



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월14일
(11) 등록번호 10-1419213
(24) 등록일자 2014년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/49 (2006.01) A61K 8/30 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0057518
(22) 출원일자 2013년05월22일
심사청구일자 2013년05월22일
(56) 선행기술조사문헌
US20030191145 A1
KR1019960009427 B1
KR101216949 B1

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김은기
서울특별시 양천구 목동서로 38 목동1단지아파트 131동 506호
이향복
인천광역시 남동구 석산로 35 풍림아이원아파트 108동 2003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

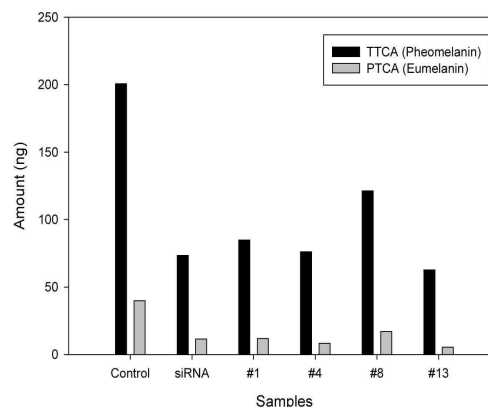
심사관 : 염금희

(54) 발명의 명칭 메틸 5-시아노-6- {[2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐} -2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 피부 미백용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 우수한 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내는 메틸 5-시아노-6- {[2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐} -2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 (methyl 5-cyano-6- {[2-(4-methoxyphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-2-methyl-4-(2-thienyl)-1,4-dihydro-3-pyridinecarboxylate) 화합물은 세포 독성이 거의 없으므로, 피부 미백용 화장품 조성물, 식품 조성물 및 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

비비크

인천광역시 남구 인하로 100 인하대학교 생물공학과

호앙구엔

베트남 호치민시 탄푸구 후인 반 못 30/15

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A103017

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 글로벌코스메틱연구개발사업단

기 여 율 1/1

주관기관 (재)대한화장품산업연구원

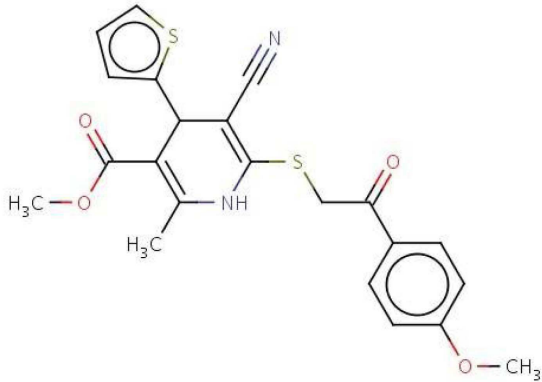
연구기간 2012.11.01 ~ 2013.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

[화학식 1]



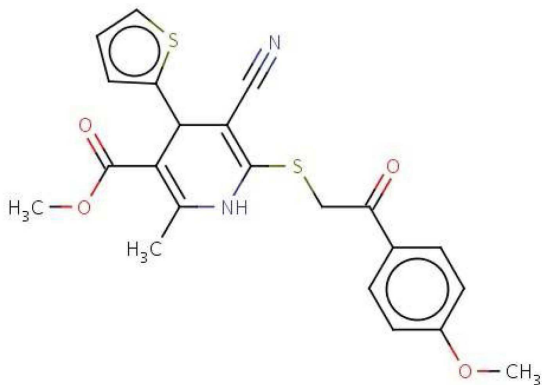
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 피부외용연고, 크림, 유연화장수, 영양화장수, 팩, 에센스, 헤어토닉, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 트리트먼트, 젤, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드 크림, 파운데이션, 영양에센스, 선스크린, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디 로션 및 바디 클렌저로 이루어지는 군으로부터 선택된 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 식품 조성물.

