

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>8</sup> A61K 8/97 (2006.01) A61K 8/72 (2006.01) A61Q 17/00 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년01월24일 10-0544570 2006년01월12일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-1999-7003431	(65) 공개번호	10-2000-0052655
(22) 출원일자	1999년04월20일	(43) 공개일자	2000년08월25일
번역문 제출일자	1999년04월20일		
(86) 국제출원번호	PCT/IB1997/001318	(87) 국제공개번호	WO 1998/17246
국제출원일자	1997년10월21일	국제공개일자	1998년04월30일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장                    96/12821                    1996년10월22일                    프랑스(FR)

(73) 특허권자                    알오씨  
프랑스 92130 이스 레 물리노 뤼 까밀 데스물랭 1

(72) 발명자                    카스텔리,도미니크  
프랑스,에프-75017빠리,루에뽕세레뜨,12

리에스,게르트  
독일,데-40474뒤셀도르프,카이저스베르트허스타라세270,존슨&존슨

쁘리떼아우,라우렌스  
프랑스,에프-94000끄레따일,루드에폴레스,60

바우시그니르,엘리자베스

프랑스,에프-92100끌리히,루두제네탈로꾸에뜨,6

쁘레돈,라우렌트

프랑스,에프-92400꾸르베보이,아베뉴디라레뿌블리끄,18

(74) 대리인

문경진

조현석

심사관 : 정세준

## (54) 민감성 피부를 치료하는 조성물을 제조하기 위한 복합체의 사용방법, 제조 방법 및 저알레르기성 조성물

### 요약

본 발명은, 민감성 및/또는 알레르기 피부를 치료하도록 a) 항라디칼(anti-radical), b) 항염증(anti-inflammatory) 및 c) 항알레르기(anti-allergic) 활성 중 적어도 두 가지 활성을 나타내는 조성물을 제조하기 위해, 상기 세 가지 활성을 갖는 성분으로부터 선택된 적어도 두 가지 화합물의 사용방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 조성물을 제조하는 방법과 이렇게 제조된 조성물에 관한 것이다.

### 대표도

도 1

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 외부의 요인에 의한 것이든 개개인 고유의 요인에 의한 것이든지 간에 과민성 피부 상태(hyperreactive skin condition), 더욱 일반적으로는 알레르기성 반응 및/또는 불내성(intolerance) 현상에 대해 이것을 개선 및 치료하는데 유용한 신규한 피부 화장품 및 약리학적 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

사실 "민감성"으로 표현되는 피부를 나타내는 어린이 및 어른의 숫자가 증가하고 있다. 프랑스의 최근 연구에 의하면, 설문 에 응한 여성의 70%가 자신이 민감성 안면 피부를 가지고 있다고 진술했다. 민감성 피부의 개념은 반응성 피부 및 불내성 피부를 포함하는 외적 표현의 배열을 커버한다. 아토피성(Atopic) 피부 또한 여기 포함된다. 이러한 피부 타입은 때때로 환자들에게 "알레르기성"으로 잘못 알려져 있는데, 알레르기성 성분이 때로 민감성 피부의 증상을 일으킬 수도 있지만, 민감성 피부가 이에 국한되지는 않을 것이다. 자극 인자는 바람, 공해, 온도 변화, 과경수(excessively hard water) 또는 비위생, 피부 화장품 또는 보호용 제품과 같은 환경적 요인일 수 있다; 이러한 현상은 또한 환자가 느끼는 스트레스 또는 감정, 음식물 또는 약물 섭취와 관련될 수 있다. 추가로, 개인적 요소(특히 신경성 또는 호르몬) 또는 유전적 인자가 있는데 이는 상기 반응을 증폭시킨다.

일반적으로, 환자는 주관적 및/또는 객관적 표시에 의해 나타나는 피부의 곤란을 느낀다. 피부에 있어 흔히 찌르는 듯한 고통, 가려움 또는 쓰림 현상이 발생하며 본인은 피부에 열, 옥신거림(pricking) 또는 화끈거림을 느낄 수 있다. 피부는 붉게 되거나 허물이 벗겨질 수 있다. 비정상적 기초에서 건조증(Xerosis), 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 모세관 확장증(telangiectasis), 소포(vesicles) 또는 심지어 수종(oedema)이 나타날 수 있다.

가장 심각한 경우에는 아토피성, 습진 또는 신경성 피부염과 같은 면역성 알레르기(immunoallergic) 타입의 피부 질환이 나타날 수 있다.

이러한 증상은 피부, 점막 또는 두피에서 나타날 수 있다. 후자의 경우, 비듬 및/또는 탈모증을 수반할 수 있다.

현재까지, 피부 화장품 제제에 있어서 알레르기를 일으키는 것으로 알려진 성분의 존재를 제한함으로써 상기 질환의 발생을 억제하려는 시도가 이루어졌다. 그러나, 피부의 반응성을 감소시키고 자극 인자에 대한 저항성을 높여서 상기 증상을 방지하고 치유할 수 있는 상업적으로 유용한 활성 조성물이 보다 바람직할 것이다.

### 발명의 상세한 설명

본 출원인은 뜻밖에도 활성이 있는 저알레르기 유발 복합체 (active hypoallergenic complex)을 생성하는 상승작용 결합물 (synergic combination)을 포함한 조성물을 사용해서 상기 목적을 이룰 수 있음을 발견하였다.

게다가, 이러한 복합체는 다른 활성 성분에 대한 피부의 수용성 (receptivity)을 개선시킬 것이다.

이 때문에, 본 발명의 주제는 피부 화장품 조성물로, 이 조성물은 적어도 두 가지 성분의 면역 조절(immunomodulatory) 또는 저 알레르기성 상승작용 결합물을 포함하고, 이러한 각각의 성분은 다음 활성 중 적어도 한 가지 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

- a) 항라디칼성(anti-radical)
- b) 항염증성(anti-inflammatory)
- c) 항알레르기성(anti-allergic),

상기 성분은 조성물에 a), b) 또는 c) 중 2가지 이상의 활성이 존재하도록 선택되어진다.

본 발명의 보다 구체적인 대상은 민감성 및/또는 알레르기성 피부를 치료하기 위해 상기 a), b) 및 c)의 활성 중 2가지 이상을 나타내는 조성물, 특히 면역조절 조성물을 제조하기 위해, a) 항라디칼성, b) 항염증성 및 c) 항알레르기성을 갖는 성분으로부터 선택된 2가지 이상의 화합물의 용도에 관한 것으로, 이 양상 중 하나에 의해 a), b) 및 c)의 활성은 조성물에서 발현된다.

실제로, 본 출원인은, 서로 보완적인 항알레르기성, 항라디칼성 및/또는 항염증성을 갖는 활성 성분의 결합물이 활성 성분의 상승 작용을 통해 민감성 및/또는 불내성 피부의 증상 또는 면역 알레르기성 질병의 증상에 수반되는 현상을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 알았다.

본 발명에 의한 제제의 일부를 형성하는 성분은 정제되거나 정제되지 않은 분자, 합성물 또는 추출물, 활성 성분의 혼합물 또는 식물이나 동물을 원료로 하는 출발 물질로부터 하나 또는 다수의 분별 단계를 거친 추출물일 수 있다.

바람직하게는, 제제(formulation)에 존재하는 2가지 성분이 동일한 타입의 활성을 보인다면 다른 메커니즘에 의해 기능을 발휘할 것이다.

항염증성에 대해서는, 특히 프로스타글란딘 억제인자(시클로옥시게나아제 루트), 시토킨 생성 억제인자 및 류코트리엔(leukotrienes) 생성 억제인자(LTB<sub>4</sub>, 예를 들면 리포옥시게나아제 루트)에 의해 제공될 수 있다.

항염증성을 갖는 성분 또는 성분들은 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 및/또는 TNF $\alpha$ (종양 괴사 인자)(Tumour Necrosis Factor)의 생성에 대한 억제 활성을 나타내는 것이 유리하다.

항염증 기능은 또한 자유 라디칼의 발생을 제한함으로써 세포에 의한 반응성 질소 유도체의 생성을 감소시키는 결과를 가져올 수 있다.

