

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 10월 15일 (15.10.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/156558 A1

- (51) 국제특허분류:
C07D 309/10 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003429
- (22) 국제출원일: 2015년 4월 6일 (06.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0041275 2014년 4월 7일 (07.04.2014) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 국제캠퍼스내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 박훈규 (PARK, HoonGyu); 443-814 경기도 수원시 영통구 영일로 20, 205 호, Gyeonggi-do (KR). 김지영 (KIM, Jiyoung); 137-907 서울시 서초구 나루터로 4길 28, 306 동 1204 호, Seoul (KR). 안지인 (AHN, Jiin); 463-718 경기도 성남시 분당구 미금로 251, 701 동 1602 호, Gyeonggi-do (KR). 정미라 (JUNG, Mira); 446-929 경기도 용인시 기흥구 구성로 392, 910 동 1101 호, Gyeonggi-do (KR). 김학원 (KIM, Hakwon); 135-554 서울시 강남구 인주로 30길 26, G 동 504 호, Seoul (KR). 이현진 (LEE, Hyunjin); 443-814 경기도 수원시 영통구 정명남로 12번길 15, 305 호, Gyeonggi-do (KR). 이태훈

(LEE, Tae Hoon); 446-954 경기도 용인시 기흥구 사은로 126번길 10, 109 동 1403 호, Gyeonggi-do (KR). 권현지 (KWON, Hyun Ji); 410-776 경기도 고양시 일산동구 고봉로 278번길 17, 206 동 403 호, Gyeonggi-do (KR). 창페이 (CHANG, Fei); 200093 상하이 과학기술대학교 환경 및 건축부, Shanghai (CN).

(74) 대리인: 안소영 (AHN, So-Young); 137-881 서울시 서초구 서초대로 344, 4층 안소영 국제특허법률사무소, Seoul (KR).

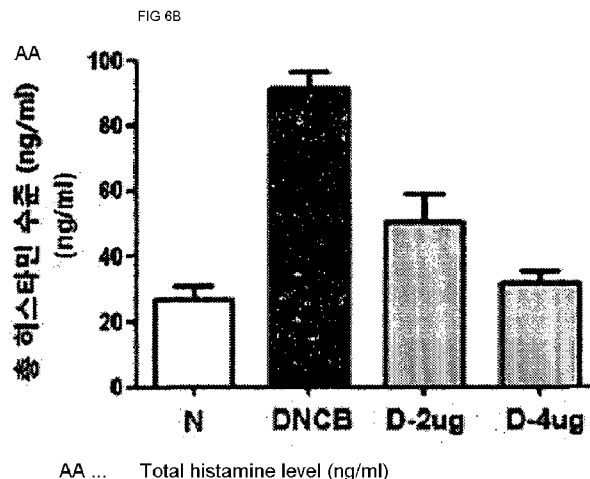
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

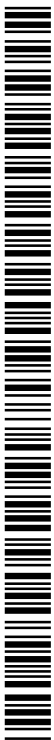
(54) Title: COMPOSITION COMPRISING NOVEL 5,6-DIHYDROERGOSTEROL GLYCOSIDE DERIVATIVE

(54) 발명의 명칭 : 신규 5,6-다이하이드로에르고스테를 글리코시드 유도체를 포함하는 조성물



(57) Abstract: The present invention provides a novel 5,6-dihydroergosterol glycoside derivative. The novel 5,6-dihydroergosterol glycoside derivative according to the present invention can be usefully used as an agent for preventing or treating dermatitis or as a cosmetic material for relieving atopy since the derivative, in preventing and treating dermatitis, inhibits generation of chemokine which increases according to inflammatory stimulation of the skin, and inhibits activity of transcription factors which control expression of various inflammatory mediators.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 5,6-다이하이드로에르고스테를 글리코시드 유도체를 제공한다. 본 발명에 따른 신규 5,6-다이하이드로에르고스테를 글리코시드 유도체는 피부염 예방 및 치료에 있어서, 피부 염증 자극에 따라 증가하는 케모카인의 생성을 억제하고 다양한 염증 매개체의 발현을 조절하는 전사인자들의 활성을 억제하여 피부염 예방 및 치료제 내지 아토피 개선 화장품 소재로 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2015/156558 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

명세서

발명의 명칭: 신규 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 포함하는 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체 및 이를 포함하는 피부염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 아토피(atopy)란 그리스어인 a-topos가 어원으로 특이한, 이상한, 비정상적인 반응등의 뜻을 가진다. 말 그대로 다양한 원인이 복잡하게 뒤엉켜 발병하고 완화와 재발을 반복한다.
- [3] 아토피 질환에는 알레르기 천식, 알레르기 결막염, 알레르기 비염, 아토피 피부염 등이 있으며 이들 질환은 단독 또는 여러 질환이 동시에 나타날 수 있다.
- [4] 현재까지 알려진 아토피 질환의 발병 원인은 정확히 밝혀져 있지 않지만 보편적으로 유전적, 면역학적 요인이 관여하는 것으로 추정되며, 기타 환경적, 정신적 요인 등이 악화 요인으로 작용한다는 것이 전문가들의 보편적인 견해이다.
- [5] 아토피 피부염은 영아와 소아에서 가장 흔한 피부 질환 중 하나이며 생후 6개월 동안에 45 %, 생후 12개월 이전에 60 %, 5세 이전에 적어도 85 %의 비율로 시작된다. 보통 어릴 때 잠시 앓는 병이라고 알려져 있으나 환자의 50 %는 두 돌 이내에 그 증상이 없어지지만, 25 %는 청소년기까지 지속되며, 나머지 25 %는 성인이 되어도 없어지지 않고 계속된다.
- [6] 아토피 피부염의 주증상은 가려움인데, 가려워서 긁게 되면 습진성 병변으로 발전하고 이러한 병변이 진행되면서 다시 더 심한 소양증이 유발되는 일련의 악순환이 반복되게 된다.
- [7] 현재 피부면역 질환 치료에 사용되는 제제로는 스테로이드제, 항히스타민제, 면역조절제 등이 사용되고 있으며 그 중 스테로이드계 약품이 소염 효과 및 면역억제 효과가 가장 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나 스테로이드제를 장기간 사용하면 바른 부위의 피부에서 털이 나고 피부가 위축되며, 피부 색소가 적어지고 피부가 얇아지는 등의 부작용을 일으키는 것으로 보고되고 있다.
- [8] 일례로 현재 아토피 피부염에 가장 널리 사용되는 치료제는 스테로이드제로 알려진 덱사메타손(Dexamethasone)이 있으나, 이는 단기 치료에는 효과적일 뿐, 1년 이상 장기 치료시에는 안정성과 그 효능이 성립되지 않고 피부가 얇아지거나, 피부위축, 상흔, 피부변색 등의 부작용이 발생하는 사례가 보고되는 등 문제점이 나타내고 있다.
- [9] 이에 따라 화학 약품의 부작용을 최소화하면서도 급증하고 있는 아토피 피부염을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 우수한 효능을 가지는 새로운

약물에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

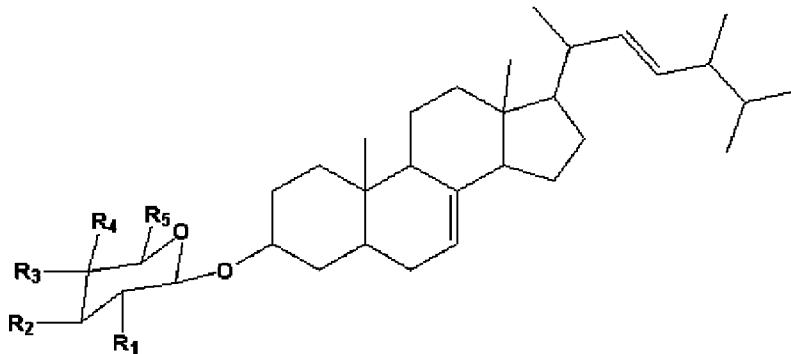
- [10] 본 발명은 신규 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 제공하고자 한다.
- [11] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 포함하는 피부염 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [12] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 포함하는 아토피 피부 개선 또는 완화용 화장품 조성물을 제공하고자 한다.
- [13] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 피부염 예방 또는 치료 방법을 제공하고자 한다.
- [14] 본 발명은 피부염, 특히 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명자는 피부염, 특히 아토피 피부염을 치료 또는 개선할 수 있는 물질을 찾기 위해 노력한 결과, 사포닌계 유도체 중에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체, 특히 신규한 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체인 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈가 피부염 및 아토피 피부염의 증상을 현저히 개선하고 치료하는 효능을 가지는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [16] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 포함하는 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[17] [화학식 1]

[18]



- [19] 상기 화학식에서 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 하이드록시이며 R₅는 수소 또는 CH₂OH이다.
- [20] 보다 바람직하게 R₁ 내지 R₅는 하기의 표 1과 같은 구조를 가질 수 있다.

[21] [표 1]

[22]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	글리코시드
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH	글루코즈
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH	갈락토즈
3	OH	OH	OH	H	H	자일로즈
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH	글루코사민

[23] 예를 들어, 상기 표 1에서 R₁은 OH, R₂는 OH, R₃은 OH, R₄는 H 및 R₅는 CH₂OH인 경우, 상기 글리코시드는 글루코즈이다.

[24] 표 1에서 R₁은 OH, R₂는 OH, R₃은 H, R₄는 OH 및 R₅는 CH₂OH인 경우, 상기 글리코시드는 갈락토즈이다.

