(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월17일
(11) 등록번호 10-1494375
(24) 등록일자 2015년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 8/97* (2006.01) *A61Q 5/00* (2006.01)
*A61Q 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7008216
(22) 출원일자(국제) 2009년09월09일
심사청구일자 2014년08월06일
(85) 번역문제출일자 2011년04월08일
(65) 공개번호 10-2011-0069059
(43) 공개일자 2011년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/061712
(87) 국제공개번호 WO 2010/029115
국제공개일자 2010년03월18일
(30) 우선권주장
0816507.8 2008년09월10일 영국(GB)
09290446.5 2009년06월12일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008015342 A1
EP1514536 A
JP2003095910 A
WO2007094030 A1
전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자
**엘브이엠에이취 러쉐르쉐**
프랑스 세인트 젠 데 브라이브 45800 애비뉴 드 베르뒨 185
(72) 발명자
**쿠르퓌르스 로빈**
프랑스 에프-45800 쎙 장 데 브레 뤼 데 롱그 알레 104
**니자르드 카린**
프랑스 에프-94200 이브리 쉬르 센 뤼 라스페일 31
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**박장원**

심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 **피부 또는 헤어의 색소침착 연구 또는 조절에 유용한 방법, 화장 관리 방법 및 조성물용 식물 추출물**

## (57) 요 약

본 발명은 피부 또는 헤어의 색소침착 연구 또는 조절에 유용한 방법 및 조성물에 있어 식물 추출물의 용도 및 피부 또는 헤어의 색소침착을 감소 또는 증강시키기 위하여 이러한 조성물을 국소적으로 사용하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

**쉬네베르 실비앵**

프랑스 에프-45160 올리베 뤼 데 쁠레쎄 738

**페리에 에릭**

프랑스 에프-38138 레 코테스 다리 쉐맹 데 로리에

**토빈 데스몬드 제이.**

영국 빙리 웨스트 요크셔 비디16 2이에이치 1 리스 워스 애비뉴

**싱 수먼 케이**

인도 자크핸드 831004 잠쉐드푸르 텔코-콜로니 크로스 로드 엔-14 케이2-35

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

임의의 물질의 멜라노사이트로부터 케라티노사이트로의 멜라닌 이동을 조절하는 능력을 평가하기 위한 방법으로서,

a)- 시험 물질을 제공하는 단계와,

b)- Myo-X를 발현하는 세포를 제공하는 단계와,

c)- 상기 세포에서 시험 물질이 미오신-X (Myo-X)의 발현 또는 활성화를 조절하는 능력을 측정하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, Myo-x를 발현하는 세포는 멜라노사이트 또는 케라티노사이트인 것인 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 시험 물질로 처리한 세포에서의 Myo-X의 발현 또는 활성화와 대조군 세포에서의 Myo-X의 발현 또는 활성화를 비교하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, Myo-X의 발현 또는 활성화를 조절하는 시험 물질의 능력을 측정하는 것은:

- 세포 내 또는 세포 상의 Myo-X 단백질의 양을 측정하는 단계와,

- Myo-X 단백질 합성에 있어서 전구체의 양을 결정하는 단계 또는,

- 세포 내 멜라닌 소체 이동 수준을 측정하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

**청구항 5**

피부 또는 헤어의 색소침착을 향상시킬 수 있는 활성 물질을 선택하는 방법으로서,

- 제1항 기재의 방법의 단계 a) 내지 c)에 따라, 상기 물질이 멜라닌의 이동을 조절하는 능력을 평가하는 단계와,

- Myo-X의 발현 또는 활성화를 증가시킬 수 있는 물질을 선택하는 단계

를 포함하는 것인 피부 또는 헤어의 색소침착을 향상시킬 수 있는 활성 물질을 선택하는 방법.

**청구항 6**

피부 또는 헤어의 색소침착을 감소시킬 수 있는 활성 물질을 선택하는 방법으로서,

- 제1항 기재의 방법의 단계 a) 내지 c)에 따라, 상기 물질이 멜라닌의 이동을 조절하는 능력을 평가하는 단계와,

- Myo-X의 발현 또는 활성화를 감소시킬 수 있는 물질을 선택하는 단계

를 포함하는 피부 또는 헤어의 색소침착을 감소시킬 수 있는 활성 물질을 선택하는 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 시험 물질은 식물 추출물인 것인 방법.

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

# 명 세 서

## 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부 또는 헤어 색소침착 연구 또는 조절에 유용한 방법, 피부 또는 헤어의 멜라닌을 조절하는, 조성물 제조용 활성 제제로서의 식물 추출물의 용도 및 화장 관리 방법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 인간에게서, 색소침착은 피부, 모낭 또는 눈에서의 멜라닌 색소의 합성 및 분포의 결과이다. 색소침착은 유전적으로 기정되어 있지만, 많은 내부적 또는 외부적 요인에 의하여 조절된다. 멜라노사이트에 의하여 생산된 멜라닌 및 또한 멜라노사이트의 수, 그들의 티로시네이즈 (tyrosinase) 활성과, 멜라닌을 케라티노사이트(keratinocyte)로 운반하는 능력 및 멜라닌 과립을 함유하는 멜라닌 소체의 크기가 인간의 피부색을 좌우한다. 각 개인에게 있어서는, 얼마나 많이 또는 얼마나 적게 자외선을 조사받았는가에 따라 피부색은 주로 변한다. 달리 말하면, 각 개인에게 있어서는, 상기 개인이 가장 약한 자외선을 조사받은 경우에는 그의 가장 밝은 피부색에 상응하는 기본적인 피부 색소침착이 있고, 보다 강한 자외선을 조사받으면, 더 진하게 피부 색소가 형성되어 만일 강한 자외선 조사에 지속적으로 노출되면 그의 가장 어두운 피부색에 상응하는 최대값의 색소침착에 이르게 된다.

[0003] 이에 더하여, 잘 알려진 바와 같이, 전 세계 인구들 간에도 피부 색소침착에 관한 매우 큰 유전적 다양성이 존재한다. 그러므로, 인종에 따라, 상기 정의한 기본적 색소침착에 상응하는 피부색은 매우 밝은 색과 매우 어두운 색이라는 양 극단 사이에서 더 어둡거나 더 밝은 색조를 나타낼 수 있다. 또한 인종에 따라, 기본적 색소침착과 최대값의 색소침착 사이의 피부 색조의 차이는 더 크거나 작을 수 있다. 따라서, 피부색이 밝은 (기본적 색소침착) 특정 인종에 속하는 사람들은 비록 이들이 고의적으로 스스로를 장기간 태양에 노출시키지 않았더라도 자외선 조사에 신속하게 및/또는 상당하게 반응하고 그러므로 쉽게 피부가 어두운 색조를 띄게 된다.

[0004] 또한, 사람들은 특히 얼굴이나 손과 같은 피부상에 더 어둡거나 더 많이 착색된 부분 및/또는 반점이 나타남으로 해서, 피부상에 이색이 지는 것을 경험하기도 한다. 이러한 반점 (spots)은 멜라노사이트에서 멜라닌 생성 활성이 항진된 결과로 표피 케라티노사이트에 멜라닌이 고농도가 됨에 따른 것이다.

[0005] 피부의 색소침착 기전은 멜라닌 합성과 관련되어 있다. 이 기전은 특히 복잡하고, 개략적으로 다음의 주요 단계들로 이루어진다:

[0006] 티로신→도파→도파퀴논→도파크롬→멜라닌

[0007] 티로시네이즈 및 티로시네이즈-연관-단백질 1 (TRP-1)이 이 일련의 반응과 관련한 필수 효소들이다. 이들은 티

로신을 도파 (디하이드록시페닐알라닌)로 전환시키는 반응 및 도파를 도파퀴논으로 전환시키는 반응을 촉매하여, 멜라닌 색소를 생성하게 한다.

[0008] 어떤 분자가 멜라노사이트의 활성을 억제함으로써 표피 멜라노사이트에 직접 작용하는 경우 및/또는 멜라닌 생합성 중의 한 단계를 봉쇄하거나 또는 형성된 멜라닌을 분해하는 경우 탈색소 분자로 인정된다. 이는 특히 그 분자가 멜라닌 형성에 관련된 하나의 효소를 억제한다거나 멜라닌 합성 연쇄반응의 화학적 화합물과 반응하는 경우이다.

[0009] 알려진 탈색소 물질로는 특히 하이드로퀴논 및 그들의 유도체, 코지산, 아르부틴, 이미노페놀류, 카르니틴과 퀴논의 배합물, 아미노페놀 아미드 유도체, 및 벤조시아졸 유도체가 있다. 이 물질들은 특정한 결함을 가질 수 있다. 이들은 불안정할 수 있고, 고농도의 사용을 요하며, 그 작용 방식에 관하여 특이성이 결여되거나, 세포 독성 또는 자극성을 가질 수 있다.

[0010] 반면, 어떤 분자가 피부 또는 모낭에 존재하는 멜라노사이트의 멜라닌 생성 활성을 자극함으로써 피부 또는 헤어의 색소침착을 촉진할 뿐 아니라, 피부와 헤어의 색소침착 이상을 치료하고, 더 특별하게는 멜라닌의 생합성을 촉진할 수 있게 하는 경우, 색소 형성 분자로 인정된다.

[0011] 알려진 색소 형성 물질로는 특히 포르스콜린 (forskoline) [콜레우스 포르스콜리이 (Coleus forskholii)추출물] 또는 테프로시아 푸르푸리아 (Tephrosia purpurea) 추출물 등의 아데닐레이트 사이클레이즈 활성화제들이 있다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0012] 멜라노사이트는 표피 및 모구(毛球)의 기저막을 따라 분포하는 신경 능선-유도 세포이다. 이 세포는 멜라닌 소체라고 불리는 특유한 멜라노사이트-특이 기관 내에서 멜라닌 형성이라고 일컬어지는 과정을 통하여 멜라닌 색소를 합성한다. 색소 형성되어야 하는 피부 및 헤어에 있어서는 이 멜라닌이 멜라노사이트로부터 인접 케라티노사이트로 이동되어야 한다. 포유류의 피부, 눈, 및 헤어/양모/모피 색은 여러 가지 다양한 분자들 및 화합물에 의하여 다수의 조절점에서 조절되는 많은 단계를 포함하는 과정에서의 멜라닌의 양 및 질 (갈색/검정색 유멜라닌 또는 적색/황색 페오멜라닌)에 의하여 결정된다. 지난 수십 년간 멜라닌 합성과 멜라닌 소체 생체발생/성숙의 분자적 조절에 대한 우리의 이해는 크게 진보해 왔다.

[0013] 그러나 멜라닌의 이동이 조절되는 방법에 대한 이해가, 이 과정이 궁극적으로 피부 표면 및 헤어 섬유소의 색소침착 수준을 조절하기 때문에, 주된 임상적/미용적 관심사일 것이다.

### *과제의 해결 수단*

[0014] 본 발명의 발명자들은 멜라노사이트로부터 케라티노사이트로의 멜라닌의 이동을 조절하는 미오신 X (Myo-X)의 작용을 수반하는, 인간의 피부 멜라노사이트로부터 인간 피부 케라티노사이트로의 멜라닌 이동을 조절하는 기전을 밝혀냈다. 멜라노사이트의 생물학 (예컨대, 멜라닌 이동)에 있어 Myo-X가 관여한다는 것은 지금까지 보고된 바가 없다. 멜라노사이트에서의 멜라닌 형성의 조절 (즉, 멜라닌 합성)에 관하여 많은 것이 알려진 반면, 멜라닌 소체가 멜라노사이트로부터 케라티노사이트로 어떻게 이동하는지에 대한 이해는 여전히 매우 제한적이다. 세포-포식작용 역할 뿐 아니라, 케라티노사이트의 원형질 막과 상호 작용할 수 있는 사상 위족 (filopodia)을 통하여 멜라닌 소체의 이동이 일어난다는 것을 지지하는 증거가 증가하고 있다 (Scott et al, 2002, Singh et al, 2008). 중요하게는 멜라노사이트의 수상 돌기의 측면 및 말단으로부터 생기는 사상 위족과 일치하고, 그 내강에 멜라닌 소체를 함유하는 구조가 이미 인간 피부의 인 시투 (*in situ*) 실험 및 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 보고된 바 있다 (Scott et al., 2002).

[0015] 멜라닌 이동의 생물학에 대한 연구 중에 본 발명의 발명자들은 이 과정에 있어 Myo-X의 잠재적인 역할을 조사하였다. 본 출원은 인간의 피부 멜라노사이트로부터 인간의 피부 케라티노사이트로의 멜라닌 이동을 조절하는 신규한 기전을 설명한다.