그러나, 항라디칼성은 바람직하게는 자유 라디칼 제거제, 항지질과산화제(anti-lipoperoxidants) 및 자유 라디칼 분해 효소의 내인성 생성 자극제 (stimulants of the endogenous production of the enzyme)로부터 선택되는 성분을 의미하는 것으로 이해된다.

정의에 의하면, 자유 라디칼은 쌍을 이루지 않은 전자를 갖는 중성 또는 대전된 화학종인데, 이러한 "홀전자(single electron)"는 자유 라디칼이 특수한 화학적 성질 및 짧은 수명을 갖게 한다. 이것은 결합 또는 이동에 의해 안정화되는 반응의 중간 생성물질로 연쇄 반응의 소스가 될 수 있다. 자유 라디칼 중 초산화물(superoxide) 음이온  $O_2^-$ , 수산화 라디칼  $OH^-$ ,  $NO^-$  또는 과산화물이 언급될 수 있다.

자유 라디칼에 대한 내인성 방어 시스템에서 활성인 효소는, 예를 들면 SOD(또는 초산화물 디스무타제(dismutase)), 카탈라제 또는 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase)로서 이러한 효소의 생성을 자극하기 위한 시도가 이루어지거나 또는 외생적으로(exogenously) 도입될 수 있다.

본 발명에 의한 조성물에 항알레르기성 기능을 제공하는 성분은 림프구 분열 억제인자, 조직 친화성(histocompatibility) 화합물 분자의 내계투사(internalization) 억제인자(예를 들면 HLA-DR) 또는 시토킨 생성 억제인자로부터 선택되는 것이 바람직하다. 그것은 알레르기 현상 동안 발생하는 염증의 매개체(mediator) 생성을 감소시킬 수 있는 것이 유리하다.

위에서 지적된 바와 같이, 조성물은 항라디칼성, 항염증성 및 항알레르기성 활성 중에서 2가지 이상을 나타낼 것이다. 게다가, 활성의 저알레르기성 복합체의 성분은 동일한 활성을 기준으로 서로 다른 메카니즘을 통해 상승 작용이 발휘되도록 선택된다.

각 성분은 다수의 파라미터에 의해 본 발명에 의한 조성물의 전체적 활성에 기여하는 것이 바람직할 것이다.

본 발명에 의한 조성물은 서로 다른 성분의 활성의 상승 효과에 의해, 피부 세포에 있어서 신경매개체(neuromediators)의 합성 및/또는 발현을 억제하는 성질이 특히 뛰어나다. 상기 신경매개체는 뉴로키닌 A 및 B(neurokinines A and B)(NKA)(NKB), 혈관에 작용하는 창자의 폴리펩티드(vasoactive intestinal polypeptide)(VIP), 칼시토닌 유전자 관련 펩티드(calcitonin gene related peptide)(CGRP), 뉴로펩티드 Y(NPY), 뉴로텐신(neurotensin)(NT), 소마토스타틴(somatostatin)(SOM), 가스트린 방출 펩티드(GRP), 신경 성장 인자(nerve growth factor)(NGF), PGP 9.5(Protein Gene Product 9.5) 및 봄베신(bombesin)을 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다.

본 발명에 의한 피부 화장품 조성물의 제조를 가능하게 하는 성분은 하기의 그룹으로부터 선택되는 것이 유리하다. 은행나무 및 그 추출물, 이라민(iramine), D-판테놀(D-panthenol),  $\beta$ -시토스테롤( $\beta$ -sitosterol), 모듈렌(modulene),  $\alpha$ -토코페롤 및 그 유도체,  $\beta$ -글루칸 및 그 유도체, 아이코사펜타논산(eicosapentanoic acid),  $18\beta$ -글리시레틴산( $18\beta$ -glycyrrhetic acid), 글리시레틴산 모노글루쿠로니드(monoglucuronide), 스테아릴 글리시레티네이트, 골무꽃 추출물, 락토페린, 녹차와 그 추출물, 비타민 C, 글루타티온, 리파시드(lipacid) 및 표피 흉선 인자. 그러나, 골무꽃 추출물과 비타민 E의 결합물은 본 발명에 의한 조성물에 포함되지 않는다.

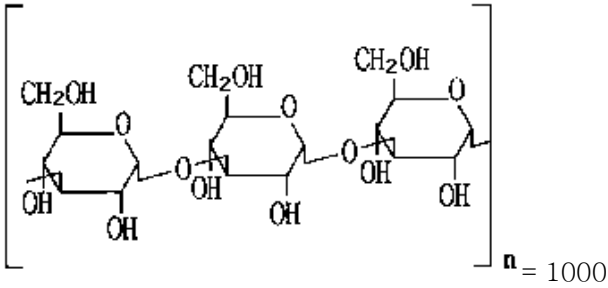
본 발명의 한 양상에 의하면, 상기 조성물은 상기 그룹으로부터 1가지 이상의 성분, 바람직하게는 2가지 이상의 성분을 함유한다.

본 발명에 따라 사용된 아졸 유도체는, 이미다졸 또는 트리아졸 유도체에서 선택될 수 있고, 특히 비포나졸(bifonazole), 부토코나졸(butoconazole), 클로르단토인(chlordantoin), 클로르미다졸(chlormidazole), 클로코나졸(cloconazole), 클로트리마졸(clotrimazole), 에코나졸(econazole), 에닐코나졸(enilconazole), 펜티코나졸(fenticonazole), 플루트리마졸(flutrimazole), 이소코나졸(isoconazole), 케토코나졸(ketoconazole), 라노코나졸(lanoconazole), 미코나졸(miconazole), 오모코나졸(omoconazole), 옥시코나졸(oxiconazole), 세르타코나졸(sertaconazole), 술코나졸(sulconazole), 티오코나졸(tioconazole), 플루코나졸(fluconazole), 이트라코나졸(itraconazole), 사퍼코나졸(saperconazole), 테르코나졸(terconazole) 또는 엘루비올(elubiol)로 구성되어 있는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 이것은, 이러한 화합물이 특히 항라디칼 활성을 나타내는 것을 증명할 수 있기 때문이다.

사용될 수 있는  $\alpha$ -토코페롤 유도체 중에  $\alpha$ -토코페롤 인산염이 특히 언급될 수 있다.

$\beta$ -글루칸 유도체 중에 카르복시메틸- $\beta$ -글루칸 및 드리엘린(drieline)이 언급될 수 있다.

드리엘린은 하기의 구조식을 갖는 폴리- $\beta(1\rightarrow3)$ - 글루코피라노오스(glucopyranose)로서  $n=1000$  이다.



상기 분자는 물 및 소르비톨(sorbitol) 내에 0.1% 용액의 형태 또는 가루 형태로 제공될 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 조성물은 은행나무 추출물과  $\beta$ -글루칸 화합물의 상승작용 결합물을 포함한다.

실제로, 본 출원인은 두 성분의 결합물이 본 발명에 의한 조성물의 활성을 제공하는 기능적 특성을 갖는 최적의 결합을 가능하게 한다는 사실을 발견하였다.

글루칸은 특히 효모 세포의 세포벽으로부터 추출될 수 있는  $\beta(1\rightarrow3)$  글루코스 체인으로 구성된다. 이것의 특히 용해도를 개선시키기 위해 화학적 변형을 가할 수 있다.

$\beta$ -글루칸은 카르복시메틸 그룹으로 치환되는 것이 유리한데, 이것은 염의 형태, 특히 나트륨 염의 형태로 존재할 수 있다. 유도체에 의해 양호한 결과가 얻어질 수 있는데, 유도체에서 카르복시메틸 그룹에 의한 치환 정도는 0.65 내지 0.85의 범위를 가지며, 5.5 내지 8.5의 pH를 나타낸다.

은행나무는 극동 지역의 암수딴그루로서 그 잎은 특정 약재로 사용된다. 그것은 지방족 탄화수소 및 알코올, 루테올린(luteolin) 또는 퀘르세톨(quercetol)과 같은 폴리페놀, 또는 아멘타플라본(amentaflavone)으로부터 유도된 비플라본(biflavones)과 같은 성분을 포함하며, 보다 구체적인 성분으로 킱콜린산(ginkgolic acid) 및 아나카르딘산 유도체, 리모넨(limonene)으로부터 유도된 테르펜(terpenes) 또는 테르트-부틸(tert-butyl) 그룹을 포함한 테르펜이 있다.

