



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월02일
(11) 등록번호 10-2184684
(24) 등록일자 2020년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/36 (2015.01)
A61K 38/44 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/60 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0629 (2013.01)
A61K 35/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0081129

(22) 출원일자 2019년07월05일

심사청구일자 2019년07월05일

(56) 선행기술조사문헌

JP2008528508 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

의료법인 성광의료재단

서울특별시 강남구 논현로 566 (역삼동)

(72) 발명자

오상호

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
피부과학교실

이진우

인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동
702호

김동현

서울특별시 서초구 남부순환로 2311-12 래미안방
배아트힐아파트 103동 1403호

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 저색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 저색소(hypopigmentation) 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 재조합 벡터, 형질 전환체 및 인공 피부 등은 각질 형성 세포에서 티로시나제 및/또는 PMEL의 유전자 발현을 안정적으로 유도하여 상기 각질 형성 세포에서 안정적으로 색소 형성을 유도함에 따라 멜라닌 세포의 사멸에 기인한 저색소 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도2

Con. TYR
+PMEL



(52) CPC특허분류

A61K 38/44 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
A61L 27/362 (2013.01)
A61L 27/60 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C12N 5/0698 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
C12Y 114/18001 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

JP2014528238 A
 KR1020100105256 A
 KR1020130002307 A
 CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 2878-2885
 Molecules. 2017 Aug 4;22(8):1303
 PLoS Genet. 2011 Sep;7(9):e1002285
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI18C0262
 부처명 보건복지부
 과제관리(전문)기관명

연구사업명 연구자 주도 질병극복연구

연구과제명 HMGB1의 멜라닌세포 고사 기전연구를 통한 백반증 치료제 개발 및 질환 활성도 마커

발굴

기 여 율 1/2
 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C1559
 부처명 보건복지부
 과제관리(전문)기관명 차의과학대학교 산학협력단
 연구사업명 한국보건산업진흥원 연구중심병원 R&D 육성 사업
 연구과제명 조직공학기반 융합형 줄기세포 치료법 개발

기 여 율 1/2
 과제수행기관명 분당차병원
 연구기간 2016.04.25 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

티로시나제(tyrosinase)를 코딩하는 유전자; 및 PMEL(premelanosome protein)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질 전환된 형질 전환체를 포함하고,

상기 숙주세포는 각질 형성 세포(keratinocyte)인, 인공 피부.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 도입은 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법(electroporation), 초음파 천공법(sonoporation), 자기장을 이용한 자기주입법(magnetofection), 리포좀-매개 형질감염법, 유전자 밤바드먼트(gene bombardment), 텐드리머 또는 무기(inorganic) 나노 입자에 의해 수행되는 것인, 인공 피부.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인공 피부는, 적어도 1층의 진피층을 형성하는 단계; 및 상기 진피층 상에 상기 형질 전환체를 배양하는 단계에 의해 제조되는, 인공 피부.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인공 피부는 피부 이식용인, 인공 피부.

청구항 7

티로시나제(tyrosinase)를 코딩하는 유전자; 및 PMEL(premelanosome protein)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효 성분으로 포함하고,

상기 재조합 벡터는 각질 형성 세포(keratinocyte)에 도입되는 것인, 저색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 저색소 질환은 백반증인, 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 도입은 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법(electroporation), 초음파 천공법(sonoporation), 자기장을 이용한 자기주입법(magnetofection), 리포좀-매개 형질감염법, 유전자 밤바드먼트(gene bombardment), 덴드리머 또는 무기(inorganic) 나노 입자에 의해 수행되는 것인, 약학 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터인, 약학 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 티로시나제를 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어지는 것인, 약학 조성물.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 PMEL을 코딩하는 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기 서열로 이루어지는 것인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저색소(hypopigmentation) 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 피부는 다양한 외부 환경적 스트레스에 노출되는 장기로, 자외선(UVR) 등에 의한 잠재적 손상을 방어하기 위하여 다양한 메커니즘이 존재한다. 이러한 방어 메커니즘으로는 DNA 손상 메커니즘, 카탈레이즈 및 과산화물 제거효소와 같은 다양한 효소, 및 피부 색소 침착을 포함한다. 이러한 요소 중에는, 색소 침착이 가장 중요한 광-보호적인 요소에 해당한다. 티로시네이즈 효소(tyrosinase)는 멜라닌 색소의 합성 경로에서 두가지의 속도 제한적인 반응을 촉진시키므로 색소 침착에 중요한 조절자로 작용한다. 이러한 속도 제한적인 반응으로는 1) 3,4-디하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)을 생성하기 위한 티로신 히드록실화, 2) 도파퀴논(dopaquinone)을 생성하기 위한 DOPA 산화 공정이 있다.

[0003] 한편, 포유동물의 피부, 머리 및 눈 등에서 시각적 색깔은 멜라노솜(melanosomes)의 양, 질 및 상피세포의 분포에 기인한다. 상기 멜라노솜은 특별한 수지 세포 중 하나인 멜라닌 세포(melanocyte)에 의하여 형성된다. 멜라닌 색소는 멜라노솜에서 합성되어 멜라닌 세포의 수상 돌기에 의하여 케라틴 세포(keratinocytes)로 이동한다. 따라서, 멜라닌의 분포 패턴이 피부 색깔을 결정한다. 멜라닌 색소는 태양 UV 방사선으로부터 넓은 파장 범위로 피부를 보호하고, 피부에서 생산되는 자유 라디칼을 흡수하는 기능을 한다. 멜라닌 형성에 관련된 효소의 발현에 의하여 멜라닌 합성이 조절된다. 색소 침착을 조절함에 있어서 100개 이상의 단백질이 관여한다. 예를 들어, 멜라닌 합성은 티로신(tyrosine)의 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화되면서 개시되는데, 상기 산화 과정은 티로시나아제 효소에 의하여 촉매화된다. 도파퀴논은 이후 분자 내 고리화 반응 및 중합 반응에 의하여 유멜라닌(eumelanin)으로 전환된다.

