



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월30일

(11) 등록번호 10-1532866

(24) 등록일자 2015년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/045 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61K 36/9068 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0010730

(22) 출원일자 2014년01월28일

심사청구일자 2014년01월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130032421 A

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

오억수

서울 서초구 방배로 14, 5동 606호 (방배동, 임광아파트)

서은경

서울 성북구 숲샘로1길 9, (정릉동)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

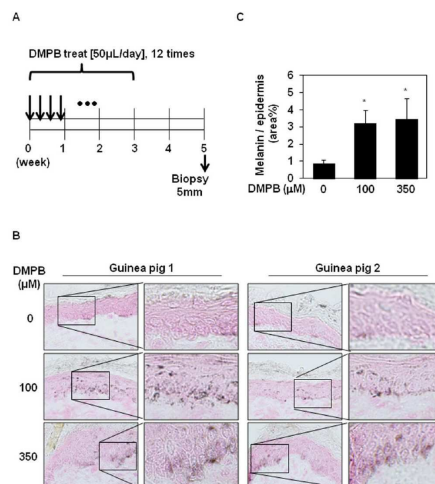
심사관 : 유준석

(54) 발명의 명칭 **벵골 생강 추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 멜라닌 합성 촉진 용도**

(57) 요약

본 발명은 (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB), 또는 이를 함유하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 기능성 화장품 조성물 및 멜라닌 증가를 위한 의약외품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465011788

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-병원특성화연구센터

연구과제명 세포표현형 변이 제어를 통한 여성암 치료법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2017.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

(*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DMPB는 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb)으로부터 분리된 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 DMPB는 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성을 촉진시키는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 DMPB는 티로시네이즈(tyrosinase)의 발현을 촉진시키는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 저색소증 질환은 백색증(albinism), 특발성적상저멜라닌증(idiopathic guttate hypomelanosis), 한센병(leprosy)에서의 저색소증, 루시즘(leucism), 페닐케톤증(Phenylketonuria)에서의 저색소증, 백색 비강진(pityriasis alba), 백반증(vitiligo), 안젤만 증후군(Angelman syndrome)에서의 저색소증 및 어루러기(tinea versicolor)에서의 저색소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환인 것인 조성물.

청구항 6

(*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 기능성 화장품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 저색소증 질환 개선을 위한 것인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 태닝(tanning)용인 것인 조성물.

청구항 9

(*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 의약품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 피부 외용제의 형태를 가지는 것인 조성물.

청구항 11

(E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB)을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

(E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB)을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 기능성 화장품 조성물.

청구항 13

(E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB)을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB), 또는 이를 함유하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 기능성 화장품 조성물 및 멜라닌 증가를 위한 의약품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멜라닌 세포의 멜라노솜에서 합성되는 멜라닌은, 피부 외관을 결정하고 자외선, 독성인 약물 및 화학 약품의 해로운 영향에 대하여 보호 작용을 수행하여 피부 암을 예방한다. 그러나 멜라닌의 과다한 생성은 기미, 흑색점, 멜라닌 세포성 모반 및 악성 흑색종과 같은 질병을 유발할 수 있으며, 멜라닌 세포의 소실은 백반증을 가져올 수 있다. 따라서, 피부의 멜라닌 합성 밸런스를 적절하게 조절하는 것은 매우 중요한 문제이다.

[0003] 멜라닌 합성은 티로시네이즈, 티로시네이즈 관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1, TRP-1) 및 티로시네이즈 관련 단백질 2(tyrosinase-related protein 2, TRP-2/DOPA, chrome tautomerase)와 같은 다양한 효소에 의해 조절된다. 그 중에서도 티로시네이즈는 멜라닌 합성에 있어서 속도 결정 효소로서, 두 가지 구별되는 반응에 관여한다. 첫 번째는 티로신의 히드록실화 반응을 촉매하여 티로신을 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)으로 전환시키고, DOPA의 산화를 촉진시켜, 여러 반응으로 멜라닌으로 전환될 수 있는 DOPA 퀴논(DOPA quinone)을 형성시킨다. 따라서, 티로시네이즈의 발현 또는 활성을 조절하는 방법을 찾기 위하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 멜라닌 형성 효소는 또한, MITF(microphthalmia-associated transcription factor)라 불리는 전사인자에 의해 조절되고, 티로시네이즈 전사는 또한 진행 류신 지퍼 전사인자의 진화적으로 보존된 bHLH(basic-helix-loop-helix) 패밀리에 속하는 Usf-1에 의하여 조절된다. 티로시네이즈 프로모터에서,

MITF에 의해 인지되는 인자들은 또한 Usf-1의 표적이 되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 티로시네이즈, MITF 및 MAPK(MAP kinase)를 조절하는 신호전달 경로에 대한 보다 분명한 이해가 요구되는 상황이다.

[0004]

멜라닌 합성을 조절하는 것에 관여하는 인자들을 규명하기 위하여 그동안 많은 연구가 수행되어 왔다. 그 중 많은 천연물들이 티로시네이즈를 조절하여 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 보고된바 있으며, 이러한 천연물의 예로는 적복령 추출물(Hoelen extracts)(Chang MS, Choi MJ, Park SY, Park SK (2010) Phytother Res 24: 1359-1364.), 카페오일 세로토닌(Caffeoyl serotonin)(Kim HE, Ishihara A, Lee SG (2012) BMB Rep 45: 724-729.) 또는 세사몰(sesamol)(Kumar CM, Sathisha UV, Dharmesh S, Rao AG, Singh SA (2011) Biochimie 93: 562-569.) 등이 알려져 있다. 또한, 아트로피토피 스코파리움(*Arthropytum scoparium*) 추출물(Chao HC, Najjaa H, Villareal MO, Ksouri R, Han J, Neffati M, Isoda H (2013) Exp Dermatol 22: 131-136.) 및 새삼(*Cuscuta japonica*) 수추출물의 경우 MITF를 조절하여 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 보고된바 있다(Jang JY, Kim HN, Kim YR, Choi YH, Kim BW, Shin HK, Choi BT (2012) Ethnopharmacol 141: 338-344). 이렇듯, 멜라닌 합성을 조절하여 멜라닌에 의한 질환을 치료할 수 있는 물질을 규명하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 멜라닌 생성 저해로 유발되는 질환을 치료할 수 있는 물질에 대한 개발의 필요성도 높아지고 있는 상황이다.

[0005]

한편, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb., Zingiberaceae)은 동남 아시아에 넓게 분포되어 있는 열대성 생강으로, 위장질환 및 멀미 치료에 사용되어 온 약용 식물이다. 벵골 생강의 두 가지 주요 구성물질은 페닐부테노이드(phenylbutenoid) 및 커큐미노이드(curcuminoid)로서, 이는 항-염증, 항암 및 항산화 효과를 나타낸다고 알려져 있다. 그러나, 벵골 생강 및 이에 함유된 화합물의 멜라닌 합성 촉진 효과는 지금까지 보고된 바 없었다.

[0006]

이러한 배경 하에 본 발명자들은 멜라닌 합성을 조절할 수 있는 천연물 유래의 성분을 규명하기 위하여 예의 노력한 결과, 벵골 생강 추출물 및 이로부터 분리된 화합물인 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB)이 멜라닌 세포의 증식을 가져오지 않으면서 멜라닌 합성을 현저하게 촉진하는 것을 확인하여, 이를 멜라닌 합성 촉진이 필요한 분야에 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 하나의 목적은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008]

본 발명의 다른 목적은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 기능성 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009]

본 발명의 또 다른 목적은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010]

본 발명의 또 다른 목적은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011]

본 발명의 또 다른 목적은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 기능성 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012]

본 발명의 또 다른 목적은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이를 함유하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 저색소증 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

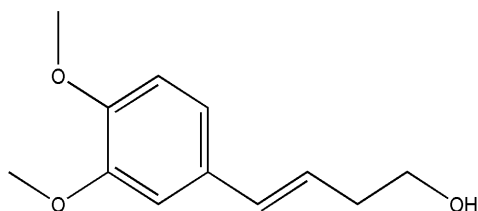
[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이를 함유하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 멜라닌 색소를 회복시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 용어, "(*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB)"는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 의미한다.

[0017] [화학식 1]



[0019] 상기 DMPB는 상용화된 화합물 또는 공지의 화합물 제조 방법에 따라 수득할 수 있으며, 또한 상기 화합물을 포함하는 식물 등으로부터 분리 정제하여 제조할 수 있다. 그 예로, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb)으로부터 분리 정제할 수 있으며, 구체적으로 벵골 생강의 탄소수 1 내지 4의 알코올 추출물의 클로로포름 분획물로부터 분리 정제하여 수득할 수 있다.

[0020] 상기 DMPB는 약학적으로 허용가능한 염 형태로 본 발명의 조성물에 포함될 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어 “약학적으로 허용가능한 염”이란, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다. 본 발명에 따른 DMPB 화합물은 통상적인 방법에 의해 그의 염으로 전환시킬 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 DMPB는 멜라닌 세포에서 티로시네이즈(tyrosinase) 발현을 증가시켜 멜라닌 합성을 촉진시킬 수 있으므로, 이를 멜라닌 생성이 필요한 질환, 예컨대 저색소증 질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어, "멜라닌"은 흑갈색의 색소로서, 피부, 털, 눈 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌을 만드는 세포를 멜라닌 세포(melanocyte)라 하는데, 이 세포 내에는 멜라노솜(melanosome)이라는 작은 자루 모양

의 세포 내 소기관이 있어서 여기서 멜라닌을 만들며, 멜라닌 세포는 멜라노솜이 들어있는 돌기(dendrite)를 뻗어서 각질 세포 등 주변의 다른 세포에 멜라닌을 전달하는 역할을 한다. 멜라닌은 일정량 이상의 자외선을 흡수하는 방식으로 자외선의 침투를 차단하여 인체를 보호하는 역할을 하며, 멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정되게 된다. 따라서, 멜라닌의 양이 적어지는 경우, 피부에 하얀 반점이 생기는 등의 저색소증 질환이 나타날 수 있으며, 또한 피부의 멜라닌 양을 증가시켜 피부색을 검게 만들 수 있다. 이러한 멜라닌 합성에 있어서 티로시네이스(tyrosinase) 단백질은 티로신이 DOPA로 전환되는 과정 및 DOPA가 다시 DOPAquinone으로 전환되는 과정을 매개하며, 멜라닌 생합성 과정에서 속도 결정 효소로서 작용하므로, 멜라닌 합성 조절에 있어서 중요한 타겟으로 여겨진다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 DMPB는 이러한 티로시네이스 단백질의 발현을 증가시키고, 이에 따라 멜라닌 합성을 촉진시킬 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "저색소증 질환"은 피부색이 손실되는 현상을 보이는 질환으로서, 멜라닌 또는 멜라닌 세포의 고갈로 유발될 수 있다. 이러한 저색소증 질환의 예로는, 백색증(albinism), 특발성적상저멜라닌증(idiopathic guttate hypomelanosis), 한센병(leprosy)에서의 저색소증, 루시즘(leucism), 페닐케톤증(Phenylketonuria)에서의 저색소증, 백색 비강진(pityriasis alba), 백반증(vitiligo), 안젤만 증후군(Angelman syndrome)에서의 저색소증 또는 어루러기(tinea versicolor)에서의 저색소증이 있으나, 특별히 이에 제한되지 않으며, 멜라닌 양을 증가시킴으로써 예방, 개선 또는 치료가 될 수 있는 질환이라면 본 발명의 질환의 범위에 모두 포함된다.

