



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월04일
(11) 등록번호 10-1953671
(24) 등록일자 2019년02월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/69 (2006.01) A61K 31/16 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) A61K 8/19 (2006.01)
A61K 8/42 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/69 (2013.01)
A61K 31/16 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0105254
(22) 출원일자 2017년08월21일
심사청구일자 2017년08월21일
- (56) 선행기술조사문헌
Experimental Dermatology., 2013., Vol.22, pp
742-747*
(뒷면에 계속)
- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
김기광
충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67
김용은
대전광역시 중구 안영로 68, 105동 1601호(사정동, 성산마을우남스타원아파트)
- (74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

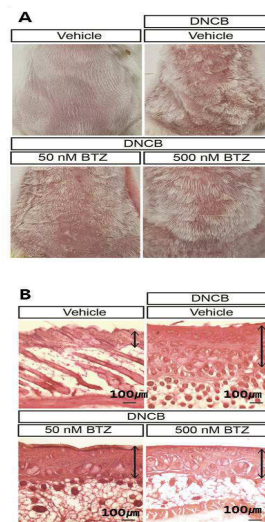
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 프로테아좀 억제제인 보르테조미프(BTZ, bortezomib), MG132 및 VR23은 세포-세포 사이에 밀착연접(tight junction)을 형성하는 단백질의 발현량을 증가시켜 피부의 수분 증발로 인한 건조를 막고, 피부장벽 보호기능을 강화시킬 수 있으며, 아토피성 피부염의 병변을 개선시키고, 아토피 피부염 유발 부위의 피부조직 두께를 감소시키는 효과가 우수하므로, 아토피성 피부질환의 예방, 개선 치료용 의약품 또는 의약외품 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 8/19 (2013.01)

A61K 8/42 (2013.01)

A61K 8/4953 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20160108108 A1

JP2011500676 A

KR1020060026052 A

JP2011519975 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

보르테조미(bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 감소로 인해 발생하는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 감소로 인해 발생하는 피부 건조증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

보르테조미(bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 감소로 인해 발생하는 피부 건조증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 조성물은 소독 청결제, 샤워폼, 구강청정제, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 코팅제 및 필터 충전제로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 감소로 인해 발생하는 피부 건조증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아토피성 피부염은 만성 혹은 재발성 피부염으로 근래에 들어 그 발생 빈도가 증가하는 양상을 보이고 있다. 아토피성 피부염은 각질화된 피부의 수분이 증발되어 건조하며, 피부의 외부 침입 보호작용이 정상인보다 현저히 떨어져서 외부 자극물질인 알러젠(allergen)에 항시 노출되어 있다는 점과 기질세포간 지질 감소로 인하여 피부 보호가 제대로 되지 못하고, 각종 박테리아의 증식 빈도가 월등히 높다는 점이 커다란 문제점으로 알려져 있다.

[0003] 피부에 보습 기능이 원활하지 못하면 피부표면에 균열이 발생하게 되고, 이러한 균열을 통해 알러지 반응을 일

으키는 알러젠(allergen)이 유입된다. 유입된 알러젠은 생체 내 면역반응을 유발하는데, 이로 인해 피부조직이 붓게된다. 면역부분 중에서 간과할 수 없는 부분은 아토피성 피부염 조직의 가려움증(소양증)이다. 이는 면역과 연관되어 있는데 히스타민과 밀접히 연관되어 있다. 피부의 각화와 피부의 가려움증이 환자의 가장 불편한 문제점이라 본다면 아토피성 피부염 관련 발명에 있어서 항히스타민 역할은 피부 보습 효과와 더불어 중요하다고 할 수 있다. 또한, 자유 라디칼은 염증의 악화나 가려움증 유발 등에 중요한 작용을 하므로 유효성이 큰 항산화제 선별은 아토피성 피부염 개선에 없어서는 안 될 부분이다.

[0004] 또한, 아토피성 피부염이 발생되면 피부의 외부 보호막의 기능이 현저히 떨어지는데 각종 외부 병원균의 오염이 빈번하게 된다. 피부에는 많은 미생물들이 존재하고 있지만 평상시에는 생육이 억제되어 있어서 별반 문제가 생기지 않지만, 아토피성 피부염으로의 진행은 피부의 산도를 약화시켜 이들 각종 병원균의 생육 억제기능을 상실하게 된다. 이들의 증식속도는 면역반응에 의한 조절속도보다 빨리 일어나 피부는 각종 오염에 시달리게 된다. 이들의 증식을 억제시키는 것이 아토피성 피부염 환자에 있어서 중요하다는 것은 두말할 나위가 없다.