[0004] 상기한 멜라닌 합성 과정에서 조절 장애가 발생하거나 멜라닌 세포가 증식 또는 감소가 발생하면 색소의 과다한 침착 혹은 저색소를 초래한다.

[0005] 저색소 질환(hypopigmentation)은 멜라닌 부족으로 발생되거나 멜라닌 세포의 결손에 의해 발생하게 되며 노출된 피부를 시각적으로 보기에 흉하게 만들어 심리사회학적 문제를 야기시킨다. 특히 대표적인 저색소 질환으로 백반증은 자가면역 기전에 의해 발생하는 비교적 흔한 후천성 저색소 질환이다. 백반증은 자가 멜라닌세포 항원을 인지하는 CD8 T 세포가 멜라닌 세포를 파괴하여 나타나며 CD8 T 세포가 멜라닌 세포를 인지하는 자가면역 기전의 발생 이전에 선천 면역이 매우 중요한 역할로 작용한다. 이와 같이 선천 면역과 관련되어있는 물질로 댄프(damage-associated molecular patterns; DAMPs)가 잘 알려져 있고, 이에 해당되는 물질로 다양한 것이 있다. 이 중에 ATP는 세포 대사에 매우 중요한 세포 에너지원으로 작용하는 물질이지만, 세포가 손상을 받으면서 세포 밖으로 유출된 ATP는 자가면역의 방아쇠 역할을 하여 다양한 면역 질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 현재

까지 백반증의 치료법으로는 스테로이드제, 면역조절제와 함께 자외선 치료와 같이 면역조절 기능을 목적으로 갖는 치료법이 주치료법으로 사용되지만 아직까지 치료 효과가 낮아 새로운 치료법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 티로시나제(tyrosinase)를 코딩하는 유전자 및 PMEL(premelanosome protein)을 코딩하는 유전자를 각질 형성 세포(keratinocyte)에 도입하여 저색소 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 티로시나제(tyrosinase) 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 PMEL(premelanosome protein) 또는 이를 코딩하는 유전자; 중 적어도 하나를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 질환을 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명에서 상기 "티로시나제(tyrosinase)"는 멜라닌 생성을 조절하는 속도-제한 효소인 산화효소이다. 이러한 효소는 멜라닌 합성의 두 구별되는 반응에 관여하는데, 첫째는 모노페놀의 수산화 과정이고, 둘째는 o-디페놀을 o-퀴논으로 전환시키는 과정이다. 이렇게 생성된 o-퀴논은 최종적으로 멜라닌을 형성하게 된다. 본 발명에서 상기 티로시나제는 구리를 포함하는 효소로, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 서열번호 2로 표시되는 염기 서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [0010] 본 발명에서 상기 "PMEL(premelanosome protein)"은 100 kDa 크기의 타입 I 막관통 당단백질에 해당한다. 본 발명에서 상기 PMEL은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 서열번호 4로 표시되는 염기 서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 상기 조성물은 각질 형성 세포(keratinocyte)에 처리되는 것이, 멜라닌 세포가 사멸되어 유발되는 저색소 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있어 바람직하다.
- [0012] 본 발명에서 상기 조성물은 티로시나제(tyrosinase) 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 PMEL(premelanosome protein) 또는 이를 코딩하는 유전자; 중 적어도 하나를 유효 성분으로 포함할 수 있지만, 바람직하게는 티로시나제(tyrosinase)를 코딩하는 유전자 및 PMEL을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 상기 티로시나제(또는 이의 유전자)만을 각질 형성 세포 내로 도입하는 경우 세포 질 내에 분포하며 세포 독성을 유발할 수 있지만, PMEL(또는 이의 유전자)을 함께 각질 형성 세포 내로 도입하는 경우 상기 티로시나제를 상기 각질 형성 세포 내 멜라노솜 (멜라닌소체)의 구조 속으로 유도하여 안정적으로 세포에 색소 침착을 유도할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 조성물은 그 용도에 따라 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 저색소 질환은 멜라닌 세포의 사멸로 유도되는 모든 질환일 수 있는데, 예컨대 백반증일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 티로시나제(tyrosinase)를 코딩하는 유전자; 및 PMEL(premelanosome protein)를 코딩하는 유전자 중 적어도 하나를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 벡터는 목적 유전자 발현을 위한 요소 (elements)를 포함하는 것으로, 복제원점 (replication origin), 프로모터, 작동 유전자 (operator), 전사 종결 서열 (terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위 (예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선택 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보솜 결합 부위 (ribosome binding site; RBS), IRES (Internal Ribosome Entry Site) 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 벡터는 프로모터로서 상기한 융합 폴리뉴클레오타이드 (융합 프로모터)를 갖도록 통상적인 유전공학적인 방법으로 조작된 것일 수 있다. 상기 벡터는 상기 프로모터 이외의 전사 조절 서열 (예컨대 인핸서 등)을 추가로 포함할 수 있다.

