



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월12일
(11) 등록번호 10-2010171
(24) 등록일자 2019년08월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7052 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/7056 (2006.01) A61K 31/706 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7052 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2018-0014141
(22) 출원일자 2018년02월05일
심사청구일자 2018년02월05일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020100080437 A
Brz. J. Med. Biol. Res., 43(9), 828-836, 2010.
US20100168049 A1
- (73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
윤태진
서울특별시 강남구 압구정로 201, 83동 1204호 (압구정동, 현대아파트)
김경일
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상대학교
- (74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

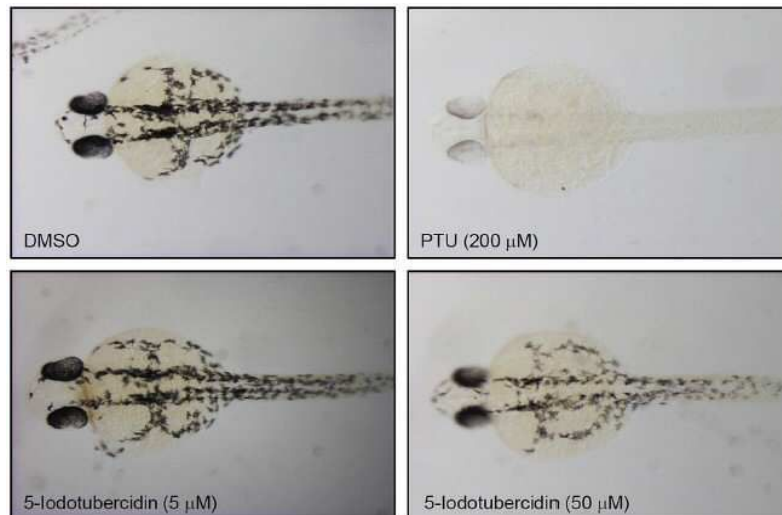
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 5-아이오도튜베르시딘을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 5-아이오도튜베르시딘을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게 5-아이오도튜베르시딘은 티로시나아제 활성 및 색소침착을 억제하는 효과가 나타나는 것으로 확인됨에 따라, 상기 5-아이오도튜베르시딘을 유효성분으로 함유하는 조성물은 색소 침착에 의해 발병되는 질환 치료를 위한 약학조성물 및 건강식품으로 사용될 수 있으며, 피부미백용 화장품 조성물로도 유용하게 제공될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/7056 (2013.01)
A61K 31/706 (2013.01)
A61K 8/602 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1A2B2005612
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구지원사업
연구과제명	새로운 색소조절약물을 신약재창출(drug repositioning)로 개발함
기 여 율	1/1
주관기관	경상대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2022.02.28
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하며, 상기 5-아이오도튜베르시딘은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 과색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 5-아이오도튜베르시딘은 티로시나아제 활성 및 색소침착을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하며, 상기 5-아이오도튜베르시딘은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 과색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 5

5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부미백용 화장료조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 피부미백용 화장료조성물은 수렴화장수, 유연화장수, 크림, 영양 에센스, 화운데이션, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저 및 유액으로 이루어진 군에서 선택된 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멜라닌은 색소 세포 내에 존재하는 티로시나아제의 작용에 의해 티로신으로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다. 이때 생성된 멜라닌은 피부 세포에 전달되고 표피 박리와 함께 멜라닌이 상실되어 소멸되는 순환 작용을 보인다. 이러한 멜라닌 생성 과정은 자연적으로 일어나는 현상으로서, 정상 상태의 피부에서는 멜라닌의 과다 생성이 일어나지 않는다. 그러나 피부가 외부의 자극, 예를 들면 자외선, 환경오염 또는 스트레스 등에 반응하면 멜라닌이 과다 생성되어 피부 밖으로 배출되지 못하고 각질형성세포(keratinocyte)로 전달되어 피부 표피층에 축적되어 기미, 주근깨 및 노인성 흑자 등 심각한 미용상의 문제를 일으킬 뿐만 아니라, 피부노화를 촉진하며 피부암을 유발하기도 한다.

[0003] 미백제의 개발에 있어서, 생성된 멜라닌 색소를 환원시켜 탈색하는 방법과 멜라닌 색소를 형성하는 효소인 티로시나아제의 활성을 억제하는 방법이 알려져 있다. 그러나 멜라닌 색소를 환원시키기 위해 사용되는 토코페롤이나 비타민류 등을 사용한 미백제는 멜라닌 색소의 탈색효과가 아주 작은 것으로 알려져 있다. 따라서 티로시나아제의 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 저해제가 주목받고 있다.

