



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0103378
(43) 공개일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) C07C 39/19 (2006.01)
C07D 311/04 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01) C12P 7/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1085 (2013.01)
C07C 39/19 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0030240
(22) 출원일자 2017년03월09일
심사청구일자 2017년03월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)
김별
경기도 안양시 동안구 경수대로883번길 33, 105동 1002호 (비산동, 비산한화꿈에그린아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

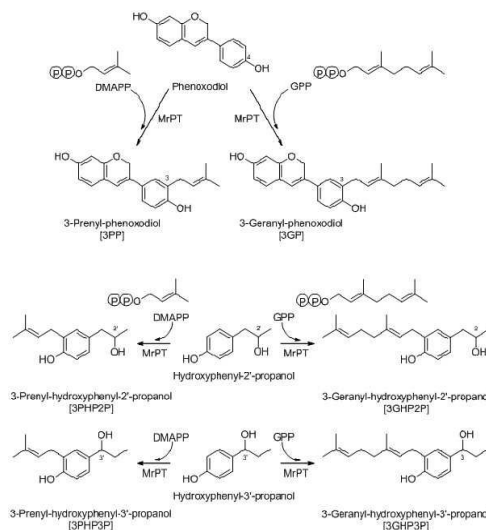
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 프레닐트랜스퍼라제 및 이를 이용한 프레닐화 방향족 화합물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 재조합 방향족 프레닐트랜스퍼라제를 이용하여 프레닐화 방향족 화합물의 제조에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 항암 또는 미백 활성을 가지는 신규한 프레닐화 방향족 화합물의 생전환에 관한 것이다. 본 발명에 따른 재조합 방향족 프레닐트랜스퍼라제를 이용하여 효소적 생전환된 프레닐화 방향족 화합물은 항암 또는 미백활성이 우수하고, 저비용으로 대량 생산이 가능하므로 의약적 응용 및 산업적으로 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07D 311/04 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 17/06 (2013.01)

C12P 7/22 (2013.01)

(72) 발명자

이재우

서울특별시 은평구 가좌로 344, 113동 1304호 (신사동, 현대아파트)

임주현

경기도 용인시 기흥구 구성로 470, 401동 704호 (청덕동, 물푸레마을4단지경남아너스빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011066

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01002524

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 프레닐트랜스퍼라제 효소 (MrPT).

청구항 2

제1항의 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제2항에 있어서, 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제2항의 폴리뉴클레오티드 또는 제5항의 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

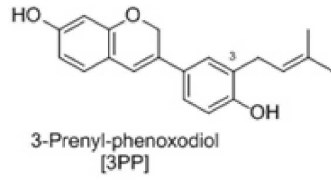
청구항 8

제6항의 재조합 미생물을 배양하여 프레닐트랜스퍼라제 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 (MrPT)의 제조 방법.

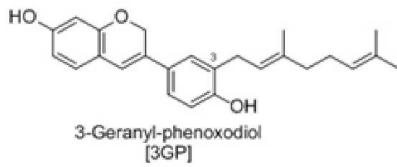
청구항 9

하기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염.

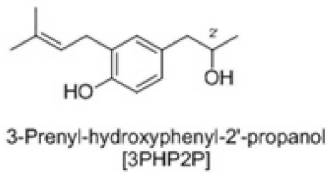
[화학식 1]



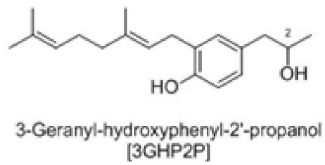
[화학식 2]



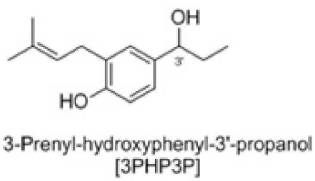
[화학식 3]



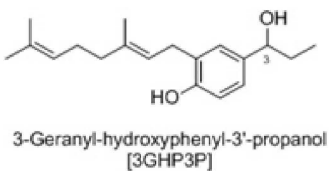
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



청구항 10

제9항에 있어서, 상기 프레닐화 방향족 유도체는 프레닐화 페녹소다이올 유도체 또는 프레닐화 단순 페놀릭 유도체인 것을 특징으로 하는 화합물.

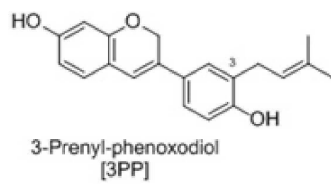
청구항 11

다음 단계를 포함하는 하기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체의 제조 방법:

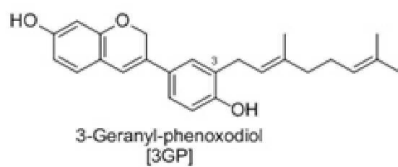
(a) 제1항의 프레닐트랜스퍼라제 효소 (MrPT)의 존재하에 하기 화학식 7 내지 화학식 9로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 프레닐 수용체와 프레닐 공여체를 반응시켜 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체를 생합성 시키는 단계; 및

(b) 상기 합성된 프레닐화 방향족 유도체를 회수하는 단계.

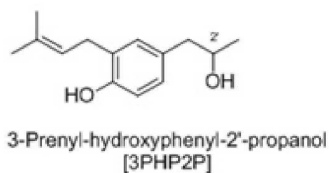
[화학식 1]



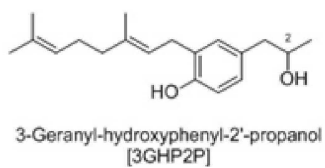
[화학식 2]



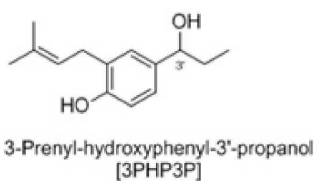
[화학식 3]



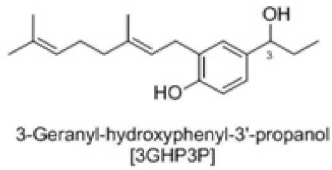
[화학식 4]



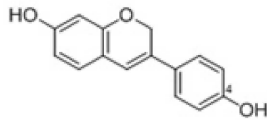
[화학식 5]



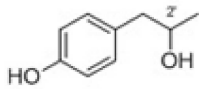
[화학식 6]



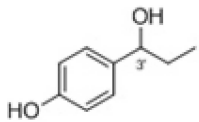
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]



청구항 12

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 메탄올:물:포름산 75:25:0.2(v/v/v/v) 혼합액 이동상, 및 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하여 24-35분 유지시간(Retention time) 조건에서 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 프레닐 수용체는 페녹소다이올 (phenoxodiol), 4-히드록시페닐-2-프로파놀 (4-hydroxyphenyl-2'-propanol) 또는 4-히드록시페닐-3-프로파놀 (4-hydroxyphenyl-3'-propanol)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 프레닐 공여체는 DMAPP(dimethylallyl diphosphate) 또는 GPP(geranyl diphosphate)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제9항의 화합물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 암은 전립선암, 난소암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 17

제9항의 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 재조합 방향족 프레닐트랜스퍼라제를 이용하여 프레닐화 방향족 화합물의 제조에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 항암 또는 미백 활성을 가지는 신규한 프레닐화 방향족 화합물의 생전환에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 방향족 화합물의 이소프레닐화는 유비퀴논(ubiquinone), 메나퀴논(menaquinone) 혹은 플라스토퀴논(plastoquinone)과 같은 생체 내 일차 대사산물의 생합성에 중요할 뿐만 아니라, 식물 및 진균 또는 세균 내 이차 대사산물의 구조적 다양성에 중요하다 (Saleh O *et al.*, *Phytochem.* 2009, 70(15-16):1728-1738). 지난 십 수년간 다양한 식물 유래의 PT 및 그 재조합 PT를 이용한 프레닐화된 플라보노이드 및 폴리페놀 화합물의 합성이 보고되고 있다 (Winkelblech J *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99(18):7379-7397; Saleh O *et al.*, *Phytochem.* 2009, 70(15-16):1728-1738; Yazaki K *et al.*, *Phytochem.* 2009, 70(15-16):1739-1745; GB 2430199 A; KR 2010004212 A; WO 2011017798 A1). 또한, 최근 진균과 세균 내 이차대사에 연관된 신규한 방향족 프레닐트랜스퍼라제 그룹이 보고되었으며 (Pojer F *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(5):2316-2321, 2003; Kumano T *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 16(17):8117-8126, 2008; Ozaki T *et al.*, *J. Antibiot.* 62(7):385-392, 2009), 특히 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 방선균 유래의 수용성 PT를 암호화하는 유전자들의 발견 및 발현 단백질들 중 일부 단백질의 3차 구조를 확인하였다. 이러한 보고들은 약학적 활성을 지닌 기존 화합물의 생합성과 관련된 새로운 전략을 제공하는 동시에, 신규한 프레닐화 화합물 라이브러리를 제공할 수 있으므로, 프레닐화 방향족 화합물들의 생합성에 대한 관심은 증대되고 있다.

