



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년07월01일
(11) 등록번호 10-0905336
(24) 등록일자 2009년06월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/19 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7004396
(22) 출원일자 2001년09월27일
심사청구일자 2006년02월23일
(85) 번역문제출일자 2003년03월26일
(65) 공개번호 10-2003-0036843
(43) 공개일자 2003년05월09일
(86) 국제출원번호 PCT/N02001/000393
(87) 국제공개번호 WO 2002/26218
국제공개일자 2002년04월04일

(30) 우선권주장

20004844 2000년09월27일 노르웨이(NO)

(56) 선행기술조사문현

EP0273202 A2

전체 청구항 수 : 총 4 항

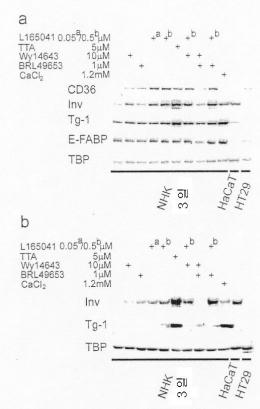
심사관 : 박정민

(54) 중식성 피부 장애를 치료하기 위한 지방산 유사체

(57) 요 약

본 발명은 중식성 피부 질환을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 화학식 (I)의 지방산 유사체에 관한 것이다: $R_1-[X_1-CH_2]_n-COOR_2$, 상기 식에서 R_1 은; 하나 이상의 이중 결합 및/또는 하나 이상의 삼중 결합을 가진 C_1-C_{24} 알켄, 및/또는 C_1-C_{24} 알킨, 및/또는 C_1-C_{24} 알킬, 또는 C_1-C_{24} 알킬 또는 하나 또는 몇몇 위치에 플루오라이드, 클로라이드, 히드록시, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 알킬티오, C_2-C_5 아실옥시 또는 C_1-C_4 알킬을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물이 치환된 C_1-C_{24} 알킬이고, R_2 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬이며, n 은 1 내지 12 중 정수이고, i 는 홀수이며, $COOR_2$ 에 대해 상대적인 위치를 의미하고, X_i 는 서로 독립적으로 O, S, SO, SO₂, Se 및 CH₂를 포함하는 군으로부터 선택되며, 단, X_i 중 하나 이상은 CH₂가 아니고, -R₁이 알킨 또는 알켄이면, 탄소-탄소 삼중 결합 또는 이중 결합이 (ω -1) 탄소 및 (ω -2) 탄소 사이, 또는 (ω -2) 탄소 및 (ω -3) 탄소 사이, 또는 (ω -3) 탄소 및 (ω -4) 탄소 사이에 위치한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 각질형성 세포의 증식 및/또는 분화 억제에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에쿠아도르, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아 공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 필리핀, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 남아프리카, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 크로아티아, 인도, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 시에라리온, 인도네시아, 감비아

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터키, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 적도 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고

특허청구의 범위

청구항 1

테트라데실티오아세트산 (TTA) 또는 그의 염, 또는 테트라데실셀레노아세트산 (TSA) 또는 그의 염을 포함하는, 각질증식성 피부병을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 각질증식성 피부병이 건선, 아토피성 피부염, 라멜라 어린선 (ichthyosis), 표피 박리성 과각화증 (epidermolytic hyperkeratosis), 전악성 (pre-malignant) 일광 유도 각화증 및 지루증 (seborrheic)을 포함하는 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 각질증식성 피부병이 건선인 조성물.

청구항 4

삭제

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

작제

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 테트라데실티오아세트산 (TTA) 또는 그의 염, 또는 테트라데실셀레노아세트산 (TSA) 또는 그의 염이 국소 투여되는 조성물.

명세서

기술 분야

본 발명은 증식성 피부 질환을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 지방산 유사체에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 각질형성 세포 (keratinocyte) 분화 및 증식의 조절과 관련된 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 지방산 유사체의 용도에 관한 것이다.

배경기술

*증식성 피부 질환은 전세계적으로 만연되어 있고, 수백만명의 인류 및 이들에 의해 길들여진 동물들이 고생하고 있다. 증식성 피부 질환은 각질형성 세포의 증식 또는 분열을 특징으로 하며, 또한 불완전한 표피의 분화도 관련이 있을 수도 있다. 건선 (psoriasis)은 본 발명과 관련된 증식성 피부 질환 중 가장 심각한 것이다.

