(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월25일
(11) 등록번호 10-1971977
(24) 등록일자 2019년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 309/38 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/351 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 309/38 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0093952
(22) 출원일자 2017년07월25일
심사청구일자 2017년07월25일
(65) 공개번호 10-2019-0011853
(43) 공개일자 2019년02월08일
(56) 선행기술조사문헌
CN102070588 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
부산광역시 영도구 해양로 385(동삼동)
(72) 발명자
신희재
경기도 수원시 권선구 금호로 45 103동 1101호(금곡동,삼익1차아파트)
필감방
서울특별시 마포구 월드컵북로 221-9, 102동 603호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김범수

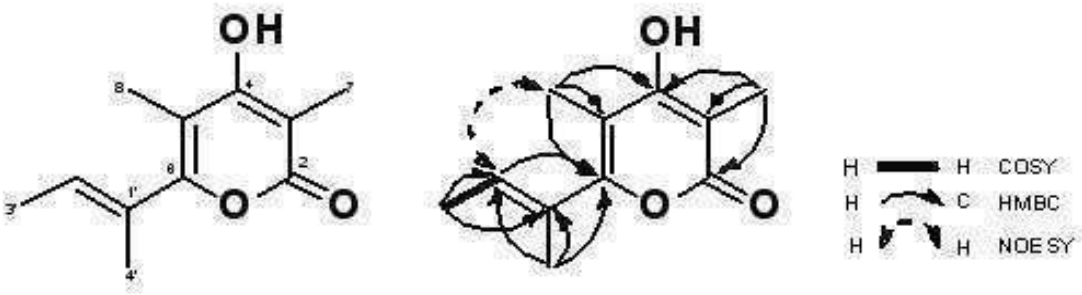
(54) 발명의 명칭 **해양미생물에 의해 생산되는 신규 화합물 및 그 화합물을 활성 성분으로 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 조성물**

(57) 요 약

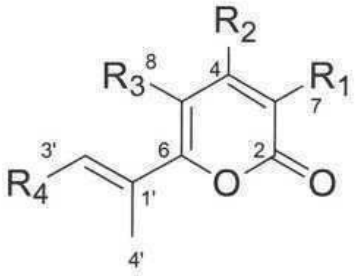
본 발명은 해양 유래 곰팡이 *Penicillium* sp.에 의해 생산되는 하기 화학식 2로 표시되는 신규 화합물 및 이 신규 화합물이 가지는 우수한 콜라겐 합성 증진 활성 및 멜라닌 생성 억제 활성을 이용한 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도6



[화학식 2]



상기 식에서

R_1 은 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.R_1은 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

R_2는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

R_3는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

R_4는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

(52) CPC특허분류
A61K 31/351 (2013.01)
A61K 8/4973 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자
이희승
서울특별시 광진구 아차산로 552 7동 1105호 (광장동,극동아파트)
이종석
경기도 안양시 동안구 귀인로 210 206동 1306호 (평촌동,현대홈타운아파트)
이연주
경기도 과천시 별양로 12 319동 1602호 (원문동, 래미안슈르아파트)
이지훈
경기도 안양시 만안구 경수대로1394번길 12 105동 701호 (석수동, 힐스테이트 석수)

(56) 선행기술조사문헌
J. Biol. Chem. 291(53):27403-27420(2016.12.30.)*
RSC Adv. 43(3):20726-20731(2013.)*
Planta. Med. 78(6):582-588(2012.04.)*
J. Agric. Food Chem. 54(6):2129-2133(2006.03.22.)*
J. Heterocyclic Chem. 15:363-366(1981.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525006512PM59880
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 국가연구개발사업
연구과제명 종합해양과학기지 구축 및 활용연구
기 여 율 1/1
주관기관 한국해양과학기술원
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PM60300
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 국가연구개발사업
연구과제명 해양자원유래 고령친화형 글로벌 기능성 식품소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국해양과학기술원
연구기간 2017.04.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

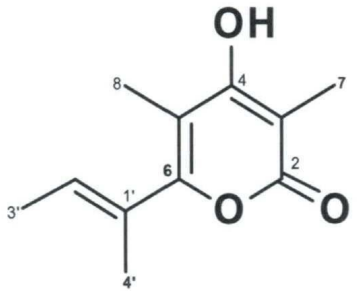
청구항 1

삭제

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 화합물;

[화학식 1]



.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 기탁번호 KCTC 13190BP로 기탁된 미생물에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 화합물.

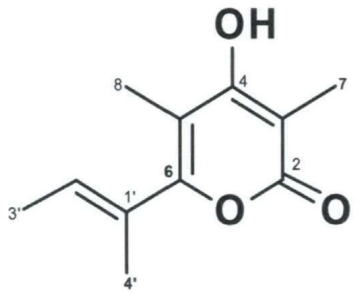
청구항 4

삭제

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선 및 피부 미백용 약학적 조성물;

[화학식 1]



.

청구항 6

삭제

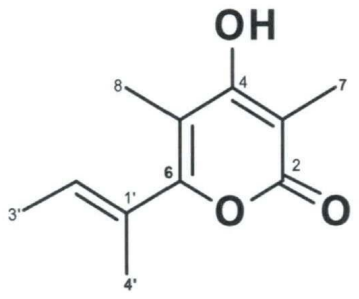
청구항 7

삭제

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선 및 피부 미백용 피부 외용제 조성물;

[화학식 1]



.

