



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월26일
(11) 등록번호 10-2316961
(24) 등록일자 2021년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/166 (2006.01) A61K 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/166 (2013.01)
A61K 31/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0013723
(22) 출원일자 2021년01월29일
심사청구일자 2021년01월29일
(65) 공개번호 10-2021-0097062
(43) 공개일자 2021년08월06일

(73) 특허권자
프라비바이오 주식회사
경상남도 김해시 인제로 197, 318호 (어방동, 인
제대학교)
(72) 발명자
박석주
부산광역시 해운대구 해운대로469번나길 9-22
(74) 대리인
지정훈

(30) 우선권주장
1020200010607 2020년01월29일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR100953177 B1
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 곽희찬

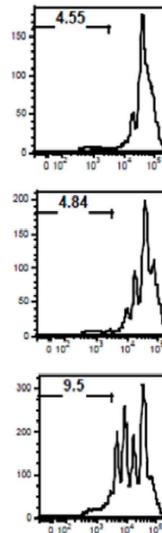
(54) 발명의 명칭 면역억제제로서의 벤젠 유도체의 면역억제용 약학적 조성물

(57) 요약

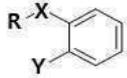
본 발명은 면역억제제로서의 벤젠 유도체의 면역억제용 약학적 조성물을 개시한다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



본 발명에 따르는 면역억제용 약학적 조성물은 면역억제 용도를 위한 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 특징이 있는데, 이에 의할 때, <화학식 1>



(상기 R은 탄소수는 6 개 내지 14개이고 가지형 알킬기, 분지형 알킬기 또는 일부 알켄으로 치환된 알킬기이며, X는 아마이드기 또는 에스테르기이고, Y는 할로젠, 메톡시기, 에톡시기, 하이드록시기 또는 니트로기임), T 림프구의 증식을 억제할 수 있으므로 면역억제제로서 유용하게 활용되며, T 세포매개성 면역질환들의 치료 예를 들어 장기이식 및 골수이식에서 거부반응 예방 및 치료 및 T 세포매개성 자가면역질환들, 건선, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 인슐린-의존성 당뇨병, 특정 용혈성 빈혈, 궤양성 대장염, 위근무력증, 사구체 신염, 길랑-바레 (Gillain-Barre)증후군 등과 알러지성 질환 즉, 알러지성 천식 아토피 등의 치료에 유효한 효과가 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020000023339 A

KR1020060050555 A

KR1020140084174 A

KR1020150098983 A

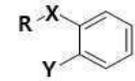
명세서

청구범위

청구항 1

면역억제 용도를 위한 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역억제용 약학적 조성물.

<화학식 1>



(상기 R은 탄소수는 6 개 내지 14개이고 가지형 알킬기, 분지형 알킬기 또는 일부 알켄으로 치환된 알킬기이며, X는 아마이드기 또는 에스테르기이고, Y는 할로젠, 메톡시기, 에톡시기, 하이드록시기 또는 니트로기임)

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화학식 1에서의 X, Y는 오로쏘 위치에 치환된 것을 특징으로 하는 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 약제가 세포-매개 면역성 억제에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 약제가 동종이식편의 거부 반응 치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 약제가 자가면역 질병의 치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 약제가 항암 질병의 치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,
상기 약제는 건선치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,
상기 약제는 아토피치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,
상기 약제가 인슐린-의존성 당뇨병의 치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서,
상기 약제가 다발성 경화증의 치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항에 있어서,
상기 약제가 류마티즘성 관절염의 치료에 유용한 것인 면역억제용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역억제제로서의 벤젠 유도체의 면역억제용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 T 림프구의 증식을 억제할 수 있으므로 면역억제제로서 유용하게 활용되며, T 세포매개성 면역질환들의 치료 예를 들어 장기이식 및 골수이식에서 거부반응 예방 및 치료 및 T 세포매개성 자가면역질환들, 건선, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 인슐린-의존성 당뇨병, 특정 용혈성 빈혈, 궤양성 대장염, 위근무력증, 사구체 신염, 길랑-바레(Gillain-Barre)증후군 등과 알리지성 질환 즉, 알리지성 천식 아토피 등의 치료에 유효한 면역억제제로서의 벤젠 유도체의 면역억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 면역(immunity)은 병원체 등의 항원으로부터 생체를 보호하기 위하여 필요한 중요한 현상이다.

[0004] 면역반응은 초기의 선천면역(innate immunity)반응과 후기의 적응면역 반응에 의해 매개된다.

[0005] 선천면역(innate immunity)은 선천성 면역, 비특이적 면역, 1차 방어작용, 자연면역이라고도 불리며 특정한 병원체를 기억하지 않고 즉각적으로 반응하는 면역 체계를 가리킨다.

[0006] 선천면역에 비해 적응면역(adaptive immunity)은 각기 다른 거대분자들에 대한 정교한 특이성을 가지며 동일한 항원에 반복적으로 노출되는 경우에는 매우 강력한 면역반응을 일으킬 수 있다.

[0007] 적응면역 반응에는 세포매개면역(cell-mediated immunity)과 체액면역(humoral immunity)이라 불리는 두 유형이 있는데 세포매개 면역은 T 림프구에 의해 매개된다.

- [0008] T 림프구는 기능적으로 구별되는 집단으로 구성되는데, Th1 세포, Th2세포, Th17세포 Treg세포 등을 포함하는 도움 CD4 (Helper) T 세포와 CD8 세포용해 T 림프구(Cytotoxic T lymphocyte)가 있다.
- [0009] 조직이나 장기를 이식 하는 경우, 유전 배경이 다른 이식편을 이식하게 되면 T 세포는 이식편의 Class I 및 Class II MHC 분자를 인식하여 이식편을 파괴하는 거부반응이라는 특이 면역반응이 나타나므로 장기이식 및 골수 이식을 성공적으로 수행하려면 T 세포에 의한 면역반응을 조절해야한다.
- [0010] 알러지성 질환의 경우, 일부 CD4+ 도움 T 세포들은 B 세포 항체의 IgE로의 동형전환을 자극하는 IL-4, IL-13을 내는데 이는 아토피의 병리기전에 매우 중요한 면역글로불린 E(IgE)라는 특별한 종류의 항체를 생산하게 하는데 매우 중요한 역할을 하므로 T 세포의 면역반응을 조절하는 것이 매우 중요하다.
- [0011] 자가면역 질환의 경우, 병원균 같은 외부의 항원에 대비해서 만들어진 면역체계가 자신의 기관이나 조직을 외부에서 유래한 항원으로 인식 및 면역 반응을 일으키는 질환을 말하는데 T 세포가 관여하는 것으로 알려진 자가면역 질환들은 그 기전이 T세포 사이토카인 매개염증으로 알려진 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 염증성 장질환 건선 등이 있다.
- [0012] 이런 경우도 이러한 질환들을 치료하기 위하여 T 세포의 면역반응을 조절하는 것이 매우 중요하므로 T 세포의 면역반응을 조절하기 위해서는 T 세포의 증식을 억제하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2008-0013886호 (2008. 02. 13. 공개)

발명의 내용

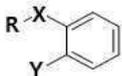
해결하려는 과제

- [0015] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 T 림프구의 증식을 억제할 수 있으므로 면역억제제로서 유용하게 활용되며, T 세포매개성 면역질환들의 치료 예를 들어 장기이식 및 골수이식에서 거부반응 예방 및 치료 및 T 세포매개성 자가면역질환들, 건선, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 인슐린-의존성 당뇨병, 특정 용혈성 빈혈, 케양성 대장염, 위근무력증, 사구체 신염, 길랑-바레(Gillain-Barre)증후군 등과 알러지성 질환 즉, 알러지성 천식 아토피 등의 치료에 유효한 면역억제제로서의 벤젠 유도체의 면역억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명은 상술한 기술적 과제를 해결하기 위하여, 면역억제 용도를 위한 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역억제용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0018] <화학식 1>



- [0019]
- [0020] (상기 R은 탄소수는 6 개 내지 14개이고 가지형 알킬기, 분지형 알킬기 또는 일부 알켄으로 치환된 알킬기이며, X는 아마이드기 또는 에스테르기이고, Y는 할로젠, 메톡시기, 에톡시기, 하이드록시기 또는 니트로기임)
- [0021] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 화학식 1에서의 X, Y는 오르쏘 위치에 치환된 것일 수 있다.
- [0022] 삭제
- [0023] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 세포-매개 면역성 억제에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 동종이식편의 거부 반응 치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.

- [0025] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 자가면역 질병의 치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 항암 질병의 치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제는 건선치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제는 아토피치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 인슐린-의존성 당뇨병의 치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 다발성 경화증의 치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 약제가 류마티즘성 관절염의 치료에 유용한 것인 용도일 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따르는 면역억제제로서의 벤젠 유도체의 면역억제용 약학적 조성물에 의하면, T 림프구의 증식을 억제할 수 있으므로 면역억제제로서 유용하게 활용되며, T 세포매개성 면역질환들의 치료 예를 들어 장기이식 및 골수이식에서 거부반응 예방 및 치료 및 T 세포매개성 자가면역질환들, 건선, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 인슐린-의존성 당뇨병, 특정 용혈성 빈혈, 케양성 대장염, 위근무력증, 사구체 신염, 길랑-바레(Gillain-Barre)증후군 등과 알러지성 질환 즉, 알러지성 천식 아토피 등의 치료에 유효한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 발명에 따르는 실시예 1에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 2는 본 발명에 따르는 실시예 2에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 3은 본 발명에 따르는 실시예 3에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 4는 본 발명에 따르는 실시예 4에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 5는 본 발명에 따르는 실시예 5에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 6은 본 발명에 따르는 실시예 6에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 7은 본 발명에 따르는 실시예 7에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 8은 본 발명에 따르는 실시예 8에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 9는 본 발명에 따르는 실시예 9에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 10은 본 발명에 따르는 실시예 10에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 11은 본 발명에 따르는 실시예 11에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 12는 본 발명에 따르는 실시예 12에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 13은 본 발명에 따르는 실시예 13에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 14는 본 발명에 따르는 실시예 14에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 15는 본 발명에 따르는 실시예 15에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 16은 본 발명에 따르는 실시예 16에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 17은 본 발명에 따르는 실시예 17에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 18은 본 발명에 따르는 실시예 18에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 19는 본 발명에 따르는 실시예 19에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 20은 본 발명에 따르는 비교예 1에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,
- 도 21은 본 발명에 따르는 비교예 2에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이고,
- 도 22는 본 발명에 따르는 비교예 3에 대한 T 세포 분열의 억제 정도를 나타내는 그래프이며,

도 23은 본 발명의 실시예 2에 대하여 IL-2, IL-4, IL-13 및 TNF 유전자 발현을 1시간, 4시간 경과후에 Fragments per kilobase of transcript per million 으로 transcript 당 fragment수를 이용하여 발현 정도를 표현한 그래프이고,

도 24는 본 발명의 실시예 2에 대하여 IL-3, NFATC1, REL 및 MYC 유전자 발현을 1시간, 4시간 경과후에 Fragments per kilobase of transcript per million 으로 transcript 당 fragment수를 이용하여 발현 정도를 표현한 그래프이고,

도 25는 본 발명의 실시예 1에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 26은 본 발명의 실시예 2에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 27은 본 발명의 실시예 3에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 28은 본 발명의 실시예 4에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 29는 본 발명의 실시예 5에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 30은 본 발명의 실시예 6에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 31은 본 발명의 실시예 7에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 32는 본 발명의 실시예 8에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 33은 본 발명의 실시예 9에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 34는 본 발명의 실시예 10에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 35는 본 발명의 실시예 11에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 36은 본 발명의 실시예 12에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 37은 본 발명의 실시예 13에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 38은 본 발명의 실시예 14에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 39는 본 발명의 실시예 15에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 40은 본 발명의 실시예 16에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이고,

도 41은 본 발명의 실시예 17에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 42는 본 발명의 실시예 18에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 43은 본 발명의 실시예 19에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 44는 본 발명의 비교예 1에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 45는 본 발명의 비교예 2에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 46은 본 발명의 비교예 3에 의한 IL-2 생성이 억제를 나타내는 그래프이며,

도 47, 48은 본 발명에 따르는 실시예 2, 3, 6에 대한 이식거부반응 예방효과를 나타낸 사진이고,

도 49는 본 발명에 따르는 실시예 14, 17에 대한 건선치료 효과를 보여주는 사진이고,

도 50, 51 및 52는 본 발명에 따르는 실시예 14, 17에 대한 건선치료 효과를 육안으로 평가하여 그래프로 나타낸 것이며,

도 53, 54 및 55는 본 발명에 따르는 실시예 14, 17에 대한 건선치료 효과를 병리 조직사진(H&E)으로 나타낸 것이고,

도 56 및 57은 본 발명에 따르는 실시예 14, 17에 대한 건선을 유발한 마우스에서 T 세포의 변화를 나타낸 그래프이고,

도 58은 본 발명에 따르는 실시예 2에 대한 아토피 피부염 치료효과를 보여주는 사진이며,

도 59는 본 발명에 따르는 실시예 2에 대한 아토피 피부염 치료효과를 병리 조직사진(H&E)으로 나타낸 것이고,

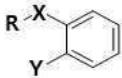
도 60은 본 발명에 따르는 실시예 2에 대한 아토피 피부염 치료효과를 병리 조직사진(톨루이딘블루 염색)으로 나타낸 것이고,

도 61은 본 발명에 따르는 실시예 2에 대한 아토피 피부염 치료효과를 IgE 감소효과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0037] 본 발명은 T 세포의 증식을 억제함으로써 면역을 억제하는 약물로서, T 세포 증식억제 효과로서 면역억제 효능을 동물에서 확인하기 위하여 이식모델로서 피부이식, 과민 면역반응모델로서 아토피 피부염, 그리고 자가면역 질환 모델로서 건선모델을 이용하여 증명함으로써 발명을 완성하였다.
- [0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하며, 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0040] 또한, 본 발명은 특정한 부분을 상세히 기술하나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.
- [0041] 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0042] 본 발명에 따르는 화학식 1의 화합물의 용도는 면역억제 용도를 위한 약제 제조를 위한 것을 특징으로 한다.

