



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월30일  
(11) 등록번호 10-2294967  
(24) 등록일자 2021년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/49 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 8/9789 (2017.08)  
A61K 8/49 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0102960  
(22) 출원일자 2019년08월22일  
심사청구일자 2019년08월22일  
(65) 공개번호 10-2021-0023155  
(43) 공개일자 2021년03월04일  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2881333 B2\*  
[네이버 블로그], “피부관리는 천연화장품 수세미수액 에센스”(2010.10.18.) 1부.\*  
KR1020020088004 A  
JP4630102 B2  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
이중희  
제주특별자치도 제주시 애월읍 장전안길 16-1  
조성은  
제주특별자치도 제주시 애월읍 장전안길 16-1  
(72) 발명자  
이중희  
제주특별자치도 제주시 애월읍 장전안길 16-1  
조성은  
제주특별자치도 제주시 애월읍 장전안길 16-1  
(74) 대리인  
특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 2 항

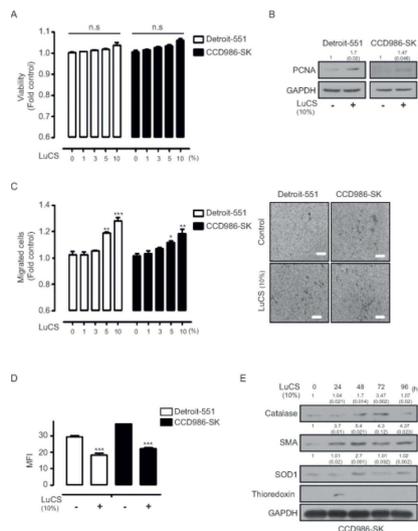
심사관 : 강신견

(54) 발명의 명칭 수세미 수액을 유효성분으로 하는 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명의 일실시예는 수세미 수액을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장품 조성물을 제공한다. 본 발명의 다른 일실시예는 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장품 조성물을 제공한다. 상기와 같은 조성물은 수세미 수액 또는 그 유효성분인 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 소량만 포함하면서도 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백 등의 다양한 효과를 낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61Q 19/004* (2013.01)

*A61Q 19/02* (2013.01)

*A61Q 19/08* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장품 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 조성물은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 3 내지 20  $\mu$ M 함유한 화장품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 수세미 수액을 유효성분으로 하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 수세미 수액을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV 손상 및 미백용 화장품 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 피부는 신체의 외부를 둘러싸고 있는 기관으로서, 몸을 환경으로부터 1차적으로 보호하는 중요한 생물학적인 역

할뿐 아니라, 타인에게 보이는 외피의 대부분을 구성하는 요소로서 사회적인 역할을 담당한다. 생명체의 모든 조직에서는 나이가 들어가면서 노화가 진행되는데 피부 또한 예외가 아니다. 일반적으로 피부노화는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외인성 노화로 나뉘는데, 전자는 나이에 따라 유전적으로 정해진 바에 따라 자연적으로 진행되는 노화를 의미하며, 후자는 햇빛, 오염(니코틴 등), 반복적인 근육사용, 식단, 전반적인 건강상태 등에 의해 유도되는 노화현상을 말한다.

[0004] 피부가 노화되면서 나타나는 대표적인 현상은 주름과 기미·검버섯·잡티 등의 색소침착이다. 피부 주름의 경우 여러 원인에 의해 피부 진피층에 존재하는 섬유아세포의 숫자 및 이들 세포의 합성능력 감소로 인해 콜라겐과 엘라스틴으로 대표되는 세포외기질이 변화 및 분해되며 탄력이 떨어지면서 나타나며, 색소침착은 호르몬 이상이나 자외선에 의해 멜라닌 색소가 과다하게 생성되면서 나타나게 된다. 인류는 오래전부터 아름다움과 젊음을 추구해왔으며, 특히 상기와 같은 외형적 노화의 대표적인 증상인 피부의 주름과 색소침착을 늦추고 개선하는 효과가 있는 원료에 대한 니즈는 항상 존재해왔다. 이러한 효과가 있는 화장품이 큰 시장을 형성하고 있으며, 기능성 화장품들이 다수 출시되고 있는 가운데 더 좋은 효과를 갖는 화장품 및 이를 위한 원료에 대한 수요 또한 커지고 있는 실정이다.

[0005] 수세미(*Luffa cylindrica (L.) Roem*)는 박과의 한해살이물로, 덩굴성 줄기와 그물모양의 섬유가 발달되고 검은 종자가 든 열매를 형성하며 자란다. 아시아의 열대 및 아열대 지방에서 오랜 기간 재배되어 왔으며, 열매, 껍질, 씨앗, 수액 등 부위에 따라 식음료의 재료와 주방 및 목욕용품으로 사용하는 스폰지의 재료뿐 아니라 민간과 전통의학에서 다양한 증상의 치료를 위한 약재 등으로 쓰여왔다. 예컨대 중국에서는 구충, 해열 및 건위제 등으로 사용되었으며, 한방에서는 생리불순에 효과를 가지며 거담, 지혈, 해독 등을 위한 약재로 알려져 있다.

[0006] 수세미는 민간에서 피부 미용을 위해서 사용되었으며, 최근 연구에서는 수세미의 과육 및 껍질 추출물이 항염, 항산화 및 피부수분손실방지 등의 효과를 가지는 것으로 보고되기도 하였다. 그러나 수세미의 수액이 피부에 가지는 효과에 대해서는 구체적으로 규명된 바가 없다. 이와 관련하여, 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0061902호는 수세미수액을 함유한 화장료 조성물이 아토피의 가려움을 방지할 수 있고 피부 재생에 도움을 주어 아토피 치료 효과를 나타낼 수 있다고 주장하고 있으나, 그 증거를 제시하고 있지는 않다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0078070호는 유근피, 산양산삼 및 인삼 등 한방 재료를 농축한 한방액과 수세미 수액을 섞은 피부 개선용 조성물에 대해 개시하였으나, 피부개선이 구체적으로 어떤 효과인지 알기 어려울 뿐 아니라, 상기 효과가 어떤 재료로부터 오는 것인지 알 수 없다.

[0007] 본 발명의 발명자는 수세미의 수액이 피부에 미치는 영향을 연구하던 중, 수세미 수액이 주름, UV 손상 및 색소 침착과 관련된 개선 효과를 가진다는 것을 밝혀 이 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명은 전술한 요구를 해결하고자 안출된 것으로서, 본 발명의 일 실시예는 수세미 수액을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예는 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 유효성분으로 하는 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0014] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 수세미 수액을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0015] 여기서, 상기 수세미 수액은 상기 조성물 내에 3 (v/v)% 이상 포함되는 것일 수 있다.

[0016] 상기 화장료 조성물은 섬유아세포 내 EGFR의 발현, EGFR의 인산화, ERK1/2의 인산화 및 AKT의 인산화 중 하나 이상을 증가시키는 것일 수 있다.

[0017] 상기 화장료 조성물은 섬유아세포 내 콜라겐, 섬유아세포 내 엘라스틴, 지방세포 내 지방 및 지방세포 내 C/EBP

의 중 하나 이상을 증가시키는 것일 수 있다.

- [0018] 상기 화장품 조성물은 UV에 의해 유도된 피부손상을 회복시키는 것이고, 상기 피부손상은 섬유아세포 내 콜라겐의 감소, 섬유아세포 내 엘라스틴의 감소, 섬유아세포의 변형 및 멜라닌 세포의 멜라닌 생성 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 현상을 수반하는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 화장품 조성물은 HGF에 의한 멜라닌 생성 감소 촉진 및 FGF에 의한 멜라닌 생성 증가 저해 중 하나 이상의 효과를 가지는 것일 수 있다.
- [0020] 상기 수세미 수액은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 포함하는 것일 수 있다. 상기 수세미 수액 내 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine 함량은 3% 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 일 측면에 따른 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장품 조성물은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 유효성분으로 한다.
- [0023] 여기서, 상기 조성물은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 3 내지 20  $\mu$ M 함유할 수 있다.

**발명의 효과**

- [0025] 본 발명의 실시예에 따르면, 수세미 수액을 유효 성분으로 함유하여 피부자극이 없으면서도 피부의 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백효과를 가지는 화장품 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 수세미 수액을 소량 포함하면서도 상기와 같은 효과를 낼 수 있다.
- [0027] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0029] 도 1은 수세미 수액이 섬유아세포의 증식(A, B), 이동성(C), 항산화능(D, E)에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도2는 수세미 수액이 섬유아세포 내 신호전달에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도3은 수세미 수액이 섬유아세포 내 매트릭스 메탈로프로타아제 양에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도4는 수세미 수액이 섬유아세포 내 콜라겐(A, B) 및 엘라스틴(C, D) 양에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도5는 수세미 수액이 지방전구세포의 지방 축적에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도6은 수세미 수액이 UV에 의한 섬유아세포의 콜라겐(A) 및 엘라스틴(B) 감소 및 세포 변형(C)에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도7은 각 성장인자가 멜라닌세포의 멜라닌 양에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도8은 FGF 및 HGF가 각각 멜라닌세포의 항산화단백질(A) 및 멜라닌 생성 관련 단백질(B)의 발현에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도9는 수세미 수액이 멜라닌세포의 생존(A), 멜라닌 양(B), 세포 내 신호전달(C, D)에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도10은 FGF 및 HGF mRNA와 연령의 상관관계(A, B) 및 수세미 수액이 멜라닌세포의 FGF 및 HGF 처리에 따른 멜라닌 양 변화(C)에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도11은 수세미 수액이 멜라닌 세포의 생존(A) 및 UV에 의한 멜라닌 양 증가에 미치는 영향에 대한 데이터(B)이다.
- 도12는 수세미 수액의 HPLC 및 MS/MS 결과 데이터이다.
- 도13은 수세미 수액의 성분인 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine의 처리가 섬유아세포의 콜라겐 및 엘라스틴 양에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도14는 수세미 수액의 성분인 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine의 처리가 분화유도된 지방세포의 지방 축적에 미치는 영향에 대한 데이터이다.
- 도15는 수세미 수액의 성분인 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine의 처리가 흑색종 세포의 멜라닌 양에 미치는

영향에 대한 데이터이다.

