(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0118396
(43) 공개일자 2018년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 215/46 (2006.01) *A61K 31/4706* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 215/46 (2013.01)
A61K 31/4706 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0051660
(22) 출원일자 2017년04월21일
심사청구일자 2017년04월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
황은숙
서울특별시 강남구 영동대로57길 28, 107동 204호(대치동, 현대아파트)
원희연
서울특별시 마포구 숭문길 106, 103동1101호(염리동, 상록아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

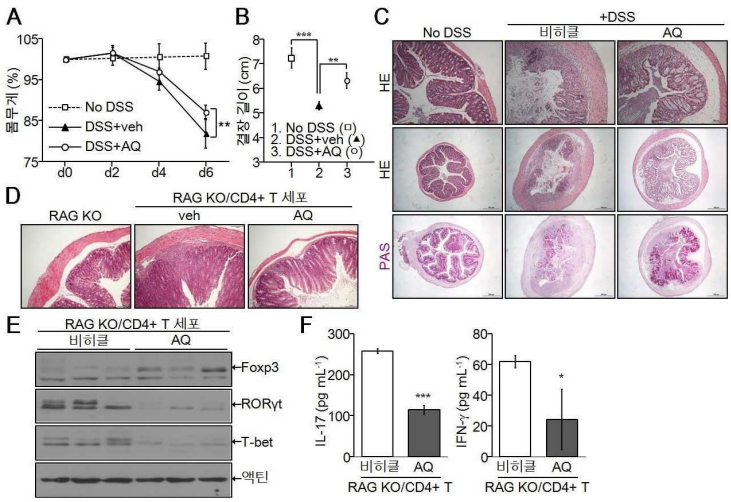
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **아미노퀴놀린계 화합물을 포함하는 면역 증강용 조성물, 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물, 및 이를 이용한 방법**

(57) 요 약

아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 조성물, 및 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물, 이를 이용하는 조절 T 세포로의 분화 방법, 및 상기 방법에 의해 분화된 조절 T 세포를 포함하는 면역 증강용 세포 치료제를 제공한다. 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염은 면역 증강 효과를 가지므로, 면역 질환의 예방 또는 치료제로서 사용할 수 있다.

대 표 도



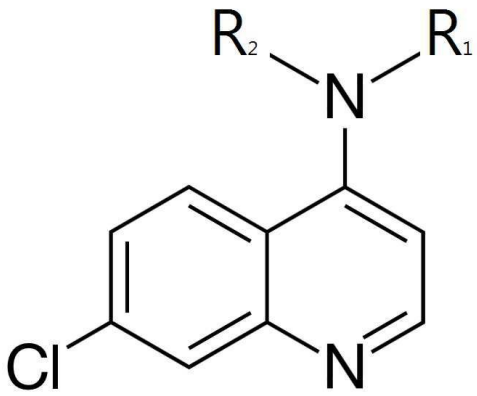
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 치환된 C_6 내지 C_{14}의 아릴기 또는 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기이고;

상기 치환은, 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, C_1 내지 C_5의 알킬기, 또는 이들의 조합이며; 및

R_2는 수소 또는 C_1 내지 C_5의 알킬기이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 R_1은 치환된 C_6의 아릴기이고;

상기 치환은 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, 또는 이들의 조합인 것이며; 및

상기 R_2는 수소인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 R_1은 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기이고;

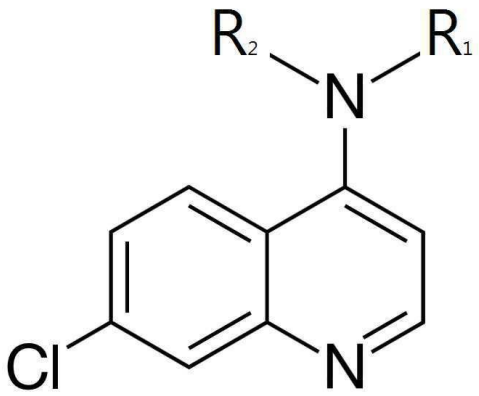
상기 치환은 C_1 내지 C_5의 알킬기이며; 및

상기 R_2는 수소인 것인 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 분리된 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 치환된 C_6 내지 C_{14}의 아릴기 또는 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기이고;

상기 치환은, 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, C_1 내지 C_5의 알킬기, 또는 이들의 조합이며; 및

R_2는 수소 또는 C_1 내지 C_5의 알킬기이다.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 R_1은 치환된 C_6의 아릴기이고;

상기 치환은 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, 또는 이들의 조합인 것이며; 및

상기 R_2는 수소인 것인 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 R_1은 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기이고;

상기 치환은 C_1 내지 C_5의 알킬기이며; 및

상기 R_2는 수소인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 T 세포는 미접촉 (naive) $CD4^+$ T 세포인 것인 조성물.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 조절 T 세포는 CD25, Foxp3, CTLA4, GITR, 또는 이들의 조합을 발현하는 것인 조성물.

청구항 9

청구항 4에 있어서, 상기 염증반응성 Th (effector helper T) 세포의 증식, 활성 또는 이들의 조합을 억제하는 것인 조성물.

청구항 10

T 세포에 청구항 4의 조성물을 가하여 T 세포를 조절 T 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 조절 T 세포로 분화시키는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 분화시키는 단계는 종양성장인자 베타 (Transforming growth factor beta: TGFβ)를 가하는 것과 동시에 또는 순차적으로 수행되는 것인 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 조성물은 상기 염증반응성 Th 세포의 증식, 활성 또는 이들의 조합을 억제하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 아미노퀴놀린계 화합물을 포함하는 면역 증강용 조성물, 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물, 및 이를 이용하여 조절 T 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역 (Immunity)은 생체 조직으로 침입하거나 주입되는 모든 외부 고분자물질 (항원)에 대한 생체의 자기보호 체계이다. 정상 개체는 자기 (self)를 구성하고 있는 항원 물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 많은 비자기 (non-self) 항원에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이처럼 자기 항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성 (immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라고 한다. 이러한 자기 관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기 항원에 대하여 면역 반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하면서 각종 자가면역 질환이 발병하게 된다. 이러한 자가면역 질환 (autoimmune disease)을 치료하는 주된 방법에는 주로 면역 기능을 억제하는 약물이 사용되고 있다. 그러나 부작용이 많아 지속적으로 사용하기 곤란하고 재발을 충분히 막지 못하여 치료에 한계가 있다.

[0003] 한편, 아모디아퀸 (amodiaquine)은 아미노퀴놀린계 화합물로, 말라리아 치료제로서 판매되고 있고, 파킨슨 치료제로서 이용한 연구가 보고되어 있다 (대한민국 10-2008-0106928 A). 아모디아퀸은 이미 안전성이 검증되어 있는 바, 약물 리포지션 (drug reposition)의 가능성 및 유용성이 높다고 할 수 있다.

[0004] 따라서, 면역 증강을 위해, 인체에 무해하고 부작용이 적으며, 면역 조절 기능이 우수한 물질을 탐색할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

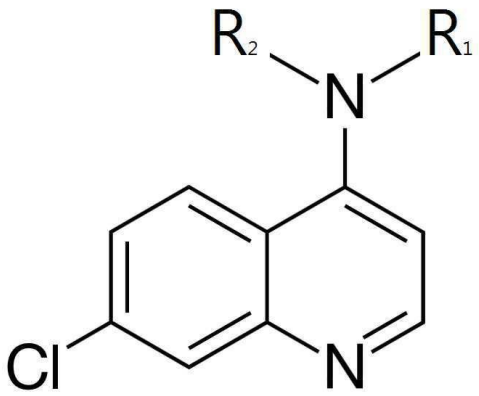
[0007] 다른 양상은 T 세포를 조절 T 세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것일 수 있다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식 1에서, R_1은 치환된 C_6 내지 C_{14}의 아릴기 또는 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기인 것일 수 있고, 상기 치환은, 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, C_1 내지 C_5의 알킬기, 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. R_2는 수소 또는 C_1 내지 C_5의 알킬기인 것일 수 있다.

[0013] 상기 화학식 1에서, 상기 R_1은 치환된 C_6의 아릴기이고, 상기 치환은 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, 또는 이들의 조합인 것이며, 상기 R_2는 수소인 것일 수 있다. 상기 화학식 1에서, 상기 R_1은 치환된 C_6의 아릴기이고, 상기 치환은 히드록시기, 디에틸아미노메틸기, 또는 이들의 조합인 것이며, 상기 R_2는 수소인 것일 수 있다.

[0014] 상기 화학식 1에서, 상기 R_1은 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기이고, 상기 치환은 C_1 내지 C_5의 알킬기이며, 상기 R_2는 수소인 것일 수 있다. 상기 화학식 1에서, 상기 R_1은 치환된 C_2 내지 C_6의 아미노 알킬기이고, 상기 치환은 C_1의 알킬기, C_2의 알킬기, 또는 이들의 조합인 것이며, 상기 R_2는 수소인 것일 수 있다.

[0015] 상기 "치환 (substituted)"은 작용기에 포함된 하나 이상의 수소 원자가 히드록시기, C_1 내지 C_5의 알킬기로 치환된 아미노메틸기, C_1 내지 C_5의 알킬기, 또는 이들의 조합으로 대체되는 것 또는 바뀌는 것을 의미한다.

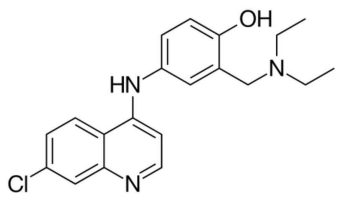
[0016] 상기 "알킬"은 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 (또는, 직쇄 또는 선형) 탄화수소를 의미한다. 알킬의 비제한적인 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, iso-아밀, n-헥실, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, 또는 n-헵틸 등을 들 수 있다.

