

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 5월 30일 (30.05.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/077617 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/009842
- (22) 국제출원일: 2012년 11월 20일 (20.11.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0122447 2011년 11월 22일 (22.11.2011) KR
- (71) 출원인: 동국대학교 산학협력단 (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 100-715 서울시 중구 필동 3가 26, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이애영 (LEE, Ai-Young); 110-044 서울시 중구 필운동 254번지 신동아블루아 아파트 801호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 구로동 197-22번지 에이스테크노타워 5차 601호, Seoul (KR).

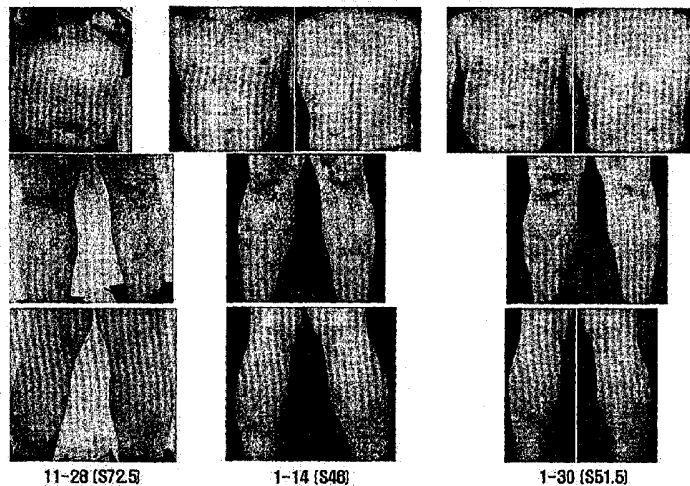
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING, TREATING OR ALLEVIATING ATOPIC DERMATITIS COMPRISING IMMUNOSUPPRESSANT AND TRANSGLUTAMINASE 2 INHIBITOR

(54) 발명의 명칭 : 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제를 포함하는 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing, treating or alleviating atopic dermatitis comprising an immunosuppressant and a transglutaminase 2 inhibitor as active ingredients. Conjoint administration of an immunosuppressant and a transglutaminase 2 inhibitor according to the present invention makes it possible to achieve far better therapeutic effects than with administration of either an immunosuppressant or a transglutaminase 2 inhibitor alone, since there is a reduction in the dose of an immunosuppressant which is difficult to administer for a long time because of side effects and with which, when discontinued, lesions are liable to become exacerbated to the original state, and since an immunosuppressant is mixed with a transglutaminase 2 inhibitor which in some patients has a lacklustre effect in treating atopic dermatitis.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/077617 A1



본 발명은 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제의 병용 투여는, 부작용으로 인하여 장기 투여가 어렵고, 중단 시 원상으로 병변이 악화되기 쉬운 면역억제제의 용량을 감량하고, 일부 환자에게서 아토피 치료 효과가 미진했던 트랜스글루타미나제 2 억제제를 면역억제제와 혼합하여, 면역억제제 또는 트랜스글루타미나제 2 억제제의 단독 투여보다 매우 높은 치료 효과를 달성할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제를 포함하는 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.
- 배경기술**
- [2] 아토피 피부염(atopic dermatitis)은 공통적으로 원인 불명의 강한 소양감을 보이고 그 외에 피부의 건조, 피부 홍반과 염증이 복합적으로 동반되는 피부의 이상 증후군이다(Lancet. 1998; 351:1715-1721). 아토피 피부염은 장기간 생활에 큰 불편을 끼치는 만성 질환으로, 주로 영아나 유아에게서 일어난다. 이는 전체 영아, 유아의 10 내지 15%에서 발생하는데, 아토피 환자군 내의 발생 현황을 살펴보면, 1년 이하의 영아기 때 60%가, 5년 이하의 유아기 때 85%가 발생한다(Lancet. 1998; 351:1715-1721). 아토피 피부염 어린이 환자의 40%는 성장과 함께 병세가 점점 개선되었으나 급격한 산업화로 유발된 공해, 환경오염 등으로 인해 성인의 발생율이 전체 성인의 1 내지 3% 정도 (Immunol. Allergy. Cli. North Am. 2002; 22:1-24)로 산업화 이전에 비해 2 내지 3배로, 그 발생율이 증가되고 있다 (Lancet. 2003; 361:151-160). 이러한 이유로 많은 연구자들이 아토피 피부염의 임상적인 증상을 감소시키는데 관심을 갖고 있다.
- [3] 아토피성 피부염의 임상증상은 개인에 따라 차이는 보이지만, 대표적으로 나타나는 증세는 첫째로 극심한 가려움증을 호소하고, 둘째로 환자의 피부가 건조한 상태로 유지되어 불쾌감을 갖게 하며, 셋째로는 건조성 피부로 인해 피부 표면의 방어기능이 소실되어 외부로부터 자극물질의 피부침입이 쉬워지고, 이러한 침입물로 인하여 피부가 거부반응을 일으켜 염증반응이 일어나는 것이다 (Lancet. 1998; 351:1715-1721, J. Pediatr.Health Care. 2002; 16:143-145).
- [4] 아토피 피부염의 원인과 치료에 대해서는 최근까지 많은 연구가 진행되고 있으나, 질환 자체의 복잡성과 서로 상충되는 연구 데이터들로 인해 정확한 병인과 유효한 치료법에 대해서 아직까지 명확한 이론이 확립되지 않은 상태이다.
- [5] 현재까지 개발되어 있는 아토피성 피부염 치료제는 스테로이드, 타크로리무스, 피메크롤리무스와 같은 국소 항염증 제제, 항히스타민제 및 사이클로스포린과 같은 면역억제제 등이 이용되고 있다. 또한, 보조적인 요법으로 저자극성 보습제 사용, 자외선 A를 이용한 광화학요법도 임상에서 시행되고 있다. 그러나, 이러한 치료법 또는 치료제는 근본적인 치료보다는 증상을 적절한 수준으로 조절하는데 도움을 주는 것으로서, 현재까지 아토피 피부염 환자들의 요구를 완전히 충족시켜주지 못하고 있다.

- [6] 이러한 요구에 부응하기 위해 본 발명자는 이미 안전성이 인정되어 상용화되고 있는 천연물질인 트랜스글루타미나제 억제제로서의 글루코사민을 유효성분으로 함유한 아토피 피부염 치료제를 개발한 바 있다(대한민국공개특허 제2008-0035997호). 그러나, 글루코사민은 일부 개체에서만 치료 효과를 보일 뿐 심한 아토피 피부염 환자에서는 치료 효과가 미약하였다. 한편, 기존 치료법이 잘 안 듣는 심한 아토피 피부염 환자에게는 사이클로스포린과 같은 면역억제제가 사용되고 있다. 이러한 면역억제제는 효과는 우수하지만, 신장독성, 치은 비후, 다모증, 신경독성, 고혈압, 고지혈증, 고혈당, 고칼륨혈증, 고요산혈증, 용혈요독 증후군, 감염과 같은 부작용이 우려되는 단점이 있다. 또한, 면역억제제의 부작용으로 인하여 장기투여에 어려움이 있음에도 불구하고 투여를 중단할 경우 원래 상태로 환원되는 문제점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자는 상기와 같은 문제점을 해결하고, 과다 투여시 부작용이 유발될 수 있는 면역억제제의 부작용을 줄이면서도 아토피 피부염 치료 효과가 높은 치료법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 트랜스글루타미나제 2 억제제를 포함시키는 경우 면역억제제의 사용 용량을 줄이면서도 아토피 피부염의 치료 효과는 면역억제제를 단독 투여한 경우보다 상승하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [8] 본 발명의 목적은 면역억제제의 용량을 감량하여도 면역억제제 이상의 우수한 치료 효과를 보일 수 있는 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 치료용 약학적 조성물 및 아토피 피부염 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [10] 또한 본 발명은 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명에 따른 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제의 병용 투여는, 부작용으로 인하여 장기 투여가 어렵고, 중단 시 원상으로 병변이 악화되기 쉬운 면역억제제의 용량을 감량하고, 면역억제제 또는 트랜스글루타미나제 2 억제제의 단독 투여보다 매우 높은 아토피 치료 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 글루코사민(500 mg/kg/day)과 타크로리무스(FK-506)(1.0mg/kg/day)를 단독 또는 병용 투여한 후 임상 피부 점수(clinical skin score)를 측정하여 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [13] 도 2는 글루코사민(500 mg/kg/day)과 타크로리무스(FK-506)(1.0mg/kg/day)를 단독 또는 병용 투여한 후 아토피 유도된 NC/Nga 마우스에서의 피부 병변의 변화를 임상적으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [14] 도 3은 사이클로스포린(CsA)(10, 45, 100 mg/kg/day)과 글루코사민(100, 500 mg/kg/day)을 단독 또는 병용 투여한 후, 임상 피부 점수를 측정하여 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [15] 도 4는 글루코사민을 500mg/kg/day 용량으로 고정하고, 사이클로스포린(CsA)의 용량을 달리하여 단독 또는 병용 투여한 후, 임상 피부 점수를 측정하여 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [16] 도 5 내지 도 8은 타크로리무스(FK-506) 1.0mg/kg/day와 글루코사민 500mg/kg/day을 단독 또는 병용 투여한 후, IL-5(도5), IL-13 (도6), TARC (도 7) 및 이오타신(eotaxin)(도 8)의 발현을 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [17] 도 9는 사이클로스포린 (CsA)(2, 5, 10mg/kg/day)과 글루코사민 (500mg/kg/day)을 단독 또는 병용 투여한 후, IL-5, IL-13, 이오타신(eotaxin), TARC 및 TSLP의 감소 효과를 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [18] 도 10은 타크로리무스(FK-506)(1.0mg/kg/day)와 글루코사민(500mg/kg/day) 단독 또는 병용 투여시, CLA+ 및 CD3+ T세포의 저해 효과를 나타낸 도이다.
- [19] 도 11은 저용량의 사이클로스포린(CsA)(2, 5, 10mg/kg/day) 와 글루코사민 (500mg/kg/day)을 단독 또는 병용투여 하는 경우, CD4+CD25+ 조절 T 세포수의 감소 효과를 나타낸 도이다.
- [20] 도 12는 및 도 13은 타크로리무스(FK-506)(1.0mg/kg/day)와 글루코사민 (500mg/kg/day)을 단독 또는 병용 투여 시, 비만세포 및 호산구의 증식, 활성의 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 14는 사이클로스포린 (CsA)(10mg/kg/day) 저용량과 글루코사민 (500mg/kg/day)을 단독 또는 병용 투여 시, 피부 병변에 침투한 비만세포 및 호산구 수를 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 15는 타크로리무스(FK-506)와 글루코사민 병용 투여에 의한 혈청 IgE 감소 효과를 나타낸 도이다.
- [23] 도 16은 사이클로스포린(CsA)과 글루코사민 병용 투여에 의한, 인보루크린 (Involucrin) 및 필라그린(filaggrin) 발현의 변화를 나타낸 도이다.
- [24] 도 17은 아토피 피부염 환자에게 글루코사민을 단독 투여하는 방법과 사이클로스포린과 글루코사민을 혼합한 조성물을 투여하는 방법을 반복하면서, 투약방법이 변경될 때마다 측정한 SCORAD 지수를 나타낸 도이다.
- [25] 도 18은 사이클로스포린과 글루코사민을 병용-단독 또는 단독-병용을 번갈아 시행하면서, 투약방법이 변경될 때마다 측정한 SCORAD 지수를 나타낸

도이다(위: 10명 전체의 결과, 아래 왼쪽: 병용을 먼저 시행한 5명의 결과, 아래 오른쪽: 병용을 나중에 시행한 5명의 결과를 나타냄).

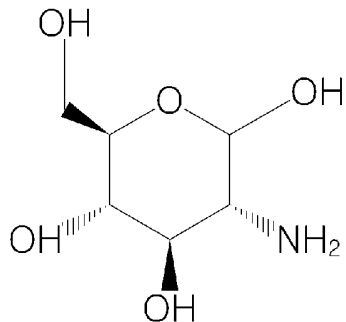
- [26] 도 19는 도18의 값들의 평균값을 구하여 병용을 먼저 시행한 5명(DRUG1)에서의 평균 SCORAD 변화(아래 왼쪽)와 단독을 먼저 시행한 5명(DRUG0)에서의 평균 SCORAD 변화(아래 오른쪽), 전체 환자의 결과에 각각의 평균선을 함께 표시하여 비교가 가능하도록(위) 나타낸 도이다.
- [27] 도 20은 사이클로스포린에 글루코사민을 병용한 경우와 사이클로스포린 단독을 투여한 경우의 목적 함수값 (objective functional value; OFV)을 계산한 결과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 21은 사이클로스포린과 글루코사민을 병용투여한 후 지정된 시간별로 환자의 환부를 촬영한 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 22 사이클로스포린과 글루코사민(자스민)을 병용투여한 후, 사이토카인 (IL-4, IL-5, IFN- β , IFN- γ)의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 23은 사이클로스포린 단독 투여와 사이클로스포린과 글루코사민을 병용투여했을 때의 IL-4 발현량 변화의 평균값을 나타낸 도이다.
- [31] 도 24 내지 도 26은 면역억제제인 타크로리무스(FK-506), 사이클로스포린, 글루코사민, 텍사메타존을 단독 투여한 경우의 염증 억제 효과를 IFN-g(도 24), IL-4(도 25), IL-5(도 26)의 변화를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [32] 본 발명은 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는, 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [33] 상기 조성물은 약학적 조성물 및 화장료 조성물을 포함한다.
- [34] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [35] 본 발명의 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제를 병용 투여하면, 아토피 피부염 환자의 염증성 사이토카인의 분비가 효과적으로 감소하게 되며, 아토피 피부염 치료를 위한 유효량보다 훨씬 적은 양의 면역억제제로도 아토피 피부염 치료 효과를 확인할 수 있어, 면역억제제에 따른 부작용을 줄일 수 있다.
- [36] 상기 "면역억제제"는 생체의 면역반응을 억제하는 약제를 통칭한다. 상기 면역억제제로는 글루코코르티코이드(Glucocorticoid), 사이클로스포린(Cyclosporine), 타크로리무스(Tacrolimus, FK506), 피메크롤리무스(Pimecrolimus), ISA(TX)247을 포함한 칼시뉴린(calcineurin) 억제제, 라파마이신(Rapamycin), 타입 IV PDE 억제제 (Type IV PDE inhibitors), 마이코페놀레이트 모페틸 (Mycophenolate Mofetil), 텍사메타존 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 공지된 모든 면역억제제를 이용할 수 있다.
- [37] 또한 1 종의 면역억제제를 단독으로 이용하거나, 2 종 이상의 면역억제제를 조합으로 이용할 수 있으며, 바람직하게는 상기 면역억제제로서 사이클로스포린, 타크로리무스, 텍사메타존, 피메크롤리무스로 구성된 군에서

선택된 1종 이상을 이용할 수 있다.