[0004] 종래의 화장품 분야에서는 미백 성분으로서, 예를 들면, 코지산(Kojic acid), 알부틴(Arbutin) 등과 같은 티로

시나아제 효소 활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(Hydroquinone), 비타민 C(L-Ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다. 그러나 처방제 중에서의 안정성이 나빠 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다.

[0005] 코지산은 티로시나제의 활성 부위에 존재하는 구리 이온을 흡착시켜 효소활성을 저해하지만, 화장품에 배합시 불안정성, 피부 부작용의 문제 및 최근 동물실험 결과 간암을 유발한다고 밝혀져 화장품 원료로 사용이 중지되었다. 비타민 C 및 그 유도체는 산화가 잘되는 불안정성 때문에 화장품 원료로서 사용이 어려우며, 하이드로퀴논은 피부에 대한 미백효과는 탁월하지만 알레르기를 유발하는 성질, 멜라닌 생성 세포에 대한 독성, 피부의 영구 탈색화 등 피부에 대한 자극성이 높으며, 최근 발암성 물질로 규정되어 사용이 금지되어 각 나라별로 제한적인 농도만 허가하고 있다.

[0006] 또한, 알부틴은 하이드로퀴논에 글루코피라노사이드(Glucopyranoside)가 결합된 유도체로 하이드로퀴논 사용 시 나타나는 부작용이 적으면서 인체에 대한 독성은 없이 멜라닌 색소의 합성을 억제하는 작용이 있어, 멜라닌 색소 침착이 증가되는 피부 질환의 치료제로서의 이용 가능성이 제시되었으나, 피부 효소에 의해 일부 분해되는 단점이 있다. 따라서, 소량으로도 효능이 우수하고 부작용이 적은 안전한 대체 미백제의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2003-0079470호(2003. 10. 10. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 세포독성 없이 우수한 미백효능을 나타내는 5-아이오도튜베르시딘을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부미백용 화장료조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 5-아이오도튜베르시딘은 티로시나아제 활성 및 색소침착을 억제하는 효과가 나타나는 것으로 확인됨에 따라, 상기 5-아이오도튜베르시딘을 유효성분으로 함유하는 조성물은 색소 침착에 의해 발병되는 질환 치료를 위한 약학조성물 및 건강식품으로 사용될 수 있으며, 피부미백용 화장료 조성물로도 유용하게 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1A는 5-아이오도튜베르시딘의 구조이며, 도 1B는 5-아이오도튜베르시딘의 세포 독성을 HM3KO 멜라노마 세포에서 확인한 결과로, 세포에 0.1, 0.5 및 1.0 μM 농도의 5-아이오도튜베르시딘을 72시간 동안 처리하고 MTT 분석을 통하여 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 2는 HM3KO 멜라노마 세포의 색소침착에 대한 5-아이오도튜베르시딘의 영향을 확인한 결과로, 도 2A는 0.1, 0.5 및 1.0 μM 농도의 5-아이오도튜베르시딘을 72시간 동안 처리한 세포를 원심분리한 후 펠렛 색 변화를 확인한 결과이며, 도 2B는 세포를 용해시키고 멜라닌을 1N NaOH로 100℃에서 30분간 용해시킨 후 분광기를 통하여

멜라닌 함량을 확인한 결과이며(*P < 0.01 vs. control), 도 2C는 세포 용해물에 L-DOPA를 인큐베이션한 후 405 nm 흡광도에서 티로시나아제 활성을 확인한 결과이다(*P < 0.01 vs. control).

도 3은 HM3KO 멜라노마 세포에서 색소침착 관련 분자에 대한 5-아이오도튜베르시딘의 영향을 확인한 결과로, 도 3A는 색소침착 관련 분자의 단백질 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 3B는 5-아이오도튜베르시딘 처리 후 시간경과에 따라 CREB, AKT 및 ERK의 인산화 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 3C는 5-아이오도튜베르시딘 처리 후 세포 내 cAMP 수준을 확인한 결과로, 백분을 대조군으로 DMSO 처리군을 사용하였으며, 세 번 반복 측정된 평균을 평균 $\pm$ SD로 나타낸 결과이다.