건선은 2개의 생물학적 특성을 특징으로 하는 유전학적으로 결정되는 피부 질환이다. 첫 번째는, 가속화되고 불완전한 분화와 관련이 있는 심각한 표피 고증식성 (hyperproliferation)이 있다. 두 번째로, T 림프구의 가입 (recruitment)이 증가된 표피 및 진피의 현저한 염증이 있으며, 몇몇의 경우에는 호중구성 미소 농양 (neutrophil microabscesses)의 형성이 있다. 건선의 많은 병리학적 특징은 피부의 표면의 0.2mm 내에서 발생하는 표피 세포의 증가된 증식과 함께 표피 각질형성 세포의 성장 및 성숙에 있어서 변형에 기인할 수 있다. 건선의 병인 (pathogenesis)에 대한 전통적인 연구는 표피의 증가된 증식 및 비대증 (hyperplasia)에 초점을 맞춰 왔다. 정상 피부에서는, 세포가 기저층 (basal layer)으로부터 과립층 (granular layer)을 통해 이동하는 시간은 4 내지 5주이다. 건선 병변 (lesion)에서, 상기 시간은 단축된 세포 주기, 증식 가능한 세포의 절대적인 수에 있어 증가, 및 실제로 분열하는 세포의 비율 증가에 의해 7배 내지 10배 감소된다. 건선 환자의 임상적 관련이 없는 피부에서도 실질적으로 보다 적은 정도이지만, 고증식 현상이 발현되기도 한다.

건선, 심상성 건선 (psoriasis vulgaris)의 일반적인 형태는 두꺼운 은색 비늘에 의해 덮혀진 식별이 쉬운 홍반 플라크 (erythematous plaque)인 것을 특징으로 한다. 특징적인 발견은 새로운 건선 병변이 피부 외상 부위에서 발병하는 동형성 반응 (Koebner phenomenon)이다. 병변은 종종 말단 기관 (extremity)의 신근 (extensor) 표면에 편재되어 있으며, 손톱 및 두피에서도 통상 발견되기도 하다.

건선의 치료 노력은 세포 분열에 대한 직접적인 작용에 의해 또는 간접적으로는 면역학적 반응을 감소시킴으로써 표피의 증식 속도를 감소시키는 것을 목적으로 하고 있다. 편재화되고, 제한된 건선 환자에 있어서, 국소적 코르티코스테로이드 (corticosteroids)의 투여는 가장 편리한 외래 환자 치료법이다. 이러한 접근법에 의해 신속한 개선이 나타날 수도 있지만, 유익한 단기 효능은 제한적이며, 만성적 국소 코르티코스테로이드 치료는 그리 권할만한 것은 아니다. 만성적 국소 코르티코스테로이드 치료의 부작용은 피부의 위축 (atrophy), 사용된 제제에 대한 내성의 출현 (속성 내성 (tachyphylaxis)), 중단 후 질환의 심각한 악화 (exacerbation)를 포함할 수 있다. 뇌하수체-부신 억제 (Pituitary-adrenal suppression)는 특히 제제가 신체 대부분의 표면을 덮고 있고 폐색성 드레싱 하에서 사용되는 경우 강력한 국소 코르티코스테로이드 치료의 잠재적 및 심각한 합병증이다.

레티노이드 (retinoid), 특히 에트레티네이트 (etretinate)는 단독 또는 PUVA와의 조합물로서 건선에 대한 유효한 치료제이다. 에트레티네이트는 특히 건선의 박리성 (exfoliative) 및 농포성 (pustular) 변형체에 대해 유용하다. 그러나, 몇몇 주요 잠재적인 합병증이 레티노이드 처방된 환자에 있어서 관찰된다. 일례로서, 레티노이드는 강력한 기형 발생 물질 (teratogen)이며, 불충분한 피임 (contraception)을 하는 가임 연령의 여성에게는 투여되어서는 안 된다. 다른 레티노이드와 같이 에트레티네이트는 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 수준을 증가시킬 수 있다; 따라서, 식이 조절이 필요할 수 있다. 또한, 에트레티네이트는 간독성 (hepatotoxicity)을 유도할 수 있기 때문에, 간 기능 테스트가 약물의 사용 전 및 사용 도중에 일정한 간격으로 수행되어야 한다.

상이한 약물의 사용 및 건선과 같은 피부 증식성 피부 질환을 치료하는데 현재 사용되고 있는 광화학 치료에 수반하는 부작용을 고려하면, 피부 증식성 질환의 증후를 경감하기 위해 각질형성 세포의 증식을 억제하기 위한

새로운 방법 및 새로운 조성물에 대한 필요성이 있다.

발명의 상세한 설명

표피는 상기저층 (suprabasal layer)을 통해 이동하면서 기저층이 매우 순차적인 분화 프로그램을 거치는 선조 세포 (progenitor cell)로 구성된 층화된 (stratified) 비늘 모양의 표피 조직 (epithelium)이다. 각 분화 단계는 특정 표지 유전자의 발현을 특징으로 한다. 증식하는 기저 세포는 K5 및 K14와 같은 케라틴 유전자를 발현시키는 반면, 기저층으로부터 가시층 (spinous layer)으로의 기저 세포 전이는 초기 분화 표지자 케라틴 1 (K1) 및 케라틴 10 (K10)의 상향 조절 (upregulation)과 관련이 있다. 가시층으로부터 과립층으로의 전이는 인볼루크린 (involucrin) (IVL) 및 트랜스글루타미나아제 (transglutaminase) (TGM1)와 같은 각화된 (cornified) 외피의 구조 단백질을 암호화하는 유전자의 상향 조절에 의해 수반된다.