[0016] 이 기전은 Myo-X의 작용을 수반한다. Myo-X는 멜라노사이트의 나노세관 (nanotubules) (소위 사상 위족)의 생성을 조절하는데, 이는 멜라닌 이동에 있어 세포 간 도관으로 작용한다. Myo-X가 멜라닌 이동을 조절한다는 증거를 제공하기 위하여 멜라노사이트에서 그 발현을 녹다운 (knockdown)시키기 위하여 유전자-침묵 (gene-silencing) 기법을 사용하였다. Myo-X의 결핍은 멜라노사이트의 사상 위족의 손실 및 케라티노사이트로의 멜라

닌 소체의 이동 억제가 수반되는 결과를 낳았다.

[0017] 본 발명의 발명자들은 어떻게 사상 위족의 생성이 조절되는지 시험하고 미오신 수퍼패밀리의 액틴계 모터 단백질들이 관련될 수 있는지를 관찰하였다. 특히, 미오신 X (Myo-X) (240KDa의 척추 동물-특이적 MyTH4-FERM 미오신)가 사상 위족의 형성에 대단히 중요했다 (Sousa and Cheney 2005). 이것은 사상 위족의 말단 구조의 일부로서 기능 및/또는 사상 위족의 형성에 필요한 분자들은 수송함으로써 기능한다 (Bohil et al, 2006).

[0018] Myo-X가 인간의 멜라노사이트와 인간의 케라티노사이트 간의 멜라닌 이동을 조절할 수 있다는 것은 본 출원에서 최초로 보고되는 것이다. Myo-X 및 그 구조와 작용에 기반한 분자들이 포유류의 피부 및 헤어 색소침착에 대한 신규한 조절 인자로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 첫번째 관점에 따르면, 본 발명은 멜라노사이트로부터 케라티노사이트로의 멜라닌의 이동을 조절하는 어떤 물질의 능력을 가늠하는 방법을 제공하는데, 이 방법은

[0020] a)- 시험 물질을 제공하는 단계와,

[0021] b)- Myo-X를 발현하는 세포를 제공하는 단계와,

[0022] c)- 시험 물질이 미오신-X (Myo-X)의 발현 또는 활성화를 조절하는 능력을 결정하는 단계

[0023] 를 포함하여 이루어진다.

[0024] “조절 (modulating)”이란, 활성 제제가 인간의 Myo-X의 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있거나 Myo-X의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있다는 것을 의미하며, 이 활성 제제는 Myo-X에 직접 또는 간접으로 작용, 즉, Myo-X 대사 경로에 있어 표적의 상류에 작용하는 것을 의미한다.

[0025] Myo-X를 발현하는 세포는 좋기로는 멜라노사이트 또는 케라티노사이트이고, 더 좋기로는 멜라노사이트이다.

[0026] 본 발명에 따른 물질이 멜라닌 이동을 조절하는 능력을 평가하는 방법은 시험 물질로 처리한 세포 내에서의 Myo-X의 발현 또는 활성화와 대조군 세포 내에서의 Myo-X의 발현 또는 활성화를 비교하는 것을 포함한다.

[0027] 상기 능력의 결정은,

[0028] - 세포 내 또는 세포 상의 Myo-X 단백질의 양을 측정하는 단계와,

[0029] - Myo-X 단백질 합성시의 전구체의 양을 결정하는 단계 또는

[0030] - 세포 내 멜라닌 소체의 이동 수준을 측정하는 단계

[0031] 를 포함한다.

[0032] Myo-X의 발현을 결정하는 방법은 세포 내 또는 세포 상의 Myo-X 단백질의 양을 측정하는 단계, 또는 Myo-X 단백질 합성시의 전구체, 예를 들어 Myo-X를 암호화하는 mRNA 등의 양을 결정하는 단계를 포함한다. Myo-X 단백질의 발현 수준 또는 Myo-X mRNA 수준을 결정하는 데 필요한 기법은 이 기술 분야의 숙련자에게 자명하다. 단백질 수준을 결정하는 기법은 면역염색법 (immunostaining), ELISA, 2차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis) 또는 질량 분석법 (mass-spectrometric methods)을 포함할 수 있다. mRNA의 수준을 결정하는 기법으로는 노던 블롯 (northern blotting), 역전사효소 PCR (reverse transcriptase PCR), 정량적 PCR (quantitative PCR), 마이크로어레이 (microarrays) 또는 애피메트릭스® 칩 ( Affymetrix® chips)이 있다.

[0033] Myo-X의 발현 또는 활성화 수준은 이 기술 분야의 숙련자에게 명백한 많은 방법으로 결정될 수 있다. 본 발명의 실시 상태로 발현 정도는 면역 형광법 (immunofluorescence), 웨스턴 블롯 (western blotting)을 이용하여 결정하거나, 또는 Myo-X mRNA의 수준을 결정함으로써 결정될 수 있다. 상기 언급한 바와 같이. 기타 적합한 방법들이 이 기술 분야의 숙련자에게 자명하다.

[0034] Myo-X의 활성을 결정하는 방법은 세포 내에서 멜라닌 소체의 이동 수준을 측정하는 것을 포함한다. 이러한 이동 수준을 결정하는데 필요한 기법은 케라티노사이트로의 멜라닌 이동에 대한 정량 분석을 포함할 수 있고, 이 기술 분야의 숙련자에게 자명하다.

[0035] 멜라닌 이동 수준을 결정하기 위한 기법은 Singh SK et al.에 의해 Exp. Dermatol. 17, 5, 418-426 에 개시된 것 또는 이 기술 분야의 숙련자에게 자명한 임의의 적합한 방법 등 분자 추적자 (molecular tracker)로서 gp100

의 사용을 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 기타 관점들에 따라, 본 발명은 피부 또는 헤어 색소침착을 향상시킬 수 있는 활성 물질의 선별 방법을 제공하는데, 이 방법은

[0037] - 청구항 제1항의 방법의 단계 a) 내지 c)에 따라 상기 물질의 멜라닌의 이동을 조절하는 능력을 평가하는 단계와,

[0038] - Myo-X의 발현 또는 활성화를 증가시킬 수 있는 물질을 선별하는 단계

[0039] 를 포함하여 이루어진다.

[0040] 본 발명은 또한 피부 또는 헤어 색소침착을 감소시킬 수 있는 활성 물질의 선별 방법을 제공하는데, 이 방법은

[0041] - 청구항 제1항의 방법의 단계a) 내지 c)에 따라 상기 물질의 멜라닌의 이동을 조절하는 능력을 평가하는 단계와,

[0042] - Myo-X의 발현 또는 활성화를 감소시킬 수 있는 물질을 선별하는 단계

[0043] 를 포함하여 이루어진다.

[0044] 본 발명에 의할 때, “피부 또는 헤어 색소침착”은 “인간의 피부 또는 헤어 색소침착”으로 이해되어야 한다.

[0045] 본 발명에 있어서, 평가 또는 시험 대상 물질은 식물 추출물이다. 본 발명의 방법에 의하여 Myo-X의 발현 또는 활성화를 증가시킬 수 있는 것으로 선별된 식물 추출물은 콩 (soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)로 이루어지는 군에서 선택되고, 본 발명의 방법에 의하여 Myo-X의 발현 또는 활성화를 감소시킬 수 있는 것으로 선별된 식물 추출물은 아르토카르푸스 속 식물 (Artocarpus genus plant), 좋기로는 아르토카르푸스 헤테로필러스 추출물 (Artocarpus heterophyllus extract), 더 좋기로는 아르토카르푸스 헤테로필러스 종자 추출물 (Artocarpus heterophyllus seed extract); 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana) 및 부들레자 속 식물 (Buddleja genus plant) 추출물, 좋기로는 부들레자 아실라리스 추출물 (Buddleja axillaris extract), 더 좋기로는 부들레자 아실라리스 잎 추출물 (Buddleja axillaris leaf extract):로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0046] 또 다른 관점에 따라, 본 발명은 상기 식물 추출물 중 1종 이상의 화장품 조성물에 있어서의 용도, 또는 화장품 조성물의 제조시 Myo-X의 발현 또는 활성을 조절하는 활성 제제로서의 용도를 제공하며, 상기 조성물은 피부 또는 헤어의 색소침착을 조절하는 것이다.

[0047] 본 발명에 따라, 식물 추출물은 이 기술 분야의 숙련자에게 알려진 다양한 추출 과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0048] 추출은 좋기로는 선택된 식물 원료를 극성 용매 또는 극성 용매들의 혼합물과 접촉시킴으로써 수행된다. 본 발명에 따라, “극성 용매”라는 용어는 그 용매가 4 이상의 극성 지수 값을 갖는다는 것을 의미한다. 극성 지수는 분자의 더하거나 덜한 극성 정도를 나타내는 (용해도 및 상 변화의) 열역학량에 기초하여 계산되는 양이다.

[0049] 용매의 극성 지수에 대한 참고 자료로서 L.R. SNYDER의 문헌: 일반적인 액체의 용매 특성 분류; Journal of Chromatography, 92 (1974), 223-230 을 들 숭 있으며, 이는 본 출원에 참고 문헌으로서 포함되어 있다.

[0050] 극성 용매는 물, 에탄올, 글리콜류, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 부틸렌글리콜 및 프로필렌글리콜 및 이들의 혼합물 등의 C1-C4 알코올 중에서 선택되는 것이 유리하다.

[0051] 좋기로는, 추출은 하이드로-알코올릭 혼합물을 사용하여 수행되며, 특히 물-에탄올 혼합물, 및 좋기로는 50/50 (v/v) 비율의 물-에탄올 혼합물이 유리하다.

[0052] 본 발명에 따라, 적어도 Myo-X의 발현 또는 활성을 조절할 수 있는 식물 추출물은 아르토카르푸스 속 식물 (Artocarpus genus plant), 좋기로는 아르토카르푸스 헤테로필러스 추출물 (Artocarpus heterophyllus extract), 더 좋기로는 아르토카르푸스 헤테로필러스 종자 추출물 (Artocarpus heterophyllus seed extract); 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii

extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana); 콩 속 (soybean genus) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract); 부들레자 속 식물 (Buddleja genus plant) 추출물, 좋기로는 부들레자 아실라리스 추출물 (Buddleja axillaris extract), 더 좋기로는 부들레자 아실라리스 잎 추출물 (Buddleja axillaris leaf extract)으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0053] 특히, 아르토카르푸스 속 식물 (Artocarpus genus plant), 좋기로는 아르토카르푸스 헤테로필러스 추출물 (Artocarpus heterophyllus extract), 더 좋기로는 아르토카르푸스 헤테로필러스 종자 추출물 (Artocarpus heterophyllus seed extract); 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana) 및 부들레자 속 식물 (Buddleja genus plant) 추출물, 좋기로는 부들레자 아실라리스 추출물 (Buddleja axillaris extract), 더 좋기로는 부들레자 아실라리스 잎 추출물 (Buddleja axillaris leaf extract)은 Myo-X의 발현 또는 활성을 감소시키는 활성 제제이고 콩 (soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)은, Myo-X의 발현 또는 활성을 증가시키는 활성 제제이다.

[0054] 본 발명의 또 다른 목적은 적어도 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana); 콩 (soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)로 이루어지는 군에서 선택되는 식물 추출물을, 화장품 조성물로의 용도로, 또는 피부 또는 헤어 색소침착을 조절하는 활성 제제로서의 화장품 조성물의 제조용으로 제공하기 위한 것이고, 특히 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana);은 피부 또는 헤어 색소침착을 감소시키는 용도의 활성 제제, 콩 (soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)은 피부 또는 헤어 색소침착을 상승시키는 용도의 활성 제제이다.

[0055] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면 피부 또는 헤어 색소침착을 감소 또는 상승시키기 위하여 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana); 콩 (soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 식물 추출물을 포함하는 화장품 조성물의 국소적 용도를 포함하는 화장 관리 방법이 제공된다.

[0056] 본 발명의 추가적인 관점에 따르면 피부 또는 헤어 색소침착을 감소 또는 상승시키기 위하여 Myo-X의 발현 또는 활성을 조절하는 활성 제제로서 본 발명의 방법에 의하여 얻을 수 있는, 1종 이상의 식물 추출물을 포함하는 화장품 조성물의 국소적 용도를 포함하는 화장 관리 방법이 제공된다.

[0057] 특히, 시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea

cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana)이 피부 색소침착을 감소시키는 활성 제제이고 콩 (soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)이 피부 또는 헤어 색소침착을 상승시키는 활성 제제이다.

[0058] 본 발명에 따라, 적어도 상기 개시된 식물 추출물은 화장품 조성물을 제조하기 위하여 사용되거나 피부 또는 헤어 색소침착을 밝게 또는 어둡게 하는 화장품 조성물의 제조에 있어 피부 또는 헤어 색소침착을 조절하는 활성 제제로서 사용된다.

