

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0037122

(43) 공개일자 2025년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/41 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)*A61K 8/49* (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)*A61P 29/00* (2023.01) *A61Q 19/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/41 (2013.01)*A23L 33/10* (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0119547

(22) 출원일자 2023년09월08일

심사청구일자 2023년09월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

임동순

서울특별시 광진구 광나루로 410, 1307호 (화양동, KCC파크타운)

손소은

경상남도 김해시 계동로 86, 506동 403호 (대청동, 갑오마을부영아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

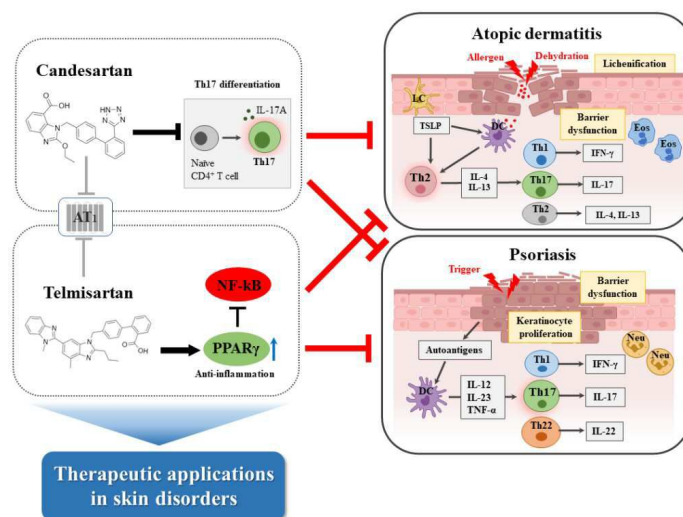
(54) 발명의 명칭 칸데사르탄을 함유하는 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 칸데사르탄을 함유하는 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 칸데사르탄 또는 이의 약학적/식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 치료용 약학 조성물, 화장료 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 조성물은 T 세포의 헬퍼 T 세포 17 (Th17) 세포로의 분화를 억제함으로써, 우수한 항염증 또는 항알레르기 활성을 가져 아토피성 피부염 또는 건선을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 8/494 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711168207
과제번호	2019R1A2C1005523
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	아토피 피부염과 Treg 세포 조절자로서 FFA4와 S1P2의 메카니즘 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

T 세포의 헬퍼 T 세포 17 (Th17) 세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

Th1, Th2, Th22 또는 Th17 관련 사이토카인의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

비만 세포의 침윤을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

Ki-67 양성 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 칸데사르탄의 피부질환 치료 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 칸데사르탄 또는 이의 약학적/식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부염 또는 건선 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 안지오텐신 II 수용체 차단제(angiotensin II receptor blocker, ARB) 또는 AT₁ 수용체 길항제(AT₁ receptor antagonist)는 레닌-안지오텐신계를 조절하는 약물 중 하나이다. 주로 고혈압 치료에 사용되며, 당뇨병성 신장 질환(diabetic nephropathy)과 울혈성 심부전(congestive heart failure)의 치료에도 사용되기도 한다. ARB는 다발성 경화증, 자가면역 뇌척수염 및 관절염 모델을 포함한 염증성 질환 동물 모델에서 염증 반응에 대한 억제 효과를 가지며, 최근 전신 염증 및 알레르기 반응에서 ARB의 잠재적 이점을 연구하였으나, 아직까지 아토피 피부염 및 건선과 같은 염증성 피부질환에 대한 효능은 밝혀지지 않았다.
- [0003] 아토피 피부염(atopic dermatitis) 또는 건선 피부염(psoriasis)은 유전적, 환경적, 면역학적인 원인에 의해 발생하고, 피부 가장 바깥에서 보호벽 역할을 하는 각질층에 이상이 생긴 것으로 건조한 기후에서 더욱 심해지는 알레르기 질환이다. 아토피, 건선 피부염은 전 세계적으로 약 10~20%의 유병률을 보이며, 생후 1개월에서 1년 사이의 유아에게서 주로 발병하고 3세가 되면 어느 정도 완화되나, 생활환경, 개인차 등에 의해 다시 재발할 수 있다.
- [0004] 이들의 주요 증상은 심한 가려움증, 피부 건조, 발진, 진물, 부스럼딱지, 비늘 같은 껍질이 있는 피부(인비늘) 등으로 주로 만성 피부염증이 동반된다. 가려움에 의한 환자의 긁는 행동으로 인해서 피부 장벽이 붕괴되고 2차 감염을 유발하여 염증이 더욱 악화된다. 이들의 증상은 일시적으로 완화될 수 있지만, 환경 및 식품 등의 자극 원에 의해서 재발되어 악화될 수 있으며, 악화와 완화가 반복될 수 있다.
- [0005] 아토피성 피부염 또는 건선 피부염에 대한 처방은 스테로이드제, 항히스타민제, 항생제 등과 같은 약물요법이 주로 이루어지고 있다. 스테로이드제(부신피질호르몬제)는 크게 소염작용과 면역억제 작용이 있고 효과가 우수하지만, 장기간 바르면 피부 약화, 전신 호르몬 증상, 중독성 등의 부작용이 나타날 수 있다.
- [0006] 이에, 부작용 없이 안전하고 효과적인 아토피성 피부염 또는 건선 피부염의 치료제가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0129025호 (2009년12월16일 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 종래 고혈압 치료제로 사용되던 안지오텐신 II 수용체 차단제인 칸데사르탄의 신규한 용도로, 아토피성 피부염 또는 건선의 개선 또는 치료에 우수한 효과를 가지는 물질을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따른 조성물은 T 세포의 헬퍼 T 세포 17 (Th17) 세포로의 분화를 억제함으로써, 우수한 항염증 또는 항알레르기 활성을 가져 아토피성 피부염 또는 건선의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학 조성물, 화장료 조성물 및 건강기능식품 조성물로 활용할 수 있다.
- [0013] 본 발명에 따른 조성물은 T 세포의 Th17 세포로의 분화 억제 활성을 규명한 바, 나아가 이와 관련된 질환의 치료제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1은 귀 조직의 아토피성 피부염 유사 반응에 대한 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB)의 영향을 확인한 것으로, (A)는 실험 계획을 나타낸 개략도, (B)는 실험 49일째 귀의 거시적 관찰 이미지, (C)는 49일째 생쥐 귀 피부 조직의 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색 이미지, (D)는 조직 섹션에서 귀 피부 두께 측정 그래프로, 그래프는 평균값의 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다 ($n = 5$). (** $P < 0.001$ vs. vehicle 처리군, ### $P < 0.001$ vs. CDNB 처리군, \$\$\$ $P < 0.001$ vs. 텔미사르탄 처리 그룹)

도 2는 귀의 비만 세포 축적 및 염증성 사이토카인 수준에 대한 ARB의 영향을 확인한 것으로, (A)는 49일째 귀 피부 샘플의 톨루이딘 블루 O (TBO) 염색 결과, (B)는 다른 조직 섹션에서 비만 세포 수, (C)는 인터루킨(IL)-4, (D)는 IL-13, (E)는 인터페론(IFN)- γ , (F)는 IL-17A의 발현 수준을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$ vs. CDNB 처리군; \$\$\$ $P < 0.001$, \$\$ $P < 0.01$ vs. 텔미사르탄 치료군).

도 3은 림프절의 크기와 림프절의 염증성 사이토카인 수준에 대한 ARB의 영향을 확인한 것으로, (A)는 49일째에 분리된 경부 림프절의 사진, (B)는 분리된 림프절의 무게, (C)는 IL-4, (D)는 IL-13, (E)는 IL-17A, (F)는 IFN- γ 의 발현 수준을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$ vs. CDNB 처리군; \$\$\$ $P < 0.001$, \$\$ $P < 0.01$ vs. 텔미사르탄 치료군).

도 4는 Naive T 세포의 T 헬퍼(Th)-17 세포로의 분화에 대한 ARB의 영향을 확인한 것으로, (A)는 유세포분석 결과이고, (B)는 $CD4^+IL-17A^+$ 세포 집단의 히스토그램으로, 데이터의 Gaussian distribution assumption은 Kolmogorov-Smirnov(KS) 테스트를 사용하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, # $P < 0.05$ vs. Th17 분화 배지 처리군).

도 5는 피부의 건선 피부염 유사 반응에 대한 ARB의 효과를 확인한 것으로, (A)는 실험 계획을 나타낸 개략도, (B)는 처리 6일 후 마우스 등 피부의 거시적 관찰 이미지, (C)는 7일째 두께, 홍반, 스케일링 및 총 건선 면적 및 중증도 지수(PASI) 점수 그래프로, Bonferroni multiple comparison post-hoc test와 함께 two-way analysis of variance로 분석되었고, 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)으로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs. 이미퀴모드 처리군).

도 6은 건선 피부의 조직학적 변화에 대한 ARB의 영향을 확인한 것으로, (A)는 등 피부의 H&E 염색 이미지로, 이미퀴모드-처리된 그룹에서 표피능이 길어지고 곤봉화가 관찰될 뿐만 아니라 중증도 내지 중증 피부 림프구 침윤이 관찰되었다. (B)는 Ki-67 염색 이미지로, 빨간색 화살표는 Ki-67 양성 세포를 나타낸다. (C)는 표피 두께, (D)는 $Ki-67^+$ 세포 수의 히스토그램으로 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)으로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$ vs. imiquimod 처리군).

