



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0008609
(43) 공개일자 2011년01월27일

(51) Int. Cl.

A61K 36/482 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0066030

(22) 출원일자 2009년07월20일

심사청구일자 2009년07월20일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김은기

서울시 양천구 목동 신시가지아파트 1단지
131-506호

신정현

인천 중구 신흥동3가 인하대학병원

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

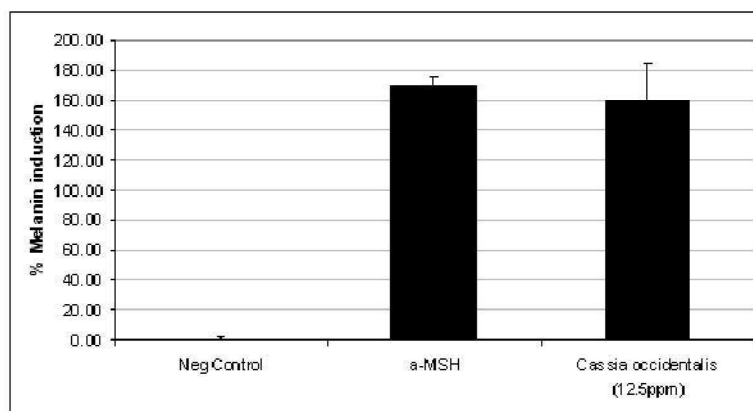
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 석결명 추출물을 유효성분으로 함유하는 백반증 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 백반증(vitiligo) 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 석결명 추출물은 비활성 멜라노블라스트(melanoblast)에서 티로시나아제(tyrosinase) 활성화 및 멜라닌 생성의 유도, 및 표피 조직으로의 세포이동을 촉진시킴으로써 탈색 부위의 색소 재침착을 유도하는 백반증 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라 멜라노블라스트의 분화 및 이동을 촉진하므로 백반증의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

바비타

인천시 남구 용현동 253 인하대 생명화학공학부

라이스 가우델리아

필리핀 바기오시 2600 안드레아스 보니파시오가 세
인트루이스 대학 자연과학대학

카브리안

필리핀 바기오시 2600 안드레아스 보니파시오가 세
인트루이스 대학 자연과학연구단

특허청구의 범위

청구항 1

석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 백반증(vitiligo) 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 석결명 추출물은 물, C₁~C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 C₁~C₄의 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 멜라노블라스트의 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 멜라노블라스트의 이동을 촉진하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 백반증의 치료 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 추출물을 유효 성분으로 함유하는 백반증(vitiligo) 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멜라닌(melanin) 색소는 피부색을 결정하며 자외선을 흡수하여 피부를 보호하는 역할을 한다. 멜라닌 색소는 티로신(tyrosine)이라는 아미노산으로 이루어져 있는데, 티로신은 티로시나아제(tyrosinase)라는 효소에 의해 활성화된다. 티로신은 전환 과정에 따라 피오멜라닌(pheomelanin) 또는 유멜라닌(eumelanin)의 두 종류의 멜라닌으로 합성되는데, 피오멜라닌은 황색에서 적색을 띠며, 유멜라닌은 갈색에서 검은색을 띠는 색소로 주로 동양인에게서 볼 수 있다. 멜라닌 색소를 생성하는 멜라닌 세포(melanocyte)는 멜라노블라스트(melanoblast)에서 유래한다. 멜라노블라스트가 자극을 받아 멜라닌 세포로 분화되면, 티로시나아제가 활성화되어 세포 내 함유되어 있는 티로신을 DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine)로 변화시키고, 이어서 DOPA는 도파옥시다제(dopaoxidase)라는 효소의 작용으로 도파퀴논(dopaquinone)이라는 물질로 변환 후 멜라닌으로 합성된다. 멜라닌 세포는 멜라닌을 만든 후 피부 상층부의 표피 조직까지 이동하여, 표피 조직에 존재하는 각질 형성 세포(keratinocyte)로 멜라닌을 전달한다. 세포 이동 과정에서 멜라닌 색소는 멜라노솜(melanosome)에 저장되어 운

만되는데 생성 초기에는 색이 없다가 점차 상층부로 이동하면서 4-5 단계에 걸쳐 검은 색소로 채워져 마침내 완전한 색소를 띤 성숙한 멜라닌 과립이 된다.

