(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월24일
(11) 등록번호 10-1699572
(24) 등록일자 2017년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 31/4375* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 9/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7002287
(22) 출원일자(국제) 2010년06월30일
심사청구일자 2015년06월19일
(85) 번역문제출일자 2012년01월27일
(65) 공개번호 10-2012-0047240
(43) 공개일자 2012년05월11일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2010/000983
(87) 국제공개번호 WO 2011/000218
국제공개일자 2011년01월06일
(30) 우선권주장
61/221,725 2009년06월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20060286054 A1*
Phytochemical, 15, 340-347쪽(2008.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더만 바이오메디슨 코. 엘티디.
중화민국 타오위안 카운티 33380 귀샨 타운쉽 다후 빌리지 웬 23 스트리트 넘버12
(72) 발명자
홍, 슈엔-루
타이완 장화 시티 섹션 6 장난 로드 넘버 340
청, 웬-홍
타이완 난터우 카운티 중량오 타운쉽 용핑 빌리지 용핑 로드 넘버 207
장, 츠웬
대만 타이페이 시티 115 난캉 디스트릭트 아카데미아 로드 섹션 2 래인 98 앨리 21 넘버 2 13층
(74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **주사 또는 홍안 관련 피부 질환의 치료를 위한, 베르베린 또는 그의 유사체를 함유하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 주사 및 다른 홍안-관련 피부 질환의 치료를 위한 베르베린 및 그의 생물학상 등가인 유사체, 예컨대 팔마틴 및 콥티신의 국소 제약 제형을 개시한다. 본 발명의 국소 제약 제형은 주요 활성 약물 성분으로서 정제된 베르베린을 0.1% 초과의 농도로 함유한다. 본 발명은 또한 베르베린 또는 그의 생물학상 등가인 유사체, 예컨대 팔마틴을 함유하는 국소 제약 제형의 투여를 포함하는, 주사 및 다른 홍안 관련 피부 질환, 예컨대 스테로이드-유도 주사형 피부염의 치료 방법을 개시한다.

명 세 서

청구범위

청구항 1

0.02% w/w 이상의 베르베린 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 홍안 관련 피부 질환의 예방 또는 치료를 위한 국소 제약 조성물에 있어서,

상기 베르베린 또는 그의 제약상 허용되는 염이 유일한 제약 활성 성분이고,

상기 홍안 관련 피부 질환이 주사(rosacea)인 국소 제약 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 베르베린 또는 그의 제약상 허용되는 염의 농도가 0.05% 내지 2% w/w인 국소 제약 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] 1. 주사(rosacea) 및 그의 주요 증상

[0002] 주사는 발적 및 종창 (주로 얼굴 상에, 특히 얼굴 중앙 영역)을 나타내는 만성 피부 질병이다. 다른 이환 영역에는 두피, 목, 귀, 가슴, 등 및 눈이 포함된다. 주사는 안면 홍조, 홍반, 모세혈관확장증, 및 구진 및 농포 동반 염증성 삽화, 및 중증 경우에, 비류를 특징으로 한다. 면포(comedone)가 현저시 부재한다[1].

[0003] 주사를 갖는 환자는 대개 안면 피부의 민감도 증가 및 건조성 박리성 안면 피부염, 얼굴 부종, 및 지속성 육아종 구진결절을 갖는다[2]. 임상적 및 조직병리학적 특징에 따라, 질병은 네 가지 하위유형으로 분류될 수 있다: (a) 홍반혈관확장성, (b) 구진농포성, (c) 비류성 및 (d) 안구성 (각각 세 가지 중증도 등급을 갖음 (경증, 중등도, 중증))[3]. 질병의 과정은 전형적으로 만성이며, 재발성 관해 및 재발을 동반한다.

[0004] 2. 다른 홍안 관련 피부 질환

[0005] 주사는 가장 흔한 홍안 관련 피부 질환이다. 증상적 유사성 및 아마도 병리학적 원인을 공유하는 다른 홍안 관련 피부 질환에는 보통 여드름, 지루성 피부염, 광피부염 및 접촉성 피부염이 포함된다. 이들 홍안 관련 병태는 열감 및 강한 민감도로 홍조 또는 작열에 대한 민감도의 범위일 수 있다[4]. 주사 및 다른 홍안 관련 피부 질환을 갖는 환자는 종종 환경 인자 및 국소 인자에 대해 극도의 민감도를 나타낸다[5]. 스테로이드-유도 주사형 피부염 (또는 스테로이드 주사)은 홍반성 및 부종성에 기반한 구진성 또는 농포성 병변 (모세혈관확장증 동반 또는 부재)이며, 모세혈관확장증은 얼굴에 대한 국소 스테로이드의 연장된 적용에 의해 또는 국소 스테로이드의 중단 후 반동성 병태로서 야기된다[6, 7] (문헌 [Chen AY Zirwas MJ, 2009]; [Lee DH, Li K, Suh DH 2008]). EGFR 억제제, 예컨대 세툭시맙, 엘로티닙, 제피티닙은 환자의 30 내지 90%에서 얼굴 또는 다른 피부 영역 상에서 여드름양 피부염 (구진농포성 반응, 홍반, 모세혈관확장증 및 홍조 포함)을 야기하며, 또한 박테리아, 예컨

대 황색포도상구균(*staphylococcus aureus*)으로 중복감염될 수 있다[8,9] (문헌 [Wollenberg A, Kroth J et al, 2010]; [Lacouture ME, Maitland ML et al, 2010]).

[0006] 3. 주사의 발병기전

[0007] 주사의 병인은 잘 이해되지 않는다. 다양한 인자가 주사의 발병 및 소견에 기여하는 것으로 제안되었다. 그러나 이들 중 어느 것도 명확히 확인되지 않았다.

