(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0169284
(43) 공개일자 2024년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4045 (2006.01) *A23K 20/137* (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4045 (2013.01)
A23K 20/137 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0066814
(22) 출원일자 2023년05월24일
심사청구일자 2023년05월24일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
국립한밭대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)
(72) 발명자
김영미
서울특별시 강남구 영동대로 22, 812동 1405호(일원동, 디에이치 자이 개포)
박정호
대전광역시 유성구 동서대로 125, N6동 210호, 212호 화학생명공학과(덕명동)
(74) 대리인
특허법인정진

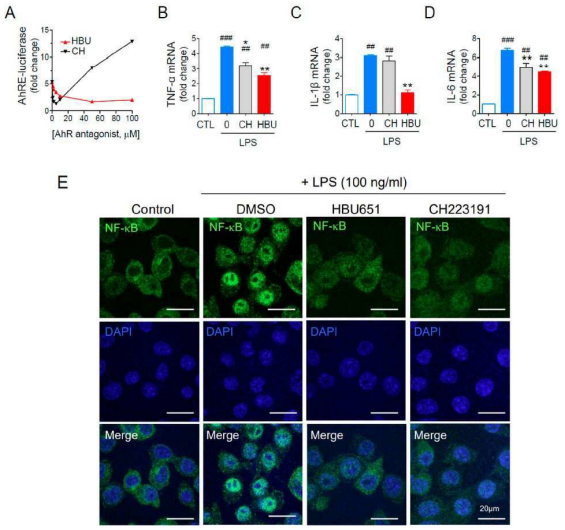
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 특정 화학식으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함함으로써, AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 약학적 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345365662
과제번호 2018R1A6A1A03025124
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율 30/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2027.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711188582
과제번호 2020R1A2C1008699
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 환경호르몬에 의한 미토콘드리아 손상의 분자 기전 연구
기 여 율 70/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2024.02.29

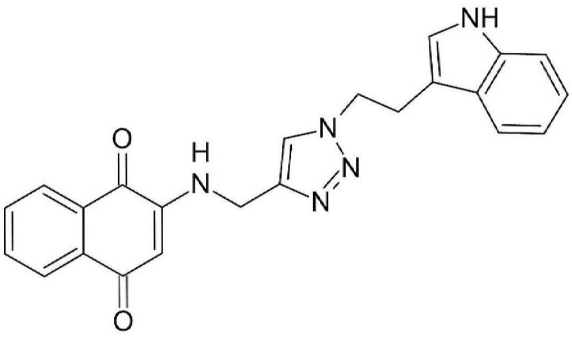
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 및 비히클(vehicle)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물의 농도는 10 내지 500㎛M인 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 AhR-매개 질환은 염증성 질환 또는 RNA 바이러스 감염증을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 염증성 질환은 신경 퇴행성 질환 또는 대사 질환을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅톤병, 루게릭병, 프리온 질환, 루이소체 치매, 다계통 위축증, 진행성 핵상 마비, 프리드라이히 운동실조증, 측두엽 간질 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 대사 질환은 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 8

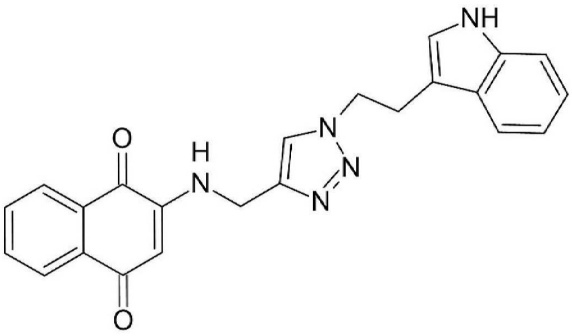
제4항에 있어서,

상기 RNA 바이러스는 사스코로나바이러스 유형 1 및 2(SARS Corona Virus; SARS-CoV-1, SARS-CoV-2), 인플루엔자 A 바이러스(influenza A virus; IAV), 소 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 돼지 유행성 설사 코로나바이러스(porcine epidemic diarrhea coronavirus; PEDV), 소 로타바이러스(Bovine species A rotavirus; RVA), 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV), 돼지 사포바이러스(Porcine sapovirus; PSaV), 노로바이러스(norovirus), 고양이 전염성 복막염 코로나바이러스(feline infectious peritonitis virus; FIPV), 메르스코로나바이러스(MERS Corona Virus), 지카바이러스(Zika virus), 뎅기열 바이러스(dengue fever virus), 및 A형/C형 간염 바이러스(Hepatitis viruses)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]

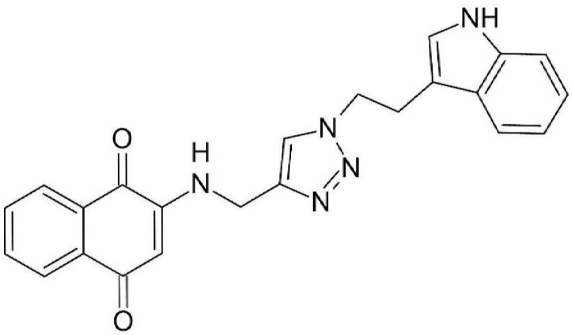


.

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 사료학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물:

[화학식 1]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경 퇴행성 질환은 중추신경계(CNS)의 특정 영역에서 뉴런의 진행성 구조적 및 기능적 퇴행 및 사멸을 포함하는 질환이다. 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환은 환자의 삶의 질에 상당한 영향을 미치며, 기억력, 감정, 균형감각, 인동기능, 언어기능, 호흡 또는 심장기능과 같은 다양한 기능에 영향을 미친다. 이러한 신경퇴행성 질환의 분자적 기전은 구체적으로 밝혀지진 않았지만, 신경염증과 밀접한 관련이 있음이 보고되었다. 신경염증은 종양 괴사 인자(TNF-α), 인터루킨(IL)-1, IL-6, MCP-1/CCL2, 활성 산소종(ROS) 및 NF-$_k$B 등을 포함하는 염증 및 신경 독성 매개체에 의해 매개되어 CNS에 발병하는 염증이다.

[0003] 대표적인 대사질환 중 하나인 비만은 만성 저등급 염증 상태로서, 신경퇴행성 질환의 발병과 강력한 상관관계가 있음이 밝혀진 바 있다. 비만은 TNF-α, IL-6, IL-1과 같은 염증 촉진성 사이토카인(proinflammatory cytokine) 및 MCP-1과 같은 케모카인(chemokine)을 생성하는 지방 조직의 저산소 손상을 유발한다. 이러한 염증성 사이토카인은 혈뇌장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)의 역할을 방해하여 케모카인 모집 단핵구(chemokine-recruited microglia)가 BBB를 통과하여 염증성 미세아교세포로 전환되도록 한다. 이렇게 전환된 미세아교세포는 결과적으로 신경염증을 유발하고, 산화 스트레스를 증가시키며, 미토콘드리아 기능을 감소시켜 세포사멸 또는 괴사에 의한 신경세포 사멸을 유도함으로써, 결과적으로 신경퇴행성 질환의 발병률을 증가시킨다.

[0004] 이와 같이, 만성염증은 다양한 질병의 발명에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 신경 퇴행성 질환의 발병인자 중 하나로 알려져 있다.

[0005] 한편, 아릴 탄화수소 수용체(AhR)는 다이옥신 유사 환경 화학물질, 키누레닌(kynurenine) 트립토판 유도체, 식이 성분 및 저밀도 지단백질과 같은 다양한 리간드에 의해 활성화되는 리간드-활성화 핵 수용체/전사 인자로써, 리간드 활성화된 AhR은 지방 대사를 방해하기 때문에 비만 발명에 기여하는 원인 중 하나이다. 또한, AhR은 만성 질환 및 염증 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, AhR 활성을 저해할 수 있는 물질의 개발이 필요한 실정이다.

[0006] 이와 관련하여, 대한민국 공개특허 제10-2021-0110566호에는 AhR 길항제로서 사용될 수 있는 화합물에 대하여 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2021-0110566호(2021.09.08)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위한 것으로서, AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 약학적 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

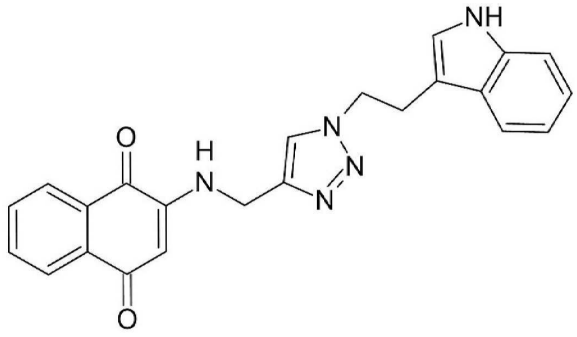
[0009] 또한, 본 발명은 AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 식품 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 사료 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 약학적 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 그 특징으로 한다:

[0012] [화학식 1]



[0013] .

[0014] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 그 특징으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명의 사료 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 사료학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 그 특징으로 한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 약학적 조성물은 AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 항염 효과가 우수하여 신경 염증을 포함한 만성 염증의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수하기 때문에, 이를 통해 유발될 수 있는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군 등의 대사 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다. 또한, 신경 염증으로 인해 유발될 수 있는 알츠하이머병 또는 파킨슨병 등을 포함한 신경 퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다. 뿐만 아니라, AhR 활성을 저해함으로써, SARS-CoV-2(COVID-19) 등을 포함한 RNA 바이러스 감염증에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 AhR 길항제로서 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다. 구체적으로는, 항염 효과가 우수하여, 신경 염증을 포함한 만성 염증의 예방 또는 개선 효과가 우수하고, 이를 통해 유발될 수 있는 신경 퇴행성 질환, 대사 질환 또는 RNA 바이러스 감염증에 대한 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 사료 조성물은 AhR 길항제로서 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다. 구체적으로는, 항염 효과가 우수하여, 신경 염증을 포함한 만성 염증의 예방 또는 개선 효과가 우수하고, 이를 통해 유발될 수 있는 신경 퇴행성 질환, 대사 질환 또는 RNA 바이러스 감염증에 대한 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 HBU651 화합물의 AhR 길항 효과 및 항염증 효과를 실험한 결과를 도시한 것이다. 도 1의 (A)는 HBU651 화합물 처리에 따른 AhR-luciferase 활성을 분석한 실험 결과이며, (B)는 TNF-α, (C)는 IL-1β, (D)는 IL-6의 mRNA 수준에 대한 실시간 qRT-PCR 데이터이며, 이 때, 상기 (B) 내지 (D)의 데이터는 평균 ±SEM(n=5)으로 표시하였다($^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ vs. 대조군(CTL), and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. LPS-처리된 DMSO). (E)는 NF-kB p65/RELA 항체(녹색) 및 DAPI(파란색) 면역염색 결과이며, BV2 세포의 공초점 현미경 이미지(scale bar = 20㎛)이다.

도 2는 미토콘드리아 기능 분석에 대한 실험 결과를 도시한 것이다. 도 2의 (A)는 세포 내 ATP의 함량, (B)는 TMRE-매개 미토콘드리아 막 전위, (C)는 DCF-DA 기반의 총 ROS 생성, (D)는 Mito-SOX 기반의 미토콘드리아 슈퍼옥사이드의 생성에 대한 실험 결과이다. 이 때, 데이터는 평균 ±SEM으로 표시하였다(n=5)($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ vs. 대조군(CTL), and $^{**}p < 0.01$ vs. LPS-처리된 DMSO).

도 3은 고지방식(HFD)으로 유도된 비만 마우스에 대한 HBU651의 항비만 효과를 실험한 결과를 도시한 것이다. 도 3의 (A)는 실험 과정을 도식화한 것이며, (B)는 실험 종료 시의 체중(BW), (C)는 체중의 변화, (D)는 경구 칼로리 섭취량, (E)는 부고환 백색 지방 조직(EWAT) 중량, (F)는 간의 무게, (G)는 공복 혈당(FBG), (H)는 공복 인슐린, (I)는 인슐린 저항성의 항상성 모델 평가(HOMA-IR), (J) 경구 포도당 내성 검사(OGTT)에서의 시간에 따

른 혈당 변화, (K)는 OGTT의 곡선 아래 면적(AUC)의 실험 결과를 도시한 것이다. 이 때, 데이터는 평균 ± SEM(n=5)으로 표시하였다($^{###}p < 0.001$ vs. NC, and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. HFD-대조군. NC, normal chow; 대조군, HFD-대조군; HBU10, HFD + HBU651 10 mg/kg; HBU30, HFD + HBU651 30 mg/kg).

도 4는 HFD로 유도된 비만 마우스의 혈액에서 지질 및 생화학적 프로파일을 분석한 결과를 도시한 것이다. 도 4의 (A)는 총 콜레스테롤(Total-C), (B)는 LDL-콜레스테롤(LDL-C), (C)는 HDL-콜레스테롤(HDL-C), (D)는 유리지방산(FFA), (E)는 인지질(PL), (F)는 트리글리세리드(TG), (G)는 AST, (H)는 ALT, (I)는 크레아티닌 분석 결과를 도시한 것이다. (J) 및 (K)는 ELISA의 간 기능 마커 효소의 활성을 분석한 실험 결과로서, 각각 TNF-α(J), MCP-1(K)의 혈청 단백질 수준을 분석한 실험 결과를 도시한 것이다. 이 때, 데이터는 평균 ±SEM(n=5)으로 표시하였다($^{#}p < 0.05$, $^{###}p < 0.001$ vs. NC, and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. HFD-대조군. NC, normal chow; 대조군, HFD-대조군; HBU10, HFD + HBU651 10 mg/kg; HBU30, HFD + HBU651 30 mg/kg).