[0025] 본 발명에서 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 발병을 저해 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0026] 본 발명의 조성물은 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 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 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다.

[0030] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 달라질 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함하나, 피부에 도포함이 바람직하다.

- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는 벵골 생강 메탄을 추출물의 클로로포름 분획물이 마우스 멜라닌 세포인 B16F10 세포에서 멜라닌 합성을 촉진시키며, 이러한 역할을 수행하는 유효성분이 DMPB임을 확인하였다(도 1). DMPB가 멜라닌 합성을 촉진하는 구체적인 기전을 또한 확인하였고, DMPB는 티로시네이즈의 활성이 아닌 발현을 촉진시킴으로써 멜라닌 합성을 증가시킴을 확인하였다(도 2). 또한, *in vivo* 상태와 유사한 환경을 가질 것이라 여겨지는 각질세포-멜라닌 세포 공배양 시스템에도 DMPB를 처리하였고, 앞서 확인한 결과와 동일한 결과를 재차 확인하였다(도 3). DMPB의 티로시네이즈 발현 증가에 따른 멜라닌 합성 증가에는 ERK 및 p38과 같은 MAPK 신호전달경로가 관여함을 확인하였고(도 4), MITF 및 p53은 신호전달에 관여하지 않음을 확인하였다(도 5). 상기 실험은 모두 마우스 멜라닌 세포인 B16F10 세포에서 진행된 것이므로, 인간 멜라닌 세포에서도 동일한 결과를 나타낼 수 있는지 확인하였고, 그 결과 인간 멜라닌 세포에서도 DMPB는 멜라닌 합성을 효과적으로 촉진시키며, 멜라닌 세포의 증식은 가져오지 않는 결과를 나타내었다.(도 6). 갈색 기니아 피그를 이용한 *in vivo* 실험에서도 DMPB는 멜라닌 세포의 증식을 가져오지 않으면서도 멜라닌 합성을 증가시키는 결과를 나타내었다(도 7). 상기와 같은 결과들은 모두 본 발명의 DMPB 또는 이를 포함하는 벵골 생강의 추출물 또는 분획물을 멜라닌 합성 증가가 필요한 분야, 예컨대 저색소증 질환 등의 치료 분야에 사용할 수 있음을 시사하는 결과이다.
- [0032] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 기능성 화장료 조성물을 제공한다.
- [0033] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 약학적으로 허용가능한 염 및 멜라닌에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0034] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올은 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량을 증가시키므로, 이를 화장료 조성물에 포함시켜 저색소증 질환의 예방 또는 개선을 위하거나, 또는 피부의 멜라닌 함량을 증가시켜 피부를 태닝(tanning)하기 위한 기능성 화장품으로 이용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "기능성 화장품(cosmedical, cosmeceutical)"이란 화장품에 의약품의 전문적인 치료기능이 도입되어, 일반 화장품과 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 제품을 의미한다. 그 예로, 상기 기능성 화장품은 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부 주름 개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태우거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 화장품을 의미하며, 본 발명에서는 피부를 곱게 태우거나 저색소증 질환에 개선 효과가 있는 화장품을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 화장료 조성물을 포함하는 화장품은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 로션, 젤, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 연고, 스틱, 패취, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 화장료 조성물은 화장 분야에서 통상적인 보조제 예를 들어, 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 뿐만 아니라 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제와 함께 일반 화장품 또는 기능성 화장품의 구성요소로서 사용될 수 있다.
- [0038] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 약학적으로 허용가능한 염 및 멜라닌에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0040] 본 발명에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기

계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 피부 외용제 및 개인위생용품도 포함한다.

[0041] 본 발명에서 상기 의약품에 포함되는 성분은 의약품 조성물에 그대로 첨가되거나, 다른 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정할 수 있다. 상기 피부외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젼의 형태로 제조되어 사용될 수 있다.

[0042] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 저색소증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 저색소증 질환, 예방, 치료 및 약학적 조성물의 내용에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0044] 본 발명에서 용어, "벵골 생강(*Zingiber cassumunar* Roxb)"은 동남 아시아에 넓게 분포되어 있는 열대성 생강으로, 가랑갈(galangal)과 동족이기도 하다. 상기 벵골 생강은 위장질환 및 멀미 치료에 사용되어 온 약용 식물로서, 다양한 그림 양성 및 그림 음성균 등에 대하여 항균활성을 나타내는 것이 보고된 바 있으나, 아직까지 멜라닌 합성 촉진 효과를 나타냄은 보고된 바 없었으며, 본 발명에서 이를 규명하였다.

[0045] 본 발명에서 용어 "벵골 생강 추출물"은 벵골 생강을 추출하여 수득한 물질을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 벵골 생강 추출물은, 멜라닌 생성을 촉진시키는 화합물인 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 포함하도록, 벵골 생강을 추출한 물질인 것이 바람직하다. 이러한 벵골 생강 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4인 알코올 또는 유기용매로 추출하여 얻을 수 있으며, 바람직하게는 벵골 생강의 탄소수 1 내지 4인 알코올의 추출물이나, 이에 제한되지 않는다. 상기 탄소수 1 내지 4인 알코올의 예로서는, 메탄올, 에탄올 또는 부탄올 등이 있다.

[0046] 본 발명에서 용어, "벵골 생강 추출물의 분획물"은 벵골 생강 추출물을 유기용매로 추출하여 얻은 분획 추출물 또는 상기 추출물을 크로마토그래피 방법으로 정제하여 얻은 분획 추출물로서, (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 포함하도록 제조한 분획물을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 벵골 생강 추출물의 분획물은, 바람직하게는 벵골 생강의 탄소수 1 내지 4인 알코올 추출물의 클로로포름 분획물, 더욱더 바람직하게는 벵골 생강의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획물을 의미하나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 상기 조성물에 포함되는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물은 멜라닌 합성을 촉진시키는 화합물인 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 포함하므로, 멜라닌 합성이 필요한 저색소증 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0048] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 기능성 화장품 조성물을 제공한다.

[0049] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 벵골 생강, 추출물, 분획물, 멜라닌 및 화장품 조성물에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0050] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올을 함유하는 것을 특징으로 하는, 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 증가용 의약품 조성물을 제공한다.

[0051] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 벵골 생강, 추출물, 분획물, 멜라닌 및 의약품 조성물에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0052] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 또는 이를 함유하는 벵골 생강 추출

물 또는 이의 분획물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 저색소증 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0053] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 벵골 생강, 추출물, 분획물 및 저색소증 질환에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0054] 구체적으로, 본 발명의 치료 방법은 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물, 또는 상기 화합물을 포함하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학적 조성물을 저색소증 질환 의심 개체 내에 투여하는 것을 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 랫트, 닭 또는 인간을 포함하는 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0056] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 또는 이를 함유하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 멜라닌 색소를 회복시키는 방법을 제공한다.

[0057] 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 벵골 생강, 추출물, 분획물, 개체의 종류 및 멜라닌에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0058] 상기 방법은 상기 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물, 또는 상기 화합물을 포함하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학적 조성물을 멜라닌 색소가 감소한 개체 내에 투여하여, 멜라닌 색소가 감소하기 전의 상태로 멜라닌 색소의 양을 증가시키는 것을 의미한다.

발명의 효과

[0059] 본 발명의 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올 및 이를 포함하는 벵골 생강 추출물 또는 이의 분획물은 멜라닌 생성을 효과적으로 촉진시키므로, 이를 멜라닌 생성 증가가 필요한 질환의 치료제 및 태닝제와 같은 화장품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은, 벵골 생강으로부터 분리된 (E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB)이 멜라닌 합성을 촉진시킴을 나타내는 도이다. (A) 벵골 생강의 메탄을 추출물의 헥산, 클로로포름 및 부탄올 분획을 48시간 동안 B16F10 세포에 처리한 다음, 상기 세포의 멜라닌 함량을 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다(**, $p < 0.01$ versus DMSO 처리된 세포). (B) 벵골 생강 메탄을 추출물의 클로로포름 분획물로부터 분리한 3종의 화합물을 B16F10 세포에 48시간 동안 처리한 후 멜라닌 함량을 측정된 결과를 나타내는 것이다(*, $p < 0.05$ versus DMSO treated cells). (C) DMPB의 구조를 나타내는 도이다. (D) DMPB를 농도별로 48시간 동안 B16F10 세포에 처리한 다음, 멜라닌 함량을 측정된 결과를 나타낸 도이다. (E) DMPB 30 μ M를 시간별로 B16F10 세포에 처리한 후, 멜라닌 함량을 측정된 결과를 나타내는 도이다. (F) B16F10 세포에 30 μ M DMPB 또는 1 μ M α -MSH를 48시간 동안 처리한 다음, 멜라닌 함량을 측정된 결과를 나타내는 도이다(**, $p < 0.01$ versus DMSO treated cells).

