



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0077223
(43) 공개일자 2021년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/343 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61P 17/14* (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/343 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0168621

(22) 출원일자 2019년12월17일

심사청구일자 2019년12월17일

(71) 출원인

(주)셀로스바이오텍

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 중합과학
관싸동405호(대현동, 이화여자대학교)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)

(72) 발명자

배윤수

경기도 고양시 일산동구 호수로 606, 10층
A-1009호(장항동)

(74) 대리인

특허법인리채

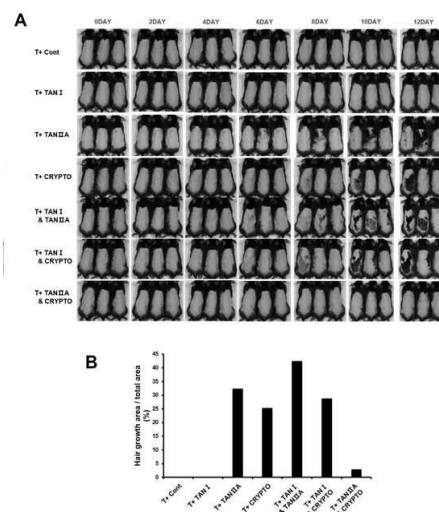
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로 NOX 발현을 저해하고, 활성 산소 생성을 감소시켜 효과적으로 탈모를 예방하거나 치료할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 탄시논 I, 탄시논 IIA 및 크립토탄시논 중 두 가지 이상의 화합물을 포함하고, 단일 화합물을 사용하는 경우에 비해 탈모 예방 또는 치료에 탁월한 효능을 가진다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 8/4973 (2013.01)

A61P 17/14 (2018.01)

A61Q 7/00 (2019.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9B3061850

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 전분화능줄기세포 분화와 간/폐 생체모사체 생성에서 Nox의 기능연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

명세서

청구범위

청구항 1

탄시논 I(Tanshinone I), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA) 및 크립토탄시논(cryptotanshinone) 중 적어도 2 이상을 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 탄시논 I 및 탄시논 IIA는 3:1 내지 1:3의 몰비로 포함되는, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 탈모는 안드로겐성 탈모(androgenetic alopecia)인, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 조성물은 활성 산소 수준을 낮춤으로써 탈모를 예방하거나 치료하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 모낭 세포에서 NOX(NADPH Oxidase)의 발현을 저해하는 것인, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 5 α -환원 효소 저해제를 더 포함하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

탄시논 I(Tanshinone I), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA) 및 크립토탄시논(cryptotanshinone) 중 적어도 2 이상을 포함하는 탈모 예방 또는 완화용 화장료 조성물.

청구항 9

탄시논 I(Tanshinone I), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA) 및 크립토탄시논(cryptotanshinone) 중 적어도 2 이상

을 포함하는 탈모 예방 또는 완화용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 머리카락은 건강을 나타내는 중요한 척도로 건강이 나빠졌을 때는 머리카락이 거칠어지거나 빠지는 등의 현상이 나타난다. 인간의 두피에는 보통 평균적으로 100,000개의 성모가 있으며, 이들은 생장기 (anagen), 퇴행기 (catagen), 휴지기 (telogen), 탈모기(exogen)의 주기적인 변화를 하면서 생성, 소멸을 반복한다. 모발은 18종의 아미노산으로 구성된 90% 케라틴과 10% 정도의 수분으로 이루어지며, 주로 탄소, 산소, 질소, 수소, 유황으로 이루어져 있다. 머리카락은 하루에 80~100개 정도가 정상적으로 빠지며 빠진 자리에는 새로운 모발이 형성되게 된다.

[0004] 탈모란 머리카락이 새로 나는 숫자보다 빠지는 숫자가 많은 상태를 말하는 것으로, 탈모의 원인은 개인에 따라 다르지만, 유전적인 요인을 포함하여 노화에 의한 두피 세포의 퇴화, 모근에 공급되는 영양소의 부족, 두피 지방질 과다로 인한 산소공급 부족, 지방질이나 이물질 또는 두피 질환에 의한 염증과 모공 폐쇄 현상, 스트레스 등을 들 수 있다. 또한, 혈액순환이 잘 되면 모근에 영양분과 산소가 원활하게 공급되어 모발이 건강하게 자라지만, 고지방식이나 흡연 등으로 혈액순환이 원활하지 않으면 탈모가 촉진된다. 탈모증은 과거 중장년층에서만 발생되었으나, 최근에는 20~30대의 젊은 층에서도 빈번하게 발생되고 있다.

[0005] 지금까지 수많은 탈모치료제 및 발모촉진제가 소개되고 있으나, 환자들의 모발이 획기적으로 촉진되어 재생되고 장기적으로 탈모가 예방되었다는 보고는 전혀 없다. 또한 이러한 탈모치료용 약제들은 일부 환자들에 대해서는 성욕 감퇴, 발기 부전 등의 부작용을 나타낸다는 문제점이 보도된 바 있다.

[0006] 이에 따라 안전하면서 탈모 예방 또는 치료 효능이 우수한 물질의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1205209호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 탈모 예방 또는 완화용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 탈모 예방 또는 완화용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 탄시논 I(Tanshinone I), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA) 및 크립토탄시논(cryptotanshinone) 중 적어도 2 이상을 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0014] 2. 위 1 있어서, 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0015] 3. 위 2에 있어서, 상기 탄시논 I 및 탄시논 IIA는 3:1 내지 1:3의 몰비로 포함되는, 탈모 예방 또는 치료용 약

학 조성물.