- [0019] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터일 수 있으며, 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스 벡터, 아데노-부속 바이러스 벡터 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 비바이러스성 벡터로는 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 리포솜, 세균인공염색체, 효모인공염색체 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명에서 상기 재조합 벡터에서 상기 목적 유전자는 상기 융합 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 유전자 발현 조절 서열과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 유전자 발현 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다. 상기 재조합 벡터에 있어서, 상기 융합 폴리뉴클레오타이드가 상기 목적 유전자에 작동 가능하게 연결되기 위해서, 상기 융합 폴리뉴클레오타이드는 상기 목적 유전자의 5' 말단에 연결된 것일 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터는, 발현시키고자 하는 목적 단백질의 암호화 유전자가 작동 가능하게 연결될 경우, 적절한 숙주 세포에서 상기 목적 단백질을 높은 효율로 발현시킬 수 있는 목적 단백질의 발현 벡터로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 전사 조절 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 전사 조절 서열은 폴리아데닐화 서열(pA)과 같은 전사 종결 서열; f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, BBV 복제원점 등의 복제 원점 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 또한, 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 선별 마커를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 재조합 벡터가 숙주 세포 내에 성공적으로 도입되었는지 여부를 확인하거나 안정적인 세포주 구축을 위한 유전자로서, 예컨대, 항생제와 같은 약물 저항 유전자, 대사 관련 유전자, 유전자 증폭 유전자 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 숙주 세포에서 발현 가능한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 숙주 세포는 동물 세포에서 전사 개시를 강력하게 유도할 수 있는 것일 수 있으며, 구체적으로 포유동물 세포, 예를 들어 인간으로부터 유래된 세포와 같은 동물 세포에서 전사 개시를 유도하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 재조합 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질 전환된 형질 전환체에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에서 상기 재조합 벡터의 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예컨대, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법(electroporation), 초음파 천공법(sonoporation), 자기장을 이용한 자기주입법(magnetofection), 리포솜-매개 형질감염법, 유전자 밤바드먼트 (gene bombardment), 텐드리머 및 무기(inorganic) 나노 입자의 사용 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 상기 숙주세포는 포유동물 세포, 예를 들어 인간으로부터 유래된 세포일 수 있는데, 바람직하게는 각질 형성 세포(keratinocyte)인 것이 멜라닌 세포가 사멸되어 유도되는 저색소 절환 부위에서 안정적으로 색소 발현을 유도할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 형질 전환체를 포함하는 인공 피부에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에서 상기 "인공 피부(artificial skin)"는 피부 세포와 피부 구성물질인 콜라겐, 엘라스틴 등을 이용하여 3차원적으로 상기와 같은 피부를 재구성한 것으로서, 살아있는 섬유아세포와 각질 형성 세포로 구성되어 실제 피부와 유사한 구조적, 기능적 특성을 나타내기 때문에 피부 모사체(skin equivalent 또는 reconstructed skin)라고도 불린다.
- [0032] 본 발명에서 상기 인공 피부는 진피층 및 표피층을 포함할 수 있고, 상기 진피층, 표피층, 또는 그 사이에 본 발명에 따르는 형질 전환체를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 표피층에 본 발명에 따르는 형질 전환체를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 인공 피부를 제작하는 방법은 특별히 제한하지 않으며, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으나, 예를 들면 이하의 방법에 따라 제작될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 예시에 따르는 인공 피부의 제작 방법은 적어도 1층의 진피층을 형성하는 단계; 및 진피층 상에

본 발명에 따르는 형질 전환체를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0035] 본 발명에서 상기 진피층을 형성하는 단계는, 진피 세포, 바람직하게는 인간 피부로부터 분리한 진피 세포로 섬유아세포를 진피 세포 배양액에서 배양하며 수행할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 진피 세포 배양액의 조성은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, USA); MEM (Minimal Essential Medium, GIBCO, USA); BME (Basal Medium Eagle, GIBCO, USA); RPMI 1640 (GIBCO, USA); DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10; GIBCO, USA); α -MEM(α -Minimal essential Medium; GIBCO, USA); G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium, GIBCO, USA); IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO, USA); 또는 KnockOut DMEM (GIBCO, USA)의 배지를 사용할 수 있고, 바람직하게는 DMEM 배지를 사용할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 "DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)"은 통상 배지에 사용하는 DMEM이며, 상기 B27 용액 (Gibco® B-27® Supplements, Life Technologies)은 비오틴, DL 알파 토크페놀 아세테이트, DL 알파 토크페놀, 비타민 A, BSA, 카탈라아제, 인슐린, 슈퍼옥사이드 디스무타제, 코티코스테론, D-갈락토오스, 에탄올아민 HCl, 글루타티온, L-카르니틴 HCl, 리놀레산, 리노레닉산, 프로게스테론, 푸트레신 2HCl, 나트륨 투석고 (sodium selenite) 및 트리오토-1-티로닌을 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 상기 진피 배양용 배지는 소 태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS) 1 내지 10 중량%; 및 항생제 0.1 내지 3 중량% 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 또한, 본 발명의 상기 진피 배양용 배지는 아스코르브산(ascorbic acid)을 30 내지 200 μ g/ml, 바람직하게는 50 내지 100 μ g/ml의 양으로 더 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 진피 세포의 배양은 37 °C, 5 부피% CO₂의 배양 조건 하에서 수행될 수 있고, 7일 내지 40일, 바람직하게는 21일 내지 35일, 보다 바람직하게는 25일 내지 30일 동안 배양할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서는 상기 진피층을 적어도 1층 형성할 수 있고, 바람직하게는 형성된 2층 내지 5층의 진피층을 적층할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기와 같이 진피층이 형성되면, 상기 진피층 상에 본 발명에 따르는 형질 전환체를 배양하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 형질 전환체의 배양 시 표피 세포로 각질 형성 세포를 상기 형질 전환체와 함께 공배양(co-culture)할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 형질 전환체의 배양은 37 °C, 5 부피% CO₂의 배양 조건 하에서 수행될 수 있고, 3일 내지 10일, 바람직하게는 5일 내지 7일 동안 1차 배양한 뒤, 7일 내지 30일, 바람직하게는 10일 내지 20일 동안 2차 배양할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 1차 배양을 위한 배양액의 조성은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, USA); MEM (Minimal Essential Medium, GIBCO, USA); BME (Basal Medium Eagle, GIBCO, USA); RPMI 1640 (GIBCO, USA); DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10; GIBCO, USA); α -MEM(α -Minimal essential Medium; GIBCO, USA); G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium, GIBCO, USA); IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO, USA); 또는 KnockOut DMEM (GIBCO, USA)의 배지를 사용할 수 있고, 바람직하게는 DMEM 배지를 사용할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 상기 1차 배양용 배지는 소 태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS) 1 내지 10 중량%; 및 항생제 0.1 내지 3 중량% 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서 상기 2차 배양 시 공기노출 액체배양 (Air liquid interface culture) 조건 하에서 수행될 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 상기 2차 배양을 위한 배양액의 조성은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄스 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy's 5A) 또는 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)의 배지를 사용할 수 있고, 바람직하게는 DMEM/F12 배지를 사용할 수 있다.

