



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0115839
(43) 공개일자 2020년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A61K 31/395* (2020.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) *C12R 1/465* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A23L 29/03 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0035276

(22) 출원일자 2019년03월27일

심사청구일자 2019년03월27일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

임경민

경기도 화성시 메타폴리스로 6, 312동 801호(반송동, 동탄시범다운마을 삼성래미안)

남상집

경기도 광명시 하안로 320, 1012동 607호(하안동, 고층주공아파트)

(74) 대리인

유미특허법인

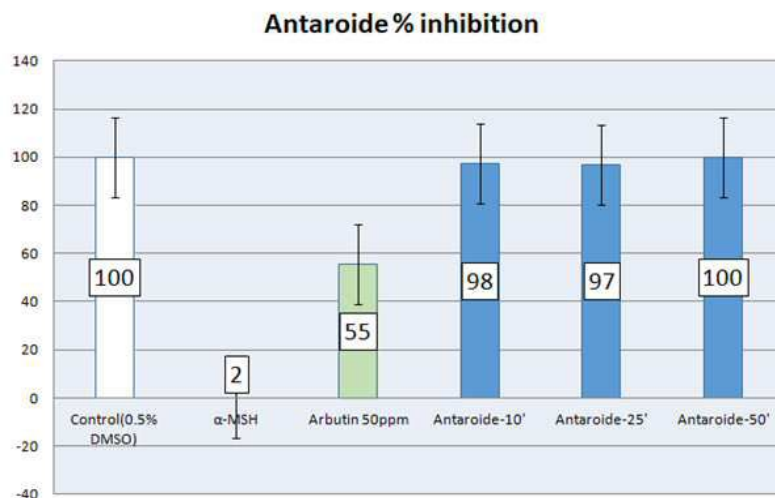
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스 속 균주 및 이를 포함하는 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 해양 퇴적토로부터 분리된 신규한 스트렙토마이세스 SC0736 균주, 이로부터 생성되는 신규 천연물, 및 이의 미백 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)
A61K 31/395 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
A61K 8/49 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
C12R 1/465 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711074290
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

멜라노마 세포의 멜라닌 생성 저해능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 미백용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미백용 조성물은, 피부 색소 침착 또는 멜라닌 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는, 미백용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 용액, 연고, 외용연고, 크림, 에센스, 폼, 화장수, 영양화장수, 유연수, 유연화장수, 팩, 유액, 메이크업베이스, 비누, 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 파운데이션, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 가지는, 미백용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미백용 조성물은, 약학적 조성물, 화장료 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 또는 의약외품 조성물인 것인, 미백용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물인, 미백용 조성물.

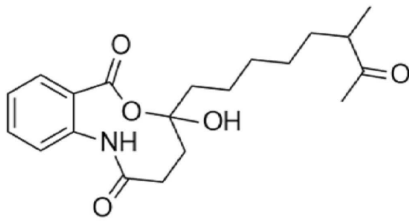
청구항 6

제4항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부 미백 또는 피부 색소 침착 개선용 화장료 조성물인, 미백용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 미백용 조성물은 하기 화학식 1을 갖는 화합물, 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것인, 미백용 조성물:

[화학식 1]



청구항 8

제1항에 있어서, 상기 추출물은 상기 균체, 상기 균주의 배양물, 또는 상기 균주의 파쇄물을 유기용매로 분획추출하여 얻어지는 것인, 미백용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 추출물은 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 또는 상기 균주의 파쇄물을 유기용매로 분획추출하고, 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 상기 분획추출물을 크로마토그래피 분리 및 정제한 분획물로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는, 미백용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 미백용 조성물.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 알코올은 메탄올인, 미백용 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC 13805BP로 기탁된 스트렙토마이세스 SC0736인, 미백용 조성물.

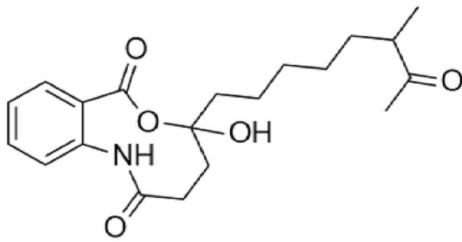
청구항 13

멜라노마 세포의 멜라닌 생성 저해능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 균주는 하기 화학식 1을 갖는 화합물을 생성하는 것인, 균주:

[화학식 1]



청구항 15

제13항에 있어서, 상기 균주는 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, α MSH)의 처리 조건에서 멜라닌 합성을 억제하는 것인, 균주.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC 13805BP로 기탁된 스트렙토마이세스 SC0736인, 균주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양 퇴적토로부터 분리된 신규 균주, 및 이를 포함하는 미백용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 사람의 피부색을 결정하고 기미, 잡티들이 생성되는 현상에는 여러 요인들이 관여하는데, 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트(melanocyte)의 활동성, 혈관의 분포, 피부의 두께, 카로티노이드, 빌리루빈 등 여러 인자들이 복합적으로 관여되어 있다. 이중에서도 가장 중요한 인자는 인체 내의 멜라노사이트에서 여러 효소들이 작용하여 생성되는 멜라닌 색소이다. 멜라닌 색소의 형성에는 유전적 요인, 호르몬 분비, 스트레스, 자외선 등의 생리적 요인 및 환경적 요인 등이 영향을 미친다고 알려져 있다.

[0004] 사람의 피부색을 결정하는 멜라닌(melanin)은 멜라노사이트(melanocyte)에서 생성되는데, 멜라노사이트에는 티로시나제 등의 효소가 존재하며, 이들이 함께 작용하여 생체 내에 항상 존재하는 티로신(tyrosine)이라는 아미노산을 기질로 중합화 산화반응하여, 흑갈색의 색소인 멜라닌을 형성하게 된다. 이렇게 형성된 멜라닌은 멜라노사이트의 수지상 돌기를 통하여 케라티노사이트(keratinocyte)라는 표피 세포로 이동한다. 여기서 멜라닌은 핵 주변에 모자와 같은 구조를 형성하여 자외선으로부터 유전자를 보호하고, 자유 라디칼(free radical)을 제거하여 세포 내 단백질을 보호하는 등 중요한 역할을 하게 된다. 생체 내에는 멜라닌을 분해하는 효소가 없고, 다만 케라티노사이트가 노화되어 제 기능을 다하고 표피에서 떨어져나갈 때 케라티노사이트와 함께 피부로부터 제거된다. 하지만 멜라닌이 필요 이상으로 과다하게 생성되면 기미나 주근깨, 점 등과 같은 과색소침착증을 유발한다.