[25] 표 1에서 R₁은 OH, R₂는 OH, R₃은 OH, R₄는 H 및 R₅는 H인 경우, 상기 글리코시드는 자일로즈이다.

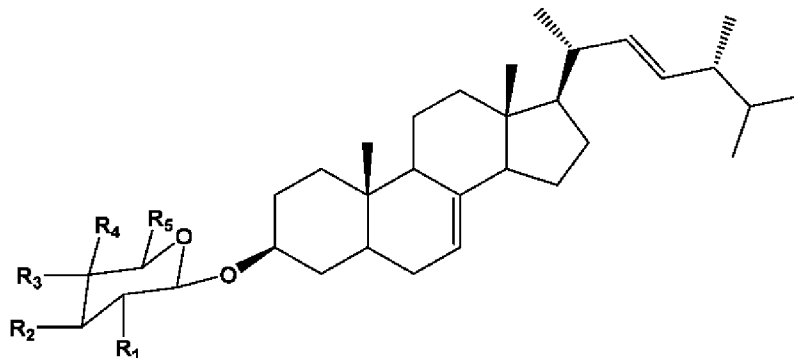
[26] 표 1에서 R₁은 NH₂, R₂는 OH, R₃은 OH, R₄는 H 및 R₅는 CH₂OH인 경우, 상기 글리코시드는 글루코사민이다.

[27] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 비대칭탄소를 포함할 수 있다. 이와 같은 경우, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물뿐만 아니라 이의 광학 이성질체까지 모두 포함할 수 있다.

[28] 본 발명의 바람직한 모습으로써, 상기 화학식 1의 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

[29] [화학식 2]

[30]



[31] 상기 화학식 2에서 R₁ 내지 R₅는 하기 표 2와 같다.

[32] [표 2]

[33]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	글리코시드
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH	글루코즈
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH	갈락토즈
3	OH	OH	OH	H	H	자일로즈
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH	글루코사민

[34] 예를 들어, 상기 표 2에서 R₁은 OH, R₂는 OH, R₃은 OH, R₄는 H 및 R₅는 CH₂OH인 경우, 상기 글리코시드는 글루코즈이다.

[35] 표 2에서 R_1 은 OH, R_2 는 OH, R_3 은 H, R_4 는 OH 및 R_5 는 CH_2OH 인 경우, 상기 글리코시드는 갈락토즈이다.

[36] 표 2에서 R_1 은 OH, R_2 는 OH, R_3 은 OH, R_4 는 H 및 R_5 는 H인 경우, 상기 글리코시드는 자일로즈이다.

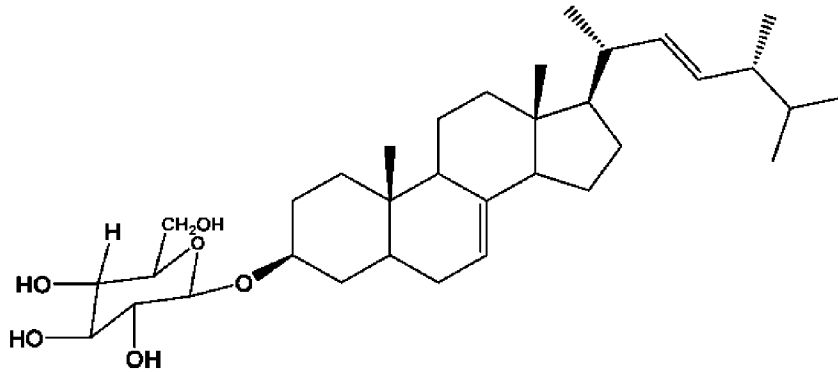
[37] 표 2에서 R_1 은 NH_2 , R_2 는 OH, R_3 은 OH, R_4 는 H 및 R_5 는 CH_2OH 인 경우, 상기 글리코시드는 글루코사민이다.

[38]

[39] 본 발명의 또 다른 바람직한 모습으로써, 상기 화학식 1로 표시되는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 각각 하기 화학식 3 내지 5에 따른 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈, 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 자일로즈이다.

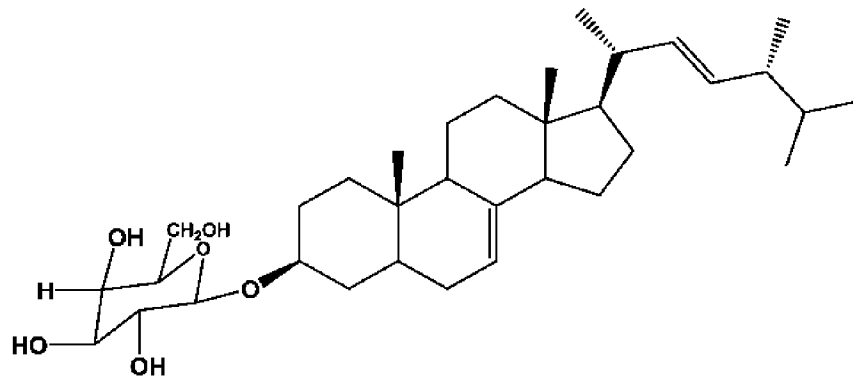
[40] [화학식 3]

[41]



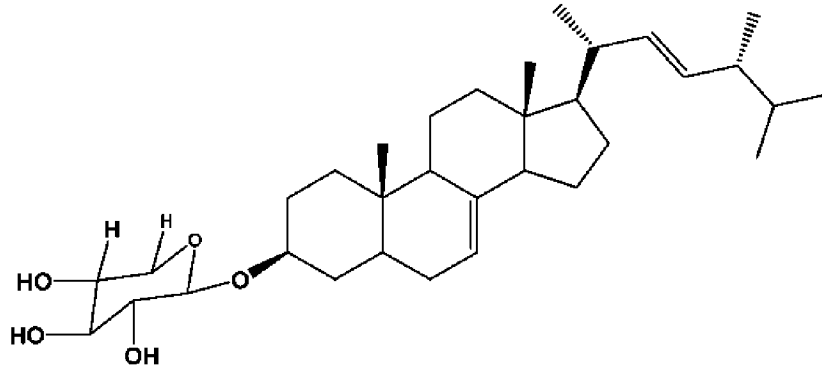
[42] [화학식 4]

[43]



[44] [화학식 5]

[45]



[46] 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 5 화합물의 약학 또는 생리학적으로 허용되는 모든 염 형태를 포함한다. 예를 들어 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산, 주석산 및 황산 등으로 제조된 무기산염, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산, 구연산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 하이드로 아이오딕산, 만델산, 뮤크산, 질산, 파모산, 판토텐산, 숙신산, 타르타르산 등으로 제조된 유기산염, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 캄포르설폰산, 또는 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염, 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염 및 트리메틸아민, 트리에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민 염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 상기 약제학적으로 허용 가능한 염은 무기산으로서 염산, 유기산으로서 메탄설폰산일 수 있다.

[47] 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체 중 알려진 화합물에 대해서는 당업계에 공지된 방법에 따라 화학적으로 합성할 수 있다.

[48] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 에르고스테롤을 DIBAL로 선택적 환원 반응을 수행하여 5,6-다이하이드로에르고스테롤을 합성하고 합성된 5,6-다이하이드로에르고스테롤을 글리코실 할라이드(glycosyl halide), 글리코실 설파이드(glycosyl sulfide) 또는 글리코실 트라이클로로아세트이미데이트(glycosyl trichloroacetimidate)로 글리코실화 반응을 수행하여 합성한다.

[49] 본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 5의 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 피부 염증 자극에 따라 증가하는 케모카인의 생성을 억제하고 다양한 염증 매개체의 발현을 조절하는 전사인자들의 활성을 억제함으로써 피부염 치료에 현저한 효과를 보인다. 본 발명의 피부염은 아토피 피부염, 접촉성 피부염, 지루성 피부염을 포함하며 바람직하게 아토피

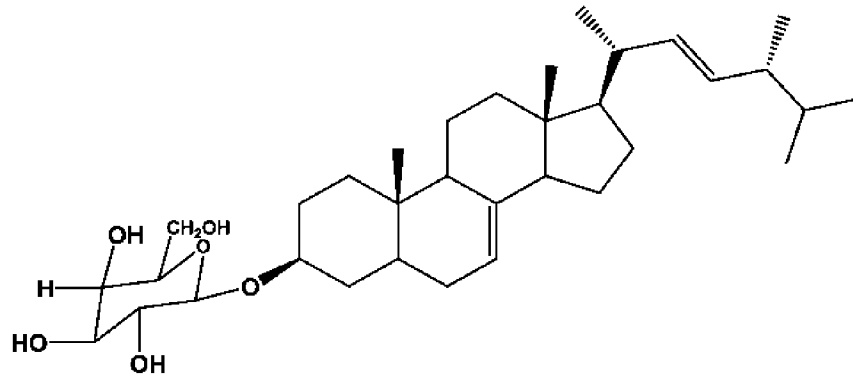
피부염이다.

- [50] 본 발명에서, 의약 조성물은 연고, 젤, 크림, 패취 및 분무제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형일 수 있다. 또한, 상기 의약 조성물은 경구용 제제 또는 주사용 제제일 수 있다. 상기 경구용 제제는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제이고, 상기 주사용 제제는 멸균 주사제 형태의 제형일 수 있다.
- [51] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA의 문헌을 참조할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 의약 발명 부분에 속하는 통상의 기술자에게 의약 조성물 제조시 통상적으로 사용되는 것을 의미한다. 예를 들어, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 또한, 약학적으로 허용되는 담체는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 예를 들어, 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등은 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다. 그러나, 상기 열거된 약제학적으로 허용되는 담체 등으로 본 발명이 한정되는 것은 아니며, 이들은 단지 예시에 불과하다.
- [52] 상기 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 1일 0.01 mg/kg 내지 10mg/kg으로, 바람직하게는 2.5 mg/kg 내지 5 mg/kg의 용량으로 투여되거나 피부 등에 도포될 수 있으며, 상기 투여 내지 도포는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 상기 약제학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 0.0001 내지 80 중량%로 포함할 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있다.