도 5는 HFD로 유도된 비만 마우스의 혈액 염증성 단핵구 및 지방조직 대식세포(ATM)의 변화를 분석한 실험 결과를 도시한 것이다. 도 5의 (A) 및 (B)는 혈액 $Ly6c^{low}$ 단핵구(monocyte, Mo)(A) 및 혈액 $Ly6c^{high}$ 단핵구의 유동혈구계측 결과이며, (C) 및 (D)는 $Ly6c^{low}$ 단핵구(C) 및 $Ly6c^{high}$ 단핵구(D)의 백분율을 도시한 것이고, (E)는 $CD45^{+}$, $CD11b^{+}$ 및 $F4/80^{+}$ ATM 유동혈구계측 결과이며, (F)는 $CD11c^{+}$ 염증성 ATM, (G) 총 ATM 백분율 및 (H) $CD11c^{+}$ 염증성 ATM 유동혈구계측 결과를 도시한 것이다. 이 때, 데이터는 평균 ±SEM(n=5)으로 표시하였다($^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ vs. NC, and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. HFD-대조군. NC, normal chow; 대조군, HFD-대조군; HBU10, HFD + HBU651 10 mg/kg; HBU30, HFD + HBU651 30 mg/kg).

도 6은 HFD로 유도된 비만 마우스의 간에 대한 조직학적 분석 및 염증성 유전자 발현에 대한 실험 결과를 도시한 것이다. 도 6의 (A)는 간 H&E 염색 및 F4/80 면역 염색 실험 결과로, 여기서 화살표는 F4/80 양성세포를 표시한 것이며, (B)는 간 지질 방울(LD) 영역을 정량화 하여 도시한 것이다. (C) 내지 (G)는 F4/80(C), TNF-α(D), IL-1β(E), IL-6(F) 및 MCP-1(G)에 대한 간 mRNA의 실시간 qRT-PCR 분석 결과를 도시한 것이다. 이 때, 데이터는 평균 ±SEM(n=5)으로 표시하였다($^{###}p < 0.001$ vs. NC, and $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$ vs. HFD-대조군. NC, normal chow; 대조군, HFD-대조군; HBU10, HFD + HBU651 10 mg/kg; HBU30, HFD + HBU651 30 mg/kg).

도 7은 FHD로 유도된 비만 마우스에서 부고환 지방의 조직학적 분석 및 염증성 유전자 발현에 대한 변화를 분석한 실험 결과를 도시한 것이다. 도 7의 (A)는 EWAT H&E 염색 및 F4/80 면역 염색 결과를 도시한 것으로, 화살표는 F4/80 양성세포를 표시한 것이며, (B)는 EWAT의 지방세포의 크기를 측정한 결과를 도시한 것이다. (C) 내지 (G)는 F4/80(C), TNF-α(D), IL-6(F) 및 MCP-1(G)에 대한 EWAT mRNA의 실시간 qRT-PCR 분석 결과를 도시한 것이다. 이 때, 데이터는 평균 ±SEM(n = 5)으로 표시하였다($^{#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ vs. NC, and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ vs. HFD-대조군. NC, normal chow; 대조군, HFD-대조군; HBU10, HFD + HBU651 10 mg/kg; HBU30, HFD + HBU651 30 mg/kg).

도 8은 HFD로 유도된 비만 마우스의 시상하부 염증의 변화를 분석한 실험 결과를 도시한 것이다. 도 8의 (A) 및 (B)는 각각 GFAT(A), Iba-1(B) 항체로 면역 염색한 시상 하부 절편의 이미지로, 아치형 핵(ARC) 영역(화살표 및 삽입 상자로 표시) 및 제3뇌실(3V)를 함께 표시하였다. (C) 및 (D)는 각각 ARC에서 성상세포(GFAP 양성 세포)(C) 및 활성화된 소교세포(Iba-1 양성세포)(D)를 정량화한 결과를 도시한 것이다. 이 때, 데이터는 평균 ± SEM (n = 5)로 표시하였다($^{###}p < 0.001$ vs. NC, and $^{**}p < 0.01$. $^{***}p < 0.001$ vs. HFD-대조군. NC, normal chow; 대조군, HFD-대조군; HBU10, HFD + HBU651 10 mg/kg; HBU30, HFD + HBU651 30 mg/kg.

도 9는 본 발명의 실시예 12의 실험 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 “약학적으로 허용 가능한 염”이라 함은, 건전한 의학적 판단의 범주에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등이 없이 사람 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 타당한 이익/위험 비를 갖는 염을 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 당업계에 익히 공지되어 있다. 본 발명에서 허용 가능한 염은 적

합한 무기 및 유기 산 및 염기로부터 유도된 것들을 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 무독성 산 부가 염의 예는 염산, 브롬산, 인산, 황산 및 과염소산과 같은 무기 산 또는 아세트산, 옥살산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 석신산 또는 말론산과 같은 유기 산으로 형성되거나 이온 교환과 같은 당업계에서 사용되는 다른 방법을 사용하여 형성되는 아미노 기의 염이다. 다른 약학적으로 허용 가능한 염은 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 비설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 글루코네이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다.

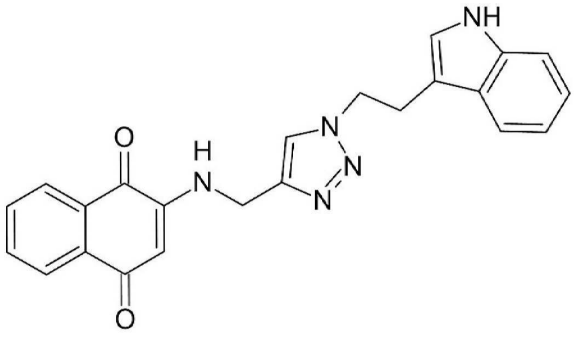
[0022] 적절한 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄 및 N^+ (C1-4알킬)4 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등을 포함한다. 또 다른 약학적으로 허용 가능한 염은, 적절한 경우, 무독성 암모늄, 4급 암모늄, 및 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 저급 알킬 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 짝이온을 사용하여 형성된 아민 양이온을 포함한다.

[0023] 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에 개시된 화합물의 구조는 또한 상기 구조의 모든 이성체(예를 들면, 에난티오머, 부분입체 이성체, 및 기하 이성체(또는 형태 이성체)) 형태: 예를 들면, 각각의 비대칭 중심에 대한 R 및 S 배위, Z 및 E 이중결합 이성체, 및 Z 및 E 형태 이성체를 포함한다. 따라서, 본 발명의 화합물의 단일 입체 화학적 이성체 및 에난티오머, 부분입체 이성체 및 기하(또는 형태) 혼합물도 본 발명의 범주 내에 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 화합물의 모든 호변이성체 형태는 본 발명의 범주 내에 있다. 또한, 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에서 개시된 구조는 또한 하나 이상의 동위 원소 풍부 원자의 존재만이 상이한 화합물을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, 수소가 중수소 또는 삼중수소로 대체되거나 탄소가 ^{13}C- 또는 ^{14}C-풍부 탄소로 대체된 본 발명의 구조를 갖는 화합물은 본 발명의 범주 내에 있다. 이러한 화합물은, 예를 들면, 분석 기구로서, 생물학적 분석에서 탐침으로서, 또는 본 발명에 따른 치료제로서 유용하다.

[0025] 이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명의 한 양태에 따른 약학적 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물(HBU651) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 그 특징으로 함으로써, AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다.

[0028] [화학식 1]



[0029] .

[0030] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 AhR 리간드 결합부위와 직접 상호작용함으로써, AhR에 결합하고자 하는 AhR 리간드와 경쟁하는 새롭고도 강력하며 선택적인 AhR 길항제이다. 구체적으로 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 NF-$_k$B 신호 경로를 차단함으로써, 체내 다양한 염증반응을 억제하는 이점이 있다.

[0031] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 항염 효과가 우수하여 신경 염증을 포함한 만성 염증의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수하기 때문에, 이를 통해 유발될 수 있는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군 등의 대사 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다. 또한, 신경 염증으로 인해 유발될 수 있는 알츠하이머병 또는 파킨슨병 등을 포함한 신경 퇴행성 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다. 뿐만 아니라, AhR 활성을 저해함으로써, SARS-CoV-2(COVID-19) 등을 포함한 RNA 바이러스 감염증에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수한 이점이 있다.

[0033] 상기 AhR은 아릴 탄화수소 수용체(aryl hydrocarbon receptor)를 의미하며, 상기 AhR은 HSP90에 결합된 세포질에서 리간드 없이 비활성 상태로 존재하는 전사 인자이다. 상기 AhR에 리간드가 결합되면, AhR은 핵으로 전위하며, 이 때 Arnt에 의해 이량체화되어 기능적 전사 인자를 형성한다. AhR/Arnt는 유전자 전사를 조절하는 다수의 유전자의 프로모터에 존재하는 다이옥신 반응 요소(dioxine response element, DRE)에 결합한다. AhR에 의해 조절되는 가장 잘 알려진 유전자로는 사이토크롬 P450 유전자 CyP1a1 및 Cyp1b1이 있으며, 이 때 AhR의 활성화는 이들 유전자의 발현을 크게 증가시키기 때문에, Cyp1a1 및 Cyp1b1 mRNA 수준은 AhR 활성화의 선택적 판독치가 된다.

[0034] 수용체를 활성화시키는 AhR의 다수의 외인성 및 내인성 리간드(ligand)가 존재하며, 대표적인 외인성 리간드 부류는 다이옥신이다. 또한, 확인되어야 하는 1차적 내인성 리간드들 중 하나는, TDO(Opitz 2011) 또는 IDO(Mezrich 2010)에 의해 발생되는 키누레닌(kynurenine)이다. 상기 키누레닌은 IDO/TDO 경로에서 안정한 대사산물이며, 트립토판의 분해산물로서, 다른 DRE-구동 유전자와 마찬가지로, 다수의 세포 유형에서 Cyp1a1 및/또는 Cyp1b1 mRNA 수준 증가에 의해 측정되는 바와 같이 AhR을 활성화시킨다. 상기 키누레닌은 암, 신경 장애와 같은 만성 질환에서 증가하는 내인성 AhR 작용제(agonist)로서, 염증 과정이 진행됨에 따라 AhR 경로를 활성화한다.

[0035] AhR은 많은 면역 세포에서 고도로 발현되기 때문에, AhR 신호는 건강과 질병의 면역 체계에서 중요한 역할을 하며, 면역 반응에서 환경과 대사를 통합하는 분자 경로를 제공한다. 특히, 리간드-활성화된 AhR은 염증성 사이토카인 및 케모카인의 NF-$_k$B 의존적 전사를 유도하고 비만과 같은 대사실환 및 이로부터 유발되는 말초 및 중추 염증과도 관련이 있다.

[0037] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물(HBU651) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 AhR과 상호작용하는 핵인자 카파비(NF-$_k$B)의 신호 경로를 차단함으로써, AhR의 활성을 억제하고 이를 통해 항염 효과가 우수한 이점이 있다. 한편, SARS-CoV2 RNA 바이러스가 숙주 세포에 감염될 때, 수용체 역할을 하는 안지오텐신 전환효소 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)와 바이러스의 스파이크 단백질을 분해하는 제2형 세포막 세린 단백질분해효소 (type II transmembrane serine protease, TMPRSS2)의 발현이 AhR 활성-의존적으로 증가한다. 따라서 AhR의 활성을 억제하면, ACE2와 TMPRSS2의 발현이 감소함으로써, RNA 바이러스의 감염력을 감소시킬 수 있다. HBU651은 ACE2와 TMPRSS2의 발현을 억제시키는 효과가 우수하여, RNA 바이러스 감염증에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과 또한 우수할 것으로 예측된다.

[0039] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 및 비히클(vehicle)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0040] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 및 비히클은 제형화되는 화합물의 약리학적 활성을 파괴하지 않는 무독성 담체, 보조제 또는 비히클을 의미하는 것으로, 당 업계에 공지된 것이라면 특별한 제한 없이 사용할 수 있으며, 본 발명에서는 그 구체적인 종류를 특별히 한정하지 않으나, 일 예를 들면, 이온교환제, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 사람 혈청 알부민, 완충 물질, 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스계 물질, 폴리에틸렌글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블럭 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지(wool fat)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 10 내지 500㎛M일 수 있고, 바람직하게는 10 내지 300㎛M일 수 있으며, 보다 바람직하게는 10 내지 100㎛M일 수 있다. 상기 화합물의 농도범위가 전술한 범위 내로 포함되는 경우, AhR 전사 활성을 보다 억제할 수 있는 이점이 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 AhR-매개 질환은 염증성 질환 또는 RNA 바이러스 감염증을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함함으로써, 상기 화합물이 AhR과 상호작용하는 NF-κB의 신호 경로를 차단하고 이를 통해 염증 반응을 억제할 수 있는 이점이 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 염증성 질환은 신경 퇴행성 질환 또는 대사 질환을 포함할 수 있으며, 상기 신경 퇴행성 질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅톤병, 루게릭병, 프리온 질환, 루이소체 치매, 다계통 위축증, 진행성 핵상 마비, 프리드라이히 운동실조증, 측두엽 간질 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있고, 상기 대사 질환은 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0046] 전술한 바와 같이, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 AhR 길항제로서 해마 또는 시상 하부와 같은 뇌 영역에 발생하는 신경 염증의 발생을 억제할 수 있으며, 이를 통해 상기 신경 염증으로부터 유발될 수 있는 신경 퇴행성 질환의 발병을 억제할 수 있고, 상기 신경 퇴행성 질환의 다양한 증상, 예를 들면, 인지능력, 학습능력 또는 기억력 저하 등의 증상을 개선 또는 치료할 수 있는 이점이 있다.