[0059] 본 발명에 따라, 상기 식물 추출물은 건조 중량으로 표현하면 본 발명의 조성물 중량으로 0.0001% 내지 10%, 좋기로는 0.01% 내지 2%의 농도 범위로 사용된다.

[0060] 또 다른 관점에 따라, 본 발명은 Myo-X의 발현 또는 활성을 조절하는 활성 물질을 포함하는 화장품 조성물이 통상 피부 또는 헤어 색소침착을 감소 또는 증가시키기 위해 사용되는 화장 관리 방법을 제공한다.

[0061] 양호한 실시 상태로 상기 활성 물질은 Myo-X를 암호화하는 DNA 또는 RNA와의 상호 작용을 통해 Myo-X의 발현을 조절할 수 있는 핵산, 더 좋기로는 RNA 분자 또는 그들의 기능적 일부분이다.

[0062] 특히, 상기 RNA 분자는 Myo-X를 암호화하는 mRNA에 대해 안티-센스 상호 작용이나 RNA 간섭을 표적화할 수 있다.

[0063] 한 가지 실시 상태에 있어서 상기 RNA 분자는 RNAi를 통하여 Myo-X mRNA를 표적으로 하는, 5'-CAGCGGTATAAGAGAAATCAA-3' (SEQ ID N° 1)의 서열을 갖는 mRNA 분자이다.

[0064] Myo-X mRNA에 대한 RNAi를 나타내는 다른 적합한 서열을 결정하는 것은 이 기술 분야의 숙련자의 기술 범위 내이다.

[0065] 본 발명에 따른 화장품 또는 약학적 조성물, 특히 피부과학적 조성물은 따라서 색소침착을 감소시키고 싶은 경우 뿐 아니라 색소침착을 상승시키고 싶은 경우에도 미용학 또는 피부과학의 영역에서 다양하게 응용될 수 있다.

[0066] 예를 들어, 이들 탈색소 조성물은 인간 피부를 밝게하는 효과를 얻고자 하는 경우 또는 균일한 피부색을 얻고자 하는 경우에 사용될 수 있다. 이들은 또한 피부, 특히 얼굴이나 손과 같은 피부상에 더 어둡거나 더 많이 착색된 부분 및/또는 반점이 나타남으로 해서, 피부상에 이색이 지는 경우에도 사용될 수 있다. 이 반점은 멜라노사이트에서 멜라닌 생성 활성이 항진된 결과로 표피 케라티노사이트에 멜라닌이 고농도가 됨에 따른 것이다. 상기 조성물은 특히 특발성 기미와 같은 멜라노사이트 과활성에 기한 국소적인 과다 색소침착, 태양광 흑반 또는 노인성 흑반이라고 불리는 색소 형성 지점과 같은 멜라노사이트 과활성에 기한 국소적 과다 색소침착, 광과민 또는 상처-후 반흔과 같은 사고에 의한 과다 색소침착, 및 또한 백반증과 같은 특정한 형태의 백피를 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 후자의 경우, 피부에 색소 재침착은 가능하지 않으므로 피부를 더 균일한 색으로 맞추기 위해 탈색된 부분 주변의 색소침착을 줄이게 된다.

[0067] 본 발명의 양호한 실시상태로서, 최소한 피부 또는 헤어 색소침착을 감소시킬 수 있는 식물 추출물[시아테아 속 식물 (Cyathea genus plant) 추출물, 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 추출물 (Cyathea cumingii extract), 더 좋기로는 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (Cyathea cumingii leaf extract); 시케일 속 식물 (Secale genus plant) 추출물, 좋기로는 시케일 시리얼 추출물 (Secale cereale extract), 더 좋기로는 시케일 시리얼 종자 추출물 (Secale cereale seed extract); 탈라시오시라 속 식물 (Thalassiosira genus plant) 추출물, 좋기로는 탈라시오시라 수도나나 분비물 (secretion of Thalassiosira pseudonana)로 이루어지는 군으로부터 선택되는]을 포함하는 화장품 조성물이 특발성 기미, 흑반 등의 질병과 관련된 과다 색소침착을 포함하는 피부 또는 헤어 과다 색소침착의 미용적 치료를 위한 화장 관리 방법으로 사용된다. 상기 조성물은 백반증과 같이, 보통 또는 진한 피부에 둘러싸인 탈색 부분으로 인한 색소침착의 대조를 화장품으로 감소시키기 위한 화장 관리 치료법에도 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명에 따른 탈색화 조성물은 또한 특정한 사람들, 특히 자외선 조사에 매우 민감한 사람들이 피부색을 밝게 하기 위하여, 특히 얼굴과 손에, 피부색을 가능한 약하게 유지하기 위하여 또는 자외선의 색소 형성 효과를 최

소로 줄이기 위하여 피부-탈색 제제로 사용될 수 있다.

[0069] 반면, 본 발명에 따른 색소 형성 조성물은 태닝을 가속화하거나 강화하기 위한 일광 제품으로서 사용될 수 있는데, 태닝은 종종 일컬어지는 미용적인 이점 이외에도 표피에 멜라닌 비율을 증가시켜 자외선에 대한 자연 방어를 강화시킬 수 있다. 이 조성물은 예를 들어 피부에 좀 더 그을린 효과를 주기 위해서 크림의 형태로, 또는 회색모의 출현을 치료하고 방지하기 위하여 로션의 형태로 사용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 바람직한 실시 상태로 적어도, 피부 또는 헤어 색소침착을 상승시킬 수 있는 식물 추출물[콩(soybean) 추출물, 좋기로는 콩 종자 추출물 (soy seed extract), 더 좋기로는 콩 종자 과피 추출물 (soy seed pericarp extract)로 이루어지는 군에서 선택된]을 포함하는 화장품 조성물은, 예컨대 어루러기 (tinea versicolor), 백색 잔비늘증 (pityriasis alba), 전신 홍반 루푸스 (lupus erythematosus), 균상 식육종 (mycosis fungoides), 사르코이드증 (sarcoidosis), 나병 (leprosy), 매독 (syphilis) 및 탈색 모반 (nevus depigmentosus) : 등의 질병과 관련된 피부 또는 헤어 탈색화의 미용적 치료를 위한 화장 관리 방법으로 사용된다.

[0071] 추가적으로 본 발명에 따른 화장품 조성물은 적어도 식물 추출물 외에 자외선 차단제와 같은 피부 또는 헤어 색소침착을 조절하거나 그렇지 않은 기타 활성 제제를 포함할 수 있고, 또한 중합체, 계면 활성제, 유동성 조절제, 향료, 전해액, pH 조정제, 항산화제, 보존제, 염료, 진주층, 색소 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있는, 1종 이상의 화장품 재료로 허용되는 첨가제를 포함할 수도 있다.

[0072] 본 발명에서 언급하는 화장품 조성물은 국소용으로 사용되도록 의도된 것이다. 이 조성물은 예를 들어 세럼, 로션, 스프레이, 폼 (foam), 용액, 파우더, 머릿기름, 유액, 유화액, 착색 크림 또는 수분 겔일 수 있고, 스틱 (stick), 패치 또는 마스크 형태일 수 있다.

[0073] 이에 더하여, 본 발명에 따른, 국소 투여용 화장품 조성물은 예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 올레산 또는 필수 오일류, 특히 메탄올 및 유칼립톨 같은 화장품학 및 피부약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 제제 등 문제의 피부 구조 내로 침투 및 확산을 촉진시킬 수 있는 1종 이상의 제제를 포함할 수 있다.

[0074] 이하에, 본 발명의 실시 상태를 오직 예시 목적에서, 도면을 참고로 설명한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0075] 도 1은 정상적으로 색소침착된(normal pigmented) 인간 멜라노사이트에 있어서의 멜라닌 형성에 미치는 본 발명의 식물 추출물의 효과를 도시한다

도 2는 중간 정도로 색소침착된(moderately-pigmented) FM55 흑색종에 있어서의 멜라닌 형성에 미치는 본 발명의 식물 추출물의 효과를 도시한다.

도 3A 및 3B는 정상적으로 색소침착된 인간 멜라노사이트에 있어서의 티로시네이즈 활성에 미치는 본 발명의 식물 추출물의 효과를 도시한다.

도 4A 및 4B는 중간 정도로 색소침착된 FM55 흑색종에 있어서의 티로시네이즈 활성에 미치는 본 발명의 식물 추출물의 효과를 도시한다.

도 5A 및 5B는 정상적인 인간 멜라노사이트와 케라티노사이트 공배양체 중의 티로시네이즈 활성에 미치는 본 발명의 식물 추출물, IBMX 및 니아신아미드의 효과를 도시한다.

도 6은 본 발명의 식물 추출물과 함께 배양된 후의 멜라닌 소체 이동의 정량 분석 결과를 도시한다.

도 7A 및 7B는 정상적인 인간의 멜라노사이트에서 본 발명의 식물 추출물이 Myo-X 단백질에 미치는 효과를 웨스턴 블롯을 통하여 도시한다.

도 8은 표피의 멜라노사이트-케라티노사이트 공배양체에 있어서, 표피 멜라노사이트의 Myo-X 발현을 넉다운시킨 후 멜라닌 소체 이동의 정량 분석 결과를 도시한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0076] **배경기술:**

[0077] 이하 보고되는 결과에서 본 발명에 따라 사용된 식물 추출물은 각각 다음에 해당하는 그들의 원 코드명으로 구

별된다:

[0078] -L-18: 아르토카르푸스 헤테로필러스 종자 추출물,

[0079] -L-19: 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 (극성 용매 추출),

[0080] -L-20: 시케일 시리얼 종자 추출물 (극성 용매, 특히 물로 추출한 후 효소에 의해 가수 분해),

[0081] -L-21: 탈라시오시라 수도나나 분비물 (바닷물에서 배양하여 얻음)

[0082] -L-22: 콩 종자 과피 추출물 (수성 현탁 후 효소에 의해 가수 분해)

[0083] -L-23: 부들레자 아실라리스 잎 추출물 (추출/농축, 후 동결건조/멸균)

[0084] 이 보고는 정상인의 표피 멜라노사이트에 있어서, 이들과 완벽히 매치되는 표피 케라티노사이트로의 멜라닌 소체 이동에 미치는 여러 L-18 내지 L-23의 효과에 대한 결과를 제시한다. 각 활성 식물 추출물의 최적 투여량을 표피의 멜라노사이트 및 케라티노사이트에 대하여 각각 표준화하였다. a) 멜라닌 합성 및 b) 단독 배양된 멜라노사이트 및 매치되는 케라티노사이트와 같이 배양된 멜라노사이트 (즉, EM-KC 공배양체)를 이용한 티로시네이즈 활성도에 대한 모든 L-18 내지 L-23의 효과를 평가하였다. gp00 면역레이블링 (immunolabelling)으로 EM:KC 공배양체에서 멜라닌 소체 이동에 대한 활성 식물 추출물의 효과를 측정하였다.

[0085] 양성 멜라노사이트 모듈레이터 (IBMX) 및 멜라닌 소체 이동 억제제 (니아신아미드) 모두를 이 연구의 대조군으로 사용하였다.

[0086] 일반적으로, L-18, 19, 20, 21, 23은 멜라닌 합성, 티로시네이즈의 도파-산화효소 활성, 멜라닌 소체 이동, 및 Myo-X 발현을 하향 조절하였다. 사실, L-18 및 L-23은 탈색소 제제로 알려져 있었지만 이 변수들에 대한 이들의 작용은 지금까지 알려진 바 없었다. 반면, L-22는 상기 변수들을 상향 조절하는 것으로 밝혀졌다.

[0087] **재료 및 방법**

[0088] **본 발명의 식물 추출물의 멜라노사이트 및 흑색종 세포에 대한 자극**

[0089] **세포 배양:**

[0090] 이하 보고서에서, 사용된 출발 물질은

[0091] - L-18의 경우, 분말 (수성 모액에 넣어, 표시된 농도로 맞춤),

[0092] - L-19의 경우, 물/글리세롤 혼합물 중 건조 추출물 30%의 용액,

[0093] - L-20의 경우, 건조 추출물 5.6%의 수용액,

[0094] - L-21의 경우, 건조 추출물 6%의 수용액,

[0095] - L-22의 경우, 건조 추출물 15%의 수용액,

[0096] - L-23의 경우, 분말 (수성 모액에 넣어, 표시된 농도로 맞춤).

[0097] **투여량 평가:** 완전히 매치되는 표피 멜라노사이트 EM과 표피 케라티노사이트 (EK)를 6-웰 (well) 혈청-보충된 MEM 멜라노사이트 및 K-SFM 케라티노사이트 완전 (full) 배지에 깔고 24시간 동안 배양하였다. 세포를 L- 18 (0.001-0.005%), L- 19 (0.5- 1.0%), L-20 (0.1-0.5%), L-21 (10 μg/ml), L-22 (0.1-1.0%) 및 L-23 (0.01-0.05 μg/ml)으로 보충한 무혈청[소위 스타브드 (굶긴)] 배지로 옮겨 12시간 및 72시간 동안 배양하였다. 대조군은 IBMX (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM)을 포함하였다. 세포 독성은 세포 사멸 및 형태상 세포 병리적 변화로 평가되었다.