은행 추출물은 노화성 정신 박약, 간헐성 파행(intermittent claudication), 만성 동맥 폐색(obliterating chronic arteriopathies) 및 레이노병(Raynaud's disease), 또는 망막 결실(retinal deficiency)의 증상을 호전시키기 위해 제안되었다.

그것은 자유 라디칼에 대한 보호 효과로 인해 미용술에 사용되었다.

본 출원인은 뜻밖에도 은행 추출물이 우수한 항염증성 및 항알레르기성을 가지고 있음을 발견하였는데, 이는 각질세포(keratinocytes) 및 대식세포(macrophages)와 같은 피부 세포에서 증명될 수 있다. 게다가, 본 출원인은 이 활성이  $\beta$ -글루칸의 존재 하에서 강화된다는 사실을 보여주었다.

특히 본 발명의 실시예에 적합한 추출물은 은행나무 잎으로부터 얻어지는데, 은행나무잎의 테르펜 농도는 약 7% 미만, 바람직하게는 약 3%(건조 추출의 w/w) 미만에 이르는 단계를 거친다. 한 실시예에서, 이러한 테르펜 농도는 약 1% w/w 미만이다.

건조 추출물에서 플라본 배당체(flavone heterosides)의 농도는 24% 이상, 보다 바람직하게는 약 28% w/w 이상이 유리하다.

항염증성 및 항알레르기성 성질은 특히 시험관 모델에 대해 증명될 수 있는데, 시험관 모델에 대해서는 이미 인간에게 수행된 임상 연구와 동물 모델에 상관관계가 존재한다.

특히 각질세포 및 대식세포 세포 상에서 작용하는 것이 가능한데, 이는 국부 염증 반응의 전개에 필수적인 세포이기 때문이다. 게다가, 대식세포는 피부에 있는 고유 세포이므로 국부 면역을 조절하는 다수의 시토킨을 생성하고 항원을 제공하는

능력을 통해서 국부 염증 반응뿐만 아니라 면역 반응을 조절하기 때문에, 특히 적합한 세포이다. 이러한 대식세포는 또한 순환계(circulatory system)와 서로 통하게 되는데 적당하다면 서로 다른 세포 타입(단핵 세포, 누트로필, 에오시노필)에 맞도록 해서, 고려되는 조직의 특정 및 불특정 방어 능력을 향상시킬 수 있다.

그러므로 시험 생성물질의 활성은 인간의 대식세포 및 각질세포 배양물에 대해서 조사되었는데 이것은 인터페론- $\gamma$  + 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide) (비특이성 염증) 또는 IL-4 (알레르기성 염증)에 의해 자극되거나 자극되지 않는다. 이러한 타입의 자극은 세포를 산화-지향 반응(pro-oxidizing response) (질소 유도체의 생산량을 측정하여 값을 구할 수 있는 NO 또는 초산화물 음이온 자유 라디칼의 생성) 및 면역-염증 반응(immuno-inflammatory response) (TNF- $\alpha$ 와 같은 시토킨의 생성)의 환경 하에 놓는다.

알레르기성 염증을 평가하기 위해, 세포가 CD23 수용체를 유도하는 IL4 및 연이은 IgE-함유 면역복합체(immunocomplex)에 의해 활성화된다. 모든 경우에 있어서, 세포 상청액(cellular supernatants)은 활성화 이후에 분석된다.

게다가, 세포에 대한 생존력(viability) 연구가 수행된다.

성분의 활성은 혼합된 림포-표피(lympho-epidermal) 배양물에서도 확인된다.

피부에서, 랑게르한스 세포는 면역 반응에 관여하는 항원 및 각질세포 생성 인자 존재시 실제 중요한 역할을 수행해서, 피부 면역 시스템을 구성한다. MLEC는 물질에 의한 치료 또는 치료 없이, 항원 제공 알레르기성 표피 세포에 의해 유발된 림프구(lymphocyte) 증식을 측정함으로써, 물질의 면역 조절 특성을 측정할 수 있도록 한다.

은행 및  $\beta$ -글루칸에 대해 얻어진 결과가 아래의 표에 요약되어 있다.

활성	매개체 또는 파라미터	은행나무	$\beta$ -글루칸
항염증성	· LTB4 · PGE2 · IL-1 $\alpha$ · TNF $\alpha$	억제 효과없음 효과없음 효과없음	효과없음 억제 억제 억제
항자유라디칼성	· 지질의 과산화 · NO · 카탈라아제 · 글루타티온 퍼옥시다아제	억제 억제 효과없음 자극	효과없음 억제 자극 자극
항알레르기성	· MLEC	억제	효과없음

### 삭제

본 발명에 의한 조성물은 0.001% 내지 10% w/w, 보다 바람직하게는 0.05 내지 2%의 은행 추출물을 특히 함유하는데, 한 실시예에 의하면 은행 추출물의 농도는 약 0.1 내지 0.5%이지만 이것은 당업자에 의해 조절될 수 있다.

본 발명의 실시예에 적당한  $\beta$ -글루칸, 특히 카르복시메틸화  $\beta$ -글루칸의 농도는 전체 조성물의 중량 중 0.001 내지 10 중량% 이다.

본 발명에 특히 적당한 다른 조성물은 락토페린과 드리엘린, 판테놀과 녹차 추출물, 또는 판테놀과  $\beta$ -시토스테롤의 결합물을 포함한다.  $\alpha$ -토코페롤(또는 그 염 중의 하나) 및 은행 추출물의 결합물이 본 발명에 의해 사용될 수도 있다. 상기 결합물은 피부 및 두피의 반응 문턱(threshold)을 낮추고, 가능한 불내성 또는 면역 알레르기성 반응의 크기를 감소시키는 활성의 저알레르기성 복합체를 생성한다.

녹차 추출물은 건조 동백나무속 올레이페라(camellia oleifera) 잎으로부터 얻어지며 특히 테오필린(theophylline), 카페인 및 테오브로민(theobromine)을 함유한다.

본 발명의 또 다른 대상은 항자유라디칼, 항염증성 및 면역조절 활성 성분으로 구성되는 그룹 중 하나 이상에 속하는 성분을 선택하고 이어서 상호보완적인 활성을 갖는 두 성분이 결합물의 항라디칼성, 항염증성 및 항알레르기성을 강화시키기 위해 결합되는 것을 특징으로 하는 활성의 저알레르기성 복합체의 제조 방법이다.

활성의 저알레르기성 복합체를 구성하는 물질의 결합물은 소위 "민감성" 피부 또는 자극 반응성 피부와 상호관련이 있는 VIP, PGP 9.5 또는 CGRP와 같은 신경매개체의 합성 또는 발현을 감소시키는 것이 바람직하다.

본 발명의 또 다른 대상은 민감성 피부의 화장 치료 방법으로 하루에 1회 이상 신체 또는 안면 피부에 활성 저알레르기성 복합체 및/또는 위에서 정의한 조성물을 도포하는 것을 포함한다.

특히, 본 발명은 탈모증의 치료 방법에 관한 것으로 이것은 항라디칼성, 항염증성 및/또는 항알레르기성 성분 결합물을 두 피에 일주일에 한 번 또는 두 번, 또는 1일에 한 번 또는 두 번 도포시키는 것을 포함한다. 결합물은 샴푸 또는 로션과 같은 다른 제제일 수 있는데, 이것은 선택적으로 탈모증, 비듬 현상 및/또는 지루 현상에 대해서 활성인 다른 활성 성분과 함께 동시에, 별개로 또는 순차적으로 도포될 수 있다.

본 발명의 또 다른 대상은 특히 아토피성, 건선, 다형 홍반, 건피증, 홍반성 낭창(lupus erythematosus), 천포창(pemphigus), 피부염, 주사(rosacea), 좌창(acne), 습진 및 신경성 피부염으로부터 선택되는 질병의 치료를 위한 면역 조절 약품의 제조를 위한, 위에서 정의된 저알레르기성 복합체의 용도이다.