- [38] 상기 "트랜스글루타미나제 2 (transglutaminase 2, 이하 TG2) 억제제"는 TG2의 활성 억제제 또는 TG2의 발현 억제제를 모두 포함한다. TG2는 서로 다른 단백질의 글루타민기와 라이신기가 엡실론 감마 글루타밀라이신(ϵ - γ -glutamyl-lysine) 결합하는 것을 촉매하는 효소(Methods in Enzymol. 1985; 113: 358-375)로 피부 손상을 예방하고 손상된 조직을 치유하는데 중요한 인자로 여겨지고 있다 (FASEB J. 1999; 13: 1787-1795). 그러나, 비정상적으로 활성화된 TG2는 뇌질환, 동맥경화, 염증성 질환, 자가면역질환과 섬유증과 같은 여러 가지 질환의 발병에 기여한다 (Neurochem. Int. 2002; 40: 85-103).
- [39] 본 발명에서 TG2의 활성 억제제는 바람직하게는 TG2의 활성을 중화시킬 수 있는 항-TG2 항체일 수 있다. 본 발명에서 항-TG2 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 TG2 단백질을 항원으로 하여 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다.
- [40] 또 다른 TG2의 활성 억제제는 TG2의 활성을 억제하는 화합물로서, 예를 들면, 시스타민 (cystamine), 푸트레신 (putrescine), 모노단실카다베린 (monodansylcadaverine), w-디벤질아미노아킬아민 (w-dibenzylaminoalkylamine), 3-할로-4,5-디히드로이소キサ졸 (3-halo-4, 5-dihydroisoxazole), 2-[(2-옥소프로필)티오]이미다졸리움 유도체 (2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium derivatives) 등을 언급할 수 있다. 또한, 에피갈로카테킨 갈레이트 (epigallocatechin gallate) 또는 클로로젠산 (chlorogenic acid)이 이용될 수 있다.
- [41] 본 발명의 "TG2 유전자의 발현 억제"는 유전자 전사의 억제 및 단백질로의 번역 억제가 포함되며 유전자 발현이 완전히 정지된 것뿐만 아니라 발현이 감소된 것도 포함된다. 유전자의 발현을 억제하는 방법으로는 안티센스 분자를 이용하는 것이 가장 보편적이다. 안티센스 분자가 표적 유전자의 발현을 억제하는 작용으로는 삼중쇄 형성에 의한 전사개시 저해, RNA 폴리머라제에 의해 국부적인 개상 루프 구조가 만들어진 부위에서 하이브리드 형성에 의한 전사 억제, 합성이 진행되고 있는 RNA에서 하이브리드 형성에 의한 전사 저해, 인트론과 엑손과의 접합점에서 하이브리드 형성에 의한 스플라이싱 억제, 스플라이소좀 형성 부위에서 하이브리드 형성에 의한 스플라이싱 억제, mRNA와의 하이브리드 형성에 의한 핵으로부터 세포질로의 이행 억제, 번역 개시인자 결합 부위에서 하이브리드 형성에 의한 번역개시 억제 등이 있다. 이들은 전사, 스플라이싱 또는 번역 과정을 저해하여 표적 유전자의 발현을 억제한다.
- [42] 본 발명에 사용되는 안티센스 분자는 상기의 어느 작용으로든지 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있으며, 대표적인 안티센스 분자로는 3중쇄, 리보자임 (ribozyme), RNAi, 또는 안티센스 핵산 등이 포함될 수 있다.
- [43] TG2 억제제의 바람직한 일례로써 글루코사민을 이용할 수 있다.

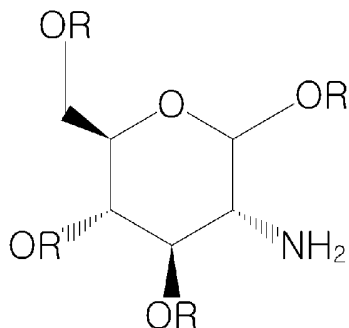
"글루코사민"은 바닷게 껍질이나 새우 껍질의 주성분인 키토산의 분해산물이다. 바닷게 또는 새우 껍질의 주성분은 키틴과 키토산으로, 키틴은 2-아세트아미도-2-데옥시-베타-D-글루코오스(N-아세틸글루코사민)로 구성되어 있으며, 키토산은 키틴의 탈아세틸화가 일어난 다당류로서 폴리(베타-(1,4)-글루코사민)이다. 글루코사민은 다음과 같은 화학식 1의 구조를 가진다.

[44] 화학식 1



[45] 본 발명에서는 글루코사민 대신에 글루코사민 유도체가 이용될 수도 있다. 본 발명에서 용어 "글루코사민 유도체"는 글루코사민의 하이드록시기의 수소가 아실 또는 알킬화합물로 치환된 것으로, 하기 화학식 2의 구조를 가지는 것을 말한다.

[46] 화학식 2



[47] 상기 식에서, R은 탄소수가 2 내지 18개인 아실기 또는 1 내지 5인 직쇄 또는 측쇄 알킬로서, 바람직하게는 아세틸 프로피오닐, 부티릴, 펜타오닐, 헥사노일, 헵타노일, 옥타노일, 노나노일, 데카노일, 운데카노일, 라우릴, 트리데카노일, 미리스틸, 펜타데카노일, 팔미토일, 마가릴 또는 스테아릴기 등의 아실기이거나, 또는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 이소프로필, 이소부틸 또는 sec-부틸기 등의 알킬기일 수 있다.

[48] 또한, 본 발명에 사용되는 글루코사민 또는 그의 유도체는 그 사용 용도 등에 따라 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있다. 이러한 염의 형태는, 예를 들어 글루코사민 또는 글루코사민 유도체의 황산염, 글루코사민 또는 글루코사민 유도체의 염산염, 글루코사민 또는

글루코사민 유도체의 말레이트 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
바람직한 염의 형태는 글루코사민 또는 글루코사민 유도체의 황산염이다.

- [49] 본 발명의 조성물에서 사이클로스포린과 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 1.8 내지 2000의 중량비로 함유되는 것이 바람직하며, 타크로리무스와 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 18 내지 2000의 중량비로 함유되는 것이 바람직하다. 또한, 아토피 피부염의 중증도가 심할수록 면역억제제의 함량을 높이고, 치료에 의해 중증도가 낮아질수록 면역억제제의 함량을 줄이는 것이 바람직하다.
- [50] 본 발명의 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 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 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화한다.
- [51] 본 발명의 조성물은 경구 투여용 고상 제제로 제형화되는 것이 바람직하다. 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스 또는 락토스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [52] 또한, 본 발명의 조성물은 경구 투여용 액상 제제로 제형화되는 것이 바람직하다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제(예를 들면, 정제수, 에탄올, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [53] 또한, 본 발명의 조성물은 비경구 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액 (Hank's solution), 링거 용액 (Ringer' solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충 용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기제인 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween)

- 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [54] 인간 환자에게 투여되는 경우, 본 발명의 조성물의 총 1일 사용량은 의학적인 판단 범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 조성물의 분비율, 치료 기간을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [55] 바람직하게는 사이클로스포린은 0.025mg/kg 이상 2.9 mg/kg 이하로 글루코사민과 혼합복용될 수 있고, 타크로리무스는 0.0025mg/kg 이상 0.29 mg/kg 이하로 글루코사민과 혼합복용될 수 있다. 트랜스글루타미나제 2 억제제로서 글루코사민은 5mg/kg 이상 50mg/kg 이하로 혼합 처방 및 복용될 수 있으며, 복용 횟수는 환자의 피부 상태에 따라 적절히 가감하여 하루 1회 내지 3회 복용할 수 있다. 또한 사이클로스포린의 경우 피부 병변 상태에 따라, 최고 5mg/kg까지 혼합하여 복용될 수 있다.
- [56] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 피부 외용제 또는 화장료 제제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 피부 외용제는 연고제, 경고제, 스프레이제, 현탁액, 유액, 크림, 젤 등을 포함하는 것일 수 있다.
- [57] 면역억제제로서 사이클로스포린과 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 1.8 내지 2000의 중량비로 함유되는 것이 바람직하며, 타크로리무스와 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 18 내지 20000의 중량비로 함유되는 것이 바람직하다.
- [58] 본 발명의 바람직한 일 예로써, 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제는 화장료 조성물 총 건조 중량에 대하여 0.001 내지 5중량%로 포함되는 것이 바람직하다.
- [59] 또한 본 발명의 화장료 조성물은 상기한 유효성분 외에도 필요에 따라 본 발명의 효과를 저하시키지 않는 범위 내에서 피부 외용제에 일반적으로 사용하는 각종 성분, 예를 들면 수용성 성분, 분말 성분, 유분, 계면활성제, 보습제, 점도 조절제, 방부제, 산화방지제, 향료, 색소 등을 배합하는 것이 가능하다. 또한 종래의 아토피피부 치료제에 많이 사용되어온 세라마이드(Ceramides) 등 보습제 또는 지질 (Lipids) 성분이나 하이드로코티손 (Hydrocortisone) 등의 스테로이드 (Steroids), 레티닐 팔미테이트 (Retinyl palmitate) 등의 비타민A 유도체 또는/및 토코페롤 (Tocopherol), 기타 식물추출물 등을 공지의 레시틴 (lecithin)을 이용하여 리포솜 (liposome) 형태로 만들거나 N-스테아로일-파이토스핑고신 (Nstearoyl-phytosphingosine)에 포접시켜 병용도 가능하다.
- [60] 본 발명의 화장료 조성물의 제형은 임의로 선택할 수 있으며, 종래의 화장료제형인 피부외용연고, 에센스, 미백 크림, 로션, 에멀전, 팩, 일반화장수, 스킨밀크, 크림, 세럼, 미용비누, 유연화장수, 약용화장수, 헤어토닉, 전신세정제,

오일젤과 같은 여러 가지 형태로 제조할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 및 향료로 이루어지는 군으로부터 1 종 이상 선택되는 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 바람직한 제형으로 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 맛사지크림, 영양세럼, 에센스, 팩의 제형을 가질 수 있다.

[61] 본 발명의 화장료 조성물은 피부 염증 부위에 도포함으로써 아토피 피부염을 완화, 개선할 수 있다. 도포양은 환자의 염증 부위에 따라 적절히 가감될 수 있으며, 하루 1회 내지 5회 반복 도포하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[62] 본 발명의 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물을 이용하면, 초기 심한 아토피 환자에 대해서는 증상을 완화시키는 치료의 효과를 기대할 수 있으며, 면역제제 단독 요법보다 용량을 줄여 사용할 수 있으므로 장기간 병용 투여가 가능하여 소양감을 개선하고 아토피 환자가 장기간 바람직한 피부 상태를 유지할 수 있도록 할 수 있다. 즉, 본 발명의 아토피 피부염 예방 또는 치료용 조성물을 이용하는 경우, 아토피 증상의 완화에 따른 치료효과 뿐만 아니라 극심한 소양감 및 피부염 증상이 유발되지 않도록 하는 예방의 효과도 기대할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[63] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[64] 실시예 1. 아토피 피부염에 걸린 마우스에서의 아토피 치료 효과 확인

[65] 1.1 실험 재료 및 방법

[66] 8주령의 수컷 NC/Nga 마우스는 Shizuoka Laboratory Animal Center (Hamamatsu, Japan)에서 구입하였다. 글루코사민은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), 타크로리무스(FK-506) 및 사이클로스포린은 종근당에서 구입하여 사용하였다. Df body 연고는 Biostir Inc.(Kobe, Japan)에서 준비하였다. NC/Nga 마우스에서 아토피를 유도하기 위하여, 마우스의 털을 제거하고 등과 귀에 4% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 처리하였으며 3시간 후, Df body 연고를 도포하였다. 이러한 과정을 4주 동안 2번씩 반복하였다. 피부 병변은 임상 피부 점수(clinical skin score)를 이용하여 확인하였다. 임상 피부 점수(clinical skin score)는 홍반/출혈(erythema/hemorrhage), 흉터/건조(scarring/dryness), 부종(edema) 및 찰과상/진무름(excoriation/erosion) 증상을 기초로 하여 0(none)~ 8(severe)으로 점수를 내고, 그 점수를 합산하여 측정하였다.

[67] 면역억제제와 TG2 억제제의 단독/ 병용 투여의 효과는 임상 피부 점수가 8인 마우스를 사용하였으며, NC/Nga 마우스의 Df-유도된 피부염을 사용하여 아토피 개선 효과를 확인하였다.

[68]

[69] **1.2 면역억제제와 TG2억제제의 단독 또는 병용 투여에 의한 아토피 개선 효과 비교**

[70] 면역억제제인 타크로리무스, 사이클로스포린과 TG2 억제제인 글루코사민의 복합 투여에 의한 효과를 확인하기 위하여, 글루코사민을 3주 동안 하루에 1회씩 경구적으로 타크로리무스 또는 사이클로스포린과 단독 또는 혼합하여 투여하였다. PBS를 대조군으로써 약물 대신에 투여하였으며 각각의 그룹은 5마리의 마우스로 구성되었다.

[71]

[72] **1.2.1 면역억제제와 글루코사민 병용 투여에 의한 임상 피부 점수 비교**

[73] 타크로리무스와 글루코사민의 병용 투여 효과

[74] 글루코사민은 500mg/kg/day로, 타크로리무스는 아토피 치료 및 예방 효과를 나타내는 용량인 1.0 mg/kg/day로 투여하였다. 글루코사민과 타크로리무스(FK-506)를 단독 또는 병용 투여한 후, 아토피 유도된 NC/Nga 마우스에서의 임상 피부 점수를 확인하였다.

[75] 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[76] 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 글루코사민에 타크로리무스(FK-506)가 병용 투여된 그룹이 글루코사민 단독 또는 타크로리무스(FK-506) 단독 투여군보다 임상 피부 점수 및 임상적인 측면에서 뚜렷하게 병변이 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

[77]

[78] 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여 효과

[79] 사이클로스포린(CsA) 10, 45, 100 mg/kg/day와 글루코사민 100, 500 mg/kg/day를 단독 또는 병용투여하고, 피부병변을 유발한 NC/Nga 생쥐에서 치료효과를 임상 피부 점수를 통해 확인하였다.

[80] 결과를 도 3에 나타내었다.

[81] 도 3에 나타낸 바와 같이, 사이클로스포린 저용량인 10 mg/kg/day 자체는 효과가 유의하지 않았으나 글루코사민 100 mg/kg/day를 병용투여하자 유의한 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 글루코사민은 500mg/kg/day 용량으로 병용 투여하자 사이클로스포린 적정용량인 45mg/kg/day뿐만 아니라, 고용량인 100 mg/kg/day 단독과 유사하거나 약간 좋은 치료효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[82] 이러한 결과에 따라, 글루코사민을 500mg/kg/day 용량으로 고정된 후 사이클로스포린을 2, 5, 10 mg/kg/day인 저용량으로 하여도 치료 효과를 나타내는지 임상 피부 점수를 통해 확인하였다.

[83] 결과를 도 4에 나타내었다.

[84] 도 4에 나타낸 바와 같이, 사이클로스포린을 2 mg/kg/day인 저용량으로 투여하여도 글루코사민과 병용투여시 사이클로스포린(CsA) 10 mg/kg/day를

단독 투여한 경우보다 좋은 효과를 나타내었다.

[85]

[86] **1.2.2 면역억제제와 글루코사민 병용 투여에 의한 사이토카인 및 케모카인 비교**

[87] 면역억제제와 TG2 억제제인 글루코사민을 포함하는 조성물 투여에 의한 사이토카인 및 케모카인 분비량의 변화를 확인하기 위하여, 최종 투여 1주일 경과 후, 비장으로부터 세포를 얻고 이를 PMA(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, sigma) 및 1 μ M의 이오노마이신(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)에서 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 모은 후 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , CCL17/TARC의 농도와 이오타신(eotaxin)을 ELISA 키트(R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA)를 사용하여 측정하였다.

[88]

[89] 타크로리무스(FK-506)와 글루코사민의 병용 투여 효과

[90] 타크로리무스(FK-506) 1.0mg/kg/day와 글루코사민 500mg/kg/day를 단독 또는 병용 투여한 후, 마우스의 비장 세포를 이용하여 IL-5, IL-13, 이오타신(eotaxin) 및 TARC를 타깃으로 하는 ELISA 분석을 수행하였다.

[91] 결과를 도 5 내지 도 8에 나타내었다.

[92] 도 5 내지 도 8에 나타낸 바와 같이, IL-5(도5), IL-13 (도6), TARC (도 7) 및 이오타신(eotaxin)(도 8)의 발현이 글루코사민 또는 타크로리무스를 단독으로 투여한 경우(p=0.008 및 p=0.011)또는 대조군(p=0.001)보다 글루코사민과 타크로리무스를 병용 투여하는 경우 뚜렷하게 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

[93]

[94] 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여 효과

[95] 사이클로스포린(CsA) 2, 5, 10mg/kg/day 저용량과 글루코사민 500mg/kg/day를 단독 또는 병용 투여한 후, 마우스의 비장 세포를 이용하여 IL-5, IL-13, 이오타신(eotaxin), TARC 및 TSLP의 감소 효과를 비교하였다.

[96] 결과를 도 9에 나타내었다.

