



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0045451
(43) 공개일자 2024년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/64 (2006.01) A23K 20/147 (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01) A61K 8/02 (2006.01)
A61K 8/19 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A23K 20/147 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0124690

(22) 출원일자 2022년09월29일

심사청구일자 2022년09월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

강경태

경기도 용인시 수지구 성북1로 35, 216동 1902호 (성북동, 성북역 롯데캐슬 클라시엘)

박혜연

경기도 수원시 장안구 일월로66번길 9-15, 303호 (천천동)

(74) 대리인

특허법인정진

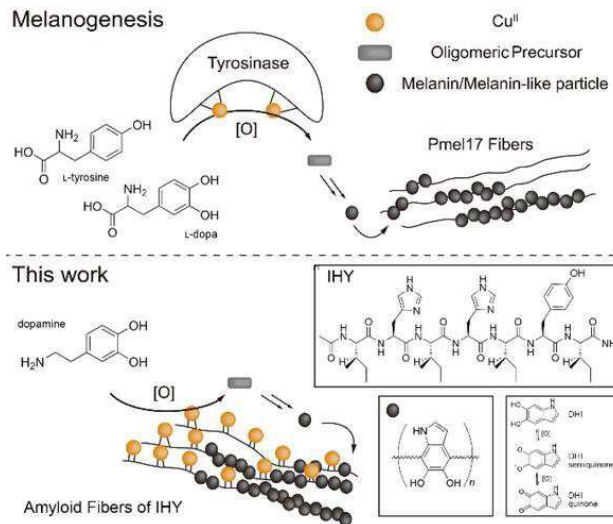
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 자기조립 능력을 갖는 펩타이드를 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 자기조립 능력을 가진 펩타이드를 이용한 멜라닌 합성 촉진용 조성물, 촉매와 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 용도에 대한 것으로, 본 발명에 따른 자기조립 능력을 가진 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유는 표면에 노출된 아미노산 잔기를 통해 구리와 결합할 수 있으며, 기질 산화 활성을 보유하고, 티로시나아제(tyrosinase)와 유사한 기능을 보유한 바, 도파민(dopamine)을 산화시켜 멜라닌 유사체를 우수하게 합성할 수 있으므로, 멜라닌 생성이 필요한 다양한 분야에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)

A61K 8/027 (2013.01)

A61K 8/19 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711161601
과제번호	2019R1C1C1009111
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	카테콜-아밀로이드 상호작용 연구 및 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 펩타이드인 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 N 말단에 AcNH 작용기가 결합되고, C 말단에 CONH₂ 작용기가 결합된 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 응집되어 섬유(fiber) 구조를 형성하는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 멜라닌 합성 촉진용 조성물은 구리(Cu)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 구리는 펩타이드가 응집된 섬유의 표면의 아미노산 잔기와 결합된 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 멜라닌 합성 촉진용 조성물은 티로시나아제(tyrosinase) 기능을 갖는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

진용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 멜라닌 합성 촉진용 조성물은 카테콜(Catechol)을 산화시키는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 9

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 합성 촉진용 촉매.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 멜라닌 합성 촉진용 촉매는 구리(Cu)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 합성 촉진용 촉매.

청구항 11

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상은 백반증(vitiligo), 색소침착저하증(hypopigmentation), 백색증(albinism), 부분 백색증(piebaldism), 탈색모반(nevus depigmentosus), 특발 물방울 모양 멜라닌 저하증(idiopathic guttate hypomelanosis), 바덴부르그 증후군(Waardenburg syndrome), 보그트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome), 광노화(photoaging), 일광각화증(solar keratosis), 어루러기(pityriasis versicolor), 백색비강진(pityriasis alba), 이토 멜라닌 저하증(hypomelanosis of ito) 및 백모증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 의약품 조성물.

청구항 13

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 14

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 15

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 16

하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 위한 사료첨가용 조성물.

XHXHXYX(서열번호 1)

상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

청구항 17

(a) 도파민(dopamine) 또는 L-dopa을 포함하는 용액과 제 1항에 따른 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 반응시켜 멜라닌 유사체를 제조하는 단계;

(b) 상기 제조된 멜라닌 유사체를 분리하는 단계를 포함하는, 멜라닌 유사체의 제조방법.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 반응은 1 내지 40℃에서 100 내지 300 rpm으로 5분 내지 1시간 수행하는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 유사체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 자기조립(Self-assembly) 능력을 가지는 펩타이드를 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

인체 피부의 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 생성되는 멜라닌(melanin)은 검은 색소와 단

[0001]

[0003]

백질의 복합 형태를 갖는 페놀계 고분자 물질을 말한다. 상기 멜라닌은 농도와 분포에 따라서 사람의 피부색을 결정하기도 하고, 자외선으로부터 인체의 피부를 보호해주는 역할도 한다. 멜라닌이 과도하게 생성되면 기미, 주근깨 등의 색소침착을 유발한다. 그러나 반대로 멜라닌의 생성이 과도하게 억제되면 백반증의 피부병변이 나타나기도 하고 모근의 멜라닌 세포의 수와 기능이 감소하여 백모가 발생하기도 하며 저색소증이 발생해 피부암의 위험인자가 되기도 한다.

[0004] 백반증(vitiligo)은 멜라닌 세포의 상실로 인하여 야기되는 탈색소 질환이다. 백반증과 유사한 질병인 백모도 외모에 대한 관심이 높아지면서 주목받고 있어 보건비용, 심리적인 면에서 연구 대상이 되고 있다. 백반증 또는 백모를 가진 환자들은 심리적으로 우울하거나 스트레스가 증가하며 대인관계나 사회활동에서 불편함을 느끼고 있다.

[0005] 현재, 백반증의 치료에 있어서 국부의 코르티코스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 비타민 D 파생물, 광선치료(UVA, narrow band UVB, 광화학치료), 정상적인 멜라닌 세포를 가지고 있는 표피를 이식하는 수술적인 치료, 국부적인 치료와 광선치료의 조합을 포함한 다양한 치료들이 사용되고 있지만 비흑색종 피부암과 흑색종의 발생정도를 증가시키는 등 부작용을 가지고 있다.

[0006] 또한, 현재 백모 해결방안으로 다양한 모발 염모제가 사용되고 있는 실정이다. 그러나 이런 영구 염모제는 식물성 염모제, 금속성 염모제, 합성 염모제 등으로 이루어지기 때문에 화학작용으로 인하여 모발과 두피에 손상, 자극 등의 부작용을 가지고 있다.

[0007] 이 외에도 재생의학의 발달에 따라, 줄기세포를 이용한 다양한 세포 치료법이 연구되고 있으며, 백반증 치료를 위하여 피부에서 분리해낸 멜라닌 세포를 이식하는 세포 치료법이 또한 연구되고 있다. 백반증 치료를 위한 세포 치료법은 자가 표피를 이식하거나 멜라닌 세포를 체외에서 배양하여 이식하는 방법 등을 포함한다. 그러나 멜라닌 세포는 순수 분리가 어렵고 증식속도가 느린 문제점이 있다.

[0008] 한편, 자기조립은 물질의 자연적인 제조 과정에서 자주 발견된다. 자가 조립에 의한 복합적이고 역동적인 계층 구조는 주로 우수한 재료 특성을 나타내며, 많은 경우에서 단량체 분자 단위에 없는 화학적 기능을 확인할 수 있다. 이는 초분자 결합(supramolecular) 결합이 표면에서 주기적인 분자 구성을 제어하는 효율적인 방법을 제공하기 때문에 가능한 것이며, 이는 종종 다양한 계면의 촉매 특성에 기여한다.

[0009] 그 중 기능성 아밀로이드(functional amyloid)는 일종의 정규한 자기조립 초분자 구조로, 그 동안 병리학적으로 좋지 않은 물질로 알려져 있었지만 현재 다학제적(multidisciplinary) 관심을 받고 있다. 아밀로이드의 초분자 구조는 우수한 재료 특성(예: 물리화학적 안정성 및 높은 강성(rigidity)/탄성(elasticity) 및/또는 화학적 기능(예: 촉매 스캐폴딩, 유전자 조절, 저장 호르몬 및 분자 인식)을 비롯한 유용한 기능을 보유하고 있다.

