



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0099827
(43) 공개일자 2017년09월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/198 (2006.01) A23L 33/175 (2016.01)
A61K 8/02 (2006.01) A61K 8/44 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/198 (2013.01)
A23L 33/175 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2017-0107021(분할)
(22) 출원일자 2017년08월24일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-0154216
원출원일자 2015년11월04일
심사청구일자 2015년11월04일
- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
박중석
서울특별시 용산구 후암로28라길 19-3 (후암동)
조정제
경기도 성남시 분당구 수내로 206, 305동 202호 (수내동, 푸른마을 아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
안소영

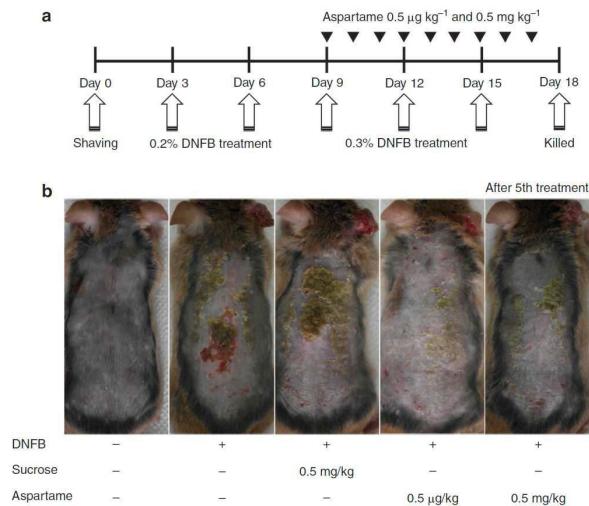
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 아스파탐을 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아스파탐을 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/02 (2013.01)
A61K 8/44 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
A61K 9/20 (2013.01)
A61K 9/48 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

안현중

서울특별시 도봉구 노해로66길 21, 108동 1002호
(창동, 삼성아파트)

박용식

서울특별시 도봉구 도봉로136길 111, 204동 202호
(창동, 창동2차현대아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 경구용 제제가 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 및 동결건조제로 구성된 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 경구용 제제가 1일당 0.1 내지 50 mg/체중 kg의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 외용제가 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 구성된 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 외용제가 1일당 0.1 내지 50 mg/체중 kg의 양으로 도포되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 로손, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이이크 및 메이크업베이스로 구성된 그룹 중에서 선택된 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 아스파탐을 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 아토피성 피부염(atopic dermatitis, AD)은 심한 가려움증, 건조함과 더불어 피부 병변에서의 홍반, 부종 및 태선화와 같은 임상 증상들을 수반하는 심각하고 만성적으로 재발하는 염증성 피부 질환이다(Leung 및 Bieber, 2003). 아토피성 피부염은 부종, 홍반, 각화(scaling) 및 가려움증을 포함하는 재발성 임상 증상을 특징으로 하는 흔한 만성 염증성 피부 질환으로, 이는 환자와 가족의 삶의 질을 심각하게 손상시킨다(Galli et al., 2003).
- [0003] 이러한 임상 증상은 IgE-매개 감각과 관련되어 있고, 경피 수분 손실 및 피부 과민증을 증가시켜 피부 장벽의 붕괴에 이르게 한다(Gittler et al., 2013). 추정되는 아토피성 피부염 환자의 수는 전 세계적으로 5%에 이르는 성인과 18%에 이르는 어린이를 포함하고, 유병률은 꾸준히 증가하고 있다(Shaw et al., 2011). 아토피성 피부염은 유전적, 면역학적 및 환경적 요인을 포함하는 복잡한 병인을 가지므로, 효과적인 치료에 방해가 되고 있다(Leung, 2000).
- [0004] 국소 스테로이드 요법이 아토피성 피부염에 대한 가장 일반적이고 효과적인 치료이나, 스테로이드제의 장기간 적용은 피부 박형화(thinning) 및 위축증(atrophy)을 포함하는 부작용을 일으킬 수 있다(Rudikoff 및 Lebwohl, 1998). 스테로이드의 지속적인 반복 적용이 피부 박형화 및 위축증을 포함하는 부작용에 이르게 한다는 또 다른 보고도 있다(Del Rosso 및 Friedlander, 2005).
- [0005] 따라서, 연화제, 항균제 및 항염증제를 포함하는 병용 치료법이 현재 아토피성 피부염 환자에 대한 바람직한 치료 목표이다(Wollenberg 및 Schnopp, 2010). 아토피성 피부염에 대한 새로운 종류의 치료제 개발의 필요성이 있다.
- [0006] 아스파탐(N-L- α -아스파틸-L-페닐알라닌-1-메틸 에스테르)은 비영양성 인공 감미료로 사용되는 디펩티드의 메틸 에스테르이다. 아스파탐은 누트라스위트(NutraSweet), 캔더렐(Canderel), 사넥타(Sanecta), 이퀄(Equal) 등의 상품명으로 판매되고 있다(Bains, 1985; Magnuson et al., 2007). 아스파탐은 저렴한 가격, 건조 조건에서의 안정성, 감소된 칼로리 섭취량, 전통적인 설탕에 비해 현저히 증가된(150 내지 200배) 단맛 및 검증된 부작용의 부재를 반영하여 각종 식품, 의약품 및 음료에서 가장 널리 사용되는 합성 감미료이다(Magnuson et al., 2007). 이러한 특성으로 인해, 아스파탐은 체중을 감소 또는 유지하기 위해 대중적으로 사용되어 왔다(Pandurangan et al., 2014). 아스파탐은 또한 심각한 독성 효과 없이 3T3-L1 분화 동안 페록시좀 증식제-활성화 수용체 γ , 지방산-결합 단백질 4, CCAAT/인핸서-결합 단백질 α , 및 스테롤 조절 인자-결합 단백질 1의 발현, 및 지질 축적을 감소시킨다(Pandurangan et al., 2014).
- [0007] 아스파탐은 페닐알라닌, 아스파르트산, 및 메탄올 또는 포름알데히드 등의 일부 유해 물질로 대사된다(Bell 및 Labuza, 1991). 그런데, 메탄올은 간에서 포름알데히드로 대사되고, 포름알데히드는 2분에 불과한 반감기를 가지는 포름산으로 급속히 대사되므로, 포름알데히드는 체내에 축적되지 않는다(Barceloux et al., 2002).
- [0008] 아스파탐은 쥐의 골수 또는 정소줄기세포(spermatogonial cells)의 염색체 상에 하루 1,600 mg/체중 kg까지 투여시 생체 내 유해한 영향을 나타내지 않았다(Bowles, 1970). 아스파탐은 아스피린 등의 비스테로이드성 항-염증약(NSAIDs)의 기능과 유사한 진통제 기능이 있다. 이러한 기능은 카라기난-유도 단일 관절염 쥐 모델에서 증가된 운동 활동 및 감소된 기계적 통각과민을 포함한다(LaBuda 및 Fuchs, 2001). 상기 연구는 카라기난-유도 단일 관절염 쥐 모델에서 아스파탐이 25, 50 및 100 mg/kg의 농도에서 진통제 및 항-염증 효과가 있는 것을 보여주었다.
- [0009] 또한 아스파탐은 지질다당류-자극으로 생산된 염증 반응의 바이오마커인 IL-6를 감소시키고, 인간 전-혈액 배양에서 항-염증 사이토카인인 IL-10을 약간 증가시키는 것으로 전해진다(Rahiman 및 Pool, 2014). 구체적으로, 상기 연구는 10 μ g/ml의 아스파탐 처리가 지질다당류-자극에 의한 IL-6 생산을 저해하는 반면, 인간 전-혈액 배양에서 IL-10의 생성은 약간 증가시키는 것으로 보고하였다.
- [0010] 아스파탐의 이러한 항-염증 기능에 대한 직접적인 증거는 없지만, 아마도 프로스타글란딘 H₂ 합성 및 사이클로옥시게나아제의 저해를 수반할 것이다. 컴퓨터를 이용한 가상 모델링은 아스파탐이 Ig 경쇄에 해당하는 인간 벤스-존스(Bence-Jones) 다이머에 대한 적절한 리간드임을 보여주었다(Edmundson 및 Manion, 1998). 아스파탐과 벤스-존스 다이머의 이러한 복합체는 프로스타글란딘 H₂ 합성효소-1의 사이클로옥시게나아제 부분의 활성 부위에 밀접하게 매치되었고, 이들은 IgM 류마티스 인자들과 상호작용한다(Edmundson 및 Manion, 1998; Rahiman 및 Pool, 2014). 정상적인 인간 IgG Fc와 IgM-타입 류마티스 인자 사이의 복합체 형성에 대한 아스파탐 간섭이 설명된바 있다(Ramsland et al., 1999). 이러한 감소하는 류마티스 인자 활성화는 류마티스 관절염 및 골관절염 환자에서 통증을 완화하고, 보행, 등산 및 악력(grip strength) 등의 수행능력을 향상시켰다(Edmundson 및

