(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0168652
(43) 공개일자 2024년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/223 (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61P 39/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/223 (2013.01)
A61P 11/06 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0066266
(22) 출원일자 2023년05월23일
심사청구일자 2023년05월23일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
오권익
강원도 춘천시 지석로 67 208동 1002호
아누프리아 굽타
강원도 춘천시 삭주로70번길 16-1. 301호 (교동)
(74) 대리인
구현서

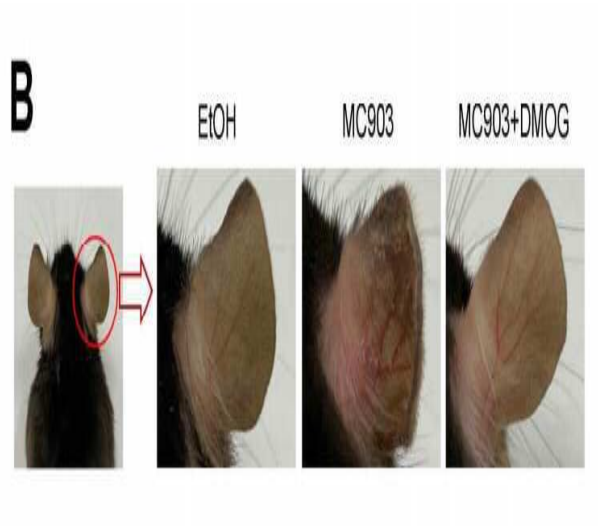
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **DMOG를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 천식 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 DMOG를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 및/또는 천식 치료용 조성물, 또는 그 DMOG를 유효성분으로 포함하는 조성물의 상피 세포 유래 사이토카인 생성 억제 용도, ROS 억제 용도 및 항염증 용도에 관한 것이다. 본 발명의 DMOG 화합물은 아토피성 피부염 및 천식 질환 치료제 후보물질로 사용될 가능성을 가진다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 39/06 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180033
과제번호	2021R1F1A1061547
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	아토피 피부염에서 저산소증 유도인자(HIF-1a)에 의한 염증 조절 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DMOG의 유효량은 마우스 기준으로 1mg/일 내지 4mg/일인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 14일 기간 처리하는 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염 치료용 조성물.

청구항 4

DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 천식 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 백혈구 침윤 및 기도 점액 축적을 회복시키는 것을 특징으로 하는 천식 치료용 조성물.

청구항 6

DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 상피 세포 유래 사이토카인 생성 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상피 세포 유래 사이토카인은 TSLP 또는 IL-33인 상피 세포 유래 사이토카인 생성 억제용 조성물.

청구항 8

DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 ROS(Reactive Oxygen Species) 억제용 조성물.

청구항 9

DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 1형 및 2형 사이토카인 모두를 하향 조절하고 필라그린 발현을 상향 조절하는 것을 특징으로 하는 항염증용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 조성물은 림프구 및 선천성 림프구 세포(innate lymphoid cells, ILC)와 독립적인 방식으로 작용하는 것을 특징으로 하는 항염증용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DMOG를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 또는 천식 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아토피 피부염은 재발성 습진과 심한 소양증을 특징으로 하는 만성 피부 염증 질환이다.

[0003] 아토피 피부염의 병리생리학은 복잡하나 면역세포 (2형 도움 T 세포(TH2)와 2형 선천성 림프구 세포(ILC2s))에 의해 유발되는 피부 염증이 발병에 중요한 역할을 담당한다. 그 외 필라그린을 암호화하는 유전자의 돌연변이 및 기능 상실로 인한 피부 장벽 기능 장애 역시 아토피 피부염 발병의 중요한 원인이다. 면역세포 및 피부 장벽 기능 손상은 상호 작용하며 아토피 피부염 발병을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 필라그린 결핍은 피부 장벽 손상으로 이어지며, 이는 피부에서 TH2 세포의 침투 및 세균 감염을 촉진시킨다. 피부로 침투한 TH2 세포는 2형 염증을 유발하고, 피부 장벽 기능을 더욱 손상시켜 가려움증과 조직 손상을 악화시킨다. 일부 아토피 피부염 환자에서 알레르기성 비염, 음식 알레르기 및 천식과 같은 다른 알레르기 질환을 순차적으로 앓을 수 있으며, 이를 "아토피 마치(atopic march)"라 부른다. 아토피 마치는 아토피 피부염이 피부에만 국한되지 않은 전신질환임을 시사한다. 아토피 피부염은 최근 유병률이 증가하고 있으며 제한된 의료 자원에 상당한 부담이 된다. 또한 아토피 피부염에 대한 치료법은 아직 확립되지 않아 새로운 치료법 개발이 시급하다.

[0004] MC903(칼시포트리올)은 칼슘 대사를 방해하지 않는 비타민 D 유사체이다. 건선 환자에게 치료용으로 사용되었으며 일부 건선 환자에서 부작용으로 자극성 피부 염증을 유발하였다. MC903을 마우스에 사용하는 경우, MC903은 마우스 피부 각질 세포에서 TSLP 발현을 증가시키고 아토피 피부염과 유사한 피부염증을 유발한다. TSLP 수용체는 ILC2를 비롯한 다양한 면역세포에서 발현되며, TSLP와 그 수용체의 상호작용은 ILC2를 활성화시켜 IL-5, IL-13과 같은 2형 사이토카인을 생성하고 호산구, 호염구, 수지상 세포, TH2 세포를 자극한다. 궁극적으로 이와 같은 일련의 반응은 아토피 피부염과 유사한 피부 염증을 일으키며, 마우스 MC903 피부 염증 모델은 아토피 피부염을 모방하는 마우스 질환모델로서 사용된다.

[0005] 저산소증 유도 인자(HIF)는 산소에 민감한 소단위(HIF-1α 또는 HIF-2α)와 산소와 무관하게 발현하는HIF-β소단위로 구성된 이종이량체 단백질이며, 저산소 환경에 의해 유도되는 유전자 발현을 조절한다. 산소가 풍부할 때 HIF-α는 철 의존성 프롤릴 수산화효소(PHD)에 의해 수산화된 후 VHL(von Hippel-Landau) 유비퀴틴 리가아제의 도움으로 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 통해 조기에 분해된다. 반대로, 저산소 상태에서는 PHD의 활동이 억제되며 그 결과 안정된 HIF-α가 HIF-β와 결합한 후 저산소증 연관 유전자의 전사 조절과 반응성 산소종(ROS) 발생을 억제시키는 역할을 담당한다..

[0007] [선행 특허 문헌]

[0008] 대한민국 공개특허번호 제 10-2011-0039708호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 아토피성 피부염 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 신규한 천식 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 상피 세포 유래 사이토카인 생성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 ROS 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 항염증용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 DMOG의 유효량은 마우스 기준으로 1mg/일 내지 4mg/일인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 14일 기간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 또한 본 발명은 DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 천식 치료용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 백혈구 침윤 및 기도 점액 축적을 회복시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0020] 또 본 발명은 DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 상피 세포 유래 사이토카인 생성 억제용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상피 세포 유래 사이토카인은 TSLP 또는 IL-33인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0022] 또 본 발명은 DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 ROS(Reactive Oxygen Species) 억제용 조성물을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 DMOG(dimethyloxalylglycine)를 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 1형 및 2형 사이토카인 모두를 하향 조절하고 필라그린 발현을 상향 조절하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 림프구 및 선천성 림프구 세포(innate lymphoid cells, ILC)와 독립적인 방식으로 작용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0026] 한편, 상기 치료용 조성물에는 약제학적으로 허용되는 염 및/또는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 매질, 특히 멸균된 물, 생리식염수, 식물성 기름, 유화제, 현탁제, 계면 활성제, 안정제, 향미제(flavoring agent), 부형제(excipient), 매개제(vehicle), 보존제, 결합제 등을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 염"이란 환자의 치료에 적합한 산 부가 염 또는 염기 부가 염을 의미한다. "약제학적으로 허용되는 담체"란 무독성 용매, 분산제, 부형제, 보조제 또는 활성 성분과 혼합되어 약제학적 조성물, 즉 환자에게 투여할 수 있는 투여 제형을 형성할 수 있는 기타 물질이다.

[0027] 상기 "치료"는 상기 질환의 경감, 예방, 치료를 모두 포함하는 의미이다.

[0028] 인간이나 마우스, 랫, 기니피그, 토끼, 고양이, 쥐, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비, 침팬지 등 동물들의 의약으로 사용하기 위해 본 발명의 화합물을 투여할 때에는, 이 화합물을 직접적으로 투여되거나, 기존의 조제 방법을 이용해 1회 분량으로 제작해 투여할 수 있다. 예를 들면, 필요한 경우, 이러한 의약들은 설탕으로 코팅된 알약이나 캡슐, 엘릭시르(elixir), 마이크로캡슐과 같이 경구투여가 가능한 것들일 수도 있고, 물이나 다른 약학적으로 가능한 액체로 된 현탁액(suspension)이나 무균용액(sterile solution)들이 든 주사제의 형태로 된 것, 즉 경구투여하지 않는 것들일 수도 있다. 예를 들어, 이러한 물질이나 화합물들은, 일반적인 의약사용을 위해 1회투약분이 개별단위로 포장된 형태(a unit dose form)로, 약학적으로 사용 가능한 담체 또는 매질, 특히 멸균된 물, 생리식염수, 식물성 기름, 유화제, 현탁제, 계면 활성제, 안정제, 향미제(flavoring agent), 부형제(excipient), 매개제(vehicle), 보존제, 결합제 등과 혼합될 수 있다. 이러한 의약 제조에서 지시된 가능한 범위 내에서 적절한 투여량으로 주성분의 양을 정하게 된다.

[0029] 알약이나 캡슐과 혼합될 수 있는 첨가물들은 예를 들면, 젤라틴(gelatin), 옥수수 전분, 트라가칸스 고무(tragacanth gum), 아라비아 고무 등 결합제들이나 셀룰로스 결정(crystalline cellulose)와 같은 첨가제들, 옥수수 전분, 젤라틴, 알긴산(alginic acid)등 팽윤제들(swelling agents), 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate)와 같은 윤활제들, 수크로스(sucrose), 락토스(lactose), 사카린 (saccharin) 등 감미료, 박하, 가울테리아 아데노트릭스(Gaultheria adenothrix) 기름, 체리와 같은 향미제 등이다. 만약 개별단위로 포장된 형태가 캡슐이라면, 기름과 같은 액체 운반체도 이러한 성분에 포함될 것이다. 주사액에 사용되는 증류수와 같은 매개제를 이용해 하기 일반적으로 의약을 사용하는 식으로 주사액에 사용되는 멸균된 합성물을 만들 수 있다. D솔비톨(sorbitol), D-만노스(mannose), D-마니톨(mannitol), 염화나트륨과 같은 보조제을 포함하는 등장성 용액, 글루코스, 생리식염수는 주사약 수용액으로 이용할 수 있다. 이러한 것들은 알콜, 특히 에탄올과 같은 적절한 용해화제(solubilizer)나 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 같은 폴리알콜(polyalcohol), 또는 HCO-50, 폴리솔베이트 80 (Polysorbate 80 (TM))과 같은 비이온성(nonionic) 계면활성제들과 함께 사용할 수 있다. 참기름이나 콩기름은 유성 액체(oleaginous liquid)로 이용가능한데, 벤질벤조에이트(benzyl benzoate)나 벤질알콜(benzyl alcohol)과 같은 용해화제, 인 완충용액(buffer) 또는 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액과 같은 완충용액, 염산프로카인(procaine hydrochloride)과 같은 마취제나 진통제, 벤질알콜이나 페놀과 같은 안정화제, 항산화제와 함께 사용할 수 있다. 이렇게 만들어진 주사약을

적절한 앰플(ample)에 넣는다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물을 환자에게 투약하는 데는, 피부 국소 적용, 동맥주사, 정맥주사, 경피주사(percutaneous injection),비강 내 투여, 근육 내 투여, 경구 투여와 같이 널리 알려진 방법들이 사용된다. 투약 시 1회 용량(dosage)이나 방법은 환자의 몸무게, 나이, 투약방법에 따라 다양하며, 이때 당업자는 적절한 투약방법을 용이하게 선택할 수 있다.

[0031] 게다가 그 물질이나 화합물을 DNA로 코딩할 수 있다면, 그 DNA를 유전자 치료를 위해 벡터에 삽입시키고, 그 벡터를 환자에게 투약해 치료를 할 수 있다. 그 투약 시 1회 용량 및 방법은 환자의 몸무게, 나이, 증세에 따라 달라지지만, 당업자는 이들을 용이하게 선택할 수 있다. 비경구 투약시, 환자나 의약이 목적하는 기관(organ), 증세, 투약방법에 따라 어느 정도 차이가 있다.

[0032] 본 발명은 본 명세서에 기재된 치료 물질이나 화합물을 하나 또는 그 이상 포함하는 약학적 또는 치료용 조성물을 포함한다. 선택적으로, 본 발명은 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약학적 또는 치료용 조성물의 제조를 위한, 본 문서에 기재된 하나 또는 그 이상의 치료제나 화합물의 용도도 제공한다.

[0033] 의약의 제조는, 국소 적용, 구강, 직장, 비강(nasal), 국소(볼이나 혀 밑을 포함한다), 질이나 비경구(근육내피하 또는 정맥을 포함한다)투약 또는 흡입(inhalation)이나 통기법(insufflation)을 통한 투약에 적합한 것들을 포함한다. 이 제법은 적당히, 무엇이든 간에 제약 업계에 잘 알려진 방법으로 만들 수도 있고, 분량 단위로 따로따로 편리하게 만들 수도 있다. 이러한 의약의 제법들은 모두 유효 화합물(active compound)들을 액체 담체나 세밀하게 분리된 고체 담체, 또는 필요하다면 양자 모두와 결합시키는 단계 및, 필요에 따라, 원하는 제제로 생산품을 만드는 단계를 포함한다.

[0034] 구강 투여에 적합한 의약의 제조는, 각각 유효 성분을 미리 계산한 만큼 포함한 알약이나 교갑제(cachet), 캡슐과 같이 분리된 단위 또는 분말이나 과립(granules) 또는 용액, 현탁액(suspension)이나 유상액(emulsion)으로 적당하게 만들 수 있다. 유효 성분은 예를 들면 담체 없이 순수한 형태 또는 페이스트(paste), 덩어리 연질약(bolus electuary)으로 될 수 있다. 구강 투여를 위한 알약이나 캡슐은 결합제(binding agent), 충전제, 윤활제, 붕해제나 습윤제(wetting agent)들과 같은 적당한 부형제들을 포함할 수 있다. 알약은 하나나 그 이상의 제조 성분들을 선택적으로 압축(compression) 또는 성형(molding)해서 만들 수 있다. 분말이나 과립과 같이 자유유동형태(free-flowing form)의 유효성분들이 결합제나 윤활제, 불활성 희석제(inert diluent), 윤활시키는, 계면활성 또는 분산제와 선택적으로 섞이는 적절한 기계 내에서 압축되어, 압출된 알약들이 만들어진다. 성형된 알약들은, 불활성 액체 희석제로 촉촉해진 가루 화합물의 혼합물을 적절한 기계 내에서 성형하여 만든다. 이 알약들은 당업계에 잘 알려진 방법들로 코팅할 수 있다. 예를 들면, 수성 또는 유성 현탁액, 용액, 유상액, 시럽(syrups)이나 엘릭세르의 형태로 구강액을 제작할 수 있고, 사용 전 물이나 다른 적합한 매개제와 조성(contitution)하기 위해 건조한 상품으로 제조할 수도 있다. 이러한 경구용 액체의 제조는 현탁제, 유상제, 비수성(non-aqueous) 매개제(식용유를 포함한다)나 방부제 등 종래의 첨가제를 포함할 수 있다. 이 알약들은 유효성분들이 유리되는 것을 통제하거나 천천히 제공되도록 제조될 수 있다.

[0035] 비경구 투약을 위한 조제는, 비후제(thickening agents) 및 현탁 물질이 포함된 수성 및 비수성 무균 현탁액; 과항산화제, 완충용액, 정균제(bacteriostats), 수혈자의 피와 등장의 제제인 용질을 포함하는 수성 및 비수성 무균 주사액을 포함한다. 이 제제는 바이알(vials)이나 밀봉된 앰플과 같이 다회용량(multi-dose)나 일회용량(unit dose)용 용기로 제작될 수도 있고, 사용 직전 식염수, 주사용 증류수(water for injection)와 같은 무균 액체 담체만 있으면 되는 냉동건조(동결건조)조건에서 보관할 수도 있다. 또한 계속주입(continuous infusion)을 위한 제제를 만들 수도 있다. 현탁액이나 임시주사용액(extemporaneous injection solution)으로 앞서 기재한 종류의 무균 분말이나 과립, 알약을 만들 수 있다.

[0036] 직장(rectal)투여 용 제제는 코코아 버터나 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 같은 일반적인 담체를 이용해 좌약으로 만들 수 있다. 입이나 혀 밑과 같이 입에 국소 투약을 위한 제제는 수크로스(sucrose), 아카시아나 트라가칸스 고무(tragacanth)와 같은 향이 나는 베이스를 주성분으로 하는 사탕정제(lozenge)와 수크로스와 아카시아 또는 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin)등을 유효성분으로 하는 패스틸(pastille)을 포함한다.

[0037] 본 발명의 화합물은 비강투여를 위해서 드랍(drop) 형태의 분산용(dispersible) 분말이나 액체 스프레이(spray)로 사용될 수 있다. 드랍은 하나나 그 이상의 현탁제나 용해제(solubilizing agent), 분산제(dispersing agent)로 구성된 수성 또는 비수성 베이스(base)로 만들 수 있다. 액체 스프레이는 기존의 방식대로 압축팩(pressurized packs)으로 운반된다.

[0038] 흡입으로 투여하기 위해서, 화합물은 주입기(insufflator), 분무기 (nebulizer), 압축팩이나 에어로졸 스프레이(aerosol spray)를 운반하는 다른 적당한 수단으로 적절히 운반될 수 있다. 압축팩은 디클로로디플루로메탄(dichlorodifluoromethane), 트리클로로플루오로메탄(trichlorofluoromethane), 디클로로테트라플루오로에탄(dichlorotetrafluoroethane), 이산화탄소나 기타 적절한 가스와 같은 적절한 추진제를 포함할 수 있다. 압축된 에어로졸의 경우, 용량이 제공된 밸브로 정해져, 측정량만큼 운반된다.

[0039] 또한, 흡입이나 통기법으로 투여하기 위해 이 화합물은 락토오즈(lactose)나 전분과 같이 적절한 분말 베이스나 화합물의 분말 조성물과 같이 건조한 분말 조성물의 형태가 될 수도 있다. 이 분말 조성물은, 분말이 흡입기나 주입기로 투여될 수 있도록 캡슐, 카트리지(catridges), 젤라틴이나 블리스터팩(blister packs)과 같은 단위용량 형태로 제조될 수 있다. 원하는 경우, 상기 기재된 제제들은 유효 성분들을 지속적으로 방출시키기 위해 변형될 수도 있다. 약학적 조성물은 또한 항균물질, 면역억제제나 보존제와 같은 다를 유효 성분을 포함할 수도 있다.

[0040] 본 발명의 제제는, 앞서 따로 언급한 성분들 외에도, 적절히 경구투여하기 위해 향미제를 포함하는 것과 같이, 필요한 제제 타입에 따라 당업계에 알려진 기존의 물질들을 포함할 수도 있다.

[0041] 약학적 조성물은 바람직하게는 피부 국소 적용이나, 비강 투여, (정맥이나 피하)주사로 투여되거나 경구투여되며, 피실험자에게 투여되는 정확한 양은 담당 의사의 재량이 될 것이다. 그러나 채택된 용량은, 피실험자의 나이나 성별, 치료받아야할 정확한 질환 및 그 심각한 정도 등 여러 요인에 따라 결정되어야 할 것이다. 또한 투여 과정은 상태와 위중한 정도에 따라 다양할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 화합물은 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 기타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 국소, 비강, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0045] 이하 본 발명을 설명한다.

[0046] 본 발명은 마우스 MC903 아토피 피부염 모델을 사용하여 저산소증과 DMOG가 아토피 피부염 발달에 미치는 영향을 조사했다.

[0047] MC903을 PHD 억제제 DMOG(dimethyloxalylglycine, 저산소증과 유사한 효과를 낸다)와 함께 적용했을 때

[0048] ① MC903에 의해 유발된 피부 염증이 현저히 감소했으며

[0049] ② 상피 세포 유래 사이토카인(TSLP, IL-33)의 발현 역시 감소하였다.

[0050] 재조합 TSLP와 IL-33 사이토카인을 추가로 처리한 경우, DMOG의 항 염증 효과는 사라졌으며 이는 DMOG의 항 염증 효과가 TSLP와 IL-33을 억제함으로써 나타난다는 것을 시사한다.

[0051] 본 발명의 결과는 PHD 억제제(DMOG)가 알레르기 질환에 대한 치료제로 사용될 수 있음을 시사한다.

[0052] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0053] 본 발명에서는 MC903으로 유도된 아토피 피부염 모델을 이용하여 PHD 억제제인 DMOG의 잠재적인 항 염증 효과를 조사하고자 하였다.

[0054] 본 발명자들은 DMOG가 MC903 처리 후, 수 일이 지난 다음 투여된 경우에도 다양한 농도에서 MC903 유발 피부염을 효과적으로 억제함을 관찰했다(도 1).

[0055] MC903은 호중구 및 호산구 모집, IL-4와 같은 염증성 사이토카인의 발현 증가, 필라그린 발현 억제를 특징으로 제2형 염증 반응을 유도했다(도 2).

[0056] 그러나 DMOG는 MC903에 의해 유도된 2형 염증반응을 억제하였다. 본 발명자들은 RAG-1 KO 마우스 연구결과에서

DMOG의 항 염증 효과가 T 또는 B 림프구에 대한 직접적인 작용보다는 피부 각질 세포에 대한 작용에 기인한다는 것을 발견했다(도 7).

[0057] T 와 B 림프구과 달리 DMOG의 항 염증 효과가 피부 각질 세포 외에 선천성 림프구 세포(ILC)를 통해 작용할 가능성을 완전히 무시할 수는 없다 (항 CD90 항체 처리 연구결과).