[0005] 한편, 사람의 피부에서 표피는 ICJ(intracellular junction) 구조로 결합된 각질형성세포로 둘러싸여, 외부 환경으로부터 내부기관을 보호하고 인체의 항상성을 유지함에 유익한 역할을 수행한다. ICJ의 역할은 다양한 접합 구조들로 행해지고 있는 가운데, 이들 중 밀착연접(Tight junction; TJ)은 다기능-단백질 복합체로서 표피의 과립층에서 발현되며, 밀접한 세포 사이를 밀착시킴으로써 상피(epithelial)와 내피(endothelial) 방어 기능을 유지시키며, 밀착연접의 장벽기능은 세포 간의 투과성(permeability)과 분자 통로(molecule passage)를 평가하는 척도로서 잘 알려져 있다. 밀착연접의 이상은 천식, 멜라노마(melanoma) 등의 다양한 질병에서도 주요한 기능을 한다는 연구결과들이 보고되고 있다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제2016-0117839호는 보르테조밍을 포함하는 비만 또는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 조성물을 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1742023호는 보르테조밍을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 프로테아좀 억제제인 보르테조밍(bortezomib), MG132(carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) 및 VR23(7-chloro-4-(4-(2,4-dinitrophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline)을 농도별로 HaCaT 세포에 각각 처리하였을 때, 세포-세포 사이에 밀착연접(tight junction)을 형성하는 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현량이 현저하게 증가하는 것을 확인하였으며, 동물모델 마우스에 아토피 피부염 유도물질인 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzen)를 도포하여 아토피 피부염을 유도한 후, 보르테조밍을 처리하였을 때, 피부병변이 개선되고 아토피 피부염 유발 부위의 피부 조직 두께가 현저하게 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 프로테아좀 억제제인 보르테조밍(bortezomib), MG132(carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) 및 VR23(7-chloro-4-(4-(2,4-dinitrophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline)은 세포-세포 사이에 밀착연접(tight junction)을 형성하는 단백질의 발현량을 증가시켜 피부의 수분 증발로 인한 건조를 막고, 피부장벽 보호기능을 강화시킬 수 있으며, 아토피성 피부염의 병변을 개선시키고, 아토피 피부염 유발 부위의 피부조직 두께를 감소시키는 효과가 우수하므로, 아토피성 피부질환의 예방, 개선 치료용 의약품 또는 의약외품 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

