

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0104109
(43) 공개일자 2025년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/575 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61K 47/69 (2017.01) A61P 11/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01) A61P 37/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/575 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0196160

(22) 출원일자 2023년12월29일

심사청구일자 2023년12월29일

(71) 출원인

(주)카보엑스퍼트

대전광역시 유성구 대학로 99, 산학연교육연구관
705호 (궁동, 충남대학교)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

충남대학교병원

대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)

(72) 발명자

이창규

대전광역시 유성구 대학로 99 산학연교육연구관
705호

김용민

대전광역시 유성구 용산2로 39

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인더웨이브

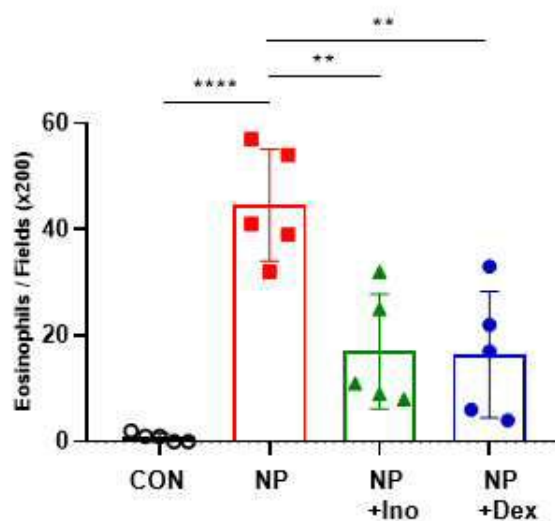
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 이노토디올 또는 이의 전구약물을 포함하는 호산구 증가증 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

이노토디올 또는 이의 전구약물을 포함하는 호산구 증가증 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 일 양상에 따른 이노토디올 또는 이의 전구약물을 포함하는 조성물은 호산구 특이적으로 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과를 나타내어 호산구 증가증 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

대표도 - 도11c



(52) CPC특허분류

A61K 47/6951 (2017.08)

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 37/08 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/314 (2013.01)

(72) 발명자

최미라

대전광역시 중구 삼성로 108-23, 301동 803호

박중태

대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 603동 1102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425173685

과제번호 S3291899

부처명 중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 중소기업기술혁신개발

연구과제명 천식 치료제 신약 후보물질 CE9A215의 특성 향상을 위한 전구약물(prodrug)의 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 (주)카보엑스퍼트

연구기간 2022.07.01 ~ 2024.06.30

명세서

청구범위

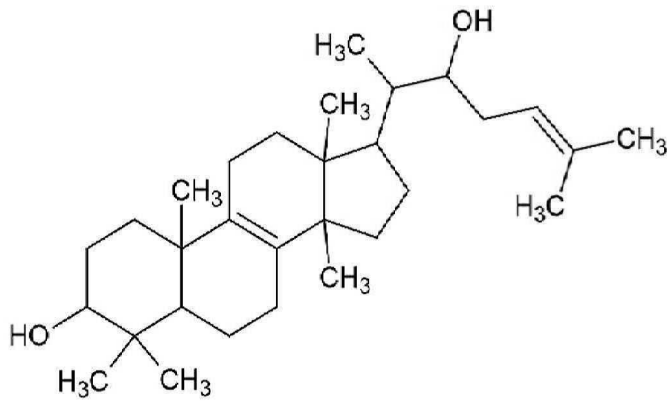
청구항 1

이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 전구약물은 하기 화학식 1의 이노토디올 화합물의 하이드록실기와 지방산, 글루쿠론산 알킬 무수 숙신산, 또는 페놀산의 카르복실기가 에스테르 축합반응을 통해 형성된 이노토디올 에스테르 유도체 화합물인 것인, 약학적 조성물:

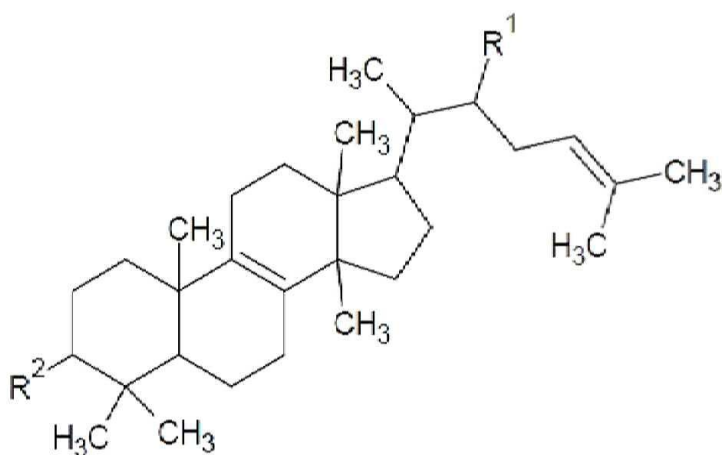
[화학식 1]



청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 이노토디올 에스테르 유도체 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 것인 약학적 조성물:

[화학식 2]



상기 식에서 R1 및 R2는 서로 독립적으로, OH, 또는 -OC(O)-R3이고, R3는 1 내지 30개의 탄소수를 가진 직선형 또는 분지형 알킬, 알켄일 또는 알킨일 사슬이며,

R1 및 R2 중 적어도 하나는 -OC(O)-R3이다.

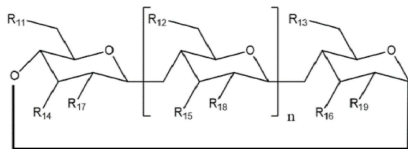
청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 R3는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a-$, 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b(\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2))_c(\text{CH}_2)_d-$ 를 갖는 비치환된 직선형 알킬 또는 알켄일 사슬이되, a는 8 내지 24의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고, c는 1 내지 6의 정수이고, d는 3 내지 7의 정수인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 하기 화학식 3로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체를 더 포함하는 것인, 약학적 조성물:

[화학식 3]



상기 화학식 3에서 n은 4, 5 또는 6이고, R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₇, R₁₈ 및 R₁₉는 독립적으로 -OH, C₁ 내지 C₄의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C₁ 내지 C₄의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

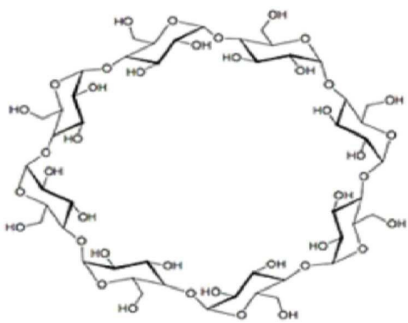
청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 상기 화학식 3으로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체의 내부에 포접되어 있는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 화학식 3로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체는 하기 화학식 4의 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin)인 것인, 약학적 조성물.

[화학식 4]



청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 이노토디올 또는 그의 전구약물은 호산구(Eosinophil) 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 호산구 증가증(Eosinophilia)은 호산구성 심근염(eosinophilic cardiomyopathy), 호산구성 폐렴(Eosinophilic Pneumonia, EP), 특발성 만성 호산구성 폐렴(Idiopathic Chronic Eosinophilic Pneumonia, ICEP), 특발성 급성 호산구성 폐렴(Idiopathic Acute Eosinophilic Pneumonia, IAEP), 호산구성 기관지염(eosinophilic bronchitis), 호산구성 식도염(eosinophilic esophagitis), 호산구성 위장염(eosinophilic gastroenteritis), 호산구성 위염(eosinophilic gastritis), 호산구성 대장염(eosinophilic colitis), 호산구성 장염(eosinophilic enteritis), 호산구성 근막염(eosinophilic fasciitis), 특발성 근염(idiopathic myositis), 만성 호산구성 백혈병(chronic eosinophilic leukemia, CEL), 과호산구성증후군(hypereosinophilic syndrome, HES), 특발성 과다호산구 증후군(Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome,

IHES), 척스트라우스증후군 (Churg-Strauss syndrome), Löffler씨 증후군(Löffler's Syndrome, Simple Pulmonary Eosinophilia), 폐흡충증(Paragonimiasis), 독소-기름 증후군(Toxic-oil Syndrome) 및 호산구-근육통 증후군(Eosinophilia-myalgia Syndrome)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 호산구성 염증 질환은 비강, 비부비동 또는 기관지 내 유발된 염증 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 호산구성 염증 질환은 알레르기성 기관지폐선균증(allergic bronchopulmonary aspergillosis), 호산구성 약물 알레르기(drug allergy) 및 호산구성 천식(eosinophilic asthma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여되는 것으로, 상기 비경구 투여는 비강 내 흡입, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 및 흉부내 주사 주입방식으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 이노토디올 또는 이의 전구약물을 포함하는 호산구 증가증 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 호산구 매개 질환인 호산구 증가증 또는 호산구성 염증질환은 병변 내에 호산구가 다수 발견되거나, 병의 발생에 호산구가 중요한 병태·생리적 역할을 할 것으로 추정되는 특징을 갖는 질환군이다.

[0003] 다양한 원인에 의하여 호산구 증가증 또는 호산구성 염증질환이 발생할 수 있으며, 염증의 발생부위에 따라 질병의 양상이 달라지기도 한다. 예를 들어 대표적인 호산구 증가증(Eosinophilia)인 호산구성 폐렴(Eosinophilic Pneumonia, EP)은 폐실질부에 다수의 호산구의 침윤을 볼 수 있는 것에 비해, 알레르기성 기관지폐선균증(allergic bronchopulmonary aspergillosis)은 기도 내에 국한하여 발생되기도 한다(문헌 [Hanyang Med Rev 2013;33:65-74]).

[0004] 또한, 호산구는 천식과 같은 유병률이 높은 질환과 희귀 질환의 병태·생리에 직·간접적으로 관련되어 있고, 만성적 중증 염증을 동반하는 난치성 질환의 병태·생리 과정에서 중요한 역할을 수행한다. 구체적으로, 호산구는 알레르기성 질병, 예컨대 만성 기관지 천식 및 아토피성 피부염에 이병률(morbidity)을 발생시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(문헌 [Adv.Immunol., 39, 177(1986), Immunol. Today, 13, 501(1992)]), 호산구 증가증으로 일반적으로 칭해지는 질병들, 예컨대, 과호산구성 증후군(HES), 호산구성 위장관염, 호산구성 백혈병, 호산구성 육이종 및 기무라병에 연관되어 있는 것으로 알려져 있다(문헌 [Ann. Intern. Med. 97, 78(1982)]).

[0005] 호산구의 부산물이 표피에 손상을 주거나, 기관지 협착증, 천식환자의 기도에 부종과 점액전과 같은 조직독성을 나타낼 수 있기 때문에 과도하게 존재 및 활성화된 호산구를 효과적으로 제어하는 것은 호산구 매개 질환을 치료하는 데 있어 매우 중요하다. [Simon HU, Blaser K, 1995, Immun. Today 16, 53-55; Haslett C, 1997, British Med.Bull. 53, 669-683].

[0006] 호산구를 제거하는 치료제로서 글루코코르티코이드(glucocorticoid)나 테오필린(theophiline)등이 알려져 있으

나, 이들은 장기간 복용시 체내 대사 이상이나 백내장 등 여러 스테로이드성 부작용을 나타내는 단점이 있다.

