(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 1 월 5 일 (05.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/003114 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/4178 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61K 47/38* (2006.01)
A61K 8/46 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61K 8/42 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006338

(22) 국제출원일: 2016 년 6 월 15 일 (15.06.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0093049 2015 년 6 월 30 일 (30.06.2015) KR

(71) 출원인: **(주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION)** [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강대로 106, Seoul (KR).

(72) 발명자: **빈범호 (BIN, Bum-Ho)**; 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). **조은경 (CHO, Eun-Gyung)**; 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). **최은정 (CHOI, Eun-Jeong)**; 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). **김성태 (KIM, Sungtae)**; 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). **최서연 (CHOI, Suhyeon)**; 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). **이태룡 (LEE, Taeryong)**; 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR).

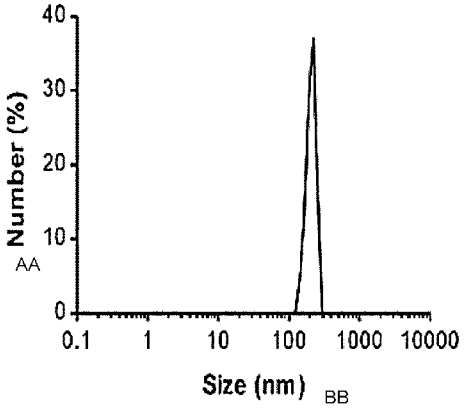
(74) 대리인: **김순영 (KIM, Sun-young)**; 110-727 서울시 종로구 종로 5 길 58 석탄회관빌딩 10 층, Seoul (KR).

(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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SKIN WHITENING COMPOSITION, AND METHOD FOR SCREENING FOR MATERIALS HAVING SKIN WHITENING EFFECT

(54) 발명의 명칭 : 피부 미백용 조성물 및 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법



엑소좀 평균 크기 CC (nm)

206.90 ± 22.18

AA ... Number (%)
BB ... Size (nm)
CC ... Average size of exosomes (nm)

(57) **Abstract**: Disclosed in the present specification are: a skin whitening composition having a skin whitening effect by controlling the secretion of exosomes to be secreted from melanocytes; and a method for screening for materials having a skin whitening effect. The skin whitening composition can promote apoptosis of melanocytes by inhibiting the amount of secretion of exosomes to be secreted from melanocytes, and consequently inhibits the generation of melanin through the apoptosis of melanocytes, thereby exhibiting a skin whitening effect.

(57) **요약서**: 본 명세서에는 멜라닌형성세포에서 분비되는 엑소좀의 분비 제어를 통해 피부 미백에 효능이 있는 피부 미백용 조성물 및 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법이 개시된다. 상기 피부 미백용 조성물은 멜라닌형성세포에서 분비되는 엑소좀의 분비량을 억제시킴으로써 멜라닌형성세포의 세포사멸을 증가시킬 수 있고, 이러한 멜라닌형성세포의 세포사멸로 인해 결과적으로 멜라닌 생성을 저해하여 미백 효능이 발휘되는 효과가 있다.

WO 2017/003114 A1

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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, 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 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 피부 미백용 조성물 및 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법

기술분야

[1] 본 명세서에는 피부 미백용 조성물 및 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법이 개시된다.

배경기술

[2] 대부분의 동물 세포는 다양한 크기와 성분을 갖는 세포 내 기원의 세포외 소낭(extracellular vesicle)을 분비할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 이러한 세포외 소낭은 혈액, 소변, 타액 및 세포 배양액을 포함하는 모든 생물학적 유체(biological fluids)에서 발견된다(Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. Circ Res 2014;114:345-53)(Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. Adv Drug Deliv Rev 2013;65:398-401).

[3] 세포외 소낭은 작게는 직경 약 20 nm부터 크게는 직경 약 5 ㎛의 크기를 갖는 막 구조 소낭체로서, 그 크기와 구성에서 이질성이 있고, 엑소좀(exosome), 엑토좀(ectosome), 마이크로소낭(microvesicle), 마이크로입자(microparticle), 세포자멸체(apoptotic body) 등의 다수의 상이한 종을 포함한다.

[4] 이와 같은 세포외 소낭은 분비하는 기원 세포(공여 세포)의 상태를 반영하며, 어떤 세포에서 분비되었는가에 따라 다양한 생물학적 활성을 나타내고, 세포들 사이에 유전 물질과 단백질을 옮기면서 세포 간 상호작용에서 중요한 역할을 수행한다.

[5] 또한, 멜라닌(melanin)은 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 지니는 페놀류의 생체 고분자 물질로서, 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출될 때 발생하는 갈변 또는 동물의 외피 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서 관찰된다. 멜라닌이 과잉 생산되는 경우 피부에 침착되어 기미, 주근깨 등이 형성되고 피부 노화도 촉진되며, 피부암도 유발될 수 있다.

[6] 인체에서 멜라닌형성세포(melanocyte)는 외부에서 들어오는 자외선에 대한 방어 기작의 일환으로 멜라닌을 합성하는 세포로서, 피부가 자외선에 의해 사멸되는 것으로부터 막아주는 역할을 한다. 외부로부터의 자외선이 피부에 노출되게 되면 피부조직 세포들 중에 멜라닌형성세포가 자외선에 반응하여 멜라닌을 합성하게 되는 것이다.

[7] 자외선에 의한 멜라닌 합성은 자외선에 의해서 멜라닌 자극 호르몬(melanin stimulating hormone, MSH)이 분비되고, MSH는 MC1R이라는 수용체에 반응하여 멜라닌형성세포 내에 cAMP를 향상시켜 멜라닌 합성을 위한 유전자들의 반응을 유도하여 멜라닌을 합성하고, 합성된 멜라닌은 멜라닌형성세포의 외부로

분비되어 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하게 된다. 멜라닌의 생합성에 관여하는 단백질로는 mitf, tyr, trp1, trp2 등이 알려져 있다.