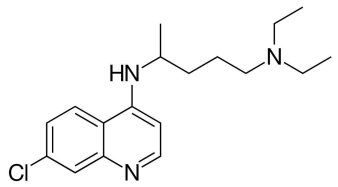
[0017] 상기 "아릴"은 방향족 탄화수소의 핵에서 수소 원자 하나를 제거한 잔기를 의미하고, 방향족 고리가 하나 이상의 탄소 고리에 융합된 그룹도 포함한다. 아릴의 비제한적인 예로는, 페닐, 나프틸, 또는 테트라히드로나프틸 등을 들 수 있다.

[0018] 상기 화학식 1은 하기 표에 기재된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

표 1

[0019]

화합물	화합물명	구조식
1	4-([7-클로로-4-퀴놀리닐]아미노)-2-([디에틸아미노]메틸)페놀 (4-([7-Chloro-4-quinolinyl]amino)-2-([diethylamino]methyl)phenol)	

2	4-N-(7-클로로퀴놀린-4-일)-1-N,1-N-디에틸펜탄-1,4-디아민 (4-N-(7-chloroquinolin-4-yl)-1-N,1-N-diethylpentane-1,4-diamine)	

[0020] 상기 "입체이성질체 (stereoisomer)"는 분자식 및 구성원자의 연결 방법은 동일하지만 원자 사이의 공간 배열이 동일하지 않은 화합물을 의미한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체 (diasteromer) 또는 거울상 이성질체 (enantiomer)인 것일 수 있다. 거울상 이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체 (optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R (Rectus: 시계방향) 및 S (sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체 이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스 (cis)-트랜스 (trans) 이성질체로 나뉠 수 있다.

[0021] 상기 "유도체 (derivative)"는 상기 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 의미한다.

[0022] 상기 "염"은 화합물의 무기산염, 유기산염, 또는 금속염의 부가염을 의미한다. 상기 염은 약학적으로 허용가능한 염인 것일 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 화합물이 투여되는 또는 가해지는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염인 것일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염인 것일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 초산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캠실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈룩투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 메탄설폰산, 에탄술폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔술폰산, 또는 아스파르트산염인 것일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염인 것일 수 있다.

[0023] 상기 "수화물"은 물 분자와 결합하여 형성된 것을 의미하며, 용매화물을 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 상기 "면역 증강 (immunopotentiation)"은, 비정상적으로 활성화된 면역 세포의 기능을 억제하여 염증 반응을 제어하는 것을 의미한다. 면역 증강은 면역 조절 또는 면역 안정화와 동일한 의미로 사용되는 것일 수 있다.

[0025] 상기 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 감소 또는 억제시키는 것일 수 있다. 상기 염증성 사이토카인은 Th1, Th2, 또는 Th17 세포가 분비하는 사이토카인인 것일 수 있고, 예를 들면 IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-5, 및 IL-13 등을 포함하는 것일 수 있다. 상기 조성물은 조절 T 세포로의 분화를 촉진시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 조절 T 세포의 활성을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 염증반응성 Th 세포 (effector helper T cell, 효과기 T 세포) 대비 조절 T 세포 (regulatory T cell)의 비율을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 감소 또는 억제시키는 동시에, 조절 T 세포로의 분화 및 조절 T 세포의 활성을 증가시켜, 염증 반응을 억제 또는 완화시키는 것일 수 있다.

[0026] 다른 양상은 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, T 세포에서 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염에 대하여는 전술한 바와 같다.

[0028] 상기 T 세포는 분리된 T 세포 또는 체내에 존재하는 T 세포인 것일 수 있다. 상기 T 세포는 미접촉 (naive) T 세포, 예를 들면 미접촉 $CD4^+$ T 세포인 것일 수 있다.

[0029] 상기 "미접촉 (naive) T 세포"는 항원과 접촉하지 않은 T 세포를 의미한다. 수지상세포 (dendritic cell)는 주요 항원 제시 세포 (antigen presenting cell: APC)로써, 주된 기능은 인체에 외부 병원균의 감염이나 종양 발생 등으로 인한 항원을 인식하고 이들을 미접촉 T 세포에게 제시하는 것이다. 따라서, 수지상 세포는 미접촉

$CD4^+$ T 세포의 Th1, Th2, Th17, 또는 조절 T 세포로의 분화를 자극함으로써 다양한 면역 반응을 지휘한다. 미접촉 T 세포는 미분화 T 세포와 동일한 의미로 사용되는 것일 수 있다.

[0030] 상기 "분화 (differentiation)"는 미분화 T 세포가 염증반응성 Th 세포 또는 조절 T 세포로 전환 (conversion) 또는 발달 (development)되는 것을 의미하며, 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉 생물의 세포 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것일 수 있다. 즉, 상기 조성물은 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화를 촉진하는 것일 수 있다. 상기 조성물은 미분화 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화를 촉진하는 것일 수 있다. 상기 조성물은 조절 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화를 더욱 촉진하는 것일 수 있다.

[0031] 상기 조성물은 T 세포, 미분화 T 세포 또는 조절 T 세포에서 조절 T 세포의 활성을 촉진하는 것일 수 있다. 즉, 상기 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 감소 또는 억제시키는 동시에, 조절 T 세포로의 분화 및 조절 T 세포의 활성을 증가시켜, 염증 반응을 억제 또는 완화시키는 것일 수 있다.

[0032] 상기 "활성"은 면역 세포가 가지는 모든 기작이 촉진 또는 증진되는 것을 의미하며, 예를 들면, 면역 세포가 분비하는 사이토카인의 생성을 포함하는 것일 수 있다.

[0033] 상기 조절 T 세포의 활성은 생체 내에서 조절 T 세포, 즉, 자연성 (natural) 조절 T 세포 및/또는 적응성 (adaptive) 조절 T 세포가 가지는 모든 기작이 촉진 또는 증진되는 것을 의미하며, 생체 내의 면역 반응이 정상 상태를 유지하도록 조절하는 것, 비정상적으로 활성화된 면역 세포의 기능을 억제하여 염증 반응을 제어하는 것, 예를 들면, 면역 억제 반응이 촉진 또는 증진되는 것일 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 조절 T 세포가 분비하는 사이토카인의 생성을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 조절 T 세포가 분비하는 사이토카인은 IL-10을 포함하는 것일 수 있다.

[0035] 상기 조절 T 세포는 IL-2 수용체 알파 사슬 (Interleukin-2 receptor alpha chain: CD25), Foxp3 (forkhead box P3), 세포독성 T 림프구 관련 단백질 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4: CTLA4, CD152), 글루코코르티코이드 유도 종양괴사인자수용체 관련 단백질 (glucocorticoid-induced TNFR-related protein: GITR), 또는 이들의 조합을 발현하는 것일 수 있다. CD25, Foxp3, CTLA4, 또는 GITR 유전자의 발현은 조절 T 세포의 분화와 활성을 조절할 수 있다. 상기 조절 T 세포는 세포 표면에 발현되는 CD25, Foxp3, CTLA4, 및 GITR 마커에 대하여, CD25, Foxp3, CTLA4, GITR, 또는 이들의 조합인 양성 표면 마커를 발현하는 것일 수 있다. 상기 조성물을 가함에 따라 상기 마커의 발현이 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 100%, 또는 200% 이상 증가될 수 있다.

[0036] 상기 "양성"은 조절 T 세포 마커와 관련하여, 그 마커가 기준이 되는 다른 조절 T 세포 또는 염증반응성 Th 세포와 비교하였을 때 더 많은 양, 또는 더 높은 농도로 존재하는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0037] 상기 조성물은 CD25, Foxp3, CTLA4, 또는 GITR의 전사 활성, mRNA 수준 또는 단백질 수준을 증가시키는 것일 수 있다.

[0038] 상기 CD25, Foxp3, CTLA4, 또는 GITR 유전자의 발현은 전사 (프로모터) 활성, mRNA 수준 또는 단백질 수준을 측정하여 확인할 수 있다. 전사 활성 수준을 검출하는 분석법은 리포터 유전자 분석 (reporter gene assay), 예를 들면, 루시퍼라제 (luciferase) 및 β-갈락토시다제 (β-galactosidase) 효소 활성 분석 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. mRNA 수준을 검출하는 분석법은 역전사 중합효소반응 (Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay: RPA), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 검출하는 분석법은 웨스턴 블랏팅 (Western blotting), 효소면역흡착법 (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역분석법 (radioimmunoassay: RIA), 방사선 면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 (rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석 (Immunoprecipitation Assay), 보체고정분석 (Complement Fixation Assay), 유세포분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter: FACS), 단백질 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 상기 CD25, Foxp3, CTLA4, 또는 GITR의, 전사 활성, mRNA 수준 또는 단백질 수준이 증가된 것은, 상기 조성물이 핵 수용체 서브 패밀리 4(nuclear receptor subfamily 4: NR4A)의 표적 유전자 내에 위치하는 NR4A가 결합할 수 있는 영역 (예를 들면, NGFI-B response element: NBRE)에 NR4A가 결합할 수 있는 활성을 촉진하여, 표적 유전자의 전사 활성, mRNA 수준 또는 단백질 수준을 증가시키는 것으로 예상된다. 즉, 상기 조성물은 NR4A의 전

사 활성, mRNA 수준 또는 단백질 수준을 증가시키는 것 수 있다. 상기 NR4A는 NR4A1, NR4A2 또는 NR4A3인 것일 수 있다.

[0040] 상기 조성물은 염증반응성 Th (effector helper T) 세포의 증식, 활성 또는 이들의 조합을 억제하는 것일 수 있다.

[0041] 상기 "증식 (proliferation)"은 세포가 분열되어 동질의 것이 불어나는 것을 의미하며, 세포 수가 양적으로 증가되어 가는 것일 수 있다. 상기 조성물은 염증반응성 Th 세포의 세포 주기 진행 및 분열을 억제하는 것일 수 있다.

