(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0062120
(43) 공개일자 2012년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0123230
(22) 출원일자 2010년12월06일
심사청구일자 2010년12월06일

(71) 출원인
(주)코스비전
경기도 용인시 기흥구 중부대로 1 (영덕동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
이세미
경기도 수원시 권선구 일월천로16번길 39, LD 코오롱아파트 104동 1801호 (구운동)
황재성
서울특별시 송파구 동남로18길 44, 프라자아파트 9동 402호 (가락동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤동열

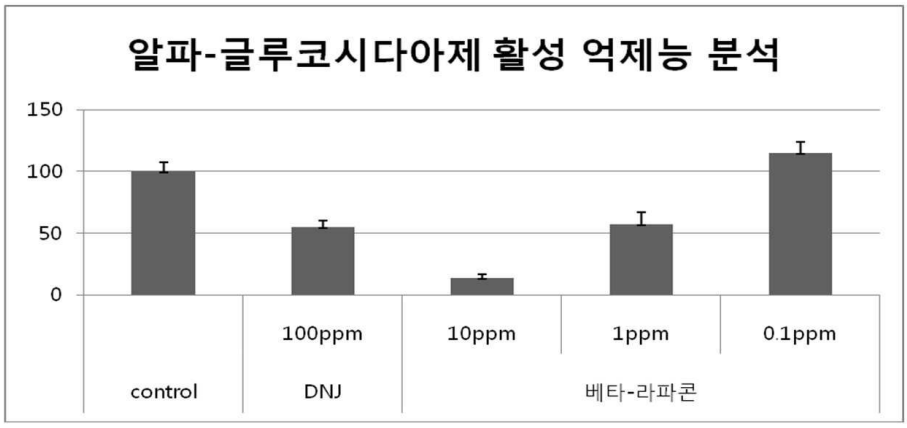
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **베타-라파콘을 함유하는 피부 과색소성 질환 치료 및 피부 미백용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 베타-라파콘(beta-lapachone)을 함유하는 피부 과색소성 질환 치료 및 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하여 글루코시다아제 효소의 활성을 효과적으로 억제함으로써 멜라닌의 생합성을 막아 피부 미백 활성이 우수하고, 멜라닌의 과잉 형성을 억제함으로써 그로 인한 피부 과색소성 질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이석민

경기도 수원시 권선구 일월천로16번길 39, LD코오롱아파트 104동 1801호 (구운동)

구정현

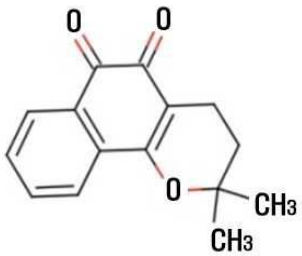
경기도 용인시 기흥구 구성2로 52, 휴먼시아물푸레마을1단지아파트 108동 803호 (청덕동)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 과색소성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 베타-라파콘은 타베뷔아 아베라네다(Tabebuia-Avellanedae)의 껍질로부터 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 과색소성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

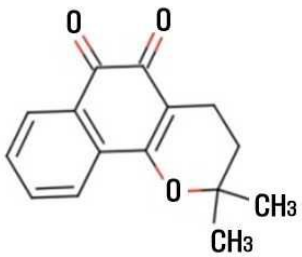
청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 피부 과색소성 질환은 백반, 바덴부르그 증후군과 같은 유전적 피부 질환; 후염증성 백색 비강진, 원인불명 물방울 멜라닌 저하증, 기미와 같은 후천적 피부 질환; 미노사이클린, 블레오마이신, 부술판, 지도부딘과 같은 약물치료에 기인한 피부 질환; 또는 어루러기와 같이 감염을 통해 전이된 피부 질환;인 것을 특징으로 하는 피부 과색소성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1의 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 조성물 총 중량에 대하여 0.001~20중량%을 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 베타-라파콘은 타베뷔아 아베라네다(Tabebuia-Avellanedae)의 껍질로부터 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 베타-라파콘(beta-lapachone)을 함유하는 피부 과색소성 질환 치료 및 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하여 글루코시다아제 효소의 활성을 효과적으로 억제함으로써 멜라닌의 생합성을 막아 피부 미백 활성이 우수하고, 멜라닌의 과잉 형성을 억제함으로써 그로 인한 피부 과색소성 질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사람의 피부색을 결정하는 멜라닌(melanin)은 멜라노사이트 (melanocyte)라 불리는 피부 세포에서 만들어져 케라티노사이트(keratinocyte)라는 표피 세포로 이동한다. 여기서 멜라닌은 핵 주변에 모자와 같은 구조를 형성하여 자외선으로부터 유전자를 보호하고 자유 라디칼(free radical)을 제거하여 세포 내단백질을 보호하는 등 중요한 역할을 하게 된다.

[0003] 멜라닌생성(melanogenesis)은 멜라닌세포에서 멜라닌 색소가 생합성되는 것을 의미하며, 이는 세포내 및 세포외 환경에 의해 조절된다. 이러한 멜라닌생성은 티로시나아제에 의해 촉발되는데, 이는 티로신을 도파퀴논으로 산화시키고, 상기 도파퀴논은 계속해서 엷은 황색/적색 화합물인 페오멜라닌(pheomelanin)과 연갈색 내지 흑색인 유멜라닌(eumelanin)으로 전환된다. 피부에서, 멜라닌은 색소형성에 영향을 주고, 피부를 자외선과 다른 피부 질환의 원인들로부터 보호하지만, 반면에 멜라닌의 비정상적인 축적은 기미와 주근깨를 형성시킬 수도 있다.

