



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0035384
(43) 공개일자 2019년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) A61K 47/06 (2017.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 9/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0014 (2013.01)
A61K 31/4164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0124525
(22) 출원일자 2017년09월26일
심사청구일자 2017년09월26일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(72) 발명자
임미희
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김상태
서울특별시 성동구 왕십리로 241, 101동 3605호(행당동, 서울숲 더샵)
한호성
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호(삼성동, 삼성 대우 멤버스카운티1차)
(74) 대리인
리엔목특허법인

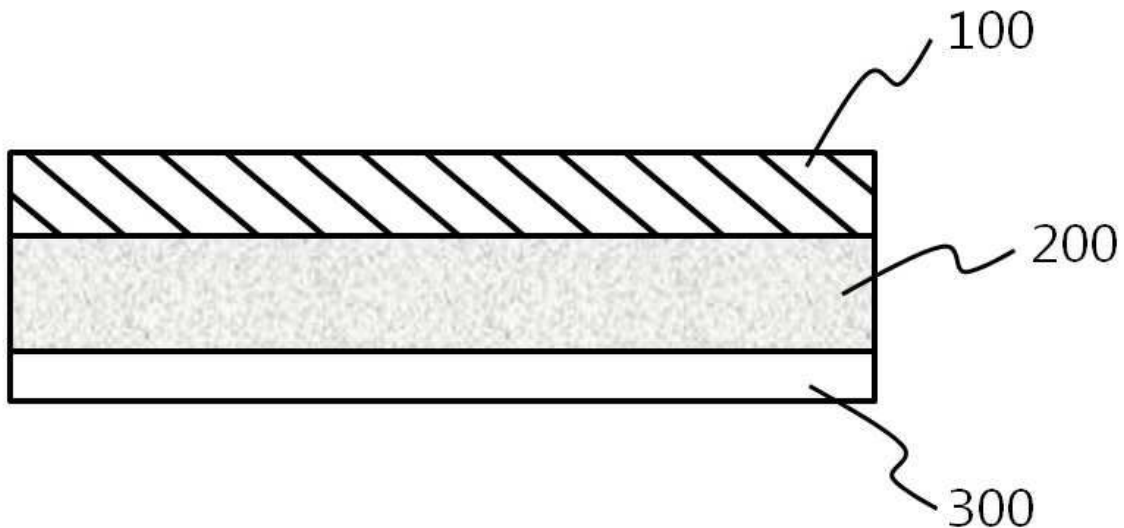
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 약물의 경피 흡수가 증진된 제제

(57) 요약

본 발명은 치매, 알츠하이머 병, 및 탈모 예방 또는 치료를 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 경피 흡수 제제에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 31/44 (2013.01)

A61K 47/06 (2013.01)

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 9/7023 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711050877

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(미래부)(13111015015112001234301)

연구과제명 치매 병리에 금속-단백질-활성산소종 네트워크의 역할 규명 연구

기 여 율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711048290

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(13111015015112001234302)

연구과제명 다공성 플랫폼 기반 생체모방 촉매

기 여 율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및
벤젠 디아민 유도체를 포함하는 경피 흡수 제제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 벤젠 디아민 유도체는 N^1 -(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민, N^1 -((5-플루오로피리딘-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민, $N1,N1$ -디메틸- $N4$ -((1-메틸-1H-이미다졸-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민, 2-((4-(디메틸아미노)페닐)아미노)에탄-1-티올, 또는 이들의 조합인 것인 제제.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 경피 흡수 촉진제는 구연산 유도체를 더 포함하는 것인 제제.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 경피 흡수 촉진제는 트리아세틴(triacetin)을 더 포함하는 것인 제제.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 경피 흡수 촉진제는 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene)을 더 포함하는 것인 제제.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 지방족 탄화수소 유도체는 2 종 이상을 포함하는 것인 제제.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 지방족 탄화수소 유도체는 이소프로필 미리스트레이트(isopropylmyristate), 옥수수 유 PEG-8 에스테르, 옥수수유 PEG-6 에스테르, 라우릴알코올, 글리세롤 라우릴알코올, 올레일 알콜(oleyl alcohol), 라우릴 락테이트(lauryl lactate), 올레오일 마크로골 글리세라이드(oleoylmacrogolglyceride), 올레인산(oleic acid), 라우로일 마크로골 글리세라이드(lauroyl macrogolglyceride), 리놀레오일 마크로골 글리세라이드(linoleoyl macrogolglyceride), 글리세롤모노라우레이트, 글리세롤 모노올레이트, 이소프로필미리스테이트, 프로필렌 모노라우레이트(propylenemonolaurate), 프로필렌글리콜 라우레이트(propyleneglycol laurate), 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate), 소르비탄 모노스테아레이트 모노올레이트(Sorbitan monostearate monooleate), 소르비탄 모노올레이트(sorbitan mono-oleate), 프로필렌글리콜 모노라우레이트(propyleneglycol monolaurate), 프로필렌 모노올레이트(propylene monooleate), 프로필렌글리콜 모노올레이트, 올레일 마크로고글리세라이드, 올레인산, 라우로 일마크로고글리세라이드, 리놀레오일 마크로고글리세라이드, 프로필렌글리콜 카프릴레이트(Propyleneglycol caprylate), 프로필렌글리콜 카프레이트(Propylene glycol caprate), 카프릴릭 트리글리세라이드(caprylic triglyceride), 카프릭 트리글리세라이드(capric triglyceride), 카프릴릭-카프릭 트리글리세라이드(caprylic-capric triglyceride), 프로필렌글리콜 모노카프릴레이트(propyleneglycol monocaprylate), 폴리옥시에틸렌 모노올레이트(polyoxyethylene monooleate), 폴리글리세릴 디이소스테아레이트(polyglyceryl diisostearate), 소르비탄모노스테아레이트, 또는 이들의 조합인 것인 제제.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 지방족 탄화수소 유도체는 글리세롤 모노라우레이트(glycerol monolaurate), 글리세롤 모노올레이트(glycerol monooleate), 또는 이들의 조합인 것인 제제.

청구항 9

청구항 3에 있어서, 상기 구연산 유도체는 아세틸트리에틸시트레이트(Acetyl triethyl citrate), 디에틸시트레이트(Diethyl citrate), 트리부틸시트레이트(tributyl citrate), 트리에틸시트레이트(triethyl citrate), 아세틸트리부틸시트레이트(Acetyl tributyl citrate), 또는 이들의 조합인 것인 제제.

청구항 10

청구항 3에 있어서, 상기 구연산 유도체는 트리에틸시트레이트인 것인 제제.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 피롤리돈 유도체는 N-사이클로헥실-2-피롤리돈(N-Cyclohexyl-2-pyrrolidone), 1-부틸-3-도데실-2-피롤리돈(1-Butyl-3-dodecyl-2-pyrrolidone), 1,5-디메틸-2-피롤리돈(1,5-Dimethyl-2-pyrrolidone), 1-에틸-2-피롤리돈(1-Ethyl-2-pyrrolidone), 1-헥실-4-메틸옥시카르보닐-2-피롤리돈(1-Hexyl-4-methyloxycarbonyl-2-pyrrolidone), 1-헥실-2-피롤리돈(1-Hexyl-2-pyrrolidone), 1-(2-하이드록시에틸)피롤리돈(1-(2-Hydroxyethyl)pyrrolidone), 3-하이드록시-N-메틸-2-피롤리돈(3-Hydroxy-N-Methyl-2-pyrrolidone), 라우릴 피롤리돈(Lauryl pyrrolidone), 1-라우릴-4-메틸옥시카르보닐-2-피롤리돈(1-Lauryl-4-methyloxycarbonyl-2-pyrrolidone), N-메틸-2-피롤리돈(NMethyl-2-pyrrolidone), N-카프릴릴-2-피롤리돈(N-Carpryl-2-pyrrolidone), N-도데실-2-피롤리돈(NDodecyl-2-pyrrolidone), 또는 이들의 조합인 것인 제제.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 피롤리돈 유도체는 N-도데실-2-피롤리돈인 것인 제제.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 경피 흡수 촉진제 중 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체의 총 함량은 15 w/w% 이상인 것인 제제.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 경피 흡수 제제는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용인 것인 제제.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매 또는 알츠하이머 성 치매인 것인 제제.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 경피 흡수 제제는 탈모 치료용인 것인 제제.

