

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0022795
(43) 공개일자 2020년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/12 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 8/35 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/12 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0098863

(22) 출원일자 2018년08월23일

심사청구일자 없음

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

주식회사 코팜

경기도 고양시 덕양구 화정로 65, 1515호(화정동, 한화오벨리스크)

주식회사 바이오지노코리아

서울특별시 용산구 새창로 217, 15층 (한강로2가, 용산토투밸리)

(72) 발명자

박길홍

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문숙의학관 3층 생화학분자생물학교실 305호

손상욱

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문숙의학관 3층 생화학분자생물학교실 305호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 5 항

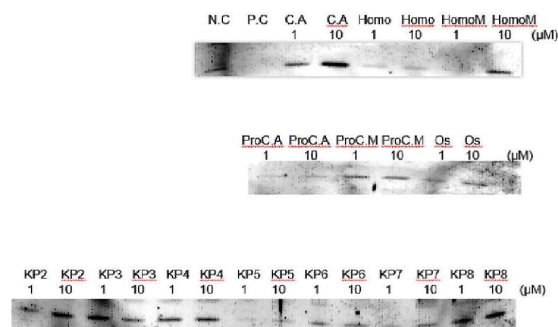
(54) 발명의 명칭 디하이드록시벤조산 유도체를 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 디하이드록시벤조산 유도체를 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 화학식 1의 화합물은 정상세포에 대한 세포독성이 매우 낮아 안전하면서, 필라그린 발현 증가 효과가 우수하여 피부 보습 및 각질 개선에 따른 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 치료제, 기능성 식품 또는 화장품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 8/35 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

파티바다 트리베니

대한민국 서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

김명환

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

안준태

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

변재광

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

김경진

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

이삼미

서울특별시 성북구 인촌로73 (안암동5가) 고려대학교 의과대학 문속의학과 3층 생화학분자생물학교실 305호

신봉식

서울특별시 용산구 새창로 217, 15층 1501호(한강로2가, 용산토투밸리) 주식회사 바이오지노코리아

김동민

경기도 고양시 덕양구 화정로 65, 1515호(화정동, 한화오벨리스크) 주식회사 코팜

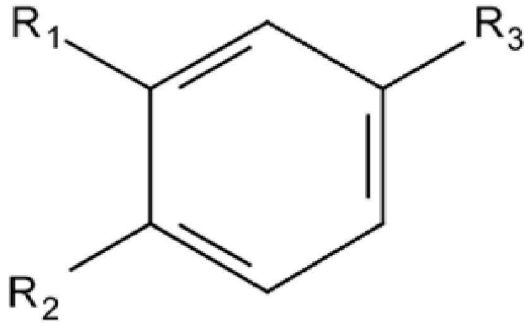
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

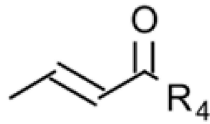
<화학식 1>



상기 식에서,

R1은 히드록시기, 메톡시기, 및 플루오르(-F)기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;

R2는 히드록시기, 메틸기, 및 플루오르기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;



R3는 메틸 에스테르기(-COOMe) 또는 이고;

R4는 메틸기, -CH₂OH(히드록시메틸기), -SH, 아미노기(-NH₂), 할로젠, 할로메틸, -PO₂, -CH₂SH(술폰닐메틸기), -CH₂NH₂, 및 -CH₂PO₂로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은

osmundacetone;

protocatechuic acid methyl ester;

4-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one;

4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one;

4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one(degdydrozingerone);

4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one;

4-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)acrylamide;

4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide;

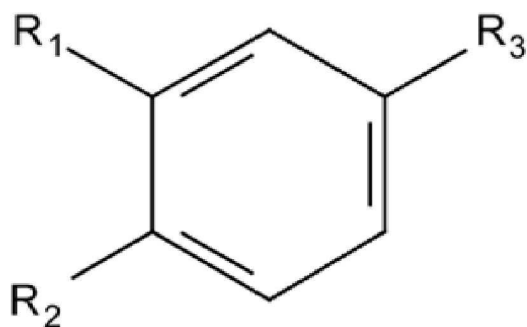
3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-Propenethioic acid;

3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-Propenamide;
 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-Propenoyl chloride;
 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-hydroxy-3-Buten-2-one;
 (3E)-1-Bromo-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one;
 (3E)-1-Iodo-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one;
 (3E)-1-Chloro-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one;
 (3E)-1-Fluoro-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one;
 (3E)-1-Mercapto-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one;
 (3E)-1-Amino-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one;
 (4E)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxide-4-buten-3-one-phosphine oxide; 및
 (3E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxide-3-propen-2-one-phosphine oxide
 으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

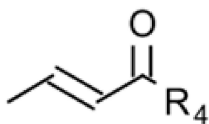
<화학식 1>



상기 식에서,

R1은 히드록시기, 메톡시기, 및 플루오르(-F)기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;

R2는 히드록시기, 메틸기, 및 플루오르기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;



R3는 메틸 에스테르기(-COOMe) 또는 이고;

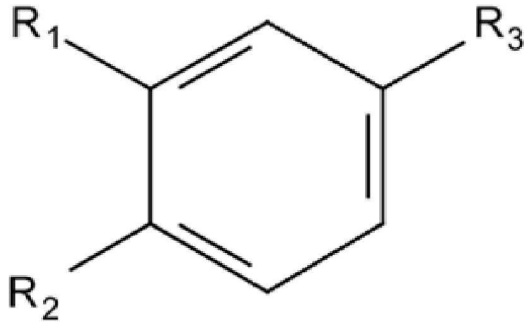
R4는 메틸기, -CH₂OH(히드록시메틸기), -SH, 아미노기(-NH₂), 할로젠, 할로메틸, -PO₂, -CH₂SH(술폰메틸기), -CH₂NH₂, 및 -CH₂PO₂로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

청구항 4

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 보습 개선용 화장

료 조성물:

