

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2012년 5월 18일 (18.05.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/064072 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 31/4184 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/008447

(22) 국제출원일: 2011년 11월 8일 (08.11.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0110791 2010년 11월 9일 (09.11.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 부산 금정구 장전동 산 30 부산대학교, 609-735 Pusan (KR).

(72) 발명자: 김

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 민도식 (MIN, Do Sik) [KR/KR]; 부산시 해운대구 좌동 두산동국아파트 108동 703호, 612-030 Busan (KR). 유현정 (YOO, Hyun Jung) [KR/KR]; 부산시 동래구 안락 2동 강변뜨란채 ATP 106동 1304호, 607-772 Busan (KR). 강동우

(KANG, Dong Woo) [KR/KR]; 부산시 금정구 부곡 3동 15-19번지 2/5, 609-323 Busan (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 서울시 구로구 구로동 197-22번지 에이스테크노 5차 601호, 152-766 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

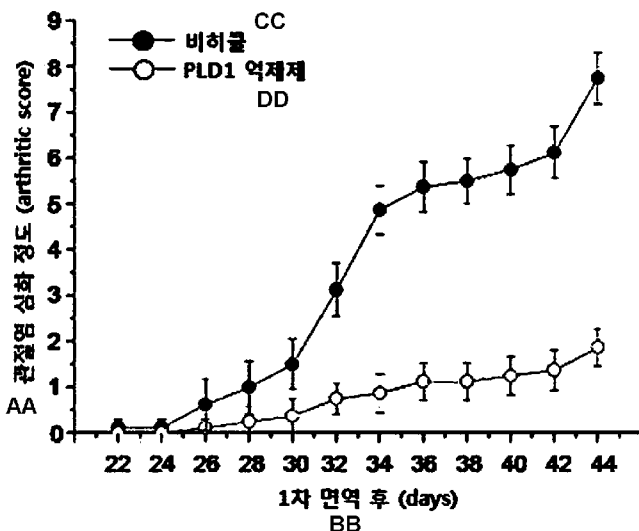
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING RHEUMATOID ARTHRITIS COMPRISING A PHOSPHOLIPASE D1 INHIBITOR AS AN ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 조성물

[Fig. 6]



AA ... Arthritic score (arthritic score)
BB ... After the first immunization (days)
CC ... Vehicle
DD ... PLD1 inhibitor

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating rheumatoid arthritis comprising a phospholipase D1 inhibitor as an active ingredient. The phospholipase D1 inhibitor of the present invention exhibits the effect of markedly improving the symptoms of rheumatoid arthritis by suppressing inflammation at joints through suppression of articular cartilage destruction, suppression of bone destruction and suppression of the production of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MCP-1 and IL-17); while the composition of the present invention, which comprises the phospholipase D1 inhibitor that has these characteristics as an active ingredient, can be used to advantage in the prevention or treatment of rheumatoid arthritis.

(57) 요약서: 본 발명은 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제는 관절연골 파괴 억제, 뼈의 파괴 억제 및 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IFN- γ , MCP-1 그리고 IL-17)의 생성 억제에 의한 관절부위의 염증을 억제시킴으로써 류마티스 관절염 증상을 현저히 개선시키는 효과를 나타내므로, 이러한 특징을 가진 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 류마티스성 관절염 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.



LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, **공개:**

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 조성물 및 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)은 여러 관절에 다발성으로 나타나는 염증성 자가면역질환이다. 관절염에 걸린 환자의 경우, 관절의 활막(synovial membrane)조직이 과증식(hyperplasia)되며, 판누스의 형성 및 연골 및 뼈의 파괴를 특징으로 한다. 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell) 및 활성화된 T 림프구와 B 림프구가 활막 조직으로 이동하고 다형핵 세포(polymorphonuclear cell)는 활액(synovial fluid)내와 연골(cartilage) 표면에 축적되어 염증을 유발하게 되는 것이다. 이와 같은 활막 조직의 염증은 알려지지 않은 자가항원에 대해 반응성이 있는 T 림프구가 유발하는 것으로 추측되고 있다.
- [3] 그럼에도 불구하고 대부분의 조직에 침윤된 T 림프구는 세포 표면에 활성화 표지를 나타내지 않으며 사이토카인을 거의 발현하지도 않는다. 이와 대조적으로 류마티스 관절염 증상을 가진 활막 조직과 활액에는 대식세포(macrophage)에서 유래된 사이토카인들이 매우 많이 관찰되고 있다. 이러한 사이토카인으로는 활막 섬유 세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려진 인터루킨-1 (IL-1), 종양괴사인자-알파 (TNF-alpha) 등이 있다. 이러한 실험 결과들은 T 림프구가 활막 조직의 염증을 유발하는 데 매우 중요하며, 이후의 염증증상은 활성화된 활막 세포들로부터 유래된 사이토카인에 의해 유지된다는 가설을 제시한다.
- [4] 류마티스 관절염에 대한 임상적 치료방법들은 여러 가지가 개발되어 있으며, 이는 일반 보존적 요법, 약물요법, 수술적 요법 등으로 나뉘어진다. 일반적으로 류마티스 관절염의 치료는 이 질병이 만성 관절염에 의한 관절통증과 관절의 변형, 기능의 소실을 유발하므로 통증과 염증을 억제하고 관절의 기능소실을 최소화하여 정상 생활로 복귀하는데 치료의 목표를 두고 있다.
- [5] 현재 사용되고 있는 치료 방법은 약물 요법인데, 이는 그 증상에 따라서 아스피린 & 비스테로이드성 소염제, 저용량 경구 스테로이드제, 설파살라진(sulfasalazine), 면역억제제 (메소트렉세이트(MTX), 이뮤란 (Immuran) 등), 금을 포함하는 화합물 약제(gold drugs: gold sodium thiosulfate)나 페니실아민(penicillamine), 항말라리아제 (anti-malarials)와 같은 항류마티스 약제 (DMARDs:

disease modifying anti-rheumatic drugs) 등이 사용된다. 그러나 이 제제들 역시 관절염의 진행을 다소 감소시키지만 심각한 부작용을 동반할 수 있기 때문에 DMARD를 이용한 치료법이 시작된 5년 이후에는 5-15% 환자만이 이 약물을 고수한다. 또한 관절 내 스테로이드제 주사 및 생물학적 제제인 etanercept (Enbrel™, Wyeth), infliximab (Remicade™, Centocor Ortho Biotech) 그리고 adalimumab (Humira™, Abbott) 등의 항-TNF 항체와 같은 종양괴사인자 차단제(tumor necrosis factor blockade), anakinra (Kineret™, Amgen)와 같은 interleukin-1 수용체 길항제, rituximab (Rituxan™, Roche)과 같은 항-CD20 항체 등이 사용된다.

- [6] 하지만, 이러한 약물요법은 위장장애, 간장애, 신장기능장애, 감염 등의 부작용이 발생할 수 있는 단점이 있고, 염증반응 억제에 주로 치중하여 개발되고 있는 실정이다. 이처럼 현재까지 개발되어 사용되고 있는 관절염 치료제의 대부분은 관절질환의 연골과 뼈조직을 보호 유지시키는데 주목하여 고안되었다기보다는 오히려 염증반응을 억제시키는 것이었으며, 대부분의 경우는 미미한 치료 효과만을 나타내는 한계를 갖고 있었다. 따라서 류마티스 관절염의 예방 및 치료를 위한 새로운 물질의 개발은 항상 요구되고 있다.

