(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월09일
(11) 등록번호 10-0872821
(24) 등록일자 2008년12월02일

(51) Int. Cl.
A61K 8/36 (2006.01) *A61K 8/30* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0079685
(22) 출원일자 2007년08월08일
심사청구일자 2007년08월08일
(56) 선행기술조사문헌
인하대학교 대학원 생물공학과 석사학위논문 2007.2.(미백물질 탐색을 위한 HTS System으로서의 Protein Chip의 적용가능성에 대한 연구)

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
김은기
인천 남구 용현동 253 인하대학교 공과대학 생물공학과 2남 118호
노경태
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 연세공학원 B138A
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

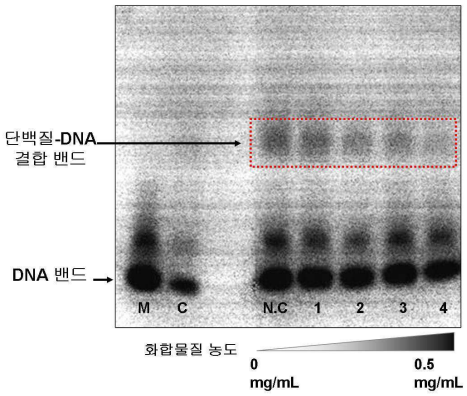
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 이동욱

(54) ＭＩＴＦ 저해제 및 이를 포함하는 미백용 화장료 조성물

(57) 요 약

본 발명은 MITF(microphthalmia transcription factor) 유도 저해제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 색소 침착 관련 효소의 유전자 프로모터와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩을 이용하여 선별된 MITF 저해제 및 이를 포함하는 미백용 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 피부 미백 활성이 있으며 세포 독성은 없으므로 피부 미백용 화장품 또는 미백제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

신정현

인천 중구 신흥동3가 7-206

김해종

경기 광명시 광명7동 746-8 상우빌라 가-101

양상희

인천 연수구 선학동 금호A 2동 1706호

특허청구의 범위

청구항 1

N'-[1-(4-Chloro-phenyl)-meth-(E)-ylidene]-N-(4,6-di-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl)-N-methyl-hydrazine, 3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol, 4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one, {4-[3-Isobutyl-2-[(Z)-4-methoxy-phenylimino]-4-oxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-2-methoxy-phenoxy}-acetic acid, N-tert-Butyl-2-((2-chloro-benzyl)-{2-[5-(3,4-dimethoxy-phenyl)-tetrazol-2-yl]-acetyl}-amino)-2-thiophen-2-yl-acetamide, N,N-Diphenyl-2-[3-pyridin-4-yl-5-(thiazol-2-ylcarbamoylmethylsulfanyl)-[1,2,4]triazol-1-yl]-acetamide, (E)-3-[4-(3-Chloro-benzoylamino)-2,5-diethoxy-phenylcarbamoyl]-acrylic acid, N-[(4-Methoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-N-(3-methoxy-phenyl)-N'-thiazol-2-yl-succinamide, N-[3-(4-Ethoxy-phenoxy)-5-m-tolyloxy-phenyl]-2-(3-nitro-[1,2,4]triazol-1-yl)-acetamide, {1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid, 3-{[(2-Methoxy-5-methyl-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl}-1-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid, 1-hydroxy-1-(5,5-dimethyl-1-octyl-2-oxo-3-m-tolylimidazolidin-4-yl)-3-m-tolylurea, 1-(4-Ethoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid, N-(3-Chloro-4-methyl-phenyl)-N'-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)-N''-(3-oxo-butyryl)-guanidine, 4-[3-(4-Chloro-benzoyl)-4-hydroxy-5-oxo-2-phenyl-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl]-butyric acid 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 MITF(microphthalmia transcription factor) 저해제를 유효성분으로 포함하는 미백용 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 MITF 저해제는 3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol, 4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one 및 {1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미백용 화장료 조성물.

청구항 4

N'-[1-(4-Chloro-phenyl)-meth-(E)-ylidene]-N-(4,6-di-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl)-N-methyl-hydrazine, 3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol, 4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one, {4-[3-Isobutyl-2-[(Z)-4-methoxy-phenylimino]-4-oxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-2-methoxy-phenoxy}-acetic acid, N-tert-Butyl-2-((2-chloro-benzyl)-{2-[5-(3,4-dimethoxy-phenyl)-tetrazol-2-yl]-acetyl}-amino)-2-thiophen-2-yl-acetamide, N,N-Diphenyl-2-[3-pyridin-4-yl-5-(thiazol-2-ylcarbamoylmethylsulfanyl)-[1,2,4]triazol-1-yl]-acetamide, (E)-3-[4-(3-Chloro-benzoylamino)-2,5-diethoxy-phenylcarbamoyl]-acrylic acid, N-[(4-Methoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-N-(3-methoxy-phenyl)-N'-thiazol-2-yl-succinamide, N-[3-(4-Ethoxy-phenoxy)-5-m-tolyloxy-phenyl]-2-(3-nitro-[1,2,4]triazol-1-yl)-acetamide, {1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid, 3-{[(2-Methoxy-5-methyl-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl}-1-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid, 1-hydroxy-1-(5,5-dimethyl-1-octyl-2-oxo-3-m-tolylimidazolidin-4-yl)-3-m-tolylurea, 1-(4-Ethoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid, N-(3-Chloro-4-methyl-phenyl)-N'-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)-N''-(3-oxo-butyryl)-guanidine, 4-[3-(4-Chloro-benzoyl)-4-hydroxy-5-oxo-2-phenyl-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl]-butyric acid 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로 부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 MITF(microphthalmia transcription factor) 저해제를 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 MITF 저해제는 3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol, 4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one 및 {1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 멜라닌 생성 억제제.

청구항 7

N'-[1-(4-Chloro-phenyl)-meth-(E)-ylidene]-N-(4,6-di-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl)-N-methyl-hydrazine, 3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol, 4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one, {4-[3-Isobutyl-2-[(Z)-4-methoxy-phenylimino]-4-oxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-2-methoxy-phenoxy}-acetic acid, N-tert-Butyl-2-((2-chloro-benzyl)-{2-[5-(3,4-dimethoxy-phenyl)-tetrazol-2-yl]-acetyl}-amino)-2-thiophen-2-yl-acetamide, N,N-Diphenyl-2-[3-pyridin-4-yl-5-(thiazol-2-ylcarbamoylmethylsulfanyl)-[1,2,4]triazol-1-yl]-acetamide, (E)-3-[4-(3-Chloro-benzoylamino)-2,5-diethoxy-phenylcarbamoyl]-acrylic acid, N-[(4-Methoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-N-(3-methoxy-phenyl)-N'-thiazol-2-yl-succinamide, N-[3-(4-Ethoxy-phenoxy)-5-m-tolyloxy-phenyl]-2-(3-nitro-[1,2,4]triazol-1-yl)-acetamide, {1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid, 3-{[(2-Methoxy-5-methyl-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl}-1-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid, 1-hydroxy-1-(5,5-dimethyl-1-octyl-2-oxo-3-m-tolylimidazolidin-4-yl)-3-m-tolylurea, 1-(4-Ethoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid, N-(3-Chloro-4-methyl-phenyl)-N'-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)-N''-(3-oxo-butyryl)-guanidine, 4-[3-(4-Chloro-benzoyl)-4-hydroxy-5-oxo-2-phenyl-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl]-butyric acid 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로 부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 MITF(microphthalmia transcription factor) 저해제를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 MITF 저해제는 3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol, 4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one 및 {1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 약학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 MITF(microphthalmia transcription factor) 유도 저해제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 색소 침착 관련 효소의 유전자 프로모터와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩을 이용하여 선별된 MITF 저해제 및 이를 포함하는 미백용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> MITF(microphthalmia transcription factor)는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 특이적으로 발현되는 단백질로 멜라닌(melanin) 생성에 있어서 중요한 조절 인자이다. 피부 색소 침착은 멜라닌 세포의 티로신(tyrosine)이 골지(Golgi)에서 티로시나제(tyrosinase), Tyrp1(tyrosinase related protein 1), Tyrp2(tyrosinase related protein 2), DCT(dopachrom tautomerase), DHICA(dihyduoxyinkole carboxylic acid) 산화효소 등과 같은 색소형성 효소에 의해 산화되어 검은색을 내는 유멜라닌(eumelanin)과 황색 또는 적색을 내는 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성함으로써 발생한다(T. Ellenberger et al. *Genes Dev.*, **8**, 970, 1994). 상기 효소들은 특이적으로 멜라닌 세포에서 발현되는데, MITF는 티로시나제 등 상기 색소형성 효소 유전자의 프로모터에 존재

하는 E-box(CATGTG)에 결합하여 상기 E-box에 N-말단 전사 활성 도메인(N-terminal transcription activation domain; TAD)(Sato S et al., Oncogene 14:3083-3092, 1997), C-말단 TAD(Takeda K et al. Hum Mol Genet 9:125-132, 2000)이 결합하는 것을 촉진함으로써(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004) 색소 침착 효소들의 발현을 유도하여 멜라닌 합성을 야기한다. 따라서 MITF와 E-box 결합은 색소형성에 관여하는 주요 효소의 발현을 조절하는데 중요한 부분이다.

<3> 미백 기작을 밝히기 위해 멜라닌 세포의 성장, 분화에 중요한 요소인 ET-1(endothelin-1), 멜라노좀의 전달에 중요한 요소인 PAR-2, 멜라닌 형성을 유도하는 MITF에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 현재 MITF와 E-box 결합의 저해제로 알려진 MITF-DN, PIAS3(protein inhibitor of activated STAT3)은 관련 효소의 발현을 저해한다고 보고된 바 있어(C. Levy et al. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1962, 1992) MITF와 E-box의 특이적 결합 저해제는 피부 색소 침착 병변 치료제 및 기능성 화장품의 미백 물질로 사용 가능할 것이라 여겨지고 있다. 그러나 MITF를 표적으로 한 미백 소재의 개발은 미비한 실정이며 세포 내 탐색에 국한되어있어 세포 외적인 새로운 탐색 시스템 구축이 미흡한 상황이다.