[0005] 이에 따라 멜라닌의 과도한 생성을 막아 피부에서 색소 침착을 억제하기 위한 미백제에 대한 연구가 이루어졌으며, 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin) 등과 같은 티로시나제 활성을 저해하는 억제제들, 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 A등을 비롯하여 대표적인 항산화제인 비타민 C 및 이들의 유도체 등이 보고되었다.

[0006] 그러나 기존의 미백 물질들은 그 효능이 약하거나 세포 독성 등을 동반하는 경우가 많아, 안전하고 미백 효능이 높은 천연물을 발굴하고자 하는 노력이 계속되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 남극 해양퇴적토에서 분리된 미생물 스트렙토마이세스 SCO-736 균주를 연구하던 중, 이로부터 신규천연물인 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)를 발견하여 구조를 규명하였고, 안타로이드가 멜라닌 합성을 효과적으로 저해할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 남극 해양퇴적토에서 분리한 미생물인 스트렙토마이세스 SCO-736 균주는, 해양 방선균 (Marine *Streptomyces*) 의 일종으로, 이러한 방선균들은 아직까지 밝혀지지 않은 신규한 종들이 다수 존재하며, 이에 신규한 해양 방선 균으로부터 아직까지 밝혀지지 않았던 새로운 천연물 또한 발견할 수 있을 것으로 기대되고 있다.
- [0010] 화학식 1로 표시되는 화합물인 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo-[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)는, 해양 방선균 (Marine *Streptomyces*, SCO-736)에서 처음으로 발견 및 분리되었으며, 이의 활성에 대한 구체적인 연구결과는 아직까지 전혀 보고되지 않아, 신규천연물인 안타로이드의 새로운 활성에 대한 연구가 절실히 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일예는, 화학식 1을 가지는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.
- [0013] 상기 화합물은 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0014] 상기 화합물은 상기 균주의 배양물을 유기용매로 분획추출하고, 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 상기 분획추출물을 크로마토그래피 분리 및 정제한 분획물로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0015] 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0016] 상기 알코올은 메탄올일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 일예는, 스트렙토마이세스 속 균주의 배양액을 유기용매로 분획 추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 화학식 1을 갖는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.
- [0018] 상기 크로마토그래피는 농도 구배 크로마토그래피일 수 있다.
- [0019] 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0020] 상기 크로마토그래피는 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 상기 분획추출물을 분리 및 정제하는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 알코올은 메탄올인 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일예는, 화학식 1을 갖는 신규 화합물, 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 미백용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 상기 조성물은 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 저해하는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 조성물은 용액, 연고, 외용연고, 크림, 에센스, 폼, 화장수, 영양화장수, 유연수, 유연화장수, 팩, 유액, 메이크업베이스, 비누, 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 파운데이션, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및

스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 가지는 것일 수 있다.

- [0025] 상기 화장료 조성물은 피부 미백 또는 피부 색소 침착 개선용 화장료 조성물인 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 일예는, 화학식 1을 갖는 신규 화합물, 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 약학적 조성물, 화장료 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 의약품 조성물, 피부 색소 침착의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 피부 색소 침착의 예방 또는 개선용 의약품 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 상기 약학적 조성물은 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물인 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 일예는, 미백 활성을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 일예는, 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 및 상기 균주의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 미백용 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 일예는, 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 및 상기 균주의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 피부 색소 침착의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 피부 색소 침착의 예방 또는 개선용 의약품 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일예는, 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 분획추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 미백용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0032] 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0033] 상기 크로마토그래피는 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 상기 분획추출물을 분리 및 정제하는 것일 수 있다.
- [0034] 상기 알코올은 메탄올일 수 있다.
- [0036] 이하, 본 발명을 더욱 자세하게 설명한다.
- [0037] 본 발명자들은 남극의 해양퇴적토를 채취한 뒤, 클린벤치에서 건조 후 상기 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/20으로 희석한 후 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여 순수한 균주를 분리 및 선별하였다. 이와 같이 분리된 SCO-736 균주는 전형적인 스트렙토마이세스 속에 속하는 균주의 형태적 양상이 관찰되었다 (도 1 참조).
- [0038] 본 발명의 일예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주는, 서열번호 3의 16S rRNA 유전자 염기서열을 가지며, 이차대사산물로서 하기의 화학식 1로 표시되는 화합물을 분비하는 것을 특징으로 한다. 상기 균주 SCO-736는 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture)에 2019년 1월 30일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC 13805BP 를 부여받았다. 상기 스트렙토마이세스 속 SCO-736 균주의 16S rRNA genes 염기서열은 서열번호 3과 같다.
- [0039] 상기 스트렙토마이세스 속 균주는, 하기 (1) 내지 (4) 중 1 이상의 특징을 가지는 것일 수 있다:
- [0040] (1) 미백 활성을 가짐,
- [0041] (2) 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 저해함,
- [0042] (3) 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, α MSH)의 처리 조건에서 멜라닌 합성을 억제함,
- [0043] (4) 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 분비함.
- [0044] 상기 스트렙토마이세스 속 균주의 상기 (3) 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, α MSH)의 처리 조건에서 멜라닌 합성을 억제하는 억제율은, 알부틴(arbutine) 대비 1배 내지 20배, 1배 초과 내지 20배, 2배 내지 20배, 3배 내지 20배, 4배 내지 20배, 5배 내지 20배, 6배 내지 20배, 7배 내지 20배, 8배 내

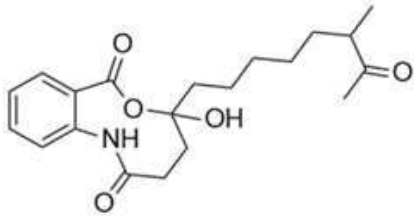
지 20배, 9배 내지 20배, 10배 내지 20배, 11배 내지 20배, 12배 내지 20배, 13배 내지 20배, 14배 내지 20배, 또는 15배 내지 20배일 수 있다.

