



등록특허 10-2316957



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월27일

(11) 등록번호 10-2316957

(24) 등록일자 2021년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/122 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 8/35 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/122 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0050364

(22) 출원일자 2020년04월24일

심사청구일자 2020년04월24일

(56) 선행기술조사문헌

Phytochem. Res., 16, 389-440, 2017.

US20160171050 A1

기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

주식회사 지에이치팜

경기도 고양시 덕양구 화정로 65, 1515호(화정동, 한화오벨리스크)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박길홍

서울특별시 성북구 인촌로 73 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호 (안암동5가)

김명환

서울특별시 성북구 인촌로 73 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호 (안암동5가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 성선영

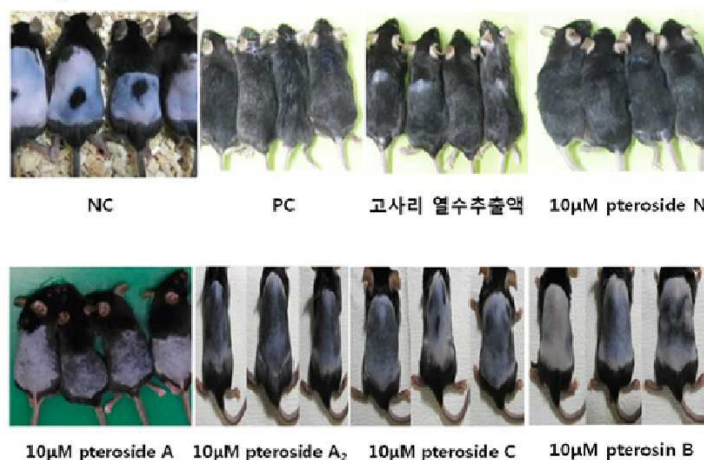
(54) 발명의 명칭 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 및 탈모 개선을 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료용 약학적 조성물 혹은 탈모 방지 및 탈모 개선용 기능성식품 및 기능성화장품에 관한 것이다. 본 발명은 고사리에서 추출한 프테로신 화합물 및 이의 유도체를 이용하여 탈모 질환을 치료하기 위한 치료제, 탈모 증진 및 탈모 방지를 위한 식품, 화장품 등을 제공하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5

Day 14



(52) CPC특허분류

A61K 8/35 (2013.01)

A61P 17/14 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

파티바다 트리베니

대한민국 서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가)
고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

김경진

서울특별시 성북구 인촌로 73 고려대학교 의과대
학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호 (안암동5가)

안준태

서울특별시 성북구 인촌로 73 고려대학교 의과대
학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호 (안암동5가)

변재광

서울특별시 성북구 인촌로 73 고려대학교 의과대
학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호 (안암동5가)

헤마선다르 알라빌리

대한민국 서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가)
고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

이민아

서울특별시 양천구 목동중앙로13길 2, 901호(목동,
효원빌라트)

명세서

청구범위

청구항 1

프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 치료용 약학적 조성물로서,

상기 프테로신 화합물 또는 이의 유도체는 프테로신 A(pterodin A), 프테로신 B(pterodin B), 프테로신 C(pterodin C), 프테로신 D(pterodin D), 프테로신 P(pterodin P), 프테로신 Z(pterodin Z), 프테로사이드 A(pteridine A), 프테로사이드 A2(pteridine A2), 프테로사이드 B(pteridine B), 프테로사이드 C(pteridine C), 프테로사이드 D(pteridine D), 프테로사이드 N(pteridine N), 프테로사이드 P(pteridine P) 및 프테로사이드 Z(pteridine Z)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 탈모 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 프테로신 화합물 또는 이의 유도체는 고사리로부터 정제된 탈모 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 탈모는 남성형 탈모증, 여성형 탈모증, 원형 탈모증, 전두 탈모증, 전신 탈모증, 휴지기 탈모증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 탈모 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 발모 증진 및 탈모 방지용 식품 조성물로서,

상기 프테로신 화합물 또는 이의 유도체는 프테로신 A(pterodin A), 프테로신 B(pterodin B), 프테로신 C(pterodin C), 프테로신 D(pterodin D), 프테로신 P(pterodin P), 프테로신 Z(pterodin Z), 프테로사이드 A(pteridine A), 프테로사이드 A2(pteridine A2), 프테로사이드 B(pteridine B), 프테로사이드 C(pteridine C), 프테로사이드 D(pteridine D), 프테로사이드 N(pteridine N), 프테로사이드 P(pteridine P) 및 프테로사이드 Z(pteridine Z)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 발모 증진 및 탈모 방지용 식품 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 탈모는 남성형 탈모증, 여성형 탈모증, 원형 탈모증, 전두 탈모증, 전신 탈모증, 휴지기

탈모증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 발모 증진 및 탈모 방지용 식품 조성물.

청구항 10

프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 발모 증진 및 탈모 방지용 화장품 조성물로서,

상기 프테로신 화합물 또는 이의 유도체는 프테로신 A(pterodin A), 프테로신 B(pterodin B), 프테로신 C(pterodin C), 프테로신 D(pterodin D), 프테로신 P(pterodin P), 프테로신 Z(pterodin Z), 프테로사이드 A(pteroid A), 프테로사이드 A2(pteroid A2), 프테로사이드 B(pteroid B), 프테로사이드 C(pteroid C), 프테로사이드 D(pteroid D), 프테로사이드 N(pteroid N), 프테로사이드 P(pteroid P) 및 프테로사이드 Z(pteroid Z)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 발모 증진 및 탈모 방지용 화장품 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 탈모는 남성형 탈모증, 여성형 탈모증, 원형 탈모증, 전두 탈모증, 전신 탈모증, 휴지기 탈모증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 발모 증진 및 탈모 방지용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료용 약학적 조성물 혹은 탈모 방지 및 발모 개선용 식품 조성물 또는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 모발(hair)은 피부기름샘(sebaceous gland), 땀샘, 및 손톱과 함께 부가적인 외피(integument) 구조로 인식되는 신체 보호 기관이다. 모발은 상피조직을 외상 및 자외선으로부터 보호하고, 외부의 자극을 체내에 전달하며 체온을 조절한다. 두피 모발은 전체 체모의 20%를 차지하는데, 모발의 생리적 기능과 함께 두부의 완충작용으로 두부를 충격으로부터 보호할 뿐 아니라 성별, 연령 및 지위에 따른 개인의 개성과 긍정적인 이미지를 부여하는 등의 사회적으로 중요한 기능을 갖는다(Cash, 2001; Hong, 2009).

[0004] 모발 성장은 매우 잘 조절되는 순환 과정으로, 포유류에서는 생장기(anagen), 퇴행기(catagen) 및 휴지기(telogen)의 성장주기를 반복하는데, 정상적인 두피에서 90~95%는 생장기, 1% 미만은 퇴화기, 5~10%는 휴지기에 있으며, 매일 100개 이상의 모발이 휴지기에 접어들고 같은 수의 모낭은 다시 생장기로 들어간다(Price, 1999). 따라서 매일 100개 이상의 모발이 탈락되고 새로 생성되는데, 모발이 비정상적으로 많이 탈락되거나 재생되지 않는 증상을 탈모(alopecia)라 한다. 퇴행기 동안 모발 모낭의 퇴행은 근위 상피 모구(proximal epithelial hair bulb)의 말단 분화와 세포사(apoptosis), 모낭주위 단백질분해(perifollicular proteolysis) 및 모낭 멜라닌 생성(follicular melanogenesis) 완료 등 매트릭스 리모델링을 특징으로 하는 엄격하게 조절된 프로세스를 반영한다.