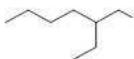
[0043] <화학식 1>



- [0044]
- [0045] (상기 R은 가지형 알킬기, 분지형 알킬기 또는 일부 알켄으로 치환된 알킬기이며, X는 아마이드기 또는 에스테르기이고, Y는 할로젠, 메톡시기, 하이드록시기 또는 니트로기임)

[0046] 상기 R은 가지형 알킬기, 분지형 알킬기 또는 일부 알켄으로 치환된 알킬기인데, 여기서 가지형 알킬기는 탄소수 6 개 내지 14개의 탄소로서, CH₃(CH₂)_n-으로 나타내면 n=6 내지 14로 표기할 수 있고, 분지형 알킬기는 아래 구조식 1과 같이 주가지(탄소수 6개)의 중간에 분기된 가지(탄소수 2개)를 갖는 경우에 R의 탄소수는 주가지 탄소수 6 개 내지 14개인 범위 내에서 분기된 가지를 가지는 특징이 있으며,

[0047] <구조식 1>



- [0048]
- [0049] 일부 알켄으로 치환된 알킬기는 아래 구조식 2와 같이 주가지(탄소수 8개)에 분기된 가지(탄소수 1개)를 가지고, 이중결합을 가지고 있는 특징이 있다.

[0050] <구조식 2>



- [0051]
- [0052] 여기서 상기 가지형 알킬기, 분지형 알킬기 또는 일부 알켄으로 치환된 알킬기에 포함된 탄소수는 앞서 분기된 가지와 주가지에서 언급한 것처럼 탄소수는 주가지 탄소수 6 내지 14개가 바람직한데, 만일 6개 미만이면 면역억제 효과가 발휘되기 어렵고, 14개를 초과하면 체내에서 흡수되기 어려운 문제가 있을 수 있다.

[0053] 상기 X는 아마이드기 또는 에스테르기로 각각 아래 구조식 3, 4인 기능기로 나타낼 수 있다.

[0054] <구조식 3>



[0056] <구조식 4>



[0058] 상기 Y는 할로젠, 메톡시기, 하이드록시기 또는 니트로기인데, 할로젠은 플로로(F-), 클로로(Cl-), 브로모(Br-), 요오드(I-)이고, 메톡시(Methoxy, MeO-), 하이드록시(Hydroxy, OH-), 니트로(Nitro, NO₂-)이다.

[0059] 여기서, 상기 Y는 X에 인접한 위치(오르쏘, ortho)에 특정할 때 면역억제의 효과를 한층 더 발휘될 수 있다.

[0060] 면역(immunity)은 병원체 등의 항원으로부터 생체를 보호하기 위하여 필요한 중요한 현상이다. 면역반응은 초기의 선천면역(innate immunity)반응과 후기의 적응면역 반응에 의해 매개된다. 선천면역(innate immunity)은 선천성 면역, 비특이적 면역, 1차 방어작용, 자연면역이라고도 불리며 특정한 병원체를 기억하지 않고 즉각적으로 반응하는 면역 체계를 가리킨다. 선천면역에 비해 적응면역(adaptive immunity)은 각기 다른 거대분자들에 대한 정교한 특이성을 가지며 동일한 항원에 반복적으로 노출되는 경우에는 매우 강력한 면역반응을 일으킬 수 있다. 적응면역 반응에는 세포매개면역(cell-mediated immunity)과 체액면역(humoral immunity)이라 불리는 두 유형이 있는데 세포매개 면역은 T 림프구에 의해 매개된다.

[0061] T 림프구는 기능적으로 구별되는 집단으로 구성되는데, Th1 세포, Th2세포, Th17세포 Treg세포 등을 포함하는 도움 CD4 (Helper) T 세포와 CD8 세포용해 T 림프구(Cytotoxic T lymphocyte)가 있다.

[0062] 조직이나 장기를 이식 하는 경우, 유전 배경이 다른 이식편을 이식하게 되면 T 세포는 이식편의 Class I 및 Class II MHC 분자를 인식하여 이식편을 파괴하는 거부반응이라는 특이 면역반응이 나타나므로 장기이식 및 골수 이식을 성공적으로 수행하려면 T 세포에 의한 면역반응을 조절해야한다.

[0063] 알러지성 질환의 경우, 일부 CD4+ 도움 T 세포들은 B 세포 항체의 IgE로의 동형전환을 자극하는 IL-4, IL-13을 내는데 이는 아토피의 병리기전에 매우 중요한 면역글로불린 E(IgE)라는 특별한 종류의 항체를 생산하게 하는데 매우 중요한 역할을 하므로 T 세포의 면역반응을 조절하는 것이 매우 중요하다.

[0064] 자가면역 질환의 경우, 병원균 같은 외부의 항원에 대비해서 만들어진 면역체계가 자신의 기관이나 조직을 외부에서 유래한 항원으로 인식 및 면역 반응을 일으키는 질환을 말하는데 T 세포가 관여하는 것으로 알려진 자가면역 질환들은 그 기전이 T세포 사이토카인 매개염증으로 알려진 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 염증성 장질환 건선 등이 있다. 이런 경우도 이러한 질환들을 치료하기 위하여 T 세포의 면역반응을 조절하는 것이 매우 중요하다. 따라서 T 세포의 면역반응을 조절하기 위해서는 T 세포의 증식을 억제하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 특허에서는 T 세포의 증식을 억제함으로써 면역을 억제하는 약물을 찾았고 T 세포 증식억제 효과로서 면역억제 효능을 동물에서 확인하기 위하여 이식모델로서 피부이식, 과민 면역반응모델로서 아토피 피부염, 그리고 자가면역 질환 모델로서 건선모델을 이용하여 증명함으로써 발명을 완성하였다.

[0065] 상기 화학식 1의 화합물에 의한 약제는 세포-매개 면역성 억제에 유용하게 사용될 수 있다.

[0066] 또한, 상기 약제가 동종이식편의 거부 반응 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0067] 아울러, 상기 약제는 자가면역 질병의 치료에 유용한 용도로 사용될 수 있다.

[0068] 또한, 상기 약제는 건선치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0069] 아울러, 상기 약제는 아토피치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0070] 또 한편, 상기 약제는 인슐린-의존성 당뇨병의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0071] 아울러, 상기 약제는 다발성 경화증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0072] 또한, 상기 약제는 류마티즘성 관절염의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0073] 한편, 앞서 본 바와 같이, 상기 화학식 1의 화합물이 면역억제 활성을 갖고 있으며, 이러한 면역억제 활성은 T-세포의 증식억제 시험과 IL-2 유전자 발현량 측정시험과 IL-2 단백질 발현량 측정시험을 통해 확인할 수 있다.

- [0074] 또한, 상기 면역억제활성은 화학식 1의 화합물은 세포-매개 면역을 억제하는 면역억제약제의 제조에 사용할 수 있고, 자가면역 질환, 알러지 반응 및 '이식편 대 숙주' 질병과 같이 변경된 면역학적 적응 반응과 관련된 질환의 치료에 부작용을 최소화하며 사용할 수 있어, 관련 질환으로 고통받는 환자의 병증 완화하거나 완치하는데 도움이 될 것이며, 특히 원치아니하는 면역학적 반응을 예방하기 위해, 동종 조직 또는 장기를 이식받았거나 받을 예정인 환자의 예방 치료에 있어서도 유용할 것이다.
- [0075] 본 발명은 인체에 사용될 수 있으며, 자가 면역 질환 또는 '이식편 대 숙주' 질환과 같은 질환으로 고통받거나, 조직이식된 동종 조직 또는 장기의 거부반응의 위험에 처해있는 사람을 포함하는 포유류, 예를 들어 애완용 동물, 마우스(mouse), 래트(rat)를 포함할 수 있다.
- [0076] 또 한편, 상기 화학식 1의 화합물의 유효량은 면역억제 효과는 면역 반응 또는 세포-매개 면역 반응의 더 이상의 발현을 지체, 차단, 억제 또는 예방하는 것을 의미하고, 당업계의 숙련자로서의 담당 진단 전문 의사가 공지된 기술 및 유사 환경하에서 얻은 관찰 결과를 사용하여 쉽게 결정할 수 있는데, 예를 들어, 담당 진단 의사가 포유류의 종이나 크기, 나이 및 건강상태, 연관된 특별한 질병 유무, 질병의 연관도, 각 환자의 반응이나 투여하는 특정 화합물, 투여 방식, 투여한 제제의 생체내 발현 특성 및 다른 관련된 환경을 고려할 수 있다.
- [0077] 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 약제는 상기 화합물을 유효량으로 생체내에서 이용가능하게 하는, 경구적 또는 비경구 경로를 비롯한 어떠한 형태 또는 방법으로 투여할 수 있는데, 예를 들어 경구로, 피하로, 근육 내로, 정맥 내로, 경피적으로, 비강내로, 직장내로 등으로 투여할 수 있고, 바람직하게는 경구적 투여가 사용될 수 있다.
- [0078] 또는 다른 면역억제제와 병용투여하여 다른 약물의 부작용을 최소화하거나 효과를 올리는 용법으로 사용될 수도 있다.
- [0079] 제형을 제조하는 당업계의 숙련자는 선택된 화합물의 특성, 치료해야 할 질병의 상태, 질병의 단계 및 다른 관련 환경에 따라 적당한 형태 및 투여 방식을 쉽게 선택할 수 있다.
- [0080] 상기 화합물은 제약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 조합된 약제 조성물의 형태로 투여할 수 있고, 상기 담체 또는 부형제의 비율 및 성질은 선택된 화합물의 용해도 및 화학적 성질, 및 표준 제약학적 관례에 의해 결정할 수 있다.
- [0081] 상기 약제 조성물은 제약 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 제조할 수 있으며, 담체 또는 부형제는 고형, 반-고형, 또는 액체형 물질일 수 있고, 이는 유효 성분에 대한 부형약 또는 매질로서 기능하며, 적당한 담체 또는 부형제는 본 기술 분야에 주지되어 있어 이를 활용할 수 있다.
- [0082] 또한 상기 약제는 경구적 또는 비경구적 사용에 맞출 수 있고, 환자에게 정제, 캡슐제, 좌약, 용액제, 현탁액제 등의 형태로 투여될 수 있으며, 예를 들어 불활성 희석제 또는 식용 담체와 함께, 경구로 투여할 수 있고, 젤라틴 캡슐 중에 담거나 정제로 압축시킬 수도 있다.
- [0083] 경구 치료 투여를 위해, 상기 화합물은 부형제와 함께, 정제, 트로키, 캡슐제, 엘릭시르제, 현탁액제, 시럽, 웨이퍼, 츄잉검 등의 형태로 사용할 수 있다.
- [0084] 한편, 본 발명의 화학식 1의 화합물이 약제 내에 존재하는 양은 적정 투여량이 얻어지는 정도이면 족하다 할 것이다.
- [0085] 아울러, 본 발명의 약제에는 정제, 환약, 캡슐제, 트로키 등은 보조약을 더 포함할 수 있는데, 예를 들어 미정질 셀룰로오스, 검 트라가칸트 또는 젤라틴과 같은 결합제, 전분 또는 락토오스와 같은 부형제, 알긴산, 프리모겔(Primogel, 상표명), 옥수수 전분 등과 같은 붕해제, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로텍스(Sterotex, 상표명)와 같은 윤활제, 콜로이드질 이산화 규소와 같은 활택제 및 수크로스 또는 사카린과 같은 감미제를 첨가할 수도 있거나 박하, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미료와 같은 향미제를 첨가할 수도 있고, 단위 제형이 캡슐일 경우, 상기 유형의 물질 이외에도, 폴리에틸렌 글리콜 또는 지방오일과 같은 액상 담체를 함유할 수도 있다.
- [0086] 또 다른 단위 제형은, 예를 들면 코팅과 같이 단위 제형의 물리적인 형태를 개질하는 상이한 각종 물질을 함유할 수 있어서, 정제 또는 환약은 설탕, 셀락 또는 다른 장용피제로 코팅할 수 있고 시럽의 경우에는 본 발명의 화합물에 추가하여 감미제로서의 설탕 및 특정 보존제, 염료 및 착색제 및 향미료를 함유할 수 있음은 물론이다.