- [0045] 본 발명자들은 해양퇴적토로부터 분리된 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주를 액체 배양한 후, 에틸아세테이트를 이용하여 추출물을 조제하였고, 이로부터 화학식 1로 표시되는 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione) 화합물을 분리하여 화합물의 구조를 동정하였고, 또한 상기 화합물들의 미백 효능을 평가함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 일 예는, 상기 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주를 고체 배지에서 1차 배양한 이후, 이로부터 생성된 콜로니를 액체 배지에 접종하여 대량 액체 배양하는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 일 예는, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*, SCO-736)로부터 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하는 방법에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 일예는, 상기 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 유기용매 추출물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 미백제 또는 피부 색소 침착 질환의 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0049] 상기 건조물과 농축물은, 상기 배양물을 통상적인 방법으로 건조 또는 농축하여 얻어진 것을 의미한다. 상기 유기용매 추출물은, SCO-736 균주의 배양물을 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추출하여 얻어진 추출물일 수 있다.
- [0050] 상기 추출은 초임계추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법, 또는 셀라이트 또는 폴리 스틸렌 또는 폴리아마드 흡착수지를 이용하는 방법으로 대체 가능하나, 이에 한정되지 않는다. 추출 시 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 상온에서 추출하는 것이 바람직하다. 추출 회수는 1 내지 3회인 것이 바람직하며, 감압건조는 회전진공농축기 (Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 20 내지 40 °C가 바람직하고, 더욱 바람직하게는 25 내지 35°C, 예를 들어 30°C인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 일예에 의하면, 상기 추출물을 분리 및 정제하여 소획물을 얻을 수 있으며, 예를 들어 상기 소획물은 농도 구배를 가지는 크로마토그래피를 사용하여 상기 추출물을 분리 및 정제하여 얻어질 수 있다. 상기 크로마토그래피는 역상 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, HPLC, 및 UPLC로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 크로마토그래피 방법일 수 있다. 일례로, 상기 소획물은 전개용매로 메탄올 수용액을 사용하고 농도 구배를 가지는 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 상기 추출물을 분리하여, 메탄올 농도 60%(v/v)의 분획에서 얻어진 크로마토그램 분획물일 수 있다. 예를 들어, 상기 추출물의 물/메탄올 분획물은 상기 유기용매 추출물을 메탄올 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%(v/v) 용액으로 추가로 분획하여 얻어진 소획물일 수 있으며, 일례로 네 번째 크로마토그램인 메탄올 60%(v/v) 분획물일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 일예에 의하면, 상기 소획물을 분리 및 정제하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻을 수 있으며, 예를 들어 상기 소획물을 크로마토그래피로 분리하여 얻을 수 있다. 상기 크로마토그래피는 역상 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, HPLC, 및 UPLC로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 크로마토그래피 방법일 수 있다. 일례로, 상기 소획물을 액체 크로마토그래피를 사용하여 정제하여, 머무름 시간 10 내지 50분, 10 내지 45분, 10 내지 40분, 10 내지 30분, 15 내지 50분, 15 내지 45분, 15 내지 40분, 15 내지 35분, 20 내지 50분, 20 내지 45분, 20 내지 40분, 20 내지 35분, 25 내지 50분, 25 내지 45분, 25 내지 40분, 25 내지 35분, 30 내지 50분, 30 내지 45분, 30 내지 40분, 30 내지 35분, 31 내지 50분, 31 내지 45분, 31 내지 40분, 31 내지 35분, 31 내지 34분, 31 내지 33분, 31 내지 32분, 또는 31분에서 화학식 1의 화합물을 얻을 수 있다. 상기 액체 크로마토그래피는 역상 액체 크로마토그래피일 수 있다.
- [0053] 상기 분획물 및/또는 소분획물은 화학식 1로 표시되는 화합물을 비롯하여 유용한 이차대사산물을 함유하여 우수한 미백 효과를 나타낼 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 일예에 의하면, 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주의 이차

대사산물 중 미백 효능을 갖는 물질이 포함되어 있음을 확인하였다 (실시예 2 및 4). 이러한 유용한 이차대사산물은 상기 균주의 배양 후 약 6일 제부터 생산되는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 일예에 의한 미백제 또는 피부 색소 침착 질환의 치료용 조성물의 유효 성분으로, 스트렙토마이세스 SCO-736 균주 뿐만 아니라 스트렙토마이세스 SCO-736 균주의 배양물도 사용할 수 있다. 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일예는 화학식 1로 표시되는 화합물인 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo-[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

상기 "안타로이드"는 다음과 같은 화학식 1로 표시되는 물질이다.

화학식 1



상기 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo-[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)는 멜라닌 생성을 저해하여 피부의 색소 침착을 예방, 치료, 개선할 수 있고, 미백효능을 나타낼 수 있다.

본 발명의 일예에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물인 "안타로이드"는 멜라닌 생성을 저해할 수 있다. 상기 "멜라닌 생성 저해"는 피부에서 멜라닌 합성을 억제하는 것, 생성된 멜라닌의 분해를 촉진하는 것과 같이 피부에서 멜라닌의 함량을 낮추고, 색소의 침착을 억제하는 기전을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 저해하거나, 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, αMSH)로 인해 증가된 멜라닌 합성을 억제하는 기전일 수 있다.

상기 SCO-736 균주 및/또는 이로부터 분리된 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은, 적은 농도로 강한 미백 효능을 가져 폭넓은 미백제로 사용될 수 있다는 이점을 갖는다.

본 발명의 일예에 따른 미백용 조성물은, 화학식 1로 표시되는 물질 및 이와 유사한 것으로 당 분야에서 인지될 수 있는 유도체, 이성질체 등을 제한 없이 포함할 수 있다.

본 발명에서 "피부 미백"은 예컨대 기미, 주근깨, 검버섯 및 잡티 등의 예방 또는 개선이 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 피부에서의 색소침착을 예방 또는 개선, 치료하는 모든 활성을 포함한다.

상기 유효성분으로 사용되는 화학식 1로 표시되는 화합물인 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo-[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)는 그 자체, 또는 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염인 유리산에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다.

본 발명의 또 다른 예에서, SCO-736 균주로부터 상기 화학식 1의 화합물을 분리 정제하여 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:

1) 상기 SCO-736 균주를 배양한 배양액에 초산에틸 유기용매를 가하여 추출하는 단계;

2) 상기 얻어진 추출물을 20 내지 100%의 메탄올/물 혼합 용액을 이용하여 C-18 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피하여 분획물을 얻는 단계; 및

3) 상기 분획물들 중 첫 번째와 네 번째 분획물을 각각 Acetonitrile : H₂O = 48 : 52, 용액으로 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제 하는 단계.

