

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035389

(43) 공개일자 2020년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/66 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/52 (2006.01) A61K 31/7076 (2006.01)
A61K 8/55 (2006.01) A61K 8/60 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/66 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0037193(분할)

(22) 출원일자 2020년03월27일

심사청구일자 2020년03월27일

(62) 원출원 특허 10-2018-0102920

원출원일자 2018년08월30일

심사청구일자 2018년08월30일

(30) 우선권주장

1020170114020 2017년09월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

오상호

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
피부과학교실

김지영

서울특별시 동대문구 이문로16길 33

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

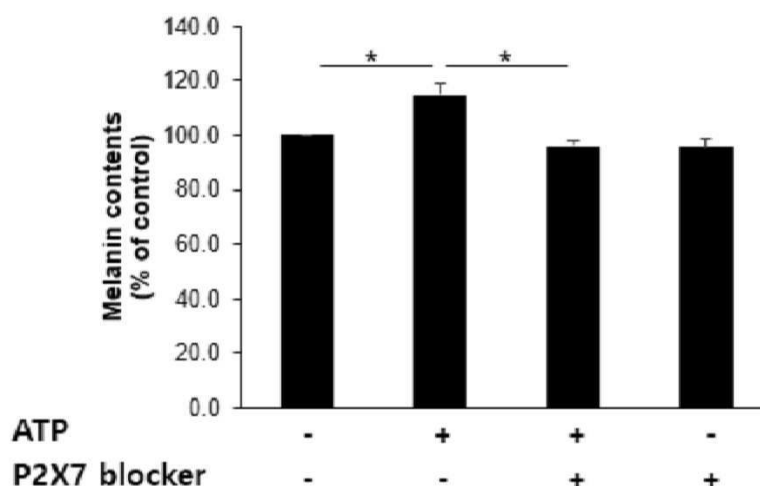
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 저색소 침착(hypopigmentation) 또는 과다색소침착(hyperpigmentation)에 기인한 다양한 색소 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 퓨린성 수용체의 아고니스트(agonist)를 포함하는 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물과, 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 포함하는 과다색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

A61K 31/52 (2013.01)
A61K 31/7076 (2013.01)
A61K 8/55 (2013.01)
A61K 8/60 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

정지훈

경기도 용인시 수지구 성북2로76번길 31, 107동
 302호 (성북동, 푸른마을푸르지오)

(72) 발명자

이은정

서울특별시 성동구 금호로 107 래미안하이리버아파트
 101동 404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1C1B2008015

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원사업

연구과제명 멜라닌세포에서 purinergic signaling을 통한 색소형성에 미치는 영향의 규명과 새로운 색

소 치료 타겟 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서,

상기 퓨린성 수용체의 길항제는 AZD-9056인, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퓨린성 수용체는 P2X₂, P2X₄, P2X₇ 및 P2Y₁로 이루어진 군에서 선택되는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 퓨린성 수용체는 P2X₇인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 퓨린성 수용체의 길항제는 멜라닌 합성을 억제하는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 과색소 침착에 기인한 색소 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 또는 일광흑색증(solar lentigines)인, 약학 조성물.

청구항 6

퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 있어서,

상기 퓨린성 수용체의 길항제는 AZD-9056인, 화장료 조성물.

청구항 7

퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서,

상기 퓨린성 수용체의 길항제는 AZD-9056인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 저색소 침착(hypopigmentation) 또는 과다색소침착(hyperpigmentation)에 기인한 다양한 색소 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) 도파 퀴논(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 발생하면 이는 색소의 과다한 침착 혹은 저색소 침착을 초래한다.

[0005] 과다색소침착(hyperpigmentation)은 기미(melasma), 검버섯(age spots) 및 일광성 각화증(solar keratosis)와 같은 질환을 유발하여, 화장품 업계에서 피부 색깔의 개선은 오래 전부터 요구되어 왔고, 다양한 미백 제품이 전세계적으로 판매되고 있다. 이러한 미백 제품 또는 치료제들은 하이드로퀴논, 레티노이드 및 티로시네이즈 억제제 등을 포함하고 있는데, 이들은 돌연변이, 독성 및 조직 흑갈병(ochronosis, blue-black hyperpigmentation of skin) 등의 부작용이 문제되고 있다. 따라서, 최근에는 부작용을 일으키지 않고 피부 독성이 적으면서 피부 미백 효과가 뛰어난 치료제 혹은 화장품에 대한 연구 및 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

[0006] 한편, 저색소 침착(hypopigmentation)은 멜라닌 부족으로 발생하는 것으로, 발병 시 피부암 발생율이 70배 이상 증가한다. 유전적 저색소 침착은 알비노(albinism)와 같은 질환을 발생시킨다. 또한, 저색소 침착된 병변은 노출된 피부를 시각적으로 보기에 흉하게 만들어 심리사회학적 문제 또한 발생시킨다. 멜라닌 생합성을 상향 조절할 수 있는 작은 분자들이 저색소 침착 질환을 치료하고 UV-유도된 피부 손상을 감소시키는 데에 잠재적인 물질로 연구되고 있다. 이에, 다양한 광보호적 속성을 가진 색소 침착 촉진 물질로, 예를 들어, 디아실글리세롤(diacylglycerols), 3-이소뷰틸-1-메틸크산틴(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX) 및 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)가 개발되었다. 하지만, 이들 화합물은 종양 형성을 촉진하는 경향의 심각한 부작용이 문제되고 있다. 따라서, 최근에는 색소 침착 효과가 더 뛰어나지만 독성이 없고 경제적으로 유효한 물질의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 멜라닌 형성 촉진 효과가 뛰어나 저색소 침착에 기인한 다양한 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명의 일 목적은 멜라닌 형성 억제 효과가 뛰어나 과다색소침착에 기인한 다양한 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 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

[0010] 본 발명의 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위하여 예의 노력한 결과, 퓨린성 수용체(purinergic receptor)가 색소 침착에 중요한 역할을 수행하며, 상기 퓨린성 수용체의 아고니스트(agonist)를 사용하는 경우 멜라닌 합성이 증가하였고, 상기 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 사용하는 경우 멜라닌 합성이 억제되어 다양한 색소 질환을 치료할 수 있음을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.

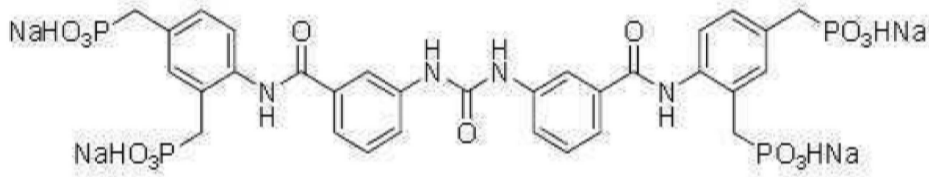
[0011] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 아고니스트(agonist)를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착

에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

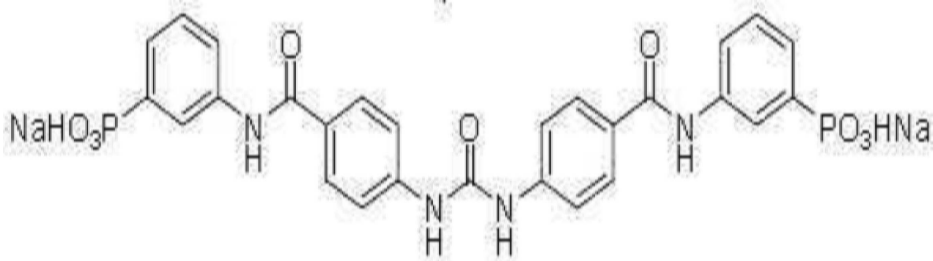
- [0012] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 아고니스트(agonist)를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 아고니스트(agonist)를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서 상기 퓨린성 수용체는 P2X₂, P2X₄, P2X₇, P2Y₁ 및 P2Y₁₁로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 바람직하게는 상기 퓨린성 수용체는 P2X₇ 또는 P2Y₁₁일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 "P2X₇"은 리간드-통로 이온 채널로서 대식세포 (Macrophage), 비만세포 (Mast cell), 림프구 (Lymphocyte) 등 주로 염증 및/또는 면역반응에 관여하는 세포에 존재한다. 특히, ATP에 의한 P2X₇ 수용체의 활성화는 인터루킨-1β (Interlukin-1 β)의 방출, 거대세포의 형성 (대식세포/미세아교세포), 탈과립 (비만세포), 증식 (T 세포), 세포사멸 및 L-셀렉틴 (L-selectin)의 박리 (shedding) (림프구)를 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한, P2X₇ 수용체는 항원제시세포 (antigen-presenting cell, APC), 각질세포, 타액선방세포 (이하선 세포), 간세포 및 혈관간세포 등에도 위치하는 것으로 보고되고 있으며, 중추신경계에서는 척수(Spinal cord) 신경세포에서 발현하고 있고, 마우스를 모델로 사용한 경우에는 인위적인 척수 손상 부위에서 이차적인 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Nature Medicine, 10(8): 821-7, 2004).
- [0017] 본 발명에서 상기 "P2Y₁₁"은 상이한 약학적 선택성을 가진 수용체 아형들을 포함하고 있는 G-단백질 연결 수용체 (G-protein coupled receptors)의 패밀리에 속한다. 상기 P2Y₁₁ 수용체는 포스포이노시타이드 (phosphoinositide) 및 아데닐릴 고리화효소(adenylyl cyclase) 경로에 연결되어 선택적인 퓨리노셉터 (purinoceptor)로 작용한다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "아고니스트 (agonist)"는 일반적으로 수용체(receptor)를 긍정적으로 자극하는 역할을 하는 화학물질을 뜻하는 것으로, 효능제라고도 불린다. 즉, 안타고니스트(antagonist), 길항제와는 반대로, 일반적인 리간드를 방해하거나 반대의 역할을 수행하는 대신, 아고니스트는 긍정적인 역할을 수행한다. 본 발명에서는 일반적으로 수용체와 결합하는 화학물질을 뜻하는 용어인 "리간드(ligand)"와 병행하여 사용될 수 있으며, 본 발명의 목적상 퓨린성 수용체, 바람직하게는 P2X₇ 아고니스트 또는 P2Y₁₁ 아고니스트일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 퓨린성 수용체의 아고니스트는 바람직하게는 P2X₇에 결합하여 이를 활성화시킬 수 있는 물질은 제한 없이 사용될 수 있으나, 예를 들면, 3'-O-(4-벤조일)벤조일 ATP(3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl ATP, BzATP) 및 인간 카테리시딘 LL-37(human cathelicidin LL-37) 중 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 상기 퓨린성 수용체의 아고니스트는 바람직하게는 P2Y₁₁에 결합하여 이를 활성화시킬 수 있는 물질은 제한 없이 사용될 수 있으나, 예를 들면, 하기 화학식 1로 표시되는 4,4'-(카보닐비스(이미노-3,1-페닐렌-카보닐이미노-3,1-(4-메틸-페닐렌)-카보닐이미노))-비스(1,3-자일렌-α, α'-디포스포산) 테트라소듐 염(4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene-α, α'-diphosphonic Acid) Tetrasodium Salt]; 하기 화학식 2로 표시되는 소듐 (((4,4'-(카보닐비스(아잔디일))비스(벤조일))비스(아잔디일))비스(3,1-페닐렌))비스(하이드로젠포스페이트)(sodium (((4,4'-(carbonylbis(azanediy))bis(benzoyl))bis(azanediy))bis(3,1-phenylene))bis(hydrogenphosphonate))); 아데노신 5'-O-(2-티오디포스페이트)(adenosine 5'-O-(2-thiodiphosphate)); 아데노신 5'-O-티오모노포스페이트(adenosine 5'-O-thiomonophosphate); 아데노신 3'-포스페이트 5'-포스포설파이트(adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate); 하기 화학식 3으로 표시되는 [[[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-2-프로필설파닐퓨린-9-일)-3,4-디하이드록시옥살란-2-일]메톡시-하이드록시포스포틸]옥시-하이드록시포스포틸]-디클로로메틸]포스포산([[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-2-propylsulfanylpurin-9-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methoxy-hydroxyphosphoryl]oxy-hydroxyphosphoryl)-dichloromethyl]phosphonic acid); 하기 화학식 4로 표시되는 헥사소듐 7,7'-[카보닐비스(아잔디일-4,1-카보닐아잔디일)]비스(나프탈렌-1,3,5-트리설파네이트)(Hexasodium 7,7'-[carbonylbis(azanediy-4,1-carbonylazanediy)]bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonate)); 하기 화학식 5로 표시되는 헥사소듐 7,7'-{카보닐비스[아잔디일-3,1-페닐렌카보닐아잔디일 (4,1-페닐렌)카보닐아잔디일]}비스(나프탈렌-1,3,5-트리설파네이트)(Hexasodium 7,7'-{carbonylbis[azanediy-3,1-phenylenecarbonylazanediy(4,1phenylene)carbonylazanediy]}bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonate)); 및 세

