(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0016847
(43) 공개일자 2012년02월27일

(51) Int. Cl.
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0079330
(22) 출원일자 2010년08월17일
심사청구일자 2010년08월17일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김은기
서울특별시 양천구 목동서로 38, 목동1단지아파트 131동 506호 (목동)
엄지민
인천광역시 남구 매소홀로428번길 25-19, A동 201호 (학익동, 촌마을빌라)
(74) 대리인
이원희

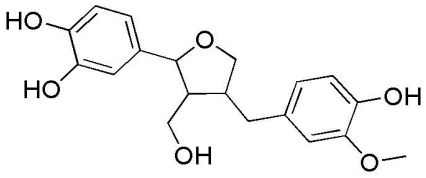
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) ＭＩＴＦ 저해제 및 이를 포함하는 피부미백용 화장료 조성물

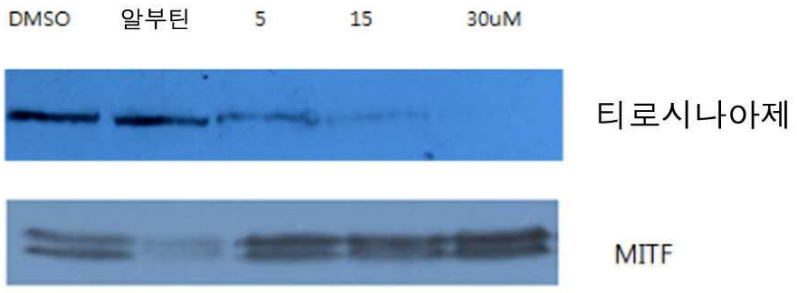
(57) 요 약

본 발명은 MITF(microphthalmia transcription factor) 저해제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 MITF와 E-box라고 하는 특정 염기서열의 결합을 저해하는 하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 피부미백용 화장료 조성물에 관한 것으로, 하기 화학식 1의 화합물은 피부 미백 활성이 우수할 뿐만 아니라 세포독성이 없으므로 피부 피부미백용 화장품 또는 미백제로 유용하게 사용될 수 있다.

[화학식 1]



대 표 도 - 도2



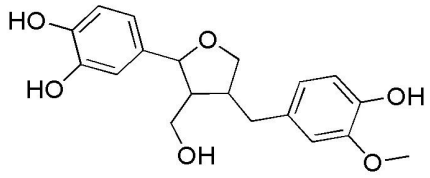
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A092055
부처명 보건복지가족부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 그린코스메틱 연구개발센터
기여율 1/1
주관기관 서울산업대학교 산학협력단
연구기간 2009.11.01 ~ 2015.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

MITF 저해제로서 하기 화학식 1로 표시되는 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올 0.005 내지 50 중량 %를 유효성분으로 포함하는 피부미백용 화장료 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

MITF 저해제로서 제1항의 상기 화학식 1로 표시되는 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올 0.005 내지 50 중량 %를 유효성분으로 포함하는 멜라닌 생성 억제제.

청구항 3

MITF 저해제로서 제1항의 상기 화학식 1로 표시되는 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올 0.005 내지 50 중량 %를 유효성분으로 포함하는 피부미백용 약학적 조성물.

명 세 서

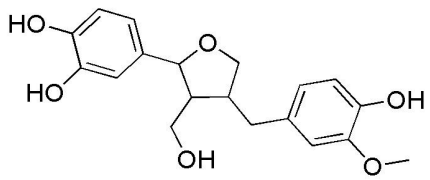
기 술 분 야

[0001] 본 발명은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 유도 저해제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 색소 침착 관련 효소의 유전자 프로모터(E-box)와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩을 이용하여 선별된 MITF 저해제 및 이를 포함하는 피부미백용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 하기 화학식 1로 표시되는 4-{4-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-3-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl}benzene-1,2-diol은 파마코포어 데이터베이스(pharma copore database)로부터 CERIUS Ⅱ 프로그램을 이용한 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 E-box라고 하는 특정 염기서열의 결합을 저해할 것으로 예상되는 화합물 중에서 선별된 단일 화합물이다:

[0003] [화학식 1]

[0004] 

.