상기 균주의 배양기간은, 유용한 이차대사산물의 생산이 활발한 약 4일 이상, 바람직하게는 4 내지 20일, 보다 바람직하게는 6 내지 15일로 설정될 수 있다.

상기 화학식 1로 표시되는 유용한 이차대사산물의 생산에 최적 조건을 제공하기 위하여, 균주의 배양 배지는 Marine broth (BD) 등일 수 있다. 상기 Marine broth 배지 형태는 고체배지와 액체배지 모두 가능하며, 바람직

하계는 액체배지일 수 있다. 예를 들어, 상기 제조방법에 있어서 단계 1)의 액체 배양은 Marine broth 액체배지를 사용하여 균주 콜로니 2-3개당 액체배지 20 내지 30 ml의 비율로 접종하여 수행하는 것이 바람직하다.

[0069] 상기 배양액의 유기용매 추출 시, 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 예를 들어 약 2 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 감압건조는 회전진공농축기 (Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 20 ~ 40℃인 것이 바람직하고 30℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0070] 상기 단계 2) 또는 단계 3)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파텍스, RP-18, RP-8, RP-4, 폴리아미드, 도요펄 (Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 그룹으로부터 선택된 충전제를 이용한 컬럼 크로마토그래피일 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충전제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으며, 용매로 클로로포름 (CHCl₃)-메탄올, 초산에틸 (ethyl acetate)-메탄올, 염화메틸렌 (dichloromethane)-메탄올, 메탄올-물 또는 아세트나이트릴-물을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0071] 본 발명의 구체 예에서, 용리 조건에 물과 메탄올을 사용하였으며, 20% 메탄올/80% 물로 시작하여 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%까지 메탄올의 함량을 증가시켰다. 이로부터 얻어진 분획물을 C-18을 이용한 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 주성분을 분석한 결과, 60% 메탄올/40% 물 분획물에서 1종의 화합물이 확인되었다. 상기 분획물에 추가적으로 48% 아세트나이트릴/52% 물 조건 및 분당 2 ml의 유속의 용리조건으로, 10 mm × 250 mm의 RP-18 컬럼을 이용한 역상 액체 크로마토그래피법을 통해 정제하였으며 머무름 시간 31분에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물인 안타로이드 (Antaroid, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo[c][1,5]oxazonine- 2,7(1H,3H)-dione)를 수득하였다.

[0072] 상기 분리한 화합물들을 MS 및 핵분광기를 이용하여 화합물의 구조를 분석하여 화학구조를 동정하였으며, 화합물 안타로이드 (Antaroid, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)는 분자량 361이며, 분자식이 C₂₀H₂₇NO₅인 연갈색 오일상의 물질인 것을 확인하였다.

[0073] 본 발명의 또 다른 일예는, 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 분획추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 미백용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0074] 본 발명의 또 다른 일예는, 상기 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계 이후에, 상기 크로마토그래피로 얻어진 크로마토그램 분획물을 얻는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일예로, 상기 크로마토그래피는 역상 칼럼 크로마토그래피일 수 있다. 예를 들어, 상기 크로마토그래피는 전개용매로 메탄올 수용액을 사용한 역상 칼럼 크로마토그래피일 수 있다. 상기 크로마토그래피는 농도 구배를 가지는 역상 칼럼 크로마토그래피일 수 있으며, 예를 들어 메탄올 함량이 점차 증가되는 메탄올 수용액을 전개용매로 사용한 농도 구배 역상 칼럼 크로마토그래피일 수 있다. 일예로, 상기 크로마토그래피는 전개용매로 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%(v/v)까지 메탄올의 함량을 증가시킨 메탄올 수용액을 사용한 역상 칼럼 크로마토그래피일 수 있다. 상기 분획물은, 상기 역상 칼럼 크로마토그래피로 얻어진 크로마토그램 분획물일 수 있다. 일예로, 상기 분획물은 전개 용매로 메탄올 수용액을 사용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 얻어진 크로마토그램 분획물일 수 있으며, 예를 들어 메탄올 농도 50 내지 70%(v/v), 50 내지 65%(v/v), 50 내지 64%(v/v), 50 내지 63%(v/v), 50 내지 62%(v/v), 50 내지 61%(v/v), 50 내지 60%(v/v), 55 내지 70%(v/v), 55 내지 65%(v/v), 55 내지 64%(v/v), 55 내지 63%(v/v), 55 내지 62%(v/v), 55 내지 61%(v/v), 55 내지 60%(v/v), 56 내지 70%(v/v), 56 내지 65%(v/v), 56 내지 64%(v/v), 56 내지 63%(v/v), 56 내지 62%(v/v), 56 내지 61%(v/v), 56 내지 60%(v/v), 57 내지 70%(v/v), 57 내지 65%(v/v), 57 내지 64%(v/v), 57 내지 63%(v/v), 57 내지 62%(v/v), 57 내지 61%(v/v), 57 내지 60%(v/v), 58 내지 70%(v/v), 58 내지 65%(v/v), 58 내지 64%(v/v), 58 내지 63%(v/v), 58 내지 62%(v/v), 58 내지 61%(v/v), 58 내지 60%(v/v), 59 내지 70%(v/v), 59 내지 65%(v/v), 59 내지 64%(v/v), 59 내지 63%(v/v), 59 내지 62%(v/v), 59 내지 61%(v/v), 59 내지 60%(v/v), 또는 60%(v/v) 메탄올 농도에서 분리된 분획물일 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 일예는, 상기 크로마토그래피로 얻어진 크로마토그램 분획물을 얻는 단계 이후에, 상기 크로마토그램 분획물을 분리 및 정제하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일예로, 상기 크로마토그램 분획물은 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, HPLC, 및 UPLC로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 분리 및 정제될 수 있으며, 일예로 역상 액체 크로마토그래피로 분리 및 정제

될 수 있다. 예를 들어, 상기 크로마토그램 분획물은 크로마토그래피의 머무름 시간 10 내지 50분, 10 내지 45분, 10 내지 40분, 10 내지 30분, 15 내지 50분, 15 내지 45분, 15 내지 40분, 15 내지 35분, 20 내지 50분, 20 내지 45분, 20 내지 40분, 20 내지 35분, 25 내지 50분, 25 내지 45분, 25 내지 40분, 25 내지 35분, 30 내지 50분, 30 내지 45분, 30 내지 40분, 30 내지 35분, 31 내지 50분, 31 내지 45분, 31 내지 40분, 31 내지 35분, 31 내지 34분, 31 내지 33분, 31 내지 32분, 또는 31분에서 화학식 1의 화합물을 얻을 수 있다.

