(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0010239
(43) 공개일자 2019년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/713 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/713 (2013.01)
Y10S 514/857 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0092747
(22) 출원일자 2017년07월21일
심사청구일자 2017년07월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
조경아
서울특별시 강남구 개포로110길 43, 104동 605호 (일원동, 한신아파트)
김유희
경기도 파주시 동패로 117, 202동 503호 (동패동, 벽산아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 6 항

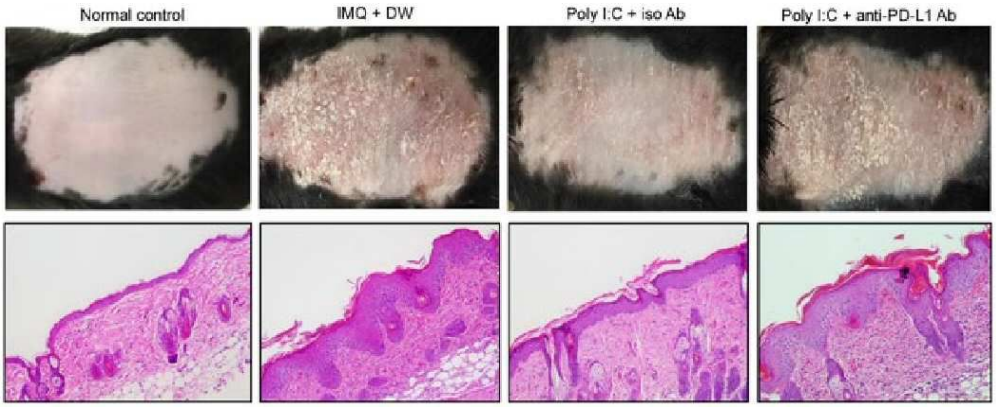
(54) 발명의 명칭 **톨 유사 수용체 3의 작용제를 유효성분으로 포함하는 피부 염증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)의 작용제를 유효성분으로 포함하는 피부 염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)의 작용제는 피부 각질세포에서 피부 염증 조절에 중요한 역할을 하는 PD-L1의 발현을 증가시키고 IL-36γ의 발현을 감소시키는 효능이 우수하여, 건선을 포함한 피부 염증의 예방, 개선 및 치료용 약학적 조성물로 다양하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
Y10S 514/863 (2013.01)
(72) 발명자
박민화
경기도 부천시 상일로 71, 1816동 505호 (상동, 반달마을 건영,동아,선경아파트)
우소연
서울특별시 동대문구 왕산로19다길 36, 202호
유경하
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1C1A1A01053573
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 편도유래 줄기세포를 이용한 난치성 자가 면역 질환인 건선의 새로운 치료기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR3)의 작용제를 유효성분으로 포함하는 피부 염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 3의 작용제는 poly(I:C)인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 3의 작용제는 각질세포에서 PD-L1의 발현을 증가시키는 효능을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 톨 유사 수용체 3의 작용제는 각질세포에서 IL-36γ의 발현을 감소시키는 효능을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 피부 염증은 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 알러지성 피부염, 일광 피부염, 감염에 의한 피부염, 면역 질환에 의한 피부염, 건선, 습진, 여드름, 두드러기 및 발진으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 피부 염증은 건선인 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)의 작용제를 유효성분으로 포함하는 피부 염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 체내 수분을 보호하고 외부로부터 유입될 수 있는 침입 인자를 막아 인체를 보호하는 장벽 역할을 한다. 피부에 염증 반응을 일으키는 인자로는 물리적인 자극, 화학적인 자극, 알러지 항원(allergen), 병원균 감염, 자외선 등이 있으며, 이로 인해 이차적으로 생산된 염증 관련 사이토카인 또는 케모카인 등이 염증 반응을 일으키는 인자가 될 수 있다. 피부 염증 반응의 일반적인 경로는 외부 자극으로부터 인체를 보호하기 위한 면역 반응으로 알려져 있으며, 이러한 염증 반응을 억제하여 염증을 조절하고자 하는 것이 근래 주요한 치료 타겟이 되고 있다.

[0003] 건선(psoriasis)은 은백색의 비늘로 덮여 있고 경계가 뚜렷하며 크기가 다양한 붉은색의 구진이나 판을 이루는 발진이 전신의 피부에 반복적으로 발생하는 만성 염증성 피부병으로, 조직학적으로 표피의 증식과 진피의 염증을 특징으로 한다. 건선의 원인은 아직 완벽하게 규명되지는 않았으나, 피부에 있는 면역세포인 T세포의 활동성이 증가되어, 그 결과 분비된 면역 물질이 피부의 각질세포를 자극하여 각질세포의 과다한 증식과 염증을 일으키는 것으로 밝혀지고 있다. 그 외에도 유전적 요인, 환경적 요인, 약물, 피부자극, 건조, 상기도 염증, 정신적 스트레스 등이 건선을 일으키거나 악화시키는 요인으로 알려져 있다.

[0004] 현재 건선을 포함한 피부 염증 질환의 치료제로는 스테로이드 제제, 국소 면역 억제제, 국소 항생제, 항히스타

민 등이 사용되고 있으나, 상기 약물제제를 장기적으로 사용하는 경우 살이 트는 팽창선조, 피부위축, 모세혈관 확장, 스테로이드성 여드름, 다모증, 자반 등의 부작용이 일어날 수 있는 것으로 알려져 있다. 특히 스테로이드제를 광범위한 부위에 도포하게 되면, 피부를 통해 약제가 전신적으로 흡수되어 소아의 경우 성장을 방해할 수 있고, 성인의 경우 골다공증과 같은 전신적인 부작용이 발생할 위험이 있다.

