



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0140444
(43) 공개일자 2022년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0046650(분할)
(22) 출원일자 2022년04월15일
심사청구일자 2022년04월15일
(62) 원출원 특허 10-2021-0046041
원출원일자 2021년04월08일
심사청구일자 2021년04월08일

(71) 출원인
재단법인 전남바이오산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
(72) 발명자
김재용
전남 순천시 왕궁길 95, 105동 101호(조례동, 송
촌프라임)
이규옥
전라남도 장흥군 장흥읍 장흥로 76-25 미르채
101-1205
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최석진

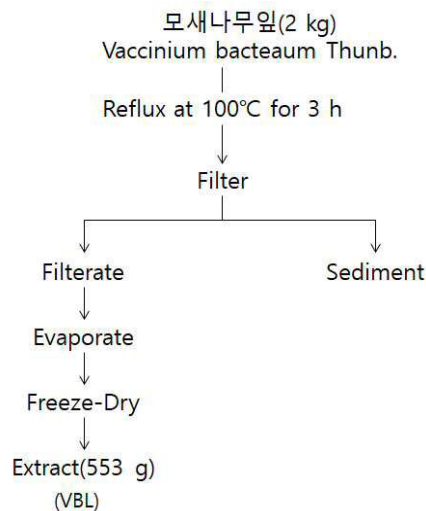
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 모새나무(Vaccinium bacteum Thunb.) 잎 추출물을 유효성분을 포함하는 반려동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 하는 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 조성물으로써 국내 천연 토종자원인 모새나무를 자원으로 이용하고 독성이나 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 반려동물용 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서규화

전라북도 남원시 운봉읍 운봉로 471

신자원

전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호

김초인

전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288

최은진

전라남도 담양군 무정면 내당길 31-2

안건내

전라남도 여주시 웅천동 꿈에그린 203동 1901호

한의정

전라남도 여주시 신월로 561-8, 9동 705호 (신월동, 금호아파트단지)

이학성

대전광역시 유성구 엑스포로 448(전민동, 엑스포아파트) 106-1205

명세서

청구범위

청구항 1

모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 반려동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 모새나무 잎 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 추출 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 반려동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물

청구항 3

제2항에 있어서, 피부 장벽 및 보습 개선용 조성물은 모새나무 잎 추출물이 0.1 내지 2000 mg/kg/체중/1일의 양으로 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 반려동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물

청구항 4

제1항에 있어서, 반려동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물은 로션, 크림, 외형제, 티슈, 샴푸, 린스 중에서 선택된 하나의 제형에 첨가되는 것을 특징으로 하는 반려동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 반려동물용 피부 장벽, 보습 개선 및 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 천연원료인 모새나무 잎을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 반려동물용 피부 장벽 및 보습 개선 또는 예방용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체의 1차적인 보호장벽으로 체내 수분을 보존하고 외부 환경으로부터 피부를 지키는 역할을 한다. 피부는 천연보습인자를 보유하고 있지만 건조한 외부환경, 과도한 세정제 사용, 신진대사를 조절하는 다양한 호르몬 분비 감소, 자외선 노출 등 다양한 물리적, 화학적 자극에 의해 기능이 저하되면서 피부 건조가 발생할 수 있다.

[0003] 피부는 크게 표피, 진피, 그리고 피하지방으로 이루어져 있다. 피부 중 표피층은 매우 복잡하고 역동적이며 자기재생적인 피부장벽으로 인체의 조직 가운데서도 가장 역동적인 기관으로 표피세포의 형성, 분화 및 탈각과정이 끊임없이 반복되면서 표피의 항상성을 유지한다.

[0004] 표피의 주요구성 세포는 각질형성세포의 분화정도에 따라 각질층, 과립층, 유극층 및 기저층 4개로 나뉘는데 각층에 따라 유전자의 발현이 다르게 나타난다. 피부의 표피층을 구성하며 그 중 최외각에 위치하고 있는 각질층은 케라틴 50%, 지방 20%, 수용액 23%, 수분 7%로 구성되어 있으며 수분함유상태에 따라 각질층의 두께가 달라진다.

