(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0101694
(43) 공개일자 2020년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/517 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/517 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0019877
(22) 출원일자 2019년02월20일
심사청구일자 2019년02월20일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
송영섭
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 8동 1306호 (잠실동, 우성아파트)
장성은
서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1804호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

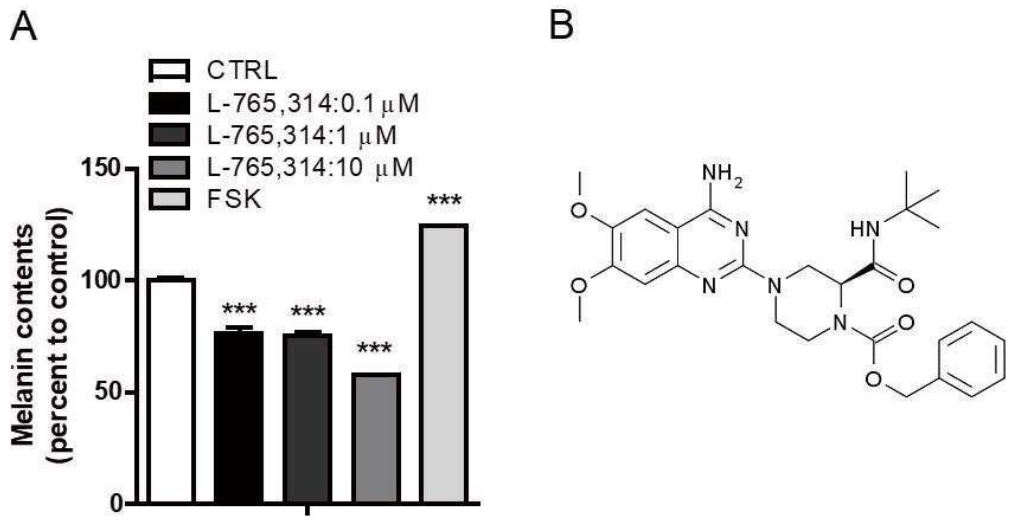
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **과색소침착 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 과색소침착 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 멜라닌 생성을 억제하는 물질을 스크리닝한 결과, 본 발명의 화합물(L-765,314)이 PKC(protein kinase C) 신호전달 경로를 억제하여 티로시나아제 활성을 억제하고 멜라닌 생성을 감소시키는 것을 확인한 바, 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 화합물은 과색소침착질환 예방 또는 치료용, 또는 미백용 약학 조성물, 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물, 또는 미백용 화장료 조성물, 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 미백용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/4953 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A2B2002691
부처명 과학기술통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 cAMP 신호전달계와 CRTC3에 의한 갈색/베이지지방에서의 에너지대사 조절 연구
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2019.02.28

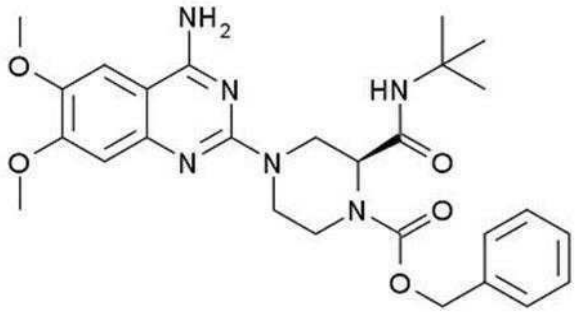
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



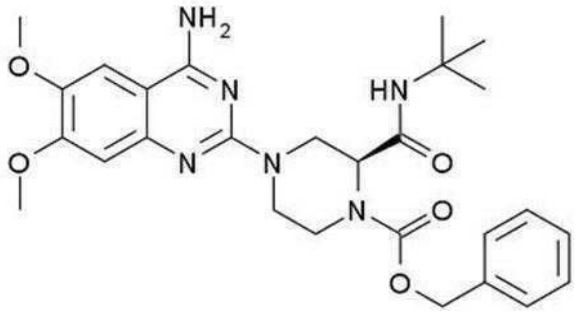
청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 과색소침착질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 색소침착으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 과색소침착질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물:

[화학식 1]



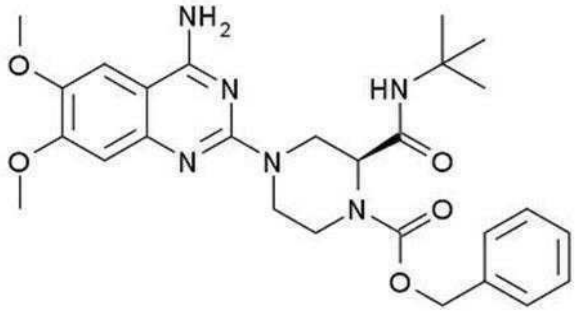
청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 과색소침착질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 색소침착으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물:

[화학식 1]



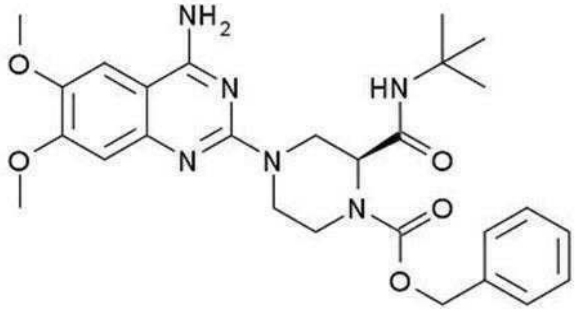
청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 과색소침착질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 색소침착으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 약학 조성물:

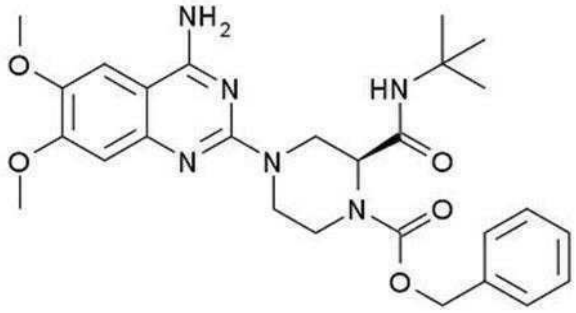
[화학식 1]



청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물:

[화학식 1]

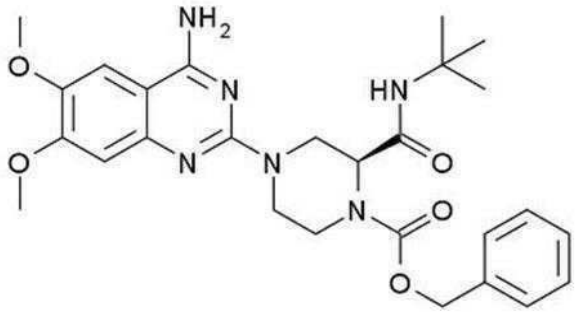


청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용

건강식품 조성물:

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 과색소침착 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 멜라닌은 피부색을 결정하는 요인으로 표피의 기저층에 있는 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성 경로에 의해 생산된다. 멜라닌은 UV에 의한 손상에 대해 피부를 보호하는 데 중요한 역할을 한다. 그러나, 멜라닌의 과잉 생산은 주근깨, 기미 및 검버섯을 포함하는 과색소침착(hyperpigmentation)을 유발하며, 이것은 심각한 심미적 문제와 연관된 세 번째로 가장 흔한 피부 질환이다.