도 4는 제브라피쉬 배아에서 5-아이오도튜베르시딘의 색소침착에 미치는 영향을 확인한 결과로, 동시 발생된 배아에 5-아이오도튜베르시딘을 5 및 50 μ M 농도로 0.1% DMSO에 용해시켜 배아 배지에 첨가하고 실험현미경하에서 제브라피쉬의 색소침착을 확인하였으며, PTU를 양성대조군으로 사용한 결과로, 사진은 55 hpf 배아의 색소침착 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0016] 상기 5-아이오도튜베르시딘은 티로시나아제 활성 및 색소침착을 억제할 수 있다.

[0017] 본 발명의 실시예에 따르면, 5-아이오도튜베르시딘을 0.1, 0.5 및 1.0 mM 농도로 HM3KO 멜라노마 세포에 처리하고 5-아이오도튜베르시딘이 HM3KO 멜라노마 세포에 미치는 영향을 확인한 결과, 도 2A와 같이 5-아이오도튜베르시딘이 처리된 HM3KO 멜라노마 세포에서는 유의한 색소침착 억제효과가 유도된 것을 확인할 수 있었으며, 멜라닌 함량을 확인한 결과, 도 2B와 같이 5-아이오도튜베르시딘의 용량의존적으로 멜라닌 함량이 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 티로시나아제 활성을 확인한 결과, 도 2C와 같이 5-아이오도튜베르시딘은 티로시나아제 활성을 유의하게 감소시켰다.

[0018] 상기 결과로부터 5-아이오도튜베르시딘에 의해 티로시나아제 활성 및 색소침착이 효과적으로 억제되는 것이 확인되었다.

[0019] 상기 피부 색소 침착 질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 과색소 침착으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 치료용 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0023] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0024] 상기 5-아이오도튜베르시딘의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부 색소 침착 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.
- [0027] 상기 건강식품은 상기 5-아이오도튜베르시딘 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0028] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0029] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 5-아이오도튜베르시딘 (5-iodotubercidin)을 유효성분을 함유하는 피부미백용 화장료조성물을 제공할 수 있다.
- [0031] 상기 피부미백용 화장료조성물은 수렴화장수, 유연화장수, 크림, 영양 에센스, 화운데이션, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저 및 유액으로 이루어진 군에서 선택된 제형을 갖을 수 있다.
- [0032] 상기 화장료조성물은 유효성분인 5-아이오도튜베르시딘 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0034] 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.
- [0035] 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.
- [0036] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 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.
- [0037] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 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.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0041] <실험예> 세포 배양

[0042] 10% 태아소혈청(FBS)와 항생제(Life Technologies Corporation, Grand Island, NY)가 포함된 MEM(Minimum Essential Medium) 배지에서 HM3KO 사람 악성 흑색종 세포를 유지시켰다.

[0043] 5-아이오도튜베르시딘(5-iodotubercidin) 화합물을 Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA)에서 구입하여 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)에 용해시키고 배양배지로 희석(final concentrations of DMSO is 0.1%)하여 사용하였다.

[0045] <실시예 1> 세포독성 확인

[0046] 5-아이오도튜베르시딘의 구조는 아데노신과 유사하지만, 아데노신은 7번 위치의 질소가 존재하는 반면, 5-아이오도튜베르시딘은 탄소가 대체되어 있으며, 상기 탄소는 아이오딘과 결합하여, 도 1A와 같은 구조로 7-아이오도-7-데아자아데노신(7-iodo-7-dezaadenosine)으로도 불리운다.

[0047] 이러한 5-아이오도튜베르시딘의 세포독성을 HM3KO 멜라노마 세포에서 확인하였다.

[0048] 세포독성 확인을 위해, HM3KO 멜라노마 세포에 5-아이오도튜베르시딘을 24시간 처리한 후, 0.5 mg/ml 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Htetrazolium bromide (MTT) 용액이 포함된 신선한 배지로 교체하여 4시간 동안 추가 배양하였다.

[0049] 마지막으로 포르마잔 결정은 DMSO로 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 광학밀도(optical density)를 측정하여 세포 생존도를 확인하였다.