[0076] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 효과

[0078] 상기한 바와 같이, 본 발명은 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO736 균주의 액체 배양법을 개발하여, 화학식 1로 표시되는 화합물인 안타로이드 (Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo-[c]-[1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)를 분리, 정제하였다. 이 화합물은 미백 효능이 뛰어나며, 따라서 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주의 액체 배양액 추출물, 혹은 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 분획물, 또는 그 화학식 1의 화합물 혹은 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은, 미백제 개발을 위한 후보물질로서 유용하게 이용될 수 있다.

[0079] 또한, 상기 SCO-736 균주로부터 분리된 화학식 1의 화합물인 안타로이드(Antaroide, 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione)가 우수한 미백 효능이 있는 것으로 나타났다. 따라서, 화학식 1로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 미백제 또는 치료용 조성물이 제공될 수 있다.

[0080] 본 발명의 일예에 따른 화학식 1의 화합물은 천연물 유래이므로 안전한 물질이며, 멜라닌 생성을 효과적으로 억제함으로써 피부의 색소침착을 예방, 치료, 개선할 수 있어, 미백제 개발을 위한 조성물의 제조에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 해양퇴적토로부터 분리한 스트렙토마이세스 디아스타티쿠스 아종 아테스시아쿠스 SCO-736 균주의 Marine 고체배지에서의 형태를 나타내는 사진이다.

도 2는 배양한 SCO-736 균주의 전체 추출물 분획 후, 그 중 미백효과가 가장 뛰어난 Fraction 4번 째의 크로마토그램 중 UV 210, 254 nm에서 화학식 1로 표시되는 화합물이 분리된 피크를 화살표로 나타낸 도면이다.

도 3a는 실시예 3에서 분리 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위해 핵자기공명(NMR) 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3b는 실시예 3에서 분리 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위한 질량분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도 의존적 멜라닌 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1. 균주 선별 및 동정

[0086] 1-1: 퇴적토 내 균주 분리

[0087] 2016년 5월 2일 남극 인근 36° 00' 42.7" N 126° 39' 41.8" E 에서 퇴적토를 채집하였다. 채집된 퇴적토는 클린 벤치에서 건조 후, 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/20으로 희석한 뒤 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여

순수한 균주를 분리 및 선별하였다.

[0088] 순수 분리된 SCO-736 균주는 도 1 과 같이 스트렙토마이세스 속에 속하는 균주들과 같은 형태적 양상이 관찰되었다.

[0090] 1-2: 균주의 동정

[0091] 실시예 1-1에서 분리된 균주의 종 동정을 위해 마린브로스 (Marine broth) 액체배지에서 4일 동안 27℃에서 배양된 균주 1ml을 취하여 “Tissue Genomic DNA Isolation kit” (Cosmogenetech co, Ltd., Seoul, South Korea)를 이용하여 제조회사 프로토콜에 의하여 genomic DNA를 추출하였다. 종 분석을 위해 16S rRNA 유전자 증폭을 27F 및 1492R 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용한 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

종류	서열 (5' -> 3')	서열번호
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	2

[0093] PCR 산물은 “PCR purification kit” (Cosmogenetech co, Ltd., Seoul, South Korea)을 이용하여 정제 후, capillary electrophoresis (Applied Biosystems 3730XL)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0094] SCO-736 균주로부터 얻어진 16S rRNA 유전자 염기서열을 GenBank/EMBL/DDBJ 데이터베이스의 BLAST 서치를 활용하여 이전에 보고된 균주들의 정보와 비교하였다. 그 결과 SCO-736 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Streptomyces diastaticus*, *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*, 및 *Streptomyces fradiae* strain SMS_SU23 균주들과 99.9% 상동성을 나타내었으며, 본 발명의 스트렙토마이세스 속 SCO-736 균주는 *Streptomyces* 속에 속하는 균주로 판단되었다. *Streptomyces diastaticus*는 streptomycetes속의 알칼리성(Alkaliphile) 및 고온성(thermophilic)세균으로 oligomycin A, oligomycin C, rimocidin 및 leukotriene-A4 hydrolase-inhibitor 8 (S) -amino-2 (R) -methyl-7-oxononanoic acid를 생산하는 특징을 가진다.

[0095] 상기 스트렙토마이세스 속 SCO-736 균주의 16S rRNA genes 염기서열을 표 2에 나타내었다 (서열번호 3):

표 2

서열번호 3	AGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGGCTATCAGCTTGTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC GGCTGTGTCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGACGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGAGATCGGA ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCGGATACTGACGCTGAGGAGC GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTG CGTGCCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAGCTAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGC GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCT TGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCC CGTGTGCCAGCAACTCTTCGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATC ATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACAGTGTCTACAATGGCCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGC CGGTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCA
--------	--

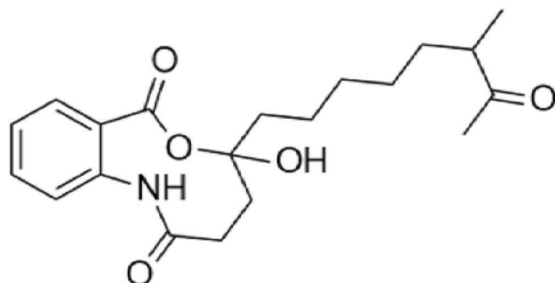
[0098] 실시예 2. 균주 배양물 및 추출물 제조

[0099] 실시예 1에서 동정된 스트렙토마이세스 속 균주를 2.5L 배양 용기에 해수가 포함된 1리터 배양액 (10 g/L 전분, 2 g/L 효모 추출물, 4 g/L 펩톤)에 7일 동안 27℃, 130 rpm 조건에서 배양 후, 스트렙토마이세스 속 SCO-736 균주의 배양물을 얻었다.