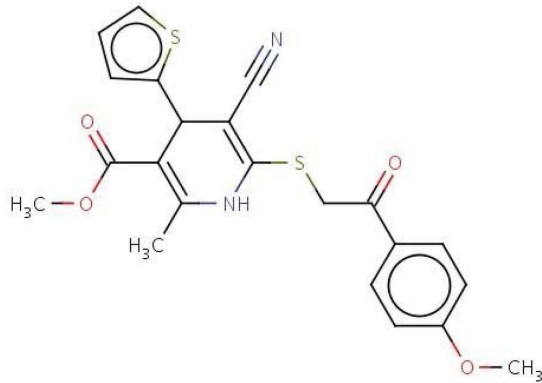
[화학식 1]



청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학 조성물.

[화학식 1]



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 피부 미백용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 메틸 5-시아노-6-([2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐)-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물, 식품 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 사람의 피부색은 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트의 활동성, 혈관의 분포, 피부의 두께 및 카로티노이드, 빌리루빈 (bilirubin) 등의 인체 내외의 색소 함유 유무와 같은 여러 요인에 의해 결정된다. 그 중에서도 멜라노사이트에서 형성되는 멜라닌이라는 색소가 피부색 형성에 가장 중요한 요소로 받아들여지고 있다. 멜라닌은 티로신이 티로시나아제에 의해 3,4-디하이드록시페닐알라닌, 도파퀸, 류코도파크롬, 도파크롬, 5,6-디하이드록시인돌 및 인돌-5,6-퀴논을 거쳐 최종적으로 멜라닌으로 변환되는 산화 과정의 최종 생성물이다. 즉, 티로신 및 티로시나아제는 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 단백질로 작용한다.

[0003] 또한, 멜라닌 형성을 위해 중요한 다른 단백질은 P 단백질이다. 이러한 P 단백질은 황색/적색 색소 침착을 유발하는 페오멜라닌 (pheomelanin)보다, 갈색/흑색의 색소 침착을 유발하는 유멜라닌 (eumelanin)의 생성에 필요하며 (Lamoureux *et al.*, *Pigment Cell Res.* 8:263-70, 1995), 티로신의 운반 및 멜라노솜 (melanosome) 내 pH를 조절하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 그러나 P 단백질이 피부, 모발 및 눈에서 정상적인 양의 멜라닌을 생성하기 위해 결정적인 역할을 수행한다는 것은 알려져 있지만, 이 과정에서 P 단백질의 정확한 기능은 아직 규명되지 않은 상태로 남아있다.

[0004] 이처럼 멜라닌 생합성은 매우 복잡한 과정으로 아직까지 멜라닌 합성을 유도하는 정확한 메커니즘이 무엇인지에 대해서는 자세히 밝혀지지 않고 있다. 멜라닌은 유해한 자외선에 대한 자연적 방어 역할을 제공하지만 멜라닌이 과잉 생산되는 경우 기미, 주근깨 등의 과다 색소침착을 유발한다. 또한, 과도한 자외선 노출로 인한 멜라닌의 과잉 생성은 심하게는 피부암을 유발하기도 한다. 따라서, 멜라닌 생합성 저해 물질 개발의 필요성이 증가하고 있으며, 미백에 관련된 연구도 활발하게 이루어지고 있다.

[0005] 피부의 색소 침착을 억제하여 미백 효과를 나타내는 물질로 알부틴, 테옥시알부틴, 옥타데센다이온산, 공액 리놀레산, 니아신아미드, 하이드로퀴논, 코지산, 글루타치온, 아젤라인산 등의 유효성분들이 알려져 있다. 상기과 같은 물질들은 티로시나아제 저해 활성을 갖는 것으로 알려져 있고, 실제로 미백 제품들에 사용되어 왔다. 그러나 상기 유효 성분들은 불충분한 미백 효과, 피부에 대한 안전성 문제, 제형 제작의 난이성 및 안정성 문제 등으로 인해 그 사용이 제한되고 있다. 따라서, 본 발명자들은 미백 효과가 우수하며, 안정성 및 피부 안전성이 높은 화합물을 화장품 조성물로 제공하고자 한다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제0841276호에는 '미백 활성이 우수한 백삼 에틸아세테이트 분획물을 함유하는 피부 미백용 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1216949호에는 '미백 활성을 가지는 신규 코지산 유도체, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 미백 화장품 조성물'이 개시되어 있다. 그러나 본 발명에서와 같이 메틸 5-시아노-6-([2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐)-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 화합물을

