



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월22일
(11) 등록번호 10-1236527
(24) 등록일자 2013년02월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) **A61K 31/015** (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2006-7027751
- (22) 출원일자(국제) 2005년05월27일
심사청구일자 2010년04월23일
- (85) 번역문제출일자 2006년12월28일
- (65) 공개번호 10-2007-0034538
- (43) 공개일자 2007년03월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2005/018884
- (87) 국제공개번호 WO 2005/117849
국제공개일자 2005년12월15일
- (30) 우선권주장
60/575,599 2004년05월28일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP05213729 A
JP2000095721 A
US05880314 A
US06296857 B1

전체 청구항 수 : 총 25 항

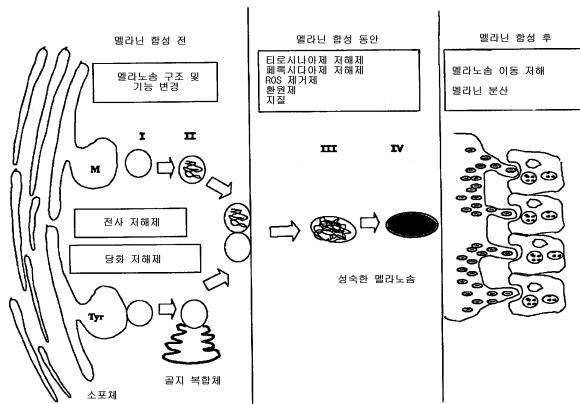
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **이핵성 효소의 강력한 저해제로서의 디아릴알칸**

(57) 요약

본 발명은 활성 식물 추출물 및 특별한 화합물 - 이핵성 효소 기능을 특이적으로 저해하는 추출물 안의 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀을 확인하기 위한 화학적 중복분리방지 방법과 함께 효소 저해 검정을 조합한 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 유도된 조성물은 이핵성 효소 활성, 특이적으로 티로시나아제의 저해 및 멜라닌 과생성을 예방하는 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀로 구성된다. 본 발명은 또한 이핵성 효소의 활성, 특히 티로시나아제를 저해하는 방법 및 이핵성 효소의 기능과 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법을 포함한다. 본 발명은 멜라닌 과생성 및 이와 관련된 피부의 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함한다. 이핵성 효소의 기능 및 멜라닌 과생성과 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법은 약제학적으로 허용가능한 단체와 함께 하나 또는 그 이상의 식물로부터 합성 및/또는 분리된 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀을 포함하는 유효량의 조성물을 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판 및 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판을 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 디아릴알칸을 포함하는, 세균 감염, 진균성 감염, 말라리아 감염, 바이러스성 감염, 환원된 산화질소 생성, 비정상적 남성 또는 여성의 성홍분 장애, 염증 질환, 산화적 스트레스, 비정상적 약물 대사, 암, 고형종양, 치주질환, 구강 전암성(oral pre-cancerous) 질환, 구강암, 다른 구강 악성종양, 민감성 잇몸 및 치아, 후유증(sequelae), 치수염(pulpitis), 과민증(irritation), 의치(oral denture)의 물리적 이식(implantation)에 의해 야기된 통증 및 염증, 외상(trauma), 상해(injuries), 수면 중 이갈이(bruxism) 및 다른 구강, 잇몸상 또는 혀상의 사소한 상처, 치태(dental plaque) 및 치석(calculus), 치아 석회질 제거(tooth decalcification), 단백질 분해(proteolysis) 및 카리에스(caries)(부식; decay)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 이핵성 효소와 관련된 질병 또는 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 디아릴알칸이 유기 합성에 의해 얻어지거나, 국화과(Compositae), 다콩과(Fabaceae), 농나무과(Lauraceae), 콩과(Leguminosae), 백합과(Liliaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 뽕나무과(Moraceae) 및 육두과(Myristicaceae)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물과로부터 분리되는 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 디아릴알칸이 줄기, 줄기 수피(stem barks), 자루(trunks), 자루 수피(trunk barks), 작은 가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리, 뿌리 수피(root barks), 새싹(young shoots), 씨앗(seeds), 근경(rhizomes), 꽃 및 다른 번식 기관, 잎 및 다른 대기중의 부분으로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 부분으로부터 분리되는 약제학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제2항에 있어서, 디아릴알칸이 아카시아(*Acacia*), 꾸지나무(*Broussonetia*), 다이아넬라(*Dianeilla*), 헬리크러섬(*Helichrysum*), 이리안테라(*Iryanthera*), 네마(*Knema*), 린데라(*Lindera*), 페로카르파스(*Pterocarpus*), 비스쿰(*Viscum*) 및 크산토케르시스(*Xanthocercis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 종으로부터 분리되는 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 이핵성 효소가 티로시나아제(tyrosinase), 아르기나아제(arginase), 우레아제(urease), 사이토크롬 C 옥시다아제(cytochrome c oxidase), 프로톤 펌핑 헴-구리 옥시다아제(proton pumping heme-copper oxidase), 2기능성의 카본 모노사이드 디하이드로게나아제/아세틸 코엔자임 A 신타아제(bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetylcoenzyme A synthase), 리보뉴클레오티드 리덕타아제(ribonucleotide reductase), 메탈로-베타-락타마아제(metallo-beta-lactamase), H⁽⁺⁾-ATP아제 및 다른 옥시다아제, 및 세균성 포스포트리에스터라아제(phosphotriesterase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 이핵성 효소가 티로시나아제인 약제학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판 및 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 디아릴알칸을 포함하는, UV 노출에 의한 피부 다크닝 및 손상, 선텐(suntan), 피부 노화, 간질환에 따른 과색소 침착 반점(hyper pigmentation spots), 열에 의한 화상 및 국소적 상처, 진균성, 미생물성 및 바이러스성 감염에 의해 야기된 염증 질환에 의한 피부 색소침착, 백반증(vitiligo), 악성종양, 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 멜라닌의 과생성 또는 불규칙한 분포와 관련된 질병 또는 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

구리, 철, 아연, 봉소, 리튬, 셀레늄, 칼슘, 크롬, 몰리브덴, 마그네슘 및 망간으로 이루어진 군으로부터 선택되는 전달되는 금속 이온과 함께 1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판 및 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 디아릴알칸을 포함하는, 빈혈 및 다른 철 결핍, 염증; 비만 및 당뇨병, 바이러스성 감염, 불면증, 억제된 면역 기능, 골다공증, 무월경(amenorrhea), 월경 불순(dysmenorrheal), 간질(epilepsy), 고혈압, 콜레스테롤 혈증, 관상동맥 질환 및 뇌 혈관경련(cerebral vasospasms), 설사, 파킨슨 병, 알츠하이默 병, 암, 류마티스성 관절염, 치주 질환, 구강 전암성(oral pre-cancerous) 질환, 구강암 및 다른 구강 악성종양, 민감성 잇몸 및 치아, 후유증(sequelae), 치수염(pulpitis), 과민증(irritation), 의치(oral denture)의 물리적 이식(implantation)에 의해 야기된 통증 및 염증, 외상(trauma), 상해(injuries), 수면 중 이갈이(bruxism) 및 다른 구강, 잇몸상 또는 혀상의 사소한 상처, 치태(dental plaque) 및 치석(calculus), 치아 석회질 제거(tooth decalcification), 단백질 분해(proteolysis) 및 카리에스(caries)(부식; decay), 남성 불육증(male infertility) 및 시력감퇴(mucular degeneration)로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

제13항에 있어서, 금속 이온이 막 또는 피부를 통해 혈류 안으로 전달되는 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 막이 혈액/뇌 관문(blood/brain barrier)인 약제학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 디아릴알칸이 유기 합성에 의해 얻어지거나, 국화과(Compositae),

다콩과(Fabaceae), 녹나무과(Lauraceae), 콩과(Leguminosae), 백합과(Liliaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 뽕나무과(Moraceae) 및 육두과(Myristicaceae)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물과로부터 분리되는 약제학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 디아릴알칸이 줄기, 줄기 수피(stem barks), 자루(trunks), 자루 수피(trunk barks), 작은 가지(twigs), 둉이줄기(tubers), 뿌리, 뿌리 수피(root barks), 새싹(young shoots), 씨앗(seeds), 근경(rhizomes), 꽃 및 다른 번식 기관, 잎 및 다른 대기중의 부분으로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 부분으로부터 분리되는 약제학적 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 디아릴알칸이 아카시아(*Acacia*), 꾸지나무(*Broussonetia*), 다이아넬라(*Dianella*), 헬리크러섬(*Helichrysum*), 이리안테라(*Iryanthera*), 네마(*Knema*), 린데라(*Lindera*), 페로카르페스(*Pterocarpus*), 비스쿰(*Viscum*) 및 크산토케르시스(*Xanthocercis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 종으로부터 분리되는 약제학적 조성물.

청구항 21

제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 이핵성 효소가 티로시나아제(tyrosinase), 아르기나아제(arginase), 우레아제(urease), 사이토크롬 C 옥시다아제(cytochrome c oxidase), 프로톤 펌핑 헴-구리 옥시다아제(proton pumping heme-copper oxidase), 2기능성의 카본 모노사이드 디하이드로게나아제/아세틸 코엔자임A 신타아제(bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetylcoenzyme A synthase), 리보뉴클레오티드 리덕타아제(ribonucleotide reductase), 메탈로-베타-락타마아제(metalo-beta-lactamase), H(+)-ATP아제 및 다른 옥시다아제, 및 세균성 포스포트리에스터라아제(phosphotriesterase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항, 제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 수용자 체중 kg 당 0.01 내지 200mg으로부터 선택된 투약량으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 23

제1항, 제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 치료학적 제형의 총 중량에 기초하여 0.001% 내지 100%로부터 선택된 투약량으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항, 제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적, 피부학적 또는 화장품용으로 허용가능한 담체 중에 디아릴알칸 또는 디아릴알칸의 혼합물 0.001중량% 내지 99.9중량%로 구성된 약제학적, 피부학적 또는 화장품용 제형으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항, 제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 경로가 국소적, 에어로솔, 좌약, 피부내, 근육내 및 정맥내 투여로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 들러붙지 않는 거즈, 붕대, 약솜, 클로스 와이프, 반창고, 마스크, 보호제, 세척제, 치아 플로싱 물질, 소독제, 용액, 크림, 로션, 연고, 젤 또는 애멸전, 유동체, 치약, 양치질 물약, 코스메틱 페이스트, 비누 또는 파우더를 사용하여 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항, 제11항 또는 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 국소 도포를 위한 약제학적, 피부학적 또는 화장품용으로

적합한 통상의 부형제를 더 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 보조제, 담체, 표준 또는 서방성 비히클, 또는 이들의 조합을 더 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판, 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판 및 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올로 이루어진 군으로부터 선택된 디아릴알칸.

청구항 30

제29항에 있어서, 유기합성에 의해 얻어지거나, 국화과(Compositae), 다콩과(Fabaceae), 녹나무과(Lauraceae), 콩과(Leguminosae), 백합과(Liliaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 뽕나무과(Moraceae) 및 육두과(Myristicaceae)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물과로부터 분리되는 디아릴알칸.

청구항 31

제30항에 있어서, 줄기, 줄기 수피(stem barks), 자루(trunks), 자루 수피(trunk barks), 작은 가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리, 뿌리 수피(root barks), 새싹(young shoots), 씨앗(seeds), 근경(rhizomes), 꽃 및 다른 번식 기관, 잎 및 다른 대기종의 부분으로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 부분으로부터 분리되는 디아릴알칸.

청구항 32

삭제

청구항 33

제30항에 있어서, 아카시아(*Acacia*), 꾸지나무(*Broussonetia*), 다이아넬라(*Dianella*), 헬리크러섬(*Helichrysum*), 이리안테라(*Iryanthera*), 네마(*Knema*), 린데라(*Lindera*), 페로카르파스(*Pterocarpus*), 비스쿰(*Viscum*) 및 크산토케르시스(*Xanthocercis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 종으로부터 분리되는 디아릴알칸.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

명세서**기술분야**

[0001]

본 발명은 일반적으로 이핵성 효소(binuclear enzyme)에 의해 매개된 질병 및 이상의 예방 및 치료에 관련된 것이다. 특히, 본 발명은 이핵성 활성 부위(active site)를 가지는 효소의 활성을 저해하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명은 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸(diarylalkane(s))으로 구성된 신규한 조성물을 포함한다. 본 발명의 디아릴알칸은 하나 또는 그 이상의 식물로부터 분리될 수 있거나 유기 합성에 의해 얻어질 수 있다. 본 발명은 자연원(natural source)로부터 이 화합물을 분리하는 방법 및 이 화합물을 합성하는 방법을 더 포함한다. 하나의 실시예로, 디아릴알칸은 식물원(plant source)으로부터 분리된 자연적으로 존재하는 화합물의 합성적 변형(synthetic modification)에 의해 얻어졌다.

배경기술

[0002]

과도한 피부 착색을 저해하거나 예방할 수 있는 물질에 대한 요구가 높다. 피부의 선천적 색소 멜라닌(melanin)은 멜라노사이트(melanocytes) 안에 존재하는 막 결합 세포기관인 멜라노솜(melanosomes)에서 합성된 질소 중합체(nitrogenous polymer)이다. 다양한 농도로 생성된 멜라닌은 피부 타입(유전적 성질) 및 환경 요인에 의존한다. 멜라노사이트는 표피(epidermis)의 기저막에 존재하는 세포이며 세포 구성물의 5% 및 10% 사이를 차지한다(대략 cm^2 당 1200–1500 멜라노사이트). 멜라노사이트는 자외선(ultraviolet light; UV)과 같은 인자에 의해 자극될 때 더욱 빠르게 분열하여 더 많은 양의 멜라닌을 생성한다. 멜라닌은 그 후 케라티노사이트(keratinocytes)에서 성숙한 멜라노솜으로 이동되어 표피 안에서 갈색의 피부색을 나타낸다.

[0003]

인간의 피부에서 멜라노사이트의 수는 피부색과 상관없이 대체로 동일하다. 피부색은 생성된 멜라닌(흑색의 유멜라닌(eumelanin) 또는 황색을 띠는 연갈색의 페오멜라닌(pheomelanin))의 양과 타입에 크게 의존한다. 아시아인 및 옅은 색의 피부를 가진 사람들은 어두운 색의 피부를 가진 사람들보다 유멜라닌의 농도가 낮으며 방사선의 영향에 대해 상대적으로 덜 보호된다. 빨간 머리색을 가진 사람은 페오멜라닌 색소로 특징지워지며 광보호가 거의 없거나 없다. 게다가, 피부에서 멜라닌의 분포 또한 다양하다. 밝은색의 피부를 가진 사람들에서 대부분의 색소가 기저층에 위치하는 반면, 어두운색의 피부를 가진 사람들에서 멜라닌은 각질층(horny layer)에 도달하는 모든 부분에 퍼져있다.

- [0004] 멜라닌의 과생성은 상이한 형태의 병적인 피부색, 모색(hair color) 및 피부의 또 다른 질병 및 질환을 야기할 수 있다. 피부 색소침착과 관련된 두개의 질환이 있다. 피부의 흑화(darkening)는 UV 노출 및 노화에 의해 야기된 병적으로 높아진 멜라닌; 및 피부 색소의 이상 분포에 의한 노화반점(age spots), 기미(liver spots) 및 의약품 및 상처/질병 유도 색소과다침착(hyperpigmentation)을 포함한다(Seiberg *et al.*, (2000) *J. Invest. dermatol.* 115:162; Paine *et al.* (2001) *J. Invest. Dermatol.* 116:587).
- [0005] 멜라닌 세포 생성(melanogenesis)의 조절제(modulator)는 도1에 나타낸 다양한 방식의 기능을 가지도록 선택되거나 설계될 수 있다. 도1을 참고하여, 이들은 멜라닌 생성에 앞서 멜라노솜의 구조 및 기능을 직접적으로 조절할 수 있고, 멜라닌의 합성에 관계된 티로시나아제(tyrosinase)와 같은 효소의 생성 또는 기능을 저해할 수 있고, 유멜라닌/페오멜라닌의 비율을 변화시킬 수 있거나 케라티노사이트에서 멜라노사이트로부터 멜라노솜의 이동을 담당하는 댐핑 메카니즘(damping mechanisms)에 의해 기능할 수 있다(Briganti *et al.* (2003) *Pigment Cell Research* 16:101-110).
- [0006] 티로시나아제는 멜라닌 생성에 있어서 주요 효소이다. 이 효소는 세개의 반응을 촉매한다: 3,4-디하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine)을 위한 티로신의 수산화반응(hydroxylation), DOPA 퀴논(DOPA quinone)을 위한 DOPA의 산화 및 인돌 퀴논(indole quinone)을 위한 DHI(5,6-dihydroxyindole)의 산화(Hearng *et al.* (1991) *FASEB* 53:515). 티로시나아제가 촉매 활성을 위해 기질 및 2가의 금속 이온 모두를 필요로 한다는 것이 측정되어졌다. 피부 미백을 목적으로 멜라닌 합성을 저해하기 위해 일반적으로 사용된 방법은 주로 티로시나아제 그 자체에 직접적으로 결합하거나 간접적으로 예를 들어, 필수 금속 이온과 복합체를 형성하는 티로시나아제 활성을 저해하는 물질에 기초하고 있다.
- [0007] 티로시나아제는 활성 부위에 2개의 구리 이온을 포함하는 타입 3 구리 단백질 패밀리에 속한다. 티로시나아제 활성 부위 구조에 대한 연구는 2개의 구리 이온이 가까이 위치하고 있으며 각각의 이온이 도2에 나타낸 것과 같이 N-ε 질소 원자의 측쇄를 통해 3개의 히스티딘과 연결되어 있음을 밝혔다(Pfiffner and Lerch (1981) *Biochem.* 20: 6029; Cuff *et al.* (1998) *J. Mol.* 278:855). 이핵성 구리 이온은 세가지 주요 레독스 형태(redox form)로 존재할 수 있다 : Cu^I-Cu^I 환원형, 과산화물로서 역으로 O₂와 결합하는 Cu^{II}-O₂-Cu^{II}형, 및 효소의 휴지형(resting form), 여기에서 Cu²⁺ 이온은 일반적으로 작은 리간드에 연결된다. Cu^{II}-O₂-Cu^{II} 레독스 상태는 티로시나아제 효소 활성에 중요하다는 것이 측정되어졌다. 이 상태에서, 티로시나아제는 멜라닌 생합성에 중요한 반응인 모노-페놀(티로신과 같은)의 오르토 위치(ortho position)에 두번째 수산기의 도입을 촉매한다.
- [0008] 티로시나아제 활성 부위에서 모노페놀의 접근, 리간드 형성 또는 산화를 방해하는 어떤 화합물은 티로시나아제의 효과적인 저해제일 수 있으며, 잠재적으로 멜라닌 생성의 감소 및 더 밝은 피부색을 야기한다. 일반적으로 말하자면, 티로시나아제 활성 부위에서 구리 이온은 산소, 질소, 황 및 할로겐 표면의 고립전자쌍(lone pair electrons)과 쉽게 키클레이트 화합물을 형성할 수 있다(Weder *et al.* (1999) *Inorg. Chem.* 38:1736). 도3은 몇 가지 알려진 티로시나아제 저해제의 활성 구조 및 메카니즘을 나타낸다(Briganti *et al.* (2003) *Pigment Cell Research* 16:101-110; Seo *et al.* (2003) *J. Agric. Food Chem.* 51:2837).
- [0009] 도3을 참고하면, 하이드로퀴논과 같은 3,4-디하이드록시페닐알라닌(DOPA)과 유사한 구조를 가지는 화합물은 티로시나아제를 저해하며 또한 멜라노사이트 용해 물질일 수 있다(U.S. Pat. No. 5,523,077). 예를 들어, 일반적인 월귤나무 우바우르(*Uvae ursi*)의 잎으로부터 분리된 알부틴은 인간의 멜라노사이트에서 멜라닌 합성에 영향을 주고 티로시나아제를 저해하는 천연으로 존재하는 하이드로퀴논의 베타-글루코파라노사이드(beta-glucopyranoside)이다(Chakraborty *et al.* (1998) *Pigment Cell Res.* 11:206; U.S. Pat. No. 5,980,904). 알부틴 작용의 메카니즘은 티로시나아제 활성 부위에 결합하기 위한 L-티로신 또는 L-도파의 경쟁을 포함한다. 이것은 단백질의 발현 또는 합성을 억제할 수 없다(Maeda and Fukuda (1996) *J. Pharmacol. Exp.* 276:765). 합성 알부틴 타입 화합물은 또한 인간의 티로시나아제를 강력하게 저해한다(Sugimoto *et al.* (2003) *Chem. Pharm. Bull.* 51:798). 배양된 홍화(safflower; *Carthamus tinctorius L.*) 세포로부터 분리된 신규한 디퀴논(diquinone)인 키노비온 A(Kinobeon A)은 코직산(kojic acid) 보다 더 뛰어난 티로시나아제 저해 활성을 가진다(Kanehira *et al.* (2003) *Planta Med.* 69:457). 만일 오랜 기간동안 적용되거나 높은 농도의 하이드로퀴논에서는 심각한 부작용을 가질 수 있다. 게다가, 하이드로퀴논은 영구적인 탈색소(de-pigmentation)를 초래할 수 있으며 따라서 자외선에 노출되었을 때 피부의 감광성(photosensitivity)을 증가시킬 수 있다.
- [0010] 현재 사용되고 있는 내약성이 좋은(better-tolerated) 미백 물질은 천연물(natural origin)이다. 예를 들어, 코직산은 어떤 박테리아를 포함하는 탄수화물 용액으로부터 유래된 천연의 하이드록실-γ-페론(hydroxyl-γ-

pyrone)이다. 도3을 참고하면, 코직산은 산화된 오르토-디하이드록시페놀로 볼 수 있다. 코직산은 금속 이온 특히 Cu^{II}와 강력한 킬레이트 화합물을 형성한다고 알려져 있다(Gerard and Hugel (1975) Bull. Soc. Chim. Fr. 42:2404). 그것은 강력하게 길항적이지만 티로시나아제의 저해제에 결합하는 것이 느리다(Cabanes et al. (1994) J. Pharm. Pharmacol. 46:982). 최근의 연구는 코직산이 염화 제이구리(dicopper (II)) 복합체 및 염화 제이구리-이산소 부가물(dicopper-dioxygen adduct) 모두와 강력하게 결합하는 가교 리간드(bridging ligand)로서 작용하며, 따라서 효소에 카테콜(catechol) 기질의 결합을 예방함을 보여준다(Battaini et al. (2000) JBIC 5:262). 코직산 및 그의 에스테르는 피부 표백제의 용도로 특허출원되었다(U.S. Pat. Nos. 4,369,174; 4,771,060; 5,824,327; 5,427,775; 4,990,330을 참고하시오).

