(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0030363
(43) 공개일자 2017년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/426 (2006.01) *A61K 31/17* (2006.01)
A61K 8/46 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/426 (2013.01)
A61K 31/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0127868
(22) 출원일자 2015년09월09일
심사청구일자 2016년09월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
황재성
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 유전공학과 250호 (서천동)
김용현
서울특별시 관악구 관악로30길 27, 112동 601호 (봉천동, 관악푸르지오1단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

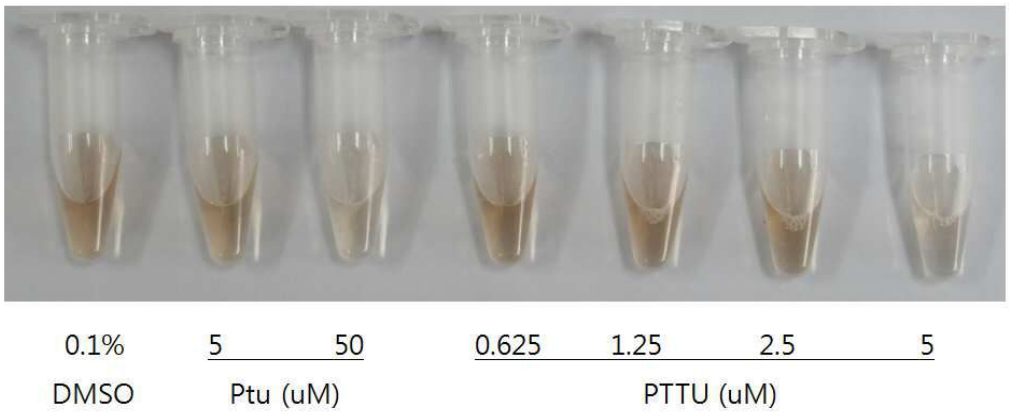
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **N-페닐-N''-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 함유하는 피부 미백용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물 또는 멜라닌의 과다 축적 또는 이상 축적으로 인한 피부 색소성 질환 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나제를 억제하고 멜라닌 생합성 양을 감소시킴으로써 탁월한 미백 효과를 나타낸다. 따라서 약학적 조성물 및 화장료 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 8/466 (2013.01)
A61K 8/49 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
(72) 발명자
장성은
서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1804호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
방승현
서울특별시 송파구 풍성로24길 42, 308동 811호 (풍납동, 현대리버빌)

명 세 서

청구범위

청구항 1

N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(N-phenyl-N'-(1,3-thiazol-2-yl)thiourea)를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 외용제 약학적 조성물.

청구항 2

N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환의 예방 또는 치료용 외용제 약학적 조성물로서, 상기 피부 색소성 질환은 주근깨, 유전성대측성색소이상증, 망상지단색소침착증, 모반, 기미, 및 노인성색소반을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 패취, 파우더, 스프레이 및 연고를 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형인 조성물.

청구항 4

N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(N-phenyl-N'-(1,3-thiazol-2-yl)thiourea)를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 외용제 화장료 조성물.

청구항 5

N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환의 예방 또는 개선용 외용제 화장료 조성물로서, 상기 피부 색소성 질환은 주근깨, 유전성대측성색소이상증, 망상지단색소침착증, 모반, 기미, 및 노인성색소반을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 용액, 현탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 화장수, 에센스, 팩, 파우더, 메이크업 베이스, 파운데이션, 로션, 연고, 패취, 클렌징폼, 클렌징크림, 클렌징워터, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 비누 및 스프레이를 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물 또는 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 멜라닌은 피부색을 결정하는 중요한 요소이다. 멜라닌은 멜라닌 생성세포(melanocyte) 내의 멜라노좀(melanosome)이라는 소기관 내에서 합성되는데, 먼저 티로신(tyrosine)이 디하이드록시페닐알라닌(Dihydroxyphenylalanine, DOPA)으로 변환되고, DOPA는 도파퀴논(dopaquinone)으로 변환되고, 도파퀴논은 5,6-디하이드록시인돌을 거쳐 최종적으로 멜라닌(melanine)이 된다. 상기 각 과정에서 티로시나제(tyrosinase)가 중요하게 작용한다. 따라서 티로시나제가 억제되면 멜라닌 합성이 저해된다.

[0003] 티로시나제 합성을 감소시키거나, 티로시나제 활성을 억제하거나, 또는 티로시나제를 분해함으로써 멜라닌 양을 감소시켜 피부 미백 효과를 나타내는 물질들이 알려져 있다. 예를 들어 페닐티오우레아(phenylthiourea, PTU)는 티로시나제를 분해함으로써 멜라닌 양을 감소시켜 피부 미백 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Hall AM, Orlow SJ). 그러나 종래 알려진 물질들보다 더욱 뛰어난 피부 미백 효과를 나타내는 물질을 찾기 위한 연구가

계속되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 국내 출원번호 제 10-2013-0012822 호(발명의 명칭: 6-[N′ ′ -(3,4-디히드록시-벤질리덴)-히드라지노]-피리딘-3-술폰산 디에틸아미드를 주성분으로 포함하는 피부 과색소성 질환 치료 또는 피부 미백용 조성물)

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Hall AM, Orlow SJ., Degradation of tyrosinase induced by phenylthiourea occurs following Golgi maturation, Pigment Cell Res. 2005 Apr; 18(2):122-9

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 티로시나제의 합성을 억제하고 활성을 억제함으로써 멜라닌 생합성을 억제하여 피부 미백 효과 및 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환 치료 효과를 갖는 조성물을 제공하고자 한다.