[0058] DMOG의 작용 메커니즘을 탐색하는 동안 MC903이 ROS 생산을 증가시키는 것을 관찰했다. ROS가 피부 각질 세포에서 TSLP 발현을 자극한다는 사실을 고려하여 DMOG가 ROS를 억제함으로써 TSLP 발현을 감소시킬 수 있다는 가설을 세웠다. 실제로 DMOG는 ROS를 효과적으로 억제했으며, ROS 제거제인 NAC도 DMOG와 유사하게 MC903 피부 염증을 억제하였다. 이러한 결과는 DMOG가 ROS를 억제함으로써 피부 각질 세포에서 TSLP 발현을 감소시켜 궁극적으로 아토피 피부염을 억제함을 시사한다.

[0059] 화합물 DMOG는 PHD 효소 억제제로 HIF 발현을 증가시킨다. HIF는 세린 합성 경로 및 엽산 대사를 촉진하여 미토콘드리아에서 항산화제 생성을 증가시킨다. HIF가 결핍된 세포는 과도한 ROS로 인해 다양한 이상(세포의 조기 사망 등)이 증가하는 것으로 보고되었다.

[0060] 이러한 결과를 바탕으로 DMOG가 HIF 의존적 방식으로 ROS 생성을 억제하고, TSLP 발현을 감소시켜, 결국 MC903 유발 피부 염증을 예방한다는 가설을 세웠다.

[0061] 마지막으로 아토피 피부염 외에 천식 질환 치료제로서의 DMOG의 가능성을 탐색하였다.

[0062] 본 발명자들은 파파인을 사용하여 폐 염증 모델을 만들고 DMOG가 제2형 폐 염증에 미치는 영향을 조사했다.

[0063] DMOG는 파파인에 의해 유도된 폐 염증을 효과적으로 억제하고, 피부에서 관찰된 바와 같이 상피 세포 유래 사이토카인 TSLP 및 IL-33의 발현을 감소시켰다(도 5).

[0064] 그러나 피부와 달리 필라그린 발현의 증가는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 DMOG가 피부와 폐 모두에서 상피 세포 유래 사이토카인의 생성을 억제하여 피부 및 폐에서 알레르기 반응을 억제함을 시사한다.

발명의 효과

[0065] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 DMOG(Dimethyloxalylglycine) 화합물은 아토피성 피부염 및 천식 질환 치료제 후보물질로 사용될 가능성을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 DMOG는 MC903으로 유발된 피부 염증을 억제하는 것을 나타낸 그림으로,

(A) 귀 붓기 반응의 시간 경과. 마우스는 14일 동안 MC903(각 귀에 10㎕의 EtOH에 0.5nmol/일)을 사용하여 양쪽 귀를 감작시킴. 귀 두께는 3-4일마다 측정됨.

(B) 뒤에서 찍은 오른쪽 귀의 대표 이미지가 표시됨.

(C) 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 귀의 조직학적 분석. 중간 그림의 삽입 그림은 염증 세포 침윤을 보여줌. 호중구는 화살표로 표시됨. 축척 막대: 100 ㎛

(D) 귀 붓기 반응의 시간 경과. DMOG 치료는 MC903과 동시에(파란색, d0~), 또는 MC903 처리 3일 후(빨간색, d3~) 또는 7일 후(녹색, d7~)에 시작되었다. 오른쪽 그래프는 14일째의 귀 두께를 보여줌.

(E) (D) 실험 결과 나타나는 마우스 귀의 대표 이미지.

(A, B, C, D, E)에 제시된 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 대표함.

풀링된 데이터는 (D, 오른쪽)에 표시되며 각 원은 개별 마우스를 나타냄.

데이터는 평균 ± SD로 표시됨.

NS, 유의하지 않음; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

도 2는 제2형 염증은 DMOG 처리로 개선되는 것을 나타낸 그림으로,

(A) MC903 또는 MC903 + DMOG로 처리된 귀의 유세포 분석. 골수(CD11b+) 및 림프(CD90+) 세포의 각 하위 집합의 백분율, ST2 및 계통 전사 인자(RORγT-bet)의 발현 수준이 표시됨.

(B) MC903 또는 MC903 + DMOG로 처리된 귀 조직에서 조혈 세포(CD45+), 골수 세포(CD11b+), 호중구(CD11b+Ly6G+), 호산구(CD11b+SiglecF+), 림프 세포(CD90+), αβT 세포(TCRβγδ의 세포수 T 세포(TCRγδ및 ILC(CD90+CD3$^-$) 세포의 수적 변화를 나타냄.

(C) MC903 또는 MC903 + DMOG로 처리된 귀 조직에서 IL-4, IL-13, IFN-γIL-17 및 필라그린 발현을qPCR을 이용하여 분석. 결과는 대조군에 비해 배수 변화로 표시됨.

데이터는 3개의 독립적인 실험을 대표함.

그래프(B)의 각 원은 개별 마우스를 나타냄.

데이터는 평균 ± SD로 표시됨.

도 3은 DMOG의 보호 효과는 rTSLP와 rIL-33을 추가함으로써 제거된다는 사실을 나타낸 그림으로,

(A) MC903-유도 염증 동안 TSLP, IL-33 및 IL-4 발현의 시간 경과. TSLP 및 IL-4의 표현은 왼쪽 축에 표시되고 IL-33의 표현은 오른쪽 축에 표시됨.

(B) MC903 또는 MC903 + DMOG로 처리된 귀에서 TSLP, IL-33 및 필라그린의 발현 수준. TSLP 및 필라그린의 경우 3일째; IL-33의 경우 5일째 각 유전자 발현을 RT-qPCR로 분석하였다. 결과는 컨트롤에 비해 배수 변경으로 표시됨.

(C) MC903, MC903 + DMOG 또는 MC903 + DMOG + rTSLP/rIL-33 처리 14일째 귀 두께의 범위.

(D) 상단: (c)에서 처리를 받은 오른쪽 귀의 이미지. 아래: (c)에서 처리를 받은 귀의 조직학적 분석(헤마톡실린 및 에오신 염색). 눈금 막대: 100 μm.

(E, F) rTSLP 및 rIL-33 보충 후 귀의 유세포 분석. 골수 세포(CD11b+) 집단은 게이팅되고 CD11b+ 집단에서 호중구(CD11b+Ly6G+) 및 호산구(CD11b+Siglec-F+)의 백분율이 표시됨(E). T 세포(CD4+, CD8+) 및 ILC(CD90+CD3-)에서 ST2 양성 세포의 백분율이 표시됨(F).

(G) MC903, MC903 + DMOG 또는 MC903 + DMOG + rTSLP/rIL-33 처리된 귀 조직에서 IL-4, IFN-γ및 IL-17의 발현 수준을 qPCR로 측정하였다. 결과는 컨트롤에 비해 배수 변경으로 표시됨.

모든 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 대표함.

풀링된 데이터는 (C)에 표시되며 각 원은 개별 마우스를 나타냄.

데이터는 평균 ± SD로 표시됨.

NS, 유의하지 않음; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

도 4는 ROS는 TSLP 발현에 대한 DMOG의 억제 효과를 매개한다는 것을 나타낸 그림으로,

(A) TNF 또는 TNF + DMOG로 처리된 HaCaT 세포에서 ROS 발현을 표시.

(B) TNF 또는 TNF + DMOG 또는 TNF + NAC로 처리된 HaCaT 세포에서 TSLP의 발현을 분석하였다. 상단: TSLP PCR의 겔 전기영동 이미지. 액틴은 로딩 컨트롤로 사용됨. 하단: TSLP 전기영동 이미지의 상대적인 양을 보여주는 그래프. 정량은 Image J 프로그램을 사용하여 수행되었다.

(C) MC903 또는 MC903 + DMOG로 처리된 귀에서 ROS의 면역형광 이미지. MC903 또는 MC903 + DMOG는 분석 18시간 전에 처리되었다.

(D)(C)의 형광 강도의 정량화.

(E) 3일째 TSLP mRNA 발현의 qPCR 분석.

(F) 14일째 NAC 처리 후 귀 두께의 정도.

(G) 상단: 오른쪽 귀의 이미지. 아래: 처리를 받은 귀의 조직학적 분석(헤마톡실린 및 에오신으로 염색됨). 눈금 막대: 100 μm.

(H) qPCR은 처리된 귀 조직에서 IL-4, IFN-γ 및 IL-17의 발현 수준을 측정했다. 결과는 대조군에 비해 배수 변화로 표시됨.

데이터는 3개의 독립적인 실험을 대표함.

풀링된 데이터는 개별 마우스를 나타내는 각 원과 함께 (F)에 표시됨.

데이터는 평균 ± SD로 표시됨.

NS, 유의하지 않음; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

도 5는 DMOG 처리가 파파인 유발 폐 염증을 완화한다는 것을 나타낸 그림으로,

(A) 파파인 또는 파파인 + DMOG 처리 후 BALF의 유세포 분석. 호산구(위, CD11c-SiglecF+) 및 호중구(아래, Ly6G+)의 백분율이 표시됨.

(B) BALF에서 조혈 세포(CD45+), 호산구 및 호중구의 세포 수.

(C) 폐 ILC(CD45+CD3-CD90+CD127+)에서 IL-5 및 IL-13의 발현을 유세포 분석기로 분석함.

(D) 처리된 귀의 조직학적 분석(H/E 또는 PAS로 염색됨). 눈금 막대: 100 μm.

(E) 폐 조직에서 TSLP, IL-33 및 필라그린 발현 수준의 qPCR 분석.

데이터는 2개 또는 3개의 독립적인 실험을 대표함.

그래프(B)의 각 원은 개별 마우스를 나타냄.

데이터는 평균 ± SD로 표시됨.

NS, 유의하지 않음; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

도 6은 DMOG가 용량 의존적으로 MC903-유도된 염증을 감소시키는 것을 나타낸 그림(도 6A, B)이고,

고 용량의 MC903 (2 nmol/ear)을 사용한 경우에도 효과적이라는 것을 나타낸 그림(도 6C, D).

도 7은 DMOG가 림프구와 무관하게 작용한다는 것을 나타낸 그림으로,

DMOG는 WT 및 RAG-1 KO 마우스 모두에서 피부 염증을 개선하여 귀 두께(도 7A), 형태학적 변화(도 7B) 및 염증 세포 침윤(그림 S2C)을 감소시키고,

다음으로 CD90 양성 ILC를 고갈시키기 위해 항-CD90 항체를 RAG-1 KO 마우스에 투여했고(도 7F).

항-CD90 처리 마우스의 귀는 대조군 마우스의 귀만큼 부풀어 오르지 않았으며(도 7D),

DMOG는 항 CD90 처리 RAG-1 KO 마우스에서 귀 부종을 감소시켰고(도 7D), DMOG의 항 염증 효과는 귀 형태에서도 명확하게 관찰되었음(도 7E).

도 8은 DMOG의 보호 효과가 rTSLP 처리에 의하여 감소되었지만(도 8A),

rTSLP로 처리된 귀는 MC903 단독 처리 만큼 손상되지 않았다는 것을 보여주는 그림(도 8B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0068] 본 발명에 사용된 마우스 및 처리는 다음과 같다.

[0069] 야생형(WT) C57BL/6(B6) 마우스는 Koatech(평택, 한국)로부터 입수하였다. RAG-1 녹아웃(KO)(B6.129S7-Rag1tm1Mom/J), 플록스 HIF1α (B6.129-Hif1atm3Rsjo/J), 플록스 HIF2α(Epas1tm1Mcs/J), K14Cre (B6N.Cg-Tg(KRT14-cre)1Amc /J) 마우스는 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)에서 구입했다.

[0070] 모든 동물 실험은 한림대학교 국제 동물 관리위원회(Hallym 2021-59)의 지침 및 승인에 따라 수행되었다. ILC를 고갈시키기 위해 항-CD90 항체(BioXcell, Lebanon, NH)를 이틀마다 i.p 투여하였다.

[0071] rTSLP 및 rIL-33 주사 실험을 위해, 62.5ng의 rTSLP 및 rIL-33(Biolegend, San Diego, CA)을 MC903 + DMOG와 함께 14일 동안 매일 피하 주사하였다.

[0072] 실시예 1: MC903 유도 쥐 AD 모델

[0073] MC903(calcipotriol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 DMOG(Frontier Scientific, Logan, UT)를 EtOH에 용해하고 마우스 귀에 국소 적용했다. 각 귀는 달리 명시되지 않는 한 매일 0.5nmol의 MC903 및 1mg의 DMOG 또는 동일한 부피의 EtOH(대조군 마우스)로 14일 동안 감작되었다. MC903 치료 기간 동안 마이크로미터(Mitutoyo, Kanagawa, Japan)를 이용하여 귀 두께를 측정하였다.

[0075] 실시예 2:조직 준비 및 유세포 분석

[0076] 귀를 다지고 0.1 mg/ml DNase I 및 0.1 mg/ml Liberase TL(Sigma-Aldrich)을 함유하는 2 ml HBSS에서 37℃에서 1시간 동안 소화시켰다. 그런 다음 현탁액을 70-μm 셀 스트레이너(SPL, 서울, 한국)에 통과시켰다. 표면 염색을 위해 세포를 암실에서 4° C에서 30분 동안 항체로 염색하였다. 세포내 염색을 위해 Foxp3 염색 완충액 세트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 세포를 염색하였다.

[0077] 항체에는 항-마우스 CD11b BV510(M1/70), CD11c BV421(N418), CD3 FITC(145-2C11), CD4 PE/Cy7(RM4-5), CD45 PE/Cy7 또는 BV510(30-F11), CD8 APC(53-6.7), CD90.2 APC/Cy7(30-H12), Ly-6G PerCP/Cy5.5(1A8), Siglec-F A647(E50-2440), TCRβ APC/Cy-7(H57) -597), TCRɣ/δ PerCP/Cy5.5(GL3), Gata-3 eFluor660(TWAJ), T1/ST2 비오티닐화(DJ8) 항체(모두 Biolegend, BD Biosciences, eBioscience 및 mdbioproducts로부터 구입).

[0078] FACS Canto-II(BD Biosciences, San Jose, CA)를 통해 데이터를 수집하고 FlowJo 소프트웨어(BD Biosciences)로 분석했다.

[0080] 실시예 3:세포 배양

[0081] 인간 각질세포 HaCaT 세포(ATCC)를 10% FBS/DMEM에서 5% CO_2의 가습 분위기 하에 37℃에서 배양하였다. 모든 세포 자극 실험에서 2×10^5 세포를 24-웰 플레이트의 각 웰에 사용하였다. 세포가 80% 컨플루언스까지 성장하면 TNF-α로 2시간 동안 자극한 다음 RNA 추출을 위해 Trizol(Thermo Fisher Scientific)에서 수확했다.

[0083] 실시예 4:ROS 감지

[0084] 세포 내 ROS 수준은 DCFH-DA(Sigma-Aldrich)를 사용하여 검출되었다. DCFH-DA를 무혈청 배지에서 1:1000으로 최종 농도 10 μM로 희석했다. 희석된 DCFH-DA를 배양 접시에 첨가하여 세포를 충분히 덮은 후 세포 배양기에서 20분 동안 배양하였다. 세포를 무혈청 배지로 3회 세척하여 세포에 들어가지 않은 여분의 DCFH-DA를 충분히 제거하였다. 세포를 채취하여 여기 파장 488 nm, 방출파장 525 nm에서 형광강도를 측정하였다.

[0086] 실시예 5:디하이드로에티듐(DHE) 염색

[0087] 모든 마우스는 희생 전 1시간 동안 DHE(10mg/kg)를 복강내 주사했다. 귀를 조심스럽게 수집하고 밤새 4% 파라포름알데히드에 후-고정했다. 냉동 절편을 위해 귀를 Frozen Section Compound(FSC 22 Clear, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)에 내장했다. 귀는 암 조건에서 20 μm 두께로 절단되었다. 절편된 슬라이드를 실온에서 10분 동안 PBS로 3회 세척한 다음, 암 조건에서 37℃에서 최소 15분 동안 건조하고 D.P.X(Sigma-Aldrich)로 커버 슬립했다. 염색된 귀 조직을 여기 500-530 nm/방출 590-620 nm에서 형광 현미경(Carl Zeiss, Baden-Wurttemberg, Germany)으로 관찰하였다. 형광 강도는 Zeiss Zen Blue 소프트웨어를 사용하여 0.310mm2(축척 막대 = 100μm) 영역에 대한 귀의 적색 형광에 대해 정량화되었다.

[0089] 실시예 6:파파인 유발 천식 모델

[0090] WT 생쥐를 4일 동안 매일 20μg의 파파인(Sigma-Aldrich)과 2mg의 DMOG 또는 PBS로 비강 내로 처리했다. 다음 날, BAL(bronchoalveolar lavage) 유체 및 폐를 유동 세포측정 및 조직학에 의한 검사를 위해 수집하였다.

[0091] 본 발명의 상기 실시예의 통계 분석은 양측, 짝이 없는 스튜던트 t-검정을 사용하여 그룹 간 차이의 통계적 유

의성을 계산했다.

[0092] p 값은 다음과 같이 표시된다. ***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05인 반면, 유의하지 않은 NS는 P 값 > 0.05를 나타내는 데 사용된다. 오류 막대는 s.d.를 나타낸다.

[0094] 상기 실시예의 결과를 상술한다.

[0095] DMOG는 MC903으로 유발된 피부 염증을 감소시킴.

[0096] MC903은 마우스에서 제2형 피부 염증을 일으키고 알츠하이머병 유사 증상을 유발하는 것으로 알려져 있다. MC903은 매일 귀에 단독으로 또는 DMOG와 함께 적용되었다. 그런 다음 시간 경과에 따라 귀의 두께를 측정하여 염증의 정도를 모니터링했다.

[0097] MC903으로 처리한 지 14일 후에 비히클(EtOH)로 처리한 귀에 비해 귀가 점차 부어 오르고 2배 더 두꺼워졌다(도 1A).

[0098] MC903으로 처리된 귀는 또한 12일째에 표피가 벗겨지기 시작하면서 발적, 부종 및 인설을 보였다(도 1B).

[0099] 조직학적 분석은 또한 표피 증식 및 염증 세포 침윤을 밝혀냈다(도 1C 및 삽입).

[0100] 그러나 MC903을 DMOG와 함께 적용했을 때 DMOG가 MC903에 의해 유도된 2형 염증을 예방한다는 것을 관찰했다(도 1B).

[0101] 실제로 DMOG는 용량 의존적 방식으로 MC903 유발 염증을 감소시켰고(그림 S1A, B) 고용량의 MC903을 사용한 경우에도 효과적이었다(도 6C, D).

[0102] 더욱이, DMOG 처리가 3일 또는 7일 동안 지연된 경우에도 DMOG는 여전히 귀 부종(도 1D)을 방지하고 홍반 및 스케일링을 감소시켰다(도 1E).

[0103] 귀 피부의 면역학적 변화를 유세포 분석법으로 평가했다. 대조군 마우스(EtOH로 처리)에서 림프구(CD90+) 및 골수(CD11b+) 세포 집단의 빈도는 비슷하거나 더 많은 림프구 세포가 있었다. 그러나 MC903을 처리한 귀에서는 호중구(CD11b+Siglec-F-Ly6G+)와 호산구(CD11b+Siglec-F+)를 포함한 골수 세포의 빈도가 극적으로 증가했다(도 2A, 왼쪽).

[0104] 또한 MC903 처리는 TCRβ+ 세포의 빈도를 증가시켰고 CD4+ 세포에서 T-bet 및 ST2와 같은 TH1 및 TH2 마커를 상향 조절했지만 TH17 특정 전사 인자 RORγ-t의 발현은 증가시키지 않았다(도 2A, 오른쪽).

[0105] 우리는 또한 각 세포 집단의 절대 수를 계산하고 MC903 처리된 귀에 더 많은 골수 세포, T 세포 및 ILC가 있음을 발견했다(도 2B).

[0106] 그러나 귀 두께 결과와 유사하게 DMOG는 T-bet 및 ST2의 발현 수준(도 2A, 오른쪽)과 모든 염증 하위 집합의 세포 수(도 2B)를 감소시켰다.

[0107] DMOG의 작용 방식을 이해하기 위해 전 염증성 사이토카인과 장벽 단백질 필라그린의 발현을 테스트했다. 본 발명자들은 유형 2(IL-4, IL-13) 및 유형 1(IFN-γ) 사이토카인이 모두 상향 조절되고 필라그린의 발현이 MC903에 의해 하향 조절됨을 발견했다. 반대로, DMOG는 1형 및 2형 사이토카인 모두를 하향 조절하고 필라그린 발현을 상향 조절했다(도 2C).

[0108] 종합하면, MC903은 혼합형 1형 및 2형 피부 염증(비록 2형 염증이 지배적이지만)을 유도했으며, 이는 DMOG에 의해 억제되었다.

[0110] DMOG는 림프구 독립적인 방식으로 작용함.

[0111] MC903으로 유도된 AD 모델에서 CD4+ T 세포와 ILC2가 모두 활성화되고 IL-4와 IL-13을 생성하여 피부 염증에 기여한다. 또한 HIF-1이 1형 및 3형 면역을 증강시키는 것으로 보고되었다. 이것은 DMOG가 TH1 또는 TH17 세포 분화를 촉진함으로써 2형 염증을 억제하는지에 대한 의문을 제기했다. DMOG의 항 염증 효과가 림프구와 ILC에 의존하는지 여부를 확인하기 위해 항 CD90 항체 처리 유무에 관계없이 RAG-1 KO 마우스에서 MC903 실험을 수행했다.

[0112] MC903은 RAG-1 KO 마우스에서 WT 마우스만큼 효과적으로 염증을 유발했다.

[0113] DMOG는 또한 WT 및 RAG-1 KO 마우스 모두에서 피부 염증을 개선하여 귀 두께(도 7A), 형태학적 변화(도 7B) 및 염증 세포 침윤(도 7C)을 감소시켰다.

[0114] 다음으로 CD90+ ILC를 고갈시키기 위해 항-CD90 항체를 RAG-1 KO 마우스에 투여했다(도 7F).