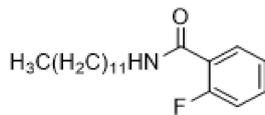
[0087] 아울러, 비경구적 치료 투여를 위하여 화학식 1의 화합물은 용액 또는 현탁액으로 준비할 수 있는데, 당업계의 전문가에 의하여 본 발명의 화합물의 양은 적당한 투여량이 얻어지는 정도로 사용될 수 있다.

[0088] 또 한편, 상술한 용액 및 현탁액은 주사용수, 염수, 고정오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 무균 희석제, 벤질 알콜, 메틸 파라벤과 같은 항균제, 아스코르브산, 중아황산 나트륨과 같은 항산화제, 에틸렌 디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제, 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트와 같은 완충액, 염화나트륨 또는 데스트로스과 같은 장성(tonicity) 조절제를 포함할 수 있고, 비경구 제제는 애플, 1회용 주사, 유리나 플라스틱제 다회 투여 바이알 내에 밀봉할 수 있음은 물론이다.

[0089] 실시예 1

[0090] 아래 화학식 2에 의한 화합물을 DMSO와 혼합하여 10uM, 20uM, 30uM, 40uM의 웰(well)을 준비하였다.

[0091] <화학식 2>

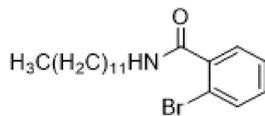


[0092]

[0093] 실시예 2

[0094] 아래 화학식 3을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0095] <화학식 3>

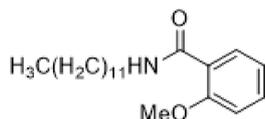


[0096]

[0097] 실시예 3

[0098] 아래 화학식 4를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0099] <화학식 4>

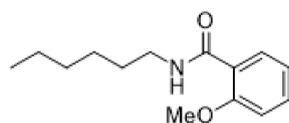


[0100]

[0101] 실시예 4

[0102] 아래 화학식 5를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0103] <화학식 5>

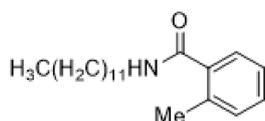


[0104]

[0105] 실시예 5

[0106] 아래 화학식 6을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0107] <화학식 6>

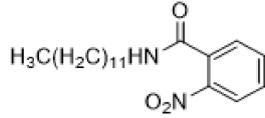


[0108]

[0109] 실시예 6

[0110] 아래 화학식 7을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0111] <화학식 7>

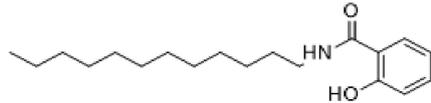


[0112]

[0113] 실시예 7

[0114] 아래 화학식 8을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0115] <화학식 8>

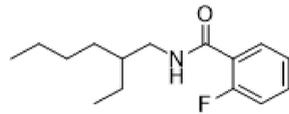


[0116]

[0117] 실시예 8

[0118] 아래 화학식 9를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0119] <화학식 9>

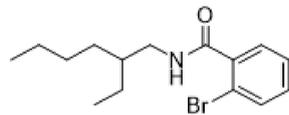


[0120]

[0121] 실시예 9

[0122] 아래 화학식 10을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0123] <화학식 10>

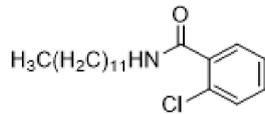


[0124]

[0125] 실시예 10

[0126] 아래 화학식 11을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0127] <화학식 11>

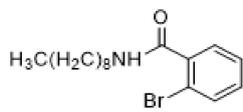


[0128]

[0129] 실시예 11

[0130] 아래 화학식 12를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0131] <화학식 12>

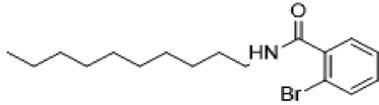


[0132]

[0133] 실시예 12

[0134] 아래 화학식 13을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0135] <화학식 13>

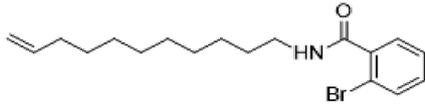


[0136]

[0137] 실시예 13

[0138] 아래 화학식 14를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0139] <화학식 15>

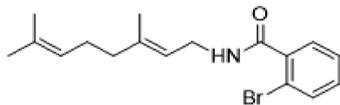


[0140]

[0141] 실시예 14

[0142] 아래 화학식 15를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0143] <화학식 15>

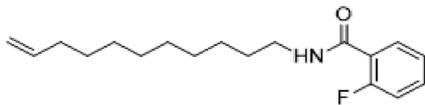


[0144]

[0145] 실시예 15

[0146] 아래 화학식 16을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0147] <화학식 16>

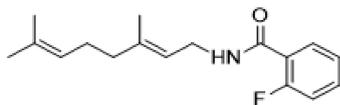


[0148]

[0149] 실시예 16

[0150] 아래 화학식 17을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0151] <화학식 17>

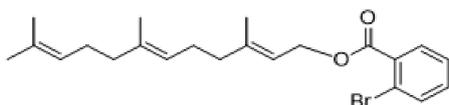


[0152]

[0153] 실시예 17

[0154] 아래 화학식 18을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0155] <화학식 18>

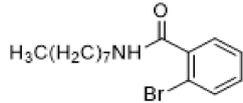


[0156]

[0157] 실시예 18

[0158] 아래 화학식 19를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0159] <화학식 19>

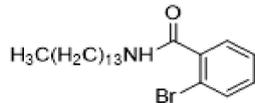


[0160]

[0161] 실시예 19

[0162] 아래 화학식 20을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0163] <화학식 20>

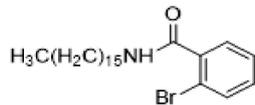


[0164]

[0165] 비교예 1

[0166] 아래 화학식 21을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0167] <화학식 21>

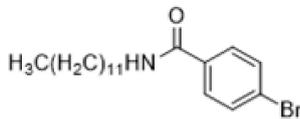


[0168]

[0169] 비교예 2

[0170] 아래 화학식 22를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0171] <화학식 22>

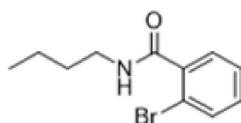


[0172]

[0173] 비교예 3

[0174] 아래 화학식 23을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같이 실시하였다.

[0175] <화학식 23>



[0176]

[0177] 실험예 1 T 세포 증식 억제 실험

[0178] 실시예, 비교예에 의한 화합물이 T 세포의 증식을 억제하는 효과를 알기 위하여 세포내 분자와 공유결합으로 결합하는 형광염료인 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)를 이용하여 T 세포의 증식을 ex vivo로 측정하였다. 7주령 C57BL/6 생쥐에서 비장을 적출하여 으갠 후 strainer (40µm pore size)로 단세포만 분리한 후 ACK(Ammonium-Chloride-Potassium)lysis 완충용액으로 적혈구를 제거하여 백혈구만 분리하였다. 여기에 CD 90.2 microbead (miltenyi 130-121-278)를 가하고 4°C에서 20분 반응시킨 후 MACS Magnetic Stand와 LS column을 이용하여 비장의 T cell만 분리하였다. 비장세포에서 분리한 T cell은 Free media (RPMI1640+200 U/mL penicillin + 200 ug/mL Streptomycin) 1 ml로 부유한 후 CFSE(10mM) 0.3ul를 첨가한 후 37°C에 5분간 반응했다. Free media 10 ml를 첨가하여 반응을 정지한 후 원심분리하여 세포침전물을 얻었다. 여기에 10% FBS와 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin 이 들어있는 RPMI 1640 배지를 가하여 세포를 부유시키고 96 well plate에 한 well 당 2×10^5 cell을 분주하고 CD3, CD28 항체를 (각각 0.5 ug/ml)로 처리하여 T cell을

활성화하고, 실험기기(FACS canto)로 실험결과를 도 1 내지 22에 나타내었다.

[0179] 도면을 참조하면, 그래프들은 밑에서부터 위로 농도가 증가한 것으로 순서대로 10uM, 20uM, 30uM에서의 결과 그래프로서, 실시예들은 T 세포의 증식을 억제하는 효과가 발현되는 반면에 비교예들은 억제효과가 미미함을 알 수 있다.

[0180] 위 도면의 그래프에서 세로축은 세포의 양(갯수)이고, 가로축은 세포 내에 존재하는 CFSE의 양으로서 그래프상 왼쪽으로 이동할 수록 형광이 감소하는 것을 의미하며, 이러한 감소 수준에 따라 세포의 증식되는 것을 의미한다.

[0181] 실험예 2 세포독성 실험

[0182] 실시예, 비교예의 화합물에 대한 세포독성 실험은 CCK-8 (Cell Counting Kit, Dojindo) 방법으로 하였고 한국세포주 은행으로부터 구입한 T lymphocyte 세포주 Jurkat E6-1을 이용하여 측정하였다. 세포주를 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin 이 함유된 RPMI1640 배지에서 키운 후 96 well plate 에 한 well당 2×10^4 씩 분배하고, 실시예, 비교예들을 세포에 각각 처리한 후 다음 20시간 동안 37° C 5% CO₂ 항온배양기에서 배양한 후 CCK-8 용액을 10% 되도록 가하고 다시 37° C 5% CO₂ 항온배양기에서 1 시간 반 동안 배양한 후 450 nm (Reference: 650 nm)에서 흡광도를 측정하고 아무처리 하지 않은 세포에서 나온 값을 생존율 100% 라고 기준하여 상대값으로 아래 표 1에 나타내었다.

[0183] 즉, 100이라 표기된 것이면, 100% 생존율을 의미한다.

표 1

	None (%)	10 uM (%)	20 uM (%)	30 uM (%)
실시예 1	100	97.3	94.3	96.6
실시예 2	100	99	96	89.8
실시예 3	100	98	94	90
실시예 4	100	96	92	88
실시예 5	100	88.7	87.2	85.7
실시예 6	100	99.3	99.2	99.4
실시예 7	100	82	79.3	66
실시예 8	100	94.7	92.2	90.9
실시예 9	100	95.3	95.1	92.0
실시예 10	100	98.7	96.8	91.8
실시예 11	100	89.8	91	93
실시예 12	100	91	85.3	78.5
실시예 13	100	98.8	97.9	90.3
실시예 14	100	96.9	96.6	95.4
실시예 15	100	88.8	91.2	93.5
실시예 16	100	89.3	85.7	76.3
실시예 17	100	73.6	72.1	72.7
실시예 18	100	80.2	79.3	75.7
실시예 19	100	88.4	90.5	94.2

[0185] 위 표 1을 참고하면 실시예들이 처리된 후의 생존율을 보면 세포독성이 매우 적음을 알 수 있다.