[0004] 프레닐화 화합물들은 프레닐화 이전의 화합물과 비교하여 그 생리활성에 차이가 나타나며, 이와 같은 생리활성의 차이는 프레닐화에 의한 생물학적 막에 대한 투과도 향상 및 표적 단백질에 대한 결합 친화도의 증가에 기인한다고 할 수 있다 (Botta B *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 26(12):606-608, 2005). 따라서, 다양한 생리활성이 부가된 프레닐화 방향족 화합물은 농업 및 의약 등의 다양한 산업적 응용이 가능하다. 근래 부각되고 있는 프레닐화 플라보노이드의 생물학적 활성 및 그 약리학적 특성은 특히 항암 화학요법제로서의 활용 가능성을 제시하고 있다. 즉, 잔투몰(xanthumol), 아르테라스틴(artelastin) 및 프레닐 나린게닌(8-prenyl naringenin) 등은 아직까지는 일부 소수의 표적 단백질들만이 확인되기는 하였으나, 발암(carconogenesis) 단계를 전반적으로 저해하는 암 예방 잠재성(cancer-preventive potential)을 보여준다 (Pan L *et al.*, *Mol. Nutr. Food Res.* 49(9):837-843, 2005). 한편, 프레닐화 혹은 게라닐화 크라이신(prenyl- 혹은 geranyl-chrysin)과 같은 프레닐화 플라보노이드는 항암 화학요법제 실패의 주요 원인 중 하나인 다제 저항성 단백질(multi-drug resistance proteins)에 대하여 특이적이며 강력한 저해제로 알려져 있다 (Tokalov SV *et al.*, *Pharmacol.* 71(1):46-56, 2004). 이 같은 특정 암세포의 화학요법제에 대한 내성은 암세포 막의 ABCG2와 P-glycoprotein과 같은 ABC(ATP-binding cassette) 프랜스포터(transporter)들이 자체 ATP의 소비를 통하여 세포 내 화학요법제를 세포 밖으로 방출하는 기작을 포함하고 있다. 즉, 프레닐화 플라보노이드들은 이들 ABC 프랜스포터 단백질에 강하게 결합함으로써 화학요법제의 막 외부 방출을 저해하며, 이를 통하여 암세포의 다제 내성활성에 대응이 가능하다. 또한 최근의 구조-활성 연관성(Structure-Activity Relationship) 연구들로부터 플라보노이드의 프레닐화는 ABC 프랜스포터의 일종인 P-glycoprotein의 저해활성에 중요함을 보여주었다 (Ahmed-Belkacem A *et al.*, *Cancer Res.* 65(11):4852-60, 2005). 따라서, 프레닐화 방향족 화합물 중 하나인 프레닐화 플라보노이드들의 신

규한 합성은 다제내성 암세포에 대한 조절제 후보물질로 개발 가능하며, 이는 나아가 차세대 항암 화학요법제 개발에 필수적이다 할 것이다.

[0005] 이와 같이, 폴리페놀 및 플라보노이드 등의 프레닐화는 개선된 약리적 활성 및 구조적 다양성을 제공할 수 있으나, 이들 화합물의 구조- 및 위치-특이적 유기 합성은 매우 제한적이며, 고비용인 동시에 격렬한 화학 반응이 요구된다. 또한, 대다수 프레닐화 방향족 화합물들은 자연계 내 천연물 안에서 극히 소량으로 존재하여 의약품 개발에 필수 과정인 전임상 및 임상 실험에 필수적으로 요구되는 충분한 양을 제공하기가 쉽지 않다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 개선된 약리적 활성을 가지는 프레닐화 방향족 화합물을 생전환 방법을 통해 제조하고자 예의 노력한 결과, 재조합 방향족 프레닐트랜스퍼라제를 이용하여 항암 또는 미백 활성을 가지는 신규한 프레닐화 방향족 화합물을 생전환할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT) 및 상기 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)를 이용한 프레닐화 방향족 유도체의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 프레닐화 방향족 유도체 화합물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)에 의해 제조된 프레닐화 방향족 유도체 화합물을 함유하는 항암 또는 미백 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

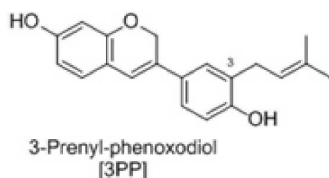
[0014] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 프레닐트랜스퍼라제 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)의 제조방법을 제공한다.

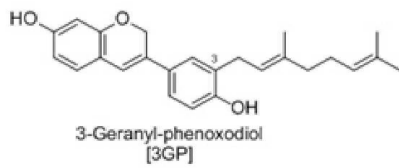
[0017] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0018] [화학식 1]



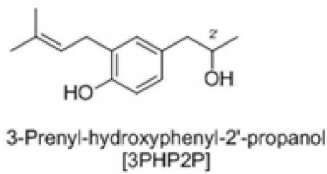
[0019]

[0020] [화학식 2]



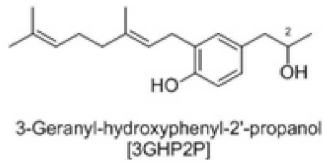
[0021]

[0022] [화학식 3]



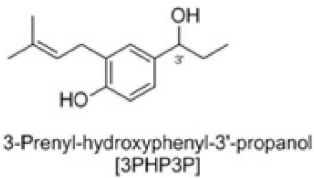
[0023]

[0024] [화학식 4]



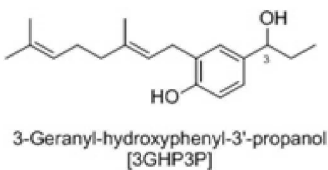
[0025]

[0026] [화학식 5]



[0027]

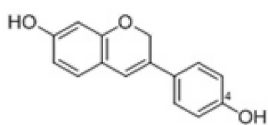
[0028] [화학식 6]



[0029]

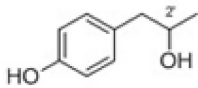
[0030] 본 발명은 또한, 상기 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)의 존재하에 하기 화학식 7 내지 화학식 9로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 프레닐 수용체와 프레닐 공여체를 반응시켜 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체를 생합성 시키는 단계; 및 상기 합성된 프레닐화 방향족 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0031] [화학식 7]



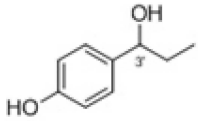
[0032]

[0033] [화학식 8]



[0034]

[0035] [화학식 9]



[0036]

[0037] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0040] 본 발명에 따른 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 재조합 방향족 프레닐트랜스퍼라제를 이용하여 효소적 생전환된 프레닐화 방향족 화합물은 항암 또는 미백활성이 우수하고, 저비용으로 대량 생산이 가능하므로 의약적 응용 및 산업적으로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 재조합 MrPT 프레닐트랜스퍼라제 효소 반응에 의한 방향족 화합물의 프레닐화 유도체로의 생전환을 나타낸 것이다.

도 2는 생전환 프레닐화 유도체인 페녹소다이올 유도체의 전립선암 세포주에 대한 항암활성을 확인한 것이다.

도 3은 생전환 프레닐화 유도체인 페녹소다이올 유도체의 난소암 세포주에 대한 항암활성을 확인한 것이다.

도 4는 생전환 프레닐화 단순 페놀릭 유도체들의 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 합성저해 활성을 확인한 것이다.

도 5는 신규 생전환 프레닐화 단순 페놀릭 유도체 4종과 생전환 전 단순 페놀릭 화합물 2종의 섬유모세포(fibroblast)에 대한 세포독성 결과를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0045] 본 발명에서는 토양 방선균의 일종인 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주 유전체로부터 유전체(genome)로부터 프레닐트랜스퍼라제(PT) 암호화 후보 오픈 리딩 프레임(open reading frame)들을 일차 분리하고, 생물정보학(bioinformatic) 분석을 통하여 선발된 PT 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작한 다음, 재조합 프레닐프랜스터리라제 효소 MrPT를 제조하였다. 본 발명의 재조합 프레닐프랜스터리라제 효소 MrPT는 기존에 보고된 방선균 유래 프레닐트랜스퍼라제 효소들과는 달리 탄소골격 15개의 FPP(farnesyl diphosphate)의 이소프레닐 공여체를 프레닐 공여체로 사용하지 않고, 탄소골격 5개의 DMAPP(dimethylallyl diphosphate)와 10개의 GPP(geranyl diphosphate)를 프레닐 공여체로 사용하므로, 프레닐 공여체들에 대한 기질 특이성을

가진다.