- [7] 한편, 포스포리파아제 D (Phospholipase D: PLD)는 포스파티딜콜린 (phosphatidyl choline: PC)을 분해하여 이차산물로 포스파티드산 (phosphatidic acid, PA)과 콜린을 생성시키는 효소로서, 생성물인 PA는 다시 phosphatidic acid phosphohydrolase (PPH)에 의하여 분해되어 디아실글리세롤 (diacylglycerol: DAG)이 생성된다. 이들 포스파티드산 전구체는 세포 신호전달과 대사경로에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 포스파티드산은 휴지기의 세포에서는 낮은 수준으로 존재하고, 포스포리파아제 D 활성화는 세포의 소포상 이동, 세포의 물질분비, 세포이동, 세포생존과 증식을 조절하는 기전에 의해 조절된다고 알려져 있다.

- [8] 포스포리파아제 D는 포유동물세포에서는 PLD1과 PLD2의 두 가지 동위효소로 존재하며, 활성화 기능에는 약간의 차이가 있다. 특히 포스포리파아제 D1 억제제 (도 1)의 경우는 유방암세포주의 침윤성 이동 (invasive migration)을 억제시키는 것으로 알려졌으며, 암전이를 차단하는데 유용하다고 보고되어 있다.

- [9] 이에 본 발명자들은 류마티스성 관절염에서 포스포리파아제 D 역할을 연구하던 중에 포스포리파아제 D의 활성을 억제할 수 있는 포스포리파아제 억제제가 류마티스 관절염 치료에 효능을 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 류마티스성 관절염을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 개발하여, 이를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물을

제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[12]

- [13] 본 발명은 또한 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제는 관절연골 파괴 억제, 뼈의 파괴 억제 및 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IFN- γ , MCP-1 그리고, IL-17)의 생성 억제에 의한 관절부위의 염증을 억제시킴으로써 류마티스 관절염 증상을 현저히 개선시키는 효과를 나타내므로, 이러한 특징을 가진 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 류마티스성 관절염 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제의 화학적 구조식을 나타낸 것이다.
- [16] 도 2는 활막세포에서 인터루킨-1 베타 (IL-1 β 와 포스포리파아제 D1 억제제를 처리한 후 염증관련 유전자의 mRNA 발현을 나타낸 전기영동사진이다 (PLD1 억제제-포스포리파아제 D1 억제제).
- [17] 도 3은 활막세포에서 인터루킨-1 베타 (IL-1 β 와 포스포리파아제 D1 억제제를 처리한 후 COX-2와 MMP-2의 단백질 발현을 나타낸 전기영동사진이다 (PLD1 억제제-포스포리파아제 D1 억제제).
- [18] 도 4는 인터루킨-1 베타 (IL-1 β 와 포스포리파아제 D1 억제제를 처리한 후 염증관련 사이토카인의 생성량을 나타낸 그래프이다 (PLD1 억제제-포스포리파아제 D1 억제제).
- [19] 도 5는 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델에 투여한 후 관절염의 발병을 억제 정도를 측정하여 나타낸 그래프이다 (PLD1 억제제-포스포리파아제 D1 억제제).
- [20] 도 6은 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델에 투여한 후 발부종 치료효과를 시간의 경과에 따른 관절염 진행단계 (index grade, scoring)로 측정한 그래프이다 (PLD1 억제제-포스포리파아제 D1 억제제).
- [21] 도 7은 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 정상 마우스, 콜라겐-유도 관절염 마우스 및 콜라겐-유도 관절염 마우스 복강에 투여한 후, 각각의 마우스 뒷발의 이미지를 나타낸 사진이다 (normal: 정상 마우스, 비히클: 콜라겐-유도 관절염 마우스, PLD1 억제제: 포스포리파아제 D1 억제제를 투여한 마우스).

- [22] 도 8은 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 정상 마우스, 콜라겐-유도 관절염 마우스 및 콜라겐-유도 관절염 마우스 복강에 투여한 후, 각각의 마우스 무릎부위와 뒷발의 구조를 마이크로 전산화 단층 촬영(micro-computed tomography scan)하고 3차원적으로 재구성한 이미지 사진이다 (normal: 정상 마우스, 비히클: 콜라겐-유도 관절염 마우스, PLD1 억제제: 포스포리파아제 D1 억제제를 투여한 마우스).
- [23] 도 9는 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 정상 마우스, 콜라겐-유도 관절염 마우스 및 콜라겐-유도 관절염 마우스 복강에 투여한 후, 각각의 마우스 무릎단면을 헤마토실린/에오진으로 염색한 사진이다 (normal: 정상 마우스, 비히클: 콜라겐-유도 관절염 마우스, PLD1 억제제: 포스포리파아제 D1 억제제를 투여한 마우스).
- [24] 도 10은 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 정상 마우스, 콜라겐-유도 관절염 마우스 및 콜라겐-유도 관절염 마우스 복강에 투여한 후, 각각의 마우스 염증 정도를 조직병리학적으로 분석한 그래프이다 (normal: 정상 마우스, 비히클: 콜라겐-유도 관절염 마우스, PLD1 억제제: 포스포리파아제 D1 억제제를 투여한 마우스).
- [25] 도 11은 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 정상 마우스, 콜라겐-유도 관절염 마우스 및 콜라겐-유도 관절염 마우스 복강에 투여한 후, 각각의 마우스 혈청에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MCP-1 그리고 IL-17의 농도를 나타낸 그래프이다 (normal: 정상 마우스, 비히클: 콜라겐-유도 관절염 마우스, PLD1 억제제: 포스포리파아제 D1 억제제를 투여한 마우스).

[26]

발명의 실시를 위한 형태

[27] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.

[28]

[29] 본 발명은 포스포리파아제 D1 억제제 (phospholipase D1 inhibitor: PLD1 inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[30] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제는 포스포리파아제 D1을 억제할 수 있는 물질이면 특별히 이를 제한하지는 않는다.

[31] 구체적으로, 본 발명의 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물로 사용할 수 있는 포스포리파아제 D1 억제제는 1-butanol, (1R, 2R)-N-([S]-1-{4-[5-bromo-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo(d)imidazole-1-yl]piperidin-1-yl}propan-2-yl)-2-phenylcyclopropanecarboxamide (VU0359595, C₂₅H₂₉BrN₄O₂), N-(2-{4-[2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo(d)imidazole-1-yl]piperidin-1-yl}ethyl)-2-naphthamide (VU0155056, C₂₅H₂₆N₄O₂) 및 N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidinyl]-1-met

hylethyl]-2-naphthalenecarboxamide (VU0155069, $C_{26}H_{27}ClN_4O_2$)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

- [32] 본 발명의 일 구체예에서 포스포리파아제 D1 억제제는 N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidiny]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide이다.
- [33] 상기 N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidiny]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide는 분자식이 $C_{26}H_{27}ClN_4O_2$ 이고, 분자량은 462.97이다. 본 물질의 화학구조는 도 1에 나타내었다.
- [34] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제는 관절부위의 염증, 관절연골 파괴 및 뼈의 파괴를 억제하는 효과가 있으며, 구체적으로는 종양괴사인자-알파 (TNF-alpha), 인터루킨-1 베타 (IL-1 β), 인터루킨-6 (IL-6) 및 인터페론-감마 (IFN-gamma), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) 및 인터루킨-17 (IL-17)의 생성을 억제하는 효과를 가진다.
- [35] 따라서 이러한 특징을 가진 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 류마티스성 관절염 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [36] 본 발명에 따른 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물일 수 있다.
- [37] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [38] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [39] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및

생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분이상을 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 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[40] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 상기 억제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[41]

[42] 본 발명은 또한 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 건강 기능성 식품을 제공한다.