- [53] 또한 본 발명의 약제학적 조성물은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체 이외에 피부염의 개선, 완화, 치료 또는 예방을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [54] 또한 본 발명의 약제학적 조성물은 피부염의 개선, 완화, 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [55] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 포함하는 아토피 피부 개선 또는 완화용 화장료 조성물을 제공하고자 한다.
- [56] 본 발명에서, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형일 수 있다.
- [57] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 유도체를 사용하여 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [58] 또한, 화장료 조성물이 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 유도체를 함유하는 향장 제품, 샴푸, 헤어로션, 헤어크림, 헤어 젤 등의 형태로 제조될 경우, 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다.
- [59] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 유도체를 조성물 총 중량을 기준으로 0.001% 내지 20 중량% 함유할 수 있다.
- [60] 본 발명은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 피부염 예방 또는 치료 방법을 제공하고자 한다.
- [61] 본 발명에서 사용되는 “치료학적으로 유효한 양”이라는 용어는 피부염의 예방 또는 치료에 유효한 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 양을 나타낸다.
- [62] 본 발명의 피부염의 예방 또는 치료 방법, 특히 아토피 피부염의 예방 또는 치료 방법은 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체를 투여(피부에 도포를 포함함)함으로써, 징후의 발현 전에 질병 그 자체를 다룰뿐만 아니라, 이의 징후를 저해하거나 피하는 것을 또한 포함한다. 질환의 관리에 있어서, 특정 활성 성분의 예방적 또는 치료학적 용량은 질병 또는 상태의 본성(nature)과 심각도, 그리고 활성 성분이 투여되는 경로에 따라 다양할 것이다. 바람직하게 1일 0.01 mg/kg 내지 10mg/kg으로, 보다 바람직하게는 2.5 mg/kg 내지 5 mg/kg의 용량으로 투여되거나 피부 등에 도포될 수 있으며, 상기 투여 내지 도포는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 그러나, 이의 용량 및 용량의 빈도는 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이며, 적합한 용량 용법은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해

쉽게 선택될 수 있다.

- [63] 또한, 본 발명의 피부염의 예방 또는 치료 방법은 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체과 함께 질환 치료에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 더 포함할 수 있으며, 추가적인 활성제제는 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체과 함께 시너지 효과 또는 보조적 효과를 나타낼 수 있다.
- [64] 본 발명은 피부염, 특히 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 용도를 제공하고자 한다. 약제의 제조를 위한 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 허용되는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다.
- [65] 본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.
- [66] 본 발명은 신규한 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체로 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈를 제공한다. 본 발명에 따른 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈는 하기 화학식 4의 구조를 가진다.
- [67] [화학식 4]
- [68]



- [69] 상기 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈는 에르고스테롤을 DIBAL(Diisobutylaluminium hydride)로 선택적 환원 반응을 수행하여 5,6-다이하이드로에르고스테롤을 합성하고 합성된 5,6-다이하이드로에르고스테롤을 글리코실 할라이드(glycosyl halide), 글리코실 설파이드(glycosyl sulfide) 또는 글리코실 트라이클로로아세트이미데이트(glycosyl trichloroacetimidate)로 글리코실화 반응을 수행하여 합성한다.
- [70] 일 구체예에 따르면, 5,6-다이하이드로에르고스테롤과 2,3,4,6-테트라-O-벤조일-β-D-갈락토피라노실 트라이클로로아세트이미데이트를 메틸렌클로라이드 하에 반응후, Cu(OTf)₂를 추가로 처리하고 트라이에틸아민을 넣고 중화시켜, 2,3,4,6-테트라벤조일 갈락토피라노실 다이하이드로에르고스테롤을 제조한다. 제조된

2,3,4,6-테트라벤조일 갈락토피라노실 다이하이드로에르고스테롤을 메틸렌클로라이드와 메탄올에 녹인 뒤 NaOMe 넣고 반응후, Dowex Mac-3를 넣어서 중화시킨 뒤 컬럼크로마토그래피로 정제하여 생성물을 얻는다.

발명의 효과

- [71] 본 발명의 신규 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체는 피부염 예방 및 치료에 있어서, 피부 염증 자극에 따라 증가하는 케모카인의 생성을 억제하고 다양한 염증 매개체의 발현을 조절하는 전사인자들의 활성을 억제하여 피부염 예방 및 치료제 내지 아토피 개선 화장품 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [72] 도 1은 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 세포 독성을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [73] 도 2는 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 미치는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체가 TNF- α , IFN- γ 에 따른 CCL17 및 CCL22의 발현을 억제하는 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [74] 도 3은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체가 CCL17 및 CCL22 발현의 주요 전사인자들인 NF- κ B 와 STAT1의 활성화를 억제하는 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [75] 도 4는 아토피 피부염 마우스 모델에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체 처리에 따른 외관 피부병변 및 면역세포 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [76] 도 5는 아토피 피부염 마우스 모델에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체 처리에 따른 표피두께 및 비만세포 수 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [77] 도 6은 아토피 피부염 마우스 모델에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체 처리에 따른 IgE 및 히스타민 농도 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [78] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [79] <실시예 1> 5,6-다이하이드로에르고스테롤의 제조

- [80] 에르고스테롤 (0.75 g)과 톨루엔 (10 ml), 다이아이소부틸 알루미늄 하이드라이드 (1M in toluene, 8ml)를 밀봉관에 넣고 140 °C에서 20시간 동안 교반하였다. 소량의 메탄올을 넣은 뒤 용액을 빠르게 3M HCl 수용액에 넣고 메틸렌클로라이드로 추출하였다. 추출된 유기층은 NaCl 수용액으로 3번 씻어준 뒤 MgSO₄로 건조하고 여과하였다. 여과액은 감압농축 시킨 뒤

컬럼크로마토그래피를 통하여 정제하여 96%의 수득률로 생성물을 얻을 수 있었다.

[81] 수소 NMR 피크는 하기에 제시한 바와 같다.

[82] **¹H NMR** (300MHz, CDCl₃): δ 0.55-2.02 (m, 42H), δ 3.60 (brs, 1H), δ 5.17-5.20 (m, 3H)

[83] <실시예 2> 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈의 제조

[84] (1) 2,3,4,6-테트라벤조일 글루코피라노실 다이하이드로에르고스테롤의 제조

[85] 5,6-다이하이드로에르고스테롤 (0.5 g)과

2,3,4,6-테트라-O-벤조일-a-D-글루코피라노실 트라이클로로아세트이미데이트 (1.21 g)를 메틸렌클로라이드 (27 ml)에 녹인 뒤 4 Å몰레큘러시브를 넣고 -20°C에서 30분간 교반하였다. Cu(OTf)₂ (49 mg)를 넣고 -20°C에서 하루 동안 교반하였다. 트라이에틸아민을 넣고 30분간 충분히 중화시킨 후 셀라이트 여과하여 여과액을 감압농축시켰다. 농축액을 컬럼크로마토그래피를 통하여 정제하여 68% 수득률로 생성물을 얻을 수 있었다.

[86] 수소 NMR 피크는 하기에 제시한 바와 같다.

[87] **¹H NMR** (300MHz, CDCl₃): δ 0.51-1.86 (42H, dihydroergosterol peaks), δ 3.59 (brs, 1H), δ 4.14-4.20 (m, 1H), δ 4.52 (dd, 1H, *J*=5.9, 12.1 Hz), δ 4.61 (dd, 1H, *J*=3.3, 11.9 Hz), δ 4.95 (d, 1H, *J*=7.9 Hz), δ 5.09 (brs, 1H), δ 5.18 (t, 1H, *J*=6.3 Hz), δ 5.47-5.53 (m, 1H), δ 5.63 (t, 1H, *J*=9.7 Hz), δ 5.90 (t, 1H, *J*=9.7 Hz), δ 7.29-7.57 (m, 12H), δ 7.82-8.03 (m, 8H)

[88] (2) 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈의 제조

[89] 2,3,4,6-테트라벤조일 글루코피라노실 다이하이드로에르고스테롤 (0.7 g)을 메틸렌클로라이드 (7.0 ml)와 메탄올 (7.0 ml)에 녹인 뒤 0.5M NaOMe (8.6 ml)를 넣고 실온에서 하루 동안 교반하였다. Dowex Mac-3를 넣어서 중화시킨 뒤 여과하여 여과액을 감압농축 하였다. 컬럼크로마토그래피로 정제하여 생성물을 89%의 수율로 얻었다.

[90] 녹는 점, 수소 NMR 및 탄소 NMR 피크는 하기에 제시한 바와 같다.

