



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월29일

(11) 등록번호 10-2607222

(24) 등록일자 2023년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2023.05)
A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7018865

(22) 출원일자(국제) 2015년12월09일

심사청구일자 2020년11월09일

(85) 번역문제출일자 2017년07월07일

(65) 공개번호 10-2017-0095928

(43) 공개일자 2017년08월23일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/059490

(87) 국제공개번호 WO 2016/092493

국제공개일자 2016년06월16일

(30) 우선권주장

62/090,908 2014년12월12일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Advances in psoriasis, a multisystemic guide
(2014.8.28.) 1부.*

PLoS One 9(8) e105234 (2014.8.) 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더마반트 사이언시즈 게엠베하

스위스 바젤 4051 비아독트스트라쎄 8

(72) 발명자

코테-시에라, 자비에르

미국 02492 메사추세츠주 니드햄 6 파인우드 로드

스미스, 수잔 에이치.

미국 27709 노스캐롤라이나주 리서치 트라이앵글

파크 20 티.더블유. 알렉산더 드라이브

프레이, 스티븐 엠.

미국 27709 노스캐롤라이나주 리서치 트라이앵글

파크 20 티.더블유. 알렉산더 드라이브

(74) 대리인

양영준

전체 청구항 수 : 총 15 항

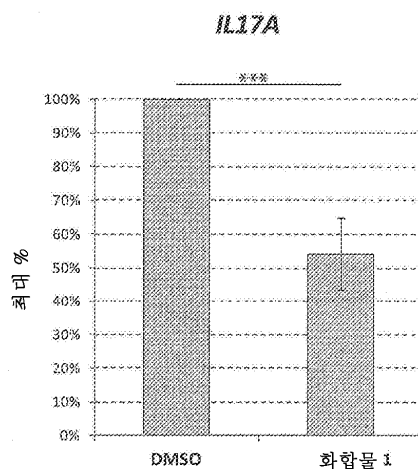
심사관 : 최연정

(54) 발명의 명칭 신규 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 (화합물 1) 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 유효량을 환자에게 국소 투여하는 것을 포함하는, 그것을 필요로 하는 인간 환자에서의 여드름의 신규 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2300/00 (2023.05)

Y10S 514/859 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

국소 도포되는 0.5 w/w % 내지 5 w/w % 범위인 농도의 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 포함하는, 여드름 치료를 필요로 하는 환자에서의 여드름을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 여드름이 몸통 여드름인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 여드름 병변이 환자의 얼굴 및 두피 부위에 발생한 것인 제약 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 환자의 환부에 1 일 1 회 투여되는 제약 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 환자의 환부에 1 일 2 회 투여되는 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤을 포함하는 제약 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 화합물이 0.5 w/w % 내지 2 w/w % 범위인 농도로 국소 도포되는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 화합물이 0.5 w/w %, 1 w/w %, 또는 2 w/w %로 국소 도포되는 것인 제약 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 여드름 치료를 위한 2차 치료제의 유효량과 공동-투여되는 제약 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 2차 치료제의 공동-투여가 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염과 동시에, 순차적으로 또는 동시적으로(contemporaneously) 함께인 것인 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염이 2차 치료제에 대한 대안의 시간에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 12

인간에 국소 투여함으로써 인간에서 IL-17A의 생산을 저해함으로써 여드름을 치료하기 위한, 0.5 w/w % 내지 5 w/w % 범위인 농도의 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 포함하는 제약 조성물.

청구항 13

인간에 국소 투여함으로써 인간에서 유도된 세포자멸을 통해 각질세포 과증식을 저해함으로써 여드름을 치료하기 위한, 0.5 w/w % 내지 5 w/w % 범위인 농도의 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 포함하는 제약 조성물.

청구항 14

인간에 국소 투여함으로써 인간에서 각질세포의 세포 사멸을 촉진함으로써 여드름을 치료하기 위한, 0.5 w/w % 내지 5 w/w % 범위인 농도의 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 포함하는 제약 조성물.

