



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월11일

(11) 등록번호 10-2565096

(24) 등록일자 2023년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/381 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/381 (2013.01)*A61P 17/00* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0152109

(22) 출원일자 2020년11월13일

심사청구일자 2020년11월13일

(65) 공개번호 10-2021-0071825

(43) 공개일자 2021년06월16일

(30) 우선권주장

1020190161555 2019년12월06일 대한민국(KR)

1020200012894 2020년02월04일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

Melanoma Manag. 1(2), 127-137 (2014.12.4.) 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

오상호

서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 108동 1805호

안유리

서울특별시 서대문구 신촌로1길 50, 202호

김지영

서울특별시 동대문구 이문로16길 33

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 6 항

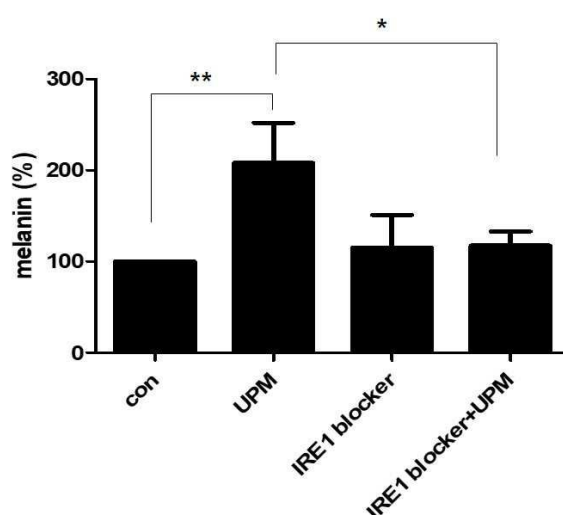
심사관 : 최연정

(54) 발명의 명칭 IRE 1a 차단제를 유효성분으로 포함하는 색소침착의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 IRE 1a 차단제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 과색소침착의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 투여하는 경우, 세포 스트레스 반응 조절을 통하여 UPR 억제를 유도하여 멜라닌의 합성을 저해함으로써 보다 효과적으로 미세먼지로 인한 색소침착의 치료 및 개선이 가능할 것으로 기대된다.

대표도 - 도7b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109834
과제번호	2019R1A2C4069490
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	ATP/P2X7 axis에 의한 색소형성기전 연구 및 P2X7억제 천연물 물질 발굴을 통한 색
소 예방 및 치료제 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465031402
과제번호	HP20C0019010020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	피부과학응용소재선도기술개발(R&D)
연구과제명	미세먼지의 노화관련분비표현형 기전규명을 통한 항노화-미백 표적물질 발굴 및 검
증	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.04.01 ~ 2020.12.31

명세서

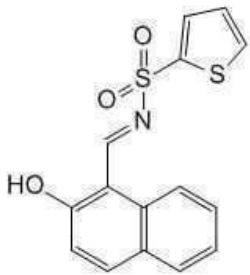
청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 IRE 1 α 차단제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 색소 침착의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 색소 침착은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 및 일광흑색증(solar lentigines)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 색소 침착은 미세먼지(urban particulate matter, UPM)에 의하여 발생되었거나 발생될 가능성이 있는 색소 침착인, 조성물.

청구항 6

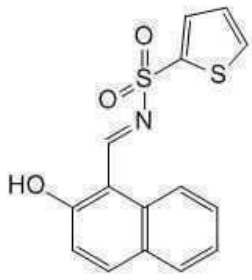
삭제

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 IRE 1 α 차단제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 색소 침착의 예방 또는 개선용 화장품 조성물로서,

상기 색소 침착은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 및 일광흑색증(solar lentigines)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

[화학식 1]



청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 색소 침착은 미세먼지(urban particulate matter, UPM)에 의하여 발생되었거나 발생될 가능성이 있는 색소 침착인, 조성물.

청구항 11

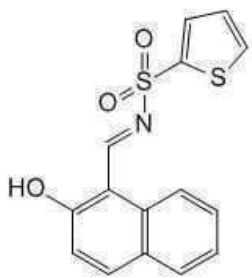
삭제

청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 IRE 1a 차단제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 색소 침착의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 색소 침착은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 및 일광흑색증(solar lentigines)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

[화학식 1]



청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 색소 침착은 미세먼지(urban particulate matter, UPM)에 의하여 발생되었거나 발생할 가능성이 있는 색소 침착인, 조성물.

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IRE 1 α 차단제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 미세먼지로 인한 색소침착의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세먼지는 질산 (NO_3^-), 암모늄 (NH_4^+), 황산 (SO_4^{2-}) 등의 이온 성분과 탄소 화합물 (carbon compounds), 금속 (elements) 화합물 등으로 이루어져 있는 물질로, 입자 지름이 10 μm 이하인 미세먼지와 2.5 μm 이하의 초미세 먼지로 분류된다. 세계 보건 기구 (WHO)는 미세먼지 중 디젤에서 배출되는 BC (black carbon)를 1 급 발암물질로 지정한 바가 있는 만큼 매우 유해한 물질에 해당한다. 최근 국내에서도 이러한 미세먼지로 인한 다양한 문제들이 수면 위로 떠올라 많은 이슈가 되고 있다. 미세먼지로 인한 문제로 감기, 천식, 기관지염 등의 호흡기 질환은 물론 심혈관 질환, 안구질환 등 다양한 각종 질병에 노출될 수 있으며, 피부 질환도 유발하는 것으로 알려져 있다. 세계 보건 기구에서는 미세먼지에 관련된 권고 기준을 발표하여 정하고 있으며, 인체에 미치는 영향을 최소화하기 위해 전 세계적으로 많은 노력을 기울이고 있다.

[0003] 미세먼지가 피부에 들러붙고 모공 안까지 침투해 여드름, 모낭염 등 트러블의 원인이 되며, 민감성 피부나 아토피 증상이 있는 사람은 피부 질환이 악화되거나 발진, 각종 먼지 알러지, 건조함 유발, 가려움증 유발, 피부 주름 생성, 피부 노화, 및 탈모를 비롯하여 색소침착 등을 일으키게 되고, 장기적으로는 미세먼지에 노출될 경우 피부암과 같은 심각한 질병을 초래할 수 있다.