[0047] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 AhR 길항제로서 AhR의 리간드 중 하나인 환경호르몬 및 잔류성 유기오염물질(persistent organic pollutant, POPs)에 의한 AhR의 활성화를 억제하는 효과가 있다. 이를 통해, POPs와 같은 지용성 화학물질들이 지방 조직 내 축적됨으로써 발병되는 대사 질환의 발병을 억제할 수 있고, 상기 대사 질환으로부터 유발된 다양한 증상들을 개선 또는 치료할 수 있는 이점이 있다.

[0048] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 RNA 바이러스는 사스코로나바이러스 유형 1 및 2(SARS Corona Virus; SARS-CoV-1, SARS-CoV-2), 인플루엔자 A 바이러스(influenza A virus; IAV), 소 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 돼지 유행성 설사 코로나바이러스(porcine epidemic diarrhea coronavirus; PEDV), 소 로타바이러스(Bovine species A rotavirus; RVA), 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV), 돼지 사포바이러스(Porcine sapovirus; PSaV), 노로바이러스(norovirus), 고양이 전염성 복막염 코로나바이러스(feline infectious peritonitis virus; FIPV), 메르스코로나바이러스(MERS Corona Virus), 지카바이러스(Zika virus), 뎅기열 바이러스(dengue fever virus), 및 A형/C형 간염 바이러스(Hepatitis viruses)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 AhR 길항제로서, RNA 바이러스의 세포내 이입을 억제할 수 있다. 한 예로, SARS-CoV-2는 외피의 돌기 단백질이 숙주 세포의 세포막에 결합하여 세포내로 이입되면서 감염된다. SARS-CoV-2의 감염은 세포막에 존재하는 안지오텐신 전환효소 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 수용체와 제2형 세포막 세린 단백질분해효소 (type II transmembrane serine protease, TMPRSS2)에 의한 스파이크 단백질 priming 의존적으로 일어난다. 따라서 ACE2와 TMPRSS2의 발현 증가는 COVID-19 환자 감염을 증가시킬 수 있는데, AhR의 활성이 증가하면 ACE2와 TMPRSS2의 발현이 증가하므로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 이용하여 AhR의 활성을 억제하면, 항 바이러스 면역을 강화하고 바이러스 역가(titer)를 낮춰 체내 바이러스로 인한 병리를 개선할 수 있고, RNA 바이러스의 복제 또한 억제할 수 있어, 결과적으로 RNA 바이러스 감염증을 예방할 수 있고, 상기 감염증으로부터 유발되는 증상들을 개선 또는 치료할 수 있는 이점이 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 경구, 비경구, 흡입 스프레이에 의해, 국소, 직장, 비강, 협측, 질 또는 이식된 저장소를 통해 투여될 수 있다.

[0051] 상기 약학적 조성물은 경구 투여를 위해, 캡슐제, 정제, 수성 현탁액 또는 용액제를 포함하는 임의의 경구적으로 허용되는 투여형으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 경구용 정제의 경우, 일반적으로 사용되는 담체는 락토오스 및 옥수수 전분을 포함할 수 있고, 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제가 또한 통상적으로 첨가될 수 있다. 또한, 캡슐 형태로 경구 투여 시의 유용한 희석액은 락토오스 및 건조된 옥수수 전분을 포함할 수 있고, 경구 사용을 위해 수성 현탁액이 필요한 경우, 활성 성분으로 에멀젼화제 및 현탁제를 조합하

여 사용할 수 있다. 필요에 따라, 상기 약학적 조성물은 특정 감미제, 향미제 또는 착색제를 더 포함할 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내, 흉골내, 척수강내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 바람직하게는, 조성물은 경구, 복강내 또는 정맥내 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 비경구 투여를 위한 일 유형으로 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액이나 용액으로 정제될 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있는 것으로, 본 발명에서는 이를 특별히 한정하지 않는다. 상기 멸균 주사용 현탁액 또는 용액은 일 예로서, 1,3-부탄디올을 포함할 수 있으며, 이 때 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매로서는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 멸균 고정유(fixed oil)가 용매 또는 현탁 매체로서 통상 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 무자극성 고정유(bland fixed oil)가 사용될 수 있다. 올레산과 같은 지방산 및 이의 글리세라이드 유도체는 특히 폴리옥시에틸화된 형태에서 올리브유 또는 피마자유와 같은 약제학적으로 허용되는 천연 오일과 같이 주사제의 제조에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 이러한 오일 용액 또는 현탁액은, 장쇄 알코올 희석액 또는 분산제, 예를 들면 에멀젼 및 현탁액을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 투여형의 제형화에 통상 사용되는 카복시메틸 셀룰로오스 또는 유사한 분산제를 함유할 수도 있다. 약학적으로 허용되는 고체, 액체 또는 다른 투여형의 제조에 통상적으로 사용되는 계면활성제, 예를 들면, Tween, Span 및 다른 에멀젼화제 또는 생체이용율 향상제가 또한 제형 목적으로 사용될 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 약학적 조성물은 또한, 직장 투여를 위한 좌제 형태로 제형화 될 수 있다. 상기 좌제는 실온에서 고체이지만 직장 온도에서 액체이므로 직장에서 용융되어 약물을 방출하는 적합한 비자극성 부형제와 제제를 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 이를 제조하기 위해 상기 약학적 조성물은 코코아 버터, 밀납 및 폴리에틸렌 글리콜 등을 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 상기 약학적 조성물이 국소 투여되는 경우, 그 치료 대상은 눈, 피부 또는 하부 장관(lower intestinal tract) 등을 포함할 수 있고, 이 외에도 국소 투여에 의해 용이하게 접근 가능한 영역 또는 기관을 포함할 수 있다. 상기 국소 투여를 위해 적합한 제형은 상기 치료 대상이 되는 영역 또는 기관 각각에 적용이 용이하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 하부 장관에 대한 국소 투여(또는 도포)는 전술한 직장 좌제 제형에서 또는 적합한 관장 제형으로 수행될 수 있으며, 국소 경피 패치 또한 사용될 수 있다. 국소 도포를 위해, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적합한 연고로 제형화 될 수 있으며, 이를 위해 광유, 액상 페트롤레이텀, 백색 페트롤레이텀, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 에멀젼화 왁스 또는 물을 포함하는 담체를 더 포함할 수 있지만, 상기 담체의 종류는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 담체를 필요에 따라 적절하게 선택하여 사용할 수 있는 것이므로, 본 발명에서는 이를 특별히 한정하지 않는다. 또한, 상기 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 로션 또는 크림으로 제형화될 수도 있다. 이 경우 더 포함가능한 적합한 담체로는 광유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도세카놀, 벤질 알코올 및 물 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 예로서, 안과 용도로 사용하기 위해 제형화되는 약학적 조성물은 pH가 조절된 등장성 멸균 식염수에서 미분화된 현탁액으로 제형화될 수 있고, 바람직하게는 벤질알코늄 클로라이드와 같은 보존제 더 포함할 수도 있는 pH가 조절된 등장성 멸균 식염수에 용해된 용액으로서 제형화 될 수 있으며, 또한 페트롤레이텀과 같은 연고로 제형화될 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 약학적 조성물은 또한 비강 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수도 있다. 이를 위한 약학적 조성물은 약학적 제형 분야에 익히 공지된 기술에 따라 제조되며, 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용율을 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 다른 종래의 가용화제 또는 분산제를 사용하여 식염수 중 용해된 용액으로서 제조될 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 임의의 특정 환자에 대하여, 상기 약학적 조성물의 투여 용량 또는 치료 요법은 상기 약학적 조성물 내 포함되는 화합물의 활성, 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 배설 속도, 약물 병용 여부, 질환의 중증도 등을 종합적으로 고려하여 결정되는 것으로, 본 발명에서는 이를 특별히 한정하지 않는다.

[0059] 본 발명의 다른 실시형태는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하

는 AhR-매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것인다. 상기 식품 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효 성분으로 포함함으로써, AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수하며, 신경 염증을 포함한 만성 염증의 예방 또는 개선 효과가 우수하기 때문에, 이를 통해 유발될 수 있는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군 등의 대사 질환에 대한 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다. 또한, 신경 염증으로 인해 유발될 수 있는 알츠하이머병 또는 파킨슨병 등을 포함한 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다. 뿐만 아니라, AhR 활성을 저해함으로써, SARS-CoV-2(COVID-19) 등을 포함한 RNA 바이러스 감염증에 대한 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다.

[0060] 상기 식품 조성물은 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조된 것일 수 있으며, 또한, 분말제, 액제, 정제, 연질캅셀제, 과립제, 티백차, 인스턴트 차 또는 드링크제 등의 형태로 제형화될 수 있다. 유효 성분으로서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 함량은 그 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있으나, 일 예를 들면 식품 조성물 전체 중량에 대하여, 0.1 내지 90 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 그 목적에 따라 장기간의 섭취를 하는 경우에는 상기 함량은 상기 범위 이하일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 이외에 본 발명이 목적으로 하는 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 본 발명의 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분을 더 포함할 수도 있다.

[0061] 상기 식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 당 업계에서의 통상적인 의미가 적용된 식품의 종류를 모두 포함할 수 있다.

[0062] 상기 식품 조성물이 음료인 경우 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 이외에, 음료 제조를 목적으로 사용되는 다른 성분을 특별한 제한이 없이 더 포함할 수 있으며, 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 더 포함할 수 있다. 상기한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 또한 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 밖에도 상기 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 더 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 다른 일 실시형태는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 사료학적으로 하용 가능한 염을 포함하는 AhR-매개 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물에 관한 것으로, 상기 사료 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효 성분으로 포함함으로써, AhR 길항제로서의 효과가 우수하여, AhR-매개 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수하며, 신경 염증을 포함한 만성 염증의 예방 또는 개선 효과가 우수하기 때문에, 이를 통해 유발될 수 있는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군 등의 대사 질환에 대한 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다. 또한, 신경 염증으로 인해 유발될 수 있는 알츠하이머병 또는 파킨슨병 등을 포함한 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다. 뿐만 아니라, AhR 활성을 저해함으로써, SARS-CoV-2(COVID-19) 등을 포함한 RNA 바이러스 감염증에 대한 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다.

[0066] 상기 사료 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 조성물은 첨가제를 더 포함할 수 있는데, 상기 첨가제는 일 예를 들면, 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 사료 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있고, 통상의 사료 성분을 더 포함할 수도 있다. 또한, 상기 사료 조성물은 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는

사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수도 있다. 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다.

[0068] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당 업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다. 이하의 실시예 및 비교예에서 함량을 나타내는 "%" 및 "부"는 특별히 언급하지 않는 한 중량 기준이다.

[0070] **<합성예 및 실험 방법>**

[0071] **합성예: HBU651의 합성**

[0072] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물인 HBU651은 박정호 연구실(한밭대학교, 대전, 대한민국)의 마이크로웨이브 반응기를 이용하여 프로파길화된 나프탈렌과 트립타민 아지드의 클릭반응을 이용하여 합성하였다.

[0073] 구체적으로, 1,4-Dihydroxy naphthalene (100mg, 0.624mmol)을 EtOH 10mL에 용해시킨 후 $CeCl_3$ $7H_2O$ (20mg, 0.062mmol), prop-2-yn-1-amine (41mg, 0.7488mmol)을 및 TEA (130mg, 1.25mmol)을 차례대로 천천히 적가하고 상온에서 반응시켰다. 반응 완결 확인(EA : HEX = 1 : 3로 TLC확인)한 다음, 물로 재결정하여 생성된 고체를 여과하여 중간 화합물 A를 수득하였다(수율 70%).

[0074] 이와 같이 얻어진 화합물 A (100mg, 1.0eq)를 acetone 5 mL와 dmso 2 mL의 혼합용매에 녹인 후 $Cu(PPh_3)_3Br$ (22mg, 0.25eq) 및 3-(2-azidoethyl)-1H-indole (162mg, 1.2eq)를 순차적으로 첨가하고, Microwave 합성기로 60deg 1시간, 70deg 1시간 30분, 80deg 1시간동안 클릭 반응시켰다. 반응 완결 확인(EA:HEX=2:1로 TLC확인, Rf=0.2)한 다음, 물과 EA로 3회 추출한 후 무수 $MgSO_4$로 건조시키고 여과 및 감압 농축하였다. 얻어진 잔사를 실리카 컬럼 크로마토그래피(전개 용매 EA:HEX=1:1 -> 2:1 -> 3:1)로 정제시켜 HBU651을 수득(150mg, 수율 79%)하였으며, 합성된 HBU651은 ^{1}H NMR(400MHz, DMSO-d_6) 및 ^{13}C NMR(100MHz, DMSO-d_6)로 그 구조를 확인하였다.