표피는 콜레스테롤, 지방산 및 스팽고지질 (sphingolipid)의 축적 및 침전이 수용성 (competent) 표피 장벽의 형성에 이르게 하는 최종 표피 분화 프로그램의 통합부를 구성하는 고속의 지방산 및 콜레스테롤 대사 작용을 가진 조직을 의미한다.

PPAR 계열은 각질형성 세포의 분화에 역할을 하는 것으로 예상되며, 본 연구에서 본 발명자들은 본 발명의 화합물인 TTA에 의해 얻어지는 효과를 가진 종래의 PPAR 리간드의 효과를 비교하였다.

본 연구에서, 본 발명자들은 인간 각질형성 세포의 생체 외 분화 동안 분리된 기저 세포 및 상기저 세포, 및 인간 피부의 부위에서 PPAR의 분화를 상세하게 분석하였다. 적절한 PPAR 아형 (subtype)을 독점적으로 표적으로 하는 PPAR 아형 선택적 리간드의 농도를 사용하여, 본 발명자는 PPAR α 및 PPAR γ 선택적 리간드가 각질형성 세포 표지 유전자 발현에 대해 효과가 거의 없음을 발견하였다 (데이터는 밝히지 않음). 중요한 것은, PPAR δ 선택적 리간드 L165041이 인볼루크린의 발현을 투여량-의존적 (dose-dependent) 방식으로 유도하였다. 3개의 모든 PPAR 아형 선택적 리간드가 단독 또는 조합하여 각질형성 세포 증식에 완만하게 영향을 미칠 뿐이다.

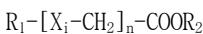
그러나, 본 특허출원은 본 발명의 화합물, 즉 티아-치환된 지방산 테트라데실티오아세트산 (TTA)이 각질형성 세포 분화 표지 유전자의 발현을 강하게 유도하고, 상기 각질형성 세포에 대한 상당한 항증식성 작용을 발휘하였음을 개시하고 있다.

따라서, TTA는 비정상 (aberrant) 분화를 특징으로 하는 각종 표피 장애를 치료하기 위한 중요한 화합물로서 유망할 수 있다.

본 발명은 결과적으로 비-세포 독성 농도의 개질된 지방산 유사체가 증식성 피부 질환을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용될 수 있음을 개시하고 있다.

본 발명은 증식성 피부 질환의 치료 및/또는 예방용 약제학적 조성물의 제조를 위한 하기 화학식 (I)의 지방산 유사체, 또는 그의 염, 프로드러그 (prodrug) 또는 캠플렉스의 용도에 관한 것이다:

화학식 I



상기 식에서,

R_1 은 하나 이상의 이중 결합 및/또는 하나 이상의 삼중 결합을 가진 C_1-C_{24} 알켄; C_1-C_{24} 알킨; 및/또는 C_1-C_{24} 알킬, 또는 C_1-C_{24} 알킬 또는 하나 또는 몇몇 위치에 플루오라이드, 클로라이드, 히드록시, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 알킬티오, C_2-C_5 아실옥시 또는 C_1-C_4 알킬을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물이 치환된 C_1-C_{24} 알킬이고,

R_2 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬이며,

n 은 1 내지 12의 정수이고,

i 는 홀수이며, $COOR_2$ 에 대해 상대적인 X 의 위치를 나타내고,

X_i 는 서로 독립적으로 O, S, SO, SO_2 , Se 및 CH_2 를 포함하는 군으로부터 선택되며,

단, X_i 중 하나 이상은 CH_2 가 아니고,

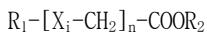
* R_1 이 알킨 또는 알켄이면, 탄소-탄소 삼중 결합 또는 이중 결합이 (ω -1) 탄소 및 (ω -2) 탄소 사이, 또는 (ω -2) 탄소 및 (ω -3) 탄소 사이, 또는 (ω -3) 탄소 및 (ω -4) 탄소 사이에 위치한다.

보다 구체적으로, 본 발명은 각질형성 세포의 분화 및 증식의 조절을 위한 화합물의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 바람직한 실시형태는 화합물 테트라데실티오아세트산 (TTA) 및 테트라데실셀레노아세트산 (TSA)에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 요지는 하기 화학식 (I)의 지방산 유사체, 또는 그의 염, 프로드러그 (prodrug) 또는 캠플렉스의 유효량을 필요로 하는 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 증식성 피부 질환의 치료 및/또는 억제를 위한 방법에 관한 것이다:

화학식 I



상기 식에서,

R_1 은 하나 이상의 이중 결합 및/또는 하나 이상의 삼중 결합을 가진 C_1-C_{24} 알켄; C_1-C_{24} 알킨; 및/또는 C_1-C_{24} 알킬, 또는 C_1-C_{24} 알킬 또는 하나 또는 몇몇 위치에 플루오라이드, 클로라이드, 히드록시, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 알킬티오, C_2-C_5 아실옥시 또는 C_1-C_4 알킬을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물이 치환된 C_1-C_{24} 알킬이고,