- [0046] 이후, 상기 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT와 일종인 반합성(semi-synthetic) 이소플라벤(isoflavene)계 열의 페녹소다이올(phenoxodiol)과 단순 페놀릭(simple phenolic)계열 화합물의 총 3종의 프레닐 수용체(페녹소다이올, 4-히드록시페닐-2'-프로파놀, 4-히드록시페닐-3'-프로파놀) 및 2종의 프레닐 공여체를 반응시켜 신규한 프레닐화 방향족 유도체인 3-프레닐-페녹소다이올(3-prenyl-phenoxodiol; 3PP), 3-게라닐-페녹소다이올(3-geranyl-phenoxodiol, 3GP), 3-프레닐-히드록시페닐-2'-프로파놀(3-prenyl-hydroxyphenyl-2'-propanol; 3PHP2P5), 3-게라닐-히드록시페닐-2'-프로파놀(3-geranyl-hydroxyphenyl-2'-propanol; 3GHP2P), 3-프레닐-히드록시페닐-3'-프로파놀(3-prenyl-hydroxyphenyl-3'-propanol; 3PHP3P) 및 3-게라닐-히드록시페닐-3'-프로파놀(3-geranyl-hydroxyphenyl-3'-propanol; 3GHP3P)을 생합성하였다. 이후 질량분석기와 핵자기 공명 스펙트로메트리(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하는 한편, 소수성 프레닐 탄소골격이 효소적으로 부가된 방향족 유도체인 신규한 프레닐화 방향족 유도체들의 전립선암 세포주에 대한 항암활성 및 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 생성억제 활성을 확인하였다.
- [0047] 본 발명은 기존 약리 활성 화합물의 프레닐 전이에 의한 구조 변형된 유도체들의 생전환을 통하여 기존 약리 화합물의 생리 활성을 보다 더 향상시킬 수 있으며, 이러한 생리활성 소재의 분자적 재설계는 신규 의약품 및 기능성 화장품으로의 응용 가능성 및 활용 잠재성을 확인할 수 있다.
- [0048] 따라서, 본 발명은 일관점에서 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 프레닐트랜스퍼라제 효소 (MrPT)에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 미생물을 배양하여 프레닐트랜스퍼라제 효소의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 (MrPT)의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0055] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단 부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0056] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0057] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능

하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0058] 당업계에서 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0059] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

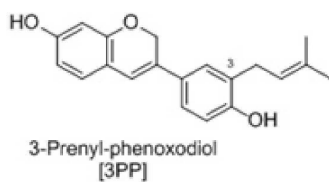
[0060] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0061] 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0062] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작 방법을 사용할 수 있으며, 일례로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

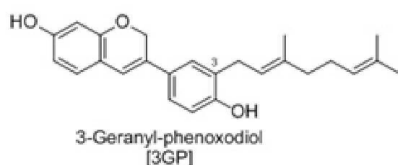
[0064] 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

[0065] [화학식 1]



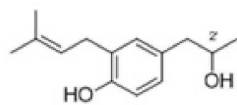
[0066]

[0067] [화학식 2]



[0068]

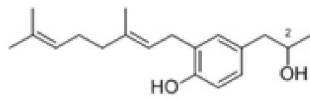
[0069] [화학식 3]



3-Prenyl-hydroxyphenyl-2'-propanol
[3PHP2P]

[0070]

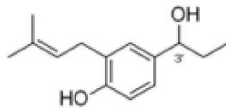
[0071] [화학식 4]



3-Geranyl-hydroxyphenyl-2'-propanol
[3GHP2P]

[0072]

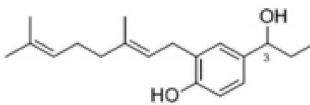
[0073] [화학식 5]



3-Prenyl-hydroxyphenyl-3'-propanol
[3PHP3P]

[0074]

[0075] [화학식 6]



3-Geranyl-hydroxyphenyl-3'-propanol
[3GHP3P]

[0076]

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 프레닐화 방향족 유도체는 프레닐화 페녹소다이올 유도체 또는 프레닐화 단순 페놀릭 유도체인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 프레닐화(prenylation)는 방향족 화합물(aromatic compounds)에 소수성(hydrophobicity)의 프레닐기가 부가된 것을 의미한다.

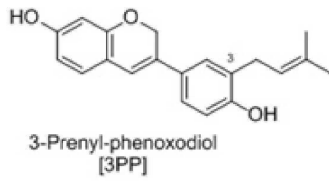
[0078] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1 내지 6의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 황산을 사용할 수 있다.

[0079] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 6의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.

[0080] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 6의 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

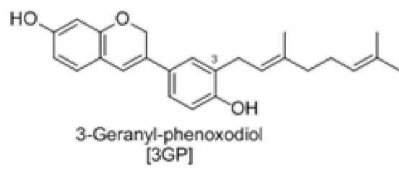
[0081] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)의 존재하에 하기 화학식 7 내지 화학식 9로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 프레닐 수용체와 프레닐 공여체를 반응시켜 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체를 생합성 시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 프레닐화 방향족 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[0082] [화학식 1]



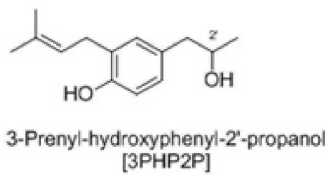
[0083]

[0084] [화학식 2]



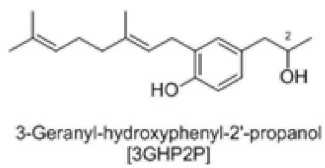
[0085]

[0086] [화학식 3]



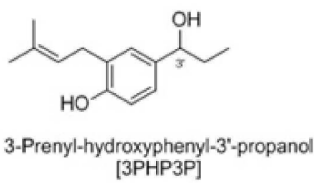
[0087]

[0088] [화학식 4]



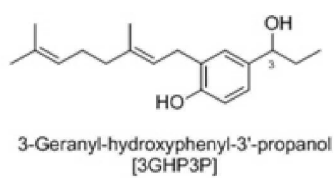
[0089]

[0090] [화학식 5]



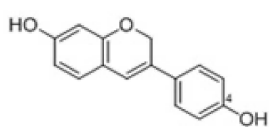
[0091]

[0092] [화학식 6]



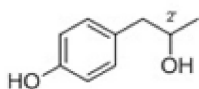
[0093]

[0094] [화학식 7]



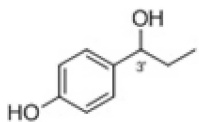
[0095]

[0096] [화학식 8]



[0097]

[0098] [화학식 9]



[0099]

[0100] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 메탄올:물:포름산 75:25:0.2(v/v/v) 혼합액 이동상, 및 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하여 24-35분 유지시간(Retention time) 조건에서 검출하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 24-26분 또는 33-35분 유지시간(Retention time)인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0101] 본 발명에 있어서, 상기 프레닐 수용체는 페녹소다이올(phenoxodiol), 4-히드록시페닐-2-프로파놀(4-hydroxyphenyl-2-propanol) 또는 4-히드록시페닐-3-프로파놀(4-hydroxyphenyl-3-propanol)인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 프레닐 공여체는 DMAPP(dimethylallyl diphosphate) 또는 GPP(geranyl diphosphate)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0102] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 프레닐트랜스퍼라제 효소(MrPT)는 분리 정제된 프레닐트랜스퍼라제 효소, 즉 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 프레닐트랜스퍼라제 효소, 상기 효소를 발현하는 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 및 상기 재조합 균주의 파쇄물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 상기 파쇄물은 상기 재조합 균주를 파쇄한 파쇄물 또는 상기 파쇄물을 원심분리하여 얻어진 상등액을 의미하는 것으로, 상기 재조합 균주로부터 생산된 효소 단백질을 포함하는 것이다. 본 명세서에 있어서, 별도의 언급이 없는 한, 프레닐트랜스퍼라제 효소 제조에 사용되는 재조합 균주는 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물 및 상기 균주의 파쇄물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 의미하는 것으로 사용된다.

[0104] 방향족 프레닐트랜스퍼라제(PT) 효소는 탄소골격 5개의 DMAPP(dimethylallyl diphosphate), 탄소골격 10개의 GPP(geranyl diphosphate) 혹은 탄소골격 15개의 FPP(farnesyl diphosphate)와 같은 이소프레닐 디포스페이트(isoprenyl diphosphate)들을 공여체(donor)로 하여 다양한 방향족 수용체(acceptor)들에 프레닐기를 전이시켜 방향족 기질의 탄소와 이소프레닐 기질 사이에 탄소-탄소 결합을 형성시키는 효소이다 (Koehl P *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* 2005, 1(2):71-72).