[0005] 각질층은 수분을 흡수하고 보유하는 능력이 있어서 피부를 유연하게 유지하고 매끄럽게 만들어주며 약 30%의 수분을 함유해야 건강한 피부 상태를 유지할 수 있고 각질층의 수분이 10% 이하로 떨어지게 되면 피부장벽에 이상이 발생하고 각질층의 보습 능력이 저하되어 피부는 건조해진다.

[0006] 기저층에서는 keratin 5와 14가 발현되는데 분화과정으로 이행하면 발현이 중단된다. 유극층에서는 keratin 1과 10이 합성되며, 유극층 및 과립층에서는 각질세포막 연관 단백질인 involucrin, loricrin, envoplakin 등이 합성되며, 과립층의 세포내에 존재하는 keratohyalin granule 안에 있는 profilaggrin은 filaggrin의 전구체로서

과립층의 세포가 각질층으로 이동하면서 filaggrin으로 변하게 된다.

[0007] 또한, 피부보습과 표피분화에 핵심적인 역할을 하는 인자로 nuclear hormone receptor중에 하나인 peroxisome proliferatoractivated receptor alpha (PPAR- α)가 알려져 있다.

[0008] 한편, 모새나무(Vaccinium bracteatum Thunb.)는 해변의 산지에서 자라는 난대성 상록활엽수로 한국, 일본, 중국 등지에 분포한다. 모새나무는 진달래목의 쌍떡잎 속씨식물로 해변의 산지에서 자란다. 높이가 1~3m로, 작은 가지는 회갈색에서 회색이고 거의 털이 없다.

[0009] 잎은 어긋나고 두꺼우며 타원형 또는 긴 타원형으로 두꺼운 가죽같은 질감을 갖는다. 가장자리에 잔 톱니가 있으며 뒷면 밑에 작은 선점(腺點)이 있으며, 꽃은 6월에 피고 홍백색이 돌며 밑으로 처지는 총상꽃차례[總狀花序]에 종처럼 생긴 꽃이 10여 개씩 달리고 포(苞)가 남아있다. 열매는 장과로 둥글고 흰가루로 덮이며 지름 6mm 정도로 10월에 익으며 먹을 수 있다

[0010] 모새나무를 포함한 상록수가 근육과 뼈를 강하게 하고 눈에 좋다고는 하나 이에 대한 자료는 찾을 수 없었다. 한편, 최근에는 모새나무 잎 추출물의 항당뇨 효능이 보고된 바 있다. 또한, 모새나무의 열매는 국내에서 토종 블루베리라 불리기도 한다.

[0011] 본 발명은 우리나라 전통적인 식물자원을 활용할 목적으로 인간 피부각질형성세포인 HaCaT 세포에서 모새나무 잎매 추출물의 피부보습 및 피부장벽 개선 효과를 검증함으로써 모새나무 잎추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 모새나무(Vaccinium bacteum Thunb.) 잎 추출물을 유효성분을 포함하는 반려동물용 피부 장벽, 보습 개선 및 예방용 화장품 조성물을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 국내 등록특허번호 제10-1230644호에는 모새나무(Vaccinium bracteatum Thunb.)의 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품 조성물에 관한 것으로써, 본 발명의 화장품 조성물은 피부에 안전하고 인간 타이로시나제 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성억제효과를 가져 피부 미백 효과를 모새나무 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0002) 국내 등록특허번호 제10-1838442호에는 천연식품인 모새나무 열매 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 안면홍조 예방 또는 개선을 위한 기능성 식품 조성물에 관한 모새나무 열매 추출물을 함유하는 안면홍조 개선용 건강식품 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0003) 국내 등록특허번호 제10-1799214호에는 우리나라 천연자원인 모새나무 열매 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 우울증 예방 및 개선용 건강 기능성 식품조성물 및 약학 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0004) 국내 등록특허번호 제10-1829583호에는 우리나라 천연자원인 모새나무 잎 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함으로써 제조 원료를 자연에 서식하는 식물로 대체함으로 제조생산단가 절감과 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있는 모새나무(Vaccinium bracteatum Thunb.) 잎 추출물을 포함하는 스트레스성 질환 및 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관하여 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 천연원료인 모새나무 잎 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 반려동물용 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 화장품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 모새나무 잎으로부터 추출한 유효성분을 포함하는 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 조성물을 제공하며, 모새나무 잎 피부 장벽, 보습 개선 및 예방용 조성물을 제공하며, 모새나무 잎 추출물은 물 또는 탄소수