- [0049] 또한, 본 발명의 상기 2차 배양용 배지는 소 태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS) 1 내지 10 중량%; 및 항생제 0.1 내지 3 중량% 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 또한, 본 발명의 상기 2차 배양용 배지는 CaCl_2 를 0.1 내지 2 mM, 바람직하게는 0.5 내지 1 mM의 양으로 더 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 제공하는 인공 피부는 포유 동물, 바람직하게는 저색소 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 포유 동물에게 피부 이식용으로 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 인공 피부를 포함하는 저색소 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 그 용도에 따라 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 상기 저색소 질환은 멜라닌 세포의 사멸로 유도되는 모든 질환일 수 있는데, 예컨대 백반증일 수 있다.
- [0057] 한편, 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 질환의 증상을 차단하거나, 그 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명에서, "개선"은 본 발명의 화장품 조성물 또는 식품 조성물을 이용하여 저색소 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0062] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 투여가 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.
- [0064] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할

수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0067] 본 발명에서 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 배스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제{화장용}, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(헨드클리너), 약용비누{비의료용}, 크림비누, 페이스셜 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 향산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.

[0069] 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸텔릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.

[0070] 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.

[0071] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 향산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.

[0073] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 식물추출물로 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0074] 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.

[0075] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.

[0076] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0077] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0078] 본 발명에서 제공하는 재조합 벡터, 형질 전환체 및 인공 피부 등은 각질 형성 세포에서 티로시나제 및/또는 PMEL의 유전자 발현을 안정적으로 유도하여 상기 각질 형성 세포에서 안정적으로 색소 형성을 유도함에 따라 멜라닌 세포의 사멸에 기인한 저색소 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0079] 도 1은 본 발명의 실험예 1에서 실시예 1에서 제작한 티로시나제 및 PMEL 과발현 각질 형성 세포주에 대하여 티로시나제 및 PMEL의 발현 수준을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 실험예 2에서 실시예 1에서 제작한 티로시나제 및 PMEL 과발현 각질 형성 세포주의 펠렛을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 실험예 3에서 실시예 2에서 제작한 인공 피부와, 비교예 1에서 제작한 인공 피부를 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 실험예 4에서 실시예 2에서 제작한 인공 피부와, 비교예 1에서 제작한 인공 피부에 H&E, Fontana-Masson 및 Melan-A 조직 염색을 수행한 뒤 각 인공 피부의 단면을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0080] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0082] 실시예

[0084] [실시예 1] 티로시나제 및 PMEL 과발현 각질 형성 세포주의 제작

[0085] 1. 전달 플라스미드(transfer plasmid)의 제작

- [0086] 전달 플라스미드(transfer plasmid)는, 한국유전자은행 (KRIBB)으로부터 구입한 cDNA를 (Accession: NM_000372 Clone ID: KU036121) 주형으로 하여 하기 표 1에 나타난 프라이머를 이용해 PCR 증폭을 시행한 후 EcoR1, Xba1 제한효소로 절단하여 pLVX-EIP 벡터(Clontech, Mountain View, CA, United States)에 삽입해 제작하였다.

표 1

| 구분 | 서열 |
|----------|---|
| TYR U1 | 5'- TATA GAATTCGCACG ATGCTCCTGGCTGTTTGTG-3' |
| TYR L1 | 5'- ATAT TCTAGA TTATAAATGGCTCTGATACAAG-3' |
| PMEL 정방향 | 5'- TATA GAATTC AACACA ATGGATCTGGTGC-3' |
| PMEL 역방향 | 5'- ATAT TCTAGA T TCAGACCTGCTGCCCA-3' |

[0089] 2. 렌티바이러스의 제작

- [0090] 상기 1.에서 제작된 전달 플라스미드를 함유하는 렌티바이러스를 제작하기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다. 숙주세포로 HEK293T 세포(Human Embryonic Kidney Cell 293T)를 10% FBS를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 6웰 플레이트에 7×10^5 세포/웰의 농도로 접종한 후 24시간 뒤에 항생제를 포함하지 않는 DMEM 배지로 교체하였다. 이후, 상기 HEK293T 세포에 상기 1.에서 제작한 전달 플라스미드 1500 ng, 패키징 플라스미드(packaging plasmid) (psPAX2, Addgene #12260) 1125 ng, VSV-G 인벨로프 플라스미드(envelope plasmid) (pMD2.G, Addgene #12259) 375 ng를 동시에 형질 감염(transfection)시켰다. 단, 상기 형질 감염에는 PEI (polyethylenimine)를 사용하였다. 다음날 10% FBS와 항생제가 포함된 DMEM/F12 배지로 교체하고 이틀에 걸쳐 렌티바이러스를 포함하는 배지를 수집하였다.

[0092] 3. 렌티바이러스의 형질 도입(transduction)

- [0093] 상기 2.에서 수집한 배지를 여과한 후 HaCaT 세포에 형질 도입(transduction) 하였다. 구체적으로는 24-웰 플레이트에 하루 전에 HaCaT 세포를 접종한 뒤 다음 날 렌티바이러스를 포함하는 배지 200 μ l, 신선한 배지 400 μ l, 폴리브렌(polybrene) 4 μ g/ml를 혼합하여 처리하였다. 다음날 신선한 배지로 교체해준 후 이틀 뒤에 퓨로마이신(puromycin) 2 μ g/ml로 선별하였다.

[0095] [실험예 1] 티로시나제 및 PMEL 발현 확인

- [0096] 상기 실시예 1에서 제작한 티로시나제 및 PMEL 과발현 각질 형성 세포주로부터 단백을 분리한 뒤 티로시나제 항체 및 PMEL 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 티로시나제 및 PMEL의 발현 수준을 측정하였고, 그 결과는 도 1에 나타내었다. 이때 대조군으로는 무처리한 HaCaT 세포를 사용하였다.