본 발명에 의한 저알레르기성 복합체는 또한 보습제 및/또는 피부 침투를 향상시키는 약제를 포함하는 조성물 내에서 제형화되는 것이 바람직한데, 이것은 본 발명에 의한 화합물의 활성을 증가시킬 것이다. 예로서, 요소(urea), 프로필렌 글리콜 또는 올레인산이 언급될 수 있을 것이며, 당업자는 제제(formulation) 타입에 적당한 다른 침투 촉진제를 사용할 수 있을 것이다.

본 발명에 의한 조성물은, 특히 용액, 로션, 크림, 샴푸, 에멀션 등의 형태인 조성물 제제가 당업자에게 적합한 것으로 알려져 있고, 약리학적 및/또는 미용적으로 수용될 수 있는 부형제를 더 함유할 것이다.

안료, 염료, 방부제, 직조제(texturing agents), 점증제(thickner), 에멀션화제 또는 향료가 제한 없이 언급될 수 있을 것이다. 조성물은 또한 자외선 방지제 또는 차단제 또는 다른 활성 성분을 함유할 수 있다.

최종적으로, 본 발명에 기재된 결합물을 포함하는 저알레르기성 복합체는 국부적 경로에 의해 하나 이상의 활성 성분을 함유하는 조성물에 주입될 수 있는데, 특히 상기 활성 성분이 피부 반응을 유발할 수 있을 때에 그렇다.

상기 활성 성분 중에서 레티노이드 및 탈색제가 특히 언급될 수 있다.

레티노이드는 특히 레티논산 또는 트레티노인(tretinoin), 레티놀, 레틴알데하이드, 그들의 염 및 그들의 에스테르를 의미하는 것으로 이해된다. 알칼리 금속, 암모늄 및 C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> 암모늄 염이 전형적인 염이다. 나트륨, 칼륨, 트리에탄올암모늄 및 암모늄 염이 특히 바람직하다. 모든 화합물의 결합물이 조성물에 존재할 수 있다. 게다가, 용어 "레티놀" 및 "레티논산"은 9-시스-레티놀, 디디히드로레티놀(didehydroretinol), 13-시스-레티논산, 13-트랜스-레티논산 및 디디히드로레티논산과 같은 수소화 또는 비수소화 이성질체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

탈색제는, 예를 들면 국산(kojic acid), 히드로퀴논, 비타민 C, 비타민 C 마그네슘 인산염, 카로테노이드(carotenoids), 아르부틴(arbutin) 등을 포함한다.

하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이다.

실시예에서, 첨부된 도면이 참조될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

도 1: 각질세포의 염증성에 대한 카르복시메틸-β-글루칸의 투여량 효과(dose effect)

도 2: 각질세포에 대한 항염증 작용에서, 은행나무 추출물(H37)과 카르복시메틸-β-글루칸(K18)의 상승 작용.

### 실시예

## 실시예 1

### 1. 물질 및 방법

#### 제품

본 연구에서는 하기의 제품이 사용된다: 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 에설리키아 콜리(*Escherichia coli*) LPS(시그마). IFN- $\gamma$  및 IL-4는 이뮤제넥스(Immugenex)사(로스엔젤레스 CA)로부터 구하며 각각 1000 U/ml 및 10 ng/ml로 사용된다. 모노클로날(monoclonal) IgEs는 스팔레르젠스사(쁘레스네스, 프랑스)로부터 구하며, 항(anti)-IgEs는 노르딕사(틸버그, 네덜란드)로부터 구한다.

#### 각질세포 배양

상기 각질세포의 초기 배양물들(keratinocyte primary cultures)은 신생아의 포피(neonatal foreskin)로부터 얻어지고, 송아지 혈청(calf serum)을 함유하지 않는 배지(medium)에서 생체 밖의 분열증식(proliferation)이 유지된다. 융합성 각질세포 배양물들(confluent keratinocyte cultures)은 트립신으로 처리되어 세포 밀도  $10^5$  세포/ml/웰에서 신선한 배지의 24-웰-플레이트들(24-well-plates)로 이동된다. 적절하다면, IL-4에 의해 자극된 경우 상기 세포들의 표면에서 면역글로블린 E 수용체(IgE receptor)(CD23)의 존재는 면역표지(immunolabelling)에 의해 확인된다.

#### 대식세포 배양(Macrophage culture)

상기 대식세포 세포들은 정상 공여자들(비-알레르기성)의 말초 혈액으로부터 얻어진다. 단핵세포들은 피콜 구배(ficoll gradient)에 의해 분리되고 림프구 세포의 환이 회수되어 세 번 씻어지고 나서 상기 세포들이 대식세포 세포들에 밀착되도록 배양된다. 이러한 세포들은 1시간 동안 밀착된 후에 회수되어 배양된다.( $10^6$ /ml/웰) 적절하다면, IL-4에 의해 자극된 경우 상기 세포들의 표면에서 면역글로블린 E 수용체(CD23)의 존재는 면역표지(immunolabelling)에 의해 확인된다.

#### 세포활성(cell activation)

상기 세포들은 3일에서 4일 동안 IFN- $\gamma$ 와 LPS의 배합에 의해 활성화되고, 그 다음에 이러한 배양물들의 상청액은 질소 유도체들 및 TNF- $\alpha$ 를 정량적으로 결정하기 위해 회수된다. 게다가 면역글로블린 E에 의해 자극되는 동안, 상기 세포들은 먼저 상기 CD23을 유도하기 위해 IL-4에 의해 활성화되고, 그 다음에 배양되며 다른 상청액을 회수하기 전에 3일에서 5일 동안 상기 면역글로블린 E를 함유하는 면역 복합체(immune complexes)에 의해 자극된다. 모든 경우에서, 세포의 생존력(cellular viability)은 이러한 배양의 결과에서 얻어진다. 대식세포에 대한 특정 경우에서, 이러한 제품의 보호 효과를 결정하기 위해 장기간(7일에서 12일) 생존력 연구가 수행되었다. 질소 유도체의 정량적인 결정은 그리스법(Griess approach)을 이용하여 수행되고, 상기 TNF 표지는 메드게닉스(Medgenix)(Fleurus, Belgium)로부터 정량적인 결정 키트(kits)를 이용하여 측정된다.

## 2. 결과

### 2.1. IFN- $\gamma$ + LPS에 의해 자극된 각질세포와 대식세포에 대한 은행나무 추출물(Ginkgo biloba extract)의 효과

마른 은행나무 잎들을 진공에서 아세톤/물 혼합물로 연속 추출하였고, 그 다음 엽록소, 지방, 왁스, 렉틴(lectins) 뿐만 아니라 용매의 제거를 위한 여러 단계가 이루어졌고, H37로 표시된 추출물이 임의의 물질들로부터 추출되었다.

상기 추출물은 다음과 같은 설명서에 따라 고운 가루의 형태로 제조된다.:

-잔여 용매들

·에탄올 < 3%

·아세톤 < 0.1%



- 부탄올 < 0.1%
- 에틸 아세테이트 < 0.1%
- 황산화된 재(sulphated ash) < 1.5%
- 물의 함량 < 3%
- 프로-안토시아니딘 < 5%
- 테르펜 < 0.5%
- 징콘 산(ginkgolic acid) < 10ppm
- 중금속 < 20ppm
- 플라본 배당체(flavone heterosides) < 32±3%

PEG 400에서 6%(w/v) 용해되고 90. 에탄올에서 4%(w/v)용해된다.

상기 연구에서, 생성물질 H37(10mg/ml)은 IFN- $\gamma$  + LPS에 의해 자극되기 30분전 첨가된다. 이 생성물질은 세포독소 활성을 보이지 않았다.

**표 1A : IFN- $\gamma$ + LPS +/- 10mg/ml의 H37에 의한 자극 후 질소 유도체 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>  $\mu$ M)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		11(5)	15(5)	5(3)	2(9)
	+H37	7(4)	8(4)	2(2)	2(2)
각질세포		12(15)	17(3)	23(12)	13(5)
	+H37	7(6)	7(3)	8(11)	6(4)

삭제

괄호 안의 값은 IFN- $\gamma$  + LPS에 의해 자극되지 않은 세포의 값이다.