포외부 β -니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오타이드(extracellular β -Nicotinamide adenine dinucleotide; β -NAD⁺)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다:

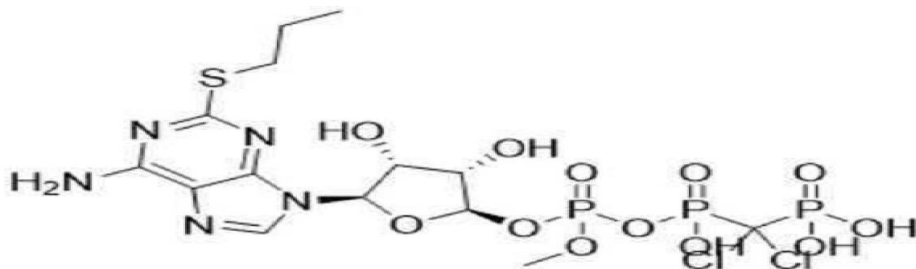
[화학식 1]



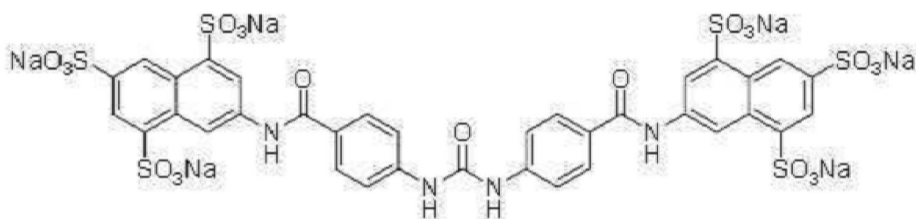
[화학식 2]



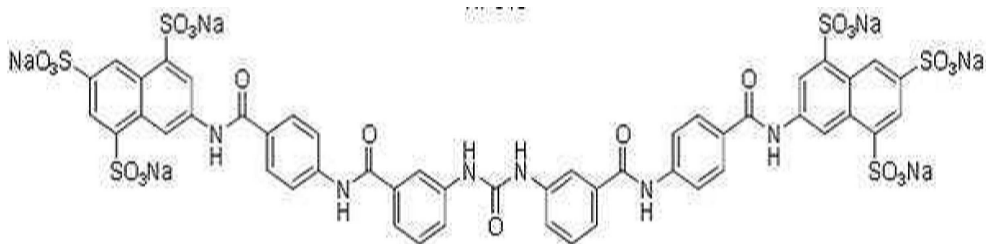
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



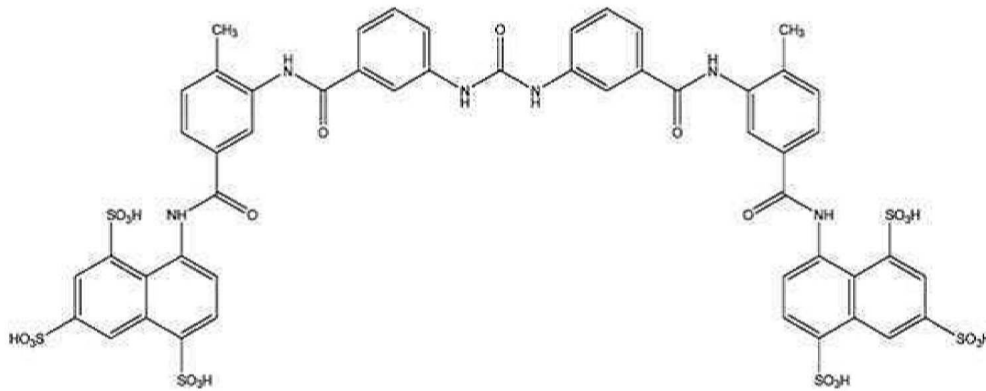
본 발명에서 상기 퓨린성 수용체의 아고니스트, 특히 P2X₇ 아고니스트 및 P2Y₁₁ 아고니스트는 멜라닌 합성량을 증가시켜 저색소 침착에 기인한 색소 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

- [0032] 본 발명에서 상기 저색소 침착에 기인한 색소 질환은 멜라닌 세포의 손실이 원인이 되거나, 멜라닌 생성 저해가 원인이 되어 멜라닌 생성이 정상 수준에 이르지 못하여 발생하는 모든 질환일 수 있는데, 예컨대 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증 후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증, 또는 점상 백피증 등일 수 있다.
- [0033] 단, 본 발명에서 상기 백색 비강진과 어루러기는 탈색소의 증상을 동반한다(Journal of the American Academy of Dermatology, Volume 19, Issue 2, Part 1, August 1988, Pages 217-255).
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 퓨린성 수용체의 길항제(antagonist)를 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서 상기 퓨린성 수용체는 $P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_7$, $P2Y_1$ 및 $P2Y_{11}$ 로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 바람직하게는 상기 퓨린성 수용체는 $P2X_7$ 또는 $P2Y_{11}$ 일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 " $P2X_7$ "은 리간드-통로 이온 채널로서 대식세포 (Macrophage), 비만세포 (Mast cell), 림프구 (Lymphocyte) 등 주로 염증 및/또는 면역반응에 관여하는 세포에 존재한다. 특히, ATP에 의한 $P2X_7$ 수용체의 활성화는 인터루킨- 1β (Interlukin- 1β)의 방출, 거대세포의 형성 (대식세포/미세아교세포), 탈과립 (비만세포), 증식 (T 세포), 세포사멸 및 L-셀렉틴 (L-selectin)의 박리 (shedding) (림프구)를 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 " $P2Y_{11}$ "은 상이한 약학적 선택성을 가진 수용체 아형들을 포함하고 있는 G-단백질 연결 수용체 (G-protein coupled receptors)의 패밀리에 속한다. 상기 $P2Y_{11}$ 수용체는 포스포이노시타이드 (phosphoinositide) 및 아데닐릴 고리화효소 (adenylyl cyclase) 경로에 연결되어 선택적인 퓨리노셉터 (purinoceptor)로 작용한다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "길항제"는 임의의 메커니즘에 의하여, 수용체 또는 세포 내 매개체와 같은 다른 분자의 영향을 부분적으로 또는 완전히 저해하는 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 퓨린성 수용체, 바람직하게는 $P2X_7$ 길항제 또는 $P2Y_{11}$ 길항제일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 퓨린성 수용체의 길항제는 바람직하게는 $P2X_7$ 에 결합하여 그 생물학적 활성을 직간접적으로 또는 실질적으로 방해, 감소 또는 저해할 수 있는 물질로, 예를 들면, A438079, 애씨드 블루 90 (Acid blue 90), 쿠마시 브릴리언트 블루 G (Coomassie® Brilliant Blue G, $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$), A740003, AZ-10606120, AZ-1645373, A-839977, A-847227, AZ-116453743, GSK314181A, AFC-5128, AZD-9056, CE-224535, AF-4025, EVT 401, 산화 ATP (oxidized ATP, oATP), 4-[(2S)-2-[(5-이소퀴놀리닐설폰일)-메틸아미노]-3-옥소-3-(4-페닐-1-피페라지닐)프로프-일]페닐 이소퀴놀린설폰산 에스터 (4-[(2S)-2-[(5-isoquinoliny)sulfonyl]-methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)prop-yl]phenyl isoquinolinesulfonic acid ester, KN-62), MRS 2159, MRS2306 및 MRS 2540로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에서 상기 퓨린성 수용체의 길항제는 퓨린성 수용체, 바람직하게는 $P2Y_{11}$ 에 결합하여 그 생물학적 활성을 직간접적으로, 또는 실질적으로 방해, 감소 또는 저해할 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용될 수 있으나, 예를 들면, 하기 화학식 6으로 표시되는 수라민 (Suramin); 하기 화학식 7로 표시되는 8,8'-[카보닐비스(이미노-