[0105] 최근, 토양 방선균(actinomycetes)의 일종인 스트렙토마이세스 내 클로로비오신(clorobiocin)과 나프테르핀(naphterpin) 생합성에 관여하는 프레닐트랜스퍼라제 활성의 CloQ 및 NphB의 발견으로, 이소프레닐화 방향족 화합물의 생합성에 관여하는 신규한 PT 그룹을 분류하였다 (Pojer F *et al.*, CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(5):2316-2321, 2003; Kumano T *et al.*, Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using Streptomyces prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* 16(17):8117-8126, 2008). 이들 PT 그룹은 반복적인 $\alpha\beta\beta\alpha$ 단백질 2차 구조 모티프(structural motif)를 특징으로 하여 ABBA계열 PT로 별도 분류되었으며, 이들은 다시 알칼로이드 생합성에 관여하는 진균 및 세균성 인돌(indole) 타입 PT와 세균성 2차 대사에 관여하는 페놀/페나진(phenazine) 타입 PT로 세분화될 수 있다(Heide L. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(2):171-179, 2009). 이들 ABBA계열 PT 그룹의 경우, 일부는 N- 혹은 O-프레닐화를 촉매하는 것으로 알려져 있지만, 대체로 프리델-크라프츠 알킬화(Friedel-Crafts alkylation) 화학반응과 동일하게 방향족 화합물의 전자 친화적 방향족 치환(electrophilic aromatic substitution)을 통한 C-프레닐화를 촉매한다(Bonitz T *et al.*, Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One.* 6(11):e27336, 2011). 또한 ABBA계열 PT들은 리포퀴논(lipoquinone) 생합성에 관여하는 조효소로 이가 양이온(divalent cation)들을 포함하는 마그네

슘-의존성(Mg^{2+} -dependent)이며 세포막 내재형(integral membrane)인 동시에 프레닐 디포스페이트 공여체와의 결합을 위한 특정 NDxxD 모티프(혹은 aspartate-rich 모티프)를 포함하는 PT와는 다르게, 마그네슘-비의존성이며 NDxxD 모티프를 포함하고 있지 않은 가용성 PT들이다 (Heide L. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(2):171-179, 2009; Bonitz T *et al.*, Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One*. 6(11):e27336, 2011). 스트렙토마이세스로부터 분리된 후 대장균에서 발현된 재조합 PT인 ABBA계열 Orf2(이후 NphB로 명명) PT는 디하이드록시나프타렌(dihydroxynaphtalene)으로부터 나린게닌(naringenin)까지를 포함하는 다양한 프레닐 수용체를 기질로 이용할 수 있었고, 공여체로 GPP와 FPP 등 이소프레닐 디포스페이트들을 이용함으로써 구조적으로 다양한 프레닐화 방향족 화합물들을 생합성할 수 있다 (Kumano T *et al.*, Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using Streptomyces prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* 16(17):8117-8126, 2008). 반면, 동일계열 PT인 CloQ와 NovQ는 이소프레닐 공여체로 DMAPP를 선호하는 동시에 방향족 화합물에 대하여 제한적인 기질 특이성을 보여주었다 (Pojer F *et al.*, CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(5):2316-2321, 2003; Ozaki T *et al.*, NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot.* 62(7):385-392, 2009). 이러한 재조합 CloQ와 NphB와 서열 유사성을 보이는 SC07190를 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)으로부터 분리하였으며, 이중 숙주에 발현된 SC07190는 NphB와 동일하게 디하이드록시나프타렌의 C-프레닐화를 촉매하는 한편, 이소프레닐 공여체로 GPP가 아닌 DMAPP에 대하여 기질 특이성을 보였다 (Sugiyama A *et al.*, Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols in transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases. *Metab. Eng.* 13(6):629-637, 2011). 최근에는 프레닐화된 벤조디아제핀(benzodiazepine)으로서 디아제피노마이신(diazeopinomicin)을 이차대사산물로 생산하는 마이크로모노스포라(*Micromonospora*) RV115 해양 세균으로부터 분리한 ABBA계열 PT인 재조합 DzmP가 대장균에서 발현되었다 (Bonitz T *et al.*, Unusual N-prenylation in diazeopinomicin biosynthesis: the farnesylation of a benzodiazepine substrate is catalyzed by a new member of the ABBA prenyltransferase superfamily. *PLoS One*. 8(12):e85707, 2013). DzmP는 DMAPP 혹은 GPP를 이소프레닐 공여체로 선호하는 기존 ABBA계열 PT들과는 다르게 FPP를 공여체로 선호하였으며, 여러 방향족 수용체에 대한 기질 유연성을 보였다. 따라서, 상기와 같은 ABBA계열 PT의 수용체 및 공여체에 대한 기질 특이성 및 유연성은 신규한 프레닐화 방향족 화합물의 생합성을 위한 유용한 도구일 수 있다.

- [0107] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0108] 본 발명에 있어서, 상기 암은 전립선암, 난소암 또는 유방암인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0109] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 암 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 난소암 및 전립선암 질환 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0110] 본 발명의 상기 화학식 1 내지 6의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 사람 전립선암과 난소암 관련 암세포주에 대하여 세포 독성을 나타내어 전립선암 혹은 난소암 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0111] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0112] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여시에 하기의 다양한 경구

또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0114] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0115] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0116] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수 회로 분할 투여할 수도 있다.

[0117] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 표시되는 프레닐화 방향족 유도체 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

[0118] 본 발명의 화학식 1 내지 6으로 표시되는 프레닐화 단순 페놀릭 유도체의 인간 멜라노마(melanoma) 세포주에 대하여 멜라닌 합성을 억제하여, 피부 미백 기능성 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0119] 또한, 화장품 조성물로 첨가되는 프레닐화 단순 페놀릭 유도체의 함유량은 각종 화장품의 0.001 내지 10 중량%인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 5 중량%이다. 해당 유도체의 함유량이 0.001 중량% 미만이면 미백효과를 기대할 수 없고, 10 중량%를 초과하면 사용량만큼의 효과가 없을 뿐만 아니라 안전성 및 제형 상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.

[0120] 또한, 본 발명의 피부 미백용 화장품 조성물은 프레닐화 단순 페놀릭 유도체 외에 본 발명이 목적으로 하는 미백 효과를 저해시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 상기 미백 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 미백 성분 등을 함유하는 것도 무방하다. 이와 같은 미백 성분으로는 아스코르브산 유도체 혹은 알파-비사보롤 등을 들 수 있다.

[0121] 또한, 본 발명의 프레닐화 단순 페놀릭 유도체를 함유하는 미백 화장품은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면 유연화장수(스킨), 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일, 보디에센스, 팩, 피부접착용 패취 및 피부접착용 겔 등의 화장품으로 제형화 될 수 있다.

[0123] [실시예]

[0124] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0126] 실시예 1: 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 PT 암호화 유전자의 분리

[0127] 토양 방선균의 일종인 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주 유전체의 포스미드(fosmid) 라이브러리 구축은 이미 보고되어 있으나 (Hoang NH *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 26(3):477-482, 2016), 기존에 세균 유래 ABBA

계열 방향족 프레닐트랜스퍼라제 PT의 경우 개별 효소들의 염기서열 간에 상동성이 매우 낮거나 나타나지 않으므로, 마이크로모노스포라 로도랑지아 포스미드 라이브러리를 주형으로하여 목적으로하는 PT 암호화 후보 유전자를 직접 탐색하는 것은 바람직하지 않다. 그러나, 기존 방선균 스트렙토마이세스 균주의 유전체에서 PT는 프레닐화 방향족 이차대사산물의 생합성에 필수적인 메발로네이트(mevalonate) 생합성 유전자 집단(gene cluster)의 바로 근처에 존재한다는 것이 알려져 있으므로, 메발로네이트 유전자 집단 내 필수적인 메발로네이트 생합성 유전자들, 즉 히드록시메틸글루타릴-코엔자임 에이 신타제(hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Synthase)와 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제(mevalonate diphosphate decarboxylase) 암호화 유전자들 내 보존부위의 서열로부터 역추적(degenerate) 프라이머(primer) 두 가지 세트(서열번호 1/2 및 서열번호 3/4)를 제작하였다.

[0128] 서열번호 1: 5' -GCC AAG TCC GCC GG(A/C/G/T) GT(A/C/G/T) TA(C/T) GT-3' (HMGCA_F)

[0129] 서열번호 2: 5' -AGC CGG AAG GGG CC(A/C/G/T) GT(A/C/G/T) GT(C/T) TG-3' (HMGCA_R)

[0130] 서열번호 3: 5' -GAC CCT GGA CGT CTT CCC (A/C/G/T)AC (A/C/G/T)AC (A/C/G/T)AC-3' (MDD_F)

[0131] 서열번호 4: 5' -GCG TTC CGC TCG GC(A/G/T) AT(C/T) TC(A/C/G/T) CC-3' (MDD_R)

[0132] 이미 보고되어 있는 토양 방선균의 일종인 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주 유전체의 포스미드(fosmid) 라이브러리 (Hoang NH *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 26(3):477-482, 2016)에서 분리한 유전체를 주형으로 사용하고, 제작된 히드록시메틸글루타릴-코엔자임 에이 신타제 보존부위 특이적인 서열번호 1(전방 프라이머, HMGCA_F) 및 서열번호 2(역전 프라이머, HMGCA_R)의 프라이머 세트와 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제 보존부위 특이적인 서열번호 3(전방 프라이머, MDD_F) 및 4(역전 프라이머, MDD_R)의 프라이머 세트를 개별적으로 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. 포스미드 라이브러리 DNA 및 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였고, 증폭된 PCR산물을 보인 양성 포스미드 라이브러리들을 일차 선별한 후, 이들 포스미드 내 삽입 서열을 전장 서열 분석하였다.

