



등록특허 10-2098583



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월09일  
(11) 등록번호 10-2098583  
(24) 등록일자 2020년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 36/185* (2006.01) *A61K 36/77* (2006.01)  
*A61K 8/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7034913

(22) 출원일자(국제) 2013년05월17일  
심사청구일자 2018년04월12일

(85) 번역문제출일자 2014년12월12일

(65) 공개번호 10-2015-0079496

(43) 공개일자 2015년07월08일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/054054

(87) 국제공개번호 WO 2013/171720  
국제공개일자 2013년11월21일

(30) 우선권주장  
2012/03648 2012년05월18일 남아프리카(ZA)

(56) 선행기술조사문현  
WO2007098873 A1  
Phytomedicine, 2011, 18(11), pp. 1006-1012\*  
Systematic botany, 1992, 17(2), pp. 272-281\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **그레이야 라들코페리 추출물 및 그의 용도**

**(57) 요 약**

본 발명은 피부 과다색소침착(hyper-pigmentation)의 치료를 위한 식물 추출물의 단리 및 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 그레이야 라들코페리(*Greyia radikoferi*, *G. radikoferi*) 식물에서 유래한 식물 물질의 추출물에서 티로시나제(tyrosinase) 저해제의 단리에 관한 것으로, 추출물은 5,7-디하이드록시플라본[(2S)-피노셉브린(pinocembrin)]; 2',6'-디하이드록시-4'-메톡시디하이드로칼콘; 2',4',6'-트리하이드록시하이드로칼콘(trihydroxyhydrochalcone); 3,5,7-트리하이드록시플라본 및 4',5',7-트리하이드록시이소플라본을 포함한다.

(72) 발명자

후세인, 아메드

이집트 11421 카이로 헬완 플랫 5 블럭 3 케이 메  
가와라 3 메이 시티 15

모가페, 엘리자베스

남아프리카 1682 미드랜드 미드리지 파크 샌리지  
빌리지 217

---

무들리, 앵드르

남아프리카 4001 더반 모닝사이드 보이지 로드 4

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- 그레이야 라들코페리(*Greyia radlkoferi*)의 잎을 건조하고;
- 건조된 잎을 분쇄하고;
- 분쇄된 잎을 용매와 혼합하여 폐놀계 화합물을 용매 내로 침출하고;
- 분쇄된 잎을 용매에서 제거하여 식물 추출물이 용매에 남도록 하는 단계를 포함하는, 티로시나제 저해제 활성을 갖는 식물 추출물의 제조방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 용매가 물 및 에탄올로 구성되는 군에서 선택된 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 분쇄된 잎과 용매를 혼합하는 단계가 잎에서 용매로의 폐놀계 화합물 침출을 향상하기 위해 혼합물을 교반하는 추가 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 용매에서 분쇄된 잎을 제거하는 단계가 용매를 진공 여과 시스템에 통과시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 보존제를 식물 추출물에 첨가하는 추가 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 보존제가 중량 당 중량 기준으로 식물 추출물에 첨가된 1%의 페녹시에탄올과 에틸헥실글리세린 혼합물의 형태인 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 크림; 로션; 수성 용액; 밤; 자외선 차단제; 스킨 오일 및 연고로 구성되는 군에서 선택된 국소 투약 형태로 식물 추출물을 제조하는 추가 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

5,7-디하이드록시플라본[(2S)-피노셈브린(pinocembrin)]; 2',6'-디하이드록시-4'-메톡시디하이드로칼콘; 2',4',6'-트리하이드록시하이드로칼콘(trihydroxy-hydrochalcone); 3,5,7-트리하이드록시플라본 및 4',5',7-트리하이드록시이소플라본을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된, 티로시나제 활성을 저해하는 식물 추출물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, L-티로신과 디하이드록시페닐알라닌 (DOPA)을 기질로서 사용할 때 17.96  $\mu\text{g}/\text{ml}$  내지 32.62  $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위의 50% 저해농도( $IC_{50}$ )로 티로시나제 저해 활성을 나타내는 식물 추출물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 피부 과다색소침착의 치료에 사용하기 위한 것인 식물 추출물.

#### 청구항 11

제8항에 있어서, 피부 과다색소침착 환자를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 국소 투약 형태로 제조된 것인 식

물 추출물.