[91] 녹는점: 257-270°C

[92] **¹H NMR** (300MHz, Pyridine-d₅): δ 0.59 (s, 3H), δ 0.74 (s, 3H), δ 0.89 (d, 6H, *J*=6.8 Hz), δ 0.99 (d, 4H, *J*=6.8 Hz), δ 1.08 (d, 3H, *J*=6.6 Hz), δ 1.15-1.28 (m, 4H), δ 1.35-1.62 (m, 8H), δ 1.66-1.73 (m, 4H), δ 1.73-1.83 (m, 2H), δ 1.86-1.95 (m, 2H), δ 1.99-2.06 (m, 3H), δ 3.95-4.08 (m, 3H), δ 4.24-4.34 (m, 2H), δ 4.41-4.44 (m, 1H), δ 4.60 (d, 1H, *J*=11.5 Hz), δ 4.86 (brs, -OH peak), δ 5.04 (d, 1H, *J*=7.7 Hz), δ 5.19 (brs, 1H), δ 5.26-5.29 (m, 1H)

[93] **¹³C NMR** (300MHz, Pyridine-d₅): δ 12.27, 13.06, 17.84, 19.83, 20.14, 21.37, 21.73, 23.27, 28.53, 30.02, 33.33, 34.53, 34.72, 37.31, 39.60, 40.15, 40.85, 43.06, 43.46, 49.56, 55.28, 56.05, 62.90, 71.75, 75.38, 77.04, 78.54, 78.67, 79.80, 102.24, 117.86, 132.06, 136.18, 139.54

- [94] <실시예 3> 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈의 제조
- [95] (1) 2,3,4,6-테트라벤조일 갈락토피라노실 다이하이드로에르고스테롤의 제조
- [96] 5,6-다이하이드로에르고스테롤 (1.0 g)과 2,3,4,6-테트라-O-벤조일-β-D-갈락토피라노실 트라이클로로아세트이미데이트 (2.23 g)를 메틸렌클로라이드 (36 ml)에 녹인 뒤 4Å몰레큘러시브를 넣고 -20°C에서 30분간 교반하였다. Cu(OTf)₂ (90 mg)을 넣고 -20°C에서 4시간동안 교반하였다. 트라이에틸아민을 넣고 30분간 충분히 중화시킨 후 셀라이트 여과하여 여과액을 감압농축시켰다. 농축액을 컬럼크로마토그래피를 통하여 정제하여 74% 수득률로 생성물을 얻을 수 있었다.
- [97] **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ 0.52-2.33 (42H, dihydroergosterol peaks), 3.67 (brs, 1H), 4.31-4.36 (m, 1H), 4.41-4.47 (m, 1H), 4.66-4.72 (m, 1H), 4.93 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 5.10-5.21 (m, 2H), 5.60 (dd, 1H, J = 3.2, 10.4 Hz), 5.75-5.81 (m, 1H), 5.99 (d, 1H, J = 2.8 Hz), 7.21-7.26 (m, 2H), 7.35-7.63 (m, 10H), 7.79 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.96 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 8.03 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 8.11 (d, 2H, J = 7.3Hz)
- [98] (2) 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈의 제조
- [99] 2,3,4,6-테트라벤조일 갈락토피라노실 다이하이드로에르고스테롤 (0.2 g)을 메틸렌클로라이드 (2.0 ml)와 메탄올 (2.0 ml)에 녹인 뒤 0.5M NaOMe (2.5 ml)를 넣고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. Dowex Mac-3를 넣어서 중화시킨 뒤 여과하여 여과액을 감압농축 하였다. 컬럼크로마토그래피로 정제하여 생성물을 87%의 수율로 얻었다.
- [100] 녹는 점, 수소 NMR 및 탄소 NMR 피크는 하기에 제시한 바와 같다.
- [101] 녹는점: 267-269°C
- [102] **¹H NMR** (300 MHz, Pyridine-d₅) δ 0.59 (s, 3H), 0.73 (s, 3H), 0.83 (dd, 1H, J = 2.9, 7.0 Hz), 0.89 (dd, 6H, J = 1.9, 6.7 Hz), 0.99 (d, 4H, J = 6.8 Hz), 1.08 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 1.18-1.30 (m, 4H), 1.34-1.62 (m, 9H), 1.68-1.72 (m, 4H), 1.77-1.86 (m, 1H), 1.88-1.94 (m, 1H), 1.98-2.12 (m, 3H), 4.01 (br s, 1H), 4.14 (t, 1H, J = 5.9 Hz), 4.24 (dd, 1H, J = 3.0, 9.4 Hz), 4.47-4.52 (m, 3H), 4.62 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.81 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 5.18 (brs, 1H), 5.27 (t, 1H, J = 5.8 Hz).
- [103] **¹³C NMR** (75MHz, Pyridine-d₅) δ 12.27, 13.05, 17.83, 19.82, 20.14, 21.36, 21.73, 23.27, 28.52, 30.02, 33.33, 34.52, 34.75, 37.33, 39.61, 40.17, 40.84, 43.06, 43.47, 49.59, 55.28, 56.07, 62.62, 70.39, 72.73, 75.46, 76.93, 76.99, 102.86, 117.86, 132.06, 136.19, 139.55.
- [104] <실시예 4> 5,6-다이하이드로에르고스테롤 자일로즈의 제조
- [105] (1) 2,3,4-트라이벤조일 자일로피라노실 다이하이드로에르고스테롤의 제조
- [106] 5,6-다이하이드로에르고스테롤 (0.3 g)과 2,3,4-트라이-O-벤조일-β-D-자일로피라노실 트라이클로로아세트이미데이트 (0.5 g)를 메틸렌클로라이드 (36 ml)에 녹인 뒤 4 Å몰레큘러시브를 넣고 -20°C에서 30분간 교반하였다. Cu(OTf)₂ (90 mg)을 넣고 -20°C에서 10시간

30분동안 교반하였다. 트라이에틸아민을 넣고 30분간 충분히 중화시킨 후 셀라이트 여과하여 여과액을 감압농축시켰다. 농축액을 컬럼크로마토그래피를 통하여 정제하여 65% 수득률로 생성물을 얻을 수 있었다.

[107] **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ 0.62-2.15 (42H, dihydroergosterol peaks), 3.65-3.71 (m, 2H), 4.44 (d, 1H, J = 11.7 Hz), 4.96 (brs, 1H), 5.26-5.35 (m, 2H), 5.75 (t, 1H, J = 7.1 Hz), 7.33-7.40 (m, 6H), 7.49-7.53 (m, 3H), 7.98-8.05 (m, 6H).

[108] **(2) 5,6-다이하이드로에르고스테롤 자일로스의 제조**

[109] 2,3,4-트라이벤조일 자일로피라노실 다이하이드로에르고스테롤 (0.7 g)을 메틸렌클로라이드 (12 ml)와 메탄올 (6 ml)에 녹인 뒤 0.5M NaOMe (6.6 ml)를 넣고 실온에서 3시간 동안 교반하였다. Dowex Mac-3를 넣어서 중화시킨 뒤 여과하여 여과액을 감압농축 하였다. 컬럼크로마토그래피로 정제하여 생성물을 86%의 수율로 얻었다.

[110] 녹는 점, 수소 NMR 및 탄소 NMR 피크는 하기에 제시한 바와 같다.

[111] 녹는점: 220-224°C

[112] **¹H NMR** (300 MHz, Pyridine-d₅) δ 0.59 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.89 (dd, 6H, J = 2.2, 6.8 Hz), 0.99 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 1.08 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 1.19-1.53 (m, 11H), 1.62-1.79 (m, 8H), 1.88-1.94 (m, 2H), 1.99-2.02 (m, 2H), 2.12-2.16 (m, 1H), 3.80 (t, 1H, J = 10.2Hz), 3.97 (brs, 1H), 4.09 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 4.24-4.37 (m, 2H), 4.42-4.47 (m, 1H), 4.95 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 5.19 (brs, 1H), 5.26 (t, 1H, J = 7.5 Hz).

[113] **¹³C NMR** (75 MHz, Pyridine-d₅) δ 12.28, 13.06, 17.83, 19.83, 20.14, 21.37, 21.75, 23.27, 28.54, 30.03, 30.17, 33.33, 34.56, 34.81, 37.41, 39.59, 40.31, 40.86, 43.05, 43.47, 49.56, 55.28, 56.06, 67.22, 71.26, 75.16, 77.36, 78.61, 103.20, 117.85, 132.06, 136.19, 139.59.

[114] <실시예 5> 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 세포 독성 확인

[115] 인간의 피부 각질세포주인 HaCaT 세포에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 및 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal)의 세포 독성 여부를 확인하였다.

[116] 2.0×10⁴ 개의 세포를 96-웰 마이크로플레이트에 옮기고, 10%(v/v)의 FBS가 포함된 DMEM에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (10, 20, 50, 100 μg/ml)를 처리하고 24시간 동안 더 배양하였다. 배양된 세포에 1mg/ml 농도의 MTT가 포함된 배지를 넣어 준 후 1시간 반응시키고 570nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 MTT assay를 통해 확인하였다.

[117] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 바와 같이 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal)의 농도가 0-100 μg/ml 일 때 HaCaT 세포의 생육에 별다른 영향을 주지 못함을 확인하였다.