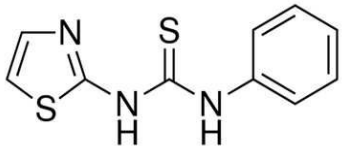
과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 종래에 알려진 피부 미백 효과를 갖는 물질들보다 더욱 뛰어난 피부 미백 효과를 나타내는 물질을 찾기 위하여 연구하던 중, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(N-phenyl-N'-(1,3-thiazol-2-yl)thiourea)가 쥐의 멜라닌 생성세포인 멜란-a 세포 및 사람의 멜라닌 생성세포인 정상 인간 멜라닌 생성세포에서 모두 뛰어난 티로시나제 단백질 발현 억제 및 활성 억제 효과를 나타내며 멜라닌 생합성량을 유의하게 감소시키는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 본 발명의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 피부 미백 효과는 기존에 피부 미백 효과가 있는 것으로 알려진 화합물인 페닐티오우레아보다 훨씬 우수하게 나타났다.

[0008] 따라서 본 발명은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 외용제 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아는 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[0010] [화학식 1]

[0011] 

[0012] 또한 본 발명은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환의 예방 또는 치료용 외용제 약학적 조성물로서, 상기 피부 색소성 질환은 주근깨, 유전성대측성색소이상증, 망상지단색소침착증, 모반, 기미, 및 노인성색소반을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 조성물을 제공한다. 피부 색소성 질환의 종류는 상기 기재한 것에 제한되지 않으며, 멜라닌의 과다 축적 또는 이상 축적으로 인해 유발되는 질환은 모두 해당될 수 있다. 예를 들어 유전적 피부 질환, 예를 들어, 백반, 바덴부르그 증후군, 후천적 피부 질환, 예를 들어, 후염증성 백색 비강진, 원인불명 물방울 멜라닌 저하증, 기미, 약물치료에 기인한 피부 질환, 예를 들어, 미노사이클린, 블레오마이신, 부술판, 지도부딘, 및 감염을 통해 전이된 피부 질환, 예를 들어, 어루러기 등도 포함될 수 있다.

[0013] 본 발명의 피부 미백용 외용제 약학적 조성물 및 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환의 예방 또는 치료용 외용제 약학적 조성물은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~50

중량%, 예를 들어 유효한 효과와 조성물의 안전성 및 제형 안정성을 고려하여 0.001~10중량%로 함유할 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않으며, 적용되는 환자의 병적 상태 및 사용되는 부형제의 종류 등에 따라 적절히 조정될 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물은 유효성분에 추가로 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함하여 제형화될 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화될 수 있으며, 가장 바람직한 제형은 외용제이다. 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다. 본 발명의 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 패취, 파우더, 스프레이 및 연고 등의 제형을 가진다. 그러나 본 발명의 조성물이 취할 수 있는 제형은 이에 제한되지 않으며, 그 외 다양한 외용제 제형을 취할 수 있다.

[0015] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 체중 60 kg 성인기준으로 0.01 mg/일~200 mg/일의 범위 내에서 조절할 수 있다. 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량 및 투여 횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0016] 본 발명은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(N-phenyl-N'-(1,3-thiazol-2-yl)thiourea)를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 외용제 화장료 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 유효성분으로 함유하는 멜라닌의 과다 축적으로 인한 피부 색소성 질환의 예방 또는 개선용 외용제 화장료 조성물로서, 상기 피부 색소성 질환은 주근깨, 유전성대측성색소이상증, 망상지단색소침착증, 모반, 기미, 및 노인성색소반을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 조성물을 제공한다. 피부 색소성 질환의 종류는 상기 기재한 것에 제한되지 않으며, 멜라닌의 과다 축적 또는 이상 축적으로 인해 유발되는 질환은 모두 해당될 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 '화장료' 란 화장품 또는 의약외품이 될 수 있는 물질을 말한다.

[0019] 화장품이란 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 또한 기능성화장품이란 피부의 미백에 도움을 주거나, 피부의 주름개선에 도움을 주거나, 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 보건복지부령이 정한 것을 포함하며, 피부를 개선시켜주는 모든 것을 통칭한다.

[0020] 의약외품은 질병을 치료하거나 예방하기 위해 쓰는 의약품보다는 인체에 대한 작용이 경미한 물품에 대해 보건복지부가 따로 정한 분류 기준에 의한 약품을 지칭한다. 약사법에 따르면 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 섬유·고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균·살충제 등이 포함된다. 의약외품의 대표적인 예로는 치약, 기능성 비누, 기능성 샴푸 등이 있다.

[0021] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분과 배합될 수 있다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알코올, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수, 자외선 차단제 등을 들 수 있다.

