



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월13일
(11) 등록번호 10-1921050
(24) 등록일자 2018년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/35 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) A61Q 17/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/35 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0094113
(22) 출원일자 2017년07월25일
심사청구일자 2017년07월25일
(56) 선행기술조사문헌
JP2003095852 A*
KR100147332 B1*
US20110207697 A1*
JP08073372 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김기영
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호 (죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)
신유경
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호 (죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 6 항

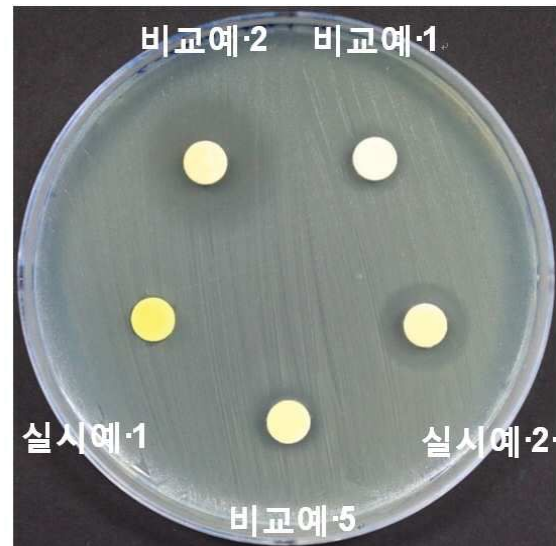
심사관 : 조수익

(54) 발명의 명칭 천연 화합물을 포함하는 여드름 개선용 향균 조성물

(57) 요약

본 발명은 여드름을 유발하는 원인균에 대한 향균용 조성물에 관한 것으로, 식물 추출물에서 유래한 화합물을 하나 이상 포함하는 인체에 안전성이 우수한 향균용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/122 (2013.01)

A61K 31/352 (2013.01)

A61K 8/355 (2013.01)

A61K 8/498 (2013.01)

A61Q 17/005 (2013.01)

Y10S 514/859 (2013.01)

(72) 발명자

박상철

서울특별시 구로구 구일로 154-17, 2동 501호 (구로동, 우방아파트)

김재구

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 211동 904호 (식사동, 위시티일산자이2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IPET116094-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 꿀벌 전염성 질병에 대한 방제 기술

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.05 ~ 2016.12.31

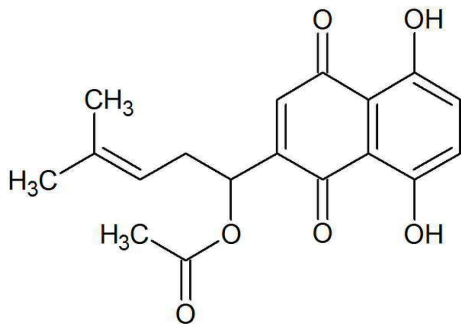
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)에 대한 억제 활성을 가지는 향균용 조성물.

[화학식 3]



청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

하나 이상의 향균제를 더 포함하는 향균용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 향균제는 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈록사신, 트로바플록사신, 로메플록사신, 레보플록사신, 예녹사신, 나프티리딘, 술폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 테트라사이클린, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린, 암포테리신, 플루코나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린, 페니라미만, 및 양우리그난으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 향균용 조성물.

청구항 5

제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 여드름 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 여드름 개선용 피부 외용제 조성물.

청구항 7

제1항, 제3항, 및 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 여드름 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 식물 유래의 단일 화합물을 사용하여 피부에 여드름을 일으키는 박테리아인 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)의 성장을 억제하는 천연 항균 후보 물질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 의학기술의 발달로 평균 수명이 증가하고, 국민소득의 상승으로 생활수준이 향상됨에 따라 현대인들의 건강과 외모에 대한 관심이 증가되고 있으며, 외모를 가꾸는데 있어 많은 관심을 가지게 되었다. 현대에는 주름관리, 미백, 아토피, 여드름관리 등 피부미용 관련 산업이 급격히 성장하고 있다.

[0003] 여드름은 특히 호르몬의 변화가 많은 사춘기에 주로 발병하며 면포, 구진, 농포, 결절 등을 특징으로 하는 모피 지성 질환(pilosebaceous disease)으로 최근에는 성인에게도 여드름의 발생이 증가하고 있다.

[0004] 서구에서는 10대 청소년의 약 79 내지 95% 정도가 여드름 질환을 앓고 있으며, 특히 미국에서는 4000 내지 5000 만명 정도가 여드름 환자로 알려져 있다.

[0005] 최근 여드름은 청소년에 국한되지 않고 성인에게도 광범위하게 발생하고 있으며 일부 연구에서는 25세 이상의 성인 중 남성 인구의 40%, 여성 인구의 54% 정도가 여드름 질환을 가지고 있는 것으로 보고하였다.

[0006] 여드름의 발생 원인은 아직 정확하게 알려져 있지 않지만, 모공의 각화 현상, 호르몬의 불균형, 피부장벽 이상, 유전, 환경적 요인, 스트레스, 여드름 균 등이 주요 원인으로 알려져 있으며, 피지선이 호르몬의 자극 등으로 피지의 분비량이 증가하는 것으로부터 여드름이 주로 시작된다(Farrar & Ingham, 2004). 정상적인 상태에서 피지는 모공을 통해 외부로 배출되어야 하나, 호르몬의 분비 불균형 등으로 피지의 분비량이 증가하게 된다.

[0007] 피부의 각화 현상이나 또는 각질이 쌓이게 되면 모공을 막게 되고 피지는 외부로 분출되지 못하게 되어 모공 안에 쌓이면서 면포(피지 덩어리; comedone)를 형성한다. 면포 단계에서 염증을 유발하는 프로피오니박테리움 아크네가 성장하면 화농성 여드름이 된다. 따라서 여드름 발생의 중요한 원인은 여드름 유발균인 *P. acnes*의 증식이다.

[0008] 여드름이 주로 발생하는 시기가 주로 사춘기부터 시작하는 원인은 성장 호르몬의 분비가 증가하여 이의 자극으로 피지선이 발달하기 때문이며, 성인의 경우 스트레스로 인한 호르몬의 분비 증가로 인하여 여드름이 발생하기도 한다.

[0009] 우리 몸에는 다양한 상재균이 살고 있으며, 상재균 중 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)는 피부에 여드름을 유발하는 대표적인 미생물이다.

[0010] 프로피오니박테리움 아크네는 지방 친화성, 혐기성 균으로 피지 내에서 생육이 유리한 환경을 만들기 위해 모공을 밀폐시키며, 피지의 배출을 억제하므로 모공 입구를 차단시킨다.