<4> 지금까지 알려진 MITF와 E-box의 특이적 결합 저해제의 탐색방법으로는 gel mobility-shift analysis(C. Jansen et al., *Biochem. J.* 246: 227-232, 1987; K. Ruscher et al., *J. Biotechnol.* 78: 163-170, 2000), Southwestern blotting(B. Bowen et al., *Nucleic Acids Res.* 8: 120, 1980; W.K. Miskimins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6741-6744, 1985), ELISA(Y. Choo et al., *Nucleic Acids Res.* 21, 1993), reporter constructs in yeast assay(S.D. Hanes et al., *Science* 251: 426-430, 1991)가 수행되었으나 상기 방법들은 방사선 동위 원소의 사용, 제한된 실험 수행의 수와 시간, 복잡한 실험 방법 등의 문제점이 있었다. 본 발명자들은 MITF(microphthalmia transcription factor)와 E-box의 특이적 결합 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법을 개발하여 보고한 바 있다(대한민국 공개 특허 10-2005-0031365). 상기 발명의 단백질 칩 및 탐색방법은 HTS(high throughput screening) 시스템을 적용하여 동시 다발적 실험 수행, 적은 농도 및 작은 분자량의 물질 탐색이 가능하여 미백 관련 표적 분자를 발굴하여 화장품 신소재 및 피부질환 치료제를 개발하는데 이용될 수 있다.

<5> 이에 본 발명자들은 MITF 와 티로시나제 유전자의 프로모터에 결합하여 발현을 저해하는 인자로써 MITF와 E-box의 결합부위를 모방하여 제작한 27개의 후보물질을 합성하고, 상기 후보물질들을 단백질 칩에 적용함으로써 MITF 저해 효과를 확인하고, 멜라닌 형성 억제 실험과 세포 독성 실험을 통해 미백용 화장료로써의 가능성도 확인하였다. 결과적으로 상기 두 실험을 기초로 하여 가장 효과가 좋은 세 개의 후보물질을 선별하였고, EMSA 검사(Electrophoretic Mobility Shift Assay)를 통해 상기 후보물질에 의한 저해 효과가 MITF-티로시나제 유전자의 프로모터의 결합을 저해함으로써 유발되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명의 목적은 미백 관련 화장품 신소재 또는 피부 질환 치료제로 이용될 수 있는 MITF(microphthalmia transcription factor) 저해제 및 이를 포함하는 미백용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<7> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MITF(microphthalmia transcription factor)와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합 저해제를 유효성분으로 포함하는 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

<8> 또한, 본 발명은 상기 저해제를 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다.

<9> 아울러, 본 발명은 상기 저해제를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학적 조성물을 제공한다.

<10> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<11> 본 발명은 MITF(microphthalmia transcription factor)와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합 저해제를 유효성분으로 포함하는 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

<12> 상기 저해제는 상기 올리고-DNA와 결합할 수 있지만 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 반응 부위를 변형시킴으로써, MITF가 전사인자로써의 역할 수행은 할 수 없도록 하는 합성물질들을 대상으로 MITF 저해제 후보물질을 선정할 수 있고, 바람직하게는 화학식 1 내지 27번의 화합물질들이고, 더욱 바람직하게는 화학식 2, 3, 5, 9, 11, 12,

14, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24 및 25번의 화합물질들이고, 가장 바람직하게는 화학식 3, 5 및 18번의 화합물질들이다. 상기 화합물질들 중 2, 3, 5, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24 및 25번의 화합물질들은 단백질 칩 상의 MITF와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합을 저해할 수 있고, 3, 5 및 18번의 화합물질들은 동물세포에서 세포독성이 적으며 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질들 중 효과가 매우 좋은 것들로 선별되었다.

<13> 본 발명의 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩에서 MITF와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합을 각각의 농도별로 확인한 결과, 적정한 MITF - E-box 결합을 위한 MITF 와 올리고-DNA의 농도가 각각 125 ㎍/㎖ 및 2 ㎍/㎖임을 확인할 수 있었다(도 1 및 도 2 참조).

<14> 상기 올리고-DNA와 결합할 수 있지만 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 반응 부위를 변형시킴으로써, MITF가 전사인자로써의 역할 수행은 할 수 없도록 하는 합성물질들을 대상으로 MITF 저해제 후보물질을 선정하여 상기 후보물질들이 단백질 칩 상의 MITF(microphthalmia transcription factor)와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합을 저해할 수 있는지를 확인함으로써 표 2에 나타낸 바와 같이 15개의 후보물질들이 선정되었다(도 3 및 도 4 참조). 또한 상기 후보물질들을 대상으로 동물세포에서 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향을 확인하고 MITF 저해제 후보물질들이 미백용 화장료 조성물로 사용할 수 있는지 판단하기 위해 세포 독성 실험을 수행한 결과 도 5에 나타낸 바와 같이 상기 선정된 MITF 저해제 후보물질을 처리한 구를 PTU 처리구와 비교했을 때 독성이 적고 멜라닌 억제 효과가 좋은 3, 5 및 18 번의 후보물질을 선정하였다.

<15> 상기 선정된 후보물질들이 MITF - E-box 간의 결합을 억제함으로써 활성을 나타내는 것인지를 확인하기 위하여 단백질 - DNA 간의 상호결합을 화학발광(chemiluminescence)을 통해 확인할 수 있는 EMSA 검사(Electrophoretic Mobility Shift Assay)를 수행한 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이 2-c의 레인에서는 비표지 올리고-DNA의 첨가에 의해 MITF와 바이오틴 표지 된 올리고-DNA 간의 결합과 경쟁하도록 하여 MITF와 올리고-DNA 간의 결합이 특이적임을 나타내었다. 또한 도 7에서 나타낸 바와 같이 1 내지 4번 레인에서 18번 후보물질의 농도가 높아질수록 MITF와 올리고-DNA 결합에 의해 젤의 상단부로 이동된 밴드의 두께가 얇아지는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 18번 후보물질이 MITF 저해제로서 MITF - E-box의 결합을 직접적으로 저해하는 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었다.

<16> 결과적으로 미백물질의 선발에 있어서 MITF를 포함하도록 제작된 단백질 칩을 이용한 HTS(High-throughput screening) 방법의 가능성을 확인할 수 있었다.

<17> 본 발명의 '단백질 칩 상의 MITF(microphthalmia transcription factor)와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합 저해제(이하; MITF 저해제)' 는 상기와 같이 과다한 멜라닌 생성을 억제하므로 미백용 화장료 조성물에 효과적으로 사용될 수 있다.

<18> 본 발명의 조성물에서 상기 MITF 저해제는 조성물 총 중량에 대하여 0.005 내지 50 중량 % 함유되는 것이 바람직하지만, 미백 효과가 있고 독성이 나타나지 않는 범위에서 사용 용도에 따라서 상기 범위 이상 또는 이하로도 사용될 수 있다.

<19> 본 발명의 조성물은 상기 MITF 저해제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

<20> 본 발명의 MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 MITF 저해제를 함유하는 화장품 이외에도 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.

<21> 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

<22> 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 MITF 저해제에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화

장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

<23> 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

<24> 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다.

<25> 상기에서 살펴본 바와 같이 상기 조성물은 일반적으로 멜라닌 형성 저해제로 알려진 PTU보다 10 내지 20% 더 멜라닌 생성을 저해하므로(도 5 참조) 본 발명의 MITF 저해제는 멜라닌 생성 억제제로서 제공될 수 있다.

<26> 본 발명의 멜라닌 생성 억제제의 구체적인 제형으로서는 시럽제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 액제 또는 현탁제 등이 이용가능하나 이에 제한되는 것은 아니다.

<27> 아울러, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학적 조성물을 제공한다.

<28> 본 발명의 약학적 조성물은 경구투여용 제형, 예를 들면 정제, 산제, 캡슐제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제; 또는 연고제 등의 다양한 제제로 제형화 할 수 있다. 통상적인 담체를 사용하여 제조된 약학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로 예를 들면, 피부 또는 국소 적용할 수 있다. 또한, 상기 유효성분의 투여 용량은 환자의 나이, 상태 등에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 성인에게 1일에 10 ~ 500, 바람직하게는 50 ~ 300 ㎎의 양이 투여되도록 하며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 수회, 바람직하게는 1회 내지는 6회 분할 투여할 수 있다.

효 과

<29> 본 발명의 조성물은 피부 미백 활성이 있으며 세포 독성은 없으므로 피부 미백용 화장품 또는 미백제로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<30> 이하, 본 발명을 실시예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다.

<31> 단, 하기 실시예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<32> **<실시예 1> MBPek-MITF 제조**

<33> **<1-1> MBPek-MITF 발현벡터 제작**

<34> 엔테로키나제 절단 자리(enterokinase cleavage site)를 포함하는 MBP(maltose binding protein)와 MITF(microphthalmia transcription factor)의 융합 단백질의 발현벡터를 제작하였다.

<35> 일본의 야마나시 의과대학 피부과 (Department of Dermatology, University of Yamanashi, Faculty of Medicine, Yamanashi, Japan)의 Kitamura 박사로부터 수득한 글루타치온-S-트랜스퍼라제(Glutathione-S-transferase, GST)-MITF 벡터를 주형으로 서열번호 1 및 2로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 하기의 반응조건으로 PCR을 수행함으로써 MITF 유전자 뉴클레오티드를 수득하였다. 또한, pMAL-c2X(New England Biolabs, 영국) 벡터를 주형으로 서열번호 3 및 4로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 하기의 반응조건으로 PCR을 수행함으로써 MBPek 유전자 뉴클레오티드를 수득하였다. 상기 MBPek 유전자 뉴클레오티드는 엔테로키나제 절단 자리를 포함하도록 증폭되었다. PCR은 DNA 중합효소(Unipfu, Takara, 일본)를 사용하여 수행하며, 상기에 기재된 프라이머 쌍과 주형을 94℃에서 5분 동안 변성시키고, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 1분간 30회 반응시키고, 72℃에서 10분간 연장(extension)시켜 반응을 종결하였다.

<36> PCR을 통해 수득한 MITF 및 MBPek 유전자의 뉴클레오티드를 *Eco*R I 및 *Sal* I 제한효소로 처리한 후, pET 벡터(Novagen, USA)에 삽입함으로써 pETMBPek-MITF 발현벡터를 제작하였다.

<37> **<1-2> MBPek-MITF 재조합 융합 단백질 발현 및 정제**

<38> pETMBPek-MITF 벡터로부터 발현되어 정제된 MBPek-MITF 단백질을 대량으로 수득하였다.