R_2 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬이며,

n 은 1 내지 12의 정수이고,

i 는 홀수이며, COOR_2 에 대해 상대적인 위치를 의미하고,

X_i 는 서로 독립적으로 0, S, SO, SO_2 , Se 및 CH_2 를 포함하는 군으로부터 선택되며,

단, X_i 중 하나 이상은 CH_2 가 아니고,

* R_1 이 알킨 또는 알켄이면, 탄소-탄소 삼중 결합 또는 이중 결합이 (ω -1) 탄소 및 (ω -2) 탄소 사이, 또는 (ω -2) 탄소 및 (ω -3) 탄소 사이, 또는 (ω -3) 탄소 및 (ω -4) 탄소 사이에 위치한다.

본 발명의 바람직한 실시형태는 본 발명의 화합물의 치료 유효 농도를 이러한 치료를 필요로 하는 포유류에게 국소 투여하는 것을 포함한다.

본 발명에서, 상기 증식성 피부 질환은 건선, 아토피성 피부염, 비-특이적 피부염, 1차 자극성 접촉 피부염, 알레르기성 접촉 피부염, 라멜라 어린선 (ichthyosis), 표피 박리성 과각화증 (epidermolytic hyperkeratosis), 전악성 (pre-malignant) 일광 유도 각화증 및 지루증 (seborrheic)을 포함하는 군으로부터 선택되는 질환을 포함한다.

실 시 예

실험 부분

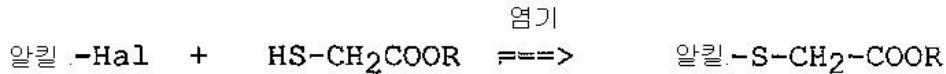
실시예 1. 화합물의 제조 및 특성화

3-치환된 지방산 유사체의 합성

치환기 $X_{i=3}$ 이 황 원자 또는 셀레늄 원자인 본 발명에 따라 사용된 화합물은 하기 일반적 절차에 따라 제조될 수 있다:

X가 황원자인 경우:

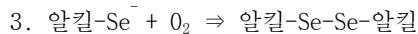
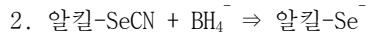
본 발명에 따라 사용되는 상기 티오-치환된 화합물은 후술하는 일반적 절차에 의해 제조될 수 있다.



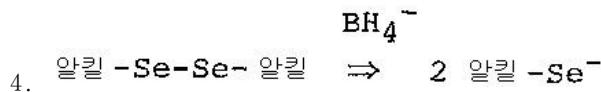
황-화합물, 즉 테트라데실티오아세트산 (TTA), $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-\text{S-CH}_2-\text{COOH}$ 는 EP-345.038에 나타낸 바와 같이 제조하였다.

X가 셀레늄 원자인 경우:

본 발명에 따라 사용된 셀레노-치환된 화합물은 하기의 일반적 절차에 따라 제조될 수 있다:



상기 화합물을 에탄올 또는 메탄올로 조심스럽게 결정화함으로써 정제하였다.



예를 들면 알킬이 테트라데실, $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-\text{Se-CH}_2-\text{COOH}$ (테트라데실셀리노아세트산: TSA))인 최종 화합물은 디에틸 에테르 및 헥산으로부터 결정화함으로써 정제될 수 있다.

본 발명에 따른 다른 화합물은 출원인 특허 출원 PCT/N099/00135 및 NO 20001123호에 기재된 대로 합성될 수 있다.

실시예 2

각질형성 세포의 분화 및 증식에 대한 TTA의 효과

재료 및 방법

세포 배양 및 분화

정상 성인 표피 각질형성 세포를 성형 수술 후 얻어진 인간 피부로부터 분리하였다. 먼저, 계대 (passage) 각질형성 세포를 무혈청 KGM (GIBCO BRL/Life Technologies, Inc)에서 성장시키고, 37°C에서 예비가온된 75cm² 배양 플라스크 또는 96-웰 마이크로티터플레이트 (microtiterplate)에 3500세포/웰의 밀도로 재도말 (replate)하였다. 세포들을 5% CO₂ 37°C의 습한 분위기에서 배양하였다. 세포가 40% 합류도 (confluence)에 도달하면, 이들을 선택적 PPAR 리간드 (상술한 바와 같이 단독 또는 조합하여), 테트라데실티오아세트산 (TTA) 또는 1,2 mM Ca²⁺을 함유한 성장 배지로 처리하였다. Wy14643를 Calbiochem으로부터 얻고, BRL49653을 J. Fleckner (Novo Nordisk)로부터 제공받았으며, L165041를 D. E. Moller (Merck Research Laboratories, Rahway, New Jersey)로부터 제공받았다. TTA를 실시예 1에 따라 제조하였다. 배지를 매일 교체하였다. 분화를 위해, 40% 합류도 (0 일)의 각질형성 세포를 1,2mM CaCl₂로 처리하였다. 배지를 2일 1회씩 교체하였다. HaCaT 세포를 L. Aarenstrup (Danish Cancer Society, 덴마크)로부터 얻었다. HaCaT 세포를 습도 5% CO₂ 및 37°C에서 10% 우태아 혈청 (FCS) 및 항생제 (100 μ/ml 페니실린, 1mg/ml 스트렙토마이신 황산염)를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)에서 배양하였다. 배지를 2일 1회씩 교체하였다.