[0115] 항-CD90 처리 마우스의 귀는 대조군 마우스의 귀만큼 부풀어 오르지 않았으며(도 7D), 이는 MC903 모델에서 ILC의 필수적인 역할을 암시한다. 그럼에도 불구하고 DMOG는 항 CD90 처리 RAG-1 KO 마우스에서 귀 부종을 감소시켰다(도 7D).

[0116] DMOG의 항염증 효과는 귀 형태에서도 명확하게 관찰되었다(도 7E). 이러한 결과는 DMOG가 MC903에 의해 유발된 피부 염증을 림프구 및 ILC 독립적인 방식으로 감소시킬 수 있음을 시사하며, 이는 우리가 피부 각질 형성 세포에 관심을 갖도록 유도했다.

[0118] DMOG는 피부 각질 세포가 사이토카인을 생성하는 것을 방지함.

[0119] 제2형 면역은 주로 IL-4 및 IL-13과 같은 림프구에 의해 생성되는 사이토카인과 관련이 있지만, 최근 연구에 따르면 상피 세포 유래 사이토카인(TSLP, IL-33 및 IL-25)도 그 개시에 역할을 하는 것으로 나타났다.

[0120] 시간 경과에 따른 이러한 사이토카인의 발현을 조사하기 위해 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일에 RT-qPCR을 수행한 결과 TSLP 및 IL-33이 피부 염증의 초기 단계, 특히 3일에 상향조절됨을 발견했다. 그리고 5일째. IL-4는 9일째에 상향조절되기 시작했으며(도 3A) IL-25의 발현은 이 설정에서 감지되지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0121] DMOG를 적용했을 때 TSLP와 IL-33의 발현은 각각 3일과 5일에 크게 감소했으며(도 3B) DMOG가 이러한 사이토카인을 하향 조절하여 2형 염증을 예방할 수 있음을 시사한다. 본 발명자들은 다음으로 필라그린 발현을 조사한 결과 필라그린이 MC903에 의해 하향 조절되고 3일째에 DMOG에 의해 복원되지 않는다는 것을 발견했다(도 3B, 오른쪽).

[0122] 종합하면, 이러한 결과는 DMOG가 TSLP 및 IL-33을 하향 조절함으로써 MC903 유발 피부 염증을 억제하여 14일째에 필라그린의 발현을 회복시키는 데 도움이 된다는 것을 시사한다(도 2C).

[0123] 다음으로 MC903+DMOG 처리 마우스에 재조합 TSLP(rTSLP)를 보충하고 귀 두께를 모니터링했다. DMOG의 보호 효과는 rTSLP 처리에 의해 감소되었지만(도 8A), 귀는 MC903 단독으로 처리한 것만큼 손상되지 않았다.(도 8B).

[0124] IL-33은 또한 2형 염증에서 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명자들은 마우스를 rTSLP와 재조합 IL-33(rTSLP/rIL-33)으로 공동 처리했다. 놀랍게도, DMOG의 보호 효과는 제거되었고, 귀 부종 및 손상은 MC903 단독으로 처리된 마우스와 유사했다(도 3C).

[0125] 조직학적 분석은 MC903 처리된 귀에서와 유사한 rTSLP/rIL-33 처리된 귀에서 표피 증식 및 염증 세포 침윤을 드러냈다(도 3D). FACS 분석은 또한 rTSLP/rIL-33 처리 후 호중구, 호산구(도 3E), ST2-발현 TH2 및 ILC2(도 3F) 집단의 증가를 보여주었다.

[0126] IFN-γ가 아닌 IL-4도 사이토카인 처리에 의해 상향 조절되었으며(도 3G), 이는 IFN-γ의 발현이 DMOG에 의해 다른 방식으로 조절됨을 시사한다.

[0127] 종합적으로, 이러한 결과는 DMOG가 TSLP 및 IL-33과 같은 상피 세포 유래 사이토카인을 억제함으로써 제2형 염증을 예방할 수 있음을 입증했다.

[0129] DMOG는 ROS를 통해 TSLP를 하향 조정함.

[0130] 본 발명자들은 체외 모델을 사용하여 TSLP 발현에서 DMOG의 역할을 조사했다.

[0131] 구체적으로, 인간 각질세포 세포주인 HaCaT 세포를 활용하여 DMOG와 함께 TNF-α에 노출시켰다. 그런 다음 RT-PCR을 사용하여 TSLP 발현을 측정했다.

[0132] DMOG는 TNF-α 유발 TSLP 발현을 효과적으로 억제했다(도 4B 참조). 인간 TSLP 프로모터 서열의 추가 분석은 TSLP 전사 시작 부위의 -62, -836 및 -2405 염기 업스트림에서 3개의 추정 저산소증 반응 요소를 밝혀냈다.

[0133] DMOG가 HIF를 안정화하고 HIF가 TSLP 프로모터 영역에 결합하도록 하여 TSLP 발현에 대한 억제 효과를 발휘하는지 여부를 조사하기 위해 항-HIF-1 및 항-HIF-2 항체를 사용하여 염색질 면역침전 분석을 수행했다. 그러나 이 경우 HIF가 이러한 추정 사이트에 결합한다는 증거를 식별할 수 없었다.

[0134] keratinocytes에서 ROS에 의해 매개되는 염증 신호가 TSLP 발현 및 TH2 반응에 중요하다는 점을 고려하여 MC903 유발 피부 염증에서 ROS와 DMOG 간의 관계를 조사하기로 결정했다.

[0135] 본 발명자들은 먼저 DMOG 처리 후 HaCaT 세포에서 ROS 수준을 측정했고 DMOG가 ROS 수준을 감소시키는 것을 발견했다(도 4A).

[0136] ROS가 TSLP 발현에 관여하는지 여부를 확인하기 위해 ROS 스캐빈저인 NAC(N-acetylcysteine)로 ROS를 차단하고 TSLP 발현을 분석했다. 놀랍게도 NAC는 DMOG만큼 효율적으로 TSLP 발현을 억제했다(도 4B).

[0137] 그 후, 본 발명자들은 귀 피부에서 ROS의 발현 수준을 평가하기 위해 형광 염료 DHE를 투여했다. DHE 신호는 MC903 처리된 귀에서 검출되었지만 DMOG에 의해 방지되었다(도 4C).

[0138] 본 발명자들은 NAC를 사용하여 ROS의 역할을 추가로 조사한 결과 MC903 유발 피부 염증에 대한 NAC의 효과가 TSLP 발현(도 4D), 귀 두께(도 4E), 조직학적 변화(도 4F) 및 사이토카인 발현(도 4G) 측면에서 DMOG의 효과와 유사하다는 것을 발견했다. .

[0139] 따라서 본 발명자들은 DMOG가 ROS 축적을 방지함으로써 피부 각질세포에서 TSLP의 생성을 억제한다고 결론지었다.

[0141] 파파인 유발 폐 염증은 DMOG에 의해 개선됨.

[0142] 파파인은 직업성 천식을 유발하고 TSLP, IL-33 및 ILC2의 상호작용을 통해 생쥐에서 폐 염증을 유발하는 것으로 알려진 프로테아제이다.

[0143] 파파인 유도 폐 및 MC903 유도 피부 염증 기전의 유사성을 고려하여 파파인 유도 천식 모델에서 DMOG의 항염증 효과를 조사하고자 했다. 파파인의 비강내 투여 후 기관지 폐포 세척액(BAL)액에서 호산구(CD11b+CD11c-Siglec-F+) 및 호중구(CD11b+Siglec-F^{-}Ly6G+) 수(도 5A, B) 뿐만 아니라 IL-5 또는 IL-13을 발현하는 폐 ILC2의 빈도(도 5C)가 크게 증가한 것을 발견했다.

[0144] 그러나 DMOG의 공동 투여는 호산구 및 호중구 수의 감소와 IL-5 및 IL-13 발현 ILC2의 빈도 감소로 입증된 바와 같이 이러한 변화를 역전시켰다(도 5A-C).

[0145] 특히, DMOG 처리는 또한 조직화학적 염색에 의해 밝혀진 바와 같이 백혈구 침윤 및 기도 점액 축적을 회복시켰고(도 5D), 파파인 처리된 마우스에서 관찰된 확대된 종격동 림프절을 정상화했다(데이터는 표시되지 않음).

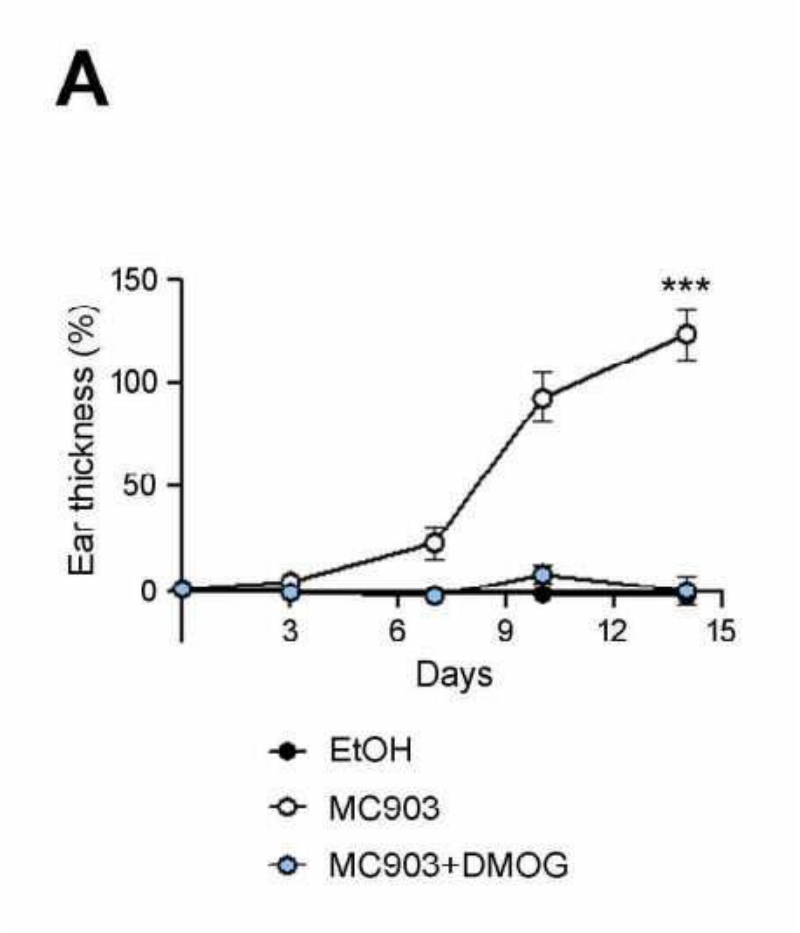
[0146] DMOG와 상피 세포 유래 사이토카인 사이의 관계를 조사하기 위해 폐에서 TSLP, IL-33 및 필라그린의 발현을 평가했다.

[0147] 본 발명자들은 TSLP와 IL-33 발현 모두 DMOG에 의해 하향 조절되는 반면 필라그린 발현은 낮게 유지되고 크게 영향을 받지 않는다는 것을 발견했다(도 5E).

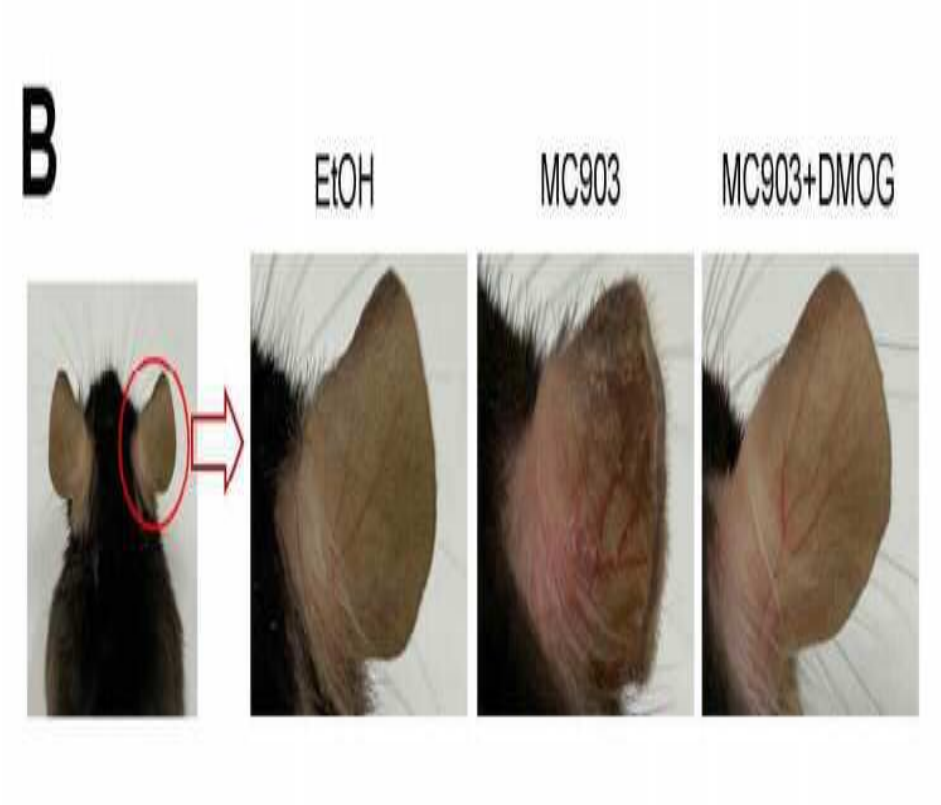
[0148] 본 발명의 결과는 DMOG가 파파인 유발 천식에서도 항염증제로서의 잠재력을 가지고 있으며 상피 세포 유래 사이토카인의 발현을 조절함으로써 그 효과를 발휘할 수 있음을 시사한다.

도면

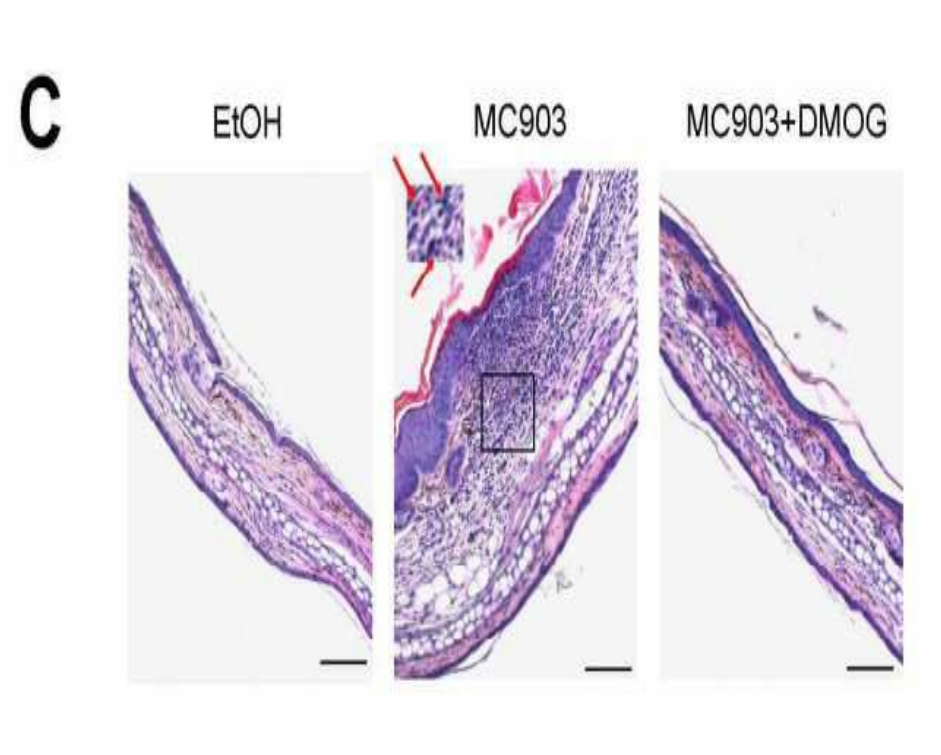
도면1a


A
150
100
50
0
Ear thickness (%)
***
3
6
9
12
15
Days
EtOH
MC903
MC903+DMOG

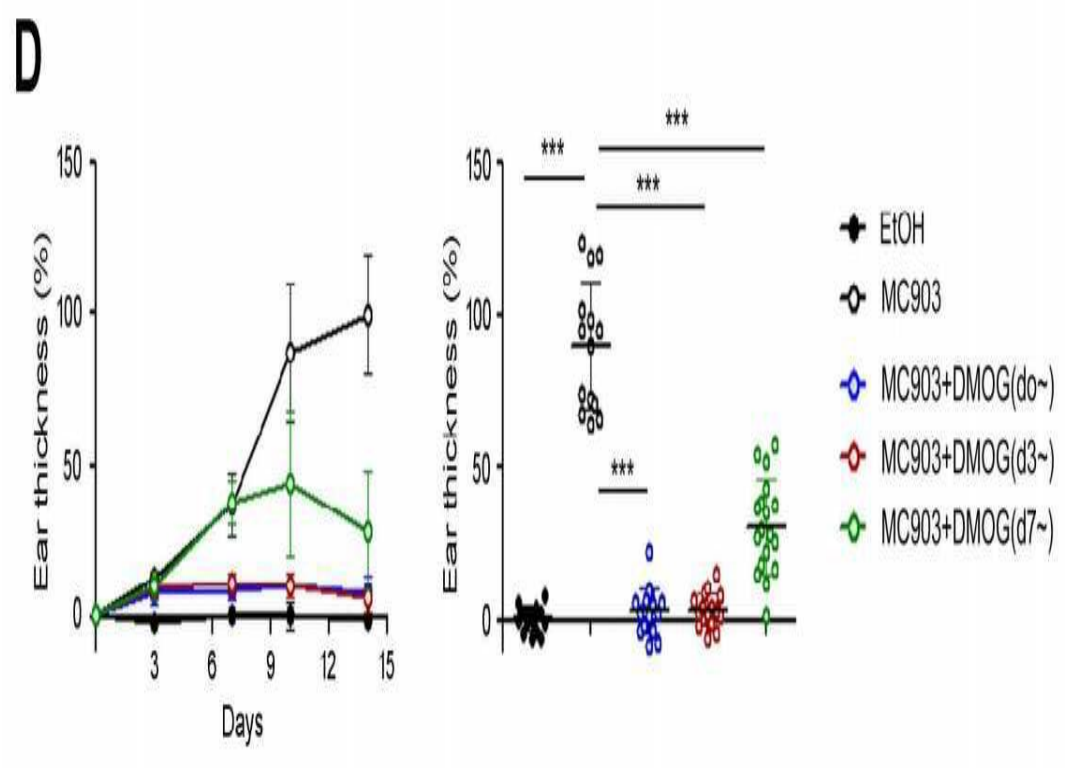
도면1b



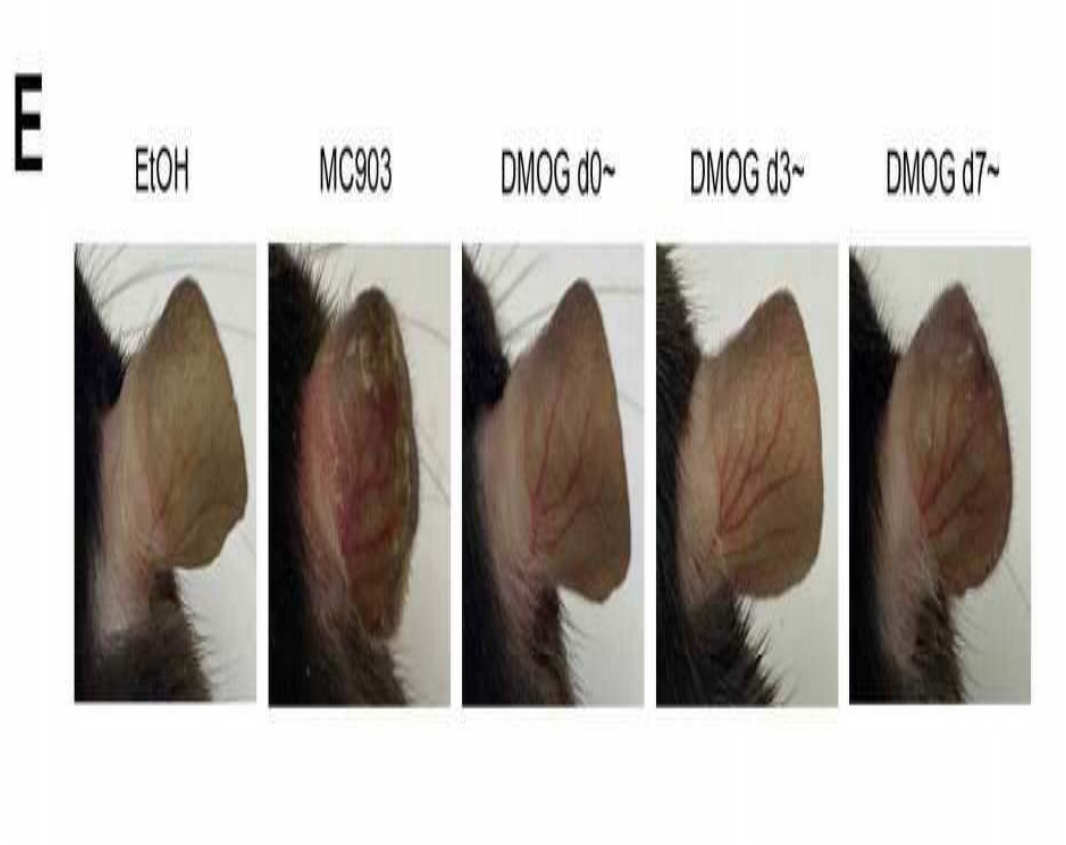
도면1c



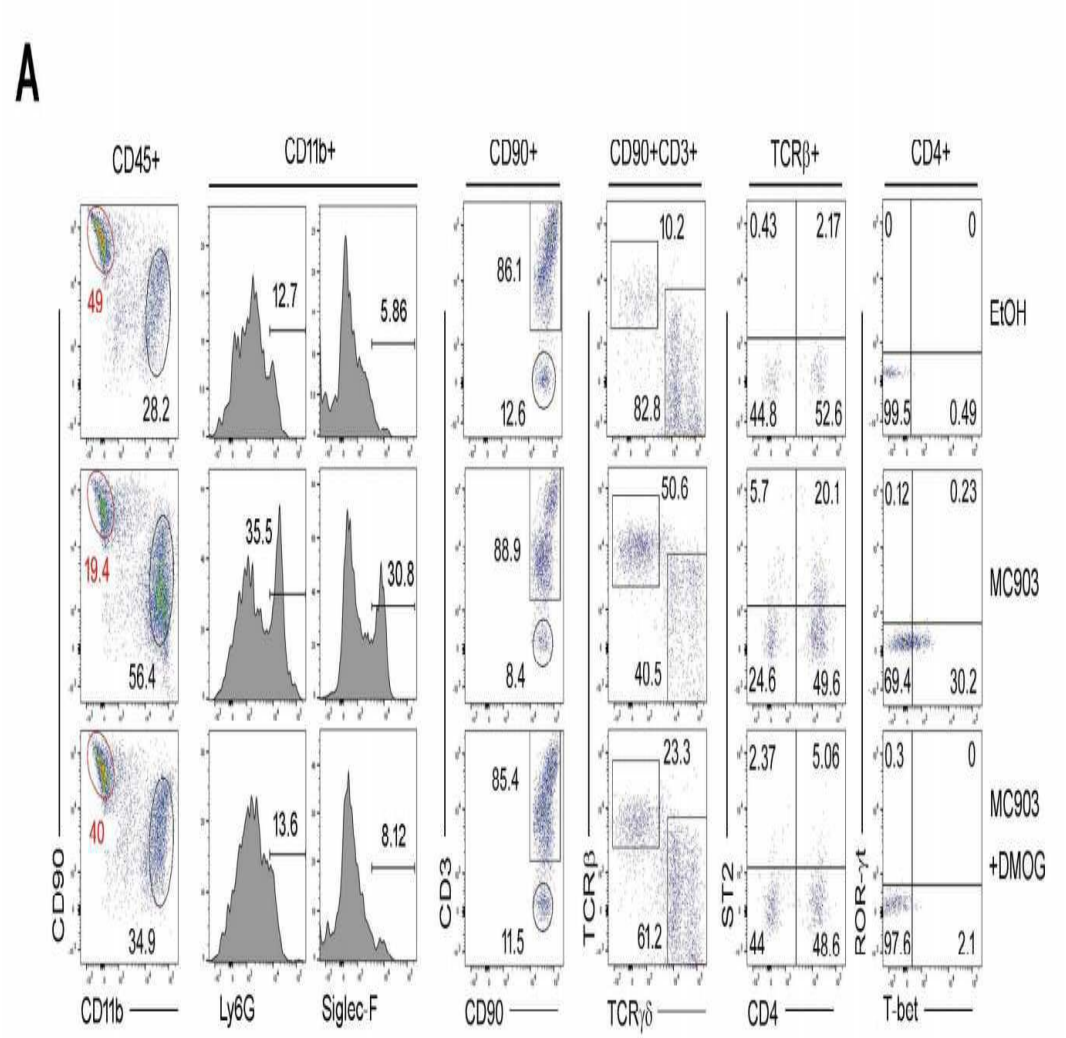
도면1d


D
Ear thickness (%)
150
100
50
0
3
6
9
12
15
Days
***
***
***
EtOH
MC903
MC903+DMOG(d0~)
MC903+DMOG(d3~)
MC903+DMOG(d7~)