<39> 실시예 1-1의 방법으로 제조한 pETMBPek-MITF 벡터를 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질도입하였다. 형질도입된 DE3를 12 시간 동안 전배양 하고, 흡광도 600 nm에서 O.D. 0.6일 때까지 본 배양한 후, 최종농도 1 mM로 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 처리하고 4시간 동안 배양하여 MBPek-MITF 단백질 발현을 유도하였다. 세포 배양액을 수거하여 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 수집하고 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0의 완충액을 이용하여 세포를 현탁하여 부유시킨 후 초음파를 이용하여 6분 분쇄, 5분 휴지를 유지하며 1시간 30분간 세포 파쇄를 수행하였다. 파쇄된 세포 현탁액 이상 Urea에 현탁하여 냉동 보관하고, 상등액은 0.2 ㎛ 필터로 거른 뒤 1.1 ㎝ × 30 ㎝ MBP 친화성(Affinity) 크로마토그래피 컬럼 (Millipore, USA)을 통해 결합 완충액(20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 10 mM 말토오즈를 포함한 용출 완충액으로 4 ㎖/min의 속도로 MBPek-MITF를 분리하였다. 분리 과정 중 냉동 보관해 둔 Urea 현탁액은 MBPek-MITF 컬럼 분리과정 중 얻어진 세척 분획 및 용출 분획들과 함께 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

<40> **<실시예 2> 단백질 칩의 제조**

<41> **<2-1> 기판의 수식화(modification)**

<42> 실시예 1의 방법으로 수득한 MBPek-MITF 단백질을 고정화할 기판의 수식화(modificaiton)를 수행하였다.

<43> 에폭시(Epoxy) 작용기가 표면에 처리되어 있는 유리기판(CEL Associates, USA)을, MBP(Maltose Binding Protein)와 결합할 수 있는 말토오즈(maltose)와 유사한 화학 구조를 가진 ß-싸이클로덱스트린(ß-Cyclodextrin; sigma, USA)을 0.1N NaOH 용액에 70 ㎎/㎖의 농도로 용해한 용액에 담가 40℃에서 20시간 동안 반응시킴으로써 유리기판을 ß-싸이클로덱스트린으로 코팅하였다. 상기 기판을 3차 증류수로 헹군 뒤 1% BSA(Qbiogene, USA)에 10 내지 20 분간 담금으로써 잔여 에폭시 작용기의 차단(Blocking)과정을 거치고 다시 3차 증류수로 헹군 후 물기를 제거하여 4℃ 냉장 보관하였다.

<44> 상기 ß-싸이클로덱스트린은 MBP와 특이적으로 반응하므로 유리기판 위에 처리 후 MBP가 표지 된 단백질만을 선택적으로 고정해주는 역할을 한다. 상기 방법으로 수식화된 기판은 일주일 내에 사용하는 것이 적당하다.

<45> **<2-2> MBPek-MITF 단백질의 점적**

<46> 실시예 1의 방법으로 수득한 MBPek-MITF 단백질을 실시예 2-1의 방법으로 수식화된 기판에 점적함으로써 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩을 제조하였다.

<47> 0(1% BSA), 31.2, 62.5, 125, 250 및 500 ㎍/㎖의 농도로 MBPek-MITF를 포함하는 완충액에 테트라에틸렌 글리콜(Tetraethylene Glycol; 최종농도 25%, sigma, USA)을 섞은 후, 상기 용액을 실시예 2-1의 수식화된 기판 위에 총 19 ㎕(기판 면적 11 ㎜ × 10 ㎜ 당)를 점적하고, 덮개를 덮어 단백질이 기판 표면에 고루 퍼지도록 한 후 50 내지 60%의 습도를 유지하며 상온에서 1시간 동안 반응함으로써 기판 위에 MBPek-MTIF가 결합하도록 함으로써 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩을 수득할 수 있었다. 반응이 끝난 단백질 칩은 세척 과정을 거친 후 다음 과정의 실험을 위해 사용되었다.

<48> **<실시예 3> MITF와 E-box(CATGTG) 간의 결합 확인**

<49> **<3-1> Cy3가 표지 된 올리고-DNA의 제조**

<50> MITF와 결합할 수 있는 E-box(CATGTG; 서열번호 7)를 포함하는 Cy3가 표지 된 올리고-DNA를 제작하였다.

<51> 상기 올리고-DNA는 티로시나제 프로모터(Tyrosinase Promoter; 이하, Tyr-P) 내 E-box(CATGTG)가 포함되어 있는 (Entrez GeneID 22173)을 주형으로 서열번호 5로 기재된 Tyr-P 정방향 프라이머와 서열번호 6으로 기재된 Tyr-P 역방향 프라이머를 이용하여 하기의 반응조건으로 PCR 함으로써 수득할 수 있었다. 기판 위에서 MITF와 E-box의 결합을 형광 신호로 감지하기 위하여 상기 프라이머들은 정방향 프라이머의 5′ 부분에 형광물질 Cy3가 표지 되도록 합성하였다(Bioneer, 한국)(J. M. Jung *et al.*, *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; M. L. Bulyk *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 7158, 2001).

<52> **<3-2> MITF와 E-box(CATGTG) 간의 결합**

<53> **<3-2-1> 적정한 MITF의 농도**

<54> 적정한 MITF - E-box 결합을 위한 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩의 MITF 농도를 결정하였다.

<55> 실시예 2의 방법으로 제작된 단백질 칩을 PBST-1(0.05% Tween20 in PBS)(sigma, USA), PBST-2(0.01% Triton X-100 in PBS)(sigma, USA), PBS(sigma, USA) 및 3차 증류수의 순서로 세척하고 물기를 제거함으로써 올리고-DNA

와 결합할 준비를 하였다. 실시예 3-1의 방법으로 제작된 Cy3가 표지 된 올리고-DNA는 완충액(TE 완충액; 10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH = 8.0)에 100 μM의 농도로 녹힌 후, 100℃ 증류수에서 5분간 변성시키고 상온에서 서서히 식혀서 이중 가닥이 되게 하였다.

<56> 0(1% BSA), 31.2, 62.5, 125, 250 및 500 ㎍/㎖의 농도로 MBPek-MITF를 포함하는 완충액으로 점적된 단백질 칩 위에, 마이크로어레이어 CM-1000(Proteogen, 한국)에 지름 320 ㎛ 규격의 핀(SMP10, Telechem, USA)을 사용해서, 상기 방법으로 수득한 올리고-DNA를 DNA 반응용액[폴리 dIdC(0.25 mg/㎖; Amersham Pharmacia Biotech, USA), 결합 완충액(Binding buffer; 10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 2.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.05% NP-40, 10% Glycerol, 5% BSA; 4℃에서 14 내지 16 시간 이상 보관 후 사용), Tetraethylene Glycol(최종농도 25%)]과 올리고-DNA : DNA 반응용액의 비율을 2 : 8로 하여 혼합한 후, 일정한 간격(1 ㎜)으로 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 10 ㎍/㎖ 씩 삼행으로 점적하였다. 점적을 마친 유리 기판은 60% 이상의 높은 습도를 유지하며 1시간 동안 상온에 두어 올리고-DNA와 MITF 단백질이 결합하도록 하였다. PBST-1(0.05% Tween20 in PBS)(sigma, USA), PBST-2(0.01% Triton X-100 in PBS)(sigma, USA), PBS(sigma, USA) 및 3차 증류수의 순서로 세척하고 물기를 제거하였다.

<57> MITF 단백질과 올리고-DNA의 반응 결과를 Cy3에 의한 형광 신호로 감지하기 위해, GenePix 4100A 스캐너(Axon, USA) 로 형광신호를 이미지화하고(도 1-1), GenePix 4.1 프로그램(Axon, USA)을 사용하여 결합신호를 수치화하였다.

<58> 그 결과, 도 1-1에서 나타낸 바와 같이 신호를 이미지화하여 그 신호치를 수치와 한 후, 도 1-2에서 나타낸 바와 같이 도표화 한 결과, 최소 농도에서 최대의 신호치를 갖는 MITF 단백질의 최적농도가 125 ㎍/㎖임을 확인하였다.

<59> **<3-2-2> E-box를 포함하는 올리고-DNA의 농도**

<60> 적정한 MITF - E-box 결합을 위한 결합 반응시 올리고-DNA의 농도를 결정하였다.

<61> 125 ㎍/㎖의 농도로 MBPek-MITF를 포함하는 완충액으로 점적된 단백질 칩 위에 실시예 3-2-1의 방법으로 수득한 이중가닥 올리고-DNA를 일정한 간격(1 ㎜)으로 0, 0.125, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 및 20 ㎍/㎖ 씩 사행으로 점적하였다(도 2-1).

<62> MITF 단백질과 올리고-DNA의 반응 결과를 Cy3에 의한 형광 신호로 감지하기 위해, GenePix 4100A 스캐너(Axon, USA) 로 형광신호를 이미지화하고(도 2-1), GenePix 4.1 프로그램(Axon, USA)을 사용하여 결합신호를 수치화하였다.

<63> 그 결과, 도 2-1에서 나타낸 바와 같이 신호를 이미지화하여 그 신호치를 수치와 한 후, 도 2-2에서 나타낸 바와 같이 상기 신호 수치를 도표화하고 수학적 통계프로그램인 SigmaPlot 2001을 이용하여 수치를 그래프화 하여 랭뮤어 등온식(Langmuir Isotherm)으로 수식화한 결과, K_I 상수 17.23과 신호치의 최대값 1.04×10^5을 얻었다(수학식 1). 또한, 125 ㎍/㎖의 농도로 MBPek-MITF를 포함하는 완충액으로 점적된 단백질 칩에서 올리고-DNA의 최적농도가 2 ㎍/㎖임을 확인할 수 있었다.

수학식 1

<64>
$$f(x)=\frac{(1.04X10^{5})x}{17.23+x}$$

<65> 이로써, 본 발명의 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩에서 MITF와 E-box를 포함하는 올리고-DNA 간의 결합을 확인할 수 있었고, 또한 적정한 MITF - E-box 결합을 위한 MITF 와 올리고-DNA의 농도가 각각 125 ㎍/㎖ 및 2 ㎍/㎖임을 확인할 수 있었다.

<66> **<실시예 4> MITF - E-box 결합을 방해하는 MITF 저해제 후보물질**

<67> **<4-1> MITF 저해제 후보물질**

<68> MITF와 올리고-DNA 간의 결합의 경쟁자로서 작용할 수 있는 MITF 저해제 후보물질을 정하였다.

