(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004097
(43) 공개일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9717 (2017.01) *A61Q 19/06* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9717 (2017.08)
A61Q 19/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7040320
(22) 출원일자(국제) 2023년05월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/061743
(87) 국제공개번호 WO 2023/213918
국제공개일자 2023년11월09일
(30) 우선권주장
2206529.6 2022년05월05일 영국(GB)
2210574.6 2022년07월19일 영국(GB)

(71) 출원인
지보당 에스아
스위스 체하-1214 베르니에 슈멩 드 라 파르퓌므리 5
(72) 발명자
휴모 안느
프랑스 22560 이레 그란데 안세 두 포르 겔린
뮈니어 마리
프랑스 51110 뽀마끌르 루트 드 바정꾸호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

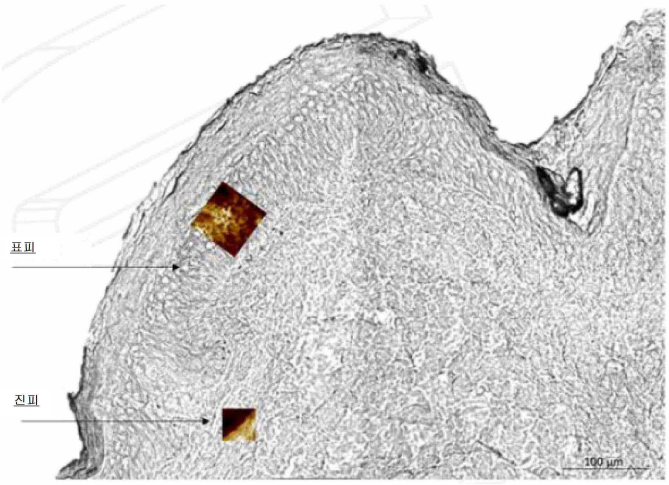
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 제조 방법 및 상기 추출물의 화장품 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61Q 19/08 (2013.01)
A61K 2800/782 (2013.01)
A61K 2800/805 (2013.01)
(72) 발명자
스칸돌레라 아만딘
프랑스 51110 뽀마끌르 루트 드 바정꾸호
드 비제몽 오드리
프랑스 22560 이레 그란데 안세 두 포르 겔린
레이노드 로맹
프랑스 31400 톨루즈 뤼 데 사텔리트 3 바티망 카날 바이오테크 1

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 마스토카르푸스 스텔라투스(*Mastocarpus stellatus*)의 수성 추출에 의해 제1 액체 상 및 제1 고체 상을 수득하는 단계;

(ii) 상기 제1 고체 상을 고온에서 산성 가수분해하는 단계;

(iii) 상 분리에 의해 제2 액체 상 및 제2 고체 상을 수득하는 단계; 및

(iv) 상기 제1 액체 상과 상기 제2 액체 상을 조합하여 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 수득하는 단계

를 포함하는, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

마스토카르푸스 스텔라투스가 수성 추출 전에 건조 및/또는 절단 및/또는 분쇄되는, 제조 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

수성 추출이 마스토카르푸스 스텔라투스를 물, 특히 탈이온수에 약 2 내지 10%, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 5%의 농도로 약 10 내지 30℃, 더욱 바람직하게는 약 20℃의 온도에서 약 5 내지 60분, 더욱 바람직하게는 약 15분 동안 침연(macerating)하는 것을 포함하는, 제조 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 액체 상 및 제1 고체 상이 원심분리, 체질 및 여과 중 하나 이상에 의해 분리되는, 제조 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

산성 가수분해가 약 1 내지 4의 pH, 더욱 바람직하게는 약 1.5 내지 2.5의 pH, 가장 바람직하게는 약 2의 pH에서 수행되는, 제조 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

산성 가수분해가 약 50 내지 90℃의 온도, 더욱 바람직하게는 약 70 내지 90℃의 온도, 가장 바람직하게는 약 80℃의 온도에서 수행되는, 제조 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

산성 가수분해 후, pH를 약 4 내지 8의 pH, 더욱 바람직하게는 약 4.5 내지 6의 pH, 특히 약 5의 pH로 조정하는 단계를 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (iii)의 상 분리가 원심분리, 여과, 진동 체질(vibrating sieving) 및 짜기(wringing) 중 하나 이상을 포함하는, 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 제조 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물.

청구항 10

제9항에 따른 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물; 및

미용적으로 허용되는 부형제(cosmetically acceptable excipient)

를 포함하는 화장품 조성물(cosmetic composition).

청구항 11

제10항에 있어서,

피부 관리 조성물(skin care composition)인 화장품 조성물.

청구항 12

마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 특히 제9항에 따른 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 또는 제10항 또는 제11항에 따른 화장품 조성물을 이중 턱(double chin)에 국소적으로 적용하는 단계를 포함하는, 이중 턱을 감소시키는 방법.

청구항 13

제9항에 따른 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 제10항 또는 제11항에 따른 화장품 조성물의, 이중 턱의 감소, 지방 분해(lipolysis)의 증진, 피부 탄성(skin elasticity)의 증가, 콜라겐 합성의 자극, 피부 수분공급(hydrating skin), 피부 노화(skin aging)의 영향 감소 및/또는 피부 노화의 영향 예방을 위한 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마스토카르푸스 스텔라투스(*Mastocarpus stellatus*) 추출물의 제조 방법, 이렇게 수득된 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 포함하는 화장품 조성물(cosmetic composition) 및 화장품에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마스토카르푸스 스텔라투스(통상적으로 카라기난 이끼 또는 폴스 아이리쉬 이끼(false Irish moss)로 공지됨)는 홍조류 해초 문(division)인 로도피세아에(Rhodophyceae) 문에 속하는 종이다. 마스토카르푸스 스텔라투스는 통상적으로 중간 및 하부 조간대(mid and lower-intertidal)의 바위에서 발견된다. 일반적으로 아일랜드와 영국의 대부분의 해안에서 발견된다. 기록된 다른 지역은 다음과 같다: 프랑스(영국 해협, 북동 대서양), 아이슬란드, 페로스, 북부 러시아에서 리오 드 오로, 캐나다(뉴펀들랜드)에서 미국(노스캐롤라이나).

[0003] 마스토카르푸스 스텔라투스는 원판형 부착기 자루(discoid holdfast stipe)에서 자라고, 콘드루스 크리스푸스(*Chondrus crispus*)의 평평한 엽상체(frond)와는 달리 엽상체에 홈이 있다. 높이가 10 내지 20 cm까지 자라고, 두 갈래로 갈라진다. 엽상체는 연골질(cartilaginous)이고, 적갈색이고, 녹색 또는 보라색을 띤다. 성숙한 조류는 직경 1 mm 이하의 직립 필라멘트(erect filament)에서 발달하는 생식 구조를 나타낸다. 색상은 적갈색 또는 보라색이거나 표백된다.

[0004] Michael Guiry에 따르면, 아일랜드 해초를 수집한 가장 오래된 기록은 12세기 수도사들의 시에서 입증된다. 2001년 아일랜드 해초 양식 시장 분석에서, 마스토카르푸스 스텔라투스와 콘드루스 크리스푸스의 연간 국가 해초 수확량은 합쳐서 100톤 미만으로 추산되었다. 마스토카르푸스 스텔라투스는 배우체 생명 단계(gametophyte life phase)에서 수확되는 데, 이는 황산화된 카라기난이 더 많은 후기 단계가 바위에서 제거하기 어렵기 때문

이다. 식품 및 약학 산업은 항산화, 항응고 및 증점 또는 겔화 특성 때문에 해초에 관심을 가지고 있다. 마스토카르푸스 스텔라투스의 건강 특성 및 응용 분야 외에도, 겔화 특성은, 식품 보존 및 기능성 식품 개발을 위한 플라스틱에 대한 지속가능하고 식용가능한 대안이 될 수 있는 생분해성 필름을 생성할 수 있다.

[0005] EP 1 743 628 A1은 1:5의 질량비를 갖는 25 내지 50 중량%의 플로리도사이드 및 10 내지 25 중량%의 이세티온산의 조합을 포함하는 홍조류 추출물과 담체를 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다. 이 조성물은 피부에 수분을 공급하고/하거나 피부 노화를 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0006] FR 2 946 878 B1은 멜라닌 생성(melanogenesis) 억제제로서 플로리도사이드 또는 홍조류 추출물의 화장품 용도에 관한 것이다.

[0007] 놀랍게도, 이제, 특별한 추출 방법을 사용함으로써, 지방 분해 활성(lypolytic activity)을 갖고 피부 탄성(skin elasticity)을 증가시켜 이중 턱(double chin)을 감소시킬 수 있는 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 수득할 수 있다는 사실이 밝혀졌다.

발명의 내용

[0008] 따라서, 제1 양상에서, 본 발명은 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0009] (i) 마스토카르푸스 스텔라투스의 수성 추출을 통해 제1 액체 상 및 제1 고체 상을 수득하는 단계;

[0010] (ii) 고온(elevated temperature)에서 제1 고체 상을 산성 가수분해하는 단계;

[0011] (iii) 상 분리에 의해 제2 액체 상 및 제2 고체 상을 수득하는 단계; 및

[0012] (iv) 제1 액체 상 및 제2 액체 상을 조합하여 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 수득하는 단계.

[0013] 제2 양상에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물에 관한 것이다.

[0014] 제3 양상에서, 본 발명은 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 및 미용적으로 허용되는(cosmetically acceptable) 부형제를 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

[0015] 제4 양상에서, 본 발명은 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 특히 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물을 이중 턱에 국소적으로 적용(applying)하는 단계를 포함하는, 이중 턱을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0016] 제5 양상에서, 본 발명은 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의, 이중 턱의 감소, 지방 분해의 향상, 피부 탄성의 증가, 콜라겐 합성의 자극, 피부 수분공급(hydrating skin), 피부 노화(skin aging)의 영향 감소 및/또는 피부 노화의 영향 예방을 위한 용도에 관한 것이다.