[0098] 대략 $1x10^4$ EM 및 $2x10^3$ FM55 의 흑색종 세포를 랩-텍® 8-웰 챔버 슬라이드 (Lab-tek® 8-well chamber slide)의 각 웰에 깔고 24시간 동안 붙였다. 세포를 350 μl의 신선한 무혈청 RPMI 배지 (흑색종 세포) 또는 스타브드 무혈청 및 BPE-프리 멜라노사이트 배지 (EM) 중 하나로 보충된 멸균 PBS로 씻고 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건 하에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 멸균 PBS로 세 번 씻고 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건 하에서 12, 24, 및 72시간 동안 $1x10^{-4}$ M IBMX로 배양하였다. 그 후 세포를 멸균 PBS로 가볍게 세 번 씻고 빙냉 (ice-cold) 메탄올로 -20℃에서 10분간 고정시켰다. 슬라이드를 면역세포화학을 실시할 때까지 -20℃에 저장하였다.

[0099] **멜라닌 분석:** 1M 수산화나트륨 (NaOH) (BOH Ltd, UK)에 500 μg/ml의 합성 멜라닌 (Sigma, UK)을 준비하고 20

분간 초음파 물 처리 수조에 용해시켰다. 이 원액으로부터 1M 수산화나트륨에 용해된 50 μg/ml 내지 1 μg/ml의 다양한 멜라닌 표준 용액을 준비하였다. 멜라닌 표준 용액을 96 웰 플레이트로 덜어 시험 샘플의 멜라닌 함량의 평가를 위한 교정 곡선을 그렸다. 1M 수산화나트륨 400μl를 각 세포 침전물에 첨가하여 히트 블록 (heat block) (100℃)에서 15분간 용해시켰다. 침전물을 격렬하게 볼텍싱 (vortexing)하고 용해된 침전물을 96-웰 플레이트로 옮겼다. 샘플의 최적 밀도는 디넥스 리빌레이션 4.02 프로그램 (DYNEX REVELATION 4.02 program) 상 495 nm에서 읽을 수 있었다. 각 시험 샘플의 멜라닌 함량은 교정 곡선으로부터 알 수 있다.

[0100] **티로시네이즈 활성 조사를 위한 비-변성 SDS-PAGE를 이용한 도파 산화효소 검출:** 대략 $5x10^5$ 의 EM, 및 FM55 흑색종 세포를 세 개의 T75 플라스크에 접종하고 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건 하에서 밤새 배양하였다. 세포를 SDS-PAGE 하고, PVDF 멤브레인 상으로 블롯팅하였다. 끓이지 않은 70μg의 비-환원 단백질 추출물을 8% SDS-PAGE 젤의 적당한 웰에 넣었다. 분리된 단백질들을 포함하는 PVDF 멤브레인을 1xPBS 로 한번 세척하고 실온에서 0.1M 인산 나트륨 완충용액에 녹인 5mM L-DOPA로 3시간 동안 진탕하였고, L-DOPA를 세 번 갈아주었다. L-DOPA 반응을 멤브레인을 증류수로 세척함으로써 중지하고 멤브레인을 스캔하였다.

[0101] **웨스턴 블롯 분석:** 융합 (confluent) T225 플라스크 내의 EM은 트립신 처리하여 완전 배지의 T25 플라스크로 접종되었고 밤새 붙였다. 웨스턴 블롯 24시간 전에 배지fmf 스타브드 배지로 교체하여 24시간 동안 두었다. 세포를 멸균 PBS로 세 번 세척하고 스타브드 배지만 있는 상태에서, 또는 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21 (10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05μg/ml)와 함께 12시간 및 72시간 동안 배양하였다. 대조군은 IBMX (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM)을 포함하였다. 각 세포 추출물로부터 총 40μg의 단백질을 환원 SDS-8%-PAGE에서 전기 영동하고 PVDF 멤브레인 (Millipore Corporation, Bedford, MA)으로 블롯팅하였다. 멤브레인을 2시간 동안 실온에서 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20으로 블로킹 (blocking)하고 4℃에서 밤새 1차 항체를 붙였다 (probe). 분자량 마커 (Magik Marker, Invitrogen)를 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20으로 반응시키고 멤브레인 조각을 1ml의 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20 (음성 대조군), 또는 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20 내 항-Myo-X 토끼 다클론성 항체 (1:200) 1ml, 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20 내 항-패신 (fascin) 토끼 다클론성 항체 (1:500) 1ml 및 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20 내 항-액틴 염소 다클론성 항체 1ml 중 하나로 4℃ 로킹 플랫폼 (rocking platform)상에서 밤새 반응시켰다.

[0102] 여러 차례 세척한 후 블롯을 겨자무 과산화효소 (horseradish peroxidase)와 접합된 이차 항체와 2시간 동안 반응시켰다. 분자량 마커는 그 후 5% 우유 PBS/0.075% Tween 20 내에서 희석된 항-인간 IgG (H+L) (Zymed, USA) HRP-염소 항체 1ml와 반응시키고 멤브레인 조각은 1ml의 항-토끼 IgG, 겨자무 과산화효소가 결합된 완전 이차 항체 (HRP) (Amersham Biosciences, UK) (5% 우유 PBS/0.075% Tween 20에서 1:700으로 희석)와 실온에서 2시간 동안 로킹 플랫폼에서 반응시켰다. 세척 과정을 반복하고 멤브레인 조각을 LumiGLO® 시약 및 Peroxide (BioLab Ltd, UK)로 실온에서 2분간 반응시켰다. 블롯 조각을 다양한 노출 시간으로 코닥 XRA 엑스-레이 필름 (Kodak, UK)에 노출시켜 화학 발광 신호를 검출하고, 이어서 밴드가 나타날 때까지 현상액 (Kodak, UK)에 담궈 현상하고, 수돗물에 헹구고, 필름이 푸르게 변할 때까지 고정액 (Kodak, UK)으로 고정시키고 수돗물로 헹군 후 건조하였다. 그 후 멤브레인에 제목을 붙여 소프트웨어 (Image Master Total lab version1.11)를 이용, 스캔 밀도 분석하였다.

[0103] **면역형광 염색:** EM:KC 공배양체 연구를 위하여 완전하게 매치되는 멜라노사이트 (p4)와 케라티노사이트 (p2)를 8-웰 랩-텍® 챔버 슬라이드에 $1x10^4$ 세포/웰의 밀도 및 멜라노사이트 1개 대 케라티노사이트 10개의 비율로 깔았다. 공배양체는 밤새 (16시간) K-SFM 및 MEM 완전 배지 혼합물 (공배양 배지)에서 배양되어 세포가 잘 붙을 수 있게 하고, 그 후 추가 24시간 동안 배지를 보충하였다. 그 후 사상 위족 (filopodia) 내에서 단백질 발현을 검출하기 위하여 세포를 차가운 (ice-cold) 메탄올로 -20℃에서 10분간 고정시키고, PBS로 세척한 후 10% 당나귀 세럼으로 블로킹하였다. 이중 레이블링 (double labelling) 실험을 위하여 첫번째 1차 항체, Myo-X (1 :100) (Santa Cruz, California, USA)를 4℃에서 밤새 반응시키고, FITC-접합 2차 항체 (1:100)와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 두 번째 1차 항체, 사이토케라틴 (1 :100) (Abeam, Cambridge, UK) 또는 β-Actin (1 :100) (Santa Cruz, USA) 또는 패신 (Fascin) (1 :100) (Santa Cruz, USA) 또는 NKi/beteb (1 :30) (Monosan) 중의 한 가지를 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후, TRITC-접합 2차 항체 (1 :100) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)를 반응시켰다. DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 핵을 염색하기 위하여 사용하였다. 이미지는 저온 상태의 하마마츠 디지털 카메라 (Hamamatsu digital camera)의 100 배율 대물렌즈로 캡쳐(capture)하고 Paint Shop Pro (Jasc Software Ver. 7. CA, USA) 프로그램으로 후-처리하였다. 음성 대조군은 1차 항체를 생략하고 2차 항체 숙주의 비-면역 혈청으로 대체하였고 2차 항체를 처리하였

다.

[0104] **멜라닌 소체 이동에 대한 정량 분석:** 정상인 4명 (즉, F39; F67; F54; F52)의 완전하게-매치되는 표피 멜라노사이트(p4) 와 표피 케라티노사이트(p2)를 8-웰 랩-텍® 챔버 슬라이드에 $2x10^4$ 세포/웰의 총 밀도 및 멜라노사이트 1개 대 정상 케라티노사이트 10개의 비율로 유지하였다. 공배양체를 추가 24 시간동안 유지하였고, 그 후 멸균 PBS로 세 번 세척하고 스타브드 배지에서만 또는 L-18 (0.001%) , L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21(10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05μg/ml)를 포함한 배지에서 12 시간 및 72 시간 동안 배양하였다. 대조군은 IBMX (100 μM) 와 니아신아미드 (10 μM)을 함유하였다. 그 후 세포들을 gp100으로 면역 형광 염색을 거쳐 케라티노사이트로의 멜라닌 소체의 이동을 조사하였다.

[0105] 멜라닌 소체 이동의 측정은 세 차례의 독립적인 실험에서 웰당 5개소에 대해 무작위로 100배율의 현미경 관찰 [액침 (oil-immersion)]을 한 결과 수용체인 케라티노사이트 내에서 형광을 내는 gp100-양성 지점을 계수함으로써 이루어졌다. 여전히 멜라노사이트와 관련되어 있는 멜라닌 과립의 계수를 회피하기 위하여, 멜라노사이트와 직접 접촉하고 있지 않은 케라티노사이트 내의 gp100-양성 지점만을 계수하였다.

[0106] siRNA를 이용한 Myo-X의 넉다운 실험: 인간의 Myo-X (5'- C AGCGGTATAAGAGAAATCAA-S') (SEQ ID NO 1)를 표적으로 하는 합성 siRNA 및 포유류의 유전자들과 알려진 상동성을 갖지 않는 siRNA로 이루어진, 논-사일런싱 대조군 (non-silencing control)을 콰이젠 사 (Qiagen, Valencia, CA)로부터 구매하였다. siRNA 처리 하루 전, 웰당 5 x $10^5$의 표피 멜라노사이트를 6-웰 플레이트에 50 내지 60%의 밀도로 깔고 37℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 그 후 세포를 하이퍼펙트 트랜스펙션 제제 [HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA)]를 이용하여 제조사의 설명에 따라 siRNA의 최종 농도가 25 nM이 되도록 12 시간 동안 처리하였다. 형광 현미경을 사용하여 거의 100%의 세포가 siRNA를 받아들였다는 것을 확인하였다 [알렉사 플루오르 488 (alexa fluor 488)로 레이블한 논-사일런싱 대조군을 사용하였다]. 12 시간 후, 각 웰의 세포들을 8-웰 랩-텍® 챔버 슬라이드에 다시 깔았다. 공배양체 연구를 위하여 siRNA 처리한 멜라노사이트를 정상 케라티노사이트(패시지 2)와 함께 8-웰 랩-텍® 챔버 슬라이드에 $2x10^4$ 세포/웰의 밀도 및 siRNA 처리한 멜라노사이트 1개 대 정상 케라티노사이트 10개의 비율로 깔았다. 24 시간 후, 멜라닌 소체 이동에 대한 유전자 넉다운의 영향을 연구하기 위하여 상기 공배양체를 gp100과, 사이토케라틴 또는 Myo-X로 이중 면역 형광 염색 처리하고, 유전자 넉다운을 확인하기 위하여 상응하는 표본을 면역 형광 염색법 및 웨스턴 블롯 분석으로 실험하였다. 또 다른 실험을 위하여 이 공배양체를 24 시간 동안 L-18 내지 23으로 처리하지 않거나, 처리하였다.

[0107] **결과/고찰:**

[0108] **식물 추출물 L-18 내지 23의 투여량 선택:**

[0109] 세포들을 각종 농도의 식물 추출물 및 색소 모듈레이터 (IBMX 및 니아신아미드)와 함께 배양하였다. 몇몇 투여량에 대해서는 세포 사멸 또는 세포 형태상의 비정상적인 변화 (예컨대, 액포 형성)가 일어났다. 본 발명의 발명자들은 세포 생장 또는 형태를 변화시키지 않는 L-18 내지 23의 최적 활성 투여량을 제시한다. 그러므로 이 투여량은 이하 본 연구에서 사용되었다.