[0008] 3.1. 유전적 기여

[0009] 조기 연구들은 안면 주사의 최초 소견인 홍조에 대한 유전적 소인을 언급하였다[10]. 또한, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 MU-1 (GSTM1) 및 글루타티온 S-트랜스퍼라제 세타 1 (GSTT1) 널(null) 유전형이 주사 위험 증가와 관련된 것으로 보고되었다[11].

[0010] 3.2. 염증 및 선천적 면역계

[0011] 주사가 진행됨에 따라 염증성 병변이 분명하게 된다. 보통 여드름과 달리, 염증성 주사는 모피지선의 박테리아성 질병이 아니다. 면포는 통상적으로 존재하지 않으며, 오직 정상적인 세균총만이 주사 환자로부터 채취된 피부 샘플에서 확인된다[12]. 주사의 염증 단계가 만성 무균 연조직염 형태로서 간주될 수 있다[13]. 미생물의 존재가 주사에 대한 잠재적 기여 인자로서 검토되어 왔으나, 결과는 확정적인 것이 아니었다[1]. 데모덱스 폴리쿨로룸(*Demodex folliculorum*) 진드기는 공생하는 것으로 고려되고, 진드기에 대한 염증성 반응이 증상을 악화시킬 수 있으나, 주사에서 유의한 병원체 역할을 하지 않는다[14].

[0012] 야마사끼 등(Yamasaki et al)은 주사를 갖는 환자로부터 피부 병변에서 조직병리학적 염색에 의해 비정상적으로 높은 수준의 카텔리시딘을 발견하였다. 카텔리시딘 펩티드에 의해 자극된 인간 상피 각질세포가 IL-8의 방출을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 마우스의 피부로의 카텔리시딘 펩티드의 주사가 인간에서 주사의 피부 질환의 증가된 호중구 침윤 및 미세 혈관 특징과 함께 염증성 변화를 초래하였다[15]. 카텔리시딘은 미생물을 사멸시키고 숙주 염증성 반응 (예컨대 IL-8 방출의 유도)을 자극할 수 있기 때문에 면역력에서 아마도 이중 역할을 할 것이다[16]. 주사에서 증가되는 것으로 발견된 다른 염증성 사이토카인은 IL-1 알파 및 전환 성장 인자 베타-2를 포함한다[17,18].

[0013] 3.3. 혈관 매개체

[0014] 염증 매개체는 주사 환자에서 보여지는 혈관확장의 원인이 될 수 있다. 예를 들어, 물질 P, 히스타민, 세로토닌, 브라디키닌 또는 프로스타글란딘이 제안되었다[19]. 스미스 등(Smith et al)은 주사에서 혈관 내피 성장 인자 및 그의 수용체의 발현 증가를 보고하였다[20].

[0015] 4. 주사의 현재 관리

[0016] 수많은 항생제, 예컨대 테트라사이클린 및 독시사이클린이 주사의 치료에 사용되어 왔다. 이러한 항생제는 항미생물 효과보다 항염증 효과를 부여하는 것으로 제안되어 왔다. 그러나, 다른 항염증제는 주사의 치료에 효과적이 아니다. 면역억제제, 예컨대 코르티코스테로이드는 종종 주사의 염증 상태를 악화시킨다.

[0017] 국소 메트로니다졸 및 특정 전신 항생제가 주사를 위한 일선의 치료제로서 종종 사용된다. 경구 테트라사이클린, 독시사이클린 및 미노사이클린이 주사의 치료를 위해 흔히 사용된다. 경구 항생제의 효능은 아마도 항생제 효과로 인한 것이라기 보다 항염증 효과로 인한 것일 것이다[21]. 아젤라산 15% 겔이 경증 내지 중등도 주사의 국소 치료에 대해 2002년에 미국 FDA에 의해 허가되었다[22]. "허가범위 초과사용(off label)" 방식으로 사용되어 온 다른 전형적인 국소 작용제에는 클린다마이신, 술프아세트아미드 및 황이 포함되나, 그들의 메카니즘은 잘 이해되지 않는다.

[0018] 5. 비-피부 질환에서의 베르베린의 용도

[0019] 베르베린 (내츄럴 옐로우(Natural Yellow) 18, 6-디히드로-9,10-디메톡시벤조(g)-1,3-벤조디옥솔로 (5,6-a) 퀴놀리지늄)은 허브 식물, 예컨대 황련 (콥티디스 리좀(*Coptidis rhizome*)), 황벽, 황금(*Scutellaria*

baicalensis), 마호니아 아퀴폴리움(*Mahonia aquifolium*) 및 소벽에 존재하는 이소퀴놀린 알칼로이드이다. 베르베린 및 그의 유도체는 항미생물 및 항말라리아 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이는 다양한 종류의 병원체, 예컨대 진균, 효모균류, 기생충, 박테리아 및 바이러스에 대해 작용할 수 있다[24]. 베르베린은 다른 잠재적인 이익을 갖는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 이는 높은 혈액 콜레스테롤, 심혈관 질병, 당뇨병 및 종양의 치료에 대한 잠재성을 가질 수 있다[25].

[0020] 베르베린은 또한 항염증 기능을 갖지만, 정확한 메카니즘은 공지되지 않았다. 최근에, 베르베린의 항염증 메카니즘이 시클로옥시게나제-2 (COX-2) 경로를 통해 매개되며, 이는 COX-2가 염증에서 상승되는 프로스타글란딘의 합성에서 핵심 역할을 하기 때문이라는 것을 몇몇 연구자가 보고하였다[26]. 트라코마의 치료를 위한 몇몇 점안액 또는 안연고에서 베르베린이 성분으로서 사용된다[27].