[0010] 이를 기반으로, 기능성 아밀로이드의 도출 및 이의 효과를 확인하기 위한 많은 연구가 수행되고 있으나, 우수한 멜라닌 생성능을 가진 기능성 아밀로이드에 대해서는 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 자기조립 능력을 가진 펩타이드의 효과에 대하여 연구하던 중, 상기 펩타이드가 응집된 아밀로이드 섬유(amyloid fiber)를 제조하고, 상기 아밀로이드 섬유가 티로시나아제(tyrosinase)와 유사한 활성을 가짐을 확인하였으며, 이를 통해 제조한 멜라닌 유사체의 구조적 특징을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 멜라닌 합성 촉진용 촉매를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 건강기능식품

을 제공하는 것이다.

- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 위한 사료첨가용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 멜라닌 유사체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0023] XHXHXYX(서열번호 1)
- [0024] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.
- [0025] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 합성 촉진용 촉매를 제공한다.
- [0026] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0029] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0030] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 위한 사료첨가용 조성물을 제공한다.
- [0031] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 도파민(dopamine) 또는 L-dopa를 포함하는 용액과 본 발명에 따른 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 반응시켜 멜라닌 유사체를 제조하는 단계; (b) 상기 제조된 멜라닌 유사체를 분리하는 단계를 포함하는, 멜라닌 유사체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 자기조립 능력을 가진 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유는 표면에 노출된 아미노산 잔기를 통해 구리와 결합할 수 있으며, 기질 산화 활성을 보유했고, 티로시나아제(tyrosinase)와 유사한 기능을 보유한 바, 도파민(dopamine)을 산화시켜 멜라닌 유사체를 합성할 수 있으므로, 멜라닌 생성이 필요한 다양한 분야에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 발명에 따른 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유(IHY) 및 본 발명에 따른 펩타이드가 응집

되어 형성된 아밀로이드 섬유의 표면에 구리가 결합된 아밀로이드 섬유(Cu^{II} -IHY)의 CD 스펙트럼과 IHY 및 Cu^{II} -IHY의 TEM 이미지(삽입)를 나타낸 결과(a)와 Cu^{II} -IHY의 기질인, 3,5-DBcat(3,5-di-tert-butylcatechol)의 산화 활성화 및 산화 과정(삽입)을 나타낸 결과(b)이다.

도 2는 고정된 농도의 Cu^{II} -IHY(20 μM)와 다양한 농도의 3,5-DBcat의 반응에 있어, 시간에 따른 흡광도 변화를 405nm에서 확인한 결과(a), 기질 변화에 따른 촉매 산화(catalytic oxidation)의 초기 속도(initial rate) 변화를 확인한 결과(b)와 3,5-DBcat 산화의 측정된 동역학 매개변수(kinetic parameter)를 나타낸 결과(c)이다.

도 3은 무촉매(대조군), IHY(300 μM), Cu^{II} (300 μM) 및 CuI^{II} IHY(300 μM)를 이용하여 도파민(300 μM , pH 7.4)에서 합성된 멜라닌 유사체를 흔들기 전(상단), 흔들 후(하단)의 사진(왼쪽부터 무촉매, IHY, Cu^{II} , Cu^{II} -IHY 실험군)(a), 각 조건에서 450nm(A_{450})에서 시간에 따른 흡광도 변화를 나타낸 결과(b) 및 각 조건에서 측정된 V_0 및 A_{max} 값을 나타낸 결과(c 및 d)이다.

도 4는 무촉매(대조군), IHY(300 μM), Cu^{II} (300 μM) 및 Cu^{II} -IHY(300 μM)를 이용하여 도파민(300 μM , pH 7.4)에서 합성된 멜라닌 유사체의 FT-IR 스펙트럼(a), 각 조건에서 합성된 멜라닌 유사체의 TEM 이미지(b)이다.

도 5는 Cu^{II} 를 이용하여 합성한 멜라닌 유사체의 EPR-스펙트럼(a), Cu^{II} -IHY를 이용하여 합성한 멜라닌 유사체의 EPR-스펙트럼(b) 및 무촉매(붉은색 선) 또는 IHY(검은색 선)를 이용하여 합성한 멜라닌 유사체의 중첩된 EPR-스펙트럼(c) 결과이다.

도 6은 일반적인 티로시나아제(tyrosinase)에 의한 멜라닌 생성에 대한 개략도(상단) 및 본 발명에 따른 IHY를 기반으로 한 Cu^{II} -배위 아밀로이드 섬유의 멜라닌 유사체 형성에 대한 개략도(하단)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0037] 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다:
- [0038] XHXHXYX(서열번호 1)
- [0039] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.
- [0040] 상기 서열에 있어서, 아미노산 H는 구리(Cu) 등의 금속과 결합하는데 기여한다. 더불어 본 발명의 펩타이드는 자기조립을 통한 아밀로이드 섬유(amyloid fiber) 형성을 위하여 N 말단 및/또는 C 말단을 개질할 수 있다.
- [0041] 따라서 본 발명의 펩타이드는 자기조립을 위하여 N 말단에 AcNH 작용기가 결합될 수 있고, C 말단에 CONH_2 작용기가 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 보다 구체적으로 상기 펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 펩타이드일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 기반으로 아밀로이드 섬유를 합성하였다. 당분야에 따르면, 상기 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또한 자기조립을 통하여 아밀로이드 섬유를 형성할 수 있다(Nat. Chem. 2014, 6, 303-309 참고).
- [0043] 더불어 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 펩타이드 뿐만 아니라, 상기 펩타이드와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이를 포함할 수 있다.
- [0044] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여,

아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [0045] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).
- [0046] 펩타이드의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0047] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 펩타이드를 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트 (+3.0 $\pm$ 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 $\pm$ 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).
- [0048] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0049] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0050] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 펩타이드는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 펩타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있는 어떤 방법이라도 제한없이 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로는 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC(9-fluorenylmethoxycarbonyl) 또는 T-BOC(tert-butyloxycarbonyl) 화학법이 포함되나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(예: Biosearch 또는 Applied Biosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 이 기술분야에서 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩타이드'라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.
- [0052] 상기 펩타이드는 응집되어 섬유(fiber) 구조를 형성할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 자기조립을 통하여 표면에 아밀로이드 잔기가 노출된 섬유 형태로 응집됨을 확인하였다.
- [0053] 본 발명의 일실시예에 따르면 본 발명의 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유에 있어서, 상기 펩타이드의 첨가로 인해 아밀로이드 섬유의 구조가 더 조밀하고 단단하게 형성되었으며, 수분 산성(water

dispersibility)를 크게 조절할 수 있음을 확인하였다.