[0022] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 상기 화합물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 화장료 조성물은 항생제 및/또는 소염제를 더 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 화장료 조성물은 보습제를 더 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 유액, 현탁액, 크림, 화장수, 에센스, 팩, 젤, 파우더, 메이크업 베이스, 파운데이션, 로션, 연고, 패취, 미용액, 클렌징폼, 클렌징크림, 클렌징워터, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 샴푸, 린스, 바디세정

제, 비누, 및 분무제에서 선택된 제형인 것일 수 있다.

[0026] 이들 제형의 제조방법은 통상의 화장료 제형의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

[0027] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 본 발명이 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나제를 억제하고 멜라닌 생합성 양을 감소시킴으로써 탁월한 미백 효과를 나타낸다. 따라서 약학적 조성물 및 화장료 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 광학 현미경으로 관찰한 결과이다.

도 2는 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(PTTU)를 처리하고 세포를 추출한 후 세포 추출물에서 육안으로 멜라닌 생성 정도를 확인한 결과이다. PTU는 양성 대조군으로 사용된 페닐티오우레아를 의미한다.

도 3은 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(PTTU)를 처리하고 멜라닌 어세이를 수행한 결과이다.

도 4는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아로 버섯 티로시나제 어세이를 수행한 결과이다.

도 5는 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 세포외 티로시나제 활성 어세이를 수행한 결과이다.

도 6은 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 세포내 티로시나제 활성 어세이를 수행한 결과이다.

도 7은 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 티로시나제, TRP1, TRP2, 및 MITF 단백질 발현량을 웨스턴블랏으로 확인한 결과이다.

도 8은 멜란-a 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 티로시나제, TRP1, TRP2, 및 MITF mRNA 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 9는 NHEM 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 멜라닌 어세이를 수행한 결과이다.

도 10은 NHEM 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 세포외 티로시나제 활성 어세이를 수행한 결과이다.

도 11은 NHEM 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 세포내 티로시나제 활성 어세이를 수행한 결과이다.

도 12는 NHEM 세포에 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리하고 티로시나제, TRP1, TRP2, 및 MITF 단백질 발현량을 웨스턴블랏으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

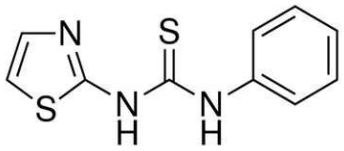
[0030] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 멜란-a 세포에서의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 멜라닌 생합성 억제 효과 확인**

[0032] **1-1. N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아 준비**

[0033] 시그마 알드리치 사에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아(N-phenyl-N'-(1,3-thiazol-2-yl)thiourea), 도면상에서 PTTU로 표시)(제품번호-PH004073)를 구입하여 준비하였다. N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 구조는 하기 화학식 1과 같다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] **1-2. 멜란-a 세포 배양**

[0037] 쥐의 불멸화된 멜라닌 생성세포인 멜란-a(Melan-a) 세포를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI 1640 배지에서, 3일에 한번씩 배지를 교환하면서 80% 점유율(confluency)을 보일 때까지 10% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[0038] **1-3. 광학현미경을 이용한 멜라닌 생합성 억제 확인**

[0039] 1-2에서 배양된 멜란-a 세포를 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA로 떼어내고, 24-배양용기(well-plate)에 다시 동일한 숫자(1×10^5 cells/well)로 분주한 후에 24시간 동안 배양하였다. 세포를 7개 군으로 나누어, 1개 군에는 0.1% DMSO를 처리하고, 2개 군에는 페닐티오우레아(phenylthiourea, 도면상에 PTU로 표시)를 각각 5 μM 및 50 μM 처리하고, 4개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 20mM로 stock을 만들어서 각각 0.625, 1.25, 2.5, 5 mM로 제조한다음 세포 well에 각 농도당 n=3으로 1/1000 희석하여, 각각 최종농도가 0.625, 1.25, 2.5 및 5 μM이 되도록 처리하였다(이하에서 '대조군'은 모두 0.1% DMSO를 처리한 군을 의미하며, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아 용액은 모두 DMSO에 희석하여 제조함).

[0040] 그 중 0.1% DMSO를 처리한 군(대조군)과 5 μM의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군을 3일 후에 광학현미경을 통해 세포를 관찰하였다. 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 대조군과 비교하여 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 멜라닌(검은색)이 적게 관찰됨을 알 수 있다.

[0041] 또한 각 군의 세포에 1N NaOH를 55℃에서 30분동안 처리하여 세포 용해물을 수득하고, 상기 세포 추출물 각각을 육안으로 관찰하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 멜라닌이 적게 관찰되며, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 페닐티오우레아보다 훨씬 낮은 농도에서 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냄이 확인된다.

[0042] **1-4. 생합성된 멜라닌 정량**

[0043] 이하에서, 멜라닌 어세이(melanin assay)를 이용하여 생합성된 멜라닌의 양을 정량함으로써 멜라닌 생합성 억제 정도를 구체적으로 확인하였다.

[0044] 상기 1-3에 기재된 바와 같이 준비한 각 군의 세포에 1N NaOH를 55℃에서 30분동안 처리하여 세포 용해물을 수득하고, 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 490nm의 빛을 투과시켜 확인한 후, 세포 용해물 내에 포함된 단백질을 정량화하여 비교해보았다. 결과는 도 3에 그래프로 나타내었다. 도 3에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 멜라닌이 적게 관찰되며, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 페닐티오우레아보다 훨씬 낮은 농도에서 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냄이 확인된다. N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 5 μM 처리한 경우에 페닐티오우레아를 50 μM 처리한 경우보다 더 적은 양의 멜라닌이 생성되었다.