[8] 그러나, 종래 멜라닌형성세포에서 분비되는 엑소좀의 분비량과 멜라닌형성세포의 세포사멸의 관련성에 대해서는 보고된 바가 없다. 미백 활성을 갖는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 선행기술은 대한민국 등록특허 제10-0840144호에 기재되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 일 측면에서, 본 명세서는 멜라닌형성세포에서 엑소좀의 배출 제어를 통해 피부 미백에 효과가 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[10] 다른 측면에서, 본 명세서는 멜라닌형성세포에서 분비되는 엑소좀의 분비량을 확인하여 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[11] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌형성세포(melanocytes)에서 분비되는 엑소좀(exosome)의 분비량을 억제하는 엑소좀 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

[12] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀 억제제는 GW4869 및 pifithrin-μ로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다.

[13] 예시적인 일 구현예에서, 상기 유효성분은 멜라닌 생성을 억제하는 것일 수 있다.

[14] 예시적인 일 구현예에서, 상기 유효성분은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 흑색종, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소 침착 및 피부염에서 발생하는 색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 피부 색소 침착 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 것일 수 있다.

[15] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 대상에게 유효량의 엑소좀 억제제를 포함하는 조성물을 적용하는 것을 포함하는 피부 미백 증진 방법을 제공한다.

[16] 또 다른 측면에서, 멜라닌 과다 생성으로 인한 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유효한 양의 엑소좀 억제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 멜라닌 과다 생성으로 인한 질환의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.

[17] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 조성물을 약학 조성물, 화장료 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 적용하는 것을 포함할 수 있다.

[18] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 조성물을 대상의 피부에 적용하는 것을 포함할 수 있다.

[19] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 대상의 피부 미백 증진을 위한

엑소좀 억제제를 제공한다.

[20] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌 과다 생성으로 인한 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 엑소좀 억제제를 제공한다.

[21] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌형성세포(melanocytes)에 시험 물질을 처리한 후 자외선을 조사하거나, 또는 멜라닌형성세포(melanocytes)에 자외선을 조사한 후 시험 물질을 처리하는 단계; 및 상기 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀(exosome)의 상대적인 분비량을 확인하는 단계를 포함하는 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[22] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀의 상대적인 분비량은 대조군인 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀의 분비량과 비교하여 확인하되, 상기 대조군은 시험 물질을 처리하지 않고 자외선을 조사한 멜라닌형성세포일 수 있다.

[23] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀의 상대적인 분비량을 확인한 후, 엑소좀의 상대적인 분비량을 감소시킨 시험 물질을 피부 미백 효능 물질로 선별하는 단계를 포함할 수 있다.

[24] 예시적인 일 구현예에서, 상기 자외선은 UVB를 20 내지 30 mJ/cm^2로 조사하는 것일 수 있다.

[25] 예시적인 일 구현예에서, 상기 멜라닌형성세포에 시험 물질을 처리하는 시간은 10 내지 24 시간일 수 있다.

[26] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀의 분비량은 CD81 또는 HSP90의 발현량으로 확인할 수 있다.

[27] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 상기 방법에 따라 피부 미백 효능 물질로 선별된 물질을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[28] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌형성세포에서 엑소좀의 배출 제어를 통해 피부 미백에 효과가 있는 조성물을 제공하는 효과가 있다.

[29] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌형성세포에서 분비되는 엑소좀의 분비량을 확인하여 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 본 명세서의 일 실험예에 따라 멜라닌형성세포로부터 방출된 엑소좀의 평균 크기를 확인한 결과이다.

[31] 도 2는 본 명세서의 일 실험예에 따라 자외선 조사시 증가된 엑소좀의 분비량이 엑소좀 억제제 처리시 감소되었음을 확인한 결과이다.

[32] 도 3은 본 명세서의 일 실험예에 따라 엑소좀 억제제가 자외선 조사된 멜라닌형성세포의 생존력에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

[33] 도 4는 본 명세서의 일 실험예에 따라 UVB를 조사하지 않은 멜라닌형성세포에서는 엑소좀에 따른 세포 생존력에 큰 차이가 없는 것을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[35] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌형성세포(melanocytes)에서 분비되는 엑소좀(exosome)의 분비량을 억제하는 엑소좀 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

[36] 본 명세서에서 "엑소좀(exosome)"은 세포에서 분비되어 세포외 공간으로 방출된 나노 크기의 세포외 소낭, 즉 세포밖 베지클(extracellular vesicles)을 의미하는 것으로서, 엑소좀은 막 구조 소낭체로 내부와 외부가 구분되며, 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, 단백질(성장호르몬, 사이토카인 등), RNA 등을 전달하여 세포-세포 간 소통을 매개하는 등의 다양한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 한편, 멜라닌형성세포의 주변에는 멜라닌형성세포를 감싸고 있는 세포 및 세포간 물질이 존재한다. 구체적으로, 멜라닌형성세포로부터 일정한 반경, 예컨대 2 mm 이내에는 각질형성세포 또는 섬유아세포 및/또는 콜라겐 등과 같은 세포간 물질이 존재할 수 있으며, 멜라닌형성세포는 세포외 기질로 엑소좀을 분비한다.

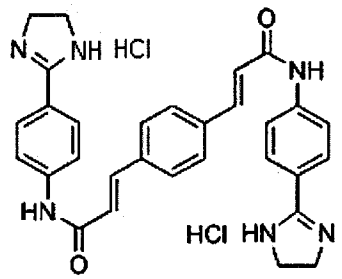
[37] 일 측면에서, 상기 엑소좀은 20 내지 400 nm의 직경을 갖는 세포밖 베지클일 수 있다.

[38] 본 명세서에서 "엑소좀 억제제"는 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀의 분비량을 억제하는 물질을 의미하는 것으로서, 멜라닌형성세포 내 엑소좀의 생성, 멜라닌형성세포로부터 엑소좀의 분비 또는 방출을 억제하는 물질을 의미하는 최광의의 개념이다.

[39] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀 억제제는 GW4869 및 pifithrin-μ로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다.

