

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 10일 (10.09.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/180059 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002915

(22) 국제출원일: 2020년 2월 28일 (28.02.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0024897 2019년 3월 4일 (04.03.2019) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이진우 (LEE, Jin Woo); 02753 서울시 성북구 장월로1길 28, 115동 2104호, Seoul (KR). 김경숙 (KIM, Kyung Sook); 13645 경기도 성남시 수정구 위례동로 61, 5619동 1605호, Gyeonggi-do (KR). 정민형 (JUNG, Min

Hyung); 34122 서울시 강남구 선릉로 221, 201동 1803호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: COMPOSITION FOR PRODUCING MELANIN CONTAINING PLASMA ACTIVATED MEDIUM AND USE THERE-OF

(54) 발명의 명칭: 플라즈마 활성 배양액을 포함하는 멜라닌 생산용 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a composition for increasing melanin production, comprising a plasma activated medium (PAM) prepared by irradiating a cell culture medium with plasma; a cosmetic composition for skin tanning, comprising said composition; a composition for the treatment of melanin hypopigmentation, comprising said composition; and a method of increasing intracellular melanin synthesis by adding the PAM to cells. Said method is characterized by increasing melanin synthesis without apoptosis in or damage on melanocytes.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 제작된 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 포함하는 멜라닌 생성 증가용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 피부의 태닝용 화장료 조성물, 상기 조성물을 포함하는 멜라닌 저색소증의 치료용 조성물 및 상기 PAM을 세포에 첨가함으로써 세포 내 멜라닌 합성을 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 멜라닌 세포의 사멸 또는 손상 없이도 멜라닌 합성을 증가시킬 수 있는 특성을 가진다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/180059 A1

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 플라즈마 활성 배양액을 포함하는 멜라닌 생산용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 플라즈마 활성 배양액을 포함하는 멜라닌 생산용 조성물 및 플라즈마 활성 배양액을 이용하여 멜라닌 세포를 배양하는 방법 및 멜라닌 세포를 이용하여 멜라닌을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피부세포는 자외선이나 환경오염, 그 밖의 외부 요인의 자극에 대해 방어기전으로 표피기저층에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)의 멜라닌소체(melanosome)에서 멜라닌을 생성한다. 멜라닌은 동물들의 피부, 눈동자, 머리카락의 색을 결정하는 중요한 요인이다. 저색소증은 피부암의 위험인자로도 알려졌다. 동양인들은 멜라닌이 과다로 생성되는 것에 민감하여 멜라닌 생성을 억제하는 미백관련의 연구가 많이 수행되었다. 하지만 최근에는 멜라닌 생성이 억제되어 나타나는 백반증(Vitiligo)에 대한 요구도 증가하고 있어 이에 대한 연구도 진행되고 있다.
- [3] 백반증은 멜라닌 세포의 사멸이나 괴사로 인한 여러 가지 크기 및 형태의 백색반이 피부에 나타나는 후천성 탈색소 질환이다. 전세계적으로 인구의 약 1%에서 나타나는 비교적 흔한 질환으로, 인종이나 지역에 따른 차이는 없다. 발생 연령은 10~30세에 가장 많고, 95%의 경우 40세 이전에 발병하고, 환자의 30%에서 가족력이 있다. 백반증이 생기는 원인에 대해서 아직 정확히 밝혀진 바는 없으나, 자가 면역설, 신경체액설, 멜라닌 세포 자가 파괴설 등 여러 가지 설이 제시되고 있다. 자가 면역설은 멜라닌 세포계 항원에 대한 자가항체의 발현으로 멜라닌 세포의 파괴 또는 기능 이상이 초래되거나 세포 독성 림프구나 활성화된 림프구가 분비한 림포카인에 멜라닌 세포가 파괴된다는 설이다. 신경체액설은 카테콜아민 생합성의 이상과 모노아민 산화효소의 증가 등으로 인하여 스트레스와 관련된 과산화수소가 만들어지고 이로 인해 멜라닌 세포가 파괴된다는 설로, 백반증이 신경절을 따라 발생하거나 신경 손상이나 스트레스 후에 발병할 수도 있다. 멜라닌 세포 자가 파괴설은 멜라닌 형성 과정에서 생기는 중간대사 물질이나 최종대사 물질인 페놀 복합체가 멜라닌 세포 내에 축적되어 세포를 파괴한다는 설이다. 그 외 고유세포 결손(inherent cellular defect), 유전요인, 세포사멸, 칼슘대사 이상 등의 다양한 인자들이 제시되고 있다.
- [4] 멜라닌은 멜라닌 생성세포(melanocytes)로부터 합성되고 자외선 조사나 독성 물질과 화학물질을 흡수함으로써 피부를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 그러므로 멜라닌 합성이 정상적으로 일어나지 않는 사람들에서는 모든 피부가

백색으로 되기보다는 부분적으로 백색으로 변해 얼룩이 생기는 외형적인 문제점도 있고 외부 자극에 민감해지는 것이 더 문제이다. 멜라닌 합성에 중요한 효소인 티로시나아제(tyrosinase)와 TRP-1(tyrosinase related protein-1), TRP-2는 산화적 반응에 촉매로 작용한다(Pigment Cell Res. 14 (6): 43744). 티로시나아제는 티로신(tyrosine)을 DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)로, DOPA를 DOPA 퀸론(quinone)으로 산화시키는 작용을 하고, TRP-1은 dihydroxyindole carboxylic acid oxidase로서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indol-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 변화시키는데 관여한다. 또한, TRP-1은 티로시나아제를 안정화시키고 활성을 조절하는 역할을 한다.

[5] TRP-2는 DOPA 크롬 타우토머라아제로서 DOPA 크롬을 DHICA로 변화시켜 멜라닌세포를 이루는 유멜라논(eumelanon)과 페오멜라논(pheomelanon)을 형성하고 이들의 비율에 따라 피부, 머리타락, 눈동자의 색깔 등이 결정된다.

[6] 멜라닌 합성은 자외선 조사와 MSH(α -melanocyte stimulating hormone)로 인해 활성화된다. α -MSH는 펩타이드 호르몬으로 자외선에 의해 생성되며 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 세포에서 만들어지는 것으로 알려져 있다. α -MSH는 측분비(paracrine)에 의해 멜라닌 생성세포의 MCR(melanocortin receptor)에 작용하여 전사인자인 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 활성을 조절하여 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 티로시나아제, TRP-1(DHICA oxidase), TRP-2(DOPACHROME tautomerase) 등의 활성을 조절한다.

[7] 멜라닌 형성세포가 UV 또는 α -MSH에 의해서 자극이 되면 각각 p38이나 PKA(protein kinase A)에 의해서 티로시나아제가 활성화된다고 보고되었다. 그런데 이 두 가지 경로 중 특히 α -MSH $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ PKA 과정이 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는데, cAMP의 증가는 CREB(cAMP-responsive element binding protein) 인산화를 촉진시키고 이것이 전사인자인 MITF의 발현을 증가시키고, 이것은 티로시나아제의 활성을 향상시키며, 티로시나아제 mRNA 발현을 증가시킨다는 보고들이 있다.

[8] 한편, 우리나라를 비롯한 동양인들은 흰 피부를 선호하는 경향이 있어, 멜라닌 생성을 억제하는 미백 성분에 대한 연구가 활발히 수행되어 왔다. 그러나 피부의 멜라닌 합성 세포에서 생성된 멜라닌은 자외선 조사나 독성 물질과 화학물질을 흡수하여 피부를 보호하는 데 중요한 역할을 한다. 멜라닌의 정상적인 합성이 나타나지 않는 경우 얼룩덜룩한 피부에 의한 미관상의 문제뿐 아니라 피부가 외부 자극에 민감하게 되어 자외선에 취약하게 되는 등의 문제가 발생하므로 멜라닌 합성 정상화를 위한 치료의 수요가 있으며, 이에 대한 연구 또한 진행되고 있다. 그러나 아직까지 멜라닌 합성을 촉진시키는 것에 대한 기술 개발은 불충분한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 포함하는, 멜라닌 생성 증가용 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 플라즈마 활성 배양액을 이용하여 멜라닌 합성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 플라즈마 활성 배양액을 포함하는, 멜라닌 저색소증의 치료, 경감 또는 처치용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은, 플라즈마 활성 배양액을 포함하는, 피부의 태닝용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은, 멜라닌 생성 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝 방법으로 선별된 억제제를 포함하는 멜라닌 생성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 제조된 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 포함하는, 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 생성 증가용 조성물을 제공한다.
- [16] 본 발명은 또한, 플라즈마를 배양액에 조사하여 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 제조하는 단계; 및 인체 내의 세포를 제외한 세포를 상기 플라즈마 활성 배양액으로 배양하는 단계를 포함하는, 멜라닌 합성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [17] 본 발명은 또한, 배양액에 전극이 접촉한 채 4분 내지 30분간 상온상압 플라즈마를 조사하여 제조된 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 포함하는, 멜라닌 저색소증의 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [18]
- [19] 이하 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [20]
- [21] 본 발명에서 제공하는 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 생성 증가용 조성물은, 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 제조된 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 포함한다.
- [22] 본 발명의 멜라닌은 동물의 피부나 눈 등의 조직에 존재하는 갈색 내지 흑색의 색소를 총칭하는 것이다. 멜라닌은 자외선 차단 및 체온 유지 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 피부색, 눈동자 색 등을 결정한다. 이러한 멜라닌의 결핍은 백색증(albino) 또는 백반증(Vitiligo)의 원인이 된다. 선천적 백색증과 달리, 백반증은 후천적으로 나타나기도 하며, 면역학적, 환경적 요인 또는 스트레스가 발병 원인이 된다.
- [23] 멜라닌 세포는 멜라닌을 보관하는 멜라닌소체(melanosome)를 합성하는 세포로, 피부의 세포 중 약 5%를 차지한다. 주로 피부의 맨 아래 기저층(basal layer)에 존재하며, 수지상 돌기를 가지는 것을 특징으로 한다. 멜라닌 세포에서

- 합성된 멜라닌 소체는 수지상 돌기를 통해 각질세포(keratinocyte)로 이동하고, 각질 세포에서 멜라닌 소체가 녹아 멜라닌이 분비되어 피부 색을 결정하게 된다.
- [24] 표피성 멜라닌 세포는 각질세포의 세포 주기와 같은 비율로 분열하게 되고, 인종이나 피부색과 관계 없이 1mm²당 1200 내지 1500개로 동일하다고 알려져 있다.
- [25] 본 발명의 플라즈마 배양액을 사용함으로써, 배양 중인 세포에 플라즈마를 직접 조사하는 경우 모든 세포에 고르게 플라즈마 활성화 효과를 얻을 수 없는 단점을 보완할 수 있다.
- [26] 본 발명에 있어서 "플라즈마"는 디바이 차폐(Debye shielding)를 만족하는 이온화된 기체를 말한다. 이는 물질의 기본적인 세 가지 상태인 기체, 액체, 고체와 더불어 또 하나의 상태로 여겨지며 제4상태로 표현된다. 본 발명의 플라즈마는 외부 전압에 의해 중성기체가 플라즈마로 중성기체의 여기, 이온화에 의하여 전자 및 양이온이 발생할 수 있고, 분자가스가 여기된 라디칼이 존재할 수 있다.
- [27] 본 발명의 플라즈마는 상압 상태에서 생성될 수 있다. 예를 들어, 상온상압 플라즈마(NTAPP)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 상온상압 플라즈마는 상온 대기압 플라즈마와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 본 발명의 플라즈마 생성장치는 본 발명의 목적에 따른 플라즈마 활성화 배양액을 생성할 수 있다면, 공지된 플라즈마 생성 장치를 제한없이 사용할 수 있으나, 특히 생물학적 목적의 플라즈마를 생성시키기 위하여 아크 및 정전기를 저해시킨 것을 특징으로 한다. 예컨대 본 발명의 플라즈마 생성장치는 장치 본체; 장치 본체 내의 일측에 구비되는 평판형 접지 전극이 본체 내에서 평판형 접지 전극과 대향하게 배치되는 니들 또는 로드형 파워 전극; 및 파워전극으로 전력을 공급하기 위한 고전압 전원 장치를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 플라즈마 생성은 3.0W microwave power와 아르곤(Ar) 가스를 이용하여 상온 대기압에서 시행하였고, 플라즈마 생성 장치와 배지는 0.8cm 이격되어 있었다. 본 발명에서 상온이란, 고온 플라즈마에 해당하지 않는 온도 범위로서 당업계에서 상온 플라즈마로 여겨지는 온도 조건을 제한 없이 적용 가능하며, 예를 들어, 60°C 이하, 40°C 이하, 0 내지 60°C, 5 내지 45°C 또는 20 내지 40°C를 의미한다.
- [28] 상기 캐리어 가스는 본 발명의 목적을 달성하는 플라즈마 및 플라즈마 활성화액의 제조 목적에 적합한 것이라면, 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 헬륨, 산소, 네온 및 아르곤으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 조합으로부터 선택된 1종 이상, 더욱 바람직하게는 아르곤을 캐리어 가스로 할 수 있으며, 이와 같은 가스에 고전압의 전류가 공급됨으로써 플라즈마가 생성될 수 있다.
- [29]
- [30] 한편, 플라즈마를 이용하여 활성화시킨 액체인 플라즈마 활성화수(plasma

activated water)는 기체 상태의 플라즈마와 유사한 특징을 보이며, 농업 및 의료 분야에 사용되고 있다. 플라즈마 활성화수는 액체 상태인 매개체에 플라즈마를 매개체 표면 또는 수중에서 발생시켜 제작한다.