3,1-페닐렌카보닐이미노(4-플루오로-3,1-페닐렌)카보닐이미노]]비스-1,3,5-나프탈렌트리설포산 헥사소듐염 (8,8'-[Carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino(4-fluoro-3,1-phenylene)carbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt); 하기 화학식 8로 표시되는 4,4'-(카보닐비스(이미노-3,1-(4-메틸-페닐렌)카보닐이미노))비스(나프탈렌-2,6-디설포산) 테트라소듐염(4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-2,6-disulfonic acid) tetrasodium salt); 하기 화학식 9로 표시되는 소듐 3,3'-((3,3'-(카보닐비스(아잔디일))비스(4-메틸벤조일))비스(아잔디일))비스(나프탈렌-1,5-디설포네이트)(sodium 3,3'-((3,3'-(carbonylbis(azanediyl))bis(4-methylbenzoyl))bis(azanediyl))bis(naphthalene-1,5-disulfonate)); 하기 화학식 10으로 표시되는 소듐 7,7'-((3,3'-(카보닐비스(아잔디일))비스(4-메틸벤조일))비스(아잔디일))비스(나프탈렌-1,3,5-트리설포네이트)(sodium 7,7'-((3,3'-(carbonylbis(azanediyl))bis(4-methylbenzoyl))bis(azanediyl))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonate)); 및 하기 화학식 11로 표시되는 헥사소듐 7,7'-{카보닐비스[아잔디일(4-플루오로-3,1-페닐렌)카보닐아잔디일]}비스(나프탈렌-1,3,5-트리설포네이트)(Hexasodium 7,7'-{carbonylbis[azanediyl(4-fluoro-3,1-phenylene)carbonylazanediyl]}bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonate))로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 일 수 있다:

[0047]

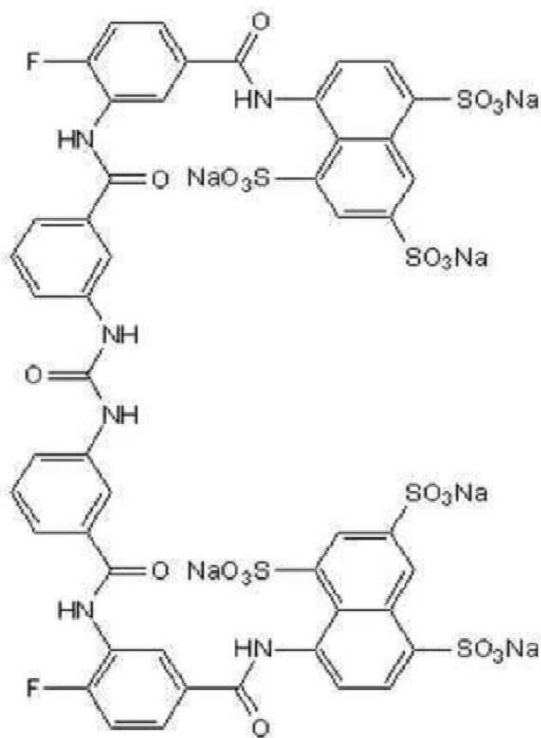
[화학식 6]



[0048]

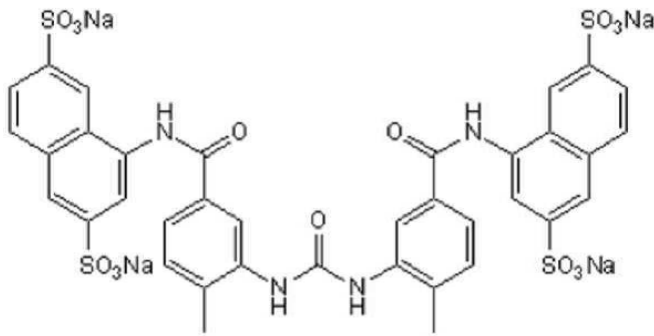
[0049]

[화학식 7]



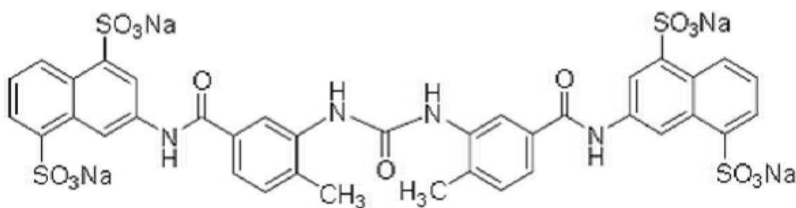
[0050]

[0051] [화학식 8]



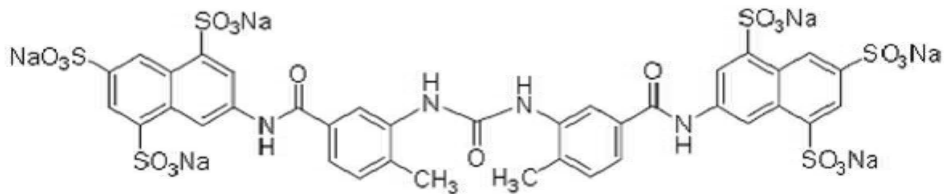
[0052]

[0053] [화학식 9]



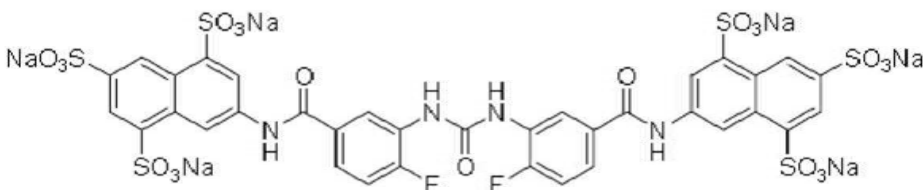
[0054]

[0055] [화학식 10]



[0056]

[0057] [화학식 11]



[0058]

[0059] 본 발명에서 상기 푸린성 수용체의 길항제, 특히 P2X₇ 길항제 및 P2Y₁₁ 길항제는 멜라닌 합성량을 감소시켜 과색소 침착에 기인한 색소 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 상기 피부 색소 질환은 과다색소침착에 기인한 질환으로, 피부 또는 손발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검거나 어둡게 되는 질환을 의미한다. 바람직하게는 상기 피부 색소 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 또는 일광흑색증(solar lentigines) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 한편, 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 침착 또는 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 증상을 차단하거나, 그 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 침착 또는 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명에서, "개선"은 본 발명의 화장료 조성물 또는 식품 조성물을 이용하여 저색소 침착 또는 과색소

침착에 기인한 색소 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

- [0066] 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.
- [0067] 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.
- [0068] 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, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0069] 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 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0070] 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.
- [0071] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 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.
- [0073] 본 발명에서 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샴푸, 샴푸크림, 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(핸드클리너), 약용비누{비의료용}, 크림비누, 페이스 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.
- [0074] 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, 항산화제, 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.
- [0075] 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수

있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.

[0076] 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 핵사데칸올이 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.

[0077] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 향산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.

[0079] 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.

[0080] 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.

[0081] 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, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.

[0082] 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.

[0083] 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

[0084] 본 발명에서 제공하는 퓨린성 수용체의 아고니스트는 인체에 독성을 일으키지 않으면서도 멜라닌 생성을 효과적으로 촉진시켜 저색소 침착에 기인한 다양한 질환을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명에서 제공하는 퓨린성 수용체의 길항제는 인체에 독성을 일으키지 않으면서도 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하여 피부 미백 효과가 뛰어나며 과다색소침착에 기인한 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 또는 일광흑색증(solar lentigines) 등의 색소 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0086] 도 1은 실시예 1에서 각질세포에 대하여 ATP 처리 후 세포 생존율의 변화를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 2에서 케라틴 세포에 자외선 조사 후 세포 외 ATP 방출량의 변화를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 2에서 케라틴 세포에 자외선 조사 후 케라틴 세포의 생존율의 변화를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 3에서 멜라닌 세포에 자외선 조사 후 ATP 방출량을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 3에서 멜라닌 세포에 자외선 조사 후 멜라닌 세포의 생존율의 변화를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 실시예 4에서 멜라닌 세포에 ATP 처리한 후 멜라닌 합성에 관여하는 MITF 및 티로시나아제의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 4에서 멜라닌 세포에 ATP 처리한 후 멜라닌 합성에 관여하는 MITF 및 티로시나아제의 발현 수준의 변화를 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 5에서 멜라닌 세포에 ATP 처리한 후 티로시나아제의 활성의 변화를 자이모그래피로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 5에서 멜라닌 세포에 ATP 처리한 후 티로시나아제의 활성의 변화를 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 6에서 멜라닌 세포에 ATP 처리한 후 멜라닌 합성량의 변화를 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 실시예 7에서 멜라닌 세포에서 퓨린성 수용체로 P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇, P2Y₁ 및 P2Y₁₁의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 실시예 8에서 멜라닌 세포에서 퓨린성 수용체로 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 및 P2Y₁₁의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 실시예 9에서 멜라닌 세포에 대하여 멜란-A(녹색) 및 P2Y₁₁ 수용체(적색)에 특이적인 항체를 이용하여 면역 세포 화학 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 실시예 10에서 정상 피부 조직에 대하여 멜란-A(녹색) 및 P2Y₁₁ 수용체(적색)에 특이적인 항체를 이용하여 면역 세포 화학 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 실시예 11에서 멜라닌 세포에 ATP를 처리한 후 P2Y₁₁ 수용체의 mRNA 발현 수준의 변화를 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 실시예 11에서 멜라닌 세포에 ATP를 처리한 후 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 17의 (a) 및 (b)는 실시예 13에서 멜라닌 세포에 ATP 또는 ATP와 P2X₇ 수용체의 길항제인 A438079를 처리한 후 상기 세포 내 칼슘 농도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 18의 (a) 및 (b)는 실시예 14에서 멜라닌 세포에 ATP 또는 ATP와 P2X₇ 수용체의 아고니스트인 BzATP를 처리한 후 상기 세포 내 칼슘 농도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 실시예 15에서 멜라닌 세포에 ATP 또는 ATP와 P2X₇ 수용체의 길항제인 A438079를 처리한 후 멜라닌 합성량의 변화를 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 20은 실시예 16에서 멜라닌 세포에 ATP 또는 ATP와 P2X₇ 수용체의 길항제인 A438079를 처리한 후 MITF 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 실시예 16에서 멜라닌 세포에 ATP 또는 ATP와 P2X₇ 수용체의 길항제인 A438079를 처리한 후 MITF 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087] 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.