청구항 15

여드름 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 환자에서의 여드름을 치료하기 위한, 0.5 w/w % 내지 5 w/w % 범위인 농도의 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염, 및 제약상 허용가능한 운반체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 보통 여드름(acne vulgaris)의 치료를 위한 스틸벤 유도체의 신규 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 보통 여드름 (또는 단순 여드름)은 약 6 억 5 천만 명의 사람, 즉 전 세계 인구의 9.4 %에 발생하는 흔한 피부 병태이다 (문헌 [Vos et al. Lancet, 380(9859):2163-2196, 2012]). 지루, 면포(comedone), 구진, 결절, 뾰루지, 및 가능한 흉터가 있는 피부 부위를 특징으로 하는 병태는 종종 청년기에 발생하지만, 성인기로까지 더 오래 지속될 수 있다 (문헌 [James. N Engl J Med, 352(14):1463-1472, 2005]).

[0003] 청년기는 높은 사회적 불안정 기간이고, 여드름의 외관 및 이로부터의 잠재적 흉터는 종종 낮은 자존감, 우울증, 또는, 극단적인 경우에는, 자살과 같은 심리적 문제를 초래한다 (문헌 [Goodman. Aust Fam Physician, 35(7):503-504, 2006; Purvis et al. J Paediatr Child Health, 42(12):793-796, 2006]).

[0004] 그람-양성균 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) (피. 아크네스(*P. acnes*))에 대한 면역학적 반응이 환자에서의 급성 염증 반응의 개시에서 주된 역할을 하는데 관여한다 (문헌 [De Young et al. J Invest Dermatol, 83(5):394-398, 1984; Jappe et al. Br J Derm. 146(2):202-209, 2002]). 여드름 치료는 피지선세포에 의한 피지 생산을 감소시키는 것, 세포 턴오버(turnover)를 빠르게 하는 것, 박테리아 감염과 싸우는 것, 염증을 감소시키는 것, 또는 이들 전략의 일부 조합에 의해 작동한다. 여드름의 치료는 오래 걸리는 경향이 있고 주로 레티노이드, 벤조일 퍼옥시드, 및 항균제 - 특히 경구 테트라시클린 및 국소 클린다마이신의 사용에 집중되어 있다. 이들 치료에 대한 피. 아크네스의 내성에서의 증가하는 속도에 추가로, 최근 여드름 요법을 위한 1 차 표적으로서 피. 아크네스, 가장 건강한 인간 피부에서 발견된 공생균의 박멸의 유용성에 의문이

