



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0008364
(43) 공개일자 2014년01월21일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/05</i> (2006.01) <i>A61K 31/045</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/60</i> (2006.01) <i>A61P 17/00</i> (2006.01)
 <i>A61P 29/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7022953</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년02월02일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년08월29일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2012/023686</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/106551
 국제공개일자 2012년08월09일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/438,890 2011년02월02일 미국(US)
 PCT/US2011/026594 2011년03월01일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 유니젠, 인크.
 미국 98121 워싱턴 시애틀 퍼스트 애비뉴 3005</p> <p>(72) 발명자
 홍 메이 펙
 미국 98503 워싱턴 레이시 세빌 레인 에스이 4740
 지아 쿼
 미국 98502 워싱턴 올림피아 페넌트 코트 엔더블
 유 3922
 브라우넬 리디아 알파로
 미국 98405 워싱턴 타코마 사우스 베르데 1224</p> <p>(74) 대리인
 최규팔</p> |
|---|---|

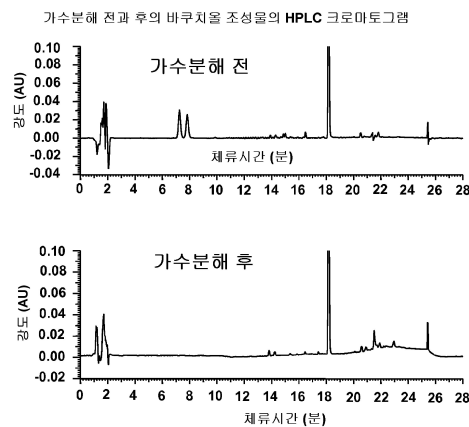
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 **염증후 색소과다침착의 치료를 위한 바쿠치올 조성물**

(57) 요약

본 발명은 염증후 색소과다침착(PIH)의 치료를 포함한다, 과도한 색소침착의 치료방법에 관한 것이다. 본 방법은 실질적으로 푸라노쿠마린이 없는 바쿠치올을 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 또한, 본 발명은 바쿠치올을 포함하는 조성물과 그의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

바쿠치올, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체 및 500 ppm 미만의 모든 퓨라노쿠마린 불순물을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 피부장애에서 유발된 상태로 인한 과도한 색소침착을 예방, 완화, 경감 또는 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상태가 염증후 색소과다침착인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물이 100 ppm 미만의 모든 퓨라노쿠마린 불순물을 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 코지산 컨트롤에 대하여 티로시나제 저해 활성을 나타내지 않는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 퓨라노쿠마린 불순물이 솔라렌, 이소솔라렌 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 염증후 색소과다침착(PIH)이 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상경피증, 기계적 트라우마, 이온화 또는 비이온화 방사선, 화상, 레이저 또는 약물 요법, 피부 감염 또는 이들의 조합에서 유발된 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 염증후 색소과다침착(PIH)이 여드름에서 유발된 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 총 중량으로 0.001% 내지 99.9%의 바쿠치올 및 약학적, 피부학적 또는 화장품으로 허용가능한 담체를 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 국소적으로 에어로졸, 좌약에 의해, 피내, 근육내 또는 정맥내로 투여된 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 국소 투여용으로 배합된 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 총 중량으로 약 0.1% 내지 약 2.0%의 바쿠치올을 포함하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 총 중량으로 약 0.5%의 바쿠치올을 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 예방하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 완화하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 경감하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 치료하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착이 피부 심층에서 발생하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 과도한 색소침착이 피부의 유두진피층(papillary dermis layer)에서 발생하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 슈퍼옥사이드 음이온 감소를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌합성 감소를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌세포 증식의 감소를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌세포 아포토시스 (apoptosis) 예방을 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 및 약학적으로 허용가능한 담체 및 500 ppm 미만의 모든 퓨라노 쿠마린 불순물을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 멜라닌합성 감소, 멜라닌 세포 증식 감소 또는 멜라닌세포 아포토시스를 예방하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 슈퍼옥사이드 음이온 감소를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 조성물이 100 ppm 미만의 모든 퓨라노쿠마린 불순물을 포함하는 방법.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 코지산 컨트롤에 대하여 티로시나제 저해 활성을 나

타내지 않는 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 있어서, 바쿠치올이 화학적으로 합성되거나 단리된 방법.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, 퓨라노쿠마린 불순물이 솔라렌, 이소솔라렌 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌합성, 멜라닌세포 증식 또는 멜라닌세포 아포토시스가 염증후 색소과다침착(PIH)의 결과인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 염증후 색소과다침착(PIH)이 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상경피증, 기계적 트라우마, 이온화 또는 비이온화 방사선, 화상, 레이저 또는 약물 요법, 피부 감염 또는 이들의 조합에서 유발된 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 염증후 색소과다침착(PIH)이 여드름에서 유발된 방법.

청구항 33

제24항 내지 제32항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 총 중량으로 0.001% 내지 99.9%의 바쿠치올 및 약학적, 피부학적 또는 화장품으로 허용가능한 담체를 포함하는 방법.

청구항 34

제24항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 국소 투여용으로 배합된 방법.

청구항 35

제24항 내지 제34항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 총 중량으로 0.1% 내지 2.0%의 바쿠치올을 포함하는 방법.

청구항 36

제24항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 총 중량으로 약 0.5%의 바쿠치올을 포함하는 방법.

청구항 37

제24항 내지 제36항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 예방하는 방법.

청구항 38

제24항 내지 제37항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 완화하는 방법.

청구항 39

제24항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 경감하는 방법.

청구항 40

제24항 내지 제39항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착을 치료하는 방법.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착이 피부 심층에서 발생하는 방법.

청구항 42

제24항 내지 제41항 중 어느 하나의 항에 있어서, 과도한 색소침착이 피부의 유두진피층에서 발생하는 방법.

청구항 43

제24항 내지 제42항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌합성을 감소시키는 방법.

청구항 44

제24항 내지 제43항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌세포 증식을 감소시키는 방법.

청구항 45

제24항 내지 제44항 중 어느 하나의 항에 있어서, 멜라닌세포 아포토시스를 예방하는 방법.

청구항 46

제24항 내지 제45항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 추가로 포함하는 방법.

청구항 47

바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 및 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 또는 비염증성 병소(lesion)를 치료하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 병소가 염증성 여드름 병소를 포함하는 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 염증성 및 비염증성 병소를 치료하는 방법.

청구항 50

바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 및 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 국소 투여용으로 배합된 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2011년 3월 1일자로 출원된 PCT 특허출원 제PCT/US2011/026594호와 2011년 2월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/438,890호에 대하여 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 청구한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 바쿠치올(bakuchiol) 조성물과 염증후 색소과다침착(hyperpigmentation)의 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 관련 기술의 설명

[0006] 염증후 색소과다침착(post inflammatory hyperpigmentation, PIH)은 증가된 멜라닌 합성 및 침착과 관련된 독

특한 피부 색소침착 상태이다. PIH는 또한 산화성 스트레스로 인한 멜라노사이트 세포의 아포토시스(apoptosis)와 염증 및 면역반응의 매개체와 사이토카인(cytokine)의 공격을 특징으로 한다. 멜라닌 침착(즉, 색소과다침착)은 상피 단계를 넘어서 발생하며, 상당한 멜라닌이 유두진피(papillary dermis)로 방출되어 거대 면역세포에 의해 포집된다. 이러한 PIH의 독특한 조직학적 특징들이 PIH를 전통적인 약제들로 치료하는데 많은 어려움이 따르게 한다.

[0007] 통상적인 PIH 치료는 코르티코스테로이드로 염증을 제어하고 광방어제를 사용하여 추가적인 색소 발달을 방지하는데 집중되어 있다. 또한, 살리실산과 글리콜산 같은 화학적 필링(peeling) 화합물을 사용하여 피부재생작용을 촉진하고 색소침착을 제거하거나 약화시킨다. 국소 레티노이드도 PIH를 치료하는데 사용되고 있으나, 이 방법은 유의한 효과가 나타날 때까지 최대 40주가 필요하다.

[0008] 티로시나제 저해제, 또는 피부미백제, 예컨대 하이드로퀴논, 아젤라산, 코지산(kojic acid) 및 감초 추출물 또한 PIH의 치료에 사용되고 있다. 전통적인 피부미백제 또는 티로시나제 저해제를 사용하는데 있어서 주목할 만한 한 가지 단점은 PIH 부위 근처 정상 피부의 비특이적 탈색이다. 이러한 효과는 바탕 피부의 색깔을 감소시켜서 PIH 부위를 더 두드러지게 한다. 따라서, 이러한 약제들은 PIH 부위에 매우 주의 깊게 적용해야만 한다. 또한, 티로시나제 저해제는 단지 상피 색소과다침착에 대해서 효과적일 뿐으로, 왜냐하면 이것이 티로시나제에 의한 멜라닌 합성 위치이기 때문이다. 염증후 색소침착은 피부 심층(예를 들어, 유두진피) 내에 있기 때문에 검은 흔적의 시각적 변화가 나타나기 이전 하이드로퀴논 약물의 지속적 도포가 6개월 이상 소요된다. 마지막으로, 하이드로퀴논형 피부미백제 또는 티로시나제 저해제는 피부 자극, 건조, 최기형성(teratogenicity) 및 백반증(vitiligo) 및 피부암 유발과 같은 부작용과 연관되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 염증후 색소과다침착은 내인성 염증 피부장애, 예컨대 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상경피증에서 유발될 수 있다. PIH의 다른 원인은 기계적 트라우마, 이온화 및 비이온화 방사선, 화상, 레이저 요법 및 피부 감염 같은 외인성 염증 자극을 포함한다. 상기한 피부장애들에 대한 현재 치료제는 PIH를 예방, 완화, 경감 또는 치료하는데 비효과적이다. 예를 들어, 상기한 피부장애들은 대개 항염증제, 예컨대 레티노이드, COX 저해제(예: 살리실산), 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 항미생물제 또는 호르몬제로 치료하지만, 이러한 치료는 PIH에 대해 비효과적인 것으로 입증되었다.

[0010] 당분야에서 의미있는 진전이 있기는 하지만, 과도한 색소침착을 예방, 완화, 경감 또는 치료하는 방법이 여전히 필요하다. 예를 들어, 염증후 색소과다침착의 치료방법이 필요하다. 본 발명은 이러한 요구들을 충족하고 추가의 관련 이점을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 일반적 측면에서, 본 발명은 과도한 색소침착을 예방, 완화, 경감 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 과도한 색소침착은 염증성 피부상태에서 유발된 상태의 결과일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 구체예는 염증후 색소과다침착(PIH)의 예방, 완화, 경감 또는 치료 방법이다. 이러한 PIH는 여드름과 같은 다양한 피부장애에서 유발될 수 있다. 본 방법은 바쿠치올과 500 ppm 미만의 모든 푸라노쿠마린(furanocoumarin) 불순물을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다.

[0012] 다른 피부미백제와는 달리, 본 발명의 바쿠치올 조성물은 티로시나제 저해제가 아니다. 그러므로, 본 조성물은 특별히 PIH 부위를 탈색하고 피부 심층(예를 들어, 유두진피)에서 색소과다침착을 치료하는데 유용하다. 따라서, 본 발명의 방법은 색소과다침착 및/또는 PIH의 치료에서 이전 방법보다 이점을 갖는다.

[0013] 따라서, 본 발명의 일 구체예는 염증성 피부장애에서 유발된 상태로 인한 과도한 색소침착을 예방, 완화, 경감 또는 치료하는 방법에 관한 것으로, 본 방법은 바쿠치올, 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체 및 500 ppm 미만의 모든 푸라노쿠마린 불순물을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다.

[0014] 일부 구체예에서, 상태는 염증후 색소과다침착이다. 다른 구체예에서, 조성물은 100 ppm 미만의 모든 푸라노쿠마린 불순물을 포함한다. 다른 구체예에서, 푸라노쿠마린 불순물은 소랄렌(psoralen), 이소소랄렌 또는 이들의 조합물을 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 코지산 컨트롤에 대하여 티로시나제 저해활성을 나타내지 않는

다.

- [0015] 또다른 구체예에서, 바쿠치올은 화학적으로 합성되거나 식물에서 단리된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 바쿠치올은 식물에서 단리된다. 또다른 일부 구체예에서, 이 식물은 서레일리아 속(*Psoralea* genus) 식물, 예를 들어 서레일리아 코릴리폴리아(*Psoralea corylifolia* L.; 콩과(Luguminosae)) 또는 서레일리아 글랜둘로사(*Psoralea glandulosa* L.; 콩과(Papilionaceae))이다.
- [0016] 다른 구체예에서, 바쿠치올은 종자(seeds), 줄기(stems), 껍질(barks), 잔가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리(roots), 뿌리 껍질(roots barks), 어린 순(young shoots), 뿌리줄기(rhizomes), 꽃 또는 다른 생식기관, 잎 또는 다른 지상부(aerial parts), 또는 이들의 조합물로부터 단리된다.
- [0017] 일부 다른 구체예에서, 염증후 색소과다침착(PIH)은 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상경피증, 기계적 트라우마, 이온화 및 비이온화 방사선, 화상, 레이저 또는 약물 요법, 피부 감염 또는 이들의 조합에서 유도된다. 예를 들어, 특정 측면에서 염증후 색소과다침착(PIH)은 여드름에서 유도된다.
- [0018] 다른 구체예에서, 조성물은 총 중량으로 0.001% 내지 99.9%의 바쿠치올 및 약학적, 피부학적 또는 화장품으로 허용가능한 담체를 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서 조성물은 총 중량으로 0.1% 내지 2.0%의 바쿠치올, 총 중량으로 1.0%의 바쿠치올 또는 0.5%의 바쿠치올을 포함한다.
- [0019] 다른 구체예에서, 피부학적으로 허용가능한 담체는 비점착성 거즈, 붕대, 면봉, 클로쓰 와이프(cloth wipe), 패치, 마스크 또는 프로텍터를 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 화장품으로 허용가능한 담체는 클렌저 또는 소독제를 포함한다.
- [0020] 일부 측면에서, 조성물은 국소 투여용으로 배합된다. 예를 들어, 일부 측면에서 조성물은 또한 크림, 로션, 연고, 젤, 에멀전, 액체, 페이스트, 비누, 분말 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0021] 다른 구체예에서, 조성물은 보조제, 피부침투증강제 또는 리포솜을 추가로 포함한다. 또다른 구체예에서, 보조제는 α -하이드록시산, 살리실산, 리놀레산, 레티노이드, 벤조일 퍼옥사이드, 소듐 설파세타미드, 클린다마이신(clindamycin), 에리트로마이신, 댁손(dapsone), 테트라사이클린, 독시사이클린(doxycycline), 미노사이클린, 아연, 에스트로겐 또는 그의 유도체, 안티안드로젠, 황, 코르티코스테로이드, 코르티손, 타자로텐(tazarotene), 커커민 추출물, 아카시아 추출물, 황금 추출물, 녹차 추출물, 포도씨 추출물 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0022] 특정 구체예에서, 조성물은 캡슐, 예를 들어 방출조절된 캡슐로 제형화된다. 다른 구체예에서, 조성물은 국소적으로 에어로졸, 좌약에 의해 피내, 근육내 또는 정맥내로 투여된다.
- [0023] 일부 측면에서, 본 방법은 과도한 색소침착을 방지한다. 다른 측면에서, 본 방법은 과도한 색소침착을 완화한다. 또다른 측면에서, 본 방법은 과도한 색소침착을 경감한다. 또다른 측면에서 본 방법은 과도한 색소침착을 치료한다.
- [0024] 다른 구체예에서, 과도한 색소침착은 피부 심층, 예를 들어 피부의 유두진피층에서 발생한다. 다른 구체예에서, 본 방법은 슈퍼옥사이드 음이온 감소를 추가로 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 본 방법은 멜라닌 합성반응을 경감하는 것을 추가로 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 방법은 멜라닌세포 증식을 경감하는 것을 추가로 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 방법은 멜라닌세포 아포토시스 예방을 추가로 포함한다.
- [0025] 다른 특정 구체예에서, 포유동물은 사람이다. 일부 다른 구체예에서, 포유동물은 염증성 피부장애에서 유도된 상태로 인한 과도한 색소침착을 예방, 완화, 경감 또는 치료를 필요로 한다. 예를 들어, 포유동물은 PIH의 치료가 필요할 수 있다.
- [0026] 또다른 구체예에서, 본 발명은 멜라닌합성을 경감하거나, 멜라닌세포 증식을 경감하거나 멜라닌세포 아포토시스를 예방하는 방법에 관한 것으로, 본 방법은 포유동물에게 바쿠치올, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체와 500 ppm 미만의 모든 퓨라노쿠마린 불순물을 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 본 방법은 슈퍼옥사이드 음이온을 경감하는 것을 추가로 포함한다.
- [0027] 다른 구체예에서, 본 조성물은 100 ppm 미만의 모든 퓨라노쿠마린 불순물을 포함한다. 다른 구체예에서, 퓨라노쿠마린 불순물은 소랄렌(psoralen), 이소소랄렌 또는 이들의 조합물을 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 코지산 컨트롤에 대하여 티로시나제 저해활성을 나타내지 않는다.
- [0028] 또다른 구체예에서, 바쿠치올은 화학적으로 합성되거나 식물에서 단리된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 바쿠

치울은 식물에서 단리된다. 또다른 일부 구체예에서, 이 식물은 서레일리아 속(*Psoralea* genus) 식물, 예를 들어 서레일리아 코틸리폴리아(*Psoralea corylifolia* L.; 콩과(Luguminosae)) 또는 서레일리아 글랜둘로사(*Psoralea glandulosa* L.; 콩과(Papilionaceae))이다.

