(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0005160
(43) 공개일자 2015년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/52 (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0078574
(22) 출원일자 2013년07월04일
심사청구일자 2014년05월20일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

전체 청구항 수 : 총 5 항

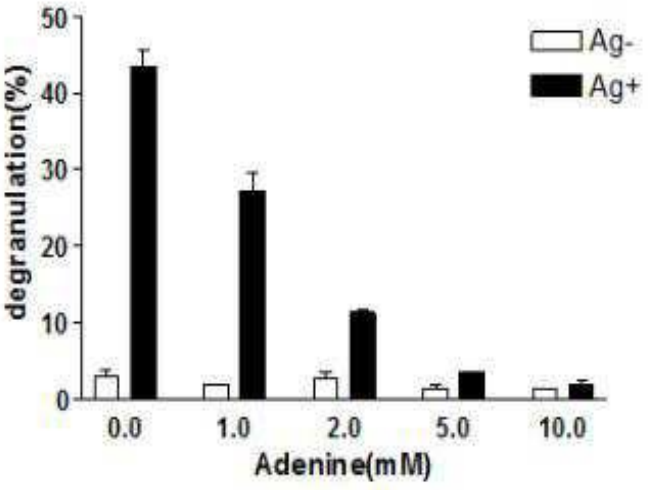
(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박승길
대전 유성구 어은로 57, 132동 706호 (어은동, 한빛아파트)
(74) 대리인
이희숙, **김석만**

(54) 발명의 명칭 **아데닌 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아데닌(adenine)의 약학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1로 표시되는 아데닌 또는 이의 염을 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 화학식 1로 표시되는 아데닌 또는 이의 염을 포함하는 비만세포 탈과립 억제, 사이토카인 발현 억제 및 아이코사노이드 생성 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 알레르기 원인이 되는 비만세포의 탈과립, 사이토카인의 전사 억제 및 아이코사노이드 생성을 억제함으로써 알레르기 질환에 효과적이므로 이들의 예방 및 치료의 목적으로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1

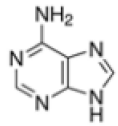


특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

<화학식 1>



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알레르기 질환은 기관지천식, 화분증, 알레르기비염, 담마진 (두드러기), 아나필락시스, 소화관 알레르기, 약물 알레르기, 알레르기성 결막염 및 아토피성 피부염으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항의 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만세포 탈과립 억제용 조성물.

청구항 4

제1항의 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 사이토카인 발현 억제용 조성물.

청구항 5

제1항의 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아이코사노이드 생성 억제용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아데닌(adenine)의 약학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1로 표시되는 아데닌 또는 이의 염을 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 화학식 1로 표시되는 아데닌 또는 이의 염을 포함하는 비만세포 탈과립 억제, 사이토카인 발현 억제 및 아이코사노이드 생성 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만 세포는 여러 종류의 조직의 거주세포(resident cell)이며, 다양한 자극에 의해 활성화되면 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 사이토카인, 케모카인, 단백질 분해효소 등을 분비한다. 비만세포는 신체가 병원체와 기생충에 대항하는 일을 수행한다. 그러나 한편으로는 알러지 염증반응을 일으켜 아토피피부염, 아토피성 아스

마, 알러지성 비염, 두드러기, 습진, 건선, 과민증을 일으킨다.

[0003] 비만세포는 IgE에 대한 수용체인 FcεRI를 발현하고 있다. 이 수용체는 하나의 α 체인과 2 가지 종류의 서브유닛 (한 개의 β 체인과 이황화(disulfide) 결합된 homo-dimer γ 체인) 으로 이루어져 있다. 항원 특이성 IgE와 결합 하고 있던 FcεRI가 다가성 항원에 의해 수용체 간의 결합이 일어나면 신호전달 반응이 일어면 비만세포는 탈과립을 일으키고, 염증성 에이코사노이드, 사이토카인(cytokine)의 방출을 일으킨다 (Abraham, S.N. *et al.*, Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. Nat Rev Immunol. 10(6): p.440-52).

발명의 내용

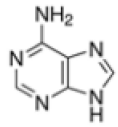
해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 아데닌이 항원자극에 의한 비만 세포의 활성을 억제한다는 점을 발견하여 아데닌을 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0005]

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] <화학식 1>

[0008] 

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만세포 탈과립 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

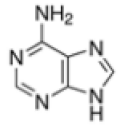
[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 사이토카인 발현 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아이코사노이드 생성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] <화학식 1>

[0014] 

[0015] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만세포 탈과립 억제용 조성물을 제공한다.