[0005] 이에, 부작용을 최소화한 피부 염증 치료 약제에 대한 연구가 계속되고 있으나(대한민국 공개특허공보 제10-2014-0033610호, 대한민국 공개특허공보 제10-2016-0137035호), 대부분 그 효과가 미미하거나 면역 조절 등에 의한 근본적 치료가 아닌 이미 발생한 증상의 완화 등에 치중한 약제가 많아 여전히 피부 염증 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)의 작용제를 유효성분으로 포함하는 피부 염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)의 작용제를 유효성분으로 포함하는 피부 염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명에서 사용되는 용어, "톨 유사 수용체(Toll-like receptor; TLR)"는 세균, 바이러스, 기생충 등의 병원체에 대하여, 초기 단계의 생체 방어 자연 면역에서 병원체를 구성하고 있는 성분의 특유한 분자패턴을 직접 인식하는 수용체를 말한다. 초파리(drosophilla)에서 먼저 톨 수용체(Toll receptor)가 발견되고, 이후 사람에서 그와 비슷한(homolog) 수용체를 발견하고 이를 톨 유사 수용체라 명명하였다. 그 중, 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)은 B 세포, 대식세포 및 수지상 세포의 막에서 발현되는 것으로 알려져 있다.

[0009] 본 발명에서 사용되는 용어, "작용제(agonist)"는 생체 작용 물질의 수용체에 결합하여 그 물질이 갖는 작용과 같은(또는 유사한) 작용을 하는 물질 또는 약제, 또는 수용부위의 활성을 높이는 분자를 말한다.

[0010] 본 발명에서 톨 유사 수용체 3의 작용제는 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 톨 유사 수용체 3에 결합하여 작용하는 모든 작용제를 포함할 수 있으나, 바람직하게는 poly(I:C)일 수 있다.

[0011] 본 발명에서 사용되는 용어, "poly(I:C)"는 polyinosinic-polycytidylic acid의 약자로, 톨 유사 수용체 3과 상호 작용하는 작용제로 알려져 있다. poly(I:C)는 일부 바이러스에 존재하며 톨 유사 수용체 3의 천연자극제인 이중 가닥 RNA와 구조적으로 유사한 것으로 알려져 있으며, 이에 poly(I:C)는 이중 가닥 RNA의 합성 유사체로 여겨지고 있다.

[0012] 본 발명에서 poly(I:C)는 바이러스 등으로부터 분리하거나 합성하여 사용할 수 있으며, 국내외에서 시판되는 것을 구입하여 사용할 수도 있다. 본 발명의 실시예에서는 poly(I:C)를 Sigma-Aldrich (시그마-알드리치) 사로부터 구입하여 사용하였다.

[0013] 본 발명의 치료 대상 질환인 "피부 염증"은 피부에서 일어나는 염증성 반응을 수반하는 피부 염증성 질환을 의미하며, 의학적으로 피부 염증의 범주에 해당하는 한 구체적인 질환명이 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 알러지성 피부염, 일광 피부염, 감염에 의한 피부염, 면역 질환에 의한 피부염 등을 모두 포함할 수 있으며, 건선, 습진, 여드름, 두드러기, 발진 등을 모두 포함할 수 있다. 본 발명에서 피부 염증은 보다 바람직하게는 건선일 수 있다.

[0014] 본 발명자들은 톨 유사 수용체 3의 작용제가 피부 염증을 예방하고 치료하는 효능이 우수함을 최초로 규명하였다.

[0015] 구체적으로 본 발명의 실시예에서, 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 4개의 군(정상 대조군; IMQ(염증 반응 조절제) 처리군(IMQ+DW); IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 이소타입 대조군 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+iso Ab); 및 IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 항-PD-L1 블로킹 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 Ab))으로 나누어 PASI (Psoriasis Area and Severity Index) 점수를 사용해 피부 염증의 심각도를 평가한 결과, IMQ+DW군과 비교할 때, IMQ+poly(I:C)+iso Ab군에서는 홍반, 인설 및 두께 면에서 모두 피부 염증이 월등히 억제된 것으로 확인되었으며, 체중 변화에 있어서도 체중 감소 정도가 가장 적고, 실험 6일째 이후에는 정상 대조군과 거의 유사

한 정도로 체중이 회복되는 것으로 확인되었다(도 1, 도 2).

[0016] 본 발명의 톨 유사 수용체 3의 작용제는 각질세포에서 PD-L1의 발현을 증가시키는 효능을 갖는다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어, "PD-L1"는 Programmed death-ligand 1의 약자로, PD-L1은 약 40kDa의 제1형 트랜스멤브레인 단백질로 알려져 있으며, CD274 또는 B7-H1이라고도 불린다. PD-L1은 임신이나 조직 동종이식(tissue allografts) 또는 자가 면역 질환이나 간염과 같은 질환이 발생 시, 면역 체계를 억제하고 조절하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0018] 본 발명의 실시예에서, 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스 4개 군(정상 대조군; IMQ(염증 반응 조절제) 처리군(IMQ+DW); IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 이소타입 대조군 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+iso Ab); 및 IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 항-PD-L1 블로킹 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 Ab))의 피부 샘플을 준비한 후, 유동 세포 분석을 통해 PD-L1을 검출하는 실험을 진행하였다.

[0019] 구체적으로 모든 실험 마우스의 등 피부에서 PD-L1을 검출하기 위하여, FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 이용하는 FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, USA) 자동 분석을 사용하였으며, 이를 위해 각 마우스의 등 피부 세포 현탁액을 PerCP-결합된 항-마우스 CD4 (GK1.5), APC-결합된 항 마우스 PD-L1 (10F.9G2), FITC-결합된 항-마우스 Gr-1 (RB6-8C5) 및 PE-결합된 항-마우스 CD11C (N418) 항체(전부 BioLegend)와 함께 배양하였다. CD4, Gr-1 또는 CD11c에 양성인 세포를 각각 게이팅하여 PD-L1 발현을 비교하였다. CD4, Gr-1 및 CD11c에 음성인 세포를 게이팅하였고, 등 피부의 비-면역 세포 분획으로 분석되었다.