[0011] 프로피오니박테리움 아크네는 피지를 주성분으로 하는 반면, 불포화지방산은 분해하지 않는다. 불포화지방산의 축적을 야기하고 피부 트러블을 유발할 수 있다. 또한, 상기 현상에 의해 백혈구가 작용하고 염증 반응이 유도된다.

[0012] 여드름의 치료를 위해서는 이와 같은 다양한 원인을 고려하여 치료를 하여야 하며, 특히 여드름 균이 발생 한 경우에는 여드름 균의 성장을 억제하거나 사멸하는 제품을 사용하여야 한다.

[0013] 화농성 여드름은 피부에 염증과 고름을 동반하며 통증이 유발될 수 있고, 여드름이 속히 제거되지 않으면 흉터 자국이 남을 수 있다.

[0014] 따라서 화농성 여드름의 원인을 없애기 위해, 여드름의 발생 초기 또는 이전에 여드름 균을 필수적으로 제거하여야 한다.

[0015] 기존에는 이들을 제어하기 위해 Clindamycin 또는 Erythromycin등 다양한 항생제를 사용하였으나, 내성에 대한 문제가 야기되므로 장기적인 사용이 불가능하다. 또한 많은 경우 피부에 대하여 트러블이 유발되므로 독성이 적고 부작용이 적은 새로운 항생 물질 대체 물질에 대한 연구가 요구되고 있다.

발명의 내용

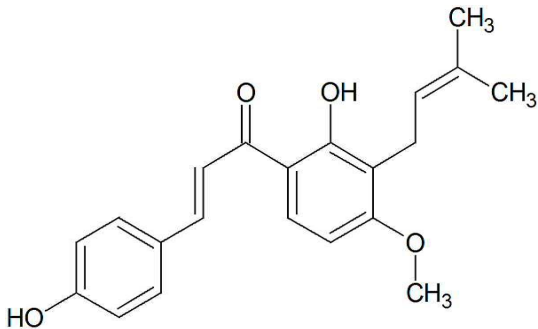
해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 인체 안전성이 우수하고, 내성을 최소화할 수 있는 식물 유래 환경 친화적인 여드름 유발균의 성장 억제제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

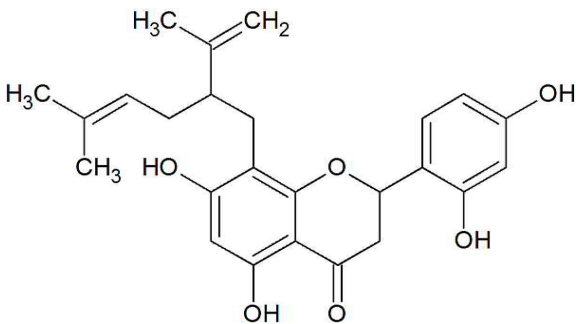
과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 여드름 원 인균에 대한 항균용 조성물이 제공된다.

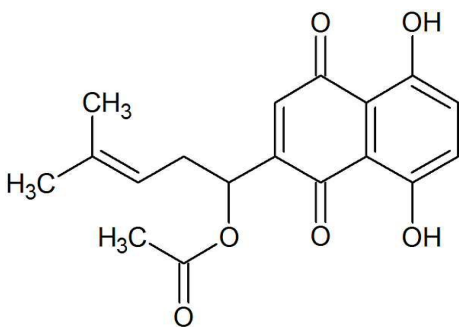
[0018] [화학식 1]



[0019]
[0020] [화학식 2]



[0021]
[0022] [화학식 3]



[0023]
[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 원인균은 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)일 수 있다.

[0025] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 항균제를 더 포함할 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 항균제는 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마 이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈플록사신, 트로바플록사신, 로메플록사신, 레보플록사신, 에녹사신, 나 프티리딘, 술폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 테트라사이클린, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린, 암포테리신, 플루코 나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토 롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린, 페니라미만, 및 양우리그난으로 구성 된 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [0027] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균용 조성물을 포함하는 여드름 개선용 화장료 조성물이 제공된다.
- [0028] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균용 조성물을 포함하는 여드름 개선용 피부 외용제 조성물이 제공된다.
- [0029] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균용 조성물을 포함하는 여드름 예방 및 치료용 약학 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따르면, 상기 여드름 치료용 조성물은 천연 유래 단일 화합물을 유효 성분으로 포함하므로 인체에 대한 독성이 낮고 원인균에 대한 항균 효과가 우수하므로 여드름 치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

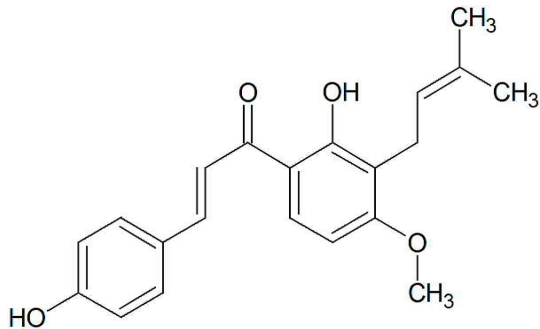
- [0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 여드름 유발균(CCARM 9009)의 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 감수성과 함께 기존에 널리 사용되는 항균제와 대조군의 감수성을 비교한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 여드름 유발균(KACC 11946)의 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 감수성과 함께 기존에 널리 사용되는 항균제와 대조군의 감수성을 비교한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 여드름 유발균(KCTC 3314)의 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 감수성과 함께 기존에 널리 사용되는 항균제와 대조군의 감수성을 비교한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin)의 농도별 처리에 따른 세포 독성을 평가한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)의 농도별 처리에 따른 세포 독성을 평가한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 아세틸시코닌(Acetylshikonin)의 농도별 처리에 따른 세포 독성을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 하기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 또한, 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략될 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0035] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0036] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

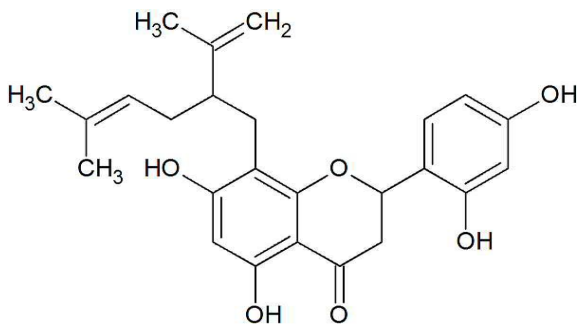
[0037] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 여드름 원 인균에 대한 항균용 조성물이 제공된다.