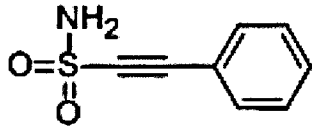
[40] "GW4869"는 분자식 $C_{30}H_{30}Cl_2N_6O_2$을 갖는 sphingomyelinase(Smase) 억제제로서 하기 화학식 1로 표기(CAS 6823-69-4)된다. Sphingomyelinase는 스핑고마이엘린을 가수분해하여 세라마이드 및 포스포콜린을 생성시키는 스핑고마이엘린-특이적 포스포리파아제(phospholipase) C이다.

[41] [화학식1]



[42] "피피트린(pifithrin)-μ"는 분자식 $C_8H_7NO_2S$를 갖는 p53 억제제로서 하기 화학식 2로 표기(CAS 64984-31-2)된다. p53은 세포가 불필요하게 증식하지 않도록 제어하는 암 제어 유전자이다. 그러나, 비정상적으로 과도하게 p53이 활성화되었을 경우 세포의 생존에 치명적이며, pifithrin은 방사선 치료 동안 정상세포는 보호한 채 암세포 사멸을 증대시키는 화합물로 동정되었다.

[43] [화학식2]



[44] 예시적인 일 구현예에서, 상기 유효성분은 멜라닌형성세포 증가와 직접 또는 간접적으로 관련되어 있는 피부 손상 또는 피부 질환을 예방, 치료 또는 개선하는 효과가 있다. 즉, 상기 유효성분은 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하므로, 멜라닌 과다 생성으로 인한 질환을 예방, 치료 또는 개선하는 효과가 있다.

[45] 상기 멜라닌 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), 운륜모반(Halo nevus), 선천성 멜라닌세포성 모반(Congenital nevocytic nevus), 스피츠 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 흑생종(Nodular melanoma), 색소성 기저세포암(pigment basal cell carcinoma), 색소성 피부섬유종(dermatofibromas), 색소성 피부낭종(dermoid cyst), 색소성 켈로이드(keloid) 및 색소성 각질극세포종(keratoacanthomas)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상일 수 있다.

[46] 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 멜라닌 생성 증가로 피부에 국소적으로 발생하는 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 흑색종, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소 침착 및 피부염에서 발생하는 색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 피부 색소 침착 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 것일 수 있다.

[47] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 멜라닌형성세포(melanocytes)에

시험 물질을 처리한 후 자외선을 조사하거나, 또는
멜라닌형성세포(melanocytes)에 자외선을 조사한 후 시험 물질을 처리하는 단계; 및 상기 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀(exosome)의 상대적인 분비량을 확인하는 단계를 포함하는 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[48] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀의 상대적인 분비량은 대조군인 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀의 분비량과 비교하여 확인하되, 상기 대조군은 시험 물질을 처리하지 않고 자외선을 조사한 멜라닌형성세포일 수 있다.

[49] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀의 상대적인 분비량을 확인한 후, 엑소좀의 상대적인 분비량을 감소시킨 시험 물질을 피부 미백 효능 물질로 선별하는 단계를 포함할 수 있다.

[50] 예시적인 일 구현예에서, 상기 자외선은 UVB를 20 내지 30 mJ/cm^2로 조사하는 것일 수 있다.

[51] 예시적인 일 구현예에서, 상기 멜라닌형성세포에 시험 물질을 처리하는 시간은 10 내지 24 시간일 수 있다.

[52] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀의 분비량은, 예컨대 동일한 세포 수로부터 동일한 분리법에 의해서 분리된 엑소좀을 정량 분석 장비 Q-Nano 혹은 NanoSight 기기를 이용, nanoparticle tracking analysis(NTA)로 그 particle 수를 세거나, 엑소좀 표면의 단백질, 지질 또는 엑소좀 내부의 단백질, 펩타이드, RNA, miRNA(microRNA), lncRNA(long noncoding RNA), 대사체 등의 정량을 통해 확인할 수 있으며, 정량하고자 하는 대상에 따라 웨스턴 블롯(western blot), 닷 블롯(dot blot), ELISA, 노던 블롯(northern blot), PCR, RT-qPCR, GC-MS, LC-MS, NMR, 방사선면역분석(radioimmunoassay), 면역침강반응 분석(immunoprecipitation assay), 방사선면역확산법(radioimmunodiffusion), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등의 방법을 당업자가 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 실시예에서는 엑소좀 표면의 CD81 또는 엑소좀 내부의 HSP90을 정량 마커로 이용하여 웨스턴 블롯을 통해 엑소좀의 양을 시각적으로 상대평가하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[53] 멜라닌형성세포에서 세포외 기질로 분비되는 엑소좀은 자외선 조사된 멜라닌형성세포의 세포사멸을 억제한다. 따라서, 멜라닌형성세포에서 분비되는 엑소좀의 분비량을 억제시킴으로써 멜라닌형성세포의 세포사멸을 증가시킬 수 있고, 이러한 멜라닌형성세포의 세포사멸로 인해 결과적으로 멜라닌 생성을 저해하여 미백 효능이 발휘되는 효과가 있다(Pigment Cell Melanoma Res. 2009 Jun;22(3):307-318).

[54] 또한, 멜라닌형성세포에서 엑소좀의 분비를 억제 또는 증가시키는 물질은 멜라닌형성세포의 세포사멸을 촉진(분비 억제 물질) 또는 감소(분비 증가 물질)시켜 멜라닌 생성을 조절할 수 있다. 이에 따라, 자외선 처리 전 또는 후에

피부 미백 효능 후보 물질을 멜라닌형성세포에 처리하여 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀 분비량을 확인함으로써 피부 색소 침착을 조절하는 물질을 스크리닝할 수 있는 효과가 있다.

[55] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 상기 방법에 따라 피부 미백 효능 물질로 선별된 물질을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

[56] 예시적인 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약학 조성물인 것일 수 있다.

[57] 상기 약학 조성물은 엑소좀 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.