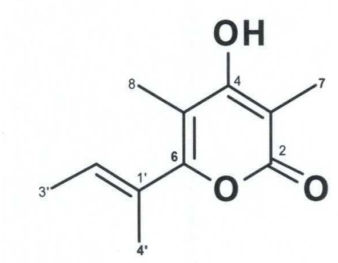
청구항 9

삭제

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 화장품 조성물.

[화학식 1]



청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

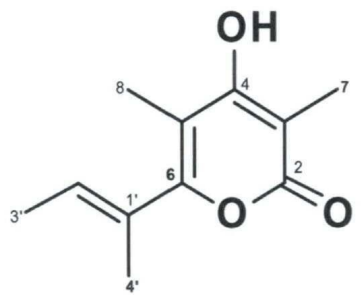
청구항 13

삭제

청구항 14

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 식품 조성물;

[화학식 1]



청구항 15

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해양미생물에 의해 생산되는 신규 화합물 및 그 화합물을 활성 성분으로 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 해양 유래 곰팡이 *Penicillium* sp.에 의해 생산되는 신규 화합물 및 이 신규 화합물이 가지는 우수한 콜라겐 합성 증진 활성 및 멜라닌 생성 억제 활성을 이용한 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로서 세포외 간질에 존재하고, 중요한 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포접착의 지탱, 세포분할과 분화(유기체의 성장 혹은 상처 치유시)의 유도 등이 있다. 이러한 콜라겐은 연령 및 자외선 조사에 의한 광 노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다. 또한, 근래에 들어 피부 노화에 대한 광범위한 연구가 발전하면서 피부에서의 콜라겐의 중요한 기능이 밝혀지고 있다.

[0003] 종래에는 콜라겐의 피부 보습 효과로부터 화장품에 콜라겐을 배합하는 제품들이 출시되어 있으나, 이들 화장품은 콜라겐을 피부 표면에 도포하는 것으로, 고분자인 콜라겐의 경피 흡수에 의한 보습작용을 기대할 수 없으므로 본질적인 피부 기능 개선이라고 말할 수 없다.

[0004] 한편, 콜라겐 합성 촉진하여 주름 개선 효과를 나타내는 유효성분들이 있는데. 예를 들어, 레티노산(retinoic acid), TGF(transforming growth factor), 동물 태반 유래의 단백[특허문헌 1], 베튤린산(betulinic acid)[특허문헌 2], 클로렐라 추출물[특허문헌 3, 4] 등이 콜라겐 합성 촉진 물질이다. 그러나 상기 유효성분들은 피부 적용 시 자극과 발적 등의 안전성의 문제로 사용량의 제한이 있거나, 효과가 미미하여 실질적으로 피부의 콜라겐 합성을 촉진하여 피부 기능을 개선하는 효과를 기대할 수 없는 문제점이 있다. 따라서, 생체에 안전하고, 유효성분이 안정하며, 무엇보다도 기존의 콜라겐 합성 촉진 물질보다 효과가 우수한 주름 개선 활성을 지닌 성분의 개발이 절실히 요망되고 있다.

[0005] 또한, 사람의 피부색은 피부내 멜라닌(melanin)의 농도와 분포에 따라 유전적으로 결정되고, 태양 자외선이나 피로, 스트레스 등의 환경적 또는 생리적 조건에 의해서도 영향을 받는다. 멜라닌은 아미노산의 일종인 티로신(tyrosine)에 티로시나제(tyrosinase)라는 효소가 작용하여 도파(DOPA), 도파퀴논(dopaquinone)으로 바뀐 후 비 효소적인 산화 반응을 거쳐 만들어진다.

[0006] 그러나 멜라닌이 만들어지는 경로는 알려져 있으나, 티로시나제가 작용하는 이전 단계인 멜라닌 합성을 유도하는 메카니즘(mechanism)이 무엇인지에 대해서는 아직도 자세히 밝혀지지 않고 있다.

[0007] 이에, 종래에는 하이드로퀴논(hydroquinone)이나 아스콜빈산(ascorbic acid), 코지산(kojic acid), 글루타치온(glutathione)과 같이 티로시나제 저해 활성을 갖는 물질을 연고나 화장료에 배합하여, 피부 미백이나 기미, 주근깨 개선의 목적에 사용하여 왔다. 하지만, 상기 방법의 경우 피부에 자극을 유발하거나 제품 안정성이 좋지 못하여 사용이 제한되고, 그로 인해 그 효과도 미약한 단점이 있어 사용이 제한되어 새로운 미백제의 개발이 절실한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 일본 특개 평8-231370호

(특허문헌 0002) 2. 일본 특개 평8-208424호

(특허문헌 0003) 3. 일본 특개 평9-40523호

(특허문헌 0004) 4. 일본 특개 평10-36283호

발명의 내용

해결하려는 과제

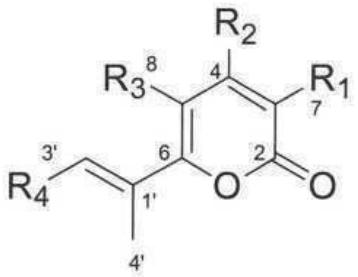
[0009] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 피부 주름 방지, 탄력 증진 및 피부 미백에 유용하게 사용할 수 있는 화합물 및 그 화합물의 제조 경로에 대하여 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여 본 발명은,

[0012] 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 및 바람직하게는 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] 상기 식에서

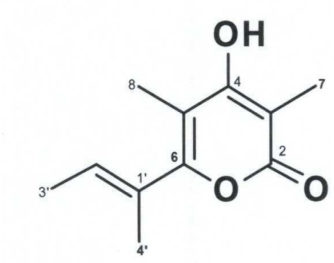
[0016] R_1은 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0017] R_2는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0018] R_3는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0019] R_4는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0021] [화학식 1]

[0022] 

[0023] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 기탁번호 KCTC 13190BP로 기탁된 미생물에 의해 제조될 수 있다.