청구항 17

약물 함유 매트릭스층을 지지층의 적어도 한쪽 면에 형성하는 첨부제로서,

상기 매트릭스 층은 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 것인 첨부제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벤젠 디아민 유도체의 경피 흡수를 촉진시키기 위한 제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 뇌질환은 다양한 원인에 의해 뇌신경에 일시적 또는 지속적인 손상이 발생하여, 점차적으로 정신 또는 운동 기능의 전반적인 장애가 나타나는 것을 특징으로 한다. 퇴행성 뇌질환으로 보고된 질환은 약 70 여 가지 이상이 있으나, 그 중 대표적으로 치매, 알츠하이머 성 치매, 파킨슨병, 또는 전측두엽 퇴행병 등이 대표적으로

잘 알려져 있다.

- [0003] 그 중 치매(dementia)는 유발률이 높은 질환 중 하나로, 기억력, 주의력, 언어기능, 시공간 능력 등에서 대뇌피질 기능장애가 발생하여 치매 환자들은 일상, 사회생활을 영위하는데 큰 어려움을 겪게 된다(Kumar V et al., Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Saunders., 7 (2004): 1386-1388).
- [0004] 현재까지 FDA등을 통해 공식적으로 치매 치료제로 허가된 약물은 대부분 알츠하이머 치매를 대상으로 하고 있는데, 그 약물 작용점이 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase)에 제한되어 있다 (예를 들어, 도네페질). 하지만, 이 효소를 억제하는 것은 아세틸콜린 저하 현상을 억제하여 정상적인 생활이 가능하도록 유도하는 역할만을 할 뿐, 치매를 일으키는 근본적인 원인을 치료하는 방법이 아니다. 그 외에 N-메틸-D-아스파테이트(N-methyl-D-aspartate; NMDA) 수용체 길항제를 이용하는 약물요법이 있으나, 이 또한 알츠하이머병 환자에서 ACh의 감소에 근거한 것으로서, 마찬가지로 근본적인 치료 방법이 아니다. 즉, 아직까지는 치매의 발병 원인을 근본적으로 되돌려 정상 상태로 만들어주는 약물은 없는 실정이다.
- [0005] 더욱이 치매 환자들 중 증상이 악화된 인지증 환자의 경우, 간병인의 지속적인 관리가 없이 환자 자발적으로 복약 지도서에 따라 용법 및 용량을 맞추어 복용하는 것을 기대하기 힘들다. 따라서, 이러한 환자들에게는 장기적이고 지속적으로 약물 방출이 가능한 제제가 요구된다.
- [0006] 탈모증은 모발의 성장 주기에서 성장기의 모발 비율이 짧아지고 퇴행기 또는 휴지기의 모발이 많아져 비정상적으로 모발이 탈락하는 숫자가 많아지는 것을 일컫는다. 탈모증의 치료나 예방 목적으로 현재까지 미국 FDA의 승인을 받은 화합물은 피나스트리드(finastride)와 미녹시딜(minoxidil)이 있다. 피나스트리드는 탈모 예방약으로 사용되고 있으나, 탈모 치료 효과는 다소 미약하다. 또한, 남성 호르몬에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고, 단지 피부 접촉만으로 유발될 수 있는 가임기 여성에게 미치는 최기형성 부작용으로 피나스트리드를 사용할 수 있는 환자는 그 한계가 있다. 더욱이, 피나스트리드는 단지 경구용으로만 사용되고 있다. 미녹시딜은 외용제로 사용되고 있으나, 발모 작용 기전이 정확히 밝혀지지 않았고 치료 효과가 미약하여 여전히 이를 대체할 수 있는 약물이 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 일 양상은 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 경피 흡수 제제를 제공한다.
- [0008] 다른 양상은 약물 함유 매트릭스층을 지지층의 적어도 한쪽 면에 형성하는 첩부제로서, 상기 매트릭스 층은 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 것인 첩부제를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 일 양상은 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 경피 흡수 제제를 제공한다.
- [0010] 일 구체예에서, 지방족 탄화수소 유도체는 이소프로필 미리스트레이트(isopropylmyristate), 옥수수유 PEG-8 에스테르, 옥수수유 PEG-6 에스테르, 라우릴알코올, 글리세롤 라우릴알코올, 올레일 알콜(oleyl alcohol), 라우릴 락테이트(lauryl lactate), 올레오일 마크로콜 글리세라이드(oleoylmacrogolglyceride), 올레인산(oleic acid), 라우로일 마크로콜 글리세라이드(lauroyl macrogolglyceride), 리놀레오일 마크로콜 글리세라이드(linoleoyl macrogolglyceride), 글리세롤모노라우레이트, 글리세롤 모노올레이트, 이소프로필미리스테이트, 프로필렌 모노라우레이트(propylenemonolaurate), 프로필렌글리콜 라우레이트(propyleneglycol laurate), 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate), 소르비탄 모노스테아레이트 모노올레이트(Sorbitan monostearate monooleate), 소르비탄 모노올레이트(sorbitan mono-oleate), 프로필렌글리콜 모노라우레이트(propyleneglycol monolaurate), 프로필렌 모노올레이트(propylene monooleate), 프로필렌글리콜 모노올레이트, 올레일 마크로콜 그리세라이드, 올레인산, 라우로 일마크로콜글리세라이드, 리놀레오일 마크로콜글리세라이드, 프로필렌글리콜 카프릴레이트(Propyleneglycol caprylate), 프로필렌글리콜 카프레이트(Propylene glycol caprate), 카프릴릭 트리글리세라이드(caprylic triglyceride), 카프릭 트리글리세라이드(capric triglyceride), 카프릴릭-카프릭 트리글리세라이드(caprylic-capric triglyceride), 프로필렌글리콜 모노카프릴레이트(propyleneglycol

monocaprylate), 폴리옥시에틸렌 모노올레이트(polyoxyethylene monooleate), 폴리글리세릴 디이소스테아레이트(polyglyceryl diisostearate), 소르비탄모노스테아레이트, 또는 이들의 조합일 수 있다.

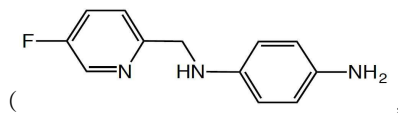
[0011] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 글리세롤 모노라우레이트(glycerol monolaurate), 글리세롤 모노올레이트(glycerol monooleate), 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 지방족 탄화수소 유도체를 2 종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 2 종 이상의 지방족 탄화수소 유도체는 적어도 글리세롤 모노라우레이트 및 글리세롤 모노올레이트; 글리세롤 모노라우레이트 및 소르비탄모노라우레이트; 글리세롤 모노올레이트 및 소르비탄 모노라우레이트; 또는 글리세롤모노라우레이트, 글리세롤 모노올레이트, 및 소르비탄 모노라우레이트를 포함하는 것일 수 있다.

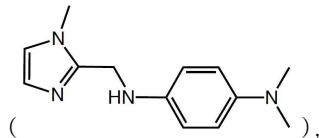
[0013] 일 구체예에서, 상기 피롤리돈 유도체는 N-사이클로헥실-2-피롤리돈(N-Cyclohexyl-2-pyrrolidone), 1-부틸-3-도데실-2-피롤리돈(1-Butyl-3-dodecyl-2-pyrrolidone), 1,5-디메틸-2-피롤리돈(1,5-Dimethyl-2-pyrrolidone), 1-에틸-2-피롤리돈(1-Ethyl-2-pyrrolidone), 1-헥실-4-메틸옥시카르보닐-2-피롤리돈(1-Hexyl-4-methyloxycarbonyl-2-pyrrolidone), 1-헥실-2-피롤리돈(1-Hexyl-2-pyrrolidone), 1-(2-하이드록시에틸)피롤리돈(1-(2-Hydroxyethyl)pyrrolidone), 3-하이드록시-N-메틸-2-피롤리돈(3-Hydroxy-N-Methyl-2-pyrrolidone), 라우릴 피롤리돈(Lauryl pyrrolidone), 1-라우릴-4-메틸옥시카르보닐-2-피롤리돈(1-Lauryl-4-methyloxycarbonyl-2-pyrrolidone), N-메틸-2-피롤리돈(NMethyl-2-pyrrolidone), N-카프릴릴-2-피롤리돈(N-Carpryl-2-pyrrolidone), N-도데실-2-피롤리돈(NDodecyl-2-pyrrolidone), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0014] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 N-도데실-2-피롤리돈을 포함하는 것일 수 있다.