유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 메틸 5-시아노-6-([2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐)-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트를 멜라닌 세포 (melan-a murine melanocyte)에 처리한 결과, 우수한 멜라닌 생성 억제 효과가 나타나며, 20 μ M 이상의 농도에서도 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 메틸 5-시아노-6-([2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐)-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물, 식품 조성물 및 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 메틸 5-시아노-6-([2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐)-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 화합물은 멜라닌 생성 억제 효과가 우수하고 세포 독성이 거의 없으므로, 피부 미백용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 멜라닌 생성 억제 효과를 분석하기 위해 선발한 화합물을 5, 10 및 20 μ M 농도로 멜라닌 세포에 처리한 후, 멜라닌 생성 및 세포 생존도에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

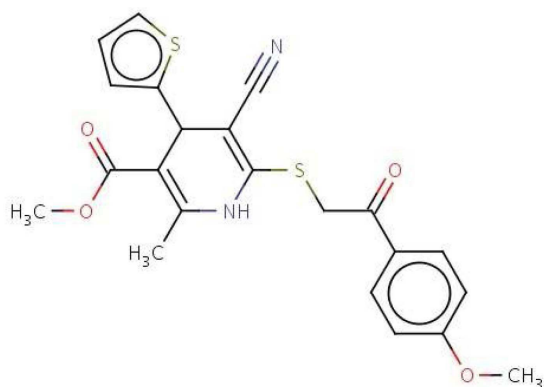
도 2는 멜라닌 생성 억제 효과가 우수한 화합물의 처리가 멜라닌 세포의 티로시나아제 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 멜라닌 세포에 멜라닌 생성 억제 효과가 우수하고 세포 독성이 낮은 화합물을 처리했을 때 생성되는 페오멜라닌 (pheomelanin) 및 유멜라닌 (eumelanin) 함량을 HPLC로 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

화학식 1



[0012]

[0013] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 메틸 5-시아노-6-([2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐)-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트 (methyl 5-cyano-6-([2-(4-methoxyphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl)-2-methyl-4-(2-thienyl)-1,4-dihydro-3-pyridinecarboxylate)인 것이 바람직하다.

[0014] 미백 성분을 실제 피부에 적용시, 우수한 미백 효과를 발휘하기 위해서는 저농도에서 고활성의 피부 미백 효과

를 나타내고, 피부를 투과하여 흡수되는 능력이 우수하고, 미백 효과를 나타내기에 충분한 시간 동안 머무를 수 있도록 휘발성이 낮고, 조성물이나 피부 상에서 활성 성분이 안정하게 유지되고, 의약이나 화장품으로의 제형화가 용이하며, 또한 피부에 안전한 것이 바람직하다. 그러나 공지의 미백 성분 중 상기 특성을 모두 만족시키는 미백 성분은 흔치 않다. 예를 들어, 몇몇 미백 성분들은 시험관 내 실험에서는 저농도에서도 미백 활성이 우수하나, 피부를 투과하여 흡수되는 능력이 떨어져 실제 피부에 적용하기 어렵다. 또 다른 미백 성분들은 친수성이 낮아 화장품이나 의약품으로 제형화가 어렵다. 또한 몇몇 미백 성분들은 열, 광, 또는 산소에 노출되었을 때 미백 성분이 분해되거나 다른 화합물로 변형되어 피부에 적용하기 전에 이미 미백 효과가 사라지는 경우도 있다. 그러나 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 기존에 알려진 미백 성분인 알부틴과 비교했을 때, 알부틴과 유사한 멜라닌 생성 억제능을 나타내며, 세포 독성이 알부틴보다 낮아서 피부에 매우 안전한 것으로 나타났다.

