



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0083095
(43) 공개일자 2013년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/35 (2006.01) A61K 31/351 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0003510
(22) 출원일자 2012년01월11일
심사청구일자 없음
- (71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
- (72) 발명자
조재열
경기도 수원시 장안구 율전동 늘푸른벽산아파트 101동 1007호
홍성렬
경기도 용인시 수지구 성북동 LG빌리지 309동 1605호
정덕
경기도 용인시 수지구 신봉동 746-13번지
- (74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 5 항

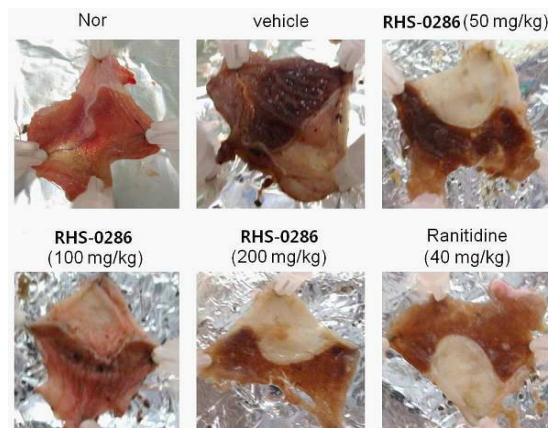
(54) 발명의 명칭 **피란 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 바람직하게는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물에 의하는 경우 부작용없이 염증을 효과적으로 치료 및 예방할 수 있다.

또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 바람직하게는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 개선용 화장품 조성물은 염증을 효과적으로 예방 또는 개선하여 피부트러블 등을 예방할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도12



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

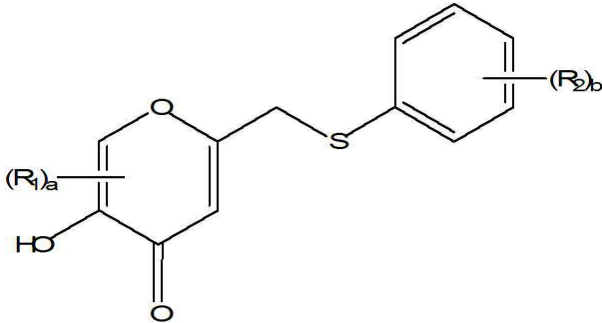
과제고유번호	B0008864
부처명	지식경제부
연구사업명	지역혁신센터(RIC)
연구과제명	식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2001.03.01 ~ 2014.02.23

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1 은 알킬기, 아릴기, 사이클로 알킬기 및 헤테로 아릴기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이고, a 는 0 내지 2의 정수이며,

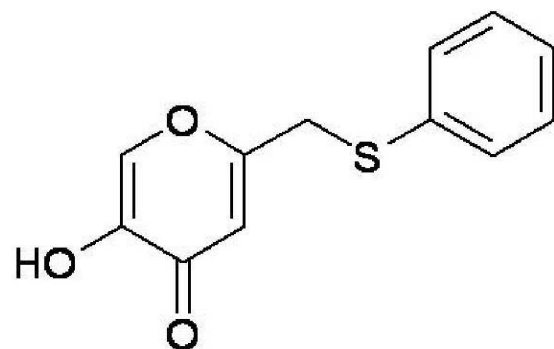
R_2 는 알킬기, 아릴기, 사이클로 알킬기 및 헤테로 아릴기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이고, b 는 0 내지 5의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

[화학식2]



청구항 3

제1항에 있어서,

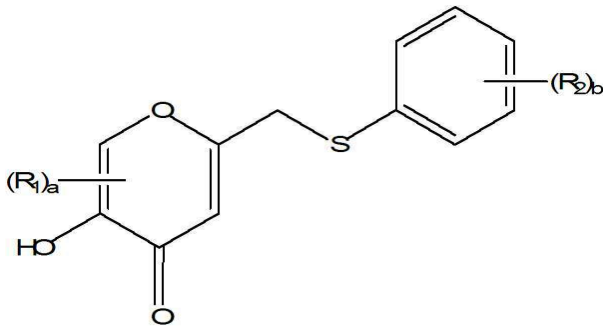
상기 염증질환은 피부염, 알레르기, 위궤양, 십이지장궤양, 간염, 식도염, 위염, 장염, 췌장염, 대장염, 신장염, 위암, 전신부종, 국소부종 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 개선용 화장료 조성

물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R₁은 알킬기, 아릴기, 사이클로 알킬기 및 헤테로 아릴기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이고, a는 0 내지 2의 정수이며,

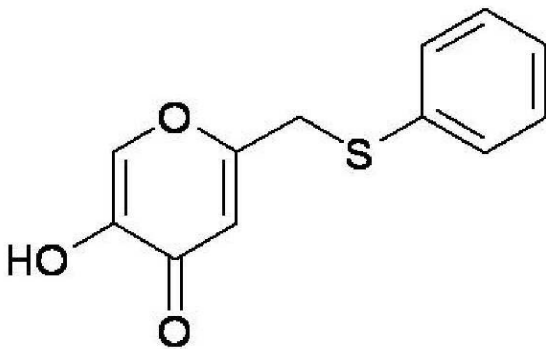
R₂는 알킬기, 아릴기, 사이클로 알킬기 및 헤테로 아릴기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이고, b는 0 내지 5의 정수이다.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 염증질환 예방 및 개선용 화장품 조성물.

[화학식2]



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 피란 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증반응은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 또는 다양한 종류의 알레르기 유발물질 등과 같은 외부감염원을 포함한 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등에 노출되거나 상기 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등에 노출되는 등 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응을 의미한다.

[0003] 또한, 상기 염증을 유발하는 여러 요인으로 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