[0045] **실시예 2. N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 티로시나제 활성 억제 확인**

[0046] **2-1. 버섯 티로시나제 어세이(Mushroom tyrosinase assay)**

[0047] N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 티로시나제를 억제하는 정도를 확인하기 위하여 하기와 같이 버섯 티로시나제 어세이를 실시하였다.

[0048] 0.1% DMSO를 포함하는 시료액, 페닐티오우레아 0.05, 0.5, 5 μM 시료액, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 6.25, 12.5, 2.5 및 50 μM 포함하는 시료액을 제조하고, 0.1M 인산나트륨 완충액(PH 6.5)과 각 시료액, 1.5 mM 티로신 용액, 버섯 티로시나제(tyrosinase from mushroom, T3824-50Ku, sigma)(1500U/ml~2000U/ml)를 처리하고 37℃에서 15분간 기다렸다. 그 후 분광광도계를 이용하여 490 nm의 빛을 투과시켜 확인하였다. 버섯 티로시나제에 의하여 L-DOPA가 많이 분해될수록 용액의 색이 진해진다. 따라서

버섯 티로시나제의 활성이 억제될수록 L-DOPA가 분해되는 양이 감소하여 용액의 색이 연하게 나타난다.

[0049] 결과는 도 4에 그래프로 나타내었다. 도 4에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의 존적으로 버섯 티로시나제가 억제되며, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 페닐티오우레아보다 훨씬 낮은 농도에서 버섯 티로시나제 억제 효과를 나타냄이 확인된다.

[0050] **2-2. 세포외 티로시나제 액티비티 어세이(Extracellular tyrosinase activity assay)**

[0051] N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 멜라닌 생성세포의 티로시나제를 억제하는 정도를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0052] 1-3에서 배양된 멜란-a 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 떼어내고, 6-배양용기(well-plate)에 다시 3.5×10^5(cells/well)로 계대한 후에 5일 동안 배양하였다. 배양 후 RIPA 완충액을 이용하여 세포를 터뜨려 세포 추출물을 수득하고, 상기 세포 추출물을 7개 군으로 나누어, 1개 군에는 0.1% DMSO를 처리하고, 2개 군에는 페닐티오우레아를 각각 5 μM 및 50 μM 처리하고, 4개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 6.25, 12.5, 2.5 및 5 μM 처리하고, L-dopa(2 mg/ml)를 처리하여 10% CO_2 배양기에 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 후 490 nm로 측정하였다.

[0053] 결과는 도 5에 그래프로 나타내었다. 도 5에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의 존적으로 티로시나제 활성이 억제됨을 알 수 있다.

[0054] **2-3. 세포내 티로시나제 활성 어세이(Intracellular tyrosinase activity assay)**

[0055] 1-3에서 배양한 멜란-a 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 떼어내고, 6-배양용기(well-plate)에 다시 3.0×10^5(cells/well)로 계대한 후에 24시간동안 배양하였다. 그 후 상기 세포를 7개 군으로 나누어, 1개 군에는 0.1% DMSO를 처리하고, 2개 군에는 페닐티오우레아를 각각 5 μM 및 50 μM 처리하고, 4개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 0.625, 1.25, 2.5 및 5 μM 처리하고, 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 RIPA 완충액을 이용하여 세포를 터뜨린 다음 세포 추출물에 L-dopa(2 mg/ml)를 처리하여 10% CO_2 배양기에 37℃에서 1시간동안 배양한 후 490 nm로 측정하였다.

[0056] 결과는 도 6에 그래프로 나타내었다. 도 6에서, 대조군과 비교하여 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 티로시나제 활성이 감소함을 알 수 있다.

[0057] 본 발명에서 2-2와 같이 세포외 티로시나제 활성 어세이와 2-3과 같이 세포내 티로시나제 활성 어세이를 별도로 수행한 것은, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 세포의 내적인 요인을 배제한 상태에서의 티로시나제 활성을 억제하는 정도와 세포의 내적인 요인이 존재하는 상태, 즉 세포 자체의 생체활동이 일어나는 상태에서 티로시나제 활성을 억제하는 정도를 각각 확인하기 위한 것이다. 세포외 티로시나제 활성 어세이 결과인 도 5와 세포내 티로시나제 활성 어세이 결과인 도 6을 볼 때, 도 5에서보다 도 6에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 더욱 우수한 티로시나제 활성 억제 효과를 나타냄을 볼 수 있다. 도 5에서 50 μM 으로 처리되었을 때 페닐티오우레아가 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아보다 티로시나제 활성 억제 효과가 우수하게 나타났지만, 도 6에서는 그렇지 않았다. 이는 본 발명의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 세포의 내적인 요인이 존재하는 상태에서도 우수한 티로시나제 억제 활성을 나타내기 때문인 것으로 보이며, 따라서 임상에 적용했을 때도 마찬가지로 우수한 티로시나제 억제 활성을 나타낼 것으로 예상된다.