[0004] 특히, 미세먼지, 황사 등과 같은 오염 물질은 피부 내 스트레스를 야기하여 색소침착을 유발하는데, 근래 매체의 발달로 남녀 노소를 불문하고 미용상 관심이 높아지면서 피부색을 밝게 하려는 노력이 증가하는 추세이다. 피부 미백에 대한 관심이 이전에 비하여 중요하게 여겨지면서, 피부 멜라닌 생성을 조절하는 다양한 피부 미백 화장품들을 비롯하여 색소 질환 치료제에 이르기까지 색소침착을 개선하기 위한 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 기존의 화장품 또는 치료제의 대부분은 티로시나아제 효소를 저해하는 작용을 하는 물질로 이루어졌으며 각종 부작용 (Raynaud E. et al., Ann Dermatol Venereol 128(6-7):720-724, 2001)이 나타나거나 물질의 사용을 중단하면 과색소침착이 다시 발생하는 등 피부 색소 침착을 효과적으로 억제할 수 있는 화장료 또는 치료제의 개발이 요구되는 실정이다. 이에 본 발명자들은 미세먼지로 인하여 유발되는 색소침착을 보다 효과적으로 예방 또는 치료하기 위하여 본 발명을 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 IRE 1 α 차단제를 유효성분으로 포함하는 과색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0006] 본 발명은 IRE 1 α 차단제를 유효성분으로 포함하는 과색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명은 IRE 1 α 차단제를 유효성분으로 포함하는 과색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0008] 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

[0009] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0010] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

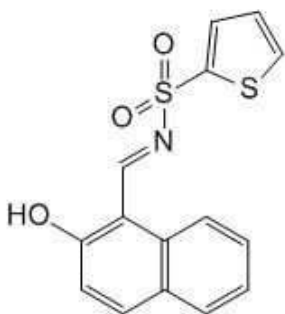
[0011] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, IRE 1 α (Inositol-requiring endonuclease 1 α) 차단제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 색소 질환의 예방 치료용 약학 조성물에 대한 것이다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 "IRE 1 α 차단제 (Inositol-requiring endonuclease 1 α inhibitor)"란 소포체 스트레스와 관련된 세포 스트레스 반응 (Unfolded protein response, UPR) 수용체 중의 하나인 IRE1 α 수용체에 작용하여 그의 활성을 억제하는 약물을 말하며, IRE1 수용체를 타겟으로 하여 소포체와 핵 간 시그널링을 억제하는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서 상기 IRE 1 α 차단제는 STF 083010 (N-[(2-히드록시-1-나프탈레닐)메틸렌]-2-티오펜술폰아마이드), B I09 (7-(1,3-디옥산-2-일)-1,2,3,4-테트라하이드로-8-히드록시-5H-[1]벤조피라노[3,4-c]피리딘-5-온), AMG 18 하이드로클로라이드 (2-클로로-N-[6-메틸-5-[[3-[2-[(3S)-3-피페리디닐아미노]-4-피리미디닐]-2-피리디닐]옥시]-1-나프탈레닐]벤젠술폰아마이드 하이드로클로라이드), 및 4 μ 8C (7-히드록시-4-메틸-2-옥소-2H-1-벤조피란-8-카르복살데하이드)로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 STF 083010일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 구체예에서 상기 "STF 083010"란 N-[(2-히드록시-1-나프탈레닐)메틸렌]-2-티오펜술폰아마이드라고도 불리며, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물로서 IRE1 α 엔도 뉴클레아제 활성을 억제한다. XBP1 mRNA 스플라이싱을 차단하고, 주로 다발성 골수종 세포에서 세포 증식 억제 및 세포 독성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

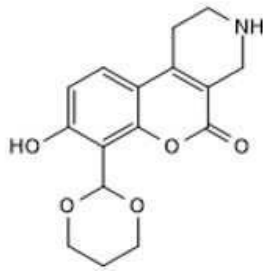
[0015] [화학식 1]



[0016]

[0017] 본 발명의 일 구체예에서 상기 "B I09"란 7-(1,3-디옥산-2-일)-1,2,3,4-테트라하이드로-8-히드록시-5H-[1]벤조피라노[3,4-c]피리딘-5-온으로도 불리며, 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 말한다. 상기 화합물은 IRE-1/XBP1 경로를 차단하는 역할을 하며, 인간 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL) 세포의 성장을 억제하는 것으로도 알려져 있다.

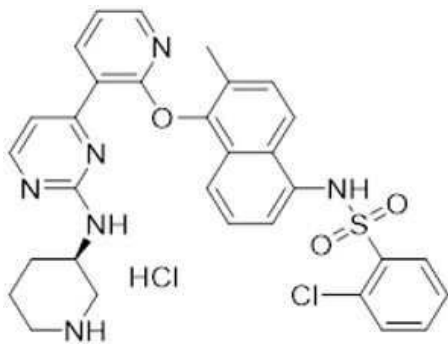
[0018] [화학식 2]



[0019]

[0020] 본 발명의 일 구체예에서 상기 "AMG 18 하이드로클로라이드"란 2-클로로-N-[6-메틸-5-[[3-[2-[(3S)-3-피페리딘아미노]-4-피리미디닐]-2-피리디닐]옥시]-1-나프탈레닐]벤젠술포아마이드 하이드로클로라이드라고도 불리며, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 말한다. 상기 화합물은 IRE1 α RNase로서 췌장 세포에서 소포체 스트레스로 유발된 세포 사멸을 감소시키는 것으로도 알려져 있다(Cell Metab. 2017 Apr4;25(4):883-897.1).

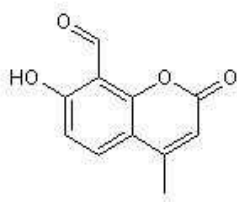
[0021] [화학식 3]



[0022]

[0023] 본 발명의 일 구체예에서 상기 "4 μ 8C"란 7-히드록시-4-메틸-2-옥소-2H-1-벤조피란-8-카르복살데하이드라고도 불리며, 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 말한다. 상기 화합물은 IRE1의 활성 부위로 기질이 결합하는 것을 억제하며, XBP1 스플라이싱 및 IRE1 매개 mRNA 분해를 선택적으로 불활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[0024] [화학식 4]



[0025]

[0026] 상기 약제학적으로 허용 가능한 염은 산 또는 염기의 부가염, 및 이의 입체화학적 이성질체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 유기산 또는 무기산의 부가염의 형태로 있을 수 있다. 염은 환자에 투여되었을 때에 환자에서 바람직한 효과를 갖는 것으로, 그들의 모화합물의 활성을 유지하는 염의 염들을 포함하지만, 이에 특별히 한정되는 것은 아닐 수 있다. 이러한 염들은 무기염 및 유기염, 예컨대 아세트산, 질산, 아스파르트산, 술폰산, 설푸릭산, 말레산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스테아르산, 락트산, 비카르본산, 비설푸릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘 이테트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이테트산, 톨루엔술폰산, 푸마르산, 글루세프산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸질산, 말론산, 염산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄술폰산, 헥사믹산, 판토테닉산, 모노히드로젠인산, 디히드로젠인산, 살리실산, 술파민산, 술파닐린산, 메탄술폰산의 염 등을 포함할 수 있다. 염기의 부가