[0038] [화학식 1]



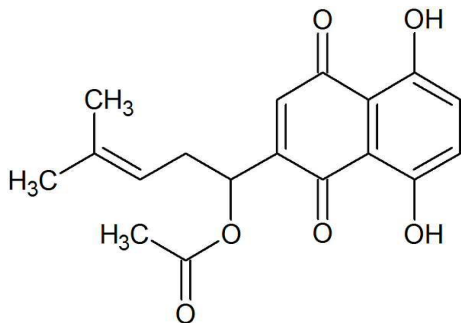
[0039]

[0040] [화학식 2]



[0041]

[0042] [화학식 3]



[0043]

[0044] 상기 화학식 1의 화합물은 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin)으로 불리우며, (이)-1-[2-히드록시-4-메톡시-3-(3-메틸부-2-테닐)페닐]-3-(4-히드록시페닐)프로-2-엔-1-원((E)-1-[2-hydroxy-4-methoxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one)으로도 명명될 수 있다.

[0045] 상기 화학식 1의 화합물은 신선초(*Angelica keiskei*) 추출물에서 분리될 수 있다. 상기 신선초는 미나리과(*Apiaceae*)에 속하는 다년생 초목으로, 명일엽으로도 알려져 있다. 아열대 지방에서 자생하며 우리나라 전역에서 재배되고 있다.

[0046] 상기 신선초는 주요 활성성분으로 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin), 잔소안젤롤(Xanthoangelol), 게르마늄, 비타민, 각종 무기물을 다량 함유하며, 한약재의 원료로도 사용된다. 상기 신선초는 항암, 알레르기 예방, 염증 치료, 노화 방지, 간기능 개선등의 등의 약리 효과가 보고된 바 있다.

[0047] 상기 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin)을 분리하기 위한 식물은 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin)을 함유하는 것으로 알려진 식물 종, 이로부터 유도된 캘러스, 식물 세포, 및 식물 세포 현탁 배양액을 모두 포함할 수 있다. 상기 식물의 사용 부위는 식물체 전체, 잎, 과육, 줄기, 뿌리, 꽃을 모두 사용할 수 있으며, 바람직하게는 뿌리 부위를 사용할 수 있다.

[0048] 상기 4-하이드록시테리신(4-Hydroxyderricin)는 메탄올 또는 에탄올과 같은 저급 알코올 용매 또는 이들의 혼합

용매로 열수 추출한 후에 감압 농축될 수 있다. 4-하이드록시데리신(4-Hydroxyderricin)을 더욱 효과적으로 추출하기 위해, 상기 신선초 뿌리는 핀밀(pin mill) 또는 볼밀(ball mill) 분쇄기에 의해 100 내지 200 메쉬로 분쇄될 수 있으며, 50 내지 99 %의 저급알코올로 3회 열수 추출될 수 있다.

- [0049] 상기 열수 추출된 엑스는 증류수에 용해시켜 현탁 시킨 후, 여과하여 물 불용성 층 및 물 가용성 층으로 분리될 수 있으며, 상기 물 가용성 층은 클로로포름, 에테르 또는 메틸렌클로라이드와 같은 비극성 유기용매에 의해 탈지될 수 있다.
- [0050] 상기 물 가용성층은 4-하이드록시데리신 뿐만 아니라 친수성 또는 소수성 불순물을 다량 함유할 수 있으므로, 상기 물 가용성층을 비극성 유기용매로 탈지시켜 신선초 뿌리의 소수성 불순물을 제거할 수 있으며, 바람직하게는 상기 탈지 공정이 3회 실시될 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 신선초 뿌리 추출물에 함유된 화학식 1의 화합물은 당해 기술 분야에 널리 알려진 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있다. 예컨대, 상기 탈지된 물 가용성층은 상기 비극성 유기용매가 제거된 후, 컬럼 크로마토그래피용 비이온성 수지에 흡착될 수 있다. 상기 컬럼 크로마토그래피는 당해 기술 분야에 널리 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.
- [0052] 상기 화학식 2의 화합물은 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)로 지칭되며, (2S)-2-(2,4-디하이드록시페닐)-5,7-디하이드록시-8-[(2R)-2-아이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일]-2,3-디하이드로-4H-크로멘-4-원 ((2S)-2-(2,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(2R)-2-isopropenyl-5-methyl-4-hexen-1-yl]-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one)로 명명될 수 있다.
- [0053] 상기 화학식 2의 화합물은 고삼(*Sophora flavescens* Ait root.) 추출물에서 분리될 수 있다. 상기 고삼은 쌍떡잎 식물 장미목 콩과에 속하며, 해발 1000m 이하의 초지에서 흔히 자라는 여러 해 살이 풀로 우리나라 각 처의 산과 들에 자생한다. 가을에 뿌리를 캐어 씻어 말린 것을 고삼이라고 하며 약재로 사용된다.
- [0054] 상기 고삼의 주요 활성 성분으로는 마트린(matrine), 옥시마트린 (Oxymatrine)과 소포라플라바논 G(sophoraflavanone G), 큐라리논(kurarinone)을 포함한 알칼로이드(alkaloid)와 플라보노이드(flavonoid), 사포닌(saponin)을 함유하고 있어 한약재의 원료로 사용될 수 있다.
- [0055] 상기 고삼은 기관지염과 역균작용, 마비작용 등이 있을 뿐만 아니라 항암 작용, 항알러지, 항부정맥, 항균작용, 이뇨작용 등의 약리 효과가 보고 되어 있어 다양한 질환에 사용된다.
- [0056] 상기 화합물을 분리하기 위한 식물은 식물 종뿐만 아니라 이로부터 유도된 식물 세포 및 식물 세포 현탁 배양액을 모두 포함할 수 있다.
- [0057] 상기 소포라플라바논 G(sophoraflavanone G)을 효과적으로 추출하기 위하여 상기 고삼 뿌리를 핀밀(pin mill) 또는 볼밀(ball mill) 분쇄기로 100 내지 200 메쉬로 분쇄될 수 있으며, 50 내지 99 %의 저급 알코올로 3회 열수 추출한 다음 감압 농축할 수 있다.
- [0058] 상기 열수 추출된 엑스는 증류수에 용해시켜 현탁 시킨 후, 여과하여 물 불용성 층 및 물 가용성 층으로 분리될 수 있으며, 상기 물 가용성 층은 에테르 또는 메틸렌클로라이드와 같은 비극성 유기용매에 의해 탈지될 수 있다. 상기 물 가용성층은 소포라플라바논 G 뿐만 아니라 다양한 불순물을 함유할 수 있으므로, 상기 물 가용성층을 비극성 유기용매로 탈지시켜 고삼 뿌리의 불순물을 제거할 수 있으며, 바람직하게는 상기 탈지 공정이 3회 실시될 수 있다.
- [0059] 또한, 상기 고삼 뿌리 추출물에 함유된 화학식 2의 화합물은 당해 기술 분야에 널리 알려진 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있다. 상기 고삼 추출물에 함유된 화학식 2의 화합물은 추가적인 크로마토그래피, 예컨대, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있으며, 단일 화합물을 분리하기 위한 공지된 다양한 방법론이 적용될 수 있다.
- [0060] 예컨대, 상기 비극성 유기용매가 제거된 후, 컬럼 크로마토그래피용 비이온성 수지에 흡착될 수 있다. 상기 컬럼 크로마토그래피는 당해 기술 분야에 널리 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.
- [0061] 상기 화학식 3의 화합물은 아세틸시코닌(Acetylshikonin)으로 지칭되며, 4-[(2S,3R)-4-(1,3-벤조다이옥솔-5-yl)-2,3-디메틸부틸]-2-메톡시페놀 [1-(5,8-디하이드록시-1,4-디옥소나프탈렌-2-일)-4-메틸펜트-3-에닐]아세테이트([1-(5,8-dihydroxy-1,4-dioxonaphthalen-2-yl)-4-methylpent-3-enyl] acetate)로 명명될 수 있다.
- [0062] 상기 화학식 3의 화합물은 자초(*Lithospermum erythrorhizon* S. et Z.) 추출물에서 분리될 수 있다. 상기 자초