[0058] **실시예 3. 웨스턴블랏 및 RT-PCR을 이용한 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 티로시나제 발현 억제 확인**

[0059] 멜라닌 생합성에 관여하는 효소로는 티로시나제 외에도 TRP1(Tyrosine-related protein 1), TRP-2(Dopachrome tautomerase) 등이 있고, 상기 효소들의 발현을 조절할 수 있는 전사인자인 MITF 역시 멜라닌 생합성 과정에 관여한다. 이하에서는 웨스턴블랏 및 RT-PCR을 이용하여 본 발명의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 티로시나제 및 상기 효소들의 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0060] **3-1. 웨스턴블랏**

[0061] 1-3과 같이 배양된 멜란-a 세포를 7개 군으로 나누어, 1개 군에는 DMSO 0.1%를 처리하고, 3개 군에는 페닐티오우레아를 각각 0.2, 1 및 5 μM 처리하고, 3개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 최종농도가 0.2, 1 및 5 μM이 되도록 처리하고, 72시간 동안 배양하였다. 그 후 용혈 완충액(lysis buffer)(RIPA 완충

액, 프로테아제 억제제 칵테일, 1mM PMSF)에 넣은 후 분쇄하였다. 13,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 취하여, NuPage®10% Bis-Tris 겔을 이용하여 전기영동하고 PVDF 막으로 18시간 동안 전사하였다. PVDF 막을 블록킹 용액(skim milk)에 넣어 1시간 동안 반응시키고, 티로시나제에 특이적인 1차 항체(aPEP7, 이하 National Institute of Health, Bethesda, USA, 1:5000), TRP-1에 특이적인 1차 항체(aPEP1, 1:5000), TRP-2에 특이적인 1차 항체(aPEP8, 1:5000), MITF에 특이적인 1차 항체(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, 1:1000), β-actin에 특이적인 1차 항체(Sigma, St. Louis, MO, USA, 1:10000)를 넣어준 후 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1% 트윈 20이 들어 있는 1X TBS-T 용액으로 3회 세척하고, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Bethyl, Montgomery, USA, 1:5000), anti-mouse (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 1:10000) 와 같은 2차 항체를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척하였다. 그 다음 WEST-ZOL® Plus Western Blot Detection System (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)을 이용하여 각 효소 단백질의 발현량을 확인하였다.

[0062] 결과는 도 7에 나타내었다. 도 7에서 숫자 '0'으로 표시된 것은 DMSO 0.1%를 처리한 군을 의미한다. 도 7에서, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 티로시나제 단백질 발현량이 현저히 감소하였다. 그러나 TRP1, TRP2, MITF의 단백질 발현량에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

[0063] **3-2. RT-PCR**

[0064] 1-3과 같이 배양된 멜란-a 세포를 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA로 떼어내고, 6-배양용기(well-plate)에 다시 3.0×10^5(cells/well)로 계대 후에 24시간동안 배양하였다. 그 다음 세포를 6개 군으로 나누어 1개 군에는 DMSO 0.1%를 처리하고(도면상에 '0'으로 표시), 2개 군에는 siMITF (MITF에 대한 siRNA)를 각각 10 nM 및 20 nM 처리하고, 3개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 최종농도가 0.2, 1 및 5 μM이 되도록 처리하고, 24시간 또는 48시간 동안 배양시켰다. siMITF는 MITF의 발현을 억제함으로써 TRP-1, TRP-2 및 티로시나제의 발현을 모두 억제할 수 있을 것이기 때문에, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 효과와 비교하기 위하여 처리한 것이다. 그 후 Trizol 시약(Takara, Otsu, 일본)를 사용하여 각 세포에서 RNA를 추출하고 oligo d(T) (ELPIS, 대전, 한국) 100 pmol과 65℃에서 5분간 반응시켰다. 그 후 역전사효소와 2mM dNTPs (Fermentas, Hanover, USA)를 42℃에 1시간 동안 반응시키고 그 후 70℃에서 10분간 더 반응시킴으로써 cDNA를 수득하였다. 상기 cDNA를 HiPi PCR mix (ELPIS, 대전, 한국)와 각각의 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머와 혼합하였다. 각 프라이머의 서열은 하기 표와 같다.

[0065] **[표 1]**

[0066]

단백질	프라이머	서열 (5'→3')
티로시나제	센스	5'- GCA AAA GAA TGC TGC CCA CC
	안티센스	ATG TCC CTC CAT ATT TCA GAG CC
TRP-1	센스	TAT TGA GGC TCT GAG ACG TGG GG
	안티센스	CTC CTT GTG GCA ATG ACA AAT TG
TRP-2	센스	TTC AGC ACG CCA TCC AAG GTC ATG
	안티센스	GAG AAG CTC CCC TCA TTA AAC CTG
MITF	센스	CGG GTA ACG TAT TTG CCA TTT G
	안티센스	GCC TGA AAC CTT GCT AGG CTG G
β-액틴	센스	GTG GGG CTG CCC CAG- GCA CCA
	안티센스	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC

[0067] PCR 증폭은 25-30 cycle로 30초간 95℃에서 해리단계를 거치고, 30초 동안 65℃에서 결합단계를 거친 후, 72℃에서 5분간 연장 단계를 거쳐 1 cycle을 완료한다. 증폭된 PCR 산물을 2% 아가로스 겔을 이용하여 전기영동 시키고 RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (INtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)을 이용하여 확인하였다.