염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속의 염, 예컨대 암모늄, 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등의 염; 유기 염기를 갖는 염, 예컨대 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 등의 염; 및 아미노산을 갖는 염, 예컨대 아르기닌, 리신 등을 포함할 수 있다. 또한, 이들 염들은 적정 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리된 형태로 전환될 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물에서 예방 또는 치료의 대상이 되는 질환으로, 색소 질환은 색소침착 (pigmentation)일 수 있으며, 보다 구체적으로 과색소침착 (hyperpigmentation)일 수 있다. 또한, 상기 색소 질환은 미세먼지에 의하여 발병되었거나 발병될 가능성이 있는 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에서 발병하였거나 발병 가능성이 있는 색소 질환의 예방 또는 치료 효과가 현저히 뛰어난 것에 특징이 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 “개체”는 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 일 구체예에서, "IRE 1 α (Inositol-requiring endonuclease 1 α)"란 소포체 (endoplasmic reticulum, ER) 스트레스 요인에 대한 미접힘 단백질 반응 (Unfolded protein response, UPR)을 매개하는 소포체(ER) 막관통 단백질을 말한다. 소포체는 단백질 및 지질의 합성, 칼슘의 저장, 신호전달 등을 담당하는 중요 세포소기관으로 환경 변화에 따라 선택적이고, 정교하게 조절된다. 소포체 내에 미접힘 단백질 (UP)이 증가하는 것을 소포체 스트레스 (ER stress)라고 하며, 세포는 이러한 소포체 스트레스를 해결하기 위한 일련의 과정을 활성화시키는데, 이를 미접힘 단백질 반응 (UPR)이라고 한다. 소포체 스트레스를 감지하는 센서 단백질인 IRE1 α 에 의하여 상기 반응이 매개되는 것으로 알려져 있다.

[0031] 본 발명의 일 구체예에서, "미세먼지 (particulate matter, PM)"란 대기 중에 떠다니거나 흩날려 내려오는 입자상 물질을 말하는데, 먼지 입자의 크기에 따라 50 μm 이하인 총먼지 (Total Suspended Particles, TSP)와 입자크기가 매우 작은 미세먼지 (Particulate Matter, PM)로 구분된다. 상기 미세먼지는 다시 지름이 10 μm 보다 작은 미세먼지 (PM₁₀)와 지름이 2.5 μm 보다 작은 미세먼지 (PM_{2.5})로 나뉜다. 먼지에 대한 환경기준은 1983 년 총먼지로 하였으며, 1993 년 10 μm 이하의 미세먼지 (PM₁₀)에 관한 기준이 추가되었으며, 2001 년 총먼지기준을 폐지하고, 2011 년 2.5 μm 이하의 미세먼지 (PM_{2.5})를 추가하여 현재 우리나라의 경우 미세먼지 2 종에 대한 대기환경기준만을 운영하고 있다.

[0032] 본 발명에서 상기 “미세먼지”는 지름이 2.5 μm 이하, 지름이 10 μm 이하, 또는 이보다 더 큰 범위에 속하는 입자의 지름 범위 내의 미세먼지를 의미할 수 있다. 비제한적인 예에서, 미세먼지는 약 0.0001 μm 내지 20 μm , 약 0.0001 μm 내지 15 μm , 약 0.0001 μm 내지 10 μm , 약 0.0001 μm 내지 7 μm , 약 0.0001 μm 내지 5 μm , 약 0.0001 μm 내지 2.5 μm , 약 0.0001 μm 내지 1 μm , 약 0.0001 μm 내지 0.5 μm , 약 0.0001 μm 내지 0.01 μm , 약 0.0001 μm 내지 0.001 μm , 약 0.00001 μm 내지 20 μm , 약 0.00001 μm 내지 15 μm , 약 0.00001 μm 내지 10 μm , 약 0.00001 μm 내지 7 μm , 약 0.00001 μm 내지 5 μm , 약 0.00001 μm 내지 2.5 μm , 약 0.00001 μm 내지 1 μm , 약 0.00001 μm 내지 0.5 μm , 약 0.00001 μm 내지 0.01 μm , 약 0.00001 μm 내지 0.0001 μm , 약 0.000001 μm 내지 20 μm , 약 0.000001 μm 내지 15 μm , 약 0.000001 μm 내지 10 μm , 약 0.000001 μm 내지 7 μm , 약 0.000001 μm 내지 5 μm , 약 0.000001 μm 내지 2.5 μm , 약 0.000001 μm 내지 1 μm , 약 0.000001 μm 내지 0.5 μm , 약 0.000001 μm 내지 0.01 μm , 약 0.000001 μm 내지 0.001 μm 일 수 있다. 또한, 본 발명에서의 미세먼지는 도시 미세먼지 (urban particulate matter, UPM)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 일 구체예에서, "멜라닌세포 (melanocyte)"란 색소형성세포로도 불리우며, 표피의 기저층에서 존재하는 것으로 표피 세포의 약 5 %를 차지하고 있다. 멜라닌세포는 체내에서 검은색 색소인 멜라닌을 생성하는 세포를 말한다. 멜라노사이트는 멜라닌을 합성하여 주변의 케라티노사이트에 멜라닌을 공급하는 세포로서, 태아 14 주경에 멜라노사이트 (melanocyte) 형성되며 기저층의 10 %를 차지하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌의 합성은 멜라노사이트 내에서 생기는 멜라노솜이라고 불리는 단위막으로 둘러싸인 소립자에서 합성된다. 티로시나제, TRP-1, TRP-2 등의 효소가 관여하여 다갈색, 검은색의 유멜라닌을 생성하거나, 황적색의 페오멜라닌을 생성하는 등 다양한 색상으로의 침착을 일으키게 된다.

[0034] 본 발명의 일 구체 예에서 "멜라닌 (melanin)"이란, 피부, 털, 눈의 맥락막 등에 있는 페놀화합물의 산화 중합에 의하여 생성되는 흑갈색의 색소로 멜라닌 세포 (melanocyte)에서 생성된다. 동물의 경우 피부 등에 분포하는 멜라노사이트라고 하는 세포에서 티로시나아제에 의한 티로신의 산화에 의해 생성된다. 태양광선에 노출시 멜라

닌이 형성되는데 멜라닌 형성 세포의 종류와 양에 따라 피부 색깔이 달라지게 된다. 멜라닌은 태양광선의 자외선에 대한 피부 보호 작용을 하는 것으로도 알려져 있다. 그 예로 피부 색깔이 검은 사람은 피부색이 옅은 사람에 비하여 멜라닌 색소가 더 많이 형성되어 태양광선에 노출시 자외선으로부터 화상을 덜 입게 되는 것으로 알려져 있다. 또한, 멜라닌은 피부색을 결정짓는 가장 중요한 요소이다. 정상 인체의 피부색은 멜라닌 소체의 크기, 모양, 유형, 색 분포에 의해 결정된다.

[0035] 본 발명의 일 구체 예에서 "멜라닌형성(melanogenesis)"이란 o-디페놀류의 산화적 중합에 의해 멜라닌이 생성되는 과정을 말한다. 동식물계와 균계에 널리 분포하며, 특히 척추동물에서 멜라닌은 멜라닌세포 또는 흑색세포의 세포질 내의 멜라닌소체에서 티로신이 티로시나아제 (카테콜산화효소)에 의한 산화에 의해 생성되며, 상기에서 생성된 멜라닌은 피부를 암색화시키게 된다.