- [0054] 또한 본 발명의 또다른 실시예에 따르면 본 발명의 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유의 존재하에서 합성된 멜라닌 유사체(melanin-like species)에 있어서, 상기 펩타이드는 멜라닌 유사체의 형성을 촉진할 뿐만 아니라 그 안에 있는 짝을 이루지 않은 전자의 함량을 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명의 또다른 실시예에 따르면 아밀로이드 섬유의 형성에 있어서, 구리 존재시 더 성숙한 크로스(cross) β -시트(β -sheet) 구조를 형성할 수 있음을 확인한 바, 구리가 아밀로이드 섬유의 형성을 지원함을 확인하였다.
- [0055] 또한 표면에 노출된 아미노산 잔기와 구리가 결합된 아밀로이드 섬유가 펩타이드만 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유보다 더 우수한 멜라닌 유사체의 형성 가속화 효과를 나타냄을 확인하였으며, 구리는 특히 도파민의 초기 산화를 촉매함으로써 결합을 촉진함을 확인하였다.
- [0056] 종합적으로 도 6(하단)에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유는 표면에 노출된 아미노산 잔기와 결합된 구리를 통해 올리고머 전구체(Oligomeric precursor)로부터 멜라닌 및/또는 멜라닌 유사입자를 합성할 수 있다.
- [0057] 그러므로 본 발명에 따른 멜라닌 합성 촉진용 조성물은 구리(Cu)를 더 포함할 수 있으며, 상기 구리는 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유 표면의 아미노산 잔기와 결합될 수 있고, 상기 결합은 배위 결합(coordination bond)인 것을 특징으로 한다.
- [0058] 한편, 티로시나아제는 모노페놀형(monophenol) 구조 물질을 수산화시켜 카테콜형 구조 물질을 생산하는 일차 산화 반응(monophenolase activity)을 수행한다. 이후, 모노페놀형 구조 물질에서 생변환된 카테콜형 구조 물질은 티로시나아제의 이차 산화 반응(diphenolase activity)에 의해 퀴논형 물질(quinonic compounds)로 생변환된다. 이러한 퀴논형 물질은 라디칼(radical)을 형성하여 빠르게 멜라닌(melanin)을 형성한다.
- [0059] 본 발명의 또다른 실시예에 따르면 본 발명의 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유는 3,5-DBcat(3,5-di-tert-butylcatechol)를 산화시킬 수 있었으며, 표면에 노출된 아미노산 잔기와 구리가 결합된 아밀로이드 섬유는 상기 산화 효과가 크게 가속화됨을 확인하였다. 더불어 본 발명의 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유 및 표면에 노출된 아미노산 잔기와 구리가 결합된 아밀로이드 섬유를 도파민(dopamine) 용액과 반응시킨 결과, 이를 산화시켜 멜라닌 유사체를 형성할 수 있음을 확인하였다.
- [0060] 따라서 본 발명에 따른 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 카테콜(Catechol)을 산화시킬 수 있으므로, 티로시나아제(tyrosinase) 기능을 가짐으로써 멜라닌을 합성할 수 있다.
- [0061] 더불어 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 합성 촉진용 촉매를 제공한다:
- [0062] XHXHXYX(서열번호 1)
- [0063] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.
- [0064] 상기 촉매에 있어서, 상기 펩타이드(서열번호 1)에 대한 설명은 앞서 기술한 바와 같다.
- [0065] 본 발명에 따른 촉매는 포함된 펩타이드의 특성을 기반으로, 자기조립될 수 있으며 멜라닌을 합성하는데 사용될 수 있다.
- [0066] 더불어 본 발명에 따른 촉매는 구리를 더 포함할 수 있고 상기 구리는 펩타이드가 응집되어 형성된 아밀로이드 섬유 표면의 아미노산 잔기와 결합된 것을 특징으로 한다.
- [0067] 또한 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다:
- [0068] XHXHXYX(서열번호 1)
- [0069] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.
- [0070] 상기 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상은 백반증(vitiligo), 색소침착저하증(hypopigmentation), 백색증(albinism), 부분 백색증(piebaldism), 탈색모반(nevus depigmentosus), 특발 물방울 모양 멜라닌 저하증(idiopathic guttate hypomelanosis), 바덴부르크 증후군(Waardenburg syndrome), 보그트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome), 광노화(photoaging), 일광각화증(solar keratosis), 어루러기(pityriasis versicolor), 백색비강진(pityriasis alba), 이토 멜라닌 저하증

(hypomelanosis of ito) 및 백모증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 백모증은 멜라닌 생성 과정인 DOPA-quinone에서 작용이 멈추어 모발이 각화되어 위로 올라오면서 티로시나아제를 생성하지 못하여 더 이상 산화 작용이 이루어지지 못하는 상태를 의미한다. 또는 색소 형성효소의 방해 물질의 존재로 멜라닌 형성이 저해되거나, 멜라닌 과립의 형태 변화에 의해 활성 티로신 산화효소의 작용에 변화가 발생하는 경우를 의미한다.

[0071] 상기 백모증은 머리의 모근 및 모낭, 머리카락 및 속눈썹과 겹눈썹, 수염, 거드랑이, 음모, 신체 전반에 모근 및 모낭이 있는 모든 부위의 모발에서 야기될 수 있다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품을 의미한다. 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 피부 외용제 및 개인위생용품도 포함한다.

[0073] 본 발명의 조성물을 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 목적으로 의약외품에 포함시킬 경우, 상기 조성물을 그대로 포함하여 사용하거나 다른 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정할 수 있다.

[0074] 본 발명의 의약외품은 특별히 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 크림제, 로션제, 에어로졸제, 샴푸제, 젤제 또는 팩제의 형태로 제조되어 사용될 수 있다.

[0075] 크림제, 연고제, 샴푸제, 젤제 또는 팩제의 경우에 있어서는, 백색 바셀린, 황색 바셀린, 라놀린, 표백 밀랍, 세탄올, 스테아릴알코올, 스테아르산, 경화유, 겔화 탄화수소, 폴리에틸렌글리콜, 유동 파라핀, 스쿠알란 등의 기재; 올레산, 미리스트산이소프로필, 트리이소옥탄산글리세린, 크로타미톤, 세바크산디에틸, 아디프산디이소프로필, 라우르산헥실, 지방산, 지방산 에스테르, 지방족 알코올, 식물유 등의 용제 및 용해 보조제; 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸하이드록시톨루엔, 부틸하이드록시아니솔 등의 산화 방지제; 파라하이드록시벤조산에스테르 등의 방부제; 글리세린, 프로필렌글리콜, 히알루론산나트륨 등의 보습제; 폴리옥시에틸렌유도체, 글리세린 지방산 에스테르, 자당 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 프로필렌글리콜 지방산 에스테르, 레시틴 등의 계면 활성제; 카르복시비닐 폴리머, 잔탄검, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨염류, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 증점제 등이 있다.

[0076] 에어로졸제의 경우에 있어서는, 연고제, 크림제, 젤제, 현탁제, 유제, 액제 및 로션제 등의 조제에 사용되는 백색 바셀린, 황색 바셀린, 라놀린, 표백 밀랍, 세탄올, 스테아릴알코올, 스테아르산, 경화유, 겔화 탄화수소, 폴리에틸렌글리콜, 유동 파라핀, 스쿠알란 등의 기재; 올레산, 미리스트산이소프로필, 아디프산디이소프로필, 세바크산이소프로필, 트리이소옥탄산글리세린, 크로타미톤, 세바크산디에틸, 라우르산헥실, 지방산, 지방산 에스테르, 지방족 알코올, 식물유 등의 용제 및 용해 보조제; 토코페롤 유도체, L-아스코르브산, 디부틸하이드록시톨루엔, 부틸하이드록시아니솔 등의 산화 방지제; 파라하이드록시벤조산에스테르 등의 방부제; 글리세린, 프로필렌글리콜, 히알루론산나트륨 등의 보습제; 폴리옥시에틸렌 유도체, 글리세린 지방산 에스테르, 자당 지방산 에스테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 프로필렌글리콜 지방산 에스테르, 레시틴 등의 계면 활성제; 카르복시비닐 폴리머, 잔탄검, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨염류, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 증점제; 추가로 각종 안정제, 완충제, 교미제, 현탁화제, 유화제, 방향제, 보존제, 용해 보조제, 그 밖의 적당한 첨가제를 배합할 수 있다. 이 외에도 필요에 따라 안정제, 보존제, 흡수 촉진제, pH 조정제, 그 밖의 적당한 첨가제를 배합할 수 있다.

[0077] 더불어 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다:

[0078] XHXHXYX(서열번호 1)

[0079] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

[0080] 또한 본 발명은 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [0081] 본 발명에 따른 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 건강보조식품(health supplement) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분말제, 정제, 캡슐제, 환제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0082] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드 자체를 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취하거나 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 할 수 있다. 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0083] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마멀레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 펩타이드를 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0084] 또한 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품 첨가물 공전"에 수록된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제 제류들을 들 수 있다.
- [0085] 본 발명의 식품 조성물에 있어, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 바람직하게 식품 조성물 대비 0.00001~50 중량%로 포함될 수 있다. 상기 함량이 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [0086] 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 조성물이 음료로 제조될 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g이다.
- [0088] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0089] 본 발명에 있어서, “건강보조식품” 또는 “건강기능식품(health functional food)”이란 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0090] 또한 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다:
- [0091] XHXHXYX(서열번호 1)
- [0092] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.
- [0093] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안

