



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0076059
(43) 공개일자 2024년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/5377 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 8/49 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/5377 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0158145

(22) 출원일자 2022년11월23일

심사청구일자 2022년11월23일

(71) 출원인

동서대학교 산학협력단

부산광역시 사상구 주례로 47(주례동,
동서대학교)

(72) 발명자

김동원

부산 해운대구 마린시티2로 38

박유경

부산 사상구 가야대로344번길 60

(74) 대리인

김종석

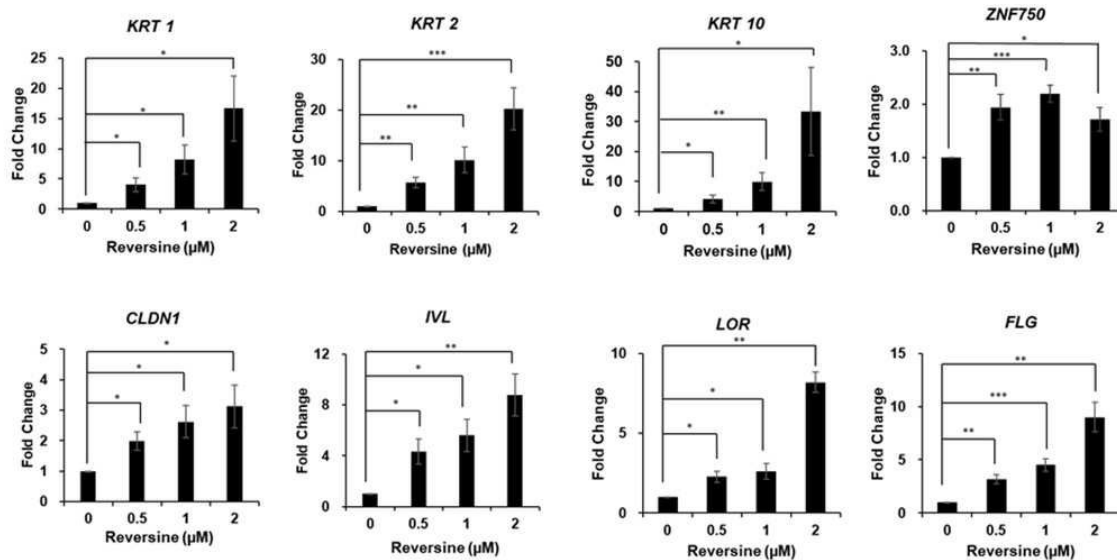
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 리버신을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 리버신을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피부각질세포의 분화 유전자인 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린 (Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)의 발현을 유도하여 피부장벽 기능을 개선하는 효과를 가지는 리버신을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/4953 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345356165
과제번호	LINC3.0-2022-60
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	산학연협력고도화지원
연구과제명	3단계산학연협력선도대학육성사업(LINC3.0)(0.5)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	동서대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은

리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은

리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 흉선 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin) 유전자 발현이 감소하는 것을 특징으로 하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물.

청구항 5

리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 리버신을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피부각질세포의 분화 유전자인 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)의 발현을 유도하여 피부 장벽 기능을 개선하는 효과를 가지는 리버신을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 조성물에

관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 아토피 피부염은 피부 소양감, 피부 발적, 태선화 및 피부 감염 등의 임상 소견을 나타내는 질환으로, 이의 발병 원인은 피부장벽을 구성하는 필라그린(Filaggrin) 유전자 돌연변이에 의한 유전적 요인과 혈액 내의 면역글로불린E(IgE)가 증가하는 면역학적 요인 및 환경적 요인 등이 있다.
- [0004] 현재 아토피 피부염에 사용되는 치료제로는 국소 스테로이드제, 항히스타민제, 국소 면역조절제 등이 있다. 국소 스테로이드제는 아토피 피부염의 기본적인 효과적인 치료제이지만, 피부 조직을 약화시켜 피부의 과민반응이 증가하고, 장기투여 시 약물에 대한 반응성이 낮아져서 더 높은 농도의 스테로이드제를 사용해야 한다는 부작용이 있다. 또한, 약물 투여를 중단할 경우 대다수의 사람에게서 아토피 증상이 더욱 심하게 나타나는 단점이 있다. 이와 같은 이유로 아토피 피부염에 대한 새로운 치료제 개발의 필요성이 커지는 추세이다.
- [0005] 리버신(Reversine)은 Peter G. Schultz가 개발한 소분자로, 세포 주기 조절 및 세포질 분열과 관련하여 리버신의 역할이 연구되었으며, 주요 기능으로는 줄기세포 역분화 및 세포 주기 조절 등이 있다. 또한, 리버신은 여러 종양 세포주에 대한 암세포 선택적 사멸 효과가 밝혀지면서 항암제로 활용될 가능성도 존재한다.
- [0006] 이에, 리버신을 이용한 다능성 세포의 제조방법 및 리버신을 포함하는 세포 리프로그래밍 유도용 조성물에 대해서는 개시된 바 있지만, 리버신(Reversine)의 아토피 예방, 개선 또는 치료 효과에 대해서는 전혀 개시되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1731624호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 본 발명의 기재로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 케라틴1(KRT1), 케라틴2(KRT2), 케라틴10(KRT10), 인볼루크린(IVL), 아연집게단백질 750(ZNF750), 클라우딘1(CLDN1), 로리크린(LOR) 및 필라그린(FLG)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는

것을 특징으로 한다.

- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 형성된 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin) 유전자 발현이 감소하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적, 화장품 및 건강기능식품 조성물에 언급된 모든 사항은 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물은 아토피성 피부염 환자에게서 저하되는 케라틴1(KRT1), 케라틴2(KRT2), 케라틴10(KRT10), 인볼루크린(IVL), 아연집게단백질 750(ZNF750), 클라우딘1(CLDN1), 로리크린(LOR) 및 필라그린(FLG) 유전자의 발현을 증가시킴으로써 피부장벽 기능을 개선하는 의약품으로 활용될 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물은 아토피 및 건선 피부의 소양증 완화용 화장품으로 활용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 청구범위의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자들의 발현 변화를 나타내는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자들의 발현 변화를 나타내는 웨스턴 블롯(Western blot) 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 리버신의 피부각질세포 분화 유도 효과를 나타낸 세포 사진이다.
- 도 4는 리버신의 세포독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자 발현 회복 효과를 나타낸 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 결과 그래프이다.
- 도 6은 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자 발현 회복 효과를 나타낸 웨스턴 블롯(Western blot) 결과 사진이다.
- 도 7은 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자의 발현 조절에 따른 구체적인 기전을 확인한 웨스턴 블롯(Western blot) 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 8은 리버신의 TSLP 유전자 발현 억제 효과를 확인한 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 리버신의 TSLP 유전자 발현 억제 효과를 확인한 면역형광법 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상

세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0027] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0029] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에서는, 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자의 발현 증가를 mRNA 수준에서 확인하였으며, 상기 분화 유전자는 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)일 수 있다 (실시예 1 및 도 1 참조).

[0032] 본 발명의 다른 실시예에서는, 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자의 발현 증가를 단백질 수준에서 확인하였으며, 상기 분화 유전자는 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴10(Keratin 10; KRT10) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)일 수 있다 (실시예 2 및 도 2 참조).

[0033] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 리버신에 의한 흉선 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 유전자의 발현 감소를 mRNA 수준에서 확인하였다 (실시예 3 및 도 8 참조).

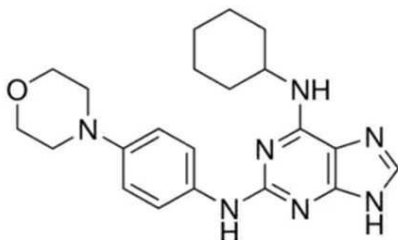
[0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 리버신에 의한 흉선 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 유전자의 발현 감소를 면역형광법으로 확인하였다 (실시예 4 및 도 9 참조).

[0036] 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물

[0037] 이에, 본 발명은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 리버신(Reversine)은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있으며, 2-(4-모르폴리노아닐리노)-6-사이클로헥시아미노퓨린(2-(4-Morpholinoanilino)-6-cyclohexylaminopurin)일 수 있다.

화학식 1



[0040]

[0042] 본 발명에서 “약학적으로 허용가능한 염”이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서, 이 염에 기인한 부작용이 리버신(Reversine)의 아토피 예방, 개선 또는 치료 효과를 저하시키지 않는 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 말하며, 예컨대 유리산으로는 유기산과 무기산 또는 무독성 염류 등을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루

엔셀폰산, 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 석신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미하며, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 케라틴 1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 흉선 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin) 유전자 발현이 감소하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0047] 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물

[0048] 또한, 본 발명은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 화장수, 토너, 에센스, 크림, 팩, 젤, 로션, 연고, 패취, 폼, 스프레이, 파우더, 비누, 입욕제, 분무제, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워젤, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 자외선차단용 화장품, 클렌징밀크, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제, 크림비누, 페이스워시, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔 또는 치약 등의 형태로 제형화되어 사용될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 상기 화장품 조성물은 통상적으로 화장품 조성물의 제조에 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제, 증점제, 향산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 향진균제를 포함할 수 있다.

[0052] 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물

[0053] 또한, 본 발명은 리버신(Reversine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 건강기능식품 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제형화되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 건강기능식품 조성물에는 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 포함할 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.

[0058] **실시예 1. mRNA 수준에서 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자 발현 변화 확인**

[0059] 리버신(Reversine)의 아토피 피부염 예방, 개선 또는 치료 효과를 확인하기 위해, 피부각질세포에서 피부각질세포가 분화할 때 발현되는 대표적인 유전자 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. 상기 실시예 1에서 사용된 세포는 Neonatal human epidermal keratinocytes (NHEK)으로 Lonza Bioscience(Walkersville, USA)에서 제공받은 피부각질세포를 사용하였으며, 리버신은 Sigma Aldrich Korea에서 구매하여 사용하였다.