[0005] MITF(microphthalmia-associated transcription factor)는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 특이적으로 발현되는

단백질로 멜라닌(melanin) 생성에 있어서 중요한 조절 인자이다. 피부 색소 침착은 멜라닌 세포의 티로신(tyrosine)이 골지(Golgi)에서 티로시나제(tyrosinase), Tyrp1(tyrosinase related protein 1), Tyrp2(tyrosinase related protein 2), DCT(dopachrom tautomerase), DHICA(dihyduoxyinkole carboxylic acid) 산화효소 등과 같은 색소형성 효소에 의해 산화되어 검은색을 내는 유멜라닌(eumelanin)과 황색 또는 적색을 내는 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성함으로써 발생한다(T. Ellenberger et al. *Genes Dev.*, **8**, 970, 1994). 상기 효소들은 특이적으로 멜라닌 세포에서 발현되는데, MITF는 티로시나제 등 상기 색소형성 효소 유전자의 프로모터에 존재하는 E-box(CATGTG)에 결합하여 상기 E-box에 N-말단 전사 활성 도메인(N-terminal transcription activation domain; TAD)(Sato S et al., Oncogene 14:3083-3092, 1997), C-말단 TAD(Takeda K et al. Hum Mol Genet 9:125-132, 2000)가 결합하는 것을 촉진함으로써(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004) 색소 침착 효소들의 발현을 유도하여 멜라닌 합성을 야기한다. 따라서 MITF와 E-box 결합은 색소형성에 관여하는 주요 효소의 발현을 조절하는데 중요한 부분이다.

[0006] 이제까지의 미백제 개발은 주로 멜라닌 생합성에서 없어서는 안될 기본적이면서도 가장 중요한 역할을 하는 효소인 티로시나아제(tyrosinase)의 활성을 저해하는 것을 통해 멜라닌 생성량을 줄이는 물질을 찾는 것으로 이루어져왔다. 이렇게 개발된 미백제로는 코지산, 알부틴, 글루타치온, 비타민 A, 비타민 C 등이 있지만 소비자들이 만족할 만한 미백효과를 갖지 못하고 있으며 부작용 때문에 그 사용량에 제한이 따른다. 또한 식물 추출물의 경우에는 고농도에서만 비교적 높은 효과를 나타내는 단점을 가지고 있어 제품의 적용 범위가 매우 제한된다.

[0007] 미백 기작을 밝히기 위해 멜라닌 세포의 성장, 분화에 중요한 요소인 ET-1(endothelin-1), 멜라노좀의 전달에 중요한 요소인 PAR-2, 멜라닌 형성을 유도하는 MITF에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 현재 MITF와 E-box 결합의 저해제로 알려진 MITF-DN, PIAS3(protein inhibitor of activated STAT3)은 관련 효소의 발현을 저해한다고 보고된 바 있어(C. Levy et al. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1962, 1992) MITF와 E-box의 특이적 결합 저해제는 피부 색소 침착 병변 치료제 및 기능성 화장품의 미백 물질로 사용 가능할 것이라 여겨지고 있다. 그러나 MITF를 표적으로 한 미백 소재의 개발은 미비한 실정이며 세포 내 탐색에 국한되어있어 세포 외적인 새로운 탐색 시스템 구축이 미흡한 상황이다.

[0008] 지금까지 알려진 MITF와 E-box의 특이적 결합 저해제의 탐색방법으로는 gel mobility-shift analysis(C. Jansen et al., *Biochem. J.* 246: 227-232, 1987; K. Ruscher et al., *J. Biotechnol.* 78: 163-170, 2000), Southwestern blotting(B. Bowen et al., *Nucleic Acids Res.* 8: 120, 1980; W.K. Miskimins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6741-6744, 1985), ELISA(Y. Choo et al., *Nucleic Acids Res.* 21, 1993), reporter constructs in yeast assay(S.D. Hanes et al., *Science* 251: 426-430, 1991)가 수행되었으나 상기 방법들은 방사선 동위 원소의 사용, 제한된 실험 수행의 수와 시간, 복잡한 실험 방법 등의 문제점이 있었다.

