(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0164311
(43) 공개일자 2022년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/194 (2006.01) *A61K 8/368* (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/194 (2013.01)
A61K 8/368 (2019.05)
(21) 출원번호 10-2021-0072913
(22) 출원일자 2021년06월04일
심사청구일자 2021년06월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
황선욱
서울특별시 서초구 서리풀4길 36 (서초동, 상지리츠빌) 702호
김채은
서울특별시 성북구 보문로32길 35 (동선동2가, 그레이스빌) 4층 403호
임지연
서울특별시 강서구 공항대로 382 (화곡동, 우장산롯데캐슬)101동 1502호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

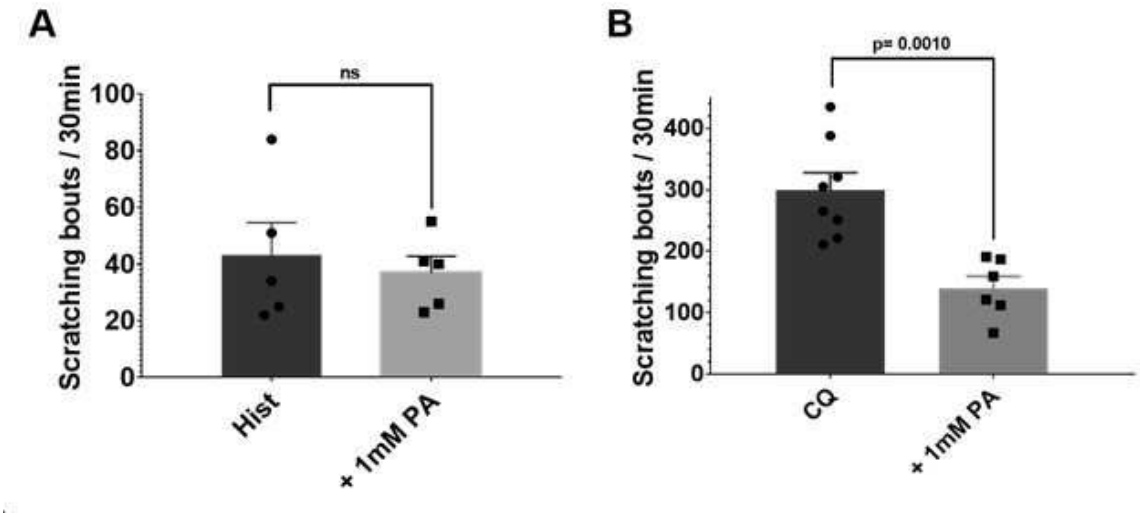
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **파모인산을 유효성분으로 포함하는 가려움증 억제용 조성물**

(57) 요 약

파모인산은 클로로퀴닌으로 유도된 비히스타민성 가려움증 실험모델 및 피부염을 원인으로 하는 가려움증 실험모델에 대해 가려움증 치료 효과가 확인되었으므로 가려움증 치료를 위한 용도로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 17/04 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711114200
과제번호 2017R1A2B2001817
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 신규 수용체 발굴 및 작동원리 연구를 통한 미해결 몸감각 기전 규명
기 여 율 2/5
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711105927
과제번호 2017M3C7A1025600
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명 입력신경망 분자기전 기반 통증조절 및 통증판정 원천기술 개발
기 여 율 2/5
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711127223
과제번호 2019R1A4A1029000
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율 1/5
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

파모인산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 가려움증 예방, 경감, 또는 치료용 약학적 조성물.

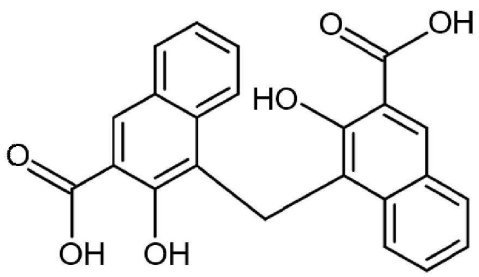
청구항 2

제1항에 있어서,

상기 파모인산은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인,

약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가려움증은 비히스타민성 가려움증(non-histaminergic pruritus)인,

약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 가려움증은 피부질환, 전신성 질환, 신경병증, 및 정신질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 원인에 의한 가려움증인,

약학적 조성물.

