

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2023-0002938
(43) 공개일자 2023년01월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2022-7040703
(22) 출원일자(국제) 2021년05월21일
심사청구일자 2022년11월29일
(85) 번역문제출일자 2022년11월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/063690
(87) 국제공개번호 WO 2021/234159
국제공개일자 2021년11월25일
- (30) 우선권주장
FR2005429 2020년05월21일 프랑스(FR)
FR2102686 2021년03월17일 프랑스(FR)
- (71) 출원인
에이정세 프랑세즈 뿌르 르 디벨로페망뜨 달 올라
프랑스 75008 파리 튀 드 쿠셀 82
- (72) 발명자
도디네 엘리자베스
프랑스 12560 생-로랑 돌트 튀 프랑시팔레 6
보르제또 빈센트
프랑스 56130 페렐 리우 디 트레모렐 52
- (74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 모링가 페레그리나 종자 추출물, 이의 제조 방법 및 화장품 조성물에서의 이의 용도**(57) 요약**

본 발명은 화합물 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 모링가 페레그리나 종자의 추출물, 보다 구체적으로 상기 종자의 케이크 추출물, 및 상기 추출물의 추출 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 추출물을 포함하는 화장품 또는 뉴트리코스메틱 조성물, 및 피부, 점막 또는 외피의 외양의 개선, 피부 이완, 진정 및 스트레스 해소, 피부의 노화, 및/또는 광노화의 신호 예방, 및/또는 퇴치, 및 검버섯 예방을 위한 상기 조성물의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

모링가 페레그리나 종자 추출물로서, 껍질을 벗기지 않은 종자 케이크를 고체-액체 추출하고, 이는 주로 알코올성인 용매 내에서 교반 하에 이루어지는 것이고, 상기 알코올은 선택적으로 폴리에올 또는 아임계수(subcritical water)와 같은 공용매(cosolvent)를 포함하는 에탄올 또는 메탄올로부터 선택되며 용매의 총 중량에 대해 70중량% 내지 100중량%의 알코올의 비율인 것이고, 약 2시간 동안 16 내지 30℃의 온도에서 이루어지며, 이후 액체상 및 고체상을 분리하여 고체상을 제거하고 모링가 페레그리나 종자의 액체 추출물을 회수하는 것을 통해 얻어지는 것을 특징으로 하며, 상기 추출물은 화합물 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 것인, 추출물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 얻어진 액체 추출물을 건조시켜 건조 물질 전체 중량에 대하여 2,5-디포르밀푸란을 50중량% 이상으로 함유하는 모링가 페레그리나 종자 케이크의 건조 추출물을 얻는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 모링가 페레그리나 종자의 추출물을 얻는 방법으로서,

- a) 모링가 페레그리나의 껍질을 벗기지 않은 종자를 수집하고 건조시켜 내부 수분 함량이 8% 미만이 되도록 하는 단계,
- b) 상기 건조된 종자를 압착하여 나머지 종자로부터 오일을 분리하여 케이크를 얻는 단계,
- c) 상기 b)단계에서 얻은 케이크를 밀링(mill)하는 단계,
- d) 상기 c)단계에서 얻은 밀링된 물질을 사용된 총 중량에 대해 약 25중량%의 고체 물질의 비율로 주로 알코올성인 용매에 분산시키는 단계로서, 상기 알코올은 선택적으로 폴리에올 또는 아임계수와 같은 공용매(cosolvent)를 포함하는 에탄올 또는 메탄올로부터 선택되며, 용매의 총 중량에 대해 70 중량% 내지 100 중량% 알코올의 비율인 것인 단계;
- e) 약 2시간 동안 16 내지 30℃의 온도에서 교반하면서 고체-액체 추출을 수행하는 단계,
- f) 액체상과 고체상을 분리하여 고체상을 제거하고 액체 모링가 페레그리나 케이크 추출물을 회수하는 단계, 및
- g) 선택적으로, 상기 알코올이 에탄올인 경우, 얻은 액체 모링가 페레그리나 추출물을 건조시켜 고체 모링가 페레그리나 추출물을 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 주로 알코올성인 용매는 용매 96° 순도 에탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 액체 모링가 페레그리나 추출물을 증류, 미세여과(microfiltration), 한외여과 및/또는 나노여과에 의해 정제시켜 추출물의 2,5-디포르밀푸란을 또한 추출된 유기물에 비해 농축시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

활성제로서 유효량의 제1항 또는 제2항에 기재된 모링가 페레그리나 종자 추출물, 및 생리학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 또는 뉴트리코스메틱(nutricosmetic) 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 모링가 페레그리나 종자의 추출물이 조성물 내 조성물의 총 중량에 대해 0.002 중량% 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.01중량% 내지 10중량%의 농도로 존재하며 피부 국소 적용을 위해 제형화된 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 모링가 페레그리나 종자의 추출물이 조성물 내 조성물의 총 중량에 대해 0.01중량% 내지 100중량%의 농도로 존재하며 섭취(ingestion)를 위해 제형화된 뉴트리코스메틱 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

피부, 점막, 또는 외피의 외양 개선, 피부의 이완(relaxing), 진정(soothing), 및 스트레스 해소(destress), 피부의 노화, 및/또는 광노화의 신호 예방, 및/또는 퇴치(combat), 및 검버섯(age spot) 예방을 위한 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 화장용 또는 뉴트리코스메틱 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 화장품 및 뉴트리코스메틱 분야, 보다 구체적으로 스킨케어 조성물의 제형에 포함되는 활성 구성성분 (active ingredient) 분야에 관한 것이다. 본 발명은 화합물 2,5-디포르밀푸란(2,5-diformylfuran, DFF)이 풍부한 모링가 페레그리나(*Moringa peregrina*) 종자 추출물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 특정 모링가 페레그리나 종자 추출물을 얻기 위한 방법, 이러한 추출물을 포함하는 화장료 조성물, 및 마지막으로 피부, 두피(scalp) 및 외피(integument) 관리를 위한 이러한 조성물의 화장용 또는 뉴트리코스메틱(nutricosmetic) 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

모링가과(Moringaceae)는 동아프리카로부터 아시아에 분포하는, 저자에 따르면 12 내지 14종으로 구성되는 사하라-신디안 식물상(Saharo-Sindian flora)의 요소인 단일-속 패밀리아(*모링가 아단스(Moringa adans)*), 1속만 존재이다. 상기 속은 전통적으로 세 부분으로 나뉘지만 계통발생학적 분석에 의해 단일계통으로 확인되지는 않는다. 상기 분석은 오히려 특정 형태학적 특성을 중심으로 한 클레드(clade)를 밝혀냈다: 파키콜(pachycaul) ("병나무(bottle tree)"); "덩이 나무(tuberous tree)" 및 병나무나 덩이 나무가 아닌 나무("슬렌더 나무(slender tree)"). 모링가 페레그리나 (Forssk.) 피오리(*Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori) 종은 세 번째 그룹에 속한다. 속이나 과에 대한 드문 유전 연구는 특히 인도 모링가(Indian Moringa), 모링가 올레이페라 램(*Moringa oleifera* Lam)과 관련하여 속의 다른 종에 비해 종의 실체를 확인시켜 준다. (특히 다음 기사 참조: Olson, M.E. 2002, Combining Data from DNA Sequences and Morphology for a Phylogeny of Moringaceae (Brassicales), *Systematic Botany* 27(1): 55-73; Hassanein, A.M.A. and Al-Soqee, A.A., 2018, Morphological and genetic diversity of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* genotypes, *Horticulture, Environment and Biotechnology* 59(2): 251-261). 사우디 아라비아의 다양한 위치에서 샘플링된 모링가 페레그리나에 대한 최근 기사는 ITS 마커를 사용하여 종의 유전적 안정성이 있으나 (Alaklabi, A., 2015, *Journal of Biological Sciences* 22: 186-190), 높은 수준의 집단-내 유전적 변이가 존재한다고 결론지었다.

[0003]

모링가 페레그리나 종은 예멘, 오만, 사우디 아라비아, 동부 아프리카, 수단, 에티오피아, 에리트레아, 소말리

아 및 지부티의 암석 환경에서 발견된다. 이란에서의 존재는 남-동부 지역에 국한된 것으로 보이지만 확인이 필요하다 (PROTA14 = Munyanzia E. and Yongabi K.A., Vegetable oils/Oleaginous plants, *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, http://database.prota.org/protahtml/moringa_peregrina_fr.htm, accessed on 10/23/2019). 중동 및 이집트에서, 이 종은 이제 주로 수단 지역의 일부 지역에서 드물게 분산된 잔존생물 서식지 (relict station)(특정 고도에 있는 소수의 집단 제외)에서만 나타난다. 모링가 페레그리나는 오늘날 수단과 예멘에서도 희귀하고 위협에 처한 것으로 여겨진다. 이의 클레드의 다른 종들에 비해, 모링가 페레그리나는 가장 건조하고 척박한 서식지에 거주한다. 그것은 열대 및 아열대 지역에서 상업적으로 대규모로 재배되는 모링가 올레이페라보다 명백히 더 내건성(drought-resistant)이다. 최근 연구에 따르면 종자의 크기와 둘레는 발아 시간 및 어린 개체의 성장률 및 성장 속도에 유리한 영향을 미치는 것으로 나타났으며 (Gomaa N.H. and Pico F.X., 2011, Seed germination, seedling traits, and seed bank of the tree *Moringa peregrina* (Moringaceae) in a hyper-arid environment, *American Journal of Botany* 98(6): 1024-1030), 이는 수보다는 종자 품질에 관한 자원 할당의 조정을 나타내며, 이는 모링가 페레그리나가 극도의(과-건조) 비생물적 환경에서 효율적으로 번식할 수 있도록 한다. 모링가 페레그리나 종자는 모링가 올레이페라 종자보다 세포층 측면에서 더 두꺼운 중앙 메소종피(mesotesta)를 갖는다.

[0004] 모링가 페레그리나 오일이 이슬람 초기에 알-울라(Al-Ula) 지역에서 활발하게 거래되었음을 나타내는 몇 가지 역사적 보고가 존재한다(Naseef, A.A.S., 1995, *Al-'Ula, A study of Cultural and Social Heritage*). 모링가 페레그리나에서 지역적으로(locally) 생산된 오일은 오늘날 주로 개인 소비 또는 현지 시장으로 향한다. 사우디아라비아에서 있는 전통적으로 당뇨병, 장 질환, 안과 질환 및 빈혈 치료를 위한 내복용 탕약(decoction) (Abdel-Kader, M.S., Hazazi A.M. A., Elmakki O.A. and Alqasoumi S.I., 2018, A survey on the traditional plants used in Al Kobah village, *Saudi Pharmaceutical Journal* 26(6): 817-821) 및 이뇨제, 발적제(rubefacient), 및 수축제(astringent) (Aqeel A.A.M., Tariq M., Mossa J.S., Al-Yahya M.A. and Al-Said M.S., 1984, "Plants used in Arabian Folk medicine", *Report submitted to Saudi Arabian National Centre for Science and Technology*, Riyadh, Saudi Arabia)으로서 사용되었다. 오만에서는 여름 말에 여성이 추출한 오일을 편두통, 발열, 화상, 열상 및 골절, 변비 및 복통을 퇴치하고 근육통, 모발 건조 및 분만통(labour pain)을 퇴치하는 데 사용한다 (Ghazanfar S.A., 1994, *Handbook of Arabian Medicinal Plants*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, U.S.; Ghazanfar S.A., 1998, Plants of Economic Importance, cap. 15, in Ghazanfar, S.A. and Fisher, M. (ed.) *Vegetation of the Arabian Peninsula*. Geobotany 25, pages 241-264, Kluwer Academic Publishers, table 11.1, page 247 and 11.7 page 251). 이것은 또한 향이 나는 조성물 내에서(Ghazanfar S.A., 1998, page 259) 및 오만 및 예멘에서 얼굴 로션으로 사용되었다(Ghazanfar S.A. and Rechinger B., 1996, Two multi-purpose seed oils from Oman. *Plants for Food and Medicine. Paper presented at the joint meeting of the Society for Economic Botany and International Society for Ethnopharmacology*, July 1-7, 1996, London).

[0005] 모링가 올레이페라 종자에서 유래한 추출물은 화장품 분야에 알려져 있다. 예를 들어, FR 296 879는 오일(트리글리세라이드, 지방산 및 극성 지질 포함) 및 폴리페놀을 함유하는 모링가 올레이페라의 전체 종자(whole seed)(표피 포함) 추출물, 및 이의 피부 노화 퇴치용 화장품 조성물에서의 그의 용도를 개시한다. 상기 문헌에서 활성으로 보이는 것은 모링가 올레이페라 종자의 비극성 부분, 더욱 특히 오일 부분이다. FR 2 776 519로부터 탁한 물에 대한 정화 효과로 알려진 모링가 올레이페라 종자 유래 단백질 추출물이 피부와 점막에 대한 연화, 생리학적 조절, 보습, 재구성 및 복구 효과가 있으며 오염방지 활성제(antipollution agent)로서 효과가 있음을 알 수 있다. 상기 문헌에서, 활성 성분(active principle)은 모링가 올레이페라 케이크의 수성 추출을 통해 얻은 6500 내지 8800 Da의 분자량을 갖는 단백질이다. FR 3 076 460은 민감한, 민감화된, 반응성이 있는, 취약한, 및/또는 무른 피부 및/또는 점막의 치료 및/또는 홍반, 특히 유아의 기저귀 발진의 치료 및/또는 예방을 위한 비-발아 및 오일-제거한 모링가 올레이페라 종자의 단백질 추출물의 용도에 관한 것으로도 알려져 있다. 상기 문헌에서, 추출 방법은 약 8800 Da의 분자량을 갖는 단백질의 주요 분획의 생산을 가능하게 한다. KR2013/0088224는 또한, 특히 초임계 유체를 사용하여 추출하여 얻은 발아된 전체 모링가 올레이페라 종자의 추출물을 화장품에서 사용하는 것을 개시한다. 상기 방법은 미백 화장품 용도의 활성제로 기술되는 비극성 아미노산 및 카로티노이드를 분리하는 것을 가능하게 한다. 상기 언급된 모든 문헌은 모링가 올레이페라 종의 사용과 관련이 있으며; 그것들 중 어느 것도 화장품 분야에서 모링가 페레그리나 종의 사용에 대해 기술하지 않는다. Kolheil et al.의 XP055753955, 2011은 모링가 페레그리나의 전체 종자로부터 에탄올을 사용한 생물활성 폴리페놀 화합물, 탄닌, 플라보노이드, 사포닌, 불포화 스테롤 및/또는 트리테르펜의 추출을 개시한다. 얻어진 추출물은 4°C에서 보관하며 항산화 효과가 있다. Abbas Alba et al.의 XP055753970, 2018은 모링가 페레그리나의 전

체 종자에 대해 3일 이상 동안 수행된 에탄올 추출을 개시한다. 여액은 45 내지 50℃의 온도에서 감압하에 농축된다. Abou-Hashem *et al.*의 XP055754018, 2019은 모링가 페레그리나의 전체 종자에 대해 3x72시간 동안 수행된 에탄올 추출을 개시한다. 그 다음, 얻은 추출물을 여과하고 약 45℃의 온도에서 회전 증발기에서 농축시킨다. Majali Ibrahim *et al.*의 XP055754048, 2015은 모링가 페레그리나의 전체 종자에서 30분 동안 교반하면서 에탄올로 추출한 후 72시간에 걸쳐 침전시키는 것을 개시한다. 상기 언급된 문헌 중 어느 것도 껍질을 벗기지 않은 모링가 페레그리나 종자의 케이크의 에탄올 추출을 개시하지 않는다.