- [31] 본 발명의 플라즈마 활성화 배양액은, 플라즈마 처리된 배지(plasma-conditioned medium; PCM)와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 이와 같은 플라즈마 처리 배지는 조사된 플라즈마와 동일한 기전을 통해 동등한 또는 개선된 또는 유사한 항암 효과를 가지며, 플라즈마와 비교하여 이동 및 적용이 용이한 장점이 있다.
- [32] 본 발명의 플라즈마 활성화 배양액 제조를 위하여 플라즈마가 조사되는 배지는 세포 배양을 위해 사용되는 임의의 공지의 배지를 제한없이 사용할 수 있으며, 상기 배지는 배양을 위해 선택된 세포의 종류에 따라 해당 세포의 배양에 적절한 배지를 선별하여 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 피부의 상피조직, 예를 들어 멜라닌 세포(Melanocyte) 또는 각질형성세포(Keratinocyte)에 적합한 배지의 경우는 M254 배지를 기본배지(basal media)로 사용할 수 있다. 상기 M254 배지는 칼슘을 포함하지 않을 수 있으며, 아미노산 20종, 비타민, 무기염(inorganic salts), Adenine.HCl, D-Glucose(Dextrose), DL-alpha-lipoic Acid, Ethanolamine, HEPES, O-Phosphorylethanolamine, Putrescine 2HCl, Sodium Pyruvate, 및 Thymidine을 포함할 수 있다. 상기 아미노산 20종은 글리신, 알라닌, 알라닐 글루타민, 아르기닌 염산염, 아스파라긴, 아스파틱산, 시스테인, 글루탐산, 히스티딘 염산염, 이소류신, 류신, 라이신 염산염, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린을 포함한다. 상기 비타민은 엽화콜린, 판토텐산, 엽산, 미오-이노시톨, 나이아신아마이드, 피리독살 염산염, 비타민 B12, 및 d-비오틴(d-Biotin)을 포함한다. 상기 무기염은 NaVO₃, ((NH₄)₆(Mo₇O₂₄-4H₂O), CuSO₄-5H₂O, FeSO₄-7H₂O, MgCl₂-6H₂O, MnSO₄-H₂O, NiCl₂-6H₂O, KCl, NaCH₃COO-3H₂O, NaHCO₃, NaCl, Na₂SiO₃-9H₂O, Na₂HPO₄-7H₂O, Na₂SeO₃, SnCl₂-2H₂O, 및 ZnSO₄-7H₂O를 포함할 수 있다.
- [33] 본 발명의 플라즈마 활성화 배양액 제조를 위하여 플라즈마가 조사되는 배지는 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 포함하는 것일 수 있다.
- [34] 상기 플라즈마는 마이크로파 전력(microwave power)을 이용하여 생성될 수 있으며, 상기 마이크로파 전력은 실험의 목적 및 방법에 따라 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 예를 들어 1.0W 내지 5.0W, 2.0W 내지 4.0W 또는 2.5W 내지 3.5W일 수 있으며, 바람직하게는 3.0W일 수 있다.
- [35] 상기 플라즈마는 플라즈마가 조사될 배양액과 플라즈마 기체(plume)가 접촉한 상태 또는 일정한 거리를 두고 떨어진 위치에서 조사될 수 있다. 플라즈마 전극이 배지와 이격되어 플라즈마가 조사되는 경우, 이격거리는 0.1 내지 15cm, 0.1 내지 10cm, 0.1 내지 5cm, 0.1 내지 3cm, 0.1 내지 1cm, 0.3 내지 15cm, 0.3 내지 10cm, 0.3 내지 5cm, 0.3 내지 3cm, 0.3 내지 1cm, 0.5 내지 15cm, 0.5 내지 10cm, 0.5 내지 5cm, 또는 0.5 내지 3cm일 수 있으며, 바람직하게는 0.5 내지 1cm, 더욱

- 바람직하게는 0.6 내지 1cm일 수 있다. 상기 전극이 배양액과 접촉한 상태에서 조사되는 경우, 배양액의 표면 또는 배양액 내에 전극이 위치할 수 있다.
- [36] 상기 플라즈마를 배양액에 조사하는 시간은 4분 내지 30분, 4분 내지 25분, 4분 내지 20분, 5분 내지 30분, 5분 내지 25분, 5분 내지 20분, 또는 8분 내지 20분일 수 있다.
- [37] 본 발명의 일 실시예에서, M254 배지에 상온상압 플라즈마를 가해 플라즈마 활성 배양액을 제조하였다. 페트리 접시에 담긴 10ml M254배지 표면으로부터 전극이 0.8cm 이격된 상태에서 4분, 8분, 12분, 16분, 또는 20분간 플라즈마를 조사하여 플라즈마 활성 배양액을 제작하였다. 상기 상온상압 플라즈마의 조건은 3.0W 마이크로파 전력(microwave power)과 아르곤(Ar) 가스를 이용하여 상온 대기압에서 시행하였고, 플라즈마 생성 장치와 배지는 0.8cm 이격되어 있었다. 세포가 없는 배지 10mL를 페트리 접시에 담고, 플라즈마를 각각 4분, 8분, 12분, 16분, 또는 20분간 조사하여 최종 플라즈마 활성 배양액을 제조하였다. 마이크로파 정확도는 $\pm 2.0\%$, 가스 압력은 0 내지 3Bar 및 가스 흐름은 0 내지 5 SLM으로 조절되었다.
- [38] 주입되는 아르곤 가스 원자로부터 방출되는 스펙트럼은 690 내지 990nm이고 N2 및 O에 의한 피크는 337.2 및 690 내지 900nm 사이로 각각 측정되었다. OH band는 307 내지 309nm 범위에서 관찰되었다.
- [39] 본 발명이 제공하는 플라즈마 활성 배양액은, 멜라닌 세포의 사멸 또는 세포 손상을 야기하지 않으면서 멜라닌 세포 내 멜라닌 생성량을 증가시킬 수 있는 장점을 가진다.
- [40] 본 발명이 제공하는 플라즈마 활성 배양액은, 플라즈마를 조사하지 않은 배양액에 비해 멜라닌세포의 멜라닌 생성능을 1.0 내지 4배, 1.0 내지 3배, 1.1 내지 4배, 1.1 내지 3배, 1.1 내지 2.5배, 1.1 내지 2배, 1.3 내지 4배, 1.3 내지 3배, 1.3 내지 2.5배, 1.3 내지 2배, 또는 1.4 내지 1.8배 증가시킬 수 있다.
- [41] 본 발명의 일 실시예에서, PAM을 사용한 경우 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나아제, TRP1 및 TRP2의 발현량이 모두 증가하였다.
- [42] 본 발명의 일 실시예에서, 플라즈마 활성 배양액을 사용한 경우, 플라즈마 조사 시간에 비례하여 멜라닌 양이 증가하는 양상을 보였다 (도 2). 보다 구체적으로, 플라즈마 활성 배양액의 플라즈마 조사 시간이 8분인 군에서 멜라닌 양이 증가됨이 확인되었고, 12분 처리 군에서는 급속하게 멜라닌 양이 증가됨을 볼 수 있으며, 16분, 20분에서도 동일한 결과를 보였다. 멜라닌 양이 최고치에 이른 결과를 보인 20분 처리군을, 플라즈마를 전혀 처리하지 않은 배양액에서 배양한 멜라닌 세포인 대조군과 비교할 때, 플라즈마 활성 배양액 처리 후 24시간이 경과한 다음에는 멜라닌 양이 1.7배, 48시간 후에는 1.55배 증가된 결과를 보였다.
- [43] 따라서 본 발명의 플라즈마 활성 배양액이 멜라닌 세포의 멜라닌 생성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

[44]

[45] 본 발명에 따른 배양 조성물은, 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 상온상압 플라즈마를 20분간 조사한 플라즈마 활성화 배양액에 멜라닌 세포를 24시간 배양한 경우 생성된 멜라닌 양이, 상기 플라즈마 처리를 하지 않은 포유동물 세포 배양액에 멜라닌 세포를 배양한 경우 생성된 멜라닌 양을 기준으로 1.1 내지 4배인 것일 수 있다. 구체적으로 상기 멜라닌 양은 마이크로 그램 / (1 X 10⁶ 세포)로 나타낼 수 있다.

[46] 본 발명에 따른 배양 조성물은, 멜라닌세포 성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 상온상압 플라즈마를 20분간 조사한 플라즈마 활성화 배양액에 멜라닌 세포를 24시간 배양한 경우 티로시나제 mRNA 발현양이, 상기 플라즈마 처리를 하지 않은 포유동물 세포 배양액에 멜라닌 세포를 배양한 경우의 티로시나제 mRNA 발현양을 기준으로 1 내지 4배, 1.01 내지 4배, 1.01 내지 3배, 1.01 내지 2.7배, 1.02 내지 4배, 1.02 내지 3배, 1.02 내지 2.7배, 1.05 내지 4배, 1.05 내지 3배, 1.05 내지 2.7배인 것일 수 있다.

[47] 본 발명에 따른 배양 조성물은, 플라즈마 활성화 배양액을 처리하지 않은 대조군에 비해 티로시나아제, TRP1, 및 TRP2로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[48] 구체적으로, 플라즈마 활성화 배양액에서 배양한 멜라닌 세포의 TRP1의 발현량은 플라즈마 활성화액을 포함하지 않는 대조군의 발현량에 비해 1.01 내지 4배, 1.01 내지 3.5배, 1.01 내지 3배, 1.01 내지 2.5배, 1.01 내지 2.3배, 1.01 내지 2.0배, 1.05 내지 4배, 1.05 내지 3.5배, 1.05 내지 3배, 1.05 내지 2.5배, 1.05 내지 2.3배 또는 1.05 내지 2.0배 증가할 수 있다. 플라즈마 활성화 배양액에서 배양한 멜라닌 세포의 TRP2의 발현량은 플라즈마 활성화액을 포함하지 않는 대조군의 발현량에 비해 1.01 내지 4배, 1.01 내지 3.5배, 1.01 내지 3배, 1.01 내지 2.5배, 1.01 내지 2.3배, 1.01 내지 2.0배, 1.01 내지 1.5배, 1.05 내지 4배, 1.05 내지 3.5배, 1.05 내지 3배, 1.05 내지 2.5배, 1.05 내지 2.3배, 1.05 내지 2.0배, 또는 1.05 내지 1.5배 증가할 수 있다.

[49] 본 발명에서 제공하는 멜라닌 합성을 증가시키는 방법은,

[50] 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 플라즈마 활성화 배양액(PAM)을 제조하는 단계; 및

[51] 상기 플라즈마 활성화 배양액을 세포배양액으로 사용하여 배양하는 단계;를 포함한다.

[52] 상기 플라즈마 활성화 배양액 제조법은 앞서 설명한 바와 같다.

[53] 상기 플라즈마 활성화 배양액은 제조 후 즉시 사용되는 것이 바람직하며, 구체적으로 제조 후 1주일 이내, 5일 이내, 3일 이내, 2일 이내, 24시간 이내, 12시간 이내, 8시간 이내, 4시간 이내, 제조 후 2시간 이내, 제조 후 1시간 이내,

제조 후 30분 이내, 제조 후 15분 이내, 제조 후 10분 이내, 또는 제조 후 5분 이내에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 제조 후 사용에 소요되는 시간은 플라즈마 활성화 배양액에 플라즈마 조사가 완료된 이후 세포 배양액의 교체까지 소요되는 시간을 의미한다.