도16은 수세미 수액의 성분인 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine의 처리가 UV 처리한 섬유아세포에 미치는 영향에 대한 데이터이다.

도17은 수세미 수액의 성분인 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine의 처리가 섬유아세포, 지방전구세포 및 흑색종 세포의 증식에 미치는 영향에 대한 데이터이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0030] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0031] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0033] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0035] 본 발명의 일실시예는 수세미 수액을 유효성분으로 하는, 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0036] 여기서, 상기 수세미 수액은 상기 조성물 내에 3 (v/v)% 이상 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게 5 (v/v)% 이상, 가장 바람직하게 10 (v/v)% 이상 포함되는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 수세미 수액은 바람직하게 한국 재래종 수세미로부터 채취된 것일 수 있다. 상기 수세미 수액은 바람직하게 3미터 이상 자란 수세미의 줄기에서 지상으로부터 노출된 부위 길이가 1미터 정도 되는 부분을 절단하고, 이 절단부로부터 채취된 것일 수 있다. 이때, 수액을 받는 용기 및 용기에 삽입되는 줄기부위는 세정 및 소독하고, 수액에 빗물이나 먼지 등의 불순물이 들어가지 못하도록 밀봉한 상태로 채취하는 것이 바람직하다. 상기와 같은 절단부로부터 품질이 동일한 수액을 채취할 수 있는 기간은 6일 이내로 알려져 있다. 상기 채취 과정은 수액 채취기를 이용하여 진행될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 화장품 조성물은 유효 성분으로서 상기 수세미 수액 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 상기 통상적으로 이용되는 성분들은 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0039] 본 발명의 화장품 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로

플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

- [0043] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0044] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 젤이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 화장료 조성물은 섬유아세포 내 EGFR(Epidermal growth factor receptor)의 발현, EGFR의 인산화, ERK1/2(Extracellular signal regulated kinase)의 인산화 및 AKT(AKT serine/threonine kinase)의 인산화 중 하나 이상을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0049] 피부는 최외각에 존재하며 방수 및 항균 기능을 하는 상피, 결합조직을 포함하며 탄력, 부피, 구조적 단단함을 제공하는 진피 및 주로 지방세포로 구성되며 절연(insulation) 기능을 하는 피하로 나뉜다. 피부 노화에 있어서 특히 진피가 중요한 역할을 하는데, 피부 노화가 진행되면 진피가 얇아질 뿐 아니라 콜라겐 및 엘라스틴이 감소하게 되며, 이러한 변화는 피부가 주름지고 늘어지는 결과를 가져온다. 진피 섬유아세포는 상기 진피를 구조적으로 채우고 장벽 역할을 하는 콜라겐, 엘라스틴 등을 생산하는 주요 세포로 알려져 있다.
- [0050] 특히 주름과 관련성이 높은 콜라겐 및 엘라스틴의 양에 영향을 주는 세포 내 현상은, 예컨대, 콜라겐 및 엘라스틴의 합성 저해, 분해 촉진, 발현 감소 등 다양한 방향으로 나타날 수 있고, 이러한 결과를 유도하는 신호전달 체계 또한 NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , MAPK 신호전달 등 복수의 체계가 알려져 있으며, 상기 신호전달 체계에 영향을 주는 방법 역시 발현의 변화, 인산화 등 단백질 번역 후 조절(modification) 등으로 여러 가지 방향이 존재하는 것으로 보고된 바 있다. 본 발명의 발명자들은, 본 발명의 화장료 조성물 내 유효성분인 수세미 수액이 섬유아세포의 콜라겐 및 엘라스틴의 양을 증가시킴에 있어 MAPK 신호전달 체계의 활성을 높이는 방향으로 작용하고, 특히 MAPK 신호전달 중에서도 EGFR을 신호개시분자로 하며, 이러한 EGFR을 활성화시킬 뿐 아니라 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 상기 MAPK 신호전달이 활성화되면 콜라겐 전사를 증가시키는 것으로 알려져 있을 뿐 아니라, PPAR $\gamma$ 를 통해 콜라겐 및 엘라스틴의 분해를 촉진하는 MMP를 감소시키는 것을 본 발명의 발명자들이 후술할 실험을 통해 증명한 바 있다.
- [0052] 상기 화장료 조성물은 섬유아세포 내 콜라겐(Collagen), 섬유아세포 내 엘라스틴(Elastin), 지방세포 내 지방 및 지방세포 내 C/EBP(CCAAT enhancer binding protein)의 중 하나 이상을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 화장료 조성물의 유효성분인 수세미 수액은 섬유아세포 내 콜라겐 양, 섬유아세포 내 엘라스틴 양 및 지방세포로 분화유도된 지방전구세포 내 지방 양을 농도 의존적으로 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 지방전구세포의 변화는 C/EBP $\alpha$  양 증가 및 ERK1/2의 인산화 감소를 수반하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0054] 상기 화장료 조성물은 UV에 의해 유도된 피부손상을 회복시키는 것이고, 상기 피부손상은 섬유아세포 내 콜라겐의 감소, 섬유아세포 내 엘라스틴의 감소, 섬유아세포의 변형 및 멜라닌 세포(melanocyte)의 멜라닌(Melanin) 생성 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 현상을 수반하는 것일 수 있다. 상기 UV는 UV-A 일 수 있다.
- [0056] 상기 화장료 조성물은 HGF(Hepatocyte growth factor)에 의한 멜라닌 생성 감소 촉진 및 FGF(Fibroblast growth factor)에 의한 멜라닌 생성 증가 저해 중 하나 이상의 효과를 가지는 것일 수 있다. 본 발명의 발명자

들은 몇 가지 성장인자들이 멜라닌 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하고, 이 중 HGF는 멜라닌 생성을 감소, FGF는 증가시킨다는 것을 발견한 바 있다. 본 발명의 조성물의 유효성분인 수세미 수액은 이러한 HGF의 멜라닌 감소 효과를 증폭하고, FGF의 멜라닌 생성 촉진을 저해하는 것으로 나타났다. 이는 상기 화장료 조성물에 HGF를 추가로 포함시킬 경우 미백효과를 좀더 강화할 수 있음을 나타낸다.

[0058] 상기 수세미 수액은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 포함하는 것일 수 있다. 특히 상기 수세미 수액은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다. 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine은 상기 화장료 조성물 내에 3  $\mu\text{M}$  이상, 바람직하게 5  $\mu\text{M}$  이상, 더 바람직하게 10  $\mu\text{M}$  이상 포함되는 것일 수 있다. 상기 수세미 수액 내 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine 함량은 3% 이상, 바람직하게 5% 이상, 더 바람직하게 7% 이상 포함되는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 일 측면에 따른 주름방지, 주름개선, 항-UV손상 및 미백용 화장료 조성물은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 유효성분으로 한다.

[0061] 여기서, 상기 조성물은 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 3 내지 20  $\mu\text{M}$ , 바람직하게 3 내지 10  $\mu\text{M}$ , 더 바람직하게 5 내지 7  $\mu\text{M}$  함유할 수 있다.

[0064] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0066] **실시예1. 수세미 수액 채취**

[0067] 한국 재래종 품종의 수세미 종자(원진약초농원, 울산, 한국)를 과종한 후 2일에 한번씩 급수하며 노지배양하여 식물이 3미터정도 자라도록 하였다. 수세미 수액은 상기 수세미의 뿌리로부터 1m 정도 윗부분의 줄기를 잘라내고, 절단부로부터 약 12시간동안 받아서 모았다.

[0069] 하기 세포실험에서 사용된 인간진피섬유아세포(Human dermal fibroblast, Detroit-551 및 CCD986-SK), 지방전구세포(preadipocyte, 3T3-L1) 및 흑색종세포(melanoma cell, B16F10)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 상기 세포들은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 5% CO<sub>2</sub>, 37° C, 습도조절된 조건에서 배양하였다. 이때, DMEM에 인간진피섬유아세포주들은 10% (v/v) fetal bovine serum, 지방전구세포주는 10% (v/v) fetal calf serum(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 각각 추가하고, 공통적으로 1 $\times$ 10<sup>5</sup> unit/L penicillin 및 100 mg/L streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하였다.

[0070] 하기 western blot 실험에서는 모두 대조마커로 GAPDH를 사용하고, 결과 상대적 픽셀 강도는 ImageJ로 분석하였다.

[0072] **실험예1. 수세미 수액이 섬유아세포 증식, 이동, ROS에 미치는 영향 분석**

[0073] 배양액에 각각 0, 1, 3, 5 및 10% (v/v)의 수세미 수액을 포함하여 섬유아세포(Detroit-551 및 CCD986-SK)를 72시간 배양하였다.

[0074] 수세미 수액이 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 섬유아세포에 WST-1 reagent (Nalgene, Rochester, NY) 시약을 한 웰(well) 당 10  $\mu\text{l}$  추가하고 2시간 후 배양물의 흡광도를 450 nm에서 측정하였다 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). 그 결과, 통계적으로 유의미하지는 않았으나 대체로 수세미 수액의 농도가 높아짐에 따라 세포 증식이 더 활발한 것으로 나타났다(도1A). 세포의 증식과 관련하여, 추가로 상기 섬유아세포주들 내 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)의 양을 western blot으로 확인한 결과 역시 동일하게 나타나(도1B), 수세미 수액이 섬유아세포의 증식을 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0075] 수세미 수액이 섬유아세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위해 전술한 두 세포주에 대해 24-Transwell device (Corning, NY, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실험을 진행하고, ELISA reader (Bio-Rad)로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, Detroit-551 및 CCD986-SK 모두 통계적으로 유의미하게 수세미 수액의 농도 의존적으로 이동성이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도1C).

[0076] 다음으로, 주름 생성 등 피부 노화와 큰 관련성이 있는 것으로 알려진 ROS(reactive oxygen species)에 수세미 수액이 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 두 섬유아세포주에 ROS detection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실험을 진행하고, 염색된 세포를 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 얻은 후 데이터를 FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR)를

이용하여 분석하였다. 그 결과, 수세미 수액을 처리한 세포의 ROS 수준이 대조군에 비해 확연히 낮아진 것을 알 수 있었다(도1D). 추가로, 상기 세포 내 산화스트레스를 낮추는 것으로 알려진 단백질인 카탈라제(Catalase), SOD1(Superoxide dismutase 1), SMA(Smooth muscle actin) 및 TRX(Thioredoxin)에 대해 western blot을 진행한 결과, 수세미 수액 처리군에서 상기 4종의 단백질 발현이 증가함을 확인할 수 있었으며(도1E), 이는 수세미 수액이 세포의 ROS 제거능을 높일 수 있었음을 의미한다.