[0009] 본 발명자들은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 E-box의 특이적 결합 저해제 탐색용 단백질 칩을 이용하여 선정된 MITF 저해제 및 이를 포함하는 피부미백용 화장료 조성물에 관하여 보고한 바 있다(대한민국 등록 특허 10-0872821-00-00). 상기 발명에서는 MITF 와 티로시나제 유전자의 프로모터에 결합하여 발현을 저해하는 인자로써 MITF와 E-box의 결합부위를 모방하여 제작한 27개의 후보물질을 합성하였고, 그 중에서 미백 효과를 보인 3가지 화합물을 특정하였었다.

[0010] 이에 본 발명자들은 MITF와 E-box의 결합부위에 대해 저해할 수 있는 물질을 추가적으로 연구하던 중, 파마코포어 데이터베이스(Pharmacopore database)로 부터 MITF와 E-box의 결합부위에 대해 저해할 수 있는 물질을 시리우스 Ⅱ(CERIUS Ⅱ) 프로그램을 이용하여 선정한 화합물이 안전하면서도 미백 효과가 매우 우수함을 알아내고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 피부미백용 화장료 조성물, 멜라닌 생성 억제제 또는 피부미백용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MITF 저해제로서 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올 0.005 내지 50 중량 %를 유효성분으로 포함하는 피부미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다.

[0014] 나아가, 본 발명은 상기 MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 피부 피부미백용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 피부 피부미백용 단일 화합물, 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올은 MITF와 E-box의 결합을 저해하여 티로시나아제(색소형성 효소) 단백질의 발현을 억제함으로써 멜라닌의 생성을 저해할 뿐만 아니라, 세포독성이 거의 나타나지 않으므로 피부미백용 화장품의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] **도 1**은 본 발명의 일실시예에 따른 화학식 1의 화합물이 MITF와 E-box 간의 결합을 저해하는 정도를 EMSA 검사를 이용하여 측정한 도면이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 화학식 1의 화합물이, MITF와 E-box 가 결합하여 발현되는, 티로시나아제 단백질 생성에 미치는 영향을 웨스턴 블롯을 이용하여 측정한 도면이다.

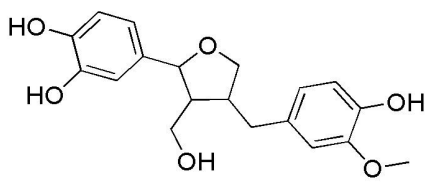
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 상세한 설명에 앞서, 본 명세서에서 쓰이는 'MITF 저해제'는 하기 화학식 1로 표시되는 '4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올'을 지칭한다.

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 MITF 저해제로서 하기 화학식 1로 표시되는 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올을 유효성분으로 포함하는 피부미백용 화장료 조성물을 제공한다.

화학식 1

[0020] 

[0021] 상기 화학식 1의 화합물은 파마코포어 데이터베이스(Pharmacopore database)로 부터 MITF와 E-box의 결합부위에

대해 저해할 수 있는 물질을 시리우스 Ⅱ(CERIUS Ⅱ) 프로그램을 이용하여 얻은 10개의 후보물질 중에 선정하여 얻었다.

[0022] MITF 저해제로서의 상기 화학식 1의 화합물은 MITF와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합을 저해하는 것으로, 올리고-DNA와는 결합할 수 있지만 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 반응 부위를 변형시킴으로써, MITF가 전사인자로써의 역할을 수행할 수 없도록 하여 멜라닌 생성을 억제하는 역할을 한다(표 1 및 표 2 참조). 또한, 상기 화학식 1의 화합물은 세포독성 실험에서 독성이 거의 없는 것으로 확인되었다(표 3 및 표 4 참조).