[54] 상기 세포는 인체 내의 세포를 제외하고 멜라닌 합성 활성을 가지는 것이면 어느 것이든 사용될 수 있으며, 예를 들어, 멜라닌 세포(melanocyte), 흑색종(melanoma) 세포, 또는 멜라닌 합성능을 가지는 형질전환 세포일 수 있다. 상기 멜라닌 세포는 인간을 포함하는 포유류로부터 분리된 것일 수 있다.

[55] 상기 인체 내의 세포를 제외한 세포는 배양액 중에서 배양 중인 세포일 수 있다. 상기 세포를 배양 중인 배양액은 플라즈마가 조사되지 않은 배양액일 수 있으며, 필요에 따라 플라즈마 활성화 배양액과 동종 또는 이종의 배양액을 선택하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 M254 배지를 사용할 수 있다.

[56] 본 발명의 일 실시예에서, 인간 피부의 멜라닌 세포를 1%(v/v)의 human melanocyte growth supplement(HMGS, Gibco Cascade biologics, USA), 100U/ml 페니실린 및 50ug/ml 스트렙토마이신을 첨가한 M254 배지에서 배양한 후, 플라즈마를 각각 4분, 8분, 12분, 16분 또는 20분 조사한 M254 배지로 배양액을 교체하여 이후 배양을 수행하였다.

[57]

[58] 본 발명에 따른 멜라닌 합성을 증가시키는 방법은 대조군에 비해 멜라닌 생산량이 1.2 내지 4배, 1.2 내지 3.5배, 1.2 내지 3배, 1.2 내지 2.5배, 1.2 내지 2배, 1.2 내지 1.9배, 1.2 내지 1.8배, 1.3 내지 4배, 1.3 내지 3.5배, 1.3 내지 3배, 1.3 내지 2.5배, 1.3 내지 2배, 1.3 내지 1.9배, 1.3 내지 1.8배, 1.4 내지 4배, 1.4 내지 3.5배, 1.4 내지 3배, 1.4 내지 2.5배, 1.4 내지 2배, 1.4 내지 1.9배 또는 1.4 내지 1.8배 증가할 수 있다.

[59] 본 발명에 따른 멜라닌 합성을 증가시키는 방법은, 상기 플라즈마 활성화 배양액이 티로시나아제(tyrosinase), TRP1 및 TRP2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킴으로써 멜라닌 합성이 증가하는 것일 수 있다.

[60] 본 발명의 일 실시예에서, 플라즈마 조사 시간에 비례하여 멜라닌 양이 증가하는 양상이 나타났으며 (도 2), 보다 구체적으로 12분 처리군에서 급속하게 멜라닌 양이 증가했다. 멜라닌 양이 최고치로 나타난 20분 처리군의 경우, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 플라즈마 활성화 배양액 처리 후 24시간 경과 시에는 1.7배, 48시간 경과 시에는 1.55배 멜라닌 양이 증가하였다.

[61] 본 발명의 일 실시예에서, 플라즈마 활성화 배양액을 세포 배양액으로 사용하여 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나아제, TRP1, 및 TRP2의 mRNA 양을 분석한 결과, 티로시나아제의 경우, 모든 경우에서 대조군보다 각 유전자의 mRNA 양이 높게 나타났다 (도 3 내지 도 5). 보다 구체적으로 티로시나아제의 경우, 플라즈마 조사 시간이 8분인 때부터 20분인 때까지 플라즈마 조사 시간에 비례하여

mRNA양이 증가하는 양상을 보여 20분에는 대조군 대비 2.5배 mRNA양이 증가하였고(도 3), TRP1과 TRP2는 플라즈마 조사 시간에 비례하여 발현이 증가되는 양상을 보이지는 않았으나, 플라즈마 활성 배양액에서 배양한 세포 모두에서 대조군에 비해 발현량이 증가하였다(도 4 및 도 5).

[62] 본 발명의 일 실시예에서, 플라즈마 활성 배양액을 세포 배양액으로 사용한 결과, 멜라닌 세포의 손상 또는 사멸은 관찰되지 않았다(실시예 3). 보다 구체적으로, 현미경으로 멜라닌 세포를 살핀 결과, 멜라닌 세포 특유의 수지상 돌기가 확인되는 등 외관상 세포의 손상이 나타나지 않았다(도 6). 따라서 본 발명에 의한 멜라닌 합성을 증가시키는 방법은, 정상 세포를 손상시키지 않으면서 멜라닌을 증가시킬 수 있다.

[63]

[64] 본 발명에 의한 멜라닌 합성을 증가시키는 방법은, 멜라닌 형성 세포에서 멜라닌 생성을 증가시키며, 멜라닌 합성을 조절하는 효소인 티로시나아제의 발현을 증가시키고, 멜라닌 형성에 관여하는 인자인 TRP1 및 TRP2의 발현을 증가시킨다(실시예 2). 이러한 실시예 2의 결과는 본 발명의 플라즈마 활성 배양액이 멜라닌 생성을 증가시킴으로써 멜라닌 저색소증을 완화하는 효과를 가진다는 것을 의미한다. 따라서 본 발명의 플라즈마 활성 배양액은 멜라닌 저색소증의 예방, 개선 및 치료용도로 이용될 수 있다.

[65] 본 발명에서 멜라닌 저색소증은 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증 또는 점상 백피증을 의미한다.

[66]

[67] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 플라즈마 활성 배양액을 유효성분으로 포함하는 멜라닌 저색소증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[68] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조될 경우, 본 발명의 플라즈마 활성 배양액의 약제학적 유효량(pharmaceutically effective amount) 및 약제학적으로 허용되는 담체가 포함될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상기 플라즈마 활성 배양액을 포함하는 조성물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[69]

[70] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제,

현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[71] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구로 투여하는 것이 바람직하며, 예를 들어 피부 국소 투여에 의해 투여할 수 있다.

[72] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-1000 mg/kg이다.

[73] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡슐제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[74] 본 발명에 따른 약학적 조성물에는 상기 플라즈마 활성 배양액이 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%의 비율로 포함될 수 있다.

[75]

[76] 본 발명은 또한 상기 플라즈마 활성 배양액을 포함하는, 멜라닌 생성 증가용 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 화장료 조성물은 피부의 태닝 또는 멜라닌 저색소증의 예방 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

[77] 상기 플라즈마 활성 배양액은, 배양액의 표면과 플라즈마 전극이 0.1 내지 15cm, 0.1 내지 10cm, 0.1 내지 5cm, 0.1 내지 3cm, 0.1 내지 1cm, 0.3 내지 15cm, 0.3 내지 10cm, 0.3 내지 5cm, 0.3 내지 3cm, 0.3 내지 1cm, 0.5 내지 15cm, 0.5 내지 10cm, 0.5 내지 5cm, 0.5 내지 3cm, 0.5 내지 1cm, 또는 0.6 내지 1cm의 이격거리를 둔 채 4분 내지 30분간 또는 4분 내지 20분간 상온상압 플라즈마를 조사하여 제조될 것일 수 있으며, 상기 배양액은 M254 배지일 수 있다. 상기 M254 배지는 사람 멜라닌세포 성장인자 (human melanocyte growth supplement, HMGS)가 첨가된 것일 수 있다.

[78] 본 발명에서 "태닝"은 미용 목적으로 피부를 어두운 색이 되도록 하는 모든 미용적 행위를 의미하며, 태양 및/또는 인공 자외선을 이용한 피부 태닝, 및 태닝 크림 또는 로션을 이용한 일시적, 반영구적, 또는 영구적인 착색을 모두 포함한다.

[79] 상기 멜라닌 저색소증은 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증 또는 점상 백피증을 의미한다.

[80] 본 발명의 일 실시예에서, 정상 멜라닌 세포에 대한 세포 손상 또는 사멸 효과가

[88] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트,

- 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있다.
- [89] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 플라즈마 활성 배양액을 0.001 내지 30 중량%로 포함할 수 있다.
- [90]
- [91] 본 발명은 또한 멜라닌 생성 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [92] 상기 스크리닝 방법에 의해 스크리닝 된 멜라닌 생성 억제제는 피부 미백 용도로 사용될 수 있다.
- [93] 본 발명의 멜라닌 생성을 억제하는 물질을 스크리닝하는 방법은, 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 제조하는 단계, 상기 플라즈마 활성 배양액을 세포 배양액으로 사용하여 배양하는 단계, 상기 플라즈마 활성 배양액이 사용된 세포 배양물에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 상기 세포 내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA 및 TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 함량을 분석하는 단계를 포함할 수 있다.
- [94] 본 발명의 일 실시예에서, 플라즈마 활성 배양액(PAM)을 세포배양액으로 사용하여 멜라닌 생산량이 증가하였으며(실시예 1), 따라서 플라즈마 활성 배양액의 처리 전 또는 후에 후보 물질을 세포에 처리하여 세포 내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA 및 TRP2 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 함량을 확인함으로써 피부 색소 침착을 조절 또는 미백에 관여하는 물질을 스크리닝 할 수 있는 효과가 있다.
- [95] 상기 세포 내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA 및 TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 함량을 분석하는 단계 이후에, 상기 분석결과를, 상기 후보 물질이 존재하지 않는 경우와 비교하여 세포내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA 및 TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 함량이 감소하는 경우 멜라닌 생성을 억제하는 화합물로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [96] 상기 세포 내 멜라닌 양 측정은 당업계에 공지된 방법을 당업자가 자유롭게 선택하여 사용할 수 있으며, 예를 들어, 흡광도 측정, 또는 웨스턴 블롯, 면역조직화학염색(Immunohistochemistry), 공초점현미경 (Confocal microscopy) 및 중합효소연쇄반응 (PCR)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 흡광도 측정은 세포 용해물을 진한 황산 또는 수산화나트륨에 용해시킨 용액의 흡광도를 측정하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [97] 본 발명의 일 실시예에서, 세포 내 멜라닌 양 측정은 멜라닌 세포를 1N NaOH에 60°C, 1시간 조건에서 용해시켜 470nm 파장에 대한 흡광도를 측정하는 방법으로 수행되었다(실시예 1).

- [98] 상기 티로시나아제 mRNA, TRP1 mRNA 및 TRP2 mRNA로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 세포내 함량 측정 방법은 당업계에 공지된 방법을 당업자가 자유롭게 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 mRNA의 전사량 수준 측정법으로 수행하는 것일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [99] 상기 펠라닌, 티로시나아제 단백질, TRP1 단백질 및 TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 세포내 함량 측정 방법은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질 발현 또는 활성 수준을 측정하는 방법으로 수행하는 것일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [100] 상기 후보 물질 또는 펠라닌 생성을 억제하는 화합물은 티로시나아제, TRP1, 및 TRP2로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [101]
- [102] 본 발명은 또한 상기 스크리닝 방법에 따라 펠라닌 생성 억제 또는 피부 미백 효과가 있는 것으로 선별된 물질을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.
- [103] 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 펠라닌 과다 생성으로 인한 질환의 예방, 치료, 또는 경감 용도로 사용될 수 있다.
- [104] 상기 펠라닌 과다 생성으로 인한 질환은 기미, 주근깨, 검버섯, 잡티, 표피 멜라닌세포성 병변(Epidermal melanocytic lesion), 밀크커피 반점(Cafe's au lait macules), 베커 모반(Becker's Nevus), 반문상 모반(Nevus Spilus), 흑자(Lentigines), 진피 멜라닌세포성 병변(Dermal melanocytic lesions), 몽고반(Mongolian spot), 오타 모반(Nevus of Ota), 후천성 양측성 오타 모반양 반(Acquired bilateral nevus of Ota-like macules), 이토 모반(Nevus of Ito), 청색 모반(Blue nevus), 멜라닌형성세포성 모반(Melanocytic nevus), 경계 모반(Junctional nevus), 복합 모반(Compound nevus), 진피내 모반(Intradermal nevus), 윤륵모반(Halo nevus), 선천성 멜라닌세포성 모반(Congenital nevocytic nevus), 스피즈 모반(Spitz nevus), 이형성 모반(Dysplastic nevus), 흑색종(Melanoma), 악성 흑자 흑색종(Lentigo maligna melanoma), 표재 확장성 흑색종(Superficial spreading melanoma), 선단 흑자성 흑색종(Acral lentiginous melanoma), 결절성 흑색종(Nodular melanoma),

색소성 기저세포암(pigment basal cell carcinoma), 색소성 피부섬유종(dermatofibromas), 색소성 피부낭종(dermoid cyst), 색소성 켈로이드(keloid) 및 색소성 각질극세포종(keratoacanthomas)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[105] 상기 약학 조성물은 상기 멜라닌 생성 억제제 이외에 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 투여제 또는 비경구 투여제 형태로 제형화할 수 있다.