[0021] 6. 피부 질환에서의 베르베린의 용도

[0022] 미국 특허 제6440465호는 건선의 치료를 위한, 베르베린을 함유하는 유연제 베이스 중의 글루코사민의 국소 피부 제형에 관한 것이다[28]. 특허 출원 제20050158404호는 경구 투여로 여드름의 치료를 위한, 비타민 A, 비타민 E, 셀레늄, 비타민 B6, 아연, 크롬 및 베르베린의 약초 공급원을 함유하는, 영양제, 식이 보조제 또는 제약 조성물에 관한 것이다[29]. 미국 특허 제6974799호는 노화의 시각적 징후 (주름, 튼살, 다크 써클 포함)의 치료를 위한 트리펩티드 (N-팔미토일-Gly-His-Lys) 및 테트라펩티드 (N-팔미토일-Gly-Gln-Pro-Arg)를 포함하는 국소 조성물에 관한 것이다[30]. 제형은 추가 성분 (베르베린 포함)을 함유할 수 있다. 이들 발명들에서, 베르베린은 많은 성분 중 하나로서 포함되며, 그의 농도는 특정되지 않았다.

[0023] 특허 출원 제20040146539호는 피부 노화, 피부 주름, 피부 박리, 여드름, 주사 및 다른 피부 문제의 치료를 위해 사용될 수 있는, 바디 슬리밍 및 톤-퍼밍(tone-firming) 노화억제 이익을 갖는 국소 뉴트라슈티컬(neutraceutical) 조성물에 관한 것이다[31]. 이 발명의 조성물은 베르베린을 비롯한 여러 작용제로부터 선택된 항미생물제를 포함한다. 이들 뉴트라슈티컬 조성물에서, 베르베린은 많은 성분 중 하나로서 포함되며, 그의 농도는 특정되지 않았다. 건선의 치료를 위한, 0.1% 베르베린을 함유하는 10% 마호니아 아퀴폴리움 크림 (릴리바(Relieva)™, 아폴로 파마슈티컬 캐나다 인크(Apollo Pharmaceutical Canada Inc))이 존재한다[32].

[0024] 주사 및 다른 홍안-관련 피부 질환의 치료에서의 베르베린의 치료학적 효과는 공지되지 않았다. 지금까지, 베르베린이 주사의 증상을 개선할 수 있다는 것을 제안하는 직접적인 증거는 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0025] <발명의 설명>

[0026] 최소의 부작용으로 주사 및 다른 관련 피부 질환을 치료하기 위한 효과적인 치료요법에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 주사 및 다른 홍안 관련 피부 질환, 예컨대 여드름, 지루성 피부염, 접촉성 피부염 및 광피부염의 치료에서 효과적이고 안전한 국소 제약 제형에 관한 것이다. 본 발명은 구성성분으로서 베르베린을 함유하는 현재 이용가능한 국소 제약 제형 또는 실험 제형의 결핍을 인식하고, 상기 결핍을 개선시킨다.

과제의 해결 수단

[0027] 베르베린의 동물 연구 및 인간 임상 시험에서 정제된 베르베린 또는 베르베린 약초 추출물을 함유하는 제형으로 베르베린이 약물 활성 성분인 것을 나타내는 여러 증거들이 있다. 많은 질병 적응증에서, 예컨대 박테리아성 및 진균성 감염 및 심혈관 질병의 치료에서, 베르베린의 통계적으로 유의한 효능 결과가 가끔 얻어졌다. 베르베린-풍부 추출물을 함유하는 제형에 의한 건선의 시험에서, 효능있는 결과가 또한 얻어졌으나, 건선에서 베르베린의 효능은 받아들여지지 않았다. 이들 결과는 베르베린이 분자 표적에 대해 작용하고 이 특허 출원에서 배경기술 부분에 기재된 바와 같은 특정 분자 경로 및 세포 기능에서의 변형을 야기할 수 있다는 것을 제안한다.

[0028] 제약 활성 화합물이, 약물이 치료되는 대상체에서 의미있는 생물학적 및 약물학적 효과 및 이에 따라 치료학적 효과를 달성하기 위한 특정 역치 농도 초과로 체내 또는 이환 조직에 존재해야 한다는 것이 수많은 제약 화합물

의 약물학적 연구에서 명확히 나타났다. 1종 이상의 식물(들)의 추출물을 함유하는 약초 의약 제제에, 많은 활성 약물 성분이 존재한다. 약초 제제를 경구 또는 국소 경로로 사용하는 대부분의 치료에서, 개별 약물 성분은 치료되는 대상체의 체내 또는 이환 조직에 역치 이하의 농도로 존재한다. 그러나, 동일한 식물 또는 상이한 식물로부터의 여러 화합물이 동일한 분자 표적에 대해 작용할 수 있거나, 또는 동일한 식물 또는 상이한 식물로부터의 여러 화합물이 동일한 생물학적 경로에서 상이한 분자 표적에 대해 작용할 수 있다. 그 결과로서, 다양한 화합물이 공동으로 작용하여 의미있는 생물학적 및 약물학적 효과 및 이에 따라 치료학적 효과를 유발하였다.

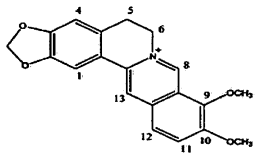
[0029] 약초 제약 제제가 치료되는 대상체에서 치료학적 효과를 유발하는데 실패한 경우, 그 안에 함유된 이와 다르게 약물학상 활성인 화합물이 치료되는 대상체에서 너무 낮은 농도로 존재하고, 화합물 (그 자체로서 또는 제제 중 화합물과 조합됨)이 의미있는 생물학적 및 약물학적 효과를 유발하는데 실패할 가능성이 있다. 사실, 많은 중요한 약물 화합물 (단일 화학적 실체)이 약초 제제에서 사용되는 식물로부터 확인되고 단리되었다. 이들 순수한 화합물의 경우, 치료학적 효능이 종종 화합물을 함유하는 약초 제제로 달성가능한 효능을 능가한다.