[0006] 탈모(hair loss)는 인간에게 감정적으로 고통을 주는 질병이다. 또한, 탈모는 많은 인간의 질병과 연관되어 있다. 질병, 영양 결핍, 노화, 호르몬 불균형, 및 스트레스 등을 포함하여 탈모를 일으키는 많은 원인들이 있다.

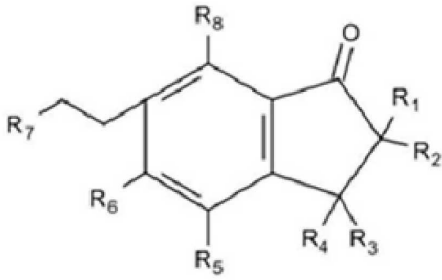
- [0008] 모발 모낭의 성장과 발달은 많은 성장 인자 및 사이토카인과 상호작용한다. 가장 많이 알려진 인자로 각질세포 성장인자(keratinocyte growth factor, KGF)와 인터루킨-1(Interleukin-1, IL-1)이 있다. 특히, 인터루킨-1의 조절은 모발 모낭의 증식과 발달에 직접 연관되어 있다.
- [0010] 발모제의 연간 추정 시장은 수십억 달러에 달한다. 그러나, 현재 항-고혈압 칼륨 채널 조절약물(anti-hypertensive potassium channel opener)인 미녹시딜(Minoxidil®)과 다이하이드로테스토스테론-억제 5 α -환원 효소 억제제 (dihydrotestosterone-suppressing 5 α -reductase inhibitor)인 피나스테리드(finasteride) 제제 프로페시아(Propecia®)의 2개의 탈모 방지 약물만이 FDA의 승인을 받은 상태이다(Price, 1999; Selmanowilz et al., 1974). 이중 미녹시딜은 작용 기전에 대한 보고가 명확하지 않고, 가벼운 두피자극과 알레르기성 피부염 등의 부작용이 보고되었으며, 약 30%의 환자에게만 모발 성장의 효과를 보였고, 일반적인 원형탈모 환자 외에는 효과가 없는 상황이다. 한편, 프로페시아는 남성 호르몬대사에 작용하는 효소활성 억제제가 작용기전으로 알려져 있고, 성욕 감퇴, 발기부전, 여성형 유방 등의 부작용이 보고되었으며, 특히, 약물에 내재된 독성으로 인하여 임신부에게 사용이 금지되고 있다(Hagemann et al., 2005; McClellan and Markhan, 1999).
- [0012] 국내에서도 탈모 관련 많은 연구들이 진행되고 있으며, 최근에는 면역 억제제인 사이클로스포린 A(Cyclosporine A)의 발모효과가 보고 된 바 있으나, 여러 가지 부작용(간 독성, 면역 억제 효과, 신장독성, 고혈압, 중성지방 증가 등)으로 인하여 실제 임상 치료에서 적용에는 무리가 있는 실정이다.
- [0014] 탈모의 치료방법으로는 경피 도포제로서 미녹시딜과 경구 복용제로서 프로페시아가 FDA의 승인을 받은 유일한 의약품으로 많이 사용되고 있다(Price, 1999; Selmanowilz et al., 1974). 하지만 임상사례에서 미녹시딜에서 체중 증가, 부종, 협심증, 피부염 및 소양증 등과, 프로페시아에서 남성 성기능 장애 및 기형아 출산 등의 심각한 부작용이 보고되어 사용이 제한적이거나 또는 환자들의 자발적인 기피현상 등 문제점이 있다(Hagemann et al., 2005; McClellan and Markhan, 1999).
- [0015] 따라서 독성이나 부작용이 적으며 효과가 뛰어난 탈모 치료제의 개발이 시급한 실정이다.
- [0017] 한편, 천연물은 다양한 연구에서 항산화 및 면역조절 기능을 나타내는 것으로 보고되었으며, 이를 이용하여 피부에 자극이 적은 반면 항노화, 미백, 주름개선 또는 항염증 등의 다양한 기능성을 갖는 한방화장품을 개발하기 위한 연구들이 주목받고 있다(Cho et al., 2011; Kim et al., 2011; Lee et al., 2011; Seo et al., 2009). 특히, 최근 항산화 효과 및 면역조절 작용 등을 나타내는 천연물을 이용하여 발모효과가 우수하면서도 부작용이 적은 발모제를 개발하기 위한 연구들이 다양하게 수행되고 있다. Lim 등은 tocotrienol의 섭취가 두피의 지질과 산화 및 산화적 스트레스를 감소시켜 발모를 촉진하는 것으로 보고하였으며(Lim et al., 2010), Joo는 수종의 천연물과 *Lactobacillus plantarum* 균주를 이용한 발효추출물의 도포가 모발생장에 관여하는 cytokine을 조절하여 C57BL/6 mouse의 모발성장을 촉진하는 것으로 보고하였다(Joo, 2011). Kim 등은 화학요법제인 cytarabine에 의한 자발적인 탈모실험 모델에서 측백나무 (*Thuja orientalis*) 추출물의 도포가 염증성 cytokine과 염증 유발 인자의 조절을 통해 DBA1J mouse의 모발성장을 촉진한 것으로 보고하였다(Kim et al., 2004). 이 밖에도 탈모 치료에 이용되는 한방 처방전 또는 민간요법에 근거한 다양한 종류의 한약재나 천연물 추출물을 이용한 발모제의 개발에 대한 연구가 보고되어 천연물로부터 발모효과가 우수한 제제의 개발이 가능할 것으로 시사하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 이에 본 발명자들은 독성이나 부작용이 적은 천연물을 이용한 탈모 치료제에 관해 연구하던 중, 고사리 추출물에 프테로신 화합물 및 이의 유도체가 함유되어 있다는 것을 확인하였고, 이것이 생체에 미치는 영향을 확인한 결과, 프테로신 화합물 및 이의 유도체가 발모 증진 효과를 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 따라서 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0022] <화학식 1>



[0023]

[0024] 상기 식에서 R1, R2, R3, R4, R5, R6 및 R8은 각각은 독립적으로, H, OH, 탄소수 1 내지 4의 알킬 또는 알콕, 또는 알킬-O-글루코오스이며;

[0025] R7은 할로젠, H, OH, O-알킬, O-알케닐, O-알카이닐, O-알콕, O-카르복실, O-에테르, O-술폰산(-SO₃ H), O-시클로알킬, O-헤테로시클로알킬, 글루코오스, 및 O-글루코오스로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

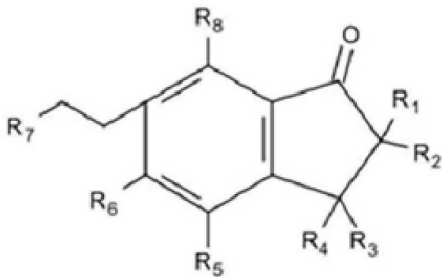
[0027] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 방지 및 발모 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0029] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 방지 및 발모 증진용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0031] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0032] <화학식 1>



[0033]

[0034] 상기 식에서 R1, R2, R3, R4, R5, R6 및 R8은 각각은 독립적으로, H, OH, 탄소수 1 내지 4의 알킬 또는 알콕, 또는 알킬-O-글루코오스이며;

[0035] R7은 할로젠, H, OH, O-알킬, O-알케닐, O-알카이닐, O-알콕, O-카르복실, O-에테르, O-술폰산(-SO₃ H), O-시클로알킬, O-헤테로시클로알킬, 글루코오스, 및 O-글루코오스로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

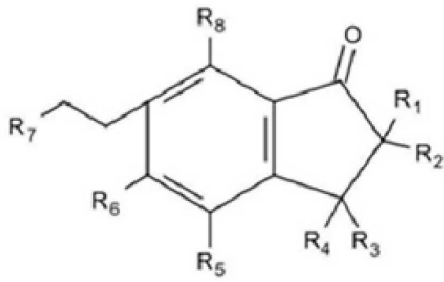
[0037] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 발모 증진 및 탈모 질환 방지용 식품 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 발모 증진 및 탈모 질환 방지용 화장품 조성물을 제공한다.

