

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2016년 10월 13일 (13.10.2016)



(10) 국제공개번호  
**WO 2016/163751 A2**

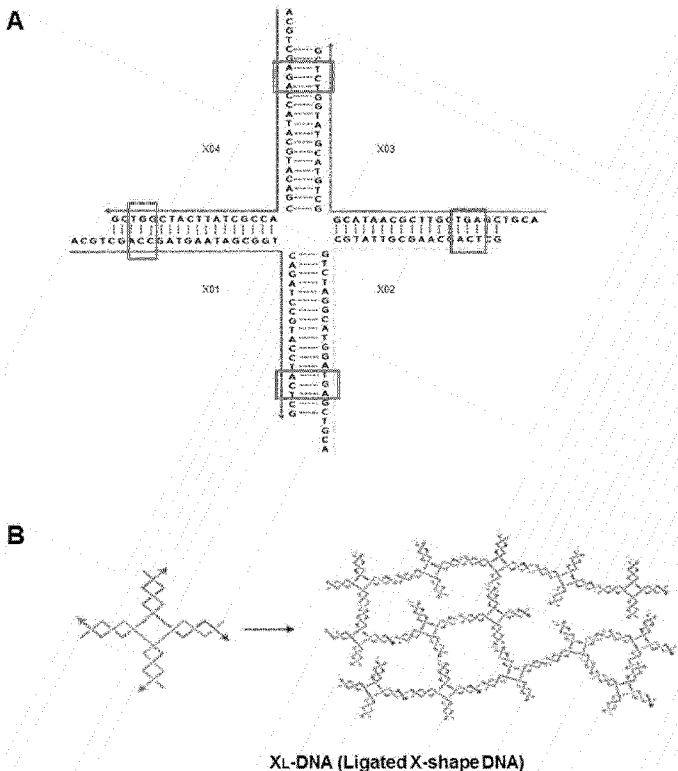
- (51) 국제특허분류:  
A61K 48/00 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)  
A23L 1/30 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003595
- (22) 국제출원일: 2016년 4월 6일 (06.04.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2015-0048953 2015년 4월 7일 (07.04.2015) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이주영 (LEE, Joo Young); 06279 서울시 강남구 도곡로 78길 22, 107동 1201호, Seoul (KR). 양갑식 (YANG, Gabsik); 07964 서울시 양천구 목동중앙로 47-10, 901호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, 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, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ATOPIC DERMATITIS COMPRISING X-SHAPE DNA STRUCTURE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating an atopic dermatitis comprising, as an active ingredient, an X-shape DNA structure ( $X_L$ -DNA) formed by complementary binding of oligonucleotides having the base sequences of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:4. When treating the  $X_L$ -DNA in an animal model of an atopic dermatitis, the  $X_L$ -DNA alleviates skin lesions such as erythema, bleeding and swelling, and swelling of ears, and exhibit an effect to decrease the expression of IgE, and thus may be useful as a pharmaceutical composition, health food or functional cosmetics for the atopic dermatitis.

(57) 요약서: 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA( $X_L$ -DNA)를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 아토피 피부염 동물 모델에 상기  $X_L$ -DNA를 처리하는 경우, 홍반, 출혈 및 부종과 같은 피부 병변과 귀의 부종이 완화되며 IgE의 발현이 감소되는 효과를 보이므로, 아토피 피부염에 대한 약화 조성물, 건강식품 또는 기능성 화장품으로 유용하게 사용할 수 있다.