[0003] 백반증은 멜라닌 세포의 사멸이나 피사로 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. 백반증의 임상 양상으로는 다양한 크기의 둥글거나 불규칙한 모양의 흰색 반점이 나타나고, 초기에는 탈색 정도가 뚜렷하지 않으나 시간이 경과하면서 뚜렷해지는 경우가 많으며, 정상피부와 경계가 뚜렷하지 않을 수도 있으나 정상피부색 보다도 진하면서 뚜렷하게 나타날 수 있다. 드문 경우 가려움을 느끼기도 한다. 털이 있는 부위, 특히 머리카락, 눈썹부위에 흰반점이 나타나는 경우는 흰 털이 자라나는 경우도 있다. 백반증은 피부의 어디에나 발병할 수 있으나, 특히 손가락, 발가락, 무릎, 팔꿈치 등의 뼈가 돌출한 부위, 입주위, 코주위, 눈주위, 겨드랑이, 손목 안쪽 등에 자주 발생한다. 그리고 입술이나 성기 등 점막에도 올 수 있으며, 상처를 자주 받는 부위에 특히 잘 발생한다. 백반증의 분포는 좌우 대칭적이거나, 신경에 따른 분포를 보이기도 한다. 백반증은 단순히 피부에 흰 반점이 나타나는 경우 외에 눈의 홍채와 망막의 색소이상을 동반할 수 있으며, 당뇨병, 악성 빈혈, 갑상선 기능 저하 또는 항진, 다운 증후군, 담즙성 간경변, 위암, 아디손병, 원형탈모증, 홍반성 낭창 등의 자가 면역질환과 병발할 수 있다. 백반증이 생기는 원인에 대해서 아직 정확히 밝혀진 바는 없으나, 자가면역설, 스트레스, 바이러스 가설, 신경체액설, 멜라닌 세포 자가 파괴설 등 여러 가지 설이 제시되고 있다. 그 외 고유세포 결손(inherent cellular defect), 유전요인, 세포사멸, 칼슘대사 이상 등의 다양한 인자들이 제시되고 있다.

[0004] 백반증 치료에는 여러 가지 방법이 사용되고 있다. 백반증 환자의 탈색 부위에 메톡살렌(8-methoxypsoralen; 8MOP)과 자외선 조사 치료(ultraviolet A radiation therapy) 방법을 이용하여 종종 성공적인 치료 효과를 확인하였다. 이 치료법에 의해 모낭이 집중된 부위에서 색소 재침착이 천천히 진행되는데, 이는 모낭이 집중된 부위의 모낭 말단에 멜라노블라스트가 존재하기 때문이다. 모발 모낭의 비활성 멜라노블라스트는 백반증에서 색소 재침착을 위한 멜라닌 세포의 소스로서 제공될 수 있을 것이다. 또한, 멜라노블라스트는 멜라닌세포로 분화하는 메커니즘의 특성을 이해하는데 이상적인 모델로 이용될 수 있다.

[0005] 석결명(*Cassia occidentalis*)은 다양한 작물 사이의 잡초로써 아시아와 유럽에서 두루 발견되는 콩과의 식물이다(VM Vashishtha *et al.*, *Indian J Med Res*, 2007, 125(6): 756-762). 석결명은 다양한 목적으로 열대지방에서 민속 약으로 광범위하게 사용되고 있다(RN Chopra *et al.*, 1980, In: Glossary of Indian Medicinal Plant, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, p. 55; JC Chukwujekwu *et al.*, *South African Journal of Botany*, 2006, 72: 295-297). 이 식물 잎의 에탄올 추출물은 간 손상을 유도하는 디오아세타마이드(thioacetamide)와 사염화탄소(carbon tetrachloride)에 대해 항간독성 활성을 지닌 것으로 알려졌다(S Saraf *et al.*, *International Journal of Pharmacognocny*, 1994, 32: 178-183). (석결명의 뿌리와 줄기로부터 분리한 조성물이 항혈소판제 활성과 항염증 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(SC Kuo *et al.*, *Chinese Pharmaceutical Journal*, 1996, 48: 291-302). 이 외에도, 석결명에는 세노사이드(sennoside)(B Christ *et al.*, *Arzneimittelforschung*, 1978, 28: 225-231), 안트라퀴논(anthraquinone)(JC Chukwujekwu *et al.*, 2006), 안트로퀴논 글리코사이드(anthroquinone glycosides)(D Chauhan *et al.*, *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry including Medicinal Chemistry*, 2001, 40: 860-863), 글리코시딕 플라보노이드(glycosidic flavonoids)(T Hatano *et al.*, *Phytochemistry*, 1999, 52: 1379-1383), 플라보노이드 글리코사이드(flavanoid glycosides)(M Singh and J Singh, *Planta Med*, 1985, 51(6): 525-526) 및 갈락토만난(Gallactomannan)(AK Gupta *et al.*, *Indian Journal of Chemistry*, 1995, 34: 169-170) 등의 화학적 성분이 포함되어 있다.