[0041] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0042] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] <화학식 1>



[0045]

[0046] 상기 식에서 R1, R2, R3, R4, R5, R6 및 R8은 각각은 독립적으로, H, OH, 탄소수 1 내지 4의 알킬 또는 알콜, 또는 알킬-O-글루코오스이며;

[0047] R7은 할로젠, H, OH, O-알킬, O-알케닐, O-알카이닐, O-알콜, O-카르복실, O-에테르, O-술폰산(-SO₃ H), O-시클로알킬, O-헤테로시클로알킬, 글루코오스, 및 O-글루코오스로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

[0049] 본 발명에서 사용한 용어 "알킬"은 1 내지 4 탄소수를 함유하는 직쇄 또는 측쇄형 알킬기를 포함하는 기 또는 기의 일부분을 기술하기 위해 사용되며; 이러한 기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert 부틸을 포함한다.

[0051] 본 발명에서 사용한 용어 "알케닐"은 2-10개 탄소 원자 (예를 들어, C2-C10)를 가지며, 하나 이상의 이중 결합을 갖는 직쇄 또는 분지된 일가 또는 이가 탄화수소이다. 알케닐의 예로는 비제한적으로, 에틸닐, 프로페닐, 프로페닐렌, 알릴 및 1,4-부타디에닐을 포함한다.

[0053] 본 발명에서 사용한 용어 "알카이닐"은 2-10개 탄소 원자 (예를 들어, C2-C10)를 가지며, 하나 이상의 삼중 결합을 갖는 직쇄 또는 분지된 일가 또는 이가 탄화수소이다. 알카이닐의 예로는 비제한적으로, 에틸닐, 에틸닐렌, 1-프로피닐, 1- 및 2-부티닐 및 1-메틸-2-부티닐을 포함한다.

[0055] 본 발명에서 사용한 용어 "알콜"은 1 내지 4 탄소 원자를 가지는 직쇄 또는 측쇄형 알콜 또는 알콕시기를 기술하기 위하여 사용되며; 이러한 기는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 그들의 알콕시기를 포함한다. 알콕시기의 예로는 메톡시, 에톡시, 이소프로폭시, tert-부톡시를 포함한다.

[0057] 본 발명에서 사용한 용어 "할로젠"은 할로젠족 원자를 나타내며, 불소, 염소, 브롬, 요오드 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 R7은 바람직하게는 염소일 수 있다.

[0059] 본 발명의 상기 프테로신(pterodin) 화합물 및 이의 유도체는 고사리에 존재하는 세스퀴테르페노이드로, 고사리 추출물에서 정제된 것을 특징으로 한다. 또한 본 발명의 프테로신 화합물 및 이의 유도체는 이에 한정되지는 않으나 프테로신 A(pterodin A), 프테로신 B(pterodin B), 프테로신 C(pterodin C), 프테로신 D(pterodin D), 프테로신 J(pterodin J), 프테로신 M(pterodin M), 프테로신 P(pterodin P), 프테로신 S(pterodin S), 프테로신 Z(pterodin Z), 프테로사이드 A(pterodide A), 프테로사이드 A2(pterodide A2), 프테로사이드 B(pterodide B), 프테로사이드 C(pterodide C), 프테로사이드 D(pterodide D), 프테로사이드 N(pterodide N), 프테로사이드 P(pterodide P), 프테로사이드 Z(pterodide Z), 또는 황산화 프테로신 C(sulfated Pterodin C)일 수 있으며, 바람직하게는 본 발명의 표 1에 기재된 프테로신 화합물 또는 유도체일 수 있다.

[0060] 또한 본 발명의 프테로신 화합물은 비방향족 이중 결합 및 하나 이상의 비대칭 중심을 가질 수 있으며, 이들은 라세미체 및 라세미체 혼합물, 단일 거울상이성질체, 개별적인 부분입체이성질체, 부분입체이성질체 혼합물 및 시스- 또는 트랜스-이성질체로서 발생할 수 있고, 이와 같은 모든 이성질체 형태를 포함할 수 있다. 바람직하게는 시스- 또는 트랜스- 이성질체 형태를 포함할 수 있다.

[0061] 예를 들어, 프테로신 C의 이성질체는 (2R,3S)-프테로신 C, (2S,3S)-프테로신 C, (2R,3R)-프테로신 C, (2S,3R)-프테로신 C일 수 있다.

[0062] 프테로사이드 C의 이성질체는 (2S,3R)-프테로사이드 C, (2R,3R)-프테로사이드 C일 수 있다.

[0063] 황산화 프테로신 C의 이성질체는 (2R,3S)-황산화 프테로신 C, (2S,3S)-황산화 프테로신 C일 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 프테로신 화합물 및 이의 유도체는 천연으로부터 분리되거나 당 업계에 공지된 신규한 화합물의

화학적 합성법으로 제조할 수 있다.

