



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109197
(43) 공개일자 2024년07월10일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/06 (2006.01) A23K 20/163 (2016.01)
A23L 33/125 (2016.01) A61K 31/7032 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) A61P 27/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07H 15/06 (2013.01)
A23K 20/163 (2016.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0194535
(22) 출원일자 2023년12월28일
심사청구일자 2023년12월28일</p> <p>(30) 우선권주장
1020220190567 2022년12월30일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
주식회사 미래생명자원
서울특별시 송파구 법원로9길 26, 디-506호~512호(문정동, 에이치비지니스파크)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
김성진
경기도 이천시 마장면 서이천로233번길 72-77
전호진
서울특별시 강동구 고덕로 360, 339동 1705호(상일동, 고덕아르테온)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
최규환</p> |
|---|---|

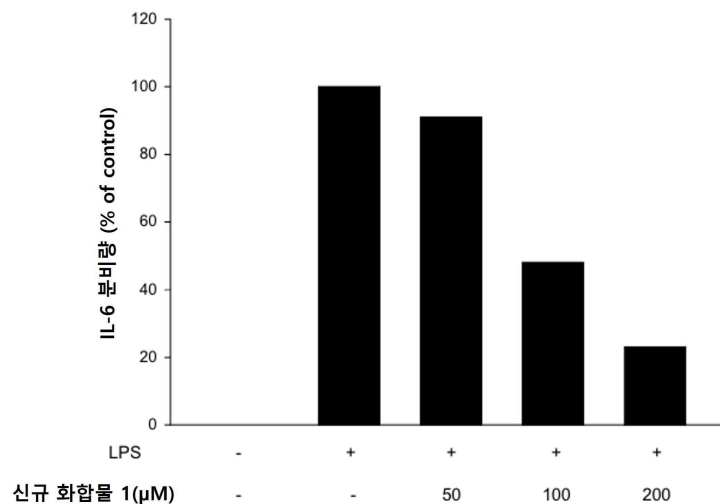
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 테트라셀미스 추이로부터 분리한 신규 화합물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 테트라셀미스 추이로부터 분리한 신규 화합물을 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 테트라셀미스 추이로부터 분리한 신규 화합물이 LPS로 유도한 인터루킨-6의 생성량을 감소시키는 효과가 있고, 안구건조증 동물모델에서, 눈물량 감소, 각막표면의 손상 완화, 각막 두께의 증가 및 안구건조증 관련 인자의 유전자 발현량 감소 뿐만 아니라, 각막 조직에서의 염증 관련 마커의 단백질 발현량을 감소시키는 효과가 있으며, 건선 동물모델에서 유발된 피부염을 개선하는 효과가 있으므로, 본 발명의 조성물을 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방, 개선 또는 치료용 의약품, 건강기능식품, 의약외품, 또는 사료첨제로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23L 33/125 (2020.05)
A61K 31/7032 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
A61P 27/04 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)

(72) 발명자

오미향

경기도 용인시 기흥구 향린1로95번길 14(동백동)

김이준

경기도 안성시 공도읍 공도로 51-17, 111동 1501호(우미린 더퍼스트)

전용재

서울특별시 강동구 풍성로45길 61, 201호(성내동)

유선화

경기도 의정부시 용현로 143, 105동 107호(민락동, 산들마을신안·길훈·현대아파트)

나민균

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 208동 602호(전민동, 엑스포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525012211
과제번호	20210485
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오 전략소재 개발 및 상용화 지원사업
연구과제명	테트라셀미스 추이를 이용한 눈건강 기능성 식품의 제품화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 미래생명자원
연구기간	2021.04.01 ~ 2023.12.31

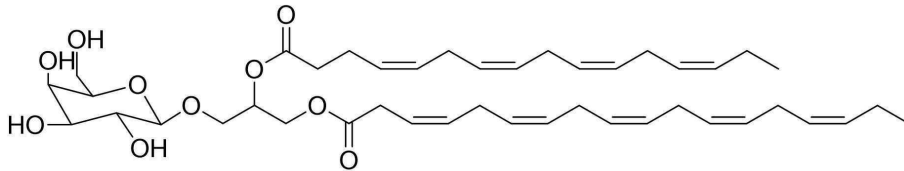
명세서

청구범위

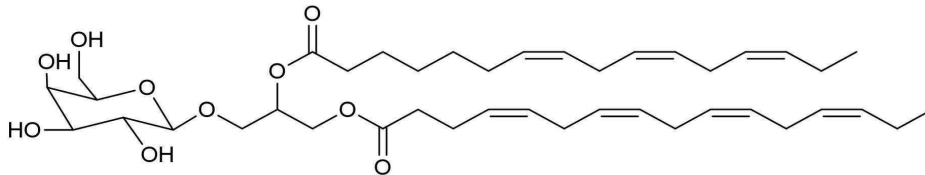
청구항 1

하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

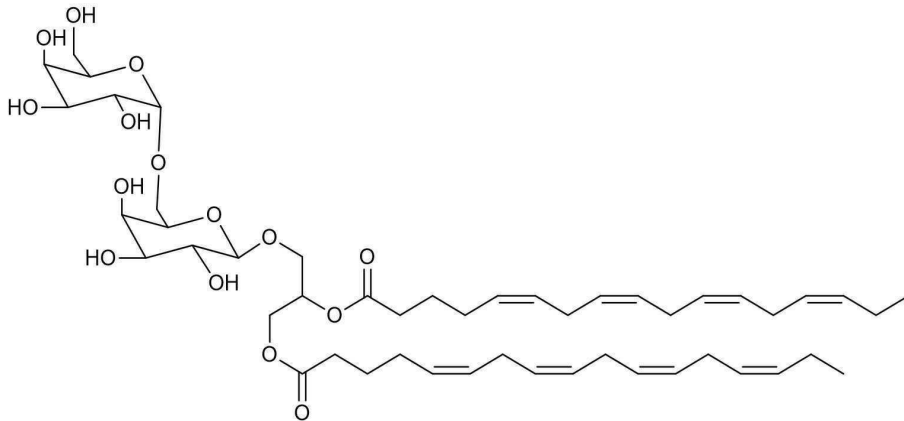
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 항염 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 신규 화합물.

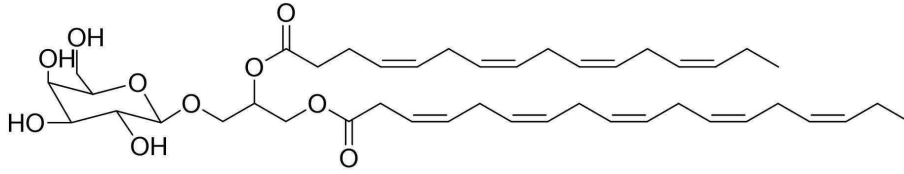
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 미세조류인 테트라셀미스 추이(*Tetraselmis chuii*)로부터 분리한 것을 특징으로 하는 신규 화합물.

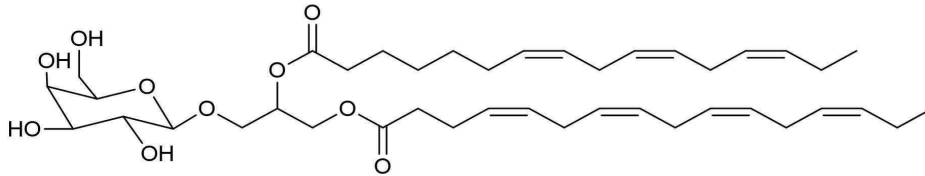
청구항 4

하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

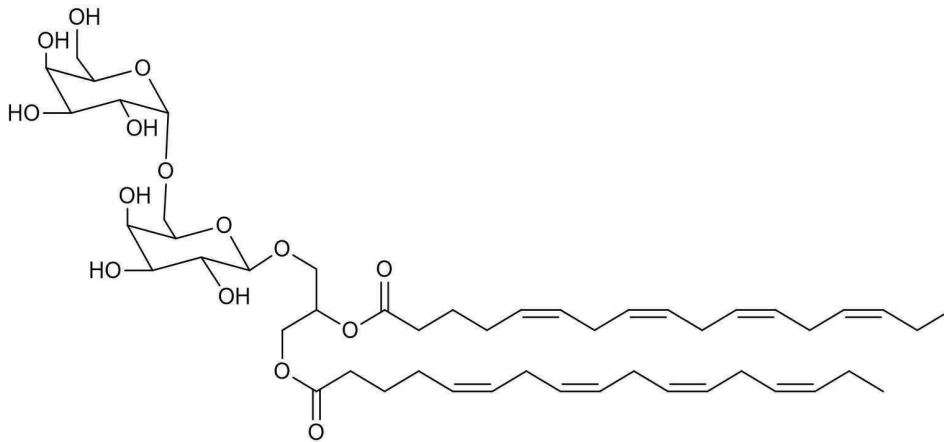
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



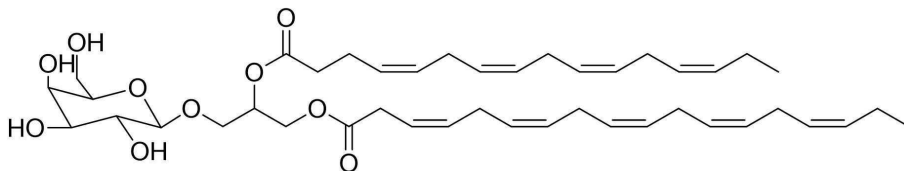
청구항 5

제4항에 있어서, 상기 염증성 질환은 안구건조증에 의한 건성각결막염, 기관지염, 폐렴, 피부염, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 위염, 관절염, 건염, 건조염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염 및 신장염 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

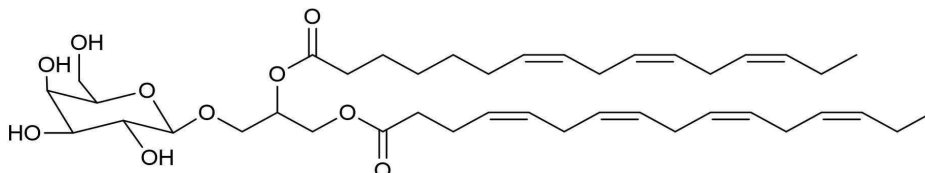
청구항 6

하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

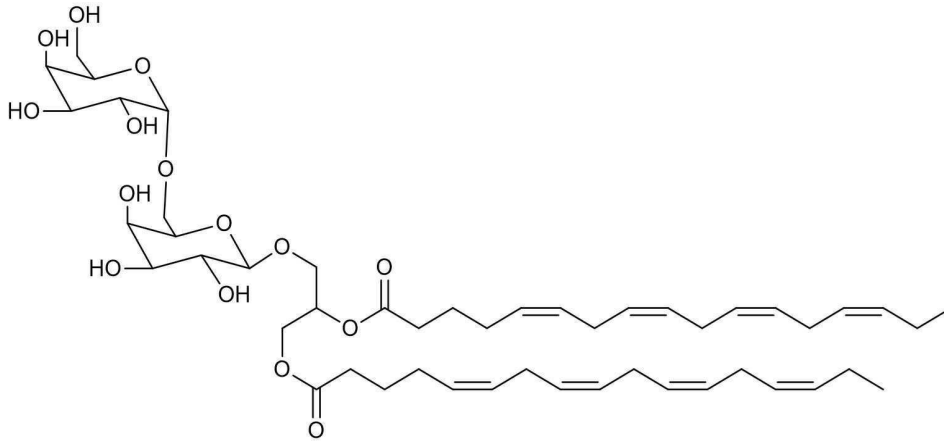
[화학식 1]