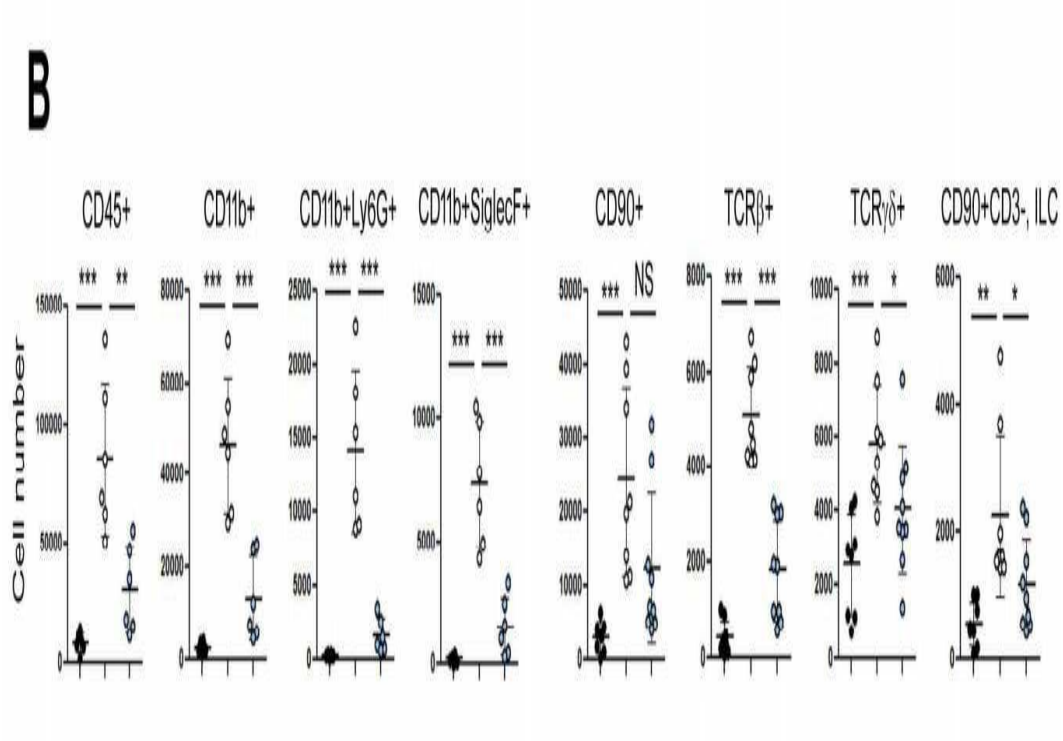
도면1e


E
EtOH
MC903
DMOG d0~
DMOG d3~
DMOG d7~

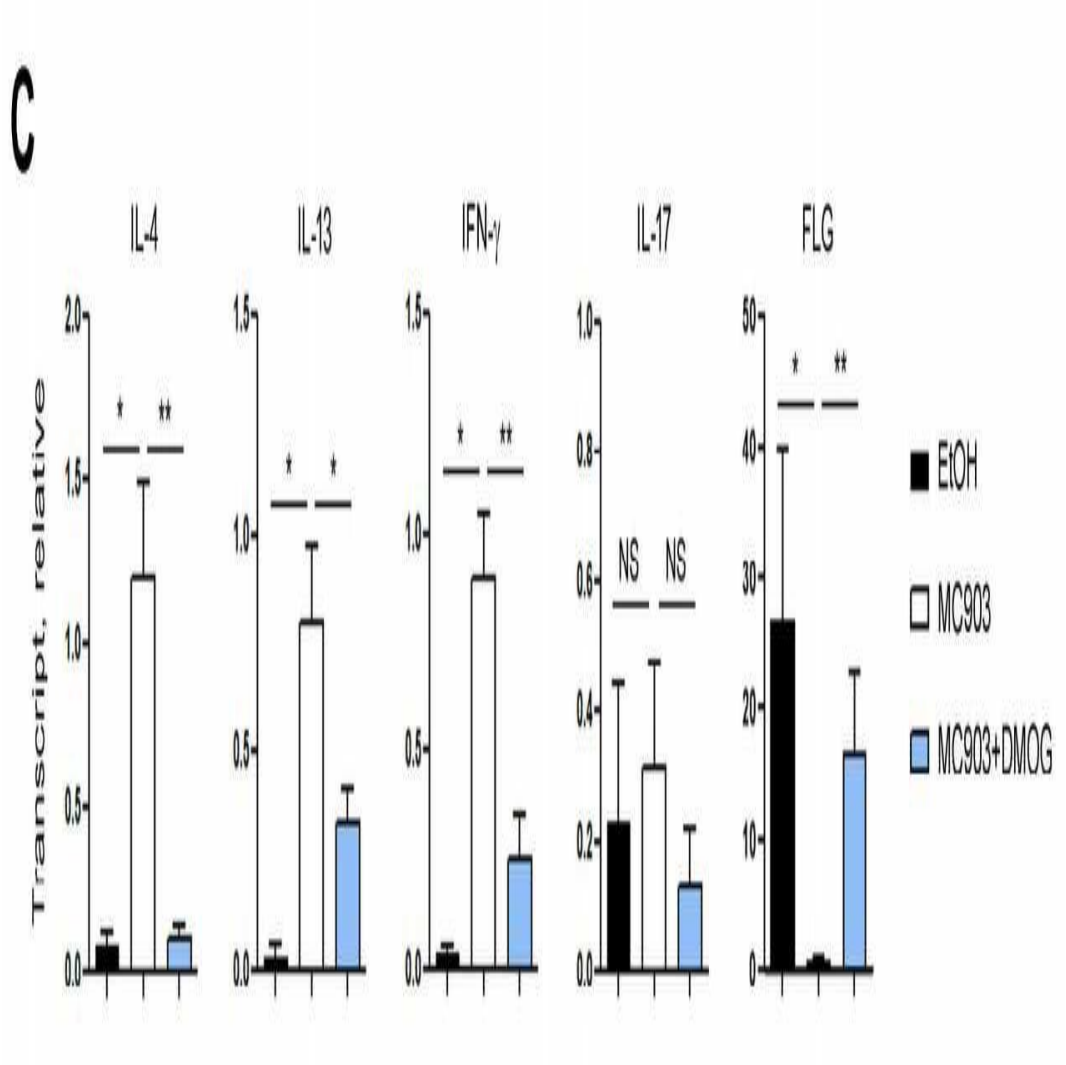
도면2a


A
CD45+
CD11b+
CD90+
CD90+CD3+
TCRβ+
CD4+
EtOH
MC903
MC903 +DMOG
CD90
CD11b
Ly6G
Siglec-F
CD3
CD90
TCRβ
TCRγδ
ST2
CD4
ROR-γt
T-bet

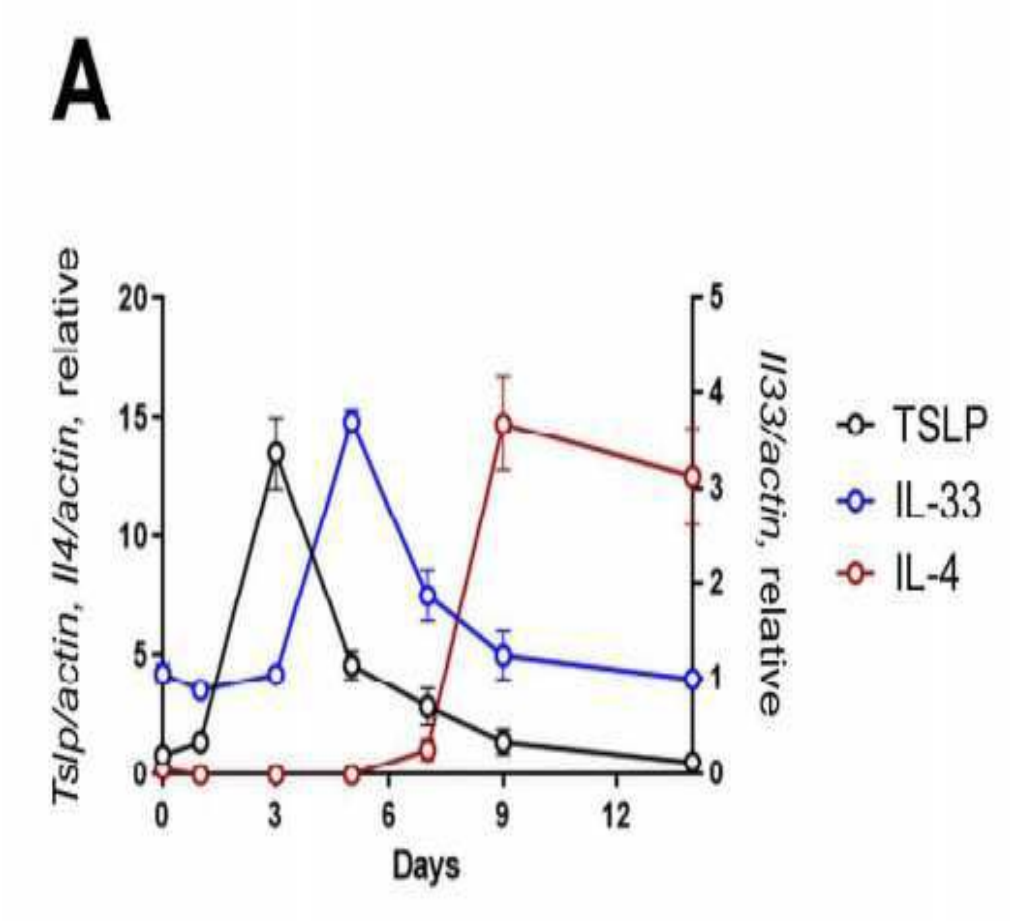
도면2b


B
CD45+
CD11b+
CD11b+Ly6G+
CD11b+SiglecF+
CD90+
TCRβ+
TCRγδ+
CD90+CD3-, ILC
Cell number
NS

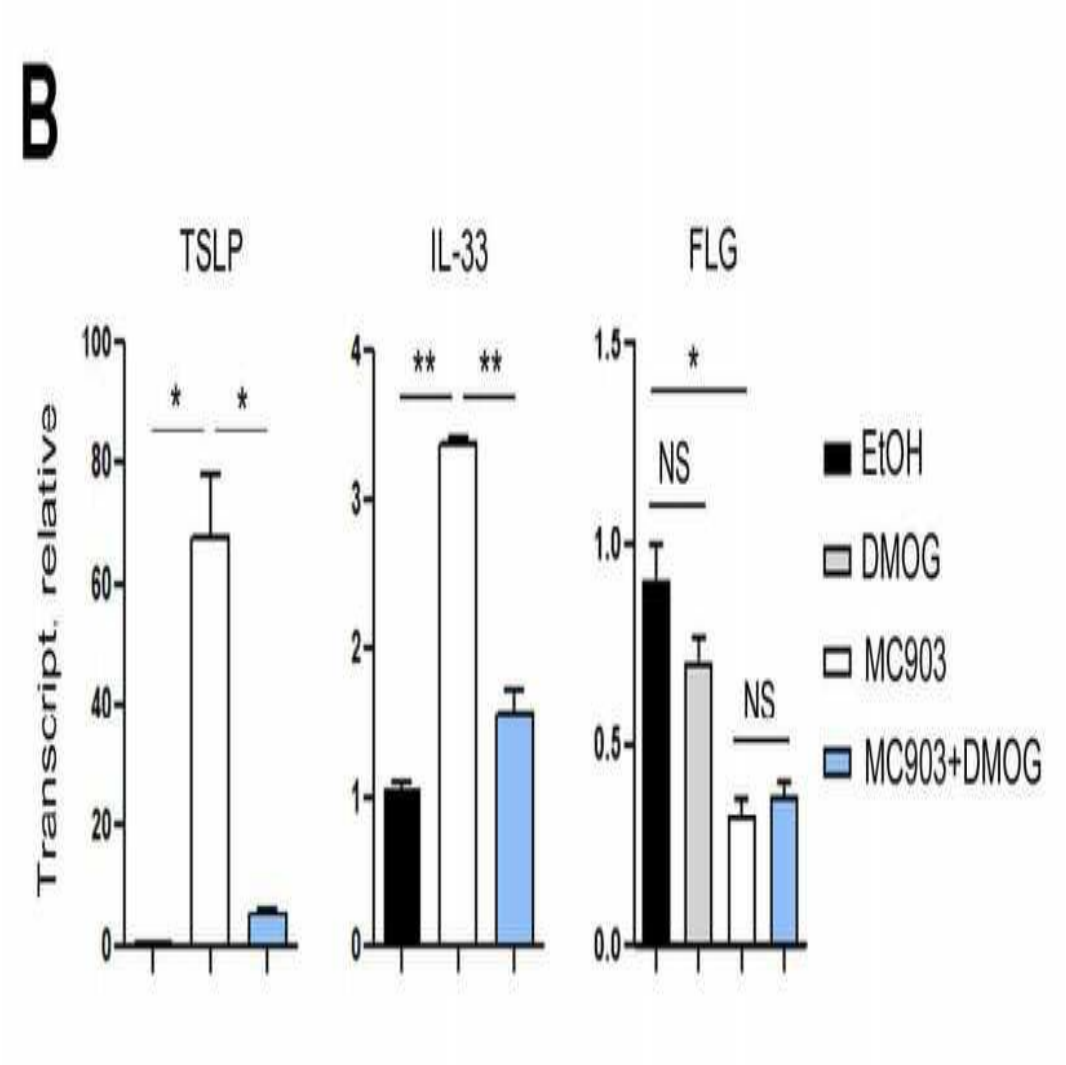
도면2c


C
IL-4
IL-13
IFN-γ
IL-17
FLG
Transcript, relative
NS
NS
EtOH
MC903
MC903+DMOG

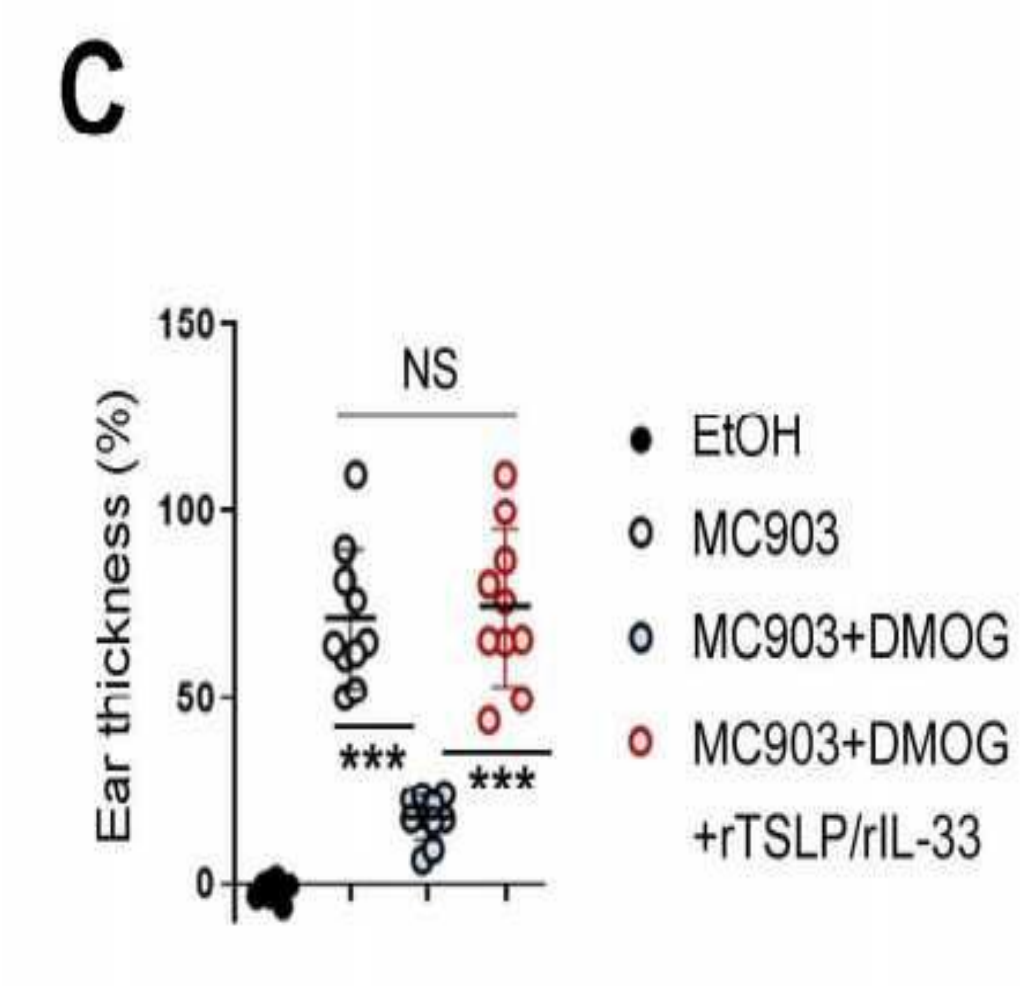
도면3a


A
Tslp/actin, Il4/actin, relative
Il33/actin, relative
Days
TSLP
IL-33
IL-4

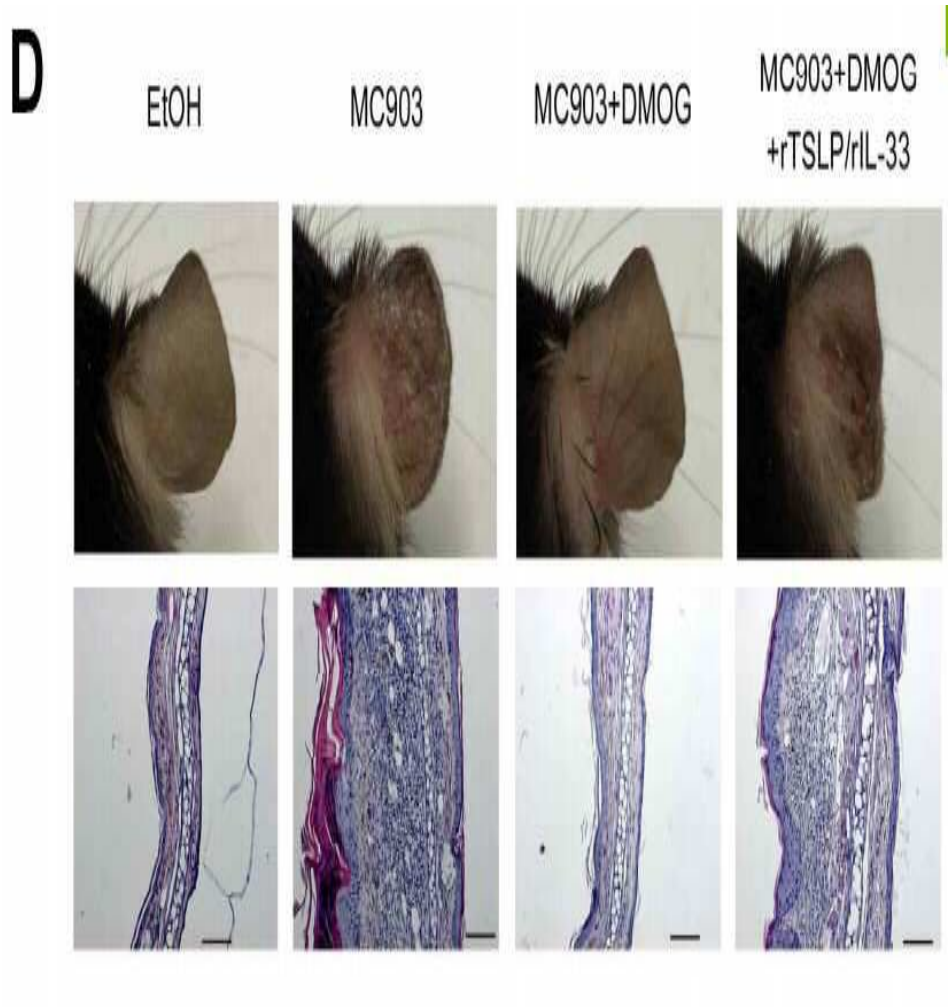
도면3b


B
TSLP
IL-33
FLG
Transcript, relative
100
80
60
40
20
0
4
3
2
1
0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
**
**
*
NS
NS
EtOH
DMOG
MC903
MC903+DMOG