[0025] 또한 다른 기술적 과제를 달성하기 위하여 본 발명은,

[0026] 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 약학적 조성물, 피부 외용제 조성물, 화장품 조성물 및 건강식품 조성물을 제공한다.

[0027] 상술한 바와 같은 본 발명에 따른 조성물은 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량%로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 상술한 바와 같은 본 발명에 따른 화합물은 피부의 섬유아세포의 콜라겐 합성을 촉진하여 피부의 탄력을 향상시키고 주름을 개선시키는 효과를 보이며, 또한 멜라닌 생성 억제 효과가 매우 우수하여 피부 미백 효과를 나타내며 세포독성이 없어 부작용 없이 의약품, 화장료 또는 건강식품에 사용할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 108YD020 균주의 분리한 지역에 관한 도면이다.

도 2는 108YD020 균주 배양 추출액의 ^{1}H NMR spectrum이다.

도 3은 소포체(antifoam) 테스트 결과에 대한 108YD020 균주 배양 추출액의 ^{1}H NMR spectrum이다.

도 4는 배양 추출물의 물질 분리 및 정제 과정에 관한 도면이다.

도 5는 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 ^{1}H and ^{13}C NMR data이다.

도 6은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 구조 및 COSY 및 HMBC 상관관계에 관한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하기로 한다.

[0032] 먼저, 해양 곰팡이 *Penicillium* sp. 108YD020의 분리, 동정 및 배양에 대하여 설명하기로 한다.

[0034] 108YD020 균주는 2010년 8월 동해의 왕돌초(도 1 참조)에서 채집한 해면(108YD-1)에서 분리되었다. 채집한 해면 약 1 g을 멸균된 해수 9 mℓ가 채워진 falcon tube에 넣고 5분 동안 sonification한 후 멸균 해수를 섞어 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}배로 희석하였다. AIA, HV agar, BN agar에 micro pipette으로 각각 100 ㎕을 3등분으로 접종하여 골고루 도말하고, 28 ℃ B.O.D incubator에서 14일 동안 배양하였다. 108YD020 균주(Fig. 1)는 10^{-2}의 농도, BN agar 배지에서 관찰되었다. 형성된 하얀 곰팡이 집락을 분리용 malt extract agar배지에 재차 streaking하여 순수하게 분리하였다. 순화된 곰팡이를 백금이로 긁어내어 40% glycerol stock에 넣어 -70 ℃ deep freezer에 보존하였다.

[0036] 108YD020 균주의 최적 성장 온도는 28 ℃이었고, 배양 4일째에 흰 포자와 가운데는 갈색을 띄는 형태 변화를 보였다. 액체 배양 시에는 염분 농도가 32 g/L의 인공해수에서 생육이 가장 좋았다. 균주의 동정 및 계통분류학적인 위치를 확인하기 위하여 18S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 확인한 결과 *Penicillium* sp. 로 동정 되었

으며, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2017년 1월 26일자로 기탁하였으며, 기탁번호는 KCTC 13190BP이다.

[0038] 40% glycerol stock에 보관된 균주를 -70 ℃ deep freezer에서 꺼내어 malt extract agar 배지에 무균 환경에서 접종하여 28 ℃ B.O.D incubator에서 배양하였다. 고체 배지에서 성장 속도가 우수한 균주를 선발하여 malt extract 액체 배지 50 mℓ를 함유한 100 mℓ flask에 접종하여 7일간 28 ℃, 120 rpm shaking incubator에서 소량 배양을 실시하였다. 배양액 양과 동일하게 50 mℓ의 EtOAc로 30분간 2번 추출하고, 감압 농축기를 통해 농축하여 얻은 추출물을 MeOH-d_4에 녹여 ^{1}H NMR 관찰하였다(도 2 참조). Down field에서 관찰되는 다양한 화합물의 양을 확보하고, 분리하기 위해 대량배양을 진행하였다.

[0040] 100 L fermentor에서 배지가 넘치는 것을 방지하기 위해 대량배양을 하기 전 소포제 test를 진행하였다. 도 3과 같이 4가지 조건을 각각 EA 추출 후 농축하여 NMR data를 확인하고 소포제가 균 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하여 대량배양에 사용하였다. 0.1% antifoam을 함유한 50 L malt extract 배지가 들어있는 100 L fermentor에 500 mℓ의 seed culture를 접종하여 7일간 28 ℃, sea salt 32 g/L, 40 rpm 조건 하에 2차 대량 배양을 진행하였다. 배양 4일 째에 배양액 100 mℓ를 덜어내어 EtOAc로 추출하고 ^{1}H NMR 관찰하여 균의 성장과 재현성을 확인한 후 배양 7일째에 수확하였다.

[0042] 이어서 배양액에서 화합물을 추출, 분리, 정제 과정 및 그 화합물의 구조 규명 등에 대하여 설명한다.

[0044] 7일간 배양된 배양액은 원심분리기 60,000 rpm 조건에서 배양액과 균체를 분리시켰다. 배양액과 동일한 양으로 EtOAc를 섞어 교반기를 이용하여 30분씩 2번 추출하였으며, 배양액으로부터 분리한 균체는 MeOH로 30분 동안 실온에서 추출하였다. 배양액과 균체를 완전히 추출한 후, 감압 농축기로 농축하여 추출물 얻었다.