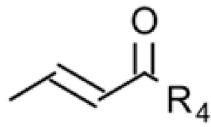
<화학식 1>



상기 식에서,

R1은 히드록시기, 메톡시기, 및 플루오르(-F)기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;

R2는 히드록시기, 메틸기, 및 플루오르기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;



R3는 메틸 에스테르기(-COOMe) 또는 이고;

R4는 메틸기, -CH₂OH(히드록시메틸기), -SH, 아미노기(-NH₂), 할로젠, 할로메틸, -PO₂, -CH₂SH(술폰메틸기), -CH₂NH₂, 및 -CH₂PO₂로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 필라그린 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디하이드록시벤조산 유도체를 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부장벽을 구성하는 핵심 단백질이 필라그린, 로리크린 (Loricrin) 그리고 인볼루크린(Involucrin) 이라고 알려져 있다. 그 중, 필라그린은 과립층에서는 keratohyalin granule을 구성하는 단백질인 프로필라그린(profilaggrin) 형태로 존재하다가, 각질형성세포의 최종분화 과정에서 필라그린으로 분해되어서 각질세포막을 형성할 때에 케라틴 필라멘트를 응집하여 각질세포의 단단하고 편평한 구조를 만들어 피부장벽에서 벽돌의 역할을 수행한다. 이후 각질층 상부로 올라가면서 필라그린은 아미노산으로 분해되고, 함습에 매우 중요한 자유아미노산과 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)로 변화한다. 따라서 필라그린의 분해산물이 피부를 촉촉하게 유지하는데 가장 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다(McGrath JA et al., Trends in Molecular Medicine, 14:20-27, 2008; Brown SJ et al., Journal of Investigative Dermatology, 132:751-762, 2012).

- [0005] 필라그린은 분해과정을 통하여 citrulline, PCA, trans-UCA를 생성하며 이들은 각질층 수화, 각질층 pH의 정상화, 투과장벽, 각질층의 견고함 (integrity/cohesion), 항균 및 항염작용을 수행한다. 필라그린 유전자(FLG)의 돌연변이에 의해 발생하는 보통 어린선(Ichthyosis vulgaris)은 매우 심한 피부건조를 나타낸다. 즉, 필라그린 유전자의 돌연변이는 필라그린 단백질의 생성을 감소시키고 자연보습인자의 생성을 감소시켜서 건조피부를 유발하게 된다. 아토피 피부염 환자의 비병변 피부에서 표피 분화 단백질 중 많은 비중을 차지하는 loricrine이나 involucrin 등은 차이가 없는데 유독 필라그린의 발현만이 감소되었다는 보고가 있으며 이를 통해서 필라그린이 아토피 피부염 병인으로 대두 되어 활발히 연구 되고 있다.
- [0007] 피부의 천연보습인자(Natural Moisture Factor, NMF)들은 각질층의 수분 함량을 유지함에 있어서 중요한 기능을 수행한다. NMF의 주요 구성성분을 형성하는 아미노산들은 케라토히알린 과립들로부터 기인된 단백질분해적으로 절단된 필라그린에 의해 생산되는 것으로 보고되었다. 필라그린은 317개 아미노산으로 구성된 단백질이다. NMF의 주요 구성성분을 형성하는 아미노산은 필라그린으로부터 유래되는 것이 명확하기 때문에, 필라그린과 건조 피부를 나타내는 병적인 상태의 관계에 대한 조사가 실행되었다. 최근 수년 동안, 노인성 건조증, 아토피 질환 및 이와 유사한 증상에서 볼 수 있는 건조 피부의 각질층의 아미노산 함량은 감소되며, 이러한 건조 피부에서 필라그린의 발현이 감소된다는 것이 분명해졌다. 더욱이, 거친 피부와 같은 피부 트러블은 건조 환경으로 인한 것이라는 것은 잘 알려져있다
- [0009] 필라그린 유전자는 피부의 방벽 층들을 구축하는데 역할을 하며, 이 유전자에서 돌연변이는 습진과 같은 상태로 이어진다. 필라그린은 피부의 가장 외층에 있는 풍부한 단백질이며, 필라그린 유전자에 의해 만들어진다. 필라그린의 기능은 피부의 가장 외층 표면에 존재하는 불침투성 피부 방벽 층들을 만드는 것을 돕고, 이들 방벽층들이 수화된 상태로 유지되는 것을 지원한다. 피부의 온전한 방벽의 기능은 플라스틱 또는 점착 필름과 유사하여 피부로부터 수분 상실을 방지하고, 그리고 중요한 것으로, 환경에 있는 알레르겐과 같이 외부 물질로부터 신체를 보호하는 작용을 한다. 온전한 피부 방벽의 부족으로 알레르겐이 신체로 유입되게 되며, 신체에서 알레르겐은 습진, 천식, 고초열 및 기타 알레르기를 포함하는 알레르기 반응을 일으킨다.
- [0011] 아토피 피부염은 심한 가려움증과 전체적인 건조피부를 동반하며 습진 병변이 특정부위에 반복하여 재발하는 만성 염증성 피부질환으로, 유전적인 소인을 나타내고 음식물 알레르기, 알레르기 천식, 알레르기 비염 등 알레르기 질환과 동반하는 알레르기 행진을 하는 특징을 가지고 있다(Akiharu Kubo et al., J Clin Invest. 122(2):440-447, 2012; Hywel CW et al., N Engl J Med, 352:2314-2324, 2005). 오늘날 아토피 피부염의 병인은 크게 피부장벽과 연관된 병인과 비정상적인 면역반응과 연관된 병인으로 나누어지는데, 필라그린 유전자의 돌연변이가 아토피 피부염 환자의 40% 정도에서 나타나며 심한 증상을 나타내거나 성인까지 지속되는 경우에는 더 흔하게 나타난다고 보고되었다. 그 기전은, 선천적으로 손상된 피부장벽을 가진 사람에서 외부의 알레르겐이 더 쉽게 각질층을 통과하여 몸에 감작을 일으킴으로써 아토피 피부염을 유발시킨다.
- [0013] 아토피 피부염 환자들에서 증가되어 있는 것으로 보고되고 있는 Th2 사이토카인에 의한 필라그린의 발현 감소 현상이 몇몇 논문들에 의해보고 되었다(Kim BE et al., Journal of Investigative Dermatology, 131:1272-1279, 2011; Howell MD et al., J Allergy Clin Immunol, 120:150-5, 2007). 아토피 피부염 환자의 각질형성세포에는 고농도의 TSLP(thymic stromal lymphopoietin)가 존재한다. 비정상적 신호전달의 최상위 단백질이 바로 TSLP 싸이토카인이다. 각질세포 세포막에 TSLP수용체가 발현된다(WO 2015163534 A1). 알레르겐이 몸에 침투되면 TSLP 등의 물질이 수지상 세포를 자극하여 반응을 하게 되는데, 이 과정에서 아토피 피부염의 증상이 나타나는 것이다. TSLP는 CD11c+ 수지상세포를 자극해서 TARC(thymus and activation-regulated chemokine)와 MDC 생성을 증가시킨다. 이러한 cytokine의 농도는 아토피 피부염의 증상과 밀접한 연관성을 가지고 있다(Holgate ST et al., Trends in immunology, 28:248-251, 2007).
- [0015] 현대 사회의 주요 질환의 하나로 여겨지는 피부 건조증은 피부 장벽 기능 이상에 의해 야기되는 증상의 하나로, 최근, 환경오염, 아파트, 고층 건물과 같은 건조한 환경의 증가, 사회적 스트레스의 증가, 우리나라 특유의 과