[0050] 그 결과, 도 1B와 같이 5-아이오도튜베르시딘 농도가 1.0 mM 까지는 유의한 세포독성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

[0052] <실시예 2> 멜라닌 침착 억제 및 티로시나아제(tyrosinase) 활성 확인

[0053] 앞선 실험에서 확인된 결과에 따라, 5-아이오도튜베르시딘을 0.1, 0.5 및 1.0 mM 농도로 HM3KO 멜라노마 세포에 처리하고 5-아이오도튜베르시딘이 HM3KO 멜라노마 세포에 미치는 영향을 확인하였다.

[0054] 색소 확인을 위해, 세포를 수집하고 원심분리하여 펠렛으로 준비하였다.

[0055] 100℃에서 30분간 1 N NaOH에 멜라닌 색소를 용해시키고 405nm에서 광학밀도를 확인하여 정량하였다.

[0056] 또한, 티로시나아제 활성을 확인하기 위해, 세포를 Pro-Prep 단백질 추출 용액(Intron, Daejeon, Korea)으로 용해시킨 후 세포 용해물을 원심분리하여 정제하였다.

[0057] 용해 버퍼 100ml 내에 전체 단백질 250mg이 포함되도록 정량한 후 96-웰 플레이트에 옮겨 담고 1 mM L-DOPA를 100ml씩 첨가하여 37℃에서 30분간 인큐베이션한 후 405nm에서 흡광도를 확인하고 티로시나아제 활성을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0058] 그 결과, 도 2A와 같이 5-아이오도튜베르시딘이 처리된 HM3KO 멜라노마 세포에서는 유의한 색소침착 억제효과가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 또한, 멜라닌 함량을 확인한 결과, 도 2B와 같이 5-아이오도튜베르시딘의 용량의존적으로 멜라닌 함량이 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0060] 멜라닌생성에 있어 티로시나아제는 비율 제한적인 효소이기 때문에 세포 용해물을 이용하여 티로시나아제 활성을 확인한 결과, 도 2C와 같이 5-아이오도튜베르시딘은 티로시나아제 활성을 유의하게 감소시켰다.

[0062] <실시예 3> 신호전달 경로 확인

[0063] 앞선 실험결과로부터 5-아이오도튜베르시딘이 멜라노마 세포 내에서 티로시나아제 활성을 감소시키는 것으로 확인됨에 따라, 5-아이오도튜베르시딘이 색소침착과 관련된 유전자 발현에 영향을 미치는지 확인하였다.

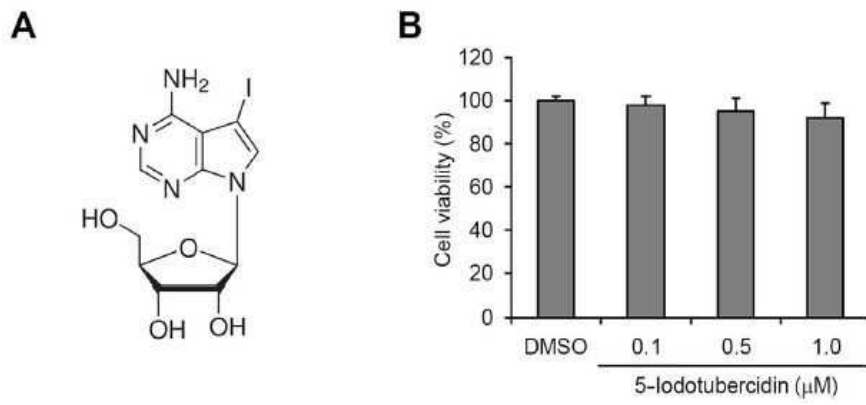
[0064] 먼저, 원심분리하여 세포를 수거하고 프로-프랩 단백질 추출 용액(Intron)으로 용해시켰다. 격렬하게 파이프팅

후 추출물을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다.