[0003] UV 방사선, α-멜라닌 세포 자극 호르몬(α-melanocyte stimulating hormone, α-MSH), cAMP-활성제[포스콜린(forskolin)] 및 멜라닌 합성 효소[티로시나아제(tyrosinase), 티로시나아제 관련 단백질-1(tyrosinase related protein-1), 도파크롬 상호변이효소(dopachrome tautomerase)]와 같은 다양한 원인은 멜라닌 생성과 피부 축적을 조절하는데 연구되고 있다. 그 중 티로시나아제는 티로신을 도파퀴논(dopaquinone)으로 변환하고, 유멜라닌(eumelanin)과 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성하는 멜라닌 생성(melanogenesis)의 속도-제한 단계(rate-limiting step)를 조절하는 바, 티로시나아제의 억제는 과색소침착 치료에 효과적이다.

[0004] 한편, 최근 피부 미백제 관련 연구는 주로 티로시나아제 활성을 억제하는 물질, 멜라닌 생산 기전에 관련된 단백질을 조절하는 물질, 멜라노좀 이동을 억제하는 물질, α-MSH의 길항제, N-글리코실화 억제 물질 등과 같이 멜라닌 형성 기전을 방해하여 미백 효과를 도모하는 물질을 탐색하는 방향으로 진행되고 있다. 그러나, 미백제의 개발은 오랜 연구에도 불구하고, 강한 독성, 낮은 안전성 및 피부 투과성, 불충분한 활성으로 인해 그 사용이 제한되고 있다. 따라서 멜라닌 생성 및/또는 티로시나아제 활성을 억제하는 새로운 치료제 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1943346호 (2019.01.23.등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 과색소침착질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 피부 미백용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물, 또는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 피부 미백용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

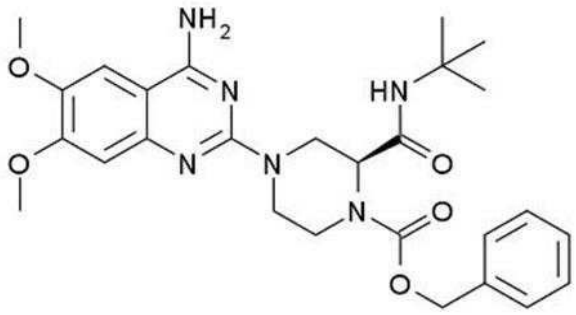
과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 피부 미백용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물, 또는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 피부 미백용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

발명의 효과

[0014] 본 발명에서는 멜라닌 생성을 억제하는 물질을 스크리닝한 결과, 본 발명의 화합물(L-765,314)이 PKC(protein kinase C) 신호전달 경로를 억제하여 티로시나아제 활성을 억제하고 멜라닌 생성을 감소시키는 것을 확인한 바, 상기와 같은 효과를 가지는 본 발명의 화합물은 과색소침착질환 예방 또는 치료용, 또는 미백용 약학 조성물, 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물, 또는 미백용 화장료 조성물, 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물, 또는 미백용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 B16F10 흑색종 세포에서 L-765,314에 의한 멜라닌 생성 감소 효과에 관한 것으로, (A)는 B16F10 흑색종 세포에 L-765,314(0.1-10 μM) 및 포스콜린(10 μM) 처리 후 72시간째에 멜라닌 함량을 확인한 결과이며, (B)는 L-765,314[벤질(S)-4-(4-아미노-6,7-디메톡시퀴나졸린-2-일)-2-(터트-부틸카바모일)피페라진-1-카르복실레이트)의 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 정상 Mel-ab 멜라닌 세포에서 L-765,314에 의한 멜라닌 생성 감소 효과에 관한 것으로, (A)는 Mel-ab 멜라닌 세포에 L-765,314(0.1-20 μM) 처리 후 96시간째에 현미경 이미지, (B)는 멜라닌 함량, (C)는 Mel-ab 멜라닌 세포에 L-765,314(10 μM) 및 포스콜린(10 μM) 처리 후 96시간째에 현미경 이미지, (D)는 멜라닌 함량을 확인한 결과이다.

도 3은 Mel-ab 멜라닌 세포에서 L-765,314(0.1-20 μM)에 의한 세포 생존율을 MTT 분석으로 확인한 결과이다.

도 4는 L-765,314에 의한 멜라닌 생성 억제와 아드레날린 수용체 신호전달 경로와의 관련성을 확인한 것으로, (A)는 Mel-ab 멜라닌 세포, B16F10 흑색종 세포 및 HaCat 각질 세포에서 ADRA1a, ADRA1b 및 ADRA1d의 발현[비히클(DMSO), 포스콜린(10 μM), ADRA 작용제, 즉 페닐에프린(5 μM) 및 시라졸린(5 μM), 96시간 처리], (B)는 현미경 이미지, (C)는 멜라닌 함량을 확인한 결과이다.

도 5는 티로시나아제 발현 감소 없이 L-765,314에 의한 티로시나아제 활성 억제에 관한 것으로, (A)는 Mel-ab

세포에 L-765,314(10 μM) 처리 후 MITF, DCT, Tyrp1 및 티로시나아제의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이며, (B)는 96시간째의 MITF, DCT, Tyrp1 및 티로시나아제의 mRNA 발현 수준을 qRT-PCR로 확인한 결과이며, (C)는 L-765,314(10 μM)가 MITF 및 티로시나아제 프로모터 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이며, (D)는 96시간째의 티로시나아제 활성을 확인한 결과이다.

도 6은 L-765,314에 의한 PKC 자극 티로시나아제 활성 억제에 관한 것으로, (A)는 Mel-ab 세포에 L-765,314(10 μM) 처리 후 PKC 활성을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이며, (B)는 Mel-ab 세포에 L-765,314(10 μM) 및 TPA(100 nM) 처리 후 PKC 활성을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이며, (C)는 티로시나아제 활성을 확인한 결과이며, (D)는 현미경 이미지를 나타낸 것이며, (E)는 멜라닌 함량을 확인한 결과이다.