**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 4개의 올리고뉴클레오티드가 상보적으로 결합하여 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 아토피는 "비정상적인 반응" 또는 "기묘한"이라는 뜻을 나타내는 아토피(Atopy)란 그리스어가 어원으로, 아토피 소인을 가지고 있는 개인에서 피부, 호흡기점막, 안 점막, 장 점막 등에 나타나는 알레르기 증상을 말하는 것이다.
- [3] 특히, 아토피 알레르기를 가진 사람에게서 나타나는 대표적인 피부질환인 아토피 피부염은 피부염증 및 가려움증을 유발시키는 것으로 가렵고, 건조하고, 민감한 피부를 유발하여 아토피 피부염에 걸린 사람에게 많은 불편감을 제공하며 흔히 관절의 안쪽인 팔꿈치 안쪽, 무릎의 뒷 쪽, 목 등에 잘 생기는 것으로 알려져 있다.
- [4] 이러한 아토피 피부염은 전 인구의 0.5 내지 1%로 정도가 증상을 나타내고 있는 것으로 알려져 있으며, 어린이(소아)의 경우에는 5 내지 10%가 고통받고 있으며 성인이 된 후에도 20 내지 25% 이내의 성인이 지속적인 아토피 피부염으로 인해 고통받고 있다.
- [5] 특히, 아토피 피부염은 많은 고통을 지속적으로 일으킬 수 있는 것으로 밤낮없이 피부가 가려워서 긁게 되고, 잠을 설치며, 피부가 흉측하게 변할 수 있고, 이로 인해 어린 아이의 성장발육의 문제 및 사회생활의 부적응 등을 불러올 수 있는 문제를 야기한다.
- [6] 최근에는 환경적 요인, 정신적인 스트레스와 같이 사회생활의 다양화에 따른 생활환경의 다변화로 인하여 많은 아토피 피부염 환자들이 발생하고 있는 실정이다.
- [7] 특히, 이러한 아토피 피부염의 악화요인으로서는 건조한 피부, 주변 온도와 습도의 변화, 심한 운동과 과도한 땀, 양모 및 섬유 등에 의한 피부자극, 음식물, 약물, 집먼지, 동물의 털, 자극성 화학물질, 감염이나 정신적인 스트레스 등과 같이 아토피 피부염을 일으키는 원인 및 요인도 다양화되고 있다.
- [8] 아토피 피부염을 예방하고 개선하기 위하여 항 알러지 효과가 나타나는 제제 또는 항균 작용이 있는 제제를 아토피 피부염이 발생된 피부에 바르는 방법을 통하여 증상을 완화시키고, 가려움증을 야기시킬 수 있는 요인을 사전에 제거하여 아토피 피부염의 증상 악화를 예방하는 치료법이 행해진다.

- [9] 일 예로, 아토피 피부염이 발병된 피부에 스테로이드계 항염증약(steroid anti-inflammatory drug)을 도포하여 증상을 개선하고, 카페인, 알코올, 자극적인 양념류 등을 피하는 식사조절 및 환경적인 요인을 개선하고, 스트레스를 해소하는 방법 등으로 아토피 피부염 치료가 행해지고 있다.
- [10] 그러나 피부가 연약한 부위에 상기 스테로이드계 항염증약을 장기간 사용하게 되는 경우에는 피부가 얇아지거나 피부색이 변색되는 부작용이 야기될 수 있다.
- [11] 또한, 음식 조절이나 스트레스 해소 등으로 아토피 피부염의 증상악화를 예방하는 경우에도 아토피 환자의 영양관리에 문제가 있을 수 있으며, 이를 통해 아토피 증상의 일시적인 완화는 가능하나 아토피 피부염의 근본적인 예방 및 개선을 이루기는 어려운 문제가 있다.
- [12] 따라서 아토피 피부염에 대한 효과적인 치료제의 연구 및 개발이 요구되고 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [13] 따라서, 본 발명은 아토피 피부염 증상을 효과적으로 완화시킬 수 있는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