[0006] 보다 구체적으로, 모링가 페레그리나 종의 경우 모링가 페레그리나의 잎 또는 전체 종자로부터 얻은 특정 페놀 및 플라보노이드 화합물은 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Al-Dabbas M., 2017, Antioxidant activity of different extracts from the aerial part of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, from Jordan, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(6): 2151-2157). 이러한 화합물은 잎 또는 전체 종자로부터 메탄올, 에틸 아세테이트 또는 헥산과 같은 용매로 추출된다. 가장 많은 양의 활성 화합물을 구성하는 것은 잎인 것으로 나타난다.

[0007] 따라서 모링가 속 중 사용되는 종에 따라, 식물 부분(잎 또는 종자), 종자 부분(전체 종자 또는 기타, 껍질이 있거나 없는) 및 수행되는 추출 공정, 특히 용매의 선택에 따라 추출되는 분자가 다른 것으로 관찰된다. 이제, 추출물의 구성은 생물학적 활성 및 결과적으로 화장품 효능에 영향을 미친다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기를 감안할 때, 본 발명이 해결하고자 하는 한 가지 문제는 화장품에 사용될 수 있고 사용하기 쉬운 모링가 속의 *M. 페레그리나* 종의 추출물을 기반으로 하는 신규한 제품을 개발하는 것이다.

[0009] 따라서, 본 출원인은 특히 피부 이완 및 항스트레스 활성, 항노화 활성 및 검버섯 예방 활성을 나타내는 모링가 페레그리나 종의 종자, 보다 구체적으로 종자 케이크에서 얻은 신규한 추출물을 밝혀냈다. 본 발명에 따른 추출물은 2,5-푸란디카복스알데히드(2,5-furandicarboxaldehyde)로도 알려진 2,5-디포르밀푸란(DFP)이 풍부하다. 상기 추출물은 특히 알코올 추출을 통해 종자, 또는 더욱 구체적으로 모링가 페레그리나의 껍질을 벗기지 않은 씨앗의 케이크로부터 얻는다. 본 발명에 따른 추출물은 첫째로 사용된 특정 종의 기원 및 둘째로 이의 특정 화합물 함량으로 인해 선행 기술의 추출물에 비해 화장품 분야에서 두 가지 측면에서 신규하다.

[0010] 프랑스 공화국 정부와 사우디 아라비아 왕국 간의 2018년 4월 10일 정부 간 협정에 따라, 본 출원인, Agence Francaise Pour Le Developpement d'Al Ula (AFALULA) 및 Commission Royale pour AIU1A (RCU)가 특히 토착 식물 유래 천연 제품의 지역적 생산(local production)을 위한 지속 가능한 농업 및 지역 경제를 발전시키고, 및 사우디 아라비아 왕국의 알울라(AIU1a) 지역의 생물 다양성 및 권리를 보호하는 프로젝트를 공동으로 한다. 사우디아라비아 왕국은 2020년 10월 8일부터 나고야 의정서의 멤버이다. 본 특허의 초안을 작성할 당시, 나고야 의정서가 현지법의 관련 측면에 통합될 것인지 관한 시행중인 규제가 검토 중이다. 결과적으로, 이 단계에서 사우디아라비아 왕국은 현재 특허 출원 및 나고야 의정서와 관련하여 특정 자격 요건이 없다. 따라서 특허출원일 현재 유전자원(genetic resource)에 대한 접근에 관한 준수요건에 대한 증명서는 존재하지 않는다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 제1 주제는 화합물 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 모링가 페레그리나 종자 추출물이다. 화합물 2,5-디포르밀푸란은 식물계에서는 희귀한 당류 성질의 화합물이며 푸르푸르알로부터 5-히드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural)의 중간체 합성을 통해 합성된다.

[0012] 2,5-디포르밀푸란의 농도가 높다는 특별한 특징으로 인해, 본 발명에 따른 추출물은 모링가(*Moringa*) 속에서 독특하다. 모링가 페레그리나 종은 다른 종, 특히 출원인이 공개한 모링가 올레이페라 종과 다른 특정 분자 프로필을 가지고 있음이 입증될 것이다.

[0013] 본 발명의 제2 주제는 본 발명에 따른 모링가 페레그리나 종자의 추출물을 얻기 위한 방법으로서:

[0014] a) 모링가 페레그리나의 껍질을 벗기지 않은 종자를 수집하고 건조시켜 내부 수분 함량이 8% 미만인 되도록 하는 단계,

[0015] b) 상기 건조된 종자를 압착하여 나머지 종자로부터 오일을 분리하여 케이크를 얻는 단계,

- [0016] c) 상기 b)단계에서 얻은 케이크를 밀링(mill)하는 단계,
- [0017] d) 상기 c)단계에서 얻은 밀링된 물질을 사용된 총 중량에 대해 약 25중량%의 고체 물질의 비율로 주로 알코올 성인 용매에 분산시키는 단계로서, 상기 알코올은 선택적으로 폴리에올 또는 아임계수와 같은 공용매(cosolvent)를 포함하는 에탄올 또는 메탄올로부터 선택되며, 용매의 총 중량에 대해 80 중량% 내지 100 중량% 알코올의 비율인 것인 단계;
- [0018] e) 약 2시간 동안 16 내지 30℃의 온도에서 교반하면서 고체-액체 추출을 수행하는 단계,
- [0019] f) 액체상과 고체상을 분리하여 고체상을 제거하고 액체 모령가 페레그리나 케이크 추출물을 회수하는 단계, 및
- [0020] g) 선택적으로, 얻은 액체 모령가 페레그리나 추출물을 건조시켜 고체 모령가 페레그리나 추출물을 얻는 단계를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 제3 주제는 활성제로서 유효량의 본 발명에 따른 모령가 페레그리나 종자 추출물 및 생리학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 화장료 또는 뉴트리코스메틱 조성물이다.
- [0022] 마지막으로, 본 발명의 제4 주제는 피부, 점막 또는 외피의 외양의 개선, 피부 이완, 진정 및 스트레스 해소, 피부의 노화, 및/또는 광노화의 신호 예방, 및/또는 퇴치, 및 검버섯 예방을 위한 본 발명에 따른 조성물의 화장용 또는 뉴트리코스메틱 용도이다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 단지 예시를 위해 그리고 제한 없이 제공되는 본 발명의 몇몇의 특정 구체예의 하기 기술로부터 본 발명은 더 잘 이해될 것이고, 이의 추가 목적, 세부사항, 특징 및 이점은 더 명확하게 나타날 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 명세서에서, 달리 명시되지 않는 한, 범위가 주어질 때, 그것은 상기 범위의 상한 및 하한을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0025] 본 발명에서 하기 약어는 하기에 주어진 의미를 갖는다:
 - [0026] - MTT: 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT 테스트는 생세포 카운팅을 위한 빠른 방법이다)
 - [0027] - SDS: 도데실 황산 나트륨(Sodium Dodecyl Sulfate)
 - [0028] - PBS: 인산완충식염수(Phosphate-Buffered Saline)
 - [0029] - ELISA: 효소-결합 면역흡착 분석
 - [0030] - PCR: 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)
 - [0031] - ANOVA: 분산 분석(Analysis Of Variance)
 - [0032] - MSH: 멜라닌 세포 자극 호르몬
- [0033] 본 발명에서는 하기 정의가 적용된다:
 - [0034] - "화합물 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 추출물": 다른 확인된 구성성분보다 많은 양, 즉 총 추출물의 건조 물질에 대해 50% 초과 양의 화합물 2,5-디포르밀푸란을 함유하는 추출물.
 - [0035] - "유효량": 원하는 결과, 즉 특히 피부의 세포외 기질의 보호를 얻을 수 있게 하는 활성 분자의 필요한 양.
 - [0036] - "국소 적용": 본 발명에 따른 활성 성분 또는 이를 함유하는 조성물을 피부 표면, 점막 또는 외피에 적용하거나 퍼바르는 것.
 - [0037] - "생리학적으로 허용가능한": 독성, 비적합성, 불안정성 또는 알레르기 반응의 위험 없이 국소 사용, 인간 피부 접촉, 또는 다른 투여 경로, 예를 들어 경구 또는 피부 주사를 통한 사용에 적합한.
 - [0038] - "케이크": 압착 후 종자의 오일을 제거한 부분. 종자에서 오일을 추출한 것으로부터 생기는 고체 잔류물이다. 이는 오일 제조 과정인 그라인딩 작업의 부산물(co-product)이다. 일반적으로 종자 질량의 50% 내지 75%를 나타낸다.

- [0039] - "껍질을 벗기지 않은 종자": 수확한 종자의 껍질, 또는 과피(pericarp)가 종자 주위에 유지되는 것을 의미한다.
- [0040] - "열매가 익었을 때": 열매가 익은 것을 의미하며, 바람직하게는 꼬투리가 열개하기 시작하여 짙은 베이지색에서 갈색으로 변하고 꼬투리 아래쪽 4분의 1의 180° 트위스트가 꼬투리 조각(valve)의 열림을 유발할 때를 의미한다.
- [0041] - "주로 알코올성인 용매(predominantly alcoholic solvent)": 96° 순도 에탄올이 가장 적합한 알코올성 용매로 나타나는 것을 고려하면, 알코올성 유형의 용매가 활성 성분을 추출하기에 충분한 특성을 갖는 공용매를 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0042] - "약": 주어진 정보에 대해 플러스 또는 마이너스 10% 내지 20%의 차이 (기간, 백분율 등).
- [0043] - "활성 성분(active principle)"이라고도 하는 "활성 분자"는 본 발명의 방법에 따라 *모링가 페레그리나* 종자로부터 추출된 2,5-디포르밀푸란 분자를 지칭한다. 이 분자는 본 발명에 기술된 생물학적 활성을 담당한다.
- [0044] - "활성제(active agent)": 기술된 생물학적 활성을 얻기에 충분한 양의 본 발명에 따른 추출물. 추출물이 액체인지 건조되었는지, 농축되었는지 아닌지 여부에 따라, 활성제의 양은 조성물의 총 중량에 대해 0.002중량% 내지 20중량%의 비율로 가변적일 수 있다.
- [0045] - "피부 노화의 신호": 노화로 인한 피부 및 외피의 임의의 변형, 예를 들어 주름 및 잔주름, 주름이 쪼글쪼글한 피부, 처진 피부, 얇아지는 피부(thinning skin), 피부의 탄력 및/또는 톤의 부족, 거칠고 광택이 없는 피부 또는 피부의 색소침착, 모발 변색 또는 손톱 얼룩, 뿐만 아니라 자외(UV) 방사선 노출 후 임의의 피부의 내부 약화(degradation)와 같이 변형된 외관에 의해 체계적으로 반영되지 않는 임의의 피부의 내부 변형.
- [0046] 본 발명의 제1 주제는 화합물 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 *모링가 페레그리나* 종자 추출물에 관한 것이다. 2,5-푸란디카복스알데히드로도 알려진 2,5-디포르밀푸란 분자는 *모링가(Moringa)* 속의 종의 종자 추출물에서 한번도 특성화된 적이 없다. *모링가 페레그리나* 종은 매우 건조한 기후에서 자란다. 따라서, 이의 가뭄을 견디는 능력으로 인해 독특한 특징을 획득할 수 있으며, 출원인은 이를 전체 종자 또는 바람직하게는 종자 케이크에 적합한 추출 방법의 사용을 통해 알아낼 수 있다.
- [0047] 본 발명의 맥락에서, 선택된 식물 부분은 *모링가 페레그리나* 종자이다. *모링가 페레그리나* 종자는 *페레그리나* 오일(INCI 명칭: *모링가 페레그리나* 종자유(Moringa peregrina seed oil))로 알려진 오일의 추출에 사용되는 것으로 알려져 있으며, 이 오일은 국지적으로 개인의 소비 또는 다양한 전통 의학 적용중에 사용된다. 종자에서 오일을 제거한 후 얻은 케이크는 현재 특히 동물 사료로 사용되는 폐기물이다.
- [0048] 본 발명의 제1 목적에 따르면, 상기 *모링가 페레그리나* 추출물은 껍질을 벗기지 않은 종자 케이크를 고체-액체 추출하고, 이는 주로 알코올성인 용매 내에서 교반 하에 이루어지는 것이고, 상기 알코올은 선택적으로 폴리올 또는 아임계수(subcritical water)와 같은 공용매를 포함하는 에탄올 또는 메탄올로부터 선택되며 용매의 총 중량에 대해 70중량% 내지 100중량%의 알코올의 비율인 것이고, 약 2시간 동안 16 내지 30°C의 온도에서 이루어지며, 이후 액체상 및 고체상을 분리하여 고체상을 제거하고 *모링가 페레그리나* 종자의 액체 추출물을 회수하는 것을 통해 얻어지는 것을 특징으로 하며, 상기 추출물은 화합물 2,5-디포르밀푸란이 풍부한 것이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 추출물은 *모링가 페레그리나* 열매가 익었을 때 *페레그리나* 오일(INCI 명칭: *모링가 페레그리나* 종자유)을 추출한 후 수확된 종자의 케이크로부터 얻어진다.
- [0049] 본 발명에 따른 추출물의 활성 성분, 즉 2,5-디포르밀푸란은 특정 취약성을 갖는 혼합된 극성의 분자임을 주목해야 한다. 따라서 껍질을 벗기지 않은 전체 종자에서 얻은 추출물은 30°C를 초과하지 않는 온도와 적절한 용매 및 공용매를 사용하여 고농도의 활성 성분을 얻기 위해 선택적인 추출을 거쳐야 한다.
- [0050] 상기 공용매는 예를 들어 글리콜 에테르(모노프로필렌 또는 디프로필렌 글리콜, 프로판디올, 및 기타 프로필렌 글리콜 유도체, 에틸렌 또는 디에틸렌 글리콜 유도체) 글리세롤, 디메틸 에테르 이소소르비드, 지방산의 메틸 또는 에틸 또는 프로필 에스테르; 디카프릴릴 카보네이트, 디카프릴릴 에테르, 알킬 아세테이트 또는 프로피오네이트, 아세톤, 메틸 또는 에틸 케톤, 및 α-피넨(α-pinene) 또는 리모넨(limonene)과 같은 모노테르펜(monoterpenes)일 수 있다. 이러한 공용매는 0 내지 30%(V/V)의 비율로 1차 용매(예: 에탄올 또는 메탄올)와 혼합될 수 있다.
- [0051] 추출 조건은 대기압 또는 진공 하에 또는 비활성 대기 하일 수 있지만, 바람직하게는 16 내지 30°C의 온도에서

어둠 속이다.