제기되었고, 대신에 일부는 박테리아에 대한 염증 반응의 치료를 기초로 하는 모델을 고려하고 있다 (문헌 [Agak et al. J Invest Dermatol, 2013]). 염증은 여드름의 후기 단계에서 염증이 있는 구진 및 농포의 존재 및 조직학적으로 개방된 면포에서의 세포 침윤물의 존재에 임상적으로 관련이 있다 (문헌 [Tanghetti, E.A. J. Clin. and Aesthetic Derm. 6(9):27-35, 2013]). 과거 10 년 동안, 새로운 발견이 초기 여드름의 발병과정의 부분으로서 염증 메커니즘의 개입을 입증하였고 (문헌 [Norris, J.F. and et al. Br. J. Dermatol. 118:651-659, 1988]) 여드름이 염증성 질병으로 간주되어야 한다는 관점이 발전하고 있다 (문헌 [Stein, L.F. and et al. J. Drugs Dermatol. Suppl 6:s67-s69, 2013]). 사실상, 피부는 면역학적으로 활성 기관이다. 털피지샘 단위의 주요 구성요소인 모낭성 각질세포 및 피지선세포는 *피. 아크네스*를 인식함으로써 선천성 면역 시스템을 활성화한다. 모낭간(interfollicular) 및 누두(infundibular) 인간 각질세포 및 피지선세포 모두는, 선천성 면역에서의 이들 세포의 역할과 일관되게 그들이 기능성 킬-유사 수용체 (TLR) 2, TLR4 및 CD14를 발현하기 때문에 *피. 아크네스*의 존재를 감지할 수 있다 (문헌 [Song, P.I. et al. J. Invest Dermatol. 119:424-432, 2002; Selway, J.L. et al. BMC Dermatol. 13:10, 2013; Nagy et al. Microbes and Infection, 8:2195-2205, 2006]). 사실상, 그람 양성균인 *피. 아크네스*는 병원체 관련 분자 패턴 (PAMP), 예를 들어 펩티도글리칸 (PGN) 및 리포테이코산 (LTA)에 의한 TLR2의 활성화를 통해 초기 및 후기 여드름 병변에서 면역 시스템을 촉발시킬 수 있다. 실제로, IL-1a가 TLR2 활성화에 대한 반응에서 각질세포에 의해 방출된다. 유사하게, PGN 및 LTA가 각질세포 과각화를 유발하고, 이것은 여드름 병변의 특징이다. 또한 *피. 아크네스*가 인간 단핵구에서 Th1 및 염증성 시토카인 (IFN γ , IL-12, IL-18, IL-8, 및 IL-1b)의 분비를 유도하는 것이 밝혀졌고, *피. 아크네스*가 털피지샘 모낭을 둘러싸는 조직 대식세포를 활성화할 수 있다는 것을 제기한다 (문헌 [Sugisaki, H. et al. J. Dermatol. Sci. 55(1):47-52, 2009; Kim, J. Dermatology. 211(3):193-198, 2005]). 마지막으로, 최근 연구는 *피. 아크네스*가 IL-17A, ROR α , ROR γ , IL-17RA를 포함하여 Th17-관련 유전자의 발현을 자극했고 CD4 T 세포로부터 IL-17의 분비를 촉발시켰다는 것을 밝혔다 (문헌 [Agak et al. J Invest Dermatol, Feb 2014 134(2): 366-73]). 따라서, 염증이 초기 및 후기 여드름 병변 모두에 존재하기 때문에, 어떤 병인 인자가 여드름 병변의 개시 또는 유지에 관련되는지에 관계없이 여드름 병변을 제거할 수 있는 항염증 요법이 제시된다.

[0005] 시판되는 순수 항염증성 화합물의 유용성은 코르티코스테로이드, 및 레티노이드 및 비타민 D 유사체의 지속적인 사용에 관한 안전 우려 때문에 제한된다. 추가로 항염증 치료는 피지 생산, 박테리아 집단, 및 피부 턴오버에 다른 효과를 가질 수 있다.

[0006] 따라서, 여드름 치료에 사용하기 위한 보다 안전한 및 보다 효능이 있는 요법에 대한 필요성이 남아있다. 현재 항염증 치료와 동일한 안전 우려를 갖지 않는 신규 경로에 의한 안전하고, 효능이 있고, 항염증성인 치료는 여드름 치료 요법에 독창적 첨가가 될 것이다.

발명의 내용

[0007] 도 1은 IL-17A의 전사 발현이 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 1 일 전처리로 억제된다는 것을 도시한다.

[0008] 도 2는 IL-17A 단백질 생산에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤에 의한 용량 의존적 효과를 도시한다.

[0009] 도 3 (A-C)은 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤이 분화된 Th17 세포에 의한 시토카인 분비를 저해하고 CD4+ T 세포의 Th17 분극화를 강력하게 억제하는 것을 도시한다.

[0010] 도 4는 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤이 피지 생산을 억제하지 않는 것을 도시한다.

[0011] 도 5는 원발성 각질세포에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 세포자멸사 효과를 도시한다.

[0012] 도 6은 149 개 생화학적 분석법의 패널에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 및 레스베라트롤을 테스트한 결과를 비교한다.

[0013] 본 발명은 항염증성 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 (1) 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 사용하는 여드름 치료 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 측면은 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 여드름 치료를 위해 환자에게 국소 도포하는 것이다.