료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

- [0094] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.
- [0095] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.
- [0096] 보다 바람직하게는 헤어토닉, 헤어크림, 헤어로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어스프레이, 헤어에어 쏘, 폼마드, 분말 젤, 헤어팩, 헤어트리트먼트, 눈썹발모제, 속눈썹 발모제 또는 속눈썹 영양제의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로 플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 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.
- [0100] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 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.
- [0101] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 펩타이드 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방, 개선 또는 치료 성분을 비롯하여 피부 상태 개선에 도움을 주는 성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 상기 성분은 히알루론산, 부틸렌글라이콜(Butylene Glycol), 글리세린(Glycerin), 아미노산(amino acid), 트레할로스(trehalose), 코지산(kojic acid) 및 이의 유도체, 알부틴(arbutin), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 이의 유도체, 하이드로퀴논(hydroquinone) 및 이의 유도체, 레조르시놀(resorcinol), 2,7-디니트로인다졸(2,7-dinitroindazole), 아데노신(adenosine), 레티놀(retinol), 레티닐팔미테이트(retinyl palmitate), 폴리에톡실레이티드레티나마이드(polyethoxylated retinamide), 효모, 다이펩타이드(dipeptide), 팔미토일 올리고펩타이드(Palmitoyl oligopeptide) & 팔미토일 테트라펩타이드-7(Palmitoyl Tripeptide-7), 아세틸 헥사펩타이드(acetyl hexapeptide), EGF(epidermal growth factor) 또는 덩굴굴, 쌀, 감초, 시어버터, 알로에 베라, 코코넛, 올리브, 아보카도와 같은 식물 추출물 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 펩타이드 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 화장료 조성물로 이용하는 경우, 펩타이드는 화장료 조성물의 총 중량에 대하여 0.001~50.0 중량%의 양으로 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 0.005~10.0 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 그 함량이 0.001 중량% 미만일 경우에는 실질적인 펩타이드 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방, 개선 또는 치료 효과를 기대하기 어려우며, 50 중량%를 초과할 경우에는 화장학적 효과 대비 제조 비용이 상승하는 문제점이 발생할 수 있다.
- [0104] 또한, 본 발명의 펩타이드 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선용 화장료 조성물은 그 제형에 달리하여 애완동물용으로 사용할 수 있다. 예를 들어, 애완동물용 샴푸 및 애완동물용 린스 등과 같이 용

액, 솔젤, 에멀전, 오일, 왁스, 에어졸 등 다양한 형태로 제조될 수 있고, 애완동물의 피부에 자극이 적고 보습력이 탁월한 중성의 세제를 첨가하여 제조할 수 있다.

[0105] 더불어 본 발명은 하기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 위한 사료첨가용 조성물을 제공한다:

[0106] XHXHXYX(서열번호 1)

[0107] 상기 X는 I, V 및 L로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나임.

[0108] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹는 임의의 천연 또는 인공 구정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미하며, 본 발명에 따른 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 위한 사료 첨가용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0109] 본 발명에서 용어, "사료첨가용 조성물"은 "사료첨가제"를 의미할 수 있으며, 이는 동물에 있어 질병 증상의 완화, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다.

[0110] 본 발명의 사료첨가용 조성물은 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0111] 상기 사료 중 농후사료로는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0112] 상기 사료 중 조사료로는 야초, 목초, 풋배기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋배기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0113] 본 발명에 따른 상기 사료첨가용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 첨가하여 제조 가능하다.

[0114] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 멜라닌 형성 및 기능 저하에 의한 질환 또는 증상의 예방 또는 개선을 목적으로 하는 개체라면 제한없이 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간 동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.

[0115] 또한 본 발명은 하기 단계를 포함하는 멜라닌 유사체의 제조방법을 제공한다:

[0116] (a) 도파민(dopamine) 또는 L-dopa을 포함하는 용액과 본 발명에 따른 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 반응시켜 멜라닌 유사체를 제조하는 단계;

[0117] (b) 상기 제조된 멜라닌 유사체를 분리하는 단계.

[0118] 상기 반응은 1 내지 40℃에서 100 내지 300 rpm으로 5분 내지 1시간동안 수행할 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 35℃의 실온에서 250 rpm으로 5분 내지 30분동안 수행할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 1 내지 35℃의 실온에서 250 rpm으로 10분동안 수행할 수 있다.

[0120] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가

적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0122] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0124] 실시예 1. 아밀로이드 섬유 형성능의 펩타이드 합성

[0125] 1-1. 재료 및 시약 구입

[0126] 링크 아미드 MBHA 수지 HL(Rink Amide MBHA resin HL)은 Novabiochem에서 구입하였고, 99% 피페리딘(Piperidine), 0.5M HEPES(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonic acid), pH 8 용액 및 99% 3,5-디-tert-부틸카테콜(3,5-di-tert-butylcatechol)은 Alfa Aesar에서 구입하였다. 더불어 Fmoc-보호된 아미노산(Fmoc-protected amino acids)와 99% DIPEA(N,N-diisopropylethylamine)은 TCI(일본)에서 구입하였다. 99.5% 아세트산 무수물(acetic anhydride), 99% CuSO₄(copper(II) sulfate) 및 인텟스텐산 수화물(H₃[P(W₃O₁₀)₄] · H₂O)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 펩타이드 합성(99.8%)을 위한 99% DMF(*N,N*-dimethylformamide)는 Acros Organics에서 구입하였다. 99% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 메틸 알코올(HPLC 등급), 아세토니트릴(HPLC 등급), 물(HPLC 등급), 99.5% 디클로로메탄(dichloromethane) 및 99.5% 에틸 에테르(ethyl ether)는 삼천(한국)에서 구입하였다.

[0128] 1-2. 수동 고체상 펩타이드 합성법(manual solid phase peptide synthesis)을 이용한 펩타이드 합성

[0129] 금속 배위 능력(metal-coordinating ability)을 가진 아밀로이드 구조로 자가 조립(self-assemble)하도록 설계된 짧은 펩타이드인 IHY(IHIHIYI(서열번호 2))를 수동 고체상 펩타이드 합성법을 이용해 합성하였다. 이때 자가 조립을 위하여 상기 IHY의 N 말단에는 AcNH 작용기를 결합시켰고, C 말단에는 CONH₂ 작용기를 결합시켰다.

[0130] 이를 위하여 링크 아미드 MBHA 수지를 사용하였고, 반응은 상온에서 진행하였다. Fmoc-탈보호(deprotection)은 20% 피페리딘의 DMF 용액을 사용하여 수행하였다. 커플링 시약(coupling reagent)는 DMF에 Fmoc-보호된 아미노산, HBTU(2-(1 H -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), DIPEA를 혼합하여 제조하였고, 커플링 반응은 실온에서 2시간 소요되었다. Fmoc-탈보호 및 커플링 반응은 원하는 시간동안 반복하였고, N-말단(N-terminal)은 DMF의 아세트산 무수물 및 피리딘으로 아세틸화되었다. 트리플루오로아세트산, 트리이소프로필실란(triisopropylsilane) 및 DCM(95:2.5:2.5의 비율로 혼합, v/v)을 함유하는 절단 혼합물(cleavage cocktail)을 실온에서 2시간 동안 처리하여 절단 및 측쇄 탈보호(side-deprotection)를 달성하였다. 생성된 용액을 여과하고 감압 건조한 후 디에틸 에테르에 침전시켰다. 침전물을 여과하여 조 생성물(crude product)을 얻은 다음 C18 컬럼(Thermoscientific, 250 × 4.6 mm, 5 μm)이 있는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(reverse-phase high-performance liquid chromatography)를 사용하여 정제하였다. 이동상(mobile phase)는 탈이온수(DI water)(0.1% 트리플루오로아세트산, v/v; 용액 A) 및 CH₃CN(0.1% 트리플루오로아세트산, v/v; 용액 B). 조 생성물을 11번에 걸쳐 용액 B의 30%에서 34%로의 구배로 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조하여 원하는 생성물인 백색 고체(185 mg, 50%)를 수득하였다. 고분해능 질량 분석기(High-resolution mass spectrometry): C₄₇H₇₃N₁₂O₉ [M+H]⁺ = 949.5618에 대한 계산된 m/z(ESI⁺), 실측치: 949.5603.

[0132] 실시예 2. 아밀로이드 섬유의 형성 및 특성 분석 방법

[0133] 2-1. 아밀로이드 섬유의 형성

[0134] 상기 실시예 1에서 합성한 IHY를 응집시켜 아밀로이드 섬유를 형성하였다.

[0135] 먼저, 정제된 펩타이드를 10mM HCl 용액에 용해시켜 스톡 용액(stock solution)을 제조하였다. 사용하기에 앞서, 이에 침전물 또는 티오플라빈 T 신호(thioflavin T signal)가 없으므로 단량체 상태(monomeric state)임을 확인하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

[0136] Cu^{II} 결합 IHY 섬유(이하, Cu^{II}-IHY로 기재)는 50 mM 물, 펩타이드 스톡 용액 및 25 mM HEPES 완충액(pH 8.2)에

CuSO₄를 혼합하여 제조하였다. 상기 펩타이드의 작업 용액(working solution)의 최종 농도는 500 μM이었다. 아밀로이드 섬유가 형성되었는지 확인하기 위하여, 작업 용액을 37℃, 200rpm으로 배양하였다. 펩타이드를 응집시킨 아밀로이드 섬유(이하, IHY로 기재) 제조의 경우, 용액에 CuSO₄를 첨가하지 않았다.