[0020] 유동 세포 분석을 통해, 먼저 HaCaT 세포에서 건선의 면역 병원 발생에 필수적인 IL-17 또는 IL-22 사이토카인이 PD-L1의 발현에 영향을 미치는 지 관찰한 결과, IL-17 또는 IL-22는 PD-L1의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며, PD-L1의 발현은 poly(I:C)에 의해 증가되는 것으로 확인되었다(도 5).

[0021] 한편, 모든 실험 마우스의 등 피부 세포에서 PD-L1 발현을 비교한 결과, Gr-1, CD4 또는 CD11c 양성인 면역 세포들은 IMQ 투여만으로도 PD-L1의 증가가 일어나긴 하였으나, poly(I:C)를 함께 투여할 때 가장 큰 증가를 보이는 것으로 확인되었다. 그러나, 비면역 세포에 의한 PD-L1의 발현은 poly(I:C)를 함께 투여한 경우에만 상향 조절되는 것으로 확인되었다(도 6.)

[0022] 본 발명의 톨 유사 수용체 3의 작용제는 각질세포에서 IL-36γ의 발현을 감소시키는 효능을 갖는다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "IL-36γ"는 인터루킨-36 감마(Interleukin-36 gamma)라고도 하며, 인터루킨-1 패밀리 멤버 9 (interleukin-1 family member 9; IL1F9)로 알려져 있다. IL-36γ는 주로 건선과 같은 피부 염증의 바이오 마커로 사용되는 것으로 알려져 있다.

[0024] 본 발명의 실시예에서, 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스 4개 군(정상 대조군; IMQ(염증 반응 조절제) 처리군(IMQ+DW); IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 이소타입 대조군 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+iso Ab); 및 IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 항-PD-L1 블로킹 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 Ab))의 피부 샘플을 준비한 후, 웨스턴 블랏을 통해 PD-L1 및 IL-36γ의 수준을 검출하는 실험을 진행하였다.

[0025] 구체적으로 실험동물 내의 PD-L1 및 IL-36γ의 수준을 검출하기 위하여, 마우스 피부를 균질화하고 단백질을 분리하여 레인 당 20 ㎍의 단백질을 로딩하였다. 블랏팅 후, 멤브레인을 PD-L1 (sc-50298), IL-36γ (sc-168163) 또는 β-액틴 (sc-47778)에 대한 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 하룻밤 배양하였다. 그 다음, 상기 멤브레인을 세척한 후에, 상응하는 2차 항체와 함께 배양하고, 최종적으로 ECL (enhanced chemiluminescence; ThermoFisher Scientific)을 사용하여 검사하였다.

[0026] 상기 실험 결과, IMQ 처리에 의해 유도된 IL-36γ의 발현은 poly(I:C)의 투여에 의해 현저히 억제되는 것으로 확인되었으며, 이는 poly(I:C)의 투여에 의해 PD-L1의 발현이 강하게 유도되어 IL-36γ의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다(도 3).

[0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서, real-time PCR을 수행하여 각각 IL-17, IL-22 또는 poly(I:C)의 존재 하에 HaCaT 세포에서의 IL-36γ의 발현 정도를 측정한 결과, poly(I:C)의 존재 하에서 IL-36γ의 발현이 두드러지게 감소되는 것으로 확인되었다(도 4a).

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 톨 유사 수용체 3의 작용제를 유효성분으로 포함하는 것 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는

담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 톨 유사 수용체 3의 작용제는 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001 중량% 내지 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.0001 중량% 내지 90 중량%, 보다 바람직하게는 0.0001 중량% 내지 50 중량%, 더욱 바람직하게는 0.0001 중량% 내지 30중량%로 포함될 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물을 연고, 크림, 도포용 파우더, 오일, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용하여도 우수한 효과를 발휘할 수 있으나, 치료 효율을 증가시키기 위하여 추가적으로 호르몬 치료, 약물 치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 톨 유사 수용체 3 (Toll-like receptor 3; TLR 3)의 작용제는 피부 각질세포에서 피부 염증 조절에 중요한 역할을 하는 PD-L1의 발현을 증가시키고 IL-36γ의 발현을 감소시키는 효능이 우수하여, 건선을 포함한 피부 염증의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 IMQ를 6일 연속 처리한 후, 7일째에 촬영한 정상 대조군 마우스, IMQ+증류수(DW) 마우스, IMQ+poly(I:C)+iso Ab 마우스, 및 IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 블로킹 Ab 마우스의 등 피부 사진 및 등 피부의 H&E 염색 절편을 나타낸 것이다.

도 2에서 (a)는 정상 대조군 마우스, IMQ+증류수(DW) 마우스, IMQ+poly(I:C)+iso Ab 마우스, 및 IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 블로킹 Ab 마우스의 등 피부의 홍반, 인설 및 두께를 0-4의 척도로 각각 매일 평가한 점수를 나타낸 그래프, (b)는 상기 홍반, 인설 및 두께의 누적 점수를 나타낸 그래프이고, (c)는 상기 각 군의 마우스의 체중을 측정한 그래프를 나타낸 것이다. 상기 그래프들에서 n=6; *P<0.05이며, 모든 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 나타내었다.

도 3은 정상 대조군 마우스, IMQ+증류수(DW) 마우스, IMQ+poly(I:C)+iso Ab 마우스, 및 IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 블로킹 Ab 마우스의 등 피부에서의 PD-L1 및 IL-36γ 단백질 수준을 웨스턴 블랏을 통해 측정한 결과를 나타낸 것이다(*P<0.05).