[0046] 상기 추출물 2.70 g을 MeOH에 녹여 RP-18 silica gel column chromatography로 정제하였다. 용출용매는 MeOH와 H_2O의 혼합액을 사용하였으며, MeOH:H_2O 2:8(fraction 1), MeOH:H_2O 4:6(fraction 2), MeOH:H_2O 6:4(fraction 3), MeOH:H_2O 8:2(fraction 4), MeOH(fraction 5), wash(fraction 6)의 순으로 step gradient로 하였다. 각 분획물을 감압하에 농축하여 fraction 1(1.56 g), franction 2(197.1 mg), fraction 3(267.5 mg), fraction 4(201.5 mg), fraction 5(82.7 mg), fraction 6(20.6 mg) 확보였다. Fraction 3을 mobile phase 50% MeOH로 RP-18 HPLC를 이용하여 신규 물질을 순수하게 분리하였다. 배양액 추출물의 물질 분리 및 정제 과정은 다음 scheme은 도 4와 같다.

[0048] 상기 배양액 추출물을 C_{18} 역상 고속 감압 크로마토그래피로 정제하여 얻어진 60% MeOH (287.5 mg) 분획물을 MeOH에 녹인 뒤 역상 HPLC (C_{18} reversed-phase HPLC, column: YMC-Pack ODS-A 입자직경 5 ㎛, 250 ㎚ 10 mm (길이 ㎚ 내경), 이동상: 50% MeOH, 용출속도 1.5 mℓ/min, RI detector)로 분리하여 t_R=69 min에서 화학식 1로 표시되는 화합물을 7.1 mg을 얻었다.

[0050] 화학식 1로 표시되는 화합물은 갈색의 무정형 고체로, HR-ESI-MS *m/z* 193.0866 (calcd. *m/z* 193.0865 $[M-H]^-$)와 불포화도 5.5, ^{13}C NMR data를 통해 분자식은 $C_{11}H_{14}O_3$로 확립하였다. IR spectrum에서 1664 cm^{-1}(C=C), 2944 cm^{-1}(sp^3 C-H)로 functional group들을 확인하였고, UV 215 nm, 297 nm에서 log ε(4.66), (4.15)의 최대 흡광도 값을 갖는 것을 확인하였다. gHSQC 실험을 통해 4개의 methyl group, 1개의 olefinic group을 확인하였다.

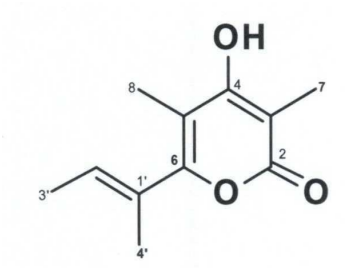
[0052] ^{1}H NMR (도 5 참조)에서 1개의 olefinic proton H-2'(δ_H 5.78)와 4개의 methyl proton [H-7(δ_H 1.91), H-8(δ_H 1.97), H-3'(δ_H 1.80), H-4'(δ_H 1.88)]의 존재를 알 수 있었다. ^{13}C NMR (Table 13)에서 5개의 olefinic carbon [C-3(δ_C 99.2), C-5(δ_C 109.6), C-6(δ_C 160.2), C-1'(δ_C 130.1), C-2'(δ_C 132.1)], 4개의 methyl carbon [C-7(δ_C 9.1), C-8(δ_C 12.0), C-3'(δ_C 13.9), C-4'(δ_C 14.7)], 1개의 oxygenated sp^2 quaternary carbon C-2(δ_C 168.5), 1개의 carboxyl carbon C-4(δ_C 170.0)의 존재를 알 수 있었다.

[0054] gCOSY를 통하여, H-2'(δ_H 5.78)와 H-3'(δ_H 1.80)이 공간상으로 서로 인접해 있음을 알 수 있었고, NOESY 스펙트럼에서 H-8(δ_H 1.97)과 H-2'(δ_H 5.78)의 correlation을 통해 3차원 구조상 proton이 서로 인접해 있음을 확인할 수 있었다(도 6 참조). gHMBC에서 H-7(δ_H 1.91)와 C-2(δ_C 168.5), C-3(δ_C 99.2), C-4(δ_C 170.0)의

correlation과 H-8(δ_H 1.97)와 C-4(δ_C 170.0), C-5(δ_C 109.6), C-6(δ_C 160.2)의 correlation을 통해 pyran ring을 이루고 있는 carbon들의 위치를 알 수 있었고, C-6(δ_C 160.2)와 H-2(δ_H 5.78), H-4'(δ_H 1.88)의 correlation을 통해 pyran ring에 side chain이 연결되는 것을 확인할 수 있었으며, 화학식 1로 표시되는 화합물의 구조를 결정할 수 있었다(도 6 참조).

[0056] 화학식 1로 표시되는 화합물은 demethyl nectriapyrone A의 구조에서 C-3와 C-5에 methyl group이 도입되고, C-4에 methoxyl group 대신 hydroxyl group이 도입된 구조임을 알 수 있었다. 문헌을 검색하여 본 결과 화학식 1로 표시되는 화합물의 구조는 지금까지 자연계에서 분리된 적이 없었으며, *Penicillium* sp.에서 분리된 적이 없는 신규물질로 확인되었으며 그 구조식은 다음과 같다.

[0057] [화학식 1]

[0058] 

[0060] 상술한 바와 같은 기탁번호 KCTC 13190BP로 기탁된 미생물에 의해 수득되는 화학식 1로 표시되는 화합물에서 여러 위치에 치환기를 결합시켜 화학식 1로 표시되는 화합물과 동등한 정도의 효과를 가지는 화합물에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 화학식 2의 화합물로 정의될 수 있으며, 따라서 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 화학식 2로 표시되는 화합물을 신규 물질로 제공하며 그 용도에 대해서는 새롭게 규명한 것이다.