1 내지 5의 알코올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 피부 장벽, 보습 개선 및 예방용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 피부 장벽 및 보습 개선 및 예방용 조성물은 화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 바디 로션, 바디 오일, 바디 젤, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 젤, 화운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스 중에서 선택된 하나의 제형으로 제조될 수 있다.

[0016] 또한, 모새나무 잎 추출물의 유효성분으로 포함하는 반려 동물용 피부 보습 및 피부장벽 강화용 화장료 조성물로 제공될 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 하는 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 조성물으로써 국내 천연 토종자원인 모새나무를 자원으로 이용하고 독성이나 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 반려동물용 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 모새나무 잎 추출물 제조방법을 나타낸 그래프이다.

도 2은 모새나무 잎 추출물의 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포생존율에 대한 보호 효과를 나타낸 그림이다.

도 3은 모새나무 잎 추출물의 HacaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 증가된 ROS 생성량에 억제 효과를 나타낸 그림이다.

도 4은 모새나무 잎 추출물의 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포에서 피부 장벽 및 보습과 관련된 단백질 발현에 미치는 효과를 나타낸 그림이다.

도 5는 본원발명의 모새나무 잎 추출물의 파우더 및 액상을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 반려동물용 피부 장벽, 보습 개선 또는 예방용 화장료 조성물에 관한 것으로 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명한다.

[0020] 실시예 1. 모새나무 잎 추출물의 제조

[0021] 도 1은 모새나무 잎 추출물 제조방법을 나타낸 모식도이다. 건조된 모새나무 잎 2kg에 증류수 40L를 첨가하고, 환류 추출기에서 3시간 동안 100℃로 가열, 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압 필터 후 농축하였다. 농축된 열수추출물은 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 -50℃에서 48시간 동안 동결건조 시켰다. 이상의 방법으로 상기 열수추출물은 553 g의 농축액을 얻었다.

[0022] 실시예 2. 모새나무 잎 추출물의 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포생존율에 대한 보호 효과

[0023] 도 2은 모새나무 잎 추출물의 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포생존율에 대한 보호 효과를 나타낸 그림이다. TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포생존율에 대한 모새나무 잎 추출물의 보호 효과를 측정하기 위해 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다.

[0024] HaCaT 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells로 분주하고 각 well에 10% FBS와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어있는 DMEM 500 μ L와 함께 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양하였다. 그 후 샘플을 농도별(15.6-250 μ g/mL)로 처리하여 1시간 동안 배양한 후 TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다.

[0025] 배양이 끝난 후, 각 well에 MTT 시약(5 mg/mL)을 넣고 추가적으로 37℃에서 배양하였다. 4시간 후, 상층액을 제거한 다음 dimethylsulfoxide (DMSO) 500 μ L를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 다음과 같이 측정하였다.

[0026] 생존율(%) = TNF- α /IFN- γ 처리군 또는 TNF- α /IFN- γ + 샘플 처리군의 흡광도/대조군의 흡광도 * 100

[0027] 도 2에 나타낸 바와 같이, HacaT 세포에 TNF- α /IFN- γ 를 처리하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 세포 생존율이 66.7%로 감소하였으나, 모새나무 잎 추출물을 농도별로 처리한 경우 TNF- α /IFN- γ 처리에 의

해 감소된 세포생존율을 유의적으로 향상시킨 것을 확인할 수 있었다 (도 2).