[0075] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3.23 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.59 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 5.75 (s, 1H), 6.93 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.73 (td, J = 1.2, 7.6 Hz, 1H), 7.83 (td, J = 1.2, 7.6 Hz, 1H), 7.91 (bs, 1H), 7.94 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.99 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 10.83 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 26.4, 37.9, 50.5, 100.9, 110.4, 111.8, 118.8, 121.4, 123.5, 123.6, 125.8, 126.3, 127.3 130.8, 132.7, 133.5, 135.3, 136.5, 143.3, 148.6, 182.0, 182.02; HRMS-FAB+ clad. for $C_{23}H_{19}N_5O_2$ [M]+: 397.1539 found: 397.1536; mp : 155℃

[0077] **실험방법 1: AhR-의존성 luciferase 리포터 분석**

[0078] Hepa1c1c7 마우스 간암 세포(CRL-2026)를 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 α-minimum essential medium(MEM)에서, 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 6-well 플레이트에 1 × 10^5 cells/well로 시드된 Hepa1c1c7 세포를 Superfect(Qiagen, Valencia, CA, USA)10을 사용하여, pGL4-DRE-luc(puro+) 및 pRL-mTK로 동시에 형질감염시킨 후, 퓨로마이신(1㎍/mL) 내성 안정 콜로니를 3주 동안 선별하였다.

[0079] AhR-의존성 루시퍼라제 활성(AhRE-lusiferase 또는 DRE-luciferase)을 측정하기 위해, 10% charcoal stripped-FBS가 보충된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)에서 70% 컨플루언트 안정 세포를 AhR 길항제(HBU651 또는 CH223191)로 1시간 동안 전처리하고, 50pM 2,3,7,8-테트라클로로디벤조-p-다이옥신(TCDD)으로 24시간 동안

자극하였다. Dual-Glo 루시퍼라아제 분석 시스템(Promega, Madison, WI, USA) 및 루미노미터(Berthold, Badwildbad, Germany)를 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정한 후, Renilla luciferase 활성에 대해 정규화하였다.

[0081] **실험방법 2: 세포 배양 및 시료 처리**

[0082] BV2 생쥐 미세아교세포(ATCC, CRL-2469)를 DMEM 완전 배지에서 배양하였다. BV2 세포(2×10^5 cells/well)를 배양 접시(60mm)에 24시간 동안 시딩한 후, 0.5% FBS를 함유하는 혈청 결핍 DMEM 배지에서 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 HBU651(10μM) 또는 CH223191(1μM, AhR 길항제, CAS #.301326-22-7, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 24시간 동안 양성 대조군으로써 전처리하고, LPS(lipopolysaccharide, 100ng/mL)또는 DMSO(dimethyl sulfoxide) 비히클과 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이 때, DMSO의 최종 농도는 0.1%였다.

[0084] **실험방법 3: 미토콘드리아 기능 분석**

[0085] 미토콘드리아 기능을 전반적으로 측정할 수 있는 세포 기반 미토콘드리아 활성 분석 시스템(Cell-based Mitochondrial Activity Profiling System, CMAPS, Piao Y. et al (2012) Biochim Biophys Acta, 1820: 577-585)은 96 well 플레이트에서 SH-SY5Y 세포를 사용하여 실시하였다. 이 분석 시스템을 이용하여, 생존 능력(Calcein), NADH 탈수소 효소 복합체 1 활성에 대한 메틸 티아질 테트라졸륨-미토콘드리아 탈수소 효소 활성(MTT) 분석, 세포 내 ATP(adenosine triphosphate) 함량, TMRE 기반 미토콘드리아 막 전위(tetramethylrhodamine, ethyl ester, TMRE) 및 CM-H2DCFDA 또는 세포의 MitoSox-의존성 활성산소종(ROS)에 대한 정량 분석을 실시하였다. 미토콘드리아의 기능적 변화는 CMAPS 결과를 사용하여 평가하였다.

[0087] **실험방법 4: NF-$_k$B 활성 분석**

[0088] HBU651이 NF-$_k$B의 p65 서브 유닛의 핵 전좌에 미치는 영향을 공초점 현미경을 이용한 면역 현광법으로 조사하였다. 구체적으로, BV2 세포를 6-well 플레이트의 폴리-L-라이신 코팅된 커버슬립에서 배양하고, 10μM HBU651 또는 1μM의 CH223191로 24시간 동안 전처리 한 다음, 100ng/mL LPS로 4시간 동안 자극하였다. 이렇게 처리된 세포를 실온에서 20분 동안 4% 파라포름알데하이드로 고정한 후, PBS 내 0.1% Triton X-100으로 15분 동안 투과시키고, 3% BSA로 블락하였다. 세포를 실온에서 항-NF-$_k$B p65/RELA(sc-372, Santa Cruz BioTech, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 다클론 토끼 항체와 실온에서 FITC-접합 염소 항-토끼 IgG와 순차적으로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이를 PBS로 세척한 후 샘플을 GEL/MOUNT(Biomeda, Foster City, CA, USA)에 장착하고, 공초점 형광 현미경(Carl Zeiss, GÖttingen, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

[0090] **실험방법 5: 실시간 정량적 역 전사-PCR(Quantitative Reverse Transcription-PCR, qRT-PCR)**

[0091] 배양 세포 또는 간 조직의 총 RNA는 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 분리하였다. Mini RNA Isolation II™(Zymo Research, Orange, CA, USA)를 사용하여 부고환 지방 패드의 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA(2㎍)는 MMLV 역전사효소(Promega, Madison, WI, USA)와 10 pM oligo dT 프라이머(invitrogen)를 사용하여 각 제조업체의 지침에 따라 역 전사하였다. mRNA 수준은 2x AmpiGene® qPCR green Mix Lo-ROX (Enzo Biochem, New York, NY, USA)를 갖는 Roter-Gene Q(Qiagen, Hilden, Germany)로 사이토카인 프라이머(TNF-α, IL-6, IL-1β), cDNA 및 SYBR PCR 마스터 믹스를 사용하여 실시간 qRT-PCR을 사용하여 결정하였고, 이는 95℃에서 10분 동안, 이어서 95℃에서 5초, 60℃에서 15초, 72℃에서 20초의 45사이클로 수행하였다.

[0092] 생쥐 mRNA분석에 사용된 프라이머의 서열은 TNF-α (5'-AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA-3', and 5'-GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTTG-3'), IL-6 (5'-AACGATGATGCACTTGCAGA-3'; 5'-GAGCATTGGAAATTGGGGTA-3'), IL-1β (5'-TACGAGCCGTAGCCCAAACA-3'; 5'-GATCGTAACGGAAGCGTGGA-3'), MCP-1 (5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTGG-3'; 5'-CTGCTGCTGGTGATCCTCTTG-3'), F4/80 (5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3'; 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'), 18S rRNA (5'-GAGCGAAAGCATTTGCCAAG-3'; 5'-GGCATCGTTTATGGTCGGAA-3')였다. 사람 mRNA분석에 사용된 프라이머의 서

열은 CYP1A1 (5'- AGGAGCTGAAGGGAGACACA-3', and 5'- GTAGCCTGAAGCTCCTGGTG-3'), ACE2 (5'- GGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAA-3'; 5'- AGGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'), TMPRSS2 (5'- ACTCTGGAAGTTCATGGGCAG-3'; 5'- TGAAGTTTGGTCCGTAGAGGC-3'), IL-6 (5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'; 5'-TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'), IL-1β (5'- CCACAGACCTTCCAGGAGAATG-3', and 5'- GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG-3'), 18S rRNA (5'- GAGCGAAAGCATTTGCCAAG-3'; 5'- GGCATCGTTTATGGTCGGAA-3')였다.

[0093] mRNA 발현의 정량 분석은 SDS 소프트웨어 2.4(Applied Biosystems®, Waltham, MA, USA)를 사용하여 분석하였다. 각 복제 주기 임계값(C_t)은 18S로 정규화하였다. comparative C_t method를 이용하여 유전자 발현의 상대적 정량을 계산하였다. C_t의 차이($\triangle C_t$)는 18S와 관심 유전자의 차이를 의미한다. 폴드 변화는 1로 설정된 제어 조건으로 정규화되었다.

[0095] **실험방법 6: 고지방식(High Fat Diet, HFD)을 먹인 마우스 동물 실험**

[0096] 중앙실험동물 (Central Lab Animals, Inc., 대한민국, 서울)에서 구입한 체중 19 내지 21g의 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 동물 실험에 사용하였다. 상기 마우스는 통제된 조명 조건(12시간 빛, 12시간 밤)과 습도(40 내지 70%)에서 사육하였으며, 물과 음식을 공급하였다. 1주일의 적응기 후, 마우스에게 정상적인 음식 (NC, Research Diets D12450B, 10% kcal 지방) 또는 고지방식(HFD, Research Diets D12492, 60% kcal 지방)를 제공하였다. 4주간의 NC 또는 HFD의 공급 후, 식이 및 치료 방법에 따라 마우스를 4개 그룹으로 분류하였다: NC 그룹(n = 5), HFD 그룹(n = 5), HFD + 10 mg/kg HBU651 그룹(HBU10, n = 5), HFD + 30 mg/kg HBU651 그룹(HBU30, n = 5). HBU10군과 HBU30군은 각각 HBU651 10mg/kg과 30mg/kg을 1일 1회 6주간 경구 투여하였고, NC군과 HFD군에게는 HBU6651 대신 식염수를 투여하였다. 동물관리 및 실험은 실험실 동물 관리 원칙(NIH 간행물 번호 85-23, 1085 개정) 및 대한민국 서울 경희대학교의 동물 관리 및 사용 지침에 따라 수행하였다. 경희대학교 동물실험 윤리위원회는 본 연구를 승인하였다(KHSASP-20-163). 10주차에 마우스를 희생시켜 조직의 무게를 측정하고, 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0098] **실험방법 7: 대사 표현형 분석**

[0099] 전자저울(CAS 2.5D, 서울, 대한민국)을 사용하여 실험 기간 동안 각 마우스의 체중(BW)을 기록하였다. BW는 아침 수유 전 동시에 측정하였다. 식이 섭취량은 매일 아침 식이 변화 시, 하나의 우리 당 전날 공급된 사료에서 다음날 공급 전 남은 사료 무게를 뺀 마우스 1마리당 1일 사료 섭취량의 평균으로 계산하였다. 칼로리 섭취량은 NC군은 2.91kcal/kg, 고지방식군은 5.24kcal/g을 곱하여 계산하였다.

[0100] 9주 째에 마우스를 깨끗한 우리에서 14시간 동안 금식시킨 후, 경구 포도당 내성 검사(OGTT)와 인슐린 저항성에 대한 항상성 모델 평가(HOMA-IR)를 실시하였다. OGTT 전에 마우스의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 공복 혈당과 공복 인슐린 수치를 측정하였다. OGTT의 경우, 증류수에 녹인 포도당(2g/kg)을 각 마우스에 경구 투여하고, 포도당을 경구 투여한 후, 0, 30, 60, 90, 120 및 180분이 경과된 시점에 측면 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈당 수치는 스트립 작동식 혈당 측정기(ACCU-CHEK PERFORMA, 서울, 대한민국)를 사용하여 측정하였고, 인슐린 수치는 효소 결합 면역흡착 분석법(Crystal Chem, Elk Grouve village, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. 상기 HOMA-IR은 다음 수학식 1에 따라 계산되었다.

[0101] [수학식 1]

[0102] HOMA-IR = (공복 혈당(mg/dL) × 공복 혈당(ng/mL))/22.5.

[0104] **실험방법 8: 생화학적 분석**

[0105] 10주차에 마우스를 마취하고, 심장에서 혈액을 채취하고, 총콜레스테롤(Total-C), 저밀도 지단백콜레스테롤(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 고밀도 지단백콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C), 인지질(phospholipid, PL), 트리글레세리드(triglyceride, TG), 유리지방산(free fatty acid, FFA)을 포함한 임상변수를 측정하였다.

[0106] 간 및 신장 기능을 평가하기 위하여, 아스파르테이트 아미노전이효소(Aspartate aminotransferase, AST), 알라

닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT) 및 크레아티닌(creatinine)을 측정하였다.

[0108] **실험방법 9: 혈청 TNF-α 및 MCP-1 단백질 수준**

[0109] 염증성 사이토카인 TNF-α 및 케모카인 MCP-1의 혈청 농도는 마우스 TNF-α 및 마우스 MCP-1 ELISA 키트(BMS607-3 and BMS6005, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여, 제조업체의 프로토콜에 따라 측정하였다.