[0062] [화학식 2]

[0063]

[0064] 상기 식에서

[0065] R_1은 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0066] R_2는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0067] R_3는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0068] R_4는 H, OH, COOH, 탄소수 1 내 6의 알킬 및 탄소수 1 내지 6의 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0070] 다음으로 시험예를 통하여 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물의 항주름 및 피부 미백 활성에 대하여 설명하기로 한다.

[0072] **<시험예 1: 항주름 활성으로 콜라겐 합성 증가 테스트>**

[0073] 화학식 2로 표시되는 화합물 중에서 표 1에서 같은 본 발명에 따른 화합물을 인간 유래 섬유아세포의 배양액에

첨가하여 세포수준에서 콜라겐 합성 촉진 효과를 실험하였다.

표 1

[0074]

	R_1	R_2	R_3	R_4
화합물 1	H	OH	H	H
화합물 2	CH_3	OH	CH_3	CH_3
화합물 3	CH_2CH_3	OH	CH_2CH_3	CH_2CH_3
화합물 4	H	OH	COOH	H
화합물 5	CH_3	H	CH_3	CH_3
화합물 6	H	OH	H	CH_2OH
화합물 7	H	OH	H	$CHCH_3CHCH_3$
화합물 8	H	OH	H	$CHCH_3CHCH_2CH_3$
화합물 9	CH_2CH_3	CH_3	COOH	CH_2OH
화합물 10	CH_2CH_3	CH_3	CH_2CH_3	CH_2CH_3

[0076] 합성된 콜라겐의 측정은 PICP EIA kit(Procollagen Type I C-Peptide Enzyme ImmunoAssay KIT)를 이용하여 정량하였다.

[0077] 실험 전 인간 유래 섬유아세포를 대상으로 실험물질의 농도 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm, 0.01 ppm 및 0.001 ppm에서 MTT 시험을 통해 세포독성을 평가하였다. MTT 시험은 Mossman T.(1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth & survival: application to proliferation & cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods vol.65, pp.55-63에 개시된 방법을 사용하였다.

[0078] 상기 세포독성 결과 세포독성이 없는 농도를 선정하여 콜라겐 합성능을 평가하였다.

[0079] 실험에서 본 발명의 화합물의 최종 농도는 20ppm으로 하였으며, 각각의 시료는 인간 섬유아세포의 배양 배지에 첨가하여 1일간 배양한 후, 배양액을 취하여 PICP EIA 키트로 각 농도에서의 콜라겐 합성 정도를 분광광도계를 이용하여 450nm에서 측정하였다. 효과의 비교를 위하여 아무것도 첨가하지 않은 섬유아세포의 배양 배지(대조군)와 비타민 C를 최종 농도 20ppm가 되도록 첨가한 시료에 대하여 동일한 방법으로 콜라겐합성 정도를 측정하였다. 콜라겐 생성량은 UV 흡광도로서 측정하였으며, 콜라겐 생성 증가율은 대조군에 대한상대적인 콜라겐 생성량 비율로 계산하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0080]

시료	흡광도 평균값	콜라겐 증가율(%)
대조군	189	
화합물 1	287.65	152.2
화합물 2	287.24	147.2
화합물 3	287.24	147.2
화합물 4	287.61	152.1
화합물 5	287.65	152.2
화합물 6	287.61	152.1
화합물 7	287.24	147.2
화합물 8	287.65	152.2
화합물 9	287.61	152.1
화합물 10	287.24	147.2
비타민 C	217.35	115.3

[0081] 상기 표 2에서 보는 바와 같이 본 발명에 따른 화합물은 비타민 C 보다 월등히 우수한 콜라겐 증가율을 보여 화장품 원료로 사용하는 경우에 우수한 주름 방지 효과를 보일 것으로 판단이 된다.

[0083] **<시험예 2 미백 활성으로서 멜라닌 생성 억제 테스트>**

[0084] 상기 표 1의 화합물 최종농도가 2ppm, 20ppm이 되도록 하여 각각 B-16멜라노마 세포의 배양배지에 첨가하여 3일간 배양하였다. 이후, 세포들을 트립신(trypsin) 처리하여 배양용기로부터 떼어내 원심분리한 후 멜라닌을 추출하였다. 이것에 수산화 나트륨 용액(1N농도) 1ml를 가하여 10분간 끓여 멜라닌을 녹이고 분광 광도계를 이용하여, 400나노미터(nm)에서 흡광도를 측정하여 생성된 멜라닌의 양을 측정하였다. 상기 멜라닌 양은 단위 세포수당(10^6cell)의 흡광도로 나타내는 방법으로 측정하였으며, 아무것도 첨가하지 않은 대조군에 대한 상대적인 멜라닌 생성량을 저해율(%)로 계산하고 결과를 표 3에 정리하였다. 또한, 시험은 3번 반복하였다.

[0085] 또한 본 발명에 따른 본 발명에 따른 화합물의 멜라닌 억제능을 비교하여 위하여 알부틴(arbutin) 20ppm도 동일한 방법으로 시험하여 그 결과도 표 3에 나타냈다.