1시간 인큐베이션(incubation)한 후 용액을 원심분리하고(15000 rpm(20400 g), 15분) 상청액을 증류수로 교체하였다.

2-2. 아밀로이드 섬유의 특성 분석 방법

2-2-1. 카테콜 산화 동역학 분석(Catechol oxidation kinetic assay)

기질인 3,5-DBcat(3,5-di-*tert*-butylcatechol)의 산화로 인한 흡광도의 증가를 37℃에서 플레이트 판독기로 모니터링하였다. 405 nm에서 다른 농도의 기질(0.2 mM, 0.4 mM, 0.8 mM, 1 mM 및 2 mM)의 흡광도를 모니터링하였다. 이에 앞서 메탄올에 함유된 3,5-DBcat 스톱 용액(4 mM)을 준비하였다. Cu^{II}-IHY 용액(500 μM, 7.2 μL)과 다양한 부피의 3,5-DBcat 용액을 혼합하고 마지막으로 메탄올을 첨가하여 최종 부피가 180 μL가 되도록 하였다. 스펙트럼은 10분마다 수집하였다. 반응의 초기 속도는 1900 M⁻¹cm⁻¹에서 측정된 3,5-디-터트-벤조퀴논(di-*tert*-benzoquinone)의 흡광 계수(extinction coefficient)를 사용하여 계산하였다. 미카엘리스 멘텐 분석(Michaelis-Menten analysis)은 데이터를 하기 수학적 1에 적용하여 수행하였다.

[수학적 1]

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} = \frac{[E_t] \times k_{cat} \times [S]}{K_m + [S]}$$

효소의 총 농도[Et]는 IHY 단량체의 농도로 설정하였으며, 실제 활성 부위의 정확한 농도는 반영하지 않았다. 상기 수학적 1에 있어서, V_{max}는 초기 반응 속도, k_{cat}는 효소의 촉매반응 속도, K_m은 효소와 기질의 결합에 관한 상수이다.

2-2-2. 멜라닌 유사체(melanin-like species)의 합성 및 반응의 동역학 분석

구리 용액은 원하는 농도에 도달할 때까지 CuSO₄ 스톱 용액(10mM)을 증류수로 희석하여 준비하였다.

Cu^{II}-IHY, Cu^{II} 및 IHY의 수용액을 큐벳에서 다양한 몰비(molar ratio)로 도파민(dopamine) 용액과 혼합한 후, 이를 실온에서 250 rpm의 궤도 진탕기(orbital shaker)에 넣고 10분간 반응시켰다.

흡광도를 측정하기 전에 형성된 멜라닌 유사체의 분산을 위해 큐벳을 조심스럽게 교반하였다. 역학 분석은 데이터를 하기 수학적 2의 로지스틱 함수(logistic function)에 적용하여 수행하였다.

[수학적 2]

$$A_{450}(t) = A_{max} \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{t}{t_0}} \right)$$

상기 수학적 2에 있어서, A_{max}는 최대 흡수값(maximum absorption value)을 의미하고, t₀는 곡률 부호(curvature of sign)가 반전되는 지점을 의미한다. 반응의 초기 속도(initial velocity)는 0과 1시간 사이의 각 스펙트럼의 기울기를 측정하여 획득하였다.

2-2-3. 원형 이색성 분광법(Circular dichroism spectroscopy)

Jasco J-715 CD 분광계를 사용하여 CD 스펙트럼을 수집하였다. 샘플 농도는 5mM HEPES(pH 7.8)에서 0.4 mg/mL

이었다. 연속 스캔 모드(continuous scan mode (100 nm/분))를 사용하여 실온에서 측정하였다.

[0157] **2-2-4. FT-IR(Fourier-transform infrared) 분광법**

[0158] Cu^{II} -IHY 및 IHY의 섬유를 원심분리하고(15000 rpm, 15분) 상청액을 제거하였다. 그런 후 25mM HEPES 완충용액 (pH 8.2)으로 세척한 후, 샘플을 동결건조하였다. 다양한 물비의 촉매로 합성된 멜라닌 유사체도 원심분리 (15000 rpm, 15분)하여 상청액을 제거한 후 동결건조하였다. 모든 샘플은 KBr을 사용하여 팔레트(pallet)로 만들었다. FT-IR 스펙트럼은 Spectrum One System (Perkin-Elmer)을 통해 수집하였다.

[0160] **2-2-5. 투과전자현미경(Transmission electron microscopy, TEM microscopy)**

[0161] 투과전자현미경 분석을 위해 용액내 존재하는 염을 제거하였고, 피브릴(fibril)이 포함된 샘플을 증류수로 희석하였다. 각 샘플을 Formvar/carbon 200 코팅된 구리 그리드(copper grid)에 배치하였다. 샘플을 3분 동안 그리드에 흡착시킨 후, 증류수로 반복 세척하고 건조하였다. 그리드를 1% 인텅스텐산 수화물로 5분 동안 염색한 후, 염에서 제거하고 공기 중에서 건조시켰다. 이를 JEM-2100F를 사용하여 분석하였다.

[0163] **2-2-6. 전자 상자기 공명 분광법(Electron paramagnetic resonance, EPR spectroscopy)**

[0164] EPR 스펙트럼은 저온 유지 장치가 장착된 JEOL X 밴드 분광계(JES-FA100)를 사용하여 80K에서 기록하였다. IHY, Cu^{II} 또는 Cu^{II} -IHY를 사용하여 촉매없이 형성된 멜라닌 유사체의 4가지 고체 샘플을 각각 EPR 튜브로 옮기고 액체 질소에서 급속 동결하였다. g 값은 Mn^{2+} 마커를 사용하여 보정하였으며, EPR 매개변수(g 값)의 실험 오차는 ± 0.001 이었다.

[0165] EPR 측정을 위한 실험 매개변수는 다음과 같다: 마이크로파 주파수(microwave frequency)= 9.025 GHz, 마이크로파 전력(microwave power)= 0.998 mW, 변조 진폭(modulation amplitude)= 10 G, 게인(gain) 1×10^4 , 변조 주파수(modulation frequency)= 100 kHz, 시정수(time constant)= 30.96 ms 및 변환 시간(conversion time)= 85.00 ms.

[0167] **2-3. 아밀로이드 섬유 특성 확인**

[0168] 상기 실시예 2-1에서 제조한 아밀로이드 섬유를 TEM(transmission electron microscopy), CD 및 FT-IR 분광법을 통해 확인하였다.

[0169] 그 결과 도 1(a)에 나타난 바와 같이, Cu^{II} 가 있거나 없는 IHY의 CD 스펙트럼은 β -시트(β -sheet) 구조의 특징(signature)을 나타냈다(약, 220nm의 음의 타원율(negative ellipticity)). 이는 아밀로이드 섬유가 Cu^{II} 에 관계없이 IHY에 의하여 즉시 형성됨을 나타낸다. 더불어 Cu^{II} 가 존재하면 밴드 강도가 증가되었으며, 이는 더 성숙한 크로스(cross) β -시트 구조의 형성을 나타낸다. 이를 통해 아밀로이드 섬유의 형성에 있어서, Cu^{II} 가 지원하는 역할을 함을 확인하였다. 마찬가지로 TEM 이미지를 통해 Cu^{II} 결합 IHY 섬유(Cu^{II} -IHY)는 너비가 10~12nm인 아밀로이드 섬유의 특징적인 형태를 보임을 확인하였다.

[0170] Cu^{II} -IHY는 2,6-디메톡시페놀(2,6-dimethoxyphenol)의 산화와 파라옥손(paraoxon)의 가수분해를 촉매하는 것으로 알려져 있으므로, 이를 통해 Cu^{II} -IHY 섬유가 카테콜 함유 분자의 산화 및 후속 멜라닌 유사 결합에도 가능할 것으로 예상되었다.

[0171] 3,5-DBcat을 카테콜 산화에 대한 프로브(probe)로 사용한 결과, 도 1(b)와 같이, 본 발명의 Cu^{II} -IHY에 의하여 산화된 형태의 3,5-DBcat은 가시광선 범위에서 독특한 흡광도 밴드를 나타내는 것을 확인하였다.