- [0016] 4. 위 1에 있어서, 상기 탈모는 안드로겐성 탈모(androgenetic alopecia)인, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0017] 5. 위 4에 있어서, 상기 조성물은 테스토스테론에 활성 산소 수준을 낮춤으로써 탈모를 예방하거나 치료하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0018] 6. 위 1에 있어서, 상기 조성물은 모낭 세포에서 NOX(NADHP Oxidase)의 발현을 저해하는 것인, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0019] 7. 위 1에 있어서, 5 α -환원 효소 저해제를 더 포함하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0020] 8. 탄시논 I(Tanshinone I), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA) 및 크립토탄시논(cryptotanshinone) 중 적어도 2 이상을 포함하는 탈모 예방 또는 완화용 화장품 조성물.
- [0021] 9. 탄시논 I(Tanshinone I), 탄시논 IIA(Tanshinone IIA) 및 크립토탄시논(cryptotanshinone) 중 적어도 2 이상을 포함하는 탈모 예방 또는 완화용 식품 조성물.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로 NOX 발현을 저해하고, 활성 산소 생성을 감소시켜 효과적으로 탈모를 예방하거나 치료할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 탄시논 I, 탄시논 IIA 및 크립토탄시논 중 두 가지 이상의 화합물을 포함하고, 단일 화합물을 사용하는 경우에 비해 탈모 예방 또는 치료에 탁월한 효능을 가진다.

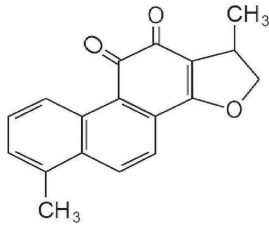
도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 NOX 발현 저해에 따른 활성 산소 생성 감소를 확인한 도이다.
- 도 2는 NOX 발현 저해에 따른 세포 사멸(apoptosis)의 감소를 확인한 도이다.
- 도 3은 NOX 발현 저해에 따른 모발 성장 회복을 확인한 도이다.
- 도 4는 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 NOX 저해 효능을 확인한 도이다.
- 도 5는 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 비-표적 효과를 제거 분석 (도 5A), 글루코오스 옥시다아제 저해 활성 분석 (도 5B), 및 잔틴 옥시다아제 저해 활성 분석 (도 5C)으로 확인한 결과이다.
- 도 6은 in vitro에서 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 활성 산소 생성 억제를 확인한 도이다.
- 도 7은 in vitro에서 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 함량에 따른 활성 산소 생성 억제를 확인한 도이다.
- 도 8은 in vitro에서 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 테스토스테론으로부터 유도된 세포사(cell death) 감소를 확인한 도이다.
- 도 9는 탄시논 I 및 탄시논 IIA에 의한 모낭 길이 성장을 확인한 도이다.
- 도 10은 C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장을 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 탄시논 I, 탄시논 IIA 및 크립토탄시논 중 적어도 2 이상을 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 탄시논 I 은 하기 구조식 (1)로 표시될 수 있다.

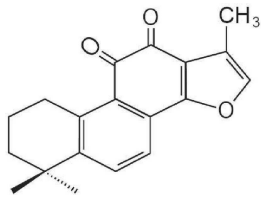
[0031] 구조식 (1)



[0032]

[0033] 본 발명에 있어서, 탄시논 IIA는 하기 구조식 (2)로 표시될 수 있다.

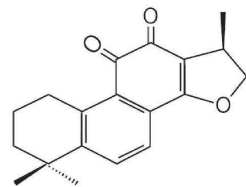
[0034] 구조식 (2)



[0035]

[0036] 본 발명에 있어서, 크립토탄시논은 하기 구조식 (3)으로 표시될 수 있다.

[0037] 구조식 (3)



[0038]

[0040] 본 발명에 따른 조성물은 탄시논 I, 탄시논 IIA 및 크립토탄시논 중에서 선택된 2 이상의 화합물을 포함한다. 상기의 화합물 중 두 가지 이상의 화합물을 조합하여 사용함으로써, 단일 화합물을 사용하는 경우에 비해 탈모 예방 또는 치료 효능이 강화될 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물은 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 포함한다. 조성물에 포함되는 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 함량은 예를 들어, 5:1 내지 1:5의 몰비, 3:1 내지 1:3의 몰비, 또는 1:1의 몰비로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 탈모는 안드로겐성 탈모, 휴지기 탈모, 성장기 탈모, 원형 탈모, 약물성 휴지기 탈모, 산후 휴지기 탈모를 포함할 수 있다. 그 외 일련의 요인에 의한 경모의 연모화, 군모의 단모화, 모포의 위축 등의 비정상적인 탈모 패턴을 형성하는 모든 종류의 탈모를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따라 탈모는 안드로겐성 탈모일 수 있다. 안드로겐성 탈모는 대사계에서 테스토스테론 또는 안드로겐 호르몬의 과다한 축적에 의해 유발된 과안드로겐 자극에 기인한다.

[0045] 안드로겐성 탈모는 테스토스테론에 의해 활성 산소 수준이 증가됨으로 인해 탈모가 진행되는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 테스토스테론은 GPRC6A 수용체에 결합하여 칼슘 생성을 증가시키고, 이로 인해 NOX의 활성이 증가되어 활성 산소가 생성된다. 모낭 세포에서 생성된 활성 산소는 모낭세포의 사멸을 유도하여 탈모가 나타날 수 있다 (Eunbi Ko et al., Testosterone stimulates Duox1 activity through GPRC6A in skin keratinocytes, Journal of Biol Chem. 2014 oct 17;289(42):28835-45.).