[0023] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물로 표시되는 MITF 저해제는 상기와 같이 과다한 멜라닌 생성을 억제하므로 피부미백용 화장료 조성물에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물에서 상기 MITF 저해제는 조성물 총 중량에 대하여 0.005 내지 50 중량 % 함유되는 것이 바람직하지만, 미백 효과가 있고 독성이 나타나지 않는 범위에서 사용 용도에 따라서 상기 범위 이상 또는 이하로도 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 상기 MITF 저해제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0026] 본 발명의 MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 MITF 저해제를 함유하는 화장품 이외에도 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.

[0027] 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 MITF 저해제에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0029] 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다.

[0031] 상기에서 살펴본 바와 같이 상기 조성물은 멜라닌 형성 저해제로 잘 알려진 알부틴과 비슷한 멜라닌 생성 저해 효과를 가지므로(표 1 및 표 2 참조) 본 발명의 MITF 저해제는 멜라닌 생성 억제제로서 제공될 수 있다.

[0032] 본 발명의 멜라닌 생성 억제제의 구체적인 제형으로서는 시럽제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 액제 또는 현탁제 등이 이용가능하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 아울러, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 피부미백용 약학적 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 경구투여용 제형, 예를 들면 정제, 산제, 캡슐제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제; 또는 연고제 등의 다양한 제제로 제형화 할 수 있다. 통상적인 담체를 사용하여 제조된 약학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로 예를 들면, 피부 또는 국소 적용할 수 있다. 또한, 상기 유효성분

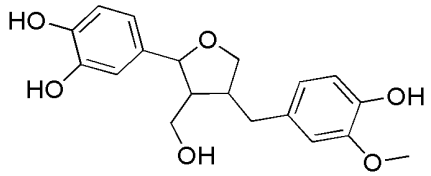
의 투여 용량은 환자의 나이, 상태 등에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 성인에게 1일에 10 ~ 500, 바람직하게는 50 ~ 300 ㎎의 양이 투여되도록 하며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 수회, 바람직하게는 1회 내지는 6회 분할 투여할 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] **<실시예 1> MITF - E-box 결합을 방해하는 MITF 저해제 후보물질의 선정**

[0037] 파마코포어 데이터베이스(Pharmacopore database)로 부터 MITF와 E-box의 결합부위에 대해 저해할 수 있는 물질을 시리우스 Ⅱ(CERIUS Ⅱ) 프로그램을 이용하여 후보물질을 얻었다. 상기와 같이 얻은 후보물질 10개 중에서 1개의 화합물을 선별하였고, 하기 화학식 1로 나타내었다.

[0038] [화학식 1]

[0039] 

[0040] 4-{4-[(4-하이드록시-3-메톡시페닐)메틸]-3-(하이드록시메틸)옥솔란-2-일}벤젠-1,2-다이올

[0041] **<실시예 2> B16F10 세포의 배양**

[0042] 멜라닌을 생성하는 세포주로서 일반적으로 미백물질 스크리닝에 사용되는 B16F10 뮤라인 흑생종 세포주(B16F10 murine melanoma cell; 이하, B16F10; 수원 임업 연구소)를 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum; Sigma, USA), 페니실린(penicillin; Invitrogen, USA)-스트렙토마이신(streptomycin; Invitrogen, USA) 1%(v/v)를 첨가한 무균상태의 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium; GIBCO, USA)에서 37℃, 5% CO_2 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. B16F10 세포 배양은 100 π 접시가 90% 정도 찼을 때마다 계대하였으며 계대 배양은 최대 30회를 넘지 않았다.

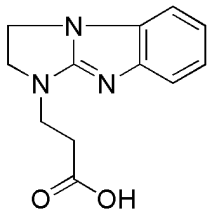
[0043] **<실시예 3> 멜란-에이(melan-a) 세포의 배양**

[0044] 멜라닌을 생성하는 세포주로서 일반적으로 미백물질 스크리닝에 사용되는 멜란-에이 세포(melan-a cell; 아모레퍼시픽)를 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum; Sigma, USA), 페니실린(penicillin; Invitrogen, USA)-스트렙토마이신(streptomycin; Invitrogen, USA) 1%(v/v)를 첨가한 무균상태의 RPMI 배지(Rosewel Park Memorial Institute; 제조사, 제조국)에서 37℃, 10% CO_2 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 멜란-에이 세포 배양은 100 π 접시가 90% 정도 찼을 때마다 계대하였으며 계대 배양은 최대 30회를 넘지 않았다.