[106] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 분제, 산제, 세립제, 과립제, 펠렛제 등이 있으며, 이들 제형은 유효성분 이외에 계면 활성제, 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[107] 또한, 상기 비경구 투여 형태로는 경피 투여형 제형일 수 있으며, 예를 들어 주사제, 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제(坐劑), 패취 등의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[108] 상기 약학 조성물은 비경구, 직장, 국소, 경피, 피하 등으로 투여될 수 있다. 상기 유효성분의 투여량 결정은 통상의 기술자의 수준 내에 있으며, 약물의 1일 투여 용량은 투여하고자 하는 대상의 진행 정도, 발병 시기, 연령, 건강상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라지지만, 성인을 기준으로 할 때 일 측면에서 상기 조성물 1 μ g/kg 내지 200mg/kg, 다른 일 측면에서 50 μ g/kg 내지 50mg/kg을 1일 1 내지 3회 분할하여 투여할 수 있으며, 상기 투여량은 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[109] 상기 약학 조성물은 피부 외용제일 수 있으며, 상기 피부 외용제는 피부 외부에서 도포되는 어떠한 것이라도 포함될 수 있는 총칭으로서 다양한 제형의 의약품이 여기에 포함될 수 있다.

[110]

[111] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 피부의 미백용 화장품 조성물일 수 있다.

[112] 상기 화장품 조성물에는 엑소좀 억제제 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장품 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물로는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고

지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다. 이외에 포함되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.

- [113] 상기 화장품 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [114] 본 발명에서 제공하는 플라즈마 활성 배양액을 배양된 멜라닌 세포에 첨가함으로써 세포에 손상을 주거나 세포 사멸에 이르지 않으면서 멜라닌 세포에서의 멜라닌 생산량을 증가시킬 수 있다. 상기 플라즈마 활성 배양액을 포함하는 조성물을 이용하여, 멜라닌 저색소증과 같은 피부 질환의 치료, 경감 또는 처치 또는 피부암 위험을 줄인 피부의 태닝용 화장품 등에 사용될 수 있다.
- [115] 또한 본 발명에서 제공하는 멜라닌 생성 억제제의 스크리닝 방법을 이용하여 멜라닌 생성이 증가한 세포에서 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하는 억제제를 선별할 수 있으며, 상기 억제제를 유효성분으로 하는 멜라닌 과다 생성으로 인한 질환의 예방, 경감 또는 치료용 약학적 조성물 또는 미백용 약학적 조성물 또는 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [116] 도 1은 각 멜라닌 세포의 용해물(cell lysate)을 NaOH에 용해시킨 용액의 색을 육안 관찰한 결과이다. Control은 플라즈마 활성 배양액을 처리하지 않은 경우를, Arbutin은 알부틴을 처리한 세포 용해물을, Plasma는 상온상압 플라즈마를 20분 조사한 플라즈마 배양액을 사용한 경우를 나타낸다.
- [117] 도 2a는 멜라닌 세포에 플라즈마 활성 배양액, a-MSH, 또는 알부틴을 첨가한 후 24시간 동안 배양한 후 멜라닌 생성량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [118] 도 2b는 멜라닌 세포에 플라즈마 활성 배양액, a-MSH, 또는 알부틴을 첨가한 후 48시간 동안 배양한 후 멜라닌 생성량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [119] 도 3은 표시된 각 첨가물을 멜라닌 세포 배양액에 첨가한 후 다시 24시간 배양한 후의 티로시나아제 mRNA량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [120] 도 4는 표시된 각 첨가물을 멜라닌 세포 배양액에 첨가한 후 다시 24시간 배양한 후의 TRP1 mRNA양을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [121] 도 5는 표시된 각 첨가물을 멜라닌 세포 배양액에 첨가한 후 다시 24시간

배양한 후의 TRP2 mRNA 양을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

- [122] 도 6은 플라즈마를 20분 조사한 플라즈마 활성화 배양액을 첨가하여 24시간 또는 48시간 배양한 멜라닌 세포를 현미경으로 관찰한 사진이다.
- [123] 도 7a는 각 플라즈마 활성화 배양액을 첨가하여 48시간 배양한 후의 생존 세포 수 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- [124] 도 7b는 각 플라즈마 활성화 배양액을 첨가하여 48시간 배양한 후의 생존 세포 수 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- [125] 도 8a는 상온상압 플라즈마 발생기의 모식도이다.
- [126] 도 8b는 실시예 1-1에 따른 상온상압 플라즈마 제트의 방전 중 200 내지 100nm 범위의 광학적 방출 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.
- [127]

발명의 실시를 위한 형태

- [128] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 자세히 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이고, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것은 아니다.
- [129]
- [130] 실시예 1. 플라즈마 활성화 배양액의 세포 내 멜라닌 양 증가 효과 확인
- [131] 1-1: 플라즈마 활성화 배양액(plasma activated media, PAM)의 제조
- [132] 배양 중인 세포에 플라즈마를 직접 조사하는 경우 모든 세포에 고르게 플라즈마 활성화 효과를 얻을 수 없는 점 등 단점을 보완하기 위해, 세포 배양용 액체 배지에 직접 플라즈마를 조사하여 플라즈마 활성화 배양액을 제조하여 실험에 이용하였다.
- [133] 멜라닌 세포 배양액으로는 M254 배지(GIBCO Cascade Biologics, Portland, OR, USA)가 사용되었으며, 상기 M254 배지에 상온상압 플라즈마를 가해 플라즈마 활성화 배지를 제작하였다.
- [134] 구체적으로, 본 발명에 따른 상온상압 플라즈마 조건은 3.0W 마이크로파 전력(microwave power)과 아르곤(Ar) 가스를 이용하여 상온 대기압에서 시행하였고, 플라즈마 생성 장치와 배지는 0.8cm 이격되어 있었다. 플라즈마 조사 온도는 40°C를 넘지 않도록 하였다. 세포가 없는 배지 10mL를 페트리 접시에 담고, 플라즈마를 각각 4분, 8분, 12분, 16분, 또는 20분간 조사하여 최종 플라즈마 활성화 배양액을 제조하였다. 마이크로파 정확도는 $\pm 2.0\%$, 가스 압력은 0 내지 3Bar 및 가스 흐름은 0 내지 5 SLM으로 조절되었다. 도 8a에 상온상압 플라즈마 발생기의 모식도를, 도 8c에 플라즈마 발생기 전극과 배지 사이의 간격을 나타내었다.
- [135] 도 8b에 본 발명의 상온상압 플라즈마 제트의 방전 중 광학적 방출 스펙트럼을 200 내지 1000nm 범위에서 나타내었다. 주입되는 아르곤 가스 원자로부터 방출되는 스펙트럼은 690 내지 990nm이고 N2 및 O에 의한 피크는 337.2 및 690 내지 900nm 사이로 각각 측정되었다. OH band는 307 내지 309nm 범위에서

관찰되었다.

- [136] 멜라닌 세포를 먼저 배양한 후, 플라즈마 활성화 배양액으로 배양액을 교체하여 실험을 진행하였으며, 플라즈마 활성화 배지(Plasma-activated medium, PAM)는 플라즈마 조사 후 즉시 멜라닌 세포 배양에 이용되었다.

[137]

[138] **1-2: 멜라닌 세포의 배양**

- [139] 본 발명에 이용된 정상 인간 피부의 멜라닌 세포는 ATTC(Manassas, VA, USA)에서 구매하여 사용하였다. 본 발명에서 사용된 멜라닌 세포는 M254 Medium(GIBCO Cascade Biologics, USA)에 1%의 human melanocyte growth supplement(HMGS, Gibco Cascade biologics, USA), 100U/ml 페니실린 및 50ug/ml 스트렙토마이신을 첨가한 배지에서 배양하였다.

- [140] 배양된 세포가 60mm 세포배양 접시에 1×10^6 cells/dish가 되도록 분주하여 24시간 adaptation 시킨 후, 4분, 8분, 12분, 16분, 또는 20분간 플라즈마를 조사한 플라즈마 활성화 배양액 10mL에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. 양성 대조군(Positive control)으로는 플라즈마 활성화 배양액 대신 멜라닌 생성 증가 효과가 있다고 알려진 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)를 10mL의 배지에 최종 농도 1uM이 되게 처리하였고, 음성 대조군(negative control)으로는 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 알려져 있는 알부틴(albutin)을 1mM이 되도록 첨가하였다.

- [141] 배양 후 trypsin-EDTA solution (JBI, Seoul, Korea) 처리 및 5%(v/v) FBS를 함유한 PBS 로 세척 후 세포를 수확하였다. 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

[142]

[143] **1-3. 세포 용해물의 색 변화**

- [144] 멜라닌 세포에 함유된 멜라닌의 양은 흡광도를 이용하여 측정되었다. 구체적으로, 먼저 각 멜라닌 세포를 1N NaOH에 60°C, 1시간 조건에서 용해시켜 흡광도 측정을 위한 시료를 준비하였다. 상기 얻어진 세포 용해물을 NaOH에 녹인 흡광도 측정 시료의 색을 육안으로 관찰하였다.

- [145] 도 1에 각 멜라닌 세포 용해물(cell lysate)을 NaOH에 용해시킨 결과를 나타내었다. 플라즈마를 20분 조사한 플라즈마 활성화 배양액을 사용한 경우 대조군에 비해 용액의 색이 짙게 나타났다. Control은 플라즈마 활성화 배양액을 처리하지 않은 경우를, Arbutin은 알부틴을 처리한 세포 용해물을, Plasma는 상온상압 플라즈마를 20분 조사한 플라즈마 배양액을 사용한 경우를 나타낸다. 알부틴을 처리한 경우, 세포 용해물의 NaOH 용액 색이 가장 옅어 이미 알려져 있는 바와 같이 멜라닌 생성이 억제되었음을 알 수 있으며, 플라즈마 활성화 배양액을 처리한 경우, 대조군에 비해 육안으로 확인 가능할 정도의 짙은 색을 나타내어, 플라즈마 활성화 배양액을 처리한 멜라닌 세포 내 멜라닌 양이 증가하였음을 시사한다 (도 1).

[146]

[147] **1-4. 흡광도를 이용한 멜라닌 양 측정**

[148] 멜라닌 세포에 함유된 멜라닌의 양은 흡광도를 이용하여 측정되었다.

구체적으로, 먼저 각 멜라닌 세포를 1N NaOH에 60°C, 1시간 조건에서 용해시켜 흡광도 측정을 위한 시료를 준비하였다. 각 시료의 흡광도는 microplate reader (Spark 10M, Tecan, Austria)를 이용하여, 37°C에서 470nm 파장에 대한 흡광도를 측정하였으며, 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

[149] 상기 흡광도를 측정한 결과를 도 2 및 하기 표 1에 나타내었다. 도 2의 상단 그래프는 4, 8, 12, 16 또는 20분간 플라즈마를 조사하여 얻어진 플라즈마 활성 배양액에서 멜라닌 세포를 배양한 것을 실시예로 표시하고, M254 배지에 α -MSH, 또는 알부틴을 첨가한 후 24시간 배양한 후 멜라닌 생성량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 2의 하단 그래프는 48시간 배양한 후 멜라닌 생성량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. Control은 M254 배지에 플라즈마 활성 배양액을 처리하지 않은 것으로 M254 배지 자체이고, 음성 대조군(negative control)으로는 M254 배지에 알부틴(albutin)을 1mM이 되도록 첨가한 것이고, 양성 대조군은 M254 배지에 α -MSH를 첨가한 것이다.