- [0004] 상기 염증반응은 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 메카니즘으로, 국소 혈관과 체액에 존재하는 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액침윤, 세포 이동, 조직 파괴, 홍반, 부종, 발열 또는 통증 등이 나타난다. 또한, 상기와 같은 증상에 의해 기능 장애가 유발되기도 한다.
- [0005] 상기 염증은 정상적인 경우에는 생체 내에서 염증반응을 통하여 외부감염원을 제거하거나 발병 요인을 중화 또는 제거하고, 상한 조직을 재생시켜서 정상적으로 구조와 기능을 회복시키는 작용을 한다. 하지만, 항원이 계속 제거되지 않거나 특정한 내부 물질이 원인이 되어 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되면, 과민성 질환이나 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증 반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암발생 과정(carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 효소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 수혈, 약물투여 또는 장기이식 등의 치료과정에서도 장애요인이 된다.
- [0006] 생체에 있어서 염증반응은 다양한 생화화적인 현상이 관여하고 있으며, 특히, 면역세포에 의해 생산되는 염증 반응과 관련된 다양한 효소에 의해 반응이 개시되거나 조절된다.
- [0007] 구체적으로, 상기 면역세포들은 히스타민(histamine), 일산화질소(nitric oxide, NO) 또는 프로스타글라딘 E2(prostaglandin E2, PGE₂) 등의 도움으로 혈관을 통해 손상된 부위로 이동하여 염증반응을 개시한다. 상기 손상된 부위로 이동한 면역세포는 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 β (interleukin-1 β 또는 IL-6(interleukin-6)와 같은 사이토카인(cytokine) 이나 MIP-1, IL-8 또는 MCP-1등과 같은 케모카인(chemokine)을 분비하여 직접적인 외부침입물질을 파괴하거나 다른 면역세포들을 모아 염증반응을 개시한다.
- [0008] 상기 염증반응을 일으키는 interferon- γ lipoteichoic acid, lipopolysaccharide(LPS) 등의 염증유발 물질이나 다양한 염증 유도 사이토카인에 노출될 경우, iNOS(inducible Nitric Oxide synthase)와 COX-2(cyclooxygenase-2)가 발현되어, NO와 PGE₂가 과량 생성된다. 이들 여러 염증 개시인자들(iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 등)은 활성화된 NF- κ B에 의해 전사가 촉진되며, 이로 인해 NO가 필요이상으로 생성되면 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응에 의해 유발되는 조직 손상, 돌연변이유발(mutagenesis), 신경조직의 손상 등을 일으킨다.
- [0009] 한편, 일상생활에 사용되는 화장품은 피부를 보호하고 미화 청결을 위해 사용되는 제품이지만 화장품 조성물을 살펴보면 피부 보호 목적과는 상이한 성분들이 제품 형성에 필수 불가결한 존재로서 사용된다. 예를 들어, 계면활성제, 방부제, 향료, 자외선 차단제, 색소 및 기타 효능이나 효과를 부여하기 위해 쓰이는 여러 가지 성분들을 들 수 있다. 상기 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분은 일반적으로 피부에 염증이거나, 뾰루지 또는 부종 등과 여러 가지 부작용을 발생시키는 것으로 알려져 있다.
- [0010] 또한, 체내로부터 배출되는 피지 성분, 땀 성분 및 화장품 성분 중의 지방산, 고급 알코올, 단백질 등이 피부 상에 존재하는 피부 상재 균들에 의해 독성이 강한 물질로 분해되면, 이들에 의해 피부 염증이 유발될 수도 있으며, 태양으로부터 나오는 자외선에 의해서도 피부 염증이 유발된다는 것은 잘 알려진 사실이다.
- [0011] 이렇듯 화장품에 있어서 피부 부작용 유발요인은 항상 잠재되어 있으며 이를 해결하고자 여러 가지 연구가 진행되어 왔다. 현재까지 홍반이나 부종 같은 자극완화 및 염증 완화 목적으로 이용되고 있는 물질로는 비스테로이드계로 플루페나믹산(flufenamic acid), 이부프로펜(ibuprofen), 벤지다민(benzylamine), 인도메타신(indomethacin)등이 있고, 스테로이드계로는 프레드니솔론(prednisolone), 텍사메타손(dexamethasone) 등이 있으며, 알란토인, 아즈렌, ϵ -아미노키프론산, 하이드로코티존, 감초산 및 그 유도체(β -글리칠레친산, 글리칠레친산 유도체) 등이 항염증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0012] 그러나, 일반적으로 항염제로 쓰이는 상기 인도메타신은 화장품에는 사용할 수 없는 물질이고, 상기 하이드로코티존은 사용량이 제한되어 있으며, 감초산 및 그 유도체는 안정화시키기 어렵거나 용해도가 좋지 않아 실제 적용 시 농도의 제한으로 인하여 실질적인 효과를 거두기가 어려운 점이 있는 등 지금까지 알려진 항염제는 피부 안전성 면이나 화장품 배합시의 안정성 면에서 대부분 문제점이 있어서 그 사용이 제한되고 있다.
- [0013] 또한 최근 위염과 관련한 치료제의 기전은 2번째 히스타민 수용체(H2 receptor)를 막아서 위벽세포에서 위산의 분비를 감소시키는 H2 저해제(H2-Blockers)가 주를 이룬다. 위산이 줄어들므로 인해 이미 손상된 위벽세포(위궤양 등)의 추가적인 손상을 방지하게 된다. 이러한 H2 저해제는 간에서의 다른 약들의 대사를 방해하기 때문에(potent inhibitors of P-450) 다른 약과 같이 복용할 경우 주의가 필요하고, 항안드로겐(Anti-Androgen) 효과가 있어서 남성에게서 여성형 유방(gynecomastia), 발기부전(impotence), 성욕 감소 등의 부작용이 발생할 수

있다. 또한 태반과 뇌혈관장벽을 통과하므로 임산부나 노인에게 부작용이 더 위험할 수 있고, 두통이나 혼동, 혼미, 어지럼증 등을 일으킬 수 있다.

[0014] 그러므로, 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적으면서, 효과적으로 NF- κ B, iNOS 및 TNF- α 의 발현을 억제할 수 있어 염증 치료 및 예방 효과가 우수하고, 부작용없이 염증을 억제할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) KR 10-2010-0107962 A1

(특허문헌 0002) KR 10-2006-0043942 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

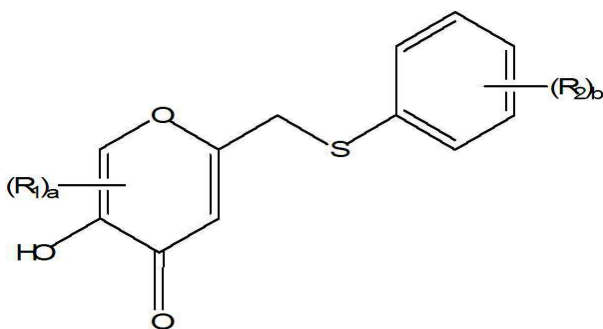
[0016] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 피란 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0017] 또한 염증과 관련된 NF- κ B, iNOS 및 TNF- α 의 발현을 억제할 수 있는 성분을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

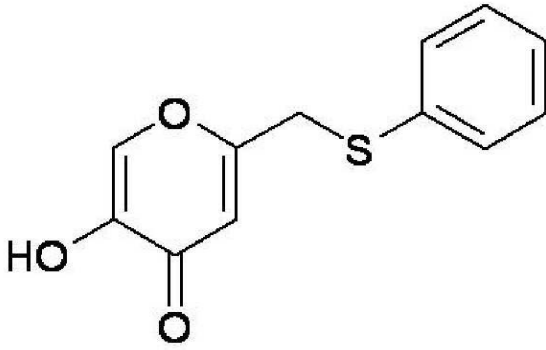
과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물이다.

[0019] [화학식 1]



[0023] [화학식 2]



[0024]

[0025] 상기 염증질환은 피부염, 알레르기, 위궤양, 십이지장궤양, 간염, 식도염, 위염, 장염, 궤장염, 대장염, 신장염, 위암, 전신부종, 국소부종 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.

[0026] 그리고 본 발명은 일 실시예에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 바람직하게는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0027] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0028] 본 발명의 발명자는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물 및 그의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물이 염증을 직접적으로 유도할 수 있는 NO의 분비를 억제할 수 있고, 상기 NO의 분비 또는 염증 유발과 관련된 단백질인 NF- κ B, TNF- α 의 발현 및 PGE₂의 생성을 억제할 수 있다는 것을 실험결과를 통해, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 염증질환에 효과가 우수하다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

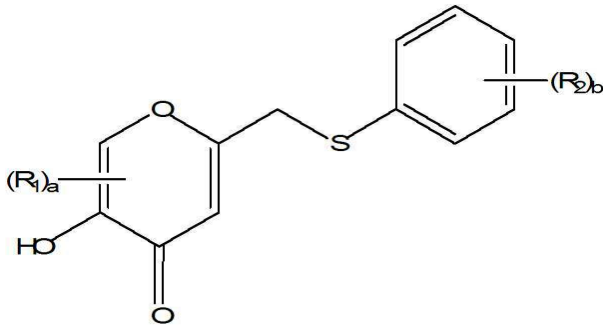
[0029] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 알킬(alkyl)은 알칸(alkane)에서 한 개의 수소 원자를 뺀 1가 원자단으로, 일반식 C_nH_{2n+1}은 1 내지 30의 정수인 것을 의미한다. 상기 알칸은 직쇄상 알칸, 분지상 알칸을 포함하며, 1차 알칸, 2차 알칸 및 3차 알칸을 포함한다.

[0030] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 아릴(aryl)은 아렌(arene)류에서 수소 원자 하나를 제거한 1가 원자단을 의미하며, 상기 아렌류는 벤젠링을 1개 포함하는 것뿐만 아니라 2 내지 7개를 포함하는 탄화수소 및 이들의 유도체를 포함한다.

[0031] 본 명세서에서 모든 화합물 또는 치환기는 특별한 언급이 없는 한 치환되거나 비치환된 것일 수 있다. 여기서 치환된이란 수소 원자가 할로겐원자, 하이드록시기, 카르복시기, 시아노기, 니트로기, 아미노기, 사이오기, 메틸사이오기, 알콕시기, 나이트릴기, 알데하이드기, 에폭시기, 에테르기, 에스테르기, 에스테르기, 카르보닐기, 아세탈기, 케톤기, 알킬기, 시클로알킬기, 헤테로시클로알킬기, 벤질기, 아릴기, 헤테로아릴기, 포플루오르알킬기, 이들의 유도체 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나로 대체된 것을 의미한다.