[화학식 2]



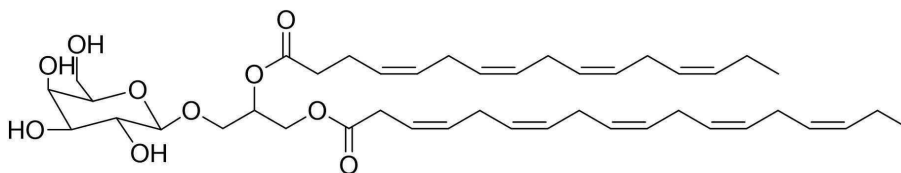
[화학식 3]



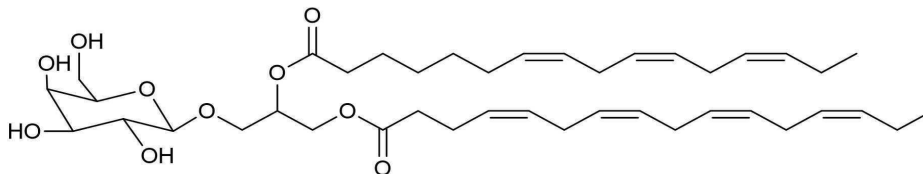
청구항 7

하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 수의학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

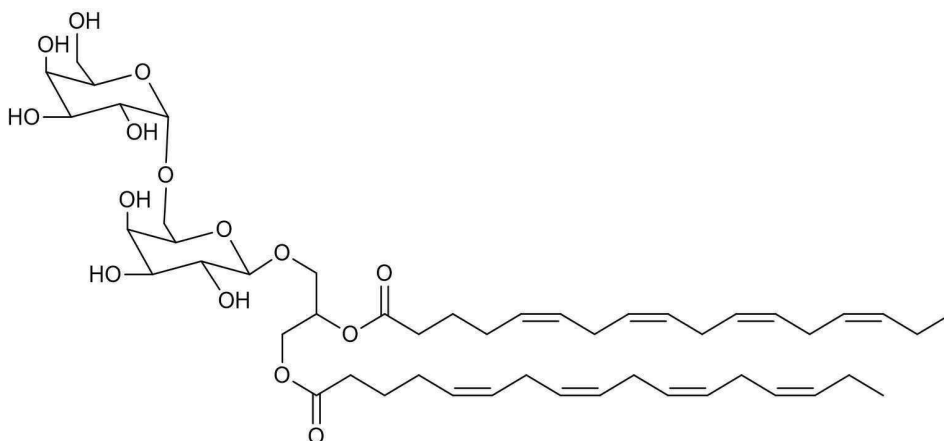
[화학식 1]



[화학식 2]



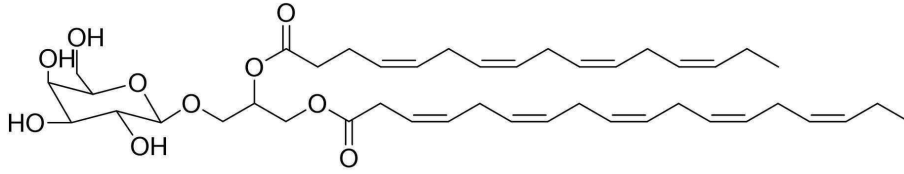
[화학식 3]



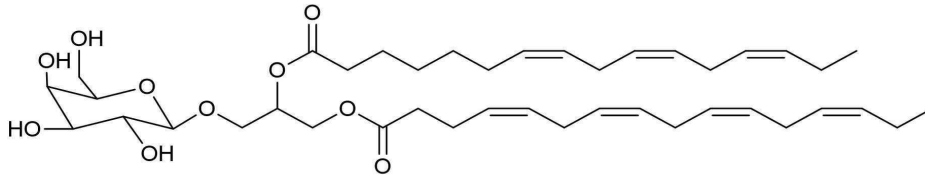
청구항 8

하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 의약품.

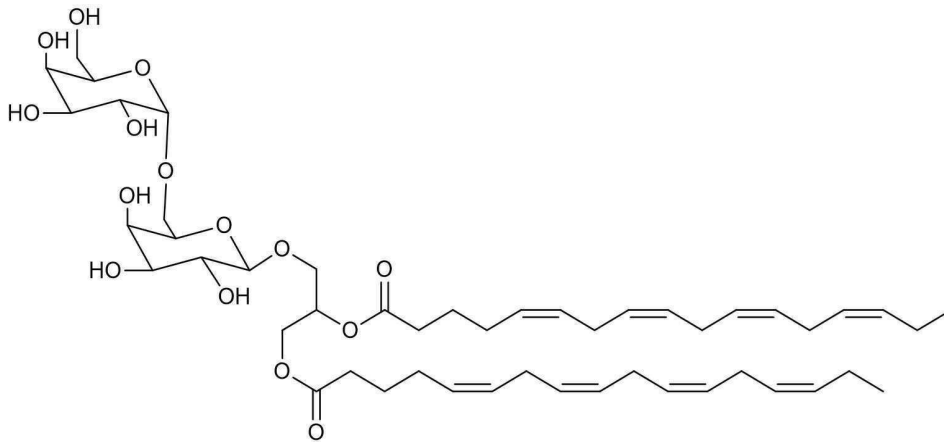
[화학식 1]



[화학식 2]



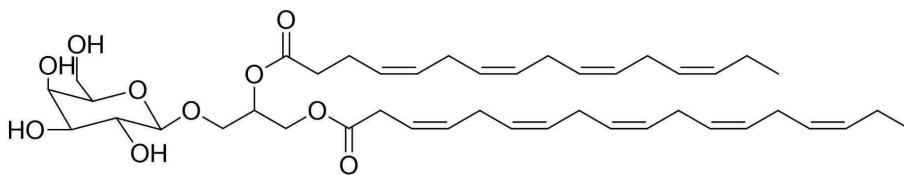
[화학식 3]



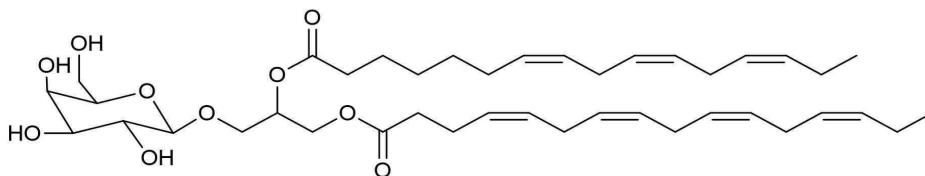
청구항 9

하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 사료첨가제.

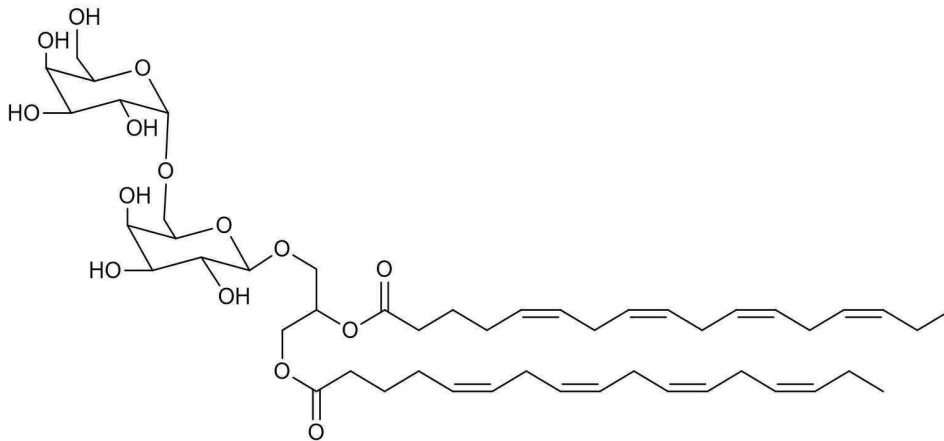
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 테트라셀미스 츠이로부터 분리한 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증반응은 생체 혹은 조직에 기질적 변화를 가져오는 화학적 물질, 세균 감염 및 물리적 작용에 의해 발생된 손상 부위를 재생하려는 복귀기전이다. 유해한 자극, 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현되면 국소적으로 염증성 성분과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 염증을 유발하는데, 이와 같은 염증반응이 지속되면 오히려 점막손상을 촉진함에 따라 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등으로 인한 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염, 천식 등의 염증성질환을 유발할 수 있다. 대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 대하여 항상성 유지에 관여하며, 염증 반응 시에는 NO(nitric oxide) 및 다양한 사이토카인을 생산하여 감염 초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포이다.

[0003] RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)의 자극에 의해 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 β (interleukin-1 β) 및 IL-6와 같은 염증매개성 사이토카인의 분비를 촉진한다.

[0004] 한편 염증 질환 중에서, 안구건조증에 의한 건성각결막염 또는 건성안은 가벼운 작열감에서 눈꺼풀 아래의 지속적인 긁힘 감각에 이르기까지 다양하다. 건성안은 고통스러울뿐만 아니라 눈 감염에 걸리기 쉽고 또한 시력이 흐려질 수 있으며, 건성안에 의해 충분한 눈물을 생성할 수 없어 외안부에 염증이 발생한다.

[0005] 안구건조증 또는 안구건조증에 의한 건성각결막염에 사용되는 약물은 사이클로스포린(cyclosporine)과 리피테그라스트(lifitegrast)이다. 그러나, 사이클로스포린과 리피테그라스트 점안은 모두 작열감과 따끔거림을 동반하는 국소 자극을 빈번하게 유발하고, 시력을 흐리게 할 수 있으며, 미각장애를 유발하고, 시력을 저하시키며, 효과가 좋지 않다. 결과적으로, 보다 효과적이거나 눈의 부작용을 덜 발생할 수 있는 새로운 치료제 개발이 실질적으로 필요하다.