### 과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [15] 더불어 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.
- [16] 더불어 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [17] 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 아토피 피부염 동물 모델에 상기 조성물을 피하 주사하는 경우, 홍반, 출혈 및 부종과 같은 피부 병변과 귀의 부종이 완화되며 면역글로불린 E(immunoglobulin E, IgE)의 발현이 감소되는 효과를 보이므로, 아토피 피부염에 대한 약학 조성물, 건강식품 또는 화장품으로 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 본 발명에 따른  $X_L$ -DNA의 구조를 나타낸 모식도이고,  
 [19] 도 2는 NC/Nga 마우스의 집 먼지 진드기(House Dust Mite, HDM)/2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-Dinitrochlorobenzene, DNCB)에 의해 유도된 아토피 피부 병변에서  $X_L$ -DNA의 효과를 확인한 결과이고,  
 [20] 도 3은 NC/Nga 마우스의 HDM/DNCB에 의해 유도된 염증 매개 물질의 생산에서  $X_L$ -DNA의 효과를 확인한 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [21] 본 발명의 발명자들은 특정한 4개의 올리고뉴클레오티드가 상보적으로 결합하여 형성된 X형 구조의 DNA에 대하여 연구하던 중, 아토피 피부염 동물 모델에 상기 X형 구조의 DNA를 주사하는 경우, 홍반, 출혈 및 부종과 같은 피부 병변과 귀의 부종이 완화되며 면역글로불린 E(Immunoglobulin E, IgE)의 발현이 감소되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [22] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [23] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA( $X_L$ -DNA)를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [24] 상기  $X_L$ -DNA는 둘 이상의  $X_L$ -DNA 상호간의 상보적 결합에 의해 중합체(polymer)를 형성할 수 있다.
- [25] 상기  $X_L$ -DNA는 IgE 생성을 억제하고 흉선간질성림프구생인자(Thymic Stromal Lymphopoietin, TSLP) 또는 TARC(Thymus and Activation-Regulated Chemokine)의 발현을 감소시킨다.
- [26] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [27] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [28] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [29] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분,

- 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [30] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [31] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [32] 본 발명에 따른 약학 조성물의 유효성분인  $X_L$ -DNA의 투여 용량은 예를 들면 당해 기술분야에서 널리 알려진 기술을 사용하여 동물 실험 등의 *in vivo* 데이터로부터 평가될 수 있다. 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 동물 데이터에 기초하여 사람에게 대한 투여를 용이하게 최적화할 수 있다.
- [33] 정확한 산정, 투여 루트 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다.
- [34] 통상적으로, 환자에게 투여되는 조성물의 선량 범위는 환자 체중의 약 0.5 내지 1000 mg/kg 일 수 있다. 투여량은, 환자에게 요구되는 정도에 따라, 한번에 또는 하루 또는 그 이상의 과정으로 일련의 둘 또는 그 이상으로 제공될 수도 있다.
- [35] 또한, 본 발명에 따른 화합물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [36] 상기 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [37] 더불어 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.
- [38] 상기  $X_L$ -DNA는 둘 이상의  $X_L$ -DNA 상호간의 상보적 결합에 의해 중합체(polymer)를 형성할 수 있다.
- [39] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 유효성분인  $X_L$ -DNA 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

- [40] 상기 건강식품에 함유된  $X_L$ -DNA의 유효용량은 상기 약학 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [41] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [42] 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 기능성 화장품 조성물을 제공한다.
- [43] 상기  $X_L$ -DNA는 둘 이상의  $X_L$ -DNA 상호간의 상보적 결합에 의해 중합체(polymer)를 형성할 수 있다.
- [44] 상기 화장품 조성물은 피부 외용연고, 기초화장품, 메이크업 화장품, 바디 화장품 또는 면도용 화장품 등의 용도로 제공될 수 있으며, 상기 기초화장품의 예로는 에센스, 로션, 크림, 젤, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있을 수 있고, 상기 메이크업 화장품의 예로는 파운데이션, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스크라, 아이브로우 펜슬, 메이크업 베이스 등이 있을 수 있으며, 바디 화장품으로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 썬 스크린 크림, 썬 오일 등이 있을 수 있고, 면도용 화장품으로는 애프터셰이브로션, 셰이빙 크림 등이 있다.
- [45] 상기 유효성분인  $X_L$ -DNA 외에 추가로 기능성 물질이나 물성 개선을 위한 부형제, 희석제 등의 물질이 포함될 수 있다.
- [46] 일 예로, 상기 화장품 조성물에는 물성 개선을 위하여 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류 또는 합성 고분자 물질 등이 추가로 첨가될 수 있다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로 유지 성분, 에멀리언트제, 계면 활성제, 유기 안료, 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, pH 조정제, 알코올, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한제 또는 정제수 등일 수 있다.
- [47] 상기 유효성분 이외의 첨가해도 되는 배합 성분은 한정되지 않으며, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하다.
- [48] 또한, 상기 화장품 조성물은 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있으며, 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형일 수 있고 일 예로 스프레이, 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발 화장품 등의 제형일 수 있다.
- [49] 보다 구체적으로 본 발명의 화장품 조성물은 스프레이, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클린저, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트리젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림,

영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스 및 팩의 제형을 포함할 수 있다.