Manion, 1998).

[0011] 이러한 관찰들은 집합적으로 아토피성 피부염 치료에 대한 아스파탐의 잠재적 가치를 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국 특허등록 제10-1396458호

(특허문헌 0002) 한국 특허공개 제2015-0111500호

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Baines CJ (1985) Table top artificial sweeteners. Current use in Canada. J Can Dent Assoc 51:427-8

(비특허문헌 0002) Barceloux DG, Bond GR, Krenzelok EP et al. (2002) American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. J Toxicol Clin Toxicol 40:415-46

(비특허문헌 0003) Bell LN, Labuza TP (1991) Aspartame degradation as a function of "water activity". Adv Exp Med Biol 302:337-49

(비특허문헌 0004) Deane JA, Hickey MJ (2009) Molecular mechanisms of leukocyte trafficking in T-cell-mediated skin inflammation: insights from intravital imaging. Expert Rev Mol Med 11:e25

(비특허문헌 0005) Dubrac S, Schmuth M, Ebner S (2010) Atopic dermatitis: the role of Langerhans cells in disease pathogenesis. Immunol Cell Biol 88:400-9

(비특허문헌 0006) Edmundson AB, Manion CV (1998) Treatment of osteoarthritis with aspartame. Clin Pharmacol Ther 63:580-93

(비특허문헌 0007) Jin H, He R, Oyoshi M et al. (2009) Animal models of atopic dermatitis. J Invest Dermatol 129:31-40

(비특허문헌 0008) LaBuda CJ, Fuchs PN (2001) A comparison of chronic aspartame exposure to aspirin on inflammation, hyperalgesia and open field activity following carrageenan-induced monoarthritis. Life Sci 69:443-54

(비특허문헌 0009) Leung DY (2000) Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. J Allergy Clin Immunol 105:860-76

(비특허문헌 0010) Leung DY, Bieber T (2003) Atopic dermatitis. Lancet 361:151-60

(비특허문헌 0011) Magnuson BA, Burdock GA, Doull J et al. (2007) Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. Crit Rev Toxicol 37:629-727

(비특허문헌 0012) Pandurangan M, Park J, Kim E (2014) Aspartame downregulates 3T3-L1 differentiation. In Vitro Cell Dev Biol Anim 50:851-7

(비특허문헌 0013) Rahiman F, Pool EJ (2014) The in vitro effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. J Immunoassay Immunochem 35:26-36

(비특허문헌 0014) Ramsland PA, Movafagh BF, Reichlin M et al. (1999) Interference of rheumatoid factor activity by aspartame, a dipeptide methyl ester. J Mol Recognit 12:249-57

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 국소 스테로이드 요법이 아토피성 피부염에 대한 가장 일반적이고 효과적인 치료이나, 스테로이드제의 장기간 적용은 피부 박형화(thinning) 및 위축증(atrophy)을 포함하는 부작용을 일으킬 수 있다. 따라서, 아토피성 피부염에 대한 새로운 종류의 치료제 개발의 필요성이 있다.
- [0015] 이에, 본 발명자들은 아스파탐의 진통 효과가 아토피성 피부염의 증상을 감소시킬 수 있을 것이라는 가설을 세우고, 아토피성 피부염-유사 피부 병변에 대한 아스파탐의 치료적 효과를 조사하였고, 그 결과 아스파탐의 우수한 아토피성 피부염 치료 효과를 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