[0045] **<비교예 1> MITF 저해효과가 없는 화합물의 선정**

[0046] 실시예 1에 따른 화학식 1의 화합물의 MITF 저해효과와 비교하기 위하여, 실시예 1에서 선정한 상기 10개의 후보물질 중에서 MITF와 E-box 간의 결합 저해 효과가 없는 하기 화학식 2의 화합물을 선정하였다.

화학식 2

[0047] 

[0048] 3-{2,5,7-트리아자트리시클로[6.4.0.0(2,6)]도데카-1(12),6,8,10-테트라엔-5-일}프로파논산

[0049] **<실험예 1> 멜라닌 생성 억제 정도의 평가**

[0050] **<실험예 1-1> B16F10 세포의 멜라닌 생성 억제 정도의 평가**

[0051] 실시예 1의 방법으로 선정된 화학식 1의 화합물이 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 멜라닌 함량 측정법은 Hosoi 법(Hosoi *et al.*, *CANCER RESEARCH* 45:1474-1478, 1985)을 참고하였다.

[0052] 구체적으로, B16F10 세포를 6×10^4 세포/웰의 농도로 12-웰 플레이트에서 실시예 2와 동일한 배지 및 조건에서 24시간 배양한 후, 무처리군에는 DMSO를 처리하였고, 비교군에는 미백물질로 알려진 알부틴(arbutin, 제조사, 제조국)을 200 ppm으로 처리하였으며, 처리군에는 화학식 1의 화합물을 5, 15, 30 μM로 처리하였다. 추가로, 48시간 동안 배양한 후, EDTA를 포함하는 트립신(Trypsin)을 처리하여 B16F10 세포들을 회수하였다. 상기 세포들을 PBS로 2회 세척한 후 10% DMSO를 포함하는 1N NaOH 200 ㎖에 혼탁하고, 90℃에서 1시간 동안 중탕한 뒤 식혀서 멜라닌이 충분히 녹아나오도록 한 후, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 리더(reader)[MDS(Molecular Device), USA]를 이용하여 405 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하고, 하기 수학식 1을 이용하여 멜라닌 생성도를 계산하였다.

수학식 1

[0053] $$\text{멜라닌생성도(\%)}=(\text{처리군흡광도}/\text{무처리군흡광도})\times100$$

[0054] 수학식 1을 이용하여 무처리군, 비교군 및 처리군의 멜라닌 생성정도를 계산한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0055]

	B16F10 세포에 처리한 시료명	멜라닌 생성도(%)
무처리군	DMSO	100
비교군	알부틴 (200ppm)	51.1
처리군	화학식 1의 화합물 (5 μM)	83.5
	화학식 1의 화합물 (15 μM)	71.8
	화학식 1의 화합물 (30 μM)	57.5

[0056] 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물을 5, 15, 30 μM로 처리했을 경우 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였는데, 30 μM로 처리했을 경우 알부틴과 비슷한 정도의 멜라닌 합성 저해효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] **<실험예 1-2> 멜란-에이(melan-a) 세포의 멜라닌 생성 억제 정도의 평가**

[0058] B16F10 세포 대신 멜란-에이 세포를 사용한 것을 제외하고는 실험예 1-1과 같은 방법으로 수행하여 선정된 화학식 1의 화합물이 멜란-에이 세포에서 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0059]

	멜란-에이 세포에 처리한 시료명	멜라닌 생성도(%)
무처리군	DMSO	100
비교군	알부틴 (200ppm)	29.4
처리군	화학식 1의 화합물 (5 μM)	89.3
	화학식 1의 화합물 (15 μM)	90.3
	화학식 1의 화합물 (30 μM)	58.5

[0060] 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물을 5, 15, 30 μM로 처리했을 경우 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였는데, 30 μM에서 58.5% 정도의 멜라닌 합성 저해효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이것은, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물이 멜라닌 생성을 억제하는 효과가 확실히 있음을 나타내는 것이다.