[0133] 그 결과, 3종의 메발로네이트 생합성 유전자 집단을 선택할 수 있었고, 이중 1종의 메발로네이트 유전자 집단 바로 상부(upstream)에서 ABBA계열 PT를 암호화하는 것으로 예측되는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 선별할 수 있었다. 이러한 오픈 리딩 프레임을 포함하고 있는 포스미드 라이브러리를 주형으로 하여 상기 오픈 리딩 프레임 특이적인 서열번호 5(전방 프라이머, PT_F) 및 서열번호 6(역전 프라이머, PT_R)의 프라이머 세트를 이용하여 다시 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

[0134] 서열번호 5: 5' - GGCAATGTACAGGCTCGGCCGCCGAGGGCG - 3' (PT_F, *NdeI* 제한위치)

[0135] 서열번호 6: 5' - CGCTCGAGGCGGTGGACAGCAGCATCTGGTCG - 3' (PT_R, *XhoI* 제한위치)

[0136] PCR 산물을 정제한 후, pGEMR-T 이지 벡터(pGEMR-T easy vector, Promega, Madison, WI, USA)에 접합한 다음, 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 42 °C에서 45초간 열처리한 후, 형질전환을 수행하였다. 선별된 형질전환 대장균으로부터 T-이지 벡터를 분리, 정제한 후 그 염기서열(서열번호 7) 및 이로부터 유추한 아미노산 서열(서열번호 8)을 결정하였다.

[0137] 그 결과, 전체 오픈 리딩 프레임의 염기서열(서열번호 7)은 909 bp이며, 번역 후 단백질은 총 302개의 아미노산(서열번호 8)으로 구성(총 33.3 kDa)되어 있었다. 상기 단백질의 아미노산 서열을 블라스트(Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) 분석한 결과, ABBA계열 방향족 프레닐트랜스퍼라제의 필수 보존 부위(conserved domain)들을 모두 포함하고 있었다. 한편, NCBI 데이터베이스 중 마이크로모노스포라 리파마이시니카 유래 프레닐트랜스퍼라제 암호화 추정 아미노산 서열(GenBank 수탁번호 WP_067309254)과 약 85%의 상동성을 나타내었고, 5종 이상의 스트렙토마이세스 및 마이크로모노스포라 유래 프레닐트랜스퍼라제 암호화 추정 아미노산 서열(GenBank 수탁번호 WP_037700793, SCL32322, WP_026220570, WP_027750390 및 SCL21956)들과 50% 이상의 상동성을 제시하였다. 반면, 최근에는 보고된 바 있는 FPP를 프레닐 공여체로 이용 가능한 마이크로모노스포라 RV115 유래 ABBA계열 프레닐트랜스퍼라제인 DzmP와는 50%의 상동성을 보였다.

[0139] 실시예 2: 대장균에서 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT의 발현

[0140] 실시예 1의 T-이지 벡터를 *NdeI*과 *XhoI* 제한효소로 처리한 MrPT DNA 절편을, 동일한 제한효소들로 처리한 단백

질 발현 벡터인 pET-28(a+)(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입한 후, 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 형질전환시켰다. 이때, 형질전환체의 선발을 위하여 카나마이신 항생제 50 ppm을 사용하였다.

[0141] 상기 재조합 대장균을 카나마이신 항생제와 최종 농도 1 M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5 mM 베타인(betaine)이 첨가된 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후 30℃에서 배양한 다음, 광학농도(optical density) 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자, 최종 농도 0.5 mM의 이소프로필-D-티오갈락토포피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 재조합 대장균 균주를 22℃에서 18시간 추가 배양 후 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음, 50 mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 이 후, 12000 rpm에서 20분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 따로 모아 일부 시료를 12% SDS-PAGE로 분석하여 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT의 발현 정도를 확인하였다.

[0142] 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여, 상기 상등액을 50 mM 인산 완충용액(0.3 M NaCl, 20 mM imidazole)으로 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4℃에서 두 시간 동안 배양하였다. 2000 rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 50 mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 120 mM 이미다졸을 포함한 인산 완충용액 2 ml로 수지에 결합된 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT를 정제하였다.

[0144] 실시예 3: 재조합 MrPT 프레닐트랜스퍼라제 효소에 의한 방향족 화합물의 프레닐화 유도체로 생전환

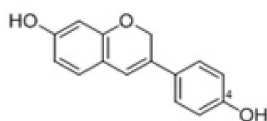
[0145] 3-1: 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT의 프레닐트랜스퍼라제 활성

[0146] 프레닐화 방향족 유도체 생전환 전에, 실시예 2에서 정제한 재조합 프레닐트랜스퍼라제 효소 MrPT의 프레닐트랜스퍼라제 활성을 검정하였다. 기존에 방향족 프레닐트랜스퍼라제의 프레닐 수용체로 사용된 것으로 보고된 4-히드록시페닐피루베이트(4-hydroxyphenylpyruvate)와 1,6-디히드록시나프타렌(1,6-dihydroxynaphthalene)을 방향족 기질로 하고, 프레닐 공여체로 DMAPP와 GPP를 반응 완충용액(50 mM 인산 완충용액, 2 mM 염화마그네슘)에 같이 첨가한 후 정제한 재조합 MrPT를 첨가하여 프레닐화 반응 여부를 조사하였다. 반응 산물인 프레닐화 방향족 화합물의 존재는 HPLC-ESI-MS 분석법으로 확인하였다.

[0148] 3-2: 재조합 MrPT 프레닐트랜스퍼라제 효소에 의한 신규한 프레닐화 방향족 유도체로 생전환

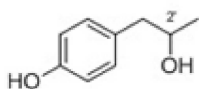
[0149] 신규한 프레닐화 방향족 유도체의 생전환을 위하여, 프레닐 수용체로 페녹소다이올(화학식 7), 4-히드록시페닐-2'-프로파놀(화학식 8) 및 4-히드록시페닐-3'-프로파놀(화학식 9)을 최종 0.3 mM의 농도로 하고 여기에 프레닐 공여체들(즉, DMAPP와 GPP)을 0.6 mM 수준으로 하는 한편, 재조합 효소 MrPT를 최종 완충용액(50 mM 인산 완충용액, 2 mM 염화마그네슘) 내 1 mg/ml 수준으로 첨가하여 30℃에서 5시간 동안 효소 반응을 실시하였다(도 1). 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층의 유기 용매층만을 모아서 감압건조를 실시하였다. 상기 추출물 내 목적 유도체의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행하였다. 이동상으로 메탄올:물:포름산 75:25:0.2(v/v/v) 혼합액을 분당 120 μ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μ m; Milford, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0150] [화학식 7]



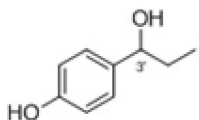
[0151]

[0152] [화학식 8]



[0153]

[0154] [화학식 9]



[0155]

[0156] 다음으로, 상기 조추출물로부터 목적하는 프레닐화 방향족 유도체들의 분리 및 정제를 위해 콤비플렉시 Rf MPLC 시스템을 적용하였다. 역상(reverse-phased) C18 카트리지에 메탄올:물:포름산 75:25:0.2(v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 12 ml의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템을 이용하여, 동일한 이동상 4 ml에 용해시킨 상기 조추출물을 주입한 후 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분취를 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 프레닐화 방향족 유도체들을 분리하였다.

[0157] 그 결과, 기질로 사용된 페녹소다이올, 4-히드록시페닐-2-프로판올 및 4-히드록시페닐-3-프로판올은 MPLC 시스템 상 약 11 ~ 17분의 유지 시간으로 분취되었고, 목적하는 프레닐화 유도체들은 기질보다 느린 유지 시간인 24 ~ 35분 사이로 검출되었다. 이들 정제된 프레닐화 방향족 유도체들은 도 1에 나타내었다. 프레닐 공여체로 탄소골격 5개인 DMAPP를 이용한 생전환 반응의 수율은 대략 40% 이상으로 반응이 일어났으나, 탄소골격 10개인 GPP의 경우엔 모두 생전환 수율이 25% 이하 수준으로 낮게 나타났다. 한편, 프레닐 공여체로 탄소골격 15개인 FPP를 이용한 생전환 반응 산물은 기기분석으로 검출되지 않은 바, 본 발명의 프레닐트랜스터라제 MrPT는 프레닐 공여체로 FPP를 기질로 사용하지 않는 것으로 확인되었다. 이는 재조합 MrPT 효소의 프레닐 수용체 및 프레닐 공여체 기질들에 대한 상대적인 기질 특이성을 제시하였다.

[0159] 3-3: 신규한 프레닐화 방향족 유도체의 NMR

[0160] NMR 시료들은 200 μ l의 DMSO-d6에 각 유도체들을 용해시킨 후, 5 mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. 13 C NMR 스펙트럼은 베리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298 K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 프레닐화 방향족 유도체들의 13 C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 방향족 화합물들과 비교하였다.

