



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월10일
(11) 등록번호 10-1949451
(24) 등록일자 2019년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 279/26 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/155 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01) A61K 8/43 (2006.01)
A61K 8/46 (2006.01) C07C 233/06 (2006.01)
C07C 279/18 (2006.01) C07C 311/21 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 279/26 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0131313
(22) 출원일자 2016년10월11일
심사청구일자 2016년10월11일
(65) 공개번호 10-2017-0043457
(43) 공개일자 2017년04월21일
(30) 우선권주장
1020150142929 2015년10월13일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
US20130095140 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
주식회사 이노파마스크린
인천광역시 연수구 인천타워대로 323, 비동 3201호(송도동, 송도센트로드)
(72) 발명자
강인철
인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 32, 201동 701호(송도동, 송도자이하버뷰2단지)
(74) 대리인
구현서

전체 청구항 수 : 총 9 항

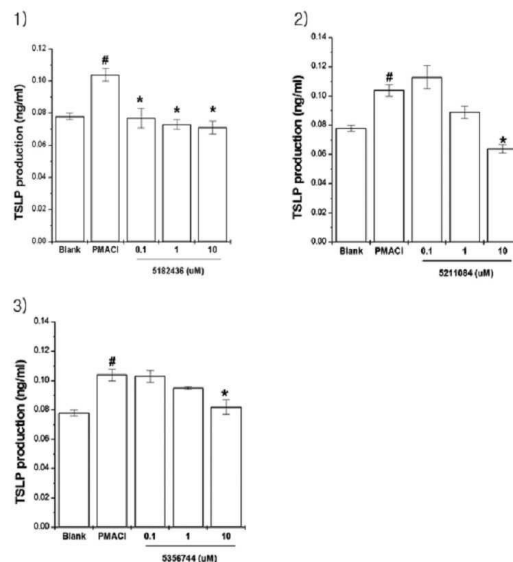
심사관 : 조수익

(54) 발명의 명칭 염증성 장 질환 및 아토피 피부염 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 비만세포로부터 TSLP(Thymic Stromal Lymphopoietin) 분비를 억제하는 화합물 및 그 용도에 관한 것으로, 본 발명의 화합물은 비만세포로부터 TSLP 분비를 유의적으로 억제함을 확인하였으며, 이에 따라 아토피 피부염, 알레르기성 피부염, 및/또는 염증성 장질환에 대한 치료 및 예방 후보물질로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/155 (2013.01)
A61K 31/167 (2013.01)
A61K 31/18 (2013.01)
A61K 8/43 (2013.01)
A61K 8/46 (2013.01)
C07C 233/06 (2013.01)
C07C 279/18 (2013.01)
C07C 311/21 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110010763 A*
W02003037346 A1*
Chemical Abstract 화합물, STN express. RN
300382-90-5 (Entered STN: 2000.10.30. 공개)*
KR101901895 B1*

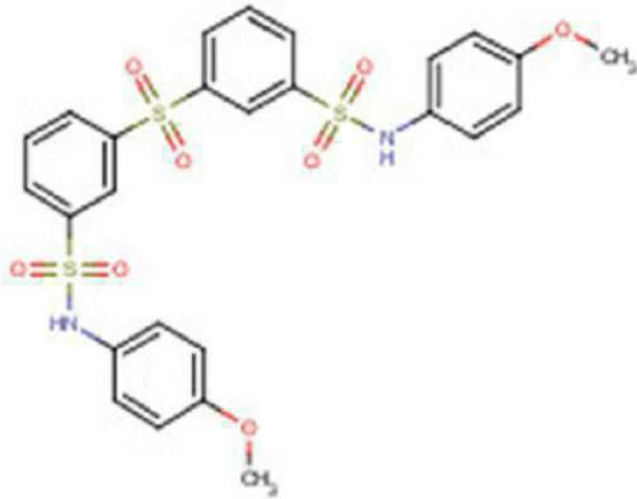
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 인간의 아토피 피부염 예방 및 치료용 약학 조성물.



[화학식 2]



[화학식 3]

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인간의 아토피 피부염 예방 및 치료용 약학 조성물은 비만세포(mast cell)로부터 TSLP(Thymic Stromal Lymphopoietin) 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 인간의 아토피 피부염 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

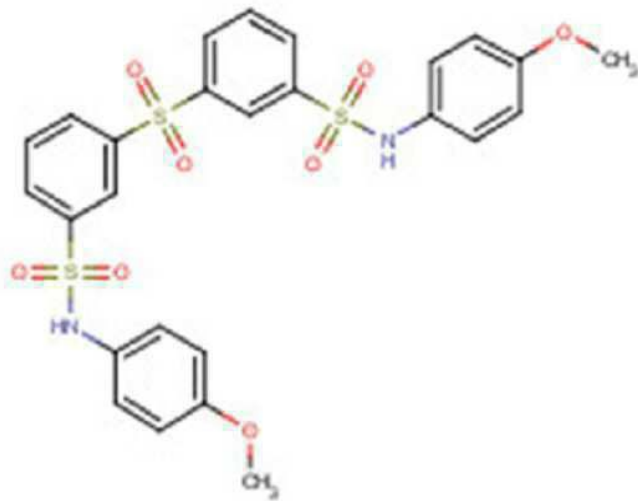
삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 인간의 알레르기 및 치료용 약학 조성물.



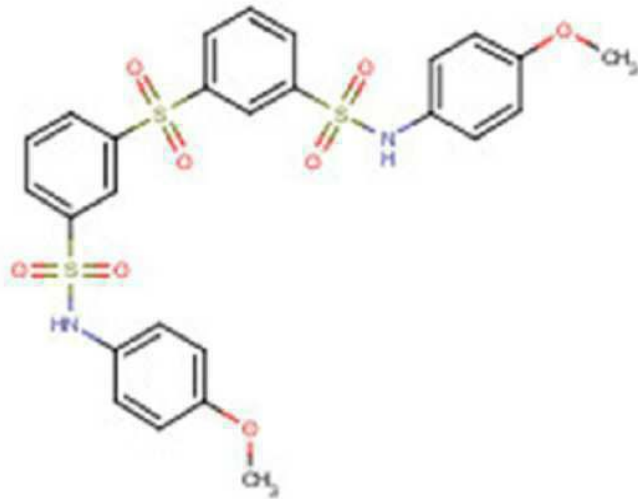
[화학식 2]



[화학식 3]

청구항 6

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선 및 완화용 화장품 조성물.



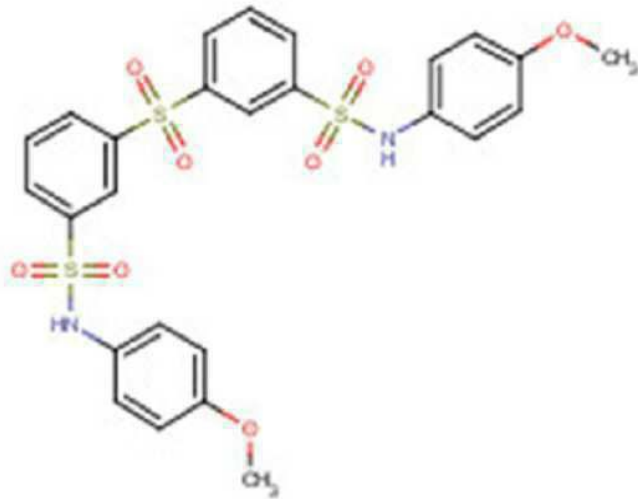
[화학식 2]



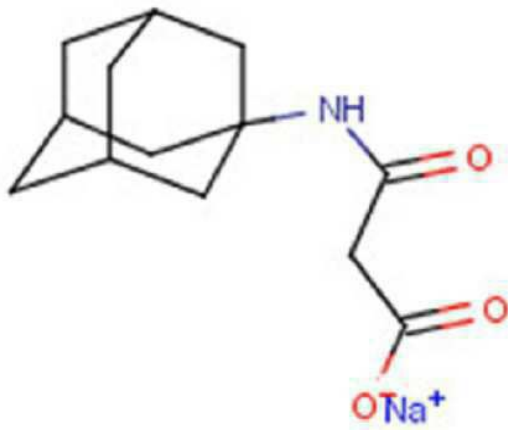
[화학식 3]

청구항 7

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 및 완화용 화장품 조성물.



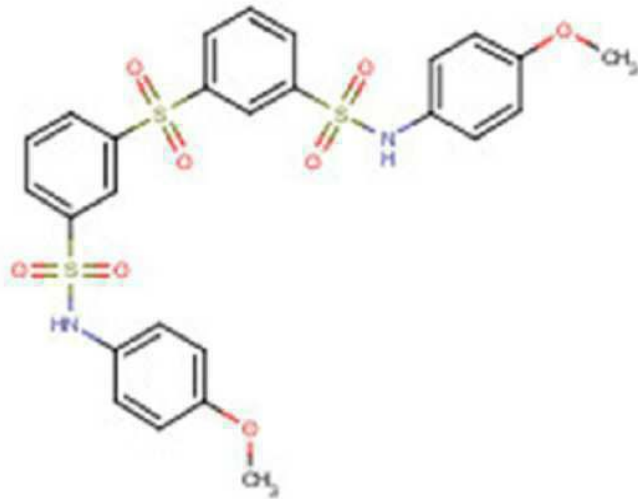
[화학식 2]



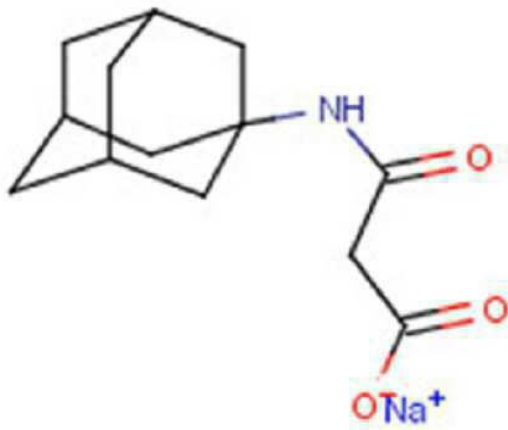
[화학식 3]

청구항 8

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 인간의 아토피 피부염 개선 및 완화용 식품 조성물.



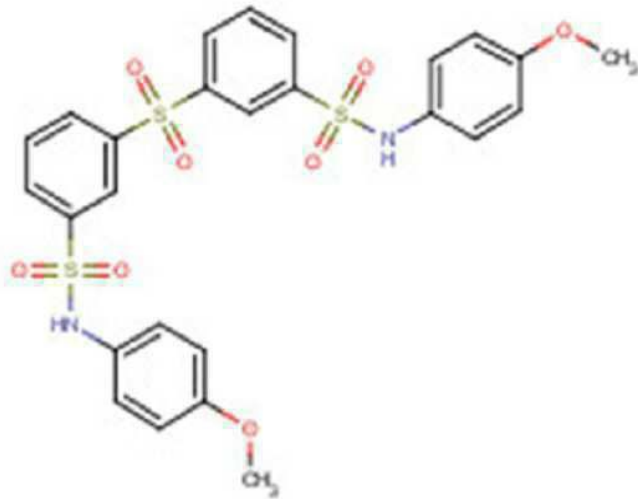
[화학식 2]



[화학식 3]

청구항 9

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 인간의 알레르기 개선 및 완화용 식품 조성물.



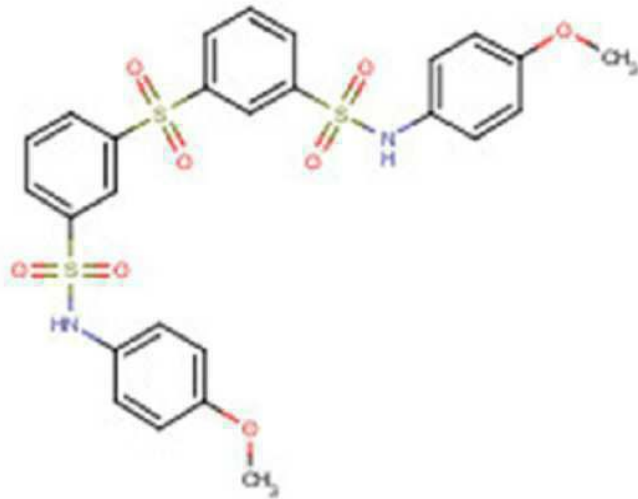
[화학식 2]



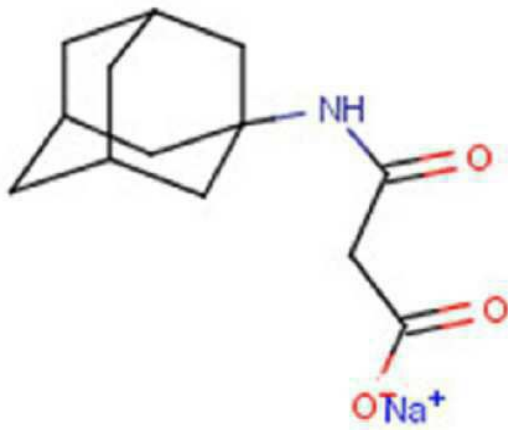
[화학식 3]

청구항 10

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 인간의 염증성 장질환 치료용 약학 조성물.



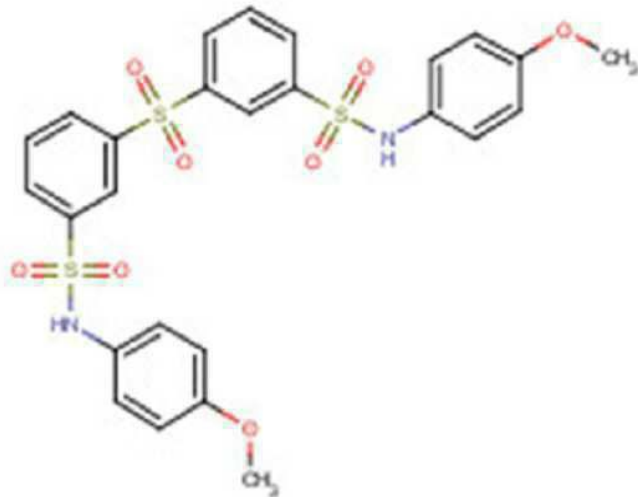
[화학식 2]



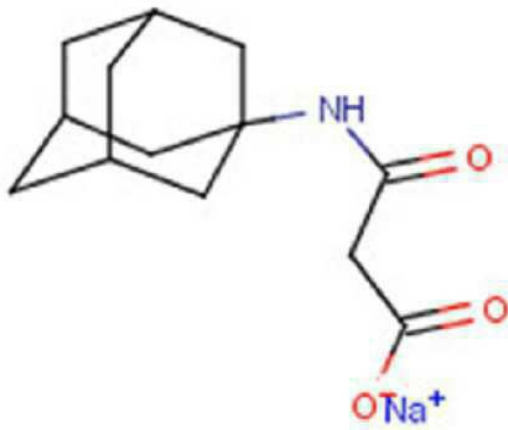
[화학식 3]

청구항 11

하기 화학식 2 내지 3의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 인간의 염증성 장질환 개선 및 완화용 식품 조성물.



[화학식 2]



[화학식 3]

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비만세포로부터 TSLP(Thymic Stromal Lymphopoietin) 분비를 억제하는 화합물 및 그 화합물의 염증성 장 질환 및 아토피 피부염 치료용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알레르기(allergy)는 어떤 외래성 물질과 접한 생체가 그 물질에 대하여 정상과는 다른 반응을 나타내는 현상으로서, 생물체(生物體)가 어떤 외래성 물질과 접하게 되면 항원항체반응(抗原抗體反應)에 의하여 생체 내에 급격한 반응 능력의 변화가 생기는데, 이를 알레르기라고 한다. 생체는 이종물질에 대해서는 그 항원(抗原)에 특이적으로 반응하는 항체(抗體)와 림프구를 생산하고 재차 항원과 접하면 여러 가지 면역반응을 일으킨다. 이 면역응답 또는 면역반응은 생체의 자기 보존을 위한 중요한 방어메커니즘의 하나인데, 보통 생체에 대해 보호적으로 작용하지만 때로는 이 메커니즘이 생체에 불리하게 작용하여 장애를 일으키는 경우가 있다. 알레르기는 "과민반응"이라는 뜻이므로서, 그리스어 낱말 allos가 어원이며, 이는 "변형된 것"을 뜻한다. 알레르기라는 용어는 1906년 프랑스 학자 폰 피르케가 처음으로 사용하였다. 알러지 또는 앨러지는 영어 발음, 알레르기는 독일어식 발음으로 한국어에선 둘 다 혼용되어 통용된다. 알레르기 반응을 유발하는 항원은 알레르겐(allergen)이라고 하

며, 전형적인 알레르겐은 꽃가루, 약물, 식물성 섬유, 세균, 음식물, 염색약, 화학물질 등이 있다. 면역계에는 항원에 대항하여 신체를 지키기 위한 몇 가지 방어 메커니즘이 있다. 이들 중 가장 많은 종류는 림프구로, 특정 항원에 반응하기 위해 특이화되어 있으며, B세포와 T세포가 이에 해당한다. B세포는 항원에 결합하여 항원을 파괴시키고 중화시키는 단백질을 항체를 생성한다. T세포는 항체를 생산하는 대신에 항원에 직접 결합하여 공격을 자극한다. 알레르기 반응은 즉시형 알레르기 또는 지연형 알레르기로 나타나는데, 항원이 B세포나 T세포 중 어느 세포와 반응하는지에 따라 결정된다. 알레르기로 인해 일어나는 질환에는 자가면역질환, 교원병 등을 포함하여 여러 가지 질환이 있으나, 일반적으로 알레르기성 질환이라고 하는 경우에는 고전적 알레르기성 질환인, 아나필락시스 쇼크, 식품 알레르기, 알레르기성 비염, 화분증, 기관지천식, 약제 알레르기, 식물 알레르기, 두드러기, 습진, 알레르기성 접촉성 피부염 등이 이에 해당된다. 이들은 알레르기가 병의 원인인 질환이지만 그 발증(發症)에는 그 밖의 생체측 조건이 필요한 경우도 있다. 또한 비(非)알레르기적 메커니즘에 의해서도 동일한 증상이 나타날 수 있다.

- [0003] 아토피 피부염은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성이 강한 염증성 피부질환으로 소양증(가려움증)과 피부건조증, 특징적인 습진을 동반한다. 유아기에는 얼굴과 팔다리의 펼쳐진 쪽 부분에 습진으로 시작되지만, 성장하면서 특징적으로 팔이 굽혀지는 부분과 무릎 뒤의 굽혀지는 부위에 습진의 형태로 나타나게 되며, 많은 경우에 성장하면서 자연히 호전되는 경향을 보인다. 어른의 경우 접히는 부위 피부가 두꺼워지는 태선화(lichenification)가 나타나고, 유소아기에 비해 얼굴에 습진이 생기는 경우가 많다. 아토피 피부염은 세계적으로 증가하는 추세이며 유병률이 인구의 20%라는 보고도 있다.
- [0004] 알러지 환자들을 위한 발전적인 알레르기 치료와 우수한 알레르기 치료제들의 지속적인 판매 증가에도 불구하고 현대인의 알레르기 증상은 더욱 심각해지고, 그 환자 수도 급증하고 있다.
- [0005] 이러한 현상은 현행 치료제들이 한계로, 다른 여러 경로로 알레르기 질환이 증폭되는 등 일시적인 개선효과에 그치는 등의 문제점을 안고 있다.
- [0006] 기존 아토피 치료제는 소양증을 완화하고 손상된 피부 표면을 회복시키는 방법의 치료제이며, 대부분 면역억제제나 스테로이드 제제로 부작용이 문제로 인식하고 있다.
- [0007] 따라서 기존의 부작용이 보고된 면역억제제나 스테로이드제제가 아닌 아토피 치료에 있어 근원적인 아토피 발생 원인을 해결하여, 면역과민반응으로서의 아토피를 해결할 수 있는 치료제가 필요하다.
- [0008] 한편, 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 임상적으로 유사하면서도 조직학적 소견과 내시경 및 면역학적 측면에서 서로 다른 궤양성 대장염 및 크론병의 두 가지 질환으로 분류되며, 이러한 IBD는 염증세포의 활성화가 중요한 병인인 것으로 알려져 있다. 장면역계의 지속적이거나 부적절한 활성화는 만성 점막성 염증의 병리생리에서 중요한 역할을 하며, 특히 호중구, 대식세포, 림프구 및 비만세포의 침윤에 의해 결국 점막 파괴 및 궤양을 초래한다. 침윤되고 활성화된 호중구는 활성산소질소종의 중요한 원인이 되며, 이러한 활성종은 세포 독성 물질로서 가교 단백질, 지질 및 핵산에 의해 세포성 산화 스트레스를 유도하고 상피성 기능장애 및 손상을 초래한다.
- [0009] 염증성 질환이 있으면 장관의 점막에서 다양한 염증성 사이토카인들이 분비된다. TNF- α 는 궤양성 대장염 환자의 대장 루멘과 대장 상피세포에서 높게 나타나며, 최근 연구에 의하면, TNF- α 는 궤양성 대장염의 병인으로 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 항-TNF- α 항체인 인플릭시맵(infliximab)은 중기의 치료 뿐 아니라, 기존에 치료되지 않던 크론병의 치료에 효과적이라고 알려졌다. 그러나, 이러한 치료법은 비용이 많이 들고, 일부 환자에게는 수액 반응 또는 전염성 합병증과 같은 부작용이 야기된다.
- [0010] 현재 염증성 장질환 치료제로는 프로스타글란딘(prostaglandins)의 생성을 차단하는 5-아미노살리실산(5-aminosalicylic acid; 5-ASA) 계통 약물 예를 들어, 설파살라진 등을 이용하거나 스테로이드류의 면역억제제를 사용하고 있다.
- [0011] 설파살라진은 복부허실(fullness), 두통, 발진, 간질환, 백혈구 감소증, 무과립구증, 남성 불임 등과 같은 부작용 또는 역효과를 일으키기 쉽다. 또한, 설파살라진이 장의 환부를 절개한 환자 또는 차도가 있는 환자에게 충분한 재발 억제 효과가 있는지는 불분명하다.
- [0012] 스테로이드류의 면역억제제는 부신피질 스테로이드로서, 단기적인 효과는 인정받고 있지만, 장기적인 예후를 향상시킬 수는 없으며, 유도된 감염성 질환, 2차 부신피질 부전증, 소화성 궤양, 당뇨병, 정신장애, 스테로이드성 신장병 등과 같은 부작용의 측면에서 단지 급성인 경우에만 사용되어야 하는 한계가 있다.