[0017] 본 발명 및 이의 바람직한 특징은 아래에서 더 자세히 설명될 것이다.

[0018] 의심을 피하기 위해, 본 발명의 소정 양상, 특징 또는 매개변수에 대해 표시된 선호도, 옵션, 특정 특징 등은 맥락상 달리 표시되지 않는 한, 본 발명의 동일하거나 다른 양상, 특징 및 매개변수에 대해 표시된 임의의 및 모든 다른 선호도, 옵션, 특정 특징 등과 조합으로 개시된 것으로 간주되어야 한다.

[0019] 본 발명의 방법은 마스토카르푸스 스텔라투스의 수성 추출에 의해 제1 액체 상 및 제1 고체 상을 수득하는 단계를 포함한다.

[0020] 수성 추출은 마스토카르푸스 스텔라투스 식물 전체에 대해 수행될 수 있다. 다르게는, 식물의 특정 부분, 예를 들어 자루 및/또는 엽상체만을 사용할 수도 있다.

[0021] 수성 추출 전에, 마스토카르푸스 스텔라투스는, 예를 들어, 절단, 분쇄, 으깨기(crushing), 다지기(mincing) 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 적절한 방법에 의해 건조되고/되거나 더 작은 조각으로 가공될 수 있다.

[0022] 따라서, 한 실시양태에서, 마스토카르푸스 스텔라투스는 수성 추출 전에 건조된다. 조류는 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들어, 저온(예컨대, 약 40℃)의 오븐에서 또는 햇볕에서 건조될 수 있다. 건조된 조류를 사용하면 보관 및 물류가 용이해진다. 다르게는, 예를 들어, 신선한 조류 또는 냉동 조류를 사용할 수도 있다.

[0023] 한 실시양태에서, 마스토카르푸스 스텔라투스는 수성 추출 전에 더 작은 조각으로 가공되고, 특히 절단 및/또는

분쇄된다. 이는 추출 공정의 효능을 개선한다. 바람직하게는, 마스토카르푸스 스텔라투스는 수성 추출 전에 약 15 내지 20 ㎜ 길이의 조각으로 가공된다(예를 들어, 조각은 하기 크기 분포를 가질 수 있음: 5 내지 10% > 2,360 μm; 1,000 μm < 80 내지 90% < 2,360 μm; 10 내지 15% < 1,000 μm). 이를 통해 추출 공정을 최적화할 수 있으면서, 동시에 제1 추출 단계에서 카라기난을 추출하지 않아도 된다. 본 발명의 방법에서, 바람직하게는 조류에 함유된 모든 카라기난은 산성 가수분해된다.

[0024] 수성 추출은 일반적으로 물, 특히 탈이온수를 사용하여 수행된다. 다르게는, 예를 들어, 일반 수돗물, 또는, 예를 들어 글리세롤, 프로판 다이올, 에탄올 또는 기타 극성 용매 또는 완충제와 같은 첨가제를 함유하는 물을 사용할 수도 있다.

[0025] 한 실시양태에서, 수성 추출은 마스토카르푸스 스텔라투스를 물, 특히 탈이온수에 침연(macerating)하는 것을 포함한다.

[0026] 수성 추출, 특히 물 중 침연은 물 중에서 적합한 농도의 마스토카르푸스 스텔라투스에서 수행될 수 있다.

[0027] 한 실시양태에서, 수성 추출은 마스토카르푸스 스텔라투스를 물, 특히 탈이온수 중에서 약 2 내지 10%, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 5%, 예를 들어 약 4.8%의 농도로 침연하는 것을 포함한다.

[0028] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 백분율(%)의 표시는 달리 명시되지 않는 한 중량%(w/w)를 나타낸다.

[0029] 수성 추출, 특히 물 중 침연은 실온에서 수행될 수 있다. 다르게는, 약간 더 높거나 낮은 온도를 사용할 수도 있다.

[0030] 한 실시양태에서, 수성 추출물은 마스토카르푸스 스텔라투스를 약 10 내지 30℃, 더욱 바람직하게는 약 20℃의 온도에서 침연하는 것을 포함한다.

[0031] 수성 추출, 특히 물 중 침연은 사용된 온도 및/또는 농도에 따라 적절한 시간 동안 수행될 수 있다.

[0032] 한 실시양태에서, 수성 추출물은 마스토카르푸스 스텔라투스를 약 5 내지 60분, 더욱 바람직하게는 약 15분 동안 침연하는 것을 포함한다.

[0033] 특정 실시양태에서, 수성 추출은 마스토카르푸스 스텔라투스를 물, 특히 탈이온수 중에서 약 2 내지 10%, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 5%의 농도로 약 10 내지 30℃, 더욱 바람직하게는 약 20℃의 온도에서 약 5 내지 60분, 더욱 바람직하게는 약 15분 동안 침연하는 것을 포함한다.

[0034] 제1 액체 상 및 제1 고체 상은 임의의 적절한 방법을 사용하여 분리할 수 있다. 바람직한 방법은, 예를 들어 수성 추출의 규모에 따라 변할 수 있지만, 입자 크기, 액체 상의 점도 또는 이용가능한 장비와 같은 다른 인자에 따라서도 변할 수 있다. 원심분리, 체질 및/또는 여과가 특히 적합한 방법이다.

[0035] 한 실시양태에서, 제1 액체 상 및 제1 고체 상은 원심분리, 체질 및 여과 중 하나 이상에 의해 분리된다.

[0036] 제1 상 분리 후, 제1 액체 상은 적절한 조건 하에 보관될 수 있다. 예를 들어, 제1 액체 상은 나머지 추출 공정 동안 몇 시간(예컨대, 약 3 내지 4시간) 동안 빛으로부터 보호된 채 상온에서 보관될 수 있다. 또한, 제1 액체 상은 적절한 안정화제, 예를 들어 (극성) 용매의 첨가에 의해 안정화될 수 있다. 예를 들어, 제1 액체 상은 20%의 프로판 다이올의 첨가에 의해 안정화될 수 있다.

[0037] 제1 고체 상의 산성 가수분해는 특히 조류 물질에 함유된 카라기난을 가수분해하는 데 사용된다.

[0038] 제1 고체 상의 산성 가수분해는 적절한 pH에서 수행될 수 있다. 원하는 가수분해도에 따라 약간 더 높거나 낮은 pH가 선택될 수 있다.

[0039] 한 실시양태에서, 산성 가수분해는 약 1 내지 4의 pH, 더욱 바람직하게는 약 1.5 내지 2.5의 pH, 가장 바람직하게는 약 2의 pH에서 수행된다.

[0040] 원하는 pH는 적합한 산의 첨가에 의해 수득될 수 있다. 황산, 염산, 시트르산 및 이들의 혼합물이 특히 매우 적합하다.

[0041] 한 실시양태에서, 산성 가수분해는 황산, 염산, 시트르산 또는 이들의 임의의 혼합물의 첨가를 포함한다.

[0042] 산에 대한 마스토카르푸스 스텔라투스의 비율은 원하는 가수분해도에 따라 조정될 수도 있다. 적합한 비율은, 예를 들어 황산의 약 3 내지 6%, 바람직하게는 황산의 약 4.5%이다.

[0043] 산성 가수분해는 고온에서 수행된다. 원하는 가수분해도에 따라 더 높거나 낮은 온도가 선택될 수 있다.

[0044] 한 실시양태에서, 산성 가수분해는 약 50 내지 90℃의 온도, 더욱 바람직하게는 약 70 내지 90℃의 온도, 가장 바람직하게는 약 80℃의 온도에서 수행된다.

[0045] 산성 가수분해의 지속 시간은 원하는 가수분해도에 따라 조정될 수도 있다. 지속 시간이 길수록 중합도는 낮아진다.

[0046] 한 실시양태에서, 산성 가수분해는 약 1시간 내지 3시간, 더욱 바람직하게는 약 2시간에 걸쳐 수행된다.

[0047] 예를 들어, pH를 높이거나 온도를 낮춤으로써, 산성 가수분해가 중단될 수 있다.

[0048] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 산성 가수분해 후에 pH를 약 4 내지 8의 pH, 더욱 바람직하게는 약 4.5 내지 6의 pH, 특히 약 5의 pH로 조정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0049] pH는 적합한 염기, 예를 들어 무기 염기, 예컨대 수산화나트륨의 첨가에 의해 조정될 수 있다.

[0050] 산성 가수분해 후, 임의적으로 pH를 조정한 후, 제2 액체 상 및 제2 고체 상을 수득하기 위해 상 분리가 수행된다. 이러한 상 분리는, 예를 들어 원심분리, 여과, 진동 체질(vibrating sieving) 및/또는 짜기(wringing)와 같은 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0051] 따라서, 한 실시양태에서, 단계 (iii)의 상 분리는 원심분리, 여과, 진동 체질 및 짜기 중 하나 이상을 포함한다.

[0052] 임의적으로, 제1 액체 상과 조합하기 전에 제2 액체 상에 적합한 안정화제가 첨가될 수 있다. 예를 들어, 제2 액체 상은 (극성) 용매, 예를 들어 20%의 프로판 다이올의 첨가에 의해 안정화할 수 있다. 바람직하게는, 제1 액체 상 및 제2 액체 상 둘 다에 동일한 안정화제가 사용된다.

[0053] 마지막으로, 제1 액체 상 및 제2 액체 상을 조합하여 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 수득한다.

[0054] 임의적으로, 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은, 예를 들어 최대 0.3 μm까지 제1 및 제2 액체 상을 조합한 후 여과될 수 있다.

[0055] 임의적으로, 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은, 예를 들어, 약 60℃까지 1차 및 2차 액체 상을 조합한 후 가열될 수 있다. 이는 아마도 피코에리트린과 같은 색소를 파괴함으로써 추출물의 분홍색을 감소시킬 수 있다.