[43] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제는 포스포리파아제 D1을 억제할 수 있는 물질이면 특별히 이를 제한하지는 않는다.

[44] 상기 포스포리파아제 D1 억제제는 N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidinyl]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide 일 수 있다. 또한 상기 포스포리파아제 D1 억제제는 화학식 1로 표시될 수 있다.

[45] 상기 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 건강 기능성 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 또는 건강보조식품류일 수 있다.

[46]

[47] 본 발명은 또한 류마티스성 관절염 예방, 치료 의약 또는 식품의 제조를 위한 상기 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 관절염과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[48]

[49] 또한 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 포스포리파아제 D1 억제제를 투여하는 것을 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[50] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

- [51] 여기에서 사용된 용어 치료상 "유효량"은 연구자, 의사, 또는 기타 임상에서 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, 1mg/kg~500mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 1mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 좋다.
- [52] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [53]
- [54] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들 및 실험예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들 및 실험예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들 및 실험예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [55]
- [56] [실시예]
- [57] 실시예 1. 실험동물모델 선정 및 처치
- [58] DBA1/J 웅성의 20-25g 마우스를 중앙실험동물에서 구입하여 2주일 간 검역과 순화사육을 거쳐 적응성을 나타내는 건강한 동물만을 실험에 이용하였다. 본 실험은 온도 18-22°C, 상대습도 40-60%, 조명시간 12시간 (낮과 밤 주기)로 설정된 사육 환경이 갖춰진 양산 부산대학교병원 실험동물센터 SPF (specific pathogen free) 동물 사육실에서 실시되었으며, 모든 마우스에 실험동물용 고형사료 및 멸균된 상수도 (음수)를 자유 섭취시켰다.
- [59]
- [60] 실시예 2. 마우스 복강 투여용 포스포리파아제 D1 억제제 주사액 제조
- [61] 본 발명에 의한 관절염 치료용 주사액은 포스포리파아제 D1 억제제(N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidinyl]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide)를 전자저울을 이용해 필요한 양만큼

칭량 후 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹이고 10% DMSO가 되도록 멸균된 PBS에 희석하여 제조하였다. 이 주사액을 면역화된 콜라겐-유도 관절염 마우스의 복강에 5mg/kg씩 2일에 1회 간격으로 3주간 총 12회 주사하였다.

[62] [화학식1]

[63]

[64] 실시예 3. 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델의 제조

[65] 포스포리파아제 D1 억제제의 관절염 치료효과를 알아보기 위하여 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델 시험을 실시하였다.

[66] 콜라겐-유도 관절염 (collagen-induced arthritis, CIA) 마우스 모델은 인간의 류마티스 관절염과 유사한 특징을 지닌 자가면역질환계열의 관절염 모델로서, 하기와 같이 제조하였다.

[67] 소(牛)의 2형 콜라겐을 프로인트 완전 보조제 (complete Freund's adjuvant)에 얼음으로 냉각하면서 3ml 주사기에 연결된 T-연결기를 이용하여 균질하게 에멀전화 (emulsification)하였다. 이 에멀전화된 콜라겐 용액을 6주령의 DBA1/J 마우스의 꼬리 기저부에 피내 주사하여 면역원을 투여하였다. 1차 면역 후 21일째에 소의 2형 콜라겐을 프로인트 불완전 보조제 (incomplete Freund's adjuvant)에 혼합하여 에멀전화한 후 꼬리 기저부에 피내 주사하여 2차 면역 (boosting)반응을 유도하였으며, 2차 면역 후 관절염 증상이 점차적으로 나타나기 시작하였고, 관절염증의 임상질병지수를 판단하였다. 관절염 병변의 육안 관찰은 다음과 같은 스코어를 사용하여 실시하였다. 0: 종창 및 발적이 없음, 1: 발목관절의 경미한 발적 및 종창, 2: 발목 관절부 발적 및 종창이 뚜렷함, 3: 손가락 관절을 포함하여 발적, 종창의 정도가 심함, 4: 관절의 전 부위에 걸쳐 종창이 극심함. 따라서 관절병변의 최고 스코어는 다리 하나 당 4이고, 마우스 한 마리당 좌우의 앞발, 뒷발을 합하여 최고의 질병지수는 16이었다.

[68]

[69] 실시예 4. 육안적 관찰에 의한 관절염 지수 비교

[70] 2차 면역 후 마우스의 앞발과 뒷발을 이틀 간격으로 육안으로 관찰하여, 염증에 의한 관절염이 발생하였는지를 확인하였다.

[71]

[72] 실험예 1. 포스포리파아제 D1 억제제의 전염증사이토카인 억제 효과

[73] 관절염 환자의 수술시 얻은 활막세포 (fibroblast-like synoviocyte)를 채취 및

배양한 후 IL-1 β 로 자극시켜 전염증사이토카인 (proinflammatory cytokine)과 골 파괴 효소인 매트릭스 메탈로프로테이네이즈 (matrix metalloproteinase: MMPs) 등의 생성량을 증가하게 만들었다. 이 때 포스포리파아제 D1 억제제를 농도별로 5, 10 μ M씩 각각 처리하여 싸이클로옥시게나아제 2 (cyclooxygenase-2: COX-2), 메탈로프로테이네이즈 2 (metalloproteinase-2: MMP-2), 인터루킨-6 (IL-6), 인터루킨-8 (IL-8), 인터루킨-15 (IL-15) 및 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)과 같은 전염증인자 (proinflammatory mediator) 들의 전사가 억제되는 것을 역전사 효소 PCR법을 이용하여 관찰할 수 있었다 (도 2 참조).

[74] COX-2 와 MMP-2의 경우, 전사 수준은 농도 의존적으로 감소한 것이 관찰되었고 번역 수준에서 포스포리파아제 D1 억제제 효과를 웨스턴 블롯 방법으로 조사하여, 포스포리파아제 D1 억제제가 농도 의존적으로 COX-2 와 MMP-2의 단백질 발현량을 억제시키는 것도 관찰할 수 있었다 (도 3 참조).

[75] 또한 본 실험에서 포스포리파아제 D1 억제제는 농도 의존적으로 VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-6, IL-8, IL-15 그리고 MCP-1의 생성량이 통계적으로 유의적으로 감소한 것을 ELISA 방법을 통해 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[76]

[77] 실험예 2. 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델을 이용한 관절염 치료 효과 실험

[78] 1차 면역반응 유도하고 3주 후 2차 면역 반응을 유도 후, 2일 간격으로 3주 동안 포스포리파아제 D1 억제제를 투여하였다. 그룹 당 8마리의 마우스를 선택한 후 포스포리파아제 D1 억제제는 10% DMSO 에 5 mg/kg 로 복강 내 주사의 방법으로 투여하였다. 한편 비히클 (vehicle) 투여군의 경우는 10% DMSO 만을 복강 내 주사하였다. 이후 관절염 진행 추이를 살펴며 관절 부위의 홍반과 종창(joint swelling)과 같은 육안적 소견, 관절 부위 활막 세포의 과증식 정도, 연골 및 뼈의 손상도 측정과 같은 조직학적 소견 및 염증관련 사이토카인 레벨과 같은 분자 생물학적 소견 등을 조사하여 관절염의 심화 정도를 측정하였다. 포스포리파아제 D1 억제제는 어떤 독성 신호도 나타내지 않았으며, 치사율도 관찰되지 않았다.