[0078] **실험예2. 수세미 수액이 섬유아세포의 세포 내 신호전달체계에 미치는 영향 분석**

[0079] 배양액에 각각 0, 10% (v/v)의 수세미 수액을 포함하여 섬유아세포(Detroit-551 및 CCD986-SK)를 0, 24, 48 및 72시간 배양하였다.

[0080] 수세미 수액이 섬유아세포의 세포 내 신호전달체계에 미치는 영향을 알아보기 위해 phospho-RTK array kit(R&D Systems, Minneapolis, MN) 사용하여 분석한 결과, 수세미 수액은 EGFR의 인산화를 유도한 것으로 나타났다(도2A). 수세미 수액이 섬유아세포에 미치는 영향의 기작을 좀더 상세하게 알아보기 위해, EGFR 신호전달체계 내 분자를 western blot으로 분석하였다. 이때, 분석 대상은 EGFR, phospho-ERK1/2, ERK1, phospho-AKT 및 AKT였으며, 분석 결과, 수세미 수액이 농도 의존적으로 EGFR의 양, ERK1/2의 인산화 및 AKT의 인산화 수준이 높이는 것을 확인할 수 있었다(도2B).

[0081] 기존에 EGFR 신호전달과 PPAR $\gamma$ 의 관련성에 대한 보고가 있어, 수세미 수액이 PPAR $\gamma$ 의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다. 수세미 수액 처리군에서 Western blot 결과 PPAR $\gamma$ 의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었으며(도2C), PPAR $\gamma$  luciferase reporter assay 결과 PPAR $\gamma$ 의 활성화 역시 감소(도2D)된 것으로 나타났다. EGFR과 PPAR $\gamma$ 의 관련성을 다시 확인하기 위해 각각에 대한 siRNA를 처리하고 EGFR 및 PPAR $\gamma$ 에 대한 western blot을 진행한 결과, si-EGFR을 처리한 경우 PPAR $\gamma$ 의 발현이 증가하고, si-PPAR $\gamma$ 을 처리한 경우 EGFR의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0082] 종합해보면, 수세미 수액은 섬유아세포에서 EGFR의 발현 및 인산화를 증가시키고, 하위 신호전달분자의 인산화 수준을 높이는 한편, EGFR 신호전달을 통해 PPAR $\gamma$ 의 발현 및 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

[0084] **실험예3. 수세미 수액이 섬유아세포의 세포 내 MMP에 미치는 영향 분석**

[0085] 배양액에 각각 0, 10% (v/v)의 수세미 수액을 포함하여 섬유아세포(Detroit-551 및 CCD986-SK)를 48, 72시간 배양하였다.

[0086] PPAR $\gamma$ 와 MMP(Matrix metalloproteases) 및 MMP와 피부의 관련성은 각각 보고된 바 있다. 수세미 수액이 섬유아세포 내 MMP를 포함한 프로테아제의 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위해 human protease array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)로 분석한 결과, ADAM8(a), ADAM9(b), MMP1(c), MMP2(d), MMP7(e), MMP9(f) 및 elastase(g)의 발현이 수세미 수액을 처리하지 않은 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났다(도3A). 이들 프로테아제 중 특히 주름 형성과 관련된 것으로 알려진 MMP1, MMP2 및 MMP9에 대해 추가적인 western blot을 통해 분석해본 결과, 수세미 수액을 처리한 두 섬유아세포주 모두에서 상기 세 MMP들의 발현이 저해된 것을 확인할 수 있었다(도3B). PPAR $\gamma$ 와 MMP의 관련성을 다시 확인하기 위해 PPAR $\gamma$ 에 대한 siRNA를 처리하고 PPAR $\gamma$ , MMP1, MMP2 및 MMP9에 대한 western blot을 진행한 결과, si-PPAR $\gamma$ 을 처리한 경우 상기 세 MMP의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 종합해보면, 수세미 수액은 섬유아세포에서 PPAR $\gamma$ 의 발현 및 활성을 감소시킬 수 있으며, 이에 따라 주름형성에 관련이 있는 MMP의 발현이 저해되는 것으로 나타났다.

[0089] **실험예4. 수세미 수액이 섬유아세포의 ECM 생성에 미치는 영향 분석**

[0090] 배양액에 각각 0, 1, 3, 5 및 10% (v/v)의 수세미 수액을 포함하여 섬유아세포(Detroit-551 및 CCD986-SK)를 0, 24, 48, 72, 96시간 배양하였다.

[0091] 수세미 수액이 섬유아세포에 의해 생성되는 세포외기질(ECM, extracellular matrix) 분자에 미치는 영향을 알아보기 위해, 대표적인 ECM 분자인 1형 콜라겐(collagen type I) 및 엘라스틴에 대해 분석하였다. 우선 샌드위치 ELISA로 수세미 수액 농도별(72시간 처리) 1형 콜라겐의 전구체인 1형 프로콜라겐 양을 비교해본 결과, 농도 의존적으로 증가하고(도4A), 10% 수세미 수액 처리시간별 1형 프로콜라겐 및 콜라겐의 양을 western blot으로 분석한 결과, 처리시간에 의존적으로 증가한 것(도4B)을 확인할 수 있었다. 다음으로, 샌드위치 ELISA로 수세미 수액 농도별(72시간 처리) 엘라스틴 양을 비교해본 결과, 농도 의존적으로 증가하고(도4C), 10% 수세미 수액 처리시간별 엘라스틴의 양을 western blot으로 분석한 결과, 처리시간에 의존적으로 증가한 것(도4D)으로 나타나,

수세미 수액은 진피를 구조적으로 채워 피부의 탄력을 높이고 주름을 없앨 수 있는 세포외기질의 양을 늘릴 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0093] **실험예5. 수세미 수액이 지방세포 내 지방축적에 미치는 영향 분석**

[0094] 우선, 수세미 수액이 지방전구세포의 생존에는 영향을 미치지 않음을 WST-1 reagent를 이용한 분석을 통해 확인하였다(도5A).

[0095] 수세미 수액이 지방전구세포의 분화 및 지방생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 지방전구세포주인 3T3L1을 MDI(isobutyl-methylxanthine, dexamethasone and insulin)을 포함한 배지에서 6일간 배양하여 분화유도하였다. 이때, 상기 분화유도 배양물 및 MDI를 넣지 않은 배양물에 각각 수세미 수액을 여러 농도로 처리하여 배양하였으며, 상기 6일간 배양 후 세포에 oil red O staining하여 분석하였다. 그 결과, 분화유도된 지방전구세포에서 지방이 다량 생산되었으며, 특히 수세미 수액을 처리한 경우 농도 의존적으로 지방축적이 증가되었음을 알 수 있었다(도5B). 분화유도배양물의 지방방울 면적(lipid droplet area)를 분석한 결과, 10%의 수세미 수액을 첨가한 경우 수세미 수액을 넣지 않은 대조군에 비해 면적이 유의미하게 증가한 것으로 나타나(도5C), 수세미 수액이 지방전구세포의 분화 및 지방생성을 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0096] 이러한 효과가 나타나는 기작을 알아보기 위해, 분화유도배지 및 MDI를 넣지 않은 배지에서 수세미 수액과 함께 배양한 지방전구세포의 세포 내 신호전달분자를 western blot 분석하였다. 수세미 수액을 첨가한 세포에서는 C/EBP α의 발현이 증가하고, ERK1/2의 인산화가 감소하는 것으로 나타나(도5D), 수세미 수액이 지방전구세포에서는 ERK1/2 신호를 저해하고 그 결과 C/EBP α의 발현을 증가시켜 분화 및 지방생성을 유도함을 알 수 있었다.

[0097]

[0098] **실험예6. 수세미 수액이 UV에 의한 섬유아세포 기능손상에 미치는 영향 분석**

[0099] 섬유아세포를 60mm plate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 시딩한 후 2일간 배양하였다. UV 조사 전 80% confluency의 세포를 0.2 % FBS 배지에서 18시간 배양하여 starvation시켰다. UV-A 램프 (365 nm, BoTeck, Seoul, Korea)를 이용한 UV 조사 시 광원은 세포로부터 15 cm 거리에 두었으며, UV-meter (International Light Inc., Newburyport, MA, USA)로 6.3 J/cm<sup>2</sup>의 UV를 가하였다. UV 조사 후 세포 내 콜라겐 및 엘라스틴 함량을 ELISA 및 western blot으로 분석한 결과, 조사하지 않은 세포군에 비해 각각 약 60% 및 65% 수준으로 감소하였다. 이러한 콜라겐 및 엘라스틴 감소는 농도의존적으로 수세미 수액에 의해 회복되었음을 확인할 수 있었다(도6).

[0101] **실험예7. 각종 성장인자들이 멜라닌 세포의 멜라닌 생성 및 ROS 제거능에 미치는 영향 분석**

[0102] 흑색종세포(B16F10)에FGF(Fibroblast growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor), EGF(Epidermal growth factor), TGF(Transforming growth factor), PDGF(Platelet-derived growth factor), VEGF(Vascular endothelial growth factor)를 각각 20ng/mL 처리하고 72시간 후 10% DMSO를 포함하는 0.1 M NaOH 용액으로 세포 펠렛을 1시간동안 녹인 후 490nm에서 멜라닌 함유량을 측정하였다. 그 결과, 상기 성장인자 중 FGF 및 HGF를 제외한 경우는 멜라닌 생성에 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, FGF는 멜라닌 생성을 촉진, HGF는 저해하는 것을 확인할 수 있었다(도7).

[0103] FGF 및 HGF가 흑색종세포의 ROS 제거능에 미치는 영향을 확인하기 위해, 흑색종세포에 20ng/mL씩 처리하고 0, 12, 24, 48시간 후 ROS에 대한 방어와 관련된 Catalase, SMA 및 SOD1 단백질의 발현을 western blot 분석하였다. 그 결과, FGF는 상기 세 단백질의 발현을 처리시간이 길어짐에 따라 감소시키는 반면, HGF는 증가시키는 것으로 나타났(도8A).