- [0052] 본 발명에 따른 바람직한 일 구체예에서, 상기 추출물은 알콜성 용매, 96° 에탄올을 사용한 고체-액체 추출에 의해 껍질을 벗기지 않은 종자 케이크로부터 얻는다.
- [0053] 또 다른 구체예에서, 상기 얻어진 액체 추출물은 건조 물질의 총 중량에 대해 50 중량% 초과인 2,5-디포르밀푸란을 함유하는 모링가 페레그리나 종자 케이크의 건조 추출물을 얻도록 건조된다.
- [0054] 모링가 페레그리나 종자 케이크의 건조 추출물은 더욱 정확하게 건조 물질의 전체 중량에 대해 약 55 중량%의 2,5-디포르밀푸란, 2.5중량%의 푸르푸랄, 1.2중량%의 이소프로필 미리스테이트, 4.7중량%의 팔미트산, 11.1중량% 올레산 및 25.8중량% 트리글리세리드를 함유한다.
- [0055] 본 발명의 제2 주제는 하기 단계를 포함하는 본 발명에 따른 모링가 페레그리나 종자 케이크의 추출물을 얻기 위한 방법으로서:
- [0056] a) 모링가 페레그리나의 껍질을 벗기지 않은 종자를 수집하고 건조시켜 내부 수분 함량이 8% 미만이 되도록 하는 단계,
- [0057] b) 상기 건조된 종자를 압착하여 나머지 종자로부터 오일을 분리하여 케이크를 얻는 단계,
- [0058] c) 상기 b)단계에서 얻은 케이크를 밀링(mill)하는 단계,
- [0059] d) 상기 c)단계에서 얻은 밀링된 물질을 사용된 총 중량에 대해 약 25중량%의 고체 물질의 비율로 주로 알코올성인 용매에 분산시키는 단계로서, 상기 알코올은 선택적으로 폴리올 또는 아임계수와 같은 공용매(cosolvent)를 포함하는 에탄올 또는 메탄올로부터 선택되며, 용매의 총 중량에 대해 70 중량% 내지 100 중량% 알코올의 비율인 것인 단계;
- [0060] e) 약 2시간 동안 16 내지 30°C의 온도에서 교반하면서 고체-액체 추출을 수행하는 단계,
- [0061] f) 액체상과 고체상을 분리하여 고체상을 제거하고 액체 모링가 페레그리나 케이크 추출물을 회수하는 단계, 및
- [0062] g) 선택적으로, 상기 알코올이 에탄올인 경우, 얻어진 액체 모링가 페레그리나 추출물을 건조시켜 고체 모링가 페레그리나 추출물을 얻는 단계를 포함한다.
- [0063] 바람직한 일 구체예에서, 껍질을 벗기지 않은 종자, 즉 껍질이 유지되는 종자는 열매가 익었을 때 및 바람직하게는 꼬투리가 열개하기 시작에 있을 때 수집된다.
- [0064] 바람직한 일 구체예에서, 종자는 내부 수분 함량이 약 6%가 되도록 건조되며, 상기 건조는 바람직하게는 햇빛으로부터 보호되는 통풍 랙, 바람직하게는 야외(open air) 그늘 아래에서 수행된다.
- [0065] 그런 다음 건조된 종자를 냉압착 방식으로 즉석에서 밀링하여 페레그리나 오일(INCI 명칭: 모링가 페레그리나 종자유)이 압축된 종자, 즉 케이크의 나머지 부분에서 기계적으로 분리되도록 한다.
- [0066] 상기 케이크는 이후 해머 밀(hammer mill), 플레일 밀(flail mill), 나이프 밀(knife mill) 또는 파쇄/분쇄 밀(crushing/shredding mill)과 같은 임의의 유형의 기계적 밀로 기계적으로 밀링된다.
- [0067] 상기 추출은 유리하게 항상 교반하면서 수행되며, 따라서 액체에서 고체의 분산 및 균질화를 가능하게 하여 용매에서 용질의 확산을 향상시킨다.
- [0068] 관심 화합물, 2,5-디포르밀푸란을 주로 추출하기 위해, 96° 에탄올과 같은 알코올성 용매가 바람직하지만, 폴리올 또는 아임계수와 같은 공용매와 함께 메탄올도 사용할 수 있다. 추출의 마지막에, 관심 화합물이 고갈된 잔류 식물 물질은 청징 여과(clarifying filtration)를 통해 액체상으로부터 유리하게 분리된다. 더욱 더 바람직하게는, 상기 용매는 96° 에탄올이다. 0.5% 내지 1.6%의 건조 물질을 포함하는 액체 추출물은 유리하게는 모링가 페레그리나 종자 케이크로부터 얻어질 것이며, 이 건조 물질은 적어도 50%의 2,5-디포르밀푸란으로 구성되며, 이는 액체 추출물의 총 중량에 대해 대략 0.25중량% 내지 0.8중량%에 상응한다.
- [0069] 본 발명에 따른 생산 방법의 일 구체예에서, 얻어진 액체 모링가 페레그리나 추출물을 증류, 미세여과, 한외여과 및/또는 나노여과에 의해 정제하여 추출물의 관심 화합물인 2,5-디포르밀푸란을 또한 추출된 유기물에 비해, 특히 추출된 물질의 나머지, 예를 들어 또한 추출된 지방질(fatty substance) 및 유도체에 비해 농축시킨다. 이러한 정제 단계는 언급된 바와 같은 다른 추출된 화합물 및 용매를 희생시키면서 관심 화합물을 농축하는 것을 가능하게 한다.

- [0070] 본 발명에 따른 생산 방법의 또 다른 구체예에서, 상기 얻어진 액체 추출물은 추출된 건조 물질의 총 중량에 대해 50 중량% 초과와 관심 화합물, 즉 2,5-디포르밀푸란을 함유하는 모링가 페레그리나 종자 케이크의 건조 추출물을 얻도록 건조된다.
- [0071] 본 발명의 유리한 일 구체예에 따르면, 용매가 에탄올인 경우, 얻어진 액체 모링가 페레그리나 종자 추출물은 바람직하게는 건조되며, 예를 들어 분무화(atomization), 동결건조 또는 지오드레이션(zeodration)에 의해 건조되어 고체 모링가 페레그리나 종자 케이크 추출물이 얻어지고, 에탄올은 증발된다. 상기 건조는 말토덱스트린, 시클로덱스트린 또는 이눌린과 같은 유기 지지체(organic support)의 존재 또는 필로실리케이이트, 마그네슘 실리케이이트 또는 이들의 탄산염 및 염과 같은 미네랄 지지체(mineral support)의 존재하에 수행될 수 있다.
- [0072] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 생산 방법을 통해 얻을 수 있는 모링가 페레그리나 종자의 추출물에 관한 것이다.
- [0073] 본 발명의 제3 주제는 활성제로서 유효량의 본 발명에 따른 모링가 페레그리나 종자 추출물 및 생리학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 화장료 또는 뉴트리코스메틱 조성물이다.
- [0074] 본 발명에 따른 조성물은 국소 투여 또는 경구 투여에 적합한 다양한 제제의 형태로 제형화될 수 있다.
- [0075] 제1 변형에 따르면, 상기 다양한 제제는 국소 투여에 적합하고 크림, 수중유 및 유중수 에멀전, 밀크(milk), 연고, 로션, 오일, 밤, 수성 또는 수성-알코올성 또는 글리콜산 용액, 세럼, 분말, 패치, 스프레이 또는 임의의 외용 제품(예: 의료 기기 또는 화장품-섬유(cosmetic-textile) 제품)를 포함한다.
- [0076] 제 2 변형에 따르면, 상기 다양한 제제는 경구 투여에 적합하며; 식품 조성물 또는 식품 보충제에 포함될 수 있는 활성 화합물 2,5-디포르밀푸란을 포함하는 식물 추출물이 있다. 상기 식품 보충제는 본 발명의 맥락에서 경질 겔 캡슐 또는 연질 젤라틴 또는 식물성 캡슐의 형태일 수 있다. 또한, 상기 식품 보충제는 0.01 중량% 내지 100 중량%의 식물 추출물을 함유할 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 식물 추출물의 양은 조성물의 총 중량에 대해 0.02 중량% 내지 40 중량%, 특히 0.2 중량% 내지 20 중량%이다.
- [0077] 식품 용도의 맥락에서, 영양 또는 화장용(코스메토-푸드(cosmeto-food) 또는 뉴트리코스메틱) 목적을 위해, 상기 조성물은 유리하게는 경구 투여에 적합한 제제의 형태로 제형화될 것이다. 이는 부형제를 포함하지 않을 수 있고, 그 전체가 활성 화합물 2,5-디포르밀푸란을 포함하는 식물 추출물로 구성될 수 있다.
- [0078] 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물은 더욱 특히 국소 투여용으로 의도된다. 따라서 이러한 조성물은 화장용으로 허용되는 배지, 즉 피부 및 외피에 적합한(compatible) 배지를 함유해야 하고 모든 화장용 형태를 커버해야 한다. 이들 조성물은 특히 크림, 수중유 또는 유중수 에멀전 또는 복합 에멀전, 세럼, 용액, 현탁액, 겔, 밀크, 로션, 스틱 또는 고른 분말의 형태일 수 있고 피부, 입술 및/또는 외피 적용에 적합할 수 있다. 이들 조성물은 용매, 연화제(emollient), 증점제(thickener), 희석제, 계면활성제, 향산화제, 생물활성제, 염료, 보존제 및 방향제와 같은 제형화에 필요한 부형제를 포함한다. 스킨케어 제품 및/또는 스킨메이크업 제품으로 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명에 따른 조성물은 특히 헤어케어 조성물, 특히 샴푸, 헤어 컨디셔너, 트리트먼트 로션(treating lotion), 스타일링 크림 또는 겔, 헤어 재구성 로션, 마스크 등으로 이루어질 수 있다. 본 발명에 따른 화장료 조성물은 특히 링잉(ringing)이 뒤따를 수도 있고 아닐 수도 있는 적용을 포함하는 트리트먼트에 또는 대안적으로 샴푸의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 비듬 방지 치료에 유리하게 사용될 수 있다. 이는 또한 특히 속눈썹, 눈썹 또는 모발에 브러시 또는 빗을 사용하여 적용되는 염료 또는 마스크라 형태일 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 조성물은 또한 예상되는 적용 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 첨가제 및 또한 이들의 제형화에 필요한 아주버트, 예컨대 용매, 증점제, 희석제, 향산화제, 염료, 선스크린, 셀프-태닝제, 안료, 충전제, 방부제, 방향제, 냄새 흡수제, 화장용 또는 약학적 활성제, 에센셜 오일, 비타민, 필수 지방산, 계면활성제, 필름 형성 폴리머 등을 포함할 수 있다.
- [0081] INCI 사전 & 핸드북(Personal Care Products Council Inc., Washington, D.C.에서 발행한 "International Nomenclature of Cosmetic Ingredients" (13th edition, 2010))은 본 발명에 따른 조성물에서 추가 구성성분으로 사용하기에 적합한, 스킨케어 산업에서 일반적으로 사용되는 다양한 화장용 및 약학적 구성성분을 제한 없이 기재한다.
- [0082] 어떤 경우든, 당업자는 본 발명에 따른 조성물의 원하는 유리한 특성이 불리하게 영향을 받지 않도록 이러한 아

주변트 및 이들의 비율이 선택되도록 주의할 것이다.