[0013] 따라서, 염증성 장질환에 대해 아직까지 신뢰할 만한 치료요법은 없으며 이러한 질환에 대해 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0014] [선행 특허 문헌]

[0015] 대한민국 특허공개번호 제1020100058104호

발명의 내용

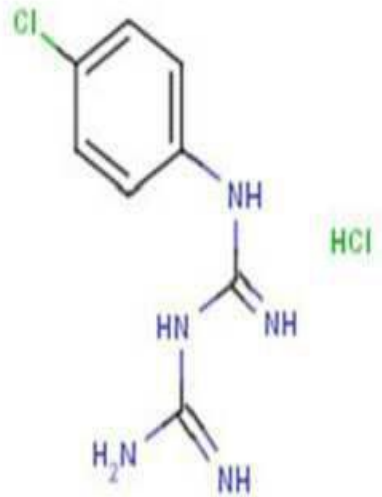
해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 알레르기성 아토피 피부염 치료 후보물질을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 신규한 염증성 장 질환 치료 후보물질을 제공하는 것이다.

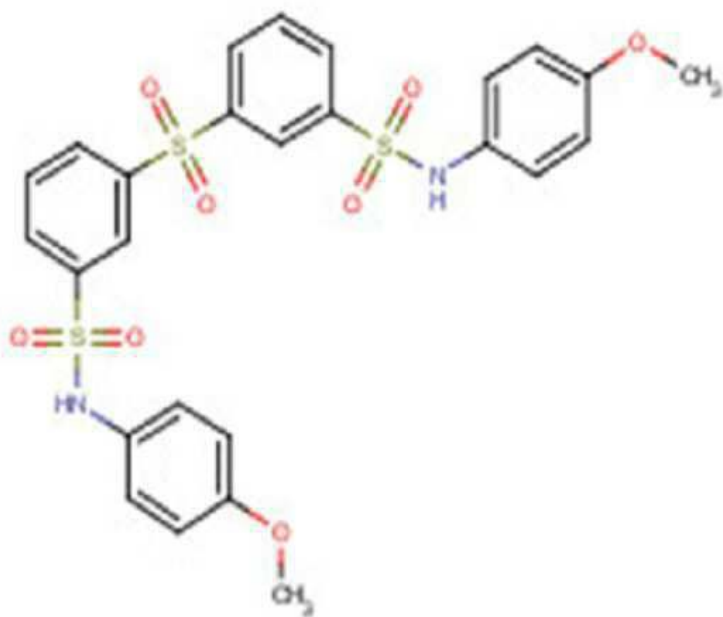
과제의 해결 수단

[0018] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1 내지 4의 화합물 중에서 선택된 하나의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.



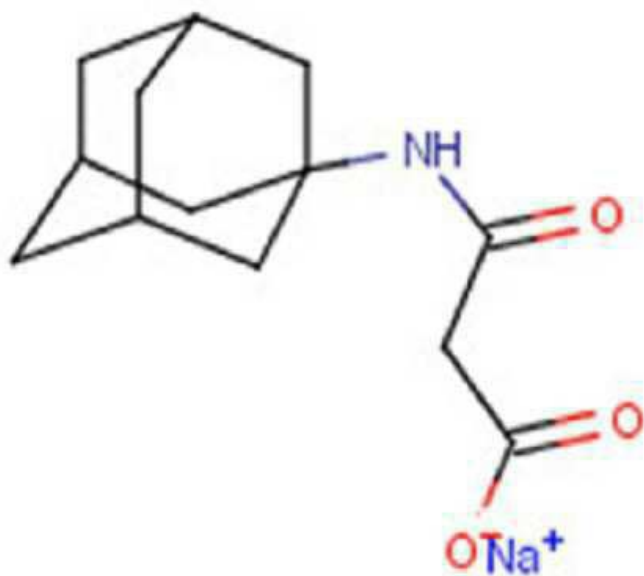
[0019]

[0020] [화학식 1]



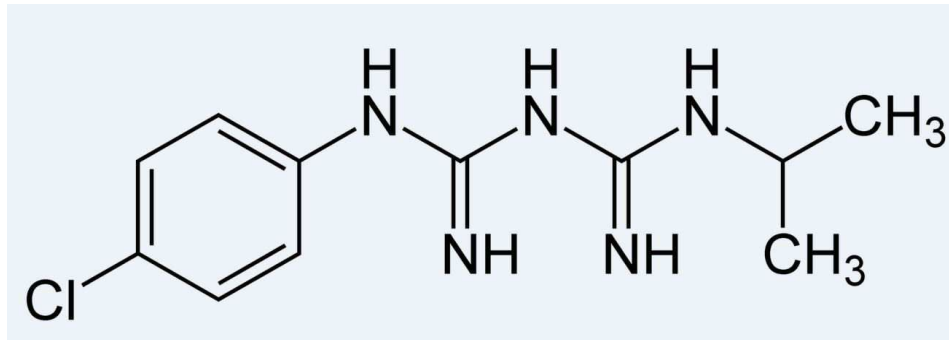
[0021]

[0022] [화학식 2]



[0023] 삭제

[0024] [화학식 3]



[0025]

[0026] [화학식 4]

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 비만세포로부터 TSLP(Thymic Stromal Lymphopoietin) 분비를 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하고,

[0028] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 화합물은 아토피 피부염에 효과를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 화합물은 염증성 장 질환에 효과를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0030] 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 염은 Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn과 같은 무기염기로 부터 유래된 염; N,N'-디아세틸에틸렌디아민, 글루카민, 트리에틸아민, 염소, 하이드록사이드, 디사이클로헥실아민, 메트포민, 벤질아민, 트리알킬아민, 티아민, 및 이의 동등물과 같은 유기염기의 염; 알킬페닐아민, 글리시놀, 페닐 글리시놀 및 이의 동등물과 같은 키랄 염기, 글리신, 알라닌, 바린, 류신, 이소류신, 노류신, 타이로신, 시스틴, 시스테인, 메티오닌, 프로린, 하이드록시 프로린, 히스티딘, 오미틴, 라이신, 알기닌, 세린, 및 이의 동등물과 같은 천연 아미노산 염; 알킬 할라이드, MeI, (Me)₂SO₄와 같은 알킬 설페이트를 갖는 본원발명의 화합물의 4가(quaternary) 암모늄 염 및 이의 동등물; D-이성질체, 또는 치환된 아미노산등의 인조 아미노산; 구아니딘, 니트로, 아미노, 알킬, 알케닐, 알킬닐로부터 선택되어 치환된 구아닌, 암모늄 또는 치환된 암모늄 염 및 알루미늄 염을 포함한다. 염은 산을 첨가한 염을 포함할 수 있으며, 적절한 것으로는 황산염, 질산염, 인산염, 과염소산염, 붕산염, 하이드로할라이드, 아세테이트, 타트레이트, 말리에이트, 시트레이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 팔모에이트, 메탄설포네이트, 벤조에이트, 살리실레이트, 벤젠설포네이트, 아스코베이트, 글리세로포스페이트, 케토글루타레이트 및 이의 동등물이다. 약제학적으로 허용가능한 용매화합물은 수산화물또는 알콜과 같은 결정화 용매를 포함한다.

[0031] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0033] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 단일 단위 투약 제형은 환자에게 경구투여, 점막투여(예를 들어 코, 혀 밑, 질, 구강, 또는 직장), 비경구투여(예를 들어 피하, 정맥 내, 볼루스 주사, 근육 내, 동맥 내), 또는 경피투여로 적합하다. 투약 제형의 예로, 이하 나열되는 예에만 국한되지는 않지만, 정제; 캐플렛(caplets); 연질 탄성의 젤라틴 캡슐과 같은 캡슐; 카셋(cachets); 트로키제; 로젠지(lozenges); 분산액; 좌약; 연고; 스폰지제(파프제); 페이스트; 분말; 드레싱; 크림; 석고; 용액; 부작포; 분무제(예를 들어 비내 분무기 또는 흡입기); 젤; 현탁액(예를 들어, 수용성 또는 비수용성 액상 현탁액, 수중유형 액상유제(oil-in-water emulsions), 또는 유중수형 액상유제(water-in-oil liquid emulsions)), 용액, 및 엘릭시르를 포함하는 환자의 경구투여나 점막투여에 적합한 액상 투약 제형; 환자의 비경구 투여에 적합한 액상 투약 제형; 및 환자의 비경구투여에 적합한 액상 투약 제형으로 가공될 수 있는 무균 고형제(예를 들어, 결정체, 비결정질 고체)를 포함한다.

- [0035] 본 발명의 투약 제형의 조성물, 모양, 종류는 전형적으로 그 용도에 따라 다양할 것이다. 예를 들어, 점막투여에 적합한 투약 제형은 같은 병을 치료하는데 사용되는 경구투여에 적합한 투약 제형보다 더 작은 양의 활성 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 양상은 이 분야의 통상의 기술자에게 아주 명백할 것이다. (참조: Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing, Easton PA.)
- [0036] 전형적인 약학적 조성물과 투약 제형은 하나 또는 그 이상의 부형제(excipient)를 포함한다. 적합한 부형제는 약학 관련 통상의 기술자에게는 자명하며 본 발명에 기술된 적합한 부형제 예는 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 특정의 부형제가 약학적 조성물 또는 투약 제형으로 적합한지의 여부는 이에 한정되지는 않지만, 환자에게 투여될 투약제형방법을 포함하여 이 기술분야에서 잘 알려진 다양한 요소에 의존된다. 예를 들어 정제와 같은 경구용 투약 제형은 비경구용 제형의 사용에는 적합하지 않은 부형제를 포함할 수 있다.
- [0038] 특정의 부형제의 적합성은 투약 제형의 특유의 활성 성분에도 의존할 수 있다. 예를 들어, 어떤 활성 성분들의 분해는 젖당과 같은 부형제에 의하거나 수용액에 노출되었을 때 가속될 수 있다. 1차 또는 2차 아민(예를 들어, N-데스메틸벤라팍신 및 N,N-디데스메틸벤라팍신)을 포함하는 활성 성분은 특히 이러한 가속화된 분해에 민감하다.
- [0039] 본 발명은 또한 활성 성분이 분해되는 속도를 줄이는 한가지 또는 그 이상의 화합물을 포함하는 약학적 조성물과 투약 제형을 제공한다. 이러한 화합물들은, 이하의 예에 국한되지는 않으나, 아스코르브산과 같은 산화방지제, pH 완충용액, 염 완충용액을 포함한다.
- [0040] 부형제의 양과 종류와 같이, 투약 제형에서 활성 성분의 양과 종류는, 이하의 예에 한정되지는 않으나, 환자에서의 투여 방법과 같은 요인들에 의해 달라질 것이다. 그러나 본 발명의 전형적인 투약 제형은 약 1mg 내지 약 1000mg, 바람직하게는 약 50mg에서 약 500mg, 가장 바람직하게는 약 75mg에서 약 350mg의 양의 본 발명의 화합물이나, 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 특정 환자에게 적당한 복용량이나 투약 제형 결정은 본 기술 분야 내에 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선 및 완화용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0042] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 및 완화용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 화장품 조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있는데, 에센스, 에멀전, 로션, 크림(수중유적형, 유중수적형, 다중상), 용액, 현탁액(무수 및 수계), 무수 생성물(오일 및 글리콜계), 젤, 마스크, 팩, 분말 등의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0044] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선 및 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0045] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 및 완화용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물은 비만세포로부터 TSLP 분비를 유의적으로 억제함을 확인하였으며, 이에 따라 아토피 피부염 및/또는 알레르기성 피부염 및 염증성 장질환에 대한 치료 및 예방 후보물질로 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 Caspase-1과 ChemBridge 라이브러리 화합물 docking 결과 예시 5173488
- 도 2는 인간비만세포(HMC-1 Cell)에서 TSLP 양 측정
- 도 3은 인간비만세포(HMC-1 cell)에서 세포독성 측정
- 도 4는 IPS-07001(5182436)에 의한 인간비만세포(HMC-1 cell)에서 TSLP 측정과 mRNA 발현 측정. 1) IPS-07001에 의한 TSLP 양 측정. 2) IPS-07001에 의한 mRNA 발현 측정
- 도 5는 IPS-07001(5182436)에 의한 인간비만세포(HMC-1 cell)에서 활성 1) IPS-07001의 caspas-1 활성 효능

측정. 2) western blot에 의한 IPS-07001의 활성 caspase-1 발현 변화

도 6은 IPS-07001(#5182436)에 의한 caspase-1 활성 저해능 측정

도 7은 인간비만세포(HMC-1)에서 inflammatory cytokine mRNA 발현 측정

도 8은 DNCB로 유도된 아토피성 피부염 balb/c mice serum에서 발현 측정

도 9는 DNCB로 유도된 아토피성 피부염 balb/c mice dorsal skin에서 caspas-1 활성 측정

도 10은 DNCB로 유도된 아토피성 피부염 balb/c mice dorsal skin에서 inflammatory cytokine 조절

도 11은 DNCB로 유도된 아토피성 피부염 balb/c mice dorsal skin에서 inflammatory cytokine 조절 1) RT-PCR 전기영동 결과 2) 전기영동 결과 densitometer로 측정

도 12는 DNCB에 의해 유도된 AD balb/c mice에 처리된 IPS-07001과 dexamethasone의 결과 사진 (respectively 0.01, 0.1, 1 μ M).

도 13은 H&E로 염색한 dorsal skin의 조직학적 특징. 1) for measurement of epidermis thickness values 2) in balb/c mice with DNCB-induced atopic dermatitis lesions (epidermal depth) (##p<0.01 Normal control vs DNCB; *p<0.01 DNCB vs treated with 0.01, 0.1, 1 μ M, **p<0.01 DNCB vs treated with 0.01, 0.1, 1 μ M respectively)

도 14는 toluidine blue로 염색한 dorsal skin의 조직학적 특징. 1) 피부조직 염색 사진 2) DNCB로 유도한 아토피성 피부염 장애 balb/c mice에서 mast cells의 양 측정 (## p<0.01 Normal control vs DNCB; ** p<0.01 DNCB vs treated with 0.01, 0.1, 1 μ M respectively)

도 15는 DNCB에 의해 유도된 AD balb/c mice의 혈청에서 IgE 측정 (## p<0.01 Normal control vs DNCB; ** p<0.01 DNCB vs treated with 0.01, 0.1, 1 μ M respectively)

도 16은 Cytokine&Chemokine 항체 마이크로 어레이 단백질 칩 분석. 1) Control은 1% DNCB만을 처리한 피부조직 샘플이고, IPS-07001은 1% DNCB와 1 μ M IPS-07001을 처리한 피부조직 샘플이다. INR 형광 이미지에서 Red color는 발현이 증가되었음을 의미하고 Green color는 발현이 감소되었음을 의미하며, 발현의 차이가 없는 곳은 검게 나타난다. 2) INR 결과 1.1이상의 결과는 발현이 증가됨을 나타내고, 0.9이하의 발현이 감소됨을 나타낸다.

도 17은 DNCB로 유도된 아토피성 피부염 balb/c mice dorsal skin에서 cytokine 단백질 발현 변화. 1) Western blot 사진 이미지 2) 밴드의 intensity를 측정하여 나타낸 그래프.

도 18은 DSS-유도된 동물 모델에서 급성 IBD에 대한 IPS-07001(화학식 1)의 저해 효과,

도 19는 DSS-유도된 동물 모델에서 만성 IBD에 대한 IPS-07001(화학식 1)의 저해 효과,

도 20은 DSS-유도된 동물 모델에서 설사 스코어에 대한 IPS-07001(화학식 1)의 효과,

도 21은 DSS-유도된 동물 모델에서 지라 무게에 대한 IPS-07001(화학식 1)의 저해 효과,

도 22는 HaCat 세포 증식에 대한 IPS-07004(화학식 4)의 효과,

도 23은 인간 재조합 caspase-1 활성에 대한 IPS-07001(화학식 1) 및 IPS-07004(화학식 4)의 저해 효과,

도 24는 HMC-1 세포에서 인간 Caspase-1 활성에 대한 IPS-07004(화학식 4)의 효과,

도 25는 DSS-유도된 동물 모델에서 급성 IBD에 대한 IPS-07004(화학식 4)의 저해 효과,

도 26은 DSS-유도된 동물 모델에서 체중 변화에 대한 IPS-07004(화학식 4)의 저해 효과,

도 27은 DSS-유도된 동물 모델에서 출혈 스코어에 대한 IPS-07001(화학식 4)의 저해 효과,

도 28은 DSS-유도된 동물 모델에서 설사 스코어에 대한 IPS-07004(화학식 4)의 저해 효과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0048]