[0100] 스트렙토마이세스 속 SCO-736 균주의 배양물에 에틸아세테이트 1L를 넣어 두 층을 분리하고 이로부터 에틸아세테이트 층을 얻었다. 이후 에틸아세테이트 층으로부터 진공회전 농축기를 이용하여 유기 용매를 제거하고 이의 추출물을 얻었다. 상기 에틸아세테이트 추출물 (3.4 g)은 H2O와 MeOH의 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%까지

MeOH의 단계적 구배에 따르는 C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다. 그 중 60% 메탄올/ 40% 물로 분획한 네 번째 분획에서 유기 용매를 제거하였으며, 그 분획물을 3ml 메탄올에 녹이고, 그 용액에 대한 고성능 액체 크로마토그래피를 수행하여 최종적으로 순수한 화합물 (화학식 1)을 획득하였으며, 스트렙토마이세스 속 SCO-736 균주의 배양물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 확인하였다.

[화학식 1]



실시예 3. 화합물의 분리 및 정제

실시예 2에서 얻은 스트렙토마이세스(*Streptomyces*, SCO-736) 배양액에 에틸아세테이트 1L를 넣어 두 층을 분리하고 이로부터 에틸아세테이트 층을 얻었다. 이후 에틸아세테이트 층으로부터 진공회전 농축기를 이용하여 유기 용매를 제거하고 이의 추출물을 얻었다. 상기 에틸아세테이트 추출물 (3.4 g)은 H₂O와 MeOH의 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%까지 MeOH의 단계적 구배에 따르는 C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다.

그 중 LC-MS 분석에서 특이한 분자량과 자외선 흡광을 보이는 피크인 60% 메탄올/ 40% 물로 분획한 네 번째 분획 (도 2)의 유기 용매를 제거하였으며, 그 분획물을 3ml 메탄올에 녹이고, 그 용액에 대한 고성능 액체 크로마토그래피를 수행하여 최종적으로 순수한 화합물을 획득하였으며, 이를 "안타로이드 (Antaroide)"로 명명하였다. 사용한 고성능 액체 크로마토그래피의 조건은 다음과 같다:

Phenomenex Luna C-18 (2), 250×10.0 mm

2.0 mL/분, 5 mm, 100 Å, UV = 210 nm, 아세토나이트릴 (CH₃CN) : 물 (H₂O) = 48 : 52

상기와 같은 방법에 따라 안타로이드 (13 mg)를 스트렙토마이세스(*streptomyces*, SCO-736)로부터 머무름 시간 31분에 분리하였다.

실시예 4. 화합물의 동정

실시예 3에서 분리 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위하여 핵자기공명(NMR)과 질량분석(MS)을 수행하였다.

도 3a 및 표 3에 도시된 NMR 분석 결과와, 도 3b에 도시된 질량분석 결과를 근거로, 분리 정제된 화합물을 분자량 361, 화학식 1의 구조를 가진 5-hydroxy-5-(6-methyl-7-oxooctyl)-4,5-dihydrobenzo[c][1,5]oxazonine-2,7(1H,3H)-dione으로 동정하였다. 화학식 1의 구조를 가지는 화합물은 아직까지 보고된 바 없는 천연에서 처음으로 분리된 신규한 화합물임을 확인하였다. 하기 화학식 1의 화합물을 "안타로이드(Antaroide)"로 명명하였다.

표 3

NMR Data for Antaroide (DMSO-*d*₆)^a

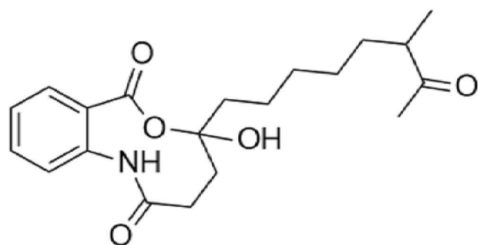
No.	<i>d</i> _H (J in Hz)	<i>d</i> _C , mult. ^b
1	—	161.1, qC
2	—	116.3, qC
3	7.99, d (8.0)	129.7, CH
4	7.41, d (8.0, 8.0)	125.7, CH
5	7.79, dd (8.0, 8.0)	135.6, CH

6	7.95, d (8.0)	120.9, CH
7	—	136.0, qC
8	—	172.2, qC
9	2.67, t (7.0)	29.0, CH ₂
10	2.53, t (7.0) 2.34, t (7.0)	28.5, CH ₂
11	—	97.2, qC
12	1.90, t (7.0) 1.82, t (7.0)	36.3, CH ₂
13	1.46, m 1.30, m	22.6, CH ₂
14	1.25, m	29.1, CH ₂
15	1.19, m 1.18, m	26.1, CH ₂
16	1.56, m 1.25, m	31.8, CH ₂
17	2.50, m	45.9, CH
18	—	211.8, qC
19	2.04, s	27.9, CH ₃
20	0.92, d (6.8)	15.7, CH ₃

[0115] ^a 800 MHz for ¹H NMR and 200 MHz for ¹³C NMR.

[0116] ^b Numbers of attached protons were determined by analysis of 2D spectra.

[0118] [화학식 1]



[0119]

[0121] 실시예 5. 멜라닌 생성 저해능 측정

[0122] 실시예 3에서 분리된 화학식 1로 표시되는 화합물의 멜라닌생성 저해 활성을 이용하여 측정하였다.

[0123] 구체적으로, B16F10 멜라노마 세포 (ATCC, USA)를 1×10^4 cells/well로 48 웰 플레이트에 300 μ L씩 분주한 후에 인큐베이터에서 하룻밤 동안 배양하였으며, 배지로는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)high glucose 배지(ATCC, USA)를 사용하였다. 멜라닌 생성 촉진 자극원인 Alpha-MSH (0.1 uM, Sigma-Aldrich, USA)와 DMSO에 용해시켜 10, 25, 50ppm 농도로 제조한 안타로이드를 동시에 섞은 배지를 제조하였다. 양성대조군으로는 알부틴 50ppm을 사용하였다. 분주된 웰 내의 배지를 제거한 후에 제조된 배지를 웰 당 450 μ L씩 넣어주었다. 72 시간 후 배지를 완전히 제거하고, 1N NaOH 를 웰 당 200 μ L씩 넣어준 후 60℃에서 1시간 동안 배양하여 세포로부터 멜라닌을 용해시켰다. 용해된 멜라닌 시료 100 μ L를 96 웰 플레이트에 옮겨 담고 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 차이로부터 멜라닌 생성 저해도는 다음 수학적 식 1과 같이 산출하였다. 멜라닌 생성 저해도 측정 결과를 도 4에 나타내었다.

