혼합 추출물은 웨스턴 블롯(western blot) 및 루시페레이즈 리포터 분석(luciferase reporter assay)을 통해서 각질세포 분화에 관련된 인자들의 단백질 발현 및 프로모터(promoter)활성이 증가 됨을 확인하고, 표피 수분 손실(transepidermal water loss, TWEL) 실험을 통해 유의한 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명의 여정자, 황기, 귤피, 백지 혼합 추출물을 피부 보습용 화장품 조성물, 피부 보습용 피부 외용제 및 피부 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 UPLC(ultra performance liquid chromatography)-photodiode array (PDA) 검출 방법으로 확인한 본 발명의 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 귤피(*Citrus unshiu*

Markovich), 백지(*Angelica dahurica root*) 혼합 추출물의 성분을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 혼합 추출물의 각질세포에 대한 세포 생존율을 나타낸 도이다.

HME(herbal mixture extract): 본 발명의 혼합 추출물을 처리한 실험군

CTL(control): 본 발명의 혼합 추출물을 처리하지 않은 대조군

Cell viability(% control): 본 발명의 혼합 추출물을 처리하지 않은 대조군에 대한 실험군의 세포 생존율

도 3은 본 발명의 혼합 추출물로 인한 각질 세포 분화 관련 인자들의 단백질 발현을 나타낸 도이다.

CTL(control): 본 발명의 혼합 추출물을 처리하지 않은 대조군

Ca²⁺: 각질세포 분화의 유도 인자인 칼슘을 처리한 양성 대조군

HME(herbal mixture extract): 본 발명의 혼합 추출물을 처리한 실험군

도 4는 본 발명의 혼합 추출물로 인한 인볼루크린(*involucrin*) 및 로리크린(*loricrin*)의 프로모터 활성을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 혼합 추출물로 인한 세포 성장을 나타낸 도이다.

1d, 3d, 5d(1day, 3day, 5day): control, Ca²⁺, HME를 처리한 후 경과 한 날 수

도 6은 본 발명의 혼합 추출물로 인한 피부 장벽 기능의 회복을 나타낸 도이다.

Vehicle: 본 발명의 혼합 추출물을 처리하지 않은 대조군

TWEL(transepidermal water loss): 표피 수분 손실도

도 7은 본 발명의 혼합 추출물로 인한 피부 장벽 기능 개선 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030]

본 발명은 여정자(*Ligustrum lucidum Aiton*), 황기(*Astragalus membranaceus Bunge*), 귤피(*Citrus unshiu Markovich*) 및 백지(*Angelica dahurica root*) 혼합 추출물을 함유하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0031]

상기 혼합 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0032]

1) 여정자, 황기, 귤피, 백지에 추출 용매를 가하여 추출하는 단계;

[0033]

2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0034]

3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 여정자, 황기, 귤피, 백지의 추출물을 제조하는 단계.

[0035]

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 여정자, 황기, 귤피, 백지는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0036]

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물 및 유기 용매를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 여정자, 황기, 귤피, 백지 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 4 내지 6배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것

은 아니다.