[0111] **실험방법 10: 기질혈관세포(Stromal vascular cells, SVC)의 준비**

[0112] 기질 혈관 세포(SVC)는 잘 정립된 콜라게나제 기반 방법을 사용하여 부고환 지방 패드로부터 분리하였다. 간략하게, 마우스 사육 10주차에 마우스 지방 조직 샘플을 부고환 지방 패드로부터 분리하였다. 2% BSA(bovine serum albumin, Gibco, USA)가 포함된 PBS(phosphate-buffered saline, Gibco, Waltham, MA, USA) 버퍼에 상기 분리된 샘플을 1 내지 2mm 크기의 작은 조각으로 자른 후 투입하였다. 콜라게나제 2형(10mg/mL, Worthington) 및 데옥시리보뉴클레아제 I(2 mg/mL, Roche, Indianapolis, IN, USA)을 상기 샘플에 투입한 후, 37℃에서 30분 동안 진탕하여 소화시켰다. 소화된 지방 조직을 100㎛ 세포 스트레이너(BD Biosciences, 미국 캘리포니아주 샌디에이고)를 통해 여과시켜 소화되지 않은 지방 조직을 제거한 다음 2% BSA/PBS와 5mM EDTA를 첨가하여 현탁액을 제조하였다. 상기 현탁액을 1000rpm에서 3분 동안 원심분리하고, SVC를 포함하는 펠릿을 2% FBS/PBS로 재현탁하여, 염색을 위해 준비하였다.

[0114] **실험방법 11: 혈액 면역 세포 및 지방 조직 대식세포(Adipose Tissue Macrophage)의 유동혈구분석(Flow cytometry analysis)**

[0115] 사육 9주째에 마우스의 꼬리 정맥에서 혈액 샘플을 채취하였다. EDTA를 적용한 후, Cellometer(Nexcelom Bioscience LLC, MA, USA)를 사용하여 혈구 수를 세고 각 샘플을 10^5 cell로 조정하였다. 그런 다음, 각 시료에 1% Fc block(BD Biosciences, CA, USA)을 1:100의 비율로 첨가하여 10분 간 반응시킨 후 암흑 속에서 20분 동안 형광단-결합 항체로 염색하였다. 혈액 림프구 및 Ly6c 단핵구 분석에 사용된 항체는 CD45-APC Cyanine7, CD11b-phycoerythrin Cyanine7, CD3-FITC, CD4-PerCP CY5.5, CD8-phycoerythrin 및 Ly6c-APC였다.

[0116] 분리된 SVC를 1% Fc Block (BD Biosciences)과 함께 배양한 다음, CD45-APC Cyanine7, CD11b-phycoerythrin Cyanine7, F4/80-APC 및 CD11c-phycoerythrin으로 염색하였다. 모든 항체는 BioLegend(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 2% FBS/PBS 용액으로 세척하고 1500rpm에서 원심분리한 후, 샘플을 FACS(flow cytometry)용 튜브로 옮기고 유동혈구 분석기인 BD Canto(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 혈액 Ly6c 단핵구를 분석하기 위해 CD45+ 게이팅 후 Ly6c+ 및 CD11b+ 세포를 분석하였다. 혈액 림프구의 경우 CD45+ 게이팅 후 CD3+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 분석하였다. 지방조직 대식세포(ATM)는 CD45+, CD11b+ 및 F4/80+ 게이팅 후 F4/80+ ATM(total ATM) 및 CD11c+ M1 ATM으로 분석하였다. 면역 세포의 수는 FlowJo FACS 분석 프로그램(Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA)을 이용하여 분석하였다.

[0118] **실험방법 12: 간 및 부고환 지방 패드의 조직학적 분석**

[0119] 간 및 부고환 지방 패드를 4% 파라포름알데히드(PFA) 용액에 고정하고 파라핀 블록을 생성하였다. 마이크로톰을 사용하여 각 블록을 5m 두께의 슬라이스로 자르고 각각을 슬라이드에 놓았다. 헤마톡실린 & 에오신(H&E) 및 면역조직화학(IHC) 염색을 위해, 마우스 당 2개 조직의 슬라이드를 자일렌으로 탈파라핀화하고 구배 재수화시켰다. 이미지는 컴퓨터에 연결된 BX50 현미경(Olympus Optical, Tokyo, Japan)으로 촬영하였다. 마지막으로 ImageJ로 부고환 지방 패드의 지방 세포 크기와 간의 지질 방울을 측정하였다.

[0121] **실험방법 13: 뇌 조직 준비 및 면역조직화학적 염색**

[0122] 마우스의 전체 뇌를 두개골로부터 분리하고, 4℃에서 4% 포름알데하이드 가 포함된 0.1M 인산 완충액(PB)으로 밤새 후고정한 후, 가라앉을 때까지 4℃에서 0.05M PBS 내 30% 수크로스 용액에 보관하였다. 뇌는 30㎛ 두께의

관상 절편을 갖는 Cryostat(Microsystems AG, Leica, Wetzlar, Germany)에서 동결 절편하여, 4℃에서 동결 보호제(25% 에틸렌글리콜, 25% 글리세롤, 0.2M PB 및 물)에 사용할 때까지 보관하였다. 모든 섹션을 6개의 다른 시리즈로 수집하고, 면역 염색을 위해 처리하였다. 시상하부를 포함하는 뇌 관상 절편(두께 30㎛)을 토끼 항-신경교 원섬유성 산성 단백질(anti-GFAP, 1:5000; Neuromics, Edina, MN, USA) 또는 토끼 항-이온화 칼슘 결합 어댑터 분자 1(anti-Iba-1, 1:1000; Wako, Osaka, Japan)에 인큐베이트 시키고, biotinylated anti-rabbit IgG 및 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 표준 키트 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 염색하였다. 신호는 0.003% H_2O_2를 함유하는 0.1M PBS에서 0.5mg/mL 3,3'-디아미노벤지딘(Sigma, St. Louis, MO, USA)과 함께 섹션을 배양하여 검출하였다.

[0124] 시상하부에서 휴지 및 활성화된 미세아교세포 및 성상세포를 정량화하기 위해, 관상 뇌 절편(두께 30㎛)을 수집하고(5개 절편/시리즈) 항-iba-1 또는 항-GFAP 항체로 표지한 뒤, 광학현미경(bright-field microscope, Olympus Optical, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. Iba-1- 또는 GFAP로 표시된 섹션을 디지털화하고, 시상하부(2개 필드/동물)의 미리 선택된 필드(500 × 400 ㎛) 내에서 수동으로 계산하였다. 활성화된 미세아교세포 및 성상세포는 형태에 따라 분류 및 계수되었습니다. 구체적으로, 휴지 중인 미세아교세포와 성상교세포는 길고 가늘며 파형화된 과정을 보이는 작고 콤팩트한 소마타를 보인 반면, 활성화된 미세아교세포와 성상교세포는 세포가 현저하게 비대해지고 세포질이 수축하여 세포질의 길이가 소체 구획의 직경보다 짧았다. 세포는 단면/평면 내에서 핵이 보이고 세포 프로파일에 뚜렷한 경계선이 표시된 경우에만 샘플링하였다.

[0126] **실험방법 14: 통계적 분석**

[0127] 모든 통계 분석은 InStat(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 그룹 간의 차이 수준을 결정한 다음, Tuckey의 사후 테스트를 수행하였다. 모든 실험 데이터는 평균 ± 평균의 표준오차(SEM)로 표시하였다. 모든 p-값은 양측(two-tailed)이었고, $p < 0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0129] **실험방법 15: Calu-3 세포 배양 및 시료 처리**

[0130] Calu-3 사람 폐 상피세포(ATCC, HTB-55)를 MEM 완전 배지에서 배양하였다. Calu-3 세포(5×10^5 cells/well)를 배양 접시(60mm)에 시딩한 후. 10% charcoal-stripped FBS (활성탄으로 화합물을 제거한 FBS)가 포함한 MEM 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 100pM TCDD를 첨가하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 HBU651(10㎛) 또는 양성 대조군으로써 CH223191(1㎛, AhR 길항제, CAS #.301326-22-7, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 24시간 동안 후처리하고, 다시 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이 때, DMSO의 최종 농도는 0.1%였다.

[0132] **<실시예>**

[0133] **실시예 1: AhR-길항제로서의 HBU651의 효과**

[0134] AhR-매개 전사 활성을 억제하는 화학물질을 스크리닝 하기 위해 AhRE (DRE)-luciferase 리포터 플라스미드로 형질 감염된 안정한 Hepa1c1c7 세포를 사용하였다.

[0135] 상기 Hepa1c1c7 세포에 상기 합성예에서 합성된 HBU651을 1시간 동안 전처리 한 후, 50pM의 2,3,7,8-테트라클로로디벤조-p-다이옥신(TCDD)으로 24시간 자극하여 luciferase의 활성을 조사하였으며, 그 결과를 도 1의 (A)에 개시하였다.

[0136] 도 1의 (A)를 참고하면, 상기 HBU651은 50pM의 TCDD로 활성화된 AhRE (DRE)-luciferase 활성을 용량 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. HBU651의 반수 최대 억제 농도(IC_{50})는 약 10㎛였다. 비교군으로 사용된 종래의 AhR 길항제인 CH223191(IC_{50} = 1㎛)은 5㎛ 미만에서는 더 큰 길항 활성을 나타냈지만, AhRE (DRE)-luciferase 활성은 CH223191가 10㎛ 초과하면서 증가하였다. 따라서, 후속 실험에서는 10㎛의 HBU651 및 1㎛

M의 CH223191을 사용하였다.

[0138] **실시예 2: HBU651 화합물의 항염증 효과**

[0139] TNF-α, IL-6 및 IL-1과 같은 주요 전염증성 사이토카인의 mRNA 수준을 분석하여 BV2 세포에서 LPS로 유도된 신경염증에 대한 HBU651의 효과를 평가하였다.

[0140] 생쥐 BV2 미세아교세포를 10μM HBU651(HBU) 또는 1μM CH223191(CH)로 24시간 동안 전처리하고, 100ng/mL LPS(lipopolysaccharide)로 4시간 동안 자극한 후, 분석을 위해 수확하여, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 mRNA 수준에 대한 실시간 qRT-PCR 분석을 실시하였으며, 그 결과를 도 2의 (B) 내지 (D)에 개시하였다.

[0141] 도 2의 (B) 내지 (D)를 참고하면, LPS 자극(100ng/mL)은 BV2 세포에서 상기 사이토카인 mRNA 수준을 3 내지 6배 증가시켰는데, HBU651 처리를 처리하면 이러한 수준이 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 또한, HBU651은 종래의 AhR 길항제인 CH223191보다 사이토카인을 보다 효과적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0143] 또한, 생쥐 BV2 미세아교세포를 10μM HBU651 또는 1μM CH223191로 24시간 동안 전처리한 후, 100ng/mL LPS로 4시간 동안 자극한 후, BV2 세포의 핵(Merge)을 NF-$_k$B p65/RELA 항체(녹색) 및 DAPI(파란색)로 면역 염색하였으며, 그 결과를 도 1의 (E)에 개시하였다. 이 때, NF-$_k$B의 핵 국소화를 시각화하기 위해 세포 이미지를 확대하여 개시하였다.

[0144] NF-$_k$B는 염증성 사이토카인의 마스터 전사 인자로서, 전염증성 사이토카인 및 케모카인의 전사는 NF-$_k$B와 상호작용하는 AhR 활성화에 의해 수정될 수 있다. 도 1의 (E)를 참고하면, LPS의 자극은 I_kB의 인산화 및 분해를 유도하고 결과적으로 활성 NF-$_k$B의 핵 국소화를 유도하였다. NF-$_k$B p65/RELA의 면역세포화학적 염색 결과를 통해 HBU651이 NF-$_k$B p65/RELA의 LPS-매개 핵 국소화를 완전히 차단하였음을 확인할 수 있었는데, 이는 HBU651이 LPS로 활성화된 미세아교세포에서 전 염증성 사이토카인의 NF-$_k$B및 NF-$_k$B-의존성 전사의 핵 전이를 차단함을 의미한다.

[0146] **실시예 3: BV2 세포의 미토콘드리아 기능 변화 분석**

[0147] 96-well 플레이트에 생쥐 BV2 미세아교세포를 24시간 동안 10μM HBU651(HBU) 또는 1μM CH223191(CH)로 전처리하고, 4시간 동안 100ng/mL LPS로 자극한 뒤, 미토콘드리아 활성 분석을 위해 수확하여, 미토콘드리아 기능에 미치는 영향을 분석하였으며, 그 결과를 도 2에 개시하였다.

[0148] 도 2를 참고하면, LPS의 처리는 세포 내 ATP 함량과 미토콘드리아 막 전위 및 ROS 생성을 사용하여 모니터링할 수 있는 미토콘드리아 활성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. HBU651은 CH223191과 유사한 수준으로 LPS로 유도되는 세포 내 ATP 함량 감소를 방지하는 것을 확인할 수 있었다(도 2의 (A) 참조). 또한, HBU651은 종래의 AhR 길항제로 알려진 CH223191과는 달리 LPS-매개 총 세포 ROS 생산을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 2의 (C) 참조).

[0149] 한편, LPS의 처리는 TMRE-미토콘드리아 막 전위와 MitoSOX-슈퍼옥사이드 생산에 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었으며, HBU651 및 CH223191 역시 이들에 변화를 유도하지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 2의 (B) 및 (D) 참조).

[0151] **실시예 4: 대사 표현형 분석**

[0152] 도 3의 (A)에 도시한 바와 같이 실험군을 설계하여, HBU651의 항-비만 효과를 조사하였으며, 그 결과를 도 3에 개시하였다.