[0056] 하기 표는 본 발명의 제1 액체 상, 제2 액체 상 및 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 비교한 것이다.

[0057]

	제 1 액체 상	제 2 액체 상	본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물
최종 pH	6.06-6.77	4.84-5.21	5.45-6.10
건조 물질 (%)	0.98-1.51	2.19-2.43	1.63-1.78
플로리도시드 (g/L)	0.87-1.72	0.25-0.74	0.83-0.86
쉬노린 (g/L)	0.13-0.20	0.03-0.07	0.07-0.11
총 중성 당 (g/L)	데이터 없음	데이터 없음	10.42

[0058] 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 그대로 사용할 수도 있거나, 의도된 용도 및 원하는 농도에 따라 희석하거나 농축될 수도 있다.

[0059] 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 적절한 조건, 예를 들어 상온에서 보관될 수 있고, 바람직하게는 빛으로부터 보호될 수 있다.

[0060] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물에 관한 것이다.

[0061] 당업자라면 알 수 있듯이, 본원에 사용된 용어 "로부터 수득가능한"은 추출물이 식물로부터 수득될 수 있거나 식물로부터 단리될 수 있거나, 예를 들어 화학적 합성 또는 효소적 생산에 의해 대체 공급원으로부터 수득될 수 있음을 의미한다. 반면에, 본원에 사용된 용어 "수득된"은 추출물이 식물 공급원으로부터 직접 유래됨을 의미한다.

[0062] 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 여러 가지 유익한 미용 효과(cosmetic effect)가 있는 것으로 밝혀졌고, 이는 시험관내 연구와 임상 연구를 통해 입증되었다(하기 실시예 참조).

[0063] 특히, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 이중 턱을 감소시키고, 지방 분해를 증진하고, 피부 탄성을 증가시키고, 콜라겐 합성을 자극하고, 피부 수분공급하고, 피부 노화의 영향을 감소시키고, 피부 노화의 영향을 예방할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0064] 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 유리하게는 피부에 국소적으로 적용된다.

[0065] 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 및 미용적으로 허용되는 부형제를 포함하는 화장품 조성물을 제공한다. 본 발명의 화장품 조성물은 국소 적용을 목적으로 한다.

[0066] 화장품 조성물에서 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 농도는 원하는 효과가 달성되도록 선택되어야 한다.

[0067] 인간 피부에 사용하기 위한 화장품 제제의 제조에 통상적으로 사용되는 임의의 부형제가 본 발명에 사용될 수 있다. 적합한 부형제는, 비제한적으로, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 관능 특성, 피부 침투 및 생체이용률에 영향을 미칠 수 있는 성분을 포함한다. 더욱 구체적으로, 이는 액체, 예를 들어 물, 오일 또는 계면활성제, 예를 들어 석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 것, 예컨대, 비제한적으로, 땅콩기름, 콩기름, 광유, 참기름, 피마자유, 폴리소르베이트, 소르비탄 에스터, 에터 설페이트, 설페이트, 베타인, 글리코사이드, 말토사이드, 지방 알코올, 노녹시놀, 폴록사머, 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸렌 글리콜, 덱스트로스, 글리세롤, 디지토닌 등을 포함한다.

[0068] 피부로의 국소 적용을 위한 제형은 임의의 물리적 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 화장품 조성물, 특히 피부 관리 조성물(skin care composition)은 리포솜 조성물, 혼합 리포솜, 올레오솜, 니오솜, 에토솜, 밀리입자(milliparticle), 마이크로입자, 나노입자 및 고체 지질 나노입자, 소포(vesicle), 미셀(micelle), 계면활성제들의 혼합 미셀, 계면활성제-인지질 혼합 미셀, 밀리구체(millisphere), 마이크로구체 및 나노구체, 지질구체(liposphere), 밀리캡슐, 마이크로캡슐 및 나노캡슐뿐만 아니라 마이크로에멀젼 및 나노에멀젼(마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 더 많은 침투를 달성하기 위해 첨가될 수 있음)의 형태일 수 있다.

[0069] 화장품 조성물, 특히 피부 관리 조성물은, 국소적으로 또는 경피 적용에 의해 피부에 적용하기에 유용한 임의의 고체, 액체 또는 반고체 형태로 제조될 수 있다. 따라서, 이러한 국소 또는 경피 적용 제제는, 비제한적으로, 크림, 다중 에멀젼, 예컨대, 비제한적으로, 수계 에멀젼(water emulsion) 중의 오일 및/또는 실리콘, 유중수(water-in-oil) 및/또는 실리콘 에멀젼, 수/유/수 또는 수/실리콘/수 유형 에멀젼, 및 유/수/유 또는 실리콘/수/실리콘 유형 에멀젼, 마이크로-에멀젼, 에멀젼 및/또는 용액, 액정, 무수 조성물, 수성 분산액, 오일, 우유, 발삼, 포말(foam), 수성 또는 유성 로션, 수성 또는 유성 젤, 크림, 하이드로-알코올성(alcholic) 용액, 하이드로-글리콜성(hydro-glycolic) 용액, 하이드로겔, 도찰제(liniment), 세라(sera), 비누, 안면 마스크, 세럼, 다당류 필름, 연고, 무스, 포마드, 페이스트, 분말, 바, 펜슬 및 스프레이 또는 에어로졸(스프레이)(방치형 및 세척형 제형 포함)을 포함한다.

[0070] 따라서, 본 발명은 또한 피부 관리 조성물을 제공한다.

[0071] 본 발명의 화장품 조성물은 임의적으로 다른 화장품 활성제, 예를 들어 노화방지제(anti-ageing), 보습제(moisturizing) 또는 수분공급제(hydrating agent)를 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 한 실시양태에서, 본 발명의 화장품 조성물은 WO 2020/201185에 기술된 바와 같이, 만노스-6-포스페이트 및 만노스의 혼합물을 포함하는 노화방지제를 추가로 포함한다. 화장품 활성제 및 이의 실시양태 및 용도에 관한 WO 2020/201185의 개시내용은 본원에 참조로 혼입된다.

[0073] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 특히 본 발명에 따른 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 또는 본 발명에 따른 화장품 조성물을 이중 턱에 국소적으로 적용하는 단계를 포함하는, 이중 턱을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0074] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의 이중 턱을 감소시키기 위한 용도에 관한 것이다.

[0075] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의 지방 분해를 증진하기 위한 용도에 관한 것이다.

[0076] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의

피부 탄성을 증가시키기 위한 용도에 관한 것이다.

[0077] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의 콜라겐 합성을 자극하기 위한 용도에 관한 것이다.

[0078] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의 피부 수분공급을 위한 용도에 관한 것이다.

[0079] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의 피부 노화의 영향을 감소시키기 위한 용도에 관한 것이다.

[0080] 다른 양상에서, 본 발명은 또한 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 또는 본 발명의 화장품 조성물의 피부 노화의 영향을 예방하기 위한 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1에 AFM 측정에 의해 수득된 진피의 힘-부피(Force-volume)를 도시한다.

도 2는 그림에서 분석한 두 차원에서 콜라겐 섬유의 배향의 분포를 도시한다.

도 3은 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림을 적용하는 자원자 중 한 명의 AEVA HE® 측정에 대한 실례 사진을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 더욱 자세히 설명된다:

[0083] 실시예 1: 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물

[0084] 물 중 마스토카르푸스 스텔라투스의 건조 물질 4.8%의 현탁액을 제조하였다(20 g의 건조된 조류 + 396.67 g의 삼투수(osmosed water)). 조류 물질을 먼저 가위로 길이 9 mm의 작은 조각으로 자른 후, 실온(22℃)에서 15분 동안 교반하면서 침연하였다. 바이오매스(= 제1 고체 상)와 상청액(= 제1 액체 상)을 여과(Whatman 필터, 40 μm)에 의해 분리하였다. 1,3-프로판다이올을 총량의 20% 농도로 상청액에 첨가하여 추출물 1을 수득하였다. 이어서, 추출물 2를 제조하면서, 실온에서 보관하고, 약 3 내지 4시간 동안 빛으로부터 보호하였다.

[0085] 이전 추출물의 불용성 부분(= 제1 고체 상)을 다시 삼투수 중 4.8%의 건조 물질로 현탁하였다. 이어서, 현탁액을 교반하고, 96% 황산 용액으로 pH=2로 산성화시킨 후, 80℃까지 가열하였다. 산 가수분해는 80℃에서 2시간 동안 지속되었다. 2시간 후, 현탁액을 냉각하고, 10 M 수산화나트륨 용액으로 pH=5로 중화시켰다. 추출물을 원심분리하고(4,500 rpm, 20℃, 20분), 상청액을 고체로부터 분리하고, 1,3-프로판다이올을 상청액(= 제2 액체 상)에 총량의 20% 농도로 첨가하여 추출물 2를 수득하였다.

[0086] 마지막으로, 두 추출물 1 및 2를 조합하고, 교반하고, 60℃에 도달할 때까지 가열하였다. 30분 동안 가열한 후, 혼합물을 즉시 2.5 μm 및 0.3 μm에서 연속적으로 여과하여 본 발명에 따른 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 수득하였다.

[0087] 이렇게 수득된 추출물은 약 5.45의 pH, 약 1.63%의 건조 질량 함량, 약 2.1의 가드너 색상(Gardner color), 및 약 0.86 g/L의 플로리도사이드 함량을 가졌다.