도한 목욕 문화, 피부 노화 등과 같은 여러 가지 요인에 의해 점점 더 증가하고 있으며, 증세가 심하여 치료를 필요로 하는 경우 또한 지속적으로 증가하고 있다.

[0017] 최근 소아의 10 %에서 발병하는 아토피성 피부염 역시 피부 건조증, 보다 근본적으로는 피부 장벽 기능의 이상을 주요 원인으로 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 아토피성 피부염을 치료하기 위하여, 종래에는 피부 내 적절한 수분 유지에 중점을 두어 외부로부터 수분을 공급하거나 체내로부터의 수분 손실을 최소화하기 위한 연구가 많이 진행되어 왔으며, 실제로 수분 보유 능력이 있는 세라마이드 (ceramide) 또는 그의 유도체와 같은 보습제가 개발되어 제약 또는 화장품 영역에서 많이 사용되고 있다.

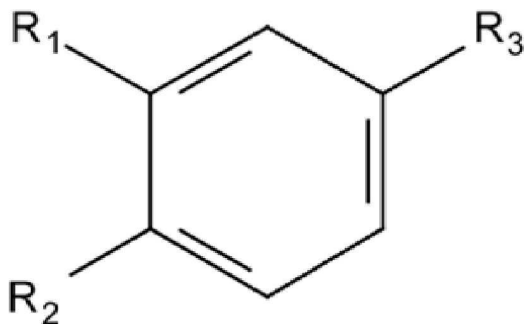
발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 이에, 본 발명자들은 필라그린 발현을 증가시키는 피부질환 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, TSLP에 의하여 필라그린의 발현이 억제되는 경우 아토피 피부염 및 피부건조증 등 피부질환을 초래하는 사실에 기초하여, 이 과정을 억제하는 화합물로서 생강의 성분인 디하이드록시벤조산 유도체 관련 천연물 및 합성 화합물을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0021] 따라서 본 발명의 목적은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0022] <화학식 1>

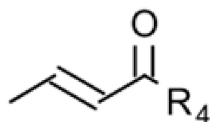


[0023]

[0024] 상기 식에서,

[0025] R1은 히드록시기, 메톡시기, 및 플루오르(-F)기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;

[0026] R2는 히드록시기, 메틸기, 및 플루오르기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;



[0027] R3는 메틸 에스테르기(-COOMe) 또는 이고;

[0028] R4는 메틸기, -CH₂OH(히드록시메틸기), -SH, 아미노기(-NH₂), 할로젠, 할로메틸, -PO₂, -CH₂SH(술폰메틸기), -CH₂NH₂, 및 -CH₂PO₂로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

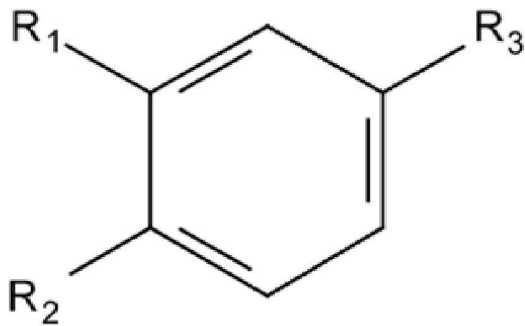
[0030] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0032] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0034] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] <화학식 1>

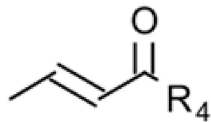


[0036]

[0037] 상기 식에서,

[0038] R1은 히드록시기, 메톡시기, 및 플루오르(-F)기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;

[0039] R2는 히드록시기, 메틸기, 및 플루오르기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;



[0040] R3는 메틸 에스테르기(-COOMe) 또는 이고;

[0041] R4는 메틸기, -CH₂OH(히드록시메틸기), -SH, 아미노기(-NH₂), 할로젠, 할로메틸, -PO₂, -CH₂SH(술폰닐메틸기), -CH₂NH₂, 및 -CH₂PO₂로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

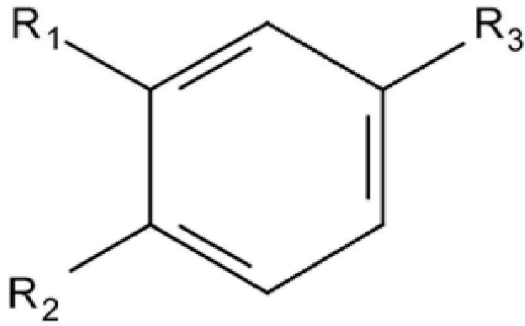
[0043] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 보습 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0047] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0049] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0051] <화학식 1>