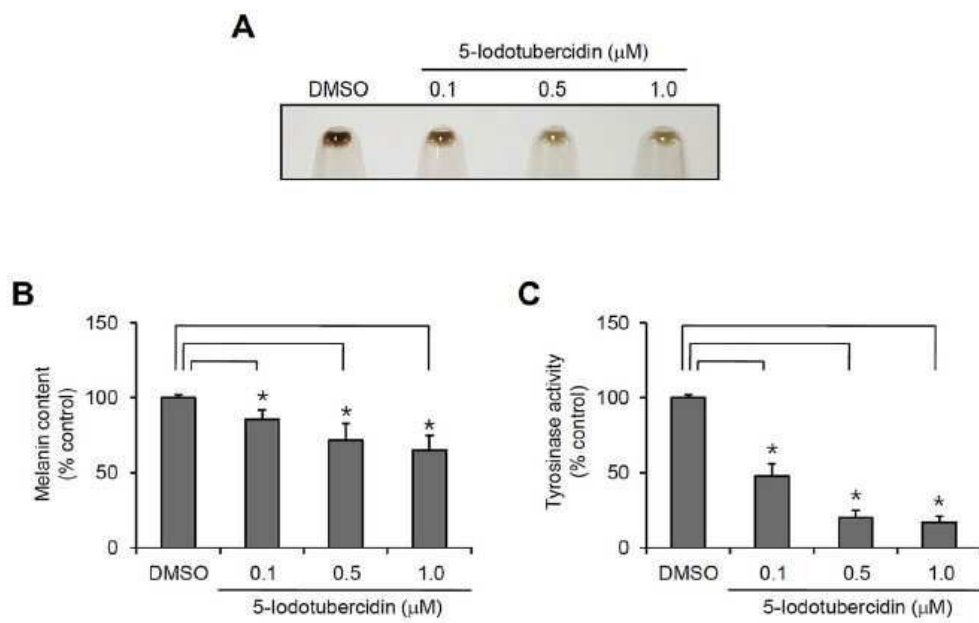
- [0065] BCA 단백질 분석 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL)를 이용하여 전체 단백질을 측정하고, SDS-폴리아크릴 아마이드 겔 레인 당 20-30 mg 단백질 시료를 적용시킨 후 니트룰셀룰로스 막으로 옮겼다. 상기 막과 적합한 항체를 4℃에서 하룻밤 동안 교반하면서 인큐베이션하였다.
- [0066] 그 후, 실온에서 페록시다아제가 결합된 2차 항체와 30분간 인큐베이션하고, 향상된 chemiluminescence(Intro n)으로 블롯을 시각화하였다.
- [0067] 상기 사용된 일차 항체는 MITF, 티로시나아제(tyrosinase), TRP1, TRP2 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA); β -액틴 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); phospho-AKT, phospho-ERK, phospho-CREB (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)이다.
- [0068] 그 결과, 도 3A와 같이 5-아이오도튜베르시딘은 HM3KO 멜라노마 세포에서 MITF, 티로시나아제 및 TRP1와 같은 색소침착 관련된 분자의 단백질 수준을 감소시킨 반면, TRP2 수준에는 유의한 영향을 나타내지 못하였다.
- [0069] 한편, 멜라닌 생성은 다양한 신호전달 경로에 의해 진행되기 때문에 세포 내 신호 경로에서 5-아이오도튜베르시딘의 영향을 확인하였다.
- [0070] cAMP/PKA 신호전달의 하위경로를 확인하기 위해, CREB(cAMP response elementbinding protein)에 미치는 5-아이오도튜베르시딘의 영향을 확인하였다.
- [0071] 세포 내 cAMP를 측정하기 위해, cAMP-Glo™ 분석 키트를 (Promega; Madison, WI) 사용하였다. 12-웰 배양 플레이트에서 세포가 50% 합류되도록 성장시킨 후, 5-아이오도튜베르시딘을 정해진 시간마다 처리하였다.
- [0072] 배지를 제거한 후, 세포를 용해시켜 반응 버퍼 및 PKA 용액과 30분간 인큐베이션하였다. Luminoskan™ Ascent Microplate Luminometer (Thermo Scientific, Rockford, IL)를 이용하여 발광수준을 확인하고 대조군과 비교하여 cAMPwas의 발현량을 대조군에 대하여 백분율로 나타내었다.
- [0073] 그 결과, 도 3B와 같이 5-아이오도튜베르시딘이 처리된 세포에서 CREB의 인산화가 감소하였으나, 이와 대조적으로 AKT 및 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화는 유의적으로 증가하였다.
- [0074] 상기 결과로부터 5-아이오도튜베르시딘은 PKA 억제 및 AKT/ERK 경로의 활성화를 통하여 멜라노마 세포의 색소침착을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0075] 또한, 5-아이오도튜베르시딘 처리 후 세포 내 cAMP 수준을 확인하였으나, 도 3C와 같이 세포 내 cAMP 수준은 5-아이오도튜베르시딘에 의한 영향이 나타나지 않았다.
- [0077] **<실시예 4> 제브라피쉬 모델에서 색소침착 억제 효과 확인**
- [0078] 작은 열대어인 제브라피쉬를 색소침착 실험 동물모델로 사용하여, 이전에 보고된 방법으로 제브라피쉬 배아에 5-아이오도튜베르시딘을 처리하고 색소침착에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0079] 동시 발생된 배아를 수집하고 수정 후 9시간에서 55 hpf까지 5-아이오도튜베르시딘을 처리하고, 실체현미경하에서 제브라피쉬의 색소에 미치는 영향을 확인하였으며, 화합물의 균일한 분포를 위하여 매일 배지를 교체하고 수시로 교반하였다.
- [0080] 모든 실험은 200 mM 1-페닐 2-티오우레아(1-phenyl 2-thiourea; PTU)를 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0081] 관찰을 위해, 포셉을 이용하여 배아 용모막을 제거하고 트리카인 메탄설포네이트 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 마취시킨 후 3% 메틸 셀룰로스 depression slide(Aquatic Eco-Systems, Apopka, FL)위에 올려 놓고 실체현미경 MZ16 (Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Strasse, Germany)하에서 사진을 찍었다.
- [0082] 그 결과, 도 4와 같이 PTU가 200 mM로 처리된 실험군에서 색소침착 억제가 유의하게 나타났으나, 5-아이오도튜베르시딘이 50 mM으로 처리된 제브라피쉬 배아에서 우수한 색소침착 억제 효과가 확인되었다.
- [0083] 또한, 제브라피쉬 배아의 발달단계 동안 5-아이오도튜베르시딘에 의한 부작용은 전혀 나타나지 않았다.
- [0085] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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