- [0037] 상기 혼합 추출물은 여정자, 황기, 굴피 또는 백지 각각의 추출물을 제조한 후 혼합하여 혼합 추출물을 제조할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 상기 수득한 여정자, 황기, 굴피 및 백지 혼합 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.
- [0039] 상기 혼합 추출물은 혼합 추출물 전체 100 중량부에 대하여 여정자 40 ~ 50 중량부, 황기 20 ~ 25 중량부, 굴피 20 ~ 25 중량부, 백지 10 ~ 15 중량부 인것이 바람직하고, 여정자 42.5 중량부, 황기 21.2 중량부, 굴피 21.2 중량부, 백지 14.8 중량부 인것이 더 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 혼합 추출물은 각질세포 분화를 촉진하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 여정자, 황기, 굴피, 백지 혼합 추출물을 제조한 다음, 상기 혼합 추출물의 각질세포 분화 촉진을 통한 피부 보습 개선효과를 확인하기 위하여, 세포 독성을 확인한 결과, 본 발명의 혼합 추출물이 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(도 2 참조). 또한, 각질세포 분화의 정도를 확인할 수 있는 인자들의 단백질 발현 및 프로모터 활성을 확인하기 위해 웨스턴 블롯(western blot) 및 루시퍼레이즈 리포터 분석(luciferase reporter assay)을 수행한 결과, 본 발명의 혼합 추출물이 각질세포 분화를 촉진함을 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0043] 또한, 상기 혼합 추출물의 처리로 인한 피부 장벽 기능의 변화를 확인하기 위한, 표피 수분 손실도를 측정하는 TWEL(trans-epidermal water loss) 실험 및 각질 세포의 분화-증가 활성을 강하게 하는 필라그린의 발현을 확인하기 위한 면역침강(immunohistochemistry)실험을 수행한 결과, 상기 혼합 추출물은 피부 장벽 기능의 회복을 빠르게 하여 피부 장벽 기능을 개선 시키는 데 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명의 혼합 추출물이 피부 장벽 기능에 유의한 효과가 있음을 확인하였다(도 6 및 도 7 참조).
- [0044] 따라서, 본 발명의 혼합 추출물은 각질세포 분화를 촉진하고, 피부 장벽 기능을 개선하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물로 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 상기 혼합 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종이상 함유할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- [0048] 또한, 상기 화장료 조성물은 본 발명의 혼합 추출물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(forming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 조성물에서 상기 혼합 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.005 내지 90 중량% 함유되는 것이 바람직하지만, 보습 효과가 있고 독성이 나타나지 않는 범위에서 사용 용도에 따라서 상기 범위 이상 또는 이하로도 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명은 여정자, 황기, 굴피, 백지 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 보습용 피부 외용제를 제공한다.
- [0052] 상기 혼합 추출물을 피부 외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(forming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명은 여정자, 황기, 굴피, 백지 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부질환 예방 및 약학적 조

성물을 제공한다.

- [0055] 상기 피부 질환은 건선(psoriasis) 또는 아토피(atopic dermatitis) 인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0056] 상기 혼합 추출물은 각질세포 분화를 촉진하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡셀제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화 될 수 있다.
- [0059] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면 정제, 트로치제(troches), 로젠제(lozenge), 수용성 또는 우성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)로 제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 봉해제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.
- [0060] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 혼합 추출물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.
- [0061] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수율, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 혼합 추출물을 0.0001 ~ 500 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 0.001 ~ 100 mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0063] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.
- [0064] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0066] **<실시예 1> 본 발명의 혼합 추출물의 제조**
- [0067] 본 발명에 사용된 여정자, 황기, 귤피, 백지 혼합 추출물을 제조하였다.
- [0068] 구체적으로, Omniherb(Daegu, Korea)에서 구입한 건조된 여정자(*Ligustrum lucidum* Aiton) 100 g, 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge) 50 g, 귤피(*Citrus unshiu* Markovich) 50 g, 백지(*Angelica dahurica* root) 35 g을 작게 자르고, 혼합한 후, 상기 혼합물의 8배의 부피의 물에 4시간 동안 끓여서 추출물을 획득하였다. 상기 추출물은 감압여과(Whatman filter paper) 한 후, 상기 여과액을 동결 건조하여 혼합 추출물(herbal mixture extract, HME)을 제조하였다. 상기 혼합 추출물을 세포에 처리하기 위해서, 물에 재용해하여 사용하였고, 마우스의 국부에 사용하기 위해서는, 70%의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 30%의 에탄올(ethanol)을 혼합한 것에 재용해하여 사용하였다.
- [0070] **<실시예 2> 각질세포 분화를 위한 세포 배양**
- [0071] 본 발명에 사용된 각질세포주를 구축하여 배양하였다.
- [0072] 구체적으로, 인간 표피 각질 세포(human epidermal keratinocyte)에 시미안 바이러스 40 라지 T 항원(simian virus large T antigen, SV40T)을 주입하여 형질전환시킨 세포주 SV-HEK를 소 너하수체 추출 및 인간 표피 성장 호르몬을 보충한 각질세포-무혈청 배지(keratinocyte-serum free medium, K-SFM)에 배양하였다.
- [0074] **<실험예 1> Ultra performance liquid chromatography(UPLC)를 이용한 본 발명의 혼합 추출물의 성분 확인**
- [0075] 상기 <실시예 2>의 방법으로 조제된 본 발명의 혼합 추출물의 구성 성분을 확인하기 위하여 UPLC-photodiode array(PDA) 검출 방법을 수행하였다.
- [0076] 구체적으로 Brownlee SPP C18 column(3.0 × 100 mm, 2.7 μm)을 사용하였고, 이동상(mobile phase)은 포름산(formic acid)에 의해 산성화 된 아세토니트릴(acetonitrile, 0.1%, solvent A) 및 물(solvent B)로 구성하였