[0068] 세포를 24시간 배양한 후 확인한 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아 처리 농도에 관계없이 티로시나제 mRNA 발현량에 변화가 없는 것으로 나타난다. 이로부터 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아가 티로시나제를 조절하는 기전은 mRNA 수준이 아니라 단백질 수준에서 일어남을 알 수 있다. 또한 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아 처리는 TRP1, TRP2, MITF의 mRNA 발현량에도 영향이 없는 것으로 나타났다.

[0069] 한편 세포를 48시간 배양한 후 확인한 결과도 상기 도 8과 마찬가지로 나타났다.

[0070] **실시예 4. 인간 멜라닌 생성세포에서의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 멜라닌 생합성 억제 효과 확인**

[0071] **4-1. 인간 멜라닌 생성세포 배양**

[0072] 13세 남자아동의 포피에서 절제하여 분리한 정상 인간 멜라닌 생성세포(Normal human melanocyte, 이하 NHEM 세포)를 1X HMGS가 포함된 Medium 254 배지에 접종하고, 2일에 한번씩 배지를 교환하면서 80% 점유율(confluency)을 보일 때까지 5% CO_2배양기에서 배양하였다.

[0073] **4-2. 광학현미경을 이용한 멜라닌 생합성 억제 확인**

[0074] 상기 4-1에서 배양된 NHEM 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 떼어내고, 24-배양용기(well-plate)에 다시 5×10^4(cells/well)로 분주한 후에 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 6개 군으로 나누고, 1개 군에는 DMSO 0.1%를 처리하였고, 1개 군에는 페닐티오우레아를 각각 100 μM 처리하고, 4개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 0.625, 1.25, 2.5 및 5 μM 처리하고, 3일 후에 광학현미경을 통해 세포 모양을 관찰하였다. 그 결과, DMSO 0.1%를 처리한 군에 비해 상기 시료를 처리하였을 경우 멜라닌의 합성이 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

[0075] **4-3. 생합성된 멜라닌 정량**

[0076] 4-2의 NHEM 세포를 용해하여 세포 용해물을 수득하고 멜라닌 어세이를 수행하였다. 멜란-a 세포 대신 NHEM 세포를 사용했다는 점을 제외하고, 구체적인 방법은 1-4에서와 같다.

[0077] 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 멜라닌이 감소된 것을 확인할 수 있다. 100 μM의 페닐티오우레아를 처리한 것보다 5 μM의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 경우에 멜라닌이 더욱 많이 감소하였다.

[0078] **실시예 5. 인간 멜라닌 생성세포에서의 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 티로시나제 활성 억제 확인**

[0079] **5-1. 세포외 티로시나제 활성 어세이(Tyrosinase activity assay)**

[0080] 배양한 NHEM 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 떼어내고, 6-배양용기(well-plate)에 다시 1.5×10^5(cells/well)로 계대한 후에 5일 동안 배양하였다. 배양 후 RIPA 완충액을 이용하여 세포를 터뜨려 세포 추출물을 수득하고, 상기 세포 추출물을 6개 군으로 나누어 1개 군에는 DMSO 0.1%를 처리하고(도면상에 'control'로 기재), 1개 군에는 페닐티오우레아를 5 μM 처리하고, 4개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 최종농도가 6.25, 12.5, 2.5 및 50 μM이 되도록 처리하고, L-dopa(2 mg/ml)를 처리하여 10% CO_2 배양기에 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 490 nm로 측정하였다.

[0081] 결과는 도 10에 그래프로 나타내었다. 도 10에서 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 멜라닌이 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0082] **5-2. 세포내 티로시나제 활성 어세이(Intracellular tyrosinase activity assay)**

[0083] 4-1에서 배양한 NHEM 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 떼어내고, 6-배양용기(well-plate)에 다시 1.0×10^5(cells/well)로 계대한 후에 24시간동안 배양하였다. 그 후 1개 군에는 DMSO 0.1% 처리하고(도면상에 'control'로 표시), 1개 군에는 페닐티오우레아를 100 μM 처리하고, 4개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 최종농도가 0.625, 1.25, 2.5 및 5 μM이 되도록 처리하고, 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 RIPA 완충액을 이용하여 세포를 터뜨린 다음 세포 추출물에 L-dopa(2 mg/ml)를 처리하여 10% CO_2 배양기에 37℃에서 1시간동안 배양한 후 490 nm로 측정하였다.

[0084] 결과는 도 11에 그래프로 나타내었다. 도 11에서, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 농도의존적으로 티로시나제 활성이 감소함을 알 수 있다. 페닐티오우레아를 100 μM 처리한 경우보다 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 0.625, 1.25, 2.5 및 5 μM 처리한 경우에 티로시나제 활성 억제 정도가 훨씬 높았다.