[0060] 이하, 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자 발현 변화를 mRNA 수준에서 확인한 방법에 대해 상세히 기술한다. 상기 NHEK 세포를 6 well plate에 1.5×10^5 cells/well 만큼 분주하고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 리버신을 농도별로 0, 0.5, 1 또는 2 μM로 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 NHEK 세포를 이용하여 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)의 발현 변화를 확인하기 위하여 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative real-time PCR; qRT-PCR)을 실시하였다. 상기 리버신을 처리한 NHEK 세포의 RNA는 Quick-RNA Micro Prep Kit (R1051; ZYMO Research, USA)를 사용해 분리하였고, 상기 분리된 RNA의 농도와 순도는 INNO-M microplate spectrophotometer를 이용하여 분석하였으며, High-capacity cDNA Kit with RNase inhibitor Kit (4374966; ThermoFisher Scientific)의 매뉴얼에 따라상기 분리된 RNA 1 내지 2 μg을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 상기 합성된 cDNA는 TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (4444557; ThermoFisher Scientific, USA)와 Taqman Probe (ThermoFisher Scientific)와 함께 제조사의 지침에 따라 QuantStudio3 (A28132, ThermoFisher Scientific) 기기에서 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)이 실행되었다. 본 연구의 분석에 사용된 유전자는 사람 KRT1 (Hs00196158_m1), KRT2(Hs00166294_m1), KRT10 (Hs00166289_m1), FLG (Hs00856927_g1), CLDN1(Hs00221623_m1), ZNF750(Hs01563263_g1), IVL(Hs00846307_s1) 및 LOR (Hs01894962_s1)를 사용하였으며 housekeeping gene인 ribosomal protein large P0 (RPLP0, Hs00420895)를 loading control로 사용하였다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)은 50℃에서 5분간 불활성화 하고 95℃에서 20초간 pre-denaturation, 95℃에서 3초 denaturation, 60℃에서 20초 동안 annealing/extension 과정을 40회씩 반복하여 cDNA를 증폭한 뒤 분석하였다. 상기 실시예 1의 결과에 대한 통계적 유의성은 양측 student *t*-test로 분석하였다. *p*-value는 0.05 이하의 값을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 실험결과는 3회 이상 반복 실험을 하여 모든 데이터는 평균과 평균의 ± 표준오차(standard error of the mean: SEM)로 수치화 하였다. 상기 실시예 1의 결과를 도 1에 그래프로 나타내었다.

[0061] 본 실시예 1의 결과, 피부각질세포에 리버신을 농도별로 0, 0.5, 1 또는 2 μM으로 처리했을 때, 피부각질세포의 대표적인 분화 유전자인 케라틴1(Keratin 1; KRT1), 케라틴2(Keratin 2; KRT2), 케라틴10(Keratin 10; KRT10), 아연집게단백질750 (Zinc finger protein 750; ZNF750), 클라우딘1(Cloudin1; CLDN1), 인볼루크린(Involucrin; IVL), 로리크린(Loricrin; LOR) 및 필라그린(Filaggrin; FLG)의 mRNA 발현이 mRNA 수준에서 리버신 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다.

[0063] **실시예 2. 단백질 수준에서 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자 발현 변화 확인**

[0064] 리버신(Reversine)의 아토피 피부염 예방, 개선 또는 치료 효과를 확인하기 위해, KRT1, KRT10, 및 FLG 유전자의 발현을 단백질 수준에서 확인하였다. 상기 실시예 2에서 사용된 세포는 상기 실시예 1에서 사용된 NHEK 세포로 동일하게 준비하였고, 리버신도 상기 실시예 1와 동일하게 준비하였다.

[0065] 이하, 리버신에 의한 피부각질세포 분화 유전자 발현 변화를 단백질 수준에서 확인한 방법에 대해 상세히 기술한다. 상기 NHEK 세포를 6 well plate에 1.5×10^5 cells/well 만큼 분주하고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 리버신을 농도별로 0, 0.5, 1 또는 2 μM로 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포를 이용하여 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10) 및 필라그린(FLG) 유전자의 단백질 발현 변화를 웨스턴 블

롯을 통해 확인하였고, loading control로 베타-액틴(β -actin)을 사용하였다.

[0066] 이하, 상기 웨스턴 블롯의 실험방법에 대해 상세히 설명한다. 상기 리버신을 처리한 NHEK 세포의 단백질을 스크랩퍼를 이용하여 수확하고 Xpert protease inhibitor Cocktail Solution이 포함된 RIPA Lysis and Extraction Buffer(89900, Thermo fisher science)를 첨가한 뒤, Q125 sonicator(QSonic, USA)를 사용해 cell lysis를 진행하였다. 상기 lysis가 완료된 Cell lysate은 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리한 후, 상등액만 다음 실험에 사용하였다. 상기 상등액은 BCA 분석(Pierce™BCA Protein Assay Kit, #Cat 23225)을 통해 정량하여 총 20 μ g의 단백질을 NuPAGE™ Sample Reducing Agent(NP0004, Invitrogen)와 Bolt™ LDS Sample Buffer(B0007, Invitrogen)에 섞어 95°C에서 10분간 가열시킨 후 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 이후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes(10600021, 0.2 μ m, Cytiva)에 30 volt의 전류로 1 시간 동안 단백질을 transfer하였다. 상기 transfer한 membrane은 TBS-T (Tris-Buffered Saline with 1% Tween 20)에 5% Non-Fat Powdered Milk(NFDM, F141511-0250, Cellconic)을 이용해 1시간 동안 blocking하고, 4°C에서 15시간 동안 1차 항체와 반응시켰다. 상기 1차 항체는 beta-Actin (C4)-mouse monoclonal antibody(sc-47778, Santa Cruz Biotechnology), KRT1(E-12)- mouse monoclonal antibody(sc-376224, Santa Cruz Biotechnology), KRT10 (RKSE60)- mouse monoclonal antibody(sc-23877, Santa Cruz Biotechnology) 및 FLG (AE21)- mouse monoclonal antibody(sc80609, Santa Cruz Biotechnology)을 사용하였다. 상기 1차 항체를 반응시킨 membrane은 TBS-T를 사용해 씻어내고 2차 항체를 결합시켜 1시간 동안 반응시켰다. 상기 2차 항체를 반응시킨 Membrane에 있는 단백질의 확인은 SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate(Cat# 34580, Thermo Scientific)를 사용하여 iBright imaging system (Invitrogen)에 의해 분석하였다. 상기 실시예 2의 결과를 도 2에 그림으로 나타내었다.