- [0029] 다른 구체예에서, 바쿠치올은 종자, 줄기, 껍질(barks), 잔가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리, 뿌리 껍질(roots barks), 어린 순(young shoots), 뿌리줄기(rhizomes), 꽃 또는 다른 생식기관, 잎 또는 다른 지상부, 또는 이들의 조합물로부터 단리된다.
- [0030] 일부 구체예에서, 멜라닌합성, 멜라닌세포 증식 또는 멜라닌세포 아포토시스는 염증후 색소과다침착(PIH)의 결과이다. 일부 다른 구체예에서, 염증후 색소과다침착(PIH)은 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상경피증, 기계적 트라우마, 이온화 또는 비이온화 방사선, 화상, 레이저 또는 약물 요법, 피부 감염 또는 이들의 조합에서 유도된다. 예를 들어, 특정 측면에서 염증후 색소과다침착(PIH)은 여드름에서 유도된다.
- [0031] 다른 구체예에서, 조성물은 총 중량으로 0.001% 내지 99.9%의 바쿠치올 및 약학적, 피부학적 또는 화장품으로 허용가능한 담체를 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서 조성물은 총 중량으로 0.1% 내지 2.0%의 바쿠치올, 총 중량으로 1.0%의 바쿠치올 또는 0.5%의 바쿠치올을 포함한다.
- [0032] 다른 구체예에서, 피부학적으로 허용가능한 담체는 비점착성 거즈, 붕대, 면봉, 클로쓰 와이프(cloth wipe), 패치, 마스크 또는 프로텍트트를 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 화장품으로 허용가능한 담체는 클렌저 또는 소독제를 포함한다.
- [0033] 일부 측면에서, 조성물은 국소 투여용으로 배합된다. 예를 들어, 일부 측면에서 조성물은 또한 크림, 로션, 연고, 젤, 에멀전, 액체, 페이스트, 비누, 분말 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다.
- [0034] 다른 구체예에서, 조성물은 보조제, 피부침투증강제 또는 리포솜을 포함한다. 또다른 구체예에서, 보조제는 α -하이드록시산, 살리실산, 리놀레산, 레티노이드, 벤조일 퍼옥사이드, 소듐 셀파세타미드, 클린다마이신, 에리트로마이신, 덤손(dapsone), 테트라사이클린, 독시사이클린(doxycycline), 미노사이클린, 아연, 에스트로겐 또는 그의 유도체, 안티안드로겐, 황, 코르티코스테로이드, 코르티손, 타자로텐(tazarotene), 커커민 추출물, 아카시아 추출물, 황금 추출물, 녹차 추출물, 포도씨 추출물 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0035] 특정 구체예에서, 조성물은 캡슐, 예를 들어 방출조절된 캡슐로 제형화된다. 다른 구체예에서, 조성물은 국소적으로 에어로졸, 좌약에 의해 피내, 근육내 또는 정맥내로 투여된다.
- [0036] 일부 측면에서, 본 방법은 과도한 색소침착을 방지한다. 다른 측면에서, 본 방법은 과도한 색소침착을 완화한다. 또다른 측면에서, 본 방법은 과도한 색소침착을 경감한다. 또다른 측면에서 본 방법은 과도한 색소침착을 치료한다. 일부 구체예에서, 과도한 색소침착은 피부 심층, 예를 들어 피부의 유두진피층에서 발생한다.
- [0037] 일부 다른 구체예에서, 본 방법은 멜라닌합성을 경감한다. 또다른 구체예에서, 본 방법은 멜라닌세포 증식을 경감한다. 또다른 구체예에서, 본 방법은 멜라닌세포 아포토시스를 예방한다.
- [0038] 다른 특정 구체예에서, 포유동물은 사람이다. 일부 다른 구체예에서, 포유동물은 멜라닌합성을 경감하거나, 멜라닌세포 증식을 경감하거나 멜라닌세포 아포토시스를 방지하는 치료가 필요한 상태이다.
- [0039] 또다른 구체예에서, 조성물은 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 추가로 포함한다.
- [0040] 본 발명의 또다른 구체예는 염증성 또는 비염증성 병소를 치료하는 방법에 관한 것으로, 본 방법은 바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 및 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서 병소는 염증성 여드름 병소를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 방법은 염증성 및 비염증성 병소를 치료한다.
- [0041] 상기한 기타 특정 구체예에서, 포유동물은 사람이다. 일부 다른 구체예에서, 포유동물은 염증성 또는 비염증성 병소의 치료가 필요하다.
- [0042] 다른 구체예에서, 본 발명은 바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 및 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 국소 투여용으로 배합된다.
- [0043] 본 발명의 이러한 측면과 다른 측면은 이하의 상세한 설명을 참조로 더 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도면에서, 동일한 참조번호는 유사한 요소들을 나타낸다. 도면 내 요소들의 크기와 관련 위치는 스케일과 필수적으로 연관되지는 않으며, 이러한 요소들 중 일부는 도면 가독성을 향상하기 위해 임의로 확대 및 배치되었다. 또한, 나타난 요소들의 특정 형태는 특정 요소들의 실제 형태와 관련한 정보를 전달할 목적은 아니며, 단지 도면의 인지 용이성을 위해 선택되었다.
- 도 1은 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌 표준물의 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 2는 가수분해 전과 후 바쿠치올 조성물의 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 3은 바쿠치올 조성물의 강력한 항산화 특성을 입증하는 데이터를 나타낸 것이다.
- 도 4는 바쿠치올 조성물과 코지산의 티로시나제 저해 활성 그래프이다.
- 도 5는 개별 시험 대상의 PIH 중증도 변화를 나타낸 것이다.
- 도 6은 개별 시험 대상의 PIH 영향을 받은 얼굴 영역의 변화율 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 7은 5명의 시험 대상의 PIH 평균변화율과 PIH 중증도를 나타낸 것이다.
- 도 8은 기점과 비교된 매 방문시 PIH의 평균 등급수준 감소 및 PIH 중증도를 나타낸 것이다.
- 도 9는 다양한 시간 간격에서 시험 참가자 2명의 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하의 설명에서는 다양한 구체예의 완벽한 이해를 제공하기 위해 특정한 구체적 상세를 기재하였다. 그러나, 당업자라면 본 발명을 이러한 상세가 없이도 실시할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 다른 예로, 공지된 화학식들은 구체예의 설명을 불필요하게 모호화하는 것을 방지하기 위해 상세하게 나타내거나 기술하지 않았다. 내용이 달리 요구하지 않는 한, 명세서와 특허청구범위 전체에서 "포함하다"와 그의 변형, 예컨대 "구성하다" 및 "포함하는"이란 용어들은 개방적이고 포괄적 의미, 즉 "함유하지만, 제한되지 않는"으로 이해되어야 한다. 또한, 여기에 제공된 제목은 단지 편의를 위한 것으로 본 발명의 범위 또는 의미를 설명하지 않는다.
- [0046] 본 명세서 전체에서 "일 구체예" 또는 "구체예"란 언급은 구체예와 관련하여 기술된 특별한 특징, 구조 또는 특성이 적어도 일 구체예에 포함된 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에서 다양한 위치의 "일 구체예에서" 또는 "구체예에서"라는 용어의 출현은 필수적으로 모두 동일한 구체예를 언급하는 것은 아니다. 게다가, 특별한 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 적합한 방법으로 조합될 수 있다. 또한, 본 명세서와 특허청구범위에서 사용된 단수 형태에 대한 지시어들(예를 들어, "a", "an", 및 "the")은 내용상 명백하게 달리 지적하지 않는 한 복수 형태를 포함한다. 또한, "또는"은 내용상 명백하게 달리 기술하지 않는 한 일반적으로 "및/또는"과 같은 의미를 적용하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0047] 정의
- [0048] 여기에서 사용되고 내용상 달리 기술되지 않는 한, 다음 용어들은 이하에 특정된 의미를 가진다.
- [0049] 여기서 사용된 "바쿠치올(Bakuchiol)"은 다음 화학식을 갖는 화합물을 지칭한다:
- The chemical structure of Bakuchiol is shown. It consists of a cyclohexene ring with a hydroxyl group (-OH) at the 1-position. A side chain is attached at the 2-position, which includes a double bond and a methyl group. The side chain continues with a double bond and a methyl group, and ends with a double bond and a methyl group.
- [0050]
- [0051] 바쿠치올
- [0052] 상기 식에서, 벤질 이중결합은 시스 또는 트랜스일 수 있다. 여기서 사용된 바쿠치올은 바쿠치올의 약학적으로 허용가능한 염 및 토토머를 포함한다. 바쿠치올과 구조적으로 연관된 페놀성 화합물도 이 정의 내에 포함된다.
- [0053] "바쿠트롤(Bakutrol)TM"은 바쿠치올을 포함하는 조성물이고 또한 서레일리아 식물에서 추출된 지방산을 추가로

포함할 수 있다.

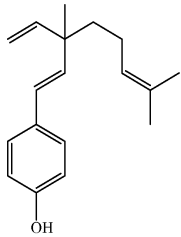
- [0054] "UP256"은 0.5% (wt/wt)의 바쿠치올 배합물을 지칭한다.
- [0055] 본 방법의 내용에서 "예방", "방지" 및 "예방하다"는 모두 특정한 상태, 예를 들어 PIH의 발생을 저해하거나 중지하는 예방적(prophylactic) 방법을 지칭한다.
- [0056] 본 방법의 내용에서 "완화하는", "완화" 및 "완화하다"라는 용어는 모두 특정한 상태, 예를 들어 PIH의 작용 또는 증상을 줄이거나 저감하는 것을 지칭한다.
- [0057] 본 방법의 내용에서 "경감", "감소" 및 "경감하다"라는 용어는 모두 특정한 상태, 예를 들어 PIH의 작용 또는 증상을 저하시키는 것을 지칭한다.
- [0058] 본 방법의 내용에서 "치료하는", "치료" 및 "치료하다"라는 용어는 모두 특정한 상태, 예를 들어 PIH의 증상을 개선하거나, 그 발생을 감소 또는 중지하려는 기술 또는 방법을 지칭한다.
- [0059] "불순물"은 전형적으로 바쿠치올을 천연 공급원으로부터 분리하는 것으로 인한 바쿠치올 조성물 내의 의도하지 않은 물질들을 포함한다. 불순물이란 용어는 비제한적으로 플라노쿠마린, 예를 들어 비제한적으로 솔라렌, 이소솔라렌 및 기타 쿠마린 종류의 불순물을 포함한다. 또한 불순물은 이러한 조성물을 얻기 위한 합성방법에서 유래한 불순물을 지칭한다.
- [0060] "치료학적"이란 치료 및/또는 예방을 포함한다. 사용되는 경우, 치료학적이란 사람뿐만 아니라 다른 동물들을 지칭한다.
- [0061] "약학적으로, 화장품으로 또는 치료적으로 유효한 투약량 또는 양"은 바람직한 생물학적 또는 작용적 결과를 유도하기에 충분한 수준의 용량을 지칭한다. 그 결과는 질병의 징후, 증상 또는 원인, 피부 상태 또는 바람직한 생물학적 시스템의 다른 변화를 완화시키는 것일 수 있다.
- [0062] "플라시보(Placebo)"란 비활성 물질(non-active substance)로 질병의 징후, 증상 또는 원인을 완화시킬 수 있는 바람직한 생물학적 결과를 유도하는데 충분한 약학적 또는 치료학적으로 유효한 투여량 또는 사용량을 대체하는 것을 지칭한다.
- [0063] "수용체(host)" 또는 "대상자" 또는 "환자"는 여기에 기술된 조성물을 투여한 살아있는 피실험자, 인간 또는 동물이다. 따라서, 여기에 기술된 조성물은 인간뿐만 아니라 수의과적 적용에도 사용할 수 있고, "환자" 또는 "대상자" 또는 "수용체"라는 용어는 제한적인 방법으로 해석되지 않아야 한다. 수의과적 적용의 경우에, 투약량 범위는 동물의 체중을 고려하여 하기에 기재된 것과 같이 결정할 수 있다.
- [0064] 상기한 바와 같이 본 발명의 일 구체예는 염증성 피부장애에서 유도된 상태로 인한 과도한 색소침착의 예방, 완화, 경감 또는 치료를 위한 기본적으로 플라노쿠마린 불순물 없이 바쿠치올을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 본 방법은 염증후 색소과다침착(PIH)의 치료에 유용하다. 특정 구체예에서, PIH는 여드름에서 유도될 수 있다. 본 방법은 합성 바쿠치올 또는 플라노쿠마린이 없는 서레일리아 추출물 바쿠치올 조성물을 사용하여 하기와 같은 피부장애에서 유도된 염증후 색소과다침착의 예방, 완화, 경감 및 치료에 있어서 인간에 대한 임상적 효능을 나타내었다: 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상경피증; 및 기계적 트라우마, 이온화 및 비이온화 방사선, 화상, 레이저 및 약물 요법, 및 피부 감염으로 인한 염증후 색소과다침착. 이러한 및 다른 측면과 다양한 본 발명의 구체예는 이하의 설명을 참조하여 더욱 분명하게 된다.