[0186] 실험예 3 유전자 발현량 측정 실험

[0187] 실시예 2에 대한 유전자 발현량 측정실험은 본 발명에 따르는 화합물이 Jurkat T lymphocyte의 총유전자 발현에 어떤 영향을 미치고 있는지 알아보기 위하여 5×10^6 jurkat cell에 본 발명에 따르는 화합물을 30분간 처리한 세포배양 샘플과 처리하지 않은 세포배양 샘플을 만들고 여기에 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 Ionomycin을 각각 25 ng/mL, 1 uM/mL로 가하여 각각의 세포배양 샘플을 1시간 또는 4시간 동안 활성화시켰다. 배양액을 원심분리하여 세포침전물만 얻은 후 여기에 Trizol을 가하여 제공사에서 지시한 방법으로 전체 RNA를 추출하였다. RNA sequencing을 통하여 화합물이 Jurkat T 세포의 활성화에 관여하는 유전자를 발굴하였다. IL-2 유전자는 IL-2단백질을 생성하는데 필수적이며 IL-2 단백질은 T-세포의 증식을 유도하는데 중요한 사이토카인이

고, IL-4 유전자는 B 전구세포에서 IgE 및 IgG4 생산이 가능한 B 세포로 전환되는 Class switching을 유도하는 IL-4 단백질을 생성하는데 필수적인 유전자이며 MHC Class II의 생산을 촉진하며, TNF 유전자는 Tumor Necrosis Factor(TNF, 종양괴사인자)라는 급성염증반응을 일으키는 사이토카인 유전자이고 류마티스 등 자가면역질환의 기전에 관여하는 유전자이고, IL-13 유전자는 Th2 세포에 의해 분비되는데 알러지 염증이나 천식 등의 질환을 매개하는 유전자이고, IL-3나 특정 자극(impulses)나 항원에 의해 자극되었을 때 활성화된 T세포에서 생산 되는 것으로 알려져 있으며 강력한 비만세포(mast cell) 성장인자도 알려져 있어 IL-3의 발현을 억제 할 경우 비만세포를 억제하여 아토피 등 비만세포매개 질환에도 효과가 있고, IL-3는 조혈 전구세포(hematopoietic progenitor cells)의 증식에 필요한 조혈인자 이므로 골수 증식성 질환이나 혈액암에 사용되어질수 있다. 아울러, MYC는 여러 리간드-막수용체 복합체의 하류 유전자들의 신호 경로 교차점에 놓여 있어서 즉각적으로 반응하여 세포의 증식과 성장을 조절한다. 원래는 배아세포와 같은 줄기세포가 분열할 때, 그 과정이 보다 신속하게 진행될 수 있도록 하는 조력자 역할을 하며, 더 이상 성장하거나 분열할 필요할 없는 일반세포에서는 거의 발현되지 않은 상태로 잠들어 있고, Myc의 유전자는 8q24에 위치하는데 여러 암종에서 amplification과 translocation과 같은 유전자 이상으로 과발현이 발견되며, 정상적인 줄기세포에서는 p53이 Myc의 기능을 적절히 제어하고 있으나, 암 세포에서는 통제 수준을 넘어선 과발현이나 p53의 기능 상실로 인해 종양유전자인 Myc이 높은 활성을 유지하는 것으로 알려져 있고, 암세포에서 과발현된 Myc의 기능을 억제할 경우 암세포의 성장을 억제하고 사멸에 이르게 할 뿐만 아니라 기존 항암제 내성이 감소하며 시너지 효과를 나타낸다는 여러 실험 결과들이 발표되고 있으며, 이러한 이유에서 Myc의 과발현이나 활성을 제어하는 것이 새로운 항암제 목적으로 주목받고 있으며 Myc의 과발현은 대부분의 혈액암 뿐만 아니라 다양한 암종에서 발견되고 있고, 또한 NFATc1과 Rel은 면역세포의 증식에 중요한 인자로 알려져 있는데, 첨부된 도 23, 24의 그래프를 통하여 상술한 유전자들이 억제됨을 확인할 수 있다.

[0188] 따라서, 실시예2는 각종 암종의 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0189] 실험예 4 IL-2 단백질 발현량 측정 실험

[0190] 본 발명에 따르는 실시예들의 화합물에 대하여, 7주령 C57BL/6 생쥐에서 비장을 적출하여 으갠 후 strainer (40uM pore size)로 단세포만 분리한 후 ACK (Ammonium-Chloride-Potassium)lysis 완충용액으로 적혈구를 제거하여 백혈구만 분리하였다. 여기에 CD90.2 microbead(miltenyi 130-121-278)를 가하고 4℃에서 20분 반응시킨 후 MACS Magnetic Stand와 LS column을 이용하여 비장의 T 세포만 분리하였다. 원심분리하여 MACS buffer를 제거하고, 세포침전물을 얻었다. 여기에 10% FBS와 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin이 들어있는 RPMI1640 배지를 가하여 세포를 부유시키고 96 well plate에 한 well 당 2×10^5 cell을 분주하고 CD3, CD28항체를 각각 0.5 ug/ml로 처리하여 T 세포를 활성화하고, 10 uM, 20 uM, 30 uM, 40 uM 각각 3개의 well씩 처리하고 37℃, 5% CO₂ 항온배양기에서 24시간 배양한 후 soup을 따서 ELIZA kit을 이용하여 IL-2를 정량적으로 측정하여 그 결과를 첨부된 도 25 내지 도 43의 그래프로 나타내었다.

[0191] 도 24 내지 46을 참조하면, 본 발명에 따르는 화합물이 투여될 경우 용량의존적으로 IL-2 생성이 억제됨을 확인할 수 있는데, 도면 내 막대그래프가 의미하는 것은 IL-2의 생성량을 의미하는 것으로서 본 발명에 따르는 실시예들에 의하여 IL-2 생성이 억제됨을 알 수 있으나, 비교예들의 경우는 IL-2 생성이 억제되지 않아 T세포 증식이 억제되지 않은 것으로 판단할 수 있다.

[0192] 실험예 5 이식 실험

[0193] 피부이식 동물 실험을 위하여 donor로서 BALB/c (7주령/20g/Female)을 recipient 로서 C57/BL6(7주령/20g/Female)을 (주)하나바이오테크에서 구매하여 일주일 동안 사육환경에 적응하도록 하였다. 이후 donor 마우스 BALB/c의 복강내에 알팍산 100 mg/kg을 투여하여 마취 후 면도기로 마우스의 등을 제모한 후 10% 포비돈으로 등을 소독한 후 등의 피부를 떼어내어 이식편을 준비하고 얼음이든 petridish의 젖은 거즈 위에 보관하였다. Recipient 마우스 C57/BL6도 알팍산 100 mg/kg을 복강으로 투여하여 마취 후 면도기로 마우스의 등을 제모한 후 10% 포비돈으로 등을 소독하고 나서 가위를 이용하여 panniculus carnosus를 보존하면서 직경 10 mm 크기로 피부를 떼어냈다. ice petridish에 보존한 donor의 피부를 이식하고 band를 붙이고 gentamycin을 투여하였다. 면역억제제는 recipient 마우스의 복강에 이식 이틀 전부터 12시간 간격으로 하루 두 번씩 투여하면서 피부이식 거부반응 여부를 관찰하였다. 수술 후 어떤 약물도 투여하지 않은 마우스와 용매로 사용한 DMSO를 투여한 마우스, 그리고 이식된 마우스의 이식편의 상태를 비교하여 관찰하여 도 47, 48에 나타내었는데, 이를 참고하면, 그냥 둔 경우, 용매만 투입한 경우에는 수술 후 7일 쯤 거부반응이 발생하였으나 실시예 2, 실시예 3, 실시예 6으로 처리한 마우스는 이식편이 21일 이상 유지되었다.

[0194] 실험예 6 자가면역질환 실험

[0195] 건선 동물을 이용한 건선 피부 병변의 완화에 대한 평가 실험은 먼저 실험동물 BALB/c (7주령/20g/Female)을 (주)하나바이오테크에서 구매하여 일주일 동안 사육 환경에 적응하도록 하였다. 이후 마우스의 등부위의 털을 깎은 후 다시 제모크림(니크린 크림 (치오글라이콜락에씨드 80%, 일동제약))으로 깨끗이 털을 제거하고 24시간 동안 사육하였다. 건선을 유발하기 위하여 Aldara[®] cream을 매일 80 mg(imiquimod 4 mg)씩 1주일(7일, 총 7회)간 도포하고 그림과 같이 건선이 유발되는 것을 확인한 후 이후 계속 10일 동안 각 그룹에 Aldara[®] cream 80 mg(imiquimod 4 mg)씩 계속 도포를 유지하면서 아래 표 2와 같은 실험계획으로 실시예의 화합물 각각을 투여 하면서 건선이 완화되는지 관찰하였다. 관찰결과 음성 대조군이나 DMSO를 투여한 그룹보다 아래 그림과 같이 피부병변의 정도가 양호하게 되었다.

[0196] 즉, 도 49에서 볼 수 있듯이, 실시예14, 17에 의하여 처리된 경우가 피부병변이 양호함을 알 수 있었다.

표 2

구분	Topical application of Imiquimod 4 mg	내용	No. of Mouse
Normal	X	제모만 시행(투약하지 않음)	5
Negative Control	0	제모만 시행(투약하지 않음)	5
DMSO(vehicle)	0	용매 DMSO(Dimethyl sulfoxide 50 μL 복강 투여	5
실시예 14, 17	0	용매 DMSO 50 μL + 화합물 40 mg/kg 복강 투여	5

[0198] 도 50, 51 및 52에서 볼 수 있듯이, 실시예 14, 17에 의하여 처리된 마우스 피부는 인설(scaling)과 홍반(erythema)과 두께가 유의하게 감소함을 보였다(P < 0.05, P : P-value).

[0199] 또한, 위의 각각 실험 계획에 따른 실험대상들의 피부의 조직을 H&E 염색을 하여 염증세포 침윤정도를 관찰하여 도 53, 54 및 55에 나타내었는데, Imiquimod만 바른 그룹(음성대조군)과 Imiquimod를 바르면서 DMSO를 복강에 주사한 그룹에서는 과각화증(hyperkeratosis), 착각화증(parakeratosis), 불규칙한 극세포증(acanthosis)이 심하게 나타났지만 본 발명에 따르는 실시예 14, 17의 경우에는 투여한 마우스에서는 염증세포의 침윤이 적음이 관찰되었다.

[0200] 또한, 도 56, 도 57을 참고하면, 본 발명에 따르는 실시예14, 17에 대하여 유세포분석을 한 결과그래프인데, 실험대상들의 생체 내에서 T 세포에 대한 영향을 확인하기 위해서 각 화합물을 투여한 마우스의 비장을 적출하여 T세포를 추출하여 유세포 분석(FACS)을 시행하였을 때 실시예의 경우에 마우스에서 CD4 T세포와 CD8 T세포가 감소함을 보였고, 따라서 본 발명에 따르는 실시예에 의하여 T세포의 생체 내에서 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

[0201] 실험예 7 알리지성 질환 실험

[0202] 아토피 동물(7주령 NC/Nga, male 마우스)로서, 7주령 NC/Nga male 마우스를 중앙실험동물(SLC, Japan)로부터 구입하여 일주일 동안 사육환경(실내 온도 21~23℃, 습도 50 ~ 60%가 유지)에 적응하도록 하였다. 마우스의 등부위의 털을 3 x 4 cm 깎은 후 다시 제모크림(니크린 크림, 치오글라이콜락에씨드 80%)으로 털을 제거하고 24시간 동안 방치하였다. 아토피를 유발하기 위하여 Biostir 연고 100 mg을 면봉을 이용해 등부위에 도포하였다. 두 번째부터는 도포 부위에 4% SDS수용액 150 μl을 바르고 약 2-3시간 동안 완전히 건조한 후 아토피 피부염을 유발하는 Biostir 연고 100 mg을 다시 등쪽에 균일하게 주 2회 총 8회(4주)를 바르고 아토피를 유발하였다. 약효를 실험하기 위하여 아래 표 3과 같이 4 그룹으로 나누어 실험하였고, 구체적으로 총 8회 Biostir 연고를 발라 아토피를 유발한 후 2주 동안 Biostir 연고를 주 2회 추가로 더 바르면서 처치하였다.

