(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0141688
(43) 공개일자 2017년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A61Q 17/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 17/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7030903
(22) 출원일자(국제) 2016년04월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년10월26일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2016/050895
(87) 국제공개번호 WO 2016/170256
국제공개일자 2016년10월27일
(30) 우선권주장
15 53518 2015년04월20일 프랑스(FR)

(71) 출원인
라보라투와르 클라란스
프랑스, 75823 파리 세덱스 17, 아비뉴 드 라 포르테 데 테르네 12
(72) 발명자
쿠르탱, 올리버
프랑스, 92200 뇌이 쉬르 센, 루 자크 둘루 7
피투시, 리차드
프랑스, 78600 메종 라피트, 루 드 라 프호쎄씨옹 48
웨버, 산드린
프랑스, 95830 코메이유 엥 베싱, 알레 데 샹 5
(74) 대리인
이원희

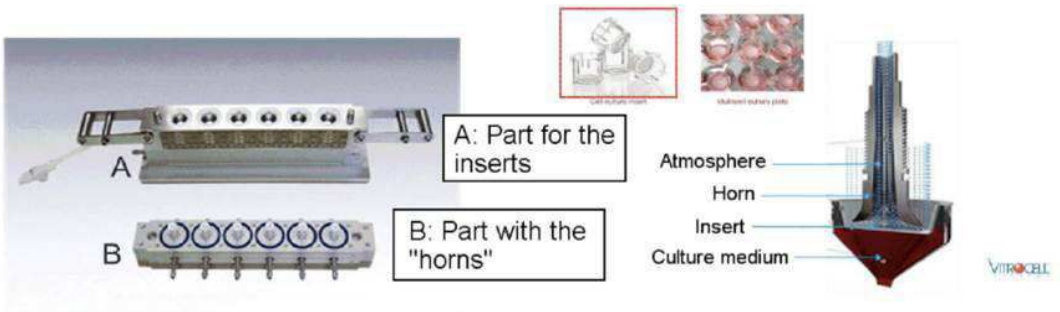
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **항 오염제로서 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물 단독 또는 다른 활성제와의 조합의 화장용 용도**

(57) 요 약

본 발명은 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물 단독 또는 사니큘라 유로 피아(Sanicula europaea) 추출물 및/또는 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)* 추출물 및/또는 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물과의 조합의 오염이 피부에 미치는 영향을 방지 또는 예방하기 위한 화장용 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물 단독 또는 다른 활성제와의 조합을 피부에 적용하는 것으로 구성된 오염이 피부에 미치는 영향을 예방 또는 치료하기 위한 미용 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대기 오염의 유해한 영향으로부터 피부를 보호 및/또는 대기 오염에 의해 유발된 피부 증상을 회복하기 위한, 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 화장용 용도.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 대기 오염은 산화제, 일산화탄소, 탄화수소 및 용매, 이산화황, 금속, 포름알데히드, 담배 연기, 현탁액 내의 미립자 또는 미세 먼지 및 전자기파로부터 선택된 내부 또는 외부 오염물의 존재로 인한 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 용도는 하기 활성을 통해 오염으로 유발된 피부 질환의 퇴행 예방 및/또는 회복을 위한 것임을 특징으로 하는 용도:

- 피부 및 각질층의 응집력 증가 및 피부의 장벽 기능 개선;

- 케라틴세포(keratinocyte) 증식 및 분화 과정의 항상성 회복;

- 피부 기질(dermal matrix) 회복;

- 피부 보습의 예방 및 회복;

- 피부 세포의 응집력 개선;

- 세포 커뮤니케이션의 개선;

- 진피표피경계(dermoepidermal junction)의 회복.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 용도는 오염으로 유발된 피부 노화를 예방 및/또는 보정하기 위한 것임을 특징으로 하며, 특히, 주름 및 미세선(fine line)을 예방 또는 교정 및/또는 광택 유지 및/또는 보습 증가 및/또는 박리 조절, 오염된 피부의 탄력 유지 또는 자극을 위한 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추출물은 식물의 지상부를 분쇄 및 수성 및/또는 유기 용매로 추출함으로써 수득되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 추출물을 0.01 내지 10 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

연화제, 염료, 필름 형성 활성제(film-forming active agents), 계면활성제, 향료, 보존제, 유화제, 오일, 글리콜, 비타민 E와 같은 비타민, UV 차단제를 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 겔, 로션, 크림, 에멀젼, 유액(milk), 스프레이 형태인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추출물은 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물과 조합되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물은 식물의 지상부의 수용성 추출물인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추출물 또는 추출물의 조합은 또한 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물은 해수 염분(marine salts)이 풍부한 올리고퍼셀라란(oligofurcellaran)을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추출물 또는 추출물의 조합은 또한 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물을 포함하는 것을 특징으

로 하는 용도.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물은 식물의 지상부의 수성-글리콜릭(aqueous-glycolic) 추출에 의해 수득된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 15

디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물을 단독 또는 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물 및/또는 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물 및/또는 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물과의 조합 또는 상기 추출물 또는 상기 조합 중 언으 하나를 포함하는 조성물 적당량을 피부에 적용하는 것을 특징으로 하는 오염이 피부에 미치는 영향을 방지 및 예방하기 위한 미용 관리 방법(cosmetic care process).

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물 단독 또는 사니큘라 유로 피아(Sanicula europaea) 추출물 및/또는 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)* 추출물 및/또는 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물과의 조합의 오염이 피부에 미치는 영향을 방지 또는 예방하기 위한 화장용 용도에 관한 것이고; 또한, 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물 단독 또는 다른 활성제와의 조합을 피부에 적용하는 것을 포함하는 오염이 피부에 미치는 영향을 예방 또는 치료하기 위한 미용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 순수한 공기는 질소 78%, 산소 21%, 아르곤 0.09% 및 수증기 0.1%와 이산화탄소, 수소 및 오존을 포함하는 다소 희귀한 기타 가스들의 혼합이다.

[0003] 대기 오염은 순수한 공기의 구성요소의 변화 또는 유해 요소의 추가에 의한 순수한 공기의 변화에 의해 정의된다. 매우 개략적으로, 현재 나열된 오염 물질은 본질적으로 산업, 난방 및 교통에 의해 필수적으로 생산되는 것이다. 오염 물질을 일곱 가지 화학 계열로 분류하는 것이 일반적이다:

[0004] - 오존 또는 질소 산화물와 같은 산화제(oxidizing agent)는 자극성(irritants)이고, 자유 라디칼 생성제(free-radical generators)이다;

[0005] - 먼지는 때때로 다환식 탄화수소(polycyclic hydrocarbons)를 고정시키는 현탁액의 입자이고; 이의 유해학 역할은 공기의 수분 정도 및 온도에 의해 변화되고; 산 입자는 자극성이고; 조직의 수화 및 산소화의 저하가 관찰된다;

[0006] - 유기 화학 생성물은 발암 물질이며, 산업 폐기물 및 자동차 연소로부터 발생한다;

[0007] - 일산화탄소(carbon monoxide)는 조직 저산소증으로 이어지고, 80%는 자동차에서 비롯된다;

[0008] - 탄화수소 및 용제는 자동차 오염의 50 %를 차지하며 독성, 자극성, 발암성 및 돌연변이 유발성이고, 빛의 존재 하에서 이들은 질소 산화물과 반응하여 오존을 생성한다;

[0009] - 이산화황은 난방 또는 가정용 석유과 석탄의 연소 생성물 중 하나이며, 피부의 수 지질 막(hydro-lipid film)의 변화와 피부 자극을 일으킨다;

[0010] - 납, 아연, 알루미늄, 수은 등의 금속은 효소 반응에 영향을 주어 세포 대사를 방해 할 수 있다. 이들은 DNA

병변 및 세포 지질 병변이있는 산화 적 손상과 관련된다.

[0011] 또한, 외부 공기와 연속되는 주거 내부의 공기는 생물학적 기원 (수분 및 곰팡이(molds)의 원천, 내 독소(endotoxins), 알레르겐(allergens) 등), 물리적 기원 (라돈(radon), 입자(particles), 섬유(fibers) 등) 및 화학적 기원 (담배 연기, 알데히드, 휘발성 유기 화합물 - 휘발성 유기 화합물 (volatile organic compounds, VOCs), 금속 등)일 수 있는 자체 오염원을 포함한다.

[0012] 1969년, Harry Daniell은 흡연자가 비 흡연자보다 늙어 보인다고 인식했다. 그는 이어서 주름을 등급화하는 시스템을 개발하여 흡연과 주름진 피부의 연관성을 보다 객관적으로 분석할 수 있었으며, 상기 시스템으로 그는 첫인상을 확인할 수 있었다. 그 후, 그의 시스템은 다양한 역학 연구 (Daniell HW. Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of “crow's feet”. Ann Intern Med 1971; 75:873-80)에 사용되었다.

[0013] 이러한 역학 연구는 만성 흡연이 조기 피부 노화와 관련된 중요한 환경 요인이라는 것을 증명했다. (Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging. J Dermatol Sci 2007; 48:169-75). 여기에는 많은 생리병리학적 메커니즘이 인용되었다. 담배 연기에 의한 각질층의 탈수는 각질층의 두께 감소를 어느 정도 설명할 것이다 (Freiman A *et al.* Cutaneous effects of smoking. J Cutan Med Surg 2004; 8:415-23). 만성 흡연은 카복시헤모글로빈 (carboxyhemoglobin)의 양을 증가시키고 바소프레신의 분비를 촉진시키면서 티오시나네이트(thiocyanates)를 방출함으로써 만성 흡연이 진피(dermis)의 상대적인 만성 허혈의 원인이되고, 산소의 경피적 분압을 감소시킨다. 결과적으로 진피의 신진 대사가 변화된다: 이영양증성 탄력 섬유(dystrophic elastic fibers) 및 프로테오글리칸(proteoglycans) 축적, 세포외 기질 단백질(extracellular matrix proteins)이 메탈로프로테아제(metalloproteases)에 의해 추가로 분해되고 콜라겐 합성이 감소된다.

[0014] 흡연과 노화의 연관성은 MMP-1 및 MMP-3 mRNA의 높은 발현과 콜라겐 I 및 III의 감소를 통해 나타난다 (Yin L *et al.* Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2001; 17:178-83; Yin L *et al.* Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. Arch Dermatol Res 2000; 292:188-94).

[0015] 흡연은 또한 MMP-1 발현의 유도 이외에 다른 분자 경로(pathway)를 나타내는 탄력섬유증(elastose)과 모세혈관 확장증(telangiectasia)의 증가(Kennedy C *et al.* Effect of smoking and sun on the aging skin J Invest Dermatol 2003; 120:548-54) 와 관련이있는 것으로 보인다. 최근 AhR 경로(pathway)가 담배에 의해 유발되는 조기 피부 노화의 과정에서 역할을 할 수 있음이 제안되었다(Morita A *et al.* Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. J Investig Dermatol Symp Proc 2009; 14:53-5).

[0016] 일부 연구는 오존이 피부 나 피부 세포에 미치는 영향을 연구했다. 오존은 태양 복사와 배출 파이프 가스 배출 사이의 상호 작용에 따라 지표면에서 형성 될 수있는 오염 물질이다. McCarthy et al.은 정상 인간 표피 각질세포 (normal human epidermal keratinocytes, NHEKs)를 도시에서 측정된 오존 농도에 노출시키고 그 영향를 분석했다. 과산화수소 및 IL-1α의 수준은 증가하지만 ATP 수준은 감소한다. 마지막으로 McCarthy et al.은 오존이 DNA 손상을 증가 시킨다는 사실에 주목했다(McCarthy JT *et al.* Effects of ozone in normal human epidermal keratinocytes. Exp Dermatol. 2013 May;22(5):360-1). 다른 연구들은 강력한 산화제인 오존이 피부 통합성(skin integrity)에 영향을 줄 수 있음을 보여주는 마우스 피부 조직에 오존이 미치는 영향을 연구했다 (Thiele JJ *et al.* Ozone-exposure depletes vitamin E and induces lipid peroxidation in murine stratum corneum. J Invest Dermatol 1997; 108:753-7). 마찬가지로, 연구에 따르면 오존은 마우스 피부에서 MMP-9 발현을 유도 할 수있어 기질 재구성에서 역할을 나타낸다(Valacchi G *et al.* Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305:741-6).

[0017] 최근 역학 조사에 따르면 미립자(particulate matter, PM)에 노출 된 것과 안료 반점 뿐만 아니라 주름과 같은 피부 노화 징후가 나타나는 것 사이의 직접적인 연관성이 밝혀졌다(Vierkotter A *et al.* Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. J Invest Dermatol 2010; 130:2719-26). 주변 입자가 이러한 유해한 영향을 미치는 중요한 메커니즘은 ROS의 생성이다(Donaldson K *et al.* Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol 2005; 2:10).

[0018] 또한, 입자는 미토콘드리아 병변을 통해 피부 노화를 유도하는 ROS를 생성하기 위해 미토콘드리아에 국한화 될 수있는 유기 화학 제품 및 금속에 대한 지지체로서 작용할 수 있다(Li N, Sioutas C *et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ Health Perspect 2003; 111:455-60). 피부 노화를 유도하는 또 다른 경로(pathway)는 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAHs))의 경로(pathway)일 수 있다. PAHs는 도시 지역의 공기 중 미립자 (particulate matter)의 표면에 흡착되어 AhR을 통해 비생체성분(xenobiotics)의 신진 대사를 활성화 할 수 있다 (Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. Sci Total Environ 1992; 116:109-35).