도 7은 피부의 Th17 및 Th1 관련 사이토카인 수준에 대한 ARB의 영향을 확인한 것으로, 이미퀴모드 유도 및 ARB 처리 마우스로부터 분리된 피부 조직에서 Th17 (IL-17A, IL-23 및 IL-22) 및 Th1 (IFN- γ , 종양 괴사 인자 [TNF]- α 및 IL-1 β)과 관련된 사이토카인의 mRNA 발현 수준에 대한 qRT-PCR 분석 결과이다. (A) IL-17A, (B) IL-23, (C) IL-22, (D) IFN- γ , (E) TNF- α 및 (F) IL-1 β . GAPDH 전사 수준에 대한 수준의 비율을 계산하여 사이토카인의 상대적 mRNA 수준이 정량화되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)으로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs. 이미퀴모드 처리군).

도 8은 림프절과 비장의 크기 및 $CD4^+IL-17A^+$ T 세포 집단에서의 ARB의 영향을 확인한 것으로, (A)는 배액 림프절의 형태학적 변화를 평가한 것이고, (B)는 림프절의 무게, 및 (C)는 림프절에서 $CD4^+IL-17A^+$ T 세포의 백분율이며, (D)는 비장의 형태학적 변화를 확인한 것이고, (E)는 비장의 측정된 무게, 및 (F)는 비장에서 $CD4^+IL-17A^+$ T 세포의 백분율을 나타낸 것이다. 데이터의 Gaussian distribution assumption은 KS 테스트를 사용하여 확인되었고, 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)으로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs. 이미퀴모드 처리군).

도 9는 림프절에서 Th17 및 Th1 관련 사이토카인 수준에 대한 ARB의 영향을 확인한 것으로, (A) IL-17A, (B)

IL-23, (C) IL-22, (D) IFN- γ , (E) TNF- α 및 (F) IL-1 β 의 수준을 나타내며, 이는 GAPDH 전사 수준에 대한 수준의 비율을 계산하여 사이토카인의 상대적 mRNA 수준이 정량화되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차 (SEM)으로 표시되었다 ($n = 5$) (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. vehicle 처리군; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs. 이미퀴모드 처리군).

도 10은 칸데사르탄과 텔미사르탄의 아토피 및 건선성 피부염 치료 효과를 나타낸 개략도로, 칸데사르탄은 naive T 세포의 Th17 세포로의 분화를 억제하여 아토피성 피부염과 건선을 억제하여 IL-17 생성을 감소시키고 동시에 Th1/Th2/Th22 사이토카인을 억제하며, 텔미사르탄은 PPAR- γ 를 활성화하여 NF- κ B 활성화를 억제하여 결과적으로 염증성 사이토카인 생산을 억제함으로써 아토피성 피부염과 건선을 억제한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0017] 본 발명자는 안지오텐신 II 수용체 차단제 (angiotensin II receptor blocker, ARB)의 피부질환에서의 생체 내 항염증 효과를 확인하기 위해, 1-클로로-2,4-디니트로벤젠(CDNB)으로 유발된 아토피성 피부염, 이미퀴모드(imiquimod)로 유발된 건선 유사 피부 모델에 대한 칸데사르탄과 텔미사르탄의 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0019] 본 명세서에서, "예방"이란, 본 발명에 따른 약학 조성물, 화장료 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 아토피성 피부염, 건선 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

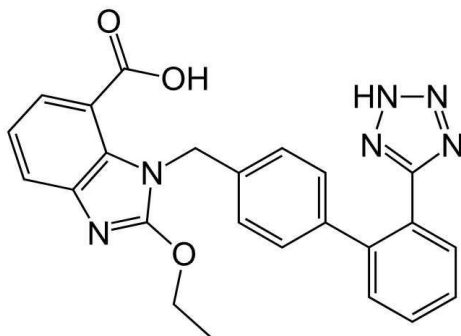
[0020] 본 명세서에서, "치료"란, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 아토피성 피부염, 건선 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0021] 본 명세서에서, "개선"이란, 본 발명에 따른 화장료 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 아토피성 피부염, 건선 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0023] 본 발명은 칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

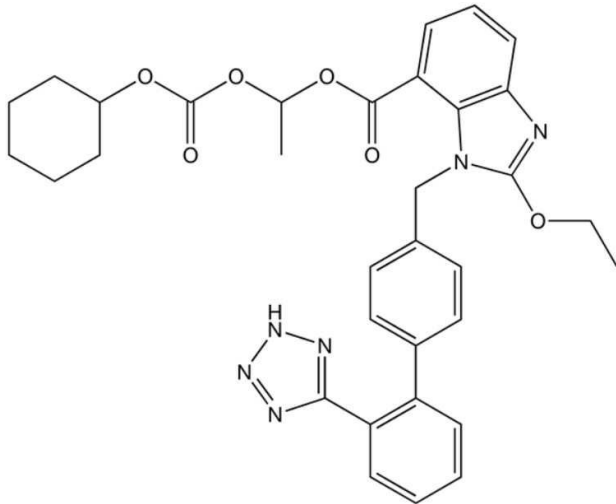
[0024] 본 명세서에서, "칸데사르탄(Candesartan)"이란, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물로, 주로 고혈압, 심부전 치료에 사용되는 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB)이다.

[0025] <화학식 1>



[0027] 바람직하게는, 상기 칸데사르탄은 하기 화학식 2로 표시되는 칸데사르탄 실렉세틸(candesartan cilexetil)의 형태로 함유되어 작용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] <화학식 2>



[0029]

[0030] 상기 칸데사르탄은 당업계에서 잘 알려진 방법으로 합성될 수 있고, 시판중인 것을 선택하여 사용할 수 있으나, 그 방법 또는 물질은 특별히 한정되지 않는다.

[0031] 상기 칸데사르탄은 이와 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서, "약학적 또는 식품학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없어, 인간에게 투여하기에 적합한 안전성 및 효능 프로파일을 갖는 염을 의미한다.

[0033] 상기 염은 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염기성 염 또는 산성염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 염기성염은 유기 염기염, 무기 염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0034] 산성염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 이중 인산, 질산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 말산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산, 스테아르산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함될 수 있다.

[0035] 또한, 상기 칸데사르탄은 상기의 염 뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물, 유도체 등을 모두 포함할 수 있다. 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있고, 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹여 과량의 유기염기를 가하거나 무기염기의 염기 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또는 이 혼합물에서 용매나 과량의 염기를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 상기 조성물은 T 세포의 헬퍼 T 세포 17 (Th17) 세포로의 분화를 억제함으로써, 항알레르기 또는 항염증 활성을 가져 아토피성 피부염, 건선 또는 이들의 증상을 개선하거나 억제할 수 있다. Th17 세포로의 분화를 억제함으로써, IL-17 생성을 감소시킬 수 있고, 더불어, Th1, Th2, Th22 또는 Th17 관련 사이토카인의 생성을 억제할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 칸데사르탄은 아토피성 피부염과 관련된 Th1, Th2, 또는 Th17 관련 사이토카인인 IL-4, IL-13, IFN- γ , 또는 IL-17A의 mRNA 발현 수준을 감소시킴을 확인할 수 있다. 또한, 칸데사르탄은 건선과 관련된 Th1, Th22 또는 Th17 관련 사이토카인인 IL-17A, IL-23, IL-22, IFN- γ , TNF- α 또는 IL-1 β 의 mRNA 발현 수준을 감소시킴을 확인할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 비만 세포의 침윤을 억제하고, Ki-67 양성 세포의 증식을 억제할 수 있다.

- [0039] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 본 발명에 따른 칸데사르탄은 또 다른 안지오텐신 II 수용체 차단제인 텔미사르탄보다 아토피성 피부염 또는 건선에 대해 우수한 치료 효과를 가짐을 확인할 수 있고, 이때 텔미사르탄이 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor)의 활성화를 통해 아토피성 피부염 또는 건선에 작용하는 것과는 달리, 칸데사르탄은 Th17 세포로의 분화를 억제함에 따른 효과로 그 작용 메커니즘이 상이함을 확인할 수 있다.
- [0040] 즉, 안지오텐신 II 수용체 차단제라도 항알레르기 또는 항염증 활성화에 대한 작용 메커니즘이 상이할 수 있으며, 칸데사르탄의 Th17 세포로의 분화 억제를 통한 아토피성 피부염 또는 건선의 치료는 본 발명에서 처음 규명한 것이다.
- [0042] 본 명세서에서, "약학 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 아토피성 피부염, 건선 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다
- [0043] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 봉해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 칸데사르탄 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로든 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0045] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0047] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0049] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0051] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만, 일반적으로 0.001 내지 1000mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 100mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에 따른 약학 조성물은 아토피성 피부염 또는 건선이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를

들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.