[0032] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0033] [화학식 1]

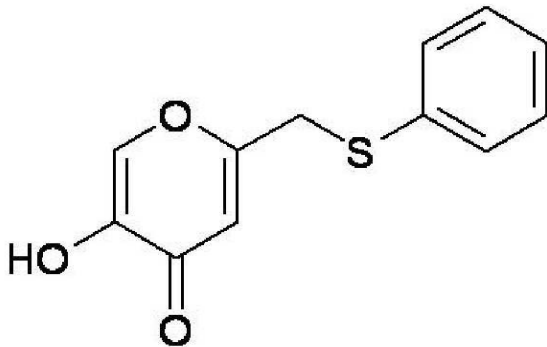


[0034]

[0035] 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 알킬기, 아릴기, 사이클로 알킬기 및 헤테로 아릴기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이고, a 는 0 내지 2의 정수, b 는 0 내지 5의 정수일 수 있으며, 바람직하게 a 및 b 는 0인 5-하이드록시-2-페닐설펜메틸-피란-4-온(5-hydroxy-2-phenylsulfanylmethyl-pyran-4-one)일 수 있다.

[0036] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 바람직하게는 5-하이드록시-2-페닐설펜메틸-피란-4-온(5-hydroxy-2-phenylsulfanylmethyl-pyran-4-one)일 수 있으며, 상기 5-하이드록시-2-페닐설펜메틸-피란-4-온은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다

[0037] [화학식 2]



[0038]

[0039] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 염은 약학적으로 허용되는 산 또는 염기와의 염을 의미하고, 약학적으로 허용되는 산에는 무기산과 유기산이 모두 포함되며, 무기산의 일 예로 여산, 황산, 인산, 이인산, 브롬화수소산 또는 질산 등이 있고, 유기산의 일 예로 구연산, 푸마르산, 말레산, 말산, 아스코르브산, 숙신산, 주석산, 벤조산, 아세트산, 메탄설펜산, 에탄설펜산, 벤젠설펜산 또는 p-톨루엔설펜산 등이 있으나 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 약학적으로 허용되는 염기에는 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 수산화물 등이 있으나 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 200 μ M를 사용하는 경우에도 세포독성을 유발하지 않는 것으로 확인되었지만, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 10 μ M만 사용한 경우에도 PGE₂의 생성을 80% 이상 억제할 수 있고, 50 μ M를 사용한 경우 NO의 생성 및 TNF- α 발현을 억제할 수 있어서, 세포독성을 유발하지 않는 즉, 부작용 등이 문제되지 아니한 범위 내에서 그 항염 활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0041] 따라서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 염증질환을 억제하거나 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 염증질환은 일 예로 각종 피부염, 알레르기, 전신성 홍반성 낭창, 망막염, 위궤양, 십이지장궤양, 간염, 식도염, 위염, 장염, 췌장염, 대장염, 관절염, 신장염, 위암, 전신부종, 국소부종 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 상기 전신부종은 구체적으로 울혈성 심부전, 교착성 심낭염, 제한성 심장 근육 병증, 간경변, 신부전, 신증후군 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 상기 국소부종은 피부와 연부 조직의 일부가 부은 상태를 의미하며, 구체적으로 피부와 연부 조직에 염증이 발생하는 봉소염, 정맥이나 림프관의 환류 장애, 피부와 연부조직의 일부가 손실되는 화상, 벌레물림, 세균감염 등을 포함할 수 있으며, 상기 알레르기는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염(atopic

dermatitis), 접촉성 피부염, 두드러기(urticaria), 곤충 알러지, 식품 알러지 및 약품 알러지를 포함 할 수 있다. 바람직하게는 피부염, 알레르기, 위궤양, 십이지장궤양, 간염, 식도염, 위염, 장염, 궤장염, 대장염, 신장염, 위암, 전신부종, 국소부종 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 위궤양, 십이지장궤양, 위염, 장염, 궤장염, 국소부종 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.

[0042] 부종이 유발된 세포에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 처리한 경우 부종이 완화되고, 위염이 유발된 경우에도 염증 부위가 감소하는 것이 확인되었다.

[0043] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0044] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염은 상기 염증질환 예방 또는 약학 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 더욱 상세하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.

[0045] 이 경우 상기 조성물 내 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염의 함량은 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0046] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아가시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 염증질환에 효과가 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로, 항염증제, NO 저해제 또는 COX-2 저해제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0048] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥, 구강, 경막의 및 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0049] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0050] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0051] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을

이용하여 제형화 될 수 있다.

[0052] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성분 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0053] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 세포독성이 없는 범위 내에서 사용하더라도, 염증 억제 효과가 뛰어나기 때문에 염증의 예방 및 개선 효과가 우수하므로 화장품에 포함된 성분들에 의해 유도되는 염증 및 외부 환경에 의해 유도되는 염증을 효과적으로 제어할 수 있어 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염은 염증질환을 예방 및 개선하는 효과를 갖는 화장품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0055] 상기 화장품 조성물은 기초 화장품, 메이크업 화장품, 바디 화장품, 두발용 화장품, 두피용 화장품, 면도용 화장품 또는 구강용 화장품의 용도로 제공될 수 있다.

[0056] 상기 기초 화장품의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있고, 상기 메이크업 화장품의 예로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스크라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 상기 바디 화장품의 예로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있고, 상기 두발용 화장품의 예로는 샴푸, 린스, 헤어 트리트먼트, 헤어 무쓰, 헤어 리퀴드, 포마드, 헤어 칼라제, 헤어 블리치제 또는 칼라 린스 등이 있으며, 상기 두피용 화장품의 예로는 헤어 토닉 또는 스칼프 트리트먼트 등이 있고, 상기 면도용 화장품의 예로는 애프터셰이브로션 또는 셰이빙 크림 등이 있으며, 상기 구강용 화장품의 예로는 치약 또는 마우스 워셔 등이 있다.

[0057] 상기 화장품 조성물에는 유효성분 외에 사용용도 및 화장품 조성물의 성질에 따라 통상 화장품 조성물에 배합되고 있는 성분, 일 예로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등이 추가로 배합될 수 있다. 또한, 상기 화장품 조성물은 약물 또는 유효성분을 피부조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 상기 화장품 조성물의 제형은 사용용도 및 화장품 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 일 예로 수용액제, 가용화제, 유화제, 유액제, 겔제, 페이스트제, 연고제, 에어줄제, 물-기름 2층제 또는 물-기름-분말 3층제일 수 있으며, 상기 제형의 예는 단순한 에시일 뿐, 상기 예시에 의해 본 발명의 화장품 조성물의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.

[0059] 상기 유효성분은 상기 화장품 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%일 수 있으나, 상기 함량은 제형 또는 화장품 조성물에 함유되는 유효성분 외의 성분의 함량에 따라 적절히 조절할 수 있으며, 상기 함량에 의해 본 발명에 포함되는 유효성분의 함량이 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 염증을 억제하여 염증질환을 예방 및 치료하기 위한 약학 조성물 및 특정 제형 등과 관련하여 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분 또는 외부환경으로 인한 피부의 염증을 효과적으로 억제할 수 있는 특징을 갖는 화장품 조성물 등에 응용될 수 있으므로, 본 발명은 염증질환과 관련된 질병에 대한 치료와 관련된 의료산업 및 피부염증의 제어와 관련된 화장품 산업의 분야에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 화학식 2로 표시되는 화합물(RHS-0286)의 세포독성을 확인한 그래프로, 상기 그래프의 가로축은 RHS-0286의 함량을 의미하고, 상기 그래프의 세로축은 세포 생존율(Cell viability(%) of control)을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 NO 생산에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 RAW 264.7 세포의 NO 함량의 대조군(control)에 대한 상대적인 값을 의미하고, 가로축은