[0006] 본 발명자들은 모낭 말단의 비활성 멜라노블라스트를 백반증 환자의 색소 재침착을 유도하는데 이용할 수 있을 것이라는 점에 착안하여, 비활성 멜라노블라스트를 분화, 증식 및 이동을 촉진시키는 물질을 개발하여 백반증 치료를 위한 효과적인 치료제로 사용하고자 하였다. 이에, 본 발명자는 석결명 추출물이 비활성 멜라노블라스트에서 티로시나아제 활성화, 멜라닌 생성의 유도, 및 표피 조직으로의 세포이동을 촉진시킴으로 백반증 치료에 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 백반증(vitiligo) 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 백반증의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 백반증(vitiligo) 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 백반증의 치료 방법을 제공한다.

효 과

- [0011] 본 발명의 석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라 멜라노블라스트(melanoblast)의 분화 및 이동을 촉진하므로 백반증(vitiligo)의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0013] 본 발명은 석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물을 유효성분으로 하는 백반증(vitiligo) 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 구체적 실시예에서, 본 발명자들은 석결명 추출물을 제조한 다음, 상기 추출물이 마우스 멜라노블라스트(melanoblast) 세포주인 Melb-a에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 발명의 추출물은 멜라노블라스트 세포주에 대하여 세포 독성없이 세포 성장을 증가시키는 것을 확인하였다(도 1 참조). 또한, 본 발명의 추출물이 멜라노블라스트에서 멜라닌 생성을 유도하고(도 2A 및 도 2B 참조), 티로시나아제(tyrosinase) 활성이 나타나는 것을 확인하여(도 3 참조), 멜라노블라스트의 분화를 유도하는 것을 제시하였다. 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 추출물이 멜라노블라스트의 세포 이동을 촉진하는 것을 확인하여(도 4A 및 도 4B 참조), 멜라노블라스트를 표피 조직으로 이동시킬 수 있음을 제시하였다.
- [0015] 상기 석결명은 채취한 것, 양식한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 상기 석결명 추출물을 제조하는 방법은 초임계추출, 아임계추출, 고온추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다. 가온하며 환류 추출 또는 상온에서 추출하는 것이 바람직하나 이에 한정하는 것은 아니다. 아울러 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 또한, 상기 석결명 추출물은 바람직하게는 건조된 석결명을 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 C₁-C₄의 알코올로 추출한 추출물일 수 있고, 가장 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올로 추출한 추출물일 수 있다. 일례로 석결명의 건조물을 적당한 크기로 분쇄하여 추출용기에 넣고 C₁-C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 넣고 용액을 끓이며 환류 추출한 후, 일정시간 방치한 다음 거름종이 등으로 여과하여 알코올 추출물을 얻을 수 있다. 추출 시간은 2 내지 12 시간인 것이 바람직하며, 3~5시간인 것이 가장 바람직하다. 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 거칠 수 있다.

- [0017] 따라서, 본 발명의 석결명 추출물은 멜라노블라스트에서 멜라닌 생성 유도 및 티로시나아제 활성화를 촉진하여 멜라닌 세포로의 분화를 촉진하고, 멜라노블라스트의 세포 이동을 유도하므로, 탈색 부위로 멜라닌 세포를 공급하여 피부를 착색시켜 백반증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 광산란제, 항산화제 및 자외선 차단제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 멜라노블라스트의 분화를 유도한다. 상기 멜라노블라스트의 분화는 멜라노블라스트에서 멜라닌 생성 및 티로시나아제 활성 여부를 측정하여 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 멜라노블라스트의 이동을 촉진한다.
- [0020] 본 발명에 따른 약학적 조성물이 적용될 수 있는 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0021] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으나 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)가 바람직하며, 특히 도포가 더욱 바람직하다.
- [0022] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 국소 투여의 조성물은 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0023] 백반증을 효과적으로 치료하기 위해서는 적합한 외용제형을 선택하는 것이 중요하다. 백반증을 치료하기 위해 석결명 추출물을 적당히 희석하여 피부에 직접 도포할 수도 있으며, 본 발명의 백반증 치료용 약학적 조성물이 환부에 효과적으로 적용될 수 있도록 연고제로 제조할 수 있다. 상기 연고제는 본 발명의 백반증 치료용 약학적 조성물을 무기물질과 배합한 다음, 이를 지용성 기제로 코팅하여 제조한다. 상기 무기물질은 항균성, 소염 효과, 표피재생 효과 등이 우수한 소재를 사용하는 것이 바람직하고, 이들의 구체적인 예로는 산화아연, 탄산아연, 산화철 등이 있다. 또한, 수용성 물질인 본 발명의 백반증 치료용 약학적 조성물을 안전하게 함침 할 수 있는 세라믹 담체를 추가로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 세라믹 담체로는 제올라이트, 활석, 석고, 모려분 및 이들의 혼합물이 바람직하게 사용된다. 이러한 세라믹 담체는 수용성 성분의 함침성이 우수하여 피부에 수용성 성분의 공급을 원활히 할 수 있다.
- [0024] 상기 약학조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형 등으로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 봉해제로는 진분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시 메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크릴린 칼륨 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 진분, 젤라틴화 진분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아