[50] 일 예로, 본 발명의 제형이 스프레이 또는 파우더인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있으며, 특히 본 발명의 제형이 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[51] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[52] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제, 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르일 수 있다.

[53] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 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.

[54] 본 발명의 제형이 계면 활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코 시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 형태

[55] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[56]

#### [57] <실시예 1> 실험 방법

##### [58] 1. XL-DNA의 제작

[59] 하기 표 1에 기재된 4개의 올리고뉴클레오타이드를 동일한 양으로 어닐링 버퍼(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 50mM NaCl)에 용해하고 멸균된 Milli-Q 워터를 첨가하여 최종 농도가 0.1mM이 되도록 각각 준비하였다. 올리고뉴클레오타이드 혼합물을 유전자 증폭기(thermal cycler)를 이용하여

95°C로 가열하고, 4°C로 서서히 냉각함으로써 어닐링하였다.

[60] [표1]

|        | 염기서열                                                                      |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| XL-DNA | X01: 5'-ACG TCG ACC GAT GAA TAG CGG TCA GAT CCG TAC CTA CTC G- 3'(서열번호 1) |
|        | X02: 5'-ACG TCG AGT AGG TAC GGA TCT GCG TAT TGC GAA CGA CTC G- 3'(서열번호 2) |
|        | X03: 5'-ACG TCG AGT CGT TCG CAA TAC GGC TGT ACG TAT GGT CTC G- 3'(서열번호 3) |
|        | X04: 5'-ACG TCG AGA CCA TAC GTA CAG CAC CGC TAT TCA TCG GTC G- 3'(서열번호 4) |

[61] XL-DNA는 도 1A와 같은 구조를 가지며, X01의 ACC는 X04의 GGT, X02의 AGT는 X01의 ACT, X03의 AGT는 X02의 ACT, X04의 AGA는 X03의 TCT와 상보적으로 결합할 수 있다.

[62] 따라서, 도 1B에 나타낸 바와 같이 XL-DNA는 모노머(monomer)가 상호간에 결합된 형태의 응집된 복합체 구조(polymer)로 존재할 수 있다.

[63] XL-DNA는 20분간 실온에서 200V 조건의 6% 폴리아크릴 아마이드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)으로 분석한 후, 브롬화 에티듐(ethidium bromide)을 이용하여 염색하여 시각화하였다.

[64] 세포 흡수 연구의 경우, 알렉사 플루어 488이 표지된 mTri-2(Alexa Fluor 488-labeled mTri-2)를 mTri-2 대신에 사용하였다.

[65] 2. 시약

[66] 집 먼지 진드기(House dust mite, HDM)는 바이오스트리(Biostri Inc, Kobe, Japan)에서 얻었고, 디엑콜(dieckol)은 보타메디(Botamedi Inc., Jeju, Korea)로부터 구매하였고, 1-클로로-2,4-디니트로벤젠(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)은 시그마로부터 구매했고(Sigma, St.Louis, MO), 아세톤은 마크(Merck, Darmstadt, Germany)에서 구매하였다. 비트(Veet)는 렉키트 벤키저(Reckitt Benkiser, Mannheim, Germany)에서 구매하였다.

[67] 3. 실험동물

[68] NC/Nga 수컷 마우스(체중 14 내지 22g, 4주령)은 센트럴 실험실(Central Lab Inc, Seoul, Korea)과 일본 찰스 리버의 지점(branch of Charles River Japan, Kanagawa, Japan)에서 구매하였다. 마우스는 제어된 환경(온도  $22 \pm 2$  °C; 조명 07:00-19:00 h; 습도 30-70%)의 무균(specific pathogen-free, SPF) 조건에서 사육하였다. 사료와 물을 자유롭게 제공하였고 2주 동안 적응 후, 실험군을 임의로 세 그룹으로 나누었다.