[0065] A. 바쿠치올 조성물

- [0066] 일 구체예에서, 본 발명은 불순물, 특히 플라노쿠마린 불순물이 실질적으로 없는 바쿠치올을 포함하는 조성물을 제공한다. 이 조성물은 또한 여기에서 바쿠트름™이라 지칭한다. 일부 구체예에서, 본 조성물은 문헌(Hongli Chen and Yuanhao Li, Letters in Organic Chemistry, 2008, 5, 467-469)에 기술된 간단한 화합물에서 또는 식물에서 유기 합성으로 얻어진다. 특정 구체예에서, 바쿠치올 조성물은 식물에서 분리된다. 바쿠치올의 식물 공급원은 콩과(Leguminosae와 Papilionaceae), 녹나무과(Lauraceae) 및 목련과(Magnoliaceae)를 포함하는 식물들의 과(family)이나 이들로 제한되지는 않으며, 서레일리아(Psoralea), 사사프라스(Sassafras), 매그놀리아(Magnolia) 및 아스트라틸로이드(Astractylodes)를 포함하는 식물들의 속이나 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들어, 바쿠치올 조성물은 서레일리아 코릴리폴리아(Psoralea corylifolia L.; 콩과) 또는 서레일리아 글랜돌로사

(*Psoralea glandulosa* L.; 콩과)로부터 분리될 수 있다. 본 조성물은 식물 전체로부터 얻어질 수 있거나, 종자(seeds), 줄기(stems), 껍질(barks), 잔가지(twigs), 덩이줄기(tubers), 뿌리(roots), 뿌리껍질(roots barks), 어린 순(young shoots), 뿌리줄기(rhizomes), 꽃 및 다른 생식기관, 잎 및 다른 지상부(aerial parts) 또는 그의 조합물을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 식물의 하나 또는 그 이상의 개별 부분으로부터 얻어질 수 있다. 식물에서 바쿠치올을 분리하는 방법으로는 용매 추출, 초임계 유체 추출, 증류, 물리적 압착 또는 그의 조합을 예로 들 수 있다.

[0067] 하기한 화학식을 갖는 바쿠치올은 방향족 고리상에 하나의 하이드록실 그룹과 불포화 탄화수소 사슬을 갖는 페놀성 화합물이다. 하기 화학식에서는 트랜스(trans)로 표시되었지만, 바쿠치올의 벤질 이중결합은 시스도 가능하다.



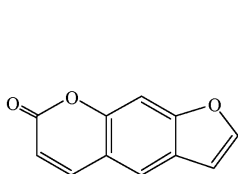
[0068]

[0069]

바쿠치올

[0070] 정제된 식물 추출물 중 바쿠치올의 양(즉, 중량 백분율(w/w))은 추출방법과 조추출물(crude extract)의 정제 범위에 따라 다르다. 일 구체예에서, 추출물 중 바쿠치올의 양은 표 2에 나타난 바와 같이 13.7% 내지 29.1%의 범위 내이다. 다른 구체예에서, 추출물 중 바쿠치올의 양은 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%이다. 특정 구체예에서, 추출물 중 바쿠치올의 양은 100%이다. 다른 특정 구체예에서, 조성물 중 바쿠치올의 양은 60% 이상이다. 실시예 6-8은 다양한 양의 바쿠치올을 포함하는 추출물의 예를 제공하고 있다.

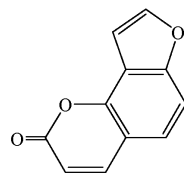
[0071] 바쿠치올이 다양한 질환과 상태의 예방 및 치료에 사용하는데 있어서 상당한 잠재력을 가진 생물학적으로 활성인 천연물이지만, 이 화합물의 사용과 연관된 많은 제한성이 있다. 일부 제한성은 천연 공급원 내 바쿠치올의 낮은 농도와 바쿠치올 공급원 내에 공존하는 독성 성분이다. 바쿠치올 조성물에 존재하는 불순물은 바쿠치올 공급원에 따라 다양하다. 예를 들어, 퓨라노쿠마린이라고도 알려진 솔라렌은 서레일리아 속 식물(바쿠치올 공급원)에서 자연적으로 발생하는 2차 대사산물이며 다양한 열매와 채소에도 존재한다. 대개 바쿠치올과 공존하고 있는 것으로 확인된 퓨라노쿠마린의 예는 솔라렌과 이소솔라렌을 포함한다.



[0072]

[0073]

솔라렌



이소솔라렌

[0074] 많은 건강상의 위험들이 솔라렌을 함유하는 식물과 합성 솔라렌의 취급, 국소 적용 및 섭취와 관련되어 있다. 솔라렌은 자외선에 대한 피부의 민감성을 증가시키고 피부암을 촉진시키는 광독성제(phototoxic agents)로 잘 알려져 있다(Epstein (1999) Med. Surg. 18(4):274-284). 솔라렌은 래트에서 성장 억제를 유도하는 것으로 나타났다(Diawara et al. (1997) Cancer Lett. 114(12):159-160). 서레일리아 식물들의 조추출물에서 유래한 생식선 독성(gonadal toxicity)은 시상하부-뇌하수체-고환축(hypothalamus-pituitary-gonadal axis)의 파괴와 직접적으로 연결되어 있다(Takizawa et al. (2002) J. Toxicological Sciences 27(2):97-105). 암컷 래트의 식이에서 솔라렌, 베르갑텐(bergapten; 5-메톡시솔라렌) 및 잔토크신(xanthotoxin; 8-메톡시솔라렌)의 경구 투여는 투약 의존성 방법으로 출생률(birthrates); 착상 부위(implantation site), 새끼(pups), 황체(corpora lutea)의 수; 가득찬 자궁 및 빈 자궁의 중량; 및 순환 에스트로겐의 농도를 감소시켰다(Diawara et al. (1999) J.

Biochem. Molecular Toxicology 13(3/4):195-203). 솔라렌들은 또한 간효소(liver enzymes) CYP1A1 및 UGT1A6의 mRNA를 유도하는 것으로 나타나서, 솔라렌들에 의한 증강된 에스트로겐 대사가 생식 독성(reproductive toxicity) 및 난소의 난포 기능(ovarian follicular function)과 배란(ovulation)의 관찰된 감소를 설명할 수 있음을 시사한다(Diawara et al. (May-June 2003) Pediatr Pathol Mol Med. 22(3):247-58). 퓨라노쿠마린의 독성으로 인하여 염증후 색소과다침착 또는 다른 증상을 치료하고자 하는 바쿠치올 조성물에서 솔라렌과 이소솔라렌을 제거하는 것이 중요하다.

[0075] 솔라렌 및 이소솔라렌은 서레일리아 종자들의 건조 중량의 약 0.1 - 2%를 차지하며, 용매 또는 초임계 유체 추출물에서 중량의 약 1 - 20%를 차지한다. 서레일리아 속 식물의 조추출물은 용매 추출, 또는 초임계 유체 추출, 증류, 물리적 압착 또는 상기한 추출방법의 조합으로 얻어질 수 있다. 강화된 바쿠치올 조성물은 크로마토그래피 분리, 용매 분할(인도 특허공개 #00570/KOL/2005), 증류, 재결정 및 다른 습식 화학적 및 물리적 공정에 의해 얻어질 수 있다. 미국 특허출원 공개 제2006/0251749호는 여기에 그의 전체 내용이 참조로 포함되어 있으며, 용매 추출한 다음, 하이드록실화하여 퓨라노쿠마린 고리를 분해하고 본질적으로 퓨라노쿠마린 불순물이 없는(예를 들어, 500 ppm 미만, 또는 100 ppm 미만의 퓨라노쿠마린 불순물) 증강된 바쿠치올 조성물을 얻는 것을 기술하고 있다. 공개된 방법은 식물 공급원으로부터 화합물의 추출, 가열하에서 염기성 용액을 사용한 조추출물의 가수분해, 및 예를 들어 비제한적으로 컬럼 크로마토그래피, 추출 후 결정화, 용매 분할, 재결정 및 이들의 조합을 포함하는 방법에 의한 정제의 단계들을 포함한다. 본 발명자들은 본질적으로 퓨라노쿠마린 불순물이 없는 바쿠치올이 증강된 서레일리아 추출물의 조성물이 과도한 색소침착의 예방, 완화, 경감 또는 치료에 사용될 수 있음을 발견하였다. 예를 들어, 기술된 바쿠치올 조성물은 염증후 색소과다침착(PIH)의 예방, 완화, 경감 또는 치료에 효과적이다.

[0076] 본 발명은 또한 천연 공급원에서 얻어진 바쿠치올 및 관련 화합물들의 정제되지 않은 조성물을 단리 및 정제하는 방법에 관한 것이다. 이러한 조성물을 단리 및 정제하는 방법은 식물 공급원에서 화합물을 추출하고 조추출물을 염기성 용액으로 가수분해하여, 예를 들어 비제한적으로 컬럼 크로마토그래피, 추출 후 결정화, 용매 분할, 재결정 및 이들의 조합을 포함하는 방법에 의한 정제의 단계들을 포함한다. 이 방법으로 정제된 조추출물은 본질적으로 솔라렌과 이소솔라렌 같은 퓨라노쿠마린 불순물을 포함하지 않는다. 따라서, 잠재적 광독성, 국소 자극, 발암성(carcinogenicity) 및 이러한 화합물과 연관된 생식 독성이 본질적으로 제거된다.

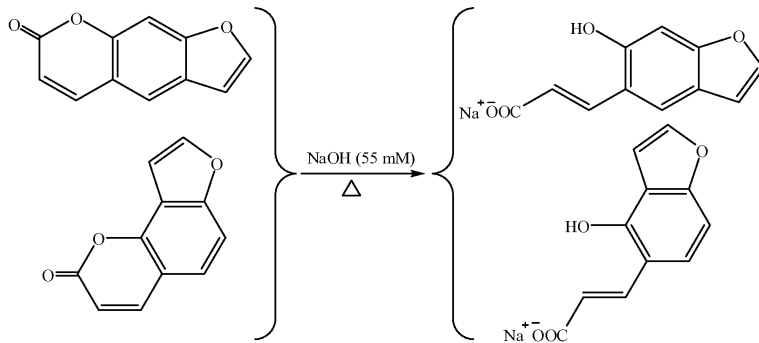
[0077] 특정 구체예에서, 본 조성물은 500 ppm 미만, 250 ppm 미만, 100 ppm 미만, 또는 50 ppm 미만으로 모든 퓨라노쿠마린 불순물을 포함한다. 퓨라노쿠마린 불순물의 농도는 당업자들에게 알려진 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 일 구체예에서 퓨라노쿠마린 함량을 HPLC로 측정할 수 있다.

[0078] 식물 공급원으로부터 바쿠치올 추출의 효율은 실시예 2에 기술한 것과 같은 두 세트의 추출 조건하에서 6개의 상이한 유기용매 시스템을 사용하여 평가하였다. 그 결과를 표 2에 기재하였다. 표 2와 관련하여, 바쿠치올은 여러 유기용매 및/또는 그의 조합을 사용하여 서레일리아 식물로부터 추출될 수 있다는 것을 알 수 있다. 여러 가지 추출물에서 바쿠치올의 양은 13.7 중량% 내지 29.1 중량%의 범위이다. 다른 추출방법으로는 CO₂ 초임계 유동 추출 및 수분 증류가 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 종자 같은 신선한 식물부로부터의 압착 삼출물(squeeze exudate)도 천연 공급원에서 바쿠치올 조성물을 얻는데 사용할 수 있다.

[0079] 컬럼 크로마토그래피에 의한 바쿠치올 조추출물의 정제 효율을 실시예 3과 표 3에 나타내었다. 8개의 상이한 종류의 레진들을 퓨라노쿠마린 불순물들로부터 바쿠치올을 분리하는 그의 능력에 대하여 구체적으로 평가하였다. 실리카 겔과 CG-161 레진 모두가 만족스러운 분리를 나타내었다. 그러나, 산업적 규모에서 식물 조추출물의 컬럼 크로마토그래피 분리는 전형적으로 고가의 장비와 시약 및 숙련된 경험자를 필요로 한다는 점에서 경제적으로 적합하지 않다. 또한, 식물 조추출물의 복잡성으로 인한 이러한 샘플들의 극도로 저조한 충전량은 산업적 규모의 컬럼크로마토그래피를 어렵게 한다.

[0080] 실시예 4는 퓨라노쿠마린 불순물들로부터 바쿠치올을 분리하는 경제적인 방법을 기술하고 있다. 이 방법은 염기를 사용하여 퓨라노쿠마린 불순물들을 함유하는 조성물을 처리하는 것을 포함한다. 예시를 위하여 NaOH를 사용하는 다음 도해 1에 나타낸 바와 같이, 염기와 함께 가열하여 퓨라노쿠마린의 락톤 고리를 개방하여 이것을 카복실산의 대응 염으로 전환한다. 이 염들은 이후에 다양한 방법에 의해 혼합물의 잔여물로부터 용이하게 분리될 수 있다. 본 발명에 따르면, 본질적으로 퓨라노쿠마린 불순물이 없는(예를 들어, 500 ppm 미만) 바쿠치올 조성물을 제조할 수 있다. 이처럼 고도로 순수한 바쿠치올 조성물은 기술된 가수분해 없이 표준 크로마토그래피 기술을 사용하여서는 얻을 수 없다.

[0081] 반응식 도해 1. 퓨라노쿠마린의 가수분해



[0082]

[0083] 염기 용액은 락톤 고리를 개방할 수 있는 어떠한 염기도 포함할 수 있으며, 예를 들어 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 수산화리튬 또는 이들의 조합물이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이 용액은 산염(acid slat)으로의 전환을 최대화시키기 위하여 서로 다른 농도 및 pH값을 가질 수 있다. 반응 혼합물은 또한 반응속도, 효율 및 수득량을 최대화시키기 위하여 서로 다른 온도 및 압력 하에서 가열될 수 있다.

[0084] 퓨라노쿠마린의 그의 개별 카복실산염으로의 완전한 전환을 확인하기 위해 반응경로를 HPLC로 추적할 수 있다. 가수분해 전후의 정제되지 않은 조성물의 HPLC 크로마토그램을 도 2에 나타내었다. (HPLC에 의해 측정된)반응 완료시, 반응 용액을 다양한 방법, 예를 들어 비제한적으로 컬럼 크로마토그래피, 결정화, 용매 분할, 침전, 용매 세척 또는 이들의 조합을 사용하여 처리할 수 있다. 용매 분할에 사용될 수 있는 유기용매는 기타 수 비혼화성(water immiscible) 유기용매뿐만 아니라 석유 에테르, 에틸 아세테이트, 에틸 에테르, 헥산, 클로로포름, 프로판올, 부탄올 및 염화메틸렌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0085] 이 방법으로 정제된 추출물은 솔라렌과 이소솔라렌 같은 퓨라노쿠마린 불순물을 본질적으로 포함하지 않는다. 예를 들어, 정제된 추출물은 500 ppm 미만, 250 ppm 미만, 100 ppm 미만 또는 50 ppm 미만의 퓨라노쿠마린 불순물을 포함할 수 있다. 또한, 이렇게 고도로 순수한 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물의 색은 연한 갈색 또는 빨간색이며, 이들은 활성제의 색 및 조성에 대하여 매우 안정하여 배합, 저장 및 화장품 적용에 특히 적합하다.

[0086] 또한, 불순물을 검출하고 정량할 수 있는 바쿠치올 조성물의 분석방법도 본 발명에 포함된다. 이 구체예에서, 바쿠치올 조성물의 분석방법은 조성물을 고압액체크로마토그래피(HPLC)로 분석하는 단계를 포함한다. HPLC 분석으로 혼합물 내의 다양한 성분들을 정량할 수 있으며, 바쿠치올, 솔라렌, 이소솔라렌 및 서레일리아 식물 중의 다른 천연성분을 추적하는 방법을 제공하여 추출, 가수분해 및 정제공정을 유도한다. 고압액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 바쿠치올 조성물을 분석하는 방법을 실시예 1(표 1)에 기술하였다.