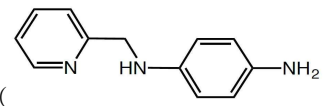
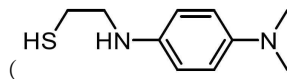
[0015] 일 구체예에서, 상기 벤젠 디아민 유도체는 N¹-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민

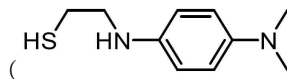
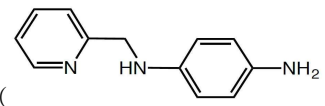


N¹-((5-플루오로피리딘-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민



N1,N1-디메틸-N4-((1-메틸-1H-이미다졸-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민



(, 2-((4-(디메틸아미노)페닐)아미노)에탄-1-티올 (, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0016] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 구연산 유도체를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 일 구체예에서, 상기 구연산 유도체는 아세틸트리에틸시트레이트(Acetyl triethyl citrate), 디에틸시트레이트(Diethyl citrate), 트리부틸시트레이트(tributyl citrate), 트리에틸시트레이트(triethyl citrate), 아세틸트리부틸시트레이트(Acetyl tributyl citrate), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0018] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 트리에틸시트레이트를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 트리아세틴(triacetin)을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제는 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene)을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 일 구체예에서, 상기 경피 흡수 촉진제 중 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체의 총 함량은 15 w/w% 이상일 수 있다. 상기 경피 흡수 촉진제 중 지방족 탄화수소 유도체의 총 함량은 10 w/w% 이상일 수 있다. 다른 구체예에서 상기 경피 흡수 촉진제 중 지방족 탄화수소 유도체의 총 함량은 12.5 w/w% 이상일 수 있다. 상기 경피 흡수 촉진제 중 피롤리돈 유도체는 2.5 w/w% 이상일 수 있다. 상기 경피 흡수 촉진제 중 트리아세틴은 5 w/w% 이상일 수 있다. 상기 경피 흡수 촉진제 중 구연산 유도체는 5 w/w% 이상일 수 있다. 상기 경피 흡수 촉진제에 포함되는 벤젠 디아민 유도체의 함량은 1 w/w% 이상일 수 있다.

[0022] 상기 경피 흡수 촉진제에 함유된 벤젠 디아민 유도체는 약학적으로 허용가능한 염과 결합된 형태일 수 있다.

[0023] 상기 '약학적으로 허용가능한 염'은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 염으로서, 이 염에 기

인한 부작용이 본 발명의 조성물 내 화합물의 이로온 효능을 떨어뜨리지 않는 것을 의미한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염으로는 화합물의 임의의 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 상기 염으로는 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 클리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 메실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 푸마레이트, 글루세이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프틸레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트일 수 있다.

[0024] 상기 경피 흡수 제제는 벤젠 디아민 유도체를 외용제로 사용하기에 적합할 수 있다. 상기 외용제는 패취, 밴드, 유액, 연고, 팩, 젤, 크림, 로션, 액제 또는 분말제의 형태로 적용될 수 있고, 화장품으로서 유연화장수, 영양화장수, 마사지 크림, 영양크림, 보습크림, 기능성 로션, 미스트, 팩, 젤 또는 피부 점착타입 제형으로서 적용될 수 있다. 따라서 상기 외용제로 사용되기 위하여 통상 화장품이나 의약품 등의 외용제에 사용되는 성분, 예컨대 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제 등이 조성물에 필요에 따라서 적절하게 배합될 수 있다. 상기 외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속붕쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.

[0025] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체는 Aβ 응집을 억제하는 효과, 및 치매 동물 모델에서 치매 증상 완화 효과가 있음을 확인하였다. Aβ 단백질의 치매 및 알츠하이머에 대해서는 매우 잘 알려져 있고, 파킨슨병에서도 Aβ 침적 또는 응집이 높게 나타나며 이는 곧 파킨슨병에서 흔히 관찰되는 파킨슨성 치매와도 연관이 깊다고 보고되어 왔다 (Mov Disord. Nov;11(6) (1996): 647-53 등). 또한, 과도한 Aβ는 타우 단백질의 과인산화를 촉진시킬 수 있어, 전측두엽 퇴행병에 수반되는 신경세포 줄기의 엉킴 형성과 관련성이 있다고 보고된 바 있다 (Curr Alzheimer Res. 2010 Dec; 7(8): 656-664). 따라서, 일 구체예에서 상기 경피 흡수 제제는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용일 수 있다.

[0026] 일 구체예에서 상기 퇴행성 뇌질환은 치매 또는 알츠하이머 성 치매일 수 있다.

[0027] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체는 경피 투여되어 SOX2 및 SOX9의 발현을 증가시키고, 탈모 모델 마우스에서 발모 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다. 따라서, 일 구체예에서 상기 경피 흡수 제제는 탈모 치료용일 수 있다.

[0028] 다른 양상은 약물 함유 매트릭스층을 지지층의 적어도 한쪽 면에 형성하는 첩부제로서, 상기 매트릭스 층은 지방족 탄화수소 유도체 및 피롤리돈 유도체를 포함하는 경피 흡수 촉진제; 및 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 것인 첩부제를 제공한다.

[0029] 상기 첩부제는 도 7에 나타난 바와 같이 지지층 (100), 매트릭스층 (200), 및 박리층 (300)을 포함하는 것일 수 있다,

[0030] 상기 지지층 (100)은 적어도 일면에 약물 함유 매트릭스층을 지지하는 것이고, 매트릭스층의 형태를 고정, 부착 후 건조에 의한 경화 현상을 방지, 외부로의 약물 유출 차단, 또는 외부로부터 매트릭스 층으로의 오염 물질 유입을 방지하기 위함이다. 상기 지지층의 재료는 폴리우레탄, 폴리에스테르, 폴리올레핀, 폴리염화비닐, 폴리염화비닐리덴, 에틸렌/초산비닐 공중합체등에서 되는 각종플라스틱 필름, 펄프, 금속박, 발포 시트, 직포, 부직포, 편포, 중공 섬유실 등을 이용한 다공 섬유상 시트 및 이들을 적층한 복합 필름 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 매트릭스층 (200)은 약물을 함유하고 있으며, 상기 약물은 주적응증을 치료하기 위한 활성 성분으로서 벤젠 디아민 유도체일 수 있으나, 이를 강화하는 보조 성분, 예를 들어, 영양제, 효소, 복합 활성 성분 등을 포함하는 개념이다. 상기 매트릭스층은 활성 성분으로서 벤젠 디아민 유도체 및 점착제를 함유하는 경피 흡수 촉진제를 포함한다. 상기 점착제는 폴리에틸렌 비닐아세테이트, 스티렌-이소프렌-스티렌, 스티렌-에틸렌-프로필렌, 스티렌-부타디엔-스티렌, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 점착제는 경피 흡수 촉진제에서 50 w/w% 포함될 수 있다. 상기 매트릭스층은 미세바늘을 포함하여 활성 성분의 흡수를 더욱 촉진시킬 수 있도록 고안된 것일 수 있다.

[0032] 상기 박리층 (300)은 이형지, 이형필름, 박리 라이너 등의 용어와 동일한 의미로 사용될 수 있으며, 선택적으로 형성되는 것일 수 있다. 상기 박리층은 제제 보관 시에 매트릭스층을 보호하는 역할을 하는 것으로서, 사용 시 탈착 및 제거되는 부분을 의미한다. 상기 박리층은 실리콘 수지 처리 또는 불소수지 처리를 한 박리지, 금속박, 알루미늄 박, 플라스틱 필름, 폴리에틸렌 필름, 플로로카본디아크릴레이트 코팅지 등으로 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 일 양상에 따른 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 경피 흡수 제제를 이용하여, 벤젠 디아민 유도체를 경피로 투여하여, 경구제, 주사제 등에 비하여 환자의 복약 순응도를 매우 우수하게 상승시키고, 장시간 약물을 지속적으로 투여시킬 수 있으면서도 약물의 부작용을 최소화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 치매 모델 마우스의 수조 미로 시험(water maze test)에서 행동적 변화를 탈출잠복기(escape latency)로 나타낸 것이다.

도 2는 치매 및 탈모 모델 마우스에서 화합물 2에 의한 피부 변화를 보여준다.

도 3은 치매 및 탈모 모델 마우스에 화합물 2를 경구 투여한 후 SOX2 발현양상을 나타낸 것이다.

도 4는 치매 및 탈모 모델 마우스에 화합물 2를 경구 투여한 후 SOX9 발현양상을 나타낸 것이다.

도 5는 치매 및 탈모 모델 마우스에 화합물 2를 경피 투여 후 SOX2 발현양상을 나타낸 것이다.

도 6은 치매 및 탈모 모델 마우스에 화합물 2를 경피 투여한 후 SOX9 발현양상을 나타낸 것이다.

도 7은 첨부제의 구조를 도식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

[0036] 1. 제조예 1: 벤젠 디아민 유도체의 합성

[0037] 벤젠 디아민 유도체를 하기와 같이 합성하였다.