- [0083] 본 발명의 일 유리한 구체예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물 중 식물 추출물의 양은 조성물의 총 중량에 대해 0.002 중량% 내지 20 중량%, 특히 0.001 중량% 내지 10 중량%이다.
- [0084] 마지막으로, 본 발명의 제4 주제는 피부, 점막 및 외피의 외양의 개선, 피부 이완, 진정 및 스트레스 해소, 피부 노화, 및/또는 광노화의 신호 예방, 및/또는 퇴치, 및 검버섯 예방을 위한 본 발명에 따른 조성물의 화장 용 또는 뉴트리코스메틱 용도이다.
- [0085] 일 구체예에 따르면, 본 발명에 따른 용도의 목적은 보다 구체적으로 피부를 이완시키고, 진정시키고, 및 스트레스를 해소시키고, 및 피부의 노화 신호를 퇴치하는 것이다.
- [0086] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명에 따른 용도의 목적은 검버섯의 출현을 예방하는 것이다.
- [0087] 본 발명이 몇 가지 특정 구체예와 관련하여 설명되었지만, 그것이 어떤 식으로든 이에 제한되지 않고 본 발명의 맥락에 속하는 경우라면 기재된 수단의 모든 기술적 등가물 및 이들의 조합을 포함한다는 것은 매우 명백하다.
- [0088] 동사 "함유하다(contain)", "포함하다(comprise)" 또는 "포함하다(include)"와 그 활용형의 사용은 청구범위에 명시된 것 이외의 요소 또는 단계의 존재를 배제하지 않는다.
- [0089] 청구범위에서, 괄호 안의 임의의 참조 기호는 청구 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0090] **실시예**

[0091] 실시예 1: 모링가 페레그리나 케이크 유래 식물 추출물 제조

[0092] 열매가 익었을 때 수확한 모링가 페레그리나(Forssk.) 피오리의 껍질을 벗기지 않은 종자를 내부 수분 함량이 8% 미만, 바람직하게는 약 6%가 되도록 건조시킨 후, 이후 기계식 엔드리스 스크류 프레스(endless screw press)로 압착시켜 한편으로는 버진 오일(virgin oil)을 얻고, 다른 한편으로는 케이크를 얻기 위해 종자의 나머지에서 오일을 분리시킨다. 그런 다음 케이크는 1 내지 2cm 조각으로 미리 절단된 롤 형태로 분리된다. 55°C에서 10분 동안 예열된 케이크에, 55°C에서 10분 동안 예열된 96° 에탄올로 25%/75%(m/m)의 비율로 침용(maceration) 및 추출을 수행하고, 혼합물을 블렌더에서 15분 동안 전단(shear)하고, 이후 16°C 내지 30°C 온도에서 2시간 동안 임펠러(impeller)로 교반되도록 둔다. 이어서, 상기 생성물을 진공하에 Büchner 깔때기를 통해 여과하여 1.15% 건조 물질을 함유하는 옅은 노랑색 여과액을 얻는다. 얻어진 액체 추출물은 이하 "본 발명에 따른 페레그리나 추출물" 또는 "페레그리나 추출물" 또는 "페레그리나 케이크 추출물"로 지칭된다. 이 액체 추출물은 이후 다양한 효율성 테스트에 사용된다.

[0093] 본 발명에 따른 이 페레그리나 추출물은 1.15%의 건조 물질을 함유하며, 그 자체는 하기를 포함한다(건조 물질(dry matter, DM)에 대한 결과로 표시):

[표 1]

활성 화합물	DM 내 총 화합물		%
	푸르푸랄	2.528	57.18
	2,5-푸란디카복스알데히드 (2,5-Furandicarboxaldehyde)	54.66	
식물 기원 지방질	이소프로필 미리스테이트 (Isopropyl myristate)	1.175	42.812
	팔미트산	4.713	
	올레산	11.093	
	트리글리세리드(Triglyceride)	25.831	

- [0094]
- [0095] 상기 기재된 건조 추출물은 액체 추출물에 존재하는 증발 후의 질량을 기준으로 중량법(gravimetric method)을 통해 얻어진다.

[0096] 2,5-푸란디카복스알데히드 또는 2,5-디포르밀푸란은 이 추출물의 활성 성분이다. 이를 크로마토그래피 방법으로, 보다 정확하게는 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector)와 결합된 기체 크로마토그래피로 분석하였다.

[0097] 푸르푸랄을 동일한 방법으로 분석하였다.

[0098] 이소프로필 미리스테이트를 동일한 방법으로 분석하였다.

[0099] 팔미트산 및 올레산을 동일한 방법으로 분석하였다.

[0100] 트리글리세리드를 초원심분리에 의해 분리하였다.

[0101] 실시예 2: 항산화제로서의 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효과

[0102] 이 연구의 목적은 DPPH(2,2-디페닐-1-피크릴하이드라질) 라디칼 및 참조(reference) 항산화제인 아스코르브산을 사용한 무세포 인 비트로 비색 모델(colorimetric model)에서 페레그리나 추출물에 의한 항산화 활성의 조절을 평가하는 것이다. 사용된 방법은 억제하는 것으로 알려져 있다. 이것은 참조 항산화제인 아스코르브산을 사용할 때, 540nm에서 흡수하는 보라색 산화 라디칼 DPPH의 분해를 기반으로 한다. 이 반응은 양성 대조군으로 작용하며 무색 또는 심지어 옅은 노란색인 DPPH 화합물을 형성한다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물 및 참조 생성물 "아스코르브산"을 40°C에서 30분 동안 DPPH 용액과 접촉시키도록 둔다. 이후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 평가한다. 이 활성의 조절은 시험 활성제에 의한 항산화 활성 자극의 백분율로서, 참조로 아스코르브산(T+)의 존재 하에 얻은 최대 항산화 활성과 함께 표시된다.

[0103] 프로토콜: DPPH 용액을 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 부재(대조군) 또는 존재(T+) 및 감소하는 농도의 테스트 샘플에서 40°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 기간 마지막에, 40°C에서 30분 후에 염색을 통해 참조 생성물의 존재 및 페레그리나 추출물의 존재 또는 부재에 따른 항산화 활성을 밝혔다. 따라서 540 nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 평가하였다. 테스트된 각 농도에 대해, 테스트 생성물을 통한 항산화 활성 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0104] [수학 공식. 1]

[0105] 항산화 활성 조절 백분율 = $100 \times [(OD_{540} \text{ 대조군} - OD_{540} \text{ 테스트 생성물}) / OD_{540} \text{ 참조 생성물}]$.

[0106] 결과가 음수인 경우, 테스트 제품은 산화로 여겨지며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 자유-라디칼-소거 활성의 자극으로 표시된다. 얻어진 결과는 하기와 같다.

[표 2]

		DPPH 억제
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	2%	36
	1.0%	23
	0.1%	5

[0107]

[0108] 결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 자유 라디칼로부터의 보호가 가능하다: 1% 이상의 농도에서 상당한 항산화 특성을 갖는다.

[0109] 실시예 3: 메탈로프로테아제 억제제로서의 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효과

[0110] 본 연구의 목적은 I형 콜라게나제 및 기질 복합체인 히알루로니다제 및 발색단인 닌히드린을 사용하여 인 비트로 무세포 모델에서 본 발명에 따른 페레그리나 추출물에 의한 메탈로프로테아제 억제 활성의 조절을 평가하는 것이다. I형 콜라게나제 및 히알루로니다제의 완충 용액은 80°C에서 15분 동안 인큐베이션을 통해 특정 기질 복합체와 반응하여 이를 변형시켜 발색단을 활성화할 수 있는 화합물을 형성한다. 따라서 콜라게나제 및 히알루로니다제 활성은 565 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가될 수 있다. 샘플을 5분 동안 37°C에서 효소 기질 복합체와 함께 콜라게나제 및 히알루로니다제 용액과 접촉하도록 둔다. 80°C에서 15분 동안 인큐베이션을 통해 효소로 변환된 기질은 발색단을 활성화시킬 수 있다. 샘플의 존재/부재에서의 콜라게나제 및 히알루로니다제 활성은 565 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가된다. 이 활성의 조절은 활성제의 부재, 즉 효소 기질만의 존재 하에서 콜라게나제 및 히알루로니다제 활성의 억제 또는 활성화의 백분율로 표현된다.

[0111] 프로토콜: I형 콜라게나제 및 히알루로니다제 효소의 용액을 본 발명에 따른 시험된 페레그리나 추출물의 부재 또는 존재하에 기질에서 5분 동안 인큐베이션한다. 그런 다음 용액을 발색체(chromogen) 닌히드린과 접촉시킨 다음 80℃에서 15분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 기간 마지막에, 테스트 또는 참조 생성물의 존재 또는 부재 하 콜라게나제 및 히알루로니다제 효소의 활성을 565 nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 평가하였다. 테스트한 각 농도에 대해, 테스트 생성물을 통한 콜라게나제 및 히알루로니다제 효소적 활성의 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0112] [수학 공식. 2]

[0113] 콜라게나제/히알루로니다제 효소적 활성 조절 백분율 = $100 \times [(OD \text{ 테스트 또는 참조 생성물} - OD \text{ 콜라게나제/히알루로니다제 단독}) / OD \text{ 콜라게나제/히알루로니다제 단독}]$.

[0114] 결과가 음수인 경우, 백분율은 효소 억제로 표시되며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 효소 활성으로 표시된다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 메탈로프로테아제 억제 결과는 하기와 같다.

[표 3]

		대조군에 비한 억제(%)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	1%	87
	0.5%	87
	0.1%	88
	0.01%	62

[0115]

[0116] 결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 0.01%의 매우 낮은 수준에서 62%의 강력한 메탈로프로테아제(콜라게나제/히알루로니다제) 억제를 나타낸다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 이러한 메탈로프로테아제를 강력하게 억제할 수 있고, 피부의 세포의 기질을 매우 효과적으로 보호할 수 있는 우수한 잠재력을 가지며, 이러한 억제를 통해 노화 방지 효과를 나타낸다.

[0117] 실시예 4: 히스톤 데아세틸라제(histone deacetylase, HDAC) 및 시르투인 I 효소 억제에 대한 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효과

[0118] 이 연구의 목적은 효소 HDAC 및 시르투인 I에 대한 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 억제 활성을 입증하는 것이다. HDAC 및 시르투인 I의 완충 용액은 37℃에서 20분 동안 기질과 반응하여 이를 화합물로 변형시키며, 이는 현색제(developer)의 존재 하 37℃에서 10분 동안 인큐베이션한 뒤 염색된다. 따라서 시르투인의 최대 탈아세틸화 활성은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 평가할 수 있다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물 또는 참조 생성물 "트리코스타틴 A(trichostatin A (STA)) 억제제 1μM"을 효소 기질과 함께 시르투인 용액에 37℃에서 20분간 접촉시킨 후, 효소에 의해 변환된 기질에 현색제(developer)를 추가하여 염색시켰다. 활성제의 존재 하에 HDAC 및 시르투인 I의 탈아세틸화 활성은 405 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가된다. 이 활성의 조절은 활성제의 부재 하에, 즉 HDAC 및 시르투인 I 효소에 대한 기질만 있는 경우에 HDAC 및 시르투인 I의 최대 활성의 억제 또는 활성화의 백분율로 표현된다.

[0119] 프로토콜: 시르투인 효소 용액을 참조 생성물의 부재(대조군) 또는 존재 또는 시험 제품의 농도를 증가시키면서 기질에서 20분 동안 인큐베이션한다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 하기 농도에서 테스트된다: 2%; 1%; 0.1%(V/V). 인큐베이션 기간 마지막에, 테스트 또는 참조 생성물의 존재 또는 부재 하 시르투인 효소의 활성이 현색제 용액을 사용한 염색(37℃에서 10분)으로 밝혀졌고 405nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 평가되었다. 테스트된 각 농도에 대해, 테스트 생성물을 통한 히스톤 데아세틸라제 및 시르투인 I 효소의 탈아세틸화 활성의 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0120] [수학 공식. 3]

[0121] 시르투인 효소 활성 조절 백분율 = $100 \times [(OD_{405} \text{ 테스트 또는 참조 생성물}) - (OD_{405} \text{ HDAC 및 시르투인 I 단독})] / OD_{405} \text{ 시르투인 단독}$.

[0122] 결과가 음수인 경우, 백분율은 효소적 반응의 억제로 표시되며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 효소적 반응의

활성화로 표시된다. 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 효소의 억제에 대한 결과는 하기와 같다.

[표 4]

본 발명에 따른	백분율	대조군에 비한 억제(%)
페레그리나 추출물	2%	20
	1%	ns
	0.10%	-18

[0123]

[0124]

결론: 2%에서, 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 상당한 HDAC 억제를 나타내며; 이러한 억제는 특히 노화 과정과 관련된 유전적 부동(genetic drift)으로부터 피부 세포의 자가-보호를 촉진하는 능력을 반영한다. 따라서 추출물은 피부 표면에서 가장 흔한 유전적 부동 중 하나인 섬유증에 대해 유용한 것으로 나타나며, 이는 "쥐젖 (skin tag)" (섬유성 돌기, fibrotic protuberance)의 출현으로 나타난다. 상기 추출물은 유리하게는 피부 표면의 섬유화를 방해하여 피부 노화를 예방할 수 있다.

[0125]

실시예 5: 포스포리파제-A2 효소의 항염 활성을 조절하기 위한 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효과.

[0126]

이 연구의 목적은 "SPLA2 (type V) Inhibitor Screening Assay Kit"를 사용하여 인 비트로 무세포 모델에서 하나 이상의 샘플에 의한 효소 포스포리파제 A2의 항염 활성 조절을 평가하는 것이다. 포스포리파제 A2는 아라키돈 연쇄반응(arachidonic cascade)에 의해 촉발되는 염증 과정의 업스트림에 있는 핵심 효소이다. 포스포리파제 A2의 완충 용액은 특정 기질인 디헵타노일 티오-PC(diheptanoyl thio-PC)와 반응하며, 실온에서 교반 하 발색체인 DTNB에 결합하는 화합물로 변환시킨다. 따라서 포스포리파제 A2 활성은 413 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가될 수 있다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물 또는 참조 억제 생성물 "티오에테르아미드-PC(thioetheramide-PC)"를 효소 기질과 동시에 포스포리파제 A2 용액과 접촉하도록 둔다. 효소에 의해 변형된 기질은 실온에서 교반하여 발색체 DTNB에 의해 염색된다. 그런 다음, 본 발명에 따른 페레그리나 추출물 또는 참조 생성물의 활성을 413 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가하였다. 이 활성의 조절은 활성제의 부재, 즉 효소 기질(디헵타노일 티오-PC)만의 존재에서 포스포리파제 A2 활성의 억제 또는 활성화의 백분율로 표현된다.

[0127]

프로토콜: 효소 포스포리파제 A2의 용액을 참조 억제제 및 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 부재 또는 존재 하에, 이의 기질인 디헵타노일 티오-PC 내에서 인큐베이션하고, 하기 조건에서 테스트하였다: 2%; 1%; 0.1%(V/V), 이후 발색체 DTNB를 혼합시키고 25°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간 마지막에, 413 nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 테스트 생성물 또는 참조 생성물의 존재 및 부재 하 효소 포스포리파제 A2의 활성을 평가한다. 테스트된 각 농도에 대해, 테스트 제품을 통한 포스포리파제 A2 효소적 활성 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0128]

[수학 공식. 4]

[0129]

포스포리파제 A2 효소 활성 조절 백분율 = $100 \times [(OD_{405} \text{ 테스트 생성물 또는 참조 생성물} - OD_{405} \text{ sPLA2 단독}) / OD_{405} \text{ sPLA2 단독}]$.