- [0065] 바람직하게는 본 발명의 프테로신 화합물 및 이의 유도체는 천연 식물로부터 분리 및 정제할 수 있다. 즉, 종래의 물질을 추출하고 분리하는 방법을 이용하여 식물 또는 식물의 일부로부터 수득될 수 있다. 줄기, 뿌리 또는 잎은 목적하는 추출물을 획득하기 위하여 적절히 건조하여 침연(macerated)하거나, 단지 건조시켜 적절한 유기용매로 추출하고, 목적하는 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 프테로신 화합물 및 이의 유도체는 고사리로부터 분리 및 정제할 수 있다.
- [0066] 상기 고사리는 예컨대, 덴스타티아새(Dennstaedtiaceae) 및 프테리다새(Pteridaceae)일 수 있다. 이러한 식물의 특정 예로는 비제한적으로, 덴스타티아 스캔덴스(Dennstaedtiacandens), 히스티옵테리스 인시사(Histiopteris incisa), 마이크롤피아 스펠운케(Microlepia speluncae), 프테리둠 아퀼리눔 바르. 라티우스쿨룸(Pteridium aquilinum var. latiusculum), 프테리둠 레볼루툼(Pteridium revolutum), 하이폴피스 푼크타타(Hypolepis punctata), 세라토프테리스 탈릭트로이데스(Ceratopteris thalictroides), 프테리스 파우리에이(Pteris fauriei), 프테리스 디미디아타(Pteris dimidiata) 및 프테리스 엔시포르미(Pteris ensiformi)를 포함한다. 이들 식물은 전 세계적으로 분포하며 특히 우라이 타운십(Wulai Township), 타이페이 카운티(Taipei County) 및 마운틴 다툰(Mountain Datun), 타이페이 시티(Taipei City)에서 발견될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 프테로신 화합물 및 이의 유도체는 하기와 같은 단계를 포함하는 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다:
- [0068] (a) 고사리를 물 또는 탄소수 1 내지 4의 유기용매로 추출하는 단계;
- [0069] (b) 상기 (a) 단계에서 얻은 추출물을 에틸-아세테이트 또는 부탄올로 분획화하는 단계;
- [0070] (C) 상기 (b) 단계에서 얻은 에틸-아세테이트 분획 또는 부탄올 분획을 농도구배 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계.
- [0071] 상기 (a) 단계에서 고사리는 식물 전체를 그대로 또는 그 전체를 사용할 수 있으며, 추출효율을 증대시키기 위해 청호의 전체를 분쇄기로 분쇄한 것을 사용할 수 있다. 건조방법으로는 양건, 음건, 열풍건조, 동결건조 및 자연건조 방법을 모두 사용할 수 있다. 바람직하게는 열풍건조 및 동결건조 방법을 사용할 수 있다.
- [0072] 상기 고사리 추출에 사용되는 탄소수 1 내지 4의 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 디클로로메탄 또는 석유에테르일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 고사리를 물로 추출하였다.
- [0073] 상기 (b) 단계에서는 상기 (a) 단계에서 수득한 추출물을 분획화하는 단계로 에틸-아세테이트 또는 부탄올을 이용하여 분배 추출한다.
- [0074] (b) 단계에서 수득한 에틸-아세테이트 분획 내지 부탄올 분획을 농도구배 크로마토그래피로 분리한다. 상기 크로마토그래피로는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina) 등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 고속액체크로마토그래피(HPLC)등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 (b) 단계에서 수득한 분획들 중에서 에틸-아세테이트 분획 또는 부탄올 분획을 실리카겔 컬럼에 적용하고, 용출용매의 조성을 조절하여 극성을 점차 높여가면서 다양한 분획을 얻을 수 있다. 상기과 같은 과정에서 얻은 분획들 중에서 활성을 가진 분획을 다시 용출용매의 조성을 조절하여 극성을 점차 높여가는 농도구배 실리카겔 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 그러나 화합물의 추출 및 분리정제 방법은 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 상기 (c) 단계에서는 상기 (b) 단계에서 얻은 에틸-아세테이트 분획 또는 부탄올 분획을 농도구배 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계이다.
- [0076] 상기 크로마토그래피로는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina) 등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 고속액체크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 고속액체크로마토그래피를 이용하여 신규한 화합물을 분리 및 정제할 수 있다.
- [0077] 이들 화합물을 분리하는데 이용되는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Takahashi et al., Phytother. Res, 2004, 18, 573, Sheridan et al, Planta Med., 1999, 65, 271, Nagao et al., Mutation Research, 1989, 215, 173, Murakami et al., Chem. Pharm. Bull, 1976, 24, 2241, and Kuraishi et

al., Chem. Pharm. Bull, 1985, 33, 2305] 참조. 이들 화합물은 또한 화학 합성법에 의해 제조될 수 있다. 비 천연 발생 프테로신 화합물은 천연 발생 화합물로부터 전환되거나 (예를 들어, 문헌 [Banerji et al., Tetrahedron Letters, 1974, 15, 1369, Hayashi et al., Tetrahedron Letters, 1991, 33, 2509, and Morris et al., J.Org. Chem., 1992, 57, 6876] 참조), 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 새로 합성될 수 있다.

[0078] 상기 프테로신 화합물을 합성하는데 유용한 합성 화학 변환 및 보호기 방법 (보호 및 탈보호)은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers(1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); and L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) and subsequent editions thereof]에 기술되어 있다.

[0079] 본 발명의 일실시예에서 고사리 5kg으로 30L 열수 추출한 다음, 열수추출물을 먼저 에틸아세테이트(ethyl acetate, EA)를 첨가하고, 잘 혼합하여 추출하였다. 그 다음 에틸아세테이트 추출물을 DMSO에 녹인 후 물로 희석하여 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 7개 분획으로 나누었다. 나눈 분획은 HPLC로 분석하여 화학식 1의 프테로신 화합물 및 그 유도체들을 추출하였다. 다음 열수추출물에 부타놀(butanol)을 첨가하고 잘 혼합하여 추출하였다. 그 다음 부타놀 추출물을 DMSO에 녹인 후 물로 희석하여 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 9개의 분획으로 나누었다. 나눈 분획은 HPLC로 분석하여 본 발명의 화합물들을 추출하였다 (실시예 1 참조).

[0081] 본 발명의 상기 탈모질환은 두피의 모발이 소실되는 질환으로서 장년기 이상의 남성에게 많이 나타난다. 본 발명의 탈모질환의 구체적인 예는 이에 한정되지 아니하나, 남성형 탈모증, 여성형 탈모증, 원형 탈모증, 전두 탈모증, 전신 탈모증, 모발생성 장애 질환, 휴지기 탈모증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 일 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

[0084] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0085] 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다.

[0086] 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.

[0087] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0088] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

[0089] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

[0090] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 젤제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다.

[0091] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수

있다.

- [0092] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.
- [0093] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1 당 약 0.01 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설물 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0095] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체는 발모 증진 및 탈모 방지를 위한 목적으로 식품 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0096] 본 발명에 따른 프테로신 화합물 또는 이의 유도체를 이용한 식품용 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형들은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0097] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 식품용 조성물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한 본 발명의 식품용 조성물은 체지방 감소, 콜레스테롤 개선, 혈압강하의 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0098] 또한 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예를 들어 과일 통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예를 들어 햄, 소시지콘비프 등), 빵류 및 면류(예를 들어 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예를 들어 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예를 들어 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 식품용 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0099] 본 발명에 따른 식품용 조성물의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 총 중량 중 0.01 내지 50 중량% 이다. 본 발명의 식품용 조성물을 식품첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0100] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 글루코오스, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100mL당 일반적으로 약 0.01-0.04g, 바람직하게는 약 0.02-0.03g 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0101] 본 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0103] 본 발명의 상기 "치료"는 탈모 관련 질환의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 이러한 질환을 치유하거나, 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시키는 것을 포함할 수 있으며, 탈모 관련 질환으로부터 비롯된 한 가지 증상 또는 대부분의 증상을 완화시키거나, 치유하거나 예방하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0105] 본 발명의 상기 "증진"은 발모기능을 보다 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 발모기능과 관련된 능력, 바람직하게는 탈모 방지 혹은 발모를 개선시키는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0107] 본 발명의 조성물에 사용되는 프테로신 유도체들은 고사리 유래의 모든 프테로신 유도체들을 포함한다. 야생형(wild type)의 프테로신 유도체들을 포함하여, 세포내에서 탈모 방지 및 발모 개선 기능을 하는 한, 화학기의 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 프테로신의 유도체를 포함한다.
- [0109] 프테로신의 유도체란 야생형의 구조식과 하나 이상의 화학기가 상이한 화학적 유도체를 의미한다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 원자의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능할 수 있다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 원자로 이루어지나, 일부의 경우에는 결사슬(side chain) 중 하나가 결실될 수 있는 것과 같이 보다 큰 결실 또한 가능할 수 있다. 이런 유도체는 당해 분야에 공지된 화학적 합성방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989). 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 화학적 유도체에서의 화학기 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(Ref.). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 화학기 간의 교환이다.
- [0111] 또한, 프테로신은 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.
- [0113] 상기 유도체는 천연 화합물과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이나, 필요에 따라서는 약효의 극대화 및 부작용의 최소화를 위해 이의 화합물의 특성을 변형시킨 유도체일 수 있다. 바람직하게는 결사슬의 변이와 수식에 의해서 화합물의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 체내 흡수율이 증가하거나 생리 활성이 증가한 화합물이다.
- [0115] 프테로신 유도체들은 당해 기술분야에 널리 공지된 방법으로 고사리를 비롯한 천연에서 추출 및 정제하여 얻을 수 있다. 달리는, 프테로신의 구조식이 밝혀져 있으므로 화학적으로 합성하여 얻을 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당해 기술분야에 널리 공지된 화합물 합성법을 이용하여 얻을 수 있다.
- [0117] 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구용 액상차 또는 도포제로 제형화할 수 있다.
- [0118] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구 방식으로 투여할 수 있으며, 용량은 하루에 0.001 μ g~10mg/kg의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0120] 또한, 본 발명에 따른 경구투여제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 경구투여제를 제조함에 있어서는 일반적인 정제, 캡슐, 젤리 등의 베이스에 본 발명의 고사리 열수추출물 혹은 프테로신 유도체들을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [0122] 또한, 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 국소적용(topical application) 할 수 있으며, 용량은 하루에 0.001 μ g~10mg/kg의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0124] 또한, 본 발명에 따른 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 고사리 열수추출물 혹은 프테로신 유도체 등을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [0126] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 프테로신 화합물 또는 이의 유도체는 발모 증진 및 탈모 방지를 위한 목적으로 화장료 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0128] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제,

킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0129] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[0130] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0131] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리이미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0132] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0133] 본 발명의 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, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0135] 따라서, 본 발명은 프테로신 화합물 및 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법은 고사리에서 추출한 프테로신 화합물 및 이의 유도체를 이용하여 탈모 질환을 치료하기 위한 치료제, 발모 증진 및 탈모 질환 방지를 위한 식품, 화장품 등을 제공하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0137] 도 1은 고사리 열수추출물에서 프테로신 유도체들을 분리 정제한 흐름도이다.

도 2는 프테로신 유도체들의 구조이다.

도 3 내지 도 5는 음성대조군(중류수 투여군), 양성대조군(5% 미녹시딜 투여군), 고사리 열수추출물 투여군, 프테로사이드 N(pterostide N) 등 프테로신 유도체 투여군 각각이 체모한 C57BL/6 마우스의 모발 성장에 미치는 효과를 기간별로 비교한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0138] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0139] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실험방법>

실험 기구

[0143] ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼은 중수소 클로로포름(CDC13), 메탄올(CD3OD), 디메틸 술폭 시드(DMSO-d8)로 ¹H NMR로 700 MHz에서, ¹³C NMR로 175MHz에서 Bruker Ascend III 700 분광계(Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)를 이용하여 측정하였다.

[0144] 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔(70-230 메쉬; Merk, Darmstadt, Germany), RP-18(40-63mm; Merk) 및 Sephadex

LH-20(20-100mm; Sigma, St. Louis, MO, USA)로 실시되었다. 얇은 층 크로마토그래피(TLC)는 Kiesel gel 60 F254 plates(0.25 mm; Merck) 및 25 RP-18 F 254s plate(5 -10 cm, Merk)로 미리 코팅된 상태로 실시하였다. 분무 시약은 50% H₂ SO₄ 였다. 컬럼 크로마토그래피에 사용된 모든 화학 물질 및 용매는 시약 등급 내이며 구입하여 수령한 그대로 사용하였다.

[0146] MTT assay

[0147] 쥐 glial cell C6, 마우스 섬유아세포주 NIH3T3 세포를 1 X 10³ cells/well의 농도로 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM를 포함하는 96 well plate에서 5% CO₂, 37℃에서 배양하였다. 화합물(pterodin A, pterodin B, pterodin C, pterodin D, pterodin P, pterodin Z, pteridine A, pteridine A2, pteridine B, pteridine C isomers, pteridine D, pteridine N, pteridine P, pteridine Z)을 각각 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 그 후 MTT(0.5mg/ml PBS) 100 μL를 투여한 후, 2시간 배양하였다. 그 후 각 well에서 배지를 제거하고 100 μL의 DMSO를 가하였다. 10분간 배양 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader; SPCTRA MAX 340PC, Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 생존한 세포의 수를 나타내는 지표로서 하단의 식으로 계산되며, 3회의 실험으로 재현성을 확인하였다.

[0148] 세포 증식율(%)=OD550(sample)/OD550(control)

[0150] <실시예 1>

[0151] 고사리 열수추출물 제조 및 프테로신 유도체 정제

[0152] 고사리 뿌리줄기(rhizome)를 100℃에서 물에 48시간 끓인 후 고형성분을 제거하여 고사리 열수추출물을 얻었다.

[0153] 고사리 열수 추출물을 에틸아세테이트(ethyl acetate)와 부탄올(butanol)을 이용하여 추출한 뒤, 7개의 분획으로 분리하였고, 각 분획에서 HPLC 방법을 이용하여 프테로신 화합물 및 신규 화합물을 분리하였다.

[0154] 구체적으로, 고사리 추출물은 전라남도 남원시에서 구입한 고사리 뿌리줄기 5kg을 깨끗이 씻은 후 물 30L를 첨가하여 48시간 끓인 후 냉장보관한 것을 열수 추출물로 사용하였다. 열수 추출물에 동일한 부피의 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EA)를 첨가하고 잘 혼합한 후, EA 층을 rotary evaporator로 건조하여 EA 추출물로 사용하였다. EA 추출물을 최소량의 DMSO에 녹인 후 물로 희석하였는데, 이때 희석 배수는 수율을 대략 70%로 예상하여 열수 추출물 원래 부피의 70%까지 희석하였다.

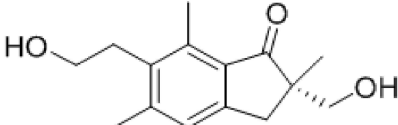
[0155] EA 추출물을 실리카겔(silica gel) 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 이용하여 클로로포름(CHCl₃)과 메탄올 조건으로 7개의 분획으로 나누었다. 그 다음 각각의 분획물을 Prep-HPLC로 분석한 결과, 분획물 2, 4, 5, 6, 7에서 도 1과 같이 프테로신 및 그 유도체들을 추출할 수 있었다. 추출하는 과정은 도 1에 나타내었다.

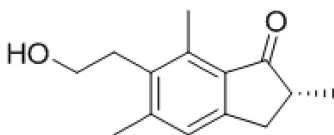
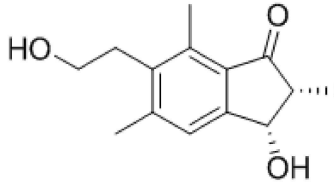
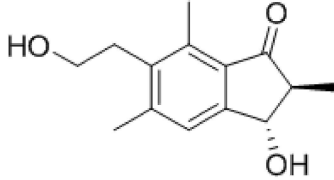
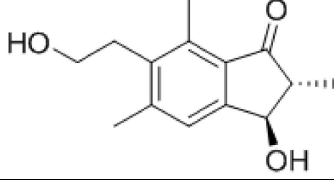
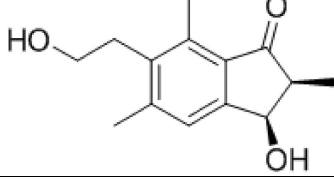
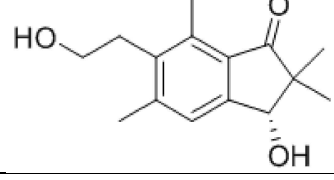
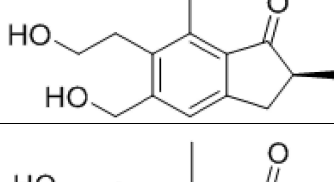
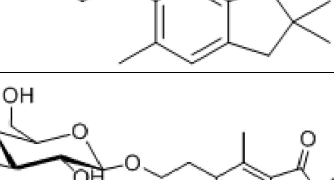
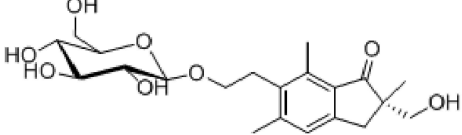
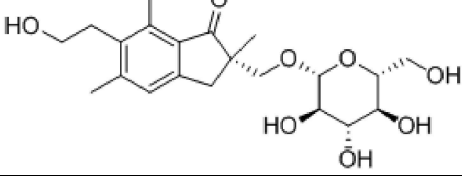
[0156] 또한, 열수 추출물을 EA로 추출하고 남은 추출물에 동일한 부피의 부타놀을 첨가하고 잘 혼합한 후, 부타놀 층을 rotary evaporator로 건조하여 Bu 추출물로 사용하였다. Bu 추출물을 최소량의 DMSO에 녹인 후 물로 희석하였는데, 이때 희석 배수는 수율을 대략 70%로 예상하여 열수 추출물 원래 부피의 70%까지 희석하였다.