[0161] 3-프레닐-페녹소다이올(화학식 1; 3-prenyl-phenoxodiol; 3PP; 생전환율 42%; 13 C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 18.4, 24.5, 28.2, 68.1, 101.8, 108.0, 115.6, 116.9, 123.0, 126.4, 127.1, 127.6, 128.3, 129.0, 129.4, 130.7, 131.6, 155.2, 155.7, 158.5)

[0162] 3-게라닐-페녹소다이올(화학식 2; 3-geranyl-phenoxodiol, 3GP; 생전환율 16%; 13 C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 16.3, 18.4, 24.5, 26.3, 28.2, 39.6, 68.2, 101.8, 108.1, 115.7, 116.9, 122.6, 123.3, 126.4, 127.1, 127.6, 128.2, 129.1, 129.4, 130.8, 132.2, 136.2, 155.2, 155.7, 158.6)

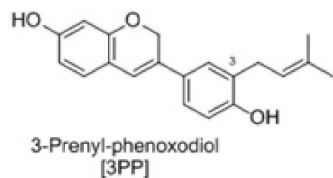
[0163] 3-프레닐-히드록시페닐-2'-프로판올(화학식 3; 3-prenyl-hydroxyphenyl-2'-propanol; 3PHP2P, 생전환율 51%; 13 C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 18.5, 23.1, 24.6, 28.0, 46.3, 70.3, 115.8, 123.0, 127.7, 128.3, 130.3, 131.3, 131.9, 153.5)

[0164] 3-게라닐-히드록시페닐-2'-프로판올(화학식 4; 3-geranyl-hydroxyphenyl-2'-propanol; 3GHP2P; 생전환율 23%; 13 C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 16.5, 18.5, 23.1, 24.5, 26.6, 28.3, 39.9, 46.4, 70.3, 115.9, 122.2, 123.2, 127.6, 128.3, 130.3, 131.2, 132.0, 136.4, 153.4)

[0165] 3-프레닐-히드록시페닐-3' -프로파놀(화학식 5; 3-prenyl-hydroxyphenyl-3' -propanol; 3PHP3P; 생전환율 55%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 10.1, 18.5, 24.6, 28.1, 31.5, 76.5, 115.8, 123.1, 125.3, 128.1, 129.7, 130.9, 131.6, 153.4)

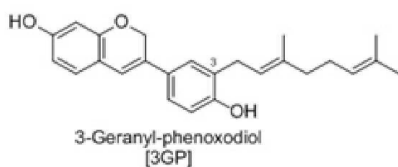
[0166] 3-게라닐-히드록시페닐-3' -프로파놀(화학식 6; 3-geranyl-hydroxyphenyl-3' -propanol; 3GHP3P; 생전환율 20%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 10.1, 16.2, 18.6, 24.6, 26.3, 28.3, 31.6, 39.5, 76.5, 115.9, 122.1, 123.5, 125.3, 128.3, 129.7, 130.9, 131.8, 136.2, 153.3)

[0167] [화학식 1]



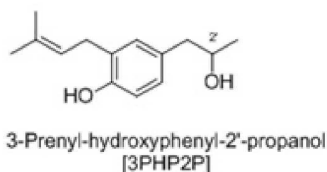
[0168]

[0169] [화학식 2]



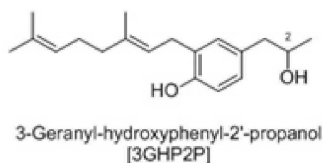
[0170]

[0171] [화학식 3]



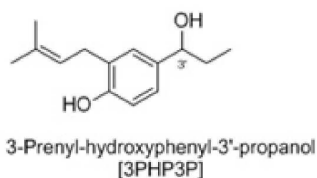
[0172]

[0173] [화학식 4]



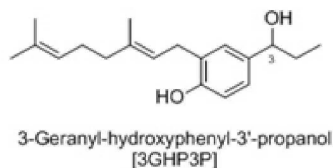
[0174]

[0175] [화학식 5]



[0176]

[0177] [화학적식 6]



[0178]

[0180] 실시예 4: 프레닐화 페녹소다이올 유도체의 항암활성

[0181] 실시예 3-2의 화합물 중 2종의 프레닐화 페녹소다이올 유도체의 항암활성을 생전환 전의 페녹소다이올과 비교 검토하기 위하여, 인간 난소암세포주인 SKOV-3와 인간 전립선암세포주인 DU-145를 대상으로 하여 MTT 방법으로 그 세포 독성을 확인하였다. 비교군으로는 상기 암세포주들에 대하여 항암활성이 이미 보고된 페녹소다이올을, 그리고 양성 대조군으로는 화학요법제(chemotherapy agent)로 빈번히 사용되는 시스플라틴(cisplatin)을 이용하였다.

[0182] 우선, 상기 2종의 사람 암세포주인 SKOV-3와 DU-145 각각의 세포주를 RPMI1640 배지(0.2% sodium bicarbonate, 10% fetal calf serum, glutamine 4 mM, 스트렙토마이신 100 ppm, 페니실린 10 ppm)에 전 배양시킨 후, 원심 분리하고 T-플라스크에 분주하여 본 배양을 5일간 수행하였다. 배양 조건은 5% 이산화탄소 대기 내 37℃에서 실시하였다. 배양 3일째에 2종의 프레닐화 페녹소다이올 유도체(3-프레닐-페녹소다이올(3-prenyl-phenoxodiol, 3PP)과 3-게라닐-페녹소다이올(3-geranyl-phenoxodiol, 3GP)), 비교군 및 대조군을 각각 20% DMSO에 용해하여 최종 0.5부터 100 μ M의 여섯 농도 구간이 되도록 처리한 후, 2일간 추가 배양하고 필요할 경우 하루 간격으로 처리 세포주들을 분리하여 샘플링을 실시하였다. 최종 MTT로 정색 반응을 실시하여 각 암세포주에 대한 개별 IC₅₀(50% 세포주 성장 저해를 야기시키는 화합물의 농도)을 측정하였다.

[0183] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 비교군인 페녹소다이올은 난소암세포주 SKOV-3에 대하여 약 30 μ M의 IC₅₀ 수치를, 전립선암세포주인 DU-145에 대하여는 약 22 μ M의 IC₅₀ 수치를 나타내었다. 반면, 양성 대조군인 시스플라틴 화학요법제의 경우 상기 난소암세포주에는 약 35 μ M과 전립선암세포주에는 약 31 μ M의 IC₅₀ 수치를 나타내었다. 그에 비하여, 프레닐화 페녹소다이올 유도체들인 3-프레닐-페녹소다이올(3-prenyl-phenoxodiol, 3PP)과 3-게라닐-페녹소다이올(3-geranyl-phenoxodiol, 3GP)은 상기 난소암세포주를 대상으로 각각 약 26 μ M과 22 μ M의 IC₅₀ 수치를, 그리고 상기 전립선암세포주에 대하여는 각각 약 19 μ M과 16 μ M의 IC₅₀ 수치를 나타내었다. 이는, 소수성의 프레닐화된 페녹소다이올 유도체들이 원래 물질인 생전환 전의 페녹소다이올 보다 향상된 전립선 및 난소암 관련 항암활성을 보이고 있으며, 기존 화학요법제인 시스플라틴과 비교하여도 눈에 띄게 향상된 항암활성을 보여주고 있다. 또한, 2종의 유도체들 간의 항암활성은 10개의 탄소골격이 부가된 3GP이 5개의 탄소골격이 부가된 3PP 보다 항암활성이 높게 나타났다. 따라서, 페녹소다이올의 소수성의 변화 정도에 따른 세포막 투과 정도의 변화 혹은 암세포주 세포막 내 특정 표적 단백질에 대한 결합도의 변화가 항암활성을 향상시키는 원인으로 예측된다.

[0185] 실시예 5: 프레닐화 단순 페놀릭 유도체의 멜라닌 합성저해 활성

[0186] 실시예 3-2의 생합성된 화합물 중 프레닐화 단순 페놀릭 유도체들의 멜라닌 생성 억제 활성을 검토하기 위하여, B16/F10 멜라노마(melanoma) 세포주를 사용하였다. 멜라노마 세포주를 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지를 96 웰 플레이트에 2000 cell/well 수준으로 분주한 후 37℃에서 5% 이산화탄소 농도로 24시간 배양하였다. 배양 후 각각 2 μ M 농도의 알파-MSH(α -melanocyte stimulating hormone)와 2 mM 농도의 테오필린(theophylline)을 포함하는 DMEM 배지로 교체한 뒤 최종 0.3 mM 수준(DMSO용해)으로 고정화된 프레닐화 단순 페놀릭 유도체 4종(3-프레닐-히드록시페닐-2' -프로파놀[3PHP2P], 3-프레닐-히드록시페닐-3' -프로파놀[3PHP3P], 3-게라닐-히드록시페닐-2' -프로파놀[3GHP2P], 3-게라닐-히드록시페닐-3' -프로파놀[3GHP3P]) 및 반응 전 단순 페놀릭 화합물 2종(4-히드록시페닐-2' -프로파놀 및 4-히드록시페닐-3' -프로파놀)을 하루 간격으로 3일간 세 번에 걸쳐서 처리하였다. 총 5일간 배양 후 배지를 우선 제거하고 0.25% 트립신-EDTA(Sigma)용액으로 처리하여 멜라노마 세포를 회수한 다음, 이를 10,000 rpm에서 10분간 냉장 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 회수된 세포들을 55℃에서

건조시킨 뒤 1 N 수산화나트륨 용액 100 μ l를 첨가하여 세포 내 멜라닌을 녹이고 이를 인산 완충용액으로 희석하여 최종 475 nm 마이크로플레이트 리더(Microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DMSO가 한편 양성 대조군으로는 0.3 mM 수준(DMSO용해)의 알부틴을 사용하였으며, 멜라닌 생합성 저해 활성을 하기 계산식 1로 환산하여 도 4에 막대 그래프로 나타냈다.