- [0016] 아스파탐의 아토피성 피부염 치료 기작에 관한 연구에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 본 발명에서는 아스파탐이 아토피성 피부염의 예방 또는 치료를 위한 용도로 사용할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다
- [0017] 본 발명자들은 아스파탐이 아토피성 피부염-유사 피부 병변을 유발한 마우스에서 아토피 증상을 개선하고, 호산구의 침윤을 억제하고, 비만 세포의 탈과립화 및 침윤을 억제하고, CD4+ T 세포의 침윤을 억제하고, 활성화된 CD4+ T 세포에 의한 염증성 사이토카인 합성을 억제하고, 혈청 IgE 합성을 억제하는 결과를 토대로, 아스파탐의 아토피성 피부염에 대한 치료 효과를 확인하게 되었고, 이를 바탕으로 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물을 제공함으로써 상기 과제를 해결하였다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물은, 아토피성 피부염-유사 피부 병변을 유발한 마우스에서 아토피 증상을 개선할 뿐만 아니라, 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 호산구의 침윤을 억제하고, 비만 세포의 탈과립화 및 침윤을 억제하고, CD4+ T 세포의 침윤을 억제하고, 활성화된 CD4+ T 세포에 의한 염증성 사이토카인 합성을 억제하고, 혈청 IgE 합성을 억제시키는바, 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 식품 조성물, 화장품 조성물 등 다방면에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1a는 NC/Nga 마우스에 2,4-디니트로플루오로벤젠(DNFB)을 반복적으로 도포하여 아토피성 피부염-유사 피부 병변을 유도하는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 1b는 15일째 NC/Nga 마우스의 등 피부 사진이다.
- 도 2a는 마우스의 귀 두께를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2b는 마우스의 귀 피부 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하여 침윤한 호산구의 수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2c는 마우스의 귀 피부 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3a는 마우스의 등 피부의 표피 비후(thickness)를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3b는 마우스의 등 피부 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하여 침윤한 호산구의 수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3c는 마우스의 등 피부 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4a는 마우스의 등 피부 절편을 톨루이딘 블루로 염색하여 침윤한 비만 세포의 수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4b는 마우스의 등 피부 절편을 톨루이딘 블루로 염색하여 탈과립화된 비만 세포의 수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4c는 마우스의 등 피부 절편을 톨루이딘 블루로 염색한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5a는 마우스의 등 피부 절편을 면역형광 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 마우스의 등 피부 절편을 면역형광 염색하여 침윤한 CD4+ T 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 마우스의 림프절로부터 분리한 활성화된 CD4+ T 세포에 의해 생성된 IL-4의 양을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 마우스의 림프절로부터 분리한 활성화된 CD4+ T 세포에 의해 생성된 IFN- γ 의 양을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 마우스의 혈청 샘플 중 총 혈청 IgE의 양을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 7b는 마우스의 혈청 샘플 중 디니트로페닐(DNP)-특이적 IgE의 양을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있고, 광범위한 투여 범위에 대해 유효하다.
- [0021] 본 발명에 따른 일 태양에서, 상기 약제학적 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화될 수 있다. 상기 경구용 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 및 동결 건조제제로 구성된 그룹 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 외용제는 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 구성된 그룹 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명은 또한 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명은 또한 아스파탐을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다. 상기 화장품 조성물은 아토피용 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨로션, 스킨스프레이, 스킨토너, 로션, 크림, 에센스, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이크 및 메이크업베이스로 구성된 그룹 중에서 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 2,4-디니트로플루오로벤젠(DNFB)의 반복 적용은 NC/Nga 마우스에서 아토피성 피부염-유사 임상 증상을 유도하였다(Jin et al., 2009). DNFB의 지속적인 반복 적용에 의해 유도되는 아토피성 피부염-유사 피부 병변은 NC/Nga 마우스에서 홍반, 부종, 삼출(oozing), 긁은상처(excoriation), 딱지(crust) 및 태선화를 포함하는 심각한 임상 증상들을 수반한다.
- [0025] 이에, 본 발명자들은 DNFB-유도 아토피성 피부염-유사 병변에서 아토피성 피부염-유사 임상 증상들의 중증도에 대한 아스파탐의 효과를 조사하였다. 그 결과, 본 발명자들은 아스파탐이 아토피성 피부염-유사 피부 병변을 유발한 마우스에서 아토피 증상을 개선하고, 호산구의 침윤을 억제하고, 비만 세포의 탈과립화 및 침윤을 억제하고, CD4+ T 세포의 침윤을 억제하고, 활성화된 CD4+ T 세포에 의한 염증성 사이토카인 합성을 억제하고, 혈청 IgE 합성을 억제하는 효과를 확인하였다.
- [0026] 구체적으로, 0.5 μ g/kg 및 0.5 mg/kg 아스파탐을 처리한 마우스는 수크로스-처리 그룹 및 DNFB-처리 그룹과 비교하여 홍반, 부종, 긁은상처(excoriation) 및 과다각화증을 포함하는 아토피성 피부염-유사 임상 증상들을 유의적으로 감소시켰다(도 1b 및 표 1). 또한, DNFB-유도 마우스 귀 부종(swelling)도 아스파탐에 의해 부분적으로 억제되었다(도 2a).
- [0027] DNFB의 반복적 적용은 표피 장벽을 현저히 교란시키고 부착 분자들을 유도한다. 다양한 면역 매개 물질의 수준이 DNFB 처리에 의해 증가하는데, 이들은 사이토카인 캐스케이드를 유도하고 표피 백혈구 밀도를 증가시켜 백혈구 롤링(rolling) 및 염증성 세포의 침윤에 이르게 한다(Proksch 및 Brasch, 1997; Deane 및 Hickey, 2009). Fc ϵ RI(고 친화성 면역글로불린 E 수용체)를 발현하는 호산구 및 비만 세포 수의 증가는 만성 아토피성 피부염의 발생에 중요한 역할을 한다(Abboud et al., 2009). 아토피성 피부염에서, 침윤한 호산구는 지질 매개체, 독성 과립 단백질, 사이토카인, 및 호산구 페록시다아제를 포함하는 효소, 및 피부 병변에서 조직 손상 및 염증을 유발하는 주요 기본 단백질을 분비한다(Wakita et al., 1994).
- [0028] DNFB의 반복적 적용은 피부의 물리적인 장벽을 방해하고, 호산구, 비만 세포 및 T 림프구를 포함한 염증성 세포의 표면상에서, 혈관 세포 부착 분자 및 세포간 부착 분자와 같은 다양한 부착 분자의 발현을 유도한다(Deane

및 Hickey, 2009). 다양한 면역 매개 물질의 분비는 사이토카인 캐스케이드를 유도하고, 콜라겐의 축적을 촉진하는데, 이는 피부 비후 및 증가하는 조직 손상의 서막이 된다(Barker et al., 1991; Proksch 및 Brasch, 1997; Purwar et al., 2008). DNFB의 지속적인 적용은 마우스의 귀 및 등 피부에서 표피의 두께 및 호산구의 침윤의 증가를 유도하였다(도 2 및 도 3). 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 및 0.5 mg/kg의 아스파탐은 증가하는 표피 두께 및 호산구의 침윤을 감소시켰으나, 0.5 mg/kg 수크로스 처리는 억제하지 못했다.

[0029] 알러젠-감작된 IgE는 비만 세포를 활성화시키고, 이는 Th2 세포의 발달 및 사이토카인, 키모카인, 프로스타글란딘 및 혈소판-활성화 인자의 분비를 초래하고, 이들은 결국 아토피성 피부염-유사 피부 병변의 발생을 유도한다(Harvima et al., 1994). 아스파탐은 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 및 0.5 mg/kg 투여량 모두에서 비만 세포의 탈과립화 및 침윤하는 비만 세포를 저해하였으나, 0.5 mg/kg 투여량의 수크로스는 그러하지 못했다(도 4).

[0030] 활성화된 비만 세포의 탈과립화 및 침윤은 활성화된 T 림프구에 의한 염증성 사이토카인의 생성 또는 증가하는 IgE 합성 중 어느 하나와 관련된다. 이에, 본 발명자들은 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 아스파탐이 T 림프구의 침윤을 억제하는지 여부를 조사하기 위해, 마우스의 등 피부 병변 상에서 면역형광 검사를 수행하였다. 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 및 0.5 mg/kg 아스파탐의 경구 투여는 침윤하는 CD4+ T 세포의 수를 저해하였다(도 5).

[0031] 아토피성 피부염은 만성 단계 및 급성 단계의 2개의 구별되는 단계를 특징으로 하는데, T 헬퍼 타입 1(Th1)이 우세한 염증을 초래하거나 T 헬퍼 타입 2(Th2)가 우세한 염증을 초래한다. Th1 우세 염증은 주로 Th1 세포 및 그들이 생산하는 IL-2 및 IFN- γ 에 의해 영향을 받는 반면, IL-4, IL-5 및 IL-13은 Th2 우세 염증에 영향을 미치는 Th2 세포에 의해 생성된다(Leung, 2000). IL-2 및 IFN- γ 는 과다각화증 및 피부 비후에 일조하여 아토피성 피부염의 만성 단계에 이르게 한다. Th2 사이토카인은 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 IgE의 합성과 분비 및 염증성 세포의 축적을 유도하는데, 이 또한 아토피성 피부염의 만성 단계의 발달에 이르게 한다. 알러지성 염증에서, 유출된 림프절에서 랑게르한스 세포 감작된 알러젠 특이적 나이브 T 세포는 전-알러지 세포(proallergic cell)로 발달하여 피부 병변으로 모여들고, 이어서 염증성 사이토카인이 생성된다(Dubrac et al., 2010).