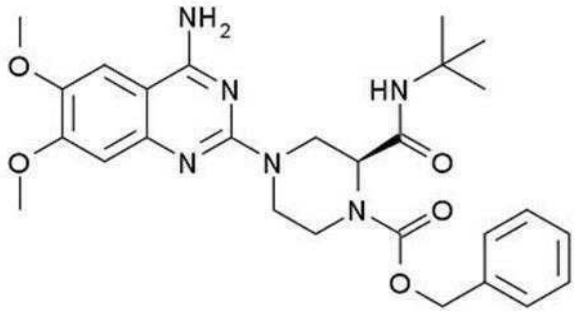
도 7은 정상 인간 멜라닌 세포에서 L-765,314에 의한 멜라닌 생성 억제에 관한 것으로, (A)는 NHM 멜라닌 세포에서 L-765,314(0.1-10 μM) 처리 후 96시간째에 멜라닌 함량을 확인한 결과이며, (B)와 (C)는 L-765,314(10 μM) 처리 후 96시간째에 PKC 및 티로시나아제 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 발명자들은 멜라닌 생성을 억제하는 물질을 스크리닝 하여 화합물(L-765,314)을 선정하였으며, 상기 화합물이 PKC 신호전달 경로를 억제하여 티로시나아제 활성을 억제하고 멜라닌 생성을 감소시키는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0018] 이에, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] [화학식 1]

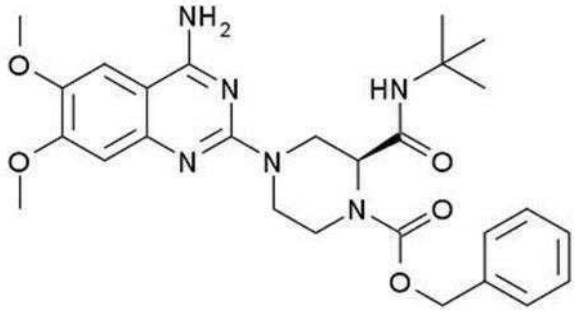


[0020]

[0021] 상기 과색소침착질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 색소침착으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0022] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 약학 조성물을 제공한다.

[0023] [화학식 1]



[0024]

[0025] 상기 약학적으로 허용가능한 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염기성 염일 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0026] 상기 약학적으로 허용가능한 염은 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 구연산, 초산, 말레산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캠퍼설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산 및 아스파르트산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 산성 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

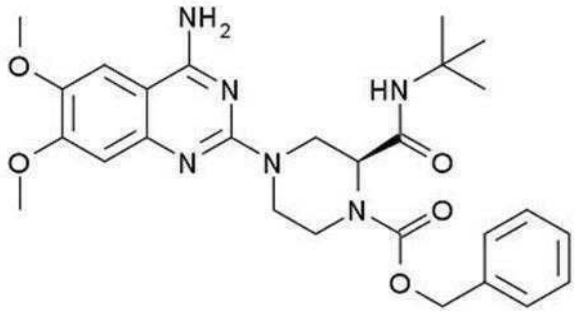
[0028] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 ㎎/㎏ 내지 50 ㎎/㎏이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0033] [화학식 1]

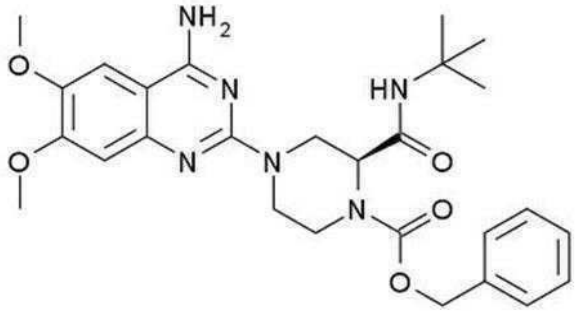


[0034]

[0035] 상기 과색소침착질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 색소침착으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0036] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0040] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물인 경우, 상기 화장료 조성물은 상기 유효성분 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키기 위해 피부 흡수 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 상기 화장료 조성물의 제형은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 화장료 조성물은 화장수, 유액, 스킨, 토너, 로션, 에센스, 선 스크린, 크림, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 팩, 젤, 연고, 패치, 스틱, 샴푸, 린스, 스프레이, 메이크업 제거제 및 세정제 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아님을 명시한다.

[0042] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

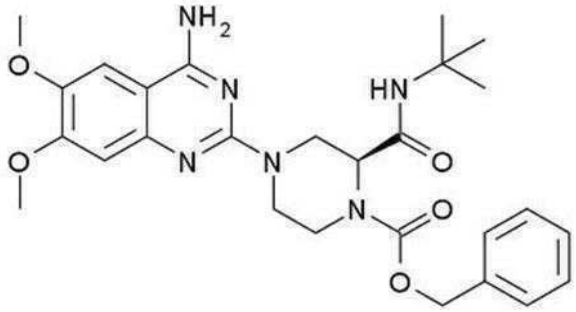
[0043] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0044] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0045] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0048] [화학식 1]

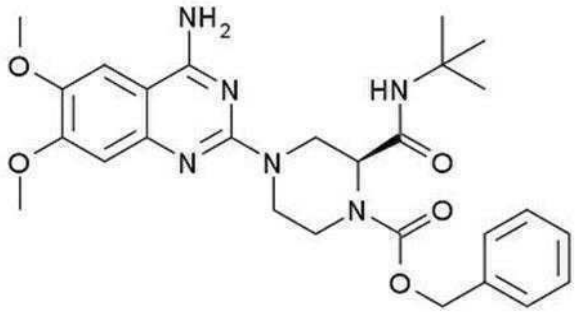


[0049]

[0050] 상기 과색소침착질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 색소침착으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0051] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0052] [화학식 1]



[0053]

[0055] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

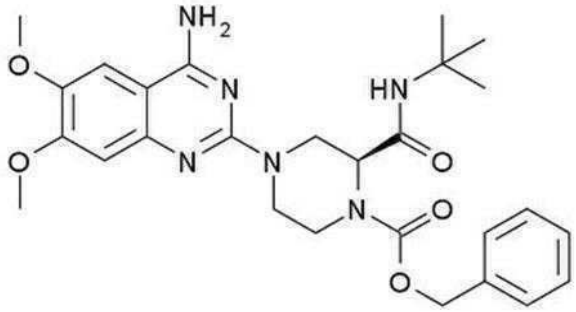
[0056] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0057] 상기 식품첨가물공전에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0058] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 PKC(protein kinase C) 신호전달 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0061] [화학식 1]



[0062]

[0064] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0066] **실시예 1: 물질**

[0067] B16-F10 세포(마우스 흑색종 세포)에서 멜라닌 생성에 관한 스크리닝에는 The LOPAC library(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 사용하였다. L-765,314(L-3040)와 TPA(12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 포스콜린(forskolin; FSK)과 시라졸린 염산염(cirazoline hydrochloride; CRZ)은 Tocris Bioscience(Bristol, UK)에서 구매하였고, 페닐에프린 염산염(phenylephrine hydrochloride; PE)은 Tokyo Chemical Industry(Tokyo, Japan)에서 구매하였다.

[0069] **실시예 2: 세포 배양**

[0070] (1) B16-F10 세포(마우스 흑색종 세포)와 HEK-293T 세포(인간 배아 신장 세포)는 한국세포주은행으로부터 제공받았으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Corning, 35-015-CV) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Hyclone, SV30010)이 첨가된 DMEM 배지(Corning, 10-013-CVR)에서 배양하였다. B16-F10 세포를 이용하여 실험을 수행할 경우에는 페놀 레드가 첨가되지 않은 DMEM 배지(Gibco, 31053-028)에 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였다(L-글루타민, 소듐 피루베이트 첨가). 계대 배양은 2일에 한 번 수행하였다.