[0089] 실시예

[0091] [실시예 1] ATP의 멜라닌 세포 독성 평가

[0092] 인간 표피 각질형성세포(primary human epidermal melanocyte)를 96-웰 플레이트에 1.0×10^4 세포로 분주하고 배양한 뒤 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate, ATP)를 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM 및 3 mM의 농도로 처리한 뒤 1 내지 3일간 배양하며 MTT 시약을 이용하여 세포 생존율의 변화를 측정하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0093] 도 1에서 보는 바와 같이, 인간 표피 각질세포에 ATP를 처리한 결과, 0.1 mM 및 0.5 mM의 농도에서는 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] [실시예 2] 인간 표피 각질형성세포에 자외선 조사 영향의 평가

[0096] 인간 표피 각질형성세포(primary human epidermal keratinocyte) 1.0×10^5 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 분주하고 배양한 뒤 자외선을 10 mJ/cm^2 , 50 mJ/cm^2 , 100 mJ/cm^2 및 200 mJ/cm^2 의 세기로 조사하고 2시간 후 세포 밖으로 방출되는 ATP의 양을 측정하여 그 결과를 하기 표 1 및 도 2에 그래프로 나타내었고, MTT 시약을 이용하여 상기 인간 표피 각질형성세포의 생존율의 변화를 측정하여 그 결과를 하기 표 2 및 도 3에 나타내었다.

표 1

자외선 조사 (mJ/cm^2)	ATP 방출량(nM)
무처리	109
UV 10	97.23333
UV 50	106.7667
UV 100	174.6667
UV 200	140.6667

표 2

자외선 조사 (mJ/cm^2)	세포 생존율(%)
무처리	100
UV 10	92.70098
UV 50	89.52074
UV 100	80.18573
UV 200	73.98641

[0100] 표 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, 케라틴 세포에 자외선을 10 mJ/cm^2 또는 50 mJ/cm^2 의 세기로 자외선을 조사하자 ATP 방출량이 약간 감소하는 추세로 보였지만, 자외선의 세기가 증가할수록 세포 외부로 방출되는 ATP의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 또한, 표 2 및 도 3에서 보는 바와 같이 인간 표피 각질형성세포에 조사하는 자외선의 세기가 증가할수록 세포의 생존율이 저하되는 것을 확인할 수 있었다.

[0103] [실시예 3] 멜라닌 세포에 자외선 조사 영향의 평가

[0104] 인간 멜라닌 세포(primary human epidermal melanocyte) 1.0×10^5 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 분주하고 배양한 뒤 자외선을 10 mJ/cm^2 , 50 mJ/cm^2 , 100 mJ/cm^2 및 200 mJ/cm^2 의 세기로 조사하고 2시간 후 세포 밖으로 방출되는 ATP의 양을 측정하여 그 결과를 하기 표 3 및 도 4에 그래프로 나타내었고, MTT 시약을 이용하여 상기 멜라닌 세포의 생존율의 변화를 측정하여 그 결과를 하기 표 4 및 도 5에 나타내었다.

표 3

자외선 조사 (mJ/cm ²)	ATP 방출량(nM)
무처리	8.05
UV 10	6.183333333
UV 50	5.966666667
UV 100	6.133333333
UV 200	18.53333333

표 4

자외선 조사 (mJ/cm ²)	세포 생존율(%)
무처리	100
UV 10	95.55739
UV 50	98.3047
UV 100	93.49942
UV 200	88.00362

[0106]

[0107]

[0108]

[0109]

[0111]

[0112]

[0113]

[0114]

[0115]

표 3 및 도 4에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에 자외선을 조사하자 자외선 세기가 약한 경우 ATP 방출량이 약간 감소하는 추세로 보였지만, 자외선의 세기가 증가할수록 세포 외부로 방출되는 ATP의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 표 4 및 도 5에서 보는 바와 같이 멜라닌 세포에 조사하는 자외선의 세기가 증가할수록 세포의 생존율이 저하되는 것을 확인할 수 있었다.

[실시예 4] ATP 처리에 따른 멜라닌 합성에 미치는 영향의 평가(1)

멜라닌 세포에 ATP 처리 시 멜라닌 합성에 관여하는 단백질의 발현 수준의 변화를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯(Western blot) 수행하였다.

멜라닌 세포(primary melanocyte) 1.0 X 10⁵ 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 분주하고 ATP를 100 μM의 농도로 처리한 뒤 72시간 배양한 후 웨스턴 블롯을 이용하여 멜라닌 합성에 관여하는 단백질인 MITF(Microphthalmia-associated transcription factor) 및 티로시나아제(Tyrosinase)의 발현 수준의 변화를 분석하였다.

웨스턴 블롯에 사용된 단백질의 준비 방법은 하기와 같다. 상기 멜라닌 세포에 아큐타아제(Accutase; Sigma-Aldrich)를 처리하여 수득(harvest)하고, PBS로 세척 후 단백질 분해 억제제가 포함되어 있는 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)를 이용하여 용해시켰다. 상기 용해된 용액을 원심분리기를 이용하여 전체 용액을 분획한 뒤, 단백질이 포함된 용액만을 추출하였다. 상기 추출된 단백질은 BCA (Bicinchoninic acid) 방법에 의해 정량화하였다. 정량화를 통해 20μg 농도의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 겔 전기영동을 수행하여 분리한 뒤, 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 막에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막은 비 특이적 결합을 줄이기 위하여 5% 탈지유(non-fat milk)가 포함된 TBS-T(Tris-buffered saline/0.05% Tween-20)용액으로 상온에서 1시간 동안 차단(blocking)한 후, 1차 항체를 4℃ 조건에서 하룻밤(overnight) 동안 반응시킨 뒤, 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 시각화를 위해서는 화학 발광 시스템(Enhanced chemiluminescence system)을 이용하였다. 시각화된 이미지는 이미지 프로그램을 이용하여 단백질 밴드 강도(protein band intensity)를 정량분석하여 단백질 발현 정도를 정량적으로 분석하였고, 그 결과를 도 6 및 7에 나타내었다.

도 6 및 7에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에 ATP를 처리하자 멜라닌 합성에 중요한 MITF와 티로시나아제의 발현 수준이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0117] [실시예 5] ATP 처리에 따른 멜라닌 합성에 미치는 영향의 평가(2)

[0118] 멜라닌 세포에 ATP 처리 시 티로시나아제 활성의 변화를 확인하기 위하여 자이모그래피(zymography) 분석을 수행하였다.

[0119] 구체적으로는, 멜라닌 세포(primary melanocyte) 1.0×10^5 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 배양하고 ATP 100 mM을 처리하였다. 72시간 배양 후 BCA 방법에 따라 단백질을 정량하였다. 동일량의 용해물(lysate)과 β -머캅토에탄올(β -mercaptoethanol)이 들어있지 않은 단백질 시료 버퍼(protein sample buffer)를 섞어준 후 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel)에 전기영동하여 겔에 함유된 티로시나아제의 활성을 측정하기 위해 겔을 0.1 M 소듐 포스페이트 버퍼(sodium phosphate buffer)(pH 6.8)에 가볍게 행구어 준 다음 30분 후에 새로운 버퍼로 다시 행구어 주었다. 겔을 5 mM L-DOPA가 함유된 0.1 M 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.8)에 넣어 37℃에서 3시간 동안 반응 하였다. 티로시나아제 활성은 어둡게 나타나는 밴드로 확인하였다. 상기 전기영동 분리 후 사진을 도 8에 나타내었고, 티로시나아제 활성의 변화를 분석한 결과는 하기 표 5에 나타내었으며, 그 평균 값을 그래프로 도 9에 나타내었다.

표 5

[0121]

구분	티로시나아제 활성도(대조군 대비%)				
	1회차	2회차	3회차	평균	표준편차
무처리	100	100	100	100	0
ATP 처리	119.0131	116.602	117.3041	117.6397	1.240071

[0122] 상기 표 5와, 도 8 및 9에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에 ATP를 처리하자 티로시나아제 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0124] [실시예 6] ATP 처리에 따른 멜라닌 합성량의 변화

[0125] 멜라닌 세포에 ATP 처리 시 멜라닌 합성량의 변화를 확인하기 위하여, 멜라닌 세포(primary melanocyte) 1.0×10^5 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 분주하고 ATP를 100 μ M의 농도로 처리한 뒤 5일 동안 배양한 후 수득한 세포를 세포 용해 버퍼를 이용하여 용해시킨 뒤, 세포 펠렛(pellet)에 1N 염화나트륨(NaOH)을 넣고 60℃에서 2시간 동안 용해한 뒤, 405nm의 흡광도에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. 정량을 위하여, 구입한 멜라닌(Melanin)(sigma)을 이용하여 표준 곡선을 그린 뒤, 이를 이용하여 멜라닌을 정량화 하였다. 정량화된 멜라닌 생성 정도는 ATP 처리하지 않은 군(control)의 발현 정도를 기준으로 백분율로 계산하여, 그 결과를 하기 표 6과 도 10에 나타내었다.

표 6

[0127]

구분	멜라닌 함량(대조군 대비%)					
	1회차	2회차	3회차	4회차	평균	표준 편차
무처리	100	100	100	100	100	0
ATP 처리	119.2967317	113.668	121.3341	118.0996	118.0996	3.97078

[0128] 상기 표 6과 및 도 10에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에 ATP를 처리하자 멜라닌 생성량이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 ATP가 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성을 촉진하는 것을 알 수 있었다.