<69> 상기 올리고-DNA와 결합할 수 있지만 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 반응 부위를 변형시킴으로써, 분자 모델링

방법을 이용하여 MITF가 전사인자로써의 역할 수행은 할 수 없도록 하는 합성물질들을 대상으로 MITF 저해제 후보물질을 선정하였다. 구체적으로, MITF와 올리고-DNA 간의 결합이 예상되는 부위를 이용하여 상용 데이터베이스의 화합물들을 가상탐색 하였다. 1차적으로 'DOCK4' 프로그램으로부터 얻어지는 결합모드 및 에너지값을 분석하였고, 다음으로 'LigandFit(Accelrys Inc., USA)' 프로그램으로부터 계산된 총 4가지의 점수 함수[Ludi(수소결합, 이온결합, 소수성 분자표면 및 회전결합을 고려한 함수) / LigScore(vDW, 타겟과 리간드 간의 극성 표면면적을 고려한 함수) / PLP1-2(Pairwise Linear Potentials; 수소결합, 반발력 및 접촉력을 고려한 함수) / PMF(Potential of Mean Force; 타겟과 리간드 사이의 모든 원자들을 고려한 에너지 함수)]를 종합평가함으로써 가상탐색으로 얻어진 화합물들을 재선정할 수 있었다. 이렇게 선정된 화합물들은 각각의 화합물 판매회사를 통해 구매할 수 있었다.

<70> 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이 총 27개의 MITF 저해제 후보물질을 선정하였고, 각 후보물질들을 DMSO에 0.5 ㎎/㎖의 농도로 용해하여 이후의 실험에 사용하였다.

표 1

<71> MITF 저해제 후보물질

번호	물질명	구조식	입수처
1	6-[3-(4-Fluoro-benzoyl)-4-hydroxy-2-(4-isopropyl-phenyl)-5-oxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl]-hexanoic acid	$C_{26}H_{28}FNO_5$	CHEMDIV, USA
2	N'-[1-(4-Chloro-phenyl)-meth-(E)-ylidene]-N-(4,6-di-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl)-N-methyl-hydrazine	$C_{21}H_{28}ClN_7$	ASINEX, 러시아
3	3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol	$C_{21}H_{22}FN_7O$	CHEMBRIDGE, USA
4	2-Diphenylacetylamino-5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiophene-3-carboxylic acid	$C_{22}H_{19}NO_3S$	SPECS, USA
5	4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one	$C_{30}H_{22}FNO_4$	SPECS, USA
6	2-[(4,6-Di-pyrrolidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl)-hydrazonomethyl]-phenol	$C_{18}H_{23}N_7O$	SPECS, USA
7	N-[1-(4-Ethyl-phenyl)-2,5-dioxo-pyrrolidin-3-yl]-N-(4-methoxy-benzyl)-succinamic acid	$C_{24}H_{26}N_2O_6$	IBSCREEN, 러시아
8	2-{5-Oxo-1-phenyl-4-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylsulfanyl}-N-(4-sulfamoyl-phenyl)-acetamide	$C_{27}H_{26}N_4O_7S_2$	SPECS, USA
9	{4-[3-Isobutyl-2-[(Z)-4-methoxy-phenylimino]-4-oxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-2-methoxy-phenoxy}-acetic acid	$C_{24}H_{26}N_2O_6S$	SPECS, USA
10	[4-Benzyl-5-(2-hydroxy-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl]-acetic acid	$C_{17}H_{15}N_3O_3S$	ASINEX, 러시아
11	N-tert-Butyl-2-((2-chloro-benzyl)-{2-[5-(3,4-dimethoxy-phenyl)-tetrazol-2-yl]-acetyl}-amino)-2-thiophen-2-yl-acetamide	$C_{28}H_{31}ClN_6O_4S$	ASINEX, 러시아
12	N,N-Diphenyl-2-[3-pyridin-4-yl-5-(thiazol-2-ylcarbamoylmethylsulfanyl)-[1,2,4]triazol-1-yl]-acetamide	$C_{26}H_{21}N_7O_2S_2$	ASINEX, 러시아
13	2-(4-Benzyl-5-p-tolyloxymethyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(tert-butylcarbamoyl-methyl)-N-(4-fluoro-phenyl)-acetamide	$C_{31}H_{34}FN_5O_3S$	ASINEX, 러시아
14	(E)-3-[4-(3-Chloro-benzoylamino)-2,5-diethoxy-phenylcarbamoyl]-acrylic acid	$C_{21}H_{21}ClN_2O_6$	ASINEX, 러시아
15	N-[(4-Methoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-N-(3-methoxy-phenyl)-N'-thiazol-2-yl-succinamide	$C_{24}H_{26}N_4O_5S$	ASINEX, 러시아
16	N-[3-(4-Ethoxy-phenoxy)-5-m-tolyloxy-phenyl]-2-(3-nitro-[1,2,4]triazol-1-yl)-acetamide	$C_{25}H_{23}N_5O_6$	ASINEX, 러시아
17	N,N'-Bis-(4-ethoxy-phenyl)-6-(5-methyl-[1,3,4]thiadiazol-2-ylsulfanyl)-[1,3,5]triazine-2,4-diamine	$C_{22}H_{23}N_7O_2S_2$	ASINEX, 러시아
18	{1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid	$C_{17}H_{15}ClN_2O_3S$	ASINEX, 러시아

19	[4-(3,4-Dimethyl-phenyl)-2-(4-methoxy-phenylamino)-thiazol-5-yl]-acetic acid	$C_{20}H_{20}N_2O_3S$	ASINEX, 러시아
20	3-{[(2-Methoxy-5-methyl-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl}-1-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	CHEMDIV, USA
21	2-(Benzylcarbamoyl-methylsulfanyl)-4-oxo-3-[2-(4-sulfamoyl-phenyl)-ethyl]-3,4-dihydro-quinazoline-7-carboxylic acid methyl ester	$C_{27}H_{26}N_4O_6S_2$	CHEMDIV, USA
22	1-hydroxy-1-(5,5-dimethyl-1-octyl-2-oxo-3-m-tolylimidazolidin-4-yl)-3-m-tolylurea	$C_{28}H_{40}N_4O_3$	IBSCREEN, 러시아
23	1-(4-Ethoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid	$C_{19}H_{19}NO_4$	IBSCREEN, 러시아
24	N-(3-Chloro-4-methyl-phenyl)-N'-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)-N''-(3-oxo-butyryl)-guanidine	$C_{18}H_{20}ClN_5O_2$	IBSCREEN, 러시아
25	4-[3-(4-Chloro-benzoyl)-4-hydroxy-5-oxo-2-phenyl-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl]-butyric acid	$C_{21}H_{18}ClNO_5$	CHEMBRIDGE, USA
26	5-[5-(4-Fluoro-phenyl)-3-thiophen-2-yl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-5-oxo-pentanoic acid	$C_{18}H_{17}FN_2O_3S$	IBSCREEN, 러시아
27	3-(3,4-Dichloro-benzyloxy)-thieno[2,3-b]pyridine-2-carboxylic acid	$C_{15}H_9NO_3SCl_2$	KEYORGANICS, 영국

<72> **<4-2> MITF 저해제 후보물질 탐색용 단백질 칩**

<73> MITF와 E-box의 결합을 저해할 수 있는 MITF 저해제 후보물질과 올리고-DNA의 경쟁반응을 위한 MITF를 포함하는 단백질 칩을 제조하고자 하였다.

<74> 저해반응에 의해 단백질 칩상의 신호가 약해질 것을 예상하여 최적농도 125 ㎍/㎖ 보다 높은 500 ㎍/㎖의 단백질 칩을 제작하였다. 500 ㎍/㎖의 농도로 MBPek-MITF를 포함하는 완충액에 테트라에틸렌 글리콜(Tetraethylene Glycol; 최종농도 25%, sigma, USA)을 섞은 후, 상기 용액을 실시예 2-1의 방법으로 수식화된 기판 위에 80 ㎕ (기판 면적 25 ㎜ × 50 ㎜)를 점적하고, 덮개를 덮어 단백질이 기판 표면에 고루 퍼지도록 한 후 50 내지 60%의 습도를 유지하며 상온에서 1시간 동안 반응함으로써 기판 위에 MBPek-MTIF가 결합하도록 함으로써 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩을 수득할 수 있었다. 반응이 끝난 단백질 칩은 세척 과정을 거친 후 다음 과정의 실험을 위해 사용되었다.

<75> **<4-3> MITF 저해제 후보물질의 MITF - E-box 결합 저해효과**

<76> 실시예 4-1의 방법으로 수득한 MITF 저해제 후보물질의 MITF - E-box 결합 저해효과를 확인하고자 하였다.

<77> 실시예 4-2의 방법으로 제작된 단백질 칩을 PBST-1(0.05% Tween20 in PBS)(sigma, USA), PBST-2(0.01% Triton X-100 in PBS)(sigma, USA), PBS(sigma, USA) 및 3차 증류수의 순서로 세척하고 물기를 제거함으로써 올리고-DNA 및 MITF 저해제 후보물질과 결합할 준비를 하였다. 실시예 3-1의 방법으로 제작된 형광물질이 표지 된 올리고-DNA는 DNA 반응용액 [폴리 dIdC(0.25 mg/㎖; Amersham Pharmacia Biotech, USA), 결합 완충액(Binding buffer; 10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 2.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.05% NP-40, 10% Glycerol, 5% BSA; 4℃에서 14 내지 16 시간 이상 보관 후 사용), Tetraethylene Glycol(최종농도 25%)] 에 4 ㎍/㎖의 농도로 녹인 후, 100℃ 증류수에서 5분간 변성시키고 상온에서 서서히 식혀서 이중 가닥이 되게 하였다. 실시예 4-1의 방법으로 수득한 27개의 MITF 저해제 후보물질들도 상기 DNA 반응용액에 0.25 및 0.025 mg/㎖의 농도로 함께 첨가하여 처리하였다.

<78> 500 ㎍/㎖의 농도로 MBPek-MITF를 포함하는 완충액으로 점적된 단백질 칩 위에, 마이크로어레이어 CM-1000(Proteogen, 한국)에 지름 320 ㎛ 규격의 핀(SMP10, Telechem)을 사용해서, 상기 방법으로 수득한 올리고-DNA 및 MITF 저해제 후보물질들의 혼합용액을 일정한 간격(1 ㎜)으로 슬라이드에 핀이 닿는 시간을 0.1 초, 지정 클론 사이즈를 300 ㎛로 지정하여 두 열로 점적하였다. 도 3에서 나타낸 바와 같이 대조군으로 첫 번째 열에서는 정상적인 MITF - E-box 결합을 유도하기 위해 실시예 3-2-1의 방법으로 수득한 올리고-DNA 용액만을 점적하였고, 두 번째 열에서는 DMSO 가 MITF - E-box 결합에 미치는 영향을 살피기 위해 본 발명의 후보물질을 용해한 DMSO 만을 첨가하여 슬라이드에 핀이 닿는 시간을 0.1 초, 지정 클론 사이즈를 300 ㎛로 지정하여 점적하였으며, 세 번째 및 네 번째 열에는 올리고-DNA 및 MITF 저해제 후보물질들의 혼합용액을 점적하였다. 점적을 마친 유리 기판은 60% 이상의 높은 습도를 유지하며 1시간 동안 상온에 두어 결합 및 저해 반응이 수행되도록 하였다. PBST-1(0.05% Tween20 in PBS)(sigma, USA), PBST-2(0.01% Triton X-100 in PBS)(sigma, USA),

PBS(sigma, USA) 및 3차 증류수의 순서로 세척하고 물기를 제거하였다.