[0006] 한편, 미세조류 테트라셀미스 츠이(*Tetraselmis chuii*)는 해양 단세포 조류로 알려져 있으며, 한국공개특허 제 2022-0068509호에 테트라셀미스 츠이를 유효성분으로 포함하는 안구건조질환 개선용 조성물이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2020-0136928호에 테트라셀미스 추출물이 개시되어 있으나, 아직까지는 본 발명의 테트라셀미스 츠이로부터 분리한 신규 화합물을 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 테트라셀미스 츠이로부터 분리한 신규 화합물

을 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 테트라셀미스 추이로부터 분리한 신규 화합물이 LPS로 유도한 인터루킨-6의 생성량을 감소시키는 효과가 있고, 안구건조증 동물모델에서, 눈물량 감소, 각막표면의 손상 완화, 각막 두께의 증가 및 안구건조증 관련 인자의 유전자 발현량 감소뿐만 아니라, 각막 조직에서의 염증 관련 마커의 단백질 발현량을 감소시키는 효과가 있으며, 건선 동물모델에서 유발된 피부염을 개선하는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 수의학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 의약품을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 테트라셀미스 추이로부터 분리한 신규 화합물을 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 테트라셀미스 추이로부터 분리한 신규 화합물이 LPS로 유도한 인터루킨-6의 생성량을 감소시키는 효과가 있고, 안구건조증 동물모델에서, 눈물량 감소, 각막표면의 손상 완화, 각막 두께의 증가 및 안구건조증 관련 인자의 유전자 발현량 감소 뿐만 아니라, 각막 조직에서의 염증 관련 마커의 단백질 발현량을 감소시키는 효과가 있으며, 건선 동물모델에서 유발된 피부염을 개선하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명의 신규 화합물(화합물 1)의 구조 및 400MHz NMR의 HMBC 스펙트럼이다.
- 도 2는 본 발명의 신규 화합물(화합물 2)의 구조 및 400MHz NMR의 HMBC 스펙트럼이다.
- 도 3은 본 발명의 신규 화합물(화합물 3)의 구조 및 400MHz NMR의 HMBC 스펙트럼이다.
- 도 4는 본 발명의 신규 화합물(화합물 1)의 RAW264.7 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 신규 화합물(화합물 2)의 RAW264.7 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 신규 화합물(화합물 3)의 RAW264.7 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 신규 화합물(화합물 1)의 처리에 따른 인터루킨-6의 분비량 변화를 확인한 결과이다.
- 도 8은 본 발명의 신규 화합물(화합물 2)의 처리에 따른 인터루킨-6의 분비량 변화를 확인한 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 신규 화합물(화합물 3)의 처리에 따른 인터루킨-6의 분비량 변화를 확인한 결과이다.
- 도 10은 본 발명의 신규 화합물 1~3의 투여에 따른 눈물량 변화를 확인한 결과이다. Con는 아무것도 처리하지 않은 대조군이며, SCO는 스킵올라민을 투여하여 안구건조증을 유도한 군이고, Omega-3는 SCO로 안구건조증을 유도하고, 오메가-3를 투여한 양성대조군이다.
- 도 11은 본 발명의 신규 화합물 1~3의 투여에 따른 각막 두께를 확인한 결과이다. Con는 아무것도 처리하지 않은 대조군이며, SCO는 스킵올라민을 투여하여 안구건조증을 유도한 군이고, Omega-3는 SCO로 안구건조증을 유도하고, 오메가-3를 투여한 양성대조군이다.

도 12는 본 발명의 신규 화합물 1~3의 투여에 따른 각막 손상정도를 확인한 결과이다. Con는 아무것도 처리하지 않은 대조군이며, SCO는 스코폴라민을 투여하여 안구건조증을 유도한 군이고, Omega-3는 SCO로 안구건조증을 유도하고, 오메가-3를 투여한 양성대조군이다.

도 13은 망막색소 상피(ARPE-19) 세포에서, 본 발명의 신규 화합물 1~3의 처리에 따른 염증 관련 인자의 유전자 발현량 변화를 확인한 결과이다. #, ##은 대조군(CON) 대비 염증을 유도한 TNF- α 처리군(TNF- α)의 염증 관련 인자의 유전자 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, #는 $p<0.05$, ##는 $p<0.01$ 이고, *, **은 TNF- α 처리군(TNF- α) 대비 TNF- α +본 발명의 신규 화합물 1~3의 처리군의 염증 관련 인자의 유전자 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, *는 $p<0.05$, **는 $p<0.01$ 이다.

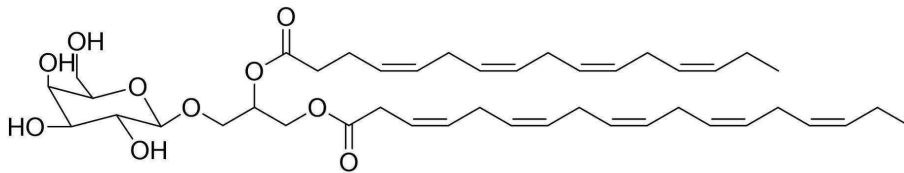
도 14는 망막색소상피세포(ARPE-19)에서, 본 발명의 신규 화합물 1~3의 처리에 따른 염증 관련 인자의 단백질(ICAM, MMP-9, TGF- β , IFN- γ , TNF- α 및 IL-1 β) 발현량 변화를 확인한 결과이다.

도 15는 본 발명의 신규 화합물 1~3의 도포에 따른 건선이 유도된 동물 모델에서 염증 완화 효과를 확인한 결과로, (A)는 신규 화합물 1~3의 도포 8일 후의 피부상태를 확인한 사진이고, (B)는 신규 화합물 1~3의 도포 8일 후의 피부조직 두께변화를 확인한 H&E 염색 결과이며, (C)는 면역형광분석을 통해 케라틴 1 및 케라틴 14의 발현량 변화를 확인한 결과이다.

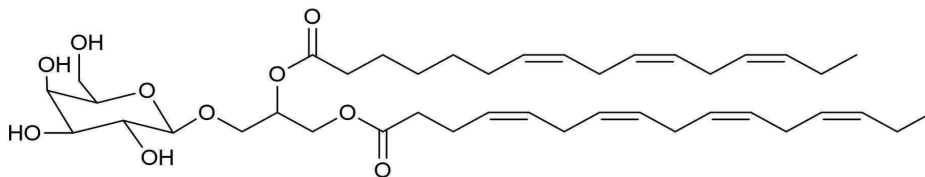
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

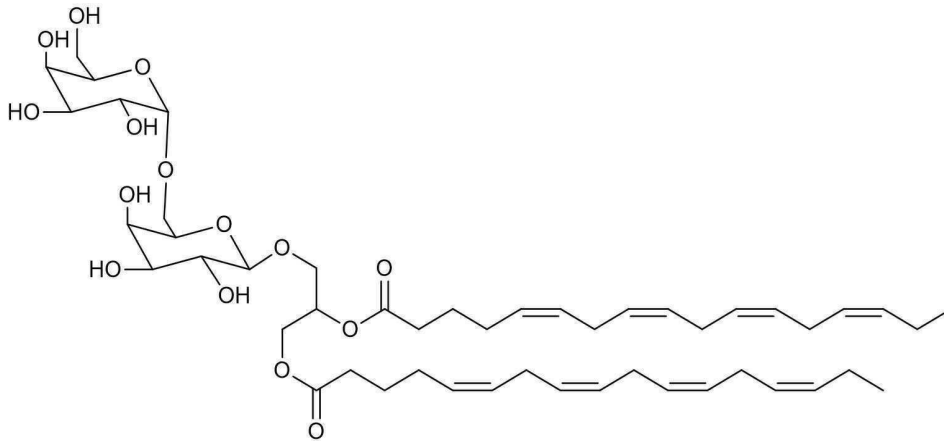
화학식 1



화학식 2



화학식 3



[0019]

[0020]

상기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 항염 활성을 갖는 것이 특징이다.

[0021]

상기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 미세조류 테트라셀미스 추이(*Tetraselmis chuii*)로부터 분리한 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0022]

약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동일한 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycolic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산 및 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

[0023]

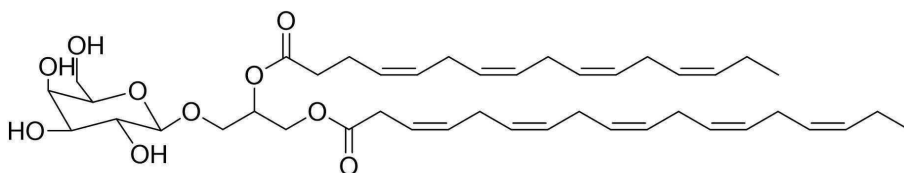
또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다. 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 하이드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0024]

또한, 본 발명은 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

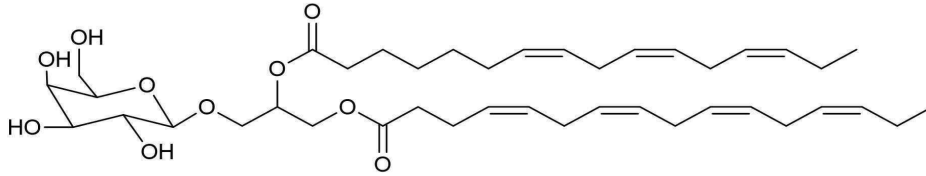
[0025]

[화학식 1]



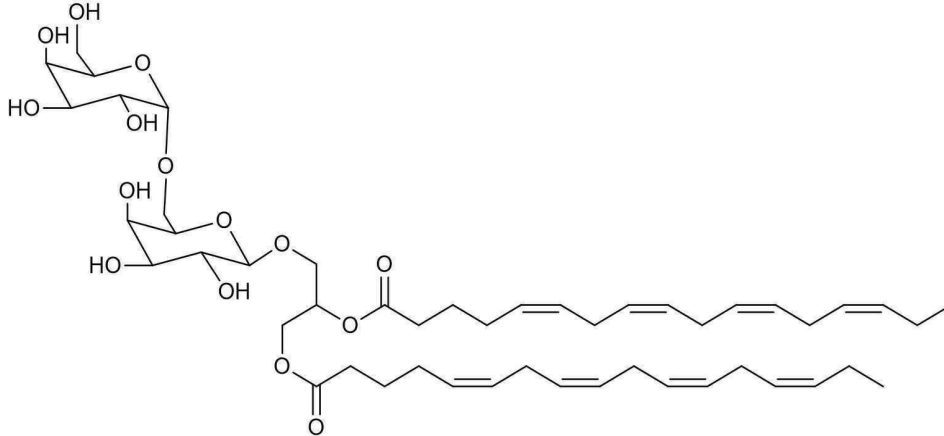
[0026]

[0027] [화학식 2]



[0028]

[0029] [화학식 3]



[0030]

[0031] 상기 염증성 질환은 안구건조증에 의한 건성각결막염, 건선과 같은 피부염, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 위염, 관절염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염 및 신장염 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

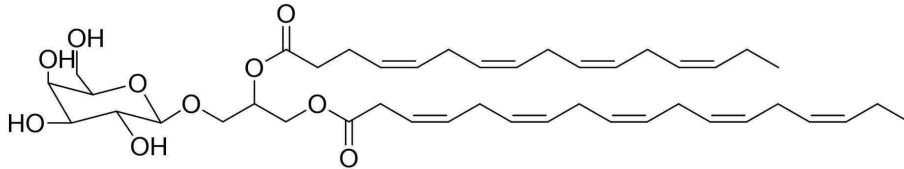
[0032] 본 발명의 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1~50 중량%로 포함한다. 본 발명의 신규 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0033] 본 발명의 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 단독으로 또는 다 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose), 락토오스 (lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 및 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름 및 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지 및 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 0.0001~100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001~100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~50중량%의 함량으로 배합될 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 및 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

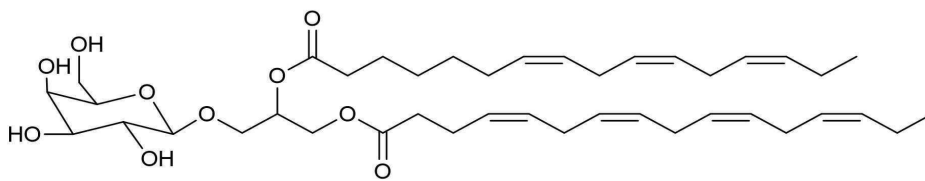
[0035] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0036] [화학식 1]