고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 약학적 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 백반증 치료용 약학적 조성물은 상기 석결명 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 백반증의 치료 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 석결명 추출물은 멜라노블라스트의 분화 유도 및 세포 이동 촉진 효과가 있으므로, 백반증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0032] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

[0033] 실시예 1. 석결명 추출물의 제조

[0034] <1-1> 물 추출물

[0035] 필리핀 바기오에서 채취한 석결명의 꼬투리(*Cassia occidentalis pod*)를 그늘에서 건조한 뒤, 적당한 크기로 세절하여 추출용기에 석결명 꼬투리 100 g과 물 600 ml을 가하여 환류 냉각 추출한 다음, 거름종이로 여과하여 추출물을 얻었다. 이후 용매를 감압 농축 및 건조하여 0.1 g의 추출물을 수득하였다.

[0036] <1-2> 메탄올 추출물

[0037] 추출용매로 물 대신 100% 메탄올을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하여 0.2 g의 추출물을 수득하였다.

[0038] <1-3> 에탄올 추출물

[0039] 추출용매로 물 대신 100% 에탄올을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하여 0.15 g의 추출물을 수득하였다.

[0040] <1-4> 에탄올 수용액 추출물

[0041] 추출용매로 물 대신 70% 에탄올 수용액을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 <1-1>의 추출방법과 동일하게 추출하여 0.12 g의 추출물을 수득하였다.

[0042] 실시예 2. 마우스 멜라노블라스트 세포주 배양

[0043] 마우스의 멜라노블라스트 세포주(Mouse melanoblast lines)인 Melb-a를 기능 유전체학 세포주 은행(Functional Genomics Cell Bank, 영국)에서 구입하였다. 상기 세포주는 37℃, 10% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 완전 RPMI1640 배지[RPMI1640배지(Invitrogen, 미국)에 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, 미국), 20 nM PDBu(Phorbol 12,13-dibutyrate; Sigma, 미국), 1 ng/ml bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor; PeproTech, 미국), 5% 우태아혈청(fetal calf serum) 및 2 nM L-글루타민(L-Glutamine) 첨가]로 계대 배양하였다.

[0044] 상기 배양된 세포주를 트립신-EDTA(트립신-ethylenediamine tetraacetic acid; Invitrogen, 미국)를 처리하여 배양 접시에서 떼어낸 후, 혈청이 함유된 배지를 첨가하여 트립신을 불활성화 시킨 다음, 원심분리하여 침전시켰다. 상등액을 제거한 뒤 완전 RPMI1640 배지를 첨가하여 세포를 현탁시켰다. 살아있는 세포를 트리판블루 색소배제법(trypan blue dye exclusion test)으로 염색한 다음 헤모사이토미터를 이용하여 계수한 후, 100 mm 디쉬에 2×10^4 세포/디쉬로 계대 배양하였다.

[0045] 실시예 3. 석결명 추출물의 세포독성 확인

[0046] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 수득한 석결명 추출물이 포유류 멜라노블라스트에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 상기 추출물의 세포 독성 여부를 확인하였다. 구체적으로, Melb-a 세포(4×10^3 세포/웰)를 96 웰 플레이트에 200 μ l씩 넣은 후, 37℃, 10% CO₂ 항온기에서 24시간 전배양시켜 세포를 부착시켰다. 상기 부착된 세포에 12.5 mg/l의 석결명 추출물(실험군), 12.5 mg/l의 α -MSH(양성 대조군, 알파-멜라닌세포 촉진 호르몬; alpha-melanocyte stimulating hormone; Phonix Pharmaceuticals, 미국) 또는 12.5 μ l/l DMSO(음성 대조군; Sigma, 미국)의 시험 시료가 각각 포함된 동일량의 배양액을 첨가한 다음, 4일 동안 이틀마다 배지를 교환해 주며 배양하였다. 96 시간이 지난 후 상기 세포주에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; Sigma, 미국) 시약(5 mg/ml)을 처리하여 540 nm 파장에서 마이크로 플레이트 리더(Biorad, 미국)로 측정하였다. 음성 대조군 처리시 생존율(viability)을 100%로 했을 때, 양성 대조군 및 각 석결명 추출물들의 처리시 생존율을 표 1 및 도 1에 나타내었다.