[0004] 멜라닌 과잉 형성에 기인한 피부 과색소성 질환으로는 유전적피부 질환, 예를 들어, 백반, 바덴부르그 증후군, 후천적 피부 질환, 예를 들어, 후염증성 백색 비강진, 원인불명 물방울 멜라닌 저하증, 기미, 약물치료에 기인한 피부 질환, 예를 들어, 미노사이클린, 블레오마이신, 부술판, 지도부딘, 및 감염을 통해 전이된 피부 질환, 예를 들어, 어루러기 등이 있다.

[0005] 생체 내에는 멜라닌을 분해하는 효소가 없고 다만 케라티노사이트가 표피에서 떨어져나갈 때, 멜라닌과 함께 피부에서 떨어져나가는 것으로 제거된다. 하지만 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생기게 되면 기미나 주근깨, 점 등과 같은 과색소침착증을 유발하여 미용상으로 좋지 않은 결과를 가져오게 된다. 또한 레져 인구의 증가로 외부에서 활동하는 것을 즐기는 사람들이 많아지면서 자외선에 의한 멜라닌 색소 침착을 막고자 하는 요구가 더욱 늘어나게 되었다. 이에 과도한 멜라닌 생성을 막는 미백제 개발이 필요하게 되었고 그 동안 많은 노력들이 이루어 졌다.

[0006] 이제까지의 미백제 개발은 주로 멜라닌 생합성에서 없어서는 안될 기본적이면서도 가장 중요한 역할을 하는 효소인 타이로시네이즈(tyrosinase)의 활성을 저해하는 것을 통해 멜라닌 양을 줄이는 물질을 찾는 것으로 이루어져왔다. 합성 미백제에 대한 최근의 연구에서 알콕시 벤조에이트 및 알콕시 신나메이트 유도체, 및 하이드록삼산의 용도가 탐색된 바 있다. 다른 연구들은 공지된 티로시나아제 저해제의 유도체, 예를 들어 5-[(3-아니노프로필)포스피노옥시]-2-(하이드록시메틸)-4H-피란-4-온{5-[(3-aminopropyl) phosphinooxy]-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one}, 및 N-하이드록시신나모일펜알킬-아미드(Nhydroxycinnamoylphenalkyl-amide) 유도체의 합성에 초점이 맞추어져 있었다.

[0007] 이렇게 개발된 미백제로 코직산, 알부틴, 글루타치온, 비타민A, 비타민 C 등이 있지만 소비자들이 만족할 만한 미백효과를 갖지 못하고 있으며 부작용 때문에 그 사용량에 제한이 따른다. 따라서, 기존의 미백제보다 효능이 뛰어나고 좀 더 안전한 미백제를 개발하는 것이 절실한 시점이 되었다.

[0008] 멜라닌을 생합성 하는 효소인 타이로시네이즈는 당단백질로써, 생체 내 당단백질 합성 과정인 글라이코실레이션(glycosylation) 과정을 통해 만들어진다. 이 글라이코실레이션 과정에 문제가 생겨 타이로시네이즈의 당부분에 이상이 생기면 타이로시네이즈는 세포내 멜라닌 생합성 장소인 멜라노좀(melanosome)으로 이동하지 못하고 따라서 멜라닌 생성이 이루어질 수 없게 된다.

[0009] 상기 글라이코실레이션 과정에는 많은 효소가 관여하는데 그 중 중요한 효소가 글루코시다아제(glucosidase)이다. 만약 이 효소의 효소 활성을 억제할 수 있다면 멜라닌의 생합성을 억제할 수 있고, 따라서 미백 효과를 가져올 수 있을 것이다.

[0010] 한편 이러한 글루코시다아제의 활성 억제물질은 수크로오스, 말토오스, 말토트리오스(maltotriose) 및 올리고당(oligosaccharide)을 단당류인 D-글루코오스(D-glucose), D-갈락토오스(D-galactose) 및 D-프럭토오스(D-fructose)로 전환시키는 작용을 억제함으로써 탄수화물의 가장 최종적인 소화단계에서 글루코오스로 전환되는 것을 막고 특히 식후에 급격한 혈당의 상승을 방지하는데 사용되기도 한다.

[0011] 이와 관련하여 종래 대한민국 특허 공개번호 제10-2005-0099839호 '방선균 배양물 추출물을 함유하는 피부 미백용 조성물'에는 방선균(Actinomycetes) 균주 또는 방선균(Actinomycetes) 배양물 추출물이 멜라닌 생합성에 관여하는 효소인 타이로시네이즈(tyrosinase)를 합성하는 글라이코실레이션(glycosylation)의 과정에 관여하는 중요한 효소인 베타-글루코시다아제(betaglucosidase)의 효소 활성을 억제함으로써, 타이로시네이즈의 글라이코실레이션을 억제하여 멜라닌 생성을 저해함으로써 미백 효과를 나타낸다는 사실이 개시되어 있다.

[0012] 베타-라파콘은 능소화과(Bignoniaceae) 타베비아(Tabebuia)속인 식물에 많이 함유되어 있는 단일 물질로, 토포아이소머레이즈-I, II의 인히비터(Topoisomerase-I, II inhibitor, Inflamm Res 2003 Jan;52(1):8-17)로 연구가 되고, 특히 항암치료제로 연구가 많이 되고 있다. 베타-라파콘은 항미생물, 항균, 항종양, 항백형변, 항염작용을 갖으나 부작용이 큰 라파콜과 유사한 활동을 하지만 부작용이 없는 것으로 밝혀져 있다. 또한 베타 라파콘(beta-lapachone)은 전골수구성백혈병(promyelocytic leukemia), 전립선암, 신경교종암(malignant glioma), 대장암, 유방암, 간암, 난소암, 췌장암, 다발성골수종과 같은 사람의 암세포에 대항하는 항암효능이 있다고 알려진바 있고, 또한 현재 베타 라파콘의 또 다른 '전립성 종양의 성장을 억제하는 생체능력'이란 특허가 출원되어있다.

