

Abstract

Hyperpigmentation is the process by which an excess of melanin is produced by the skin. Typically, hyperpigmentation occurs as a result of stress, damage or prolonged inflammation of the skin. The most common cause is sun damage, though hyperpigmentation is often a consequence of inflammation following acne, eczema, psoriasis, dermatitis etc. Hyperpigmentation may also occur in the skin due to hormonal changes in the body typically associated with pregnancy or the taking of oral contraception. Beside this medical aspects, the global skin depigmenting product market has been forecast to reach a value of \$19.8 billion by 2018, driven by the growing desire for light-coloured skin among both men and women primarily from the Asian, African and Middle East regions. Although products do exist that can actually bleach the skin, these products contain dangerous or toxic ingredients (such as hydroquinone and mercury) and are banned in most countries.

Blocking or reducing the accumulation of melanin in the skin can be obtained either by switching off one or more components of the pathway that go from the receptor activation to the enzymatic inhibition of melanin formation catalyzed by the tyrosinase. For this purpose, several antimelanogenic reagents have been developed and discovered nowadays. However, only a few of these inhibitors have been introduced and used due to their problems in cytotoxicity (affecting the cell growth and survival), selectivity, solubility and stability.

The present project was aimed at identifying new total plant extracts exerting beneficial effects in skin care, with special emphasis on the development of novel plant-derived actives with hypopigmenting effects. Experimental activities were carried out in collaboration with Arterra Bioscience S.r.l, in the frame of the programme "Dottorato di Ricerca in Azienda", funded by European Commission and Regione Campania (POR Campania FSE 2007-2013). Arterra is an Italian research-based Biotech company mostly involved in developing new plant-derived extracts to be used as active ingredients with cosmetic application.

Hairy root cultures of three different plant species (*Cichorium intybus*, *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* and *Helianthus annuus*) were generated. Hairy roots of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* were selected for further studies on the base of a preliminary screening for anti-oxidant activity of a total crude ethanol extract and a sugar/peptides mixture derived from cell walls, coupled to an active growth.

Crude ethanol extract and a sugar/peptides mixture derived from cell wall of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* hairy roots were tested in murine melanoma cells (B16-F1) and human epidermal melanocytes isolated from lightly pigmented adult skin (HEMA-LP), by using a panel of *in vitro* and *in vivo* biological assays to assess their role in modulating melanogenesis. Both extracts at different concentrations demonstrated to inhibit the cellular tyrosinase, a key enzyme in melanin production, and to reduce melanin content in murine melanoma cells. In addition, the sugar/peptides mixture of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* hairy roots significantly inhibited the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), an important second messenger within melanogenesis signalling pathway. Furthermore, the same extract significantly decreased the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and its promoter activity of about 30%, analyzed by *in vitro* reporter (*Luc+*)-assay. Altogether these data indicates that the sugar/peptides mixture isolated from cell wall of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* hairy roots might exert its inhibitory effect on melanogenesis through the downregulation of MITF transcription.

Furthermore, *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* ethanol extract was able to enhance the expression levels of important genes encoding for proteins involved into extracellular matrix (ECM) assembly.

Finally, a competitive industrial production hairy-root based platform was developed by *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* hairy root biomass scaling-up and improved extraction procedures.

Overall, these results, under pending patent application, will contribute to introduce product and process innovations at Arterra Bioscience s.r.l, for the identification of new and safer plant-derived melanogenesis inhibitors. In general, the developed industrial production platform will be also extended to the screening of actives from other plant species and to the release of novel plant-derived products in different segments of the cosmetic market.

Abstract

L'iperpigmentazione è il processo mediante il quale un eccesso di melanina è prodotto dalla pelle. Tipicamente, l'iperpigmentazione si verifica in seguito a stress, danno o infiammazione prolungata della pelle. La causa più comune è rappresentata dal danno da esposizione alla luce solare, anche se l'iperpigmentazione è spesso una conseguenza di una infiammazione post-acne, eczema, psoriasi, dermatite ecc. L'iperpigmentazione cutanea può verificarsi anche a causa di squilibri ormonali tipicamente associati allo stato di gravidanza oppure all'assunzione dei contraccettivi orali. Al di là di questi aspetti medici, è stato previsto che il mercato globale dei prodotti cosmetici ad attività depigmentante raggiungerà fatturati per 19,8 miliardi di dollari entro il 2018, grazie al crescente desiderio tra uomini e donne delle regioni asiatiche, africane e del Medio Oriente di ottenere una pelle di colore chiaro. Nonostante esistano diversi prodotti che possono effettivamente ridurre il livello di pigmentazione della pelle, essi contengono ingredienti pericolosi o tossici (come idrochinone e mercurio) e sono vietati in molti Paesi.