다. 모든 용매는 0.2 μm 필터를 이용하여 여과한 후 사용하였다. 또한, 총 투입량은 2 μl이고, 분당 0.5 mL의 속도로 하기와 같이 용매 A의 농도를 조작하여 밀도 프로그램을 설정하여 수행하였다. 0 ~ 4 분은 용매 A의 2%, 4 ~ 7분은 2 내지 5%의 용매 A에서 선형으로, 7 ~ 12분은 5 내지 7%의 용매 A에서 선형으로, 12 ~ 17분은 7 내지 10%의 용매 A에서 선형으로, 17 ~ 41분은 10 내지 30%의 용매 A에서 선형으로, 41 ~ 47분은 30 내지 50%의 용매 A에서 선형으로, 47 ~ 54분은 50 내지 70%의 용매 A에서 선형으로 및 54 ~ 59분은 70 내지 100%의 용매 A에서 선형으로 설정하였다.

[0077] 그 결과, 도 1 및 표 1에 나타난 바와 같이 혼합 추출물에서 식물화학물질(phytochemical)인 나린게닌(naringenin), 나린진(naringin), 나리루틴(narirutin), 헤스페리딘(hesperidin), 네오헤스페리딘(neohesperidin), 아비프린(aviprin) 및 비야크양겔리신(byakangelicin)을 확인할 수 있었다(도 1 및 표 1).

표 1

[0079]

피크 순서	전체 시간(분)	성분 확인
1	27.398	나린제닌
2	32.630	나린진, 나리루틴
3	34.342	헤스페리딘, 네오헤스페리딘
4	37.292	아비프린 (옥시포스다닌 수화물, oxypeucedanin hydrate)
5	38.314	비야크양겔리신

[0081] <실험예 2> 본 발명의 혼합 추출물의 각질세포에 대한 독성 확인

[0082] 본 발명의 혼합 추출물의 각질세포 분화에 대한 효과를 확인하기 위하여, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 수행하였다.

[0083] 구체적으로 상기 <실시예 2>의 방법으로 구축하여 배양 중이던 SV-HEK 세포 2×10^5 개를 12 웰 배양 접시에 분주하고, 본 발명의 혼합 추출물을 하루 동안 처리하였다. 그 뒤, 상기 세포에 2 mg/ml의 농도의 MTT 용액을 첨가한 후, 4시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 배양했던 배지를 제거하고, 형성된 포마잔 결정(formazan crystal)을 100 μl의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해 시킨 뒤, 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, enzyme-linked immunospecific assay, ELISA) 판독기를 이용하여 540 nm에서의 흡광도(optical density)를 측정하였다.

[0084] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 SV-HEK 세포에 혼합 추출물을 500 μg/ml까지 투입량을 증가하여도, 처리 후 3일째에 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 2).

[0086] <실험예 3> 본 발명의 혼합 추출물의 각질세포 분화 조절 확인

[0087] 본 발명의 혼합 추출물의 각질세포 분화에 대한 효과를 확인하기 위하여, 각질세포 분화의 정도를 확인할 수 있는 인자들의 단백질 발현 및 프로모터 활성을 확인하기 위해 웨스턴 블롯(western blot) 및 루시퍼레이즈 리포터 분석(luciferase reporter assay)을 수행하였다.

[0088] 구체적으로, 각질세포 분화의 유도 인자로 잘 알려진 칼슘을 양성 대조군으로 사용하였고, 상기 SV-HEK 세포에 본 발명의 혼합 추출물을 3일 동안 처리하였다. 그 다음, 수확한 세포는 프로프렙(proprep) 용액을 이용하여 분쇄한 뒤, 전체 단백질은 BCA(bichinichomonic acid) 단백질 분석 시약(Pierce Biotechnology, Fockford, IL,

USA)을 사용하여 정량하였다. 샘플은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)에 옮긴 뒤, 알맞은 일차 항체에 반응시켰다. 상기 블롯은 퍼옥시데이즈(oxidase)에 결합된 이차 항체를 사용하여 반응시킨 뒤, 심화 화학발광 (enhanced chemiluminescence, Intron)기기를 이용하여 분석하였다.