도 2는, DMPB가 티로시네이즈 활성이 아닌 발현을 증가시킴을 나타내는 도이다. (A) B16F10 세포에 DMPB 30 μ M를 48시간 동안 처리한 다음, 티로시네이즈 발현 수준을 웨스턴 블롯 및 RT-PCR로 확인한 결과를 나타내는 도이다. (B) DMPB-처리된 B16F10 세포(30 μ M, 48시간)를 용해시키고, 10% SDS-PAGE로 분리한 다음, L-DOPA와 반응시킨 결과(위쪽)와, 세포 용해물을 L-DOPA와 반응시킨 다음, 470nm에서 흡광도를 측정된 결과(아래쪽)를 나타내는 것이다(**, $p < 0.01$ versus DMSO treated cells). (C) B16F10 세포에 DMPB를 농도 및 시간별로 처리한 다음, 세포수를 MTT 어세이로 측정된 결과로서, 3번의 독립적인 실험의 평균치로 나타내었다. (D) DMPB-처리된 B16F10 세포(48시간)를 L-DOPA와 반응시킨 다음, 명시야 현미경으로 촬영한 결과를 나타내는 것이다(Scale bars

= 50 μ m). (E) DMPB를 처리한 B16F10 세포의 세포 용해물을 이용하여 항-티로시네이즈 항체로 웨스턴 블롯을 수행한 결과(위쪽) 및 L-DOPA를 이용하여 티로시네이즈 활성을 측정한 결과(아래쪽)를 나타내는 도이다. (F) 내재적으로 티로시네이즈를 발현하지 않은 HEK293에 인위적으로 티로시네이즈를 인코딩하는 유전자를 도입한 다음, DMPB 처리에 의한 티로시네이즈 활성 변화를 관찰한 도이다(**, $p < 0.01$ versus empty vector transfected cells).

도 3은, 각질세포-멜라닌 세포 공배양 시스템에서 DMPB에 의한 멜라닌 합성 증가를 확인한 도이다. (A) HaCaT 각질세포를 B16F10 세포와 48시간 공배양(5:1 비율)한 다음, DMPB 30 μ M 처리하여 멜라닌 함량을 확인한 도이다(*, $p < 0.05$ versus DMSO treated cells). (B) 멜라닌 세포 단일 배양 또는 각질세포-멜라닌 세포 공배양 시스템에 DMPB를 처리한 다음, 티로시네이즈의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 결과를 확인한 도이다. (C) 각질세포-멜라닌 세포 공배양 시스템에 DMPB를 처리한 다음, L-DOPA와 반응시키고 명시야 현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는, DMPB가 MAPK의 인산화를 증가시키는 결과를 나타내는 도이다. (A) B16F10 세포에 DMPB(0, 15 및 20 μ M)를 48시간 동안 처리한 다음, p38 및 ERK 인산화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타내는 도이다. (B) B16F10 세포에 PD98059 1 μ M를 1시간 동안 전처리한 다음, DMPB를 처리하였을 때, ERK 인산화 변화 여부, 티로시네이즈 단백질 발현의 변화 여부 및 멜라닌 함량 변화 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다. (C) B16F10 세포에 SB239063 5 μ M를 0.5시간 동안 전처리한 다음, DMPB를 처리하였을 때, p38 인산화 변화 여부, 티로시네이즈 단백질 발현의 변화 여부 및 멜라닌 함량 변화 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는, DMPB에 의한 멜라닌 합성 조절이 MITF 및 p53과 무관하게 일어남을 확인한 결과를 나타낸 도이다. (A) B16F10 세포에 1 μ M α -MSH의 존재 또는 부재 하에 30 μ M DMPB를 처리한 다음, MITF 발현 변화를 RT-PCR 또는 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. (B) 1 μ M α -MSH의 존재 또는 부재 하에 30 μ M DMPB를 B16F10 세포에 처리한 다음, p53의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. 여기서, β -액틴은 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 6은, DMPB가 인간 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성을 촉진함을 나타내는 도이다. (A) 인간 멜라닌 세포에 DMPB 30 μ M를 48시간 동안 처리한 다음, 멜라닌 함량을 측정한 결과를 나타낸 도이다. (B) 인간 멜라닌 세포에 DMPB 30 μ M를 48시간 동안 처리한 다음, 티로시네이즈 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 측정한 결과를 나타낸 도이다. (C) 인간 멜라닌 세포에 DMPB 30 μ M를 48시간 동안 처리한 다음, 세포 용해물과 L-DOPA를 반응시킨 다음, 티로시네이즈 활성 정도를 측정한 결과를 나타낸 도이다(*, $p < 0.05$ versus DMSO treated cells). (D) 인간 멜라닌 세포에 DMPB를 48시간 동안 처리한 다음, L-DOPA와 반응시키고 이를 명시야 현미경으로 촬영한 결과 및 수상돌기수를 세포수로 나눈 퍼센트 값을 나타낸 것이다(위쪽: Scale bars = 50 μ m; 아래쪽: **, $p < 0.01$ versus DMSO treated cells). (E) 인간 멜라닌 세포를 DMPB와 반응시킨 다음, 세포 생존율을 MTT로 측정한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은, 갈색 기니아 피그에서 DMPB가 색소 형성을 촉진함을 나타내는 도이다. (A) 기니아 피그의 등쪽 피부에 DMSO 또는 DMPB(100, 또는 350 μ M)를 3주 동안 12회 동안 국소 적용하고, 적용 후 35일이 된 때에 시료를 수득한 과정을 모식도로 나타낸 것이다. (B) 동결시킨 피부 시료를 10 μ m 두께로 자른 다음, Fontana-Masson 염색 방법으로 멜라닌 함량을 측정한 결과를 나타낸 도이다. (C) 표피에서의 멜라닌 함량을 바 그래프로 나타낸 결과이다(*, $p < 0.05$ versus DMSO treated skins).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061]

이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0062]

실시예 1: 실험 방법

[0063]

(1) 항체 및 재료

[0064]

티로시네이즈 및 p53에 대한 다클론항체 및 phospho-ERK, ERK, 사이토케라틴 및 베타-액틴에 대한 단일클론항체는 산타크루즈사(Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. phospho-p38, p38, phospho-JNK, 및 JNK는 Cell Signaling

사(Danvers, MA)에서 구입하였다. MITF에 대한 다클론항체는 Proteintech 사(Chicago, IL)에서 구입하였다. 알파-MSH 및 L-DOPA는 시그마 사(St. Louis, MO)에서 구입하였다. PD98059 및 SB239063는 Calbiochem 사(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB), (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-1,3-다이엔((*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1,3-diene, DMPBD) 및 (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-일 아세테이트((*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl acetate, DMPBA)는 벵골생강(*zingiber cassumunar*) 500g의 클로로포름 추출물로부터, Han et al(Planta Medica, 2004, 70: 1095-1097 및 Natural Product Sciences, 2003, 9: 109-111.)에 기술된 방법으로 분리하였다.

[0065]

상기 DMPB, DMPBD 및 DMPBA의 존재를 확인한 구체적인 실험 데이터는 하기와 같았다.

(*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올((*E*)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, DMPB): a pale yellow oil; IR (liquid film) $\nu_{\max}$ 3400, 2935, 1599, 1460, 1263, 1139, 1025 cm^{-1} ; UV (CHCl_3) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 301(3.0) nm; FABMS m/z [M^+ 208.2478 (calcd. 208.2595 for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.92 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.89 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.43 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-4), 6.07 (1H, dt, J = 15.6, 7.2 Hz, H-3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 3.84 (3H, s, OCH_3), 3.75 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-1), 2.47 (2H, dt, J = 7.2, 6.4 Hz, H-2); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 149.0 (C-3'), 148.6 (C-4'), 132.5 (C-4), 130.4 (C-1'), 124.4 (C-3), 119.1 (C-6'), 111.2 (C-5'), 103.6 (C-2'), 62.1 (C-1), 55.9 (OCH_3), 55.8 (OCH_3), 36.4 (C-2).

[0066]

(*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-1,3-다이엔 ((*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1,3-diene, DMPBD): a pale yellow oil; IR (liquid film) $\nu_{\max}$ 2925, 2853, 1597, 1514, 1463, 1419, 1266, 1233, 1138, 1026 cm^{-1} ; UV (CHCl_3) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 293(4.3), 238.5(4.1) nm; EIMS m/z (%) [M^+ 190 (100), 159 (75), 144 (40), 115 (60), 103 (20), 51 (15); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.96 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, J = 8.0, 1.6 Hz, H-6'), 6.82 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.67 (1H, dd, J = 16.0, 9.8 Hz, H-2), 6.50 (1H, dt, J = 16.0, 9.8 Hz, H-3), 6.45 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-1), 5.29 (1H, dd, J = 16.0, 2.0 Hz, H-4a), 5.12 (1H, br d, J = 9.8 Hz, H-4b), 3.91 (3H, s, OCH_3), 3.88 (3H, s, OCH_3); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 149.3 (C-4'), 149.1 (C-3'), 137.5 (C-3), 132.8 (C-1), 130.5 (C-1'), 128.1 (C-2), 120.1 (C-6'), 116.9 (C-4), 111.4 (C-5'), 103.9 (C-2'), 56.1 (OCH_3), 56.0 (OCH_3).

[0067]

((E)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-일 아세테이트 ((E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl acetate, DMPBA): a pale yellow oil; IR (liquid film) $\nu_{\max}$ 2923, 2853, 1738, 1602, 1515, 1461, 1265, 1236, 1028 cm^{-1} ; UV (CHCl_3) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 268.5(4.1), 239(3.8); EIMS m/z (%) [M]⁺ 250 (20), 190 (35), 159 (25), 117 (15), 85 (100), 83 (100), 55 (10); ¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.91 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.88 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-4), 6.03 (1H, dt, J = 16.0, 6.8 Hz, H-3), 4.18 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-1), 3.90 (3H, s, OCH_3), 3.88 (3H, s, OCH_3), 2.53 (2H, qd, J = 6.8, 1.2 Hz, H-2), 2.06 (3H, s, OCOCH_3); ¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 171.3 (OCOCH_3), 149.3 (C-3'), 148.8 (C-4'), 132.3 (C-4), 130.6 (C-1'), 123.8 (C-3), 119.3 (C-6'), 111.4 (C-5'), 108.8 (C-2'), 64.1 (C-1), 56.2 (OCH_3), 56.0 (OCH_3), 32.5 (C-2), 21.2 (OCOCH_3).