각질형성 세포를 기저 및 상기저 세포로 분리

성형 수술로부터 얻은 정상 성인 피부를 지방 세척하고, 견갑골 (scapula)을 사용하여 표피 층을 통해 절단하였다. 상기 조직을 밤새 열음 상의 헹크스 (Hanks) 완충 식염수 용액에서 제조된 25U/ml 디스파아제 (dispase)

II (Roche)에서 배양하였다. 표피를 집게 (pincer)를 사용하여 박리하고, 표피 박리를 0.05mg/ml 트립신 (1:250, GIBCO BRL/Life Technologies, Inc) 37°C에서 단일 세포가 박리될 때까지 인큐베이션하였다. 트립신 활성을 혈청-함유 배지를 첨가함으로써 억제되었다. 상기 세포들을 800rcf에서 원심분리하였고, 예비 가온된 각질형성 세포-SFM (GIBCO BRL/Life Technologies, Inc)에서 재현탁하였다. 상기 세포 혼탁액을 래트 꼬리 콜라겐으로 코팅시킨 조직 배양 플라스크에 첨가하였다. 1시간 후, 상기 부착되지 않은 (non-attached) 세포를 상기저 분획으로서 수거하고, 부착 기저 세포를 고무 찰자 (rubber policeman)를 사용하여 수거하였다. 세포 펠렛을 사용하기까지 -70°C에서 동결시켰다.

생존률 및 증식성의 결정

Mosmann T (J Immunol Methods 65: 55-63, 1983)에 의해 소개된 MTT 변형 분석법에 의해 생존률/증식성을 측정하였다. Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이 없는 PBS 내 25 μl 의 5 mg/ml MTT (NaCl 8g/l, KCl 0.2g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.44g/l, KH2PO4. 2g/l, pH 7.4)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 성장 결정이 세포벽을 투과할 때까지 배양기에 두었다. 전형적으로 3 내지 4시간 후, 플레이트를 플리이크 (flick)하여 배지를 제거하고, 포르마잔 (formazan) 결정이 에탄올:아세톤 (60:40 w/w)에서 30분동안 4°C에서 부드럽게 진탕함으로써 용해될 때까지 2번 동결 해동하였다. 포르마잔의 양을 540nm에서 ELISA-리더 (reader)를 사용하여 정량화하였다. 650nm에서의 바탕값을 빼주었다.

ELISA에 의한 Tg-1 발현의 결정

세포를 2번의 동결-해동 주기 처리하고, 트랜스글루타미나아제 1형 (Tg-1)을 ELISA에 의해 결정하였다. 각 웰을 1시간 동안 37°C에서 PBS 내 200 μl 1% BSA로 차단한 다음, 37°C에서 1시간 동안 PBS-1% BSA에서 1:1000으로 희석된 100 μl Tg-1-특이적 단일클론성 (monoclonal) 항체 B.C1 (Biomedical Technologies Inc)와 함께 인큐베이션하였다. 웰들을 5분 동안 PBS-0.05% Tween 20에서 3회 세척하고, PBS-1% BSA에서 1:2500으로 희석된 100 μl 2차 양고추냉이 (horseradish) 페옥시다아제 결합된 (conjugated) 염소-항-마우스 항체와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 웰들을 PBS-0.05% Tween 20으로 3회 세척하고, PBS로 1회 세척하였다. 100 μl o-페닐렌디아민 (OPD) 기질 (substrate)을 첨가하고 30분 후, 암실에서 100 μl 2N 황산으로 반응 종결하였다. 트랜스글루타미나아제의 양을 490nm에서 ELISA-리더와의 OPD 반응을 정량화하고, 650nm에서의 바탕값을 빼줌으로써 측정하였다. 세포 수 변화를 보정하기 위해, 모든 값을 세포 수로 표준화하였다.

결과

CD36에 대한 효과

TTA 및 각종 PPAR 활성 인자가 공지의 PPAR 반응성 유전자의 발현 및 각질형성 세포의 분화에 어떻게 영향을 주는가 평가하기 위해, 본 발명자들은 최초로 CD36/FAT 및 PPAR 선택적 활성 인자 및 TTA로 처리된 NHK에서 2개의 분화 표지자, Inv and Tg-1의 mRNA의 수준을 3일에 걸쳐 측정하였다 (도 1a). CD36/FAT 유전자의 인접 프로모터가 PPAR 반응성 엘레먼트를 은닉하고 있는 것으로 밝혀졌다. BRL49653 (PPAR γ -리간드) 또는 Wy14643 (PPAR α -리간드)의 투여는 CD36/FAT의 발현을 유도하고, PPAR δ 선택적 리간드 L165041은 CD36/FAT이 PPAR δ 반응성 유전자임을 암시하는 CD36의 유의적인 투여량-의존적 발현을 유도하였다.