[0042] 상기 조성물은 염증반응성 Th 세포의 활성을 감소시켜, 염증성 사이토카인의 생성을 감소 또는 억제시키는 것일 수 있다. 상기 염증성 사이토카인은 Th1, Th2 또는 Th17 세포가 분비하는 사이토카인인 것일 수 있고, 예를 들면 IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-5 및 IL-13 등을 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 조성물은 T 세포에서 염증반응성 Th 세포로의 분화를 억제시키는 것일 수 있다.

[0044] 다른 양상은 T 세포에 상기 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물을 가하여 T 세포를 조절 T 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 조절 T 세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[0045] 상기 T 세포에서 조절 T 세포로의 분화 촉진용 조성물, 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염에 대하여는 전술한 바와 같다.

[0046] 상기 T 세포는 분리된 T 세포 또는 체내에 존재하는 T 세포인 것일 수 있다. 상기 T 세포는 미접촉 (naive) T 세포, 예를 들면 미접촉 $CD4^+$ T 세포인 것일 수 있다.

[0047] 상기 방법에 있어서, 상기 분화시키는 단계는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 T 세포를 분리하는 단계 후에 수행되는 것일 수 있다. T 세포를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다.

[0048] 상기 "T 세포에 분화 촉진용 조성물을 가하는 것"은 상기 조성물을 함유하는 배지에 상기 T 세포를 분주하는 것, 또는 상기 T 세포에 상기 조성물을 첨가하는 것일 수 있다. 상기 T 세포에 분화 촉진용 조성물을 가하는 것은 T 세포와 분화 촉진용 조성물이 접촉하는 것일 수 있다.

[0049] 상기 방법에 있어서, 상기 분화시키는 단계는 2 시간 내지 700시간, 10시간 내지 350시간, 15 시간 내지 100시간, 또는 20 내지 50 시간 동안 수행되는 것일 수 있다.

[0050] 상기 방법에 있어서, 상기 분화시키는 단계는 T 세포 수용체 (T Cell Receptor: TCR) 자극를 가하는 것과 동시에 또는 순차적으로 수행되는 것일 수 있다. 예를 들면, 분리된 T 세포에 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 TCR 자극과 동시에 가하거나, 또는 TCR 자극을 가한 후 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 가하는 것일 수 있다. 예를 들면, 분리된 T 세포에 TCR 자극을 가한 후 6 시간, 12시간, 15 시간, 18 시간, 21 시간, 27시간, 30 시간, 33 시간, 36 시간, 또는 48 시간 후에 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 가하는 것일 수 있다.

[0051] 상기 방법에 있어서, 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염의 농도는 약 0.1 내지 100μM, 약 0.2 내지 50μM, 약 0.5 내지 20μM, 약 0.75 내지 15μM, 약 1 내지 12μM인, 약 5 내지 12μM, 또는 약 10μM인 것일 수 있다.

[0052] 상기 방법에 있어서, 상기 분화시키는 단계는 종양성장인자 베타 (Transforming growth factor beta: TGFβ)를 가하는 것과 동시에 또는 순차적으로 수행되는 것일 수 있다. 예를 들면, T 세포에 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 TGFβ와 동시에 가하거나, 또는 TGFβ를 가한 후 상기 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 가하는 것일 수 있다.

[0053] 상기 TGFβ의 농도는 5 내지 500 ng/㎖, 10 내지 250 ng/㎖, 25 내지 100 ng/㎖, 또는 40 내지 60 ng/㎖인 것일 수 있다. 상기 분화시키는 단계는 IL-6를 가하지 않고 수행되는 것일 수 있다.

[0054] 상기 방법은 상기 염증반응성 T 세포의 증식, 활성 또는 이들의 조합을 억제하는 것일 수 있다.

[0055] 다른 양상은 T 세포를 조절 T 세포로 분화시키는 방법에 의해 분화된 조절 T 세포를 포함하는 면역 증강용 세포

치료제를 제공한다.

[0056] 상기 "세포치료제"는 세포 또는 조직의 기능을 복원시키기 위하여 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포를 체외에서 증식 및 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 상기 세포 치료제는 생체 내 면역 반응의 억제 또는 면역 반응의 항진 등, 면역 반응을 조절하기 위한 면역 세포 치료제인 것일 수 있다.

[0057] 상기 세포 치료제의 투여 방법은 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들면, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 세포 치료제는 세포 치료에 일반적으로 사용되는 담체, 부형제, 또는 희석제와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다.

[0058] 다른 양상은 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 조성물을 면역이 저하되거나 저하될 염려가 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체의 면역을 증진시키는 방법을 제공한다. 상기 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것일 수 있다.

[0059] 상기 개체는 마우스, 래트, 개, 돼지, 고양이, 소, 말, 원숭이, 낙타, 및 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0060] 상기 면역 증강용 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 면역 증강용 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들면, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 또는 피내 경로일 수 있다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 1000 ㎎/㎏, 약 0.001 내지 100 ㎎/㎏, 약 1 내지 100 ㎎/㎏, 약 2 내지 50 ㎎/㎏, 약 5 내지 20 ㎎/㎏, 또는 약 10㎎/㎏로, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여될 수 있다. 투여 기간은 1일 내지 1년, 1일 내지 6개월, 1일 내지 3개월, 2일 내지 40일, 4일 내지 20일, 또는 5일 내지 15일인 것일 수 있다.

[0061] 다른 양상은 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것 일 수 있다.

[0062] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것일 수 있다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 예를 들면, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함하는 것일 수 있다.

[0063] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형을 갖는 것일 수 있다. 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0064] 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구 투여를 위한 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제일 수 있다. 상기 고형 제제는 부형제 또는 윤활제를 더 포함할 수 있다. 부형제는 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트 (calcium carbonate), 수크로스, 락토스, 또는 젤라틴일 수 있다. 또한, 상기 윤활제는 마그네슘 스테아레이트, 또는 탈크일 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 또는 시럽제일 수 있다. 상기 액상 제제는 물, 또는 리퀴드 파라핀을 포함할 수 있다. 상기 액상 제제는 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 또는 보존제를 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제는 크림, 로션, 연고, 액제, 패취, 향낭(sachet), 주사제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 또는 및 좌제일 수 있다.

[0065] 상기 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 유효한 양으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 유효한 양은 질환의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강, 성별, 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 상기 약학적 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 1000 ㎎/㎏, 약 0.001 내지 100 ㎎/㎏, 약 1 내지 100 ㎎/㎏, 약 2 내지 50 ㎎/㎏, 약 5 내지 20 ㎎/㎏, 또는 약 10㎎/㎏로, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여될 수 있다. 투여 기간은 1일 내지 1년, 1일 내지 6개월, 1일 내지 3개월, 2일 내지 40일, 4일 내지 20일, 또는 5일 내지 15일인 것일 수 있

다.

[0066] 상기 약학적 조성물이 면역 증강 효과를 달성하여, 치료 또는 예방하고자 하는 면역 질환은, 조절 T 세포의 활성이 감소되어 야기되는 질환인 것일 수 있다. 상기 면역 질환은 예를 들면, 골관절염, 류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis), 천식 (Asthma), 피부염 (Dermititis), 건선 (Psoriasis), 낭섬유증 (Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증 (Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 이식편대숙주질환 (graft-versus-host disease), 이식거부질환, 다발성 경화증 (Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군 (Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선 (Hashimoto thyroiditis), 다발성근염 (polymyositis), 경피증 (scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염 (glomerulonephritis) 및 폐섬유증 (pulmonary fibrosis), 염증성장질환 (Inflammatory Bowel Diesese), 크론 병 (Crohns disease), 자가면역성 당뇨 (Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증 (Diabetic retinopathy), 비염 (Rhinitis), 허혈-재관류 손상 (Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착 (Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환 (Chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 그레이브병 (Graves disease), 위장관 알러지 (Gastrointestinal allergy), 결막염 (Conjunctivitis), 죽상경화증 (Atherosclerosis), 관상동맥질환 (Coronary artery disease), 협심증 (Angina), 암 전이, 소동맥 질환 및 미토콘드리아 질환 (mitochondrial disease) 등을 포함하는 것일 수 있다.

[0067] 다른 양상은 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 면역 증강용 식품 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것 일 수 있다.

[0068] 상기 화학식 1로 표시되는 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 캡슐화, 분말화, 또는 현탁액 등으로 제제화하여 기능성 식품으로 이용하거나 각종 식품에 첨가할 수 있다. 상기 식품은 예를 들면, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 기능성 식품 및 건강 식품인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0069] 아미노퀴놀린계 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 수화물 또는 약학적으로 허용가능한 염은 면역 증강 효과를 가지므로, 면역 증강용 조성물 또는 면역 질환의 예방 또는 치료제로서 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1a에서 A 및 C는 각각 1μM, 5μM, 및 10μM의 AQ를 염증반응성 Th 세포에 가한 경우 T 세포의 분열 정도를 나타내며, 도 1a에서 B는 각각 1μM, 5μM, 및 10μM의 AQ를 조절 T 세포에 가한 경우 T 세포의 분열 정도를 나타낸 그래프이다. 도 1b는 AQ 및 CQ를 가한 경우 T 세포의 세포 분열에 따른 총 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

도 2에서 A는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포에서 IL-2의 생성 수준을 나타낸 그래프이다. 도 2에서 B는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포에서 IL-2의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다. 도 2에서 C는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포 내에서의 IL-2의 발현 수준을 나타낸 그래프이다.

도 3a에서 A는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서의 CD25 및 Foxp3의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 C는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서 CTLA4의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 B 및 D는 AQ를 가한 경우, 조절 T 세포에서 Foxp3, CTLA4, GITR 및 IL-10의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 E는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포 내에서의 IL-10의 생성 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3b는 분리된 $CD4^+$ T 세포를 비분화 조건 및 Th1 세포로의 분화 조건에서 배양하고, AQ 및 CQ를 처리한 경우, IFN-γ의 생성 수준을 나타낸 그래프이다.