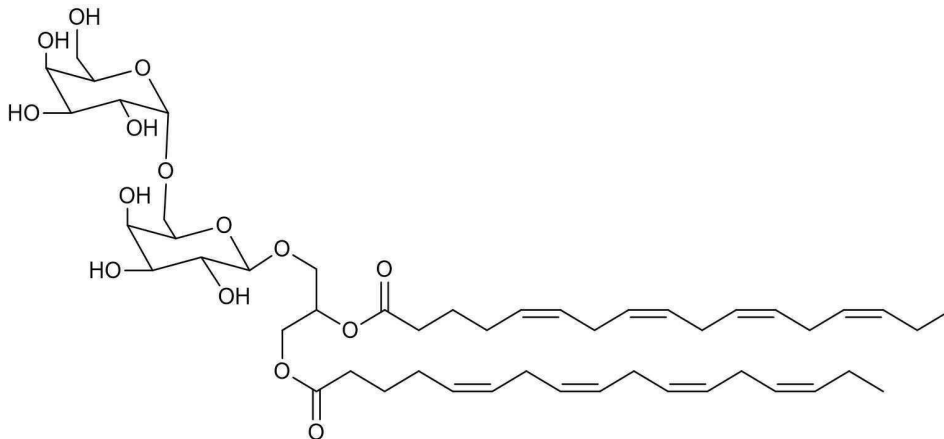
[0037]

[0038] [화학식 2]



[0039]

[0040] [화학식 3]



[0041]

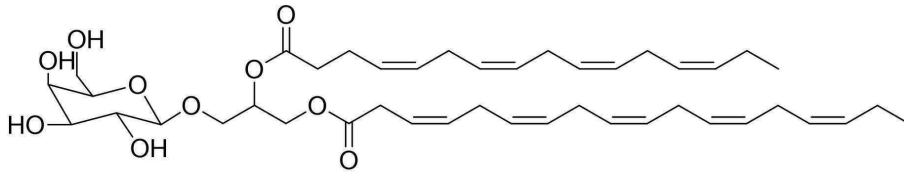
[0042] 본 발명의 화합물은 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 및 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제 및 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다. 본 발명의 신규 화합물은 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01~15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02~30g, 바람직하게는 0.3~10g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g이다. 상기 외에 본 발명의 신규 화합물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알

코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 신규 화합물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 1~20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

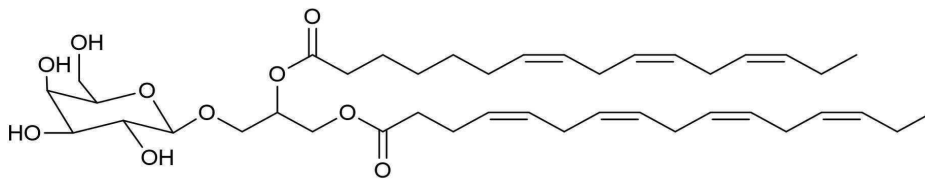
[0044] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 수의학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물에 관한 것이다.

[0045] [화학식 1]



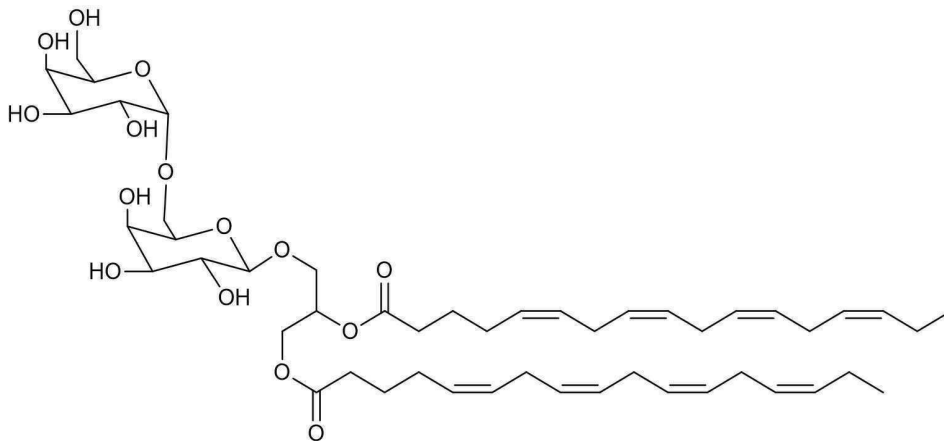
[0046]

[0047] [화학식 2]



[0048]

[0049] [화학식 3]



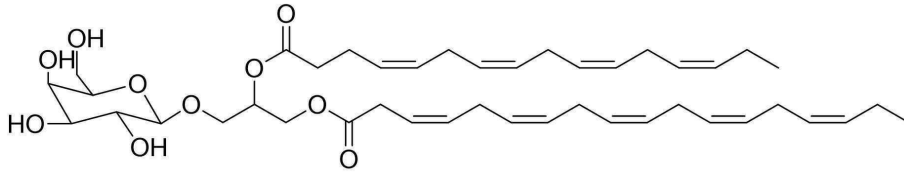
[0050]

[0051] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 항응집제, 운할제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후, 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

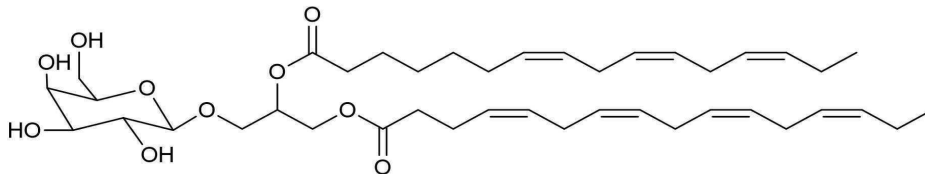
[0052] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유

효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 의약외품에 관한 것이다.

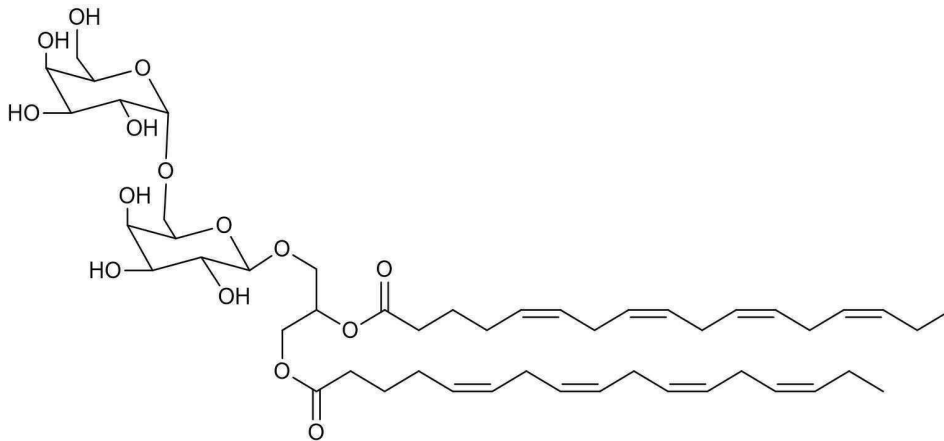
[화학식 1]



[화학식 2]



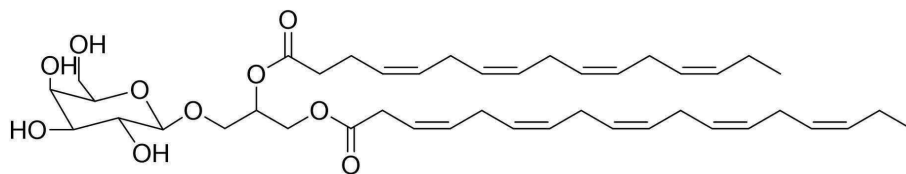
[화학식 3]



본 발명에서 용어, '의약외품'은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적을 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물질로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물질 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물질 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물질을 의미한다. 또한 상기 의약외품은 피부외용제 및 개인 위생용품을 포함한다. 본 발명의 신규 화합물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 신규 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 상기 피부외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 상기 개인위생용품에는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 비누, 물티슈, 휴지, 피부 크림, 얼굴 크림, 에어프레쉬너 젤 또는 세정젤일 수 있다. 또한, 본 발명의 의약외품의 또 다른 예로 소독청결제, 샤워폼, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터 충전제가 있다.

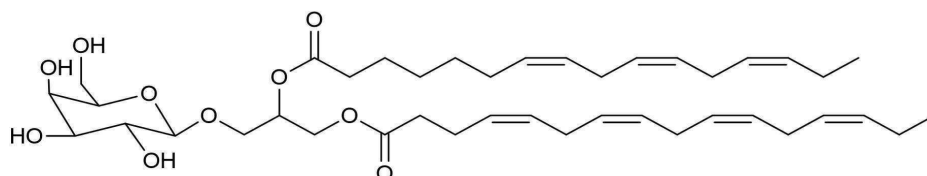
또한, 본 발명은 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 신규 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 안구건조증의 예방 또는 개선용 사료첨가제에 관한 것이다.

[0061] [화학식 1]



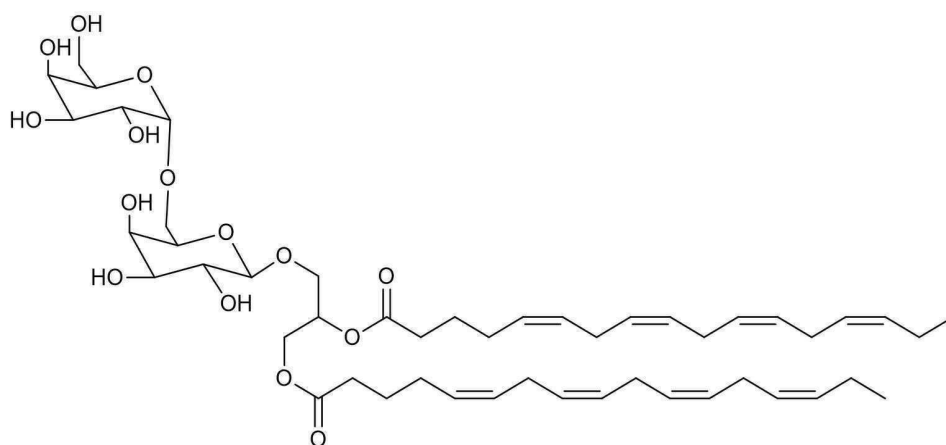
[0062]

[0063] [화학식 2]



[0064]

[0065] [화학식 3]



[0066]

[0067] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0068] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0069] 실시예 1. 신규 화합물의 분리정제 및 구조 확인

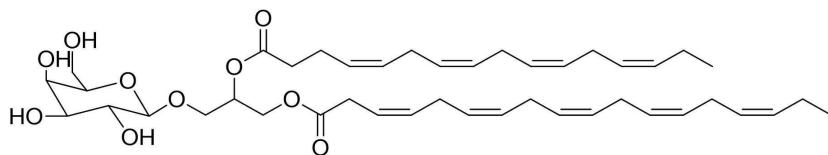
[0070] 상온에서, 미세조류 테트라셀미스 추이(*Tetraselmis chuii*)에, 100% 에탄올을 첨가한 후, C₁₈ 칼럼을 사용하여 MPLC 및 Preparaive LC를 이용하여 화합물 3종을 분리정제하였다. 상기 분리정제한 화합물 3종에 대해 NMR(400MHz, CDC₁₃)과 HRMS로 분석하여 구조를 확인하였고, 상기 분리한 화합물 3종은 글리코글리세로리피드(glycoglycerolipid) 성분으로 확인되었다.