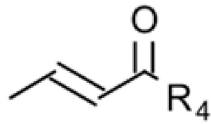


[0052]

[0053] 상기 식에서,

[0054] R1은 히드록시기, 메톡시기, 및 플루오르(-F)기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;

[0055] R2는 히드록시기, 메틸기, 및 플루오르기로 이루어진 군에서 선택된 하나이고;



[0056] R3는 메틸 에스테르기(-COOMe) 또는 이고;

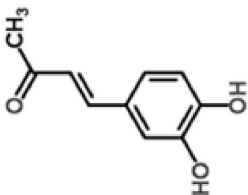
[0057] R4는 메틸기, -CH₂OH(히드록시메틸기), -SH, 아미노기(-NH₂), 할로젠, 할로메틸, -PO₂, -CH₂SH(술폰메틸기), -CH₂NH₂, 및 -CH₂PO₂로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

[0059] 본 발명에서 사용한 용어 ‘할로젠’ 또는 ‘할로’는 할로젠족 원자를 나타내며, 불소, 염소, 브롬, 요오드 등을 포함한다.

[0060] 본 발명에서 사용한 용어 ‘할로메틸’은 메틸기의 수소원자 1개를 할로젠 원자로 치환한 것을 나타내며, 예를 들어 -CH₂F, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂I일 수 있다.

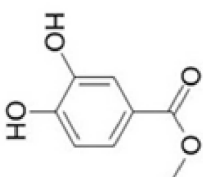
[0062] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물에 있어서, 바람직한 화합물 또는 이의 염은 다음과 같다:

[0063] (1) osmundacetone((3E)-4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one)



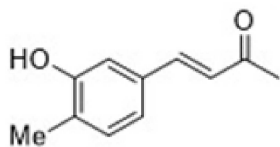
[0064]

[0065] (2) protocatechuic acid methyl ester(methyl 3,4-dihydroxybenzoate)



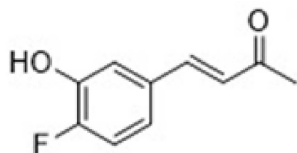
[0066]

[0067] (3) 4-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one



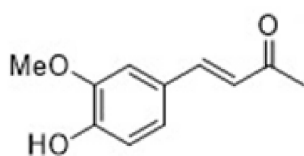
[0068]

[0069] (4) 4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one



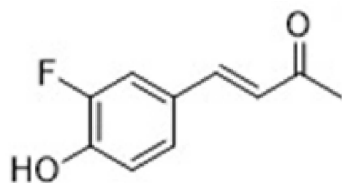
[0070]

[0071] (5) 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one



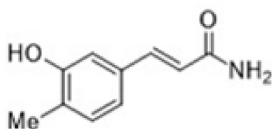
[0072]

[0073] (6) 4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one



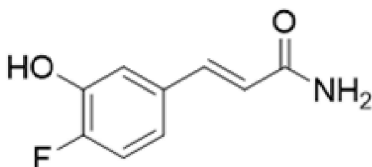
[0074]

[0075] (7) 4-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)acrylamide



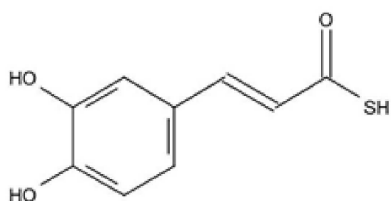
[0076]

[0077] (8) 4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide



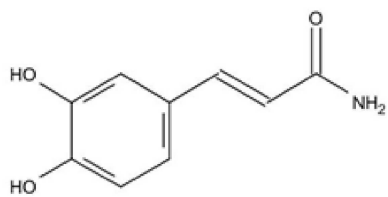
[0078]

[0079] (9) (2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-Propenethioic acid



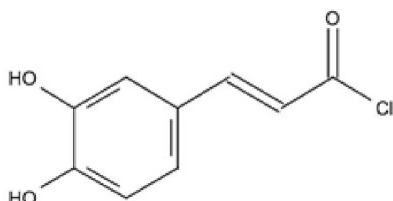
[0080]

[0081] (10) (2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-Propenamide



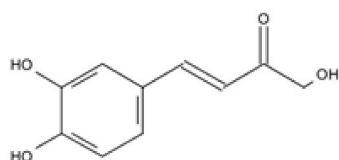
[0082]

[0083] (11) (2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-Propenoyl chloride.



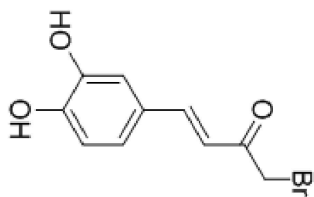
[0084]

[0085] (12) (3E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-hydroxy-3-Buten-2-one



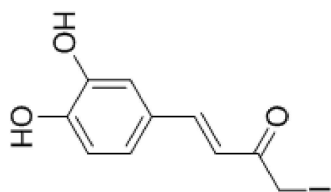
[0086]

[0087] (13) (3E)-1-Bromo-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one



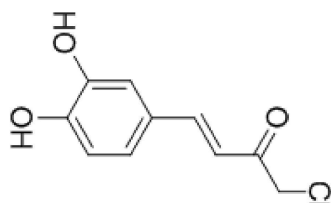
[0088]

[0089] (14) (3E)-1-Iodo-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one



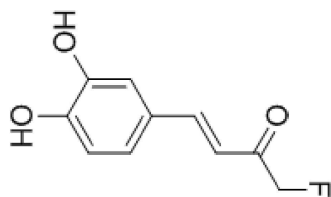
[0090]

[0091] (15) (3E)-1-Chloro-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one



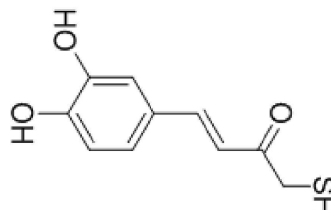
[0092]