[0110] 정상인의 표피 케라티노사이트 배양체 (여성-67; p2)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21(10 μg/ml), L-22 (1%) 및 LVMH-23 (0.05μg/ml)으로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM).

[0111] 정상인의 표피 멜라노사이트 배양체 (여성-67; p4)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21(10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05μg/ml)으로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM).

[0112] **실험 설계를 위한 투여량 선택**

| 식물 추출물 | MC-KC 공배양체에 대한 연구를 위한 최종 투여량 선택 |
|---|---|
| L-18 | 0.001% |
| L-19 | 1.0% |
| L-20 | 0.5% |
| L-21 | 10㎍/ml |
| L-22 | 1.0% |
| L-23 | 0.05㎍/ml |

[0113]

[0114] **멜라닌 형성에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과:**

[0115] 정상인의 표피 멜라노사이트 (F52; p5) 및 인간 흑색종 세포 (FM55)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21 (10 ㎍/ml), LVMH-22 (1%) 및 L-23 (0.05 ㎍/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 그 밖에, IBMX 및 $NH_4Cl$ (양성 멜라노사이트 모듈레이터) 및 니아신아미드 (음성 모듈레이터)를 대조군으로 사용하였다. 정상 멜라노사이트에서는 그들의 이미 높은 멜라닌의 기저 수준 때문에 뚜렷한 변화는 특히 관찰되지 않았다 **(도 1)**. 반면에, 흑색종 세포에서는 멜라닌의 기저 수준이 낮기 때문에 뚜렷한 변화가 관찰되었다 **(도 2)**. L-19, L-20, L-21 및 L-23은 정상적인 멜라노사이트와 FM55 흑색종 세포 양자 모두에서 기저 수준에 비해 멜라닌 함량을 크게 감소시켰다. 그러나 L-22는 기저 수준에 비해 멜라닌 함량을 증가시키는데 관련되어 있었다. L-18은 이 세포들에서 현저한 변화를 일으키지 못했다. **표 1**과 **도 1 및 도 2**에 결과가 요약되어 있다.

[0116] **도 1: 정상적으로 색소침착 수준의 인간 멜라노사이트에서 멜라닌 형성에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23 활성 성분의 효과**

[0117] 정상인의 표피 멜라노사이트 (F52; p5)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21 (10 ㎍/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05 ㎍/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 ㎛M), $NH_4Cl$ (100 ㎛M) 및 니아신아미드 (10 ㎛M).

[0118] (A) 멜라닌 함량을 수산화나트륨에 용해시켜 분광-광도계 (475 nm)로 측정하였다.

[0119] (B) 이 세포들에서는 이미 높은 멜라닌의 기저 수준 때문에 뚜렷한 변화는 특히 관찰되지 않았다. 결과를 자극받지 않은 대조 수준에 대한 멜라닌 함량 (pg/세포)의 변화로 표현하였다. 평균값은 3회의 독립적인 실험 후 *P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다. NS -Not Significant (유의하지 않음)

[0120] **도 2: 중간 정도로 색소침착된 FM55 흑색종에서 멜라닌 색소침착에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과**

[0121] FM55 세포를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), LVMH-21(10 ㎍/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05㎍/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 ㎛M), $NH_4Cl$ (100 ㎛M) 및 니아신아미드 (10 ㎛M).

[0122] (A) 멜라닌 함량을 수산화나트륨에 용해시켜 분광-광도계 (475 nm)로 측정하였다. 멜라닌 기저 수준이 낮은 세포들은 IBMX 및 $NH_4Cl$ 자극 후 멜라닌 형성에 있어서 눈에 띄는 증가를 나타내었다.

[0123] (B) 결과를 자극받지 않은 대조 수준에 대한 멜라닌 함량 (pg/세포)의 변화로 표현하였다. 평균값은 3회의 독립적인 실험 후 *P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다. NS -Not Significant (유의하지 않음)

표 1

식물 추출물 L-18 내지 23과 반응시킨 후 멜라닌 수준의 변화

| | 기저수준 | 음성 대조군 | IBMX | $NH_4Cl$ | L-18 | L-19 | L-20 | L-21 | L-22 | L-23 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F52 EM (% 변화) | 0 | -4.01 | +74.57 | +166.17 | -4.57 | -34.43 | -15.66 | -43.58 | +31.60 | -25.25 |
| (pg/세포) | (35.63) | (34.2) | (62.2) | (94.83) | (34.04) | (23.36) | (30.62) | (20.2) | (46.89) | (26.62) |
| FM55 (% 변화) | 0 | -5.94 | +250.8 | +478.82 | -3.22 | -21.90 | -20.36 | -68.66 | +29.33 | -33.20 |
| (pg/세포) | (9.92) | (9.33) | (34.8) | (56.83) | (9.62) | (7.74) | (7.92) | (4.2) | (12.82) | (6.63) |

[0124]

[0125] **티로시네이즈 활성에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과:**

[0126] 정상인의 표피 멜라노사이트 (F52; p5) 및 인간 흑색종 세포 (FM55)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21(10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05 μg/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 그 밖에, IBMX 및 $NH_4Cl$ (양성 멜라노사이트 모듈레이터) 및 니아신아미드 (음성 모듈레이터)를 대조군으로 사용하였다. IBMX 및 $NH_4Cl$은 EM 및 FM55 세포 양자 모두에서 티로시네이즈의 도파 산화효소 활성의 극적인 증가와 관련되어 있었다 **(도 3 및 도 4)**. L-18 내지 23 중, L-19, L-20, L-21 및 L-23은 정상 멜라노사이트 및 FM55 흑색종 세포 양자 모두에 있어서 티로시네이즈 활성을 기저 수준에 비해 현저히 감소시켰다 **(도 3 및 도 4)**. 반면, L-22는 기저 수준과 비교하여 티로시네이즈 활성의 현저한 증가와 관련되어 있었으며, 한편 L-18은 어떤 눈에 띄는 변화도 일으키지 못하였다. **표 2**에 이 결과들이 요약되어 있다.

[0127] **도 3: 색소침착된 정상인의 멜라노사이트에서 티로시네이즈 활성에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과**

[0128] 정상인의 표피 멜라노사이트 (F52; p5)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21 (10 μg/ml), LVMH-22 (1%) 및 L-23 (0.05 μg/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 μM), $NH_4Cl$ (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM).

[0129] (A) 티로시네이즈 활성을 측정하기 위하여 단백질 추출물을 전기블롯팅하고 멤브레인을 L-도파로 염색하였다.

[0130] (B) 밴드 세기를 농도 스캐닝하고 그 값을 자극받지 않은 대조군의 수준에 대한 증가 배수로 나타내었다. 평균값은 3회의 독립적인 실험 후 *P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다. NS -Not Significant (유의하지 않음).

[0131] **도 4: 중간 정도로 색소침착된 FM55 흑색종에서 티로시네이즈 활성에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과**

[0132] FM55 세포를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21 (10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05μg/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 μM), $NH_4Cl$ (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM).

[0133] (A) 티로시네이즈 활성을 측정하기 위하여 단백질 추출물을 전기블롯팅하고 멤브레인을 L-도파로 염색하였다.

[0134] (B) 밴드 세기를 농도 스캐닝하고 그 값을 자극받지 않은 대조군의 수준에 대한 증가 배수로 나타내었다. 평균값은 3회의 독립적인 실험 후 *P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다. NS -Not Significant (유의하지 않음).

표 2

식물 추출물 L-18 내지 23 과 반응시킨 후 티로시네이즈 활성의 변화

[0135]

| | 기저수준 | 음성 대조군 | IBMX | $NH_4Cl$ | L-18 | L-19 | L-20 | L-21 | L-22 | L-23 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F52 EMc (% 변화) | 0 | -4.58 | +72.47 | +159.63 | -6.17 | -55.23 | -13.76 | -60.55 | +16.50 | -39.44 |
| FM55 (% 변화) | 0 | -3.31 | +141.72 | +408.27 | -5.29 | -50.37 | -22.15 | -42.54 | +43.54 | -42.88 |

[0136] 그러나, EM 단독 배양의 결과는 케라티노사이트의 측분비 영향 (paracrine influences)을 전적으로 반영하지 못할 수 있고 따라서 이로부터 L-18 내지 23와 관련된 효과가 전적으로 드러나지 않을 수 있다. 그러므로, 완전히 매치되는 EM:KC 공배양체에서 두 가지 식물 추출물, 즉 어떤 변화도 보이지 않았던 추출물 (L-18)과 현저한 감소를 보였던 추출물 (L-23)로 티로시네이즈 활성에 대한 상기 측정을 반복하였다. 공배양체 조건하에서, L-18이 이제는 티로시네이즈의 도파 산화효소 활성을 현저히 감소시켰다는 점이 흥미롭다 (EM 세포 단독 배양 시 -3.46%였던 것이 매치되는 KC와 공배양 시 -57.02%로 감소됨). L-23의 경우, 공배양 시는 티로시네이즈의 도파 산화효소 활성을 더욱 감소시켰음을 볼 수 있다 (단독 배양에서 -41.16%였으나 공배양에서는 -76.17%로 감소하였다) **(도 5 및 표 3)**. 이와 유사한 양적 및 음적 경향을 또한 IBMX와 니아신아미드에서도 각각 볼 수 있다.

[0137] **도 5: 정상인의 멜라노사이트와 케라티노사이트의 공배양체에 있어서 티로시네이즈 활성에 미치는 식물 추출물 L-18 및 L-23, IBMX 및 니아신아미드의 효과 (주: 단백질 로딩량은 멜라노사이트 단백질에 대해서만 평준화되었다).**

[0138] 정상인 표피 멜라노사이트 배양체 (여성-52;p5) 및 매치되는 공배양체 F52 MC-KC를 L-18 (0.001%), L-23 (0.05 μg/ml)로 72 시간 동안 처리하였다. 대조군 : 멜라노사이트 모듈레이터 : IBMX (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM). 음성 대조군 레인: 케라티노사이트 단독

[0139] (A) 티로시네이즈 활성을 측정하기 위하여 단백질 추출물을 전기블롯팅하고 멤브레인을 L-도파로 염색하였다.

[0140] (B) 밴드 세기를 농도 스캐닝하고 그 값을 자극받지 않은 대조군의 수준에 대한 증가 배수로 나타내었다. 평균값은 3회의 독립적인 실험 후 *P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다.

표 3

식물 추출물 L-18 내지 23으로 반응시킨 후 EM:KC 공배양체에 대한 EM 티로시네이즈 활성의 변화

[0141]

| | 기저수준 | | 음성 대조군 | | L-18 | | L-23 | | IBMX | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | EM | EM-EK | EM | EM-EK | EM | EM-EK | EM | EM-EK | EM | EM-EK |
| EM 티로시네이즈 활성 대 EM 기저 수준(즉,0)의 % 변화 | 0 | +12.16 | -2.12 | -20.50 | -3.46 | -57.02 | -41.16 | -76.17 | +56.51 | +93.41 |
| 자극 받은 EM의 티로시네이즈 활성 vs 자극 받은 EM-EK 수준 (즉12,16)의 % 변화 | | +12.16 | | -18.84 | | -56.47 | | -57 | | +23.57 |

[0142] **식물 추출물 L-18 내지 23을 이용한 gp100-양성 멜라닌 소체 이동의 정량 분석:**

[0143] Gp100 면역형광법은 케라티노사이트로의 멜라닌 이동에 대한 일반적 시험 및 멜라노사이트 표현형 모듈레이터 평가용으로 강력한 추적법을 제공한다 (Singh et al, 2008). L-18 내지 23 모두, 포스포디이스터레이즈 억제제 IBMX (phosphodiesterase inhibitor IBMX) (예컨대, cAMP 유도체) 및 니아신아미드로 처리한 후 EM:KC 공배양체를 이중 면역레이블링 (NKi/beteb 및 항-사이토스켈레톤 항체)한 결과, 케라티노사이트 내 녹색 형광 gp100-양성 멜라닌 과립의 수에 명백한 변화가 일어났음을 알 수 있다 (도 6). 이 실험에서 기본 조건 (즉, 자극이 없는 경우)하에서 멜라노사이트로부터 매치되는 케라티노사이트로의 멜라닌 소체의 이동이 케라티노사이트 당 평균 27.3개의 gp100-양성 지점에서 측정되었다. 그러나 이 결과는 공배양체를 IBMX로 자극한 24시간 이후에는, gp100-양성 지점이 케라티노사이트 당 99.5개로 거의 4배로 증가하였다. 반면, 니아신아미드는 멜라닌 소체 이동을 28% [케라티노사이트 당 19.6개의 gp100-양성 지점; $p<0.01$; 피부 색소침착에 대한 미백제로서의 임상적 사용과 관련한 결과 (Hakozaki et al, 2002; Greatens et al., 2005)] 감소시켰다.