[0011] 플라보노이드는 티로시나아제의 저해제로서 보고되어 있는 또 다른 종류의 천연물이다(Shimizu et al. (2000) Planta Med. 66:11; Xie et al. (2003) Biochem. 68:487). 활성 티로시나아제 저해제는 플라본(Likhitwitayawuid et al. (2000) Planta Med. 66:275), 플라보놀(Kubo and Kinsh-Hori (1999) J. Agric. Food Chem. 47:4121), 프레닐화된(prenylated) 플라보노이드(Kuniyoshi et al. (2002) Planta Med. 68:79; Son et al. (2003) Planta Med. 69:559; Kim et al. (2003) Biol. Pharm. Bull. 26:1348), 플라반(No et al. (1999) Life Sci. 65:PL241; Kim et al. (2004) Biomacromolecules 5:474), 및 디하이드로칼콘(dihydrochalcones)(Shoji et al. (1997) Biosci. Biotechnol. Biochem. 61:1963)을 포함한다.

[0012] 티로시나아제 저해제의 다른 타입은 폐놀 유도체(Sakuma et al. (1999) Arch. Pharm. Res. 22:335; Kerry and Rice-Evans (1999) J. Neurochem. 73:247; Battaini et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:44606), 벤즈알데히드(Kubo and Kinsh-Hori (1999) Plant Medica 65:19; Chen et al. (2003) J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 18:491; Nihei et al. (2004) Bioorg. Med. Chem. 14:681), 벤조산 유도체(Curto et al. (1999) Biochem Pharmacol. 57:663; Chen et al. (2003) J. Protein Chem. 22:607; Miyazawa et al. (2003) J. Agric. Food Chem. 51:9653; Kubo et al. (2003) Z. Naturforsch [C] 58:713), 쿠퍼론(cupferron)(Xie et al. (2003) Int. J. Biochem. Cell Biol. 35:1658), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 뿌리로부터의 벤조디피란(benzodipyran)(Yokota et al. (1998) Pigment Cell Res. 11:335), 티오하이드록실 화합물(Park et al. (2003) J. Protein Chem. 22:613), 테르펜(terpenoids)(Oh et al. (2002) Planta Med. 68:832) 및 옥사졸로디네티온(oxazolidinethione)(Seo et al. (1999) Planta Med. 65:683)을 포함한다. 가장 강력하다고 알려진 천연의 티로시나아제 저해제는 스틸벤(stilbenes)(IC₅₀=0.3~5 μM)(Shin et al. (1998) Biochem Biophys. Res. Commun. 243:801; Ohguchi et al. (2003) Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:1587), 스틸벤 글리코시드(Iida et al. (1995) Planta Med. 61:425) 및 4-치환된 리소시놀(4-substituted resorcinols)(Shimizu et al. (2000) Planta Med. 66:11)이다.

[0013] 4-치환된 리소시놀의 구조/활성 연구는 -CH₂C₆H₅와 같은 소수성이며 덜 부피가 큰 치환체 및 알킬기 즉, -CH₂CH₂CH₃ 이 10 μM 보다 적은 IC₅₀의 가장 큰 효능을 가짐을 나타낸다(Shimizu et al. (2000) Planta Med. 66:11). 4-치환된 리소시놀 작용의 메카니즘은 이핵성 구리 이온에서의 금속 킬레이트 효과의 어떠한 추가적인 해석 없이 DL-β-(3,4-디하이드록시페닐)알라닌(DL-dopa) 산화의 느린 결합 경쟁 저해로서 특징지워진다(Jimenez and Garcia-Carmona (1997) J. Agric. Food Chem. 45:2061).

[0014] 백합과에 속하는 알로에는 많은 생물학적 활성 물질을 포함하는 복잡한 식물이다(Cohen et al. (1992) in Wound Healing/Biochemical and Clinical Aspects, 1st ed. W B Saunders, Philadelphia). 360종이 넘는 알로에의 대부분이 아프리카 토종으로 알려져 있다. 역사적으로, 알로에 산물은 화상, 종기(sores) 및 다른 상처의 치료를 위한 피부적용에 사용되어 왔다. 이러한 용도는 임상학적 활성을 가지는 알로에 식물로부터 화합물을 확인하려는 많은 연구에 자극이 되었다(Grindlay and Reynolds (1986) J. of Ethnopharmacology 16:117-151; Hart et al. (1988) J. of Ethnopharmacology 23:61-71).

[0015] 야기 등은 알로에로부터 분리된 화합물군, 특히 티로시나아제의 효과적인 저해제인 알로에신(aloesin) 및 그것의 유도체 중의 하나인 2"-O-페롤로일알로에신(2"-O-feruloylaloesin)에 대해 밝혔다(Yagi et al. (1987) Plant Medica 515-517; Yagi et al. (1977) Z. Naturforsch 32c:731-734). C-글루코실화된 5-메틸크로몬(C-glucosylated 5-methylchromone)인 알로에신은 0.92mM의 IC₅₀ 투여량에 의존하여 인간 티로시나아제 수산화효소 활성을 저해하였으며, 또한 IC₅₀=0.41mM을 가지는 코직산 및 IC₅₀=3.02mM을 가지는 알부틴과 비교하여 IC₅₀=0.70mM의 투여량에 의존하여 DOPA 산화효소 활성을 저해하였다. 알로에신에 의한 티로시나아제 효소 활성 및 필연적인 멜라닌 형성의 저해는 B16F1 쥐의 멜라노마 세포를 사용한 세포-기초 검정법에서 확인되었다. 멜

라닌 생합성은 알로에신($IC_{50}=0.167\text{mM}$) 투여량에 의존하여 저해된다(Jones *et al.* (2002) *Pigment. Cell Res.* 15:335). 알로에 크로몬(aloe chromones)의 티로시나아제 저해 작용 메카니즘은 구리 이온의 감소에 관련된 것이라고 추측되었다. 천연(U.S. Pat. No. 6,451,357), 반합성(semi-synthetic)(U.S. Pat. No. 5,801,256; U.S. Pat. No. 6,083,976) 뿐만 아니라 조제된 알로에 크로몬(U.S. Pat. No. 6,123,959)은 그들의 피부 미백력으로 특허출원되었다.

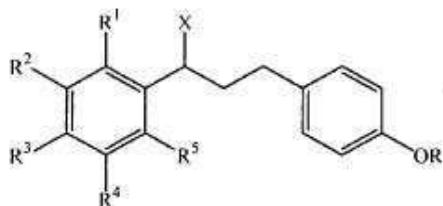
[0016] 아스코르브산(감귤류 과일과 같은 천연원 및 합성으로부터의 비타민 C) 및 그들의 유도체는 또한 피부 미백에 이용되어왔다. 대부분의 경우, 비타민 C는 코직산 또는 다른 티로시나아제 저해제(U.S. Pat. Nos. 4,919,921; 6,458,379 및 5,916,915)와 함께 첨가된다. 다른 보고된 피부 미백 화합물은 올리브 식물에서의 추출물(U.S. Pat. No. 6,682,763), 불포화 장쇄 지방산(U.S. Pat. No. 6,669,932), 커큐민(U.S. Pat. No. 6,641,845), 효소 추출물(U.S. Pat. No. 6,514,506), 쿠메스트롤(coumestrol)(U.S. Pat. No. 6,503,941), 하이드록실 카르복시산(U.S. Pat. No. 6,417,226; 6,365,137; 5,609,875; 5,262,153), 베타-글루칸(U.S. Pat. No. 6,251,877), 알로에 크로몬(U.S. Pat. No. 6,083,976), 폐닐알라닌 화합물(U.S. Pat. No. 5,767,158), 루틴(U.S. Pat. No. 5,145,782), 에시놀(escinol)(U.S. Pat. No. 5,728,683), 살리실산(U.S. Pat. No. 5,700,784), 안지오제닌(U.S. Pat. No. 5,698,185), 머캅토덱스트란(U.S. Pat. No. 6,077,503), 엘라직 산(U.S. Pat. No. 6,066,312), 포스핀산(U.S. Pat. No. 6,280,715), 봉소 함유 화합물(U.S. Pat. No. 5,993,835), 식물 추출물(푸에라리아로부터, U.S. Pat. No. 6,352,685; 뽕나무, U.S. Pat. Nos. 6,197,304; 6,066,312 및 5,872,254; 아세로라 체리 발효물, U.S. Pat. No. 5,747,006; 퓨라논, U.S. Pat. No. 5,602,256; 및 그 외, U.S. Pat. No. 5,773,014)이다.

[0017] 디아릴알칸은 천연물의 흔하지 않은 종류이다. 지금까지, CD-ROM상의 천연물 사전(the Dictionary of Natural Products)에 기재된 179,000개 이상의 천연 화합물 중에서 단지 82개만이 디아릴프로판(n=3)이다(Chapman & Hall/CRC, Version 12:2 January 2004). 꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*)는 뽕나무과(Moraceae family)의 낙엽성(deciduous) 나무이며, 20가지 이상의 디아릴프로판이 오로지 이 속으로부터 분리되었다(Keto *et al.* (1986) *Chem. Pharm. Bull.* 34:2448; Ikuta *et al.* (1986) *Chem. Pharm. Bull.* 34:1968; Takasugi *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 689; Gonzalez *et al.* (1993) *Phytochem.* 32:433). 생물학적 정량으로 유도된 꾸지나무 추출물의 분류는 아로마타아제 저해 활성을 가지지 않는 4개의 디아릴프로판으로 산출되었다(Lee *et al.* (2001) *J. Nat. Prod.* 64:1286). 그러나, 동일한 식물로부터 분리된 2 프레닐화된 디아릴프로판은 몇몇의 암세포주에 대해 세포독성을 나타내며(Ko *et al.* (1999) *J. Nat. Prod.* 62:164) 브로우쏘닌 A(broussonin A)는 항진균 활성을 나타내었다(Iida *et al.* (1999) *Yakugaku Zasshi*. 119:964).

[0018] 많은 수의 디아릴알칸은 또한 이리안테라(*Iryanthera*) 종(육두과; Myristicaceae)으로부터 분리되었다(Alvea *et al.* (1975) *Phytochem.* 14:2832; de Almeida *et al.* (1979) *Phytochem.* 18:1015; Braz *et al.* (1980) *Phytochem.* 19:1195; Diaz *et al.* (1986) *Phytochem.* 25:2395). 4개의 디하이드로칼콘(dihydrochalcones)이 항산화 활성을 보인 이리안테라 란시폴리아(*Iryanthera lancifolia*)로부터 분리되었다(Silva *et al.* (1999) *J. Nat. Prod.* 62:1475). 많은 수의 디아릴프로판 또한 육두과의 비롤라(*Virola*) 종으로부터 분리되었다(Braz *et al.* (1976) *Phytochem.* 15:567; Hagos *et al.* (1987) *Plant Med.* 53:57 Gonzalez *et al.* (1993) *Phytochem.* 32:433; Kijjoa *et al.* (1981) *Phytochem.* 20:1385; Talukdar *et al.* (2000) *Phytochem.* 53:155).

[0019] 다른 디아릴프로판은 폐로카르페스 마르수파움(*Pterocarpus marsupium*)(콩과; fabaceae)(Rao *et al.* (1984) *Phytochem.* 23:897; Maurya *et al.* (1985) *J. Nat. Prod.* 48:313), 린데라 웜벼레이트(*Lindera umbellata*)(녹나무과; Lauraceae)(Morimoto *et al.* (1985) *Chem. Pharm. Bull.* 33:2281), 헬리크리섬 문디(*Hilichrysum mundii*)(국화과; Compositae)(Bohlmann *et al.* (1978) *Phytochem.* 17:1935), 비스콤 안굴라툼(*Viscum angulatum*)(겨우살이과; Loranthaceae)(Lin *et al.* (2002) *J. Nat. Prod.* 65:638), 평활근 이완효과를 가지는 아카시아 토틸리스(*Acacia tortilis*)(콩과; Leguminosae)로부터 분리된 것(Hagos *et al.* (1987) *Planta Med.* 53:27), 크산토케르시스 잡베시아카(*Xanthocercis zambesiaca*)(콩과)(Bezuidenhout *et al.* (1988) *Phytochem.* 27:2329) 및 네마 글로머라타(*Knema glomerata*)(육두과)(Zeng *et al.* (1994) *J. Nat. Prod.* 57:376)로부터의 세포독성 화합물들을 포함하는 천연원으로부터 분리되었다.

[0020] 일본 특허 No. JP05213729A는 피부 염증, 반점(stains), 주근깨(freckles) 및 선변(sun-burn)으로부터 생기는 색소증(chromatosis)의 치료를 위한 멜라닌 저해제로서 합성 디하이드로칼콘의 용도를 알려준다. 청구된 화합물은 하기의 일반식을 가진다:



[0021]

[0022] 여기에서, X는 H, OH 또는 =O로부터 선택되고; R은 H 또는 Me; 및 R¹-R⁵는 독립적으로 H, OR 및 NH₂로부터 선택된다. 따라서, 기술된 디하이드로칼콘은 페닐 고리 상의 하이드록시/메톡시 치환체 및 제2고리 상의 다섯개의 비특이적 치환체(R¹-R⁵)를 포함한다. 청구된 조성물의 어떠한 것에서도 효소 저해는 측정되지 않았으며, 반대로 멜라닌의 저해는 UV 자극에 따른 동물 피부의 색깔 변화 및 배양된 피부 세포에서 생성된 멜라닌 양의 측정에 의해 측정되었다. 최근의 발명에서, JP05213729A에 기재된 화합물 중의 하나인 1-(4-하이드록시페닐)-3-(4'-하이드록시페닐)-1-프로판올(1-(4-hydroxyphenyl)-3-(4'-hydroxyphenyl)-1-propanol)이 합성되었고, 그것의 티로시나아제 저해능이 측정되었다. 이 화합물은 단지 티로시나아제에 대한 적당한 저해를 나타내었다(IC₅₀=305 μM, 표2). 본 발명은 독특한 치환 패턴을 가지는 신규한 디아릴알칸을 보여주며, 여기에서 적어도 2개의 방향족 고리 Ar₁ 또는 Ar₂ 중의 하나는 1-5 R' 기(R'₁-R'₅)으로 치환되고 여기에서 적어도 상기 R'₁-R'₅의 2개는 H가 아니다. 이러한 화합물은 JP05213729에 의해 알려진 화합물 보다 4-600배 더 티로시나아제의 활성을 저해하는 예상치 못한 능력을 나타낸다. 지금까지 본 발명에서의 어떠한 화합물도 간행물에 나타나 있지 않다고 여겨진다.

발명의 상세한 설명

[0023]

본 발명은 여기에서 이색성 효소로서 언급한 이해성 활성 부위를 갖는 효소의 활성을 저해하기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에 투여하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 디아릴알칸은 하나 또는 그 이상의 식물로부터 합성 및/또는 분리된다. 이해성 효소의 예로는 티로시나아제(tyrosinase), 아르기나아제(arginase), 우레아제(urease), 사이토크롬 C 옥시다아제(cytochrome c oxidase), 프로톤 펌핑 헴-구리 옥시다아제(proton pumping heme-copper oxidase), 2기능성의 카본 모노사이드 디하이드로게나아제/아세틸 코엔자임 A 신타아제(bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetylcoenzyme A synthase), 리보뉴클레오티드 리덕타아제(ribonucleotide reductase), 메탈로-베타-락타마아제(metalo-beta-lactamase), H(+)-ATP아제 및 다른 옥시다아제, 및 세균성 포스포트리에스터라아제(phosphotriesterase)로 본 발명의 범위 안에 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 한 실시예에서, 이해성 효소는 티로시나아제이다.

[0024]

본 발명은 또한 이해성 효소의 활성과 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법을 포함한다. 본 발명에 따른 예방 및 치료의 방법은 치료적으로 유효한 양의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 내부(internally) 또는 국소적(topically)으로 투여하는 것을 포함한다. 디아릴알칸은 저해되는 이해성 효소에 따라 항균성, 항진균성, 항말라리아성 또는 항바이러스성 약제, 남성 또는 여성의 성흥분 장애(sexual arousal) 조절 수단으로서 산화질소(nitric oxide) 생성 조절제(regulator), 항염증성 약품, 항산화제, 암 또는 고령종양의 성장의 저해제 또는 약물대사(drug metabolism) 조절제로서 사용될 수 있다. 디아릴알칸은 또한 치주 질환의 예방 및 치료, 구강 전암성(oral pre-cancerous) 질환, 구강암 및 다른 구강 악성 종양, 민감성 잇몸 및 치아, 후유증(sequelae), 치수염(pulpitis), 과민증(irritation), 의치(oral denture)의 물리적 이식(implantation)에 의해 야기된 통증 및 염증, 외상(trauma), 상해(injuries), 수면 중 이갈이(bruxism) 및 다른 구강, 잇몸상 또는 혀상의 사소한 상처, 치태(dental plaque) 및 치석(calculus), 치아 석회질 제거(tooth decalcification), 단백질 분해(proteolysis) 및 카리에스(caries)(부식; decay)에 사용될 수 있다.

[0025]

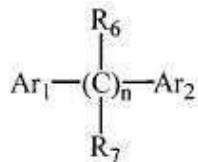
본 발명은 멜라닌의 과생성 또는 불규칙한 분포와 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함하며, 상기 방법은 치료학적 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 내부적 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 멜라닌의 과생성 또는 불규칙한 분포와 관련된 질병 및 질환은 선랜(suntan), 노화, 간질환에 따른 과색소 침착 반점(hyper pigmentation spots), 열에 의한 화상 및 국소적 상처, 진균성, 미생물성 및 바이러스성 감염, 백반증(vitiligo), 악성종양, 흑색종, 다른 포유류 피부 질환과 같은 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 상기 방법은 또한 UV 방사 노출, 화학물, 열, 자연의 바람 및 건조한 환경으로부터 야기되는 피부 다크닝 및 손상을 예방 및 치료하기 위해 사용될 수 있다. 결국, 상기 방법은 주름, 쳐진 피부, 눈 주변의 라인 및 다크서클, 보습 민감성(soothing sensitive) 피부의 예방 및 치료, 피부 상태와 관련된 피부염 및 다른 알레르기의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 게다가, 상기 기술된 피부의 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 그들의 용도로 여기에 기술된 치료학적 조성물을 개선된 피부색, 강화된 탄력성, 노화의 감소 및 지연, 강화된 젊은 외관 및 감촉(texture) 및 증가된 유연성, 단단함(firmness), 매끄러움(smoothness) 및 유순성(suppleness)과 함께 부드럽고 젊어진 피부 외관에 이로움을 나타내는 유효한 조성물을 제공한다.

[0027] 금속이온과 퀼레이트 화합물을 형성하는 것에 의해 디아릴알칸은 또한 수용자의 혈류안으로 필수 금속이온을 운반 및/또는 피부 또는 다른 막과 같은 혈액 뇌관문(blood brain barrier)을 통한 금속이온의 운반에 사용될 수 있다. 이러한 실시예에서, 상기 방법은 운반된 금속이온과 함께 치료학적 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함한다. 디아릴알칸의 이러한 능력은 빈혈(anemia) 및 다른 철 결핍, 염증; 비만 및 당뇨병, 치주 질환, 구강 전암성(oral pre-cancerous) 질환, 구강암 및 다른 구강 악성종양, 민감성 잇몸 및 치아, 후유증(sequelae), 치수염(pulpitis), 과민증(irritation), 의치(oral denture)의 물리적 이식(implantation)에 의해 야기된 통증 및 염증, 외상(trauma), 상해(injuries), 수면 중 이갈이(bruxism) 및 다른 구강, 잇몸상 또는 혀상의 사소한 상처, 치태(dental plaque) 및 치석(calculus), 치아 석회질 제거(tooth decalcification), 단백질 분해(proteolysis) 및 카리에스(caries)(부식; decay), 바이러스성 감염에 의한 불면증, 억제된 면역 기능, 골다공증, 무월경(amenorrhea), 월경 불순(dysmenorrheal), 간질(epilepsy), 고혈압, 콜레스테롤 혈증, 관상동맥 질환 및 뇌 혈관경련(cerebral vasospasms), 설사, 파킨슨 병, 알츠하이머 병, 암, 류마티스성 관절염, 남성 불육증(male infertility) 및 시력감퇴(mucular degeneration)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 질병 및 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 상기 금속이온은 구리, 크롬, 철, 아연, 봉소, 리튬, 셀레늄, 칼슘, 망간, 마그네슘, 몰리브덴 및 다른 금속이온을 포함하는 군으로부터 선택되나 이에 제한되지는 않는다.