[69] 본 연구에서 동물 실험은 가톨릭 대학교(허가번호#2013-020-01)의 동물

관리위원회에 의해 승인되었다.

[70] **4. 아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)발생**

[71] 수컷 NC/Nga 마우스는 집 먼지 진드기(House Dust Mite, HDM), 1% 2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-Dinitrochlorobenzene, DNCB, 200  $\mu$ l의 아세톤/올리브오일을 3:1로 혼합한 혼합물)으로 자극했다(0, 7, 14, 21, 28 및 35일의 간격으로 자극). 하루가 지난 뒤, 매일 X<sub>L</sub>-DNA 그룹 마우스에 7.5mg의 X<sub>L</sub>-DNA를 피하주사로 주입하였고, 대조군 마우스에는 인산완충액(Phosphate Buffer Solution, PBS)를 피하주사하였고 정상 마우스는 어떠한 자극도 가하지 않았다.

[72] 42일 후 마우스를 안락사시킨 후 피부와 혈액을 추출하였다.

[73] **5. 피부염의 중증도 평가**

[74] 임상적인 피부염의 중증도는 이미 공지된 방법에 의해 시험하였다(Sone, K., et al., Exp Anim, 2007. 56(2): p. 139-48 참고). 피부염의 정도는 각 일주일에 한번씩 평가하였다. 홍반/출혈(erythema/hemorrhage), 흉터/건조(scarring/dryness), 부종(edema) 및 탈피/침식(excoriation/erosion)의 진행은 다음과 같이 점수로 평가하였다: 0:없음, 1:가벼움(<20%), 2:중간(20 내지 60%), 및 3:중증(>60%). 각별 점수 합계는 피부염의 점수로서 사용하였다.

[75] **6. 피부병변의 조직학적 분석**

[76] 마우스를 안락사한 후, 등과 귀의 부위에서 피부 샘플을 채취하였다.

[77] 각 샘플들은 10% 완충된 포르말린에 고정한 후, 파라핀에 박아 4  $\mu$ m의 조각으로 절단하였다. 그리고 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin, H&E)으로 염색하였다. 그런 후 표피와 진피 증식, 이상각화증(parakeratosis), 과각화증(hyperkeratosis), 피부 부종(dermal edema), 소낭(vesicular) 형성 및 염증과 같은 병리학적 변화를 그룹 간에 비교하여 평가하였다.

[78] 비만 세포 침윤을 평가하기 위하여, 선택한 단편을 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색하였다. 각 표본의 20개의 얇은 단편의 비만 세포 수는 평방 밀리미터 당 비만 세포 밀도를 이용하여 측정하였다.

[79] **7. 귀 두께의 측정**

[80] 귀 두께는 마이크로미터(Mitutoyo, Kawasaki, Japan)로 측정하였다.

[81] 마이크로미터는 연골능선에서 떨어진 귀의 끝 부분에 적용하였고, 마이크로미터에 측정한 두께를 기록하였다.

[82] **8. 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

[83] 앞서 실시예 1중 4에서 채취한 각 마우스의 혈액 샘플을 30분 동안 1700g의 속도로 원심 분리하여 혈청을 수득하고, -70°C에 보관하였다.

[84] 혈청 내의 총 IgE 레벨은 마우스용 IgE ELISA 키트(Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan)을 이용하여 측정하였다.

[85] **9. 정량적인 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction, PCR)**