[0032] 이에, 본 발명자들은 아스파탐이 경피 피부 병변에서 CD4+ T 세포의 사이토카인 생성을 조절하는지 여부를 조사하기 위해 ELISA를 수행하였다. DNFB의 지속적인 처리는 활성화된 CD4+ T 세포에 의한 IL-4와 IFN- γ 의 생성을 현저히 유도하였다. 그러나, 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 및 0.5 mg/kg 아스파탐이 IL-4와 IFN- γ 의 생성 양자 모두를 유의적으로 억제하였다(도 6a 및 6b). 다른 연구들(Yamaguchi et al., 1999)과 일관되게, 증가된 IL-4의 생성 및 비만 세포의 침윤 및 탈과립은 IgE 생성과 연관되었고, 이들 효과 모두가 아스파탐의 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 및 0.5 mg/kg 투여량 양자 모두에 의해 억제되었다(도 4 및 6a).

[0033] 한편, 아스파탐이 활성화된 CD4+ T 세포에 의한 사이토카인의 생성을 억제하는지 여부는 조사하지 않았으나, T 림프구의 침윤의 억제는 사이토카인 생성 감소와 상관관계가 있을 것으로 추측되었다.

[0034] 활성화된 T 림프구에 의해 생성된 IL-4, IL-5 및 IL-13을 포함하는 Th2 사이토카인은 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 IgE 합성 및 호산구 침윤에 있어서 중심축이 된다. 특히, IL-4는 B 세포의 C γ_4 또는 C ϵ 에 결합함으로써 가변 다양성의 재배열에 매우 중요하다(Bacharier 및 Geha, 2000). 총 혈청 IgE 수준 및 디니트로페닐(DNP)-특이적 IgE의 수준이 NC/Nga 마우스에서 DNFB에 의해 증가하였다(도 7a 및 7b). 0.5 mg/kg 수크로스 처리는 IgE 합성을 감소시키지 못했으나, 아스파탐 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 및 0.5 mg/kg 농도로 처리된 마우스는 농도 의존적으로 총 혈청 IgE 및 DNP-특이적 IgE의 생성을 유의적으로 감소시켰다(도 7a 및 7b).

[0035] 아토피성 피부염-유사 모델에서 아스파탐의 치료적 효과에 대한 분자 메커니즘이 완전히 확인되지 않았다. 본 발명자들은 아스파탐이 그의 진통 기능 및 염증 억제에 기초하여 아토피성 피부염에 대한 잠재적인 치료 화합물로서 사용될 수 있음을 시사한다.

[0036] 본 발명의 유효성분인 "아스파탐"은 "N-L- α -아스파틸-L-페닐알라닌-1-메틸 에스테르"의 화합물명을 갖는 아스파탐 자체뿐만 아니라, 그와 동등한 생리활성을 가지는 아스파탐의 유도체 또는 유사체를 포함한다.

[0037] 본 발명에 있어서, 용어 "아토피성 피부염"은 그 발생의 직간접적인 원인을 불문하고 당업계에서 아토피성 피부염으로 분류되는 모든 질환을 포함하는 의미로 사용된다. 통상 아토피성 피부염은 그 발병 시기 또는 그 발병 대상에 따라 유아형 아토피성 피부염, 소아형 아토피성 피부염, 성인형 아토피성 피부염 및 임신부 아토피성 피부염으로 분류되는데, 본 발명에서 아토피성 피부염은 이러한 모든 유형의 아토피성 피부염을 포함하는 것으로 정의된다.

- [0038] 본 발명에 있어서, 용어 "유효성분으로 포함하는"은 아토피성 피부염의 개선, 예방, 또는 치료의 효과를 가져오는 용량 범위로 함유하는 것을 의미하고, 증증도 및 제형에 따라 용량범위는 변할 수 있으며, 적용횟수도 적용 대상의 연령, 체중 및 체질에 따라 변할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 유효량의 아스파탐을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제는 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 물질을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 개체에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화될 수 있다. 상기 경구용 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 및 동결건조제제로 구성된 그룹 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 외용제는 크림, 젤, 연고, 유화액, 현탁액, 분무제 및 경피 전달성 패치제로 구성된 그룹 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 용어 "치료"는 본 발명의 약제학적 조성물을 아토피성 피부염 개체에 투여한 결과로서 아토피성 피부염 증세의 완치는 물론 아토피성 피부염 증세의 부분적 완치, 호전 및 경감을 포함한다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 용어 "예방"은 본 발명의 약제학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물을 아토피성 피부염이 없는 개체에 투여, 섭취 또는 적용하여 아토피성 피부염 증세를 억제 또는 차단함으로써, 아토피성 피부염 증세가 사전에 발생되지 않도록 하는 것을 의미한다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 용어 "개선"은 본 발명의 약제학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물을 아토피성 피부염 개체에 투여, 섭취 또는 적용하여 아토피성 피부염 증상의 경감, 예방 또는 치료를 포함하는 의미이다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 용어 "개체"는 아토피성 피부염이 이미 발명되었거나 발명될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 개선에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0047] 인간의 아스파탐의 1일 허용 섭취량 수준은 유럽식품안전청 및 미국식약청(FDA)에 의하면 각각 40 mg/체중 kg 및 50 mg/체중 kg이다(Magnuson et al., 2007). 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 아토피성 피부염 예방 또는 치료를 위한 아스파탐의 1일 투여량 또는 약학적으로 유효한 양은 0.1 mg 내지 50 mg/체중 kg, 바람직하게는 1.0 mg 내지 50 mg/체중 kg, 보다 바람직하게는 10 mg 내지 50 mg/체중 kg이다. 그러나 상기 1일 투여량 또는 약학적으로 유효한 양은 아토피성 피부염 증상의 정도, 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있으며, 담당 의사/수의사에 의해 선택될 수 있다.
- [0048] 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물에 해당하는 경구용 제제 또는 외용제는 1일당 0.1 내지 50 mg/체중 kg의 양으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 일 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 아토피성 피부염의 예방 또는 치료를 위하여 다른 약물과 조합/배합하여 투여될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 식품 조성물은 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 아스파탐의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 각종 음료, 차, 즙, 드링크제, 주스, 알콜 음료, 아이스크림류, 요거트류를 포함한 낙농제품, 각종 스프 등의 식품을

예로 들 수 있다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 보다 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0054] **실시예**

[0055] 후술하는 실시예에서는 하기의 내용대로 실험을 수행하였다.

[0056] **실험 동물**

[0057] 7주령 NC/Nga 수컷 마우스(19-22g)를 일본 SLC 사(시즈오카, 일본)로부터 구입하여 특정 병원균이 없는 상태에서 유지하였다. 마우스를 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도 및 $40 \pm 5\%$ 의 상대 습도로 냉난방 장치를 한 동물 방에 수용하고, 이 들에서 증류수 및 실험 식이를 공급하였다. 동물 처치 및 유지는 실험 동물 관리 원칙(the Principles of Laboratory Animal Care(NIH 공개번호 제85-23호, 1985년 개정)) 및 경희대학교 동물 복지에 대한 윤리위원회가 발행한 가이드라인(KHUASP (SE)-15-021)을 준수하였다. 모든 절차는 미국 국립 보건원(NIH) 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0059] **약물 처리**

[0060] 마우스를 5개의 처리 그룹으로 무작위로 배분하였다(그룹 당 $n = 5$).