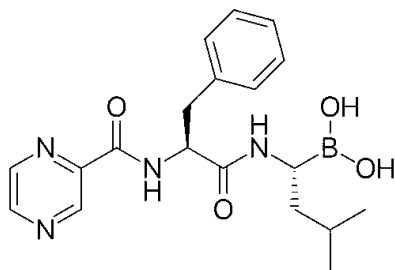
도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 프로테아좀 억제제인 보르테조미프(BTZ, bortezomib), MG132(carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) 및 VR23(7-chloro-4-(4-(2,4-dinitrophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline)을 농도별로 HaCaT 세포에 각각 처리하였을 때, 면역블롯(immunoblot) 분석을 통해 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 양상을 확인한 결과이다. GAPDH는 로딩 컨트롤이다.
- 도 2는 본 발명의 50nM의 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 HaCaT 세포에 처리한 후 면역형광법(Immunofluorescence)를 이용하여 클라우딘 1 단백질의 발현 양상을 확인한 결과이다. 대조군(Control)은 보르테조미프 대신에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 처리한 정상군이며, 화살 표시는 밀착연접(tight junction)을 형성하는 클라우딘 1 단백질(green)을 가르키는 것이다.
- 도 3은 모델 마우스의 등을 대상으로 아토피 피부염을 유도하기 위한 아토피 피부염 유도물질인 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)와 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib) 처리에 대한 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 아토피 피부염 모델 마우스의 등에 처리하였을 때, 아토피 피부염의 완화 효과를 나타낸 것이다. A는 육안으로 관찰한 마우스의 등 사진이며, B는 조직학적으로 관찰한 등 피부 표피층의 H&E 염색 사진이다. Vehicle은 보르테조미프(BTZ, bortezomib) 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리한 정상군이다.
- 도 5는 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 아토피 피부염 모델 마우스의 등에 처리하였을 때, 아토피 피부염 모델 마우스에 대한 피부병변의 개선효과(A) 및 피부조직 두께의 감소효과(B)를 나타낸 것이다.
- 도 6은 모델 마우스의 귀를 대상으로 아토피 피부염을 유도하기 위한 아토피 피부염 유도물질인 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)와 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib) 처리에 대한 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 아토피 피부염 모델 마우스의 귀에 처리하였을 때, 아토피 피부염의 완화 효과를 나타낸 것이다. A는 육안으로 관찰한 마우스의 귀 사진이며, B는 조직학적으로 관찰한 귀 피부 표피층의 H&E 염색 사진이다. Vehicle은 보르테조미프(BTZ, bortezomib) 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리한 것이며, Control은 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)를 처리하지 않은 대조군이다.
- 도 8은 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 아토피 피부염 모델 마우스의 귀에 처리하였을 때, 아토피 피부염 모델 마우스의 피부조직 두께의 감소효과를 나타낸 것이다. Control은 보르테조미프(BTZ, bortezomib) 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리하고 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)를 처리하지 않은 대조군이며, BTZ는 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 처리하고 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)를 처리하지 않은 대조군이다.
- 도 9는 DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)로 유도된 아토피 피부염 모델 마우스에 본 발명의 보르테조미프(BTZ, bortezomib)을 처리한 후, 피부에서 면역블롯(immunoblot)(A) 및 면역형광법(Immunofluorescence)(B)을 이용하여 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 양상을 확인한 결과이다. Vehicle은 보르테조미프(BTZ, bortezomib) 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리한 정상군이며, 화살 표시는 밀착연접(tight junction)을 형성하는 클라우딘 1 단백질(green)을 가르키는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

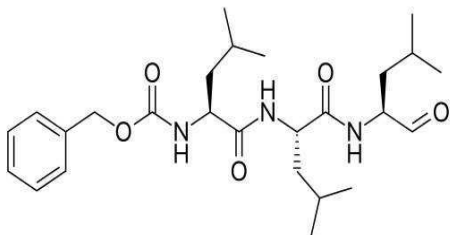
- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 아토피성 피부질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에서, 상기 프로테아좀 억제제는 보르테조미프(bortezomib), MG132(carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) 또는 VR23(7-chloro-4-(4-(2,4-dinitrophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 상기 보르테조미프(bortezomib)은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있으며, MG132(carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal)는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으며, VR23(7-chloro-4-(4-(2,4-dinitrophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline)은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] [화학식 1]



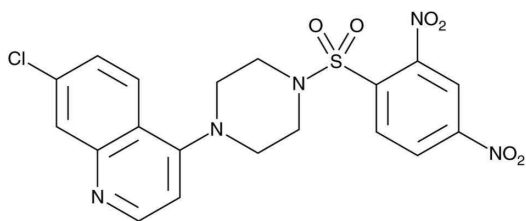
[0016]

[0017] [화학식 2]



[0018]

[0019] [화학식 3]



[0020]

[0021] 또한, 상기 아토피성 피부질환은 세포-세포 사이에 밀착연접(tight junction)을 형성하는 단백질의 발현 감소로 인해 피부가 건조해져 발생하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 또한, 상기 단백질은 클라우딘 1(claudin 1) 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 조성물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 프로테아좀 억제제를 포함하는 약학 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, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 프로테아좀 억제제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌

제의 기제로는 위텡솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0027] 본 발명의 프로테아좀 억제제는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 프로테아좀 억제제를 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품의 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 피부 외용제 및 개인위생용품도 포함한다.

[0030] 본 발명의 아토피성 피부질환의 예방 또는 개선용 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 아토피성 피부질환의 예방 또는 개선용 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0031] 본 발명의 아토피성 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물은 소독 청결제, 샤워폼, 구강청정제, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 코팅제 및 필터 충전제로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제조에 사용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 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.

