



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0051138
(43) 공개일자 2017년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/10 (2006.01) *A61K 31/05* (2006.01)
A61K 8/34 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
B01D 15/16 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12P 19/44* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/1048 (2013.01)
A61K 31/05 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0033921

(22) 출원일자 2016년03월22일

심사청구일자 2016년03월22일

(30) 우선권주장

1020150152333 2015년10월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박제원

경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 21 항

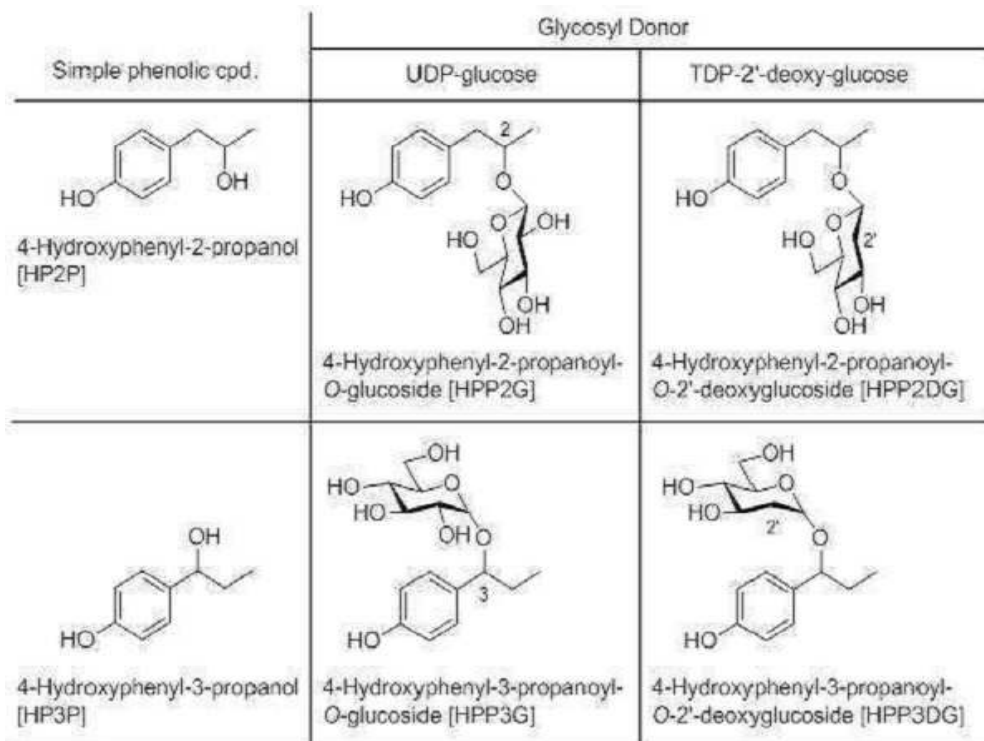
(54) 발명의 명칭 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 피부미백 또는 주름개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 피부미백 또는 주름개선용 화장품에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 유래의 당전이효소(Glycosyltransferase, 이하 MrSPGT)를 이용한 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



analogs)의 제조방법 및 이들 유도체를 유효성분으로 함유하는 피부미백 또는 주름개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 유래의 당전이효소(MrSPGT)를 이용하여 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체는 항산화 활성, 티로시나제 저해 활성 및 인간 멜라노마 세포주 내 멜라닌 생합성 저해 활성 및 세포 독성이 없는 바, 인체 피부에 적용 가능하고, 피부미백 및 주름개선 효과가 우수하여 색소 침착 관련 피부질환의 예방 또는 치료 목적의 의약 조성물 및 피부미백 또는 주름개선용 화장품 조성물로 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61K 8/347 (2013.01)

A61Q 19/02 (2013.01)

B01D 15/163 (2013.01)

C12N 15/52 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12P 19/44 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011066

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규당부가 항생물질 생산

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

연구기간 2015.03.01 ~ 2017.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01002524

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원(핵심연구)사업

연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제후보물질 디자이너

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이효소(MrSPGT).

청구항 2

제1항의 효소를 코딩하는 핵산.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 4

제2항에 있어서, 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 5

제2항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 6

제2항의 핵산 또는 제5항의 벡터를 포함하는 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

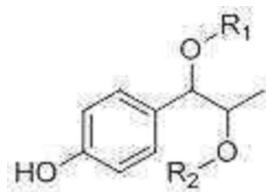
청구항 8

제6항의 재조합 미생물을 배양하여 당전이효소인 MrSPGT의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이효소(MrSPGT)의 제조방법.

청구항 9

화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭.

[화학식 I]



상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

청구항 10

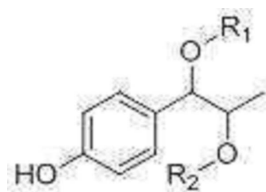
제9항에 있어서, 상기 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체의 제조방법:

- 제1항의 당전이효소인 MrSPGT 존재하에 단순 페놀릭 화합물(Simple Phenolics, SP) 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic analogs)를 합성시키는 단계; 및
- 상기 합성된 단순 페놀릭 배당 유도체를 회수하는 단계;

[화학식 I]



상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단순 페놀릭 화합물은 4-하이드록시페닐-2-프로판올(4-hydroxyphenyl-2-propanol, HP2P) 또는 4-하이드록시페닐-3-프로판올(4-hydroxyphenyl-3-propanol, HP3P)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 당 공여체는 UDP-글루코스(Glc), UDP-갈락토스(Gal) 또는 TDP-2'-데옥시글루코스(deoxy-Glc)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

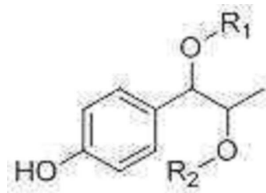
청구항 15

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 아세토나이트릴:메탄올:물:개미산 10:40:60:30~50:0.05~0.2(v/v/v/v) 혼합액 이동상 및 6~9분 유지시간(Retention time) 조건의 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 16

제9항의 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 함유하는, 색소 침착 관련 피부질환의 치료 및/또는 예방용 의약 조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

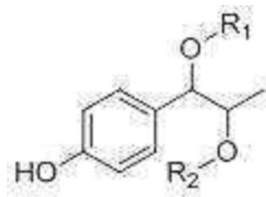
청구항 18

제16항에 있어서, 의약적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

청구항 19

제9항의 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 함유하는, 피부미백 또는 주름개선용 화장품 조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 화장품으로서 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 피부미백 또는 주름개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 유래의 당전이효소(Glycosyltransferase, 이하 MrSPGT)를 이용한 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic analogs)의 제조방법 및 이들 유도체를 유효성분으로 함유하는 피부미백 또는 주름개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 단순 페놀릭 화합물(Simple Phenolics, 이하 SP)은 자연계 중 특히 식물계에 다양하게 존재하는 피토케미컬(Phytochemicals)에 속하며 다양한 생리활성을 보여주고 있는 저분자의 바이오소제이다. 가령, 올리브 잎이나 가공 후 올리브 오일에 주성분으로 존재하는 하이드록시티로솔(hydroxytyrosol 혹은 3,4-dihydroxyphenyl ethanol)과 그 배당체의 일종인 올레로페인(oleuropein)의 경우, 지방 및 핵산의 산화를 방지하는 항산화 활성, 일부 미생물에 대한 항생 활성, 혈소판응집(platelet aggregation) 억제 활성 및 혈관내피세포 장애(endothelial dysfunction) 예방 활성 등이 인비트로(in vitro) 수준에서 보고되고 있다(Tripoli, E. et al., Nutr. Res. Rev. (2005) 18(1): p. 98; de la Torre, R., (2008) 16(5): p. 245; Barbaro, B. et al., Int. J. Mol. Sci. (2014) 15(10): p. 18508).

[0004] 한편, 중국에서 오래전부터 이용되고 있는 한약재로서 SP계열의 티로솔(tyrosol 혹은 4-hydroxyphenyl ethanol)과 여기에 글루코스(glucosde)가 당쇄 결합한 살리드로사이드(salidroside)를 함유하고 있는 홍경천(*Rhodiola*

rosea L 혹은 *tibetan ginseng*)의 경우, 항산화 활성, 심혈관 질환 예방 활성, 항암 활성 및 항피로(anti-fatigue) 활성, 무산소증(anoxia) 억제 활성, 항노화(anti-aging) 활성과 같은 강장(adaptogenic) 효과 등의 다양한 약리활성을 제공하고 있다(Nakamura, S. et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) (2008) 56(4): p. 536; Panossian, A. et al., (2008) 15(1-2): p. 84). 또한 한약재의 일종으로 이용 중인 천마(*Gastrodia elata* Blume) 내 주성분으로 알려진 SP계열 가스트로디게닌(gastrodigenin 혹은 4-hydroxybenzyl alcohol)과 글루코스 배당체인 가스트로딘(gastrodin) 역시 항산화 활성뿐만 아니라 항경련(anti-convulsive) 개선 및 뇌 대사 개선(neuroprotective) 활성을 제시하고 있어서(Ojemann, L.M. et al., Epilepsy Behav. (2006) 8(2): p. 376; Wang, Q. et al., Int. J. Pharm. (2007) 341(1-2): p. 20) 현재 중국에서는 가스트로딘을 신경쇠약(neurasthenia), 두통 및 뇌전증(epilepsy)의 보조 치료제로 임상 이용 중이다. 한편, 베어베리(bearberry)에서 추출되는 SP계열 하이드로퀴논(hydroquinone 혹은 4-hydroxyphenol)과 그 글루코스 배당체인 알부틴(arbutin), 그리고 구주소나무(*Pinus sylvestris* 혹은 Scotch pine) 잎 추출물 내에 SP계열 하이드록시페닐프로판올(4-hydroxyphenyl propanol) 등은 항산화 활성과 피부미백 활성이 알려져 왔다(Sugimoto, K. et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) (2003) 51(7): p. 798; Sugimoto, K. et al., Biol. Pharm. Bull. (2004) 27(4): p. 510; O'Donoghue, J.L., J. Cosmet. Dermatol. (2006) 5(3): p. 196). 이상과 같이, 기존에 다양한 생리 활성이 보고되고 있는 단순 페놀릭 화합물(SP)과 이를 아글리콘(aglycone)으로 하여 당이 추가적으로 부가된 배당체들은 근래에 이르러 피부미백 활성에 따른 기능성 화장품 원료로서 주목 받고 있다.