최종적으로, 본 발명의 화합물, 즉 TTA의 첨가는 CD36/FAT mRNA를 Wy14643 또는 BRL49653으로 관찰된 것보다 약간 높은 수준까지 발현을 유도하였다.

각질형성 세포 분화의 잘-확립되고 강력한 유도 인자인 CaCl_2 로 처리하였더니 CD36/FAT의 발현을 유도하지 못하였다.

Inv mRNA의 발현

도 1a에 나타낸 바와 같이, Wy14643로 처리하면 Inv mRNA 발현의 완만한 유도를 나타내었다. 중요한 것으로는, L165041의 첨가가 Inv mRNA 발현의 투여량-의존적 유도를 초래하는 반면에 BRL49653 단독 첨가는 Inv mRNA 발현에 대해 어떠한 효과도 갖지 않았다는 것이다. L165041 및 Wy14643의 동시 첨가는 Inv mRNA 발현 수준을 유의적으로 증가시키지는 못하였다. 유사하게, Wy14643 및 BRL49653의 조합 처리는 Wy14643 단독에 대해 관찰된 상술한 Inv mRNA 발현을 유도하지 못하였다. 주목할 만한 것은, L165041 및 BRL49653의 동시 첨가는 PPAR δ 및 PPAR γ 간의 상승작용을 나타내는 Inv mRNA 발현을 강하게 유도하였다는 것이다. 웨스턴 블로팅 (Western blotting)은 L165041에 의한 Inv 단백질의 투여량-의존적 유도 및 L165041 및 BRL49653 간의 강한 상승작용을

나타내는 RT-PCR에 의해 얻어진 결과를 주로 요약하였다 (도 1b). 각각의 PPAR-선택적 리간드는 Tg-1 mRNA 발현을 유도하였고, PPAR 선택적 리간드의 조합은 부가적 방식으로 발현을 유도하였다.

본 발명의 화합물인 TTA의 첨가는 Inv 및 Tg-1 mRNA의 발현을 PPAR 선택적 리간드로 처리하여 얻어진 수준을 유의적으로 초과하는 수준까지 유도하였다. TTA의 Inv 및 Tg-1 발현 유도 인자로서 강도는 웨스턴 블로팅에 의해 단백질 수준에서 발현이 분석될 때 훨씬 더욱 현저하였다 (도 1b). TTA는 CaCl₂로 처리할 때 관찰되었던 것보다 동등 또는 그 이상의 수준까지 Inv 및 Tg-1 mRNA 및 단백질 발현을 유도하였다는 것에 주목해야 한다. 이들 결과는 PPAR-의존성 경로를 통해 Inv 및 Tg-1 발현을 유도할 수 있다는 것 외에, TTA는 PPAR 리간드 및 활성 인자로서 TTA의 기능과 관련이 없는 메카니ズム에 의해 Inv 및 Tg-1 발현에 대한 뚜렷한 효과를 발휘하였음을 시사하고 있다.

TTA가 각질형성 세포 분화 표지자의 발현을 상향 조절하였기 때문에, 본 발명자들은 TTA 또는 상이한 아형-선택적 PPAR 활성 인자를 단독 또는 조합하여 처리하면 분화 단계의 초기에 NHK 형태에 영향을 주는지를 조사하였다 (도 2). 또한, Inv 및 Tg-1의 발현을 간접적인 면역 형광 현미경법 (immunofluorescence microscopy)에 의해 검사하였다 (도 3). 위상차 현미경 (phase contrast microscopy)에 의해 평가된 바와 같이, 3일 동안 리간드 또는 1.2mM CaCl₂로 처리된 NHK의 형태가 현저하게 다르지 않았다. 그러나, TTA로 처리된 디쉬 (dish)에서의 세포 밀도는 비히클 (vehicle) 처리된 세포 또는 PPAR-선택적 리간드로 처리된 세포에 비해 훨씬 낮았고, 이는 각질형성 세포 특이적 표지자를 유도하는 것은 별도로 TTA가 증식 속도에 있어 성장 정지 (growth arrest) 또는 감소를 초래하였다는 것을 의미한다.

웨스턴 블로팅, 간접 면역 형광 현미경법에 의해 얻어진 결과를 확증하면, CaCl₂- 및 TTA 처리된 세포에서 Inv 및 Tg-1의 비견할만한 발현 수준을 나타내었다. 더욱이, 이러한 분석을 통해 PPAR δ 선택적 리간드 L165041이 투여량-의존성 방식으로 Inv 발현을 유도하였음을 알 수 있었다.