- [0049] 실시예 1: 치료 후보물질 발굴
- [0050] CADD기술을 응용한 구조기반 가상 스크리닝(in-silico 스크리닝)
- [0051] 가. 실험 방법 : Caspase-1 타겟 단백질에 대한 가상 스크리닝을 위하여 컴퓨터를 이용한 분자 도킹 시뮬레이션을 실시하였다.
- [0052] (1)단백질 준비 : 타겟 단백질의 초기 구조는 Protein Data Bank (PDB) Caspase-1 의 구조 (PDB id 2HBQ) 를 사용하였으며, 모델링 소프트웨어를 사용하여 누락된 수소 원자들을 보완하고 non-crystal water 분자를 제거하여, 타겟 단백질의 분자 모델을 완성하였습니다. 완성된 단백질 모델은 에너지 최소화를 거쳐 안정화시킨 후에 시뮬레이션에 사용하였다.
- [0053] (2)리간드 준비 : 화합물 라이브러리 중에서 ChemBridge 사의 636,565개 화합물 구조는 Ligprep 모듈을 이용하여, 염 제거 및 이온화를 해주었다.
- [0054] (3)수용체 Grid 생성 : 도킹 부위는 3-[2-(2-benzyloxycarbonylamino -3-methyl-butyrylamino)-propionylamino]-4-oxo-pentanoic acid (z-VAD-FMK) 결합부위 근처 30박스에 한정하였고, 계산에 사용된 소프트웨어는 Schrodinger사의 Glide 프로그램입니다. Glide 자체 함수를 scoring function으로 사용하였고, 최종 결과에 대한 Glide Score를 구하였다.
- [0055] (4)리간드 docking : 각 리간드 화합물 1개당 최대 10개의 docked pose를 계산하였으며, Score가 높은 순서로 결과를 도출하여 출력 파일을 얻었다. 구조 검색은 Glide-SP 모드에서 실시하여 Docking 계산 결과 보정된 Final Score 가 가장 높은 순서로 화합물에 대한 결과를 산출하였다.
- [0056] 실시예 2:알레르기 아토피 피부염의 in vitro 모델에서 유효성분의 아토피관련인자 조절 효능 연구
- [0057] In vitro 세포 기반 후보물질의 알레르기 억제 활성 분석
- [0058] 가. 실험 방법
- [0059] (1) 세포배양 : 인간 비만세포 주 (HMC-1)는 IMDM에 10% FBS를 넣어서 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 후보물질들은 DMSO에 녹인 후 0.22 μm 필터를 사용하여 여과하였음. DMSO로 희석하여 세포에 처리하였다.
- [0060] (2) 세포독성(MTT-assay) : 비만세포 (3 x 10⁵ 세포/ml)를 1시간 동안 안정화 시킨 후 후보물질들을 10 μM 농도로 처리한 뒤 PMA와 A23187 (PMACI)를 8시간 동안 배양한다. 배양 후 새로운 배지로 갈아준 뒤 5 mg/ml MTT 용액을 넣고 4시간 동안 37℃에 배양하였다. 250 DMSO를 넣고 MTT formazan을 추출하고 각 well의 흡광도를 ELISA reader 540 nm에서 측정하였다.
- [0061] (3) 효소 면역측정법 (ELISA) : 비만세포 (3 x 10⁶ 세포/ml)를 1시간 동안 안정화 시킨 후 후보물질들을 0.1, 1, 10 μM 농도로 처리한 후 PMACI를 8시간 동안 처리하였다. 원심분리를 수행하여 상층액을 얻었다. 세포에서 분비된 TSLP양을 측정하기 위해 효소면역측정법을 사용하였다. 효소면역측정법은 1 μg/well TSLP capture Ab로 코팅된 96-well plates에서 진행된다. 코팅된 plates을 PBS로 2번 닦아준다. 10% FBS를 포함하는 PBS로 2시간 동안 처리한다. 그 뒤에 0.05% Tween-20 (Sigma)를 포함하는 PBS 씻어주고 표준곡선을 그리고 위해 재조합된 TSLP를 이용하였다. 그 뒤에 plates를 biotinylated-TSLP 항체, Avidin peroxidase, solution 30% H₂O₂를 포함하는 ABTS 기질에 노출시킨 뒤 405 nm에서 측정하였다.
- [0062] (4) Caspase-1 assay : 재조합 Caspase-1과 약물을 반응시킨 후 caspase-1 assay kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 활성을 측정하였다.
- [0063] (5) RT-PCR (revers transcription-polymerase chain reaction) Quantitative real time PCR : 세포 및 조직으로부터 total RNA를 분리한 다음 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성한 다음 분석하고자 하는 사이토카인의 primer와 반응시켜 PCR 및 real time-PCR을 수행하였다. RT-PCR 반응물을 1.5% agarose 젤을 이용하여 전기영동하여 분석하였다.
- [0064] (6) Western blot analysis : 6 well plate에 세포를 seeding 한 후, 약물을 처리하고 일정 시간이 지난 후 세포를 harvest. 세포를 harvest 한 후 PBS로 세정한 다음, lysis 하였다. 조직 단백질 및 세포 추출 단백질 50 μ

g을 12% gel에서 전기영동 한 후, nitrocellulose paper에 transfer하고 6% bovin serum albumin으로 2시간 동안 blocking. 1차 항체를 overnight 시키고 PBS-tween으로 세정하였다. 그 뒤, 2차 항체를 2시간 동안 반응시키고 세척한 후, ECL solution kit로 검출하였다.

[0065] (7) 통계학적 분석 : 실험결과는 적어도 세 번의 실험을 수행하여 평균을 기록하였고 분석은 SPSS ver 11.5를 이용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 각 처리된 군 사이에 비교했고, independent t-test와 Tukey's posthoc test와 함께 ANOVA에 의해 대조하였고, $P < 0.05$ 의 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0066] 실시예 3: in vivo 실험 구축

[0067] 실험 방법

[0068] 가. 실험 동물 : 5주령의 수컷 BALB/c마우스를 대한바이오링크(충북 음성)에서 공급받아 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기횟수 10~15 회/시간, 조명 12시간, 조도 150~300 Lux의 환경조건으로 설정된 호서대학교 안전성평가센터 청정동물사육실(소동물실 2-302호)에서 2주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

[0069] 실험동물은 폴리카보네이트 사육상자 ($270 \times 500 \times 200$ mm, 계룡과학)에 4마리씩 수용하였다. 사료(5053-Picolab Rodent 20, PMI Nutrition International)와 음수 (자외선 살균 처리 여과수)는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험의 모든 절차는 호서대학교 안전성평가센터 윤리위원회의 승인(HTRC-15-19)을 얻어 수행하였다.

[0070] 나. 피부염의 유발 : 마우스의 등을 제모하고 24시간 방치한 후 1%의 2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB) 용액 (아세톤 : 올리브오일 = 3:1) 150ul를 제모 부위에 1주일에 1회씩 3주간 도포하였다. 3주후부터는 1주일에 2회씩 3주간 도포하여 아토피성 피부염을 유발하였다.

[0071] 다. 처 치 : 마우스를 6군 나누어 대조군의 동물에는 0.5% DMSO를, 시험군의 동물에는 시험물질 0.01, 0.1, 1 uM 200ul를 3주간 매일 도포하였다. 양성대조군의 동물에는 원액 알코올에 녹인 0.1% Dexamethasone 50 ul를 2일 간격으로 도포하였다.

표 1

[0072]

시험군	시험물질	동물 수	처리농도
1군	대조군 (0.5% DMSO)	6	0
2군	DNCB	6	0
3군	DNCB + Dexamethasone	6	0.1%
4군	DNCB + 시험물질	6	0.01 uM
5군	DNCB + 시험물질	6	0.1 uM
6군	DNCB + 시험물질	6	1 uM

[0073] 라. 조직검사 : 시험물질 도포 종료 후 심마취하에서 실험동물의 등쪽 피부를 절제하여 일부는 액체질소를 사용하여 급속동결 시킨 후 분석 전까지 -70°C 에서 보관하였으며 나머지는 10% Neutral buffered formalin으로 24시간 동안 고정하였다. 고정된 조직은 일반적인 조직처리과정을 거쳐 슬라이드를 제작한 후 표피층의 두께 측정을 위하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 또한 비만세포의 양적 변화관찰을 위하여 toluidine blue 염색을 실시하였다. 염색한 조직은 광학현미경하에서 관찰하면서 Image analyzer(Olympus DP-21)를 사용하여 표피층의 두께 및 비만세포의 수를 계수하였다.

[0074] 마. IgE level 측정 : 부검 시 채취된 혈장을 사용하여 혈중 Ig E 농도를 측정하였다 (SHIBAYAGI, Japan)을 사용하여 측정하였다. antibody가 부착된 96well에 IgE standard solution과 sample 50 μL 를 넣고 2시간 동안 반응시킨 후, biotin-conjugated anti-IgE antibody solution 50 μL 씩 넣어 다시 2시간 동안 반응 시켰다. 그 후 HRP-avidin solution 1시간, chromogenic substrate(TBM) reagent 20분 반응시킨 후 reaction stopper를 사용하여 반응을 정지시켰다. ELISA(Molecular devices Emax)을 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0075] 실시예 4: 급성경피 독성시험

[0076] 실험 방법

[0077]

가. 사육환경

[0078]

(1) 환경 조건 : 본 시험은 온도 $22\pm3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm20\%$, 환기횟수 10~15 회/시간, 조명주기 12 시간, 조도 150~300 Lux의 환경조건으로 설정된 호서대학교 안전성평가센터 청정동물사육실(소동물실 2-302호)에서 실험동물을 사육하였다.

[0079]

(2) 사육상자 및 깔개 : 스테인레스망 뚜껑을 가진 폴리카보네이트 사육상자 (270×500×200mm, 계룡과학)에 순화기간 중 성별로 2 또는 3마리씩 수용하였으며, 군분리 후 성별로 1마리씩 수용하였다. 깔개는 감마선 조사된 멸균 Betachip (NEPCO)을 사용하였다.

[0080]

(3) 사료 및 음수 : 사료는 PMI Nutrition International사의 실험동물용 쥐 사료(5053-Picolab Rodent 20)를 자유섭취 시켰으며, 음수는 자외선 살균 처리 여과수(R/O water)를 자유공급하였다.

[0081]

(4) 사료 및 음수 중의 오염물질 확인 : 사료에 대한 오염물질의 확인은 사료 제조업체로부터 성적서를 받아 확인하였고, 음용수의 수질은 본 시험기관의 해당 SOP에 따른 정기적 검사를 통해 오염물질이 없음을 확인하였다.

[0082]

나. 시험 방법

[0083]

(1) 시험군의 구성

표 2

[0084]

시험군	시험물질	성	동물번호 (두수)	투여용량 (μM/kg/4ml bw)
1군	IPS-07001	수컷	1101 ~ 1105 (5)	0
		암컷	2101 ~ 2105 (5)	
2군		수컷	1206 ~ 1210 (5)	200
		암컷	2206 ~ 2210 (5)	

[0085]

(2) 투 여 :

표 3

[0086]

투여경로 및 선택이유	:	시험의뢰자의 요구로 경피투여를 선택하였다.
투여횟수	:	1 회/일, 단회투여 후 24시간 노출
투여용량 산출	:	투여 당일 체중기준으로 투여용량별 투여량(mg/kg)을 산출하였다.

[0087]

(3) 실험 방법

[0088]

(가) 투여 약 24시간 전에 등 부분의 털을 전체표면적의 약 10% 이상이 되도록 제거하였으며, 피부에 상처가 나지 않도록 주의하였다.

[0089]

(나) 투여 당일 각 개체별로 투여량을 산출한 후 용매를 이용하여 시험물질을 충분히 습윤시킨 다음 전체표면적의 약 10% 범위(약 44 cm)에 시험물질을 적용하였다.

[0090]

(다) 시험물질은 24시간 노출기간 중 다공성 거즈, 비자극성 테이프 및 붕대를 사용하여 피부와의 접촉을 유지시켰다.

[0091]

(라) 노출기간의 종료 시 남아있는 시험물질은 미온수를 사용하여 제거하였다.

[0092]

(4) 관찰 항목

[0093]

(가) 일반증상 관찰 : 모든 동물에 대하여 투여 후 30분부터 4시간까지는 집중적으로 관찰하였고, 1회/1일 14일 까지 일반증상을 관찰하였다. 관찰 시 사망여부 및 임상증상을 개체별로 기록하였다.

[0094]

(나) 체중측정 : 모든 동물에 대하여 입수 시, 군분리 시, 투여직전(투여 당일), 투여 개시 후 1, 4, 7, 10일과 14일에 측정하였다.

[0095]

(다) 부검 : 시험 중 사망동물은 발견 즉시 부검하여 육안적으로 장기를 검사하였고, 시험종료 시 모든 생존동

물에 대하여 CO2가스 흡입법으로 안락사하여 방혈한 후 육안적으로 장기를 검사하였다.

- [0096] (라) 반수치사량(LD50)산출 : 본 시험의 투여용량에서 사망이 관찰되지 않아 반수치사량(LD50)을 산출되지 않았다.
- [0097] (마) 통계처리 : 체중 데이터는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 체중에 대한 통계학적 분석은 실시하지 않았다.
- [0098] 실시예 5: 항체 마이크로어레이 시스템 구축
- [0099] 실험 방법
- [0100] 가. 조직 샘플 준비 : 마우스 피부조직을 액체질소에 넣어 얼린 후, 막자사발에 곱게 갈았다. 중간 중간 액체질소를 첨가하여 조직이 녹지 않도록 하였다. 곱게 갈린 피부조직을 lysis M 버퍼에 넣어 조직샘플 용해물을 만들었다.
- [0101] 나. 조직 용해물의 형광 표지 : 일정 시간동안 샘플이 처리된 조직 용해물과 처리 되지 않은 조직 용해물에서 각각 단백질을 추출하여(Lysis M 추출 용액, 로슈사) 형광물질(Cy3 또는 Cy5)로 표지한다(GE health care 사). 먼저, 각각의 조직 용해물의 단백질 양이 최소 1mg이 되도록 조절한 후, coupling buffer(0.1M sodium carbonate buffer, pH9.3)를 첨가하여 잘 섞어준다. coupling buffer를 첨가한 각각의 조직 용해물에 Cy3, Cy5 dye를 넣고 잘 섞어준 뒤 4℃에서 16시간 이상 동안 표지한다. 대조군은 DNCB만 처리된 것으로 Cy3, Cy5 표지를 하고, 샘플이 처리된 실험군 또한 Cy3, Cy5로 표지 하였다. 형광다이로 표지 후 free dye를 Post-reactive Spin column (Sigma 사)를 사용하여 제거하였다.
- [0102] 다. 항체 마이크로 어레이 제작 : 단백질 칩으로는 ProteoChipTM (Proteogen, Inc., 서울, 한국)을 사용하였으며, ProteoChipTM 상에 Protein A 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 고정된 기관에 세포내 단백질을 26개에 대한 항체를 스팟팅하여 항체 마이크로어레이(microarray)를 제조한다. 먼저 상기 항체들을 30% 글리세롤을 함유한 인산완충액을 이용하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석시키고, 항체 어레이를 밤새도록 4℃에서 고정한다. 항체칩을 PBST로 3번 세척하고, 교반기에서 1시간 동안 실온조건으로 3% BSA로 블로킹한다. 블로킹 후에 과잉의 BSA를 제거하기 위해 PBST 용액(0.05% 트윈 20을 함유하는 인산완충액)으로 상기 칩을 세척하고, N2 gas로 건조시킨다.
- [0103] 라. 항체 어레이의 혼성화 반응 : 형광물질로 표지된 조직 용해물을 정량(Bradford 방법)하였으며, 각각 형광 표지된 샘플은 30 μg 씩 10 ml 반응 용액에 넣어서 섞었다. 형광 표지된 샘플이 담긴 버퍼에 항체칩을 담가서 30℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 항체칩은 PBST 용액으로 두 번 세척하고, 질소 가스로 건조시켰다. 각 슬라이드를 형광 마이크로어레이 스캐너를 사용하여 분석하였다. Cy3와 Cy5의 주 피크가 10000정도 되도록 PMT값을 조정하여 스캔하였다. 각각의 스팟에 있어서의 Cy3에 대한 Cy5의 비율은 소프트웨어 (Genepix 6.0)을 사용하여 계산된다. INR 값은 $\text{sample-Cy5}/\text{control-Cy3} * \text{sample-Cy3}/\text{control-Cy5}$ 로 계산 하였다. 발현에 차이가 없을 경우 이상적인 INR 값은 1이며, 1이상 값은 발현의 증가, 1 이하 값은 발현의 감소를 의미한다.
- [0104] 마. 웨스턴 블롯 분석 : 상기 항체 어레이 실험을 통해 단백질 발현이 차이가 나는 것들을 검증하기 위하여 western blot analysis를 수행 하였다. 조직 용해물로부터 단백질을 SDS-PAGE 상에서 분리시킨다. 그 후, 상기 전기영동된 단백질은 PVDF 막위로 트랜스퍼 하였다. PBST 용액으로 세척후 5 % 탈지분유를 이용하여 1시간 동안 PVDF 막을 블로킹한 후, 일차 항체로 4℃에서 하룻밤 동안 반응 시켰다. 상기 막들을 PBST 용액으로 세척하고, 실온에서 1시간 동안 HRP(horseradish peroxidase)와 결합된 이차 항체(anti-IgG)와 반응시키고 감광 필름으로 확인한다.
- [0105] 상기 실시예의 결과를 하기에서 설명한다.
- [0106] CADD기술을 응용한 구조기반 가상 스크리닝(in-silico 스크리닝)
- [0107] Docking 계산 결과 보정된 Final Score 가 가장 높은 50 개 화합물에 대한 결과를 산출하였으며, 분자 구조를 결과표로 제공하였다.
- [0108] 가. 화합물 스코어 결과를 아래 표에서 나타내었다.

표 4

[0109]

	ID	Score	ID	Score	ID	Score
1	5173488	-8.25902	7249234	-7.19073	7936732	-7.03225
2	5572011	-8.10539	5541710	-7.18264	6589632	-7.02742
3	5116307	-8.09505	5182410	-7.13911	7579578	-7.02315
4	5173962	-7.83898	5119461	-7.12365	7270409	-6.98396
5	7663208	-7.75609	5182436	-7.12115	7290917	-6.94433
6	5356744	-7.49706	7808944	-7.10769	5566788	-6.9397
7	5117545	-7.44377	5916129	-7.09631	6181266	-6.91605
8	5116232	-7.3576	5248955	-7.08261	7933953	-6.9136
9	7231009	-7.31524	9198688	-7.0455	5808421	-6.90651
10	7894092	-7.21013	9150101	-7.03455	5535147	-6.89749

표 5

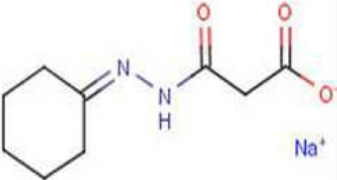


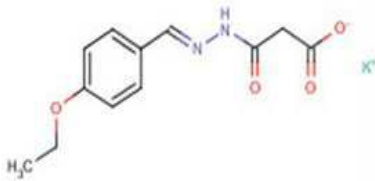
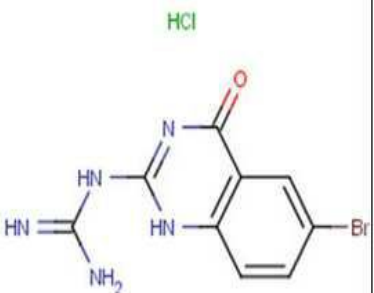
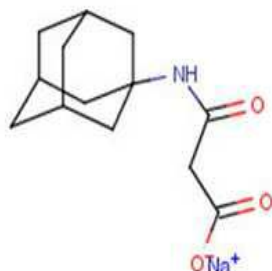
[0110]

	ID	Score	ID	Score
1	7123737	-6.89518	9138070	-6.80033
2	7940511	-6.86224	9030779	-6.79826
3	5173510	-6.85642	7967935	-6.79613
4	5211084	-6.85482	5235245	-6.79222
5	7238182	-6.85347	9141139	-6.78522
6	9339450	-6.83857	9143017	-6.77679
7	6392971	-6.8121	7933471	-6.77184
8	4031614	-6.80955	7271310	-6.75385
9	5554416	-6.80617	7934027	-6.74975
10	7247002	-6.80133	7614505	-6.74535

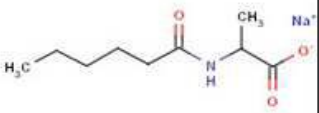

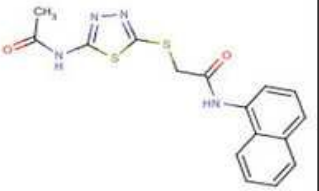
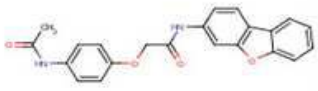
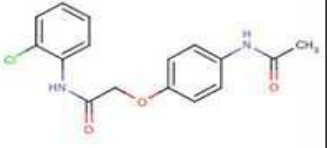

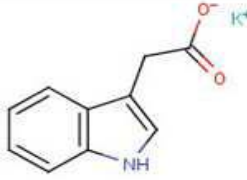
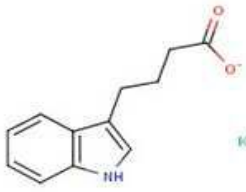
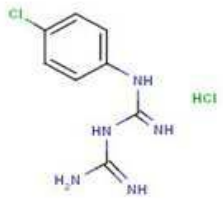
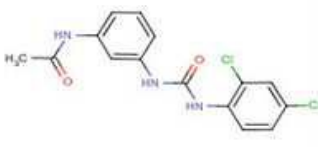
[0111]