는 지치과(*Borraginaceae*)에 속하며, 여러 해 살이 풀로 우리나라 각 처의 산과 들에서 자생한다. 지치, 자초, 지초 또는 자근으로 불리우며 한방에서는 그 뿌리를 자초라고 해서 약재로 사용하고 있다.

- [0063] 상기 자초는 주요 활성성분으로 아세틸시코닌(Acetylshikonin), 시코닌(shikonin), 알칸난(Alkannan), 아이소부틸릴시코닌(Isobutylshikonin)등 나프토크논(Naphthoquinone)계 화합물을 다량 함유하고 있으며, 이외에도 기름, 정유, 색소 등 다양한 성분을 함유하고 있어 생약재 및 한약재 원료로 널리 이용되고 있다.
- [0064] 상기 자초는 피임작용을 포함한 다양한 약리 기능이 있으며, 최근에는 항염 활성, 박테리아에 대한 항균작용, 약간의 항암 작용, 혈액 순환 촉진작용 등의 약리 효과가 보고되었다.
- [0065] 상기 자초는 상온에서 40℃ 미만의 저온의 물 또는 60℃ 이상의 고온의 물을 용매로 하여 추출될 수 있으며, 또는 알코올을 용매로 하여 추출될 수 있다. 상기 알코올은 탄소수 1 내지 6의 지방족 알코올 일 수 있으며, 구체적으로는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 헥산 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 상기 알코올 추출물은 유기용매 및 물로 분배 추출 될 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 10의 지방족 탄화수소, 탄소수 1 내지 10의 지방족 할로겐화 탄화수소 및 탄소수 2 내지 10의 에스테르 중에서 선택될 수 있다.
- [0067] 상기 자초 추출물에 함유된 화학식 3의 화합물은 추가적인 크로마토그래피, 예컨대, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있으며, 단일 화합물을 분리하기 위한 공지된 다양한 방법론이 적용될 수 있다.
- [0068] 상기 조성물은 유효성분으로서 상기 화학식 1 내지 3의 화합물 중 하나 이상을 포함하므로 상기 여드름 원인균에 대한 우수한 항균 활성을 가질 수 있으며, 상기 원인균은 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)일 수 있다.
- [0069] 즉, 상기 조성물은 특정 균주에 대한 특이적인 항균 활성을 보유하므로 광범위한 사용이 유도되지 않고 내성 발생률이 최소화될 수 있으며, 생체 안전성이 우수하다.
- [0070] 상기 조성물은 하나 이상의 항균제를 더 포함할 수 있다. 상기 항균제는 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈록사신, 트로바플록사신, 로메플록사신, 레보플록사신, 에녹사신, 나프티리딘, 숄폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 테트라사이클린, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린, 암포테리신, 플루코나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린, 페니라미판, 및 앙우리그난으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0071] 즉, 기존에 널리 사용되어온 일부 항균제는 상기 원인균에 대한 항균 활성을 보유하고 있으나, 과도한 사용으로 인해 내성이 증가하고 있으며 생체 독성으로 인해 그 사용이 제한되므로 사용량을 감소시킬 필요가 있다.
- [0072] 따라서, 상기 항균제는 상기 분리된 화학식 1 내지 화학식 3의 화합물과 복합적으로 적용됨으로써 그 사용량이 현저히 저감될 수 있으며, 상승 효과로 인해 항균 활성이 현저히 개선될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균용 조성물을 포함하는 여드름 개선용 피부 외용제 조성물 또는 화장료 조성물이 제공된다.
- [0074] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물은 통상의 방법에 의해 제형화될 수 있다. 피부 외용제의 제형화에 있어서 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있고, 화장료 조성물의 제형화에 있어서 International cosmetic ingredient dictionary, 6th ed., The cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, 1995에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있다.
- [0075] 구체적으로, 상기 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 예컨대, 유연 화장수 또는 영양 화장수 등의 화장수; 웨이셜 로션, 바디로션 등의 유액; 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등의 크림; 에센스; 화장연고; 스프레이; 젤; 팩; 선 스크린; 메이크업 베이스; 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션; 파우더; 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 오일 등의 메이크업 제거제; 또는 클렌징 폼, 비누, 바디워시 등의 세정제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 피부 외용제는, 연고, 패취, 젤, 크림 또는 분무제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물은 각각의 제형에 있어서 상기 필수성분 외에 제형의 종류 또는 사용 목적

등에 따라 본 발명에 따른 목적을 저해하지 않는 범위 내에서 다른 성분들이 적절히 배합될 수 있다.