청구항 5

파모인산을 유효성분으로 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 파모인산을 유효성분으로 포함하는 가려움증 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 가려움증은 개인의 삶의 질과 사회 생산성을 모두 저하시키는 심각한 질환이다.

[0003] 가려움증을 원인을 기준으로 분류하면, 피부질환을 원인으로 하는 가려움증(아토피 피부염, 접촉피부염, 건선, 태선, 신경피부염, 화폐상 습진, 포진피부염, 계절성 피부염 등), 전신성 질환을 원인으로 하는 가려움증(황달, 만성 신부전, 기생충증, 황달, 당뇨, 후천성 면역결핍증 등), 신경병증을 원인으로 하는 가려움증, 심인성 질환(정신질환)을 원인으로 하는 가려움증, 약물 또는 화학물질(조영제 등) 투여를 원인으로 하는 가려움증 등이 있다.

[0004] 가려움증을 지속기간을 기준으로 분류하면 급성 가려움증과 만성 가려움증으로 분류할 수 있다. 통상적으로 6주 이상 가려운 감각이 유지되는 경우를 만성 가려움증으로 정의한다.

[0005] 가려움증을 병리학적 원인에 따라 분류하면 히스타민성 가려움증과 비히스타민성 가려움증으로 분류할 수 있다. 가려움증의 병리학적 기전은 아직 완전히 규명된 것은 아니지만, 가려움 신호를 감지하는 신경전달경로가 과활성화되는 것이 원인으로 알려져 있으며, 히스타민 경로와 비히스타민 경로로 구별하고 있다. 동일한 질환을 원인으로 하는 가려움증 환자들 중에서도 히스타민성 가려움증 또는 비히스타민성 가려움증이 다르게 발현할 수 있고, 이에 따라 약물 투여시 치료 효과도 다르게 나타나므로 보편적인 처방이 어려운 실정이다.

[0006] 현재 가려움증 치료제로서 널리 사용되는 항히스타민제는 비히스타민성 가려움증에 대해서는 효과가 없고, 스테로이드제는 비히스타민성 가려움증에 대한 효과가 높지 않으며 장기 투여시 부작용이 발생한다. 또한 병인, 기전, 및 증상에 따라 가려움 신호 매개체 억제제(Itch-mediator inhibitors), 항경련제 (Anticonvulsants), 항우울제(Antidepressants), 아편계 길항제(Opioid antagonists), 면역 억제제(Immunosuppressant), 피부 청결제(Mild cleansers), 피부 연화제(Emollients), 냉각제(Coolants) 또는 국소마취제(Topical anesthetics) 등이 처방되고 있으나, 비히스타민성 가려움증에 대한 명확한 치료제는 아직 없다.

[0007] 이와 같이 비히스타민성 가려움증은 다양한 약물 치료 방법에도 불구하고 만족할만한 효과를 얻지 못하는 경우가 많기 때문에 새로운 치료제가 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Itching, chloroquine, and malaria: a review of recent molecular and neuroscience advances and their contribution to mechanistic understanding and therapeutics of chronic non-histaminergic pruritus, Adesuyi Ajayi, Int J Dermatol. 2019 Aug;58(8):880-891

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 가려움증에 대한 억제 효과가 알려진 바 없는 파모인산을 유효성분으로서 포함하는 가려움증 억제용 조성물 및 이를 이용한 가려움증 억제 방법을 제공한다.