RHS-0286의 함량을 의미한다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 TNF- α 에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 RAW 264.7 세포의 TNF- α 함량의 대조군(control)에 대한 상대적인 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286의 함량을 의미한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 PGE₂의 생산에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 RAW 264.7 세포의 PGE₂ 함량의 대조군(control)에 대한 상대적인 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286의 함량을 의미한다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 PGE₂의 생산에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 복강 대식세포의 PGE₂ 함량의 대조군(control)에 대한 상대적인 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286의 함량을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 RHS-0286이 TNF- α iNOS, COX-2 및 GAPDH의 발현에 미치는 영향을 나타낸 사진으로, 상기 RHS-0286을 처리하지 않은 경우, 100 및 200 μ M로 각각 처리한 경우 발현 정도를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 NF- κ B에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 HEK 293 세포의 NF- κ B 루시퍼라제 활성에 대한 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286의 함량 및 NF- κ B Luc 또는 TBK1의 처리 여부를 의미하며 +는 양성으로 처리한 경우를 의미하고, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 IRF-3에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 HEK 293 세포의 TRIF 루시퍼라제 활성에 대한 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286의 함량 및 TRIF의 처리 여부를 의미하는 것으로 +는 양성으로 처리한 경우를 의미하고, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 RHS-0286의 p65, p-IRF3, Total IRF3 및 γ -tubulin의 발현에 미치는 영향을 나타낸 사진으로, 상기 핵 절편에 LPS 및 RHS-0286을 처리한 시간 및 각각의 처리 여부를 의미하는 것으로 +는 양성으로 처리한 경우를 의미하고, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 귀부종에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 부종이 유발된 귀에서 부종의 두께의 대조군(control)에 대한 상대적인 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286, 인도메타신(Indomethacin) 및 아라키돈산(Arachidonic acid)의 처리 여부를 의미하는 것으로 +는 양성으로 처리한 경우를 의미하고, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 위염에 미치는 영향을 정량적으로 확인한 그래프로, 상기 그래프의 세로축은 염증이 유발된 위에서 염증 면적의 대조군(control)에 대한 상대적인 값을 의미하고, 가로축은 RHS-0286 및 라니티딘(Ranitidine)의 처리 여부를 의미하는 것으로 +는 양성으로 처리한 경우를 의미하고, -는 처리하지 않은 경우를 의미하고, 가로축의 숫자는 처리된 화학식 1로 표시되는 화합물의 함량을 의미한다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른, RHS-0286이 위염에 미치는 영향을 나타낸 사진으로, 좌측 상단부터 아무 처리도 하지 않은 대조군(Nor), 염증을 유발시킨 경우(vehicle), RHS-0286을 각 50, 100, 200 mg/kg씩 처리한 경우 및 Ranitidine을 40 mg/kg 처리한 경우 변화를 나타내는 사진이다.

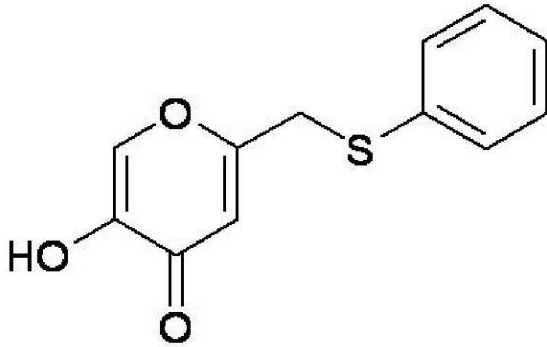
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위하여 제조예 및 실시예를 제시한다. 그러나 하기 제조예 및 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시한 것일 뿐, 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 예들에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 실시예; 항염효과 확인

[0064] 항염 효과를 갖는 물질에 대해 연구하던 중, 본 발명의 발명자들은 RHS-0286으로 명명한 화합물인 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 즉, 5-하이드록시-2-페닐설풀메틸-피란-4-온(5-hydroxy-2-phenylsulfonylmethyl-pyran-4-one)에 대한 항염효과를 확인하였다

[0065] [화학식 2]



[0066]

[0067] 실시예 1. 시료 및 세포의 준비

[0068] 상기 염증질환에 대한 예방 및 치료효과를 측정하기 위하여 하기 시료와 세포를 이용하여 시험을 수행하였다.

[0069] 상기 시료의 입수처는 하기와 같다.

[0070] iNOS, TAK1, p65(NF-κB), MyD88에 대한 모든 항체는 Cell signaling(USA)으로부터 구입하였다. 또한, TNF-α 및 IL-6에 대한 ELISA Kits는 Pierce Endogen(USA)에서 구입하였다. 또한, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sulfanilamide, lipopolysaccharide(LPS) 및 다른 모든 시약들은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

[0071] 실험에 사용한 마우스 대식세포주 RAW264.7 세포와 HEK293 세포는 한국세포주연구재단(대한민국)으로부터 구입하여 사용하였다. 상기 RAW264.7 세포와 HEK293 세포는 RPMI1640 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum(Gibco, Grand Island, NY), 클루타민 및 항생제(penicillin 및 streptomycin)를 첨가하고, 37°C의 온도 조건 및 5% CO₂ 조건의 배양기(incubator)에서 배양하였다. 각 실시예에서 실험은 세포밀도 2×10^6 cells/ml로 실험하였고, 상기 밀도에서 99% 이상의 세포가 생존함을 트리판 블루 염색으로 확인하였다.

[0072] 실험에 사용한 쥐는 17 g 내지 21 g의 6 내지 8주 된 수컷 ICR 쥐(대한 바이오링크)를 준비하고, 물과 사료(삼양사)를 자유식으로 공급하였다.

[0073] 실시예2. 세포독성의 확인

[0074] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 세포독성을 확인하기 위하여, RAW264.7 세포를 이용하여 MTT assay를 통한 세포 생존율을 확인하였다.

[0075] 보다 구체적으로, 96 well plate에 2×10^6 cells/ml로 상기 RAW264.7 세포를 분주하고 16 시간 동안 세포를 안정시킨 후, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μM)로 처리하고, 1 시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 1 μg/ml의 농도로 LPS를 처리하고, 24시간 동안 37°C 및 5 % CO₂의 조건의 배양기(incubator)에서 배양하였다. 상기 배양 후, 세포 배양액을 제거하고, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 후 4 시간 배양하였다. 상기 배양 후, 원심분리를 통해 상등액을 제거하고, DMSO 150 μl를 첨가하여 생성된 formazan crystals을 용해시킨 후 ELISA microplate reader(TECAN, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였다. 상기 측정결과는 도 1에 나타내었으며, 상기 도 1에 나타낸 세포의 생존율은 아무런 시료를 첨가하지 않은 대조구(control)에 대한 백분율로 표시하였다.

[0076] 상기 도 1에 나타낸 바와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물은 6.25 μM 내지 200 μM의 모든 농도에서 안전한 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로, 12.5 μM를 처리한 경우 실험결과에서 RAW264.7 세포의 생존율이 100 % 안팎으로 나타났고, 가장 많은 200 μM를 처리한 경우에도 약 80 %의 세포 생존율이 확인되어, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 6.25 μM 내지 200 μM의 농도에서 세포독성을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