[0019] Ushio *et al.* 이 수행한 다른 연구(1999)는 배지(culture)에서 각질 세포 (keratinocyte)에서의 디젤 입자의 동작을 실험했다. 고농도의 디젤 입자는 이들 세포의 성장 및 이동에 장애를 일으킨다.

[0020] 따라서, 입자는 피부 통합성(skin integrity)에 직접적인 영향을 미치는 것처럼 보인다. 또한, 이러한 노출은 IL-8 분비를 증가시킨다. 이것이 일어날 때, 이런 사이토킨(cytokine)은 염증성 피부 반응과 관련이 있다. 이 연구는 디젤 입자가 습진(eczema), 알레르기성 피부염(allergic dermatitis) 또는 건선(psoriasis)과 같은 염증성 피부 질환의 개시 및/또는 발병 기전에서 역할을 할 수 있음을 제시하는 것으로 보인다(Ushio, H., K. Nohara, *et al.* (1999). "Effect of environmental pollutants on the production of pro- inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes." Toxicol Lett 105 (1): 17-24).

[0021] 따라서 외부 및 내부의 대기 오염 물질이 많은 보기 좋지 않은 피부 증상의 원인인 것으로 나타난다: 특히, 피부의 두께, 탄력성, 견고함 또는 그 밖의 광채의 변화, 주름, 칙칙한 안색 또는 색소 반점의 등장. 이러한 피부 증상이 피상적으로 남아있고 병리학적이 아니더라도 대부분의 사람들은 오염 물질에 다소 노출되어 있으며 그들의 외형를 예방하거나 억제할 수있는 새로운 화장품 제제를 개발할 필요가 있다.

[0022] 피부는 신체의 전체 표면을 덮는 매우 광범위한 기관이며 성인 남성의 경우 총 약 1.6 평방 미터의 표면적을 덮고 있다. 그 기능은 깊은 조직을 외부 환경으로부터 보호하는 것이며, 특히 면역, 온도 조절 및 체액 감소에 대한 활성을 가진다. 피부는 크게 세 부분으로 구성된다. 얇은 표면은 표피(epidermis), 내부의 두꺼운 부분은 진피(dermis), 깊은 지방 부분은 하피(hypodermis)라 부른다. 표피는 특히 약 90 %를 차지하는 세포인 케라틴세포(keratinocyte)의 분화가 증가하는 상태에 해당하는 층(strata)의 형태로 조직화되어 있다. 이러한 케라틴세포(keratinocyte)는 표피의 깊은 층에서 표피의 외부 표면으로 이동한다. 상기 이동 동안, 케라틴세포(keratinocyte)는 수많은 생화학적 및 구조적 변형을 겪으며, 그 중 가장 중요한 것은 세포가 각질(keratin)을 합성하는 과정인 각화(keratinization)이다. 표피의 가장 표면층인 각질층(horny layer)은 주로 각질세포(corneocytes)라고 불리는 죽은 세포로 이루어져 있으며 특히 외부의 공격에 매우 강하다. 표피는 피부의 외부 구조를 구성하는 코팅 상피(coating epithelium)로 정의 될 수 있다. 이는 피부에 보호 기능을 제공하는데, 특히 강한 섬질의 단백질인 케라틴(Keratin)의 생성에 의한 것이다. 케라틴은 피부의 불투과성을 일부 담당한다.

[0023] 진피는 "진피표피경계(dermoepidermal junction)"에 의해 표피와 구분된다. 진피는 하피에 의해 명확한 한계없이, 깊은 아래로 계속된다. 진피의 역할은 특히 피부의 탄력과 힘을 유지하는 것이다. 또한 다른 필수 기능을 수행합니다. 진피의 많은 혈관신생(vascularization)은 표피와 영양 교환을 수행 할 수 있게 한다. 또한 진피는 피부의 면역 방어의 필수 구성 요소인 대식세포(macrophage) 및 수상 세포 유형(dendritic cell type)의 면역 세포가 풍부해질 수 있게 한다. 또한, 진피는 촉각을 위한 원인이 되는 감각 수용체를 가지는 조직에 신경을 분포시킨다. 마지막으로, 진피는 표피를 대상으로 한 치유 및 용해성 사이토킨 및 성장인자 합성에 의한 케라틴세포 증식 및 분화 조절 현상에 관여한다. 진피는 본질적으로 섬유아세포(fibroblast) 및 세포외 기질(extracellular matrix)을 형성하는 콜라겐, 엘라스틴(elastin) 및 프로테오글리칸(proteoglycan)의 마이크로피브릴라(microfibrillar) 네트워크로 구성되는 결합지지 조직이다. 상기 세포외 기질은 섬유아세포의 접착 기질 및 조직의 기계적 지지체이다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0024] 도1은 포름 알데히드 모델에 사용 된 Vitrocell® 노출 모델을 나타낸다.

도 2A 및 2B는 포름알데히드에 노출된 표피 모델에 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 처리하여 수행된 프로테오믹 연구(proteomic studies)의 결과이다.

도 3A 및 3B는 담배연기에 노출된 표피 모델에 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 처리하여 수행된 프로테오믹 연구의 결과이다.

도 4A 및 4B는 미세 입자(fine particle)에 노출된 표피 모델에 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros*

mespiliformis) 추출물을 처리하여 수행된 프로테오믹 연구의 결과이다.

도 5는 다양한 조건 (비처리 세포 대조군, H_2O_2, 레스베라트롤(resveratrol) 및 다양한 농도의 Sanicle 추출물)에 노출된 케라틴세포(keratinocyte)의 미토콘드리아 ROSs 수준에 대한 영향을 나타내는 히스토그램(histogram)이다.

도 6은 다양한 조건 (비처리 세포 대조군, H_2O_2, 레스베라트롤(resveratrol) 및 다양한 농도의 Sanicle 추출물)에 노출된 케라틴세포(keratinocyte)의 세포 ROSs(cellular ROSs)수준에 대한 영향을 나타내는 히스토그램(histogram)이다.

도 7은 다양한 조건 (비처리 세포 대조군, H_2O_2, 레스베라트롤(resveratrol) 및 다양한 농도의 Sanicle 추출물)에 노출된 케라틴세포(keratinocyte)의 세포 SOD (cellular SOD)활성에 대한 영향을 나타내는 히스토그램(histogram)이다.

도 8은 다양한 조건 (비처리 세포 대조군, H_2O_2, 레스베라트롤(resveratrol) 및 다양한 농도의 Sanicle 추출물)에 노출된 케라틴세포(keratinocyte)의 미토콘드리아 SOD (mitochondrial SOD)활성에 대한 영향을 나타내는 히스토그램(histogram)이다.

도 9는 다양한 조건 (비처리 세포 대조군, H_2O_2, 레스베라트롤(resveratrol) 및 다양한 농도의 Sanicle 추출물)에 노출된 케라틴세포(keratinocyte)의 총 글루타티온(glutathione)수준에 대한 영향을 나타내는 히스토그램(histogram)이다.

도 10은 배기 가스 오염에 노출되고 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물로 처리 또는 비처리된 피부 이식편(skin explants)의 피부 보습 정도를 나타내는 히스토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 외부 및/또는 내부 대기 오염이 피부에 미치는 영향을 보호 및/또는 회복시키기위한 활성제를 확인하기 위한 연구의 맥락에서. 본 출원인은 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 추출물이 포름알데히드, 담배 연기 및 미세 입자(fine particle)가 피부에 미치는 영향에 대해 현저한 활성을 갖는다는 것을 발견했다 (실시예 1에 설명된 실험 참조).

[0026] 따라서, 본 발명은 오염이 피부에 미치는 영향을 예방 및 / 또는 회복하기 위한 디오스피로스 메스필리포르미스 (Diospyros mespiliformis) 추출물 또는이를 함유하는 화장 조성물의 화장 용도에 관한 것이며, 본 발명에 따른 용도는 건강한 피부에 적용하기에 특히 적합하다.

[0027] 본 발명의 문맥에서, "건강한 피부"라는 용어는 어떠한 피부 병리도 나타내지 않으며, 또한 화장품 관련 2009 년 11 월 30 일의 유럽 국회와 의회((EC) REGULATION No. 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of November 30, 2009, relating to cosmetic products))(EC) 제 1223/2009 호의 (제 2.1.1a 조)에 의거한 양호한 상태의 피부를 지칭한다.

[0028] 아프리카 흑단(African ebony)으로도 불리는 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis),*는 감나무(family Ebenaceae)의 식물로, 아프리카에서 시작된 상록수 나무이며, 매우 분지된 크라운(crown)과 조밀한 잎으로 40cm의 높이에 달할 수 있다. 잎은 번갈아 가며 단순하고 전체이며 꽃은 흰색에서 녹-황색이다. 열매는 전통적으로 음료이나 콘플라워(broth mixed with cornflower)과 혼합된 브로스(broth)로 소비된다.

[0029] 상기 식물은 전통적인 치료약(remedies)의 제조를 위해 사용되며, 특히 항생제 특성 때문에 사용된다; 또한, 생식력(fertility)의 개선, 말라리아(malaria), 매독(syphilis), 한센병(leprosy) 또는 진균증(mycoses)의 치료, 또는 구충제로도 사용된다. 리프 뽑기는 발열, 귀 감염 및 상처 치료에 사용된다. 잎을 달인 즙은 발열, 귀 감염 및 상처 치료에 사용된다.

[0030] 지금까지, 피부에 오염이 미치는 영향를 예방하거나 회복 시키는데 있어서 상기 식물의 어떠한 활성도 기술된 바 없다.

[0031] 본 출원인에 의해 건강한 표피의 모델에서 수행된 실험에서, *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 처리 또는 비처리하고, 다양한 오염에 노출되었을 때, 하기와 같은 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물의 영향들이 설명된다:

[0032] - 상기 추출물은 각질 피막(horny envelope)의 구성 마커 (hornerin HRNR, Small Proline Rich Protein SPRR2A, CE2B, LCE3D)의 발현 유도를 통해 피부 장벽을 보강함으로써 포름알데히드의 유해한 영향를 예방 및 보정한다; 또한 상기 영향는 면역조직화학(immunohistochemistry)에 의해 각질 피막의 주요 단백질인 로리크린(loricrin)의 발현의 유도 확인함으로써 확인된다. 나아가, 상기 추출물은 케라틴세포 (keratinocyte)의 증식 및 분화 과정의 항상성에 관여하는 단백질인 SIRT1의 발현을 증가시킨다. 마지막으로, 염증 증상을 감소시킴으로써 포름알데히드로부터 표피를 보호한다; 실제로, 얻어진 결과는 염증, 세포 사멸 및 기질 분해(matrix degradation)의 마커가 과소 발현되었음을 보여준다; 사이토킨 IL-8 및 기질 프로테아제(matrix proteases) MMP1 및 MMP9의 분석은 전사체(transcriptomic) 연구의 결과를 확인한다.

[0033] - 상기 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 더 이상 염증과 관련된 요소를 요구하지 않음으로써 담배 연기에 노출된 표피를 보호한다. 실시예 1에 제시된 실험결과는 염증, 세포 사멸 및 기질 분해의 마커가 추출물의 존재하에서 과소 발현됨을 보여 주며; 사이토킨 IL1-α 및 IL-8 및 MMP1의 분석은 전사체(transcriptomic) 연구의 결과를 확인한다. 또한, *디오스피로스 메스필리포르미스*(Diospyros mespiliformis) 추출물은 우수한 보습이 유지되도록 한다(도2, CD44). 얻어진 결과는 상기 추출물을 표피에 사용하는 것은 특히 담배 연기의 영향에 대한 진피 표피 경계 (dermoepidermal junction)에 의해 제공되는 세포 응집력 및 claudin 1 (CLDN1)과 desmocollin 1 (DSC1) 세포 커뮤니케이션을 유지 및 회복하게 할 수 있다(콜라겐 IV 및 VII 유전자 발현을 유지 또는 회복). 상기 실험은 또한 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물이 피부가 오염 물질에 노출되었을 때 피부 항상성 유지에 기여한다는 것을 보여준다.

[0034] - 마지막으로, *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 대기 입자에 의한 장벽 기능의 변화를 예방 및 회복한다; 상기 결과는 피부 장벽 기능에 중요한 역할을 하는 로리크린 (loricrin)의 발현이 크게 증가했기 때문이다. 입자의 존재에 의해 변화된 건강한 표피 및 입자 노출 전 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 처리한 표피 의 비교에 의해 수행된 실험은 후자가 양호한 세포 응집력 및 양호한 세포 커뮤니케이션, 특히, claudin 1 (CLDN1)과 desmocollin 1 (DSC1)에 의한 세포 커뮤니케이션이 유지되고, 입자의 영향로부터 보호받은 이의 진피표피경계(dermoepidermal junction)를 가진다(진피표피경계(dermoepidermal junction), 콜라겐 IV, VII 및 니도겐(nidogen) I 주요 구성 요소의 유전자 발현 증가).