나. 화합물 구조 정보를 아래 표에서 나타내었다


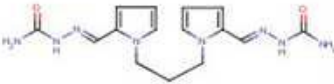
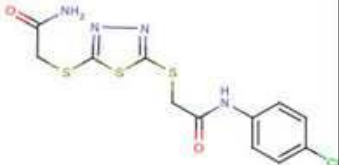
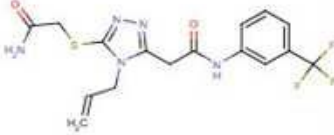
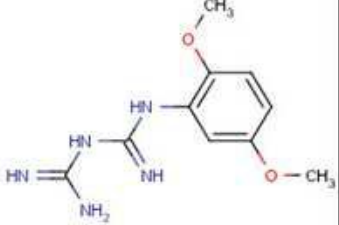
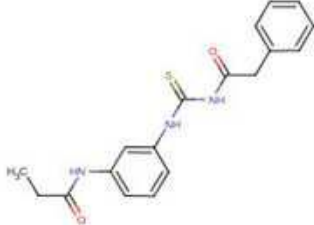
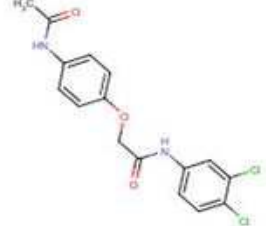
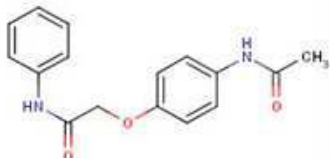

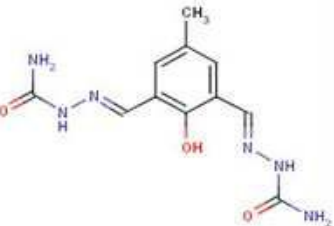
표 6

Structure	ID	Structure	ID
	5173488		5572011
	5116307		5173962
	7663208		5356744

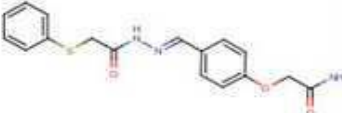
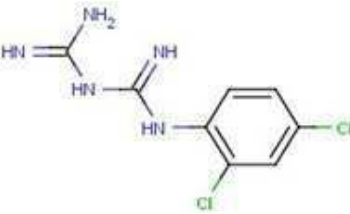
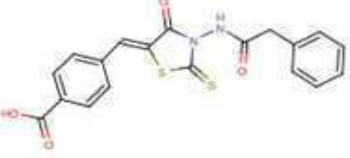

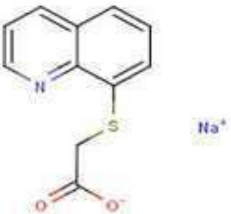

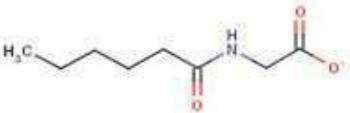
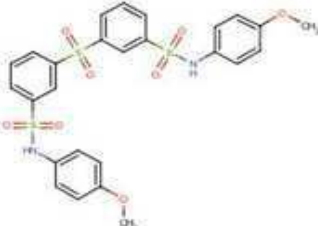
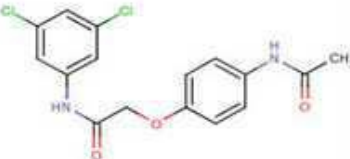
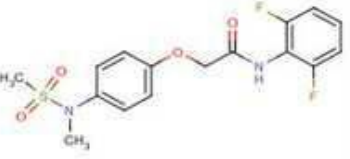
[0112]

	5117345		5118232
	7231009		7894092
	7249234		5541710
	5182410		5119481
	5182438		7808944

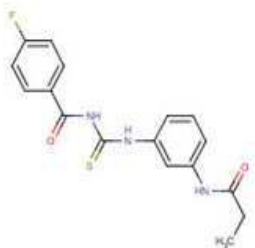

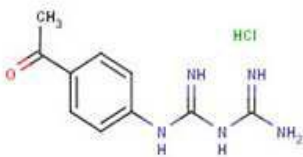
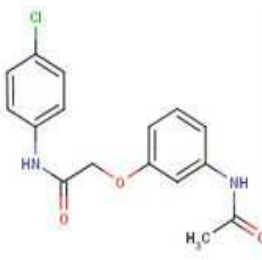
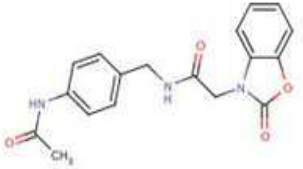
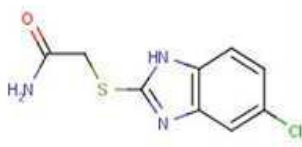
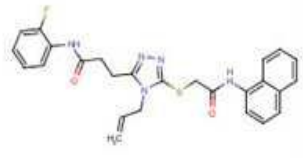
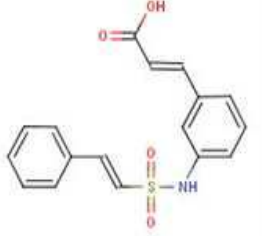
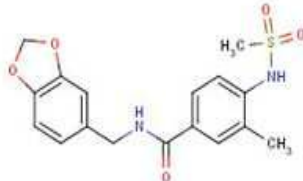
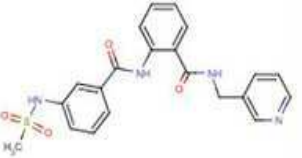
[0113]

	5916129		5248955
	9198688		9150101
	7936732		6589632
	7579578		7270409
	7290917		5566788

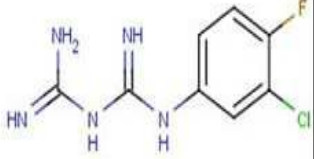
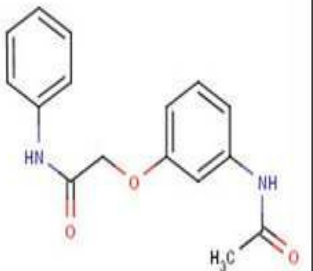
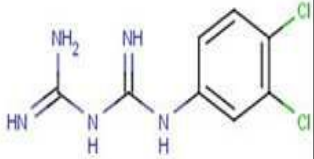
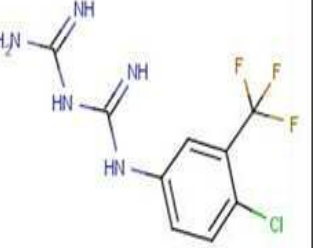
[0114]

	6181266		7933953
	5808421		5535147
	7123737		7940511
	5173510		5211084
	7238182		9339450

[0115]

	6392971		4031614
	5554416		7247002
	9138070		9030779
	7967935		5235245
	9141139		9143017

[0116]

	7933471		7271310
	7934027		7614505

[0117]

[0118]

In vitro 세포 기반 후보물질의 알레르기 억제 활성 분석

[0119]

가. 아토피 피부염 원인인자 TSLP 조절 물질 탐색

[0120]

Caspase-1은 아토피 피부염 원인인자인 TSLP의 분비를 유도함. TSLP 조절 물질을 탐색하기 위해, 아토피 피부염의 원인 세포인 비만세포를 PKC activator인 PMA와 calcium ionophore A23187 (PMACI)로 자극. 자극된 비만세포로부터 TSLP 분비가 자극되지 않은 세포 (Blank)에 비해 유의적으로 증가함을 알 수 있었으며, 다양한 후보물질들의 효능을 검색하였음. 그 결과, 5182436, 5211084, 및 5356744 물질이 비만세포로부터 TSLP 분비를 유의적으로 억제함을 확인하였다(도 2).

[0121]

나. TSLP 조절 물질의 세포독성확인

[0122]

효과물질들의 세포독성을 확인하기 위해 MTT-assay를 수행한 결과, IPS-07002(5211084)과 IPS-07003(5356744) 농도 10 μ M에서 세포독성을 나타내지 않았다. 그러나 IPS-07001(5182436) 농도 10 μ M에서 세포독성 나타나는 것을 확인하였다. IPS-07001(5182436)은 다양한 농도로 반복실험 결과 1 μ M까지 세포독성이 없었다(도 3).

[0123]

다. IPS-07001(5182436)에 의한 TSLP 생성 조절 효능 반복 실험

[0124]

IPS-07001이 독성 없는 농도로 TSLP 생성 조절 효능 반복 실험을 하였으며, 반복실험을 통해 IPS-07001 0.011 μ M 농도에서 TSLP 생성을 유의하게 조절함을 알 수 있었다. IPS-07001는 또한 TSLP mRNA발현도 유의하게 억제하였다(도 4).

[0125]

라. IPS-07001(5182436)의 Caspase-1활성 조절 효능 분석

[0126]

Caspase-1 활성화에 있어서 #5182436의 조절 효능을 규명하기 위해 세포추출물을 이용하여 caspase-1 assay를 수행. 그 결과, IPS-07001은 농도 의존적으로 caspase-1활성을 유의하게 억제함을 알 수 있었다. 또한 IPS-07001에 의해 active caspase-1의 발현도 억제됨을 알 수 있었다(도 5).

[0127]

마. Kinectic assay를 통한 IPS-07001(5182436)의 Caspase-1활성 조절 확인

[0128]

Caspase-1 활성화에 있어서 IPS-07001의 조절 효능을 규명하기 위해 caspase-1 assay를 수행하였다. 그 결과, IPS-07001는 농도 의존적으로 caspase-1활성을 유의하게 억제함을 알 수 있었다(도 6).

[0129]

바. 인간비만세포(HMC-1)에서 #5182436에 의한 inflammatory cytokine 생성 조절 효능실험

[0130]

IPS-07001 (#5182436)는 다양한 inflammatory cytokine의 생성 및 mRNA 발현을 유의하게 억제하였다(도 7).

- [0131] 사. DNCB 도포된 balb/c mice serum에서 IPS-07001(#5182436)에 의한 histamine, IL-4, 및 IgE 수준 조절 효능 분석
- [0132] DNCB 도포된 balb/c mice serum에서 histamine, IL-4, 및 IgE 수준을 측정하였다. IPS-07001(#5182436) 0.011 μ M 농도에서 serum histamine, IL-4, 및 IgE 수준이 유의하게 조절됨을 확인할 수 있었다(도 8).
- [0133] 아. DNCB 도포된 balb/c mice dorsal skin에서 IPS-07001(#5182436)에 의한 caspase-1 활성 조절 분석
- [0134] 아토피 피부염 In vivo모델에서, caspase-1 활성에 있어서 IPS-07001(#5182436)의 조절 효능을 알아보기 위해 DNCB 도포된 balb/c mice의 dorsal skin을 가지고 caspase-1 assay를 수행하였다. 그 결과, IPS-07001(#5182436)는 농도 의존적으로 caspase-1활성을 유의하게 억제함을 알 수 있었다(도 9).
- [0135] 자. DNCB 도포된 balb/c mice dorsal skin에서 IPS-07001(#5182436)에 의한 inflammatory cytokine 조절 효능 분석
- [0136] DNCB 도포된 balb/c mice의 dorsal skin에서 염증성 cytokine 수준을 분석하였다. IPS-07001(#5182436) 0.011 μ M 농도에서 IL-4 및 IL-6 수준이 유의하게 조절됨을 확인할 수 있었다(도 10).
- [0137] 차. DNCB 도포된 balb/c mice 피부조직에서 #5182436에 의한 염증성 cytokine mRNA 발현 조절 효능 분석
- [0138] DNCB 도포된 balb/c mice 피부조직에서 염증성 cytokine mRNA expression을 조절 여부를 분석한 결과, IPS-07001(#5182436)이 아토피 피부 병소부위의 TARC, TNF- α , 및 IL-6 mRNA expression을 조절함을 알 수 있었다(도 11).
- [0139]
- [0140] DNCB에 의한 접촉성 아토피 피부염 동물모델에서 아토피 관련인자 조절효능 연구
- [0141] 가. 육안관찰
- [0142] 피부 건조가 일어나는 대표적인 질환으로 건선염과 아토피 피부염이 알려져 있는데 이 중 특히 아토피성 피부염은 피부 건조화뿐만 아니라 표피 증식(hyperkeratosis), 홍반, 부종, 심한 소양증, 삼출과 부스럼 딱지를 특징으로 하고 급성기에는 표피 내에 수포를 형성하며 만성기에는 피부에 비후가 생기는 피부염증 등과 같은 여러 증상을 같이 수반하는 피부질환이다 (Bieber T. Atopic dermatitis. N Engl J Med. 2008;358:1483-94). 이에 따라 본 시험에서는 홍반(erythema), 건조피부(dry skin), 부종과 혈종(edema & excoriation), 깃무름(erosion), 그리고 태선화(lichenification)를 중심으로 피부 임상증상을 관찰하였다. 관찰한 결과 DNCB 단독 처리군은 정상대조군과 비교하여 뚜렷한 건조, 홍반, 혈종, 태선화가 관찰되었다. 반면 Dexamethasone처리군에서는 홍반을 제외한 DNCB로 유발된 피부 증상이 대부분 소실되었다. 시험물질 처리군에서는 0.01 μ M, 0.1 μ M에서는 뚜렷한 육안관찰 변화가 관찰되지 않았으나 1 μ M에서는 DNCB군과 비교하여 홍반, 혈종, 태선화가 감소하였다(도 12).
- [0143] 나. 표피두께 변화
- [0144] 아토피가 유발된 DNCB군에서 조직학적 관찰을 통한 마우스의 피부조직에서 과각화증(hyperkeratosis)을 확인할 수 있었다. DNCB군의 표피 두께는 $87.1 \pm 13.0 \mu\text{m}$ 로 Normal control군의 $24.5 \pm 10.3 \mu\text{m}$ 보다 뚜렷한 두께 증가를 나타내어 아토피성 피부염에서 나타나는 과각화증을 나타내었다. 양성대조물질인 Dexamethasone을 처리한 군에서는 $39.9 \pm 9.4 \mu\text{m}$ 으로 확인한 표피층 두께 감소를 나타내었다. 각 농도별로 시험물질 처리한 군(0.01, 0.1 및 1 μ M)에서는 각각 농도 별로 $70.8 \pm 4.3 \mu\text{m}$, $74.4 \pm 7.1 \mu\text{m}$ 및 $60.0 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 로 두께가 감소하였다(도 13).
- [0145] 다. 피부조직 내 비만세포의 수
- [0146] 아토피 피부염에서 mast cell의 탈과립에 의하여 분비되는 히스타민은 소양감의 주요한 원인으로 작용하여 피부 장벽을 손상시키고 피부 염증을 유발함으로써 아토피성 피부염의 진행에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Lee, E.J., G.E. Ji and M.K. Sung. 2010. Inflamm. Res. 59(10):847-854). 시험물질을 3주간 도포한 후 확인한 결과 시험물질 0.1 μ M 도포군(25.8 ± 3.5 , $p < 0.01$), 1 μ M 도포군에서 (23.8 ± 5.1 , $p < 0.01$)에서 통계적으로 유의한 감소를 나타내었으며 이러한 결과는 DNCB 처리군과 유사한 결과로 시험물질이 mast cell의 수를 감소시킴으로써 소양감을 줄여주는데 효과가 있음을 의미한다(도 14).
- [0147] 라. 혈중 IgE 수치

[0148] 혈청 Ig E의 증가는 아토피성 피부염 지표로 알려져 있는데 특히 Ig E는 임상적 중증도와 밀접한 상관관계를 가진 것으로 알려져 있다 (M. Ban and D. Hetich, Toxicol. Lett, 118, 129 (2001)). 아토피성 피부염은 IgE 항체 반응을 증가시킨다 (Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G. P., Sperl, J., Tsudzuki, M. and Hiroi, J.: Int. Immunol. 9, 461 (1997)). 또한, Ig E 생성증가는 항체반응 증가를 유도하고 Ig E 의존성 히스타민 유리체의 활동성을 증가시켜 히스타민 분비를 촉진시킨다. 히스타민 등은 호산구의 침윤을 유도하고 급성 과민반응과 소양감을 유발하는 것으로 알려져 있다(H. C. Sung, W. J. Lee, S. J. Lee, and D. W. Kim, Kor. J. Dermatol, 44, 1051 (2006)). 따라서 Ig E의 감소는 아토피성 피부염 개선을 확인하는 주요한 지표로 여겨진다. 본 시험에서는 DNCB군(790.0 ± 151.8)에서 정상대조군과 비교하여 70%이상 증가한 Ig E수치를 나타내었으며 Dexamethasone 처리군(703.8 ± 86.5)에서는 다소 감소하였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 시험물질을 농도별로 처리한 군에서는 0.1 uM 도포군(632.6 ± 138.8, p<0.05), 1 uM 도포군에서(537.9 ± 132.9, p<0.01)에서 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(도 15).

[0149] 급성경피 독성시험

[0150] IPS-07001의 독성양상 및 독성강도를 알고자 SD 랫트 암수 모두에 0, 200 μM 단회 경피투여한 후 14일간 사망 및 빈사동물 발생 여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고, 관찰기간 종료 후 부검하여 개체 별로 이상 여부를 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

[0151] 가. 사망률

[0152] 시험기간 동안 시험물질 투여군 모두에서 사망동물이 관찰되지 않았다(표 7).

표 7

Dose group (㎍/kg bw)	Sex	No. of Animals	Number of death on day									
			0	1	2	3	4	5	6	7	8~14 day	Mortality (%)
시험물질 (0)	Male	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3 (0)
	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3 (0)
시험물질 (200)	Male	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3 (0)
	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3 (0)

[0154] 표 7은 테스트 물질 처리 후 사망률

[0155] 나. 임상증상

[0156] IPS-07001 투여 후 0, 200 μM/kg bw 투여군의 암수 랫트 모두에서 시험종료일까지 피부병변을 포함한 임상증상이 관찰되지 않았다(표 8). 0, 200 μM/kg군의 각 1마리에서 피부홍반이 관찰되었으나 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되며 투여 후 1일 이내 소실되었다.

표 8

Dose group (mg/kg bw)	Sex	30 min ~3 hour	4 hour	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10~14
시험물질 (0)	Male	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)
	Female	NCS (2/3) Erythema(1/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)

시험물질 (200)	Male	NCS (2/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)
	Erythe ma(1/ 3)												
	Female	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)	NCS (3/3)

표 8은 테스트 물질 처리에 의하여 유도되는 임상 증상

다. 체중변화

암수 랫트의 모든 투여군에서 투여 후 1일째에 체중이 감소되었다. 이러한 결과는

시험물질 처리 과정에서 발생한 환경변화에 다른 것으로 판단되며 2일째부터 정상적인 체중 증가 양상을 나타내었다. (표 9 및 10).

표 9

[0162]

Dose group (/kgbw)	Ani. No	Body weights (g)						
		Day 0 ^{a)}	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14	Weight gain ^{b)}
시험물질	1101	235.3	228.4	252.9	272	292.2	314.6	79.3
(0)	1102	241.6	232.4	265.8	286.3	303.9	322.4	80.9
	1103	247.3	240.5	266.1	287	307.9	330.5	83.2
	Mean	241.4	233.8	261.6	281.8	301.3	322.5	81.1
	SD	6.0	6.2	7.5	8.5	8.2	8.0	2.0
	n	3	3	3	3	3	3	3
시험물질	1206	236	227.4	256	282	307.1	332.5	96.5
(2)00	1207	247.1	237.9	267.5	288.8	310.5	333.1	86
	1208	227	216.9	245.7	264	281	309.4	82.4
	Mean	236.7	227.4	256.4	278.3	299.5	325.0	88.3
	SD	10.1	10.5	10.9	12.8	16.1	13.5	7.3
	n	3	3	3	3	3	3	3

표 9는 테스트 물질 처리된 수컷 랫트에서 체중 변화

a): 14 hr 동안 굶긴 후 데이터

b): 체중 증가는 0-14일간 계산

표 10

[0166]

Dose group (/kgbw)	Ani. No	Body weights (g)						
		Day 0 ^{a)}	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14	Weight gain ^{b)}
시험물질	2101	181.6	172.8	187.2	197.9	209.6	223	41.4
(0)	2102	168.7	156.7	172	181.7	188.4	194.1	25.4
	2103	182.1	170.3	188.5	202	208.2	223.3	41.2
	Mean	177.5	166.6	182.6	193.9	202.1	213.5	36.0
	SD	7.6	8.7	9.2	10.7	11.9	16.8	9.2
	n	3	3	3	3	3	3	3
시험물질	2206	178.8	165.6	187.3	193.2	197	205.6	26.8
(200)	2207	175.8	159	181.1	191.5	204.4	212.6	36.8
	2208	182.1	175.3	194.2	209	227.6	236.3	54.2
	Mean	178.9	166.6	187.5	197.9	209.7	218.2	39.3
	SD	3.2	8.2	6.6	9.7	16.0	16.1	13.9
	n	3	3	3	3	3	3	3

[0167] 표 10은 테스트 물질 처리된 암컷 랫트에서 체중 변화

[0168] a): 14 hr 동안 굶긴 후 데이터

[0169] b): 체중 증가는 0-14일간 계산

[0170] 라. 부검 소견

[0171] 관찰기간 종료 후 생존한 동물에 대하여 육안적 병리검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 이상소견이 관찰되지 않았다 (표 11).