[79] 종창 정도를 기준으로 하여 관절염 발생률을 조사하였을 경우, 비히클 투여군의 경우 관절염 발생률이 100%인 반면에 포스포리파아제 D1 억제제 투여군은 30~40%를 나타내었다. 이로서 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제가 관절염 발생률을 현저히 감소시킴을 확인할 수 있었다 (도 5 참조).

[80] 관절염의 심화 정도를 측정했을 때, 발목 부위의 관절염 진행은 관절 부위 종창과 같은 육안적 소견으로 판단하였고, 시간에 따른 관절염의 치료 효과 정도를 관절염의 발병율 및 관절염증의 임상질병지수(clinical arthritic score index)를 기준으로 나타내었다. 또한 마우스의 관절염 진행 지수를 조사한 결과, 포스포리파아제 D1 억제제 투여군이 비히클 투여군에 비해 유의적으로 관절염 진행지수를 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 6 및 도 7참조).

[81]

[82] **실험예 3. 관절연골 및 뼈 분석**

[83] 관절염이 발생한 마우스의 연골 및 뼈조직을 3차원적으로 분석하기 위하여 마우스의 무릎관절과 뒷발을 마이크로 전산화단층 촬영(micro-computed tomography scan) 장치로 촬영한 후, 소프트웨어 프로그램으로 3차원 재구성하였다. 비히클을 투여한 마우스의 무릎관절과 뒷발에서 에서는 연골과 뼈의 소실과 변형이 나타나는 전형적인 관절염 소견을 보였고, 포스포리파아제 D1 억제제를 처리한 마우스에서는 정상마우스와 유사한 소견이 관찰되어, 관절염의 치료효과가 육안으로 확인되었다 (도 8 참조).

[84]

[85] **실험예 4. 관절염 심화 정도의 측정**[86] 조직 병리학적 관절염 심화 정도 측정 방법

[87] 류마티스성 관절염의 병리 중 가장 중요한 점은 관절 활막세포의 과증식과 이로 인한 연골 조직의 비가역적 파괴로 요약 될 수 있으며, 이 활막세포의 과증식과 연골조직 손상의 진행을 판정하기 위해, 조직학적 분석이 가장 유효하다.

[88] 정상 마우스, 콜라겐-유도 관절염 마우스와 콜라겐-유도 관절염에 포스포리파아제 D1 억제제를 투여한 마우스 각각의 무릎 조직을 분리하여 10% neutral buffered formalin (NBF) 고정액에 고정하고, 10% EDTA 용액을 이용하여 칼슘제거과정 (decalcification)을 거친 후에 파라핀에 포매하였다. 이후 4 μ m의 조직 절편을 만들고 헤마톡실린/에오신 (hematoxylin/eosin)염색을 수행하였다 (도 9 참조).

[89] 상기 관절염 심화 정도를 측정하기 위한 지표들의 구체적인 판정 또는 측정 방법으로서 비히클을 투여한 군, 포스포리파아제 D1 억제제 투여군의 무릎관절을 분리하여 조직학적 분석을 수행하였다. 훈련된 연구원이 어떤 동물이 비히클 또는 약제를 투여받았는지를 알지 못한 상태에서 관절염의 발생 및 심각성을 헤마톡실린/에오신 염색 사진을 관찰하여 활막조직의 염증도 (synovial inflammation), 뼈 침식정도 (bone erosion), 연골세포 파괴정도 (cartilage damage) 그리고 면역세포의 침윤 (leukocyte infiltration)의 4가지 평가기준으로 판단하였다.

[90] 그 결과 도 10에서 나타난 바와 같이, 4가지 평가기준 모두에서 포스포리파아제 D1 억제제 투여군이 비히클 투여군과 비교하여 월등히 낮은 수치를 나타내는 것을 알 수 있었으며, 이를 통해 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제가 활막세포의 과증식과 연골조직 손상의 진행의 억제를 통한 관절염 치료에 효과가 있음을 유추할 수 있었다.

[91]

[92] 분자생물학적 분석을 이용한 염증의 심화정도 측정

[93] 마우스 혈액 내 염증성 사이토카인(TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, INF-gamma,

MCP-1 그리고 IL-17)의 농도는 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

- [94] 그 결과 도 11에서 보이는 바와 같이, 포스포리파아제 D1 억제제 투여군은 TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IFN-gamma, MCP-1 그리고 IL-17의 농도가 비히클을 투여한 군과 비교하여 현저하게 감소된 것을 알 수 있었다 (도 11 참조).

[95]

- [96] 전체적으로 포스포리파아제 D1 억제제를 이용한 관절염의 치료효과를 확인하기 위하여, 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델을 이용하여 관절염에 대한 치료 효과를 시험하여 본 결과, 류마티스 관절염 마우스에 비해 포스포리파아제 D1 억제제 투여군은 관절염 발생율도 감소하였고, 관절염이 발생한 개체의 경우 발목 관절의 붓기 정도가 현저히 감소하였다. 또한 무릎 관절 부위의 조직학적인 소견으로도 류마티스 관절염 마우스에 비해 연골조직의 손상 정도가 현저히 감소하여 본 발명의 관절염의 발생 억제 및 치료에 효과적임을 확인할 수 있었다. 복강 투여에 사용되는 용액은 PBS와 혼합된 10% DMSO를 사용하였다.

- [97] 특히, 류마티스 관절염 마우스에 비해 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제가 투여했을 경우, 관절염의 진행 정도에 밀접하게 관여하는 것으로 알려진 염증성 사이토카인 (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IFN-gamma 등)이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[98]

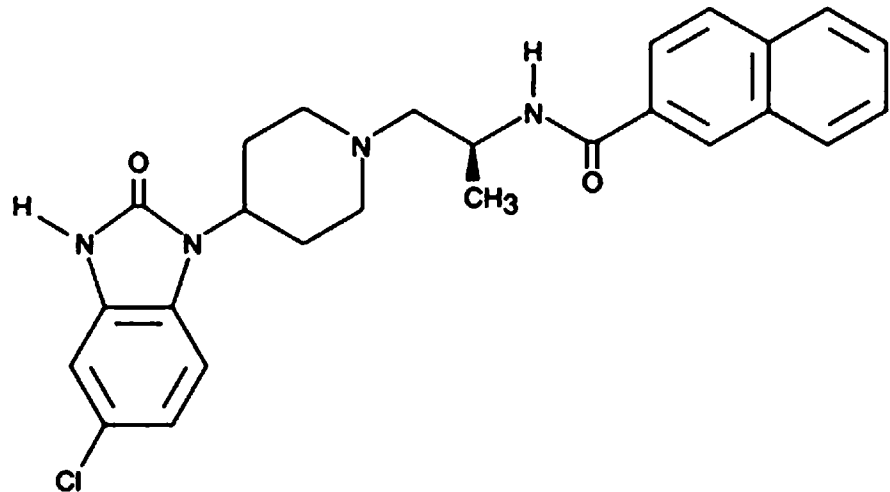
산업상 이용가능성

- [99] 본 발명의 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 류마티스성 관절염의 예방 또는 치료 효과를 보이므로, 이를 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물 또는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 건강기능식품으로 이용할 수 있다.