도 4에서 A는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서 CD25, CD122 및 CD132의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 B는 AQ를 가하고 시간이 경과함에 따라 조절 T 세포에서 CD25의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 C는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서 CD25, CD122 및 CD132의 mRNA 수준을

나타낸 그래프이다.

도 5에서 A는 항-IL-2 및 항-CD25 항체의 존재하에서, CD25의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 5에서 B 및 C는 항-IL-2 및 항-CD25 항체의 존재하에서, CD25 및 CD132의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다.

도 6에서 A는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 도입 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, NBRE-luc의 루시퍼라제 효소 활성을 나타낸 그래프이다. 도 6에서 B는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 도입 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3가 NBRE에 결합한 정도를 나타낸 이미지이다. 도 6에서 B의 1는 NBRE에 결합된 단백질의 양을 나타내며, 2는 투입된 단백질 양을 나타낸다. 도 6에서 C는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 도입 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, CD25-luc의 루시퍼라제 효소 활성을 나타낸 그래프이다. 도 6에서 D는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 도입 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 CD25의 프로모터 영역 내 NBRE에 결합한 정도를 나타낸 이미지이다. 도 6에서 B의 3은 CD25의 NBRE에 결합된 단백질의 양을 나타내며, 4는 투입된 단백질 양을 나타낸다.

도 7에서 A 및 B는 DSS를 투여하고, AQ를 투여한 실험군 및 비히클 (vehicle)을 투여한 대조군에서의 몸무게 및 대장 길이를 나타낸 그래프이다. 도 7에서 C는 DSS를 투여하고, AQ 및 비히클을 각각 투여한 실험군 및 대조군에서 H&E 및 PAS로 염색한 이미지이다. 도 7에서 D는 미접촉 T 세포를 투여하고, AQ 및 비히클을 각각 투여한 실험군 및 대조군을 H&E로 염색한 이미지이다. 도 7에서 E는 AQ를 투여한 경우, Foxp3, RORγt 및 T-bet의 발현 수준을 면역 블롯 분석으로 나타낸 이미지이다. 도 7에서 F은 AQ를 투여한 경우, IL-17 및 IFN-γ의 생성 수준을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1. 아미노퀴놀린계 화합물의 조절 T 세포 분화 및 활성 촉진 기능 확인**

[0073] **1. 아미노퀴놀린계 화합물의 준비**

[0074] 아미노퀴놀린계 화합물인 아모디아퀸 (amodiaquine: AQ)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였으며 (amodiaquine hydrochloride, 4-([7-Chloro-4-quinolinyl]amino)-2-([diethylamino]methyl)phenol, MW = 464.81, purity > 98%), 순도 100%의 다이메틸설폭사이드 (dimethyl sulfoxide: DMSO)에 용해하였다. 아미노퀴놀린계 화합물인 클로로퀸 (Chloroquine: CQ)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였으며 (Chloroquine phosphate, N4-(7-Chloro-4-quinolinyl)-N,N-dimethyl-1,4-pentanediamine diphosphate salt, Chloroquine diphosphate salt), 인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline: PBS)에 용해하였다. 상기 아미노퀴놀린계 화합물 스톡 (stock)은 냉동 보관하였다.

[0075] **2. 마우스**

[0076] 8 내지 10 주령의 수컷, C57BL6 마우스 및 6주령의 수컷, RAG2 (recombination activation gene 2) 넉아웃 (knockout: KO) 마우스를 이화여자대학교 내 무균 조건의 동물 실험실에서 사육하였다. 모든 동물 취급 및 실험은 기관 내 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC No. 2012-01-071, 2014-01-011)에 승인을 받았으며, 기관, 국내 및 국제법 및 지침에 따라 수행하였다.

[0077] **3. $CD4^+$ T 세포 분리 및 배양**

[0078] 마우스에서 림프절 (lymph node)를 분리하고, 제조사의 지시에 따라 항-CD4 항체가 부착된 mini MACS 비드 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 이용하여 $CD4^+$ T 세포를 분리하였다. 분리된 $CD4^+$ T 세포를 항-CD3 (2 ㎍/㎖) 및 항-CD28 (1 ㎍/㎖)가 코팅된 플레이트에 분주하고, 재조합 인간 IL-2 (10 U/㎖)를 가하고, 24시간 동안 배양하여, 활성화시켰다. 세포에 AQ 및 CQ를 각각 가하고 배양하거나, 또는 세포에 5 ㎍/㎖ 항-IL-4, 5 ㎍/㎖ 항-IFN-γ, 및 50 ng/㎖ TGFβ를 포함하는, 조절 T 세포로의 분화 조건에서 AQ 및 CQ를 각각 가하고 배양하였다.

[0079] **4. AQ가 TGFβ에 의해 유도된 조절 T 세포의 항-증식 활성에 미치는 영향 분석**

[0080] AQ가 조절 T 세포로의 분화 조건에서 세포 주기 진행을 억제하는지 확인하였다. 3에서 분리된 $CD4^+$ T 세포를 5 μM의 카복시플루오레신 다이아세테이트 석신이미딜 에스터 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl

ester: CSFE) (Sigma-Aldrich)로 표지하고, 항-CD3 (2 ㎍/㎖) 및 항-CD28 (1 ㎍/㎖)가 코팅된 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 배양하여 활성화시켰다. 이어서, 세포에 AQ를 가하고, 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후, 유세포 분석을 위해 수득하였다.

[0081] 도 1a는 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포로의 분화 조건에서, AQ를 농도 의존적으로 가한 경우 T 세포의 분열 정도를 나타낸 그래프이다. 도 1에서 A 및 C는 각각 1㎛M, 5㎛M, 및 10㎛M의 AQ를 염증반응성 Th 세포에 가한 경우 T 세포의 분열 정도를 나타내며, 도 1a에서 B는 각각 1㎛M, 5㎛M, 및 10㎛M의 AQ를 조절 T 세포에 가한 경우 T 세포의 분열 정도를 나타낸 그래프이다. 도 1a에 나타낸 바와 같이, AQ는 농도 의존적으로 염증반응성 Th 세포의 세포 분열을 억제하고, 비 분화 조건에서의 T 세포의 세포 주기 진행을 현저하게 억제하였다. 특히, T 세포 수용체 (T Cell Receptor: TCR) 자극 후 48시간의 시점에서, 염증반응성 Th 세포로 분화되는 세포 집단 중 높은 세포 분열 횟수를 갖는 세포 집단은, 첨가된 AQ의 농도 의존적으로 감소하였다. 반면, AQ는 조절 T 세포로의 분화 조건에서 T 세포의 세포 분열을 다소 억제하였으나, 이러한 억제 활성은 염증반응성 Th 세포의 세포 분열이 억제된 정도에 비하여 낮았다.

[0082] AQ 및 CQ가 T 세포에서 세포 독성이 있는지 확인하였다. 3에서 분리된 $CD4^+$ T 세포에 AQ 및 CQ를 각각 가하고, 제조사의 지시에 따라 EZ-CYTOX 분석 키트를 이용하여 세포 독성이 있는지 확인하였다. 도 1b는 AQ 및 CQ를 가한 경우 T 세포의 세포 분열에 따른 총 세포의 수를 나타낸 그래프이다. 도 1b에 나타낸 바와 같이, 10㎛M의 AQ 및 CQ를 가한 경우에 $CD4^+$ T 세포의 수는 감소하였다. 그러나, 유의미한 세포 독성을 보이지 않았다.

[0083] **5. AQ가 조절 T 세포로의 분화 조건에서 IL-2 생성에 미치는 영향 분석**

[0084] T 세포의 성장 인자인, IL-2의 생성 및 발현 수준을 확인하였다.

[0085] **(5.1) 효소면역분석법 (enzyme immunoassay: EIA)에 의한 사이토카인 생성 분석**

[0086] AQ가 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포에서 IL-2의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포로의 분화 조건에서 배양된 T 세포의 상층액을 수득하고, EIA 플레이트에서 IL-2 항체와 반응시킨 다음, 포스파타제 (phosphatase)가 중합된 이차 항체와 반응시켰다. 이어서, 포스파타제의 기질인 p-니트로페닐 포스페이트 (p-nitrophenylphosphate)를 가하여 발색시키고, 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 발색 정도를 측정하였다. 도 2에서 A는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포에서 IL-2의 생성 수준을 나타낸 그래프이다.

[0087] **(5.2) 역전사 및 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 mRNA 수준 분석**

[0088] AQ가 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포에서 IL-2의 mRNA 수준에 미치는 영향을 확인하였다. 총 RNA는 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 추출하고, 역전사 효소 (Promega, Madison, WI)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 표 2에 기재된 IL-2 특이적인 프라이머 세트, 및 StepOnePlus (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)을 이용하여, 제조사의 지시에 따라 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time polymerase chain reaction)을 수행하였다. 하기 유전자의 전사 수준은 액틴으로 정규화하였다. 도 2에서 B는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포에서 IL-2의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다.