[0130]

결과가 음수인 경우, 백분율은 효소 억제로 표시되며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 효소 활성으로 표시된다. 포스포리파제-A2 효소의 항염 활성 조절에 대한 결과는 하기와 같다.

[표 5]

		대조군에 비한 억제(%)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	2%	19
	1%	16
	0.10%	11

[0131]

[0132]

결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 0.1% 이상, 보다 바람직하게는 1% 또는 2%의 용량에서 약간의 안정적인 PLA2의 억제를 생성한다. 이것은 본 발명에 따른 페레그리나 추출물이 아라키돈 연쇄반응/염증 연쇄반응의

매우 조기 감소를 가져오는 능력을 갖는다는 것을 의미하며; 따라서 이 추출물은 피부 상 우수한 진정 또는 이완 잠재력을 갖는다.

[0133] 실시예 6: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 엔도텔린-1(endothelin-1) 작용 억제 효과

[0134] 엔도텔린은 인체에 알려진 가장 강력한 혈관수축제이다. 또한, 엔도텔린 고갈은 혈관 확장 효과를 생성하는 것으로 알려져 있다[Hirata, Y. *et al.*, 1988, Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 154: 3, pages 868-875] [Shalinkumar P. *et al.*, 2018, H2S Mediates the Vasodilator Effect of Endothelin-1 in the Cerebral Circulation. *American Journal of Physiology. Heart Circulatory Physiology*, 315, pages 1759-1764].

[0135] 목적은 본 발명에 따른 페레그리나 추출물에 24시간 동안 노출시킨 후 인간 미세혈관 내피 세포 내 1형 엔도텔린을 분석하는 것이다.

[0136] 프로토콜: 인간 미세혈관 내피 세포는 PELOBiotech 회사에 의해 공급되었고 공급자의 생산 방법에 따라 96-웰 플레이트에서 배양되었다. 추출물은 내피세포에 대해 24시간 동안 80%의 컨플루언스(confluence)로 다양한 농도로 작용하도록 두고, 세포 상층액의 엔도텔린-1은 PicoKine ELISA kit(EDN1)를 사용하여 정량화한다. 생존률 테스트를 엔도텔린-1 분석에 사용할 무독성 용량을 정의하기 위해 사전에 수행한다. 음성 대조군은 처리하지 않은 배양 배지의 세포를 사용하여 수행한다. 생존률 테스트에서 양성 대조군은 0.5% SDS이다. 모든 조건은 배양 배지에서 준비되었고, 이후 세포를 36.5°C/5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션한다.

[0137] a) 내피 세포에 대한 테스트 용액의 적용:

[0138] 테스트 생성물을 96웰 플레이트 내 서브컨플루언스의 내피 세포와 접촉하도록 둔다. 각 농도에 대해 3개의 웰에서 테스트를 수행한다. 플레이트를 36.5°C/5% CO₂에서 24시간 ± 1시간 동안 인큐베이션한다.

[0139] b) 생존율 테스트:

[0140] 세포 생존율은 세포 상에서 생성물과 함께 인큐베이션 후 MTT 방법으로 평가한다. 24시간 동안 인큐베이션한 후, 상층액을 회수하고 분석을 위해 -20°C에서 보관한다. 이후 웰을 200 µL의 PBS로 1회 행군다. 50 µL의 0.5 mg/ml MTT 용액을 각 웰에 첨가한다: 36.5°C/5% CO₂에서 3시간 동안 인큐베이션한다. 100 µL의 이소프로판올을 각 웰에 첨가한다. 균질화 후, 550 nm에서 흡광도 판독값을 취한다. 각 조건에 대해, 음성 대조군의 평균 흡광도(optical density value)에 대한 세포의 평균 흡광도의 비율은 생존율을 결정한다.

[0141] c) 엔도텔린-1 분석:

[0142] 분석은 ELISA 키트를 사용하여 수행한다.

[표 6]

	추출 농도	대조군에 비한 세포 성장(%)	대조군에 비한 엔도텔린 1(%)	대조군에 비한 엔도텔린 1(pg/ml)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	5%	-22.31	-53.21	-71.8
	1%	0	-11.61	-15.66
	0.10%	-5.77	-25.11	-33.88

[0143]

[0144] 결론: 처리 마지막에 수행된 생존률 테스트는 테스트된 농도에 대한 독성 효과를 나타내지 않았다. 엔도텔린-1 분석은 무독성 농도의 세포 상층액에서 수행된다. 각 조건에 대한 엔도텔린-1의 양은 ELISA 키트를 사용하여 분석된다. 음성 대조군 세포의 경우, 값은 134.94pg/ml 정도이다. 다양한 농도의 추출물로 처리한 세포에서, 값은 63.14pg/ml(5%의 본 발명에 따른 추출물 사용)에서 101.06pg/ml(0.1%의 본 발명에 따른 추출물 사용)이며, 이는 본 발명에 따른 추출물의 0.1% 이상에서는 약 25%의 1형 엔도텔린 생성 억제 및 본 발명에 따른 추출물의 5%에서는 최대 53% 억제를 갖는 현저한 억제를 나타낸다.

[0145] 실시예 7: 텔로머라제 활성 자극에 대한 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효과

[0146] 텔로미어는 선형 염색체 끝에 위치한 DNA를 보호하는 복합체로 염색체 안정성을 향상시킨다. 인간의 텔로미어

짧음(shortness)은 질병의 위험 및 진행, 및 많은 유형의 암, 특히 유방, 전립선, 결장, 방광, 두경부, 폐 및 신장 세포에서의 암의 조기 사망의 예후 마커로 발견하고 있다[Ornish D., 2008, Increased Telomerase Activity and Comprehensive Lifestyle Changes: a Pilot Study, *Lancet Oncology* 9, pages 1048-1057]. 텔로미어 단축(shortening)은 세포 효소 텔로머라아제에 의해 대응된다.

- [0147] 본 연구의 목적은 단층 배양에서 낮은 계대 수준(passage level)의 성인 인간 각질형성세포(keratinocyte)로 구성된 모델에서 텔로머라제 활성화에 대한 "본 발명에 따른 페레그리나 추출물"로 알려진 화합물의 효과를 평가하는 것이다.
- [0148] 프로토콜: 인간 각질형성세포는 49세 기증자로부터 얻었다. 실험을 수행하기 위해, 각질형성세포는 낮은 계대 수준(즉, 세포 분리 계대 수 2)으로 사용하였다. 세포는 실험에 사용되기 전에 약 75%의 컨플루언스에 도달할 때까지 단층으로 성장시켰다.
- [0149] 참조 생성물: 100ng/ml의 FK228을 텔로머라제 1 활성화의 참조 유도제로 사용하였다.
- [0150] 인큐베이션 프로토콜: 세포를 참조 생성물 또는 증가하는 농도: 0.5%; 1%; 및 5%(v/v)의 본 발명에 따른 페레그리나 추출물과 같은 테스트 화합물의 부재(대조군) 또는 존재 하에 24시간동안 인큐베이션하였다.
- [0151] 본 발명에 따른 페레그리나 추출물을 상기 기재된 다양한 농도를 달성하기 위해 인큐베이션 배지에서 직접 희석시킨다.
- [0152] 효과 평가:
- [0153] - 단백질 측정
- [0154] 인큐베이션 기간 마지막에, 세포의 총 단백질을 세포로부터 추출하고 분광 비색법 (spectrocolorimetric method, Bradford method)을 사용하여 측정하였다. 이 측정은 PCR 단계에서 테스트한 모든 조건에 대해 동일한 양의 단백질(텔로머라제 함유)을 유지하도록 하는 텔로머라제 활성화 측정에 사용할 추출물의 정확한 부피를 결정하는 데 사용된다.
- [0155] - 텔로머라제 활성화 측정
- [0156] 인큐베이션 기간 마지막에, 텔로머라아제를 세포로부터 추출하고 그 활성을 특이적이고 민감한 키트를 사용하여 결정하였다. 텔로머라제 키트의 원리는 텔로머라제 연장 생성물의 양을 반-정량적(semi-quantitative)으로 측정하기 위한 ELISA 단계와 PCR 단계(텔로머라제가 연장 활성화와 관련하여 기능함)를 결합하여 텔로머라제 활성을 측정하는 것이다.
- [0157] - 통계
- [0158] 결과는 텔로머라제 활성화 수준에 대한 임의의 단위로 표시된다(평균 ± S.D). "비히클" 및 "참조 생성물" 간의 유의 수준(significance level)은 스튜던트 t 테스트를 통해 평가하였다(*: p<0.05). "대조군" 및 "테스트 화합물" 간의 유의 수준을 일원 분산 분석(one-way ANOVA)에 이어 Holm-Sidak 테스트(*: p<0.05)를 통해 각 제품에 대해 독립적으로 평가하였다.
- [0159] 0.5% 및 1%(v/v)에서 시험된 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 "대조군"에 비해 텔로머라제 활성을 유의하게 조절하지 않았다. 5%(v/v)에서 시험한 경우, 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 "대조군"과 비교하여 텔로머라제 활성을 18.9%(p < 0.001)까지 유의하게 증가시켰다.
- [0160] 100ng/ml에서 테스트한 "FK228"이라는 참조 생성물은 텔로머라제 활성을 28.0%까지 유의하게 증가시켰다(p < 0.01). 이 결과는 예상되었으며 실험을 검증한다. 텔로머라제 활성화 자극에 대한 결과는 하기와 같다.

[표 7]

	추출물의 농도	대조군에 비한 세포 성장(%)	대조군에 비한 텔로머라제 활성화(%)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	5.00%	+5.8	+18.90
	1.00%	ca. -2.2	+4.00
	0.50%	-2.6	+2.30

[0161]

[0162] 결론: 0.5% 및 1%(v/v)에서 테스트된 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 "대조군"에 비해 텔로머라제 활성을 유의하게 조절하지 않았다. 5%(v/v)에서 테스트한 경우, 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 "대조군"과 비교하여 텔로머라제 활성을 18.9%(p<0.001)까지 유의하게 증가시켰다. 본 발명에 따른 추출물은 염색체 말단에 보호적인 텔로미어를 형성하고 유전 물질의 자연적 노화를 늦추는 이러한 효소적 경로에 직접 작용한다. 따라서, 본 발명에 따른 추출물은 염색체에 대한 노화 방지 효과를 생성할 수 있다.

[0163] 실시예 2 내지 7은 본 발명에 따른 페레그리나 추출물이 우수한 피부 보호제의 프로파일을 입증하는 항노화, 항스트레스 및 이완 특성을 갖는다는 것을 입증한다.

[0164] 실시예 8: 티로시나아제(tyrosinase) 활성 자극에 대한 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효과

[0165] 이 연구의 목적은 균류 기원 티로시나제 효소(Sigma-Aldrich ref. T3824), 이의 기질 L-티로신(Sigma-Aldrich ref. T3754) 및 참조 억제제인 하이드로퀴논(Sigma-Aldrich ref.H17902, 억제제 = 히드로퀴논 2.5mM)를 사용하여 인 비트로 무세포 모델에서 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 효소 티로시나제에 대한 활성을 평가하기 위한 것이다. 티로시나제의 완충 용액은 기질인 L-티로신 2.5mM과 23°C에서 60분 동안 반응하고, 이를 변형시켜 유색 화합물을 형성한다. 따라서 최대 티로시나제 활성은 475 nm에서 흡광도를 측정하여 평가할 수 있다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물 또는 참조 생성물 "히드로퀴논"을 23°C에서 60분 동안 효소 기질과 함께 티로시나제 용액과 접촉되도록 두고; 효소에 의해 변형된 기질은 자연적으로 색을 나타낸다. 활성제의 존재 하에 티로시나제 활성은 이후 475 nm에서 흡광도를 측정함으로써 평가된다. 이 활성의 조절은 활성제의 부재, 즉 효소 기질 (L-티로신)만의 존재에서 최대 티로시나제 활성의 억제 또는 활성화의 백분율로 표현된다.

[0166] 프로토콜: 티로시나제 효소 용액을 참조 생성물, 또는 증가하는 농도/농도; 2%; 1%; 0.1%의 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 부재(대조군) 또는 존재 하에서 60분 동안 이의 기질 L-티로신 내에서 인큐베이션한다. 인큐베이션 기간 마지막에, 테스트 또는 참조 생성물의 존재 또는 부재 하 티로시나제 효소의 활성을 475 nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 평가하였다. 테스트된 각 농도에 대해, 테스트 제품을 통한 티로시나제 효소적 활성 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0167] [수학 공식. 5]

[0168] 티로시나제 효소 활성 조절 백분율 = 100 x [(OD475 테스트 생성물 또는 참조 생성물) - (OD475 티로시나제 단독)]/OD475 티로시나제 단독.

[0169] 결과가 음수인 경우, 백분율은 효소 억제로 표시되며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 효소 활성으로 표시된다. 티로시나제 활성 자극에 대한 결과는 하기와 같다.

[표 8]

		대조군에 비한 활성화(%)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	2%	65
	1%	37
	0.10%	8

[0170]

[0171] 결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 기저의 티로시나제 활성을 낮출 수 있으며, 이는 이 추출물이 피부 보호의 천연 형태 중 하나인 자외선에 대한 보호를 증가시키는 능력을 갖는다는 것을 나타낼 수 있게 한다.

[0172] 실시예 9: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

[0173] 인간 세포 배양 상의 이 연구의 목적은 본 발명에 따른 페레그리나 추출물에 5일 동안 노출된 후 인간 멜라닌 세포에 대한 멜라닌 조절 테스트를 수행하기 위해 사용된 모든 데이터와 얻은 결과를 대조(collate)하는 것이다.

[0174] 프로토콜: 인간 멜라닌 세포를 96- 및 24-웰 플레이트에서 배양한다.