[0015] 본 발명에 있어서, '미백'이라 함은 피부의 과다 색소 침착을 억제, 저해 또는 완화시키는 것을 말한다. 피부의 과다 색소 침착은 주근깨, 기미, 자외선 노출 후 과다 색소 침착, 염증 후 과다 색소 침착, 노인흑색점, 갈색 반점 또는 검버섯 등을 포함한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따른 화장료 조성물에 있어서, 상기 피부 미백용 화장료 조성물은 상기 화학식 1의 화합물을 상기 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~90 중량부의 양으로 함유할 수 있으나, 바람직한 미백 효과를 제공할 수 있는 유효량을 포함한다면 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에 있어서, '유효량'이라 함은 피부의 과다 색소 침착을 억제, 저해 또는 완화시킬 수 있는 화합물의 양을 의미한다. 본 발명의 피부 미백용 조성물에 포함되는 상기 화합물의 유효량은 피부 미백용 조성물이 제품화되는 형태, 상기 화합물이 피부에 적용되는 방법 및 피부에 머무르는 시간 등에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 상기 피부 미백용 조성물이 피부의 과다 색소 침착에 따른 피부과적 치료를 위한 의약품으로 제품화되는 경우에는 일상적으로 피부에 적용하게 되는 화장품으로 제품화되는 경우에 비해 높은 농도로 상기 화학식 1의 화합물을 포함할 수 있을 것이다. 화장품으로 제품화되는 경우에 있어서도 유효성분이 단기간 내에 피부에 머무르게 되는 메이크업 제거제, 세정제 등과 같은 워쉬-오프(wash-off) 타입의 화장품의 경우에는 비교적 높은 농도의 상기 화합물을 포함할 수 있을 것이다. 반면 유효성분이 장기간 동안 피부에 머무르게 되는 화장수, 유액, 크림, 에센스등의 리브-온(leave-on) 타입의 화장품의 경우에는 워쉬-오프 타입의 화장품에 비해 낮은 농도의 상기 화합물을 포함해도 무방할 것이다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 화장료 조성물에 있어서, 상기 피부 미백용 화장료 조성물은 피부외용연고, 크림, 유연화장수, 영양화장수, 팩, 에센스, 헤어토닉, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 트리트먼트, 젤, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드 크림, 파운데이션, 영양에센스, 선스크린, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디 로션 및 바디 클렌저로 이루어지는 군으로부터 선택된 제형을 가질 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 이들 각 제형의 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기재와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물은 본 발명의 화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 피부 미백 활성 성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 피부 미백 활성 성분으로는 코지산 및 이의 유도체, 알부틴, 아스코르브산 및 이의 유도체, 하이드로퀴논 및 이의 유도체, 레조르시놀, 사이클로알카논, 메틸렌디옥시페닐 알칸올, 2,7-디니트로인다졸 또는 덩굴굴 추출물, 쌀 추출물, 감초 추출물과 같은 식물 추출물 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0023] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제,

에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

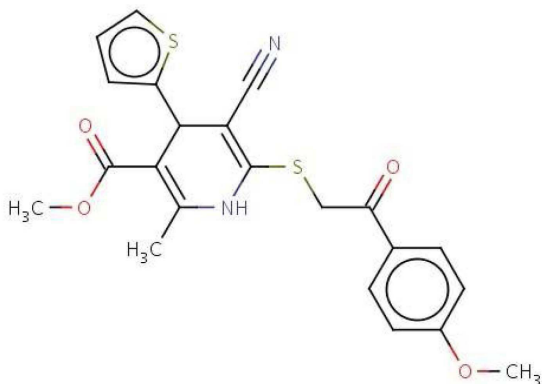
[0024] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 제형은 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 단백질, 용해화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물 등을 포함하는 부형제를 추가로 함유할 수 있다.