[0089] 구체적으로, 프로모터 활성 분석을 위해서는 각질 세포로부터 유전체적(genomic) DNA를 분리한 뒤, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)의 템플레이트(template)로서 사용하여, 인볼루크린-루시페레이즈 리포터 아데노바이러스(invovucin-luc reporter adenovirus, Ad/Inv-luc) 및 로리크린-루시페레이즈 리포터 아데노바이러스(loricrin-luc reporter adenovirus, Ad/Lor-luc)를 합성하였다. 상기 중합효소연쇄반응을 위해 사용된 프라이머의 시퀀스(sequence)는 하기와 같다. 인볼루크린(invovucin) 프로모터(서열번호 1 및 서열번호 2), 로리크린(loricrin) 프로모터(서열번호 3 및 서열번호 4). 상기 중합효소연쇄반응에 의해, 인볼루크린의 전사 위치의 -2,467 부터 +1,239까지의 염기 쌍을 포함하는 절편 및 로리크린의 전사 위치의 -2,033 부터 +12까지의 염기 쌍을 포함하는 절편을 획득하였다. 상기 프로모터 절편은 pGL3 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝 된 후, pENTR 벡터로 이동이 되었으며 아데노바이러스를 제조하였다.

[0090] 상기 SV-HEK 세포는 12 웰 배양 접시에 50%의 세포 밀도(confluency)로 배양하였고, 리포터 아데노바이러스를 이용하여 형질 전환 시켰다. 그 후, 상기 세포는 새로운 배지에서 배양하였고, 혼합 추출물을 처리하였다. 세포는 48시간 더 배양하였으며, 세포 추출물은 세포 분쇄 완충액(cell lysis buffer)를 사용하여 세포 추출물을 준비하였다. 루시페레이즈의 활성은 루시페레이즈 분석 시스템(Promega, Madison, WI, USA)에서 제공하는 프로토콜에 따라 분석하였다.

[0091] 그 결과, 도 3의 왼쪽에 나타난 바와 같이 혼합 추출물의 처리에 의해 케라틴 1(keratin 1), 인볼루크린(invovucin) 및 로리크린(loricrin)이 급격하게 증감을 확인하였다. 또한 도 3의 오른쪽에 나타난 바와 같이 혼합 추출물을 처리하고 7일이 지났을 때, 분화 말기 마커(marker)인 필라그린(filaggrin)이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다(도 3).

[0092] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이 인볼루크린 및 로리크린의 프로모터 활성은 혼합 추출물의 처리양에 의존적임을 확인하였다(도 4).

[0093] 이러한 결과를 통하여 본 발명의 혼합 추출물이 각질세포 분화를 촉진함을 확인하였다.

[0095] <실험예 4> 혼합 추출물의 세포 성장에 대한 영향 확인

[0096] 각질세포 분화는 세포 주기 정지(cell cycle arrest)와 함께 일어나기 때문에, 본 발명의 혼합 추출물의 세포 성장에 대한 영향을 확인하기 위하여, [³H]thymidine 흡수 분석을 수행하였다.

[0097] 구체적으로, 상기 <실시예 1>의 SV-HEK 세포를 60-mm 세포 배양 접시에 분주하고, 1μCi의 [³H]thymidine(Amersham, Buckinghamshire, UK)를 처리하였다. 하기의 제시된 시간동안 배양을 한 뒤, 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 행군 뒤 실온에서 0.1 N NaOH에 배양하였다. 세포 분쇄물의 방사능성은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

[0098] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명의 혼합 추출물을 처리한 실험군은 칼슘을 처리한 대조군과 비슷한 세포 성장 저해를 나타내었다(도 5).

[0099] 이러한 결과를 통하여 본 발명의 혼합 추출물이 세포 성장을 저해하지 않으면서, 각질세포 분화를 촉진함을 확인하였다.

