

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0131619 (43) 공개일자 2012년12월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 8/49</i> (2006.01) <i>A61Q 19/02</i> (2006.01) <i>A61Q 19/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0049918 (22) 출원일자 2011년05월26일 심사청구일자 2011년05월26일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 황재성 서울특별시 송파구 동남로11길 4, 미릉아파트 101동 206호 (가락동) 이하연 경기도 성남시 중원구 금빛로59번길 17, 라 401호 (금광동, 와이드빌) 김효영 전라남도 순천시 낙안면 목촌리 289번지 (74) 대리인 이덕록

전체 청구항 수 : 총 4 항

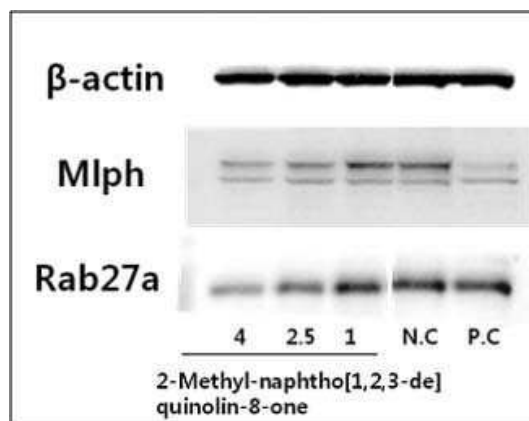
(54) 발명의 명칭 2-Methyl-naphtho [1,2,3-de] quinolin-8-one을 주성분으로 하는 피부 과색소성 질환 치료 및 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식[I]의 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 과색소성 피부 질환 치료용 외용제의 신규한 용도를 개시한다.



대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A103017

부처명 보건복지부

연구사업명 초고속 자동분획시스템을 활용한 천연미백제 탐색 및 기전연구

연구과제명 초고속 자동분획시스템을 활용한 천연미백제 탐색 및 기전연구

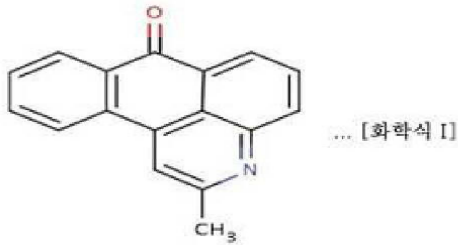
주관기관 (재)대한화장품산업연구원

연구기간 2009.11.01 ~ 2014.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one가 타베비아 아베라네다(Tabeuia-Avellaneda)로부터 분리된 것임을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one가 전체 조성물 중 0.001 ~ 10%중량 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 제형 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 외용제.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one을 주성분으로 함유한 피부 과색소성 질환 치료 및 미백용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는, 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one를 함유한 조성물을 멜라닌생성세포(멜라노사이트, melanocyte) 내의 멜라노솜(melanosome)의 운반체인 멜라노필린(melanophilin)과 미오신(myosin) 5a의 두 단백질간의 결합을 억제하여, 멜라닌(melanin)의 이동을 저해함으로써 피부 미백효과를 나타내는 피부 외용제 미백용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

인체 피부의 색을 조절하는 기전으로서, 멜라닌 생성의 화학적 및 효소적 기초에 대한 지식은 잘 알려져 있다. 멜라닌생성세포(melanocyte)는 멜라노솜(melanosome)이라는 소기관 내에서 멜라닌을 합성하고, 이 멜라노솜은 후에 멜라닌생성세포 덴드라이트(dendrites)를 통해 각질형성세포(케라티노사이트, keratinocyte)로 전달된다. 이렇게 각질형성세포로 전달된 멜라닌이 실제로 피부색을 결정하는 중요한 요소가 된다. 멜라노솜을 멜라닌생성세포의 덴드라이트로 이동시키는 데에는 주요 구성체들이 관여한다. 이들은 MTC(Melanosome

transport complex)라고 불리며, 멜라노필린(Melanophilin), Rab27a 및 미오신(Myosin) 5a 세가지 단백질로 구성되어 있다. 상기 Rab27a는 멜라노솜의 표면에 결합하여 멜라노솜을 인지하고 이동시키는 운반체역할을 하는 단백질로서, 말단으로 이동하기 위해서는 세포내 세포골격(cytoskeleton)인 미오신 5a 단백질을 만나야 하며, 중간에서 이 두 단백질을 인지하고 연결시키는 어댑터(adapter)역할을 하는 단백질이 멜라노필린(melanophilin)이다.