[0061] **<실험예 2> 세포 독성 검사**

[0062] 실시예 1에서 선정된 화학식 1의 화합물이 피부미백용 화장료 조성물로 사용할 수 있는지 판단하기 위해 세포 독성 실험을 하였다.

[0063] 구체적으로, B16F10 세포 및 멜란-에이 세포를 2.5×10^3 세포/웰의 농도로 각각 96-웰 플레이트에서 실시예 2와 동일한 배지 및 조건에서 24시간 배양한 후, 무처리군에는 DMSO를 처리하였고, 비교군에는 미백물질로 알려진 알부틴(arbutin, 제조사, 제조국)을 200 ppm으로 처리하였으며, 처리군에는 화학식 1의 화합물을 5, 15, 30 μM로 처리하였다. 추가로, 48시간 동안 배양한 후, PBS(phosphate-buffered saline)에 녹인 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma, USA) 용액(5 mg/mℓ) 100 ㎕을 주입하였다. 4시간 배양한 뒤에 배지를 제거하고 100 ㎕의 DMSO를 첨가하여 형성된 포르마잔(formazan)을 녹여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 마이크로플레이트(Microplate) 리더(reader)[MDS(Molecular Device), USA]를 이용하여 540 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 하기 수학식 2를 이용하여 계산하였다.

수학식 2

[0064] $$\text{세포생존율}(\%)=(\text{처리군흡광도}/\text{무처리군흡광도})\times100$$

[0065] 수학식 2를 이용하여 무처리군, 비교군 및 처리군에서 B16F10 세포 및 멜란-에이 세포의 생존도를 계산한 결과를 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 3

[0066]

	B16F10 세포에 처리한 시료명	세포 생존도(%)
무처리군	DMSO	100
비교군	알부틴 (200ppm)	90.1
처리군	화학식 1의 화합물 (5 μM)	107.4
	화학식 1의 화합물 (15 μM)	97.4
	화학식 1의 화합물 (30 μM)	110.9

표 4

[0067]

	멜란-에이 세포에 처리한 시료명	세포 생존도(%)
무처리군	DMSO	100
비교군	알부틴 (200ppm)	88.4
처리군	화학식 1의 화합물 (5 μM)	104.6
	화학식 1의 화합물 (15 μM)	88.2
	화학식 1의 화합물 (30 μM)	84.4

[0068] 표 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 화합물을 30 μM의 높은 농도로 세포에 처리할 경우에도 높은 세포 생존도를 나타냈다. 이것은, 아무런 처리를 하지 않은 무처리군과 비슷한 세포 생존도를 나타내는 것으로, 화학식 1의 화합물은 세포 독성이 거의 없음을 나타내는 것이다.

[0069] **<실험예 3> MITF와 E-box 결합 저해 평가**

[0070] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물이 MITF와 E-box의 결합을 저해함으로써 미백활성을 갖는지 확인하기 위하여 DNA와 단백질 간의 상호결합을 화학발광을 통해 확인할 수 있는 EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay) 검사를 수행하였다. 실험은 LightShif? Chemiluminesecent EMSA Kit(Pierce, IL, U.S.A.)의 사용법으로 수행하였다.

[0071] 구체적으로, MITF와 결합할 수 있는 E-box(CATGTG)를 포함하는 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA와 E-coli에 벡터(vector)를 삽입하여 생산, 분리 정제한 MBPek-MITF를 DMSO만 가하여 무처리군 샘플을 제조하고, 화학식 2의 화합물을 1 mM 가하여 비교군을 제조하였으며, 화학식 1의 화합물을 각각 0.5 mM, 1 mM, 2 mM 및 3 mM로 넣어준 샘플 및 MITF 항체 2 ㎍을 처리한 샘플을 제조하여 EMSA 검사법으로 비교분석한 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1의 EMSA 검사에서 실시한 샘플 1 내지 7은 다음과 같다.

