

WO 2020/022696 A1

명세서

발명의 명칭: SDF1 프로모터 영역을 이용한 피부 미백제 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 기질세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1; SDF1)의 프로모터 영역을 이용한 피부 미백제 스크리닝 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 사람의 피부색은 멜라닌, 카로틴, 헤모글로빈의 양에 따라 결정되며, 그 중 멜라닌이 가장 결정적인 요소로 작용한다. 멜라닌 색소는 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 페놀계 고분자 물질로서 자외선 차단 역할을 하여, 멜라닌 색소가 부족한 사람은 햇빛에 매우 민감하여 화상을 입기 쉬우며 어린 나이에도 피부암의 발생 확률이 높다. 반면, 단파장의 자외선 및 발암물질은 피부에서 유해한 자유라디칼을 형성하는데 멜라닌은 이러한 자유 라디칼 등을 제거하여 단백질과 유전자들을 보호해 주는 유용한 역할을 한다. 따라서 멜라닌의 양이 많다는 것은 물리적 또는 화학적 독성 물질로부터 피부를 보호할 수 있는 효과적인 대응 체계를 가지고 있다는 것을 의미한다.
- [3] 멜라닌은 색소 세포 내에 존재하는 티로시나아제의 작용에 의해 티로신으로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다. 이때 생성된 멜라닌은 피부 세포에 전달되고 표피 박리와 함께 멜라닌이 상실되어 소멸되는 순환 작용을 보인다. 이러한 멜라닌생성 과정은 자연적으로 일어나는 현상으로서, 정상 상태의 피부에서는 멜라닌의 과다 생성이 일어나지 않는다. 그러나 피부가 외부의 자극, 예를 들면 자외선, 환경오염 또는 스트레스 등에 반응하면 멜라닌이 과다 생성되어 피부 밖으로 배출되지 못하고 각질형성세포(keratinocyte)로 전달되어 피부 표피층에 축적되어 기미 주근깨 및 노인성 흑자 등 심각한 미용상의 문제를 일으킬 뿐만 아니라, 피부노화를 촉진하며 피부암을 유발하기도 한다. 노화성 흑색종에서 색소침착이 많이 일어나는 것으로 알려져 있는데, 피부 노화 또는 색소 침착과 관련하여 이를 조절할 수 있는 인자에 대한 관심이 높아지고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 SDF1 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시켜, 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법 또는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [5] 또한, 본 발명의 목적은 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계를 포함하는 피부

미백제 스크리닝 방법 또는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기질세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1; SDF1) 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 세포에서 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 리포터 유전자의 활성이 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [7] 또한, 본 발명은 과색소침착 피부세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 SDF1 프로모터 영역의 메틸화 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 SDF1 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 세포에서 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 리포터 유전자의 활성이 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 과색소침착 피부세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 SDF1 프로모터 영역의 메틸화 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명은 기질세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1; SDF1) 프로모터 영역을 이용한 피부 미백제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 피부의 색소발현량과 SDF1 프로모터 발현의 상관관계를 관찰할 수 있고, 이를 통하여 색소침착물질과 색소감소물질을 사전에 스크리닝하는 시스템에 이용 가능할 것으로 예상된다. 또한, 본 발명을 통해 스크리닝된 약물은 피부색소 관련 질환에 대한 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 섬유아세포에서 SDF1의 발현을 측정한 결과로, 도 1A는 실시간 PCR 분석결과이며, 도 1B는 ELISA, 도 1C는 면역화학염색법의 분석 결과이다.
- [12] 도 2는 섬유아세포와 노화된 섬유아세포 및 UVA J/cm²가 조사된 섬유아세포에 SDF1 프로모터가 삽입된 pGF-1 벡터를 삽입한 플라스미드를 감염시켜 SDF1 프로모터의 활성을 Luciferase assay를 통해 관찰한 것이다.