[0036] 본 발명에서 상기 멜라닌 합성에 관여하는 단백질은 MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) 또는 티로시나아제 (Tyrosinase)일 수 있다. 다만, 미세먼지로 인한 멜라닌 합성에 관여하는 단백질로는 티로시나아제 및 gp100일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 "멜라노사이트 유도성 전사인자 (Microphthalmia-associated transcription factor, MITF)"란 멜라닌 합성에 관여하는 기초-루프-힐릭스 루이신 지퍼 패밀리 (Basic-loop-helix leucine zipper family) 중 하나에 해당하는 단백질을 의미한다. 세포의 색소화 반응에 중요하게 관여하는 인자로서, MITF는 멜라닌 세포에서 정상적인 멜라닌 합성에 필수적인 다양한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 이 유전자의 돌연변이가 생기는 경우 눈과 피부 등의 색소침착을 초래한다는 것이 많은 연구를 통해 밝혀져 있다(Hum Mol Genet. 2013 Nov 1;22(21):4357-67.). 상기 MITF는 MITF-M, MITF-A, MITF-B, MITF-C, MITF-H 및 MITF-J의 아형을 포함하는 것으로, 본 발명의 목적상 피부의 멜라닌세포에서 발현되며 멜라닌을 만들어내는 데 관여하는 MITF-M 아형(Korean J Phys Anthropol. 2016 Mar;29(1):27-34. Korean)의 발현을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 멜라닌 형성에 핵심적으로 작용하는 효소인 티로시나아제(tyrosinase)의 유전자 발현을 조절하는 주된 전사인자이기도 하다.

[0038] 본 발명의 일 구체 예에서 "티로시나아제 (tyrosinase)"란 페놀옥시다아제의 하나로 약 0.2 %의 구리를 함유하는 구리 단백질로 멜라닌 형성에 핵심적으로 작용하는 효소이다. 이는 멜라닌 생성을 조절하는 산화 효소로 1895 년 프랑스의 생화학자 G. E. 베르트랑이 젓빛머털에서 발견하였다. 이는 식물 또는 동물의 조직에서 나타나는데, 인간 피부의 멜라닌 세포에서 합성되는 멜라닌소체 (melanosome)에서 발견될 수 있다. 유전적으로 상기 효소가 결핍되면 백자증 (선천적 멜라닌형성부전)을 일으키는 것으로도 알려져 있다. 티로신을 히드록시화하여 도파 (dihydroxyphenylalanine, DOPA)를 형성하고, 계속하여 산화가 진행되어 도파퀴논 (dopa quinone)이 생성되고, 도파퀴논 분자가 계속하여 중합하게 되면 멜라닌 (melanin)을 형성하는 기전으로 작용한다. 미백 물질을 탐색하는 방법으로 색소 세포 내에서의 색소량의 증감 측정과 함께 색소 작용에 중요하게 관여하는 효소로서 활용되고 있다.

[0039] 본 발명의 일 구체 예에서, "gp100"이란 종양 세포에 대한 CTL 반응을 유도 할 수 있는 면역 원성 에피토프를 운반하는 것으로 알려진 흑색종 관련 항원이다. 특히, HR-gp100에 대한 항체는 멜라노사이트 기원의 종양을 검출하거나 단백질 또는 이의 펩티드 중 하나에 의한 면역요법 전에 종양에서 gp100 발현의 수준을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 다른 구체 예에서, 상기 색소 질환의 발생 수준을 측정하기 위하여 웨스턴블롯 (Western blot), Fontana-masson 염색 키트, 실시간 연쇄중합반응 (Real-time PCR) 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법을 사용할 수 있으며 당업자에게 통상적으로 사용되는 실험이라면 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명의 다른 구체 예에서, 상기 미세먼지로 인한 색소침착을 예측할 수 있는 특징적 유전자는 GRP78, sXBP-1 및 ATF-4로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 특징적 유전자와 그 서열번호 Entrez ID는 하기 표 1과 같다.

표 1

유전자	서열번호(Entrez ID)
GRP78	NM_3309
sXBP-1	NM_7494
ATF-4	NM_468

- [0043] 본 발명에서 상기 예방 또는 치료의 대상이 되는 질환으로 상기 “색소 질환”은 포유류의 멜라닌 세포에서 주 색소 효소인 티로시나아제를 함유한 멜라노좀 내에서 합성되는 멜라닌이 표피 내 과다하게 생성 및 분포됨으로써 발생될 수 있으며, 구체적으로 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 및 일광흑색증 (solar lentiginosis)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 멜라닌의 과도한 합성으로 인하여 발생될 수 있는 질병은 이에 제한되지 아니하고 모두 포함될 수 있다.
- [0044] 본 발명에서, “예방”은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 색소침착의 증상을 차단하거나, 색소침착의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, “치료”는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 피부 질환, 보다 구체적으로는 색소 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 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 약학적 조성물은 약제적으로 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 약학적 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.
- [0048] 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.
- [0049] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0050] 본 발명에서, “비경구”는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1 일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/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.
- [0053] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, IRE 1a 차단제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 대한 것이다.
- [0054] 본 발명의 화장료 조성물에서 상기 유효성분과 과색소침착에 기인한 색소 질환, 예방 및 멜라닌 합성에 관여하는 단백질에 관한 내용은 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 구체적인 기재를 생략한다.
- [0055] 본 발명에서, “개선”은 본 발명의 조성물을 조사하여 피부 질환, 보다 구체적으로는 색소 질환으로 색소 침착이 호전되거나 이롭게 되어 피부톤이 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서 상기 화장료 조성물은 화장수, 영양 로션, 영양 에센스, 마사지 크림, 미용목욕물 첨가제, 바

디 로션, 바디 밀크, 베스 오일, 베이비 오일, 베이비파우더, 샤워젤, 샤워크림, 선스크린 로션, 선스크린 크림, 선텐 크림, 스킨 로션, 스킨 크림, 자외선차단용 화장품, 클렌징밀크, 탈모제화장용, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민 오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누비의료용, 크림비누, 페이스워시, 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.

[0057] 본 발명에 있어서 상기 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있다. 또한, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제 (humectant), 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명에 있어서 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.

[0059] 또한, 본 발명에 있어서 상기 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, 부틸스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용 가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다. 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 항산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.

[0061] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, IRE 1 α 차단제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 대한 것이다.

[0062] 본 발명의 식품 조성물에서 상기 유효성분과 과색소침착에 기인한 색소 질환, 예방 및 개선, 멜라닌 합성에 관여하는 단백질에 관한 내용은 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 구체적인 기재를 생략한다.