- [0055] 본 발명에 따른 약학 조성물은 아토피성 피부염 또는 건선의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명은 칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0058] 상기 조성물은 T 세포의 헬퍼 T 세포 17 (Th17) 세포로의 분화를 억제함으로써, 아토피성 피부염 또는 건선에 대해 우수한 개선 효과를 가지는 바, 아토피성 피부염 또는 건선의 예방 또는 개선을 위한 화장료 조성물로 활용될 수 있다.
- [0059] 본 명세서에서, "화장료"란, 피부보호, 피부보습, 아토피성 피부염 또는 건선 피부염 개선의 효과를 가지는 기능성 화장료를 포함할 수 있고, 상기 기능성 화장료는 일반 화장료와 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 것으로, 피부보호, 피부보습, 아토피성 피부 개선 등 특정 효능과 효과가 강조된 화장료를 의미한다.
- [0061] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 식품의약품안전처에 등록된 화장품 원료 리스트 및 ICID(국제화장품 원료집)에 등재되어 있는 성분 중에서 1종 이상을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 유기 용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 방향제, 계면활성제, 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제, 방부제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 염료 및 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 하나 이상 더 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 비타민은 수용성 또는 유용성 비타민을 포함할 수 있고, 상기 수용성 비타민은 수용성 비타민으로서 화장품에 배합 가능한 것으로, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민C, 비타민 H 등을 들 수 있다. 또한, 그들의 염 (티아민염산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체(아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 포함될 수 있고, 상기 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 화장수, 유액, 로션, 크림, 페이스트, 젤, 용액, 현탁액, 오일, 왁스, 팩, 파우더, 파운데이션, 스프레이, 계면활성제-함유 클렌징 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 더욱 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 수렴 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 밀크 로션, 파우더, 에센스, 아이 크림, 선로션, 선크림, 메이크업 프라이머, 메이크업 베이스, 비비크림, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징 워터, 비누, 팩, 스틱상 제품, 밤(Balm) 타입 제품, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따른 화장료 조성물이 크림 또는 젤 제형인 경우에는 담체 성분으로 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등을 더 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 화장료 조성물이 용액 또는 유탁액 제형인 경우에는 용매, 용매화제 또는 유탁화제로, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르 등을 더 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 화장료 조성물이 현탁액 제형인 경우에는 담체 성분으로 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등을 더 포함할 수 있다.

- [0069] 상기 화장료 조성물이 파우더 또는 스프레이 제형인 경우에는 담체 성분으로 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더를 더 포함할 수 있고, 특히 스프레이 제형인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체를 더 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 화장료 조성물이 계면활성제-함유 클렌징 제형인 경우에는 담체 성분으로 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등을 더 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 단독 또는 중복으로 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명은 칸데사르탄(Candesartan) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아토피성 피부염 또는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0075] 상기 조성물은 T 세포의 헬퍼 T 세포 17 (Th17) 세포로의 분화를 억제함으로써, 아토피성 피부염 또는 건선에 대해 우수한 개선 효과를 가지는 바, 아토피성 피부염 또는 건선의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물로 활용될 수 있다.
- [0076] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 아토피성 피부염 또는 건선의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.
- [0078] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 아토피성 피부염 또는 건선의 예방 또는 개선 목적으로, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [0079] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과일 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제(식품 첨가물) 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정할 수 있다. 상기 '식품첨가물공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0082] 상기 기타 보조 성분은 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 건강기능식품에 함유된 상기 칸데사르탄의 유효 용량은 아토피성 피부염 또는 건선의 예방 또는 개선 등 그 사용 목적에 따라 적절하게 조절될 수 있다.

[0085] 상기 건강기능식품 조성물은 식품을 원료로 하여 일반 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 아토피성 피부염 또는 건선의 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0087] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0089] <실험방법>

[0090] 1. 재료

[0091] 칸데사르탄 실렉세틸 (candesartan cilexetil; 분자량 610.66, SML0245, $\geq 98\%$ 고성능 액체 크로마토그래피 [HPLC], Pubchem ID 329825255), 텔미사르탄 (telmisartan; 분자량 514.62, T8949, $\geq 98\%$ HPLC, Pubchem ID 329826889), GW9662 (분자량 495.57, G5668, $\geq 98\%$ HPLC, Pubchem ID 24278789), 올리브 오일, 1-클로로-2,4-디니트로벤젠 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB), 기타 재료는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0093] 2. 동물

[0094] 수컷 BALB/c 마우스 (생후 7주, 그룹당 $n = 5$)는 Daehan Biolink Co., Ltd.(Seoul, Korea)에서 구입하여 경희대학교 실험 동물 시설에서 관리하였다. 모든 동물은 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도와 $60 \pm 5\%$ 의 습도에서 12시간의 명암 주기로 수용되었으며 표준 실험실 사료와 물이 자유식으로 제공되었다. 경희대학교의 동물관리위원회는 본 실험을 위한 동물실험계획서 (승인번호 KHSASP-20-372, KHSASP-22-064)를 검토 및 승인하였다.

[0096] 3. BALB/c 마우스에서 아토피성 피부염 유사 반응의 유도

[0097] 아세톤과 올리브 오일 (3:1) 혼합물에 제조된 CDNB의 국소 적용으로 마우스에서 아토피성 피부염을 유도하였다. 순응 1주 후, CDNB로 유도된 아토피성 피부염이 있는 마우스를 무작위로 다음 7개 그룹으로 분류하였다 (그룹당 $n = 5$):

[0098] vehicle (아세톤과 올리브 오일의 3:1 혼합물)-, CDNB-, 칸데사르탄(candesartan)/CDNB-, 텔미사르탄 (telmisartan)/CDNB-, GW9662/CDNB-, GW9662/candesartan/CDNB- 및 GW9662/telmisartan/CDNB-처리군.

[0099] 요약하면, 0일째에 마우스의 복부 털을 제거하고 복부 피부에 면역원으로 1% CDNB 용액 ($300 \mu\text{L}$)을 적용하여 감작하였다. 7일째부터 격일로 0.3% CDNB ($200 \mu\text{L}$)를 귀에 적용하여 아토피성 피부염 유사 피부 병변을 유발하였다. 칸데사르탄 (10 mg/kg 체중), 텔미사르탄 (10 mg/kg 체중), GW9662 (1 mg/kg body weight)는 19일째부터 실험이 완료될 때까지 CDNB 유발 30분 전에 복강내 주사로 투여되었다. 49일째에 모든 마우스를 희생시켰다.

[0101] 4. BALB/c 마우스에서 건선 유사 반응의 유도

[0102] 8주령의 수컷 BALB/c 마우스를 무작위로 다음 4개 그룹으로 분류하였다 (그룹당 $n = 5$):

[0103] vehicle-, 이미퀴모드(imiquimod)-, 칸데사르탄(candesartan)/이미퀴모드(imiquimod)-, 텔미사르탄 (telmisartan)/이미퀴모드(imiquimod)-처리군

[0104] 0일째에 마우스의 등쪽 털을 면도하였다. 1일째부터 62.5mg의 5% 이미퀴모드 크림 (알다라 크림, 동아에스티)을 6일 동안 매일 도포하여 건선 유사 피부 염증을 유발하였다. Vehicle 처리군에는 vehicle 크림(바셀린)을 도포하였다. 칸데사르탄과 텔미사르탄 (각각 10mg/kg 체중)을 이미퀴모드 크림을 6일 동안 적용하기 30분 전 복강내

투여했다. 7일째에 마우스를 희생시켰다.

[0105]

실험 기간 동안 피부 염증은 건선 병변과 중증도 지수(PASI)를 기준으로 홍반, 인설, 피부 두께를 0-4 (0, 없음, 1, 경미함, 2, 보통, 3, 심함, 4, 매우 심함)의 점수로 평가하였다. 총 PASI 점수는 심각도 점수(0-12)를 합산하였다. 귀 두께는 H&E 염색 현미경 사진을 사용하여 측정되었다. 평균값은 마우스당 5회 측정하여 계산되었다.

[0107]

6. 조직학 및 면역조직화학

[0108]

피부 염증의 조직학적 평가를 위해 왼쪽 귀와 등쪽 피부 조직을 10% 포르말린으로 고정하였다. 피부 조직을 4℃에서 2일 동안 30% 수크로스(sucrose) 용액에서 탈수하고 최적 절삭 온도 화합물(optimal cutting temperature compound)에 포매하고 8μm 두께로 절편을 제작하였다. 조직 절편을 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) (H&E) 또는 톨루이딘 블루 0 (toluidine blue 0; cat. T3260; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 로 염색하여 피부의 비대와 비만 세포를 확인하였다. 각 그룹의 5마리 생쥐의 귀 조직을 검사하였다.

[0109]

Ki-67의 면역조직화학적 염색을 위해, 조직 절편을 0.5% Tween-20이 함유된 인산완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS-T)으로 세척하였다. 그 후, 5% 소혈청알부민(bovine serum albumin)이 함유된 PBS-T로 실온에서 30분 동안 조직 절편을 블로킹하였다. 조직 절편을 Ki-67 recombinant rabbit monoclonal antibody (MA5-14520, Invitrogen)로 실온에서 1시간 동안 표지하였다. VECTASTAIN Elite ABC Kit (PK-6101, Vector Laboratories)를 염색에 사용했다. ImmPACT DAB substrate (SK-4105; Vector Laboratories)와 함께 조직 슬라이드를 실온에서 10분 동안 배양하여 과산화효소 반응 생성물 시각화에 사용하였다. 마지막으로, 슬라이드를 헤마톡실린으로 대조 염색하였다.

[0111]

7. 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

[0112]

역전사(RT)-PCR로 마우스의 림프절과 피부에서 염증 마커의 발현 수준을 결정하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 전체 RNA로부터 합성되었고 TRIzol 시약 (Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 분리되었다. 총 RNA는 림프절과 피부 조직에서 분리되었고 mRNA는 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA로 전사되었다. 정량적 PCR은 Thunderbird Next SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) 및 CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였다. Thermal-cycling 조건은 다음과 같다: 95℃에서 4분 동안 1 cycle, 95℃에서 30초 및 57℃에서 30초 동안 40 cycle, 95℃에서 30초 동안 1 cycle. 각 유전자의 발현은 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 발현에 대해 정규화되었다. 얻어진 데이터는 CFX Maestro Software의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 분석하였다. 프라이머 서열은 표 1에 표시하였다.