[0033] 재료 및 방법

[0034] 1. 세포 배양

[0035] 불멸화된 인간 유래 피부각질세포인 HaCaT 세포(ThermoFisher Scientific, MA, USA)는 열-불활성(heat-inactivated) 10% FBS(fetal bovine serum, GIBCO, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Sigma-Aldrich, USA)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지에 5% CO₂ 가습 배양기에서 37℃의 조건하에 유지시켰다.

[0036] 2. 동물 실험

[0037] 동물 모델에 아토피 피부염을 유도하기 위해, 8주령의 수컷 BALB/c 마우스를 대한 바이오링크(Eumseong, Korea)로부터 구입하였으며, 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(22±2℃) 및 습도(50±5%)는 일정하게 유지하였으며, 사료(standard rodent chow)와 식수는 자유롭게 급여하였다. 모든 마우스는 실험 개시전에 7일 동안 순응시켰으며, 모든 동물 실험은 충남대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았으며, 이의 규정에 준하여 수행하였다.

[0038] 3. 아토피 피부염 유도

[0039] (1) 등

[0040] DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)로 마우스의 등에 아토피성 피부염을 유도하기 위해, 마우스의 등을 클리퍼(clipper) 및 제모 크림을 이용하여 제모한 후 멸균된 PBS로 씻어주었으며, 마우스는 4개의 처리군(군당 5마리)인 Vehicle군(정상군), DNCB 처리군, DNCB + 50nM의 보르테조미프 처리군 및 DNCB + 500nM의 보르테조미프 처리군으로 나누었다. 실험 1일째에 1% DNCB(Sigma-aldrich, USA) 용액(아세톤:호호바오일=3:1) 250μl을 마우스의 등에 도포하였고, 이후에 2일마다 0.2% DNCB 용액 250μl을 도포하였으며, 14일째부터 마우스의 등에 아세톤 및 호호바오일(3:1)에 용해시킨 50nM 및 500nM의 보르테조미프(LC Laboratories, USA) 250μl을 매일 도포하였다(도

3). Vehicle군(정상군)은 보르테조밍 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리하였다. 피부병변의 평가는 보르테조밍을 도포한 후 7일마다 피부병변을 관찰하여 6가지 항목인 홍반(erythema), 출혈(hemorrhage), 건조 피부(dryness), 흉터(scarring), 찰과상(excoriation) 및 짓무름(erosion)을 체크하여 증상 없음(0점), 증상 약함(1점), 보통(2점) 및 심함(3점)으로 총 점수를 부여하여 평가하였다.

(2) 귀

마우스의 귀에 아토피성 피부염을 유도하기 위해, DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)를 마우스의 귀 내부 및 외부에 도포하였으며, 마우스는 임의로 4개의 처리군(군당 5마리)인 Vehicle군(정상군), DNCB 처리군, 50nM의 보르테조밍 처리군 및 DNCB + 50nM의 보르테조밍 처리군으로 나누었다. 실험 1일째에 1% DNCB 용액(아세톤:호호바오일=3:1) 40 μ l을 마우스의 귀에 도포하였고, 이후에 3일마다 0.2% DNCB 용액을 도포하였으며, 14일째부터 마우스의 귀 내부 및 외부에 아세톤 및 호호바오일(3:1)에 용해시킨 보르테조밍(50nM)을 매일 도포하였다(도 6). Vehicle군(정상군)은 보르테조밍 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리하였다. 귀 두께는 7일마다 마이크로 캘리퍼(micro caliper)를 이용하여 측정하였다.

5. 면역블롯 분석(Immunoblot analysis)

HaCaT 세포에 프로테아제 저해제(Roche, Switzerland)가 포함된 용해 버퍼(10mM Tris-Cl(pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10% 글리세롤 및 1% 트리톤 X-100)를 첨가하여 이로부터 단백질을 추출하였으며, 마우스 피부 조직은 조직 무게에 대해 3배 부피의 상기 용해 버퍼를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 단백질 농도는 Qubit 단백질 분석 키트(ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 측정하였으며, 시료당 30 μ g의 용해물을 15% SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 분리하였다. 면역블롯팅은 참고문헌(Won M. et al. 2016, Biochem. Biophys. Res. Commun. 472, 373-378)에 따라 수행하였다. 항-클라우딘-1(Cell Signaling Technologies, USA) 및 항-GAPDH(Meridian Life Science, USA)는 면역 분석에 사용하였다.