표 1

	음성 대조군(%)	α -MSH(%)	석결명(%)
물 추출물	100	113.5	103.5
메탄올 추출물			106.6
에탄올 추출물			93.2
에탄올 수용액 추출물			94.9

[0048] 그 결과, 도 1 및 표 1에서 나타난 바와 같이 본 발명의 석결명 추출물은 마우스 멜라노블라스트 세포주에서 세포독성 없이 세포 증식을 현저히 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, 각 추출물에 대한 세포 생존율이 비슷하였으므로, 가장 효과가 좋았던 메탄올 추출물을 선별하여 다음 실험에 사용하였다.

[0049] 실시예 4. 석결명 추출물이 멜라노블라스트 분화에 미치는 영향 확인

[0050] <4-1> 멜라노블라스트에서 석결명 추출물에 의한 멜라닌 생성 확인

[0051] 본 발명자들은 본 발명의 추출물이 포유류 멜라노블라스트의 분화를 유도하는지 확인하기 위하여, 멜라노블라스트가 멜라닌 세포로 분화되었을 경우 나타나는 특징인 티로시나아제 활성 및 멜라닌 생성 여부를 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다. 우선, 본 발명의 추출물에 의해 멜라노블라스트에서 멜라닌이 생성되는지 확인하는 실험을 수행하였다. 구체적으로, Melb-a 세포(6×10^4 세포/ml)를 12 웰 플레이트에 1 ml씩 넣은 후, 37℃,

10% CO₂ 항온기에서 24시간 전배양 시켰다. 배양액을 제거한 다음, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 각 시험 시료들을 처리 및 배양하였다. 96 시간 후, 배양액을 제거한 다음, 1 ml의 PBS(Invitrogen, 미국)로 두 번 세척한 뒤, 트립신-EDTA를 처리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 1.5 ml 마이크로 튜브에 옮겨 닦아 원심 분리하여 세포를 침전 시킨 후, 상등액을 모두 제거한 다음, 10% DMSO가 들어있는 1 N NaOH 용액 100 μ l에 현탁시켜 80℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 용해된 세포 내의 멜라닌은 405 nm 파장에서 마이크로 플레이트 리더로 측정하였다.

[0052] 그 결과, 도 2A에서 나타난 바와 같이 본 발명의 추출물을 처리한 실험군(160%)은 양성 대조군(170%)과 유사한 정도로 멜라닌 생성을 유도한 것을 확인하였다. 반면, 음성 대조군에서는 멜라닌이 생성되지 않았다.

[0053] 또한, 도 2B에서 나타난 바와 같이 실험군 및 양성 대조군에서 육안으로도 쉽게 확인이 될 정도로 멜라닌 색소가 많이 생성되어 세포 침전물의 색깔이 검게 변한 것을 확인할 수 있었다.

[0054] <4-2> 멜라노블라스트에서 석결명 추출물에 의한 티로시나아제 활성화 확인

[0055] 이어, 본 발명자들은 본 발명의 추출물에 의해 멜라노블라스트에서 티로시나아제(tyrosinase) 활성이 나타나는지 확인하는 실험을 수행하였다. 세포 내 티로시나아제 활성은 DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine; Sigma, 미국)의 산화 활성을 측정하여 분석하였다. 멜라노블라스트는 티로시나아제(tyrosinase) 활성이 없어 DOPA 염색이 되지 않고, 멜라닌을 생성하지 않는다. 구체적으로, Melb-a 세포를 2×10^4 세포/디쉬 농도로 60 mm 디쉬에 접종하였다. 24시간 전배양 시킨 후, 부착된 세포에 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 시험 시료를 첨가하여 배양시켰다. 96 시간 후, 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 스크래퍼를 사용하여 디쉬로부터 세포를 분리하여 1.5 ml 마이크로 튜브에 옮겨 닦아 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 상등액을 제거하였다. 침전된 세포에 용출 버퍼[0.1M 인산 버퍼, pH 6.8, 1%(w/v) 트리톤 X-100] 100 μ l를 첨가하여 4℃ 상태에서 초음파 분쇄기로 30 분 동안 반응시켰다. 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 분쇄된 세포 찌꺼기를 침전시킨 후, 상등액을 수득하였다. 상기 수득한 상등액에 포함된 단백질의 양을 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, 미국)를 사용하여 측정하였다. 추출한 단백질은 96 웰 플레이트에 넣고 PBS에 녹인 2.5 mM DOPA를 첨가한 후, 37℃ 배양기에 1시간 동안 반응 시킨 후, 475 nm에서 마이크로 플레이트 리더로 측정하여 대조군과 비교하였다.