[0026] 상기와 같이 피부 미백용 화장품 조성물을 의약품 또는 화장품으로 제형화할 경우, 활성 성분에 대한 담체로 작용하는 피부에 적용가능한 공지의 부형제를 포함할 수 있다. 의약품으로의 제형화시에는 [Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA]에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있으며, 화장품으로 제형화시에는 [International cosmetic ingredient dictionary, 6th ed., The cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, 1995]에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있을 것이다. 상기 문헌들은 본 명세서의 일부로서 포함된다.

[0027] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 식품 조성물을 제공한다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0031] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 젤리류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

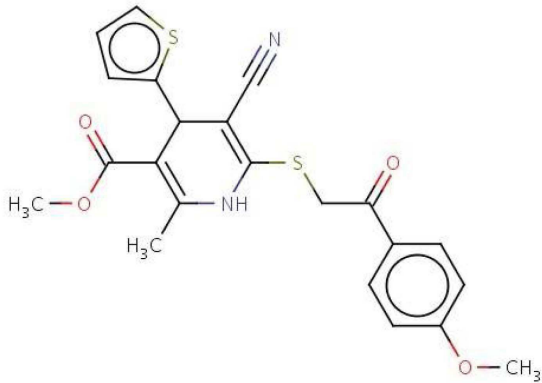
[0032] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0033] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음

료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학 조성물을 제공한다.

[0035] [화학식 1]



[0036]

[0037] 본 발명에 의한 피부 미백용 약학 조성물은, 유효성분인 상기 화학식 1의 화합물을 그대로 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젖산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술포산, 벤젠술포산, 톨루엔술포산, 나프탈렌술포산 등을 사용할 수 있다. 산 부가염 이외에도, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 트리에틸아민, 3차-부틸아민과 같은 염기 부가염도 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에 의한 약학 조성물의 제형에 있어서, 유효성분의 함유량은 제형에 따라 광범위하게 변할 수 있으며, 통상적인 방법에 따른다.

[0039] 본 발명에 의한 약학 조성물은, 유효성분에 악영향을 미치지 않는 한, 필요에 따라 의약에 사용되는 각종 보조제, 예컨대 담체나 기타 첨가제, 예컨대 안정제, 완화제, 유화제 등을 첨가하여 제제화될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 또는 경구 등으로 투여할 수 있다. 비경구 투여 루트로는 경피 투여가 바람직하며, 그 중에서도 국소도포가 가장 바람직하다. 예를 들어, 반창고 형태로 제조하여 붙일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 제형으로는, 연고, 크림, 주사제, 산제, 과립제, 정제 등을 비롯하여 약학적 제제에 적합한 어떠한 제형으로도 할 수 있다.

[0041] 본 발명에 의한 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 0.001 내지 1000 mg/Kg·day일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에 의한 조성물은 단독으로 투여되거나 다른 약제와 동등하게 또는 다른 약제를 보조하기 위해 함께 투여될 수 있다. 또한, 각 제형의 조성물에 있어서, 상기한 필수 성분인 조성물 이외의 다른 성분들은 기타 외용제의 제형 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 재료 및 방법

[0044] 1. 세포 배양

[0045] 멜라닌 세포 (melan-a murine melanocyte)는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 200 nM TPA가 포함된 RPMI 배지를 이용하여 37℃ 및 10% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 계대 배양은 멜라닌 세포가 배양 플레이트

트의 80~90%까지 증식했을 때 수행하였다.

[0046] **2. 멜라닌 분석**

[0047] P 단백질 활성을 억제하여 미백 효과를 나타내는 화합물을 선별하기 위한 실험을 수행하였다. P 단백질 저해제를 탐색하기 위하여 *in silico* modeling을 이용하여 탐색하였다. P 단백질의 밝혀진 크리스탈 구조가 없기 때문에 아미노산 서열을 이용하여 상동성 (homology) 분석을 하고, 티로신 트랜스포터 (tyrosine transporter)와 다른 채널 단백질 (channel protein)을 이용하여 P 단백질의 fragmental modeling을 수행하였다. 생성된 모델은 PROCHECK, WHAT IF, SUPERPOSE를 이용해서 검증했고, ZINC database generated ligand library를 이용하여 Molegro virtual docker에 의한 docking을 시도하였다. ADME/TOX 분석을 실시하고 pharmacophore model을 만들어 최종 20개의 화합물을 선별하였다. 각 화합물은 www.specs.net으로부터 구입하였다.