[0124] [수학적 식 1]

[0125] 멜라닌생성 저해도(%) = $1 - (ODS - ODc) / (ODm - ODc) \times 100$

- [0126] ODS: 시험물질(안타로이드)과 alpha-MSH를 처리한 시료의 흡광도
- [0127] ODm: alpha-MSH 만 처리한 시료의 흡광도
- [0128] ODC: 시험물질(안타로이드) 및 alpha-MSH 미처리 음성대조군(1N NaOH 100 μ L)의 흡광도
- [0130] 그 결과, 도 3에서 확인되는 바와 같이, 화학식 1로 표시되는 화합물 (안타로이드, Antaroide)는 10ppm, 25ppm, 50ppm 으로 농도가 증가할수록 멜라닌 생성 저해 효과가 더욱 증가하였다. 특히 동일 농도인 50ppm 에서는 양성 대조군인 알부틴과 비교하여 약 42% 높은 저해 활성도를 보였으며, 특히 저농도인 10ppm에서도 약 43%의 높은 멜라닌 생성 저해 활성을 나타내었다.
- [0131] 상기와 같은 결과에 따라, 본 발명의 안타로이드(Antaroide)는 멜라닌 생성 저해 활성이 매우 우수하며, 멜라닌 생성 저해를 통해 피부 색소 침착과 관련된 다양한 질병 및 상태에 적용 가능성을 확인하였다.
- [0133] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