[0072] 샘플 1. 무처리군: DMSO

[0073] 샘플 2. 비교군: 화합물 2 (1 mM)

[0074] 샘플 3. 처리군: 화학식 1의 화합물 (0.5 mM)

[0075] 샘플 4. 처리군: 화학식 1의 화합물 (1 mM)

[0076] 샘플 5. 처리군: 화학식 1의 화합물 (2 mM)

[0077] 샘플 6. 처리군: 화학식 1의 화합물 (3 mM)

[0078] 샘플 7. 대조군: MITF 항체 (2 ㎍)

[0079] 도 1은 화학식 1의 화합물이 MITF와 E-box 간의 결합을 저해하는 정도를 EMSA 검사를 이용하여 측정한 도면이다.

[0080] 도 1에 나타난 바와 같이, MITF와 E-box 간의 결합으로 생성되는 밴드는 MITF와 MITF-항체 간의 반응으로 생성되는 밴드(샘플 7 참조)보다 한칸 아래에 생성되는 것으로 샘플 1 내지 6에서 나타나는 밴드가 MITF와 E-box 간의 결합으로 생성되는 밴드임을 확인할 수 있었다. 또한, 화학식 1의 농도가 높아질수록 MITF와 E-box 간의 결합에 의해 생성되는 밴드의 두께가 얇아지다가 사라지는 것을 확인할 수 있었다.(샘플 3 내지 6 참조) 이것은, 화학식 1의 화합물이 MITF와 E-box의 결합을 직접적으로 저해하는 것으로, 화학식 1의 화합물이 MITF 저해제로서 탁월한 효과가 있음을 나타내는 것이다.

[0081] **<실험예 4> 티로시나아제 단백질 발현양 측정**

[0082] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물이 MITF와 E-box의 결합을 저해하여 미백활성을 갖는지 더 확실하게 알아보기

위하여 MITF와 E-box가 결합함에 따라 발현되는 티로시나아제(색소형성 효소) 단백질을 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 측정하였다.

[0083] 구체적으로, DMSO(무처리군); 알부틴(비교군); 및 화학식 1의 화합물(처리군)을 5, 15, 30 μM의 농도로 처리한 B16F10 세포를 라이시스 버퍼(lysis buffer)[40 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5 % Nonidet P-40 (NP-40), 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 mg/ml aprotinin, 2 mg/ml leupeptin, and 100 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 이용하여 총단백질을 얻었다. 다음으로, 단백질 활성 검색 시약(Pierce, IL, U.S.A.)을 이용하여 단백질을 정량하고 같은 양의 단백질을 10분 동안 가열하였다. 총단백질은 10 % 소듐 도데실설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 크기별로 분리하고, PVDF 막으로 옮겨 화학발광(chemiluminescence) 측정기(Amersham Life Science, IL, U.S.A.)로 티로시나아제 단백질의 발현을 측정하였다.

[0084] 상기 실험에서, MITF의 발현양은 미묘한 변화가 있는 반면에 티로시나아제 단백질의 발현양은 화학식 1의 화합물의 농도가 높아질수록 급격히 감소하는 양상을 보였는데, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0085] 도 2는 화학식 1의 화합물이 티로시나아제 단백질 생성을 저해하는 정도를 웨스턴 블롯을 이용하여 측정한 도면이다.

[0086] 도 2에 나타난 바와 같이, 화학식 1의 화합물의 농도가 높아질수록 MITF와 E-box가 결합하여 생성하는 티로시나아제 단백질의 생성량이 눈에 띄게 줄어들고, E-box와 결합하지 못하고 남은 MITF의 양이 소량 늘어나는 것을 확인할 수 있었다. 이것은, 화학식 1의 화합물이 MITF와 E-box의 결합을 직접적으로 저해함을 나타내는 것으로, 미백제로 흔히 알려져 있는 알부틴(비교군)에 비하여 화학식 1의 화합물이 MITF 저해제로서 티로시나아제(색소형성 효소) 단백질의 생성을 억제하는데 탁월한 효과가 있음을 나타낸다.