[100]

청구범위

- [청구항 1] 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 포스포리파아제 D1 억제제는 하기 화학식 1인 것을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- 화학식 1



- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 포스포리파아제 D1 억제제는 N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidiny]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide인 것을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 포스포리파아제 D1 억제제는 관절연골 파괴 억제, 뼈의 파괴 억제 및 염증성 사이토카인의 생성 억제에 의한 관절부위의 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IFN- γ , MCP-1 및 IL-17로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 7] 포스포리파아제 D1 억제제를 유효성분으로 포함하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 건강 기능 식품.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,

상기 포스포리파아제 D1 억제제는

N-[(1S)-2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-pi
peridiny]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide인 것을

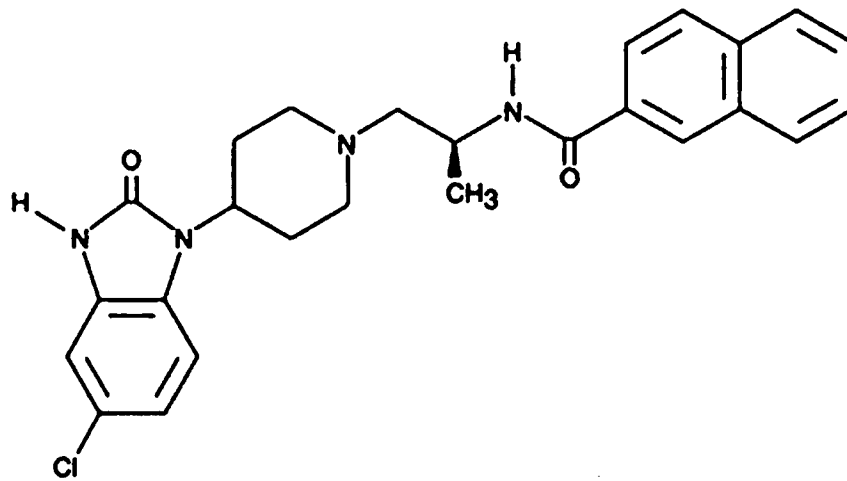
특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용 건강 기능
식품.

[청구항 9]

제7항 또는 제8항에 있어서,

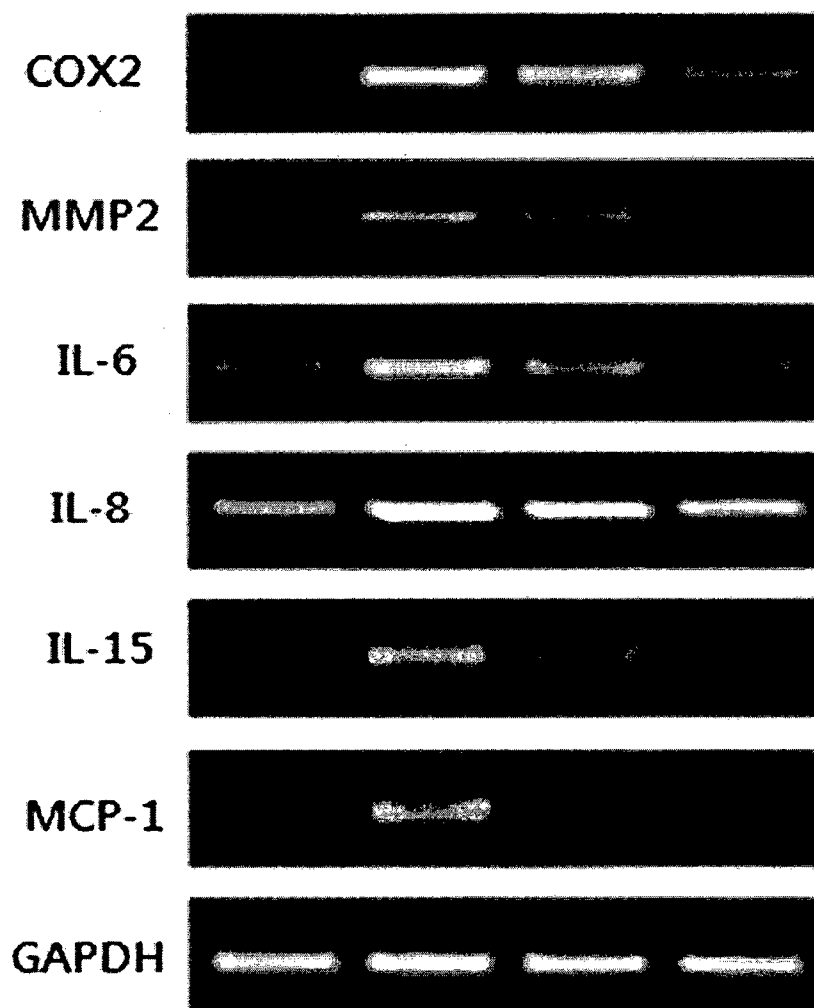
상기 건강 기능 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자,
라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류,
비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택된
1종인 것을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 예방 또는 치료용
건강 기능 식품.

[Fig. 1]