- [0077] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물은 통상적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있으며, 예컨대 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 상기 허용 가능한 담체는 제형에 따라 달리할 수 있다. 예컨대, 연고, 페이스트, 크림 또는 젤로 제형화될 때 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0079] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물이 파우더 또는 스프레이로 제형화될 때, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있고, 스프레이의 경우 클로로플루오로히드로카본, 프로판, 부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 더 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물이 용액 또는 유탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 용매, 용해화제, 또는 유탁화제가 사용될 수 있고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 사용될 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 사용될 수 있다.
- [0081] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물이 현탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리 옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 사용될 수 있다.
- [0082] 상기 화장료 조성물이 비누로 제형화될 때, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 사용될 수 있다.
- [0083] 상기 피부 외용제 또는 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온붕쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가적으로 함유할 수 있다.
- [0084] 다만, 상기 보조제 및 그 혼합 비율은 본 발명에 따른 화장료 조성물의 바람직한 성질에 영향을 미치지 않도록 적절히 선택할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균용 조성물을 포함하는 여드름 예방 및 치료용 약학 조성물이 제공된다.
- [0086] 상기 “예방”은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 여드름 군에 의해 발생하는 증상이 상기 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.
- [0087] 상기 “치료”는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0088] 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 전신 또는 국소 투여될 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.
- [0089] 상기 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아가

시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0090] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.
- [0091] 경구 투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있고, 상기 고형제제는 상기 화합물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [0092] 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있고, 단순화석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.
- [0093] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴이 사용될 수 있다.
- [0094] 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다. 상기 “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0095] 상기 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0096] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0097] **실험예 1 : *P. acnes*에 대한 항균 최소 농도 시험**
- [0098] 상기 화학식 1의 화합물(4-Hydroxyderricin), 상기 화학식 2의 화합물(Sophoraflavanone G) 및 상기 화학식 3의 화합물(Acetylshikonin)의 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균 최소 농도를 평가하였다.
- [0099] 하기 표 1은 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 anti-*Propionibacterium acnes* 활성과 함께 기존에 널리 사용되는 항균제와 후보 물질의 항균 최소 농도를 비교한 것이다.
- [0100] 화합물의 *P. acnes*에 대한 항균 최소 농도를 확인하고자 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing(EUCAST)에서 제시한 broth microdilution assay를 사용하였다. 각 화합물은 10mg/mL의 농도로 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 후 사용하였다.
- [0101] *P. acnes*는 reinforced clostridial broth(RCB; Becton, Dickinson and Company, USA), Mueller-Hinton agar(MHA; MB cell, USA) 또는 broth(MHB; MB cell, USA)를 사용하여 실험을 수행 하였다. 균주는 해당 배지를 이용하여 anaerobic package(Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 anaerobic 상태로 37°C에서 배양 한 후 최소 1회 계대 배양하여 활성이 회복된 균주를 사용하였다.
- [0102] 각 화합물에 있어 DMSO 농도는 2.5% 보다 높지 않도록 하여 사용하였다. 각 화합물은 2배씩 계속 희석된 후 96-well microtitre plate에 100 μ L 첨가하였으며, 100 μ L의 *P. acnes* 균주 현탁액(OD₆₀₀=0.1)을 각각의 well 에 투입한 후 anaerobic 환경에서 37° C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다.
- [0103] 각 화합물의 농도는 최대 200mg/L 내지 최소 0.2mg/L로 제어하였으며, 물질에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소 농도로 하였다.
- [0104] 표 1을 참조하면, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 MIC 값을 측정한 결과 *P. acnes*에 대하여 성장 저해 효과가 확인되었다.

- [0105] 4-히드록시테리신 및 소포라플라바논 G는 기존에 널리 사용되는 항균제인 테트라사이클린과 비교하여 우수한 항균 효과를 보였으며, 아세틸시코닌은 상대적으로 미흡한 항균 활성을 나타내었으나 테트라사이클린과 동등한 수준으로 *P. acnes*의 성장을 저해하였다.
- [0106] 뿐만 아니라, 대조군으로 사용된 비교예 3, 4의 화합물은 *P. acnes*에서 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 비교적 약한 활성을 보이는 아세틸시코닌과 유사한 정도의 활성이 확인되었으며, 4-히드록시테리신 및 소포라플라바논 G와 비교하여 그 활성이 미흡하였다.
- [0107] 비교예 13, 16, 18, 19 내지 20의 물질은 상기 미생물에 대한 성장 저해 활성을 일부 나타내었으나, 그 효과가 일부만 미흡하게 확인되었다.
- [0108] 즉, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌은 여드름 질병을 유발하는 *P. acnes*에 대한 항균 활성이 있으며, 기존의 항균제와 비교하여 그 활성이 우수하거나 또는 유사하고 안전성이 우수한 장점이 있다.

표 1

구분	P625 (ATCC9008)		P693 (KCTC3314)		P694 (KCTC3320)		P687 (KACC11946)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
실시예 1 (4-Hydroxyderricin)	3.125	3.125	3.125	6.25	6.25	6.25	3.125	3.125
실시예 2 (Sophoraflavanone G)	3.125	3.125	1.56	3.125	3.125	3.125	3.125	3.125
실시예 3 (Acetylshikonin)	12.5	12.5	3.125	3.125	12.5	25	12.5	12.5
비교예 1 (Miconazole)	12.5	12.5	25	25	25	25	25	25
비교예 2 (Tetracycline)	6.25	12.5	3.125	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5
비교예 3 (6,8-Diprenylorobol)	6.25	6.25	6.25	12.5	25	50	6.25	6.25
비교예 4 (Kurarinone)	12.5	12.5	3.125	6.25	12.5	12.5	6.25	6.25
비교예 5 (Alismol)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 6 (Actinidic Acid)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 7 (Alpiniumisoflavone)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 8 (Bisdemethoxy-curcumin)	>200	>200	200	200	>200	>200	>200	>200
비교예 9 (Dehydrocostus lactone)	100	200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 10 (<i>((R)-(+)-Dalbergi</i> phenol)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 11 (Dehydrodieugenol)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 12 (Eupatilin)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 13 (Falcarindiol)	>200	>200	50	100	100	100	>200	>200
비교예 14 (Gagaminine)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 15 (Galangin)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 16 (Guaiacin)	100	100	50	100	100	100	>200	>200

비교예 17 (Matairesinoside)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 18 (Myristargenol A)	>200	>200	100	100	100	100	6.25	6.25
비교예 19 (Oleiferin F)	>200	>200	100	100	100	100	3.125	3.125
비교예 20 (Sargachromanol G)	>200	>200	12.5	50	>200	>200	>200	>200
비교예 21 (Sargachromanol I)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
비교예 22 (Timosaponin AIII)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

[0110] 실험예 2 : 균주 특이적 항균 활성 확인

[0111] 표 2는 상기 4-히드록시테리신의 각 균에 대한 성장 저해 효과를 측정한 것이고, 표 3은 상기 소포라플라바논 G의 각 균에 대한 성장 저해 효과를 측정한 것이며, 표 4는 상기 아세틸시코닌에 의한 각 균에 대한 성장 저해 효과를 측정한 것이다.