[0130] [실시예 7] 멜라닌 세포에서 퓨린성 수용체의 발현 수준의 평가

[0131] 멜라닌 세포(primary melanocyte)에서 퓨린성 수용체의 발현 수준을 평가하기 위하여, 상기 멜라닌 세포를 6-웰 배양용 평판에 24시간 배양 후, 퓨린성 수용체로 P2X 및 P2Y 아형에 대한 각각의 특이적인 프라이머(하기 표 7

참조)를 이용하여 RT-PCR로 상기 수용체의 mRNA 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

표 7

수용체		프라이머 서열
P2X	P2X ₁	정방향: 5'- CAA CGA CAC TGT GAA GAC GTG - 3'
		역방향: 5'- CGT GGA AAG CTG ATG CTG TTC - 3'
	P2X ₂	정방향: 5'- CTG CCT CGT CAG GCT ACA AC - 3'
		역방향: 5'- GTG GGA ATC AGG CTG AAC TTC - 3'
	P2X ₃	정방향: 5'- ACG CCA ACA GAG TCA TGG ATG - 3'
		역방향: 5'- CGC ACT GGC TGT CTG ATA CA - 3'
	P2X ₄	정방향: 5'- CTA CCA GGA AAC TGA CTC CGT - 3'
		역방향: 5'- GGT ATC ACA TAA TCC GCC ACA T - 3'
	P2X ₅	정방향: 5'- TAC CTG GTC GTA TGG GTG TTC - 3'
		역방향: 5'- GCC CAA GAT CCG AGG TGT TG - 3'
	P2X ₆	정방향: 5'- GAA CCC CAG TTT TCC ATC ATCA - 3'
		역방향: 5'- GGC GTC ACA AGG AAG TTG GT - 3'
	P2X ₇	정방향: 5'- TAT GAG ACG AAC AAA GTC ACT CG - 3'
		역방향: 5'-GCA AAG CAA ACG TAG GAA AAG AT -3'
P2Y	P2Y ₁	정방향: 5'- AAT GCG ATC TGT ATC AGC GTG - 3'
		역방향: 5'- TGG TGT CGT AAC AGG TGA TGG - 3'
	P2Y ₁₁	정방향: 5'- AGC TCC TAT GTG CCC TAC CA - 3'
		역방향: 5'- GCG GCC ATG TAG AGT AGA GG - 3'

도 11에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에서 P2X₂, P2X₄, P2X₇과, P2Y₁, P2Y₁₁가 높은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[실시예 8] 멜라틴 세포에서 P2Y 수용체의 발현 수준의 평가

멜라닌 세포(primary melanocyte)에서 퓨린성 수용체 중에서도 특히 P2Y 수용체의 발현 수준을 평가하기 위하여, 상기 멜라닌 세포를 6-웰 배양용 평판에서 24시간 배양 후, 하기 표 8에 나타낸 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ 각각에 특이적인 프라이머를 이용하여 하기 표 9에 나타낸 조건으로 RT-PCR을 수행해 상기 수용체의 mRNA 발현 수준을 분석하였다. 단, DNA 마커로는 BIOFACT 100bp Plus (SM342-500)를 사용하였다. RT-PCR 수행 결과는 도 12에 나타내었다.

표 8

수용체		프라이머 서열
P2Y	P2Y ₁	정방향: 5'- AAT GCG ATC TGT ATC AGC GTG - 3'
		역방향: 5'- TGG TGT CGT AAC AGG TGA TGG - 3'
	P2Y ₂	정방향: 5'- GGT GTC TGG GCG TCT TAC G - 3'
		역방향: 5'- TGG TGG TGA CAA AGT AGA GCA - 3'
	P2Y ₄	정방향: 5'- GAC ACC ACT CGG CCT GAA G - 3'
		역방향: 5'- AGC CAT GAG TCC ATA GCA AAC - 3'
	P2Y ₆	정방향: 5'- GTG TCT ACC GCG AGA ACT TCA - 3'
		역방향: 5'- CCA GAG CAA GGT TTA GGG TGT A - 3'
	P2Y ₁₁	정방향: 5'- AGC TCC TAT GTG CCC TAC CA - 3'
		역방향: 5'- GCG GCC ATG TAG AGT AGA GG - 3'

표 9

초기 변성 단계 (Initial denaturation)	94℃, 4분	-
변성 단계 (Denaturation)	94℃, 30분	35 사이클 반복
결합 단계 (Annealing)	55℃, 30초	
연장 단계(Extension)	72℃, 1분	
최종 연장 단계 (Final extension)	72℃, 5분	-

[0140]

[0141]

도 12에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에서 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆ 및 P2Y₁₁이 발현되었으나, 그 중에서도 특히 P2Y₁₁가 높은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0143]

[실시예 9] 멜라닌 세포에서 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준의 평가

[0144]

멜라닌 세포(primary melanocyte) 1.0 X 10⁴ 세포를 8-웰 슬라이드 글라스(glass slide)에 분주한 뒤 멜란-A(melan-A) 및 P2Y₁₁ 수용체에 특이적인 1차 항체(1:50 용해)와 함께 밤새 배양한 뒤 2차 항체로 멜란-A의 경우 Alexa Fluoro 488(녹색), P2Y₁₁ 수용체의 경우 DyLight 594(적색)을 이용하여 밤새 배양한 뒤 형광 현미경으로 관찰 및 촬영한 결과를 도 13에 나타내었다.

[0145]

도 13에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포의 마커인 멜란-A가 양성(녹색)인 멜라닌 세포에서 P2Y₁₁가 높은 수준으로 발현(적색)되는 것을 확인할 수 있었다.

[0146]

[0147]

[실시예 10] 피부 조직에서 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준의 평가

[0148]

정상 피부 조직에 대하여 상기 실시예 9와 동일한 과정을 통하여 실험을 수행하였고, 그 결과는 도 14에 나타내었다.

[0149]

도 14에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포의 마커인 멜란-A가 양성(녹색)을 보이는 멜라닌 세포에서 P2Y₁₁가 높은 수준으로 발현(적색)되는 것을 확인할 수 있었다.

[0151]

[실시예 11] ATP 처리에 따른 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준의 평가

[0152]

멜라닌 세포에 ATP 처리 시 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준을 평가하기 위하여 Q-RT PCR과 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0153]

구체적으로, 멜라닌 세포(primary melanocyte) 1.0 X 10⁵ 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 분주하고 배양한 후, ATP를 100 μM, 500 μM, 1,000 μM의 농도로 처리한 뒤 6시간 후 상기 P2Y₁₁ 각각에 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행해 상기 수용체의 mRNA 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 15에 나타내었고, ATP 처리 후 24시간 후 웨스턴 블롯을 이용하여 상기 P2Y₁₁ 수용체의 단백질 발현 수준의 변화를 분석하여 그 결과를 도 16였다.

[0154]

도 15 및 16에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에 ATP를 처리한 경우 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0156]

[실시예 12] P2Y₁₁ 수용체의 아고니스트 처리에 따른 멜라닌 합성량의 변화

- [0157] 멜라닌 세포에 P2Y₁₁ 수용체의 아고니스트 처리 시 멜라닌 합성량의 변화를 확인하기 위하여, 멜라닌 세포(primary melanocyte) 1.0 X 10⁵ 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 분주하고 P2Y₁₁ 수용체의 대표적 아고니스트인 NF546을 10 μM의 농도로 처리한 뒤 5일 동안 배양한 후 수득한 세포를 세포 용해 버퍼를 이용하여 용해시킨 뒤, 세포 펠렛(pellet)에 1N 염화나트륨(NaOH)을 넣고 60℃에서 2시간 동안 용해한 뒤, 405nm의 흡광도에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 멜라닌 세포에 P2Y₁₁ 수용체의 아고니스트를 처리하자 멜라닌 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0158] 상기 실험을 통하여 자외선이 조사되는 경우 인간 피부 각질 세포와 멜라닌 세포에서 ATP 발현 수준 및 방출량이 증가하고, 상기 ATP를 멜라닌 세포에 처리하는 경우 P2Y₁₁ 수용체의 발현 수준이 증가하며 멜라닌 합성 또한 증가하는 바, P2Y₁₁ 수용체의 아고니스트를 처리하는 경우 멜라닌 합성량이 증가하여 저색소증의 질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 알 수 있었다. 이를 통하여 반대로 P2Y₁₁ 수용체의 길항제를 처리하는 경우 멜라닌 합성이 저해되어 과색소침착에 기인한 질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 용이하게 예측할 수 있었다.
- [0160] [실시예 13] P2X₇ 수용체의 길항제 처리에 따른 멜라닌 세포 내 칼슘 함량의 변화
- [0161] 1차 인간 표피 멜라닌 세포(primary human epidermal melanocytes, PHEMs)에 ATP 100 μM를 처리하거나; A438079 50 μM과 ATP 100 μM을 병용 처리한 뒤 fura-2AM을 처리하여 37℃에서 40분간 반응시켰다. 이후, 30분간 세척(rinse)한 뒤 상온에서 집약적(intensified) sCMOS-도립 현미경을 이용하여 세포 내 칼슘 농도를 확인하여 그 결과를 도 17의 (a) 및 (b)에 나타내었다.
- [0162] 도 17의 (a) 및 (b)에서 보는 바와 같이 사람의 멜라닌 세포에 ATP를 처리하자 Ca²⁺의 증가가 보이고 P2X₇ 수용체의 길항제를 처리하면 Ca²⁺의 증가가 사라지는 것을 볼 수 있다.
- [0164] [실시예 14] P2X₇ 수용체의 아고니스트 처리에 따른 멜라닌 세포 내 칼슘 함량의 변화
- [0165] 1차 인간 표피 멜라닌 세포(primary human epidermal melanocytes, PHEMs)에 ATP 100 μM를 처리하거나; BzATP 100 μM과 ATP 100 μM을 병용 처리한 뒤 fura-2AM을 처리하여 37℃에서 40분간 반응시켰다. 이후, 30분간 세척(rinse)한 뒤 상온에서 집약적(intensified) sCMOS-도립 현미경을 이용하여 세포 내 칼슘 농도를 확인하여 그 결과를 도 18의 (a) 및 (b)에 나타내었다.
- [0166] 도 18의 (a) 및 (b)에서 보는 바와 같이 사람의 멜라닌 세포에 P2X₇ 수용체의 아고니스트를 처리하자 Ca²⁺의 증가가 관찰되었다.
- [0168] [실시예 15] P2X₇ 수용체의 길항제 처리에 따른 멜라닌 합성량의 변화
- [0169] 1차 인간 표피 멜라닌 세포(primary human epidermal melanocytes, PHEMs)에 ATP 100 μM를 5일간 처리하거나; 또는 A438079 50 μM을 30분간 전처리한 뒤 ATP 100 μM을 5일간 처리하였다. 이후, 세포 펠렛(pellet)에 1N 염화나트륨(NaOH)을 넣고 60℃에서 2시간 동안 용해한 뒤, 405nm의 흡광도에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. 정량을 위하여, 구입한 멜라닌(Melanin)(sigma)을 이용하여 표준 곡선을 그린 뒤, 이를 이용하여 멜라닌을 정량화하였다. 정량화된 멜라닌 생성 정도는 ATP 처리하지 않은 군(control)의 발현 정도를 기준으로 백분율로 계산하여, 그 결과를 하기 도 19에 나타내었다.
- [0170] 도 19에서 보는 바와 같이 멜라닌 세포에 ATP를 처리하자 멜라닌 함량이 증가하였지만, P2X₇ 수용체의 길항제를 함께 처리하자 이러한 증가가 사라지고 오히려 정상 대조군 보다도 멜라닌 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0172] [실시예 15] P2X₇ 수용체의 길항제 처리에 따른 MITF 발현량의 변화

[0173] 1차 인간 표피 멜라닌 세포(primary human epidermal melanocytes, PHEMs)에 ATP 100 μ M를 5일간 처리하거나; 또는 A438079 50 μ M을 30분간 전처리한 뒤 ATP 100 μ M을 5일간 처리였다. 이후, 세포 펠렛(pellet)에 용혈 버퍼를 첨가한 후 4℃에서 30분간 반응하여 원심 분리(4℃, 10분)하였다. 상층액(supernatant)만 새로운 e.p 튜브(tube)로 옮긴 후 BCA 어세이(assay)를 이용하여 단백질 정량을 수행하였다. 10% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에 전기영동하여 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 이동시켰다. 항-MITF와 막(membrane)을 4℃에서 밤새 반응시키고, ECL 키트를 이용하여 밴드(band)를 확인하였다. 그 결과는 도 20 및 21에 나타내었다.