[0087] B. 바쿠치올 조성물을 사용한 과도한 색소침착의 치료

[0088] 본 발명의 일 구체예는 염증성 피부장애에서 유도된 상태로 인한 과도한 색소침착의 예방, 완화, 경감 또는 치료를 위한 본질적으로 퓨라노쿠마린 불순물이 없는 바쿠치올을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 본 방법은 염증후 색소과다침착(PIH)의 예방, 완화, 경감 또는 치료를 포함한다. 특정 구체예에서, PIH는 여드름에서 유발될 수 있다. 본 발명은 전형적 화장품 비히클 및 또한 이하에 더욱 상세히 언급된 바와 같은 피부관리 크림, 겔 로션 및 다른 제형에서 바쿠치올 조성물의 배합을 포함한다. 실시예에서 보이는 바와 같이, 본 발명자들은 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 알러지 피부염, 색소 실조증, 편평태선, 만성 홍반성 낭창, 반상 경피증 같은 피부장애로 유발된 염증후 색소과다침착(PIH); 및 기계적 트라우마, 이온화 및 비이온화 방사선, 화상, 레이저와 약물 요법, 및 피부 감염으로 유발된 염증후 색소과다침착의 예방, 완화, 경감 또는 치료에서 바쿠치올 조성물의 사람에 대한 예상하지 못한 임상적 효능을 입증하였다.

[0089] 본 방법은 퓨라노쿠마린 불순물이 실질적으로 없는 바쿠치올을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물(예를 들어, 인간 환자)에게 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 조성물은 500 ppm 미만의 퓨라노쿠마린 불순물을 포함할 수 있다. 조성물은 약 0.0001% 내지 약 100% 바쿠치올을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 조

성물은 약 0.1% 내지 약 2% 바쿠치올 또는 약 0.5% 내지 약 1%의 바쿠치올을 포함한다. 다른 실시예에서, 조성물은 약 0.5% 또는 약 1.0% 바쿠치올을 포함한다. 특정 구체예에서 포유동물은 인간이고, 다른 구체예에서 포유동물은 염증성 피부장애에서 유발된 상태로 인한 과도한 색소침착의 예방, 완화, 경감 또는 치료를 필요로 하며, 예를 들어 포유동물은 PIH 치료가 필요할 수 있다.

[0090] 본 발명은 합성 또는 천연 바쿠치올 조성물의 예상치 못한 독특한 생물학적 특성을 입증하고 있다. 실시예 5와 표 4에 나타난 바와 같이, 약 57.35%의 바쿠치올을 포함하는 바쿠트룰 조성물은 특히 슈퍼옥사이드 음이온에 대해 예상외로 높은 항산화능력을 가지며(>69,000 $\mu\text{mole TE/g}$), 5개 우세 반응종에 대한 총 ORAC값이 >92,000 $\mu\text{mole TE/g}$ 였다.

[0091] 슈퍼옥사이드는 화학식 O_2^- 를 갖는 음이온이다. 여드름(acne vulgaris) 같은 만성 염증상태는 *P. acnes*(Grange PA., et al. Plos Pathogens 2009, 5(7) 1-14) 같은 그람 양성 혐기성 박테리아에 의해 자극되는, 각질형성세포로부터 슈퍼옥사이드 음이온 생성을 급격하게 증가시킬 수 있다. 슈퍼옥사이드는 생물학적으로 매우 독성이고 면역 시스템에 의해 발생하여 침입 미생물을 사멸한다. 포식세포(phagocytes)에서 슈퍼옥사이드는 NADPH 옥시다제 효소에 의해 침입한 병원균의 산소 의존성 사멸 메커니즘에서 사용하기 위해 대량으로 생산된다. 염증이 생긴 피부에서 슈퍼옥사이드 음이온과 다른 반응성 산소종들은 멜라닌합성, 멜라닌세포 증식 및 멜라닌세포 아포토시스를 유발할 수 있으며, 이것은 염증후 색소과다침착의 주요 원인성 인자이다. 따라서, 본 발명의 일 구체예는 본질적으로 푸라노쿠마린 불순물이 없는 바쿠치올을 포함하는 조성물로 슈퍼옥사이드를 감소하여 염증성 피부장애로 유발된 상태로 인한 과도한 색소침착을 완화, 경감 또는 치료하는 방법이다. 일 구체예에서, 상태는 PIH이다. 다른 구체예에서, 본 발명은, 예를 들어 슈퍼옥사이드 음이온을 감소하여 멜라닌합성 또는 멜라닌세포 증식을 감소하거나 멜라닌세포 아포토시스를 저해하는 방법을 제공한다. 본 방법은 푸라노쿠마린 불순물이 본질적으로 없는 바쿠치올을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 포유동물은 인간이며, 다른 구체예에서 포유동물은 멜라닌합성 또는 멜라닌세포 증식 감소 또는 멜라닌세포 아포토시스 저해를 필요로 한다.

[0092] 실시예 6과 도 3에서 보이는 바와 같이, 불순물, 특히 푸라노쿠마린 불순물이 실질적으로 없는 77.02%의 바쿠치올을 포함하는 조성물은 4-터셔리부틸페놀(4-TBP)에 의해 유발된 산화성 스트레스에 대해 방어작용을 나타냈다. 4-TBP에 의해 생성된 반응성 산소종에서 유래한 멜라닌세포에 대한 세포독성을 바쿠치올 조성물이 시험된 2개 농도에서 방어하였다. 이론과 결부되기를 바라는 것은 아니지만 본 발명자들은 염증후 색소과다침착(PIH)을 경감, 완화, 예방 또는 치료하는 합성 또는 천연 바쿠치올 조성물의 의외의 임상 효능은 반응성 산소종, 특히 슈퍼옥사이드 음이온을 중화하고 저감된 상피 흑색증(melanosis) 및/또는 피부 흑색증을 일으키는 염증상태에서의 산화성 스트레스로부터 멜라닌세포를 보호하는 그의 독특하고 예상치 못한 능력으로부터 유래하는 것으로 판단된다.

[0093] 기대이상의 높은 항산화 능력 이외에, 본 발명자들은 본 바쿠치올 조성물이 티로시나제 저해제가 아니라는 것을 발견하였다. 이것은 티로시나제 저해를 통한 피부미백제로서 바쿠치올을 기술하고 있는 다른 보고들(일본 특허 제P1107123호)과 대조되는 것이다. 이러한 의외의 발견으로 본 발명자들은 색소침착이 피부심층에서 일어나고 티로시나제 저해제가 비효과적인 PIH를 치료하기 위한 현재의 본 발명의 방법에 이르게 되었다. 실시예 4와 도 4는 본 바쿠치올 조성물이 티로시나제를 저해하지 않는 것을 나타낸다. 순수한 바쿠치올(100%)과 천연 공급원에서 얻어진 100 ppm 이하의 푸라노쿠마린을 갖는 강화 바쿠치올(77.02%) 모두 8개의 상이한 용량에서 티로시나제 저해 작용을 나타내지 않았다.

[0094] 86.54% 및 77.02% 바쿠치올 농도의 바쿠치올 포함 조성물을 그의 안정성 특성에 대해 평가하였다. 시험관내와 인간 임상시험에 기초한 실시예 9와 표 6에서 보이는 바와 같이, 바쿠트룰(UP256) 조성물은 눈 자극, 정상 또는 절개 피부에서의 피부 자극, 피부 접촉 민감화, 광독성 및 돌연변이성 독성 모두 나타나지 않았다. 바쿠치올 조성물의 국소 크림은 인간 및 시험관내 시험 모두에서 잘 받아들여졌다.

[0095] 실시예 10에서 보이는 바와 같이, 서레일리아 코틸리폴리아의 종자로부터 추출 및 농축된 77.02% 바쿠치올과 100 ppm 미만의 푸라노쿠마린을 포함하는 천연 바쿠치올 조성물(바쿠트룰™)을 경증 또는 중등도 여드름으로 인한 염증후 색소과다침착(PIH) 환자에 대한 인간 임상시험에서 시험하였다. 바쿠치올 조성물은 국소 적용을 위해 0.5% 바쿠치올로 배합하였다. 0.5% 바쿠트룰 크림을 매일 국소 적용한 후, 염증후 색소과다침착(PIH)의 급격한 감소가 5명 환자 모두에서 관찰되었다. 도 5에서 보이는 바와 같이, 5명 환자 모두가 PIH 중증도의 적어도 한 등급 수준의 경감을 나타냈다. 0.5% 바쿠트룰 크림을 8주 동안 연속 국소 적용한 후 PIH 영향을 받은 얼굴영역에서 50% 초과 개선 얻었다(도 6). PIH와 그의 중증도 모두에 대한 평균 백분율 및 절대 등급 수준 개선을

도 7과 8에 요약하였다. PIH와 그 중증도에서 40% 초과 개선, 또는 한 등급 수준 초과의 경감이 바쿠치올 조성물을 사용한 4주 후처럼 조기에 얻어졌다. PIH의 실질적 감소는 얼굴피부 영향부위에서 도 9에서 보이는 바와 같이 두 환자의 사진에서 분명히 드러나고 있다. 두 대상자는 바쿠트룰 크림의 국소 적용후에 경증 및 중등도 여드름과 연관된 피부 염증후 색소과다침착(PIH)의 진행성 개선을 나타내었다.

[0096] 표 7(실시예 10)은 항미생물제 또는 항염증제 또는 이들의 조합을 함유하는 일반적인 여드름 치료제와 비교한 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물(즉, 바쿠트룰)을 사용한 임상 결과를 요약한 것이다. 표 7의 데이터는 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물이 염증 및 비염증성 병소수를 개선했을 뿐만 아니라 피부의 염증후 색소과다침착을 상당히 향상한 것을 분명히 나타내고 있다. 바쿠치올 조성물의 PIH 효능은 티로시나제 저해 활성이 없음을 기초하여 볼 때 예상되지 않는 것이다.

[0097] 표 8(실시예 11)은 PIH 등급(즉, 색소침착 범위)의 감소를 나타내는 데이터를 제공하고 있다. 바쿠치올이 PIH 치료에서 플라시보 및 살리실산보다 더 효과적인 것이 이 데이터들로부터 분명하다. 게다가 본 발명자들은 또한 바쿠치올(또는 이를 포함하는 조성물)이 염증성 병소, 예컨대 여드름 병소의 치료에 효과적인 것을 발견하였다. 표 9 (실시예 11)는 플라시보 또는 살리실산을 사용한 치료와 비교된 염증성 병소의 치료에서 바쿠치올의 효능을 입증하고 있다.

[0098] 바쿠치올을 포함하는 조성물을 사용한 치료를 포함하는 방법 이외에, 본 발명은 포유동물을 바쿠치올과 살리실산을 포함하는 조성물로 치료하는 구체예를 포함한다. 예를 들어, 본 발명자들은 살리실산이 비염증성 병소의 치료에 효과적이지만 바쿠치올은 염증성 병소의 치료에 효과적인 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 일 구체예는 염증성 병소(예를 들어, 여드름 병소)를 치료하는 방법에 관한 것으로, 본 방법은 바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예는 비염증성 및/또는 비염증성 병소(예를 들어, 여드름 병소)를 치료하는 방법에 관한 것으로, 본 방법은 바쿠치올과 살리실산(또는 약학적으로 허용가능한 그의 염)을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예는 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하는 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하여 비염증성 병소를 치료하는 것을 포함한다. 상기한 것의 특정 구체예에서, 포유동물은 인간이다. 다른 구체예에서, 포유동물은 염증성 및/또는 비염증성 병소, 예컨대 여드름의 치료가 필요한 상태이다.

[0099] 병소 치료 이외에, 바쿠치올과 살리실산의 조합은 상기한 상태(예를 들어, PIH, 멜라닌합성 감소, 멜라닌세포 증식 감소 또는 멜라닌세포 아포토시스 예방 등)의 치료에 효과적이다. 따라서, 일부 구체예는 바쿠치올과 살리실산을 포함하는 조성물에 의한 치료에 관한 것이다. 다른 구체예는 바쿠치올 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 살리실산 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0100] 상기한 방법은 염증성 및/또는 비염증성 병소를 실질적으로 제거하는데 효과적이다. 예를 들어, 일부 구체예에서 본 방법은 병소를 약 1% 내지 약 99% 또는 약 10% 내지 약 90% 감소시킨다. 다른 구체예에서, 본 방법은 병소를 50% 초과까지 감소시킨다.

[0101] 바쿠치올 대 살리실산의 비율은 특별히 제한되지 않으며 원하는 결과에 따라 당업자들에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서 바쿠치올 대 살리실산의 중량 비율은 약 1:100 내지 약 100:1의 범위이다. 다른 구체예에서, 중량 할당량(ration)은 약 10:90, 약 20:80, 약 30:70, 약 40:60, 약 50:50, 약 60:40, 약 70:30, 약 80:20 내지 약 10:90의 범위이다. 조성물은 여기에 기술된 배합비에 따라 배합될 수 있다.

[0102] C. 바쿠치올 조성물의 배합

[0103] 본 발명의 바쿠치올 조성물은 당업자들에게 공지된 방법으로 배합될 수 있다. 실시예 8과 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물은 약학, 화장품 또는 피부과학 조성물로 배합될 수 있으며 약학적으로 및/또는 화장품으로 허용가능한 활성제, 부형제, 보조제, 담체 또는 이들의 조합물 같은 다른 성분들을 포함할 수 있다. 부형제는 피부과학적으로 및 화장품으로 허용된 제품 및 약물용 희석제 또는 비히클(vehicle)로서 사용된 불활성 물질이다. 이러한 부형제의 예로는 물, 완충제, 염분(saline), 글리세린, 수화 실리카, 프로필렌 글리콜, 산화알루미늄, 카라기난, 셀룰로스 겔, 이산화탄, 링거액, 텍스트로스 용액, 만니톨, Hank 용액, 보존제 및 기타 생리학적으로 조절된 수성 염 용액이 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 비수성 비히클, 예컨대 불휘발성유, 참기름, 에틸 올리에이트 또는 트리글리세라이드도 사용될 수 있다. 다른 유용한 배합물은 점도증강제, 예컨대 소듐 카복시메틸셀룰로스, 솔비톨 또는 텍스트란을 함유하는 현탁액을 포함한다.