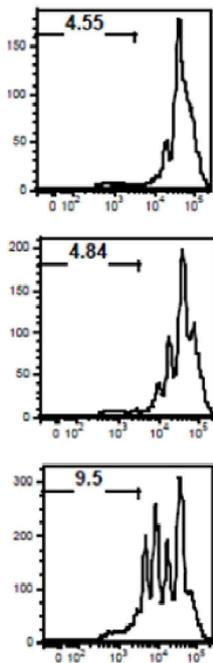
표 3

Group	Topical application of Biostir oint	Intervention	No. of Mouse
Normal	X	제모만 시행(투약하지 않음)	5
Negative Control	0	제모만 시행(투약하지 않음)	5
Vehicle	0	용매 DMSO(Dimethyl sulfoxide 50 μL 복강 투여	5
실시예 2	0	용매 DMSO 50 μL + 화합물 40 mg/kg 복강 투여	5

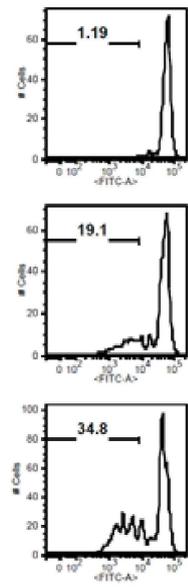
- [0204] 도 58을 참고하면, 본 발명에 따르는 실시예 2에 의한 경우가 병변이 호전됨을 육안으로 용이하게 알 수 있었다.
- [0205] 또한 도 59를 참고하면, 표 3의 마우스 피부를 잘라서 H&E 염색을 하였을 때 유발만 하거나 DMSO 만 복강내 투여한 마우스에서는 surface erosion과 fibrinosuppurative exudate 및 심한 염증세포 침윤이 보였으나 화합물 3을 투여한 마우스에서는 호전되는 양상을 보였다.
- [0206] 도 60을 보면, 피부에 존재하는 비만세포의 양으로 아토피 피부염의 정도를 평가할 수 있는데, 실시예 2에 의한 아토피 피부염의 치료효과를 확인하기 위하여 피부조직에 toluidine blue 염색을 하여 비만세포를 관찰하였다. 음성대조군과 DMSO를 투여한 군보다 실시예 2를 투여한 마우스 피부에서 비만세포의 수가 줄어드는 것이 관찰되었다.
- [0207] 도 61을 보면, 실시예 2에 의한 화합물을 투약하며 2 주 후의 쥐 심장에서 피를 뽑아서 IgE 량을 측정하여 그룹별로 비교하여 그래프로 나타낸 것인데, DMSO 처리군에 비하여 실시예 2에 의한 경우가 IgE 농도가 감소함을 알 수 있었다.