[0028] **실시예 3. 모새나무 잎 추출물의 HacaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 증가된 ROS 생성량에 억제 효과**

[0029] 도 3은 모새나무 잎 추출물의 HacaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 증가된 ROS 생성량에 억제 효과를 나타낸 그림이다. HacaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 증가된 ROS 생성량에 대한 모새나무 잎 추출물의 억제 효능을 평가하기 위해 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay를 수행하였다.

[0030] HacaT 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells로 분주하고 각 well에 10% FBS와 1% streptomycin과 penicillin이 포함되어있는 DMEM 500 μ L와 함께 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양하였다. 샘플을 농도별(15.6-250 μ g/mL)로 처리하여 1시간 동안 배양한 후 TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL)를 처리하여 1시간 동안 추가로 배양하였다. 그런 다음 0.5 mg/mL의 DCFH-DA 용액을 처리하여 1시간 동안 배양 후, microplate reader를 이용하여 Excitation 485 nm/Emission 528 nm에서 측정하여 세포 내 ROS 생성량을 계산하였다.

[0031] **ROS 생성량 (%) = 대조군 또는 샘플 처리군의 흡광도/TNF- α /IFN- γ 만 처리한 군의 흡광도*100**

[0032] 도 3에 나타난 바와 같이, 세포에 TNF- α /IFN- γ 처리를 처리하였을 때 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교 시, 세포 내 ROS가 유의적으로 증가된 것을 확인할 수 있었으나, 모새나무 잎 추출물을 농도별로 처리한 경우 농도 의존적으로 감소됨을 알 수 있었다.

[0033] **실시예 4. 모새나무 잎 추출물의 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포에서 피부장벽 및 보습과 관련된 단백질 발현에 미치는 효과 확인**

[0034] 도 4은 모새나무 잎 추출물의 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포에서 피부 장벽 및 보습과 관련된 단백질 발현에 미치는 효과를 나타낸다. HacaT 세포에서 피부장벽 및 보습과 관련된 단백질의 발현을 western blot으로 확인하였다.

[0035] HacaT 세포를 6 cm culture dish에 분주하여 부착시킨 다음, 샘플을 농도별로(15.6, 31.3 및 62.5 μ g/mL) 처리하여 1시간 배양하고, TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL)를 처리하였다. 12시간 배양한 후, 상등액을 제거하고 세포에 lysis buffer (RIPA, sigma)를 넣어 10분씩 6회 교반(vortexing)한 뒤 원심분리하여 단백질을 얻었다.

[0036] 동일한 농도의 단백질과 샘플 버퍼(sample buffer)를 혼합한 후, 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 끓여 단백질 변성을 유도하고, 10% SDS-PAGE를 실행하여 단백질을 분리한 후, PVDF 막(PVDF membrane)으로 단백질을 전이하였다.

[0037] 비특이적인 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 블로킹 버퍼(blocking buffer)를 함유한 Tris-buffered saline(TBS)에 2시간 동안 반응시켜 블로킹(blocking) 하였다. 이후에 1차 항체인 LEKT1 (1:1000), KLK5 (1:1000), PLA2 (1:1000), PAR2 (1:1000), Involucrin (1:1000), Filaggrin (1:1000), occludin (1:1000), ZO-1 (1:1000), claudin-1,3,4,5,23 (1:1000) 및 β -actin (1:10000)가 첨가된 용액을 12시간 동안 혼합한 후 TBS-T로 10분간 3번 세척하였다.

[0038] 그런 다음 막(membrane)을 2차 항체 goat anti-rabbit과 goat anti-mouse가 첨가된 용액을 상온에서 1시간 30분 동안 결합시켜 반응한 후 TBST로 10분간 3번 세척하였고, ECL (electrochemiluminescence)을 이용하여 효소 반응에 의한 발광을 통해 표적 단백질의 발현을 측정하였다.