[97] 도 9에 나타낸 바와 같이, 저용량의 사이클로스포린과 글루코사민 병용투여시 2 mg/kg/day 용량을 포함한 모든 용량에서 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13과 케모카인인 이오타신(eotaxin), TARC 및 TSLP가 치료하지 않은 군은 물론 사이클로스포린 단독 및 글루코사민을 단독으로 치료한 군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

[98]

[99] **1.2.3 면역억제제와 글루코사민 병용 투여에 의한 T 세포의 면역조직화학적 변화 비교**

[100] 타크로리무스(FK-506)와 글루코사민의 병용 투여 효과

[101] 말초혈관 CD3+ T세포 및 CLA+세포의 발현은 아토피 질환을 가진 아이들에서 뚜렷하게 증가되는 것으로 보고되어 있다. NC/Nga 쥐에서 Df-유도된 CLA+ 및 CD3+ T세포(표면에 녹색으로 표시)의 침습에 면역억제제인

타크로리무스(FK-506)와 글루코사민의 병용투여가 미치는 영향을 면역조직화학 방법으로 확인하였다. 면역조직화학적 분석을 수행하기 위하여, CD3+ T 세포 또는 CLA(cutaneous lymphocyte antigen)의 면역 형광 염색을 수행하였다. 각각의 마우스 그룹으로부터 피부 샘플을 얻은 후 파라핀 왁스를 이용하여 고정시켰으며 5 μ m의 절편을 얻었다. 파라핀을 제거하고 재수화 후, 절편들을 100 mM 시트르산염 완충액 (pH 6.0)에서 5분 동안 가열하였다. 피부 조직 절편들은 3% BSA(bovine serum albumin)에서 1시간 동안 실온으로 전배양하였고, 연속적으로 1:100 anti-CD3 항체(rabbit polyclonal, abcam, Cambridge, UK) Egsns anti-CLA 항체 (rat monoclonal, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)와 4°C에서 하룻밤동안 반응시켰다. 그리고 CD3 염색을 위해 Alexa Fluor-labeled goat antirabbit IgG (594; Invitrogen, Eugene, OR, USA) 또는 CLA 염색을 위해 Alexa Fluor-labeled goat anti-rat IgG 및 IgM (488; Invitrogen)을 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 핵은 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)로 대비 염색하였다. 염색된 조직 샘플은 image analysis system (Dp Manager 1 r 2.1; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)에 의하여 분석하였다. 타크로리무스(FK-506) 1.0mg/kg/day와 글루코사민 500mg/kg/day를 단독 또는 병용 투여한 후, NC/Nga 쥐에서 Df-유도된 CLA+ 및 CD3+ T세포(표면에 녹색으로 표시)의 침습을 상기와 같은 방법으로 확인하였다.

[102] 결과를 도 10에 나타내었다.

[103] 도 10에 나타낸 바와 같이, 글루코사민과 타크로리무스를 병용 투여하는 경우 더욱 효과적으로 CLA+ 및 CD3+ T세포가 저해됨을 확인하였다.

[104]

[105] 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여 효과

[106] 면역기능을 조절하는 조절 T 세포 (regulatory T cell; Treg)의 수와 기능은 아토피피부염에서 저하되는 것으로 알려져 있다. 이러한 조절 T 세포의 저하는 아토피 피부염 환자에서 Th2 면역반응이 우세한 면역 불균형 상태를 유발하는데 관여한다. 따라서 사이클로스포린과 글루코사민을 병용 투여하는 경우, 조절 T 세포 수의 변화가 효과적으로 일어나는 지 여부를 확인하였다. 비장세포로부터 유래된 단일 세포를 FITC-anti-CD4(GK1.5) 및 PE-anti-CD25 (280406) (R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA)을 이용하여 염색하였다. 염색된 세포를 PBS, 2% FBS, 4°C 조건의 암실에서 30분 동안 배양하였다. 배양된 세포를 2번 세척한 후, CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 T 세포 수의 변화를 확인하였다.

[107] 결과를 도 11에 나타내었다.

[108] 도 11에 나타낸 바와 같이, 저용량의 사이클로스포린(CsA)(2, 5, 10mg/kg/day)와 글루코사민 500mg/kg/day를 병용투여 하는 경우, 가장 낮은 용량인 2 mg/kg/day 용량을 포함한 모든 용량에서 CD4+CD25+ 조절 T 세포수가 대조군인 치료하지 않은 군은 물론 사이클로스포린 단독 및 글루코사민을 단독으로

치료한 군에 비하여 유의한 감소를 보이는 것을 확인하였다.

[109]

[110] **1.2.4 면역억제제와 글루코사민 병용 투여에 의한 비만세포 및 호산구 감소 효과 비교**

[111] Th2 사이토카인은 염증과 함께 비만세포 및 호산구의 증식과 활성을 유도한다. 면역억제제와 글루코사민의 병용 투여가 이러한 염증 세포의 피부 침윤을 억제시킬 수 있는지 알아보기 위해 아토피 피부염이 유발된 마우스의 조직을 톨루이딘 블루(toluidine blue) 또는 콩고 레드 (Congo red)로 염색하였다. 세포 수는 세포의 밀도로 five high-power fields (X 400)로 관찰하여 나타내었다.

[112]

[113] 타크로리무스(FK-506)와 글루코사민의 병용 투여 효과

[114] 타크로리무스(FK-506) 1.0mg/kg/day와 글루코사민 500mg/kg/day를 단독 또는 병용 투여한 후, NC/Nga 쥐에서 비만세포 및 호산구의 증식, 활성의 억제 효과와 피부 침윤에 미치는 영향을 비교하였다.

[115] 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다.

[116] 도 12 및 도 13에 나타낸 바와 같이, 침투된 세포의 수는 글루코사민 또는 타크로리무스(FK-506)를 단독으로 투여한 경우($P=0.003$ 및 $P=0.002$)보다 글루코사민과 타크로리무스(FK-506)를 병용 투여한 경우 뚜렷한 감소를 나타내는 것을 확인하였다(대조군 마우스 $P=0.001$).

[117]

[118] 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여 효과

[119] 사이클로스포린 10mg/kg/day 저용량과 글루코사민 500mg/kg/day를 단독 또는 병용 투여한 후, 피부 병변에 침투한 비만세포 및 호산구 수를 비교하였다.

[120] 결과를 도 14에 나타내었다.

[121] 도 14에 나타낸 바와 같이, 저용량의 사이클로스포린(10 mg/kg/day)과 글루코사민 병용투여시 피부병변에 침투한 비만세포 및 호산구수가 치료하지 않은 군은 물론 단독 투여군에 비하여 유의하게 감소하였다.

[122]

[123] **1.2.5 타크로리무스(FK-506)와 글루코사민 병용 투여에 의한 혈청 IgE 감소 효과**

[124] 아토피 피부염의 주요 증상은 강한 Th2 면역반응과 연관되어 있어 IgE의 과다 생성이 일어난다. 따라서 아토피 유발 마우스에 글루코사민 또는 타크로리무스를 각각 단독 투여하거나 이를 병용 투여하여 혈청 내 IgE의 레벨을 측정하였다. 최종 투여 1주일이 경과한 후에 마우스의 혈청을 얻었으며, ELISA kit (Yamasa, Tokyo, Japan)을 사용하여 총 IgE의 양을 측정하였다.

[125] 결과를 도 15에 나타내었다.

[126] 도 15에 나타낸 바와 같이, 총 혈청 IgE의 양은 글루코사민 또는 타크로리무스 단독으로 투여한 경우($p=0.002$ 및 $p=0.003$)보다 뚜렷한 감소를 보였다. 각각

단독으로 투여한 경우와 대조군 사이에는 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 따라서, 병용 투여하는 경우 대조군뿐만 아니라 단독 투여하는 경우보다 현저한 IgE의 감소를 나타내므로, 본 발명의 면역억제제인 타크로리무스를 저용량으로 사용하더라도 타크로리무스와 글루코사민의 병용 투여가 기존 단독 투여에 비하여 뚜렷한 효과를 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

[127]

[128] **1.2.6 사이클로스포린과 글루코사민 병용 투여에 의한 인보루크린(Involucrin) 및 필라그린(filaggrin) 발현 증가**

[129] 아토피 피부염 환자는 피부 장벽의 기능이 저하된다. 이러한 피부 장벽 기능의 저하는 필라그린의 발현 감소 및 로리크린 등의 단백질과 함께 각질세포막을 구성하는 인보루크린과 관련된 것으로 추정된다. 따라서, 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여로 인한 필라그린 및 인보루크린의 발현 변화를 확인하였다. 마우스의 등으로부터 채취한 피부세포를 -80°C에서 보관하였다. 이후, 세포를 균질화 하고 Lysis buffer (10mM Tris-HCl containing 50mM NaCl, 50mM NaF, 10mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5mM leupeptin, and 10g/ml aprotinin, pH 7.5)에 용해시켰다. 20μg 동일한 양의 단백질을 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고, NC 막에 블랏하였다. 반응을 정지시킨 후, 필라그린, 인보루크린 및 대조군인 β-액틴(Santa Cruz, CA, USA)에 대한 1:1000 희석 항체를 이용하여 반응(incubation)시켰다. HRP 결합 이차항체(1:3,000 희석)을 이용하여 추가적으로 배양한 후 블랏하였으며, ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 시각화하였다. 발생 신호는 Image Reader (LAS-3000; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)를 이용하여 확인하였다.

[130] 결과를 도 16에 나타내었다.

[131] 도 16에 나타낸 바와 같이, 저용량의 사이클로스포린(CsA)(10mg/kg/day)과 글루코사민(500mg/kg/day) 병용 투여시, 인보루크린(Involucrin) 및 필라그린(filaggrin) 단백질의 발현이 정상군과 유사할 정도로 증가하는 것을 확인하였다.

[132]

[133] **실시예 2. 아토피 피부염 환자에서의 면역억제제와 TG2 억제제 병용 투여의 효과**

[134] 사이클로스포린 투여를 요하는 심한 아토피 피부염 환자에 면역억제제인 사이클로스포린 및 TG2 억제제인 글루코사민을 단독 또는 병용 투여하여, SCORD 지수, 사진을 통한 환부 측정 및 사이토카인 발현양을 측정하여 병용 투여의 효과를 확인하였다. 실험을 수행하는 동안 활력징후 즉 혈압 및 맥박은 앉은 자세에서 3분 동안 안정을 취한 후 측정하였으며, 측정 결과 피험자들의 혈압과 맥박은 모두 정상 범위에 속하는 것을 확인하였다.

[135]

[136] **2.1 임상실험-SCORAD 지수**

[137] 사이클로스포린 투여를 요하는 심한 아토피 피부염 환자를 피험자로 선정하여 지정된 용량의 면역억제제인 사이클로스포린을 단독 2주, 황산글루코사민 (500mg)과 병용하여 2주, 다시 단독 2주, 병용하여 2주를 투여하고 SCORAD 지수를 측정하였다. 사이클로스포린은 투여용량의 절반 이하인 100mg(Cs1), 150mg(Cs1.5) 또는 200mg(Cs2)을 이용하였다. 투약 전과 투약 방법이 바뀌는 시점에서 SCORAD 지수를 측정하였다. SCORAD 지수는 병변이 차지하는 면적을 9의 법칙(rule of nine) 원칙에 따라 0-100%로 하고 면적의 1/5과, 심한정도를 홍반(erythema), 부종/구진화(edema/papulation), 삼출/가피(oozing/crusts), 찰상(excoriations), 태선화 (lichenification), 피부건조(skin dryness)의 6항목으로 나누어 심한 정도를 0-3으로 나누어 합계한 $(0-18) \times 7/2$ 를 더한 객관적 SCORAD 및 깨어있는 동안의 가려움과 수면장애를 각 analog scale로 0-10까지 한 주관적 SCORAD의 총합(0-103)으로 계산한다(European Task Force on Atopic Dermatitis, 1993). 그러나 실제 환자에게 가려움과 수면장애에 대한 자각증상을 0-10의 scale로 평가하라고 하였을 때 제대로 하기 어려운 경우를 많이 경험하였고 실제 주관적인 척도를 제외한 객관적인 SCORAD 지수만 포함하여 0-83 점으로 평가하기도 하므로 (Kunz 등, Dermatology 1997;195:10-19), 본 실시예에서는 객관적인 SCORAD 지수만으로 평가하였다.

[138] 결과를 도 17에 나타내었다.

[139] 도 17에 나타낸 바와 같이, 아토피 피부염 환자에 글루코사민 단독 투여한 기간(11월10일~11월24일)에는 SCORAD에 변화가 거의 없었다. 그러나, 사이클로스포린과 글루코사민을 병용 투여하자 SCORAD가 72.5에서 51.5로 급격히 낮아졌다. 약물 중단(12월9일) 후 높아진 SCORAD가 사이클로스포린 단독(12월18일) 및 후속된 병용 투여 (12월30일)에 의해 낮아졌다. 이어서, 다시 사이클로스포린을 단독(1월9일) 투여하자 이전 치료에 의해 낮아졌던 SCORAD가 다시 올라가는 것을 확인하였다. 또 다른 환자에서는 사이클로스포린 단독 투여기간 (11월17일~12월1일)에는 SCORAD에 거의 변화가 없었으며, 이러한 결과는 일부 개체는 사이클로스포린도 잘 듣지 않는다는 기존의 보고를 뒷받침한다. 사이클로스포린과 글루코사민을 병용 투여한 기간 (12월1일~12월15일)에는 SCORAD가 41에서 34로 급격히 낮아졌다. 다시 사이클로스포린을 단독 (12월15일) 투여하자 오히려 SCORAD가 올라갔고, 병용 투여 (12월30일)에 의해 SCORAD가 낮아졌다. 즉, 글루코사민 단독 투여는 치료 효과가 미흡하였고, 사이클로스포린 단독 투여는 경우에 따라 SCORAD가 높아지는, 즉 치료 효과가 떨어지는 양상을 보였다. 그에 반하여 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여는 글루코사민 또는 사이클로스포린 단독 투여에 비하여 치료 효과가 우수하였고, 병용 투여시 사이클로스포린의

용량은 통상의 사이클로스포린 사용 용량의 절반 이하였다.

[140]

[141] **2.2 사이클로스포린과 글루코사민의 병용투여에 따른 10명의 아토피 환자에서의 SCORAD 지수 측정**

[142] 사이클로스포린과 글루코사민의 병용투여의 아토피 피부염 치료 효과를 더 많은 환자와 시간을 두고 관찰하기 위하여 아토피 환자 10명을 피험자로 선정하여 SCORAD 지수를 측정하였다. 상기의 방법과 마찬가지로, 2주의 간격을 두고 사이클로스포린 단독 투여와 사이클로스포린과 글루코사민의 병용투여를 반복하며 SCORAD 지수의 변화를 20주에 걸쳐 관찰하였다. 사이클로스포린의 사용량은 2 - 2.9 mg/kg/day, 평균 2.4mg/kg/day 이고, 글루코사민의 경우는 성인의 경우 1,000mg/day, 소아의 경우 500mg/day로 하였다. 10명의 환자의 SCORAD 지수의 변화를 하나의 그래프로 나타내었으며, 글루코사민과 사이클로스포린의 병용 투여를 먼저 시행한 환자군 (SEQ1) 5명의 SCORAD 지수 변화 및 사이클로스포린 단독을 먼저 시행한 환자군 (SEQ0) 5명의 SCORAD 지수 변화를 확인하였다.

[143] 결과를 도 18에 나타내었다.

[144] 도 18에 나타낸 바와 같이, 처음에 SCORAD 지수가 50.4 인 환자가 사이클로스포린과 글루코사민을 병용투여했을 때 38.4까지 내려갔으며, 다시 사이클로스포린만을 투여했더니 48.4로 올라갔고, 병용투여했을 때 37.4로 내려감을 확인할 수 있었다. 다른 환자는 처음에 SCORAD 지수가 68.4 였으나, 사이클로스포린과 글루코사민을 병용투여했더니 2주만에 SCORAD 지수가 35.5로 급격히 줄어들었다. 즉, 사이클로스포린의 단독 투여는 치료 효과가 미흡한 것을 확인하였으며, 사이클로스포린과 글루코사민의 병용투여로 증상이 완화되었던 환자도 사이클로스포린 단독 투여로 다시 증상이 악화되었다. 반면, 사이클로스포린과 글루코사민을 병용 투여했을 때는 글루코사민 단독 또는 사이클로스포린 단독 투여보다 사용 용량은 절반 이하였음에도 불구하고, 아토피 치료 효과가 매우 우수하였으며, 이를 통해 두 물질의 혼합으로 아토피 치료의 시너지 효과가 일어났음을 확인할 수 있었다.

[145] 상기 10명의 아토피 피부염 환자의 평균값을 구하여 먼저 시행한 5명 (DRUG1)에서의 평균 SCORAD 변화와 단독을 먼저 시행한 5명(DRUG0)에서의 평균 SCORAD 변화를 확인하고 전체 환자의 결과에는 각각의 평균선을 함께 표시하여 비교가 가능하도록 한 결과를 도 19에 나타내었다.