[0104] FGF 및 HGF가 멜라닌 생성에 어떻게 영향을 미치는지 알아보기 위해, 흑색종세포에 FGF 및 HGF를 20ng/mL씩 처리하고 0, 12, 24, 48시간 후 멜라닌 생성에 관여하는 단백질인 Tyrosinase, MITF, TP1, TRP2의 발현을 western blot 분석하였다. 그 결과, FGF는 상기 네 단백질의 발현을 모두 증가시켰으며, HGF는 Tyrosinase, TRP1 및 TRP2 발현을 감소시키는 것으로 나타났(도8B).

[0106] **실험예8. 수세미 수액이 멜라닌 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향 분석**

[0107] 우선, 수세미 수액이 흑색종세포의 생존에는 영향을 미치지 않음을 WST-1 reagent를 이용한 분석을 통해 확인하였는데(도9A), 10% 이상의 수세미 수액을 처리한 경우에도 독성효과가 없는 것으로 나타났(data not shown).

[0108] 흑색종세포에 수세미 수액을 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10%(v/v) 처리하고 72시간 후 10% DMSO를 포함하는

0.1 M NaOH 용액으로 세포 펠렛을 1시간동안 녹인 후 490nm에서 멜라닌 함유량을 측정하였다. 그 결과, 멜라닌 생성은 수세미 수액에 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도9B).

[0109] 수세미 수액이 멜라닌 생성을 저해하는 기작을 밝히기 위해 흑색종세포에 수세미 수액을 10%(v/v) 처리하고 72 시간 후 Phospho-MAPK array(R&D Systems, Minneapolis, MN)을 제조사 매뉴얼에 따라 진행하였다. 그 결과, 수세미 수액에 의해 다양한 MAPK 신호에 관여된 단백질의 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었으며(도9C), 이를 다시 확인하기 위해 수세미 수액을 농도별로 처리한 세포에서의 MAPK 신호 단백질인 JNK, CREB, AKT의 인산화를 확인한 결과, 농도 의존적으로 상기 세 단백질의 인산화가 저해되는 것으로 나타났다(도9D).

[0111] **실험예9. 수세미 수액이 성장인자에 의한 멜라닌 생성 촉진/저해에 미치는 영향 분석**

[0112] 멜라닌 생성에 영향을 미치는 FGF 및 HGF의 발현이 어떻게 변화하는지 알아보기 위해 GEO 데이터베이스를 이용하여 그 mRNA 발현을 연령별로 분석하였다. 그 결과, 연령이 높아질수록 FGF 및 HGF의 mRNA 발현량이 모두 통계적으로 유의미하게 감소하는 것으로 나타났다(도10A-B).

[0113] 다음으로, 수세미 수액이 HGF에 의한 멜라닌 감소 및 FGF에 의한 멜라닌 증가에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, HGF 및 FGF를 50ng/mL, 수세미 수액을 10% 포함한 배지에서 흑색종세포를 XX시간 배양한 후 멜라닌 생성을 확인하였다. 그 결과, 수세미 수액은 HGF에 의한 멜라닌 감소를 더욱 강화하며, FGF에 의한 멜라닌 생성을 억제하는 효과를 나타내었다(도10C).

[0115] **실험예10. 수세미 수액이 UV에 의한 멜라닌 생성에 미치는 영향 분석**

[0116] 흑색종세포를 60mm plate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 시딩한 후 2일간 배양하였다. UV 조사 전 80% confluency의 세포를 0.2 % FBS 배지에서 18시간 배양하여 starvation시켰다. UV-A 램프 (365 nm, BoTeck, Seoul, Korea)를 이용한 UV 조사 시 광원은 세포로부터 15 cm 거리에 두었으며, UV-meter (International Light Inc., Newburyport, MA, USA)로 6.3 J/cm<sup>2</sup>의 UV를 가하였다.

[0117] 우선, 수세미 수액 및 UV처리가 흑색종세포의 생존에는 영향을 미치지 않음을 WST-1 reagent를 이용한 분석을 통해 확인하였다(도11A).

[0118] 다음으로, 0, 1, 3, 5, 10%(v/v)의 수세미 수액을 첨가한 흑색종세포에 UV를 처리하고, 각 실험군의 멜라닌 생성을 분석하였다. 그 결과, 수세미 수액에 농도 의존적으로 UV에 의해 유도된 멜라닌 생성이 저해되는 것으로 나타났으며(도11B), 실험예6의 결과와 종합해보면, 수세미 수액은 UV에 의해 유도되는 섬유아세포의 콜라겐 및 엘라스틴의 합성저해 및 분해나 세포변형, 멜라닌 세포의 멜라닌 생성 모두를 억제할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0120] **실험예11. 수세미 수액의 유효성분 분석**

[0121] HPLC 분석에는 Photo diode array (PDA) detector 및 Luna C18(2) column (5 μm particle size, 4.6 mm X 250 nm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)이 장착된 HPLC system (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD)이 사용되었다. 분석은 0 분 20% 아세트나이트릴, 10 분 40% 아세트나이트릴, 70% 20 분 아세트나이트릴, 25 분 70% 아세트나이트릴, 27 분 20% 아세트나이트릴, 30 분 20% 아세트나이트릴 순서의 step gradient mode로 진행하고(컬럼 유속 1 mL/min), 270 nm에서 피크를 분석하였다.

[0122] MS분석 시에는 준비된 샘플을 0.1% FA 수용액에 재현탁 후 Q-Exactive Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) 및 Ultimate 3000 UPLC system (Thermo Fisher Scientific)을 이용하였다. 대사물 분석 시에는 2 μm C18 레진으로 채워진 내부직경 50 cm x 75 μm의 분석컬럼이 사용되었다.

[0123] Capillary를 250 °C로 가열하고 spray voltage를 2.0 kV로 세팅하였다. 전체 MS 스캔은 100.0 to 1,000.0 m/z 범위에서 고질량 해상도70,000으로 이루어졌다. Automatic gain control (AGC) target은 1E6였고 maximum injection time (MIT)은 60 ms였다. m/z 400 MS<sup>2</sup>에 대해 17,500 해상도로 스캔된 피크들에 대하여, 30 normalized collisional energy (NCE)로 precursor ion들을 fragmentation하였는데, 이때, isolation window는 2.0 m/z였다. Dynamic exclusion setting은 90.0 s로 세팅하였다.

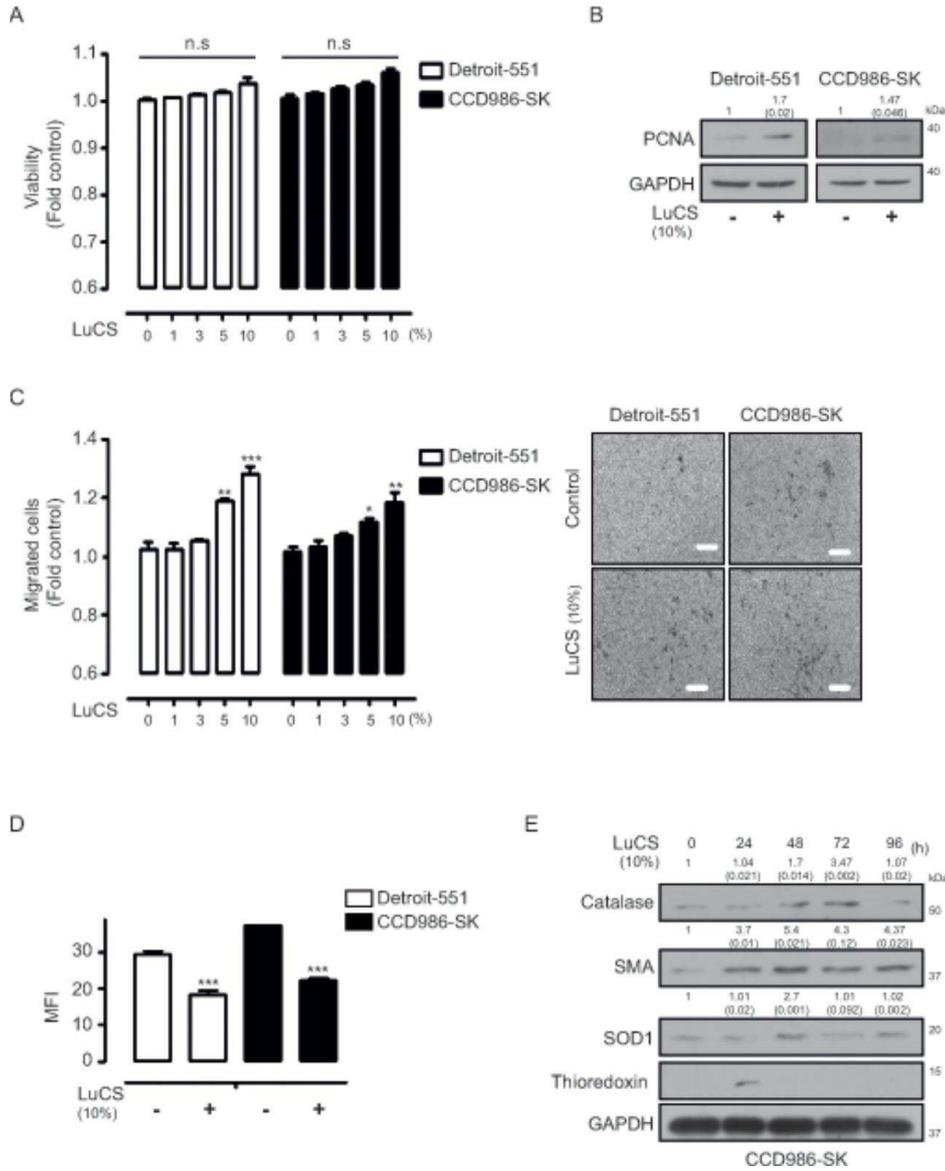
[0124] 평형시 컬럼 이동상 용액의 유속은 0.15 mL/min이었다. 농도구배용리(gradient elution) 시 이동상 용액 A 로 0.1 % FA 수용액이, 이동상 용액 B로 80 % ACN이 각각 사용되었다. Gradient step은 총 60분으로, 12.5 % B 20 분, 12.5 - 25.0 % B 5 분, 25.0 - 37.5 % B 5분, 37.5 - 80.0 % B 6분, 종료시까지 2.5 % B의 선형구배로 이

루어졌다.