[0068]

[0069]

(2) 세포 배양

[0070]

B16F10 마우스 흑색종 세포, HaCaT 인간 각질세포, 및 HEK293T 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 겐타마이신(gentamicin, 50mg/ml, sigma)를 포함하는 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, WelGene, Daegu, Korea) 조건에서 37℃ 온도, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 초대계양 인간 외피 멜라닌세포는 Modern Cell & Tissue Technologies 사에서 구입하였고, 5% FBS, 재조합 인간-섬유아세포 성장 인자 B(rh-FGF B), rh-인슐린, 겐타마이신 설페이트 엠포테리신-B, 염화 칼슘, PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate), 소 점액 추출물 및 하이드로코르티손을 포함하는 멜리난세포 성장 배지-4(Lonza) 조건에서 37℃ 온도, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0071]

HEK293 세포의 일시적 형질감염은 Vivamagic 시약(Vivagen, Korea)을 사용하여 수행하였다. B16F10 흑색종 세포 및 HaCaT 세포(1:5 비율)의 공배양은 10% FBS 및 겐타마이신(50 mg/ml)을 포함하는 DMEM 배지에서 37℃ 온도, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0072]

(3) RNA 추출 및 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)

[0073]

전체 RNA를 세포에서 추출하였고, 역전사하였고, 이에 따른 cDNA 산물의 엘리컷을 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 증폭하였다.

표 1

[0074]

유전자		서열(5'→3')	서열번호
마우스 티로시네이즈(mouse tyrosinase)	forward	CGAGCCTGTGCCTCCTCTAA	1
	reverse	CCAGGACTCACGGTCATCCA	2
마우스 MITF	forward	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	3
	reverse	TGATGATCCGATTCAACCAGA	4
베타-액틴	forward	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA	5
	reverse	TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	6

[0075]

94℃에서 5분간 최초 변성을 수행한 다음, 그 시료를, 94℃에서 30초간 변성, 52℃에서 30초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 60초간 연장으로 구성된 사이클을 30회 반복하여 증폭하였다.

[0076]

(4) 면역블로팅

[0077]

배양된 세포들을 PBS로 두차례 세척하고, 이 세포들을 프로테아제 억제제 혼합물[1 μ g/ml 아프로티닌(aprotinin), 1 μ g/ml 안티파인(antipain), 5 μ g/ml 류펩틴(leupeptin), 1 μ g/ml 펩스타틴 A(pepstatin A), 및 20 μ g/ml PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)]를 포함하는 용해 완충액(50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM NaF, 및 2 mM Na₃VO₄)으로 용해시켰다. 용해물은 13,000 x g에서 4℃에서 15분간 원심분리하였고, SDS 샘플 완충액으로 변성시키고, 이를 끓인 다음, SDS-PAGE로 분석하였다. 이 단백질을 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane, Amersham Biosciences)에 전사하고, 이를 항체와 반응시키고, ECL(iNtRON Biotechnology, Kyungki-Do, Korea)로 검출하였다.

[0078]

(5) 멜라닌 정량

[0079]

세포는 PBS로 2회 세척한 다음, 트립신/EDTA와 반응시켜 떼어내었고, 이를 1000 × g 에서 3분간 원심분리하여 수집하였다. 그 다음, 5X10⁵ 세포를 1 N NaOH-10% DMSO의 100 μ l에서 80℃ 온도에서 2시간 동안 용해시켰다. 용해된 멜라닌은 405nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였고, 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma)로 생성한 표준 곡선을 사용하여 결정하였다.

[0080]

(6) 티로시네이즈 활성 어세이

[0081]

세포는 1% Triton X-100, 1 μ M PMSF, 1 μ g/ml 아프로티닌 및 10 μ g/ml 류펩틴을 포함하는 50mM 인산 나트륨 완충액(pH 6.8)에 용해시켰다. 상기 용해물은 13,000 × g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 펠렛을 제거하고, β -말캅토포탄올이 없는 샘플 완충액과 혼합한 다음, 10% SDS-PAGE로 단백질을 서로 분리하였다. 상기 겔은 50mM 인산 나트륨 완충액(pH 6.8)에 20분간 인큐베이션시킨 다음, 10mM L-DOPA(L-3, 4-dihydroxyphenylalanine)와 37℃에서 한 시간 동안 반응시켰다. 티로시네이즈 활성은 겔에 L-DOPA-멜라닌을 포함하는 어두운 색 밴드로 나타났다.

[0082]

또한, 펠렛이 제거된 용해물은 L-DOPA와 37℃에서 2시간 동안 반응시키고, 티로시네이즈 활성을 470 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 면역형광을 위하여, 세포는 12-웰 플레이트 내의 커퍼슬립에 플레이팅하였고, 4% 파라포름알데히드로 20분간 고정시킨 다음, PBS로 세척하고, 10 mM L-DOPA와 함께 인산 나트륨 완충액에서 3시간 동안 37℃의 조건에서 인큐베이션하였다. 그 다음, 세포를 PBS로 세척하고, 상기 커퍼슬립을 유리 슬라이드에 마운팅한 다음, 형광 현미경으로 슬라이드를 관찰하였다.

[0083]

(7) 세포 증식 어세이

[0084]

세포 증식은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide] 어세이로 측정하였다. B16F10 세포는 0.05% 트립신/EDTA로 수집하였고, 이를 96-웰 플레이트에 5 × 10³ 세포수/웰로 시딩하였다. 이를 인큐베이션한 다음, 0.5mg/ml MTT(100 μ l; Sigma)를 포함하는 배지를 각 웰에 추가하였고, 세포를 한 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 배지를 제거하고, 100 μ l의 산성인 이소프로파놀(90% 이소프로파놀, 0.5% SDS, 25 mM NaCl)을 각 웰에 첨가하였다. 각 샘플의 570nm에서 흡광도의 평균 농도를 96-웰 마이크로타이타 플레이트 리더(Dynatech, Chantilly, VA)를 사용하여 측정하였다.

[0085]

(8) 기니아 피그 모델 실험

[0086]

모든 동물 실험 및 과정은 아산 의료 센터의 아산 생명과학 연구소의 동물실험 위원회(IACUC)가 제정한 실험실 동물 관리의 원칙에 부합하도록 수행하였다.

[0087]

갈색을 띤 Kw1:A1 기니아 피그는 중앙 실험 동물(서울, 한국)에서 구입하였고, 실라진(xylazine, Rompun; Bayer Korea, Korea) 및 졸레틸(Zoletil 50; Virbac, France)의 혼합물(1:4 비율)로 매주 마취시키고, 면도하였다. emdWHr 피부는 3 구역(각 1 cm x 1 cm)로 나누고, DMPB 100 μ M, DMPB 350 μ M 또는 DMSO 단독(각 50 μ l)을 위치를 정한 부위의 중심부에 국소적으로 적용하였다(3주간 12회). 35일째 되던날, 피부 표본을 5-mm 펀치 생검

으로 획득하고, 이를 조직-Tek OCT 컴파운드(Sakura Fine Technical, Tokyo, Japan)에 담구고, 빠르게 동결시켰다. 동결된 시료는 10 μ m 두께로 자르고, 차가운 아세톤에 10분간 고정시켰다. 멜라닌 색소는 표준 Fontana-Masson 염색으로 시각화하였고, 이미지 분석은 3개의 임의로 선정한 플드의 대표적인 부위를 사용하여, ImageJ 프로그램(<http://rsb.info.gov/ij/>)을 사용하여 수행하였다. 멜라닌 세포의 계수를 위하여, 섹션은 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였고, 임의로 선택된 필드를 현미경으로 조사하였다(x400). 피부과 의사들은 0.5mm 길이의 표피의 4가지 서로 다른 필드 내에서 멜라닌 세포를 계수하였다.

[0088] (9) 통계 분석

데이터는 세번의 독립적인 실험의 평균으로 나타내었다. 통계적 분석은 unpaired Student's t 테스트를 사용하여 수행하였다. 0.01 또는 0.05 이하의 p-값을 통계학적으로 유의한 값으로 간주하였다.

[0090] 실시예 2: 실험 결과

[0091] (1) 벵골 생강으로부터 분리된 (*E*)-4-(3,4-디메톡시페닐)부트-3-엔-1-올은 멜라닌 합성을 촉진시킨다.

벵골 생강의 메탄올 추출물을 헥산, 클로로포름 및 부탄올로 순차적으로 분획하였다. 그 다음, 상기 분획물(BF: 부탄올 분획; CF: 클로로포름 분획; 및 HF: 헥산 분획) 30 μ M을 B16F10 마우스 흑색종 세포에 48시간 처리한 다음, 멜라닌 세포의 멜라닌 양을 450nm 흡광도에서 측정하여 분석하였다. 이때, DMSO는 대조군으로 사용하였다. 이렇게 분석한 결과는 도 1A에 나타내었다.

그 결과, 도 1A에 나타낸 바와 같이, 클로로포름 분획에서만 B16F10 마우스 흑색종 세포의 멜라닌 합성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다(도 1A).

그 다음, 상기 클로로포름 분획에서 3개의 화합물, DMPB((*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol), DMPBD((*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1,3-diene) 및 DMPBA((*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl acetate)를 분리하였다.

이렇게 분리한 화합물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 어세이를 다시 수행하고, 그 결과를 도 1B에 나타내었다.

그 결과, 도 1B에 나타낸 바와 같이, 상기 3가지 화합물 중 DMPB만이 B16F10 세포에서 멜라닌 합성을 증가시키는 결과를 나타내었고(도 1B), 이러한 DMPB의 화학 구조를 도 1C에 나타내었다.

또한, 이의 농도 의존적 영향 및 시간-의존적 영향을 확인하였고, 그 결과를 도 1D 및 1E에 각각 나타내었다. 구체적으로, B16F10 세포에 DMPB를 다양한 농도로 48시간 처리하거나(도 1D), 30 μ M 농도의 DMPB를 도 1E에 표시한 시간만큼 처리하였다.

그 결과, 도 1D에 나타낸 바와 같이, DMPB는 농도의존적으로 멜라닌 합성을 증가시켰고, 30 μ M에서 최대 효과를 나타내었다. 또한, 도 1E에 나타낸 바와 같이, 30 μ M의 DMPB 처리는 48시간에서 최대 효과를 나타내었다.