[0013] 이러한 베타-라파콘은 타베뷔아 아베라네다(Tabebuia-Avellanedae)의 껍질 성분에 많이 함유되어 있어 이로부터 추출하여 얻은 추출물을 이용한 '타히보 추출물을 함유하며 항염증 및 피부자극완화 효능을 갖는 화장료 조성물(대한민국 특허 공개 번호 제10-2009-0025497호)'가 공개되어 있으나, 베타-라파콘을 이용하여 글루코시다아제 억제 기능을 가진 미백 물질을 개발하거나 미백 효능을 검증한 예는 없으며 이에 대한 특허는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 이에, 본 발명자들은 기존의 미백제보다 효능이 뛰어나고 안전한 미백 물질을 개발하고자 여러 식물 추출물에서 글루코시다아제 효소 활성 억제능을 검색해본 결과, 베타-라파콘이 매우 우수한 글루코시다아제 효소 활성 억제능을 가짐을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 멜라닌 과잉 생성에 기인한 피부 과색소성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 인체에 안전하면서 피부 미백 효과가 우수한 피부 미백용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 과색소성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 베타-라파콘(beta-lapachone)을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 베타-라파콘(beta-lapachone)은 글루코시다아제 효소의 활성 억제 효과와 멜라닌 생성 억제 효과가 우수하여 멜라닌 과잉 생성으로 인한 피부 과색소성 질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다. 또한, 피부 미백 활성에도 매우 효과적이므로 제약산업상 및 화장품 산업상 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 베타-라파콘(beta-lapachone)의 알파-글루코시다아제 활성 억제 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 베타-라파콘(beta-lapachone)의 멜란-a 세포에서 멜라닌 억제 효능 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 시험예 3에서의 세포액을 원심분리하여 얻은 펠렛의 사진이다.

도 4는 베타-라파콘(beta-lapachone)의 HM3KO 세포에서 멜라닌 억제 효능 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 베타-라파콘(beta-lapachone)의 멜란-a 세포내의 타이로시네이즈 활성 억제 효능 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 과색소성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

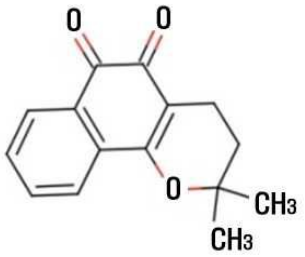
[0022] 본 발명은 또한 베타-라파콘(beta-lapachone) 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0024] 본 발명에 있어서, "유효성분"이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능?효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0025] 본 발명의 유효성분인 베타-라파콘(beta-lapachone)의 화학구조식은 하기 화학식 1과 같다.

화학식 1

[0026] 

[0027] 본 발명의 베타-라파콘은 타베뷔아 아베라네다(Tabebuia-Avellanedae)의 껍질로부터 추출할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 화학식 1의 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염은 피부 세포에서 멜라닌을 생합성하는 효소인 타이로시네이즈 합성 과정인 글라이코실레이션(glycosylation) 과정 관여하는 글루코시다아제(glucosidase)의 효소 활성을 효과적으로 억제하여 멜라닌의 생합성을 억제하여 피부 미백 활성을 증가시킬 수 있는 동시에, 멜라닌의 과잉 형성을 억제함으로써 그로 인한 피부 과색소성 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 멜라닌 과잉 형성에 기인한 피부 과색소성 질환으로는 유전적 피부 질환, 예를 들어, 백반, 바덴부르그 증후군, 후천적 피부 질환, 예를 들어, 후염증성 백색 비강진, 원인불명 물방울 멜라닌 저하증, 기미, 약물치료에 기인한 피부 질환, 예를 들어, 미노사이클린, 블레오마이신, 부술판, 지도부딘, 및 감염을 통해 전이된 피부 질환, 예를 들어, 어루러기 등이 있다

[0030] 본 발명의 화학식 1의 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약제학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 약제학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0033] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0034] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염의 바람직한 투여량은 환자의상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화학식1의 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 따른 화학식 1의 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 및 피부에 직접 투여될 수 있다.

[0037] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 상기 조성물은 화장수(스킨로션), 로션, 크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 제형들은 당업계에 종래 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0038] 또한, 상기 화학식 1의 베타-라파콘 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 20중량%로 포함될 수 있다. 이는 0.001중량% 미만이면 그 효과가 미미하고, 20중량% 초과이면 피부자극이 있을 수 있기 때문이다.

[0039] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 화학식 1의 물질 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

[0040] 이하, 실시예, 비교예 및 시험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예, 비교예 및 시험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 하기 실시예, 비교예 및 시험예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0041] [실험예 1] 알파 글루코시다아제 활성의 억제 효능 평가

[0042] 알파-글루코시다아제가 p-니트로페닐(PNP) 알파-D-글루코사이드의 글루코사이드 부분을 기질로 인식하여, PNP와 알파-D-글루코사이드를 효소반응으로 끊어주기 때문에 여기서 나온 PNP의 양을 405nm에서 흡광도를 측정하여 알파-글루코시다아제 활성을 간접적으로 측정하였다.

[0043] 데옥시노지리마이신(Deoxynojirimycin, DNJ) 100ppm을 양성 대조군으로 사용하고, DMSO를 대조군으로 사용하고, 베타-라파콘을 10, 1, 0.1ppm의 농도로 사용하였다. 베타-라파콘은 시그마알드리치사에서 구입하여 DMSO

에 녹여 1% 용액으로 만들어 사용하였다.