[86] 먼저, 피부 조직에서 웰프랩(Welprep) 총 RNA 분리 시약(Welprep total RNA

- isolation reagent, Welgene, Daegu, Korea)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다.
- [87] 20 $\mu$ l 부피의 역전사 PCR(Reverse Transcription PCR, RT-PCR, Promega, Madison, WI)을 이용하여 총 RNA의 1 $\mu$ g을 역전사하였다.
- [88] 실시간 정량 PCR(Real-time quantitative PCR)과 결과 분석은 iQ5(Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 수행하였다.
- [89] 흉선간질성림프구생인자(Thymic Stromal Lymphopoietin, TSLP) mRNA의 발현은 내부 표준 물질로서 마우스 액틴 mRNA를 이용하여 각 샘플에 대한 RNA 로딩에 정상화시켰다.
- [90] [TSLP 프라이머, 정방향:5'-GGACCACTG GTGTTTATTCT-3'(서열번호 5); 역방향:5'-CAGGGTTTAG ATGCTGTCAT-3'(서열번호 6)], [T 세포에서 발현되는 T-박스 함유 단백질(T-box-containing protein expressed in T cells, T-bet) 프라이머, 정방향: 5'-TACGCATCTG TTGATACGAG-3'(서열번호 7); 역방향:5'-TTCATAACTG TGTTCCTGAG-3'(서열번호 8)], [트랜스-작용 T-세포-특이 전사인자(Trans-acting T-cell-specific transcription factor, GATA3) 프라이머, 정방향:5-ATGAGAAAGA GTGCCTCAAG-3'(서열번호 9); 역방향:5'-CTTCTGTGCT GGATCGTG-3'(서열번호 10)], [액틴 프라이머, 정방향:5'-TCATGAAGTG TGACGTTGAC ATCCGT-3'(서열번호 11); 역방향:5'-TTGCGGGCAC GATGGAGGGG CCGGA-3'(서열번호 12)]가 각각 152 및 452bp 단편을 증폭하기 위하여 사용되었다.
- [91] PCR 조건은 다음과 같다: TSLP의 경우, 95°C에서 10초간, 60°C에서 10초간, 72°C에서 7초로 40 사이클; 글리세르알데히드-3-인산디히드로게나아제(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)의 경우, 95°C에서 10초간, 64°C에서 10초간, 72°C에서 18초로 30 사이클.
- [92] 모든 PCR 조건은 용해 곡선 분석(melting curve analysis)를 통해 행해졌다.
- [93]
- [94] <실시에 2> NC/Nga 마우스의 HDM/DNCB에 의해 유도된 아토피 피부 병변에서 XL-DNA의 효과
- [95] AD를 앓는 NC/Nga 마우스는 가려움증, 습진, 염증성 피부 병변 및 귀가 두꺼워지는 증상을 겪었다.
- [96] NC/Nga 마우스에서 집먼지 진드기 항원(house dust mite antigen)에 의해 유도된 아토피성 피부염 모델을 설정하기 위하여, HDM/DNCB를 6주 동안 일주일에 2번씩 피부 병변과 귀에 반복적으로 투여하였다.
- [97] 그 결과 대조군 NC/Nga 마우스에서 반복적인 HDM/DNCB의 투여는 먼저, 피부 건조를 유도했으며 심한 홍반, 출혈, 흉터, 부종, 탈피 및 짓무름을 뒤이어 유도하였다(도 2A).
- [98] 그러나 XL-DNA 치료는 이러한 피부 증상을 억제하였다. 더불어 정상군과 비교하였을 때 대조군에서 피부 병변의 조직학적 특징은 진피/표피 내의 염증

세포의 축적 및 부종, 피부의 비후 증상을 보이는 반면,  $X_L$ -DNA의 처리 그룹은 이러한 변화가 감소된 것을 보여주었다.

[99] 피부 상태는 6주 동안 일주일에 한번 피부염 점수 계측기(dermatitis scoring metric)을 이용하여 평가하였다. 대조군의 피부염 점수는 정상군과 비교하여 3주에서 현저한 차이를 보였으며, 빠르게 증가하였다.

[100] 그러나  $X_L$ -DNA를 처리한 마우스는, 대조군 마우스와 비교하여 피부염 점수가 4주에서 현저히 감소하였다.

[101]

[102] <실시예 3> NC/Nga 마우스에서 HDM/DNCB에 의해 유도된 귀의 부종에서  $X_L$ -DNA의 효과

[103] NC/Nga 마우스에 HDM/DNCB를 투여시 귀의 부종이 점차 증가되었다.

[104] 정상군에 비교하였을 때 대조군의 귀에서 염증 세포의 축적과 진피와 표피가 비대된 조직학적 특징을 보였다(도 2B).