[0056] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 석결명 추출물을 처리한 경우, 양성 대조군과 유사한 정도로 티로시나아제 활성이 증가하였다(147-150%). 반면, 음성 대조군에서는 티로시나아제 활성이 측정되지 않았다.

[0057] 실시예 5. 석결명 추출물이 멜라노블라스트 이동에 미치는 영향 확인

[0058] 멜라노블라스트에서 분화된 멜라닌 세포(melanocyte)는 표피 조직으로 이동한 다음, 생성된 멜라닌을 각질 형성 세포(keratinocyte)로 전달하여 피부를 착색 시킨다. 이에, 본 발명자들은 본 발명의 추출물이 포유류 멜라노블라스트의 이동을 유도하는지 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다. 세포의 이동은 막통과 세포 배양 챔버(Transwell cell culture chamber; corning costar, 미국)를 이용하여 측정되었다. 막통과 세포 배양 챔버 내의 0.8 μ m 폴리비닐피롤리돈-프리 폴리카보네이트(polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate) 필터에 1% 젤라틴으로 코팅하였다. 상기 코팅한 필터를 굳힌 후, 챔버의 아랫부분에 무혈청 RPMI 배지 600 μ l를 첨가한 다음, 챔버의 윗 부분에 melb-a 세포주(2×10^6 세포/ml)를 100 μ l 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 24 시간 후, 필터를 올려내어 메탄올로 고정시킨 후, 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)으로 염색한 다음, 필터 위의 이동되지 않은 세포를 제거하기 위해 면봉으로 닦아내었다. 필터의 아래 부분으로 이동된 세포를 현미경으로 관찰하였으며, 필터를 사등분 한 뒤 현미경으로 40 배 확대하여 세포 수를 측정한 뒤 평균값을 구하였다. 상기 실험을 세 번 반복하여 수행한 다음 평균값을 그래프로 나타내었다.

[0059] 그 결과, 도 4A에서 나타난 바와 같이 본 발명의 추출물을 처리한 경우 음성 대조군에 비하여 막을 통과하여 이동한 멜라노블라스트의 수가 더 많은 것을 확인하였다.

[0060] 또한, 도 4B에서 나타난 바와 같이 본 발명의 추출물을 처리한 경우 음성 대조군에 비하여 2배 증가하였고, 양성 대조군의 경우 음성 대조군에 비하여 8-8.5 배 증가하였다. 이로써, 본 발명의 석결명 추출물이 멜라노블라스트를 표피 조직으로 이동시킬 수 있음을 제시하였다.

[0061] **제조예 1: 약학적 제제의 제조**

[0062] **<1-1> 산제의 제조**

[0063]	석결명 추출물	2 g
[0064]	유당	1 g
[0065]	상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.	

[0066] **<1-2> 정제의 제조**

[0067]	석결명 추출물	100 mg
[0068]	옥수수전분	100 mg
[0069]	유 당	100 mg
[0070]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0071]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	

[0072] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0073]	석결명 추출물	100 mg
[0074]	옥수수전분	100 mg
[0075]	유 당	100 mg
[0076]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0077]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	

[0078] **<1-4> 환의 제조**

[0079]	석결명 추출물	1 g
[0080]	유당	1.5 g
[0081]	글리세린	1 g
[0082]	자일리톨	0.5 g
[0083]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	

[0084]

[0085] **<1-5> 과립의 제조**

[0086]	석결명 추출물	150 mg
[0087]	대두 추출물	50 mg
[0088]	포도당	200 mg
[0089]	전분	600 mg
[0090]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	