[0046] NOX 또는 NADPH 옥시다아제는 활성 산소 생성을 매개하는 단백질로서 NOX1, NOX2, NOX4, NOX5, DUOX1 및 DUOX2를 포함한다.

[0047] 활성 산소 또는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소 원자를 포함한 화학적으로 반응성이 있는 분자이다. 생물체 내에서 생성되는 산소의 화합물로서, 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한

특성을 갖는다. 활성 산소가 증가하면 세포가 사멸하게 되고, 활성 산소가 증가한 세포에 NAC(N-acetylcysteine) 또는 BHA(butylated hydroxyanisole)과 같은 항산화 물질을 처리하는 경우 세포 사멸이 억제된다(Sang Won Kang, Role of Reactive Oxygen Species in Cell Death Pathways, Hanyang Med Rev, 2013;33:77-82).

- [0049] 본 발명자는 탈모가 모낭 세포에서 NOX가 과발현되어 활성 산소 수준이 높아짐으로 인해 발병될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 투여하는 경우, 모낭세포에서 NOX의 발현을 저해하여 활성 산소 수준을 낮추고, 세포 사멸을 억제하여 탈모를 예방 또는 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 조성물을 처리한 세포에서 테스토스테론에 의해 유도된 세포 사멸(apoptosis)이 감소됨을 TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling assay)를 통해 확인하였다(도 8). 여기서, 'TUNEL assay'는 사멸된 세포의 수를 확인하기 위한 방법으로서, 주형과 무관하게 이중 가닥 DNA 파편의 평활 말단 (blunt end)을 표지하는 TdT의 특성을 이용하여 수행되며 (Kateryna Kyrylkova et al., Detection of apoptosis by TUNEL assay, Methods Mol Biol, 2012;887:41-7), 도입된 표지에 따라 시각화할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 안드로겐성 탈모는 테스토스테론의 4번 및 5번 탄소 사이의 이중 결합을 환원시키는 효소인 5 α -환원 효소에 의해 테스토스테론으로부터 생성된 디하이드로테스토스테론(DHT, 안드로겐 호르몬)이 모근의 안드로겐 수용체와 결합하여 모근의 모낭 생성을 저해함으로써 발병될 수 있다 (Shigeki Inui, Satoshi Itami. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. Journal of Dermatological Science. 2011 Jan; 61(1):1-6.).
- [0052] 본 발명의 조성물은 5 α -환원 효소 저해제를 더 포함할 수 있다. 이 효소의 작용을 저해하여 디하이드로테스토스테론의 생성을 억제하는 5 α -환원 효소 저해제로는 피나스테라이드, 두타스테라이드와 같은 화합물이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 조성물이 탄시논 I, 탄시논 IIA 및 크립토탄시논 중에서 선택된 2 이상의 화합물 및 5 α -환원 효소 저해제를 포함하는 경우, NOX 및 5 α -환원 효소에 의한 각각의 기전을 억제할 수 있으므로, 탈모 예방 또는 치료에 탁월한 효능이 있을 수 있다.
- [0054] 본 발명의 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 외용제이고, 액상 또는 젤 타입 등 조성물이 피부에 닿도록 할 수 있는 어떠한 제형으로 제조하는 것도 가능하다. 예를 들어, 연고, 크림, 팩 및 젤과 같은 도포제, 패치, 또는 스프레이 타입으로 제형될 수 있다. 도포제는 발모를 필요로 하는 신체 부위에 도포하는 방식으로 사용될 수 있고, 패치는 발모를 필요로 하는 신체 부위에 부착함으로써 사용할 수 있다. 또한, 스프레이는 발모를 필요로 하는 신체 부위에 분무하는 방식으로 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스(sucrose), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0056] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0057] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마

크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0058] 본 발명의 의약 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 조성물이 포함될 수 있는 부위는 두피뿐만 아니라 발모를 필요로 하는 신체 부위라면 어디나 적용할 수 있다. 예를 들면, 외상으로 인한 흉터로 모발 또는 털이 손상된 부위 또는 단순 미용효과를 목적으로 하는 넓은 이마 또는 M형 이마, 속눈썹 또는 눈썹 및 무모증의 상태 호전에도 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 탈모 예방 또는 완화용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0062] 상기 화장품 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징 워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 또는 바디 세정제 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 화장품 조성물로 사용시, 피부 외용제 또는化粧료의 제형에 맞게 물질을 더 첨가할 수 있다. 예를 들어, 이에 한정되는 것은 아니나 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있고, 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있으며, 특히, 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 또한 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되는데, 바람직하게는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으며, 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 탈모 예방 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0066] 본 발명의 식품 조성물은 음료 (알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류 (예:우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 젓, 유제품 (예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등 일 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.
- [0068] 식품 조성물은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 첨가제로는 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제(치즈, 초콜렛 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.
- [0069] 또한, 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜렛 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본

발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0071] 전술한 바와 같이 본 발명에 따른 조성물은 탈모를 예방 내지 치료하거나 발모를 촉진할 수 있는 의약(외)품 개발의 원료로 유용하게 사용될 수 있다.