[0005] 한편, 사람의 피부색은 표피에 존재하는 멜라닌의 양과 분포에 의하여 주로 결정된다. 멜라닌은 단백질과 결합된 형태의 중합체로 피부에 존재하여 자외선을 포함한 넓은 영역의 빛을 흡수하는 기능이 있어서 자외선 조사로부터 신체를 보호하는 중요한 기능을 가지고 있지만, 비정상적으로 생합성이 저해되면 백반증과 같은 피부병변이 유발되고, 반대로 멜라닌이 과잉 생산 되는 경우엔 기미, 주근깨와 같은 색소침착이 형성할 뿐 아니라 피부노화를 촉진하며 피부암 유발과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 멜라닌은 티로시나제(tyrosinase)를 포함하는 여러 효소의 일련에 걸친 산화 환원 반응을 통하여 생합성되며, 특히 티로신(L-tyrosine)을 기질로 이용하여 L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)와 순차적으로 DOPA퀴논(L-DOPAquinone)으로 전환시키는 티로시나제는 멜라닌 생합성 초기 반응으로서 멜라닌 생합성 속도결정 단계로 매우 중요하다(Pillaiyar, T. et al., Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009-2014). Expert Opin. Ther. Pat. (2015) 25(7): p. 775). 피부색소 이상침착 증상과 자외선 노출 등에 따른 과도한 멜라닌 색소 침착을 치료 또는 경감시켜주기 위해서 1990년대 이후 다양한 티로시나제 저해활성을 지닌 화합물을 화장품나 의약품에 배합 사용하여 왔는데, 아스코르빈산(ascorbic acid)과 그 유도체들은 티로시나제에 대한 항산화 활성으로, 코지산(kojic acid)와 엘라그산(ellagic acid)는 티로시나제 포함된 구리(copper) 원자에 대한 킬레이트화(chelating) 활성으로, 그리고 알부틴(시세이도사 제조), 루시놀(rucinol 혹은 4-butyl-benzol-1,3-diol; POLA사 제조), 4MSK(4-methoxy potassium salicylate; 시세이도사 제조), 로도데놀(rhododenol 혹은 4-hydroxyphenyl-2-butanol; 가네보사 제조)되었으나 현재 백반증 유발에 따른 배합 금지) 등은 티로시나제에 대한 경쟁적 저해(competitive inhibition) 활성을 가진 화합물들로 화장품에 배합되고 있다. 이중 SP계 화합물은 티로시나제에 대한 경쟁적 저해 활성을 지닌 상기 화장품 소재들과 구조적으로 유사하다.

[0006] 최근의 선행특허에 따르면 천연의 SP계 화합물인 티로솔과 그 배당체인 살리드로사이드를 함유하는 홍경천 추출물의 피부미백 활성이 보고되었고, 또한 천연 올리브오일 유래의 SP계열 하이드록시티로솔의 멜라닌 생성 억제에 대한 선행 특허들이 제시되어 있다(대한민국 등록특허 10-0445404, 미국공개특허 제20030108651호, 제20030180833호, 일본공개특허 제2011-074044호). 하지만, 천연물 자원들의 경우 기술폭이성에 따른 수확 상 난점, 무분별한 채집, 천연물 내 낮은 함량 및 정제 상 난점은 이들의 산업화에 있어 걸림돌이라 할 수 있다.

[0007] 한편, SP계열 아글리콘(aglycone)들의 경우 생체흡수율은 향상되지만 그 생체대사속도 또한 높은 것으로 보고되었으며, 제형으로 배합 시 아글리콘은 화학적 안정성이 떨어지는 것으로 알려져 있다(de la Torre, R., (2008) 16(5): p. 245). 반면, 배당체의 경우 생체흡수율은 떨어지지만 생체지속성은 아글리콘에 비하여 개선가능하며 다양한 제형화가 용이할 뿐만 아니라 프로드러그(prodrug)화를 통한 신규한 구조 및 제형의 기능성 화장품 원료 및 개량 신약으로 개발이 가능할 것이다. 따라서, 유기합성법이나 효소적 방법으로 다양한 SP계열 화합물에 다양한 배당체를 제조하는 선행 특허 및 비특허 문헌들이 또한 꾸준히 보고되고 있다(대한민국 등록특허 제10-0716797호, 제10-0775095호, 제10-1213219호, 중국등록특허 제101654468B호, 제102241710호, 중국공개특허 제104099379A호; Hirata, T. et al., J. Mol. Catal. B: Enzym. (1999) 6: p. 67; Shimoda, K. et al., J. Mol. Catal. B: Enzym. (2002) 16: p. 275; Sugimoto, K. et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)(2003) 51(7): p. 798; Khymenets, O. et al., Adv. Synth. Catal. (2006) 348: p. 2155; Shimoda, K. et al., Biotechnol. J. (2007) 2: p. 1294; Guo, Y. et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) (2010) 58(12): p. 1627; Shi, T. et al.,

Syn. Comm. (2011) 41: p. 2594; Trincone, A. et al., Bioresour. Technol. (2012) 115: p. 79; Bai, Y. et al., Sci. Rep. 2014. 4: p. 6640; Potocka, E. et al., J. Mol. Catal. B: Enzym. (2015) 113: p. 23).

[0008] 이와 같이 SP계열 화합물의 구조적 변형을 통한 기능성 증대 기술들 중 하나는 SP계열 화합물 화학구조 내 수산기(hydroxy function)에 당 분자를 전이시킬 수 있는 당전이효소(glycosyltransferase)를 이용한 효소적 제조 방법이 있다. 이와 같은 특정 화합물의 당전이화는 원래 물질에 비하여 당화된 화합물은 그 용해도 및 생체 적용 시 흡수성을 보다 높여 줄 수 있어서, 화장품 및 의약품의 제형 개량과 신규 제형 개발 및 프로드럭(prodrug)화에 도움을 줄 수 있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 당이 부가되지 않은 단순 페놀릭 화합물(Simple Phenolics, SP) 대비 생리활성 및 제형적 특성이 현저히 향상된 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic analogs)를 제조하고자 예의 노력한 결과, 단순 페놀릭 화합물을 기질로 하여 당전이 반응을 가능케 하는 신규 당전이효소(MrSPGT)를 이용하여 제조된, 글루코스 및 2'-데옥시-글루코스를 당체로 포함하는 단순 페놀릭 배당 유도체의 피부미백 및 주름개선 효과가 우수한 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 신규한 당전이효소(MrSPGT), 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 상기 핵산 또는 벡터를 포함하는 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 배양하여 당전이효소(MrSPGT)의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이효소의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 당전이효소(MrSPGT)를 이용한 단순 페놀릭 배당 유도체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 단순 페놀릭 배당 유도체를 유효성분으로 포함하는 색소 침착 관련 피부질환의 치료 및/또는 예방용 의약 조성물 및 피부미백 또는 주름개선포 화장료 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

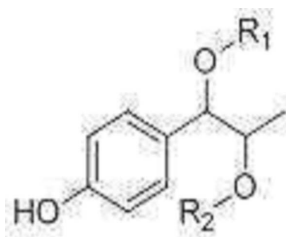
[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이효소(MrSPGT)를 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 효소를 코딩하는 핵산; 상기 핵산을 함유하는 벡터; 및 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 재조합 미생물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 당전이효소(MrSPGT)의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이효소의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 제공한다.