6. 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E) 염색

본 발명의 보르테조밍의 최종 도포 24시간 후, 각 그룹의 마우스를 희생시키고, 등 피부와 귀(이하 '시료'라 함)를 채취하여 4% 파라포름알데히드로 24시간 동안 고정시킨 후, 30% 수크로오스를 함유하는 PBS에 24시간 동안 담가 두었다. Tissue-Tek® O.C.T. 화합물(Sakura Finetek USA, CA, USA)에 내장된 동결건조 시료를 12 μ m 절편으로 제작하였으며, O.C.T. 화합물을 제거하기 위해, 슬라이드는 PBS로 가볍게 세척해주었다. 또한, 표피 두께를 관찰하기 위해, 피부 및 귀 절편은 헤마톡실린-에오신 Y(hematoxylin-eosin Y, Sigma-Aldrich, USA)로 염색하였으며, 슬라이드는 100X의 고정 배율에서 광학 현미경으로 관찰하였다. 이때 16개의 슬라이드는 무작위로 선택하였으며, 표피 두께는 측정된 3개 평균값으로 나타내었다.

7. 면역형광 현미경법(Immunofluorescence microscopy)

HaCaT 세포를 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시켜 주었으며, 0.5% 트리톤 X-100이 함유된 PBS를 15분 동안 처리한 후, 5% 염소 혈청(goat serum) 및 0.1% BSA로 블로킹하였다. 이후 항-클라우딘 1(anti-claudin 1) 항체 및 항-클라우딘 6(anti-claudin 6) 항체(Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)를 밤새동안 반응시켰다. 토끼 IgG 및 마우스 IgG(ThermoFisher Scientific, MA, U.S.A.)에 대해 알렉사플루오르 488(Alexa Fluor 488)- 및 알렉사플루오르 532-접합된 염소 항체를 각각의 2차 항체로 사용하였다.

마우스의 피부 조직을 염색하기 위해, 항-클라우딘 1(Santa Cruz Biotechnology, USA) 및 항-NMHC II-A(Covance, USA)를 사용하였으며, 마우스 IgG 및 토끼 IgG(ThermoFisher Scientific, U.S.A.)에 대해 알렉사플루오르 488- 및 알렉사플루오르 532-접합된 염소 항체는 각각의 2차 항체로 사용하였다. 핵은 DAPI(ThermoFisher Scientific, U.S.A.)로 염색하였으며, 이미지는 LSM 510 라이브 구성 바리오 투(Live Configuration Vario Two) VRGB 공초점 레이저 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 확인하였다.

8. 통계 분석(statistical analysis)

모든 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, 마우스 피부병변에 대한 DNCB 대 보르테조밍 처리 그룹간의 차이의 통계적 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였다. 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 결과는 *, ** 또는 ***로 표시하였으며, *는 $p < 0.05$, **는 $p < 0.01$, ***는 $p < 0.001$ 임을 의미한다.

실시예 1. 프로테아좀 억제제 처리에 따른 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 증가 효과

본 실시예 1에서는 사람 유래 피부각질세포(human keratinocyte)인 HaCaT 세포에 프로테아좀 억제제인 보르테조

밈(BTZ; bortezomib), MG132 및 VR23을 농도별로 각각 12시간 동안 처리한 후, 클라우딘 1 단백질의 발현 양상을 면역블롯 분석(Immunoblot analysis)을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 보르테조밈(BTZ), MG132 및 VR23을 HaCaT 세포에 각각 처리하였을 때, 농도의존적으로 클라우딘 1 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 또한, HaCat 세포에 50nM의 보르테조밈을 12시간 동안 처리한 후, 면역형광법(Immunofluorescence)을 통해 클라우딘 1 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 보르테조밈을 HaCat 세포에 처리하였을 때, 보르테조밈 대신에 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 처리한 대조군(control)에 비해 세포-세포 사이에 밀착연접(tight junction)을 형성하는 클라우딘 1 단백질의 발현 정도(초록색)가 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 2. 보르테조밈(bortezomib) 처리에 따른 아토피 피부염 개선 효과**