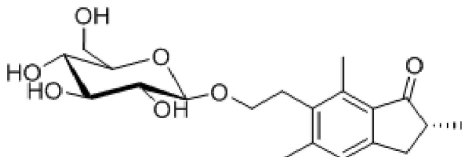
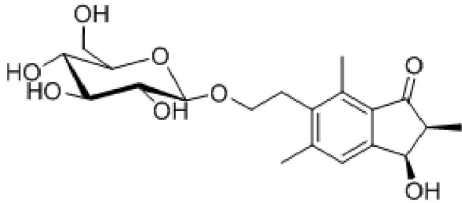
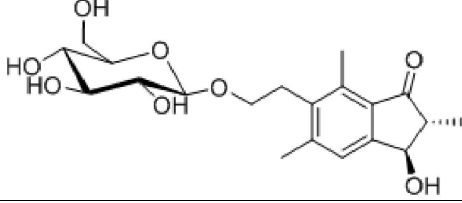
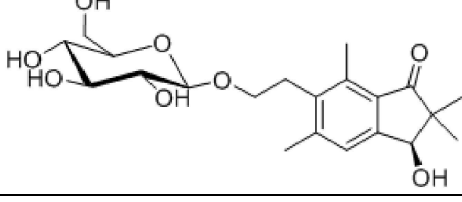
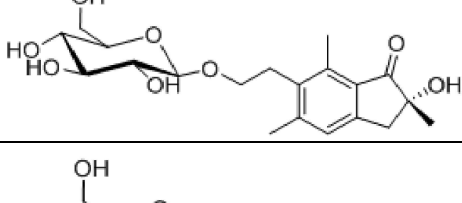
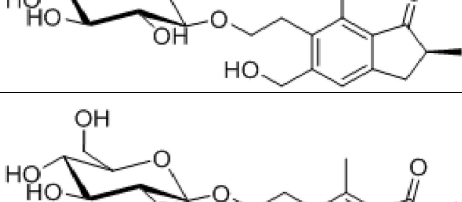
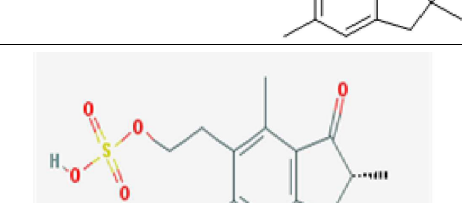
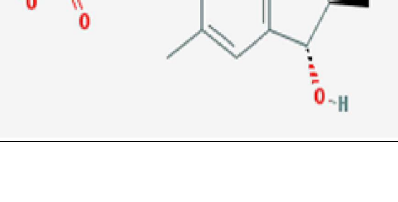
[0157] Bu 추출물을 실리카겔(silica gel) 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 이용하여 클로로포름(CHCl₃)과 메탄올 조건으로 9개의 분획으로 나누었다. 그 다음 각각의 분획물을 Prep-HPLC로 분석한 결과, 분획물 6에서 표 1과 같이 프테로신 유도체들을 추출할 수 있었다. 추출하는 과정은 도 1에 나타내었다.

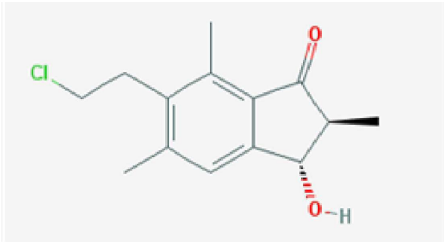
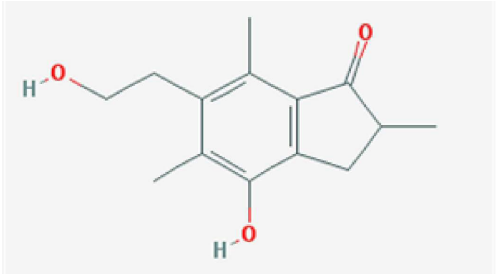
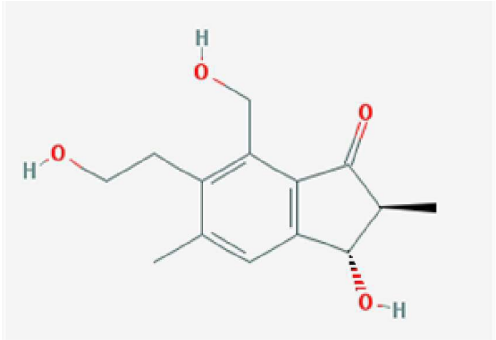
[0158] EA-2 분획물 및 Bu-6 분획물에서 단일 화합물을 분리하기 위한 HPLC의 조건은 도 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

화합물(도 1 comp.)	구조식	명칭
1(comp.2)		(2S)-pterodin A

2(comp.3)		(2 <i>R</i>)-pterosin B
3		(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-pterosin C
4		(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-pterosin C
5(comp.5)		(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-pterosin C
6(comp.4)		(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-pterosin C
7(comp.6)		(3 <i>R</i>)-Pterodin
8(comp.7)		(2 <i>S</i>)-pterosin P
9(comp.8)		pterodin
10(comp.9)		(2 <i>S</i>)-pteroside A
11(comp.10)		(2 <i>S</i>)-pteroside A ₂

12(comp. 11)		(2 <i>R</i>)-pteroside B
13(comp. 12)		(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-pteroside C
14(comp. 13)		(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-pteroside C
15(comp. 14)		(3 <i>S</i>)-pteroside D
16(comp. 15)		(-)-pteroside N
17(comp. 16)		(2 <i>S</i>)-pteroside P
18(comp. 17)		pteroside Z
19		(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)-sulfated pterosin C
20		(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-sulfated pterosin C

21		pterodin J
22		pterodin M
23		pterodin S

<실시예 2>

화합물들의 세포독성 평가 (MTT assay)

본 발명의 화합물들이 세포에 독성 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

상기 실험방법에 기재된 바에 따라 C6(rat glial cell), NIH3T3(mouse embryo fibroblast cell-line)를 96웰 플레이트에 배양한 뒤 각 화합물을 농도별로 세포 배지에 첨가하고 48시간 동안 배양한 뒤 MTT를 투여한 뒤, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 생존한 세포의 수를 나타내는 지표로서 하단의 식으로 계산되며, 3회의 실험으로 재현성을 확인하였다.