[0153] 도 3의 (B) 및 (C)에 개시한 바와 같이, HFD 급여 10주 후, HFD 그룹은 정상적인 음식(NC) 그룹에 비해 체중(BW, △BW)이 크게 증가(9.8 ± 0.4g vs. 30.5 ± 0.9 g in ΔBW, $p < 0.001$)한 것을 확인할 수 있었으며, HFD

를 급여한 마우스에게 10mg/kg(HBU10) 및 30mg/kg(HBU30)의 HBU651를 투여한 결과 △BW가 크게 감소 (각각 25.9 ± 1.4 g and 24.7 ± 1.7 g, $p < 0.01$)한 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 도 3의 (D)에 개시한 바와 같이, HFD 급여 군의 경우 음식 섭취량과 칼로리 섭취량이 NC 군에 비해 유의하게 증가하였으나($p < 0.001$), HBU651 및 HBU30군에서는 HFD 대조군과 비교하여 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0155] 또한, 도 3의 (E) 및 (F)에 개시한 바와 같이, 체중 변화와 유사하게, HFD가 부고환 백색 지방 조직(EWAT)과 간의 무게를 증가($p<0.001$ vs. NC)시키는 것을 확인하였으며, HBU651을 처리한 HBU10 및 HBU30의 경우 HFD 대조군에 비해 EWAT 및 간의 무게를 유의하게 감소($P < 0.05$)시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0156] 이러한 결과를 통해 HBU651이 칼로리 섭취에는 영향을 미치지 않으면서도 HFD로 인한 신체, 부고환 지방 및 간에서의 체중 증가를 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0158] **실시예 5: 포도당 대사 및 인슐린 저항성 분석**

[0159] 인슐린 저항성은 대사 질환과 관련된 만성 말초염증에 의해 유발되는 병리생리학적 상태로, 고혈당증, 고인슐린혈증, 이상지질혈증, 내장지방증가, 간지방증의 증상을 보이는 것으로 알려져 있다. 인슐린은 필수 인슐린 민감 조직, 골격근, 간 및 지방 조직에서 지방 분해를 억제하고 포도당 흡수를 촉진한다. 그러나, 비만 상태에서는 손상된 인슐린 민감성이 지방 분해를 활성화하고, 순환하는 유리 지방산(FFA)의 농도를 증가시킨다. 증가된 FFA는 근육 세포에 의한 포도당 흡수를 억제하고 간의 포도당 생산을 증가시켜 근육과 간 조직 모두에서 이소성 지질 축적을 유도한다. 인슐린 반응 조절에 관련이 있는 단백질 중 하나가 AhR이라는 점에 착안하여, HBU651 화합물이 인슐린 변화에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험을 실시하였다.

[0160] 도 3의 (H) 및 (G)를 참고하면, HFD 그룹의 공복 혈당과 공복 인슐린 수치가 NC 그룹에 비해 현저하게 상승($p < 0.001$)한 것을 확인할 수 있었다. 또한, HBU30를 투여한 군에서는 공복 인슐린이 상당히 개선(2.26 ± 0.13 vs. 3.09 ± 0.23 ng/dL, $p < 0.05$, 도 3의 (H) 참조)되는 것을 확인할 수 있었으나, HFD 대조군과 비교하여 공복 혈당은 개선되지 않았다(도 3의 (G) 참조).

[0161] 또한, 인슐린 저항성에 대한 항상성 모델 평가(HOMAIR)와 경구 포도당 내성 검사(OGTT)를 사용하여 인슐린 저항성을 평가하여 그 결과를 도 3의 (I) 내지 (K)에 개시하였다. 도 3의 (I) 내지 (K)에 개시한 바와 같이, HBU30의 처리는 HFD 대조군과 비교하여 HOMA-IR 및 OGTT를 상당히 완화($p < 0.05$)시키는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 도 3의 (J)에 개시한 바와 같이, OGTT에서 모든 시점의 포도당 수치는 NC 그룹보다 HFD 그룹에서 더 높았는데, 포도당 부하 후, 30, 60, 90, 120 및 180분에서의 HBU10 및 HBU30 그룹의 포도당 수준이 HFD 대조군에 비해 유의미하게 감소($p < 0.01$)하는 것을 확인할 수 있었다.

[0162] 도 3의 (K)에 개시한 바와 같이, HFD 대조군의 AUC(Area Under the Curve)는 NC 군보다 유의하게 높아졌지만, HBU10 및 HBU30은 HFD 대조군에 비해 AUC가 유의하게 감소($p < 0.01$)하는 것을 확인할 수 있었다.

[0164] **실시예 6: 지질 및 생화학적 매개변수 분석**

[0165] 비만은 혈중 지질과 생화학적 매개변수에 영향을 미치므로, 혈액 내 지질 프로필과 간 및 신장 생화학 매개변수를 조사하여 그 결과를 도 4에 개시하였다.

[0166] 도 4의 (A) 내지 (F)에 개시한 바와 같이, HFD는 모든 혈중 지질 프로필을 악화시켰지만, HBU651은 HDL-콜레스테롤(HDL-C, $p < 0.05$, 도 4의 (C) 참조), 유리 지방산(FFA, $p < 0.05$, 도 4의 (D) 참조), 인지질 수준(PL, $p < 0.05$, 도 4의 (E) 참조) 및 트리글리세리드(TG, $p < 0.05$, 도 4의 (F) 참조)의 프로필을 효과적으로 개선하는 것을 확인할 수 있었다.

[0167] 또한, 도 4의 (G) 내지 (I)에 개시한 바와 같이, 간 및 신장 독성에 대한 혈청 간 또는 신장 손상 마커를 측정하였는데, HBU651의 투여는 HFD 급여로 인해 증가된 aspartate aminotransferase(AST, $p < 0.05$, 도 4의 (G) 참조) 및 alanine aminotransferase(ALT, $p < 0.01$, 도 4의 (H) 참조)를 회복시키는 것을 확인할 수 있었다. 반면, HBU651은 혈청 크레아티닌 수치의 HFD-매개 증가분은 변화시키지 않았다(도 4의 (I) 참조). 이러한 결과를 통해, HBU651 투여가 간 및 신장에 어떠한 부작용도 유발하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0169] **실시예 7: 혈청 염증성 사이토카인 및 케모카인 분석**

[0170] 전-염증성 사이토카인 및 케모카인은 비만으로부터 유발된 말초 및 중추 염증과 밀접한 관련이 있기에, 이를 확인하기 위한 실험을 실시하였으며 그 결과를 도 4의 (J) 및 (K)에 개시하였다.

[0171] 도 (J) 및 (K)에 개시한 바와 같이, ELISA를 이용하여 혈청 TNF-α와 MCP-1 수치를 측정한 결과, HFD는 혈청 TNF-α 수치를 4.2배($p < 0.001$), MCP-1을 1.6배($p < 0.001$) 증가시키는 것을 확인할 수 있었으나, HBU30은 HFD로 유도된 TNF-α 수준을 HFD 대조군 대비 약 48%까지 감소($p<0.05$, 도 4의 (J) 참조)시켰으며, MCP-1을 NC 그룹 수준으로 감소(도 4의 (K) 참조)시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0173] **실시예 8: 염증성 단핵구 및 지방 조직 대식세포(ATM) 분석**

[0174] 유동혈구분석(flow cytometry) 및 유동 보조 세포 분류(flow-assisted cell sorting) 기술은 혈액 또는 조직에서 단핵구 및 대식세포의 면역 표현형 분석, 정량화 및 정제를 가능하게 한다. 단핵구는 염증성 사이토카인 및 케모카인을 분비하며 말초 혈액 단핵구는 Ly6c의 발현에 따라 두 집단($Ly6c^{low}$ and $Ly6c^{high}$ 단핵구)으로 하위 분류되는데, 염증 상태일 때 $Ly6c^{high}$ 단핵구는 국소 사이토카인 환경에서 M1 염증 유발 대식세포로 분화한다. 이를 근거로 하여, 말초 혈액에서 $CD45^{+}/CD11b^{+}$ 단핵구의 Ly6c 아형의 집단을 분석하였으며, 그 결과를 도 5에 개시하였다.

[0175] 도 5에 개시한 바와 같이, HFD는 $Ly6c^{low}$ 단핵구를 감소(도 5의 (A) 및 (C) 참조)시켰으며, $Ly6c^{high}$ 단핵구의 비율은 증가($p < 0.001$, 도 5의 (B) 및 (D) 참조)시켰다. HBU651의 처리는 $Ly6c^{high}$ 단핵구의 수준은 NC 수준으로 감소($p < 0.01$, 도 5의 (D) 참조)시켰지만, $Ly6c^{low}$ 단핵구의 수준은 크게 변화시키지 않았다(도 5의 (C) 참조).

[0176] 지방 조직 대식세포(ATM)는 분비된 염증성 사이토카인의 주요 공급원으로, 유동 혈구 계측법을 사용하여 ATM 및 해당 하위 유형의 개체수를 정량화하여 그 결과를 도 5에 개시하엿다. 도 5의 (E) 및 (G)에 개시한 바와 같이, 총 ATM의 비율은 HFD 대조군에서 크게 증가($p < 0.001$)하였으나, HBU651 처리군에서의 총 ATM의 비율은 HFD 대조군보다 현저히 감소($p < 0.05$, 도 5의 (G) 참조)한 것을 확인할 수 있었다. 이와 유사하게, 도 5의 (F) 및 (H)에 개시한 바와 같이, HFD는 $CD11b^{+}/Ly6c^{high}$ 단핵구와는 별개로, TNF-α 및 MCP-1을 분비하는 $F4/80^{+}/CD11c^{+}$ 전염증성 1형 대식세포(M1)의 비율을 증가($p < 0.001$)시키는 것을 확인할 수 있었고, HBU651을 처리함으로써 $F4/80^{+}/CD11c^{+}$ M1 ATM의 비율이 감소($p < 0.05$, 도 5의 (H) 참조)하는 것을 확인할 수 있었다.

[0178] **실시예 9: 간 지방 및 사이토카인 mRNA 분석**

[0179] 간 지방 침착은 인슐린 저항성을 초래하여 순환하는 염증성 사이토카인 수치를 증가시킨다. 이를 근거로 하여, HFD 마우스의 간에서의 지방 축적 정도를 H&E 염색된 간에서의 간 지질방울(lipid droplet, LD)의 면적을 측정하여 분석하였으며, 이를 도 6에 개시하였다.

[0180] 도 6의 (A) 및 (B)를 참고하면, HFD는 간 LD의 면적을 상당히 증가($p < 0.001$, 도 6의 (B) 참조)시켰으며, HBU651의 처리는 LD의 수 및 크기와 관련하여, 간으로의 지방 축적을 현저히 억제($p < 0.001$, 도 6의 (A) 및 (B) 참조)하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 연구 그룹의 간 무게와도 관련이 있다.

[0181] 간 조직 확장에서의 과도한 지방 침착이 대식세포 집결의 주요 원인이라는 점에 착안하여, HBU651을 처리한 간에서의 대식세포 침윤을 면역조직화학적 염색을 사용하여 분석하였음며, 그 결과를 도 6에 개시하였다. 도 6의 (A)에 개시한 바와 같이, 간 F4/80 양성세포(빨간색)는 NC와 비교하여 HFD 대조군에서 증가하였고, HBU651 처리에 의해 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 결과는 F4/80의 mRNA 수준에 대한 결과($p < 0.05$, 도 6의 (C) 참조)와도 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

[0183] **실시예 10: 지방 조직의 축적 및 대식세포의 침윤 분석**

[0184] 도 7에 개시한 바와 같이, HFD 그룹의 지방 세포 크기는 NC 그룹의 크기보다 현저히 컸지만, HBU651의 처리는

지방 세포 크기를 감소($p < 0.001$, 도 7의 (B) 참조)시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0185] 또한, 도 7의 (A)에 개시한 바와 같이, F4/80에 대한 부고환 백색 지방 조직(EWAT)의 면역조직화학 염색 결과 NC 그룹보다 HFD 대조군에서 대식세포의 증가율이 보다 큰 것을 확인할 수 있었는데, HBU651의 처리는 이러한 F4/80 양성 세포를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0186] 도 7의 (A)에 개시한 바와 같이, EWAT의 유전자 발현에 있어서, HFD는 F4/80 mRNA를 9.8배($p < 0.001$), TNF-α mRNA를 6.6배($p < 0.001$), IL-1β mRNA를 3.9배($p < 0.01$), IL-6 mRNA는 4.3배($p<0.05$), MCP-1 mRNA는 18.1배($p<0.001$) 증가시키는 것을 확인할 수 있었는데, HBU651의 투여는 EWAT에서 F4/80($p < 0.01$), TNF-α($p < 0.05$), L-1β($p < 0.05$) 및 MCP-1($p < 0.05$)의 mRNA 수준을 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0188] **실시예 11: 시상하부의 신경염증 분석**

[0189] HFD에 의해 유발된 말초 간 및 지방 조직의 염증성 면역 세포 및 사이토카인은 BBB를 통과하여 해마 및 시상 하부와 같은 뇌 영역에 신경 염증을 유발할 수 있다. 중기저 시상 하부의 아치형 핵(arcuate nuleus, ARC)의 염증은 비만이 발생하기 전에 빠르게 발생하며, 시상하부 염증은 식이 유발 비만 및 인슐린 저항성을 담당하는 ARC 뉴런의 변화를 일으킬 수 있다. HBU651 처리가 시상 하부 염증을 조절하는지 그 여부를 확인하기 위하여 뇌 관상 부분의 면역 조직 화학 염색을 사용하여 HFD로 유도된 미세아교세포 및 성상 세포의 활성화를 분석하여 그 결과를 도 8에 개시하였다.