**표 1B : IFN- $\gamma$ + LPS +/- 10mg/ml의 H37에 의한 자극 후 TNF(pg/ml)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		755(ND)	1250(155)	998(55)	1510(ND)
	+H37	605(ND)	1120(75)	895(50)	1315(ND)
각질세포		187(ND)	173(ND)	208(ND)	135(ND)
	+H37	168(ND)	165(ND)	112(ND)	105(ND)

삭제

괄호 안의 값들은 IFN- $\gamma$ + LPS에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다. ND는 검출되지 않은 것이다.

이들 실험을 통해, IFN- $\gamma$ + LPS에 의해 자극된 대식세포들은 크게 질소 유도체들을 생성하지 않는 반면, 각질세포들은 질소 유도체들을 재생할 수 있게 생성한다는 것을 알게된다. 사실, 최근에야 그런 자극이 일어나는 동안 대식세포들이 신타제(synthase)의 활성을 크게 감소시킬 수 있는 불안정한 NO 신타제를 생산하며, 각질세포의 경우에는 분명히 그렇지 않다는 것이 증명되었다.

각질세포들에서, H37은 자극 후 NO의 생산을 억제한다.

생성물질 H37은 경미한 "항염증성"을 나타낸다. 더구나, 각질세포들에 의한 이런 생산에 대해 H37의 투약 효과를 평가할 때, 최대 효과는 10mg/ml에서 관찰되는 것을 보여준다.

또한, H37은 라디칼 생성물질에 의해 유도된 세포의 죽음으로부터 대식세포 세포들을 보호한다. 자극된 대식세포들이 상당한 양의 질소 유도체들을 생산하지 않는다는 것은 이런 세포들이 세포의 죽음을 야기할 수 있는 산화 충격(oxidative shock)을 겪지 않는다는 것을 배제하는 것은 아니다.

이것은 10일에서의 장기간 세포 생존력에 대한 효과와 단기간 배양(2일)에 대한 효과를 비교함에 의해서 객관화된다. 10mg/ml의 H37 이 대부분 라디칼 생성물질들에 의해 유도된 세포의 죽음으로부터 대식세포들을 보호한다는 것이 나타난다.

**표 2 : 대식세포의 생존력에 대한 H37의 효과**

대식세포 + IFN/LPS	2일째에서 생존 가능한 세포의 %	10일째에서 생존 가능한 세포의 %
배지	85 ± 2	55 ± 7
+ H37	88 ± 3	80 ± 2

삭제

2.2. IL-4에 의해 자극된 대식세포와 각질세포에 대한 생성물질 H37의 효과

세포들은 그들의 표면에서 면역 글로블린 E(CD23)에 대한 저친화성을 가진 수용체를 유도하기 위해, IL-4(10ng/ml)의 존재 하에 48시간동안 자극된다. 이 배양 기간이 끝날 때, 각질 세포 및 대식세포의 30-80%가 CD23을 발현한다. 각개의 변이는 이들 각각의 서로 다른 알레르기 상황을 반영하지 않는다. 상황에 관계없이, 이 유도 단계에서, 시험 생성물질은 CD23의 유도를 변형하지 않는다. 사실상, 5%미만의 감소는 관찰될 수 없다 (n=8),

**표 3. 10mg/ml H37 존재 또는 부재시 IL-4에 의해 자극된 서로 다른 세포에 의한 CD23의 발현 유도**

세포	배 지	+IL-4
대식세포	< 5%	45 +/- 4
+H37	< 5%	41 +/- 2
각질세포	ND	55 +/- 7
+H37	ND	51 +/- 4

삭제

세포들은 10ng/ml IL-4 및 다른 생성물질들의 존재 또는 부재시 48시간 동안 자극된다. ND는 검출되지 않은 것이다.

상기 CD23이 면역 글로블린 E를 함유한 면역 복합체에 의해 흡수된 후, 다수의 매개체(mediators) 및 사이토킨(cytokines)(특히 TNF) 및 산화 대사작용으로부터 생기는 질소 유도체와 같은 생성물질의 생산이 유도된다. 이런 자극은 시험관 내에서 알레르기성 유형의 염증 반응을 재정의 한다.

이 경우에, 관찰된 결과들은 모든 면에서 IFN-γ 및 LPS로 얻어진 결과들과 비교된다. 상기 결과들은 H37이 아마도 염증을 일으킨 세포의 산화력을 조절하는 능력을 통해 특정 항 염증성(비 특이성 및 알레르기성)을 나타낸다는 것을 증명하는 경향이 있다. 얻어진 결과들이 하기의 두 표에서 요약된다.:

**표 4A : IL-4 +/- 10mg/ml의 H37에 의한 자극 후 질소 유도체들(NO<sub>2</sub><sup>-</sup> μM)의 생성**

세포	실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
----	------	------	------	------

대식세포		25(5)	30(2)	55(11)	15(2)
	+H37	15(2)	17(75)	21(50)	6(2)
각질세포		17(13)	13(3)	23(12)	13(5)
	+H37	12(11)	8(2)	10(10)	8(6)

삭제

괄호 안의 값들은 면역 글로블린 E를 함유한 면역 복합체에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다.

생성물질 H37은 IL-4에 의해 자극된 대식세포 및 각질세포에 의한 질소 유도체들의 생산을 억제하는데 우수한 능력을 나타낸다.

**표 4B : IL-4 +/- 10mg/ml의 H37에 의한 자극 후 TNF(pg/ml)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		975(105)	275(35)	455(40)	310(89)
	+H37	850(105)	215(25)	365(35)	275(87)
각질세포		185(ND)	158(ND)	315(35)	308(ND)
	+H37	155(ND)	120(ND)	245(30)	276(ND)

삭제

괄호 안의 값들은 면역 글로블린 E를 함유한 면역 복합체에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다. ND는 검출되지 않았음을 나타낸다.

생성물질 H37은 IL-4에 의해 자극된 대식세포 및 각질세포에 의한 TNF $\alpha$ 의 생산의 경미한 감소를 유도한다.

비 특이성 자극 동안과 마찬가지로, H37은 대식세포 및 면역 글로블린 E를 함유하는 면역 복합체에 의해 자극된 각질세포의 장기간 생존력을 증가시키는데, 이는 생성물질 H37이 표적 세포에 대한 항산화성을 통해 경미한 항염증성을 나타낼 때 매우 강하게 시사한다.

그러므로, 생성물질 H37은 항염증성(알레르기성 또는 비 알레르기성)을 나타내는 것으로 보인다. 이러한 특징은 알레르기성 원인인든 아니든 염증 반응의 심각성이 이러한 세포들의 산화 대사작용에서 불균형을 야기하기 때문에 매우 중요하다. 적어도 부분적으로는 이러한 반응과 관련된 면역학적 현상의 조절 원인이 되는 것은 특히 이러한 불균형이다: 이것은 특이성 알레르기항원 반응 및 사이토킨의 생산을 위한 경우이다.

**2.3. IFN- $\gamma$ + LPSDP 의해 자극된 각질세포와 대식세포에 대한 생성물질 K17 및 K18의 효과**

드리엘린(Drieline)은 K17로 표시된다. 드리엘린은 사카로미세스 세레비시아 이스트(Saccharomyces cerevisiae yeast)의 막에서 정제된 폴리  $\beta(1 \rightarrow 3)$  글루코피라노오스이다; 드리엘린은 물/소르비톨 혼합물에서 용해된다.

카르복시메틸- $\beta$ -글루칸(아르나우드사에 의해 등록상표 CM Glucan이라는 상표명으로 판매됨)은 K18로 표시된다.

이 연구에서, 상기 생성물질들 (10mg/ml 또는 1/100 v/v)은 IFN- $\gamma$ + LPSDP에 의해 자극되기 30분 전 첨가된다. 상기 경우들에 있어서, 이들 생성물질들은 어떠한 세포독소 활성을 갖지 않는다.

**표 5A : IFN- $\gamma$ + LPS +/- 10mg/ml의 생성물질 K17과 K18에 의한 자극 후 질소 유도체(NO $_2^-$   $\mu$ M)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		13(2)	8(5)	9(6)	3(2)
	+K17	5(2)	2(1)	7(1.5)	2(2)
	+K18	6(1)	4(1)	5(1)	1(2)

각질세포		25(2)	28(5)	19(6)	13(2)
	+K17	15(2)	16(1)	15(1)	8(2)
	+K18	13(1)	14(1)	11(1)	7(1)

삭제

괄호 안의 값들은 IFN- $\gamma$  + LPS에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다.