- [0104] 실시예 8에서, 본 발명의 조성물은 트란스쿠톨(transcutol), 또는 카프릴 트리글리세라이드, 또는 폴리솔베이트-20, 또는 정제수 또는 2종 이상의 상기한 비히클의 조합물로 배합되었다. 부형제는 또한 미량의 첨가제, 예컨대 EDTA, 디소듐 DDTA, BHA, BHT, 디암모늄 시트레이트, 노르디히드로구아아레트산(nordihydroguaiaretic acid), 프로필 갈레이트, 소듐 글루코네이트, 소듐 메타비설파이트, t-부틸 하이드로퀴논, SnCl₂, H₂O₂, 및 2,4,5-트리하이드록시부티로페논, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 E 아세테이트, 페노넵(phenonip), 및 등장성과 화학적 안정성을 강화하는 다른 물질을 함유할 수 있다.
- [0105] 배합물의 pH를 조절하는 물질의 예로는 수산화나트륨, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 펜타소듐 트리포스페이트, 테트라소듐 파이로포스페이트, 소듐 라우릴 설페이트, 과산화칼슘, 인산염 완충액, 중탄산염 완충액, 트리스 완충액, 히스티딘, 시트레이트, 및 글라이신, 또는 이들의 혼합물이 있다. 풍미제의 예로는 티메로살(thimerosal), m- 또는 o-크레졸, 포르말린, 과일 추출물 및 벤질 알코올이 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 표준 배합물은 액체 또는 고체 중 하나일 수 있으며, 투약용 현탁액 또는 용액으로서 적합한 액체가 될 수 있다. 따라서, 비액체 배합물의 경우, 부형제는 텍스트로스, 인간 혈청 알부민, 보존제 등을 포함할 수 있고, 투여 전에 멸균수 또는 식염수를 첨가할 수 있다.
- [0106] 일 구체예에서, 바쿠치올 조성물은 피부 색소침착 감소를 위한 상이한 작용 메카니즘을 목표로 하는 다른 활성 화합물과 배합된다. 이러한 활성제는, 예를 들어 하이드로퀴논, 모노벤질에테르, 아부팅(arbuting), 테옥시아부틴, 메퀴놀, N-아세틸-4-S-시스테인아미닐페놀, 코지산, 아젤라산, 글리콜산, 젠티스산, 파보노이드, 알로에신(aloesin), 스틸벤 및 스틸벤 유도체, 감초 추출물, 베어베리 추출물, 멀베리 추출물, 알로에 베라 겔, 글라브리딘(glabridin), 비타민 C 유도체, 마그네슘 아스코르빌 포스페이트, 테트라헥실테실 아스코르베이트, 비타민 e 유도체, 트라넥삼산 및 그의 유도체, TGF-β 단백질의 바이오미메트릭(biomimetic), 센타우레이딘, 니아신아미드, PAR-2 저해제, 락틴, 네오글리코단백질, 레소르시놀 및 그의 유도체, 및 Nivitol™을 포함하며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0107] 다른 구체예에서, 본 조성물은 바쿠치올 조성물과 상승적으로 작용하여 감염, 감염과 연관된 염증, 및 표피 전환의 가속화를 경감할 수 있는 항염증제 및 항미생물제를 포함한다. 이러한 활성제는, 예를 들어 α-하이드록시산, 살리실산, 리놀레산, 레티노이드, 벤조일 퍼옥사이드, 소듐 셀라세타미드, 클린다마이신, 에리트로마이신, 다프손, 테트라사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린, 아연, 에스트로겐 및 그의 유도체, 안티안드로겐, 황, 코르티코스테로이드, 코르티손, 타자로텐, 커커민 추출물, 아카시아 추출물, 황금 추출물, 녹차 추출물, 포도씨 추출물을 포함하며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0108] 특정 구체예에서, 조성물은 보조제 또는 담체를 포함한다. 보조제는 전형적으로 특이적 생물활성제에 대한 포유동물의 생물학적 반응을 통상적으로 증강하는 물질이다. 적합한 보조제는, 예를 들어 Freund 보조제; 기타 박테리아 세포벽 성분; 알루미눔, 칼슘, 구리, 철, 아연, 마그네슘, 주석 포함 염; 실리카; 미세연마제(microdermabrasion agents), 폴리뉴클레오티드; 톱소이드; 혈청 단백질; 바이러스 피막 단백질; 다른 박테리아 유래 조제물; 감마 인터페론; 헌터스 티터맥스 보조제(Hunter's Titermax adjuvant; Vaxcel. T.M., Inc. Norcross, Ga)와 같은 블록 코폴리머 보조제; 리비 보조제(Ribi adjuvant; Ribi ImmunoChem Research, Inc., (Hamilton, Mont.)로부터 입수가 가능); 및 Quil A(Superfos Biosector A/S(덴마크)로부터 입수가 가능) 같은 사포닌 및 그의 유도체를 포함하며, 이에 한정되지는 않는다. 담체는 전형적으로 치료된 수용체에서 치료학적 조성물의 반감기를 증가시키는 화합물이다. 적합한 담체는 중합성 서방형 배합물, 생분해성 임플란트, 리포솜, 나노캡슐, 나노입자, 박테리아, 바이러스, 오일, 에스테르 및 글리콜을 포함하며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0109] 다른 실시예에서, 본 조성물은 조성물을 수용체 내로 서서히 방출하는 서방형 배합물로 제조된다. 여기에서 사용된 서방형 배합물은 바쿠치올 조성물을 서방형 비히클 내에 포함한다. 적합한 서방형 비히클은 당업자들에게 공지되어 있다. 서방형 배합물의 예는 생분해성(즉, bioerodible)이며 캡슐을 포함한다.
- [0110] 일 구체예에서, 적합한 연고는 일반적으로 국소 배합물의 총 중량에 기초하여 0.001% 내지 100%, 65% 내지 100% (예를 들어, 75% 내지 96%)의 백색 소프트 파라핀, 0% 내지 15%의 액상 파라핀, 및 0% 내지 7% (예를 들어 3 내지 7%)의 라놀린 또는 그의 유도체 또는 합성 등가물의 범위로부터 선택된 효과적이며, 독성을 나타내지 않는 양의 바람직한 농도의 UP256(바쿠치올)로 구성된다. 또 다른 구체예에서, 연고는 폴리에틸렌-액상 파라핀 매트릭스를 포함할 수 있다.
- [0111] 일 구체예에서, 적합한 크림은 앞서 제공한 바와 같이 합성되고/되거나 단일 식물 또는 다수의 식물들로부터 단리된 바람직한 농도의 UP256(바쿠치올)과 함께 에멀전 시스템으로 구성된다. 상기 에멀전 시스템은 바람직하게

2 내지 10%의 폴리옥시에틸렌 알코올(예를 들어, 상표명 Cetomacrogol™1000으로 입수가능한 혼합물), 10 내지 25%의 스테아릴 알코올, 20 내지 60%의 액상 파라핀, 및 10 내지 65%의 물; 및 하나 이상의 보존제, 예를 들어 0.1 내지 1%의 N,N"-메틸렌비스[N'-(3-(하이드록시메틸)-2,5-디옥소-4-이미다졸리디닐)우레아] (제품명 Imidurea USNF로 입수가능), 0.1 내지 1%의 알킬 4-하이드록시벤조에이트(예를 들어, 상표명 Nipastat로 Nipa Laboratories로부터 입수가능한 혼합물), 0.01 내지 0.1%의 소듐 부틸 4-하이드록시벤조에이트(상표명 Nipabutyl sodium으로 Nipa Laboratories로부터 입수가능), 및 0.1 내지 2%의 페녹시에탄올로 구성된다.

[0112] 일 구체예에서, 적합한 겔은 반고체 시스템으로 구성되며, 여기에서 액체상은 고도의 가교결합으로 삼차원 폴리머 매트릭스 내에 제한된다. 상기 액체상은 바람직한 양의 UP256(바쿠치올)과 함께, 물, 0.01 내지 20%의 수-혼화성(water-miscible) 첨가제, 예를 들어 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 프로필렌 글리콜, 및 0.01 내지 10%, 바람직하게 0.5 내지 2%의 증점제, 예를 들어 트라가칸트, 펙틴, 카라긴, 아가 및 알긴산 같은 천연물 또는, 메틸셀룰로스와 카복시폴리메틸렌(carbopol) 같은 합성 또는 반합성 화합물; 및 하나 이상의 보존제, 예를 들어 0.1 내지 2%의 메틸 4-하이드록시벤조에이트(메틸파라벤) 또는 페녹시에탄올-디퍼렌셜(differential)로 구성될 수 있다. 다른 적합한 배합물은 바람직한 양의 UP256(바쿠치올)과 함께, 70 내지 90%의 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, 미국 처방집(U.S. National Formulary; USNF)에 따라 제조된 40%의 폴리에틸렌 글리콜 3350 및 60%의 폴리에틸렌 글리콜 400을 함유하는 폴리에틸렌 글리콜 연고), 5 내지 20%의 물, 0.02 내지 0.25%의 항산화제(예를 들어, 부틸화된 하이드록시톨루엔) 및 0.005 내지 0.1%의 킬레이트제(예를 들어, 에틸렌디아민 테트라아세트산; EDTA)로 구성된다.

[0113] 앞서 사용된 소프트 파라핀이란 용어는 크림 또는 연고 베이스인 백색 소프트 파라핀과 황색 소프트 파라핀을 포함한다. 라놀린이란 용어는 천연 양모지(native wool fat) 및 정제된 양모지를 포함한다. 라놀린 유도체들은 특히 그의 물리적 또는 화학적 특성을 변경하기 위하여 화학적으로 개질된 라놀린을 포함하며, 라놀린의 합성 등가물은 특히 합성 또는 반합성 화합물 및 라놀린 대용으로써 제약 및 화장품업계에 공지되어 사용되고 있고, 예를 들어 라놀린 치환체로 지칭될 수 있는 혼합물을 포함한다.

[0114] 사용가능한 라놀린의 적합한 합성 등가물은 Softisan 649로서 알려진 상표명 Softisan™으로 입수가능한 물질이다. Dynamit Nobel Aktiengesellschaft로부터 입수할 수 있는 Softisan 649는 천연 식물성 지방산, 이소스테아르산 및 아디프산의 글리세린 에스테르이고; 그의 특성은 H. Hermsdorf in Fette, Seifen, Anstrichmittel, Issue No. 84, No.3 (1982), pp. 3-6에서 언급되었다.

[0115] 적합한 연고 또는 크림 베이스의 구성성분으로서 본원에서 상기한 다른 물질들 및 그의 특성은 표준 참고 작업(standard reference works), 예를 들어 미국 약전(pharmacopoeia)에 논의되어 있다. 세토마크로골 1000(cetomacrogol 1000)은 화학식 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 를 가지며, 여기에서 m은 15 또는 17일 수 있고, n은 20 내지 24일 수 있다. 부틸화된 하이드록시톨루엔은 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸(2,6-di-tert-butyl-p-cresol)이다. 니파스타트(Nipastat)는 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 4-하이드록시벤조에이트의 혼합물이다.

[0116] 본 발명의 조성물은 일반적인 약학 기술에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 앞서 언급된 조성물은, 예를 들어 높은 온도, 예를 들어 60-70 °C에서 소프트 파라핀, 만일 존재한다면 액상 파라핀 및 라놀린 또는 그의 유도체 또는 합성 등가물과 함께 혼합하여 편리하게 제조될 수 있다. 이후, 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 무피로신(mupirocin)의 수화된 결정성 칼슘염을 첨가한 후, 코르티코스테로이드 및 임의의 다른 성분과 함께 적절한 분산을 위해 교반하였다.

[0117] 최종적으로, 바쿠치올은 $\log P = 6.13$ 의 분배계수를 가진다. 화학적 화합물의 분배계수는 그의 친수성/친유성 밸런스와 그에 따른 그의 잠재적 생체이용가능성에 대한 열역학적 척도를 제공한다. 분배계수가 6.13이라는 것은 이 화합물이 전달 시스템으로 배합되었을 때 높은 세포막 투과성과 생체이용가능성을 가지는 것을 의미한다. 피부 관리 크림으로서 활성 화합물 - 바쿠치올의 피부 투과성을 단리된 인간 피부에 대한 생체의 시험으로 정량하였다. 그 결과, 양호한 피부 투과성과 생체이용가능성을 나타냈다. 특정 구체예에서, 본 조성물은 피부 투과성 증강제를 포함한다.

[0118] D. 바쿠치올 조성물의 투여

[0119] 본 발명의 조성물은 당업자들에게 알려진 방법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 조성물은 내부로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 투여방법은, 예를 들어 경장(경구) 투여, 비경구(정맥내, 피하, 및 근육내) 투여 및 국

소 적용을 포함하며, 이에 한정되지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 조성물은 국소로 투여된다.

[0120] PIH용 최종 피부관리제품에서 바쿠치올 조성물의 함량은 0.001 중량% 내지 99.9 중량%의 범위일 수 있다. 일부 구체예에서, 조성물은 0.1% 내지 2% 바쿠치올을 포함한다. 다른 예에서, 조성물은 0.5% 또는 1.0% 바쿠치올을 포함한다. 특정 구체예에서, PIH 피부관리크림에서 바쿠치올 조성물의 양은 0.5-1% 범위이다. 본 발명에 따른 방법은 포유동물에게 바쿠치올을 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 내부로 또는 국소적으로 투여하는 것을 포함하며, 바쿠치올은 완전 합성되거나 천연 공급원(또는 이들의 조합)에서 단리되며 불순물, 특히 퓨라노쿠마린 불순물을 실질적으로 포함하지 않는다(예를 들어, 500 ppm 미만).

[0121] 본 발명의 치료제는 당업자들에게 알려진, 치료학적 조성물을 국소 투여하기 위한 적합한 방법으로 국소 투여될 수 있다. 이러한 투여방법은, 예를 들어 연고, 젤, 로션 또는 크림 베이스로서 또는, 에멀전으로서, 패치, 드레싱 또는 마스크, 비점착성 거즈, 붕대, 면봉, 클로쓰 와이프로서 투여되는 것을 포함하며, 이에 한정되지는 않는다. 이러한 국소 적용은 영향 부위에 국소 투여용으로 알려진 표준방법을 사용하여 국소적으로 투여될 수 있다. 치료 조성물은 투여방법에 따라 다양한 단일용량(unit dosage) 형태로 투여될 수 있다. 특별한 전달 방법에 있어서는, 치료 조성물을 상기한 바와 같은 부형제와 배합할 수 있다. 본 발명의 치료 조성물은 수용체, 바람직하게 포유동물, 더욱 바람직하게 인간에게 투여할 수 있다. 구체적인 투여방법은 치료되는 상태에 따라 달라진다.

[0122] 투여방식과 상관없이, 특정 투약량은 수용체의 근사 체중에 따라 계산된다. 각각의 상기한 배합물과 관련한 치료에서 적절한 용량을 결정하는데 필요한 산출의 추가적 정교화(refinement)는 당업자들에 의해 관례적으로 만들어지며, 과도한 실험 없이, 특히 여기에 기재된 용량 정보 및 검정에 따라 그들에 의해 일상적으로 수행되는 업무의 범위 내에 있다. 용량은 적절한 투약량(dose)-반응 데이터와 함께 사용된 용량을 결정하기 위해 구축된 검정법의 사용을 통해 확인할 수 있다. 특정 구체예에서, 바쿠치올을 포함하는 조성물의 투약량은 체중 1 킬로그램 당 0.001 내지 200 mg의 범위이다.

[0123] 다음 실시예는 예시를 위해 제공된 것으로, 본 발명을 제한하지는 않는다.

[0124] 실시예 1: HPLC에 의한 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 정량

[0125] 추출물, 분획물, 처리 물질, 성분 및 최종 배합된 생성물 중의 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 양을 포토다이오드 어레이 검출기(PhotoDiode Array detector; HPLC/PDA)를 사용하여 고압 액체크로마토그래피(HPLC)로 정량하였다. 목적 화합물을 루나 페닐-헥실 컬럼(Luna Phenyl-hexyl column; 250 mm x 4.6 mm)으로부터 36% 내지 100%의 아세토니트릴(ACN)의 ACN 또는 메탄올 및 물 그래디언트를 사용하여 12분에 걸쳐 용출한 다음, 3분 동안 100%의 ACN으로 용출하였다. 사용된 상세한 HPLC 조건은 표 1에 기재하였다. HPLC 분리의 크로마토그램은 도 1에 도시하였다. 목적 화합물을 확인하고 상업적으로 입수할 수 있는 순수 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌을 정량 표준으로서 사용하여 체류시간 및 UV 피크 면적(peak area)에 기초하여 정량하였다. 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 체류시간은 각각 18.19분, 7.33분 및 7.95분이었다.