[150] [Table 1]

	24시간		48시간	
	멜라닌 생산량 (ug/1x10 ⁶)	표준편차	멜라닌 생산량 (ug/1x10 ⁶)	표준편차
control	26.41	0.18	45.60	0.07
α -MSH (1 μ M)	31.59	0.47	48.07	0.49
Arbutin (1mM)	24.79	0.97	41.12	0.42
PAM 4min	26.32	0.11	50.44	0.32
PAM 8min	32.99	0.24	56.90	0.28
PAM 12min	39.77	0.21	66.39	0.13
PAM 16min	43.08	0.55	68.70	0.17
PAM 20min	44.45	0.11	70.15	0.12

[151] 플라즈마 활성 배양액을 사용한 경우, 플라즈마 조사 시간에 비례하여 멜라닌 양이 증가하는 양상을 보였다 (도 2). 보다 구체적으로, 플라즈마 활성 배양액으로 8분 처리한 군에서 멜라닌 양이 증가됨이 확인되었고, 12분 처리 군에서는 급속하게 멜라닌 양이 증가됨을 볼 수 있으며, 16분, 20분에서도 동일한 결과를 보였다. 멜라닌 양이 최고치에 이른 결과를 보인, 플라즈마 조사시간이 20분 인 처리군을 기준으로 할 때 플라즈마 활성 배양액에 멜라닌 세포의 배양 시간이 24시간이 경과한 경우 멜라닌 양이, M254 배지에 플라즈마를 처리하지 않은 control 대비 1.7배, 48시간 후에는 1.55배 멜라닌 양이

증가된 결과를 보였다.

[152]

[153] 따라서 본 발명의 플라즈마 활성화 배양액이 멜라닌 세포의 멜라닌 생성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

[154]

[155] 실시예 2. 멜라닌 합성 관련 유전자의 mRNA 양 확인

[156] 2-1. 세포 배양

[157] 멜라닌 세포를 100mm 세포배양 접시에 1.5×10^6 cells /dish가 되도록 분주하고, 72시간 동안 배양하였다. 일반 배양액만을 이용하여 배양한 대조군(Control), 1uM a-MSH 10mL를 첨가한 양성 대조군, 1mM 알부틴을 10mL 처리한 음성 대조군, 플라즈마 조사 시간 4분, 8분, 12분, 16분, 또는 20분인 플라즈마 활성화 배양액에서 배양된 실험군을 각 첨가물 처리 후 24시간 더 배양하였다.

[158]

[159] 2-2. RNA 추출 및 RT-PCR

[160] 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성은 티로시나아제(tyrosinase), 티로시나아제 관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1; TRP1) 및 티로시나아제 관련 단백질 2(tyrosinase-related protein 2; TRP2)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 따라서 플라즈마 활성화 배양액에 의한 멜라닌 세포의 멜라닌 생성능 향상에 관여하는 유전자 3개의 발현량을 Real-time PCR을 이용하여 살펴보았다.

[161] TRIzol reagent를 이용하여 상기 멜라닌세포들로부터 각각 전체 RNA를 추출하였다. 구체적으로, 각 실험군과 대조군 세포에 1mL의 Trizol reagent를 100mm dish에 첨가하여 세포를 균질화시킨 후 수거하여 0.2mL의 클로로포름(chloroform)을 첨가하고 강하게 15초간 혼합하였다. 이어서 실온에서 2-3분간 반응시킨 후 4°C, 12,000g에서 15분간 원심분리하고 얻어진 상청액에 500μL의 100% isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 균질화 시키고 4°C, 12,000g에서 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 침전물에 1mL의 75% Ethanol을 첨가하여 세척 후 실온에서 10분간 물기를 제거한 후 4°C, 75,000g에서 5분간 원심분리 하여 RNA를 수거한 후 DEPC 증류수를 첨가하여 보관하였다.

[162] 상술한 방법으로 추출한 전체 RNA 1μg을 주형으로 하여 cDNA 합성을 수행하였다. 구체적으로, cDNA의 합성은 25°C에서 10분간 primer annealing 이어서 42°C에서 60분간 Reverse transcriptase (RT) 반응 그리고 95°C에서 5분 동안 transcriptase denaturation 을 하였다. 이어서 Real-Time PCR system (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 이용하여 1 μL cDNA, 1 μL 프라이머 용액(solutions of both the reverse and forward primers), 10 μL Power SYBR Green PCR Master Mix, and 7 μL PCR-grade water가 첨가된 각각의 반응액 20 μL을 넣고 initial denaturation 를 95°C에서 10분, denaturation 은 95°C for 15초 annealing 은 60°C, 1분으로 하여 실시간으로 유전자의 발현을 조사하였다.

[163] 상기 프라이머 용액은 하기 표 2에 나타낸 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍,

서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, 또는 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍을 포함하는 용액이다.

[164] [Table 2]

서열번호	이름	염기서열 (5'→ 3')
1	tyrosinase_F	5'-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3'
2	tyrosinase_R	5'-AGGCATTGTGCATGCTGCTT-3'
3	TRP1_F	5'-AGAGATGATCGGGAGGTCTG-3'
4	TRP1_R	5'-CTGTGCCATGTGAGAAAAGC-3'
5	TRP2_F	5'-GCCGGCTATAATTGTGGAGA-3'
6	TRP2_R	5'-AGGGCAAAGCAAAAGACTCA-3'

[165] 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성은 티로시나아제(tyrosinase), 티로시나아제 관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1; TRP1) 및 티로시나아제 관련 단백질 2(tyrosinase-related protein 2; TRP2)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 따라서 플라즈마 활성화 배양액에 의한 멜라닌 세포의 멜라닌 생성능 향상에 관여하는 유전자 3개의 발현량을 측정하여 그 결과를 도 3 내지 도 5 및 표 3에 나타내었다. 표 3에는 대조군(Control)의 mRNA 발현 수준을 1로 두었을 때 각 시료의 상대적인 발현 수준을 나타내었다.

[166] [Table 3]

	티로시나아제	TRP1	TRP2
Control	1	1	1
a-MSH 1uM	1.39	1.49	1.21
Arbutin 1mM	0.90	0.94	0.78
PAM 4min	1.08	1.14	1.06
PAM 8min	1.07	1.10	1.11
PAM 12min	1.31	1.15	1.07
PAM 16min	2.04	1.93	1.10
PAM 20min	2.57	1.58	1.35

[167] 티로시나아제는 플라즈마 활성화 배양액에 노출된 시간이 8분인 때부터 노출 시간에 비례하여 증가하는 결과를 보였고, 특히 플라즈마 16분 처리 군에서 a-MSH를 처리한 양성 대조군보다 mRNA 발현량이 급격히 증가하여, 20분에 최고에 도달하였다 (M254 배지에 플라즈마 활성화 배양액을 처리하지 않은 control 대비 약 2.5배) (도 3). TRP1과 TRP2의 경우, 플라즈마 조사 시간에 비례하여

발현이 증가되는 양상을 보이지는 않았으나, 플라즈마 활성 배양액에서 배양한 세포 모두에서 대조군에 비해서는 발현량이 증가하였음을 확인하였다 (도 4, 도 5).

[168] 따라서 플라즈마 활성 배양액에서의 배양으로 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나아제, TRP1, 및 TRP2의 발현이 모두 증가하여, 멜라닌 세포 내 멜라닌 양을 증가하는 데에 기여할 것으로 예측할 수 있다.

[169]

[170] 실시예 3. 세포 사멸 또는 손상 발생 여부의 확인

[171] 3-1. 세포 배양

[172] 60mm 세포배양 접시에 멜라닌 세포를 5×10^5 cells/dish가 되도록 분주하고 24시간 배양 후, 플라즈마 활성 배양액(플라즈마 조사 시간 각각 4분, 8분, 12분, 16분 또는 20분) 또는 1uM a-MSH, 1mM 알부틴을 첨가하고, ROS를 형성하는 것으로 알려져 있는 과산화수소(H_2O_2)를 최종 농도가 100uM 또는 200uM이 되도록 처리한 후, 3시간 더 배양하였다. 이후 각 세포를 PBS로 세척하고, 20 uM 2, 7-디클로로플루오레신 디아세테이트(2, 7-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 함유된 M254 배지에 HMGS와 같이 37°C 온도에서 30분간 처리하여 유세포 분석에 이용하였다.

[173]

[174] 3-2. 현미경 관찰

[175] 플라즈마를 20분 조사한 플라즈마 활성 배지에서 24시간 또는 48시간 배양한 세포를 현미경으로 관찰한 결과를 도 6에 각각 나타내었다. 도 6에서 확인되는 바와 같이, 배양 시간이 증가함에 따라 멜라닌 세포의 수가 증가했으며, 멜라닌 세포 특유의 수지상 돌기가 확인되어 외관상 손상된 세포가 거의 관찰되지 않음을 확인할 수 있다. 따라서 암세포에 플라즈마를 조사하여 활성산소가 증가하였을 때와는 달리, 본 발명의 플라즈마 활성 배양액은 멜라닌 세포의 사멸 또는 손상을 초래하지 않음을 알 수 있다.

[176]

[177] 3-3. 세포수 측정(Cell count)

[178] 세포수 측정을 통해 세포사멸이나 세포손상을 확인하였다. 구체적으로, 100mm 배양접시에 1×10^6 의 세포를 24시간 부착시킨 후 배양액을 제거하고 4분, 8분, 12분, 16분, 및 20분으로 각각 처리된 PAM 을 사용하여 멜라닌 세포를 배양하였다. 이어서 24시간과 48시간 후에 trypsin-EDTA solution (JBI, Seoul, Korea)을 처리하여 세포를 떼어낸 후 5% FBS로 효소의 작용을 억제시켰다. 이어서 인산완충버퍼액 (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하고 세포수를 자동 세포계측기 ADAM-MC cell counter (NanoEnTeK, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다

[179] 멜라닌 세포가 사멸 또는 손상에 이르게 되는 지 확인하기 위해 플라즈마 노출 시간이 각각 0분, 4분, 8분, 12분, 16분, 또는 20분인 플라즈마 활성수를 사용한

경우의 생존 세포(live cell)의 수를 측정하였다. 그 결과를 도 7a 내지 7b에 나타내었다. 세포 수 측정 결과, 플라즈마 노출 시간이 길어짐에 따라 점차 수확된 세포 수가 감소하는 양상이 나타났으나, 세포 접종량에 비해 세포수의 감소가 나타나지 않아, 세포 사멸 또는 세포 손상이 없음을 확인하였다. 즉, 본 발명의 플라즈마 활성 배양액은 세포 증식을 다소 억제하는 효과는 있으나, 세포 사멸 또는 세포 손상은 발생하지 않는다.

[180]

청구범위

- [청구항 1] 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 제조된 플라즈마 활성화 배양액(plasma activated media, PAM)을 포함하는, 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 생산용 배양 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 플라즈마는 상온상압 플라즈마이며, 상기 상압은 대기압인 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 플라즈마는 4분 내지 30분 동안 조사되는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 멜라닌 생성 세포는 멜라닌 세포(melanocyte), 흑색종 세포(melanoma), 또는 멜라닌을 생산하는 형질전환 세포인, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 배양액은, D-글루코오스(D-glucose), DL-알파-리포산(DL-alpha-lipoic acid), 에탄올아민(ethanolamine), 헤페스(HEPES), O-포스포릴에탄올아민(O-Phosphorylethanolamine), 푸트레신 2HCl, 나트륨 피루브산염(sodium pyruvate), 및 아데닌 HCl을 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 플라즈마 활성화 배양액은 티로시나아제, TRP1 및 TRP2로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가된 것인, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 배양 조성물은, 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 상온상압 플라즈마를 20분간 조사한 플라즈마 활성화 배양액에 멜라닌 세포를 24시간 배양한 경우 생성된 멜라닌 양이, 상기 플라즈마 처리를 하지 않은 포유동물 세포 배양액에 멜라닌 세포를 배양한 경우 생성된 멜라닌 양을 기준으로 1.1 내지 4배인 배양 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 배양 조성물은, 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 상온상압 플라즈마를 20분간 조사한 플라즈마 활성화 배양액에 멜라닌 세포를 24시간 배양한 경우 티로시나제 mRNA 발현양이, 상기 플라즈마 처리를 하지 않은 포유동물 세포 배양액에 멜라닌 세포를 배양한 경우 티로시나제 mRNA 발현양을 기준으로 1.1 내지 4 배인 배양 조성물로서, 상기 상압은 대기압인, 배양 조성물.
- [청구항 9] 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement,

HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 제조된 플라즈마 활성화 배양액(plasma activated media, PAM)을 제조하는 단계; 및

상기 플라즈마 활성화 배양액을 사용하여 멜라닌 생성 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 생산을 증가시키는 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 플라즈마는 상온상압 플라즈마이고, 상기 상압은 대기압인 것인, 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 플라즈마는 4분 내지 30분 동안 조사되는 것인, 방법.

[청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 멜라닌 생성 세포는 멜라닌 세포(melanocyte), 흑색종 세포(melanoma), 또는 멜라닌을 생산하는 형질전환 세포인, 방법.