[계산식 1]

$$\text{멜라닌 생합성 저해 활성(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \right)$$

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 알부틴의 경우 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 생합성 저해 활성이 약 39%로 나타났고, 비교군인 생전환 전의 단순 페놀릭 화합물들인 히드록시페닐-2'-프로파놀(HP2P) 및 히드록시페닐-3'-프로파놀(HP3P)은 각각 약 60%와 61%로 나타났으며, 프레닐화 단순 페놀릭 유도체들 4종(3-프레닐-히드록시페닐-2'-프로파놀[3PHP2P], 3-프레닐-히드록시페닐-3'-프로파놀[3PHP3P], 3-게라닐-히드록시페닐-2'-프로파놀[3GHP2P], 3-게라닐-히드록시페닐-3'-프로파놀[3GHP3P])은 모두 65%에서 73% 범위로 멜라닌 합성 저해 활성을 보여주었다.

프레닐화된 단순 페놀릭 유도체들은 생전환 전의 단순 페놀릭 화합물에 비하여 유의수준 범위 내 다소 향상된 멜라닌 생합성 저해 활성을 나타냈으며, 기존 양성 대조군인 알부틴보다 눈에 띄게 향상된 멜라닌 합성 저해 활성을 확인할 수 있었다. 한편, 4종의 유도체들 간의 멜라닌 합성 저해 활성은 부가된 탄소골격의 수(탄소골격 5개의 프레닐과 탄소골격 10개의 게라닐)의 증가에 따라 멜라닌 합성 저해 활성이 미미하게 향상되는 것을 일부 확인할 수 있었다. 즉, 프레닐 수용체인 단순 페놀릭 화합물에 탄소골격 10개의 게라닐이 부가된 유도체들(즉, 3GHP2P와 3GHP3P)의 경우 탄소골격 5개의 프레닐이 부가된 유도체들(즉, 3PHP2P와 3PHP3P)에 비하여 다소 향상된 멜라닌 합성 저해 활성 수치가 나타났다.

실시예 6: 프레닐화 단순 페놀릭 유도체의 세포 독성

실시예 3-2의 생합성된 화합물 중 프레닐화 단순 페놀릭 유도체들의 세포 독성 정도를 검정하기 위하여, 섬유모세포(fibroblast)를 이용한 MTT 검정법을 이용하였다. 대수증식기 상태의 섬유모세포를 96 웰 플레이트에 8000 cell/well 수준으로 분주하여 200 μ l의 DMEM 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 농도로 24시간 배양하였다. 고정화된 프레닐화 단순 페놀릭 유도체 4종 및 반응 전 단순 페놀릭 화합물 2종을 DMSO에 용해시켜 최종 0.3 mM 수준으로 상기 배지에 첨가한 후 약 20 시간 반응시켰다. MTT 용액을 최종 농도 500 μ g/ml로 배지에 첨가한 뒤 4시간 추가 배양을 통하여 정색반응을 실시한 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 생존 정도를 하기 계산식 2로 환산하여 도 5에 막대 그래프로 나타냈다.

[계산식 2]

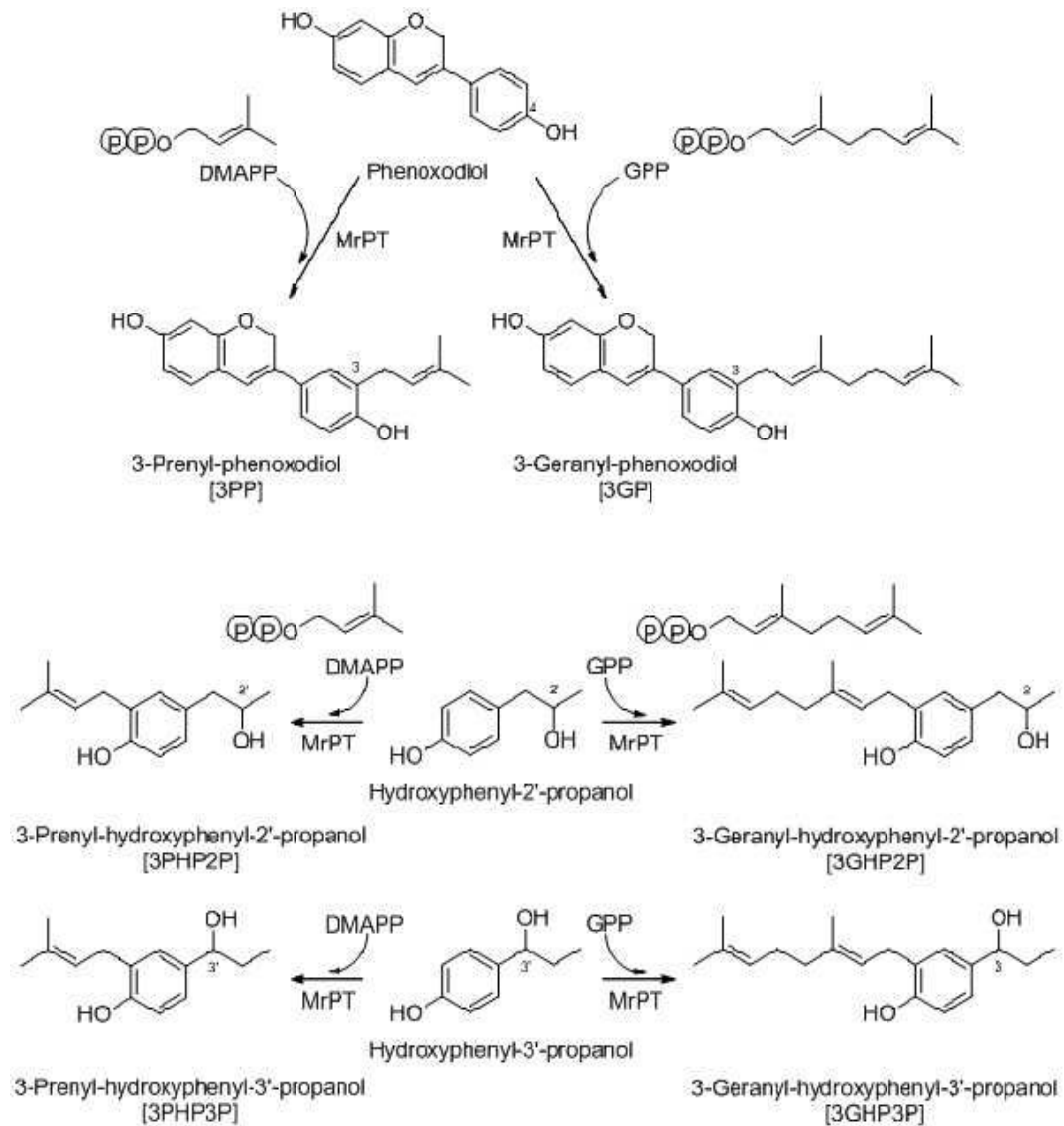
$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

도 5에 나타난 바와 같이, 비교군인 단순 페놀릭 화합물들 2종은 최종 0.3 mM 수준에서 대조군 대비 각각 약 70%와 76%의 세포 생존율이 나타났으며, 프레닐화된 단순 페놀릭 유도체들은 그 보다 높은 96%에서 106% 범위로 세포 생존율을 보여주었다. 이는 멜라노마 세포에 멜라닌 생합성 저해 활성을 나타내고 있는 0.3 mM 수준의 프레닐화된 단순 페놀릭 유도체들의 경우 생전환전 화합물인 단순 페놀릭 화합물보다 그 세포 독성이 현저히 낮음을 제시하고 있다.