- [0077] 실시예3. 항염효과 확인 1; Nitric oxide(NO)의 생성 억제능 확인
- [0078] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 예방 및 치료효과를 확인하기 위하여, NO 생성 억제 여부를 분석하여 확인하였다.
- [0079] 우선, RAW264.7세포를 96 well plate에 2×10^6 cells/ml로 상기 RAW264.7 세포를 분주하고 18 시간 동안 세포를 배양한 후, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μ M)로 30분간 처리하고, 24 시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 1 μ g/ml의 농도로 LPS를 처리하고, 20시간 동안 37℃ 온도 조건 및 5 % CO₂의 조건의 배양기(incubator)에서 배양하였다. 상기 배양한 배양액에 Griess reagent를 첨가하여, NO(Nitric Oxide)의 함량을 정량하였다.
- [0080] 상세하게, 상기 배양한 세포배양액 100 μ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid 및 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 실온에서 5 분간 반응시킨 후, 540 nm에서 ELISA microplate reader(Tecan, USA)로 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite (NaNO₂)로 흡광도를 측정하여 표준곡선을 얻은 후, 상기 측정한 흡광도로부터 NO의 농도를 산출하였다. 상기 산출된 NO 값을 도 2에 나타내었다.
- [0081] 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물은 NO 생성 억제능이 있는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로, 화학식 2로 표시되는 화합물은 LPS 처리에 의해 증가한 NO 생성량을 억제하였고, 50 μ M 처리한 경우 아무 처리도 하지 않은 대조구와 비교하여 약 20% 정도로 NO 함량이 감소되었으며, 농도 의존적으로 계속하여 NO 함량이 감소하여, 200 μ M를 처리한 경우 약 90% 정도 감소한 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 화학식 2로 표시되는 화합물은 염증질환의 예방 및 치료 효과가 우수한 것으로 확인되었다.
- [0082] 실시예4. 항염효과 확인 2; TNF- α 및 PGE₂의 생성 억제능 확인
- [0083] RAW264.7세포 및 복강 대식세포(12×10^6 cells/ml)를 18시간 배양한 후, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물로 24 시간 동안 전처리를 한 후에, LPS를 이용하여 염증을 유발하고, 상기 다시 배양(TNF- α 경우 6시간, PGE₂의 경우 24시간)하였다. 상기 배양한 배양액에 Griess reagent를 첨가하여, TNF- α 및 PGE₂의 함량을 각각 정량하였다. 상세하게, 상기 배양한 세포배양액 100 μ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid 및 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 실온에서 5 분간 반응시킨 후, 540 nm에서 ELISA microplate reader(Tecan, USA)로 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었다.
- [0084] 상기 도 3을 살펴보면 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 25, 50, 100 및 200 μ M로 각각 처리한 경우 TNF- α 함량이 대조구에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 50 μ M로 처리한 경우부터 유의적으로 감소하는 것이 확인되었고, 200 μ M까지 농도 의존적으로 감소하여 염증질환의 예방 및 치료에 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0085] PGE₂의 함량과 관련하여, 상기 도 4를 살펴보면 RAW264.7세포에 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리한 2.5, 5, 10 및 20 μ M로 각각 처리한 경우 2.5 μ M을 처리한 경우부터 PGE₂의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 5 μ M로 처리한 경우 유의적인 감소를 확인할 수 있었고, 20 μ M을 처리한 경우 PGE₂의 함량이 거의 0%에 가까운 것을 확인할 수 있었다.
- [0086] 또한 상기 도 5를 살펴보면 복강 대식세포에 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리한 2.5, 10, 25, 50 및 100 μ M로 각각 처리한 경우 2.5 μ M을 처리한 경우부터 PGE₂의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 10 μ M로 처리한 경우 유의적인 감소를 확인할 수 있었고, 50 μ M을 처리한 경우 PGE₂의 함량이 거의 0%에 가까운 것을 확인할 수 있었다.
- [0087] 따라서 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 염증질환의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0088] 실시예5. 항염효과 확인 3; 염증 관련 단백질 mRNA 정량 분석

[0089] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 항염활성을 확인하기 위하여, TNF- α , iNOS, COX-2 및 GAPDH의 발현량을 mRNA를 분석하여 확인하였다.

[0090] LPS 처리한 RAW264.7 세포로부터 RNA를 준비하였다. 상기 방법은 Lee et al., 2008에 기재된 바에 따라 TRIzol Reagent(Gibco BRL)을 이용하여 준비한다. 모든 RNA는 -70℃에서 보관한 후 사용한다. Semi-quantitative RT 반응은 MuLV reverse transcriptase를 이용하여 수행하였다. 모든 RNA(1 μ g)는 oligo-dT15로 70℃에서 5분 동안 배양되고, 5 $\times$ first strand buffer, 10 mM dNTPs 및 0.1 M DTT와 섞어주었다. 반응혼합물은 37℃에서 5 분 동안 더 배양하고, MuLV reverse transcriptase(2 U)를 첨가한 후에 60 분간 배양하였다. 70℃에서 10분간 배양하여 반응을 종결시켰다. RNase H를 첨가하여 모든 RNA를 제거하고, PCR반응을 수행하였다(conditions: 2 μ l cDNA, 4 μ M 5' and 3' 프라이머, 10 $\times$ buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl and 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTPs, MgCl₂ 25 mM 및 Taq DNA 중합효소 1unit(Promega, USA). PCR 반응은 94℃에서 30 초간 변성시키고, 55 내지 60℃에서 30 초간 어닐링 한 후에, 72℃에서 42초간 익스텐션시키고, 72℃에서 5분간 최종적으로 익스텐션 한다. 1 μ g의 RNA는 Molony murine leukemia virus 역전사 효소로 역전사 된다(Invitrogen). 각 샘플로부터 2 μ l의 cDNA가 SYBR Green Master Mix Method(Applied Biosystems, Foster City, CA)에 사용된다. 반응은 ABI사의 sequence detection system으로 진행하였다. 결과는 18S transcript에 따라 일반화하였다. TNF- α , iNOS, COX-2 및 GAPDH의 프라이머는 하기 표1에 정리하였다. 상기 확인된 결과는 도 6에 나타내었다.

표 1

[0091]

NAME		Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
iNOS	F	GGA GCC TTT AGA CCT CAA CAG A
	R	TGA ACG AGG AGG GTG GTG
TNF- α	F	TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC
	R	GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT
COX-2	F	CACTACATCCTGACCCACTT
	R	ATGCTCCTGCTTGAGTATGT
GAPDH	F	CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA C
	R	AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG

[0092] 상기 도 6에 나타낸 바와 같이, RAW264.7 세포의 mRNA를 분석한 결과 LPS의 첨가에 의해, TNF- α , iNOS, COX-2 및 GAPDH의 발현이 증가되었고, 상기 LPS에 의해 유도된 TNF- α , iNOS, COX-2 및 GAPDH의 발현은 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리한 경우 그 발현 정도가 감소하였으며, 발현 감소 정도는 처리된 화학식 2로 표시되는 화합물의 양에 따라 농도의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0093] 실시예6. 항염효과 확인 4; NF- κ B 및 IRF-3 활성 억제 여부

[0094] LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, IFN- β 또는 TNF- α 등은 전사인자인 NF- κ B에 의해 발현된다. 상기 NF- κ B는 세포질에서는 I κ B와 복합체 상태로 불활성화되어 있다가 I- κ B- α kinase에 의해 I- κ B- α 가 인산화되면 결합되어 있던 복합체가 분해되어 NF- κ B로 활성화되어 핵 내로 이동(translocation)하게 된다. 세틴/트레오닌-단백질 키나아제 TBK1은 *TBK1* 유전자에 의하여 인코딩되는 효소 중 하나로, I κ B와 유사하고, NF- κ B의 활성을 조절할 수 있다.

[0095] 또한, IFN- β 는 면역 반응식 생성이 증가되는 항 바이러스성 물질로 잘 알려져 있으며, 최근에는 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 염증질환의 치료제로 사용되고 있다. TRIF는 인터페론- β 를 유발하는 수용체를 가지는 TIP-도메인으로 TLRs(toll-like-receptors)의 활성화에 반응하는 수용체로서, 상기 TLRs는 침입 미생물의 특정 구성을 인식하여 항원에 대한 면역반응을 활성화한다. 이러한 수용체는 잘 보존된 병원성 패턴을 인식해서 염증성 사이토카인의 방출을 자극하기 위해 신호를 활성화한다. IRF-3(인터페론자극유전인자3)은 인터페론 α / β 자극에 의해 유도되는 전사 활성화 인자로 대부분 인터페론유도유전자의 전사조절영역에 있는 인터페론자극반응순서(ISRE)에 결합하여 그 전사를 활성화 시킨다.

[0096] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 염증질환에 대한 치료 및 예방 효과를 확인하기 위하여, 제조자의 프로토콜(Jin et al., 2009)에 따라 12-well plate에 PEI 방법을 이용하여 β -갈락토시다제(β -galactosidase)와 같은

수용체 분자(MyD88 및 TRIF)가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우에 NF- κ B-Luc 또는 TRIF 각각을 포함하는 플라스미드 1 μ g을 HEK293(1×10^6 cells/ml)세포에 주입(transfection)하고, 48시간 동안 배양한 후, 루시퍼라제 분석법(Luciferase assays)을 이용하여 NF- κ B 의 활성 및 IRF-3 활성을 각각 측정하였다. 상기 루시퍼라제 분석법은 상기 제조자의 프로토콜(Jung *et al.*, 2009)에 보고된 루시퍼라제 분석 시스템(Promega Co., USA)을 이용하여 수행하여 그 결과를 도 7 내지 도 9에 나타내었다.