[0035] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 식물의 어느 부분에서 나올 수 있다. 바람직하게는, 식물의 지상부이며, 더욱 바람직하게는 잎이다. 식물 또는 선택된 부분으로부터의 추출물의 추출은 분쇄 및 수성 및/또는 유기 용매, 바람직하게는 수성 용매로 추출함으로써 수행될 수있다.

[0036] 본 발명의 특정 구체예에 따라, 본 발명에 따라 사용된 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 하기 단계를 통해 수득된 말토덱스트린(maltodextrin)으로 안정화된 수성 잎 추출물이다 :

[0037] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 잎의 분쇄;

[0038] - 물로 추출;

[0039] - 분리;

[0040] - 정제;

[0041] - 말토덱스트린의 첨가;

[0042] - 여과;

[0043] - 스프레이-건조(spray-drying).

[0044] 이와 같이하여 얻어진 추출물은 특유의 냄새가 나는 황색(yellow-orange)에서 베이지 색으로 착색된 분말이며, 수용액에서 1 %로 제조되었을 때, pH는 5.0 내지 7.0이다.

[0045] 바람직하게는, *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 화장용 조성물에 제제화되며, 당업자는 상기 추출물의 물리 화학적 성질에 맞추는 방법을 알 것이다.

[0046] 바람직하게는, 상기 화장 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 고형분 중량으로 0.01 % 내지 10 %, 바람직하게는 0.01 % 내지 2 %의 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 포함한다.

[0047] 통상적으로, 상기 조성물은 예로서 제한없이, 연화제, 염료, 필름 형성 활성제(film-forming active agents), 계면활성제, 향료, 보존제, 유화제, 오일, 클리콜, 비타민 E와 같은 비타민, UV 차단제 등과 같은 화장용 및 피부과학적 조성물에 사용되는 공지된 제제화제(formulating agents) 또는 첨가제를 하나 이상 더 포함할 수 있다. 화장품에 관한 이러한 지식의 덕택으로, 당업자는 원하는 특성에 따른 본 발명의 조성물에 첨가하는 제제화제 및 양을 알 것이다.

[0048] 상기 조성물은 얼굴 또는 신체에 적용하는 것 이외의 어떠한 생약 학적(galenical) 제한없이 미용 및 피부과 분야에서 당업자에게 공지된 임의의 형태 일 수있다. 바람직하게는, 겔, 로션, 크림, 에멀젼, 유액(milk), 스프레이 등의 형태이다.

[0049] 따라서, 본 발명은 피부에 대한 손상으로부터 피부를 보호하기 위한 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 화장용 용도에 관한 것으로, 즉, 대기 오염으로 인한 피부의 원치않는 가시적인 증상 및/또는 장애를 회복시키고; 본 발명에 따른 용도는 대기 오염이 내부 또는 외부 오염의 존재에 기인하는 경우에 유리하고; 오존 또는 질소 산화물와 같은 산화제(oxidizing agent), 일산화탄소(carbon monoxide), 탄화수소 및 용매, 이산화황, 금속, 포름알데히드, 담배 연기, 현탁액 내의 미립자 또는 미세 먼지 또는 기타 전자기파의 주변 공기에 존재함으로써 발생하는 오염을 포함할 수 있다.

[0050] 보다 구체적으로, 상기 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 화장용 용도는 하기 활성을 통해 오염으로 유발된 피부에 가시적인 피부 증상의 출현 또는 피부의 열화 징후를 예방하고 및/또는 회복을 가능하게 한다:

[0051] - 피부 및 각질층의 응집력 증가 및 피부의 장벽 기능 개선;

[0052] - 케라틴세포(keratinocyte) 증식 및 분화 과정의 항상성 회복;

[0053] - 피부 기질(dermal matrix)회복원;

[0054] - 피부 보습의 회복;

[0055] - 피부 세포의 응집력 개선;

[0056] - 세포 커뮤니케이션의 개선;

[0057] - 진피표피경계(dermoepidermal junction)의 회복.

[0058] 이러한 특성에 기초하여, *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 용도는 특히 오염으로 유발된 피부 노화 및 이와 관련된 피부 증상을 예방 및/또는 제한 및/또는 보정하는데 유용하고, 특히, 오염에 의한 피부의 주름 및 미세선(fine line)을 예방 및/또는 교정 및/또는 광택 유지 및/또는 보습 증가 및/또는 박리 조절 및/또는 오염된 피부의 탄력 유지 또는 자극을 예방 및/또는 보정하는데 유용하다.

[0059] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 작용 범위를 넓히기 위해서는 미용(cosmetic) 효과를 강화하거나, 및/또는 다른 보완적인 미용(cosmetic) 효과를 하나 이상 가지는 화장용 활성제를 조합하는 것이 유리할 수 있다.

[0060] 따라서 상기 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 선택적으로 하나 이상의 다른 항산화제(antioxidant) 및/또는 항 - 오염 화장제(anti-pollution cosmetic agents)를 가지는 화장용 조성물에 조합하는 것이 유리하다.

[0061] 바람직하게, 상기 화장제(cosmetic agents)는 하기로부터 선택된다:

[0062] - 항산화 특성(실시예 2 참조) 및 각질층을 보강하여 피부의 장벽 기능을 강화시키는 특성(FR 3 007 980)을 갖는 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물. 따라서, 상기 추출물은 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물에 의한 피부의 오염에 대한 예방 및 보정을 강화시킬 수 있다.

[0063] *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*는 일반적으로 덤불에서 자라는 미나리과(Apiaceae, Umbellifers)의 초본(herbaceous) 식물이다.

[0064] *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*는 중간 크기 (15-50 cm)의 털이없는 다년생 식물(glabrous perennial plant)로서 산형화(umbels, 3 ~ 5 개의 unequal ribs)의 구형(globular appearance)으로 쉽게 알아볼 수 있다.

[0065] *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*는 사포닌, 탄닌 및 점액이 풍부하고; 치유, 수렴제(astringent) 및 상처 치유 특성에 대한 전통 의약(medicin)에서 사용된다.

[0066] 사니클(sanicle, *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*) 추출물은 바람직하게는 지상부(잎, 꽃 및 줄기)의 수용성 추출물이다. 유리하게는, 상기 추출물은 지상부의 수성 - 알콜 추출물이고, 바람직하게는 글리세롤로 안정화된다.

[0067] 바람직하게 수성-알코올 추출물은 적어도 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 수득된다:

[0068] - 상기 지상부의 건조;

[0069] - 분쇄;

[0070] - 에탄올/물 (80:20) 추출;

[0071] - 여과;

[0072] - 추출 용매의 증발에 의한 진공 하에서의 농축;

[0073] - 농도 조절 (글리세롤 첨가).

[0074] 상기 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물은 특유의 냄새를 가지는 황갈색의 약간 점성이 있는 액체이다. 다음과 같은 분석 특성을 가지고 있다: pH = 3.5-5.0; 상대 밀도(relative density): 1.050-1.200; 굴절률(refractive index) : 1.370-1.400; 건조 식물 / 추출물 비 = 1/10.

[0075] 바람직하게는, 본 발명에 따라 사용되는 화장용 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 고형분 중량으로 0.01 % 내지 10 %의 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물을 포함한다;

[0076] - 발트해(Baltic Sea)의 적조류 (red alga) 푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis) 추출물. 바람직하게는, 상기 추출물은 해수 염분(marine salts)이 풍부한 올리고퍼셀라란(oligofurcellaran)을 포함한다. 올리고퍼셀라란(oligofurcellaran)은 조류에서 추출한 설페이티드 퍼셀라란 (sulfated furcellaran)(갈락토오스 및 언하이드로갈락토즈)의 해중합(depolymerization)에 의해 얻어지고; 해중합 후, 올리고퍼셀라란은 해수염으로 풍부한 용액으로 재수화되고(rehydrated), 이런 유형의 추출물은 Hydranov P.라는 이름으로 Codif 사에 의해 판매된다.

[0077] 상기 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물은 피부 보습성을 가지고, 오염으로 인한 피부 탈수를 예방하거나 보정할 수 있다 (실시예 3 참조).

[0078] 바람직하게는, 상기 화장용 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 고형분 중량으로 0.1 % 내지 2 %의 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물을 포함한다;

[0079] - *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물; *수코리 독 크레스(Lampsana communis)*는 국화과(Asteraceae)에 속하며, 대기 오염을 겪고있는 도로 및 기타 지역의 가장자리에서 자라고있는 매우 광범위 한 일년생 식물이다. 그것은 요구가 많지 않고(undemanding) 매우 저항적인 식물이다.

[0080] 본 발명에 따른 조성물에서 사용되는 상기 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물은 상기 식물 지상부의 수성-글리콜릭(aqueous-glycolic) 추출에 의해 수득되고, 하기와 같은 분석 특성을 갖는 특유의 냄새를 갖는 투명한 갈색의 액체가 얻어진다:

[0081] - 물 함량: 18 - 26%

[0082] - pH: 6 - 8

[0083] - 밀도: 1.055 - 1.075

[0084] - 굴절률: 1.420 - 1.440.

[0085] 상기 추출물을 사용할 때, 약 0.01 중량 % 내지 5 중량 %, 바람직하게는 0.01 중량 % 내지 0.5 중량 %, 가장 바람직하게는 0.01 중량 % 내지 0.05 중량 %의 농도로 첨가된다.

[0086] 본 발명은 또한, 하기 조합 중 하나의 용도 또는 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다 :

[0087] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 및 *사니큘라 유로피아(Sanicula*

*europaea)*추출물;

[0088] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 및 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물;

[0089] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 및 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물;

[0090] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물, *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)* 추출물 및 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물;

[0091] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물, *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물 및 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물;

[0092] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물, *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물 및 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물;

[0093] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물, *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)* 추출물, *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물 및 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물;

[0094] 상기 용도는 오염이 피부에 미치는 영향을 방지 또는 예방하기 위한, 특히, 대기 오염의 유해한 영향으로부터 피부를 보호 및/또는 대기 오염에 의해 유발된 원치 않는 가시적인 증상과 같은 피부 장애를 회복하기 위한 것이다; 본 발명에 따른 용도는 대기 오염이 내부 또는 외부 오염의 존재에 기인하는 경우에 유리하고; 특히, 오존 또는 질소 산화물와 같은 산화제(oxidizing agent), 일산화탄소(carbon monoxide), 탄화수소 및 용매, 이산화황, 금속, 포름알데히드, 담배 연기, 현탁액 내의 미립자 또는 미세 먼지, 전자기파의 주변 공기에 존재함으로써 발생하는 오염을 포함할 수 있다.

[0095] 보다 상세하게는, 본 발명에 따른 상기 조합물 또는 이를 포함하는 조성물 중 하나의 용도는 다음과 같은 활성을 통해 오염으로 인한 피부상의 가시적인 피부 증상의 출현 또는 피부 붕괴의 징후를 예방하고 및/또는 이들 피부 증상 또는 장애를 회복할수 있게 한다:

[0096] - 피부 및 각질층의 응집력 증가 및 피부의 장벽 기능 개선;

[0097] - 케라틴세포(keratinocyte) 증식 및 분화 과정의 항상성 회복;

[0098] - 피부 기질(dermal matrix) 회복;

[0099] - 피부 보습의 회복;

[0100] - 피부 세포의 응집력 개선;

[0101] - 세포 커뮤니케이션의 개선;

[0102] - 진피표피경계(dermoepidermal junction)의 회복.

[0103] 이러한 특성에 기초하여, 본 발명에 따른 상기 조합물 또는 이를 포함하는 조성물 중 하나의 용도는 특히 오염으로 유발된 피부 노화 및 이와 관련된 피부 증상을 예방 및/또는 제한 및/또는 보정하는데 유용하고, 특히, 오염에 의한 피부의 주름 및 미세선(fine line)을 예방 및/또는 교정 및/또는 광택 유지 및/또는 보습 증가 및/또는 박리 조절 및/또는 오염된 피부의 탄력 유지 또는 자극을 예방 및/또는 보정하는데 유용하다.

[0104] 마지막으로, 본 발명은 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 단독 또는 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물 및/또는 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물 및/또는 *수코리 독 크레스(Lampsana communis)* 추출물과의 조합 또는 상기 추출물 또는 상기 조합 중 언으 하나를 포함하는 조성물 적당량을 피부에 적용하는 것을 특징으로 하는 오염이 피부에 미치는 영향을 예방 또는 회복하기 위한 미용 관리 방법(cosmetic care process)에 관한 것이다.

[0105] **실시예 1**

[0106] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 의 항오염활성의 입증은 재구성된 상피 세포(reconstituted epithelia)의 생물학적 반응에 대한 단일 또는 반복 노출 동안의 내부 및 외부 대기의 다양한 오염 물질의 영향을 실험관 내에서 특성화 할 수 있는 새로운 모델의 개발에 의해 가능해졌다.

[0107] 간단히 말하면, 선택된 연구 모델은 RHE 재건된 표피 (reconstructed epidermis, SkinEthic Lyon, France)이다. 상기는 원시 인간 세포(primary human cell)에서 재구성된 표피이다. 케라틴세포(keratinocyte)는 공기/액체 계면에서 폴리카보네이트 멤브레인(polycarbonate membrane, Nunc insert 0.5 cm^2)이있는 삽입물상(on inserts) 무 혈청 배지(serum-free defined medium)에서 배양된다.