[0044] 50 mM 인산염 완충액(pH 6.8)에 시료물질과 알파-글루코시다아제(0.6unit/ml)을 넣어주고, 10 mM의 PNP 알파-D-글리코사이드 용액을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 효소 반응 시킨 후, 1M의 Na_2CO_3를 3배 넣어 반응을 정지시켰다. 효소반응에서 생성된 PNP의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 하기 수학식 1에 따라 알파-글루코시다아제의 활성 저해율을 계산하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0045] 별도로 베타-라파콘 및 DNJ의 농도가 100ppm일 경우, IC_{50}(half maximal inhibitory concentration: 효소 활성 50% 저해 농도)를 측정하여 하기 표 1에 나타내었다. IC_{50} 농도는 실험을 통해 결과를 토대로 농도에 따른 활성억제율에 대한 추세선과 그 식을 구한 후 억제율 50%이 되도록 하는 물질의 농도를 산출하였다

[0046] [수학식 1]

[0047] α-글루코시다아제 활성 저해율(%) = 100-{(b-b')/(a-a')}×100

[0048] a: (-) 음성대조군의 흡광도

[0049] b: 시료물질의 흡광도,

[0050] a', b': α-글루코시다아제 대신 H_2O로 대체하여 측정한 흡광도

[0051] 그 결과 도 1에 나타낸 바와 같이, 베타-라파콘(beta-lapachone)은 농도에 비례하여 알파-글루코시다아제의 활성을 낮추는 결과를 나타내었다. 특히, 양성대조군으로 사용한 DNJ보다 낮은 농도에서도 높은 알파-글루코시다아제의 활성 저해 효과를 나타내었다.

[0052] *표 1*

물질	IC_{50} (ppm)
베타-라파콘	15.8
DNJ	100.0

[0053] 상기 표 1에서 알 수 있듯이, 본 발명의 베타-라파콘은 DNJ보다 더 낮은 IC_{50}농도를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 따라서, 본 발명의 베타-라파콘은 알파-글루코시다아제의 활성을 효과적으로 억제함으로써 멜라닌의 생합성을 억제하여 피부 미백 효과가 우수하다.

[0055] [실험예 2] 멜란-a(melan-a) 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제 효과

[0056] C57BL/6 마우스에서 유래한 불멸화 세포주인인 멜란-a(melan-a) 세포는 베넷 박사(Dr. Bennett; Cancer Research Center, London, England)로부터 분양 받아 사용하였다. 멜란-a 세포는 10% FBS, 200nM 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세테이트, 100mg/L의 스트렙토마이신, 100 IU/ml의 페니실린이 포함된 RPMI1640 배지를 사용하여 37℃, 10% CO2 조건하에서 배양하였다.

[0057] 멜란-a 세포가 배양기에서 유착되게(confluent) 자라면 0.25% 트립신/EDTA로 세포를 떼어내서 24 웰 플레이트에 웰 당 $1x10^5$개를 주입한 후 24시간 동안 세포가 플레이트에 잘 부착하도록 기다렸다가 PBS로 한번 세척한 후, 배양배지에 시료물질을 첨가하여 세포에 처리하였다. 시료물질은 DMSO에 원하는 농도의 1,000배가 되도록 녹인 후, 세포에 처리시 1,000분의 1로 희석하여 사용하였다. 대조군은 DMSO를 시료와 같은 농도로 처리한 용액을 사용하였다. 본 실험에서는 양성대조군을 DNJ 이외에도 미백에 효과가 있는 것으로 알려진 알부틴(Arbutin, Arb)을 사용하였다.

[0058] 위와 같은 방법으로 시료 물질을 3일간 처리한 후, 멜라닌의 양은 1N NaOH에 10% DMSO가 포함된 용액으로 세포를 녹여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 세포 파쇄액을 다시 브래드포드법으로 총 단백질 양을 구한 후, 일정 단백질 당 멜라닌 양으로 나타내었다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0059] 도 2에 나타낸 바와 같이, 양성 대조군인 DNJ 및 알부틴과 비교하여 베타-라파콘은 저농도에서도 멜라닌 생성 억제에 우수한 활성을 나타내었다.

[0060] 일반적으로 알부틴은 1mM농도에서 멜라닌 생성을 약 50% 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 베타-라파콘과는 미백 기전에서의 역할은 다르나, 저농도에서도 미백 효과가 있는 것으로 알려진 알부틴과 비교하였을 때에도 베타-라파콘은 알부틴만큼 저농도에서도 멜라닌 생성 억제에 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0061] [실험예 3] HM3KO 세포를 이용한 멜라닌 생성억제 효과

[0062] 상기 실험예 2에서 마우스에서 유래한 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과가 우수한 것으로 평가된 베타-라파콘(beta-lapachone)에 대하여 사람으로부터 유래한 멜라노마 세포인 HM3KO 세포와 정상 색소 생성 세포인 멜라노사이트 내에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 평가하였다.

[0063] HM3KO 세포는 10% FBS, 100mg/L의 스트렙토마이신, 100 IU/ml의 페니실린이 포함된 MEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

[0064] HM3KO 세포가 배양기에서 유착되게(confluent) 자라면 0.25% 트립신/EDTA로 세포를 떼어내서 6웰 플레이트에 웰 당 $2x10^5$개를 주입한 후 24시간동안 세포가 플레이트에 잘 부착하도록 기다렸다가 PBS로 한번 세척한 후, 배양배지에 시료물질을 첨가하여 세포에 처리하였다. 시료물질은 DMSO에 원하는 농도의 1,000배가 되도록 녹인 후, 세포에 처리시 1,000분의 1로 희석하여 사용하였다. 대조군은 DMSO를 시료와 같은 농도로 처리한 용액을 사용하였다.

[0065] 위와 같은 방법으로 시료 물질을 3일간 처리한 후, 멜라닌의 양은 1N NaOH에 10% DMSO가 포함된 용액으로 세포(cell)를 녹여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 NaOH를 처리하기 전 세포액을 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 펠렛(pallet)을 사진으로 찍어 가시적인 결과를 먼저 확인하였다(도 3). 이 세포 파쇄액을 다시 브래드포드법으로 총 단백질 양을 구한 후, 일정 단백질 당 멜라닌 양으로 나타내었다(도 4).