[0007] 또한, 호산구의 분화 또는 증식에 관여하는 사이토카인 또는 케모카인에 대해 억제 활성을 가지는 물질을 호산구 기능억제 작용제로서 사용되어 왔으나, 이들은 활성화되어 염증 부위로 침투된 사이토카인 비의존성 호산구에 대해서는 작용하지 않는다는 문제점이 있다.

[0008] 이에 호산구 특이적 억제 및 활성화된 호산구의 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 안전하고 유효한 호산구 매개 질병 치료제 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이의 허용가능한 염을 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 다른 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료용 흡입제 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 이노토디올, 이의 전구약물, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 양상은 이노토디올, 이의 전구약물, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 그들 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 일 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이의 허용가능한 염을 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 명세서의 용어, "이노토디올(Inotodiol)"은 IUPAC 명칭이 (3S,5R,10S,13R,14R,17R)-17-[(2S,3R)-3-하이드록시-6-메틸헵트-5-엔-2-일]-4,4,10,13,14-펜타메틸-2,3,5,6,7,11,12,15,16,17-데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페나트렌phenanthren-3-올 ((3S,5R,10S,13R,14R,17R)-17-[(2S,3R)-3-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl]-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,11,12,15,16,17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol)이다.

[0017] 상기 이노토디올은 차가버섯(Inonotus obliquus)의 주요 생리 활성성분으로서, 통상적인 방법에 따라 화학적으로 합성할 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수 있으며 또는 차가 버섯 추출물로부터 분리, 정제된 것일 수 있다.

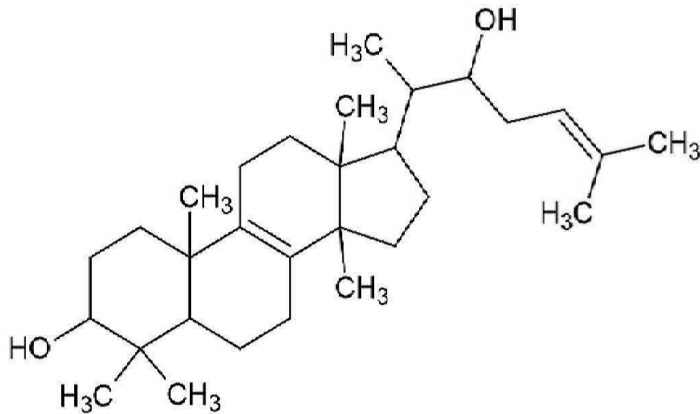
[0018] 본 명세서의 용어 "전구 약물(Prodrug)"은 그 자체로 생물학적 불활성일 수 있지만, 체내에서 그의 체류 시간 동안에 화학적/생화학적 구조변형 후 유효한 약효가 나타나는 약을 의미할 수 있다. 즉, 유용한 약물임에도 불구하고 부작용, 안정성, 용해성, 흡수성, 작용 시간 등에서 적합치 않는 성질을 가지고 있는 것에 화학적 수식을 가하여 임상 사용을 가능하게 한 것이다.

[0019] 본 명세서의 용어, "이노토디올의 전구약물"은 그 자체로 생물학적 불활성일 수 있지만, 체내에서 그의 체류 시간 동안에 화학적/생화학적 구조변형을 거쳐 이노토디올로 변화하는 것을 의미한다.

[0020] 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올의 전구약물은 하기 화학식 1의 이노토디올 화합물의 하이드록실기와 지방산 글루쿠론산(glucuronic acid), 알킬 무수 숙신산 또는 페놀산의 카르복실기가 에스테르 축합반응을 통해 형

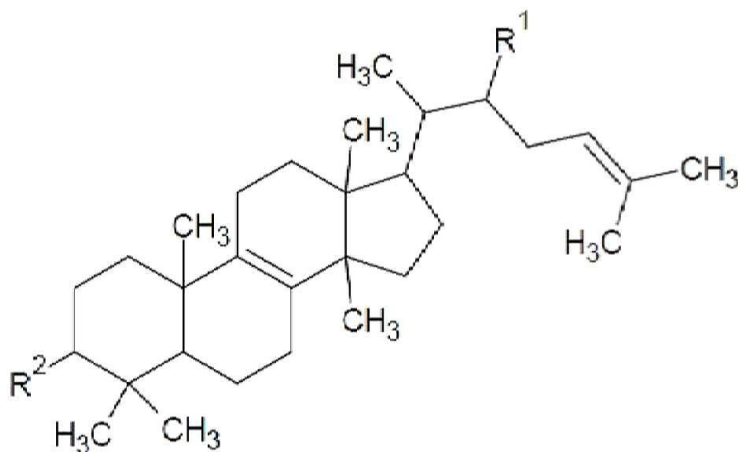
성된 이노토디올 에스테르 유도체 화합물일 수 있다:

[화학식 1]



구체적으로, 상기 전구약물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다:

[화학식 2]



상기 식에서 R1 및 R2는 서로 독립적으로, OH, 또는 -OC(O)-R3이고, R3는 1 내지 30개, 4 내지 30개, 또는 6 내지 30개의 탄소수를 가진 직선형 또는 분지형 알킬, 알켄일 또는 알킨일 사슬이며,

R1 및 R2 중 적어도 하나는 -OC(O)-R3이다.

일 구체예에 있어서, 상기 R3는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a-$, 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b(\text{CH}=\text{CH}[\text{CH}_2])_c(\text{CH}_2)_d-$ 를 갖는 비치환된 직선형 알킬 또는 알켄일 사슬이되, a는 8 내지 24의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고, c는 1 내지 6의 정수이고, d는 3 내지 7의 정수이다.

일 구체예에 따른 이노토디올 유도체는 이노토디올과 지방산의 에스테르 결합을 통해 형성된 화합물로서 유기용매에 대한 용해도가 증가하고 안정성이 향상되었을 뿐만 아니라 소장에서 이노토디올과 지방산으로 쉽게 분해되어 소장에서의 흡수가 용이하다. 예를 들어, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 숙신산의 에스테르 결합을 통해 형성된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이노토디올 유도체는 p-톨루엔술포산 촉매 하에서 알킬 무수 숙신산과 이노토디올과의 축합반응을 행하여 합성할 수 있으며 알킬 무수 숙신산을 이노토디올에 비해 과량으로 투입하여 이노토디올의 모든 또는 적어도 하나의 하이드록시기에 숙신산 에스테르 결합을 유도할 수 있다. 반응 완료 후, p-톨루엔술포산을 탄산수소나트륨으로 중화시켜 제거한다. 상기 방법에 의해 합성된 이노토디올 유도체 화합물은 상기 화학식 2의 R1 및 R2가 모두 또는 적어도 하나가 숙신산 에스테르 결합을 형성하여 수용성이 향상되었을 뿐만 아니라 에스테르 결합이 쉽게 분해되어 소장에서 쉽게 흡수될 수 있다.

또한, 다른 구체예에 따른 이노토디올 유도체는 이노토디올과 지방산의 에스테르 결합을 통해 이노토디올의 수

용성을 증가시킬 뿐만 아니라 소장에서의 가수분해 및 체내 흡수도를 낮춰 이노토디올 유도체가 대장으로 도달할 수 있는 확률을 증가시켜 대장 내 다양한 미생물에 의해 이노토디올 유도체가 분해되면 이노토디올이 직접적인 약리작용을 가능하도록 한다. 예를 들어, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 페놀산의 에스테르 결합을 통해 형성된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이노토디올 유도체는 대장 내에서 에스테르 결합이 가수분해되어 이노토디올과 페놀산을 방출함으로써 이노토디올과 페놀산 각각의 다양한 생리활성을 기대할 수 있다. 따라서, 일 양상에 따른 이노토디올의 전구약물은 이노토디올의 복용량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 고농도로 섭취시에 발생할 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0032] 상기 이노토디올 유도체는 화학적 또는 생물학적 방법을 통해 합성될 수 있다. 구체적으로, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 지방산의 에스테르화 반응에 의해 합성될 수 있다. 상기 지방산은 C_{10} 내지 C_{30} 불포화 또는 포화 지방산 일 수 있으며, C_1 내지 C_{10} 카르복시산 또는 페놀산으로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 예를 들어, 미리스톨레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산, 및 도코사헥사엔산 등 일 수 있다. 상기 포화 지방산은 예를 들어, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 리그노세르산, 세로트산, 및 미리스틴산 등 일 수 있다. 상기 포화 카르복시산은 예를 들어, 포름산(Formic acid), 아세트산(Acetic acid), 프로피온산(Propionic acid), 부티르산(Butyric acid), 숙신산(succinic acid) 등 일 수 있다. 상기 페놀산은 예를 들어, p-쿠마린산(p-coumaric acid), 신남산(cinnamic acid), 페룰산(ferulic acid), 3,4-디하이드록시 벤조산(3,4-dihydroxy benzoic acid), p-하이드록시 벤조산(p-hydroxy benzoic acid), 바닐린산(vanilic acid), 카페인산(caffeic acid), 시링산(syringic acid), 시나핀산(sinapinic acids) 등 일 수 있다.

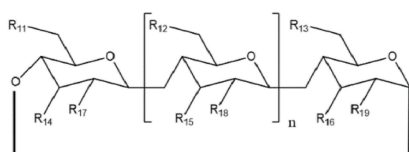
[0033] 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 불포화 지방산, 포화 지방산 및 C_1 내지 C_{10} 카르복시산으로 구성된 군에서 선택된 지방산을 1:10 내지 30의 몰비로 혼합하여 합성한 것일 수 있다. 예를 들어, 1:10 내지 30, 1:10 내지 25, 1:10 내지 20, 1:10 내지 15, 1:10 내지 13, 5:10 내지 30, 또는 5:10 내지 15의 몰비로 혼합한 것일 수 있다. 이때, 이노토디올 및 지방산의 혼합 비율이 상기 범위 미만이거나 또는 상기 범위를 초과하는 경우, 반응이 충분히 일어나지 않아 이노토디올 유도체의 생성 효율이 떨어지거나 또는 반응 소요 시간이 늘어나는 문제점이 있다. 또한, 상기 에스테르화 반응은 55 내지 65℃에서 48 내지 96시간 동안 반응하는 것일 수 있다. 이때, 에스테르화 반응 조건이 상기 범위 미만이거나 또는 상기 범위를 초과하는 경우, 반응 기질인 지방산의 완전한 용해가 어려워 반응이 거의 일어나지 않거나 효소 활성이 저하되어 에스테르 반응 효율이 떨어져 최종 산물인 이노토디올 유도체를 고수율로 합성할 수 없다는 문제점이 있다. 상기 에스테르화 반응이 종료된 이후, 공지된 여러 종류 방법 또는 정제 방법을 통하여 생성물에 포함된 에스테르의 순도를 더 높일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 이노토디올과 지방산의 혼합물에 생물학적 효소를 추가하여 합성할 수 있으며, 상기 생물학적 효소는 고효율의 이노토디올 유도체를 생산하는데 적합한 효소로서 예를 들어 칸디다 엔탈티카 리파아제 B(Candida Antarctica Lipase B, CalB)인 것일 수 있다. 상기 칸디다 엔탈티카 리파아제 B는 최종 산물인 이노토디올 유도체의 수율을 높이기 위하여 일반 효소보다 고정화 효소(immobilized enzyme)을 사용할 수 있으며, 상기 고정화 효소는 시판 제품을 사용하거나 통상적인 방법으로 제조하여 사용할 수 있다.