[청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 플라즈마 활성화 배양액은 티로시나아제, TRP1 및 TRP2로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가된 것인, 방법.

[청구항 14] 멜라닌세포성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS)를 함유하는 포유동물 세포 배양액에 플라즈마를 조사하여 제조된 플라즈마 활성화 배양액(plasma activated media, PAM)을 제조하는 단계;

상기 플라즈마 활성화 배양액을 세포 배양액으로 사용하여 멜라닌 세포를 배양하는 단계;

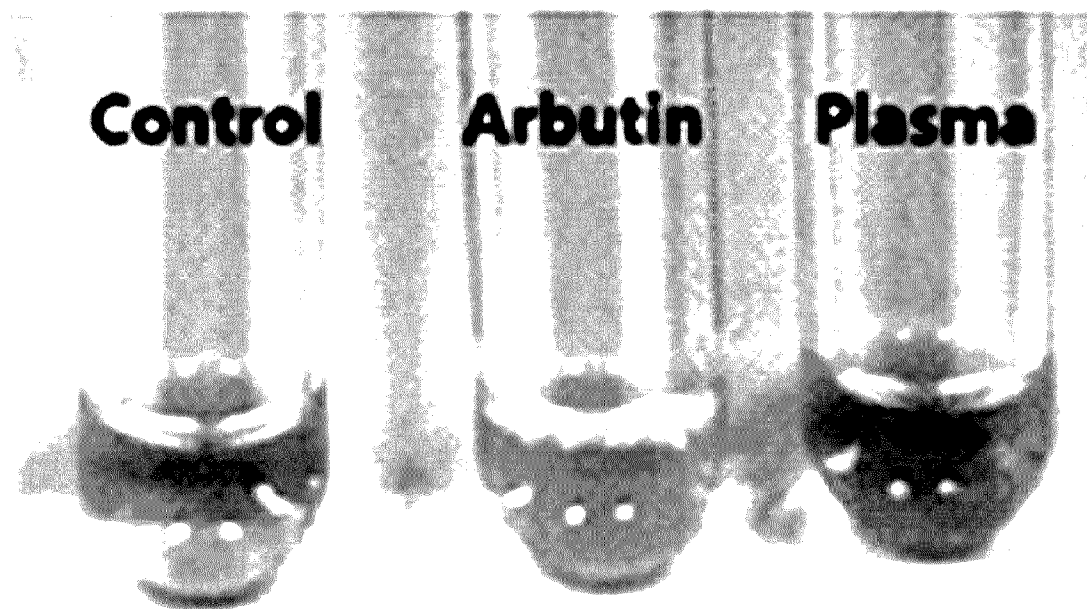
상기 플라즈마 활성화 배양액에서 배양된 세포 배양물에, 멜라닌 생성 억제제의 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 멜라닌 세포 내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA, TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 함량을 분석하는 단계를 포함하는, 멜라닌 생성 억제제의 스크리닝 방법.

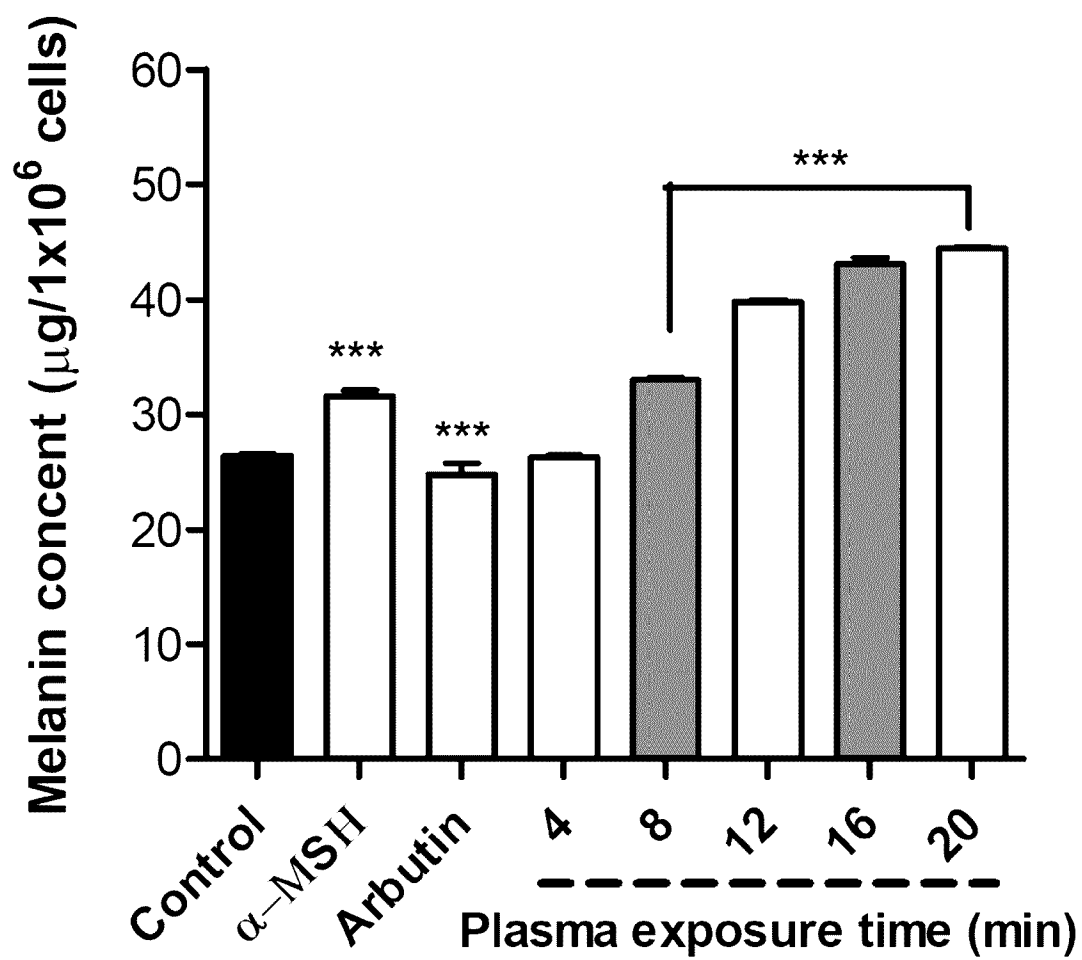
[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 세포 내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA, TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 함량을 분석하는 단계 이후에,

후보 물질이 존재하지 않는 경우와 비교하여 세포 내 멜라닌, 티로시나아제 mRNA, 티로시나아제 단백질, TRP1 mRNA, TRP1 단백질, TRP2 mRNA, TRP2 단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 함량이 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 멜라닌 생성 억제제로 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

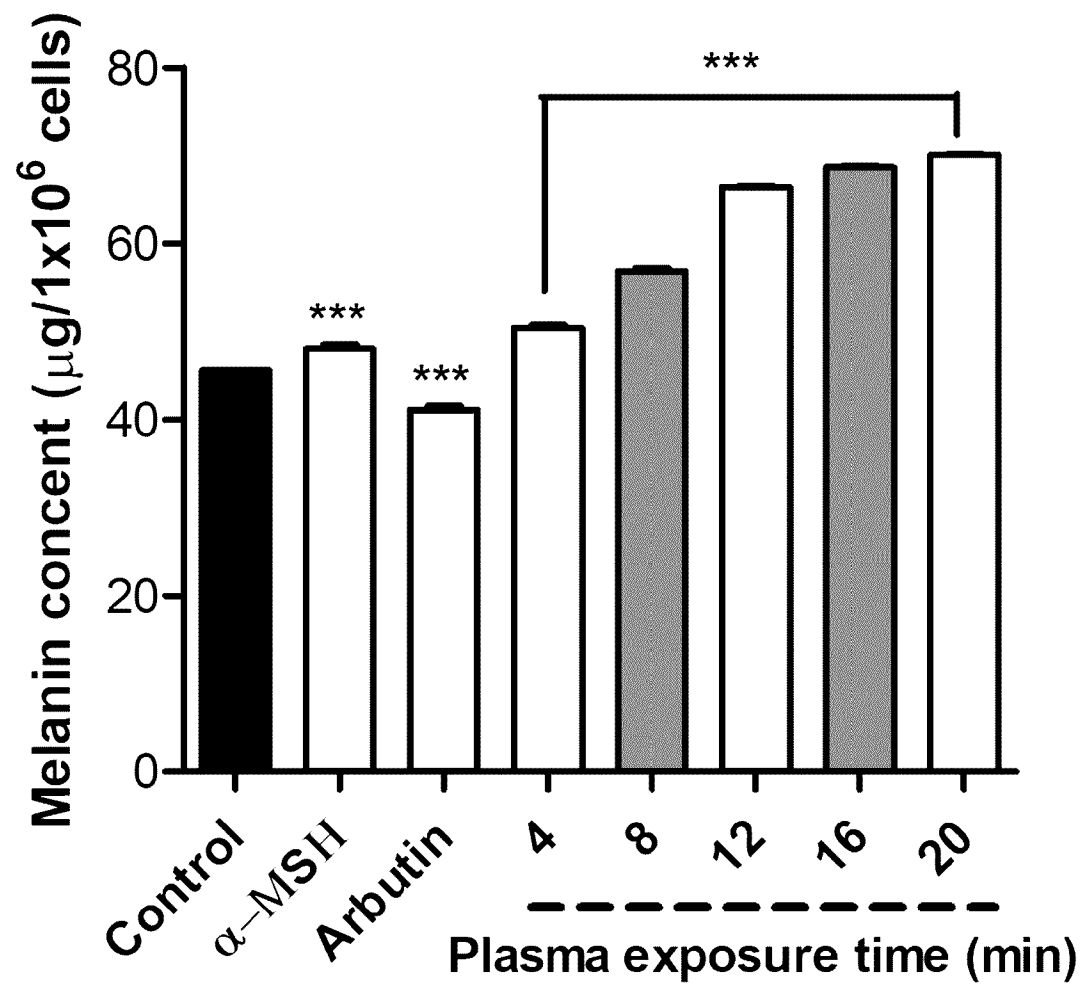
[Fig. 1]



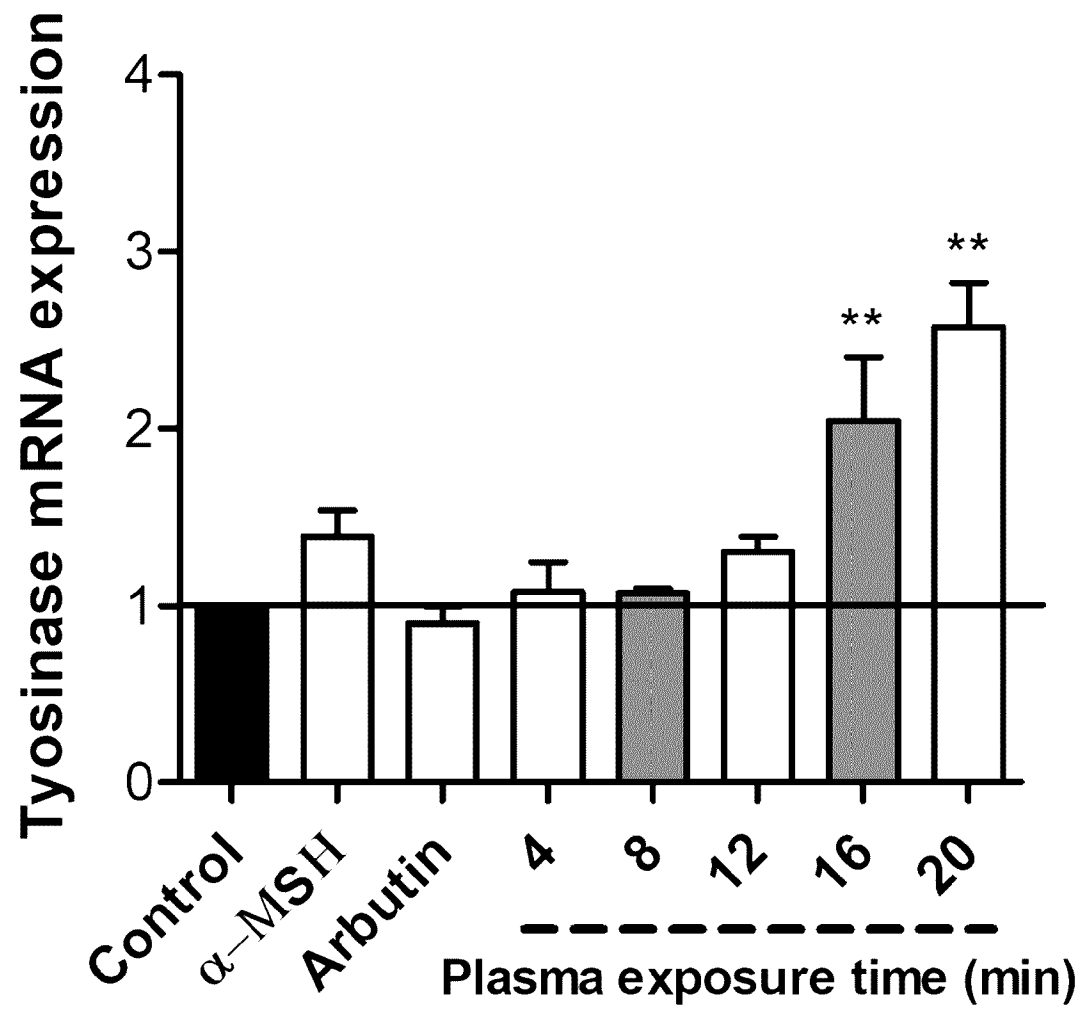
[Fig. 2a]