[0067] 본 실시예 2의 결과, 피부각질세포에 리버신을 농도별로 0, 0.5, 1 또는 2 μ M으로 처리했을 때, 피부각질세포의 대표적인 분화 유전자인 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10) 및 필라그린(FLG)의 발현이 단백질 수준에서 리버신 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다.

[0069] 실험예 1. 리버신의 피부각질세포 분화 유도 효과 확인

[0070] 리버신에 의해 피부각질세포의 분화가 유도되는지를 확인하기 위해 실험예 1을 실시하였다. 상기 피부각질세포는 Neonatal human epidermal keratinocytes(NHEK)으로 Lonza Bioscience(Walkersville, USA)에서 제공받은 피부각질세포를 사용하였으며, 상기 NHEK 세포의 배지로 KGM(Keratinocyte growth media for undifferentiation), KBM(Keratinocyte basal media for differentiation) 또는 대조군용 배지를 사용하였다. 상기 대조군용 배지는 Keratinocyte basal media(KBM, CC-3101)에 bovine pituitary extract 2 mL, hEGF 0.5 mL, recombinant human Insulin 0.5 mL, Hydrocortisone 0.5 mL, gentamicin, amphotericin-B 0.5 mL이 포함된 KGM SingleQuots™ supplements(CC-4131)을 사용하였다. 상기 NHEK 세포를 상기 KGM, KBM 또는 대조군용 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 리버신 처리군에는 리버신 2 μ M을 처리하였다. 상기 KGM, KBM 또는 대조군용 배지를 사용하여 배양한 NHEK 세포와 리버신을 처리한 세포의 형태를 비교하였으며, 상기 실험예 1의 결과를 도 3에 그림으로 나타내었다.

[0071] 본 실험예 1의 결과, 리버신을 처리한 세포의 경우 KBM에서 배양한 세포의 형태와 비슷하였다. KGM은 피부각질세포 성장 배지로서 피부각질세포의 분화를 억제하고, KBM은 배지 내 성장인자가 없기 때문에 피부각질세포의 분화를 유도한다. 상기 리버신을 처리한 세포는 KBM에서 배양한 세포의 형태와 비슷한 바, 이는 리버신에 의해 피부각질세포의 분화가 유도된 것을 의미한다.

[0073] 실험예 2. 리버신의 세포독성 평가

[0074] 리버신의 세포독성을 평가하기 위해 실험예 2를 실시하였다. 상기 피부각질세포는 Neonatal human epidermal keratinocytes(NHEK)으로 Lonza Bioscience(Walkersville, USA)에서 제공받은 피부각질세포를 사용하였으며, 96 well plate에 상기 NHEK 세포를 1.0×10^4 cells/well만큼 분주하고 24시간 동안 배양한 뒤 KGM 배양배지에 리버신을 농도별로 0, 0.5, 1 또는 2 μ M만큼 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포의 리버신이 처리된 배지를 제거하고 KGM과 CCK-8(Cell counting kit-8) 시약을 9:1의 비율로 섞어 총 100 μ l씩 각 well에 처리하였다. 상기 CCK-8을 반응시킨 세포를 3시간 동안 배양한 뒤, 450 nm 파장에서

INNO-M microplate spectrophotometer(LTek)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상기 실험에 2의 결과를 도 4에 그래프로 나타내었으며, 리버신에 의한 세포 독성은 리버신을 처리하지 않은 대조군에 대비하여 계산되었다.

[0075] 본 실험에 2의 결과, 리버신을 농도별로 0, 0.5, 1 또는 2 μM 만큼 처리하였을 때, 리버신에 의한 세포독성은 나타나지 않았다.

[0077] **실험예 3. mRNA 수준에서 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자 발현 회복 효과**

[0078] 아토피 피부염의 병태생리학적 특성에 관여하는 사이토카인 중 하나인 인터루킨(Interleukin; IL) 4 및 13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자들의 mRNA 발현이 리버신에 의해 변화하는지를 확인하기 위해 실험예 3을 실시하였다. 상기 실험예 3에 사용된 세포는 Neonatal human epidermal keratinocytes (NHEK)으로 Lonza Bioscience(Walkersville, USA)에서 제공받은 피부각질세포를 사용하였으며, 리버신은 Sigma Aldrich Korea에서 구매하여 사용하였다. 재조합 인간 IL-4 단백질(recombinant human IL-4; Cat# P05112, Lot# NCL0621011)은 bio-technie에서 제작된 것을 사용하였으며, 재조합 인간 IL-13 단백질(recombinant human IL-13; Cat# 200-13, Lot# 102123)은 Peprotech으로부터 공급받아서 사용하였다.