[146] 사이클로스포린을 중단할 경우 아토피 증상이 재발되는 것이 잘 알려져 있기 때문에 증상이 심한 환자에게 상기 면역억제제를 갑자기 중단하면 증상이 심해질 우려를 고려하여, 상기 10명의 임상실험에서는 병용-단독 또는 단독-병용을 시행하면서 약이 바뀌는 사이에 wash-out period (원하는 약이 체내에서 없어지기 까지 약을 투여하지 않고 기다리는 시간) 를 두지 않고 투약하였다. 따라서 글루코사민의 체내에서의 반감기가 1일 정도 되므로 이를

투여하였을 경우 처음 3일간은 혈중 농도가 단계적으로 증가하고 중단 후에도 3일에 걸쳐 서서히 감소함을 감안하여 글루코사민과 시간의 두 가지 파라미터에 대하여 상기 결과를 보정하였고, 이를 근거로 사이클로스포린에 글루코사민을 병용한 경우와 사이클로스포린 단독을 투여한 경우의 목적 함수값 (objective functional value; OFV)을 계산하였다.

[147] 결과를 도 20에 나타내었다.

[148] 도 20에 나타낸 바와 같이, 각각 631.640과 653.153의 값을 얻었다. 두 개의 parameter에서 목적 함수값이 5.99 이상 차이 나면 $p\text{-value} < 0.05$ 가 되는데 병용과 단독의 차이가 21.5정도 되므로 이는 $p\text{-value} < 0.05$ 를 만족하여 글루코사민과의 병용이 그렇지 않은 경우에 비하여 상승 효과를 나타내었음을 뒷받침해주었다.

[149]

[150] **2.3 사이클로스포린과 글루코사민의 병용투여에 따른 아토피 환자에서의 병변의 변화**

[151] 환부로부터 30cm 거리에서 환부 옆에 눈금자를 같이 두고 4주 간격으로 사진촬영을 하였다. 사진 촬영을 전담하는 사람은 담당 전공의로 하며, 사진을 표준화하기 위한 교육을 실시하였다. 일정한 자세 및 일정한 거리에서 병변을 찍도록 하며, 사진촬영 장소의 조도를 일정하게 유지하도록 하였다. 매번 동일한 구도로 사진 촬영을 하여 투약 전후 비교를 용이하게 하였다.

[152] 결과를 도 21에 나타내었다.

[153] 도 21에 나타낸 바와 같이, 병용요법을 사용하기 전은 병변의 홍반과 부종이 심하고, 양쪽 하지는 특히 전반적인 홍반과 부종으로 인하여 환자가 통증을 호소하였으며 가려움으로 인한 찰상이 뚜렷하였다. 병용요법을 2 순환한 후의 사진에서는 많은 부분의 병변이 소실되고 각 병변의 홍반과 부종은 물론 찰상도 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 사이클로스포린과 글루코사민 병용 투여에서 단독 투여로 투약 방법을 바꾼 후에는 병변이 약간 악화되어 홍반이 일부 피부부위에서 재발하고 찰상이 조금 증가하는 증상을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[154]

[155] **2.4 투약방법 변경에 따른, 사이토카인 발현량 분석**

[156] 투약 전과 투약 방법이 변경되는 시점, 즉 2주마다 채혈하여 IL-4, IL-5, IFN- β , IFN- γ 등의 사이토카인을 공지된 RT-PCR 방법으로 측정하였다.

[157] 결과를 도 22 및 도 23에 나타내었다.

[158] 도 22에 나타낸 바와 같이, 글루코사민 및 사이클로스포린을 병용 투여하는 경우 IL-4, IL-5, IFN- β , IFN- γ 등의 사이토카인 양이 감소하였다. 특히 IL-4의 발현량이 병용 투여에 의해 현저하게 감소하였으며, 환자 1의 경우에는 IL-5의 발현량도 눈에 띄게 감소하였다. 또한 도 23에 나타낸 바와 같이, 글루코사민과 사이클로스포린을 병용투여했을 때와 사이클로스포린을 단독 투여했을 때의 IL-4 발현 변화의 평균을 그래프로 나타낸 결과, 병용 투여했을 때 IL-4 발현

변화에 유의적인 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다.

[159]

[160] 실시예 3. 인간을 대상으로 한 적절한 투약 농도 계산

[161] 인간을 대상으로 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제의 병용투여 용량을 결정하기 위해 세포 실험 및 동물 실험을 통하여 인간에 대한 적절한 용량을 도출하였다.

[162] 세포수준의 실험을 통한 사이클로스포린 및 글루코사민의 최소 및 최대 용량은 다음과 같다.

[163] 표 1

	사이클로스포린	글루코사민
최소용량	1ng/ml	0.01 - 0.1. mM
최대용량	100 ng/ml	1-5 mM

[164] 타크로리무스의 경우 사이클로스포린에 비하여 10배 이하의 양을 필요로 하므로, 타크로리무스는 글루코사민 최소 용량 시, 0.1ng/ml, 최대 용량 시 10ng/ml을 필요로 한다. 사이클로스포린은 타크로리무스에 비하여 용량면에서 10배가 요구되나 억제 정도의 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[165] 상기의 세포 수준 실험을 동물에 대한 직접 투여 용량으로 환산하기 위하여 동물의 무게를 약 20g 정도로 하여 환산하였다. 글루코사민 1mM이 10 mg/한마리에 투여한 것에 해당하므로 0.1mM은 1 mg/한마리인 것으로 환산되었다. 글루코사민 10 mg, 사이클로스포린 200 ng 이상이면 아토피 질환에 대한 효과가 있음을 확인하였다. 이를 토대로 동물 실험 모델에서의 사이클로스포린과 글루코사민의 최소, 최대 용량을 다음과 같이 환산하였다. 타크로리무스의 경우 하기 값의 1/10의 용량으로 환산된다.

[166] 표 2

	사이클로스포린	글루코사민	사이클로스포린(kg 당 용량)	글루코사민(kg 당 용량)
최소용량	0.5~ 1 µg	0.1 ~1 mg	0.025 ~0.05 mg/kg	5 ~50 mg/kg
최대용량	50 ~ 100 µg	10 ~20 mg	2.5 ~ 5 mg/kg	500 ~1000 mg/kg

[167] 상기 동물에서의 최소/최대 용량을 사람에게 적절한 용량으로 환산하였다. 일반적으로 동물과 사람에서의 글루코사민 혈중 농도의 차이는 크지 않다. 사람의 경우 750 mg/day에 비하여 1500 mg/day 복용 시 혈중농도가 2배 증가하는 것을 확인하였으나, 1500mg/day 이상 복용 시 혈중 농도의 증가가 용량에 비례하지 않고 상당히 낮아져 차이가 뚜렷해지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 사이클로스포린을 3mg/kg 복용 시 평균 혈중 농도는 94.2ng/ml(22.1-156.2 ng/ml)로 나타났으며, 최종적인 사이클로스포린과 글루코사민의 병용 투여의

최소/최대 용량은 다음과 같다.

[168] 표 3

	사이클로스포린	글루코사민	
최소용량	0.025 -0.05 mg/kg	5 -50 mg/kg	
최대용량	2.5 - 5 mg/kg	500 -1000 mg/kg	저용량목적이므로 사이클로스포린의 경우 3mg/kg 미만

[169] 따라서, 최종적으로 인간에게 투약될 수 있는 사이클로스포린 및 글루코사민의 혼용 투약 범위는 최저 사이클로스포린 0.025 mg/kg/day + 글루코사민 5 mg/kg/day의 복합 및 최고 사이클로스포린 2.9 mg/kg/day + 글루코사민 50 mg/kg/day 일 수 있음을 확인하였다.

[170] 상기와 같은 수치를 통하여 인간에서 처방할 수 있는 적절한 용량을 검토한 결과 글루코사민은 통상 12 내지 17mg/kg을, 사이클로스포린은 1 내지 2.9mg/kg이 처방됨으로, 아토피 치료 및 예방 효과를 나타내기 위해서는 글루코사민 대 사이클로스포린의 비율이 5 내지 30: 1 이 가장 적절한 것으로 판단되었다.

[171] 또한, 타크로리무스의 경우 사이클로스포린에 비하여 더 적은 양이 요구되므로 글루코사민 대 타크로리무스의 함량 비율은 25 내지 300: 1이 가장 적절한 병용 투여 범위인 것으로 판단되었다.

[172] 또한, 투약농도의 적절한 농도를 확인하기 위해 수행된 실험을 통해 면역억제제의 종류에 따른 면역억제 효과를 추가적으로 확인하였다.

[173] 결과를 도 24 내지 도 26에 나타내었다.

[174] 도 24 내지 도 26에 나타낸 바와 같이, 사이클로스포린, 타크로리무스(FK-506), 텍사메타존이 비슷한 패턴을 보이며 면역을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 글루코사민과의 병용투여를 통한 아토피 피부염 예방 또는 치료 목적에 있어서 텍사메타존 역시 면역억제제의 하나로 유사한 효과를 나타낼 수 있음을 예측할 수 있었으며, 타크로리무스와 매우 유사한 것으로 알려져있는 피메크롤리무스 역시 본 발명의 병용 투여용 면역억제제로 사용가능할 것으로 판단되었다.

[175]

[176] 제제예 1. 약학적 제제

[177] 1.1 산제의 제조

[178] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 2g

[179] 유당 1g

[180] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[181] 1.2 정제의 제조

- [182] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 100mg
- [183] 옥수수전분 100mg
- [184] 유당 100mg
- [185] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [186] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [187] 1.3. 캡슐제의 제조
- [188] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 100mg
- [189] 옥수수전분 100mg
- [190] 유당 100mg
- [191] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [192] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [193] 1.4 주사제의 제조
- [194] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 100 mg
- [195] 만니톨 180 mg
- [196] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [197] 증류수 2974 mg
- [198] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 제조방법에 따라서 주사제를 제조하였다.
- [199]
- [200] 제제예 2. 화장료 제제
- [201] 2.1 유연화장수(스킨로션)의 제조
- [202] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 0.5 %
- [203] 베타-1,3-글루칸 1.0 %
- [204] 부틸렌글리콜 2.0 %
- [205] 프로필렌글리콜 2.0 %
- [206] 카르복시비닐폴리머 0.1 %
- [207] 피이지-12 노닐페닐에테르 0.2 %
- [208] 폴리솔베이트 80 0.4 %
- [209] 에탄올 10.0 %
- [210] 트리에탄올아민 0.1 %
- [211] 방부제, 색소, 향료 적량
- [212] 정제수 to 100 %
- [213] 2.2 영양화장수(밀크로션)의 제조
- [214] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 0.5 %
- [215] 베타-1,3-글루칸 1.0 %
- [216] 밀납 4.0 %
- [217] 폴리솔베이트 60 1.5 %

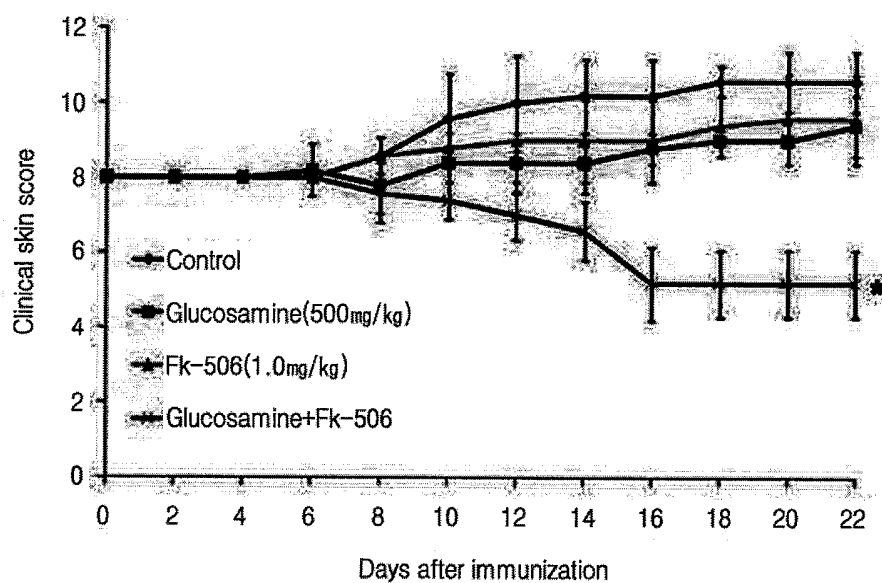
- [218] 솔비탄세스퀴올레이트 1.5 %
- [219] 유동파라핀 0.5 %
- [220] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 %
- [221] 글리세린 3.0 %
- [222] 부틸렌글리콜 3.0 %
- [223] 프로필렌글리콜 3.0 %
- [224] 카르복시비닐폴리머 0.1 %
- [225] 트리에탄올아민 0.2 %
- [226] 방부제, 색소, 향료 적량
- [227] 정제수 to 100 %
- [228] 2.3 영양크림의 제조
- [229] 면역억제제 및 트랜스글루타미나제 2 억제제 1.0 %
- [230] 베타-1,3-글루칸 5.0 %
- [231] 밀납 10.0 %
- [232] 폴리솔베이트 60 1.5 %
- [233] 피이지 60 경화피마자유 2.0 %
- [234] 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 %
- [235] 유동파라핀 10.0 %
- [236] 스쿠알란 5.0 %
- [237] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 %
- [238] 글리세린 5.0 %
- [239] 부틸렌글리콜 3.0 %
- [240] 프로필렌글리콜 3.0 %
- [241] 트리에탄올아민 0.2 %
- [242] 방부제, 색소, 향료 적량
- [243] 정제수 to 100 %

청구범위

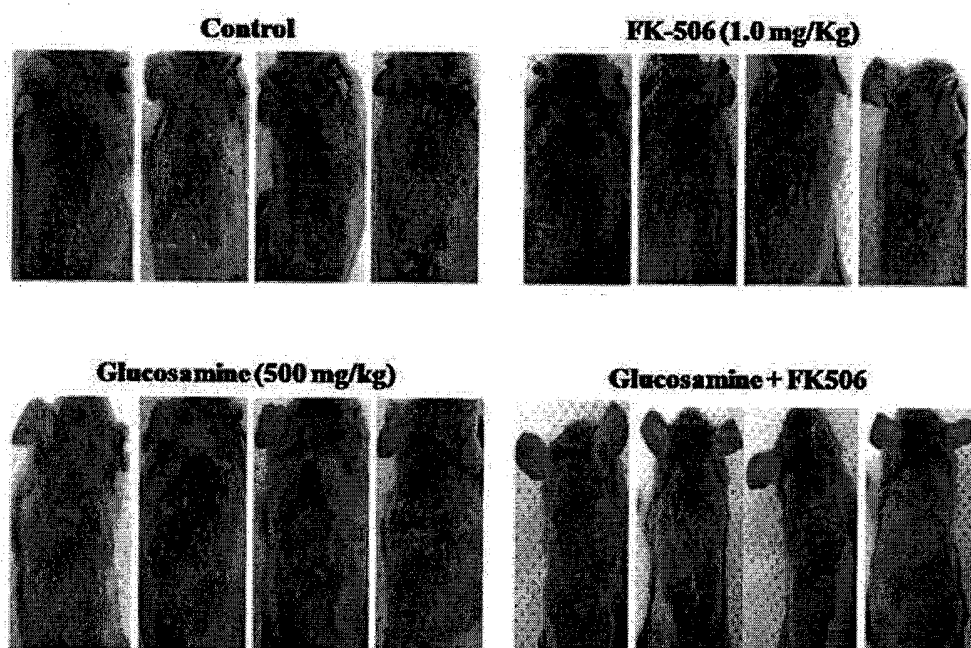
- [청구항 1] 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 면역억제제는 사이클로스포린, 타크로리무스, 텍사메타존, 피메크롤리무스로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 트랜스글루타미나제 2 억제제는 트랜스글루타미나제 2 특이적 항체인 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 트랜스글루타미나제 2 억제제는 트랜스글루타미나제 2 유전자에 대한 안티센스 분자인 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 트랜스글루타미나제 2의 유전자에 대한 안티센스 분자는 3중제, 리보자임, RNAi 및 안티센스 핵산로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 트랜스글루타미나제 2 억제제는 글루코사민인 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 글루코사민은 글루코사민 황산염인 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 면역억제제가 사이클로스포린인 경우, 사이클로스포린과 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 1.8 내지 1 대 2000의 중량비로 함유되는 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 면역억제제가 타크로리무스인 경우, 타크로리무스와 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 18 내지 1 대 2000의 중량비로 함유되는 것을 특징으로 하는, 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2의 억제제를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 면역억제제는 사이클로스포린, 타크로리무스, 텍사메타존, 피메크롤리무스로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 트랜스글루타미나제 2의 억제제는 글루코사민인 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

- [청구항 13] 제10항에 있어서, 면역억제제가 사이클로스포린인 경우,
사이클로스포린과 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 1.8 내지 1
대 2000의 중량비로 함유되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 14] 제 10항에 있어서, 면역억제제가 타크로리무스인 경우,
타크로리무스와 트랜스글루타미나제 2 억제제는 1 대 18 내지 1 대
2000의 중량비로 함유되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 15] 제10항에 있어서, 상기 면역억제제와 트랜스글루타미나제 2
억제제는 화장료 조성물 총 건조 중량에 대하여 0.001 내지
5중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.
- [청구항 16] 제10항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수,
영양크림, 마사지크림, 영양세럼, 에센스, 및 팩으로 이루어진
군으로부터 선택된 1종 이상으로 제형화 되는 것을 특징으로 하는,
화장료 조성물.