[0085] **실시예 6. 웨스턴블랏을 이용한 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아의 티로시나제 발현 억제 확인**

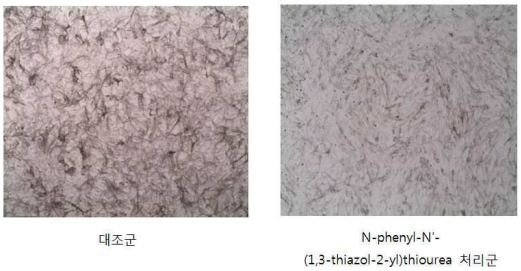
[0086] 4-1과 같이 배양된 NHEM 세포를 7개 군으로 나누어, 1개 군에는 DMSO 0.1%를 처리하고(도면상에 '0'으로 표시), 3개 군에는 페닐티오우레아를 각각 0.2 μM, 1 μM 및 5 μM 처리하고, 3개 군에는 N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 각각 최종농도가 0.2, 1 및 5 μM이 되도록 처리하였다. 그 외에 3-1

과 동일한 방법으로 웨스턴블랏을 실시하였다.

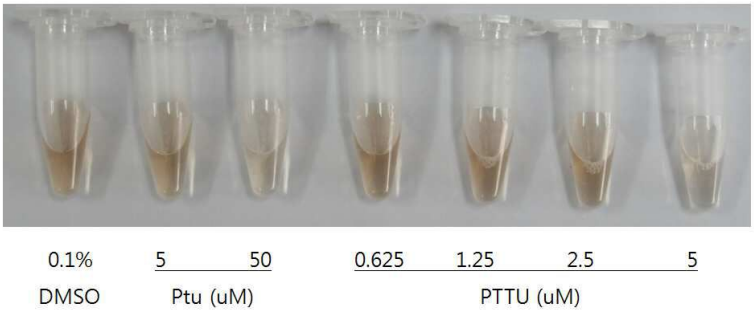
[0087] 결과는 도 12에 나타내었다. 도 12에서, N-페닐-N'-(1,3-티아졸-2-일)티오우레아를 처리한 군에서 티로시나제 단백질 발현량이 현저히 감소하였고, 페닐티오우레아보다 감소 정도가 훨씬 크게 나타났다. 그러나 TRP1, TRP2, MITF의 단백질 발현량에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

도면

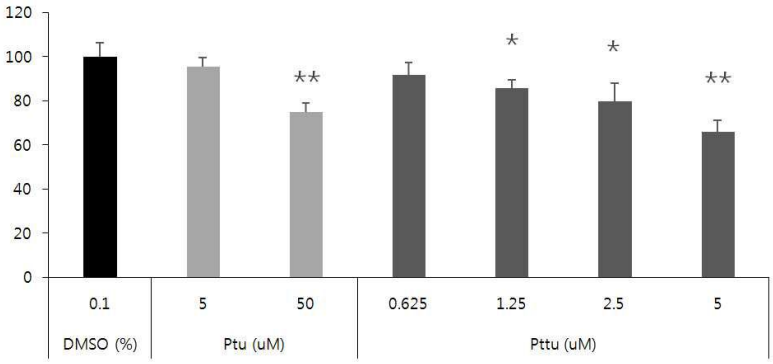
도면1



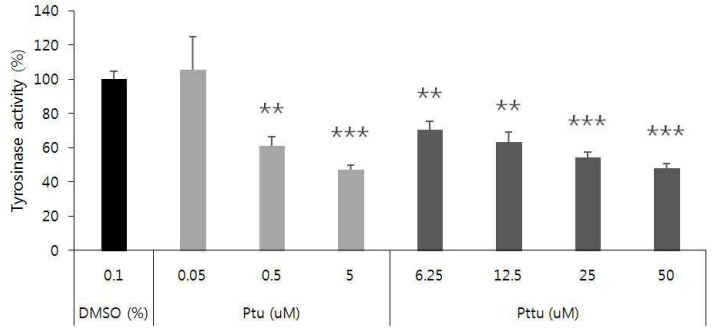
도면2



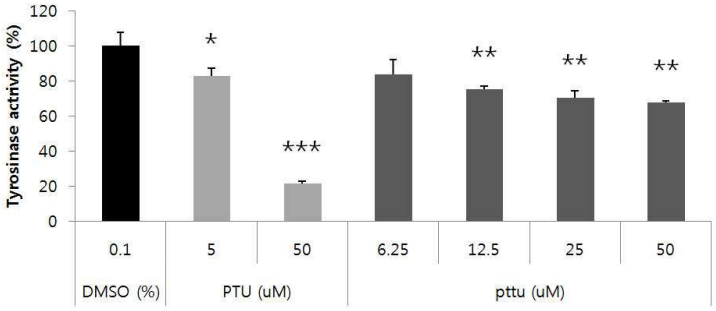
도면3



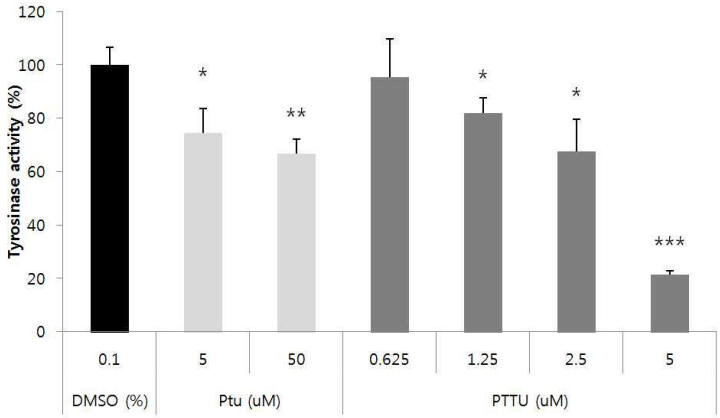
도면4


Tyrosinase activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
***
**
**
***
***
0.1
0.05
0.5
5
6.25
12.5
25
50
DMSO (%)
Ptu (uM)
Pttu (uM)