[0079] 이하, 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자 발현 회복 효과를 mRNA 수준에서 확인한 방법에 대해 상세히 기술한다. 상기 NHEK 세포를 6 well plate에 1.5×10^5 cells/well 만큼 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 리버신은 1 μM 의 농도로 처리하였고, 상기 IL-4 및 IL-13은 각각 10 ng/mL의 농도로 동시에 처리하였으며, 상기 리버신 및 IL-4/IL-13을 처리한 세포를 72시간 동안 배양하였으며, 상기 배양한 세포를 이용하여 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10), 인볼루크린(IVL) 및 필라그린(FLG) 유전자의 발현 변화를 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative real-time PCR; qRT-PCR)을 통해 확인하였다. 상기 정량적 실시간 중합효소연쇄반응은 상기 실시예 1에 사용한 방법과 동일하게 실시하였다. 상기 실험예 3의 결과를 도 5에 그래프로 나타내었다.

[0080] 본 실험예 3의 결과, IL-4/IL-13에 의해 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10), 인볼루크린(IVL) 및 필라그린(FLG)의 mRNA 발현이 감소하였으며, 상기 IL-4/IL-13에 의해 감소한 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10), 인볼루크린(IVL) 및 필라그린(FLG)의 mRNA 발현은 리버신에 의해 다시 회복하는 것을 확인하였다.

[0082] **실험예 4. 단백질 수준에서 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자 발현 회복 효과**

[0083] 아토피 피부염의 병태생리학적 특성에 관여하는 사이토카인 중 하나인 인터루킨(Interleukin; IL) 4 및 13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자들의 단백질 발현이 리버신에 의해 변화하는지를 확인하기 위해 실험예 3을 실시하였다. 상기 실험예 4에 사용된 세포, 리버신, IL-3 및 IL-13은 상기 실험예 3과 동일하게 준비하였다.

[0084] 이하, 리버신의 IL-4/IL-13에 의해 억제된 피부각질세포 분화 유전자 발현 회복 효과를 단백질 수준에서 확인한 방법에 대해 상세히 기술한다. 상기 NHEK 세포를 6 well plate에 1.5×10^5 cells/well 만큼 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 리버신은 1 μM 의 농도로 처리하였고, 상기 IL-4 및 IL-13은 10 ng/mL의 농도로 동시에 처리하였으며, 상기 리버신 및 IL-4/IL-13을 처리한 세포를 72시간 동안 배양하였으며, 상기 배양한 세포를 이용하여 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10) 및 필라그린(FLG) 유전자의 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였고, loading control로 베타-액틴(β -actin)을 사용하였다. 상기 웨스턴 블롯 실험 방법은 상기 실시예 2와 동일하게 실시하였으며, 상기 실험예 4의 결과를 도 6에 그림으로 나타내었다.

[0085] 본 실험예 4의 결과, IL-4/IL-13에 의해 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10) 및 필라그린(FLG)의 단백질 발현이 감소하였으며, 상기 IL-4/IL-13에 의해 감소한 케라틴1(KRT1), 케라틴10(KRT10) 및 필라그린(FLG)의 단백질 발현은 리버신에 의해 다시 회복하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 실험예 4에서 loading control로 사용한 베타-액틴의 발현량은 리버신에 의해 변하지 않는 것을 확인하였다.

[0087] **실험예 5. 리버신의 FLG 유전자 발현을 억제하는 구체적인 기전 확인**

[0088] 상기 실험예 4에서 리버신이 IL-4/IL-13에 의해 억제된 필라그린(FLG) 유전자 발현을 회복하는 것을 확인하였다. 상기 실험예 4의 결과의 구체적인 기전을 알아보기 위해 실험예 5를 실시하였다. IL-4 및 IL-13은

수용체에 결합하여 STAT6 단백질의 인산화를 유도하여 FLG 유전자 발현을 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서 리버신이 STAT6을 통해 FLG 유전자 발현을 억제하는지를 상기 실험에 5를 통해 확인하였다. 상기 실험에 5에서 사용한 NHEK 세포, 리버신, IL-3 및 IL-13은 상기 실험에 3과 동일하게 준비하였다.

[0089] 상기 NHEK는 6-well plate에 2.0×10^5 cells/well만큼 분주하였으며, STAT6 인산화 억제를 유도하기 위해 1 μ M의 리버신을 1시간 동안 전 처리한 뒤, IL-4/IL-13 10 ng/ml을 30분 동안 반응시켰다. 상기 리버신 및 IL-4/IL-13을 처리한 세포를 수집하여 western blot 실험으로 STAT6 인산화 수준을 확인하였다. 상기 웨스턴 블롯 실험방법은 상기 실시예 2와 동일하게 실시하였으며, STAT6 및 인산화된 STAT6(PY641)의 항체로는 Total-STAT6-rabbit monoclonal antibody(5397S, Cell Signaling Technology) 및 Phospho-STAT6-Y641-mouse monoclonal antibody(558241, BD Bioscience)을 사용하였다. 본 실험에 5의 결과를 도 7에 그림으로 나타내었다.

[0090] 본 실험에 5의 결과, 피부각질세포에서 리버신에 의해 STAT6의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다.

[0092] 실시예 3. mRNA 수준에서 리버신에 의한 TSLP 유전자 발현 억제

[0093] 리버신(Reversine)의 피부 가려움증 완화 효과를 확인하기 위해, 피부각질세포에서 리버신에 의한 흉선 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 유전자 발현 변화를 mRNA 수준에서 확인하였다. 상기 실시예 3에서 사용된 NHEK 세포, 리버신, 재조합 인간 IL-4 단백질 및 재조합 인간 IL-13 단백질은 상기 실험에 3과 동일하게 준비하였으며, Poly(I:C) (PIC)는 InvivogenTM에서 구매하여 준비하였다.