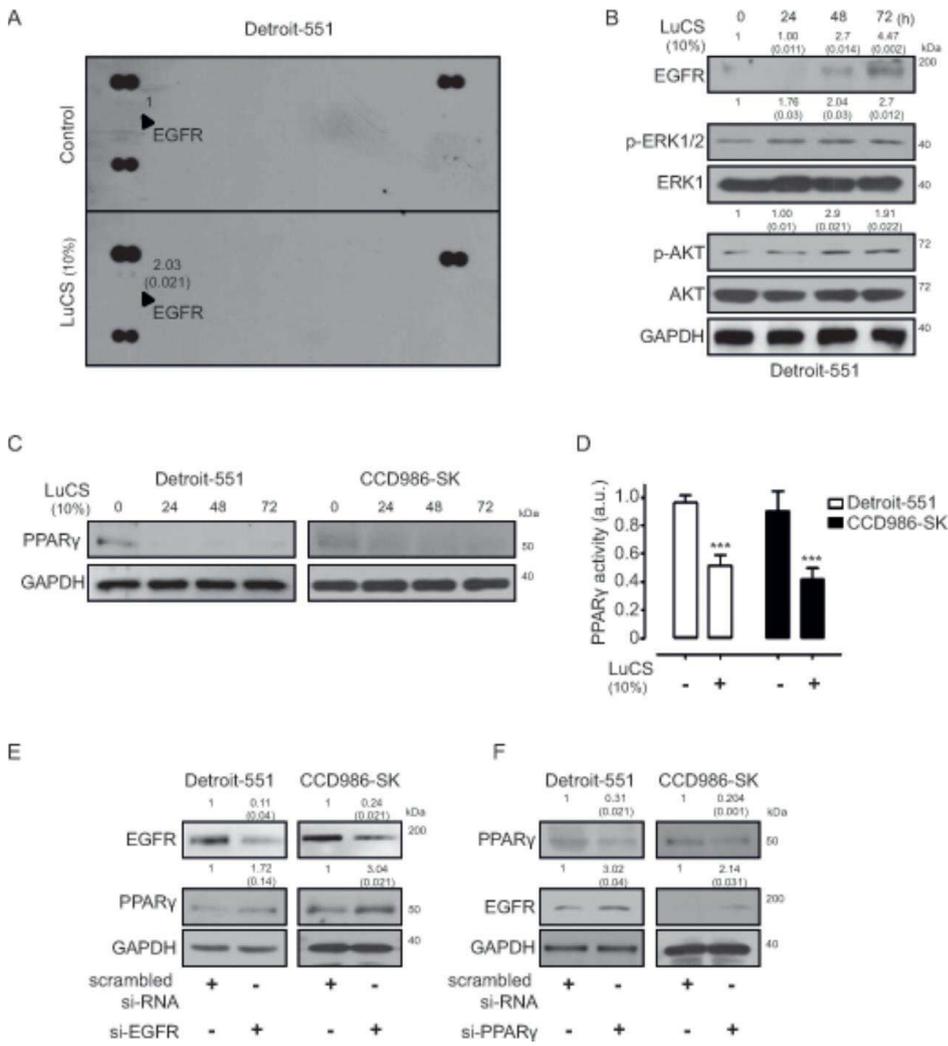
- [0125] 그 결과, 주요한 성분으로 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine이 동정되었으며, peak area로부터 수세미 수액 내에 약 8.86% 함유된 것으로 계산되었다(도12).
- [0126] 상기 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine이 전술한 수세미 수액의 효과를 유도하는 유효성분인지 알아보기 위해 상기 물질에 의한 세포외기질 분자 형성, 지방 축적, 미백, 항 UV-손상 효과를 살펴보았다. 상세하게, 우선 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 섬유아세포에 처리한 결과, 농도의존적으로 콜라겐 및 엘라스틴 양을 증가시키는 것으로 나타났는데, 특히 1-3  $\mu$ M부터 통계적으로 유의미한 효과를 보였다(도13). 다음으로, 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 지방전구세포에 처리한 결과, 분화유도된 지방전구세포에서 수세미 수액을 처리한 경우 농도 의존적으로 지방축적이 증가된 것으로 나타났다(도14). 상기 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine에 의한 세포외기질 분자 및 지방 축적의 증가는 상기 물질이 주름 개선 및 방지와 관련된 유효성분임을 나타낸다. 추가로 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine를 흑색종 세포에 처리한 결과, 농도의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였고, 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 알려진 tyrosinase, MITF 및 TRP1의 양이 감소하는 효과가 있음을 확인할 수 있었는데(도15), 이는 상기 물질이 미백 효과를 유도하는 유효성분임을 뜻한다. 마지막으로, 4-bromo-3-methylisoxazol-5-amine을 UV 조사한 세포에 처리한 결과, 농도의존적으로 UV에 의한 콜라겐 양 감소를 회복시키고, 세포 변형 또한 막아주는 것으로 나타나(도16), 상기 물질이 항 UV-손상 효과를 유도하는 유효성분임을 확인할 수 있었다.
- [0127] 마지막으로, 상기 물질이 세포 성장에 미치는 영향을 확인한 결과, 섬유아세포의 성장에는 영향이 없었으며, 지방전구세포 및 흑색종세포의 경우 소폭의 성장저해가 있었으나 미미한 수준으로 나타났다(도17).
- [0129] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0130] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