각질형성 세포의 분화는 세포 크기 증가와 관련이 있다. 중요한 것은, CaCl₂ 및 TTA 처리된 세포의 형태를 조심스럽게 비교하면, TTA-처리된 세포의 세포질 (cytoplasmic) 대 핵의 비율이 CaCl₂-처리된 세포의 비율보다 작아지는 경향이 있었음을 알 수 있었다. 따라서, CaCl₂ 및 TTA로 처리했을 때 각질형성 세포 표지 유전자의 겹침 세트 (overlapping set)를 유도하였더라도, 이러한 관찰은 TTA 및 CaCl₂가 각질형성 세포 분화에 대한 차등 효과를 발휘함을 암시하고 있다. 각질형성 세포 증식에 대한 PPAR 선택적 리간드 및 TTA의 효과를 보다 정량적인 방식으로 검사하기 위해, NHK 세포를 도 3에 나타낸 바와 같이, PPAR 리간드, TTA 및 CaCl₂로 처리하였으며, 증식을 재료 및 방법편에서 기재한 바와 같은 MTT 분석법의 변형법을 사용하여 분석하였다. 동시에, Tg-1의 발현을 ELISA-기초로 하는 분석법을 사용하여 관찰하였다 (도 3b).

주목할 만한 것은, TTA가 PPAR 선택적 리간드에 대해 관찰된 것보다 훨씬 초과하는 NHK 세포 증식의 강력하고 투여량-의존적 억제를 발휘하였다는 것이다. 이들 실험에서 CaCl₂의 항증식 작용은 무시할 만하였다. RT-PCR 및 웨스턴 블로팅에 의해 얻어진 상기 결과를 요약하면, TTA 및 CaCl₂ 만이 Tg-1 발현을 유의적으로 유도하였다. 따라서, MTT 분석을 사용하여 얻어진 결과는 PPAR-선택적 리간드로부터 TTA를 명백하게 구별하였고, TTA가 NHK 세포 증식을 강하게 억제하고, 각질형성 세포 분화 표지 유전자의 발현을 강력하게 유도한다는 개념을 구체화하였다.

본 발명의 화합물로 피부 증식 질환을 가진 숙주를 치료하는 효과는 표피 탈락 (desquamation) 및 홍반의 개선, 병변의 감소 뿐 아니라 가려움증 (itching)의 중단과 같은 주관적 기준에 의해 평가될 수 있다. 건선 환자의 치료 효과를 확립하기 위해 사용되는 객관적 방법은 플라크의 분해를 시각적 관찰 및 사진 촬영하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

<42> 도 1은 표피 분화 특이적 유전자 및 CD36의 유도를 나타내는 도면이다.

<43> 도 2는 TTA 및 선택적 PPAR 리간드로 치료된 각질형성 세포의 분화 특이적 유전자의 형태 및 발현을 나타내는 도면이다.

<44> 도 3은 TTA가 후기 표피 분화 표지자 Tg-1을 유도하고, 각질형성 세포의 증식을 억제하는 것을 나타낸다.

본 발명의 화합물 투여

약제학적 약제로서, 본 발명의 화합물은 비경구, 비강내, 경구 또는 피부를 통한 흡수와 같이 임의의 적절한 기술에 의해 포유류에 직접 투여될 수 있다. 이들은 국소적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 각 제제의 특정 투여 경로는 예를 들면 포유류의 의학적 이력에 따라 달라질 것이다.

바람직하게는, 본 발명의 화합물은 국소 투여된다.

본 발명의 화합물은 크림, 연고, 오일 또는 기타 적합한 담체 및/또는 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 이들의 혼합물과 같은 희석제로 제조되는 분산액으로 투여될 수 있다.

국소 사용을 위해 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액(수용성) 또는 분산액 및 국소 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 분말을 포함한다. 모든 경우에 있어서, 상기 형태는 비록 절대적인 요건은 아니지만 바람직하게는 멸균 상태이며, 제조 및 저장 상태에서도 안정하다. 담체는 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적절한 혼합물 및 액체 오일을 함유하는 용매 또는 분산액 매질일 수 있다. 적정한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 코팅을 사용하고, 분산액의 경우 소정의 입도를 유지하며, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 각종 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤(paraben), 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로잘(thimerosal) 등에 의해 미생물 작용을 예방할 수 있다. 다수의 경우, 등장제(isotonic agent), 예를 들면 설탕 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다.

국소 용액은 본 발명의 화합물을 각종 상기 열거한 각종 기타 성분과 함께 적절한 용매에 필요량으로 혼입하고, 경우에 따라 이후 필요한 여과 멸균함으로써 제조된다.