도면

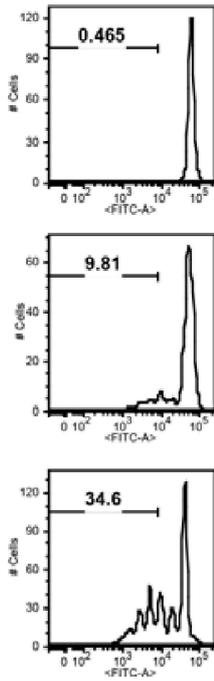
도면1



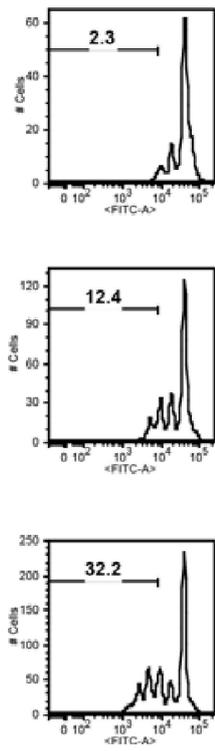
도면2



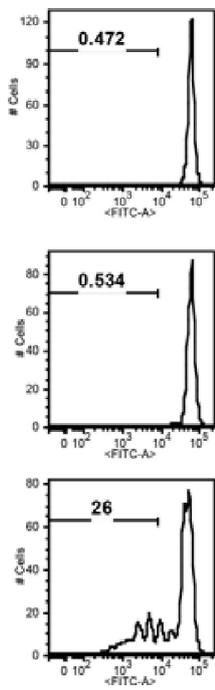
도면3



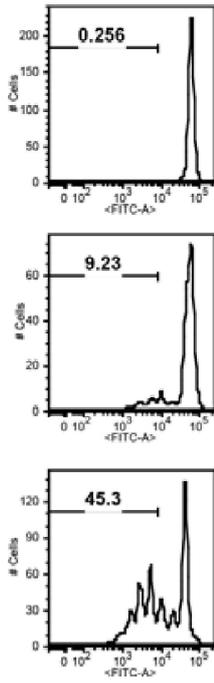
도면4



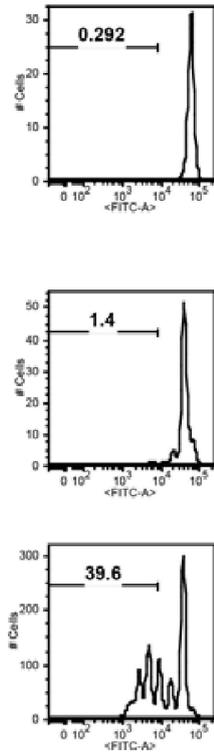
도면5



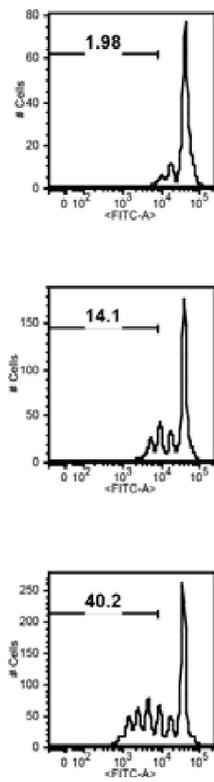
도면6



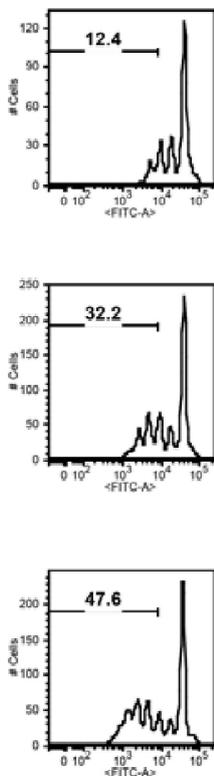
도면7



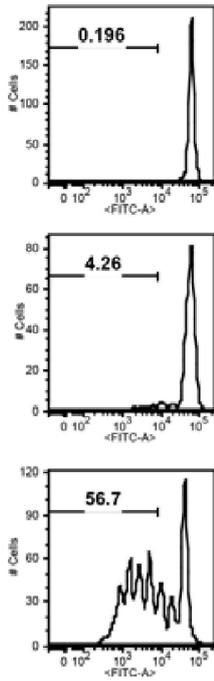
도면8



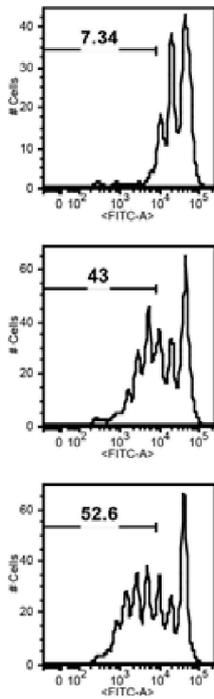
도면9



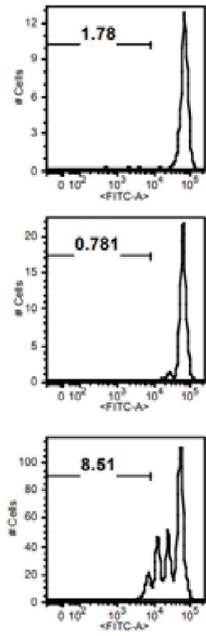
도면10



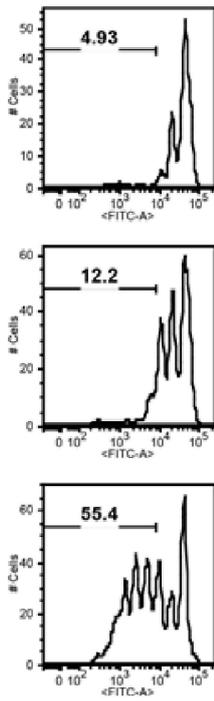
도면11



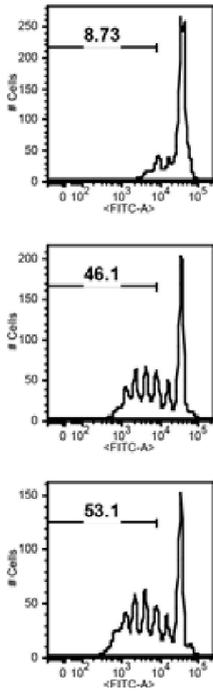
도면12



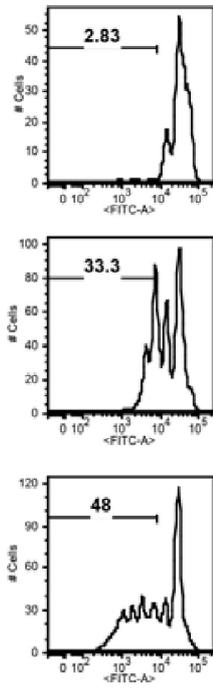
도면13



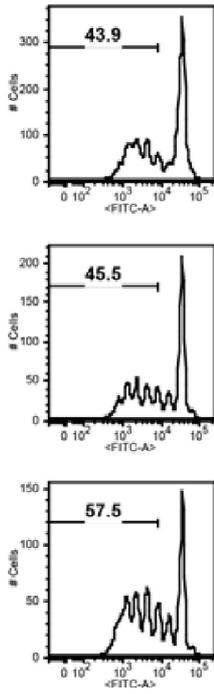
도면14



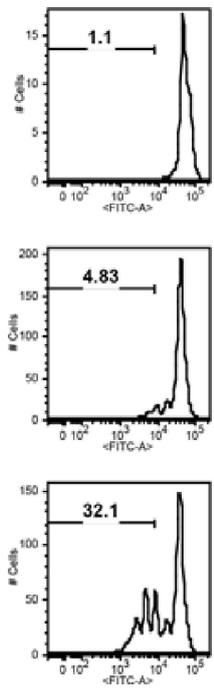
도면15



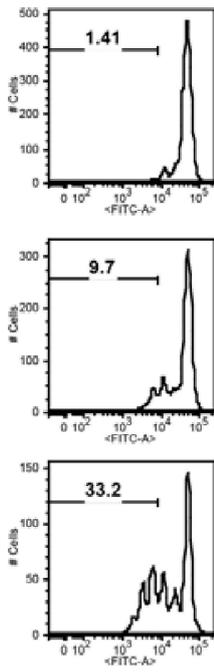
도면16



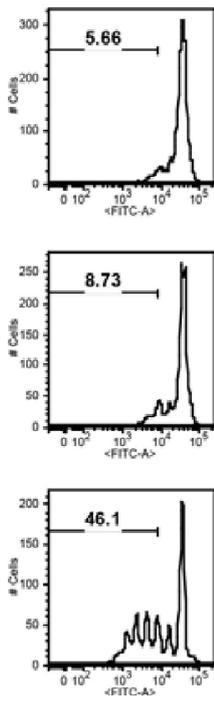
도면17



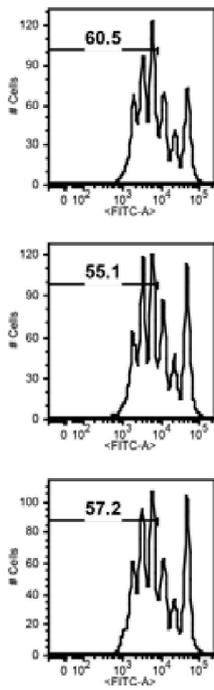
도면18



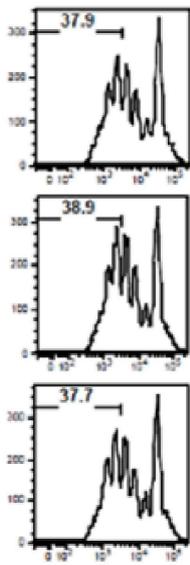
도면19