[0144] L-18, L-19, L-20, L-21 및 L-23 모두 자극받지 않은 대조군에 비하여 멜라닌 소체 이동을 감소시킨 것으로부터 볼 수 있듯이 멜라닌 소체 이동을 현저하게 감소시켰다. 반면, 공배양체를 L-23으로 자극한 경우에는 자극하지 않은 기저 수준에 비하여 케라티노사이트로의 멜라닌 소체 이동의 증가가 관찰되었다.

[0145] **도 6: 식물 추출물 L-18 내지 23로 반응시킨 후 멜라닌 소체 이동의 정량 분석 (표 4)**

[0146] 매치되는 멜라노사이트-케라티노사이트 공배양체 (여성-39)를 24시간 동안 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21(10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05μg/ml) 및 이와 병행하여 공지의 멜라노사이트 모듈레이터 (IBMX) (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM)로 처리하였다. 항-gp100 항체 (녹색) 및 항-액틴 항체 (붉은색)으로 이중 면역레이블링한 결과는 케라티노사이트 내로 이동되는 형광 지점의 수에 있어 명확한 변화를 보여주었다. 각기 다른 치료 그룹에 대하여 무작위로 선택된 5개소의 현미경 시야 범위 (microscopic field) (시야 범위당 총 20개 세포가 존재)로부터 이동된 멜라닌 소체의 정량 분석이 이루어졌다. 수치는 자극되지 않은 대조군 수준에 비하여 케라티노사이트 당 gp100-양성 지점의 수의 퍼센트 증가로 표현되었다. 평균값은 4회의 독립적인 실험을 통한 **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다.

*표 4*

| gp100+ 지점/케라티노사이트 | 27.3 ±0.9 | 99.5 ±5.4 | 19.6 ±0.7 | 17.8 ±1.5 | 16.5 ±1.9 | 21.7 ±0.8 | 17.6 ±0.9 | 36.0 ±2.9 | 14.5 ± 2.2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 멜라닌 이동의 퍼센트 변화 대 기저 수준 % | | +264 | 28 | 34 | 39 | 26 | 35 | +31 | 47 |

[0147]

[0148] **정상인 멜라노사이트 내의 Myo-X에 대한 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과**

[0149] Myo-X (데이터는 나타내지 않음) 및 gp100에 대한 항체로 이중 면역레이블링한 결과, EM 세포 주변부 및 수상돌기 말단에서 Myo-X가 두드러지게 발현한 것으로 나타났다. Myo-X는 또한 EM 사상 위족에서도 검출되었다. 본 발명자들은 IBMX가 Myo-X의 발현 및 사상 위족의 총 수를 증가시킨다는 것 (EM 수상 돌기 말단 너머의 노란 지점의 총 수로 제시되었다)을 발견하였다. IBMX는 또한 자극되지 않은 세포들과 비교하여 EM 사상 위족 내에 Myo-X의 집중 (localization)을 향상시킨다. 반면, Myo-X의 발현은 L-18, L-19, L-20, L-21 및 L-23에 의해서도 현저하게 하향-조절되지만, L-22에 의해서만 상향조절되었다. EM 사상 위족 내 Myo-X의 집중은 또한 이 식물 추출물들에 의하여 현저하게 감소되었다.

[0150] IBMX (100 μM)로 12 시간 동안 자극된 EM (F39)의 웨스턴 블롯 결과는 미처리 대조군에 비하여 Myo-X의 발현이 3배 증가하였음을 보여준다 (도 7A, B). 반면, 멜라닌 소체 이동 억제제 니아신아미드 (10 μM)는 Myo-X의 발현을 60% 감소시켰다. L-22를 제외하고는, L-18 내지 23 모두 EM Myo-X의 발현을 현저하게 하향 조절하였다 (도 7A, B).

[0151] **도 7: 정상인 멜라노사이트에 있어서 웨스턴 블롯으로 실험한 Myo-X 발현에 미치는 식물 추출물 L-18 내지 23의 효과**

[0152] 정상인의 표피 멜라노사이트 배양체 (F39-EM)를 L-18 (0.001%), L-19 (1%), L-20 (0.5%), L-21(10 μg/ml), L-22 (1%) 및 L-23 (0.05μg/ml)로 12 시간 동안 처리하였다. 대조군: IBMX (100 μM) 및 니아신아미드 (10 μM).

[0153] (A) 세포 추출물을 항-Myo-X를 사용하여 웨스턴 블롯 분석하였고 항-β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0154] (B) Myo-X 및 액틴 밴드의 세기에 대한 농도 분석을 자극되지 않은 대조군에 대한 퍼센트 변화로 나타내었다. 평균값은 3회의 독립적인 실험을 통한 **P<0.01, ***P<0.001인 ±표준오차 (SEM) 범위 내이다.

[0155] **표피 멜라노사이트에서의 Myo-X의 넉다운은 표피 케라티노사이트로의 멜라닌 소체 이동을 억제한다.**

[0156] 멜라닌 소체 이동에 있어서 Myo-X의 역할을 인간 Myo-X 및 논-사일런싱 대조군 siRNA에 대하여 합성 siRNA를 사용하여 조사하였다. 멜라노사이트 세포에서의 Myo-X 사일런싱은 웨스턴 블롯 분석으로 실험되었다. 또한 이 억제를 면역형광법으로 확인하였는데, 이 결과도 마찬가지로 논-사일런싱 대조군 siRNA에 비하여 거의 완전하게 Myo-X의 발현이 억제됨을 보여주었다. Myo-X를 침묵시킨 (Myo-X-silenced) 멜라노사이트를 항-gp100 항체로 이중 면역레이블링한 결과, 멜라노사이트 말단 주변의 gp100-양성 멜라닌 소체의 결여로부터 입증되는 바와 같이 사상 위족이 부재하는 것으로 나타났다. 논-사일런싱 대조군 siRNA로 처리한 멜라노사이트는 사상 위족 부분에서 두드러진 Myo-X 및 gp100을 나타내었다.

[0157] 본 발명자들은 내인성 Myo-X의 발현이 멜라노사이트의 사상 위족을 통한 멜라닌 소체의 이동에 필요한 것인지 여부를 알고 싶었다. 멜라닌 이동에 Myo-X가 관여하는지의 여부를 시험하기 위하여, Myo-X를 침묵시킨 멜라노사이트와 침묵시키지 않은 멜라노사이트를 이용하여 24 시간 동안 MC-KC 공배양체를 구축하였다. 이 공배양체를 항-gp100 항체 및 항-Myo-X로 이중 면역레이블링한 결과, Myo-X를 침묵시킨 멜라노사이트와 함께 배양된 케라티노사이트로 이동된 형광 지점의 수가 억제되었음이 명백하다. 항-gp100 항체 및 항-사이토케라틴으로 이중-면역레이블링한 결과는 케라티노사이트로 이동되는 형광 지점 (멜라닌 과립을 나타낸다)의 수의 명확한 변화를 보여준다.

[0158] 이 실험을 통하여 논-사일런싱 대조군 siRNA 조건 하에서의 멜라노사이트로부터 케라티노사이트로의 멜라닌 소체의 이동률이 결정되었다 **(도 8)**. 이 멜라닌 소체 이동 수준은 Myo-X를 침묵시킨 멜라노사이트와 정상적인 케라티노사이트 세포를 함께 24 시간 동안 배양한 경우 80% 감소하였다 **(도 8)**. 이 결과는 멜라노사이트로부터 케라티노사이트로의 성공적인 멜라닌 소체의 이동에 있어서 Myo-X의 생리적 역할에 대한 첫번째 증명이다.

[0159] 이하의 실시예들에 있어서, 퍼센트는 조성물의 총 중량에 대한 중량을 의미한다. 식물 추출물의 양은 건조 중량으로 표현된다.

[0160] 실시예 1:

[0161] 안색을 밝게 하기 위한 화장품 파우더

[0162] 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 0.5%

[0163] 마이크로셀룰로오스 20.0%

[0164] 소듐 라우릴 설포아세테이트 15.0%

[0165] (Sodium lauryl sulphoacetate)

[0166] 향료, 색소, 보존제 충분량

[0167] 탈크 100%되게 하는 양

[0168] 이 파우더는 피부를 깨끗하게 하고, 또한 며칠간 정기적으로 사용할 경우 안색을 밝게하는 것이 가능하다. 하루에 한 번 또는 두 번 얼굴 피부에 도포한다.

[0169] 실시예 2:

[0170] 에멀전-겔 제형의 미백용 데이 크림 화장품

[0171] 시케일 시리얼 종자 추출물 0.1%

[0172] 글리세롤 5.0%

[0173] 카프릴산/카프르산/숙신산 트리글리세리드 5.0%

[0174] 옥틸 메톡시시나메이트 1.0%

[0175] (Octyl methoxycinnamate)

[0176] 코폴리올 디메티콘 0.5%

[0177] (Copolyol dimethicone)

[0178] 아크릴레이트/C 10-30 알킬 아크릴레이트 가교중합체 0.5%

[0179] (Acrylates/C 10-30 alkyl acrylate crosspolymer)

[0180] 중화제 필요량

[0181] 보존제, 착취제 (odorant), 착색제 (colouring agents) 필요량

[0182] 물 100%되게 하는 양

[0183] 일광, 또는 심지어 직사광선에 기인한 다소 강한 일광 조사를 받는 일부 사람들은 밝은 피부를 유지하고 싶어하고 색소침착 부분이 나타나는 것을 피하고 싶어한다.

[0184] 상기 정의된 에멀전-겔을 사용하는 것은 이 목적을 달성하기 위한 수단을 제공한다. 본 조성물은 보통 아침에 얼굴에 도포한다. 이 조성물은 얼굴의 규칙적 또는 비규칙적인 색소침착을 예방 및 치유하는데 있어서는 동일하게 효과적이다.

[0185] 실시예 3:

[0186] 색소침착 반점을 예방하는 SPF 30의 보호용 플루이드

[0187] 탈라시오라 수도나나 추출물 0.01%

[0188] 휘발성 펜타시클로메타콘 49.0%

[0189] 티타늄 디옥사이드 15.0%

[0190] 옥틸 메톡시시나메이트 7.5%

[0191] 글리세린 5.0%

[0192] 페닐트리메티콘 5.0%

[0193] 코폴리올 디메티콘 3.0%

[0194] 폴리메틸메타아크릴레이트 2.5%

[0195] 부틸 메톡시디벤조일 메탄 1.0%

[0196] 중화제, 착취제, 보존제, 항산화제 필요한 경우

[0197] 물 100%되게 하는 양

[0198] 본 보호용 플루이드는 색소침착 반점이 생기는 사람들에게 있어서, 강한 태양 복사선에 노출되기 전에 이 현상을 예방하기 위하여 사용된다. 솔라 필터 중의 농도가 높을 경우 멜라닌 함량의 감소로 인한 자연적 방어 기능의 감소가 뒤따르게 됨을 유의해야 한다.

[0199] 실시예 4:

[0200] 병리상 또는 외상에 근거한 피부색소 과다침착의 치료를 위한 피부과 크림

[0201] 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 0.3%

[0202] 글리세릴 스테아레이트 + PEG- 100 스테아레이트 5.0%

[0203] 수화 폴리이소부텐 4.0%

[0204] 마그네슘 아스코르빌 포스페이트 3.0%

[0205] 글리세릴 트리카프릴레이트/카프레이트 3.0%

[0206] 스쿠알렌 3.0%

[0207] 글리세롤 2.0%

[0208] 밀랍 1.5%

[0209] 세테아릴 옥타노에이트 1.5%

[0210] 세틸 알코올 1.0%

[0211] 스테아릴 알코올 1.0%

[0212] 디메티콘 1.0%

[0213] 크산탄 고무 0.3%

[0214] 에틸렌디아민테트라아세트산 0.2%

[0215] 시트르산 0.1%

[0216] 소듐 사이트레이트 0.1%

[0217] 중화제, 향료, 보존제 충분량

[0218] 물 100%되게 하는 양

[0219] 본 크림의 사용은 병리적 또는 외상에 근거한 피부색소 과다침착을 완화시킨다. 또한 본 크림은 백피의 경우 탈색 부분 주변의 색 대비를 감소시킬 수 있다.

[0220] 실시예 5:

[0221] 안색을 밝게 하기 위한 페이스 로션 화장품

[0222] 탈라시오시라 수도나나 0.01%

[0223] 에틸 알코올 30.0%

[0224] PPG-3 미리스틸 에테르 5.0%

[0225] 글리세롤 2.0%

[0226] 카보머 0.2%

[0227] 폴리소르베이트 20 0.2%

[0228] 중화제, 향료, 보존제 충분량

[0229] 물 100%되게 하는 양

[0230] 안색을 밝게 하기 위한 이 로션은 피부의 메이크업을 지우고 깨끗하게 한 후 사용된다.