[0108] 재구성된 표피(reconstructed-epidermis) 공기-액체-인터페이스 노출 모델의 설정은 생체 내(*in vivo*) 상황(situation)에 가까운 환경에서 피부 상피 세포와 환경 오염 물질 간의 상호 작용을 연구 할 수있게한다.

[0109] 포름 알데히드, 담배 연기, 미립자(particles)의 세가지 유형의 오염 물질이 표피 표면에 적용되었다.

[0110] 포름알데히드 모델

[0111] 포름 알데히드는 물에 용해 될 때 포르몰(formol)로 더 잘 알려져 있으며, 알데히드계에 속하는 매우 휘발성 유기 화합물 (volatile organic compound, VOC)이다. 상기 물질은 낮은 분자량을 가지며 상온에서 기체가되는 성질을 가지고 있으며 현재 실내 환경에서 자주 발견된다.

[0112] 포름 알데히드는 담배 연기, 양초, 향스틱(incense sticks), 벽난로 및 가스 레인지, 석유 연소 스토브 및 포름알데히드계 성분을 함유한 건축 및 장식 제품을 포함하는 연소 소스를 포함하여 매우 많은 수의 배출원을 보유하고 있다.

[0113] 본 연구를 위해, 재건된 표피 모델은 2100ppm의 포름 알데히드 투여량에 노출되었다.

[0114] 노출은 시료에 적합한 6-well Vitrocell® 노출 모듈에서 수행된다. 상기 모듈은 (i)표피의 기저부와 영양 매체 사이 및 (ii) 정점 부분과 생성 된 대기 (대기 또는 오염 물질) 사이 의 접촉부와 공기/액체 계면을 제공하는 두 개의 부분으로 구성된다. (도 1) :

[0115] - 삽입물(표피)을 받는 부분 A. 유지 순환 배지 (maintenance culture medium, MM)는 물 순환에 의해 온도 조절 (37 ℃) 된 모듈의 하부에 침전된다.

[0116] - 기체 대기와 조직 표면 사이의 직접적인 접촉은 노광 모듈의 부분 B 및 오염 물질 유입 혼 (collantant admissions horns)에 의해 제공된다.

[0117] 공기 유량, 샘플 노출 시간 및 노출 빈도와 같은 다양한 매개 변수가 공기와 같은 "제어(control)" 분위기로 정의되었다. 이 단계의 목적은 조직 손상없이 공기/액체 인터페이스 노출을 위한 최상의 조건을 정의하는 것이다.

[0118] 담배 연기 모델

[0119] 포름 알데히드와 아세트 알데히드를 포함한 알데히드와 많은 휘발성 유기 화합물을 함유한 혼합물인 담배 연기는 상업용 담배에서 발생한다. 10 × 20ml를 주사기로 채취하여 노출 챔버에 넣었다. 표피를 200ml의 담배 연기에 37 ℃에서 60 분 동안 노출시켰다. "공기-조절(air-control)"은 동시에 연구되었다.

[0120] 미세 입자(fine particle) 모델

[0121] 미세 입자는 도로 교통, 특히 자동차의 디젤 엔진뿐만 아니라 산업, 농업 및 연소 (굴뚝, 개별 가열 등)에서 비롯ehls다. 크기가 마이크로 미터인 미세 입자는 육안으로 볼 수 없다. PM10 입자 (크기가 10 μm 이하, 세포 크기보다 6 ~ 8 배 작음)와 미세 또는 PM2.5 입자 (박테리아처럼 크기가 2.5 μm 이하).

[0122] 연구를 위해, 상기 입자(조성: 하기 표)를 재구성된 조직(reconstructed tissue)의 표면에 국소 도포 하였다. 표피를 37 ℃에서 60 분 동안 입자에 노출시켰다. "공기-조절(air-control)"은 동시에 연구되었다.

표 1

[0123]

Organic compounds in the two air pollution PM samples.

		Concentration (ng/m³)	
VOCs		$PM_{2.5}$	$PM_{>2.5}$
Benzene		0.46	0.05
Toluene		1.81	0.07
Ethylbenzene		0.83	0.10
o-Xylene		3.47	0.07
123Trimethylbenzene		1.17	0.71
Trimethylbenzene		0.52	<LQ
Tetramethylbenzene		0.35	0.20
Pentamethylbenzene		0.29	<LQ
Total		8.90	1.2
PAHs			
Naphtalene	Nap	0.01	0.01
Acenaphtylene	Ace	<LQ	0.004
Phenanthrene	Phe	0.02	0.01
Fluoranthene	Flu	0.11	0.03
Pyrene	Pyr	0.28	0.06
Benzo[a]Anthracene	BaA	0.19	<LQ
Chrysene	Chr	0.26	0.01
Benzo[b]Fluoranthene	BbF	<LQ	0.02
Benzo[k]Fluoranthene	BkF	0.30	<LQ
Benzo[a]Pyrene	BaP	0.24	0.01
Dibenzo[a,h]Anthracene	DahA	0.21	<LQ
Indeno[1,2,3-c,d]Pyrene	Ind	<LQ	0.07
Benzo[g,h,i]Perylene	BghiP	0.37	<LQ
Total		1.99	0.22

< LQ = Under limit of quantification ; VOCs = Volatile Organic Compounds, PAHs = Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

[0124] 다양한 조사 방법을 통해 Skinethic® 재건된 표피(reconstructed epidermis) 모델에 이러한 오염 물질의 영향을 특성화 할 수있었다.

[0125] - 정량적 PCR (126 "표피"유전자)에 의해 수행된 전사체(transcriptomic) 방법;

[0126] - 면역조직화학에 의해 수행된 프로테오믹 방법;

[0127] - Elisa 기술 및 멀티플렉스(multiplex) 기술을 사용하여 배양 배지를 검정하는 방법.

[0128] 오염 물질 (포름 알데히드, 담배 연기, 미입자)에 의해 유도 된 표피의 기능적 및 구조적 변형에 대한 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물의 보호 효과를 평가하는 맥락에서 다음 실험이 수행되었다 :

[0129] Skinethic® 재건된 표피는 조직의 표면에 도포된 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물과 조합되거나 조합되지 않은 오염 물질 각각으로 처리한다.

[0130] 실험된 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 하기 단계를 통해 수득된 말토덱스트린(maltodextrin)으로 안정화된 수성 잎 추출물이다 :

[0131] - *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 잎의 분쇄;

[0132] - 물로 추출;

[0133] - 분리;

[0134] - 정제;

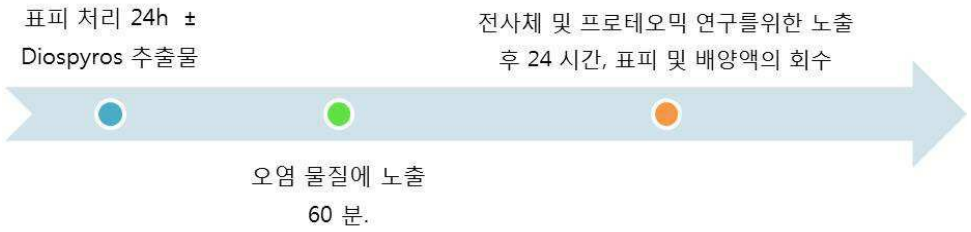
[0135] - 말토덱스트린의 첨가;

[0136] - 여과;

[0137] - 스프레이-건조(spray-drying).

[0138] 이와 같이하여 얻어진 추출물은 특유의 냄새가 나는 황색(yellow-orange)에서 베이지 색으로 착색된 분말이며, 수용액에서 1 %로 제조되었을 때, pH는 5.0 내지 7.0이다.

[0139] 처리가 끝나면 각 표피는 RT PCR에 의한 유전자 발현 분석 및 표피 - 표적 면역 표지를 수행하기 위해 보존한다. 배양 배지는 Elisa 및 멀티 플렉스 분석에 사용된다.



[0140]

[0141] **전사체 연구(transcriptomic study)**

[0142] transcriptomic 연구는 Skinethic® 재건된 표피 에서 정량적 PCR (qPCR)에 의해 수행되어 수많은 유전자의 발현을 연구할 수 있다. RNA는 RLT 버퍼를 사용하여 추출한 다음 Qiagen RNeasy 추출 마이크로 키트를 사용하여 추출한다. 그들은 연속적으로 분석되고 역전사된다. 그 다음 qPCR을 128 개의 상피 기능 유전자 (Roche Diagnostics) 플레이트에서 수행한다.

[0143] 결과는 Fold Change (FC)라고 불리는 두 조건 사이의 표현의 차이를 계산하여 분석된다. 대조군에 비해 발현이 증가한 것은 FC ≥ 1.5에 의해 반영된 것으로 간주된다. 대조군에 비해 발현의 감소가 FC ≤ 0.7에 반영됨을 의미한다.

[0144] **프로테오믹 연구(proteomic study)**

[0145] 프로테오믹 연구는 면역 조직 화학에 의해 수행되어 수많은 단백질의 존재를 연구 할 수 있다.

[0146] 재건된 표피를 10 % 포르말린에서 72 시간 동안 고정시킨 다음 탈수시키고 파라핀 블록에 매립시킨 후 5㎛ 단면으로 절단한다. 단면을 탈 파라핀 처리 한 후, 멤브레인을 투과성으로 만들고 결합 부위를 포화시키기 위해 0.1 % triton X-100 (Sigma) 및 2 % 소 혈청 알부민 (BSA-Sigma)으로 10 분 동안 처리하기 전에 탈파라핀화 한 다음 (Abcam) 마스크를 제거 하였다.

[0147] 다음 섹션을 로리크린 및 4-HNE (4- hydroxynonenal)에 대한 1 차 항체와 함께 1 시간 동안 배양한다.

[0148] 사진은 형광 변환 현미경 (Nikon Eclipse 50i)을 사용하여 촬영한다.

[0149] **ELISA, 멀티플렉싱에 의한 분석(assaying by elisa, by multiplexing (luminex technology))**

[0150] ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay의 약자)는 생물학적 액체에서 단백질을 검출 및/또는 분석하기위한 면역 학적 분석법이다. "샌드위치"분석 기술에서, 마이크로 플레이트의 웰은 요구되는 항원에 특이 적으로 결합할 수있는 포획 항체로 코팅된다. 코팅이라 불리는 이 작업 동안, 포획 항체는 정전기 상호 작용에 의해 우물의 플라스틱에 결합한다. 포획된 항원에 결합할 수 있는 미량 항체인 제 2 항체를 웰에 첨가하고 비결합 된 트레이서 항체를 헹구어 제거하였다. 추적 항체는 착색된 생성물의 형성을 촉매하는 효소에 커플링된다. 결합된 트레이서의 항체 분자의 수는 포획 항체가 고정화된 항원 분자의 수에 의존하기 때문에 반응은 따라서 항원의 공지된 농도로 생산 검량선에 기초하여 비색법에 의해 정량화 될 수 있다. 이 분석은 IL-1α 및 IL-8의 존재를 검출하는데 사용된다.

[0151] Luminex 기술은 ELISA 원리와 유동 세포 계측법에 기반을두고 있기 때문에 작은 샘플 볼륨에서 수많은 단백질

또는 핵 표적을 동시에 분석 할 수 있다. 이 기술은 폴리스티렌 비드 또는 두 가지 형광색의 혼합물로 착색된 자기 비드 (비드의 각 유형에 대해 알려져 있고 완벽하게 정의된 비율) 인 마이크로 스피어를 사용한다.

[0152] 일단 관심 분자가 비드의 표면에 결합되면, 후자는 분석될 샘플과 함께 인큐베이션된다. ELISA 유형의 실험 프로토콜을 수행 한 후, 결과는 액체 피펫 팅 및 관리 모듈에 의해 현탁액 중의 비드를 함유하는 샘플을 액상 정맥 내로 흡입하여 이들이 존재하는 방식으로 Luminex에서 판독함으로써 수득된다 하나는 이후에 두 개의 레이저 세트로 인해 여기(excited)된다.

[0153] - 각 비드의 색상 코드를 결정하기위한 적색 레이저,

[0154] - 항원 - 항체 상호 작용을 탐지하고 분석 할 수있는 리포터 분자에 결합 된 형광 염료를 여기시키는 녹색 레이저.

[0155] 이 실험은 MMP1, MMP3 및 MMP9의 존재를 탐지하는 데 사용된다.

[0156] **결과(RESULTS)**

[0157] 포름 알데히드에 대한 분석

[0158] Transcriptomic 연구:

표 2

	FORMALDEHYDE (FC)*	FORMALDEHYDE + DIOSPYROS (FC)**
TLR3	3.41	0.14
IL8	7.16	1.24
CASP14	2.55	0.46
CASP9	2.28	0.19
MMP1	1.87	0.73
MMP9	3.76	0.27
SPRR2A	0.45	0.98
HRNR	0.33	2.02
LCE2B	0.70	1.36
LCE3D	0.70	1.44
SIRT1	0.07	0.62

(FC: fold change, difference in expression between two conditions;
* formaldehyde compared with control, ** Diospyros compared with formaldehyde)

[0159]

[0160] 프로테오믹 연구의 결과는 도 2A와 2B에 나타내었다.