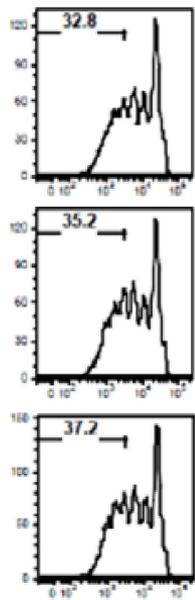
도면20



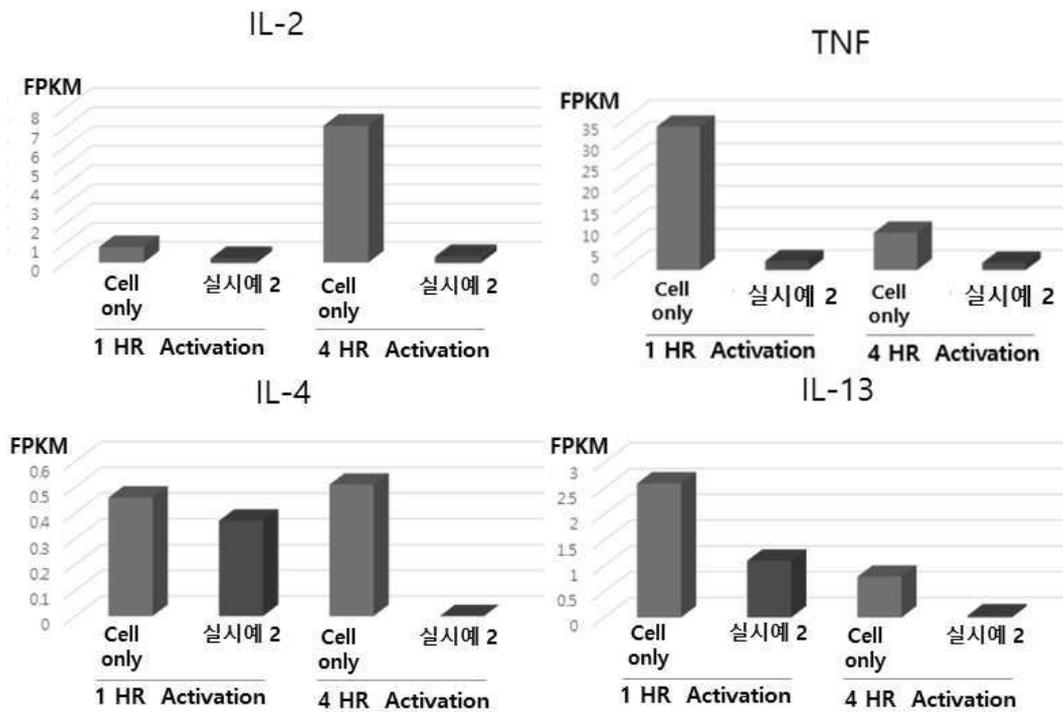
도면21



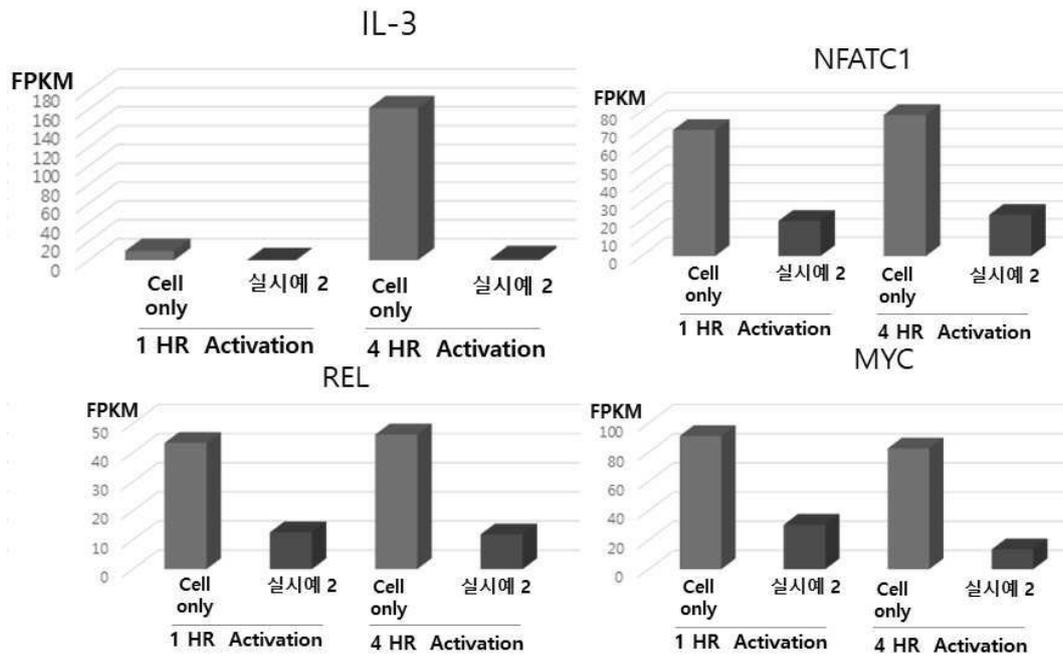
도면22



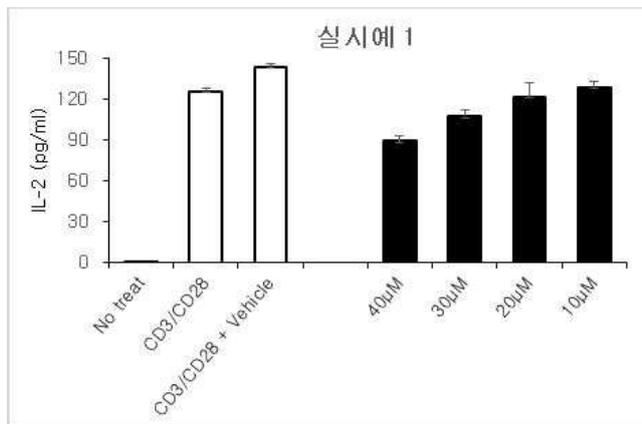
도면23



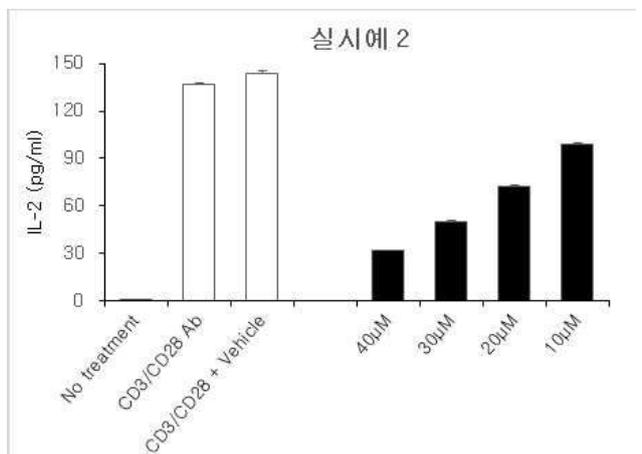
도면24



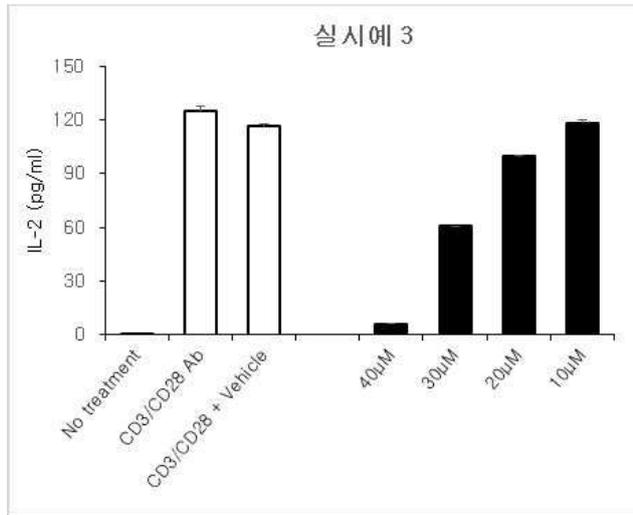
도면25



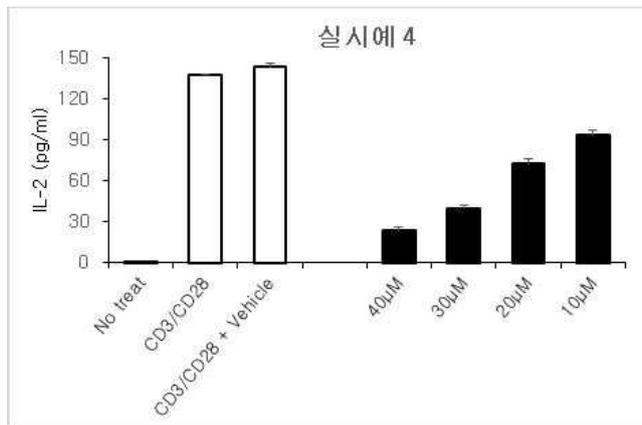
도면26



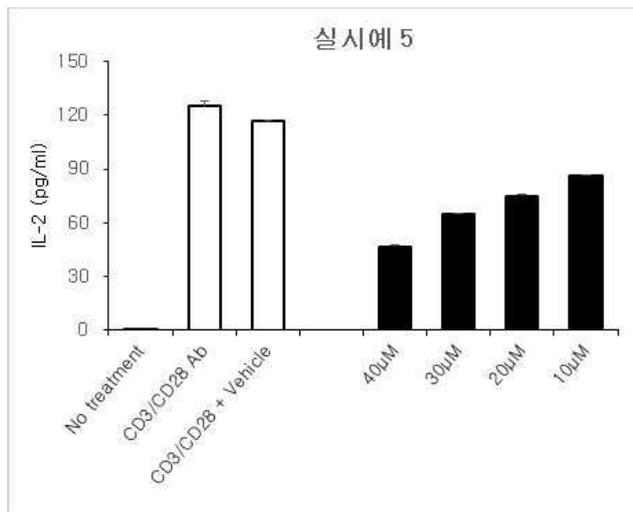
도면27



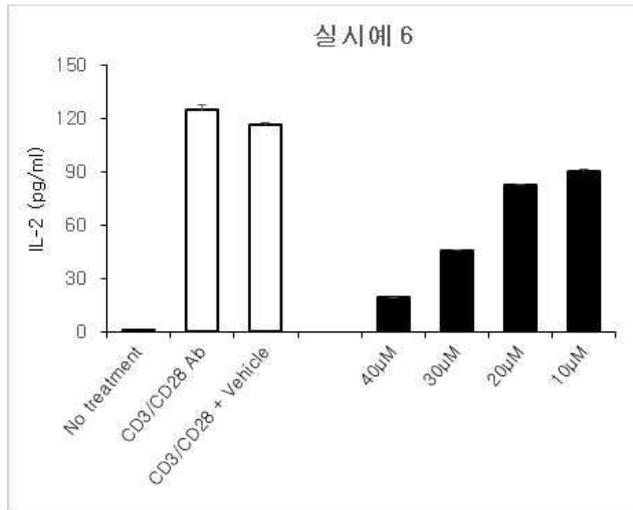
도면28



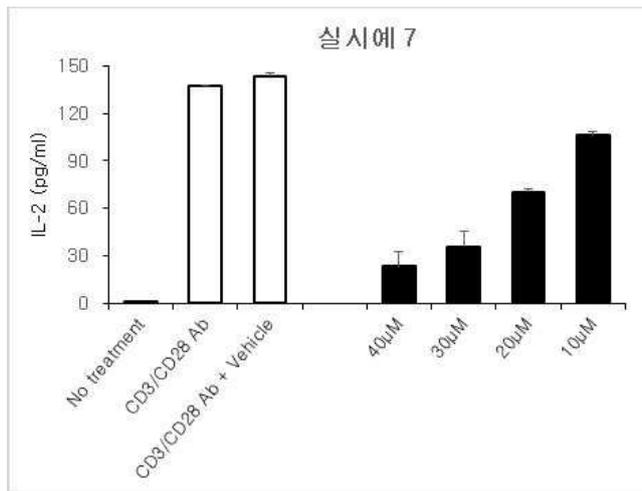
도면29



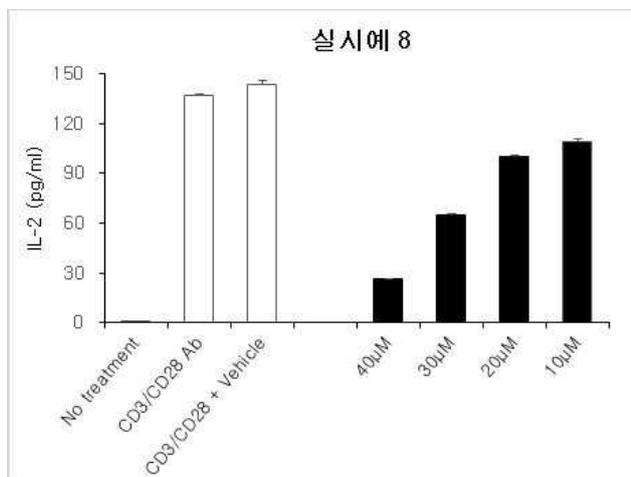
도면30



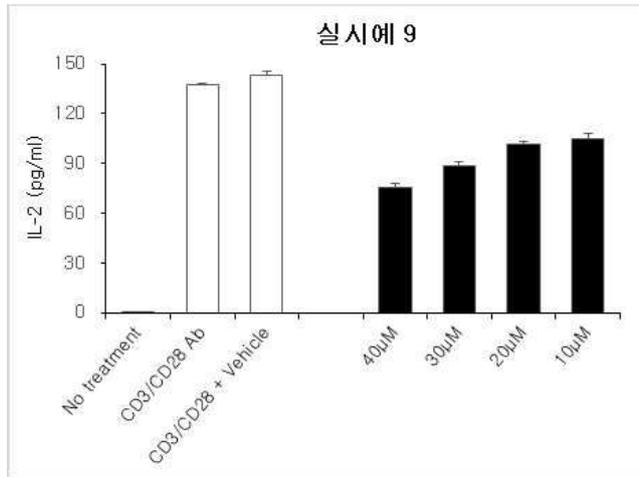
도면31



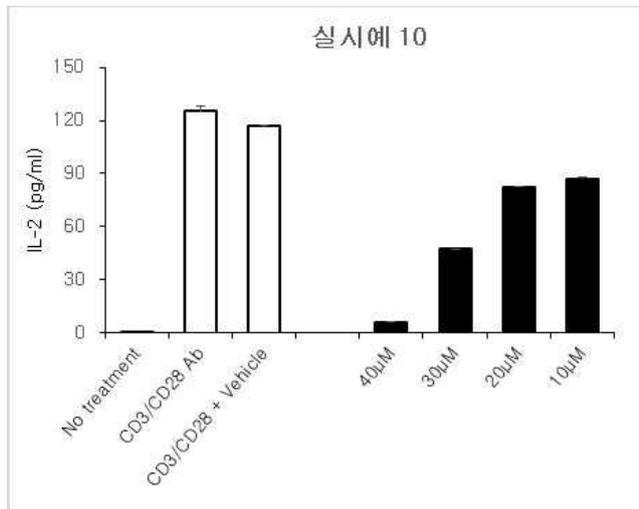
도면32



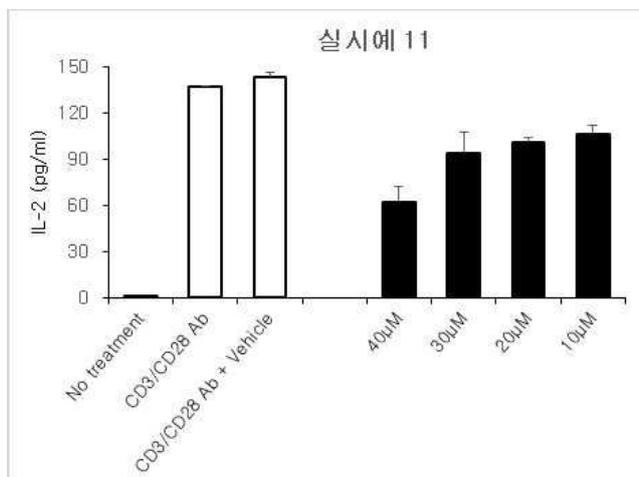
도면33



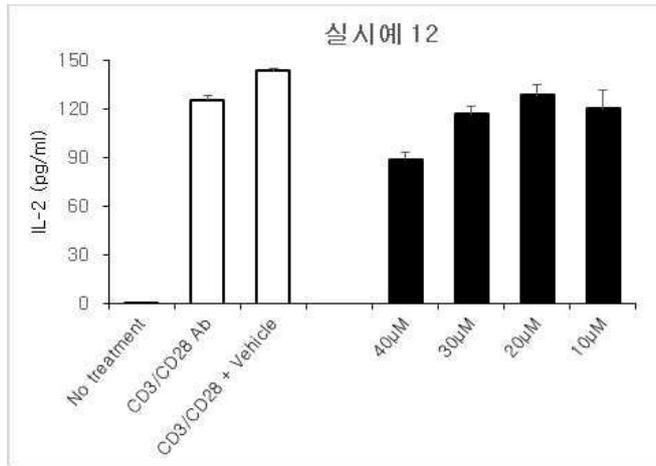
도면34



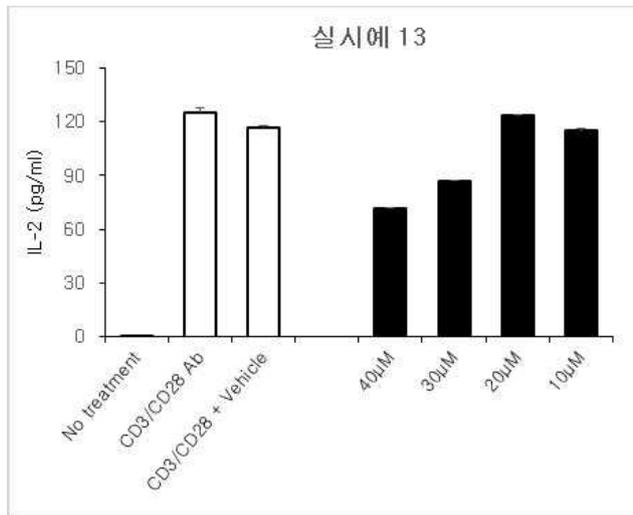
도면35



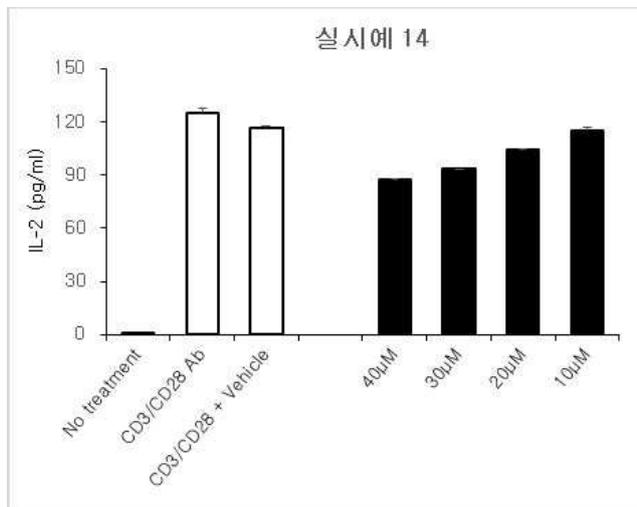
도면36



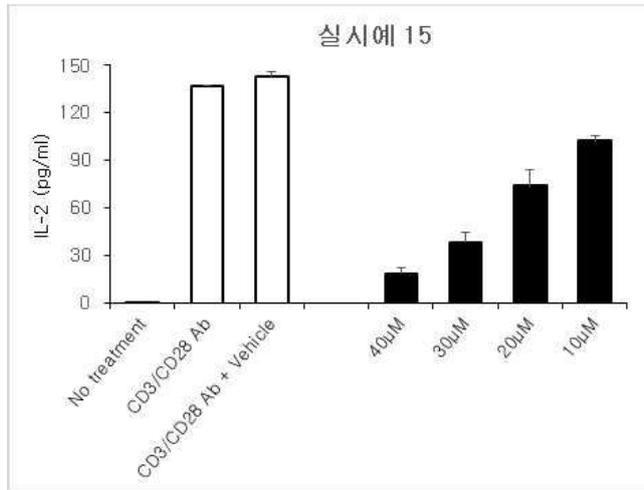
도면37



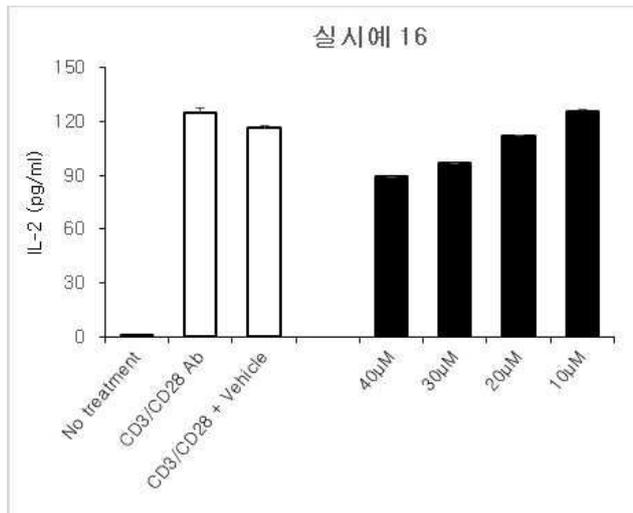