[0021] [화학식 I]

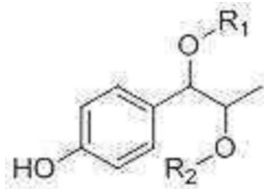


[0022]

[0023] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소이거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0025] 본 발명은 또한, (a) 상기 당전이효소인 MrSPGT 존재하에 단순 페놀릭 화합물(Simple Phenolics, SP) 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic analogs)를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 단순 페놀릭 배당 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0026] [화학식 I]

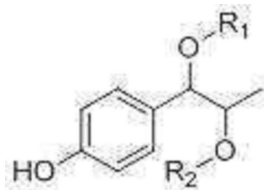


[0027]

[0028] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소이거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0029] 본 발명은 또한, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 함유하는, 색소 침착 관련 피부질환의 치료 및/또는 예방용 의약 조성물 및 피부미백 또는 주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0030] [화학식 I]



[0031]

[0032] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소이거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따르면, 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 유래의 당전이효소(MrSPGT)를 이용하여 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체는 항산화 활성, 티로시나제 저해 활성 및 인간 멜라노마 세포주 내 멜라닌 생합성 저해 활성 및 세포 독성이 없는 바, 인체 피부에 적용 가능하고, 피부미백 효과가 우수하여 색소 침착 관련 피부질환의 예방 또는 치료 목적의 피부미백용 의약 및 화장품 조성물로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 당 공여체(glycosyl donor)로 핵산-당의 일종인 UDP-글루코스(uracil-diphosphate-glucose) 또는 TDP-2-데옥시-글루코스(thymidine-2-deoxy-glucose)와 당 수용체(glycosyl acceptor)로 4-하이드록시페닐-2-프로판올(4-hydroxyphenyl-2-propanol, HP2P) 또는 4-하이드록시페닐-3-프로판올(4-hydroxyphenyl-3-propanol, HP3P)을 각각 당전이효소인 MrSPGT와 반응하는 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 신규한 단순 페놀릭 배당 유도체들, 당 부가 전의 단순 페놀릭 아글리콘들 및 양성 대조군인 아스코르브산의 항산화 활성을 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 신규한 단순 페놀릭 배당 유도체들과 당 부가 전의 단순 페놀릭 아글리콘들 및 양성 대조군인 알부틴의 인비트로(in vitro) 티로시나제 저해 활성, 인간 멜라노마(melanoma) 세포주 내 멜라닌 생합성 저해 활성 및 섬유모세포(fibroblast)를 대상으로 하는 세포 독성을 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 의한 고농도(5%)의 단순 페놀릭 배당 유도체들과 당부가 전의 단순 페놀릭 아글리콘들 및 양성 대조군인 알부틴의 섬유모세포(fibroblast)를 대상으로 한 세포독성 결과를 비교한 그래프이다.

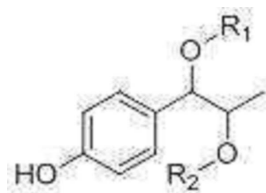
도 5는 본 발명에 의한 단순 페놀릭 배당 유도체들과 당부가 전의 단순 페놀릭 아글리콘들 및 양성 대조군인 어솔린산과 아스코르브산의 엘라스타제 효소 활성 저해 정도를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0039] 본 발명은 피부미백에 유용하게 사용될 수 있는 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체 화합물, 이들 화합물의 효소적 제조방법 및 이들 유효성분으로 함유하고, 항산화(antioxidant) 및 피부미백(skin-whitening) 활성 및 주름개선을 나타내는 색소 침착 관련 피부질환의 치료 및/또는 예방용 의약 조성물 및 피부미백용 화장품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 대장균에서 발현된 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 유래의 재조합 당전이효소(MrSPGT)를 이용하여 신규한 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG) 유도체의 제조에 관한 것이다.

[0040] [화학식 I]



[0041]

[0042] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0044] 본 발명에서는 기존에 당전이화가 보고된 바 없는 단순 페놀릭 화합물(Simple Phenolics, 이하 SP)에 당을 부가한 배당 유도체를 생산하기 위하여, 우선 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주의 유전체(genome)로부터 신규한 당전이효소 암호화 유전자를 분리하고, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질 전환 대장균을 제작한 다음, 재조합 당전이효소(MrSPGT)를 제조하였다.

[0046] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이 효소(MrSPGT)에 관한 것이다.

[0047] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 효소를 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 핵산은 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 핵산은 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 효소를 코딩하는 핵산은 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 효소를 코딩하는 염기서열의 일부(partial) 또는 전부(complete)를 이용할 수 있다(서열번호 3 참조).

- [0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 미생물을 배양하여 당전이효소인 MrSPGT의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 당전이효소(MrSPGT)의 제조방법에 관한 것이다.
- [0054] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 재조합 미생물 당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 재조합 미생물이 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단 부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0055] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 재조합 미생물로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0056] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0057] 당업계에 주지된 바와 같이, 재조합 미생물에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 재조합 미생물이 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0058] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 미생물은 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0059] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의

해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

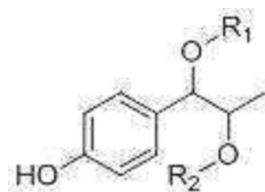
[0060] 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 재조합 미생물의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 재조합 미생물에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0061] 본 발명에서 상기 유전자를 재조합 미생물의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

[0063] 본 발명에서는 재조합 당전이효소에 기질로서 단순 페놀릭 화합물을 반응시켜 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic analogs)를 생합성하였다. 그 다음, 질량분석기(mass spectrometry)와 핵자기 공명 스펙트로메트리(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하였다.

[0065] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭에 관한 것이다.

[0066] [화학식 I]

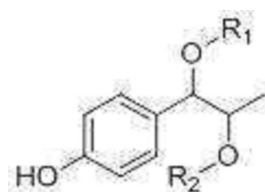


[0067]

[0068] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0070] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 당전이효소인 MrSPGT 존재하에 단순 페놀릭 화합물(Simple Phenolics, SP) 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체(Simple phenolic glycosidic analogs)를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 단순 페놀릭 배당 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[0071] [화학식 I]



[0072]

[0073] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 단순 페놀릭 화합물은 4-하이드록시페닐-2-프로판올(4-hydroxyphenyl-2-propanol, HP2P) 또는 4-하이드록시페닐-3-프로판올(4-hydroxyphenyl-3-propanol, HP3P)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명에 있어서, 상기 당 공여체는 UDP-글루코스(Glc), UDP-갈락토스(Gal) 또는 TDP-2'-데옥시글루코스(deoxy-Glc)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 부가되는 당의 종류로는 단당(mono-saccharide)의 경우에는 글루코스, 만노스(mannose), 갈락토스(galactose), 알로스(allose), 알트로스(altrose), 이도스(idose), 탈로스(talose), 프럭토스(fructose), 아라비노스(arabonose) 또는 자일로스

(xylose)일 수 있으며, 그리고 아미노당으로는 N-아세틸-갈락토사민(N-acetyl-galactosamine), N-아세틸-글루코사민(N-acetyl-glucosamine), N-아세틸-뉴라미닉산(N-acetyl-neuraminic acid), 글루코사민(glucosamine) 또는 갈락토사민(galactosamine)일 수 있고, 이당(di-saccharide)의 경우에는 수크로스(sucrose), 셀로비오스(cellobiose), 말토스(maltose), 락토스(lactose), 트레할로스(trehalose), 겐티오비오스(gentiobiose) 또는 멜리비오스(melibiose)일 수 있으며, 삼당(tri-saccharide)의 경우엔 라피노스(raffinose) 또는 겐티아노스(gentianose)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

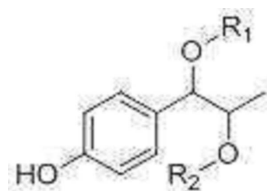
[0076] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 역상 C18 고정상, 아세트나이트릴:메탄올:물:개미산 10:40~60:30~50:0.05~0.2(v/v/v/v), 바람직하게는 10:45~55:35~45:0.07~0.12(v/v/v/v), 가장 바람직하게는 10:50:39.9:0.1(v/v/v/v) 혼합액 이동상 및 6~9분 유지시간(Retention time) 조건의 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)를 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 본 발명은 단순 페놀릭 배당 유도체의 생화학적 활성을 확인하고자, 항산화 활성, 인간 티로시나제에 대한 저해 활성, 인간 멜라노마(melanoma) 세포주 내 멜라닌 생합성에 대한 저해 활성 및 섬유모세포(fibroblast)를 대상으로 하는 세포독성 및 엘라스타제에 대한 저해활성 여부를 검사하였으며, 그 결과 인체 피부에 적용 가능하고 피부미백 효과가 우수하며 동시에 피부주름 개선까지 가능한 것을 확인하였다.

[0081] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 함유하는, 색소 침착 관련 피부질환의 치료 및/또는 예방용 의약 조성물에 관한 것이다.

[0082] [화학식 I]



[0083]

[0084] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소이거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0087] 용어 "의약(약제학적, 약학적) 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 발명의 단순 페놀릭 배당 유도체인 상기 화학식 (I)로 표시되는 화합물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.

[0088] 용어 "약리학적으로 허용되는(physiologically acceptable)"은 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 담체 또는 희석제로 정의된다.