[0028] 또 다른 실시예에서, 디아릴알칸 및 디알킬 알카놀은 과일, 베섯 및 다른 음식물의 갈변 및 색상 변화를 예방하기 위한 식품 산업에 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 포함한 물질의 신규 조성물을 포함하고, 여기에서 상기 디아릴알칸은 하기 일반 구조로 나타낸 화합물 군으로부터 선택된다:



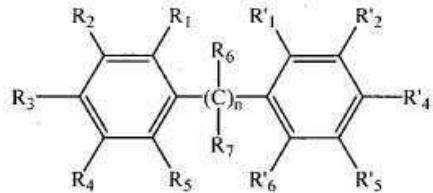
[0030]

[0031] 여기에서, Ar_1 및 Ar_2 는 각각 치환된 5- 또는 6-원자 방향족 또는 헤테로방향족 고리로 구성된 군으로부터 선택되고, 여기에서 Ar_1 및 Ar_2 가 모두 6-원자 방향족 고리 즉, 적어도 하나의 Ar_1 및 Ar_2 가 1-5 R' 기($R'_1-R'_5$)로 치환된 폐닐알라닌일 때를 제외하고, 적어도 각 6-원자 방향족 또는 헤테로방향족 고리는 각각 1-5 R' 기($R'_1-R'_5$)으로 치환되며 각 5-원자 방향족 또는 헤테로방향족 고리는 1-4 R' 기($R'_1-R'_4$)으로 치환되고, 여기에서 적어도 2개의 상기 $R'_1-R'_5$ 는 H가 아니며, 여기에서 R' 는 각각 -H, -OH, -SH, -OR, -CN, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, X 및 단당류의 글리코시드 또는 2-6 단당류로 구성된 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기에서 상기 단당류는 각각 알도펜토오스, 메틸-알도펜토오스, 알도헥소오스, 케토헥소오스 및 그들의 화학적 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기에서 R은 1-20 사이의 탄소 원자를 가지는 알킬기이고, X는 Cl, Br, F, I로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐이다;

[0032] R_6 및 R_7 은 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -CN, -NHR, -NH₂ 및 -X로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기에서 R은 1-20 사이의 탄소 원자를 가지는 알킬기이며 여기에서 X는 Cl, Br, F, I로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐; 및 n=1 내지 10이다. 바람직한 실시예에서 n=2-4이다.

[0033]

하나의 실시예에서, 상기 디아릴알칸은 하기의 구조에 의해 나타난 화합물의 군으로부터 선택된다:



[0034]

[0035]

여기에서,

[0036]

R1, R2, R3, R4, R5, R'1, R'2, R'3, R'4 및 R'5는 독립적으로 -H, -OH, -SH, -OR, -CN, -SR, -NH2, -NHR, -NR2, X 및 단당류의 글리코사이드 또는 2-6 단당류로 구성된 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기에서 상기 단당류는 독립적으로 알도펜토오스, 메틸-알도펜토오스, 알도헥소오스, 케토헥소오스 및 그들의 화학적 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기에서 R은 1-20 사이의 탄소원자를 가지는 알킬기 및 X는 Cl, Br, F, I로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐이고 여기에서 적어도 2개의 R1-R5 또는 적어도 2개의 R'1-R'5는 H가 아니다;

[0037]

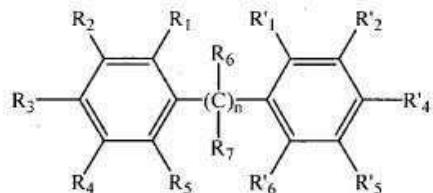
R6 및 R7은 독립적으로 -H, -OH, -OR, -CN, -NHR, -NH2 및 -X로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기에서 R은 1-20 사이의 탄소 원자를 가지는 알킬기이고 여기에서 X는 Cl, Br, F, I로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐; 및 n=1 내지 10이다. 바람직한 실시예에서 n=2-4이다.

[0038]

하나의 실시예에서, 본 발명의 디아릴알칸은 국화과(Compositae), 다콩과(Fabaceae), 녹나무과(Lauraceae), 콩과(Leguminosae), 백합과(Liliaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 뽕나무과(Moraceae) 및 육두과(Myristicaceae) 패밀리를 포함한 식물의 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 식물로부터 분리되나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 디아릴알칸은 또한 아카시아(Acacia), 꾸지나무(Broussonetia), 다이아넬라(Dianella), 헬리크러섬(Heilichrysum), 이리안테라(Iryanthera), 네마(Knema), 린테라(Lindera), 페로카르파스(Pterocarpus), 비스콤(Viscum) 및 크산토케르시스(Xanthocercis)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 고등식물 속으로부터 추출되고, 농축되고 정제될 수 있다. 상기 디아릴알칸은 줄기, 줄기 수피(stem barks), 심재(heart woods), 자루(trunks), 자루 수피(trunk barks), 작은 가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리, 뿌리 수피(root barks), 새싹(young shoots), 씨앗(seeds), 근경(rhizomes), 꽃 및 다른 번식 기관, 잎 및 다른 대기 중의 부분을 포함하나 이에 제한되지는 않는 식물의 다른 부분에서 발견할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 디아릴알칸은 식물 또는 꾸지나무, 다이아넬라 및 이리안테라 속 식물로부터 분리된다.

[0039]

또 다른 실시예에서, 본 발명의 디아릴알칸은 합성법에 의하여 얻어진다. 본 발명에는 하기 일반 구조를 가지는 화합물을 감소시키는 것을 포함하는 디아릴알칸 및 디아릴알카놀을 합성하는 방법이 포함된다:



[0040]

[0041]

여기에서,

[0042]

R1-R5 및 R'1-R'5 및 n은 상기에 정의되었으며, 여기에서 R6 및 R7은 함께 하나 또는 그 이상의 카보닐기를 형성한다. 환원제는 촉매, NaH 및 LiAlH4의 존재 하에 H2, 보로하이드라이드(borohydrides)를 포함하는 케톤을 알콜로 환원하는 어떠한 알려진 환원제로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 하나의 실시예에서 환원제는 NaBH4이다.

[0043]

또 다른 실시예에서, 디아릴알칸은 식물원으로부터 분리된 천연으로 존재하는 화합물의 합성 변형에 의해 얻어진다. 예를 들어, 천연으로 존재하는 화합물 부테인(butein)은 식물원으로부터 분리되며, 디아릴알카놀에 대응하는 수율을 위해 건조되고 환원된다.

[0044] 또 다른 실시예에서, 디아릴알칸은 2개의 적절하게 치환된 방향족 화합물의 반응에 의해 얻어진다. 2개의 치환된 방향족 화합물로부터 이러한 화합물을 합성하기 위해 알맞은 화학 반응은 치환된 벤즈알데히드 및 치환된 아세토페논 사이의 알돌 축합(Aldol condensation); 알데히드 및 케톤 사이의 크라이젠-슈미트 반응(Claisen-Schmidt reaction) 또는 교차 알돌 축합(crossed aldol condensation); 분자상의 카보닐기에 대한 첨가 반응을 통해 2차 치환된 방향족 고리와 결합하기 위하여 1차 치환된 방향족 고리의 오가노마그네슘 할라이드를 이용하는 그리냑 반응(Grignard reaction); 환원 반응에 따라 페놀의 오르토 위치에서 2차 방향족 고리와 결합하기 위하여 이성화될 수 있는 적절한 치환기로 에스테르화된 페놀의 분자 내의 이성화반응에 의한 크라이Zen 재배열 반응(Claisen rearrangement); 및 2개의 치환된 방향족 고리가 아릴보로닉산(arylboronic acids)으로 전환된 후 신중하게 선택된 팔라듐 촉매를 이용하여 알킬 할라이드와 연결되는 스즈키 결합 반응(Suzuki coupling reaction)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 반응은 당업자에게 잘 알려져 있으며 이러한 반응의 조건은 이 화합물의 합성을 위해 여기에 기술된 정보를 사용하여 결정될 수 있다.

[0045] 본 발명은 활성 식물 추출물 및 이핵성 효소를 특별히 저해하는 그 추출물 안의 개개의 화합물을 확인하기 위한 화학 중복방지 공정에 대한 저해 검정법이 조합된 방법을 제공한다. 이러한 접근법은 약품의 유효성을 최대화하고 구조를 최적화시키기 위해 천연 물질의 분리, 유기 합성, 분자 모델링 및 효소적 저해 검정법의 조합을 포함한다. 이 방법은 전체가 참고 문헌으로서 여기에 인용된 2002년 6월 27일에 출원된 미국 출원 10/185,758("Method for Generating, Screening and Dereplicating Natural Product Libraries for the Discovery of Therapeutic Agents,")에 기술되어 있다. 이 방법의 효능은 하기의 실시예에서 기술된 티로시나아제 저해 검정을 이용하여 증명된다. 본 발명의 방법에 따라 측정된 디아릴알칸의 순도는 화합물을 얻기 위해 사용된 방법론에 의하면 0.01% 내지 100%이다.

[0046] 바람직한 실시예에서, 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여된 디아릴알칸의 양은 최종 조제물의 총 중량에 기초한 0.001% 내지 100%의 범위 및/또는 수용자의 체중에 기초한 킬로그램 당 0.01mg 내지 200mg로부터 일반적으로 선택된 유효하며 무독성을 나타내는 양이다. 당업자는 정형적인 임상 실험을 이용하여 개개의 병을 치료하기 위한 최적의 양을 결정할 수 있다. 본 발명은 이상적인 생리적 활성을 가지는 물질의 조성물을 산출하기 위한 디아릴알칸의 합성 및/또는 분리, 정제 및 조제를 위하여 상업적으로 이용 가능한 옵션을 제공한다. 본 발명의 조성물은 당업자에게 알려진 어떠한 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여의 방식은 장(경구) 투여, 비경구적(정맥내, 피하 및 근육내) 투여 및 국소 투여를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 따른 치료의 방법은 단일 식물 또는 다중 식물로부터 합성 및/또는 분리된 디아릴알칸의 순수 또는 혼합물의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 환자에게 내부적 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 실시예에서 상기 조성물은 국소적으로 투여된다.

[0047] 이전의 일반적인 설명 및 하기의 기재된 설명은 모두 단지 실례로서 해석되고, 본 발명에 의해 제한받지 않는다.

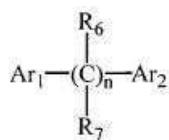
실 시 예

[0062] 본 발명은 일반적으로 이핵성 효소에 의해 매개된 질병 및 질환의 예방 및 치료에 관련된 것이다. 특히, 본 발명은 이핵성 활성 부위를 가지는 효소의 활성을 저해하는 방법을 포함한다. 본 발명에 포함된 신규 조성물은 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸으로 구성되어 있다. 본 발명의 디아릴알칸은 하나 또는 그 이상의 식물원으로부터 분리될 수 있거나 유기 합성에 의해 얻어질 수 있다. 본 발명은 천연원으로부터 이 화합물을 분리하기 위한 방법 및 이 화합물을 합성하기 위한 방법을 추가로 포함한다. 하나의 실시예에서, 디아릴알칸은 식물원으로부터 분리된 천연으로 존재하는 화합물의 합성 변형에 의해 얻어졌다.

[0063] 다양한 용어들이 본 발명의 이해를 위해 여기에 사용된다. 본 발명의 구성요소의 기술을 명확하게 하기 위해, 하기의 정의가 제공된다. 만약 다른 정의를 가지지 않는다면 여기에서 사용된 모든 기술 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 일반적으로 이해될 수 있는 의미를 가진다.

[0064] 여기에서 사용된 용어 "하나(a 또는 an)"은 하나 또는 그 이상의 실재물을 말함을 주목해야 한다; 예를 들어, 디아릴알칸(a diarylalkane)은 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 말한다. 용어 "하나(a 또는 an)", "하나 또는 그 이상(one or more)" 및 "적어도 하나(at least one)"은 여기에서 서로 바꾸어 사용될 수 있다.

[0065] 여기에서 사용된 "디아릴알칸"은 하기의 일반 구조를 갖는 방향족 화합물의 특정 분류이다: 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸으로 구성된 물질의 신규 조성물을 포함하며, 여기에서 상기 디아릴알칸은 하기 일반 구조로 나타낸 화합물의 군으로부터 선택된다:



[0066]

여기에서

[0068]

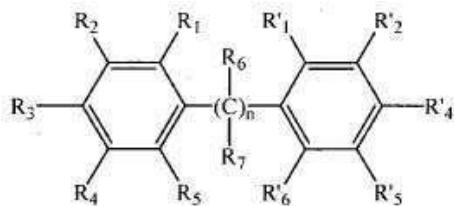
Ar_1 및 Ar_2 는 독립적으로 시화된 5- 또는 6-원자 방향족 또는 혼테로방향족 고리로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기에서 Ar_1 및 Ar_2 가 모두 6-원자 방향족 고리, 즉 적어도 하나의 Ar_1 및 Ar_2 가 1-5 R' 기($\text{R}'_1\text{-}\text{R}'_5$)으로 치환된 페닐 기일 때를 제외하고 각각의 6-원자 방향족 또는 혼테로방향족 고리는 독립적으로 1-5 R' 기($\text{R}'_1\text{-}\text{R}'_5$)으로 치환되고 각각의 5-원자 방향족 또는 혼테로방향족 고리는 1-4 R' 기($\text{R}'_1\text{-}\text{R}'_4$)으로 치환되며, 여기에서 적어도 2개의 상기 $\text{R}'_1\text{-}\text{R}'_5$ 는 H가 아니다; 여기에서

[0069]

R' 는 독립적으로 $-H$, $-OH$, $-SH$, $-OR$, $-CN$, $-SR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$ 및 $-X$ 및 단당류의 글리코시드 또는 2-6 단당류로 구성된 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기에서 상기 단당류는 독립적으로 알도펜토오스, 메틸-알도펜토오스, 알도헥소오스, 케토헥소오스 및 그들의 화학적 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기에서 R 은 1-20 사이의 탄소 원자를 가지는 알킬기이고 X 는 $C1$, Br , F , I 로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐; 및 $n=1$ 내지 $n=10$ 이다. 바람직한 실시예에서, $n=2-4$ 이다.

[0070]

하나의 실시예에서, 상기 디아릴알칸 및 디아릴알카놀은 하기의 일반 구조로 나타낸 화합물의 군으로부터 선택된다:



[0071]

여기에서.

[0073]

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R'_1 , R'_2 , R'_3 , R'_4 및 R'_5 는 독립적으로 $-H$, $-OH$, $-SH$, $-OR$, $-CN$, $-SR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, X 및 단당류의 글리코시드 또는 2-6 단당류로 구성된 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기에서 상기 단당류는 독립적으로 알도펜토오스, 메틸-알도펜토오스, 알도헥소오스, 케토헥소오스 및 그들의 화학적 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기에서 R 은 1-20 사이의 탄소 원자를 가지는 알킬기이고 X 는 Cl , Br , F , I 로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐이고 여기에서 적어도 2개의 R_1-R_5 또는 적어도 2개의 $R'_1-R'_5$ 는 H 가 아니다;

[0074]

R_6 및 R_7 은 독립적으로 -H, -OH, -OR, -CN, -NHR, -NR₂ 및 -X로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기에서 R 은 1-20 사이의 탄소 원자를 가지는 알킬기이며 여기에서 X는 Cl, Br, F 및 I로 이루어진 군으로부터 선택된 할로겐; 및 n=1 내지 10이다. 바람직한 실시예에서 n=2-4이다.

[0075]

여기에서 사용된 "디아릴알카놀(diarylalkanols)"은 두개의 방향족 고리 사이의 알킬 카본에 붙은 적어도 하나의 하이드록실 기(R_6 및/또는 $R_7=OH$)을 갖는 특정 타입의 "디아릴알칸(diarylalkanes)"이다.

[0076]

여기에서 사용된 "이핵성 효소(binuclear enzyme)"는 이핵성 활성 부위를 갖는 효소, 예를 들어 상기에 기술된 것과 같은 활성 부위에 두개의 구리 이온을 가지는 티로시나아제를 말한다. 이핵성 효소는 티로시나아제, 아르기나아제, 우레아제, 사이토크롬 C 옥시다아제, 프로톤 펌핑 헴-구리 옥시다아제, 2기능성의 카본 모노사이드 디하이드로게나아제/아세틸 코엔자임 A 신타아제, 리보뉴클레오티드 리덕티아제, 메탈로-베타-락타마아제, H(+)-ATP아제 및 다른 옥시다아제, 및 세균성 포스포트리에스터라아제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077]

여기에서 사용된 "치료상의(therapeutic)"는 예방(prevention), 치료 및/또는 예방(prophylaxis)을 포함한다.

[0078]

"약제학적 또는 치료학적 유효량(dose or amount)"은 바람직한 생물학적 결과를 유도하는데 충분한 수준의 투약

을 말한다. 그 결과는 정후, 증상 또는 질병의 요인 또는 다른 바람직한 생물학적 시스템 변화의 완화일 수 있다. 정확한 투약은 노화 및 질병, 원인, 질병의 사이즈 및 치료의 영향을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0079] "위약(placebo)"은 비활성 물질로 정후, 증상 또는 질병의 요인이 완화될 수 있는 바람직한 생물학적 효과를 유도하기에 충분한 약제학적 또는 치료학적 유효량의 대용품을 말한다.

[0080] "수용자(host)" 또는 "환자(patient)" 또는 "피험자(subject)"는 바람직한 치료를 위한 살아있는 포유류, 인간 또는 동물이다. 상기 "수용자", "환자" 또는 "피험자"는 일반적으로 본 발명의 방법에 따라 실행되는 치료의 수신자를 말한다. 여기에 기술된 본 발명은 인간 뿐만 아니라 수의학의 적용에도 사용가능하며, 상기 용어 "수용자"는 방법의 제한으로 해석되지 않아야 할 것이다. 수의학의 적용의 경우에, 투약 범위는 동물의 체중을 감안하여 하기의 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0081] 여기에 사용된 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 활성 물질의 생물학적 활성 효과를 방해하지 않으며 투약시 수용자에게 독성을 나타내지 않는 어떠한 담체를 말한다. "약제학적으로 허용가능한 담체"의 예로는 생리 식염수, 즉 링거액, 완충 생리 식염수, 물, 텍스트로오스 용액, 혈청 알부민 및 다른 정제 및 캡슐 조제를 위한 부형제 및 방부제와 같은 어떠한 표준의 약제학적 담체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0082] 본 발명은 이핵성 효소로 언급된 이핵성 활성 부위를 가지는 효소의 활성을 저해하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 디아릴알칸은 하나 또는 그 이상의 식물로부터 합성 및/또는 분리된다. 본 발명의 범위에 포함되는 이핵성 효소의 예로는 티로시나아제, 아르기나아제, 우레아제, 사이토크롬 C 옥시다아제, 프로톤 펌핑 헴-구리 옥시다아제, 2기능성의 카본 모노사이드 디하이드로게나아제/아세틸 코엔자임 A 신타아제, 리보뉴클레오티드 리덕타아제, 메탈로-베타-락타마아제, H(+)-ATP아제 및 다른 옥시다아제, 및 세균성 포스포트리에스터라아제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 실시예에서, 이핵성 효소는 티로시나아제이다.