[0035] 상기 엔탈티카 리파아제 B는 이노토디올 100 중량부 기준으로 400 내지 500 중량부를 추가하여 이노토디올 유도체를 합성할 수 있다. 이때, 엔탈티카 리파아제 B의 함량이 상기 범위 미만인 경우, 에스테르 반응이 충분히 일어나지 않아 에스테르를 생산하는 효율이 낮다는 문제점이 있으며 상기 범위를 초과하는 경우, 최종 산물인 이노토디올 유도체를 고수율로 합성할 수 없어 경제적이지 않다는 문제점이 있다.

[0036] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 하기 화학식 3로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin, CD) 유도체를 더 포함하는 약학적 조성물일 수 있다.

[0037] [화학식 3]



[0038] [0039] 상기 화학식 3에서 n은 4, 5 또는 6이고, R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{18} 및 R_{19} 는 독립적으로 -OH, C_1 내지

C₄의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C₁ 내지 C₄의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

[0040] 본 명세서의 용어 “사이클로덱스트린(cyclodextrin, CD)”은 포도당을 기본단위로 α-(1→4)-글리코시딕 결합으로 연결된 환상 화합물을 의미한다. 상기 사이클로덱스트린은 공동이 있는 반지 모양의 당 미립자로, 구조에 따라 알파(α), 베타(β), 감마(γ) 형으로 분류될 수 있다. 상기 사이클로덱스트린의 구조에 따른 내부 공극은 α-사이클로덱스트린이 5.3Å, β-사이클로덱스트린이 6.5Å, γ-사이클로덱스트린이 8.3Å이다. 상기 사이클로덱스트린의 환 외부에는 히드록시기가 존재하기 때문에 친수성을 띠는 반면 내부는 소수성을 나타낸다. 상기 사이클로덱스트린 내부구조에 적합한 분자구조를 지닌 물질들은 사이클로덱스트린의 소수성 내부 공동으로 포접되어 포접화합물을 형성할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올은 상기 사이클로덱스트린의 내부 공동에 포접되어 있는 것일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 상기 화학식 3으로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체의 내부에 포접되어 있는 약학적 조성물일 수 있다.

[0042] 본 명세서의 용어 “포접”은 게스트 분자가 사이클로덱스트린 분자의 공동과 상호작용하여 포획되는 화학양론적 분자성 현상을 의미한다.

[0043] 일 구체예에 있어서, 상기 화학식 3로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체는 하기 화학식 4의 감마-사이클로덱스트린(γ-cyclodextrin)인 것일 수 있다.

[0044] [화학식 4]



[0045]

[0047] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 이노토디올과 이의 전구약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 과 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체를 1:1 내지 10의 몰비로 혼합한 것일 수 있다. 구체적으로, 이노토디올과 이의 전구약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 사이클로덱스트린 유도체의 몰비는 1:1 내지 10, 1:1 내지 9, 1:1 내지 8, 1:1 내지 7, 1:1 내지 6, 1:1 내지 5, 1:1 내지 4, 1:1 내지 3 또는 1:1 내지 2로 혼합된 것일 수 있다. 예를 들어, 이노토디올 및 사이클로덱스트린 유도체는 1:3의 몰비로 혼합되어 이노토디올이 사이클로덱스트린 유도체의 공동에 포접되어 있는 포접 복합체를 형성하는 것일 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 용어, “약학적으로 허용가능한”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 용어, “약학적으로 허용 가능한 염”은 약학적으로 허용 가능하고 모체 화합물(parent compound)의 바람직한 약리 활성을 갖는 본 발명의 일측면에 따른 염을 의미할 수 있다. 상기 모체 화합물의 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티(moiety)를 함유하는 모체 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이들 화합물의 자유 산 형태를 적절한 염기, 예를 들어, 나트륨, 칼슘, 마그네슘 또는 칼륨의 화학양론량과 반응시킴으로써 또는 이들 화합물의 자유 염기 형태를 적절한 산의 화학양론량과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 이러한 반응은 전형적으로 수중 또는 유기 용매 중 또는 둘의 혼합물 중 수행된다. 일반적으로, 실시 가능한 경우, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질을 사용할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산 또는 염기의 부가염 및 그의 입체화학적 이성체 형태를 모두 포함하며, 예컨대, 유기산 또는 무기산의 부가염일 수 있다. 상기 염에는 투여 대상에서 모체 화합의 활성을 유지하며 바람직하지 못한 효과를 유발하지 않는 염이라면 어느 것이든 포함되는 것으로, 특별히 제한되는 것이 아니다.

[0050] 이러한 염에는 무기염과 유기염이 포함되며, 예를 들어, 아세트산, 질산, 아스파르트산, 술폰산, 설푸릭산, 말레

산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스테아르산, 락트산(lactic acid), 비카르본산, 비설피릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘이데트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이데트산, 톨루엔술폰산, 푸마르산, 글루세프산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸니트릭산, 말론산, 히드로클로린산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄설폰산, 헥사믹산, 판토테닉산, 모노히드로젠인산, 디히드로젠인산, 살리실산, 술파민산, 술파닐린산, 메탄술폰산일 수 있다.

[0051] 또한, 상기 염의 형태로는, 암모늄염, 리튬염, 소듐염, 포타슘염, 마그네슘염 및 칼슘염과 같은 알칼리 및 알칼리 토금속의 염, 예를 들어, 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 염과 같은 유기 염기를 갖는 염, 및 아르기닌, 리신과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다. 또한, 상기 염 형태는 적당한 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리 형태로 전환될 수도 있다.

[0052] 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올 또는 그의 전구약물은 호산구(Eosinophil) 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 약학적 조성물일 수 있다.

[0053] 본 명세서의 용어, “호산구(eosinophil)”란 백혈구의 한 종류로서 포유동물에서 다세포 기생충과 특정 감염에 대항하는 역할을 하는 면역계의 일원이다. 이들은 골수에서 조혈과정을 거쳐 발생하여 혈액으로 보내지며, 이후에 최종 분화하고 더이상 증식하지 않는다. 호산구는 직경이 12-15 μm 이고, 핵은 2엽편으로 되어 있으며(bilobed nucleus), 세포질은 과립(granules)으로 채워져 있는 과립구(granulocytes)이다. 과립은 산성염료인 eosin에 의해서 염색될 때 과립 내에 존재하는 염기성 단백질(basic proteins)로 인하여 밝은 심홍색을 나타낸다. 세포질에 있는 작은 과립에는 페록시다아제, RNA 분해효소(RNase), DNA 분해효소(DNase), 지방분해효소, 플라스미노겐 등과 같은 여러 화학적 매개물질을 포함하고 있다. 이들 매개물질들은 호산구의 활성화에 따른 탈과립 과정에 의해 분비되고, 이로 인해 조직학적 변화와 기능적인 변화를 초래하여 질환이 발생한다. 호산구는 염증 반응에 관여하는데 특히 알레르기 염증, 기생충 감염, 약물에 대한 과민반응 등에서 그 수가 증가되는 것으로 알려져 있다.

[0054] 본 명세서의 용어, “세포자멸사(apoptosis)”란 일부 진핵 생물, 단세포 미생물에서 발생하는 프로그램된 세포 사멸의 한 형태를 의미하는 것으로, 형태학적으로 세포의 수축, 세포막의 농포화(blebbing), 핵의 절단(nuclear fragmentation) 또는 핵붕괴(karyorrhexis), 염색질의 응축(chromosomal condensation), DNA의 뉴클레오솜간 절단(intranucleosomal cleavage) 등으로 특징지어진다. 세포 사멸시 유출되는 세포내 성분으로 인해 염증 반응(inflammatory change)이 일어나는 세포 괴사(necrosis)와 달리, 세포자멸사의 경우는 전체 과정이 조절된 상태로 진행되며 세포 사멸 후 대식세포에 의해 탐식되어 염증을 남기지 않는다.

[0055] 본 명세서의 용어, “호산구 증가증(Eosinophilia)”이란, 호산구가 증가하여 발생하는 질환을 의미한다.

[0056] 일 구체예에 있어서, 상기 호산구 증가증(Eosinophilia)은 호산구성 심근염(eosinophilic cardiomyopathy), 호산구성 폐렴(Eosinophilic Pneumonia, EP), 특발성 만성 호산구성 폐렴(Idiopathic Chronic Eosinophilic Pneumonia, ICEP), 특발성 급성 호산구성 폐렴(Idiopathic Acute Eosinophilic Pneumonia, IAEP), 호산구성 기관지염(eosinophilic bronchitis), 호산구성 식도염(eosinophilic esophagitis), 호산구성 위장염(eosinophilic gastroenteritis), 호산구성 위염(eosinophilic gastritis), 호산구성 대장염(eosinophilic colitis), 호산구성 장염(eosinophilic enteritis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn's disease, CD), 호산구성 근막염(eosinophilic fasciitis), 특발성 근염(idiopathic myositis), 만성 호산구성 백혈병(chronic eosinophilic leukemia, CEL), 과호산구성증후군(hypereosinophilic syndrome, HES), 특발성 과다호산구 증후군(Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome, IHES), 척스트라우스증후군(Churg-Strauss syndrome), Löföfler씨 증후군(Löföfler's Syndrome, Simple Pulmonary Eosinophilia), 폐흡충증(Paragonimiasis), 독소-기름 증후군(Toxic-oil Syndrome) 및 호산구-근육통 증후군(Eosinophilia-myalgia Syndrome)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 명세서에서 용어, “염증”은 유해인자에 대해 생체를 보호하기 위한 반응으로, 면역세포, 혈관 및 염증 매개체들이 관여하여 세포의 손상을 억제하고, 손상된 조직 및 괴사 세포를 제거하며, 조직을 재생하는 일련의 과정을 포함할 수 있다.

[0058] 본 명세서의 용어, “염증성 질환”이란 외부의 물리·화학적 자극 또는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염 또는 자가면역에 대한 국부적 또는 전신적 생체 방어 반응으로 특징되는 염증 반응이 일으키는 병리적 증상으로서 정의될 수 있다. 이러한 염증 반응은 각종 염증 매개 인자와 면역세포

와 관련된 효소(예컨대 iNOS, COX-2 등) 활성화, 염증 매개 물질의 분비(예컨대, NO, TNF- α , IL-6 등의 분비), 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등의 일련의 복합적인 생리적 반응을 수반하며, 홍반, 통증, 부종, 발열, 신체의 특정 기능의 저하 또는 상실 등의 증상에 의해 외적으로 나타난다. 상기 염증성 질환은 급성, 만성, 궤양성, 알레르기성 또는 괴사성을 띌 수 있으므로, 어떠한 질환이 상기와 같은 염증성 질환의 정의에 포함되는 한 그것이 급성이든지, 만성이든지, 궤양성이든지, 알레르기성이든지 또는 괴사성이든지를 불문한다.