[0072] (2) Mel-ab 멜라닌 세포(마우스 유래)는 100 mm 디쉬에 3 X 10^6개의 세포를 접종하고, 10% 우태아혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1 nM 콜레라 독소(cholera toxin, Cayman chemical, Cholera Toxin from Vibrio cholera, 23217) 및 100 nM TPA가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 계대 배양은 2일에 한 번 수행하였으며, 약 일주일 후 멜라닌 발현을 확인한 뒤 실험에 사용하였다. 실험 시에는 (1)에서 사용한 일반 조성의 DMEM 배지를 사용하였다.

[0074] (3) NHM 멜라닌 세포(인간 유래)(invitrogen)는 75T 플라스크에 3 X 10^6개의 세포를 접종하고, 10% 우태아혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 5 ml HMGS(Human Melanocyte Growth Supplement, S0025)가 첨가된 254 배지(Thermo fisher scientific, M254500)에서 9-13일 동안 배양한 뒤 실험에 사용하였으며, 실험 시에도 동일한 배지를 사용하였다.

[0076] **실시예 3: 멜라닌 생성 억제 물질 스크리닝(high throughput screening; HTS)**

[0077] 스크리닝에는 The LOPAC library(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)의 1,280개 물질을 사용하였다. 간략하게, B16-F10 세포를 96 웰 플레이트에 1 X 10^4 세포/웰 농도로 접종하고, 10% 우태아혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 nM의 α-MSH(500 nM)와 스크리닝 할 라이브러리 물질(0.1, 1, 10 μM)을 세포에 처리하였으며, 물질을 처리할 때에는 페놀 레드(phenol red)가 첨가되지 않은 DMEM 배지를 사용하였다(음성대조군: 알부틴, 100 μg/mL / 양성대조군: α-MSH 단독, 500 nM). 배양 3일 후, 배지를 회수하고 마이크로플레이트 리더기로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 B16-F10 세포에서의 멜라닌 생성 정도를 분석하였다.

[0079] **실시예 4: 세포 생존율 분석(MTT assay)**

[0080] Mel-ab 멜라닌 세포를 24 웰 플레이트에 1.5 X 10^5 세포/웰 농도로 접종하고 약물(0.1-20 μM)을 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 시약(5 μg/μl) 20 μl를 처리한 다음 1시간 동안 추가 배양하였다. 보라색의 포르마잔(formazan) 결정이 생기면 배지를 제거하고 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO) 150 μl를 처리하여 결정을 용해시킨 뒤 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0082] **실시예 5: 멜라닌 함량(melanin contents) 분석**

[0083] B16F10 흑색종 세포 또는 Mel-ab 멜라닌 세포를 6 웰 플레이트에 6 X 10^5 세포/웰 밀도로 접종하고 약물(0.1-20 μM) 및/또는 포스콜린(10 μM)을 처리한 후 24시간 단위로 현미경 사진을 획득하였으며, 멜라닌의 함량은 72시간 또는 96시간에서 측정하였다. 간략하게, 세포를 PBS로 세척한 다음 각 웰 당 1 N의 NaOH 300 μl를 처리하여 세포를 회수하고 100℃에서 30분간 가열하였다. 이후 상온에서 식힌 뒤 13000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이후 상층액만을 새로운 튜브로 옮겨 20 μl는 단백질 정량(BCA 정량법)에 사용하고 나머지 280 μl는 96 웰 플레이트에서 triplicate로 분주하여 마이크로플레이트 리더기로 400 nm(또는 405 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

[0085] **실시예 6: 티로시나아제 활성 분석**

[0086] Mel-ab 멜라닌 세포를 6 웰 플레이트에 6 X 10^5 세포/웰 밀도로 접종하고 약물을 처리한 후 96시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 차가운 PBS로 세척하고 티로시나아제 용해 버퍼(phosphate buffer, pH 6.8, 1% Triton X-100) 300 μl를 처리한 다음 freeze/thaw을 8-10회 반복하여 세포를 용해시켰다. 이후 4℃, 13000 rpm에서 10분간 원심분리 하고 상층액만을 새로운 튜브로 옮겨 단백질을 정량하였다. 단백질의 농도를 100 μg에 맞춘 다음(총 부피 90 μl, duplicate), 측정 직전 L-Dopa(Sigma, D9628, 10 mM) 10 μl를 처리하고 37℃에서 배양하면서 10분마다 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 M-tyrosine을 양성대조군으로, 샘플 버퍼(sample buffer)를 음성대조군으로 사용하였다.

[0088] **실시예 7: 웨스턴 블롯**

[0089] Mel-ab 멜라닌 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 5 mM EDTA, 1% SDS가 포함된 10 mM Tris(pH 7.4)로 용해시켰다. 이후 세포를 회수한 뒤 5X 샘플 버퍼 30 μl를 처리하고 98℃에서 10분간 가열하였다. phospho PKC substrate와 phospho PKA substrate는 12% gel을 사용하고, 그 외의 항체는 7% gel을 사용하여 SDS-PAGE로 단백질을 분리하였다. 로딩은 65 V에서 20분(phase 1), 110 V에서 80분(phase 2)을 진행하였다. 단백질을 니트로셀룰로스(nitrocellulose; NC)(MilliporeSigma, Burlington, MA, USA 또는 ATTO Technology, Amherst, NY, USA) 멤브레인으로 이동시키기 위해 카세트 당 0.2 A로 80분간 진행하였다. 이후 멤브레인을 3% BSA로 1시간 동안 블로킹(blocking)하여 비특이적 결합을 방지하고, 1차 항체를 처리하여 cold room에서 밤새 반응시켰다. 이후 2차 항체(Rabbit, Mouse, Goat 각 1:5000)를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 사용한 항체는 HSP90(SC-7947, Santa Cruz biotech, 1:1000), Tyrosinase(M-19)(SC-7834, Santa Cruz biotech, 1:1000), TYRP1(G-17)(SC-10443, Santa Cruz biotech, 1:1000), DCT(D-18)(SC-10451, Santa Cruz biotech, 1:1000), MITF[Microphthalmia(Transcription Factor) Ab-1(C5), MS-771-p1, neomarkers, 1:500]을 사용하였다.

[0091] **실시예 8: RNA 발현 분석(qRT-PCR)**

[0092] Mel-ab 멜라닌 세포, B16-F10 흑색종 세포, HaCat 각질세포(ATCC), 인간 피부 섬유아세포(Gibco)를 24 웰 플레이트에서 배양한 후 farvogen RNA prep kit(FABRK001-2)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 700 ng의 RNA, primer mix, 5X RT 버퍼, RT enzyme mix(ReverTra Ace qPCR RT Kit, Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 각각의 cDNA는 필요로 하는 RT-PCR의 primer를 제작하여 qPCR을 수행하였다. qPCR은 Lightcycler480(Roche Applied Science, IN, USA) / THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix(Toyobo)를 사용하여 수행하였으며, 94℃에서 3분간 변성 후 94℃에서 15초, 60℃에서 30초, 72℃에서 15초를 45회 반복하였다.