[0094] 이하, 리버신에 의한 TSLP 유전자 발현 변화를 mRNA 수준에서 확인한 방법에 대해 상세히 기술한다. 상기 NHEK 세포를 12 well plate에 8.0×10^4 cells/well 만큼 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 Poly(I:C) 5 μ g/mL, IL-4 및 IL-13을 각각 10 ng/mL의 농도로 처리하여 TSLP 발현을 유도하였다. 리버신의 TSLP 억제 효과를 확인하기 위해, 상기 TSLP 발현을 유도한 세포에 리버신 1 μ M을 동시에 처리하여 12시간 동안 반응시켰다. 상기 리버신을 처리한 세포를 이용하여 TSLP 유전자의 발현 변화를 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative real-time PCR; qRT-PCR)을 통해 확인하였다. 상기 정량적 실시간 중합효소연쇄반응은 상기 실시예 1에 사용한 방법과 동일하게 실시하였다. 상기 실시예 3의 결과를 도 8에 그래프로 나타내었다.

[0095] 본 실시예 3의 결과, 피부각질세포에서 Poly(I:C)에 의해 TSLP 유전자 발현이 증가하며, IL-13/IL-14에 의해 TSLP 유전자 발현이 더 증가하였다. 하지만, 리버신을 처리하면 TSLP 유전자 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

[0097] 실시예 4. 면역형광법을 통한 리버신에 의한 TSLP 단백질 발현 억제 효과 확인

[0098] 리버신(Reversine)의 피부 가려움증 완화 효과를 확인하기 위해, 피부각질세포에서 리버신에 의한 흉선 기질상 림포포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 단백질을 발현 변화를 면역형광법을 사용하여 확인하였다. 상기 실시예 4에서 사용한 NHEK 세포, 리버신, 재조합 인간 IL-4 단백질, 재조합 인간 IL-13 단백질 및 Poly(I:C)는 상기 실시예 3과 동일하게 준비하였다.

[0099] 이하, 리버신에 의한 TSLP 단백질 발현 변화를 면역형광법으로 확인한 방법에 대해 상세히 기술한다. 상기 NHEK 세포는 NuncTM Lab-TekTM II Chamber SlideTM System(154461PK, Thermo ScientificTM)에 2.0×10^4 cells/well 만큼 분주하고 24시간 후에 상기 Poly(I:C) 5 μ g/mL, IL-4/IL13 10 ng/mL과 reversine 1 μ M을 처리하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 12시간동안 배양하였다. 상기 Poly(I:C), IL-4/IL-13, 리버신을 처리한 세포는 4% 파라포름알데하이드에서 고정되고 PBS로 세척한 후, 0.5% Triton X-100가 포함된 PBS-T 용액으로 15분 동안 상온에서 반응시켜 항체의 세포에 대한 투과성을 높였다. 상기 PBS-T를 반응시킨 세포를 PBS로 세척한 후 10% Goat Serum을 포함한 PBS로 25°C에서 1시간 동안 blocking하고 TSLP 항체를 이용하여 4°C에서 15시간 동안 세포와 함께 반응시켰다. 상기 TSLP 항체를 처리한 세포는 PBS로 세척하고 2차 항체를 1시간 동안 빛이 없는 곳에서 반응시켰다. 상기 2차 항체는 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)를 사용하였다. 상기 2차 항체를 반응시킨 세포 핵은 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)가 포함되어 있는 mounting solution(R37605, Invitrogen)을 이용하여 염색을 하였으며, 최종 형광이미지는 EVOS M5000(ThermoFisher Scientific)를 이용하여 관찰하였다. 상기 실시예 4의 결과를 도 9에 그림으로 나타내었다. 상기 도 9에서 파란색으로 나타나는 부분은 NHEK

세포의 핵을 의미하고, 초록색으로 나타나는 부분이 TSLP를 의미한다.

[0100]

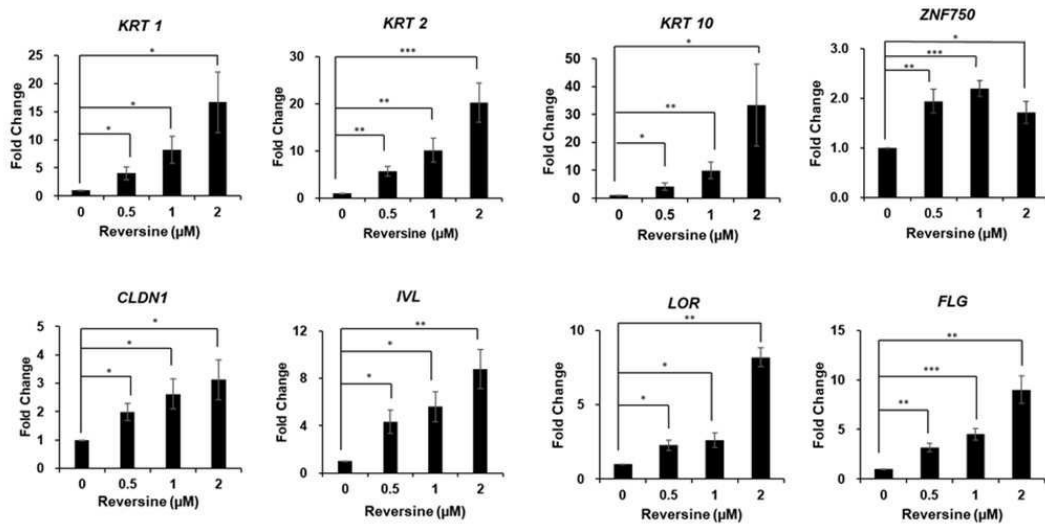
본 실시예 4의 결과, 피부각질세포에서 Poly(I:C)에 의해 TSLP 단백질발현이 증가하며, IL-13/IL-14에 의해 TSLP 단백질 발현이 더 증가하였다. 하지만, 리버신을 처리하면 TSLP 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