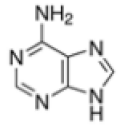
[0016] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 사이토카인 발현 억제용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아이코사노이드 생성 억제용 조성물을 제공한다.

[0018] 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.

[0019] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] <화학식 1>

[0021] 

[0022] 본 발명의 아데닌 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 알레르기 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 가지고 있다.

[0023] 이와 같은 본 발명의 효과는 본 발명의 일실시예에 잘 나타나 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에서는 염증유발과 관련이 있는 비만세포의 아이코사노이드 일종인 염증유발 물질 leukotriene B4 (LTB4)의 합성 억제, 탈과립 억제 및 사이토카인 mRNA 생성 억제에 대한 아데닌의 영향을 살펴보았다. 그 결과, 아데닌은 비만세포내의 leukotriene B4 (LTB4)의 합성 억제, 탈과립 및 사이토카인 mRNA 생성을 억제하여 알레르기 질환을 예방 및 치료하는 효과를 가지는 것을 알 수 있다. 또한 국소피부과민반응인 PCA로 실험동물 모델의 국소피부조직에서 과민반응을 측정한 결과, 아데닌은 국소피부 과민반응을 억제하는 것으로 나타났다.

[0025] 따라서 본 발명은 아데닌 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 “알레르기 질환”이란 인체의 어떤 물질에 대한 과민증, 즉 외부로부터 들어온 물질에 대해 신체 면역계가 과도한 반응을 일으켜서 유발되는 질환을 말한다. 상기 알레르기 질환의 예로는 이에 한정되지는 않으나 기관지천식, 화분증, 알레르기비염, 담마진 (두드러기), 아나필락시스, 소화관 알레르기, 약물 알레르기, 알레르기성 결막염 및 아토피성 피부염등이 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만세포 탈과립 억제용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 아데닌 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 비만세포의 탈과립 억제 효과를 가지고 있다.

[0029] 본 발명의 일실시예에서는 활성화된 RBL-2H3 세포에서, 세포내 과립 안에 있던 β-hexosaminidase 효소가 탈과립 현상에 의해 세포 밖 버퍼 액으로 방출되는 정도를 측정했다. 아데닌은 투여량 의존적으로 RBL-2H3 세포에서 β-hexosaminidase의 방출을 저해했다. 최대 억제 투여량은 5 mM이었다.

[0030] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 사이토카인 발현 억제용 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 아데닌 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 사이토카인 억제 효과를 가지고 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에서는 활성화된 비만세포에 의해 방출되는 IL-3, MCP-1의 전사물 생산에서 아데닌의 영향을 Real-Time PCR로 측정했다. 아데닌은 IL-3과 MCP-1 등의 사이토카인 전사를 완벽하게 차단하였다.

[0033] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 아데닌(adenine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 아이코사노이드 생성 억제용 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 아데닌 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 비만세포의 아이코사노이드 생성 억제 효과를 가지고 있다.

[0035] 본 발명의 일실시예에서는 활성화된 RBL-2H3 세포가 아이코사노이드의 일종인 leukotriene B4를 합성하여 세포 밖으로 방출시키는 정도를 측정하였다. 세포를 30분 자극한 다음 세포 밖으로 방출된 leukotriene B4 양을 LTB4 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 아데닌은 투여량 1 mM에서 leukotriene B4 방출을 효과적으로 저해했다.

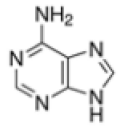
[0036] 아이코사노이드(eicosanoid)는 아라키돈산 및 리놀렌산(linolenic acid) 등과 같은 고도불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid)에서 유래하며, 세포 활성과 연관된 화합물의 어떤 종류를 지칭한다. 에이코사트리엔산(eicosatrienoic acid), 에이코사테트라엔산(eicosatetraenoic acid), 에이코사펜타엔(eicosapentaenoic acid)산 등의 탄소수 20의 불포화지방산 대사물을 총칭한다. 히드록시에이코사테트라엔산(hydroxyeicosatetraenoic acid) 또는 히드로퍼옥시에이코사테트라엔산(hydroperoxyeicosatetraenoic acid), 프로스타글란딘(prostaglandin), 트롬복산(thromboxane), 루코트리엔(leukotriene), 리폭신(lipoxin) 등의 아라키돈산 대사물이나 그의 유사물 및 그들이 화학적 수식된유도체 전부를 포함한다.