표 1: 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌의 정량을 위한 HPLC 조건

컬럼	루나 페닐-헥실, 150 x 4.6mm
그래디언트	0-8분 36% ACN/물 8-20분 36% ACN/물 내지 100% ACN 20-23분 100% ACN 23-28분 36% ACN/물
유속	1 mL/분
검출	0-11분 246nm (솔라렌 및 안젤리신에 대하여, 7-8분) 11-28분 260nm (바쿠치올에 대하여, 18-19분)
온도	35°C
표준 농도	바쿠치올에 대하여 0.1 mg/mL MeOH 솔라렌 및 안젤리신에 대하여 0.025 mg/mL
주출 준비물	0.2 mg/mL MeOH
선형 범위	0.01 mg/mL 내지 0.15 mg/mL

[0126]

[0127] 실시예 2

[0128] 서레일리아 식물에서 바쿠치올을 추출하는 일반적 방법

[0129] 방법 A - 플라스크에 용매(100 mL)와 서레일리아 코릴리폴리아 종자 분말(10 g)을 첨가하고 혼합물을 리스트 진탕기(wrist shaker)에서 실온으로 1시간 동안 진탕하였다. 이후, 혼합물을 필터에 통과시켜서 여액을 모았다. 추출 공정을 새로운 용매를 사용하여 일 회 이상 반복하고, 여액을 모아서 용매를 회전증발기로 제거하여 잔류물을 고진공 하에 건조하였다.

[0130] 방법 B - 플라스크에 용매(50 mL)와 서레일리아 코릴리폴리아 종자 분말(10 g)을 첨가하고 혼합물을 40분 동안 환류하였다. 이후, 용액을 여과하고, 추출 공정을 새로운 용매를 사용하여 2회 이상 반복하였다. 여액을 모으고 용매를 증발시켜서 건조 추출물을 얻었다.

[0131] 상기한 추출 방법 후에 동일한 식물 물질을 다음 용매들로 추출하였다: 디클로로메탄(DCM), 에틸 아세테이트(EtOAc), 아세톤, 메탄올(MeOH), 석유 에테르(BP 35-60 °C) 및 석유 에테르(BP 60-90 °C). 이후, 추출물과 식물 물질을 실시예 1에 기술된 HPLC 분석으로 분석하였다. 결과를 표 2에 기재하였다.

표 2: 여러가지 서레일리아 코릴리폴리아 추출물의 정량

	석유 에테르 (35-60 °C)	DCM	EtOAc	아세톤	MeOH	석유 에테르 (35-60 °C)	석유 에테르 (60-90 °C)
추출물 중량(g)	0.5833	1.7535	1.6710	1.8932	1.8795	0.6457	0.9203
추출물에서 바쿠치올 %	29.1%	14.2%	13.7%	13.7%	13.9%	25.6%	27.2%
식물에서 바쿠치올 %	1.7%	2.5%	2.3%	2.6%	2.6%	2.6%	2.7%
방법	리스트 진탕기(100ml/10g 고체)					환류(50ml/10g 고체)	

[0132]

[0133] 실시예 3

[0134] 바쿠치올 추출물을 정제하기 위한 크로마토그래피 방법

[0135] 다양한 크로마토그래피 방법을 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여 서레일리아 코릴리폴리아의 종자에서 단리된 정제되지 않은 용매 추출물에서 바쿠치올을 정제하기 위해 사용하였다. 특정 컬럼 강화 방법의 효능이 퓨라노쿠마린 오염, 특히 솔라렌/이소솔라렌 오염이 없는 고순도 바쿠치올을 얻는 방법으로 입증되었다. 요약하면, 각각의 비어있는 컬럼 카트리지를 (내부직경(ID) 1.3 cm 및 용량 20 mL, Bio-Rad 제품)를 상이한 매질로 채우고 바쿠치올에서 퓨라노쿠마린 불순물을 분리하기 위한 시도로 다양한 용매로 용출하였다. 분획물들(분획당 10 mL)을 시험관에 모으고 20% EtOAc/석유 에테르로 전개된 실리카겔 TLC 플레이트로 분석하였다. 표적 화합물, 바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌을 표준 화합물 용액을 사용하여 측정된 그의 체류시간에 근거하여 확인하였다. 결과를 표 3에 기재하였다. 표 3에 기술된 여러가지 방법들이 합성 및 천연 공급원에서 퓨라노쿠마린과 바쿠치올을 분리하는데 유용하였으나, 이러한 방법론의 비용은 대량 규모의 생산에 경제적으로 적합하지 않을 수 있다.

표 3: 서레일리아 코틸리폴리아의 조추출물에서 퓨라노쿠마린과 바쿠치올의

컬럼 크로마토그래피 분리에 대한 요약

매질	컬럼 크기/ 주출물 충전	용출 용매	결과
Al ₂ O ₃ (중성) (J.T.Baker)	2mL/25mg	1. 석유 에테르 2. EtOAc 3. MeOH	거의 분리되지 않음
XAD-4 (아말라이트 폴 리스티렌 수지)	5mL/19mg	100% 물에서 100% MeOH로 20%씩 증량하는 MeOH/물 그라디언트	분리되지 않음
XAD-7 (아말라이트 폴 리아크릴레 이트 수지)	8mL/16mg	100% 석유 에테르에서 100% MeOH 로 20%씩 증량하는 석유 에테르/ EtOAc 그라디언트 100% 물에서 100% MeOH로 20%씩 증량하는 MeOH/물 그라디언트	약간 분리됨 거의 분리되지 않음
폴리아미드	5mL/50mg	1. 석유 에테르 2. 5% 아세톤/석유 에테르 3. 아세톤	분리되지 않음
LH-20	8mL/50mg	석유 에테르	분리되지 않음
실리카 겔	5mL/50mg	1. 석유 에테르 2. 15% EtOAc/석유 에테르	잘 분리됨
CG-71md	5mL/50mg	1. 석유 에테르 2. 아세톤	분리되지 않음
CG-161cd	5mL/50mg	석유 에테르	분리되지 않음
	6mL/50mg	MeOH/물 단계 그라디언트	잘 분리되나 낮은 수율

[0136]

[0137]

실시예 4

[0138]

서레일리아 코틸리폴리아의 종자에서 단리된 추출물의 가수분해

[0139]

약 25% 바쿠치올을 함유한 서레일리아 코틸리폴리아 종자의 헥산 추출물 또는 CO₂ 초임계 유동 추출물을 1M NaOH 용액과 혼합하였다. 용액을 반응용기에서 80 °C 또는 그 이상의 온도에서 적어도 1시간 동안 가열하였다. 소량의 용액을 플라스크에서 주기적으로 취하여 실시예 1에 기술된 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석으로 솔라렌과 이소솔라렌의 피크가 완전히 사라진 것으로 나타난 후에 반응을 중지하였다. 이후 반응 혼합물을 실온으로 냉각하고 수성층을 제거하였다. 용액을 NaCl 포화용액으로 여러 번 세척한 후, 유기층을 에틸 아세테이트 또는 다른 유기용매로 추출하였다. 유기용액을 여과하고 세척 및 건조한 후 증발시켜서 50% 이상의 바쿠치올 함량과 총합 100 ppm 이하의 솔라렌과 안젤리신(angelicin)(이소솔라렌)을 갖는 적갈색 시럽을 얻었다.

[0140]

실시예 5

[0141]

퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물의 항산화 특성

[0142]

57.35%의 바쿠치올 및 총합 100 ppm 미만의 솔라렌과 안젤리신(이소솔라렌)을 포함하는 천연 바쿠치올 조성물 (Lot# UP256-0906MP)을 퍼옥실 라디칼, 하이드록실 라디칼, 퍼옥시나이트라이트, 슈퍼옥사이드 음이온 및 싱글렛 산소(singlet oxygen)에 대한 그의 항산화능력을 Brunswick laboratories(Norton, MA 미국)에서 평가하였다. 바쿠치올 조성물의 총 산소 라디칼 흡수 용량을 공지된 방법에 따라 측정하였다(Ou, B. et al., J Agric and Food Chem, 2001, 49 (10): 4619-4626; Prior, RL. et al., J Agric and Food Chem, 2005, 53: 4290-4302). 결과를 표 4에 기재하였다.

표 4: 바쿠트룰™(UP256)의 항산화 프로필

시험	결과 [†]	단위
퍼옥실 라디칼에 대한 항산화력	12,848	μmole TE/g
하이드록실 라디칼에 대한 항산화력	6,262	μmole TE/g
퍼옥시나이트라이트에 대한 항산화력	289	μmole TE/g
슈퍼옥사이드 음이온에 대한 항산화력	69,929	μmole TE/g
싱글렛 산소에 대한 항산화력	3,067	μmole TE/g
총 ORAC _{PH} (상기 항목의 총합)	92,395	μmole TE/g

[0143]

- [0144] *ORAC 검정의 허용가능한 정확도는 표준편차에 대하여 <15%이다.
- [0145] †액체 샘플을 칭량하고 점도에 의해 추출하였다.
- [0146] 체내에서는 5가지의 우세한 반응종이 발견된다: 퍼옥실 라디칼, 하이드록실 라디칼, 퍼옥시나이트라이트, 슈퍼옥사이드 음이온 및 싱글렛 산소. 총 ORAC_{FN}은 5가지의 우세한 반응종에 대한 식품영양제품의 총 항산화력의 수치를 제공한다.
- [0147] 실시예 6
- [0148] 바쿠치올 조성물의 4-TBP 세포독성에 대한 항산화 보호효과의 평가
- [0149] 77.02%의 바쿠치올 및 총합 100 ppm 미만의 솔라렌과 안젤리신(이소솔라렌)을 포함하는 천연 바쿠치올 조성물을 5일의 치료기간 동안 95% 생존력 투약량의 화합물 농도를 사용하여 산화성 스트레스의 4-터셔리부틸페놀(4-TBP) 유도를 방지하는 그의 능력을 평가하여 항산화 특성에 대해 시험하였다. 산화성 스트레스는 Image-iT Live Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (Invitrogen)를 사용하여 반응성 산소종(ROS)의 생성을 평가하여 측정하였다. 이 검정에서, 카복시-2',7'-디클로로디하이드로플루오레신 디아세테이트를 배양된 세포에 30분 동안 첨가하였고, 여기에서 이것은 멜라닌세포 내로 확산하여 세포내 에스테르에 의해 ROS와 반응하는 2',7'-디클로로플루오레신(DCF)으로 가수분해되어 형광성 DCF를 생성한다. 200 μ M 또는 400 μ M의 4-TBP로 처리한 5일 후에, 멜라닌세포에서 ROS의 생성이 투약량 반응(즉, 각각 적정 내지 강력)을 나타낸 반면, 미처리 및 DMSO 처리된 멜라닌세포는 ROS 생성을 나타내지 않았다. 처리 프로토콜이 시험 화합물을 포함하는 경우, UP256(바쿠치올)은 도 3에서 보이는 바와 같이 강력한 항산화 특성을 나타내었다.
- [0150] 실시예 7
- [0151] 바쿠치올 조성물의 티로시나제 저해 활성
- [0152] 77.02% 바쿠치올(100% 순도)을 포함하는 2개의 천연 바쿠치올 조성물을 티로시나제 저해 활성에 대해 시험하였다. 두 물질은 총합 100 ppm 미만의 솔라렌과 안젤리신(이소솔라렌)을 함유하였다.
- [0153] 티로시나제 저해 검정을 Jones 등(Pigment. Cell Res. 15:335 (2002))이 보고한 방법을 사용하여 수행하였다. 이 방법을 사용하여 티로시나제의 기질인 L-Dopa를 도파크롬(dopachrome)으로 전환하고 450 nm에서의 흡광도를 모니터링하였다. 티로시나제를 50 mM 인산칼륨 완충액, pH 6.8(검정용 완충액)으로 2000 U/ml로 제조하여 사용 전에 1 ml 분액으로 -20 °C에 보관하였다. 검정에서 사용하기 위하여 효소 스톱용액을 해동하여 검정용 완충액으로 200 U/ml로 희석하였다. 기질인 L-DOPA의 2 mM 실험용액을 검정용 완충액으로 각각의 검정을 위해 제조하였다. 샘플을 10% DMSO (0.5 ml)에 용해하여 검정 완충액으로 5 ml로 희석하였다. 반응 혼합물은 0.050 ml의 2 mM L-DOPA, 0.050 ml의 200 U/ml 버섯 티로시나제 및 0.050 ml의 저해제를 포함하였다. 검정용 완충액을 사용하여 반응 부피를 200 μ l로 조절하였다. 검정을 96웰 Falcon 3097 편평바닥 마이크로타이터 플레이트(Beckton Dickinson, NJ, 미국)에서 수행하였다. 도파크롬의 출현을 WALLAC 1420 Multilable Counter (Turku, 핀란드)로 측정하였다. 평균 속도는 450 nm에서의 분당 흡광도 (ΔA_{450}) 변화로 측정된 선형 효소율로부터 결정되었다. 시험 샘플에 의한 티로시나제의 저해율은 식 (1)을 사용하는 샘플 대 대조군의 흡광도 비교에 의해 측정되었다:
- [0154]
$$(\text{음성 대조군 흡수} - \text{샘플 흡수}) / \text{음성 대조군 흡수} \times 100 \quad (1)$$
- [0155] 도 4에서 보이는 바와 같이, 양 바쿠치올 조성물은 티로시나제 저해 활성을 나타내지 않는 반면, 양성 대조군(코지산)은 63.9 μ M의 IC₅₀ 값으로 투약량 반응성 티로시나제 저해를 나타내었다.
- [0156] 실시예 8
- [0157] 바쿠치올 조성물의 화장품 크림, 젤 및 로션 내 배합

[0158] 86.54% 바쿠치올 및 77.02% 바쿠치올을 포함하는 2개의 천연 바쿠치올 조성물을 하기한 바와 같이 화장품 비히클 또는 복합성 피부 관리 크림, 겔 또는 로션에 배합하였다.

[0159] 배합물 A

[0160]	바쿠치올	1.0%
[0161]	비타민 E 아세테이트	0.1%
[0162]	페노닙(Phenonip)	0.5%
[0163]	트란스쿠톨(Transcutol)	98.4%

[0164] 배합물 B

[0165]	바쿠치올	1.0%
[0166]	비타민 E 아세테이트	0.1%
[0167]	카프릴 트리글리세라이드	98.4%
[0168]	페노닙	0.5%

[0169] 배합물 C

[0170]	바쿠치올	1.0%
[0171]	폴리솔베이트-20	15.0%
[0172]	트란스쿠톨	5.0%
[0173]	비타민 E 아세테이트	0.1%
[0174]	정제수	78.2%
[0175]	페노닙	0.5%

표 5: 배합물 D

No.	물질	INCI 명칭
1	탈이온수(D.I.WATER)	물
2	Gemseal 40	C15-19 알칸
3	GLYCERIN	글리세린
4	1,3-B.G	부틸렌 글리콜
5	Carbopol#940	카보머
6	ARLATON 2121	소르비탄 스테아레이트/슈크로스 코코에이트
7	Salacos 816T	C15-19 알칸
8	해바라기유	Helianthus Annuus(해바라기) 종자유
9	TREHALOSE	트레할로스
10	ERITHRITOL	에리트리톨
11	Dow Corning #345	사이클로메티콘
12	CALCOL 68 (CETANOL)	세타놀
13	STEARIC ACID (EMERSOL#132)	스테아르산
14	CITHROL GMS A/S(AR#165)	글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트
15	GMS #205	글리세릴 스테아레이트 SE
16	BEE'S WAX	벌납
17	SODIUM HYALURONATE(Hyasol)	소듐 히알루로네이트
[0176]	바쿠치올 0.5%	가수분해된 <i>Psoralea corylifolia</i> 추출물

[0177] 실시예 9

[0178] 바쿠치올 조성물의 안정성 평가

[0179] 86.54% 바쿠치올과 77.02% 바쿠치올 및 총합 100 ppm 미만의 솔라렌과 안젤리신(이소소랄렌)을 포함하는 2개의 천연 바쿠치올 조성물을 화장품 비히클 또는 복합성 피부관리 크림에 배합하고 시험관내 모델 또는 인간 임상시험에서 그의 안전성에 대해 시험하였다. 표 6에서 입증되는 바와 같이, 바쿠치올 조성물은 눈 자극, 피부 자극, 피부 접촉 알러지성 민감화 및 광 독성을 나타내지 않았다. 조성물은 넓은 농도 범위(20 중량% 내지 100 중량%의 바쿠치올)에서 확실한 안전성 및 양호한 피부 투과특성을 가졌다.