### 청구항 12

피부 과다색소침착의 치료를 위한, 제8항에 따른 식물 추출물을 피부과학적으로 허용가능한 담체에 포함하는, 크림; 로션; 수성 용액; 밤; 자외선 차단제; 스킨 오일 및 연고로 구성되는 군 중 어느 하나로부터 선택된 국소 투약 형태.

### 청구항 13

삭제

### 청구항 14

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 피부 과다색소침착(hyper-pigmentation)의 치료를 위한 식물 추출물의 단리 및 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 그레이야 라들코페리(*Greyia radlkoferi*, *G. radlkoferi*) 식물의 식물 물질로부터 티로시나제(tyrosinase) 저해제의 단리에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002]

피부 과다색소침착은 약 10%의 멜라닌 세포에 존재하는 색소인 멜라닌의 과생성으로 인한 증상이다. '티로시나제'로 지칭되는 구리 함유 모노-옥시게나제 효소가 멜라닌 합성의 주효소이며, 멜라닌 생합성이 생합성 경로에서 속도 제한 단계를 촉매하는 티로시나제 효소에 의해 조절되기 때문이다. 티로시나제의 과도한 활성은 궁극적으로 피부의 과다색소침착을 유도하는 멜라닌의 과생성을 유발한다. 피부의 과다색소침착은 UV광에 대한 과다 노출, 약물에 대한 부작용 때문일 수 있으며 노화에 의해서도 발생한다.

[0003]

따라서, 티로시나제 효소의 저해는 피부 과다색소침착 치료의 잘 알려진 목표이다. 피부 과다색소침착의 치료를 위해 사용된 다양한 공지 제품들은 독성 및 다른 부작용과 연관되어 있다. 공지 제품들은 하이드로퀴논, 코직산(kojic acid), 아르부틴(arbutin), 글라브리딘(Glabridin) 및 이소리퀴리티제닌(isoliquiritigenin) 같은 약물을 포함한다. 이러한 약물을 함유하는 일부 화장품들은 사람에게서 세포독성 및 돌연변이성이 있는 것으로 밝혀졌다. 세포독성과 돌연변이성 이외에도 피부 과다색소침착에 대한 기존의 치료는 이하에서 보다 상세히 설명한 것처럼 특이하고 바람직하지 않은 부작용을 유발한다고 알려져 있다.

[0004]

하이드로퀴논은 의학연구 및 문헌에서 멜라닌 생성 저해를 위한 1차 국소 성분으로서 널리 인정되고 있다. 이것은 피부 자극을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 지각된 발암원 특성에 대한 우려도 있다. 따라서, 유럽연합국가들에서는 피부 미백제로서 사용이 금지되었고, 일반의약품 판매가 우려되기 때문에 미국 FDA에 의해 규제되고 있다.

[0005]

코직산은 일본식 청주, 또는 통상적으로 알려진 사케의 제조에서 쌀 발효로부터 얻어진 부산물이다. 코직산은 멜라닌 생성의 효과적인 저해제라고 홍보되고 있으며 피부 과다색소침착 치료에서 적시된 가장 효과적인 순수 생성물 중 하나로 폭넓게 받아들여지고 있다. 그러나, 피부 과다색소침착을 치료하는데 있어서 코직산의 사용은 코직산이 발암원성일 수 있다는 연구들로 인해 점점 논란이 되고 있으며, 그에 따라 한국과 일본에서는 미용적 사용이 금지되었다. 제안된 발암원 가능성 이외에도, 코직산은 자극성 접촉성 피부염의 잠재적 원인인 것으로 밝혀졌으며; 알러지를 일으키고; 민감화 가능성이 높고; 높은 빈도의 접촉과민증을 갖는다. 코직산은 또한 햇빛과 외기에 노출되었을 때 갈변하고, 이로 인해 효능이 저하되는 것으로 확인되었다. 코직 디팔미테이트가 코직산과 연관된 단점을 극복하기 위한 코직산의 대안으로 제안되었으나, 시험에서는 코직 디팔미테이트가 코직산과 같은 효능을 제공하지는 않는 것으로 나타났다.

[0006]

피부 과다색소침착의 치료에서 적시된 또 다른 공지 화합물이 아르부틴이며, 이것은 오디, 크랜베리 및 블루베리 같은 다양한 베리(berry)(장과)류 식물에서 유도된다. 아르부틴은 피부 미백특성을 갖는 것으로 나타났지만 피부자극과 연관되어 있다.