[0083] 본 발명은 또한 이핵성 효소 활성에 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법을 포함한다. 본 발명에 따른 예방 및 치료의 방법은 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 내부적 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 디아릴알칸은 저해되는 이핵성 효소에 따라 항균성, 항진균성, 항말라리아성 또는 항바이러스성 약제, 남성 또는 여성의 성홍분 장애(sexual arousal) 조절 수단으로서 산화질소(nitric oxide) 생성 조절제(regulator), 항염증성 약품, 항산화제, 약물대사(drug metabolism) 조절제, 치주 질환의 예방 및 치료, 구강 전암성(oral pre-cancerous) 질환, 구강암 및 다른 구강 악성종양, 민감성 잇몸 및 치아, 후유증(sequence), 치수염(pulpitis), 과민증(irritation), 의치(oral denture)의 물리적 이식(implantation)에 의해 야기된 통증 및 염증, 외상(trauma), 상해(injuries), 수면 중 이갈이(bruxism) 및 다른 구강, 잇몸상 또는 혀상의 사소한 상처, 치태(dental plaque) 및 치석(calculus), 치아 석회질 제거(tooth decalcification), 단백질 분해(proteolysis) 및 카리에스(caries)(부식; decay)에 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명은 멜라닌의 과생성 또는 불규칙한 분포와 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법을 더 포함하며, 상기 방법은 치료학적 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 내부적 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 멜라닌의 과생성 또는 불규칙한 분포와 관련된 질병 및 질환은 선판(suntan), 피부 노화, 간질환에 따른 과색소 침착 반점(hyper pigmentation spots), 열에 의한 화상 및 국소적 상처, 진균성, 미생물성 및 바이러스성 감염, 백반증(vitiligo), 악성종양, 흑색종, 다른 포유류 피부 질환에 의해 야기된 염증 상태에 따른 피부 색소침착과 같은 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0085] 상기 방법은 또한 자외선, 화학물, 열, 바람 및 건조한 환경에 노출되어 생기는 피부 다크닝 및 손상의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 결국, 상기 방법은 주름, 쳐진 피부, 눈 주변의 라인 및 다크서클, 보습 민감성(soothing sensitive) 피부의 예방 및 치료, 피부 상태와 관련된 피부염 및 다른 알레르기의 예방 및 치료에 사용될 수 있다. 게다가, 상기 기술된 피부의 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 그들의 용도로 여기에 기술된 치료학적 조성물은 개선된 피부색, 강화된 탄력성, 노화의 감소 및 지연, 강화된 젊은 외관 및 감촉(texture) 및 증가된 유연성, 단단함(firmness), 매끄러움(smoothness) 및 유순성(suppleness)과 함께 부드럽고 젊어진 피부 외관에 이로움을 나타내는 유효한 조성물을 제공한다.

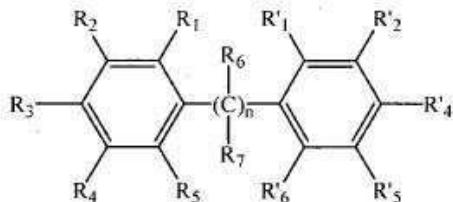
[0086] 금속이온과 칼레이트 화합물을 형성하는 것에 의해 디아릴알칸은 또한 수용자의 혈류안으로 필수 금속이온을 운반 및/또는 피부 또는 다른 막과 같은 혈액 뇌관문(blood brain barrier)을 통한 금속이온의 운반에 사용될 수 있다. 이러한 실시예에서, 상기 방법은 운반된 금속이온과 함께 치료학적 유효량의 하나 또는 그 이상의 디아

릴알칸을 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것을 포함한다. 디아릴알칸의 이러한 능력은 빈혈 및 다른 철 결핍, 염증; 비만 및 당뇨병, 치주 질환, 구강 전암성 질환, 구강암 및 다른 구강 악성종양, 민감성 잇몸 및 치아, 후유증, 치수염, 과민증, 의치의 물리적 이식에 의해 야기된 통증 및 염증, 외상, 상해, 수면 중 이갈이 및 다른 구강, 잇몸상 또는 혀상의 사소한 상처, 치태 및 치석, 치아 석회질 제거, 단백질 분해 및 카리에스(부식) 및 바이러스성 감염을 포함하나 이에 제한되지는 않는 질병 및 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 상기 금속이온은 구리, 철, 아연, 셀레늄, 마그네슘 및 다른 금속이온을 포함하는 군으로부터 선택되나 이에 제한되지는 않는다.

[0087] 또 다른 실시예에서, 디아릴알칸은 과일, 베섯 및 다른 음식물의 갈변 및 색상 변화를 예방하기 위한 식품 산업에 사용될 수 있다.

[0088] 하기에 따라 사용될 수 있는 디아릴알칸은 상기에 설명한 일반 구조에 의해 나타낸 화합물을 포함한다. 본 발명의 디아릴알칸은 합성 방법에 의하여 얻어질 수 있거나, 국화과(Compositae), 다콩과(Fabaceae), 녹나무과(Lauraceae), 콩과(Leguminosae), 백합과(Liliaceae), 겨우살이과(Loranthaceae), 뽕나무과(Moraceae) 및 육두과(Myristicaceae)를 포함한 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 식물 군으로부터 분리될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 디아릴알칸은 아카시아(*Acacia*), 꾸지나무(*Broussonetia*), 다이아넬라(*Dianella*), 헬리크리스ム(*Helichrysum*), 이리안테라(*Iryanthera*), 네마(*Knema*), 린데라(*Lindera*), 페로카르파스(*Pterocarpus*), 비스쿰(*Viscum*) 및 크산토케르시스(*Xanthocercis*)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 고등식물 속으로부터 추출되고, 농축되고 정제될 수 있다. 상기 디아릴알칸은 줄기, 줄기 수피(stem barks), 심재(heart woods), 자루(trunks), 자루 수피(trunk barks), 작은 가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리, 뿌리 수피(root barks), 새싹(young shoots), 씨앗(seeds), 근경(rhizomes), 꽃 및 다른 번식 기관, 잎 및 다른 대기 중의 부분을 포함하나 이에 제한되지는 않는 식물의 다른 부분에서 발견할 수 있다. 하나의 실시예에서, 상기 디아릴알칸은 식물 또는 꾸지나무, 다이아넬라 및 이리안테라 속 식물로부터 분리된다.

[0089] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 디아릴알칸은 합성법에 의하여 얻어진다. 본 발명에 포함된 디아릴알칸 및 디아릴알카놀을 합성하는 방법은 하기 일반 구조를 가지는 화합물을 감소시키는 것을 포함한다:



[0090]

[0091] 여기에서,

[0092] R_1-R_5 및 $R'_1-R'_5$ 및 n 은 상기에 정의되었으며, 여기에서 R_6 및 R_7 은 함께 하나 또는 그 이상의 카보닐기를 형성한다. 환원제는 촉매, NaH 및 $LiAlH_4$ 의 존재 하에 H_2 , 보로하이드라이드(borohydrides)를 포함하는 케톤을 알콜로 환원하는 어떠한 알려진 환원제로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 하나의 실시예에서 환원제는 $NaBH_4$ 이다.

[0093] 또 다른 실시예에서, 디아릴알칸은 식물원으로부터 분리된 천연으로 존재하는 화합물의 합성 변형에 의해 얻어진다. 예를 들어, 천연으로 존재하는 화합물 부테인(butein)은 식물원으로부터 분리되며, 디아릴알카놀에 대응하는 수율을 위해 건조되고 환원된다.

[0094] 또 다른 실시예에서, 디아릴알칸은 2개의 적절하게 치환된 방향족 화합물의 반응에 의해 얻어진다. 2개의 치환된 방향족 화합물로부터 이러한 화합물을 합성하기 위해 알맞은 화학 반응은 치환된 벤즈알데히드 및 치환된 아세토페논 사이의 알돌 축합(Aldol condensation); 알데히드 및 케톤 사이의 크라이젠-슈미트 반응(Claisen-Schmidt reaction) 또는 교차 알돌 축합(crossed aldol condensation); 문자상의 카보닐기에 대한 첨가 반응을 통해 2차 치환된 방향족 고리와 결합하기 위하여 1차 치환된 방향족 고리의 오가노마그네슘 할라이드를 이용하는 그리냑 반응(Grignard reaction); 환원 반응에 따라 페놀의 오르토 위치에서 2차 방향족 고리와 결합하기 위하여 이성화될 수 있는 적절한 치환기로 에스테르화된 페놀의 문자 내의 이성화반응에 의한 크라이Zen 재배열 반응(Claisen rearrangement); 및 2개의 치환된 방향족 고리가 아릴보로닉산(arylboronic acids)으로 전환된 후 신중하게 선택된 팔라듐 촉매를 이용하여 알킬 할라이드와 연결되는 스즈키 결합 반응(Suzuki coupling

reaction)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 반응은 당업자에게 잘 알려져 있으며 이러한 반응의 조건은 이 화합물의 합성을 위해 여기에 기술된 정보를 사용하여 결정될 수 있다.

[0095] 본 발명을 통하여 다양한 인용들이 제공된다. 각각의 이러한 인용들은 그 전체가 참고자료로서 본원에서 인용된다.

[0096] 본 발명은 활성 식물 추출물 및 이핵성 효소 티로시나아제를 특별히 저해하는 그 추출물 안의 개개의 화합물을 확인하기 위한 화학 중복방지 공정에 대한 티로시나아제 저해 검정법이 조합된 방법을 제공한다. 상기 언급된 것과 같이, 티로시나아제를 저해하는 효소는 멜라닌의 생성의 감소를 유도할 수 있기 때문에 피부 미백에 효과적이다. 식물 추출물의 라이브러리는 실시예1에 기술된 것과 같이 유기 용매로 건조 식물 분말을 추출함으로써 생성된다. 티로시나아제 저해 검정법은 실시예 2에 기술된 것과 같이 존스 등(Jones et al. (2002) *Pigment. Cell Res.* 15:335)에 의해 보고된 방법에 따라 개발되었다. 이 검정법을 사용하여, 총 1144개의 식물 추출물이며 쉬룸 티로시나아제(mushroom tyrosinase)의 활성을 저해하는 저해하기 위하여 선별되었다. 이러한 1차 선별에서 강력한 티로시나아제 저해 활성을 가지는 20개의 식물 추출물(1.75% 적중율)이 확인되었다. 표1에 4개의 상이한 속으로부터 분리된 4개의 추출물의 티로시나아제 저해 퍼센트를 서술하였다.

[0097] 활성 식물 추출물로부터 활성 화합물을 효과적으로 확인하기 위하여, 실시예3에 기술된 것과 같은 초고속 분류법(high throughput fractionation)이 사용되었다. 간단히 말하면, 활성 추출물을 초고속 정제 시스템(high throughput purification system; HTP system)을 사용하여 분류되었다. 각각의 단편은 그 후 실시예2에 기술된 1차 검정에 따라서 티로시나아제 활성을 저해하기 위한 그들의 능력이 테스트되었다. PDA와 HPLC의 조합 및 구조 데이터베이스 검색과 결합된 MS 검출기를 사용하고 폴리페놀 및 크로뮴과 같은 공지의 티로시나아제 저해제를 포함한 단편을 제거하여 중복분리방지(dereplication)한 후, 총 7개의 활성 추출물이 실례로서 닥나무(*Broussonetia kazinoki* Sieb. Et Zucc, 뽕나무과) 및 다이아넬라 엔시폴리아(*Dianella ensifolia* (L.) DC., 백합과) 추출물을 사용한 실시예 4-6에 기술된 생물학적 검정 유도하의 대규모 분리 및 정제에 의해 선택되었다.

[0098] 실시예 4는 신규 디아릴프로판 : 실시예 1-3에 기술된 일반 방법을 사용한 닥나무(뽕나무과)(전체 식물)로부터 1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판(UP288)(1)의 추출, 분리 및 정제를 서술한다. 도4는 UP288을 포함한 HTP 단편의 HPLC/UV 크로마토그램을 나타낸다. 활성 화합물 UP288의 구조는 실시예4에 기술된 분광기를 이용한 방법의 조합을 사용하여 밝혀졌다. 도5는 UP288의 화학 구조 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 도시한다. 도6은 티로시나아제 저해 용량 반응 곡선 및 코직산과 관련된 UP288의 IC₅₀ 값을 나타낸다. 상기 도면은 UP288(1)이 IC₅₀=24 μM을 갖는 코직산에 대한 강력한 티로시나아제 저해제임을 나타낸다.

[0099] 놀랍게도, 두개의 유사한 디아릴알칸이 실시예5에 기술된 전혀 다른 과의 식물 - 다이아넬라 엔시폴리아(백합과)로부터 분리되고 확인되었다. 도7은 다이아넬라 엔시폴리아(P0389)(전체 식물)로부터 이러한 두개의 활성 화합물(UP302a(2) 및 UP302b(3))의 생물학적 검정 유도하의 분리를 도표로 도시하였다. 도7을 참고하면, 총 264개의 수집된 샘플로부터 단지 15개의 칼럼 단편만이 티로시나아제의 강력한 저해를 나타낸다고 볼 수 있다. 활성 단편과 결합된 HPLC 분석(도8)은 활성 화합물이 이미 매우 풍부한 베스트 풀(best pool)에서 사소한 성분임을 보여준다. 고된 분리 및 정제의 노력으로 실시예 5에 나타낸 NMR 및 다른 분광기를 이용한 방법으로 전체적인 특성이 밝혀지고, 도9에 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a, IC₅₀= 0.24 μM)(2) 및 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302b, IC₅₀=1.2 μM)(3)으로 나타낸 두개의 신규한 활성 화합물이 산출되었다.

[0100] 실시예 6은 다이아넬라 엔시폴리아(DE)(전체 식물)로부터 분리된 가장 강력한 티로시나아제 저해제인 UP302a(2)의 대규모 분리를 서술하고 있다 실시예 6을 참고하면, 4.3kg의 건조 바이오매스로부터 총 30mg의 순수한 UP302a(2)가 실리카겔, CG-161 및 C-18 레진상의 다중 칼럼 분류 후에 수득된다. 분리된 화합물의 구조 및 생물학적 기능이 확인되었다.

[0101] 디아릴알칸/디아릴알카놀의 낮은 천연 존재비(natural abundance) 때문에, 이러한 분류 화합물의 상업적 원천을 대신할 생물학적 활성 화합물을 합성하기 위한 방법이 발달되어왔다. 실시예 7은 치환된 칼콘(chalcones)의 감소를 통한 디아릴알칸을 합성하기 위한 일반적 방법을 서술하고 있다. 실례로서 수소화붕소나트륨(sodium borohydride)을 사용한 2,4-디하이드록시페닐-3',4'-디메톡시페닐칼콘(4)의 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올(5)로의 환원이 기술되어 있다. 그러나, 실시예 7의 기술에 의하면 많은 수의

다른 디아릴알칸이 이 일반적인 방법을 사용하여 합성되어질 수 있다. 합성된 모든 화합물이 비교적 높은 티로시나아제 저해 활성을 보였다. 실시예 7에 기술된 일반 방법에 대해서, 어떠한 다른 공지의 환원제가 NaH 및 LiAlH₄의 촉매 존재하에 다른 보로하이드라이드, H₂를 포함하는 이 환원에 영향을 주기 위해 사용될 수 있다.

[0102] 실시예 7에 기술된 일반 반응을 사용하여, 몇몇의 다른 치환된 디아릴프로파논은 실시예 8,9 및 10에서 설명된 디아릴프로판 및/또는 디아릴프로판올로 전환된다. 실시예 11은 시작 물질로서 천연원으로부터 분리된 플라보노이드 글리코시드를 사용한 디아릴프로판올의 합성을 설명한다.

[0103] 다른 실시예에서, 본 발명은 적절하게 치환된 방향족 화합물의 반응에 의하여 이러한 종류의 화합물을 합성하기 위한 방법을 포함한다. 이 실시예는 실제로 3-메톡시-4-하이드록시신나산과 레조르시놀(resorcinol)의 반응을 사용한 실시예 12에 나타내었다. 2개의 치환된 방향족 화합물로부터 이러한 화합물을 합성하기 위해 알맞은 화학 반응은 치환된 벤즈알데히드 및 치환된 아세토페논 사이의 알돌 축합; 알데히드 및 케톤 사이의 크라이젠-슈미트 반응 또는 교차 알돌 축합; 분자상의 카보닐기에 대한 첨가 반응을 통해 2차 치환된 방향족 고리와 결합하여 위하여 1차 치환된 방향족 고리의 오가노마그네슘 할라이드를 이용하는 그리냐르 반응; 환원 반응에 따라 폐놀의 오르то 위치에서 2차 방향족 고리와 결합하기 위하여 이성화될 수 있는 적절한 치환기로 에스테르화된 폐놀의 분자 내의 이성화반응에 의한 크라이Zen 재배열 반응; 및 2개의 치환된 방향족 고리가 아릴보로닉산으로 전환된 후 신중하게 선택된 팔라듐 촉매를 이용하여 알킬 할라이드와 연결되는 스즈키 결합 반응을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 반응은 당업자에게 잘 알려져 있으며 이러한 반응의 조건은 이 화합물의 합성을 위해 여기에 기술된 정보를 사용하여 결정될 수 있다.

[0104] 실시예 13은 다수의 디아릴알칸의 IC₅₀ 값 및 본 발명의 방법에 따라 합성된 디아릴알카놀을 설명한다. 화합물은 실시예 2에 기술된 일반 방법을 사용하여 평가하였다. 각 샘플의 IC₅₀ 값은 반응이 특정 시간 및 농도에서 선형임을 확인하기 위하여 키네틱 소프트웨어(kinetics software)를 사용하여 측정하였다. 실시예 7-12에 기술된 방법을 사용하여 총 24개의 화합물이 합성되었고 티로시나아제를 저해하기 위한 그들의 능력이 측정되었다. 그 결과가 표2에 나타나있다. 표2를 참고하면, 합성 디아릴알카놀의 IC₅₀의 값은 자연적으로 존재하는 디아릴프로판과 유사하다. 따라서, 이 두 종류의 화합물은 거의 동일한 정도로 티로시나아제를 저해할 수 있다. 활성 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀의 대부분은 두 방향족 고리 사이에 3개의 탄소를 가진다. 실시예 17에 기재된 계산을 사용하여, 이 구조의 특징이 분자내 구조와 중첩되고 평행하게 생성하기 위해 중요함이 증명되었다. 그러나, 1-(2,4-디하이드록시페닐)-2-(4'-메톡시페닐)-1-에탄올(IC₅₀=77 μM) 및 1,4-비스-(3,4-디하이드록시페닐)-2,3-디메틸-부탄(IC₅₀=700 μM)과 같은 두개의 방향족 고리 사이에 두개 및 네개의 탄소를 포함한 디아릴알칸은 또한 티로시나아제 활성을 현저하게 저해할 수 있다.

[0105] UP302a(2)에 의한 티로시나아제의 저해는 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여 실시예 14에 설명한 기질로서 L-DOPA를 사용하여 측정하였다. 그 결과는 도 10에 설명하였다. 이 연구는 UP302a(2)가 장기간의 효과를 가지는 강력한 경쟁적 저해제임을 나타내었다. 흥미롭게도, 티로시나아제 활성은 UP302a와 배양한 몇일 후에는 회복되지 않았다. 대조적으로, 티로시나아제 활성은 단지 코직산과 배양한 1시간 후에 완전히 회복되었다. UP302a의 방향족 고리 상의 두개의 치환체인 메톡시기 때문에, 저해제는 쉽게 수산화 및/또는 산화될 수 없다. 이것은 UP302a 저해 활성의 유효성 및 지속성을 모두 설명할 수 있다. 따라서, 이러한 화합물은 장기간의 효과를 가질 수 있다고 결론지을 수 있을 것이다.

[0106] 청구 조성물의 효능은 또한 실시예 15에 기재된 B-16 세포주 상의 시험관내(*in vitro*) 실험에서 생성된 멜라닌의 저해를 측정함으로써 증명하였다. 그 결과는 도 11에 설명하였다. UP302a(2)에 의한 내인성 멜라닌의 환원은 코직산 보다 거의 6배 이상 크다. 게다가, UP302a에 의한 MSH 유도성 멜라닌 생성의 저해는 또한 코직산보다 현저하게 더 컸다. 예상했던 바대로, UP288(1)은 B-16 세포주 모델에서 코직산과 유사하였다.

[0107] 실시예 16은 코직산과 관련된 두개의 디아릴프로판 UP288(1) 및 UP302a(2)의 세포독성을 평가하기 위한 검정법을 설명하고 있다. 모든 세가지 실험된 화합물의 IC₅₀ 값 이상인 250 μM의 농도에서, 디아릴프로판은 코직산의 안전한 프로파일과 유사한 것으로 증명되었다.

[0108] 실시예 17은 활성 디아릴알칸 및 디아릴알카놀의 가장 안정한 3-D 구조를 결정하기 위하여 수행된 분자 모델링 분석을 설명하고 있다. 분자역학 계산(molecular mechanics calculations)은 Chem3D 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 이러한 계산은 가장 강력한 티로시나아제 저해제인 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a(2), IC₅₀=0.24 μM)이 도 12에 나타낸 두개의 방향족 고리가 서로 겹쳐지는 매우 독특

한 3차원 구조를 가짐을 나타낸다. 상기 구조의 최소화된 총 에너지는 -4.7034KJ/Mol 이며, 두개의 방향족 고리간의 거리는 3.28Å이다. 첫번째 방향족 고리상의 폐놀 수산기(phenolic hydroxyl group)는 각각 도14에 나타낸 것과 같이 두 산소 원자간의 거리가 2.99Å 및 3.16Å인 두번째 방향족 고리상의 두개의 메톡시기 바로 위에 있다. 이핵성 효소 티로시나아제의 활성 부위는 과산화물 산화 상태[Cu^{II}-O₂-Cu^{II}]에서 산소 분자와 복합체를 형성한 두개의 구리 이온을 가지며, 이것은 모노 폐놀(티로신과 같은)의 방향족 고리 오르토 위치에 수산기의 도입을 촉매하는 티로시나아제의 메카니즘에 중요하다(Decker *et al.* (2000) Angew. Chem. Int. Ed. 39:1591). 상호간 거리는 Cu-Cu가 3.56Å, Cu-O가 1.90Å 및 O-O가 1.41Å로 보고되어 있다(Kitajima *et al.* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:8975). 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a, IC₅₀=0.24 μM)의 평행 구조는 도 13 및 14에 나타낸 것과 같이 위와 아래 모두가 [Cu^{II}-O₂-Cu^{II}] 복합체의 구리 이온 모두와 완벽하게 칠레이트 화합물을 만들 것이다. 활성 부위에서 구리 이온 모두와 저해제에 의한 이러한 이중 칠레이트 화합물 형성(dual chelation)은 효소로서 L-DOPA와 같은 기질의 접근을 완전히 차단할 수 있으며, 따라서 단백질 기능을 효과적으로 저해할 수 있다. 동일한 방법을 사용하여, 표2에 기재된 분리되고 합성된 디아릴알칸 및 디아릴알카놀이 분석되었다. 이 분석 결과는 구부러지거나 비-평행 구조를 가지는 화합물이 티로시나아제의 활성을 저해하기 위한 능력이 없거나 단지 약한 능력을 가짐을 나타내었다.