[0003] 이렇게 세 구성체가 만나 복합체(complex)를 이루면, 멜라노솜을 세포 말단으로 정상적으로 이동시키는 것이 가능하고, 궁극에는 각질형성세포로까지 전달이 가능해진다. 만일 이 세가지 구성체 중에 하나라도 이상이 있으면, 멜라닌의 생성에는 아무런 문제를 주지 않으면서도 멜라노솜의 이동에 문제가 생겨서, 결국에는 피부색이 밝아지는 현상이 관찰된다.

[0004] 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one은 능소화과(Bignoniaceae) 타베비아(Tabeuia)속인 식물에 많이 함유되어 있는 단일 물질로, 토포아이스머레이즈-I, II의 인히비터(Topoisoemrase-I, II inhibitor, Inflamm Res 2003 Jan;52(1):8-17)로 알려져 있고, 특히 항암치료제로서 연구가 진행되어 왔다.

[0005] 한편, 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물은 타베비아 아베라네다(Tabeuia-Avellanadae)의 껍질 성분에도 다량 함유되어 있어 이로부터 용매 추출하여 얻은 추출물을 이용한 '타히보 추출물을 함유하며 항염증 및 피부자극완화 효능을 갖는 화장품 조성물이(대한민국 특허 공개 번호 제10-2009-0025497호)'로 공개되어 있으나, 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one을 이용하여 피부 외용제용 미백 물질을 개발하거나 물질자체의 미백 효능을 검증한 예는 전무한 실정이며 이에 대한 특허도 공지된 바 없다.

[0006] 본 발명자들은 상기한 점들을 감안하여 멜라닌생성세포인 멜라닌-a(melan-a) 세포에 타베비아 아베라네다(Tabeuia-Avellanadae) 추출물을 처리하면 멜라노솜의 이동이 억제된다는 사실을 처음으로 발견하고, 타베비아 아베라네다(Tabeuia-Avellanadae) 추출물을 분리, 정제하여 이 기능을 소망하는 유효성분이 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 임을 최초로 동정하였다. 상기 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물은 멜라닌생성세포내에서 멜라노솜의 이동을 담당하는 운반체 단백질간의 결합을 억제함으로써 멜라노솜의 이동을 저해시키며, 이로 인해 멜라닌 합성 기능이 정상임에도 미백효능을 가질 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 타베비아 아베라네다(Tabeuia-Avellanadae) 추출물 유래의 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물을 함유하는 멜라닌생성세포에서의 멜라노솜 이동 억제효능을 가지는 피부 미백용 외용제 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 상기 목적은 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 외용제 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물이 타베비아 아베라네다(Tabeuia-Avellanadae)로부터 분리, 정제된 것임을 특징으로 한다.

[0010] 이하, 본 발명의 구체적인 내용을 상세히 설명한다.

발명의 효과

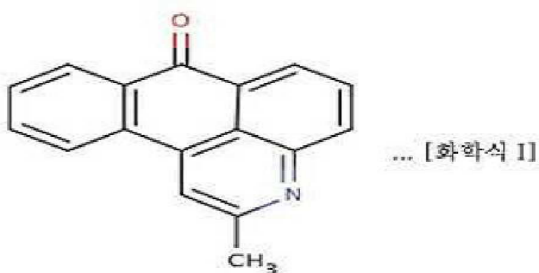
[0011] 본 발명은 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 외용제 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명 화합물을 처리하고 3일 후 광학현미경으로 관찰한 피부 세포 모양이다.
- 도 2는 본 발명 화합물을 농도를 달리하여 처리한 후 멜라닌 이동이 저해된 세포사진을 동일한 면적 하에서 멜라닌 이동이 저해된 세포의 숫자를 카운트하여 나타낸 그림이다.
- 도 3은 본 발명 화합물을 처리하고 3일 후 광학현미경으로 관찰한 피부 세포 모양이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 화합물이 웨스턴 블랏 후 멜라노필린 단백질의 발현에 미치는 효과로 보인 사진도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 멜라닌 생성세포의 멜라노솜은 자외선에 의한 세포의 파괴를 차단하는 기능을 갖는 멜라닌을 생성하는 세포내 소기관으로서, 각질 형성세포로 이 소기관이 전달되어야만 피부에서 자외선에 의한 세포 손상을 최소화시킬 수 있는 매우 중요한 세포기관이다.
- [0014] Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물은 멜라닌생성세포내에서 멜라노솜의 이동을 담당하는 운반체 단백질인 멜라노필린과 미오신 5a라는 단백질간의 결합을 억제함으로써 멜라노솜의 이동을 저해시켜, 이로 인해 멜라닌 합성 기능이 정상임에도 미백효과를 제공한다.
- [0015] 본 발명에 의한 피부 미백용 외용제 조성물은 유효성분으로 하기 화학식(I)의 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~10중량%, 바람직하게는 유효한 효과와 조성물의 안전성 및 제형 안정성을 고려하여 0.001~10중량%로 함유한다. 이는 0.001중량% 미만에서는 미백 효과를 기대할 수 없고, 10중량%를 초과하는 경우에는 조성물의 안전성 및 제형 안정성에 어려움이 있기 때문이다.
- [0016] 한편, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 제형을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.