[0063] 본 발명에 있어서, 식품 조성물은 본 발명에서 목적으로 하는 적응증의 예방 또는 개선을 위해 다양하게 이용되는 것으로서, 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 식품조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 기존의 식품용 섭취물로부터 개량되어 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 100 %의 비율로 첨가할 수 있다. 여기서, 상기 식품조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연탄수화물로서 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. 그 외 본 발명의 식품조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성풍미제 및 천연풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 통상적으로 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 100 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이거나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0064] 본 발명의 조성물을 이용하는 경우, 소포체 스트레스와 관련된 세포 스트레스 반응을 조절함으로써 미접힘 단백질 반응 (unfolded protein response; UPR) 억제를 유도하여 색소침착의 예방 또는 치료가 가능하며, 특히는 미세먼지로 인한 과색소침착의 치료에 있어 효능이 우수하므로 피부 미백을 비롯하여 피부톤 개선에 크게 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1a 및 도 1b는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 24 시간, 48 시간 노출시킨 후 웨스턴블롯 (Western blot)으로 MITF 및 티로시나아제 (Tyrosinase)의 발현량을 비교 확인한 도이다.
- 도 2a 및 도 2b는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 72 시간 노출시킨 후 gp100의 발현량을 분석한 결과이다.
- 도 2c는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 72 시간 노출시킨 후 형광멜라닌을 분석한 결과이다.
- 도 3a 및 도 3b는 피부조직 절편에 미세먼지 $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 노출시켜 5 일 경과한 때 Fontana-masson 염색한 결과를 확인한 도이다.
- 도 4는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 24 시간 노출시킨 후 real-time PCR하여 GRP78, sXBP-1, 및 ATF-4의 발현량 변화를 그래프로 나타낸 결과이다.
- 도 5a 및 도 5b는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 24 시간 노출시킨 후 웨스턴블롯 (Western blot)으로 phospho-IRE1 α 를 확인한 도이다.
- 도 5c는 음성 대조군과 IRE1 차단제 (STF083010) 처리/미처리 군에 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 24 시간 노출시킨 후 real-time PCR을 통해 sXBP1의 발현량을 확인한 도이다.
- 도 6a는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 48 시간 노출시킨 후 웨스턴블롯 (Western blot)으로 티로시나아제 (Tyrosinase)의 발현량을 비교 확인한 도이다.
- 도 6b는 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 48 시간 노출시킨 후 티로시나아제 (Tyrosinase)의 활성 정도를 확인하기 위해 지 모그래피(zymography) 데이터를 분석한 도이다.
- 도 7a는 음성 대조군과 IRE1 차단제 (STF083010) 처리/미처리 군에 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 72 시간 노출시킨 후 gp100의 발현량을 분석한 결과이다.
- 도 7b는 음성 대조군과 IRE1 차단제 (STF083010) 처리/미처리 군에 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 72 시간 노출시킨 후 형광멜라닌을 확인한 결과이다.
- 도 8은 체외 배양된 인간 피부에 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 72 시간 노출시킨 후 Fontana-masson 염색한 결과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0068] **실시예 1: 멜라노사이트(melanocyte)의 1차 배양**
- [0069] 본 발명에 사용된 멜라노사이트 (melanocyte)인 인간 기초 멜라노사이트 (human primary melanocyte)를 계대배양하였다. 상기 세포는 10 % 우태아혈청 (FBS; hyclone, logan, UT)을 포함하는 DMEM 배지와, 성장인자 (growth factor)를 포함하는 멜라노사이트 기초 배지 (melanocyte basal medium)을 이용하여, 37 °C, 5 %의 CO₂ 배양기 내에서 배양을 실시하였다.
- [0071] **실시예 2: 미세먼지(urban particulate matter, UPM) 노출이 미치는 영향 확인**
- [0072] 2.1 시간대별 미세먼지가 세포에 미치는 영향
- [0073] 멜라닌 합성을 억제하는지 확인하기 위하여, 멜라닌 합성에 관여하는 단백질의 발현 및 티로시나제의 활성도를 확인하였다. 단백질 발현 확인을 위하여, 상기 실시예 1과 동일한 조건하에서, 멜라노사이트를 1×10^5 세포로 12 웰에 파종하고, 미세먼지 ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)를 1 개의 웰당 면적 4 cm^2 가 되도록 처리한 후 시간대 별로 세포에 노출시켰다.

[0074] 상기의 농도로 미세먼지에 24 시간 또는 48 시간 노출시킨 후의 세포에서의 MITF 및 티로시나아제 (Tyrosinase)의 발현량을 단백질 수준에서 보기 위하여 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다(도 1a 및 도 1b 참조). 실험 결과 MITF의 경우 UPM 처리 후 음성대조군과 같은 양상이 나타나 48 시간 후 회복되는 것을 확인하였다. 그에 반하여, 티로시나아제의 경우 UPM 처리 후 시간이 지날수록 발현량이 증가하는 양상을 띠는 것을 확인할 수 있었다.

[0075] 보다 긴 72 시간이 경과한 후의 결과를 확인하기 위하여 상기에서 실험한 방법과 동일한 조건에서 세포를 배양하여 세포 파종하였으며 gp100을 측정하였다(도 2a 및 도 2b 참조). 측정된 결과 미세먼지 노출 후 72 시간이 경과한 경우 gp100의 발현량에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 2.2 UPM이 멜라닌 합성에 미치는 영향

[0077] 미세먼지가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 형광멜라닌을 확인하고자 멜라노사이트의 배양은 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 파종하였으며, 미세먼지 ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)에 72 시간 노출시켰다. 멜라닌을 NaOH로 약 80 °C에서 1 시간 녹인 후 원심 분리 (3000 g) 후 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 상기 상층액에 50 %의 H_2O_2 를 넣어 30 %의 H_2O_2 로 만든 후 RT에서 4 시간 동안 인큐베이션한 후에 형광을 측정하였다. 상기 결과를 도 2c에 나타내었다. 음성대조군에 비하여 162.72 %로 약 63 %의 멜라닌 합성 비율이 상승한 것을 확인할 수 있었다. 이에 따라 미세먼지가 멜라닌합성 (melanogenesis)에 영향을 직접적으로 미치는 것을 알 수 있다.

[0079] **실시예 3: 미세먼지 노출이 조직에 미치는 영향**

[0080] 실시예 2의 결과를 조직에서 알아보려고 형광멜라닌을 확인하는 실험을 추가로 수행하였다. 피부 조직을 4 mm 펀치로 수득한 후 조직배양하였으며, 미세먼지 ($20\mu\text{g}/\text{cm}^2$)을 조직 위에 5 일간 노출시킨 후 프로즌 블록 (frozen block)을 만든 후 Fontana-massone 염색 키트를 이용하여 결과를 관찰하였다(도 3a 및 도 3b 참조). 실험 결과, 도 3a의 사진을 확인하면 음성대조군에 비하여 UPM에 장시간 노출된 경우 피부 조직의 상태에 확인한 차이가 발생하는 것을 알 수 있었으며, 이를 수치로 환산하여 결과 (fold change)를 비교하였다. 조직 수준에서의 미세먼지의 영향을 알아보았다.

[0082] **실시예 4: 미세먼지가 유도하는 소포체 스트레스(ER stress) 반응 관련 유전자의 선별**

[0083] 멜라노사이트를 1×10^5 세포로 12 웰에 파종하고, 미세먼지 ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)를 1 개의 웰당 면적 4 cm^2 가 되도록 처리한 후 24 시간 노출시킨 후 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다.