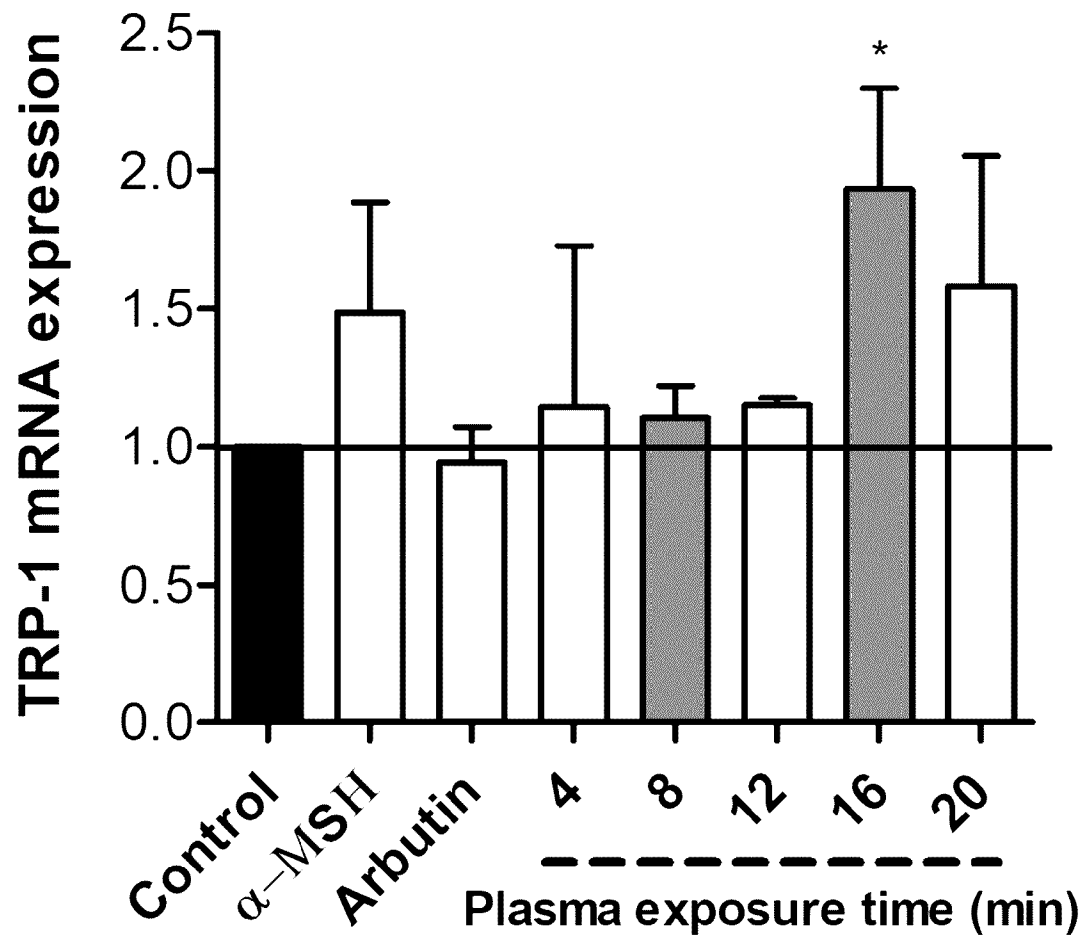
[Fig. 2b]



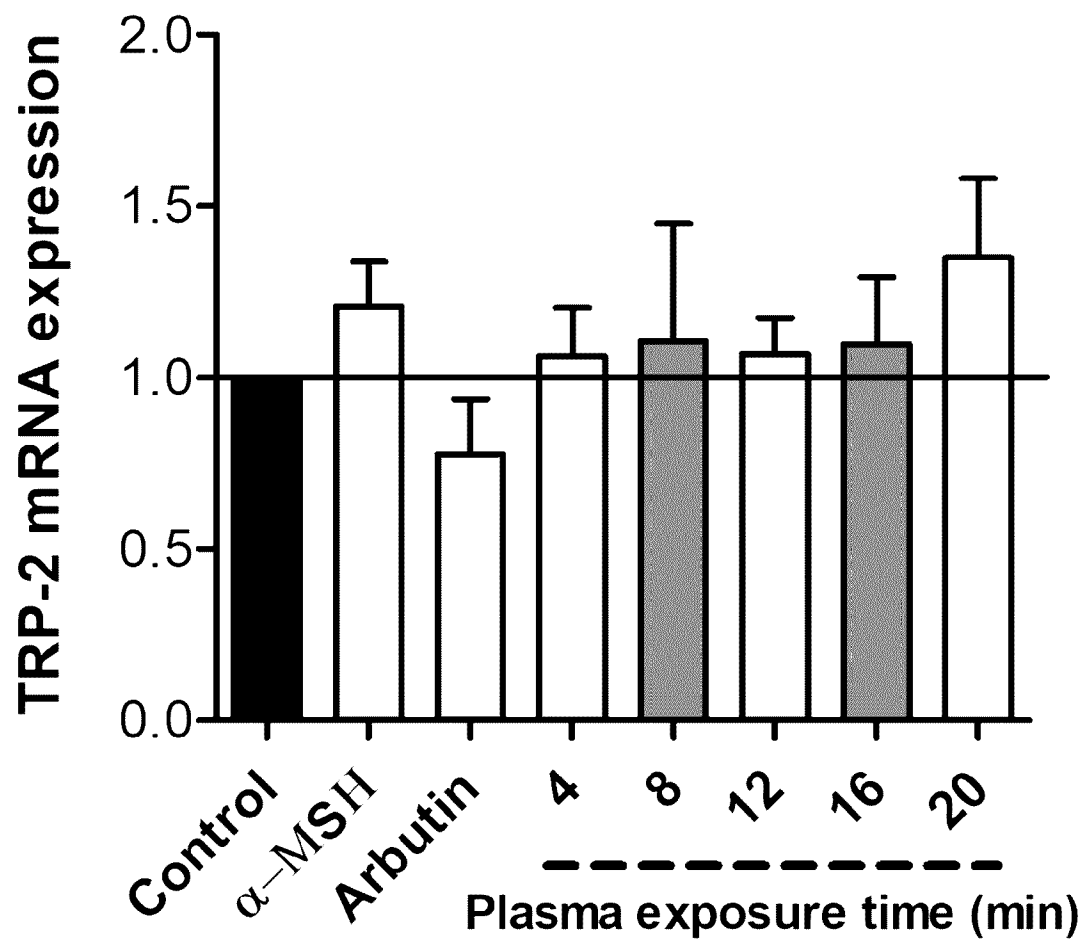
[Fig. 3]



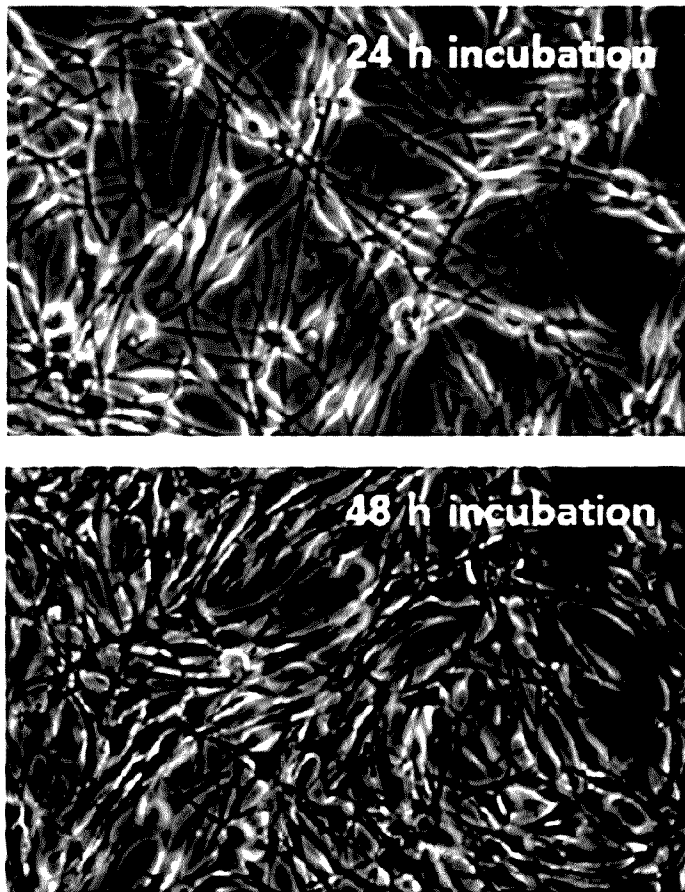
[Fig. 4]



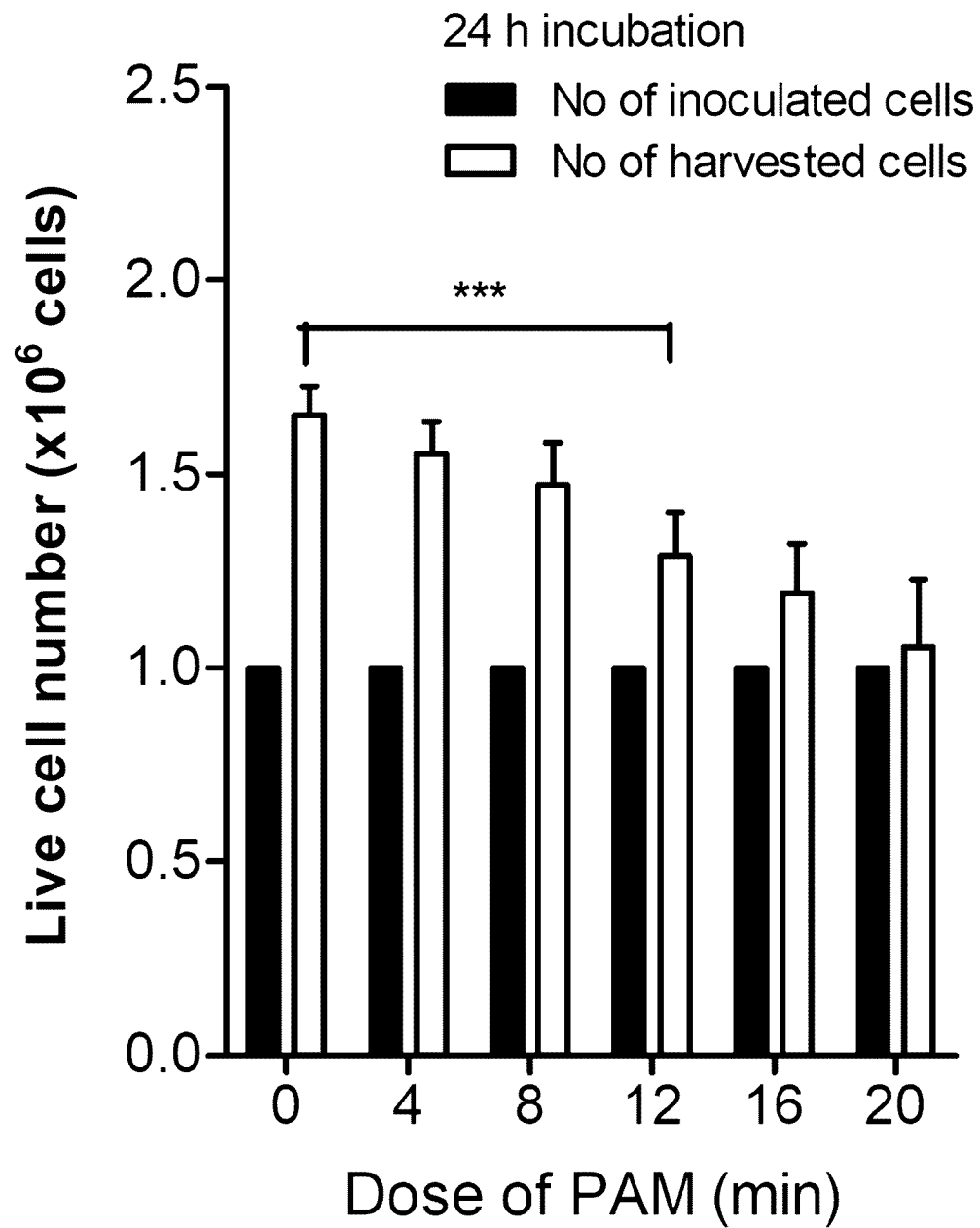
[Fig. 5]