표 1

[0093]

Gene	Forward primer	Reverse primer
L32	5'-AGATCCTGATGCCCAACATC-3'	5'-CAGCTCCTTGACATTGTGGA-3'`
mADRA1a	5'-GCTCCGTATCCACCGTAAAA-3'	5'-TCTCTCGGGAAAACTTGAGC-3'
mADRA1b	5'-GAGGCTGCGCTTACACCTAC-3'	5'-CTGCCACTGTCATCCAGAGA-3'
mADRA1d	5'-TCCGTAAGGCTGCTCAAGTT-3'	5'-GGACGAAGAAAAAGGGGAAC-3'
hADRA1a	5'-ACATTTCCAAGGCCATTCTG-3'	5'-CAGGCTACGGAGAGGATCAC 3'
hADRA1b	5'-TCTCCAGGGAAAAGAAAGCA-3'	5'-GCGGTAGAGCGATGAAGAAG-3'
hADRA1d	5'-CTCAGAGGTGGAGGCTGTGT-3'	5'-TATCGGTCTCCCGTAGGTTG-3'
MITF	5'-TGAAGCAAGAGCATTGGCTA-3'	5'-TCCACAGAGGCCTTGAGAAT-3'
Tyrosinase	5'-TTATGCGATGGAACACCTGA-3'	5'-ACTGGCAAATCCTTCCAGTG-3'
Tyrp1	5'-TCACTGATGCGGTCTTTGAC-3'	5'-CTGACCTGGCCATTGAACTT-3'
DCT	5'-TCCTAACCGCAGAGCAACTT-3'	5'-TCTCCATTAAGGGCGCATAG-3'

[0095] **실시예 9: 프로모터 발현 분석**

[0096] HEK-293T 세포를 24 웰 플레이트에 1.5 X 10^5 세포/웰 농도로 접종하고, 각 웰에 150 ng MITF-Luc reporter plasmid, 150 ng Tyrosinase-Luc reporter plasmid, 50 ng RSV-βgal plasmid를 처리하여 각 조건에 따라 형질주입(transfection) 하였다. PEI(1 mg/ml)는 DNA 1 μg 당 3 μl의 비율로 처리하였다. 형질주입 후 24시간 뒤 약물(10 μM)과 포스콜린(10 μM)을 처리하고 6시간 후 배지를 제거하고 웰에 Luciferase lysis buffer(1X gly-gly, 1% Tripton X, 100 mM ATP, 1M DTT) 150 μl를 처리하여 세포를 회수한 후 96 웰 플레이트로 옮겨주었다. 이후 -80℃ deep freezer에서 30분간 방치한고 얼음 위에서 녹인 뒤 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이후 웰 당 25 μl씩 white 96 웰 플레이트로 옮기고, Assay mix 25 μl, Luciferin 50 μl를 처리한 다음 마이크로플레이트 리더기(BioTek, Winooski, Vermont, USA)에서 Luminescence를 측정하였다. 보정을 위한 β-gal assay는 Well 당 25 μl씩 clear 96 웰 플레이트로 옮기고, β-gal Assay mix 25 μl를 처리한 다음 빛을 차단하여 상온에서 반응시켰다. 이후 10분마다 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 Luminescence 측정값을 보정하는데 사용하였다.

[0098] **실험예 1: 멜라닌 세포에서 L-765,314에 의한 멜라닌 생성 감소**

[0099] 항 멜라닌 활성을 나타내는 저분자 약물을 선정하기 위해 고속 대량 스크리닝을 수행하여 멜라닌 함량을 분석하였다. 1280 LOPAC 라이브러리 화합물 중 L-765,314는 B16F10 흑색종 세포에서 세포 내 ATP 수준에 영향을 미치지 않으면서 α-MSH로 자극된 멜라닌의 분비를 억제하는 화합물 중 하나로 확인되었다.

[0100] 도 1과 같이, L-765,314는 B16F10 흑색종 세포에서 포스콜린에 의해 자극된 멜라닌의 생성을 억제하였다.

[0101] 이에 정상 Mel-ab 멜라닌 세포에서 L-765,314의 항 멜라닌 생성 효과를 확인한 결과, 도 2와 같이, L-765,314는 5 μM 농도에서 멜라닌 생성을 19% 감소시키고, 10 및 20 μM 농도에서는 멜라닌 생성을 각각 28 및 30% 감소시키는 것을 확인하였다(도 2A 및 B). 또한, L-765,314는 10 μM 농도에서 포스콜린에 의해 자극된 멜라닌 생성을 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다(도 2C 및 D).

[0102] L-765,314에 농도 의존적으로 멜라닌 생성이 감소하는 것이 관찰되었으나, 도 3과 같이, L-765,314 농도가 20 μM까지는 Mel-ab 멜라닌 세포 생존에 영향을 미치지 않는 바, L-765,314의 항 멜라닌 생성 효과는 비특이적 세포 독성에 의한 것이 아님을 확인하였다. 또한, 10 및 20 μM 농도의 L-765,314는 멜라닌 세포 생존율에 영향을 미치지 않으면서 멜라닌 생성을 동등하게 감소시킨 바, 후속 실험은 10 μM 농도의 L-765,314로 수행하였다.

[0104] **실험예 2: L-765,314의 항 멜라닌 생성과 α_{1B}-아드레날린 수용체 신호전달과의 관련성**

[0105] L-765,314에 의한 멜라닌 생성의 감소가 아드레날린 수용체 신호전달 경로의 억제에 의해 매개되는지 여부를 확인하기 위해, 멜라닌 세포에서 아드레날린 수용체 발현을 분석하였다.

[0106] 포유동물에서 α_1-아드레날린 수용체 아형으로 ADRA1a, ADRA1b 및 ADRA1d가 보고되어 있는데, 도 4A와 같이, Mel Ab 멜라닌 세포, B16F10 흑색종 세포, HaCat 각질세포에서 세 가지 아형이 모두 발현되는 것을 확인하였다.

[0107] ADRA1b의 발현을 관찰한 후, L-765,314에 의한 멜라닌 생성의 억제가 아드레날린 수용체의 억제에 의해 매개되는지 여부와 아드레날린 수용체, 보다 구체적으로 ADRA1b의 활성에 의해 멜라닌 생성이 증가되는지 여부를 분석하였다.

[0108] 그 결과, 도 4B 및 C와 같이, 선택적 ADRA 작용제인 페닐에프린, 전체 ADRA1a 작용제 및 부분 ADRA1b 및 ADRA1d 작용제인 시라졸린은 Mel-ab 세포에서의 멜라닌 생성을 증가시키지 못하는 바, L-765,314의 항 멜라닌 생성과 α_{1B}-아드레날린 수용체 신호전달은 관련성이 없는 것을 확인하였다.

[0110] **실험예 3: PKC 신호전달 경로 억제를 통한 L-765,314의 티로시나아제 활성 억제**

[0111] L-765,314의 항 멜라닌 생성 작용 메커니즘을 확인하기 위해, 멜라닌 생성과 관련된 유전자의 발현을 분석하였다.