- [13] 도 3은 섬유아세포에서 메틸화를 분석한 결과로, 도 3A는 섬유 아세포와 노화를 유도한 섬유아세포에서의 메틸화를 분석한 결과이고, 도 3B는 주변조직과 흑색점에서의 메틸화를 분석한 결과이다.
- [14] 도 4는 SDF1 프로모터가 삽입된 벡터 바이러스(GFP 벡터 바이러스)를 감염시켜 감염된 섬유아세포만 선별하여 세포주를 만들었다. 이 세포주에 색소침착물질로 알려진 TPA와 색소억제물질인 레티노익산(Retinoic acid), 그리고 피부기능과 관련된 EGF 등을 각각 처리하였을 때의 SDF1 프로모터의 발현정도를 관찰한 결과로 도 4A는 Luciferase assay로 GFP의 활성 정도를 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [15] 본 발명은 기질세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1; SDF1) 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 세포에서 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 리포터 유전자의 활성이 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 세포는 섬유아세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [16] 또한, 본 발명은 과색소침착 피부세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 SDF1 프로모터 영역의 메틸화 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [17] 본 발명에 있어서, 상기 SDF1 프로모터 영역은 SDF1 전사 개시 사이트(Transcription start site; TSS)의 CpG 섬(island) 영역일 수 있으며, 상기 SDF1 프로모터 영역은 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [18] 또한, 본 발명은 SDF1 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 세포에서 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 리포터 유전자의 활성이 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 세포는 섬유아세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [19] 또한, 본 발명은 과색소침착 피부세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 SDF1 프로모터 영역의 메틸화 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [20] 본 발명에 있어서, 상기 피부 색소 침착 질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 과색소 침착일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다
- [21] 본 발명에 있어서, 상기 SDF1 프로모터 영역은 SDF1 전사 개시 사이트(Transcription start site; TSS)의 CpG 섬(island) 영역일 수 있으며, 상기 SDF1 프로모터 영역은 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명의 "SDF1 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질"은 NCBI accession no. AY802782 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [23] 본 발명의 "SDF1"은 "C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12)"으로 명명될 수도 있다.
- [24] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [25] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 제네티신(Geneticin; G418), 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [26] 본 발명에 있어서, "리포터"는 생체 안에서 빛을 내는 단백질 또는 리포터로서, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP), 황색 형광 단백질(yellow fluorescent protein; YFP) 또는 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP) 등을 포함하며, 바람직하게는 본 발명의 실시예에서 기재한 녹색형광단백질(green fluorescent protein; GFP)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [27] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [28] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본

발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[29]

[30] <실험예>

[31] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[32]

[33] 1. 섬유아세포에서 노화를 유도하여 SDF1의 발현 측정

[34] 섬유아세포를 배양하는데에 있어서 DMEM (글루코오스 함량이 높은) 배양액에 FBS를 10% 첨가하여 배양을 진행한다. 섬유아세포의 배증시간은 대략 24시간이고, 이를 배증시간이 14일 정도 되도록 지속적으로 배양하여 증식 노화 섬유아세포를 만들었다.

[35] UVA로 유도된 노화 섬유아세포의 경우, 섬유아세포를 PBS로 세척하고 새로 PBS로 배양액을 갈아준 후, 5 J/cm² UVA (wavelength 320-400 nm, maximum peak 350 nm)로 조사하여 노화를 유도하였다. LZC-1 photoreactor system (Luzchem Research Inc. Ontario, Canada)을 사용하였다. Sham-irradiated 섬유아세포는 UV를 조사하지 않고 irradiator box에 둔다. 조사 후에 섬유아세포를 7일간 배양한 후 실험을 진행한다.

[36]

[37] 2. SDF1의 발현량 관찰

[38] (1) 실시간 PCR(Real-time PCR)

[39] RNeasy Mini Kit(Qiagen Inc., USA)를 이용하여 각각의 벡터 바이러스에 감염된 펠라닌 세포에서 RNA를 추출하고, 추출된 총 RNA 1 μ g을 이용하여 Superscript III 역전사 시스템(Invitrogen, USA)으로 cDNA를 제작하였다.[40] 상기 제작된 각 실험군의 cDNA 2 μ l을 주형으로 사용하여 SDF1에 해당하는 프라이머로 실시간 PCR(Real-time PCR)을 수행하였다.

[41] 사용된 SDF1 프라이머는 (정방향) 5'-TGCCAGAGCCAACGTCAAG - 3' 및 (역방향) 5'-CAGCCGGGCTACAATCTGAA - 3'이며, 대조군으로는 각 세포주의 18s 유전자에 대하여 PCR을 수행하였다.

[42] PCR 조건은 95°C에서 3분, 95°C에서 10초, 60°C에서 30초간 반응하는 사이클을 39회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 95°C에서 10초, 65°C에서 5초, 95°C에서 5초간 반응시켰다.