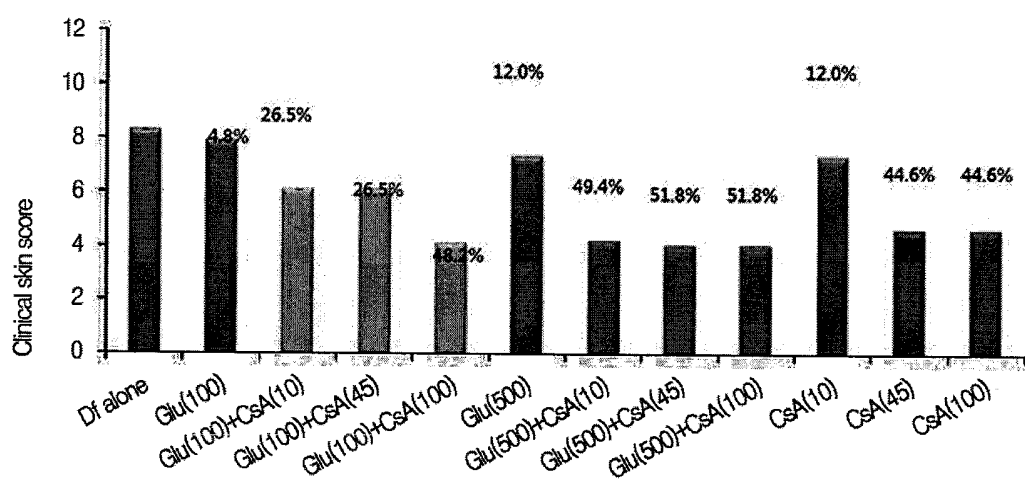
[Fig. 1]



[Fig. 2]

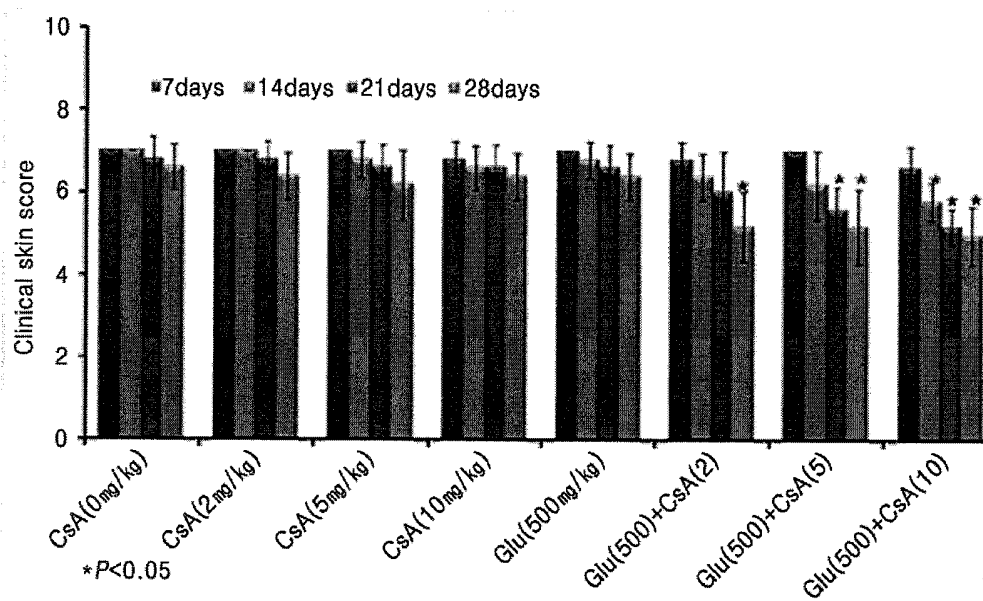


[Fig. 3]

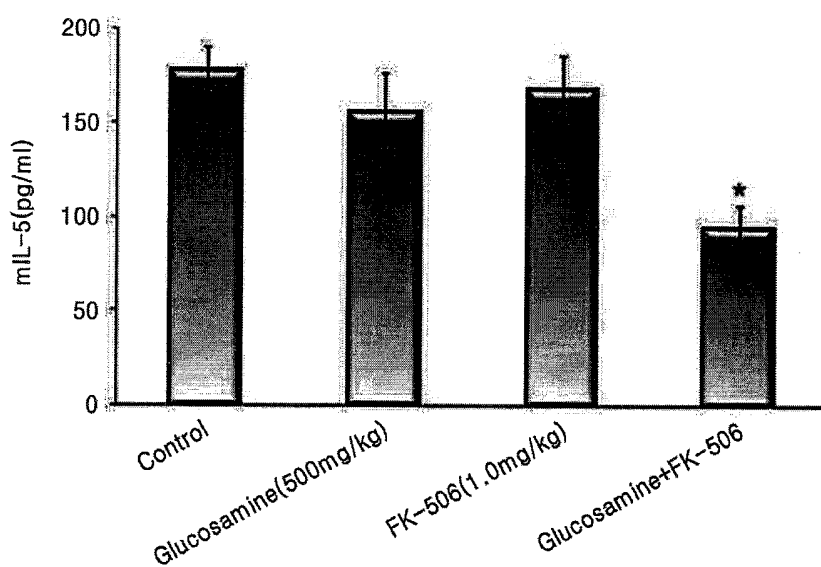


[Fig. 4]

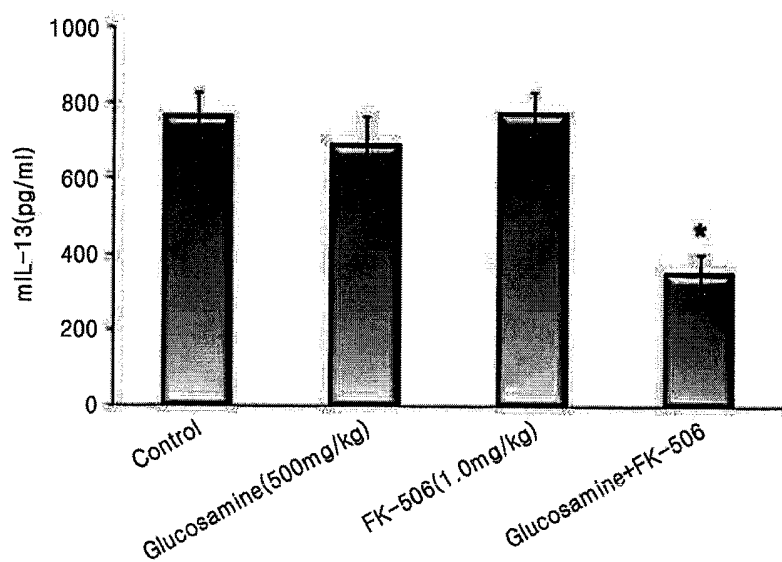
2/11

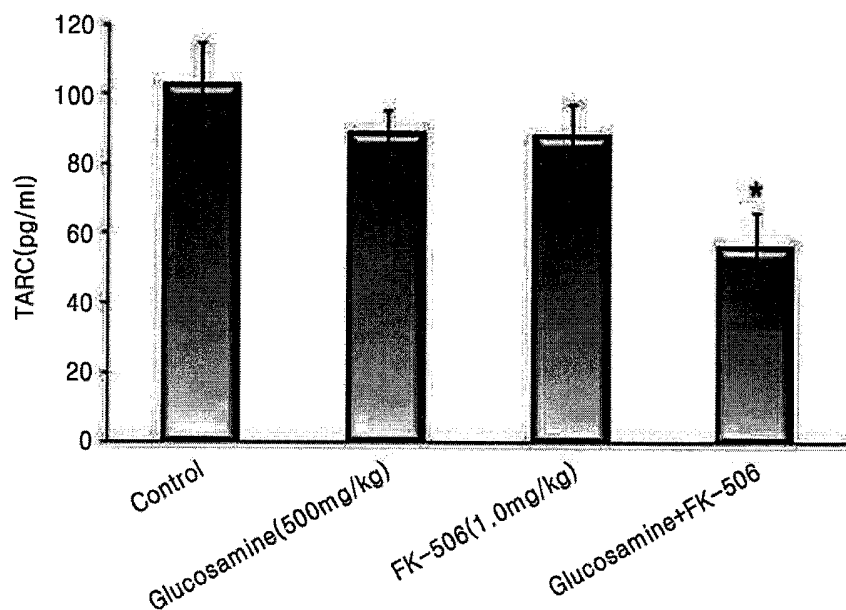


[Fig. 5]

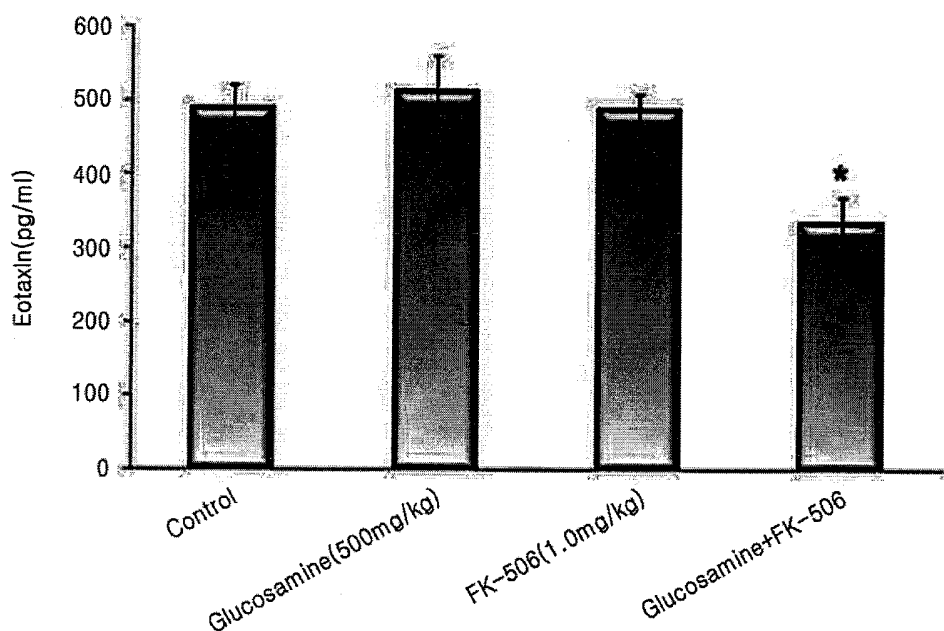


[Fig. 6]





[Fig. 8]



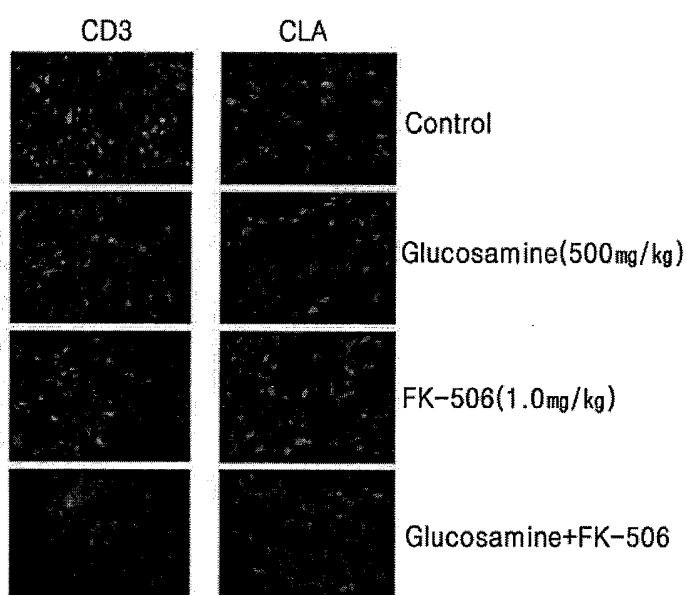
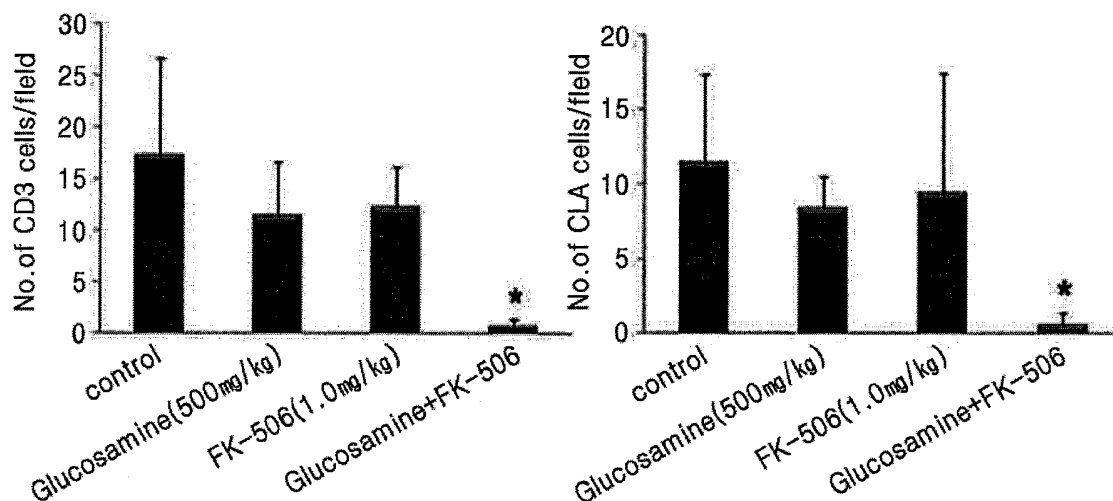
[Fig. 9]

Group		IL-4	IL-5	IL-13	Eotaxin	TARC	TSLP
Untreated		122.1±25	76.4±12.9	344.5±61.8	276.7±11.5	132.6±10.6	23.1±1.8
CsA	2	98.5±4.1	74.6±5.1	353.8±50.9	291.2±12.7	113.2±10.9	20.2±1.5
	5	103.3±8.8	79.5±3.9	392.1±29.6	285.9±6.9	125.8±6.9	21.3±1.1
	10	105.8±9.6	83.6±7.8	345.9±17.5	261.1±9.4	115.9±15.1	19.9±0.6
Glu (500)		115.5±7.3	78.5±3.1	385.9±23.3	266.6±17.4	110.7±17.1	19.2±3.4
CsA + Glu (500)	2	64.2±2.3**	42.2±8.2**	277.2±11.7**	214.7±17.4*	84.2±8.8*	13.5±2.6*
	5	57.9±2.6**	47.1±2.9**	203.6±12.6**	219.2±16.7*	83.1±5.5*	14.7±1.6*
	10	54.6±2.8**	40.3±1.4**	198.2±11.9**	218.1±15.1*	90.6±6.4*	13.2±1.1*

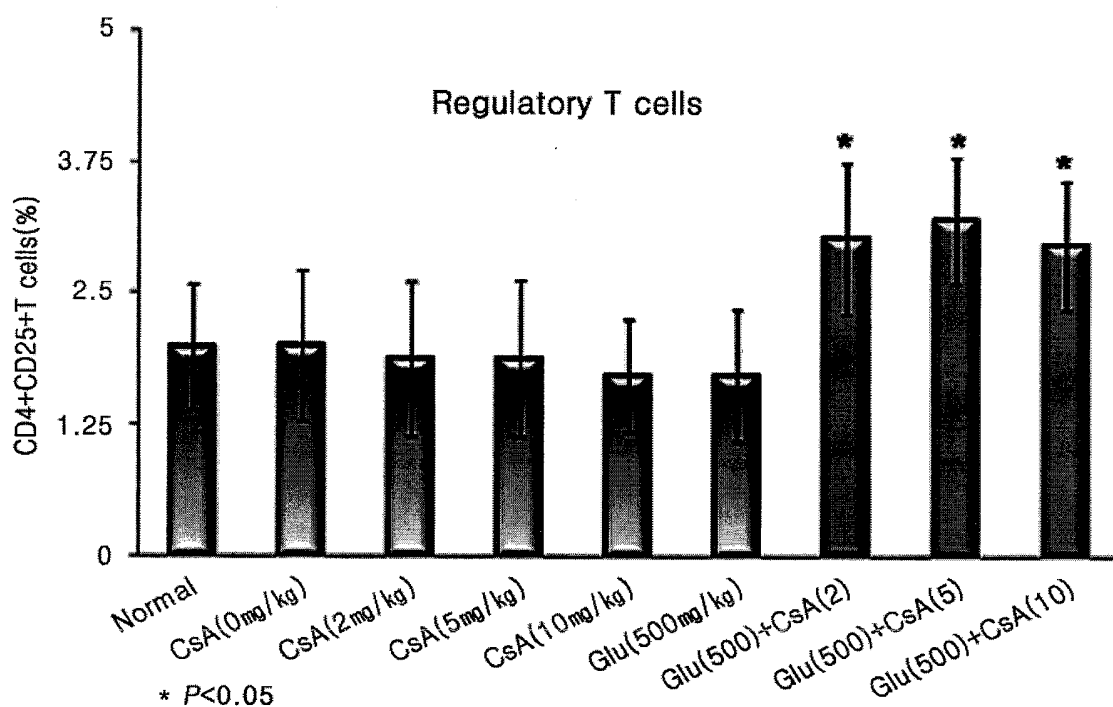
CsA: cyclosporine A
Unit of cytokines/chemokines: pg/ml
** $p < 0.01$,