[105] 그러나,  $X_L$ -DNA가 처리된 마우스에서는 염증 세포의 진피 침투 및 진피/표피의 비후가 감소된 것을 관찰하였다.

[106] 5주에서 정상군에 비교하여 대조군의 귀의 부종은 상당히 증가되는 것이 관찰되었지만,  $X_L$ -DNA를 처리한 경우, 5주 내지 6주에서 HDM/DNCB에 의하여 증가된 귀의 부종이 현저히 완화된 것을 확인하였다.

[107]

[108] <실시예 4> NC/Nga 마우스의 HDM/DNCB에 의해 유도된 염증 세포의 침윤 및 IgE 유리에 대한  $X_L$ -DNA의 효과

[109] 비만 세포(Mast cells)는 IgE 매개된 알레르기 질환의 중요한 작용기로 알려져 있으며, 혈청 내 IgE 레벨의 증가는 AD의 중요한 특징이다.

[110] 대조군에서 HDM/DNCB의 처리는 정상 마우스에 비교하였을 때 혈청 내 IgE 레벨을 상당히 증가시킨 반면,  $X_L$ -DNA를 처리한 군은 IgE 레벨이 상당히 감소된 것을 확인하였다(도 3A).

[111] TSLP는 AD의 진행에 대한 Th2 적절한 면역 초기 시스템에서 중요한 역할을 하며 TSLP는 Th2 면역 반응, TARC 및 IgE에 의한 유도와 관련이 있다.

[112] 정량적 역전사-중합효소 연쇄반응(Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 분석은 NC/Nga 마우스에서  $X_L$ -DNA가 HDM/DNCB에 의해 유도된 TSLP 및 TARC의 mRNA 발현 및 생산을 현저히 하향 조절한다는 것을 보여주었다(도 3B 및 3C).

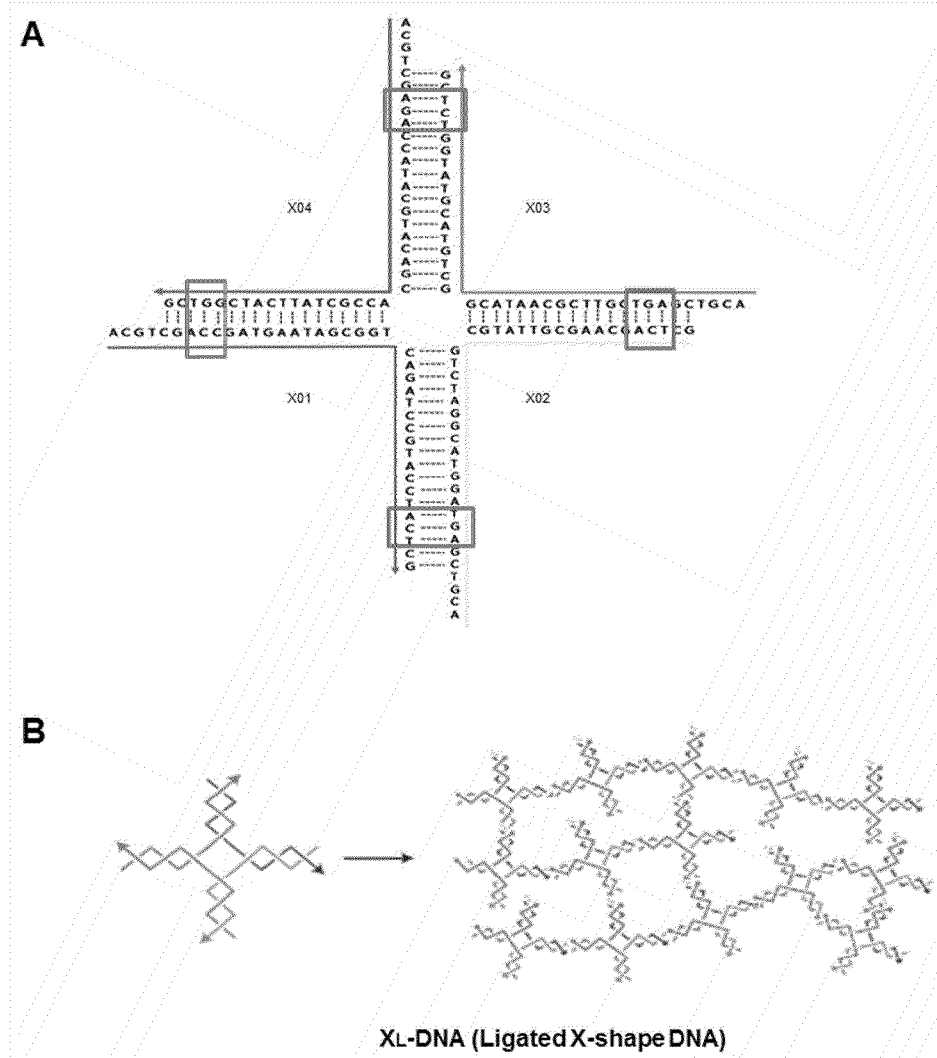
[113] 이러한 결과들은  $X_L$ -DNA가 NC/Nga 마우스 모델에서 Th2 반응을 억제하여 HDM/DNCB에 의해 유도된 피부염을 억제한다는 것을 보여주었다.