이러한 DMPB의 효과를 멜라닌 합성을 촉진시키는 호르몬인 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)의 효과와도 서로 비교하였다. 구체적으로, B16F10 세포에 30 μ M의 DMPB 또는 1 μ M의 α -MSH를 48시간 동안 처리한 다음, 멜라닌 함량을 측정하였다.

그 결과, 도 1F에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 DMPB의 효과는 양성 대조군인 α -MSH와 비교해서도 거의 대등한 정도를 나타내었다(도 1F).

- [0101] 상기와 같은 결과로부터 벵골 생강으로부터 추출한 DMPB는 B16F10 흑색종 세포에서 멜라닌 합성을 촉진시킬 수 있는 것임을 확인하였다.
- [0102] **(2) DMPB는 티로시네이즈의 활성이 아닌 발현을 촉진시킨다.**
- [0103] DMPB가 멜라닌 수준을 증가시키는 것을 확인한 다음, 이러한 DMPB가 멜라닌 합성(melanogenesis)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 티로시네이즈(tyrosinase)의 발현에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 확인하였다. 구체적으로, B16F10 세포에 30 μ M DMPB를 48시간동안 처리하고, 티로시네이즈의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인하고, 상기 세포에서 전체 RNA를 추출한 다음, RT-PCR로 분석하여 그 결과를 도 2A에 나타내었다(위쪽 - 웨스턴 블롯팅; 아래쪽 - RT-PCR 결과).
- [0104] 그 결과, 도 2A에 나타낸 바와 같이, 티로시네이즈의 발현 수준이 현저하게 증가하는 결과를 나타내었다.
- [0105] 그 다음, L-DOPA로 겔 염색하여 확인한 티로시네이즈 활성을 확인하였다. 구체적으로, DMPB를 처리한 B16F10 세포(30 μ M, 48 hr)를 용해시킨 후, 이 용해물을 10% SDS-PAGE에 적용하였다. 그 다음 SDS-PAGE 겔과 10 mM L-DOPA를 37°C 동안 1시간 동안 서로 반응시켰고, 그 결과를 도 2B 위쪽에 나타내었다. 또한, 세포 용해물(100 μ g)을 L-DOPA와 37°C에서 2시간 동안 반응시키고, 티로시네이즈 활성을 470nm에서 결정하였고, 그 결과를 도 2B 아래쪽에 나타내었다.
- [0106] 그 결과, 도 2B에 나타낸 바와 같이 DMPB 처리에 의하여 전체 티로시네이즈 활성이 증가하는 결과를 나타내었다.
- [0107] 증가된 세포수가 전체 티로시네이즈 활성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 비색분석법(colorimetric assay)을 수행하여 DMPB가 B16F10 세포의 증식에 영향을 미칠 수 있는지를 확인하였다.
- [0108] 구체적으로, B16F10 세포를 DMPB와 반응시키고, 세포 생존율을 MTT 어세이로 결정하였다. 퍼센트 값은 처리한 군과 비처리한 군(대조군)을 서로 비교하여 결정하였다. 데이터는 3번의 독립적인 실험에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 상기 실험 결과를 도 2C에 나타내었다.
- [0109] 그 결과, 도 2C에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리 유무에 관계없이 세포수는 변화하지 않는 결과를 나타내어, 상기 도 2B의 실험 결과는 세포수의 증가에 따른 결과가 아닌 티로시네이즈 전체 활성이 증가된 결과임을 보였다.
- [0110] L-DOPA 염색 실험을 통하여, 세포 내 티로시네이즈 활성 수준 역시 측정하였다. 구체적으로, DMPB를 처리한 B16F10 세포(48시간)을 37°C 온도에서 L-DOPA와 30분간 반응시킨 다음, 세포 내 티로시네이즈 활성 수준을 측정하였고, 명시야 현미경 이미지로 그 결과를 도 2D에 나타내었다. 도 2D에서 스케일 바는 50 μ m를 나타낸다.
- [0111] 그 결과, 도 2D에 나타낸 바와 같이, DMPB를 처리한 B16F10 세포에서 세포 내 티로시네이즈 활성 수준이 증가하는 결과를 나타내어, DMPB를 처리한 세포에서 상기 전체 티로시네이즈 활성 증가를 다시 한번 확인하였다.
- [0112] 그 다음, 반응 혼합물에 포함되는 티로시네이즈의 양을 조절한 다음, B16F10 세포에서 DMPB 처리 유무에 따른 티로시네이즈의 활성 변화를 서로 비교해보았다.
- [0113] 구체적으로, DMPB를 각각 0 또는 30 μ M를 처리한 B16F10 세포 용해물(20 μ g, 40 μ g)에 대하여 항-티로시네이즈 항체를 처리하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하고, 또한 37°C에서 2시간 동안 L-DOPA를 반응시켜 티로시네이즈 활성을 측정하였다. 웨스턴 블롯 결과는 도 2E 위쪽에, 티로시네이즈 활성의 평균 퍼센트 $\pm$ SEM는 도 2E 아래쪽에 나타내었다.
- [0114] 그 결과, 도 2E에 나타낸 바와 같이, 티로시네이즈 발현 수준과 유사하게 활성이 증가하는 패턴을 나타내어, 앞

서 확인한 전체 티로시네이즈 활성 증가 결과는 티로시네이즈 활성 자체가 증가하여 나타난 결과라기보다는, 티로시네이즈 단백질의 전체적인 양이 증가하면서 나타난 결과로 해석되었다.

- [0115] 그 다음, DMPB의 티로시네이즈 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 티로시네이즈를 인코딩하는 cDNA를 HEK293T 세포(내재적으로 티로시네이즈를 발현하지 않음)에 트랜스펙션하였고, HEK293T 세포에 DMPB를 처리하고 전체 티로시네이즈 활성을 분석하였다.
- [0116] 구체적으로, HEK293T 세포에서 공벡터(-tyr) 또는 티로시네이즈 인코딩 벡터(+tyr)를 트랜스펙션하였고, 30 μ M의 DMPB를 처리하였다. DMPB 처리 48시간 후, 전체 RNA를 RT-PCR로 분석하였고, 또한 티로시네이즈 단백질 발현은 항-티로시네이즈 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 티로시네이즈 활성 $\pm$ SEM의 평균 퍼센트를 도 2F에 나타내었다.
- [0117] 그 결과, 내재적으로 티로시네이즈를 발현하지 못하는 세포에서는, DMPB 처리 유무와 관계없이 전체 티로시네이즈 활성 값이 변화하지 않는 결과를 나타내어 DMPB는 티로시네이즈 발현을 조절하여 전체 세포의 티로시네이즈 활성에 영향을 미치는 것임을 나타내었다.
- [0118] 그 다음, *in vivo*와 유사한 환경에서 DMPB의 멜라닌 합성에 대한 영향을 확인하기 위하여, 각질세포-멜라닌 세포 공배양 시스템을 사용하여 DMPB가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0119] 구체적으로, B16F10 세포와 HaCaT 각질세포를 1:5의 비율로 함께 배양하였고, 24시간 후, 이 세포에 30 μ M의 DMPB를 48시간 동안 처리하였고, 이 시료를 이용하여 멜라닌 수준, 티로시네이즈 발현 수준 및 활성 수준을 각각 측정하였다.
- [0120] 멜라닌 수준의 경우, 상기 시료를 이용하여 405nm의 흡광도에서 값을 측정하여 결정하였고, 전체 티로시네이즈 발현 수준은 웨스턴 블롯 분석으로 결정하였다. 또한, 티로시네이즈의 활성 수준은 L-DOPA와 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 명시야 현미경으로 그 결과를 확인하였다.
- [0121] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 단일배양(monoculture) 결과와 유사하게, B16F10 세포에서 DMPB는 멜라닌 합성 수준을 현저히 증가시키고(A), 전체 티로시네이즈 발현 수준을 증가시키며(B), 세포 내 티로시네이즈 활성을 증가시키는 결과를 나타내었다(C).
- [0122] 상기와 같은 결과를 모두 종합하면, DMPB는 티로시네이즈 발현 수준을 증가시킴으로써 멜라닌 합성을 증가시킴을 나타내는 결과이다.
- [0123] (3) DMPB 처리는 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 인산화를 증가시킨다.
- [0124] MAPK 신호 전달 경로는 티로시네이즈 발현을 조절하여 멜라닌 합성을 조절하는 것에 관여하는 것으로 알려져 있다. UV 조사 및 α -MSH는 또한, p38 MAPK를 활성화시켜 티로시네이즈 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한, ERK 활성화는 CREB(cAMP response element binding protein) 인산화를 가져와, CREB가 MITF 프로모터의 CRE 보존 모티프에 결합하여 MITF 유전자 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, DMPB가 MAPK 신호전달 경로에 영향을 미치는 여부를 확인하였다.
- [0125] 구체적으로, ERK 및 p38에 대한 인산-특이적 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하여 ERK 및 p38의 활성을 서로 비교하였다. 우선, B16F10 세포에 DMPB를 각각 0, 15 또는 30 μ M를 48시간 동안 처리하고, p38 및 ERK의 인산화 정도를 웨스턴 블롯으로 분석하였고, 그 결과를 도 4A에 나타내었다.
- [0126] 그 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이, DMPB를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, DMPB를 처리한 세포의 경우, ERK 및 p38의 활성은 증가하나, JNK의 활성은 증가하지 않는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 DMPB에 의한 멜라닌 합성은 MAPK 활성 증가와 밀접하게 연관되어 있음을 나타내는 것이다.