표 1

[0113]

마우스 프라이머		서열
Il-4	forward	5' -CCAAGGTGCTTCGCATATTT-3'
	reverse	5' -ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT-3'
Il-13	forward	5' -CAGCATGGTATGGAGTGTGG-3'
	reverse	5' -AGGCCATGCAATATCCTCTG-3'
Il-17A	forward	5' -AGCTGGACCACCACATGAAT-3'
	reverse	5' -AGCATCTTCTCGACCCTGAA-3'
Il-22	forward	5' -CCGAGGAGTCAGTGCTAAGG-3'
	reverse	5' -CATGTAGGGCTGGAACCTGT-3'
Il-23	forward	5' -GACCCACAAGGACTCAAGGA-3'
	reverse	5' -CATGGGGCTATCAGGGAGTA-3'
Il-1β	forward	5' -CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3'
	reverse	5' -TGTCCTCATCCTGGAAGGTC-3'
Ifn-γ	forward	5' -CACGGCACAGTCATTGAAAG-3'
	reverse	5' GTCACCATCCTTTTGCCAGT-3'
Tnf-α	forward	5' -ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'
	reverse	5' -AGATAGCAAATCGGCTGACG-3'
Gapdh	forward	5' -AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'

reverse	5' -GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'
---------	-----------------------------

[0115] 8. T helper (Th)-17 분화

[0116] Naive CD4⁺ T 세포는 자기 비드 (Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit; Miltenyi Biotec)를 사용하여 마우스 비장 세포에서 분리하고 마우스 Th17 세포 분화 키트 (Cat. CDK017; R&D systems)를 사용하여 Th17 세포로 분화하도록 유도하였다. Naive CD4⁺ T 세포를 anti-mouse CD3로 코팅된 12-웰 플레이트에서 Th17 분화 배지 (X-VIVO 15, Lonza)와 함께 3일 동안 배양하였다. 3일째에 신선한 Th17 분화 배지를 추가한 다음 세포를 이를 더 배양하였다. 5일째에 세포를 수집하고 유세포분석을 사용하여 Th17 분화를 분석하였다. 칸데사르탄과 텔미사르탄 (각각 5 및 10 μ M 농도)을 Th17 분화 배지에 첨가하여 효과를 확인하였다.

[0118] 9. 유세포 분석

[0119] Th17 세포 집단을 확인하기 위해 림프절과 비장에서 분리한 단일 세포를 4℃에서 15분 동안 fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD4 rat antibody (cat. 11-0041-82; eBioscience)로 염색했다. IC 고정 완충액 (cat. 00-8222-49; eBioscience)을 사용하여 세포를 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 투과화 완충액(cat. 88-8824-00; eBioscience)를 사용하여 실온에서 eFluor 660-labeled rat anti-IL-17A (cat. 50-7177-82; eBioscience)로 1시간 동안 염색하였다. CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)를 사용하여 세포를 분석하였다. Th17 분석을 위해 10,000개의 이벤트를 수집하였다. Forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) 플롯에서 debris를 제거하는 첫 번째 게이트로 단일 세포를 설정하였다. CD4⁺ IL-17A⁺ 세포를 Th17 세포로 나타내었다.

[0121] 10. 정규성 및 통계 분석

[0122] 정규성 및 통계 테스트는 GraphPad Prism 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하였다. 연속 데이터는 동물 실험의 5회 측정에 대한 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표현되었다. Kolmogorov-Smirnov (KS) 테스트는 데이터가 정규성 가정을 충족하는지 여부를 평가하기 위해 수행되었다. 테스트한 모든 데이터는 정규성을 통과하였다. 처리 그룹 간의 차이는 Tukey's multiple comparison post-hoc test와 함께 analysis of variance (ANOVA)를 사용하였다. PASI 점수는 Bonferroni post-hoc test와 함께 two-way ANOVA를 사용하여 분석되었다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의되었으며 *는 vehicle 처리 그룹과 비교하여 유의한 차이를 나타낸다. #는 CDNB- 또는 imiquimod-처리된 그룹과, \$는 telmisartan 처리 그룹과 비교되었다.

[0124] <실험결과>

[0125] 1. 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB) 처리에 따른 귀 조직의 아토피성 피부염 유사 반응의 억제 확인

[0126] BALB/c 마우스에서 CDNB에 의해 유도된 마우스 아토피성 피부염 유사 모델을 사용하여 염증성 피부 질환에 대한 칸데사르탄과 텔미사르탄의 잠재적 효과를 확인하였다. 텔미사르탄을 포함한 여러 ARB는 PPAR γ 에 직접 결합하여 활성화하여 항염증 효과를 나타낸다. GW9662가 선택적 PPAR γ 억제제이기 때문에 본 실험에서 GW9662 처리 마우스 모델을 사용하여 PPAR γ 활성화의 효과를 확인하였다.

[0127] 그 결과, 도 1(B)에 나타난 바와 같이, CDNB 처리 마우스는 부종, 홍반, 상처와 같은 심각한 아토피성 피부염 유사 증상을 나타냈고, 이는 칸데사르탄 또는 텔미사르탄을 투여함으로써 억제되었다. GW9662 단독 처리는 CDNB로 유발된 아토피성 피부염에 영향을 미치지 않았지만, CDNB로 유발된 피부 병변에 대한 텔미사르탄의 억제 효과를 저해하여 PPAR γ 활성화가 텔미사르탄이 피부염을 억제하는 주요 작용 기전임을 보여주었다. 반면, 칸데사르탄 처리군의 경우, GW9662는 염증성 피부 병변에 대한 칸데사르탄의 억제 효과를 저해하지 않았으며, 이는 PPAR γ 가 칸데사르탄의 표적이 아님을 의미한다.

[0128] 도 1(C)를 참조하면, 앞서 진행한 거시적 관찰은 귀 피부 조직의 조직학 검사 결과와 일치했다. H&E로 염색된

절편은 CDNB 처리군에서 표피 증식과 염증을 보였고, CDNB로 유발된 과형성은 두 ARB 처리군 모두에서 개선되었다. 거시적 관찰과 일치하게 GW9662 처리는 텔미사르탄의 억제 효과를 저해했지만 칸데사르탄의 효과는 저해하지 않았다. CDNB 처리군의 귀 피부에서 많은 염증성 면역 세포가 관찰되어 부종과 표피 증식이 나타났지만, CDNB에 의해 유도된 면역 세포의 증가는 두 ARB 모두에 의해 억제되었고, GW9662 처리는 텔미사르탄 유도 억제를 저해하였다.

[0129] 도 1(D)를 참조하면, 귀 두께는 CDNB 유발로 235.87%까지 상당히 증가하였고, 이는 두 ARB에 의해 상당히 억제되었다 (칸데사르탄으로 68.52%, 텔미사르탄으로 57.28%). GW9662는 증식에 대한 텔미사르탄의 억제 효과를 역전시켰지만, 칸데사르탄의 억제 효과는 역전시키지 못했다.

[0131] 2. 마우스 모델에서 ARB 처리에 따른 비만 세포의 귀 조직 침투 감소 확인

[0132] 비만 세포는 아토피 피부염에서 통증과 가려움증을 유발하는 신경성 염증에 기여한다. 따라서 비만 세포를 분석하기 위해 귀 조직을 TBO로 염색하였다.

[0133] 도 2(A)를 참조하면, 비만 세포는 자주색 점으로 표시되었고 CDNB 처리군에서 귀 조직의 표피에 축적되었다. 두 ARB 모두 증가된 비만 세포 수를 억제하였고, GW9662 처리는 텔미사르탄의 억제 효과를 역전시켰으나 칸데사르탄의 억제 효과는 역전시키지 않았다.

[0134] 도 2(B)를 참조하면, CDNB 그룹의 귀 조직 절편의 비만 세포 수는 vehicle 처리 대조군에 비해 563.24% 증가하였으나, 칸데사르탄 또는 텔미사르탄의 투여로 비만 세포 수가 각각 71.69% 및 61.42%로 유의하게 억제되었다. GW9662 처리는 비만 세포 침윤에 대한 텔미사르탄의 억제 효과를 역전시켰지만, 칸데사르탄의 억제 효과는 역전시키지 못하였다.

[0136] 3. ARB 처리에 따른 귀 조직의 Th1, Th2 및 Th17 관련 사이토카인 수치 증가 억제 확인

[0137] CDNB 유도 아토피 피부염 모델에서 Th1과 Th17 반응뿐만 아니라 과도한 Th2 반응이 아토피 피부염의 발병에 관여한다. Th2, Th1, 및 Th17 반응의 변화는 귀 조직에서 Th2-(인터루킨[IL]-4 및 IL-13), Th1-(인터페론[IFN]- γ), 및 Th17 관련(IL-17A) 사이토카인(cytokine)의 발현 수준이 정량화되어 측정되었다.

[0138] 도 2(C) 내지 2(F)를 참조하면, 4가지 사이토카인의 mRNA 발현 수준이 CDNB 유발에 의해 유의하게 증가했으며, 두 ARB 모두 증가된 IL-4, IL-13, IFN- γ , IL-17A 발현 수준을 유의하게 억제함을 확인하였다. 텔미사르탄의 4가지 사이토카인 발현 수준에 대한 억제 효과는 GW9662에 의해 역전되었지만, 칸데사르탄의 억제 효과는 역전되지 않았다.

[0140] 4. ARB 처리에 따른 림프절의 아토피 반응 억제 확인

[0141] 경부 림프절은 귀에 가장 가까운 림프 기관으로, 귀에서 CDNB에 대한 면역 반응을 조절한다.

[0142] 도 3(A)를 참조하면, CDNB 처리군에서 림프구 증식으로 인해 림프절의 상당한 비대가 관찰되었으며, 이는 두 ARB에 의해 억제되었다. GW9662 처리는 텔미사르탄의 억제 효과를 역전시켰지만, 칸데사르탄의 억제 효과는 역전시키지 못했다.