[0091]	제조예 2: 연고제제	
[0092]	<2-1> 지용성(W/O 제형) 연고	
[0093]	석결명 추출물	0.01-10.0%
[0094]	스테아릴 알콜	7.0%
[0095]	스테아린산	2.2%
[0096]	스쿠알렌	3.4%
[0097]	옥틸두오데칸올	5.0%
[0098]	올리브유	6.0%
[0099]	글리세린모노라우릴 지방산 에스테	10.0%
[0100]	이소프로필 아디페이트	2.0%
[0101]	테고	0.3%
[0102]	카복실비닐폴리머	3.0%
[0103]	프로필렌 글리콜	5.0%
[0104]	코직산	0.05%
[0105]	알파-케토글루타민산	0.2%
[0106]	시스테인	0.2%
[0107]	파라벤류	0.3%
[0108]	멸균 정제수 또는 0.02M 인산 또는 완충용액	잔량
[0109]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 지용성 연고를 제조하였다.	
[0110]	<2-2> 친수성(O/W형) 연고	
[0111]	석결명 추출물	0.01-10.0%
[0112]	백색바세린	25.0%
[0113]	스테아릴알콜	20.0%
[0114]	프로필렌글리콜	12.0%
[0115]	프로필렌미스스틴산	0.1%
[0116]	소디움 글리세린 모노라우렐	0.2%
[0117]	폴리옥시에틸렌경화피마자유	4.0%
[0118]	베타인 함유 양이온성 유화제	0.2%
[0119]	모노스테아린산글리세린에스테	0.1%
[0120]	파라옥시안식향산프로필	0.1%
[0121]	정제수	잔량
[0122]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 친수성 연고를 제조하였다.	
[0123]	<2-3> 크림	
[0124]	석결명 추출물	0.01-10.0%
[0125]	유동파라핀	6.0%

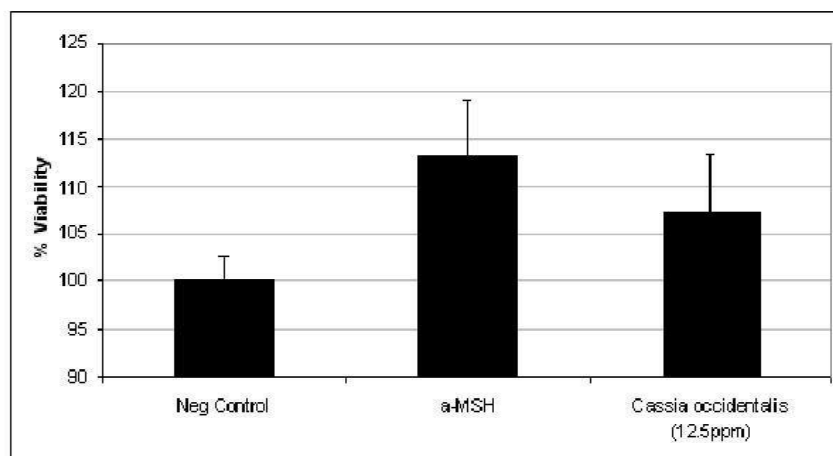
[0126]	스쿠알란	4.0%
[0127]	소르비탄세스퀴올레이트	0.5%
[0128]	폴리솔베이트 60	1.5%
[0129]	밀랍	10.0%
[0130]	카프릴릭/카프릭프리글리세라이드	5.0%
[0131]	부틸렌글리콜	6.0%
[0132]	프리에탄올아민	3.0%
[0133]	방부제	2.0%
[0134]	향료	미량
[0135]	정제수	잔량
[0136]	상기의 조성으로 석결명 추출물을 함유하는 크림을 통상의 방법에 따라 제조할 수 있었다.	

도면의 간단한 설명

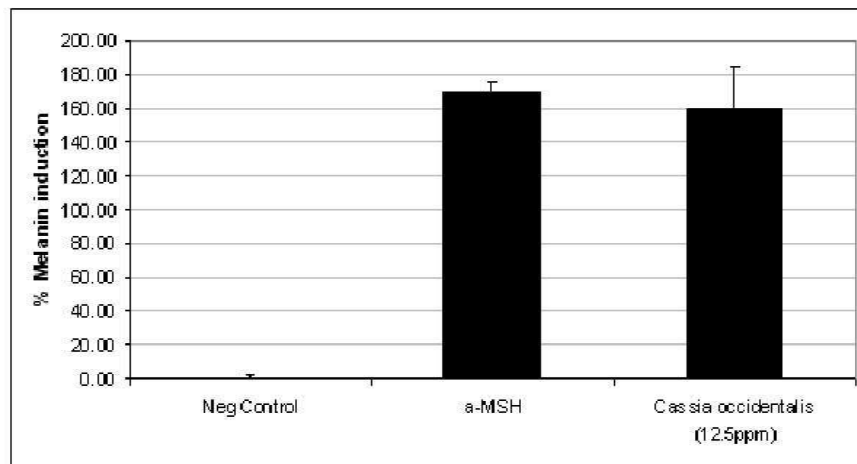
- [0137] 도 1은 석결명(*Cassia occidentalis*) 추출물의 마우스 멜라노블라스트(melanoblast) 세포주(melb-a)에서 세포 독성을 나타내는지 확인한 결과를 나타낸 도이다[음성 대조군: DMSO 처리, α -MSH(alpha-melanocyte stimulating hormone): 양성 대조군, 석결명: 실험군].
- [0138] 도 2는 석결명 추출물에 의한 멜라노블라스트의 멜라닌 생성을 확인한 결과를 나타낸 도이다(2A: 세포 내의 멜라닌을 405 nm 파장에서 마이크로 플레이트 리더로 측정한 그래프; 2B: 석결명 추출물을 처리한 멜라노블라스트를 원심분리한 침전물의 사진).
- [0139] 도 3은 석결명 추출물에 의한 멜라노블라스트의 티로시나아제 활성화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [0140] 도 4는 석결명 추출물이 멜라노블라스트 이동에 미치는 영향을 확인한 도이다(4A: 막을 통과한 멜라노블라스트를 현미경으로 관찰한 사진; 4B: 막을 통과한 멜라노블라스트의 숫자를 측정한 그래프).