[0038] 1-1. N1-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 2)의 합성

[0039] (1) 단계 1

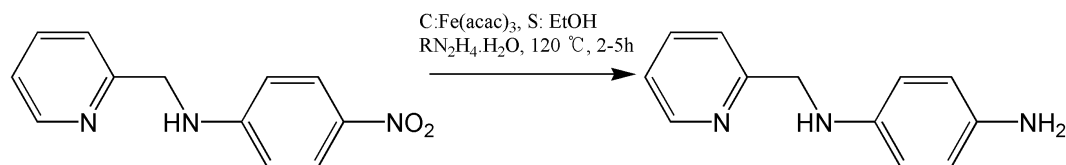


[0040]

[0041] 질소 기체 하에서, 환류 콘덴서와 환류 콘덴서와 자석 교반자를 갖춘 잘 마른 플라스크에 1-플루오로-4-니트로벤젠 (231 μ l, 2.2 mmol)과 N,N-디이소프로필에틸아민 (836 μ l, 4.8 mmol), 및 DMF(25 mL)를 넣고 2-(아미노메틸)피리딘 (247 μ l, 2.4 mmol)을 상온에서 첨가한 후, 혼합액을 70 $^{\circ}$ C로 가열하였다. 12 시간 후, 생성된 갈색의 용액에 물(75 mL)를 넣고 EtOAc(3 x 75 mL)로 추출하였다. 추출한 유기용액은 물(2 x 75 mL)과 염수(75 mL)로 세척하였다. 그 후 $MgSO_4$ 를 넣고 여과한 후, 여과액을 농축하였다. 상기 농축한 용액을 실리카 칼럼 크로마토그래피(25% 에서 100% *n*-헥산 중 EtOAc)로 정제하여 노란색 고체의 화합물을 얻는다(0.29 g, 수득률: 58%).

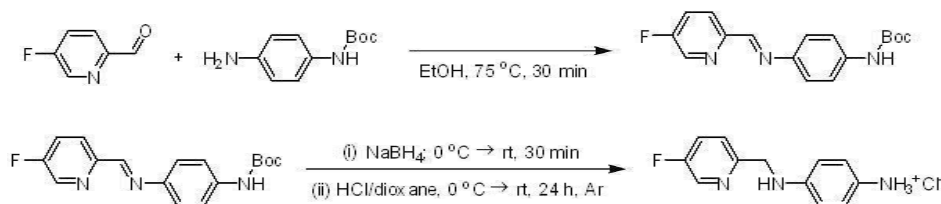
[TLC 조건(EtOAc:*n*-헥산 = 50:50 (v/v)): R_f = 0.25].

(2) 단계 2



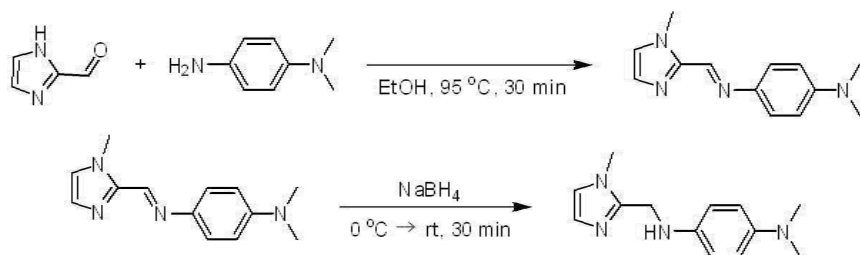
환류 콘덴서와 자석 교반자를 갖춘 잘 마른 플라스크에 상기 단계 1에서 수득된 화합물(0.52 g, 2.3 mmol)과 트리스(아세틸아세토나토)철(III) (0.024 g, 3 mol%), 및 에탄올(20 mL)을 첨가한 후, 히드라진 히드레이트(581 μ l, 11 mmol)와 혼합하였다. 상기 혼합물을 2 시간 동안 120 °C에서 환류하며 가열시켰다. 2 시간 후, 반응물이 남아있을 경우, 매 시간마다 추가로 4 당량의 히드라진 히드레이트를 첨가하였다. 생성된 갈색 오일은 농축한 후에 실리카 칼럼 크로마토그래피(EtOAc (100%)에서 EtOAc:Et₃N(99%:1%); TLC조건: (EtOAc:Et₃N=99:1(v/v)), R_f = 0.20)로 정제하였다. 상기 정제된 화합물을 최소량의 MeOH에 녹인 후, 과량의 5 M HCl을 첨가하여 염 형태의 화합물을 생성하였다. 생성물을 진공 조건에서 농축한 후 Et₂O(3x5mL)로 세척하였다. 수득된 화합물을 물(20 mL)에 녹여 수용액 층을 생성시키고 그 수용액 층을 Et₂O(3x20mL)로 세척하고 다시 농축하였다. 물을 진공 조건에서 제거한 후, MeOH와 Et₂O를 이용하여 재결정화하였다. 생성물은 옅은 노랑색 고체이다 (0.45 g. 수득률: 85%).

1-2. *N*-((5-플루오로피리딘-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 3)의 합성



5-플루오로피리딘-2-카르복살데히드 (20 mg, 0.152 mmol)를 *N*-(*tert*-부톡시카르보닐)-1,4-페닐렌디아민 (33.3 mg, 0.152 mmol)을 함유하는 에탄올 용액 (EtOH; 1.5 mL)에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 75 °C에서 24 시간 동안 교반하였다. 용매를 다른 정제 없이 진공 하에 농축시켜 황색 고체 생성물 (50.4 mg, 0.152 mmol)을 수득하였다. 소듐 보로하이드라이드 (NaBH₄, 34.5 mg, 0.911 mmol)를 메탄올 (2 mL, 0 °C로 냉각된 것)에 첨가하여 이민 생성물의 용액을 얻었다. 상기 용액을 0 °C에서 5 분간 교반하였다. 실온에서 30 분 후, 상기 반응을 H₂O로 중단(quench)시키고 에틸 아세테이트 (EtOAc, 3x)로 추출하였다. 상기 혼합된 유기 상을 염수(1x)로 세척하고 무수 마그네슘 설페이트 (MgSO₄) 상에서 건조시켰다. 상기 조 화합물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, EtOAc: hexanes = 1:6 to 1:2)로 정제하여, 백색 고체 생성물 (33.9 mg, 0.107 mmol, 70.4%)을 수득하였다. 마그네틱 교반바가 장치된 둥근 플라스크에서 HCl/디옥산 (4 mL, 4.0 M) 용액을 Ar (g) 하에 0 °C에서 냉각시켰다. Boc-보호된 화합물을 첨가한 다음, 반응물을 실온에서 교반하였다. 24 시간 후, 용매를 진공 하에 농축하였다. 그 잔여물을 디에틸 에테르 (Et₂O)로 세척하고 여과하여 수집하여, 황색 고체 생성물(10.2 mg, 0.04 mmol, 37.6%)을 얻었다. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 10.0 (3H, s), 8.63 (1H, d, J = 3.2 Hz), 7.83 (1H, td, J = 2.8 Hz, J = 12.4), 7.55 (1H, m), 7.14 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.77 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.47 (6H, s). ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 160.1, 157.6, 154.7, 146.5, 136.4, 126.01, 124.2, 122.1, 114.7, 48.2. ESI-MS (m/z): [$M + H$]⁺ Calcd. for C₁₂H₁₃FN₃⁺, 218.1; found, 218.0.

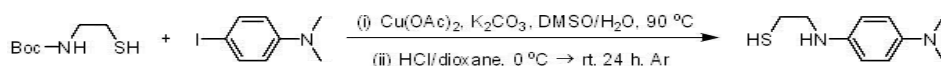
[0048] 1-3. *N,N'*-디메틸-*N'*-((1-메틸-1*H*-이미다졸-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 4)의 합성



[0049]

[0050] 1*H*-이미다졸-2-카르발데히드 (84.7 μ l, 0.88 mmol) 및 *N,N'*-디메틸벤젠-1,4-디아민 (115 μ l, 0.88 mmol)을 마그네틱 교반바가 있는 EtOH (1.2 mL)을 포함하는 시험 튜브에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 95 °C에서 30 분간 N₂ (g) 하에 교반하였다. 0 °C로 상기 용액을 냉각시킨 후, MeOH (3 mL, cooled to 0 °C) 중에 용해된 NaBH₄ (222 mg, 5.87 mmol)를 상기 이민 생성물 용액에 직접적으로 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 상기 반응을 H₂O로 중단시키고, Et₂O (3x)로 추출하였다. 생성물 (갈색 고체; 89.1 mg, 0.39 mmol, 44%)을 Et₂O 및 헥산으로부터 재결정화함으로써 얻었다. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 8.51 (1H, s), 7.36 (1H, s), 7.27 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.10 (1H, s), 6.77 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 4.05 (3H, s), 2.93 (6H, s). ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 146.2, 143.6, 141.3, 126.4, 122.1, 115.8, 114.1, 42.2, 41.3, 32.8. ESI-MS (*m/z*): [M + H]⁺ Calcd. for C₁₃H₁₉N₄⁺, 231.2; found, 231.3.