[0071] (1) 화합물 1: 1-O-(3Z,6Z,9Z,12Z,15Z-octadecapentaenoyl)-2-O-(4Z,7Z,10Z,13Z-hexadecatetraenoyl)-3-O-β-D-galactopyranosylglycerol

[0072] -性状: 노란색의 오일

[0073] - HR-ESI-MS: m/z 739.4438 [M +FA- H]⁻ (calcd. 739.4421)

[0074] [화합식 1]



[0075]

표 1

[0076] NMR 스펙트럼의 Assignments

Position	δ_c	δ_H (mult, J in Hz)
1	64.3	4.45 (dd, 12.0, 3.1) 4.29 (m)
2	71.9	5.30 (m)
3	68.7	4.01 (dd, 10.9, 5.4) 3.77 (m)
1'	173.0	-
2'	33.6	3.16 (d, 4.7)
3'	122.4	5.57 (t, 4.7)
4'	132.5	5.57 (t, 4.7)
5'	26.6	2.86 (m)
6'	129.7	5.39 (m)
7'	129.5	5.39 (m)
8'	26.6	2.86 (m)
9'	129.3	5.39 (m)
10'	129.3	5.39 (m)
11'	26.6	2.86 (m)
12'	129.1	5.39 (m)
13'	129.0	5.39 (m)
14'	26.6	2.86 (m)
15'	128.9	5.39 (m)
16'	132.8	5.39 (m)
17'	21.5	2.11 (m)
18'	14.7	0.99 (t, 7.5)
1' '	174.0	-
2' '	35.1	2.39 (m)
3' '	23.7	2.39 (m)
4' '	130.4	5.39 (m)
5' '	128.2	5.39 (m)
6' '	26.7	2.86 (m)
7' '	129.5	5.39 (m)
8' '	129.1	5.39 (m)
9' '	26.6	2.86 (m)
10' '	129.0	5.39 (m)
11' '	128.9	5.39 (m)
12' '	26.5	2.86 (m)
13' '	128.2	5.39 (m)
14' '	132.8	5.39 (m)
15' '	21.5	2.11 (m)
16' '	14.7	0.99 (t, 7.5)
1' ' '	105.4	4.25 (d, 7.4)
2' ' '	72.4	3.51 (m)
3' ' '	74.9	3.48 (dd, 3.3, 9.1)
4' ' '	70.2	3.85 (m)
5' ' '	76.8	3.53 (m)
6' ' '	62.4	3.77 (m)

[0077] (2) 화합물 2: 1-O-(4Z,7Z,10Z,13Z-hexadecatetraenoyl)-2-O-(7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoyl)-3-O-β-D-

galactopyranosylglycerol

- 정상: 노란색의 오일

- HR-ESI-MS: m/z 715.4431 $[M + FA - H]^-$ (calcd. 715.4421)

[화합식 2]

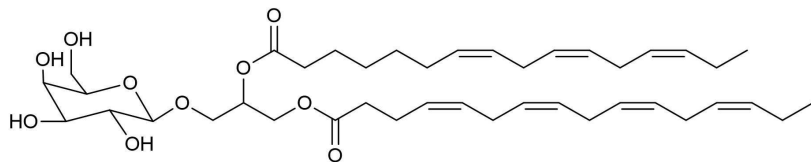


표 2

NMR 스펙트럼의 Assignments

Position	δ_c	δ_H (mult, J in Hz)
1	64.0	4.44 (dd, 12.0, 3.5) 4.24 (m)
2	72.0	5.27 (m)
3	68.7	4.00 (dd, 10.9, 5.4) 3.74 (m)
1'	174.1	-
2'	35.1	2.33 (m)
3'	25.9	2.40 (brs)
4'	129.3	5.36 (m)
5'	129.3	5.36 (m)
6'	26.6	2.84 (m)
7'	129.1	5.36 (m)
8'	129.1	5.36 (m)
9'	26.6	2.84 (m)
10'	129.1	5.36 (m)
11'	129.1	5.36 (m)
12'	26.6	2.84 (m)
13'	128.3	5.36 (m)
14'	132.8	5.36 (m)
15'	21.5	2.08 (m)
16'	14.7	0.98 (t, 7.5)
1' '	175.0	-
2' '	34.9	2.33 (m)
3' '	23.8	2.40 (brs)
4' '	30.4	1.33 (m)
5' '	29.8	1.33 (m)
6' '	28.0	2.08 (m)
7' '	130.9	5.36 (m)
8' '	130.4	5.36 (m)
9' '	26.4	2.84 (m)
10' '	129.5	5.36 (m)
11' '	129.3	5.36 (m)
12' '	26.4	2.84 (m)
13' '	128.3	5.36 (m)
14' '	132.8	5.36 (m)
15' '	21.5	2.08 (m)
16' '	14.7	0.98 (t, 7.5)
1' ' '	105.4	4.24 (d, 7.6)
2' ' '	72.4	3.52 (m)
3' ' '	74.9	3.46 (dd, 3.3, 9.7)

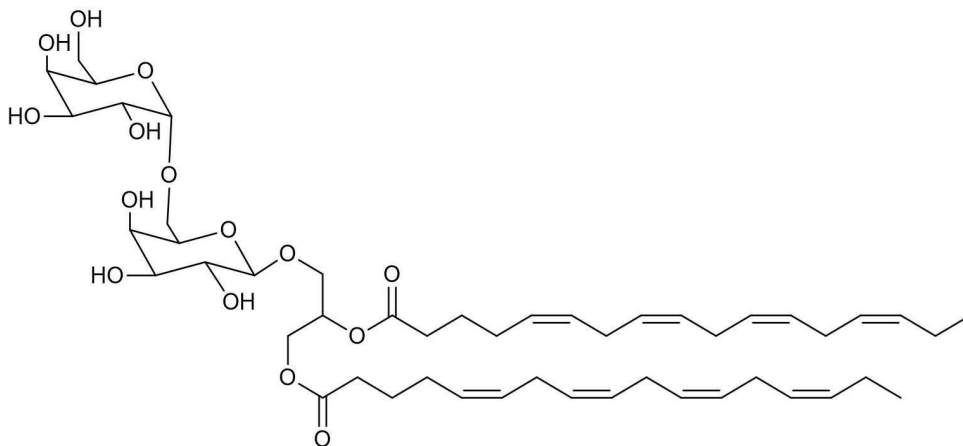
4' ' '	70.2	3.84 (m)
5' ' '	76.8	3.52 (m)
6' ' '	62.5	3.74 (m)

[0083] (3) 화합물 3: 1,2-0-5Z,8Z,11Z,14Z-diheptadecanetraenoyl-3-O- α -D-galactopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$ 6''')-O- β -D-galactopyranosylglycerol

[0084] - 성상: 노란색의 오일

[0085] - HR-ESI-MS: m/z 903.5119 [$M + FA - H$]⁻ (calcd. 903.5106)

[0086] [화합식 3]



[0087]

표 3

[0088] NMR 스펙트럼의 Assignments

Position	δ_c	δ_H (mult, J in Hz)
1	64.0	4.26 (m) 4.44 (dd, 3.0, 12.1)
2	71.9	5.25 (m)
3	68.7	3.74 (m) 3.91 (m)
1' ,1' '	170.9	-
2' ,2' '	35.1,34.8	2.34 (m)
3' ,3' '	25.6	1.62 (m)
4' ,4' '	27.9	2.10 (m)
5' ,5' '	130.6,130.4	5.37 (m)
6' ,6' '	129.5,129.5	5.37 (m)
7' ,7' '	26.6	2.85 (m)
8' ,8' '	129.3,129.3	5.37 (m)
9' ,9' '	129.1,129.1	5.37 (m)
10' ,10' '	26.6	2.85 (m)
11' ,11' '	129.0,129.0	5.37 (m)
12' ,12' '	129.0,128.9	5.37 (m)
13' ,13' '	26.5	2.85 (m)
14' ,14' '	128.2	5.37 (m)
15' ,15' '	132.8	5.37 (m)
16' ,16' '	21.5	2.10 (m)
17' ,17' '	14.7	0.98 (t, 7.5)
1' ' ' '	105.3	4.26 (d, 7.6)
2' ' ' '	72.5	3.51 (m)
3' ' ' '	74.7	3.51 (m)
4' ' ' '	70.1	3.90 (m)

5' ' '	74.6	3.74 (m)
6' ' '	67.8	3.74 (m)
1' ' ' '	100.7	4.90 (br s)
2' ' ' '	70.2	3.91 (m)
3' ' ' '	71.5	3.74 (m)
4' ' ' '	71.1	3.91 (m)
5' ' ' '	72.4	3.91 (m)
6' ' ' '	62.8	3.74 (m)

[0089] 실시예 2. 세포독성 시험(Cytotoxicity assay)

[0090] 대식세포주 RAW264.7 세포를 96웰 플레이트(Corning, USA)에, 세포수가 1×10^4 세포/웰이 되도록 분주하고 CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다(37℃, 5% CO₂). 배양 후 본 발명의 글리코글리세로리피드(glycoglycerolipid) 성분들인 화학식 1 내지 3의 신규 화합물을 0, 50, 100, 200 및 400 μM 농도로 각각 처리하여 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 배양 후 1μg/ml의 LPS(Lipopolysaccharides)를 처리하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 웰당 MTT 시약 50μl를 처리하여 4시간 동안 반응 시킨 후 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 리더로 490nm에서 흡광도 변화를 측정하여 세포의 생존율을 백분율로 계산하였다.

[0091] 그 결과, 도 4 내지 6에 개시한 바와 같이, 본 발명의 화학식 1~3의 신규 화합물은 200 μM 농도까지 80% 이상의 세포생존율을 나타냈다.

[0092] 실시예 3. 인터루킨-6의 분비량 확인

[0093] ELISA 키트를 이용하여 RAW 264.7 세포 배양액에서 인터루킨-6(IL-6)의 분비량을 측정하였다. 세포배양액을 얻기 위해 RAW 264.7 세포를 5×10^6 cells/ml로 조절하여 24웰 플레이트에 접종하고 2시간의 전 배양 후, 0, 50, 100 및 200 μM의 농도로, 본 발명의 신규 화합물 1~3을 각각 처리하였고, 동시에 1μg/ml의 LPS를 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양하고, 원심분리를 통해 상층액을 얻었다. ELISA는 마이크로플레이트(microplate)에 포획 항체(capture antibody)로 항-마우스 IL-6를 분주하여 실온에서 하룻밤 동안 코팅(coating)시켰다. 이후 세척 완충용액(Wash Buffer)으로 세척한 후, 블로킹(blocking)하였고, 이후 다시 세척 완충용액(Wash Buffer)으로 세척하고, 각 마이크로플레이트 웰에 세포 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다.

[0094] 반응 후 세척 완충용액(Wash Buffer)으로 세척하고 희석한 비오틴화된 항-마우스 IL-6 검출용 항체 및 스트렙타비딘-홀스래디쉬 퍼옥시다제 컨쥬게이트(streptavidin-horseradish peroxidase conjugate)를 분주하여 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 그 후 다시 세척 완충용액(Wash Buffer)으로 세척하고 기질 용액(Substrate Solution)을 첨가하여 실온에서 20분 동안 암반응시켰다. 반응정지 용액(Stop Solution)으로 반응을 종료시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0095] 그 결과, 하기 도 7 내지 9에 개시한 바와 같이, 본 발명의 화학식 1~3의 신규 화합물은 LPS에 의해 분비량이 증가된 염증성 사이토카인 IL-6의 분비량을 농도의존적으로 유의미하게 감소시킨다는 것을 확인하였다.