- [0089] 용어 "담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0090] 용어 "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [0091] 여기에 사용된 단순 페놀릭 배당 유도체를 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 활성 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 의약 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0092] 본 발명에서 사용에 적합한 의약 조성물에는, 활성 성분들이 그것의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 당업자의 능력 범위 내에 있다.
- [0093] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 이의 의약으로 허용가능한 염을 포함하는 의약 조성물의 투여(또는 도포)로 항산화 활성을 나타내고, 피부 색소인 멜라닌 생합성에 관여하는 티로시나제의 작용을 저해함으로써 기미, 주근깨, 피부색소 이상침착 증상 및 자외선 노출 등에 따른 과도한 멜라닌 색소 침착을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 이의 의약으로 허용가능한 염을 포함하는 의약 조성물의 투여(또는 도포)로 피부색소 이상침착 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 의약으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 의약으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 황산을 사용할 수 있다.
- [0096] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 의약으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.
- [0097] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체가 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 의약 조성물은 표준 의약 실시예에 따라 경구 또는 비경구 투여(도포) 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 의약으로 허용가능한 담체, 부형제, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.
- [0100] 상기 의약 조성물 및 후술되는 피부미백용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0101] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이

외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0102] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 이의 의약으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 의약 조성물은 임상 투여(도포)시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여(도포) 형태로 제제화되어 투여(도포)될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0103] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0104] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 이의 의약으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0105] 본 발명은 일 양태에서 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 단순 페놀릭 배당 유도체를 포함하는 조성물을 개체에 투여(또는 도포)하여 색소 침착 관련 피부질환을 치료하고 억제(또는 완화)하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 단순 페놀릭 배당 유도체를 포함하는 조성물은 색소 침착 관련 피부질환을 치료하기 위하여, 또는 색소 침착 관련 피부질환의 증세를 억제(또는 완화)하기 위하여 의약으로 효과적인 양으로 투여(또는 도포)될 수 있다. 색소 침착 관련 피부질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여(도포) 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분을 함께 투여(도포)하거나 순차적으로 투여(도포)할 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여(도포)될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여(도포)될 수 있다. 이러한 투여(도포)는 단일 또는 다중 투여(도포)일 수 있다.

[0106] 본 발명에서, "개체"는 본 발명에 따른 단순 페놀릭 배당 유도체를 투여(도포)하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게 사람을 의미한다.

[0107] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량(도포량)은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여(도포) 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여(도포)할 수도 있다.

[0108] 본 발명의 방법들에서 사용되는 임의의 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 이를 포함하는 혼합물에 대한 치료적 유효량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 측정될 수 있다. 예를 들어, 선량(dose)은 세포 배양에서 결정된 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration) 또는 EC₅₀(half maximal effective concentration)를 포함하는 순환 농도 범위를 얻기 위하여 동물 모델에서 계산될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서의 유용한 선량을 더욱 정확히 결정하는데 사용될 수 있다.

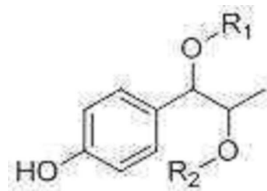
[0109] 여기에 기재되어 있는 단순 페놀릭 배당 유도체, 또는 이를 포함하는 혼합물들의 독성과 치료 효율성은, 예를 들어, LD₅₀(군집의 50%에 대한 치사량), ED₅₀(군집의 50%에 대해 치료 효과를 갖는 선량), IC₅₀(군집의 50%에 대해 치료 억제 효과를 갖는 선량)을 결정하기 위하여, 세포 배양 또는 실험동물에서의 표본 제약 과정들에 의해

산정될 수 있다. 독성과 치료 효과 간의 선량 비가 치료 지수이고 이것은 LD₅₀과 ED₅₀(또는, IC₅₀) 간의 비율로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 화합물들이 바람직하다. 이들 세포 배양 분석에서 얻어진 데이터는 인간에 사용하는 선량의 범위를 산정하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 투여량(dosage) 또는 도포량은 바람직하게는 독성이 없거나 거의 없는 상태에서 ED₅₀(또는, IC₅₀)을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다.

[0111] 본 발명의 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체의 항산화 활성을 나타내고(실시예 2-1), 인간 멜라노마(melanoma) 세포주에 대하여 멜라닌 합성을 억제하고, 세포 내 타이로시나제의 활성을 저해하는 한편 상대적으로 낮은 세포독성을 나타내고(실시예 2-2) 피부노화와 관련된 엘라스타제(elastase) 효소 반응에 대한 저해 활성을 가짐으로써(실시예 2-3), 피부미백 또는 주름개선용 기능성 화장품으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0112] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체, 이의 이성질체 또는 의약으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 함유하는, 피부미백 또는 주름개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

[0113] [화학식 I]



[0114]

[0115] 상기 화학식 (I)에서, R₁은 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)인 동시에 R₂는 수소가거나, 반대로 R₁이 수소인 동시에 R₂는 글루코스(glucose) 또는 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose)임.

[0116] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 (I)로 표시되는 단순 페놀릭 배당 유도체는 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-O-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-O-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-O-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-O-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-O-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-O-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-O-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-O-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0118] 본 발명은 또한, 화장품으로 첨가되는 단순 페놀릭 배당 유도체의 함유량은 각종 화장품의 0.001중량% 내지 10 중량%이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.01중량% 내지 5 중량%이다. 배당 유도체의 함유량이 0.001 중량% 미만이면 미백효과를 기대할 수 없고, 10 중량%를 초과하면 사용량만큼의 효과가 없을 뿐만 아니라 안전성 및 제형상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.

[0119] 또한, 본 발명의 화장품으로서 허용가능한 피부미백용 조성물은 배당 유도체 외에 본 발명이 목적으로 하는 미백 효과를 저해시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 상기 미백 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 미백 성분 등을 함유하는 것도 무방하다. 이와 같은 미백 성분으로는 아스코르브산 유도체 혹은 알파-비사보롤 등을 들 수 있다.

[0120] 또한, 본 발명의 단순 페놀릭 배당 유도체를 함유하는 피부미백용 화장품은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면 유연화장수(스킨), 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일, 보디에센스, 팩, 피부접착용 패취 및 피부접착용 겔 등의 화장품으로 제형화 될 수 있다.

[0121] 본 발명의 피부미백용 조성물의 제형은 유효성분 이외에 화장품으로서 허용가능한 담체, 부형제, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

[0123] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0125] **실시예 1: 마이크로모노스포라 로도랑지아로부터 MrSPGT 암호화 유전자 분리, 대장균 내 발현 및 MrSPGT 효소반응 산물의 정제**

[0126] **(1) 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 MrSPGT 암호화 유전자 분리**

[0127] 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 균주로부터 유래한 단순 페놀릭 화합물을 기질로 이용하는 당전이효소 MrSPGT를 분리하기 위하여, 먼저 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주에서 분리한 유전체를 주형으로 사용하고 그 유전체의 염기서열을 기초로 제작한 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머(primer)로 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 다음과 같이 실시하였다. N-터미널 프라이머는 하기 서열번호 1의 서열이고, C-터미널 프라이머는 하기 서열번호 2의 서열이다.

[0128] 서열번호 1: 5' - GGCATATGAGCGAGCCTGACACGGGTG - 3' (*Nde*I 제한위치)

[0129] 서열번호 2: 5' - CGTGGTGGGCCGACCTCGAGGAGAACAC - 3' (*Xho*I 제한위치)

[0131] 상기 균주의 유전체 DNA 및 상기 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하고 32 사이클로 중합연쇄반응을 수행하였다(초기 불활성 98℃에서 5분, 52.8℃에서 69.3℃로 기울기 반응 후, 72℃에서 5분 동안 반응 후 종결). PCR 산물을 정제한 후, pGEMT-T 이지 벡터(pGEMT-T easy vector, Promega, Madison, WI, USA)에 접합한 다음, 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 42℃에서 45초간 열처리한 후, 형질전환을 수행하였다. 선발된 형질전환 대장균으로부터 T-이지 벡터를 분리, 정제한 후 그 염기서열(서열번호 3) 및 이로부터 유추한 아미노산 서열(서열번호 4)을 결정하였다.

[0132] 그 결과, 전체 염기서열은 1176bp이며, 번역 후 단백질은 391개의 아미노산으로 구성(총 41.78kDa)되어 있는 것으로 확인되었다.

[0134] **(2) 대장균에서 MrSPGT 재조합 당전이효소의 발현**

[0135] 상기 T-이지 벡터를 *Nde*I과 *Xho*I 제한효소로 처리한 MrGT1 DNA 절편을 동일한 제한효소들로 처리한 단백질 발현 벡터인 pET-28(a+)(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입한 후, 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 형질전환시켰다. 이때, 형질전환체의 선별(selection)을 위하여 카나마이신 항생제 50ppm을 사용하였다.

[0136] 상기 재조합 대장균을 전술한 항생제와 최종 농도 1M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5mM 베타인(betaine)이 첨가된 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 37℃에서 배양하였고, 광학농도(optical density) 0.6~0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자, 최종농도 0.5mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 재조합 대장균 균주를 20℃에서 24시간 추가 배양하였다. 배양 후 배양액을 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 균주를 회수한 후, 50mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300mM NaCl, 10mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 수행하였다. 그 다음, 12000rpm에서 20분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 따로 모아 일부 시료를 12% SDS-PAGE로 분석하여 재조합 당전이효소 MrGT1의 발현 정도를 확인하였다. 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여, 전술한 상등액을 50mM 인산 완충용액(0.3M NaCl, 20mM imidazole)에 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 2000rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 20mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 180mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액 3ml로 수지에 결합된 재조합 당전이효소 MrSPGT를 정제하였다.