세포증식율(%)=OD550(sample)/OD550(control)

그 다음 세포 증식율의 변화에 근거하여 LD50(Lethal Dose 50)값을 산출하였다.

그 결과 표 2에 나타난 바와 같이, NIH3T3에서 pterodin Z의 LD50값이 $553 \pm 37 \mu\text{M}$ 로 가장 낮은 것으로 나타났으며, 이를 제외하고 다른 화합물의 LD50값은 $5000 \mu\text{M}$ 초과인 것으로 나타났다.

이를 통해, pterodin Z(화합물 9)은 약한 세포 독성이 있으며, 그 외 화합물은 정상 세포에서 세포 독성이 거의 없는 것을 확인할 수 있었다.

표 2

Compounds	LD ₅₀ (μM)Based on MTT Assay	
	C6	NIH3T3
(2S)-Pterodin A	>5,000	>5,000
(2R)-Pterodin B	>5,000	>5,000

(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Pterosin C	>5,000	>5,000
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-Pterosin C	694 ± 9.7	>5,000
(3 <i>R</i>)-Pterosin D	>5,000	>5,000
(2 <i>S</i>)-Pterosin P	>5,000	>5,000
Pterosin Z	1,850 ± 65	553 ± 37
(2 <i>S</i>)-Pteroside A	>5,000	>5,000
(2 <i>S</i>)-Pteroside A ₂	>5,000	>5,000
(2 <i>R</i>)-Pteroside B	>5,000	>5,000
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Pteroside C	>5,000	>5,000
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-Pteroside C	>5,000	>5,000
(3 <i>S</i>)-Pteroside D	>5,000	>5,000
(2 <i>S</i>)-Pteroside P	>5,000	>5,000
Pteroside Z	2,130 ± 62	>5,000

[0175] <실시예 3>

[0176] **발모 조성물의 전임상 효능평가**

[0177] **동물실험윤리위원회(IACUC) 심의**

[0178] 본 전임상 연구는 고려대학교 의과대학 동물실험윤리위원회 (EROM IACUC)로부터 동물실험계획서에 대하여 실험 동물을 이용한 연구의 적합성과 윤리성에 대하여 심사승인을 득한 후 수행하였다(IACUC No.: Korea-2016-0126-C1).

[0180] **발모 조성물의 제조**

[0181] 실험에 사용된 고사리(Pteridium aquilinum) 뿌리줄기(rhizome)는 전라북도 남원시에서 국내산으로 확인된 원료를 입수하여 사용하였다. 입수한 원료 5kg을 30L의 청정수에 48시간 100℃에서 가열하였다. 이와 같이 제조된 고사리 열수추출액에서 도 1의 흐름도에 제시된 방법으로 프테로신 유도체들을 분리 정제하여 시험에 사용하였다.

[0183] **실험동물의 입수 및 관리**

[0184] 6주령의 웅성 C57BL/6 mouse (Orient Co., Ltd, Korea)를 입수하여 1주간 사육환경에서 식이적응을 시켰다. 모든 실험동물은 open-lid cage (Jeongdo Industry Co., Ltd, Korea)내에 bedding (Lignocel, JRS Co., Germany)을 깔아 사육하였으며, 사육 기간 중 먹이는 시판 실험동물사료(Purina, Switzerland)와 정수된 수돗물을 급수병에 담아 자유급여 (ad. libitum) 하였다. 사육환경은 Clean Animal Rack (Jeongdo Industry Co., Ltd, Korea) 내에서 평균온도 25 ± 1℃, 상대습도 45 ± 5% 및 auto-timer를 이용하여 12시간의 일조시간을 유지시키며 사육하였다.

[0186] **실험동물의 제모 및 시료의 처리**

[0187] 1주일간의 식이적응을 마친 후 실험동물을 4마리씩을 한 군으로 하여 실험군을 분류하였다. 모든 모낭 (follicle)이 휴지기(telogen stage)에 들어가는, 생후 7주령에 마우스의 등을 동물용 가위로 조심스럽게 면도

한 후 시중 약국에서 구입한 80% thioglycolic acid 주성분의 제모제(Niclean, Ildong Co., Ltd, Korea)를 처리하여 모근의 털을 완전히 제거하였다. 제모 1일 후 실험동물 배부의 피부가 선홍색으로 털이 완전히 제거된 것을 확인 한 후 각각의 실험 시료를 도포하였다. 실험 시료는 음성대조군(Negative Control, NC)은 추출물 시료의 용매와 같은 distilled water, 양성대조군(Positive Control, PC)으로 의약품으로 판매되는 5% minoxidil 주성분의 발모제(Minoxil, Hyundai Pharm. Co., Ltd, Korea)와 실험물질로 고사리 열수추출물 및 프테로신 유도체들을 용액으로 제조하여 2주간 도포하였다. 매일 3회 각각의 실험군들에 증류수, 5% 미녹시딜, 15%(w/v) 고사리 열수추출액, 10 μ M 프테로사이드 N, 10 μ M pteroside A, 10 μ M (2S)-pterostide A2, 10 μ M (2R,3R)-pterostide C, 10 μ M pterostin B로 각각 처리하였다. 각 0일, 7일, 14일 경과 시에, 각 실험군의 모발 성장 상태를 육안으로 비교하였다.

[0189] 예비실험 결과 각 화합물들의 발모효과의 강도가 상이하여 유사한 발모효과를 나타내는 범위에 해당하는 투여량으로 각 화합물들의 투여 농도를 조정하였다. 각각의 시료별로 도포되는 총 부피는 1일 100 μ L 씩 3회 총 300 μ L로 모두 동일하였다. 도포는 0.1 mL 주사기로 제모한 등쪽 피부에 각 화합물 용액을 투여한 후 수술용 장갑을 낀 손가락으로 제모한 피부 전체에 균일하게 도포하였다.

[0191] 육안관찰 및 사진관독

[0192] 대조물질 및 실험물질의 도포에 따른 양모와 육모효과를 관찰하기 위하여 양모기간 중 매일 육안관찰 및 1주일 간격으로 사진촬영을 하였다. 실험 종료 후 실험동물을 CO₂ 로 도태시켰다. 각 주간에 촬영된 사진을 육안적으로 판단하여 제모된 배부 피부의 발모상태에 따라 0%(-), 0~20%(+), 20~40%(++), 40~60%(+++), 60~80%(++++), 및 80~100%(+++++)의 척도로 하여 실험 물질의 도포에 따른 전반적인 양모 및 육모효과를 평가하였다. 검은 색 소침착(black pigmentation)이 나타나면, 모발 모낭이 휴지기(telogen phase)에서 성장기(anagen phase)로 전이됨의 증거가 될 수 있다.