[0101] <실험예 5> 본 발명의 혼합 추출물의 피부 장벽 기능에 대한 효과 확인

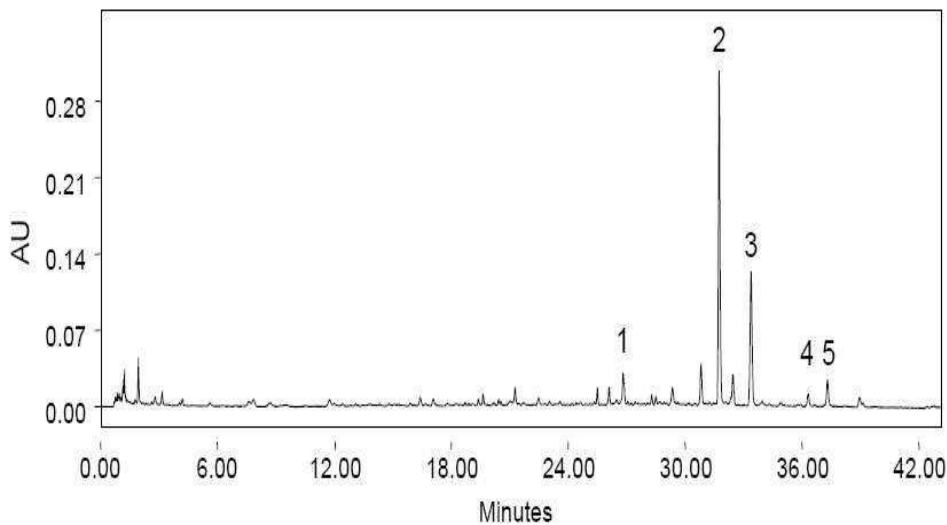
[0102] 본 발명의 혼합 추출물의 피부 장벽 기능에 대한 효과를 확인하기 위하여, 피부 장벽 기능 장애를 확인하는 잘 알려진 실험 기법인 표피 수분 손실(transepidermal water loss, TEWL)을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 7주령의 털이 없는 늙은 여성 마우스를 Orient Bio Inc.(Seongnam, Korea)에서 구입하고, tape-stripping으로 피부 장벽을 망가뜨린 뒤, 혼합 추출물을 국소적으로 처리하였다. 혼합 추출물은 70 %의 폴리데틸렌 글리콜 및 30 %의 에탄올에 용해시켜 5 mg/ml의 농도로 0.2 ml을 사용하였다. TEWL은 Yoshizawa의 논문(Y. Yoshizawa et al, Skin Res. Technol, 2001, 36-39)에 기술된 방법으로 Tewameter TM210(Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany)를 이용하여 측정하였다.

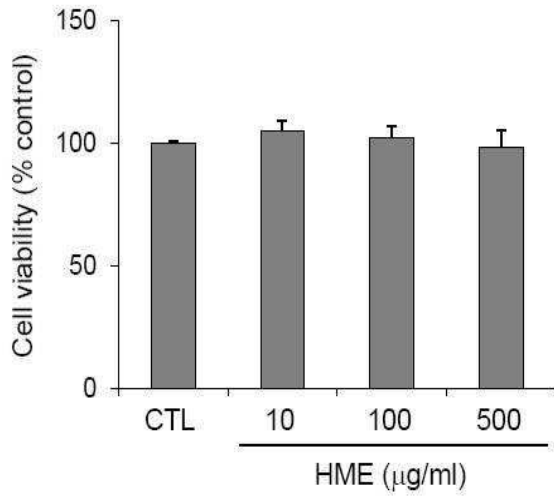
- [0104] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 본 발명의 혼합 추출물을 처리한 군(HME)이 대조군(Vehicle)에 비교하여 피부 장벽 기능의 회복을 빠르게 함을 확인하였다(도 6).
- [0105] 또한, 본 발명의 혼합 추출물의 효과를 더 알아보기 위하여 면역침강(immunohistochemistry)을 통해 필라그린의 발현량을 확인하였다.
- [0106] 구체적으로 마우스의 피부 시료(specimen)의 파라핀(paraffin) 박편(section)의 왁스(wax)를 제거하고, 다시 수화(hydrated)하였으며 PBS를 이용하여 세 번 행구었다. 상기 박편은 37 °C에서 5분간 프로티나제 K(protenase K, Dako, Carpinteria, CA, USA)와 함께 배양하였고, 실온에서 10분간 H₂O₂를 처리하였고, 0.1 % Tween-20와 1 %의 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 함유한 PBS에 30분간 blocking하였으며, 필라진 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA)에 1시간동안 반응시켰다. 상기 박편은 연속적으로 퍼옥시데이즈-결합 2차 항체(peroxidase-conjugated secondary antibody)에 배양하여 Chemmate envision 검출 키트(Dako, Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 시각화하였다.
- [0107] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 본 발명의 혼합 추출물의 처리 후 3일째인 박편에서, 각질 세포의 분화-증가 활성을 강하게 하는 마우스의 표피의 그레놀라 층(granular layer)에 있는 필라그린이 현저하게 증가 됨을 확인하였다(도 7).
- [0108] 이러한 결과를 통하여 본 발명의 혼합 추출물이 피부의 그레놀라 층에 있는 필라그린의 발현을 증가시키고, 피부 장벽 기능을 개선 시키는데 효과가 있음을 확인하였다.