[0007] 또한, 글라브리딘과 이소리퀴리티제닌은 모두 감초(*Glycyrrhiza glabra*)에서 추출되며 피부 미백특성을 나타내는 것으로 확인되었으나, 피부를 효과적으로 투과하지 못하고 제제로 사용되었을 때 둘 다 불안정하다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 피부 과다색소침착에 대한 공지된 티로시나제 저해제와 다른 치료제의 상기한 단점을 적어도 부분적으로 극복할 수 있는 티로시나제 저해제를 제공하거나, 비용 효과적 방법으로 공지된 티로시나제 저해제보다 상대적으로 더 유용하고 환경친화적인 유기 대체물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 제1 측면에 따라, 피부 과다색소침착의 치료를 위한 티로시나제 저해제 활성을 갖는 식물 추출물을 제조하는 방법을 제공하며, 이 방법은 다음을 포함한다:

[0010] - 그레이야 라들코페리(*G. radlkofeiri*)의 잎을 건조하고;

[0011] - 건조된 잎을 분쇄하고;

[0012] - 분쇄된 잎을 용매와 혼합하여 폐놀계 화합물을 용매 내로 침출하고;

[0013] - 분쇄된 잎을 용매에서 제거하여 식물 추출물이 용매에 남도록 하는 단계.

[0014] 또한, 본 발명에 따라, 용매는 물과 에탄올로 구성되는 군에서 선택될 수 있다.

[0015] 분쇄된 잎과 용매를 혼합하는 단계는 잎에서 용매로의 폐놀계 화합물 침출을 향상하기 위해 혼합물을 교반하는 추가단계를 포함할 수 있다.

[0016] 분쇄된 잎을 용매에서 분리하는 단계는 용매를 진공 필터 시스템을 통과시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따라, 본 방법은 식물 추출물에 보존제를 첨가하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 보존제는 중량 당 중량 기준으로 식물 추출물에 1%의 폐녹시에탄올과 에틸헥실글리세린 혼합물 형태로 첨가된다.

[0018] 본 발명에 따라, 본 방법은 크림; 로션; 수성 용액; 밤(balm); 자외선 차단제; 스킨 오일 및 연고로 구성되는 군에서 선택된 국소 투약 형태로 식물 추출물을 제조하는 단계를 추가로 포함한다.

[0019] 본 발명의 제2 측면에 따라, 추출물이 5,7-디하이드록시플라본[(2S)-피노SEMB린(*pinocembrin*)]; 2',6'-디하이드록시-4'-메톡시디하이드로칼콘; 2',4',6'-트리하이드록시하이드로칼콘(*trihydroxyhydrochalcone*); 3,5,7-트리하이드록시플라본 및 4',5',7-트리하이드록시이소플라본을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명의 제1 측면의 방법에 따라 제조된, 티로시나제 활성을 저해하여 피부 과다색소침착을 치료하기 위한 식물 추출물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명에 따르면, 식물 추출물은 L-티로신과 디하이드록시페닐알라닌 (DOPA)을 기질로서 사용할 때 17.96  $\mu\text{g}/\text{ml}$  내지 32.62  $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위의 50% 저해농도( $\text{IC}_{50}$ )로 티로시나제 저해 활성을 나타낸다.

[0021] 본 발명의 제3 측면에 따라, 피부 과다색소침착 환자를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 국소 투약 형태의 제조에서 본 발명의 제1 및 제2 측면에 따른 식물 추출물의 용도가 제공된다.

[0022] 본 발명의 제4 측면에 따라, 본 발명의 제2 측면에 따른 식물 추출물을 포함하는 피부 과다색소침착의 치료를 위한, 피부과학적으로 허용가능한 적합한 담체 중의, 크림; 로션; 수성 용액; 밤; 자외선 차단제; 스킨 오일 및 연고로 구성되는 군에서 선택된 국소 투약 형태를 제공한다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명의 바람직한 구체예를 비제한적 실시예를 참조로 더욱 상세히 설명하였다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구체예에 따라, 피부 과다색소침착의 치료를 위한 티로시나제 저해제 활성을 갖는 식물 추출물을 제조하는 방법은 다음을 포함한다:

[0025] - 그레이야 라들코페리의 잎을 햇빛에 노출을 피하여 실온에서 공기 건조하고;

[0026] - 건조된 잎을 분쇄하고;

[0027] - 25 g의 분쇄된 잎을 200 ml의 용매와 혼합하여 혼합물을 제조하고;

[0028] - 혼합물을 48시간 동안 교반하여 폐놀계 화합물을 용매 내로 침출하고;

[0029] - 분쇄된 잎을 용매로부터 부흐너(Buchner) 깔대기를 사용하여 진공 여과에 의해 분리하여 식물 추출물을 제조하는 단계.