[0175] 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 5일 동안 5%, 2%, 1% 및 0.1%의 농도로 포화된(confluent) 멜라닌 세포에 작용하도록 한다. 24시간 후 MTT을 사용한 생존률의 사전 테스트는 세포 독성을 평가하고 멜라닌 조절 테스트를 위한 농도를 선택할 수 있도록 한다. 이 조절은 추출물 노출 5일 후에 세포 용해물(lyzate)의 멜라닌을 분석하여 평가된다. 음성 대조군은 처리하지 않은 배양 배지의 세포를 사용하여 수행한다. 생존률 테스트를 위한 양성

대조군은 0.5% SDS이다. 멜라닌 조절 테스트의 경우, α-MSH 존재 또는 부재 배지를 음성 대조군으로 사용한다.

[0176] 모든 조건은 배양 배지에서 준비되었고, 이후 세포를 36.5°C/5% CO₂에서 세포독성 테스트의 경우 24시간 동안 및 멜라닌 분석의 경우 5일 동안 인큐베이션한다.

[0177] a) 멜라닌 세포에 대한 테스트 용액의 적용: 테스트 농도를 96-웰 플레이트(세포독성 시험) 및 24-웰 플레이트(멜라닌 분석) 내 포화된 멜라닌 세포와 접촉하도록 둔다. 각 농도에 대해 3개의 웰에서 테스트를 수행한다. 플레이트를 36.5°C/5% CO₂에서 24시간 ± 1시간 및 5일 동안 인큐베이션한다.

[0178] b) 생존율 테스트: 생성물과 24시간 인큐베이션 후 세포에 대해 MTT 방법으로 세포생존율을 평가한다. 24시간 동안 인큐베이션한 후, 목적하는 웰을 200 μL의 PBS로 한 번 헹군다. 50 μl의 0.5 mg/ml MTT 용액 각 웰에 첨가하고 36.5°C/5% CO₂에서 3시간 동안 인큐베이션을 수행한다. 150 μL의 이소프로판올을 각 웰에 첨가한다. 균질화 후, 550 nm에서 흡광도 판독값을 취한다. 각 조건에 대해, 음성 대조군의 평균 흡광도(optical density value)에 대한 세포의 평균 흡광도의 비율은 생존율을 결정한다.

[0179] 음성 대조군 값에 비해 70%의 생존율 컷오프 값은 시험 물질을 세포독성 또는 비세포독성으로 분류하는 데 사용된다. "비세포독성" 분류는 생존율>70%에 대한 인 비트로 결과에 주어지고, "세포독성" 분류는 생존율≤70%에 주어진다.

[0180] 본 발명에 따른 추출물의 5% 농도는 시험 조건하에서 5%에서 세포독성인 것으로 입증되었다. 따라서 2%, 1% 및 0.1% 농도가 멜라닌 조절 테스트에 사용된다. 세포에 존재하는 멜라닌의 양을 세포 용해 후 분석한다. 멜라닌 생성 억제 결과는 하기와 같다.

[표 9]

	추출 농도	대조군에 비한 세포 성장(%)	대조군에 비한 멜라닌 억제 (%)	멜라닌 함량 (μg/ml)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	2%	-3.41	+16.50	152
	1.0%	+13.46	+65.90	62
	0.10%	+13.29	+71.40	52

[0181]

[0182] 결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 in cellulo에서 멜라닌 생성을 억제하여 이에게 피부-보호 특성을 부여한다. 이 억제는 또한 기저율이 대조군보다 낮기 때문에(배양 배지 내 본 발명에 따른 추출물의 부재) 멜라닌 세포에 대한 이완 효과를 나타내며; 이는 멜라닌 생성은 세포 스트레스에 대한 반응이라는 것을 상기시킨다. 따라서, 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 검버섯을 예방할 수 있음을 입증한다.

[0183] 실시예 10: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물 대 동일한 추출 방법을 갖는 올레이페라 추출물의 분석적 특성화

[0184] 모링가 페레그리나 케이크 및 모링가 올레이페라 케이크를 기준으로 실시예 1에 기재된 본 발명에 따른 추출 방법을 적용하였다. 추출된 구성성분의 비교 조성은 건조 물질을 기준으로 하기에 나와있다.

[표 10]

화합물	올레이페라 (%)	페레그리나 (%)
아세트산	1.431	-
1-히드록시-2-프로판온	1.962	-
푸르푸탈	6.140	2.528
2,5-푸란디카복스알데히드 (DFF)	0.823	55.660
이소프로필 미리스테이트	0.128	1.175
메틸 팔미테이트	0.230	-
팔미트산	10.366	4.713
에틸 팔미테이트	0.309	-
메틸 리놀레이트	0.428	-
메틸 올레이트(Methyl oleate)	2.443	-
올레산	47.844	11.093
에틸 올레이트	2.675	-
스테아르산(Stearic acid)	5.064	-
비스(2-에틸헥실)헥산디오에이트 (Bis(2-ethylhexyl) hexanedioate)	1.688	-
메틸 7-옥소데히드로아비에테이트 (Methyl 7-oxodehydroabietate)	0.327	-
2-에틸헥실 1,4-테레프탈레이트 (2-Ethylhexyl 1,4-terephthalate)	0.655	-
총	84.317	74.169

[0185]

[0186]

두 추출물은 매우 상이한 프로파일을 가지고 있음이 나타난다. 모링가 올레이페라 추출물은 DFF가 1% 미만인 반면 모링가 페레그리나 추출물은 이를 50% 이상 함유한다.

[0187]

실시예 11: *in tubo* 콜라게나제 테스트를 위한 모링가 올레이페라와의 비교 테스트

[0188]

본 연구의 목적은 I형 콜라게나제 및 기질 복합체인 히알루로니다제 및 발색단인 닌히드린을 사용하여 인 비트로 무세포 모델에서 본 발명에 따른 페레그리나 추출물에 의한 메탈로프로테아제 억제 활성의 조절을 평가하는 것이다. I형 콜라게나제 및 히알루로니다제의 완충 용액은 80°C에서 15분 동안 인큐베이션을 통해 특정 기질 복합체와 반응하여 이를 변형시켜 발색단을 활성화할 수 있는 화합물을 형성한다. 따라서 콜라게나제 및 히알루로니다제 활성은 565 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가될 수 있다. 샘플을 5분 동안 37°C에서 효소 기질 복합체와 함께 콜라게나제 및 히알루로니다제 용액과 접촉하도록 둔다. 80°C에서 15분 동안 인큐베이션을 통해 효소로 변환된 기질은 발색단을 활성화시킬 수 있다. 샘플의 존재/부재에서의 콜라게나제 및 히알루로니다제 활성은 565 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가된다. 이 활성의 조절은 활성제의 부재, 즉 효소 기질만의 존재 하에서 콜라게나제 및 히알루로니다제 활성의 억제 또는 활성화의 백분율로 표현된다.

[0189]

프로토콜: I형 콜라게나제 및 히알루로니다제 효소의 용액을 본 발명에 따른 시험된 페레그리나 추출물의 부재 또는 존재하에 기질에서 5분 동안 인큐베이션한다. 그런 다음 용액을 발색체인 닌히드린과 접촉시킨 다음 80°C에서 15분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 기간 마지막에, 테스트 또는 참조 생성물의 존재 또는 부재 하 콜라게나제 및 히알루로니다제 효소의 활성을 565 nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 평가하였다. 테스트한 각 농도에 대해, 테스트 생성물을 통한 콜라게나제 및 히알루로니다제 효소적 활성의 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0190]

[수학 공식. 6]

[0191]

콜라게나제/히알루로니다제 효소적 활성 조절 백분율 = 100 x [(OD 테스트 또는 참조 생성물 - OD 콜라게나제/

히알루로니다제 단독)/OD 콜라게나제/히알루로니다제 단독].

[0192] 결과가 음수인 경우, 백분율은 효소 억제로 표시되며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 효소 활성으로 표시된다. 메탈로프로테아제 억제에 대한 결과는 하기와 같다.

[표 11]

		대조군에 비한 억제(%)
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	1%	87
	0.5%	87
	0.1%	88
	0.01%	62

[0193]

[0194] 결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 메탈로프로테아제(콜라게나아제/히알루로니다아제)의 강력한 억제를 나타낸다. 이는 0.1% 이상의 농도에서 이러한 메탈로프로테아제에 대해 88%의 억제를 나타낼 수 있으며, 피부의 세포의 기질을 매우 효과적으로 보호할 수 있는 우수한 잠재력을 가지며 이러한 억제를 통해 항노화 효과를 나타낸다.

[0195] 이것은 Pierre Fabre 특허 FR 2 946 879에 따른 추출물과 비교되어야 하며, 동일한 테스트에 따른 그 결과는 하기와 같다.

[표 12]

		대조군에 비한 억제(%)
Pierre Fabre 특허에 따른 모링가 올레이페라 추출물	1%	농도가 테스트 시스템에 적합하지 않음
	0.5%	4
	0.1%	24
	0.01%	42

[0196]

[0197] 결론: Pierre Fabre 특허에 따른 추출물은 콜라게나제 활성에 대한 약간의 역-용량-의존적(inverse-dose-dependent) 억제 작용을 나타냈으며, 최대 억제율은 42%였고, 모든 농도를 합한 경우에도 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 100% 최대 억제와는 대조된다.

[0198] 이 파라미터와 관련된 항노화 활성은 Pierre Fabre 특허에 따른 추출물에서 관찰된 효과와 비교하여 상이하고 신규한 것으로 보인다.

[0199] 실시예 12: 항스트레스 활성(PLA2의 억제에 의한)에 대한 비교 테스트.

[0200] 항노화 효과와 함께 진정/항스트레스 배향을 제공하는 피부에 대한 PLA2의 억제에 의한 항스트레스 활성을 위해, 두 가지 추가 in tubo PLA2 테스트를 수행하였다: 하나는 올레이페라 케이크 상에 수행된 본 발명에 따른 방법을 통한 것(페레그리나 상 본 발명에 따른 방법과 동일하게 제조된 추출물), 하나는 Pierre Fabre 특허 FR 2 946 879에 상응하는 추출물, 또 다른 하나는 생성물 Purisoft®을 포함하는 BASF Beauty Care Solutions 특허 FR 3 076 460에 해당하는 추출물 및 마지막으로 Chuun & Thurot 특허 FR2825267를 포함하는 마지막 추출물.

[0201] 이 연구의 목적은 "SPLA2 (type V) Inhibitor Screening Assay Kit"를 사용하여 인 비트로 무세포 모델에서 하나 이상의 샘플에 의한 효소 포스포리파제 A2의 항염 활성 조절을 평가하는 것이다.

[0202] 포스포리파제 A2의 완충 용액은 특정 기질인 디헵타노일 티오-PC(diheptanoyl thio-PC)와 반응하며, 실온에서 교반 하 발색체인 DTNB에 결합하는 화합물로 변환시킨다. 따라서 포스포리파제 A2 활성은 413 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0203] "본 발명에 따른 페레그리나 추출물" 생성물 또는 참조 억제 생성물 "티오에테르아미드-PC(thioetheramide-PC)"를 효소 기질과 동시에 포스포리파제 A2 용액과 접촉하도록 둔다. 효소에 의해 변형된 기질은 실온에서 교반하여 발색체 DTNB에 의해 염색된다. "본 발명에 따른 페레그리나 추출물" 생성물 또는 참조 생성물의 존재/부

재 하에서 포스포리파제 A2의 활성은 이후 413 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가하였다.

[0204] 이 활성의 조절은 활성제의 부재, 즉 효소 기질(디헵타노일 티오-PC)만의 존재에서 포스포리파제 A2 활성의 억제 또는 활성화의 백분율로 표현된다.

[0205] 100 μl 중 1mg 농도의 억제제 "티오에테르아미드-PC"는 이 연구에서 참조 생성물(활성 대조군)이며; 상기 생성물은 PLA2 활성을 93% 억제하여 테스트를 검증한다.

[0206] 효소 포스포리파제 A2의 용액을 참조 억제제 및 테스트 생성물 "본 발명에 따른 페레그리나 추출물"의 부재 또는 존재 하에 이의 기질인 디헵타노일 티오-PC 내에서 인큐베이션하고, 이후 발색체 DTNB를 혼합시키고, 다음, 25°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다.

[0207] 인큐베이션 기간 끝에, 413 nm에서 반응 배지의 흡광도를 측정하여 테스트 또는 참조 생성물의 존재 및 부재 하 효소 포스포리파제 A2의 활성을 밝혀냈다. 테스트된 각 농도에 대해, 테스트 제품을 통한 포스포리파제 A2 효소적 활성 조절은 하기 공식에 따라 계산된다.

[0208] [수학 공식. 7]

[0209] 포스포리파제 A2 효소 활성 조절 백분율 = $100 \times [(OD_{405} \text{ 테스트 생성물 또는 참조 생성물} - OD_{405} \text{ sPLA2 단독}) / OD_{405} \text{ sPLA2 단독}]$.

[0210] 결과가 음수인 경우, 백분율은 효소 억제로 표시되며; 결과가 양수인 경우, 백분율은 효소 활성으로 표시된다.

[표 13]

본 발명에 따른 페레그리나 추출물	1%	19
	0.1%	16
	0.01%	11

[0211]

[0212] PLA2 억제에 대한 본 발명에 따른 이 페레그리나 추출물의 일관성 및 실질적으로 용량-의존적인 활성은 아라키돈 연쇄반응의 업스트림 강도를 감소시킴으로써 진정 활성을 나타낸다. 아라키돈 연쇄반응의 훨씬 업스트림에 있는 이러한 진정 작용은 기저의 생리학적 스트레스의 영향을 감소시킨다. 본 발명에 따른 페레그리나 추출물은 결과적으로 항스트레스제이다.

[0213] Pierre Fabre 특허 FR 2 946 879의 프로토콜 추출물을 통해, 하기와 같은 결과를 얻었다.

[표 14]

Pierre Fabre 추출물	1%	0
	0.1%	16
	0.01%	8

[0214]

[0215] 이의 최소 작용 용량(working dose)에 상응하는 1%에서, 상기 추출물은 어떠한 활성도 나타내지 않는다. 희석 시 활성이 나타나지만, 용량-의존적 효과의 부재가 이 효소의 억제에 대한 추출물의 특이적이고 신뢰할 수 있는 작용을 검증할 수 있게 하는 것은 아니다.