표 2

프라이머		타깃 시퀀스
GRP78	Forward primer	CATCACGCCGTCCTATGTCG
	Reverse primer	CGTCAAAGACCGTGTTCTCG
sXBP1	Forward primer	AACCAGGAGTTAAGACACGCGCTT
	Reverse primer	CTGCACCCTCTGCGGACT
ATF4	Forward primer	ATGACCGAAATGAGCTTCCTG
	Reverse primer	GCTGGAGAACCCATGAGGT

[0085] 상기 실험을 수행한 결과를 도 4에 나타내었다. 음성대조군에 비하여 UPM에 24 시간 노출된 멜라노사이트에서 GRP78 및 sXBP1 발현량 증가가 확인되었고, ATF4의 발현량에 있어서는 통계적 유의성을 관찰하기 어려웠다(도 4 참조). 이러한 결과를 통하여 본 발명자들은 UPM에 의한 멜라닌합성 (melanogenesis)과 관련한 sXBP1의 유전자를 선별할 수 있었다.

[0087] **실시예 5: IRE1a 차단제 약물처리 후 색소침착 억제 효과의 확인**

[0088] 5.1 약물 처리

[0089] 이 때, 약물 처리 후 발현량의 변화를 확인하기에 앞서 UPM에 노출되기 전과 후의 phospho-IRE1 α을 확인하여 미세먼지가 IRE1 α에 미치는 영향이 있는지 여부를 확인하였고, 이와 함께 약물의 단독 처리 또는 약물 처리 후 UPM에의 노출 후 phospho-IRE1 α의 발현량의 변화를 확인하였다(도 5a 및 5b 참조).

[0090] 또한, 미세먼지로 인한 색소침착 억제 효과를 확인하기 위하여 IRE1 차단제인 STF083010 ($1 \mu\text{M}$) 약물을 1 시간

동안 전처리 (pre-incubation)하였으며, 그 후 미세먼지 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 24 시간, 48 시간, 또는 72 시간 노출시켜 sXBP1, 티로시나아제, 티로시나아제 효소 활성도 및 gp100의 발현량을 확인하였다(도 5c 내지 도 7a 참조).

[0091] **5.2 약물 처리 후 세포의 다양한 분석**

[0092] IRE1 차단제인 STF083010 ($1 \mu\text{M}$) 약물을 전처리 한 후의 미세먼지로 인한 색소침착 억제 효과를 확인하기 위하여 미세먼지 노출 24 시간 경과 후 증가된 phospho-IRE1 α (p-IRE1 α)의 발현량이 감소하는 것을 확인하였다(도 5a 및 5b 참조). UPM에 노출된 경우에 p-IRE1 α 의 발현 수준이 높게 나타났으며, 상기 약물을 처리한 경우 발현 수준이 음성대조군(무처리)에서의 발현 수준과 유사한 정도까지 감소한 모습을 확인할 수 있었다.

[0093] IRE1 차단제인 STF083010 ($1 \mu\text{M}$) 약물을 전처리 한 후의 미세먼지로 인한 색소침착 억제 효과를 확인하기 위하여 미세먼지 노출 24 시간 경과 후 sXBP1의 발현량을 확인하였다(도 5c 참조). UPM에 노출된 경우에 sXBP1의 발현 수준이 높게 나타났으며, 상기 약물을 처리한 경우 발현 수준이 음성대조군(무처리)에서의 발현 수준과 유사한 정도까지 감소한 모습을 확인할 수 있었다.

[0094] IRE1 차단제인 STF083010 ($1 \mu\text{M}$) 약물을 전처리 한 후의 미세먼지로 인한 색소침착 억제 효과를 확인하기 위하여 미세먼지 노출 48 시간 경과 후 티로시나아제의 발현량을 단백질 수준에서 보기 위하여 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다(도 6a 참조). 실험 결과 티로시나아제의 발현 수준 또한 약물 처리 후 감소한 모습을 확인할 수 있다. 추가적으로, 티로시나아제 효소 활성을 보기 위하여 지모 그래피 분석(zymography assay)을 수행하였다. 그 결과 상기 약물을 처리한 경우 티로시나아제 효소의 활성 수준이 음성대조군(무처리)에서의 활성 수준과 유사한 정도까지 감소한 모습을 확인할 수 있었다(도 6b 참조).

[0095] IRE1 차단제인 STF083010 ($1 \mu\text{M}$) 약물을 전처리 한 후의 미세먼지로 인한 색소침착 억제 효과를 확인하기 위하여 미세먼지 노출 72 시간 경과 후 gp100의 발현량을 상기에서와 같이 단백질 수준에서 보기 위하여 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다(도 7a 참조). 실험 결과 gp100의 발현 수준 역시 약물 처리 후 감소한 모습을 확인할 수 있다.

[0096] **5.3 멜라닌 합성의 정도 비교**

[0097] IRE1 차단제 (STF083010)의 약물을 처리한 군의 경우 미세먼지에 노출시켰으나 약물을 처리하지 아니한 음성대조군과 비교하였을 때 멜라닌 합성의 정도가 217.408 %에서 129.803 %로 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었다(도 7b 참조). 이를 통하여 상기 약물이 미세먼지로 인한 색소침착에 작용하는 효과를 확인하였으며, 멜라닌 합성을 저해시킴으로써 피부톤의 개선이 가능하다는 점을 시사한다. 상기 약물이 ER 스트레스와 관련하여 XBP1 유전자의 발현에 영향을 미쳐 IRE1 α -XBP1 경로를 통하여 궁극적으로 색소 질환의 치료, 보다 구체적으로 미세먼지로 인한 과색소침착의 치료의 효과가 있으므로 의약 및 보건 분야에서 크게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0099] **실시예 6: 미세먼지 노출로 인한 색소침착 치료 효과의 확인**

[0100] 실시예 5의 결과를 실제 피부 조직에 적용하여 색소침착의 치료 효과를 확인하고자, 형광 멜라닌을 확인하는 실험을 추가로 수행하였다. 피부 조직을 4 mm 편치로 수득한 후 조직 배양하였으며, 미세먼지 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)을 조직 위에 5일간 노출시킨 후 프로즌 블록 (frozen block)을 만들고 Fontana-massone 염색 키트를 이용하여 결과를 관찰하였다(도 8 참조).

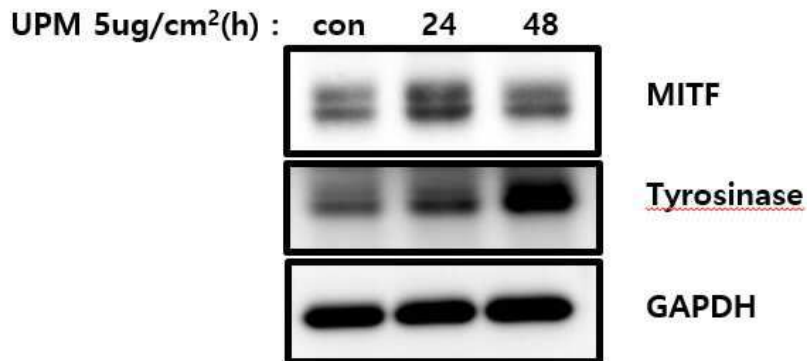
[0101] 실험 결과에 따르면, 음성 대조군에 비하여 UPM에 장시간 노출된 경우 피부 조직의 색소침착이 발생하였으며, IRE1 차단제 (STF083010)의 약물을 추가로 처리한 조직에서 색소침착의 정도가 대조군 수준으로 감소된 것을 확인하였다.