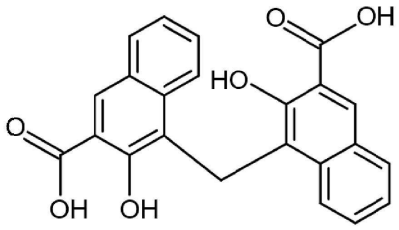
과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 파모인산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 가려움증 예방, 경감, 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 파모인산은 약학적 조성물의 염으로서 알려져 있으나, 가려움증 치료에 대한 경감 또는 치료 효과를 가지는 유효성분으로서는 알려진 바가 없다.

[0012] 상기 파모인산은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0013] [화학식 1]

[0014] 

[0016] 상기 가려움증은 비히스타민성 가려움증(non-histaminergic pruritus)일 수 있다. 비히스타민성 가려움증은 비히스타민성 뉴런(히스타민 비의존성 경로)의 활성화에 의해 발생하는 가려움으로 히스타민성 가려움증과 구별된다. 상기 비히스타민성 가려움증은 항히스타민성 약물에는 반응하지 않는 가려움증일 수 있다. 가려움증은 원인에 따라 분류할 수 있으나, 어떤 원인에 의한 것이든 비히스타민성 가려움증이 유발될 수 있다. 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 비히스타민성 가려움증 모델에 대해 치료 효과가 확인되었으므로, 다양한 원인에 의해 유발된 비히스타민성 가려움증에 대한 예방, 경감, 또는 치료 목적으로 사용될 수 있다.

[0017] 상기 가려움증은 급성 또는 만성 가려움증일 수 있다.

[0018] 상기 가려움증은 피부질환, 전신질환, 신경병증, 및 정신질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 원인에 의한 가려움증일 수 있다.

[0019] 상기 피부질환은 예를 들면 건선, 아토피 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 피부건조증, 양진, 옴, 곤충 물림, 곰팡이균, 박테리아 및 바이러스성 감염, 모낭염, 이 기생증, 수포성 피부병, 듀링포진상피부염, 수포성 유사천포창, 다발성 피부근염, 대리어병, 헤리-헤리병, 어린선, 쇼그렌-라손 증후군, 수포성 표피 박리증, 임신성 다형발진, 임신성 유사천포창, 임신성 양진, 피부 T-세포/B-세포 림프종 및 백혈병성 피부잠입으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 전신질환은 예를 들면 만성간질환, 만성신부전, 당뇨병, 담도폐쇄질환, 요독증, 갑상선 기능 항진증, 장내 흡수 불량, 폐경기 전후 가려움증, 에이즈 감염, 기생충 감염, 철 결핍증, 적혈구 증가증, 호지킨병, 비호지킨성 림프종, 형질세포종, 자궁경부, 전립선 및 큰창자의 고형 종양, 카르시노이드 증후군, 임신성 소양증, 및 약물복용에 의한 부작용으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 신경병증을 원인으로 하는 가려움증은 예를 들면 대상포진 후 가려움증, 감각이상성 등가려움증, 상완요골근 가려움증, 뇌졸중 후 가려움증, 다발성 경화증, 신생물, 농양, 대뇌 또는 척수 경색증, 외음부통 및 작은 섬유 신경병증에 의한 가려움증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 정신질환은 예를 들면 망상적 기생충증, 스트레스, 우울증, 불안장애, 강박장애, 정신분열증, 환촉, 및 전신 피로증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 약학적 조성물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등 이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다.

[0024] 상기 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 유효성분을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알단위 투여형으로 제

조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제, 트로키제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염 등과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0025] 다른 양상은 파모인산을 유효성분으로 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0026] 파모인산 및 가려움증에 대한 상세한 설명은 상술한 내용과 동일하다.