[0037] 상기와 같은 본 발명의 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물 또는 약학적 조성물은 아데닌 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0039] 본 발명의 아데닌은 각각 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 천연으로부터 분리 정제하거나, 상업적으로 구입하여 사용하거나 또는 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조할 수 있다.

[0040] <화학식 1>

[0041] 

[0042] 바람직하게, 아데닌은 세포의 핵산으로부터 분리/정제될 수 있다. 본 발명에 따른 아데닌은 유기용매 추출 등의 당업계에서 통상적으로 사용되는 공지의 방법에 의해 추출될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 아데닌은 그 자체 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 부여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키기 않는 것을 말하여, 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산 (free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산은 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한, 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0044]

[0045] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 아데닌 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다.

[0046] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0047] 본 발명의 알레르기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 경피 투여될 수 있다. 상기에서 '경피 투여'란 본 발명의 약학적 조성물을 세포 또는 피부에 투여하여 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 함유된 활성성분이 피부 내로 전달되도록 하는 것을 말한다. 예컨대, 본 발명의 약학적 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30 게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하는 방법, 또는 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다.

[0048] 또한, 상기 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.

[0049] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성 성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨,

만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0051] 본 발명의 아데닌의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 아데닌의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01 내지 1,000 mg, 가장 바람직하게는 0.1 내지 100 mg일 수 있다. 그러나 상기 아데닌의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 아데닌을 알레르기 질환의 예방 또는 치료제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

발명의 효과

[0052] 따라서 본 발명은 아데닌 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 염증 유발과 관련이 있는 비만세포내의 LTB4의 합성 억제, 탈과립 및 사이토카인 mRNA 생성을 억제함으로써 알레르기 질환에 효과적이므로 이들의 예방 및 치료의 목적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 아데닌에 의한 탈과립 억제 효과를 나타낸 것이다(Ag-: DNP-HSA를 처리 하지 않은 상태, Ag+: DNP-HSA를 처리한 상태).

도 2는 아데닌의 염형태인 아데닌 헤미설페이트(Adenine hemisulfate)에 의한 탈과립 억제 효과를 나타낸 것이다(Ag-: DNP-HSA를 처리 하지 않은 상태, Ag+: DNP-HSA를 처리한 상태).

도 3은 아데닌에 의해 염증 유발 분자인 leukotriene B4(LTB4) 생성 억제효과를 나타낸 것이다.

도 4는 RBL-2H3 세포내 사이토카인(IL-3) mRNA 전사 수준에서 아데닌의 영향을 나타낸 것이다(CN: control (PBS 사용)).

도 5는 RBL-2H3 세포내 사이토카인(MCP-1) mRNA 전사 수준에서 아데닌의 영향을 나타낸 것이다(CN: control (PBS 사용)).

도 6는 생쥐에 아데닌을 복강투여했을 시, 국소피부과민반응 억제 효과를 나타낸다. (Ad: 아데닌 처리, Control: 생리식염수 처리)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0055] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] **<실시예 1>**

[0057] **세포 배양**

[0058] RBL-2H3 세포(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)는 15% FBS(v/v)(PAA Lab. Canada), 페니실린 100 U/ml, 스트랩토마이신 100 μg/ml 이 포함된 EMEM(Lonza)에서 배양되었다. 배양은 5% CO_2배양기에서 37℃로 유지했다. 세포는 트립신 EDTA용액으로 분리했다. 세척 후, 세포들은 새 배지에서 재현탁되고 다음 실험에 사용되었다.