[0112] 도 5A 및 B와 같이, Mel-ab 세포에서 L-765,314의 처리는 MITF, DCT, Tyrp1 및 티로시나아제 단백질과 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았으며, 마찬가지로, 도 5C와 같이, L-765,314의 처리는 MITF 또는 티로시나아제 프로모터 활성을 억제하지 않는 것을 확인하였다. 즉, L-765,314가 멜라닌 생성 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 유전자 발현을 변화시키지 않으면서 티로시나아제 활성 조절에 관여할 가능성을 고려하였다.

[0113] 그 결과 도 5D와 같이, 포스콜린에 의한 티로시나아제 발현의 상향 조절과 일치하게, Mel-ab 세포는 포스콜린에 의해 향상된 티로시나아제 활성을 나타내었고 L-765,314 처리에 의해 티로시나아제 활성이 감소되는 것을 확인하였다.

[0115] 다중 신호전달 경로는 멜라닌 생성 조절에 관여하며, 그 중 PKC(protein kinase C)는 티로시나아제 인산화의 직접 유도를 통해 티로시나아제 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에, L-765,314에 의한 티로시나아제 활성 억제가 PKC 신호전달과 관련되어 있는지 여부를 확인하기 위해, Mel-ab 세포에서 PKC 활성에 대한 L-765,314의 효과를 평가하였다.

[0116] 그 결과, 도 6A와 같이, 대조군과 비교하였을 때, L-765,314 처리 시 PKC 활성이 감소하는 것을 확인하였으며, TPA가 멜라닌 세포의 PKC 활성을 자극하는 것으로 알려져 있는데, 도 6B 및 C와 같이, L-765,314 처리 시 TPA에 의해 자극된 PKC 및 티로시나아제 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로, 도 도 6D 및 E와 같이, L-765,314는 TPA에 의해 자극된 멜라닌 생성을 억제하였다.

[0118] 다음으로 Mel-ab 세포에서 볼 수 있는 L-765,314의 항 멜라닌 생성 효과가 인간의 피부에 적용 가능한지를 확인하기 정상 인간 멜라닌 세포인 NHM 세포에 L-765,314(0.1-10 μM)를 처리하였다.

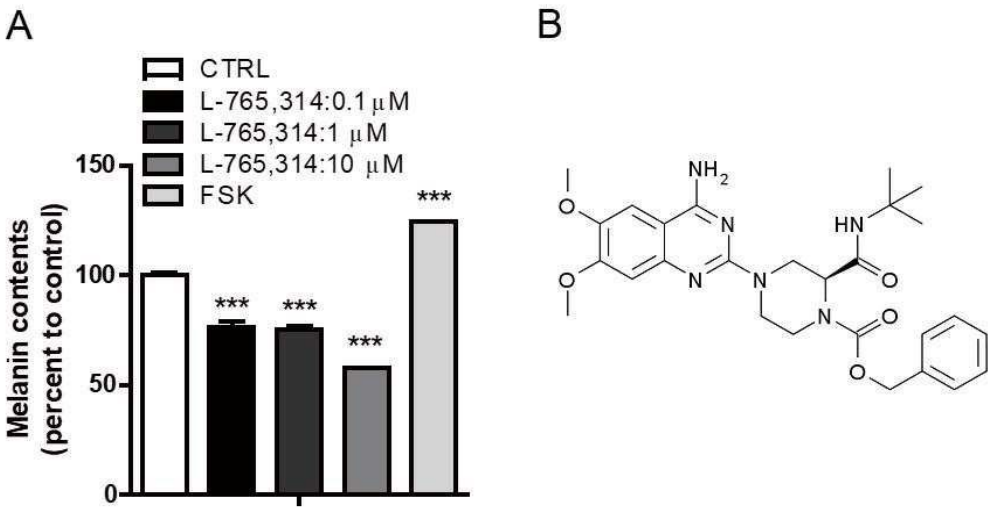
[0119] 그 결과, 도 7A와 같이, L-765,314는 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 감소시켰으며, 10 μM의 농도에서 멜라닌 생성을 약 30% 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, Mel-ab 세포에서 관찰된 결과와 유사하게, NHM 세포에서 L-765,314는 PKC 활성 및 티로시나아제 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

[0121] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

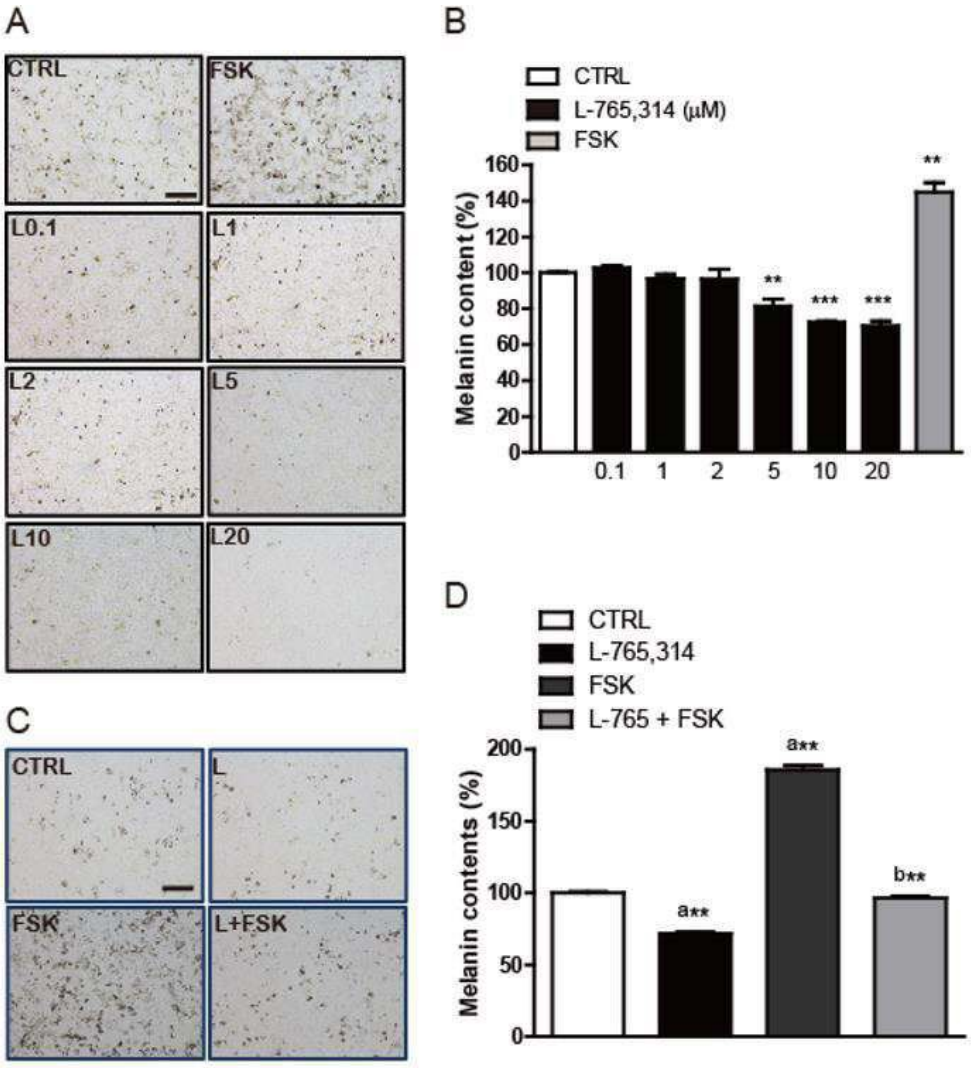
[0122] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