생성물질 K17 및 K18은 대식세포 및 IFN- $\gamma$ 와 LPS에 의해 자극된 각질세포에 의한 질소 유도체들의 생산을 억제하는 고도의 능력을 가진다.

**표 5B: IFN- $\gamma$ + LPS +/- 10mg/ml의 생성물질 K17과 K18에 의한 자극 후 TNF(pg/ml)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		612(ND)	920(155)	903(55)	700(ND)
	+K17	605(ND)	902(95)	970(45)	695(ND)
	+K18	121(ND)	320(125)	512(20)	333(ND)
각질세포		205(ND)	138(ND)	145(ND)	108(ND)
	+K17	125(ND)	98(95)	100(ND)	70(ND)
	+K18	133(ND)	95(ND)	85(ND)	82(ND)

삭제

괄호 안의 값들은 IFN- $\gamma$  + LPS에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다. ND는 검출되지 않았음을 나타낸다.

IFN- $\gamma$  + LPSDP 의해 자극된 대식세포와 각질세포에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생산은 또한 상기 질소 유도체들에 대해 관찰된 것과 비교하여 다른 생성물질들이 존재에 불리하게 영향을 미친다. 생성물질 K17 및 K18은 유효하게 TNF의 생산을 억제한다.

**2.4. IL-4에 의해 자극된 대식세포와 각질세포에 대한 생성물질 K17 및 K18의 효과**

상기 세포들은 그들의 표면에서 면역 글로블린 E(CD23)에 대한 저친화성을 가진 수용체를 유도하기 위해, IL-4(10mg/ml)의 존재 하에 48시간동안 자극된다. 이 배양 기간이 끝날 때, 각질 세포 및 대식세포의 30-80%가 CD23을 발현한다. 개별적인 변이는 이들 각각의 서로 다른 알레르기 상황을 반영하지 않는다. 상황에 관계없이, 상기 유도 단계에서, 시험 생성물질은 CD23의 유도를 변형하지 않는다; 사실상, 5% 미만의 감소는 관찰될 수 없다 (n=8).

상기 CD23이 면역 글로블린 E를 함유한 면역 복합체에 의해 흡수된 후, 다수의 매개체(mediators) 및 사이토킨(cytokines)(특히 TNF) 및 질소 유도체 같은 산화 대사작용으로부터 생기는 생성물질들의 생산이 유도된다. 이런 자극은 시험관 내에서 알레르기성 유형의 염증 반응을 재정의 한다.

**표 6A: IgE 함유 면역 복합체 (IL-4) +/- 10mg/ml의 생성물질 K17과 K18에 의한 자극 후 질소 유도체들(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>  $\mu$ M)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		15(5)	18(3)	25(11)	27(3)
	+K17	16(3)	17(6)	19(7)	30(6)
	+K18	7(2)	6(4)	10(2)	7(2)
각질세포		19(5)	22(1)	13(1)	7(1)
	+K17	16(3)	20(3)	14(2)	7(6)
	+K18	4(2)	7(4)	9(2)	3(2)

삭제

괄호 안의 값들은 면역 글로블린 E를 함유한 면역 복합체에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다.

생성물질 K18은 IL-4에 의해 자극된 각질세포와 대식세포에 의한 질소 유도체들의 생성에 대해 억제활성을 나타낸다.

**표 6B : IL-4 +/- K17과 K18에 의한 자극 후 TNF(pg/ml)의 생성**

세포		실험 1	실험 2	실험 3	실험 4
대식세포		908(78)	135(40)	508(45)	712(58)
	+K17	917(45)	102(41)	510(41)	700(32)
	+K18	524(59)	98(35)	420(32)	333(25)
각질세포		198(31)	105(10)	128(10)	132(15)
	+K17	185(35)	111(31)	120(32)	132(40)
	+K18	95(23)	60(35)	25(12)	35(12)

삭제

괄호 안의 값들은 면역 글로블린 E를 함유한 면역 복합체에 의해 자극되지 않은 세포들의 값들이다. ND는 검출되지 않았음을 나타낸다.

생성물질 K18은 IL-4에 의해 자극된 대식세포와 각질세포에 의한 TNF의 생성에 대해 억제활성을 나타낸다.

그러므로, K18은 비 특이성 및 알레르기성 유형의 항염증성을 가지는 반면 생성물질 K17은 단지 비 특이성 항염증성을 가진다.

결론적으로, 생성물질 K18의 효과가 투약 기능으로서 평가되었다. 그 결과는 도 1에 도시된다.

그러므로 K18은 투약 의존방식으로 질소 유도체의 생성 및 TNF의 생성 역시 억제한다. 이렇게 얻어진 결과는 K18이 일반적으로 유리한 항염증성을 나타내고 이러한 활성은 H37의 활성과 유사한 것을 증명한다.

**실시예 2**

**CM-β-글루칸(K18)과 은행 추출물(H37)의 활성 상승 작용 증명**

K18과 H37 및 그 결합물의 항염증성이 각각 측정되었다.

실험은 실시예 1(물질 및 방법)에 기재된 바와 같이, 한편 IFNγ+ LPS 결합물에 의해, 다른 한편으로 IL-4와 IgE-함유 면역 복합체에 의해 각질세포 모델에 대해 자극 후 수행되었다.

도 2에 도시된 바와 같이, 생성물질 K18과 H37은 항염증성 작용의 상승 효과를 나타낸다.

상기 항염증성은 비특이성 및 알레르기성 항염증성을 포함한다는 것이 상기되어야 한다.

**실시예 3**

**인간의 피부에 UV A와 UV B를 조사해서 얻어진 유해한 피부 변화 예방 분석**

기관 배양은 하기의 실험 계획안에 의해 생성된다: 서로 다른 공급자 (소스:성형수술)에게서 얻은 10개의 피부 조각을 배양 웰에 위치한 삽입물에 놓는다. 배지(항생제, FCS)를 웰의 바닥에 첨가하고, 다공성 막(0.45 μm)을 통한 느린 확산에 의해 두 개의 사이의 통과가 이루어진다.

각각의 조사 (irradiation) 이전에, 각 화장용 크림 (2mg/cm<sup>2</sup>)을 2시간 동안 피부에 직접 도포한다 {치료하지 않은 대조 피부(control skin)를 이와 동시에 분석}. 피부 위의 3개의 크림과 부형제를 일 주일에 세 번 교환한다.

- 크림 1: 0.5% CM-글루칸

- 크림 2: 0.05% 은행나무
- 크림 3: CM-글루칸 + 은행나무 추출물 (H37)
- 크림 4: 부형제(카르보폴 플라세보)

잔여 크림을 제거한 후, 이어서 피부에 20 DEM과 동등한 12 J/cm<sup>2</sup>의 UV A 및 6 J/cm<sup>2</sup>의 UV B (빌버 로울매트 T40M 램프)가 조사되었는데, 조사량은 예비 실험에 의해 결정된 것으로 특히 교원질(collagen) 및 탄성 섬유의 유해한 변화를 수반하는 표피 또는 진피 레벨의 손상을 순식간에 가져올 수 있다. 게다가, 상기 조사량은 포토패치(photopatch) 시험에 사용되는 조사량 및 햇빛에 탄 세포를 생성하기 위해 탈모 쥐(murine) 모델에 사용되는 조사량과 동등한 것이다.

조사는 격일로 수행된다. 3번의 노출이 수행되고 이어서 피부 조각이 다음 분석을 위해 수집된다.

질소 산화물(NO)과 같은 산소 유도체의 생성은 UV 선에 의한 공격을 나타낸다.

크림에 의해 가능한 보호는 아질산염 양의 감소 및 SOD의 증가를 평가함으로써 측정될 것이다.

1) 질소 산화물과 아질산염의 정량 측정

질소 산화물, NO는 혈관 확장제 및 신경전달물질로서 뿐만 아니라 염증 전구체(pro-inflammatory agent)로서 중요한 생리학적 매개물이다. 그것의 합성은 효소, NO 신타제(synthase)에 의해 매개되며 활성화된 많은 세포 타입, 특히 각질세포에 의해 발현된다.