<79> MITF 단백질과 올리고-DNA의 반응 결과를 Cy3에 의한 형광 신호로 감지하기 위해, GenePix 4100A 스캐너(Axon, USA) 로 이미지화하고(도 3) GenePix 4.1 프로그램(Axon, USA)을 사용하여 결합신호를 수치화하였다. 상기 신호치를 도표화하고(도 4) DMSO 처리군을 기준으로 하여 DMSO 처리군 보다 효과가 좋은 후보물질 처리군을 선정하였다.

<80> 그 결과, 표 2에 나타낸 바와 같이 15개의 후보물질들이 선정되었다.

표 2

<81> 단백질 칩 실험을 통해 선정된 15개 후보물질

번호	물질명
2	N'-[1-(4-Chloro-phenyl)-meth-(E)-ylidene]-N-(4,6-di-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl)-N-methyl-hydrazine
3	3-{[4-(4-Fluoro-phenylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]triazin-2-yl]-hydrazonomethyl}-phenol
5	4-[1-(2,4-Bis-benzyloxy-phenyl)-meth-(Z)-ylidene]-2-(3-fluoro-phenyl)-4H-oxazol-5-one
9	{4-[3-Isobutyl-2-[(Z)-4-methoxy-phenylimino]-4-oxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-2-methoxy-phenoxy}-acetic acid
11	N-tert-Butyl-2-((2-chloro-benzyl)-{2-[5-(3,4-dimethoxy-phenyl)-tetrazol-2-yl]-acetyl}-amino)-2-thiophen-2-yl-acetamide
12	N,N-Diphenyl-2-[3-pyridin-4-yl-5-(thiazol-2-ylcarbamoylmethylsulfanyl)-[1,2,4]triazol-1-yl]-acetamide
14	(E)-3-[4-(3-Chloro-benzoylamino)-2,5-diethoxy-phenylcarbamoyl]-acrylic acid
15	N-[(4-Methoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-N-(3-methoxy-phenyl)-N'-thiazol-2-yl-succinamide
16	N-[3-(4-Ethoxy-phenoxy)-5-m-tolyloxy-phenyl]-2-(3-nitro-[1,2,4]triazol-1-yl)-acetamide
18	{1-[2-(4-Chloro-phenoxy)-ethyl]-1H-benzoimidazol-2-ylsulfanyl}-acetic acid
20	3-{[(2-Methoxy-5-methyl-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl}-1-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid
22	1-hydroxy-1-(5,5-dimethyl-1-octyl-2-oxo-3-m-tolylimidazolidin-4-yl)-3-m-tolylurea
23	1-(4-Ethoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-carboxylic acid
24	N-(3-Chloro-4-methyl-phenyl)-N'-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)-N''-(3-oxo-butyryl)-guanidine
25	4-[3-(4-Chloro-benzoyl)-4-hydroxy-5-oxo-2-phenyl-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl]-butyric acid

<82> **<5> MITF 저해제 후보물질의 멜라닌 생성 억제 및 세포독성**

<83> **<5-1> 세포배양**

<84> B16F10 뮤라인 흑생종 세포주(B16F10 murine melanoma cell; 이하, B16F10; ATCC(American Type Culture Collection), USA)을 배양하였다. 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum; Sigma, USA), 페니실린(penicillin; Invitrogen, USA) 100 units/㎖, 스트렙토마이신(streptomycin; Invitrogen, USA) 100 ㎍/㎖을 첨가한 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium; GIBCO, USA)에서 37℃, 5% CO_2 조건의 항온기에서 배양하였다. 세포는 3일 마다 계대 배양하였으며 계대 배양은 최대 30 회를 넘지 않았다.

<85> **<5-2> 멜라닌 검사**

<86> 실시예 4의 방법으로 선정된 MITF 저해제 후보물질들이 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 멜라닌 함량 측정법은 Hosoi 법(Hosoi *et al.*, *CANCER RESEARCH* 45:1474-1478, 1985)을 참고하였다.

<87> B16F10 세포를 6×10^4 세포/웰의 농도로 6-웰 플레이트에서 실시예 5-1과 동일한 배지 및 조건에서 24시간 배양

한 후, 실시예 4의 방법으로 선정된 후보물질들을 40 ㎍/㎖로 처리하였다. DMSO를 처리한 것은 음성 대조군으로 하였고, 멜라닌 형성 저해제로 알려진 PTU(N-Phenylthiourea; Sigma, USA)를 15 ㎍/㎖로 처리한 것은 양성 대조군으로 하였다. 후보물질, DMSO 및 PTU를 각각 B16F10 세포에 처리하여 추가로 48시간 동안 배양한 후, EDTA를 포함하는 트립신(Trypsin)을 처리하여 B16F10 세포들을 회수하였다. 상기 세포들을 PBS로 2회 세척한 후 10% DMSO를 포함하는 1N NaOH 200 ㎖에 혼탁하고, 80℃에서 1시간 동안 중탕한 뒤 식혀서 멜라닌이 충분히 녹아나오도록 한 후, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 리더(reader)[MDS(Molecular Device), USA]를 이용하여 405 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성도는 하기 수학식 2를 이용하여 계산하였다. 수학식 2의 무처리구 흡광도는 음성 대조군의 흡광도를 나타낸다.

수학식 2

<88> 멜라닌 생성도(%) =(처리구 흡광도/무처리구 흡광도) × 100

<89> **<5-3> 세포 독성 검사**

<90> 실시예 4의 방법으로 선정된 MITF 저해제 후보물질들이 미백용 화장료 조성물로 사용할 수 있는지 판단하기 위해 세포 독성 실험을 하였다.

<91> B16F10 세포를 2.5×10^3 세포/웰의 농도로 6-웰 플레이트에서 실시예 5-1과 동일한 배지 및 조건에서 24시간 배양한 후, 실시예 4의 방법으로 선정된 후보물질들을 40 ㎍/㎖로 처리하였다. DMSO를 처리한 것은 음성 대조군으로 하였고, 멜라닌 형성 저해제로 알려진 PTU(N-Phenylthiourea; Sigma, USA)를 15 ㎍/㎖로 처리한 것은 양성 대조군으로 하였다. 후보물질, DMSO 및 PTU를 각각 B16F10 세포에 처리하여 추가로 48시간 동안 배양한 후, PBS(phosphate-buffered saline)에 녹인 MTT(3-(4,5- dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma, USA) 용액(5 ㎎/㎖) 100 ㎕을 주입하였다. 4시간 배양한 뒤에 배지를 제거하고 100 ㎕의 DMSO를 첨가하여 형성된 포르마잔(formazan)을 녹여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 마이크로플레이트(Microplate) 리더(reader)[MDS(Molecular Device), USA]를 이용하여 540 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 하기 수학식 3을 이용하여 계산하였다. 수학식 3의 무처리구 흡광도는 음성 대조군의 흡광도를 나타낸다.

수학식 3

<92> 세포 생존율(%) =(처리구 흡광도/무처리구 흡광도) × 100

<93> 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 실시예 4의 방법으로 선정된 MITF 저해제 후보물질을 처리한 구를 PTU 처리구와 비교했을 때 독성이 적고 멜라닌 억제 효과가 좋은 3, 5 및 18 번의 후보물질을 선정하였다.

<94> **<실시예 6> EMSA 검사**

<95> 실시예 5의 방법으로 선정된 MITF 저해제 후보물질들이 MITF - E-box 간의 결합을 억제함으로써 활성을 나타내는 것인지를 확인하기 위하여 단백질 - DNA 간의 상호결합을 화학발광(chemiluminescence)을 통해 확인할 수 있는 EMSA 검사(Electrophoretic Mobility Shift Assay)를 수행하였다.

<96> **<6-1> 핵 추출물**

<97> EMSA 검사에 필요한 MITF 단백질은 B16F10 세포로부터 추출한 핵 추출물(nuclear extract)을 사용하였다. B16F10 세포를 100π 페트리 접시에 10^6 세포/㎖의 농도로 접종하여 단일 밀생층(mono layer)이 형성되도록 24시간 배양한 후, 멜라닌 생성을 유도하는 물질인 α-MSH를 100 nM의 농도로 처리하여 다시 6시간 배양하고 세포를 회수한다.

<98> 상기 방법으로 처리된 B16F10 세포를 회수하여 차가운 PBS로 두 번 세척을 한 뒤 완충액 A [10 mM HEPES(pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 및 0.5 mM DTT plus protease inhibitors; Roche, 스위스] 400 ㎕를 첨가하여 세포들을 현탁하고 얼음에 두어 10분간 반응하였다. 다시 10초간 잘 섞어 준 뒤 마이크로원심분리기를 사용하여 14,000 rpm에서 10초간 원심분리를 한 후 펠렛(pellet) 양의 두 배의 완충액 C [20 mM HEPES(pH 7.9), 420 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 25%(v/v) glycerol plus protease inhibitors; Roche, 스위스]를 첨가하여 현탁하고 얼음에 두어 30분간 반응하였다. 다시 2분간 원심분리 후에 상등액을 회수하여 정량하고 -70℃에 보관하였다. 음성 대조군으로 사용하기 위하여 섬유아세포(fibroblast)로부터도 상기와 동일한

방법으로 핵 추출물을 추출하여 보관하였다.

<99> **<6-2> 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA의 제조**

<100> MITF와 결합할 수 있는 E-box(CATGTG)를 포함하는 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA를 제작하고자 하였다.

<101> 상기 올리고-DNA는 티로시나제 프로모터(Tyrosinase Promoter; 이하, Tyr-P) 내 E-box(CATGTG)가 포함되어 있는 (Entrez GeneID 22173)을 주형으로 서열번호 5로 기재된 Tyr-P 정방향 프라이머와 서열번호 6으로 기재된 Tyr-P 역방향 프라이머를 이용하여 PCR 함으로써 수득할 수 있었다. 나일론 멤브레인(nylon membrane) 상에서 MITF와 E-box의 결합을 감지하기 위하여 상기 프라이머들은 정방향 프라이머의 5′ 부분에 형광물질 바이오틴(biotin)이 표지 되도록 합성하였다(Bioneer, 한국)(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; M. L. Bulyk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 7158, 2001). 또한, 대조군 실험을 위한 올리고-DNA는 바이오틴이 표지 되지 않도록 합성하였다.