[0161] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 각질 피막(horny envelope)의 구성마커(hornerin HRNR, Small Proline Rich Protein SPRR2A, LCE2B, LCE3D)의 발현을 증가시켜 피부 장벽에 대한 보호 효과를 발휘한다. 이 결과는 각질 피막 의 주요 단백질인 로리크린 (loricrin)의 면역조직화학의 확인으로 확인된다. 마찬가지로, 케라틴세포(keratinocyte) 증식 및 분화 과정의 항상성에 관여하는 SIRT1의 발현은 실질적으로 재증가된다.

[0162] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 은 더 이상 염증과 관련된 요소를 요구하지 않음으로써 포름알데히드에 노출된 표피를 보호한다. 결과는 염증, 세포 사멸 및 기질 분해의 마커가 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물의 존재하에서 과소 발현됨을 보여 주준다. IL-8 사이

토킨 및 MMP1의 분석은 전사체(transcriptomic) 연구의 결과를 확인한다.

[0163] 담배연기에 대한 분석

[0164] Transcriptomic 연구:

표 3

	TOBACCO (FC)*	TOBACCO + DIOSPYROS (FC)**
TLR2	31.12	0.12
TLR4	43.41	0.04
IL8	4.89	1.64
MMP1	14.32	0.01
MT1G	2.30	0.05
FLG2	0.07	0.62
CD44	0.02	0.75
KRT1	0.03	0.52
KRT10	0.00	7.67
CLDN1	0.09	0.24
DSC1	0.01	5.46
COL4A1	0.02	1.00
COL7A1	0.03	0.5

(FC: fold change, difference in expression between two conditions;
* tobacco compared with control, ** Diospyros compared with tobacco)

[0165]

[0166] 프로테오믹 연구의 결과는 도 3A와 3B에 나타내었다.

[0167] 상기 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 더 이상 염증과 관련된 요소를 요구하지 않음으로써 담배 연기에 노출된 표피를 보호한다. 상기 결과는 염증, 세포 사멸 및 기질 분해의 마커가 선택된 실험 조건에서 추출물의 존재하에서 과소 발현됨을 보여 주며; 사이토킨 IL1-α 및 IL-8 및 MMP1의 분석은 전사체(transcriptomic) 연구의 결과를 확인한다. 또한, *디오스피로스 메스필리포르미스*(Diospyros mespiliformis) 추출물은 우수한 보습이 유지되도록 한다(도2, CD44)

[0168] 얻어진 결과는 상기 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 표피에 사용하는 것은 세포 응집력 및 claudin 1 (CLDN1)과 desmocollin 1 (DSC1) 세포 커뮤니케이션을 유지한다는 것을 알 수 DT다.

[0169] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 은 담배 연기의 영향에 대한 진피 표피 경계(dermoepidermal junction)를 보호한다. 콜라겐 IV 및 VII 유전자 발현을 확신한다.

[0170] 미립자에 대한 분석

[0171] Transcriptomic 연구:

표 4

	PARTICLES (FC)*	PARTICLES + DIOSPYROS (FC)**
TLR2	0,19	1,24
TLR3	0,29	1,30
TLR4	0,23	2,12
CRNN	0,45	1,33
LOR	0,79	4,98
CD44	0,30	1,08
EVPL	0,44	1,05
DSG1	0,47	0,82
DSC1	0,49	1,34
NID1	0,33	6,52
COL4A1	0,13	0,40
COL7A1	0,28	0,59

(FC: fold change, difference in expression between two conditions;
* particles compared with control, ** Diospyros compared with particles)

[0172]

[0173] 프로테오믹 연구의 결과는 도 4A와 4B에 나타내었다.

[0174] 상기 *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물은 입자에 대한 피부의 장벽 기능을 보호한다. 특히, 장벽 기능에 중요한 역할을하는 로리 크린 (loricrin)의 발현이 크게 증가한다.

[0175] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물을 처리한 표피로부터 얻은 결과는 특히 claudin 1 (CLDN1)과 desmocollin 1 (DSC1)에 의해 제공되는 세포 응집력 및 세포 커뮤니케이션의 유지를 보여준다.

[0176] *디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis)* 추출물 은 입자의 영향에 대한 진피 표피 경계 (dermoepidermal junction)를 보호한다. 콜라겐 IV, VII 및 니도겐(nidogen) I 주요 구성 요소의 유전자 발현이 증가된다.

[0177] **실시예 2**

[0178] 본 연구의 목적은 정상 인간 케라틴세포(keratinocyte)의 일차 배양에서 과산화수소 (H_2O_2)에 의한 산화 스트레스 유도 후 산화 환원 상태의 매개 변수를 평가하여 *사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물 의 항산화 특성을 특성화 한 것이다.

[0179] 수성-알코올 추출물은 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 수득된 추출물로 실험하였다:

[0180] - 지상부의 건조;

[0181] - 분쇄;

[0182] - 에탄올/물 (80:20) 추출;

[0183] - 여과;

[0184] - 추출 용매의 증발에 의한 진공 하에서의 농축;

[0185] - 농도 조절 (글리세롤 첨가).

[0186] 특성: 황갈색, 특유의 냄새를 가지는 약간 점성이 있는 액체, yellow-brown, slightly viscous liquid with a characteristic odor. pH = 3.5-5.0; 상대 밀도(relative density): 1.050-1.200; 굴절률(refractive index) : 1.370-1.400; 건조 식물 / 추출물 비 = 1/10.

[0187] Mitosafe® 기술은 미토콘드리아 수준에서 활성제의 항산화 효과를 탐구하는 것을 가능하게한다. 상기 기술은 세포 생존력, 세포 및 미토콘드리아 산소 자유 라디칼 생산, 산화 방지제 평가와 같은 매개 변수의 다중 측정에 의한 살아있는 세포에서의 미토콘드리아 기능의 통합 연구로 구성된다. 96- 웰 플레이트에서의 이러한 테스트는 인간 표피 세포의 1 차 배양에서 수행된다.

[0188] 하기를 측정하였다:

[0189] - 미토콘드리아 반응성 산소 종;

[0190] - ROS 세포 생산 수준;

[0191] - 미토콘드리아 및 세포 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제 (superoxide dismutase, SOD);

[0192] - 총 글루타티온 (산화 및 환원 된 형태).

[0193] 케라틴세포(keratinocyte)에서 H_2O_2에 노출되면 미토콘드리아 ROS 생산이 증가하여 미토콘드리아 SOD 활성이 과도하게 조절되고 ROS가 세포 내 축적된다. 또한 ROS의 세포 내 증가에 대한 응답으로 총 글루타티온 수준의 증가를 초래한다. 미토콘드리아 SOD 활성과 글루타티온 수준의 상향 조절은 세포 내 공간에서 ROS 축적에 의해 유도 된 산화 스트레스에 대항하는 보상 메커니즘이다. 세포 SOD는 또한 직접적인 산화 방지 메커니즘이다. 그럼에도 불구하고 이 모델에서는 H_2O_2에 노출 되어도 유도되지 않는다.

[0194] **세포 ROS의 생산을 통한 항산화 특성(Antioxidant property through the production of cell ROSs):**

[0195] Mitoread AntiOx cROS 방법론은 형광 라벨을 사용하여 세포 활성 산소 종 (reactive oxygen species, ROS)에 대한 성분의 항산화 활성을 정량화하는 것으로 구성된다. 먼저, 세포를 37 ℃에서 30 분 동안 형광 프로브와 사전 배양 하였다. 세척 후, pro-oxidizing 표준 물질인 100 μM H_2O_2의 존재하에 세포 독성이 아닌 것으로 판정된 농도의 항산화 표준 물질 인 10 μM Trolox 또는 추출물과 함께 세포를 배양 하였다.

[0196] 세포 ROS 생성물을 즉시 60 분 동안 기록 하였다. 마이크로 플레이트 판독기 (Varioskan-Thermo)를 사용하여 5 분마다 형광을 기록하였다. 세포는 동역학(kinetics) 동안 37 ° C에서 유지되었다. 모든 추출물은 4 회에 걸쳐 실험하였다. 이들의 효과는 음성 대조군 (H_2O_2) 및 양성 대조군 (Trolox)과 동시에 비교되었다.

[0197] **미토콘드리아 ROS 생산을 통한 항산화 특성(Antioxidant property through mitochondrial ROS production):**

[0198] Mitoread AntiOx mtROS 방법론은 형광 라벨을 사용하여 미토콘드리아 활성 산소 종 (ROS)에 대한 성분의 항산화 활성을 정량화하는 것으로 구성된다.

[0199] 세포를 표준 항산화제, 레스베라트롤(resveratrol) 1 μM, 또는 미리 결정된 농도의 활성 성분과 함께 37 ℃에서 60 분 동안 사전 배양 하였다.

[0200] 다음으로 항산화 화합물을 대체하여 37 ℃에서 30 분 동안 형광 프로브로 배양했다. 세척 후, 세포를 기준 pro-oxidizing 화합물인 과산화수소 H_2O_2 (100 μM)로 처리 하였다.

[0201] 미토콘드리아(mitochrondrial) ROS 생산은 60 분 동안 즉시 기록되었다. 마이크로 플레이트 판독기 (Varioskan-Thermo)를 사용하여 5 분마다 형광을 기록하였다. 세포는 동역학(kinetics) 동안 37 ° C에서 유지되었다. 모든 추출물은 4 회에 걸쳐 실험하였다. 이들의 효과는 음성 대조군 (H_2O_2) 및 양성 대조군 (resveratrol)과 동시에 비교되었다.

[0202] **세포 및 미토콘드리아 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 활성을 통한 항산화 특성(Antioxidant property through cell and mitochondrial SuperOxide Dismutase activities):**

[0203] Mitoread RedOxc/mtSOD 방법론은 세포와 미토콘드리아 SOD 활성의 정량화로 구성된다.

[0204] 세포를 표준 항산화제, 레스베라트롤(resveratrol) 1 μM, 또는 미리 결정된 농도의 활성 성분과 함께 37 ℃에서 60 분 동안 시전 배양 하였다. 세포를 pro-oxidizing 화합물인 과산화수소 H_2O_2 (100μM)로 60분 동안 처리하였다. 즉시, 세포 추출물을 제조하고 -80 ℃에서 보관 하였다. 효소 활성은 마이크로 플레이트 판독기(Varioskan-Thermo)를 사용하여 형광 분석 및 효소 방법으로 측정 하였다. 모든 추출물은 3 번씩 실험 하였다. 이들의 효과는 음성 대조군 (H_2O_2) 및 양성 대조군 (resveratrol)과 동시에 비교되었다.

[0205] **총 글루타티온 수준을 통한 항산화 특성(Antioxidant property through the total glutathione level):**

[0206] Mitoread RedOx GSHtot 방법론은 총 글루타티온 수준 (GSH + GSSG)의 정량화로 구성된다.

[0207] 세포를 표준 항산화제, 레스베라트롤(resveratrol) 1 μM, 또는 미리 결정된 농도의 활성 성분과 함께 37 ℃에서 60 분 동안 시전 배양 하였다. 세포를 pro-oxidizing 화합물인 과산화수소 H_2O_2 (100μM)로 60분 동안 처리하였다. 즉시, 세포 추출물을 제조하고 -80 ℃에서 보관 하였다. 효소 활성은 마이크로 플레이트 판독기(Varioskan-Thermo)를 사용하여 형광 분석 및 효소 방법으로 측정 하였다. 모든 추출물은 3 번씩 실험 하였다. 이들의 효과는 음성 대조군 (H_2O_2) 및 양성 대조군 (resveratrol)과 동시에 비교되었다.

[0208] **결과(Results)**

[0209] 음성 및 양성 대조군의 효과가 확인되었다. 100 μM의 H_2O_2는 미처리 세포에 비해 미토콘드리아 ROS의 생산을 9.4배로 현저하게 증가시켰다. 레스베라트롤은 1 μM에서 케라틴세포(keratinocyte)에서 H_2O_2에 의해 유도 된 미토콘드리아 ROS의과 생산을 현저히 줄였다(1.3 배 ($p = 0.013$)에 근접) (도 5).

[0210] Sanicle 추출물(*사니큘라 유로피아(Sanicula europaea)*추출물)은 H_2O_2에 의해 유도된 미토콘드리아 ROS 수준을 현저하게 줄였고, 효과적인 항산화 활성을 보였다 (**13%** at 0.001%, $p< 0.05$ and **38%** at 0.005%, $p< 0.001$).

[0211] 음성 및 양성 대조군의 효과가 확인되었다. 100 μM의 H_2O_2는 미처리 세포에 비해 세포 ROS의 생산을 7.4배로 현저하게 증가시켰다. 트로록스(Trolox)는 10 μM에서 케라틴세포(keratinocyte)에서 H_2O_2에 의해 유도 된 미토콘드리아 ROS의과 생산을 현저히 줄였다(1.7 배, $p < 0.001$).

[0212] 두가지 투여에서, Sanicle 추출물은 H_2O_2에 의해 유도된 세포 ROS의 생산을 현저하게 줄였다(평균 **49%**, $p< 0.001$) (**도 6**).