- [118] <실시예 6> 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 CCL-17 및 CCL-22 발현 증가 억제 효과 확인
- [119] HaCaT 세포에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 및 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal) 처리에 따라 염증 유도 분자로 알려져 있는 TNF- α 및/또는 IFN- γ 에 의해 유도되는 CCL-17 및 CCL-22의 발현 감소 효과를 확인하였다.
- [120] 1X10⁶ 개의 HaCaT 세포를 6-웰 마이크로 플레이트에 옮기고 10%(v/v)의 FBS가 포함된 DMEM에서 12시간 동안 배양하고 PBS로 세척한 후 serum free media 2ml에 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal)를 각각 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml 농도로 1시간 처리하였다. 그 후, 염증 유도 분자인 TNF- α , IFN- γ , 또는 TNF- α 및 IFN- γ 를 처리한 다음 18시간동안 더 배양하였다.
- [121] RNA 수준에서 CCL-17 및 CCL-22의 발현 변화를 확인하기 위하여 Trizol reagent kit(Invitrogen, Gaithersburg, MD)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 주형으로 역전사를 수행하여 cDNA를 획득하였다. cDNA는 2 μ g에 역전사 완충용액(5mM MgCl 2, 1mM dNTP, 2.5U/ul reverse transcriptase, 및 2.5uM oligo(dT) 15asa primer (omniscrypt RTkit, Qiagen), 0.5 units의 RNase 억제제, 2.5 uM 올리고(dT)(oligo(dT)) 및 2.5 units의 역전사 효소를 첨가하여 37 °C에서 반응하여 cDNA를 획득 하였다.
- [122] 획득한 cDNA를 정량하기 위하여, 하기 표 3의 프라이머를 이용하여 PCT를 수행하고 증폭된 DNA는 1% agarose gel에 의해 확인하였다.
- [123]
- | 프라이머 | 프라이머 서열 |
|---------------------------------|--|
| Foward CCL-17 (서열번호 1) | 5'-CTT CTC TGC AGC ACA TCC-3' |
| Reverse CCL-17 (서열번호 2) | 5'-AAG ACC TCT CAA GGC TTT G-3' |
| Foward CCL-22 (서열번호 3) | 5'-AGG ACA GAG CAT GGC TCG CCT ACA GA-3' |
| Reverse CCL-22 (서열번호 4) | 5'-TAA TGG CAG GGA GGT AGG GCT CCT GA-3' |
| Foward β -actin (서열번호 5) | 5'-GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T-3' |
| Reverse β -actin (서열번호 6) | 5'-GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG.-3' |
- [124] 또한 단백질 수준에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 및 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal)의 효과를 알아보기 위하여, 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal)을 각각 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml 농도로 1시간 처리한 다음, 염증유도 관련 분자인 TNF- α , IFN- γ , 또는 TNF- α 및 IFN- γ 를 처리한 후 18시간 동안 배양하였다. 배지에 존재하는 CCL-17, CCL-22에 대한 단백질 양은 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 확인하였다. 96 웰 플레이트에 2 μ g/ml 포획 항체 (항-CCL17 항체, 항-CCL22 항체) 50 ul 씩을 넣어 2 시간 동안 코팅한 후, 1 % BSA가 포함된 PBS로 1시간 동안 블로킹(blocking) 하였다. 이어서, 회수된 시료를 각각의 웰에 100 ul씩 넣어준 후 2시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척하고 각 웰에 100 ng/well 의

detector 항체 (항-CCL17 항체, 항-CCL22 항체) 50 ul를 넣고 2시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척하고 HRP가 접합된 항체를 1:200으로 희석하여 50 ul씩 넣은 다음 30분 동안 반응시켰다. PBS-T로 충분히 세척한 후에 기질액 (TMB)을 첨가하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [125] 상기 실험 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal) 처리에 따라 농도의존적으로 CCL-17 및 CCL-22의 RNA와 단백질 수준이 감소하는 것을 확인하였다.
- [126] <실시예 7> 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 염증 반응 조절인자 발현 억제 효과 확인
- [127] NF- κ B(nuclear factor kappa B)와 STAT1(Signal transducer and activator of transcription 1)은 TNF- α 및/또는 IFN- γ 에 의한 CCL-17 및 CCL-22 발현 증가에 있어서 중요한 조절인자(regulator)인 바(J.E. Darnell Jr, et al., Science, 264:1415-1421, 1994; A. Dhar, et al., Mol. Cell. Biochem., 234-235:185-193, 2002), 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc) 및 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 (DHE-Gal) 처리에 따른 NF- κ B 및 STAT1의 발현 변화를 확인하였다.
- [128] 1×10^6 개의 HaCaT 세포를 6-웰 마이크로 플레이트에 옮기고 10%(v/v)의 FBS가 포함된 DMEM에서 12시간 동안 배양하고 PBS로 세척한 후 serum free media 2 ml에 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈(DHE-Glc)를 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml 농도로 1시간 처리하였다. 다음으로 TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (10ng/ml), 또는 TNF- α (10 ng/ml) 및 IFN- γ (10 ng/ml)를 처리한 다음 15, 30 그리고 60분 동안 배양하였다. 배양된 세포에 세포 용해 완충용액 (150 ml NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PASE, 1 ug/ml leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 % NP-40, 0.25 % Sodium deoxycholate) 40 ul를 처리하고, 4 °C에서 30분간 방치하였다. 13000 rpm으로 4 °C에서 10분간 원심 분리한 후 상층액으로 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 이어 rabbit-anti-phosphor-p65 항체, rabbit-anti-I κ Ba 항체, rabbit-anti-phosphor-STAT1 항체, rabbit-anti-STAT1 항체, rabbit-anti-actin 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [129] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3 (1시간 처리 시료)에 나타낸 바와 같이 TNF- α 에 의해 자극된 세포는 p65의 인산화(phosphorylation)와 I κ B의 분해(degradation)가 증가되었고 IFN- γ 에 의해 자극된 세포는 STAT1의 인산화가 증가되었으나, 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈 처리에 따라 농도의존적으로 p65 인산화와 I κ B 분해가 감소되었고 STAT1의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다.
- [130] <실시예 8> 아토피 동물모델에서 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글리코시드 유도체의 치료 효과 확인

- [131] 5,6-다이하이드로에르코스테롤 글리코시드 유도체의 아토피 개선 효능을 확인하기 위해, 마우스에서 아토피를 유발하고 5,6-다이하이드로에르코스테롤 글리코시드 유도체의 효과 확인 실험을 수행하였다.
- [132] Balb/c 마우스에 아토피를 유도하였다. 등부위를 제모 후 300 μ l의 1% DNCB를 등 부위에 도포하여 면역 반응을 부스팅 시킨 후 1주일 후 다시 300 μ l의 0.1% DNCB를 주 3회씩 처리를 하였다. 3 주간 아토피를 유도한 후 혈청에서 IgE 수준을 확인한 후 총 5가지의 그룹으로 쥐를 나누었다. 개선 효능을 확인하기 위해 매일 3 주간 인덱션을 병행하면서 5,6-다이하이드로에르코스테롤 글루코즈 50ug 또는 100ug을 포함한 크림을 각 등부위에 처리하였고, 대조군으로는 동일한 양의 크림만을 처리하였다. 마지막 3주간의 처리 후 쥐를 희생하여 아토피 유발 부위인 등 두께 변화, 귀의 병리학적 변화 등을 살펴보았다.
- [133] **8.1. 외관상 효과 확인**
- [134] 5,6-다이하이드로에르코스테롤 글루코즈 처리에 따른 효능을 확인하기 위해 외관상 변화를 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [135] 도 4의 (A)에 나타낸 바와 같이, 아토피를 총 6주간 유도한 대조군 그룹에서 아토피 병변이 크게 증가하여 피부 두께가 상당히 증가되고 각질이 건조되고 세포 피사로 인해 딱지가 많이 형성된 것을 확인하였다. 반면 다이하드로에르코스테롤 글루코즈를 처리하였을 때 눈으로 보이는 모든 증상이 대조군에 비해 크게 완화되어 건강한 상태임을 확인하였다. 또한, 도 4의 (B)에 나타낸 바와 같이, DNCB에 의해 비장과 림프절에서 세포들의 크게 증가하였으나, 5,6-다이하이드로에르코스테롤 글루코즈 처리에 따라 그 정도가 크게 감소된 것을 확인하였다.
- [136] **8.2. 표피층 두께 및 비만세포의 수 변화 확인**
- [137] 환부의 중앙부에서 피부조직을 1 cm x 1 cm 크기로 채취하여, 10% 포르말데하이드 용액에 고정한 다음, 파라핀으로 포매하고 4 μ m의 절편을 제작하였다. 피부 표피의 두께 변화는 H&E 염색을 통해서 확인하였다. H&E 염색에서 처리되는 hematoxylin은 핵을 염색하여 짙은 파란 또는 보라색을 나타내며 eosin은 세포질을 염색하여 붉은 자주빛을 나타낸다. 이를 위해 각 그룹의 쥐의 등에 환부를 잘라 파라핀으로 고정한 후 단면을 잘라 염색을 실시하였다.
- [138] 비만세포의 수는 마우스 환부 중앙부의 피부 조직을 0.5 cm x 1 cm의 크기로 채취하여 IHC zinc fixative formalin-free 용액에 고정하였다. 피부 조직으로 파라핀으로 포매한 후 4 μ m의 두께로 연속 절편을 만들고 각 절편을 폴리-L-라이신(poly-L-lysine)으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 파라핀 제거와 수화과정을 거친 뒤 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색한 다음 광학현미경을 이용하여 200배로 확대하고 3 시야를 선택하여 비만세포의 수를 측정하였다.
- [139] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5의 (A)에서 확인되는 바와 같이, 각 시험 그룹들의 피부를 비교해 보면 대조군과 대비할 때

5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈를 처리한 그룹에서 전체적으로 짙은 파란색 또는 보라색으로 염색된 면역세포의 수가 크게 감소된 것을 확인하였다. 또한, 도 5의 (B)에서 확인되는 바와 같이 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈 처리에 따라 대조군에 비해 비만세포의 수가 감소하는 것을 확인하였다.