[0087] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

[0088] **<제제예 1> 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 미백 화장료의 제조**

[0089] **<1-1> 유연 화장수의 제조**

[0090] 화학식 1을 유효성분으로 함유하는 유연 화장수의 제제예는 하기 표 5의 조성과 같이 제조하였다.

표 5

[0091]

원료	함량(중량부)
화학식 1	10.00
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭애씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
하이드로제네이티드캐스터오일	1.00
에탄올	30.00
보존제	미량
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

[0092] **<1-2> 영양 크림의 제조**

[0093] 화학식 1의 화합물을 함유한 영양크림의 제제예는 하기 표 6의 조성과 같이 제조하였다.

표 6

[0094]

원료	함량(중량부)
화학식 1의 화합물	10.0
1,3-부틸렌 글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
식물 추출물	3.2
마그네슘알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭애씨드	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5
세테아릴알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알란	3.8
카르릴릭/카프릭트리글리세라이드	2.8
식물성 오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량
알란토인	미량
소듐 히아루로네이트	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
보존제	적량
착향제	적량
정제수	잔량

[0095] **<제제예 2> 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제의 제조**

[0096] **<2-1> 시럽제의 제조**

[0097] 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 시럽제는 하기 표 7의 조성과 같이 제조하였다.

표 7

[0098]

구성성분	함량(중량부)
화학식 1의 화합물	2
사카린	0.8
당	25.4
글리세린	8
향미료	0.04
에탄올	4
소르브산	0.4
증류수	60

[0099] **<2-2> 정제의 제조**

[0100] 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 정제는 하기 표 8의 조성과 같이 제조하였다.

표 8

[0101]

구성성분	함량(중량부)
화학식 1의 화합물	250
락토오스	175.9
감자전분	180

콜로이드성 규산	32
10% 젤라틴 용액	적량
감자전분	160
활석	50
스테아르산 마그네슘	5

[0102] 화학식 1의 화합물 250 중량부, 락토오스 175.9 중량부, 감자전분 180 중량부 및 콜로이드성 규산 32 중량부와 혼합하였다. 상기 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 매쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조하고 여기에 감자전분 160 중량부, 활석 50 중량부 및 스테아린산 마그네슘 5 중량부를 첨가하여 얻은 혼합물을 정제로 제조하였다.

[0103] **<제제예 3> 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조**

[0104] **<3-1> 산제의 제조**

[0105] 화학식 1의 화합물 2 g

[0106] 유당 1 g

[0107] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0108] **<3-2> 정제의 제조**

[0109] 화학식 1의 화합물 100 ㎎

[0110] 옥수수전분 100 ㎎

[0111] 유 당 100 ㎎

[0112] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[0113] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0114] **<3-3> 캡슐제의 제조**

[0115] 화학식 1의 화합물 100 ㎎

[0116] 옥수수전분 100 ㎎

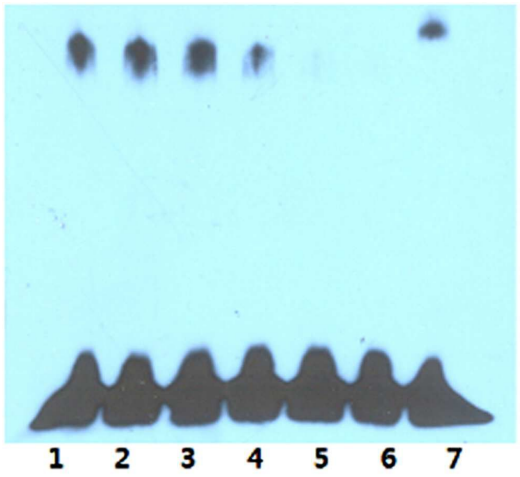
[0117] 유 당 100 ㎎

[0118] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[0119] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

도면

도면1



도면2