NO 신타제에 의한 L-아르기닌의 산화에 의해 얻어지는 NO는 불안정한 생성물질로서 아질산염(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 및 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)으로 빠르게 붕괴된다. NO 신타제 활성을 나타내는 것은 그리스(Griess) 시약이 존재할 때, 배양 상청액 내의 아질산염에 대한 분광학적 정량이다.

상기 결과는 아래의 표에 기록된다.

아질산염의 정량 측정		
	(nmol/ml)	보호 %
크림 1로 처리한 피부	21.6 ± 7.3	14.7% ± 8.2
크림 2로 처리한 피부	21.4 ± 3.6	13.5% ± 5.8
크림 3으로 처리한 피부	16.4 ± 2.9*	33.8% ± 2.3*
크림 4로 처리한 피부	24.9 ± 5.3	

\* 통계적으로 중요한 결과 {p < 0.05; 스튜던트 시험 ("t" 검정)}

삭제

보호 퍼센트는 다음 방법으로 계산되었다: (A-B/A) × 100, 여기서 A는 크림 4에 의한 결과이고, B는 크림 1, 2 또는 3에 의한 결과이다.

크림 1과 2로 처리한 피부는 아질산염 생성의 약간의 감소(크지 않은)를 나타낸다. 가장 큰 감소는 크림 3으로 처리한 피부에서 얻어졌는데, 그 차이는 부형제에 대해 통계학으로 중요하다. 보호 퍼센트의 계산을 통해, 크림 3번이 특히 34%의 보호를 갖는다는 결과가 증명된다.

2) SOD의 정량

UV 선에 의한 공격은 SOD 레벨의 감소를 통해 나타난다.

초산화물 디스뮤타제(dismutase)의 활성은 맥코드(Mccord) 및 프리도비시(Fridovich)의 기술에 의해 측정되었다. 간단히 말하면, 초산화물 음이온은 크산틴(xanthine) 상의 크산틴 옥시다아제의 작용에 의해 생성된다. 그러면, 샘플에 존재하는 SOD는 상기 초산화물 음이온에 의해 시토크롬 C의 환원을 억제할 수 있다. SOD의 활성은 반응 매질에 남아 있는 환원된 시토크롬 C의 양과 관련된다.

상기 결과는 부형제(크림 4)에 대해 억제 퍼센트로 표시된다: SOD는 UV 공격 및 크산틴/크산틴 옥시다아제 시스템에 의해 생성된 자유 라디칼 일부를 가수분해한다. 그러므로, 광학 밀도(자유 라디칼의 양에 비례)에 있어서의 감소는 SOD 레벨의 양의 직접 측정을 가능하게 할 것이다.

SOD 정량 측정	
억제 %	
크림 1로 처리한 피부	11.1% ± 3.4
크림 2로 처리한 피부	7.04% ± 2.9
크림 3으로 처리한 피부	15.1% ± 3.3*
*통계적으로 중요한 결과 {p < 0.05: 스튜던트 시험 ("t" 검정)}	

**삭제**

부형제에 관해서, 크림 1과 2로 처리된 피부는, UV 선에 의해 유발된 SOD 활성 감소에 대한 약간의 보호(크지 않은)를 나타낸다. 이러한 보호는 크림 3으로 처리한 피부에서 더 크고, 이 차이는 부형제에 대해 통계학으로 중요하다.

**결론**

아질산염에 대한 정량 측정은, 크림 3으로 처리한 피부에 대해, 부형제에 대한 이들 양의 상당한 감소를 증명했다. 이러한 결과는 염증 성분에 의해 발생한 피부의 유해한 변화에 대한 크림 3의 보호 활성을 알 수 있도록 한다. 크림 1과 2로 처리된 피부는 보호 경향만을 갖는다. 그러므로, 크림 3의 성분 사이에는 상승 작용이 존재한다.

SOD의 정량 측정은, UV 선에 의해 발생한 유해한 라디칼 변화에 대해, 크림 3으로 처리한 피부의 보호에 관한 분석을 확증하는 것으로 보인다. 크림 1과 2로 처리한 피부는 보호 경향만 있을 뿐이고, 이는 크림 1의 경우 더욱 두드러진다.

**실시에 4: 본 발명에 기재된 결합물을 포함한 조성물**

**A) 탈색제를 갖는 제제**

%

- 물 70.965
- 옥틸메톡시신나메이트(Octylmethoxycinnamate) 6.000
- 글리세릴 스테아레이트/PEG-100 스테아레이트 5.000
- 글리세롤 5.000
- C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> 알킬 벤조에이트(benzoate) 4.000
- 페트로라툼(petrolatum) 1.500
- 세틸(cetyl) 팔미테이트 1.000
- 세틸 알코올 1.000

- 스테아릴 알코올 0.500
- 나트륨 술포이트(sulphite) 0.025
- 나트륨 디술포이트(disulphite) 0.025
- 히드로퀴논 2.000
- 시트르산 0.15
- 카르보머(carbomer) 0.300
- 도쿄페릴 아세테이트 0.100
- 페녹시에탄올 0.730
- 메틸파라벤 0.200
- 프로필파라벤 0.070
- 수산화나트륨 0.135
- 디소듐(disodium) EDTA 0.200
- 베타 글루칸 1.0
- 은행나무 추출물 0.1

**B) 레티놀을 갖는 제제**

%

- 물 56.42
- 세테아릴 옥타노에이트(cetearyl octanoate) 9.00
- 옥틸 메톡시신나메이트 8.00
- 락토오스(lactose) 5.00
- 글리세롤 5.00
- 수소화 땅콩 기름 5.00
- 글리세릴 폴리메타크릴레이트 3.45
- 부틸 메톡시디벤조일메탄 1.50
- 이소프로필 미리스테이트(myristate) 1.00
- 수소화 레시틴(lecithin) 1.00
- 베타 글루칸 1.00



- 수산화암모늄 0.75
- 페녹시에탄올 0.73
- C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub> 알킬 아크릴레이트 공중합체/아크릴레이트 0.50
- 폴록사머(poloxamer) 407 0.50
- 토크페릴 아세테이트 0.50
- 메틸파라벤 0.20
- 은행나무 추출물 0.10
- 카르보머 0.10
- BHT 0.10
- 프로필파라벤 0.07
- 프로필렌 글리콜 0.05
- 레티놀 0.03

100.00

**C) 레티놀을 갖는 제제**

%

- 물 69.689
- 옥틸 히드록시 스테아레이트 6.2942
- 글리세롤 4.0000
- 세테아레쓰-20(ceteareth-20)/스테아릴 알코올 3.0000
- 세테아레쓰-20/세테아릴 알코올 3.0000
- 글리세릴 디스테아레이트 2.8000
- 디메티콘 2.5000
- C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> 알킬 락테이트 1.5000
- 스테아레쓰-10 1.4000
- 콜레스테롤 1.0000
- 아세틸화 라놀린 알코올/세틸 아세테이트 1.0000

- 폴리소르베이트 80(polysorbate 80) 0.7000
  - 시트르산 나트륨 0.5160
  - C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub> 이소파라핀/라우레스-7 0.5000
  - 스테아릴 알코올 0.5000
  - 폴리소르베이트 20/레티놀 0.1058
  - BHT 0.1000
  - 메틸 파라벤 0.2000
  - 향료 0.0500
  - 프로필 파라벤 0.0300
  - 시트르산 0.0150
  - 은행나무 추출물 0.1
  - 판테놀 1.0
- 100.-

**D) 트레티노인을 갖는 제제**

- 트레티노인 0.05 g
- 베타 글루칸 0.50 g
- 은행나무 추출물 0.10 g
- 분자량이 작은(가벼운) 액체 파라핀 25.00 g
- 비결정질의 70% 소르비톨(sorbitol) 용액 5.00 g
- 히드록시옥타코사닐 히드록시스테아레이트 5.00 g
- 메톡시메크로골 22(methoxymacrogol 22)/  
도데실 글리콜 공중합체 5.00 g
- 메크로골 45/도데실 글리콜 공중합체 3.00 g
- 스테아록시트리메틸실란 및 스테아릴 알코올 1.00 g
- 디메티콘 1.00 g
- 향료 0.25 g

- 메틸 파라-히드록시벤조에이트 0.20 g
- 소듐 에데테이트(edetate) 0.10 g
- 퀴터늄 15(quaternium 15) 0.10 g
- 부틸화 히드록시톨루엔 0.10 g
- 시트르산 모노하이드레이트(monohydrate) 0.10 g
- 정제수 53.495 g

### 산업상 이용 가능성

본 발명은 외부의 요인에 의한 것이든 개개인 고유의 요인에 의한 것이든지 간에 과민성(hyperreactive) 피부 상태, 더욱 일반적으로는 알레르기성 반응 및/또는 불내성(intolerance) 현상에 대해 그것을 개선 및 치료하는데 유용한 신규한 피부 화장용 및 약리학적 조성물에 관한 것이다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

은행나무 추출물 (Ginko biloba extract) +  $\beta$ - 글루칸 ( $\beta$ - glucan) 또는 그 유도체들 중 하나와, 트리엘린 (drieline) + 락토페린 (lactoferrin)과, 판테놀 (panthenol) + 녹차 추출물과, D - 판테놀 +  $\beta$ - 시토스테롤 ( $\beta$ - sitosterol)을 포함하는 그룹으로부터 선택된, 민감성 피부를 치료하기 위한 상승작용 결합물 (synergic combination).