[0027] 상기 화장료 조성물은 피부 외용제 또는 화장품 등으로 제형화될 수 있다. 상기 피부 외용제는 연고제, 경고제, 스프레이제, 현탁액, 유액, 크림, 젤 등을 포함하는 것일 수 있다. 상기 화장품은 기초 화장품, 메이크업 화장품, 바디 화장품, 면도용 화장품 등을 포함하는 것일 수 있다. 상기 기초 화장품의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있으며, 상기 메이크업 화장품의 예로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이새도, 아이라이너, 마스카라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 바디 화장품의 예로는, 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있으며, 면도용 화장품의 예로는 애프터 셰이브로션, 셰이빙 크림 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 상기 화장료 조성물은 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대, 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키기 위하여 피부 흡수 촉진 물질을 추가로 포함될 수 있다. 화장품의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다. 화장품의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 화장품의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다. 화장품의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 화장품의 제형이 계면-활성제 함유 클린싱인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0029] 또 다른 양상은 파모인산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 가려움증을 예방, 경감, 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0030] 파모인산 및 가려움증에 대한 설명은 상술한 내용과 동일하다.

[0031] 상기 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"란 가려움증이 유발된 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적으로 인간을 포함한 포유동물일 수 있다. 투여 경로는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함될 수 있으며, 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 파모인산 또는 이의 염은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 구

체적으로, 상기 약학적 조성물은 0.01 내지 1000 mg/kg/day로, 보다 구체적으로 0.1 내지 500 mg/kg/day로 투여될 수 있다. 상기 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라 증감될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 일 구체예에 따른 파모인산을 포함하는 조성물은 가려움증을 억제 또는 완화하기 위한 용도로 사용될 수 있으며, 약학적 조성물 또는 화장료 조성물로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 히스타민 또는 클로로퀴닌으로 유도된 가려움증에 대해 파모인산이 억제효과가 있는지 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 1의 B에 따르면 파모인산은 클로로퀴닌으로 유도된 가려움증을 억제하므로 비히스타민성 가려움증을 억제하는 효과가 있음이 확인되었다.

도 2는 피부염을 원인으로 하는 가려움증에 대해 파모인산이 억제효과가 있는지 확인한 결과를 나타낸 것이다. *P<0.05, **P<0.01, 및 ***P<0.001은 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 평가하였다.

도 3은 파모인산이 DNCB 투여 부위의 표피 두께에 미치는 영향을 확인한 결과이다. *P<0.05, **P<0.01, 및 ***P<0.001은 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 평가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1: 히스타민 또는 클로로퀴닌 투여로 유발된 가려움증에 대한 피모인산의 억제 효과**

[0038] 표준화된 가려움증 모델인 히스타민 또는 클로로퀴닌을 투여한 급성 가려움증 동물 모델을 이용하여 파모인산의 급성 가려움증 억제 효과를 확인하였다.

[0039] 수컷 BALB/c 마우스(15 내지 20g)의 목덜미 뒤쪽 부위를 제모하고, 관찰용 방풍유리 챔버에서 3 일 간 매일 30분 이상 길들였다. 50㎕ 등장성 염수에 히스타민 200 mg/ml 또는 클로로퀴닌 200 mg/ml를 희석시켜 용액을 준비하였다. 제모한 날로부터 4일 후, 마우스의 제모 부위에 히스타민 용액 또는 클로로퀴닌 용액을 피하주사(subcutaneous injection)하였다. 파모인산 투여군은 히스타민 용액 또는 클로로퀴닌 용액을 주사하기 30분전에 파모인산 1mM를 제모 부위에 피내투여(intradermal injection) 하였다. 히스타민 용액 또는 클로로퀴닌 용액이 투여된 마우스는 히스타민 또는 클로로퀴닌 유도성 급성 가려움증 반응인 긁는 행동을 시작하였다. 히스타민 또는 클로로퀴닌 용액을 투여한 직후부터 30분 동안 마우스의 긁는 행위의 횟수를 기록하였다. 긁는 행위는 마우스가 뒷다리를 들어 올려 주사 부위를 반복적으로 긁은 뒤 발을 바닥에 다시 놓거나 핥는 것으로 정의하고, 30분 동안 긁는 행위의 총 횟수를 기록하였다. 군 당 5 - 8마리의 마우스의 평균치 ± S.E.M.으로서 그 결과를 나타냈다.