[0073] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0075] 실험방법 및 결과

[0076] 1. NOX 발현 저해 시 활성 산소 생성 감소 확인

[0077] Wild type mice와 Duox1 knockout mice에서 각각 primary mouse keratinocyte를 분리하여 35mm culture dish에 배양한 뒤 16-18시간 serum starvation을 진행하였다. 세포에 테스토스테론 자극을 준 뒤 $10\mu\text{M}$ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)이 포함된 Hanks' balanced salt solution (HBSS)에서 10분간 incubation하였다. 이 세포를 laser-scanning confocal microscope (LSM 510, Carl Zeiss)의 488nm 파장에서 형광 정도를 측정하였다.

[0078] 그 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1을 참조하면, Duox1 knockout된 mice의 활성 산소 생성이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0080] 2. NOX 발현 저해 시 세포 사멸(apoptosis)의 감소 확인

[0081] Wild type mice와 Duox1 knockout mice의 primary keratinocyte에서 70% 에탄올 또는 테스토스테론을 serum free medium에 처리한 뒤 24시간 incubation하였다. 그 후 3.5% paraformaldehyde로 상온에서 한 시간 고정시키고, 0.5% triton X-100에 10분간 투과성화(permeabilization) 시켰다. In situ cell death detection kit (Roche)를 사용해 1시간 동안 사멸이 일어난 세포를 염색하였다. 그리고 DAPI로 10분 간 염색하였다. 각 단계 사이에는 1X PBS로 세척하였다. 염색된 세포는 공초점 현미경을 통해 형광을 측정하여 DAPI 대비 apoptotic cell의 개수를 Image J 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0082] 그 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2와 같이 Duox1 knockout된 mice의 TUNEL-positive cell이 감소한 것으로 보아 세포 사멸이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0084] 3. NOX 발현 저해 시 모발 성장 확인

[0085] Wild type과 Duox1 knockout의 8주령 마우스에서 등의 피부를 왁스를 이용해 depilation 하여 마우스 모발 주기를 동기화 시켰다. Depilation 후 8일째부터 7일간 $200\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 의 테스토스테론을 마우스의 등 피부에 도포하여 주었다. 그 후 마우스를 희생하여 피부조직을 얻고 H&E (hematoxylin & eosin) 염색을 실시하여 단위 길이당 존재하는 모발의 개수를 분석하였다.

[0086] 그 결과는 도 3에 나타내었다. Duox1 knockout된 mice의 테스토스테론에 의한 모발 성장의 억제가 회복된 것을 알 수 있었다 (도 3A). 또한, Duox1 knockout된 mice는 단위 길이 당 모발의 수가 더 많음을 확인할 수 있었다 (도 3B). 이는 NOX 발현 저해가 탈모 치료에 효능이 있음을 시사한다.

[0088] 4. 탄시논 I 및 탄시논 II에 의한 NOX 억제 확인

[0089] Drosophila whole body high expression을 위하여 daughterless (Da)-GAL4 promoter에 human Nox isozyme을 각각 발현하는 transgenic fly에서 각 Nox 계통별 membrane을 얻어내었다. 이 membrane에 탄시논 I 및 탄시논 II를 분주하고 10분간 반응시켰다. 1X HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) buffer에 $500\mu\text{M}$ NADPH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate)와 $400\mu\text{M}$ lucigenin (N,N' -

Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate)의 mixture를 만들고 이를 membrane에 넣었다. Spectramax i3x 기기를 사용하여 lucigenin chemiluminescence 정도를 1분 간격으로 10분간 측정한다. Ki 값 분석은 Graph-Pad Prism 5 프로그램을 이용해 진행하였다.

[0090] 탄시논 I 및 탄시논 II의 NOX 억제 효능을 IC₅₀을 측정하여 확인하였다. 그 결과는 도 4 및 표 1에 나타내었다.

표 1

(Unit: μ M)

NOX isozyme	NOX1	NOX2	NOX4	NOX5	DUOX1	DOUX2
탄시논 I	12.9	14.1	4.9	3.9	6.5	2.6
탄시논 II	2.2	3.4	7.2	1.9	2.8	3.6

[0094] 5. 탄시논 I 및 탄시논 II의 비-표적 효과 확인

[0095] Scavenging assay는 1X PBS에 탄시논 I 및 탄시논 II를 1, 10 μ M의 농도로 첨가한 후 H₂O₂ 500mM과 lucigenin 400 μ M과 반응시켜 Nox 저해제의 ROS scavenging 능력을 확인하였다. Chemiluminescence는 Promega GloMax® 20/20 Luminometer로 10초 간격으로 1분간 측정하였다. 그 평균값을 양성대조군인 NAC (N-Acetylcysteine) 500 μ M, 1mM과 비교하였다. 모든 실험에서 H₂O₂를 첨가하지 않고 Nox 저해제와 lucigenin만 반응시킨 측정값을 빼주었다.

[0096] 글루코오스 옥시다아제의 활성과 잔틴 옥시다아제의 활성은 Amplex red glucose/glucose oxidase assay kit과 Amplex red xanthine/xanthine oxidase assay kit (Thermo Fisher)을 이용하였다. 탄시논 I 및 탄시논 II를 1, 10 μ M의 농도로 처리하였을 때의 형광 수치를 흡광도 560nm 파장에서 측정하였다. 이를 NAC 500 μ M, 1mM를 처리한 경우와 비교하였다.

[0097] 그 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5A의 결과로 탄시논 I 및 탄시논 II는 활성 산소를 직접적으로 감소시키는 물질은 아님을 확인할 수 있었다. 또한, 탄시논 I 및 탄시논 II는 글루코오스 옥시다아제의 활성 억제 효능이 없고 (도 5B), 잔틴 옥시다아제의 억제 활성 효능이 없거나 매우 낮으므로(도 5C) NOX에 특이적으로 억제 활성을 가지는 화합물임을 알 수 있었다.