[0048] 20가지 각 화합물의 미백효과 측정을 위해 멜라닌 세포 내에 생성된 멜라닌의 양을 측정했고, 대조구로 PBS, DMSO (Dimethylsulfoxide) 및 알부틴 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 사용하여 멜라닌 양을 측정했다. 12-웰 플레이트에 세포를 접종하고 24시간 후 5, 10 및 20 μM 농도의 화합물 및 대조구 물질을 각각 처리했고, 72시간 동안 배양한 후 트립신/EDTA를 이용해서 세포를 회수했다. 회수한 세포에 10% DMSO를 포함하는 1N NaOH를 첨가하고, 90°C에서 1시간 동안 반응시켜 멜라닌이 충분히 녹아나오도록 한 후, ELISA 리더 (reader)를 이용하여 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0049] 멜라닌 생성도(%) = 처리구 흡광도/무처리구 흡광도 $\times$ 100

[0050] **3. 독성 시험 (MTT assay)**

[0051] 멜라닌 생성 억제 효과를 갖는 각 화합물에 대하여, 미백 화장품 조성물로 사용할 수 있는지 여부를 판단하기 위해, 세포 독성 시험을 실시했다. 96-웰 플레이트에 세포를 접종하고, 각 화합물을 5, 10 및 20 μM 농도로 처리하여 2일 동안 37°C 및 10% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 MTT (3-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 100 μL 를 멜라닌 세포에 첨가하여 30°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 용액을 제거하고 DMSO 100 μL 를 첨가하여 염색된 세포 내에 생성된 포마잔 (formazan)을 추출한 후 ELISA 리더를 이용하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0052] 세포 생존율(%) = (1-처리구 흡광도/무처리구 흡광도) $\times$ 100

[0053] **4. 웨스턴 블롯**

[0054] 멜라닌 생성 억제 효과를 갖는 각 화합물이 티로시나제 (tyrosinase)의 발현을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, 멜라닌 생성 억제 효과를 갖는 각 화합물을 20 μM 농도로 멜라닌 세포에 처리하고 24시간 후에 세포를 수거하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 같은 농도로 정량한 후 SDS-PAGE로 단백질을 분리하였고, 항-티로시나아제 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 (Western blot)을 수행하였다.

[0055] **5. HPLC (high performance liquid chromatography)**

[0056] 멜라닌 세포에 생성된 페오멜라닌 (pheomelanin) 및 유멜라닌 (eumelanin)의 양을 확인하기 위해 HPLC를 수행했다. 1×10^6 개의 멜라닌 세포를 100 파이의 페트리디쉬에 접종하고 24시간 동안 배양한 후에 각 화합물을 처리하고, 다시 72시간 동안 배양하여 세포를 수거했다. 수거한 세포는 증류수 100 μL 를 첨가하여 현탁한 후 10 mL 튜브에 옮겼고, 375 μL 의 1M K₂CO₃ 및 25 μL 의 30% H₂O₂를 첨가하여 25°C에서 20시간 동안 교반했다. 50 μL 의 10% Na₂SO₃ 및 6M HCl을 첨가하고 4000 g로 1분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 HPLC 분석을 수행했다.

[0057] 표준 화합물로 페오멜라닌 마커인 TTCA (thiazole-2,4,5-tricarboxylic acid) 및 유멜라닌 마커인 PTCA (pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid)를 사용하여 HPLC (Waters Breeze system; Shisedio C18 column (Capcell Pak MG, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm particle size, Shisedio); UV detector (269 nm); Mobile phase: 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 2.1)/methanol= 99:1; Flow rate : 0.7 mL/min)를 수행했다.