도 4에서는 (a)는 poly(I:C)의 존재 하에 HaCaT 세포에서의 IL-36γ의 발현 수준을 real-time PCR로 측정한 결과를 나타낸 그래프이고(n=3; *P<0.05), (b)는 정상 대조군 마우스, IMQ+증류수(DW) 마우스, IMQ+poly(I:C)+iso Ab 마우스, 및 IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 블로킹 Ab 마우스의 등 피부에서의 여러 유전자의 발현 수준을 real-time PCR로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(n=6; *P<0.05).

도 5는 IL-17, IL-22 또는 poly(I:C)에 노출된 HaCaT 세포에서의 PD-L1 표면 발현 수준을 유동 세포 분석을 통해 나타낸 그래프이다(n=4; *P<0.05).

도 6에서 (a)는 Gr-1 양성, CD4 양성, CD11c 양성 또는 음성으로 게이팅된 정상 대조군 마우스, IMQ+증류수(DW) 마우스, IMQ+poly(I:C)+iso Ab 마우스, 및 IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 블로킹 Ab 마우스의 등 피부의 PD-L1의 발현 수준을 유동 세포 분석을 통해 비교한 그래프이고(n=4), (b)는 유동 세포 분석의 평균(±표준편차) 형광 강도(MFI)를 나타낸 그래프이다(n=4; *P<0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 통계 분석

[0050] 본 명세서의 데이터는 평균±표준 편차(SD)로 표현하였다. 통계적 유의성은 표준 소프트웨어(Prism 6; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하고 p <0.05에서 통계적 유의성을 설정하여 일원 또는 양방향 ANOVA를 통해 분석하였다.

[0052] **실시예 1: 세포 배양**

[0053] HaCaT 인간 각질 세포주(가톨릭대학교 의과대학 김태윤 박사가 제공)를 10% 소 태아 혈청(Invitrogen), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL) 및 페니실린(100 U/mL)이 첨가된 DMEM (Invitrogen [ThermoFisher Scientific], Waltham, MA, USA)에서 배양 하였다. 상기 세포를 세포 밀집도 70-80%가 될 때까지 배양하고, IL-17 (100 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-22 (100 ng/ml, R&D Systems) 또는 poly(I:C) (20 ㎍/ml; 시그마-알드리치)로 자극을 주었다(24 h). 그 다음, 상기 세포를 이용해 유동 세포 분석 또는 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 수행하였다.

[0055] **실시예 2: 실험동물 준비 및 IMQ 처리**

[0056] 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 구입하였다(OrientBio, Emsung, Korea). 상기 마우스들은 음식과 물을 자유롭게 섭취 할 수 있고 12-h 빛/어둠 사이클인 상태에서 병원균이 없는 조건하에 유지되었다. 모든 절차는 이화여자대학교 의과대학 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다(ESM 15-0309). 8 주령의 마우스에 IMQ(염증 반응 조절제)를 5% 크림(Aldara; 동아제약, Osaka City, Japan) 형태로 6일 연속 적용(83 mg/일)하여 피부 염증을 유발하였다. 정상 대조군 마우스에는 대조군 비히클(Vaseline/Lanette cream; Fagron, Rotterdam, The Netherlands)을 동일한 방식으로 적용 하였다. poly(I:C) 처리군 마우스에는 6 일간의 IMQ 처리 기간 중, 1 일과 3 일에 poly(I:C)를 등 피하주사(100 μg/마우스) 방식으로 투여하였다. 대조군 마우스에는 동일한 양의 증류수를 투여하였다. 또한, 항-PD-L1 블로킹 Ab (5 mg/kg, 10F.9G2; BioLegend, San Diego, CA, USA) 또는 이소타입 대조군 Ab (5 mg/kg, RTK4530, BioLegend)를 상기 1 일과 3 일에 poly(I:C)를 주사하기 전에 피하 투여하였다.

[0058] **실시예 3: 피부 염증의 심각성 평가**

[0059] 피부 염증을 객관적으로 측정하기 위하여 PASI (Psoriasis Area and Severity Index) 점수를 사용하였다. 홍반(Erythema), 인설(scaling) 및 두꺼워짐(thickening)은 0-4의 척도에서 다음과 같이 독립적으로 평가되었다: 0, 없음(none); 1, 약간(slight); 2, 중간정도(moderate); 3, 뚜렷한(marked); 4, 극심한(extreme). 누적 점수는 염증 정도의 척도로 사용되었다(척도, 0-12). 또한 IMQ를 적용하는 동안에 기본 체중 변화를 매일 모니터링 하였다.

[0060] 상기 실험 결과, IMQ 처리 후 poly(I:C)를 투여하지 않은 대조군(IMQ+DW)과 비교할 때, IMQ 처리 후 poly(I:C) 및 이소타입 대조군 Ab를 투여한 실험군(IMQ+poly(I:C)+iso Ab)에서는 홍반, 인설 및 두께 면에서 모두 피부 염증이 월등히 억제된 것으로 확인되었으며, 체중 변화에 있어서도 체중 감소 정도가 가장 적고, 실험 6일째 이후에는 정상 대조군(nomal control)과 거의 유사한 정도로 체중이 회복되는 것으로 확인되었다(도 1, 도 2).

[0061] 한편, iso Ab 대신 항-PD-L1 블로킹 Ab를 투여한 IMQ+poly(I:C)+anti-PD-L1 Ab군의 경우, 상기 poly(I:C)의 효능이 감소된 것으로 보아, poly(I:C)가 PD-L1에 의존적인 방식으로 IMQ에 의해 유도된 피부 염증을 억제시키는 것으로 확인되었다(도 1, 도 2).