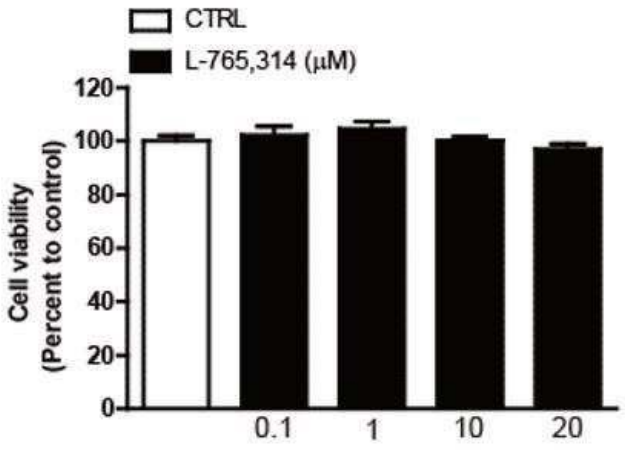
도면1



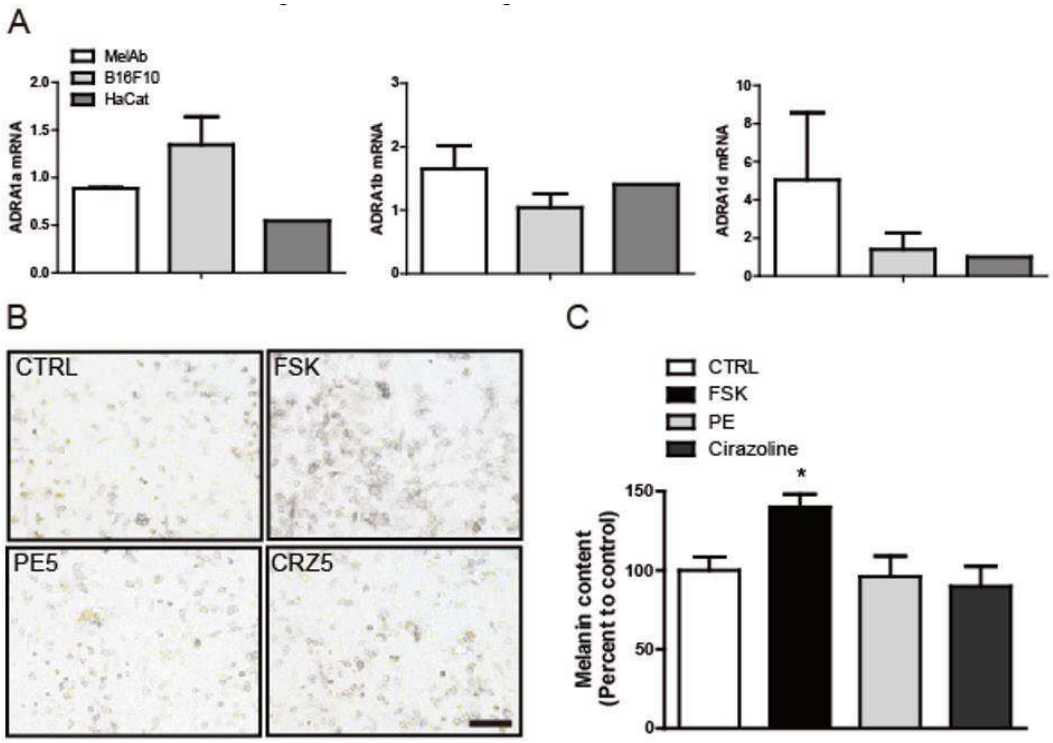
도면2


A
CTRL
FSK
L0.1
L1
L2
L5
L10
L20
B
CTRL
L-765,314 (μM)
FSK
Melanin content (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
2
5
10
20
**
***
***
**
C
CTRL
L
FSK
L+FSK
D
CTRL
L-765,314
FSK
L-765 + FSK
Melanin contents (%)
200
150
100
50
0
a**
a**
b**

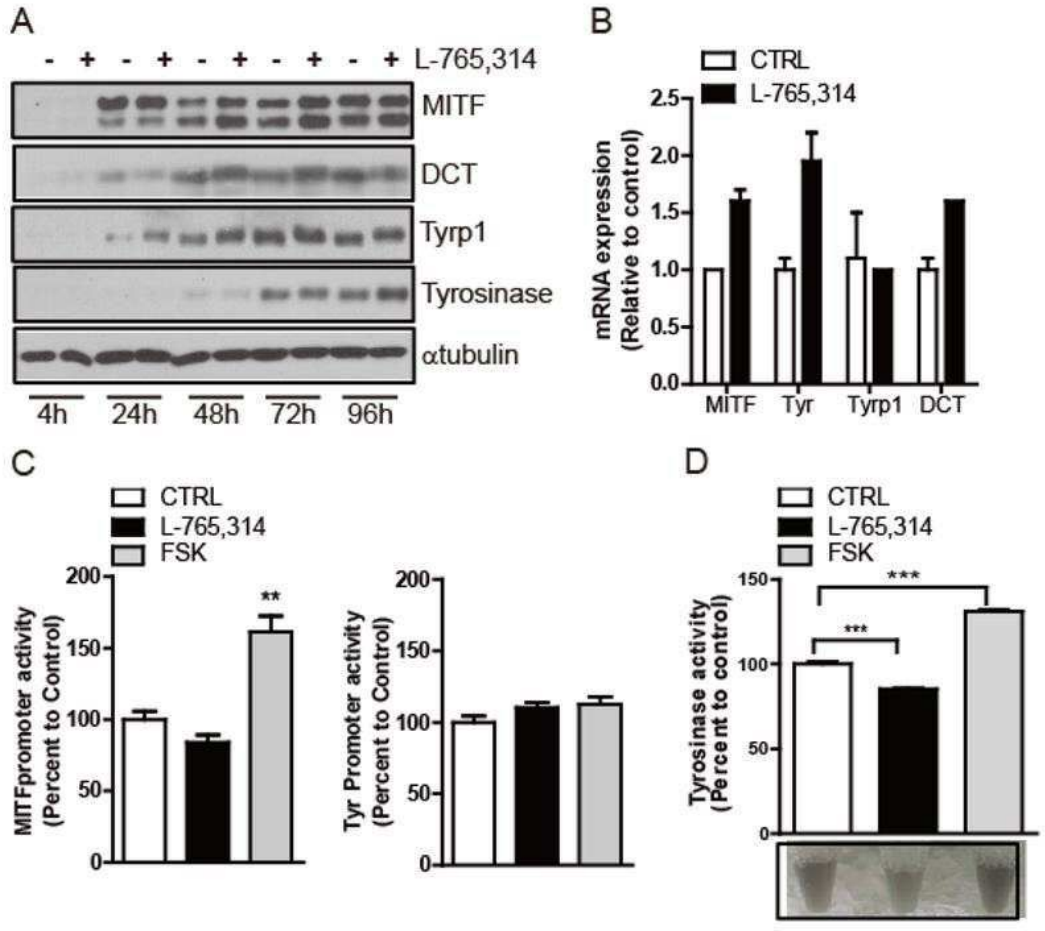
도면3


CTRL
L-765,314 (μM)
Cell viability
(Percent to control)
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
20