[0058] 실시예 1. 멜라닌 생성 억제 화합물 선발

[0059] 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성에 관여하는 p 단백질 (p Protein)의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 감소시키고, 세포에 독성이 없는 화합물을 선발하기 위해 실험을 수행한 결과는 도 1에 나타난 바와 같다. 화합물을 처리하지 않은 대조구 세포의 멜라닌 함량을 100%로 하여, 각 화합물 (5, 10 및 20 μ M 농도)을 처리한 세포들의 멜라닌 함량을 상대적인 값으로 환산했다.

[0060] 멜라닌 분석을 수행한 결과, 20가지 화합물 중 #1 (5-시아노-6-[(3-메톡시벤질)술폰닐]-2-메틸-N-페닐-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복사미드), #4 (메틸 5-시아노-6-[[2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸]술폰닐]-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트), #8 (3-(1-아다만틸)-6-아미노-4-(4-브로모페닐)-2,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴), #13 (6-아미노-4-(3-브로모-4-플루오로페닐)-3-(3,4-디메틸페닐)-2,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴) 및 #17 (메틸 6-[[2-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-2-옥소에틸]술폰닐]-5-시아노-2-메틸-4-(2-티에닐)-1,4-디하이드로-3-피리딘카르복실레이트) 화합물에서 멜라닌 저해 효과가 높은 것으로 나타났다.

[0061] 세포 독성을 분석한 결과, #1 화합물 및 #4 화합물은 3가지 농도 모두에서 독성이 없는 것으로 나타났으며, #8 화합물, #13 화합물 및 #17 화합물은 10 μ M 이상의 농도에서 독성이 있는 것으로 나타났으나, 독성이 없는 농도에서도 멜라닌 합성 저해 효과가 큰 것으로 나타났다. 상기와 같은 결과를 바탕으로, 멜라닌 생성 억제 효과가 높으며 세포 독성이 낮은 #1, #4, #8 및 #13 화합물을 멜라닌 생성 억제 화합물로 선발하였다.