[0066] 도 3으로부터 베타-라파콘을 처리한 군은 세포 내에 생성된 멜라닌의 양이 DMSO 대조군보다 감소함을 가시적으로 확인할 수 있었고, 이로써 베타-라파콘이 멜라닌 생성을 억제하여 미백 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다.

[0067] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 양성 대조군인 DNJ와 비교하여 베타-라파콘(beta-lapachone)은 저농도에서도 멜라닌 생성 억제에 우수한 활성을 나타내었다.

[0068] 본 발명의 베타-라파콘과는 미백 기전에서의 역할은 다르나, 저농도에서도 미백 효과가 있는 것으로 알려진 알부틴과 비교하였을 때에도 베타-라파콘은 알부틴만큼 저농도에서도 멜라닌 생성 억제에 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0069] [실험예 4] 멜란-a(melan-a) 세포를 이용한 타이로시네이즈 활성 억제 평가

[0070] C57BL/6 마우스에서 유래한 불멸화 세포주인인 멜란-a(melan-a) 세포는 베넷 박사(Dr. Bennett; Cancer Research Center, London, England)로부터 분양받아 사용하였다. 멜란-a 세포는 10% FBS, 200nM 12-O-테트라데카노일포르볼-13-아세테이트, 100mg/L의 스트렙토마이신, 100 IU/ml의 페니실린이 포함된 RPMI1640 배지를 사용하여 37℃, 10% CO2 조건하에서 배양하였다.

[0071] 멜란-a 세포가 배양기에서 유착되게(confluent) 자라면 0.25% 트립신/EDTA로 세포를 떼어내서 12 웰 플레이트에 웰 당 $2x10^5$개를 주입한 후 24시간 동안 세포가 플레이트에 잘 부착하도록 기다렸다가 PBS로 한번 세척한 후, 배양배지에 시료물질을 첨가하여 세포에 처리하였다. 시료물질은 DMSO에 원하는 농도의 1,000배가 되도록 녹인 후, 세포에 처리시 1,000분의 1로 희석하여 사용하였다. 대조군은 DMSO를 시료와 같은 농도로 처리한 용액을 사용하였다.

[0072] 위와 같은 방법으로 시료 물질을 3일간 처리한 후, 0.25% 트립신/EDTA으로 세포를 떼어내어 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 펠렛을 얻었다. 이를 타이로시네이즈 완충액(80mM PO4 완충액 + 1% 트리톤 X)를 100㎕ 처리하여 20분간 소니케이션(sonication)하고 얼음상에서 1시간 동안 분해(lysis)한 후, 12,500rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이로써 세포 파쇄액, 즉 효소액을 획득하였다. 위에서 얻은 세포 파쇄액을

효소액으로 하고 5mM의 3,4-디히드록시페닐-L-알라닌(Dihydroxyphenyl-L-alanine)을 기질로 하여 30분간 효소 반응을 한 뒤 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 나머지 세포파쇄액으로 브래드포드 법으로 총 단백질 양을 구한 후, 일정 단백질 당 타이로시네이즈 효소의 활성으로 나타내었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0073] 도 5에 나타낸 바와 같이, 양성 대조군인 DNJ와 비교하여 베타-라파콘(beta-lapachone)은 저농도에서도 타이로시네이즈의 활성 억제에 우수한 활성을 나타내었다.

[0074] [제형예 1~3 및 비교제형예 1] 스킨 로션

[0075] 하기 표 2에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 제형예 1~3 및 비교제형예 1의 스킨로션을 제조하였다(단위: 중량%).

표 2

[0076]

성분	제형예 1	제형예 2	제형예 3	비교 제형예 1
정제수	잔량	잔량	잔량	잔량
디소듐이디티에이	0.02	0.02	0.02	0.02
베타인(ICID), 트리메틸글리신(JSQI)	2	2	2	2
글리세린(농글리세린)	2	2	2	2
피이지/피피지-17/6 코폴리머	1	1	1	1
피이지-8	2	2	2	2
화학식 1의 베타-라파콘	0.001	1	10	-
에탄올	10	10	10	10
메틸파라벤, KP:파라옥시벤조산메틸(파라옥시안식향산에스테르)	0.1	0.1	0.1	0.1
폴리옥시에틸렌경화피마자유	0.3	0.3	0.3	0.3
옥틸도데세스-16	0.1	0.1	0.1	0.1
향	0.05	0.05	0.05	0.05

[0077]

[0078] [제형예 4~6 및 비교제형예 2] 로션

[0079] 하기 표 3에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 제형예 3~4 및 비교제형예 2의 로션을 제조하였다(단위: 중량%).

표 3

[0080]

성분	제형예 4	제형예 5	제형예 6	비교 제형예 2
글리세릴스테아레이트	0.8	0.8	0.8	0.8
스테아르산	0.5	0.5	0.5	0.5
세테아릴알코올	0.8	0.8	0.8	0.8
하이드로제네이티드레시친*C12-16알코올*팔미트산	0.6	0.6	0.6	0.6
하이드로제네이티드폴리이소부텐	3	3	3	3
세틸옥타노에이트	4	4	4	4
메틸파라벤	0.2	0.2	0.2	0.2
프로필파라벤	0.05	0.05	0.05	0.05
디메치콘	1.5	1.5	1.5	1.5
정제수	잔량	잔량	잔량	잔량
디소듐이디티에이	0.05	0.05	0.05	0.05
소듐메틸스테아로일타우레이트	0.05	0.05	0.05	0.05
글리세린 (농글리세린)	3	3	3	3
부틸렌글라이콜	2	2	2	2
화학식 1의 베타-라파콘	0.001	1	10	-
트리에탄올아민	0.13	0.13	0.13	0.13

페녹시에탄올	0.3	0.3	0.3	0.3
정제수	13	13	13	13
카보머	0.13	0.13	0.13	0.13
향	0.13	0.13	0.13	0.13

[0081]

[0082] [제형예 7~9 및 비교제형예 3] 크림

[0083] 하기 표 4에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 제형예 7~9 및 비교제형예 3의 크림을 제조하였다(단위: 중량%).