Il blocco o la riduzione dell'accumulo di melanina nella pelle può essere ottenuta agendo ad uno o più livelli del pathway che vanno dall'attivazione del recettore all'inibizione della formazione di pigmento catalizzata dall'enzima chiave tirosinasi. Per il raggiungimento di tale scopo, diversi agenti ad attività ipopigmentante sono stati scoperti e sviluppati ad oggi. Tuttavia, solo alcuni di questi inibitori sono stati introdotti e utilizzati a causa dei loro problemi di citotossicità (problemi che interessano la crescita e la sopravvivenza cellulare), selettività, solubilità e stabilità.

Il presente progetto è volto a individuare nuovi estratti totali di origine vegetale capaci di generare effetti benefici nella cura della pelle, con particolare attenzione allo sviluppo di nuovi principi attivi di origine vegetale con effetti ipopigmentanti. Le attività sperimentali sono state condotte in collaborazione con Arterra Bioscience Srl, nell'ambito del programma "Dottorato di Ricerca in Azienda", co-finanziato dalla Commissione Europea e dalla Regione Campania (POR Campania FSE 2007-2013). Arterra Bioscience Srl è una società di biotecnologie italiana per lo più impegnata nello sviluppo di nuovi estratti di origine vegetale da utilizzare come ingredienti attivi con applicazione cosmetica.

Culture di radici avventizie ("hairy roots") sono state ottenute da tre differenti specie vegetali (*Cichorium intybus*, *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* e *Helianthus annuus*). Radici avventizie di *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* sono state selezionate per ulteriori studi sulla base dei risultati ottenuti da uno screening preliminare per l'attività antiossidante di un estratto totale in etanolo e una miscela di zuccheri/peptidi derivati dalla digestione enzimatica delle pareti cellulari, accoppiati ad una crescita attiva delle colture *in vitro*.

L'estratto etanolic e la miscela di zuccheri/peptidi derivati da colture di radici avventizie di *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* sono state testate in cellule di melanoma murino (B16-F1) e in melanociti primari umani isolati dalla pelle adulta leggermente pigmentata (HEMa-LP), utilizzando un pannello di saggi biologici *in vitro* e *in vivo* per valutare il loro ruolo nella modulazione del processo di melanogenesi. Entrambi gli estratti a diverse concentrazioni hanno mostrato un effetto inibitorio verso la tirosinasi cellulare, enzima chiave nella produzione di melanina, e nel ridurre il contenuto totale di melanina in cellule di melanoma murino. Inoltre, la miscela di zuccheri/peptidi da radici di *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* ha inibito in modo significativo i livelli di adenosina monofosfato ciclico (AMP ciclico), un importante secondo messaggero nel pathway della melanogenesi. Inoltre, lo stesso estratto ha ridotto significativamente l'espressione del fattore di trascrizione associato alla microftalmia (MITF) e l'attività del suo promotore di circa il 30%, quest'ultima analizzata attraverso un saggio reporter di attivazione trascrizionale (*luc+*). Complessivamente questi dati indicano che la miscela di zuccheri/peptidi isolata dalla parete cellulare di radici avventizie di *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* potrebbe esercitare il suo effetto regolatorio sul processo di melanogenesi attraverso la down-regolazione della trascrizione del fattore MITF.

Inoltre, l'estratto etanolic da *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* è risultato in grado di aumentare i livelli di espressione di geni che codificano per importanti proteine coinvolte nell'assemblaggio della matrice extracellulare (ECM).

Infine, attraverso lo scale-up di colture di radici avventizie di *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* e l'applicazione di procedure di estrazione migliorate, è stata sviluppata una piattaforma competitiva per la produzione industriale di biomassa da radici avventizie.

Nel complesso, i risultati ottenuti contribuiranno a introdurre innovazioni di processo importanti per Arterra Bioscience Srl, al fine di individuare nuovi e più sicuri inibitori della melanogenesi di origine vegetale, e per tale motivo sono in attesa di copertura da brevetto. In generale, la piattaforma di produzione industriale sviluppata potrà essere estesa anche ad altre specie vegetali per lo sviluppo e il rilascio di nuovi prodotti di origine vegetale in diversi segmenti del mercato cosmetico.