<102> **<6-3> EMSA 검사를 통한 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 확인**

<103> MITF를 포함하는 핵 추출물과 올리고-DNA 간의 결합을 EMSA 검사를 통해 확인하였다.

<104> PIERCE사(USA)의 LightShif® Chemiluminesecent EMSA Kit 사용법에 따라 실험하였다. 0.5X TBE 완충용액을 이용하여 Pre-Run 젤인 8 × 8 × 0.1 ㎝(WHD)의 native 폴리아크릴아마이드 젤을 만든 후, 실시예 6-1의 방법으로 추출한 각각의 핵 추출물을 0, 2.5 및 0.5 ㎍/㎖의 농도로 포함하고 실시예 6-2의 방법으로 수득한 20 fmol의 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA 2 ㎕를 포함하는 총 부피 20 ㎕의 결합 용액(10× 결합 완충액, 50% 글리세롤, 100 mM $MgCl_2$, 1 ㎍/㎕ poly(dIdC), 1% NP-40; Fluka, 일본)을 실온에서 20분간 반응시킨 후 5× 로딩(loading) 염료 5 ㎕를 첨가하고 부드럽게 섞어주어 로딩용 시료를 준비하였다. 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA만을 포함한 로딩용 시료를 분자 표지로, B16F10의 핵 추출물을 섬유아세포(fibroblast)의 핵 추출물로 대체한 로딩용 시료를 음성 대조군으로 사용하였다.

<105> 상기 로딩용 시료들을 도 6에서 나타낸 바와 같이, 분자표지(M), 음성 대조군(C), α-MSH 무처리 핵 추출물군(1-a), 5 배 희석 α-MSH 무처리 핵 추출물군(1-b), α-MSH 처리 핵 추출물군(2-a), 5 배 희석 α-MSH 처리 핵 추출물군(2-b), 5 배 희석 α-MSH 처리 핵 추출물 + 비표지 올리고-DNA 군(2-c)의 순서로 각각 200 ㎛ 씩 상기 native 폴리아크릴아마이드 젤에 주입하였고, 8 × 8 × 0.1 ㎝(WHD)의 젤을 기준으로 하여 100 V의 전압을 가하여 로딩 염료가 젤의 2/3의 위치까지 내려갈 때까지 전기영동 하였다. 전기영동을 멈추고(-) 전하를 띈 나일론 멤브레인(nylon membrane)을 상기 젤 위에 얹고, 이번에는 젤 상에서 분리된(+) 전하를 띄고 있는 본 발명의 올리고-DNA들이 상기 나일론 멤브레인으로 이동되도록 전기영동 하였다. 이때, 탱크(tank) 완충액으로 0.5× TBE 완충액을 사용하여 380 mA의 전류로 30분간 전기영동 하며 10℃ 이하를 유지하였다. 전기영동이 끝난 나일론 멤브레인에 1 분간 UV를 쬐어주어 올리고-DNA와 나일론 멤브레인을 유착시켰다. 본 발명의 올리고-DNA의 양을 측정함으로써 본 발명의 후보물질이 MITF - E-box 결합에 미친 영향을 확인하기 위해, 스트렙타비딘(streptavidin)이 부착된 HRPC(Horseradish peroxidase C) 66.7 ㎕와 차단 완충액 20 ㎖의 혼합액에 올리고-DNA가 유착된 나일론 멤브레인을 담가 15분간 고정하고, 6 ㎖의 루미놀(Luminol)과 6 ㎖의 stable Peroxide Solution을 가하여 실온에서 10분 동안 발광반응을 시킨 후, 화학발광(chemiluminescence) 측정기(FLA-5000; Fuji Film, 일본)를 이용하여 감지하였다.

<106> 그 결과, 도 6에서 나타낸 바와 같이 M 레인의 밴드에서는 핵 추출물의 MITF 와 결합하지 않은 올리고-DNA 만의 위치를 알 수 있었다. 단백질과 결합한 DNA의 전기영동에 의한 젤 상에서의 이동 속도는 결합하지 않은 DNA에 비해 이동 속도가 느려져 전기영동 결과 결합하지 않은 DNA 보다 상단부에 위치하게 된다. C 레인의 음성 대조군인 섬유아세포로부터 추출한 핵 추출물에서는 올리고-DNA가 단백질과 결합하지 않음을 확인할 수 있었다. 1-a와 1-b의 레인에서는 α-MSH에 의해 그 발현량이 유도되지는 않았지만, 기본적으로 발현하고 있는 MITF와 올리고-DNA 간의 결합을 확인할 수 있었다. 또한, 2-a와 2-b의 레인에서는 α-MSH에 의해 그 발현량이 유도된 MITF와 올리고-DNA 간의 결합을 확인할 수 있었고, 2-c의 레인에서는 비표지 올리고-DNA의 첨가에 의해 MITF와 바이오틴 표지 된 올리고-DNA 간의 결합과 경쟁하도록 하여 MITF와 올리고-DNA 간의 결합이 특이적임을 나타내었다.

<107> **<6-4> EMSA 검사를 통한 후보물질의 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 억제효과 확인**

<108> 실시예 5에서 선별된 후보물질의 MITF를 포함하는 핵 추출물과 올리고-DNA 간의 결합 억제효과를 EMSA 검사를 통해 확인하고자 하였다.

<109> PIERCE사(USA)의 LightShif® Chemiluminesecent EMSA Kit 사용법에 따라 실험하였다. 0.5× TBE 완충용액을 이용하여 Pre-Run 젤인 8 × 8 × 0.1 ㎝(WHD)의 native 폴리아크릴아마이드 젤을 만든 후, 실온에서 20분간 반응시킨 실시예 6-1의 방법으로 추출한 각각의 핵 추출물을 0 및 0.5 ㎍/㎖의 농도로 포함하고 실시예 6-2의 방법으로 수득한 2 fmol의 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA 2 ㎕를 포함하는 결합 용액(10× 결합 완충액, 50% 글리세롤, 100 mM $MgCl_2$, 1 ㎍/㎕ poly(dIdC), 1% NP-40; Fluka, 일본)에 실시예 5에 의해 선정된 세 개의 화합물 중의 하나인 실시예 4-1의 방법으로 준비된 18번 후보물질을 8, 4, 2 및 1 배 희석하여 각각 1 ㎕씩을 첨가하여 총 부피 20 ㎕로 실온에서 20분간 반응시킨 후 5× 로딩(loading) 염료 5 ㎕를 첨가하여 부드럽게 섞어 로딩용 시료를 준비하였다. 바이오틴이 표지 된 올리고-DNA만을 포함한 로딩용 시료를 분자 표지로, B16F10의 핵 추출물을 섬유아세포(fibroblast)의 핵 추출물로 대체한 로딩용 시료를 음성 대조군 1로, 18번 후보물질을 DMSO로 대체한 로딩용 시료를 음성 대조군 2로 사용하였다.

<110> 상기 로딩용 시료들을 도 7에서 나타낸 바와 같이, 분자표지(M), 음성 대조군 1(C), 음성 대조군 2(N.C), α-MSH 처리 핵 추출물 + 8 배 희석 18번 후보물질군(1), α-MSH 처리 핵 추출물 + 4 배 희석 18번 후보물질군(2), α-MSH 처리 핵 추출물 + 2 배 희석 18번 후보물질군(3), α-MSH 처리 핵 추출물 + 1 배 희석 18번 후보물질군(4)의 순서로 각각 20 ㎕씩 상기 native 폴리아크릴아마이드 젤에 주입하였고, 8 × 8 × 0.1 ㎝(WHD)의 젤을 기준으로 하여 100 V의 전압을 가하여 로딩 염료가 젤의 2/3의 위치까지 내려갔을 때까지 전기영동 하였다. 전기영동을 멈추고(-) 전하를 띈 나일론 멤브레인(nylon membrane)을 상기 젤 위에 얹고, 이번에는 젤 상에서 분리된(+) 전하를 띄고 있는 본 발명의 올리고-DNA들이 상기 나일론 멤브레인으로 이동되도록 전기영동 하였다. 이때, 탱크(tank) 완충액으로 0.5× TBE 완충액을 사용하여 380 mA의 전류로 30분간 전기영동 하며 10℃ 이하를 유지하였다. 전기영동이 끝난 나일론 멤브레인에 1 분간 UV를 쬐어주어 올리고-DNA와 나일론 멤브레인을 유착시켰다. 본 발명의 올리고-DNA의 양을 측정함으로써 본 발명의 후보물질이 MITF - E-box 결합에 미친 영향을 확인하기 위해, 스트렙타비딘(streptavidin)이 부착된 HRPC(Horseradish peroxidase C) 66.7 ㎕와 차단 완충액 20 ㎖의 혼합액에 올리고-DNA가 유착된 나일론 멤브레인을 담가 15분간 고정하고, 6 ㎖의 루미놀(Luminol)과 6 ㎖의 stable Peroxide Solution을 가하여 실온에서 10분 동안 발광반응을 시킨 후, 화학발광(chemiluminescence) 측정기(FLA-5000; Fuji Film, 일본)를 이용하여 감지하였다.

<111> 그 결과, 도 7에서 나타낸 바와 같이 1 내지 4번 레인에서 18번 후보물질의 농도가 높아질수록 MITF와 올리고-DNA 결합에 의해 젤의 상단부로 이동된 밴드의 두께가 얇아지는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 18번 후보물질이 MITF 저해제로서 MITF - E-box의 결합을 직접적으로 저해하는 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었다.

<112> 또한, 결과적으로 미백물질의 선발에 있어서 MITF를 포함하도록 제작된 단백질 칩을 이용한 HTS(High-throughput screening) 방법의 가능성을 확인할 수 있었다.

<113> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<114> **<제제예 1> MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 미백 화장료의 제조**

<115> **<1-1> 유연 화장수의 제조**

<116> MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 유연 화장수의 제제예는 하기 표 3과 같이 제조하였다.

표 3

<117>

원료	함량(중량부)
MITF 저해제	10.00
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭애씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
하이드로제네이티드캐스터오일	1.00
에탄올	30.00

보존제	미량
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

<118> **<1-2> 영양 크림의 제조**

<119> MITF 저해제를 함유한 영양크림의 제제예는 하기 표 4의 조성과 같이 제조하였다.