[0093] (16) (3E)-1-Fluoro-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one



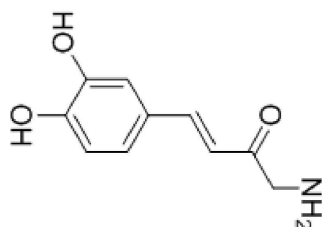
[0094]

[0095] (17) (3E)-1-Mercapto-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one



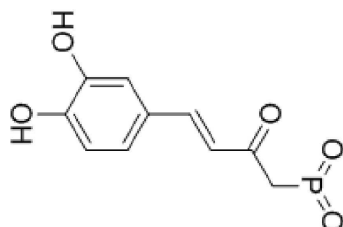
[0096]

[0097] (18) (3E)-1-Amino-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one



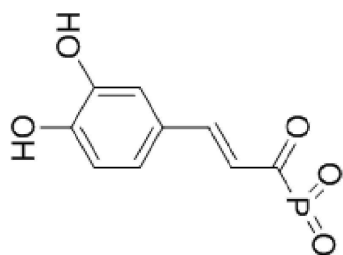
[0098]

[0099] (19) (4E)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxide-4-buten-3-one-phosphine oxide



[0100]

[0101] (20)(3E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxide-3-propen-2-one-phosphine oxide



[0102]

[0104] 본 발명에 따른 화합물은 천연물로부터 분리할 수도 있으며, 공지된 방법에 의해 합성될 수 있고, 일부 화합물은 상업적으로도 구입 가능하다. 상기 천연물은 그 종류가 제한되지 않으나, 바람직하게는 생강일 수 있다.

[0106] 상기 화학식 1의 화합물 또는 그의 염은 비대칭 원자를 포함하는 치환기를 가질 수 있으며, 이 경우 화학식 1의 화합물 또는 그의 염은 (R), (S), 또는 라세믹체(RS) 등의 광학 이성질체로 존재할 수 있다. 따라서, 달리 표기하지 않는 한, 상기 화학식 1의 화합물 또는 그의 염은 (R), (S), 또는 라세믹체(RS) 등의 광학 이성질체를 모

두 포함한다.

- [0108] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다. 상기 염은 통상의 산부가염, 예를 들어 염산, 브롬산, 황산 또는 인산과 같은 무기산으로부터 유도된 염 및 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 또는 아스파르트산과 같은 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은 통상의 금속염 형태, 예를 들어 리튬, 소듐, 또는 칼륨과 같은 알칼리 금속염; 칼슘 또는 마그네슘염과 같은 알칼리 토금속염; 또는 크롬염을 포함한다. 또한 적당한 유기 리간드들로 형성된 염, 예를 들면 4차 암모늄염을 포함하며, 디사이클로헥실아민 또는 N-메틸-D-글루카민염과 아르기닌과 라이신 등으로 형성된 아미노산염을 포함한다.
- [0110] Filaggrin은 각질형성세포가 분화단계에서 발현시키는 여러 구조 단백질 중 하나로 표피의 기저층으로부터 각질층까지 분화가 이루어지도록 하는데 관여하며, 피부 조직의 수분유지에 필수적인 천연보습인자(NMF)의 주체를 이루기도 해 피부의 수분 유지 및 피부막기능의 주요한 지표로 사용되는데, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 필라그린의 유전자 발현이 월등히 증가됨에 따라 우수한 피부 장벽 보호, 강화, 개선 기능을 가짐으로써 아토피성 피부염 또는 피부건조증을 예방 또는 치료하는데 이용될 수 있다.
- [0112] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0114] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0116] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 예를 들어 정맥내, 복강내, 뇌내, 피하, 근육내, 안내, 동맥내, 뇌척수내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 비강내, 장관, 국소, 설하, 직장내 또는 병변내 경로에 의한 주사 또는 주입, 또는 하기 기재된 서방성 (sustained release) 시스템에 의한 주사 또는 주입일 수 있으며 이에 제한되지 않는다. 일례로 상기 화학식 1의 화합물은 전신으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.
- [0120] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는

활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0122] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 젤제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.

[0124] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0126] 또한 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 피부 건조증의 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

[0128] 본 발명자들이 규명한 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 상기 필라그린 관련 피부질환에 대한 예방 또는 개선의 효과는 본 명세서에서 전술한 바와 같다.

[0130] 상기 식품용 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형들은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0132] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 식품용 조성물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한 본 발명의 식품용 조성물은 아토피성 피부염 또는 피부 건조증 예방 또는 개선의 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0134] 또한 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예를 들어 과일 통조림, 병조림, 잼, 마야말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예를 들어 햄, 소시지, 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예를 들어 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예를 들어 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예를 들어 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 식품용 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다.

- [0136] 본 발명에 따른 식품용 조성물의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 총 중량 중 0.01 내지 50중량%이다. 본 발명의 식품용 조성물을 식품첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0138] 또한 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 보습 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0140] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 필라그린 발현 증가 효과가 우수하였으므로, 이들을 유효성분으로 포함하는 조성물은 피부 보습 개선용 화장료 조성물로도 유용하게 사용될 수 있다.
- [0142] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 화학식 1의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(파운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0144] 상기 화장료 조성물에 추가적으로 첨가될 수 있는 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.
- [0146] 본 발명의 화장료 조성물은 당해 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있다.
- [0148] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0150] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0152] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0154] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 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.

[0156] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0158] 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 0.01 내지 5중량%인 것이 더욱 바람직하다.

발명의 효과

[0160] 화학식 1의 화합물은 정상세포에 대한 세포독성이 매우 낮아 안전하면서, 필라그린 발현 증가 효과가 우수하여 피부 보습 및 각질 개선에 따른 아토피성 피부염 및 피부 건조증 치료제, 기능성 식품 또는 화장료로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0162] 도 1은 사람 각질세포주인 HACAT 세포주를 칼슘으로 활성화한 후 TSLP를 처리하여 filaggrin의 발현을 억제시킨 결과이다.