- [0059] 본 명세서의 용어, “호산구성 염증 질환(eosinophilic inflammatory disease)”이란 다양한 원인에 의해 조직에 호산구가 침윤되어 발생하는 염증성 질환을 의미한다.
- [0060] 일 구체예에 있어서, 상기 호산구성 염증 질환은 알레르기성 기관지폐선균증(allergic bronchopulmonary aspergillosis), 호산구성 약물 알레르기(drug allergy), 호산구성 천식(eosinophilic asthma) 및 알레르기성 비염(allergic rhinitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 일 구체예에 있어서, 상기 호산구성 염증질환은 비강, 비부비동 또는 기관지 내에 유발된 염증 질환일 수 있다. 특히 호흡기에 점액 분비 과다를 특징으로 하는 호흡기 질환일 수 있으며, 이때 상기 호흡기에 점액 분비 과다를 특징으로 하는 호산구성 염증질환은 만성비염(Chronic Rhinitis), 만성 부비동염(Chronic Sinusitis), 만성 기관지염(Chronic Bronchitis) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 명세서에서 용어, "약학적 조성물"은, 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭할 수 있다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 약학적 조성물은 상기 유효성분에 더하여 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제, 충전제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 유화제 (계면활성제), 윤활제, 감미제, 향미제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 보조제는 상기 약학적 조성물이 적용되는 제형에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 약제학 분야에서 통상적으로 사용될 수 있는 모든 보조제들 중에서 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0065] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여되는 것으로, 상기 비경구 투여는 비강 내 흡입, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 및 흉부내 주사 주입방식으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 유효성분의 유효량 또는 상기 약학적 조성물은 임상투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(Nasal), 흡입, 안구 또는 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있고, 병변부위 국소 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 상기 약학적 조성물은 활성 성분이 위에서의 분해되지 않도록 하기 위하여 활성 성분을 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호 가능한 제형으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0066] 상기 약학적 조성물은 수성 또는 유성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 형태로 제제화될 수 있으며, 제제화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우에 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가

능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔 (Witepsol), 마크로골, 트윈 (Tween) 61, 카카오 지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0067] 상기 약학적 조성물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체 (Carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산 (Ascorbic acid) 또는 글루타치온 (Glutathione)과 같은 항산화제 (Antioxidants), 킬레이트화제 (Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제 (Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0068] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 그 투여 용량에 특별한 제약은 없고, 체내 흡수도, 체중, 환자의 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 유효량 범위를 고려하여 제조하도록 하며, 이렇게 제형화된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나 일정 시간 간격으로 수회 투여될 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 용어 "치료"는 병적 증상의 경감 또는 개선, 질환의 부위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태 또는 증상의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장, 기타 다른 이로인한 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

[0070] 본 명세서의 용어 "예방"은 특정 질병을 갖지 않는 대상에게 작용하여 상기 특정 질병이 발병하지 않도록 하거나, 그 발병 시기를 늦추거나, 발병 빈도를 낮추는 모든 기작 및/또는 효과를 포함하는 의미로 사용된다.

[0072] 다른 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0073] 본 명세서의 용어, "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말할 수 있으며, 상기 성분에 의해 생체 방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 의미할 수 있다.

[0074] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 겔, 젤리, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 티백제, 침출차, 및 건강 음료로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형 등이 있으며 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다.

[0075] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체를 포함할 수 있다.

[0076] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다.

[0077] 상기 "이노토디올", "이노토디올의 전구약물", "호산구 증가증(Eosinophilia)", "호산구성 염증 질환(eosinophilic inflammatory disease)" 등은 전술한 바와 같다. 본 발명의 약학적 조성물 및 건강기능식품에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0079] 다른 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료용 흡입제 조성물을 제공한다.

[0080] 본 발명의 흡입제 조성물에서는 유효성분을 흡입제에 그대로 첨가하거나 다른 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 치료용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0081] 비경구 투여를 위한 흡입제로서는 에어로솔제, 흡입용 분말제 또는 흡입용 액제가 포함되며, 이 흡입용 액제는 사용시에 물 또는 다른 적당한 매체에 용해 또는 현탁시켜 사용하는 형태라도 좋다. 이들 흡입제는 공지의 방법에 준하여 제조된다. 예컨대, 흡입용 액제의 경우에는 방부제(염화벤잘코늄, 파라벤 등), 착색제, 완충화제(인산나트륨, 아세트산나트륨 등), 등장화제(염화나트륨, 농글리세린 등), 증점제(카르복시비닐 폴리머 등), 흡수

촉진제 등을 필요에 따라 적절하게 선택하여 조제된다. 흡입용 분말제의 경우에는 활택제(스테아린산 및 그의 염 등), 결합제(전분, 텍스트린 등), 부형제(젓당, 셀룰로오스 등), 착색제, 방부제(염화벤잘코늄, 파라벤 등), 흡수 촉진제 등을 필요에 따라 적절하게 선택하여 조제된다.

[0082] 상기 흡입제 조성물은 흡입제 장치를 통해 투여될 수 있으며, 흡입제 장치는 조성물을 개체의 폐 조직과 같은 개체에 전달 가능한 장치로서, 예컨대 흡입기(inhaler), 분무기(nebulizer) 또는 호흡기(ventilator)가 있다. 흡입용 액제를 투여할 때에는 통상 분무기(아토마이저, 네블라이저)가 사용되며, 흡입용 분말제를 투여할 때에는 통상 분말 약제용 흡입 투여기가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0084] 다른 양상은 이노토디올(Inotodiol), 이의 전구약물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0085] 본 명세서의 용어, "의약외품"이란 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물질들 중 의약품보다 작용이 경미한 물질들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[0086] 본 발명의 조성물을 호산구성 염증질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약외품에 포함시킬 경우, 상기 조성물을 그대로 포함하거나 다른 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정할 수 있다. 본 발명의 의약외품은 그 제형에 따라 제제화에 필요한 각종의 기재와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다. 본 발명의 상기 의약외품 조성물은 예컨대 소독 청결제, 세정제, 주방용 세정제, 청소용 세정제, 물티슈, 세제, 비누, 핸드 위시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제, 필터 충전제, 및 공기나 산소를 직·간접적으로 흡입하여 일시적으로 공기나 산소를 공급하는 휴대용 제품으로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0087] 상기 "이노토디올", "이노토디올의 전구약물", "호산구 증가증(Eosinophilia)", "호산구성 염증 질환(eosinophilic inflammatory disease)" 등은 전술한 바와 같다.

[0089] 또 다른 양상은 이노토디올, 이의 전구약물, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염의 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0090] 또 다른 양상은 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 이노토디올, 이의 전구약물, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[0091] 또 다른 양상은 이노토디올, 이의 전구약물, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 그들 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 호산구 증가증(Eosinophilia) 또는 호산구성 염증 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0092] 상기 "이노토디올", "이노토디올의 전구약물", "호산구 증가증(Eosinophilia)", "호산구성 염증 질환(eosinophilic inflammatory disease)" 등은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0093] 일 양상에 따른 이노토디올 또는 이의 전구약물을 포함하는 조성물은 호산구 특이적으로 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과를 나타내어, 호산구 증가증 또는 호산구성 염증 질환 예방 또는 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0094] 도 1은 이노토디올의 용매(DMSO 0.04%)를 넣어준 음성 대조군, 덱사메타손(Dexamethasone) 1 μ M 을 넣어준 양성 대조군, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex)을 각각 5 μ g/ml, 10 μ g/ml씩 1일동안 처리한 EoL-1 cell을 H&E 염색(staining)한 결과를 나타낸 사진이다.

도 2는 이노토디올의 용매(DMSO 0.04%)를 넣어준 음성 대조군, 덱사메타손(Dexamethasone) 1 μ M 을 넣어준 양성 대조군, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex)을 각각 5 μ g/ml, 10 μ g/ml 씩 1일동안 처리한 EoL-1 cell을 형광면역염색한 후 형광신호를 측정된 사진이다.

도 3은 호산구 세포자멸사(apoptosis)관련 단백질의 발현량을 나타낸 것이다:

도 3a는 EOL-1 세포에 0.5 mM 의 부티르산만을 2일 처리한 군과 0.5 mM 의 부티르산을 1일 처리한 후 10 μ g/ml 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 용매: DMSO)을 1일 처리한 경우의 세포자멸사(apoptosis)관련 단백질의 발현량을 측정된 결과이고, 도 3b는 도 3a의 세포자멸사 관련 단백질의 발현량 측정 결과를 OptimEyes 프로그램을 이용하여 픽셀 농도(pixel density)를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 SEB(staphylococcal enterotoxins B)로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델을 제작하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 5는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비강세척액(nasal lavage fluid)에서 IL-4, IL-5, Mast cell tryptase의 발현량을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Helper T cell관련 cytokine 인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ 의 발현량을 q-PCR로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β 의 발현량을 q-PCR로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 상피유래 cytokine 인 IL-25, IL-33의 발현량을 q-PCR로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Chemokine 인 CCL1, CCL2, CXCL2의 발현량을 q-PCR로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 SEB로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델의 머리 조직에서 cleaved caspase 3와 siglec F의 발현 결과를 나타낸 것이다:

도 10a는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 머리 조직 절편에서 cleaved caspase 3와 siglec F이 발현되어 나타내는 형광신호를 나타낸 사진이고, 도 10b는 상기 마우스 모델의 머리 조직 절편에서 cleaved caspase 3와 siglec F이 함께 발현되는 세포의 비율(% of Cleaved casp3+ SiglecF+/ Siglec F+ cells)을 나타낸 그래프이다.

도 11은 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록에서 호흡기상피의 두께를 슬라이드 스캐너 시스템을 이용하여 측정된 결과이다:

도 11a는 마우스 머리 조직 절편을 H&E 염색한 결과를 나타낸 사진이고, 도 11b는 호흡기 상피 두께를 정량화한 그래프이며, 도 11c는 200 배율에서 5장의 조직 절편중 3군데 영역에서 면적당 호산구의 개수(eosinophils/Fields)를 나타낸 그래프이다.

도 12는 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록에서 배상 세포(goblet cell)를 나타낸 것이다:

도 12a는 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록을 PAS 염색한 결과를 나타낸 사진이고, 도 12b는 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록을 PAS 염색한 슬라이드를 200배율에서 면적당 배상 세포의 개수(goblet cell/Fields)를 정량화한 그래프이다.

도 13은 human eosinophilic leukemia cells (EoL-1), human mast cells (LUVa), mouse macrophage cells (Raw264.7), Human dermal fibroblast primary cells (HDF)에 이노토디올을 처리한 후 세포 생존률(Cell viability)을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다:

도 13a는 인간 호산구성 백혈병 세포(human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell)에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정된 그래프이고, 도 13b는 인간 비만 세포(human mast cells,

LUVA)에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이며, 도 13c는 쥐 대식 세포(mouse macrophage cells (Raw264.7))에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이고, 도 13d는 인간피부섬유아세포(Human dermal fibroblast primary cells, HDF cell)에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0097] 실시예 1. EoL-1 cell line 배양

[0098] 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 1% 스트렙토마이신(Streptomycin) 및 페니실린(penicillin)이 보충된 RPMI-1640에서 EoL-1 cell line을 배양하였다. EoL-1 세포를 호산구(eosinophilic)로 분화시키기 위해 0.5mM의 부티르산(Butyric acid, BA)을 1일 처리 하였다. 그 후 5 µg/ml, 10 µg/ml 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 용매: DMSO)을 1일 처리하였다. 음성 대조군은 동일한 조건의 이노토디올의 용매(DMSO 0.04%)를 넣어주었고, 양성 대조군은 덱사메타손(Dexamethasone) 1 µM 을 넣어주었다.