[0099] 6. 탄시논 I 및 탄시논 II의 활성 산소 생성 감소 확인

[0100] Ker-CT세포 (ATCC®) 1.5x10⁵개, primary mouse keratinocyte 2x10⁶ 개를 confocal 35mm culture dish에 배양한 뒤 16-18시간 동안 serum starvation 하였다. 탄시논 I 및 탄시논 II, 혹은 동량의 DMSO를 첨가하여 30분간 incubation한 뒤 기존의 배지를 제거하고 1X PBS로 세포를 세척하였다. 그리고 1X PBS에 희석한 5 μ M PO-1 (Peroxy-Orange 1; TOCRIS)으로 15분 동안 세포를 염색하였다. PO-1 처리 5분 경과 시 테스트스테론을 첨가하여 총 10분간 자극을 주었다. 이를 1X PBS로 세척한 뒤 공초점 현미경을 이용해 excitation 580nm, emission 545-750nm 조건으로 형광 세기를 측정하였다. Dish 당 총 5개 구역을 측정하고 평균값을 분석하였다.

[0101] 그 결과는 도 6에 나타내었다. 탄시논 I 및 탄시논 II 모두에서 활성 산소 생성이 감소되었다.

[0103] 7. 탄시논 I 및 탄시논 II의 함량에 따른 활성 산소 생성 감소 확인

[0104] 탄시논 I 및 탄시논 II의 농도에 따른 활성산소 생성 정도를 실험 6과 같은 방법으로 Ker-CT 세포에서 측정하였다. 탄시논 I 및 탄시논 II는 각각 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M로 처리하였다.

[0105] 그 결과는 도 7에 나타내었으며, 탄시논 I 및 탄시논 IIA 모두 농도 의존적으로 활성 산소 생성을 감소시켰다.

[0107] **8. 탄시논 I 및 탄시논 IIA의 테스토스테론 유도 세포사(cell death) 감소 효능 확인**

[0108] Wild type의 primary mouse keratinocyte를 배양하여 serum free medium에 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 각각 100, 500nM로 처리하였다. 그리고 70% 에탄올 또는 테스토스테론을 처리한 뒤 24시간 incubation 하였다. 그 후 3.5% paraformaldehyde로 상온에서 한 시간 고정시키고, 0.5% triton X-100에 10분간 투과성화(permeabilization) 시켰다. In situ cell death detection kit (Roche)를 사용해 1시간 동안 사멸이 일어난 세포를 염색하였다. 그리고 DAPI로 10분 간 염색하였다. 각 단계 사이에는 1X PBS로 세척하였다. 염색된 세포는 공초점 현미경을 통해 형광을 측정하여 DAPI 대비 apoptotic cell의 개수를 Image J 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0109] 그 결과는 도 8에 나타내었다. 탄시논 I 및 탄시논 IIA 모두에서 TUNEL-positive cells이 감소되었으므로, 세포사(cell death)가 감소됨을 알 수 있었다.

[0111] **9. 탄시논 I 및 탄시논 IIA에 의한 모낭 길이 성장 확인**

[0112] 8주령 된 C57BL/6J 마우스의 등판 털을 밀고, 적정량의 제모 크림을 발라 털을 완전히 제거하였다. 등에 상처가 나지 않은 마우스를 선별하여 군을 나누고 제모 다음날부터 3일간 200 μ g/100 μ l의 테스토스테론을 등에 도포하였다. 3일 뒤부터는 탄시논 I 과 탄시논 IIA의 최종 농도가 50, 100 μ M이 되도록 70% 에탄올에 희석하여 테스토스테론과 함께 12일간 발라주었다. 대조군에는 탄시논과 동량의 DMSO를 70% 에탄올에 희석하여 발라주었다. 약물 도포 후 12일차에 마우스를 희생하여 등 쪽 피부 조직을 얻었고 이를 frozen section 하여 H&E 염색을 하였다. 각 군의 모낭 길이는 Image J 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0113] 그 결과는 도 9에 나타내었다. 탄시논 I 및 탄시논 IIA 모두 농도 의존적으로 모낭길이가 성장하였다.

[0115] **10. C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 확인**

[0116] 실시예 및 비교예는 하기의 표 2와 같다.

표 2

	탄시논 I	탄시논 IIA	크립토탄시논
실시예1	10 μ M	10 μ M	
실시예2	10 μ M		10 μ M
실시예3		10 μ M	10 μ M
비교예1	20 μ M		
비교예2		20 μ M	
비교예3			20 μ M

[0118] 8주령 된 C57BL/6J 마우스의 등판 털을 밀고, 적정량의 제모 크림을 발라 털을 완전히 제거하였다. 등에 상처가 나지 않은 마우스를 선별하여 군을 나누고 제모 다음날부터 3일간 200 μ g/100 μ l의 테스토스테론을 등에 도포하였다. 실시예 및 비교예는 표 2와 같이 탄시논 I 및 탄시논 IIA(실시예 1), 탄시논 I 및 크립토탄시논(실시예 2), 탄시논 IIA 및 크립토탄시논(실시예 3), 탄시논 I(비교예 1), 탄시논 IIA(비교예 2), 크립토탄시논(비교예 3)의 최종 농도가 20 μ M이 되도록 70% 에탄올에 희석하여 제조하였다. 각 실시예 및 비교예를 제모 후 4일 째(약물 처리 0일차)부터 등에 도포하였으며, 대조군은 탄시논과 동량의 DMSO를 70% 에탄올에 희석하여 발라주었다. 약물 처리 후 12일차에 마우스를 희생하였다. 마우스의 모발 상태는 약물 처리 0일부터 12일 째 되는 날까지 2일 마다 한 번씩 촬영하여 확인하였다. 전체 제모 면적 대비 발모 면적의 비율은 Image-Pro Analyzer 7.0 프로그램을 사용하여 측정하였다.