[0216] 제품 Purisoft® LS9726를 사용하여 BASF Beauty Care Solutions 특허 FR 3 076 460의 프로토콜 추출물을 통해 하기와 같은 결과를 얻었다.

[표 15]

BASF 추출물 Purisoft LS9726	1%	10
	0.1%	12
	0.01%	6

[0217]

[0218] 이 추출물은 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 1%에서 관찰되는 최대량에 도달하지 않는 약간의 억제 작용,

즉 본 발명에 따른 추출물의 1% 억제와 비교되는 이 추출물은 1%에서 10% 억제를 나타낸다.

[0219] Chuun & Thurot 특허 FR 2 825 267의 프로토콜 추출물을 통해, 하기와 같은 결과를 얻었다.

[표 16]

Chuun & Thurot	1%	0
추출물	0.1%	0
	0.01%	0

[0220]

이 추출물은 이 효소에 대한 어떠한 억제 작용도 나타내지 않는다.

[0221]

[0222] 본 발명에 따른 방법의 프로토콜 추출물을 사용하되, 모링가 페레그리나 케이크 대신 모링가 올레이페라 케이크에 적용하면 하기와 같은 결과가 관찰된다.

[표 17]

모링가	1%	분석 불가
올레이페라	0.1%	0
추출물	0.01%	6

[0223]

[0224] 이 추출물은 이 효소에 대해 어떠한 유의하거나 안정적인 억제 작용을 나타내지 않는다.

[0225]

[0226] 결론: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물만이 효소 PLA2에 대한 상당한 억제 활성을 입증한다.

[0226]

실시예 13: 메이크업 제품 제형

[표 18]

구성성분	%
물	qs
카프릴릭/카프릭 트리글리세리드 (Caprylic/capric triglyceride)	19.0000
아카시아 세네갈 검(Acacia senegal gum)	7.0000
숯(Charcoal)	6.0000
글리세롤	5.0000
프로판디올	5.0000
벤토나이트(Bentonite)	3.1500
세테아릴 글루코시드(Cetearyl glucoside)	3.0000
세테아릴 알코올	3.0000
벤질 알코올	1.0000
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	2.0000
셀룰로스 검	0.8000
간단 검	0.1750
시트르산	0.1750

[0227]

[0228] 실시예 14: 세척 제품 제형

[표 19]

구성성분	%
물	qs
소듐 코코일 설페이트 (Sodium cocoyl sulfate)	5.0000
소듐 코코일 이세티오네이트 (Sodium cocoyl isethionate)	4.0000
벤토나이트	3.7800
카프릴릭/카프릭 트리글리세리드	2.0000
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	1.0000
글루코노락톤(Gluconolactone)	0.7500
소듐 벤조에이트	0.5450
방향제(Fragrance)	0.5000
잔탄 검	0.2700
소듐 스테아로일 글루타메이트 (Sodium stearyl glutamate)	0.2250
시트르산	0.2250
칼슘 글루코네이트	0.0050

[0229]

[0230] 실시예 15: 케어 제품(항스트레스 항노화 크림)의 제형화

[표 20]

구성성분	%
물	qs
카프릴릭/카프릭 트리글리세리드	18.0000
벤토나이트(Bentonite)	4.2000
세테아릴 알코올	1.5000
본 발명에 따른 페레그리나 추출물	5.0000
글루코노락톤	0.7500
소듐 벤조에이트	0.5450
잔탄 검	0.5000
방향제	0.5000
소듐 스테아로일 글루타메이트	0.2500
시트르산	0.2500
칼슘 글루코네이트	0.0050

[0231]

[0232] 실시예 16: 뉴트리코스메틱 경구-경로 제형

[0233] 진정/항스트레스 활성을 위한 1g 정제는 다음을 포함한다: 본 발명에 따른 건조 추출물 3%(이눌린 지지체 상 0.6% 2,5-디포르밀푸란 함유) + 200IU 비타민 D를 함유하는 탄산칼슘 47% + 글루콘산마그네슘 25% + 22% 이눌린 + 3% 스테아르산마그네슘.

[0234] 실시예 17: 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 독성(toxicological) 테스트

- [0235] 실시예 1에 따른 페레그리나 추출물의 제조:
- [0236] 열매가 익었을 때 수확한 모링가 페레그리나(*Forssk.*) 피오리의 종자를 내부 수분 함량이 약 6%가 되도록 건조시킨 후, 이후 기계식 엔드리스 스크류 프레스(endless screw press)로 압착시켜 한편으로는 버진 오일(virgin oil)을 얻고, 다른 한편으로는 케이크를 얻기 위해 종자의 나머지에서 오일을 분리시킨다. 그런 다음 케이크는 1 내지 2cm 조각으로 미리 절단된 물 형태로 분리된다. 케이크에 55°C에서 10분 동안 예열된 96° 에탄올로 25%/75%(m/m)의 비율로 침용 및 추출을 수행한다. 상기 혼합물을 블렌더로 15분 동안 전단하고, 20°C에서 2시간 동안 임펠러로 교반되도록 둔다. 이후 상기 생성물을 진공하에 Büchner 깔때기를 통해 여과하여 1.15% 건조 물질을 함유하는 옅은 노란색 여과액을 얻는다. 이 여과액은 하기 테스트에 사용된다.
- [0237] 박테리아 균주 *Salmonella typhimurium*(TA 100)에 대한 돌연변이성 활성(mutagenic activity) 결정 - 박테리아 복귀돌연변이(reverse mutation) 테스트
- [0238] 테스트는 세 가지 주요 단계로 수행되었다:
- [0239] - 테스트할 요소의 세포독성을 평가하고 후속 실험을 위한 용량 범위를 선택하기 위해 예비 실험을 수행하고,
- [0240] - 대사 활성화 존재 및 부재 하, 예비 연구에서 정의한 용량 범위 상 최소 아가에 대한 테스트 시스템 및 테스트의(또는 대조군의) 직접 통합(direct incorporation)을 포함하는 제1 유전독성 실험(테스트 1).
- [0241] - 대사 활성화 존재 및 부재 하, 제1 실험 결과 분석 후 연구 책임자가 정의한 용량 수준으로, 테스트 시스템 및 테스트 요소(또는 대조군)의 사전 배양을 포함하는 제2 실험(테스트 2). 이 제2 실험은 특히 제1 실험에서 애매하거나 부정적인 결과가 얻어졌을 때 제1 실험의 결과를 확인하거나 완료하기 위해 수행되었다.
- [0242] 테스트 요소의 희석은 분석적-등급수(analytical-grade water)에서 준비되었다.
- [0243] 세포독성 시험은 S9-Mix 존재 및 부재 하, 5000, 1600, 500, 160 및 50 µg/플레이트 농도에서 *Salmonella typhimurium* TA100 균주에 대해 수행되었다.
- [0244] S9-Mix 제조에 사용된 시약은 하기 지침에 따라 제조되었다.

[표 21]

	최종 농도
MgCl ₂ (0.4 M) + KCl (1.65 M)	8 mM + 33 mM
글루코스 6-포스페이트 (0.2 M)	5 mM
NADP (0.1 M)	4 mM
S9-Mix용 인산염 완충액(pH 7.4 - 0.2 M)	0.1 M
S9 분획	10%
물	최종 농도로 조정

- [0245]
- [0246] 박테리아를 대사 활성화 시스템 존재 및 부재 하에 테스트 추출물에 노출시켰다. 사용된 대사 시스템은 보조인자-보충된(cofactor-supplemented) 후-미토콘드리아 분획(post-mitochondrial fraction)(S9)이다. 효소 유도제로 처리된 Sprague-Dawley 래트 간 균질물의 마이크로솜 분획인 이 S9 분획은 Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983)에 따라 제조되었으며 Moltax TM에 의해 공급되었다. 이를 -70°C 이하의 온도에서 보관한다. S9 마이크로솜 분획은 S9-Mix 내에서 10% 농도로 사용되었다. 적용된 프로토콜은 다음과 같다:
- [0247] · 하기를 3개의 용혈 튜브에 넣었다:
- [0248] o 대사 활성화 부재 하 분석:
- [0249] · 다양한 농도의 테스트 요소 0.1 ml,
- [0250] · 0.5 ml의 멸균 0.2 M, pH 7.4 인산염 완충액,
- [0251] · *S. typhimurium*용 상부 아가(top agar) 2ml,
- [0252] · 0.1 ml의 박테리아 접종원(bacterial inoculum) (TA100).
- [0253] o 대사 활성화 존재 하 분석:

- [0254] · 다양한 농도의 테스트 요소 0.1 ml,
- [0255] · *S. typhimurium*용 탐 아가(top agar) 2ml,
- [0256] · 박테리아 접종원 (TA100) 0.1 ml,
- [0257] · S9-Mix 0.5ml.
- [0258] · 페트리 접시에 미리 깔아둔 바닥 아가(bottom agar)의 표면 상에 섞어 붓는다.
- [0259] · 37°C ± 2°C에서 48 내지 72시간 동안 인큐베이션한다.
- [0260] 이러한 분석은 예비 세포독성 테스트, 테스트 1 및 테스트 2의 각 테스트에 대해 수행되었다. 미처리 대조군, 음성 대조군 및 사전배양 방법 동안 생성된 양성 대조군을 탐 아가를 붓기 전에 37°C ± 2°C에서 20 내지 30분 동안 인큐베이션하였다.
- [0261] 적용된 프로토콜은 다음과 같다:
- [0262] · *S. typhimurium*용 상부 아가의 2ml 분획 4개에 하기를 넣는다:
 - [0263] o 0.2M, pH 7.4 인산염 완충액 0.1ml,
 - [0264] o 용매 0.1 ml,
 - [0265] o S9-Mix 0.1ml,
 - [0266] o 최고 농도의 테스트 요소의 제제 0.1ml,
- [0267] · 무균성을 체크하기 위해 *S. typhimurium*용 상부 아가 2ml 분획을 사용한다.
- [0268] · 페트리 접시에 미리 깔아둔 바닥 아가의 표면 상에 섞어 붓는다.
- [0269] · 37°C ± 2°C에서 48 내지 72시간 동안 인큐베이션한다.
- [0270] · 테스트는 세 차례 수행한다.
- [0271] · 박테리아 증식이 관찰되지 않아야 한다.
- [0272] 최소 5가지 농도의 시험 추출물에 대해, 대사 활성화 부재 하 테스트 및 대사 활성화 존재 하 테스트를 수행하였다.
- [0273] 결과 표현 및 해석
- [0274] 많은 기준을 통해, 대사 활성화 존재 또는 부재 하에서 결과가 양성인지, 특히 테스트 항목의 용량과 상관관계가 있는 복귀돌연변이체(revertant) 수의 증가, 또는 하나 이상의 농도에서 복귀돌연변이체 수의 재현 가능한 증가(reproducible increase) 여부를 결정할 수 있다.
- [0275] - 검증 단계의 결론에서 대사 활성화의 존재 및/또는 부존재 하에 5개 균주 중 하나 이상에서 용량-효과 관계가 재현 가능하게 얻어지는 경우, 테스트 요소는 돌연변이성(mutagenic)으로 여겨진다. 주어진 농도에서 복귀돌연변이체의 수가 TA98, TA100 및 TA102 균주의 경우 자발적 복귀율의 최소 2배($R \geq 2$) 및 TA1535 및 TA1537 균주의 경우 자발적 복귀율의 3배($R \geq 3$)인 경우에만 돌연변이성(mutagenicity)으로 여겨진다.
- [0276] - 테스트 1 및 테스트 2의 결론에서, 돌연변이성 효과의 부재가 테스트된 농도의 독성과 관련이 없다는 것이 확인되었다는 전제 하에, 대사 활성화 존재 및 부재 하에, 복귀돌연변이체의 빈도가 테스트 요소의 모든 농도에서 TA98, TA100 및 TA102 균주의 경우 자발적 복귀율의 2배 미만($R < 2$) 및 TA1535 및 TA1537 균주의 경우 자발적 복귀율의 3배 미만($R < 3$)으로 항상 유지되는 경우 테스트 요소는 비-돌연변이성으로 여겨진다.
- [0277] 예비 연구에서는 테스트 요소의 세포 독성이 나타나지 않았으며; 그 결과, 이 농도 범위를 유전독성 테스트 1에 사용하였다.
- [0278] 테스트 1에서 얻은 결과에 기초하여 테스트 2에서 동일한 희석 범위를 사용하기로 결정하였다. 복귀돌연변이체에 대한 분석은 하기를 나타낸다:
- [0279] - 세포독성 효과가 관찰되지 않았고,
- [0280] - 대사 활성화 존재 및 부재 하에, TA98, TA100 및 TA102의 경우 자발적 복귀율의 2배 이상 또는 TA1535 및

TA1537의 경우 자발적 복귀율의 3배 이상의 비율 R을 나타낸 테스트 추출물의 농도가 없었고,

[0281] - 테스트 시스템 또는 테스트 조건에 관계없이 용량 반응이 관찰되지 않았다.

[0282] 본 연구에서 얻은 결과에 비추어 볼 때, 실시예 1에 따른 페레그리나 추출물은 돌연변이성 또는 돌연변이유발성 (promutagenic) 활성이 없는 것으로 여겨질 수 있다.

[0283] 인비트로 광독성 테스트 3T3 NRU

[0284] 테스트의 원리는 배양된 세포 상 UVA의 비-세포독성 용량의 존재 및 부재 하에 실시예 1에 따른 페레그리나 추출물의 세포독성의 비교를 기반으로 한다. 세포 독성은 UVA 조사 존재 및 부재 하 참조 요소 및 *M. 페레그리나* 추출물로 처리한 지 24시간 후, 생체 염색(vital stain): 뉴트럴 레드(neutral red)를 사용하여 세포 생존율을 결정함으로써 평가된다. 사용된 세포는 Balb/c 3T3 클론 31 라인(ATCC - CCL163)의 마우스 배아 섬유아세포이다. 양성 대조군은 클로르프로마진 용액(CAS No.: 69-09-0)이다. 음성 대조군은 테스트 추출물용 및 참조용 회석제(완충 식염수 용액 ± 1% 용매)이다. 페레그리나 추출물은 UVA의 존재 및 부재 하에, 8가지 농도로, 연구된 농도당 최소 4개의 배양 웰에서 테스트되었다. 섬유아세포를 트립신 처리하고, 2개의 96-웰 배양 플레이트에 완전 배양 배지 내 2×10^5 개 세포/ml 를 함유하는 세포 현탁액 $100 \mu\text{l}$ (즉, 웰당 2×10^6 개 세포)를 시딩하였다.