[0099] 실시예 2. 세포주에서의 이노토디올(Inotodiol)의 호산구 세포자멸사(apoptosis) 유도 효과 확인

[0100] 2.1. H&E 염색(staining)

[0101] 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 EoL-1 cell을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용하여 고정하였고, 고정한 세포를 슬라이드에 도포 후 헤마토실린(Hematoxylin)과 이오신(Eosin)을 이용하여 H&E 염색(staining)을 하였다.

[0102] H&E 염색(staining)을 한 후, EoL-1 cell을 관찰한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0103] 도 1은 이노토디올의 용매(DMSO 0.04%)를 넣어준 음성 대조군, 덱사메타손(Dexamethasone) 1 µg/ml을 넣어준 양성 대조군, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex)을 각각 5 µg/ml, 10 µg/ml씩 1일동안 처리한 EoL-1 cell을 H&E 염색(staining)한 결과를 나타낸 사진이다. 세포의 수축, 막의 블리빙(blebbing), 핵 단편화, 세포사를 붉은색 화살표로 표시하였다.

[0104] 도 1에서 보는 바와 같이 DMSO 0.04%만을 넣어준 음성대조군에 비하여 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex)을 각각 5 µg/ml, 10 µg/ml을 처리한 EoL-1 cell의 경우, 세포의 수축, 막의 블리빙, 핵 단편화, 세포사 등 세포자멸사(apoptosis)가 일어났음을 보여주는 증거가 더 많이 관찰됨을 확인하였다.

[0105] 이는 이노토디올(Inotodiol)이 호산구 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과가 있음을 의미한다.

[0106] 2.2. 형광면역염색(Fluorescent Immunostaining)

[0107] 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 EoL-1 cell을 4% 파라포름알데하이드를 이용하여 고정하였고, 고정한 세포를 슬라이드에 도포하였다. 상기 세포가 도포된 슬라이드에 FITC(Fluorescein Isothiocyanate)가 결합된 cleaved caspase 3 항체(antibody)를 이용하여 형광면역염색(Fluorescent Immunostaining)을 진행하였다.

[0108] 구체적으로, 셀을 고정시킨 슬라이드에 FITC가 결합된 cleaved caspase 3 항체(Alexa Fluor® 488 Conjugate)를 처리하여 4°C에서 overnight하였고, 제조사에서 제공하는 방법대로 실험을 진행하여 정립형광현미경(Leica, DM2500)을 이용하여 형광 신호를 관찰하였다.

[0109] EoL-1 cell에서의 형광신호를 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0110] 도 2는 이노토디올의 용매(DMSO 0.04%)를 넣어준 음성 대조군, 덱사메타손(Dexamethasone) 1 µM 을 넣어준 양성 대조군, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex)을 각각 5 µg/ml, 10 µg/ml 씩 1일동안 처리한 EoL-1 cell을 형광면역염색한 후 형광신호를 측정한 사진이다.

[0111] 도 2에서 확인한 바와 같이, 세포자멸사(apoptosis) 과정에서 활성화되는 효소인 cleaved caspase 3는 DMSO 0.04%만을 넣어준 음성대조군에 비하여 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex)을 각각 5 µg/ml, 10 µg/ml을 처리한 EoL-1 cell의 경우에 더 활성화된 것을 확인하였다.

[0112] 이는 이노토디올이 호산구 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과가 있음을 의미하고, 이노토디올이 호산구 증가증(Eosinophilia)의 예방 및 치료에 효과가 있음을 의미한다.

[0114] 2.3 호산구 세포자멸사 관련 단백질 항체 어레이(antibody array)

[0115] 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 EoL-1 cell에서 세포자멸사(apoptosis) 관련 단백질 항체어레이(antibody array)를 진행하였다.

[0116] 구체적으로, Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit(R&D #ARY009)를 사용하였고, EoL-1 세포의 단백질을 세포자멸사관련 유전자 특이적인 포획항체(capture antibodies)가 결합되어있는 멤브레인에 4℃ overnight 반응 하였다. 이후 세척용액(washing buffer)으로 세척 후 비오티닐화된 검출 항체(Biotinylated detection antibodies)를 상온에서 1시간 반응하였다. 그리고 세척용액으로 세척 후 멤브레인에 화학발광검출시약(Chemiluminescent detection reagent)을 반응 후 5분간 x선 필름에 노출시켰다. 픽셀 밀도는 OptimEyes 프로그램을 이용하여 분석하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0117] 도 3은 호산구 세포자멸사 관련 단백질의 발현량을 나타낸 것이다: 도 3a는 EoL-1 세포에 0.5mM 의 부티르산을 2일 처리한 군과 0.5mM 의 부티르산을 1일 처리한 후 10 µg/ml 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 용매: DMSO)을 1일 처리한 경우의 세포자멸사(apoptosis) 관련 단백질의 발현량을 측정된 결과이고, 도 3b는 도 3a의 세포자멸사 관련 단백질의 발현량 측정 결과를 OptimEyes 프로그램을 이용하여 픽셀 농도(pixel density)를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0118] 도 3에 나타낸 바와 같이, 호산구 세포자멸사와 관련된 단백질의 발현량이 부티르산(BA)을 단독투여 하는 경우보다, 이노토디올과 부티르산을 함께 투여하는 경우 더 증가하는 것을 확인하였다.

[0119] 이는 이노토디올이 호산구 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과가 있음을 의미하고, 이노토디올이 호산구 증가증(Eosinophilia)의 예방 및 치료에 효과가 있음을 의미한다.

[0121] 실시예 3. SEB로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델 제작

[0122] 염증과 관련된 질환을 일으킬 수 있는 독성 물질인 스태피로코커스 엔터톡신 B(Staphylococcal Enterotoxin B, SEB)를 이용하여 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델을 만들었다. SEB로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델을 제작하는 과정을 도 4에 나타내었다.

[0123] 도 4는 SEB로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델을 제작하는 과정을 나타낸 모식도이다.

[0124] 구체적으로, Balb/c 4주령 마우스를 구입(오리엔트바이오™)하여 인산완충식염수(PBS)에 난알부민(Ovalbumin, OVA) 25mg과 명반(Aluminum hydroxide, Alu) 2 mg를 녹인 혼합물을 실험 당일 및 5일차에 동물의 복강에 주사하였다. 실험 21일차부터는 5일 동안 난알부민(OVA)을 인산완충식염수(PBS)에 3%로 녹여 비강으로 투여하였다. 실험 28일차부터 4주동안 주 3회 3% 난알부민 용액을 비강점적(I.N.)하였고, 실험 8주차부터 12주차까지 주 3회 SEB를 비강점적하였고, SEB 비강점적 한시간 후에 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)과 덱사메타손(Dexamethasone 10mg/kg)을 주 1회 복강 내 주사(I.P.)하였다. 음성 대조군은 PBS(vehicle)를 투여(I.P.)하였다.

[0125] SEB로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스를 "CON", "NP", "NP+Ino", NP+Dex"군으로 나누어 실험하였다.

[0126] "CON"은 ECRS마우스 모델을 만드는 전과정에서 난알부민 용액 복강주사 또는 비강점적, SEB의 비강점적, 치료약제(이노토디올과 덱사메타손)의 복강 주사 대신에 PBS를 투여한 군을, "NP"는 ECRS마우스 모델에서 치료약제로 용매(Tween 80%+NaCl 0.9%, 20 µl)를 복강 투여한 군을, "NP+Ino"는 이노토디올(Inotodiol 20 mg/kg)를 복강 투여한 군을 "NP+Dex"는 덱사메타손(Dexamethasone 10mg/kg)을 복강 투여한 군을 의미한다.

- [0128] 실시예 4. 마우스에서의 이노토디올(Inotodiol)의 염증관련 유전자 발현 감소 효과 확인
- [0129] 4.1 이노토디올의 비강세척액 내의 제2형 사이토카인(Type2 cytokines) 및 비만세포 트립타제(mast cell tryptase) 발현량 감소 효과 확인
- [0130] 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 마우스 모델에서 비강세척액(nasal lavage fluid)을 채취하였다.
- [0131] 구체적으로, 상기 마우스 모델을 마취하고, 마취된 상태의 마우스 모델에서 기관 절개를 시행하였다. 기관 절개를 시행한 마우스에 24gauge 카테터를 기관에서 후비공방향으로 삽입하였다. 400ul PBS를 카테터로 주입하여 콧구멍에서 이를 채취한 후, 채취된 용액을 원심분리하였다. 상층액을 이용하여 IL-4, IL-5, Mast cell tryptase의 발현량을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정하였다.
- [0132] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0133] 도 5은 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비강세척액(nasal lavage fluid)에서 IL-4, IL-5, Mast cell tryptase의 발현량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0134] 도 5에 나타낸 바와 같이, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과, 비강 내 염증을 유발시키지 않은 컨트롤(CON)에 비하여 제2형 사이토카인인 IL-4, IL-5와 Mast cell tryptase(MCT)의 발현 수준이 증가한 것을 볼 수 있다. 그에 반하여 비강 내 염증을 유발(NP) 후 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)을 투여한 경우에는 IL-4, IL-5 및 Mast cell tryptase(MCT) 발현 수준이 컨트롤(CON)과 비슷한 수준으로 확연히 낮아짐을 확인하였다.
- [0135] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 염증 관련 인자인 IL-4, IL-5와 Mast cell tryptase(MCT)의 발현량이 낮아진 것으로서, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 의미한다.
- [0137] 4.2 마우스 비부비동 점막에서 이노토디올의 Helper T cell(Th)와 관련된 사이토카인의 mRNA 발현 감소 효과 확인
- [0138] 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 마우스 모델의 비부비동 점막에서 TRIzol을 이용하여 mRNA를 추출하여 cDNA 합성 후 Th(Helper T cell) 관련 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ 의 발현량을 q-PCR로 측정하였다.
- [0139] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0140] 도 6은 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Helper T cell관련 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ 의 발현량을 q-PCR로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0141] 도 6에서 나타낸 바와 같이, SEB(Staphylococcal Enterotoxin B)로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과 비강 내 염증을 유발시키지 않은 컨트롤(CON)에 비하여 Th 관련 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ 의 발현량이 증가한 것을 볼 수 있다. 그에 반하여 비강 내 염증을 유발(NP) 후 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)을 투여한 경우, Th 관련 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ 의 발현 수준이 확연히 낮아짐을 확인하였다.
- [0142] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 염증 관련 인자인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN γ 의 발현량이 낮아진 것으로서, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 의미한다.
- [0144] 4.3. 마우스 비부비동 점막에서 이노토디올의 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 감소 효과 확인
- [0145] 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 마우스 모델의 비부비동 점막에서 TRIzol을 이용하여 mRNA를 추출하여 cDNA 합성 후, Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β 의 발현량을 q-PCR로 측정하였다.
- [0146] 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0147] 도 7은 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β 의 발현량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래

프이다.