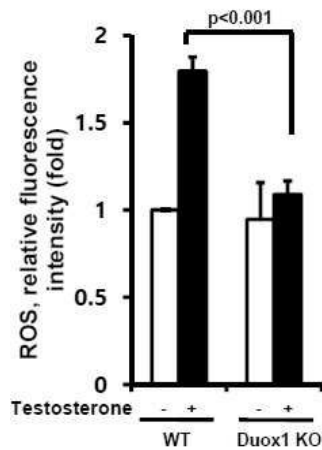
[0119] 그 결과는 도 10에 나타내었다. 탄시논 I 과 탄시논 IIA를 혼합한 경우, 각 화합물을 단일로 사용하였을 때에 비해 발모 시너지 효과가 우수하였다.

[0120]

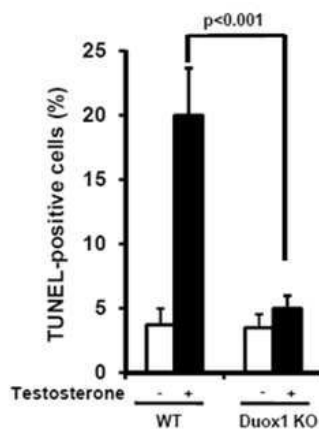
그러나, 탄시논 I 과 크립토탄시논을 혼합한 경우에는 각 단일 화합물을 사용한 경우와 비슷한 발모 효능을 나타내었으며, 탄시논 IIA와 크립토탄시논을 혼합한 경우에는 각 단일 화합물을 사용한 경우보다 발모 효능이 감소되었다.