도면

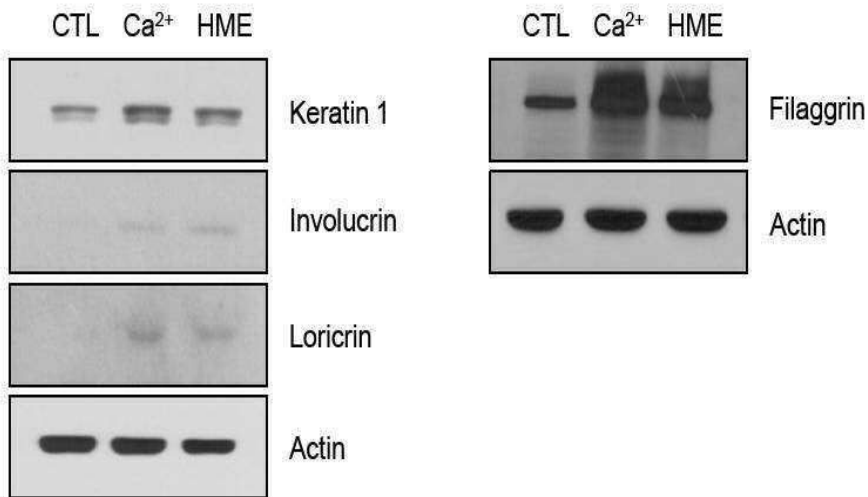
도면1



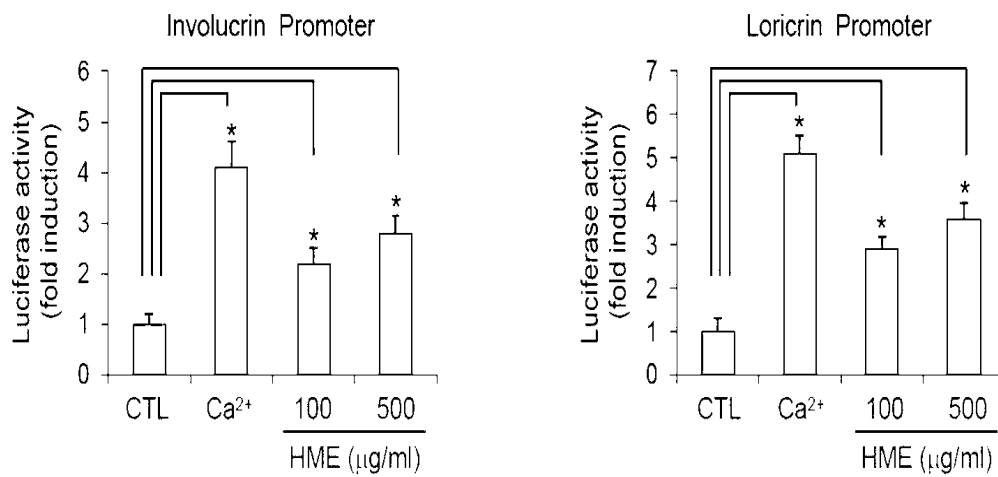
도면2



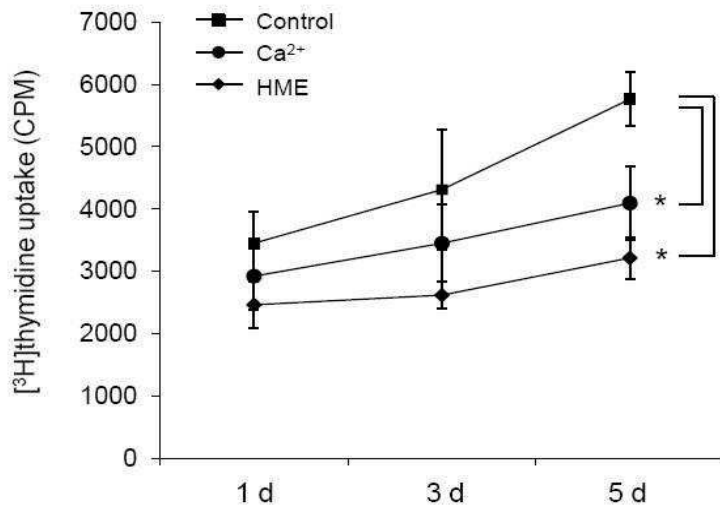
도면3



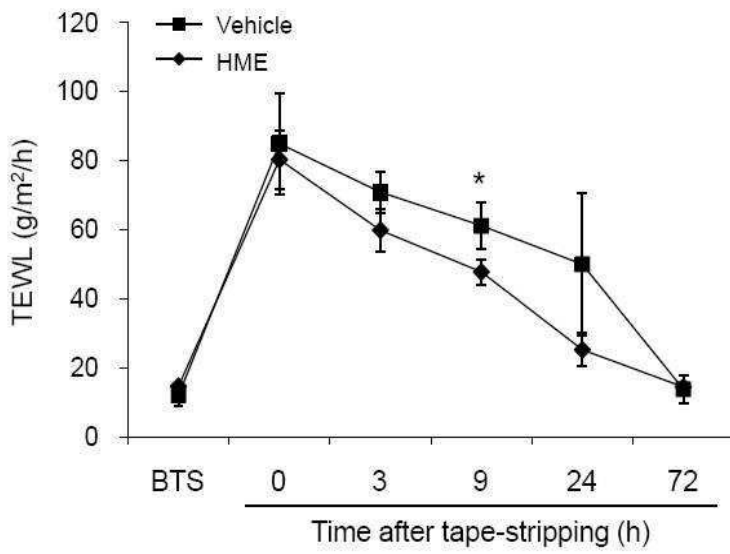
도면4



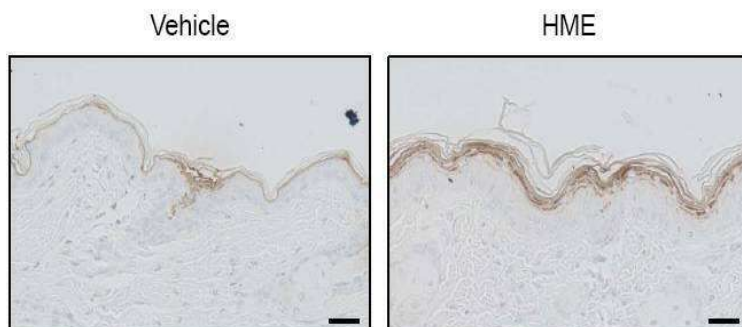
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Chungnam National University - Industry Collaboration Foundation
 <120> Cosmetic composition containing Ligustrum lucidum Aiton,
 Astragalus membranaceus Bunge, Citrus unshin Markovich, Angelica
 dahurica root extract for moisturizing the skin
 <130> 2015P-03-016
 <160> 4
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> involucrin promoter
 <400> 1
 ctccatgtgt catgggatat g 21

 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> involucrin promoter (R)
 <400> 2
 tcaacctgaa agacagaaga g 21

 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> loricrin promoter
 <400> 3
 taccaagcaa tcctctcacc ttgg 24

 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> loricrin promoter (R)

<400> 4

tgaggagaga agatgctggc

20