[0063] **실시예 4: 조직학적 관찰**

[0064] 등 피부 표본을 4% 포름알데히드에 고정시키고 파라핀에 투입했다. 현미경 검사를 위해 절편(5 ㎛)을 유리 슬라이드 위에 올려놓고 헤마톡실린 및 에오신(H & E)으로 염색하였다.

[0066] **실시예 5: 웨스턴 블랏**

[0067] 실험동물 내의 PD-L1 및 IL-36γ의 수준을 검출하기 위하여, 마우스 피부를 균질화하고 단백질을 분리하여 레인당 20 ㎍의 단백질을 로딩하였다. 블랏팅 후, 멤브레인을 PD-L1 (sc-50298), IL-36γ (sc-168163) 또는 β-액틴 (sc-47778)에 대한 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 하룻밤 배양하였다. 그 다음, 상기 멤브레인을 세척한 후에, 상응하는 2차 항체와 함께 배양하고, 최종적으로 ECL (enhanced

chemiluminescence; ThermoFisher Scientific)을 사용하여 검사하였다.

[0068] 상기 실험 결과, IMQ 처리에 의해 유도된 IL-36γ의 발현은 poly(I:C)의 투여에 의해 현저히 억제되는 것으로 확인되었으며, 이는 poly(I:C)의 투여에 의해 PD-L1의 발현이 강하게 유도되어 IL-36γ의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다(도 3).

[0070] **실시예 6: 정량적 역전사 PCR (RT-qPCR)**

[0071] 마우스 피부 조직 및 인간 HaCaT 세포를 평가하기 위하여, 제조사가 지시한 대로 First-Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 상보적 DNA (complementary DNA)를 합성하였다. 그 다음, SYBR Green Reagent (TOYOBO)를 사용하여 StepOnePlus 기기 (Applied Biosystems [ThermoFisher Scientific])에서 실시간 PCR을 수행하였다. 증폭을 위해, 피부 샘플에 다음과 같은 프라이머를 사용하였다: 마우스 PD-L1 (297 bp), 5'-ATG TCA GGC CGA GGG TTA TC-3'(forward) 및 5'-AGG ATG GAT CCC AGA AGC AC-3'(reverse); 마우스 PD-L2 (189 bp), 5'- GCA GAA GTG TCC TGG CAA AA-3'(forward) 및 5'-CAG AGG GTC AAT GAT GGC TG-3'(reverse); 마우스 BD-2 (104 bp), 5'-AAC TTG ACC ACT GCC ACA CC-3'(forward) 및 5'-ACA GGG GTT CTT CTC TGG GA-3'(reverse); 마우스 IL-6 (131 bp), 5'- CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG-3'(forward) 및 5'- AGT GGT ATA GAC AGG TCT GTT GG-3'(reverse); 마우스 IL-36γ (107 bp), 5'- TCC TGA CTT TGG GGA GGT TTT-3'(forward) 및 5'-TCA CGC TGA CTG GGG TTA CT-3'(reverse); 마우스 CCL20 (146 bp) 5'- GCC TCT CGT ACA TAC AGA CGC-3'(forward) 및 5'- CCA GTT CTG CTT TGG ATC AGC-3'(reverse); 마우스 IL-17A (165 bp), 5'-TTT AAC TCC CTT GGC GCA AAA-3'(forward) 및 5'-CTT TCC CTC CGC ATT GAC AC-3'(reverse); 마우스 IL-23 (213 bp), 5'-ATG CTG GAT TGC AGA GCA GTA-3'(forward) 및 5'-ACG GGG CAC ATT ATT TTT AGT CT-3'(reverse); 마우스 IFN-γ (182 bp), 5'-ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC-3'(forward) 및 5'-CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC-3'(reverse); 및 마우스 GAPDH (173 bp), 5'- GGT AAA GTG GAT ATT GTT GCC ATC AATG-3'(forward) 및 5'- GGA GGG ATC TCG CTC CTG GAA GAT GGT G-3'(reverse). HaCaT 세포에서 IL-36γ의 발현을 측정하기 위하여, 다음과 같은 프라이머를 사용하였다: 인간 IL-36 (232 bp), 5'-TTC CAC GAA GTG ACA GTG TGA-3'(forward) 및 5'- GCA CGG TAG AAA AGG AAG GGT-3'(reverse); 및 인간 GAPDH (192 bp), 5'-GGT AAA GTG GAT ATT GTT GCC ATC AAT G-3'(forward) 및 5'-GGA GGG ATC TCG CTC CTG GAA GAT GGT G-3'(reverse).

[0072] 상기 실험 결과, 각각 IL-17, IL-22 또는 poly(I:C)의 존재 하에 HaCaT 세포에서의 IL-36γ의 발현 정도를 측정한 결과, poly(I:C)의 존재 하에서 IL-36γ의 발현이 두드러지게 감소되는 것으로 확인되었다(도 4a).

[0074] **실시예 7: 피부 샘플 준비**

[0075] 모든 실험 마우스로부터 면도한 피부를 수집하였다. 지방 제거 후, 샘플을 10% FBS, 스트렙토마이신(100 ㎍/mL) 및 페니실린(100 U/mL)이 보충된 RPMI 1640 배지에서, 콜라게나아제 I 형(6 mg/ml, Roche, Basal, Switzerland) 및 DNase I (10 μg/ml, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)과 함께 배양 하였다 (10 분, 37 ℃). 그 다음, 조직을 잘게 썰고 교반기에서 분해하였다(60 분, 37℃). 유동 세포 분석을 통한 분석을 위해, 분해된 모든 조직을 70 um 공극 세포 스트레이너를 통해 여과하고 PBS로 2 회 세척 하였다.