표 4

[0084]

성분	제형예 7	제형예 8	제형예 9	비교 제형예 3
하이드로제네이티드폴리이소부텐	7	7	7	7
펜타에리스리틸테트라에틸헥사노에이트	2	2	2	2
2-옥틸도데칸올	1	1	1	1
식물성 스쿠알란	4.5	4.5	4.5	4.5
림난테스알바씨드오일	1	1	1	1
펜타에리스리틸테트라이소스테아레이트	3	3	3	3
아라키딜알코올*베헤닐알코올*아라키딜글루코사이드	1	1	1	1
친유형글리세릴스테아레이트	0.5	0.5	0.5	0.5
글리세릴스테아레이트	0.5	0.5	0.5	0.5
세테아릴알코올	0.5	0.5	0.5	0.5
메틸파라벤	0.2	0.2	0.2	0.2
프로필파라벤	0.1	0.1	0.1	0.1
쉐어버터	3	3	3	3
데카메틸사이클로펜타실록산	3	3	3	3
정제수	잔량	잔량	잔량	잔량
디소듐이디티에이	0.02	0.02	0.02	0.02
농글리세린	6	6	6	6
부틸렌글라이콜	6	6	6	6
화학식 1의 베타-라파콘	0.001	1	10	-
암모늄아크릴로일디메틸타우레이트/브이피 코폴리머	0.5	0.5	0.5	0.5
페녹시에탄올	0.3	0.3	0.3	0.3
트리에탄올아민	0.06	0.06	0.06	0.06
향	0.23	0.23	0.23	0.23
정제수	10	10	10	10
카보머	0.1	0.1	0.1	0.1

[0085] [실험예 5] 미백 효과 임상 실험

[0086] 상기 제형예 1~9 및 비교제형예 1~3의 스킨로션, 로션, 크림의 미백 효과를 아래의 방법에 따라 평가하였다.

[0087] <평가 방법>

[0088] 1. 시험 대상자: 기미 주근깨 검은 반점이 생성되기 시작하거나 이미 생성된 30세 이상(평균 40.6±3.5세)의 여성 피험자 15명/시료

[0089] 2. 시험 기간: 12주

[0090] 3. 시험 제품명: 제형예 1~9 및 비교제형예 1~3의 스킨로션, 로션, 크림

[0091] 4. 평가 방법: 본 시험 목적에 적합한 피험자들을 선정하여 12주간 시험제품 및 플라세보(placebo)를 얼굴 좌측 또는 우측에 무작위로 할당하여 정상적으로 사용하게 하였다. 제품 사용 전과 사용 4주, 8주, 12주 후 각 평가 시점에서 육안 평가한 다음, DSMⅡ 색차계(ColorMeter)를 이용하여 멜라닌 인덱스를 측정하였다. 또한, 제품 사용 후 각 평가시점에서 피부 안전성 평가 및 피험자에 의한 설문평가를 실시하였으며, 그 결과를

하기 표 6 내지 표 8에 나타내었다.

[0092] <임상시험의 설계>

표 5

[0093]

시료 종류	1군		2군		3군		비고
얼굴 부위	좌(우)	우(좌)	좌(우)	우(좌)	좌(우)	우(좌)	무작위
도포 시료	비교제형예 1~3	제형예 1, 4 및 7	비교제형예 1~3	제형예 2, 5 및 8	비교제형예 1~3	제형예 3, 6 및 9	

[0094] 상기 표 5에서, 피시험자 1,2,3군 모두 얼굴의 한쪽 부위에 대조군으로서 비교제형예 1~3의 스킨로션, 로션 및 크림을 순차적으로 도포하였으며, 나머지 다른 부위에 1군은 제형예 1, 4 및 7의 스킨로션, 로션 및 크림을, 2군은 제형예 2, 5 및 8의 스킨로션, 로션 및 크림을 3군은 제형예 3, 6 및 9의 스킨로션, 로션 및 크림을 각각 순차적으로 도포하였다.

[0095] <평가 항목>

[0096] 전문가 관찰 평가: 피부의 검은 정도(0?9)

[0097] 기기 평가: DSMⅡ ColorMeter Melanin index

[0098] 설문: 피부의 검은 정도(0?5), 피부 부작용(유, 무)

[0099]

[0100] <임상 결과>

[0101] 1) 전문가 관찰 평가

표 6

[0102]

시료 종류		1군		2군		3군	
도포 시료		평균*	표준편차	평균*	표준편차	평균*	표준편차
측정	사용 전	0.01	0.11	0.14	0.13	0.11	0.13
	4주 후	-0.35	0.10	0.02	0.15	-0.29	0.15
	8주 후	-0.53*	0.09 *	-0.45	0.10	-0.41	0.09 *
	12주 후	-0.88*	0.14 *	-0.54*	0.09 *	-0.57	0.14 *

[0103] 평균: 시료 처치부위 값에서 대조군(비교제형예 1~3) 처치부위 값을 뺀 값의 평균, '-'값은 피부색이 희어진 것을 나타냄

[0104] * 통계적으로 유의한 차($p<0.05$)가 있음.