[0231] 실시예 6:

[0232] 페이스 라이트닝 세럼 화장품

[0233] 시케일 시리얼 (호밀) 종자 추출물 0.2 %

[0234] 글리세롤 2%

[0235] 테트라소듐 EDTA

[0236] 시트르산 원하는 pH의 충분량

[0237] 트리소듐 사이트레이트

[0238] 크산탄 고무 0.3 %

[0239] 폴리아크릴아미드, C13-14 이소파라핀, 라우레스-7 0.5 %

[0240] 디메티콘 코폴리올 0.3 %

[0241] 향료, 염료, 보존제 충분량

[0242] 물 100%되게 하는 양

[0243] 고농축된 본 세럼 조성물 한 방울을, 일반적으로 페이스 크림의 도포 전에 도포한다. 본 세럼은 보통 안색의 라이트닝 효과를 얻기 위하여 또는 유지하기 위한 치료용으로 1주 내지 2주간 사용된다.

[0244] 실시예 7:

[0245] 체모의 라이트닝 화장품 로션

[0246] 탈라시오시라 수도나나 추출물 0.01%

[0247] 판테닐 에틸 에테르 0.5%

[0248] DL-α-토코페릴 아세테이트 0.2%

[0249] 폴리소르베이트 60 1%

[0250] 향료 0.2%

[0251] 글리세롤 0.5%

[0252] 염료 충분량

[0253] 물 100%되게 하는 양

[0254] 알코올 50%

[0255] 본 로션은 밝게하고자 하는 체모가 있는 부분, 특히 팔에 체모의 점진적 라이트닝 효과를 얻기 위하여 충분한 시간 동안 도포된다.

[0256] 실시예 8:

[0257] 손 (hand)에 도포하기 위한 항-반점 겔-크림 화장품

[0258] 카프릴산/카프르산 디글리세릴 석시네이트 6%

[0259] 옥틸 옥타노에이트 2.5%

[0260] 옥틸 메톡시시나메이트 6%

[0261] 시아테아 쿠밍기이 잎 추출물 0.3%

[0262] 페닐트리메티콘 2.5%

[0263] 벤조페논-3 0.5%

[0264] 소듐 히알루로네이트 0.1%

[0265] 크산탄 고무 0.2%

[0266] 아크릴레이트/C10-30 알킬 아크릴레이트 공중합체 0.5%

[0267] 글리세롤 2%

[0268] PEG 150 3%

[0269] 중화제, 염료, 향료, 보존제 충분량

[0270] 정제수 100%되게 하는 양

[0271] 상기 반점의 색을 완화시키기 위해서는 본 크림을 손의 반점 (태양광 흑반및/또는 노인성 흑반)에 직접 도포해

야 한다.

[0272] 실시예 9:

[0273] 병리적인 과다색소침착 치료용 피부과 용액

[0274] 시케일 시리얼 종자 추출물 0.2%

[0275] 휘발성 펜타시클로메티콘 49.0%

[0276] 티타늄 디옥사이드 15.0%

[0277] 옥틸 메톡시시나메이트 7.5%

[0278] 글리세린 5.0%

[0279] 페닐트리메티콘 5.0%

[0280] 코폴리올 디메티콘 3.0%

[0281] 폴리메틸메타크릴레이트 2.5%

[0282] 부틸 메톡시디벤조일메탄 1.0%

[0283] 중화제, 착취제, 보존제, 항산화제 필요한 경우

[0284] 물 100%되게 하는 양

[0285] 본 세럼은 국소적 과다 색소침착을 앓고 있는 사람의 치료를 위해 매일 피부에 도포된다.

[0286] 실시예 10:

[0287] 탈색된 헤어에 사용하기 위한 양모제 로션

[0288] 시케일 시리얼 종자 추출물 0.2%

[0289] 3-메틸크산틴 0.03%

[0290] 알코올 30.0%

[0291] 향료 가용화제를 포함하는 수성 향 첨가제 100%되게 하는 양

[0292] 실시예 11:

[0293] 태닝 썬 크림

[0294] 가수분해된 콩 가루 (콩 종자 과피 추출물) 0.3 %

[0295] 이소세틸 스테아레이트 8.0 %

[0296] 경화 땅콩 기름 10.0 %

[0297] 라놀린유 3.5 %

[0298] 세틸 알코올 5.0 %

[0299] 스테아릴 알코올 2.5 %

[0300] 경 (light) 액상 파라핀 10.0 %

[0301] 옥시에틸렌화 세틸 알코올의

[0302] 중화 인산 모노에스테르 3.0 %

[0303] 옥틸메톡시 시나메이트 5.0 %

[0304] 상기 상 (phase)을,

[0305] 판토테놀 0.1%

[0306] 보존제 0.2%

[0307] 를 포함하는 충분량 100%의 수성 상으로 에멀전화시킨다.

[0308] 실시예 12:

[0309] 자연의 태양광 방어 기능을 강화하기 위한 로션

[0310] 알코올 42.50 %

[0311] 프로필렌 글리콜 3.00 %

[0312] 멘톨 0.05 %

[0313] 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스 1.5 %

[0314] 가수분해된 콩 가루 0.2 %

[0315] 수성 향 첨가제 충분량 100.0 %

[0316] 본 로션은 태양에 지속적으로 노출되기 이전에 3일 내지 8일간 매일 국소적으로, 좋기로는 하루에 두 번 도포한다.

[0317] 노출 기간 동안 매일 계속 도포할 수 있다.

[0318] 실시예 13:

[0319] 흰머리 염색용 양모제 로션

[0320] 가수분해된 콩 가루 (콩 종자 과피 추출물) 0.10 %

[0321] 3-메틸크산틴 0.03 %

[0322] 알코올 30.0 %

[0323] 향료 가용화제를 포함하는 수성 향 첨가제 충분량 100.0 %

[0324] 본 로션은 흰 머리카락을 신속히 감소시키려는 강력 치료용으로 모발과 두피에 도포될 수 있다.

[0325] 실시예 14:

[0326] 피부의 색소 형성를 촉진하기 위한 피부과 겔

[0327] 가수분해된 콩 가루 0.10 %

[0328] 에탄올 0.03 %

[0329] 증류수 30.0 %

[0330] 1.25% 카보폴940® 겔을 포함하는

[0331] 겔화 첨가제 100%되게 하는 양 참고 문헌

[0332] Bohil AB, Robertson BW, Cheney RE (2006). Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. PNAS 103: 12411-12416.

[0333] Kawabata M, Imamura T,Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev. 9, 49-61.

[0334] Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden BC (2002).Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. J Cell Sci: 115: 1441-1451.

[0335] Singh SK, Nizard C, Kurfurst R, Bonte F, Schnebert S, Tobin DJ (2008). The silver ocus product (Silv/gp100/Pmel17) as a new tool for the analysis of melanosome transfer in human melanocyte-

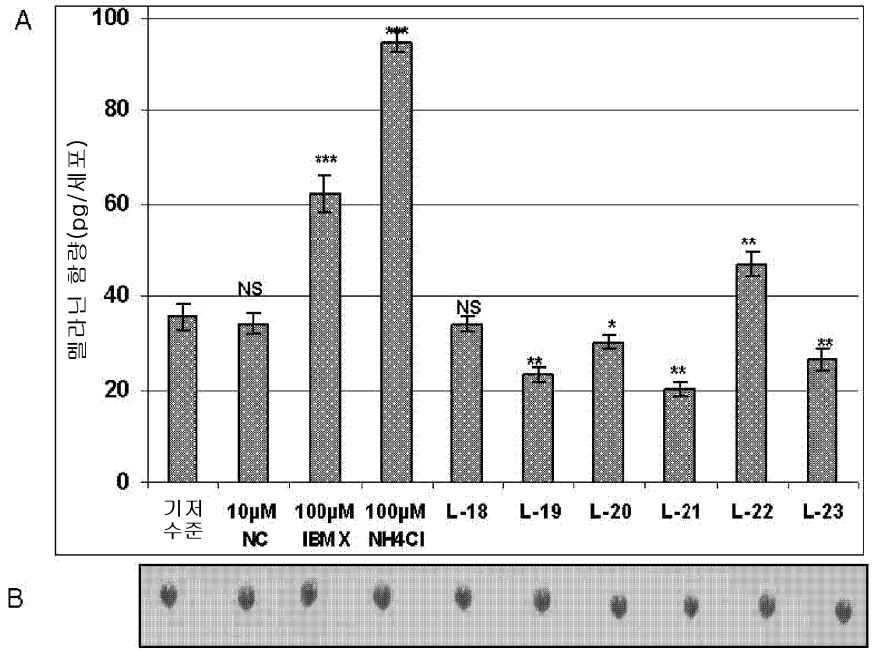
keratinocyte co-culture. Exp Dermatol. 17(5):418-26.

[0336] L.R. SNYDER: Classification of the solvent properties of common liquids; Journal of Chromatography, 92 (1974), 223-230.

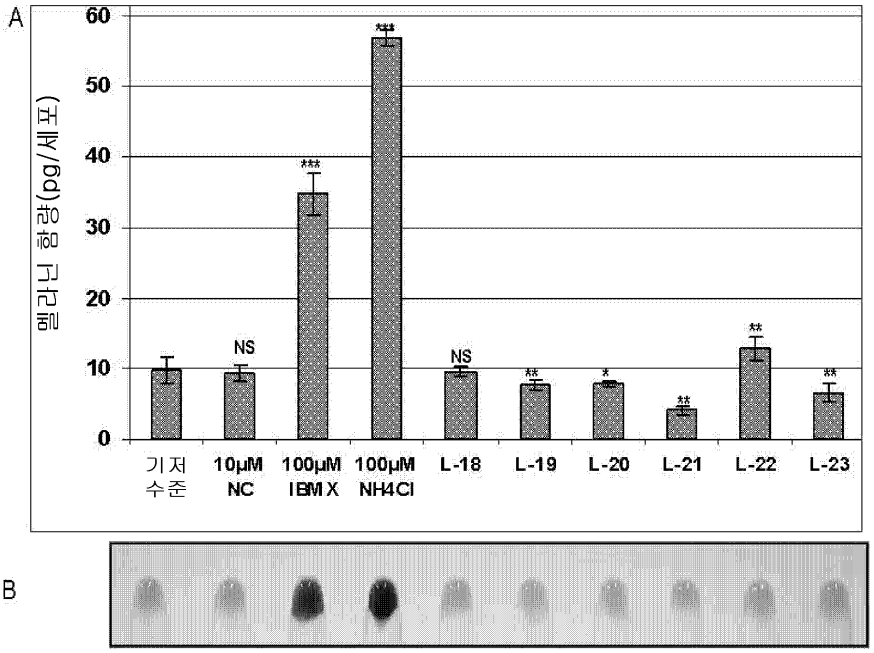
[0337] Sousa, A. D. & Cheney, R. E. (2005). Myosin-X: A Molecular Motor at the Cell's Fingertips Trends Cell Biol. 15, 533-539.