[0059] **<실시예 2>**

[0060] **탈과립 어세이(β-hexosaminidase 방출 어세이) 및 leukotriene B4 (LTB4) 측정**

[0061] RBL-2H3 세포(1×10^5/ml)를 100 ng/ml의 DNP 특이 IgE(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 하룻밤 동안 감작시켰다. Tyroide 버퍼에 3번 세척 후, 아데닌(Sigma-Aldrich) 및 아데닌 헤미설페이트(Sigma-Aldrich)의 투여량을 변화시켜 세포들을 30분 동안 37℃에서 노출시켰다. 배양 후 세포들은 100 ng/ml의 DNP-HSA(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 20분간 37℃에 두었다. 그 후에 상층액을 모아 방출된 β-hexosaminidase 및 LTB4를 측정하였다. 세포 안에 남아 있는 β-hexosaminidase 측정을 위해서 세포들을 5분간 0.5% triton X-100에 용해했다. 상층액 10 μl와 용해물을 50 μl의 기질용액(*p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide, 4 mM in citrate 0.1 M, pH 4.5)과 섞어 96 well plate에 각각 분주하고 37℃에서 1시간 배양했다. 0.2 M 글리신 (pH 10.7) 150 μl를 첨가해서 반응을 끝내고 microplate reader로 405 nM에서 흡광도를 측정했다. LTB4 측정을 위해서 상층액 100 μl를, LTB4 ELISA kit (Enzo Life Science, USA)를 사용하여 측정하였다. 시료 내에 있는 LTB4와 alkaline phosphatase와 결합된 LTB4를 경쟁적으로 anti-LTB4 antibody에 결합시킨 다음, alkaline phosphatase 기질을 넣어 발색시키고, 404 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0062] RBL-2H3 세포의 탈과립 지표로써, 세포내에 있던 β-hexosaminidase가 버퍼 액으로 방출되는 정도를 측정했다. [도 1] 및 [도 2]에서 보는 바와 같이 아데닌 및 아데닌 헤미설페이트는 최대 억제 투여량 5 mM로, 투여량 의존적으로 RBL-2H3 세포에서 β-hexosaminidase의 방출을 저해했다.

[0063] 또한 [도 3]에서 보는 바와 같이, 아데닌은 LTB4 생성을 억제 하였다. 따라서 아데닌은 비만세포의 탈과립과 아이코사노이드 LTB4 생성을 억제한다.

[0064] **<실시예 3>**

[0065] **사이토카인(IL-3 및 MCP-1) mRNA 측정**

[0066] RBL-2H3세포는 아데닌으로 <실시예 2>의 탈과립 어세이에 명시된 방법으로 감작되고 처리되었다. 그리고 DNP-HSA(100 ng/ml)으로 3 시간 동안 자극되었다. PBS로 세포들을 세척 후 easy BLUE RNA extraction kit으로 RNA를 추출했다. 전체 RNA 중 1 ㎍은 Reverse Transcriptase Master premix (5X)로 지시된 방법에 따라 cDNA를 합성하는데 쓰였다. 사이토카인 IL-3 및 MCP-1에 대한 사이토카인 mRNA를 측정하기 위해 합성된 cDNA는 프라이머와 SYBR Green reagent(Applied Biosystem)와 함께 Real-Time PCR에 사용되었다.

표 1

[0067]

서열 이름	서열	서열 번호
IL-3 (forward)	5' - TCCTGATGCTCTTCCACC - 3'	1
IL-3 (reverse)	5' - TCGCAGCTGCAGGAATACAACACT - 3'	2

MCP-1 (forward)	5' - TGGCAAGATGATCCCAAT - 3'	3
MCP-1 (reverse)	5' - AGGTGGTTGTGGAAAAG - 3'	4

[0068] IL-3, MCP-1의 전사물 생산에서 아데닌의 영향을 Real-Time PCR로 측정했다. [도 4] 및 [도 5]에서 보는 바와 같이, IL-3과 MCP-1 의 사이토카인 전사 수준에서 아데닌의 처리는 완벽한 차단을 나타냈다.

[0069] **<실시예 4>**

[0070] **국소피부과민반응(passive cutaneous anaphylaxis:PCA)**

[0071] IgE 항체중에서 dinitrophenyl (DNP)에 특이하게 결합하는 항체인 anti-DNP IgE를 생쥐(mouse strain DBA/1J)의 각 귀에 250 ng 씩 피하 주사하고, 24시간이 지난 다음 생쥐 몸무게 kg당 아데닌을 3.4 그리고 6.8 mg을 복강 주사하였다. 대조실험으로는 아데닌 대신 PBS를 복강 주사하였다. 1 시간 후에 10 mg/ml 농도의 DNP-HSA (dinitrophenyl-human serum albumin. human serum albumin에 DNP를 결합시킨 분자임)와 4% Evans blue 용액을 1:1 비율로 섞은 용액 200 μl를 생쥐의 꼬리 정맥에 주사 한다. 알러지 반응에 의해 혈관투과성이 증가한 부위로 Evans blue 용액이 혈관으로부터 유출된다. 30분 뒤에 생쥐의 귀를 여러 조각으로 잘라서 formamide 용액 500 μl에 넣고 섭씨 63도에서 밤새 방치하면 귀 혈관을 통해 유출된 Evans blue가 용액으로 나온다. Evans blue 620 nm 흡광도로 측정한다.