[114]

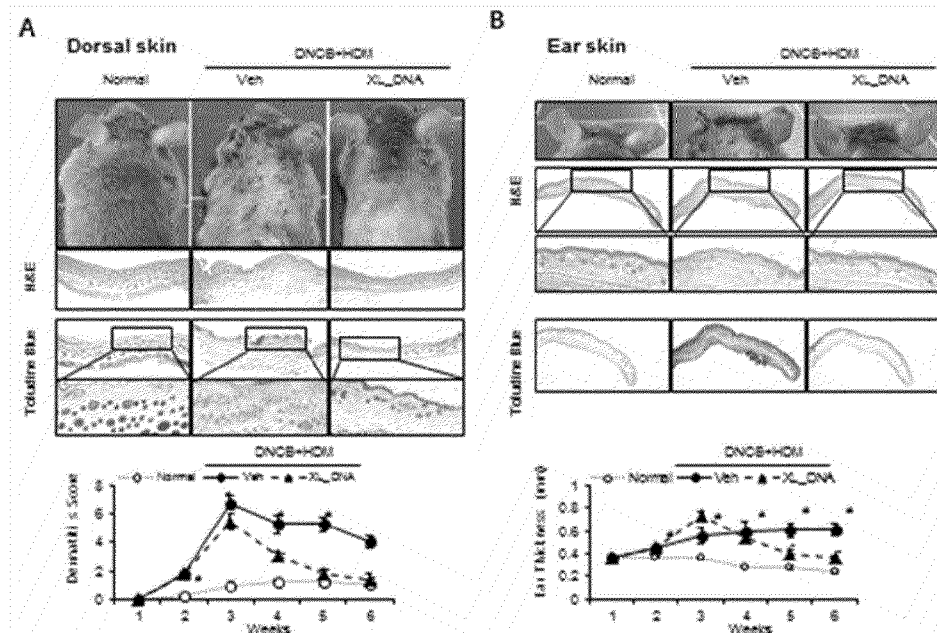
## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA( $X_L$ -DNA)를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,  
상기 X형 구조의 DNA( $X_L$ -DNA)는 둘 이상의  $X_L$ -DNA 상호간의 상보적 결합에 의해 중합체(polymer)를 형성하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,  
상기 X형 구조의 DNA는 IgE 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,  
상기 X형 구조의 DNA는 흉선간질성림프구신생인자(Thymic Stromal Lymphopoietin, TSLP) 또는 TARC(Thymus and Activation-Regulated Chemokine)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강식품.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,  
상기 X형 구조의 DNA는 둘 이상의  $X_L$ -DNA 상호간의 상보적 결합에 의해 중합체(polymer)를 형성하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강식품.
- [청구항 7] 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드의 상보적 결합에 의해 형성된 X형 구조의 DNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 기능성 화장품 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,  
상기 X형 구조의 DNA는 둘 이상의  $X_L$ -DNA 상호간의 상보적 결합에 의해 중합체(polymer)를 형성하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 기능성 화장품 조성물.

[도1]



[도2]



[도3]