[0040] 도 1A에 따르면, 히스타민 용액 및 파모인산 1 mM를 투여한 실험군은 긁는 행동의 횟수에 변화가 없었다. 그러나 도 1B에 따르면, 클로로퀴닌 용액 및 파모인산 (1 mM)를 투여한 실험군은 긁는 행동의 횟수가 유의하게 감소하였다. (P = 0.0010)

[0041] 클로로퀴닌에 의해 유도된 가려움증 동물모델은 비히스타민성 가려움증(non-histaminergic pruritus)에 대한 실험모델에 해당되므로, 파모인산이 비히스타민성 가려움에 대한 억제 효과가 있음을 알 수 있다.

[0043] **실시예 2: 피부염을 원인으로 하는 가려움증에 대한 피모인산의 억제 효과**

[0044] 표준화된 만성 피부염 모델의 일종인 DNCB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 모델을 활용하여 피부염에 의한 만성 가려움증에 대한 파모인산의 억제 효과를 평가하였다.

[0045] BALB/c 마우스를 6개의 그룹으로 분류하였다. 하나의 그룹 당 n수는 4 내지 8 마리로 하였다. 각 그룹마다 (1) 부형제(Vehicle) 피내주사(control), (2) 파모인산 1 μM 피내주사, (3) 파모인산 10 μM 피내주사, (4) 파모인산 1 mM 피내주사, (5) 파모인산 30 mM 피내주사를 통해 시험 약물을 투여하였다. 그룹 (6)은 약물을 투여하지 않았으며, 야생형(wild)로 지칭하였다.

[0046] 실험 진행 6일 전에 마우스의 목덜미 뒤쪽을 면도기로 제모하였다. 아세톤과 에탄올이 3:1로 함유된 용매에 1% DNCB 200 ㎕를 혼합하여 제모된 피부에 3일간 국소 도포함으로써 피부염을 유발시켰다. 그룹 (6)의 경우, 아세톤과 에탄올이 3:1로 혼합된 용매를 동일한 용량으로 제모부위에 국소 도포하였다.

[0047] DNCB 도포 후 2 일간 회복기간을 가진 후, 0.5% DNCB 200 ㎕를 아세톤과 올리브오일이 2:3으로 함유된 용매에 녹여 2일 간격으로 총 2주 동안 제모된 피부에 국소 도포하였다. 그룹 (6)은 아세톤과 올리브오일을 2:3의 비율로 혼합한 용매를 동일한 용량으로 동일 부위에 국소 도포하였다. DNCB를 도포할 때는 파모인산 또는 부형제(Vehicle)를 목덜미 뒤쪽 제모된 피부에 50 ㎕ 피내주사하였다. 그룹 (6) 에는 파모인산 또는 부형제를 주사하지 않았다. DNCB 및 파모인산을 투여한 다음 날에는 60분 동안 긁는 행위의 횟수를 기록하였다. 긁는 행위는 뒷다리를 들어 올려 주사 부위를 반복적으로 긁은 뒤 발을 바닥에 다시 놓거나 핥는 것으로 정의하였다.

[0048] 도 2에 따르면, 파모인산을 투여한 그룹은 부형제(Vehicle)만을 투여한 그룹보다 긁는 행동이 감소하였다. 특히, 파모인산을 고농도로 투여한 실험군(1 mM, 30 mM)은 긁는 행동이 유의하게 감소하였으므로, 파모인산은 염증성 가려움증의 완화에 효과적인 것으로 확인되었다.

[0049] 표피의 피부염 병변의 변화를 평가하기 위해, 2 주간의 관찰이 종료된 각 마우스의 목덜미 뒤쪽 피부 샘플을 수득하고 4% 파라포름알데하이드에 고정시켰다. 조직을 넣은 파라핀 블록을 제작한 후 10㎛의 두께로 섹션하여 슬라이스를 제작했다. 파라핀화된 피부 슬라이스를 H&E (Hematoxylin and Eosin) 로 염색했다. 염색된 부분의 조직학적 변화를 평가하기 위해서 광학현미경 (BX51, Olympus)로 확인하였다.