[0051] 1-4. 2-((4-(디메틸아미노)페닐)아미노)에탄-1-티올 (화합물 5)의 합성



[0052]

[0053] 4-이오도-N,N'-디메틸아닐린 (490 mg, 2.0 mmol), 2-(Boc-아미노)에탄티올 (680 μ l, 4.0 mmol), 구리 아세테이트 디히드레이트 [Cu(OAc)₂·2H₂O; 40 mg, 0.2 mmol], 및 포타슘 카르보네이트 (K₂CO₃; 1.1 g, 8.0 mmol)를 마그네틱 교반바가 있는 DMSO/H₂O (3 mL/1 mL)을 포함하는 시험 튜브에 첨가하였다. Ar (g)로 플러싱한 후, 상기 혼합물을 90 °C에서 24 시간 동안 미리 가열된 오일 조(bath) 중에 교반하였다. 상기 용액을 실온에서 냉각시킨 후, 상기 반응을 EtOAc로 중단시켰다. 사익 반응 용액을 H₂O (3x)로 세척하고 염수 (1x)로 세척하였다. 상기 유기 층을 무수 MgSO₄ 상에 건조시키고 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂; EtOAc:헥산 = 1:10)로 정제하여 생성물 (백색 고체; 210 mg, 0.71 mmol, 34%)를 얻었다. *tert*-부틸 2-(4-(디메틸아미노)페닐티오)에틸카바메이트 (400 mg, 1.4 mmol)를 Ar (g) 하에 0 °C에서 HCl/디옥산 (4.0 M, 10 mL) 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고 그 잔여물을 디에틸 에테르 (Et₂O)로 세척하였다. 끈적거리는 화합물을 1 N NaOH (aq)로 염기성화 하고 EtOAc (3x)로 추출하였다. 결합된 유기 층을 염수(1x)로 세척하고, 무수 MgSO₄ 상에 건조시키고, 진공 하에 농축하였다. 조 화합물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂; CH₂Cl₂:CH₃OH = 7:1)로 정제하였다. 생성물 (백색 분말; 50 mg, 0.25 mmol, 18%)을 황색 액체 생성물에 Et₂O를 첨가함으로써 얻었다. ¹H NMR [400 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]: 7.35 (2H, m), 6.72 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 2.94 (10H, m), 1.90 (2H, s). ¹³C NMR [100 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]: 152.2, 136.0, 119.2, 114.2, 40.6, 39.8, 35.5. HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ Calcd. for C₁₀H₁₇N₂S⁺, 197.1107; found, 197.1103.

[0054] 상기 수득된 화합물 2 내지 5를 동결 건조하여 건조 분말을 얻었다. 상기 수득된 화합물 2 내지 5를 단순히 수 용액으로 추출하여 건조시켜 건조 분말을 얻을 수 있다.

[0055] 상기 개시된 화합물 2 내지 5에 제한되지 않고 본 발명의 다양한 벤젠 디아민 유도체가 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법에 의하여 제조될 수 있다.

2. 실험예 1: 경피 흡수 제제의 제조 및 흡수량 비교

벤젠 디아민 유도체를 유효 성분으로 하는 경피 흡수 제제를 제조하여 그 경피 흡수량을 비교하였다.

(1) 실시예 1

상기 제조예 1에서 제조된 벤젠 디아민 유도체 (화합물 2) 건조 분말 1 중량%, EVA점착제 50 중량%, 글리세롤 모노라우레이트 2.5 중량%, 글리세롤 모노올레이트 10 중량%, 및 N-도데실,2-피롤리돈(NP) 2.5 중량%에 고정분 총량이 65 중량%가 되게 톨루엔을 첨가하고 완전히 용해시켜 경피 흡수 촉진제인 점착용액을 제작하였다. 그 후, 실리콘이 처리된 폴리에스터 이형필름을 도포기 위에 고정시키고, 상기 폴리에스터 이형필름 위에 약물이 함유된 점착용액을 도포하고 90 ℃에서 15 분간 1500 rpm의 속도의 풍속으로 건조시켜 두께가 100 μm인 점착층 시트를 제조하였다. 상기 점착층 시트를 폴리에스터의 지지필름과 합지한 후, 이를 일정한 크기로 잘라 본 발명의 벤젠 디아민 유도체를 유효성분으로 함유하는 경피 흡수 제제를 제조하였다.

(2) 실시예 2 내지 11의 제조

하기 표 1의 성분으로 실시예 1과 동일한 방법에 의하여 실시예 2 내지 11의 경피 흡수 제제를 제조하였다. 이때, 각 성분의 함량은 중량%이다.

표 1

		실시예										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
성분(%)	디미파스	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	EVA 점착제	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	GML	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
	GMO	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	SML		5									
	NP	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	CCS			2.5								
	LL				2.5							
	TA					5	5	5	5	5	5	5
	TC										5	5

EVA; 폴리에틸렌 비닐아세테이트 점착제, GML; 글리세롤모노라우레이트, GMO; 글리세롤모노올레이트, SML; 소르비탄모노라우레이트, NP; N-도데실-2-피롤리돈, CCS; 카프릴릭-카프릭 트리글리세라이드, LL; 라우릴 락테이트, TA; 트리아세틴, TC; 트리에틸시트레이트

(3) 비교예 1 내지 15의 제조

하기 표 2의 성분으로 실시예 1과 동일한 방법에 의하여 비교예 1 내지 12의 경피 흡수 제제를 제조하였다. 이

때, 각 성분의 함량은 중량%이다.

표 2

		비교예											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
성분 (%)	디미파스	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	SIS 점착제	50									50		
	SEP 점착제		50									50	
	SBS 점착제			50									
	아크릴 점착제				50								
	EVA 점착제					50	50	50	50	50	50	50	50
	NP	2.5	2.5	2.5	2.5								
	SML					5							
	IPM						5						
	PMO							5					
	PGML								5				
	LL									5			
	TA										5		
	TC											5	
	PGL												5

[0066]

[0067]

SLS 점착제; 스티렌-이소프렌-스티렌 점착제, SEP 점착제; 스티렌-에틸렌-프로필렌, SBS 점착제; 스티렌-부타디엔-스티렌 점착제, EVA 점착제; 폴리에틸렌 비닐아세테이트 점착제, NP; N-도데실-2-피롤리돈, SML; 소르비탄 모노라우레이트, IPM; 이소프로필 미리스트레이트, PMO; 폴리옥시에틸렌, PGML; 프로필렌글리콜 모노라우레이트, LL; 라울릴 락테이트, TA; 트리아세틴, TC; 트리에틸 시트레이트, PGL; 프로필렌글리콜 모노라우레이트

[0068]

(4) 약물 투과 실험

[0069]

실시예 1 내지 11, 및 비교예 1 내지 12의 제제에 대하여 약물 투과 실험을 수행하였다.

[0070]

구체적으로, 약물투과실험용 분산장치인 프란츠셀 (Franz cell)에 피부의 부패 억제를 위한 소듐 아자이드 0.5 중량%를 첨가한 pH 7.4인 인산 완충액 수용액을 채웠다. 상기 수용액의 온도를 32 ± 0.5 °C로 유지하고, 피부 모

텔로 동결사체 두피 (PEA020, BIOPREDIC, 프랑스)를 사용하였다. 실시예 1 내지 11, 및 비교예 1 내지 12의 제제를 두피 조직 크기에 맞게 절단하여 수행하였다. 각각 2일 후에 프란츠셀로부터 수용액 200 μ l를 취하여 액체 크로마토그래픽법으로 두피 조직을 투과된 약물을 정량하였다. 2일 경과시 약물 평균 두피투과속도를 하기의 표 3와 표 4에 나타내었다.