- [0127] DMPB에 의한 멜라닌 합성과 MAPK 활성 간의 관계를 보다 명확히 규명하기 위하여, ERK의 특이적 억제제인 PD98059를 사용하여 ERK의 관여 여부를 확인하였다.
- [0128] 구체적으로, B16F10 세포에 PD98059 1 μ M를 1시간 동안 전처리한 다음, DMPB를 처리하여 ERK 인산화 여부, 티로시네이즈 발현 정도 및 멜라닌 수준을 확인하였고, 그 결과를 도 4B에 나타내었다.
- [0129] 그 결과, 도 4B에 나타난 바와 같이, B16F10 세포에 PD98059를 전처리한 경우, DMPB에 의한 ERK의 인산화, 티로시네이즈 발현 및 멜라닌 합성이 모두 억제되는 결과를 확인하였다.
- [0130] 또한, 상기 도 4A에서 확인한 p38과 DMPB에 의한 멜라닌 합성 간의 연관성에 대해서도 p38 억제제인 SB239063을 사용하여 구체적으로 확인하였다.
- [0131] 구체적으로, B16F10 세포에 SB239063 5 μ M를 30분간 전처리한 다음, DMPB를 처리하여 p38 인산화 여부, 티로시네이즈 발현 정도 및 멜라닌 수준을 확인하였고, 그 결과를 도 4C에 나타내었다.
- [0132] 그 결과, 도 4C에 나타난 바와 같이, B16F10 세포에 SB239063를 전처리 한 경우, DMPB에 의한 p38의 인산화, 티로시네이즈 발현 및 멜라닌 합성이 모두 억제되는 결과를 확인하였다.
- [0133] 상기와 같은 결과들은 모두 DMPB에 의한 멜라닌 합성은 ERK 및 p38과 같은 MAPK 신호전달경로에 의해 매개되는 것임을 나타내는 결과이다.
- [0134] **(4) DMPB에 의한 멜라닌 조절은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 및 p53과 무관하게 일어난다.**
- [0135] MITF는 bHLH-LZ(basic helix-loop-helix leucine zipper) 전사인자로 티로시네이즈 유전자 프로모터 부위에 결합하여 티로시네이즈 유전자 발현을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이에, MITF가 DMPB에 의한 멜라닌 합성 조절에 관여하는지 여부를 확인하였다.
- [0136] 구체적으로, DMPB 30 μ M를 0 내지 12시간 동안 B16F10 세포에 처리한 다음, 웨스턴 블롯팅을 수행하여 MITF 발현 수준 변화를 확인하였고, 그 결과를 도 5A에 나타내었다.
- [0137] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, DMPB의 처리는 MITF의 발현 수준에는 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었다.
- [0138] 또한, MITF의 안정성 조절은 멜라닌 합성 신호 전달에 있어 중요한 특징이기 때문에, DMPB가 MITF 분해에 미치는지 여부를 확인하였다.
- [0139] 구체적으로, B16F10 세포에 MITF의 잘 알려진 유도제인 α -MSH를 처리하였고, 그 다음 MITF의 분해를 확인하였다.
- [0140] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, B16F10 세포에서 MITF의 수준은 α -MSH 처리 후 3시간 만에 현저하게 증가하였으나, 그 다음 6시간 만에 기초 수준(basal level)로 떨어졌다. 또한, DMPB를 함께 처리한 군에서도 이와 동일한 패턴을 나타내어, DMPB는 MITF 조절에 관여하지 않음을 시사하였다.
- [0141] 또한, p53은 티로시네이즈 발현의 조절하는 것에 관여하는 것으로 또한 알려져 있기 때문에, p53에 대해서도 동일한 종류의 실험을 수행하였다.
- [0142] 구체적으로, B16F10 세포에 30 μ M DMPB를 6시간, 9시간 또는 24시간 동안 처리하고, p53에 대하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 또한, B16F10 세포에 30 μ M DMPB와 함께 α -MSH를 처리한 다음, p53에 대하여 웨스턴 블롯팅

을 수행하였으며, 베타-액틴 단백질을 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0143] 그 결과, 도 5B에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리는 p53 발현에 특별한 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었다.

[0144] 상기와 같은 결과들은 모두 DMPB가 MITF 및 p53과 무관하게 멜라닌 합성 신호 전달을 조절함을 시사하는 것이다.

[0145] **(5) DMPB가 인간 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성을 촉진한다.**

[0146] DMPB가 인간 멜라닌 세포에서도 멜라닌 합성을 조절할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0147] 구체적으로, 인간 멜라닌 세포에 30 μ M의 DMPB를 48시간 동안 처리하고, 멜라닌 함량을 405nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였고, 그 결과를 도 6A에 나타내었다.

[0148] 그 결과, 도 6A에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리에 의하여 인간 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량이 증가하는 결과를 나타내었다.

[0149] 또한, 앞서 확인한 바와 같이, DMPB는 티로시네이즈 발현을 조절하여 멜라닌 합성을 가져오므로, 인간 멜라닌 세포에서도 DMPB가 티로시네이즈 발현을 조절할 수 있는지 인간 멜라닌 세포에 30 μ M의 DMPB를 48시간 동안 처리하고, 웨스턴 블롯팅을 실시하여 확인하였다.

[0150] 그 결과, 도 6B에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리에 의하여 티로시네이즈 발현이 효과적으로 증가하는 결과를 나타내었다.

[0151] 그 다음, DMPB의 티로시네이즈 활성 조절 여부를 확인하기 위하여, 세포 용해물(100 μ g)을 L-DOPA와 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰고, 티로시네이즈 활성을 470nm의 파장에서 결정하였다.

[0152] 그 결과, 도 6C에 나타낸 바와 같이, 앞서 확인한 결과와 마찬가지로 DMPB는 인간 멜라닌 세포에서 전체 티로시네이즈 활성을 증가시키는 결과를 나타내었다.

[0153] 또한, DMPB의 세포 내 티로시네이즈 활성 조절 여부를 확인하였다.

[0154] 구체적으로, 인간 멜라닌 세포를 12 웰 플레이트에 분주하고, 그 다음 DMPB 15 또는 30 μ M 처리한 다음, L-DOPA와 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 다음, 명시야 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 6D에 나타내었다. 도 6D에서 스케일 바는 50 μ m를 나타낸다.

[0155] 그 결과, 도 6D에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리에 의하여 세포 내 티로시네이즈 활성이 증가하였고 또한 수상돌기(dendrite) 형성도 증가한 것을 나타내었다.

[0156] 도 6A 내지 6D에 나타낸 결과로부터, DMPB가 인간 멜라닌 세포에서도 앞서 확인한 기작과 동일한 기작으로 멜라닌 합성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0157] 그 다음, DMPB가 멜라닌 세포의 증식에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

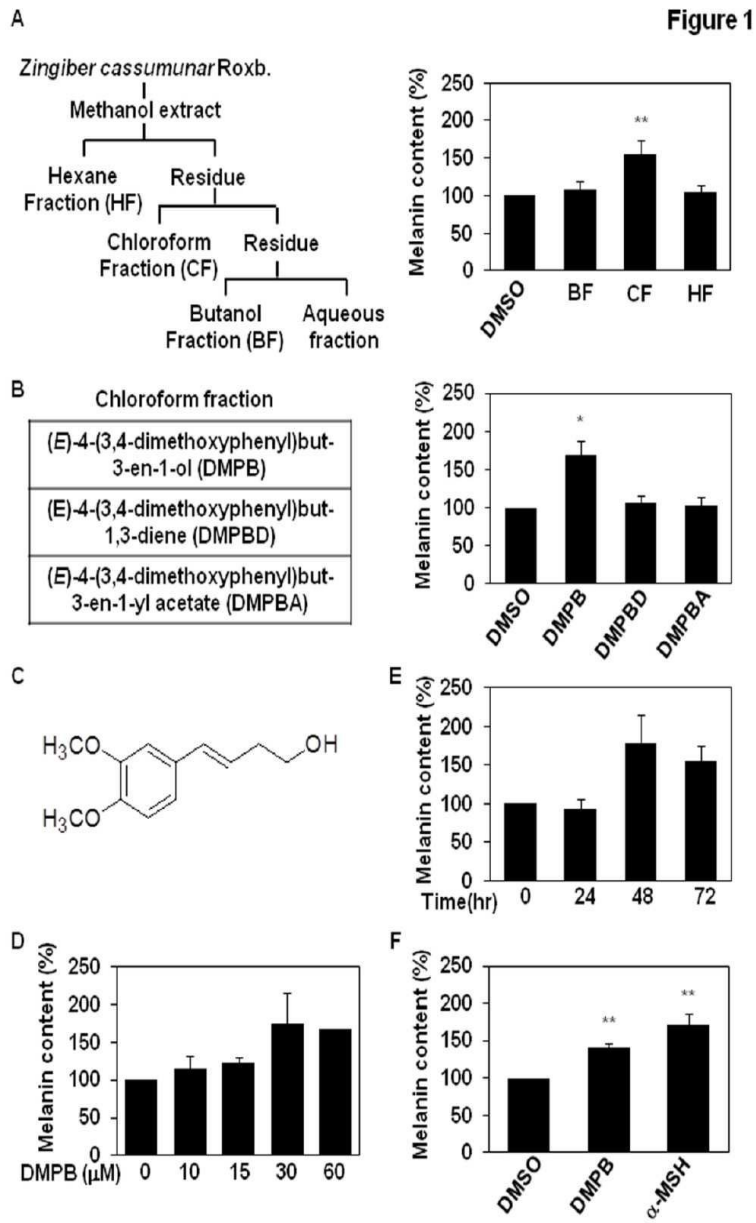
[0158] 구체적으로, 초대계양 멜라닌 세포를 96 웰 플레이트에 분주하고, DMPB 30 μ M와 반응시킨 다음, MTT를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0159] 그 결과, 도 6E에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리는 인간 멜라닌 세포의 증식에 아무런 영향을 미치지 않는 결과를 보였다.