도면

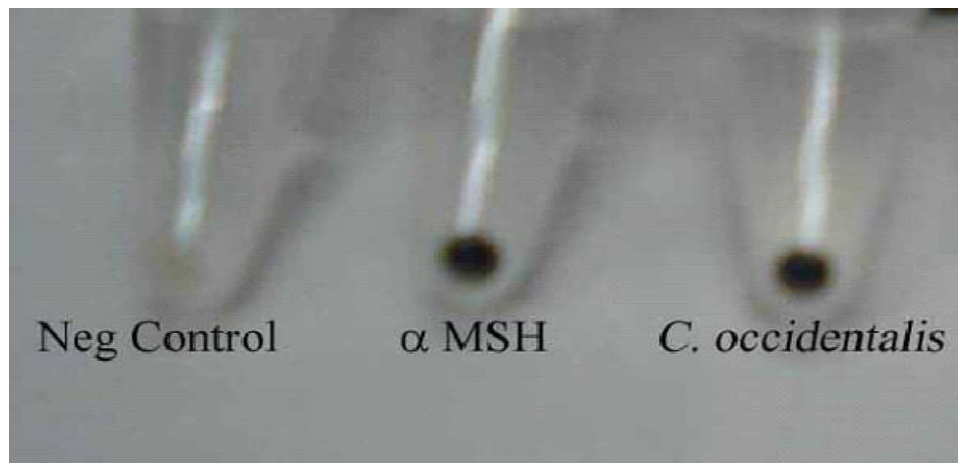
도면1



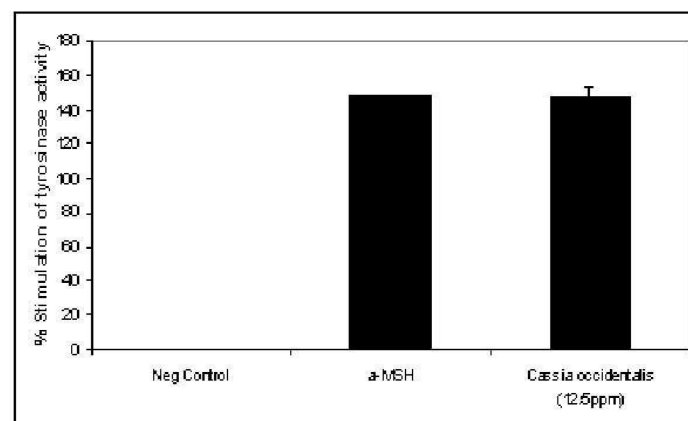
도면2a



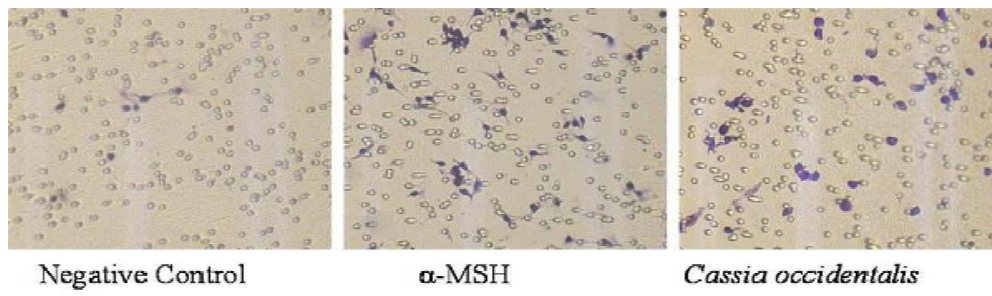
도면2b



도면3



도면4a



도면4b