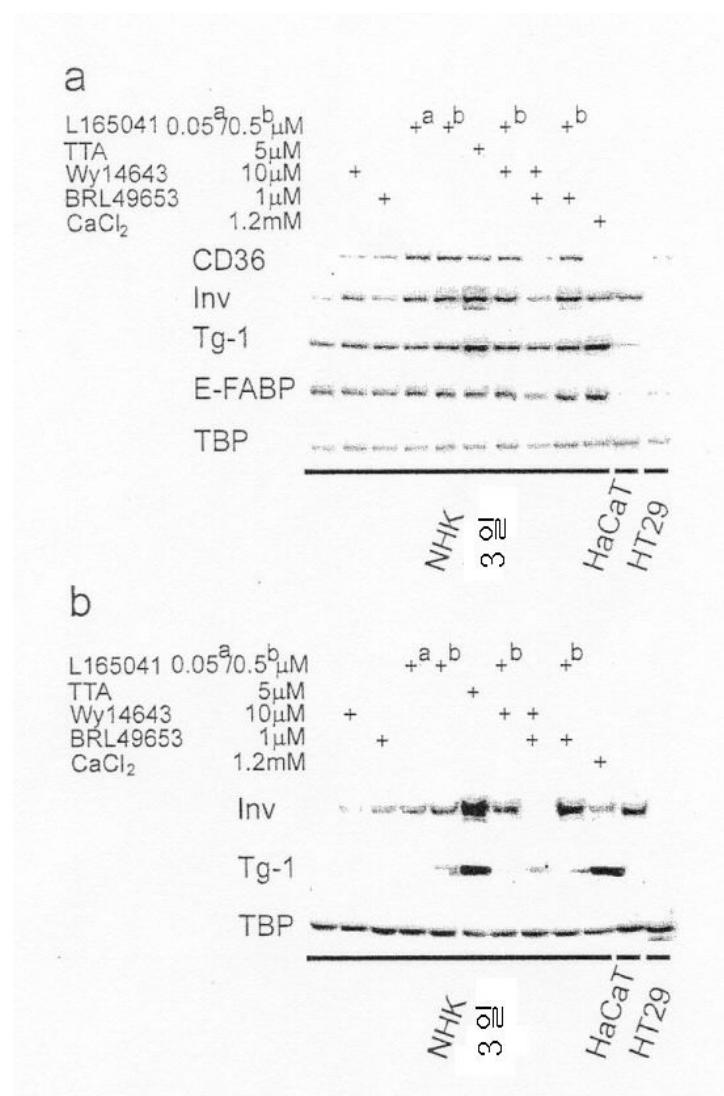
본 명세서에 사용된 "약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제"는 임의의 모든 용매, 분산액 매질, 수용액, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 종래의 매질 또는 제제가 상기 활성 성분과 상용적이지 않은 경우를 제외하고는, 약제학적 조성물에서의 이들의 사용이 고려된다.

또한, 본 발명의 화합물은 증식성 피부 장애를 제거하거나 또는 예방하기 위해 다른 치료제와 병용하여 적절히 투여된다.

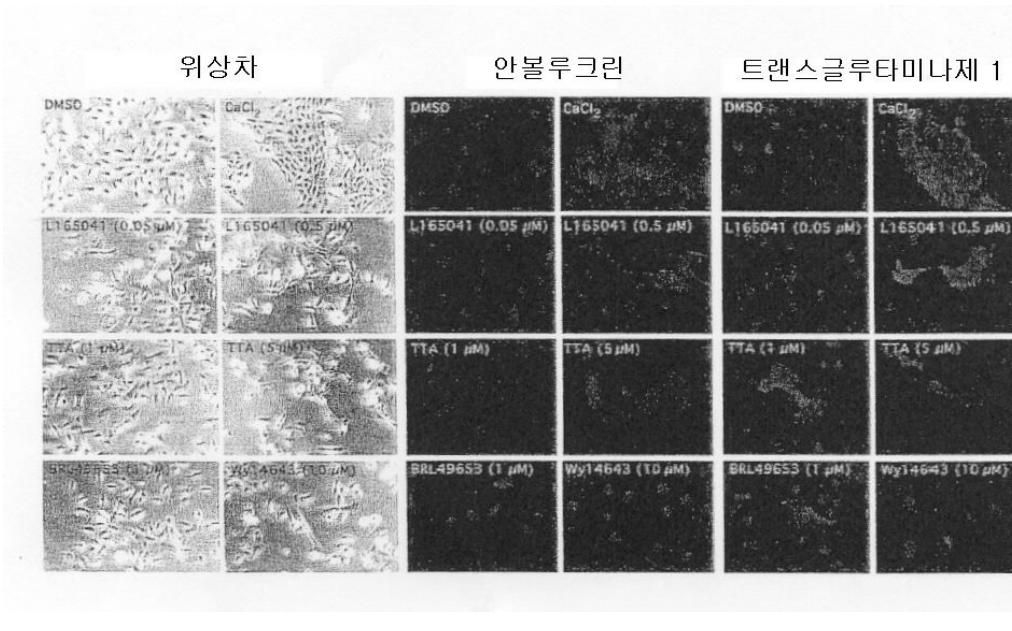
본 발명은 하기 실시예를 참조로 하여 보다 잘 이해될 것이다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명의 범위를 억제하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

도면

도면1



도면2



도면3