[0077] **실시예 8: 유동 세포 분석(Flow cytometry)**

[0078] HaCaT 세포에서 PD-L1 (CD274)의 표면 발현은 피코에리트린(phycoerythrin; PE)-결합된 항-인간 CD274 항체 (29E.2A3; BioLegend)로 표지하여 정량화하였다. PE-결합 마우스 IgG_{2b} 이소 타입 항체(MPC-11; BioLegend)를 이용한 비특이적 염색의 수준을 대조 측정으로 사용하였다.

[0079] 모든 실험 마우스의 등 피부에서 PD-L1을 검출하기 위하여, FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 이용하는 FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, USA) 자동 분석을 사용하였으며, 이를 위해 각 마우스의 등 피부 세포 현탁액을 PerCP-결합된 항-마우스 CD4 (GK1.5), APC-결합된 항 마우스 PD-L1 (10F.9G2), FITC-결합된 항-마우스 Gr-1 (RB6-8C5) 및 PE-결합된 항-마우스 CD11C (N418) 항체(전부 BioLegend)와 함께 배양하였다. CD4, Gr-1 또는 CD11c에 양성인 세포를 각각 게이팅하여 PD-L1 발현과 비교하였다. CD4, Gr-1 및 CD11c에 음성인 세포를 게이팅하였고, 등 피부의 비-면역 세포 분획으로 분석되었다.

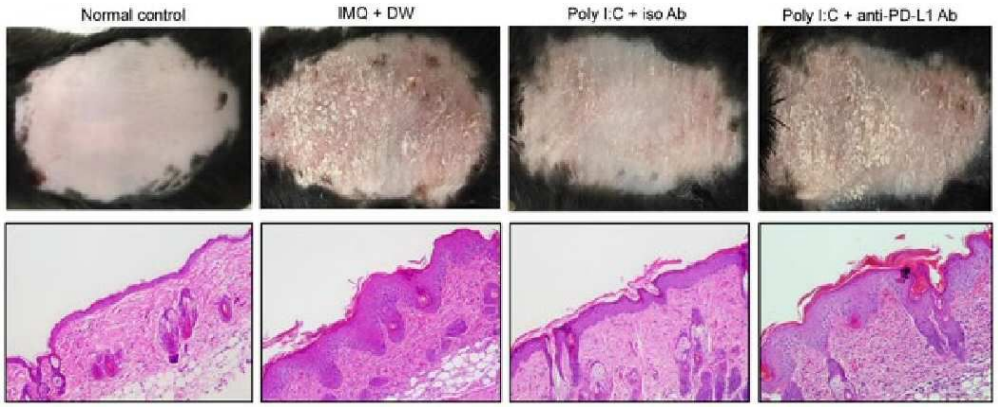
[0080] 유동 세포 분석을 통해, 먼저 HaCaT 세포에서 건선의 면역 병원 발생에 필수적인 IL-17 또는 IL-22 사이토카인이 PD-L1의 발현에 영향을 미치는 지 관찰한 결과, IL-17 또는 IL-22는 PD-L1의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며, PD-L1의 발현은 poly(I:C)에 의해 증가되는 것으로 확인되었다(도 5).

[0081] 한편, 모든 실험 마우스의 등 피부 세포에서 PD-L1 발현을 비교한 결과, Gr-1, CD4 또는 CD11c 양성인 면역 세포들은 IMQ 투여만으로도 PD-L1의 증가가 일어나긴 하였으나, poly(I:C)를 함께 투여할 때 가장 큰 증가를 보이는 것으로 확인되었다. 그러나, 비면역 세포에 의한 PD-L1의 발현은 poly(I:C)를 함께 투여한 경우에만 상향 조절되는 것으로 확인되었다(도 6.)

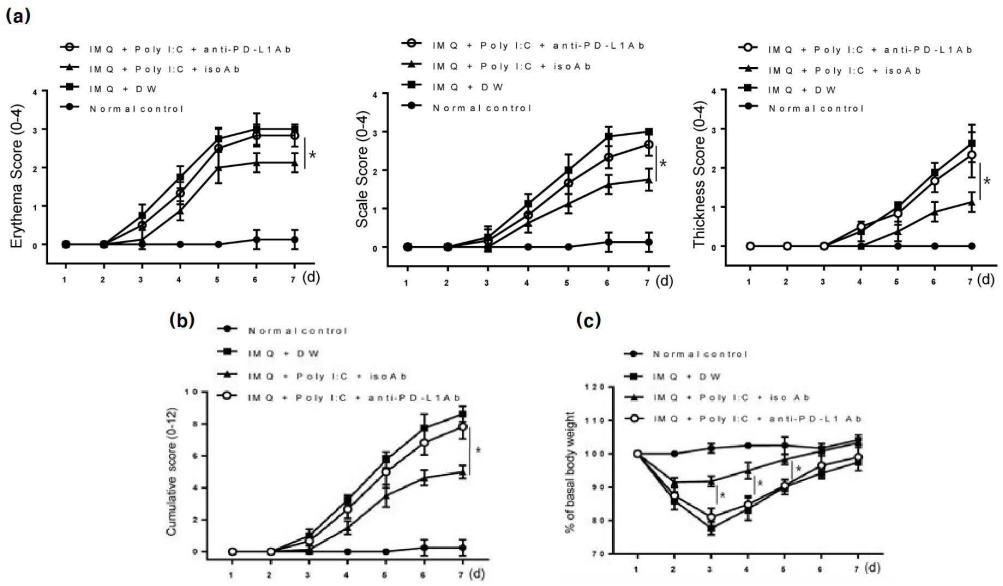
[0082] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