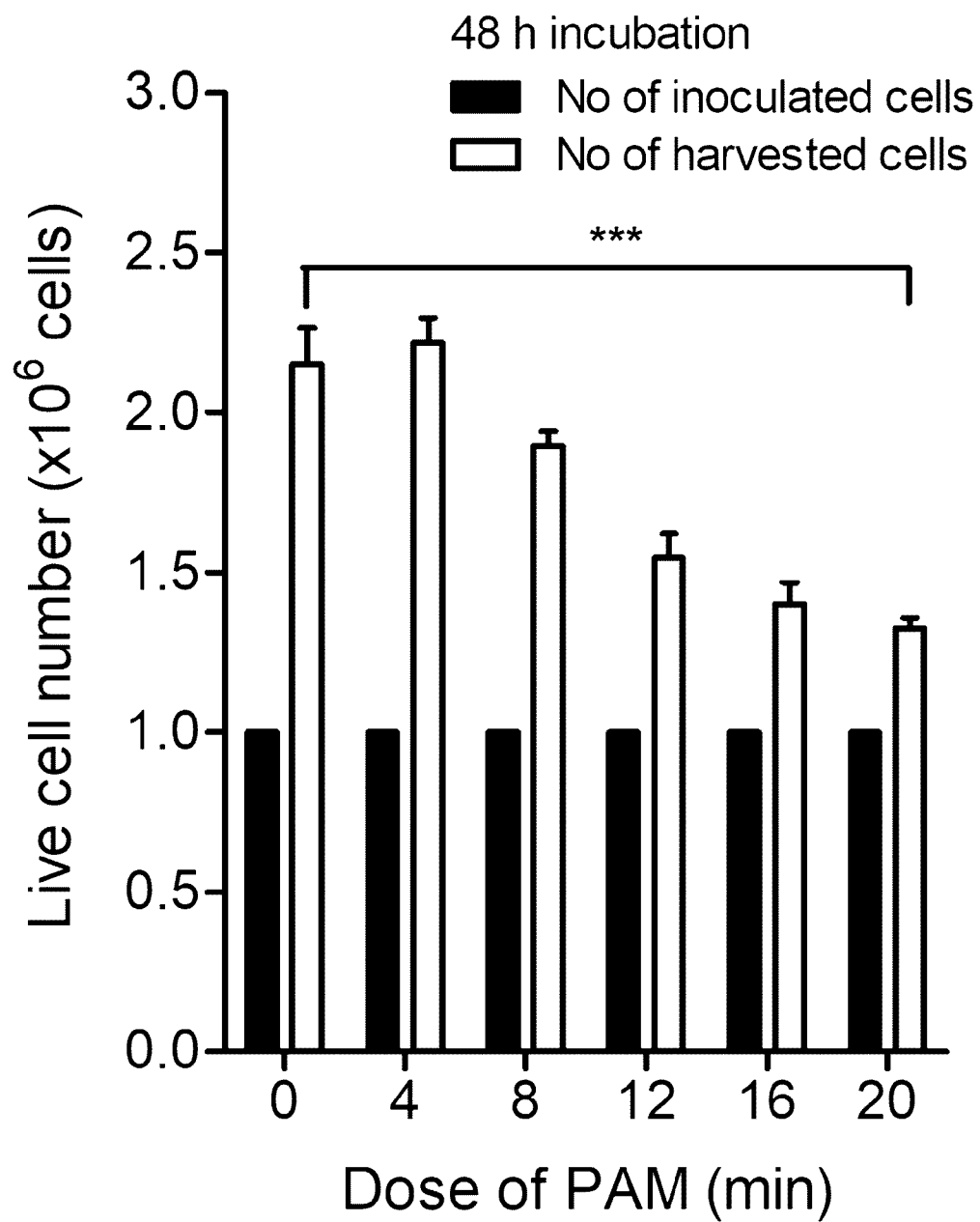
[Fig. 6]



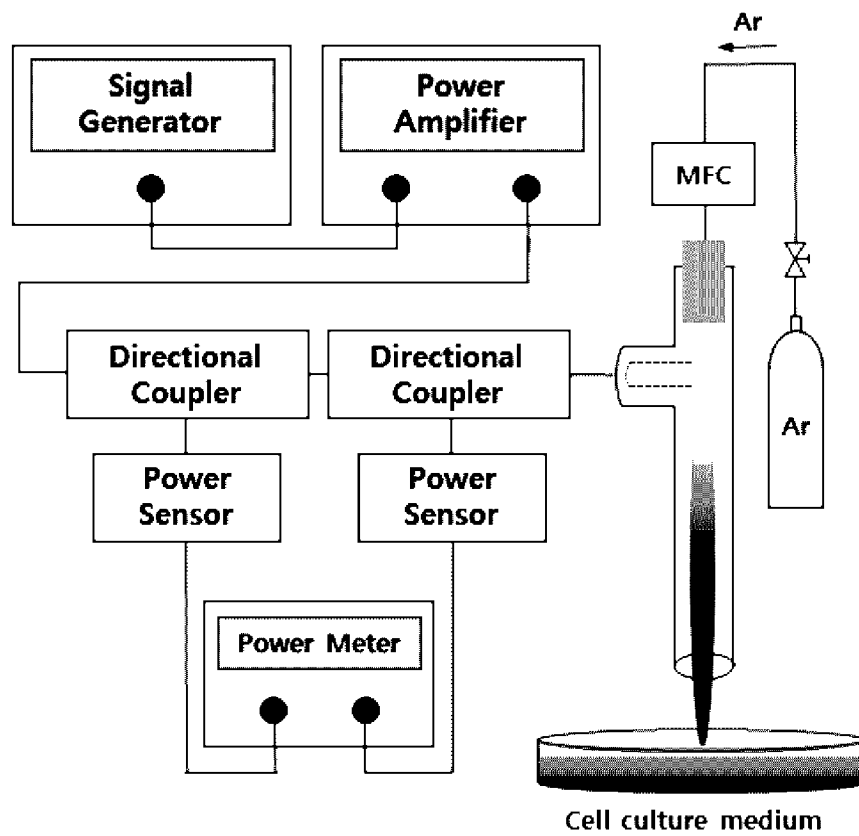
[Fig. 7a]



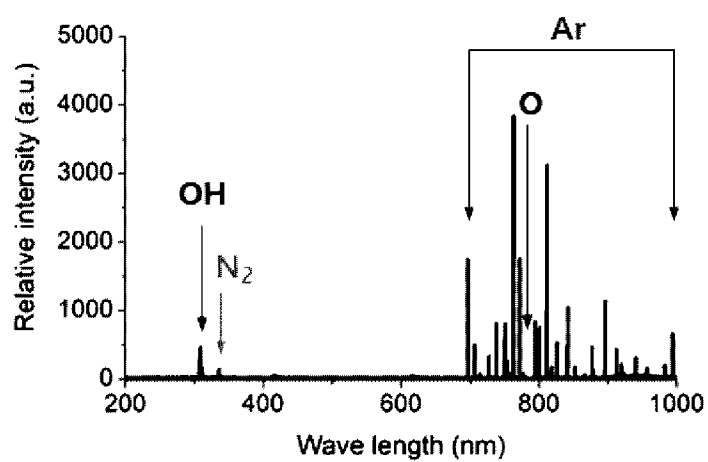
[Fig. 7b]



[Fig. 8a]



[Fig. 8b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/002915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; A61K 33/00; A61K 45/00; A61K 8/19; A61K 9/00; A61L 27/00; C12N 5/06; C12N 5/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: melanocyte, human melanocyte growth supplement (HMGS), plasma activated media (PAM), tyrosinase, TRP1, TRP2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALI, A. et al. Influence of plasma-activated compounds on melanogenesis and tyrosinase activity. SCIENTIFIC REPORTS. 02 March 2016, vol. 6, thesis no. 21779, (pages 1-20) See pages 9-11, figure 9.	1-15
Y	KR 10-2012-0103293 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY et al.) 19 September 2012 See abstract, claim 1, paragraphs [0014], [0037]-[0040], [0056]-[0061].	1-15
A	KR 10-1657063 B1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 September 2016 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2018-0059340 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 04 June 2018 See the entire document.	1-15
A	JP 2005-536214 A (CELLTRAN LIMITED) 02 December 2005 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 JUNE 2020 (05.06.2020)

Date of mailing of the international search report

05 JUNE 2020 (05.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/002915

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0103293 A	19/09/2012	KR 10-1248668 B1	28/03/2013
KR 10-1657063 B1	13/09/2016	US 2016-0296763 A1	13/10/2016
		US 9750951 B2	05/09/2017
KR 10-2018-0059340 A	04/06/2018	KR 10-1979105 B1	17/05/2019
		KR 10-2006784 B1	02/08/2019
		KR 10-2018-0059341 A	04/06/2018
		WO 2018-097527 A1	31/05/2018
JP 2005-536214 A	02/12/2005	AU 2003-260724 A1	11/03/2004
		CA 2495535 A1	04/03/2004
		EP 1539936 A2	15/06/2005
		US 2005-0244961 A1	03/11/2005
		WO 2004-018654 A2	04/03/2004
		WO 2004-018654 A3	08/04/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071; A61K 33/00; A61K 45/00; A61K 8/19; A61K 9/00; A61L 27/00; C12N 5/06; C12N 5/07

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 멜라닌 생성세포(melanocyte), 멜라닌 세포 성장인자(human melanocyte growth supplement, HMGS), 플라즈마 활성 배양액(plasma activated media, PAM), 티로시나아제(tyrosinase), TRP1, TRP2

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	ALI, A. 등, "Influence of plasma-activated compounds on melanogenesis and tyrosinase activity", SCIENTIFIC REPORTS, 2016.03.02, 제6권, 논문번호 21779, (페이지 1-20) 페이지 9-11, 도면 9	1-15
Y	KR 10-2012-0103293 A (연세대학교 산학협력단 등) 2012.09.19 요약, 청구항 1, 단락 [0014], [0037]-[0040], [0056]-[0061]	1-15
A	KR 10-1657063 B1 (아주대학교 산학협력단) 2016.09.13 전체 문헌	1-15
A	KR 10-2018-0059340 A (아주대학교 산학협력단) 2018.06.04 전체 문헌	1-15
A	JP 2005-536214 A (CELLTRAN LIMITED) 2005.12.02 전체 문헌	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 06월 05일 (05.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 05일 (05.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

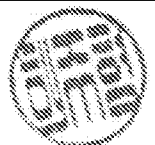
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0103293 A	2012/09/19	KR 10-1248668 B1	2013/03/28
KR 10-1657063 B1	2016/09/13	US 2016-0296763 A1	2016/10/13
		US 9750951 B2	2017/09/05
KR 10-2018-0059340 A	2018/06/04	KR 10-1979105 B1	2019/05/17
		KR 10-2006784 B1	2019/08/02
		KR 10-2018-0059341 A	2018/06/04
		WO 2018-097527 A1	2018/05/31
JP 2005-536214 A	2005/12/02	AU 2003-260724 A1	2004/03/11
		CA 2495535 A1	2004/03/04
		EP 1539936 A2	2005/06/15
		US 2005-0244961 A1	2005/11/03
		WO 2004-018654 A2	2004/03/04
		WO 2004-018654 A3	2004/04/08