도면38



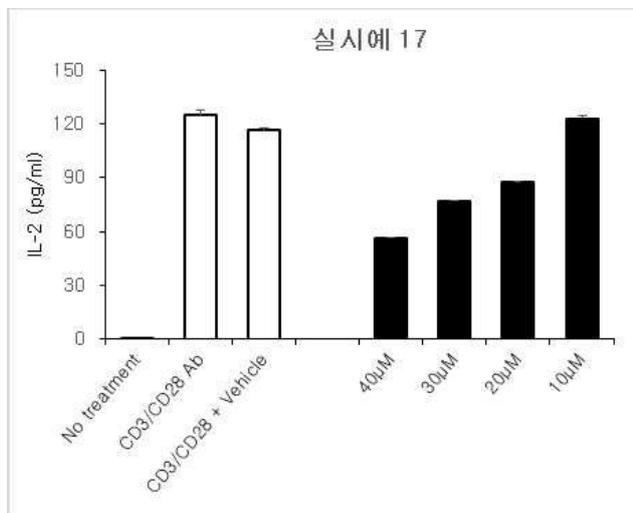
도면39



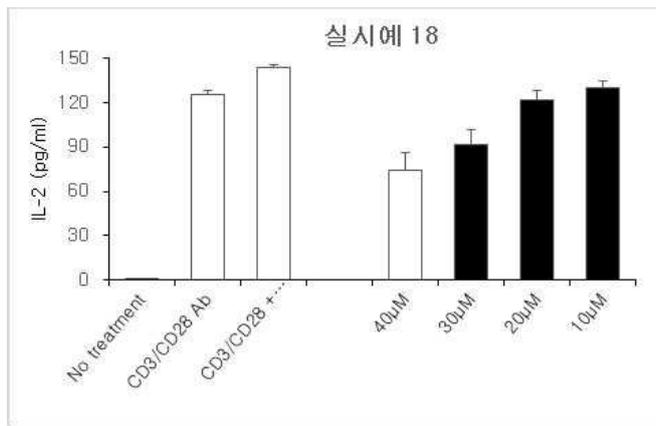
도면40



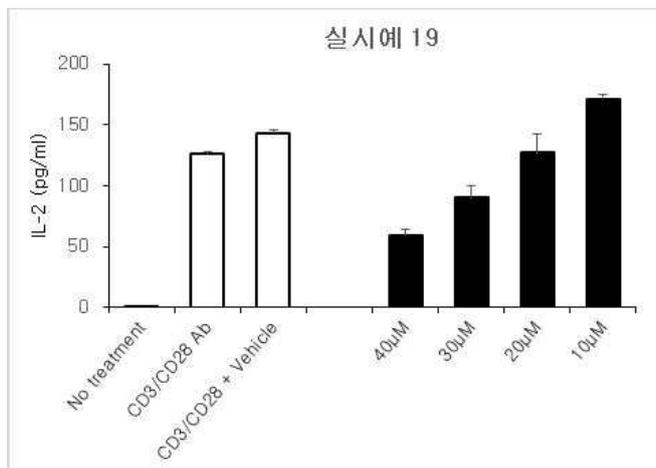
도면41



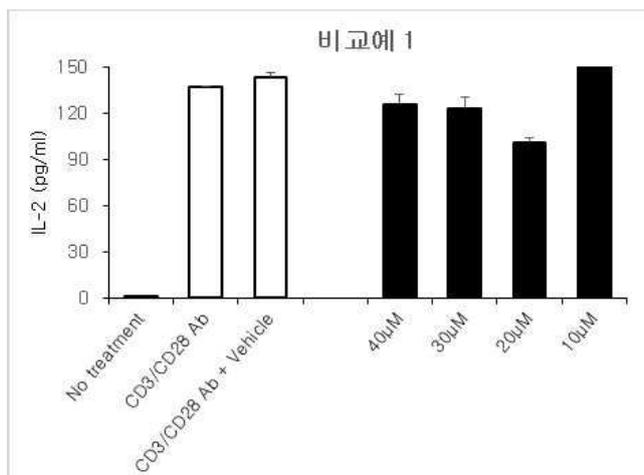
도면42



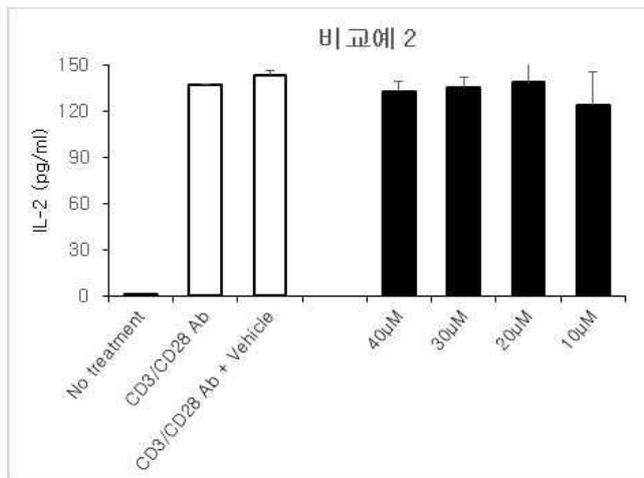
도면43



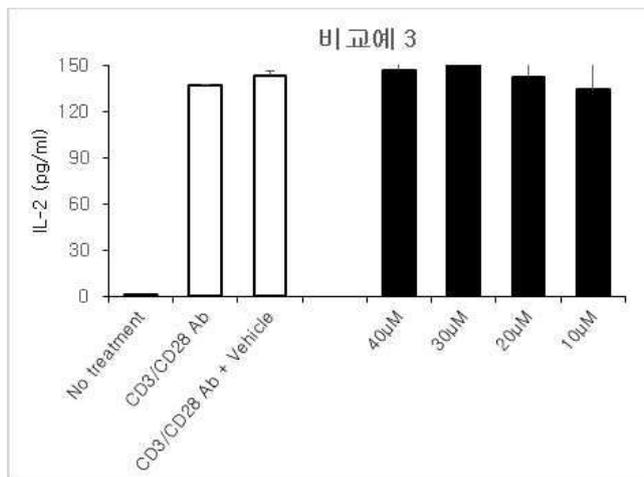
도면44



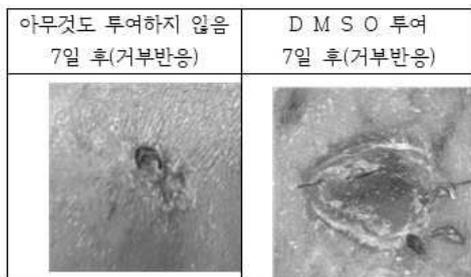
도면45



도면46



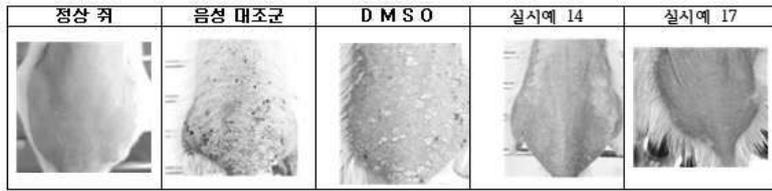
도면47



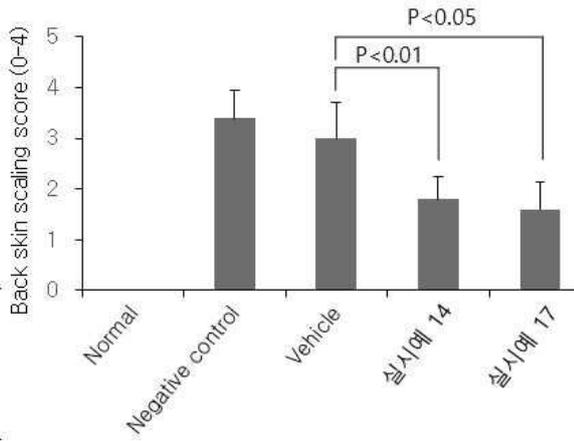
도면48



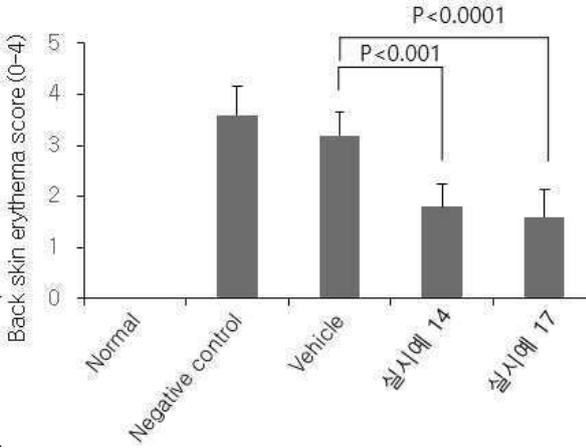
도면49



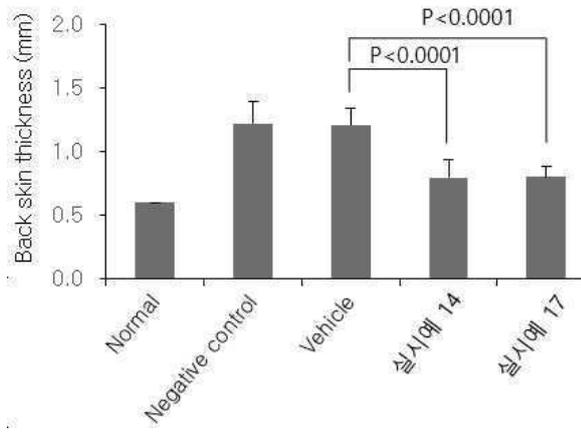
도면50



도면51



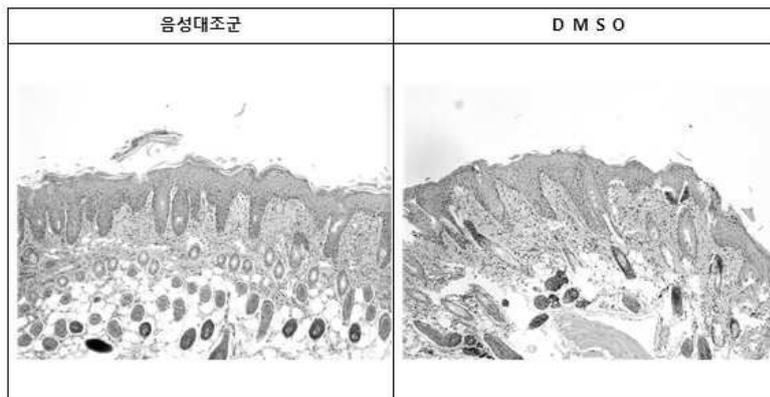
도면52



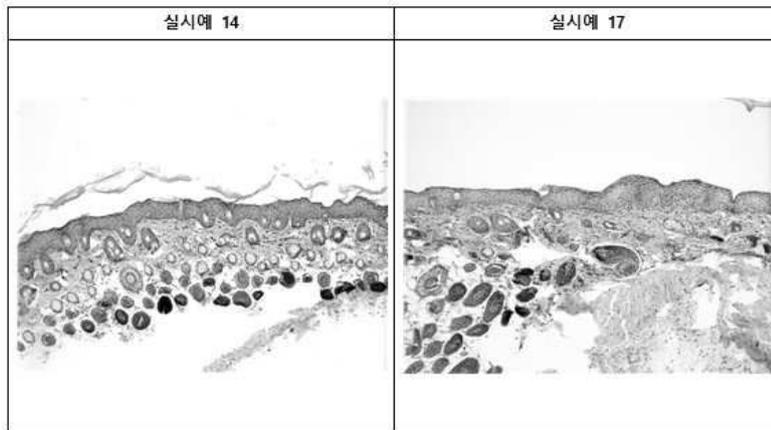
도면53



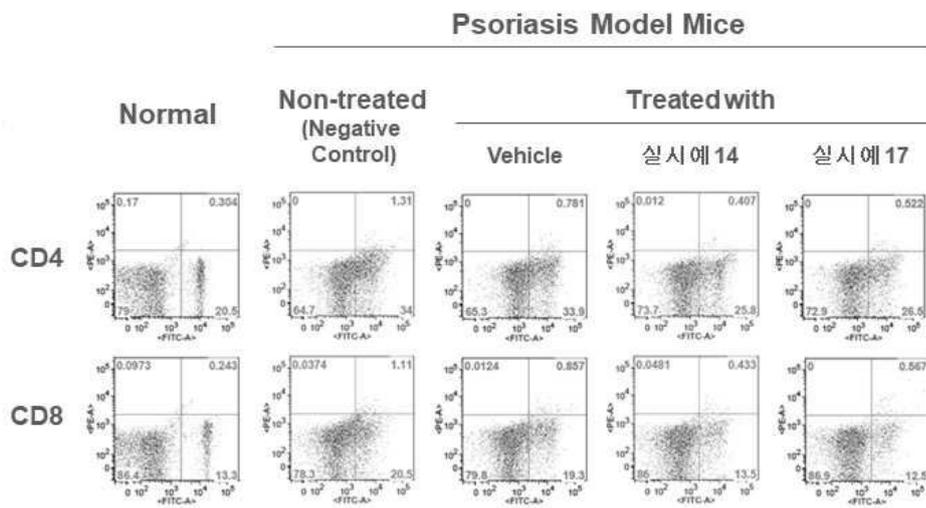
도면54



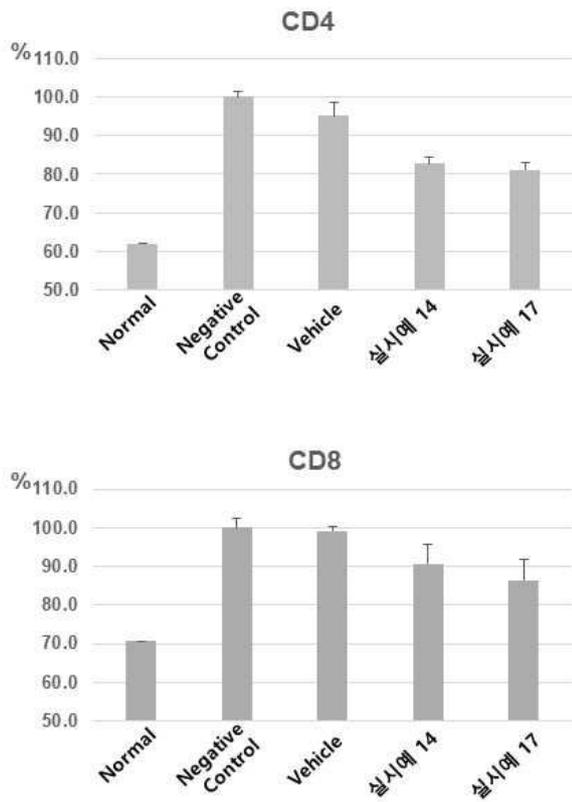
도면55



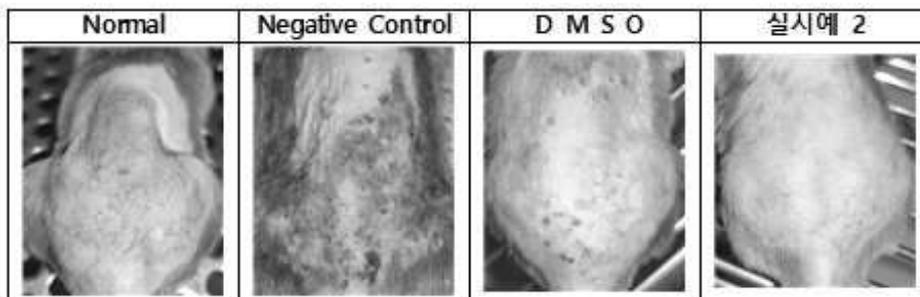
도면56



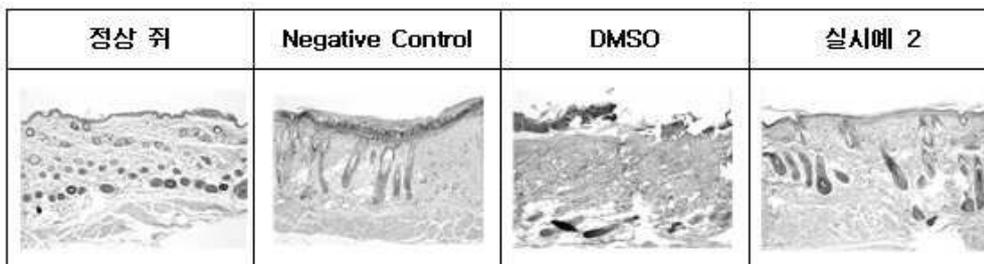
도면57



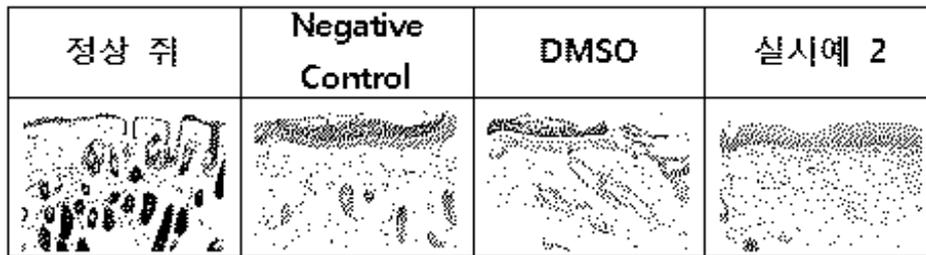
도면58



도면59



도면60



도면61