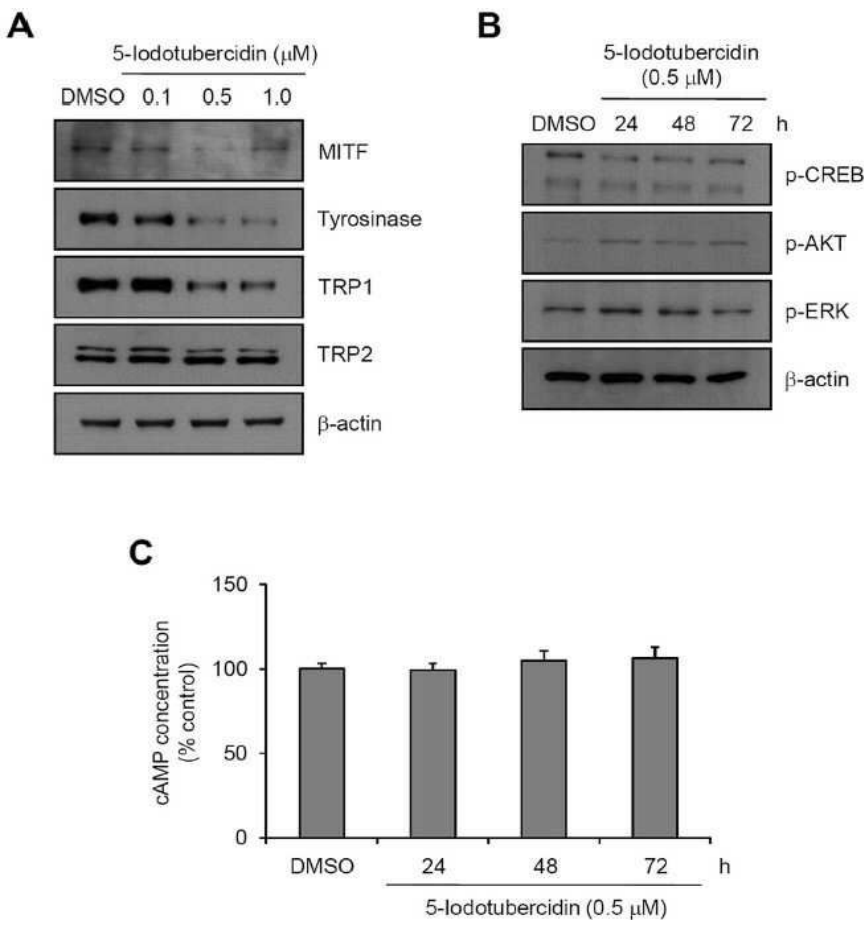
도면1



도면2



도면3



도면4