수탁번호

[0135]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13805BP

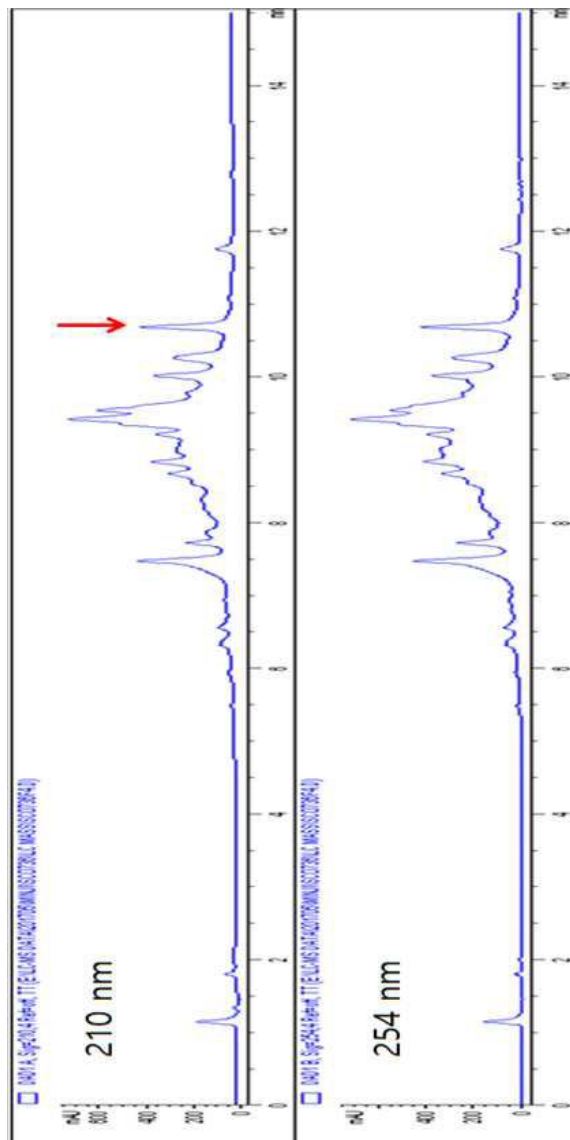
수탁일자 : 20190130

도면

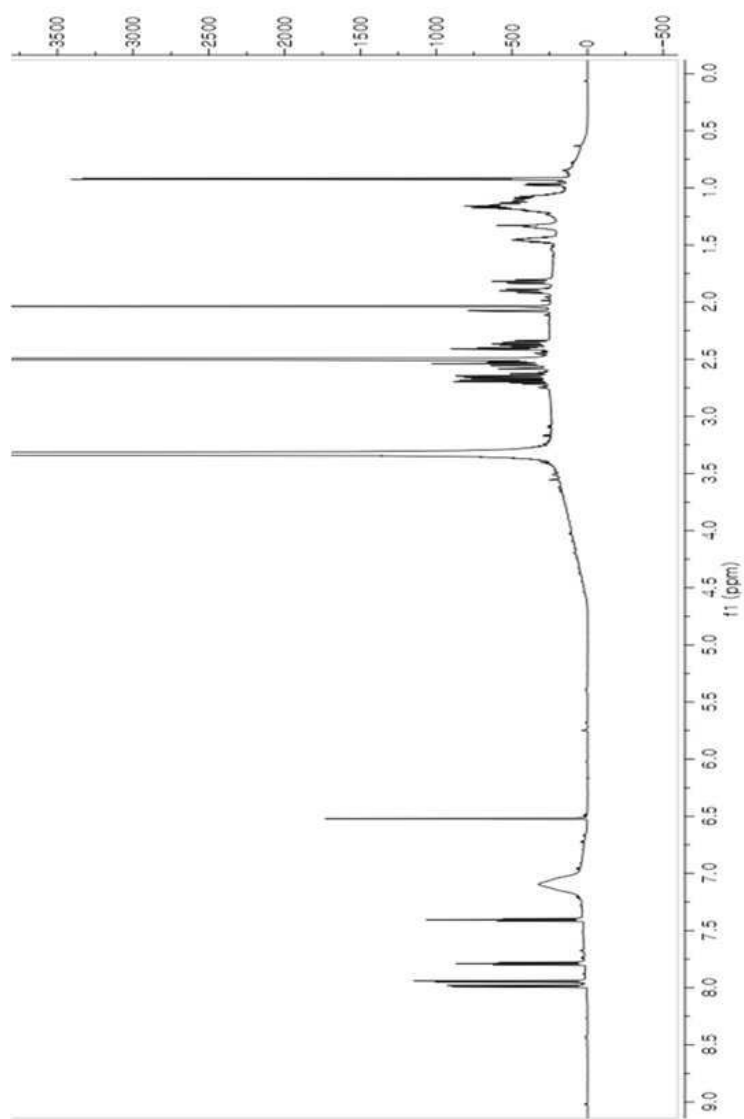
도면1



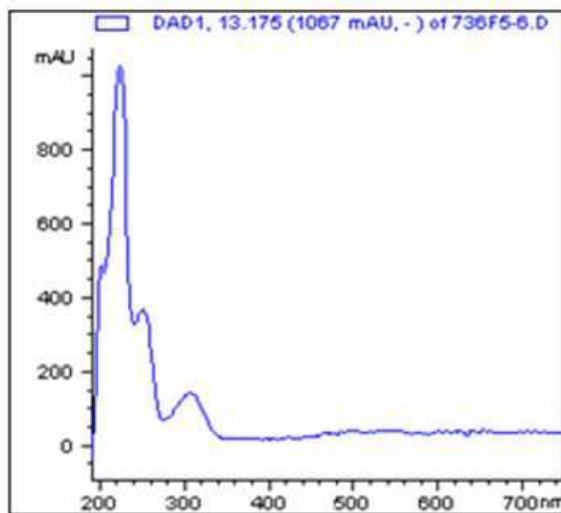
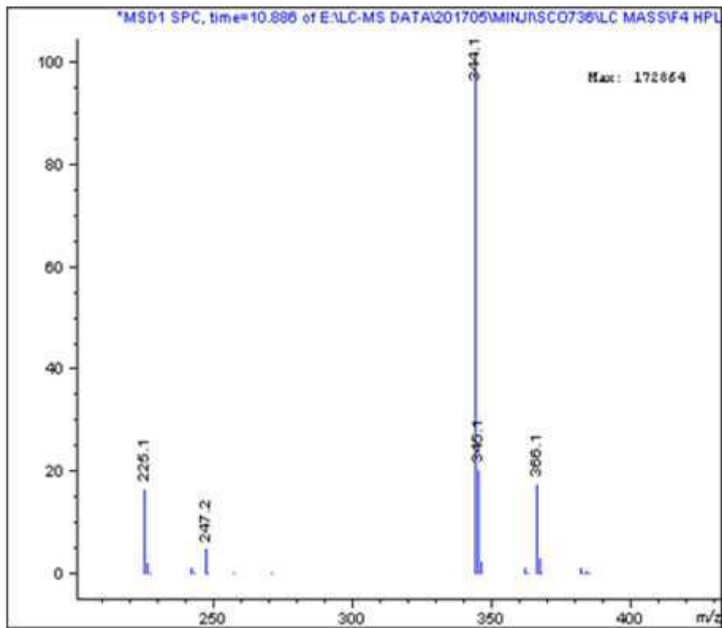
도면2



도면3a



도면3b

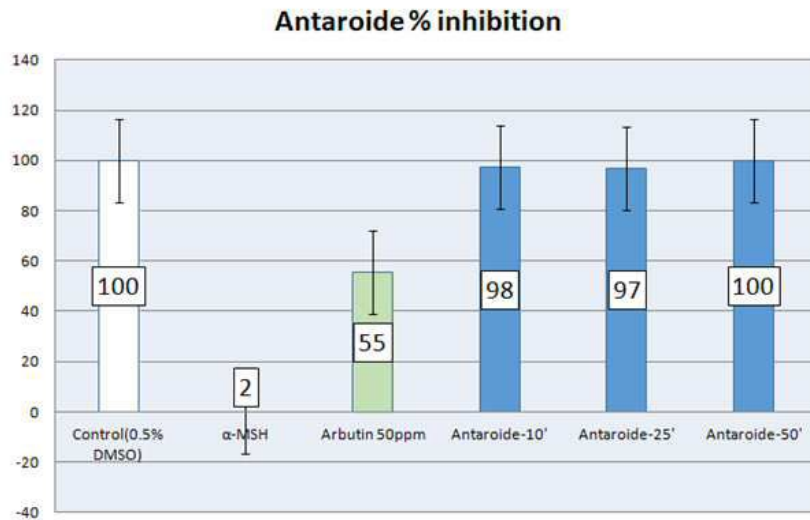


$$[M] - H_2O(18) + H(1) = 344$$

$$[M] = 343 + H_2O(18) = 361$$

$$[M] = 361$$

도면4



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Streptomyces species strain and Composition for Skin Whitening

Containing the same

<130> DPP20190386KR

<160> 3

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 27F primer

<400> 1

agagtttgat cctggctcag

20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1492R primer

<400> 2

ggttaccttg ttacgactt

19

<210> 3

<211> 1095

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Streptomyces sp.

<400> 3

agctccggcg gtgcaggatg agcccgcggc ctatcagctt gttggtgagg taatggctca 60

ccaaggcgac gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacactggg actgagacac 120

ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatatgac acaatgggag aaagcctgat 180

gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct tcgggttgta aacctctttc agcaggaag 240

aagcgaaagt gacggtacct gcagaagaag cgcgggctaa ctacgtgcca gcagccgagg 300

taatacgtag ggcgcaagcg ttgtccgga ttattgggag taaagagctc gtaggcggct 360

tgtcgcgtcg gttgtgaaag cccggggctt aacccgggt ctgcagtcga tacgggcagg 420

ctagagttag gtaggggaga tcggaattcc tgggtgtagc gtgaaatgag cagatatcag 480

gaggaacacc ggtggcgaag gcggtatctt gggccgatac tgacgtgag gagcgaaagc 540

gtggggagcg aacaggatta gatacctgg tagtcacgc cgtaaacggt gggcactagg 600

tgtgggcaac attccacgtt gtccgtgccg cagctaagc attaagtgcc ccgcctgggg 660

agtacggcgc caaggctaaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggcggagc 720

atgtggctta attcgacgca acgcaagaa ccttaccag gcttgacata caccgaaag 780

catcagagat ggtgcccccc ttgtggtcgg tgtacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct 840

cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgtcc cgtgttgcca 900

gcaactcttc ggaggttggg gactcacggg agaccgccc ggtcaactcg gaggaagggtg 960

gggacgacgt caagtcatca tgccccttat gtcttgggct gcacacgtgc tacaatggcc 1020

cgttacaatg agctgcgata ccgcaagggt gagcgaatct caaaaagccg gtctcagttc 1080

ggattggggt ctgca 1095