표 11

[0172]

Dose group (mg/kg bw)	Sex	No. of animal examined	Gross findings (internal and external)
시험물질 (0)	Male	3	NGF ^{a)}
	Female	3	NGF ^{a)}
시험물질 (200)	Male	3	NGF ^{a)}
	Female	3	NGF ^{a)}

[0173] 표 11은 테스트 물질 처리된 랫트에서 부검 소견

[0174] NGF: 이상 소견이 없음

[0175] a): 15일에 살아 있는 동물에서 관찰

[0176] 마. 반수치사량

[0177] 랫트에서 시험물질의 경피투여에 의한 반수치사량(LD50)은 암·수 모두 200 μM/kg/4ml bw 이상이였다.

[0178] 메커니즘 규명을 위한 항체 마이크로어레이 시스템 구축

[0179] 가. Cytokine & Chemokine 항체 마이크로어레이 단백질 칩

[0180] DNCB만 처리한 피부조직과 DNCB와 IPS-07001을 처리한 피부조직을 각각 파쇄하여 얻은 조직용해물을 형광물질 (Cy3 또는 Cy5)로 표지하고, 항체칩을 이용하여 단백질발현 프로파일 연구를 수행하였다. 항체 마이크로어레이 단백질 칩 분석은 ProteoChip에 고정된 항체지도를 참고해 수행하였다. 26종의 항체가 고정된 항체 칩 위에서 발현정도를 비교한 형광 이미지는 도 16-1에 나타내었다. 결과를 분석한 INR 결과 그래프는 도 16-2에 나타내었다.

[0181] 항체 칩을 이용한 프로파일 결과 피부조직의 샘플에서 증가/감소를 판단하는 기준으로 잡은 1±0.1 범위를 넘지는 못했지만, 근접한 cytokine 단백질은 IL-6, IL-22, IL-33 세 종류의 단백질의 발현 감소를 확인하였다.

[0182] IL-6는 Th2 세포에서 분비되는데 이는 아토피 피부염 환자의 T세포에서도 동일하게 증가된 것이 보고되었다 (Toshitani, Akito, et al. J Invest Dermatol 100.3 (1993): 299-304). IL-22는 Th17세포에서 생산에 되며 염 증성 피부질환의 발병에 기여하고, 염증질환에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 아토피성 피부염에서 IL-22는 발현이 증가되었다고 보고되었다(Cho, Kyung-Ah, et al. International immunology 24.3 (2012): 147-158). IL-33은 최근에 알려진 cytokine으로 IL-1 family에 속하며, Th2 타입의 면역반응과 연관되고, 장벽조직의 세포에서 발현된다. 하지만 알레르기 피부염증에서의 역할은 잘 알려지지 않았지만, 아토피성 피부염과 관계가 있다고 강하게 제시되고 있다. 최근 연구에 따르면 유도된 아토피성 피부염에서 IL-33의 발현이 증가되었다고 보고되고 있다(Savinko, Terhi, et al. Journal of Investigative Dermatology 132.5 (2012): 1392-1400).

[0183] 아토피성 피부염 피부에서 IL-6, IL-22, IL-33 모두 발현이 증가 되는 것으로 보고되고 있으며, 아토피성 피부염의 진행과 모두 밀접한 관계를 가지고 있다. 본 발명에서 위 세 가지 cytokine은 아토피성 피부염의 증상이

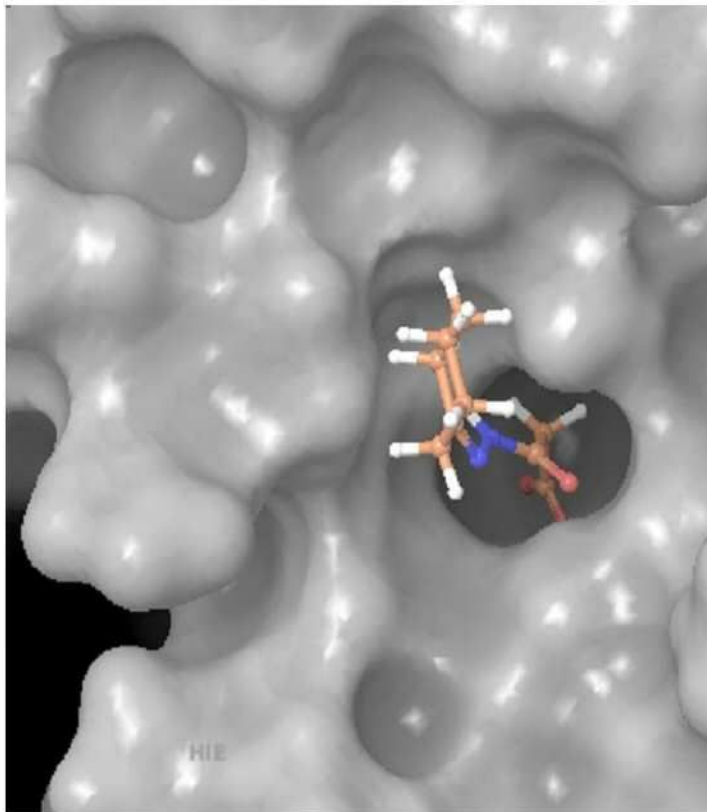
완화되어 감소되는 것으로 판단된다.

- [0184] 나. Western Blot 분석
- [0185] DNCB만 처리한 피부조직과 DNCB와 IPS-07001을 처리한 피부조직을 각각 파쇄하여 얻은 조직 용해물을 SDS-PAGE 후 PVDF membrane에 tranfer 하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 특정 단백질의 발현 정도를 확인하였다.
- [0186] 그 결과, 항체 마이크로 어레이 단백질 칩 결과에서 증가/감소를 판단하는 기준으로 잡은 1 ± 0.1 범위를 넘지는 못했지만, 가장 근접한 IL-6, IL-22, IL-33 세 가지의 cytokine을 대상으로 western blot을 실시한 결과 단백질 발현 변화가 적지만 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 17).
- [0187] 실시예 6: IPS-07004(화학식 4) 및 그 아토피 피부염 실험
- [0188] IPS-07004는 07001(화학식 1)을 스크리닝한 후, 07001과 유사한 구조를 가진 물질(07004)을 문헌 조사를 통하여 찾아낸 것이고, 07004 구매처는 Key Organics (London, UK) 이다.
- [0189] (1) 세포배양 : 인간 피부세포주 (HaCat cells)는 RPMI에 10% FBS를 넣어서 37℃, 5% CO2 조건에서 배양하였다. 후보물질들은 DMSO에 녹인 후 0.22 μ m 필터를 사용하여 여과하였음. DMSO로 희석하여 세포에 처리 하였다.
- [0190] (2) 세포독성(MTT-assay) : 인간 피부세포주 (HaCat cells) (3×10^5 세포/ml)를 1시간 동안 안정화시킨 후 후보 물질들을 10 μ M 농도부터 다양하게 처리한 뒤 Poly (I:C)를 8시간 동안 배양한다. 배양 후 새로운 배지로 갈아 준 뒤 5 mg/ml MTT 용액을 넣고 4시간 동안 37℃에 배양하였다. 250 DMSO를 넣고 MTT formazan을 추출하고 각 well의 흡광도를 ELISA reader 540 nm에서 측정하였다.
- [0191] (3) Caspase-1 활성 분석 :
- [0192] 재조합 Caspase-1과 약물을 반응시킨 후 caspase-1 assay kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 활성을 측정하였다.
- [0193] 실시예 7:염증성 장 질환 실험
- [0194] 실험동물
- [0195] 6주령의 암컷 SPF(Specific pathogen-free) C57BL/6 마우스를 두얼바이오텍으로부터 구입하였다. 마우스는 온도 $21 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 20\%$, 명암주기 12h/12h로 유지되는 호서대학교 안전성평가센터 동물실에서 1주일간 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였으며 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 동물실험의 모든 절차는 호서대학교 동물실험윤리위원회의 승인(HTRC-15-19, 및 HTRC-16-22(2))을 받아 수행되었다.
- [0196] 군 구성 및 장염의 유발
- [0197] Colitis 유발물질로 dextran sodium sulfate(cat no 160110 by Mpbio.com)를 음용수에 3% 농도로 희석하여 mouse에게 경구 투여하여 장염을 유발했으며, 마우스를 6군 나누어 대조군의 동물에는 DW를, 시험군의 동물에는 시험물질 1.0 mg/kg, 10 mg/kg을 5주간 매일 1회 경구 투여하였다. 양성대조군의 동물에는 원액 올리브오일에 녹인 Sulfasalazine (100 mg/kg)을 매일 1회 경구 투여하였다. 급성인 경우 5일간 투여 후 질병 진행정도를 확인하였다. 만성인 경우 5일 투여 후 15일과 30일 경과 시점에서 질병 진행 정도를 확인하였다.(참고문헌: Toxicology Reports 2 (2015) 10391045 -Caryophyllene attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via modulation of gene expression associated mainly with colon inflammation)
- [0198] 체중측정 및 분변관찰
- [0199] 체중은 시험기간 중 1회/5일 이상 측정하였으며 측정된 체중 결과는 정상대조군과 비교하여 차이가 없으면 0점, 체중 감소율이 15%는 1점, 510%는 2점, 1015%는 3점, >15%은 4점으로 정량화 하였다. 분변관찰은 설사의 정도를 파악하기 위하여 실시하였으며 그 결과를 정량화 하여 표시하였다. (0, normal stool; 1, mildly softstool; 2, very soft stool; 3, very soft stool (no regular shape); 4, watery stool)
- [0200] 조직 및 혈액 검체의 채취

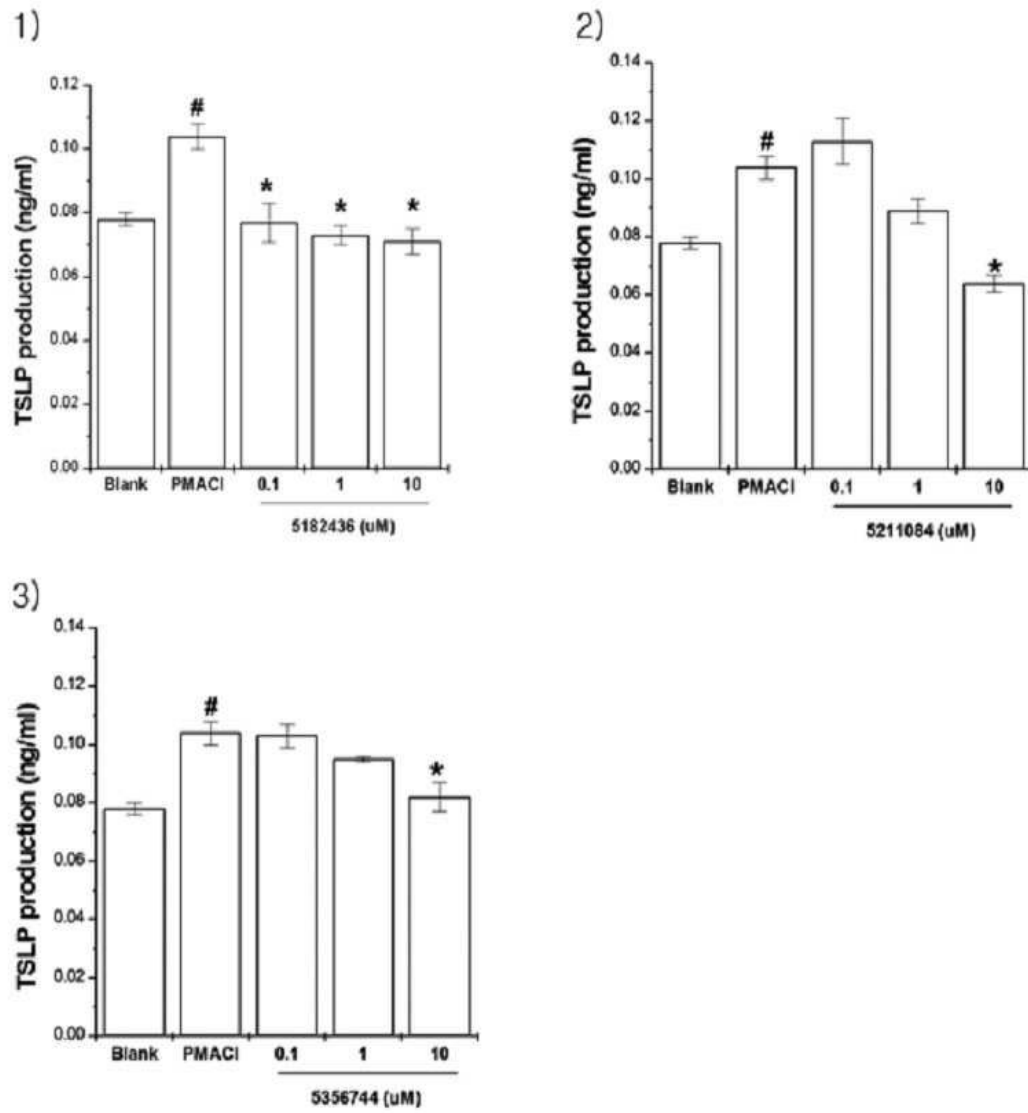
- [0201] 직장 조직과 혈액은 각 부검시기별로 5마리씩 채취하였다. 유한케타민 50[Ⓢ] (유한양행, 한국)과 럽론(bayer, 미국)을 3:1로 혼합한 후 근육주사하여 마취시켰다. 마취된 동물을 개복하여 복대동맥에서 채혈하였으며 채혈 후 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시키고 직장 조직을 채취하였다. 채취된 조직의 길이 및 무게를 측정하여 조직 1cm당 무게를 산출하였다. 채취된 조직은 일부의 조직검사에, 다른 일부는 액체질소에 동결한 후 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.
- [0202] 조직학적 검사
- [0203] 조직학적 평가를 위하여 직장의 일부 조직을 4% neutral buffered formalin(4% NBF)에 고정한 후 일반적인 조직검사 과정을 거친 후 microtome을 사용하여 4 μm두께로 박절한 후 haematoxylin & eosin stain을 실시하였다. 광학현미경을 사용하여 염증의 정도를 5단계 (normal-0, minimal-1, mild-2, moderate-3, severe-4)로 구분하였다.
- [0204] 상기 실시예의 결과를 하기에서 서술한다.
- [0205] IPS-07004의 아토피 억제 효능
- [0206] IPS-07004 경우 HaCat세포 기반 분석에서 세포 독성이 관찰되지 않았고, Recombinant Caspase-1활성 및 HMC-1 세포내에서의 Caspase-1 활성을 모두 억제하는 아토피 억제 기전을 보유하고 있음을 확인하였다.(도 22 내지 도 24 등 참조).
- [0207] IPS-07001(화학식1)과 IPS-07004(화학식 4)의 IBD장염 억제 효능
- [0208] 위 실험 방법에 의하여 구축된 DSS-유발 동물모델을 이용하여 IPS-07001과 IPS-07004의 장염 억제 효능을 관찰하였다. 투여 용량은 1.0 mg/kg과 10 mg/kg으로 나누어 진행하였고, 투여방식은 경구로 진행하였다. 효능 분석은 장 길이 대비 장 무게의 비율(wt/cm)로 효능 평가 하였고, 부가적으로 체중변화, 설사, 하혈등으로 효능 평가하였다. 실험 결과 2가지 물질 모두 10 mg/kg 투여 용량에서 DSS 대조군 대비 월등한 장염 억제 효능을 관찰하였다(도 18 내지 도 20, 도 25, 도 27 내지 28 등 참조). 체중변화는 정상군과 유사하게 증가함을 보였고, 하혈도 DSS-유발군에 비해 현저히 감소함을 관찰하였다 (도 20, 도 26 내지 도 27 등 참조). 이러한 장염억제 기전은 Inflammasome의 핵심 단백질인 Caspase-1을 억제함으로써 염증 유발 기전을 제어하기 때문이라고 판단된다.

도면

도면1

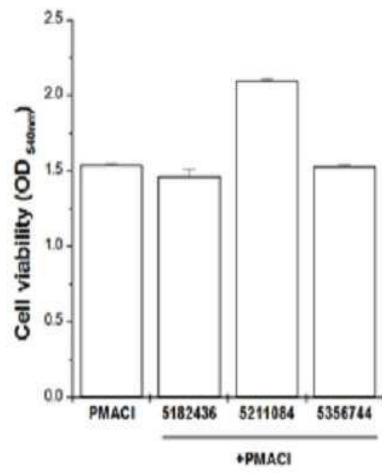


도면2

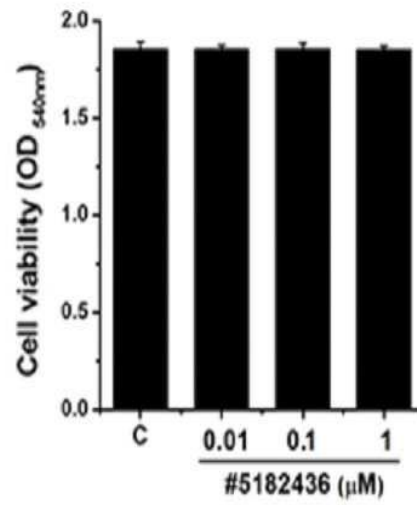


도면3

1)

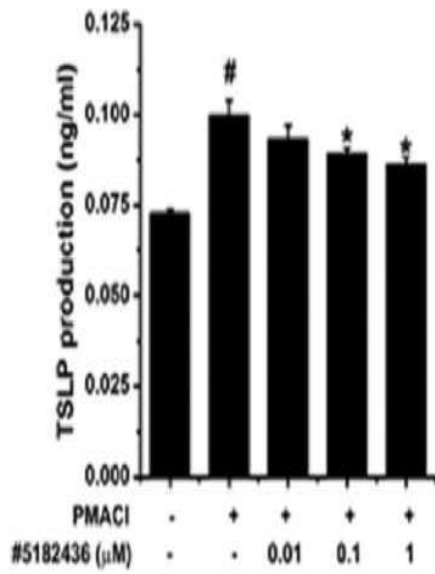


2)

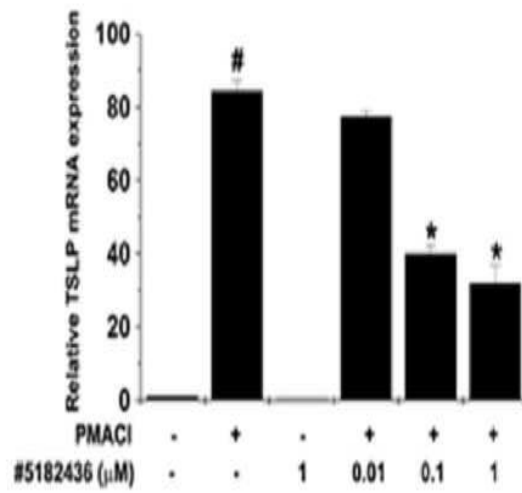


도면4

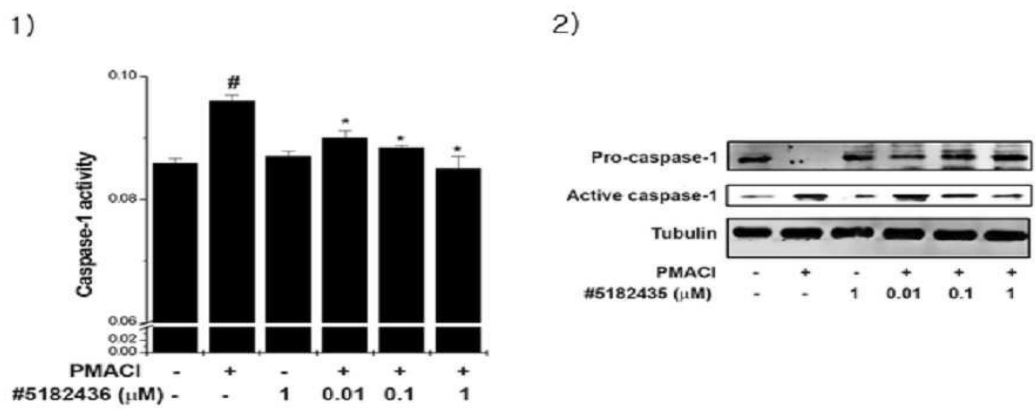
1)