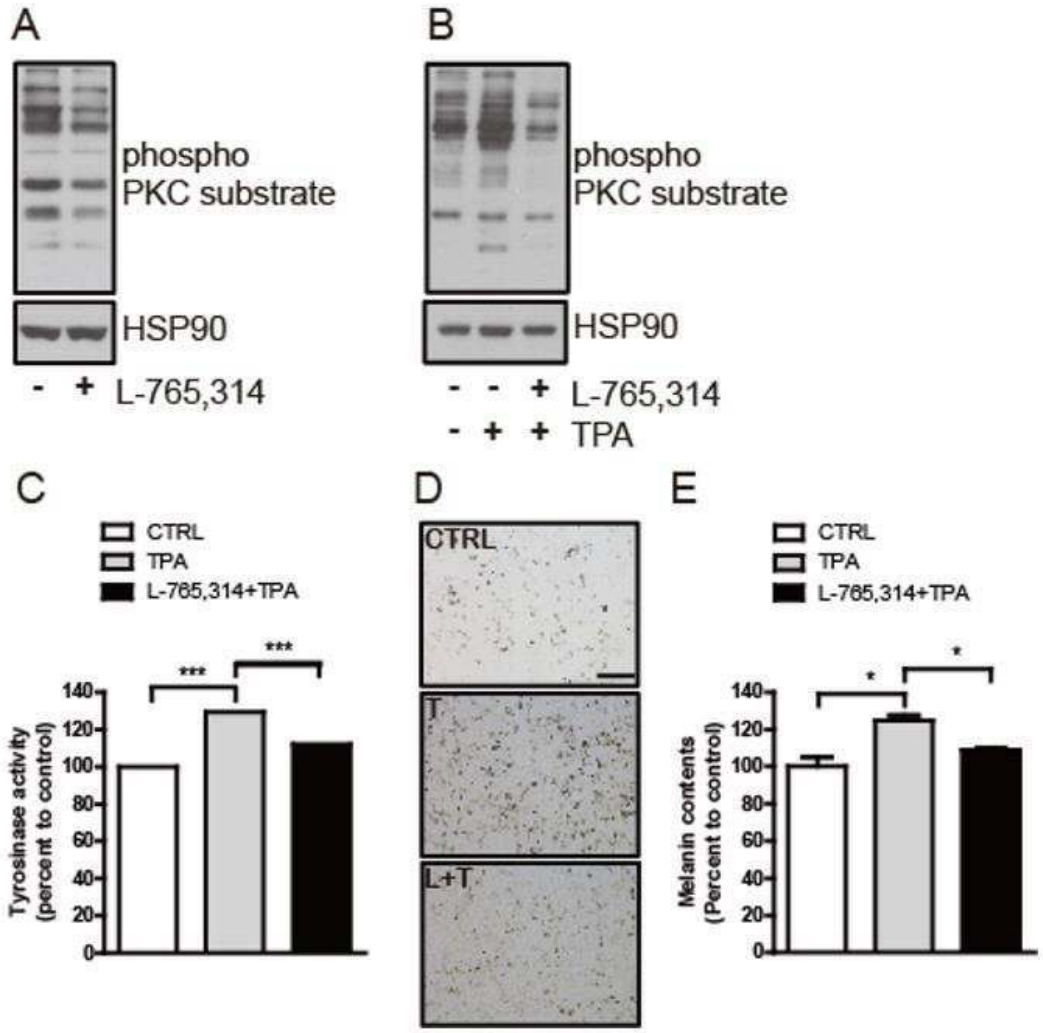
도면4


A
MelAb
B16F10
HaCat
ADRA1a mRNA
ADRA1b mRNA
ADRA1d mRNA
B
CTRL
FSK
PE5
CRZ5
C
CTRL
FSK
PE
Cirazoline
Melanin content
(Percent to control)

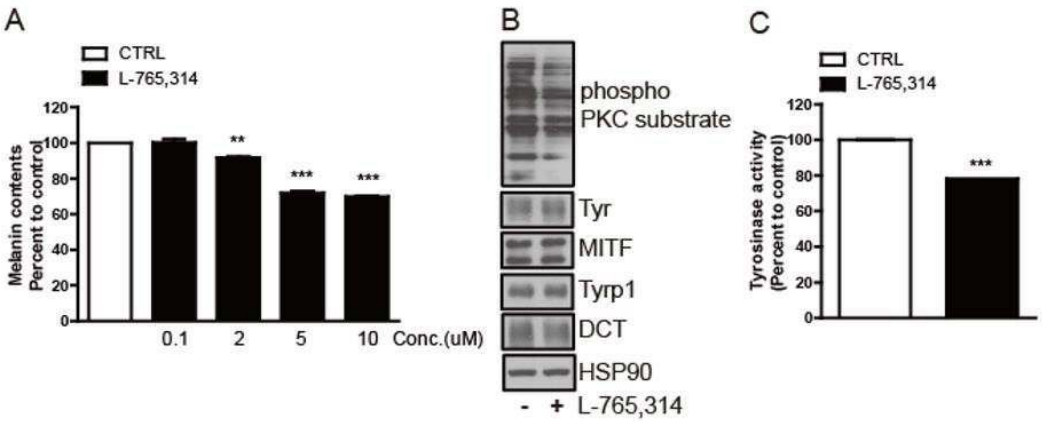
도면5


A
L-765,314
MITF
DCT
Tyrp1
Tyrosinase
αtubulin
4h
24h
48h
72h
96h
B
CTRL
L-765,314
mRNA expression
(Relative to control)
MITF
Tyr
Tyrp1
DCT
C
CTRL
L-765,314
FSK
MITFpromoter activity
(Percent to Control)
Tyr Promoter activity
(Percent to Control)
D
CTRL
L-765,314
FSK
Tyrosinase activity
(Percent to control)

도면6


A
phospho
PKC substrate
HSP90
- + L-765,314
B
phospho
PKC substrate
HSP90
- - + L-765,314
- + + TPA
C
CTRL
TPA
L-765,314+TPA
Tyrosinase activity
(percent to control)
D
CTRL
T
L+T
E
CTRL
TPA
L-765,314+TPA
Melanin contents
(Percent to control)

도면7


A
CTRL
L-765,314
Melanin contents
Percent to control
0.1
2
5
10
Conc.(uM)
B
phospho
PKC substrate
Tyr
MITF
Tyrp1
DCT
HSP90
- + L-765,314
C
CTRL
L-765,314
Tyrosinase activity
(Percent to control)