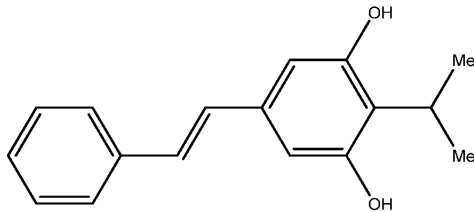
[0015] 본 발명의 또 다른 측면은 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 또는 그의 제약상 허용가능한 염

을 여드름 치료를 위해 환자에게 1 일 1 회 국소 도포하는 것이다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 여드름의 국소 치료에 유용하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 또한 5-[(E)-2-페닐에테닐]-2-(프로판-2-일)벤젠-1,3-디올, 또는 2-(1-메틸에틸)-5-[(1E)-2-페닐에테닐]-1,3-벤젠디올로 알려져 있고, 또한 본원에서 화합물 1로 지칭되고, 다음의 구조를 갖는다.



[0018]

[0019] 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 합성은 알려져 있고, 또한 많은 연구자에 의해 연구되었다 (문헌 [Krow, G.R. et al. JOC, 57(14):4040-4043, 1992; Azzena, U. et al. Synthetic Communications 33(8):1309-1317, 2003; Gao, J. et al., Advanced Materials Research 236-238:2378-2382, 2011] 참조). 또한 허베이 과학기술대학(the University of Hebei Sci & Technology)에 의한 다양한 특허 출원이 이 화합물의 합성에 대해 출원되었다 (CN 101531571 (2009); CN 101633606 (2010); CN 101648851 (2010); CN 101830764 (2010); 및 CN 101838173 (2010) 참조).

[0020] 또한 포토랍두스(*Photorhabdus*)에 의해, 화합물 1을 포함하는 스틸벤의 생산을 위한 생합성 경로가 제시되었다 (문헌 [Joyce, S.A. et al., Angewandte Chemie Int. Ed. 47:1942-1945, 2008] 참조). 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤은 원래 항생제로서 문헌 [Paul, V. et al., Journal of Chemical Ecology 7(3):589-597, 1981]에 의해 개시되었다고 여겨진다. 또한 문헌 [Li, J. et al, Applied and Environmental Microbiology 61(12):4329-4333, 1995]은 상이한 박테리아 균주로부터이지만, 화합물을 분리하였고 또한 살진균 활성을 입증하였다. 또한 살진균 활성은 WO 1995/003695에, 아그로 바이오텍(Agro Biotech)에 의해 출원된 PCT 출원에서 확인되었다. 또한 화합물은 단백질 키나제 억제제로서 웰리켄 바이오텍(Wellichem Biotech), WO 2001/042231에 기술되었다. 화합물은 건선 및 아토피성 피부염의 치료를 위한 WBI-1001로서 웰리켄 바이오텍에 의해 개발중이다.

[0021] 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 살충, 살균, 및 살진균 활성은 잘 연구되었지만, *피. 아크네스*에 대한 이것의 용도는 그렇지 않았다. 화합물 1의 역사를 보면, *피. 아크네스*에 대해 활성이라는 것이 쉽게 여겨질 수 있지만, 하기 실험 부분에서 볼 수 있는 바와 같이, 그것은 그렇지 않다. 또한 예를 들어 단백질 키나제 억제제로서의, 화합물의 다른 알려진 작용 방식이 당업자가 이 화합물이 여드름 치료에 사용하기에 적합할 것이라고 믿도록 유도하지 않을 것이다. 따라서, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤이 여드름 치료에 유용하다는 것은 예상치 못한 발견이다.

[0022] 본 발명에 이르러 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤이 Th 17 분자 경로의 억제제임이 밝혀졌다. 여드름 치료에서의 이것의 용도가 확립되는 것은 이 작용 방식에 의한 것이다.

[0023] 원래 나이브 CD4⁺ T 세포의 분화로부터 별개의 Th계인 Th17 세포는 조직 염증의 강력한 유도인자이고, Th17 세포의 과다활성이 건선, 류마티스성 관절염 및 다발성 경화증과 같은 다양한 염증 및 자가면역 질환에 연루되어 있다 (문헌 [Peck et al. Infect Immun, 78(1):32-38, 2010]). 분자 수준에서, Th17 세포는 IL-17A 및 IL-17F를 포함하는, 별개의 프로파일의 이펙터 시토카인의 생산을 특징으로 한다. 이들 시토카인은 각질세포와 같은 상이한 유형의 세포를 활성화하고, 그들의 과증식 및 또한 염증전 시토카인, 케모카인 및 항균성 펩티드의 생산을 유도하며, 이것은 다시 염증이 있는 피부에서 다른 면역 세포를 동원하고 활성화하고, 염증 반응의 증폭을 유도한다.