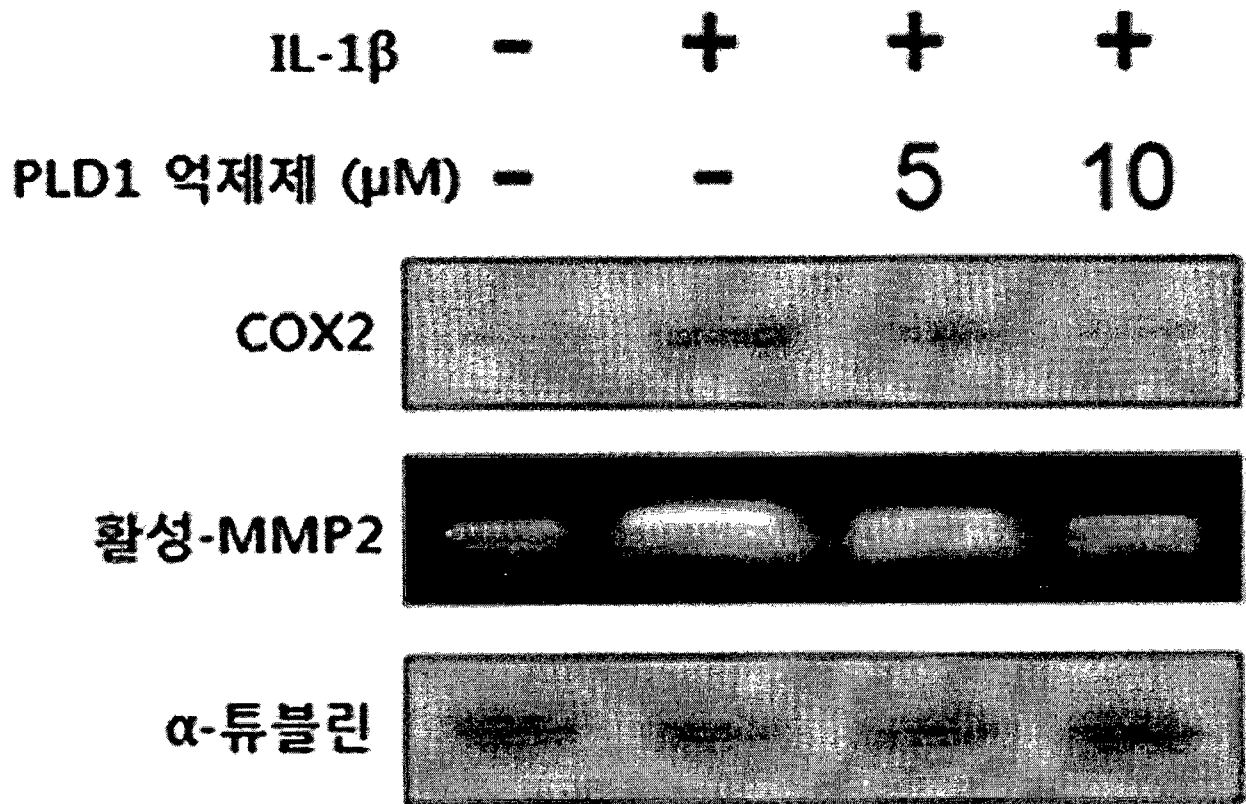


[Fig. 2]

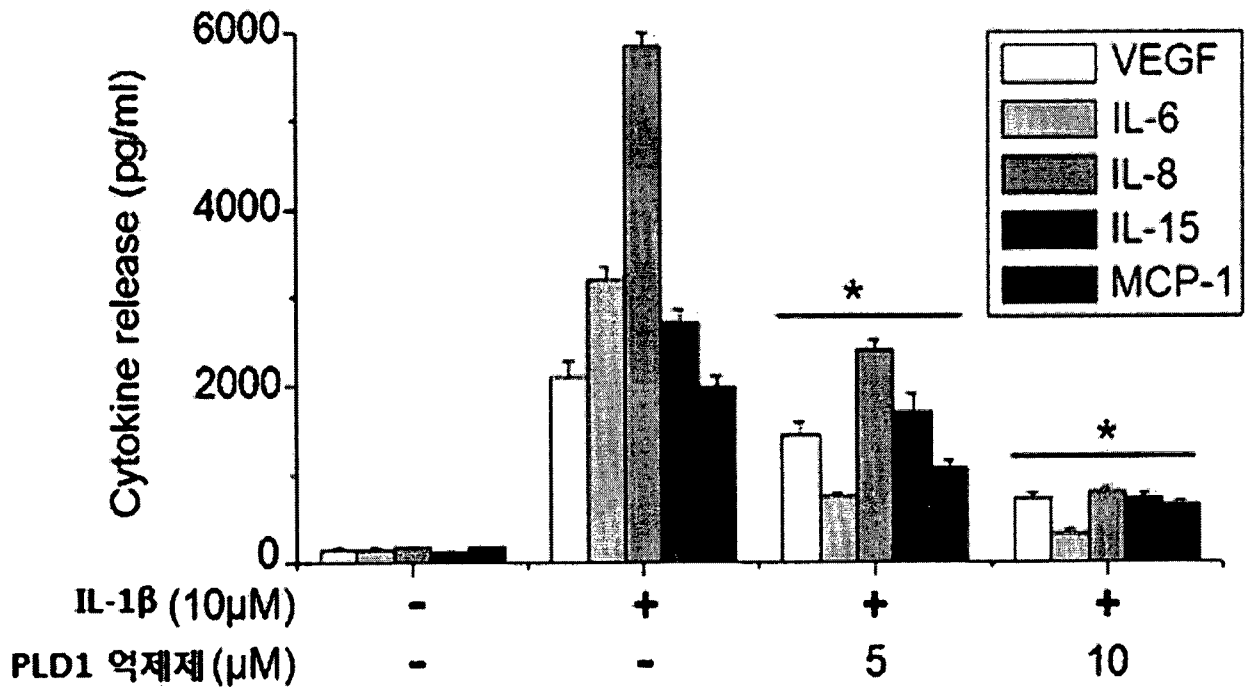
IL-1 β	-	+	+	+
PLD1 억제제 (μ M)	-	-	5	10



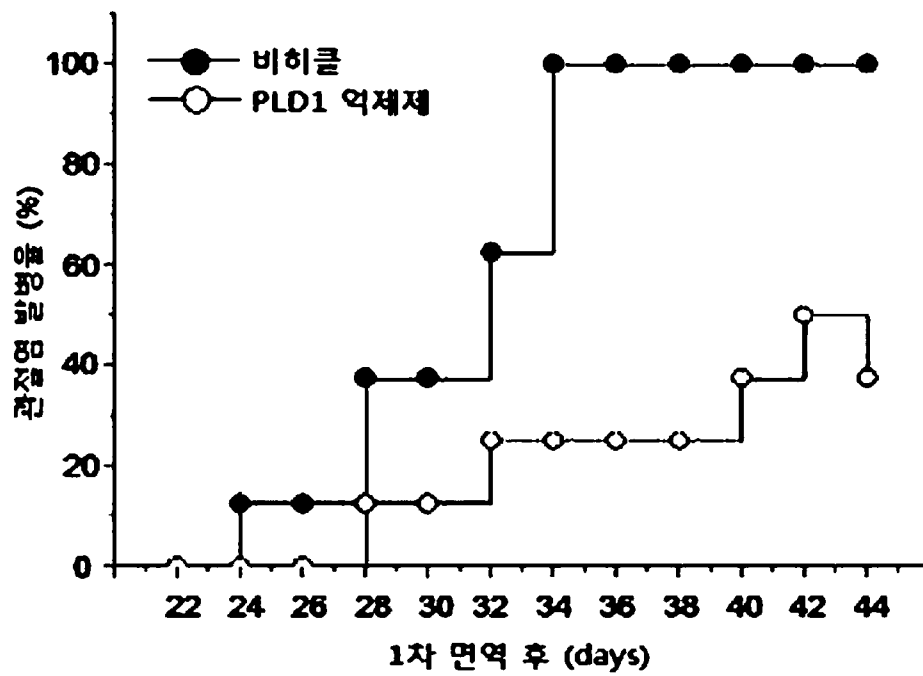
[Fig. 3]



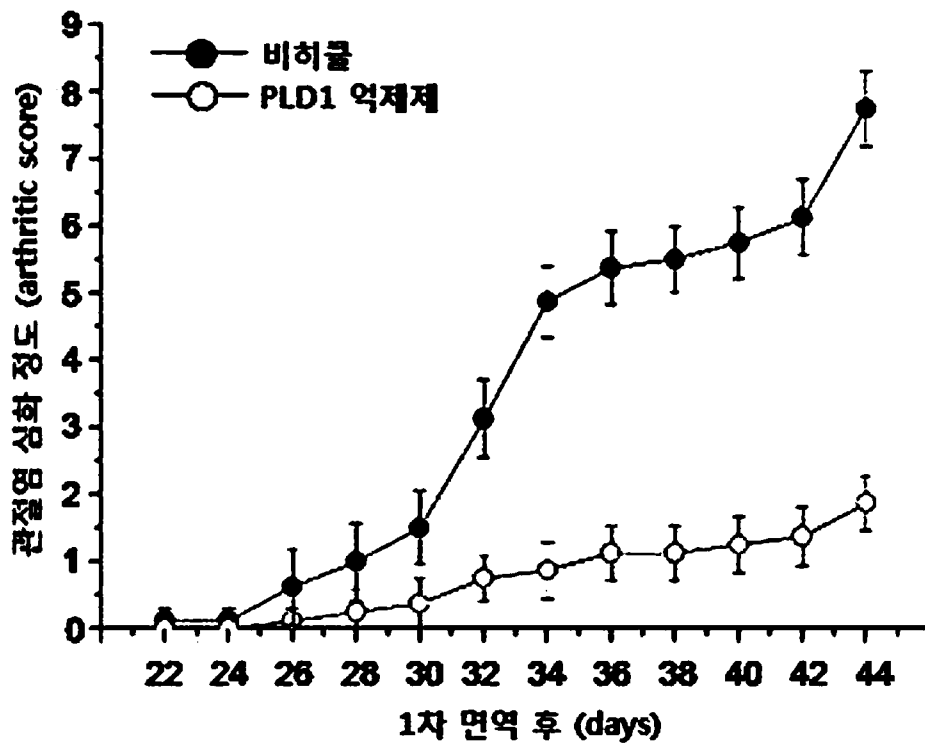
[Fig. 4]