[0102] 상기 결과를 종합하면, IRE1 차단제 (STF083010)의 약물 처리 시 미세먼지로 인한 색소침착의 치료 효과가 있음을 알 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 조성물을 사용할 경우 미세먼지, 황사 등의 환경 오염 물질로 인한 피부 손상, 보다 바람직하게는 색소 질환을 예방, 개선 또는 치료가 가능할 것으로 기대된다.

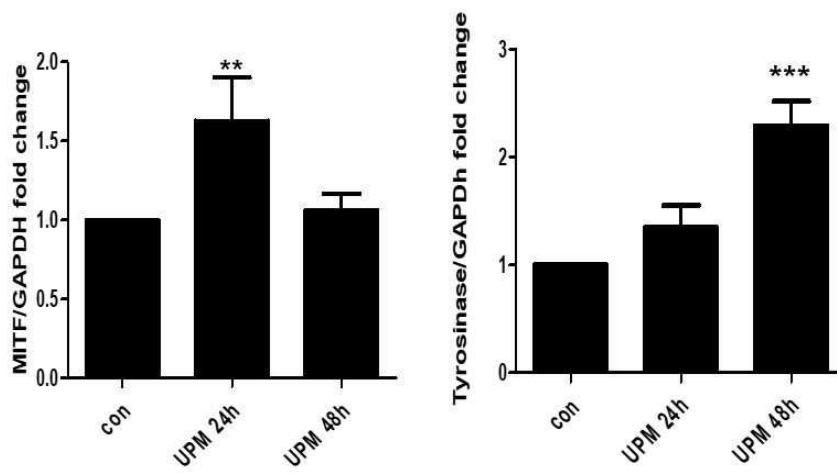
[0104] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