표 6: 바쿠트룰™의 안전성 시험 결과

시험명	시험방법의 간단한 설명	결과
EPIOCULAR MIT 생존력 검정	EpiOcular 샘플의 MIT 생존력에 대한 ET50을 측정하여 시험물품의 눈 독성 또는 자극 잠재성을 평가하는 생물학적 검정이다.	1% 농도의 시험품을 최소 내지 비자극성 카테고리 분류하였다.
캠버 난절법 (scarification)	화학적 화합물의 자극 잠재성을 평가하는 임상시험이다. 이 시험은 스크래칭으로 민감화된 피부를 가진 사람을 대상으로 수행된다. 시험되는 변수는 약화된 피부의 자극을 유발하는 화합물의 작용이다.	난절된 피부상에서 0.5% 시험품의 효과는 72시간의 식염수 대조군에 필적하였다.
누적패치 (repeated insult patch)	화학적 화합물의 자극 및 알러지성 잠재력을 모두 평가하는 임상시험이다. 이 시험은 건강한 지원자의 피부에 화합물을 반복 적용하여 수행된다. 시험되는 변수는 홍반 또는 부종을 유발하는 화합물의 작용이다.	시험 조건 하에서 시험품은 피부자극 또는 알러지성 접촉 감각에 대한 잠재성을 나타내지 않았다.
광독성	시험 화합물의 광독성 잠재성을 평가하는 임상시험이다. 이 시험은 사람을 대상으로 화합물을 피부에 적용하여 UV 조사하고 조사기간 후 최대 1주까지 수행된다. 시험되는 변수는 부작용 또는 설명되지 않는 반응을 유발하는 화합물의 작용이다.	시험품은 시험된 0.5% 농도의 레퍼런스에 따라 광독성이 아닌 것으로 간주되었다.
AMES	화학적 화합물의 돌연변이 가능성을 평가하는 생물학적 검정이다. 이 시험은 특이적 돌연변이를 수반하는 박테리아 균주를 사용한다. 시험되는 변수는 돌연변이 리버전을 유발하는 돌연변이원(mutagen)의 작용이다.	시험품은 최대 3 mg/플레이트 투약량에서 어떠한 돌연변이성 변화와도 연관되지 않았다.
경피 흡수	화학적 화합물의 피부 투과성을 평가하는 생체의 시험이다. 이 시험은 사체 피부에 단일적용하여 수행된다. 시험되는 변수는 임의의 기간 동안 피부에 흡수된 시험 화합물의 백분율이다.	0.5% 배합농도에서, 테이터는 48시간 동안 양호한 투과성과 피부내 흡수를 나타내었다.

[0180]

[0181] 실시예 10

[0182] 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물의 임상 평가

[0183] 서레일리아 코릴리폴리아 종자에서 추출 및 강화된, 77.02% 바쿠치올과 100 ppm 미만의 퓨라노쿠마린을 포함하는 천연 바쿠치올 조성물(바쿠트룰™)을 화장품 피부관리 크림(배합물 D, 실시예 8)에 배합하여 사람 임상시험에서 시험하였다. 이 시험은 국소적용한 후 0.5% 농도의 바쿠트룰™의 임상효능을 평가하기 위한 파일럿, 오픈 라벨 인체 시험이다. 이 시험에서는 염증후 색소과다침착(PIH)의 개선을 위한 천연 바쿠치올 조성물의 효능을 평가하기 위한 제외/선정 기준에 부합하는 5명의 대상자를 포함하였다. 시험 기간은 12주였다. 대상자들에게는 바쿠트룰™ 0.5% 크림을 1일 아침과 저녁에 2회 적용하고 스크리닝 방문을 포함하여 총 9회 방문 동안 위치에 복귀하도록 지시되었다. 평가는 피부 상태에 대한 Investigator Global Assessment(IGA), 피부 염증후 색소과다침착(PIH)의 전체 등급과 중증도의 평가 및, 홍반, 건조증, 박리증, 유성(Oiliness), 안정성 및 내약성(Tolerability)을 포함한 기타 연관된 피부 상태를 포함하였다. 대상자 설문지는 자극, 피부 쾌적감, 다른 제품과 자외선 차단제 사용과 관련한 안전성과 순응도 질문을 포함하였다. 기점, 4주, 8주 및 12주에 사진을 촬영하였다. PIH 중증도 기점으로부터의 변화, PIH 등급 기점으로부터의 변화, 및 IGA 스케일에 따른 성공률을 기록하고 분석하였다. 중증도의 PIH 등급에 대한 다음 6개 레벨(0=없음, 1=약간, 2=경증, 3=중등도, 4=중등도 중증, 5=중증) 및 PIH 영향을 받은 안면의 전체 영역이 임상결과 분석을 위해 사용되었다.

[0184] 도 5에서 보이는 바와 같이, 0.5% 바쿠트룰™을 포함하는 국소 크림으로 치료된 총 다섯 명의 대상자들은 적어도 한 등급의 PIH 중증도 감소를 나타냈다. PIH 영향을 받은 안면의 개선율은 8주의 지속적 적용 후에 50% 이상이었다(도 6 참조). PIH와 그의 중증도의 평균 백분율 및 절대 등급값 개선을 도 7과 8에 요약하였다. 서레일리아 코릴리폴리아의 종자에서 추출되고 강화된, 77.02% 바쿠치올과 100 ppm 미만의 퓨라노쿠마린을 포함하는 천연 바쿠치올 조성물을 사용하여 빠르면 4주 후에 PIH와 중증도 모두에서 40% 초과 개선, 또는 1등급 초과 개선이 얻어졌다. 도 9에서 보이는 바와 같은 두 명의 대상자 사진에서 PIH 영향을 받은 얼굴 피부부위에서 PIH의 실질적 감소가 뚜렷하다. 두 명의 대상자 모두가 바쿠트룰™ 크림을 국소 적용한 후에 경증 및 중증도 여드름과 연관된 피부 염증후 색소과다침착(PIH)의 점진적 향상을 나타냈다.

[0185] 항미생물제 또는 항염증제 또는 이들의 조합물을 함유하는 일반적인 여드름 치료제와 비교한 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물을 사용한 임상 결과를 표 7에 요약하였다. 이 데이터들은 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물이 염증 및 비염증 병소수를 개선할 뿐만 아니라 피부의 염증후 색소과다침착을 상당히 개선하는 것을 분명히 보여주고 있다. 실시예 7에서 보이는 바와 같은 티로시나제 저해가 없는 것을 기초하였을 때 바쿠치올 조성물의 PIH 효능은 기대이상이다.

표 7: 바쿠트룰과 OTC 약제에 대한 임상결과 요약

시험 1		시험 2		시험 3	시험 4
10 주 시험 *		12 주 시험 *		12 주 시험 *	12 주 시험 *
Benzaclin (5% 벤조일 퍼옥사이드 & 1% 클린다마이신) N=120	벤조일 퍼옥사이드 (5%) N=120	클린다마이신 (1%) N=120	비히클 N=120	ClindaGel (1% 클린다마이신) N=162	바쿠트룰 (UP256) 0.5% N=13
염증성 병소수의 평균 감소율					
46%	32%	16%	+ 3%	51%	33%
비염증성 병소수의 평균 감소율					
22%	22%	9%	+1%	25%	16%
총 병소수의 평균 감소율					
36%	28%	15%	0.2%	38%	26%
염증후 색소과다침착의 개선					
0	0	0	0	0	62%

[0186]

[0187] 실시예 11

[0188] 염증후 색소과다침착 효과를 약화하는 퓨라노쿠마린이 없는 바쿠치올 조성물의 평가

[0189] 0.5% (wt/wt) 바쿠치올(UP256) 크림의 안전성과 효능을 여드름과 관련된 PIH 치료를 위한 이중 맹검 플라시보와 양성 관리화 시험에서 평가하였다. 이 시험에서는 아시아계에서 0.5% 농도의 바쿠치올 크림, 2% 살리실산 크림 및 플라시보 크림(비히클)을 평가하였다. 참가자들에게는 시험 크림을 얼굴에 1일 2회(AM/PM) 적용하도록 지시되었다. 시험 참가자들에게 적용 지시서와 자외선 차단제를 제공하였다.

[0190] 시험 개체군은 의료기록으로 결정된 일반적으로 건강한 18세 초과 40세 미만의 남성 및 여성 대상으로 구성되었다. 바쿠치올 시험 그룹으로 18명, 살리실산(SAL) 시험 그룹으로 20명, 그리고 플라시보 시험 그룹으로 19명이 등록되었다.

[0191] 조사관과 시험 스태프는 여드름 또는 (주근깨(Ephelides), 일광흑자(lentigines) 또는 멜리스마(melisma)를 포함하지 않는) 다른 조직손상과 연관된 PIH의 명확한 정의에 대해 논의하고 합의하였다. PIH 등급은 색소과다침착의 중증도 수치이다(숫자가 클수록 더 중증의 색소침착임). 환자 개체군은 >3의 PIH 등급을 가졌고 여드름은 경

증 내지 중등도 등급 2-3이었으며, 주요인자는 현재 또는 과거 염증성 여드름과 연관된 PIH이다.

[0192] 1차 시험 목표:

[0193] 1. PIH IGA 시간 구성: 기점, 2주, 4주 및 8주

[0194] 2. PIH 분포율 % 시간 구성: 기점, 2주, 4주 및 8주

[0195] PIH 효능을 기점($p < 0.05$)으로부터 및 다른 치료그룹($p < 0.05$)에 대한 변화를 기초로 t-시험 및/또는 ANOVA를 사용하여 평가하였다.

[0196] 2차 목표: 안정성 평가

[0197] 대상자의 평가 설문지와 내약성 평가를 기점과 2주, 4주 및 8주에 수집하였다. 가임 여성에 대한 요임신반응검사를 기점과 8주에 수집하였다.

[0198] 데이터 분석

[0199] 다음 데이터들이 수집되었다:

[0200] 1. PIH 중증도에 있어서 기점으로부터의 변화

[0201] 2. PIH 등급에 있어서 기점으로부터의 변화; 및

[0202] 3. 병소수에 있어서 기점으로부터의 변화

[0203] 결과:

[0204] 매 방문시의 조사자 평가와 특정된 시점에 촬영된 사진으로부터 데이터를 분석하였다. 기점, 4주, 및 8주의 사진은 제2 그룹의 조사자들과 두 명의 개별 피부과의에 의해 개체군이 기준을 만족하는 것을 추가로 확인하기 위해 시험이 언블렌드되기(unblended) 전에 평가되었다. 분석된 데이터는 확인된 평가에 기초하였으며, 2주차에 대한 사진은 없으므로 2주차 데이터는 분석에 포함되지 않았다. 데이터를 표 8에 요약하였다.

표 8: 시험 그룹에서 PIH 등급 변화

바쿠트롤 (UP256)	기점	4 주	8 주	ANOVA (p 값)
평균	3.44	2.83	2.5	0.0083
SD	0.78	0.86	0.99	
SEM	0.18	0.2	0.23	
N	18	18	18	
(t-시험) p 값		0.0005	0.0003	
플라시보	기점	4 주	8 주	0.9712
평균	3	3.05	3	
SD	0.82	0.71	0.67	
SEM	0.19	0.16	0.15	
N	19	19	19	
p 값		0.5778	1	
2% SAL	기점	4 주	8 주	0.9798
평균	3.15	3.2	3.2	
SD	0.93	0.89	0.89	
SEM	0.21	0.2	0.2	
N	20	20	20	
p 값		0.3299	0.3299	

[0205]

[0206] 바쿠트롤(UP256) 그룹은 8주에 기점의 PIH 등급에서 상당한 변화(즉, 더 낮은 PIH 등급)를 나타내었다($p < 0.05$). 또한, 바쿠트롤 그룹은 8주차의 플라시보에 대해 상당한 변화를 나타내었다($p < 0.05$). 이 데이터는 또한 바쿠트롤 치료 그룹이 시간 및 치료 유의성 p 값($p = 0.0083$)을 갖는 유일한 그룹임을 나타내고 있다.

표 9: 모든 그룹에 대한 염증성 여드름 병소

바쿠트롤 (UP256)	기점	4 주	8 주	치료시간 동안의 ANOVA
평균	13.11	9	5.67	0.016
SD	9	6.93	4.67	
SEM	2.12	1.63	1.1	
N	18	18	18	
p 값		0.0014	0.0001	
살리실산	기점	4 주	8 주	0.513
평균	11.2	9.25	8.65	
SD	6.83	8.33	6.47	
SEM	1.53	1.86	1.45	
N	20	20	20	
p 값		0.0242	0.0159	
플라시보	기점	4 주	8 주	0.0985
평균	8.42	7	5.68	
SD	4.38	3.83	3.22	
SEM	1	0.88	0.74	
N	19	19	19	
p 값		0.1367	0.0021	

[0207]

[0208]

바쿠트롤(UP256) 그룹은 4주 및 8주에 기점으로부터 상당한 변화를 나타내었다($p < 0.001$). 바쿠트롤 그룹은 또한 8주차의 플라시보에 대해 상당한 변화를 나타내었다($p < 0.05$). 또한 UP256은 8주에 50% 초과 의 염증성 병소 감소를 달성하는 유일한 그룹이다(57%).

[0209]

비염증성 병소 카테고리에서 바쿠트롤(UP256) 그룹의 유의한 변화는 없었으나(데이터 기재하지 않음); 비염증성 병소 카테고리에서 살리실산 치료 그룹은 치료 4주차에 < 0.05 의 p값을 얻었다.

표 10: 설문지 및 조사자 안전성 평가의 요약

0.5% 바쿠트롤 UP256	플라시보	2.0% 살리실산	주요 평가 카테고리
1	2	4	가려움/화끈거림
0	0	2	피부 불쾌감

[0210]

[0211]

결론:

[0212]

이러한 결과들은 바쿠트롤(UP256) 크림이 국소 적용후 단 4주만에 여드름과 연관된 염증후 색소과다침착(PIH)을 상당히 감소시켰음을 나타낸다. UP256은 또한 염증성 여드름 병소를 8주 이후에 57%까지 대량 감소시켰다(< 0.05).

[0213]

바쿠트롤(UP256) 크림은 양호한 안전성 프로필을 가지며, 시험 참가자들에 의해 잘 허용되었다. 크림의 화장품 용인성(acceptability)은 이들의 이전 국소용 일반의약품(OTC) 여드름 치료제만큼 양호하거나, 그보다 더 우수하였다.

[0214]

실시예 12

[0215]

염증성 및 비염증성 여드름 병소의 치료

[0216]

바쿠치올과 살리실산 모두를 포함하는 조성물을 제조하였다. 염증성, 비염증성 또는 상기 두 종류의 여드름 병소를 갖는 환자를 이 조성물로 치료하였다. 이 조성물은 염증성 및 비염증성 병소 모두를 치료하는데 효과적이며 치료 4주차에 p값은 < 0.05 였다. 병소의 감소는 약 10% 내지 약 90%의 범위였다.