[43]

[44] (2) ELISA

[45] 세포를 배양한 배양액에서 SDF1의 분비량을 SDF1 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 설명서의 지시대로 진행하였다. 세포는 배양하여 48시간 동안 배양된 배양액을 수확하였고, 수확할 때에 세포의 총 개수를 1 $\times$ 10⁵의 세포수를 기준으로 보정하여 값을 측정하였다.

[46]

[47] (3) 면역화학염색

[48] 면역화학염색기법은 4- μ m 두께의 파라핀 처리된 조직 단편으로 수행되었다. 일차 항체로는 SDF1 (MAB350, R&D System)을 항체 희석액에 1:100으로 희석하여 사용하였다.

[49]

[50] **3. SDF1 프로모터 GFP 바이러스 및 GFP 바이러스 준비**

[51] SDF1 프로모터 유전자를 발현시키기 위해 pGF1-vector에 SDF1 프로모터 유전자를 삽입하여 SDF1 프로모터 GFP 벡터를 구축하였다. 상기 구축된 벡터가 삽입된 바이러스를 생산하기 위해 렌티 바이러스(lentivirus)의 바이러스 생산 시스템을 사용하였다. 필요한 구조 단백질을 코딩하는 pVSV-G(System Biosciences, USA), 상기 SDF1 프로모터 유전자가 삽입된 pGF1 벡터 및 pGag-pol을 동시에 HEK-293TN 세포에 리포솜(Liposome) 방법으로 코-트랜스펙션(cotransfection)하고 6시간 후 새 배지로 교환하여 48시간 배양한 후 바이러스가 포함된 배지를 수확하였으며, 수확된 바이러스를 섬유아세포(fibroblasts) 감염에 사용하였다. 감염된 섬유아세포는 Puromycin에 의하여 감염이 된 세포만 선별하여 실험을 진행하였다.

[52] 상기 제작된 SDF1 프로모터의 발현 확인을 위해 GFP의 레벨을 확인할 수 있는 실험인 Luciferase assay를 진행하여 발현량을 관찰하였다.

[53] 그 결과, 도 2와 같이 SDF1 프로모터 유전자가 삽입된 벡터 바이러스에 감염된 섬유아세포 및 노화가 유도된 섬유아세포의 발현 양을 Luciferase assay 실험을 통해 관찰할 수 있다.

[54]

[55] **4. 노화 섬유아세포 및 노화색소 침착 조직에서 SDF1 프로모터의 메틸화 분석**

[56] 중아황산염(bisulfate)를 처리한 gDNA (1 μ g)에 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C, 3 min; 94°C, 30s, 52°C, 40s, 72°C, 30 s $\times$ 35; 72°C, 3min으로 수행하였다.

프라이머는 SDF1 CpG 섬 프로모터(-741 내지 -477; 서열번호 1)로 제작되었다.

프라이머의 서열은 (정방향) 5'-GTTTGTGATTAGTTTATTTTATTA-3'과

(역방향) 5'-CTAAATAAAAACCAATAAAAAAC-3'이다. PCR 생산물은 blunt

TOPO vectors (MGmed, Seoul, Korea) 에 넣었고, 세포에서는 10개, 조직에서

5개의 콜로니에서 추출한 유전자에서 시퀀싱을 통하여 CpG 섬 메틸화를 분석하였다.

[57]

[58] **5. SDF1 프로모터를 이용한 색소 조절물질 스크리닝**

[59] 세포를 1 $\times$ 10³ 개의 양으로 12 well plates에 배양하였고, 24시간 뒤에 TPA 1 μ g,

EGF 10ng과 100ng 그리고 레티노익산을 1 μ g과 10 μ g으로 각각 처리하였다.

약물의 처리 후 24시간 뒤에 Luciferase assay를 통하여 GFP의 활성을 측정하였다.

[60] 그 결과 색소침착물질인 TPA를 처리한 경우에는 SDF1 프로모터의 활성이

감소하였고, 색소억제물질인 레티노익산을 처리한 경우에는 SDF1 프로모터의 활성이 증가하였다.

[61]

[62] <실시예>

[63] SDF1의 기본적인 발현량은 노화된 섬유아세포에서 현저하게 낮고, 노화 색소침착 병변에서 또한 현저하게 낮은 발현량을 보였다(도 1).

[64] SDF1 프로모터를 pGF1 vector에 삽입하여 제작한 바이러스를 감염시킨 섬유아세포에서 발현량을 Luciferase assay를 통하여 측정해보았을 때, 노화된 섬유아세포에서 활성도가 낮음을 관찰하였다(도 2).