[0056] **(1) 마우스의 등**

[0057] 8주령의 Balb/c 수컷 마우스를 대상으로 아토피 피부염 유도물질인 1% DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)로 감작(sensitization)한 후, 실험이 종료될 때까지 0.2% DNCB를 2일에 한번씩 마우스의 등에 도포하였으며, 14일째부터 보르테조밈(50nM 및 500nM) 250 μ l을 하루에 한번씩 마우스의 등에 도포하였다(도 3). 그 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 DNCB 단독 처리군에 비해 DNCB + 보르테조밈(BTZ) 처리군의 경우, DNCB 처리로 인해 아토피 피부염이 유도되는 것을 억제하는 효과가 있었으며, 특히 500nM의 보르테조밈을 처리하였을 때, 보르테조밈 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리하고 DNCB를 처리하지 않은 정상군(Vehicle)과 유사한 수준으로 아토피 피부염이 완화되는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 보르테조밈을 처리한 아토피 피부염 유도 동물 모델의 피부조직을 4% 파라포름알데히드로 고정한 후 동결절편하여 H&E 염색을 통해 조직학적 변화를 관찰하였을 때, 아토피 피부염 유도물질인 DNCB 처리군은 정상군(Vehicle)에 비해 피부 표피층(epidermis)이 많이 비후되어 있었으며, DNCB + 보르테조밈(BTZ) 처리군의 경우, 정상군(Vehicle)과 유사한 수준으로 회복되었다. 이는 아토피성 피부염 동물모델이 보르테조밈(BTZ)에 의해 외형상 뿐만 아니라 조직학적으로도 유효한 효과를 보임을 의미한다.

[0058] 또한, 도 5에 개시한 바와 같이 DNCB + 보르테조밈(BTZ) 처리군의 경우, DNCB 처리군에 비해 피부병변에 대해 낮은 점수를 나타내어, 병변 상태가 더 양호하였으며, 피부조직의 두께가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0059] **(2) 마우스의 귀**

[0060] 8주령의 Balb/c 수컷 마우스를 대상으로 아토피 피부염 유도물질인 1% DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)로 감작(sensitization)한 후, 실험이 종료될 때까지 0.2% DNCB를 3일에 한번씩 마우스의 귀에 도포하였으며, 14일째부터 보르테조밈(50nM) 40 μ l을 하루에 한번씩 마우스의 귀에 도포하였다(도 6). 또한, 정상 마우스의 귀에 50nM의 보르테조밈을 도포하여 정상적인 피부에 보르테조밈의 영향을 확인하였다. 그 결과, 도 7에 개시한 바와 같이 본 발명의 보르테조밈 단독 처리군(BTZ)의 경우, 보르테조밈 대신에 아세톤과 호호바 오일(Jojoba oil)을 3:1의 부피비로 혼합한 혼합액을 처리한 정상군(Vehicle)과 비교하여 큰 차이가 없는 것으로 보아 보르테조밈은 정상적인 피부에 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인하였으며, DNCB + 보르테조밈(BTZ)을 처리하였을 때, 정상군(Vehicle)과 유사한 수준으로 아토피 피부염이 완화되는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 보르테조밈을 처리한 아토피 피부염 유도 동물 모델의 귀를 4% 파라포름알데히드로 고정한 후 동결절편하여 H&E 염색을 통해 조직학적 변화를 관찰하였을 때, 아토피 피부염 유도물질인 DNCB 처리군은 정상군(Vehicle)에 비해 피부 표피층(epidermis)이 많이 비후되어 있었으며, DNCB + 보르테조밈(BTZ) 처리군의 경우, 정상군(Vehicle)과 유사한 수준으로 회복되었다.

[0061] 또한, 도 8에 개시한 바와 같이 21일까지는 모든 처리군의 귀 두께가 증가하였으나, DNCB + 보르테조밈(BTZ) 처리군의 경우, 22일부터 DNCB 처리군에 비해 귀의 두께가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