[0088] 실시예 2: 인간 섬유아세포에 대한 전사체 분석

[0089] 정상 인간 피부 섬유아세포(NHDF)를 6-웰 플레이트에 웰 당 300,000개의 세포로 시딩(seeding)하였다. 10% FCS가 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium에서 48시간 배양한 후, NHDF를 포스페이트 완충된 식염수(PBS)로 2회 헹군 후, 자극하기 전에 FCS-부재 배지에서 하룻밤 동안 방치하였다. 세포는 0.5% 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 자극하고, 비처리된 조건과 비교하였다. 6시간 및 18시간의 자극 후, Extract-all 방법(문헌[Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harb Protoc. 2010 Jun; 2010(6):pdb.prot5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439. PMID: 20516177.])에 의해 전체 RNA를 추출하였다. RNA 품질을 제어하고, 역전사를 수행하여 cDNA를 수득하였다. RT-qPCR은 웰 당 10 ng의 cDNA를 사용하여 NHDF의 피부 탄성에 관여하는 상이한 유전자의 전사체 발현을 연구하도록 설계된 특정 플레이트 상에서 수행하였다. 섬유아세포로 수득된 유전자 발현의 결과는 PES1(Pescadillo Ribosomal Biogenesis Factor 1), GADD45A(Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha) 및 HMBS(hydroxymethylbilane synthase) 하우스키핑

(housekeeping) 유전자에 따라 정규화되었다. 데이터는 비처리되 상태에 대한 배수 변화(fold change)로 표현된다.

[0090] *결과*

[0091] 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 피부 탄성을 향상시킬 수 있는지 탐구하기 위하여, 0.5%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 처리된 섬유아세포에 대해 전사체 연구를 실시하였고, 피부 탄성에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 분석하였다.

[0092] 6시간 처리 후, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 탄성 섬유 조직화(elastic fibers organization)에 관여하는 유전자인 FBLN5, LOXL1 및 MFAP2의 발현을 각각 +34%, +32% 및 +10%만큼 유의하게 증가시켰다. 또한, 탄성 섬유 분해(elastic fibers degradation)에 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자인 HPSE의 발현을 -53%만큼 감소시켰다.

[0093] 흥미롭게도, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 18시간 처리한 후에, FBLN5 및 MFAP2의 발현은 여전히 각각 +24% 및 +24%만큼 유의미하게 증가되었고, HPSE의 발현은 -40%만큼 감소되었다.

[0094] 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 또한 세포외 매트릭스 구조에 관여하는 유전자, 예컨대 COL3A1 및 CD44의 발현을 각각 +33% 및 +58%만큼 자극하였다. 결과는 하기 표에 요약되어 있다.

[0095]

	피부 탄성의 향상 - 전사체 연구 (배수 변화 vs 비처리된 조건)					
시간	경로	유전자	배수 변화	SEM	P 값	
6 h	탄성 섬유 조직화	FBLN5	1.344	0.01	0.0001	***
		LOXL1	1.318	0.03	0.0014	**
		MFAP2	1.103	0.03	0.0412	*
	분해	HPSE	-1.534	0.06	0.0183	*
18 h	탄성 섬유 조직화	FBLN5	1.243	0.08	0.088	#
		MFAP2	1.244	0.03	0.008	**
		MFAP5	1.063	0.02	0.081	#
	세포외 매트릭스	COL3A1	1.327	0.1	0.073	#
		CD44	1.579	0.21	0.098	#
	분해	HPSE	-1.401	0.06	0.0267	*

[0096] 이러한 전사체 연구는 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 피부 탄성을 향상시키는 데 유망한 후보임을 확인시킨다.

[0097] 실시예 3: 인간 피부 외식편(explant)에 대한 프로테옴 분석

[0098] 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 피부 탄성에 미치는 영향을 프로테옴 수준에서 더욱 자세히 평가하였다.

[0099] *샘플 준비*

[0100] 젊은 기증자(28세)와 성숙한 기증자(59세)의 피부 외식편은 공기-액체 계면에서 생존을 유지하였다. 젊은 기증자의 피부 외식편은 처리하지 않은 채로 둔 반면에, 성숙한 기증자의 피부 외식편은 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 국소 처리하여 비처리된 조건과 비교하였다. 처리 및 배지(Biopredic International의 MIL217C)는 5일 동안 매일 새로 교체하였다. 5일의 자극 후, 피부 외식편을 PBS로 2회 헹군 후, -80℃에서 동결하였다.

[0101] *샘플 처리*

[0102] 전단된 조직(sheared tissue)을 지르코니아 산화물 비드 믹스(bead mix)에 첨가하고, 700 µL의 iST LYSE 완충제(데옥시콜레이트, TCEP 및 클로로아세트아미드)를 첨가하였다. 샘플은 비드 비팅 사이클(bead beating cycle)을 2회 반복하여 용해하였다. 균질물을 Diagenode 단백질 추출 튜브로 옮기고, 공동-추출된 핵산과 세포소기관(organelle)을 마이크로 캐비테이션(micro cavitation)(Bioruptor Pico, Diagenode)으로 전단하였다. 단백질은 iST LYSE 완충제(데옥시콜레이트, TCEP 및 클로로아세트아미드)에서 비등시킴으로써 용해, 환원 및 알킬화되었다. 단백질 농도는 BCA 방법(문헌[Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. Methods Mol Biol. 1994;32:5-8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5. PMID: 7951748.])에 의해 측정하였다. 펩티드 추출물은 iST 방법(Stage Tips)에 따라 제조하였다. 50 µg의 단백질을 LysC 및 트립신의 믹스로 소화하였다. 펩티드는 혼합된 모드 역상 양이온 교환기 SPE(Solid Phase Extraction; PreOmics GmbH)에

의해 정제하고, 건조하고, 3% 아세토니트릴 - 0.1% 포름산 수용액 100 μL에 용해시켰다. 펩티드 농도는 BCA 방법을 사용하여 측정하였다.

[0103] *LC-MS/MS*

[0104] 각각의 샘플에 300 ng의 펩티드를 3회 주입하였다. 프리컬럼(precolumn)에서의 3분 트래핑 단계 후에 120분에 걸쳐 300 nL/분의 유량으로 2.5% → 35% 아세토니트릴의 구배를 적용하여 C18(75 μm x 50 cm, 2 μm 물질) 컬럼을 사용하는 Ultimate 3000(Di-onex) 장비를 사용하여 크로마토그래피를 수행하였다. 데이터는 Q-Exactive(Thermo) 질량 분석기를 사용하여 수집하였다. MS 스캔은 70,000의 해상도 및 60 ms의 축적 시간으로 수행하였다. MS/MS 스캔은 각각의 사이클의 가장 강한 이온 10개에 대해 17,500의 해상도 및 60 ms의 해상도로 수행하였다. 6,545 사이클을 수행하였고, 이에 따라 크로마토그래피 피크 당 평균 17 사이클이었다.

[0105] *단백질 식별*

[0106] 단백질은 SEQUEST-HT 알고리즘(문헌[Tabb DL. The SEQUEST family tree. J Am Soc Mass Spectrom. 2015;26(11):1814-1819. doi:10.1007/s13361-015-1201-3])을 사용하여 UNIPROT에서 채굴한 인간 기준 프로테옴과 소화에 사용된 효소를 수집한 데이터베이스에 대해 식별하였다. 검색 매개변수는 다음과 같다: 효소 = 트립신(전체); 허용된 오분할(allowed miscleavage) = 2; 전구체 허용 오차(precursor error tolerance) = 10 ppm; 단편 허용 오차 = 0.02 Da; 동적 수정(dynamic modification) = 산화(M), 탈아미드화(N/Q); 단백질 말단 수정 = 아세틸화; 정적 수정 = 카브아미도메틸(C).

[0107] 허위 발견율(False Discovery Rate: FDR) 결정은 Percolator 알고리즘(문헌[Spivak M, Weston J, Bottou L, Kall L, Noble WS. Improvements to the percolator algorithm for Peptide identification from shotgun proteomics data sets. J Proteome Res. 2009 Jul; 8(7):3737-45. doi: 10.1021/pr801109k. PMID: 19385687; PMCID: PMC2710313.])을 사용하여 수행되었다.

[0108] 식별되지 않은 것으로 간주된, SEQUEST-HT에 의해 신뢰도(confidence)가 높지 않은 것으로 보고된 모든 스펙트럼은 MS Amanda 2.0 알고리즘에 의해 상기한 바와 동일한 데이터베이스에 대해 재처리(reprocessing)되었다. 검색 매개변수는 다음과 같다: 효소 = 트립신(전체); 허용된 오분할 = 2; 전구체 허용 오차 = 10 ppm; 단편 허용 오차 = 0.02 Da; 동적 수정 = 산화(M)(P), 탈아미드화(N/Q); 단백질 말단 수정 = 아세틸화, Met-Loss, Met-Loss + 아세틸; 정적 수정 = 카브아미도메틸(C). 허위 발견율(FDR) 결정은 Percolator 알고리즘을 사용하여 수행되었다.

[0109] *단백질 정량화*

[0110] 데이터는 Minora, 및 Proteome Discoverer 2.3 소프트웨어(Thermo Fisher Scientific)를 위한 특징 매퍼(feature mapper)를 사용하여 처리되었다. 피크 통합 매개변수는 다음과 같다: 획득 후 재교정(Post acquisition recalibration) = True(파인 매개변수(fine parameter)); 최소 추적 길이 = 5; 최소 동위원소 수 = 2; 동위원소에 대한 최대 Delta RT = 0.2분; 통합을 위한 PSM(Peptide-Spectrum match: 펩티드-스펙트럼 매치) 신뢰 수준 = 높음.

[0111] 크로마토그래피 정렬 매개변수는 다음과 같다: RT 정렬 = TRUE; 매개변수 튜닝(tuning) = fine; 최대 RT 이동 = 5분; 질량 허용 오차 10 ppm. 특징 매핑 매개변수는 다음과 같다: RT 허용 오차(tolerance) = 자동; 질량 허용 오차 = 자동; S/N 임계값(threshold) = 2.

[0112] 통계 분석은 Proteome Discoverer 2.4 소프트웨어(Thermo Fisher Scientific)를 위한 Precursors Ions 수량자 노드(quantifier node)를 사용하여 수행되었다.