[0148] 도 7에서 나타낸 바와 같이, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과, 비강 내 염증을 유발시키지 않은 컨트롤(CON)에 비하여 Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β 의 발현량이 증가한 것을 볼 수 있다. 한편, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발시키고, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)을 투여한 경우에는 Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β 의 발현 수준이 컨트롤(CON)과 비슷한 수준으로 확연히 낮아짐을 확인하였다.

[0149] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 의 발현량이 낮아진 것으로서, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 의미한다.

[0151] 4.4. 마우스 비부비동 점막에서 이노토디올의 상피 유래 관련 사이토카인(epithelium-derived associated cytokines)의 mRNA 발현 감소 효과 확인

[0152] 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 마우스 모델의 비부비동 점막에서 TRIzol을 이용하여 mRNA를 추출하여 cDNA 합성 후, 상피유래 cytokine 인 IL-25, IL-33의 발현량을 q-PCR로 측정하였다.

[0153] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0154] 도 8은 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 상피유래 cytokine 인 IL-25, IL-33의 발현량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0155] 도 8에서 나타낸 바와 같이, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과, 비강 내 염증을 유발시키지 않은 컨트롤(CON)에 비하여 상피유래 cytokine 인 IL-25, IL-33의 발현량이 증가한 것을 볼 수 있다. 한편, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발시킨 이후, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)을 투여한 경우, 상피유래 cytokine 인 IL-25, IL-33의 발현 수준이 컨트롤(CON)과 비슷한 수준으로 확연히 낮아짐을 확인하였다.

[0156] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 염증을 촉진하는 역할을 하는 상피유래 cytokine 인 IL-25, IL-33의 발현량이 낮아진 것으로서, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 의미한다.

[0158] 4.5. 마우스 비부비동 점막에서 이노토디올의 케모카인(chemokines) mRNA 발현 감소 효과 확인

[0159] 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 마우스 모델의 비부비동 점막에서 TRIzol을 이용하여 mRNA를 추출하여 cDNA 합성 후, Chemokine 인 CCL1, CCL2, CXCL2의 발현량을 측정하였다.

[0160] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0161] 도 9는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Chemokine 인 CCL1, CCL2, CXCL2의 발현량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0162] 도 9에서 나타낸 바와 같이, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과, 컨트롤(CON)에 비하여 Chemokine 인 CCL1, CCL2, CXCL2의 발현량이 증가한 것을 볼 수 있다. 한편, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발시킨 이후, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)을 투여한 경우 Chemokine 인 CCL1, CCL2, CXCL2의 발현 수준이 컨트롤(CON)과 비슷한 수준으로 확연히 낮아짐을 확인하였다.

[0163] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 염증을 유발하고 유지시키는 Chemokine 인 CCL1, CCL2, CXCL2의 발현량이 낮아진 것으로서, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 의미한다.

[0165] 실시예 5. 마우스 비부비동 점막에서 이노토디올(Inotodiol)의 호산구 세포자멸사(apoptosis) 유도 효과 확인

[0166] 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 마우스 모델의 머리를 파라핀 블록으로 제작하였다. 구체적으로, 마우스 모델의 머리를 고정 및 석회질 제거 후 마우스 머리를 파라핀에 내장하여 파라핀 블록을 제작하였고, 염색을 위해 4 μ m의 두께의 절편을 만들었다. 파라핀 절편은 순차적인 에탄올 시리즈를 사용하여 파라핀 제거 및 탈수처리하였다. 슬라이드를 10mM 구연산염 완충액(pH 6.0)에서 4분 동안 끓임으로써 항원을 노출시킨 후, 내인성 퍼옥

시다제 활성화는 3% H₂O₂에서 10분간 반응 후 PBS로 세척하여 차단하였다.

- [0167] 면역형광염색은 세포자멸사(apoptosis) 과정에서 활성화되는 효소인 cleaved caspase 3와 호산구(eosinophils) 표면에 특이적으로 발현되는 단백질인 Siglec F 항체를 이용하였다. Cleaved caspase 3 항체의 경우 cell signaling #9669(Alexa Fluor® 488 Conjugate)을 구입하여 사용하였고, Siglec F 항체의 경우, Thermo fisher scientific, #14-1702-82를 구입하여 사용하였다. 상기 항체들을 탈파라핀화한 슬라이드와 overnight 반응시킨 후, Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody (Alexa Fluor제 594 A-11007)로 2시간 반응시켰다. 핵염색을 위해 300 nM농도의 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen)를 이용하여 대조 염색을 시행하였다.
- [0168] 200 배율에서 2장의 상기 마우스 머리 조직 절편 중 2군데 영역에서 cleaved caspase 3와 Siglec F의 형광신호 및 Cleaved caspase 3와 Siglec F 이 함께 발현되는 세포의 비율(% of Cleaved casp3+ SiglecF+/ Siglec F+ cells)을 도 10에 나타내었다.
- [0169] 도 10은 SEB로 유발시킨 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Cleaved caspase 3와 Siglec F 이 발현여부를 나타낸 것이다: 도 10a는 SEB로 유발시킨 호산구성(Eosinophilic) 만성 비부비동염(Chronic Rhinosinusitis, CRS) 마우스 모델의 비부비동 점막에서 Cleaved caspase 3와 Siglec F이 발현되어 나타내는 형광신호를 나타낸 사진이고, 도 10b는 상기 마우스 모델의 머리 조직 절편에서 Cleaved caspase 3와 Siglec F 이 함께 발현되는 세포의 비율(% of Cleaved casp3+ SiglecF+/ Siglec F+ cells)을 나타낸 그래프이다.
- [0170] 도 10a에서 나타낸 바와 같이, 비강 내 염증을 유발시키지 않은 컨트롤(CON)의 경우, 호산구의 세포 표면에 특이적으로 발현되는 Siglec F의 형광 신호가 거의 보이지 않는 반면, 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 경우, 컨트롤(CON)에 비하여 Siglec F의 형광 신호가 많이 나타남을 확인하였다.
- [0171] 한편, 도 10b에서 나타낸 바와 같이, 마우스 비강 내 염증을 유발시킨 이후 이노토디올(Inotodiol 20 mg/kg)을 투여한 경우에는 Cleaved caspase 3와 Siglec F이 함께 발현되는 세포의 비율(% of Cleaved casp3+ SiglecF+/ Siglec F+ cells)이 높음을 확인하였다.
- [0172] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 세포자멸사(apoptosis) 과정에서 활성화되는 효소인 cleaved caspase 3가 발현되는 비율이 높음을 의미하는 바, 이노토디올이 호산구의 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과가 있고, 호산구 증가증(Eosinophilia)의 예방 및 치료에 효과가 있음을 의미한다. 또한, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0174] **실시예 6. 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델에서 이노토디올(Inotodiol)의 SEB 유도 병리 개선 효과 확인**
- [0175] **6.1. 호흡기상피의 두께 증가 완화 효과**
- [0176] 실시예 5의 방법으로 제작한 파라핀 블록을 탈파라핀화한 후 H&E 염색을 진행하였다. 고배율(400배율)에서 5장의 조직 절편 중 4군데 영역에서 호흡기상피의 두께를 슬라이드스캐너 시스템을 이용하여 측정하였다.
- [0177] 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0178] 도 11은 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록에서 호흡기상피의 두께를 슬라이드 스캐너 시스템을 이용하여 측정한 결과이다: 도 11a는 마우스 머리 조직 절편 H&E 염색을 진행한 결과를 나타낸 사진이고, 도 11b는 호흡기 상피 두께를 정량화한 그래프이며, 도 11c는 200 배율에서 5장의 조직 절편중 3군데 영역에서 면적당 호산구의 개수(eosinophils/Fields)를 나타낸 그래프이다.
- [0179] 도 11에 나타낸 바와 같이, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과, 컨트롤(CON)에 비하여 호흡기 상피 두께 및 면적당 호산구의 수가 급격히 증가한 것을 확인하였다.
- [0180] 한편, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발시킨 이후, 이노토디올(Inotodiol 20 mg/kg)을 투여한 경우 호흡기 상피 두께는 컨트롤(CON)과 비슷한 수준으로 개선되고, 면적당 호산구의 수도 낮아짐을 확인하였다.
- [0181] 이는 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 염증 반응으로 유발된 호흡기 상피 세포의 증식 및 이에 따른 상피 조직의 두께 증가 현상이 완화된다는 것을 의미한다. 따라서, 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료

에 효과가 있음을 의미한다.

[0183] **6.2. 배상 세포(goblet cell)의 개수 측정**

[0184] 실시예 5의 방법으로 제작한 파라핀 블록을 탈파라핀화한 후 PAS염색을 진행하였다. 구체적으로, Periodic Acid Schiff (PAS) Stain Kit (Mucin Stain) #ab150680 를 사용하여 배상세포를 염색하였다. PAS시약을 이용하여 10분 반응시킨 후 수세 후에 Schiff's 시약을 이용하여 30분 반응하였다. 그 후 카운터스테인 (Counterstain)을 위한 헤마토실린 염색을 진행 후 용해성 적색을 불용성 청색으로 전환하기위해 Bluing reagent로 30초 반응하였다. 이후 탈수 처리하였다.

[0185] 상기 PAS 염색 결과를 나타낸 사진 중 200배율에서 비강, 비부비동 및 기관지 내 염증으로 인해 그 수가 증가하는 배상 세포(goblet cell)의 개수를 세었다.

[0186] 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0187] 도 12는 호산구성 만성 비부비동염(Eosinophilic CRS) 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록에서 배상 세포(goblet cell)를 나타낸 것이다: 도 12a는 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록을 PAS 염색한 결과를 나타낸 사진이고, 도 12b는 마우스 모델의 머리 조직 파라핀 블록을 PAS 염색한 슬라이드를 200배율에서 면적당 배상 세포(goblet cell)의 개수를 정량화한 그래프이다.

[0188] 도 12a에 나타낸 바와 같이, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발(NP)시킨 결과, 컨트롤(CON)에 비하여 배상 세포의 수가 급격히 증가한 것을 확인하였다. 한편, SEB로 마우스 비강 내 염증을 유발시킨 이후, 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, 20 mg/kg)을 투여한 경우에는 마우스 비강 내 배상 세포(goblet cell)의 개수가 감소함을 확인하였다.

[0189] 호흡기 상피 조직에서 점막의 점액 분비를 담당하는 배상 세포(Goblet cell)는 염증 반응이 지속되거나 만성적으로 발생하면 그 수와 활동이 증가하는 특징을 가진다. 마우스 비강 내 배상 세포(goblet cell)의 개수가 감소함은 염증 반응이 완화되었음을 의미한다.

[0190] 따라서, 염증 유발 이후 이노토디올을 투여한 경우, 배상 세포(Goblet cell)의 개수를 감소되는 현상을 통하여 이노토디올이 호산구성 염증 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있다.