[0030] 베르베린-풍부 식물 추출물을 포함하는 국소 약초 제약 제형이 다양한 피부 질환, 예컨대 건선, 여드름, 습진 등을 포함하는 다양한 병의 치료에서 수세기 동안 사용되어 왔다. 이들 국소 약초 제제는 다양한 결과를 달성하였다. 상기 제제들 중 일부에서, 베르베린-함유 추출물은 제형을 구성하는데 사용된 다양한 구성성분들 중 약 10%를 구성한다. 이러한 국소 총 제제 중의 베르베린 화합물이 가공된 제형의 대략 0.1% (w/w)를 차지하는 것으로 추정되었다[32].

[0031] 상기 이유에 근거하여, 본 발명자들은 주사의 발병기전에 관여될 수 있는 생물학적 경로에 대한 다양한 농도의 베르베린의 효과를 시험관내에서 연구하였다. 이러한 결과 및 상기 기재된 이유에 근거하여, 본 발명자들은 전형적인 약초 베르베린-함유 제약 제형 중의 베르베린의 농도보다 더 높은 정의된 백분율로 베르베린을 함유하는 화학적으로 정의된 국소 제약 제형을 개발하였다. 그 후, 본 발명자들은 주사를 갖는 환자에 대해 이환 피부 영역 상에서 상기 제형들을 시험하였다. 본 발명자들의 발견은 0.1% (w/w) 초과의 베르베린을 함유하는 국소 제약 제형이 주사 및 관련 민감성 홍안 질환의 치료에서 효능있고 관용가능한 결과를 달성할 수 있다고 나타낸다.

[0032] 베르베린의 유사체

[0033] 베르베린 (5,6-디히드로-9,10-디메톡시벤조(g)-1,3-벤조디옥솔로 (5,6-a) 퀴놀리지늄)의 구조가 하기 표시되어 있다:

[0034] 

[0035] 베르베린

[0036] 베르베린과 유사한 다양한 생물학적 활성을 갖는 여러 프로토베르베린 알칼로이드, 예컨대: 자트로리진, 팔마틴, 콥티신, 9-데메틸베르베린, 9-데메틸팔마틴, 13-히드록시베르베린, 베르베루빈, 팔마트루빈, 9-O-에틸베르베루빈, 9-O-에틸-13-에틸베르베루빈, 13-메틸디히드로베르베린 N-메틸 염, 테트라히드로프로토베르베린 및 그의 N-메틸 염, 13-헥실베르베린, 13-헥실팔마틴 및 9-라우로일베르베루빈 클로라이드가 제조될 수 있다[33,34].

[0037] 팔마틴은 다양한 과의 식물, 피브라루레아 틴크토리아 로우르(*Fibrarurea Tinctoria Lour*)의 근경에 가장 현저하게 존재한다. 팔마틴은 이소퀴놀린 알칼로이드이고, 팔미틴을 함유하는 제형은 부인과 염증, 세균성 이질, 창자염, 기도 감염, 비뇨기계 감염의 치료를 위해 중국에서 광범위하게 사용되어 왔다. 또한, 팔마틴은 항부정맥, 항방부제, 정균제 및 항바이러스 활성의 기능을 갖는다. 팔마틴은 또한 항종양 약물 스크리닝에서 화합물로서 사용될 수 있다[35]. 팔마틴-함유 제약이 국소 모발 성장 억제제 (케라민(Keramene), 디바인 스킨 솔루션스 디 에스 래보러토리즈 케라민 바디 헤어 미니마이저(Divine Skin Solutions D S Laboratories Keramene Body Hair Minimizer)로서 존재한다.

[0038] 콥티신은 중국산 황련 (콥티스 키넨시스(*Coptis chinensis*))에서 발견되는 알칼로이드이다. 이는 박테리아성 감염에 의해 유발된 소화계 질환의 치료를 위해 관련 화합물 베르베린과 함께 중국 약초 의약에서 사용된다. 콥티신은 또한 종양 성장에 대한 다소 유의한 억제를 나타낸다. 콥티신은 시험관내에서 인간 종양 결장 세포주

[36], 인간 간암 및 백혈병 세포주[37]에 대해 세포독성인 것으로 나타났다.

[0039] 본 발명자들의 연구에서, 본 발명자들은 또한 주사의 발병기전에 관여될 수 있는 생물학적 경로에 대한 다양한 농도의 팔마틴 및 콥티신의 효과를 시험관내에서 및 생체내에서 연구하였다. 이러한 결과 및 상기 기재된 이유에 근거하여, 본 발명자들은 또한 팔마틴 또는 콥티신을 정의된 농도로 함유하는 화학적으로 정의된 국소 제약 제형을 개발하였다. 이들 제형은 주사 및 관련 민감성 홍안 질환의 치료에서 효능있고 관용가능한 결과를 달성할 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 실시예 1: 인간 각질세포에 의한 카텔리시딘 펩티드-유도 사이토카인 분비의 억제에 대한 베르베린의 효과 (시험관내 검정)

[0041] 본 발명자들의 시험관내 연구를 위해, 베르베린 (시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트루이스)을 물, 메탄올, 에탄올 또는 디메틸 술폭시드 (DMSO) 중에 용해하였다. 정상적인 인간 각질세포 (인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주)를, 0.06 mM Ca^{+2}, 1% 에피라이프(EpiLife) 정의된 성장 보충제 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주)으로 보충된 에피라이프(EpiLife) 배지 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주) 중에서 성장시켰다. 세포를 5% CO_2 및 95% 공기의 가습 대기 중에서 37℃에서 성장시켰다. 인간 각질세포를 전면성장까지 배양하고, 주사에서 관찰되는 바와 유사한 염증성 반응을 유도하기 위해 합성 카텔리시딘 펩티드 (LL-37) (6.4 μM)로 16시간 동안 처리하였다. 카텔리시딘-처리 각질세포 배양물의 일부를 1.25 μg/ml 내지 12.5 μg/ml 농도의 베르베린과 공동-배양하였다. 카텔리시딘으로 또는 1% 에탄올과 함께 및 베르베린 없이 카텔리시딘으로 처리된 각질세포 배양물을 음성 대조군으로써 사용하였다. 상등액을 수집하고, 제조자의 지시사항 (알앤디 시스템스(R&D Systems), 미국 미네소타주)에 따라 인터류킨-8 (IL-8), 인터류킨-1 알파 (IL-1 알파) 및 정맥 상피 세포 성장 인자 (VEGF)의 ELISA를 위해 무균 96-웰 플레이트에 놓았다.