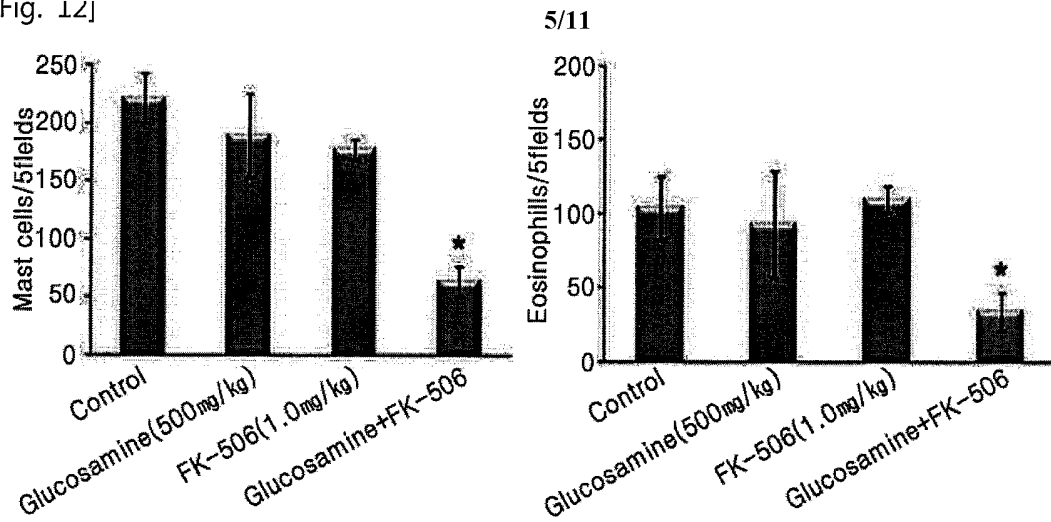
Glu: glucosamine
Unit of CsA or Glu: mg/kg
* $p < 0.05$

[Fig. 10]

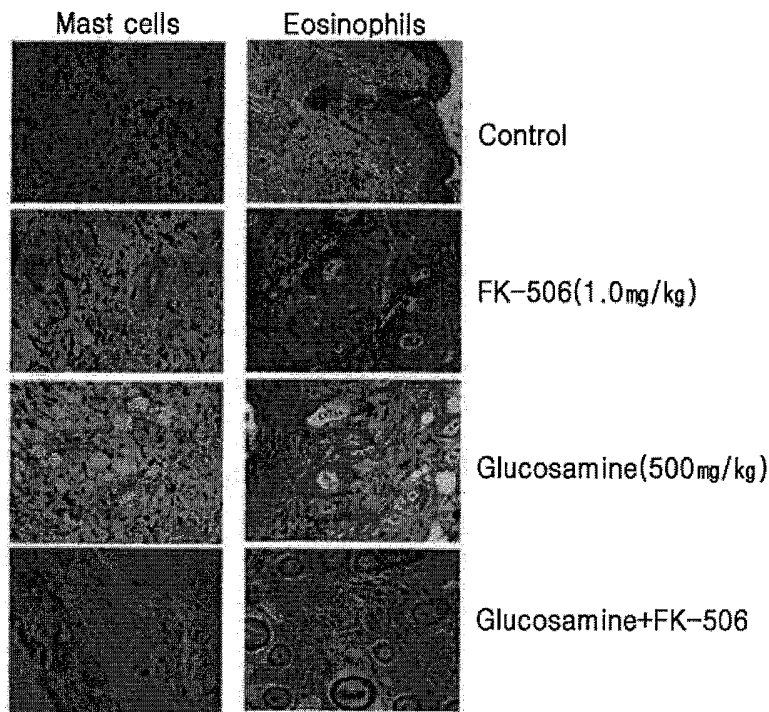


[Fig. 11]

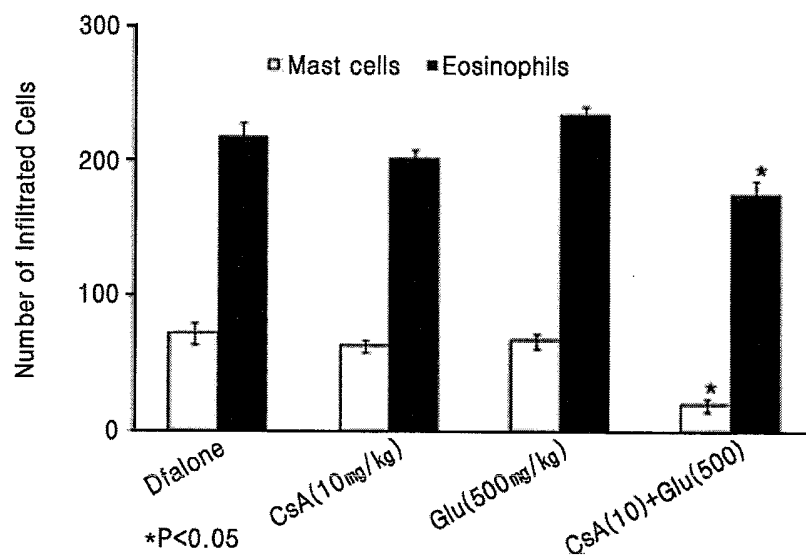


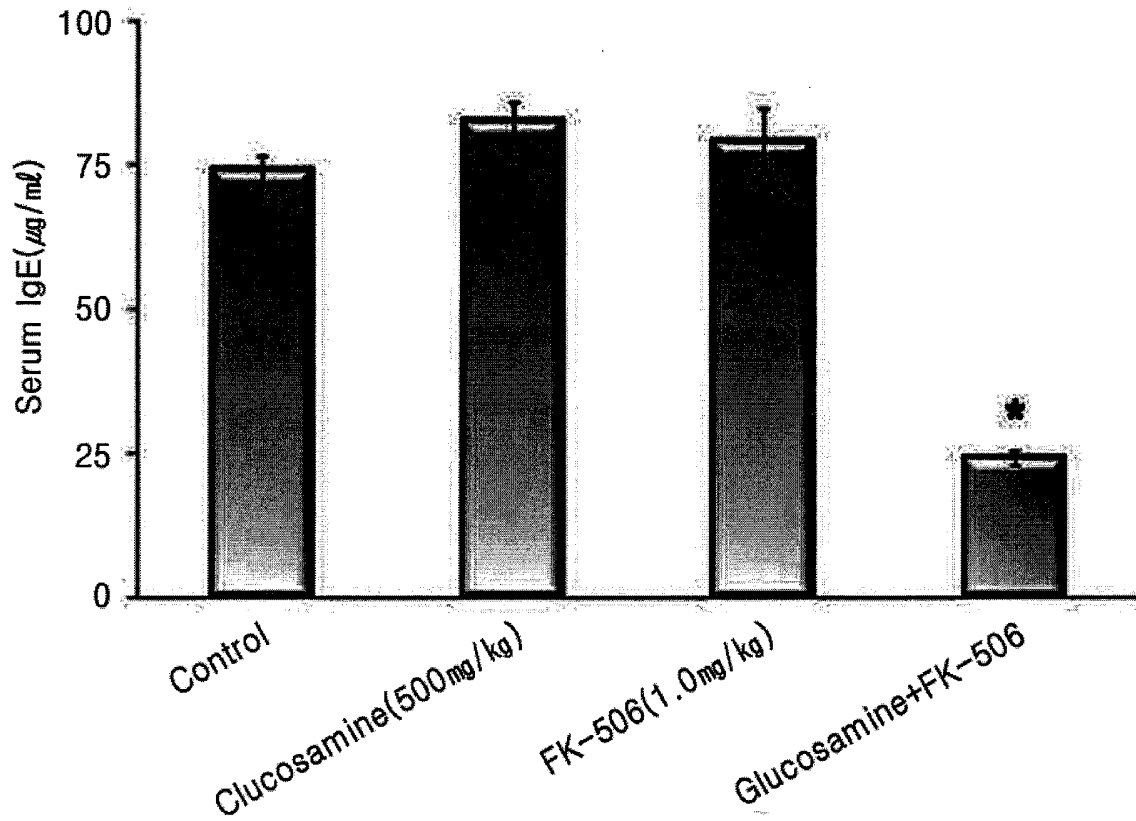


[Fig. 13]

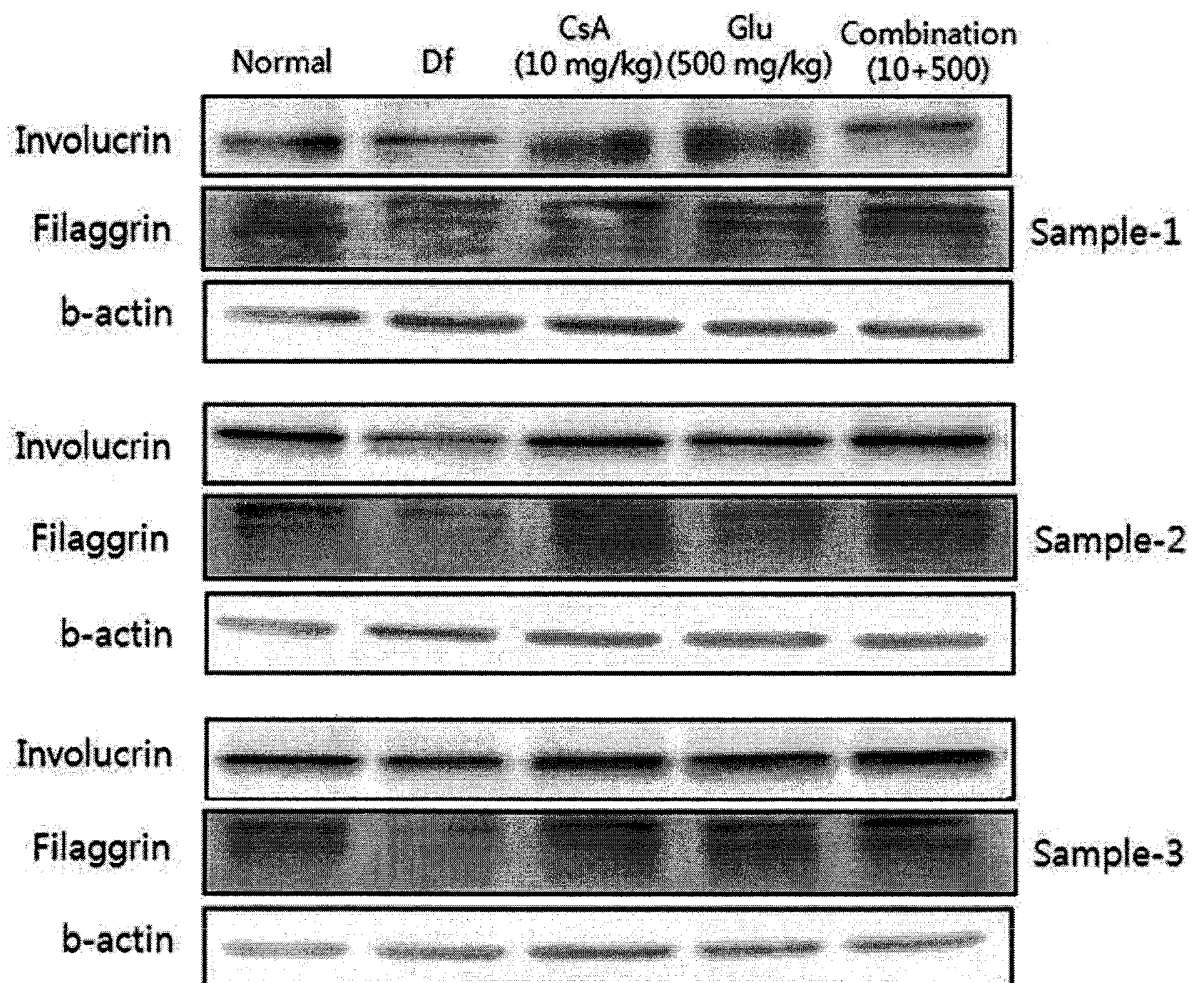


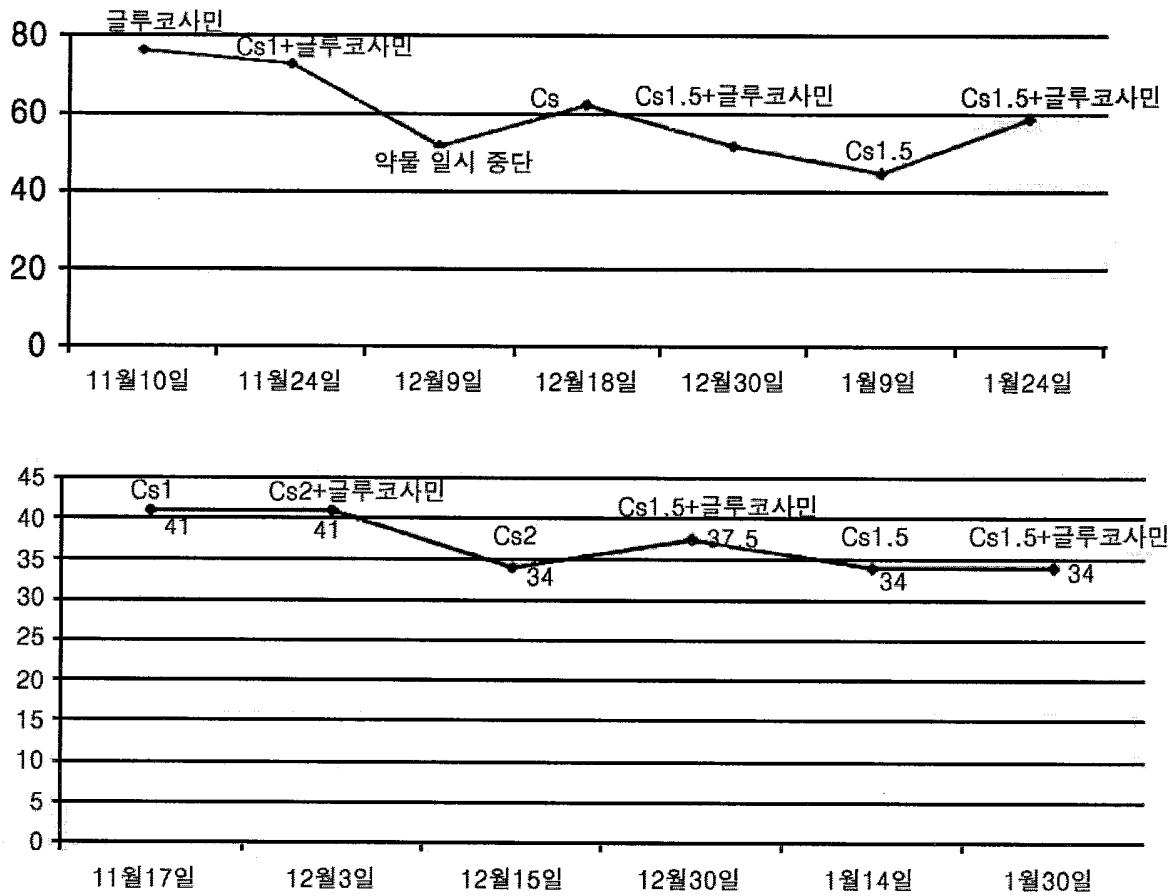
[Fig. 14]