[0192] **실시예 7. 이노토디올(Inotodiol) 처리 시 다양한 세포의 세포 생존률(Cell viability) 측정**

[0193] 이노토디올(Inotodiol)의 호산구성 질환 특이성 여부를 확인하기 위하여 human eosinophilic leukemia cells (EoL-1), human mast cells (LUVa), mouse macrophage cells (Raw264.7), Human dermal fibroblast primary cells (HDF)에 이노토디올을 처리한 후 세포 생존률을 측정하였고 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0194] **7.1 human eosinophilic leukemia cells (EoL-1)의 세포 생존률**

[0195] 인간 호산구성 백혈병 세포(human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell)를 0.01X10⁶ cells/ml로 96-well plate에 seeding한 후, overnight배양 하였다. 부티르산(Butyric acid, BA) 50 mM stock (in RPMI1640)을 EoL-1 cell (200 μ L)에 2 μ L 처리 (final conc. 500 μ M) 처리하고, CO₂ incubation을 24 hr동안 수행하였다. 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, in DMSO) 1 mM stock을 2 μ L 처리 하고, 나머지 농도는 serial dilution(final conc. 2.5, 5, and 10 μ M)하여 CO₂ incubation을 24 hr동안 수행하였다. Quantimax cell viability assay kit를 사용(20 μ L/well, 1 hr)하고, Plate reader로 450 nm에서 측정한 결과를 도 13a에 나타내었다.

[0196] 도 13a는 인간 호산구성 백혈병 세포(human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell)에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이다.

[0197] 도 13a에 나타낸 바와 같이, 이노토디올을 EoL-1 cell에 처리하여 확인한 결과, 세포 생존률(cell viability)이 감소함을 확인하였다.

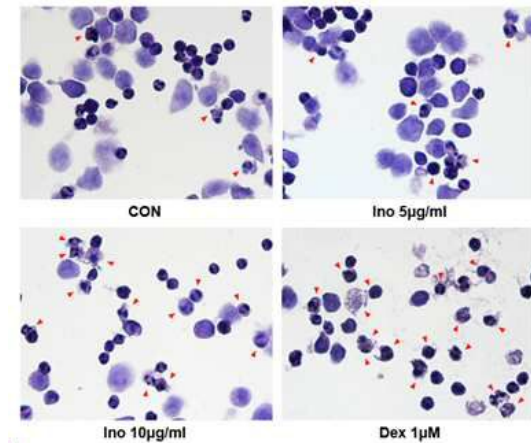
[0198] 이는 이노토디올이 호산구 사멸을 유도하는 효과가 있음을 의미하고, 이노토디올이 호산구 증가증(Eosinophilia)의 예방 및 치료에 효과가 있음을 의미한다.

- [0199] **7.2 Human mast cells (LUVA)의 세포 생존률**
- [0200] 인간 비만 세포(human mast cells, LUVA)를 0.1×10^6 cells/ml로 96-well plate에 seeding 한 후, overnight 배양하였다.
- [0201] 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, in DMSO) 10 mM stock을 LUVA cell (200 μ L)에 2 μ L 처리 (final conc. 100 μ M)하고, 나머지 농도는 serial dilution하여 처리하여(50, 25, 12.5, 6.25 μ M) CO₂ incubation을 24 hr동안 수행하였다. MTT solution (5 mg/mL) 10 μ L을 첨가하여 2 hr 배양한 후, Solution suction하였고, DMSO 100 μ L을 가한 후, Plate reader로 450 nm에서 측정하였다. 그 결과를 도 13b에 나타내었다.
- [0202] 도 13b는 인간 비만 세포(human mast cells, LUVA)에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이다.
- [0203] 도 13b에 나타난 바와 같이, inotodiol을 Human mast cell (LUVA)에 처리한 결과, 이노토디올의 세포독성은 50~100 μ M부터 나타날 수 있음을 확인하였다. 이는 인간 호산구성 백혈병 세포(human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell)의 결과와 비교해 볼 때, 인간 호산구성 백혈병 세포에서 이노토디올이 세포독성을 보인 농도(2.5 μ M)의 20배 이상의 고농도에서 세포 생존률이 감소한 것으로, 이노토디올이 호산구에 특이적으로 작용함을 의미한다.
- [0205] **7.3 mouse macrophage cells (Raw264.7)의 세포 생존률**
- [0206] 쥐 대식세포(mouse macrophage cells (Raw264.7))를 0.1×10^6 cells/ml로 96-well plate에 seeding한 후, overnight 배양하였다.
- [0207] 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, in DMSO) 10 mM stock을 Raw264.7 cell(200 μ L)에 2 μ L 처리 (final conc. 100 μ M)하고, 나머지 농도는 serial dilution하여 처리 (50, 25, 12.5, 6.25 μ M)하여 CO₂ incubation을 24 hr동안 수행하였다. MTT solution (5 mg/mL) 10 μ L을 첨가하여 2 hr 배양한 후, Solution suction하였고, DMSO 100 μ L을 가한 후, Plate reader로 450 nm에서 측정하였다. 그 결과를 도 13c에 나타내었다.
- [0208] 도 13c는 쥐 대식세포(mouse macrophage cells (Raw264.7))에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이다.
- [0209] 도 13c에 나타난 바와 같이, inotodiol을 쥐 대식세포(mouse macrophage cells, Raw264)에 처리한 결과, 이노토디올 50 μ M을 처리한 경우에는 대식세포의 세포 생존율에 영향이 없음을 확인하였다. 또한, 이노토디올 100 μ M을 처리한 경우에는 세포 생존률이 80%로 감소하였으나, 보통 세포 독성은 세포 생존률 80% 이상일 경우에는 없다고 판단하는 바, inotodiol이 대식세포에는 세포독성이 없음을 확인하였다. 이는 인간 호산구성 백혈병 세포(human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell)의 결과와 비교해 볼 때, 인간 호산구성 백혈병 세포에서 이노토디올이 세포독성을 보인 농도(2.5 μ M)의 20배 이상의 고농도에서도 세포독성이 나타나지 않은 것으로, 이노토디올이 호산구에 특이적으로 작용함을 의미한다.
- [0211] **7.4 Human dermal fibroblast primary cells (HDF)의 세포 생존률**
- [0212] 인간피부섬유아세포(Human dermal fibroblast primary cells, HDF cell)를 0.05×10^6 cells/ml로 96-well plate에 seeding한 후, overnight 배양하였다.
- [0213] 이노토디올(γ -CD + Inotodiol(3:1) inclusion complex, in DMSO) 2 mM stock을 Raw264.7 cell (100 μ L)에 1 μ L 처리 (final conc. 20 μ M)하고, 나머지 농도는 serial dilution하여 처리 (10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 μ M)하여 CO₂ incubation을 24 hr동안 수행하였다. MTT solution (5 mg/mL) 10 μ L을 첨가하여 2 hr배양 후, Solution suction하였고, DMSO 100 μ L을 가한 후, Plate reader로 450 nm에서 측정하였다. 그 결과를 도 13d에 나타내었다.
- [0214] 도 13d는 인간피부섬유아세포(Human dermal fibroblast primary cells, HDF cell)에 이노토디올을 농도별로 처리하여 세포 생존률(Cell viability)을 측정한 그래프이다.

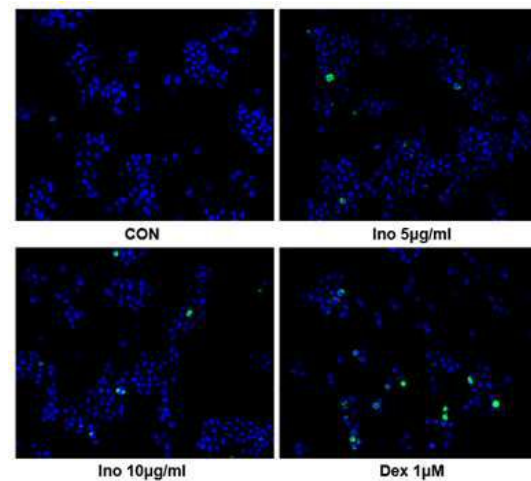
- [0215] 도 13d에 나타낸 바와 같이, inotodiol을 Human dermal fibroblast primary cell (HDF)에 처리한 경우, 이노토디올 20uM처리시에도 세포독성이 없음을 확인하였다.
- [0216] 이는 인간 호산구성 백혈병 세포(human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell)의 결과와 비교해 볼 때, 인간 호산구성 백혈병 세포에서 이노토디올이 세포독성을 보인 농도(2.5uM)의 8배 이상의 고농도(20uM)에서도 세포독성이 나타나지 않은 것으로, 이노토디올이 호산구에 특이적으로 작용함을 의미한다.