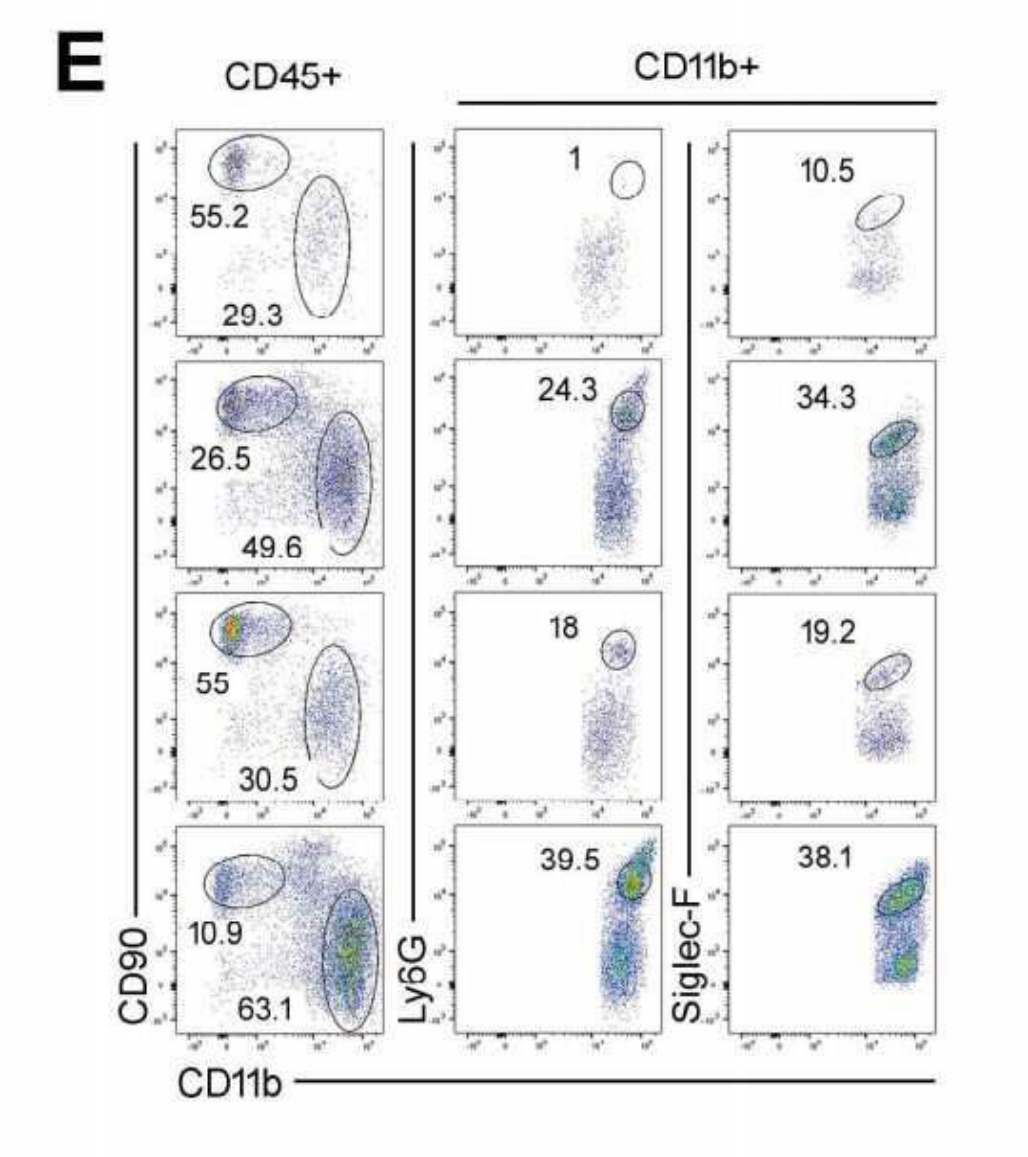
도면3c


C
Ear thickness (%)
150
100
50
0
NS
***
***
EtOH
MC903
MC903+DMOG
MC903+DMOG
+rTSLP/rIL-33

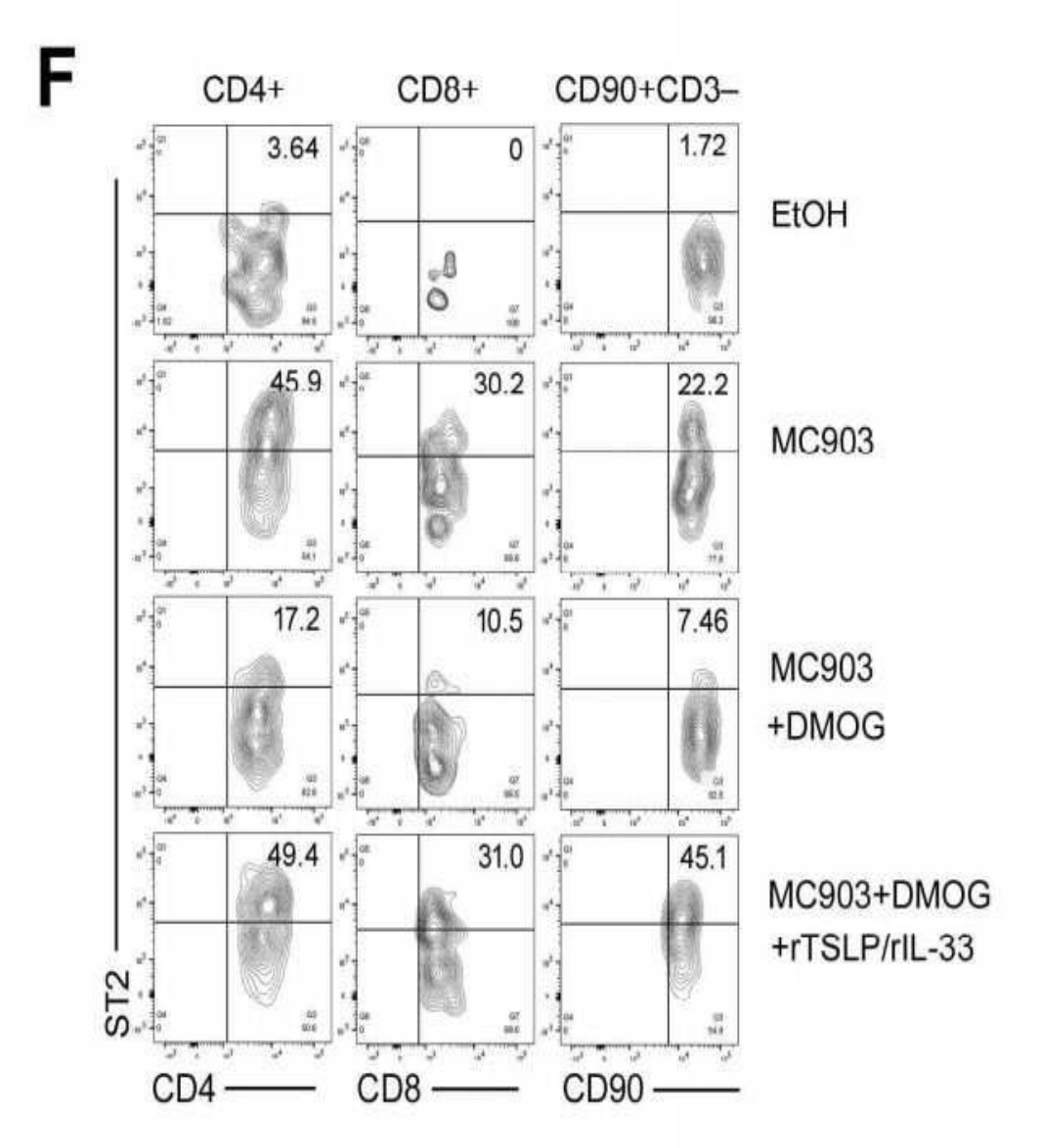
도면3d



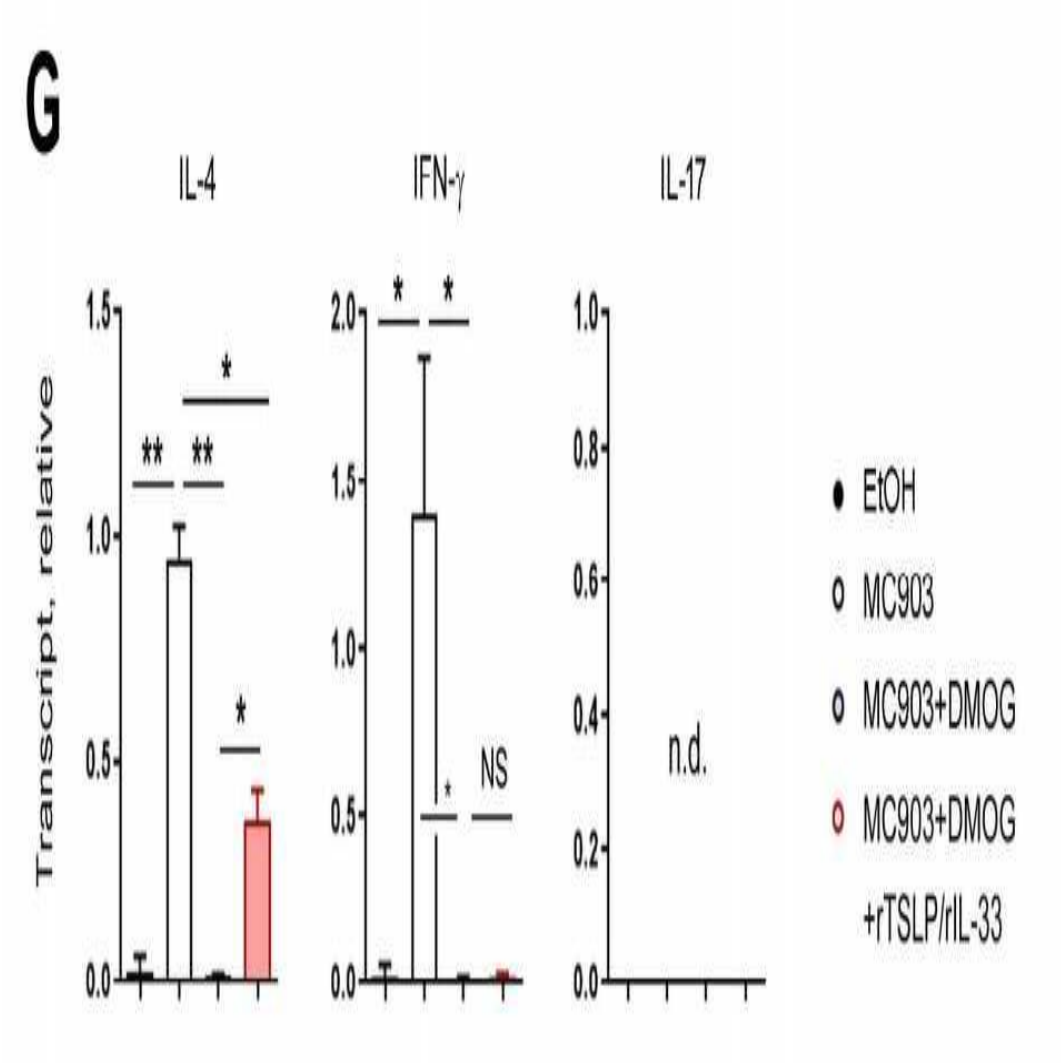
도면3e


E
CD45+
CD11b+
55.2
29.3
1
10.5
26.5
49.6
24.3
34.3
55
30.5
18
19.2
10.9
63.1
39.5
38.1
CD90
Ly6G
Siglec-F
CD11b

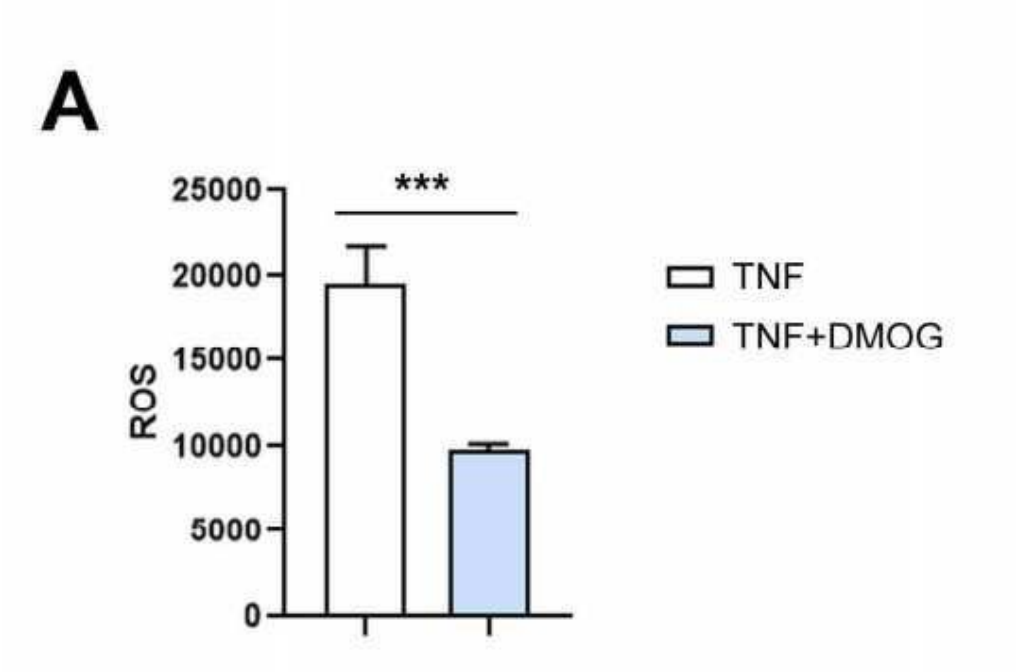
도면3f


F
CD4+
CD8+
CD90+CD3–
3.64
0
1.72
EtOH
45.9
30.2
22.2
MC903
17.2
10.5
7.46
MC903
+DMOG
49.4
31.0
45.1
MC903+DMOG
+rTSLP/rIL-33
ST2
CD4
CD8
CD90

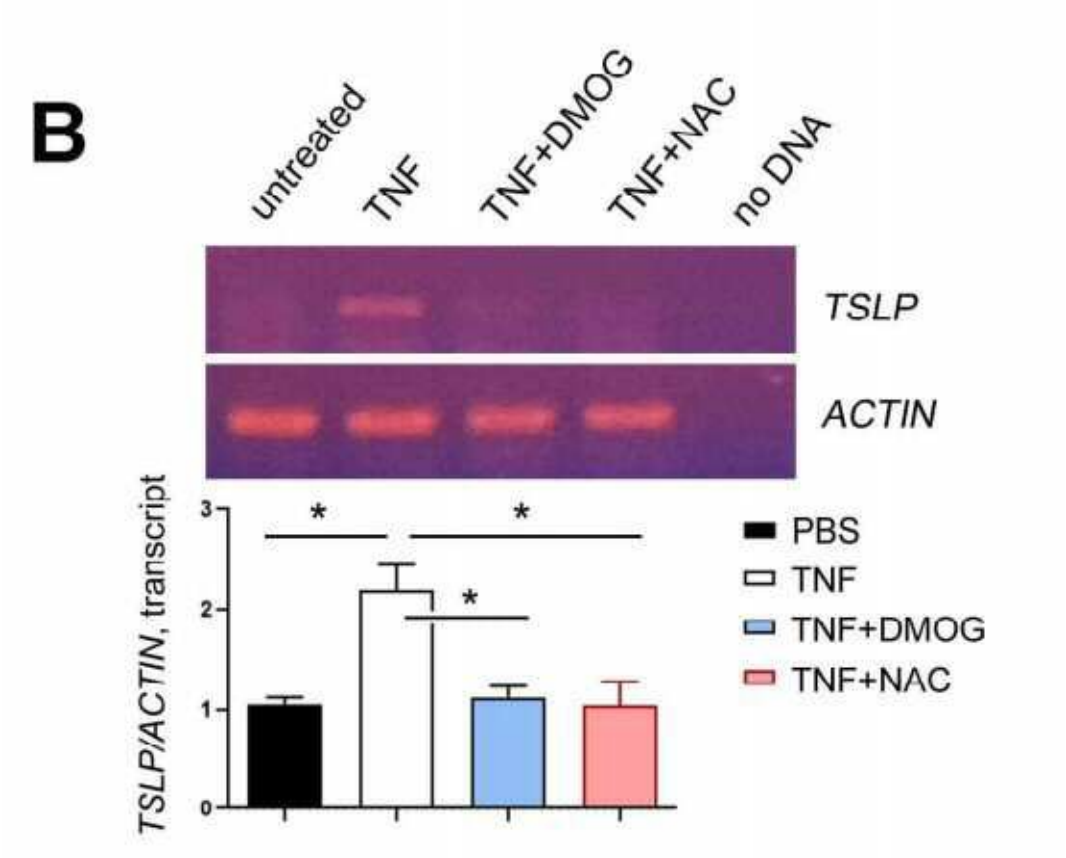
도면3g


G
IL-4
IFN-γ
IL-17
Transcript, relative
1.5
1.0
0.5
0.0
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
**
**
*
*
*
NS
n.d.
EtOH
MC903
MC903+DMOG
MC903+DMOG
+rTSLP/rIL-33

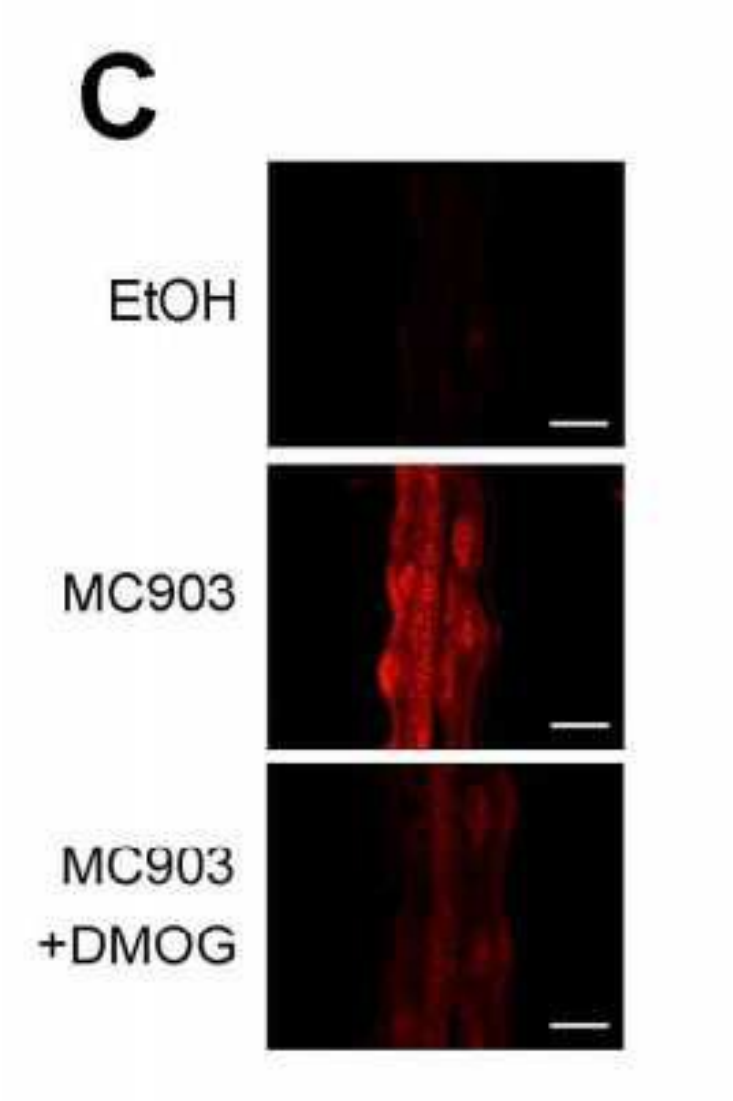
도면4a


A
25000
20000
15000
10000
5000
0
ROS
***
TNF
TNF+DMOG

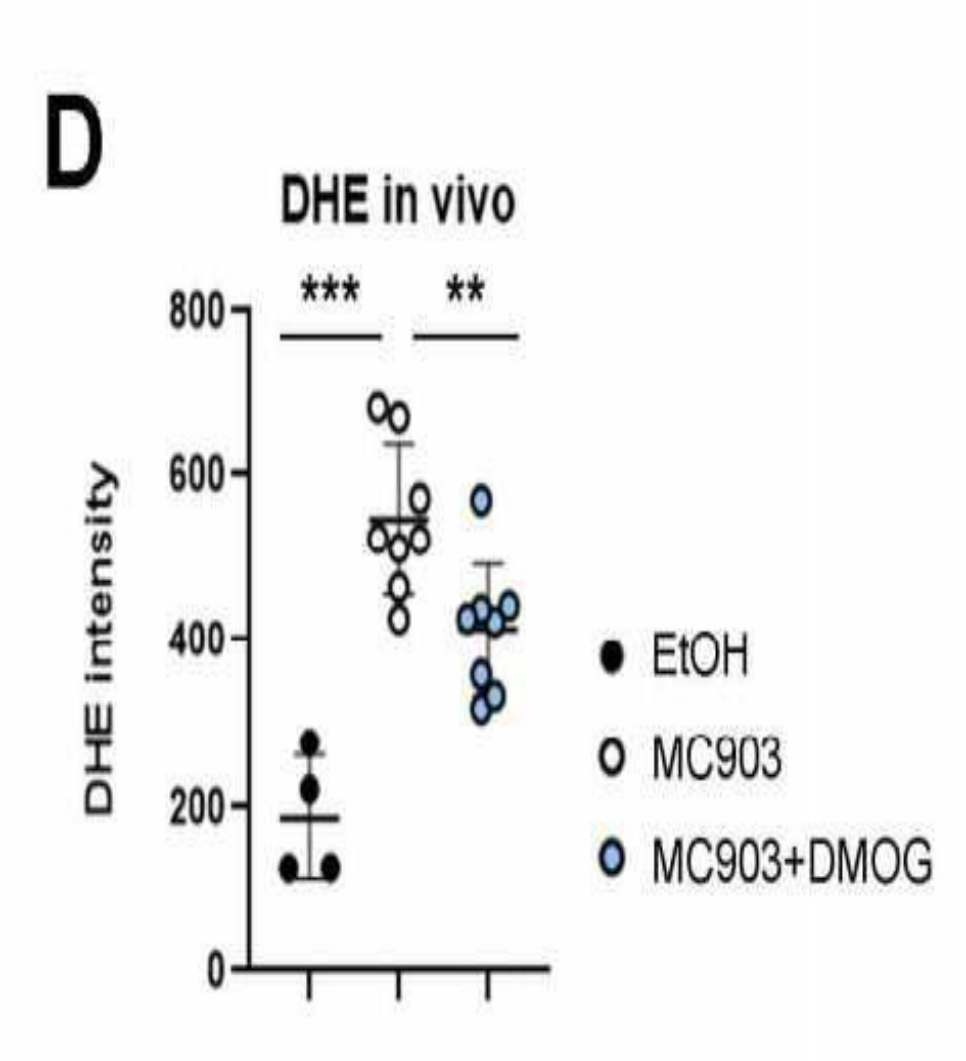
도면4b


B
untreated
TNF
TNF+DMOG
TNF+NAC
no DNA
TSLP
ACTIN
TSLP/ACTIN, transcript
3
2
1
0
*
*
*
PBS
TNF
TNF+DMOG
TNF+NAC