[65] SDF1 프로모터 메틸화가 노화된 섬유아세포에서 현저히 증가되어 있음을 관찰하였고, 노화성 색소침착병변에서도 역시 SDF1 프로모터의 메틸화가 증가되어 있는 것을 관찰하였다(도 3).

[66] SDF1 프로모터를 pGF1 vector에 삽입하여 섬유아세포에 감염시켜 만든 세포주를 통하여 약물의 스크리닝을 진행하였을 때, 색소침착물질인 TPA를 처리한 경우에는 발현량이 감소하고 레티노익산에 의해서는 발현량이 증가하는 것을 관찰하였다(도 4).

[67] 이러한 결과를 토대로 피부의 색소발현량과 SDF1 프로모터의 발현의 상관관계를 관찰할 수 있고, 이를 통하여 색소침착물질과 색소감소물질을 사전에 스크리닝하는 시스템에 이용이 가능할 것으로 보여진다.

[68]

[69] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[70]

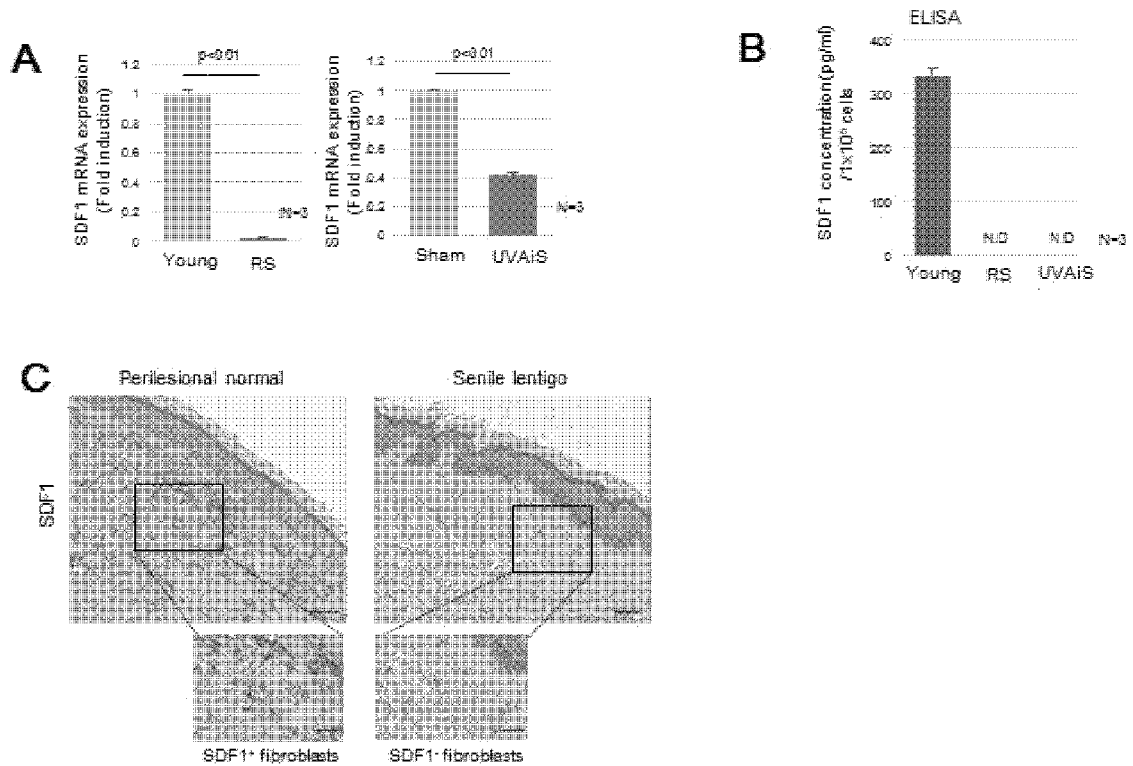
[71]