표 3

[0086]

시료	멜라닌생성량	저해율(%)
대조군(무첨가)	0.060±0.002	
알부틴(최종농도20ppm)	0.056±0.001	6.5%
화합물 1(최종농도20ppm)	0.046±0.001	23.5%
화합물 1 (최종농도2ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 2(최종농도20ppm)	0.046±0.001	23.5%
화합물 2(최종농도2ppm)	0.048±0.001	20.0%
화합물 3(최종농도20ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 3(최종농도2ppm)	0.048±0.001	20.0%
화합물 4(최종농도20ppm)	0.046±0.001	23.5%
화합물 4(최종농도2ppm)	0.048±0.001	20.0%
화합물 5(최종농도20ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 5(최종농도2ppm)	0.049±0.001	18.3%
화합물 6(최종농도20ppm)	0.046±0.001	23.5%
화합물 6(최종농도2ppm)	0.048±0.001	18.3%
화합물 7(최종농도20ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 7(최종농도2ppm)	0.049±0.001	18.3%
화합물 8(최종농도20ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 8(최종농도2ppm)	0.049±0.001	18.3%
화합물 9(최종농도20ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 9(최종농도2ppm)	0.049±0.001	18.3%
화합물 10(최종농도20ppm)	0.047±0.001	21.8%
화합물 10(최종농도2ppm)	0.049±0.001	18.3%

[0087] 상기 표 3에서 보는 바와 같은 본 발명에 따른 화합물은 알부틴보다 월등히 우수한 멜라닌 생성 억제 효과를 보이는 것을 확인할 수 있어 화장품의 원료로 사용하였을 때 우수한 미백 효능을 보일 것으로 판단이 된다.

[0089] 상술한 바와 같은 본 발명에 따른 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물은 우수한 콜라겐 합성 촉진 효과 및 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내므로, 피부 주름 개선, 탄력 증진, 피부 미백을 위한 의약품, 화장료, 건강식품 등의 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0090] 따라서, 본 발명은 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 활성 성분으로 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 약학적 조성물을 제공한다.

[0091] 본 발명의 피부 주름 개선 및 탄력 증진용 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다.

[0092] 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 유기산 또는 무기산을 이용하여 형성된 산 부가염일수 있으며, 상기 유기산은, 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산, 벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 디클로로아세트산, 아미노옥시 아세트산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 및 메탄술폰산계 염을 포함하며 무기산은 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 및 붕산계 염을 포함한다. 바람직하게는 염산염 또는 아세트산염 형태일 수 있으며, 보다 바람직하게는 염산염 형태일 수 있다.

[0093] 상기 언급된 산 부가염은 a) 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물 및 산을 직접 혼합하거나, b) 이들 중 한 가지를 용매 또는 함수 용매 중에 용해시키고 혼합시키거나, 또는 c) 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 용매 또는 수하 용매 중의 산에 위치시키고 이들을 혼합하는 일반적인 염 제조방법으로 제조된다.

[0094] 위와는 별도로 추가적으로 염이 가능한 형태는 가바염, 가바펜틴염, 프레가발린염, 니코틴산염, 아디페이트염, 헤미말론산염, 시스테인염, 아세틸시스테인염, 메티오닌염, 아르기닌염, 라이신염, 오르니틴염, 아스파르트산염 등이 있다.

[0095] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 전체 약학적 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. 보다 구체적으로 0.001 중량% 내지 1 중량%로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물이 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 0.0001 중량% 미만으로 포함할 경우에는 충분한 주름 개선, 탄력 증진 및 미백 효과를 기대할 수 없고, 10 중량%를 초과하여 포함할 경우에는 조성물 제형의 안정성에 문제가 있을 수 있으므로 이를 방지하기 위한 것이다.

[0096] 또한, 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 예컨대, 공지의 피부 주름 개선 성분 또는 탄력 증진 성분을 포함할 수 있을 것이다. 추가적인 피부 주름 개선 성분, 탄력 증진 성분 미백 성분을 포함하게 되면 본 발명의 조성물의 주름 개선, 탄력 증진 효과는 더욱 증진될 수 있을 것이다. 상기 성분 추가 시에는 복합 사용에 따른 피부안전성, 제형화의 용이성, 유효성분들의 안정성을 고려할 수 있다. 상기 조성물은 당업계에 공지된 주름 개선 성분으로서, 레티노산, TGF, 동물 태반 유래의 단백질, 베틀린산 및 클로렐라 추출물로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 피부 주름 개선 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0097] 또한, 본 발명의 피부 주름 개선 및 탄력 증진용 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0098] 약학적으로 허용되는 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충 식염수, 수크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.

[0099] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 일반 의약품 제제의 형태, 예를 들어, 임상 투여 시 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0100] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.

[0101] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0102] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0104] 본 발명은 또한 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 미백용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[0105] 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 피부 외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 피부용 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0106] 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물이 피부 외용제 제형으로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제와 같은 제형을 가질 수 있다.

[0107] 본 발명의 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 피부 외용제에 포함되는 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물은 전체 중량 대비 0.0001 내지 10 중량%로 포함될 수 있는데, 0.0001 중량% 미만으로 포함할 경우에는 충분한 주름 개선, 탄력 증진, 및 피부 미백 효과를 기대할 수 없고, 10 중량%를 초과하여 포함할 경우에는 조성물 화학적 안정성 등에 문제가 있을 수 있으므로 이를 방지하기 위한 것이다.