[0109] 이러한 연구로부터 가장 효과적인 디아릴알칸 저해제가 하나의 방향족 고리 상에 두개 내지 세개의 치환체를 가지며 두번째 방향족 고리 상에 0 내지 다중의 치환체를 가짐을 확인하였다. 가장 양호한 구조는 적어도 하나의 방향족 고리가 2 및 4-위치에서 치환된 것이다. 바람직하게는, 상기 고리는 1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-3-(2',3',4',5'-테트라하이드로-벤조디옥소신-8-일)-1-프로판올(1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-(2',3',4',5'-tetrahydronaphthalene-1-ol)) (IC₅₀=72 μM) 및 3-(5'-클로로-1'-메틸-1'-하이드로-이미다졸-2'일)-1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-프로판올(IC₅₀=225 μM)로 분리된 두개의 화합물에 의해 결정된 6-원자 방향족 및/또는 해데로방향족이다.

[0110] 본 발명의 조성물은 당업자에게 알려진 어떠한 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여의 방식은 장(경구) 투여, 비경구적(정맥내, 피하 및 근육내) 투여 및 국소 투여를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 따른 치료의 방법은 디아릴알칸 또는 두개 또는 그 이상의 디아릴알칸을 포함하는 혼합물의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 환자에게 내부적 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함한다.

[0111] 본 발명의 조성물은 약제학적 및/또는 화장품용으로 허용가능한 부형제, 보조제 및/또는 담체와 같은 다른 성분을 포함하는 약제학적 조성물로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 치료되는 수용자가 내성을 가질 수 있는 부형제로 제조될 수 있다. 상기 부형제는 디아릴알칸 또는 디아릴알칸의 혼합물과 같은 치료 시약을 위한 희석제 또는 비히클로서 사용된 비활성 물질이다. 그러한 부형제의 예로 물, 완충액, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 만니톨, 햄크스용액, 방부제 및 다른 수용성의 생리학적으로 안정된 염용액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한 고정유, 참기름, 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드와 같은 비수용성 비히클이 사용될 수 있다. 다른 유용한 제형은 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은 접성 강화제를 포함하는 혼탁액을 포함한다. 부형제는 또한 등장(isotonicity) 및 화학적 안정성을 강화하는 물질과 같은 미량의 첨가제를 포함할 수 있다. 완충액은 예로 인산 완충용액, 중탄산염 완충용액, 트리스 완충용액, 히스티딘, 구연산염 및 클라이신 또는 그의 혼합물을 포함하며, 방부제는 예로 EDTA, 디소디움 EDTA, BHA, BHT, 비타민 C, 비타민 E, 산성아황산나트륨(sodium bisulfite), SnCl₂, 티메로살(thimerosal), m- 또는 o-크레졸, 포르말린 및 벤질알콜을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 표준 제형은 투여를 위해 혼탁액 또는 용액으로서 적합한 액체를 담을 수 있는 유동체 또는 고체 모두가 될 수 있다. 따라서, 비유동성 제형에서 부형제는 텍스트로스, 인간 혈청 알부민, 방부제 등을 포함할 수 있으며, 멸균된 물 또는 식염수가 투여 전에 첨가될 수 있다.

[0112] 본 발명의 하나의 실시예에서, 조성물은 또한 보조제 또는 담체를 포함할 수 있다. 보조제는 일반적으로 특정 생물체에 작용하는 시약에 대한 수용자의 생물학적 반응을 강화시키는 전형적인 물질이다. 적합한 보조제로는 프로인트 아주반트(Freund's adjuvant), 다른 박테리아성 세포벽 성분, 알루미늄, 마그네슘, 구리, 아연, 철, 칼슘 및 염을 기반으로 한 다른 금속 이온, 실리카, 폴리뉴클레오티드, 톡소이드, 혈청 단백질, 바이러스성 피막 단백질(viral coat proteins), 다른 박테리아로부터 유래된 조제품, 감마 인터페론; 헌터스 티터맥스 아주반트(Hunter's Titermax adjuvants, Vaxcel, TM., Inc. Norcross, Ga.), 리비 아쥬반트(Ribi adjuvants, Ribi ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, Mont.)와 같은 블록 공중합체 아쥬반트(block copolymer adjuvants); 및

Quil A(Superfos Biosector A/S, Denmark)과 같은 사포닌 및 그들의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 담체는 전형적으로 치료된 수용자 안에서 치료 조성물의 반감기를 증가시키는 물질이다. 적합한 담체로는 이량체 서방성(controlled release) 제형, 생물학적으로 분해가능한 식재물, 리포좀, 박테리아, 바이러스, 오일, 에스테르 및 글리콜을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0113] 하나의 실시예에서, 상기 조성물은 수용자 내에서 본 발명의 조성물이 천천히 방출되도록 서방성 제형으로 제조되었다. 여기에서 사용된 서방성 제형은 서방성 비히클에 본 발명의 제형을 포함한다. 적합한 서방성 비히클은 당업계에 공지된 것일 수 있다. 바람직한 서방성 제형은 생물학적으로 분해가능(즉, 생분해성(bioerodible))한 것이다.

[0114] 본 발명의 치료학적 약제는 바람직하게는 연고, 젤, 로션 또는 크림 베이스로서 또는 치약, 양치질 물약으로서 또는 치아 플로싱 물질(dental flossing materials)에 코팅된 상태 또는 에멀젼으로서, 반창고, 드레싱 또는 마스크, 들러붙지 않는 거즈, 붕대, 약솜 또는 클로스 와이프(cloth wipe)를 포함하지만 이제 제한되지 않는 치료학적 조성물을 국소적으로 투여하기 위하여 당업자에게 공지된 어떠한 적합한 수단에 의해 국소적으로 투여된다. 실시예 18은 조성의 총 중량에서 디아릴알칸의 순수 및/또는 혼합물의 0.01% 및 0.1%의 활성 물질을 가지는 두개의 크림 제형의 제조를 설명하고 있다. 이러한 국소 도포(topical application)은 국소 투여를 위해 공지된 어떠한 표준 수단을 사용하여 어떠한 환부에 국소적으로 투여될 수 있다. 치료학적 제형은 투여 방법에 의존하여 다양한 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 이동의 특별한 방식으로서, 본 발명의 치료학적 제형은 본 발명의 부형제와 제조될 수 있다. 본 발명의 치료학적 약제는 어떠한 수용자, 바람직하게는 포유류 및 더욱 바람직하게는 인간에게 투여될 수 있다. 투여의 특별한 방식은 치료될 상태에 의존할 수 있다.

[0115] 하나의 실시예에서, 적합한 연고는 65 내지 100%(바람직하게는 75 내지 96%)의 화이트 소프트 파라핀, 0 내지 15%의 액상 파라핀, 0 내지 7%(바람직하게는 3 내지 7%)의 라놀린 또는 유도체 또는 유사체로부터 국소 제형의 총량에 기초한 0.001% 내지 100%의 범위로부터 일반적으로 선택된 유효하며 무독성 용량의 단일 디아릴알칸 또는 두개 또는 그 이상의 디아릴알칸 혼합물의 이상적인 농도로 구성된다. 또 다른 실시예에서 연고는 폴리에틸렌-액상 파라핀 매트릭스를 포함할 수 있다.

[0116] 하나의 실시예에서, 적합한 크림은 상기에 제공된 단일 디아릴알칸 또는 두개 또는 그 이상의 디아릴알칸의 혼합물의 적정 농도와 함께 유화 시스템(emulsifying system)으로 구성된다. 유화 시스템은 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 방부제 예를 들어, 0.1 내지 1%의 N,N"-메틸렌비스[N'-(3-(하이드록시메틸)-2,5-디옥소-4-이미다졸리디닐]우레아](Imidurea USNF로부터 입수 가능함), 0.1 내지 1%의 알킬 4-하이드록시벤조산(예를 들어, 상표 Nipastat의 Nipa Laboratories로부터 입수 가능한 혼합물), 및 0.1 내지 2%의 페녹시에탄올과 함께 2 내지 10%의 폴리옥시에틸렌 알콜(예를 들어, 상표 Cetomacrogol™ 1000으로부터 이용 가능한 혼합물), 10 내지 25%의 스테아릴 알콜, 20 내지 60%의 액상 파라핀, 10 내지 65%의 물로 구성된다.

[0117] 하나의 실시예에서, 적합한 젤은 액상(liquid phase)이 고도의 교차 결합되어 있는 3차원 중합체 매트릭스 안에서 굳어진 반고체 시스템으로 구성된다. 액상은 예를 들어 0.1 내지 2%의 메틸 4-하이드록시벤조산(메틸 파라벤) 또는 페녹시에탄올-디퍼렌셜을 포함하는 군으로부터 선택되나 이에 제한되지는 않는 하나 또는 그 이상의 방부제와 함께, 0 내지 20%의 물-혼화성(water-miscible) 첨가제 예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜, 및 메틸셀룰로오스 및 카르복시폴리메틸렌(카보풀)을 포함하는 군으로부터 선택되나 이에 제한되지는 않는 트래거캔스(tragacanth), 펙틴, 캐러기인(carrageen), 아가 및 알긴산 또는 합성 또는 반합성 화합물을 포함하는 군으로부터 선택되나 이에 제한되지는 않는 천연물질일 수 있는 1% 내지 10%(바람직하게는 0.5% 내지 2%)의 농화제(thickening agent)의 단일 디아릴알칸 또는 두개 또는 그 이상의 디아릴알칸 혼합물의 이상적 양과 물로 구성될 수 있다. 또 다른 적합한 베이스는 70 내지 90%의 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, U.S. National Formulary (USNF)에 따라 제조된 40%의 폴리에틸렌 글리콜 3350 및 60%의 폴리에틸렌 글리콜 400), 및 5 내지 20%의 물, 0.02 내지 0.25%의 항산화제(예를 들어, 부틸히드록시톨루엔), 및 0.005 내지 0.1%의 키클레이트제(예를 들어, 에틸렌디아민 사초산(EDTA))와 함께 적정량의 단일 디아릴알칸 또는 디아릴알칸의 혼합물로 구성된다.

[0118] 상기 사용된 용어 소프트 파라핀은 크림 또는 연고의 기초가 되는 화이트 소프트 파라핀 및 옐로우 소프트 파라핀을 포함한다. 상기 용어 라놀린은 천연 양모지(wool fat) 및 정제된 양모지를 포함한다. 라놀린의 유도체는 특히 그들의 물리적 또는 화학적 특성을 바꾸기 위하여 화학적으로 변경된 라놀린을 포함하고, 라놀린의 합성 유사체는 특히 합성 또는 반합성 화합물 및 예를 들어, 라놀린 치환체로 불릴 수 있는 라놀린 대신으로서 약제학적 및 화장품용으로 사용된 공지의 혼합물을 포함한다.

- [0119] 하나의 적합한 라놀린 합성 유사체로서 사용될 수 있는 것은 Softisan 649라고 알려져 있는 상표 Softisan™로부터 입수할 수 있는 물질이다. Dynamit Nobel Aktiengesellschaft사로부터 입수할 수 있는 Softisan 649는 천연 야채 지방산의 글리세린 에스테르, 이소스테아르산 및 아디프산이며; 그것의 특성은 H.Hermsdorf in Fette, Seifen, Anstrichmittel, Issue No. 84, No. 3(1982), pp. 3-6에서 토론되었다.
- [0120] 적합한 연고 또는 크림 베이스 및 그들의 특성을 이루는 구성물로서 상기에 언급된 다른 물질은 표준 참고도서 예를 들어, 약전(pharmacopoeia)에 토론되었다. 세토마크로골(cetomacrogol) 1000은 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 의 화학식을 가지며, 여기에서 m 은 15 또는 17일 수 있으며, n 은 20 내지 24일 수 있다. 부틸히드록시톨루엔은 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸(2,6-di-tert-butyl-p-cresol)이다. 니파스타트(Nipastat)는 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 4-하이드록시벤조산의 혼합물이다.
- [0121] 본 발명의 조성물은 전통적인 약제학적 기술에 의해 제조될 수 있다. 따라서 전술한 조성물은 예를 들어, 소프트 파라핀, 만일 존재한다면 액상 파라핀, 및 라놀린 또는 유도체 또는 그들의 합성 유사체를 고온, 바람직하게는 60-70°C에서 함께 혼합함으로써 전통적으로 제조될 수 있다. 상기 혼합물은 그 후 상온에서 냉각시키고 코르티코스테로이드 및 어떠한 다른 성분과 함께 무피로신(mupirocin)의 수화된 칼슘염 결정의 첨가 후에 충분히 분산시키기 위해 섞어준다.
- [0122] 투여 방식에도 불구하고, 특정 복용량은 대략의 수용자 체중에 따라 계산되어진다. 게다가 계산의 세분화는 당업자에 의해 관례대로 만들어진 각각의 상기 언급된 제형을 포함하는 적당한 투약량을 결정하기 위해 필요하며, 그것은 특히 투약 정보 및 여기에 기술된 검정법을 고려하여 불필요한 실험 없이 그들에 의해 관례대로 수행된 범위 안에 있다. 이러한 투약량은 적당한 용량 반응 데이터와 함께 이용된 투약량을 측정하기 위하여 확립된 검정법의 사용을 통해 확인될 수 있다.
- [0123] 하기의 특정한 실시예는 단지 실례로서 제공되고, 본 발명의 범위에 의해 제한받지 않는다.
- [0124] [실시예]
- [0125] **실시예 1. 건조 식물로부터 유기 추출물의 제조**
- [0126] 건조된 식물 재료는 2mm 보다 크지 않은 크기의 입자로 분쇄하였고, 일부분(60g)은 삼각플라스크에 옮겨서 600ml의 메탄올:디클로로메탄(1:1)에 추출하였다. 혼합물은 한시간 동안 흔들어 섞고 여과하고, 바이오매스는 메탄올:디클로로메탄(1:1)(600ml)에 다시 추출하였다. 유기 추출물은 화합되고 각 식물 재료로부터 유기 추출물을 제공하기 위해 진공상태 하에서 증발시켰다. 각 추출물(대략 75mg)을 그 후 50mg/ml 농도의 1.5ml DMSO에 용해시키고난 후 -70°C 냉동기에 저장하였다. 추출 용액의 엘리컷은 실시예 2에 기재된 티로시나아제 검정법에 사용하였다.
- [0127] **실시예 2. 티로시나아제 저해 검정법**
- [0128] 티로시나아제 저해 검정법은 존스 등에 의해 보고된 방법을 사용하여 수행하였다(Jones et al. (2002) Pigment. Cell Res. 15:335). 이 방법을 사용하여, 티로시나아제의 기질인 L-Dopa의 도파크롬(dopachrome)으로의 전환은 450nm에서 흡수모니터링에 의해 수행되었다. 티로시나아제는 200 U/ml의 pH 6.8(검정 완충액), 50mM 포타슘 포스페이트 완충액으로 제조하였고, 사용하기 전에 1ml로 엘리컷하여 -20°C에 보관하였다. 검정법에 사용하기 위해, 스톡 효소 용액을 녹이고 200U/ml의 검정 완충액에 희석하였다. 기질인 L-DOPA의 2mM 모액(working solution)은 각 검정법을 위한 검정 완충액으로 제조하였다. 샘플들은 10%의 DMSO(0.5ml)에 용해되고 5ml의 검정 완충액으로 희석되었다. 반응 혼합물은 0.050ml의 2mM L-DOPA, 0.050ml 200U/ml 머쉬룸 티로시나아제 및 0.050ml 저해제로 이루어졌다. 반응 부피는 200 μl의 검정 완충액으로 조정하였다. 검정은 96웰 팔콘 3097의 바닥이 평평한 마이크로타이터 플레이트(Beckton Dickinson, NJ)에서 수행하였다. 도파크롬의 존재는 WALLAC 1420 다중레이블 카운터(multilable Counter)(Turku, Finland)으로 측정하였다. 평균 속도는 분당 450nm에서 흡광도(ΔA_{450})의 변화를 측정함으로써 선형 효소비율로부터 측정되었다. 테스트 샘플에 의한 티로시나아제 저해 퍼센트는 공식(1)을 사용하여 대조군에 대한 샘플의 흡광도의 비교에 의해 측정되었다.
- [0129] (음성 대조군 흡광도 - 샘플 흡광도) / 음성 대조군 흡광도 X 100 (1)
- [0130] 그 결과는 표1에 설명하였다.

표 1

[0131]

4개의 식물 추출물의 티로시나아제 저해 활성

식물의 라틴 이름 및 부분	양	유기 추출물의 중량	티로시나아제의 저해 퍼센트 (농도 mg/ml)
<i>Broussonetia kazinoki</i> (닥나무) 전체 식물	20g	1.1g	68% (0.125 mg/ml에서)
<i>Rhus chinensis</i> 세시디움	20g	12.8g	31% (0.125 mg/ml에서)
<i>Polygonum multiflorum</i> (적하수오) 덩이줄기	20g	2.4g	43% (0.125 mg/ml에서)
<i>Dianella ensifolia</i> (다이아넬라 엔시폴리아) 전체 식물	20g	1.7g	57% (0.125 mg/ml에서)

[0132]

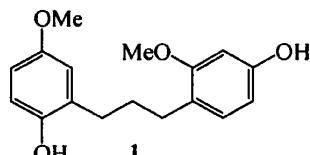
실시예 3. 활성 식물 추출물의 HTP 분류

[0133]

활성 유기 추출물(400mg)은 프리팩트(prepacked)된 정상(normal phase)의 플래시 칼럼(2cm ID x 8.2cm, 10g 실리카 겔)에 로딩하였다. 상기 칼럼은 5mL/min의 유량(flow rate)에서 30분간 100% A 내지 100% B로부터 EtOAc:헥산 50:50의 구배 이동상(gradient mobile phase)(A) 및 메탄올(B)의 히타치 초고속 정제 시스템(HTP system)을 사용하여 용리하였다. 분리는 광대역 파장 UV 디텍터(broadband wavelength UV detector)를 사용하여 관찰하였고, 분획은 길슨 분획기(fraction collector)를 사용하여 1.9mL/well의 96-deep-well에서 수집하였다. 상기 샘플 플레이트는 낮은 진공 및 원심분리 하에서 건조하였다. DMSO(1.5mL)는 각 웰에서 샘플을 용해시키는 데 사용되었고, 일부분(100 μL)은 티로시나아제 저해 검정을 두번 하는데 사용하였다.

[0134]

실시예 4. 닥나무(BK, 전체 식물)로부터 1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판(1)의 추출, 분리 및 정제



[0135]

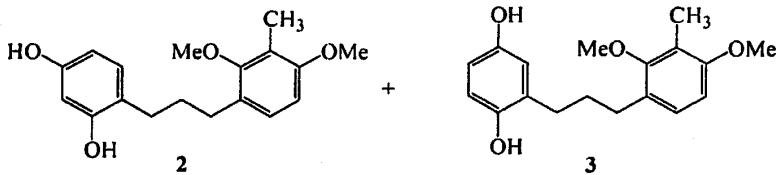
닥나무(전체 식물의 100g)를 분쇄하고 800mL의 MeOH:DCM(1:2)로 3회 추출하였다. 건조 추출물(6g)은 MeOH로 헥산/에틸 아세테이트(50:50) 구배용매 조성법(gradient solvent elution)의 실리카 겔 칼럼을 사용하여 분획하였다. 분획은 88 테스트 튜브 2세트가 수집되었다. LC/MS/PDA가 각각의 분획을 체크하기 위하여 사용되었고, 그 후 분획은 그들의 티로시나아제 저해 활성이 실시예 2에 기술된 것에 의해 측정되었다. 분획(P0346-HTP-F2-P0346-HTP-E4)이 가장 활성이 있음이 밝혀졌고, 이 분획은 결합되고 BK-F2--4로 분류되었다. 용매의 증발시킨 후, 그들의 티로시나아제 저해 활성이 실시예 2에 기술된 것에 의해 측정되었다. 분획(P0346-HTP-F2-P0346-HTP-E4)이 가장 활성이 있음이 밝혀졌고, 이 분획은 결합되고 BK-F2--4로 분류되었다. 용매의 증발후에, BK-F2--4는 물/MeOH 구배를 사용한 프리팩트된 역상 칼럼(C-18 칼럼) 상에서 추가로 분리되었다. 18개의 화합물 피크가 하기 분리에서 관찰되었다. 14개의 역상 칼럼을 수행하였고, 각 실행으로부터 유사 분획이 결합되었다. 결합되고 농축된 분획에서 UP288로 명명된 하나의 화합물 피크가 강력한 티로시나아제 저해 활성을 보였다(도4). 예비 HPLC로 분리 및 정제 후에, 6mg의 1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판(UP288)(1)을 얻었다. 이 화합물의 구조는 MS 및 NMR 분광학(¹H, ¹³C, HMQC 및 HMBC)을 사용하여 밝혀졌다. 도 5는 UP288의 화학적 구조 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 도시하고 있다. UP288은 24 μM의 IC₅₀ 값을 가지는 코직산과 유사한 활성을 가지는 티로시나아제의 저해제이다. 도 6은 티로시나아제 저해 용량 반응 곡선 및 UP288 및 코직산의 IC₅₀ 값을 나타내고 있다.