[0194]통계학적 분석

[0195] 모든 결과 값은 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS(version 12.0, SPSS Inc., USA) 프로그램을 사용하였으며, 각 처리 시점간의 평균에 대한 유의성을 검정하기 위하여 대응표본 T-검정(paired t-test)을 수행하여 분석하고, p value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0197]결과

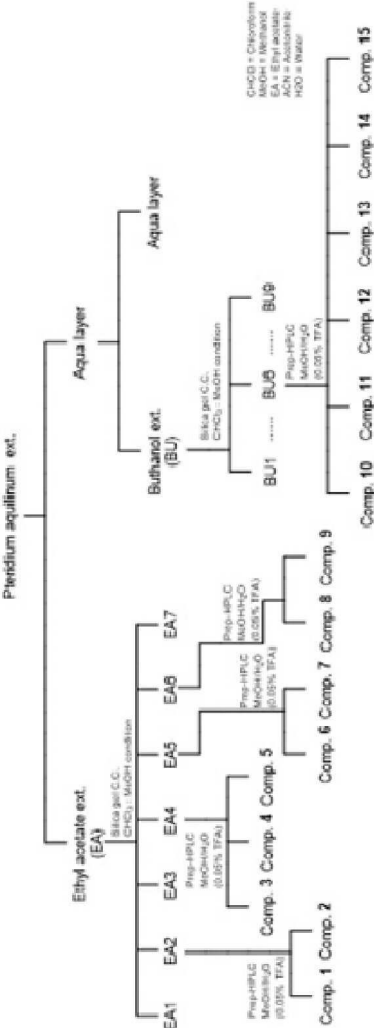
[0198] 제모 후 1일 후 실험동물의 배부는 선홍색으로 모근이 휴지기(telogen) 상태에 접어든 것으로 확인하였으며, 제모크림 처리에 따른 상처(scratch)가 모든 실험동물에서 나타났으나 1주 내에 모두 사라졌다. 등쪽 피부의 색은 국소 처리 후 1주일 내에 변화하기 시작하였다. 음성대조군(NC)의 피부는 선홍색으로 남아 있어서 모근이 아직 휴지기(telogen) 상태인 것으로 판단되었으나, 이에 비하여 나머지 5% minoxidil 처리군(PC)과 고사리 열수추출물 혹은 프테로신 유도체 처리군은 피부색이 짙은 청색으로 변하여 모근이 성장기(anagen)에 접어든 것으로 판단되었다. 음성대조군(NC)와 나머지 5% minoxidil 처리군(PC)과 고사리 열수추출물 혹은 프테로신 유도체 처리군의 등쪽 피부의 짙은 청색 변화의 정도에는 육안적으로 큰 차이가 없었다. 실험물질 도포 1주 후에는 늦게 성장기(anagen)에 들어선 음성대조군(NC)에 비하여 5% minoxidil 처리군(PC)과 고사리 열수추출물 혹은 프테로신 유도체 처리군이 두드러진 모발의 성장을 나타내었다. 실험물질 도포 2주째에 각 실험군의 발모효과가 육안적으로 확연히 차이가 나서, 음성대조군(NC)은 약 10%(+) 정도의 모발 성장을 나타내는데 대하여 PC 및 고사리 열수추출물 혹은 프테로사이드 N 군은 훨씬 길고 많은 모발 성장이 관찰되었으며(++++), 고사리 열수추출물 혹은 프테로사이드 N 유도체군과 PC군 간에는 차이를 보이지 않았다. 프테로사이드 A, 프테로사이드 A2, 프테로사이드 C도 강한 발모 효과를 나타내었으며(++), 프테로신 B(++)는 약한 발모효과를 나타내었다(도 3 내지 도 5).

산업상 이용가능성

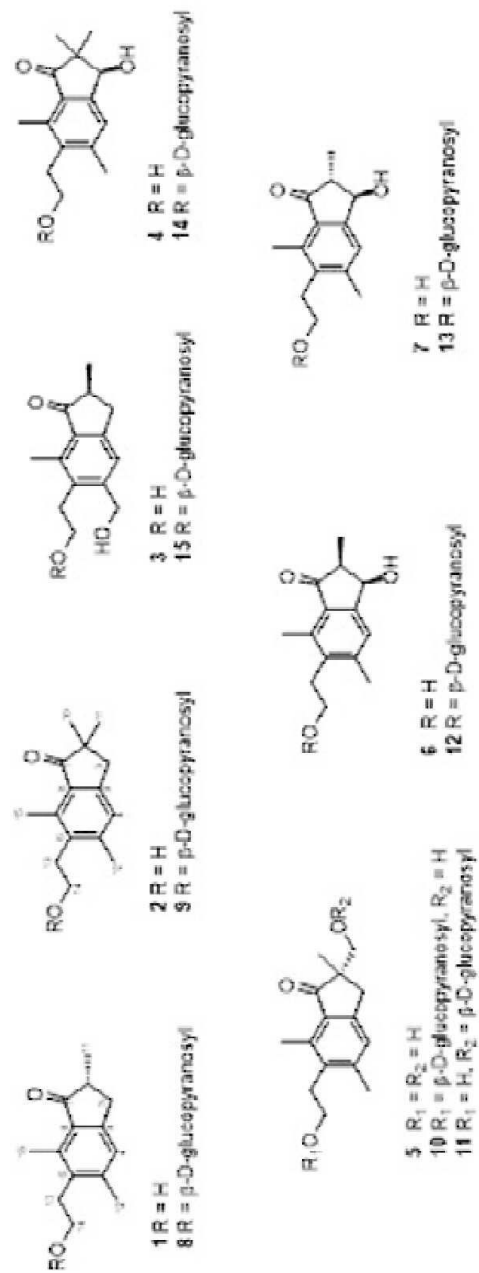
[0200] 이상 살펴본 바와 같이 본 발명은 프테로신 화합물 및 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 탈모 질환을 치료하기 위한 치료제, 발모 증진 및 탈모 방지를 위한 식품, 화장품 등을 제공하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

도면

도면1



도면2



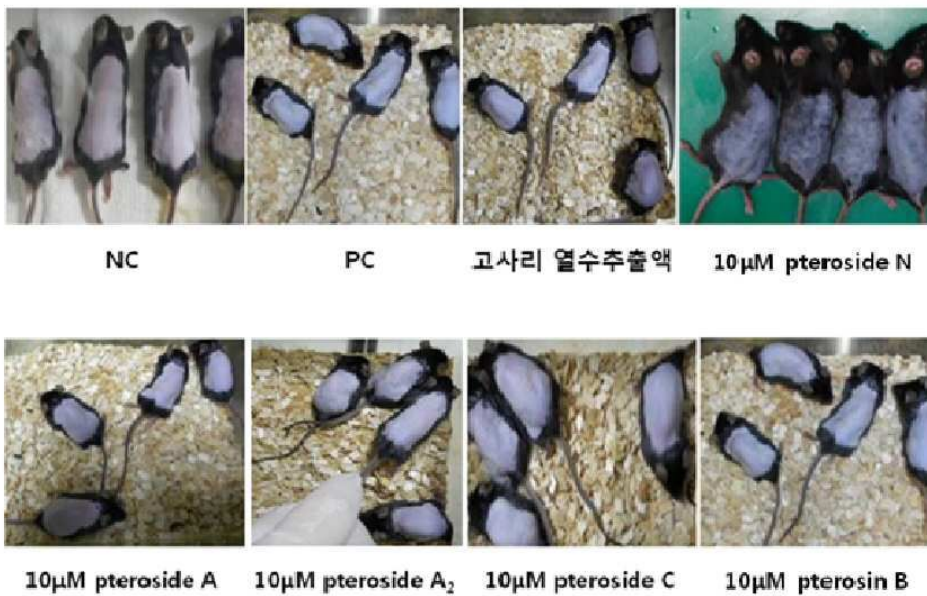
도면3

Day 1



도면4

Day 7



도면5

Day 14



NC



PC



고사리 열수추출액



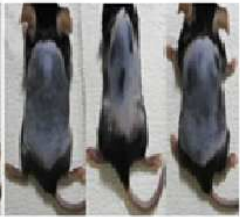
10μM pteroside N



10μM pteroside A



10μM pteroside A₂



10μM pteroside C



10μM pterosin B