[0109] 본 발명은 또한 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0110] 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 화장품으로 사용하는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하여 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 예컨대, 유연화장수 또는 영양 화장수 등과 같은 화장수, 훼이셜 로션, 바디로션 등과 같은 유액, 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등과 같은 크림, 에센스, 화장연고, 스프레이, 젤, 팩, 선 스크린, 메이크업 베이스, 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션, 파우더, 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 오일과 같은 메이크업 제거제, 클렌징 폼, 비누, 바디 워쉬 등과 같은 세정제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0111] 또한, 상기 화장료 조성물은 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물에 추가로 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 또는 향료 등의 보조제 및 담체를 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 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 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0112] 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물은 화장품으로 제품화되는 경우에 유효성분이 단기간 내에 피부에 머무르게 되는 메이크업 제거제, 세정제 등과 같은 워쉬-오프(wash-off) 타입의 화장품의 경우에는 비교적 높은 농도로 포함될 수 있을 것이다. 반면, 유효성분이 장기간 동안 피부에 머무르게 되는 화장수, 유액, 크림, 에센스 등의 리브-온(leave-on) 타입의 화장품의 경우에는 워쉬-오프 타입의 화장품에 비해 낮은 농도로 포함되도 무방할 것이다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 한 구체예에서, 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%포함할 수 있다.

[0114] 본 발명은 또한 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백용 건강식품에 관한 것이다.

[0115] 본 명세서에서 '건강식품'이란, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과가 있는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

[0116] 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 피부 주름 개선, 탄력 증진 및 피부 미백 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.

[0117] 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 0.0001 내지 10 중량%로 첨가된다. 보다 구체적으로, 0.001 내지 1 중량%로 첨가될 수 있다.

[0118] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0119] 본 발명의 건강음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토오스, 수크로스와 같은 이당류; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 다당류; 또는 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있

다.

[0120] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0121] 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

수탁번호

[0122]

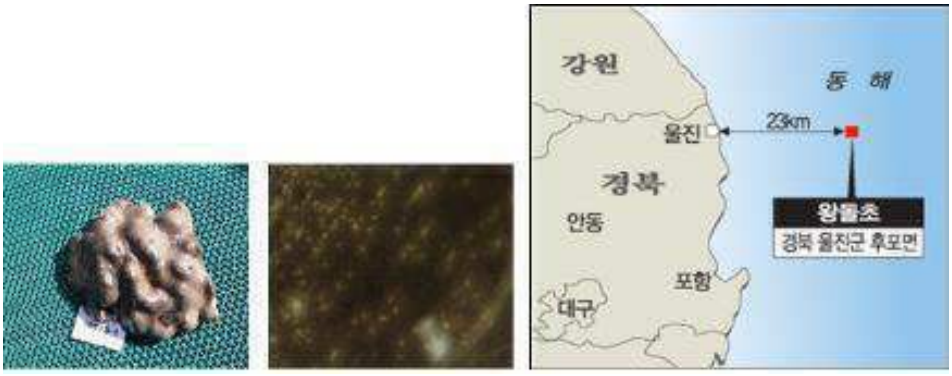
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13190BP