도면

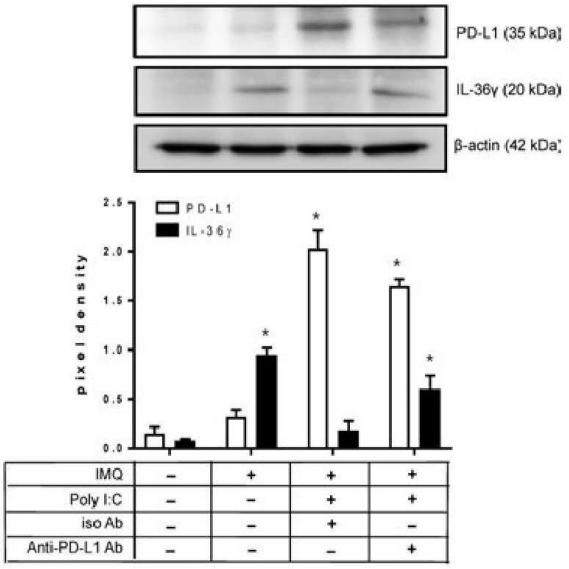
도면1



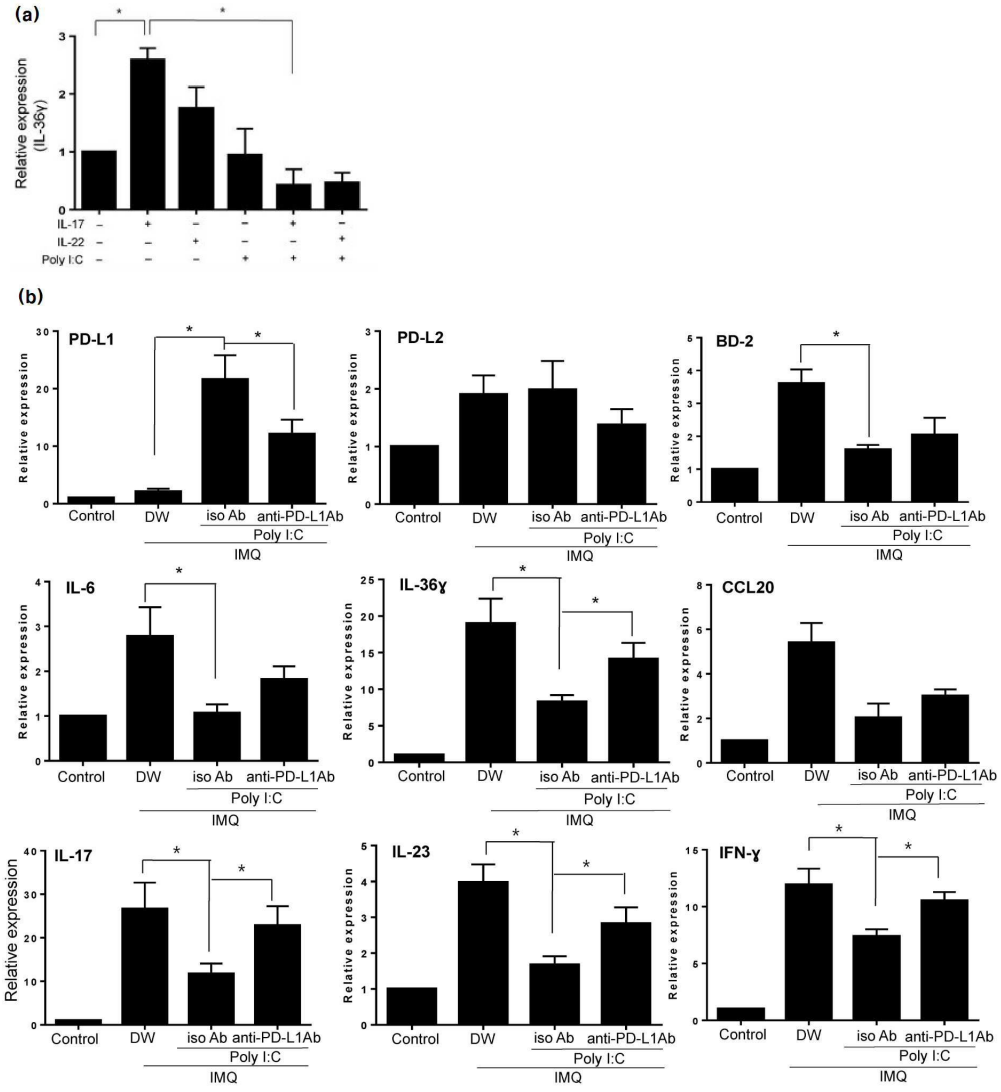
도면2



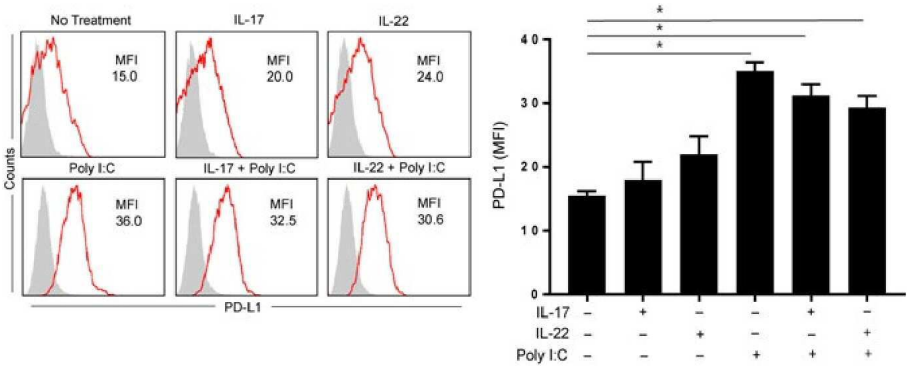
도면3


PD-L1 (35 kDa)
IL-36γ (20 kDa)
β-actin (42 kDa)
PD-L1
IL-36γ
pixel density
IMQ
Poly I:C
iso Ab
Anti-PD-L1 Ab