[0030] 분쇄된 잎과 혼합하는데 사용된 용매는 바람직하게 70% 에탄올이다. 탈이온화 중류수를 유기 추출물을 얻기 위한 에탄올의 대체 용매로 사용할 수 있다.

[0031] 식물 추출물은 1%의 폐녹시에탄올과 에틸헥실글리세린 혼합물 형태의 보존제를 식물 추출물에 중량 당 중량 기준으로 첨가하여 보존한 후, 이것을 냉장실에서 4 °C로 보관한다. 보존제 시험에서는 추출물에 첨가된 보존제가 특정 미생물, 예를 들어 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 아우레기노사(*Pseudomonas aureginosa*), 캔디다 알비坎스(*Candida albicans*) 및 아스페질러스(*Aspergillus*)의 생장을 억제하는데 성공적인 것으로 나타났다.

[0032] 식물 추출물의 구성 화합물을 측정하기 위해, 식물 추출물을 생물학적 검정 가이드 분획화를 수행하였다. 여기에서, 약 59.5 g의 식물 추출물을 최소량의 아세톤 용매에 용해하여 실리카겔과 혼합하였다. 이후, 혼합물을 미세 분말을 형성할 때까지 건조하였다. 미세 분말을 실리카겔 컬럼에서 극성을 증가하는 헥산(Hex):에틸아세테이트(EtOAc) 혼합물(100:0 Hex 대 0:100 EtOAc)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 각각 대략 500 ml의 총 40개 예비 분획을 수집하였다. 컬럼을 2 리터의 100% 메탄올(MeOH)로 세척하였다. 이후, 예비 분획을 회전식 증발을 사용하여 농축하고 박층크로마토그래피(TLC) 플레이트에 스팟팅한 다음, 디클로로메탄(DCM:MeOH) 95:5으로 전개하고 UV광 하에서 조사하여 바닐린 용액(7.5 g 바닐린, 250 ml EtOH 및 5 ml 진한 98% 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>))에 침지하고 가열하여 UV광 하에서 흡수가 없는 화합물을 검출하였다. TLC 플레이트 상에서 유사 프로파일의 화합물을 함유하는 분획을 모아서 회전식 증발을 사용하여 농축하였다. 이후, 이 분획들은 생리활성 화합물의 단리 및 동정을 위해 추가로 크로마토그래피하였다. 이 단계 후에, 특정 분획에 대해 일련의 세파텍스 컬럼 LH-20을 수행하고 100% EtOH로 용출한 후, 100% MeOH로 세척하여 화합물 C1을 수득하였다. 다른 분획에 대해 먼저 100% MeOH를 용매로 사용하는 일련의 세파텍스 컬럼을 수행하여 특정 분획을 얻었으며, 이들 중 하나를 100% MeOH를 사용하여 세파텍스 컬럼을 수행하여 서브분획을 얻었다. 서브분획들 중 하나를 제조용 TLC를 수행하고 DCM:MeOH (9:1)로 용출하여 화합물 C2를 단리하였다. 다른 분획에 대하여 100% MeOH를 사용하는 세파텍스 컬럼을 수행하여, 이로부터 화합물 C3를 단리하였다. 화합물 C4 및 C5를 유사한 방법으로 단리하였다.

[0033] 생물학적 검정 가이드 분획화의 최종 생성물은 5종의 공지된 폐놀계 화합물, 즉 5,7-디하이드록시플라본[(2S)-피노셈브린](C1); 2',6'-디하이드록시-4'-메톡시디하이드로칼콘(C2); 2',4',6'-트리하이드록시하이드로칼콘(C3); 3,5,7-트리하이드록시플라본(C4) 및 4',5',7-트리하이드록시이소플라본(C5)의 단리물이고, 이들 모두는 티로시나제 활성 저해에서 상승작용뿐만 아니라 개별적인 티로시나제 저해 능력을 나타내는 것으로 입증되었다.

[0034] 이러한 화합물들은 이미 다른 식물에서 추출되었으며, 이들의 티로시나제 저해 품질은 이전에 문서화되었다. 그러나, 그레이야 라들코페리는 상기한 화합물들 5종(C1 내지 C5)이 모두 하나의 단일 식물에서 발견된 최초의 식물로, 남아프리카 공화국이 원산지이다.