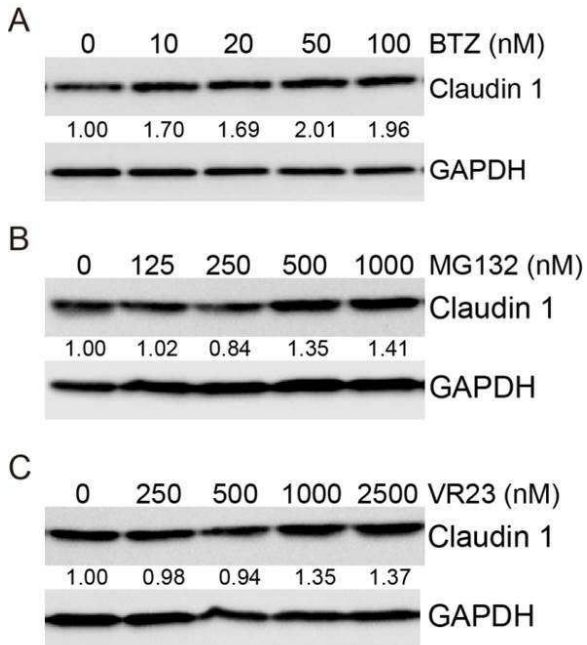
[0062] **실시예 3. 아토피 피부염 모델 마우스 피부에서 보르테조밈(bortezomib) 처리에 따른 클라우딘 1 단백질의 발현 증가 효과**

[0063] 본 실시예 3에서는 DNCB로 유도된 아토피 피부염 모델에 보르테조밈을 처리한 피부에서 분리한 단백질 추출물을 대상으로 클라우딘 1(claudin 1) 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해 면역블롯(immunoblot)을 수행하였다. 그 결과, 도 9A에 개시한 바와 같이 DNCB 처리로 아토피 피부염을 유도한 후, 본 발명의 보르테조밈을 처리하였을 때, DNCB를 단독으로 처리한 군에 비해 클라우딘 1 단백질의 발현량이 현저하게 증가하였다. 또한, 면역형광법

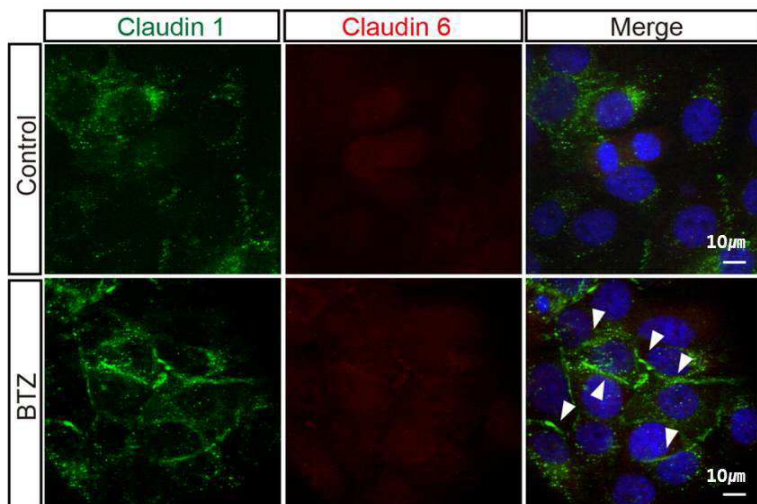
(Immunofluorescence)을 통해 DNCB로 유도된 아토피 피부염 모델의 피부 조직에서 클라우딘 1 단백질의 발현 정도를 확인한 결과, 특히 500nM의 보르테조미드를 처리하였을 때, DNCB 처리로 인해 밀착연접에서 감소되었던 클라우딘 1 단백질의 발현량(초록색)이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다(도 9B).