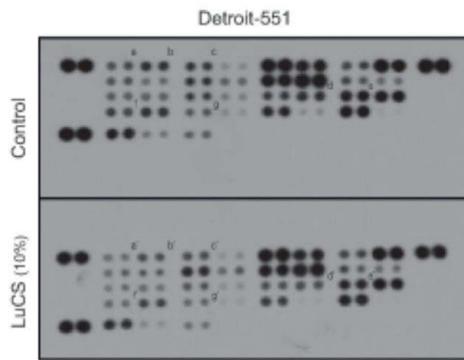


도면2

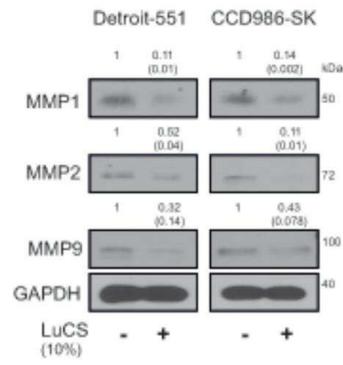


도면3

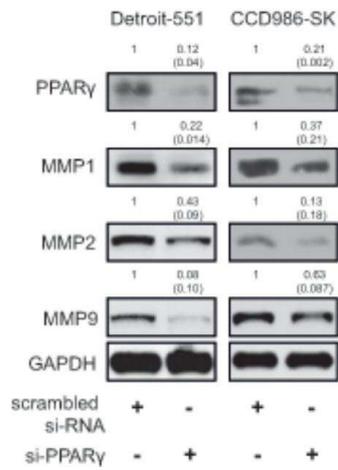
A



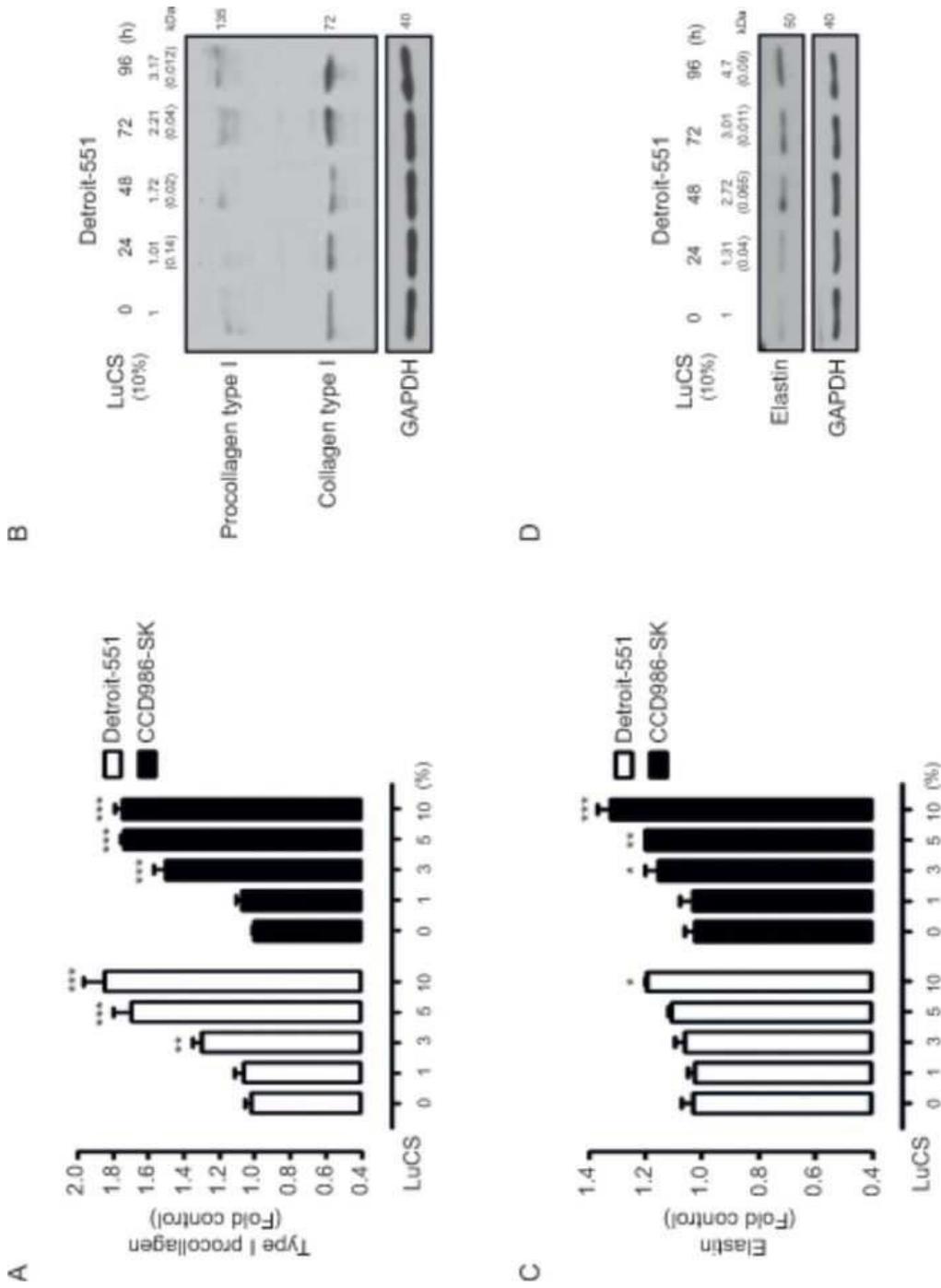
B



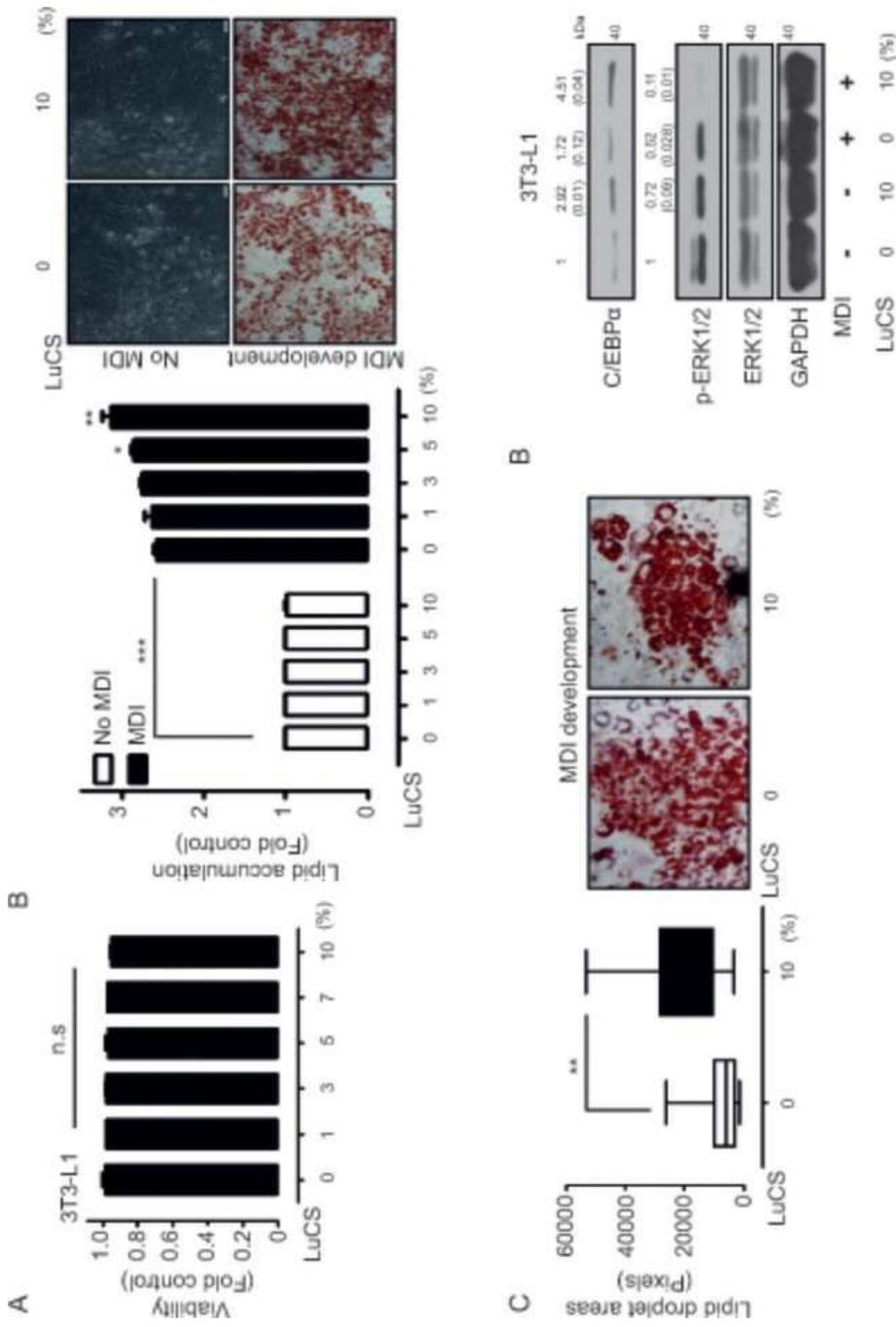
C



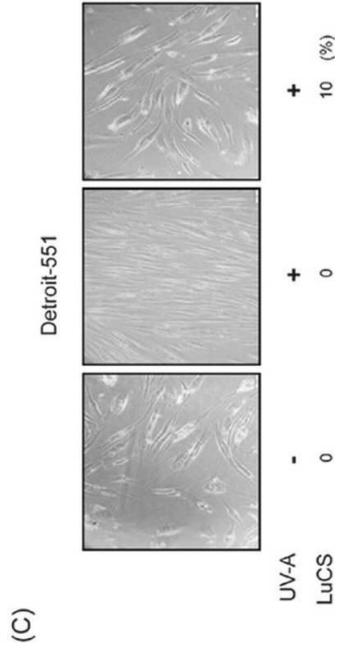
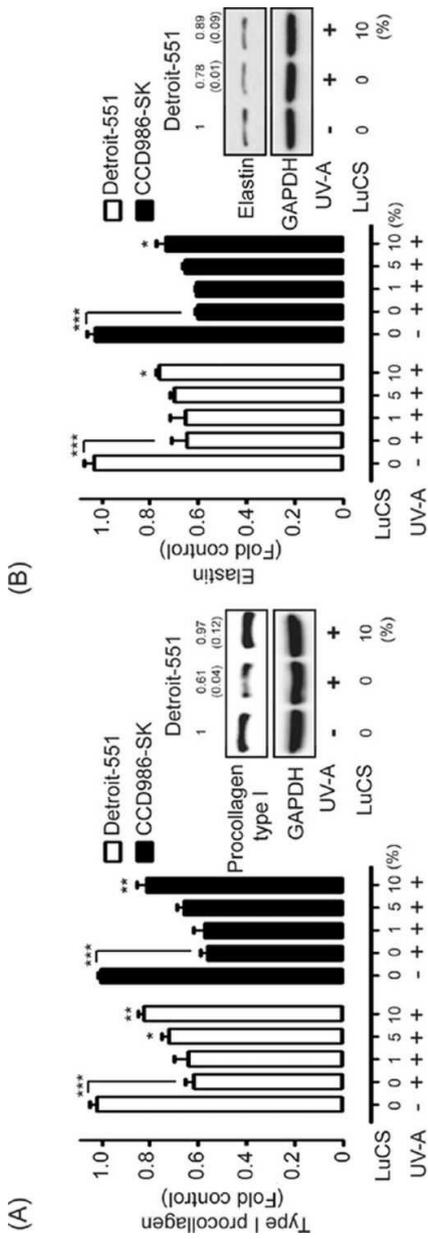
도면4