[0137]

1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판(UP288). 수율 0.006% (순도 > 96%, HPLC); UV λ_{Max} : 281.0nm; MS (초음파 이온화, 양성 이온 검출) : m/z 289(M + 1, 100%); ¹H-NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO): δ 1.70 (2H, m, CH₂), 2.46 (4H, m, 2CH₂), 3.68 (3H, s, OCH₃), 3.73 (3H, s, OCH₃), 6.26 (1H, q, H-5), 6.35 (1H, d, H-3), 6.55 (1H, q, H-14), 6.65 (1H, d, H-13), 6.72 (1H, d, H-16), 6.86 (1H, d, H-

6), 8.69 (1H, s, OH), 9.20 (1H, s, OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : δ 28.5 (C-8), 31.6 (C-9), 34.5 (C-10), 55.0 (C-7), 55.6 (C-17), 98.9 (C-3), 106.4 (C-5), 112.4 (C-16), 115.2 (C-13), 119.7 (C-1), 119.8 (C-14), 120.3 (C-11), 120.4 (C-6), 132.9 (C-12), 144.6 (C-4), 147.2 (C-17) & 158.3 (C-7).

[0138] 실시예 5. 다이아넬라 엔시풀라(P0389)(전체 식물)로부터 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a)(2) 및 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302b)(3)의 추출, 분리 및 정제



[0139]

[0140]

다이아넬라 엔시풀라(P0389, 전체 식물의 300g)를 분쇄하고, 800ml의 MeOH:DCM(1:2)에서 3회 추출하였다. 건조 추출물(5g)은 MeOH로 혼산/에틸 아세테이트(50/50) 구배용매 조성법의 실리카겔 칼럼을 사용하여 분획하였다. 분획은 264 테스트 튜브의 2세트로 수집되었다. LC/MS/PDA는 각각의 분획을 체크하기 위하여 사용되고, 분획은 그 후 그 조성물의 유사성에 기초하여 22개의 분획으로 결합되었다(도7). 결합된 분획은 용매를 제거하기 위하여 증발, 건조되었고, 그들의 티로시나아제 저해 활성을 실시예 2에 기재된 것에 따라 측정하였다. 분획 P0389-HTP-F12, P0389-HTP-F13 및 P0389-HTP-F14가 가장 활성이 있으며, 이 분획들은 결합되고 DE-F12-14로 방출되었다. 용매 증발 후에, DE-F12--14는 물/MeOH 구배를 사용한 프리팩트된 역상 칼럼 (RP-칼럼) 상에서 추가로 분리되었다. 두개의 메이저 화합물 및 11개의 마이너 화합물의 피크가 하기 분리에서 관찰되었다. 각각의 이 피크에 상응하는 화합물이 RP-칼럼 상에서 7개의 추가적인 분리에 따라 분리되었다. 수집된 모든 화합물을 건조하고 그들의 티로시나아제 저해 활성을 테스트하였다. 11개의 마이너 피크 중의 2개가 UP302a 및 UP302b로 각각 명명되었으며 강력한 티로시나아제 저해 활성을 나타내었다(도8). 분리 및 정제 후에, 두개의 활성 화합물이 수득되었다 : 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a, 10mg)(2) 및 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302b, 6mg)(3). 이 두 화합물의 구조는 MS 및 NMR 분광학(^1H , ^{13}C , gHSQC 및 HMBC)을 사용하여 밝혀졌다. 도9는 UP302a의 gHSQC 스펙트럼을 도시하고 있다. 티로시나아제 저해 검정은 UP302a가 $0.24 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 가지는 가장 강력한 저해제인 반면, UP302b는 $12 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 가짐을 보여주었다.

[0141]

1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a, 10mg)(2). 수율 0.02% (순도 > 98%, HPLC); UV λ_{Max} : 279.8nm; MS (초음파 이온화, 양성 이온 검출) : m/z 303(M + 1, 100%); ^1H -NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : δ 1.70 (2H, m, CH_2), 2.03 (3H, s, CH_3), 2.43 (2H, m, CH_2), 2.49 (2H, m, CH_2), 3.58 (3H, s, OCH_3), 3.73 (3H, s, OCH_3), 6.11 (1H, q, H-16), 6.25 (1H, d, H-14), 6.65 (1H, d, H-5), 6.76 (1H, d, H-17), 6.97 (1H, d, H-6), 8.93 (1H, s, OH), 9.03 (1H, s, OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : δ 28.8 (C-9), 29.3 (C-11), 31.1 (C-10), 55.3 (C-7), 55.9 (C-8), 102.4 (C-14), 105.8 (C-16), 106.1 (C-5), 118.4 (C-1), 118.6 (C-12), 126.9 (C-3), 127.0 (C-6), 130.1 (C-17), 155.7 (C-13), 156.2 (C-15), 156.3 (C-4) & 156.8 (C-2).

[0142]

1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',5'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302b, 6mg)(3). 수율 0.01% (순도 > 95%, HPLC); UV λ_{Max} : 279.8nm; MS (초음파 이온화, 양성 이온 검출) : m/z 303(M + 1, 100%); ^1H -NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : δ 1.82 (2H, m, CH_2), 2.07 (3H, s, CH_3), 2.52 (2H, m, CH_2), 2.56 (2H, m, CH_3), 3.63 (3H, s, OCH_3), 3.77 (3H, s, OCH_3), 6.64 (1H, q, H-15), 6.72 (1H, d, H-14), 6.64 (1H, d, H-5), 6.70 (1H, d, H-17), 7.00 (1H, d, H-6), 7.65 (1H, s, OH) 및 7.69 (1H, s, OH).

[0143]

실시예 6. 다이아넬라 엔시풀라(DE)(전체 식물)로부터 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2',4'-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a)(2)의 대규모 분리

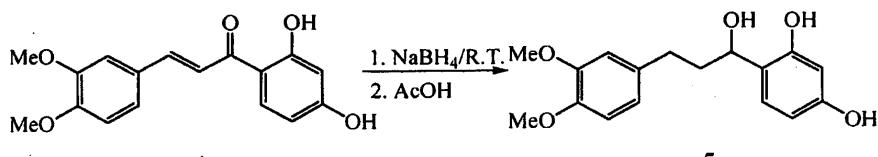
[0144]

다이아넬라 엔시풀리아(전체 식물의 4.3g)을 수집, 분쇄하고, 용매로서 메탄올과 여과 추출법을 사용하여 3회

추출하였다. 상기 추출물은 결합되고 메탄올을 제거하기 위해 증발시켰다. 조추출물은 그 후 물로 혼탁하고, DCM으로 배분하였다. 총이 분리되고, DCM 층은 60g의 물질을 산출하기 위해 증발시켰다. DCM 추출물은 헥산-ETOAC 구배로 용리하는 3중분리 실리카 젤 칼럼 상에서 분획하였다. 총 15개의 서브-분획이 수득되었고, HPLC-MS/PDA에 의해 분석되었다. 표적 화합물(UP302a)이 분획 6 내지 9에서 발견되었으며 총 3g의 농축된 UP302a를 산출하기 위해 결합되었다. 농축된 UP302a는 CG-161 레진으로 팩트된 오픈 칼럼 상에서 물-MeOH 구배로 용리하여 추가로 분리되었다. 총 23개의 분획이 15 내지 21의 분획에서 용리된 UP302a로 수집되었다. 분획 15-21은 그 후 결합되고, 용매는 700mg의 고체를 산출하기 위하여 증발되고, 30mg의 UP302a를 생성하기 위해 C-18 칼럼 상에서 예비 HPLC에 의해 추가로 정제되었다. 정제된 산물의 구조, 티로시나아제 저해 활성 및 순도는 NMR, 효소 저해 검정 및 LC-MS/PDA에 의해 확인되었다.

실시예 7. 치환된 칼콘의 수소화붕소나트륨 환원에 의한 디아릴알칸의 합성

하기에 기술된 치환된 칼콘의 수소화봉소나트륨 환원에 의한 디아릴알кан 합성의 일반적인 방법은 실례로서 2,4-디하이드록시-3',4'-디메톡시칼콘(4)의 환원을 사용한다.



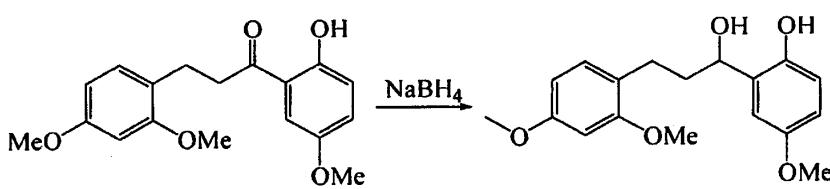
2,4-디하이드록시-3',4'-디메톡시칼콘(4)을 1-프로판올(5ml)에 용해하고, 수소화붕소나트륨(15mg)을 첨가한 후 상기 혼합물을 2시간 동안 상온에서 반응시킨다. 반응이 완료된 상태에서 20% 아세트산(0.2ml)을 첨가하고, 상기 혼합물을 5분간 80°C에서 열을 가한 후 냉각시킨다. 혼합물을 그 후 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올(5)를 산출하기 위해 프리팩트된 C₁₈ 칼럼 상에서 MeOH/H₂O 구배로 용리하여 추가로 분리하였다. 화합물(5)의 구조는 MS, UV 분광학, 1D 및 2D ¹H-NMR에 의해 확인하였다.

1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3,4-디메톡시페닐)-1-프로판올(5). 수율 60% (순도 > 98%, HPLC); UV λ_{Max} : 278.5 nm; MS (초음파 이온화, 양성 이온 검출) : m/z 305(M + 1, 100%); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 1.93 (2H, m, CH_2), 2.60 (2H, m, CH_2), 4.49 (1H, m, CH-OH), 3.78 (3H, s, OCH_3), 3.80 (3H, s, OCH_3), 6.28 (1H, q, H-5), 6.31 (1H, d, H-3), 6.98 (1H, d, H-6), 6.71 (1H, q, H-5'), 6.77 (1H, d, H-2'), 6.83 (1H, d, H-6').

상기 기술된 일반 방법을 사용한 하기의 화합물들은 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시페닐)-1-프로판올, 1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-3-(2',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올, 1-(4-하이드록시페닐)-3-(4-하이드록시페닐)-3-(4'-하이드록시페닐)-1-프로판올, 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시페닐)-1-프로판올, 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디-메톡시페닐)-1-프로판올, 1-(2,4,6-트리메톡시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올 및 1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-3-(3',4',5'-트리메톡시페닐)-1-프로판올을 산출하기 위하여 2,4-디하이드록시-2'-하이드록시칼콘, 2'-하이드록시-4'-메톡시-2,4-디메톡시-칼콘, 4'-하이드록시-4-하이드록시-칼콘, 2',4'-디하이드록시-2-하이드록시-칼콘, 2',4'-디하이드록시-3,4-디메톡시-칼콘, 2',4',6'-트리메톡시-3,4-디메톡시-칼콘 및 2'-하이드록시-4'-메톡시-3,4,5-트리메톡시-칼콘이 그에 상응하는 알콜로 환원되었다.

실시예 8. 치환된 디아릴프로파는의 수소화불소나트륨 화원에 의한 치환된 디페닐프로파울의 합성

하기에 기술된 치환된 디아릴프로파논의 수소화붕소나트륨 환원에 의한 치환된 디페닐프로판올의 합성을 위한 일반 방법은 실례로 1-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)-3-(2', 4'-디메톡시페닐)-1-프로파논(6)의 환원을 사용한다.

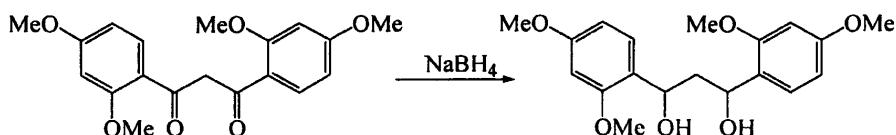


[0153]

[0154] 1-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)-3-(2',4'-디메톡시페닐)-1-프로파논(6)(5mg) 을 1-프로판올(1ml)에 용해하고, 수소화붕소나트륨(2mg)을 첨가한 후 상기 혼합물을 5시간 동안 상온에서 반응시킨다. 반응이 완료된 상태에서, 초과 수소화붕소나트륨을 중화시키기 위하여 20% 아세트산(0.2ml)을 첨가하였다. 그 후 반응 혼합물은 1-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)-3-(2',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올(7)을 산출하기 위하여 프리팩트된 C₁₈ 칼럼 상에서 MeOH/H₂O로 용리하여 분리되었다.

[0155] 상기에 기재된 일반 합성 방법에 따라 하기의 디아릴알칸 화합물은 각각 1-(2-하이드록시-4,6-디메톡시페닐)-3-(3'-메톡시-4'-하이드록시페닐)-1-프로판올, 3-(5'-벤질옥시-4'-메톡시-2'-메틸페닐)-1-(2-하이드록시-4,5-디메톡시페닐)-1-프로판올, 1-(2-하이드록시-4-메톡시-페닐)-3-(2',3',4',5'-테트라하이드로-벤조디옥소신-8-일)-1-프로페놀 및 3-(5'-클로로-1'-메틸-1'-하이드로-이미다졸-2'-일)-1-(2-하이드록시-4-메톡시-페닐)-1-프로페놀을 산출하기 위하여 1-(2-하이드록시-4,6,-디메톡시페닐)-3-(3'-메톡시-4'-하이드록시페닐)-1-프로파논, 3-(5'-벤질옥시-4'-메톡시-2'-메틸페닐)-1-(2-하이드록시-4,5-디메톡시페닐)-1-프로파논, 1-(2-하이드록시-4-메톡시-페닐)-3-(2',3',4',5'-테트라하이드로-벤조디옥소신-8'-일)-1-프로파논 및 3-(5'-클로로-1'-메틸-1'-하이드로-이미다졸-2'-일)-1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-프로페논이 환원되었다.

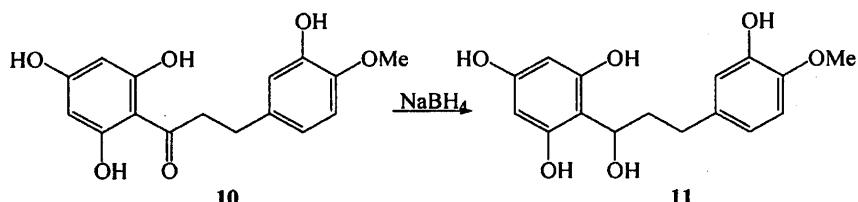
실시예 9. 1,3-비스(2,4-디메톡시페닐)-프로판-1,3-디올(9)의 합성



[0157]

[0158] 1,3-비스(2,4-디메톡시페닐)-프로판-1,3-디온(8)(5mg)을 1-프로판올(1ml)에 용해시키고, 수소화붕소나트륨(3mg)을 첨가한 후 상기 혼합물을 3시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료된 상태에서, 초과 수소화붕소나트륨을 중화시키기 위하여 20% 아세트산(0.2ml)을 첨가하였다. 상기 혼합물은 1,3-비스(2,4-디메톡시페닐)-프로판-1,3-디올(9)를 산출하기 위하여 프리팩트된 C₁₈ 칼럼 상에서 MeOH/H₂O로 용리하여 분리되었다.

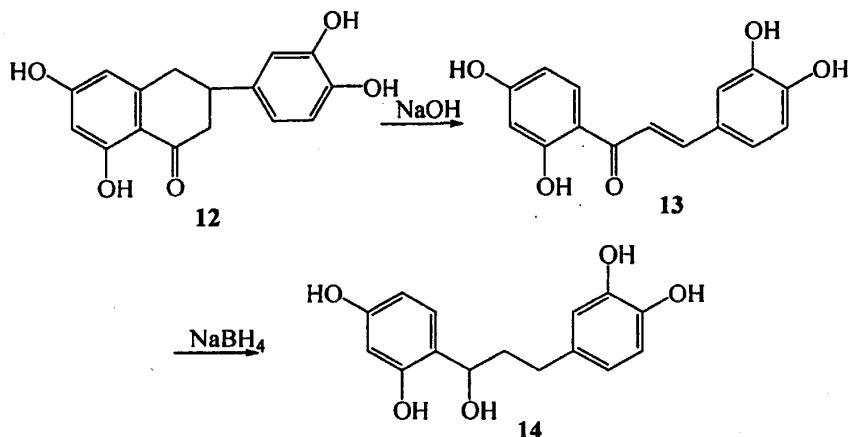
실시예 10. 네오헤스페리딘으로부터 1-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-3-(3'-하이드록시-4'-메톡시페닐)-1-프로판올의 합성



[0160]

[0161] 네오헤스페리딘은 디하이드로칼콘의 글리코시드이다. 네오헤스페리딘 총 중량의 100mg을 10ml의 1N HCl에 헌탁시키고, 2시간 동안 80°C로 열을 가했다. 가수분해산물(10)을 냉각시키고, 에틸 아세테이트(3 x 10ml)로 추출하였다. 에틸 아세테이트 층은 에틸 아세테이트를 제거하기 위하여 결합, 증발시키고 1-프로판올(5ml)에 용해시켰다. 반응이 완료된 후에, 상기 혼합물은 1-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-3-(3'-하이드록시-4'-메톡시페닐)-1-프로판올(11)을 산출하기 위하여 프리팩트된 C₁₈ 칼럼 상에서 MeOH/H₂O로 용리하여 분리되었다.

실시예 11. 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디하이드록시페닐)-1-프로판올(14)를 합성하기 위한 부트린의 추출, 정제 및 구조 변경



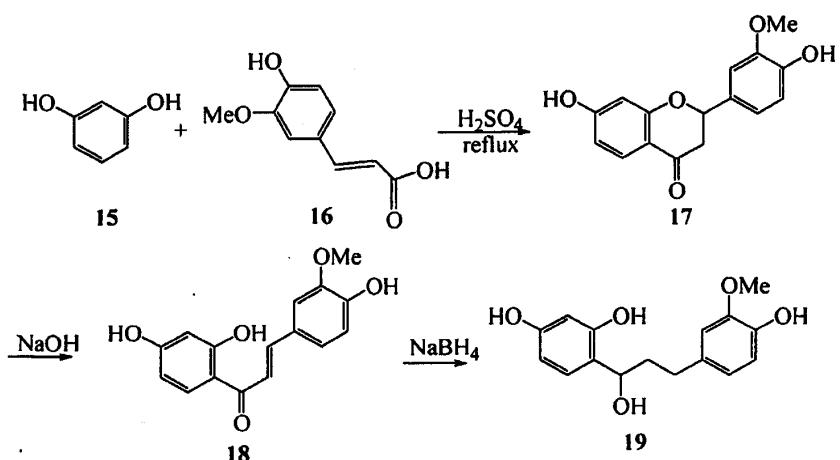
[0163]

[0164]

부트린은 부티아 프론도사(*Butea frondosa*)의 건조된 꽃으로부터 메탄올로 추출되고 다중 역상 칼럼 크로마토그래피 분리에 의해 정제된 고집적 플라바논-글리코사이드(high-content flavanone-glycoside)이다. HCl로 가수분해하여 당을 제거한 후에 부트린(12)이 생성되고 RP-HTP(전체 식물로부터 1.5%의 수율로)에 의해 정제된다. 부틴은 부테인(13)을 수득하기 위해 10%의 수산화나트륨으로 처리되고, 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디하이드록시페닐)-1-프로판올(14) ($IC_{50}=250\text{nM}$)을 수득하기 위해 수소화붕소나트륨으로 환원되었다.

[0165]

실시예12. 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3'-메톡시-4'-하이드록시페닐)-1-프로파올(19)의 합성



[0166]

[0167]

레조르시놀(15), 3-메톡시-4-하이드록시-신남산(16) 및 H₂SO₄(5%)을 7,4'-디하이드록시-3'-메톡시 플라바논(17)(90% 수율)을 산출하기 위하여 4시간 동안 THF에서 환류하였다. 상기 산물 7,4'-디하이드록시-3'-메톡시 플라바논(17)을 그 후 1시간 동안 80°C에서 10% 수산화나트륨으로 처리하였고, LC-MS/PDA 검출로 확인된 1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3'-메톡시-4'-하이드록시페닐)-1-프로판올(19)을 산출하기 위하여 프로판올 안에서 수소화붕소나트륨으로 환원시켰다. 미정제 산물은 상당히 강력한 티로시나아제 저해 활성을 나타냈다. 상기 혼합물을 HTP에 의해 더 정제하였다.