[0285] 시딩된 플레이트는 37°C 및 5% CO_2 에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 마지막에, 세포 잔디(cell lawn)의 반-컨플루언스(semi-confluence)를 확인하였다. 회석액은 세포 상에 놓기 직전에 제작하였다. 가장 높은 농도의 pH가 측정되었으며; 6.5 내지 8 이었다. 배양 배지를 제거하고, 실온에서 유지된 PBS $150 \mu\text{l}$ 로 각 웰을 조심스럽게 미리 행군 후, 각 추출물 또는 참조 회석액 $100 \mu\text{l}$ 로 처리하였다. 배양 플레이트를 37°C 및 5% CO_2 에서 1시간 ± 5분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. Bio Sun 태양광 조사기(Vilber Lourmat RMX3W)를 사용하여 조사를 수행하였다. Bio Sun 기계는 프로그래밍 가능한 마이크로프로세서를 통해 UV 조사를 제어하는 시스템이다. 시스템은 지속적으로 UV 광 방출을 따라간다. 전달된 에너지가 프로그래밍된 에너지와 동일하면 조사가 자동으로 멈춘다. 테스트 장치의 분광 복사 조도(spectral irradiance)는 보정된 분광복사계(spectroradiometer)를 사용하여 250 내지 700 나노미터의 파장 범위에서 측정되었다. 두개의 플레이트 중 하나는 상온에서 덮개를 씌운 채로 조사되었고, 다른 플레이트는 UVA로부터 보호되었고 조사 동안 상온에서 유지되었다. 조사 후, 처리 배지를 흡인하고 세포를 행구었다. μl 의 완전 배양 배지를 조심스럽게 첨가하고 플레이트를 37°C 및 5% CO_2 에서 18 내지 22시간 동안 인큐베이션하였다. 다음날, 위상차 현미경을 사용한 관찰에 의해 세포 생존율(성장, 형태, 단층 완전성)을 평가하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 염색 용액으로 처리하기 전에, 배양 배지를 제거하고 각 웰을 미리 행구어 상온에서 유지시켰다. 동일한 조건 하 플레이트를 3시간 동안 인큐베이터로 되돌렸다. 염색 용액을 제거하고 세포를 행군 다음, 행균 용액을 제거하고 $150 \mu\text{l}$ 의 탈착 용액을 각 웰에 첨가하였다. 결정이 완전히 용해될 때까지 플레이트를 흔들었다. 흡광도 값은 450 nm에서 측정되었다.

[0286] 테스트 검증:

[0287] 세포의 UVA 민감도는 대략 10회 계대마다 증가된 조사량에 노출시킨 후 그들의 생존율을 평가함으로써 확인한다. 세포는 테스트에 사용된 밀도로 배양하였다. 그들은 다음날 2.5 및 9 J/cm^2 의 양으로 조사되고 세포 생존력은 NRU 테스트를 통해 하루 후에 결정된다. 5 J/cm^2 의 UVA 조사 후 세포의 생존율이 암실에 보관된 대조군의 생존율의 80% 이상인 경우 세포가 품질 기준을 충족하며; UVA의 9 J/cm^2 의 가장 높은 양에서 생존율은 암실에 보관된 대조군의 생존율의 적어도 50%와 같아야 한다.

[0288] 결과:

[0289] 음성 대조군은 0.4 이상의 흡광도를 갖는다. 양성 대조군인 클로르프로마진의 IC_{50} 값은 UVA가 존재 하 0.1 내지 $2 \mu\text{g/ml}$ 및 UVA가 부재 하 7 내지 $90 \mu\text{g/ml}$ 이다. 이러한 결과를 통해 테스트를 검증할 수 있다. UVA의 존재 및 부재 하 50% 세포 사멸을 일으키는 페레그리나 케이크 추출물의 농도는 추정할 수 없다. 사멸율(mortality)이 50%에 도달한 적이 없다. UVA의 존재 및 부재 하 50% 세포 생존율을 나타내는 페레그리나 케이크 추출물의 농도는 추정할 수 없다. 생존율은 항상 50% 이상이다.

[0290] 결론: 채택된 실험 조건에서 페레그리나 케이크 추출물은 광독성이 없는 것으로 여겨질 수 있다.

- [0291] SIRC 세포주에 대한 뉴트럴 레드 방출법을 사용한 인 비트로 세포독성 연구에 의한 안구 자극 가능성 평가
- [0292] 이 인 비트로 연구는 뉴트럴 레드 방출 기술을 통해 세포 단층에서 50% 세포 사멸을 초래하는 농도(IC₅₀)를 결정하여 페레그리나 케이크 추출물의 세포 독성을 평가하는 것을 기반으로 한다. 사용된 세포는 미코플라스마가 없는 SIRC 토끼 각막 섬유아세포(ATCC - CCL60)이다.
- [0293] 페레그리나 추출물을 생리식염수에 25% 및 50%로 희석하였다. 섬유아세포를 트립신 처리하고, 2개의 24-웰 배양 플레이트에 완전 배양 배지 내 2X10⁵ 개 세포/ml를 함유하는 세포 현탁액 1ml의 비율로 시딩하였다. 시딩된 플레이트를 37℃ 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 마지막에, 세포 잔디의 컨플루언스를 확인하였다. 염색 용액은 완전 배양 배지에서 0.5 mg/ml로 제조하였다. 배양 배지를 제거하고 각 웰에 1ml의 염색 용액을 넣었다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO₂에서 3시간 ± 15분 동안 인큐베이터로 되돌렸다. 이 접촉 시간 후, 염색 용액을 제거하고 웰당 1ml의 완전 배양 배지로 교체했다. 추출물 또는 참조와 접촉하기 전에 시스템을 안정화시키기 위해 플레이트를 실온에서 적어도 30분 동안 유지시켰다. 각 웰을 2 ml의 PBS로 행구고 실온에서 유지시킨 다음, 페레그리나 추출물 또는 참조의 각 희석액 500 μl를 세포 잔디와 접촉시켰다. 접촉 시간은 60초(양성 대조군의 경우 30초)였다. 웰마다 처리를 수행하였으며 페레그리나 추출물 또는 참조를 넣는 순간에 스톱워치를 시작하였다. 플레이트를 처리 내내 수동으로 흔들었다. 55초 후(또는 양성 대조군의 경우 25초), 희석액을 흡인하였다. 정확히 60초 또는 30초에 5회의 연속적인 행균을 수행하였다(5 x 2 ml PBS는 실온에서 유지시킴). 각 행균 후 상청액을 흡인하고 최종 행균 후 노출(revelation) 단계를 기다리는 동안 웰은 배지가 없는 상태로 유지시켰다. 배양 플레이트의 처리 완료 후, 1 ml의 탈착 용액을 각 웰에 넣었다. 균일한 염색이 얻어질 때까지 플레이트를 약 15분 동안 흔들었다. 각 배양 웰에 대해 얻은 용액을 취하여 96-웰 플레이트의 2개의 웰에, 즉 150 μl/웰로 나누었다.
- [0294] 결과:
- [0295] 50% 세포 사멸을 일으키는 페레그리나 추출물의 농도는 > 50%로 평가되었다. 50%의 페레그리나 추출물에서 세포 사멸 비율은 17%로 평가되었다.
- [0296] 결론: 채택된 실험 조건에서 페레그리나 케이크 추출물의 세포 독성은 무시할 수 있는 세포 독성으로 여겨질 수 있다.
- [0297] 피부과학적 제어 하 48시간 동안 밀봉드레싱 하 페레그리나 추출물의 1회 적용 후 피부 적합성 평가
- [0298] 이 연구의 목적은 48시간 동안 팔의 앞-외면(antero-external face)에 대해 수행된 피부표피(epicutaneous) 테스트에 의해 페레그리나 추출물의 피부 적합성 정도를 평가하는 것이며; 일반적으로 피부를 좋은 상태로 유지하기 위한 페레그리나 추출물의 능력을 평가하는 것이다. 피부가 건조하지도 않고 민감하지도 않고 치료 부위에 피부과적 병변이 없는 18세에서 65세 사이의 건강한 여성 또는 남성 지원자 10명이 연구에 포함되었다. 실시예 1에 따른 페레그리나 추출물 5% 및 프로판디올/소르비톨 혼합물 95%를 함유하는 로션 형태로 제조된 페레그리나 추출물의 피부 적합성은 최초 적용 48시간 후에 드레싱 제거 30 내지 40분 사이에 평가하였다. 피부 반응(홍반 및 부종)은 하기 척도에 따라 0 내지 3까지 점수를 매겼다:

[표 22]

점수	홍반 (Er)	부종 (Ed)
0	홍반 없음	부종 없음
0.5	거의 인지할 수 없는 홍반, 패치 영역의 일부가 아주 약간 분홍색을 띠	손에 만져질 듯한(palpable), 거의 인지할 수 없는 부종
1	약한(mild) 홍반, 패치된 부위 전체에 분홍빛을 띠	손에 만져질 듯하고 눈에 보이는 부종
2	중간 정도의(moderate) 홍반, 패치된 전체 부위에 선명한 색을 띠	구진 또는 수포를 동반하거나 동반하지 않는 확실한 부종
3	확연한(pronounced) 홍반, 패치된 부위 전체에 강렬한 색을 띠	구진 또는 수포를 동반하거나 동반하지 않는 패치 영역 외부로 퍼지는 뚜렷한 부종

[0299]

[0300] 기타 임의의 피부 반응(물집(bulla), 구진, 수포, 건조, 표피탈락(desquamation), 거뿔, 비누 효과(soap effect) 등)을 하기 척도에 따라 평가하고 기술적으로 보고하였다:

[0301] - 0: 반응 없음

[0302] - 0.5: 매우 약함

[0303] - 1: 약함

[0304] - 2: 중간 정도

[0305] - 3: 확연함

[0306] 연구 마지막에, 하기 공식에 따라 평균 자극 점수(mean irritation score, M.I.S.)를 계산했다.

[0307] [수학 공식. 8]

[0308] $M.I.S. = \text{피부 반응의 합}(Er + 0e + \text{물집} + \text{구진} + \text{수포}) / \text{분석된 지원자 수}$

[0309] 얻어진 M.I.S.를 통해 하기 표에 제시된 척도에 따라 시험 추출물을 분류 가능하였다:

[0310] $M.I.S. \leq 0.20$ 비-자극성

[0311] $0.20 < M.I.S. \leq 0.50$ 약간 자극성

[0312] $0.50 < M.I.S. \leq 2$ 중간정도의 자극성

[0313] $2 < M.I.S. \leq 3$ 매우 자극성

[0314] 결과: 페레그리나 케이크 추출물의 평균 자극 점수(M.I.S.)는 0과 동일하다.

[0315] 결론: 페레그리나 케이크 추출물은 12명의 지원자에게 연속 48시간 동안 적용한 후 비-자극성인 것으로 여겨질 수 있다.

[0316] 테스트의 일반적인 결론:

[0317] 상기 수행된 테스트의 결과는 결정적이며 실시예 1에 따른 페레그리나 추출물에 대해 하기를 입증한다:

[0318] 1) 눈 및 피부 자극 테스트에서 음성이다.

[0319] 2) 광독성 시험에서 음성이다.

- [0320] 3) 돌연변이성 시험에서 음성이다.
- [0321] 본 발명에 따른 페레그리나 추출물의 안전성은 입증되었으며 표적 집단과 관련하여 제한 없이 대규모 국소용 화장품 용도에 이상적이다.
- [0322] 실시예 18: 21일 동안 사용 후 피부 장벽 사의 경피 수분 손실(trans epidermal water loss, TEWL) 및 이의 기호도(acceptability) 측정을 통한 평가
- [0323] 본 연구에서 연구한 제품은 실시예 15의 크림 형태의 케어 제품이다. 본 제품은 아침 및 저녁에 깨끗한 얼굴에 눈가를 피해 부드럽게 마사지하여 적용시킨다. 측정은 볼에 대해서 이루어졌다.
- [0324] 평가 기준은 하기와 같다:
- [0325] - 피부 장벽에 대한 영향 평가: 제품 적용 전(D1) 및 적용 21일 후(D21) TEWL 값의 비교.
- [0326] - 불편감에 관한 D21의 피드백.
- [0327] - 화장품 기호도: D21에 지원자가 작성한 설문지.
- [0328] 모든 피부 유형을 가진 평균 50세(20세 내지 70세)의 22명의 여성 지원자를 테스트하였다. 피부 장벽에 대해 평가된 제품은 하기와 같은 결과를 제공하였다(* = D1에 대한 D21 변동 %, ** = 쌍을 이루는 데이터에 대한 Wilcoxon 테스트로 S = 유의함($p \leq 0.05$) 및 NS = 유의하지 않음($p > 0.05$))를 나타냄:

[표 23]

	TEWL 값($g/m^2 \cdot h$)	
	D1	D21
평균	11.70	11.79
표준 편차	3.26	2.87
중간값	10.39	11.40
최솟값	7.97	7.12
최댓값	17.30	17.14
변동 % *	-	0.83
p 값** 유의도	-	p = 0.555 (NS)

- [0329]
- [0330] 결과 분석은 TEWL이 D1과 비교하여 D21에서 안정적으로 유지되었음을 나타낸다: 제품은 적용 21일 후에 "피부 보호" 효과를 나타냈다. D1과 비교하여 D21에서 TEWL 값의 유의한 감소가 없다는 점을 감안할 때, 테스트 제품의 "영양" 효과는 기기 측정에 의해 밝혀질 수 없다. 지원자의 81%가 D21의 기호도 설문지에서 "피부가 영양분을 공급받았다"는 질문에 긍정적으로 응답했다.
- [0331] 결론: 연구 조건 하 크림은 TEWL 측정에서 밝혀진 "피부 보호" 효과 및 86%의 호의적인 의견과 함께 우수한 화장품 기호도를 나타냈다.