[0143] 도 3(B)를 참조하면, 분리된 림프절의 무게는 CDNB 처리군에서 529.87%까지 증가한 것으로 나타났다. 칸데사르탄과 텔미사르탄은 림프절의 무게 증가를 각각 51.32%와 39.58%까지 유의하게 억제하였다. GW9662는 증가된 림프절 무게에서 텔미사르탄의 억제 효과를 역전시켰지만, 칸데사르탄의 억제 효과는 역전시키지 못했다.

[0145] 5. ARB 처리에 따른 림프절의 Th1, Th2, 및 Th17 관련 사이토카인 수준의 증가 억제 확인

[0146] 염증성 사이토카인 수준은 마우스에서 분리된 림프절에서 IL-4, IL-13, IFN- γ 및 IL-17A의 mRNA 수준이 정량화되어 평가되었다.

[0147] 도 3(C) 내지 3(F)를 참조하면, CDNB 처리는 림프절에서 4가지 사이토카인의 mRNA 발현 수준을 상당히 증가시켰다. 두 ARB 모두 염증성 사이토카인 수준의 증가를 억제했지만 GW9662는 Th2, Th1, Th17 반응에 대한 억제 효과

를 칸데사르탄이 아닌 텔미사르탄의 억제 효과만 저해하는 것으로 나타났다.

6. ARB 처리에 따른 T 림프구의 Th17 세포로의 분화 억제 확인

림프절에서 궁극적으로 IL-17A 사이토카인 수치를 낮추게 되는 더 적은 Th17 세포를 확인하기 위해, 우리는 ARB가 T 림프구의 Th17 세포로의 분화를 억제하는지 여부를 확인했다.

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 두 ARB 모두 10 μ M 농도에서 naive T 세포의 Th17 세포로의 분화를 유의하게 억제하였고, 텔미사르탄보다 칸데사르탄에서 더 큰 효과를 보였다 (84.5% vs. 29.4%).

7. ARB 처리에 따른 이미퀴모드-유도 건선 억제 확인

건선은 IL-23/IL-17 경로와 관련된 두꺼운 은백색 비늘로 덮인 붉은 발진을 특징으로 하는 만성 염증성 피부 질환이다. 이미퀴모드 유도 피부염 마우스 모델은 건선의 중요한 특성인 홍반, 박리, 극세포증을 나타낸다. 이미퀴모드는 toll-like receptor 7을 활성화하여 IFN- α , IL-6 및 종양 괴사 인자(TNF)- α 를 포함한 염증성 사이토카인의 과도한 분비를 초래한다. 이러한 사이토카인은 IL-12/IL-23 분비와 IL-17 생성을 증가시켜 각질세포에 작용하여 궁극적으로 강력한 증식을 유도한다.

텔미사르탄과 칸데사르탄은 모두 T 림프구의 Th17 세포로의 분화를 억제하였다. 이미퀴모드 유발 건선 마우스 모델에서 ARB의 효과를 추가로 확인한 결과, 도 5를 참조하면, 이미퀴모드 적용을 시작하고 3-4일 후에 피부 병변의 두께, 홍반, 인설이 총 PASI score와 함께 증가하였으나, ARB 투여로 감소되었다. PASI 점수의 유의한 변화는 칸데사르탄 투여군의 경우 5-6일에 관찰되었고 텔미사르탄 투여군의 경우는 6-7일에 관찰되었으며, 텔미사르탄보다 칸데사르탄의 효과가 더 큰 것으로 나타났다 (42.03% vs. 23.48%).

도 6(A)를 참조하면, H&E로 염색된 피부 조직 절편에서 표피 증식과 피부로의 백혈구 모집이 이미퀴모드 처리 그룹에서 관찰되었고 ARB에 의해 억제되었다. 도 6(C)에서도 이와 유사하게, 표피 두께는 이미퀴모드에 의해 상당히 증가되었지만, ARB에 의해 감소되었다. 또한, 도 6(B) 및 6(D)를 참조하면, Ki-67 양성 세포 수로 관찰된 각질형성세포(keratinocyte)의 증식은 이미퀴모드에 의해 증가되었다; 텔미사르탄과 칸데사르탄은 모두 Ki-67 양성 세포의 증가를 억제하였다.

건선의 병인에서 IL-23/IL-17 경로의 중요한 역할을 고려하여 IL-17A, IL-23, IL-22의 mRNA 수준을 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 와 함께 정량화하였다. 그 결과, 도 7(A) 내지 7(C)에 나타난 바와 같이, 피부 조직에서 IL-17A, IL-23 및 IL-22의 mRNA 수준은 이미퀴모드 처리군에서 증가하였다. 이는 IL-23/IL-17의 활성화를 시사하며 ARB에 의해 억제되었다. 이와 유사하게, 도 7(D) 내지 7(E)를 참조하면, Th1 관련 사이토카인인 IFN- γ 와 TNF- α 의 수준은 이미퀴모드 유발 건선 피부 병변에서 증가하였고 ARB에 의해 억제되었다. 이미퀴모드에 의한 IL-1 β 수준의 증가는 칸데사르탄에 의해 상당히 감소되었지만 텔미사르탄에 의해서는 감소하지 않았다 (도 7(F)). 따라서 칸데사르탄은 IL-23, IFN- γ 및 IL-1 β 와 같은 여러 IL-23/IL-17 경로의 사이토카인 수준을 억제하여 텔미사르탄보다 더 강력하게 작용할 수 있다.

8. ARB 처리에 따른 림프절과 비장에서의 건선 반응 감소 확인

사타구니 림프절은 피부의 이미퀴모드에 대한 면역 반응을 조절하는 등 피부에서 가장 가까운 림프 기관이다.

도 8(A) 및 8(D)를 참조하면, 본 실험에서 분리된 림프절과 비장은 이미퀴모드 처리군에서 실질적으로 증가되었고, 이러한 림프절과 비장의 크기 증가는 칸데사르탄에 의해 억제되었지만 텔미사르탄에 의해서는 억제되지 않았다. 실질적인 림프절과 비장의 비대를 림프절과 비장 각각의 무게를 측정하여 객관적으로 확인한 결과, 도 8(B) 및 8(E)에 나타난 바와 같이, 분리된 림프절과 비장의 무게는 각각 300%와 90.85%로 상당히 증가하였다. 칸데사르탄은 림프절과 비장의 무게 증가를 각각 57.6%와 63.2%로 유의하게 억제하였다. 림프절과 비장의 크기에 대한 이러한 억제 효과는 텔미사르탄에서는 관찰되지 않았다.

ARB가 피부에서 Th17 관련 사이토카인의 상당한 억제 효과를 보였음을 고려하여, 림프절과 비장에서 CD4⁺IL17A⁺ T 세포 수를 측정한 결과, 도 8(C) 및 8(F)에 나타난 바와 같이, 이미퀴모드 처리는 림프절과 비장 모두에서 CD4⁺IL17A⁺ T 세포의 백분율을 증가시켰다. 칸데사르탄은 림프절과 비장에서 CD4⁺IL17A⁺ T 세포의 비율을 각각

43.3%와 78.63%까지 유의하게 억제하였다. 텔미사르탄 투여 그룹은 $CD4^{+}IL17A^{+}$ T 세포의 비율이 비장에서 61.7% 까지 상당히 억제되었지만 림프절에서는 그렇지 않았다.

[0164] **9. ARB 처리에 따른 림프절에서의 이미퀴모드 유도에 의한 Th17 및 Th1 사이토카인 증가 억제 확인**

[0165] 염증성 사이토카인 수준은 림프절에서 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 수준과 함께 IL-17A, IL-23, IL-22의 mRNA 수준을 정량화하여 평가하였다.