[0102]

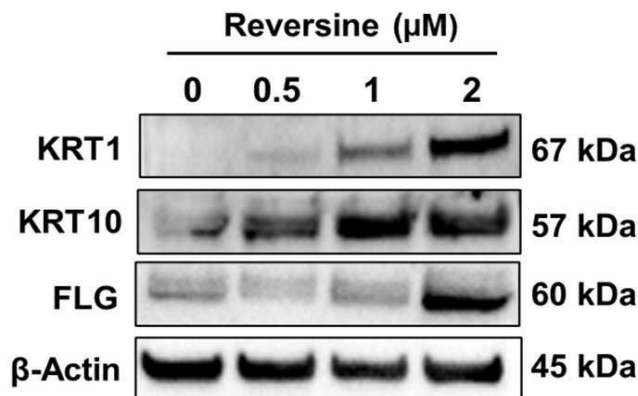
이상 설명으로부터, 본 발명에 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다.

도면

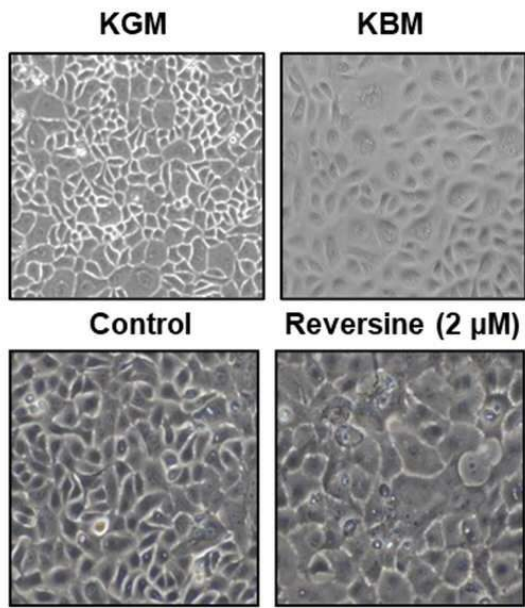
도면1



도면2

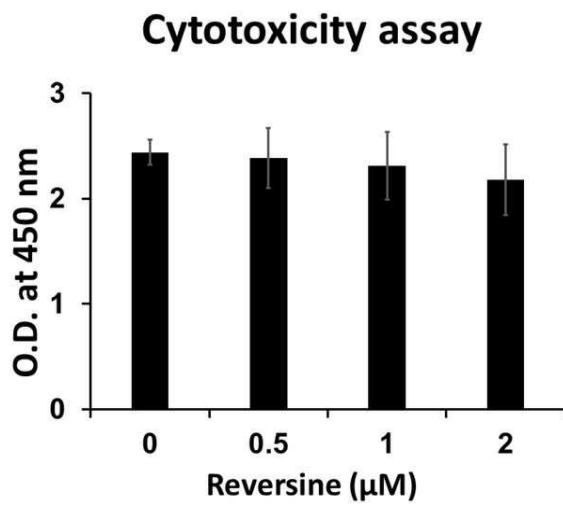


도면3

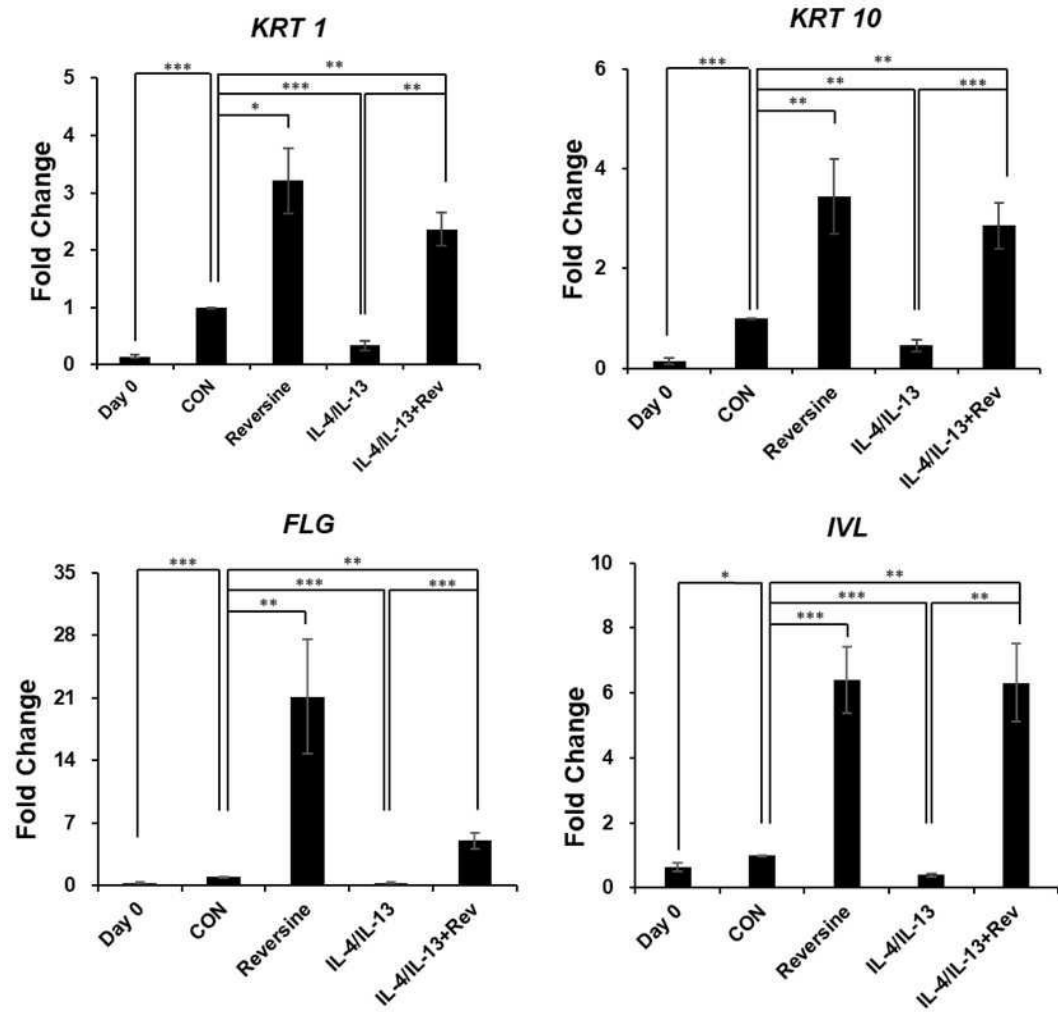