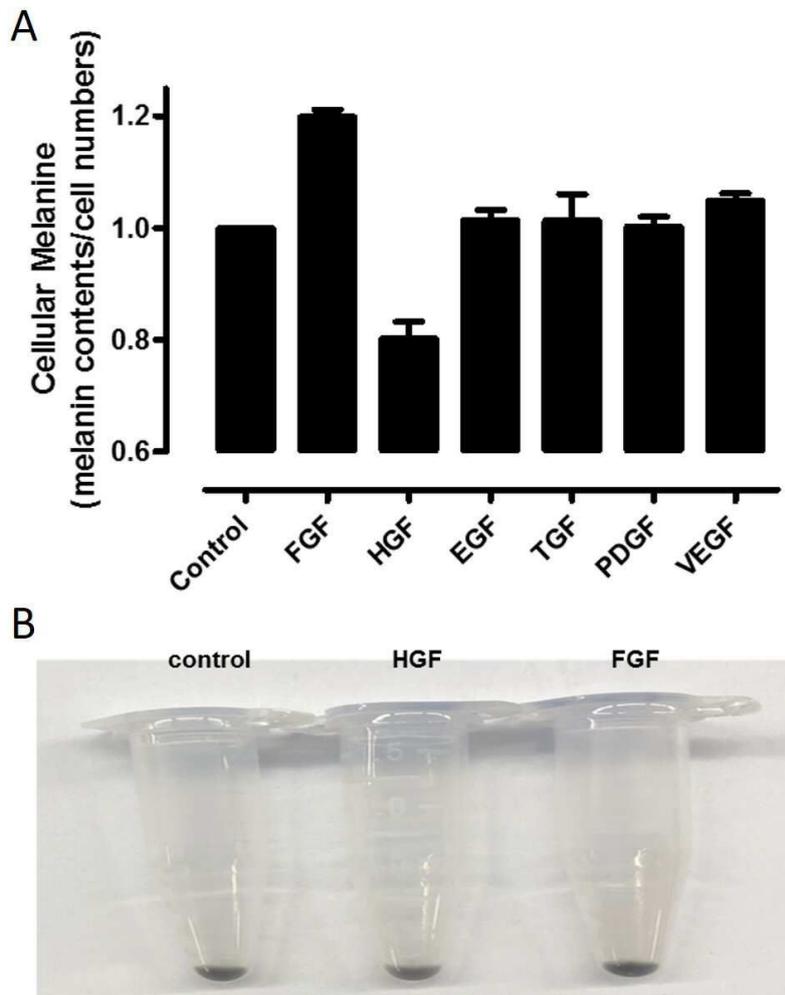
도면5



도면6

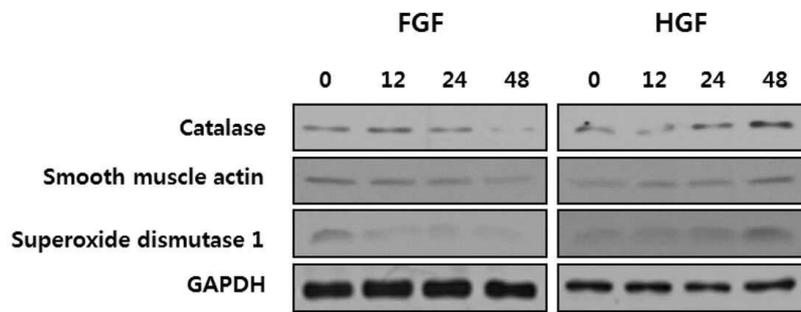


도면7

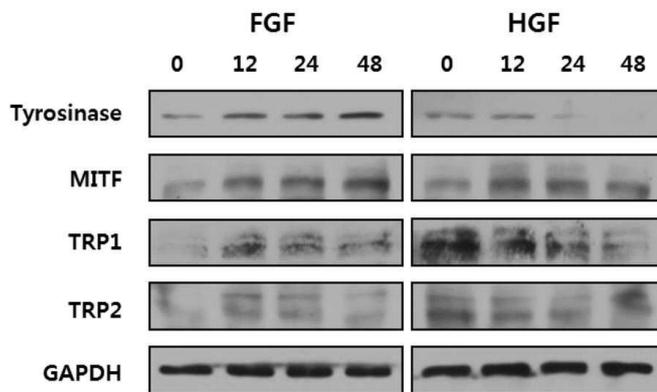


도면8

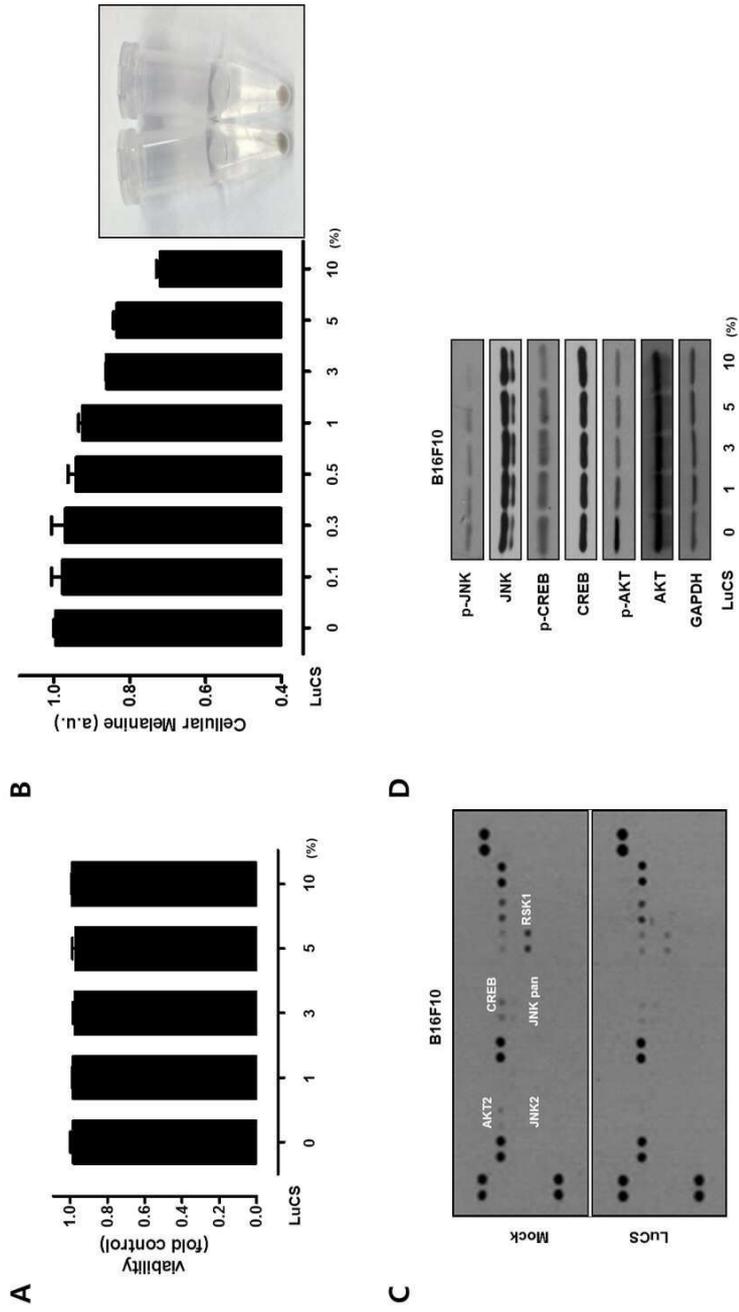
**A**



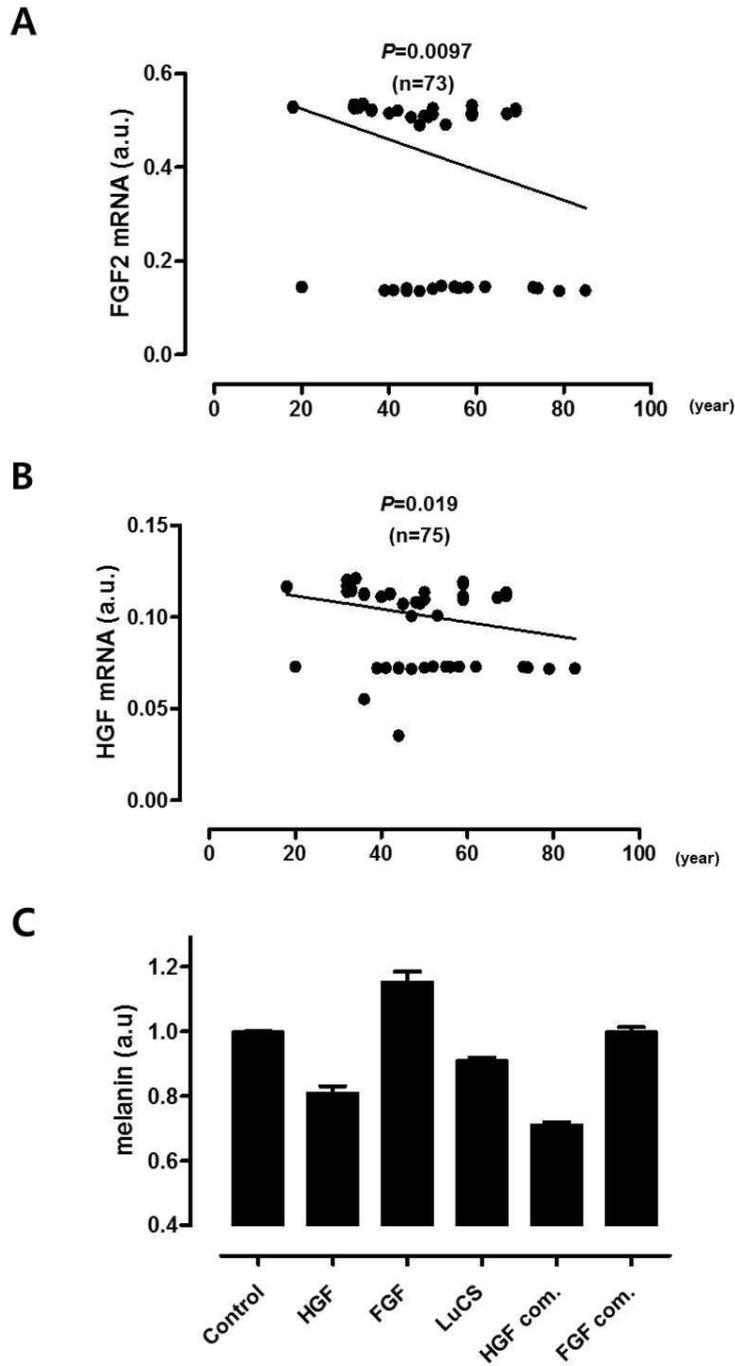