[0050] 도 3에 따르면, 부형제(Vehicle)만을 투여한 그룹(control)에 비해 파모인산을 투여한 그룹의 표피 두께가 유의하게 감소하였다. 실험 결과를 종합하면, 파모인산 투여에 의한 가려움의 감소는 긁는 행위를 유의하게 감소시키고, 긁는 행위에 의해 유발되는 병변(lesion)의 악화를 감소시켜 결과적으로 피부염 병변 완화에 기여하였음을 확인하였다.

[0051] DNCB 투여에 의한 가려움증 동물모델은 피부질환을 원인으로 하는 가려움증 모델에 해당하며, 아토피피부염 모델로도 사용된다. 아토피피부염을 원인으로 하는 가려움증에 대해 항히스타민제를 처방하는 경우도 있으나, 히스타민이 주요 원인 물질이 아닌 경우에는 항히스타민제가 효과가 없다.

[0052] 상기 실험결과들을 종합하면, 파모인산은 피부질환을 원인으로 하는 가려움증에 대해 치료효과가 있으며, 그 중 비히스타민성 가려움증에 대해 효과가 있음을 알 수 있다.

[0054] **실시예 3: 인간 피부 각질형성세포의 질환성 단편화에 대한 파모인산의 완화 효과**

[0055] 인간 피부 각질형성세포(HaCaT keratinocyte)에 피부질환을 악화시키는 핵심 cytokine인 인간 Interleukin-4 (IL-4) 또는 Interleukin-13 (IL-13)을 처리하여 피부질환모델을 실험실 조건(in vitro)상에서 재연하고, 질환성 단편화에 대한 파모인산의 억제 효과를 평가하였다.

[0056] HaCaT cell을 37℃에서 10%의 태아 소 혈청(FBS. Fetal Bovine Serum)과 1%의 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM에서 배양하여 6일간 분화시켰다. 질환 그룹의 세포는 실험 진행 2일 전부터 매일 10 ng/ml의 인간 IL-4 또는 IL-13을 함유한 DMEM을 처리하여 실험실 조건의 피부질환모델을 수립하였다. HaCaT cell에 CFSF(carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 라벨링을 하고, 37℃에서 30분간 디스파제 II(dispase II) 하에서 세포를 배양하였다. 그 후 디스파제 용액을 조심스럽게 제거하고, Balance Salt Solution을 0.5ml 첨가하였다. HaCaT cell 층에 1 ml 마이크로파이펫을 사용하여 물리적 자극을 10회 실시한 후, iRiS 디지털 영상 시스템을 통해 관찰했다. 총 10회의 사진촬영 후 단편화된 세포의 총 개수를 기록하였다. 결과로서 군 당 4회의 평균치를 산출하였다.

[0057] 도 4A에 따르면, 인간 IL-4에 의해 유도된 질환적 단편화가 파모인산을 처리한 세포군에서 유의하게 감소하였다 (P = 0.0014). 또한, 도 4B에 따르면, 인간 IL-13에 의해 유도된 질환적 단편화 또한 파모인산을 처리한 세포군에서 유의하게 감소하였다. (P = 0.0040)