[0024] 연구는 여드름 환자로부터의 임상적 단리물 및 *피. 아크네스*가 IL-17 생산 Th17 세포로의 나이브 CD4⁺ CD45RA⁺ T 세포의 분화를 유도하고 인간 PBMC 세포로부터 IL-17A 및 IL-17F의 분비를 유도할 수 있다는 것을 밝혔다 (문헌 [Agak et al., J Invest Dermatol, advance online publication 12 September 2013; doi:

10.1038/jid.2013.334])). 추가적으로, IL-17 발현 세포가 여드름 환자의 피부 생검에서 발견되지만, 건강한 개체의 털피지샘 모낭 근처 피부에서는 그렇지 않다. 이들 발견은 TH17 세포의 유도 및 IL-17A 및 IL-17F의 생산이 여드름 발병과정에서 중요한 역할을 한다고 제기한다.

- [0025] 추가적으로, 염증성 시토카인의 저하 조절 또는 억제가 여드름 환자에 대한 유리한 효과를 가질 수 있다는 증거가 있다. 여드름 치료에 사용되는 비타민 D 및 비타민 A 유사체 모두가 *피. 아크네스*에 대한 반응에서 인간 PBMC 세포에서의 IL-17A 및 IL-17F의 발현을 저하 조절하는 것이 밝혀졌다 (문헌 [Agak et al., 상기 문헌] 참조).
- [0026] 이 관점에서, 피부에서 Th17 유래 염증성 시토카인의 생산을 억제하는 국소 및 전신 약물이 여드름에 대한 가능한 요법을 나타낸다.
- [0027] 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 작용 메커니즘은 현재까지 완전히 밝혀지지 않았다. 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 항염증 활성은 피부 홍조 및 두께 모두에서의 용량 의존적 감소가 있는 마우스 귀 부종 모델에서, 및 건선 및 아토피성 피부염에 대한 인간 시험에서 모두 입증되었다 (문헌 [Bissonnette et al., Arch Dermatol, 146(4):446-449, 2010; Bissonnette et al., Br. J. Dermatol., 166(4):853-860, 2012; 및 Bissonnette et al., J Eur Acad Dermatol Venereol, 26(12):1516-1521, 2012] 참조). 이 전에는, TH17 세포로부터의 IL-17 분비에 대한 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 작용이 입증되지 않았다.
- [0028] 따라서, 본 발명의 하나의 측면은 여드름 치료를 위한, 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 유효량의 용도이다. 또 다른 측면은 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 유효량으로의 여드름 치료 방법이다. 본 발명의 추가의 측면은 여드름 치료에 사용하기 위한 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염을 제공한다.
- [0029] 또한 본 발명은 여드름 치료에서의, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염, 및 제약상 허용가능한 운반체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물의 용도를 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염, 및 제약상 허용가능한 운반체 또는 희석제의 제약 조성물의 유효량으로의 여드름 치료 방법이다. 본 발명의 추가의 측면은 여드름 치료에 사용하기 위한, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염, 및 제약상 허용가능한 운반체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 그것을 필요로 하는 포유동물에서 IL-17A의 생산을 저해하기 위한, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 용도이다. 본 발명의 또 다른 측면은 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 유효량을 그것을 필요로 하는 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에서 IL-17A의 생산을 저해하는 것이다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은 각질세포의 세포 사멸을 유도하기 위한, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 용도이다. 각질세포 사멸은 각질세포 과증식 및 면포 형성을 감소시킬 것이며, 그것에 의해 모낭 차단 및 차단된 구멍에서의 후속 피지 잔류를 감소시킨다. 본 발명의 또 다른 측면은 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 유효량을 그것을 필요로 하는 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에서 각질세포의 세포 사멸을 유도하는 것이다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 실시양태는 Th17-분극화 조건으로 항원투여된 배양 피부 조직으로부터의 IL-17A의 생산을 저해하기 위한, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 용도이다.
- [0033] 본 발명의 하나의 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 약 0.5 w/w % 내지 약 5 w/w % 범위인 농도로 국소 도포된다.
- [0034] 또 다른 실시양태에서, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 약 0.5 w/w % 내지 약 2 w/w %의 농도로 국소 도포된다.
- [0035] 또 다른 실시양태에서, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 약 0.5 w/w %, 1 w/w %, 또는 2 w/w %의 농도로 국소 도포된다.
- [0036] 또 다른 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 약 0.5