[0138] **(3) 단순 페놀릭 화합물을 기질로 사용하여 MrSPGT 재조합 효소 반응에 의한 단순 페놀릭 배당 유도체의 생합성 및 생합성된 페놀릭 배당 유도체의 정제**

[0139] 티로솔(4-hydroxyphenyl ethanol; Sigma, St. Louis, MO, USA), 하이드록시페닐-프로판올(4-hydroxyphenyl

propanol; Sigma, St. Louis, MO, USA), 하이드록시페닐-2-프로판올(4-hydroxyphenyl-2-propanol; UROSY, Latvia), 하이드록시페닐-3-프로판올(4-hydroxyphenyl-3-propanol; USOSY, Latvia)을 100mM 수준으로 메탄올에 용해한 후, 반응 완충용액(50mM 인산 완충용액, 10mM 염화마그네슘, 1mg/ml 소 혈청 알부민)으로 희석하여 최종 2mM의 농도가 되게 한 후, MrSPGT 당전이효소 50 μ M와 핵산-당으로 UDP-글루코스(UDP-glucose) 및 TDP-2-데옥시-글루코스(TDP-2-deoxy-glucose)를 4mM 농도로 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 당전이효소 반응을 수행하였다. 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 상층의 유기용매층만을 모아서 진공건조를 수행하였다. 상기 추출물 내 목적 화합물의 생합성 여부를 확인하기 위하여 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석을 수행하였다. 즉, 이동상으로 아세토나이트릴:메탄올:물:개미산 10:50:39.9:0.1(v/v/v/v) 혼합액을 분당 130 μ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50 x 1.0mm, 1.7 μ m; Milford, MA, USA)을 사용하여 기기분석을 수행하였다(도 1 참조).

[0140] 한편, 상기 조추출물로부터 목적하는 단순 페놀릭 배당 유도체들의 분리 및 정제를 위하여 하기 콤비플래시 Rf MPLC 시스템을 사용하였다. 즉, 역상(reverse-phase) C18 카트리지에 아세토나이트릴:메탄올:물:개미산 10:50:39.9:0.1(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 7ml의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템에, 동일한 이동상 3ml에 용해시킨 전술한 조추출물을 주입한 후, 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분취를 다시 감압하여 농축한 다음, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 단순 페놀릭 배당 유도체들을 정제하였다.

[0141] 그 결과, 기질로 사용된 단순 페놀릭 화합물들은 MPLC 시스템 상 12 ~ 15분의 유지 시간으로 분취되었고, 목적하는 단순 페놀릭 배당 유도체들은 기질보다 빠른 유지 시간인 6-9분 사이로 각각 검출되었다.

[0142] 또한, 정제된 단순 페놀릭 배당 유도체들 중 신규 배당체들은, 도 1에 나타난 바와 같이, 각각 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-glucoside, HPP2G), 4-하이드록시페닐-2-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-2-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP2DG), 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-glucoside, HPP3G) 및 4-하이드록시페닐-3-프로파노일-*O*-2'-데옥시글루코사이드(4-hydroxyphenyl-3-propanoyl-*O*-2'-deoxyglucoside, HPP3DG)로 각각의 배당체 구조들을 가지는 것으로 나타났으며, 상기 HPP2G, HPP2DG, HPP3G 및 HPP3DG의 수득량은 각각 9.7mg, 6.3mg, 6.8mg 및 3.9mg으로 최종 정제되었다.

[0143] NMR 시료들은 200 μ l의 CD₃OD에 각각의 배당 유도체들을 용해시킨 후, 5mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ¹³C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 배당 유도체들의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 반응 전 단순 페놀릭 화합물들과 비교하였다(표 1 참조).

[0145] 표 1은 MPLC 컬럼 크로마토그래피 작업으로 정제된 단순 페놀릭 배당 유도체들 4종의 핵자기 공명 스펙트로미터리(nuclear magnetuc resornance spectrometry) 기기 분석에 따른 ¹³C-NMR 결과를 나타낸 것이다.

표 1

위치	HPP2G	HPP2DG	HPP3G	HPP3DG
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	21.3	21.3	10.5	10.5
2	72.3	72.1	29.7	29.7
3	44.1	44.1	83.0	83.2
4	129.7	129.9	134.2	134.2
5	130.8	130.8	128.1	128.2
6	116.2	116.2	115.9	116.2
7	154.9	155.1	156.2	156.2
8	116.9	116.7	115.7	116.5
9	130.5	130.7	128.4	128.4
1 “	109.0	105.6	111.7	104.2
2 “	74.0	38.5	74.3	38.4

3 “	76.7	68.8	76.7	68.8
4 “	71.5	71.5	71.5	71.5
5 “	81.1	77.3	81.1	77.2
6 “	62.1	62.2	62.1	62.2

실시예 2: 단순 페놀릭 배당 유도체의 생화학적 활성 및 세포 독성 검정

실시예 2-1: 단순 페놀릭 배당 유도체들, 단순 페놀릭 화합물들 및 아스코르브산의 항산화 활성 비교

실시예 1에서 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체들의 항산화 활성 검정을 위하여, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 이용한 항산화능을 측정하였다. 정제된 배당체들을 메탄올로 0.1에서 2mM 사이의 5 구간 (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 그리고 2.0mM)으로 희석한 시료 각 0.1ml에 100 μ M DPPH 시약(DMSO 용해) 1.9ml을 첨가하여 5초간 진탕하여 섞은 후, 37℃에서 15분간 정치하였다. 이후, UV-VIS 분광광도계 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 아스코르브산(L-ascorbic acid; Sigma, St. Louis, MO)를 그리고 당전이 반응 전의 단순 페놀릭 화합물들을 양성 비교군으로 사용하여, 상기와 동일한 5구간을 이용하여 상기 방법과 동일하게 측정하였다. 활성 검정은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 화합물의 농도(IC₅₀)로 표시하였고, 그 결과를 도 2에 나타냈다.

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 아스코르브산은 IC₅₀이 약 0.16mM로 나타났고, 비교군인 단순 페놀릭 화합물들 2종은 IC₅₀이 약 0.19mM로 나타났으며, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 약 0.20에서 0.22mM 사이로 나타났다. 이를 통하여 당 전이된 단순 페놀릭 유도체들은 강한 항산화 활성을 지닌 양성 대조군 아스코르브산 보다는 낮은 항산화 활성을, 하지만 당 전이 전 단순 페놀릭 화합물과는 통계적 유의수준 내 유사한 항산화 활성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

실시예 2-2: 단순 페놀릭 배당 유도체들, 단순 페놀릭 화합물 및 알부틴의 티로시나제 저해 활성, 인간 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 합성 및 세포 독성 비교

실시예 1에서 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체들의 인비트로(in vitro) 티로시나제 저해 활성을 검정하기 위하여, 타이로시나제 기질로 2mM 농도의 L-티로신(L-tyrosine; Sigma) 용액 20 μ l를 96웰 플레이트(well-plate)에 첨가하고, 이어서 100mM 인산 완충용액(pH 6.8) 100 μ l와 0.3mM 수준(DMSO 용해)으로 고정화된 단순 페놀릭 배당체 4종 및 반응 전 단순 페놀릭 화합물 2종을 각각 20 μ l 첨가한 후, 마지막으로 티로시나제(2000 Unit/ml; Sigma) 10 μ l를 첨가하여 30℃에서 20분간 반응시켰다. 음성 대조군으로는 DMSO를 사용하고, 양성 대조군으로는 0.3mM 수준(DMSO 용해)의 알부틴을 사용하였으며, 반응시킨 후 490nm 흡광 필터가 장착된 마이크로 플레이트 리더(Microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정한 뒤, 티로시나제 저해 활성을 하기 계산식 I로 환산하여 도 3에 막대 그래프로 나타냈다.

[계산식 I]

$$\text{티로시나제 저해 활성(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \right)$$

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 알부틴의 경우 티로시나제 저해 활성이 약 46%로 나타났고, 비교군인 단순 페놀릭 화합물들 2종은 각각 약 76%와 약 73%로 나타났으며, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 그 사이로 나타나 약 55%에서 64% 범위로 저해 활성을 나타내었다.

이를 통하여 당 전이된 단순 페놀릭 유도체들은 당 전이 전의 단순 페놀릭 화합물보다는 그 티로시나제 저해 활성이 상대적으로 약함을 보여주었으며, 기존 양성 대조군 중 하나인 알부틴보다 높은 티로시나제 저해 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 배당 유도체 중에서 2번 위치에 수산기가 부가된 HPP2계열의 배당 유도체들이 HPP3계열의 배당 유도체보다 티로시나제 저해 활성이 높게 나타났고 이는 배당체의 부가 위치와 티로시나제의 저해 활성간의 연관성을 제시하고 있다. 하지만 부가된 당의 종류를 비교한 결과, 즉, 글루코스 혹은 2-데옥시-글루코스의 차이에 따른 티로시나제 저해 활성의 차이는 없었다.