표 3

[0071]

	피부투과도(μ G/Cm ² /hr)
실시예 1	14.34 $\pm$ 0.45
실시예 2	14.32 $\pm$ 0.67
실시예 3	14.90 $\pm$ 1.21
실시예 4	15.78 $\pm$ 1.21
실시예 5	16.23 $\pm$ 1.34
실시예 6	17.45 $\pm$ 1.34
실시예 7	16.23 $\pm$ 1.78
실시예 8	18.23 $\pm$ 1.6
실시예 9	16.34 $\pm$ 2.1
실시예 10	23.12 $\pm$ 1.2
실시예 11	23.31 $\pm$ 1.1

표 4

[0072]

	피부투과도(μ G/Cm ² /hr)
비교예 1	1.14 $\pm$ 0.25
비교예 2	1.32 $\pm$ 0.11
비교예 3	1.10 $\pm$ 0.41
비교예 4	1.28 $\pm$ 0.1
비교예 5	1.3 $\pm$ 0.12
비교예 6	1.23 $\pm$ 0.2
비교예 7	1.33 $\pm$ 0.13
비교예 8	1.43 $\pm$ 0.25
비교예 9	2.75 $\pm$ 0.1
비교예 10	3.03 $\pm$ 0.2
비교예 11	3.12 $\pm$ 0.5
비교예 12	1.34 $\pm$ 0.1

[0073]

[0074]

그 결과, 지방족 유도체 및 피롤리돈 유도체의 조합으로 제조된 실시예 1 내지 11은 그렇지 않은 비교예 1 내지 12에 비해서 경피 투과율이 현저하게 높게 측정되었다. 또한 실시예 1 내지 9와 실시예 10 및 11을 비교하였을 때, 트리아세틴 및 구연산 유도체 (트리에틸시트레이트)가 더 첨가된 실시예 10 및 11이 보다 현저한 경피 투과율을 나타냄을 알 수 있다.

[0075]

3. 실험예 2: 동물 모델을 이용한 벤젠 디아민 유도체의 효과 확인

[0076]

동물 모델을 이용하여 벤젠 디아민 유도체의 질병 및 증상의 치료 효과를 확인하였다. 본 실험을 위해 치매 동물 모델을 도입하였는데, 상기 치매 동물 모델은 외관상 탈모가 심하게 유발된 특징을 갖는다.

[0077]

(1) 실험예 2-1: 동물 모델의 제작

[0078]

치매 모델 마우스로 APP/PS/Tau를 백스랩 (BAR HARBOR, USA)에서 구입하고 APP/Tau 암놈과 타고닉(Hudson, USA)에서 구입한 APP/PSen1de9을 6세대 교차 교배시켜 F1으로부터 4개월 된 치매 모델 마우스를 얻었다.

[0079]

(2) 실험예 2-2: 동물 모델의 치매 치료 효과 확인

[0080]

본 발명의 벤젠 디아민 유도체에 의한 치매 치료 효과를 확인하기 위해, 치매 모델 마우스에서 공간 인지력 및 기억력 향상 여부를 검증하였다. 상기 검증을 위해 수조 미로 (water morris maze, Harvard Apparatus, USA)

실험을 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 직경 150cmx 높이 60cm의 스테인레스 원통과 도피대(지름 10cm, 높이 30cm)로 이루어진 수조 미로에 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 물을 채우고, 높이는 플랫폼 위 2cm로 마우스가 도피대에 앉으면 몸이 물 밖으로 나올 수 있도록 하였다. 마우스는 수조 표면 상의 수조 주변의 표지물을 이용하여 도피대를 찾아가기 때문에 주변의 환경 변화가 없도록 표지물을 실험기간동안 일정하게 유지하였다. 실험동물이 도피대를 찾아가 20초 이상 머무르면 찾아가는 때까지 걸린 시간을 탈출잠복기 (escape latency)로 하였으며 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출잠복기로 하였다. 탈출 잠복기는 수조 위 천정에 카메라를 설치하여 컴퓨터프로그램 (스마트 비디오 추적시스템 V3.0, PanLab SL, Barcelona, Spain)을 통해 관찰된 것을 기록하였다. 실험은 6일 동안 매일 3회 실시하였으며 이 때 실험동물을 수조에 넣은 위치를 순차적으로 달리하여 우연히 도피대를 찾아가게 되는 가능성을 최소화하였다. 상기 실험에는 정상 마우스, 및 각각 담체(PBS) 및 N^1 -(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민(화합물 2) 100 $\mu\text{g/kg}$ 을 2 개월 간 일주일에 2회 투여한 대조군 및 실험군 치매 모델 마우스를 투여가 끝난 후 적용하였다.

[0082] 그 결과, 도 1에 나타내는 바와 같이 화합물 2 처리군은 치매 대조군에 비하여 평균탈출시간이 3일째부터 유의하게 짧아져 정상군(non-Tg mice)과 유사한 수준으로 감소되었다. 대조군(AD mice)과 실험군(AD mice+화합물 2)의 평균탈출시간은 4일 제 각각 42 ± 1 초와 26 ± 1 초로 16초의 차이를 보였다. 5일 제에는 치매군과 화합물 2 처리군이 각각 43 ± 1 초와 24 ± 1 초로 19초의 차이를 보여 통계적으로 유의성 있는 공간 인지력 및 기억력 회복 효과가 나타났다. 특히, 정상군과 화합물 2 처리군의 경우 4일 제 이후 안정화된 감소 그래프를 보여 실험기간 동안 장기 기억을 형성함이 분명하게 나타났다.

[0083] (2) 실험예 2-3: 동물 모델의 탈모 치료 효과

[0084] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체의 탈모 치료 효과를 확인하기 위해 탈모가 유발된 모델 마우스를 도입하여 경구 투여한 후 외관상 변화를 관찰하였다. 실험예 2-1의 동물 모델은 치매 증상 뿐 아니라 외관상 탈모가 유발된 것이 특징적으로 관찰된다. 따라서 탈모 모델 마우스로 실험예 2-1의 동물 모델을 이용하였다.

[0085] 상기 탈모 모델 마우스를 대상으로 각 그룹당 6마리로 하여 2개월 간 탈모 모델 마우스 중 대조군에는 담체(PBS)를 경구 투여하고, 실험군에는 N^1 -(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 2)을 100 $\mu\text{g/kg}$ 으로 일주일에 2회 투여하였다. 그 후, 마우스의 외관상 변화를 비교하였다.

[0086] 그 결과, 대조군을 투여한 마우스의 피부는 출혈과 탈모가 관찰되었으나, 벤젠 디아민 유도체를 투여한 실험군은 정상과 유사하게 탈모가 현저히 개선된 것으로 보였다 (도 2).

[0087] 4. 실험예 3: 벤젠 디아민 유도체의 조직적 관찰

[0088] 상기 동물 모델에서 벤젠 디아민 유도체에 의한 변화를 조직적으로 관찰하였다.

[0089] 일반적으로 피부의 지방줄기세포는 피부의 표피에 존재하는 각질층이 주기적으로 탈피되므로, 이를 보완하기 위해 내피-진피층 주변에서 SOX-2는 미분화된 배아줄기세포 내 자가 재생, 또는 전분화능(pluripotency)을 유지하는데 필수적인 전사인자이다. SOX-2는 모발 성장에서 간세포(progenitor cell)를 조절하는 핵심적인 조절자로서 알려져있다 (Dev Cell. 2012 Nov 13; 23(5): 981-994). 따라서 피부 유두 세포(dermal papilla cell; DP cell)는 모발 모낭 (hair follicle) 성장유도를 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져있는데, SOX-2는 이 피부 유두 세포가 정상적으로 기능하는데 중요하게 기여한다 (Clavel et al., 2012). 또한, 모발 모낭은 성장 주기에서 줄기세포 영향을 받아 성장이 촉진되는데, 모발 모낭의 발달 동안 모발모낭줄기세포(hair follicle stem cell)의 형성이 일어나고 그러한 과정은 전사 인자인 SOX-9을 필요로 한다. 따라서, SOX-9은 성인 모발모낭 줄기세포를 유지하는데 매우 중요한 역할을 한다.

[0090] 그러므로, 본 발명자들은 탈모 동물 모델에서 본 발명의 벤젠 디아민 유도체에 의해 탈모 인자로서 SOX-2 및 SOX-9의 발현이 증가되는지 확인하였다. 피부조직내 SOX-2 및 SOX-9의 발현을 알아보기 위해 상기 실시예 5처럼 탈모가 유발된 모델 마우스인 APP/PS/Tau 마우스를 대조군으로 하고, C57BL6 마우스를 정상군으로 선정하였다. 실험군은 대조군에 벤젠 디아민 유도체 100 $\mu\text{g/Kg/0.1 ml}$ 농도로 주 2회씩 준대로 경구 투여하였다. 2 개월 후 국소마취하고 피부를 절개하여 4 % 파라포름알데하이드액에 담귀 24 시간 고정시키고, 저온냉동으로 동결시키는 오씨티 컴파운드액 (O.C.T.:SAKURA, USA)으로 조직을 플라스틱 몰드에 담귀 고정시켰다. 그런 다음, 냉동고에 5 시간 동결 후 이를 동결 마이크로톰 (freezing microtome 머신: LEICA, JAPAN)로 5 μm 두께로 절편화한 후 Sox-2에 대한 항체-형광염료 결합액인 SOX-2/QD525, Sox-9에 대한 SOX-9/QD525 및 피부의 올리고머 A β 에 대한