[58] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캅셀제, 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 폴리비닐피롤리딘과 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.

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

[60] 상기 약학 조성물은 비경구, 직장, 국소, 경피, 피하 등으로 투여될 수 있다.

[61] 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㎍/kg 내지 200mg/kg, 다른 일 측면에서 50㎍/kg 내지 50mg/kg을 1일 1 내지 3회 분할하여 투여할 수 있으며, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[62] 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.

[63] 예시적인 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 화장료 조성물인 것일 수 있다.

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

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.

[65] 상기 화장료 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 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.

[66] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[67] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[68] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[69] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[70] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[71] 예시적인 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 식품 조성물인 것일 수 있다.

[72] 상기 식품 조성물은 액상 또는 고체 상태의 제형일 수 있고, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용될 수 있다. 각 제형의 식품 조성물은 유효성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[73] 본 명세서에 개시된 유효성분 외에 함유할 수 있는 액체 성분에는 특별한 제한점이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올 등이 있다. 상기의 향미제로는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(예를 들어 사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 명세서에 개시된 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 일측면에서 약 5 내지 12g일 수 있다.

[74] 상기 식품 조성물은 일 측면에서 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그 염, 알긴산 및 그 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 다른 측면에서 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 다양할 수 있으나, 본 명세서에 개시된 조성물 100 중량부 당 0.001 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 실시를 위한 형태

[75] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[76] **실험예.**

[77] (1) 세포 배양 및 물질

[78] 인체 멜라닌형성세포(normal human melanocytes, Cascade Biologics, Portland, OR, USA)는 인체 멜라닌형성세포 성장 보충제(Cascade)가 함유된 M-254 배지(Cascade)에서 보관하였다. GW4869(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 피피트린(pifithrin)-μ(Sigma, St. Louis, MO, USA)는 DMSO에 용해시켜 이용하였다.

[79] (2) 엑소좀(exosome) 분리

[80] 엑소좀 분리를 위해 융합성 멜라닌형성세포를 PBS로 세척하고 M-254에서 48시간 동안 배양하였다. 조정배지(conditioned medium)를 수집하여 10분간 500×g, 20분간 3,000×g, 및 2시간 동안 100,000×g에서 원심분리하였다. 수득된 엑소좀-함유 펠릿을 PBS에 재현탁시키고 -80 ℃에서 저장하였다. 또한, 조정배지를 0.45 ㎛ 공극 필터(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 정제하고, 100 kDa 컷-오프 스핀 컬럼(Millipore)을 이용하여 농축하였다. 엑소좀은 ExoQuick-TC 키트(SBI, San Jose, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 분리되었다. 분리된 엑소좀 20 ㎕는 웨스턴 블롯 및 은 염색법으로 분석되었다.

[81] (3) DLS(Dynamic light scattering) 분석

[82] 엑소좀 지름은 산란 강도 10 × 30 s에서 633 nm 레이저가 구비된 Zetasizer Nano S instrument(Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)를 이용하여 측정되었다.

[83] (4) 겔 내 단백질 분리

[84] 엑소좀 단백질은 SDS-PAGE로 분리되었다. SDS-PAGE 겔을 10 조각으로 절단하고 기 공지된 방법(Bahk YY, Kim SA, Kim JS, et al. (2004) Antigens secreted from Mycobacterium tuberculosis: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. Proteomics 4:3299-307.)에 따라 트립신(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 겔 내 분리하였다. 요약하면, 겔 조각을 1:1의 아세토니트릴(ACN)/25 mM 암모늄 비카보네이트(ABC)로 4~5회 세척, 100% ACN에서 탈수, 및 건조시켰다. 45분간 56 ℃에서 100 mM ABC와 함께 100 mM DTT에서 환원 및 30분간 빛이 차단된 상온에서 100 mM ABC와 함께 55 mM 요오드아세트아미드에서 알킬레이션한 후, 조각을 100% ACN에서 건조시키고 37 ℃에서 20시간 동안 20 ng 트립신을 함유하는 325 mM ABC에서 다시 수화하였다. 액체를 새로운 튜브로 이동시키고 잔존하는 펩타이드는 30 ℃에서 40분간 0.1%(v/v) 포름산을 포함하는 50%(v/v) 수용성 아세토니트릴을 이용하여 겔로부터 추출하였다. 복합 상등액을 증발시키고 질량 분석을 위해 0.1%(v/v) 포름산을 포함하는 5%(v/v) 수용성 아세토니트릴 용액에 용해시켰다.

[85] (5) LC-MS/MS에 의한 단백질 동정

[86] 분리된 펩타이드는 기 공지된 방법(Zuo X, Echan L, Hembach P, et al. (2001) Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using one-dimensional gels for insoluble and large proteins. Electrophoresis 22:1603-15.)에 약간의 변형을 가하여 Finnigan LCQ 이온-트랩 질량 분석계(LC-MS/MS)에 직결된 역상 모세관 HPLC를 이용하여 분석되었다. 펩타이드는 10분간 트랩핑 컬럼에 결합되고 50분간 0.2 ㎕/min 유량 속도에서 0.1%(v/v) 포름산을 포함하는 5~80%(v/v) 수용성 아세토니트릴로 경사 용리되었다. Tandem MS는 m/z=450~2000 Da에서 수행되었고, 각 스펙트럼은 TurboSEQUEST 소프트웨어(Thermo Quest, San Jose,

CA, USA)를 이용하여 처리되었다. 수득된 피크 목록은 MASCOT 프로그램(http://www.matrixscience.com)을 이용하여 MSDB 또는 NCBI 데이터베이스를 조회하는데 사용되었다.

[87] (6) 웨스턴 블롯 및 은 염색법

[88] 세포 또는 분리된 엑소좀을 프로테아제 억제제(Sigma)가 함유된 용해 버퍼(1% NP-40, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 및 0.01 M $MgCl_2$)를 이용하여 용해시켰다. 단백질 농도는 BCA 어세이로 분석하였으며, 샘플은 SDS-PAGE로 분리하고, PVDF 막으로 이동시켜 CD81(SBI)에 대한 항체로 분석하였다. 한편, 은 염색을 위해 SDS-PAGE 겔을 제조사의 지시에 따라 은 염색 키트(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)에 적용하여 실험하였다.