도면

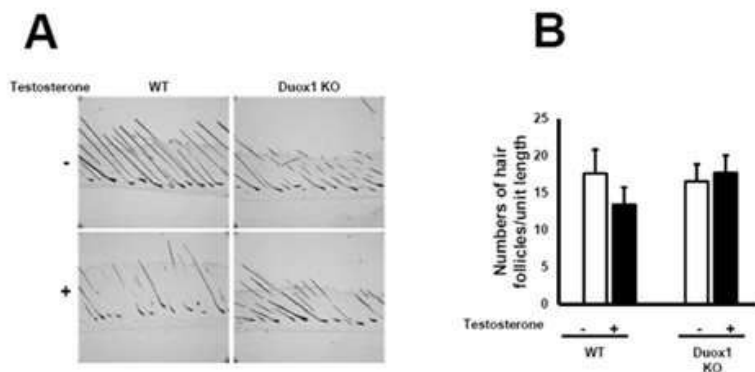
도면1



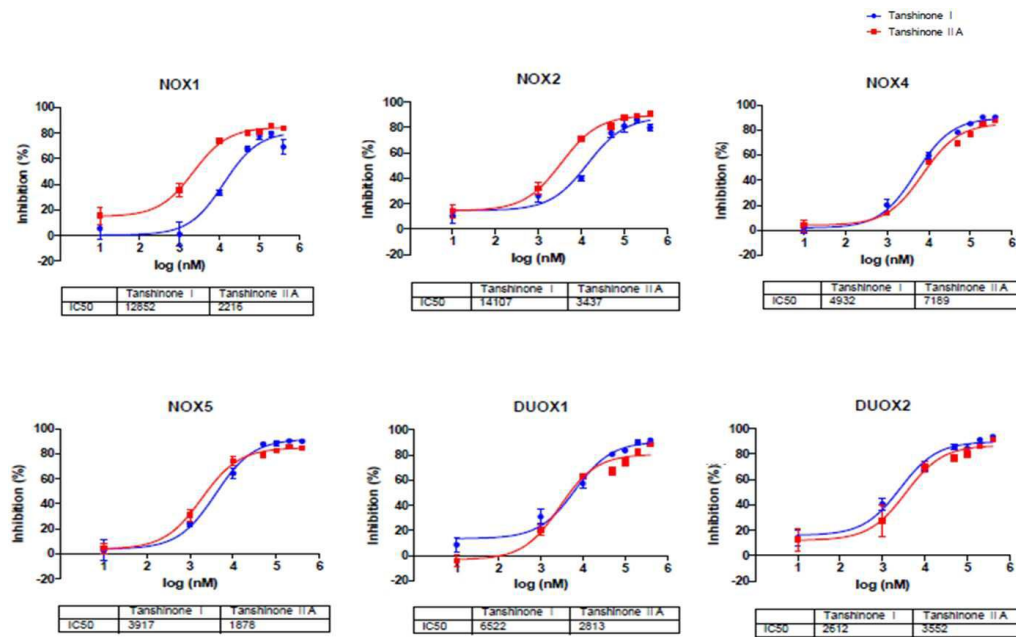
도면2



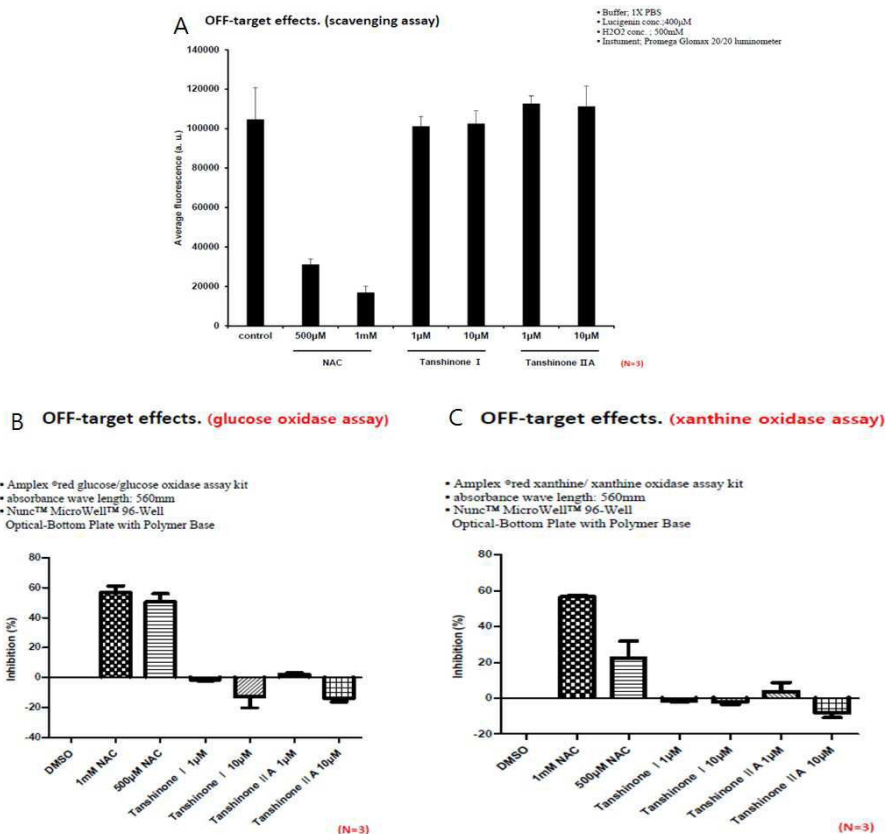
도면3



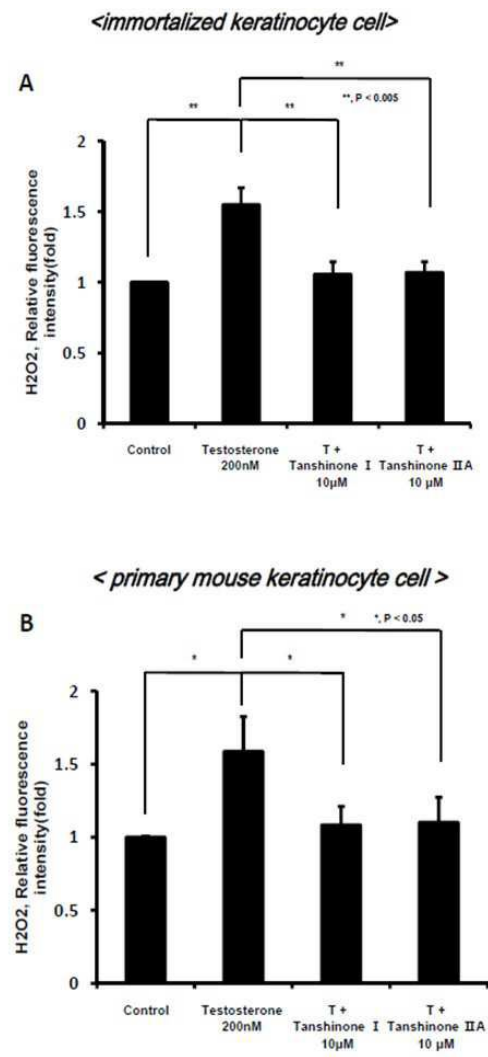
도면4



도면5

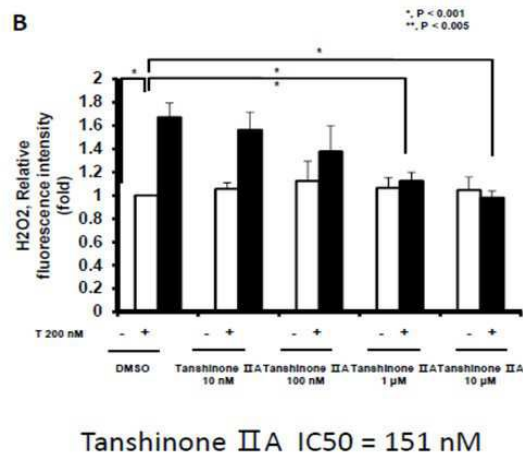
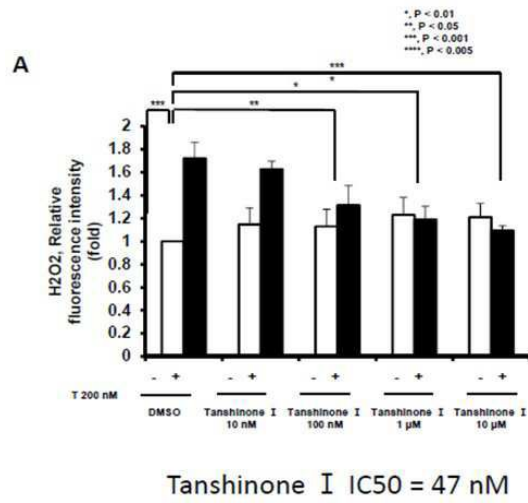