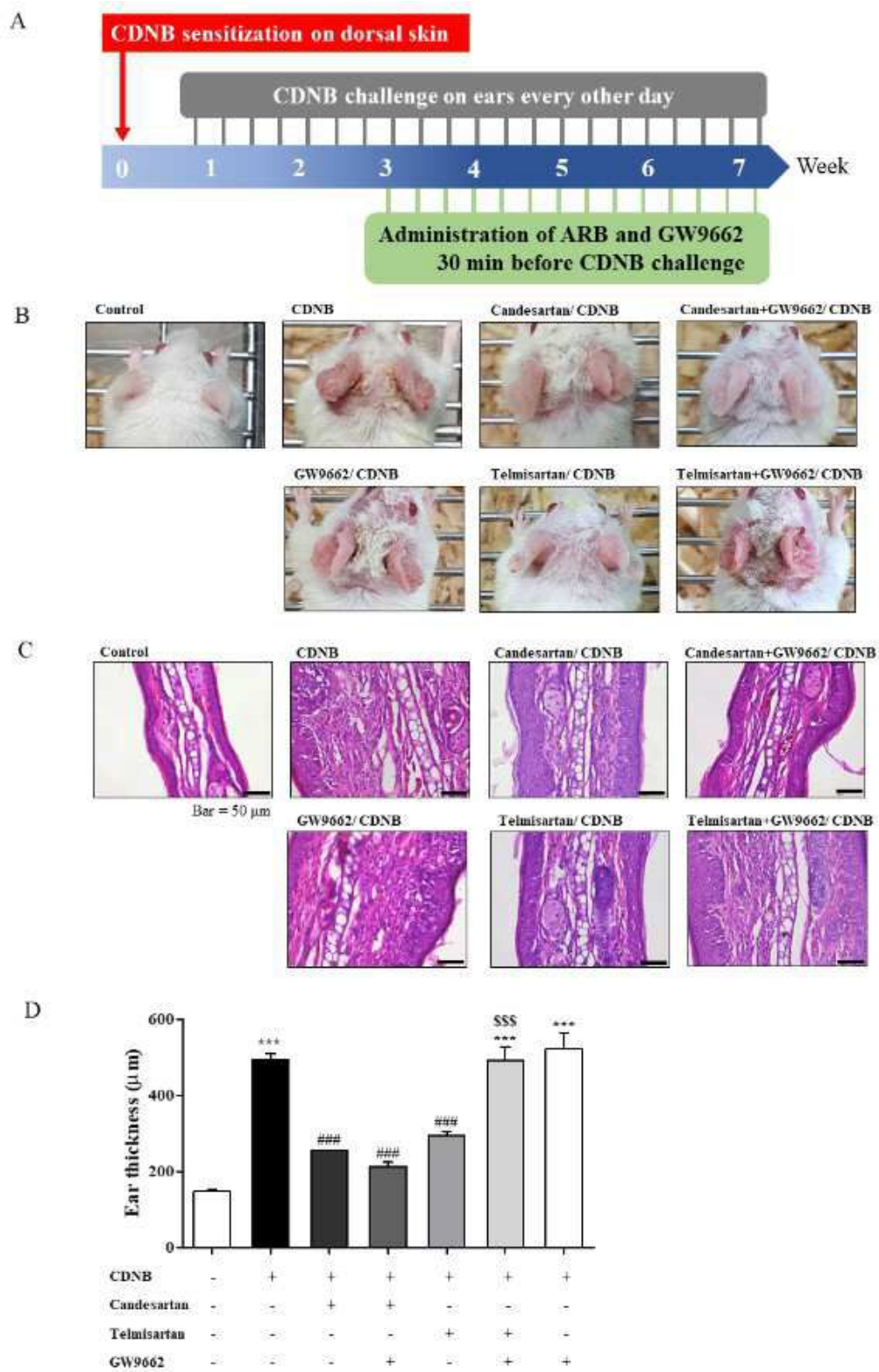
[0166] 그 결과, 도 9(A) 내지 9(C)를 참조하면, 이미퀴모드 유발은 림프절에서 IL-23/IL-17 경로(즉, IL-17A, IL-23 및 IL-22)와 관련된 사이토카인의 수준을 실질적으로 증가시켰다. 이는 이미퀴모드-처리된 마우스의 림프절에서 IL-23/IL17 경로의 활성화를 시사하고, IL-23/IL-17 경로의 활성화는 ARB에 의해 억제되었다.

[0167] 또한, 도 9(D) 내지 9(F)에 나타난 바와 같이, Th1 관련 사이토카인 (즉, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β)의 수준도 이미퀴모드 처리된 마우스의 림프절에서 증가했으나, 이는 ARB에 의해 억제되었다. 칸테사르탄은 IL-23, IFN- γ , IL-22 및 IL-1 β 의 억제를 유도하였다.

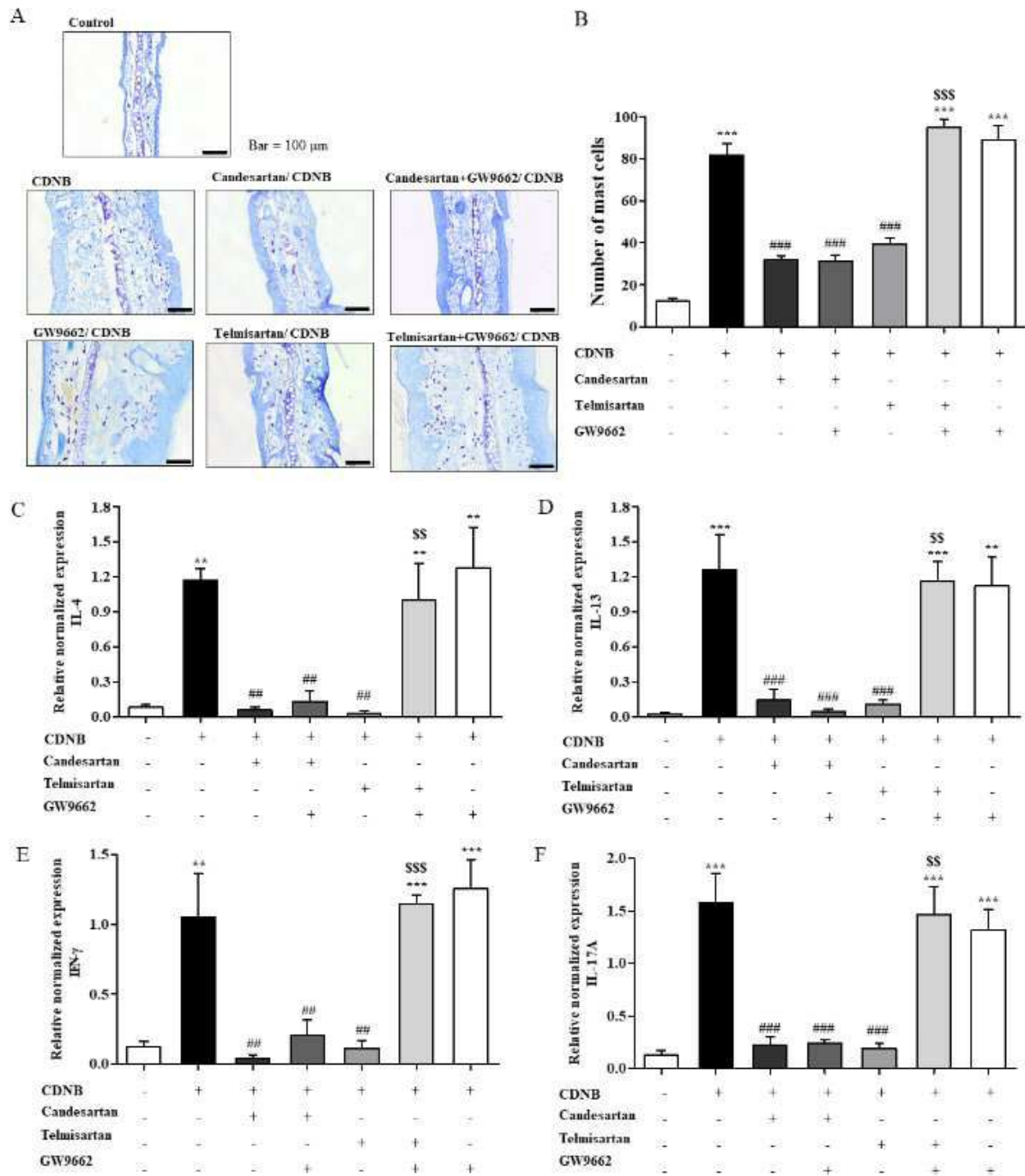
[0169] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