[140] **8.3. 혈청 IgE 및 히스티딘 변화 확인**

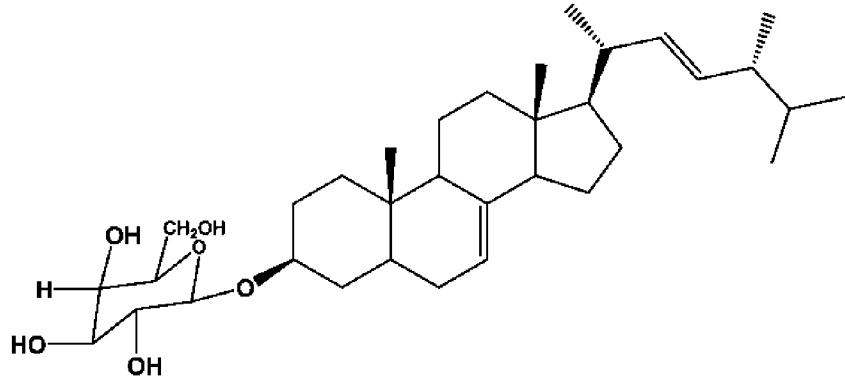
[141] 혈청 IgE 및 히스티딘 농도는 각 군의 마우스의 심장에서 채혈하여, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)법으로 측정하였으며 자세하게는 IgE 및 히스타민 항체가 코팅 되어진 플레이트에 채취한 혈액을 각각 1/250, 1/10 으로 희석하여 2시간 반응한 다음 HRP가 달려있는 2차 항체를 넣어주고 1시간 반응한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 회귀곡선을 사용하여 정량화 했으며 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, DNCB를 처리한 대조군에서 IgE와 히스티딘의 농도가 크게 증가하였으나 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈 처리에 따라 농도 의존적으로 IgE와 히스티딘의 농도가 감소하는 것을 확인하였다.

[142] 상기에서 얻어진 모든 측정치는 평균±표준편차로 산출하였으며, 통계적 유의성 검정은 분산분석법(ANOVA)을 이용하였다. 유의수준은 5% 이하로 하였다.

청구범위

[청구항 1]

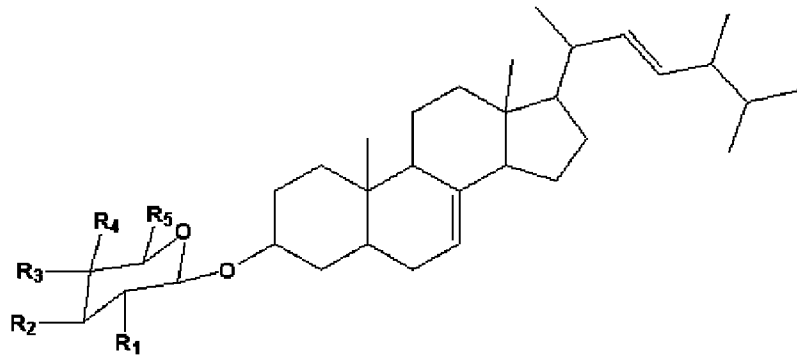
하기 화학식 4의 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 화합물
[화학식 4]



[청구항 2]

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부염 예방
또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



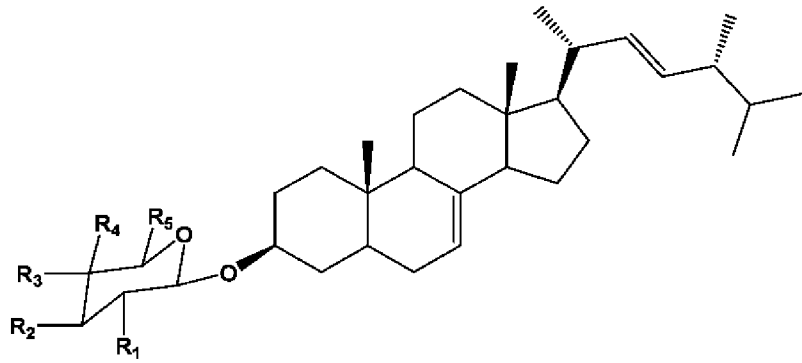
상기 식에서, R₁ 내지 R₅는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를
가짐

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	Nil ₂	OII	OII	II	CI ₂ OII

[청구항 3]

제2항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식
2로 표시되는 화합물인 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 2]



상기 식에서, R_1 내지 R_5 는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH

[청구항 4]

제3항에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은
5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈,
5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 또는
5,6-다이하이드로에르고스테롤 자일로즈 중 선택되는 어느
하나인 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 5]

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피부염은 아토피
피부염, 접촉성 피부염 또는 지루성 피부염 중 선택되는 어느
하나인 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

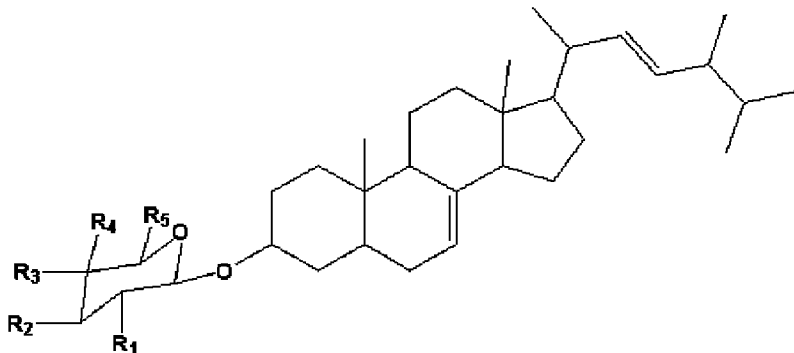
[청구항 6]

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 연고, 겔,
크림, 패취 및 분무제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형인
약제학적 조성물.

[청구항 7]

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부
개선 또는 완화용 화장품 조성물:

[화학식 1]



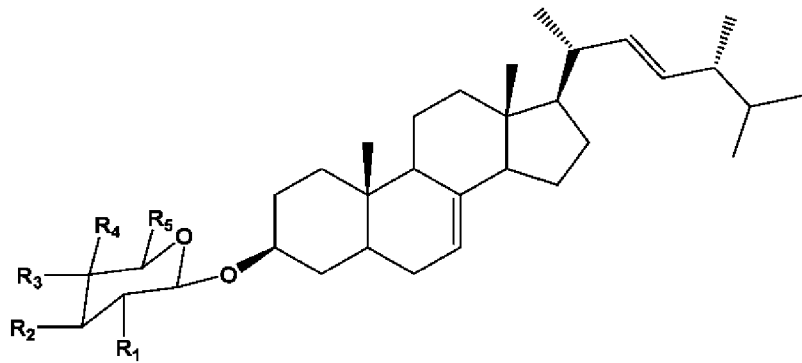
상기 식에서, R_1 내지 R_5 는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1	OII	OII	OII	II	CH_2OII
2	OH	OH	H	OH	CH_2OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH_2	OH	OH	H	CH_2OH

[청구항 8]

제7항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 아토피 피부 개선 또는 완화용 화장품 조성물:

[화학식 2]



상기 식에서 R_1 내지 R_5 는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1	OH	OH	OH	H	CH_2OH
2	OH	OH	H	OH	CH_2OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH_2	OH	OH	H	CH_2OH

[청구항 9]

제7항에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 5,6-다이하이드로에르고스테롤 글루코즈, 5,6-다이하이드로에르고스테롤 갈락토즈 또는 5,6-다이하이드로에르고스테롤 자일로즈로부터 선택되는 어느 하나인 아토피 피부 개선 또는 완화용 화장품 조성물.

[청구항 10]

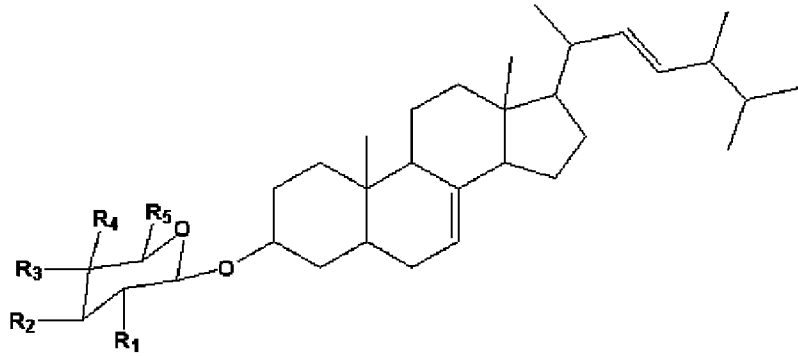
제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형인 아토피 피부 개선 또는 완화용 화장품 조성물.