[0168]

실시예 13. 합성 디아릴알칸에 의한 티로시나아제 저해의 IC₅₀값 측정

[0169]

합성 디아릴알칸에 의한 티로시나아제의 저해는 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여 측정하였다. 각 샘플의 IC₅₀ 값은 반응이 특정 시간 및 농도에서 선형을 나타냄을 입증하기 위하여 키네틱 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 실시예 7-12에 기술된 방법을 사용하여 총 24개의 화합물을 합성하였고, 티로시나아제를 저해하기 위한 그들의 능력을 평가하였다. 그 결과는 표2에 설명하였다.

[0170]

합성 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀의 IC₅₀ 값

화합물명	티로시나아제 저해(IC ₅₀)
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디하이드록시페닐)-1-프로판올	0.5 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올	0.85 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시페닐)-1-프로판올	0.7 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(2'-메톡시페닐)-1-프로판올	3 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(4'-메톡시페닐)-1-프로판올	6 μM
1-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-3-(4'-아미노페닐)-1-프로판올	8 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-페닐-1-프로판올	8 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-3-(3'-메톡시-4'-하이드록시페닐)-1-프로판올	8.5 μM
1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-3-(3',4',5'-트리메톡시페닐)-1-프로판올	11 μM
1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-3-(2',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올	25 μM
1-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올	30 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-2-(4'-메톡시페닐)-1-에탄올	77 μM
1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-3-(2',3',4',5'-테트라하이드로-벤조디옥소신-8'-일)-1-프로판올	72 μM
3-(5'-클로로-1'-메틸-1'-하이드로-이미다졸-2'-일)-1-(2-하이드록시-4-메톡시페닐)-1-프로판올	225 μM
1-(4-하이드록시페닐)-3-(4'-하이드록시페닐)-1-프로판올	305 μM
1-(2-하이드록시-4,6-디메톡시페닐)-3-(3'-메톡시-4'-하이드록시페닐)-1-프로판올	375 μM
1-(2,4-디하이드록시페닐)-2-(3',4'-디메톡시페닐)-1-에탄올	431 μM
1,4-비스-(3,4-디하이드록시페닐)-2,3-디메틸부탄	700 μM
1-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)-3-(2',4'-메톡시페닐)-1-프로판올	1000 μM
1-(2,4-디하이드록시메틸)-2-(2',4'-디클로로페닐)-1-에탄올	1000 μM
1-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-3-(3'-하이드록시-4'-메톡시페닐)-1-프로판올	1200 μM
1,3-비스(2,4-디메톡시페닐)-프로판-1,3-디올	1200 μM
1-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-3-(3'-하이드록시-4'-메톡시페닐)-1-프로판올	1200 μM
1-(2,4,6-트리메톡시페닐)-3-(3',4'-디메톡시페닐)-1-프로판올	1500 μM

[0171]

실시예 14. 효소 저해 동역학

[0172]

실시예 2에 기술된 방법을 사용하여, 티로시나아제의 저해는 기질로서 0.75, 1.25 및 2.5mM 농도의 L-DOPA를 사용하여 상이한 농도(0, 261, 1044nM)의 저해제(UP302a)하에서 평가하였다. 도10에 나타나 있듯이, UP302a가 강력하고 길게 지속되는 저해 효과를 가지는 경쟁적 저해제임을 발견하였다. 티로시나아제 활성은 UP302a와 함께 배양한 몇일 후에는 회복되지 않았다. 대조적으로, 티로시나아제 활성은 코직산과 배양한 후 단지 1시간 후에 완전히 회복되었다.

[0173]

실시예 15. B-16 세포주로부터 멜라닌 생성의 저해

[0174]

멜라닌 생성의 저해는 두개의 상이한 검정법을 사용하여 평가하였다. 첫번째 검정에서, 멜라닌 생성의 저해는 β-MSH에 의한 유도 없이 평가되었으며, 여기에서 멜라닌 생성 저해의 두번째 검정은 세포배양액에서 β-MSH 유도하에 측정되었다. 간단히 말하면, B16F1 세포(ATCC#CRL-622)가 완전히 차개(confluence) 자란 후 웰 당 40,000 세포로 분주하였다. 세포가 자랄 수 있도록 5% CO₂를 포함한 습한 환경의 37°C에서 하룻밤동안 놔두었다. 2일째에, 저해제를 0-1000 μM 범위 농도로 세포에 3회 첨가하고 4일간 배양하였다. 멜라닌 형성을 유도하기 위해 필요한 β-MSH의 양은 10 증분(ten-fold increment)으로 0-1000nM의 농도 범위의 호르몬 첨가에 의해 결정하였다. 일단 세포를 상기와 같이 분주하고 적당한 β-MSH 농도가 결정되면 하룻밤동안 배양한 후 0-1000 μM의 농도 범위로 티로시나아제 저해제와 함께 배양하였다. 색깔의 발색은 매 아침마다 육안으로 관찰하였다. 색깔의 발색 후에, 200 μl의 세포 상층액을 각 웰로부터 제거하였고 흡광도를 450nm에서 측정하였다. 결과 유형은 β-MSH 유도 및 비유도 하의 세포검정에서 멜라닌 형성의 IC₅₀ 값을 측정하는데 사용하였다. 초기의 세포독성 비교를 위하여, 250 μM가 처리된 웰을 락테이트 디하이드로게나아제(LDH) 검정을 수행하기 위하여 사용하였다. LDH는 손상된 또는 죽은 세포로부터 유출되는 대사적 효소이다. 이 효소는 분광 광도계로 관찰될 수 있는 색깔 변화를 나타내기 위해 NAD⁺ 존재하에서 발색단(chromophore)을 전환한다.

[0175]

이 검정의 결과는 만일 코직산보다 더 나은 저해제가 없다면, 모든 테스트된 천연 저해제(UP288, UP302a 및

UP302b)는 최소한 똑같은 것으로 나타났다. 이것들은 두가지 조건 하에서의 IC₅₀ 값에서 몇 가지 차이점이 있었다. 코직산에 의한 저해는 유도 실험에서 67 μM의 IC₅₀에 대하여 내인성 실험을 위한 170 μM의 IC₅₀으로 향상되었다. 코직산과 관련되어 테스트된 저해제 중의 하나인 화합물 UP302b만이는 5.2 μM의 IC₅₀에서 34 μM의 IC₅₀으로 증가하는 두가지 환경 하에서 IC₅₀의 증가를 보여주었다. 티로시나아제 저해를 위해 측정된 IC₅₀의 값을 각각 내인성 검정에서의 28 μM 및 5.2 μM와 유도 검정에서의 40 μM 및 34 μM과 비교하면 0.2 μM 및 0.3 μM의 낮은 IC₅₀ 값을 가지는 두가지 화합물 UP302a 및 UP302b를 제외하고는 테스트된 모든 화합물과 상당히 동일하다. 이러한 차이점은 다른 저해제들과 비교하여 UP302a(2) 및 UP302b(3)에 의한 세포 침투가 감소되었기 때문일 수 있다. 그러나 이것은 효소 저해의 강력함에 의해 극복된다.

[0176] 표3은 코직산과 관련된 UP288 및 UP302a 저해제를 위한 이 두가지 검정의 결과를 제공한다.

실시예 16. 세포 독성 검정

[0178] 화합물이 처리된 웰을 락테이트 디하이드로게나아제 검정(LDH)을 수행하기 위하여 사용하였다. LDH는 손상된 또는 죽은 세포 바깥으로 유출된 대사적 효소이다. 상기 효소는 분광 광도계로 관찰할 수 있는 색깔 변화를 나타내기 위해 NAD⁺의 존재하에서 발색단을 전환한다. 세포독성은 250 μM의 농도에서 측정하였다. 이 농도에서 이 화합물의 어떠한 것도 코직산보다 더 현저한 독성을 나타내지는 않았다. 그러나, 상기 세포독성은 단지 하나의 농도(250 μM)에서 측정되었다는 것을 유의하여야 한다. 표3에서 나타낸 것과 같이, UP288(1) 및 UP302a(2)는 코직산과 유사하게 적당한 세포독성을 나타낸다.

표 3

[0179] 분리된 화합물에 의한 마우스 B16 F1 세포에서의 머쉬룸 티로시나아제 및 멜라닌 형성의 저해 및 세포 독성의 비교

화합물	티로시나아제 저해 IC ₅₀ (μM)	내인성 멜라닌 저해 IC ₅₀ (μM)	MSH 유도 멜라닌 저해 IC ₅₀ (μM)	세포독성 (LDH)
UP288	24.0	108	105	0.315
UP302a	0.24	28	40	0.265
코직산	29	170	67	0.260

실시예 17. 분자 역학(MM2) 계산

[0181] 분자역학 계산은 에너지 최소화 및 가장 안정한 3-D 구조의 결정을 위하여 Chem3D 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 하기의 파라미터들이 사용되었다 : 스텝 간격(step interval) = 2.0fs, 프레임 간격(frame interval) = 10fs, 10,000 스텝, 가열/냉각률 = 1.000 Kcal/atom/PS, 타겟 온도 = 3000K후에 종결한다. 특성 : pi 결합 배열 및 입체 에너지 개요. 모든 천연 및 합성 화합물 및 다른 디아릴알칸 및 디아릴알카놀 구조를 분석하였다. 다이아넬라 엔시폴리아(L.) DC의 전제 식물로부터 분리된 가장 강력한 티로시나아제 저해제 -- 1-(3-메틸-2,4-디메톡시페닐)-3-(2,4-디하이드록시페닐)-프로판(UP302a(2), IC₅₀=0.24 μM) --는 두개의 방향족 고리가 각각 겹쳐지는 독특한 3차원 구조를 가진다. 상기 구조의 최소화된 총 에너지는 -4.7034KJ/Mol이다. 두 개의 방향족 고리간의 거리는 3.28Å이다. 첫번째 방향족 고리 상의 폐놀 수산기는 각각 도12 및 14에 나타낸 두 산소 원자간의 거리가 2.99 및 3.16Å인 두번째 방향족 고리상의 두개의 메톡시기 바로 위에 있다. 이 분자 내 평행 구조는 이 화합물이 위와 아래 모두 과산화물 형태 [Cu^{II}-O₂-Cu^{II}]일 때 이핵성 효소의 구리 이온 모두와 완벽하게 키크레이트 화합물을 형성할 수 있게 한다.

실시예 18. 디아릴알칸 조성물의 크림 제형화

[0183] UP302a는 메이저 활성 성분으로서 치환된 디아릴프로판으로 구성된다. 이러한 화합물은 에탄올, 프로필렌 글리콜 및 에틸렌 글리콜을 포함하나 이에 제한되지 않는 높은 극성 용매에 녹을 수 있다. 그들은 약제학적 및/또는 화장품용으로 허용가능한 부형제, 보조제 및/또는 담체와 함께 제조될 수 있다. 이러한 부형제를 예로 들자면 물, 완충액, 식염수, 립거액, 텍스트로스 용액, 만니톨, 행크스 용액, 방부제 및 다른 수용성 생리학적으로 보정된 염용액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 고정유, 침기름, 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드를 포함하나 이에 제한되지 않는 비수용성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 다른 유용한 제형은 카르복시메틸셀룰로

オス 나트륨, 소르비톨 또는 텍스트란을 포함하나 이에 제한되지 않는 강화제를 포함하는 혼탁액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 부형제는 또한 미량의 첨가제 또는 색 및 화학적 안정성을 강화하는 항산화제와 같은 방부제를 포함할 수 있다. UP302a는 또한 그것의 피부 침투를 증가시키기 위한 리포좀 제형 또는 수용자의 안에서 활성 물질의 조성물을 천천히 방출하는 서방성 제형으로서 제조될 수 있다.

[0184] UP302a는 바람직하게는 연고, 젤, 로션 또는 크림 베이스로서 또는 에멀젼, 반창고, 드레싱 또는 마스크, 달라붙지 않는 거즈, 붕대, 약솜 또는 클로쓰 와이프로서 국소적으로 투여된다. 이러한 국소 도포는 국소 투여를 위하여 어떠한 공지된 표준 방법을 사용하여 어떠한 환부에 국소적으로 투여될 수 있다. UP302a는 인간 및 동물 모두에게 투여될 수 있다.

[0185] UP302a의 치료학적 조성물은 투여 및 표적 증상의 방법에 의존하여 다양한 단위의 투약 형태로 투여될 수 있다. 유효하고 무독성의 양은 일반적으로 국소 제형의 총량에 기초하여 0.01% 내지 5%의 범위에서 추천된다. 두개의 상이한 농도의 UP302a(0.01% 및 0.5% 중량)는 표 4 및 5에 나타낸 것과 같이 크림으로 제조되었다. 이 크림을 제조하기 위해 디아릴알칸을 상온에서 물에 용해하고, 조성물 A를 산출하기 위하여 용액에 완전히 분산될 때까지(대략 5분) 블렌더 안에서 균질화시켰다. 상온에서, 흔들어 섞지 않고 Ultrez-21 카보머를 표면에 뿌려 전체가 젖도록(하얀 부분이 보이지 않도록) 용액안에 떨어뜨림으로서 균질화된 용액에 첨가하였다. 그 후 부드럽게 저어주면서 용액을 40°C로 가열하고 글리세린을 첨가한 후 조성물 B를 산출하기 위하여 추가적으로 5분간 상기 조성물을 혼합하였다. 40°C에서, 조성물 A를 조성물 B에 첨가하고, 상기 조성물이 균질화될 때까지(대략 5분간) 잘 혼합하였다. 그 결과 에멀젼을 30°C에서 냉각시키고 교반 막대 및/또는 주걱으로 교반하면서 중화제로 적정함으로써 pH를 대략 5.5(5.3 내지 5.7)으로 조절하였다. 상기 에멀젼은 카보머의 중화유도에 의한 구조변화 때문에 점성이 높아지게 되었다. 에멀젼의 교반은 에멀젼 크림을 위한 알맞은 점성을 가지게 해줄 수 있다. 상기 조성물을 균등해질 때까지 혼합하였고, 깨끗한 저장용기에 담고 2°C 내지 8°C에 저장한다.

표 4

[0186]

0.01% 디아릴알칸 크림의 조성물

상(phase)	성분	% (w/w)	중량(g)
수용성	정제된 물	85.00	12
	디아릴알칸(UP302a)	0.01	0.0015
	울트레즈 21 카보머	0.50	0.075
	글리세린	8.00	1.2
오일	PEG-7 글리세릴 코코에이트	3.00	0.45
	카프릴/카프르 트리글리세라이드	2.67	0.4
PH 중화제	수산화나트륨(18% w/v), 분자 생물학적 등급	0.00	0.0
합계	7 성분	100	15

표 5

[0187]

0.1% UP302a 크림의 조성물

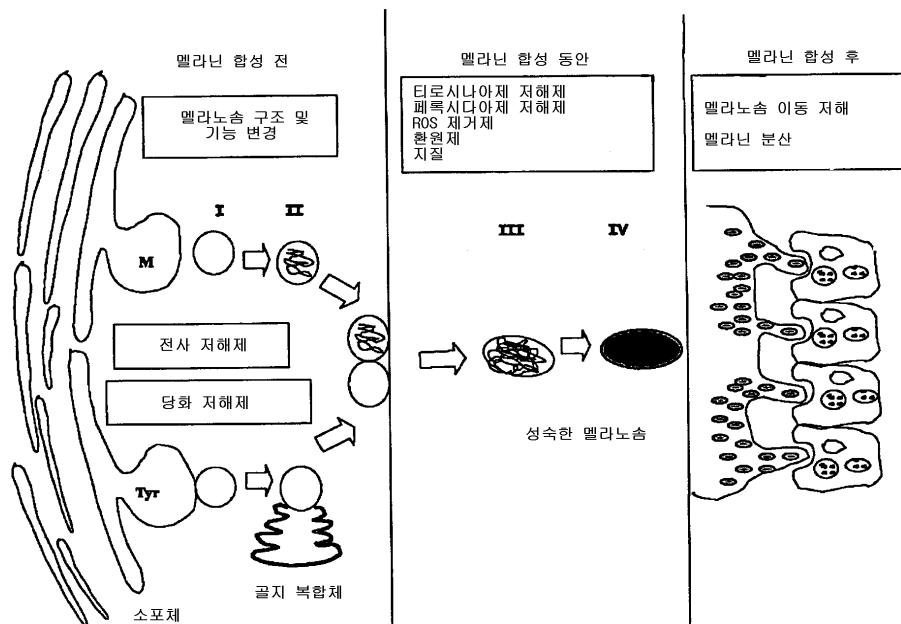
상(phase)	성분	% (w/w)	중량(g)
수용성	정제된 물	84.00	12.6
	디아릴알칸(UP302a)	0.1	0.015
	울트레즈 21 카보머	0.50	0.075
	글리세린	8.00	1.2
오일	PEG-7 글리세릴 코코에이트	3.00	0.45
	카프릴/카프르 트리글리세라이드	2.67	0.4
PH 중화제	수산화나트륨(18% w/v), 분자 생물학적 등급		
합계	7 성분	99.7	15

도면의 간단한 설명

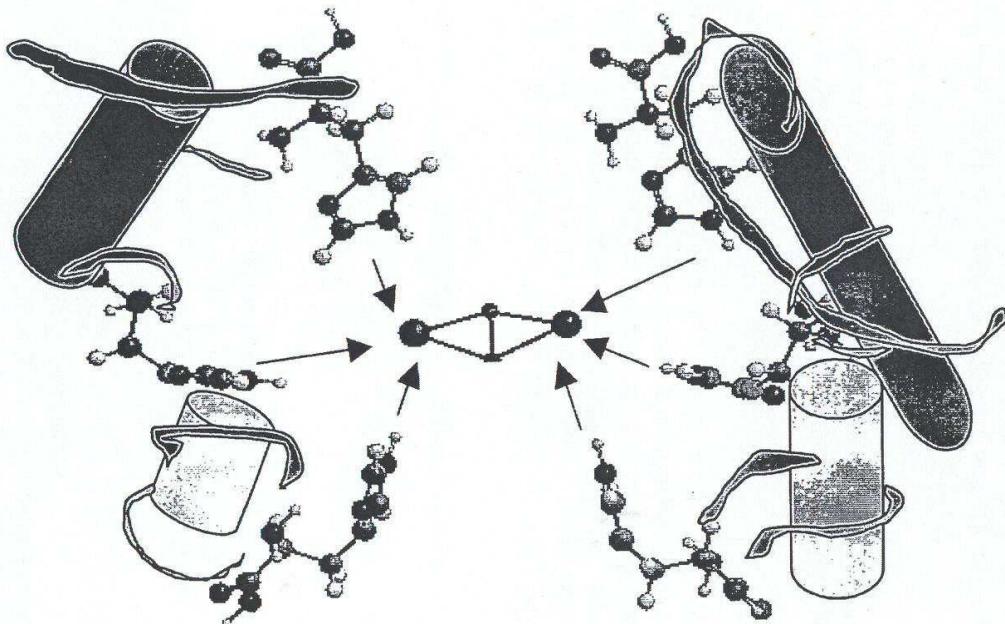
- [0048] 도1은 멜라닌 세포 생성 과정 및 이 과정을 조절하는 다양한 잠재적 메카니즘을 나타낸 것이다.
- [0049] 도2는 티로시나아제 활성 부위의 구조를 나타낸 것이다. 도2에 나타낸 것과 같이, 2개의 구리 이온은 가깝게 위치하고 있으며 각각은 그것의 측쇄의 N-ε 질소 원자를 통해 3개의 히스티딘과 연결되어 있다.
- [0050] 도3은 공지의 티로시나아제 저해제의 구조, 이름, 작용 메카니즘 및 다른 효과를 도시한 것이다.
- [0051] 도4는 강조된 UP288(1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2'-하이드록시-5'-메톡시페닐)-프로판)(1)을 포함하는 HTP 단편의 HPLC/UV 크로마토그램을 나타낸다.
- [0052] 도5는 화학적 구조 및 UP288(1)의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- [0053] 도6은 UP288 및 코직산의 티로시나아제 저해 용량 반응 곡선 및 IC_{50} 값을 나타낸 것이다.
- [0054] 도7은 다이아넬라 엔시폴리아(*Dianella ensifolia*, P0389)(전체 식물)로부터의 2가지 활성 화합물(UP302a 및 UP302b)의 생물학적 검정으로 유도된 분리를 도시한 것이다.
- [0055] 도8은 다중 컬럼 분리 후 농축된 UP302 단편의 HPLC/UV 크로마토그램을 도시한 것이다.
- [0056] 도9는 양자 및 탄소 사이의 결합으로 나타낸 UP302a(2)의 gHSQC 스펙트럼을 도시한 것이다.
- [0057] 도10은 다양한 농도의 저해제 UP302a 및 기질 L-DOPA 상에서 티로시나아제 활성의 저해를 그래프로 나타낸 것이다. 이러한 반응속도론은 UP302a가 티로시나아제 효소의 경쟁적 저해제임을 나타내었다.
- [0058] 도11은 코직산 및 UP302a(2)에 의한 마우스 B16F1 세포로부터의 내생적 멜라닌 생성의 저해를 나타낸 것이다. 각각의 샘플은 10가지 상이한 농도에서 3번 반복 실험되었다.
- [0059] 도12는 MM2 에너지 최소화 후의 UP302a의 3차원 구조를 도시한 것이다.
- [0060] 도13은 $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{O}_2-\text{Cu}^{\text{II}}$ 산화 상태에서 2개의 구리 이온과 결합할 때의 UP302a의 근접 원자간의 거리를 도시한 것이다.
- [0061] 도14는 실시예 17에서 산출된 과산화물형($\text{Cu}^{\text{II}}-\text{O}_2-\text{Cu}^{\text{II}}$)에서 구리 이온과 칼레이트될 때의 UP302a의 근접 원자간의 거리를 도시한 것이다.