도면

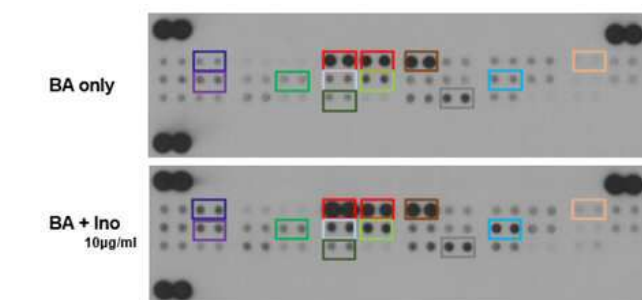
도면1



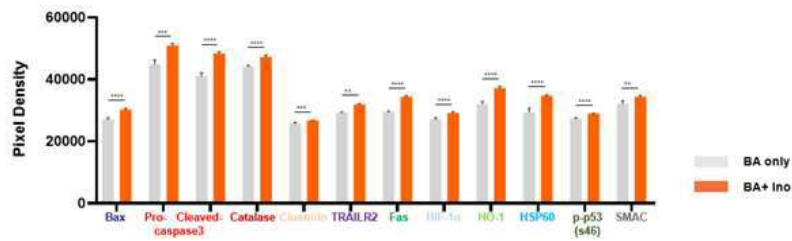
도면2



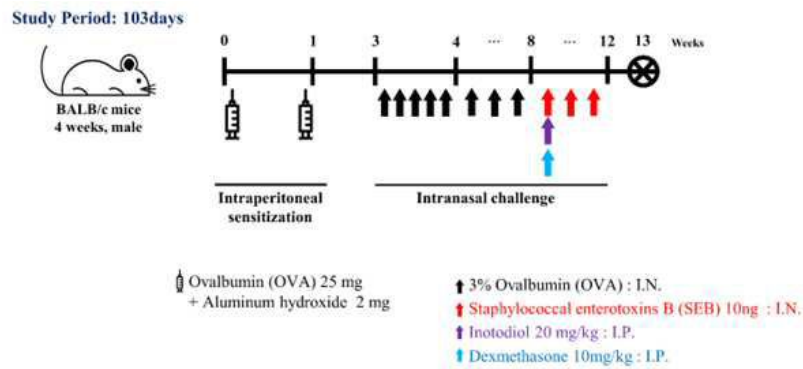
도면3a



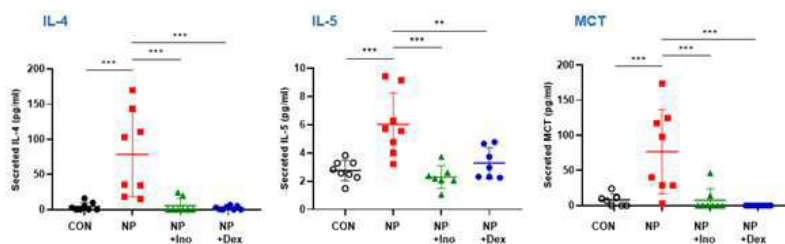
도면3b



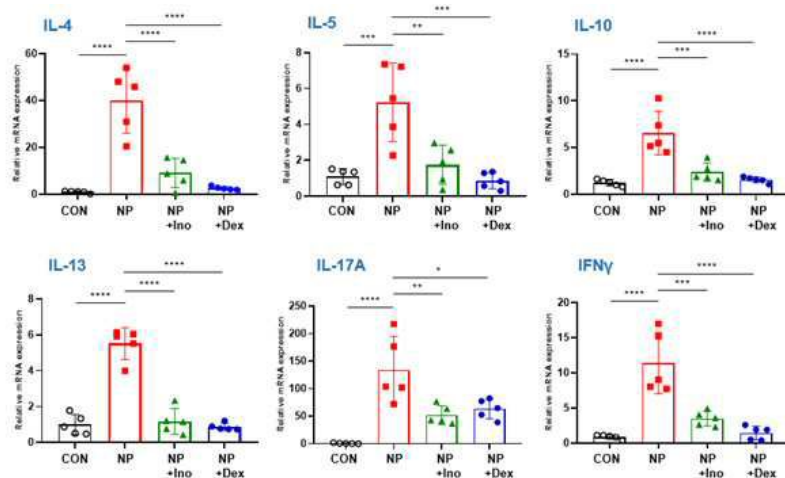
도면4



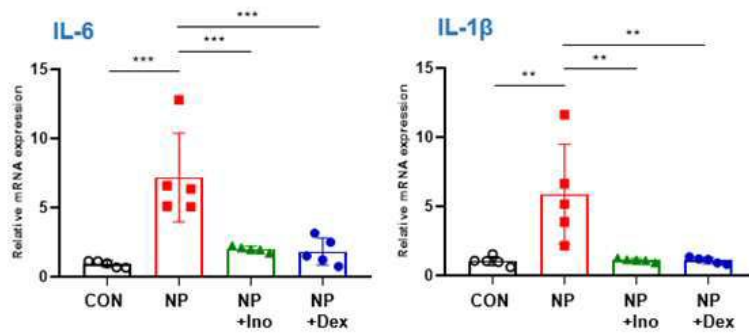
도면5



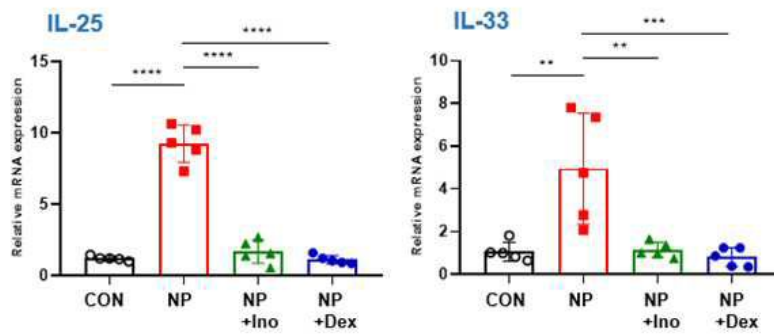
도면6



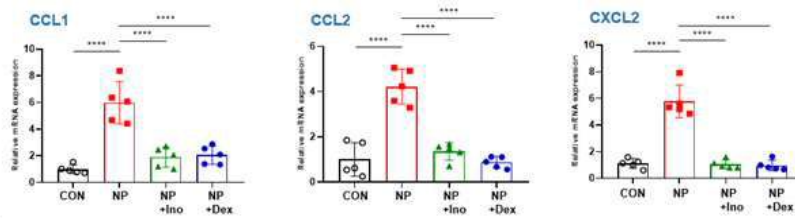
도면7



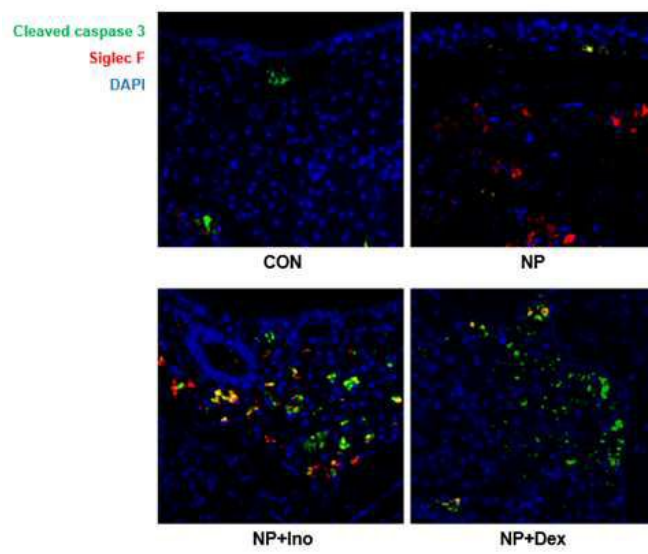
도면8



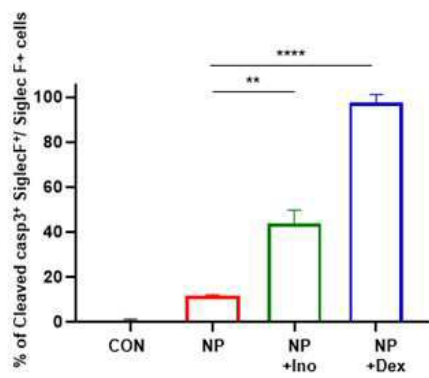
도면9



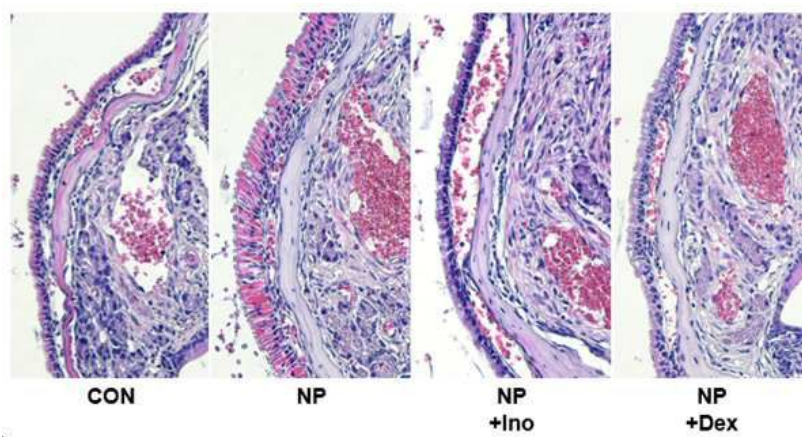
도면10a



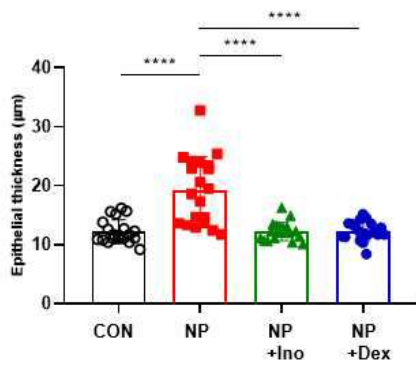
도면10b



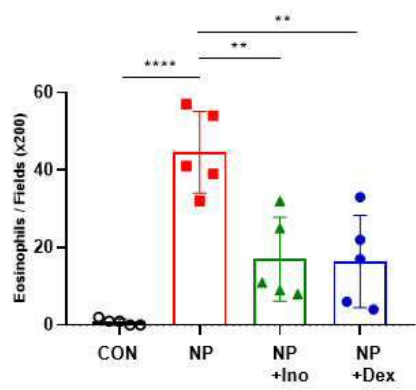
도면11a



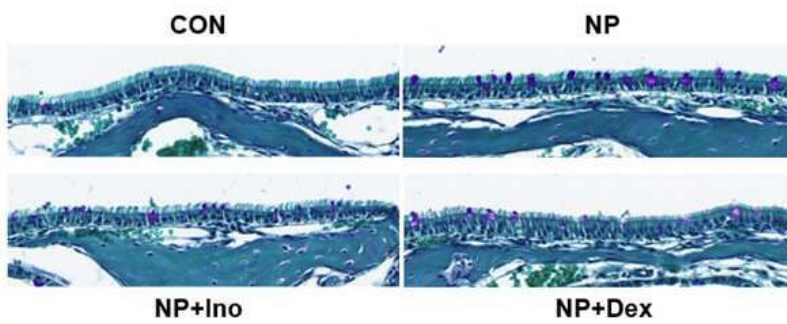
도면11b



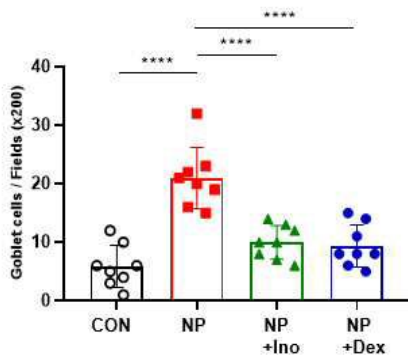
도면11c



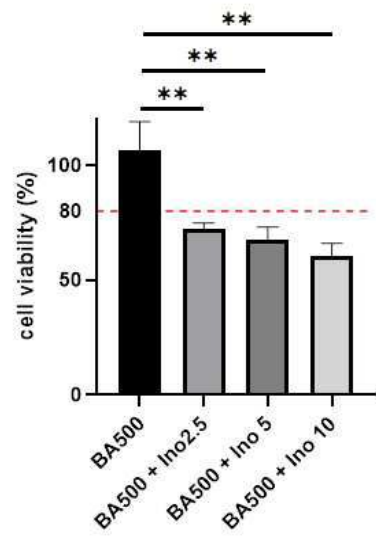
도면12a



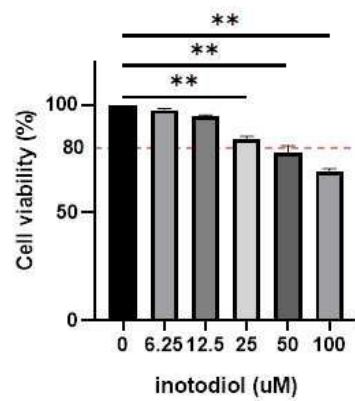
도면12b



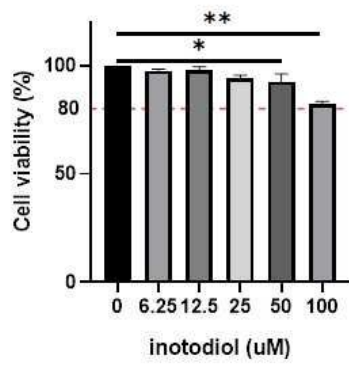
도면13a



도면13b



도면13c



도면13d