- [0018]
- [0019]
- [0020] <실험예 1> 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 에 의한 세포수준에서의 멜라노솜 이동 억제 효과 검증

[0021]

[1 단계] 멜라닌 생성세포의 배양

- [0023] 쥐의 불멸화된 멜라닌 생성세포인 멜란-α (Melan-α) 세포를 10%우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI 1640 배지에서, 3일에 한번씩 배지를 교환하면서 90% 점유율(confluency)을 보일 때까지 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0024]

[0025] [2 단계] 2-Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 에 의한 멜라닌생성세포에서 멜라닌 이동 저해 조사

[0026] 상기 1 단계에서 배양된 멜란-α (melan-α) 세포를 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA로 떼어내고, 24-배양 용기(well-plate)에 다시 동일한 숫자(1×10^5 cells/well)로 깔은 후에 24시간 동안 배양하였다. 여기에 추출물인 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 을 3가지 농도로 처리하고, 3일 후에 광학현미경을 통해 세포모양을 관찰하였으며, 결과는 도 1에 나타내었다.

[0027] 도 1에서 보는 바와 같이, 검게 보이는 것이 멜라노솜으로 추출물인 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 추출물인 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 를 처리한 세포에서는 멜라노솜이 세포 전체적으로 고루 분포하지 못하고, 핵 주변으로 몰려 있음을 확인할 수 있었다.

[0029] [3단계] 정량화

[0030] 상기 2단계에서 현미경을 통해 관찰한 멜라닌이동이 저해된 세포사진을 동일한 면적하에서 멜라닌이동이 저해된 세포의 숫자를 세어 <표1> 및 도 2에 나타내었다.

[0031] <표 1>

	대조군	Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one		
		20uM	10uM	2uM
	0	37	46	2
	0	49	36	7
	0	49	36	3
평균	0	45	39	4
표준편차	0	6.9	5.8	2.6

[0033] 이 정량화된 숫자를 통하여 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one을 처리한 세포가 대조군에 비해 멜라닌이동이 저해된 숫자가 더 많음을 알수 있었다.

[0034] <실험예 2> Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one에 의한 멜라노사이트와 각질형성세포인 케라티노사이트의 공동 배양(Co-culture)에서 멜라노솜 이동 억제효과 검증

[0035] [1단계] 멜라노사이트와 케라티노사이트의 공동 배양

[0036] 실제 피부에는 멜라노사이트와 케라티노사이트가 1:10의 비율로 존재하는데 멜라노사이트에서 생성된 멜라닌이 각질형성세포인 케라티노사이트쪽으로 이동되어 피부색을 띠게 된다.

[0037] 이처럼 실제 피부에서 함께 존재하는 멜라노사이트와 케라티노사이트의 공동배양을 통해 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one이 단일배양과 같은 멜라닌이동을 저해하는지의 효과를 보았다.

[0038] 멜란-α (Melan-α) 세포를 RPMI 1640 배지에서, 3일에 한번씩 배지를 교환하면서 90% 점유율(confluency)을 보일 때까지 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0039] 또한 쥐의 각질형성세포인 에스피원(SP-1) 세포를 EMEM 배지에서, 칼슘농도를 적절하게 맞춘조건에서 3일에 한번씩 배지를 교환하면서 90% 점유율(confluency)을 보일 때까지 10% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0040] [2 단계] Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 에 의한 공동배양에서 멜라닌 이동 저해 확인

[0041] 상기 1 단계에서 배양된 멜란-α (melan-α) 세포를 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA로 떼어내고, 6-배양용기(well-plate)에 다시 동일한 숫자(3.75×10^4 cells/well)로 깔은 후에 48시간 동안 배양하였다. 48시간후에 상기 1단계에서 배양한 에스피원(SP-1)세포를 동일한 방법으로 떼어내고 멜란-α가 배양된 6-배양용기에 세척을 한후 동일한 숫자(1.5×10^5 cells/well)로 깔은 후에 48시간동안 함께 배양하였다.

[0042] 여기에 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 을 3가지 농도로 처리하고, 3일 후에 광학현미경을 통해 세포모양을 관찰하였으며, 결과는 도 3에 나타내었다.