w/w %의 농도로 국소 도포된다.

- [0037] 또 다른 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 약 1.0 w/w %의 농도로 국소 도포된다.
- [0038] 또 다른 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 약 2.0 w/w %의 농도로 국소 도포된다.
- [0039] 본 발명의 하나의 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 그것을 필요로 하는 환자의 환부에 1 일 1 회 또는 2 회 국소 도포된다.
- [0040] 또 다른 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 그것을 필요로 하는 환자의 환부에 1 일 1 회 국소 도포된다.
- [0041] 또 다른 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 그것을 필요로 하는 환자의 환부에 1 일 2 회 국소 도포된다.
- [0042] 본 발명의 하나의 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 그것을 필요로 하는 환자의 환부에 1 일 1 회 또는 2 회 약 0.5 w/w % 내지 약 5 w/w %의 양으로 국소 도포된다.
- [0043] 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 및 이것의 제약상 허용가능한 염의 생물학적 프로파일은 현재-이용가능한 제품의 그것과 상이하기 때문에, 이것은 여드름 치료를 위해 선택할 수 있는 신규 요법을 환자에게 제공한다. 선택할 수 있는 다른 국소 치료가 이용가능하지만, 치료 기간 동안 제한 없이 넓은 신체 표면에 도포를 가능하게 하는, 허용가능한 안전성 프로파일과 높은 수준의 효능을 갖춘 신규 국소 약제가 여전히 매우 많이 필요하다.
- [0044] 본 발명에 이르러 하나의 실시양태에서, 환부(들)에 대한 투여 빈도가 이전에 구상된 것보다 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 도포는 본원의 임의의 실시양태에 의해 나타난 용량으로, 1 일 2 회, 1 일 1 회, 격일에 1 회; 1 주 2 회; 1 주 3 회, 또는 1 주 1 회 환부에 도포될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 치료는 두 단계, 1 일 1 회 또는 2 회와 같은 초기 투여 빈도 후, 격일로; 1 주 2 회; 1 주 3 회, 또는 1 주 1 회와 같은 유지 단계로 투여될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 측면에서 적어도 하나의 추가의 치료제와 투여되는, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 조합은 항균제와 같이, 여드름 질병에 대해 상이한 작용 방식을 갖는 둘 이상의 동인(動因)을 제공할 것이다.
- [0046] 또한 다른 치료적 치료 요법 및 제품과의 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 조합이 사용될 것이 예상된다. 따라서, 하나의 실시양태에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염이 하나 이상의 2차 작용제와 조합하여 국소 도포된다.
- [0047] 대상으로 적어도 하나 이상의 치료적 화합물을 투여하는 다양한 경로가 당업계에 잘 알려져 있고, 국소, 경구, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비측, 직장, 귀 및 안구 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 실시양태에서, 2차 작용제의 투여는 국소 또는 경구이다. 또 다른 실시양태에서 2차 작용제의 투여는 국소이다. 또한 2차 치료제가 환자의 신체 상에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 화합물과 동일한 국부 병변에 도포될 것이 예상된다.
- [0048] 적합하게는, 2차 작용제는 제약상 또는 피부학적 허용가능한 조성물로 투여된다. 적합한 작용제는 벤조일 퍼옥시드, 아젤라산, 답손, 살리실산, 트레티노인, 아다팔렌, 및 다른 레티노산 유도체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 클린다마이신 포스페이트, 클린다마이신, 린코마이신, 레타파몰린, 무피로신, 푸시드산, 테트라시클린 및 이것의 유도체 (예를 들어 독시시클린, 미노시클린, 및 테트라시클린), 페니실린 및 이것의 유도체, 및 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론 종류의 화합물을 포함하는 이것의 모든 유도체와 같은 국소 항생제의 조합 치료가 본원에 포함된다. 본원에 사용될 경구 제품으로 사용하기 위한 2차 치료제는 이소트레티노인, 및 테트라시클린 및 그의 연장 방출 버전을 포함하는 이것의 유도체 (예를 들어 독시시클린, 미노시클린, 및 테트라시클린), 페니실린 및 이것의 유도체, 및 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론 종류의 화합물을 포함하는 이것의 모든 유도체와 같은 경구로 이용가능한 항생제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 그들의 투여 경로의 모든 다양한 순열이 본원에 포함되도록 의도된다.