[0097] 도 1에서 보는 바와 같이, 대조군인 무처리한 각질 형성 세포에 비하여 실시예 1의 각질 형성 세포주에서는 티로시나제와 PMEL이 높게 발현되며, 티로시나제 활성 또한 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0099] [실험예 2] 멜라닌 색소 형성 확인(1)

[0100] 상기 실시예 1에서 제작한 티로시나제 및 PMEL 과발현 각질 형성 세포주의 사진을 촬영하여 그 결과를 도 2에 나타내었고, 상기 세포 펠렛을 1N NaOH에 60 °C에서 2시간 동안 처리한 후 합성 멜라닌을 이용한 표준 멜라닌 곡선을 바탕으로 405 nm에서 멜라닌 흡광도를 ELISA 리더로 확인함으로써 멜라닌 함량을 정량하였다. 측정된 흡광도와 멜라닌 함량을 하기 표 2에 나타내었다. 또한, 표준 단백 곡선을 바탕으로 단백 흡광도, 단백질 함량 및 단백질에 대한 멜라닌 함량의 비율을 측정하여 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 이때 대조군으로는 무처리한 HaCaT 세포를 사용하였다.

표 2

| 구분 | O.D | 멜라닌 함량(%) |
|-------|-------|-----------|
| 대조군 | 0.064 | 100 |
| 실시예 1 | 0.078 | 145.1613 |

표 3

| 구분 | O.D | 단백 함량(%) | 멜라닌/단백 함량 (%) |
|-------|-------|----------|---------------|
| 대조군 | 0.515 | 100 | 100 |
| 실시예 1 | 0.434 | 81.25 | 178.66 |

[0103] 도 2에서 보는 바와 같이, 육안으로 보더라도 대조군인 무처리한 각질 형성 세포에 비하여 실시예 1의 각질 형성 세포주에서 색소 형성이 발생하여 상기 세포주 펠렛의 색이 짙어진 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 또한, 표 2 및 3에서 보는 바와 같이, 실제로 대조군인 무처리한 각질 형성 세포에 비하여 실시예 1의 각질 형성 세포주에서 멜라닌의 함량이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0106] [실시예 2] 인공 피부의 제작

[0107] 상기 실시예 1에서 얻어진 티로시나제 및 PMEL 과발현 각질 형성 세포주를 이용하여 인공 피부를 제작하였다. 구체적으로는 남자 8세 포피(foreskin)로부터 분리한 진피 세포인 섬유아세포를 5% FBS (Hyclone, SH30084.03) 및 1% 페니실린(Penicillin)-스트렙토마이신(Streptomycin) (Welgene, LS202-02)을 포함하는 DMEM (Hyclone, SH30243.01)의 진피세포 배양액에서 37 °C, 5 부피% CO₂ 배양 조건으로 배양하여 준비하였다. 3M 페이퍼를 6-웰 플레이트에 맞게 링 모양으로 재단하고, 포셉, 주 및 링을 멸균하여 준비하였다. 진피 세포를 플레이트에 분주하기 전날, 멸균하여 잘 말린 3M 페이퍼를 6-웰 플레이트에 넣고 DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)로 적셔주었다. 3M paper가 6-웰 플레이트의 바닥에 고정되도록 주를 올려 주었다. DPBS를 제거한 후, 진피 세포를 각 웰에 3 X 10⁵ 세포로 분주한 뒤 진피세포 배양액에 아스코르브산을 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 배양하였다. 상기 진피세포 배양액을 2일에 한번씩 배지를 교환하는 방식으로 총 4주 동안 37 °C 및 5 부피% CO₂ 배양 조건으로 배양하였다. 배양 4주차 부터는 아스코르브산만 50 µg/ml의 농도로 변경하여 배지를 2일에 한번씩 갈아주었다. 상기 진피 세포의 배양 5주차에 상기 실시예 1에서 제작한 유전자 변형된 각질 형성 세포주와, 무처리한 HaCaT 세포주를 5% FBS (Hyclone, SH30084.03) 및 1% 페니실린(Penicillin)-스트렙토마이신(Streptomycin) (Welgene, LS202-02)를 포함하는 DMEM (Hyclone, SH30243.01)의 표피 세포 배양액에서 배양하였다. 6주차에 포셉을 이용하여 6-웰 플레이트로부터 진피 세포를 조심스럽게 떼어내서 6cm 디쉬(dish)에 포개어 주는 방법으로 3장 쌓아서 추로 고정하였다. 이렇게 얻어진 진피 세포의 층 위에 링을 올린 후, 링 안쪽으로 준비한 상기 실시예 1에서 제작한 유전자 변형된 각질 형성 세포주와, 무처리한 HaCaT 세포주를 각 웰당 2.5X 10⁵ 세포를 분주하여 상기 조성의 표피 세포 배양액으로 37 °C 및 5 부피% CO₂ 배양 조건 하에서 배양하였다. 다음날 링을 제거한 뒤 2일에 한번씩 배지 교환하는 방식으로 총 6일 동안 37 °C 및 5 부피% CO₂ 배양 조건으로 배양하였다. 이렇게 얻어진 진피-표피세포를 A/L(Air liquid interface) 위에 올려준 후, 5% FBS (Hyclone, SH30084.03), 1% 페니실린(Penicillin)-스트렙토마이신(Streptomycin) (Welgene, LS202-02) 및 0.6mM

CaCl₂ (Sigma)를 포함하는 DMEM/F12 (GIBCO, 11320-033)의 배지에 세포 아랫부분만 닿을 정도로 넣어 37 °C 및 5 부피% CO₂ 배양 조건으로 배양하였다. 상기의 배양액을 2일에 한번씩 배지 교환하는 방식으로 총 2주일 동안 37 °C 및 5 부피% CO₂ 배양 조건으로 배양하여 인공 피부를 제작하였다.