[0173] 실시예 3. Cu^{II} -IHY 복합체의 기능 확인

[0174] 3-1. 촉매 활성 확인

[0175] 더불어 도 2(a)에 나타낸 바와 같이, Cu^{II} -IHY가 존재시 3,5-DBcat의 산화가 크게 가속화됨을 확인하였다. 각 조건에서 기질의 농도에 대한 반응의 초기 속도를 플롯팅(plotting)한 결과, 도 2(b)와 같이, Cu^{II} 및 IHY 첨유는 대조군 반응과 비교하여 반응을 가속화하는데 독립적으로 활성을 보임을 확인하였다. 플롯에서 파생된 k_{cat} , k_m 및 k_{cat}/k_m 의 값은 도 2(c)에 나타내었다.

[0176] Cu^{II} -IHY의 V_{max} 및 k_{cat}/k_m 값은 각각 $5.548 \times 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$, $106.68 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이었으며, 상기 값은 Cu^{II} 및 IHY의 값의 합보다 높았다(Cu^{II} 의 경우, $2.016 \times 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$ 및 $34.52 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; IHY의 경우, $4.355 \times 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$, $15.25 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

[0177] 이를 통해 Cu^{II} 는 단독으로 3,5-DBcat의 산화에 대해 촉매 활성을 보이거나, IHY 첨유와 조정될 때 촉매 효율이 향상됨을 확인하였다.

[0179] 3-2. 멜라닌 생성에서 미치는 영향 확인

[0180] 더불어 Cu^{II} -IHY가 카테콜 유도체의 산화적 결합을 촉진할 수 있는지 확인하였다. 이를 위하여, 호기성 조건에서 멜라닌 유사체로 자가 결합하는 도파민을 가장 단순한 카테콜아민(catecholamine)으로 선택하였다. 자발적 결합을 최소화하기 위하여 중성 pH로 조정하면서 Cu^{II} , IHY 첨유 및 Cu^{II} -IHY를 도파민 용액에 추가하였다.

[0181] 멜라닌 유사체의 형성(즉, 도파민의 산화적 결합)은 자외선(ultraviolet, UV) 및 가시광선(visible) 범위에서 광을 광범위하게 흡수하기 때문에 육안으로 쉽게 인식할 수 있다.

[0182] 도 3(a)에 나타낸 바와 같이, Cu^{II} 의 존재 여부에 관계없이 IHY 첨유 및 Cu^{II} -IHY로 형성된 멜라닌 유사체는 IHY 첨유가 없는 멜라닌 유사체보다 더 쉽게 분산됨을 확인하였다.

[0183] 멜라닌 유사체의 형성을 정량적으로 분석하기 위하여, 각 조건에 대해 450nm(A_{450})에서 시간에 따른 흡광도 변화를 플롯팅하였다. 그 결과 도 3(b)와 같이, 3,5-DBcat 산화 결과와 유사하게 Cu^{II} , IHY 첨유 및 Cu^{II} -IHY의 모든 조건이 그 정도가 다르기는 하지만, 반응을 가속화함을 확인하였다. 특히, IHY 첨유 자체도 촉매 활성을 나타내었다. 특히 3,5-DBcat 산화의 경우, Cu^{II} -IHY가 멜라닌 유사체의 형성을 가속화하는데 가장 우수한 효과를 나타내었으며, 이를 통해 Cu^{II} 와 IHY 첨유가 결합될 때 시너지 효과가 나타남을 확인하였다.

[0184] 더불어 각 조건에서 A_{450} 값의 시간적 변화를 로지스틱 함수에 접목시켰다. 각 조건에서 산화 결합 과정의 운동 특성을 비교하기 위해, 초기 증가율(initial increasing rate) A_{450} 및 A_{450} 의 최대 값으로 정의된 적합 동역학 프로파일(fitted kinetic profiles)에서 V_0 , A_{max} 값을 각각 추출하였다. V_0 와 A_{max} 는 각각 도파민의 초기 산화를 위한 촉매의 효율성과 멜라닌 유사체의 구조를 수용하고 조절할 수 있는 기능적 지지체로서의 능력을 반영한다. 그 결과 도 3(c) 및 도 3(d)에 나타낸 바와 같이, V_0 및 A_{max} 값은 IHY 첨유, Cu^{II} 또는 Cu^{II} -IHY의 모든 경우에서 증가하였으며, 특히 Cu^{II} -IHY가 가장 높은 개선을 나타내었다.

[0186] 3-3. IHY 존재에 따른 멜라닌 유사체의 구조적 특징

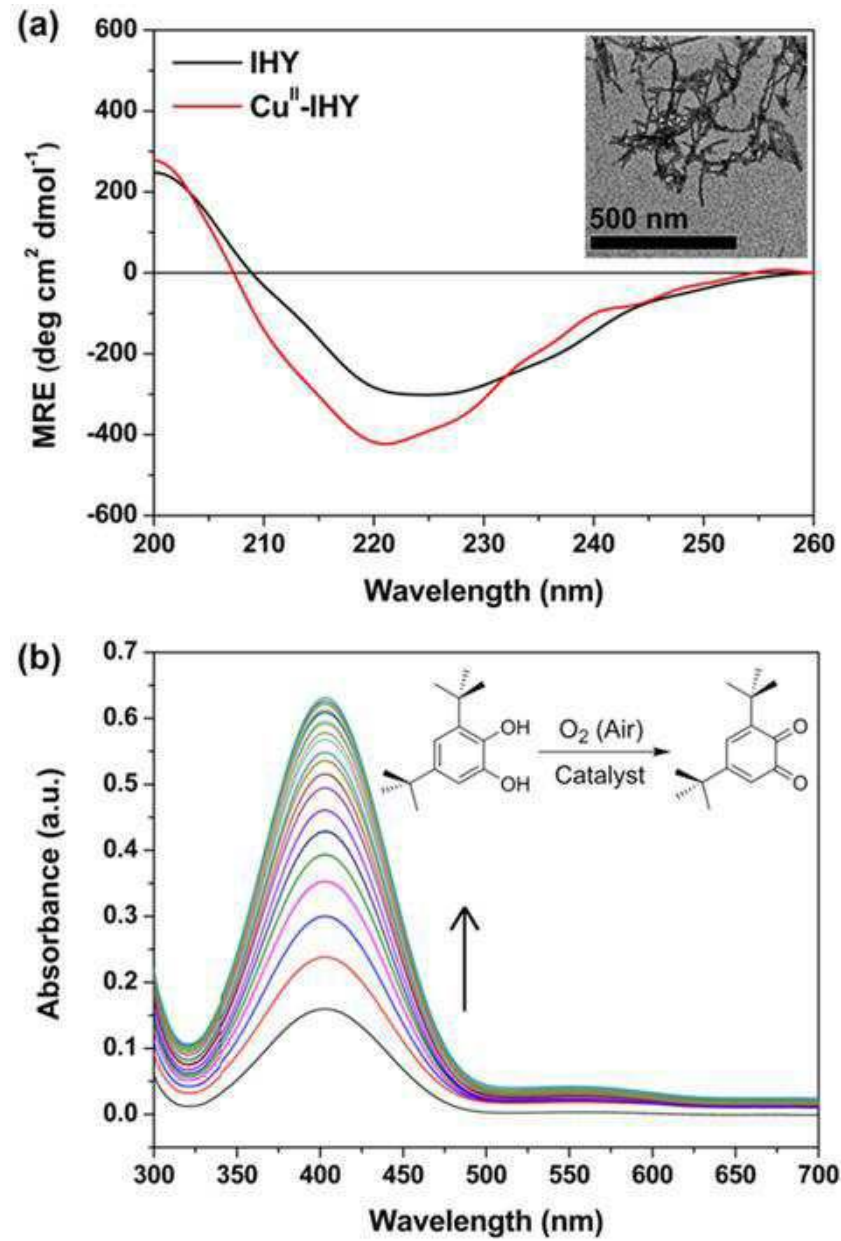
[0187] 더불어 Cu^{II} -IHY 복합체의 다른 기능을 확인하였다. 먼저 Cu^{II} , IHY 및 Cu^{II} -IHY 존재 하에 합성된 멜라닌 유사체를 특성화하기 위해 FT-IR 분광법을 수행하였다. 그 결과 도 4(a)에 나타낸 바와 같이, 멜라닌 유사체 자체에서 수집된 FT-IR 스펙트럼과 Cu^{II} 가 있는 스펙트럼은 유사한 경향을 보였으며, 1540cm^{-1} 및 1630cm^{-1} 주변의 밴드를 표시하였다.