[0061] — 비처리(대조) 그룹

[0062] — DNFB-처리 그룹

[0063] — DNFB 및 0.5 mg/kg 수크로스 처리 그룹

[0064] — DNFB 및 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 아스파탐 처리 그룹

[0065] — DNFB 및 0.5 mg/kg 아스파탐 처리 그룹

[0066] 아스파탐(SINO sweet, China) 및 수크로스(Sigma, U.S.A.)를 각각 증류수에 용해시켜 200 μl 부피가 되게 하였다. 비처리 그룹 및 DNFB(Sigma, U.S.A.) 그룹을 동일 부피의 증류수로 처리하였다. 수크로스 및 아스파탐을 9일부터 17일까지 매일 경구로 투여하였다(도 1a).

[0068] **알러젠(allergen) 감작 및 챌린지**

[0069] 아세톤/올리브 오일(3:1) 중의 0.2% DNFB 25 μl 를 3일째 및 6일째에 마우스 오른쪽 귀의 안쪽 및 바깥쪽 표면에 반복 도포하여 DNFB 감작을 유도하고, 3일째 및 6일째에 동일한 용액 100 μl 를 면도한 등 피부에 도포하였다. 9일째, 12일째 및 15일째에 감작된 마우스의 등 및 오른쪽 귀 피부 표면에 0.3% DNFB를 도포하여 챌린지하였다(도 1a). 대조 마우스를 동일 부피의 비히클로 처리하였다. 귀 두께의 증가를 디지털 인디케이터 두께 측정기(Mitsutoyo, 도쿄, 일본)로 측정하였다.

[0071] **피부염 점수**

[0072] SCORAD(SCORing Atopic Dermatitis, 아토피성 피부염 점수매기기) 방법(Oranje et al., 2007)을 사용하여 아토피성 피부염-유사 임상 증상의 중증도를 거시적으로 평가하였다. 각 증상의 정도를 0에서 3까지로 등급화하였다(0은 증상 없음; 1은 경증; 2는 중등도; 3은 중증). 이 점수매기기는 부종, 홍반, 삼출(oozing), 딱지(crust), 긁은상처(excoriation) 및 태선화의 중증도에 근거하였다. 전체 피부염 점수는 모든 개별 점수의 합으로부터 결정하였다. 한편, 평가는 상기 마우스의 그룹 배분을 보지 않은 연구자에 의해 수행하였다.

[0074] **사이토카인 생성의 측정**

[0075] 마우스의 림프절을 배출하여 T 림프구를 분리하고, Biomag 분리 컬럼(Qiagen, 힐텐, 독일)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 CD4⁺ T 세포를 정제하였다. 분리된 CD4⁺ T 세포(1×10^6)를 50 μ M의 β -머캅토에탄올 및 10% 열-불활성화 소대아혈청과 함께 RPMI-1640 배지에서 24-웰 편평 바닥 배양 플레이트에서 배양한 후, 5 μ g/ml의 고정화된 항-CD3 항체 및 2 μ g/ml의 가용성 항-CD28 항체를 사용하여 5% CO₂ 분위기하 37°C에서 72시간 동안 자극하였다. 인큐베이션 후, 배양 상청액을 회수하고, IL-4 및 IFN- γ 의 생성을 ELISA(Biolegend, 샌디에고, 캘리포니아주)에 의해 정량하였다.

[0077] **총 IgE 및 디니트로페닐(DNP)-특이적 IgE의 측정**

[0078] 18일째에 OptEIA 세트 마우스 IgE ELISA 키트(BD Pharmingen, 샌디에고, 캘리포니아주) 및 마우스 항-DNP IgE ELISA 키트(Alpha Diagnostic International, 샌 안토니오, 텍사스주)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 총 혈청 샘플을 제조하고 정량하였다. EL 800 ELISA 리더(Bio-Tek, 위누스키, 버몬트주)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 즉시 읽었다.

[0080] **조직학적 분석**

[0081] 18일째에 마우스의 오른쪽 귀 및 등 피부를 제거하고 인산염 완충 식염수(pH 7.4) 중에서 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 고정된 조직을 30% 수크로스 용액 중에서 세척하고 OCT 화합물 중에서 냉동하였다. 냉동 절편(8 μ m)을 슬라이드 위에 올려놓고 상온에서 밤새 건조시킨 후, 얼음처럼 차가운 아세톤으로 5분 동안 고정하였다. 슬라이드를 인산염 완충 식염수 중에서 다시 수화하고, 0.3% 트윈-20(세척 버퍼)을 함유하는 인산염 완충 식염수 중 5% 정상 염소 혈청으로 상온에서 2시간 동안 차단하였다. 세척 후, 절편을 일차 항-CD4 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하고, 세척하고, 면역형광 염색을 위해 Alexa Fluor 488-컨쥬게이션된 염소 항-랫트 항체와 함께 4°C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 4',6-디아미디노-2-페닐인들을 사용하여 4°C에서 4시간 동안 세포핵을 대조염색하였다. 절편을 올려 놓고, 이클립스 50i 형광 현미경(Nikon, 도쿄, 일본)을 사용하여 이미지를 포착하였다. 또한, 파라핀 블록으로부터의 피부 절편(8 μ m)을 염증성 세포에 대해 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하고, 톨루이딘 블루를 사용하여 비만 세포를 염색하였다. CD4⁺ T 세포, 호산구 및 비만 세포의 수를 $100 \mu\text{m}^2 (\times 200)$ 의 3개의 필드 중 평균 총 개수로 표현하였다.

[0083] **통계적 분석**

[0084] 데이터는 3중으로 수행된 적어도 3개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 표시한다. 통계적 분석은 일원 변량 분석(one-way analysis of variance)을 사용하여 수행하였고, 이어서 본페로니(Bonferroni)의 다중 비교 테스트를 수행하였다. 도시하지 않은 경우, 오차 막대는 심볼 내에 있다. <0.05, <0.01 및 <0.001의 P값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0086] **<실시예 1> 아토피성 피부염-유사 임상 증상에 대한 아스파탐의 효과**

[0087] 2,4-디니트로플루오로벤젠(DNFB)의 반복 적용은 NC/Nga 마우스에서 아토피성 피부염-유사 임상 증상을 유도하는 것으로 알려져 있다(Jin et al., 2009). 따라서 DNFB-유도 아토피성 피부염-유사 증상 및 반응에 대한 아스파탐의 치료적 효과를 조사하였다.

[0088] 마우스를 무작위로 5개의 그룹으로 나누었다. 3일째 및 6일째에 0.2% DNFB로 마우스를 감작한 후, 9일째, 12일째 및 15일째에 상기 마우스들을 0.3% DNFB로 추가로 챌린지하였다(도 1a). 그리고 나서, DNFB-유도 아토피성 피부염-유사 피부 병변의 부위에서 아스파탐 처리의 효과를 거시적으로 평가하였다. 0.5 mg/kg 수크로스의 매일 경구 투여는 치료학적 효과가 없었으나, 0.5 μ g/kg 및 0.5 mg/kg 아스파탐의 경구 투여는 DNFB-처리 그룹과 비교하여 아토피성 피부염-유사 피부 병변들을 완화하였다(도 1b).