[0113] 일반 정량 설정은 다음과 같다: 사용할 펩티드 = Unique + RAZOR(Unique = 상이한 단백질 또는 단백질 군에 의해 공유되지 않는 펩티드; RAZOR = 다수의 단백질 군에 의해 공유되지만 가장 큰 수의 고유(Unique) 펩티드와 가장 긴 아미노산 서열을 갖는 단백질을 정량화하는 데 사용되는 펩티드); 펩티드 고유성(Peptide Uniqueness)에 대한 단백질 군 고려 = True; 누락된 채널(Missing Channels)이 있는 정량 결과 거부(Reject Quan Results) = False. 전구체 정량 설정은 다음과 같다: 면적 기반 전구체 풍부도(Precursor Abundance Based on Area); 최소 복제 특징 수(Min number Replicate feature) = 50%(펩티드는 정량에 사용될 하나의 군의 샘플의 적어도 50%에서 검출되어야 함). 정규화 설정: 총 펩티드 양(식별된 모든 펩티드에 대한 각각의 주입에 대한 풍부도 값의 총 합계를 계산하고, 가장 높은 총 풍부도를 갖는 주입은 주입 당 일정한 인자에 의해 다른 모든 주입에서의 풍부도 값을 정정하는 기준으로서 사용되므로, 결국 총 풍부도는 모든 주입에 대해 동일해짐).

[0114] *데이터 선택*

[0115] 제1 선택은 노화에 의해 유의하게 영향을 받는 단백질(성숙한 기증자 대 젊은 기증자)만을 선택함으로써 수행되었고, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물(처리된 성숙한 기증자 대 비처리된 성숙한 기증자)에 의해 역전되었다. 이러한 단백질의 선택에서, 피부 진피 구조와 탄성에 관여하는 단백질이 확인되었다: 5개의 단백질이 강조되었다.

[0116] *결과*

[0117] 첫 번째로, 프로테옴에 대한 피부 노화의 영향을 젊은 기증자(28세)와 성숙한 기증자(59세)를 비교함으로써 평가하였다. MFAP4, TIMP1 및 FBLN5와 같은 탄성 섬유 조직화에 관여하는 단백질(각각 -10%, -60% 및 -76%)과 COL1A1 및 COL2A1과 같은 진피의 다른 구조 단백질(각각 -75%)의 발현에서 유의한 감소가 밝혀졌다. 이를 통해 진피 구조에 대한 피부 노화의 부정적 영향을 확인하였다.

[0118] 젊은 기증자와 비교한 결과가 하기 표에 요약된다:

[0119]

노화의 충격 - 프로테오믹 연구 (배수 변화 vs 젊은 기증자)				
경로	유전자	배수 변화	P 값	
탄성 섬유 조직화	MFAP4	-1.098	<0.0001	***
	FBLN5	-1.756	<0.0001	***
진피 구조 및 보호	TIMP1	-1.596	<0.0001	***
	COL1A1	-1.747	<0.0001	***
	COL2A1	-1.748	<0.0001	***

[0120] 두 번째로, 노화에 의해 진피 구조가 변경된 성숙한 기증자에 대한 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 효과를 연구하였다. 젊은 기증자에 비해 감소되었던 상기 5개의 단백질의 발현이 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 5일 동안 처리한 후에 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 실제로, 탄성 섬유 조직화와 관련하여, MFAP4, TIMP1 및 FBLN5의 발현은 각각 +64%, +23% 및 +95%만큼 증가하였다. 동일한 방식으로, COL1A1 및 COL2A1의 발현은 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물에 의해 각각 +17% 및 +14%만큼 증가하였다.

[0121] 성숙한 기증자와 비교한 결과는 하기 표에 요약된다:

[0122]

피부 탄력의 향상 - 프로테오믹 연구 (배수 변화 vs 성숙한 기증자)				
경로	유전자	배수 변화	P 값	
탄성 섬유 조직화	MFAP4	1.641	<0.0001	***
	FBLN5	1.953	<0.0001	***
진피 구조 및 보호	TIMP1	1.229	<0.0001	***
	COL1A1	1.168	<0.0001	***
	COL2A1	1.141	<0.0001	***

[0123] 이러한 결과는 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 진피 구조와 탄성 섬유 조직화에 유익하다는 것을 단백질 수준에서 확인시킨다.

[0124] 실시예 4: 피부 생체역학적 특성 분석

[0125] *샘플 준비*

[0126] 젊은 기증자(19세)와 성숙한 기증자(49세)의 피부 외식편은 공기-액체 계면에서 생존을 유지하였다. 젊은 기증자의 피부 외식편은 처리하지 않은 채로 두었고, 성숙한 기증자의 피부 외식편은 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 국소 처리하여 비처리된 조건과 비교하였다. 처리와 배지는 3일 동안 매일 새로 교체하였다. 이러한 3일의 자극 후, 피부 외식편은 PBS로 2회 헹군 후, OCT™ 화합물 마운팅 배지(compound Mounting medium)에 저온보전하고(cryopreserved), 20 μm 두께로 동결절편(cryosection)하였다.

[0127] *원자력 현미경(AFM)에 의한 영률(Young modulus) 분석*

[0128] 본 연구에 사용된 원자력 현미경은 표면형광 현미경(Leica DMi8)이 추가된 Bioscope Resolve(Broker)이다. 이러한 구성을 사용하면 샘플 상에 AFM 프로브를 정확하게 배치할 수 있다. 이러한 독특한 조합을 통해 기계적 획득에서 형광 획득에 이르기까지 상관 관계 이미지를 획득할 수도 있다.

[0129] 본 연구에서는 QNM(Quantitative Nanomechanical Mapping) Peakforce® 모드를 사용하였다. AFM 프로브는 0.4 N/m의 이론적 스프링 상수와 10 nm 미만의 곡률 반경을 갖는다. 매번 사용하기 전에, 사파이어 상에서 프로브 편향 감도(deflexion sensitivity)를 측정하였고, 이의 스프링 상수도 열 노이즈 방법(thermal noise method)에 의해 교정하였다(문헌[Kim Y, Mandriota N, Goodnight D, Sahin O. Calibration of T-shaped atomic force microscope cantilevers using the thermal noise method. Rev Sci Instrum. 2020 Aug 1; 91 (8):083703. doi: 10.1063/5.0013091. PMID: 32872926; PMCID: PMC7413748.]). 힘 측정은 공기 중에서 수행하였다(PBS 1X, 배치 번호: CP20-3404).

[0130] AFM 측정은 도 1에 도시된 바와 같이 진피의 힘-부피를 얻는 것으로 이루어진다. 힘-압입(indentation) 곡선은 이미지의 각 픽셀에 해당하고, 이로부터 탄성 계수(elastic modulus, Ea)가 추출된다. 일부 비정상적인 데이터가 소프트웨어에 의해 억제되므로, 영역 간에 값의 수가 상이할 수 있다.

[0131] *이중광자(bi-photonic) 현미경에 의한 콜라겐 섬유 조직화 분석*

[0132] SHG(Second Harmonic Generation) 이미징에는 ZEISS LSM880 역상 공초점 현미경(inverted confocal microscope)을 사용하였다. 사용된 레이저는 Coherent biphoton pulsed Cameleon 레이저였다. 대물렌즈는 "C-Apochromat" water x40 대물렌즈였다. 콜라겐을 이미징하기 위해, 샘플을 900 nm 파장에서 여기시키고, 445 nm에서 필터로 빛을 수집하였다. 조건 당 600 µm x 600 µm 크기의 3개의 큰 이미지를 만들었다.

[0133] 데이터 분석은 이미지 J, 및 이미지 당 50 x 50 µm 크기의 3개의 표면에 대한 평균 회색 값의 분석을 사용하여 수행하였다.

[0134] 콜라겐 섬유 배향에 대한 연구는 이미지 당 50 x 50 µm 크기의 3개 영역에 대해 Rozeta 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0135] *결과: 피부 탄성의 회복*

[0136] 탄성 계수의 측정은 표피와 진피 둘 다에 대한 피부 노화의 영향을 입증하였다. 실제로, 49세 기증자의 탄성 계수가 19세 기증자에 비해 유의하고 강하게 증가하였다. 이는 AFM 프로브가 젊은 피부에 비해 성숙한 피부를 변형하는 데 더 큰 힘을 필요로 하고, 이는 노화로 인해 피부 유연성(skin suppleness)이 손실되었음을 의미한다.

[0137] 그러나, 성숙한 피부 표면 상의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 적용은 표피와 진피의 탄성 계수를 유의하게 감소시켜 피부 유연성이 향상되었음을 입증하였다. 결과는 하기 표에 요약된다:

[0138]

피부 유연성 (탄성 계수, kPa)			
	젊은 피부	성숙한 피부	성숙한 피부 + 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 (1%)
평균	2.529	24.509	3.037
SEM	0.887	4.234	0.913
P 값 vs 젊은 피부		<0.0001***	
P 값 vs 성숙한 피부	0.05*		<0.0001***

[0139] *결과: 진피 스캐폴드(dermis scaffold)의 회복*

[0140] 피부의 유연성/경직성(rigidity) 특성은 주로 진피 스캐폴드 조직화에 의해 유도된다. 탄성 계수가 노화에 의해 어떻게 영향을 받는지 이해하기 위해, 진피의 콜라겐 섬유의 조직화를 연구하였다.

[0141] 젊은 기증자의 콜라겐 섬유는 2D 조직화를 나타내는 것으로 밝혀졌는 데, 이는 섬유가 적어도 두 방향으로 배향되어 스캐폴드를 구성한다는 것을 의미한다. 반면에, 성숙한 기증자의 진피 섬유는 더욱 등방성인 조직화를 나타내고, 이는 섬유가 주로 한 방향으로 배향되어 진피 스캐폴드가 손실되었음을 나타낸다. 나이가 들면서 콜라겐 섬유 배향이 변하여 스캐폴드가 손실되는 것은 피부 유연성의 손실과 직접적으로 관련이 있을 수 있다.