도면6

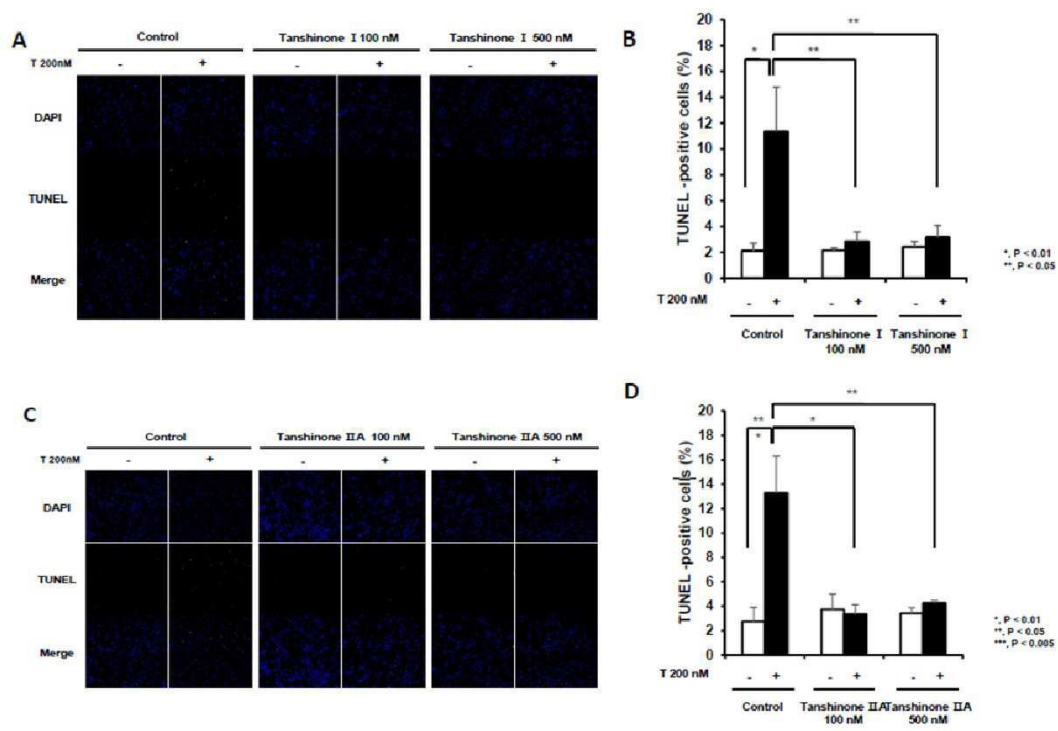


도면7

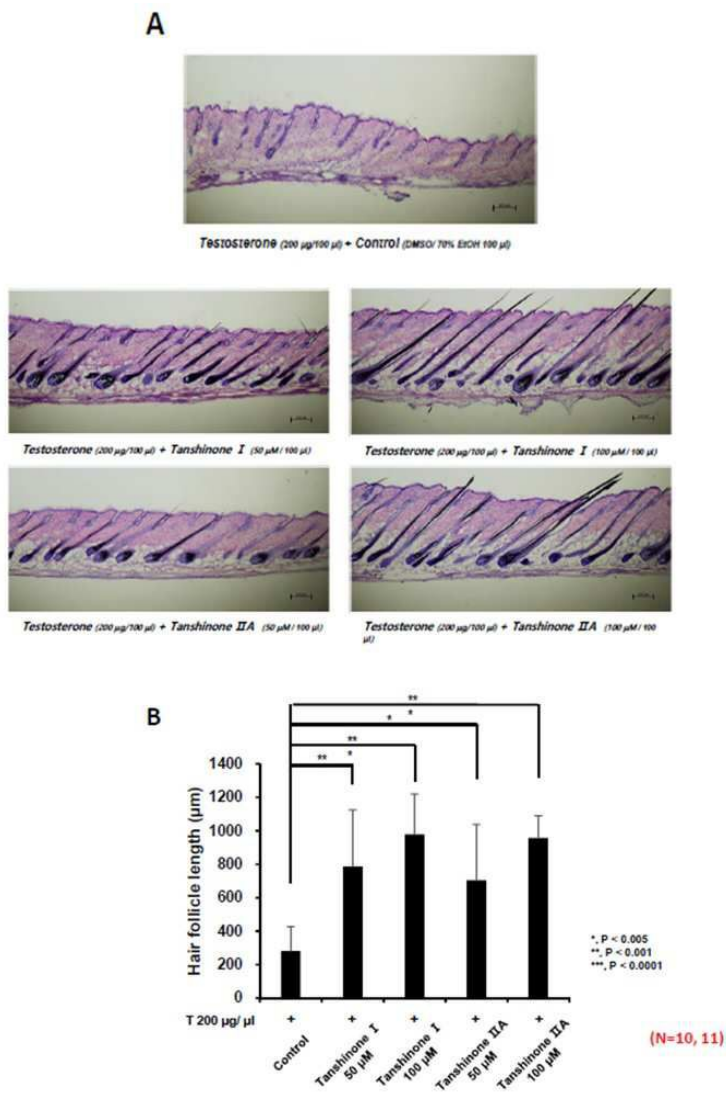
<immortalized keratinocyte cell>



도면8



도면9



도면10