[89] (7) 세포독성 시험

[90] 멜라닌형성세포를 6-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 밀도로 분주하였다. 다음 날, 동일한 세포 수로부터 분리된 엑소좀 10 ㎕를 처리하였다. 세포를 15분간 PBS 중의 4% 포름알데하이드로 고정시키고, PBS로 세척하고, 20분간 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. PBS로 세척한 후, 세포를 건조시키고 10% 아세트산으로 용해시켰다. 분광광도계를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[91] (8) 정량적 real-time PCR

[92] Trizol 시약(Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리하고, ReverTra Ace(Toyobo, Osaka,Japan)를 이용하여 cDNA로 역전사시켰다. 유전자 발현 분석은 TaqMan Universal Master Mix and TaqMan Gene Expression Assays: Hs00365052_m1(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 수행하였다.

[93] (9) 통계적 분석

[94] two-tailed Student's t-test가 두 그룹 간의 차이점을 분석하는데 사용되었다. 데이터는 3번 실험에 대한 mean±SD(***; $p<0.005$, **; $p<0.05$)로 나타내었다.

[95] **실험결과 1. 멜라닌형성세포로부터 분비된 엑소좀의 확인**

[96] 멜라닌형성세포는 엑소좀을 분비하고 방출하였으며, 분리된 엑소좀의 크기를 분석(dynamic light scattering analysis)한 결과, 멜라닌형성세포로부터 방출된 엑소좀은 206.90 ± 22.18 nm의 평균 지름을 갖는 것을 확인하였다(도 1 참조).

[97] **실험결과 2. 자외선 조사에 따른 멜라닌형성세포로부터 분비되는** 엑소좀 분비량의 변화

[98] 멜라닌형성세포를 UVB(20 mJ/cm^2)로 조사하고 24시간 동안 배양한 결과, 자외선 노출시 엑소좀의 분비량이 증가하는 것을 알 수 있었다.

[99] 또한, UVB 노출 전, 12시간 동안 엑소좀 생성/분비 저해제인 10 μM의 GW4869(Smase(sphingomyelinase) 억제제) 또는 10 μM의 피피트린(pifithrin)-μ(p53 억제제)로 처리할 경우, 엑소좀의 마커인 CD81 발현량이 감소되는 것을 알 수 있었다(도 2 참조).

[100] 이에 따라, 멜라닌형성세포는 자외선에 노출되면 방출되는 엑소좀의 양이 증가하고, 자외선에 노출되더라도 엑소좀의 생성/분비 저해제를 가할 경우 방출되는 엑소좀의 양이 감소되는 확인하였다.

[101] **실험결과 3.** 엑소좀 억제제가 자외선 조사된 멜라닌형성세포의 생존력에 미치는 영향

[102] UVB 미처리된 멜라닌형성세포, UVB 처리된 멜라닌형성세포, UVB+GW4869 처리된 멜라닌형성세포로부터 얻은 각각의 엑소좀을 멜라닌형성세포와 함께 UVB(20 mJ/cm^2)로 조사하여 3일 동안 배양한 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 자외선 노출을 받은 멜라닌형성세포 유래 엑소좀은 자외선 손상을 받은 멜라닌형성세포의 생존력을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 멜라닌형성세포의 생존력 증진 효과는 엑소좀 분비 저해 물질인 GW4869, pifithrin-μ가 자외선과 함께 처리된 멜라닌형성세포 유래 엑소좀에 의해선 감소되었다. 한편, 상기와 같은 방법으로 UVB 미처리된 멜라닌형성세포, UVB 처리된 멜라닌형성세포로부터 얻은 각각의 엑소좀을 멜라닌형성세포와 함께 배양하되 멜라닌형성세포에 UVB를 조사하지 않은 조건에서 배양할 경우에는 멜라닌형성세포의 생존력에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(도 4 참조).

[103] 따라서, 자외선 노출을 받은 멜라닌형성세포 유래 엑소좀은 자외선 손상을 받은 멜라닌형성세포의 생존력을 증가시키며, UV 조사시 멜라닌형성세포에서 배출되는 엑소좀이 멜라닌형성세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하는 효능을 갖는 것을 알 수 있었다.

[104] 이에 따라, 멜라닌형성세포에서 엑소좀의 배출을 억제 또는 증가시키는 물질은 멜라닌형성세포의 아포토시스를 촉진(배출 억제 물질) 또는 감소(배출 증가 물질)시켜 멜라닌 생성을 조절할 수 있음을 확인하였다.

[105] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물의 제형예를 아래에서 설명하나, 다른 여러 가지 제형으로도 응용 가능하며, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[106] [제형예 1] 연질캅셀제

[107] GW4869 또는 pifithrin-μ 50mg, L-카르니틴 80~140mg, 대두유 180mg, 팜유 2mg, 식물성 경화유 8mg, 황납 4mg 및 레시틴 6mg을 혼합하고, 통상의 방법에 따라 1캡슐당 400mg씩 충진하여 연질캅셀제를 제조하였다.

[108] [제형예 2] 정제

[109] GW4869 또는 pifithrin-μ 50mg, 갈락토올리고당 200mg, 유당 60mg 및 맥아당 140mg을 혼합하고 유동층 건조기를 이용하여 과립한 후 당 에스테르(sugar ester)를 6mg을 첨가하여 타정기로 타정하여 정제를 제조하였다.

[110] [제형예 3] 과립제

[111] GW4869 또는 pifithrin-μ 50mg, 무수결정 포도당 250mg 및 전분 550mg을 혼합하고, 유동층 과립기를 사용하여 과립으로 성형한 후 포에 충진하여 과립제를 제조하였다.