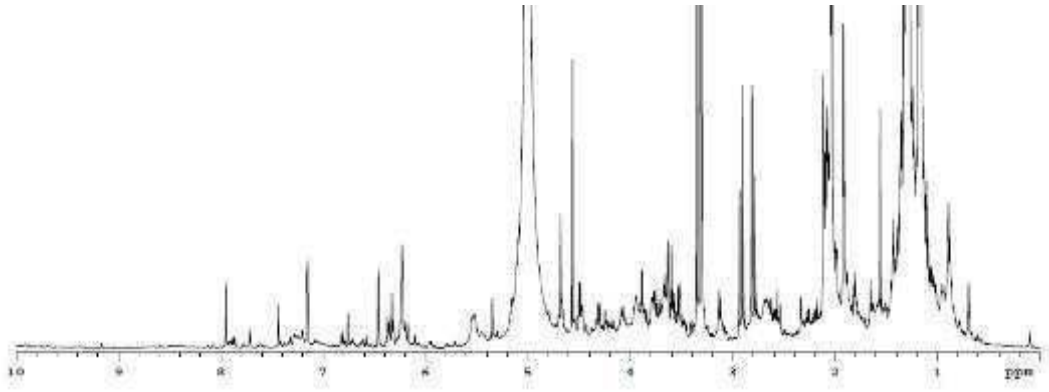
수탁일자 : 20170126

도면

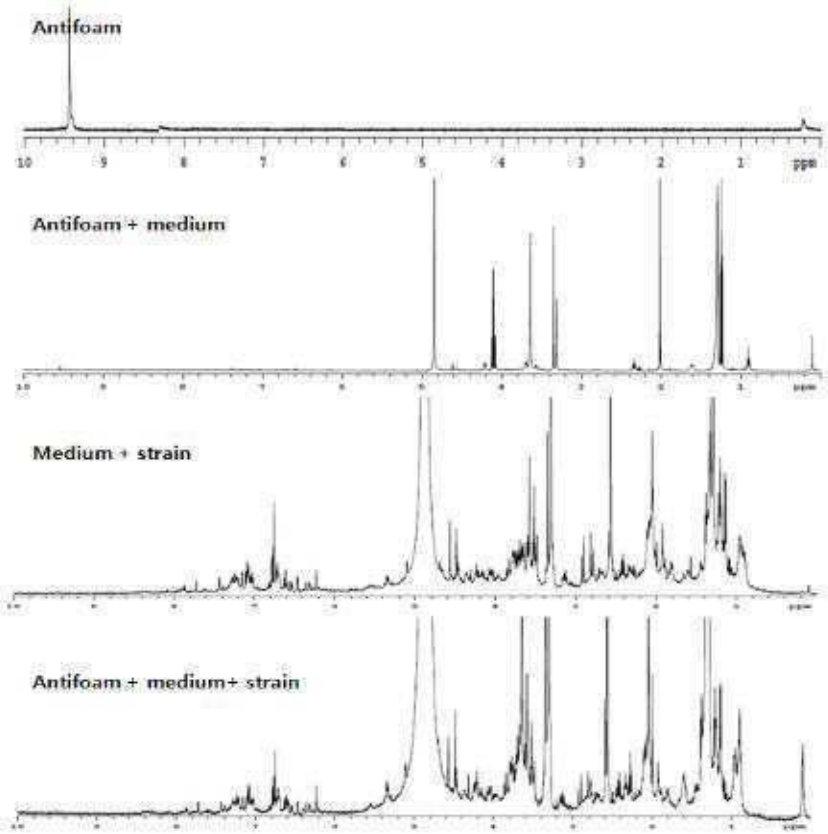
도면1



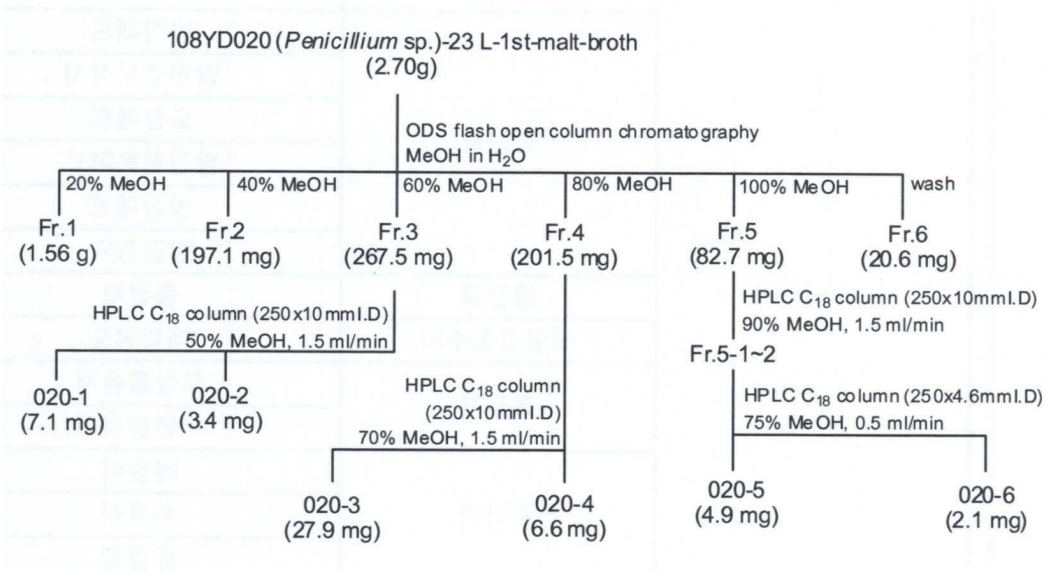
도면2



도면3


Antifoam
Antifoam + medium
Medium + strain
Antifoam + medium+ strain

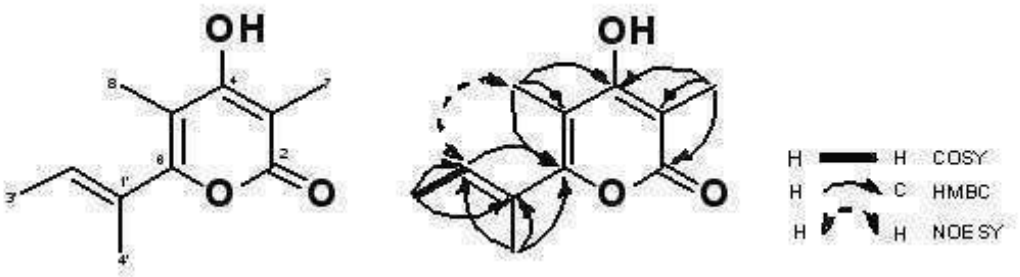
도면4


108YD020 (Penicillium sp.)-23 L-1st-malt-broth
(2.70g)
ODS flash open column chromatography
MeOH in H2O
20% MeOH
40% MeOH
60% MeOH
80% MeOH
100% MeOH
wash
Fr.1
(1.56 g)
Fr.2
(197.1 mg)
Fr.3
(267.5 mg)
Fr.4
(201.5 mg)
Fr.5
(82.7 mg)
Fr.6
(20.6 mg)
HPLC C18 column (250x10mmI.D)
50% MeOH, 1.5 ml/min
020-1
(7.1 mg)
020-2
(3.4 mg)
HPLC C18 column
(250x10mmI.D)
70% MeOH, 1.5 ml/min
020-3
(27.9 mg)
020-4
(6.6 mg)
HPLC C18 column (250x10mmI.D)
90% MeOH, 1.5 ml/min
Fr.5-1~2
HPLC C18 column (250x4.6mmI.D)
75% MeOH, 0.5 ml/min
020-5
(4.9 mg)
020-6
(2.1 mg)

도면5

^{1}H and ^{13}C NMR data[a] of 020-2

NO.	δ_C, Type	δ_H, mult. (J in Hz)	COSY	HMBC
1				
2	168.5, qC			
3	99.2, qC			
4	170.0, qC			
5	109.6, qC			
6	160.2, qC			
7	9.1, CH_3	1.91, s		2, 3, 4
8	12.0, CH_3	1.97, s		4, 5, 6
1'	130.1, qC			
2'	132.1, CH	5.78, q (7)		6
3'	13.9, CH_3	1.80, d (7)	4'	1', 2'
4'	14.7, CH_3	1.88, s		6, 1', 2'

[a] ^{1}H and ^{13}C NMR data were measured at 500 and 125 MHz, respectively.

도면6