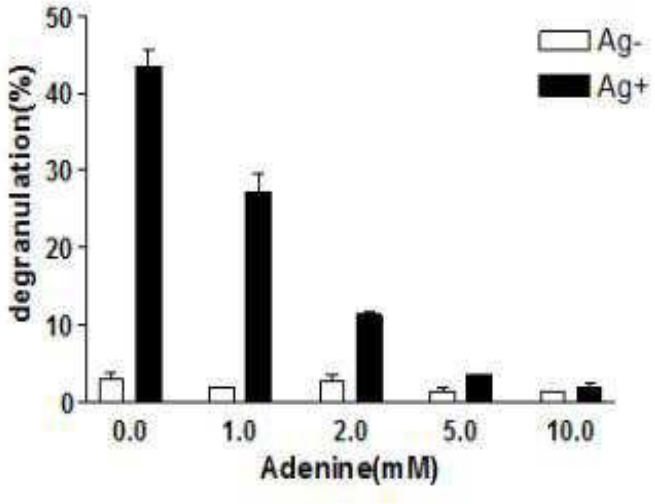
[0072] [도 6]에서 보는 바와 같이, 국소피부면역반응인 PCA로 실험 동물 모델의 국소피부조직에서 과민반응을 측정한 결과, 아데닌을 주사한 경우에 농도 의존적으로 Evans blue의 유출양이 적어졌다. 따라서 아데닌은 국소피부과민반응을 억제하는 것으로 나타났다.

산업상 이용가능성

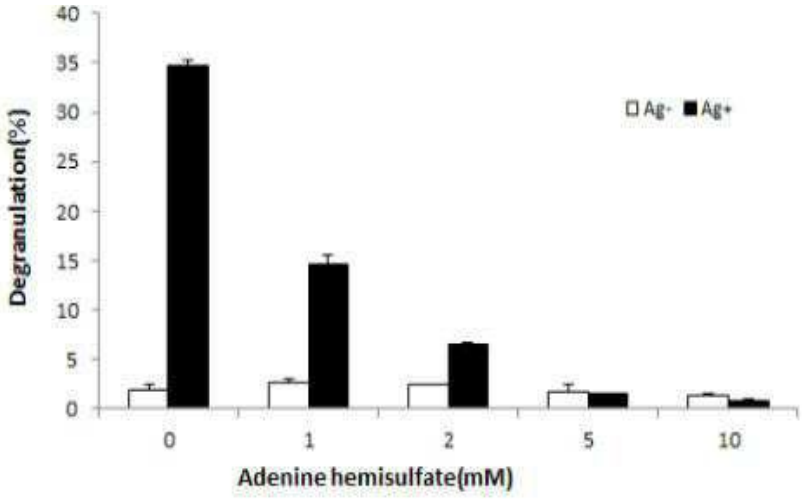
[0073] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 아데닌 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 알레르기의 원인 되는 비만세포의 leukotriene B4 (LTB4)의 합성 억제, 탈과립 및 사이토카인 mRNA 생성을 억제를 억제함으로써 알레르기 질환에 효과적이므로 이들의 예방 및 치료의 목적으로 사용할 수 있다.

도면

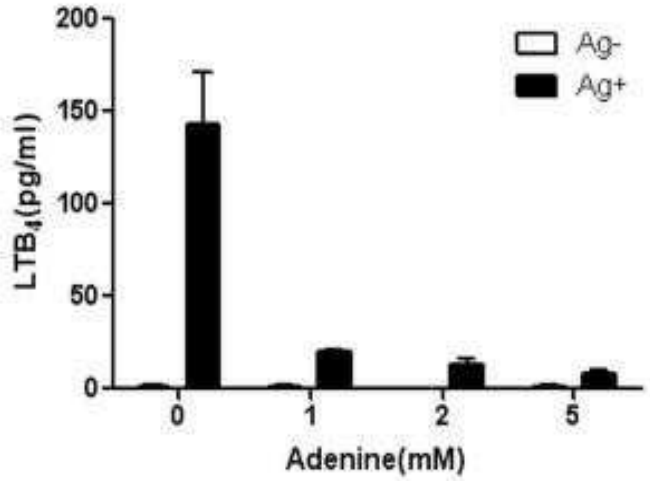
도면1


50
40
30
20
10
0
degranulation(%)
Ag-
Ag+
0.0
1.0
2.0
5.0
10.0
Adenine(mM)