[0039] 도 4에 나타난 바와 같이, 피부 장벽 관련 단백질에 대한 영향을 확인해본 결과, TNF- α /IFN- γ 를 처리한 세포의 경우 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해, occludin, ZO-1 및 claudin-1,3,4,5,23의 발현량이 감소되었다.

[0040] 그러나, 모새나무 잎 추출물을 농도별로 처리한 경우 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 감소된 단백질 발현량이 증가되었다 (도 4A). 다음으로, 피부 보습 단백질에 대한 모새나무 잎 추출물의 영향을 확인해 본 결과, TNF- α /IFN- γ 가 처리된 세포의 경우 내인단백질 가수분해효소인 LETK1이 감소하고 KLK5단백질의 발현이 증가되었고, 모새나무 잎 추출물을 농도별로(15.6, 31.3 및 62.5 μ g/mL)로 처리한 경우, LEKT1 발현량이 증가하고, KLK5의 발현량은 감소된 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 피부 pH와 표피투과 항성성에 관련된 단백질인 PLA-2와 PAR-2 단백질 발현량 역시 모새나무 잎 추출물을 처리에 의해 감소되었다.

[0041] 피부 보습과 관련된 filaggrin과 involucrin 단백질 역시 모새나무 잎 추출물 처리에 의해 발현량이 증가한 것으로 보아, 결과적으로 모새나무 잎 추출물은 TNF- α /IFN- γ 에 의해 활성화된 HacaT 세포에서 피부의 항상성을 유지하고, 손상된 피부 장벽을 개선하는데 도움을 주는 것으로 볼 수 있다 (도 4B).

[0042] 도 5는 본원발명의 모새나무 잎 추출물의 파우더 및 액상을 나타낸다. 모새나무(*Vaccinium bacteum* Thunb.) 잎

추출물을 이용하여 피부 장벽 및 보습 개선 또는 예방용 화장품 및 반려동물용 화장품으로 제조 가능하다.

[0043]

화장품의 피부외용제 제형은 스킨, 로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 선크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 린스, 헤어트리트먼트, 화장용물티슈, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클렌저로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형으로 이루어지는 것일 수 있고, 반려동물용으로는 반려동물용 로션, 크림, 외형제, 티슈 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 형태로 제조될 수 있다.

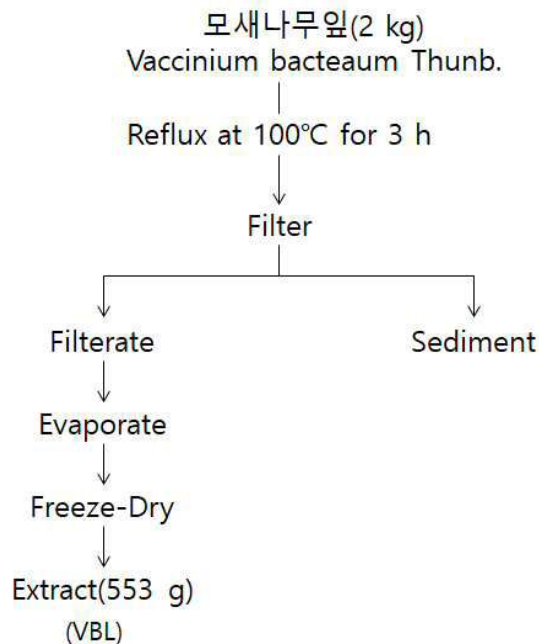
산업상 이용가능성

[0044]