[112] [제형예 4] 드링크제

[113] GW4869 또는 pifithrin-μ 50mg, 포도당 10g, 구연산 0.6g, 및 액상 올리고당 25g을 혼합한 후 정제수 300ml를 가하여 각 병에 200ml씩 충진하였다. 병에 충진한 후 130℃ 에서 4~5 초간 살균하여 드링크제 음료를 제조하였다.

[114] [제형예 5] 로션

[115] 하기 표 1에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 로션을 제조하였다.

[116] [표1]

성분	함량(중량%)
GW4869 또는 pifithrin-μ	2.00
L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염	1.00
수용성 콜라겐 (1% 수용액)	1.00
시트르산나트륨	0.10
시트르산	0.05
감초 엑기스	0.20
1,3-부틸렌글리콜	3.00
정제수	잔량
합계	100.00

[117] [제형예 6] 크림

[118] 하기 표 2에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 크림을 제조하였다.

[119] [표2]

성분	함량(중량%)
GW4869 또는 pifithrin-μ	2.00
폴리에틸렌글리콜모노스테아레이트	2.00
자기유화형 모노스테아르산글리세린	5.00
세틸알코올	4.00
스쿠알렌	6.00
트리2-에틸헥산글리세릴	6.00
스핑고당지질	1.00
1,3-부틸렌글리콜	7.00
정제수	잔량
합계	100.00

[120] [제형예 7] 팩

[121] 하기 표 3에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 팩을 제조하였다.

[122] [표3]

성분	함량(중량%)
GW4869 또는 pifithrin-μ	2.00
폴리비닐알코올	13.00
L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염	1.00
라우로일히드록시프롤린	1.00
수용성 콜라겐 (1% 수용액)	2.00
1,3-부틸렌글리콜	3.00
에탄올	5.00
정제수	잔량
합계	100.00

[123] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 멜라닌형성세포(melanocytes)에서 분비되는 엑소좀(exosome)의 분비량을 억제하는 엑소좀 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 엑소좀 억제제는 GW4869 및 pifithrin-μ로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 피부 미백용 조성물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 유효성분은 멜라닌 생성을 억제하는, 피부 미백용 조성물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 유효성분은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 흑색종, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소 침착 및 피부염에서 발생하는 색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 피부 색소 침착 질환을 예방, 개선 또는 치료하는, 피부 미백용 조성물.

[청구항 5] 멜라닌형성세포(melanocytes)에 시험 물질을 처리한 후 자외선을 조사하거나, 또는 멜라닌형성세포(melanocytes)에 자외선을 조사한 후 시험 물질을 처리하는 단계;
상기 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀(exosome)의 상대적인 분비량을 확인하는 단계를 포함하는 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 엑소좀의 상대적인 분비량은 대조군인 멜라닌형성세포로부터 분비되는 엑소좀의 분비량과 비교하여 확인하되, 상기 대조군은 시험 물질을 처리하지 않고 자외선을 조사한 멜라닌형성세포인, 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 7] 제 5항에 있어서,
상기 엑소좀의 상대적인 분비량을 확인한 후, 엑소좀의 상대적인 분비량을 감소시킨 시험 물질을 피부 미백 효능 물질로 선별하는 단계를 포함하는, 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법.

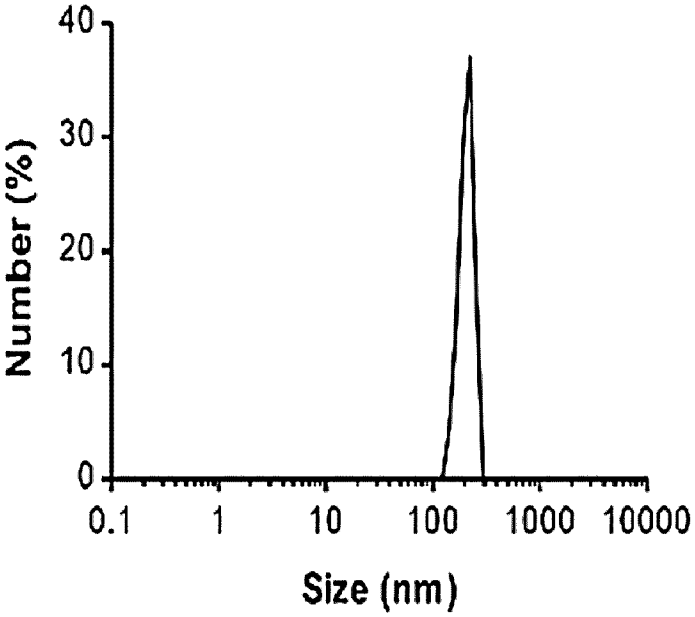
[청구항 8] 제 5항에 있어서,
상기 자외선은 UVB를 20 내지 30 mJ/cm^2로 조사하는, 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 9] 제 5항에 있어서,
상기 멜라닌형성세포에 시험 물질을 처리하는 시간은 10 내지 24 시간인, 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 10] 제 5항에 있어서,
상기 엑소좀의 분비량은 CD81 또는 HSP90의 발현량으로 확인하는, 피부 미백 효능 물질을 스크리닝하는 방법.

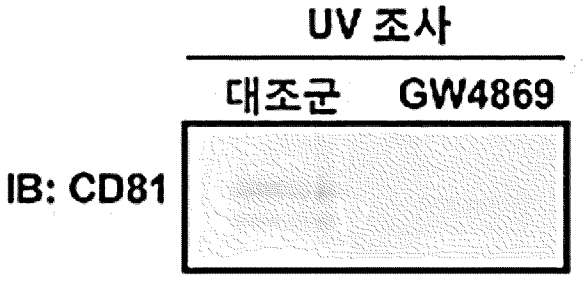
[청구항 11] 제 5항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따라 피부 미백 효능 물질로 선별된 물질을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물.