표 2

[0089]

유전자	서열번호	5'-> 3'
IL-2	서열번호 1	5'-cctgagcaggatggagaattaca-3'
	서열번호 2	5'-tccagaacatgccgcagag-3'
CD25	서열번호 3	5'-cgttgcttaggaaactcctgga-3'
	서열번호 4	5'-gctttctcgatttgtcatggg-3'
CD122	서열번호 5	5'-cgtccatgccaagtcgaac-3'
	서열번호 6	5'-gatgcctgcctcacaagactt-3'
CD132	서열번호 7	5'-ggttggaacgaatgcctccaattc-3'
	서열번호 8	5'-gcagaaccgttcactgtagtctgg-3'
CTLA-4	서열번호 9	5'-gggctcagttgcataaaccga-3'
	서열번호 10	5'-acactgccagcttttggtttcc-3'
GITR	서열번호 11	5'-aaggttcagaacggaagtg-3'
	서열번호 12	5'-gggtctccacagtggtact-3'

IL-10	서열번호 13	5'-tttgaattccctgggtgagaa-3'
	서열번호 14	5'-acaggggagaaatcgatgaca-3'
NR4A1	서열번호 15	5'-gttgatgttcccgcctttg-3'
	서열번호 16	5'-cctggagcccgtgtcg-3'
NR4A2	서열번호 17	5'-gctgccctggctatggt-3'
	서열번호 18	5'-caggtagttgggtcggtt-3'
NR4A3	서열번호 19	5'-cactgatctccccaaagaag-3'
	서열번호 20	5'-gcaggacaagtccattgc-3'
액틴 (actin)	서열번호 21	5'-agagggaaatcgtgcgtgac-3'
	서열번호 22	5'-caatagtgatgacctggccgt-3'

[0090] **(5.3) 유세포 분석 (flow cytometry)에 의한 발현 분석**

[0091] AQ가 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포 내에서의 IL-2의 발현 수준에 미치는 영향을 확인하였다. 세포 내 사이토카인을 염색하기 위하여, 세포에 포볼 미리스테이트 아세테이트 (Phorbol myristate acetate: PMA) 및 이오노마이신 (ionomycin)를 가하고 6시간 동안 배양하거나, 또는 항-CD3 (1 ㎍/ml)을 가하고 밤새 배양하고, 세포를 수득하기 전 2시간 동안 모넨신 (monensin) (4 μM)을 가하여 배양하였다. 이어서, 세포가 투과되도록 하고, 피코에리트린 (Phycoerythrin: PE)가 결합된 항-mIL-2 항체와 인큐베이션한 후, 유세포 분석 및 CellQuest 분석 (BD Biosciences)을 수행하였다. 도 2에서 C는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포 내에서의 IL-2의 발현 수준을 나타낸 그래프이다.

[0092] 도 2에서 A, B 및 C에 나타낸 바와 같이, 총 세포 수가 감소하였음에도 불구하고, 조절 T 세포에 의한 IL-2 생성은 AQ의 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 마찬가지로, IL-2 유전자의 전사는 외인성 IL-2의 도입에 관계없이 AQ에 의해 유의하게 증가하였다. 또한, 조절 T 세포로의 분화 조건에서 IL-2를 생산하는 세포 집단은 AQ를 가함으로써 더욱 증가하였다. 반면, 염증반응성 Th 세포에 의한 IL-2의 생성은 AQ를 가한 경우에 유의한 차이를 보이지 않았다.

[0093] **6. AQ가 $CD25^{+}Foxp3^{+}$의 항원 특성을 갖는 조절 T 세포로의 분화에 미치는 영향 분석**

[0094] AQ가 조절 T 세포로의 분화에 미치는 영향을 확인하였다.

[0095] **(6.1) 유세포 분석에 의한 발현 분석**

[0096] AQ가 조절 T 세포에서 CD25 및 Foxp3의 발현 수준에 미치는 영향을 확인하였다. CD25 및 Foxp3 항체, 및 CTLA4 항체와 인큐베이션한 것을 제외하고, (5.3)과 동일한 방법으로 수행하였다. 도 3a에서 A는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서의 CD25 및 Foxp3의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 C는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서 CTLA4의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 A 및 C에 나타낸 바와 같이, AQ를 가한 경우, 조절 T 세포의 마커인 CD25 및 Foxp3, 및 CTLA4의 발현 수준이 증가하였다.

[0097] **(6.2) 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 mRNA 수준 분석**

[0098] AQ가 조절 T 세포에서 Foxp3, CTLA4, GITR 및 IL-10의 mRNA 수준에 미치는 영향을 확인하였다. 상기 표 2에 기재된 Foxp3, CTLA4, GITR 및 IL-10에 특이적인 프라이머를 사용한 것을 제외하고, (5.2)와 동일한 방법을 수행하였다. 도 3a에서 B 및 D는 AQ를 가한 경우, 조절 T 세포에서 Foxp3, CTLA4, GITR 및 IL-10의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 B 및 D에 나타낸 바와 같이, AQ를 가한 경우 Foxp3의 전사가 유의미하게 동시에, 농도 의존적으로 증가하였다. 또한, 조절 T 세포의 표면 마커인 CTLA4, GITR 및 IL-10의 mRNA 수준이 증가하였다.

[0099] **(6.3) 효소면역분석법에 의한 사이토카인 생성 분석 1**

[0100] AQ가 조절 T 세포에서 IL-10의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. EIA 플레이트에서 IL-10 항체와 인큐베이션한 것을 제외하고, (5.1)과 동일한 방법으로 수행하였다. 도 3a에서 E는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포 내에서의 IL-10의 생성 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3a에서 E에 나타낸 바와 같이, 조절 T 세포로의 분화 과정에서 AQ를 가한 경우 IL-10 생성이 증가하였다.

[0101] **(6.4) 효소면역분석법에 의한 사이토카인 분석 2**

[0102] 3의 분리된 $CD4^+$ T 세포에 AQ 및 CQ를 가하고, 배양된 T 세포의 상층액을 수득하고, EIA 플레이트에서 IFN-γ 항체와 인큐베이션한 것을 제외하고, (5.1)과 동일한 방법으로 수행하였다. 또한, 3의 분리된 $CD4^+$ T 세포를 Th1 세포로의 분화 조건에서 배양하고, AQ 및 CQ를 가하고, EIA 플레이트에서 IFN-γ 항체와 인큐베이션한 것을 제외하고, (5.1)과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0103] 도 3b는 분리된 $CD4^+$ T 세포를 비분화 조건 및 Th1 세포로의 분화 조건에서 배양하고, AQ 및 CQ를 처리한 경우, IFN-γ의 생성 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3b에 나타낸 바와 같이, AQ 및 CQ를 가한 경우, Th1의 사이토카인인 IFN-γ의 생성이 감소하였다.

[0104] **7. AQ가 조절 T 세포에서 IL-2 수용체인 CD25의 발현에 미치는 영향 분석**

[0105] AQ가 조절 T 세포에서 IL-2 수용체인, CD25 (IL-2Rα), CD122 (IL-2Rβ) 및 CD132 (γ 공통 사슬)의 분화에 직접적으로 영향을 미치는지 확인하였다.

[0106] **(7.1) 유세포 분석에 의한 발현 분석**

[0107] AQ가 조절 T 세포에서 CD25, CD122 및 CD132의 발현 수준에 미치는 영향을 확인하였다. 유세포 분석 및 세포 표면의 마커를 염색하기 위하여, 세포를 고정하고 CD25, CD122, 및 CD132 항체와 인큐베이션한 것을 제외하고, (5.3)과 동일한 방법으로 수행하였다. 도 4에서 A는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서 CD25, CD122 및 CD132의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 B는 AQ를 가하고 시간이 경과함에 따라 조절 T 세포에서 CD25의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 A 및 B에 나타낸 바와 같이, AQ를 가한 경우, 조절 T 세포의 표면에서 CD25의 발현 수준이 증가하였다. 반면, CD122 및 CD132의 발현 수준은 유의미한 차이를 보이지 않았다. CD25의 발현은 TCR 자극에 의해 증가하였다가, 시간이 지남에 따라 조절 T 세포의 분화 후기에 다소 감소하였으나, AQ를 가한 경우에는 조절 T 세포의 분화 후기에도 발현 수준이 유지되었다.

[0108] **(7.2) 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 mRNA 수준 분석**

[0109] AQ가 조절 T 세포에서 CD25, CD122 및 CD132의 mRNA 수준에 영향을 미치는지 확인하였다. 상기 표 2에 기재된 CD25, CD122 및 CD132에 특이적인 프라이머를 사용한 것을 제외하고, (5.2)와 동일한 방법을 수행하였다.

[0110] 도 4에서 C는 AQ를 농도 의존적으로 가한 경우, 조절 T 세포에서 CD25, CD122 및 CD132의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다. 도 4에서 C에 나타낸 바와 같이, AQ를 가한 경우 CD25의 전사가 유의미하게 증가하였다. 반면, AQ를 가한 경우 CD122 및 CD132의 mRNA 수준에서 유의미한 차이를 보이지 않았다.

[0111] **8. AQ 첨가에 따른 조절 T 세포에서의 CD25의 발현 증가와 IL-2 / IL-2R 신호의 활성화와의 관계 분석**

[0112] 조절 T 세포로의 분화 조건에 AQ를 가한 경우 CD25의 발현이 증가된 것이 IL-2 / IL-2R 신호의 활성화에 의한 것인지 여부를 확인하였다. 도 5에서 A는 항-IL-2 및 항-CD25 항체의 존재하에서, CD25의 발현 수준을 나타낸 그래프이다. AQ를 가한 경우 항-IL-2 항체를 가한 조절 T 세포의 표면에서 CD25의 발현 수준이 증가하였다. 또한, AQ를 첨가함과 상관없이 CD25 차단 항체는 조절 T 세포의 표면에서 CD25의 염색 강도를 감소시켰다. 도 5에서 B 및 C는 항-IL-2 및 항-CD25 항체의 존재하에서, CD25 및 CD132의 mRNA 수준을 나타낸 그래프이다. AQ를 가한 경우 IL-2 중화 및 CD25 차단과 관계없이 CD25의 mRNA 수준이 증가하였으며, CD132의 발현 수준은 유의한 차이를 보이지 않았다. 즉, AQ는 IL-2 / IL-2R 신호와 독립적으로 CD25의 발현을 증가시킴을 알 수 있다.