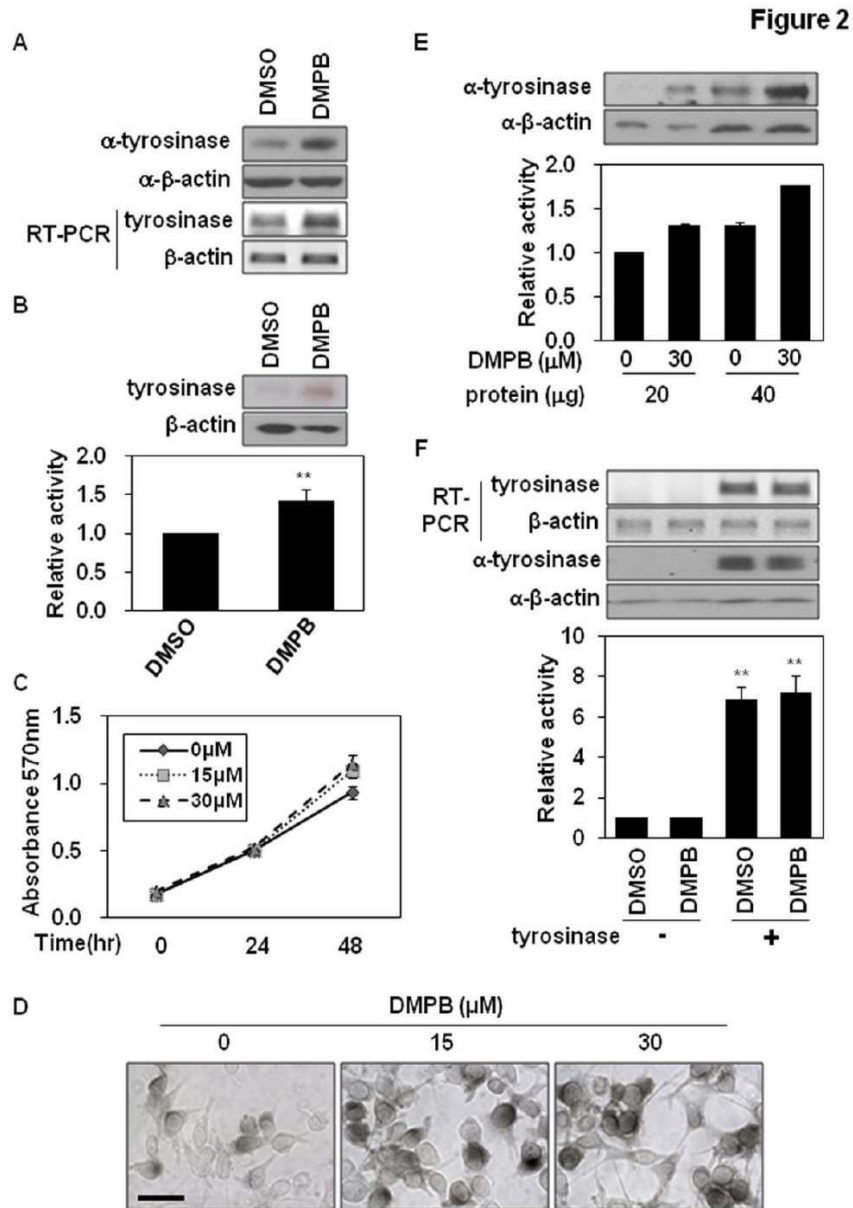
- [0160] 상기와 같은 결과는 모두 DMPB가 멜라닌 세포의 증식을 가져오는 것이 아니라, 인간 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성에 영향을 미치는 것을 나타내는 결과이다.
- [0161] (6) DMPB가 *in vivo*에서 갈색 기니아 피그의 색소침착과잉(hyperpigmentation)을 가져온다.
- [0162] 상기와 같은 결과들은 토대로, DMPB가 *in vivo*에서도 멜라닌 합성 효과를 나타낼 수 있는지를 확인하기 위하여 기니아 피그 모델을 사용하였다.
- [0163] 구체적으로, 브라운색의 Kw1:A1 기니아 피그의 등쪽 피부에 100 또는 300 μ M의 DMPB(각 50 μ l), 또는 DMSO를 3주 동안 12회 가량 국부 처리하였다(그룹당 n=2). 첫 번째 처리 후 35일째 되던 날, 피부 샘플을 5mm 펀치 생검으로 수득하였다. 상기 처리 과정을 도 7A에 나타내었다.
- [0164] 또한, 이렇게 수득한 샘플을 동결시키고, 동결시킨 피부 샘플을 절단한 다음, Fontana-Masson 염색을 수행하였고, 그 결과를 도 7B 및 7C에 나타내었다. 도7B의 결과는 X200 배율로 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 7C는 관찰한 결과에서 임의로 선택한 3개의 필드에 나타난 염색된 멜라닌 정도를 이미지 J 프로그램으로 환산하여 정량적으로 나타낸 것이다(*, $p < 0.05$ versus DMSO treated skins).
- [0165] 그 결과, 도 7B 및 7C에 나타낸 바와 같이, DMPB 처리에 의하여 멜라닌 합성이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었으며, DMPB는 표피 기초층(epidermal basal layer)에서 멜라닌 합성을 현저하게 증가시키며, 표피의 멜라닌 수에는 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었다.
- [0166] 상기와 같은 결과는 모두 DMPB가 *in vivo*에서도 멜라닌 합성을 증가시킬 수 있음을 나타내는 결과이다.
- [0167] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