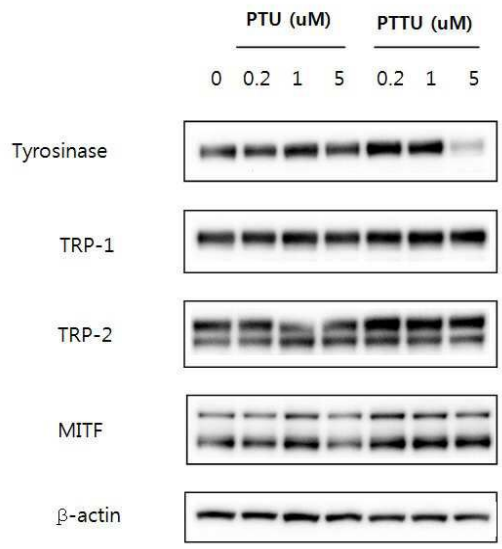
도면5


Tyrosinase activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
***
**
**
**
0.1
5
50
6.25
12.5
25
50
DMSO (%)
PTU (uM)
pttu (uM)

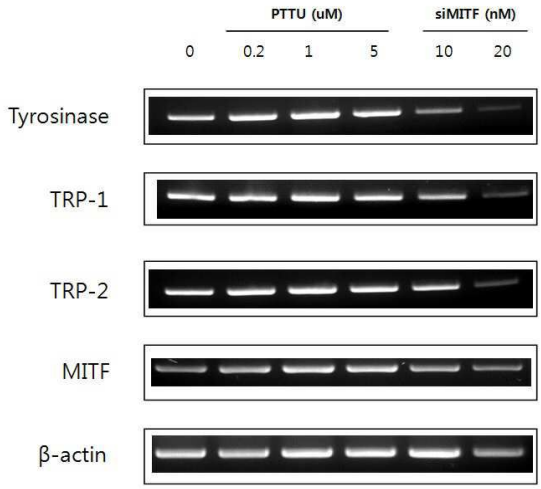
도면6


Tyrosinase activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
*
*
***
0.1
5
50
0.625
1.25
2.5
5
DMSO (%)
Ptu (uM)
PTTU (uM)

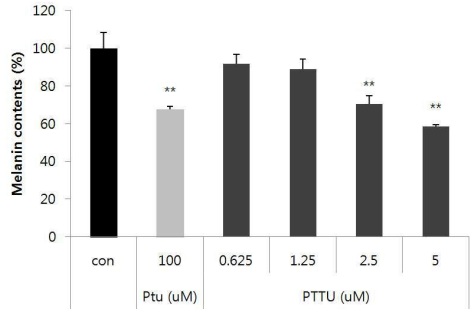
도면7


PTU (uM)
PTTU (uM)
0 0.2 1 5 0.2 1 5
Tyrosinase
TRP-1
TRP-2
MITF
β-actin

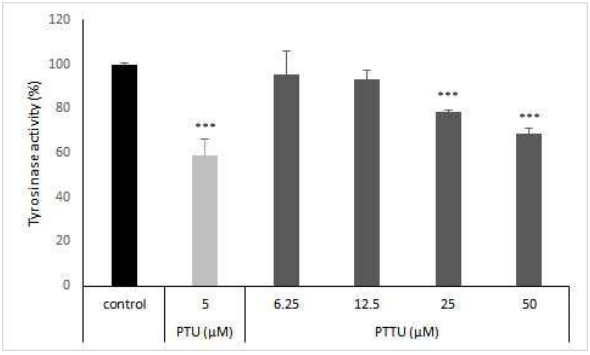
도면8


PTTU (uM)
siMITF (nM)
0 0.2 1 5 10 20
Tyrosinase
TRP-1
TRP-2
MITF
β-actin

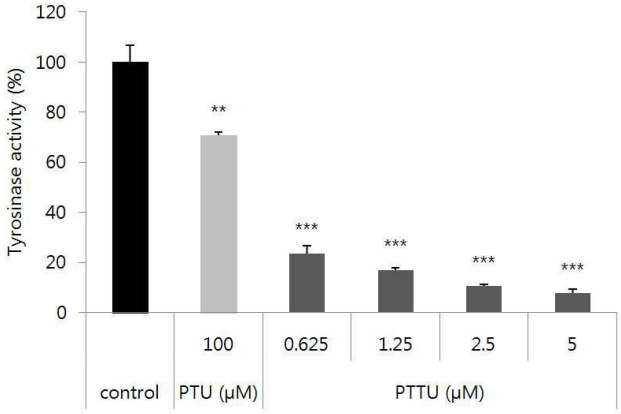
도면9


Melanin contents (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
con
100
0.625
1.25
2.5
5
Ptu (uM)
PTTU (uM)

도면10



도면11



도면12