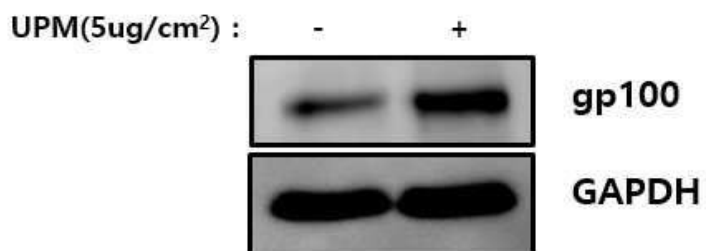
도면1a



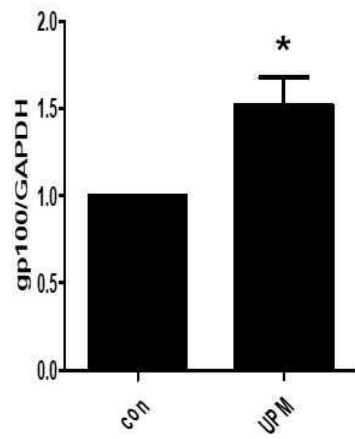
도면1b



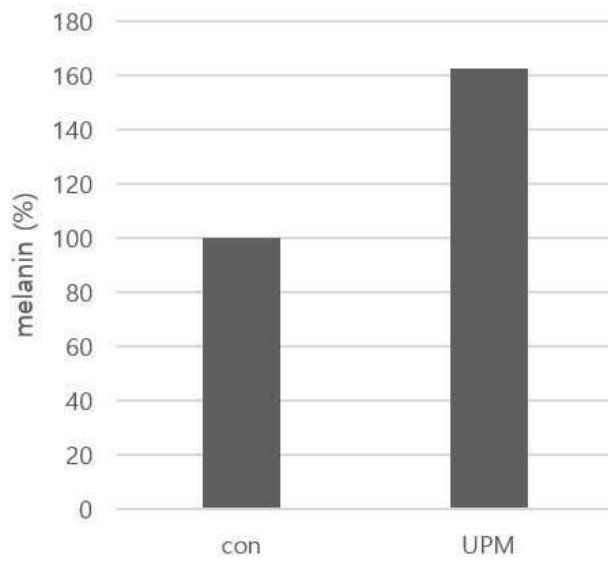
도면2a



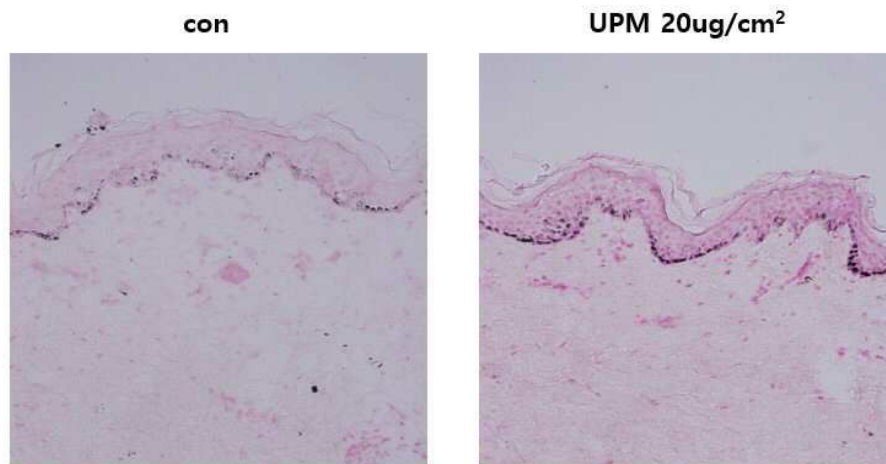
도면2b



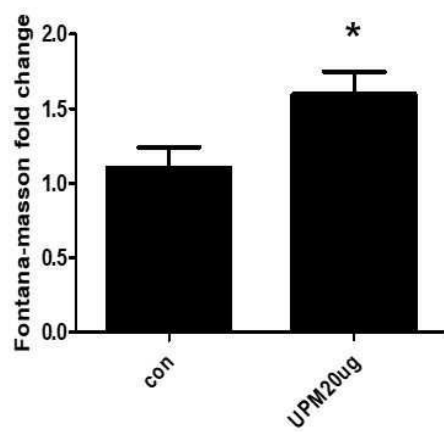
도면2c



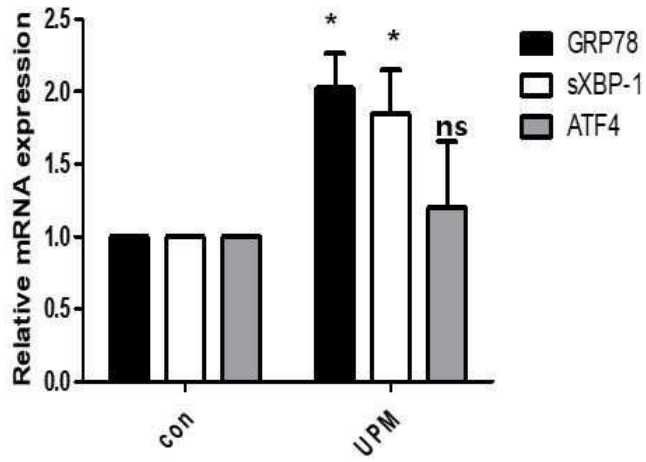
도면3a



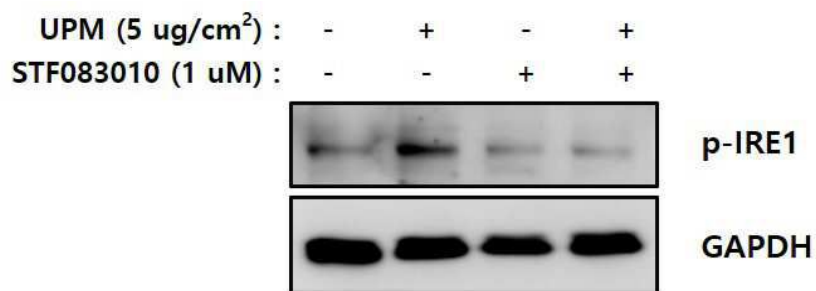
도면3b



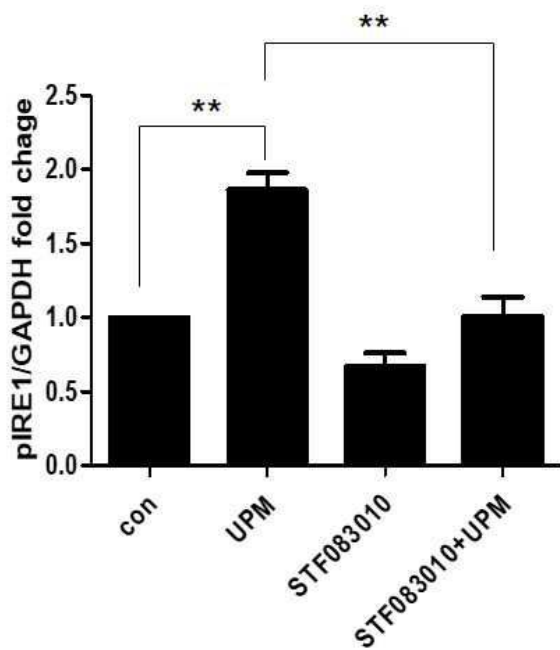
도면4



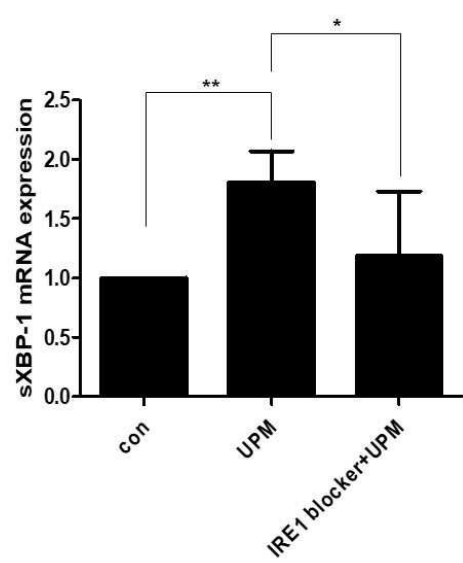
도면5a



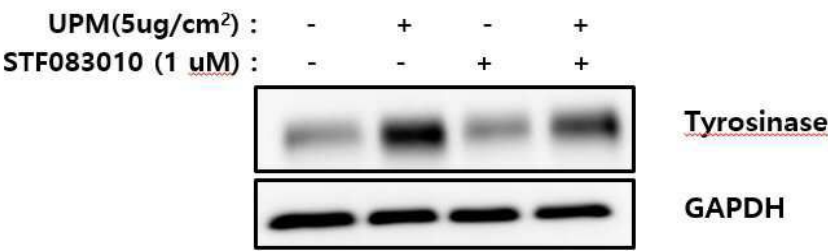
도면5b



도면5c

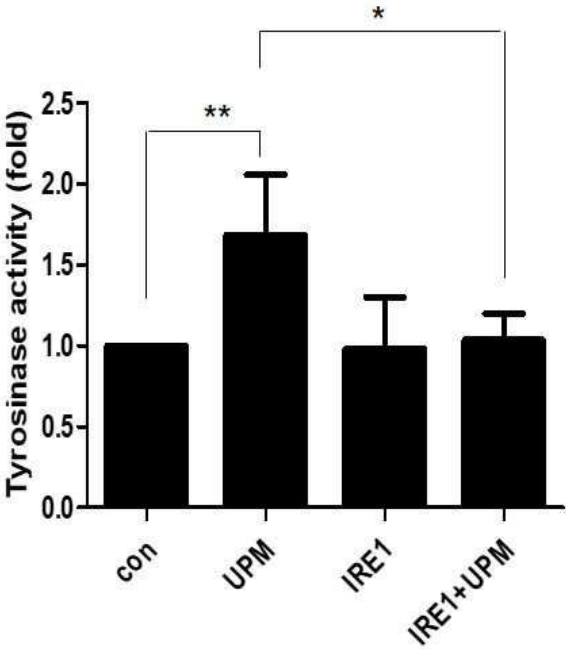


도면6a



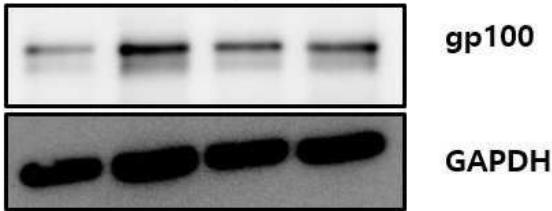
도면6b

UPM (5 ug/cm²) : - + - +
STF083010 (1 uM) : - - + +

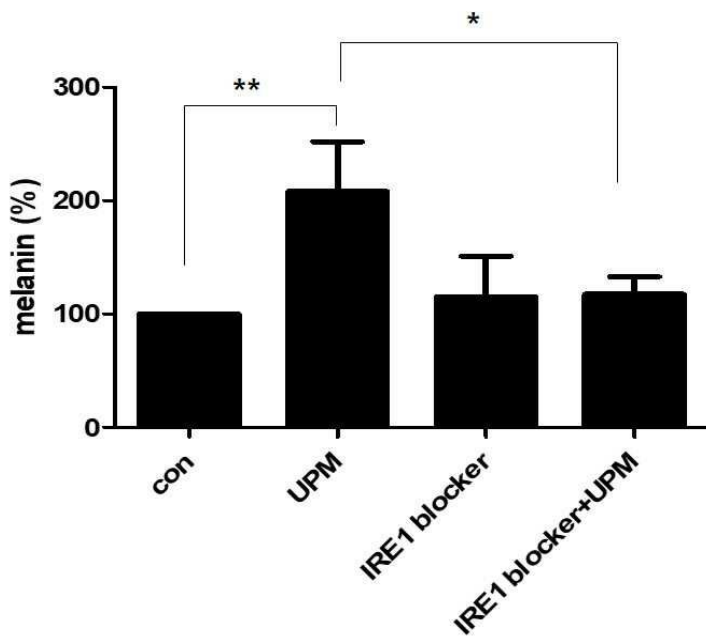


도면7a

UPM(5ug/cm²) : - + - +
STF083010 (1 uM) : - - + +



도면7b



도면8