[비교예 1] 대조군 인공 피부의 제작

상기 실시예 2와 동일한 방법으로 제작하되, 실시예 1에서 제작한 유전자 변형된 각질 형성 세포주 대신 무처리한 HaCaT 세포주만을 사용한 대조군 인공 피부를 제작하였다.

[실험예 3] 멜라닌 색소 형성 확인(2)

상기 실시예 2에서 제작한 인공 피부와, 상기 비교예 1의 인공 피부를 촬영하여 그 사진을 도 3에 나타내었다.

도 3에서 보는 바와 같이, 육안으로 보더라도 무처리한 각질 형성 세포주만을 사용하여 제작한 대조군의 인공 피부에 비하여 실시예 1의 유전자 변형된 각질 형성 세포주를 사용하여 제작한 실시예 2의 인공 피부의 색이 짙은 것을 확인할 수 있었다.

[실험예 4] 멜라닌 색소 형성 확인(3)

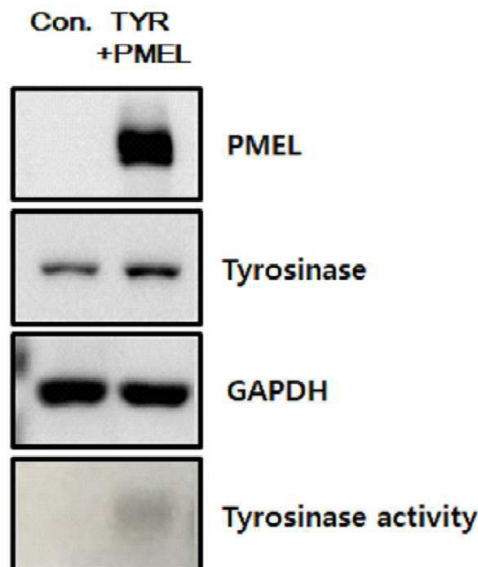
상기 실시예 2에서 각각 제작한 인공 피부와, 상기 비교예 1의 인공 피부를 H&E, Fontana-Masson 및 Melan-A 조직 염색을 수행하고, 상기 인공 피부의 단면을 촬영하여 그 사진을 도 4에 나타내었다.

도 4에서 보는 바와 같이, 실시예 2에서 제작한 인공 피부는 비교예 1의 인공 피부에 비하여 검은 색소가 관찰되었다. 이를 통하여 본 발명에 따른 인공 피부를 저색소 질환자에 이식용으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

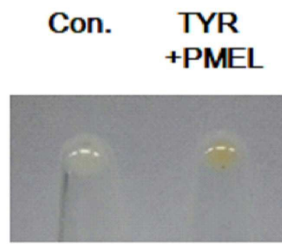
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

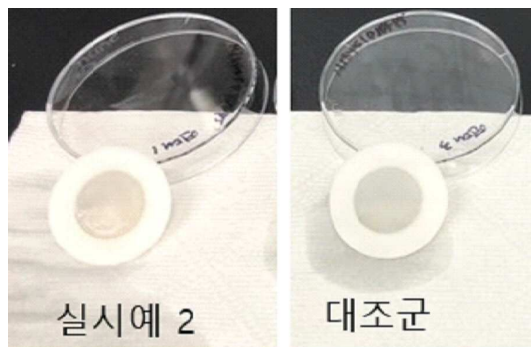
도면1



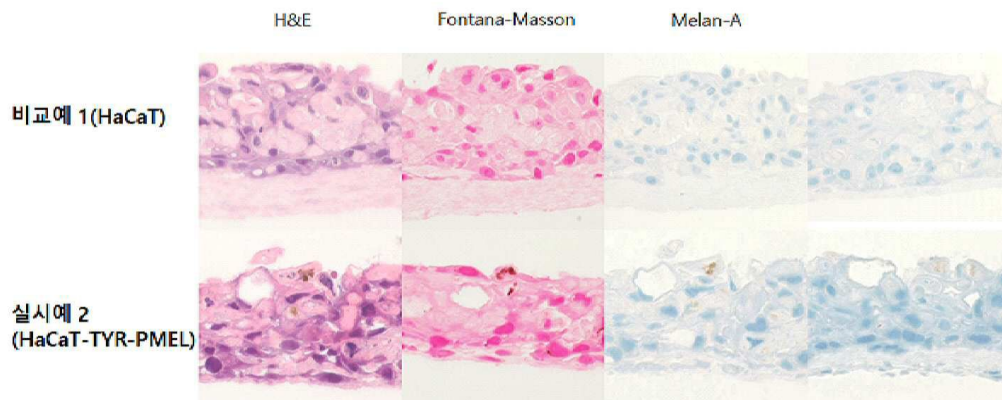
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
SUNGKWANG MEDICAL FOUNDATION
- <120> Composition for preventing or treating hypopigmentation disorders
- <130> PDPB192129
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 529

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Leu Trp Ser Phe Gln Thr Ser

1 5 10 15

Ala Gly His Phe Pro Arg Ala Cys Val Ser Ser Lys Asn Leu Met Glu

20 25 30

Lys Glu Cys Cys Pro Pro Trp Ser Gly Asp Arg Ser Pro Cys Gly Gln

35 40 45

Leu Ser Gly Arg Gly Ser Cys Gln Asn Ile Leu Leu Ser Asn Ala Pro

50 55 60

Leu Gly Pro Gln Phe Pro Phe Thr Gly Val Asp Asp Arg Glu Ser Trp

65 70 75 80

Pro Ser Val Phe Tyr Asn Arg Thr Cys Gln Cys Ser Gly Asn Phe Met

85 90 95

Gly Phe Asn Cys Gly Asn Cys Lys Phe Gly Phe Trp Gly Pro Asn Cys

100 105 110

Thr Glu Arg Arg Leu Leu Val Arg Arg Asn Ile Phe Asp Leu Ser Ala

115 120 125

Pro Glu Lys Asp Lys Phe Phe Ala Tyr Leu Thr Leu Ala Lys His Thr

130 135 140

Ile Ser Ser Asp Tyr Val Ile Pro Ile Gly Thr Tyr Gly Gln Met Lys

145 150 155 160

Asn Gly Ser Thr Pro Met Phe Asn Asp Ile Asn Ile Tyr Asp Leu Phe

165 170 175

Val Trp Met His Tyr Tyr Val Ser Met Asp Ala Leu Leu Gly Gly Ser

180 185 190

Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe Ala His Glu Ala Pro Ala Phe Leu