[0089] 또한 아토피성 피부염-유사 임상 증상의 중증도를 SCORAD(SCORing Atopic Dermatitis, 아토피성 피부염 점수매

기기)로 거시적으로 평가하여, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 전체 피부염 점수는 모든 개별 점수의 합으로 결정하였다. 데이터는 5개의 측정의 평균 $\pm$ SEM으로 표시한다(SUC: 수크로스, ASP: 아스파탐). * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 대 DNFB (+) 그룹.

표 1

그룹	SCORAD	마우스의 수
DNFB (-)	0 ± 0.00	5
DNFB	9.83 ± 1.09	5
DNFB (+) SUC 0.5 mg/kg	$8.33 \pm 1.08^*$	5
DNFB (+) ASP 0.5 μ g/kg	$6.00 \pm 1.29^{***}$	5
DNFB (+) ASP 0.5 mg/kg	$5.33 \pm 1.25^{***}$	5

<실시예 2> 마우스 귀 부종에서 염증성 세포에 대한 아스파탐의 효과

NC/Nga 마우스에서 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 염증성 세포인 호산구의 피부 침윤에 대한 아스파탐의 효과를 조사하였다. 마우스 귀 두께의 증가를 디지털 인디케이터 두께 측정기(Mitsutoyo, 도쿄, 일본)로 매일 측정하였다. DNFB는 호산구의 거대한 침윤 및 마우스의 귀 부종(swelling)을 유도하였다. DNFB에 의해 유발된 귀의 부종(swelling)은 재발하는 부종(edema) 및 삼출(oozing)과 밀접한 상관관계가 있었고, 이 반응은 아스파탐에 의해 농도-의존적으로 유의적으로 억제되었다. 0.5 mg/kg 투여량의 수크로스는 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 염증성 세포의 침윤 및 과다각화증(hyperkeratosis)을 억제하지 못한 반면, 아스파탐은 0.5 μ g/kg 및 0.5 mg/kg 투여량 모두에서 호산구의 침윤을 억제하였다(도 2). 또한, 귀의 피부 절편(8 μ m)을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하여, 침윤한 호산구의 수를 100 μ m²($\times 200$)의 3개의 필드 중 평균 총 개수로 표현하였다. 그 결과, 아스파탐은 농도-의존적으로 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 호산구의 침윤을 억제하였다(도 2b 및 2c).

<실시예 3> 마우스 등 피부 비후에서 염증성 세포에 대한 아스파탐의 효과

DNFB는 호산구의 거대한 침윤 및 마우스의 등 피부 병변에서 피부 비후(thickening)을 유도하였다(도 3). 0.5 mg/kg 투여량의 수크로스는 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 염증성 세포의 침윤 및 과다각화증(hyperkeratosis)을 억제하지 못한 반면, 아스파탐은 0.5 μ g/kg 및 0.5 mg/kg 투여량 모두에서 호산구의 침윤을 억제하였다(도 3). 또한, 마우스의 등 피부 절편(8 μ m)을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하여, 침윤한 호산구의 수를 100 μ m²($\times 200$)의 3개의 필드 중 평균 총 개수로 표현하였다. 그 결과, 아스파탐은 농도-의존적으로 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 호산구의 침윤을 억제하였다(도 3b 및 3c).

<실시예 4> 비만 세포의 탈과립화 및 침윤에 대한 아스파탐의 효과

알러젠-감작된 IgE에 의한 Fc ϵ RI 수용체를 통한 비만 세포의 활성화는 다양한 과립 매개체, 사이토카인, 및 프로스타글란딘, 류코트리엔, 혈소판-활성 인자, IL-13 및 에오타신을 포함하는 키모카인들을 방출시키는데, 이들은 아토피성 피부염의 발생과 관련이 있다(Amon et al., 1994).

따라서, 톨루이딘 블루 염색을 사용하여, DNFB-유발 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 비만 세포의 탈과립화 및 침윤에 대한 아스파탐의 억제 효과를 조사하였다. 마우스의 등 피부 절편(8 μ m)을 톨루이딘 블루로 염색하여, 침윤한 비만 세포의 수 및 탈과립화된 비만 세포의 수를 각각 100 μ m²($\times 200$)의 3개의 필드 중 평균 총 개수로 표현하였다. 아스파탐은 0.5 μ g/kg 및 0.5 mg/kg 투여량 모두에서 비만 세포의 침윤 및 탈과립화를 감소시킨 반면, 0.5 mg/kg 투여량의 수크로스는 그러하지 못했다(도 4).

[0102] <실시예 5> CD4⁺ T 세포의 침윤에 대한 아스파탐의 효과

[0103] T 림프구는 아토피성 피부염의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다. 즉, T 림프구는 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 Th₂ 사이토카인의 중요한 소스로서 작용하는데, 이들 사이토카인은 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 IgE 합성 및 호산구 축적에 중요하다(Novak et al., 2004).

[0104] 따라서 면역형광을 사용하여 아토피성 피부염-유사 피부 병변에서 아스파탐이 T 림프구의 침윤을 억제하는지 여부를 조사하였다. 마우스의 등 피부 절편을 일차 항-CD4 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하고, 세척하고, 면역형광 염색을 위해 Alexa Fluor 488-컨쥬게이션된 염소 항-랫트 항체와 함께 4℃에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 4',6-디아미디노-2-페닐인돌을 사용하여 4℃에서 4시간 동안 세포핵을 대조염색하였다. 절편을 올려 놓고, 이클립스 50i 형광 현미경(Nikon, 도쿄, 일본)을 사용하여 이미지를 포착하였다. 아스파탐은 0.5 μg/kg 및 0.5 mg/kg 투여량 모두에서 NC/Nga 마우스에서 등 피부 병변에서 침윤하는 CD4⁺ T 세포의 수를 감소시켰으나, 0.5 mg/kg 투여량의 수크로스는 T 림프구의 침윤을 억제하지 못했다(도 5).

[0106] <실시예 6> 활성화된 CD4⁺ T 세포에 의한 염증성 사이토카인 합성에 대한 아스파탐의 효과

[0107] 아스파탐이 아토피성 피부염-유사 NC/Nga 마우스 모델에서 CD4⁺ T 세포의 Th1 또는 Th2 반응에 영향을 미치는지를 조사하였다. 아스파탐은 DNFB-유도 아토피성 피부염-유사 등 피부 병변에서 CD4⁺ T 세포의 침윤을 저해하는 것이 상기 실험예 5에서 관찰되었다(도 5).

[0108] 또한 아스파탐이 경피 피부 병변에서 CD4⁺ T 세포의 사이토카인 생성을 조절하는지 여부를 조사하기 위해 ELISA를 수행하였다. 마우스의 림프절을 배출하여 T 림프구를 분리하고, CD4⁺ T 세포를 정제, 배양한 후, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체를 사용하여 72시간 동안 자극하였다. IL-4 및 IFN-γ의 생성을 ELISA(Biolegend, 샌디에고, 캘리포니아주)에 의해 정량하였다. DNFB의 지속적인 처리는 활성화된 CD4⁺ T 세포에 의한 IL-4와 IFN-γ의 생성을 현저히 유도하였다. 그러나, 0.5 μg/kg 및 0.5 mg/kg 아스파탐을 처리한 마우스는 DNFB-처리한 마우스 및 0.5 mg/kg 수크로스-처리한 마우스에서와 비교하여 IL-4와 IFN-γ의 생성을 유의적으로 억제하였다(도 6a 및 6b).