청구범위

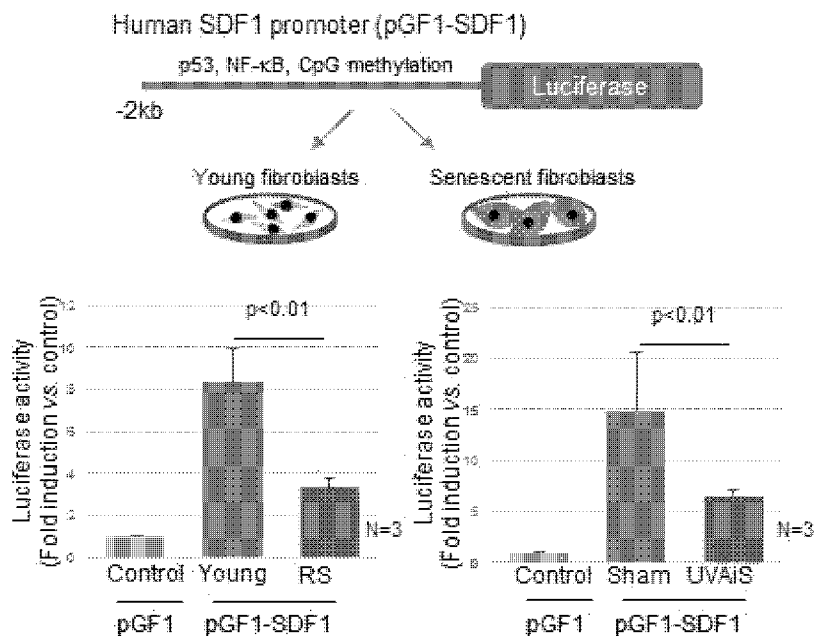
- [청구항 1] 기질세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1; SDF1) 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
상기 시험물질을 접촉한 세포에서 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계; 및
대조구 시료와 비교하여 상기 리포터 유전자의 활성이 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein; GFP) 유전자인 것을 특징으로 하는 피부 미백제 스크리닝 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 세포는 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 피부 미백제 스크리닝 방법.
- [청구항 4] 과색소침착 피부세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
상기 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계; 및
대조구 시료와 비교하여 상기 SDF1 프로모터 영역의 메틸화 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 미백제 스크리닝 방법.
- [청구항 5] 제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 SDF1 프로모터 영역은 SDF1 전사 개시 사이트(Transcription start site; TSS)의 CpG 섬(island) 영역인 것을 특징으로 하는 피부 미백제 스크리닝 방법.
- [청구항 6] 제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 SDF1 프로모터 영역은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 피부 미백제 스크리닝 방법.
- [청구항 7] SDF1 프로모터 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질감염된 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
상기 시험물질을 접촉한 세포에서 리포터 유전자의 활성을 측정하는 단계; 및
대조구 시료와 비교하여 상기 리포터 유전자의 활성이 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법.
- [청구항 8] 과색소침착 피부세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
상기 시험물질을 접촉한 과색소침착 피부세포에서 SDF1 프로모터 영역의 메틸화(methylation) 수준을 측정하는 단계; 및
대조구 시료와 비교하여 상기 SDF1 프로모터 영역의 메틸화 수준이 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법.

- [청구항 9] 제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 SDF1 프로모터 영역은 SDF1 전사 개시 사이트(Transcription start site; TSS)의 CpG 섬(island) 영역인 것을 특징으로 하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법.
- [청구항 10] 제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 SDF1 프로모터 영역은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법.
- [청구항 11] 제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 피부 색소 침착 질환은 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소침착 및 피부염에서 발생하는 과색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 피부 색소 침착 질환 치료제 스크리닝 방법.