도 2는 화학식 1로 표시되는 화합물들의 HACAT 세포주 및 다른 정상세포와 암세포에 대한 세포독성을 MTT assay로 확인한 표이다.

도 3은 화학식 1로 표시되는 화합물과 양성대조군인 caffeic acid의 HACAT 세포주 및 다른 정상세포와 암세포에 대한 세포독성을 MTT assay로 확인한 표이다.

도 4은 사람 각질세포주인 HACAT 세포주를 칼슘으로 활성화하고 TSLP를 투여하여 filaggrin 발현을 억제한 후, 본 발명의 화합물들을 농도별로 처리하여 TSLP로 발현 억제되었던 filaggrin의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 사진이다.[음성대조군(N.C): calcium-activated HaCaT cell, 양성대조군 : P.C(positive control), TSLP-treated calcium-activated HaCaT cell; C.A, caffeic acid]

도 5는 TSLP를 투여하지 않은 calcium-activated HACAT 세포주에 본 발명의 화합물들을 농도별로 처리한 후 filaggrin의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 사진이다.[양성대조군(P.C): calcium-activated HaCaT cell]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0163] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0164] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0166] 실시예 1 : 사람 각질세포에서 농도별 TSLP 처리 후 filaggrin 발현량 변화

[0167] TSLP에 의한 filaggrin의 발현 변화를 확인하기 위하여 칼슘으로 활성화한 각질세포에 TSLP를 농도별로 처리 한 후 단백질 레벨에서의 filaggrin의 발현량 변화를 확인 해 보았다.

[0169] 사람 피부 각질세포주 HaCaT 세포(German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) 2.1×10^5 를 4 ml의 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, 미국), penicillin(100 units/ml: Gibco, 미국) 그리고 streptomycin(100 mg/ml: Gibco, 미국)이 포함된 Dulbecco' modified Eagle medium (DMEM: Gibco, 미국)에 seeding한 후 5% 이산화탄소, 37℃ 인큐베이터(Thermo, 미국)에서 3일간 배양하였다. 배양 후 high calcium media(1.6mM calcium)으로 배지를 교환하고 2일간 배양하여 HaCaT 세포를 활성화하였다. 배지를 serum free media로 교환하고 0, 1, 10ng/ml의 사람 TSLP를 투여한 후 16시간 배양하였다. 세포를 cell scraper를 사용하여 harvest한 후, 단백질을 추출을 위해 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시키고 냉장원심분리기에서 13000rpm 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 단백질을 정량 후 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 젤에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 젤을 트랜스퍼한 후 5% BSA 로 1시간 동안 블로킹하고 1:1000으로 희석한 filaggrin 항체(Santa Cruz, 미국)와 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체(Santa Cruz, 미국)반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액(Pierce, 미국)을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0171] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 TSLP에 의하여 HaCaT 사람 각질세포주에서 filaggrin 단백질의 발현이 TSLP 투여량에 비례하여 억제되는 것을 확인하였다.

[0173] 실시예 2 : 세포독성 확인

[0174] 본 발명의 유도체들의 세포 독성을 확인하기 위하여, MTT assay를 수행하였다.

[0175] MTT assay 방법은 다음과 같다:

[0176] 세포[ADMSC: Human Adipose-derived mesenchymal stem cell (CEFO, Korea); HaCaT, Human epidermal keratinocyte; RAW264.7, Mouse macrophage cell line (preosteoclast); NIH3T3, Mouse embryo fibroblast; AGS, Human stomach adenocarcinoma; A549, Human lung carcinoma; HepG2, Human liver hepatoblastoma; HCT116, Human colon carcinoma; PC3, Human prostate adenocarcinoma; Caki-1, Human kidney carcinoma; T24, Human bladder carcinoma; HT1080, Human fibrosarcoma; B16F10, Mouse melanoma; TC-1 P3, HPV-16 E7-expressing mouse lung epithelial cell (- MHC class I)]는 1×10^5 cells/well의 농도로 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 100 μ L DMEM을 포함하는 96 well plate에서 5% CO₂, 37℃에서 24시간 배양한 후, 1, 10, 100, 1,000 혹은 5,000 μ M의 대상 화합물을 포함한 100 μ L serum-free 세포배지로 교환하고 24시간 배양하였다. 그 후 MTT(0.5mg/ml PBS)를 100 μ L/well의 농도로 투여한 후, 2시간 배양하였다. 각 well에 배지를 100 μ L의 DMSO로 교환하고 10분간 배양 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 생존한 세포의 수를 나타내는 지표로서 하단의 식으로 계산되며, 3회의 실험으로 재현성을 확인하였다.

[0178] 세포 증식율(%)=OD570(sample)/OD570(control)×100

[0180] 그 결과, 도 2 및 도 3에서 확인할 수 있듯이, 화합물들(표 1 참조)의 세포증식율의 변화에 근거하여 산출된 LD₅₀는 ADMSC(human Adipose-derived mesenchymal stem cell (CEFO, Korea)), HaCaT (Human epidermal keratinocyte), NIH3T3(Mouse embryo fibroblast) 등 정상세포에는 독성이 없거나 약한 반면 AGS, A549, HepG2, HCT116, PC3, Caki-1, T24, HT1080, B16F10, TC-1 P3 등 암세포에는 상대적으로 강한 세포독성을 나타내어, 안전하게 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0181] 단, 쥐 탐식세포인 RAW264.7(Mouse macrophage cell line)의 경우, LD₅₀가 caffeic acid는 $498 \pm 170 \mu$ M인 반면, 생강 고유의 자극적인 맛을 내는 화합물인 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one(dehydrozingerone)(KP4) >5,000 μ M, 4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide(KP8) $1020 \pm 39 \mu$ M, protocatechuic acid methyl ester >5,000 μ M, 이어서 KP4, KP8, protocatechuic acid methyl ester는 면역독성이 caffeic acid에 비하여 현저히 낮거나 거의 없는 것으로 확인되어 면역기능저하 부작용이 현저히 적을 것으로 기대되었다.