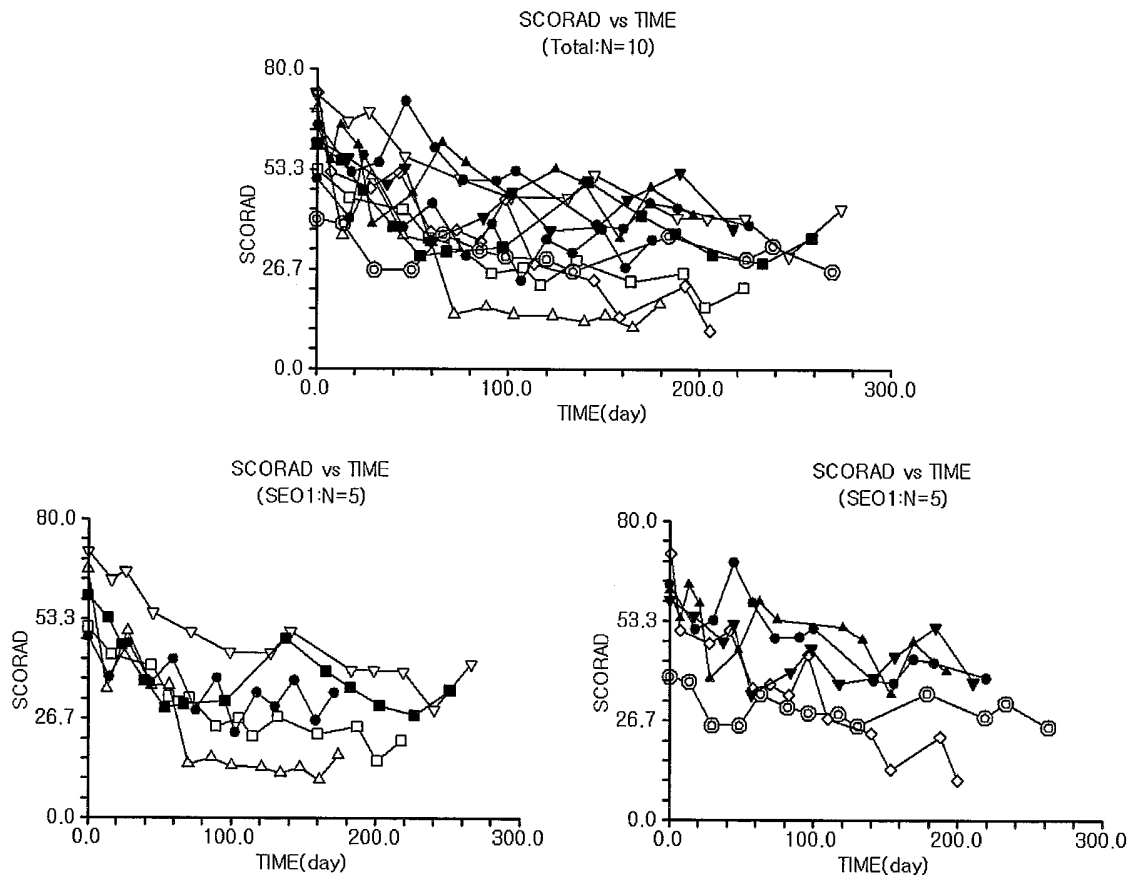


[Fig. 16]



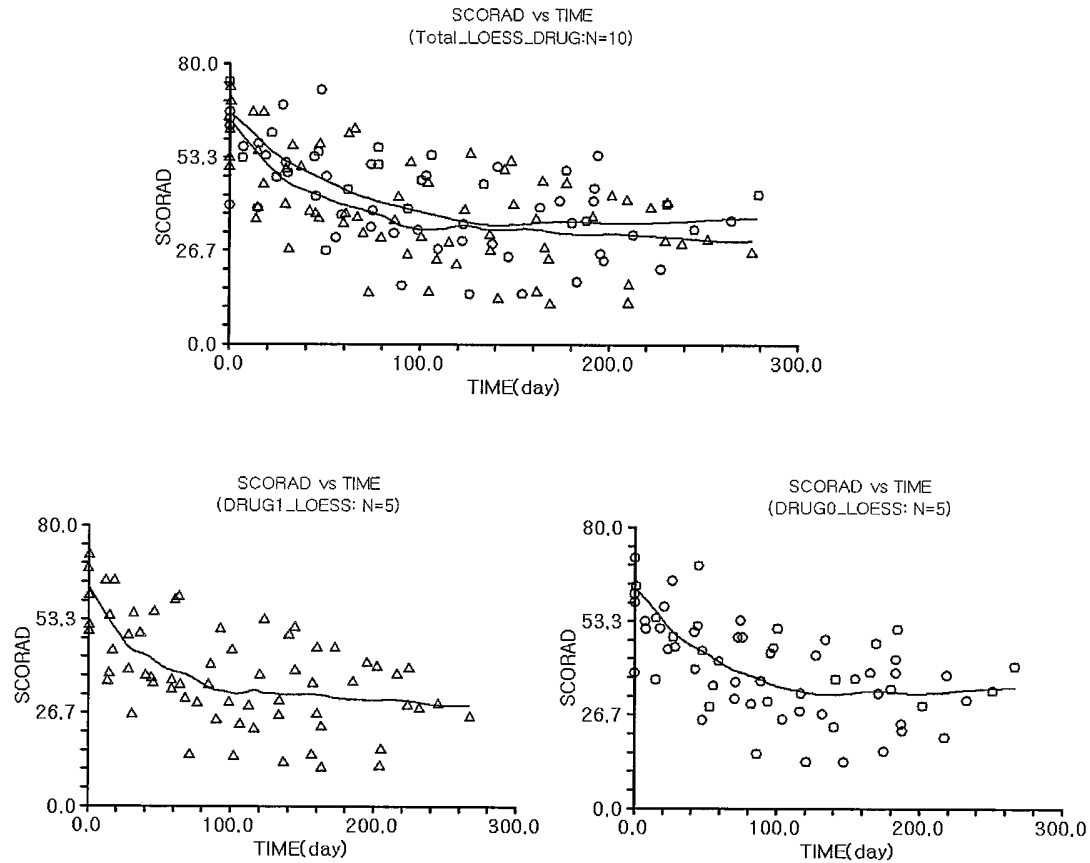


[Fig. 18]



[Fig. 19]

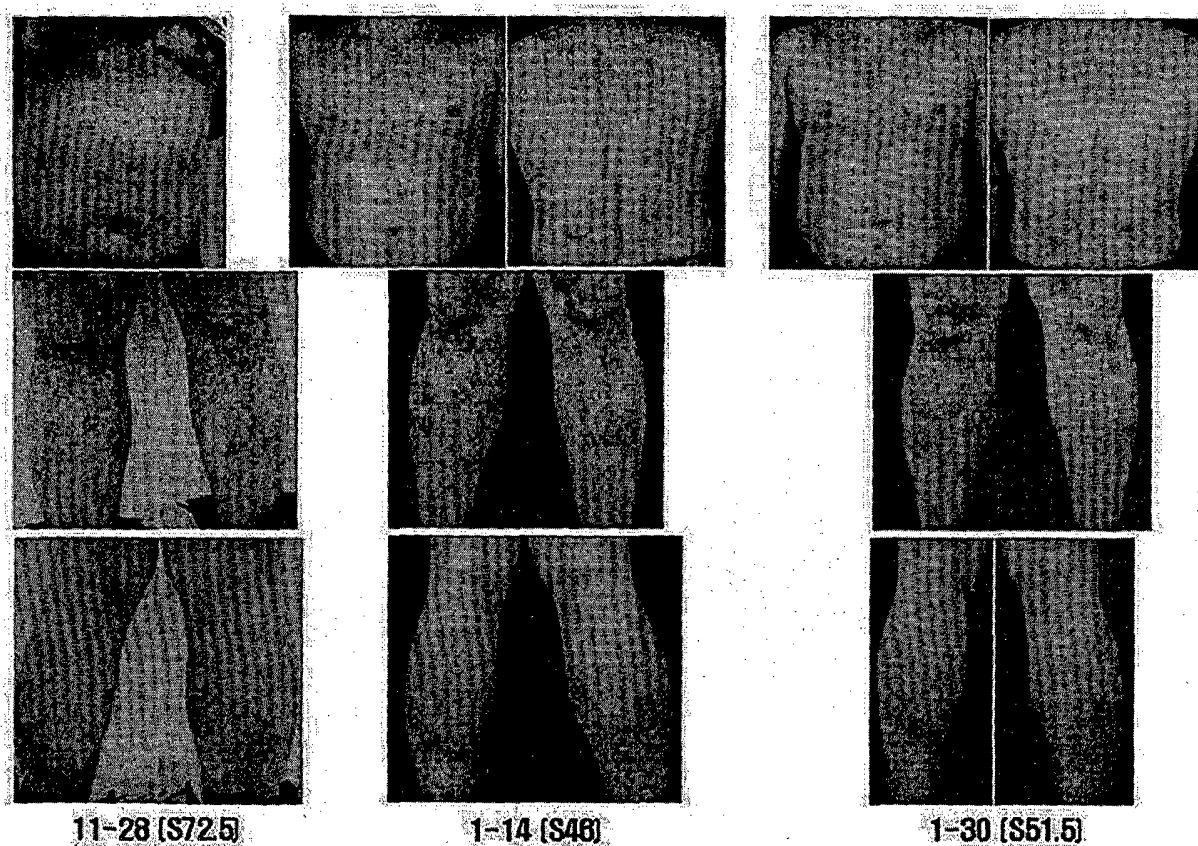
8/11



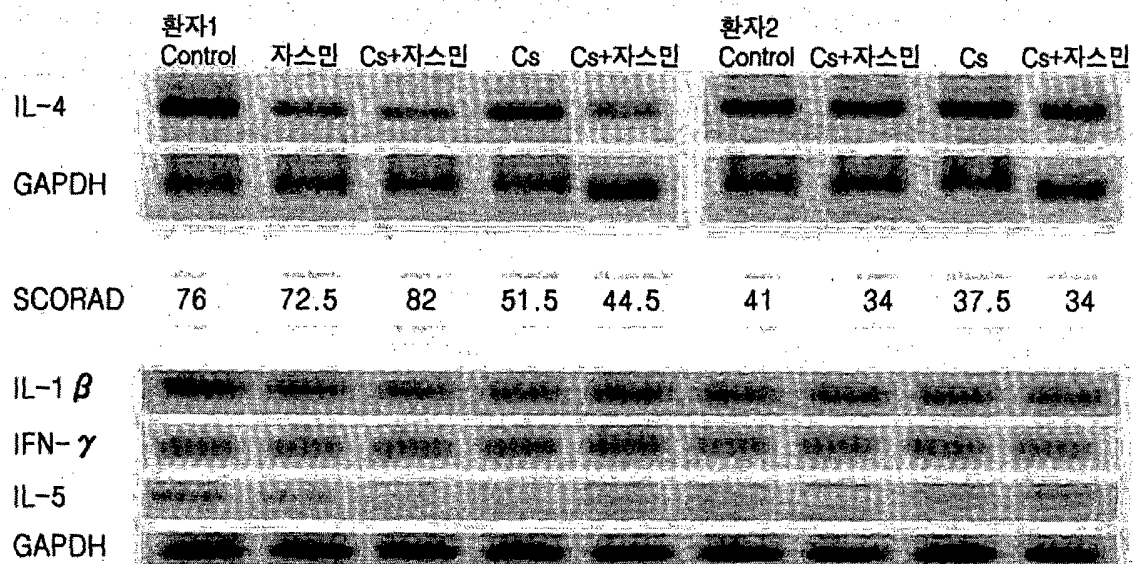
[Fig. 20]

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	ID	DRUG	TIME	BASE	SCQR	DRU	SLBE	TS	MDV	GRP	
2	1	0	0	50.4					50.4	0	1
3	2	0.125	1	50.4						1	1
4	1	0.25	2	50.4						1	1
5	2	0.5	3	50.4						1	1
6	1	1	14	50.4	33.4	3	2	38.4	0	1	1
7	1	0.5	15	50.4						1	1
8	1	0.25	14	50.4						1	1
9	1	0.125	17	50.4						1	1
10	1	0	23	50.4	40.4	4	4	48.4	0	1	1
11	1	0.125	30	50.4						1	1
12	1	0.25	31	50.4						1	1
13	1	0.5	32	50.4						1	1
14	1	1	44	50.4	33.4	2	2	37.4	0	1	1
15	1	0.5	45	50.4						1	1
16	1	0.25	46	50.4						1	1
17	1	0.125	47	50.4						1	1
18	1	0	60	50.4	36.9	3	2	48.3	0	1	1
19	1	0.125	61	50.4						1	1
20	1	0.25	62	50.4						1	1
21	1	0.5	63	50.4						1	1
22	1	1	77	50.4	26.9	2	1	29.9	0	1	1
23	1	0.5	78	50.4						1	1
24	1	0.25	79	50.4						1	1
25	1	0.125	80	50.4						1	1
26	1	0	81	50.4	33.4	4	2	33.4	0	1	1
27	1	0.125	82	50.4						1	1
28	1	0.25	90	50.4						1	1
29	1	0.5	94	50.4						1	1
30	1	1	106	50.4	20.7	2	1	28.7	0	1	1
31	1	0.5	107	50.4						1	1
32	1	0.25	108	50.4						1	1
33	1	0.125	109	50.4						1	1
34	1	0	118	50.4	26.8	4	2	34.3	0	1	1
35	1	0.125	120	50.4						1	1
36	1	0.25	122	50.4						1	1
37	1	0.5	122	50.4						1	1
38	1	1	133	50.4	26.6	3	1	30.6	0	1	1
39	1	0.5	134	50.4						1	1
40	1	0.25	135	50.4						1	1
41	1	0.125	146	50.4						1	1
42	1	0	147	50.4	32.2	5	1	38.2	0	1	1
43	1	0.125	148	50.4						1	1
44	1	0.25	149	50.4						1	1
45	1	0.5	150	50.4						1	1
46	1	1	162	50.4	24	2	1	27	0	1	1
47	1	0.5	162	50.4						1	1
48	1	0.25	163	50.4						1	1
49	1	0.125	164	50.4						1	1
50	1	0	175	50.4	33.4	1	0	34.4	0	1	1
51	2	0	0	68.4					68.4	0	1

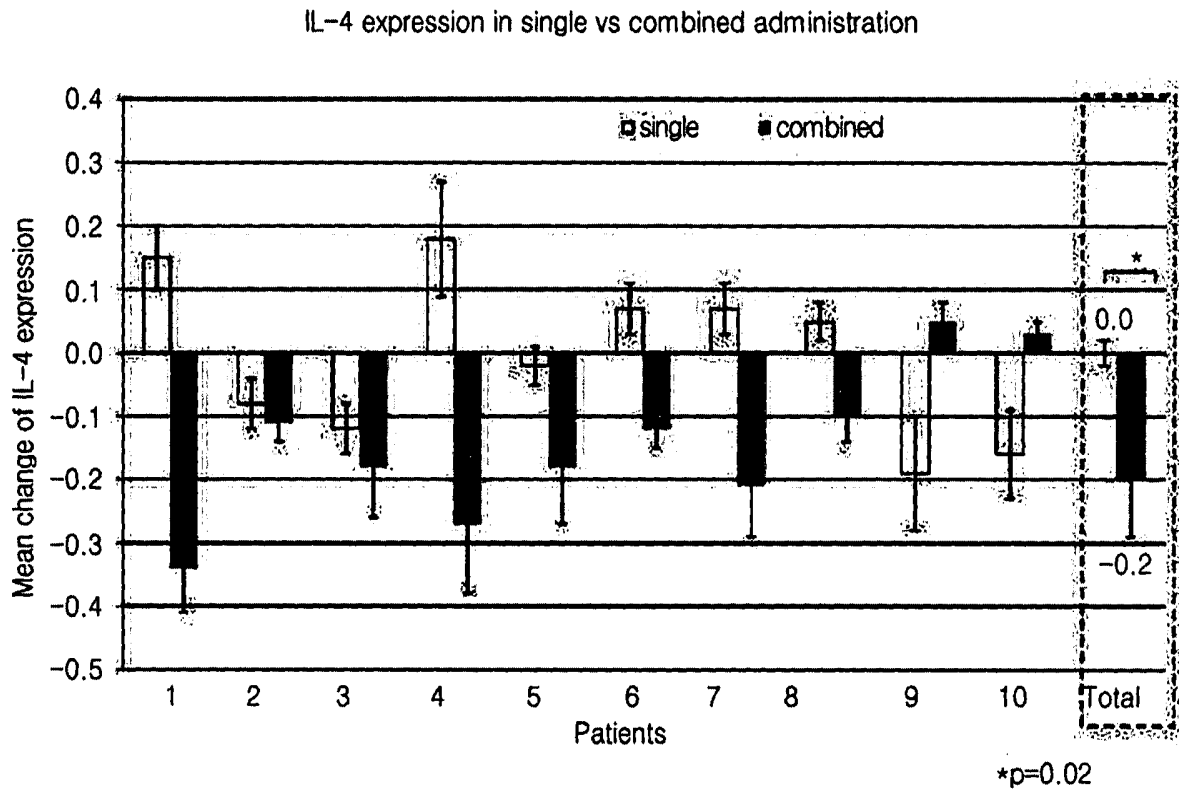
[Fig. 21]