표 4

<120>

원료	함량(중량부)
MITF 저해제	10.0
1,3-부틸렌 글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
식물 추출물	3.2
마그네슘알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭애씨드	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5
세테아릴알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알란	3.8
카르릴릭/카프릭트리글리세라이드	2.8
식물성 오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량
알란토인	미량
소듐 히아루로네이트	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
보존제	적량
착향제	적량
정제수	잔량

<121> **<제제예 2> MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제의 제조**

<122> **<2-1> 시럽제의 제조**

<123> MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 시럽제는 하기 표 5의 조성과 같이 제조하였다.

표 5

<124>

구성성분	함량(중량부)
MITF 저해제	2
사카린	0.8
당	25.4
글리세린	8
향미료	0.04
에탄올	4
소르브산	0.4
증류수	60

<125> **<2-2> 정제의 제조**

<126> MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 정제는 하기 표 6의 조성과 같이 제조하였다.

표 6

<127>

구성성분	함량(중량부)
MITF 저해제	250
락토오스	175.9
감자전분	180
콜롱드성 규산	32
10% 젤라틴 용액	
감자전분	160
활석	50
스테아르산 마그네슘	5

<128> MITF 저해제 250 중량부, 락토오스 175.9 중량부, 감자전분 180 중량부 및 콜로이드성 규산 32 중량부와 혼합하였다. 상기 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 매쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조하고 여기에 감자전분 160 중량부, 활석 50 중량부 및 스테아린산 마그네슘 5 중량부를 첨가하여 얻은 혼합물을 정제로 제조하였다.

<129> **<제제예 3> MITF 저해제를 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조**

<130> **<3-1> 산제의 제조**

<131> MITF 저해제 2 g

<132> 유당 1 g

<133> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

<134> **<3-2> 정제의 제조**

<135> MITF 저해제 100 mg

<136> 옥수수전분 100 mg

<137> 유 당 100 mg

<138> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<139> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<140> **<3-3> 캡슐제의 제조**

<141> MITF 저해제 100 mg

<142> 옥수수전분 100 mg

<143> 유 당 100 mg

<144> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<145> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

도면의 간단한 설명

<146> 도 1은 단백질 칩에서의 MITF 단백질의 최적농도 확인 결과를 나타낸 도이다.

<147> 도 1-1: 단백질 칩에서의 MITF와 올리고-DNA 결합을 이미지화한 것이다.

<148> 도 1-2: 도 1-1의 이미지로부터 얻은 신호치를 도표화한 것이다.

<149> 도 2는 올리고-DNA의 최적농도 확인 결과를 나타낸 도이다.

<150> 도 2-1: 단백질 칩에서의 MITF와 올리고-DNA 결합을 이미지화한 것이다.

<151> 도 2-2: 도 2-1의 이미지로부터 얻은 신호치를 도표화한 것이다. 랭뮤어 등온식(Langmuir Isotherm)을 이용하여 수식화한 결과, K_I 상수 17.23을 얻었다.

<152> 도 3은 본 발명의 27 개 MITF 저해제 후보물질의 MITF와 올리고-DNA 결합 억제효과를 단백질 칩에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.

<153> 도 3-1은 0.025 ㎎/㎖의 27 개 MITF 저해제 후보물질의 MITF와 올리고-DNA 결합 억제효과를 단백질 칩에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.

<154> 도 3-2는 0.25 ㎎/㎖의 27 개 MITF 저해제 후보물질의 MITF와 올리고-DNA 결합 억제효과를 단백질 칩에서 확인한 결과를 나타낸 도이다.

<155> 도 4는 도 3의 이미지로부터 얻은 신호치를 도표화한 것이다.

<156> 도 5는 본 발명의 MITF 저해제 후보물질의 멜라닌 형성 억제 효과 및 세포 독성을 동물실험을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

<157> 도 6은 EMSA 검사를 통한 MITF와 올리고-DNA 간의 결합을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

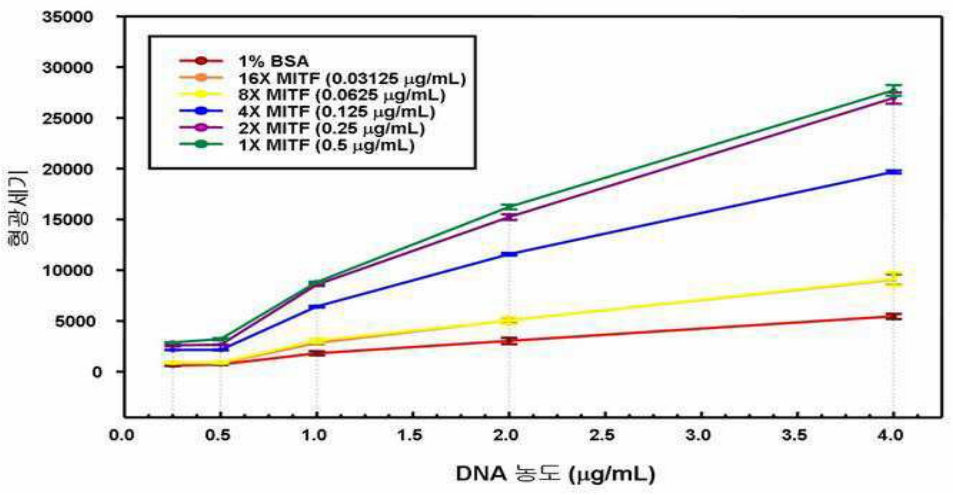
<158> 분자표지(M), 음성 대조군(C), α-MSH 무처리 핵 추출물군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(1-a), 5 배 희석 α-MSH 무처리 핵 추출물군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(1-b), α-MSH 처리 핵 추출물군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(2-a), 5 배 희석 α-MSH 처리 핵 추출물군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(2-b), 5 배 희석 α-MSH 처리 핵 추출물 + 비표지 올리고-DNA 군(2-c)

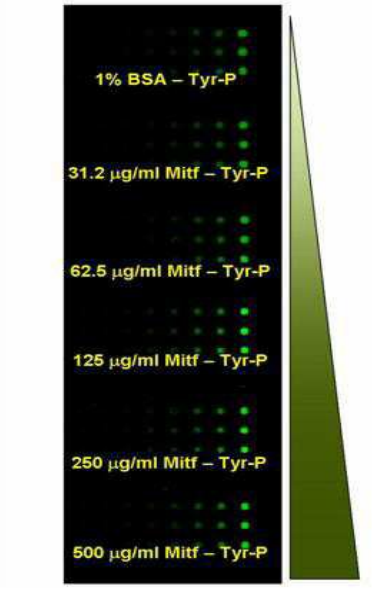
<159> 도 7은 EMSA 검사를 통한 후보물질의 MITF와 올리고-DNA 간의 결합 억제효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

<160> 분자표지(M), 음성 대조군 1(C), 음성 대조군 2(N.C), α-MSH 처리 핵 추출물 + 8 배 희석 18번 후보물질군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(1), α-MSH 처리 핵 추출물 + 4 배 희석 18번 후보물질군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(2), α-MSH 처리 핵 추출물 + 2 배 희석 18번 후보물질군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(3), α-MSH 처리 핵 추출물 + 1 배 희석 18번 후보물질군 + 바이오틴 표지 된 올리고-DNA(4)

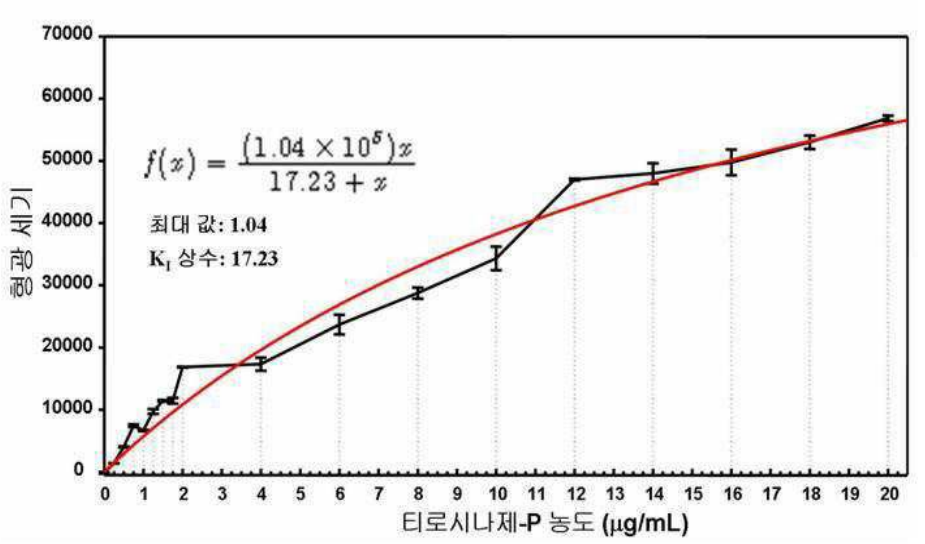
도면

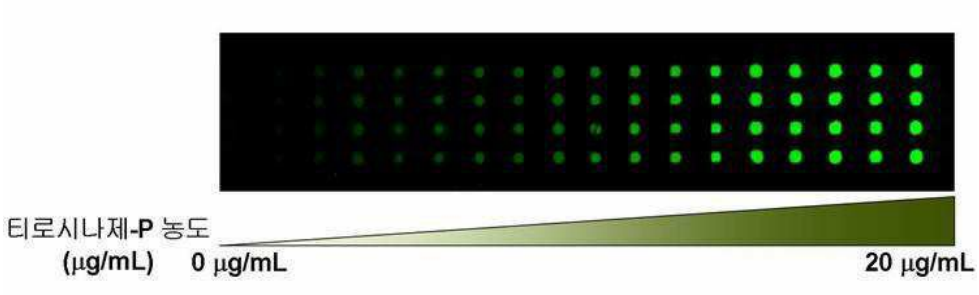
도면1


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
형광세기
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
DNA 농도 (μg/mL)
1% BSA
16X MITF (0.03125 μg/mL)
8X MITF (0.0625 μg/mL)
4X MITF (0.125 μg/mL)
2X MITF (0.25 μg/mL)
1X MITF (0.5 μg/mL)