[0113] **9. AQ가 CD25의 전사 활성을 촉진하는 메커니즘 분석**

[0114] AQ는 NR4A의 리간드이며, NR4A를 매개로 하는 타겟 유전자의 전사 활성을 촉진할 것으로 예상되므로, AQ가 NR4A의 DNA 결합 활성을 촉진하여 NR4A의 타겟 유전자인 CD25의 전사 활성을 증가시키는지 확인하였다.

[0115] **(9.1) 리포터 (Reporter) 효소 활성 분석**

[0116] 외부 유전자 도입이 용이한 293T 세포에, NR4A1, NR4A2, 또는 NR4A3의 발현 벡터와, NR4A-결합 영역을 포함하는 NBRE-luc 또는 pCD25-luc의 리포터 벡터를 형질도입하였다. pCD25-luc 리포터 벡터는 마우스 CD25 프로모터의 -600 내지 +10 영역이 pGL2-basic 리포터 유전자 (Promega, Madison, WI)에 연결되어 있는 것을 사용하였다. 루시퍼라제 활성은 루시퍼라제 분석 키트 (Promega)를 사용하여 측정하였으며, β-갈락토시다제 활성으로 정규화하였다. β-갈락토시다제 활성은 293T 세포에 pCMVβ 벡터를 형질도입시키고, Galacto-light system 키트 (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA)를 사용하여 측정하였다.

[0117] 도 6에서 A는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 도입되어 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, NBRE-luc의 루시퍼라제 효소 활성을 나타낸 그래프이다. 도 6에서 A에 나타낸 바와 같이, NBRE-luc의 루시퍼라제 효소 활성은 NR4A1, NR4A2, 또는 NR4A3를 과발현시킨 경우에 증가하였으며, AQ를 가한 경우에 더욱 증가하였다. 도 6에서 C는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 도입 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, CD25-luc의 루시퍼라제 효소 활성을 나타낸 그래프이다. 도 6에서 C에 나타낸 바와 같이, CD25-luc의 루시퍼라제 효소 활성은 NR4A1를 과발현시킨 경우에 현저하게 증가하였으며, AQ 추가에 의해 더욱 증가하였다.

[0118] **(9.2) DNA 결합 (pulldown) 분석**

[0119] 293T 세포에, NR4A1, NR4A2, 또는 NR4A3의 발현 벡터를 형질도입하고, AQ를 가하여 배양하였다. 이어서, HKMG 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하였다. 상기 HKMG 버퍼는 10 mM HEPES (pH 7.9), 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.1% NP-40, 및 10% 글리세롤을 포함하는 것을 사용하였다. 추출된 단백질을 NBRE 또는 마우스 CD25 프로모터에서 추정되는 NBRE를 포함하는 바이오틴화된 이중 가닥 DNA와 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 단백질-DNA 결합 복합체를 스트렙타비딘-아가로스 비드로 침전시키고, 침전물 내 단백질을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)으로 분리하고, 폴리비닐리덴 플루오리드 (Polyvinylidene fluoride: PVDF) 막으로 이동시켰다. 상기 PVDF 막을 1차 항체인, NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 항체 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 결합하도록 반응시키고, 2차 항체인 페록시다제가 결합된 2차 항체와 순차적으로 반응시켰다. 그 후, 단백질 밴드를 증강된 화학발광 (enhanced chemiluminescence: ECL)과 방사선자동사진법 (autoradiography)을 이용하여 확인하였다.

[0120] 도 6에서 B는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3가 NBRE에 결합한 정도를 나타낸 이미지이다. 도 6에서 B에 나타낸 바와 같이, NR4A1, NR4A2, 또는 NR4A3의 DNA 결합 활성은 AQ를 가한 경우에 더욱 증가하였다. 도 6에서 D는 NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 발현된 293T 세포에 AQ를 가한 경우, NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3 각각이 CD25의 프로모터 영역 내 NBRE에 결합한 정도를 나타낸 이미지이다. 도 6에서 D에 나타낸 바와 같이, NR4A1이 CD25 프로모터 영역 내 NBRE에 특이적으로 결합하였으며 AQ 처리에 의해 결합이 더욱 증가하였다.

[0121] **(9.3) 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 mRNA 수준 및 단백질 수준 분석**

[0122] 도 6에서 E 및 F는 3의 $CD4^+$ T 세포에 AQ를 가한 경우, NR4A1, NR4A2, 및 NR4A3의 mRNA 및 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 6에서 E 및 F에 나타낸 바와 같이, NR4A1의 mRNA 및 발현 수준은 AQ를 가하는 경우에 더욱 증가하였다.

[0123] **10. AQ가 체내 (in vivo)에서 대장염 (colitis)에 미치는 영향 분석**

[0124] 생체 내에서, AQ가 염증 반응을 억제시키는지 확인하였다.

[0125] **(10.1) 대장염에 의한 염증 반응의 조직학적 분석 1**

[0126] 10 내지 12주령의 수컷 C57BL6 마우스 (18마리)에 3%의 DSS (MP Biomedicals, Solon, OH)를 함유하는 물을 6일 동안 투여하였다. 실험군은 매일 AQ (10 mg/kg)를 복강 주사 (injection peritoneal: ip)로 주입하였다. 대조군은 비히클을 복강 주사로 주입하였다. 몸무게, 대변 상태 및 혈변이 있어났는지 여부를 매일 모니터링하고, 해부시에 대장 (colon)의 길이를 측정하였다. 대장 조직 단면을 헤마톡실린 및 에오신 (hematocylin 및 eosin: H&E) 및 과요오드산쉬프 (periodic-acid-Schiff: PAS)로 염색하였다.

[0127] 도 7에서 A 및 B는 DSS를 투여하고, AQ를 투여한 실험군 및 비히클을 투여한 대조군에서의 몸무게 및 대장 길이를 나타낸 그래프이다. 도 7에서 A 및 B를 참조하면, 마우스의 몸무게는 DSS를 투여함에 따라 감소하였으며, AQ를 투여한 실험군은 몸무게 감소가 완화되었다. 도 7에서 C는 DSS를 투여하고, AQ 및 비히클을 각각 투여한 실험군 및 대조군에서 H&E 및 PAS로 염색한 이미지를 나타낸 그래프이다. 도 7에서 C에 나타낸 바와 같이, AQ는 면역 세포의 침윤을 감소시키고, 상피 세포가 손상되는 것을 억제하였다.

[0128] **(10.2) 대장염에 의한 염증 반응의 조직학적 분석 2**

[0129] T 세포로 대장염을 유도하기 위해, C57BL6 마우스로부터 림프절을 분리하고, 제조사의 지시에 따라 미접촉 (naive) T 세포 농축 (enrichment) 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여, 항원과 접촉하지 않은 미접촉 T 세포를 분리하였다. 분리된 미접촉 T 세포를 6주령의 수컷, RAG KO 마우스에 복강내 주사 (intraperitoneal injection)로 주입하였다. 주사 6주 후에, 실험군에는 2주 동안 매일 AQ (10 mg/kg)를 복강

주사로 주입하였다. 대조군에는 비히클을 복강 주사로 주입하였다. 몸무게, 대변 상태 및 혈변이 있어났는지 여부를 매일 모니터링하고, 해부시에 대장의 길이를 측정하였다. 대장 조직 단면을 H&E 및 PAS로 염색하였다. 도 7에서 D는 미접촉 T 세포를 투여하고, AQ 및 비히클을 각각 투여한 실험군 및 대조군을 H&E로 염색한 이미지를 나타낸 그래프이다. 도 7에서 D에 나타낸 바와 같이, 주사된 T 세포에 의해 RAG KO 마우스에서 대장염이 유발되었으며, AQ를 투여한 경우 이러한 염증 반응이 현저하게 억제되었다.

[0130] **(10.3) 염증반응성 Th 세포 및 조절 T 세포의 전사 인자의 발현 수준 분석**

[0131] RIPA 용해 버퍼를 이용하여 (10.2)의 마우스의 비장 (spleen)으로부터 단백질 용해물을 수득하였다. 추출된 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, PVDF 막으로 이동시켰다. 상기 PVDF 막을 1차 항체인, Foxp3 항체, (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), RORγt, T-bet, 및 액틴 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 결합하도록 인큐베이션하고, 이어서, 2차 항체인 페록시다제가 결합된 2차 항체와 인큐베이션하였다. 그 후, 단백질 밴드를 ECL과 방사선자동사진법을 이용하여 검출하였다. 도 7에서 E는 AQ를 투여한 경우, Foxp3, RORγt 및 T-bet의 발현 수준을 면역 블롯 분석으로 나타낸 이미지이다. 도 7에서 E에 나타낸 바와 같이, AQ를 투여한 경우, 조절 T 세포의 마커인 Foxp3의 발현이 증가하였으나, 염증반응성 Th 세포, 즉 Th17 및 Th1의 마커인 RORγt 및 T-bet의 발현 수준은 감소하였다.