[0096] 실시예 4. 테트라셀미스 츠이(Tetraselmis chuii)로부터 분리한 화합물 1~3의 안구건조증에 대한 효과 확인

[0097] (1) 눈물량 측정

[0098] 테트라셀미스 츠이(Tetraselmis chuii)로부터 분리한 화합물 1~3의 안구건조증에 대한 개선 효과를 확인 위하여, 동물모델로 7~8주령 암컷 balb/c 마우스를 이용하였다. 실험군당 5마리씩 총 60마리의 동물모델을 이용하여 안구건조증 개선 효능을 탐색하였다. 마우스는 공기가 조절되며, $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 및 $40 \pm 10\%$ 의 습도, 12시간 간격으로 명/암 주기를 지닌 동물실에 수용되었으며, 사료와 물은 자유롭게 공급하였다.

[0099] 실험방법은 일주일 동안 순치시킨 후, 2주 동안 2.5mg/ml의 스코폴라민(scopolamine)을 200μl씩 하루에 2번씩 피하주사하였다. 무처리군(Nontreatment control, NTC)의 경우, 스코폴라민을 주사하지 않았으며, 그외의 나머지 군의 경우, 스코폴라민을 처리하여 안구건조증을 유도하였다. 안구건조증을 유도하면서, 하루에 한번 테트라셀미스 츠이(Tetraselmis chuii)로부터 분리한 화합물 1~3를 각각 1mg/head/day의 용량으로 경구투여하였으며, 양성대조군으로 5mg/head/day의 오메가-3를 마우스에 경구 투여하였다. 이후, 2일 간격으로 7회에 걸쳐 쉬르머(Schirmer) 시험법으로, 마우스의 눈물량을 변화를 확인하였다.

- [0100] 그 결과 도 10에 개시한 바와 같이, 스코폴라민 투여에 의해 안구건조증이 유발되어, 대조군(CON) 대비 스코폴라민 투여군(SCO)의 눈물량이 현저하게 감소하였으며, 이에 대비하여, 본 발명의 화합물 1~3 및 양성대조군(오메가-3)를 투여한 군은 눈물량 감소가 완화된 것을 확인하였다.
- [0101] **(2) 각막 표면의 손상정도 측정**
- [0102] 암실에서 플루오레세인(Fluorescein)을 마우스 각막 표면에 1방울 떨어뜨려, 눈물막을 코팅하고, 이어서 블루라이트(blue light)로 각막을 비추었다. 손상된 각막 표면은 플루오레세인으로 염색되고 블루라이트에 비추면 녹색을 나타낸다. 각막 표면을 사진 촬영하여 이미지 J를 활용하여 각막 전체 면적대비 녹색으로 나타나는 손상된 각막 면적의 비율을 계산하여 손상 정도를 파악하였다.
- [0103] 도 11에 개시한 바와 같이, 각막 손상정도 측정 결과는 대조군 대비 스코폴라민 투여에 의해 안구건조증이 유발된 군의 각막 표면 손상 정도가 증가하였고, 안구건조증 유발군 대비 본 발명의 화합물 1~3 또는 양성대조군의 각막 표면 손상 정도는 감소하였다.
- [0104] **(3) 각막 두께 변화 정도 측정**
- [0105] 각막 두께 변화정도를 확인하기 위하여, 마우스를 희생시키고, 각막을 적출하였다. 적출된 각막을 통상적인 방법으로 파라핀(paraffin) 포매한 후, 5 μ m 두께의 연속 절편으로 제작하였다. 제조된 파라핀 블록을 3 μ m로 자른 후 자일렌(xylene) 용액을 이용하여 파라핀을 3분 동안 3회 제거하였다. 10% 암모늄 용액에 에탄올, 아세트산 및 글리세롤을 넣고, 헤마톡실린(hematoxylin) 용액을 만든 뒤, 파라핀 제거가 끝난 조직 슬라이드를 10분 동안 염색하였다. 염색이 끝난 슬라이드를 증류수에 1분 세척한 뒤, 1% HCl-70% 에탄올에 5초 담근 후 증류수에 5분간 정치하였다. 그 후 0.3% 암모니아수에 2분 동안 처리하고 증류수로 세척하였다. 세척한 조직은 1% 에오신(eosin), 에탄올 및 아세트산을 이용하여 에오신 염색 용액을 만들어, 2분 동안 에오신 염색한 후 탈수 과정을 50%, 70%, 90%, 95% 및 100% 에탄올 용액 및 자일렌 용액으로 각 1회씩(2분/회) 세척하였다. 세척이 끝난 슬라이드 위에 캐나다발삼(Canada balsam)을 떨어뜨리고 커버 슬라이드로 덮어 굳힌 뒤, 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 각막의 변화를 측정하였다.
- [0106] 그 결과, 도 12에 개시한 바와 같이 대조군 대비 스코폴라민 투여에 의해 안구건조증이 유발된 군의 각막 두께가 감소하였고, 안구건조증 유발군 대비 본 발명의 화합물 1~3 또는 양성대조군의 각막 두께가 증가하였다.
- [0107] **실시예 5. 망막색소상피세포(ARPE-19)에서 안구건조증 관련 인자의 유전자 발현량 변화 확인**
- [0108] 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)에, 망막색소 상피(ARPE-19) 세포를 분주하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였고, 2~3일 간격으로 계대배양하여 유지하였다.
- [0109] 이후, 상기 ARPE-19 세포를 5 $\times$ 10⁵ 세포/웰의 밀도로, 6웰 플레이트에 분주하여 안정화 시킨 후, 무혈청 배양액에 녹인 본 발명의 화합물 1~3을 각각의 웰에 처리하여, 24시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 세포를 살짝 닦을 정도로 PBS를 첨가한 후, TNF- α 를 첨가하였다. 이후 안구건조증 주요 마커인 ICAM(intercellular adhesion molecule) 및 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)과 염증성 사이토카인인 TGF- β (transforming growth factor- β) 및 IL-1 β (interleukin-1 β)의 유전자 발현량 변화를 확인하였다.
- [0110] 그 결과, 도 13에 개시한 바와 같이 대조군 대비 TNF- α 를 첨가하여 안구건조증이 유발된 군의 안구건조증 주요 마커인 ICAM 및 MMP-9과 염증성 사이토카인인 TGF- β 및 IL-1 β 의 유전자 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, 이에 대비하여, 본 발명의 화합물 1~3 또는 양성대조군의 ICAM, MMP-9, TGF- β 및 IL-1 β 의 유전자 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다.
- [0111] **실시예 6. 각막 조직에서 안구건조증 마커 및 염증 마커의 단백질 발현량 변화 확인**
- [0112] 각막조직을 분해 완충용액(150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 50mM NaF, 10mM Na₄P₂O₇, 1% IGEPAL, 2mM Na₃VO₄, 0.25% 프로테아제 억제제 각테일 및 1% 포스포타아제 억제제 각테일)로 용해시킨 후 ICAM, MMP-9, TGF- β , IFN- γ , TNF- α 및 IL-1 β 의 단백질 발현량을 확인하였다.
- [0113] 10~25 μ g의 단백질을 11% SDS-PAGE에서 전기영동한 뒤, 니트로셀룰로스 멤브레인에 2시간 동안 전이시켰다. 멤브레인은 1시간 동안 5% BSA 블로킹한 후, 염증 관련 단백질(ICAM, MMP-9, TGF- β , IFN- γ , TNF- α 및 IL-1 β)에 대한 각각의 항체를 이용하여 단백질 발현량을 검출하였다.

[0114] 그 결과, 도 14에 개시한 바와 같이 대조군 대비 TNF- α 에 의해 유도된 염증관련 인자 단백질의 발현량이 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 신규 화합물 1~3을 처리한 실험군에서는 염증인자 단백질의 발현량이 현저하게 감소하였다.

[0115] 실시예 7. 건선 동물모델에서, 본 발명의 화합물 1~3의 도포에 따른 피부염증 완화 효과 확인

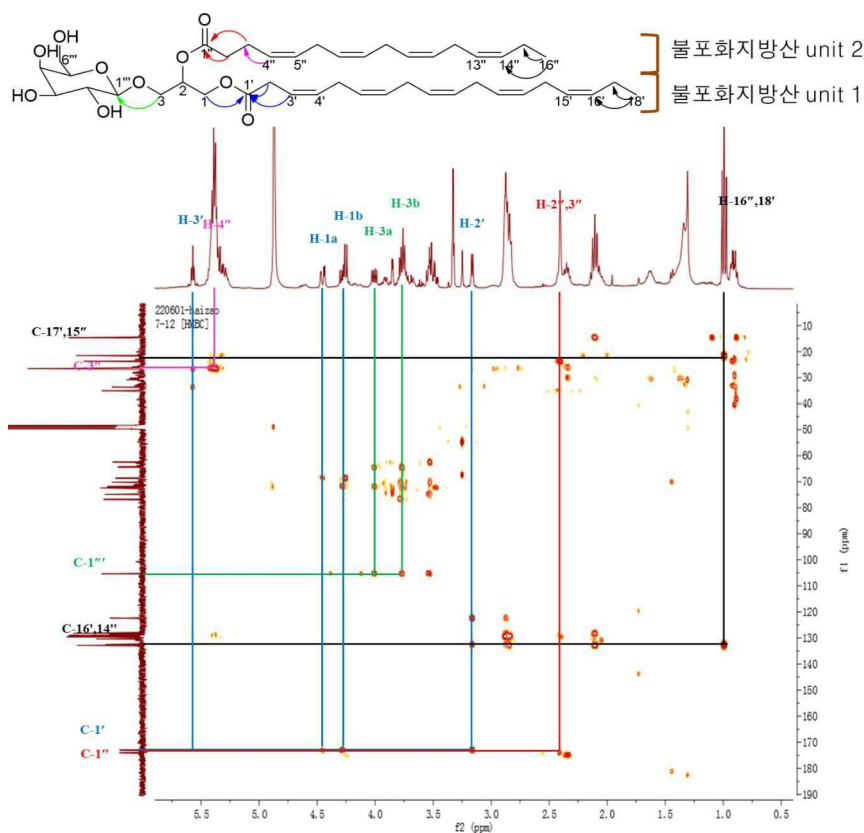
[0116] 6주령 수컷 Balb/c 마우스(강원생명과학, 한국)를 구입하고, 일주일 순화 후, 5% 이미퀴모드(imiquimod; IMQ 동아ST, 한국)를 사용하여 건선을 유발시킨 실험군당 5마리씩 총 25마리의 동물 모델을 이용하여 본 발명의 화합물 1~3의 항건선 효능을 탐색하였다. 실험군은 아무 처리를 하지 않은 정상 대조군(Non-treatment control, NTC), 이미퀴모드로 유도한 건선 유발군(IMQ), 건선유도 후 화합물 1, 2, 3을 각각 도포한 실험군으로, 총 5개 군으로 구성하였다. IMQ Cream으로 건선을 유도한 후, 본 발명의 화합물 1~3을 각각 매일 문질러바르는 도포를 7일 동안 실시하였고, 8일째 실험동물의 피부상태를 확인하기 위하여 등 사진을 촬영하였다.