[0035] 이러한 개별 폐놀계 화합물은 별도로 사용될 때 상이한 수준의 티로시나제 저해를 나타낸다. C3(2', 4', 6'-트리하이드록시디하이드로칼콘)는 17.86 μg/ml의 50% 저해농도(IC<sub>50</sub>)값을 나타내고, C4(3,5,7-트리하이드록시플라본, 갈란긴(galangin)으로도 칭함)는 2.23 μg/ml의 IC<sub>50</sub>값을 나타내며 50% 초과의 멜라닌을 3.1 μg/ml 정도의 농도로 저해한다. C2(2',6'-디하이드록시-4'-메톡시디하이드로칼콘, 제니스테인(genistein)으로도 칭함)는 21.42 μg/ml의 IC<sub>50</sub>값을 나타내며 3.125 μg/ml에서 20% 멜라닌 감소가 관찰되었다.

[0036] 그레이야 라들코페리로부터의 식물 추출물은 L-티로신과 DOPA를 기질로 사용했을 때 17.96 μg/ml의 IC<sub>50</sub>값을 보이는 상당한 저해 활성을 나타내어, IC<sub>50</sub>이 코직산(3.78 μg/ml), 이소리퀴리티제닌(896.88 μg/ml), 아르부틴(149 μg/ml) 및 그레이야 플라나가니(*Greya flanaganii*)로부터의 추출물(32.62 μg/ml) 같은 공지된 화합물에 비해 훨씬 낫다.

[0037] 식물 추출물은 또한 반점 감소 및 피부 톤(tone) 테스트로 알려진 임상 시험에서 3 %에서 증가된 피부 색조를 나타낸 반면, 그레이야 플라나가니는 3%에서 동일한 효능을 나타내지 않았다.

[0038] 과다색소침착의 저해는 효소 농도의 저해에 제한되는 것이 아니라, 멜라닌 저해가 시험관 내에서 멜라노사이트 세포에 의한 멜라닌 방출의 저해로도 얻어질 수 있다. 이 시험을 수행하는데 있어서, 식물 추출물을 아르부틴 양성 대조군과 비교하였고, 멜라닌 세포에서 50% 멜라닌 감소가 관찰되었으며, 세포는 최대 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 살아 있었다.

[0039] 식물 추출물은 5.0  $\text{mg}/\text{ml}$ 의 상대적으로 높은 농도에서 시험되었을 때에도 비돌연변이성(non-mutagenic)이었다.

[0040] 그레이야 라들코페리의 약용화장품(cosmeceutical) 활성물질에 대한 미생물 및 중금속 분석 조사에서는 임의의 미생물 오염과 납, 비소, 수은 등의 중금속이 존재하지 않는 것으로 나타났다.

[0041] 본 발명에 따른 식물 추출물은 피부 과다색소침착이 있는  $20 \text{ cm}^2$ 의 피부 당 약 5  $\text{ml}$ 의 식물 추출물 적용을 제공하도록 제제화된 피부 과다색소침착의 치료를 위한 국소 투약 형태에 포함된다. 국소 투약 형태는 수성 크림과 같은 피부과학적으로 허용가능한 적합한 담체 중의 크림; 로션; 수성 용액; 밤; 자외선 차단제; 스킨 오일 및/또는 연고로서 제조된다.

[0042] 피부 과다색소침착을 치료하기 위한 공지된 화합물, 예를 들어 아르부틴으로 기록된 단점들 중 하나는 피부 자극이다. 따라서, 이러한 단점을 본 발명에 따른 식물 추출물 및 이를 추출하는 방법에 의해 극복하였다.

[0043] 본 식물 추출물은 또한 증가된 피부 투과를 나타내며, 그에 따라 감초 식물에서 추출될 수 있는 글라브리딘과 이소리퀴리티제닌 같은 다른 공지 화합물이 나타내는 피부 투과 감소의 단점을 극복하였다.

[0044] 피부 과다색소침착의 공지된 치료제인 하이드로퀴논 및 코직산과 연관된 세포독성, 돌연변이성 및 발암원성 같은 심각한 단점 또한 본 발명에 따른 식물 추출물에 의해 극복되었다.

[0045] 본 발명에 따른 피부 과다색소침착의 치료에서 사용하기 위한 식물 추출물 및 이를 추출하는 방법으로, 첨부된 특허청구범위의 범위를 벗어나지 않고 상세의 변형이 가능한 것을 이해하여야 한다.