[0097] 상기 도 7을 살펴보면 NF- κ B의 활성이 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리하는 경우 감소하는 것을 확인되었고, 상기 도 8을 살펴보면 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리하는 경우 IRF-3의 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 특히 12.5 μ M을 처리하는 경우부터 활성이 유의적으로 감소하는 것이 확인되었으며, 또한 상기 도 9를 살펴보면 LPS로 처리하는 시간이 길어지는 경우 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 200 μ M 처리하는 시간이 길어지더라도 p65(NF- κ B), p-IRF3 및 Total-IRF3의 발현이 감소하는 것이 유의적으로 확인되지 않았으나, 5분 또는 15분 동안 LPS를 처리한 경우 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 200 μ M 처리한 경우는 그렇지 않은 경우보다 p65(NF- κ B), p-IRF3 및 Total-IRF3의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있다. 또한 γ -튜불린의 경우 LPS 처리시간이 길어지더라도 상기 화학식 2로 표시되는 화합물로 처리하는 경우 그 발현이 저하되는 것을 확인하였다. 상기의 결과에 의하여 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 염증 질환의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0098] 실시예7. 항염효과 확인 5; 실험동물을 이용한 귀부종 억제능 확인

[0099] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 귀부종의 치료 및 예방에 효과가 있다는 것을 확인하기 위해 프로스타글라딘 내생과산화효소를 저해하여 프로스타글라딘이 생합성되는 것을 억제하는 비스테로이드계 항염증제인 인도메타신(indomethacin) 및 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리하고 ICR 생쥐에 귀 부종을 유도하여 이를 억제하는지 확인하였다.

[0100] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물 50mg/kg 및 인도메타신 10mg/kg을 4번 경구투여로 전처리하고, 마지막 처리 이후, 웅성 ICR 생쥐(각 군당 7마리)에 아라키돈산(2% w/v, 50mg/ml)을 이용하여 귀부종(ear edema)을 유도하였다(Biochem Pharmacol, 37(11), pp 2161-2165, 1988). 상기 아라키돈산을 처리하고, 4시간 이후 부종의 두께를 측정하였고 도 10에 이를 나타내었다.

[0101] 상기 도 10에 나타낸 바와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물의 경우 아라키돈산만 처리한 대조군에 비하여 귀 부종의 두께가 약 30% 정도 감소한 것이 확인되어, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 귀부종 억제 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0102] 실시예8. 항염효과 확인 5; 실험동물을 이용한 위염 억제효과 확인

[0103] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 위염의 치료 및 예방에 효과가 있다는 것을 확인하기 위해 라니티딘(ranitidine) 및 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 이용하여 위염 치료효과를 확인하였다.

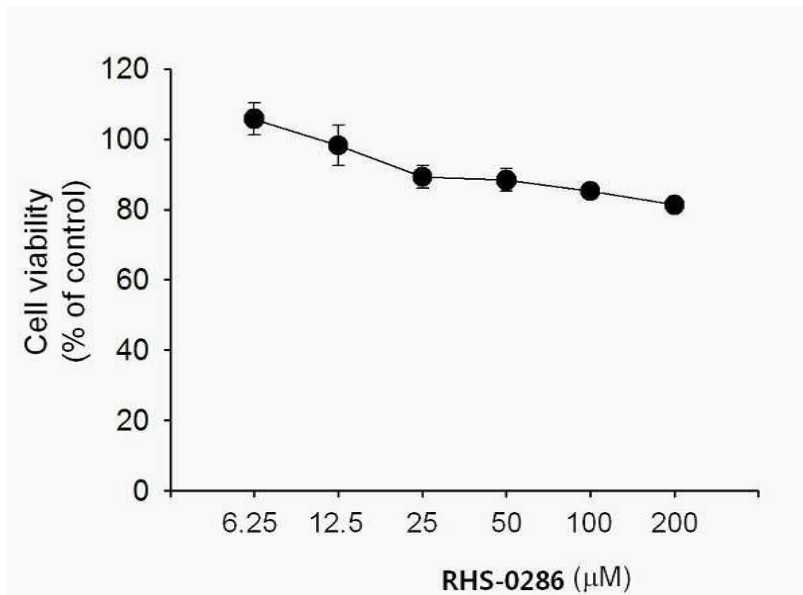
[0104] 상기 ICR쥐에 위염을 유발시키고, 라니티딘 40mg/kg 및 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 50, 100 및 200mg/kg씩 처리하고 위염이 유발된 면적의 변화를 확인하여 도 11 및 도 12에 나타내었다. 상기 라니티딘은 위 궤양 또는 역류성 식도염에 사용되는 치료제로, 히스타민 수용체(H2 receptor)를 막아 위벽세포에 위산 분비를 감소시키는 H2-Blocker중 하나이다.

[0105] 도 11을 살펴보면 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 50mg/kg 처리한 경우에도 대조군에 비하여 위염 발생 면적이 감소한 것을 확인할 수 있고, 100 및 200mg/kg을 각각 처리한 경우 유의적으로 위염이 유발된 면적이 감소된 바, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물의 경우 위염의 치료 및 예방 효과가 있음을 확인할 수 있다.

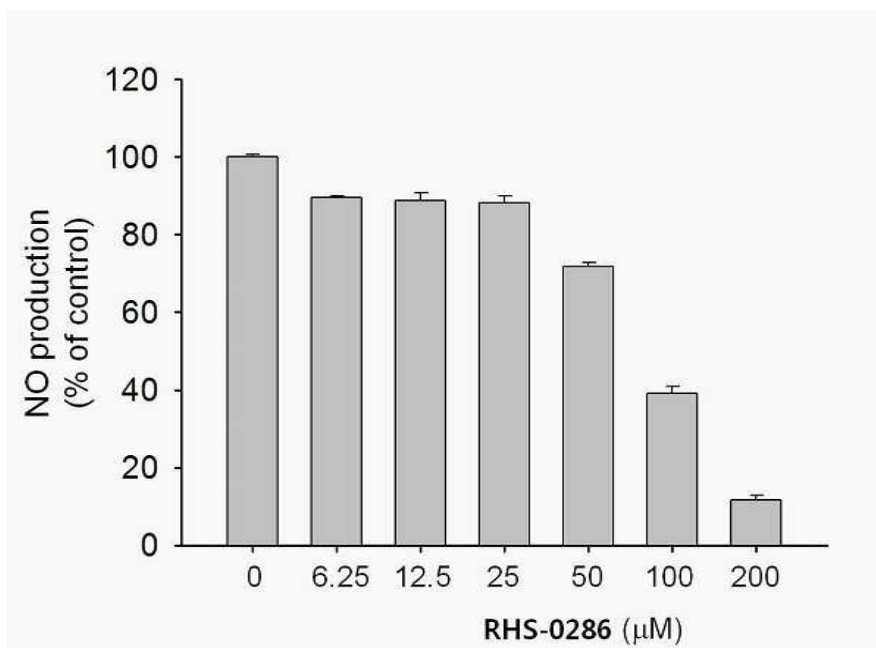
[0106] 또한 도 12를 살펴보면 염증이 유발된 쥐(vehicle)와 유발되지 않은 경우(nor)의 차이를 확인할 수 있고, 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리한 경우 염증 정도가 완화되는 것을 확인할 수 있다. 특히 화학식 1로 표시되는 화합물을 200mg/kg 처리한 경우 라니티딘을 처리한 경우 육안으로 거의 동일한 염증 치료효과가 있는 것을 확인할 수 있다.