[0117] 이후, 동물로부터 등 피부조직을 적출한 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 5 μ m로 절삭하여 슬라이드 샘플을 제작한 후, H&E 염색을 통하여 피부조직의 두께 변화를 측정하였고, 면역형광분석(immunofluorescence)을 통하여 건선으로 인한, 상피 조직 손상에 대한 바이오마커의 변화를 측정하였다.

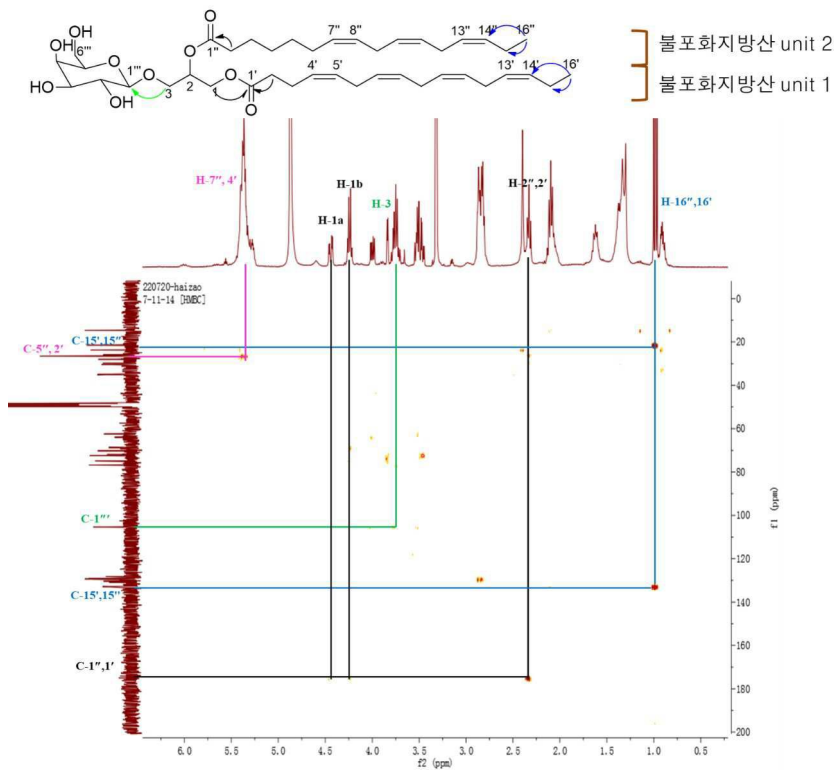
[0118] 그 결과 도 15A에 개시한 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 마우스에 비하여 IMQ 처리군은 피부발적이 일어났고, 본 발명의 신규 화합물 1~3의 도포에 의해 피부발적이 감소하였고, 도 15B에 개시한 바와 같이 건선을 유도한 IMQ군에서는 상피의 두께가 증가한 반면, 화합물 1~3처리군에서는 상피두께가 감소하는 경향을 보였으며, 도 15C에 개시한 바, 무처리군 대비 건선을 유도한 IMQ군에서 케라틴 1 및 케라틴 14의 발현이 증가하였으나, 화합물 1~3처리군에서는 발현량이 감소하는 것으로 나타났다.