표 2

[0112]

구분		4-Hydroxyderricin	
		24h	48h
실시예	<i>P. acnes</i> (P625, ATCC 9008)	3.125	3.125
	<i>P. acnes</i> (P682, CCARM 9009)	3.125	6.25
	<i>P. acnes</i> (P687, KACC 11946)	6.25	6.25
	<i>P. acnes</i> (P693, KCTC3314)	3.125	3.125
비교예	<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	3.125	6.25
	<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
	<i>E. coli</i>	>200	>200
	<i>E. faecium</i>	25	25
	<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
	<i>S. aureus</i>	>200	>200
	<i>S. saprophyticus</i>	6.25	12.5

[0113] 표 2를 참조하면, 4-히드록시테리신은 *P. acnes* 및 *B. subtilis subsp. spizizenii*, *L. Monocytogenes*, *M. luteus*, *S. saprophyticus*에 대하여 항균 활성을 나타낸 반면, 그 이외의 다른 균주에 대한 항균 활성은 나타나지 않았다.

표 3

[0114]

구분		Sophoraflavanone G	
		24h	48h
실시예	<i>P. acnes</i> (P625, ATCC 9008)	3.125	3.125
	<i>P. acnes</i> (P682, CCARM 9009)	1.56	3.125
	<i>P. acnes</i> (P687, KACC 11946)	3.125	3.125
	<i>P. acnes</i> (P693, KCTC3314)	3.125	3.125

비교예	<i>A. Baumannii</i>	>200	>200
	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	6.25	12.5
	<i>E. Cloacae</i>	>200	>200
	<i>E. coli</i>	>200	>200
	<i>E. faecium</i>	12.5	12.5
	<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200
	<i>S. aureus</i>	>200	>200
	<i>S. saprophyticus</i>	12.5	12.5

[0115] 표 3을 참조하면, 소포라플라바논 G는 *P. acnes*, *L. Monocytogenes*, *M. luteus*에 대하여 항균 활성을 나타낸 반면, 타 균주에 대한 항균 활성은 미흡하거나 나타나지 않았다.

표 4

구분	Acetylshikonin	
	24h	48h
실시예	<i>P. acnes</i> (P625, ATCC 9008)	12.5
	<i>P. acnes</i> (P682, CCARM 9009)	3.125
	<i>P. acnes</i> (P687, KACC 11946)	12.5
	<i>P. acnes</i> (P693, KCTC3314)	12.5
	<i>P. acnes</i> (P693, KCTC3314)	25
비교예	<i>A. Baumannii</i>	>200
	<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	50
	<i>E. Cloacae</i>	>200
	<i>E. coli</i>	>200
	<i>E. faecium</i>	12.5
	<i>P. aeruginosa</i>	>200
	<i>S. aureus</i>	25
	<i>S. saprophyticus</i>	12.5

[0117] 표 4를 참조하면, 아세틸시코닌은 *P. acnes* 및 *E. faecium*, *L. Monocytogenes*, *M. luteus*, *S. saprophyticus*에 대하여 항균 활성을 나타낸 반면, 그 이외의 다른 균주에 대한 항균 활성은 약하거나 나타나지 않았다.

[0118] 상기 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌은 일부 미생물 중에 대하여 특이적으로 성장을 저해하므로, 여드름 치료에 유용하게 활용될 수 있으며, 광범위한 사용의 우려가 적을 것으로 사료된다.

[0119] 실험예 3 : 항균 감수성 시험

[0120] 상기 화학식 1의 화합물(4-Hydroxyderricin), 상기 화학식 2의 화합물(Sophoraflavanone G) 및 상기 화학식 3의 화합물(Acetylshikonin)의 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)에 대한 감수성을 평가하였다.

[0121] 하기 표 5, 도 1 내지 3은 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 anti-*Propionibacterium acnes* 감수성과 함께 기존에 널리 사용되는 항균제 및 항균 활성이 알려진 대조군 화합물의 항균 감수성을 비교한 것이다.

[0122] 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 *P. acnes*에 대한 감수성을 확인하고자 The American Society for Microbiology 에서 제시한 Disk diffusion assay를 기본으로 하여 수행하였다.

[0123] 각 화합물은 10mg/mL의 농도로 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 100 µg을 사용하였다.

[0124] 감수성 실험에 사용한 *P. acnes*는 생물자원센터(KCTC, Korea) 또는 국립농업과학원미생물은행(KACC, Korea) 또는 항생제내성균주은행(CCARM, Korea)에서 분양을 받아 사용 하였다.

[0125] 배지는 reinforced clostridial broth(RCB; Becton, Dickinson and Company, USA), Mueller-Hinton agar(MHA; MB cell, USA)를 사용하였으며, 평판 배지는 사용하기 1 내지 2시간 전에 37℃에서 배양하여 오염이 없음을 확

인하고 하기 실험을 수행하였다.

- [0126] 균주는 해당 배지를 이용하여 anaerobic package(Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 혐기조건, 37℃에서 배양 한 후 최소 1회 계대 배양하여 활성이 회복된 균주를 사용하였다. 각 화합물에 있어 DMSO 농도는 2.5% 보다 높지 않도록 하였다.
- [0127] Log phase 성장 상태의 *P. acnes* 균주 현탁액($OD_{600} = 0.1$ 또는 0.5 McFarland standard 혼탁도 측정; 1.5×10^8 CFU/mL)을 상기 배지에 멸균된 면봉을 이용하여 평면 도말하였으며, 각 화합물은 각 멸균된 8mm 지름의 paper disk (Advantec, Japan)에 10mg/mL의 농도로 10 μ L를 첨가하고 건조시킨 상태로 도말된 배지 위에 적용하였다. *P. acnes* 균주 현탁액을 도말하고 혐기조건, 37℃에서 24 시간 배양하였으며 반사광을 이용하여 항균 활성 구역의 지름을 측정하였다.
- [0128] 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 *P. acnes*에 대한 감수성을 측정하였으며, 기존에 널리 사용되는 테트라사이클린과 미코나졸과 감수성을 비교하였다(도 1 내지 3).
- [0129] 4-히드록시테리신 및 소포라플라바논 G는 테트라사이클린과 미코나졸과 비교하여 상대적으로 미흡하거나 유사한 정도의 감수성을 나타내었으나, *P. acnes*의 성장을 효과적으로 억제하였다.
- [0130] 반면, 아세틸시코닌은 감수성이 확인되지 않거나 미약하였다. 그러나, 대조군으로 사용된 알피누미소프라본은 상기 미생물에 대한 감수성이 나타나지 않았다.
- [0131] 즉, 상기 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌은 여드름 질병을 유발하는 *P. acnes*에 대한 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G는 기존의 항균제와 비교하여 감수성이 유사하거나 또는 약간 미흡하나 안전성이 우수하다.