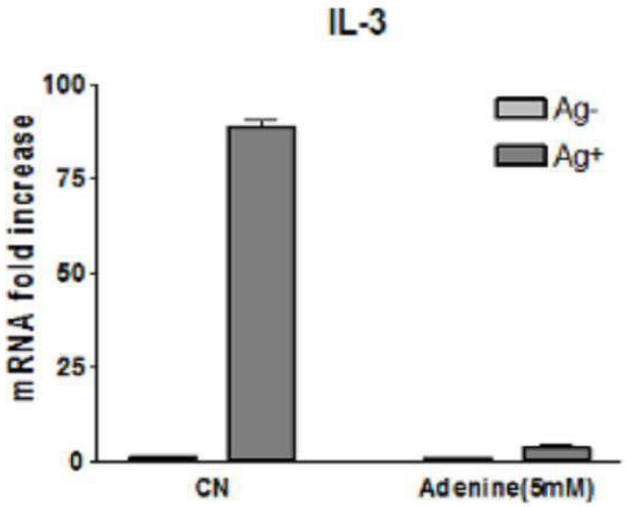
도면2


40
35
30
25
20
15
10
5
0
Degranulation(%)
Ag-
Ag+
0
1
2
5
10
Adenine hemisulfate(mM)

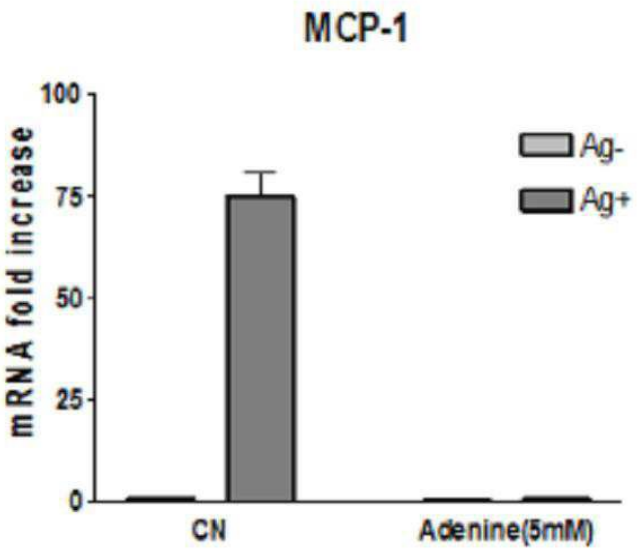
도면3


200
150
100
50
0
LTB4(pg/ml)
Ag-
Ag+
0
1
2
5
Adenine(mM)

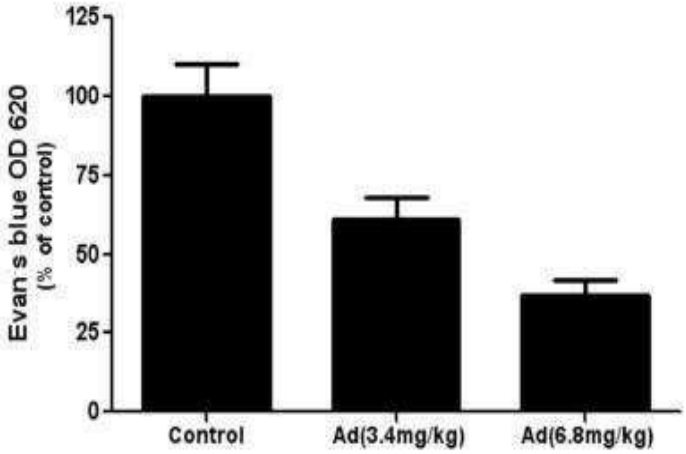
도면4


IL-3
100
75
50
25
0
mRNA fold increase
Ag-
Ag+
CN
Adenine(5mM)

도면5


MCP-1
mRNA fold increase
100
75
50
25
0
Ag-
Ag+
CN
Adenine(5mM)

도면6


Evan s blue OD 620
(% of control)
125
100
75
50
25
0
Control
Ad(3.4mg/kg)
Ad(6.8mg/kg)