도면

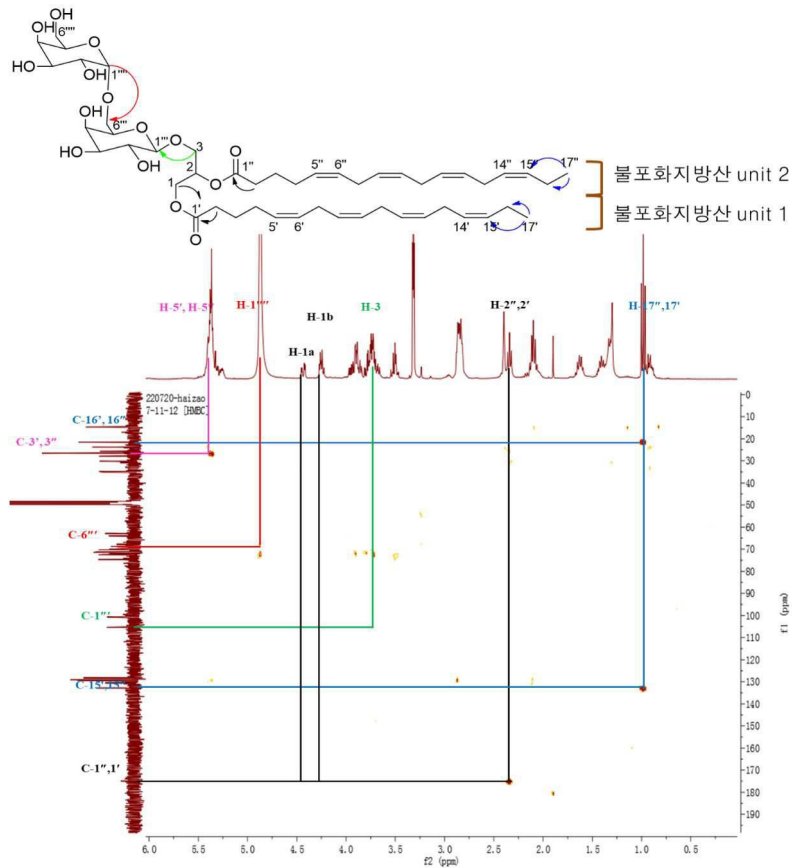
도면1



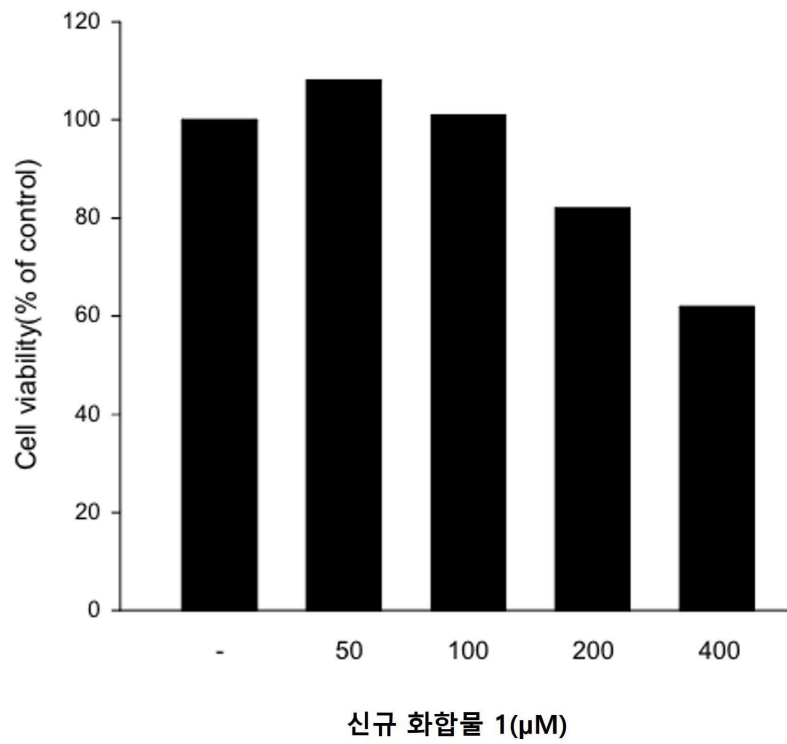
도면2



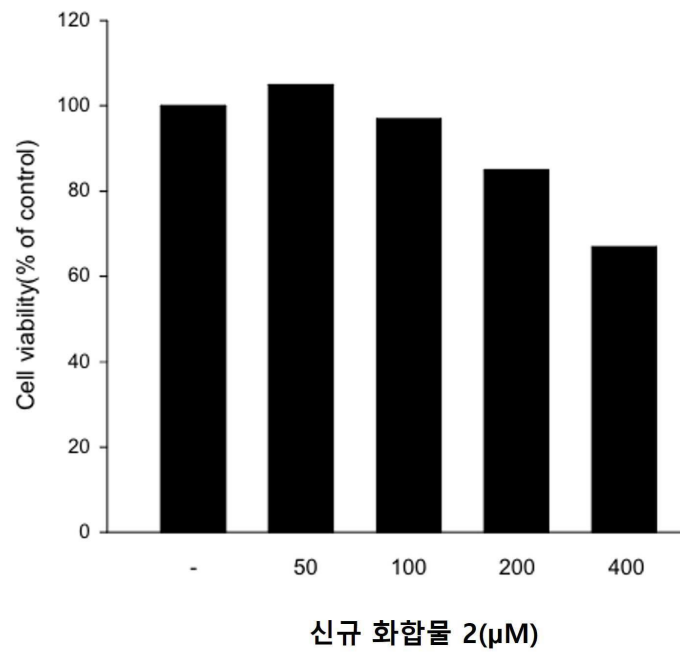
도면3



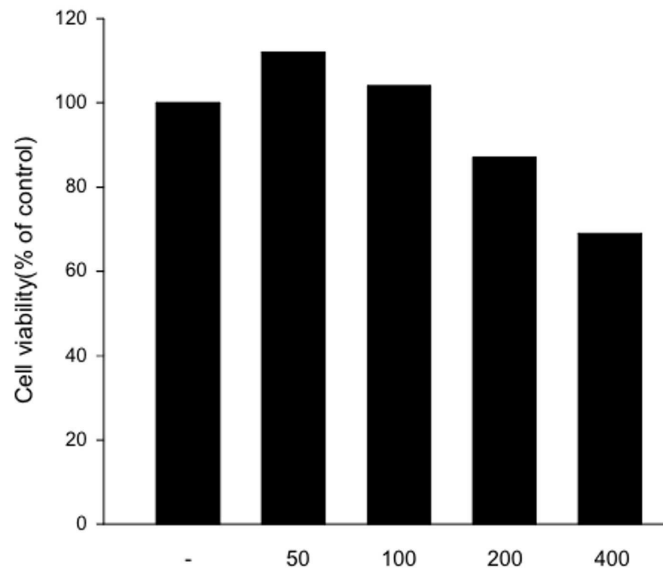
도면4



도면5

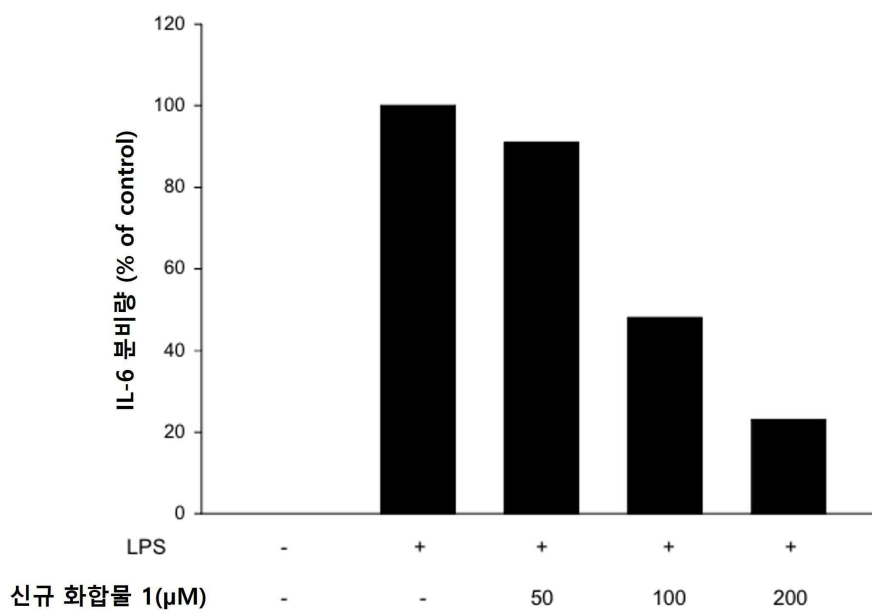


도면6



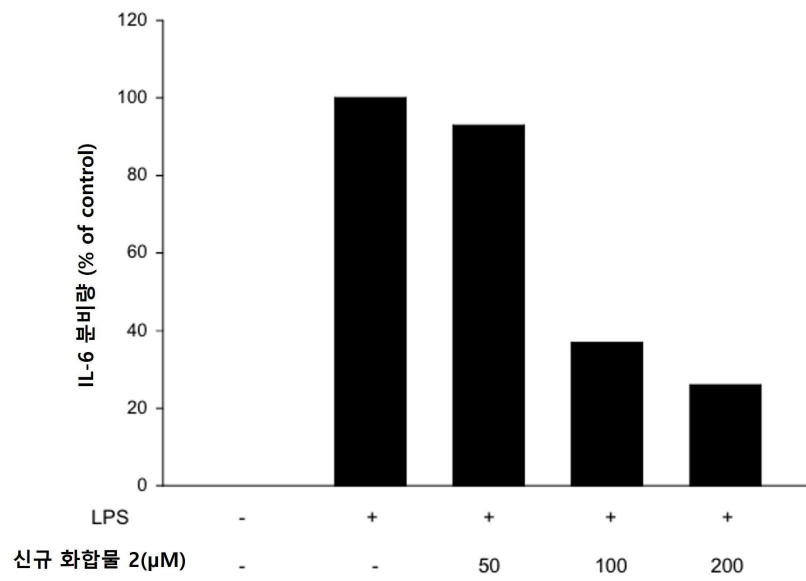
신규 화합물 3(μ M)

도면7

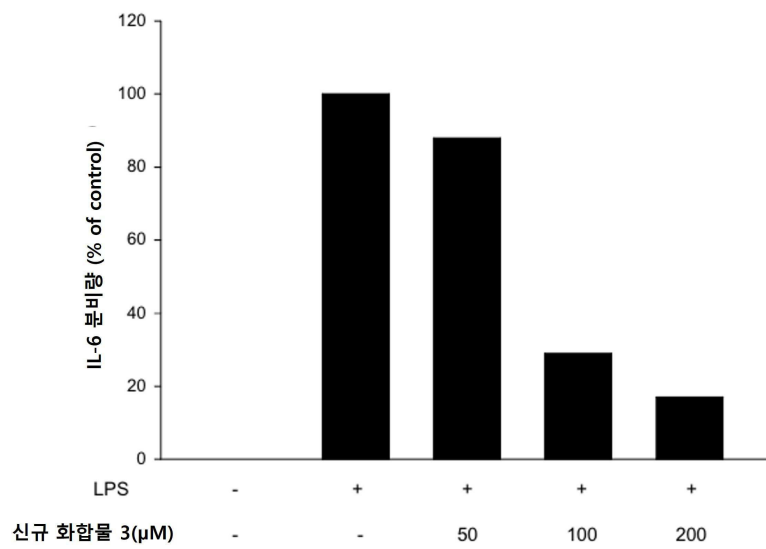


신규 화합물 1(μ M)

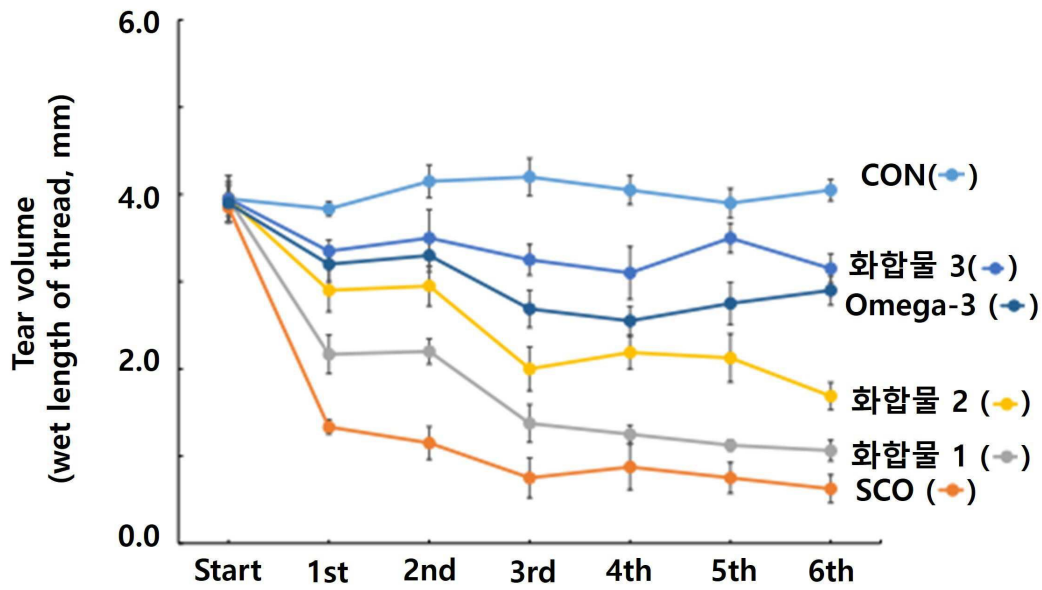
도면8



도면9



도면10

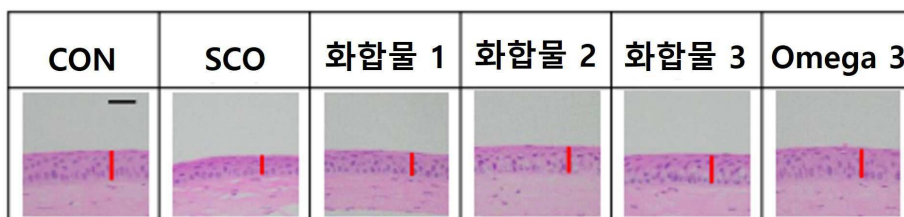


도면11



CON: control, SCO(NC): scopolamine(negative control)

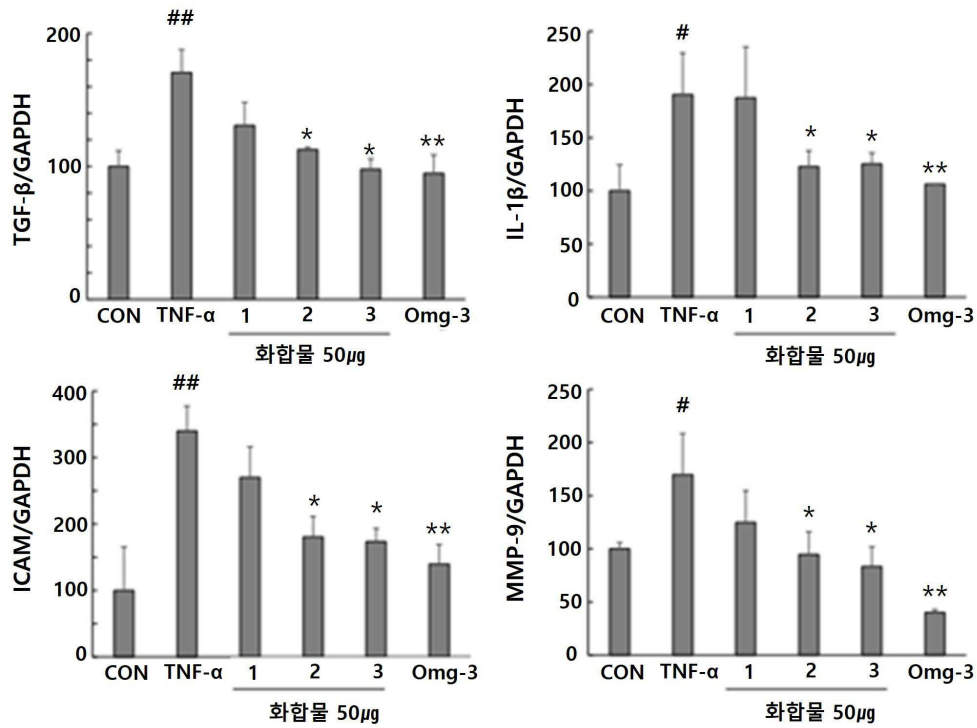
도면12



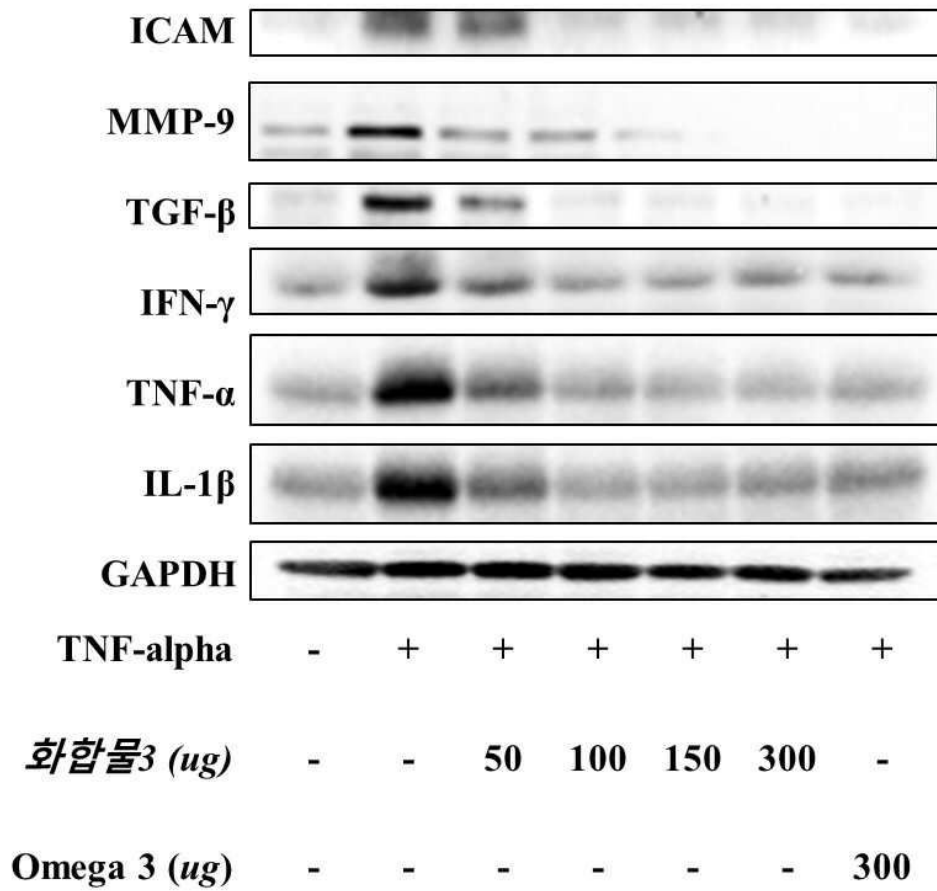
Red bar: epithelial thickness, 20μm

CON: control, SCO(NC): scopolamine(negative control)

도면13



도면14



도면15