[0132] **(10.4) 염증반응성 Th 세포의 사이토카인 측정 1**

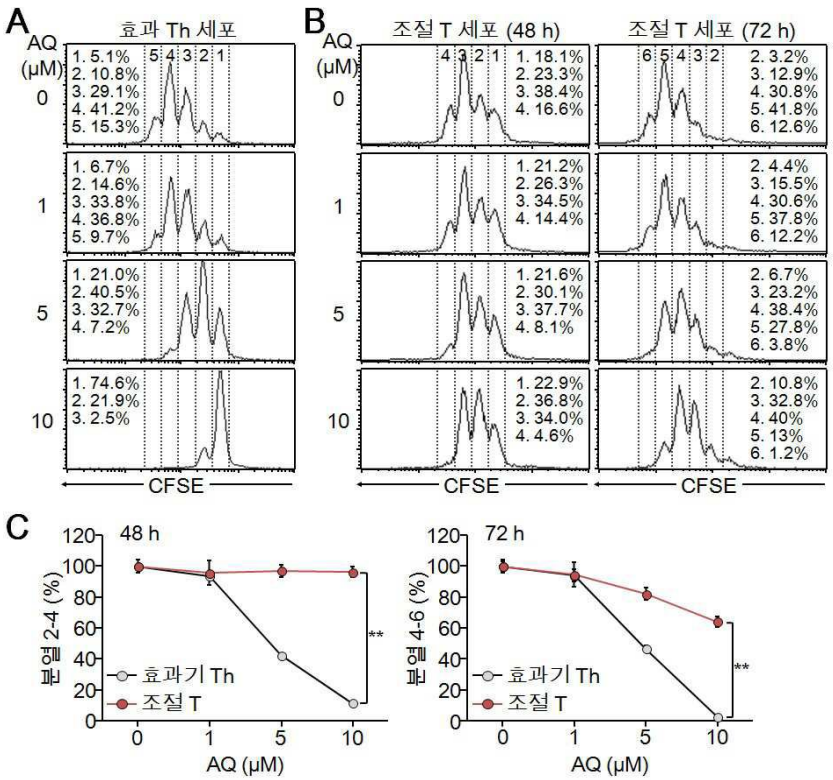
[0133] (10.2)의 마우스에서 T 세포를 분리하고, 배양된 T 세포의 상층액을 수득하고, EIA 플레이트에서 IL-17 및 IFN-γ 항체와 인큐베이션한 것을 제외하고, (5.1)과 동일한 방법으로 수행하였다. 도 7에서 F는 AQ를 투여한 경우, IL-17 및 IFN-γ의 생성 수준을 나타낸 그래프이다. 도 7에서 F에 나타낸 바와 같이, AQ를 투여한 경우, Th17 세포의 사이토카인인 IL-17, 및 Th1의 사이토카인인 IFN-γ의 생성이 감소하였다.

[0134] **11. 통계 분석**

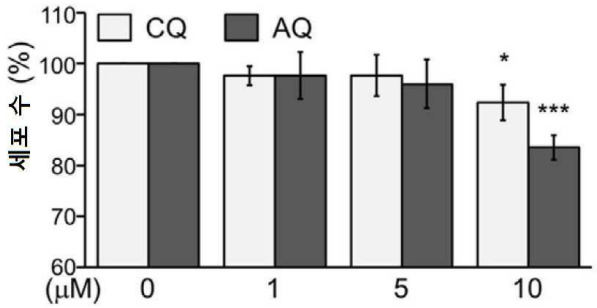
[0135] 모든 데이터는 3회 이상의 독립적 실험의 평균 ± SD으로 표시하였다. 통계적 유의성은 일원 분류 분산분석 (one-way analysis of variance: ANOVA)과 Student's t-테스트를 이용하여 계산하였다. 통계적 유의성은 다음과 같이 표시하였다. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; and ***, $p < 0.0005$.

도면

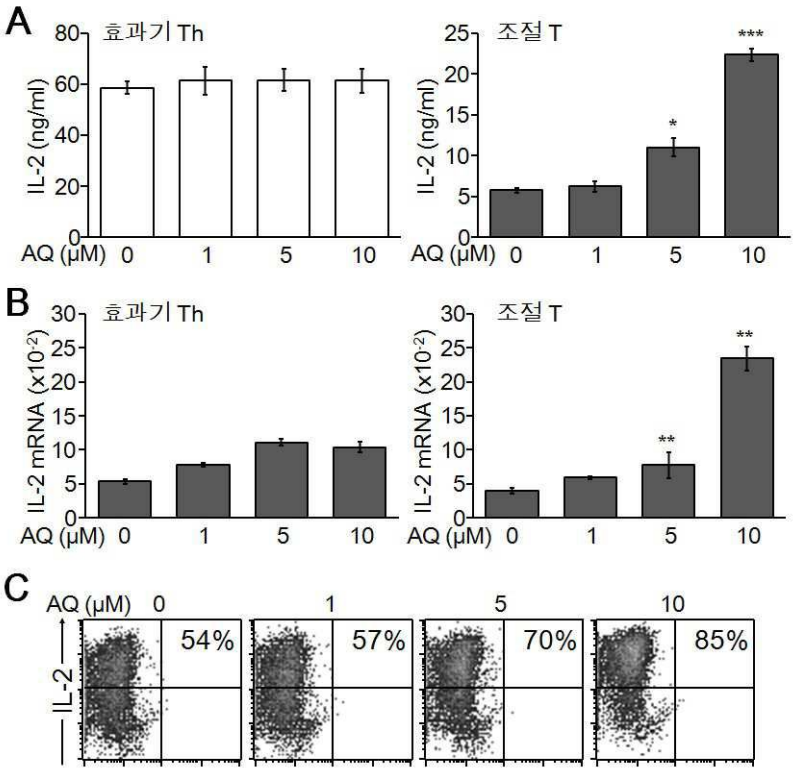
도면1a


A
효과 Th 세포
AQ (μM)
0
1
5
10
CFSE
B
조절 T 세포 (48 h)
조절 T 세포 (72 h)
CFSE
C
48 h
72 h
분열 2-4 (%)
분열 4-6 (%)
효과기 Th
조절 T
AQ (μM)
**

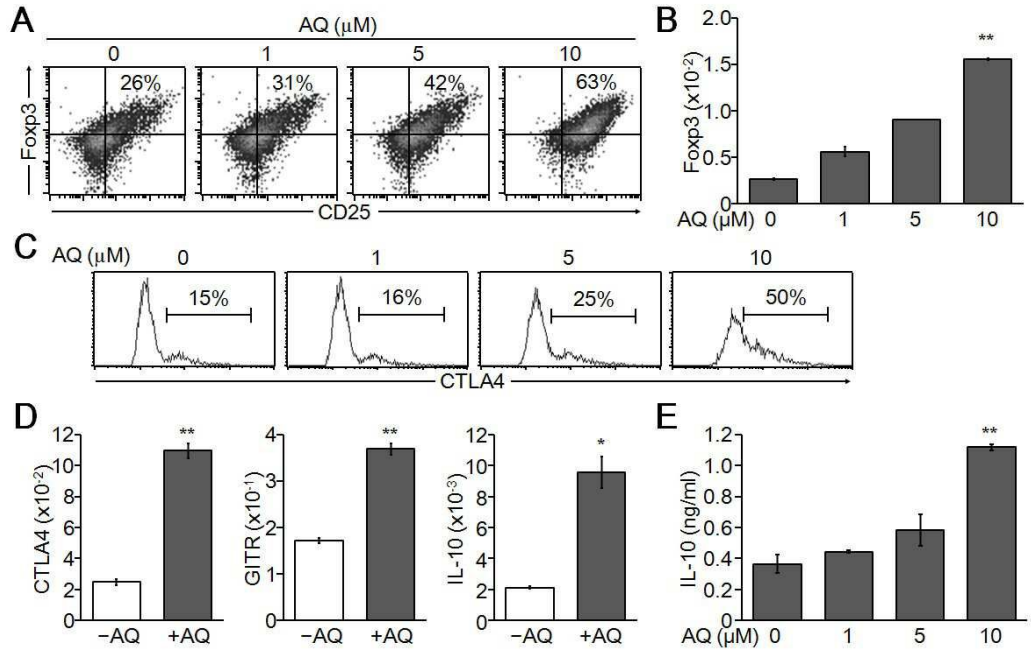
도면1b


CQ
AQ
세포 수 (%)
(μM)
0
1
5
10
*
***

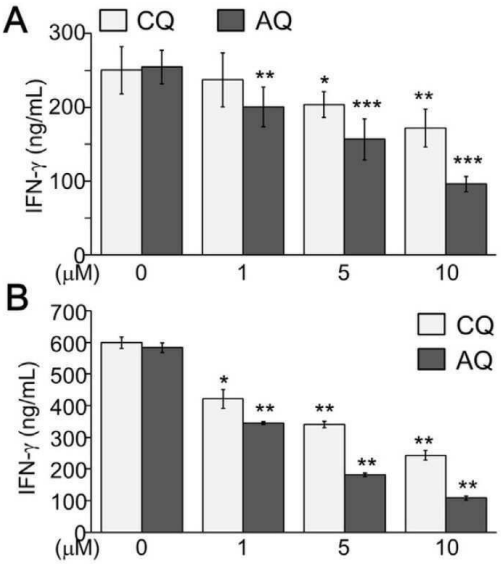
도면2


A
효과기 Th
조절 T
IL-2 (ng/ml)
AQ (μM) 0 1 5 10
B
IL-2 mRNA (x10-2)
C
AQ (μM)
54%
57%
70%
85%
IL-2

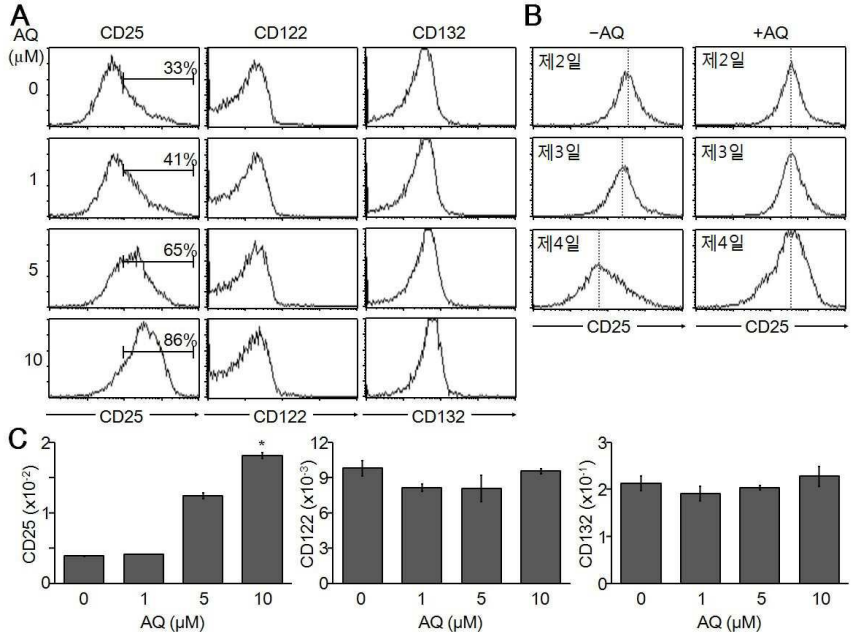
도면3a


A
AQ (μM)
26%
31%
42%
63%
Foxp3
CD25
B
Foxp3 (x10-2)
C
15%
16%
25%
50%
CTLA4
D
CTLA4 (x10-2)
GITR (x10-1)
IL-10 (x10-3)
−AQ
+AQ
E
IL-10 (ng/ml)