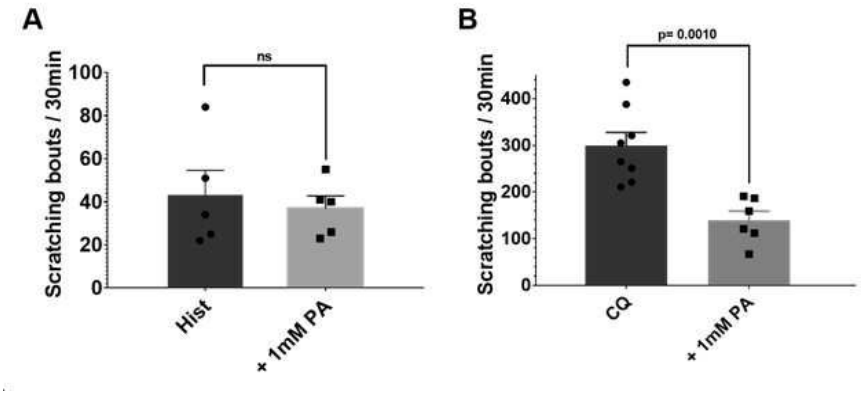
[0058] 상기 실험결과들을 종합하면, 파모인산은 인간 피부 각질형성세포의 질환적 단편화 억제를 통해, 피부 질환 병변 완화 효과가 있음을 알 수 있다.

[0060] **실시예 4: 통계**

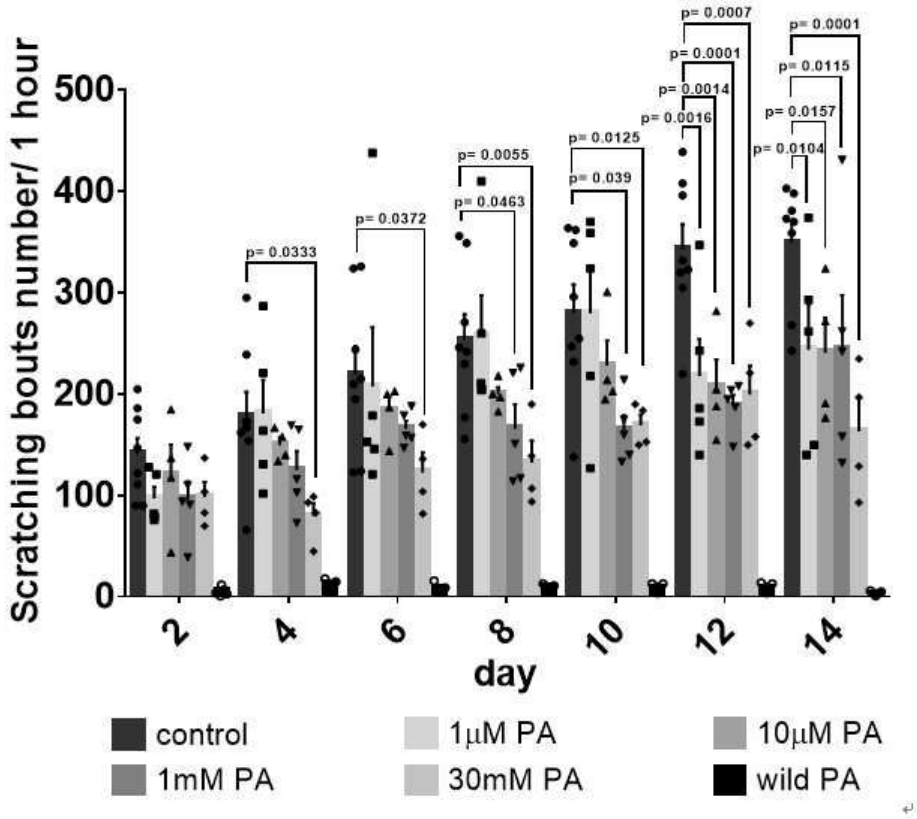
[0061] 히스타민 및 클로로퀴닌 유도성 급성 가려움증 모델의 데이터와 각질형성세포 단편화 모델은 Student's T-test를 사용하여 통계적 유의성을 검정하였으며, DNCB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 유도성 만성 피부염 모델의 데이터는 이원분산분석 (two-way ANOVA)을 적용하여 통계적 유의성을 검정하였다.