#### 청구항 2.

삭제

#### 청구항 3.

삭제

#### 청구항 4.

삭제

#### 청구항 5.

삭제

#### 청구항 6.

삭제

#### 청구항 7.

삭제

#### 청구항 8.

삭제

#### 청구항 9.

아토피성, 건선, 다형 홍반 (erythema multiforme), 건피증, 전신 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus), 천포창 (pemphigus), 피부염, 주사 (rosacea), 신경성 피부염 및 탈모증으로부터 선택된 한 가지 증상을 치료하는 약품을 제조하기 위해 제 1항에 기재된 두 가지 화합물을 사용하는 방법.

**청구항 10.**

삭제

**청구항 11.**

삭제

**청구항 12.**

저알레르기성(hypoallergenic) 또는 면역 조절(immunomodulatory) 활성을 갖는 조성물 및/또는 민감성 피부를 치료하기 위한 조성물의 제조 방법으로서,

- a) 항염증, 항라디칼 및/또는 항알레르기 활성을 나타내는 성분을 선택하고, 서로 다른 활성을 나타내는 성분을 혼합하고, 이들 두 가지 성분의 결합물에 의해 활성 중 한 가지 활성이 강화되는지를 측정하는 단계와,
- b) 항염증, 항라디칼 및 항알레르기 활성으로부터 선택된 활성 중 두 가지 활성을 나타내고, 활성 중 한 가지 활성이 강화되는 결합물을 선택하는 단계와,
- c) 상기 선택 결합물 중 한 가지가 피부 또는 화장품으로 허용 가능한 부형제 (excipients)와 혼합되어 상기 조성물을 얻는 단계를

포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물의 제조방법.

**청구항 13.**

제 12항에 기재된 방법을 통해 얻을 수 있는 조성물로서,

은행나무와 그 추출물, 이라민, D-판테놀, 모듈렌,  $\alpha$ -토코페롤과 그 유도체,  $\beta$ -글루칸과 그 유도체, 아이코사헨타논산,  $18\beta$ -글리시레틴산, 글리시레틴산 모노글루쿠로니드, 스테아릴 글리시레티네이트, 락토페린, 녹차 추출물, 비타민 C, 글루타티온, 표피 홍선 인자, 아줄 유도체 및 리파시드로 구성된 그룹으로부터 선택된 성분을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 14.**

삭제

**청구항 15.**

제 13항에 있어서, 상기  $\beta$ -글루칸은 카르복시메틸기로 치환된 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 16.**

제 13항에 있어서, 상기 은행나무 추출물에서 테르펜(terpene)의 농도는 건조물의 1% w/w 미만인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 17.**

제 13항에 있어서, 상기 은행나무 추출물의 농도는 0.001% 내지 10% w/w인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 18.**

제 13항에 있어서, 상기  $\beta$ -글루칸 농도는 0.001% 내지 10% w/w인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 19.**

삭제

**청구항 20.**

제 13항에 있어서, 피부의 국소 경로에 의해 활성화되는 다른 활성 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 21.**

제 20항에 있어서, 레티노이드와 탈색제 그룹으로부터 선택된 활성 성분을 함유하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 22.**

삭제

**청구항 23.**

삭제

**청구항 24.**

삭제

**청구항 25.**

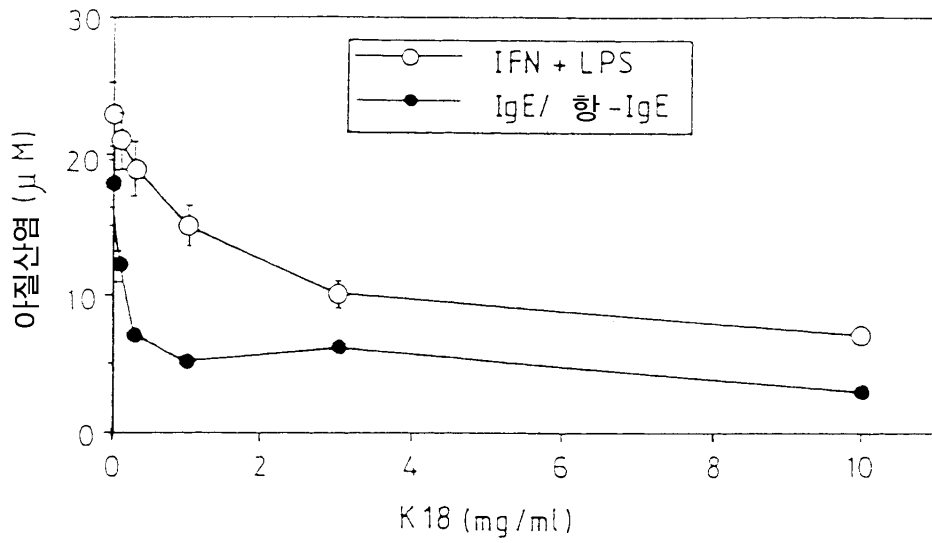
제 16항에 있어서, 상기 은행나무 추출물의 농도는 0.001% 내지 10% w/w인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 26.**

제 15항에 있어서, 상기  $\beta$ -글루칸 농도는 0.001% 내지 10% w/w인 것을 특징으로 하는, 조성물.

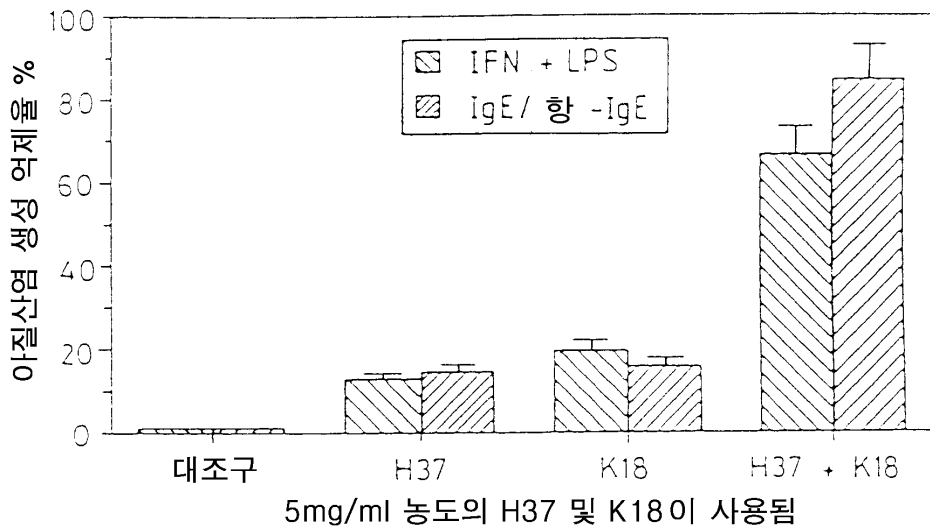
도면

도면1



각질세포의 염증성에 대한 카르복시메틸-β-글루칸의 투여량 효과

도면2



각질세포에 대한 항염증성에 있어서, 카르복시메틸-β-글루칸(K18) 사이의 시너지 효과