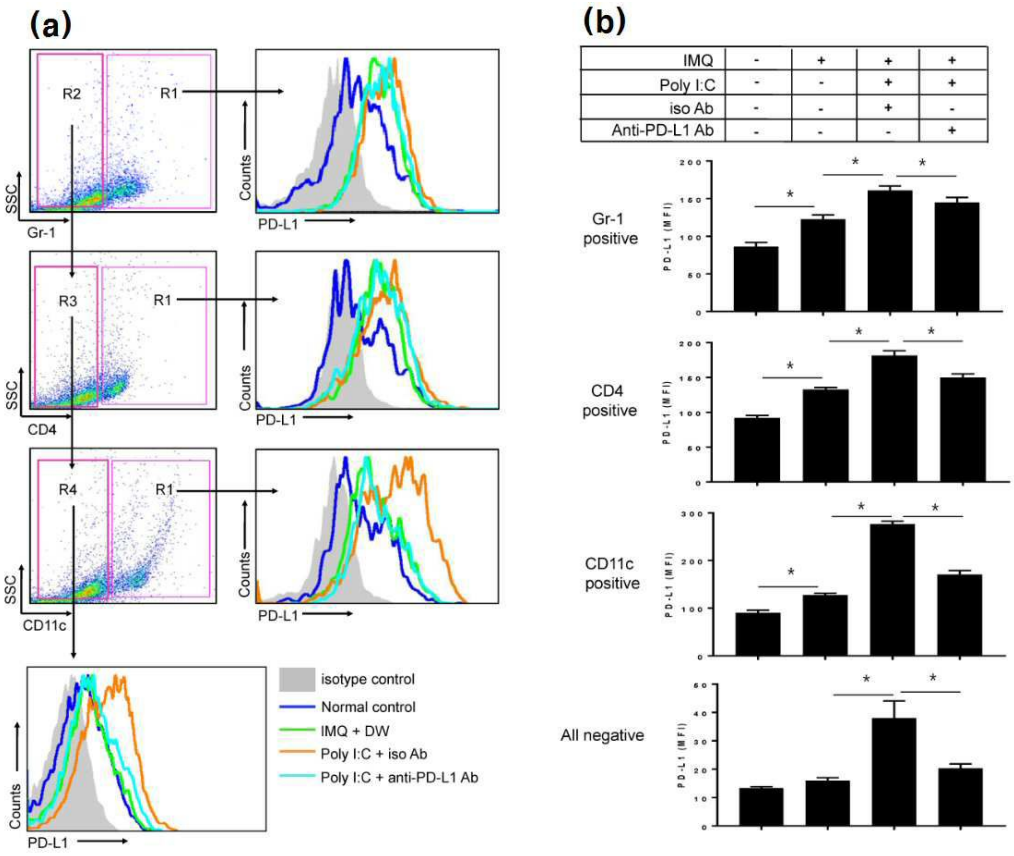
도면4


(a)
Relative expression (IL-36γ)
IL-17
IL-22
Poly I:C
(b)
PD-L1
PD-L2
BD-2
IL-6
IL-36γ
CCL20
IL-17
IL-23
IFN-γ
Relative expression
Control
DW
iso Ab
anti-PD-L1Ab
Poly I:C
IMQ

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Composition for preventing, improving or treating skin inflammation comprising Toll-like receptor 3 agonist

<130> P17-077-EWHA

<160> 24

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse PD-L1 forward primer

<400> 1

atgtcaggcc gagggttatc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse PD-L1 reverse primer

<400> 2

aggatggatc ccagaagcac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse PD-L2 forward primer

<400> 3

gcagaagtgt cctggcaaaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse PD-L2 reverse primer

<400> 4

cagagggtca atgatggctg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse BD-2 forward primer

<400> 5

aacttgacca ctgccacacc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse BD-2 reverse primer

<400> 6

acaggggttc ttctctggga 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-6 forward primer

<400> 7

ctgcaagaga cttccatcca g 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-6 reverse primer

<400> 8

tcctgacttt ggggaggttt t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-36 gamma forward primer

<400> 9

tcctgacttt ggggaggttt t 21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-36 gamma reverse primer

<400> 10

tcacgctgac tggggttact 20

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse CCL20 forward primer

<400> 11

gcctctcgta catacagacg c 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse CCL20 reverse primer

<400> 12

ccagttctgc tttggatcag c 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-17A forward primer

<400> 13

tttaactccc ttggcgcaaa a 21

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-17A reverse primer

<400> 14

ctttccctcc gcattgacac 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-23 forward primer

<400> 15

atgctggatt gcagagcagt a 21

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IL-23 reverse primer

<400> 16

acggggcaca ttatttttag tct 23

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IFN-gamma forward primer

<400> 17

atgaacgcta cacactgcat c 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IFN-gamma reverse primer

<400> 18

ccatcctttt gccagttcct c 21

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse GAPDH forward primer

<400> 19

ggtaaagtgg atattgttgc catcaatg 28

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse GAPDH reverse primer

<400> 20

ggagggatct cgctcctgga agatggtg 28

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IL-36 forward primer

<400> 21

ttccacgaag tgacagtgtg a 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IL-36 reverse primer

<400> 22

gcacggtaga aaaggaaggg t 21

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GAPDH forward primer

<400> 23

ggtaaagtgg atattgttgc catcaatg 28

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GAPDH reverse primer

<400> 24

ggagggatct cgctcctgga agatggtg 28