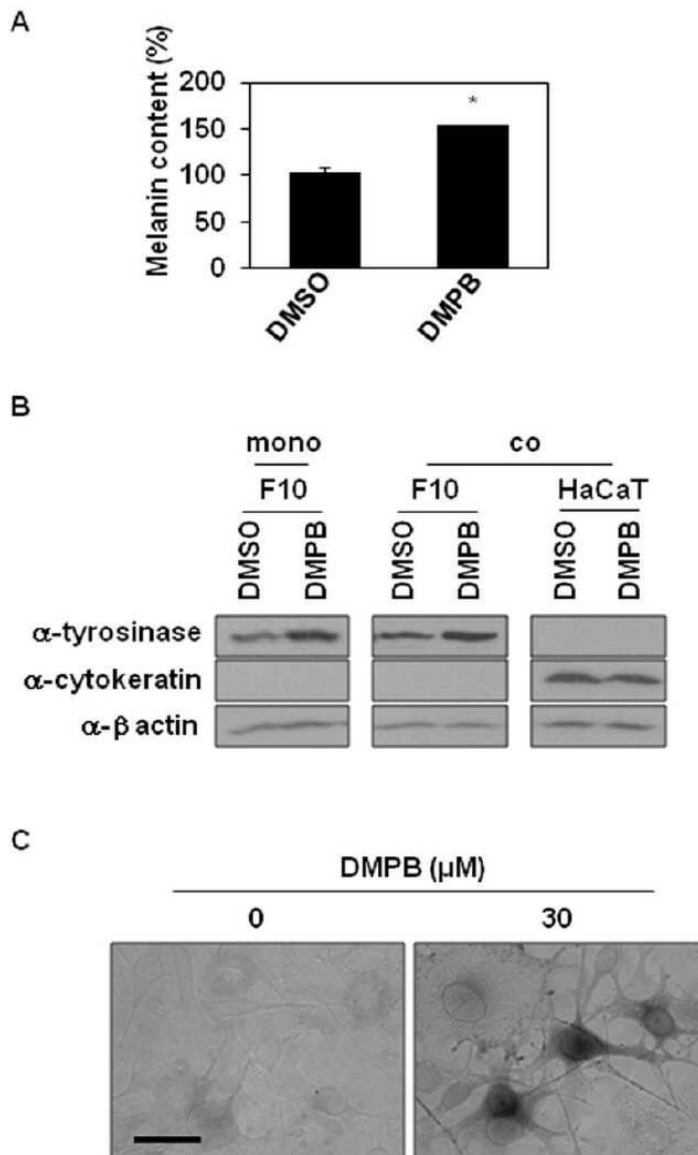
도면1



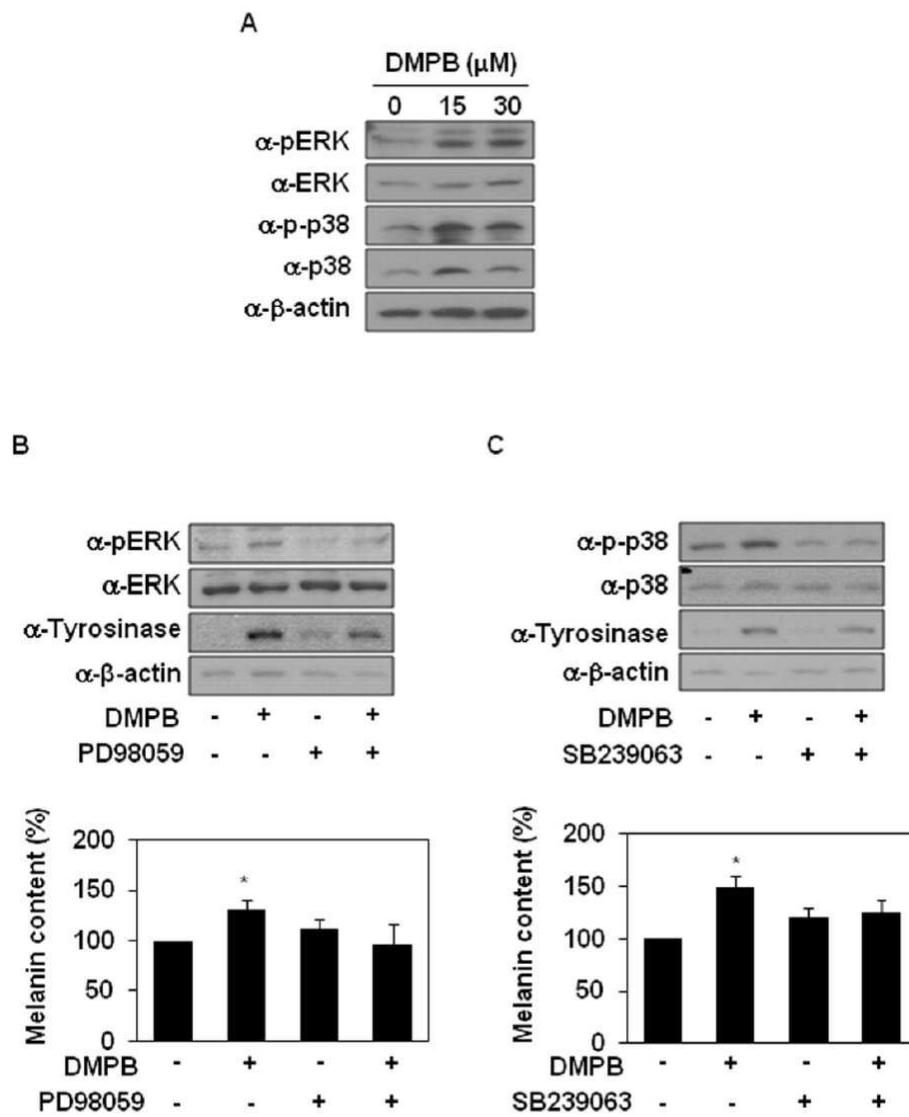
도면2



도면3

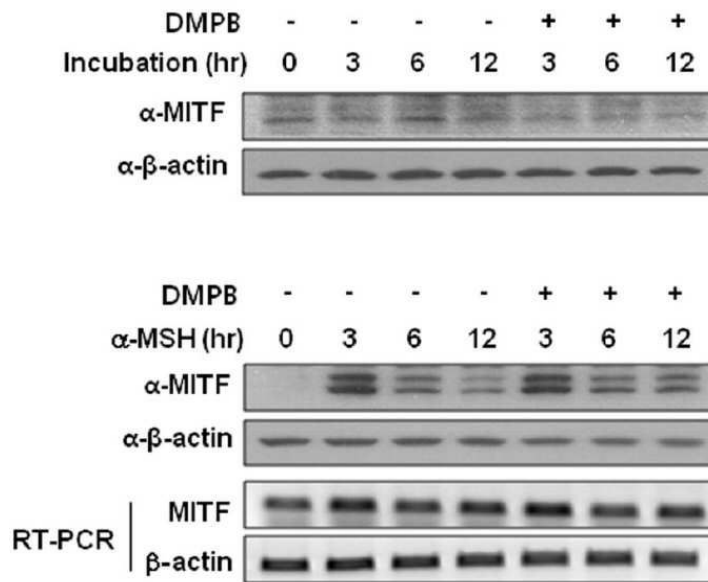


도면4

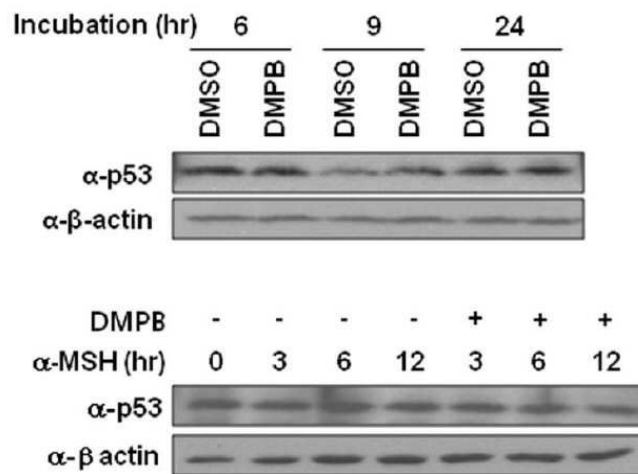


도면5

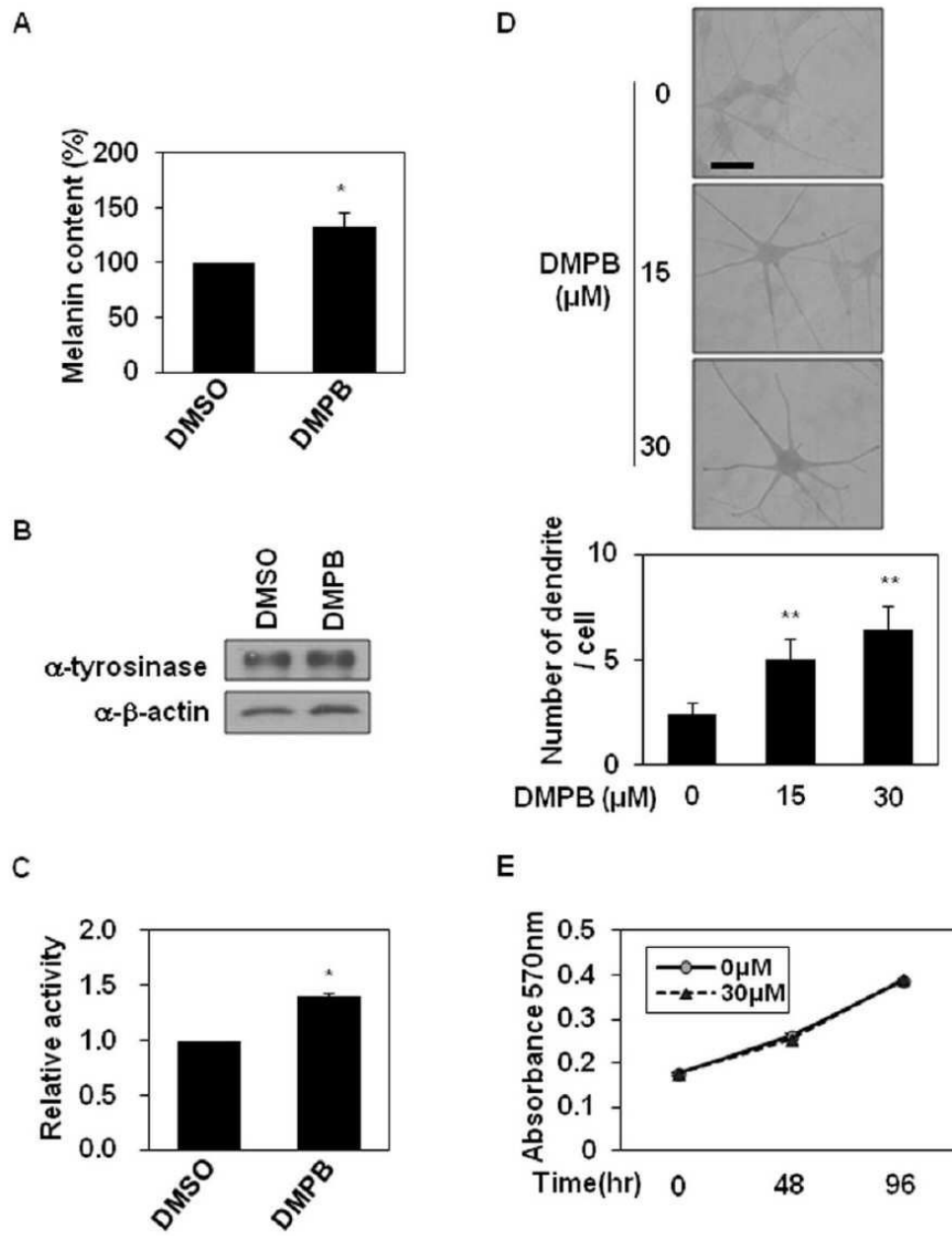
A



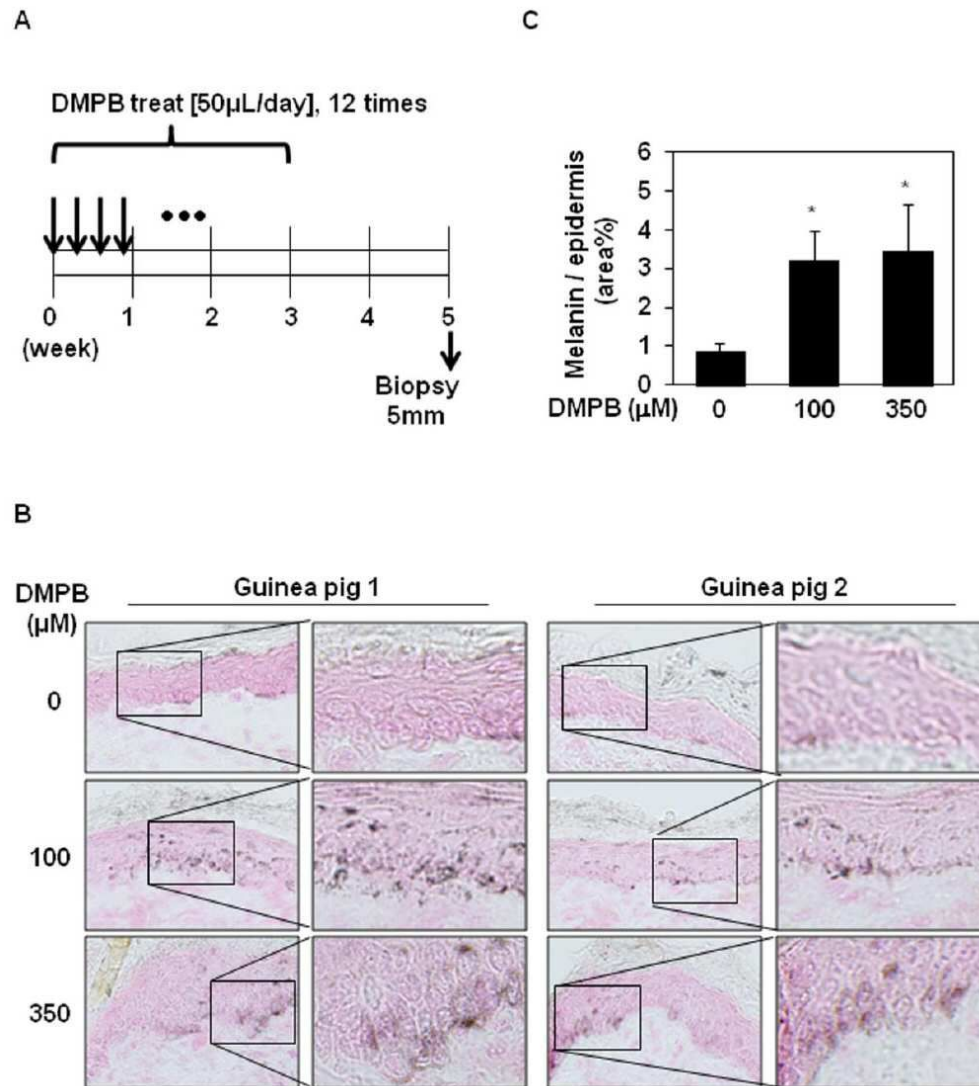
B



도면6



도면7



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> use of Zingiber cassumunar Roxb extracts or compounds isolated therefrom for enhancing melanogenesis
- <130> PA131225KR
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for mouse tyrosinase

<400> 1

cgagcctgtg cctcctctaa 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for mouse tyrosinase

<400> 2

ccaggactca cggatcatcca 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for MITF

<400> 3

ggaacagcaa cgagctaagg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for MITF

<400> 4

tgatgatccg attcaccaga 20

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for beta-actin

<400> 5

tggaatcctg tggcatccat gaaa 24

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for beta-actin

<400> 6

taaaacgcag ctcagtaaca gtccg

25