KGM : Undifferentiated keratinocytes
KBM : Differentiated keratinocytes

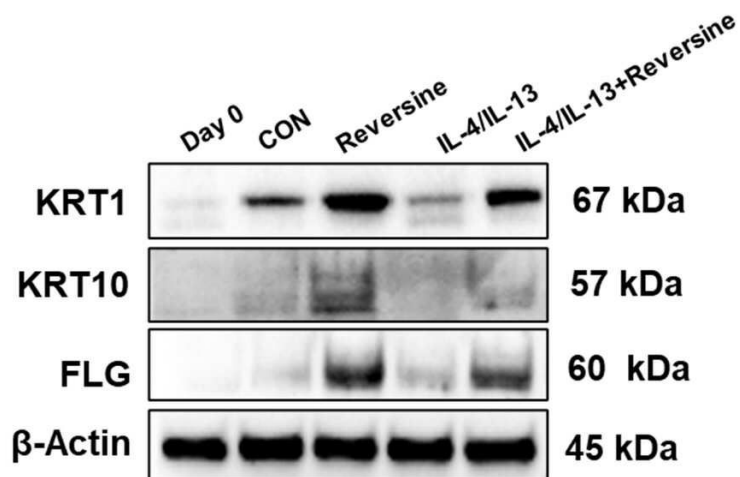
도면4



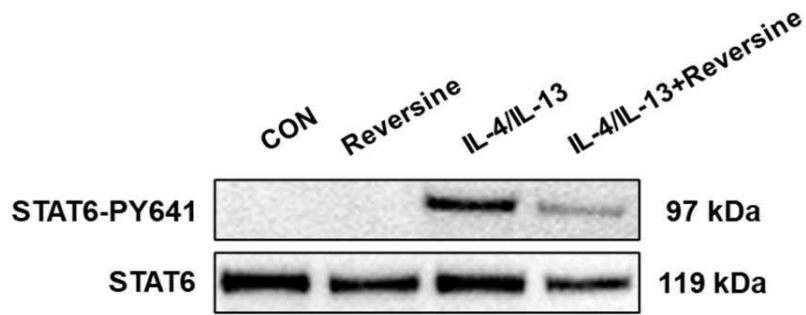
도면5



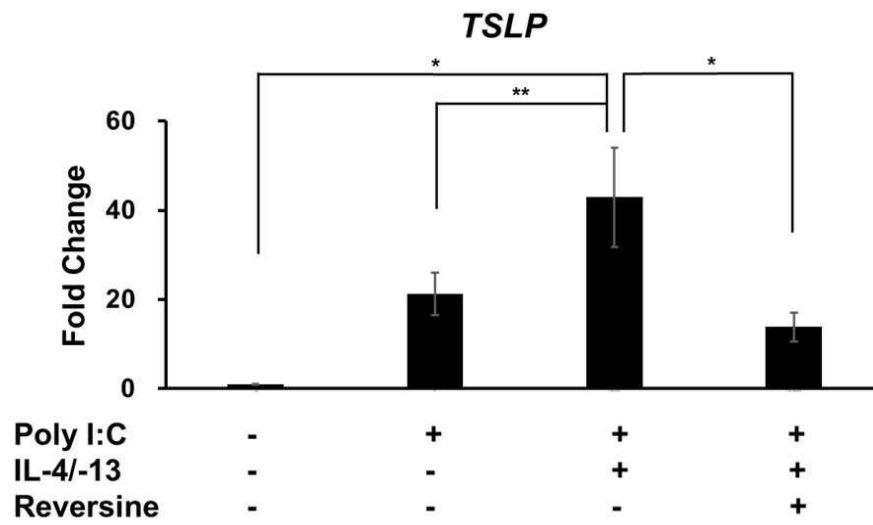
도면6



도면7



도면8



도면9