[0042] 결과는 카텔리시딘이 배양된 인간 각질세포로부터 IL-8, IL-1 알파 및 VEGF 방출을 유도할 수 있다는 것을 나타내었다. 배양 배지 중 상이한 농도 (0~12.5 μg/ml)의 베르베린을 첨가함으로써 IL-8 (도 1A), IL-1 알파 (도 1B) 및 VEGF (도 1C)의 방출에 대한 베르베린의 억제 효과를 시험하였다. 카텔리시딘-자극 각질세포를 1.25 μg/ml 베르베린으로 처리한 경우 카텔리시딘 펩티드-처리 (1% 에탄올 대조로 처리됨)와 비교하여, 각각 IL-8, IL-1 알파 및 VEGF의 방출의 31.4%, 24.9% 및 29.1% 감소가 있었다 ($P < 0.05$). 이들 결과는 베르베린이 용량-의존적 방식으로, 특히 베르베린의 농도가 6.25 μg/ml보다 더 큰 경우 카텔리시딘 유도 염증성 반응을 유의하게 억제할 수 있다는 것을 나타내었으며, 이는 베르베린이 사이토카인의 카텔리시딘-유도 방출에 대한 항염증 활성을 갖는다는 것을 나타내며, 이는 주사와 관련되었다.

[0043] 실시예 2: 정제된 베르베린 및 팔마틴을 정의된 백분율로 함유하는 국소 제약 제형의 제조

[0044] 상기 기재된 이유에 근거하여, 본 발명의 국소 베르베린-함유 제약 제형은 한 가지 핵심 특징을 갖는다: 이는 베르베린-풍부 식물의 추출물을 사용하여 이전 제형에서 얻어질 수 있는 것보다 더 높은 정의된 백분율의 정제된 베르베린을 함유한다. 상기 농도 범위를 동물 모델 연구 및 인간 임상 연구에서 시험하였다.

[0045] 동물 모델 및 인간 환자에 대한 본 발명자들의 연구를 위해, 정제된 베르베린을 100% 에탄올 중에 용해한 후, 최종 용액 중 베르베린의 원하는 농도에 도달하도록 물을 첨가하였다. 겔 제형에서, 예를 들어, 0.1% 또는 0.2% 베르베린을 10% 에탄올 중에서 제조하였다. 용액 또는 겔 제형을 캡핑하고, 사용할 때까지 4℃에서 저장하였다. 주사를 갖는 동물 모델 및 인간 환자에서 본 발명자들의 연구의 결과는 일관적으로 만족스러운 결과를 달성하기 위해 제형 중 베르베린의 농도가 0.1% 이상이어야 한다는 것을 나타낸다. 이들 농도는 베르베린-풍부 식물 추출물을 사용하여 이전에 제조된 국소 베르베린-함유 제형보다 더 높았다.

[0046] 임상의 및 환자가 사용하기에 더 적합한 연고, 겔, 크림, 로션 또는 스프레이 형태의 제형을 제조하기 위해 실험이 진행중이다. 본 발명의 국소 제약 제형에서, 베르베린 또는 베르베린의 생물학상 등가인 유사체 (예를 들어 팔마틴 및 콥티신)는 유일의 또는 주요 활성 약물 화합물이었다. 본 발명자들의 연구를 위해 사용된 정제된 팔마틴을 100% 물 중에 용해한 후, 정의된 팔마틴 농도, 예를 들어 0.02%, 0.1% 또는 0.2%의 팔미틴을 갖는 최종 용액 또는 겔 제형에 도달하도록 희석하였다.

[0047] 그러나, 개선된 또는 변형된 제형은 베르베린 또는 그의 유사체의 용해도 증가, 유화, 윤활화, 항생제 활성 또는 보습을 위한 추가 성분을 포함할 수 있다.

[0048] 베르베린 또는 베르베린의 생물학적 등가인 유사체의 용해도를 증가시키기 위한 본 발명의 한 바람직한 실시양태는 제형에 글리세롤을 첨가하는 것이다. 제형의 항생제 활성을 증가시키기 위한 본 발명의 한 실시양태는 항생제 활성을 갖는 것으로 나타난 식물 추출물을 첨가하는 것이다. 본 발명의 국소 제형의 보습 특성을 향상시키기 위한 한 실시양태는 히알루론산을 첨가하는 것이다.

[0049] 실시예 3: 주사의 마우스 모델에 대한 본 발명의 국소 제약 제제의 효과

[0050] 주사의 동물 모델: 이전에 보고된 것으로부터 주사의 동물 모델을 채택하였다[18]. 간단히, 처리 24시간 전에 쉐이빙된 BALB/c 및 C57BL/6 마우스에게 카텔리시딘 펩티드 (320 μM) 40 μl를 1일 2회 등에 피하로 주사하였다. 초기 주사 (총 4회 주사) 후 48시간에, 주사된 부위 상에서 주사의 임상 특징을 모방하는 홍반 및 부종이 관찰되었다.