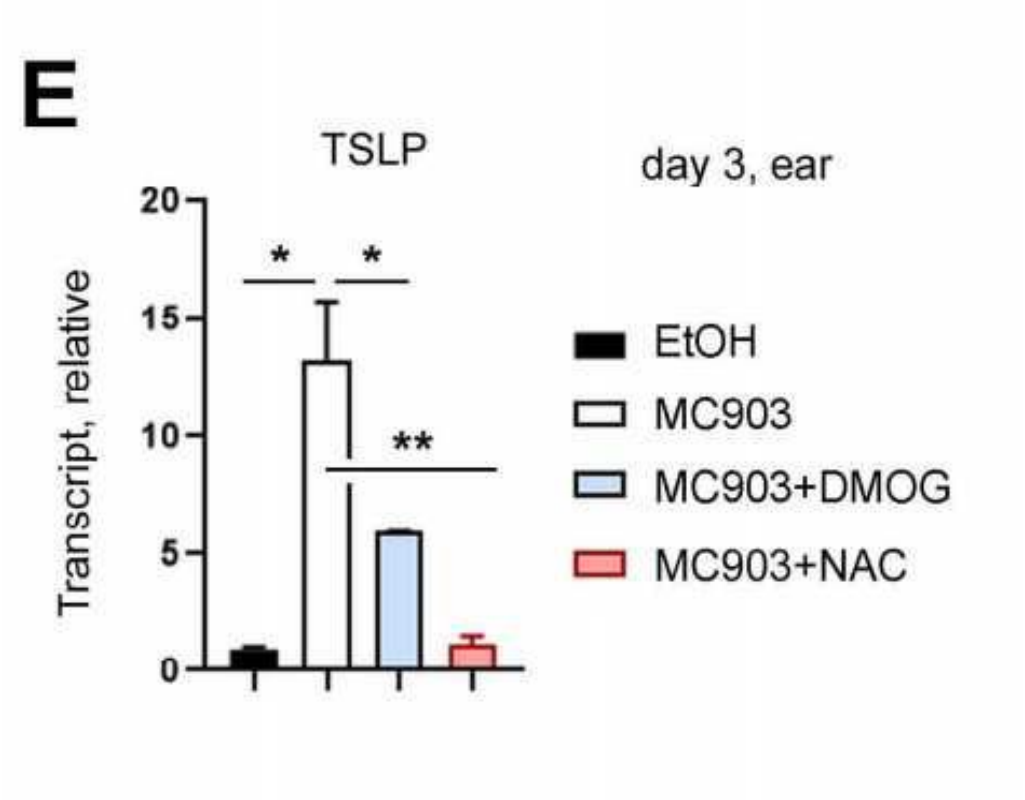
도면4c



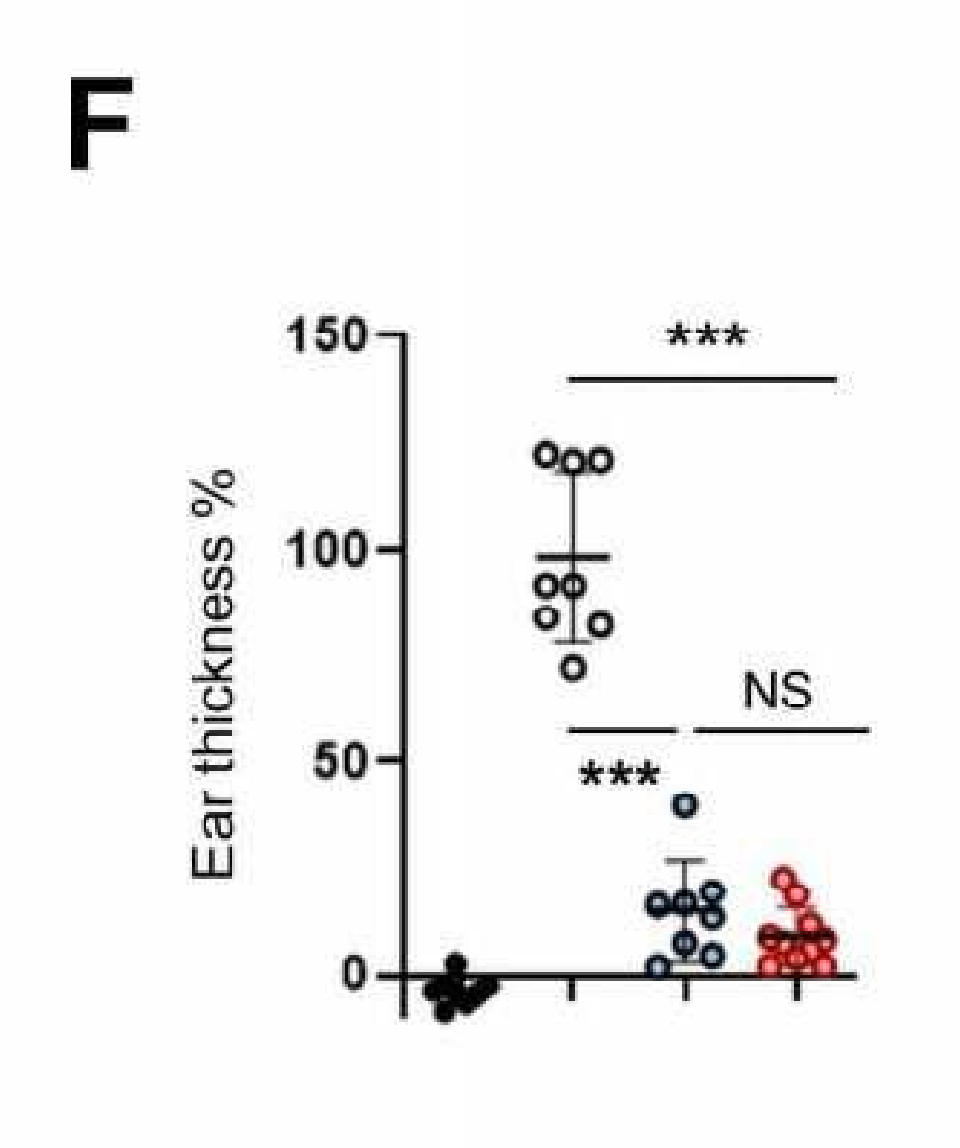
도면4d


D
DHE in vivo
***
**
800
600
400
200
0
DHE intensity
EtOH
MC903
MC903+DMOG

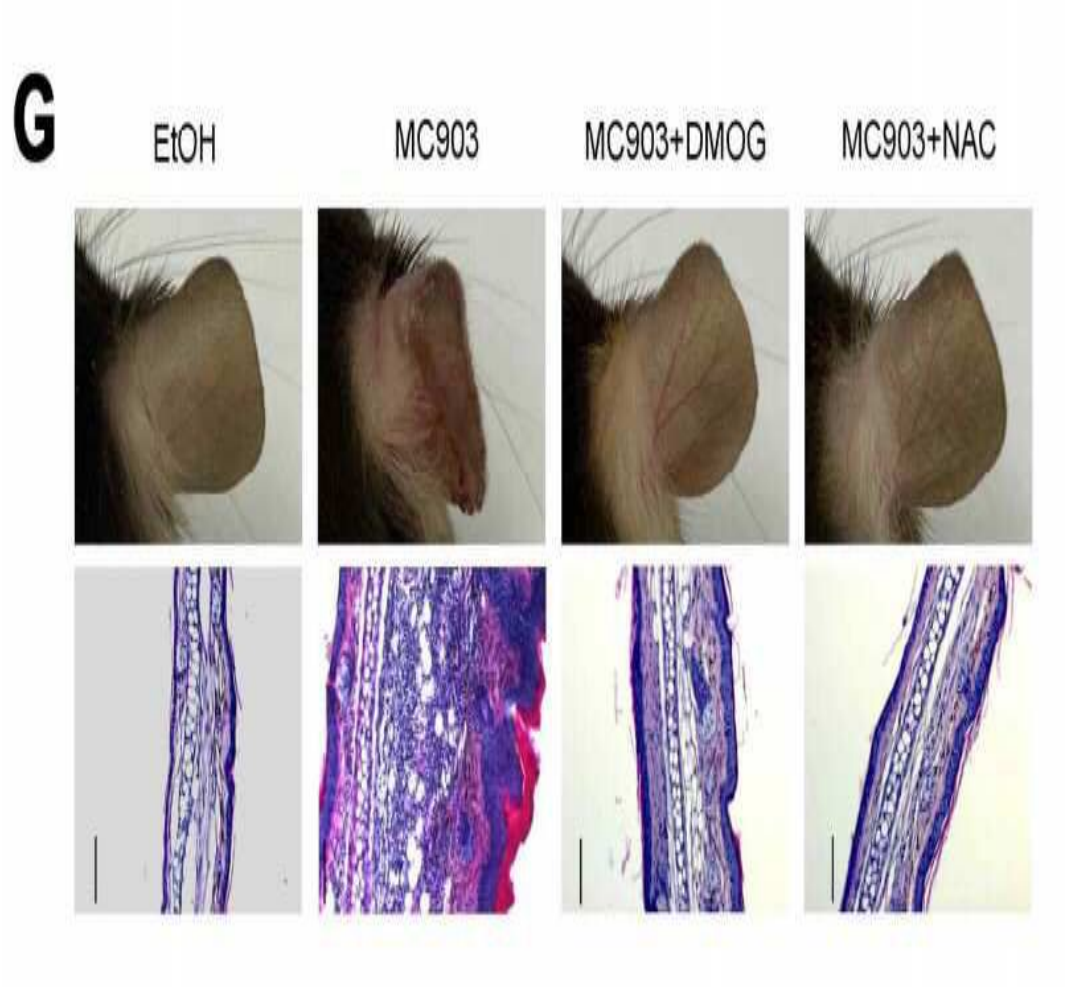
도면4e


E
TSLP
day 3, ear
Transcript, relative
20
15
10
5
0
*
*
**
EtOH
MC903
MC903+DMOG
MC903+NAC

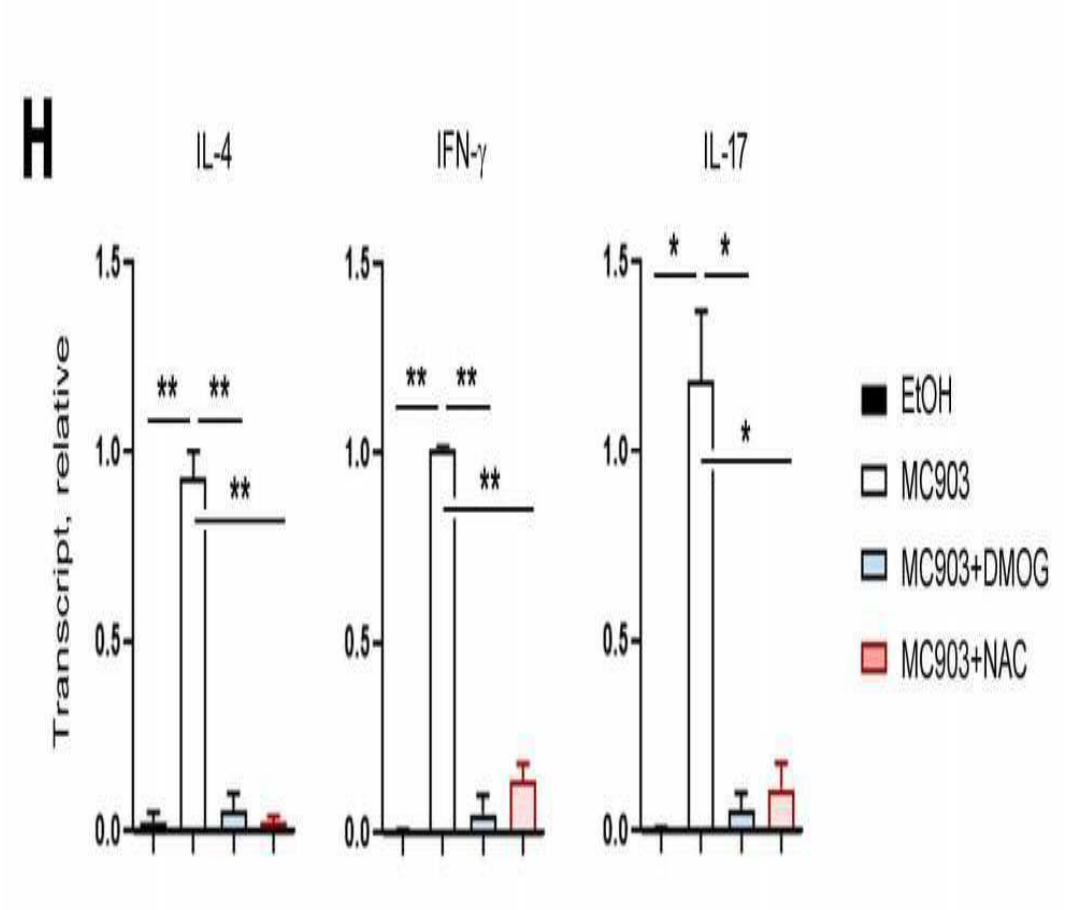
도면4f



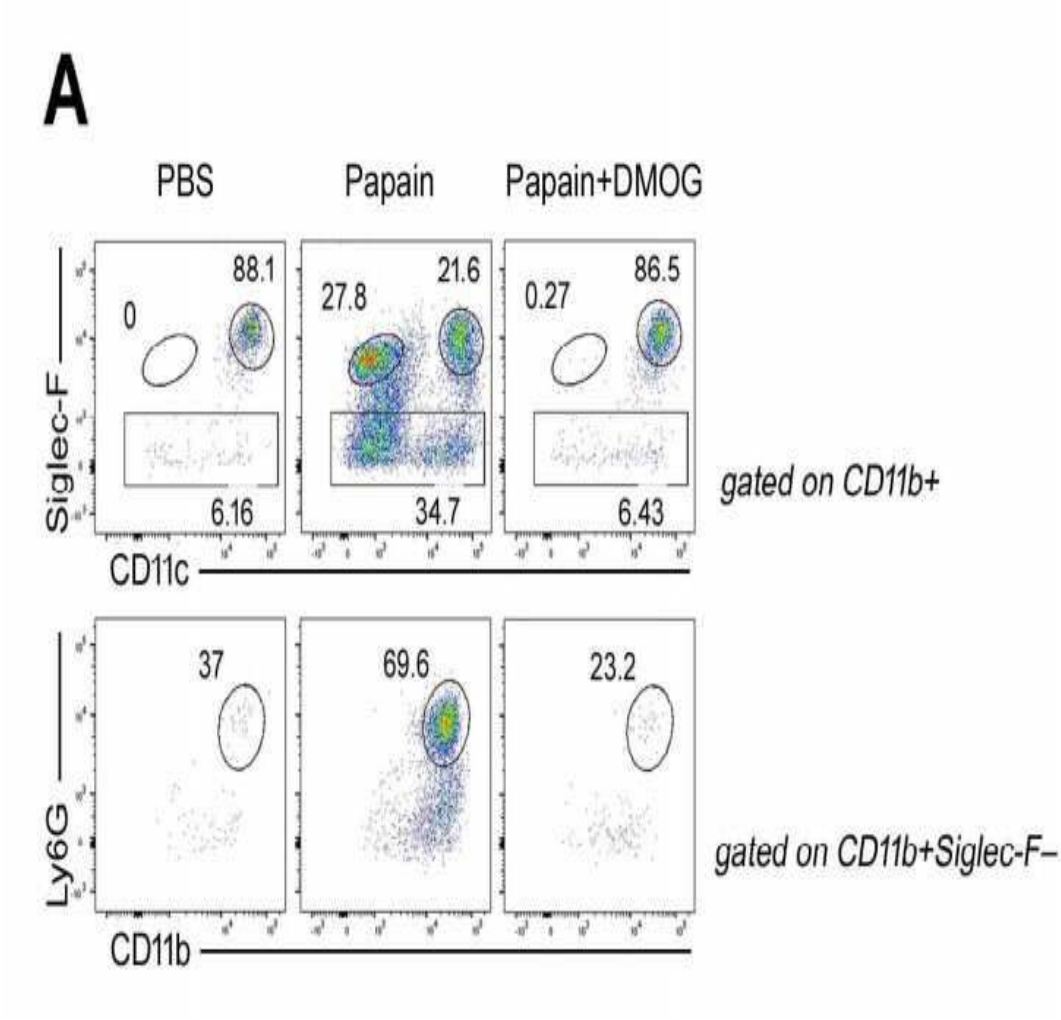
도면4g



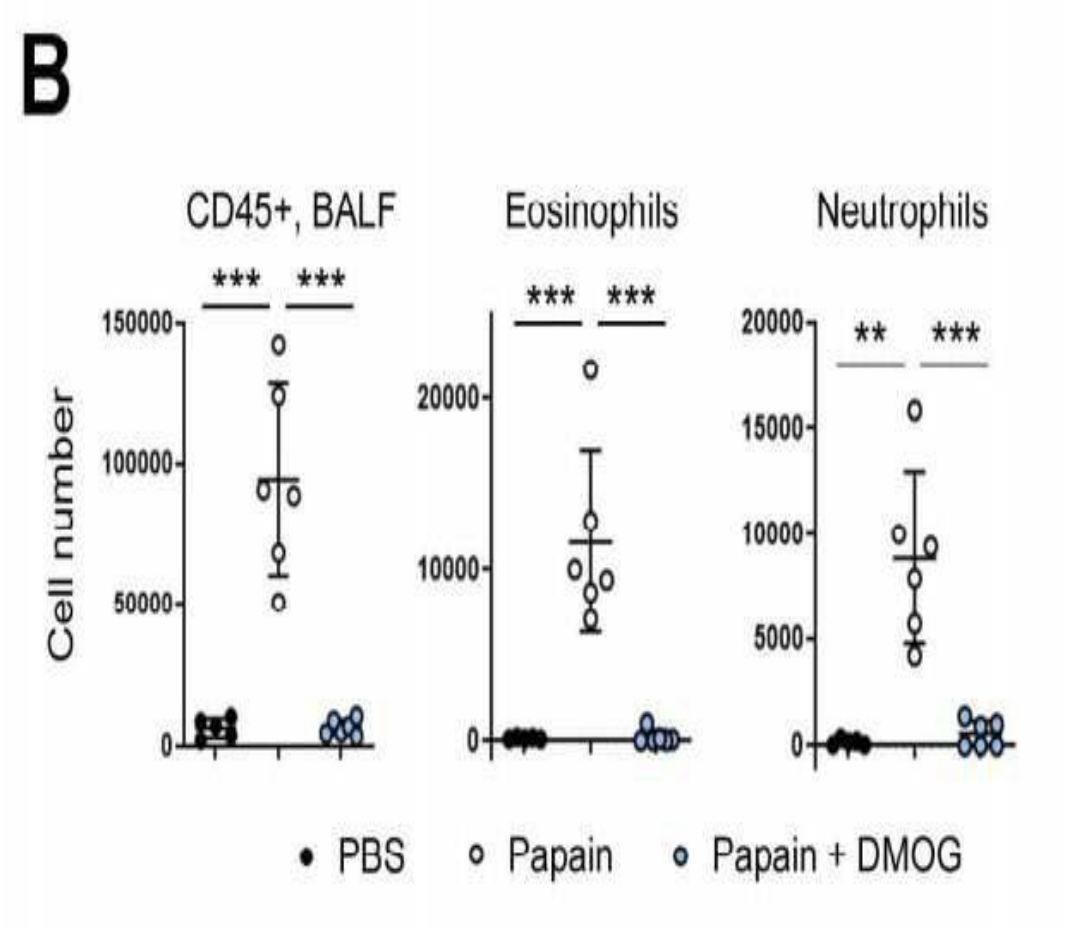
도면4h


H
IL-4
IFN-γ
IL-17
Transcript, relative
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
EtOH
MC903
MC903+DMOG
MC903+NAC