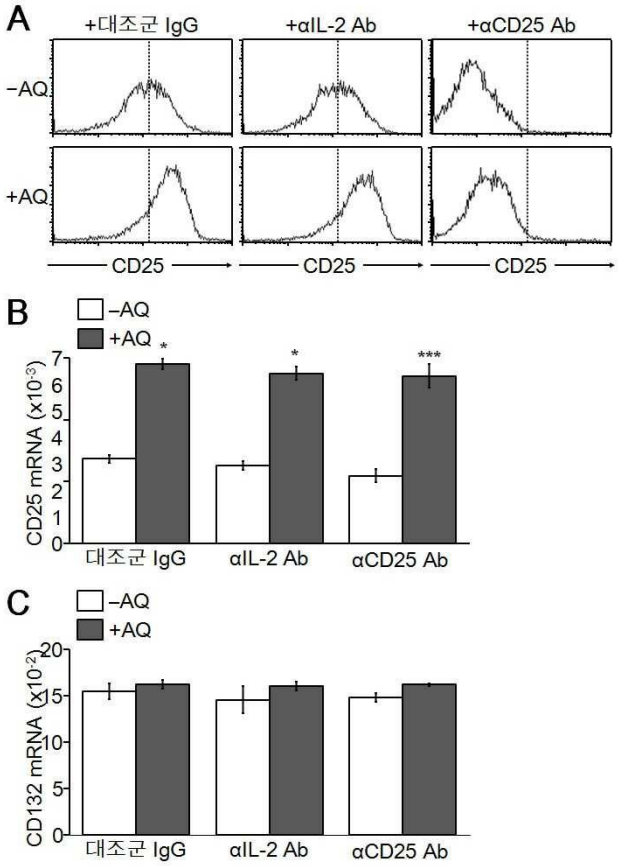
도면3b


A
CQ
AQ
IFN-γ (ng/mL)
300
200
100
0
(μM)
0
1
5
10
B
CQ
AQ
IFN-γ (ng/mL)
700
600
500
400
300
200
100
0
(μM)
0
1
5
10

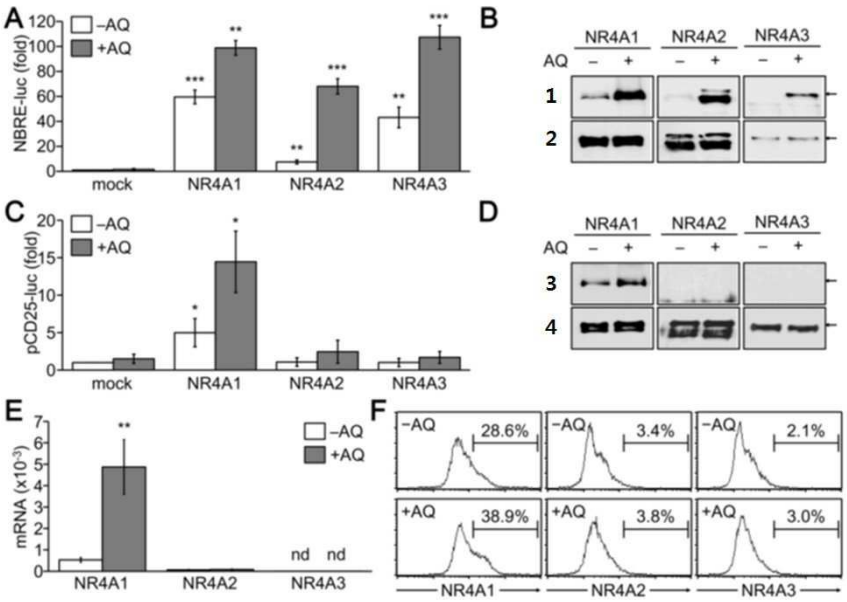
도면4


A
AQ (μM)
CD25
CD122
CD132
0
1
5
10
33%
41%
65%
86%
B
−AQ
+AQ
제2일
제3일
제4일
CD25
C
CD25 (x10⁻²)
CD122 (x10⁻³)
CD132 (x10⁻¹)
AQ (μM)

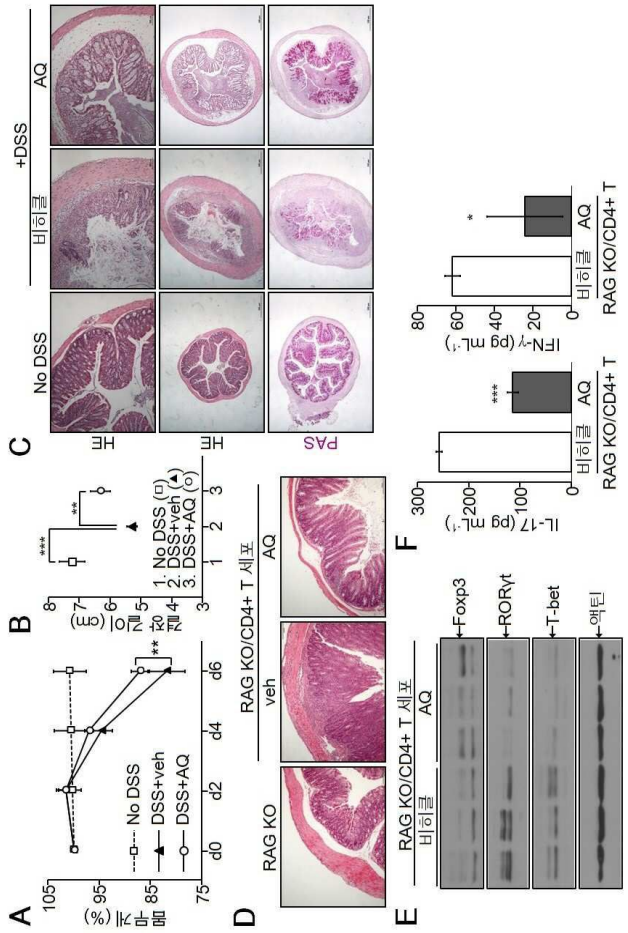
도면5


A
+대조군 IgG
+αIL-2 Ab
+αCD25 Ab
-AQ
+AQ
CD25
CD25
CD25
B
-AQ
+AQ
CD25 mRNA (x10-3)
대조군 IgG
αIL-2 Ab
αCD25 Ab
C
-AQ
+AQ
CD132 mRNA (x10-2)
대조군 IgG
αIL-2 Ab
αCD25 Ab

도면6


A
-AQ
+AQ
NBRE-luc (fold)
mock
NR4A1
NR4A2
NR4A3
B
NR4A1
NR4A2
NR4A3
AQ
1
2
C
-AQ
+AQ
pCD25-luc (fold)
mock
NR4A1
NR4A2
NR4A3
D
NR4A1
NR4A2
NR4A3
AQ
3
4
E
-AQ
+AQ
mRNA (x10-3)
nd nd
NR4A1
NR4A2
NR4A3
F
-AQ
28.6%
-AQ
3.4%
-AQ
2.1%
+AQ
38.9%
+AQ
3.8%
+AQ
3.0%
NR4A1
NR4A2
NR4A3

도면7



서 열 목 록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation EWHA WOMANS UNIVERSITY

<120> Composition for immunopotentiating containing aminoquinoline-based compound, composition for promoting development into regulatory T cell, and method using the same

<130> PN117519

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 primer

<400> 1

cctgagcagg atggagaatt aca 23

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 primer

<400> 2

tccagaacat gccgcagag 19

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD25 primer

<400> 3

cgttgcttag gaaactcctg ga 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD25 primer

<400> 4

gctttctcga tttgtcatgg g 21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD122 primer

<400> 5

cgtccatgcc aagtcgaac 19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD122 primer

<400> 6

gatgcctgcc tcacaagact t 21

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD132 primer

<400> 7

ggttggaacg aatgcctcca attc 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD132 primer

<400> 8

gcagaaccgt tcactgtagt ctgg 24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA-4 primer

<400> 9

gggctcagtt gcataaaccg a 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA-4 primer

<400> 10

acactgccag cttttggttt cc 22

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GITR primer

<400> 11

aaggttcaga acggaagtg 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GITR primer

<400> 12

gggtctccac agtggtact 19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-10 primer

<400> 13

tttgaattcc ctgggtgaga a 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-10 primer

<400> 14

acaggggaga aatcgatgac a 21

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 primer

<400> 15

gttgatgttc ccgcctttg 19

<210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A1 primer

<400> 16

cctggagccc gtgtcg 16

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 primer

<400> 17

gctgccctgg ctatggt 17

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A2 primer

<400> 18

caggtagttg ggtcggtt 18

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 primer

<400> 19

cactgatctc cccaaagaag 20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NR4A3 primer

<400> 20

gcaggacaag tccattgc 18

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> actin primer

<400> 21

agagggaaat cgtgcgtgac 20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> actin primer

<400> 22

caatagtgat gacctggccg t 21