[0142] 흥미롭게도, 성숙한 기증자 피부 외식편 상의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 국소 적용은 2D 조직화에서 콜라겐 섬유의 재배향을 야기한다. 이러한 2D 조직화는 진피 스캐폴드의 재조직화를 선호하고, 이는 AFM에 의해 제시된 피부 생체역학적 특성의 향상을 설명할 수 있다. 도 2는 그림에서 분석한 두 차원에서 콜라겐 섬유의 배향의 분포를 도시한다. 각각의 방향에서, 막대가 길수록, 섬유가 해당 방향으로 더 많이 배향된다.

[0143] 실시예 5: 지방 분해 활성

[0144] 이중 턱 형성에 관여하는 다른 인자는 턱에 지방 조직이 축적되는 것이다. 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 지방 조직 함량을 감소시킴으로써 이중 턱 부피를 감소시킬 수 있는지 확인하기 위해, 성숙한 지방 세포를 3D 매트릭스에 매립하였다.

[0145] *인간 성숙 지방 세포의 3D 배양*

[0146] 성숙한 지방 세포는 신체 질량 지수(BMI)가 28.7 kg/m^2인 30세 여성의 피하 지방 조직으로부터 수득되었고, 정보 제공에 대한 동의 하에 조직을 제공하였다. 성숙한 지방 세포는 콜라겐 분해효소에 의한 소화 후 피하 지방 조직으로부터 단리하였다. 단리된 지방 세포는 세척 완충제로 세척하고, 펩티드 하이드로젤에 캡슐화하여 크기가 25 μL인 3D 지방 세포 캡슐을 형성하였다. 지방 세포 캡슐의 형성은 캡슐 사이에 거의 같은 수의 지방 세포가 있도록 내부 표준화된 프로토콜을 따랐다. 이어서, 세포를 안정화하기 위해 37℃에서 24시간 동안 항온처리하였다. 0.5%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물로 처리한 것은 배지를 바꾸면서 D0에서 시작하였고, 배양 배지는 배양 4일이 될 때까지 매일 교체하였다. 각각의 배양 배지 교체 시, 세포 분비물을 수집하여 원심분리하고 추가 분석을 위해 -80℃에서 동결하였다. 각각의 배양 조건은 3회 반복하였다.

[0147] *글리세롤 및 아디포넥틴의 세포외 분비물 정량화*

[0148] 72시간의 처리 후, 배양 배지를 수집하였다. 아디포넥틴 및 글리세롤의 농도는 제조업체의 권장 사항에 따라 특정 키트(아디포넥틴 키트, Duoset, DY1065, R&D Systems; 글리세롤 키트, Randox, GY105)를 사용하여 각각 ELISA와 비색 검정(colorimetric assay)으로 평가하였다.

[0149] *결과: 글리세롤 방출*

[0150] 지방 세포에 의해 방출된 글리세롤의 평가는 72시간의 처리 후 지방 세포 배양 배지에서 수행되었다. 1 μM의 이소프로테레놀(양성 대조군)은 지방 세포에 대한 지방 분해 효과를 통해 글리세롤 방출을 +196%만큼 증가시켜 이러한 모델을 검증하였다. 0.5%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물도 유의한 효과가 있었고, 72시간의 처리 후 글리세롤 방출이 +36% 증가하여, 지방 분해 활성을 입증하였다.

[0151] 결과는 하기 표에 요약된다:

[0152]

글리세롤 방출 (비처리의 %)			
	비처리	이소프로테레놀	마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 (0.5%)
평균	100%	295.6	135.7
SEM	9.673	17.51	4.983
P 값 vs 비처리		0.05 *	0.05 *

[0153] *결과: 아디포넥틴 분비*

[0154] 아디포넥틴은 성숙한 지방 세포에서 분비되는 다른 인자이다. 0.5%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물은 72시간의 처리 후 아디포넥틴 분비를 +48%만큼 유의하게 증가시켜 지방 조직에 대한 용해 활성을 확인하였다.

[0155] 결과는 하기 표에 요약된다:

[0156]

아디포넥틴 분비 (비처리의 %)		
	비처리	마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 (0.5%)
평균	100%	147.5
SEM	5.533	9.248
P 값 vs 비처리		0.05 *

[0157] 실시예 6: 임상 연구 - 피부 생체역학적 특성, 이중 턱 감소 및 V-형(shape)의 향상

[0158] *제형*

[0159] 하기 설명된 제1 임상 연구 세트의 경우, 하기 INCI 포뮬라(formula)를 갖는 화장품 제형이 사용되었다.

[0160] 아쿠아/물, 세틸 알코올, 글리세릴 스테아레이트, PEG-75 스테아레이트, 세테스-20, 스테아레스-20, 이소데실 네오펜타노에이트, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물, 글리세린, 페녹시에탄올, 다이메티콘, 페녹시에탄올, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 에틸 파라벤, 향료

[0161] 플라시보 조성물에서, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 생략되었다.

[0162] 더욱 상세하게는 다음과 같다:

[0163]

INCI	활성	플라시보
아쿠아/물	88.30	87.30
세틸 알코올,글리세릴 스테아레이트, PEG-75 스테아레이트, 세테스-20, 스테아레스-20	5	5
이소데실 네오펜타노에이트	4.5	4.5
마스토카르푸스 스텔라투스 추출물	1	--
글리세린	1	1
페녹시에탄올	0.695	0.695
다이메티콘	0.3	0.3
페녹시에탄올, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 에틸 파라벤	0.105	0.105
향료	0.1	0.1

[0164] *패널 설명*

[0165] 건조한 피부(각질 측정 < 70 a.u)를 갖는 44명의 자원자와 눈가 주름(crow's feet)과 턱끝 하수(chin ptosis)에 주름이 있는 단일 센터 연구(single-center study)가 수행되었다. 자원자들은 각각 22명의 자원자로 이루어진 두 그룹으로 다음과 같이 나뉘었다.

[0166] - 그룹 1: 49±6세의 평균 연령을 갖는 22명의 여성, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림 테스트

[0167] - 그룹 2: 49±5세의 평균 연령을 갖는 22명의 여성, 플라시보 크림 테스트

[0168] 본 연구는 Bio EC의 표준 운영 절차에 따라 수행되었고, "Guia para investigaciones con seres humanos"(Guidelines for Research on Human Beings: 인간 연구 지침)에 명시된 규정과 소비자 안전 과학 위원회(Scientific Committee on Consumer Safety: SCCS)의 지침을 준수하였다.

[0169] 자원자들은 28일 동안 매일 아침과 저녁에 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림과 플라시보 크림을 각각 적용하였다.

[0170] 본 연구 중에, Cutometery® 분석을 사용하여 하기 설명된 대로 AEVA HE®에 의한 프린지 보호(fringe protection)에 의해 생체역학적 특성을 분석하였다.

[0171] *Cutometer®에 의한 피부 생체역학적 특성 측정*

[0172] 피부의 기계적 특성을 측정하면 탄성 조직 구조(탄성 섬유, 결합 다발의 곡률, 각질 층(Stratum corneum)의 주름)와 점성을 띠는 조직 구조(간질액, 내부 유착(internal adherence))의 기능적 상태를 평가할 수 있다.

[0173] 연구는 Courage & Khazaka의 Cutometer® MPA 580을 사용하여 수행되었다. 측정 원리는 흡입 방법을 기반으로 한다. 장치에 음압을 생성하고 피부를 프로브의 원통형 개구(직경 2 mm)로 끌어들인다. 프로브 내부에서, 침투 깊이는 광학 측정 시스템에 의해 결정된다. 각각의 흡입 단계(suction phase) 후에 이완 단계(relaxing phase)가 이어진다.

[0174] 하기 프로그램이 본 연구에 사용되었다.

[0175] - 사이클 길이: 4초(흡입: 2초; 이완: 2초)

[0176] - 음압: 450 mbar

[0177] - 챔버 직경: 2 mm

[0178] - 측정 영역: 눈가 주름

[0179] 음압에 의해 흡입되는 피부의 저항과 원래 위치로 돌아가는 능력은 각각의 측정의 끝에 곡선으로 표시되었다. 이러한 곡선으로부터 매개변수를 계산할 수 있다:

[0180] - 흡입 단계 중에, 음압으로 인한 피부의 변형이 먼저 탄성 저항(elastic resistance)을 결정하고, 이어서 점성 성분을 결정하는 데, 이 두 가지를 합치면 피부 견고성(skin firmness)을 나타낸다.

[0181] - 이완 단계 중에, 피부의 즉각적인 회복은 순수한 피부 탄성(sheer cutaneous elasticity)을 결정하는 반면, 피부가 초기 위치로 늦게 회복되는 것은 점탄성 구성요소(visco-elastic component)를 측정한다.

[0182] 연구는 하기 매개변수에 초점을 맞추었다:

[0183] - R0 또는 Uf는 흡입 단계 동안의 피부의 진폭을 나타낸다: 압력이 같을 때, 피부가 유연할수록 진폭이 커진다. 따라서 이러한 매개변수는 점탄성 분배능(viscoelastic dispensability), 즉 피부의 견고성을 평가한다.

[0184] - R5는 순 탄성(Ur/Ue)을 나타낸다: 즉, 이완 영역의 탄성 부분(Ur)을 흡입 영역의 탄성 부분(Ue)으로 나눈 값.

[0185] 이러한 매개변수는 D0 및 D28에서 측정되었다.

[0186] *AEVA HE® 분석: 이중 턱 부피 집중(V-형 리셰이핑(reshaping))*

[0187] 스테레오 이미징 기술과 조합된 특허(US 7,821,649)를 받은 프린지 프로젝션 유닛(fringe projection unit)을 기반으로, AEVA-HE® 시스템은 주름 감소에서 바디 리셰이핑(body reshaping)까지 다양한 측정을 가능하게 한다. 이러한 시스템은 미용(cosmetic), 심미적(aesthetical) 및 피부과(dermatologic) 제품과 치료의 효능을 정량화하도록 설계된다.