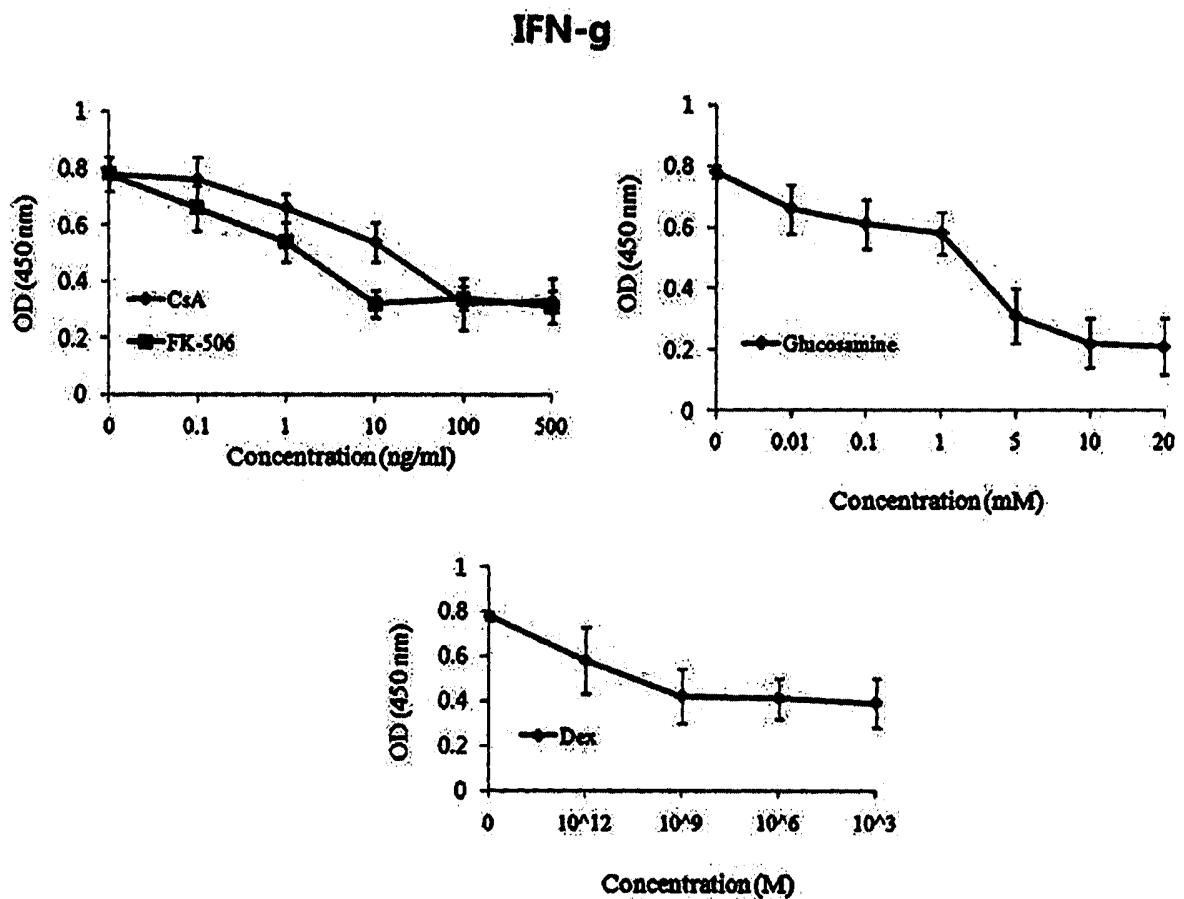
[Fig. 22]



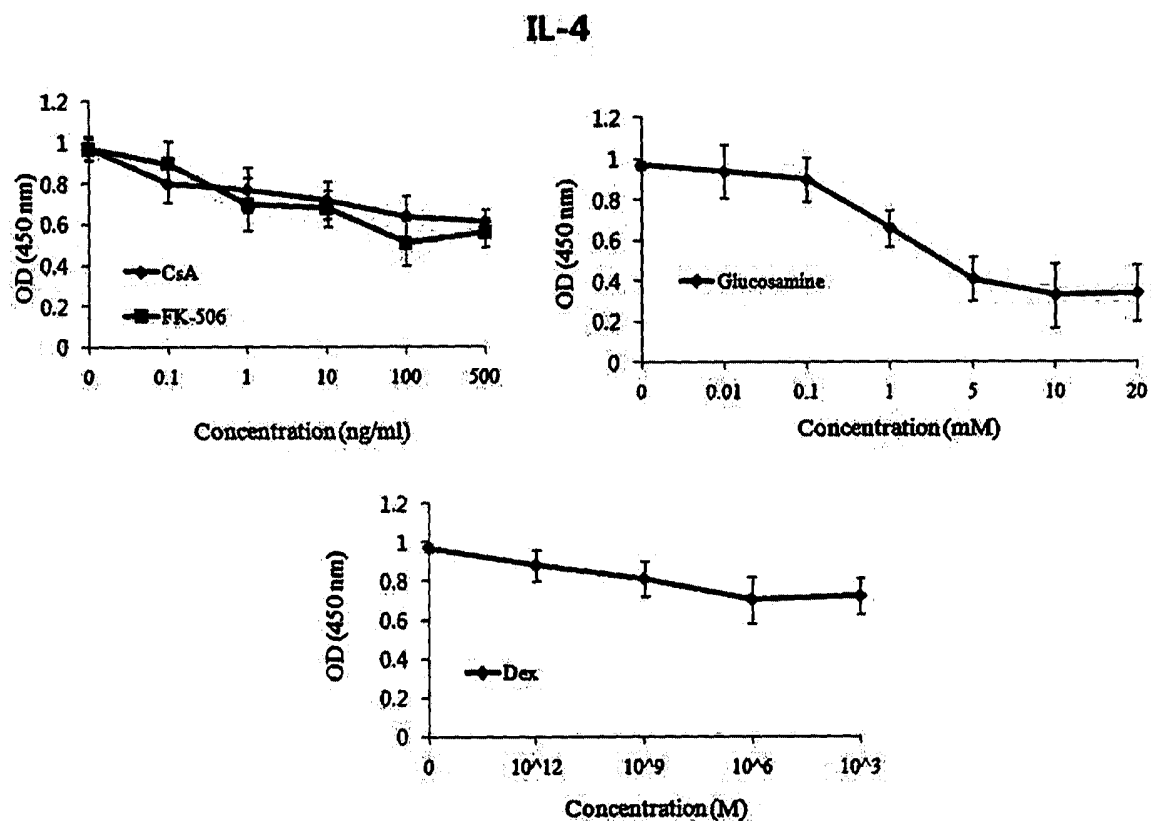
[Fig. 23]



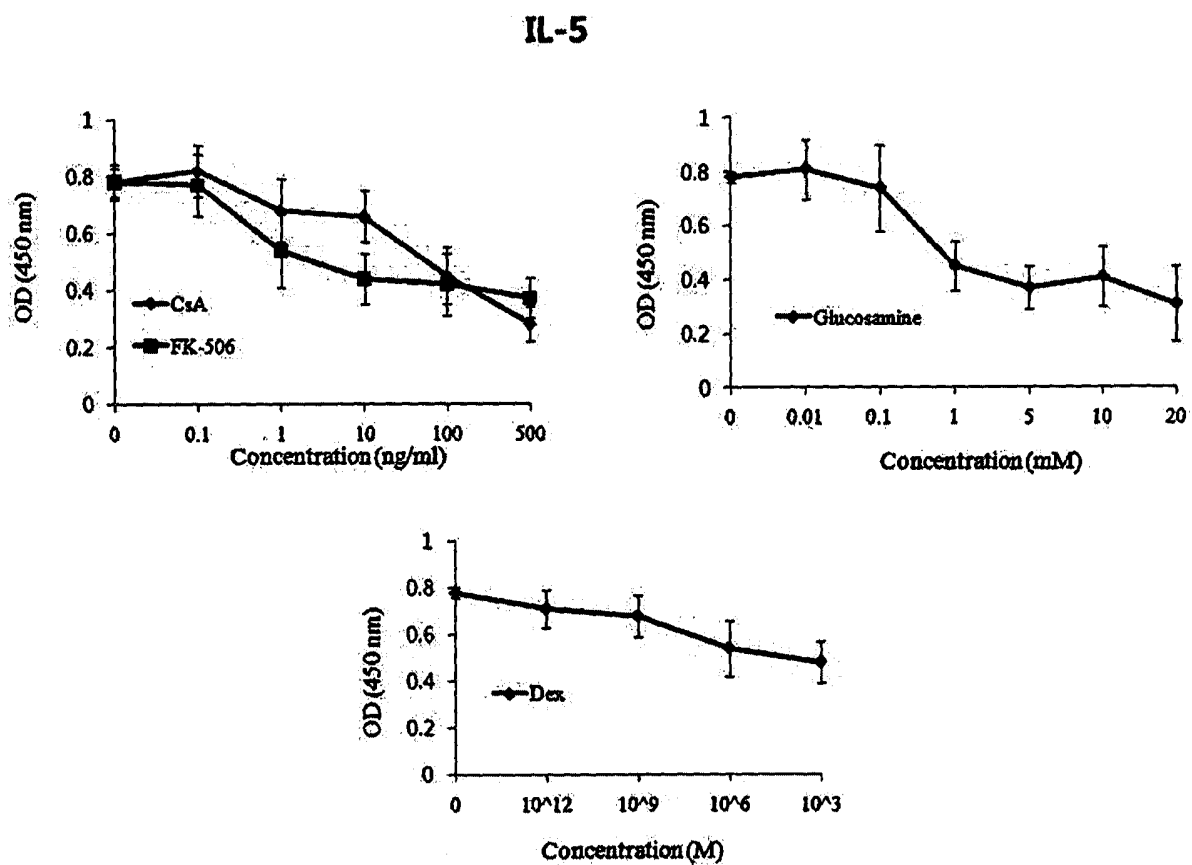
[Fig. 24]



[Fig. 25]



[Fig. 26]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/009842**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/13(2006.01)i, A61K 31/44(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/13; A61K 39/395; A61K 47/36; A61K 38/00; A61K 45/00; A61P 17/00; A61P 31/00; A61K 38/16; A61K 31/7028

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: atopic dermatitis, immunosuppressant, immunosuppressant, cyclosporine, Tacrolimus, inhibitors of transglutaminase 2, Glucosamine, Glucosamine**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KR 10-2010-0099849 A (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 15 September 2010 See claims 1-8, paragraphs [0010], [0028], [0033].	1-7,10-12,16 8,9,13-15
A	KR 10-0969634 B1 (KIM, SOO YOUL et al.) 14 July 2010 See claims 1, 5, and abstract.	1-16
A	KR 10-1993-0702014 A (LTT INSTITUTE CO., LTD.) 08 September 1993 See claim 1, and abstract.	1-16
A	JP 2010-518130 A (POLICHEM S.A.) 27 May 2010 See claims 1, 8, 14, and abstract.	1-16
A	KR 10-2010-0017998 A (KIM, HYUNG RYONG et al.) 16 February 2010 See claims 1, 2, 4, and abstract.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 FEBRUARY 2013 (26.02.2013)

Date of mailing of the international search report

28 FEBRUARY 2013 (28.02.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer


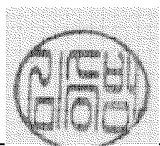
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/009842

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0099849 A	15.09.2010	NONE	
KR 10-0969634 B1	14.07.2010	EP 2094277 A1 JP 2010-506908 A US 2012-0156137 A1 WO 2008-048076 A1	02.09.2009 04.03.2010 21.06.2012 24.04.2008
KR 10-1993-0702014 A	08.09.1993	EP 0547229 A1 EP 0547229 A4 JP 05-310591 A US 5504068 A WO 93-00106 A1	23.06.1993 10.11.1993 22.11.1993 02.04.1996 07.01.1993
JP 2010-518130 A	27.05.2010	AR 065318 A1 AU 2007-346756 A1 AU 2007-346756 A2 CA 2675568 A1 CL 4422008 A1 CN 101641082 A CO 6210803 A2 EA 200901112 A1 EP 1958613 A1 EP 2117500 A1 IL 199841 D0 KR 10-2009-0119878 A MA 31238 B1 MX 2009008515 A NO 20092998 A US 2010-0062083 A1 WO 2008-098634 A1 ZA 200904945 A	27.05.2009 21.08.2008 24.09.2009 21.08.2008 22.08.2008 03.02.2010 20.10.2010 26.02.2010 20.08.2008 18.11.2009 15.04.2010 20.11.2009 01.03.2010 20.08.2009 14.09.2009 11.03.2010 21.08.2008 29.09.2010
KR 10-2010-0017998 A	16.02.2010	KR 10-0979102 B1 KR 10-0989045 B1	31.08.2010 25.10.2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>A61K 38/13(2006.01)i, A61K 31/44(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/13; A61K 39/395; A61K 47/36; A61K 38/00; A61K 45/00; A61P 17/00; A61P 31/00; A61K 38/16; A61K 31/7028 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아토피 피부염, 면역억제제, immunosuppressant, cyclosporine, Tacrolimus, 트랜스글루타미나제 2 억제제, 글루코사민, Glucosamine		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	KR 10-2010-0099849 A (동국대학교 산학협력단) 2010.09.15 청구항 1-8, 문단 [0010], [0028], [0033] 참조	1-7, 10-12, 16 8, 9, 13-15
A	KR 10-0969634 B1 (김수열 외) 2010.07.14 청구항 1, 5, 및 요약 참조.	1-16
A	KR 10-1993-0702014 A (가부시끼가이샤 엘티티 갱류쇼) 1993.09.08 청구항 1, 및 요약 참조.	1-16
A	JP 2010-518130 A (폴리켄 에스에이) 2010.05.27 청구항 1, 8, 14, 및 요약 참조.	1-16
A	KR 10-2010-0017998 A (김형룡) 2010.02.16 청구항 1, 2, 4, 및 요약 참조.	1-16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오. </div>		
<p>* 인용된 문헌의 특별 카테고리:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌</p> <p>“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌</p> <p>“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌</p> <p>“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌</p> <p>“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌</p> <p>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.</p> <p>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.</p> <p>“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌</p> </div> </div>		
국제조사의 실제 완료일 2013년 02월 26일 (26.02.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 02월 28일 (28.02.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 82-42-481-3371 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0099849 A	2010.09.15	없음	
KR 10-0969634 B1	2010.07.14	EP 2094277 A1 JP 2010-506908 A US 2012-0156137 A1 WO 2008-048076 A1	2009.09.02 2010.03.04 2012.06.21 2008.04.24
KR 10-1993-0702014 A	1993.09.08	EP 0547229 A1 EP 0547229 A4 JP 05-310591 A US 5504068 A WO 93-00106 A1	1993.06.23 1993.11.10 1993.11.22 1996.04.02 1993.01.07
JP 2010-518130 A	2010.05.27	AR 065318 A1 AU 2007-346756 A1 AU 2007-346756 A2 CA 2675568 A1 CL 4422008 A1 CN 101641082 A CO 6210803 A2 EA 200901112 A1 EP 1958613 A1 EP 2117500 A1 IL 199841 D0 KR 10-2009-0119878 A MA 31238 B1 MX 2009008515 A NO 20092998 A US 2010-0062083 A1 WO 2008-098634 A1 ZA 200904945 A	2009.05.27 2008.08.21 2009.09.24 2008.08.21 2008.08.22 2010.02.03 2010.10.20 2010.02.26 2008.08.20 2009.11.18 2010.04.15 2009.11.20 2010.03.01 2009.08.20 2009.09.14 2010.03.11 2008.08.21 2010.09.29
KR 10-2010-0017998 A	2010.02.16	KR 10-0979102 B1 KR 10-0989045 B1	2010.08.31 2010.10.25