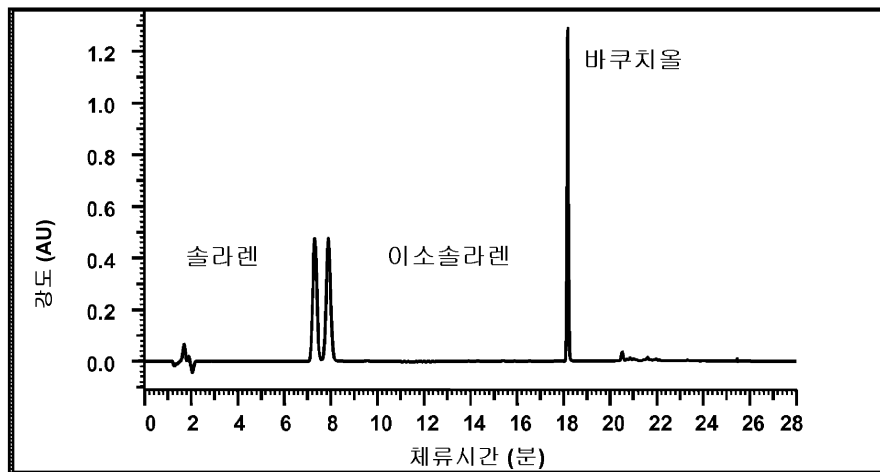
[0217]

상기한 다양한 구체예는 추가 구체예를 제공하기 위해 결합될 수 있다. 본 명세서에서 언급되거나/되고 출원 데이터 시트에 열거된 미국 특허, 미국 특허출원 공개, 미국 특허출원, 외국 특허, 외국 특허출원 및 비특허 간행물은 모두 그 전체가 여기에 참조로 포함되었다. 구체예의 측면은 수정할 수 있고, 필요하다면 다양한 특허, 출원 및 간행물의 개념을 채용하여 또다른 추가 구체예를 제공할 수 있다. 이러한 및 기타 변경은 상술한 상세한 설명의 측면에서 구체예로 만들어질 수 있다. 일반적으로, 이하의 특허청구범위에서, 사용된 용어들은 본 명세서와 특허청구범위에 기술된 특정 구체예로 청구항들을 제한하는 것으로 이해되는 것이 아니라 이러한 청구항들이 부여된 평가물의 전체 범위에 따른 모든 가능한 구체예를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 청구항은 본문에 의해 제한되지 않는다.

도면

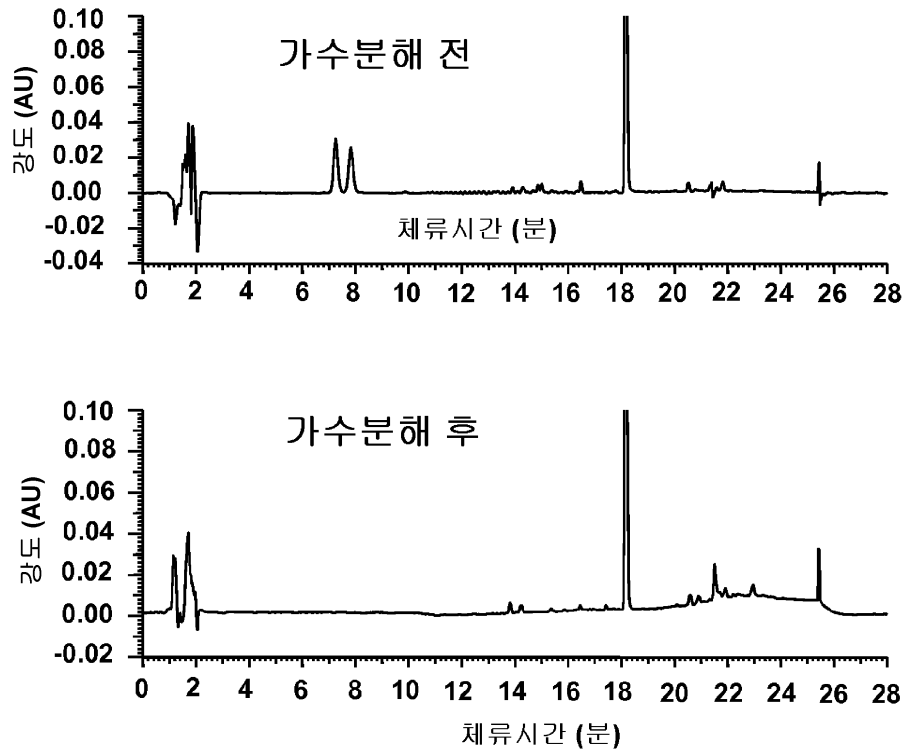
도면1

바쿠치올, 솔라렌 및 이소솔라렌 표준물의 HPLC 크로마토그램



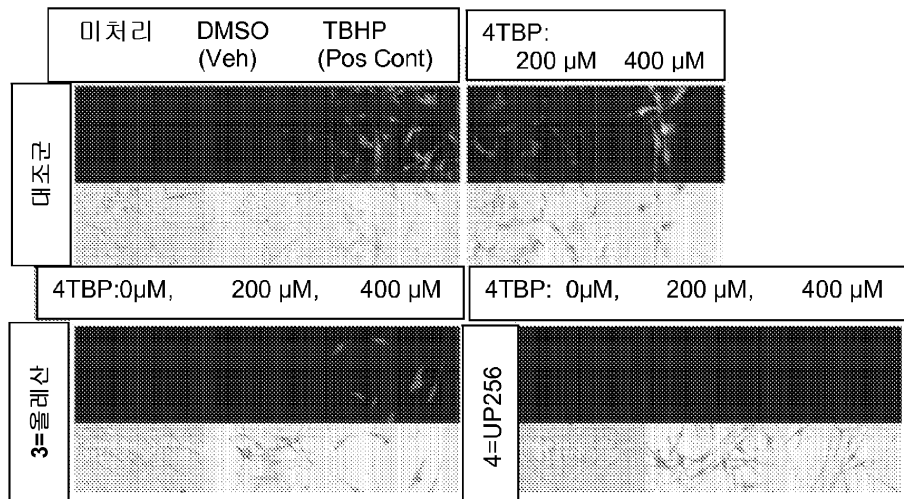
도면2

가수분해 전과 후의 바쿠치올 조성물의 HPLC 크로마토그램

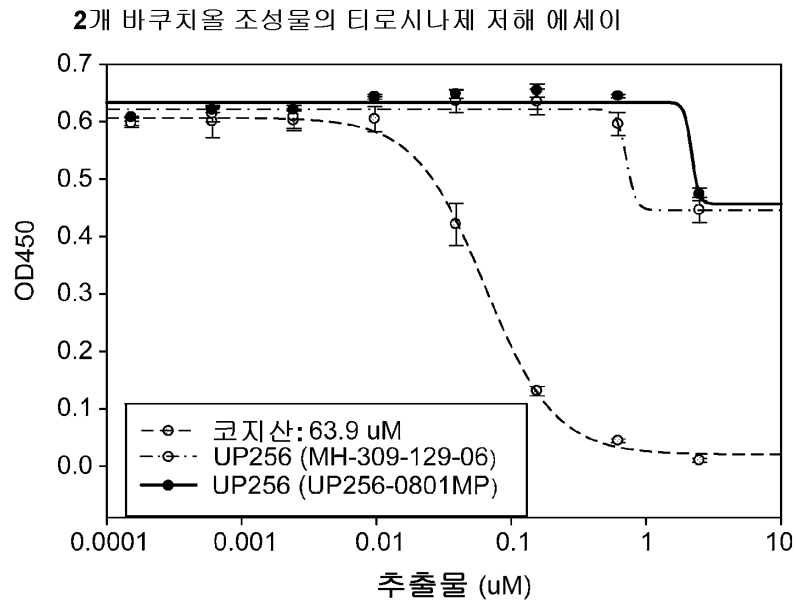


도면3

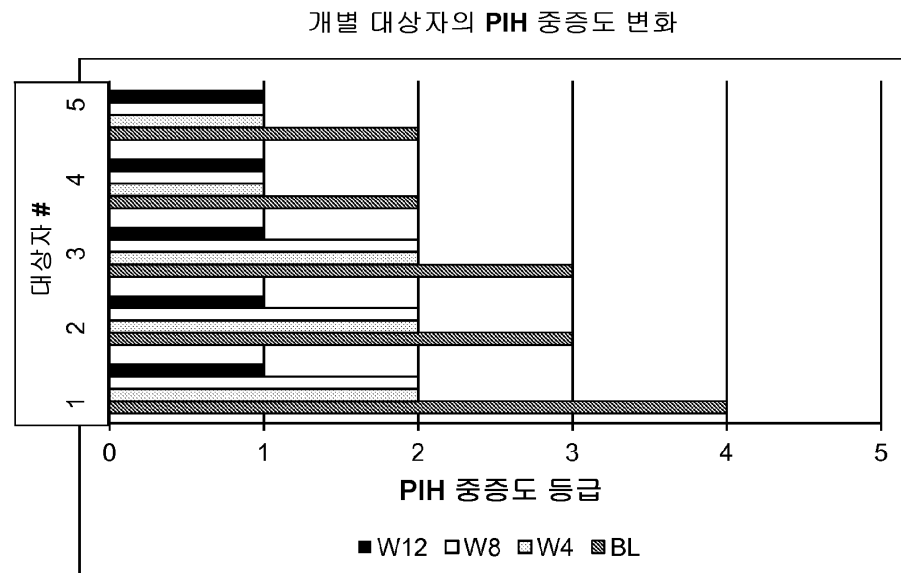
ROS로부터의 보호: 세포를 도포하고 시험 화합물 단독, 및 **4-TBP**로 유도된 **ROS**에 대한 시험화합물의 보호 특성을 평가하는 **2개** 농도의 **4-TBP**로 처리하였다. 양성 대조군으로서 **4-TBP** 처리뿐만 아니라 H_2O_2 의 활성 형태인 **TBHP**를 투약 의존성 방법으로 사용하였다. 처리는 **ROS** 존재를 나타내는 형광을 유발하였다. **UP256**은 생존력을 유지하면서 **4-TBP**로의 처리 효과를 개선하였다.



도면4

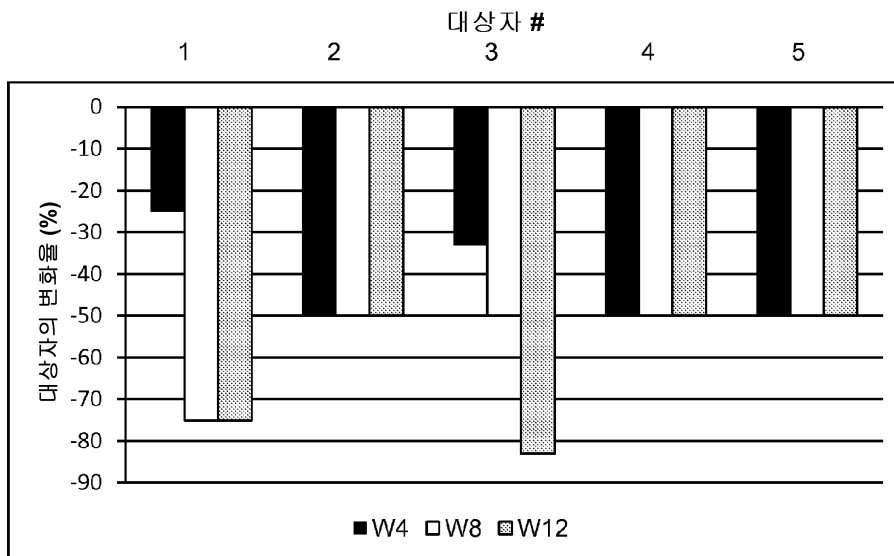


도면5



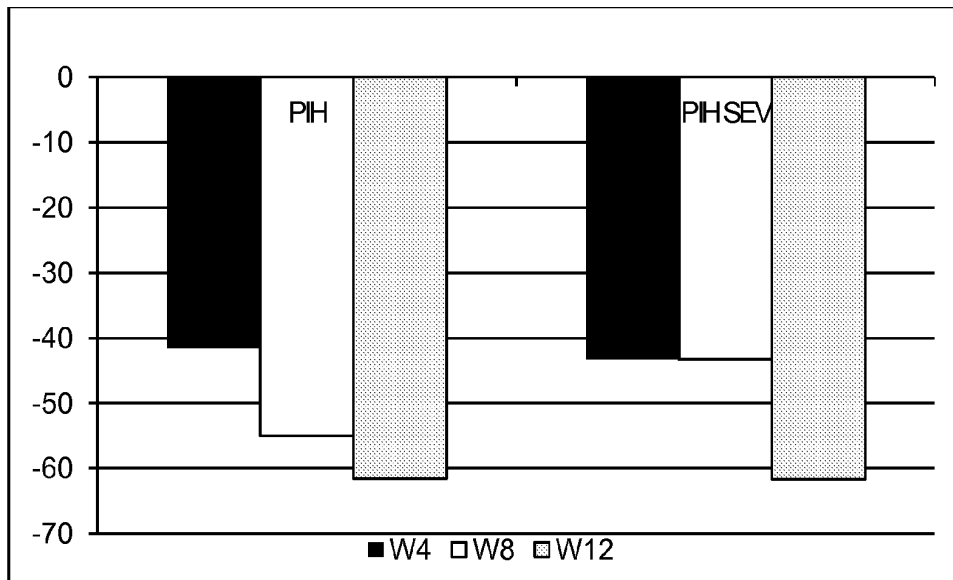
도면6

개별 대상자의 PIH 영향을 받은 얼굴 영역의 변화율

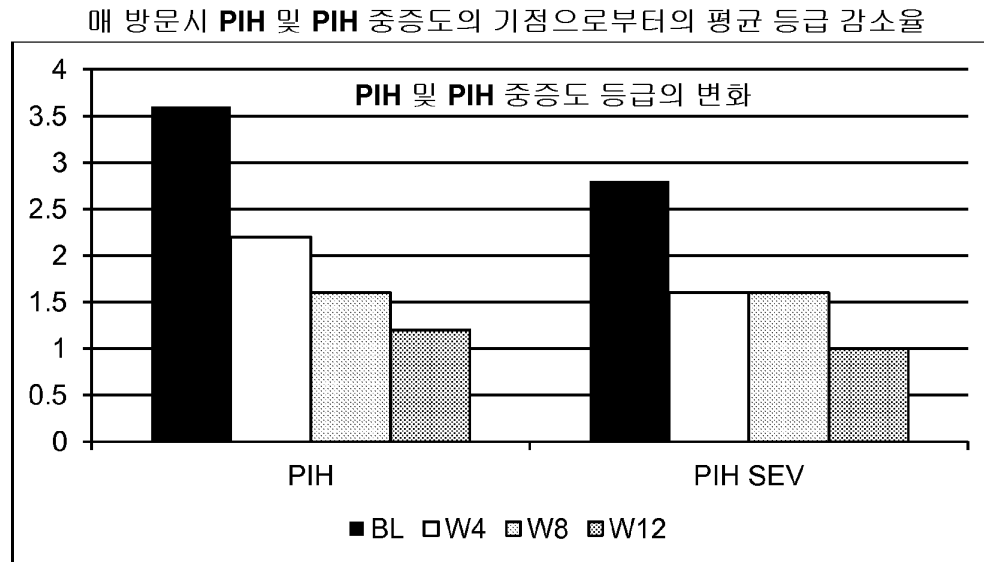


도면7

다섯 대상자의 PIH 및 PIH 중증도의 평균 변화율



도면8



도면9

시험 참여자 2인의 사진