[0188] 특히, 얼굴 처짐(face sagging)이나 이중 턱을 평가하는 데 사용할 수 있다.

[0189] *통계 분석*

[0190] 생체내 연구의 경우, 원시 데이터(raw data)가 가우시안 법칙(Gaussian Law)을 따르는지 확인하기 위해 Shapiro Wilk 테스트를 사용하였다. 정규 분포 데이터의 경우, 평균 값은 독립표본(unpaired) 스튜던트(student) t 검정 또는 대응표본(paired) 스튜던트 t 검정을 사용하여 비교하였다. 비정규 분포 데이터의 경우, 대응표본 데이터와 독립표본 데이터에 대해 각각 Wilcoxon(대응표본) 및 Kruskal-Wallis 테스트 및 이어서 Mann-Whitney U(독립표본) 검정을 사용하였다.

[0191] 어떤 통계적 테스트를 사용하더라도, 결과는 다음과 같이 유의한 것으로 간주되었다: # $p<0.1$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 및 *** $p<0.001$.

[0192] 자기 평가(self-assessment) 설문지와 일지(daily log) 결과의 분석과 관련하여, 카이제곱 검정(Chi-square test)(이분형 분석(dichotomous analysis), 연관된 답변의 수를 비교하는 것으로 이루어짐)을 실시하였다.

[0193] *결과: 증가된 피부 견고성 및 탄성*

[0194] 제1 임상 연구에서, 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물™을 함유하는 크림 또는 플라시보 크림을 얼굴에 적용한 후, 피부의 생체역학적 특성을 측정하였다. 피부 특성은 R0 및 R5 매개변수를 측정하여, 28일 동안 적용한 후 Cutometer®를 사용하여 평가하였다.

[0195] *피부 견고성에 대한 효과:*

[0196] 28일 동안 적용한 후, R0 매개변수가 감소한 것으로 관찰되었는 데, 이는 플라시보에 비해 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 견고성이 증가했음을 나타낸다(-7%).

[0197] 또한, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 효과는 플라시보 효과와 유의하게 상이한 것으로 나타났고, 연구 기간 동안 견고성이 최대 7배까지 유의미하게 증가한 것으로 나타났고, 이는 하기 데이터에서 확인할 수 있다:

	견고성 효과 (R0)	1% 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 갖는 크림 (활성 크림)	플라시보 크림	활성제 vs 플라시보
D0	평균 +/- SD (임의 단위)	0.290 ± 0.040	0.278 ± 0.035	
D28	평균 +/- SD (임의 단위)	0.271 ± 0.029	0.275 ± 0.041	
	평균 변동 vs D0	-7%	-1%	
	대응표본 t 검정 vs D0	** p<0.01	ns	
	독립표본 t 검정			# p<0.1

[0198]

[0199] 피부 탄성에 대한 효과:

[0200] 적용 28일 후, D0에 비해 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물에 의해 R5 매개변수가 유의하게 증가한 것으로 관찰되었다. 플라시보의 경우, D0에 비해 약간 증가하였다. 하기 데이터에서 확인할 수 있는 바와 같이, 측정은 또한 플라시보 크림에 비해 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림의 향상된 피부 탄성(+8%)을 나타냈다:

	탄성 (R5)	1% 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 갖는 크림 (활성 크림)	플라시보 크림	활성제 vs 플라시보
D0	평균 +/- SD (임의 단위)	0.348 ± 0.059	0.375 ± 0.044	
D28	평균 +/- SD (임의 단위)	0.374 ± 0.042	0.386 ± 0.042	
	평균 변동 vs D0	+8%	+3%	
	대응표본 t 검정 vs D0	** p<0.01	# p<0.1	
	독립표본 t 검정			# p<0.1

[0201]

[0202] *결과: 이중 턱 부피의 감소*

[0203] AEVA HE®를 사용하여 이중 턱 부피에 대한 효과를 측정하였다.

[0204] 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 활성 크림을 28일 동안 적용한 후, 이중 턱 부피의 확연한 감소가 관찰되었다.

	이중 턱 부피 [mm^3]	1% 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 갖는 크림 (활성 크림)	플라시보 크림	활성제 vs 플라시보
D0	평균 +/- SD (mm^3)	587 ± 643.8	673.7 ± 278.8	
D28	평균 +/- SD (mm^3)	569 ± 647.3	683.0 ± 287.8	
	평균 부피 변화 vs D0	-18 mm^3	+9 mm^3	
	대응표본 t 검정 vs D0	ns	# p<0.1	
	독립표본 t 검정			* p<0.05

[0205]

[0206] 도 3은 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림을 적용하는 자원자 중 한 명의 AEVA HE® 측정에 대한 실례 사진을 도시한다.

[0207] *결과: V-형의 향상*

[0208] 본 연구에서, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림 대 플라시보 크림을 매일 2회 적용한지 56일 후에 SiAscope®로 얼굴 타원의 콜라겐 수준을 측정하였다.

[0209] 28일 및 56일의 적용 후, D0에 비해 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 적용한 경우 각각 +2.4% 및 +4.2%의 평균 콜라겐의 유의한 증가가 관찰되었다. 플라시보의 경우, 56일 후에 D0에 비해 약간의 증가가 관찰되었다. 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 제품과 플라시보를 비교한 결과, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 플라시보보다 28일 후에는 3.4배, 56일 후에는 2.8배 더 콜라겐을 향상시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0210] 데이터는 하기 표에 제시된다:

	콜라겐 수준	1% 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 갖는 크림 (활성 크림)	플라시보 크림	활성제 vs 플라시보
D0	평균 +/- SD (임의 단위)	142.21 ± 9.1	142.63 ± 12.5	
D28	평균 +/- SD (임의 단위)	145.67 ± 10.5	143.68 ± 11.6	
	평균 변동 vs D0	+2.4%	+0.7%	
	대응표본 t 검정 vs D0	**	ns	
	독립표본 t 검정			# p<0.1
D56	평균 +/- SD (임의 단위)	148.18 ± 11.5	144.72 ± 14.6	
	평균 변동 vs D0	+4.2%	+1.5%	
	대응표본 t 검정 vs D0	***	#	
	독립표본 t 검정			* p<0.05

[0211]

[0212] 또한, Line-Field Optical Coherence Tomography(LC OCT®)를 사용하여 D0 및 D56의 얼굴 타원의 수준에서 진피 섬유질 네트워크를 설명하였다. LC-OCT®는, 공초점 현미경의 고해상도를 조합하여 얼굴 사진을 찍어 콜라겐의 효과를 시각화하는 비침습적 피부 이미징 기술이다.

[0213] 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림을 56일의 적용 후, 얼굴의 V-형 상에 긴 콜라겐 섬유의 외관이 명백히 관찰되었다.

[0214] 반면에, 플라시보 크림의 56일의 적용 후에는 긴 콜라겐 섬유가 관찰되지 않았다.

[0215] 또한, 20 g의 질량을 실로 매달고 스트립으로 얼굴의 타원에 부착하여 적용하는 것으로 이루어진 탄성 테스트가 수행되었다. 이러한 테스트는 D0, D28 및 D56에 수행되었다.

[0216] 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 크림의 28일 및 56일 적용 후에 피부가 더 큰 긴장성(tonus) 및 더 큰 견고성을 가짐이 밝혀졌다.

[0217] 플라시보 크림의 경우, 28일 및 56일의 적용 후에 어떠한 효과도 관찰되지 않았다.

[0218] 실시예 7: 임상 연구 - 피부 수분공급

[0219] *제형*

[0220] 하기 설명된 제2 임상 연구 세트에서, 하기 INCI 포뮬라를 갖는 화장품 로션이 사용되었다.

[0221] 아쿠아/물, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물 나트륨 벤조에이트

[0222] 플라시보 로션에서, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물이 제외되었다.

[0223] 더욱 자세하게는, 다음과 같다:

[0224]

INCI	활성제	플라시보
아쿠아/물	98.50	99.50
마스토카르푸스 스텔라투스 추출물	1	/
나트륨 벤조에이트	0.5	0.5

[0225] *패널 설명*

[0226] 수분공급 수준(hydration level)이 50 a.u 미만인 뺨에 건조한 피부를 갖는 40명의 자원자를 대상으로 하는 단일 센터 연구가 수행되었다. 자원자들은 각각 20명의 자원자로 이루어진 두 그룹으로 다음과 같이 나뉘었다:

[0227] - 그룹 1: 47±6세의 평균 연령을 갖는 20명의 자원자, 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 로션 테스트

[0228] - 그룹 2: 48±5세의 평균 연령을 갖는 20명의 자원자, 플라시보 로션 테스트

[0229] 자원자들은 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 로션 또는 플라시보 로션을 56일 동안 2일마다 1회 적용하였다. 라만 분광법을 사용하여 수분공급을 평가하였다.

[0230] *결과*

[0231] 전완의 수분공급 수준을 평가하기 위하여, 2개월 동안 매일 2회 적용한 후, 라만 분광법에 의해 각질 층의 총 물 함량을 %로 측정하였다.

[0232] 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 로션의 56일 적용 후, D0에 비해 각질 층의 총 수분 함량이 +41.9% 유의하게 증가한 것으로 관찰되었다. 플라시보의 경우, 56일 후 D0에 비해 유의한 증가를 나타냈다.

[0233] 비교하면, 1%의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물을 함유하는 로션은 56일 후 플라시보에 비해 피부 수분공급이 +10.3%만큼 향상되었다.