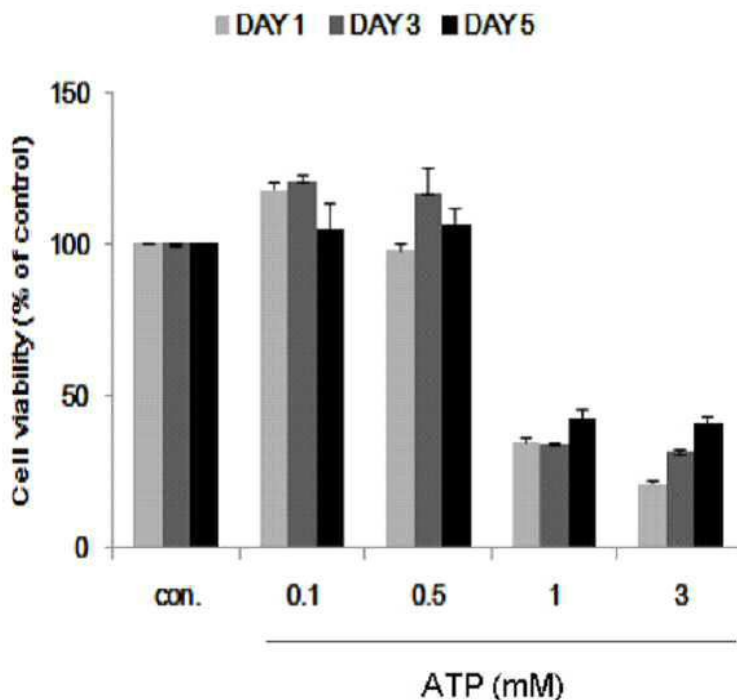
[0174] 도 20 및 21에서 보는 바와 같이, 멜라닌 세포에 ATP를 처리하자 MITF의 발현 수준이 증가하였지만, P2X₇ 수용체의 길항제를 함께 처리하자 이러한 증가가 사라지는 것을 확인할 수 있었다.

[0175] 이를 통하여 ATP는 멜라닌 형성(melanogenesis)을 증가시키는 데, 본 발명에 따른 P2X₇ 수용체의 길항제는 ATP에 의한 MITF 발현 증가를 차단하는 것으로 과색소 침착에 기인한 색소 질환의 치료제로서 효과가 있음을 알 수 있다.

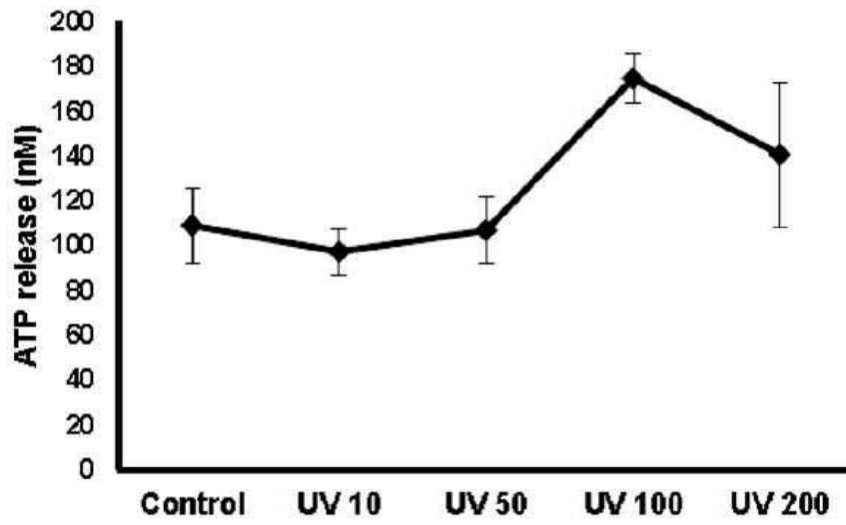
[0177] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