한편, 실시예 1에서 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체들의 멜라닌 생성 억제 활성을 검정하기 위하여, B16/F10

멜라노마(melanoma) 세포주를 사용하였다. 즉, 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지를 96 웰 플레이트에 2000세포들/웰 수준으로 분주한 다음, 37℃에서 5% 이산화탄소 농도로 24시간 배양하였다. 배양 후 각각 2μM 알파-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)와 2mM 테오필린(theophylline)을 포함하는 DMEM 배지로 교체하고, 최종 0.3mM 농도(DMSO용해)로 고정화된 단순 페놀릭 배당체 4종 및 반응 전 단순 페놀릭 화합물 2종을 하루 간격으로 3일간 3회 처리하였다. 처리된 세포를 총 5일간 배양한 다음, 배지를 제거하고 0.25% 트립신-EDTA(Sigma) 용액으로 처리하여 멜라노마 세포를 회수한 다음, 이를 10,000rpm에서 10분간 냉장 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 회수된 세포들을 55℃에서 건조시킨 뒤 1N 수산화나트륨 용액 100μl를 첨가하여 세포 내 멜라닌을 녹이고 이를 인산 완충용액으로 희석하여 최종 475nm 마이크로플레이트 리더(Microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로 DMSO를 사용하였고, 양성 대조군으로는 0.3mM 농도(DMSO용해)의 알부틴을 사용하였으며, 멜라닌 생합성 저해 활성을 하기 계산식 II로 환산하여 도 3에 막대 그래프로 나타냈다.

[계산식 II]

$$\text{멜라닌 생합성 저해 활성(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \right)$$

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 알부틴의 경우 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 생합성 저해 활성이 약 41%로 나타났고, 비교군인 단순 페놀릭 화합물들 2종은 각각 약 64%와 약 66%로 나타났으며, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 그 사이로 나타나 약 49%에서 약 57% 범위로 저해 활성을 나타낸다. 이를 통하여 당 전이된 단순 페놀릭 유도체들은 당 전이 전의 단순 페놀릭 화합물보다는 그 멜라닌 생합성 저해 활성이 상대적으로 약함을 보여주었으며, 한편 기존 양성 대조군 중 하나인 알부틴보다는 유의 수준 범위 내로 향상된 멜라닌 생합성 저해 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 배당 유도체 내 당의 부가 위치(위치 2 혹은 위치 3)와 멜라닌 생합성 저해 활성간의 연관성은 없었으나, 부가된 당의 종류 즉, 글루코스 혹은 2-데옥시-글루코스의 차이에 따른 멜라노마 세포주에 대한 멜라닌 저해 활성의 차이가 일부 나타났으며, 이는 글루코스와 2-데옥시 글루코스의 당 구조가 단순 페놀릭 배당체의 세포 내 흡수에 일부 영향을 끼칠 가능성을 제시하고 있다.

마지막으로, 실시예 1에서 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체들의 세포 독성 정도를 검정하기 위하여, 섬유모세포(fibroblast)를 이용한 MTT 검정법을 이용하였다(Mosmann, Tim, *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63, 1983). 대수증식기(log phase) 상태의 섬유모세포를 96웰 플레이트에 8000세포들/웰 수준으로 분주하여 200μl의 DMEM 배지에서 37℃에서 5% 이산화탄소 농도로 24시간 배양하였다. 상기 배지에 최종 0.3mM 수준(DMSO 용해)으로 고정화된 단순 페놀릭 배당체 4종 및 반응 전 단순 페놀릭 화합물 2종을 첨가한 후 약 20시간 반응시켰다. MTT 용액(최종 500μg/ml)을 배지에 첨가한 뒤 4시간 추가 배양을 통하여 정색반응을 실시한 뒤, 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 생존 정도를 하기 계산식 III으로 환산하여 도 3에 막대 그래프로 나타냈다.

[계산식 III]

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 비교군인 단순 페놀릭 화합물들 2종은 최종 0.3mM 수준에서 대조군 대비 각각 약 72%와 약 77%의 세포 생존율이 나타났으며, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 그 보다 높은 98%에서 107% 범위로 세포 생존율을 보여주었다. 이는 티로시나제 및 멜라노마 세포에 저해 활성을 나타내고 있는 0.3mM 농도의 단순 페놀릭 배당 유도체들의 경우 원 화합물인 단순 페놀릭 화합물보다는 그 세포 독성이 현저히 낮음을 제시하고 있다.

상기 실시예에서 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체들을 고농도로 함유할 경우에 그 세포 독성 정도를 검정하기 위하여, 상기의 섬유모세포(fibroblast)를 이용한 MTT 검정법을 이용하였다.

고농도의 기준은 현재 대한민국 식품의약품안전처에서 공지하고 있는 미백 최대 함량 5%에 준하였다. 전술한 MTT 검정법에서 대수증식기 상태의 섬유모세포를 96 웰 플레이트에 8000 cell/well 수준으로 분주하여 200μl의

DMEM 배지에서 37에서 5% 이산화탄소 농도로 24시간 배양하였다.

[0172] 37에서 5% 이산화탄소 농도로 200 μ l의 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양된 96웰 플레이트 내 섬유모세포에 최종 5% 수준(DMSO용해)으로 각각 제조된 단순 페놀릭 배당체 4종과 반응 전 단순 페놀릭 화합물 2종 그리고 양성 대조군으로 알부틴을 첨가한 후 약 20시간 반응시켰다. MTT 용액(최종 500 μ g/ml)을 배지에 첨가한 뒤 4시간 추가 배양을 통하여 정색반응을 실시한 뒤, 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 생존 정도를 상기 계산식 III으로 환산하여 도 4에 막대 그래프로 그 세포 독성을 나타내었다.

[0173] 도 4에 나타난 바와 같이, 비교군인 단순 페놀릭 화합물들 2종은 대한민국 식품의약품안전처 공시 미백성분 최대 함량 5% 수준에서 대조군 대비 각각 약 33%와 36%의 세포 생존율이 나타났으며, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 모두 통계학적으로 유의하게 84%에서 98% 범위로 세포 생존율을 보여주었다. 한편, 양성 대조군인 5% 고농도 알부틴의 경우에는 대조군 대비 약 94%의 세포 생존율을 제시하고 있다. 전술한 0.3mM(물분율을 %함량으로 변환 시 0.005에서 0.009%) 수준의 세포 독성 실험에 비하여 약 500배에서 1000배 이상으로 농축된 고농도(5%) 수준의 단순 페놀릭 배당 유도체들의 경우 당 부가 전의 단순 페놀릭 화합물들에 비하여 현저히 낮은 세포 독성을 보여주었으며 나아가 양성 대조군인 알부틴과도 유사한 세포 독성 결과를 제시하고 있다. 특히, 단순 페놀릭 배당 유도체들과 단순 페놀릭 화합물들 각각의 경우 도 4의 세포 생존율 결과와 동일한 경향을 나타내었다.

[0174] 따라서 본 발명의 신규한 단순 페놀릭 배당 유도체들은 규제기관 공시 미백 화합물 최대함량인 5% 농도 기준으로 양성 대조군인 알부틴과 그 세포 독성에 차이가 없음을 나타내고 있음을 확인하였다.

[0175] 그러므로 본 발명의 신규한 단순 페놀릭 배당 유도체들은 5% 고농도 수준으로 화장품 조성물의 제조에 첨가될 수 있다.

[0177] 실시예 2-3: 실시예 배당 유도체들과 단순 페놀릭 화합물들, 어솔릭산(ursolic acid) 및 아스코르브산의 엘라스타제(elastase) 저해 활성 비교

[0178] 실시예 1에 의해 생합성된 단순 페놀릭 배당 유도체들의 엘라스타제(elastase) 저해 활성 비교를 통한 주름개선 효과의 검정을 실시하였다.

[0179] 엘라스타제는 돼지 췌장 유래의 엘라스타제(Sigma)를, 기질로는 N-석시닐-[L-알라닌-알라닌-알라닌]-*p*-니트로아닐라이드(N-succinyl-[L-alanine-alanine-alanine]-*p*-nitroanilide, Sigma)을 사용하여 25에서 20분 반응 후, 405nm 마이크로플레이트 리더(Microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다.