[0234] 데이터는 하기 표에서 확인될 수 있다:

SC TW 중 평균 총 물 함량 (a.u.)	1% 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물			플라시보			독립표본 t 검정 vs 플라시보
	평균 ± SD (임의 단위)	평균 변동 vs D0	대응표본 t 검정 vs D0	평균 ± SD (임의 단위)	평균 변동 vs D0	대응표본 t 검정 vs D0	
D0	29.47 ± 6.35			28.90 ± 9.52			
T24h	32.51 ± 10.48	+10.3%	ns	30.06 ± 10.56	+4.0%	ns	ns
D28	37.21 ± 9.09	+26.7%	**	34.73 ± 7.25	+20.2%	*	ns
D56	41.82 ± 7.12	+41.9%	**	38.04 ± 8.81	+31.6%	**	* p<0.05

[0235]

[0236] 실시예 8: 히알루로니다제 억제 테스트(튜브내)

[0237] 천연 기질의 존재 하에, 히알루론산의 중합체는 히알루로니다제에 의해 용해된다. 효소 억제제의 존재는 가수분해 속도의 감소를 야기한다. 테스트된 추출물의 히알루로니다제 활성에 대한 억제 효과는 용해되지 않은 기질의 양을 측정하여 탁도법(turbidimetric method)으로 결정하였다.

[0238] 상기 검정은 96-웰 마이크로플레이트에서 수행되었다.

[0239] 하기 샘플을 테스트하였다:

샘플:	설명:
추출물 1	본 발명의 단계 (i)에서 수득된 제 1 액체 상
추출물 2	본 발명의 단계 (iii)에서 수득된 제 2 액체 상
본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물	본 발명의 단계 (iv)에서 수득된 제 1 및 제 2 액체 상의 조합

[0240]

[0241] 20 μL의 각각의 샘플을 10 μL의 McIlvaine 완충제(pH 4.6)와 혼합하였다. 20 μL의 히알루로니다제와 20 μL의 히알루론산을 첨가하였다.

[0242] 용매, McIlvaine 완충제(pH 4.6) 및 히알루론산으로 구성된 음성 대조군, 및 히알루로니다제를 추가로 포함하는 양성 대조군도 테스트되었다.

[0243] 또한, 각각의 샘플, 완충제 및 효소를 포함하는 블랭크 샘플을 준비하여 각각의 추출물 샘플에 대해 테스트하였다.

[0244] 샘플은 다양한 농도에서 테스트되었다. 희석된 각각의 샘플은 3회 실행되었다.

[0245] 표준 범위의 이나트륨 크로모글리케이트(DSCG)가 억제제 기준으로서 사용되었다.

[0246] 혼합물을 교반하고, 37℃에서 40분 동안 방치하였다.

[0247] 마지막으로, 모든 웰에 180 μL의 CTAB(세트리모늄 브로마이드)를 첨가하여 가수분해되지 않은 히알루론산 중합체를 침전시켰다.

[0248] 혼합물을 실온에서 20분 동안 항온처리하고, 분광 광도계를 사용하여 600 nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하였다.

[0249] 억제율은 다음과 같이 계산된다:

$$\%\ 억제 = \frac{OD(샘플) - OD(블랭크\ 샘플)}{OD(음성\ 대조군) - OD(양성\ 대조군)} * 100\%$$

[0250]

[0251] 이러한 측정에 기초하여, IC_{50}(즉, 히알루로니다제 활성이 50%만큼 억제된 샘플 농도)이 계산되었다. 결과는 하

기 표에 제시된다.

샘플:	IC_{50}:
추출물 1	10.8 μL/mL
추출물 2	8.4 μL/mL
본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물	4.5 μL/mL

[0252]

[0253] 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물의 IC_{50}은 추출물 1 및 2의 IC_{50}보다 유의하게 낮아서 본 발명의 추출물에서 관찰되는 상승효과를 나타낸다.

[0254] 실시예 9: 항당화 활성 테스트(튜브내)

[0255] 당화는 진피의 중심부(heart)에서 일어날 수 있는 비-효소적 화학 반응이다. 글루코스 분자는 단백질과 반응하여 진피의 무조직화(disorganization)(당화된 단백질)를 야기한다. 당화된 단백질은 제거될 수 없기 때문에 축적된다. 글루코스는 콜라겐과 엘라스틴 섬유 주위에 고정되어 굳어지고 결국 부러진다(피부의 탄성 상실). 이러한 과정은 비가역적이다.

[0256] 항당화 활성 테스트는 96-웰 마이크로플레이트에서 수행되었다.

[0257] 실시예 8에서와 동일한 샘플을 다양한 농도로 다시 테스트하였다. 각각의 희석된 샘플을 3회 실행하였다.

[0258] 나트륨 포스페이트 완충제와 BSA(소 혈청 알부민)를 함유하는 음성 대조군, 및 나트륨 포스페이트 완충제, BSA 및 리보스를 함유하는 양성 대조군도 테스트하였다.

[0259] 마지막으로, 2개의 블랭크 샘플을 준비하여 각각의 추출물 샘플에 대해 테스트하였다:

[0260] - 포스페이트 완충제, BSA 및 추출물을 가짐

[0261] - 포스페이트 완충제, 리보스 및 추출물을 가짐

[0262] 표준 범위의 아미노구아니딘을 억제제 기준으로 사용하였다.

[0263] 40 μL의 각각의 샘플을 50 μL의 BSA 및 10 μL의 리보스와 혼합하였다.

[0264] 혼합물을 교반하고, 37℃에서 17시간 동안 항온처리하였다. 형광(Fl)은 $\lambda_{여기}$ = 340 nm 및 $\lambda_{방출}$ = 420 nm로 결정하였다.

[0265] 항당화 활성은 다음과 같이 계산되었다:

$$\%\ \text{AGE 형성의 억제} = [1 - \frac{\text{Fl(샘플)} - \text{Fl}\left(\text{블랭크 샘플}\left(\text{리보스 또는 BSA}\right)\right)}{\text{Fl}\left(\text{양성 대조군}\right) - \text{Fl}\left(\text{음성 대조군}\right)}] * 100\%$$

[0266]

[0267] 이러한 측정에 기초하여 IC_{50}(즉, AGE 형성이 50%만큼 억제되는 샘플 농도)이 계산되었다. 결과는 하기 표에 제시된다:

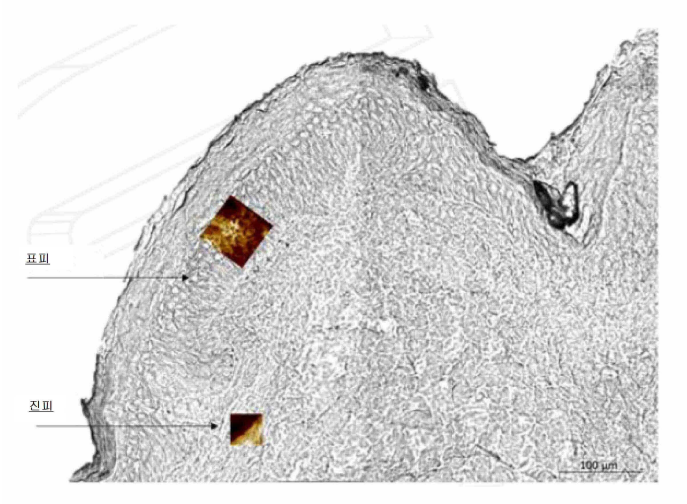
샘플:	IC_{50}:
추출물 1	180.4 μL/mL
추출물 2	177.4 μL/mL
본 발명의 마스토카르푸스 스텔라투스 추출물	39.4 μL/mL

[0268]

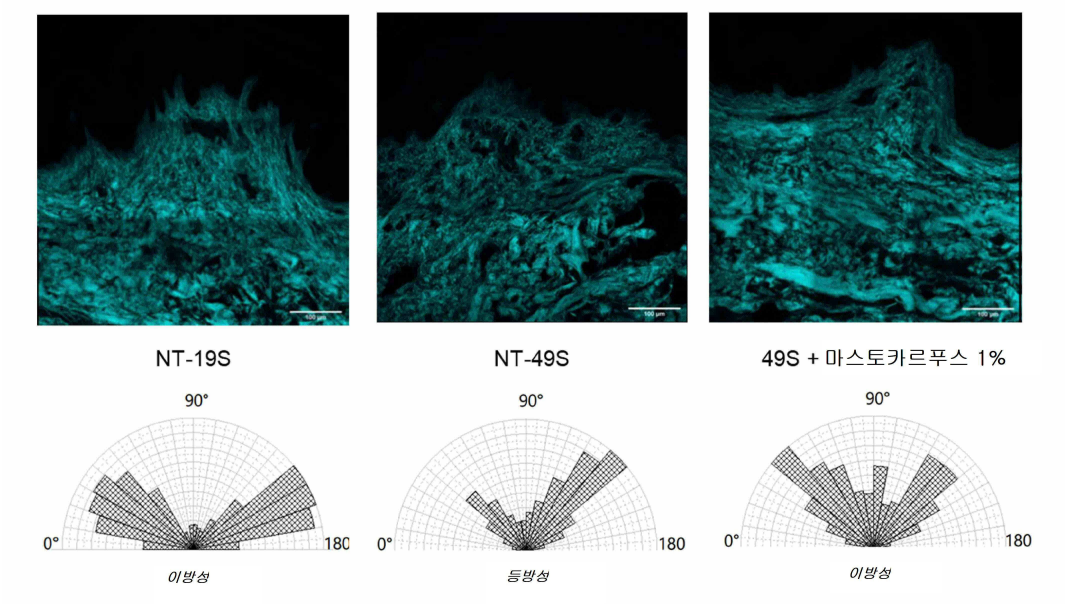
[0269] 상기 결과는 본 발명의 추출물에 대해 관찰된 강력한 상승 효과를 나타낸다.

도면

도면1


표피
진피
100 μm

도면2


NT-19S
NT-49S
49S + 마스토카르푸스 1%
90°
0°
180
이방성
90°
0°
180
등방성
90°
0°
180
이방성

도면3