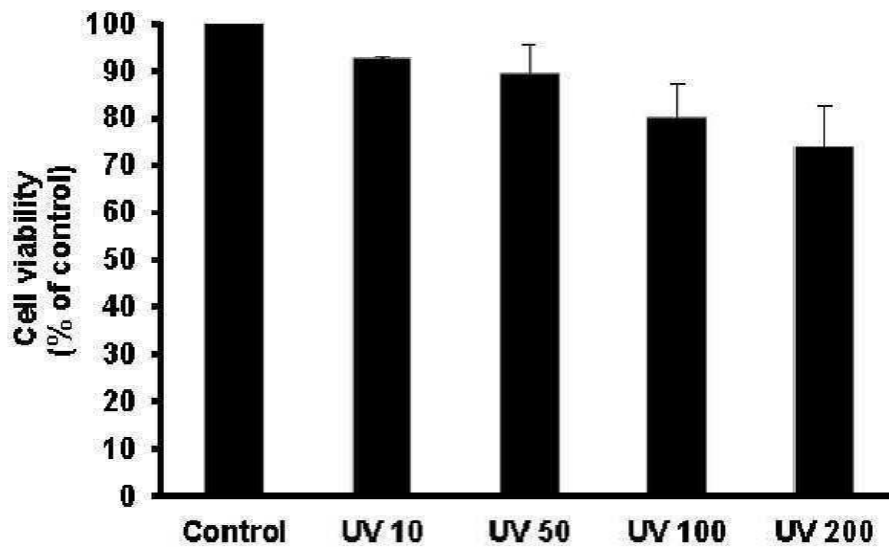
도면1



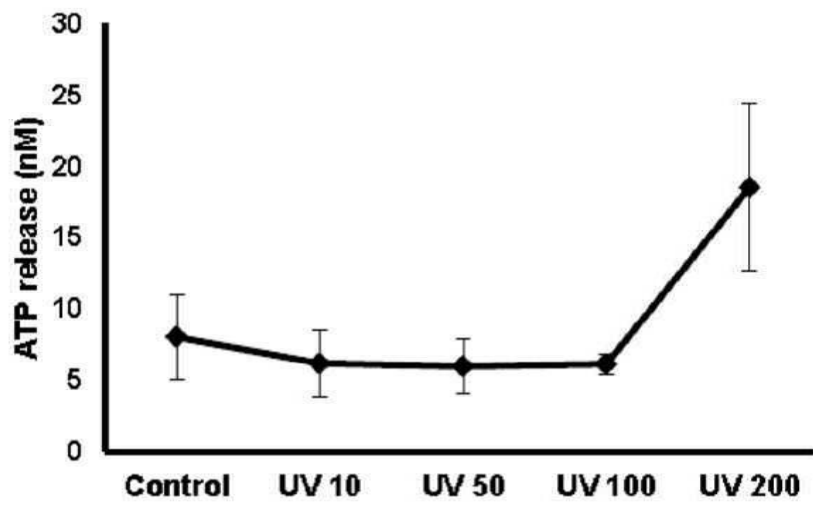
도면2



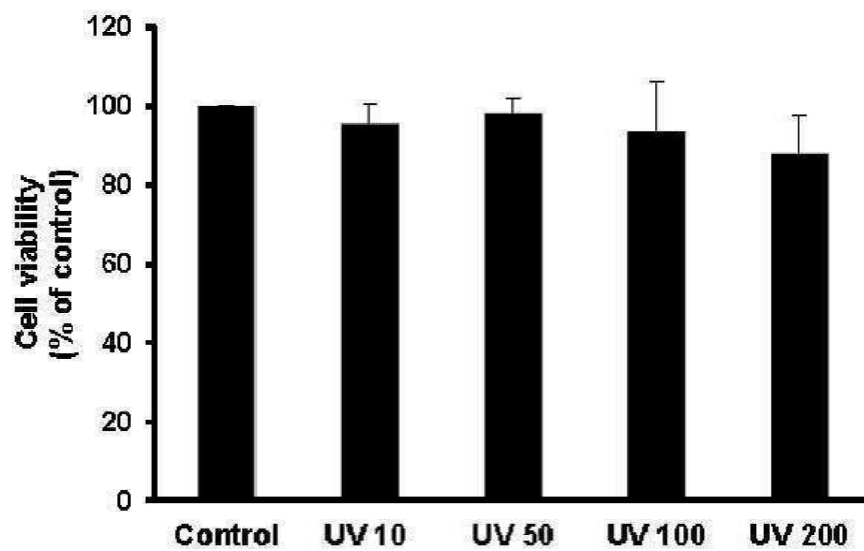
도면3



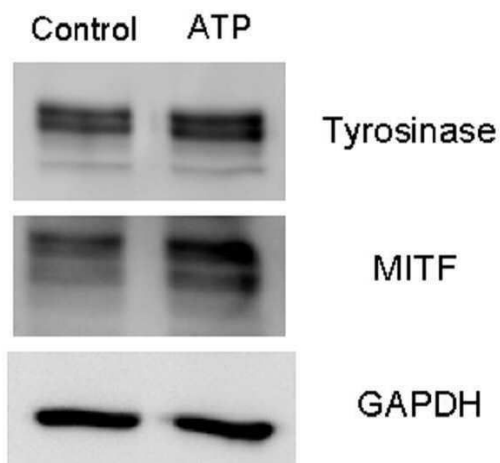
도면4



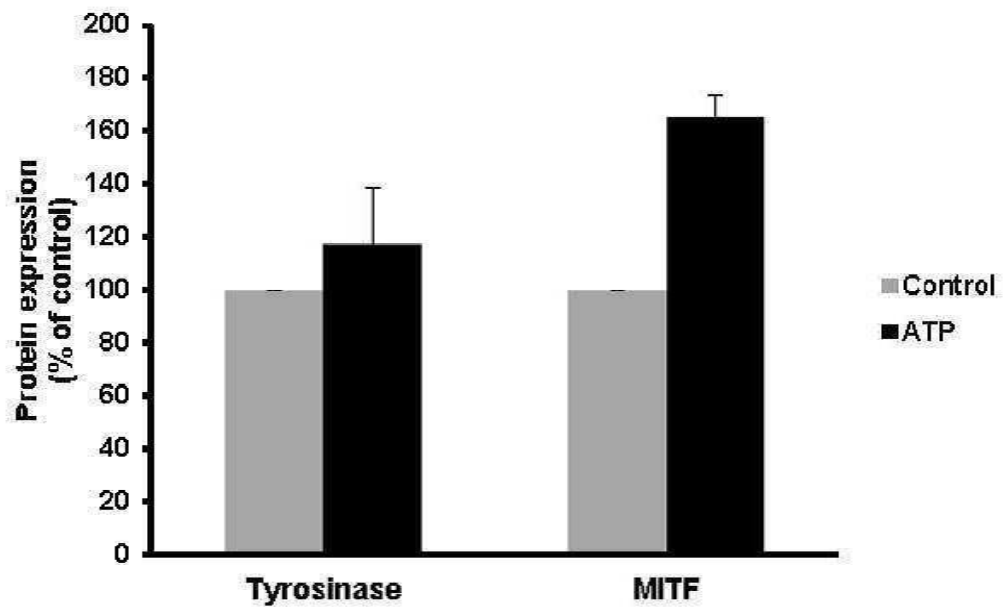
도면5



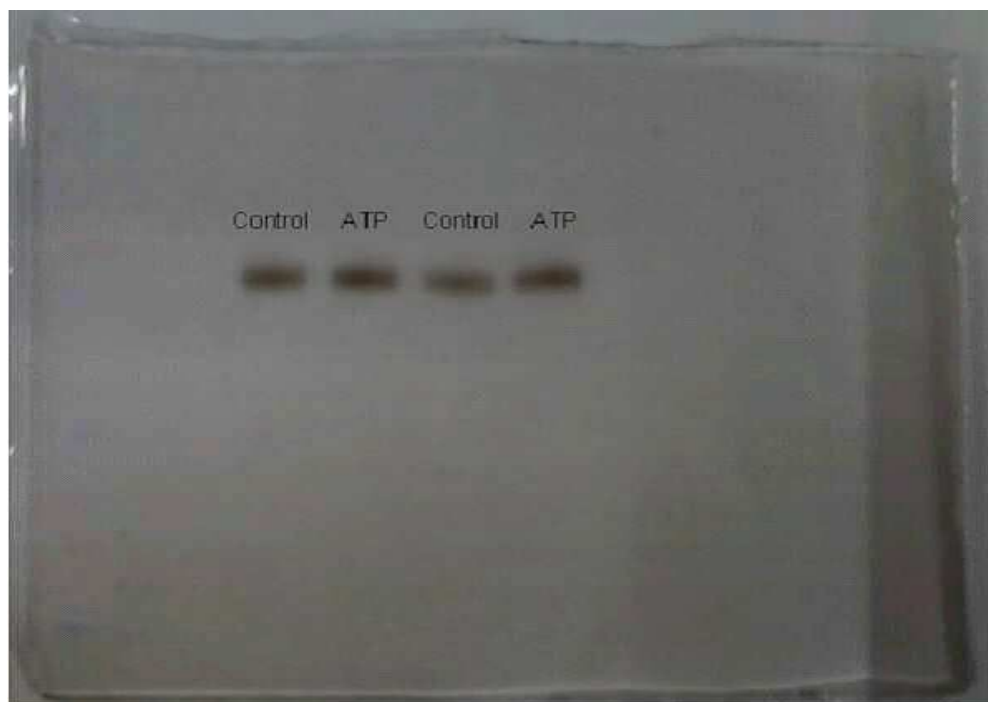
도면6



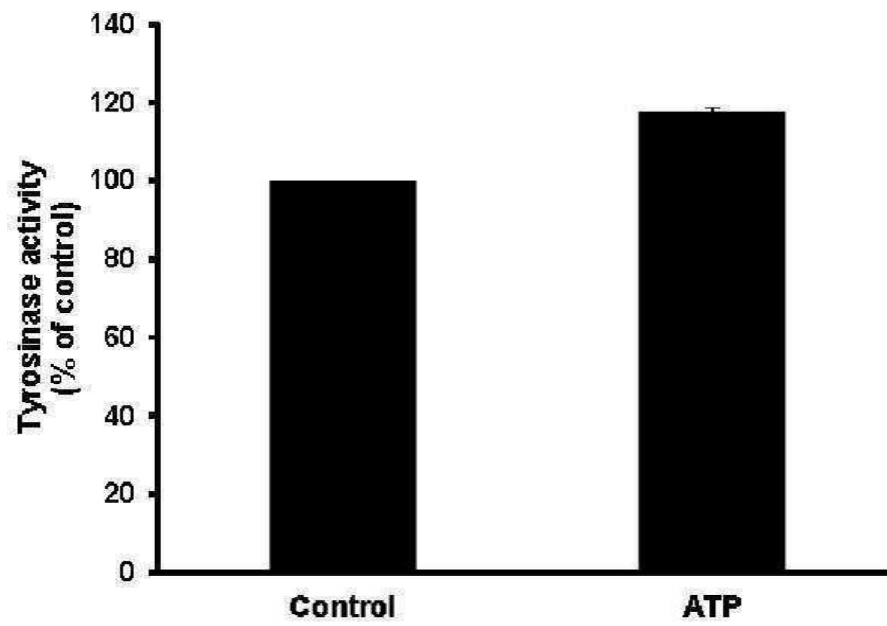
도면7



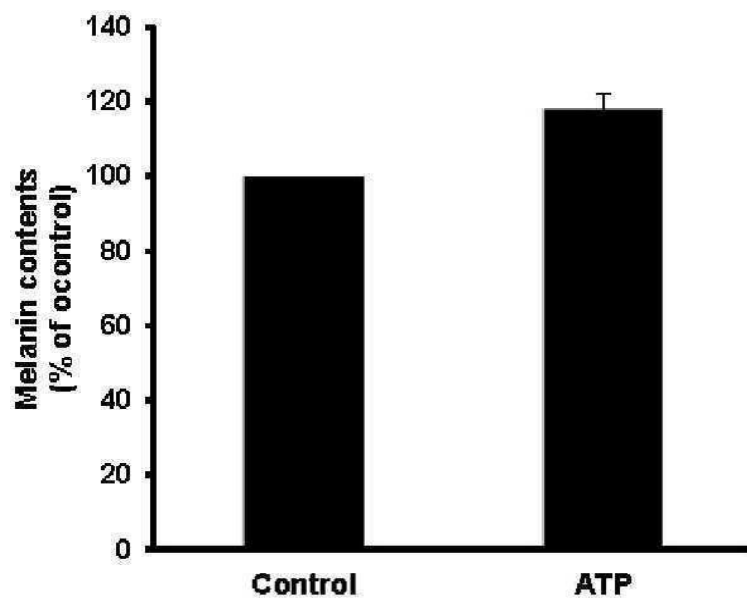
도면8



도면9



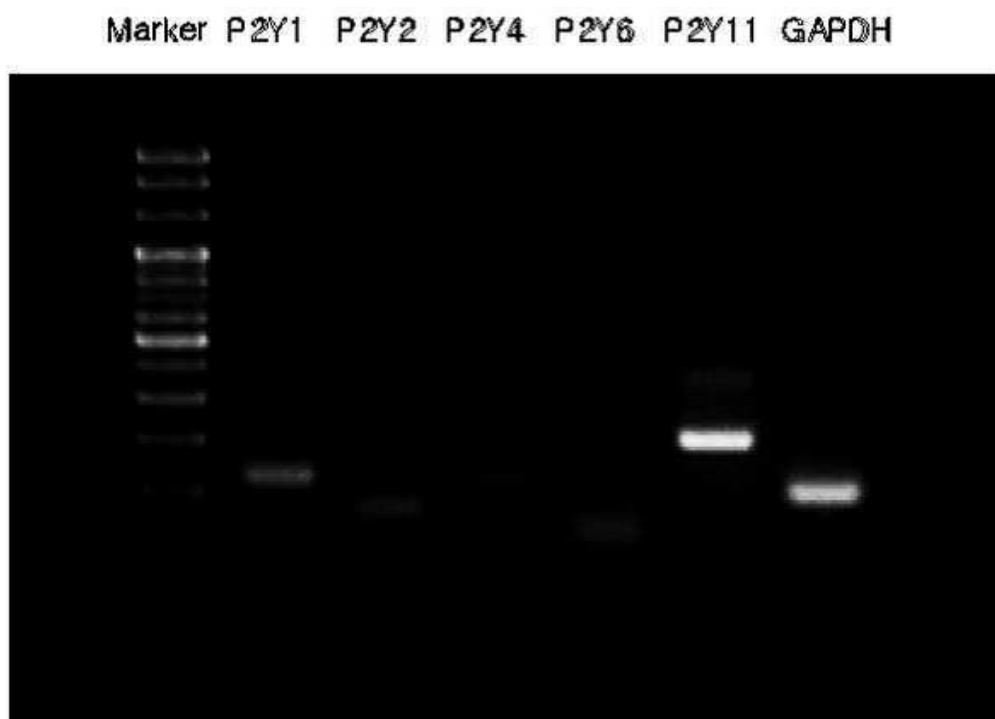
도면10



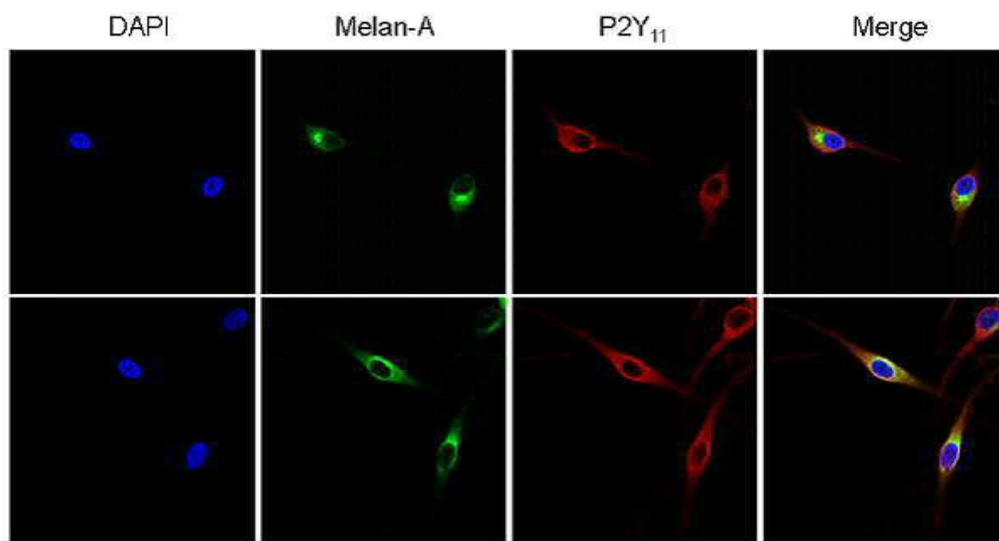
도면11



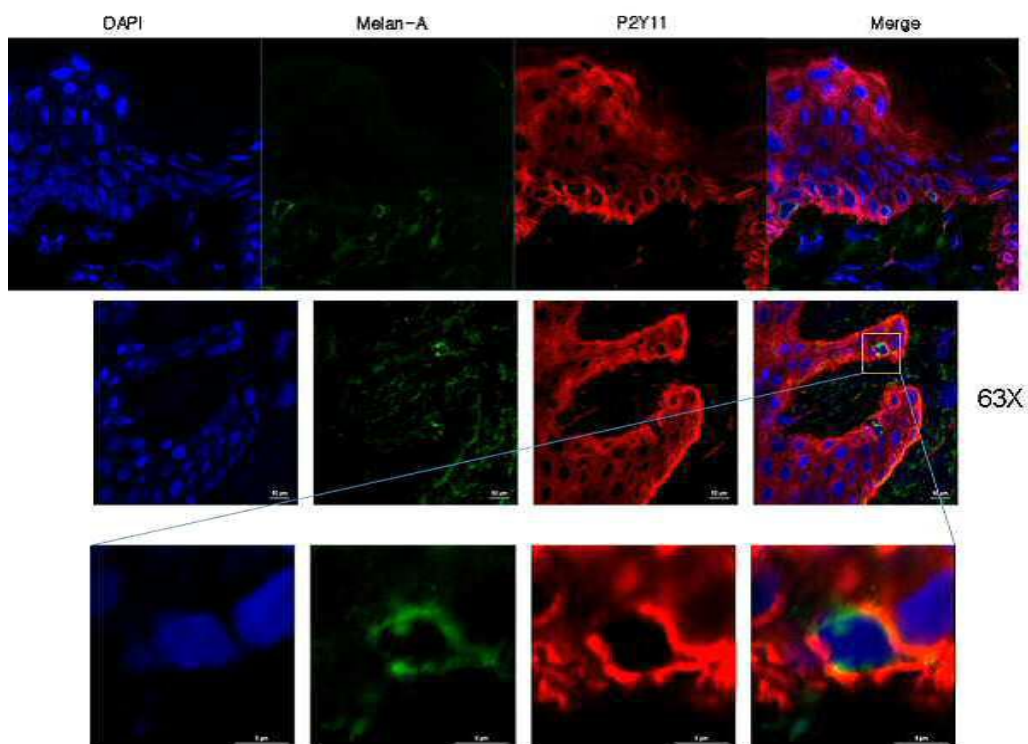