- [0188] 대조적으로 IHY 및 Cu^{II} -IHY에서 수집된 FT-IR은 1625 cm^{-1} 에서 β -시트 구조의 독특한 밴드를 포함하기 때문에 다른 것들과 결정적으로 달랐다. 이는 아밀로이드 섬유가 멜라닌 유사체를 형성하는 동안 구조적으로 손상되지 않은 상태로 남아있음을 시사한다.
- [0189] 아밀로이드 구조의 온전함은 TEM 분석을 통해서도 확인하였다. 도 4(b)와 같이, IHY 섬유가 없는 멜라닌 유사체는 Cu^{II} 의 존재와 관계없이 무정형(amorphous) 및 구형(spherical) 구조를 나타내었다. 반면, IHY 또는 Cu^{II} -IHY를 추가하면 어두운 멜라닌 유사체로 캡슐화된 두꺼운 원섬유(fibrillar) 구조가 형성됨을 확인하였다. 이러한 원섬유 합성물(composite)은 원래의 IHY 섬유보다 훨씬 더 두꺼운 구조로(100~200 nm), 여러 섬유가 함께 묶여 있음을 증명한다. 따라서 IHY 섬유의 존재는 아밀로이드 섬유의 우수한 기계적 특성을 이용하여 분자적으로 더 조밀하고 단단한 구조를 형성할 수 있음을 확인하였다. 또한 이를 통해 IHY를 함유한 멜라닌 유사체가 수용액에서 더 잘 분산되는 것으로 예상되었다.
- [0191] **3-4. 멜라닌 유사체에서 짝을 이루지 않은 전자의 배위 환경(coordination environment) 확인**
- [0192] 멜라닌 유사체에서 Cu^{II} 및 Cu^{II} -IHY와 짝을 이루지 않은 전자의 배위 환경을 조사하기 위하여, EPR 분광법을 수행하였다. 일반적으로 EPR 분석은 라디칼 종(radical species)을 포함하는 상자성 종(paramagnetic species)의 특성, 스핀 상태(spin-state), 산화 상태 및 구조(기하학(geometry))를 결정하는데 사용된다.
- [0193] 상자성 종의 EPR 신호는 상자성 종의 핵 스핀(nuclear spin)과 결합되어 각 EPR 신호를 등방성 전자(isotropic electron) Zeeman 및 스핀-핵 상호 작용(spin-nuclear interaction)에서 여러 신호로 분할할 수 있는 특정 g 인자와 함께 나타난다. 따라서 상자성 종의 전자 및 구조적 특성을 결정하려면 결과 g 값과 초미세 결합 상수(hyperfine coupling constants (A))를 확인해야 한다.
- [0194] 도 5에 나타낸 바와 같이, Cu^{II} 및 Cu^{II} -IHY로 합성된 멜라닌 유사체의 EPR 스펙트럼은 $g_{\parallel}/(\text{Cu}^{\text{II}}$ 의 경우, ~2.30, Cu^{II} -IHY의 경우, 2.07) > $g_{\perp}(\text{Cu}^{\text{II}}$ 의 경우, 2.09, Cu^{II} -IHY의 경우, 2.07)>2.00의 축성 신호(axial signal)을 나타냈으며, 이는 반 점유된 바닥 상태 궤도(half-occupied ground-state orbital) $3d_{x^2-y^2}$ 임을 나타내었다.
- [0195] 특히 도 5(a) 및 도 5(b)와 같이, Cu^{II} 존재 하에 합성된 멜라닌 유사체의 $A_{\parallel}$ 값은 120G인 반면, Cu^{II} -IHY 존재 하에 합성된 멜라닌 유사체의 $A_{\parallel}$ 값은 180G인 것으로 확인되었다. Cu^{II} 이온(120G)과 비교하여 Cu^{II} -IHY가 있는 멜라닌 유사체의 더 큰 $A_{\parallel}$ 값(180G)은 구리 주변의 다른 배위 환경에 기인한 것일 수 있으며, 이는 IHY 섬유의 존재하에 $3d_{x^2-y^2}$ 바닥 상태의 기여를 더 크게 만들 수 있다. 따라서 Cu^{II} -IHY가 있는 멜라닌 유사체는 일반적인 정사각형 평면 기하학(square planar geometry)에서 3N10 또는 2N20 배위 환경과 일치하는 반면, Cu^{II} 가 있는 종은 상당히 왜곡된(distorted) 정사각형 평면 기하학에 있을 수 있다.
- [0196] 일반적인 티로시나아제(tyrosinase)에 의한 멜라닌 생성에 대한 개략도(상단) 및 본 발명에 따른 IHY를 기반으로 한 Cu^{II} -배위 아밀로이드 섬유의 멜라닌 유사체 형성에 대한 개략도(하단)를 도 6에 나타내었다. Cu^{II} 에 관계없이 멜라닌 유사체는 세미퀴논 부분(semiquinone moieties)을 포함하는 분자 구성 요소로 인해 영구적인 라디칼 구성 요소를 포함한다. 이러한 성분은 멜라닌 유사체가 우수한 항산화 및 라디칼 소거 활성(radical-scavenging activities)을 나타낼 수 있도록 한다. 더불어 아밀로이드 섬유는 결합을 위한 산화 촉매 및 초분자 주형(supramolecular template)로 동시에 작용할 수 있다.
- [0197] 예상대로 Cu^{II} 없이 만들어진 멜라닌 유사체(정통(authentic) 멜라닌 유사체 및 IHY가 있는 멜라닌 유사체)는 g 값이 2.0051 ± 0.00005 인 짝을 이루지 않은 전자도 포함했다. 더욱이, 안정한 짝을 이루지 않은 전자의 양이 IHY 섬유의 존재에서 크게 향상되었다.
- [0198] 종합하여, 이러한 신호의 상대적 스핀 정량화를 통해 IHY 섬유가 있는 멜라닌 유사체의 스핀 밀도가 IHY 섬유가 없는 멜라닌 유사체의 스핀 밀도보다 10배 이상 큰 것을 추정할 수 있다(도 5(c) 참고). IHY 섬유의 존재는 동일한 질량에서 멜라닌 유사체의 상대적 함량을 감소시키기 때문에 두 샘플의 실제 스핀 함량의 차이는 더 클 것으로 예상되었다. Cu^{II} -IHY의 경우, 멜라닌 유사체에서 쌍을 이루지 않은 전자의 신호는 큰 Cu^{II} 신호의 간섭으로

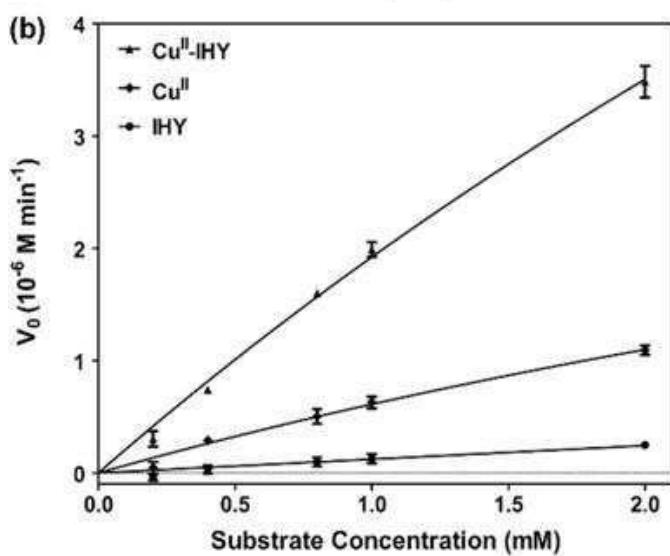
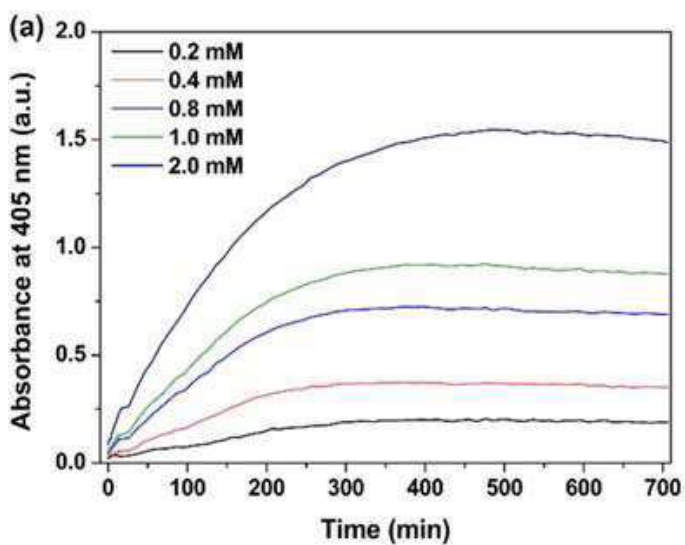
인해 거의 분석할 수 없었다. 이를 통해 IHY 섬유가 멜라닌 유사체의 형성을 촉진할 뿐만 아니라 그 안에 있는 짙을 이루지 않은 전자의 함량을 현저하게 증가시키는 것으로 판단되었다.