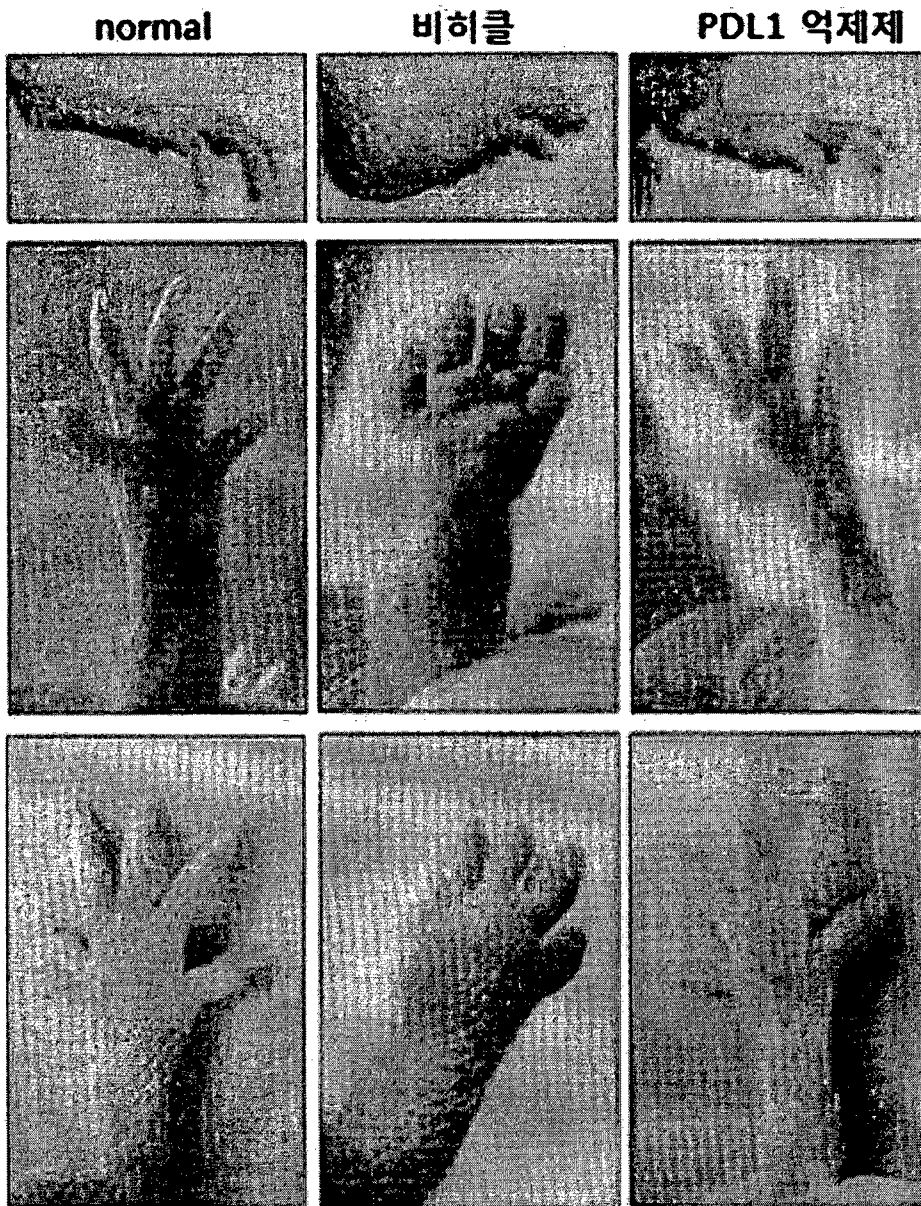
[Fig. 5]



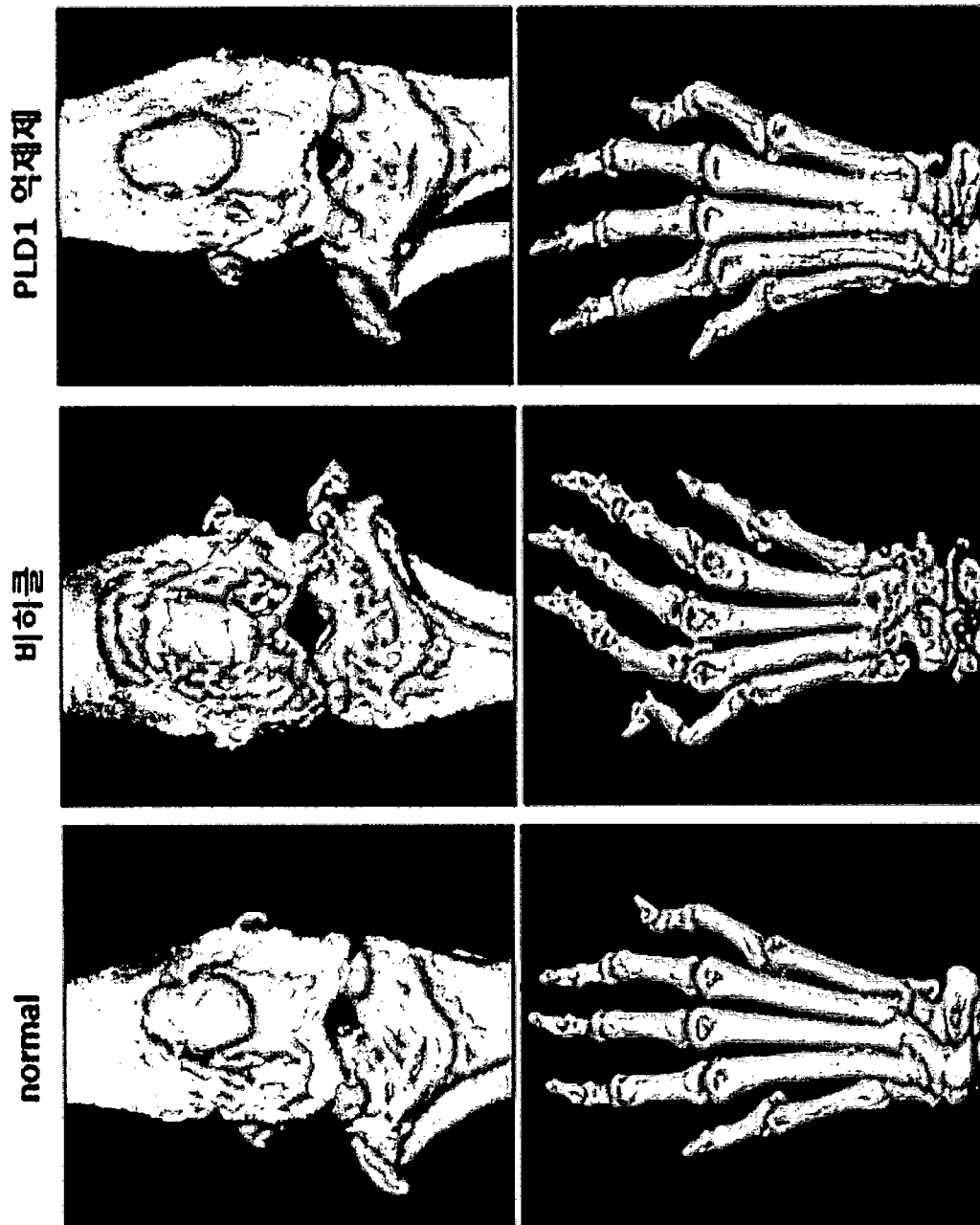
[Fig. 6]