[0213] 인간 케라틴세포(keratinocyte)에서 H_2O_2에 대한 노출은 미처리 세포에 비해 세포 SOD 활성이 30 % ($p = 0.075$)에 가까운 감소를 나타내는 것은 유의하지 않은 경향을 나타 냈지만, 미토콘드리아 SOD 활성은 비처리 세포와 비교하여 211 % ($p = 0.006$) 증가하였다.

[0214] 항산화 표준 물질인 1μM 레스베라트롤은 H_2O_2 노출에 대한 반응으로 무처리 세포에 비해 세포 SOD 활성을 40 % 가까이 증가 시켰다($p = 0.036$). 또한, 1 μM 레스베라트롤은 H_2O_2에 의해 유도된 미토콘드리아 SOD의 활성을 66 % 가까이 현저하게 감소 시켰으며($m = 2$), mtSOD 수준은 무처리 세포와 유사했다.

[0215] 케라틴세포(keratinocyte)를 0.001 %의 Sanicle 추출물로 처리하면 무처리 세포의 세포 SOD 활성이 비교될 수 있다. 0.005 %에서 Sanicle 추출물은 무처리 세포와 비교하여 H_2O_2에 의해 유도된 것과 관련된 세포 SOD 활성을 76 %까지 증가 시켰으며($p = 0.012$), 세포 산화 스트레스에 반응하여 세포 항산화 방어 물질의 상향 조절을 나타냈다 (도 7).

[0216] Sanicle 추출물 0.001 %에서 미토콘드리아 SOD 활성은 무처리 세포와 유사하게 회복되어 1μM에서 resveratrol의 효과와 유사한 방식으로 H_2O_2에 의한 유도를 80 %에 근접하게 현저히 감소시켰다 ($p = 0.008$).

[0217] 0.005 %의 Sanicle 추출물은 H_2O_2에 의해 유도된 미토콘드리아 SOD 활성을 유지했다 (도 8).

[0218] 100 μM에서 H_2O_2 는 무처리 세포와 비교하여 총 글루타티온 수준을 2.9 배 가까이 증가 시켰으며 ($p = 0.044$), H_2O_2에 의해 유도된 산화 스트레스에 반응하여 글루타티온의 상향 조절을 나타냈다. 1 μM의 레스베라트롤 과의 사전 배양은 H_2O_2(94 %) 처리 후 전체 글루타티온 수준을 현저하게 감소시켜 비 처리 세포와 비슷한 수준으로 회

복시켰다 (p = 0.006).

[0219] Sanicle 추출물은 1uM에서 레스베라트롤 과 같이 유의하게 감소하였으며, H_2O_2로 처리한 후의 총 글루타티온 수준은 처리되지 않은 세포의 수준과 비교할만한 수준으로 감소했다(도 9).

[0220] **결론(Conclusion)**

[0221] H_2O_2에 대한 노출은 원시 인간 케라틴세포(keratinocyte)의 산화 - 환원 평형을 손상시키는 세포 손상의 유도제로 확인되었다. 인간 케라틴세포(keratinocyte)에서 H_2O_2 (100 μM, 1 시간)의 영향은 하기 표에 요약하였다.

표 5

[0222]

Oxidative stress condition	Effects on redox status				
	cROS	mtROS	cSOD	mtSOD	GSHtot
H_2O_2 100 μM, 1 hour	↗***	↗***	↘(ns)	↗**	↗**

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

[0223] 실험 조건 하에서, H_2O_2는 미토콘드리아 ROS를 생성하여 세포 내 ROS를 축적시켰다. 미토콘드리아 SOD 활성의 증가와 총 글루타티온 수준의 증가는 ROS 생산의 조기 증가를 막기 위한 H_2O_2유도 산화 스트레스에 대한 반응이다.

[0224] 미토콘드리아 SOD와 GSH의 증가는 관찰 된 세포 SOD의 감소에 직접적인 원인이 될 수 있으며, 소급 루프를 통해, 치료에 의해 도입 된 외인성 H_2O_2가 $O_2^{\cdot-}$ 를 H_2O_2로 전환시키는 세포 SOD의 활성을 극복하는 활성의 감소를 설명한다.

[0225] H_2O_2에 노출된 Sanicle 추출물의 효과는 아래 표에 요약하였다.

표 6

[0226]

Oxidative stress condition	Effects on redox status in response to H_2O_2 exposure				
	cROS	mtROS	cSOD	mtSOD	GSHtot
SANICLE 0.001%	↘ 47%	↘ 13%	≈nontreated cells	≈nontreated cells	≈nontreated cells
SANICLE 0.005%	↘ 51%	↘ 39%	↗ 148% > nontreated cells	≈100 μM H_2O_2	≈nontreated cells

[0227] 0.001 %의 Sanicle 추출물은 H_2O_2에 의해 유도된 미토콘드리아 및 세포 ROS와 관련하여 효과적인 항산화제이다. 그 결과, Sanicle 추출물은 SOD 항산화 효소와 비효소 항산화제인 글루타티온을 증가시킬 필요성을 감소시킨다.

[0228] 0.005 %의 Sanicle 추출물은 H_2O_2의 존재 하에서 이미 요구 된 세포 SOD의 활성을 다시 증가시켜 첫 번째 항산화제 방어력을 강화시킨다.

[0229] **실시예 3**

[0230] 본 연구의 목적은 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물의 0.5 % 농도에서의 오염 방지 효과를 제시하는 것이다.

[0231] 이를 위해, 담배 연기, CO, NO 및 NO_2, SO_2뿐만 아니라 벤젠, 알데히드, 미립자, 휘발성 유기 화합물 (VOCs), 폴리클로로바이페닐 (polychlorobiphenyls, PCBs), 중금속 등과 같은 많은 오염 물질 스트레스에 공통적 인 오염 요소를 포함하는 자동차 배기 가스로 인한 오염이 선택되었다(Dupuis.E., 2006).

[0232] 상기 오염의 영향은 오염에 노출된 인간의 피부 외피에서 측정되었다.

[0233] 재료 및 방법

[0234] *생물학적 모델*

[0235] 58 세의 백인 여성 (Biopredic International, Rennes)에서 복부 성형 수술 후 채취 된 직경 12mm의 인간 피부 외장 이식편.

[0236] *실험 및 참고 제품(reference products)*

[0237] 실험한 추출물은 Codif의 상용 제품 Hydranov P로, 설페이티드 퍼셀라란 (sulfated furcellaran)(갈락토오스 및 언하이드로갈락토즈)의 해중합하고, 해수 염분이 풍부한 용액으로 재수화(rehydrated)하여 수득된 해수 염분이 풍부한 올리고퍼셀라란(oligofurcellaran) 추출물이다.

[0238] 상기 얻어진 추출물은 물로 0.5%까지 희석한다.

[0239] *실험 시스템*

[0240] 이식편의 수신 후, 후자는 주위 온도에서 16 시간 동안 안정화한다. 상기 안정화 후, 보습의 측정은 제품 (T0)의 적용 전에 수행된다. 그 다음, 피부 조각을 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물의 용액으로 0.5 %에서 30 분 동안 처리한다. 이러한 이식편은 다음 5 시간 동안 자동차 배기 가스에 노출된다. 그런 다음, 20-22 ℃에서 18 시간 동안 완충된 장기 배지 (buffered long-term medium, Hepes)에서 공기/배지 경계면에서 배양한다. 18 시간 후, 보습을 측정하였다(T1). 이식편에 수행된 조작은 아래에 개략적으로 나타내었다:

[0241] *가스 처리(Treatment with the gas)*

[0242] 본 테스트에 사용된 가스는 입자 필터가없는 Renault 디젤 차량 (1989)에서 나왔으며 표준 밀폐백(brand SKC, ref. Cat. No. 236-005)을 사용하여 수집하였다.

[0243] 표시 방법에 따라 가스의 조성은 다음과 같다:

표 7

[0244]

농도(μg/m^3)			농도(μg/m^3)	
화합물	**양(Amount)**		**화합물**	**양(Amount)**
1-프로펜-2-메틸	1145.55		옥산	42.20
프로펜	1988.62		헵탄, 2,4-디메틸	34.91
MEK	184.26		노난	27.87
헥산	53.66		데칸	23.90
1-부텐-3-온	49.42		데칸, 2,4,6-트리메틸	13.36
2-부테날	46.34		언데칸	15.56
벤진	140.12		에틸벤젠	5.60
아세틱 애시드	181.60		m+p 자일렌	17.11
톨루엔	42.98		옥실렌	5.88
1-옥텐	21.28		아세톤	72.94

[0245] *보습 측정(Measurement of the moisturization)*

[0246] *a. 원리*

[0247] CM 825 MDD Corneomeetre®((Courage & Khazaka)를 사용하여 피부의 보습 정도를 조사하였다. 상기 기기는 각질층의 가장 바깥 쪽의 피부층의 수분 정도를 결정하는 것을 가능하게 한다. 코네오미터(피부보습측정기, corneometer)의 작용 원리는 용량을 변경하기 위해 커패시터로 설계된 검출기에 대한 가능성에 기반한다. 측정 헤드의 전면은 피부와 접촉하여 피부의 수분 정도에 따라 용량을 변경한다. 이러한 변경은 컴퓨터에 직접 입력된다.

[0248] 피부의 보습 정도를 측정하기위한 다양한 방법이 존재한다. 그 중에서도 피부보습측정기술(코네오미터리, corneometry)은 화장품 분야에서 일반적인 방법이다. 검출기가 각질층의 가장 바깥 쪽의 피부층의 수분 정도의 기능으로 그의 용량을 변경시킬 가능성에 기초하여, 코네오미터는 화장품 또는 dermopharmaceutical 제품의 레이어의 보습 정도에 미치는 영향을 생체내에서 인간에게 직접 정량화 할 수 있게 한다.

[0249] *b. 매개변수 연구(Parameter studied)*

[0250] 보습의 정도는 임의의 단위로 표현하였다.

[0251] **피부 보습 값의 증가는 제품의 보습 효과를 반영한다.**

[0252] *통계분석(Statistical analysis)*

[0253] 미분석 데이터는 Excel 소프트웨어를 사용하여 전송되고 처리된다.

[0254] 사용된 실험은 한페어 학생의 실험이다. p 값이 0.05보다 작 으면 두 그룹간의 차이가 통계적으로 유의하다고 간주되며 *p<0.05로 표시된다.

[0255] 결과(RESULTS)

[0256] 실험 조건에서 자동차 배기 가스에 노출되면 보습이 현저하게 감소한다(도 1 : Control + gas compared with Control - gas).

[0257] *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물은 오염에 의해 유발된 인간 피부의 체외 이식편에서 보습 정도가 떨어지면 피부를 강력하게 보호한다(+ 78 %).

[0258] 상기 결과는 도 10에 설명되었다.

[0259] 결론(CONCLUSION)

[0260] 오염에 노출되면 피부의 보습 정도가 감소한다.

[0261] 인간 피부 이식편의 수준에서 0.5 %의 *푸르켈라리아 룸브리칼리스(Furcellaria lumbricalis)*추출물은 오염에 의해 유도 된 보습의 손실로부터 보호한다.

[0262] **본 발명에 따른 조성물의 실시예**

[0263] 항 주름 크림

[0264] **%**

[0265] 카보머(CARBOMER) 0.30

[0266] 글리세린(GLYCERIN) 2.00

[0267] 디메티콘(DIMETHICONE) 3.00

[0268] 이소노닐 이소노나노에이트(ISONONYL ISONONANOATE) 8.00

[0269] 세티릴 알콜 & 세티릴 글루코시드(CETEARYL 알코올(ALCOHOL) & CETEARYL GLUCOSIDE) 3.50

[0270] 토코페놀(TOCOPHEROL) 0.06

[0271] 글리세릴 스티레이트 & PEG-100 스티레이트(GLYCERYL STEARATE & PEG-100 STEARATE) 2.50

[0272] 디카프리릴 카보네이트(DICAPRYLYL CARBONATE) 4.00

[0273] 소듐 하이드록사이드(DICAPRYLYL CARBONATE) 0.08

[0274] 타피오카 전분(DICAPRYLYL CARBONATE) 1.50

[0275] 바이오사카라이드 검-4(BIOSACCHARIDE GUM-4) 1.00

[0276] 람프산(LAMPSAN) 0.50

[0277] 푸르켈라리아 룸브리칼리스(FURCELLARIA LUMBRICALIS) 1.00

[0278] 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 0.50

[0279] 사니큘라 유로피아(SANICULA EUROPAEA) 0.50

[0280] 보존제 q.s.

[0281] 디소듐 EDTA(DISODIUM EDTA) 0.10

[0282] 프라그란스(FRAGRANCE) q.s.