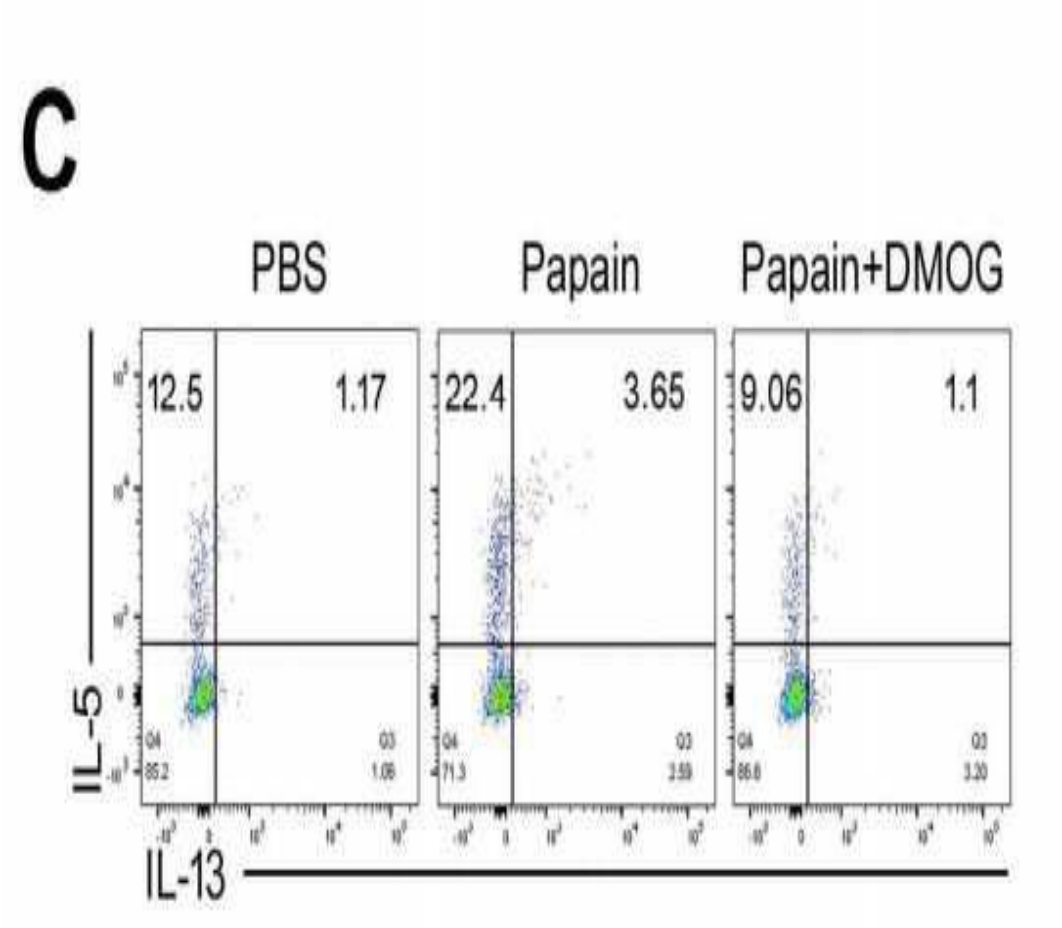
도면5a


A
PBS
Papain
Papain+DMOG
88.1
0
6.16
21.6
27.8
34.7
86.5
0.27
6.43
Siglec-F
CD11c
gated on CD11b+
37
69.6
23.2
Ly6G
CD11b
gated on CD11b+Siglec-F–

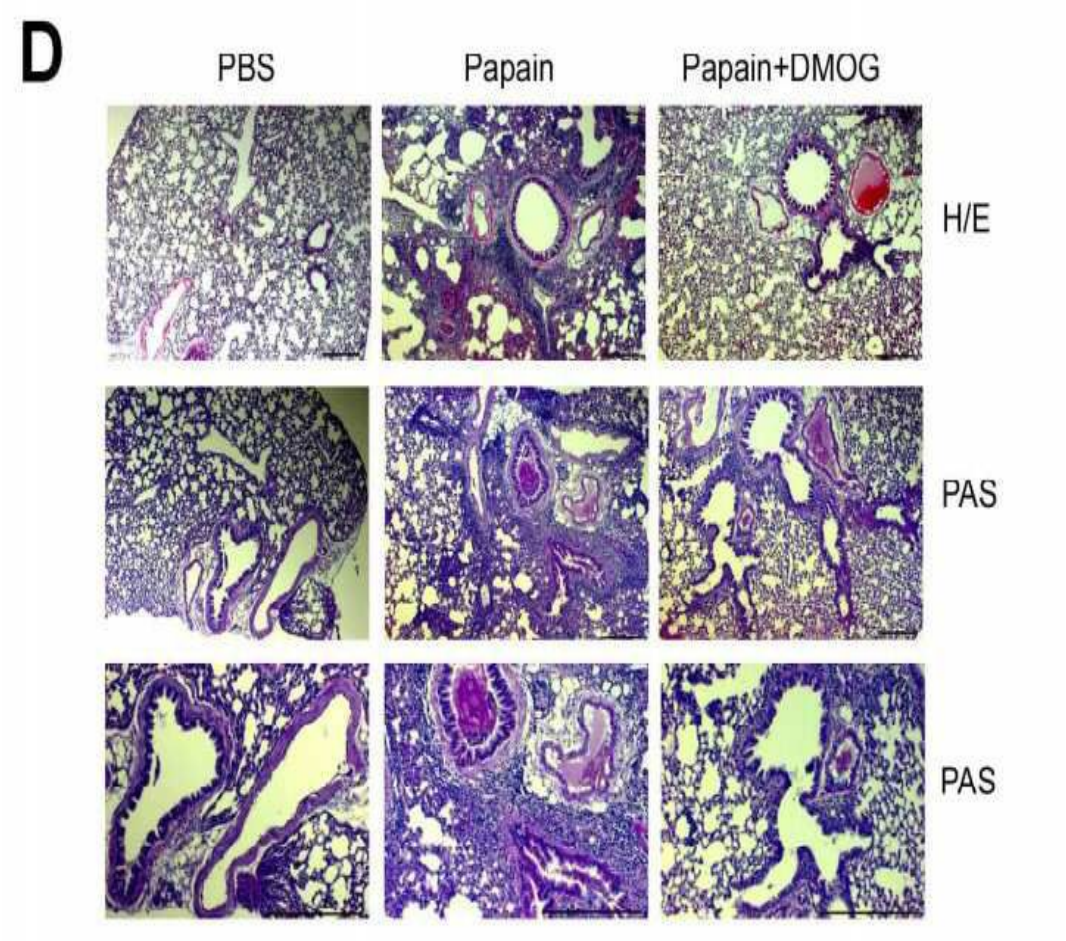
도면5b


B
CD45+, BALF
Eosinophils
Neutrophils
Cell number
150000
100000
50000
0
20000
10000
0
20000
15000
10000
5000
0
***
***
***
***
**
***
PBS
Papain
Papain + DMOG

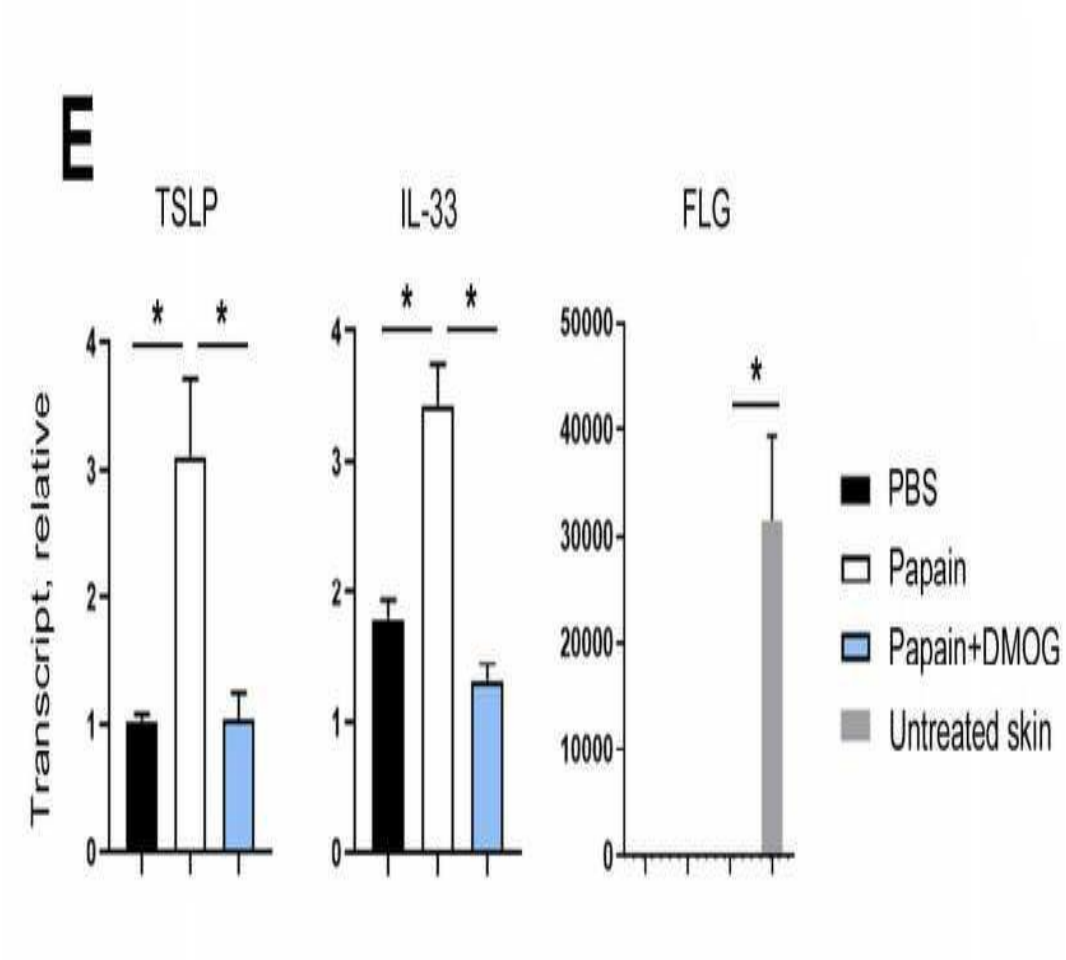
도면5c



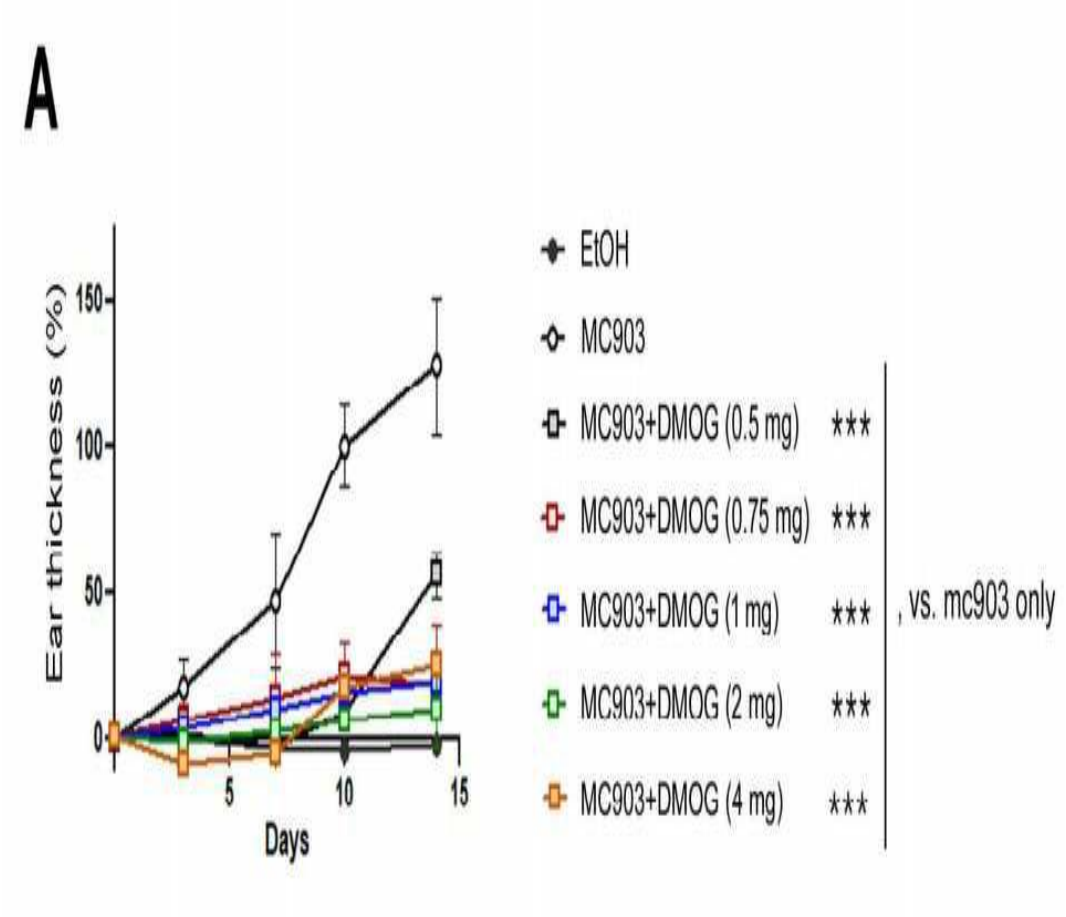
도면5d



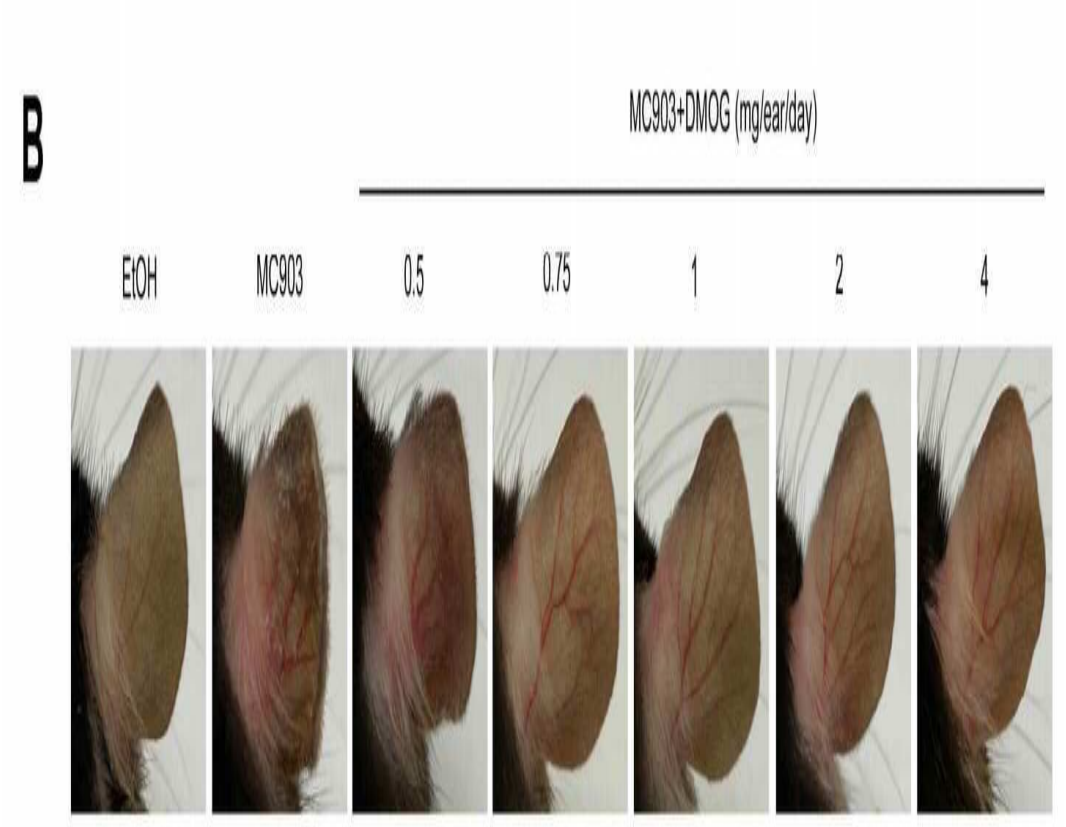
도면5e


E
TSLP
IL-33
FLG
Transcript, relative
0
1
2
3
4
10000
20000
30000
40000
50000
*
PBS
Papain
Papain+DMOG
Untreated skin

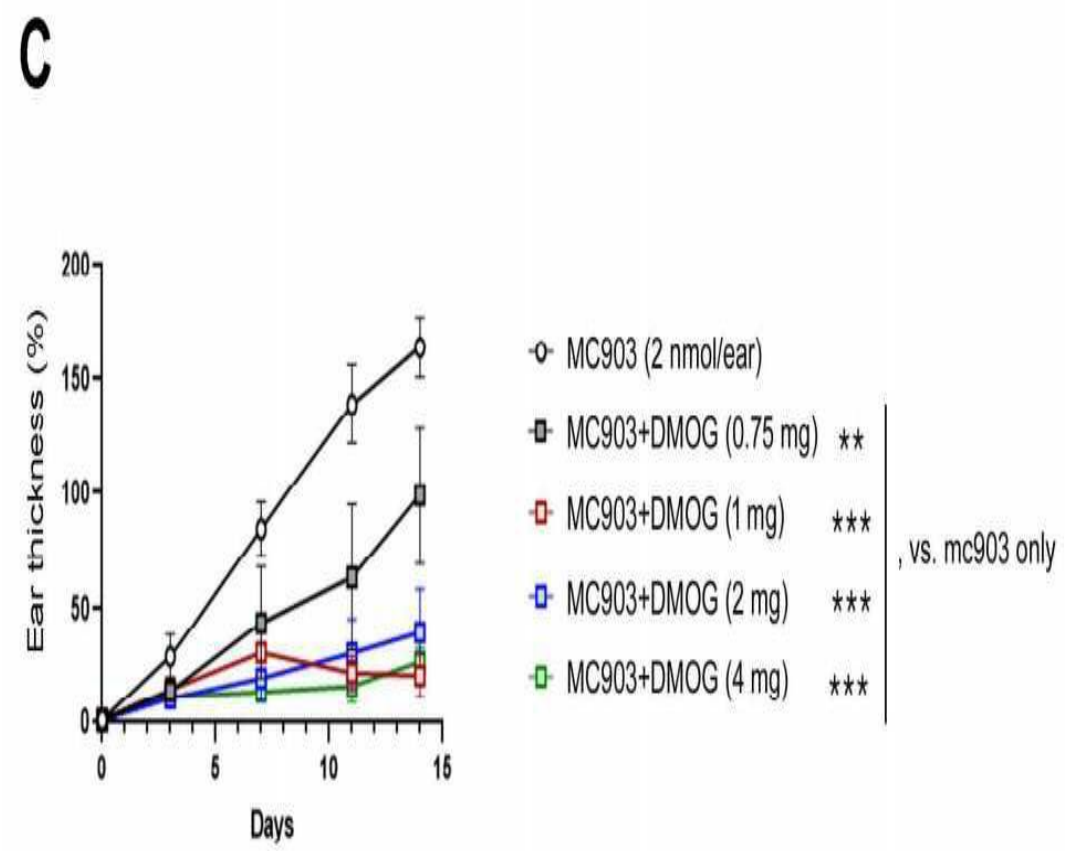
도면6a


A
Ear thickness (%)
150
100
50
0
5
10
15
Days
EtOH
MC903
MC903+DMOG (0.5 mg) ***
MC903+DMOG (0.75 mg) ***
MC903+DMOG (1 mg) ***
MC903+DMOG (2 mg) ***
MC903+DMOG (4 mg) ***
, vs. mc903 only