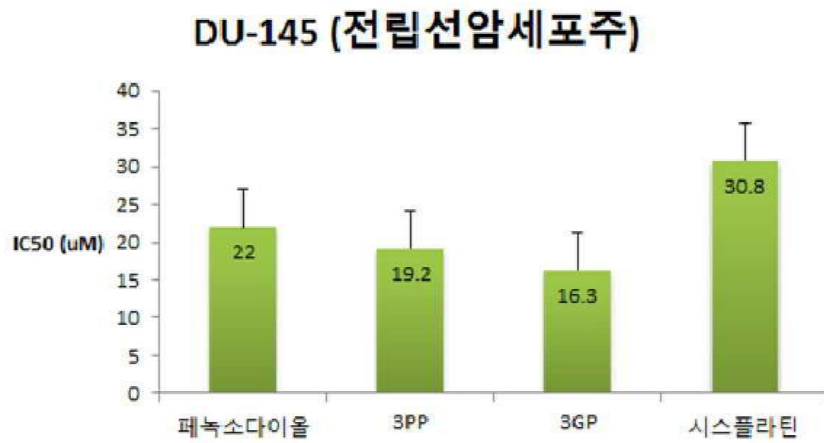
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

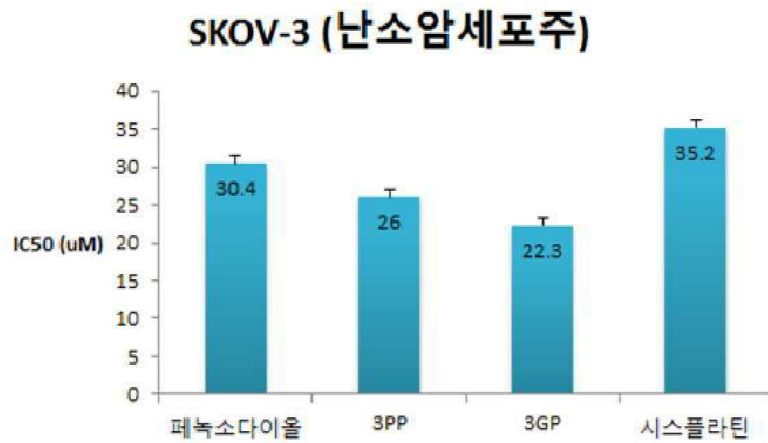
도면1



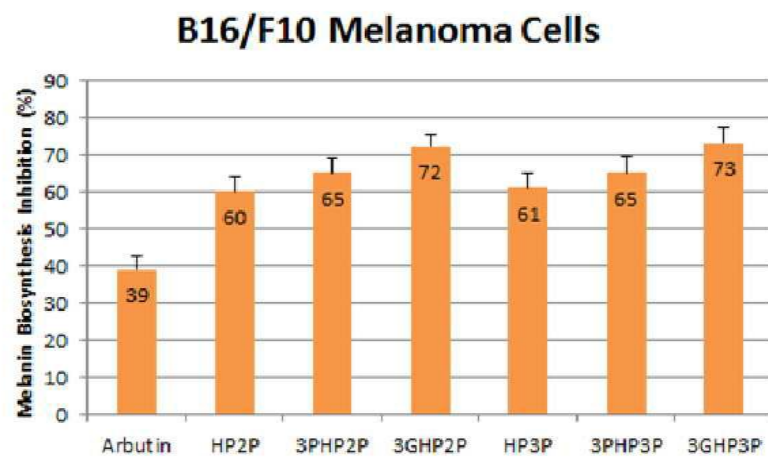
도면2



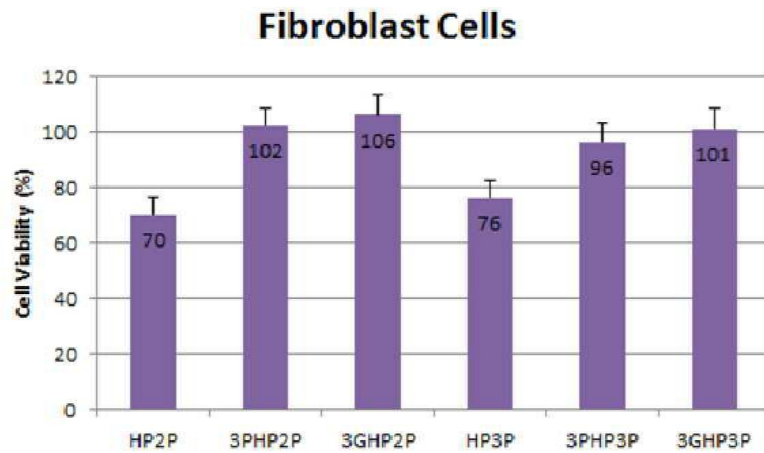
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation
 <120> Prenyltransferase and Method for Preparing Prenylated Aromatic Compounds Using the Same

<130> P16-B290

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HMGCAS_F

<400> 1

gccaaagtcgc ccgngtnta ygt 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HMGCAS_R

<400> 2

agccggaagg ggccngtngt ytg 23

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MDD_F

<400> 3

gaccctggac gtcttccna cnacnac 27

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MDD_R

<400> 4

gcgttcgct cggedatyc ncc 23

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> PT_F

<400> 5

ggcatatgta caggctcggc cggccgaggg cg 32

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PT_R

<400> 6

cgctcgaggg cggtggacag cagcatctgg tcg 33

<210> 7

<211> 909

<212> DNA

<213> Micromonospora rhodorangea

<400> 7

atgtccgagc cggccggctc ccgccagctg tactccgcct accgcgccga cgcctggctg 60

atcggcgcca cctgtttcgc cgagcgcgtc tggccggtcc tggaggccta ccgcgacaac 120

ttcgccaagg ccggcgccac cctgcgcgtc gccaccggct cccagccggg cgaccagctg 180
gactggcgct tcaccgtcgg ctccgacgtc gacccgtacg ccgtcgcctt gtccaacggc 240
ctgaccgaga agaccgacca cccggtcggc accctgctgg ccgagatctc cgagcgctgc 300
ccgatcgctt cctacggcat cgacttcggc gtcgccggcg gcttcaagaa gatctacctg 360
ttcttccgcg cggacggcat gcagtccttg tccacctgg ccgagctgcc gtccatgccg 420
cgctccctgg ccgacaacgt cgacctgttc gccgcgcg gcctgggcca caaggtcaac 480
accttcggca tcgactaccg ccaccgcacc gtcaacgtct acttcggcgg cctgccggac 540

gagtgcctgg agccggccgg cgtctgttcc atgaccgcg agctgggcct gccggaccgg 600
ggcgagcaga tgctgcgctt gggccgccag gccttcggca tctacgcctc cctgggctgg 660
gagtctccg ccgtcgagcg cttctgcttc gccgtcatgg cctccgactc ctccgcctg 720
ccgatcgacc aggagttcga gtgcgagcgc ttctgaagg gcctgcgcgc caccgccgcc 780
gactcccgtt tcgtctacta cgccggcgtc tcctccaccg gcgaggagta ctacaagctg 840
cagtcctact acaagtggca gccgtggac cgcattgggt cgcaccagat gctgctgtcc 900
accgcctga 909

<210> 8

<211> 302

<212> PRT

<213> Micromonospora rhodorangea

<400> 8

Met Ser Glu Pro Ala Gly Ser Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Arg Ala

1 5 10 15

Asp Ala Trp Leu Ile Gly Ala Thr Leu Phe Ala Glu Arg Val Trp Pro

20 25 30

Val Leu Glu Ala Tyr Arg Asp Asn Phe Ala Lys Ala Gly Ala Thr Leu

35 40 45

Arg Val Ala Thr Gly Ser Gln Pro Gly Asp Gln Leu Asp Trp Arg Phe

50 55 60

Thr Val Gly Ser Asp Val Asp Pro Tyr Ala Val Ala Leu Ser Asn Gly

65 70 75 80

Leu Thr Glu Lys Thr Asp His Pro Val Gly Thr Leu Leu Ala Glu Ile

85 90 95

Ser Glu Arg Cys Pro Ile Ala Ser Tyr Gly Ile Asp Phe Gly Val Ala

100	105	110	
Gly Gly Phe Lys Lys Ile Tyr Leu Phe Phe Pro Pro Asp Gly Met Gln			
115	120	125	
Ser Leu Ser Thr Leu Ala Glu Leu Pro Ser Met Pro Arg Ser Leu Ala			
130	135	140	
Asp Asn Val Asp Leu Phe Ala Arg Arg Gly Leu Gly Asp Lys Val Asn			
145	150	155	160
Thr Phe Gly Ile Asp Tyr Arg His Arg Thr Val Asn Val Tyr Phe Gly			
165	170	175	
Gly Leu Pro Asp Glu Cys Leu Glu Pro Ala Gly Val Leu Ser Met Thr			
180	185	190	
Arg Glu Leu Gly Leu Pro Asp Pro Gly Glu Gln Met Leu Arg Leu Gly			
195	200	205	
Arg Gln Ala Phe Gly Ile Tyr Ala Ser Leu Gly Trp Glu Ser Ser Ala			
210	215	220	
Val Glu Arg Phe Cys Phe Ala Val Met Ala Ser Asp Ser Ser Ala Leu			
225	230	235	240
Pro Ile Asp Gln Glu Phe Glu Cys Glu Arg Phe Leu Lys Gly Leu Arg			
245	250	255	
Ala Thr Ala Ala Asp Ser Arg Phe Val Tyr Tyr Ala Gly Val Ser Ser			
260	265	270	
Thr Gly Glu Glu Tyr Tyr Lys Leu Gln Ser Tyr Tyr Lys Trp Gln Pro			
275	280	285	
Leu Asp Arg Met Gly Ser Asp Gln Met Leu Leu Ser Thr Ala			
290	295	300	