도면12



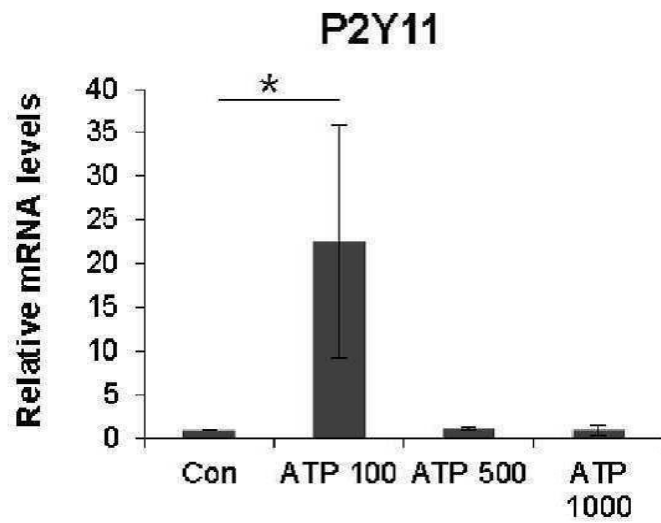
도면13



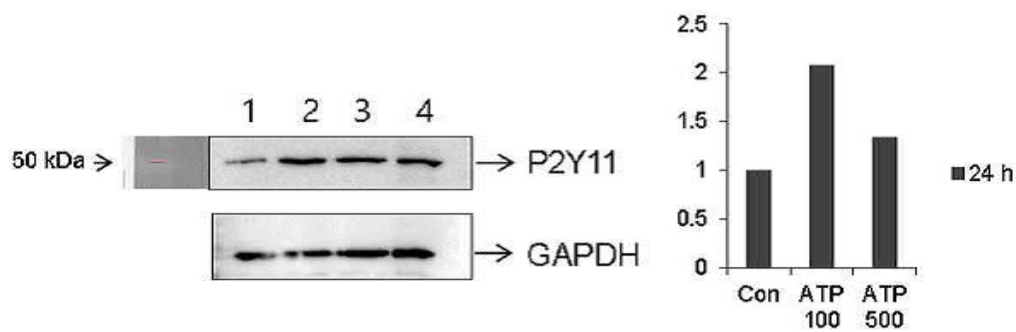
도면14



도면15

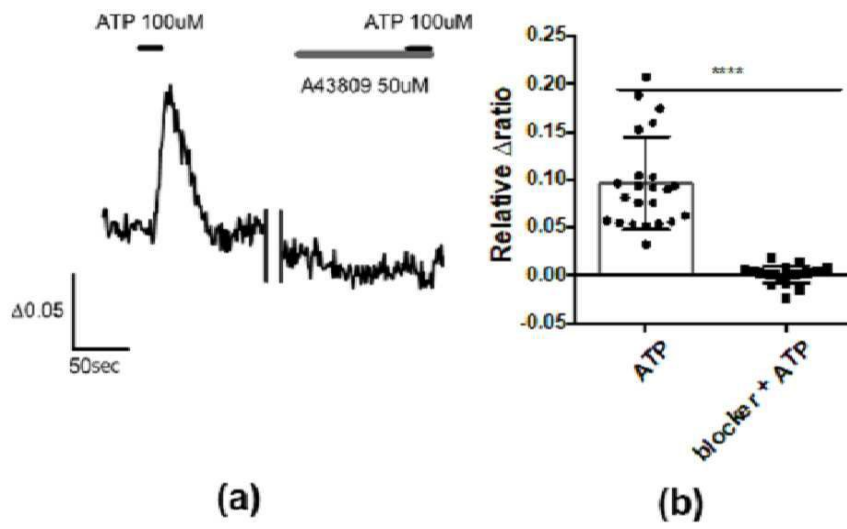


도면16

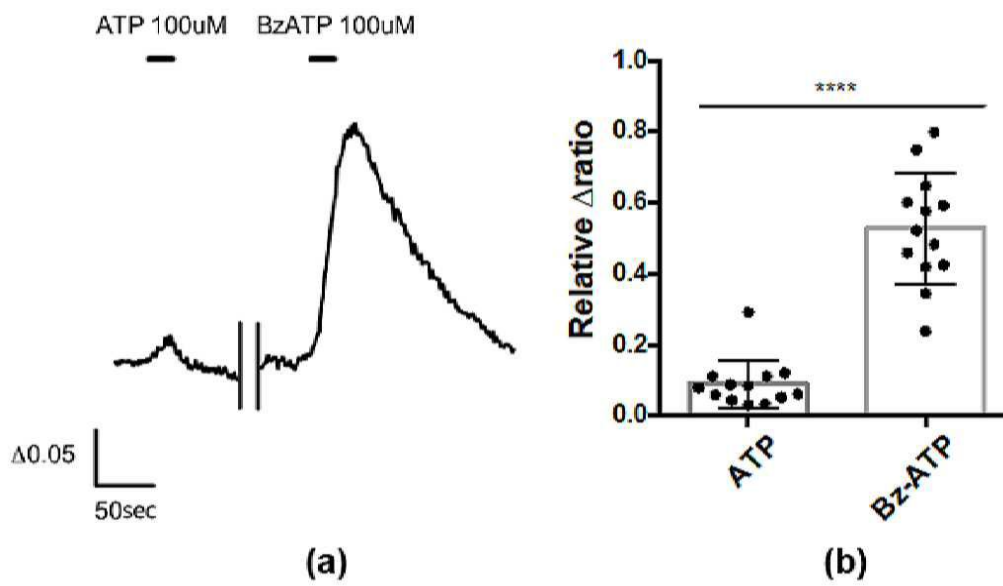


1. Human Primay melanocyte (control)
2. Human Primay melanocyte (ATP 100 uM) _ 24h treat
3. Human Primay melanocyte (ATP 500 uM) _ 24h treat
4. HEK293 cell (positive control)

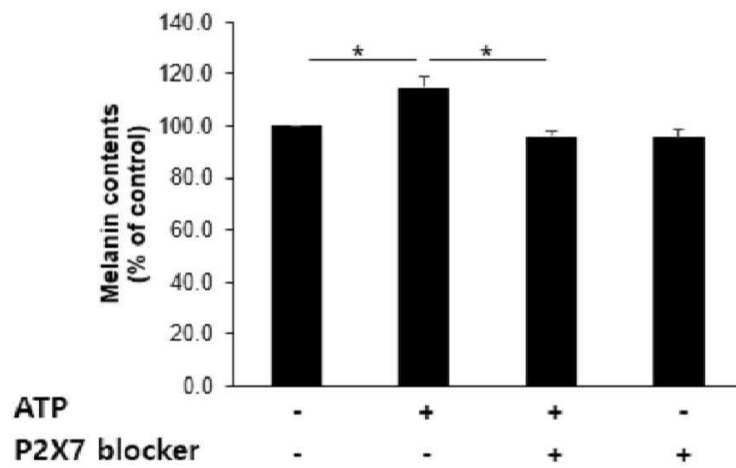
도면17



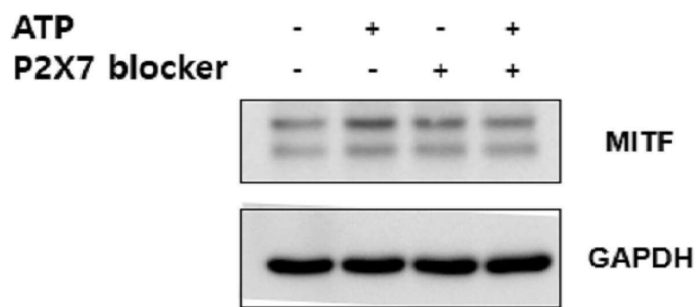
도면18



도면19



도면20



도면21