[0043] <실험예 3> 웨스턴블랏을 통한 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 에 의한 멜라노필린 단백질의 발현량 조사

[0044] 멜란-α (melan-α) 세포에 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one을 3일간 처리한후 용혈 완충액(lysis buffer)(62.5mM Tris (pH6.75), 10% 글리세롤, 2% SDS, 5% β-머캅토에탄올)에 넣은 후 분쇄하였다. 15000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 취한 다음, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 전기영동하고 PVDF 막으로 1시간 동안 전사하였다. PVDF 막을 블로킹 용액(skim milk)에 넣어 1시간 동안 반응시키고, Melanophilin(멜라노필린)에 대한 특이적 일차 항체(ProteinTech Group, Inc, 1:600)를 넣어준 후 2시간 동안 반응시켰었다.

[0045] 반응이 끝난 후 0.1% 트윈 20이 들어 있는 50mM Tris 용액으로 3회 세척하고, HRP(Horseradish peroxidase)가 붙어 있는 2차 항체(1:1000)를 이용하여 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척하였다. 이를 X-ray 필름을 이용하여 감광 후 분석하였다. 그 결과는 도 4과 같다.

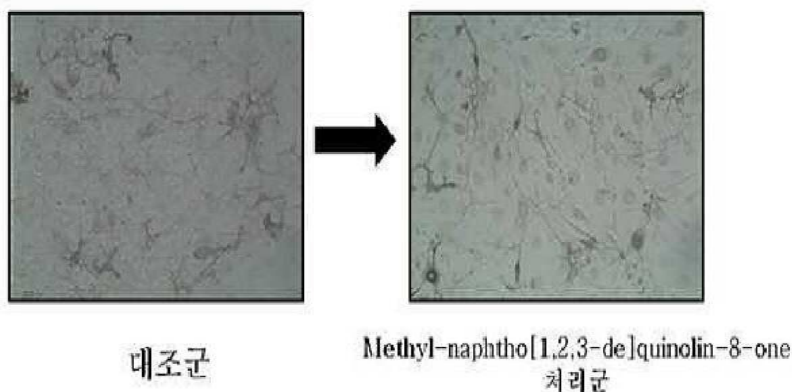
[0046] 웨스턴블랏의 결과를 통해 멜라노솜의 이동에 관여하는 3개의 단백질 중 하나인 멜라노필린 단백질의 발현량이 줄어드는 것을 관찰하였다.

산업상 이용가능성

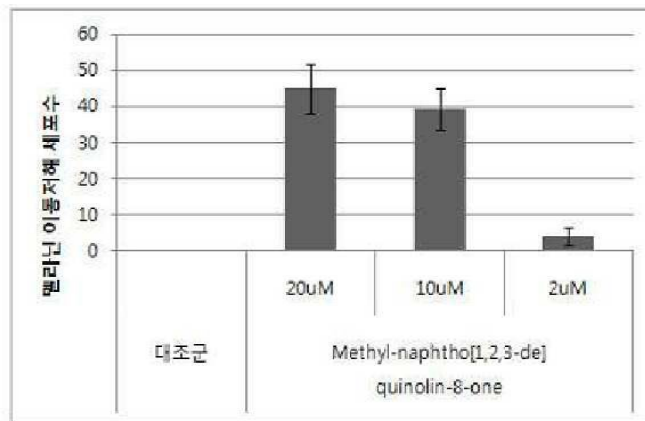
[0047] 본 발명은 타베뮌아 아베라네다 유래의 Methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one 화합물의 멜라닌 생성 세포내에서 멜라노솜의 이동에 관여하는 단백질의 활성을 억제하는 기전을 확인 하므로써 피부 미백용 화장품 조성물 및 과색소성 질환 치료용 외용제를 제공하는 뛰어난 효과가 있으므로 화장품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면

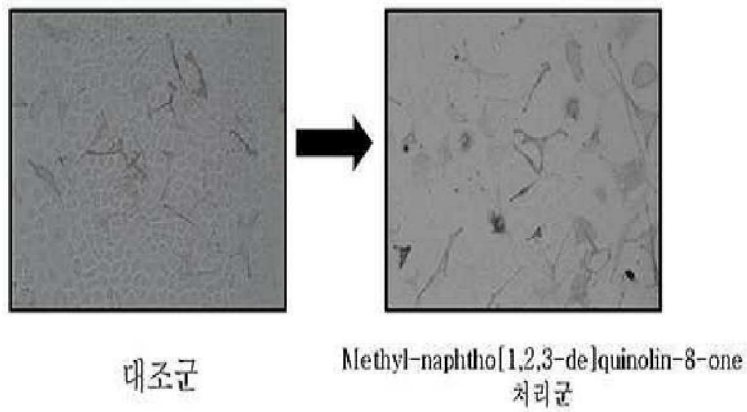
도면1



도면2



도면3



도면4