표 5

구분		P682 (CCARM 9009)	P687 (KACC 11946)	P693 (KCTC 3314)
실시예 1	4-Hydroxyderricin	0.9	0.9	1.2
실시예 2	Sophoraflavanone G	1.6	1.6	1.7
실시예 3	Acetylshikonin	-	-	-
비교예 1	Miconazole	1.3	1.7	1.7
비교예 2	Tetracycline	2.4	3.2	3.2
비교예 3	Alpinumisoflavone	-	-	-
비교예 4	6,8-Diprenylorobol 6	-	0.85	-
비교예 5	Kurarinone 15	1.2	1.35	1.4

[0133] 실험예 4 : 세포 독성 시험

- [0134] 상기 화학식 1의 화합물(4-Hydroxyderricin), 상기 화학식 2의 화합물(Sophoraflavanone G) 및 상기 화학식 3의 화합물(Acetylshikonin)의 인체 유래 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 각 화합물에 의하여 인체 유래 세포의 성장을 저해하는지 측정하였다.
- [0135] 상기 화합물의 성장 저해 효과를 확인 하기 위해 각 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌을 농도에 따라 HaCaT cell line에 각각 처리하고 MTT assay를 수행하였다.
- [0136] 상기 세포 독성 실험은 피부 세포인 HaCaT cell line을 사용하여 수행 하였다. 각 2×10^3 cells/0.1mL의 세포를 96-well tissue culture plates(Falcon)의 각 well에 넣은 후 DMSO에 용해된 각 물질을 표시된 농도로 culture plates에 추가하였다. DMSO는 최대 농도가 0.2%를 초과하지 않도록 투입하였다.
- [0137] 24시간 또는 48시간 경과 후 100 μ L 5mg/mL MTT(sigma Cat. M2128)를 투입한 후, ELISA reader(Epoch, BioTek, USA)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였으며, 모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였다.
- [0138] 도 4 내지 6은 상기 4-히드록시테리신, 소포라플라바논 G 및 아세틸시코닌의 농도별 처리에 따른 세포 독성을 평가한 결과이다.
- [0139] 도 4를 참조하면, 4-히드록시테리신을 고농도(10mg/L)로 처리하였을 경우 $93.1 \pm 8.2\%$ 의 세포 성장이 관찰되었다.

즉, 4-히드록시테리신은 고농도로 사용되더라도 생체에 대한 독성이 매우 낮으며, 통상적인 사용 농도로서 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성이 거의 없을 것으로 분석된다.

[0140] 도 5를 참조하면, 소포라플라바논 G는 고농도(10mg/L)로 처리되었을 경우 $20.6 \pm 6.9\%$ 의 세포 성장이 관찰되었다. 상기 소포라플라바논 G는 고농도로 처리되었을 때 세포의 성장을 일부 저해하였으나, 항균제로서 통상적인 농도로 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성은 극히 미미한 수준일 것으로 분석된다.

[0141] 도 6을 참조하면, 아세틸시코닌은 고농도(10mg/L)로 처리되었을 경우 $65.7 \pm 2.6\%$ 의 세포 성장이 관찰되었다. 상기 아세틸시코닌은 고농도로 처리되었을 때 세포의 성장을 일부 저해하였으나, 항균제로서 통상적인 농도로 사용되는 경우라면 생체에 대한 독성은 극히 미미한 수준일 것으로 분석된다.

[0142] 즉, 상기 화학식 1의 화합물(4-히드록시테리신), 화학식 2의 화합물(소포라플라바논 G) 및 화학식 3의 화합물(아세틸시코닌)은 천연 유래의 화합물로서 항균제의 용도로서 사용되더라도 세포 독성이 낮으므로 인간에 대해 유해성이 낮아 안전하다.

[0143] **실험예 5 : 복합 적용에 따른 항균 활성 시험**

[0144] 상기 화학식 1의 화합물(4-Hydroxyderricin), 상기 화학식 2의 화합물(Sophoraflavanone G)에 대하여 기존 항균제인 테트라사이클린과의 복합 적용에 따른 항균 활성을 평가하였다.

[0145] 테트라사이클린 및 각 화합물의 혼합 사용에 따른 *P. acnes*에 대한 항균 효과를 확인하고자 상기한 Broth microdilution assay를 chequerboard fashion으로 사용하였다.

[0146] 각 화합물의 농도는 최대 200mg/L에서 최소 0.2mg/L이 되도록 계속적으로 2배 희석한 후 96-well microtitre plate에 100 μ L 첨가되었으며, 100 μ L의 각 균주 현탁액($OD_{600}=1$)을 각각의 well 에 투입한 후 35° C에서 24시간 배양하였다.

[0147] 각 화합물에 대한 MIC 값은 각각의 plate에서 균주가 자라지 않는 최소 농도로 하여 각각의 plate에서 다시 확인하였다.

[0148] 상기 혼합 사용에 따른 상승효과는 $FICI=(Ac/Aa)+(Bc/Ba)$ 공식을 사용하여 Fractional inhibitory concentration indexes (FICIs)으로 표시하였다(Choi JG, et al., Molecules. 2009, 14, 1773-1780).

[0149] Ac와 Bc는 혼합 사용한 경우 A 물질 및 B 물질 각각의 MIC 값이며, Aa와 Ba는 단독으로 사용한 경우 A 물질 및 B 물질 각각의 MIC 값이다.

[0150] FICI 값이 0.5 이하인 경우 강력한 상승 효과, 0.5 내지 0.75의 경우 부분적인 상승 효과, 0.75 내지 1.0의 경우 상가 효과, 1.0 내지 4.0 범위에서는 두 물질간 관계 없는 것으로 평가하며, 4.0 이상일 때 반감 효과를 보이는 것으로 평가한다.

[0151] 4-히드록시테리신 및 소포라플라바논 G를 테트라사이클린과 동시에 *P. acnes*에 처리한 후 성장 저해능을 평가하였으며, 결과는 하기 표 6과 같다.