[0051] 본 발명자들의 실험에서, 염증 감소에 대한 베르베린의 효과를 관찰하기 위해 카텔리시딘-주사된 마우스를 국소 베르베린으로 1일 2회 처리하거나 처리하지 않았다. 결과는 카텔리시딘 펩티드의 마우스 제공된 피하 주사가 피부에서 홍반 및 혈관 확장을 유도하였으며, 이는 48시간 후 주사의 임상적 특징과 닮았다는 것을 나타내었다. 그 후, 카텔리시딘-주사된 마우스를 2개의 군으로 나누었으며, 이는 각각 후속 2일 동안 베르베린으로 처리된 군 (n=3) 또는 베르베린으로 처리되지 않는 군 (n=3; 대조로서)이었다. 0.1% 베르베린을 함유하는 국소 제형을 카텔리시딘-유도 병변 상에 1일 2회 적용하였다. 홍반성 또는 염증성 병변이 대조군에서 7일 초과 동안 지속되었다. 4째일에, 대조군과 비교하여 베르베린 처리군에서 홍반 및 혈관 확장이 유의하게 감소되었다. 이들 결과는 국소 베르베린이 생체내에서 카텔리시딘에 의해 유도된 염증성 반응을 감소시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0052] 실시예 4: 주사를 갖는 환자에 대한 본 발명의 국소 제약 제형의 효능을 연구하는 인간 임상 연구

[0053] 방법: 주사 및 관련 피부 질환의 치료를 위한 본 발명의 국소 베르베린 제형의 효능을 결정하기 위해 개방-라벨 임상 연구를 수행하였다. 본 연구에 포함된 환자는 피부과 전문의에 의해 임상적으로 정의된 주사를 갖는 것으로 진단되었다. 모든 환자에게 6주 동안 1일 2회 0.1% 베르베린 겔을 제공하였다. 치료 개시 및 치료후 2주 및 6주의 시점에, 환자를 그의 주사 증상에 대해 평가하였다. 환자가 그의 피부 상태를 위해 항생제를 포함하는 다른 의약품을 사용하는 것을 허용하지 않았다. 소양감 증상의 완화를 위해 오직 경구 항히스타민제만을 허용하였다.

[0054] 치료 효능을 평가하기 위해, 주사의 분류 및 단계에 대한 국립 주사 사회 전문가 협회(National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea)에 의해 개발된 주사에 대한 표준 등급화 시스템을 사용하였다[3]. 또한, 연구자의 총괄 평가 (IGA) 및 환자의 전체 홍반 중증도를 베르베린 치료 요법의 0째주, 2째주 및 6째주에 스코어화하였다. 0 (깨끗) 내지 6 (중증)의 범위를 갖는 7-점 스코어화 시스템에 따라 IGA를 표시하였다. 전체 안면 홍반 및 모세혈관확장증 각각의 중증도를 0 내지 3의 스코어로 '없음', '경증', '중등도' 또는 '중증'으로서 등급화하였다. 전체 안면 홍반 중증도를 평가하기 위해 사용된 등급화 시스템은 이전에 기재되어 있다[38].

[0055] 결과: 본 연구에서 총 20명의 주사를 갖는 환자 (여성 18명 및 남성 2명)를 등록시켰다. 연구 집단의 평균 연령은 43.3세 (19-85세)였다. 베르베린 치료전 주사의 평균 지속시간은 4년 (1-24년)이었다. 주사를 갖는 환자 20명 중에서, 13명의 사례는 홍반혈관확장성 유형 (65%), 7명의 사례는 구진농포성 유형 (35%), 5명의 사례는 비류성 유형 (25%)이었다.

[0056] 7-점 스코어 시스템에 따라, 기준선 (치료 개시)에서의 주사의 IGA 스코어는 4.1 ± 1.3이었다. 이러한 스코어는 2째주에 2.6 ± 0.9로 감소된 후 6째주에 1.6 ± 0.8로 감소되었다. 0째주, 2째주 및 6째주 간의 IGA 스코어의 차이는 통계적으로 유의하였다 (W2 vs W0: 쌍체 t 검정 $P < 0.0001$; W6 vs W0: 쌍체 t 검정 $P < 0.0001$). 치료 시작에, 환자의 대부분 (95%)은 경증으로부터 중등도 (3) 내지 중증 (6)까지의 등급을 가졌다. 치료 종료까지, 20명의 환자 중 19명 (95%)이 경증 (2) 내지 깨끗한 (0) 등급을 가졌다.

[0057] 연구자에 의해 평가된 전체 홍반 중증도는 치료 시작에 2.35 ± 0.6, 2째주에 1.5 ± 0.5 및 6째주에 0.95 ± 0.4였다. 2째주 또는 6째주에서의 개선이 통계적으로 유의하였다 (W2 vs W0: 쌍체 t 검정 $P < 0.0001$; W6 vs W0: 쌍체 t 검정 $P < 0.0001$). 치료 시작에, 환자의 대부분 (95%)은 중등도 (2) 내지 중증 (3) 등급의 홍반을 가졌다. 치료 종료까지, 20명의 환자 중 19명 (95%)이 경증 (1) 내지 없음 (0) 홍반 등급을 가졌다.

[0058] 안전성 및 관용성: 연구 동안 심각한 유해 사건은 없었다. 오직 2명의 사례 (10%)가 국소 약물투여 영역에서

일시적 가려움/자통 감각을 가졌으나, 연구 중단 없이 관용가능하였다.

[0059] 실시예 5: 국소 베르베린은 스테로이드-유도 주사형 피부염 및 EGFR 억제제-유도 여드름양 피부염의 치료에 효과적이었다.

[0060] 본 발명자들은 또한 6주 동안 1일 2회의 처방계획을 사용하여 스테로이드-유도 주사형 피부염을 갖는 환자 10명 및 EGFR 억제제-유도 여드름양 피부염을 갖는 환자 5명에 대해 0.1% 베르베린 겔을 연구하였다. 환자 15명 모두는 증상 개선을 나타내었고, 주사의 경우 관찰되는 바와 같이 국소 치료를 관용하였다.