[0283] 탈염수(DEMINERALIZED WATER) q.s. 100

[0284] 세럼

[0285] %

[0286] 세티릴 에틸헥사노에이트(CETEARYL ETHYLHEXANOATE) 2.50

[0287] 스티릴 헵타노에이트(STEARYL HEPTANOATE) 1.50

[0288] 카프리릭/카프릭 트리글리세라이드(CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE)

[0289] 3.00

[0290] PEG-20 메틸 글루코즈 세스퀴스티레이트(PEG-20 METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE) 2.00

[0291] 디메티콘(DIMETHICONE) 1.50

[0292] 토코페놀(TOCOPHEROL) 0.02

[0293] 아크릴레이트/C10-30 알킬 아크릴레이트 크로스폴리머(ACRYLATES/C10-30 ALKYL ACRYLATE CROSSPOLYMER) 0.25

[0294] 이소노닐 이소노나노에이트(ISONONYL ISONONANOATE) 3.00

[0295] C12-15 알킬 벤조에이트(C12-15 ALKYL BENZOATE) 2.50

[0296] 하이드록시에틸셀룰로스(HYDROXYETHYLCELLULOSE) 0.10

[0297] 글리세린(GLYCERIN) 5.00

[0298] 부틸렌 글리콜(BUTYLENE GLYCOL) 2.00

[0299] 에틸헥실글리세린(ETHYLHEXYLGLYCERIN) 0.20

[0300] 디소듐 EDTA(DISODIUM EDTA) 0.05

[0301] 트로메타민(TROMETHAMINE) 0.30

[0302] 람프산(LAMPSAN) 0.50

[0303] 푸르켈라리아 룸브리칼리스(FURCELLARIA LUMBRICALIS) 1.00

[0304] 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 0.50

[0305] 사니큘라 유로피아(SANICULA EUROPAEA) 0.50

[0306] 보존제 q.s.

[0307] 프라그란스(FRAGRANCE) q.s.

[0308] 탈염수(DEMINERALIZED WATER) q.s. 100

[0309] O/W 에멀젼

[0310] %

[0311] 세티릴 알콜 & 세티릴 글루코시드(CETEARYL 알코올(ALCOHOL) & CETEARYL GLUCOSIDE) 3.50

[0312] 글리세릴 스티레이트 & PEG-100 스티레이트(GLYCERYL STEARATE & PEG-100 STEARATE) 2.00

[0313] 스티레스-21(STEARETH-21) 0.50

[0314] 하이드로게네이티드 코코-글리세라이드(HYDROGENATED COCO-GLYCERIDES) 2.00

[0315] 시어버터(SHEA BUTTER) 1.00

[0316] 사이클로메티콘(SHEA BUTTER) 6.00

[0317] BHT 0.02

[0318] 카보머(CARBOMER) 0.20

[0319] 글리세린(GLYCERIN) 5.00

[0320] 소듐 하이드록사이드(DICAPRYLYL CARBONATE) 0.04

[0321] 실리카(SILICA) 1.40

[0322] 토코페릴 아세테이트(TOCOPHERYL ACETATE) 0.20

[0323] 디메티콘(DIMETHICONE) & DIMETHICONOL 0.50

[0324] 람프산(LAMPSAN) 0.50

[0325] 푸르켈라리아 룸브리칼리스(FURCELLARIA LUMBRICALIS) 1.00

[0326] 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 0.50

[0327] 사니큘라 유로피아(SANICULA EUROPAEA) 0.50

[0328] 보존제 q.s.

[0329] 테트라소듐 EDTA(TETRASODIUM EDTA) 0.05

[0330] 프라그란스(FRAGRANCE) q.s.

[0331] 탈염수(DEMINERALIZED WATER) q.s. 100

[0332] SPF 20 데이 크림

[0333] %

[0334] 에틸헥실글리세린(ETHYLHEXYLGLYCERIN) 0.20

[0335] 디소듐 EDTA(DISODIUM EDTA) 0.10

[0336] 잔탄검(XANTHAN GUM) 0.20

[0337] 글리콜(GLYCOLS) 5.00

[0338] 아카시아 세네갈 검(ACACIA SENEGAL GUM) 0.01

[0339] 부틸옥틸 살리실레이트(BUTYLOCTYL SALICYLATE) 5.00

[0340] 소듐 폴리아크릴레이트(SODIUM POLYACRYLATE) 0.50

[0341] MICA 0.10

[0342] 포타슘 세틸 포스페이트(POTASSIUM CETYL PHOSPHATE) 0.50

[0343] 부틸 메톡시디벤조릴메탄(BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE) 3.00

[0344] 옥토크릴렌(OCTOCRYLENE) 2.70

[0345] 호모살레이트(HOMOSALATE) 10.00

[0346] 세티릴 알콜 & 세티릴 글루코시드(CETEARYL 알코올(ALCOHOL) & CETEARYL GLUCOSIDE) 3.50

[0347] C12-15 알킬 벤조에이트(C12-15 ALKYL BENZOATE) 8.00

[0348] 타피오카 전분(DICAPRYLYL CARBONATE) 2.00

[0349] 람프산(LAMPSAN) 0.50

[0350] 푸르켈라리아 룸브리칼리스(FURCELLARIA LUMBRICALIS) 1.00

[0351] 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 0.50

[0352] 사니큘라 유로피아(SANICULA EUROPAEA) 0.50

[0353] 알코올(ALCOHOL) 3.00

[0354] 보존제 q.s.

[0355] 프라그란스(FRAGRANCE) q.s.

[0356] 탈염수(DEMINERALIZED WATER) q.s. 100

[0357] W/O 에멀젼

[0358] %

[0359] PEG 30 디폴리하이드록시스티레이트(PEG 30 DIPOLYHYDROXYSTEARATE) 4.00

[0360] 하이드로게네이티드 C16-C18 트리글리세라이드(HYDROGENATED C16-C18 TRIGLYCERIDES) 5.00

[0361] PEG-45 / 도데실 글리콜 코폴리머(PEG-45 / DODECYL GLYCOL COPOLYMER) 1.20

[0362] C8-C10 트리글리세라이드(C8-C10 TRIGLYCERIDES) 19.00

[0363] 리퀴드 페트로리엄 젤리(LIQUID PETROLEUM JELLY) 8.00

[0364] 글리콜(GLYCOLS) 10.00

[0365] 람프산(LAMPSAN) 0.50

[0366] 푸르켈라리아 룸브리칼리스(FURCELLARIA LUMBRICALIS) 1.00

[0367] 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 0.50

[0368] 사니큘라 유로피아(SANICULA EUROPAEA) 0.50

[0369] 보존제 q.s.

[0370] 프라그란스(FRAGRANCE) q.s.

[0371] 탈염수(DEMINERALIZED WATER) q.s. 100

[0372] 수성-알코올 로션

[0373] %

[0374] 글리콜(GLYCOLS) 2.00

[0375] 버퍼(BUFFER) 0.40

[0376] 소듐 클로라이드(SODIUM CHLORIDE) 1.00

[0377] ETHANOL 5.00

[0378] 람프산(LAMPSAN) 0.50

[0379] 푸르켈라리아 룸브리칼리스(FURCELLARIA LUMBRICALIS) 1.00

[0380] 디오스피로스 메스필리포르미스(Diospyros mespiliformis) 0.50

[0381] 사니큘라 유로피아(SANICULA EUROPAEA) 0.50

[0382] 트로메타민(TROMETHAMINE) 0.80

[0383] 보존제 q.s.

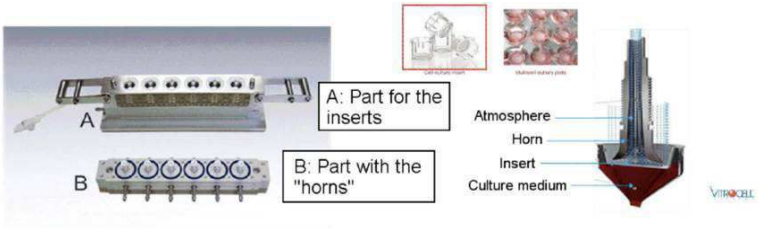
[0384] 용해 보조제(SOLUBILIZING AGENT) q.s.

[0385] 프라그란스(FRAGRANCE) q.s.

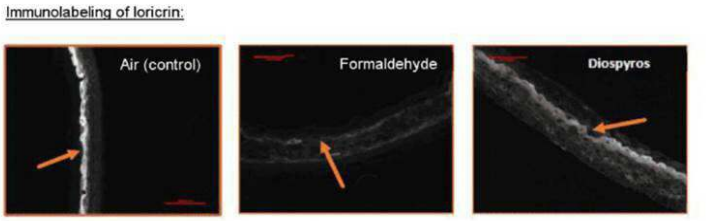
[0386] 탈염수(DEMINERALIZED WATER) q.s. 100

도면

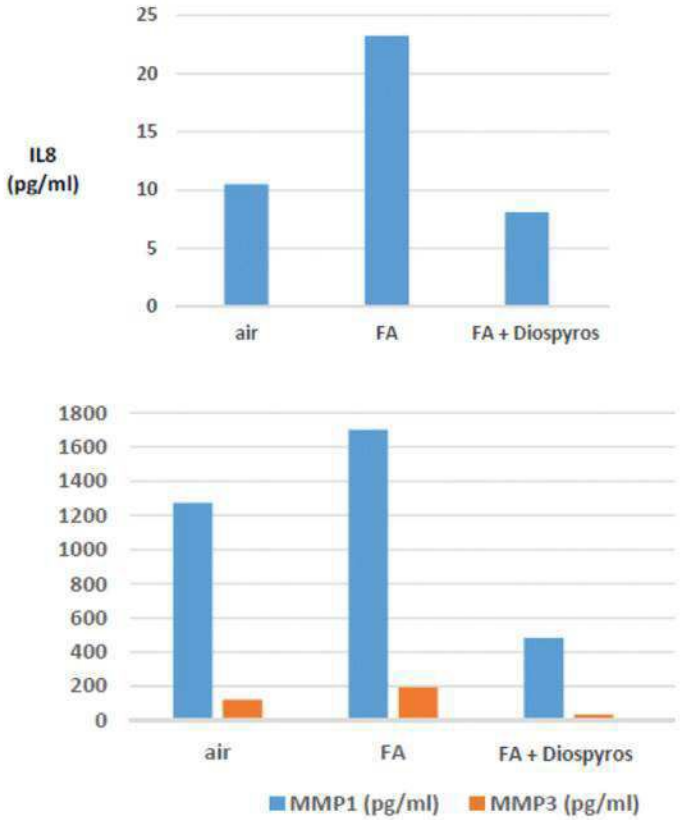
도면1


A
B
A: Part for the inserts
B: Part with the "horns"
Atmosphere
Horn
Insert
Culture medium

도면2a

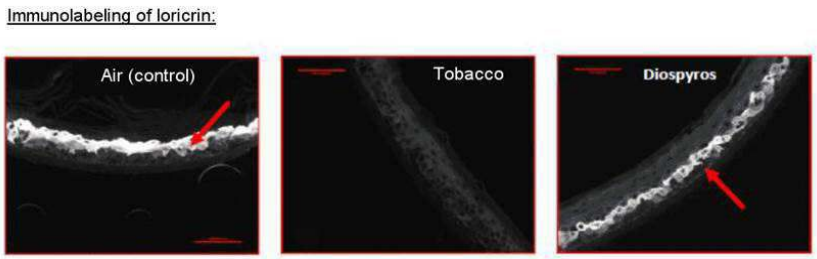

Immunolabeling of loricrin:
Air (control)
Formaldehyde
Diospyros

도면2b

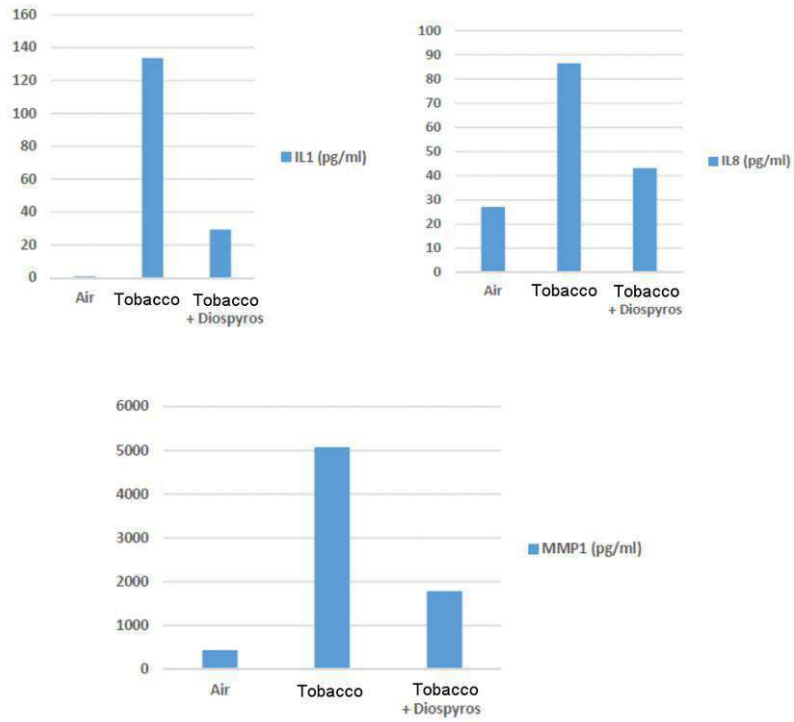


(FA: formaldehyde)