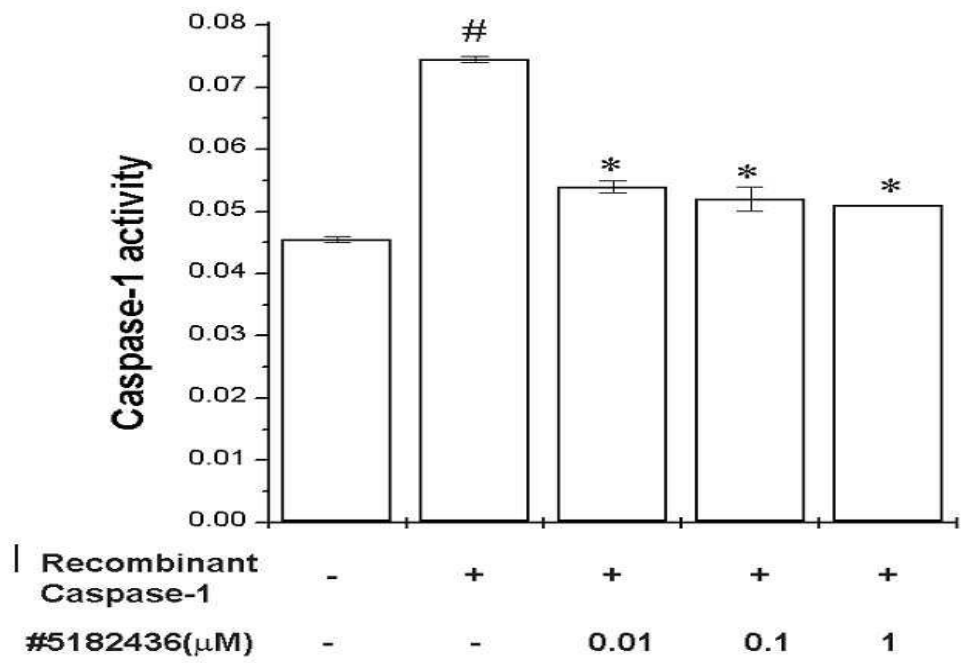
2)



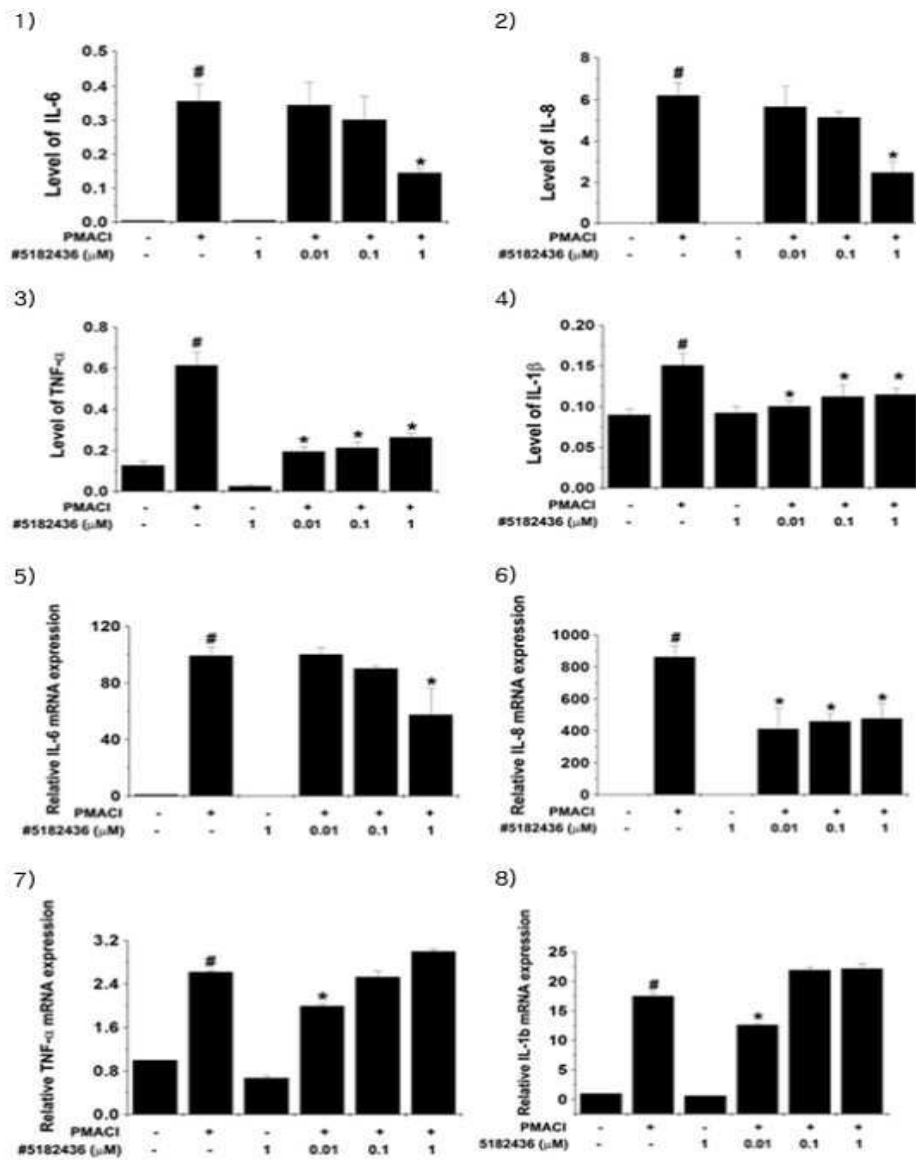
도면5



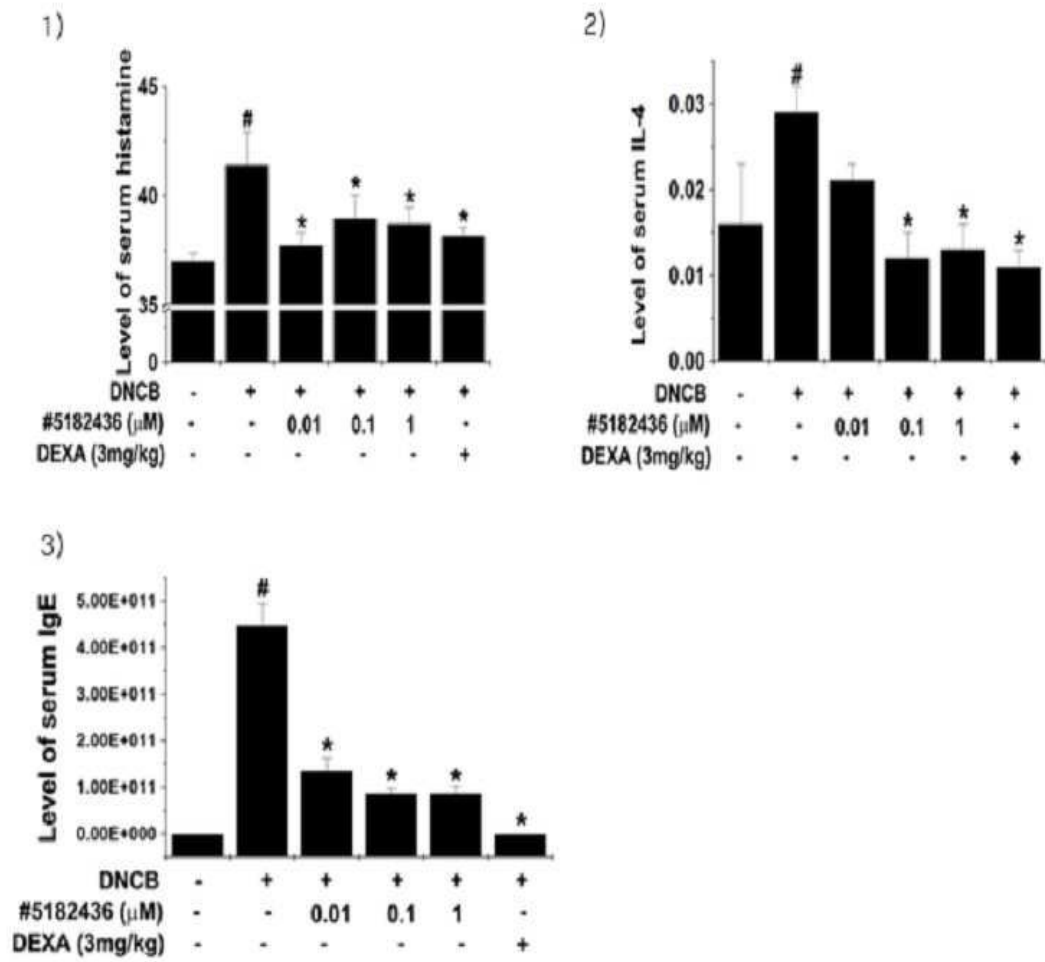
도면6



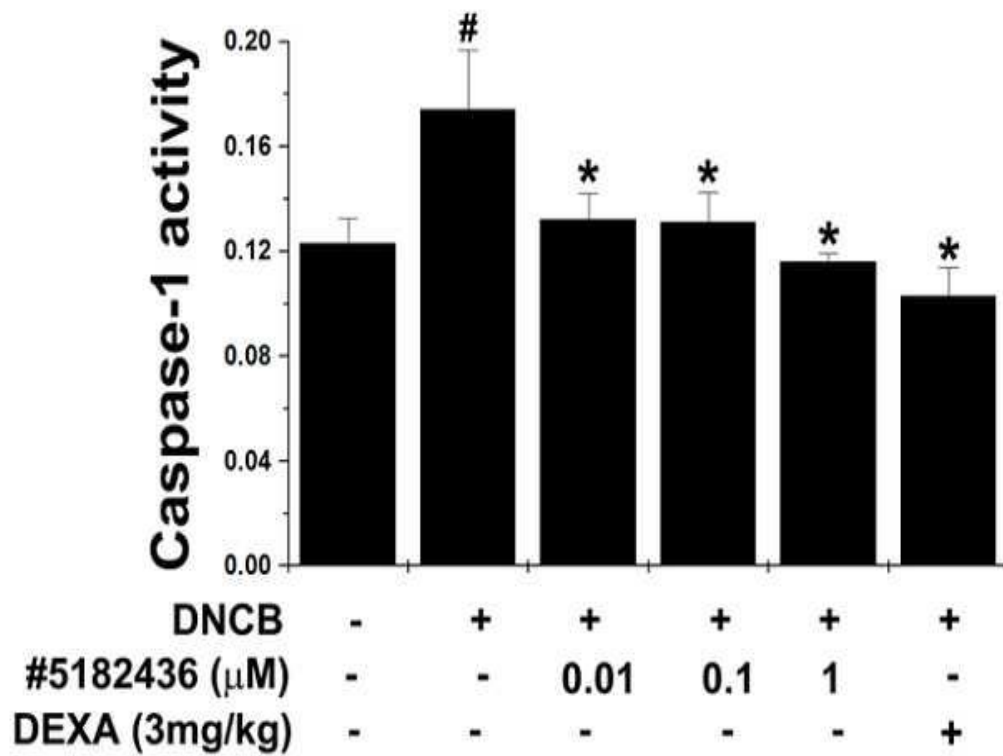
도면7



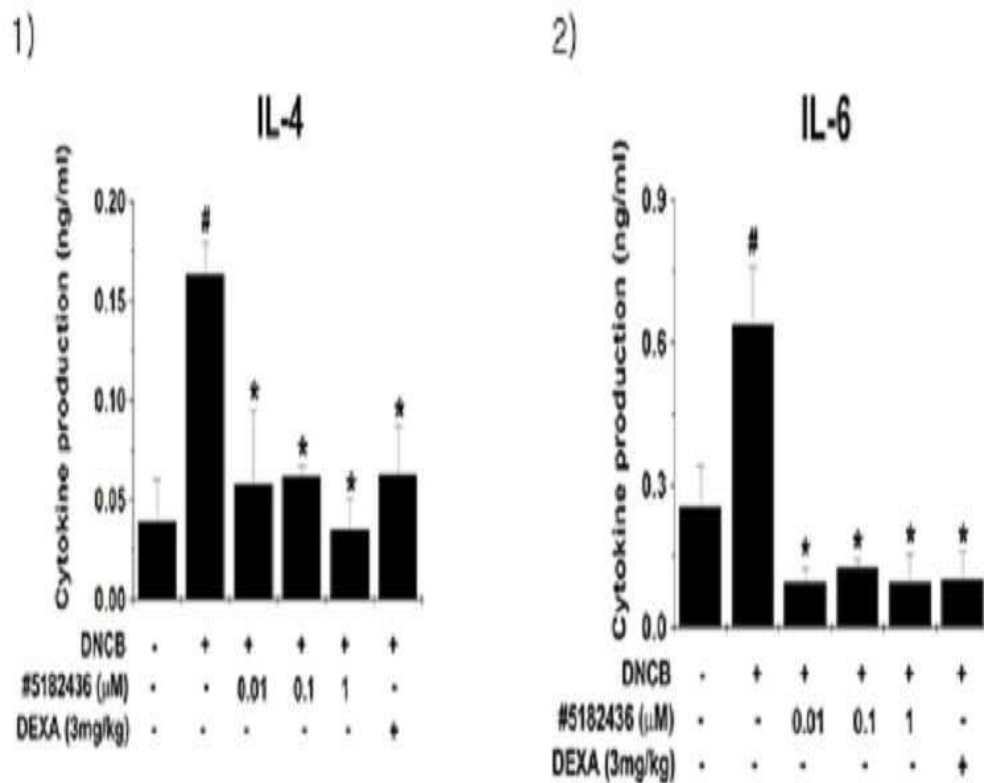
도면8



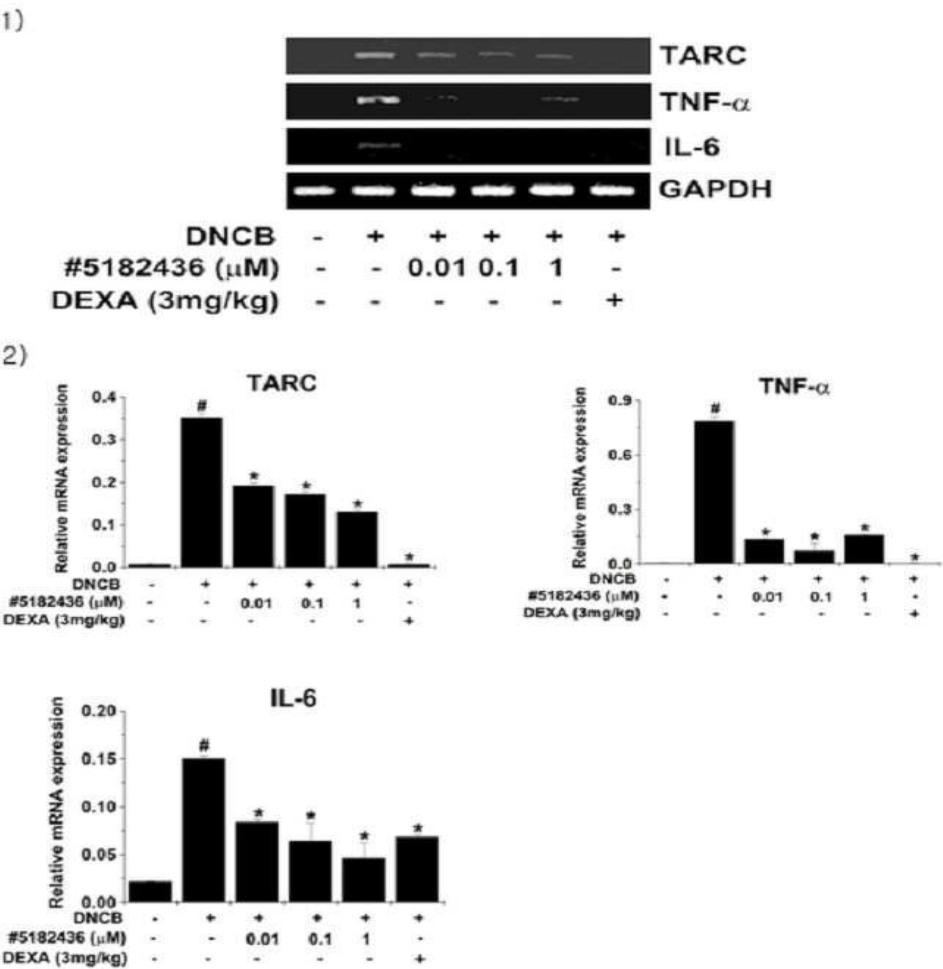
도면9



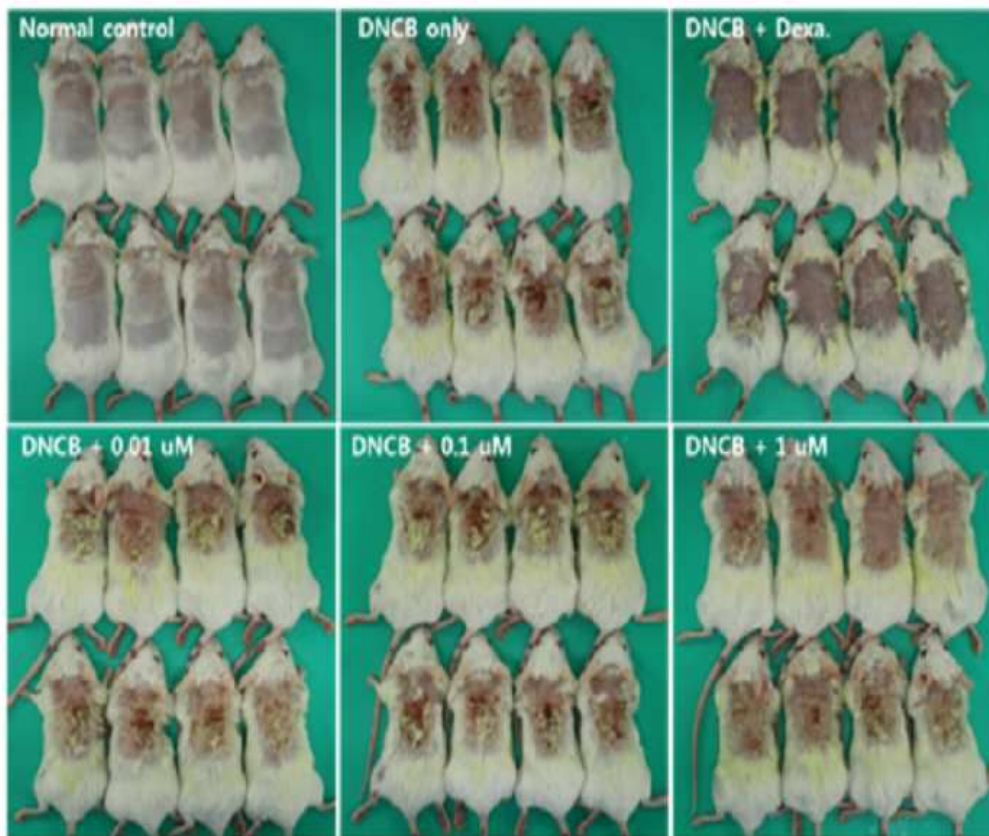
도면10



도면11

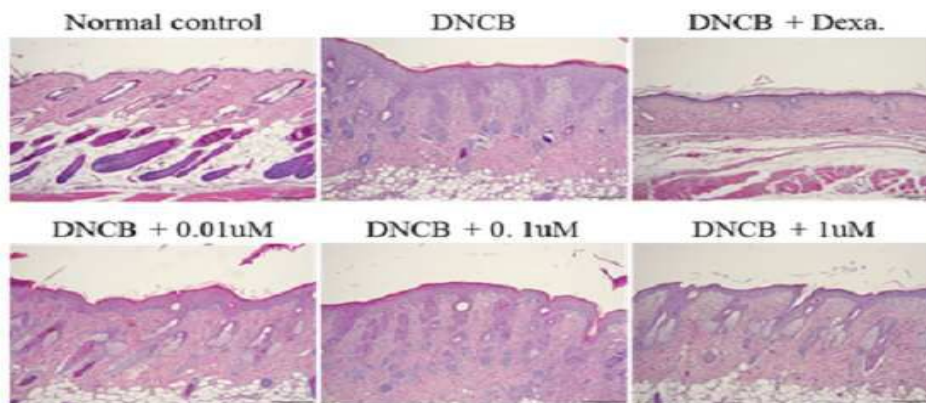


도면12

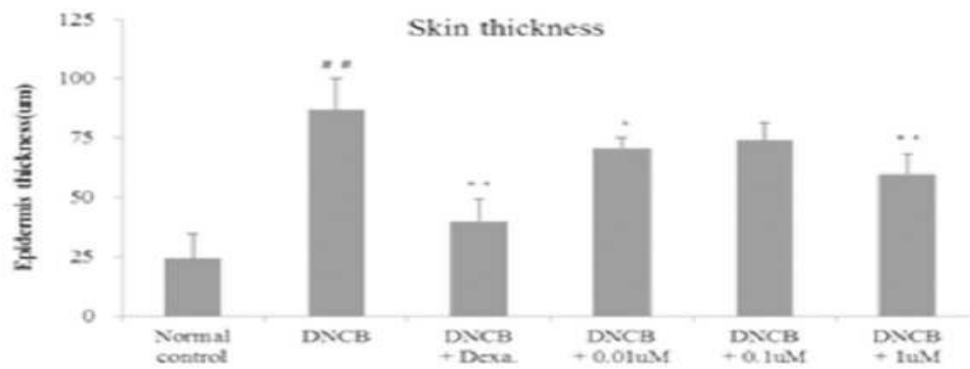


도면13

1)