[청구항 11]

하기 화학식 1의 화합물의 치료학적으로 유효한 양의 투여를

포함하는 피부염 예방 또는 치료 방법:

[화학식 1]



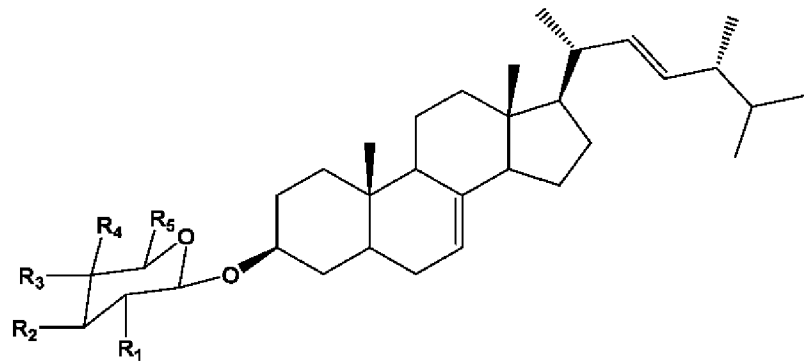
상기 식에서, R₁ 내지 R₅는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH

[청구항 12]

제11항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 피부염 예방 또는 치료 방법:

[화학식 2]



상기 식에서 R₁ 내지 R₅는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH

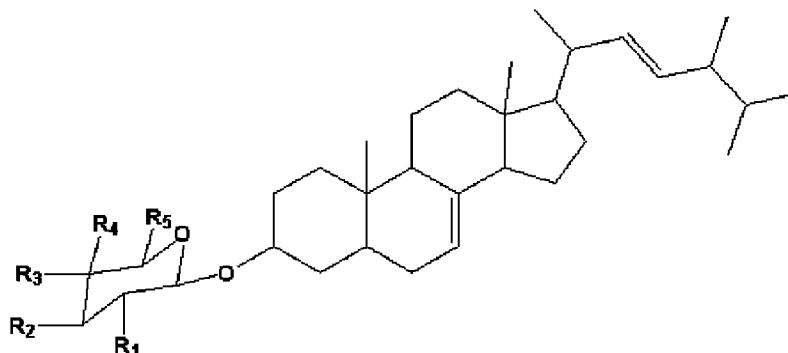
[청구항 13]

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 피부염은 상기 피부염은 아토피 피부염, 접촉성 피부염 또는 지루성 피부염 중 선택되는 어느 하나인 피부염 예방 또는 치료 방법.

[청구항 14]

피부염 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 하기 화학식 1의 화합물의 용도:

[화학식 1]



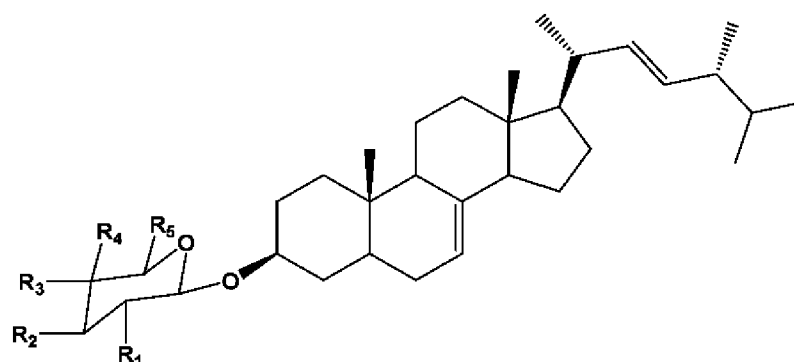
상기 식에서, R₁ 내지 R₅는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH

[청구항 15]

제14항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 피부염 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 하기 화학식 1의 화합물의 용도:

[화학식 2]



상기 식에서 R₁ 내지 R₅는 하기 표에 기재된 구조 중 어느 하나를 가짐

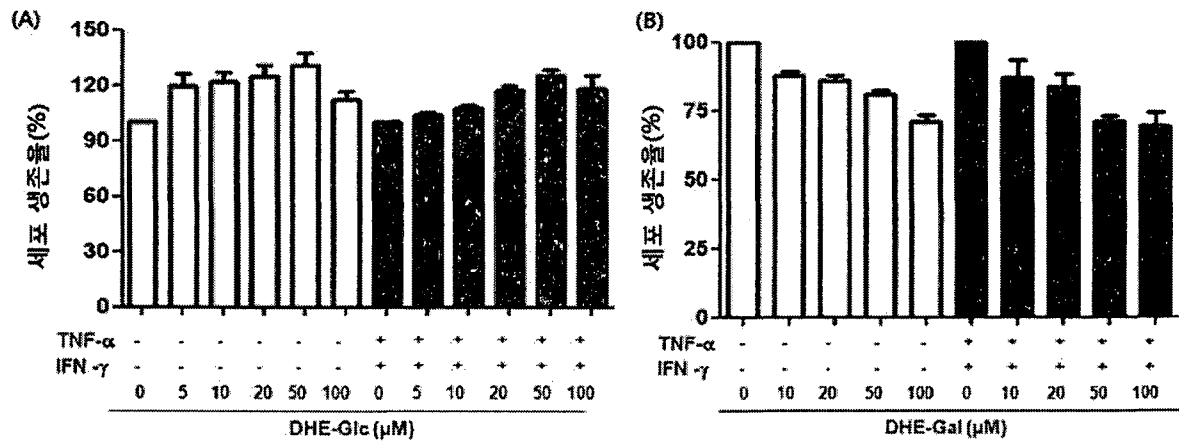
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	OH	OH	OH	H	CH ₂ OH
2	OH	OH	H	OH	CH ₂ OH
3	OH	OH	OH	H	H
4	NH ₂	OH	OH	H	CH ₂ OH

[청구항 16]

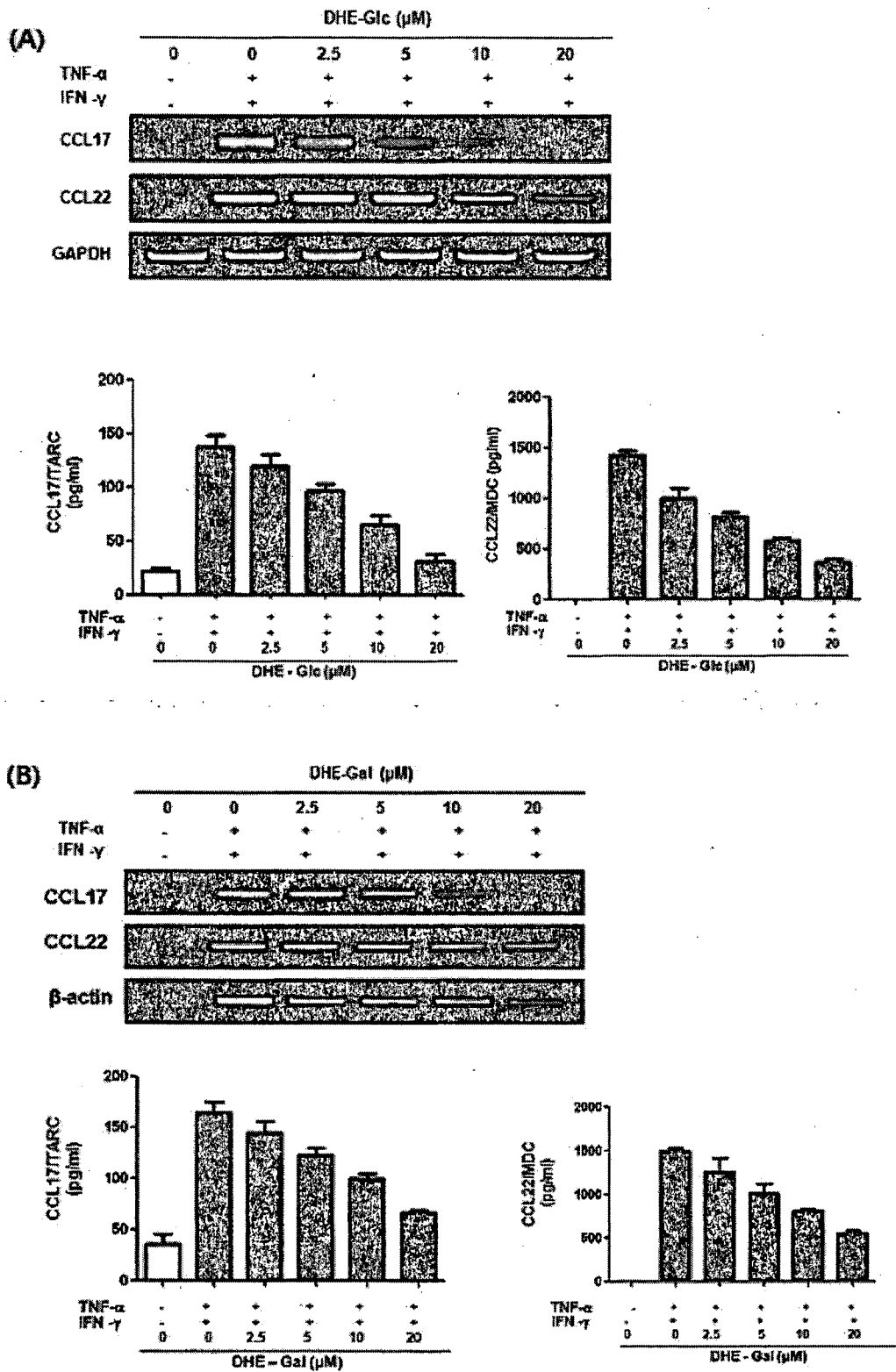
제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 피부염은 아토피 피부염,

접촉성 피부염 또는 지루성 피부염 중 선택되는 어느 하나인
피부염 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 하기 화학식 1의
화합물의 용도.