[0062] 실시예 2. 멜라닌 억제 화합물이 티로시나아제 (tyrosinase) 단백질 발현에 미치는 영향

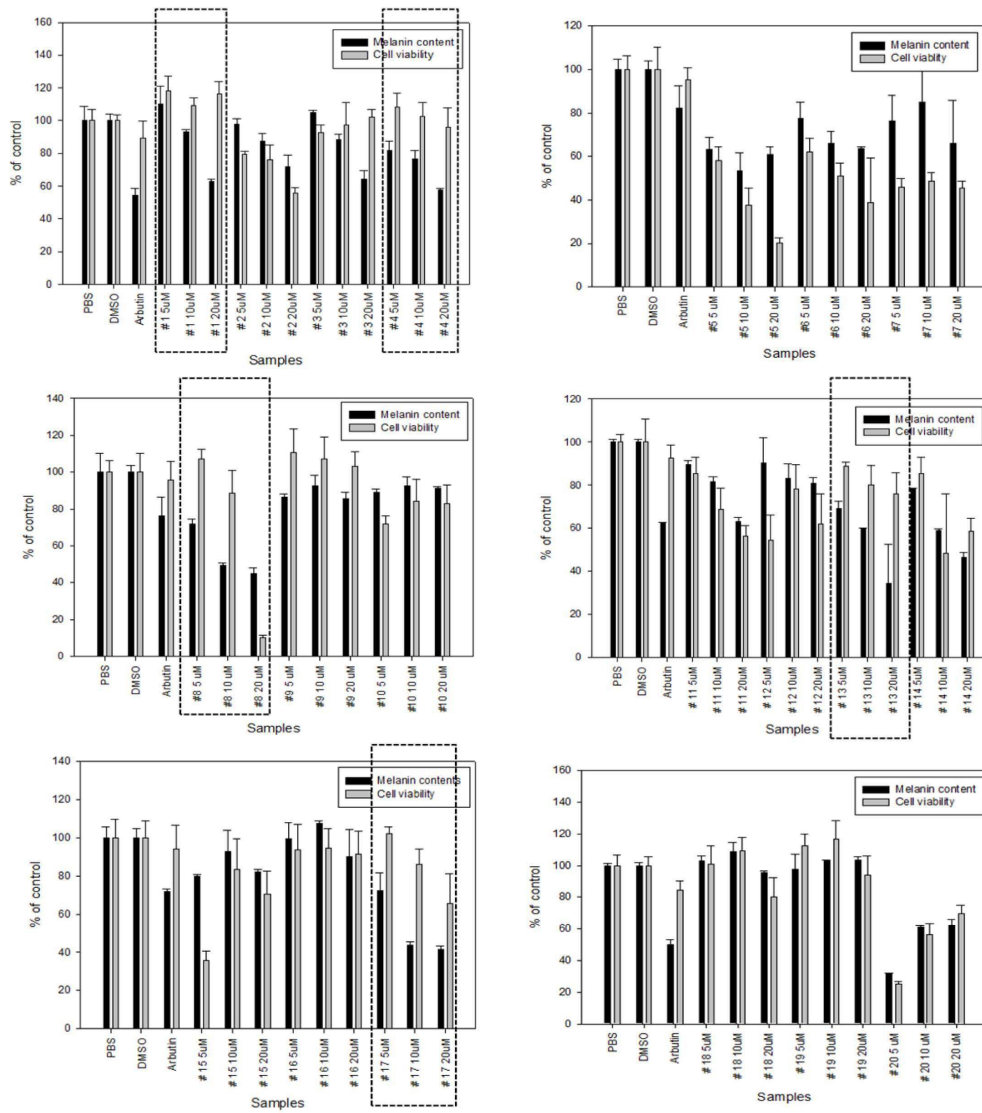
[0063] 실시예 1에서 선발한 #1, #4, #8, #13 및 #17 화합물을 20 μ M 농도로 처리한 세포의 티로시나아제 단백질 발현을 분석한 결과, #1, #4 및 #17 화합물의 처리에 의해서 티로시나아제 단백질의 양이 감소한 것으로 나타났다 (도 2). 이는 #1, #4 및 #17 화합물이 티로시나아제의 생합성에 영향을 주어 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 판단된다. 반면에 #8 및 #13 화합물의 경우에는 티로시나아제 발현 차이가 나타나지 않았다 (도 2). 그러나 #8 및 #13 화합물 처리에 의해 멜라닌 생성이 저해되는 것으로 보아, 상기 화합물들은 티로시나아제 단백질이 기능적인 형태로 성숙 (maturation)하는 것에 영향을 주어 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 예상된다.

[0064] 실시예 3. HPLC 분석을 이용한 멜라닌 함량 분석

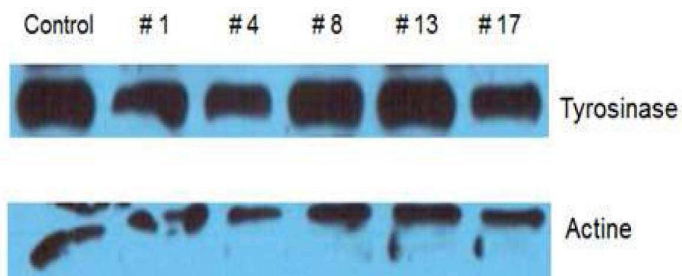
[0065] 실시예 1에서 선발한 #1, #4, #8 및 #13 화합물을 20 μ M 농도로 처리한 세포의 페오멜라닌 및 유멜라닌 함량을 분석한 결과, 화합물을 처리하지 않은 대조구에 비해 페오멜라닌 및 유멜라닌 함량이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 3).

도면

도면1



도면2



도면3