**B**



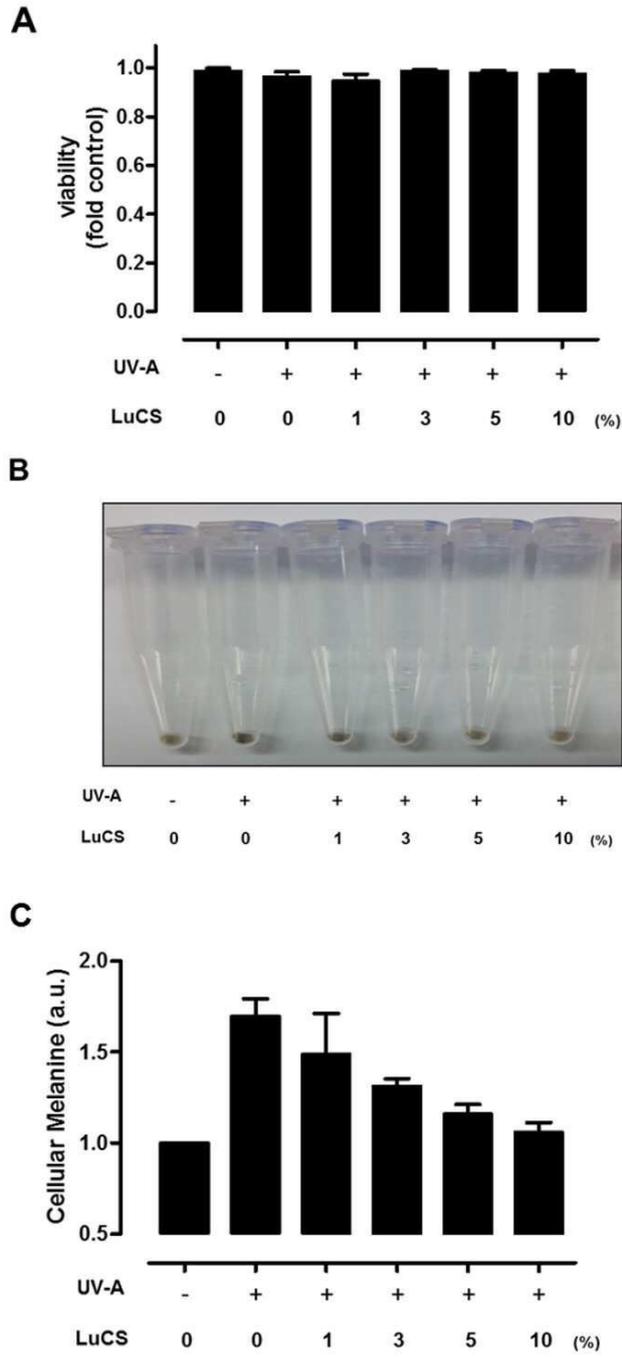
도면9



도면10

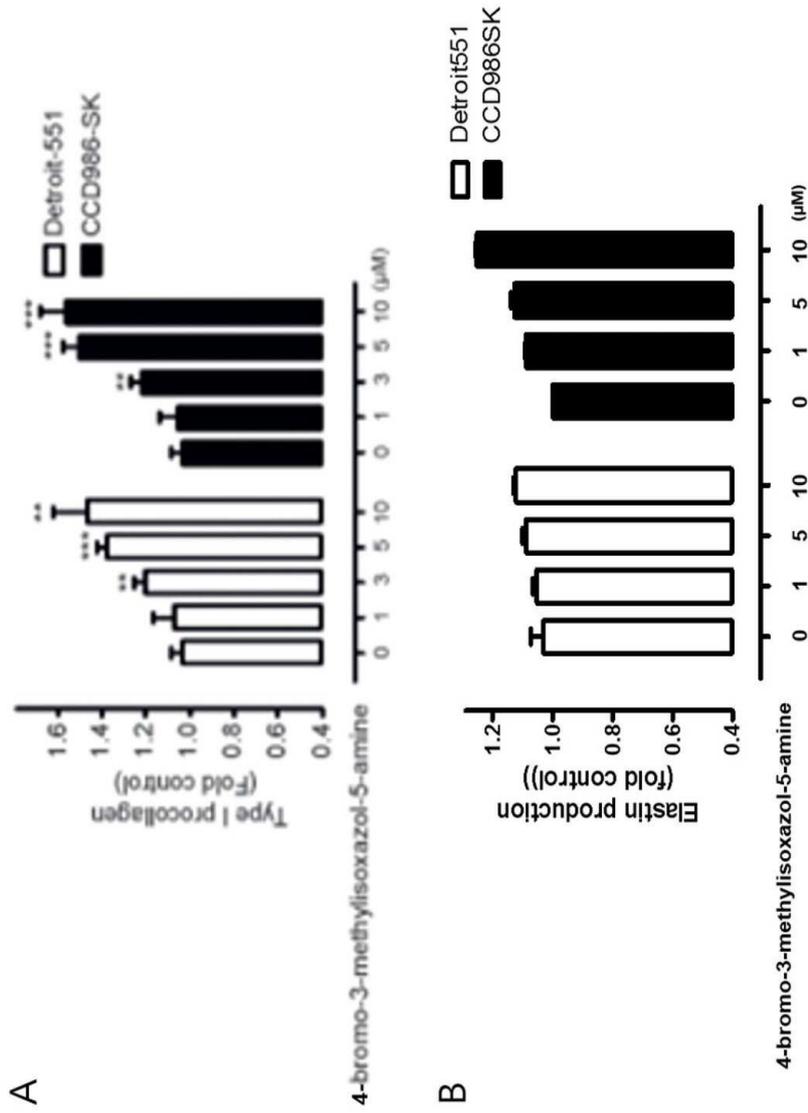


도면11

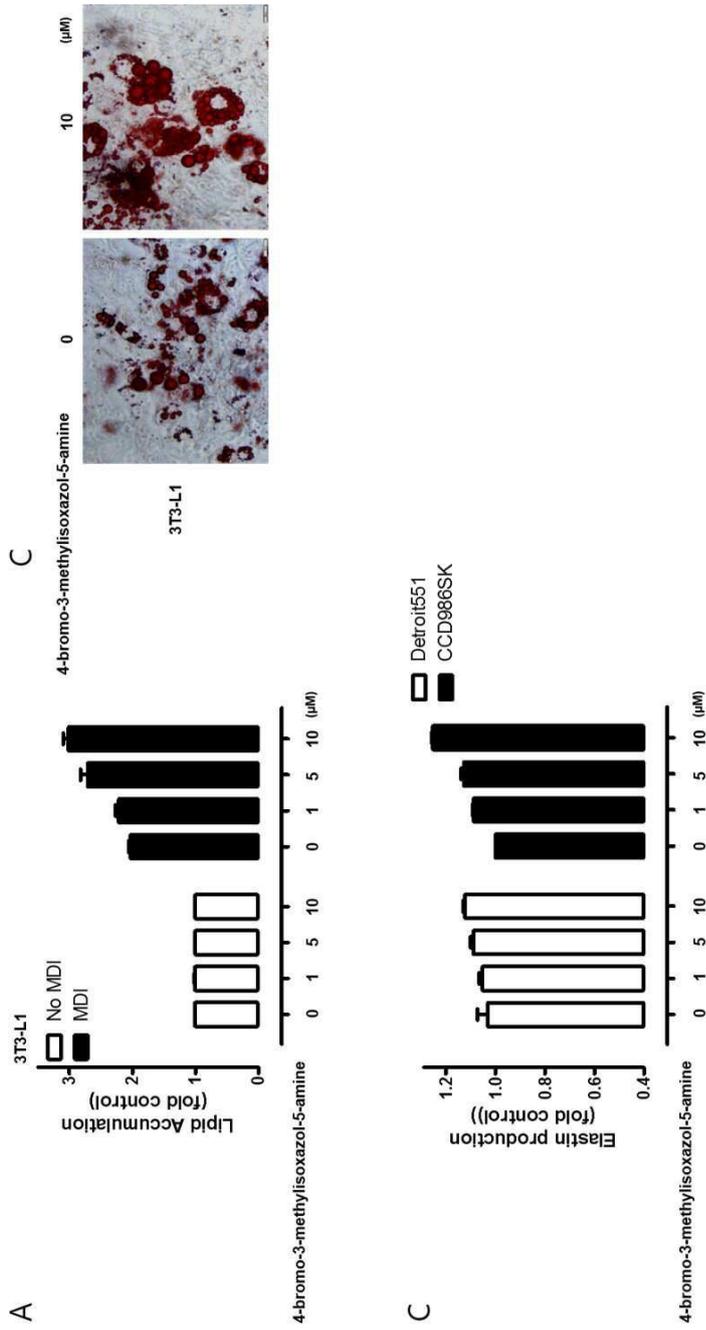




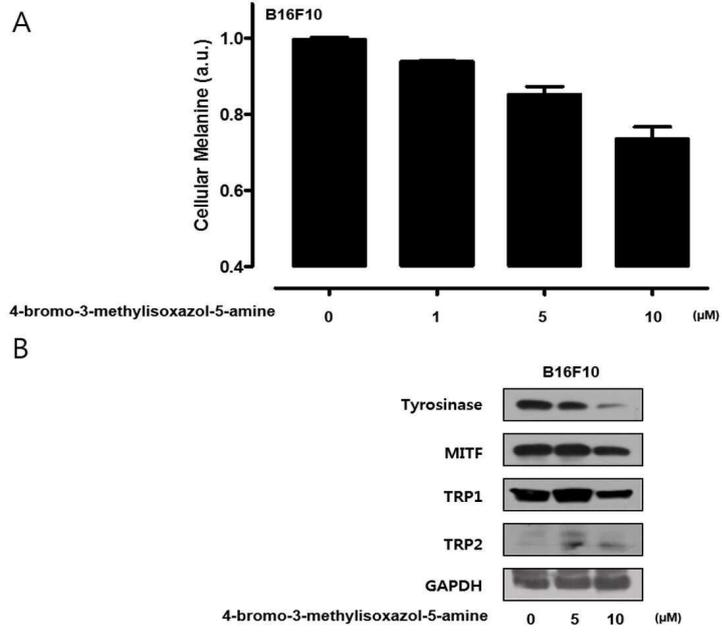
도면13



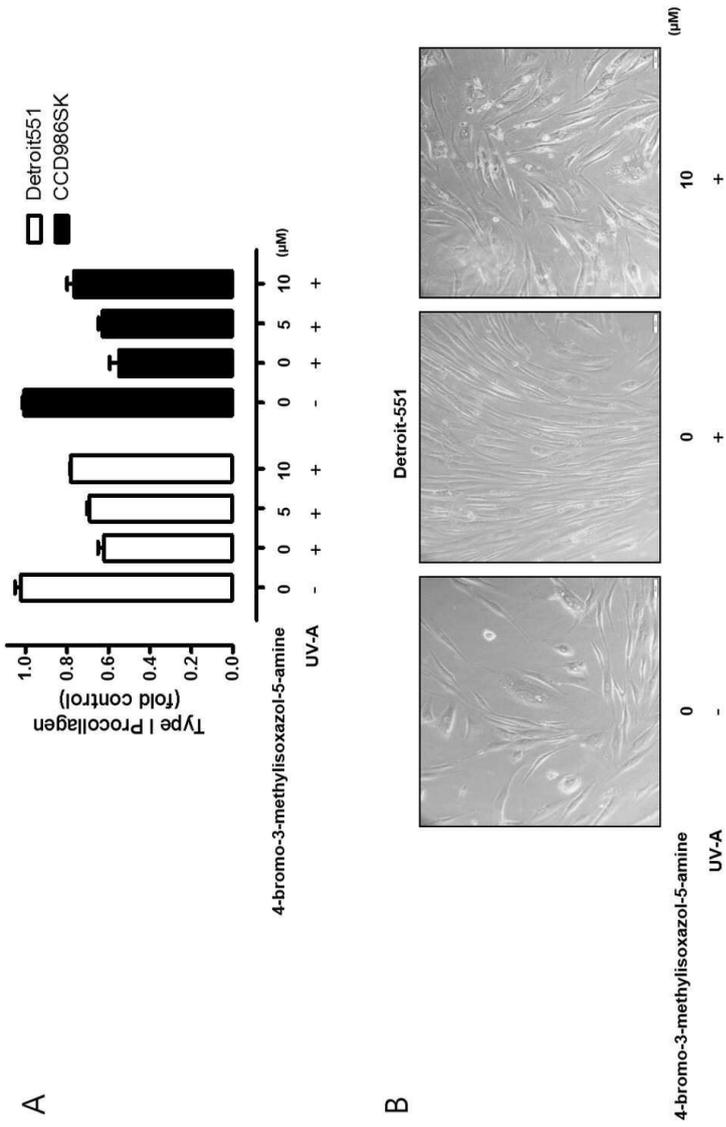
도면14



도면15



도면16



도면17