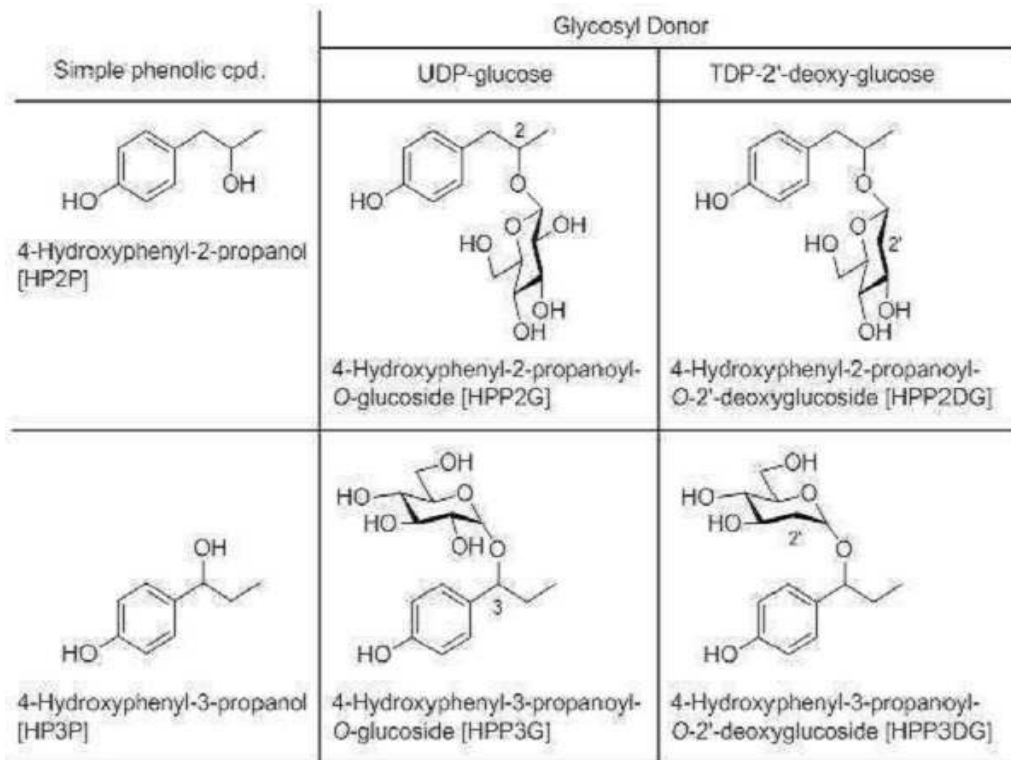
[0180] 양성 대조군으로는 어솔릭산(ursolic acid, Sigma)와 아스코르브산 2종을 그리고 당전이 반응 전의 단순 페놀릭 화합물들을 양성 비교군으로, 그리고 음성대조군으로는 시료 용해용 DMSO를 사용하였다. 엘라스타제 저해 정도는 음성대조군 대비 흡광도 50% 감소시키는데 필요한 화합물의 농도(IC₅₀)로 표시하였고, 그 결과를 도 5에 나타냈다.

[0181] 도 5에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 어솔릭산은 IC₅₀이 약 0.08 mM로 나타났으며, 한편 아스코르브산은 약 5.12 mM로 나타났다. 비교군인 단순 페놀릭 화합물 2종은 IC₅₀이 모두 1.2 mM 이상으로 나타났으며, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 0.30에서 0.70 mM 사이로 나타났다. 이를 통하여 당 전이된 단순 페놀릭 유도체들은 강한 엘라스타제 저해 활성을 지닌 양성 대조군 어솔릭산 보다는 낮으나 아스코르브산보다는 높은 엘라스타제 저해 활성을 보였다. 또한, 당 전이 전 단순 페놀릭 화합물에 비하여 단순 페놀릭 배당 유도체들은 당 부가 후 엘라스타제 저해 활성이 향상되었음을 확인할 수 있으므로, 단순 페놀릭 배당 유도체들은 어느 정도 주름 개선 효과를 보여주고 있다.

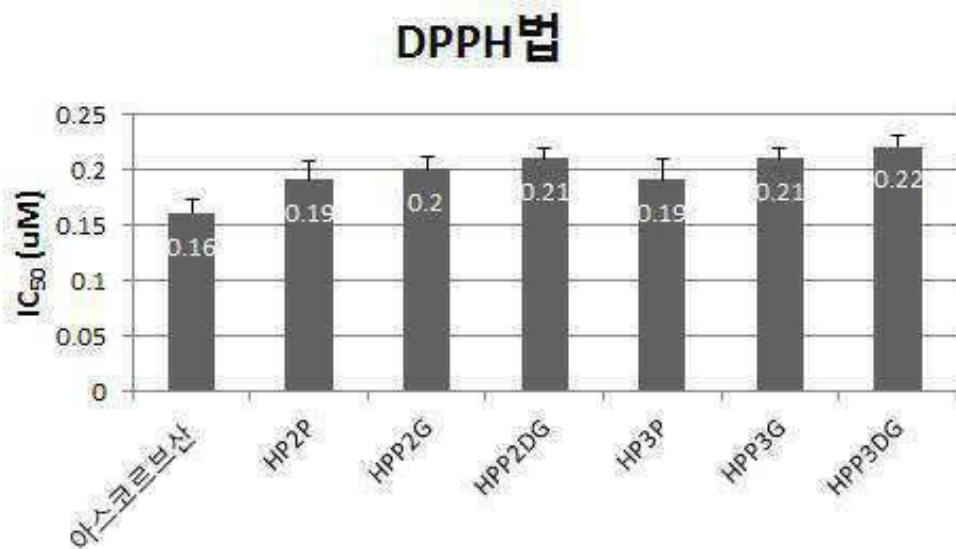
[0183] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