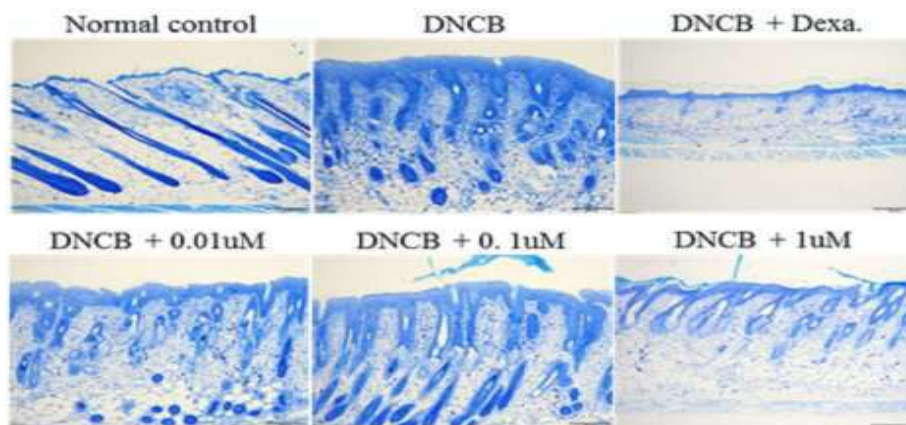


2)

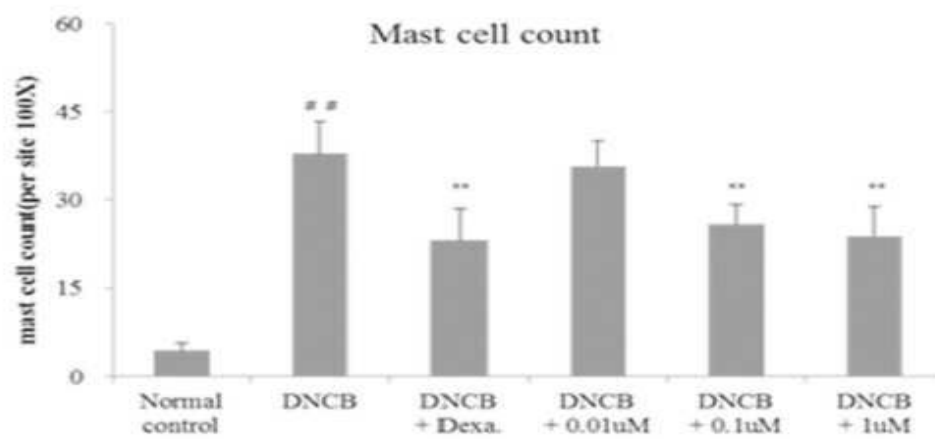


도면14

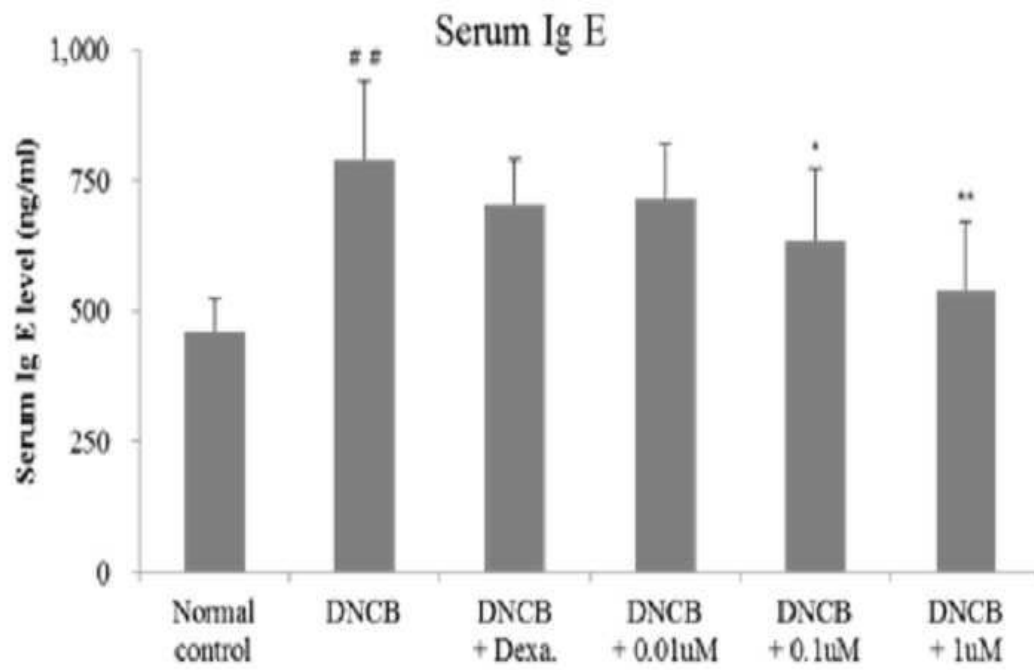
1)



2)

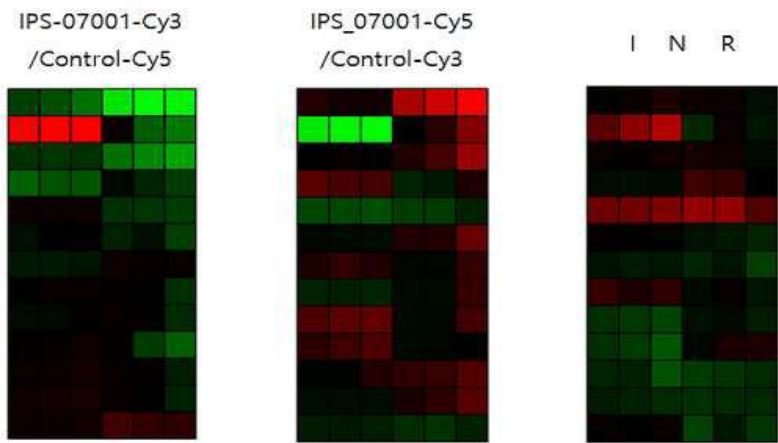


도면15

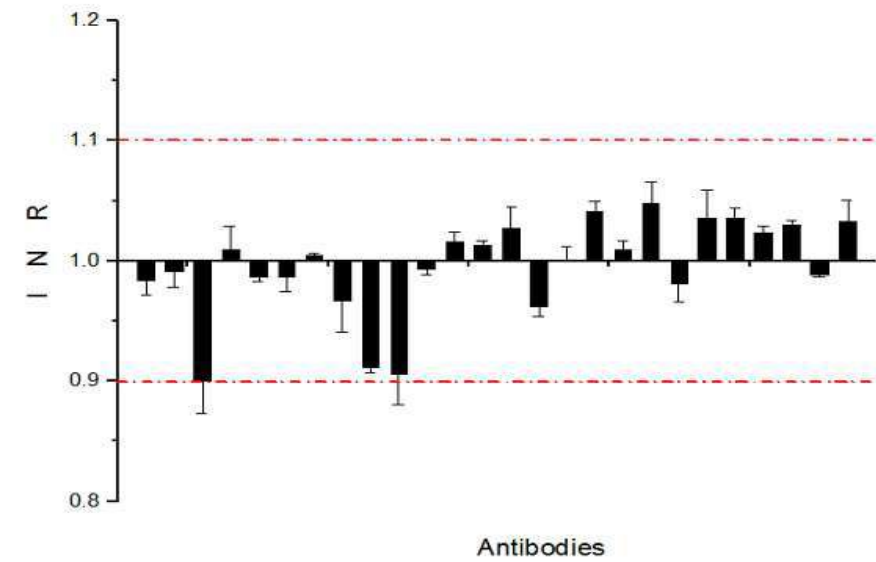


도면16

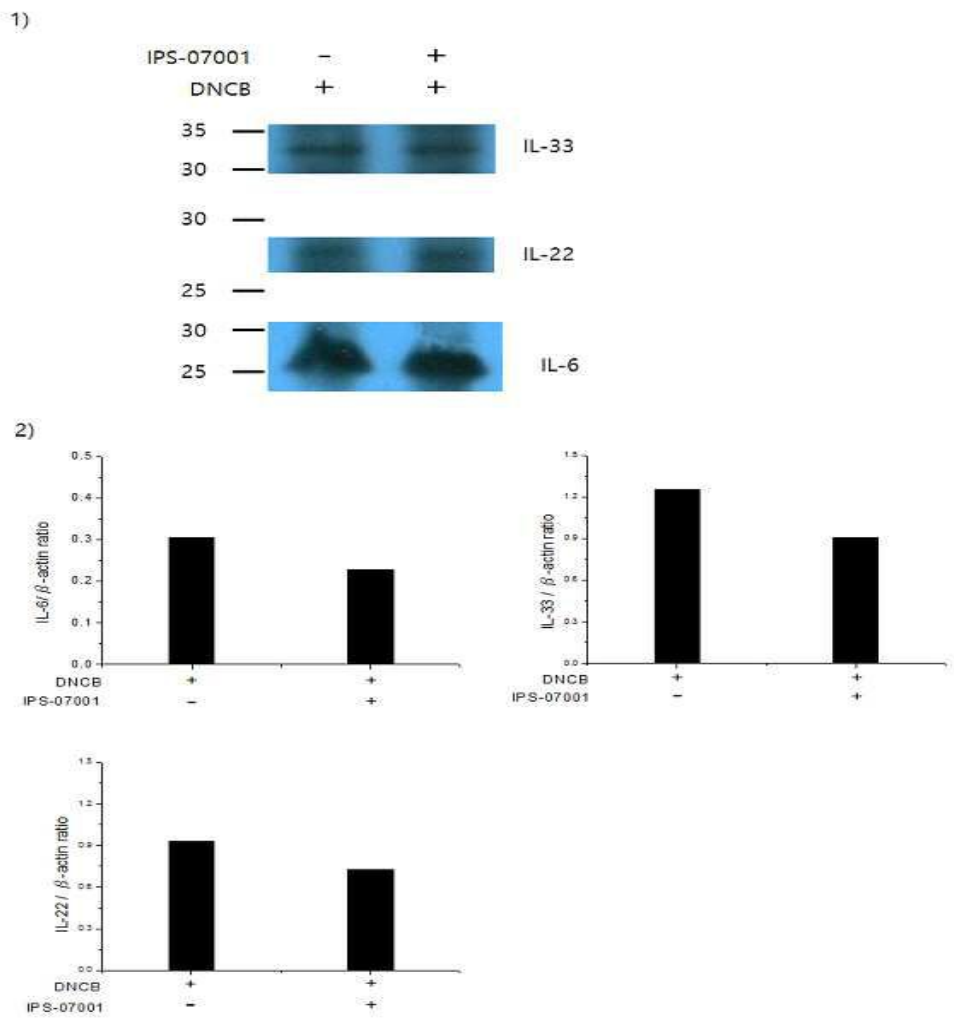
1)



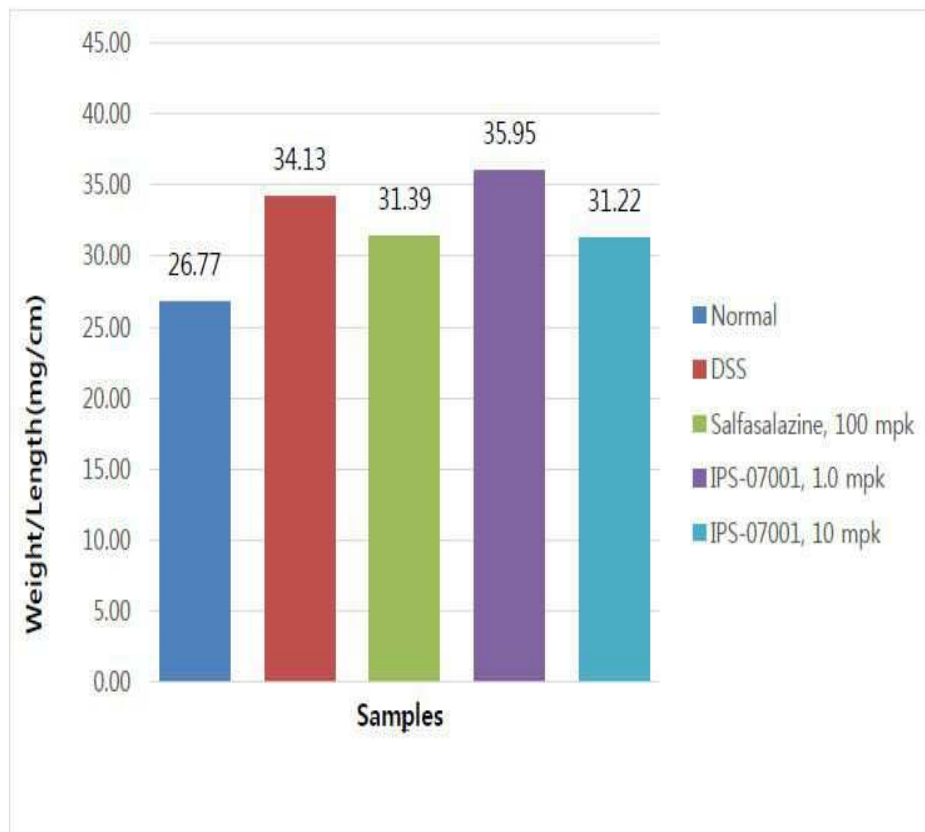
2)