[0190] 도 8에 개시한 바와 같이, HFD는 시상 하부의 ARC(삽입된 상자)에서 GFAP 표지 성상세포(도 8의 (A) 참조) 및 Iba-1 표지 미세아교세포(도 8의 (B) 참조)의 활성화를 유도하였다. HFD는 ARC에서 미세아교세포의 축적을 일으켰고, Iba-1 또는 GFAP로 표지된 미세아교세포는 확대된 소마 크기와 아메바형 모양을 가진 활성화된 세포의 전형적인 형태를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. HBU651의 처리는 이와 같이 활성화된 GFAP-양성 성상세포(도 8의 (A) 및 (C) 참조) 및 활성화된 Iba1-양성 소교세포(도 8의 (B) 및 (D) 참조)의 수를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0192] 결과적으로, 이와 같은 실험 결과를 통해, HFD가 체중 증가, 부고환 지방 및 간, 포도당 불내성(도 3 참조), 이상지질혈증, 간 효소 상승(도 4 참조), 간(도 6 참조) 및 지방 조직(도 7 참조)의 지방 축적과 같은 대사 질환을 유발하는 것을 확인할 수 있었다.

[0194] 또한, 영양 과잉으로 인한 지방 세포 비대는 저산소 손상을 일으키고, MCP-1을 분비하여 다양한 조직으로 $Ly6c^{high}$ 단핵구의 침윤을 자극하고, $Ly6c^{high}$ 단핵구는 M1 염증성 대식세포로 분화할 가능성이 더 높아진다. 대식세포는 종종 고전적으로 활성화된 대식세포 M1과 대안적으로 활성화된 대식세포 M2로 분류되는데, M1 대식세포는 높은 수준의 전염증성 사이토카인 및 ROS 생성한다. 새로 모집된 염증성 대식세포는 TNF-α, IL-1, IL-6과 같은 여러 염증성 사이토카인을 방출하여 지방 조직, 간 및 골격근을 포함한 말초 조직에서 인슐린 저항성을 유발하고, 염증 분자의 전사는 마스터 염증 전사 인자 $NF-_kB$ 의존 경로를 통해 활성화된다. 따라서, 일단 이러한 대식세포가 활성화되고 증가하면 대식세포 모집 및 염증성 사이토카인 생성을 포함한 악순환으로 발전하여 결과적으로는 만성 말초 염증이 유발된다.

[0195] 상기 실험 결과를 통해서도 알 수 있듯이, BV2 미세아교세포에서 HBU651로 인한 AhR 불활성화로 인해 LPS로 유도된 $NF-_kB$ 활성과 전염증성 사이토카인 및 ROS 생성을 억제(도 1 참조)되었다. 또한, 비만 마우스의 혈액, 지방 조직 및 간에서 HBU651은 $Ly6c^{high}$ 단핵구, 대식세포, TNF-α 및 MCP-1을 감소시켰다(도 5 참조). 따라서, HBU651에 의한 $NF-_kB$ 경로의 차단은 인슐린 저항성, 포도당 불내성 및 이상지질혈증을 개선하기 위한 초기 근본적인 기본 메커니즘이 될 수 있음을 확인하였다.

[0197] 뿐만 아니라, 뇌 역시 비만에 의해 부정적인 영향을 받을 수 있는데, 예를 들어, 측두엽과 전두엽의 회백질 부피는 체질량 지수와 음의 상관관계가 있다. 순환하는 염증성 사이토카인과 말초 조직에서 방출된 면역 세포는 BBB를 통과하여 중/저기저 시상하부(mediobasal hypothalamus)의 ARC에서 수용체에 결합하여 시상 하부 염증을

일으킬 수 있다. 또한, 말초 염증은 소교 세포와 성상 세포를 활성화하여 BBB 파괴에 기여한다. 미세아교세포, 특히 M1 미세아교세포는 TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 및 MCP-1의 분비를 통해 BBB 기능 장애 및 혈관 누출에 기여할 수 있다. 성상세포는 또한 염증 상태에서 말초 면역 세포 침윤을 촉진할 뿐만 아니라 전염증 매개체와 산화 스트레스를 생성하여 BBB 투과성에 영향을 미친다. 시상하부는 영양 공급과 신진 대사에 직/간접적으로 책임이 있으며, 시상 하부의 병리학적 염증은 비만 및 그 합병증의 발생 및 진행과도 관련이 있다. 또한, 이러한 기능 중 많은 부분이 인지의 주의, 학습 및 기억 측면과 상호 연관되어 있기 때문에, 시상하부 염증의 약리학적 또는 유전적 억제는 음식 섭취 감소, 인슐린 감수성 증가 및 말초 염증을 유발할 수 있다.

[0198] 상기 실험 결과를 통해 알 수 있듯이, HBU651은 LPS로 자극된 BV2미세아교세포에서 AhR의 활성을 감시소킴으로써, $NF-_kB$ 활성화를 억제하고, TNF-α, IL-1, IL-6 및 ROS의 생성을 억제하였다. 또한, HBU651은 미토콘드리아 기능 장애와 ATP 생산을 회복시켰다. HBU651의 투여는 시상하부의 ARC에서 활성화된 미세아교세포와 성상세포의 수 및 혈액, 간, 지방 조직의 모든 염증성 표현형을 정상화시켰다. 시험관 내 및 생체 내 실험 결과를 종합했을 때, HBU651의 AhR 길항작용은 대식세포, 미세아교세포 및 성상세포의 활성화를 차단함으로써, 간 지방증 및/또는 신경염증을 포함한 만성 염증성 질환 및 말초 염증완화시켰다. 뿐만 아니라, HBU651은 시상하부의 식욕에 대한 신경펩티드를 조절함으로써, 섭식 및 에너지 대사를 조절하여 결과적으로 비만 및 신경퇴행성 질환을 포함한 합병증 개선하였다.

[0200] **실시예 12: HBU651 화합물의 항SARS-CoV2 RNA 바이러스 효과**

[0201] 상기 Calu-3 사람 폐 상피세포에 100pM의 2,3,7,8-테트라클로로디벤조-p-다이옥신(TCDD)으로 24시간 자극한 후에, 10μM HBU651(HBU) 또는 1μM CH223191(CH)로 24시간 동안 후처리 한 다음, 분석을 위해 수확하여, CYP1A1, ACE2, TMPRSS2, IL-1β 및 IL-6 mRNA 수준에 대한 실시간 qRT-PCR 분석을 실시하였으며, 그 결과를 도 9에 개시하였다.

[0202] 도 9의 (A)를 참고하면, 상기 HBU651은 100pM의 TCDD로 2.4배 정도 증가한 CYP1A1 mRNA를 대조군(CTL)보다도 약 40% 감소한 수준으로 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

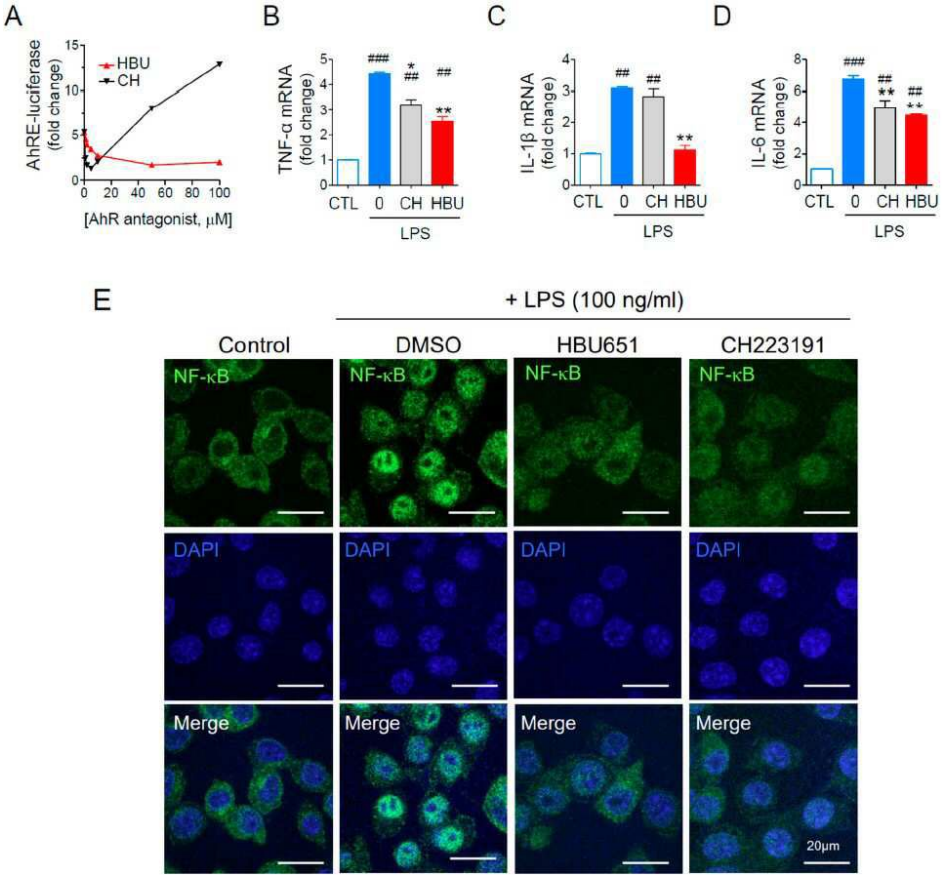
[0203] SARS-CoV 2 RNA 바이러스가 사람 폐 세포에 침투할 때 필요한 수용체 ACE2와 바이러스 스파이크 단백질 분해 효소인 TMPRSS2의 mRNA수준에 대한 실시간 qRT-PCR분석을 실시하였으며, 그 결과를 그 결과를 도 9의 (B)에 개시하였다. 도 9의 (B)의 결과를 참고하면, 100pM TCDD의 처리는 Calu-3 세포에서 ACE2와 TMPRSS2 mRNA 수준 각각을 1.5배, 2.1배 증가시켰는데, HBU651 처리를 처리하면 이러한 수준이 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 또한, HBU651은 종래의 AhR 길항제인 CH223191보다 ACE2와 TMPRSS2 를 보다 효과적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0204] 한편, 동일한 조건에서 IL-6 및 IL-1β과 같은 주요 전염증성 사이토카인의 mRNA 수준을 분석하여 Calu-3 세포에서 TCDD로 유도된 염증반응에 대한 HBU651의 효과를 qRT-PCR 분석을 통해 평가하였으며, 그 결과를 도 9의 (C)에 개시하였다.

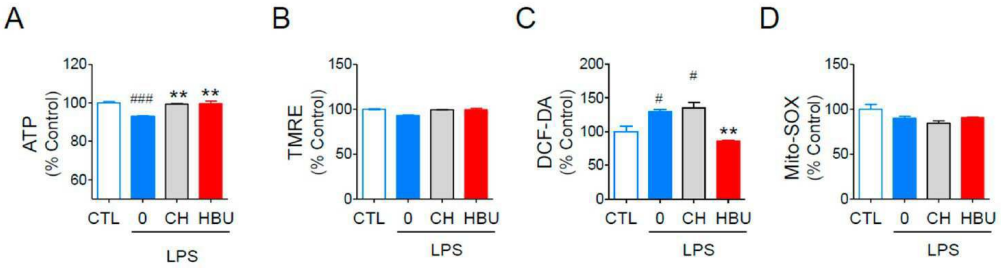
[0205] 도 9의 (C)를 참고하면, TCDD 자극(100 pM)은 Calu-3 세포에서 상기 사이토카인 mRNA 수준을 각각 2.3배 증가시켰는데, HBU651 처리를 처리하면 이러한 수준이 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 또한, HBU651은 종래의 AhR 길항제인 CH223191보다 사이토카인을 보다 효과적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

도면

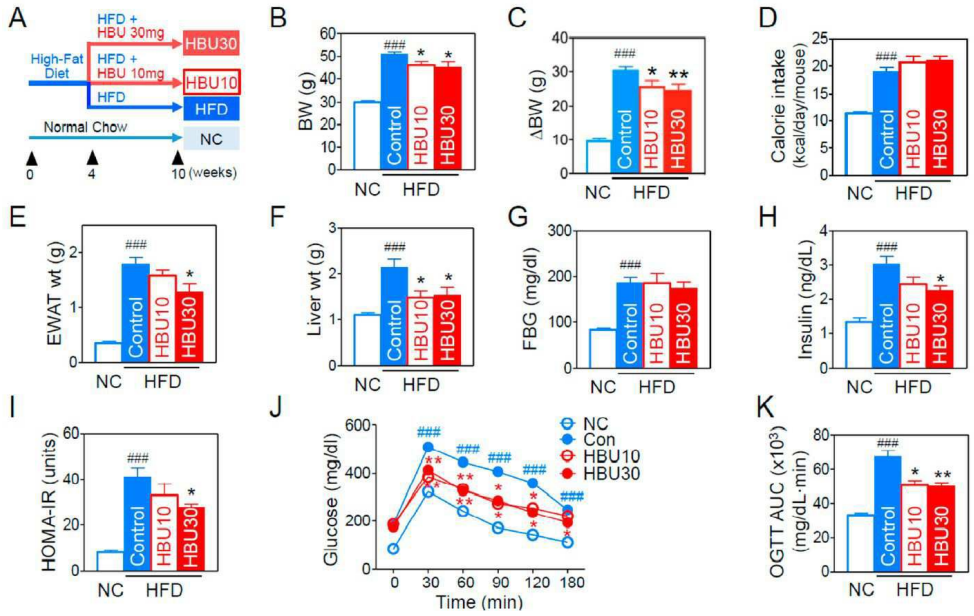
도면1


A
B
C
D
AhRE-luciferase (fold change)
HBU
CH
[AhR antagonist, μM]
TNF-α mRNA (fold change)
IL-1β mRNA (fold change)
IL-6 mRNA (fold change)
CTL
0
CH
HBU
LPS
E
+ LPS (100 ng/ml)
Control
DMSO
HBU651
CH223191
NF-κB
DAPI
Merge
20μm