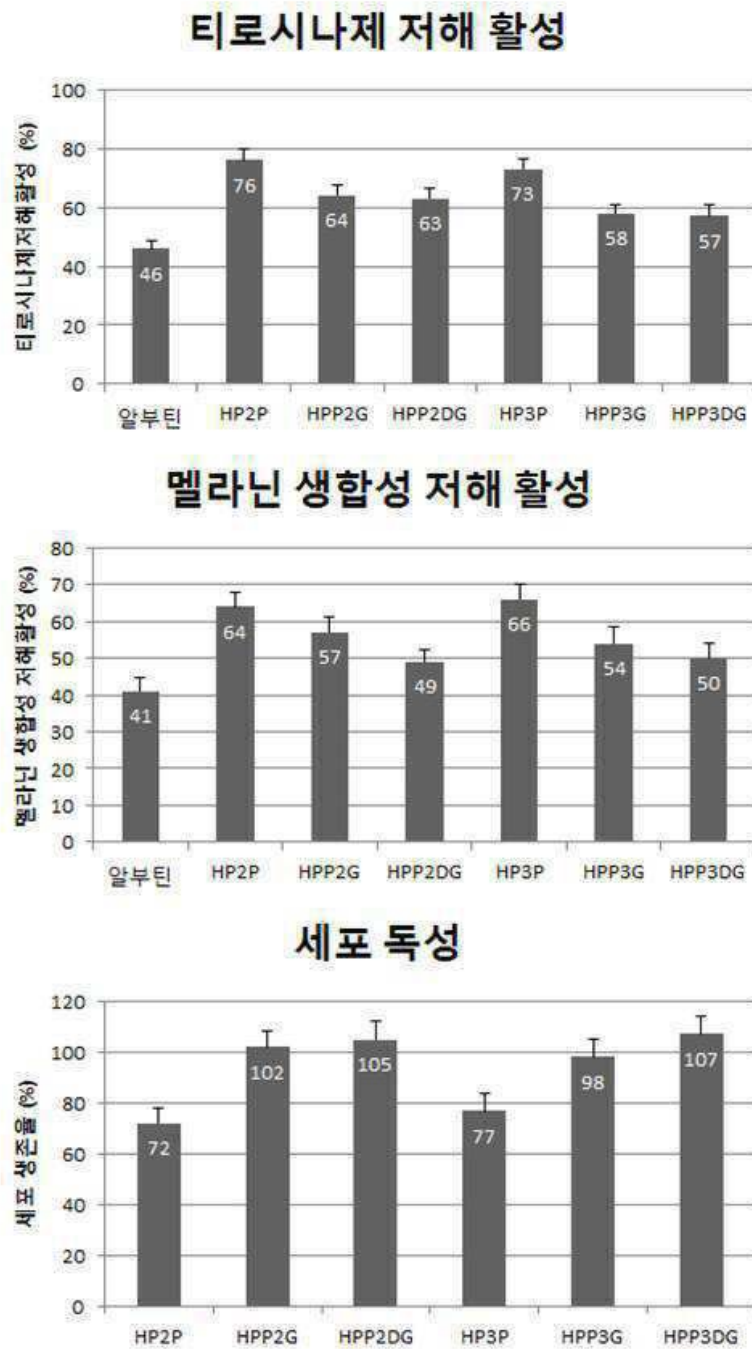
도면1



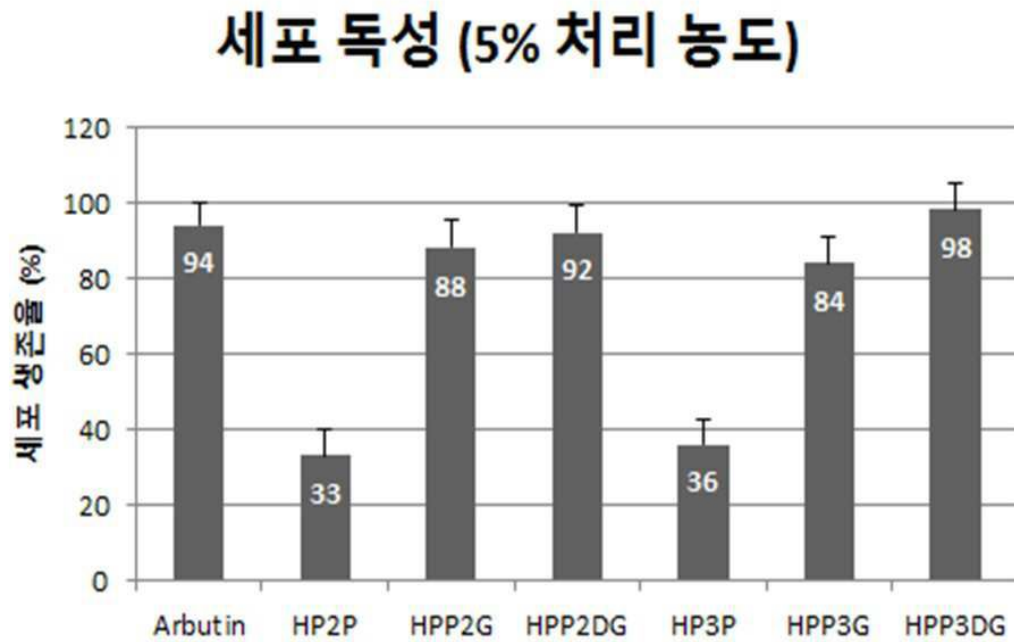
도면2



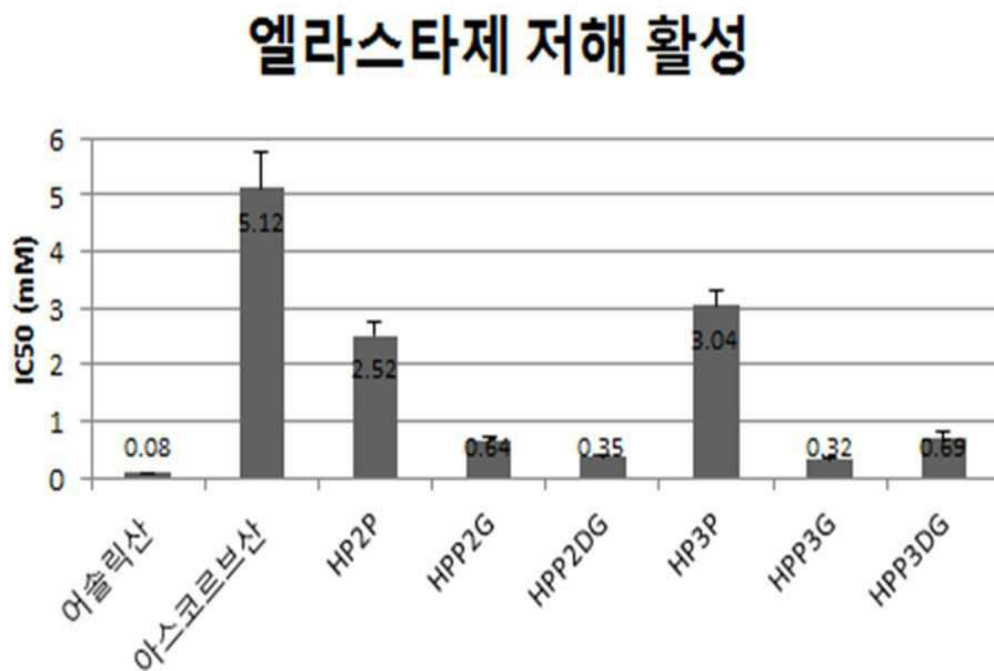
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Research And Business Foundation
- <120> Simple Phenolic Glycosidic Analogs, Preparing Method Thereof and Skin-Lightening Pharmaceutical Composition Comprising the Same

<130> P15-B309

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal primer

<400> 1

ggcatatgag cgagcctgac acgggtg 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> C-terminal primer

<400> 2

cgtggtgggc cgactcgagg agaacac 27

<210> 3

<211> 1176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Micromonospora rhodorangea derived MrSPGT

<400> 3

atgtccgcc gcccgccca catgccatg gtctccatcc cgttcacgg ccacgtcaac 60

ccgtccctgg agatcatctc caccctggtc cgcgcggcc accgcgtcac ctacgccaac 120

gacccggcgg ccgccgacct gaccaaggcc accggcgccg agctgggtccc ggtcacctcc 180

gtcccgccgg tcgccgacaa cgccggcatc gacgaccga tcgccagct gaccctgttc 240

ctggacgacg ccgtcgccat gctgccgcag gtccgcaccg cctacgccga cgaccgccg 300

gacctgtacc tgtacgacat cgccggcgcc ccggcccgcc tgctgggcga gcagtggggc 360

atcccgccg tccagcgctc cccgacctcc gtgcctggg agggctacga gcaggagatg 420

gccgccatgc gcgccgacc gccggcgcc gactactacc gcgccgctt caccgcctgg 480

ctgaccgcct gcggcgccac caccaccgac tccatggcct gctgcggccc gccgtccgc 540

tccctgggtcc tgcgcgccga ggccatgcag ccgtacgccg acaaggtcga ccgtccgtc 600

 tacaccttcg tggcccggt cctgggccgc cgctccgacg agggcacctg ggtccgcccg 660
 gagcgcgcgc acaaggtcct gctggtctcc ctgggtccg cctacaccg ccagccggag 720
 ttctaccgca acigcctggc cgccctgggc gagctgccgg gctggcacgt cgtcctgcag 780
 atcggccgcc acaccgacce gcgcgagctg ggcaccgtcc cgccgggctg cgacgtccgc 840
 acctgggtcc cgcaggtcgc cgctctggcc gaggccgacg cctgcgtcac ccacgccggc 900
 atcggctcct cctccgaggg cctgtactgc ggcacccga tgatcgccgt cccgcagggc 960
 gccgagcagt tcatgaacgc gcaccgctg gcctccctgg gcgtcgcccg ccgcatcgac 1020

 accgccgacg cctccgccgc cgagctgcgc gagacctgc tggccctgac cgccgaccg 1080
 gccgtcgtcg cccgtccgc cgagctgcgc gccgcgccc gcgccgaggg cggcacgcc 1140
 cgccgcgccg acccggtcga ggacgccgc ggtga 1176

 <210> 4
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Micromonospora rhodorangea derived MrSPGT
 <400> 4
 Met Ser Arg Arg Pro Ala His Ile Ala Met Val Ser Ile Pro Phe His
 1 5 10 15
 Gly His Val Asn Pro Ser Leu Glu Ile Ile Ser Thr Leu Val Arg Arg
 20 25 30
 Gly His Arg Val Thr Tyr Ala Asn Asp Pro Ala Ala Ala Asp Leu Thr
 35 40 45
 Lys Ala Thr Gly Ala Glu Leu Val Pro Val Thr Ser Val Pro Pro Val
 50 55 60
 Ala Asp Asn Ala Gly Ile Asp Asp Pro Ile Ala Gln Leu Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Asp Asp Ala Val Ala Met Leu Pro Gln Val Arg Thr Ala Tyr Ala
 85 90 95

 Asp Asp Arg Pro Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Ile Ala Gly Ala Pro Ala
 100 105 110

Arg Leu Leu Gly Glu Gln Trp Gly Ile Pro Ala Val Gln Arg Ser Pro
115 120 125

Thr Ser Val Ala Trp Glu Gly Tyr Glu Gln Glu Met Ala Ala Met Arg
130 135 140

Ala Asp Pro Pro Gly Ala Asp Tyr Tyr Arg Ala Arg Phe Thr Ala Trp
145 150 155 160

Leu Thr Ala Cys Gly Ala Thr Thr Thr Asp Ser Met Ala Cys Cys Gly
165 170 175

Pro Pro Ser Arg Ser Leu Val Leu Pro Pro Glu Ala Met Gln Pro Tyr
180 185 190

Ala Asp Lys Val Asp Arg Ser Val Tyr Thr Phe Val Gly Pro Val Leu
195 200 205

Gly Arg Arg Ser Asp Glu Gly Thr Trp Val Arg Pro Glu Arg Ala Asp
210 215 220

Lys Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ser Ala Tyr Thr Arg Gln Pro Glu
225 230 235 240

Phe Tyr Arg Asn Cys Leu Ala Ala Leu Gly Glu Leu Pro Gly Trp His
245 250 255

Val Val Leu Gln Ile Gly Arg His Thr Asp Pro Arg Glu Leu Gly Thr
260 265 270

Val Pro Pro Gly Val Asp Val Arg Thr Trp Val Pro Gln Val Ala Val
275 280 285

Leu Ala Glu Ala Asp Ala Cys Val Thr His Ala Gly Ile Gly Ser Ser
290 295 300

Ser Glu Gly Leu Tyr Cys Gly Thr Pro Met Ile Ala Val Pro Gln Gly
305 310 315 320

Ala Glu Gln Phe Met Asn Ala Asp Arg Leu Ala Ser Leu Gly Val Ala
325 330 335

Arg Arg Ile Asp Thr Ala Asp Ala Ser Ala Ala Glu Leu Arg Glu Thr
340 345 350

Leu Leu Ala Leu Thr Ala Asp Pro Ala Val Val Ala Arg Ser Ala Glu
355 360 365

Leu Arg Ala Arg Ala Arg Ala Glu Gly Gly Thr Ala Arg Ala Ala Asp
370 375 380

Pro Val Glu Asp Ala Arg Gly
385 390