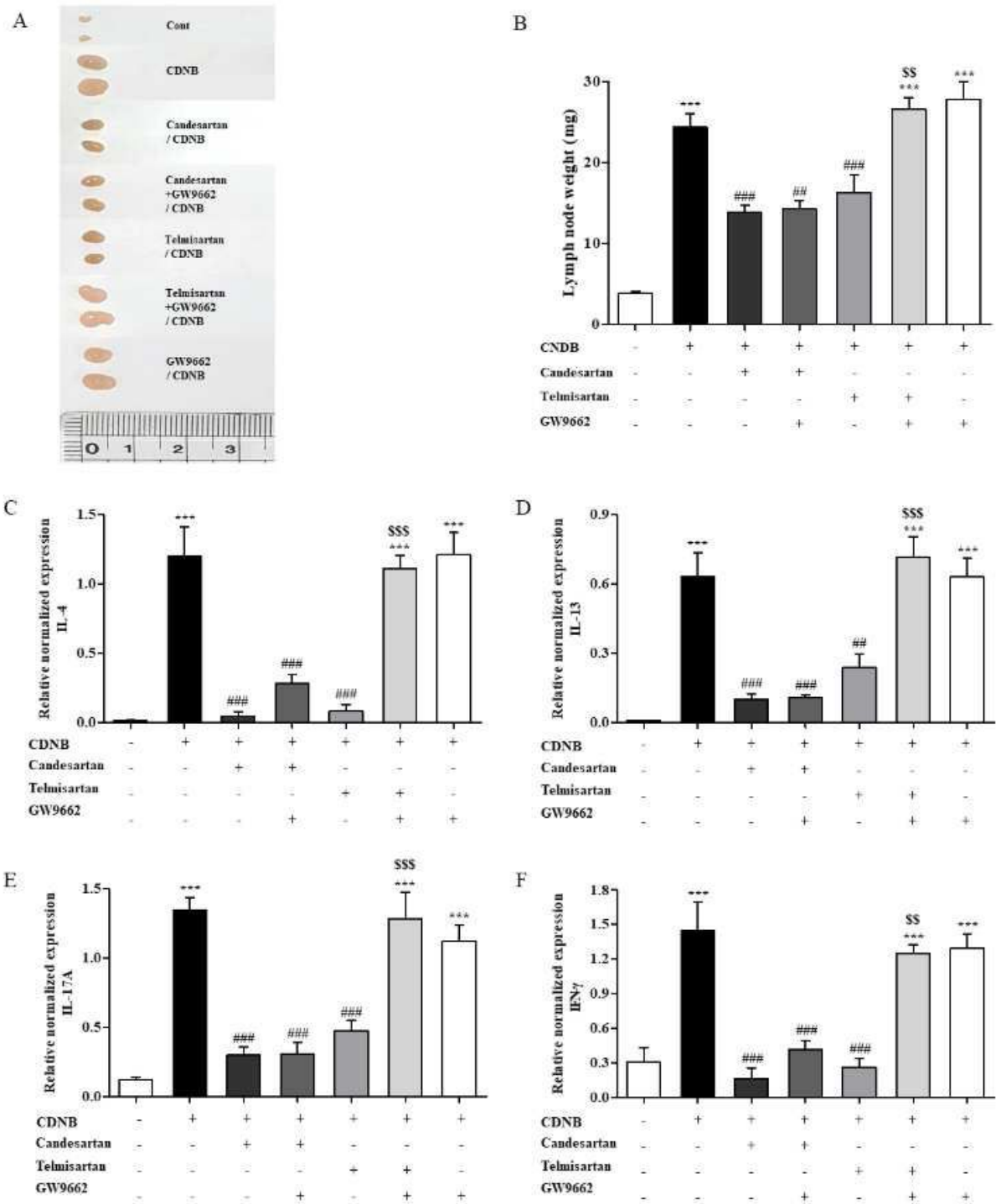
도면1



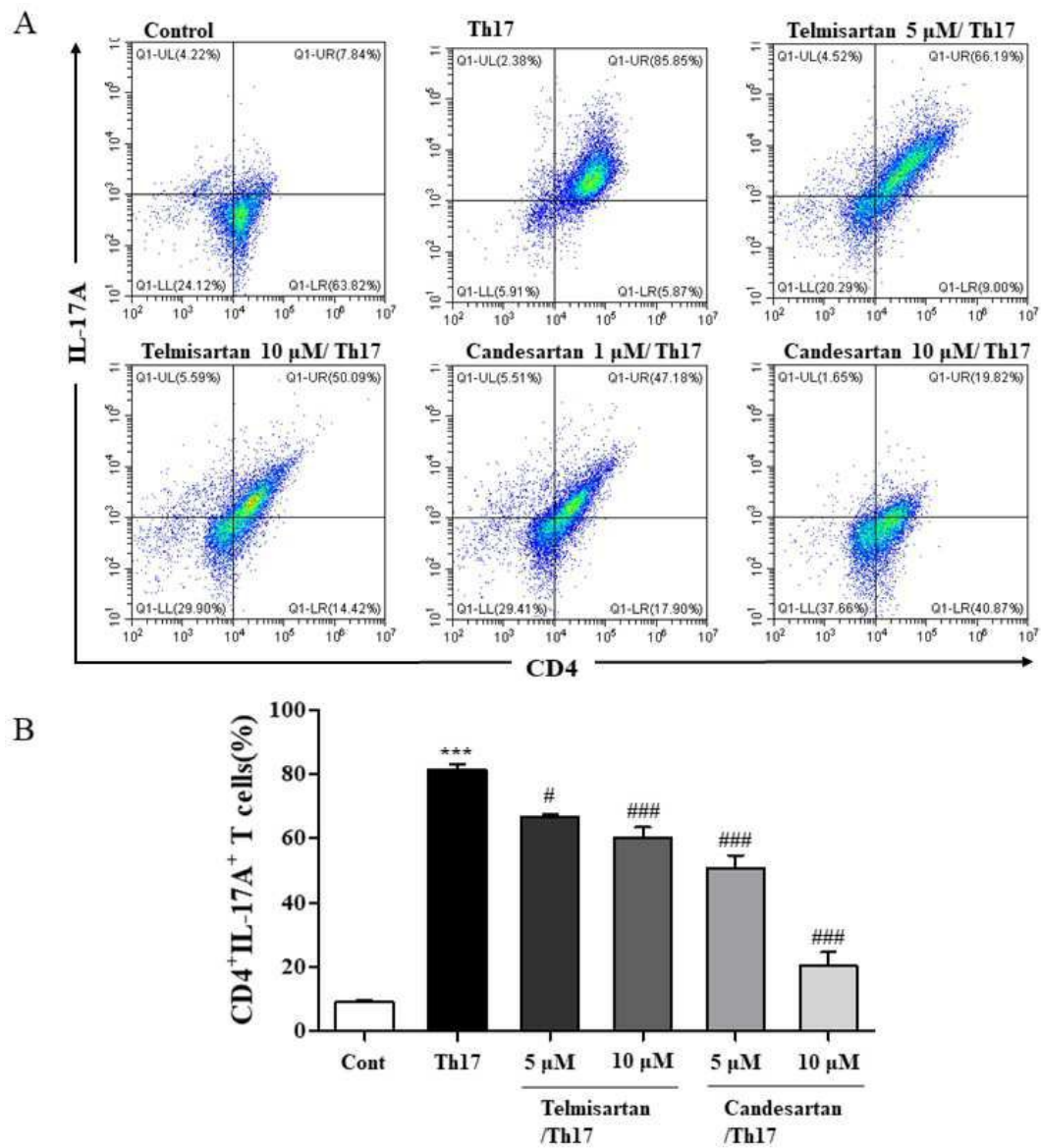
도면2



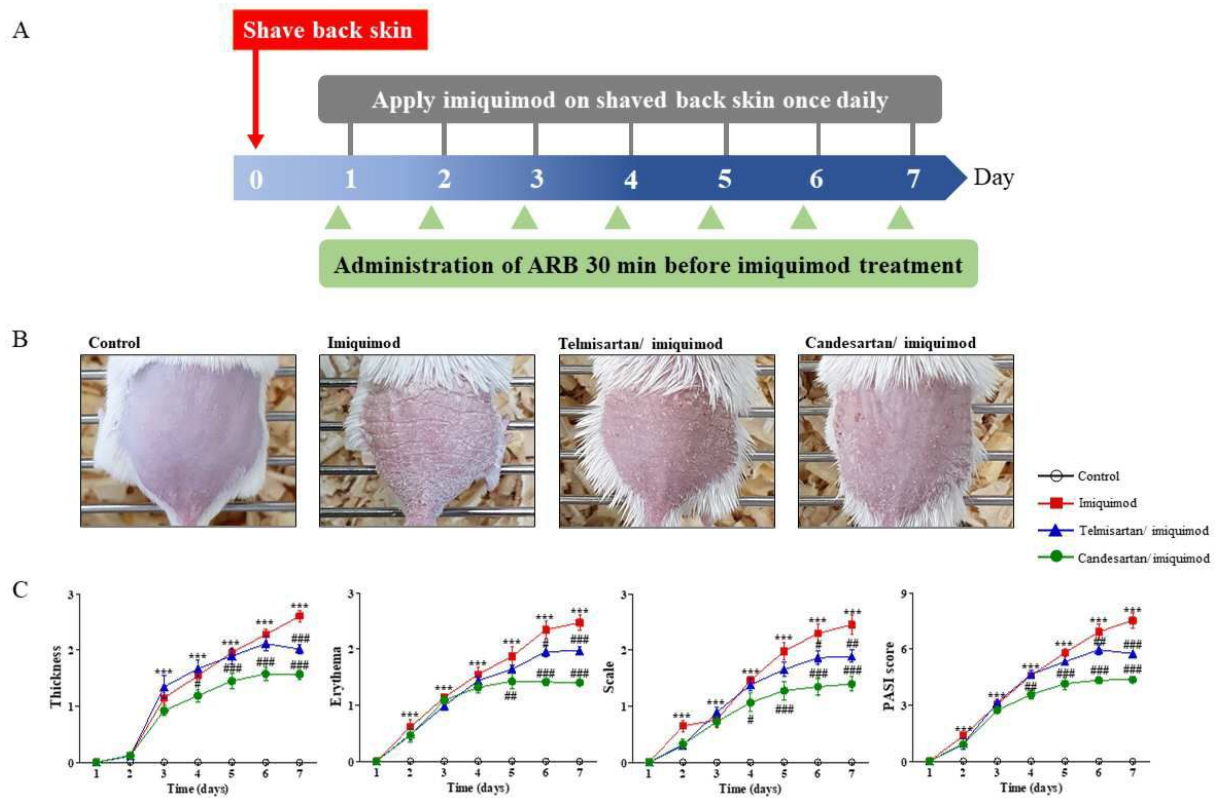
도면3



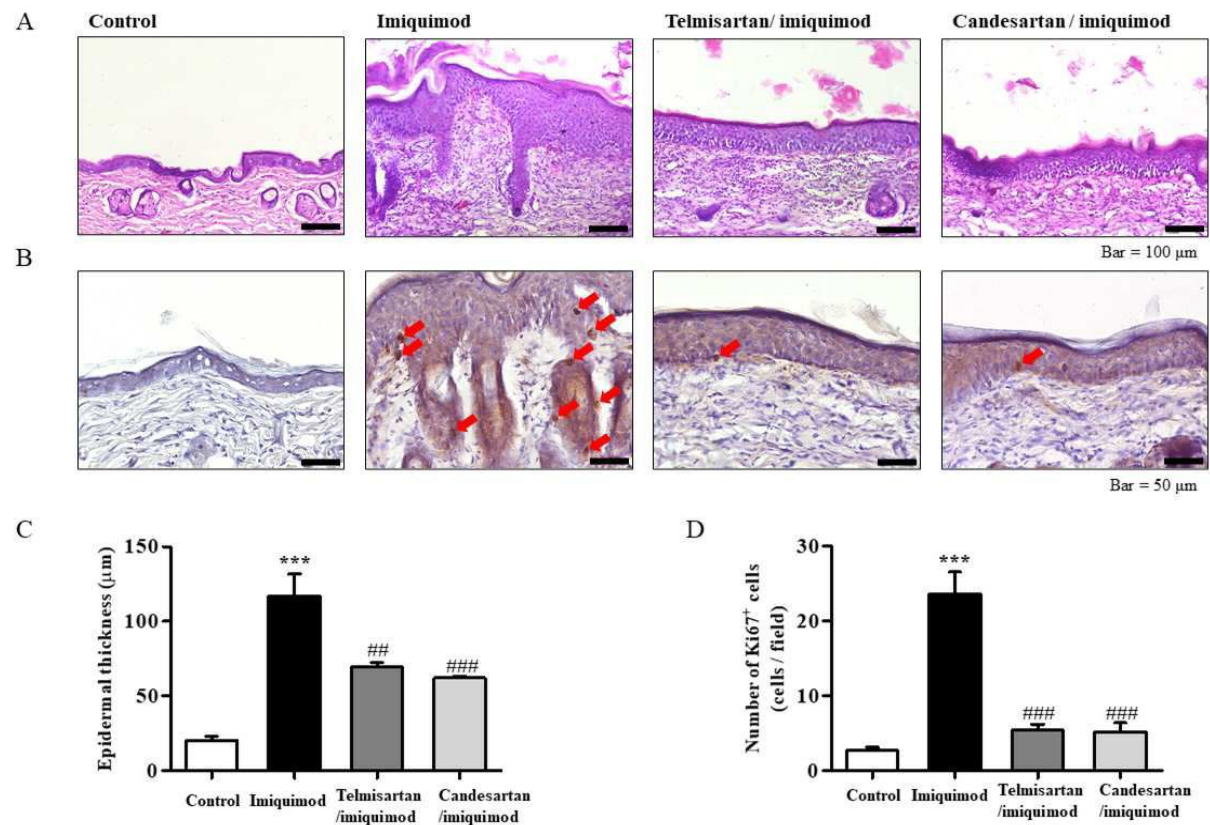