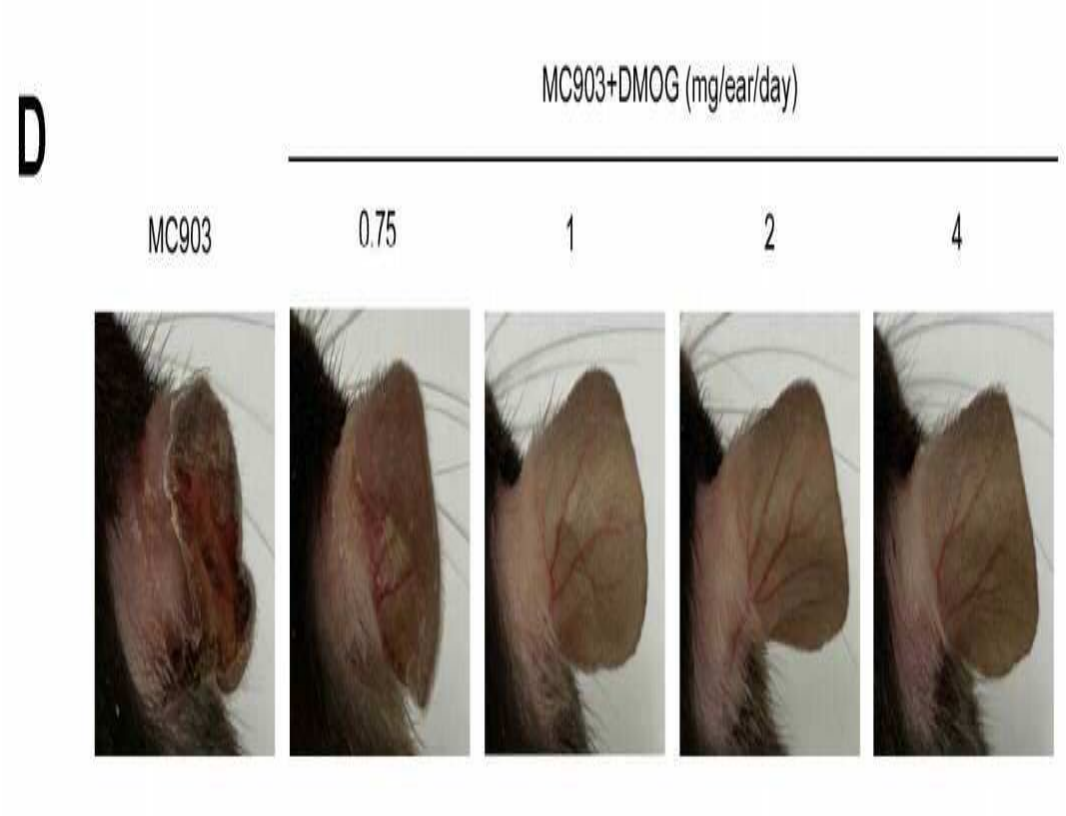
도면6b


B
MC903+DMOG (mg/ear/day)
EtOH
MC903
0.5
0.75
1
2
4

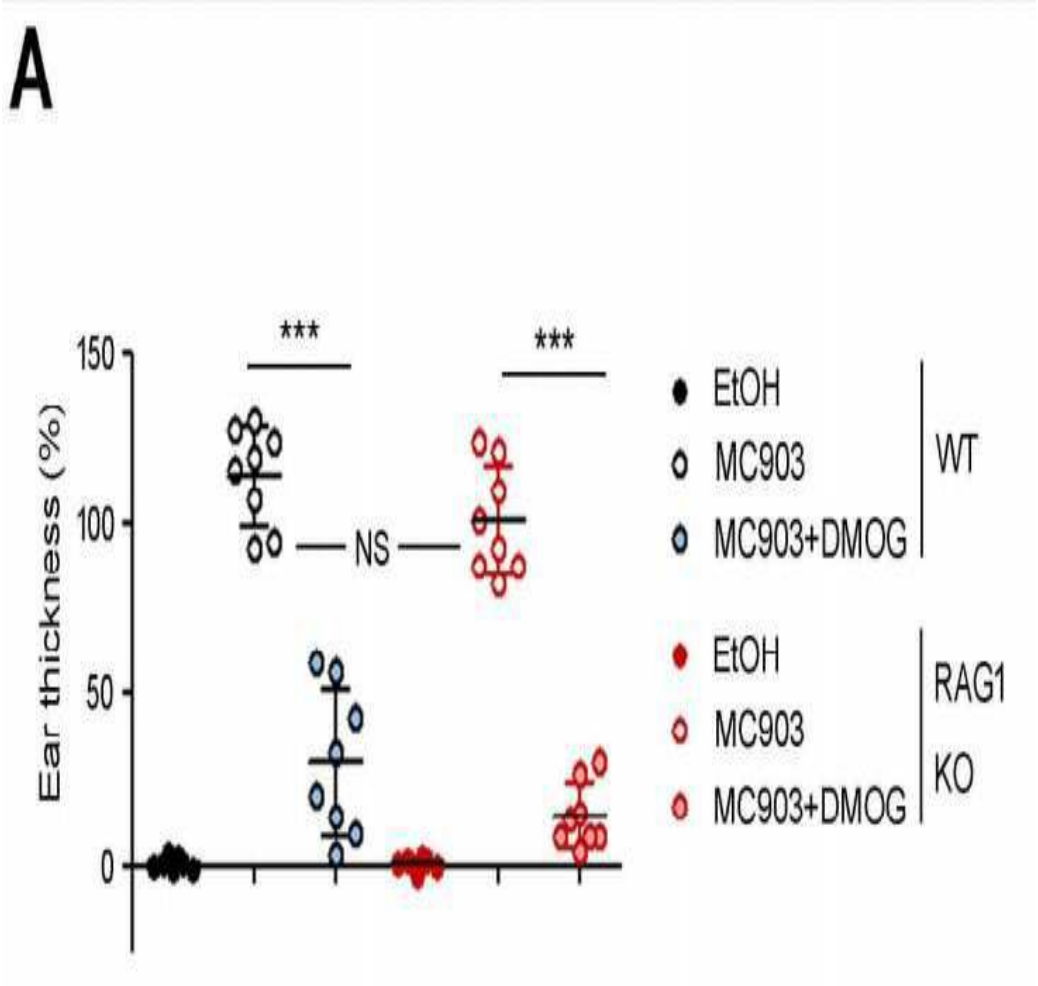
도면6c


C
Ear thickness (%)
200
150
100
50
0
0
5
10
15
Days
MC903 (2 nmol/ear)
MC903+DMOG (0.75 mg) **
MC903+DMOG (1 mg) ***
MC903+DMOG (2 mg) ***
MC903+DMOG (4 mg) ***
, vs. mc903 only

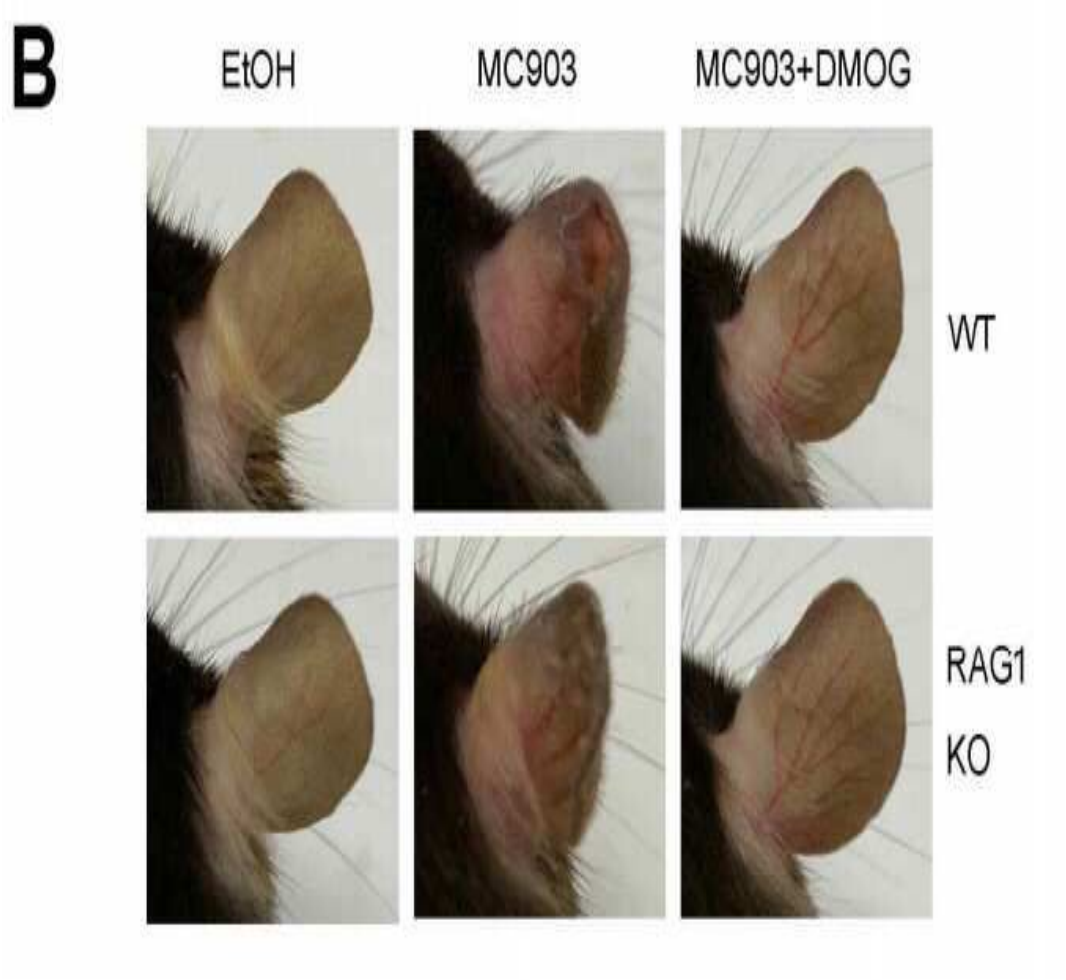
도면6d



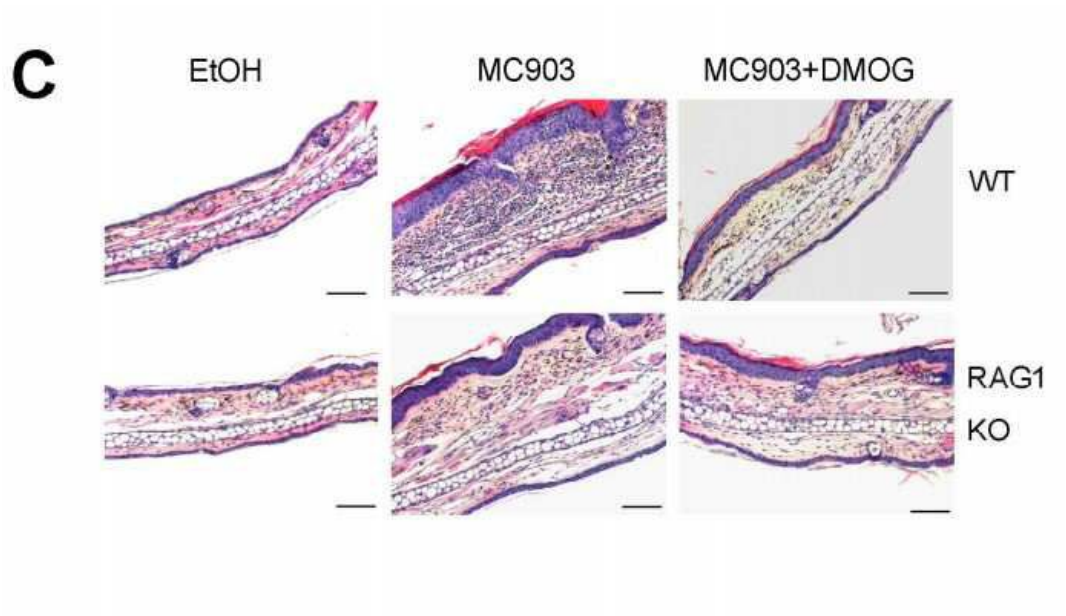
도면7a


A
Ear thickness (%)
150
100
50
0
***
***
NS
EtOH
MC903
MC903+DMOG
WT
EtOH
MC903
MC903+DMOG
RAG1
KO

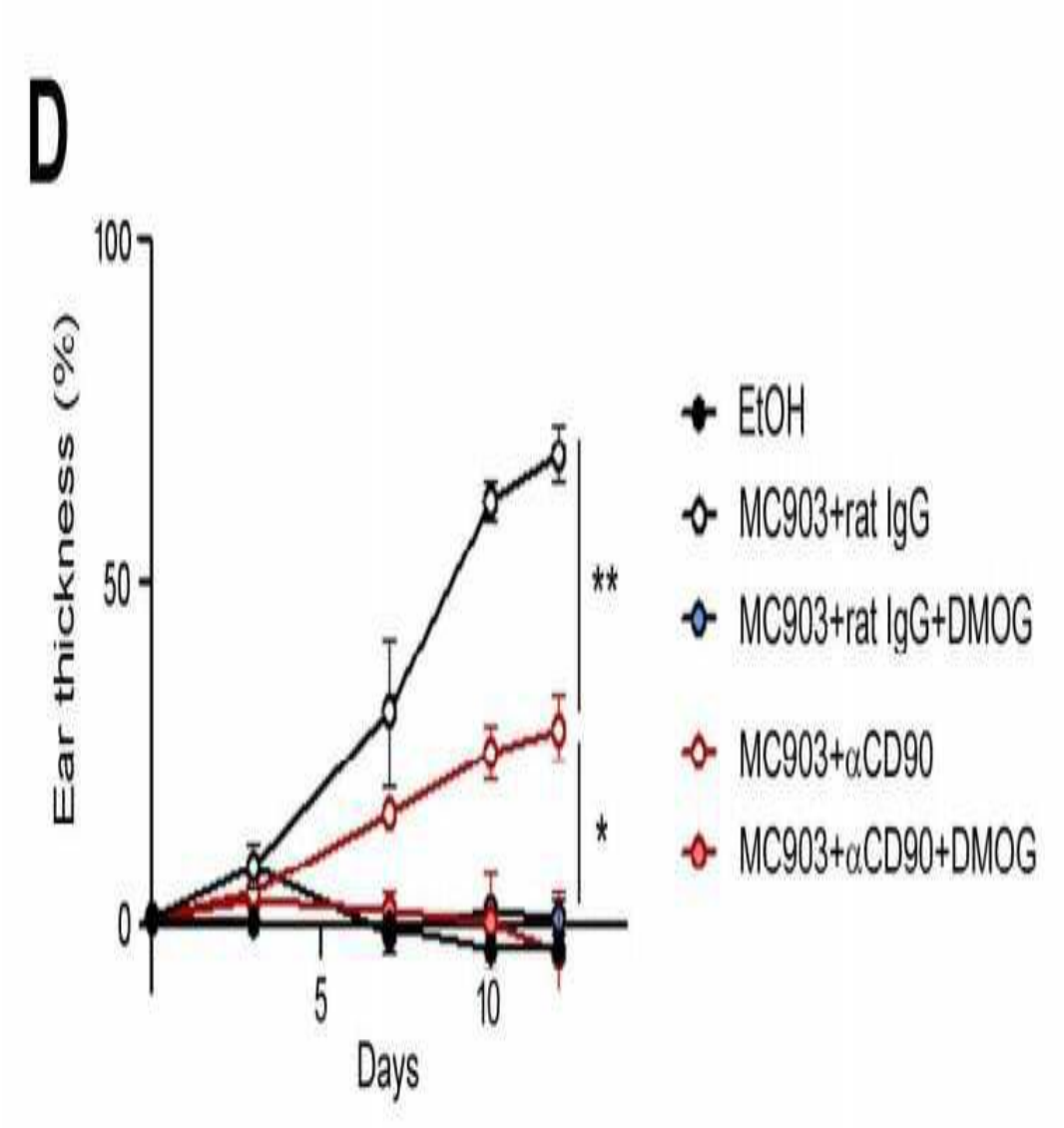
도면7b


B
EtOH
MC903
MC903+DMOG
WT
RAG1
KO

도면7c


C
EtOH
MC903
MC903+DMOG
WT
RAG1
KO

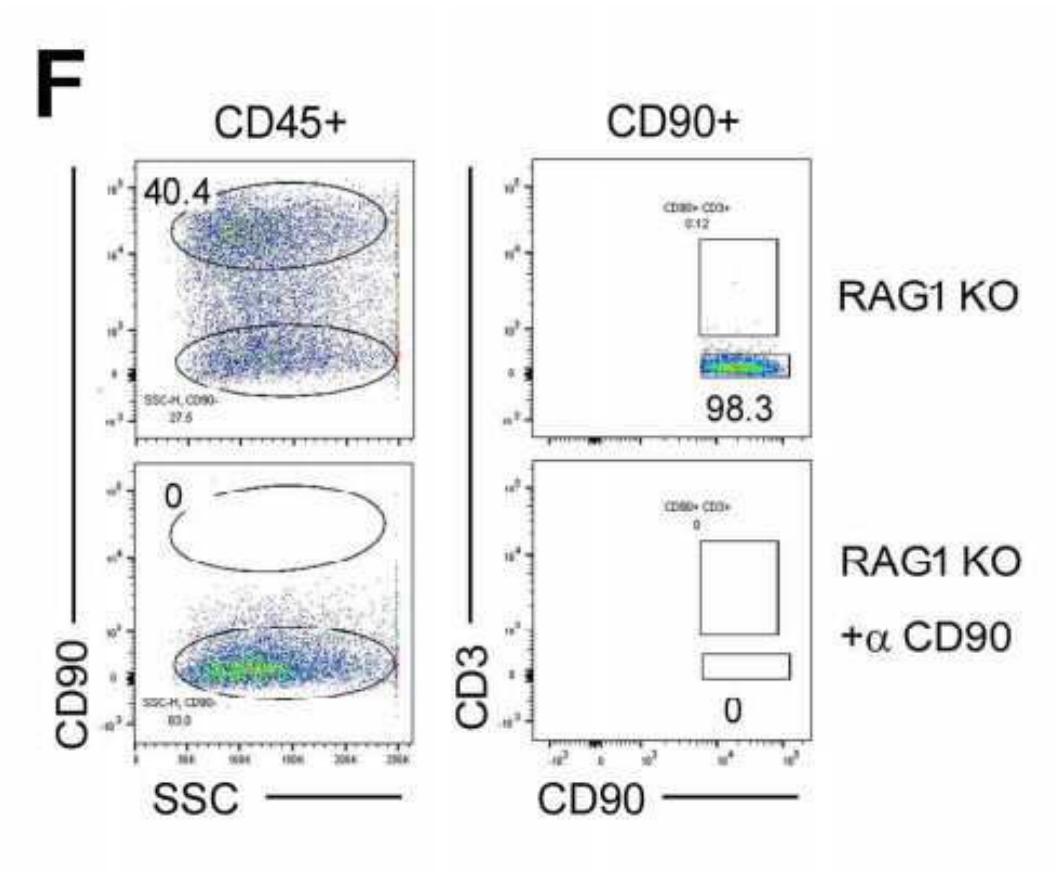
도면7d


D
Ear thickness (%)
100
50
0
5
10
Days
**
*
EtOH
MC903+rat IgG
MC903+rat IgG+DMOG
MC903+αCD90
MC903+αCD90+DMOG

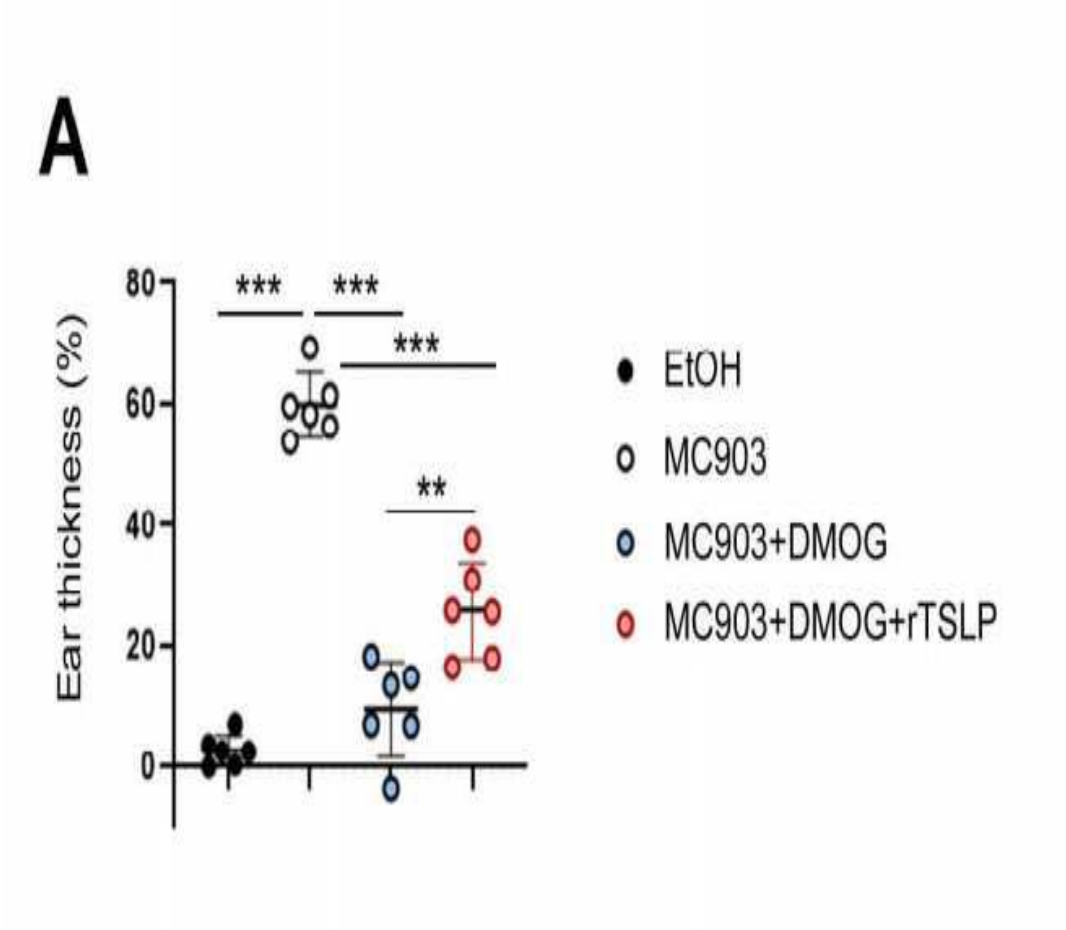
도면7e


E
EtOH
MC903
MC+DMOG
MC+αCD90
MC+αCD90+DMOG

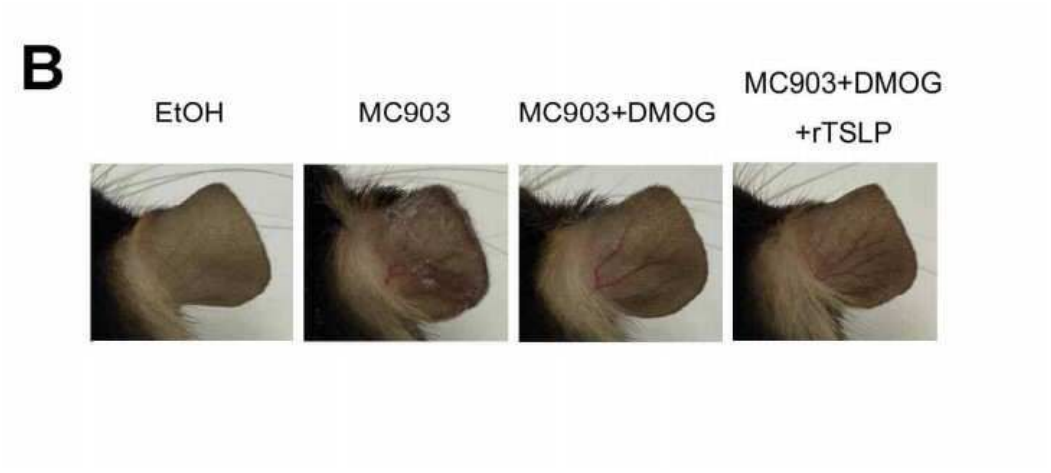
도면7f


F
CD45+
CD90+
40.4
98.3
0
0
CD90
SSC
CD3
CD90
RAG1 KO
RAG1 KO
+α CD90

도면8a


A
Ear thickness (%)
80
60
40
20
0
***
***
***
**
EtOH
MC903
MC903+DMOG
MC903+DMOG+rTSLP

도면8b


B
EtOH
MC903
MC903+DMOG
MC903+DMOG
+rTSLP