[0061] 실시예 6: 팔미틴은 주사 또는 홍안 질환의 치료에 대한 효능을 나타내었다.

[0062] 본 발명자들은 또한 주사 및 관련 홍안 질환을 갖는 환자 10명에 대해 팔마틴을 0.02% (w/w)로 함유하는 국소 제형을 연구하였다. 환자 10명 모두는 증상 개선을 나타내었고, 베르베린의 경우 관찰되는 바와 같이 국소 치료를 관용하였다.

[0063] 실시예로부터 얻은 결론:

[0064] 시험관내 배양 연구는 베르베린이 인간 각질세포에 의한 카텔리시딘-유도 IL-8, IL-1 알파 및 VEGF 생성의 억제에 의해 항염증 효과를 나타낸다는 것을 나타내었다. 염증이 주사 및 관련 피부 질환의 발병기전에 관여되기 때문에, 베르베린의 항염증 효과는 주사 및 관련 염증성 피부 질환에서 그의 임상적으로 유리한 효과를 설명할 수 있다.

[0065] 본 발명자들의 임상 연구의 결과는 0.1% 초과의 농도의 정제된 베르베린 또는 0.02% 초과의 농도의 팔마틴을 함유하는 본 발명의 국소 제약 제형이 주사 및 적색 피부 관련 질환, 예컨대 여드름, 접촉성 피부염, 지루성 피부염 및 광피부염, 스테로이드-유도 주사형 피부염, 및 EGFR 억제제-유도 여드름양 피부염의 치료를 위해 효능있고 안전하고 잘 관용될 수 있다는 것을 나타내었다.

[0066] <도면의 간단한 설명>

[0067] 도 1. 베르베린은 인간 각질세포로부터의 카텔리시딘 펩티드 (LL-37)-유도 IL-8, IL-1 알파 및 VEGF 방출을 억제하였다. 각질세포를 카텔리시딘 펩티드 (LL-37)에 의해 자극시켰으며, 각질세포에 의한 IL-8 (도 1A), IL-1 알파 (도 1B) 및 VEGF (도 1C)의 방출을 ELISA 검정에 의해 평가하였다.

[0068] 도 2. A. 베르베린 치료 시작에 및 치료 2주 및 6주에 연구자의 총괄 평가 스코어. B. 국소 베르베린 치료 시작에 및 치료 2주 및 6주에 전체 홍반 중증도 스코어.

[0069] 인용 문헌

1. Plewig G, Jansen T. Rosacea. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al., eds. Dermatology in General Medicine. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill Health Professions Division (2003) pp.688-696.

2. Lonne-Rahm SB, Fischer T, Berg M. Stinging and rosacea. Acta Derm Venereol 1999; 79:460-461.

3. Wilkin J, Dahl M, Detmar M, et al. Standard grading system for rosacea: report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. J Am Acad Dermatol 2004; 50:907-912.

4. Griffiths WA. The red face-an overview and delineation of the MARSH syndrome. Clin Exp Dermatol. 1999; 24:42-47.

5. Draelos ZD. Assessment of skin barrier function in rosacea patients with a novel 1% metronidazole gel.J Drugs Dermatol. 2005; 4:557-562.

6.Chen AY, Zirwas MJ. Steroid-induced rosacealike dermatitis: case report and review of the literature.Cutis. 2009 83(4):198-204.

7. Lee DH, Li K, Suh DH. Pimecrolimus 1% cream for the treatment of steroid-induced rosacea: an 8-week split-face clinical trial. Br J Dermatol. 2008;158(5):1069-76.

8. Wollenberg A, Kroth J, Hauschild A, Dirschka T. Cutaneous side effects of EGFR inhibitors--appearance and management. Dtsch Med Wochenschr. 2010;135(4):149-54.

9. Lacouture ME, Maitland ML, Segaert S, et al. A proposed EGFR inhibitor dermatologic adverse event-specific grading scale from the MASCC skin toxicity study group.Support Care Cancer. 2010;18(4):509-22.

10. Palleschi GM, Torchia D. Rosacea in a monozygotic twin. Australas J Dermatol. 2007; 48:132-133.

11. Yazici AC, Tamer L, Ikizoglu G, Kaya TI, Api H, Yildirim H, Adiguzel A. GSTM1 and GSTT1 null genotypes as possible heritable factors of rosacea. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2006; 22:208-210.

12. Jansen T, Plewig G. Rosacea: classification and treatment. J R Soc Med. 1997; 90:144-150.

13. Wilkin JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment. Arch Dermatol. 1994; 130:359-362.

14. Forton F, Seys B: density of *Demodex folliculorum* in rosacea: A case- control study using standardized skin-surface biopsy. Br J Dermatol. 1993; 128:650.

15. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. Nat Med. 2007; 13:975-980.

16. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37

[0070]

enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells. Allergy Clin Immunol. 2006; 117:1328-1335.

17. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40:2506-2512.

18. Pu LL, Smith PD, Payne WG, Kuhn MA, Wang X, Ko F, Robson MC. Overexpression of transforming growth factor beta-2 and its receptor in rhinophyma: an alternative mechanism of pathobiology. Ann Plast Surg. 2000; 45:515-519.

19. Guarrera M, Parodi A, Cipriani C, et al. Flushing in rosacea: a possible mechanism. Arch Dermatol Res.1982; 272:311-316.

20. Smith JR, Lanier VB, Braziel RM, Falkenhagen KM, White C, Rosenbaum JT . Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea. Br J Ophthalmol. 2007; 91:226-229.

21. McDonnell JK, Tomecki KJ. Rosacea: an update. Clev Clinic J Med. 2000; 67:587-590.

22. Gupta AK, Gover MD. Azelaic acid (15% gel) in the treatment of acne rosacea. Int J Dermatol. 2007; 46:533-538.

23. Berberine (2000). Altern Med Rev. 5:175-177

24. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, *et al*. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Food. 2005; 8:454-461.

25. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. Mol. Cancer Ther. 2006; 5:296-308.

26. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. Cancer Lett. 2004; 203:127-137.

27. Khosla PK, Neeraj VI, Gupta SK, Satpathy G. Berberine, a potential drug for trachoma. Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique. 1992; 69:147-65.

28. Meisner; Lorraine Faxon. Topical composition for the treatment of psoriasis and related skin disorders. United States Patent 6440465 (2002).

29. Goodless, Dean R. Composition and method for treatment of acne. United States Patent Application 20050158404 (2005).

30. Lintner; Karl. Compositions containing mixtures of tetrapeptides and tripeptides. United States Patent 6974799 (2005).

31. Gupta, Shyam K. Topical nutraceutical compositions with selective body slimming and tone firming antiaging benefits. United States Patent Application 20040146539 (2004).

32. Gulliver WP, Donsky HJ. A report on three recent clinical trials using Mahonia aquifolium 10% topical cream and a review of the worldwide clinical experience with Mahonia aquifolium for the treatment of plaque psoriasis. Am J Ther. 2005; 12:398-406.

[0071]

33. Iwasa K, et al. Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000; 64:1998-2000.

34. Iwasa K, Nanba H, Lee DU, Kang SI. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. Planta Med. 1998; 64:748-751.

35. Prabal Giri, Maidul Hossain and Gopinatha Suresh Kumar. RNA specific molecules: Cytotoxic plant alkaloid palmatine binds strongly to poly(A). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2006; 16:2364-2368 .

36. Colombo M.L. et al. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from Berberine. Farmaco 2001; 56:403-409.

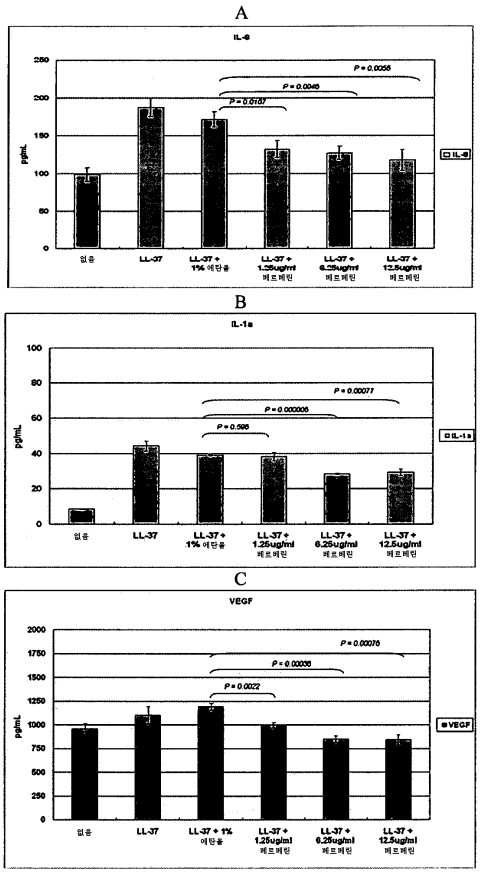
37. Chun-Ching Lin et al. Cytotoxic effects of Coptis chinensis and Epimedium sagittatum extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2004; 31:65-69.

38. Thiboutot D, Thieroff-Ekerdt R, Graupe K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea: results from two vehicle-controlled, randomized phase III studies. J Am Acad Dermatol 2003; 48:836–845.

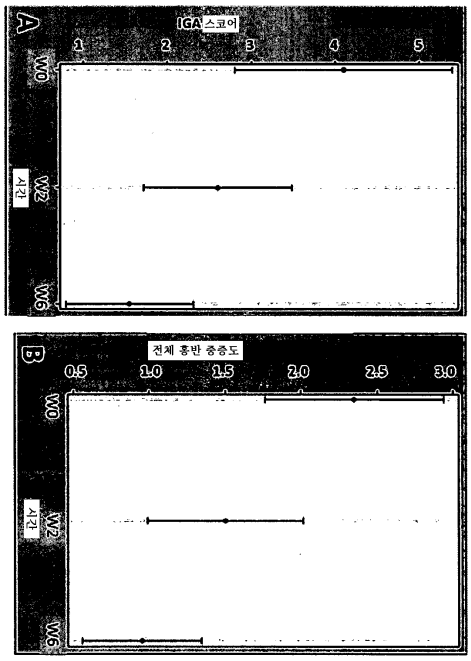
[0072]

도면

도면1


A
IL-6
pg/mL
250
200
150
100
50
0
P = 0.0056
P = 0.0046
P = 0.0107
IL-6
없음
LL-37
LL-37 + 1% 에탄올
LL-37 + 1.25ug/ml 베르베린
LL-37 + 6.25ug/ml 베르베린
LL-37 + 12.5ug/ml 베르베린
B
IL-1a
pg/mL
100
80
60
40
20
0
P = 0.00077
P = 0.000006
P = 0.526
IL-1a
없음
LL-37
LL-37 + 1% 에탄올
LL-37 + 1.25ug/ml 베르베린
LL-37 + 6.25ug/ml 베르베린
LL-37 + 12.5ug/ml 베르베린
C
VEGF
pg/mL
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
P = 0.00076
P = 0.00036
P = 0.0022
VEGF
없음
LL-37
LL-37 + 1% 에탄올
LL-37 + 1.25ug/ml 베르베린
LL-37 + 6.25ug/ml 베르베린
LL-37 + 12.5ug/ml 베르베린

도면2


A
IGA 스코어
1
2
3
4
5
W0
W2
W6
시간
B
전체 홍반 중증도
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
W0
W2
W6
시간