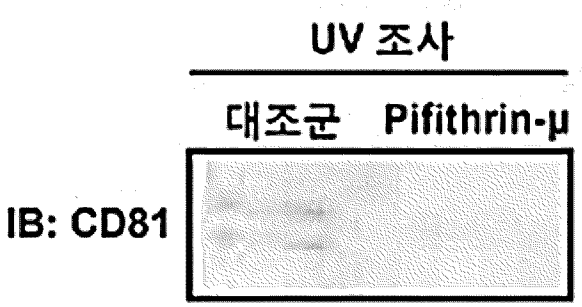
[도1]



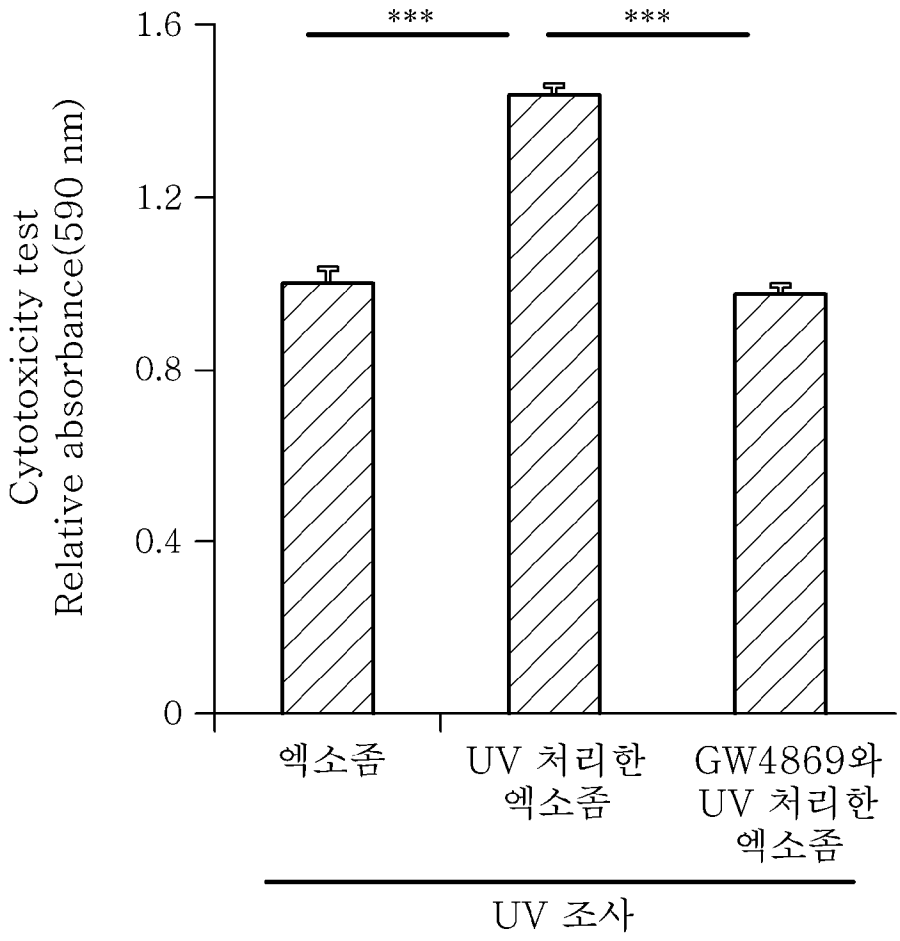
엑소좀 평균 크기 (nm)
206.90 ± 22.18

[도2]

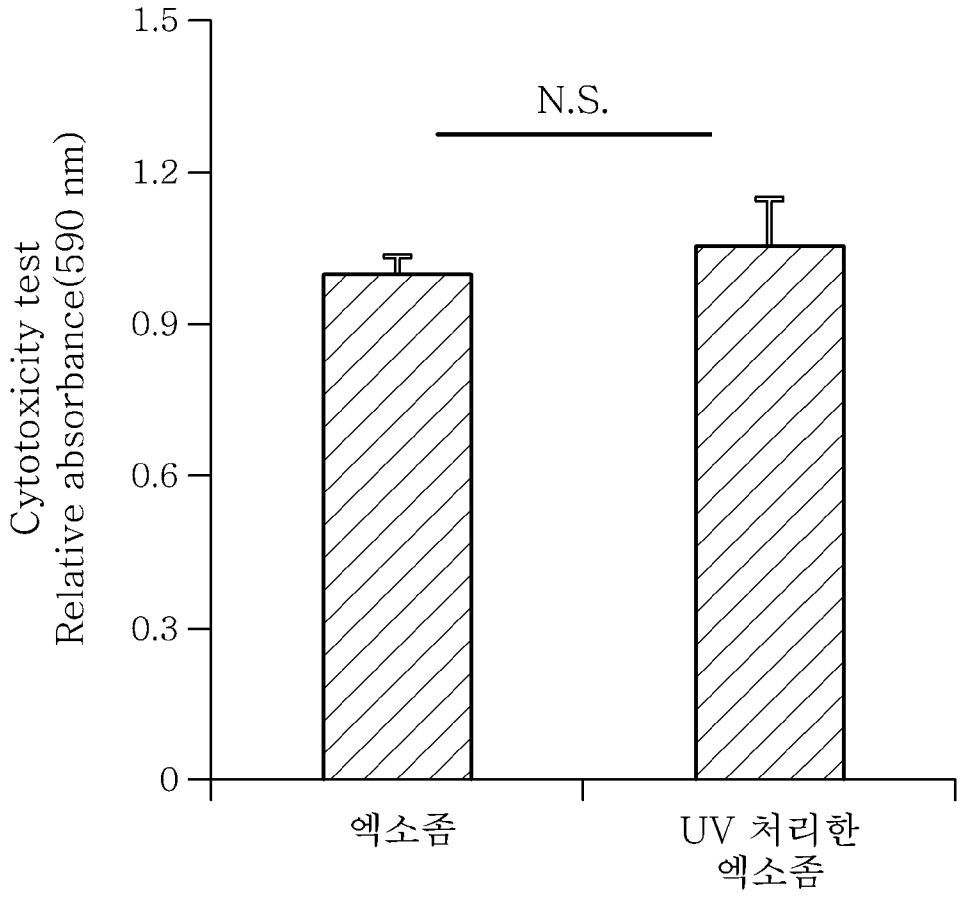




[도3]