[0109] 한편, 아스파탐이 활성화된 CD4⁺ T 세포에 의한 사이토카인의 생성을 억제하는지 여부는 조사하지 않았으나, 억제된 T 림프구의 침윤이 감소하는 사이토카인의 생성과 상관관계가 있을 것으로 추측되었다.

[0111] <실시예 7> DNFB-유도 혈청 IgE 합성에 대한 아스파탐의 효과

[0112] 알러지성 염증에서는 IgE가 B 세포에 의해 합성되어 FcεRI를 통해 비만 세포의 활성화를 유도하여 Th2 사이토카인 및 히스타민의 분비를 초래한다(Kim et al., 2012). 총 혈청 IgE의 풍부한 합성이 아토피성 피부염의 특징이다(Leung, 2000). 따라서 ELISA를 사용하여 총 혈청 IgE 및 디니트로페닐(DNP)-특이적 IgE의 수준을 평가하기 위해 혈청 샘플을 준비하였다.

[0113] 18일째에 OptEIA 세트 마우스 IgE ELISA 키트(BD Pharmingen, 샌디에고, 캘리포니아주) 및 마우스 항-DNP IgE ELISA 키트(Alpha Diagnostic International, 샌 안토니오, 텍사스주)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 총 혈청 샘플을 제조하고 정량하였다. EL 800 ELISA 리더(Bio-Tek, 위누스키, 버몬트주)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 즉시 읽었다. 총 혈청 IgE 수준 및 DNP-특이적 IgE의 수준이 NC/Nga 마우스에서 DNFB에 의해 증가하였다(도 7a 및 7b). 0.5 mg/kg 수크로스 처리는 IgE 합성을 감소시키지 못했으나, 아스파탐 0.5 μg/kg 및 0.5 mg/kg 농도로 처리된 마우스는 농도 의존적으로 총 혈청 IgE 및 DNP-특이적 IgE의 생성을 유의적으로 감소시켰다(도 7a 및 7b).

[0115] 이하, 본 발명을 제제예에 의하여 보다 상세하게 설명한다. 이들 제제예는 본 발명의 실시예에 대한 이해를 돕기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 제제예에 한정되는 것을 의미하는 것은 아니다.

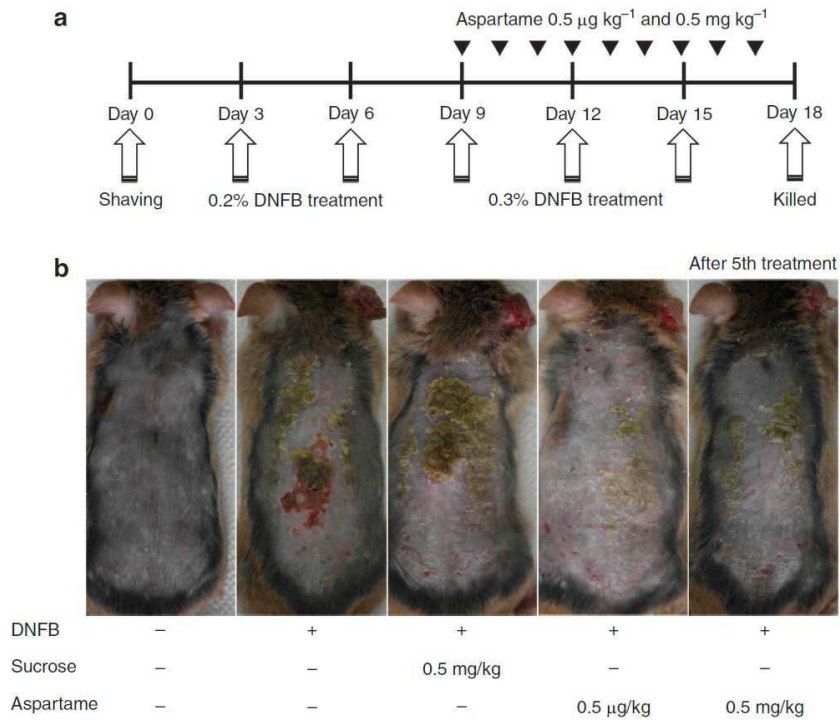
[0117] 제제예

- [0118] <제제예 1> 정제의 제조
- [0119] 아스파탐 10 mg
- [0120] 전분 100 mg
- [0121] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0122] 통상의 정제의 제조방법에 따라 상기 성분들을 혼합한 후 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0124] <제제예 2> 과립제의 제조
- [0125] 아스파탐 10 mg
- [0126] 대두 추출물 50 mg
- [0127] 포도당 200 mg
- [0128] 전분 500 mg
- [0129] 통상의 과립제의 제조방법에 따라 상기 성분들을 혼합한 후 30% 에탄올 100 mL를 첨가하여 60℃에서 건조시켜 과립을 형성한 후 포에 충전하여 과립제를 제조하였다.
- [0131] <제제예 3> 액제의 제조
- [0132] 아스파탐 10 mg
- [0133] 이성화당 1,000 mg
- [0134] 만니톨 5,000 mg
- [0135] 정제수 적량
- [0136] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 상기 성분들을 용해시키고, 적절한 양을 가한 다음 병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0138] <제제예 4> 요거트 음료의 제조
- [0139] 우유를 이용하여 통상의 요거트의 제조방법에 따라 우유를 발효시킨 후 아스파탐 10 mg을 첨가하여 요거트 음료를 제조하였다.
- [0141] <제제예 5> 탄산 음료의 제조
- [0142] 아스파탐 1%, 구연산 0.05 ~ 0.3%, 카라멜 0.005 ~ 0.02%, 비타민 C 0.1 ~ 1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79 ~ 98%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85 ~ 98℃에서 20 ~ 180초간 살균하여 냉각수와 1 : 4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5 ~ 0.82% 주입함으로써, 설탕 대신 아스파탐을 넣은 탄산음료를 제조하였다.
- [0144] <제제예 6> 비누의 제조
- [0145] 물 330 mL와 NaOH 175 g을 혼합하여 완전히 용해시킨 후, 아스파탐 10 mg을 약 30 분 동안 조금씩 첨가하면서 혼합하였다. 상기 혼합물이 건조될 때까지 그늘지고 바람이 잘 통하는 곳에서 건조시켜 비누를 제조하였다.
- [0147] <제제예 7> 목욕제의 제조
- [0148] 아스파탐 10 mg에 증류수 200 mL를 첨가하여 약 60℃ 정도가 되도록 한 후 천일염을 넣어 포화용액을 만들고 물을 증발시켰다. 상기 용액을 실온에서 냉각시킨 후 급속냉동시켜 동결건조하였다. 상기 동결건조된 고형제를

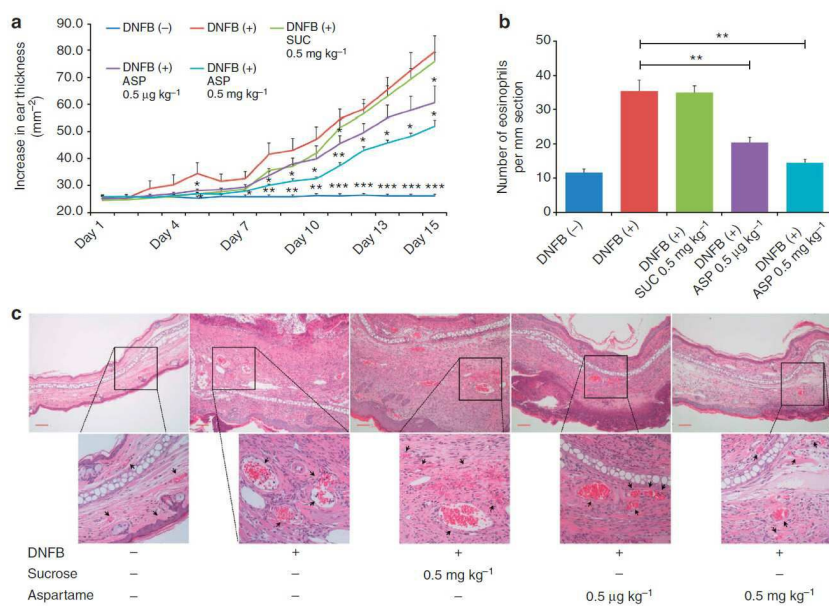
분말화하여 목욕제를 제조하였다.