도면

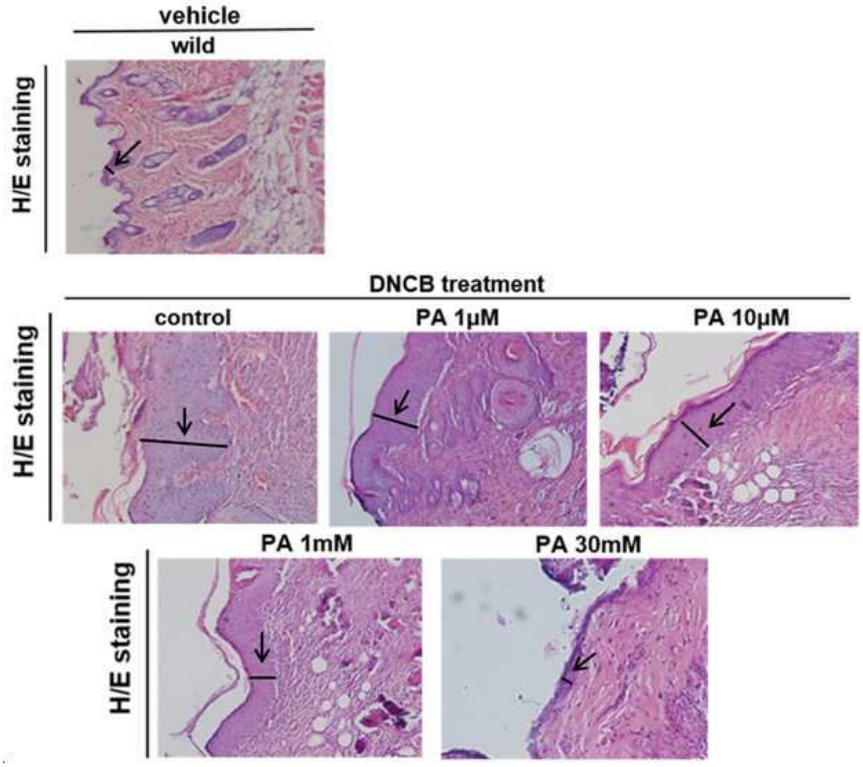
도면1



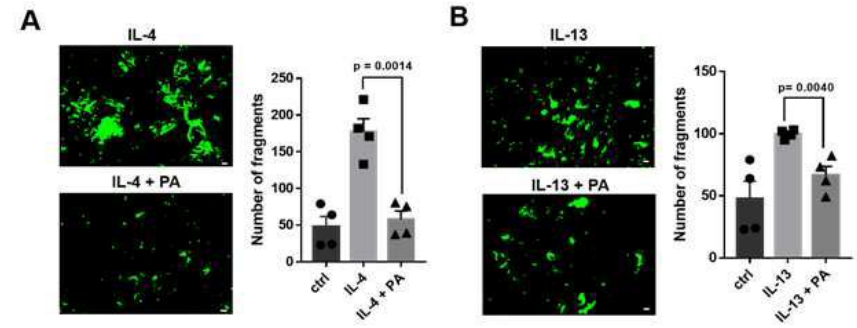
도면2


Scratching bouts number/ 1 hour
500
400
300
200
100
0
p= 0.0333
p= 0.0372
p= 0.0055
p= 0.0463
p= 0.0125
p= 0.039
p= 0.0007
p= 0.0001
p= 0.0014
p= 0.0016
p= 0.0001
p= 0.0115
p= 0.0157
p= 0.0104
2
4
6
8
10
12
14
day
control
1μM PA
10μM PA
1mM PA
30mM PA
wild PA

도면3


vehicle
wild
H/E staining
DNCB treatment
control
PA 1μM
PA 10μM
H/E staining
PA 1mM
PA 30mM
H/E staining

도면4


A
IL-4
IL-4 + PA
Number of fragments
p = 0.0014
ctrl
IL-4
IL-4 + PA
B
IL-13
IL-13 + PA
Number of fragments
p= 0.0040
ctrl
IL-13
IL-13 + PA