도면

도면1



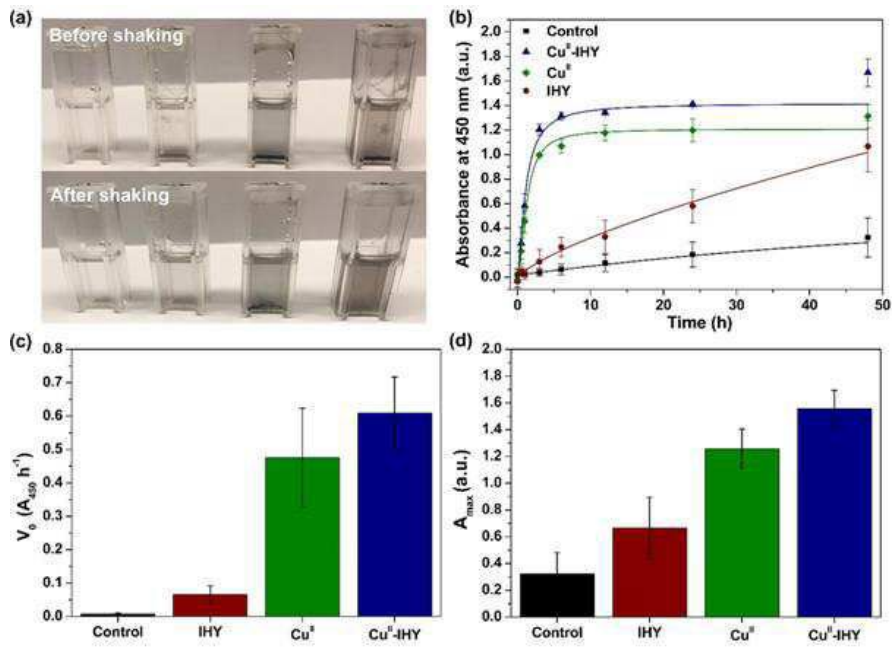
도면2



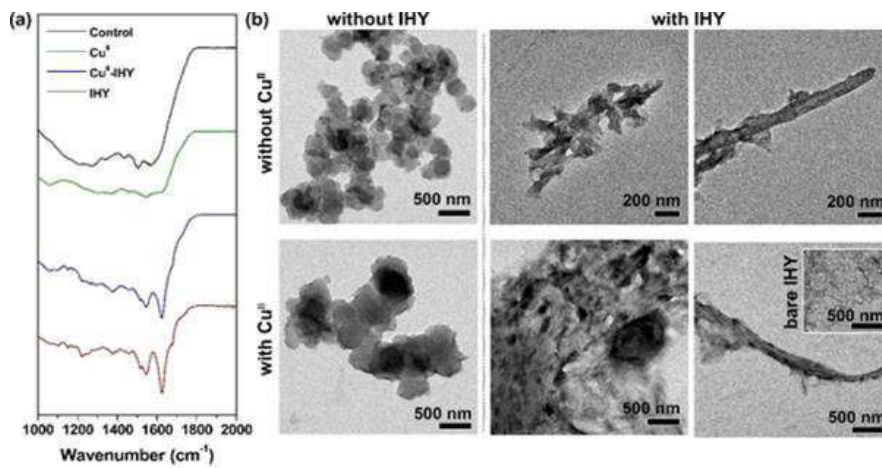
(c)

Catalyst	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	V_{max} (M min^{-1})
Cu^{II} -IHY	106.68 ± 6.93	1.26 ± 0.81	12.11 ± 8.03	5.548×10^{-5}
Cu^{II}	34.52 ± 2.87	0.28 ± 0.06	8.18 ± 2.05	2.016×10^{-5}
IHY	15.25 ± 8.37	0.02 ± 0.004	1.428 ± 0.55	4.355×10^{-7}

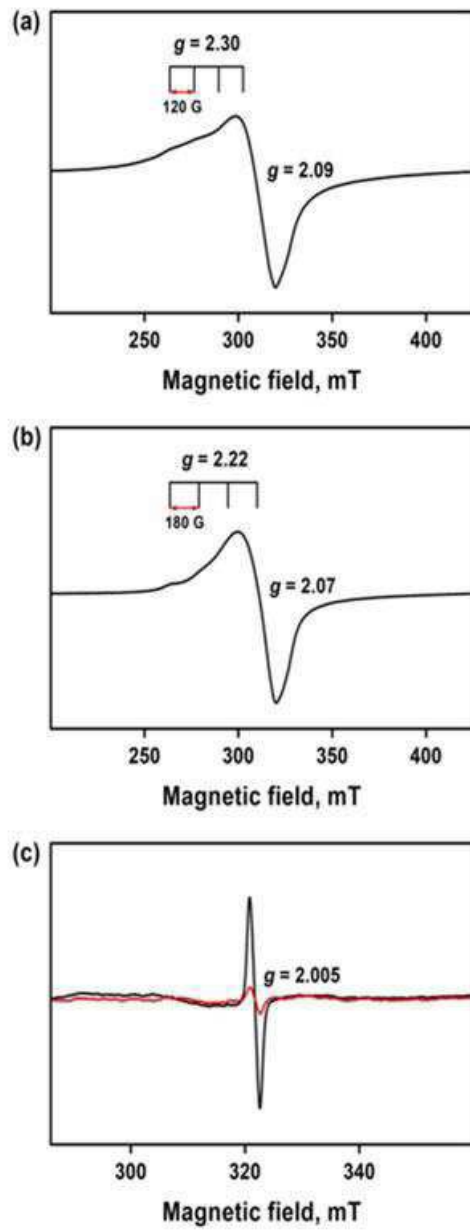
도면3



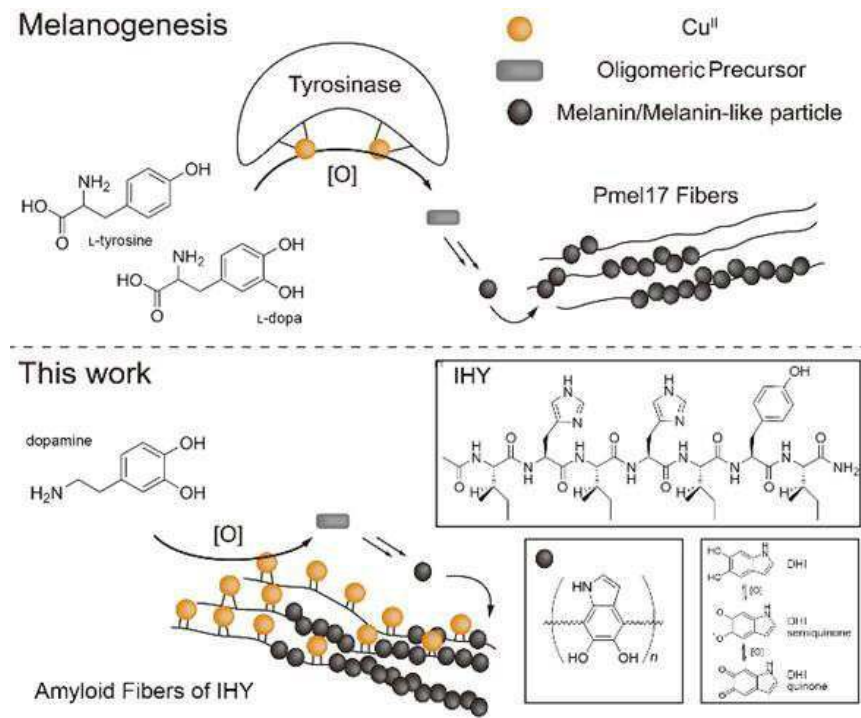
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.