도면

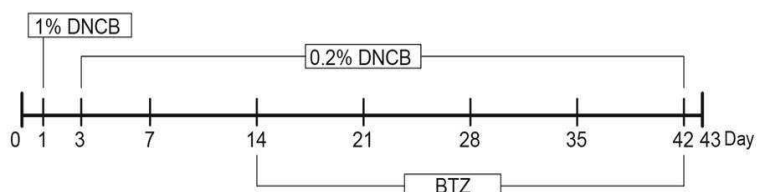
도면1



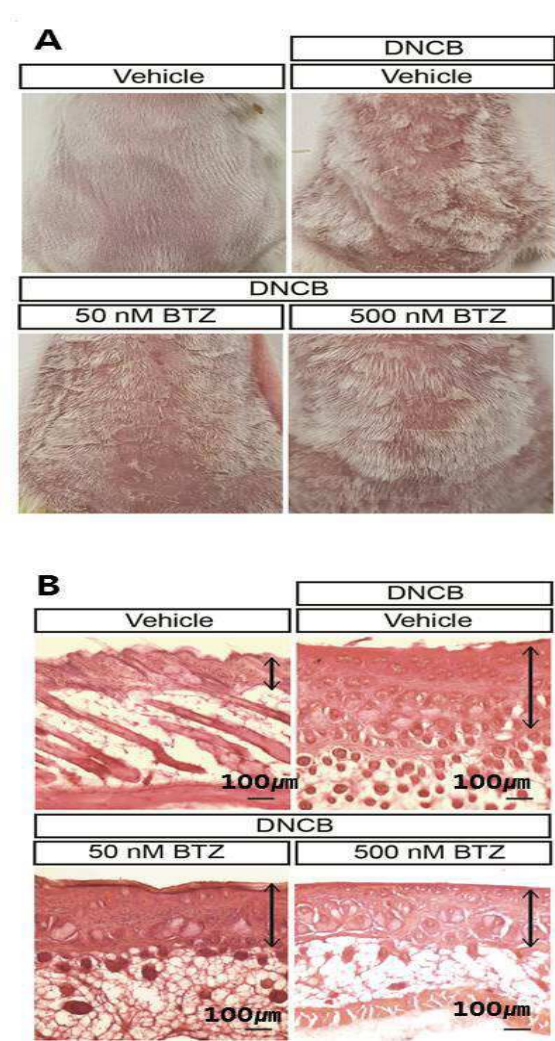
도면2



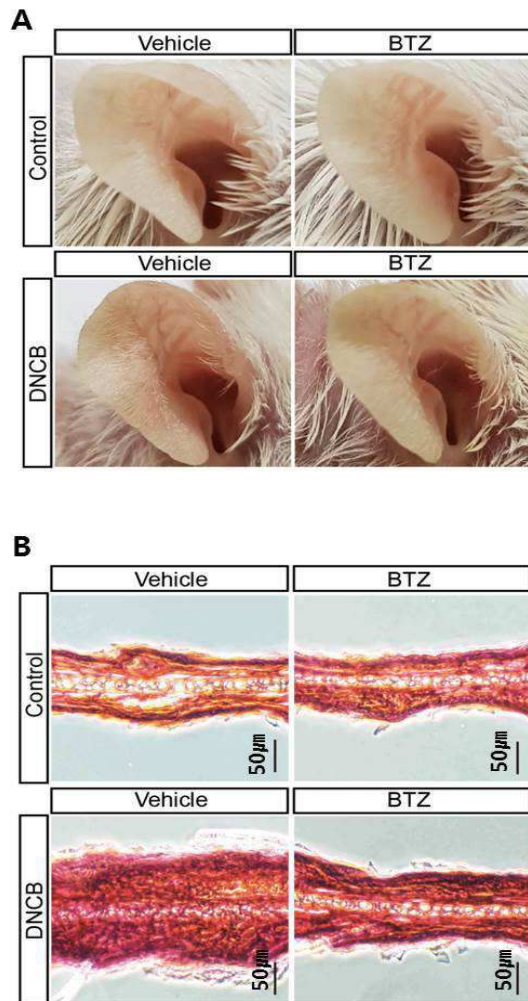
도면3



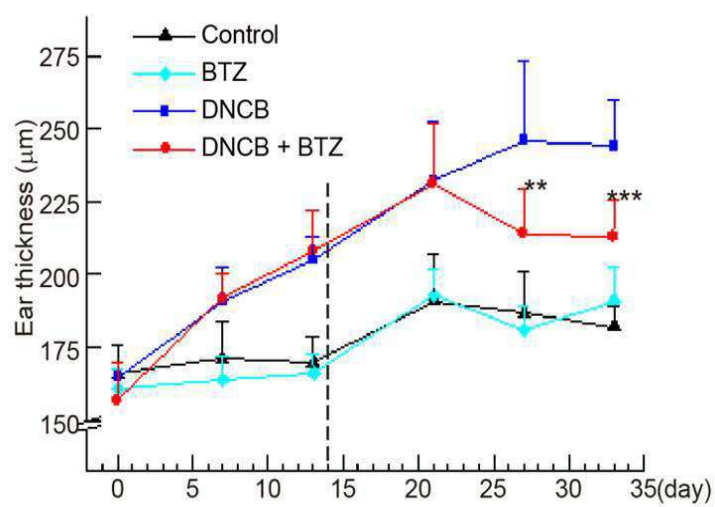
도면4



도면7



도면8



도면9