표 1

본 발명의 화합물 명칭

KP2	4-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one
KP3	4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one
KP4	4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one(dehydrozingerone)
KP5	4-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-buten-2-one(iso-dehydrozingerone)
KP6	4-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one
KP7	4-(3-Hydroxy-4-methylphenyl)acrylamide
KP8	4-(3-Hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide
C.A	Caffeic acid
Homo	homoprotocatechuic acid
HomoM	homoprotocatechuic acid methyl ester
ProC.A	protocatechuic acid
ProC.M	protocatechuic acid methyl ester
Os	osmundacetone

실시예 3 : TSLP 처리된 사람 각질세포에서 천연물 및 합성 화합물 처리에 의한 filaggrin 발현 변화

사람 각질세포에서 화학식 1의 화합물 1 μ M, 10 μ M 처리에 의한 filaggrin 발현의 변화를 확인하였다. 기존에 아토피 및 피부건조증 치료 활성이 알려진 caffeic acid를 양성대조군으로 사용하였다.

사람 각질세포주를 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 High calcium media로 활성화하였다. Serum free media로 배지를 교환하고 12시간 배양한 후 caffeic acid(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), homoprotocatechuic acid(#850217, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), homoprotocatechuic acid methyl ester(#L09552, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Haverhill, MA, USA), protocatechuic acid(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), protocatechuic acid methyl ester(Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Haverhill, MA, USA), osmundacetone(Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Haverhill, MA, USA), 4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one(KP2), 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one(KP3), dehydrozingerone(KP4)(#306045, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), iso-dehydrozingerone(KP5)(#AE-562/40322473, Specs, Zoetermeer, The Netherlands), 4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one(KP6)(#Amb25065825, Ambinter, Orleans, France), 4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)acrylamide(KP7) 및 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide(KP8) 1 μ M 혹은 10 μ M과 100ng/ml의 TSLP를 16 시간 동안 배양액에 처리하였다. 단백질을 추출하기 위하여 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에 13000rpm 30분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 단백질 정량 후 40 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA 로 1시간 동안 블로킹하고 1:1000으로 희석한 filaggrin 항체(Abcam, USA)와 함께 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.[음성대조군(N.C): calcium-activated HaCaT cell, 양성대조군 : P.C(positive control), TSLP-treated calcium-activated HaCaT cell; C.A, caffeic acid]

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 본 발명의 화합물 처리에 의해 filaggrin 발현이 상대적으로 증가하는 것을 확인하였으며, 특히, 생강의 고유한 자극적인 맛을 내는 화합물인 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one(KP4)를 비롯하여 homoprotocatechuic acid methyl ester, protocatechuic acid methyl ester, 4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one(KP2), 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one(KP3), 4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one(KP6), 및 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide(KP8) 처리에 의하여 filaggrin 발현 증가 효과가 우수한 것을 확인하였다.

특히, 양성대조군인 caffeic acid 처리 결과와 본 발명의 화합물들의 처리 결과가 비슷하거나 보다 우수하게 나타났는 바, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 천연 및 합성 화합물들은 TSLP를 비롯한 면역기전에 의하여 감소된

filaggrin 발현을 회복시킬 수 있어 피부 보습 및 장벽 강화를 통해 피부 질환을 치료할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

[0192] 실시예 4 : TSLP 비-처리된 사람 각질세포에서 천연물 및 합성 화합물 처리에 의한 filaggrin 발현 변화

[0193] TSLP가 없는 상태에서, TSLP에 의하여 저하된 filaggrin 발현을 증가시키는 것으로 확인된 caffeic acid(양성대조군), homoprotocatechuic acid methyl ester, protocatechuic acid methyl ester, 4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one(KP2), 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one(KP3), dehydrozingerone(KP4), 4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one(KP6), 및 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide(KP8) 10 μ M을 calcium으로 활성화한 HaCaT 세포에 투여 후 filaggrin 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 관찰하였다.

[0195] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 TSLP에 의하여 저하된 filaggrin 발현을 증가시키는 것으로 확인된 caffeic acid, homoprotocatechuic acid methyl ester, protocatechuic acid methyl ester, 4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-3-buten-2-one(KP2), 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)-3-buten-2-one(KP3), dehydrozingerone(KP4), 4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one(KP6), 및 4-(3-hydroxy-4-fluorophenyl)acrylamide(KP8) 투여 후, TSLP 비처리된 HaCaT 세포의 filaggrin 발현에 변화가 없는 것으로 확인되었다.(P.C(positive control): calcium-activated HaCaT cell)

[0197] 특히, TSLP를 처리하지 않은 사람 각질세포주의 경우, 양성대조군인 caffeic acid와 더불어 본 발명의 화합물들이 filaggrin 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었는바,

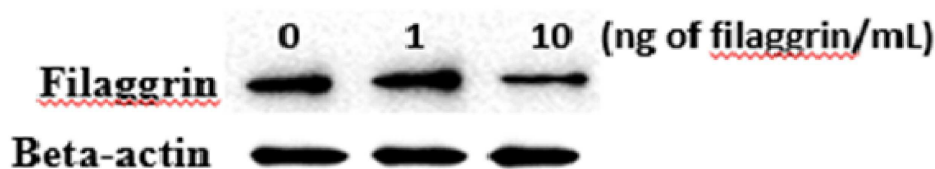
[0198] 상기 화합물들은 실시예 3의 결과에 따라 TSLP를 비롯한 면역기전에 의하여 저하된 사람 각질세포의 filaggrin 발현을 증가시키나, 정상 상태의 filaggrin 발현 수준에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었는 바, 본 발명자들은 상기 화합물들이 사람 각질세포의 filaggrin 발현을 정상 상태로 회복 또는 유지시킬 수 있음을 확인하여 필라그린 관련 피부질환의 예방 또는 치료 효과가 기대됨을 확인하였다.