도면

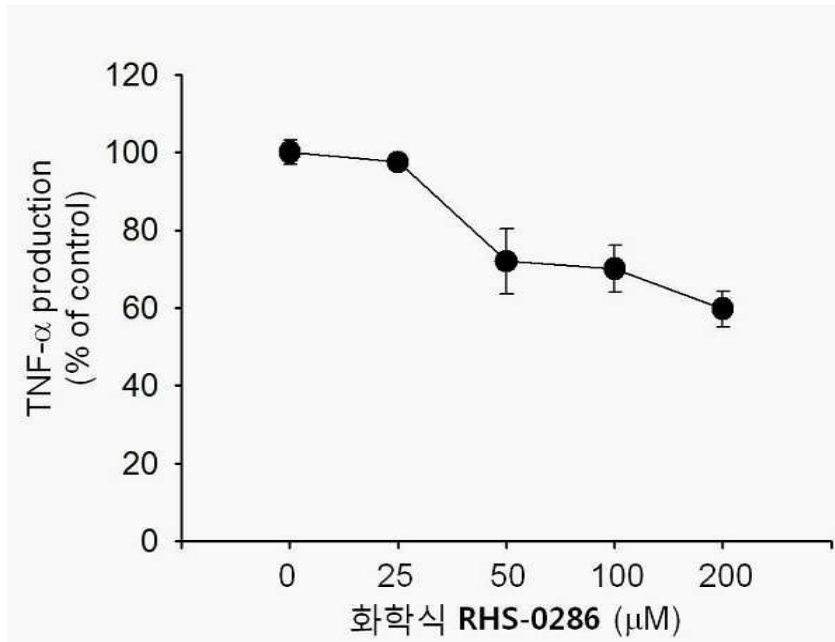
도면1



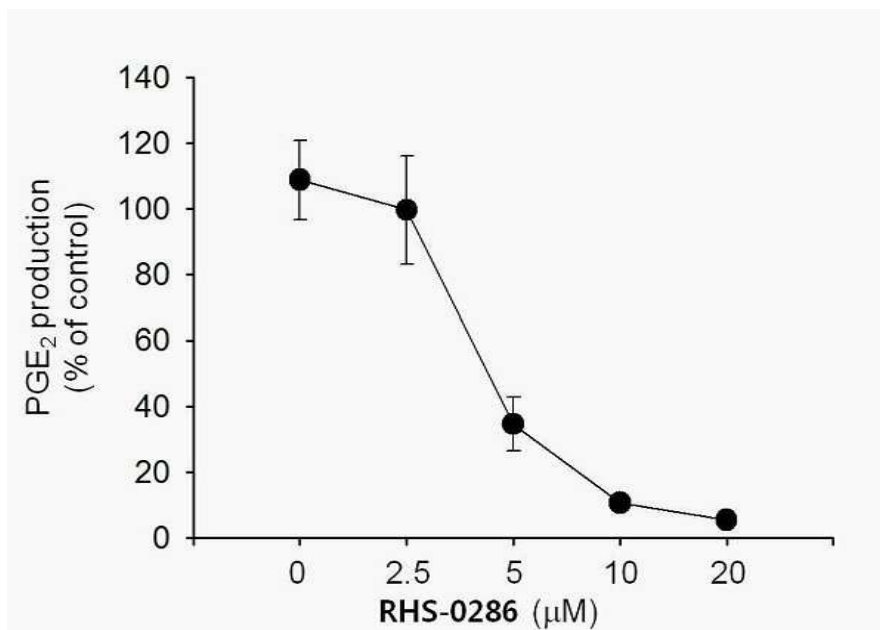
도면2



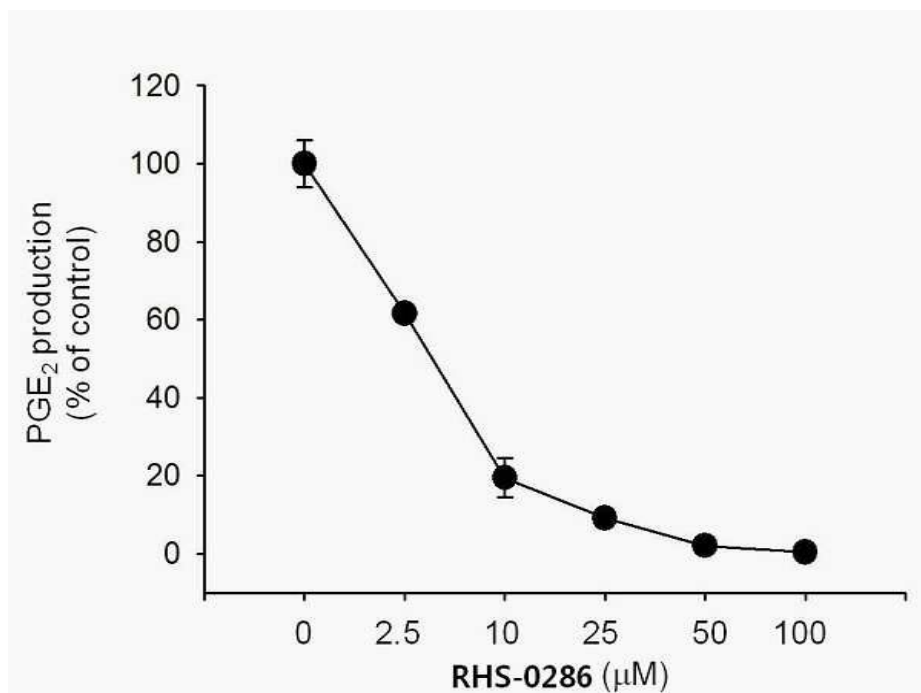
도면3



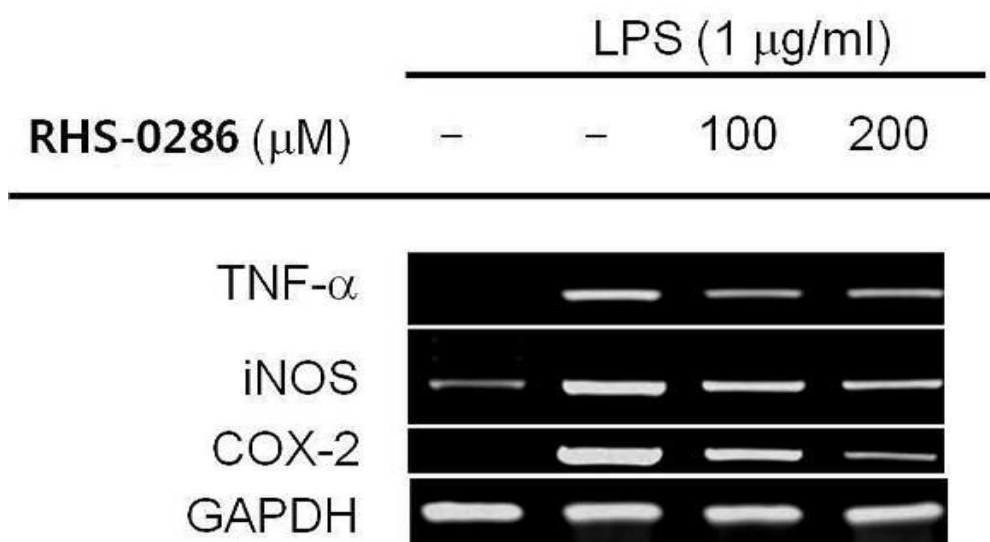
도면4



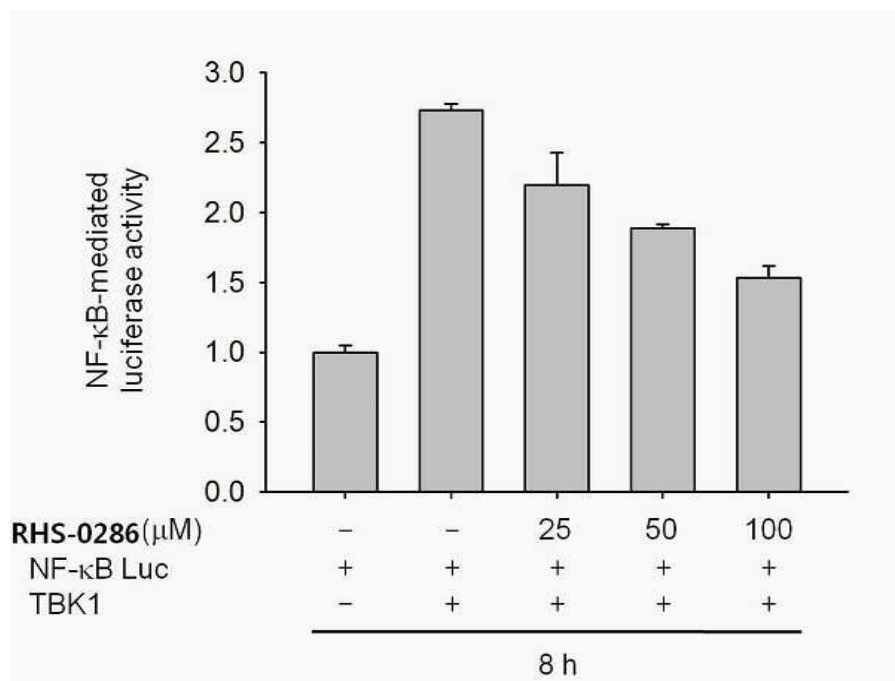