m/oA β -cy5.5 항체 용액으로 24 웰 플레이트에 담귀 이로부터 항원-항체반응을 유도하였다. 그런 다음 슬라이드 글라스 위에 올려놓고 커버 슬라이드로 덮은 후 이를 암소 아크릴 박스에 보관하여 공초점 현미경 (LSM710, 칼자이즈, Germany)으로 405488/565nm 레이저에 의해 형광 이미징을 관찰하였다. 그 결과, 정상군에서는 피부 내에 SOX-2가 발현하는 조직이 관찰되는데, 대조군에서는 SOX-2가 발현하지 않았다. 올리고머 A β 는 정상군에 비해 현저하게 발현된 것으로 관찰되었다. 그러나 화합물 1을 투여한 탈모 모델의 경우 SOX-2가 정상군에 가깝게 현저히 발현함을 확인하였다 (도 3). 이와 마찬가지로, SOX-9 또한 대조군에서는 거의 발현하지 않고 모노머/올리고머 A β 가 발현이 되는 반면, 화합물 1을 투여한 탈모 모델인 APP/PS/Tau 마우스 경우 정상군과 유사하게 SOX-9가 현저히 발현이 증가하였고 동시에 모노머/올리고머 A β 의 발현이 감소하였다. 하지만 세 그룹에서 혈관 내 플라그를 탐지하는 청색 형광 염료인 MX04 경우 모두가 강하게 나타내었다. (도 4). 따라서 화합물 1은 플라그를 제거하기 보다 올리고머 A β 생성을 억제하는 것으로 사료되어진다.

[0091] **5. 실험예 4: 동물 모델을 이용한 경피 흡수 제제 효과 확인**

[0092] 상기 실험예 2-1의 치매 및 탈모 동물 모델을 이용하여 벤젠 디아민 유도체가 실제로 경피 흡수되어 질병 및 증상의 치료 효과가 나타나는지 여부를 확인하였다.

[0093] **(1) 경피 투여용 제제의 제조**

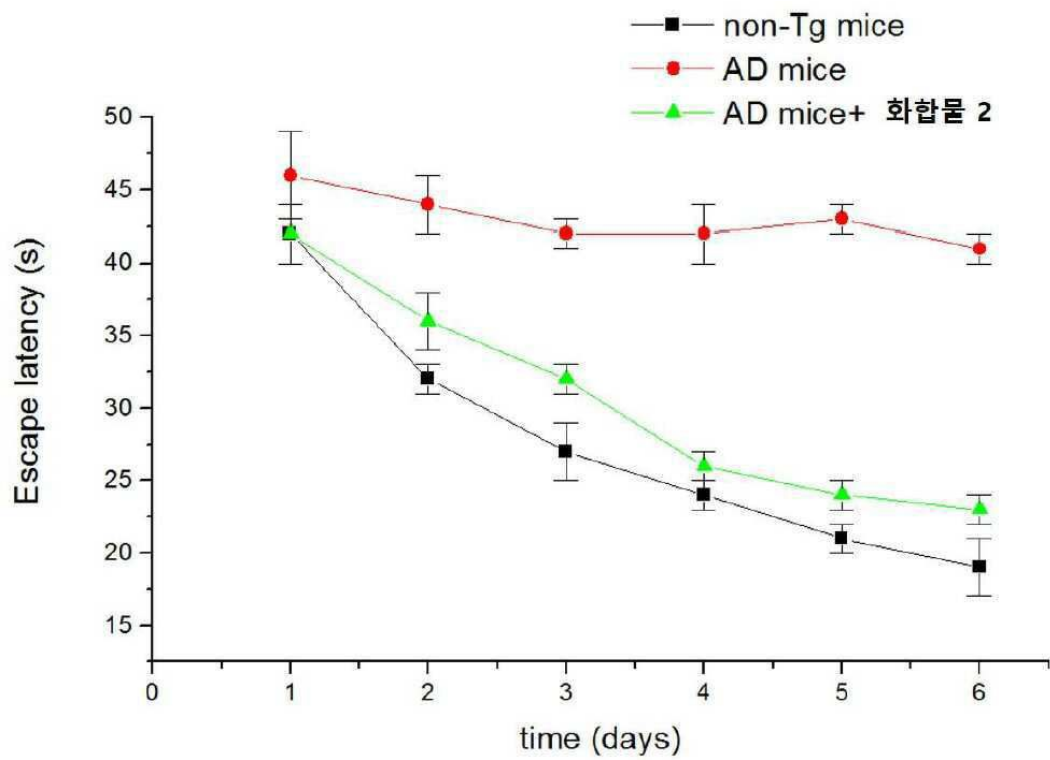
[0094] 경피 투여용 제제의 제조는 N¹-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 2) 1 중량%, 폴리에틸렌 비닐아세테이트 점착제 50 중량%, 글리세롤모노올레이트 10 중량%, 트리아세틴 5 중량%, 트리에틸시트레이트 5 중량%에 톨루엔을 가하여 고형분 총량이 65%가 되게 하여 완전히 용해시켰다. 도포기 위에 고정 시킨 실리콘이 처리된 폴리에스터 이형필름 위에 상기 약물이 함유된 점착 용액을 도포하고 90 °C에서 15 분간 1500 rpm의 속도의 풍속으로 건조시켜 두께가 100 μ m인 점착층 시트를 제조하였다. 그 후 상기 점착층 시트를 폴리에스터 지지필름과 합지하고 이를 일정한 크기로 잘라 경피흡수제제를 제조하였다.

[0095] **(2) 경피 투여**

[0096] 치매 및 탈모 동물 모델 APP/PS/Tau 마우스에서 상기 경피제제를 등피부에 부착시켜 2 주에 한 번씩 갈아주는 것으로 2 개월 간 수행하였다. 상기 동물 모델을 국소 마취하고 피부를 절개하여 4 % 파라포름알데하이드액에 담귀 24시간 고정화하였다. 그 후 저온냉동으로 동결시키는 오씨티 컴파운드액 (O.C.T.:SAKURA, USA)으로 조직을 플라스틱 몰드에 담가 고정하고, 냉동고에 5 시간 동결한 후 이를 푸르징 마이크로톰 (freezing microtome 머신: LEICA, JAPAN)로 5 μ m 두께로 절편화하였다. 그 후 Sox-2에 대한 항체-형광염료 결합액인 SOX-2/QD525, Sox-9에 대한 SOX-9/QD525, 및 피부의 올리고머 A β 에 대한 m/o A β -cy5.5항체용액으로 24 웰 플레이트에 담귀 항원-항체반응을 유도하였다. 그 후 슬라이드 글라스위에 올려 놓고 커버슬라이드로 덮은 후 이를 암소 아크릴 박스에 보관하여 공초점 현미경 (LSM710, 칼자이즈, Germany)으로 405488/565nm 레이저로 형광 이미징을 관찰하였다. 정상군의 피부 내에서는 SOX-2가 발현하는 조직이 관찰되는데 반해 대조군에서는 SOX-2가 관찰되지 않았다. 정상군에 비해 대조군에서 모노머 A β 는 현저하게 발현된 것으로 관찰되었다. 그러나 화합물 1을 함유한 경피제제를 처리한 탈모 모델의 경우 SOX-2가 정상군에 가깝게 현저히 발현함을 확인하였다 (도 5). 이와 마찬가지로, 대조군에서는 SOX-9이 거의 발현하지 않고 올리고머 A β 이 발현이 되는 반면, 화합물 1이 함유된 경피제제를 처리한 경우는 정상군과 유사하게 SOX-9가 현저히 발현이 증가하였고 동시에 올리고머 A β 이 발현이 거의 감소하였다. 하지만 세 그룹에서 혈관 내 플라그를 탐지하는 청색 형광 염료인 MX04는 모두가 강하게 나타났다 (도 6). 따라서 화합물 1은 플라그를 제거하기 보다 올리고머 A β 의 생성을 억제하는 것으로 사료되어진다. 따라서 피부 조직에서 화합물 2가 흡수되어 SOX2 및 SOX9을 증가시키고 모노머 A β 및 올리고머 A β 을 감소시키는 효과에서 입증된 바와 같이, 경구 투여 뿐만 아니라 경피 투여에 의해서도 치매 치료 효과를 얻을 수 있음을 쉽게 예측할 수 있다.