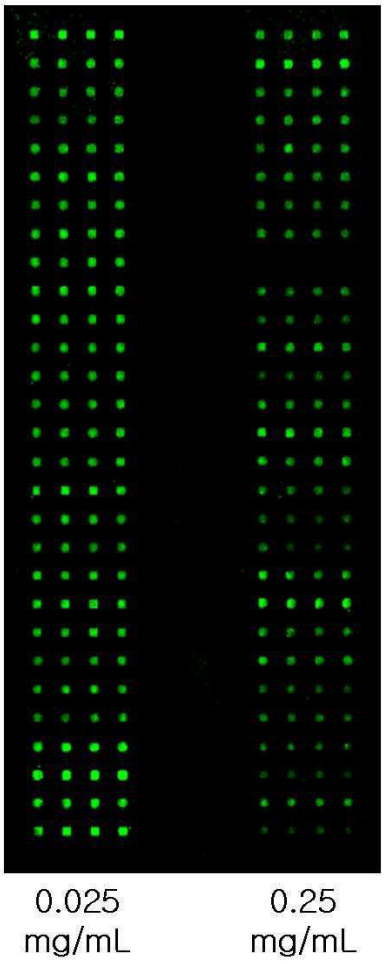

1% BSA – Tyr-P
31.2 μg/ml Mitf – Tyr-P
62.5 μg/ml Mitf – Tyr-P
125 μg/ml Mitf – Tyr-P
250 μg/ml Mitf – Tyr-P
500 μg/ml Mitf – Tyr-P

도면2

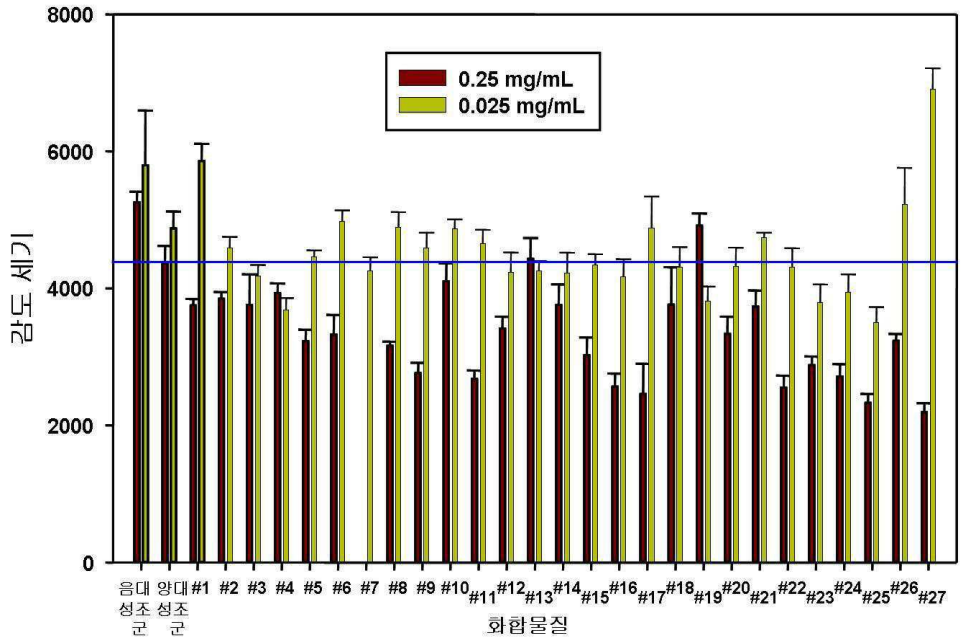

70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
형광 세기
$f(x) = \frac{(1.04 \times 10^5)x}{17.23 + x}$
최대 값: 1.04
K_I 상수: 17.23
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
티로시나제-P 농도 (μg/mL)


티로시나제-P 농도
(μg/mL)
0 μg/mL
20 μg/mL

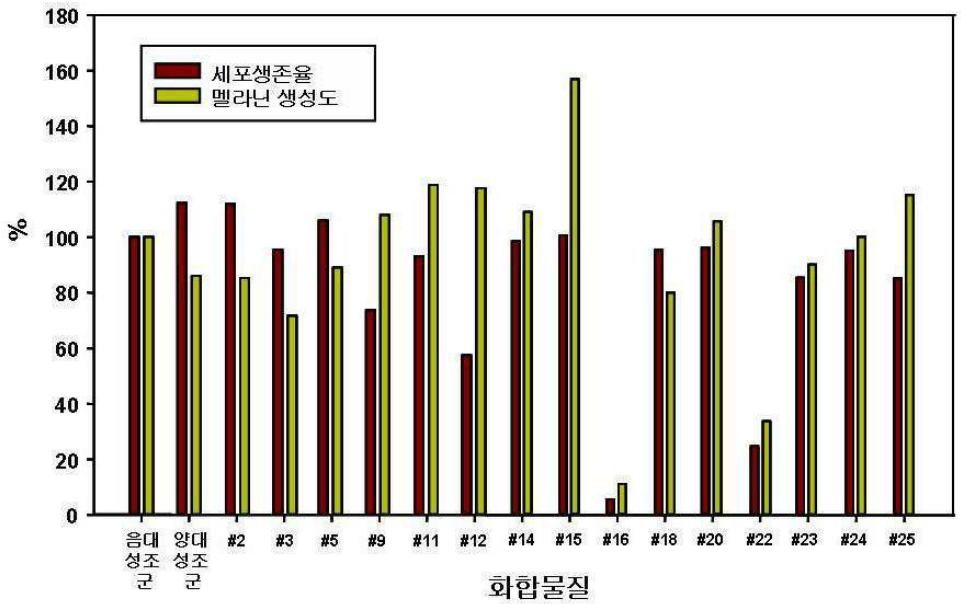
도면3



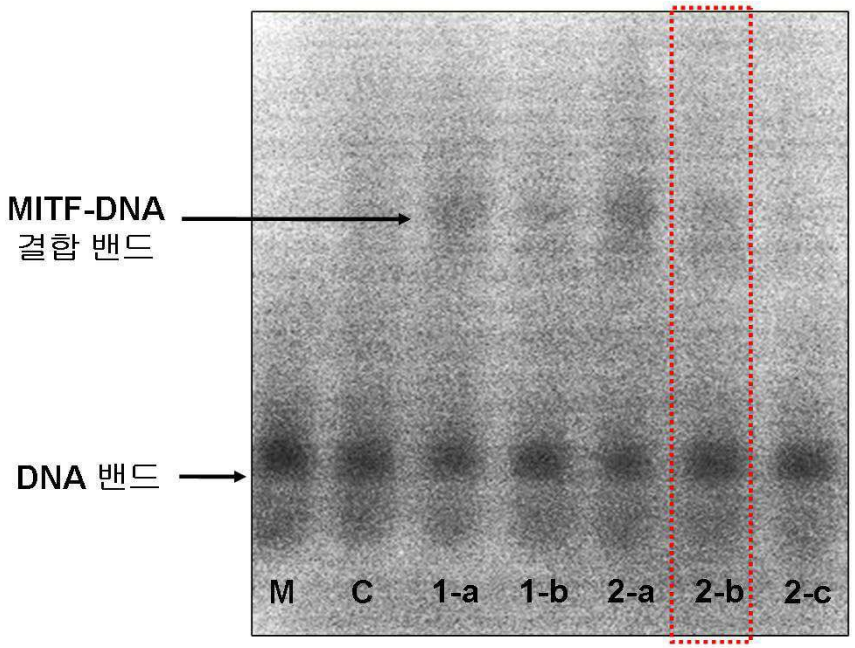
도면4


8000
6000
4000
2000
0
감도 세기
0.25 mg/mL
0.025 mg/mL
음대조군
양대조군
#1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11 #12 #13 #14 #15 #16 #17 #18 #19 #20 #21 #22 #23 #24 #25 #26 #27
화합물질

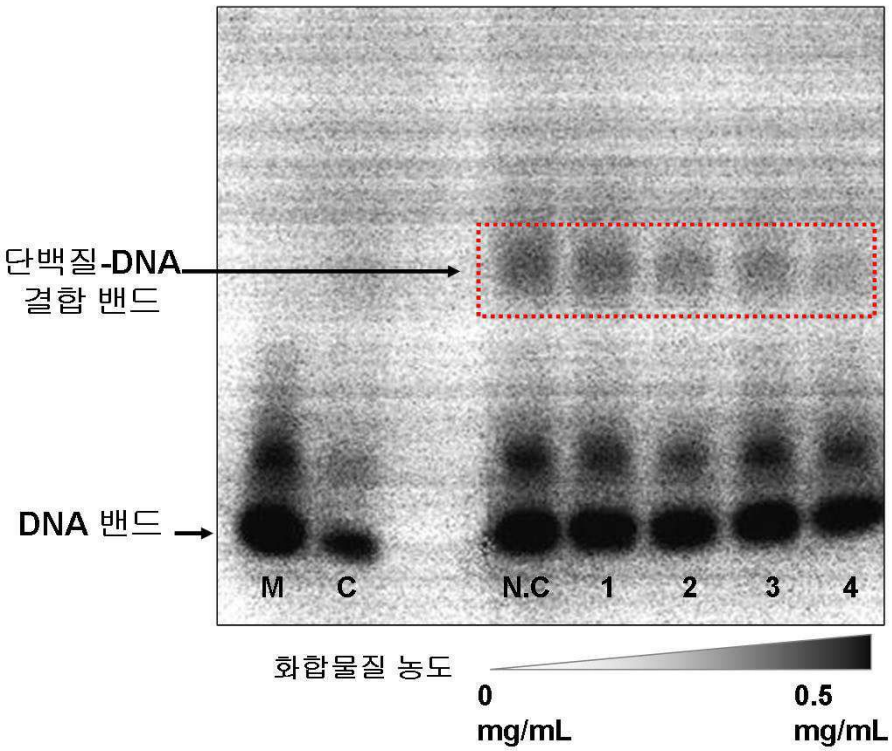
도면5


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
%
세포생존율
멜라닌 생성도
음대조군
양대조군
#2 #3 #5 #9 #11 #12 #14 #15 #16 #18 #20 #22 #23 #24 #25
화합물질

도면6


MITF-DNA
결합 밴드
DNA 밴드
M
C
1-a
1-b
2-a
2-b
2-c

도면7


단백질-DNA
결합 밴드
DNA 밴드
M
C
N.C
1
2
3
4
화합물질 농도
0
mg/mL
0.5
mg/mL

서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
<120> Competitors of microphthalmia transcription factor and the cosmetic composition comprising thereof

<130> 7p-07-74

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MITF-EcoR I _ F

<400> 1
ggcgaattca tgctggaaat gctagagtac agtc 34

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MITF-Sal I _ R

<400> 2
ggcgtcgacc taacatgcat gctccgtttc ttctg 35

<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NMBP-Nde I _ F

<400> 3
caaaaacata tgaaaatcga agaaggtaaa ctggta 36

<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CMBP-Sma I _ R

<400> 4
gtgcacgaat tcagtctgcg cgtctttcag ggctt 35

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tyr-P _ F

<400> 5
aagttagtca tgtgctttgc ag 22

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tyr-P _ R

<400> 6
ctgcaaagca catgactaac t 21

<210> 7

<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> E-box

<400> 7
catgtg 6