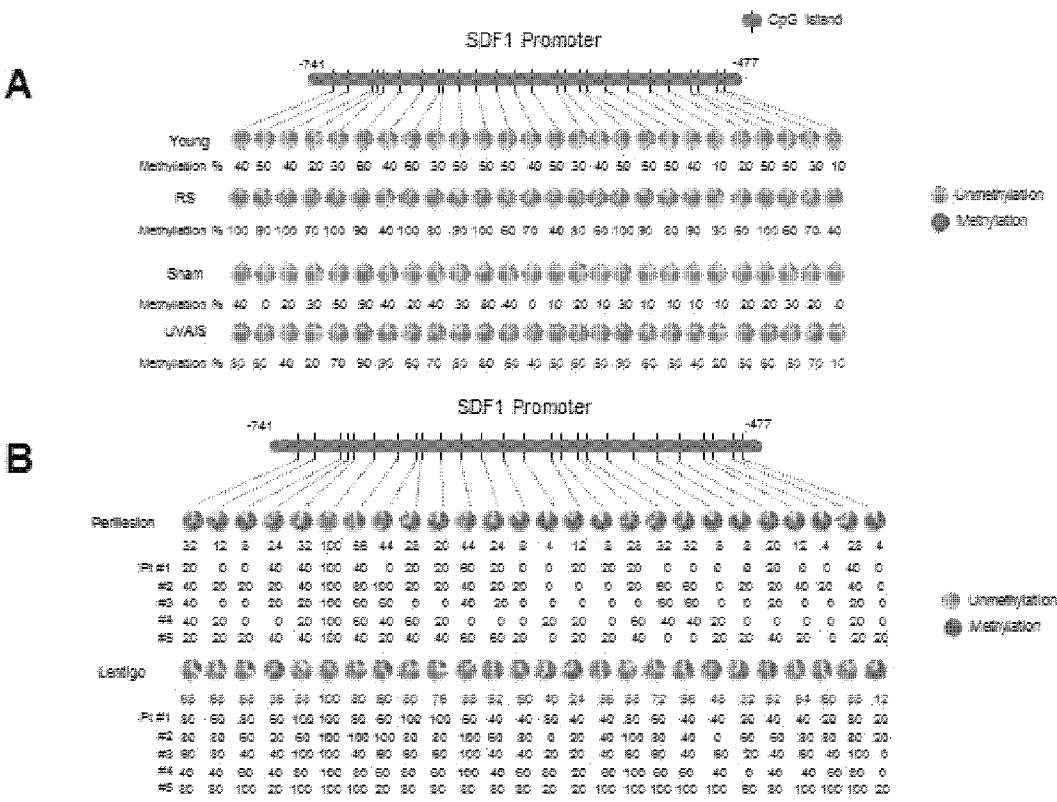
[도1]



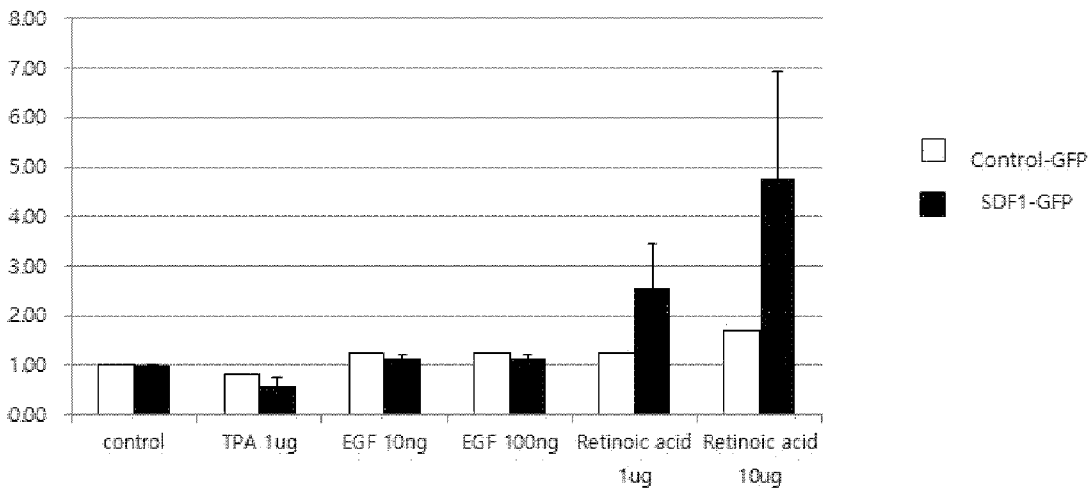
[도2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02(2006.01)i, C12Q 1/6883(2018.01)i, C07K 14/52(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/02; A23L 33/13; A23L 33/18; C12N 5/071; C12Q 1/6883; C07K 14/52; G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: stromal cell-derived factor 1 (SDF1), methylation, skin, whitening, green fluorescent protein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2013-0056955 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 31 May 2013 See abstract; claims 1, 2, 9 and 14; paragraph [0006].	1-11
Y	BELMADANI, A. et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles. Differentiation. 2009, vol. 77, pages 395-411 See abstract; page 396, right column.	1-11
Y	KAROUZAKIS, E. et al. DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Genes and Immunity. 2011, vol. 12, pages 643-652 See abstract; page 644, left column.	1-11
Y	NCBI. GenBank accession no. AY802782.1 (09 November 2004) See all sequences.	6,10
Y	YOON, J. E. et al. CXCL12 negatively regulates melanogenesis via cAMP signaling pathway. In: 2017 Ajou Biomedical Conference. Poster. 12-13 May 2017, Pyeongchang, Kensington Flora Hotel See the entire document.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 OCTOBER 2019 (30.10.2019)