도면

도면1

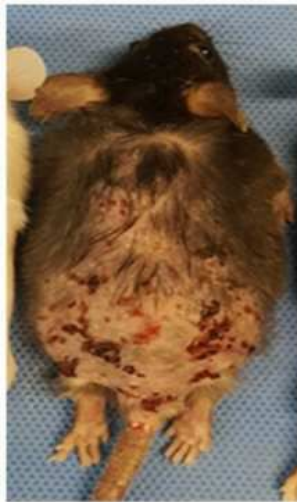


도면2

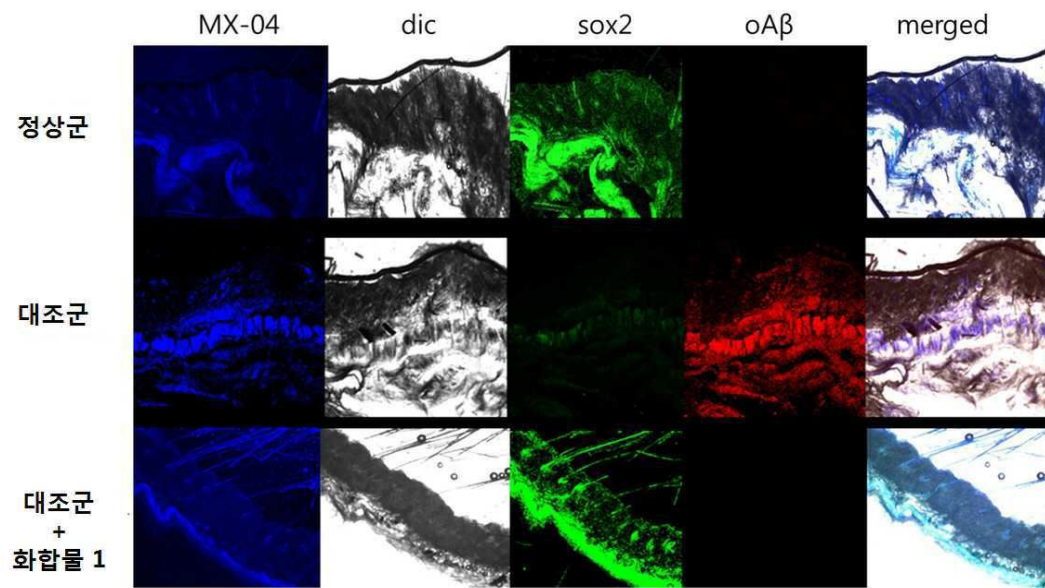
정상군

탈모 모델

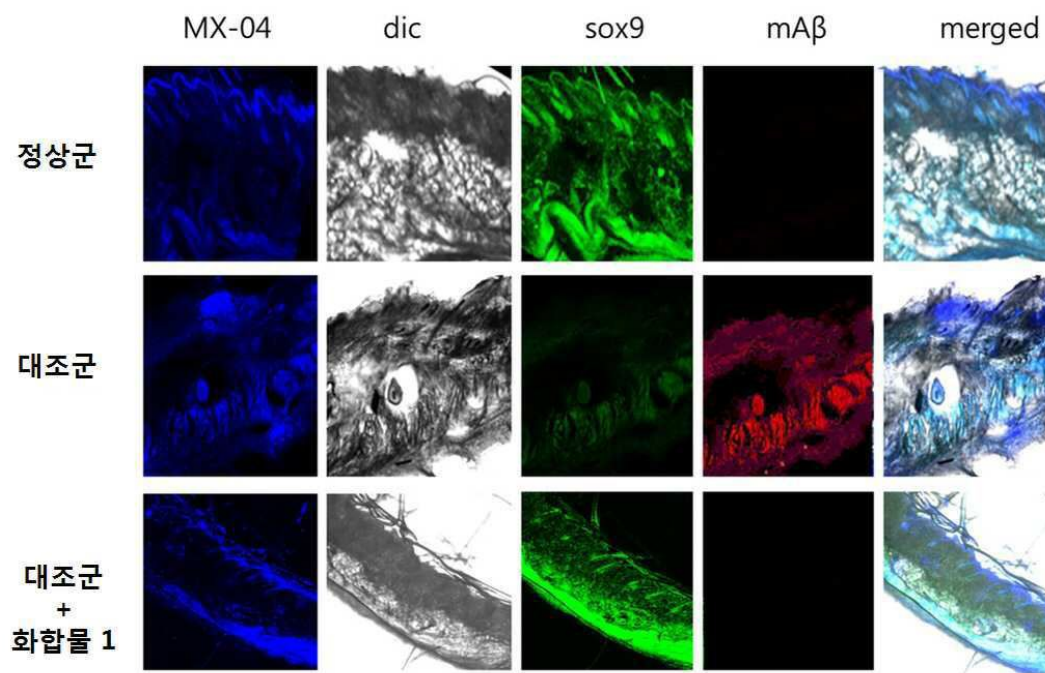
약물 투여군



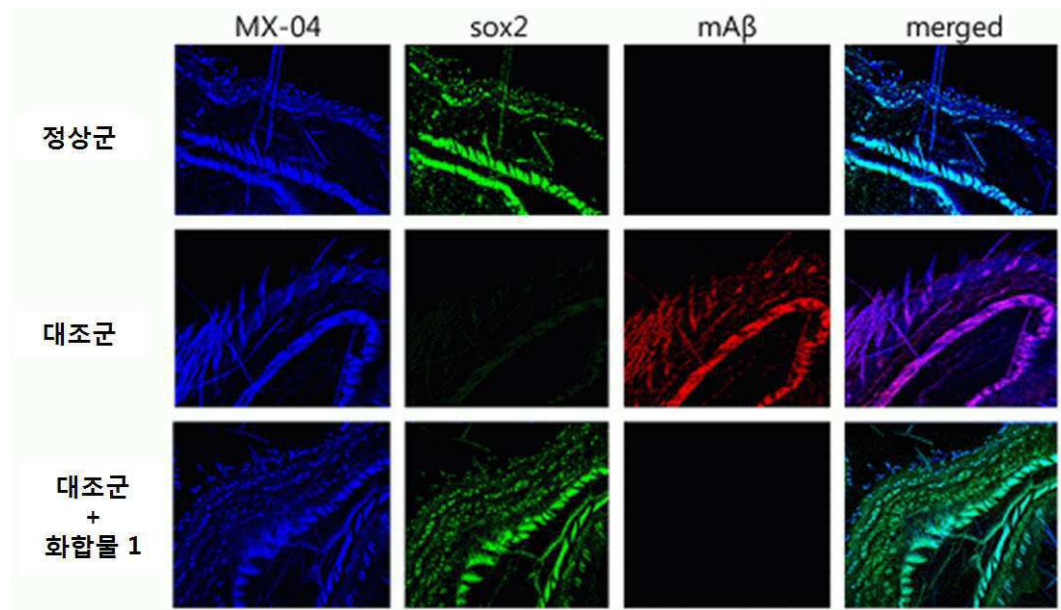
도면3



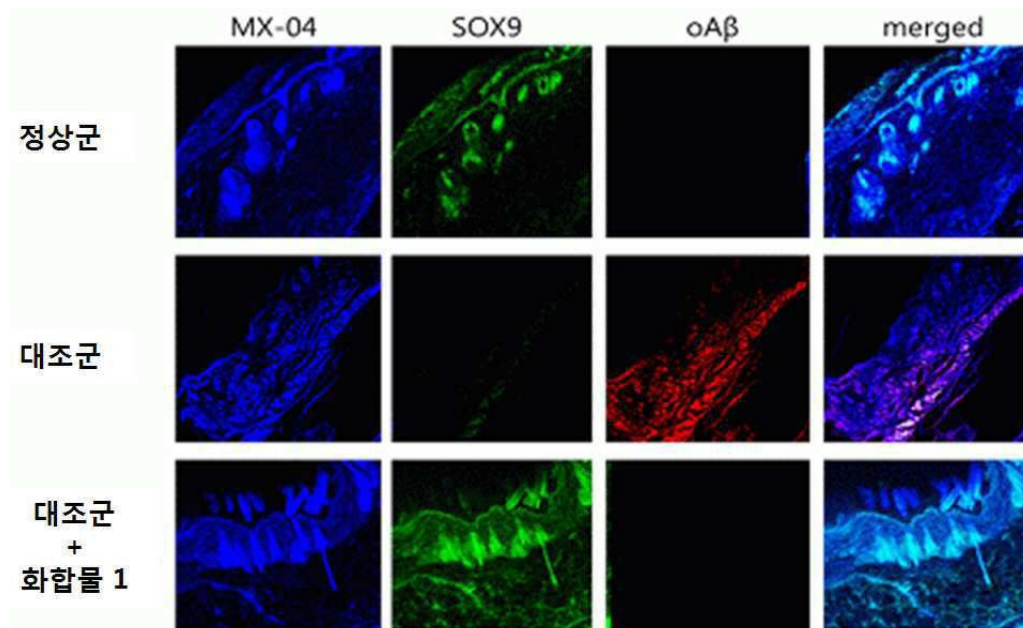
도면4



도면5



도면6



도면7