도면5



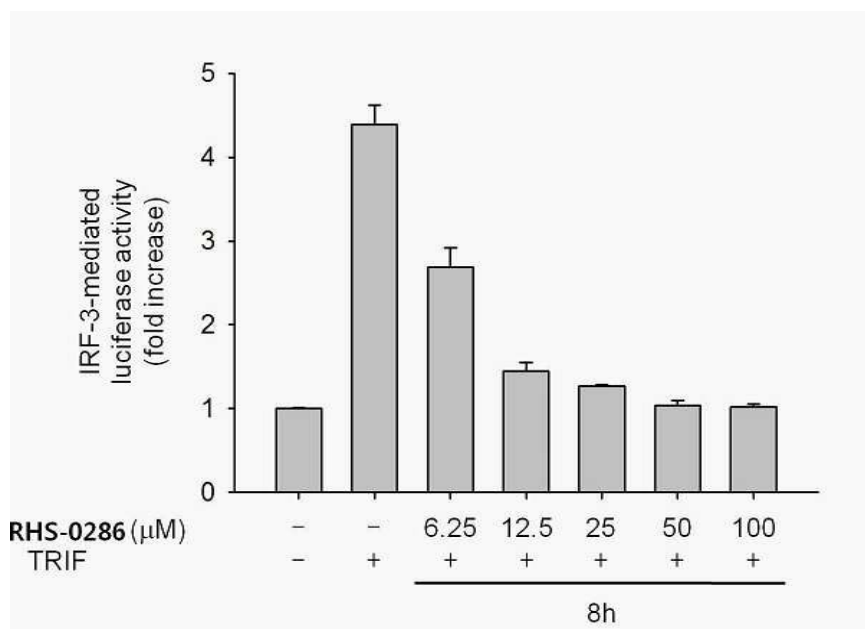
도면6



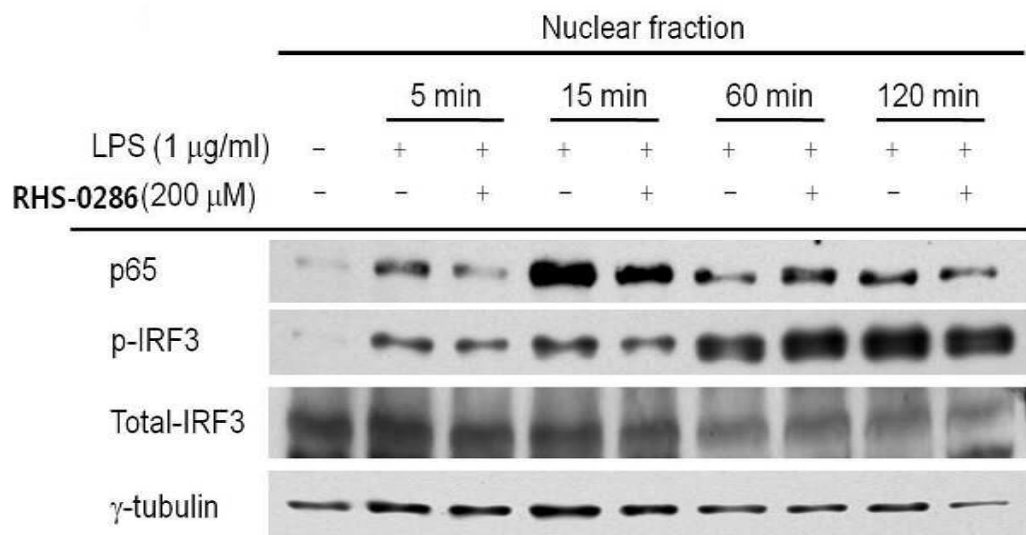
도면7



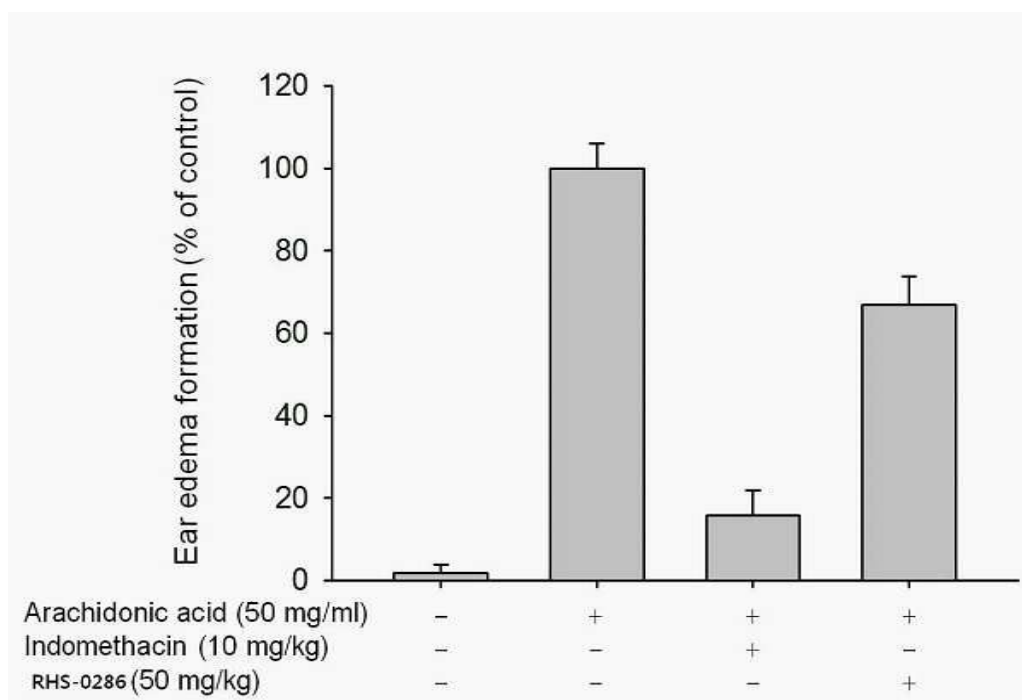
도면8



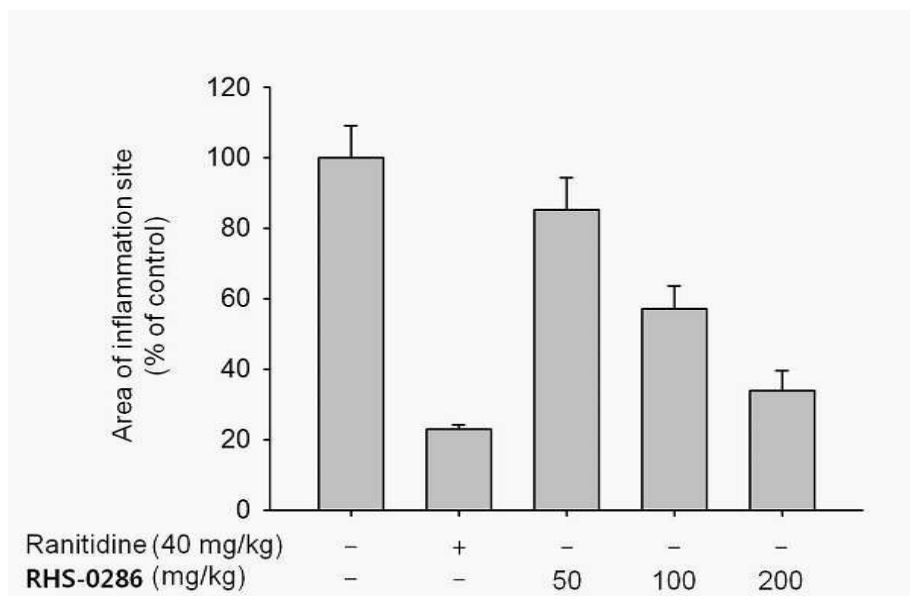
도면9



도면10



도면11



도면12