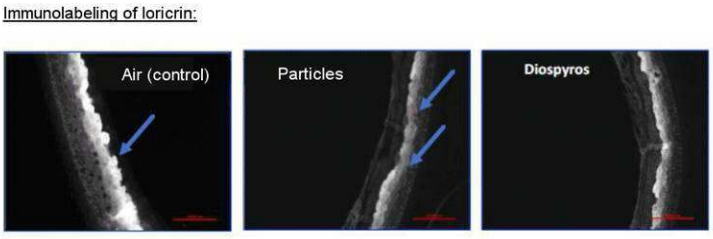
도면3a



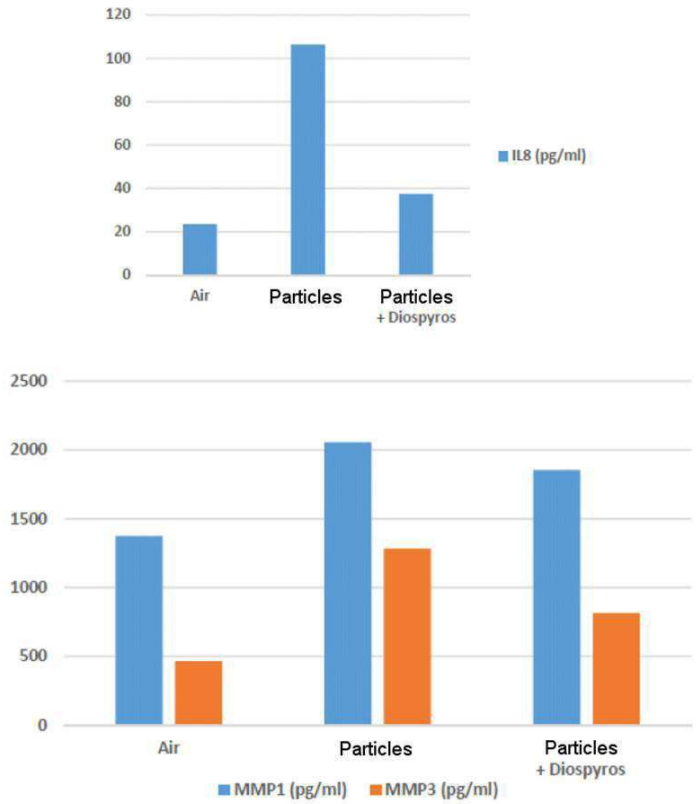
도면3b


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Air
Tobacco
Tobacco + Diospyros
IL1 (pg/ml)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Air
Tobacco
Tobacco + Diospyros
IL8 (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Air
Tobacco
Tobacco + Diospyros
MMP1 (pg/ml)

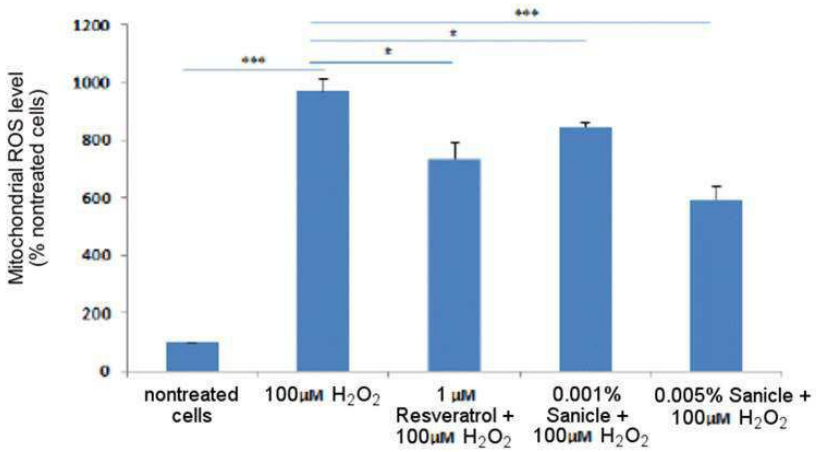
도면4a


Immunolabeling of loricrin:
Air (control)
Particles
Diospyros

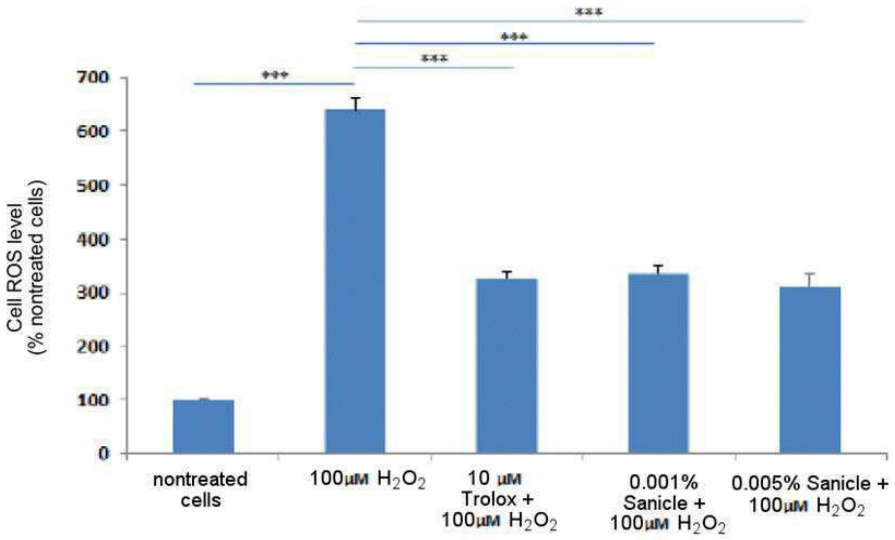
도면4b


120
100
80
60
40
20
0
IL8 (pg/ml)
Air
Particles
Particles
+ Diospyros
2500
2000
1500
1000
500
0
Air
Particles
Particles
+ Diospyros
MMP1 (pg/ml)
MMP3 (pg/ml)

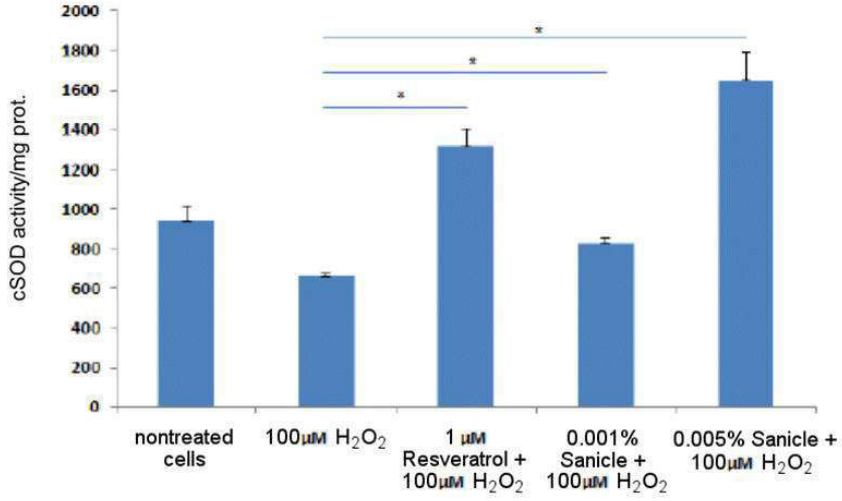
도면5


Mitochondrial ROS level
(% nontreated cells)
1200
1000
800
600
400
200
0
***
*
*
nontreated cells
100μM H2O2
1 μM Resveratrol + 100μM H2O2
0.001% Sanicle + 100μM H2O2
0.005% Sanicle + 100μM H2O2

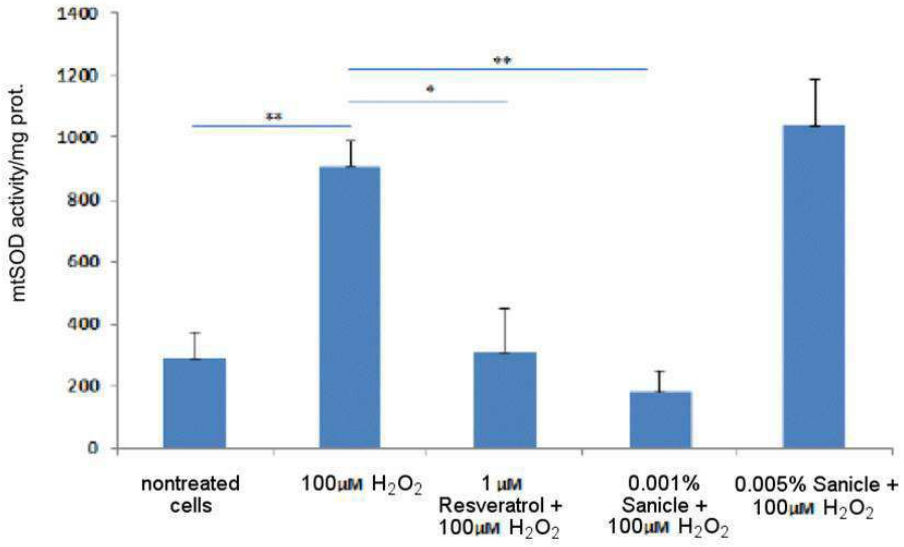
도면6


Cell ROS level
(% nontreated cells)
700
600
500
400
300
200
100
0
***
***
***
***
nontreated cells
100μM H2O2
10 μM Trolox + 100μM H2O2
0.001% Sanicle + 100μM H2O2
0.005% Sanicle + 100μM H2O2

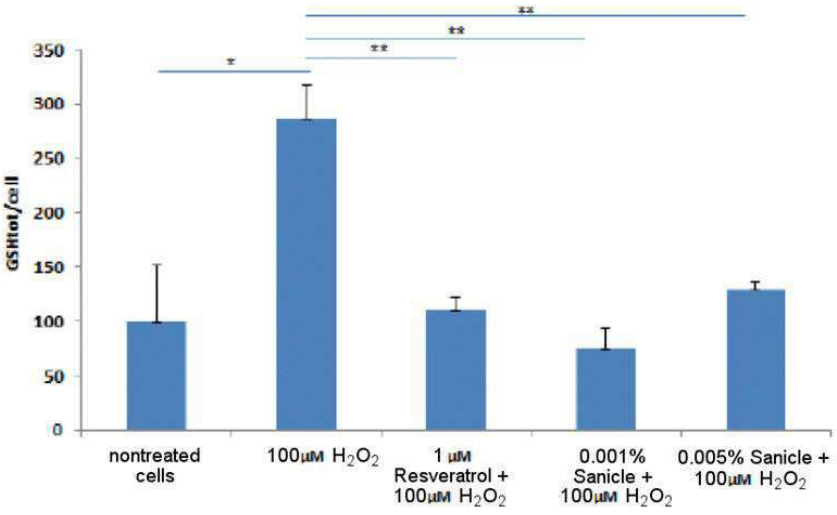
도면7


cSOD activity/mg prot.
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*
*
*
nontreated cells
100μM H2O2
1 μM Resveratrol + 100μM H2O2
0.001% Sanicle + 100μM H2O2
0.005% Sanicle + 100μM H2O2

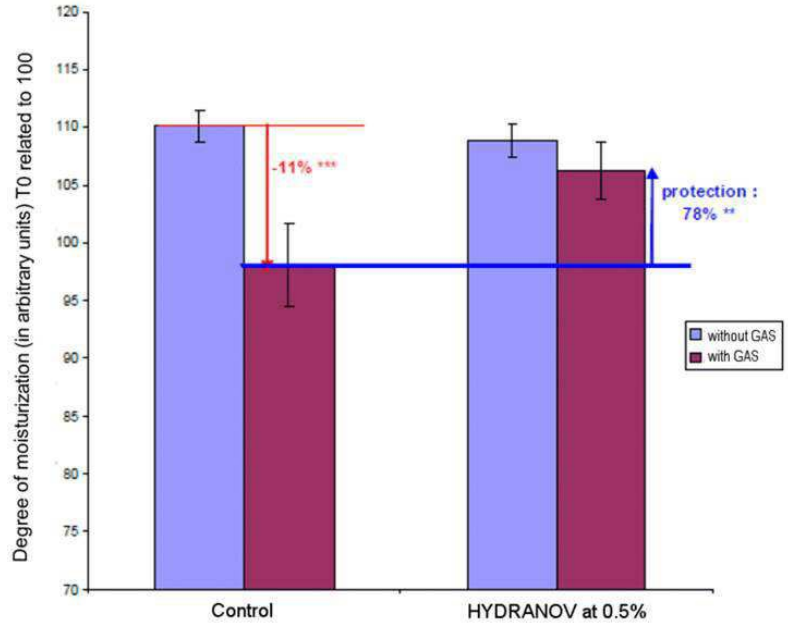
도면8


mtSOD activity/mg prot.
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
**
*
**
nontreated cells
100μM H2O2
1 μM Resveratrol + 100μM H2O2
0.001% Sanicle + 100μM H2O2
0.005% Sanicle + 100μM H2O2

도면9


GSHtot/cell
350
300
250
200
150
100
50
0
*
**
**
nontreated cells
100μM H2O2
1 μM Resveratrol + 100μM H2O2
0.001% Sanicle + 100μM H2O2
0.005% Sanicle + 100μM H2O2

도면10



**p<0.01 ; ***p<0.001 Student's test