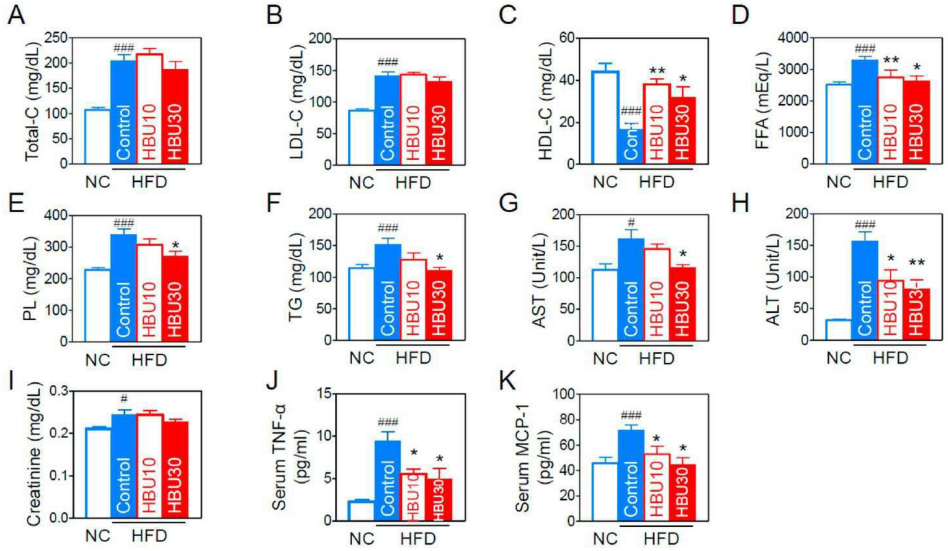
도면2


A
B
C
D
ATP (% Control)
TMRE (% Control)
DCF-DA (% Control)
Mito-SOX (% Control)
CTL
0
CH
HBU
LPS

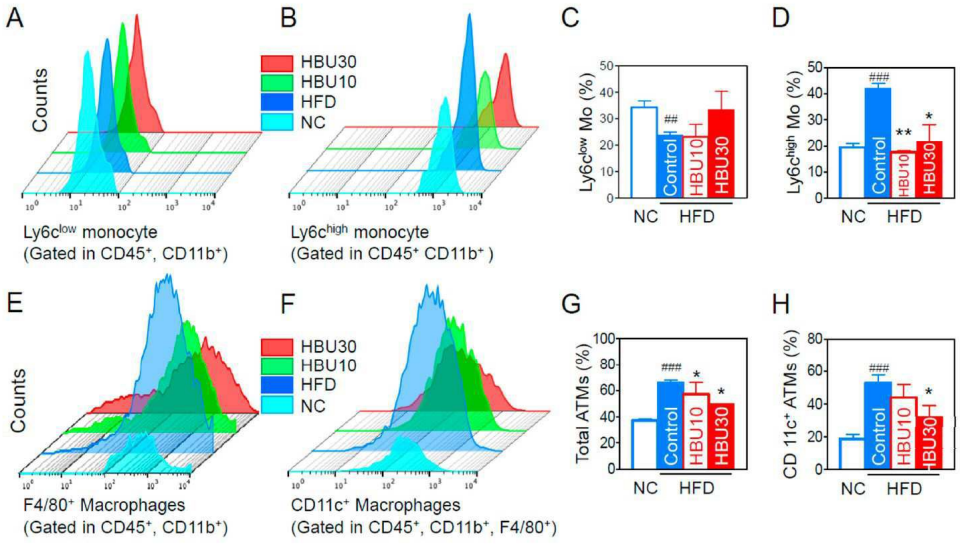
도면3


A
HFD + HBU 30mg
HBU30
High-Fat Diet
HFD + HBU 10mg
HBU10
HFD
HFD
Normal Chow
NC
NC
0
4
10 (weeks)
B
BW (g)
C
ΔBW (g)
D
Calorie intake (kcal/day/mouse)
E
EWAT wt (g)
F
Liver wt (g)
G
FBG (mg/dl)
H
Insulin (ng/dL)
I
HOMA-IR (units)
J
Glucose (mg/dl)
Time (min)
NC
Con
HBU10
HBU30
K
OGTT AUC (x10³) (mg/dL·min)
Control
HBU10
HBU30
NC
HFD

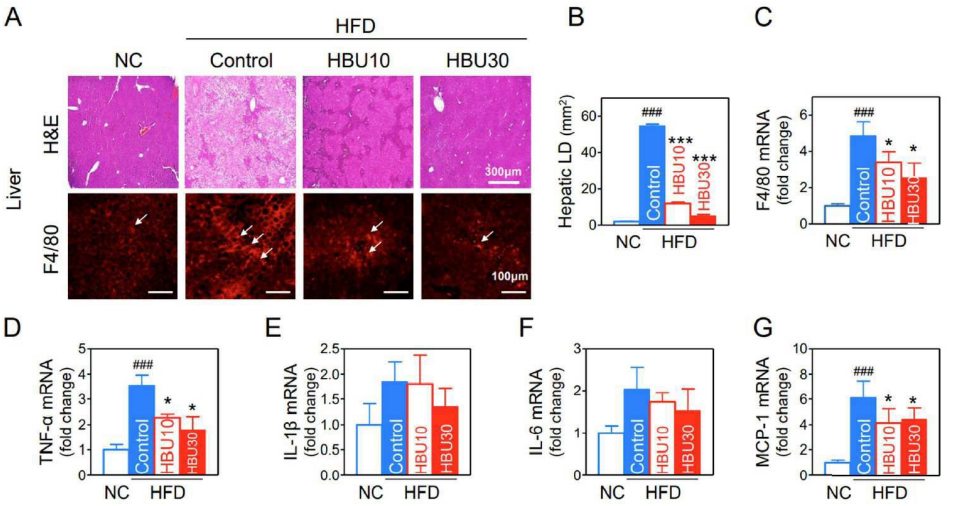
도면4


A
Total-C (mg/dL)
B
LDL-C (mg/dL)
C
HDL-C (mg/dL)
D
FFA (mEq/L)
E
PL (mg/dL)
F
TG (mg/dL)
G
AST (Unit/L)
H
ALT (Unit/L)
I
Creatinine (mg/dL)
J
Serum TNF-α (pg/ml)
K
Serum MCP-1 (pg/ml)
Control
HBU10
HBU30
NC
HFD

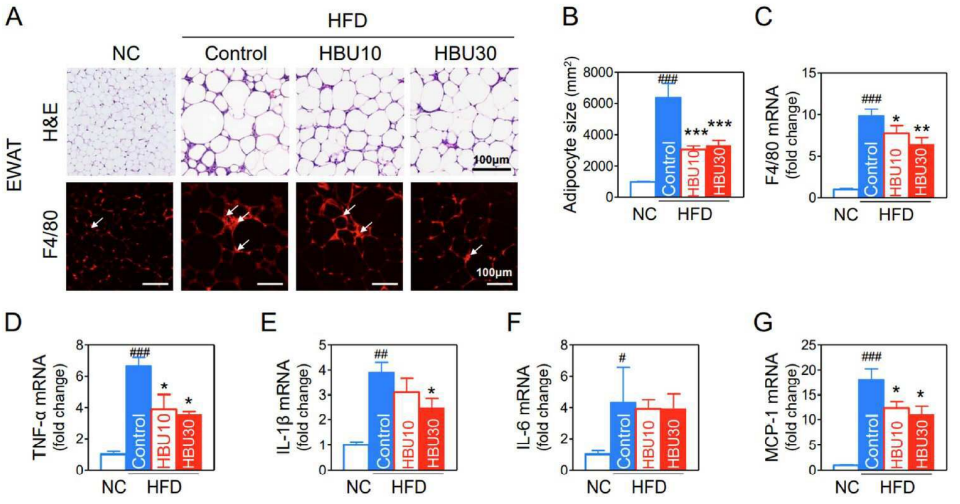
도면5


A
B
C
D
Counts
HBU30
HBU10
HFD
NC
Ly6c^low monocyte
(Gated in CD45+, CD11b+)
Ly6c^high monocyte
(Gated in CD45+ CD11b+)
Ly6c^low Mo (%)
Ly6c^high Mo (%)
Control
HBU10
HBU30
NC
HFD
E
F
G
H
F4/80+ Macrophages
(Gated in CD45+, CD11b+)
CD11c+ Macrophages
(Gated in CD45+, CD11b+, F4/80+)
Total ATMs (%)
CD 11c+ ATMs (%)

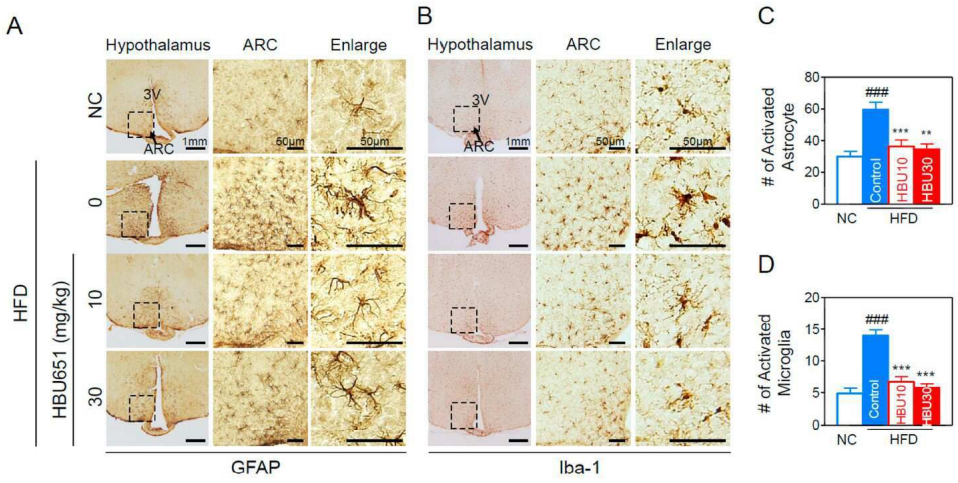
도면6


A
HFD
NC
Control
HBU10
HBU30
Liver
H&E
F4/80
300μm
100μm
B
Hepatic LD (mm²)
C
F4/80 mRNA (fold change)
D
TNF-α mRNA (fold change)
E
IL-1β mRNA (fold change)
F
IL-6 mRNA (fold change)
G
MCP-1 mRNA (fold change)

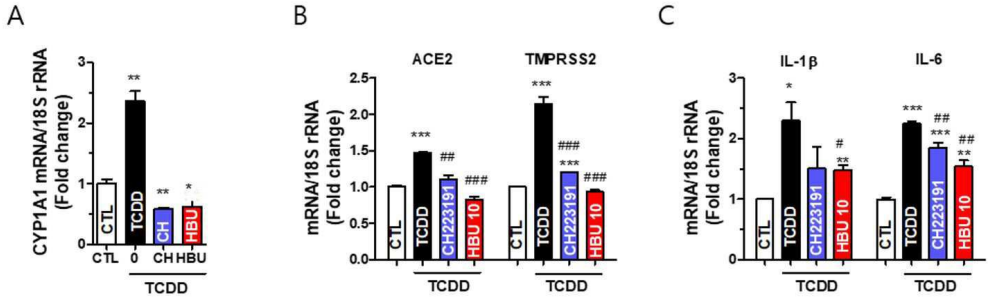
도면7


A
HFD
NC
Control
HBU10
HBU30
EWAT
H&E
F4/80
100μm
B
Adipocyte size (mm²)
C
F4/80 mRNA (fold change)
D
TNF-α mRNA (fold change)
E
IL-1β mRNA (fold change)
F
IL-6 mRNA (fold change)
G
MCP-1 mRNA (fold change)

도면8


A
Hypothalamus
ARC
Enlarge
NC
HFD
HBU651 (mg/kg)
0
10
30
3V
ARC
1mm
50μm
GFAP
B
Hypothalamus
ARC
Enlarge
Iba-1
C
# of Activated Astrocyte
Control
HBU10
HBU30
NC
HFD
D
# of Activated Microglia
Control
HBU10
HBU30
NC
HFD

도면9


A
CYP1A1 mRNA/18S rRNA (Fold change)
CTL
TCDD
CH
HBU
TCDD
B
ACE2
TMPRSS2
mRNA/18S rRNA (Fold change)
CTL
TCDD
CH223191
HBU 10
TCDD
C
IL-1β
IL-6
mRNA/18S rRNA (Fold change)
CTL
TCDD
CH223191
HBU 10
TCDD