도면17

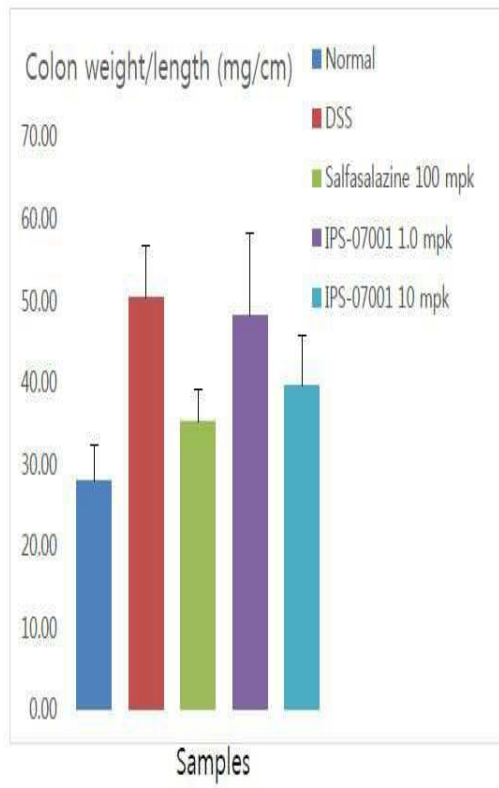


도면18

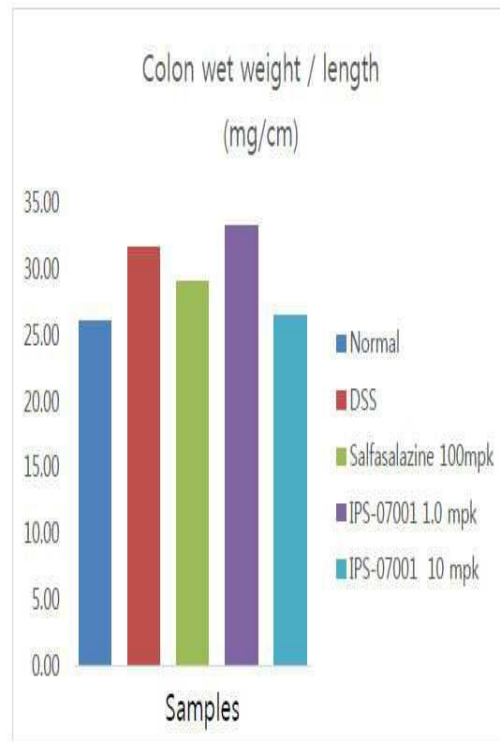


도면19

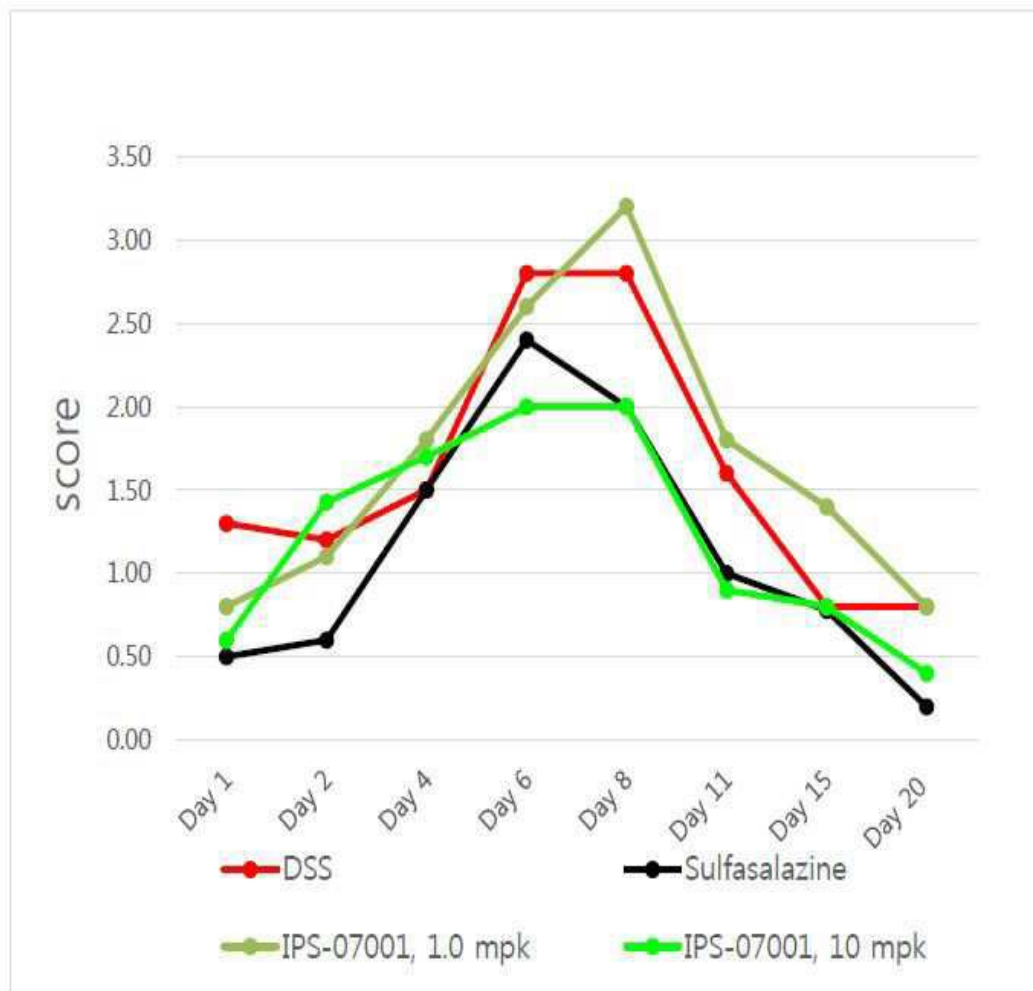
15 days



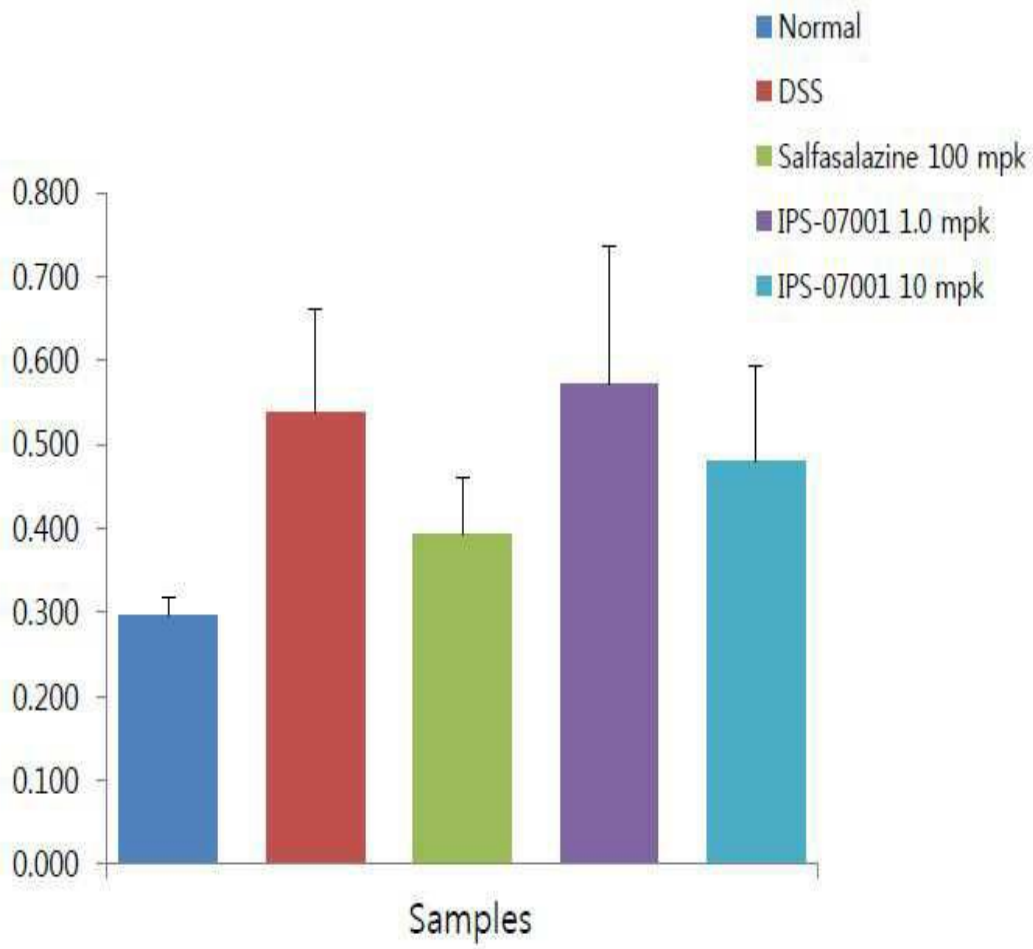
30 days



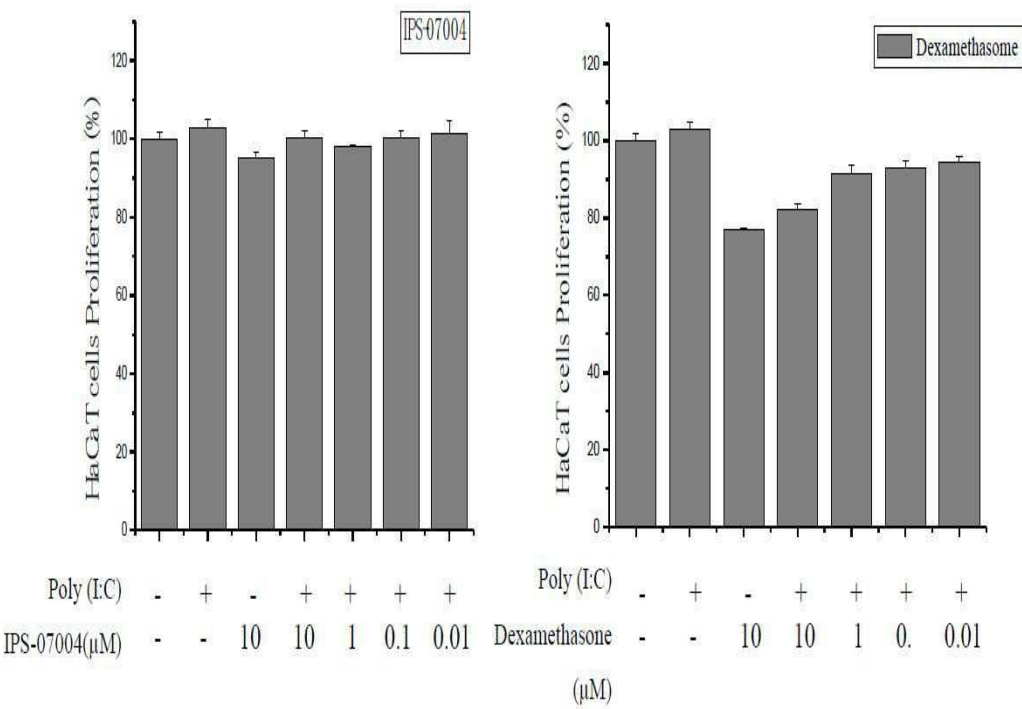
도면20



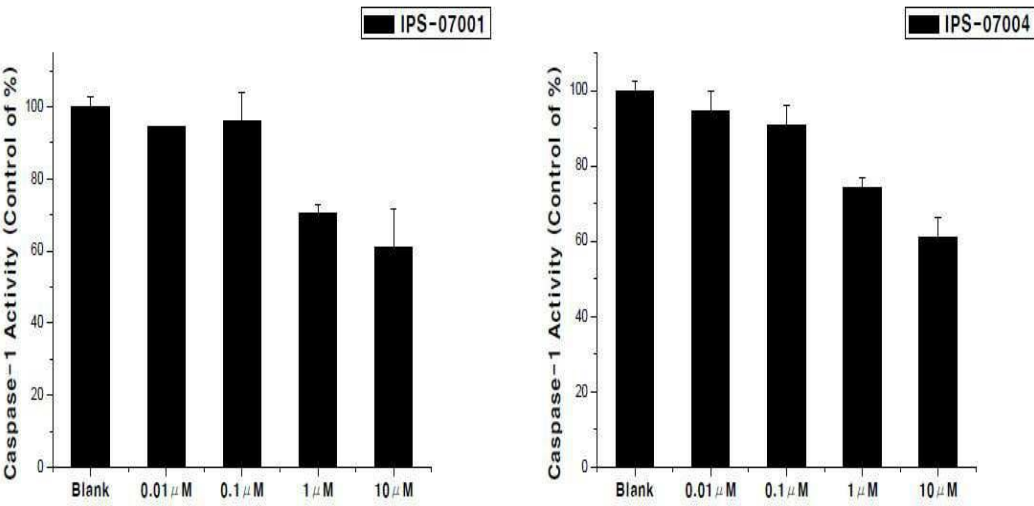
도면21



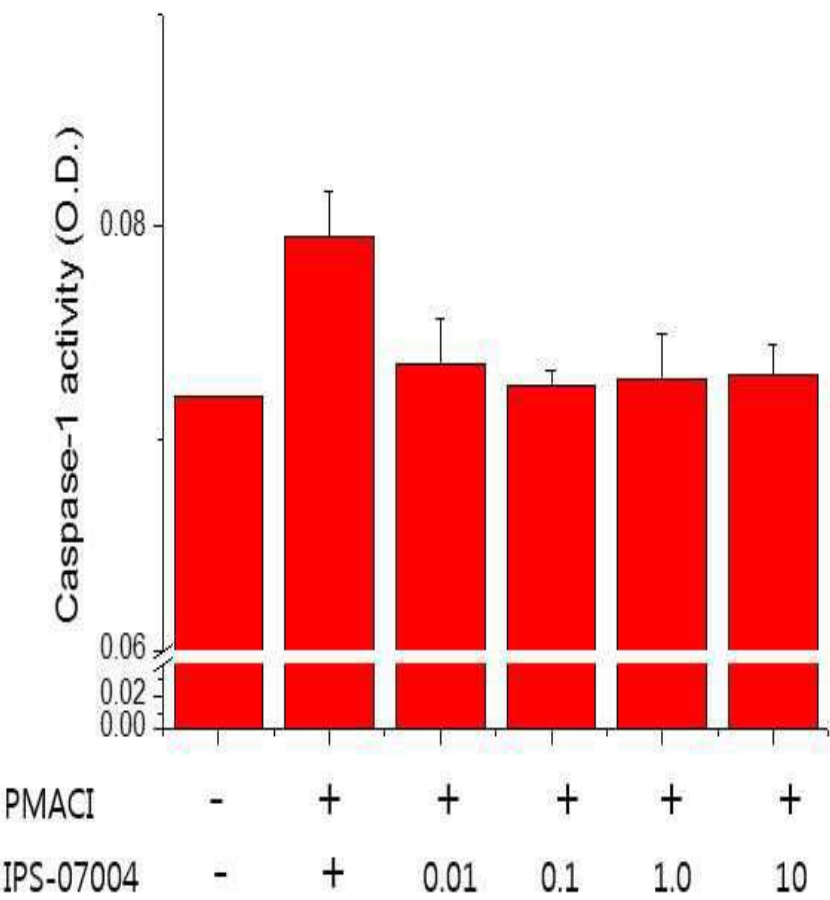
도면22



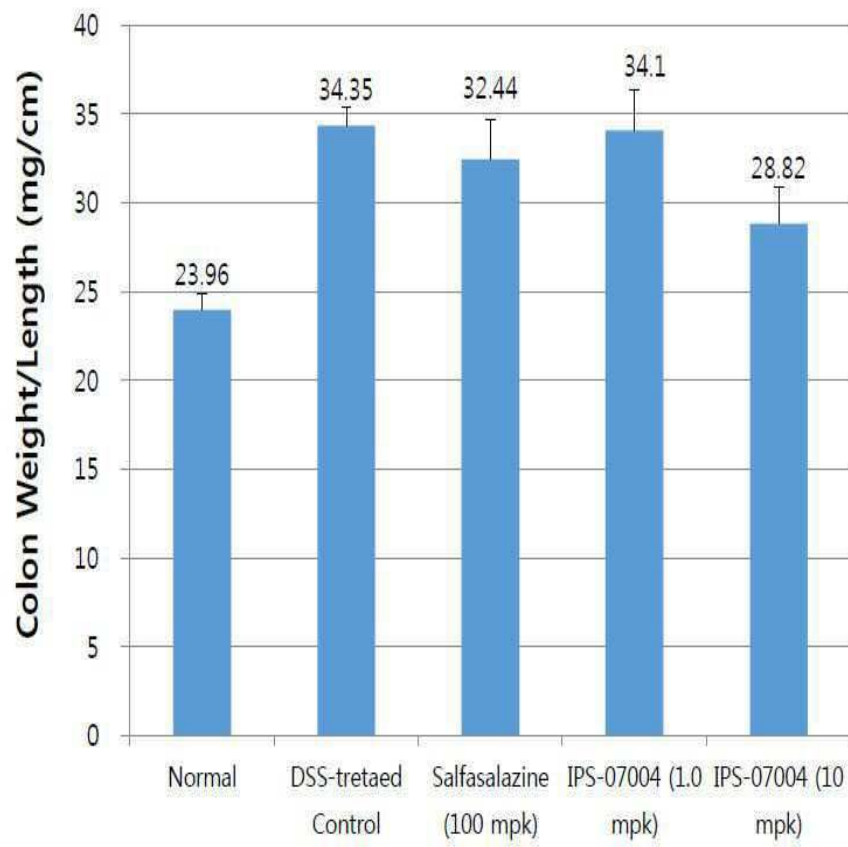
도면23



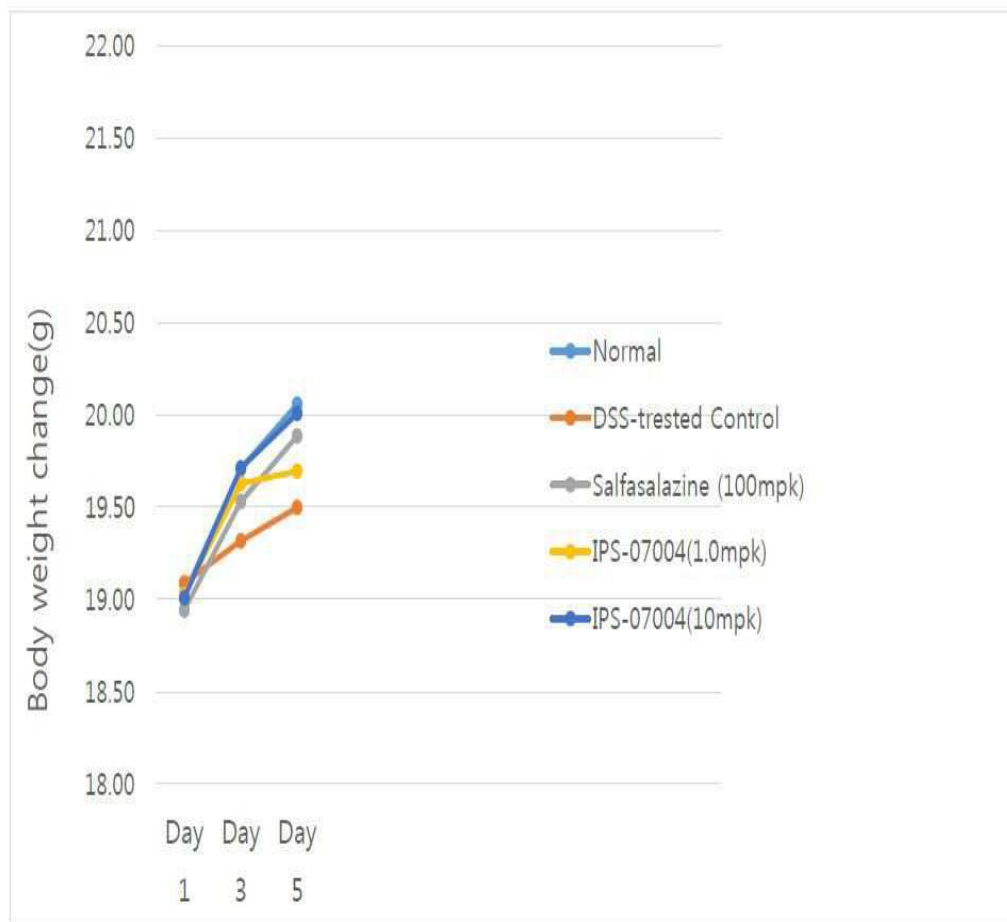
도면24



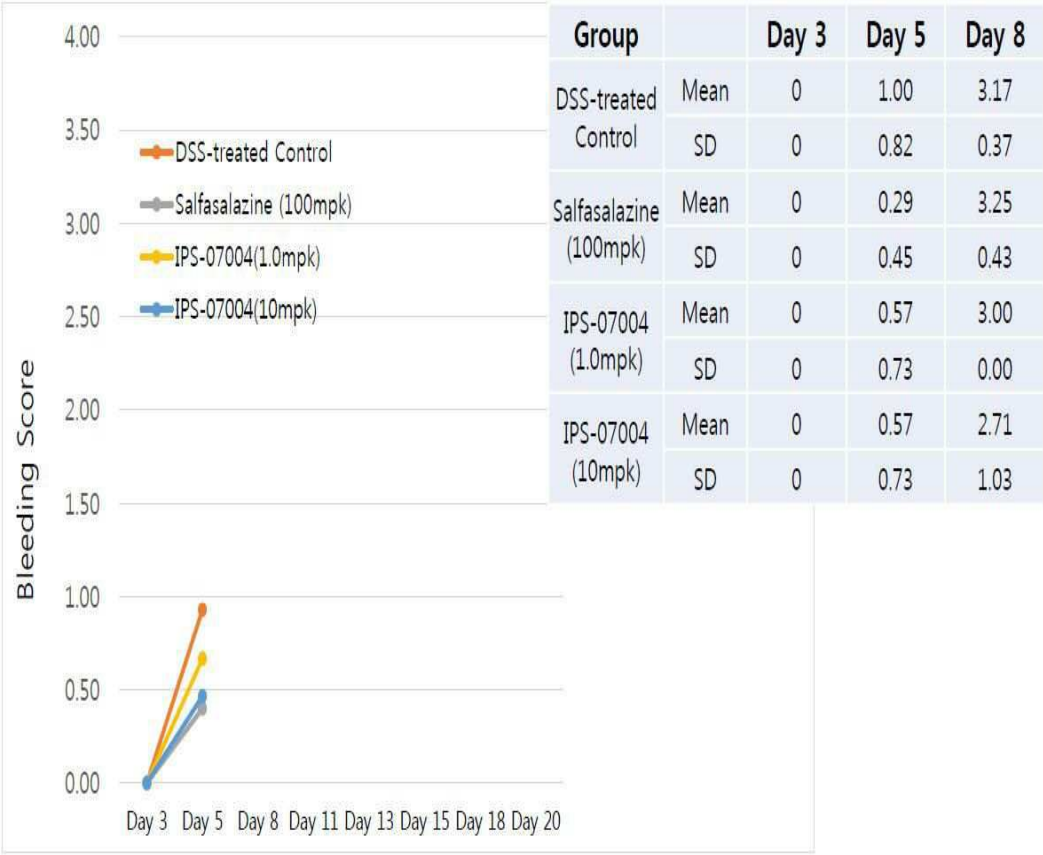
도면25



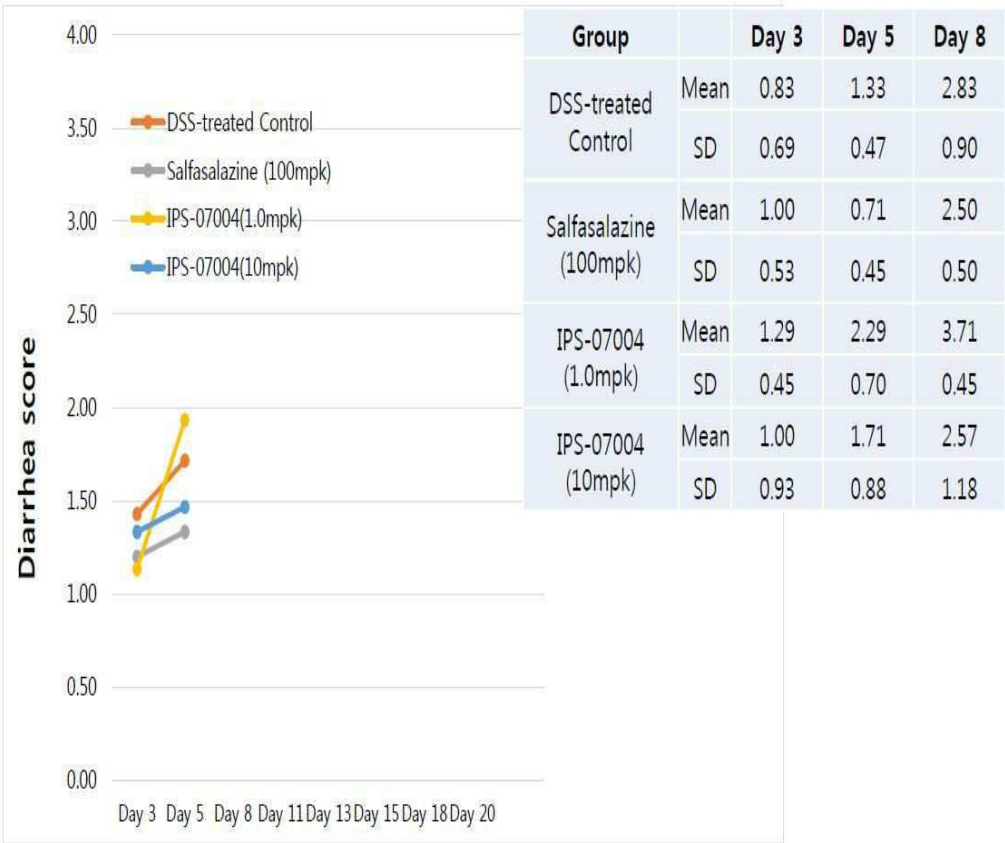
도면26



도면27



도면28



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2항

【변경전】

조성물

【변경후】

인간의 아토피 피부염 예방 및 치료용 약학 조성물