도면4



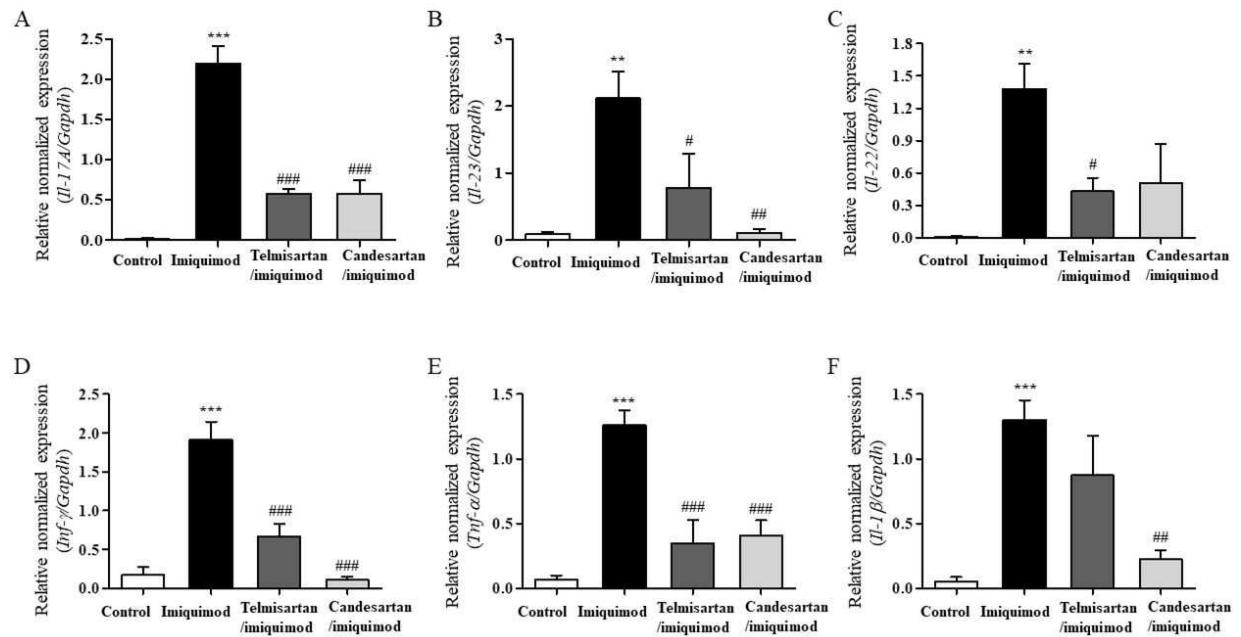
도면5



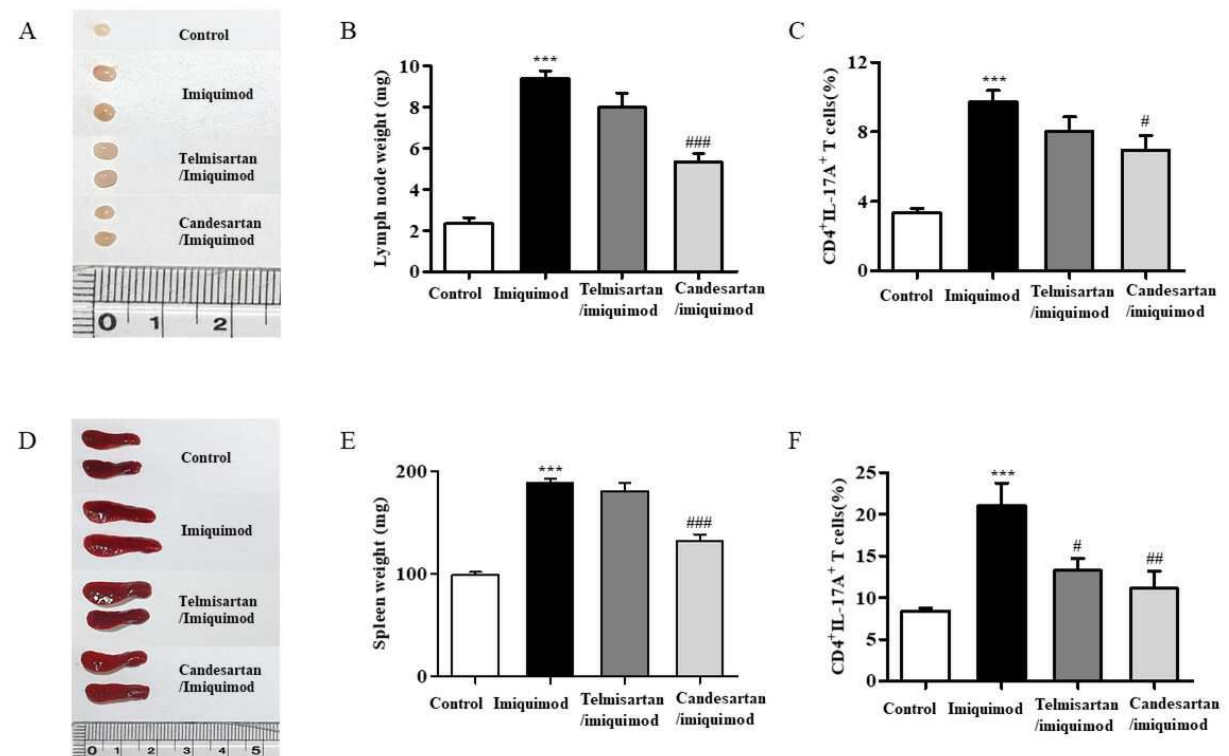
도면6



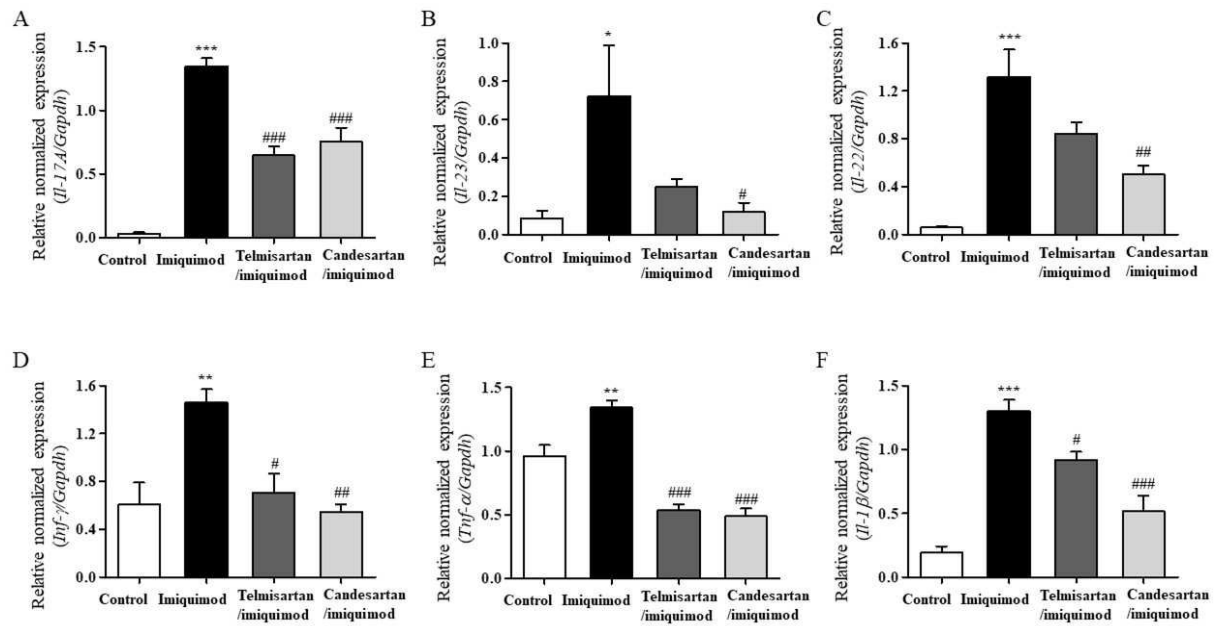
도면7



도면8



도면9



도면10