[0105]

[0106] 2) 기기 평가: DSMⅡ 색차계 멜라닌 인덱스

표 7

[0107]

시료 종류	1군		2군		3군	
도포 시료	평균*	표준편차	평균*	표준편차	평균*	표준편차

측정	사용 전	037	0.15	0.50	0.11	027	0.15
	4주 후	-0.91*	0.18*	0.02	0.42	-0.72*	0.18*
	8주 후	-1.13*	0.21*	-0.74*	0.13*	-1.09	0.42*
	12주 후	-2.16*	0.37*	-1.40*	0.21*	-2.17*	0.37*

[0108] 평균: 시료 처치부위 값에서 대조군(비교제형예 1~3) 처치부위 값을 뺀 값의 평균, '-'값은 피부색이 희어진 것을 나타냄

[0109] * 통계적으로 유의한 차($p<0.05$)가 있음.

[0110]

[0111] 3) 설문: 피부의 검은 부위 개선 정도(0?5), 피부 부작용(유,무)

표 8

[0112]

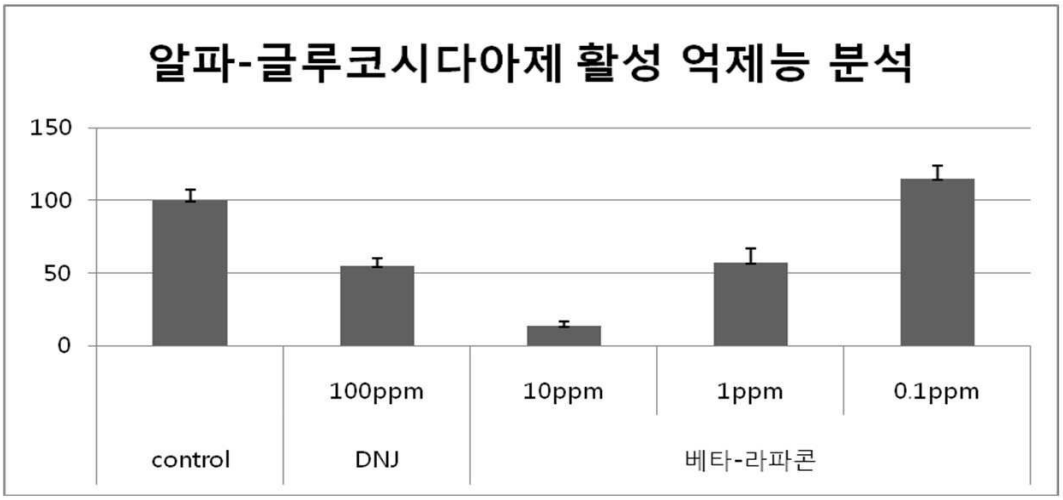
시료 종류	1군	2군	3군
도포 시료	제형예 1,4 및 7	제형예 2,5 및 8	제형예 3,6 및 9
검은정도개선(8주 후)	2.10 ± 0.55 (평균 ± 표준편차)	1.12 ± 0.39 (평균 ± 표준편차)	3.10 ± 0.30
부작용(12주 후)	없음	없음	

[0113]

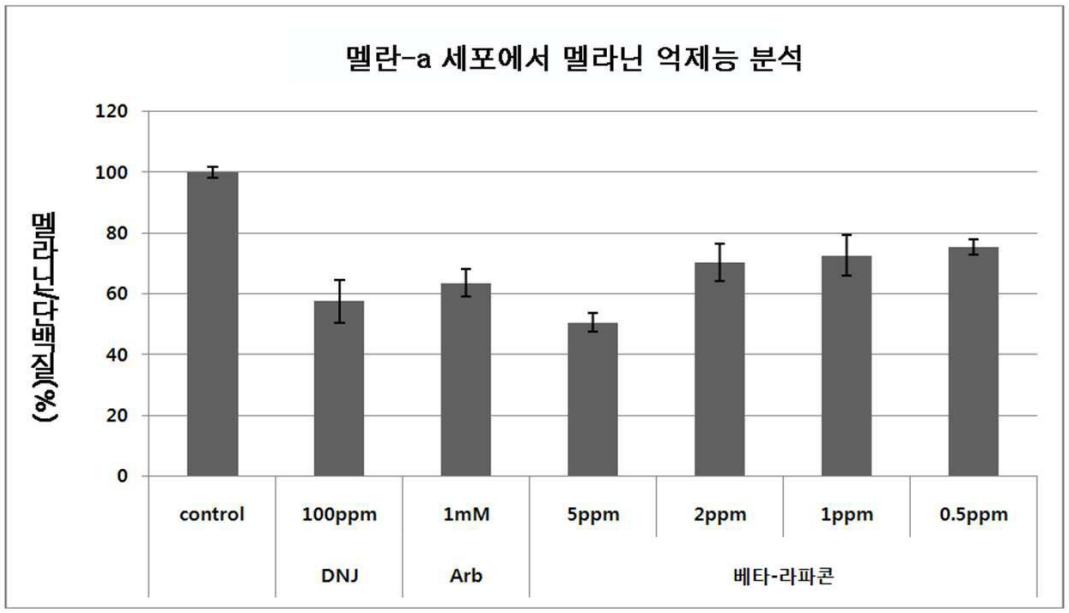
[0114] 상기 표 6 내지 8의 결과에서 보여지는 바와 같이, 전문가 관찰 평가, 기기 평가 및 설문 평가 모두에서 베타-라파콘(beta-lapachone)을 0.001~10중량% 함량으로 유효성분을 함유하는 화장료 조성물이 비교 제형예보다 우수한 피부 미백 효과를 보였으며, 피부에 대하여 안전함을 확인할 수 있었다.