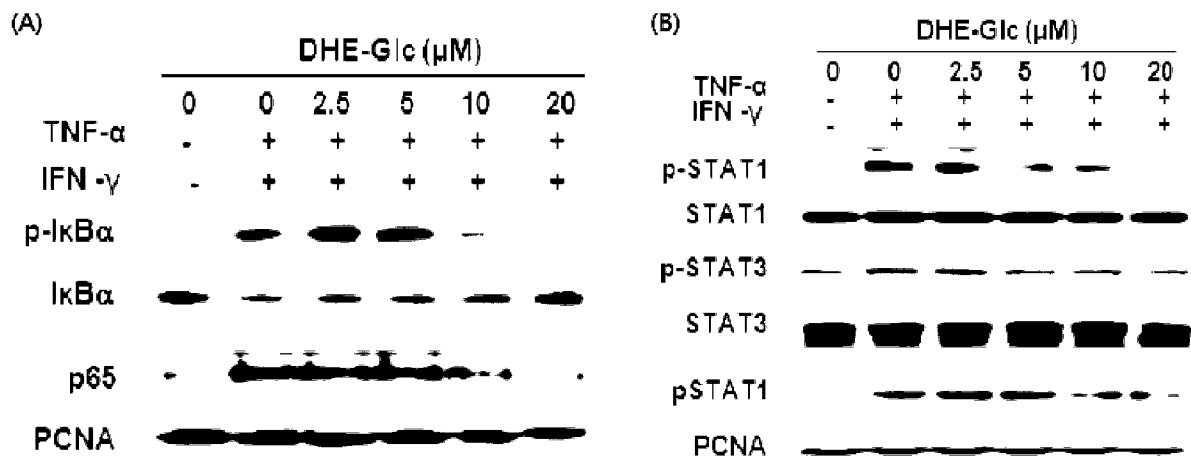
[Fig. 1]



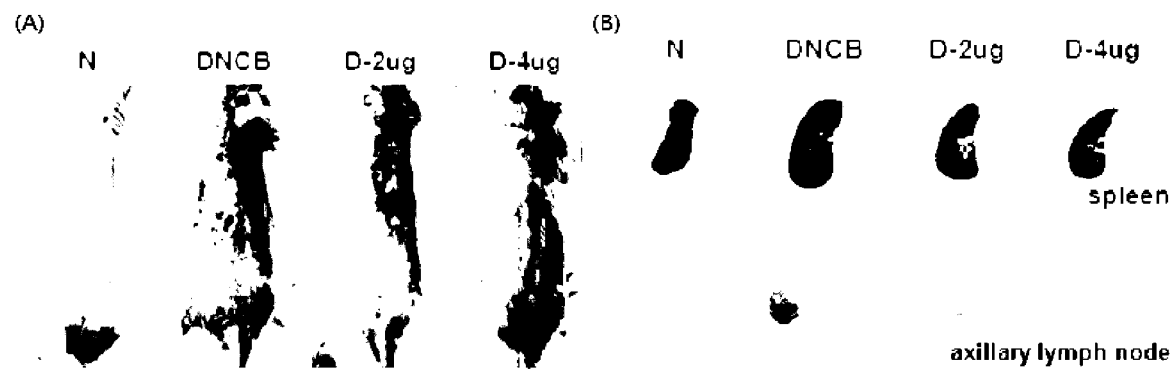
[Fig. 2]



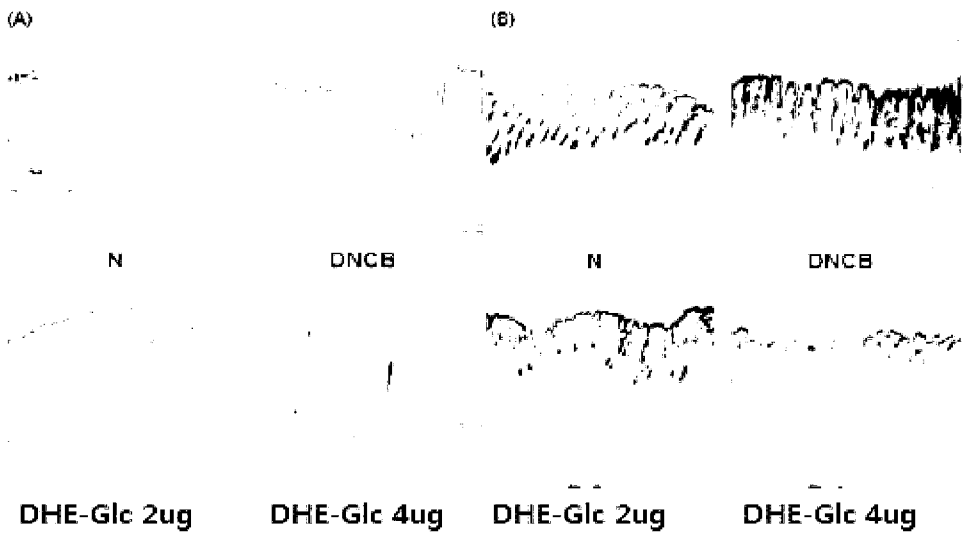
[Fig. 3]



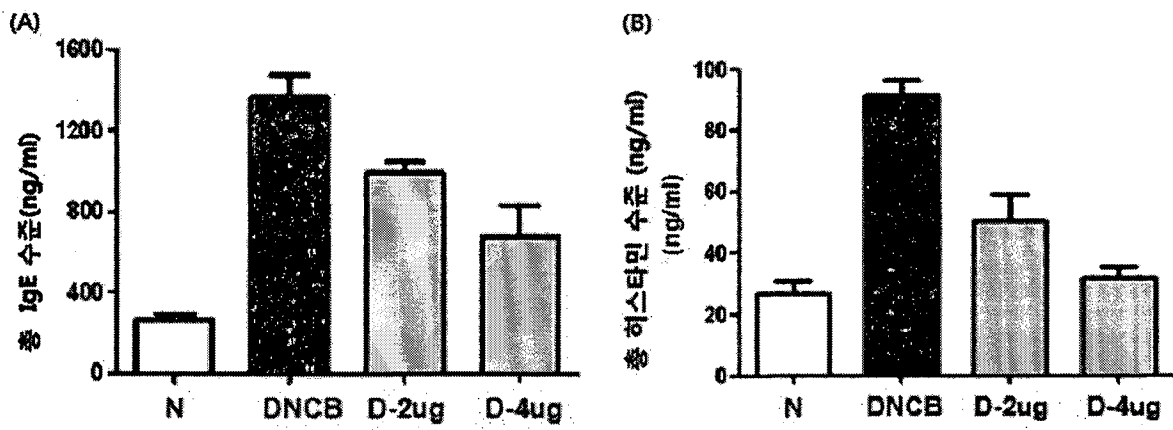
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003429**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07D 309/10(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 309/10; A61Q 19/08; A61K 31/352; A61K 8/60; A61K 36/00; A61K 31/704

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN & Keywords: 5,6-dihydroergosterol, antiinflammation, skin, atopic dermatitis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK, Hoon Gyu et al.. "Synthesis and anti-inflammatory activity of glycosyl 5,6-dihydroergosterol derivatives." The 108th General Meeting of Korean Chemical Society. September 2011 Presentation Code: III-ORGN.P-268 See abstract.	1-10,14-16
X	JUNG, M. et al.. "Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 3-O- β -D-glucopyranosylspinasterol via blocking NF- κ B and STAT1 signaling pathways in TNF- α and IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes." Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012. Vol. 427, pp. 236-241 See abstract, Fig. 1A, pages 236, 241.	2-10,14-16
A	WANDJI, J. et al.. "Fatty Acid Esters of Triterpenoids and Steroid Glycosides from Gambeya africana." Planta Med. 2002. Vol. 68, pp. 822-826 See the entire document.	1-10,14-16
A	KR 10-2013-0051548 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 21 May 2013 See the entire document.	1-10,14-16
A	WO 2010-100933 A1 (NIHON UNIVERSITY) 10 September 2010 See the entire document.	1-10,14-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 JULY 2015 (14.07.2015)

Date of mailing of the international search report

15 JULY 2015 (15.07.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003429

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11-13 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus it is considered that claims 11-13 pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search [PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)].
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/003429

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0051548 A	21/05/2013	NONE	
WO 2010-100933 A1	10/09/2010	JP 05-610179 B2 JP 2010-202602 A	22/10/2014 16/09/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 309/10(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 309/10; A61Q 19/08; A61K 31/352; A61K 8/60; A61K 36/00; A61K 31/704

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN & 키워드: 5,6-dihydroergosterol, antiinflammation, skin, atopic dermatitis

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	박훈규 외 1명. "Synthesis and anti-inflammatory activity of glycosyl 5,6-dihydroergosterol derivatives." 대한화학회 제108회 총회 및 학술발표회. 2011.09. 발표코드: III-ORGN.P-268 초록 참조.	1-10,14-16
X	JUNG, M. 외 6명. "Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 3-O-β-D-glucopyranosylspinasterol via blocking NF-κB and STAT1 signaling pathways in TNF-α and IFN-γ-induced HaCaT keratinocytes." Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012. Vol. 427, pp. 236-241 초록, Fig. 1A, 페이지 236, 241 참조.	2-10,14-16
A	WANDJI, J. 외 7명. "Fatty Acid Esters of Triterpenoids and Steroid Glycosides from Gambeya africana." Planta Med. 2002. Vol. 68, pp. 822-826 전문 참조.	1-10,14-16
A	KR 10-2013-0051548 A (경희대학교 산학협력단) 2013.05.21 전문 참조.	1-10,14-16
A	WO 2010-100933 A1 (NIHON UNIVERSITY) 2010.09.10 전문 참조.	1-10,14-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 07월 14일 (14.07.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 07월 15일 (15.07.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



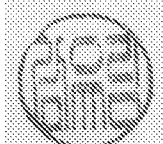
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-8741



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 11-13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제11-13항은 수술 또는 치료에 의한 인체의 치료 및 진단방법에 관한 것이므로 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당하는 것으로 인정됩니다[PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)].
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2013-0051548 A

2013/05/21

없음

WO 2010-100933 A1

2010/09/10

JP 05-610179 B2

2014/10/22

JP 2010-202602 A

2010/09/16