195 200 205

Pro Trp His Arg Leu Phe Leu Leu Arg Trp Glu Gln Glu Ile Gln Lys

210 215 220

Leu Thr Gly Asp Glu Asn Phe Thr Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Arg Asp

225 230 235 240
 Ala Glu Lys Cys Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr Met Gly Gly Gln His
 245 250 255
 Pro Thr Asn Pro Asn Leu Leu Ser Pro Ala Ser Phe Phe Ser Ser Trp
 260 265 270
 Gln Ile Val Cys Ser Arg Leu Glu Glu Tyr Asn Ser His Gln Ser Leu
 275 280 285
 Cys Asn Gly Thr Pro Glu Gly Pro Leu Arg Arg Asn Pro Gly Asn His
 290 295 300
 Asp Lys Ser Arg Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe

 305 310 315 320
 Cys Leu Ser Leu Thr Gln Tyr Glu Ser Gly Ser Met Asp Lys Ala Ala
 325 330 335
 Asn Phe Ser Phe Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Ala Ser Pro Leu Thr
 340 345 350
 Gly Ile Ala Asp Ala Ser Gln Ser Ser Met His Asn Ala Leu His Ile
 355 360 365
 Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val Gln Gly Ser Ala Asn Asp Pro
 370 375 380

 Ile Phe Leu Leu His His Ala Phe Val Asp Ser Ile Phe Glu Gln Trp
 385 390 395 400
 Leu Gln Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala
 405 410 415
 Pro Ile Gly His Asn Arg Glu Ser Tyr Met Val Pro Phe Ile Pro Leu
 420 425 430
 Tyr Arg Asn Gly Asp Phe Phe Ile Ser Ser Lys Asp Leu Gly Tyr Asp
 435 440 445
 Tyr Ser Tyr Leu Gln Asp Ser Asp Pro Asp Ser Phe Gln Asp Tyr Ile

 450 455 460
 Lys Ser Tyr Leu Glu Gln Ala Ser Arg Ile Trp Ser Trp Leu Leu Gly
 465 470 475 480

Ala Ala Met Val Gly Ala Val Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gly Leu Val
485 490 495
Ser Leu Leu Cys Arg His Lys Arg Lys Gln Leu Pro Glu Glu Lys Gln
500 505 510
Pro Leu Leu Met Glu Lys Glu Asp Tyr His Ser Leu Tyr Gln Ser His
515 520 525

Leu

<210> 2

<211> 1590

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

| | |
|--|------|
| atgctcctgg ctgttttgta ctgcctgctg tggagtttcc agacctccgc tggccatttc | 60 |
| cctagagcct gtgtctcctc taagaacctg atggagaagg aatgctgtcc accgtggagc | 120 |
| ggggacagga gtcctgtgg ccagctttca ggcagagggt cctgtcagaa tacccttctg | 180 |
| tccaatgcac cacttgggcc tcaatttccc ttcacagggg tggatgaccg ggagtcgtgg | 240 |
| ccttccgtct ttataaatag gacctgccag tgctctggca acttcattggg attcaactgt | 300 |
| ggaaactgca agtttggtt ttggggacca aactgcacag agagacgact cttggtgaga | 360 |
| | |
| agaaacatct tcgatttgag tgccccagag aaggacaaat ttttgccta ctcacttta | 420 |
| gcaaagcata ccatcagctc agactatgtc atccccatag ggacctatgg ccaaatgaaa | 480 |
| aatggatcaa caccatgtt taacgacatc aatatttatg acctctttgt ctggatgcat | 540 |
| tattatgtgt caatggatgc actgcttggg ggatctgaaa tctggagaga cattgatttt | 600 |
| gccccgaag caccagcttt tctgccttgg catagactct tcttgttcg gtgggaacaa | 660 |
| gaaatccaga agctgacagg agatgaaaac ttcactatc catattggga ctggcgggat | 720 |
| gcagaaaagt gtgacatttg cacagatgag tacatgggag gtcagcaccc cacaatcct | 780 |
| | |
| aacttactca gccagcacc attcttctcc tcttggcaga ttgtctgtag ccgattggag | 840 |
| gagtacaaca gccatcagtc ttatgcaat ggaacgccc agggaccttt acggcgtaat | 900 |
| cctggaaacc atgacaaac cagaaccca aggtccctt cttcagctga ttagaattt | 960 |
| tgctgagtt tgacccaata tgaatctggt tccatggata aagctgcaa ttacagcttt | 1020 |
| agaaatacac tggaaggatt tgctagtcca ctactggga tagcggatgc ctctcaaagc | 1080 |
| agcatgcaca atgccttgca catctatatg aatggaacaa tgtcccaggt acagggatct | 1140 |

gccaacgata ctatcttctt tcttcacat gcatttggtg acagtatttt tgagcagtgg 1200

ctccgaaggc accgtcctct tcaagaagtt tatccagaag ccaatgcacc cattggacat 1260

aaccgggaat cctacatggt tccttttata ccactgtaca gaaatggtga tttctttatt 1320

tcatccaaag atctgggcta tgactatagc tatctacaag attcagaccc agactctttt 1380

caagactaca ttaagtccta ttggaacaa gcgagtcgga tctggtcatg gctccttggg 1440

gcggcgatgg taggggccgt cctcactgcc ctgctggcag ggcttgtgag cttgctgtgt 1500

cgtcacaaga gaaagcagct tcctgaagaa aagcagccac tcctcatgga gaaagaggat 1560

taccacagct tgtatcagag ccatttataa 1590

<210> 3

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu Ala Val Ile Gly

1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp

20 25 30

Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu

35 40 45

Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly

50 55 60

Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala

65 70 75 80

Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val

85 90 95

Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly

100 105 110

Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp

115 120 125

Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser

130 135 140

Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp
 145 150 155 160
 Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg
 165 170 175
 Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg
 180 185 190
 Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr
 195 200 205
 Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala
 210 215 220
 Leu Asp Gly Gly Asn Lys His Phe Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Ala Asp Leu
 245 250 255
 Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg
 260 265 270