표 6

구분	CCARM 9009			KACC 11946			KCTC 3314		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
4-Hydroxyderricin Tetracycline	1	0.75	0.63	1	0.75	0.75	0.75	0.75	0.63
Sophoraflavanone G Tetracycline	0.5	0.6248	0.1872	2	0.156	0.3756	1	0.48	0.6248

[0153] 표 6을 참조하면, 복합 사용에 따른 상승 효과가 시간이 지날수록 증가하는 양상이 관찰되었다.

[0154] 특히 항균 효과가 가장 우수한 소포라플라바논 G와 테트라사이클린의 복합 사용은 강한 상승 효과를 보이는 것으로 관찰되었으므로, 테트라사이클린의 활성을 증가시켜 항균 활성을 구현함에 있어 필요한 양이 현저히 저감될 수 있다.

[0155] 4-히드록시테리신은 48h 이후 부분적인 상승 효과를 나타내었으므로 복합 사용에 따라 각 화합물의 사용량이 저

감될 수 있다.

[0156] 상기 결과는 상기 화학식 1의 화합물 및 상기 화학식 2의 화합물 모두 기존에 널리 사용되는 항균제인 테트라사이클린과 복합적으로 사용함으로써 우수한 항균 활성을 구현할 수 있을 뿐만 아니라 사용량을 저감시킬 수 있음을 시사한다.

[0157] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

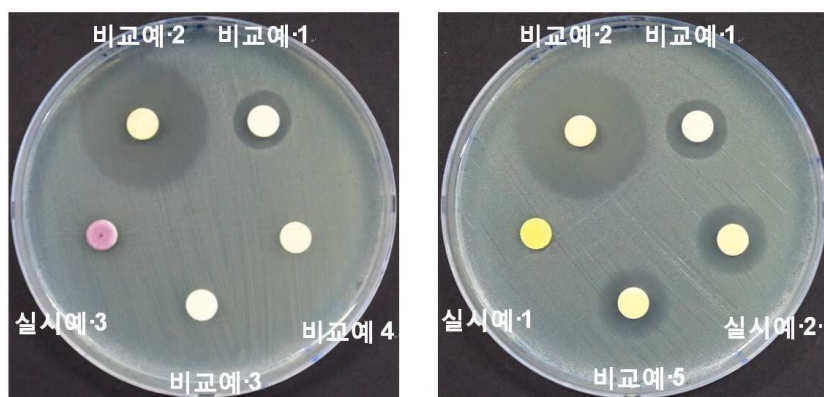
[0158] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

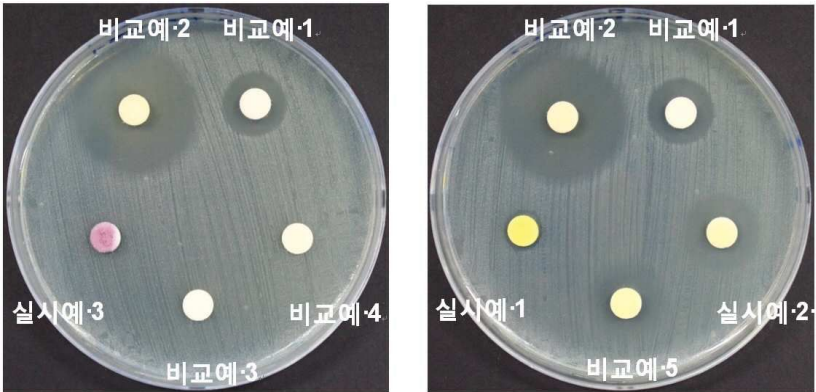
도면1



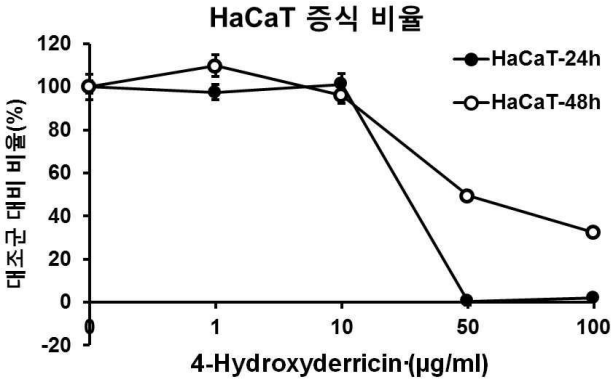
도면2



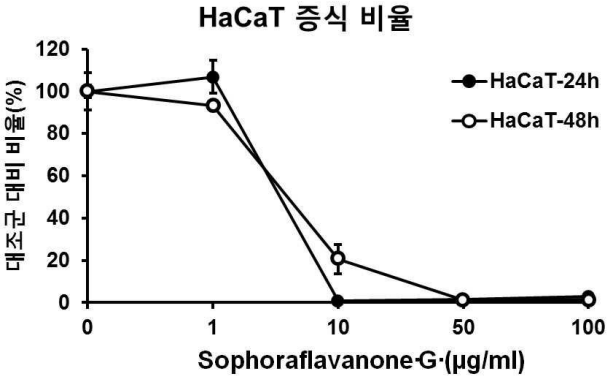
도면3



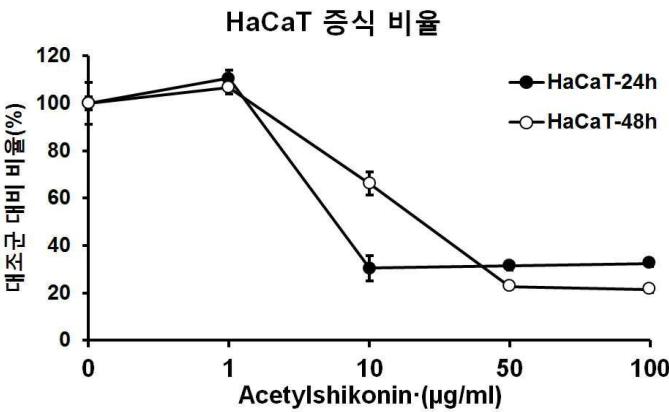
도면4



도면5



도면6



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3항

【변경전】

조성물

【변경후】

항균용 조성물

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 4항

【변경전】

조성물

【변경후】

항균용 조성물

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7항

【변경전】

어느 한 한

【변경후】

어느 한 항

【직권보정 4】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6항

【변경전】

어느 한 한

【변경후】

어느 한 항

【직권보정 5】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5항

【변경전】

어느 한 한

【변경후】

어느 한 항