Date of mailing of the international search report

30 OCTOBER 2019 (30.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008844

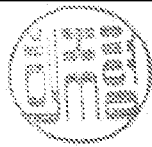
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-1883142 B1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 30 July 2018 See claims 1, 3, 6, 7 and 21; paragraphs [0008], [0017], [0019], [0051] and [0057]-[0063].	4-6,8-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0056955 A	31/05/2013	KR 10-1871922 B1	02/07/2018
KR 10-1883142 B1	30/07/2018	US 2019-0125835 A1	02/05/2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/02(2006.01)i, C12Q 1/6883(2018.01)i, C07K 14/52(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/02; A23L 33/13; A23L 33/18; C12N 5/071; C12Q 1/6883; C07K 14/52; G01N 33/50 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:기질세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1; SDF1), 메틸화(methylation), 피부(skin), 미백(whitening), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein)																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2013-0056955 A ((주)아모레퍼시픽) 2013.05.31 요약; 청구항 1, 2, 9 및 14; 단락 [0006] 참조.</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BELMADANI, A. 등, 'The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles', Differentiation, 2009, 제77권, 395-411 페이지 초록; 페이지 396, 우결립 참조.</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KAROOUZAKIS, E. 등, 'DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts', Genes and Immunity, 2011, 제12권, 643-652 페이지 초록; 페이지 644, 좌결립 참조.</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NCBI, GenBank accession no. AY802782.1 (2004.11.09) 전체 서열 참조.</td> <td>6,10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>YOON, J. E. 등, 'CXCL12 negatively regulates melanogenesis via cAMP signaling pathway', In: 2017 Ajou Biomedical Conference, 포스터, 2017.05.12-13, 평창 쟁상틴 플로라 호텔 전체 문헌 참조.</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2013-0056955 A ((주)아모레퍼시픽) 2013.05.31 요약; 청구항 1, 2, 9 및 14; 단락 [0006] 참조.	1-11	Y	BELMADANI, A. 등, 'The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles', Differentiation, 2009, 제77권, 395-411 페이지 초록; 페이지 396, 우결립 참조.	1-11	Y	KAROOUZAKIS, E. 등, 'DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts', Genes and Immunity, 2011, 제12권, 643-652 페이지 초록; 페이지 644, 좌결립 참조.	1-11	Y	NCBI, GenBank accession no. AY802782.1 (2004.11.09) 전체 서열 참조.	6,10	Y	YOON, J. E. 등, 'CXCL12 negatively regulates melanogenesis via cAMP signaling pathway', In: 2017 Ajou Biomedical Conference, 포스터, 2017.05.12-13, 평창 쟁상틴 플로라 호텔 전체 문헌 참조.	1-11
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
Y	KR 10-2013-0056955 A ((주)아모레퍼시픽) 2013.05.31 요약; 청구항 1, 2, 9 및 14; 단락 [0006] 참조.	1-11																		
Y	BELMADANI, A. 등, 'The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles', Differentiation, 2009, 제77권, 395-411 페이지 초록; 페이지 396, 우결립 참조.	1-11																		
Y	KAROOUZAKIS, E. 등, 'DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts', Genes and Immunity, 2011, 제12권, 643-652 페이지 초록; 페이지 644, 좌결립 참조.	1-11																		
Y	NCBI, GenBank accession no. AY802782.1 (2004.11.09) 전체 서열 참조.	6,10																		
Y	YOON, J. E. 등, 'CXCL12 negatively regulates melanogenesis via cAMP signaling pathway', In: 2017 Ajou Biomedical Conference, 포스터, 2017.05.12-13, 평창 쟁상틴 플로라 호텔 전체 문헌 참조.	1-11																		
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신 규정 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2019년 10월 30일 (30.10.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 10월 30일 (30.10.2019)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																		

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-1883142 B1 (아주대학교산학협력단) 2018.07.30 청구항 1, 3, 6, 7 및 21; 단락 [0008], [0017], [0019], [0051] 및 [0057]-[0063] 참조.	4-6, 8-11

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2019/008844

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2013-0056955 A

2013/05/31

KR 10-1871922 B1

2018/07/02

KR 10-1883142 B1

2018/07/30

US 2019-0125835 A1

2019/05/02