도면

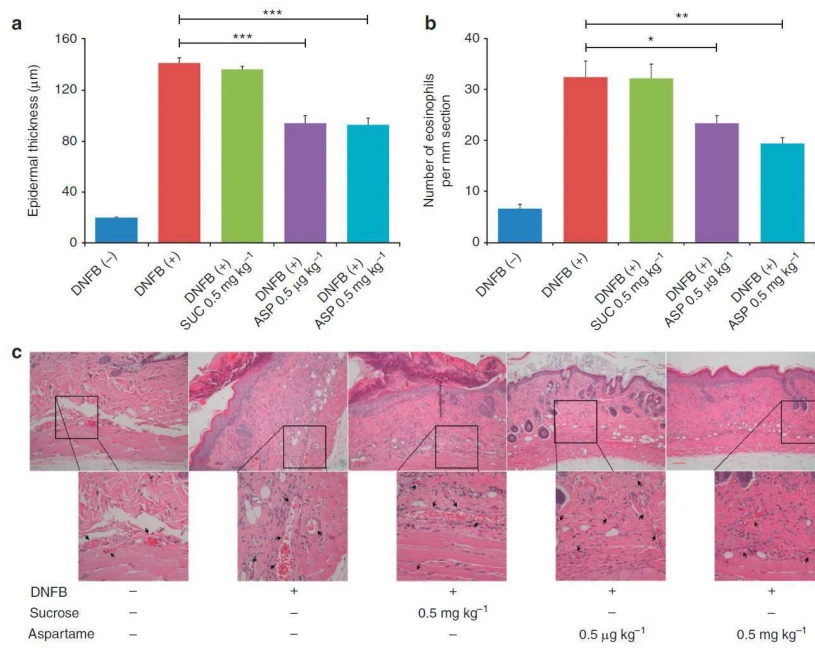
도면1



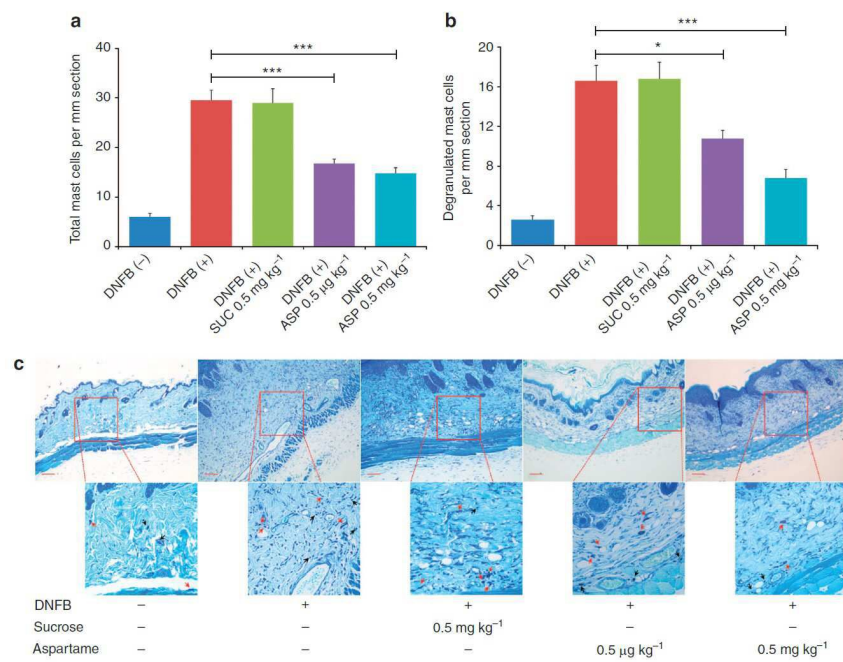
도면2



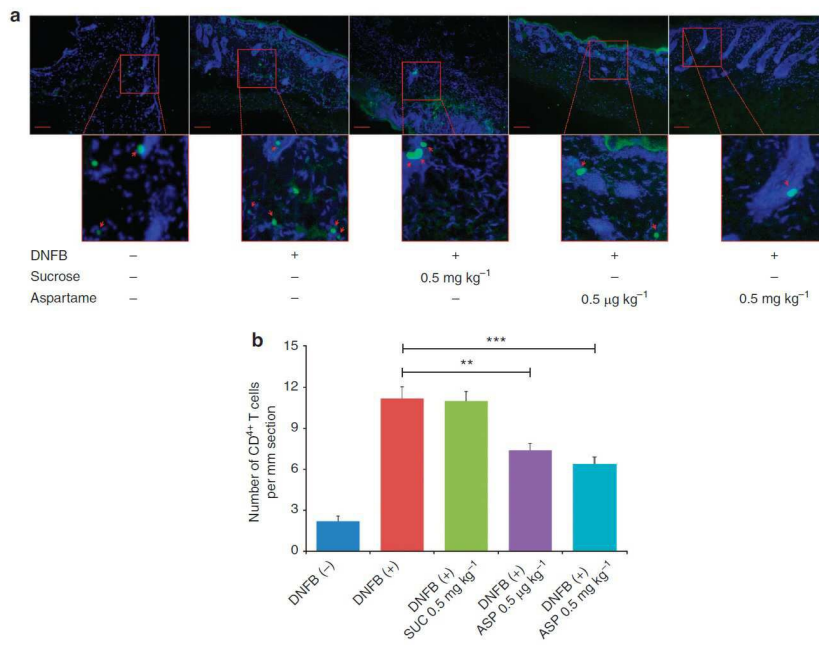
도면3



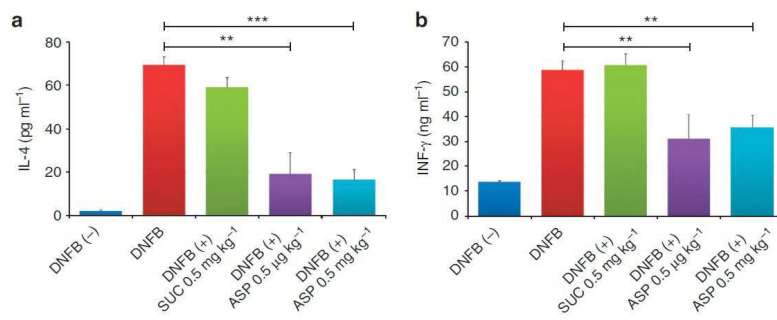
도면4



도면5



도면6



도면7