***
***
1.6
1.2
0.8
0.4
0
Cytotoxicity test
Relative absorbance(590 nm)
엑소좀
UV 처리한
엑소좀
GW4869와
UV 처리한
엑소좀
UV 조사

[도4]


1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
N.S.
Cytotoxicity test
Relative absorbance(590 nm)
엑소좀
UV 처리한
엑소좀

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/006338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4178(2006.01)i, A61K 31/18(2006.01)i, A61K 8/49(2006.01)i, A61K 8/46(2006.01)i, A61K 8/42(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i, A61K 47/38(2006.01)i, A61Q 19/02(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)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)

A61K 31/4178; A61K 31/395; A61K 31/513; C12Q 1/00; C07C 307/02; G01N 33/53; A61K 31/7072; A61K 31/519; G01N 33/68; A61K 38/20; C12Q 1/68; A61K 31/18; A61K 8/49; A61K 8/46; A61K 8/42; A61K 9/20; A61K 9/48; A61K 47/38; A61Q 19/02; G01N 33/50

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: GW4869, pifithrin-μ, exosome, exosome, melanocytes, melanocyte, skin, whitening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014-018862 A1 (CORNING INCORPORATED) 30 January 2014 See abstract; paragraphs [0009], [0033]-[0036], [0102], [0103]; and claims 1, 7, 11.	1-4
A		5-11
A	KR 10-2014-0064272 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 28 May 2014 See abstract; paragraphs [0012]-[0024], [0033], [0034]; claim 1; and figure 3.	1-11
A	US 2011-0189125 A1 (GEORGE, D. L. et al.) 04 August 2011 See abstract; claims 1-31; and figure 2.	1-11
A	US 2005-0020534 A1 (JOHNSON, R., Jr. et al.) 27 January 2005 See abstract; and claims 1-25.	1-11
A	KR 10-0840144 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 23 June 2008 See abstract; paragraphs [9], [10]; and claim 1.	1-11

☐ 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	Date of mailing of the international search report
13 SEPTEMBER 2016 (13.09.2016)	**13 SEPTEMBER 2016 (13.09.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/006338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-018862 A1	30/01/2014	NONE	
KR 10-2014-0064272 A	28/05/2014	NONE	
US 2011-0189125 A1	04/08/2011	US 2014-0087005 A1	27/03/2014
		US 9296687 B2	29/03/2016
		WO 2010-033771 A2	25/03/2010
		WO 2010-033771 A3	05/08/2010
US 2005-0020534 A1	27/01/2005	AT 382346 T	15/01/2008
		DE 602004011051 T2	26/03/2009
		EP 1631267 A2	08/03/2006
		EP 1631267 A4	12/07/2006
		EP 1631267 B1	02/01/2008
		ES 2297478 T3	01/05/2008
		WO 2005-002506 A2	13/01/2005
		WO 2005-002506 A3	01/09/2005
KR 10-0840144 B1	23/06/2008	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/006338

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/4178(2006.01)I, A61K 31/18(2006.01)I, A61K 8/49(2006.01)I, A61K 8/46(2006.01)I, A61K 8/42(2006.01)I, A61K 9/20(2006.01)I, A61K 9/48(2006.01)I, A61K 47/38(2006.01)I, A61Q 19/02(2006.01)I, G01N 33/50(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/4178; A61K 31/395; A61K 31/513; C12Q 1/00; C07C 307/02; G01N 33/53; A61K 31/7072; A61K 31/519; G01N 33/68; A61K 38/20; C12Q 1/68; A61K 31/18; A61K 8/49; A61K 8/46; A61K 8/42; A61K 9/20; A61K 9/48; A61K 47/38; A61Q 19/02; G01N 33/50

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: GW4869, pifithrin-μ, 엑소좀, exosome, 멜라닌 형성세포, melanocyte, 피부, 미백

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2014-018862 A1 (CORNING INCORPORATED) 2014.01.30 요약; 단락 [0009], [0033]-[0036], [0102], [0103]; 및 청구항 1, 7, 11 참조.	1-4
A		5-11
A	KR 10-2014-0064272 A ((주)아모레퍼시픽) 2014.05.28 요약; 단락 [0012]-[0024], [0033], [0034]; 청구항 1; 및 도면 3 참조.	1-11
A	US 2011-0189125 A1 (GEORGE, D. L. 등) 2011.08.04 요약; 청구항 1-31; 및 도면 2 참조.	1-11
A	US 2005-0020534 A1 (JOHNSON, JR., R. 등) 2005.01.27 요약; 및 청구항 1-25 참조.	1-11
A	KR 10-0840144 B1 (경상대학교산학협력단) 2008.06.23 요약; 단락 [9], [10]; 및 청구항 1 참조.	1-11

☐ 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

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 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	국제조사보고서 발송일
2016년 09월 13일 (13.09.2016)	2016년 09월 13일 (13.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/006338

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-018862 A1	2014/01/30	없음	
KR 10-2014-0064272 A	2014/05/28	없음	
US 2011-0189125 A1	2011/08/04	US 2014-0087005 A1	2014/03/27
		US 9296687 B2	2016/03/29
		WO 2010-033771 A2	2010/03/25
		WO 2010-033771 A3	2010/08/05
US 2005-0020534 A1	2005/01/27	AT 382346 T	2008/01/15
		DE 602004011051 T2	2009/03/26
		EP 1631267 A2	2006/03/08
		EP 1631267 A4	2006/07/12
		EP 1631267 B1	2008/01/02
		ES 2297478 T3	2008/05/01
		WO 2005-002506 A2	2005/01/13
		WO 2005-002506 A3	2005/09/01
KR 10-0840144 B1	2008/06/23	없음	