도면

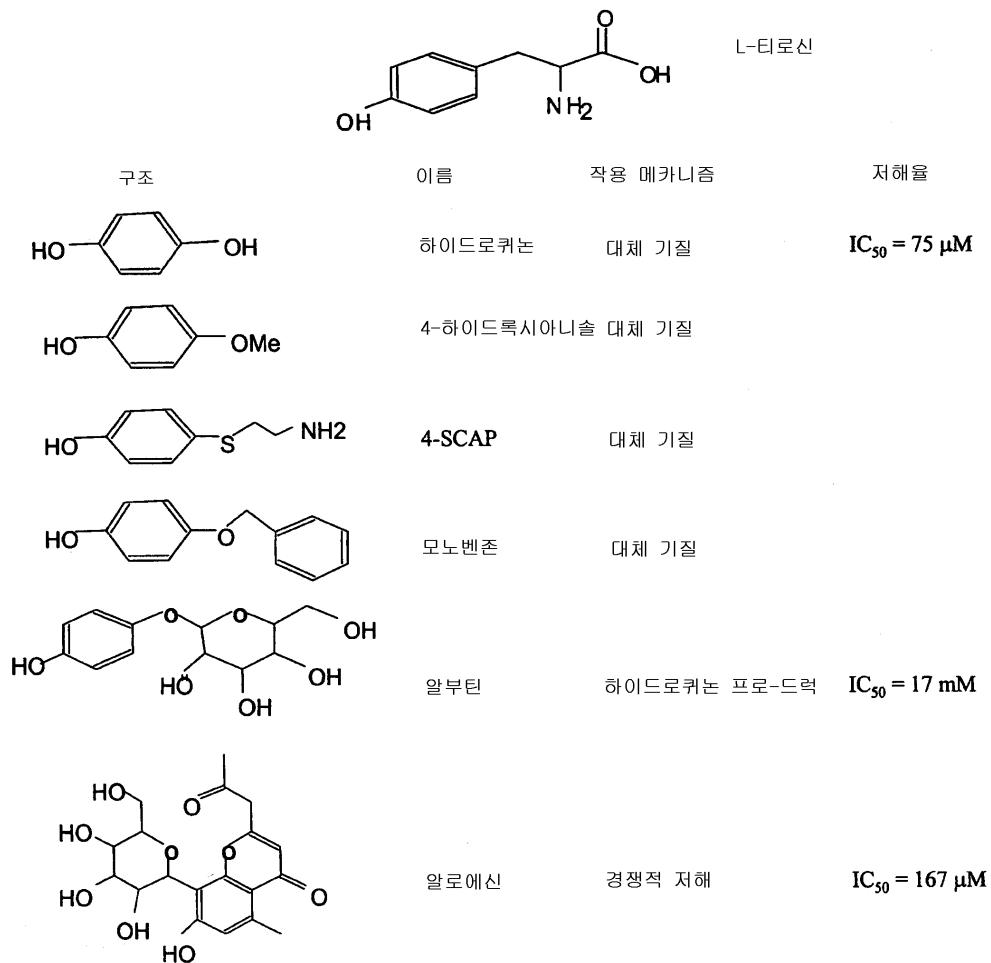
도면1



도면2



도면3a

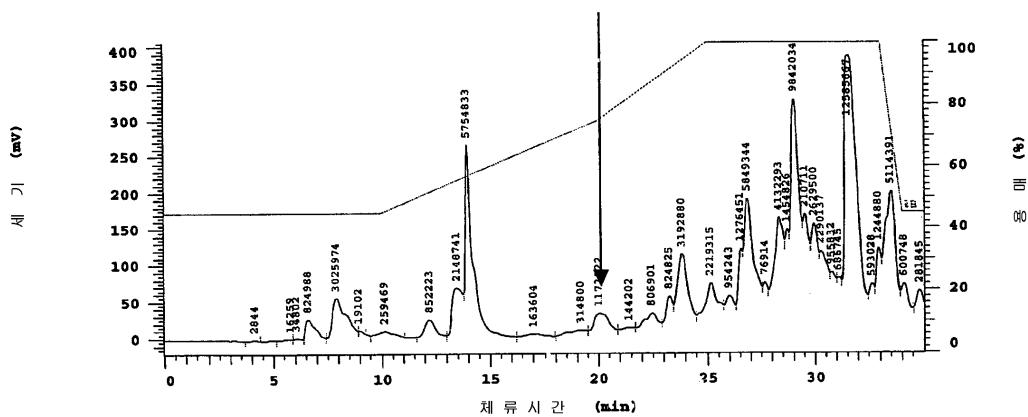


도면3b

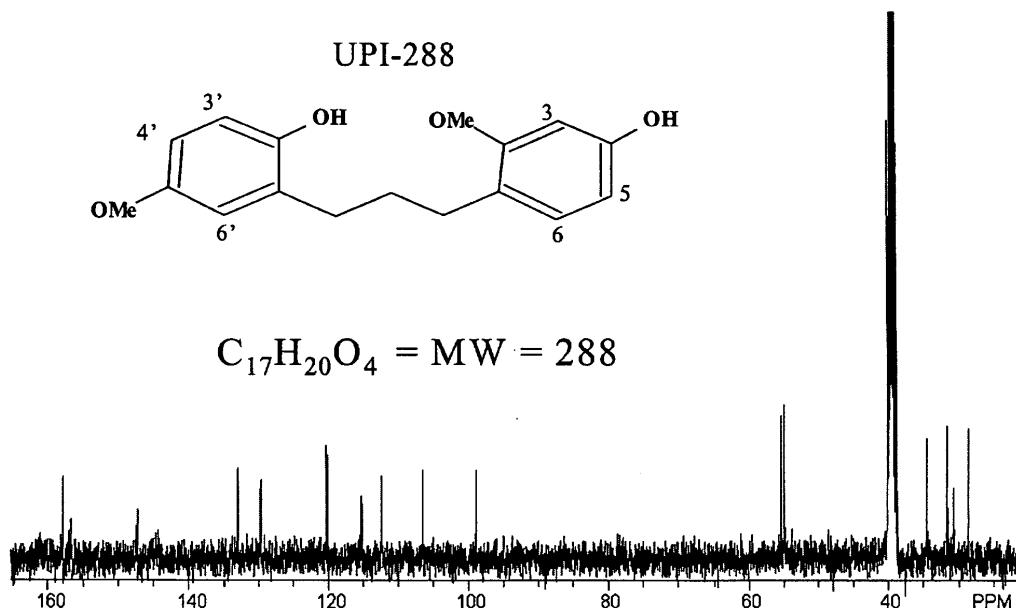
구조	이름	작용 메카니즘	저해율
	아젤라인 산	티로시나아제 활성 부위 차단 $K_i = 0.00273$	
	레스베라트롤	대체 기질 $IC_{50} = 54 \mu M$	
		독시레스베라트롤 비-경쟁적 저해제 $IC_{50} = 1.2 \mu M$	
	코직산	구리 칼레이트화 $IC_{50} = 6.2 \mu M$	
	메틸 캔티세이트	구리 칼레이트화 $IC_{50} = 11.2 \mu M$	
	엘라직 산	구리 칼레이트화	

도면4

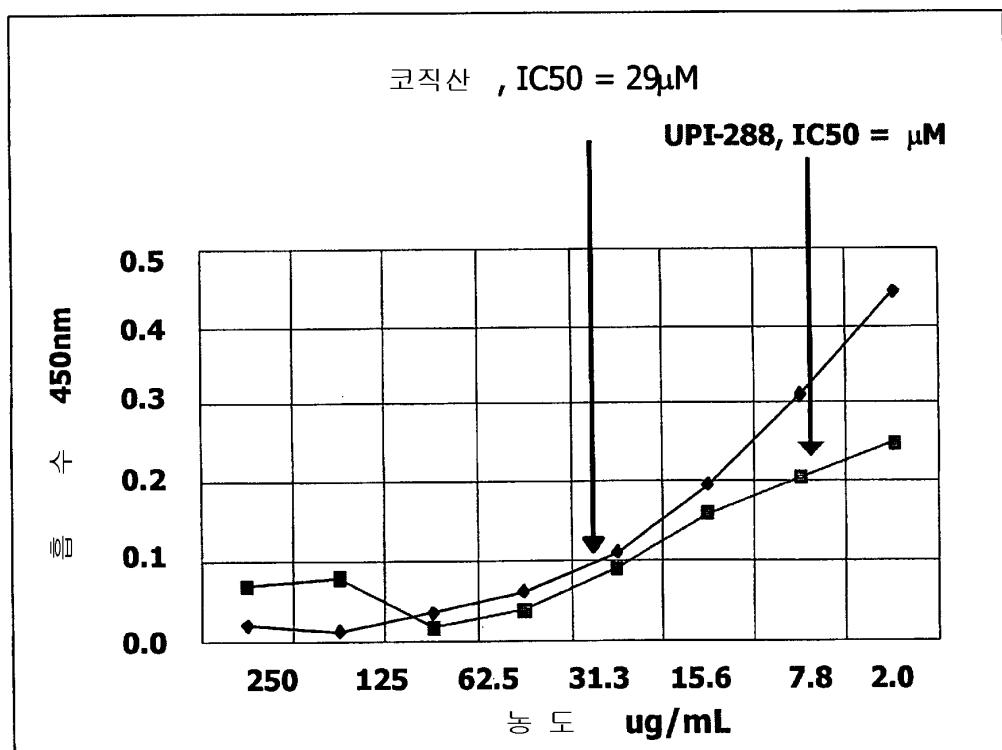
1-(2-메톡시-4-하이드록시페닐)-3-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)-프로판



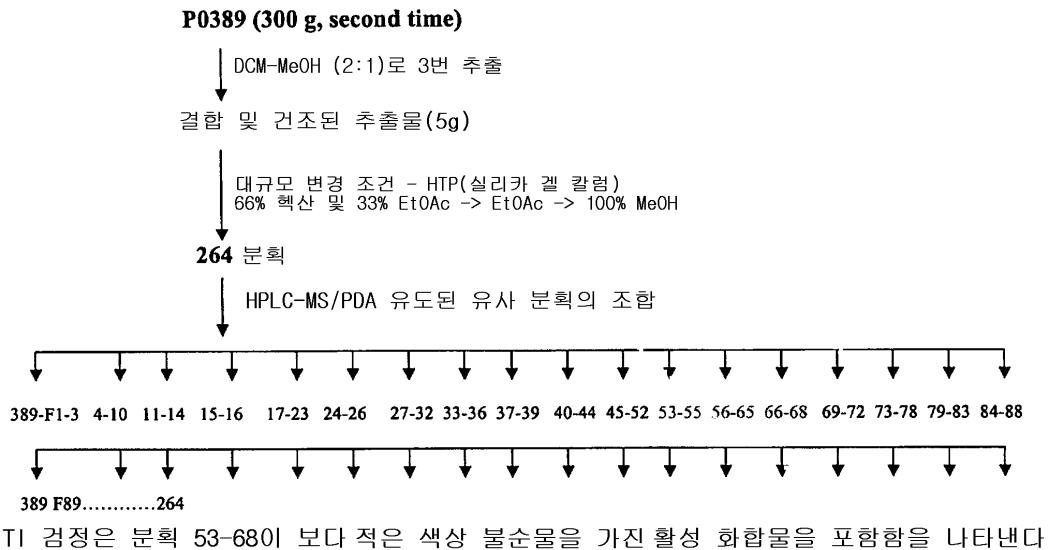
도면5



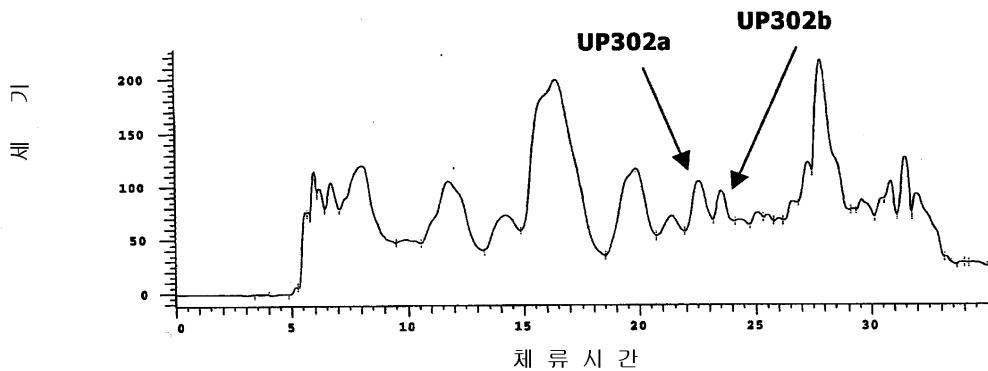
도면6



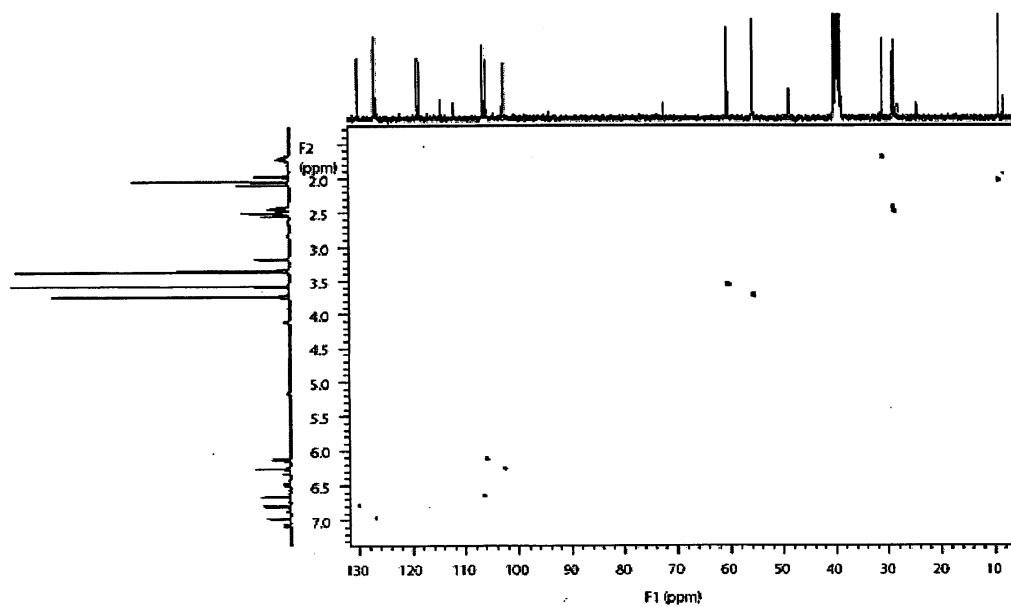
도면7



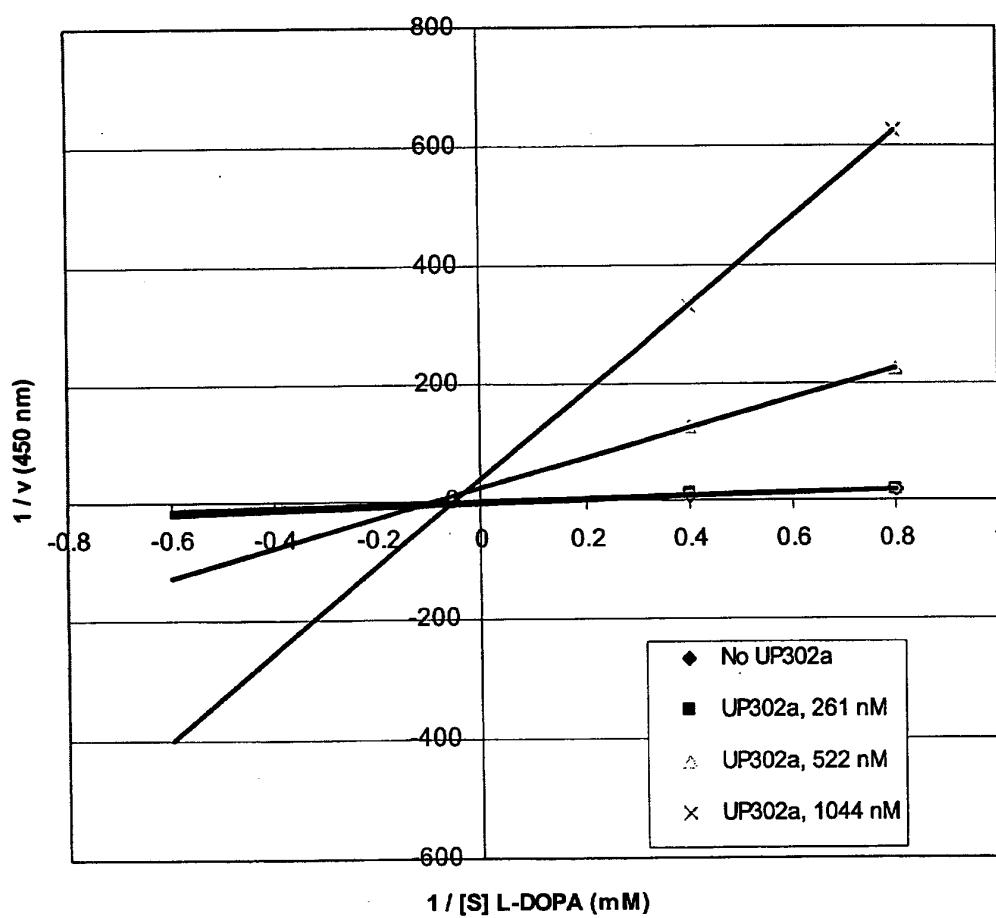
도면8



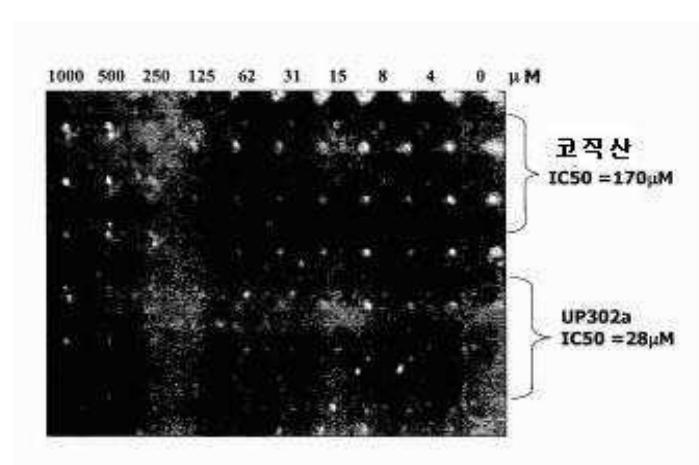
도면9



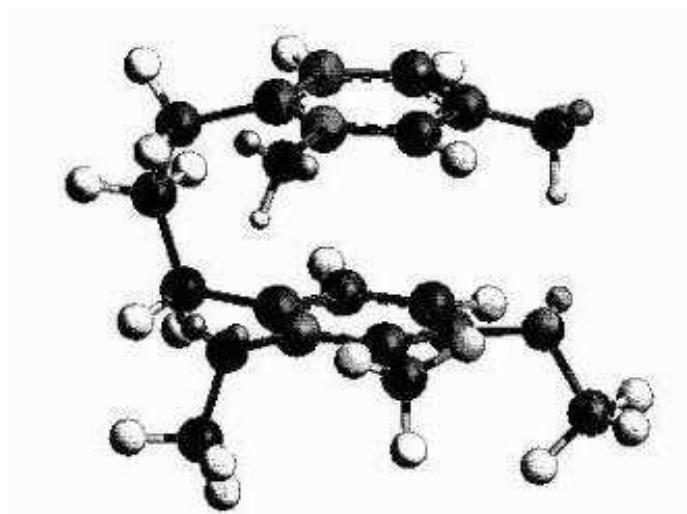
도면10



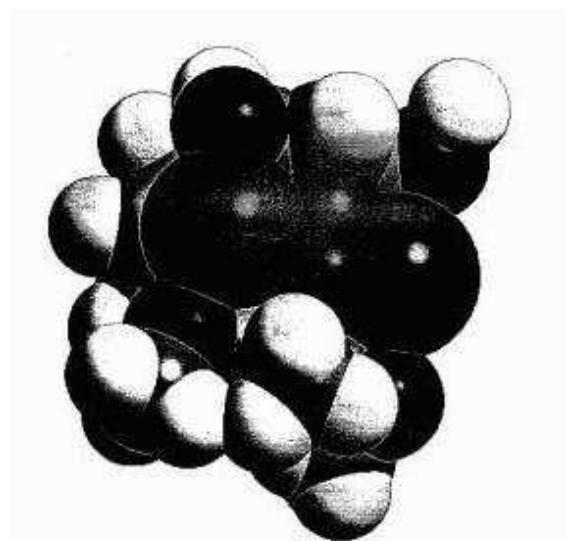
도면11



도면12



도면13



도면14