도면

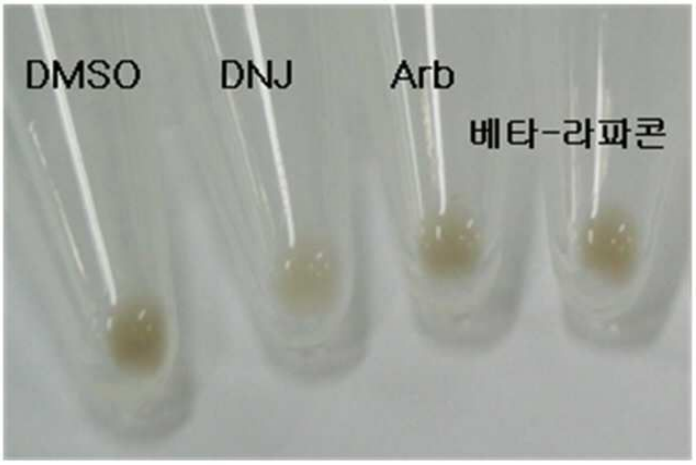
도면1



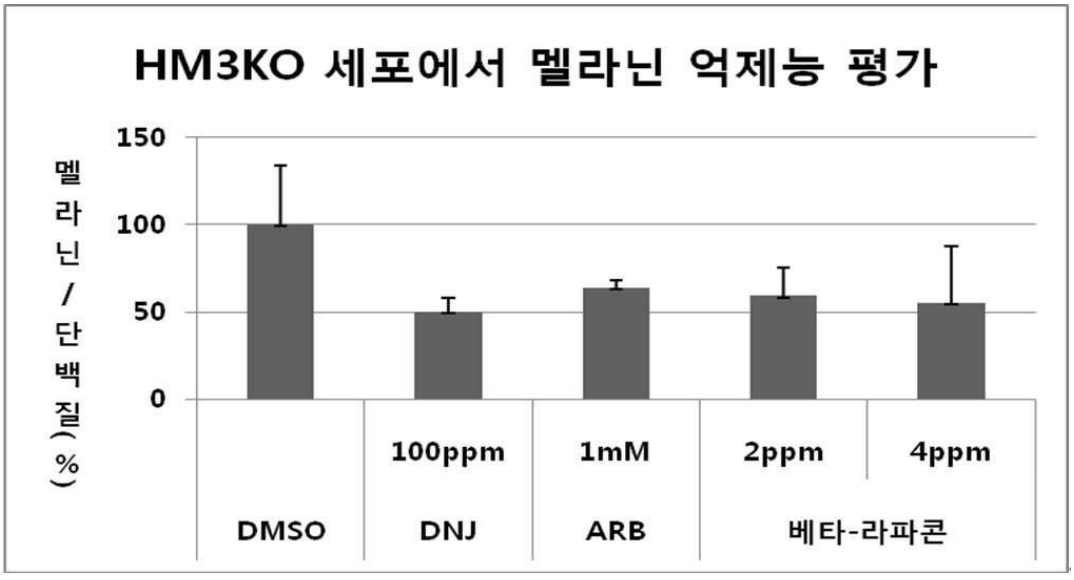
도면2


멜란-a 세포에서 멜라닌 억제능 분석
멜라닌/단백질(%)
120
100
80
60
40
20
0
control
100ppm
DNJ
1mM
Arb
5ppm
2ppm
1ppm
0.5ppm
베타-라파콘

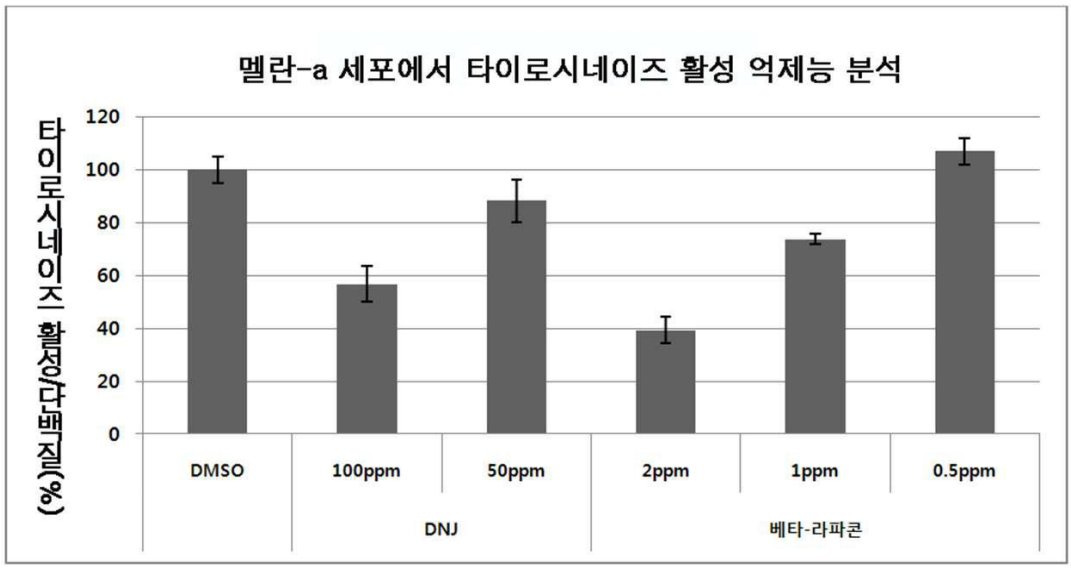
도면3


DMSO
DNJ
Arb
베타-라파콘

도면4


HM3KO 세포에서 멜라닌 억제능 평가
멜라닌/단백질(%)
150
100
50
0
DMSO
100ppm
DNJ
1mM
ARB
2ppm
4ppm
베타-라파콘

도면5


멜란-a 세포에서 타이로시네이즈 활성 억제능 분석
타이로시네이즈 활성/단백질(%)
120
100
80
60
40
20
0
DMSO
100ppm
50ppm
2ppm
1ppm
0.5ppm
DNJ
베타-라파콘