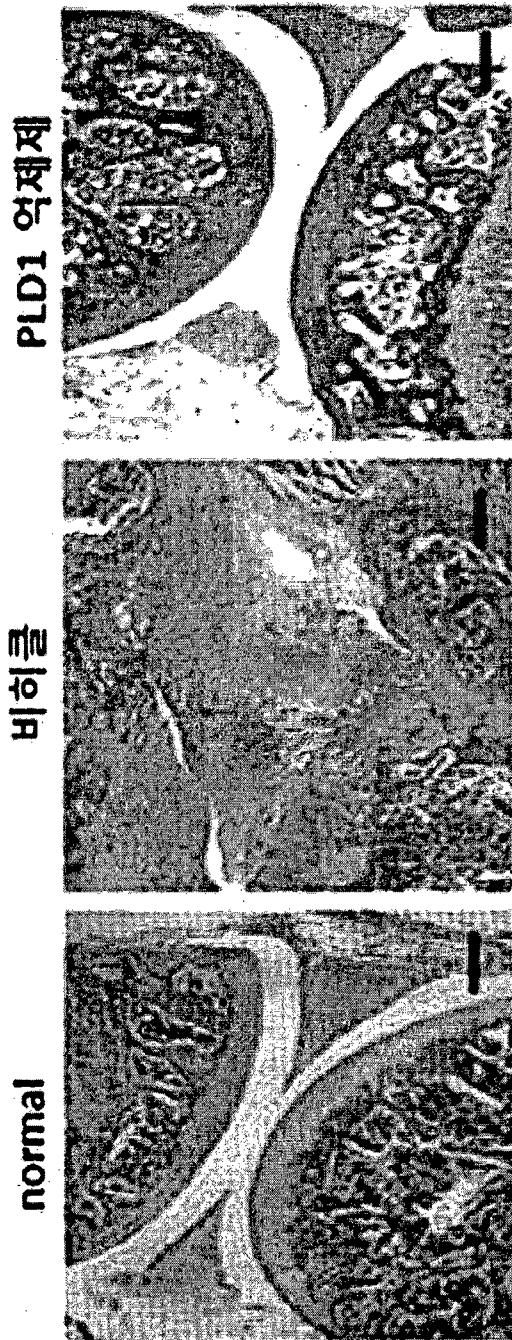
[Fig. 7]



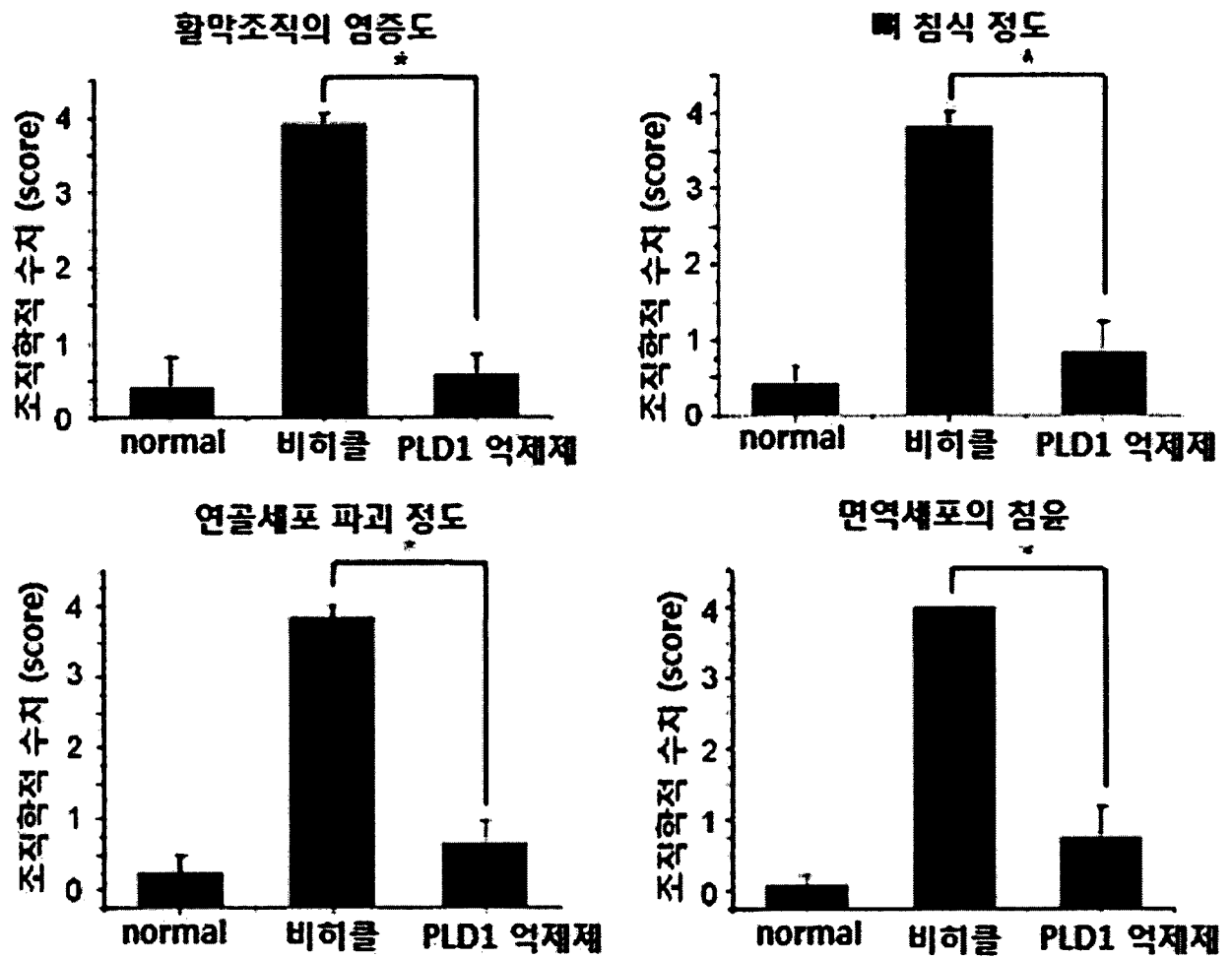
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