산업상 이용가능성

[0200] 화학식 1의 화합물은 정상세포에 대한 세포독성이 매우 낮아 안전하면서, 필라그린 발현 증가 효과가 우수하여 피부 보습 및 각질 개선에 따른 아토피성 피부염 및 피부 건조증의 치료제, 기능성 식품 또는 화장품료 유용하게 사용될 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

도면

도면1



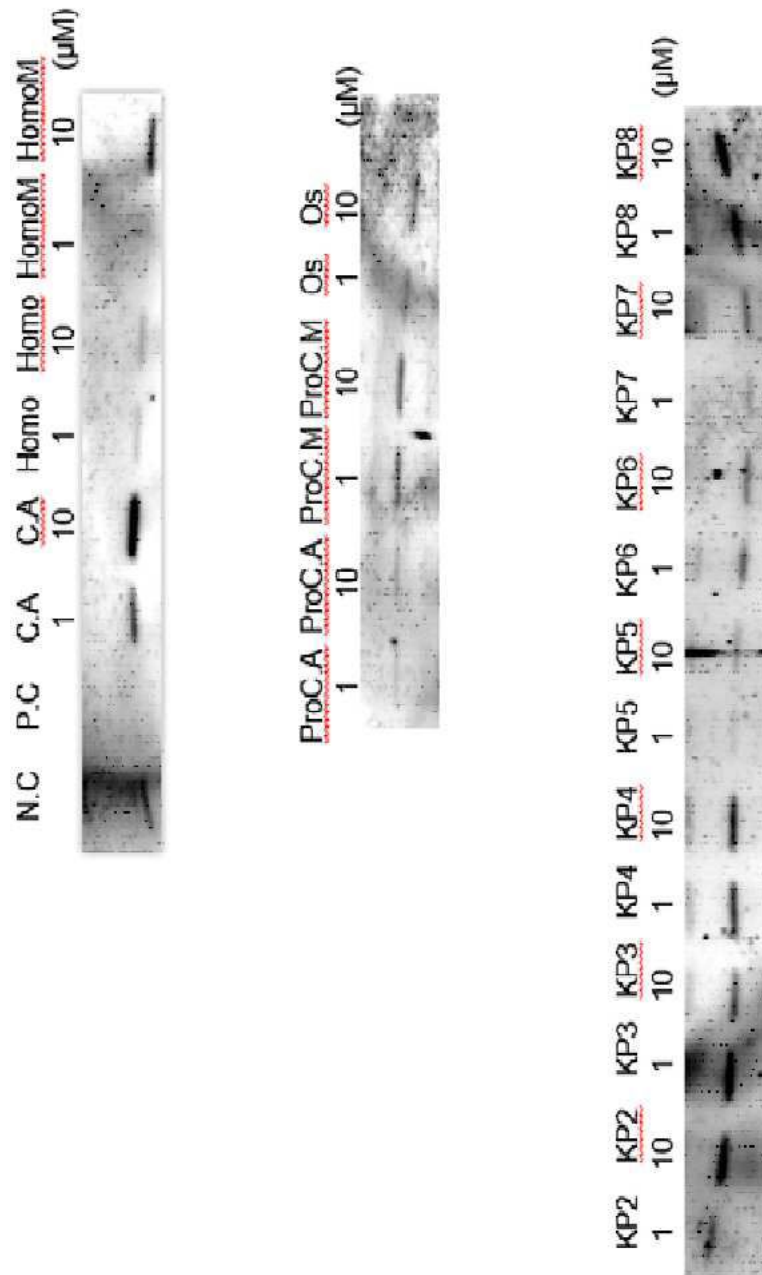
도면2

Compounds	LD ₅₀ (μM) Based on WTT Assay												
	Normal cell			Cancer cell									
	HaCat	RAW264.7	H1h3T3	AUS	45-49	h-p22	KC116	PC3	Cal-1	T24	IT1080	HGF10	TC-1 P3
Osmundacetone	3510±110	507±98	>5,000	59.9±6.1	>5,000	>5,000	811±31	65.5±8.7	928±63	2510±89	>5,000	75.8±9.2	682±95
KP2	418±10	353±37	639±82	218±10	466±65	319±28	353±28	289±7.7	956±31	1030±82	244±24	828±41	921±89
KP3	591±47	409±15	>5,000	252±21	1221±87	688±82	389±21	345±82	491±53	>5,000	410±83	291±28	1000±100
KP4	683±75	>5,000	>5,000	301±5.8	1070±59	349±25	311±35	381±73	388±15	1300±320	289±9.1	1050±77	2370±150
KP5	1190±99	>5,000	>5,000	545±27	975±81	1490±280	>5,000	>5,000	3450±55	181±59	1280±82	>5,000	>5,000
KP6	1080±78	421±52	>5,000	468±37	3570±180	120±4.3	578±51	209±89	485±10	>5,000	>5,000	951±32	>5,000
KP7	579±88	288±31	>5,000	189±9.8	2201±68	301±67	538±29	273±18	489±19	>5,000	382±21	484±50	>5,000
KP8	802±82	1050±89	>5,000	880±21	985±41	473±41	572±61	199±21	506±45	8150±390	>5,000	951±68	>5,000

도면3

Compounds	LD ₅₀ (μM) Based on MTT Assay				
	Normal cell			Cancer cell	
	ADMSC	NIH3T3	RAW264.7	B16F10	TC-1 P3
Osmundacetone	2,760±220	>5,000	499±39	64.9±5.9	692±95
Caffeic acid		>5,000	498±170	2,140±60	537±58
Protocatechuic acid		2,090±90	399±99	1,190±89	2,090±83
Protocatechuic acid methyl ester		>5,000	>5,000	>5,000	>5,000
Homoprotocatechuic acid		911±42	2,110±398	1,590±311	1360±250
Homoprotocatechuic acid methyl ester		2,170±120	450±130	977±20	1,100±220

도면4



도면5