 Ala Leu Val Val Thr His Thr Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
 275 280 285
 Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser Cys Gly Ser Ser
 290 295 300
 Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro
 305 310 315 320
 Asn Thr Thr Ala Gly Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr
 325 330 335
 Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro Ser Gly Thr Thr Ser Val Gln
 340 345 350
 Val Pro Thr Thr Glu Val Ile Ser Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr
 355 360 365
 Ala Glu Ser Thr Gly Met Thr Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val
 370 375 380
 Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met
 385 390 395 400

Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala
405 410 415

Gln Val Thr Thr Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro
420 425 430

Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu
435 440 445

Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu
450 455 460

Arg Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
465 470 475 480

Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser Ala
485 490 495

Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu
500 505 510

Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile
515 520 525

Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu Cys Gln Pro Val
530 535 540

Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly
545 550 555 560

Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser
565 570 575

Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile Met Pro Gly Gln Glu Ala Gly
580 585 590

Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala
595 600 605

Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp
610 615 620

Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu
625 630 635 640

Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu

| | | |
|---|------|-----|
| 645 | 650 | 655 |
| Ser Gly Gln Gln Val | | |
| 660 | | |
| <210> 4 | | |
| <211> 1986 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Homo sapiens | | |
| <400> 4 | | |
| atggatctgg tgctaaaaag atgccttctt catttggctg tgataggtgc ttigtctgct | 60 | |
| gtgggggcta caaaagtacc cagaaaccag gactggcttg gtgtctcaag gcaactcaga | 120 | |
| accaaagcct ggaacaggca gctgtatcca gagtggacag aagcccagag acttgactgc | 180 | |
| tgagagagtg gtcaagtgtc cctcaaggtc agtaatgatg ggcctacact gattggtgca | 240 | |
| aatgcctcct tctctattgc cttgaacttc cctggaagcc aaaaggtatt gccagatggg | 300 | |
| caggttatct gggtaacaaa taccatcatc aatgggagcc aggtgtgggg aggacagcca | 360 | |
| gtgtatcccc aggaaactga cgatgcctgc atcttccctg atggtggacc ttgccatct | 420 | |
| ggctcttggc ctgagaagag aagctttgtt tatgtctgga agacctgggg ccaatactgg | 480 | |
| caagttctag gggggccagt gtctgggctg agcattggga caggcagggc aatgctgggc | 540 | |
| acacacacca tggaagtgc tgcttacct cgccggggat cccggagcta tgtgcctctt | 600 | |
| gtcatttcca gtcagcctt caccattact gaccaggtgc ctttctccgt gagegtgtcc | 660 | |
| cagttgcggg ccttggatgg agggacaag cacttctga gaaatcagcc tctgaccttt | 720 | |
| gccctccagc tccatgacc tagtggctat ctggctgaag ctgacctctc ctacacctgg | 780 | |
| gactttggag acagtagtgg aacctgatc tctcgggcac ttgtggtcac tcatacttac | 840 | |
| ctggagcctg gccagtcac tgcccagggt gtctgcagg ctgccattcc tctcacctcc | 900 | |
| tgtggctcct cccagttcc aggcaccaca gatgggcaca ggccaactgc agaggccct | 960 | |
| aacaccacag ctggccaagt gcctactaca gaagttgtgg gtactacacc tggtcaggcg | 1020 | |
| ccaactgcag agcctcttgg aaccacatct gtgcaggtgc caaccactga agtcataagc | 1080 | |
| actgcacctg tgcagatgcc aactgcagag agcacaggta tgacacctga gaaggtgcc | 1140 | |
| gtttcagagg tcatgggtac cactctggca gagatgtcaa ctccagaggc tacaggtatg | 1200 | |
| acacctgcag aggtatcaat tgtggtgctt tctggaacca cagctgcaca ggtaacaact | 1260 | |
| acagagtggg tggagaccac agctagagag ctacctatcc ctgagcctga aggtccagat | 1320 | |
| gccagctcaa tcatgtctac ggaaagtatt acaggttccc tgggccccct gctggatggt | 1380 | |

| | |
|---|------|
| acagccacct taaggctggt gaagagacaa gtccccctgg attgtgttct gtatcgatat | 1440 |
| | |
| ggttcctttt ccgtcacctt ggacattgtc cagggtattg aaagtgccga gatcctgcag | 1500 |
| gctgtgccgt ccggtgaggg ggatgcattt gagctgactg tgcctgccca aggcgggctg | 1560 |
| cccaaggaag ccgtcatgga gatcctcatc ccagggtgcc agccccctgc ccagcggctg | 1620 |
| tgccagcctg tgctaccag cccagcctgc cagctggttc tgcaccagat actgaagggt | 1680 |
| ggctcgggga catactgcct caatgtgtct ctggctgata ccaacagcct ggcagtggtc | 1740 |
| agcaccagc ttatcatgcc tggtaagaa gcaggccttg ggcagggttc gctgacgtg | 1800 |
| ggcatcttgc tgggtgtgat ggctgtggtc ctgcatctc tgatatatag gcgcagactt | 1860 |
| | |
| atgaagcaag acttctccgt accccagttg ccacatagca gcagtcactg gctgcgtcta | 1920 |
| ccccgcatct tctgctcttg tccattggt gagaatagcc cctcctcag tgggcagcag | 1980 |
| gtctga | 1986 |