## 도면

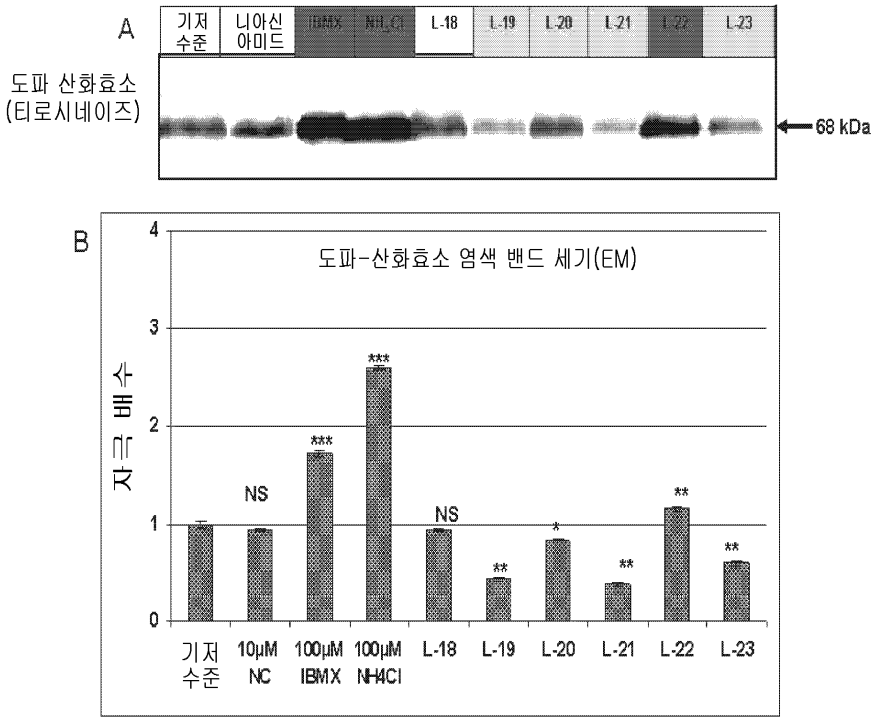
### 도면1



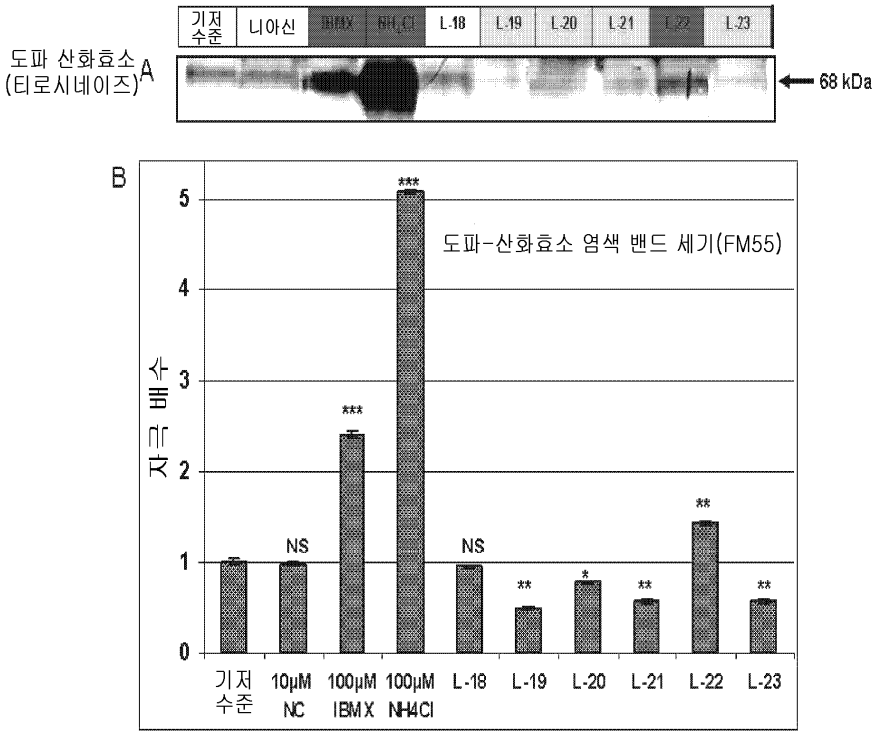
도면2


A
멜라닌 함량(pg/세포)
60
50
40
30
20
10
0
NS
NS
기저 수준
10μM NC
100μM IBMX
100μM NH4Cl
L-18
L-19
L-20
L-21
L-22
L-23
B

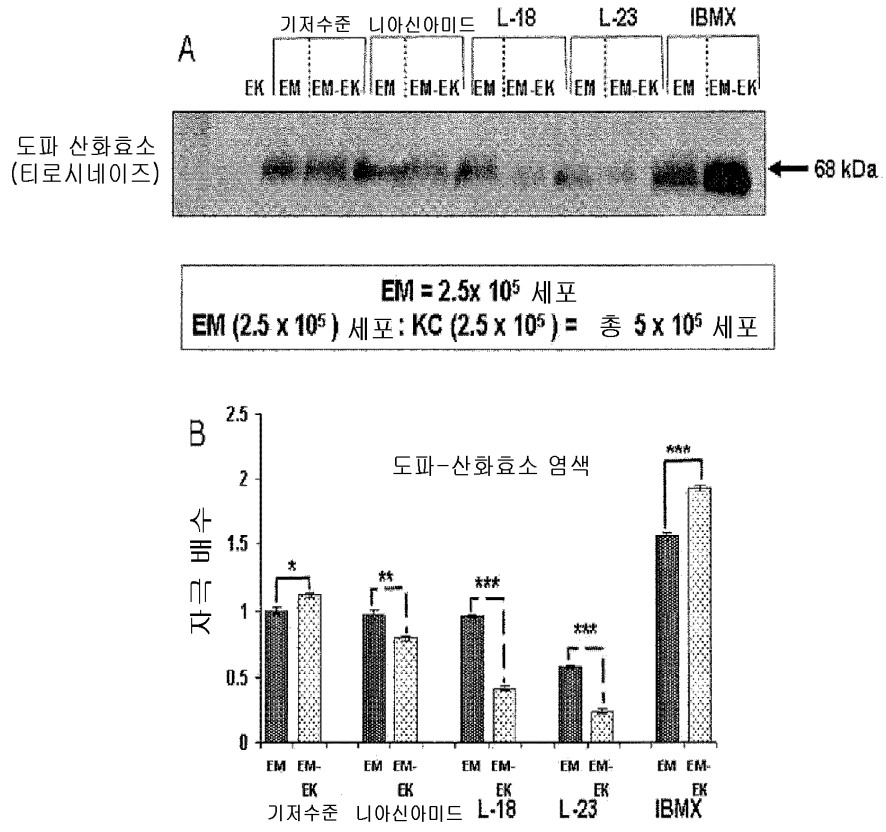
도면3


A
기저 수준
니아신 아미드
IBMX
NH4Cl
L-18
L-19
L-20
L-21
L-22
L-23
도파 산화효소 (티로시네이즈)
68 kDa
B
도파-산화효소 염색 밴드 세기(EM)
자극 배수
4
3
2
1
0
NS
NS
기저 수준
10μM NC
100μM IBMX
100μM NH4Cl
L-18
L-19
L-20
L-21
L-22
L-23

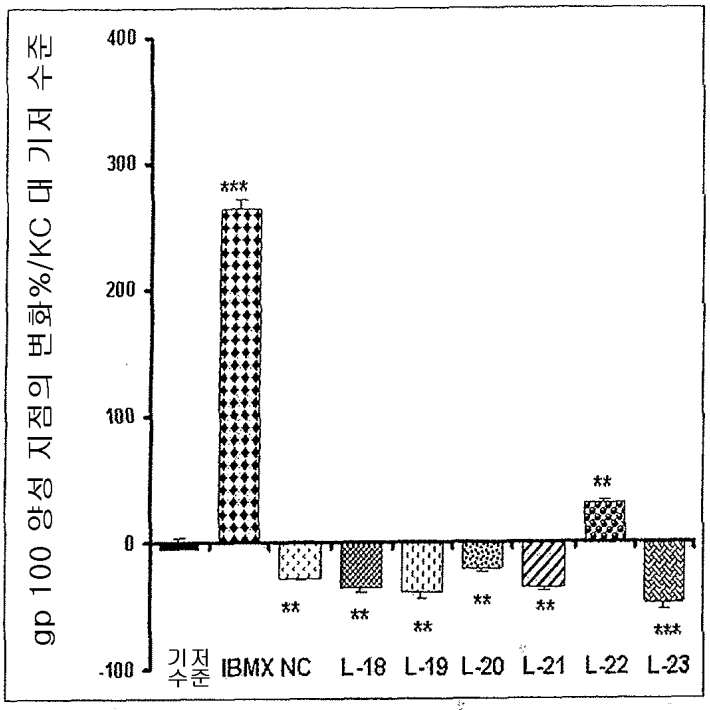
도면4


기저 수준
니아신
IBMX
NH4Cl
L-18
L-19
L-20
L-21
L-22
L-23
도파 산화효소 (티로시네이즈)
A
68 kDa
B
도파-산화효소 염색 밴드 세기(FM55)
자극 배수
NS
기저 수준
10μM NC
100μM IBMX
100μM NH4Cl

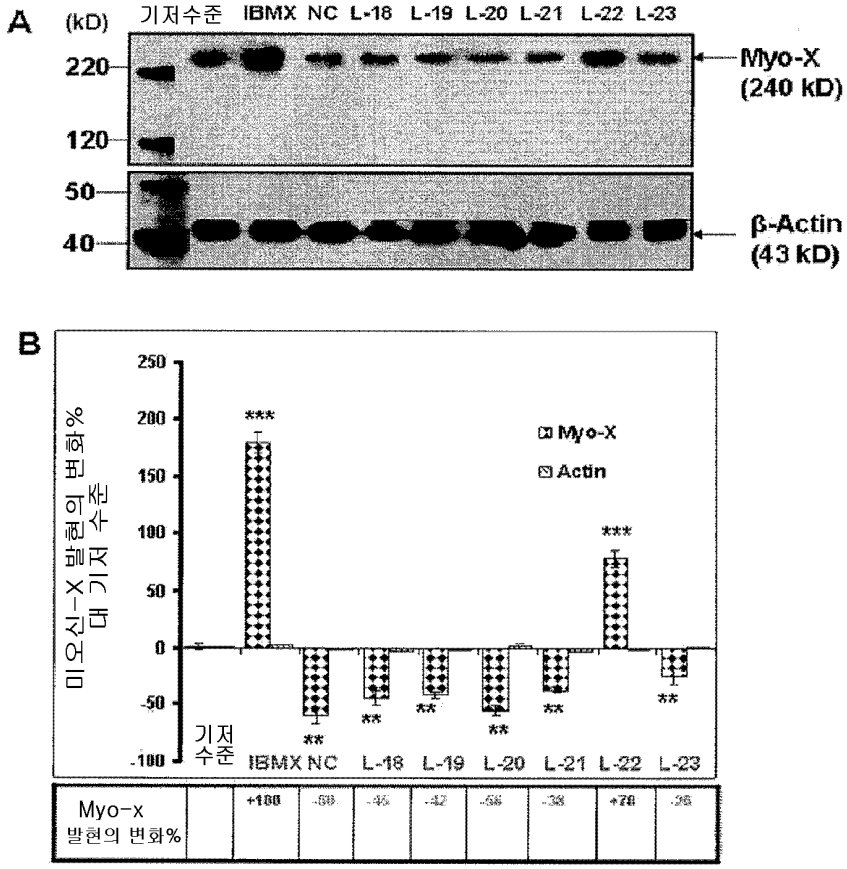
도면5


A
기저수준
니아신아미드
L-18
L-23
IBMX
EK
EM
EM-EK
도파 산화효소 (티로시네이즈)
68 kDa
EM = 2.5x 10⁵ 세포
EM (2.5 x 10⁵) 세포 : KC (2.5 x 10⁵) = 총 5 x 10⁵ 세포
B
도파-산화효소 염색
자극 배수
기저수준
니아신아미드
L-18
L-23
IBMX

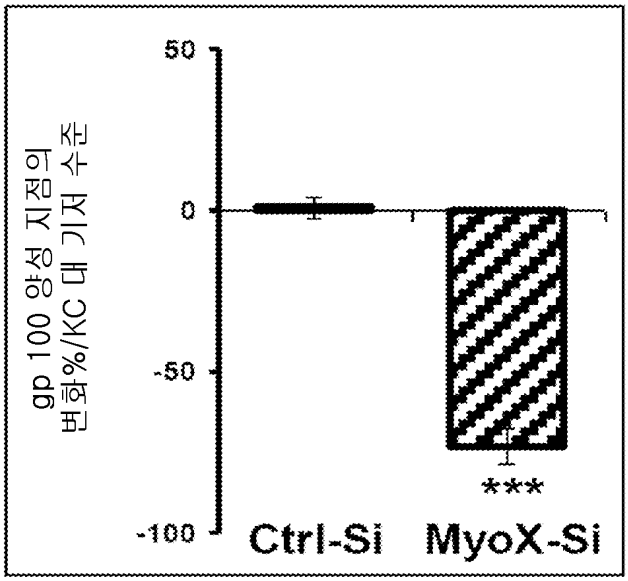
도면6


gp 100 양성 지점의 변화%/KC 대 기저 수준
400
300
200
100
0
-100
***
**
**
**
**
**
**
***
기저 수준
IBMX NC
L-18
L-19
L-20
L-21
L-22
L-23

도면7


A
(kD)
기저수준
IBMX
NC
L-18
L-19
L-20
L-21
L-22
L-23
220
120
50
40
Myo-X
(240 kD)
β-Actin
(43 kD)
B
미오신-X 발현의 변화%
대 기저 수준
250
200
150
100
50
0
-50
-100
Myo-X
Actin
***
**
기저
수준
Myo-x
발현의 변화%
+180
-59
-45
-42
-56
-38
+78
-26

도면8




| | | |
|---|---|---|
| gp100+ 지점/KC | 27.33<br>± 2.7 | 5.38<br>±4.2 |
| 유전자 사일런싱 후 기저 대조군과 비교한 멜라닌 이동의 변화 % | | -80.3% |

서 열 목 록

<110> LVMH Recherche

<120> Methods useful in studying or modulating skin or hair pigmentation, plant extracts for use in compositions and cosmetic care method.

<130> D27618-355406-FFP

<140> PCT/EP2009/061712

<141> 2009-09-09

<150> UK0816507.8

<151> 2008-09-10

<150> EP09290446.5

<151> 2009-06-12

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagcggtata agagaaatca a 21