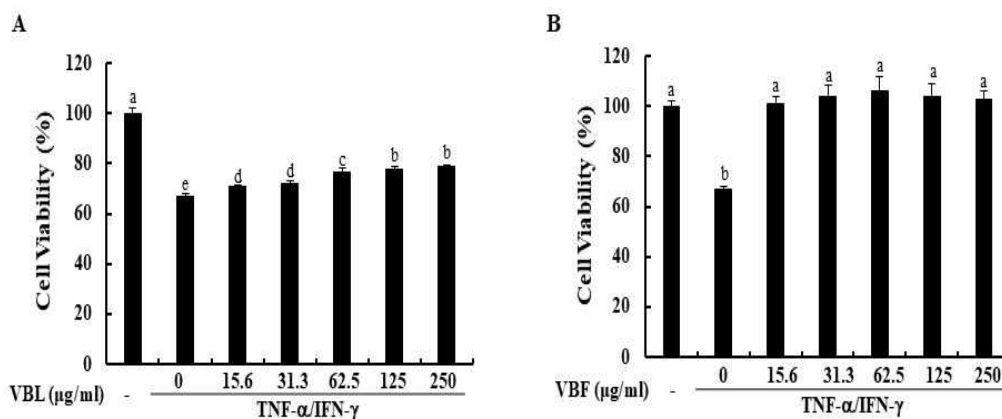
본 발명은 모새나무 잎 추출물을 유효성분으로 하는 피부장벽, 보습 개선 또는 예방용 조성물으로써 TNF- α /IFN- γ 로 활성화시킨 HacaT 세포에서 우수한 피부 장벽 및 보습 개선 및 억제 효과에 도움이 되므로 산업상 이용 가능성이 있다.

도면

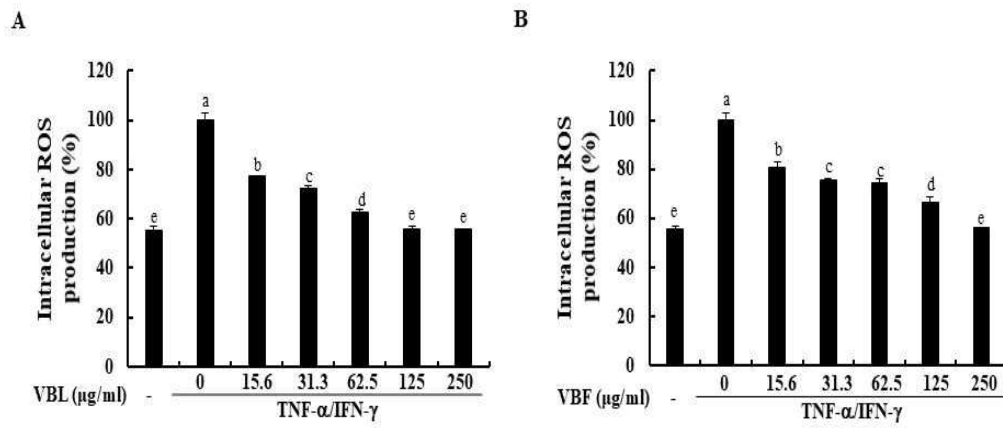
도면1



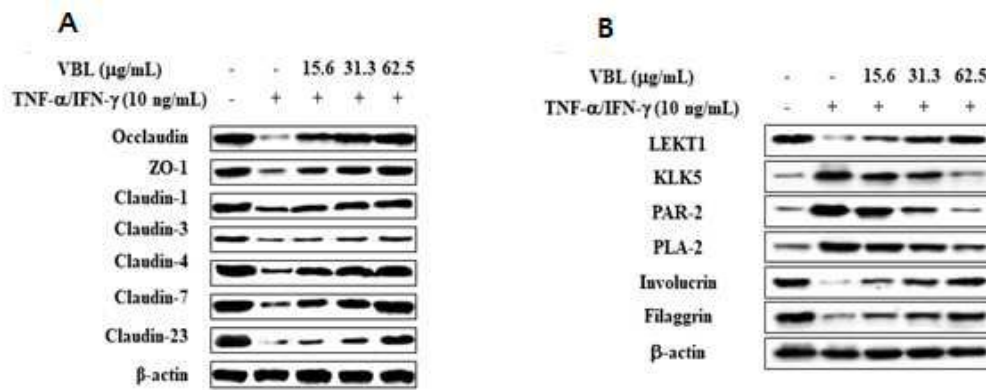
도면2



도면3



도면4



도면5