- [0049] 둘 이상의 약제는 함께 (2차 치료제에 따라), 순차적으로, 동시적으로 또는 아침 또는 밤과 같은 대안의 시간에 투여될 수 있다. 동일한 제제로의 2차 치료적 활성의 혼입은, 숙성되는 동안, 안정성 및 비상용성의 일반적인 문제를 겪을 수 있다.
- [0050] 결국, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 상이한 제제에서 동시에 함께 사용되거나, 순차적으로 사용되거나, 동시적으로(contemporaneously) 사용되거나 심지어 완전히 대안의 시간에, 예를 들어 하나는 아침에 및 하나는 여드름 치료에 이용가능한 일반적인 작용제와 밤에 투여될 수 있다.
- [0051] 용어
- [0052] 본원에 사용되는 용어 "조정하다(modulate)" 또는 "조정한다(modulates)"는 양, 품질 또는 특정 활성의 효과에서의 증가 또는 감소를 지칭한다.
- [0053] 본원에 사용되는 용어 '생물학적 작용제'는 항체, 모노클론 항체, 단백질, 폴리펩티드 및 뉴클레오티드와 같은 복합 생물학적 분자를 의미한다.
- [0054] 본원에 사용되는 용어 '여드름'은 몸통 여드름, 얼굴 여드름, 두피 여드름, 등 여드름, 위팔 여드름, 아래팔 여드름, 또는 다리 여드름을 포함한다.
- [0055] 본원에 사용되는 여드름 병태와 같은 의학적 병태를 위한 '치료', 또는 '치료 방법'은 의학적 병태의 징후, 증상, 또는 진행을 감소시키거나, 완화시키거나 지연시키는 방법을 지칭한다. 본원에 사용되는 '치료'는 치유(cure)를 함축하지 않는다. 치료는 의학 및 제약 분야에서 인식되는 바와 같이, 임상적 유용성을 갖기 위해 집단, 예를 들어 여드름 환자의 집단의 모든 구성원에 효과적일 필요는 없다.
- [0056] 본원에 사용되는 병태를 "치료하다", 이를 위한 '치료', 또는 이에 관련된 '치료 방법'은 (1) 병태 또는 병태의 하나 이상의 생물학적 증세를 완화하거나 예방하는 것, (2) (a) 병태를 초래하거나 이에 책임이 있는 생물학적 캐스케이드에서 하나 이상의 지점 또는 (b) 병태의 하나 이상의 생물학적 증세를 방해하는 것, (3) 병태와 관련된 하나 이상의 증상 또는 효과를 경감시키는 것, 또는 (4) 병태 또는 병태의 하나 이상의 생물학적 증세의 진행을 느리게 하는 것을 의미한다. 당업자는 "예방"이 절대적인 용어가 아닌 것을 이해할 것이다. 의약에서, "예방"은 병태 또는 그의 생물학적 증세의 가능성 또는 중증도를 실질적으로 감소시키기 위한, 또는 그러한 병태 또는 그의 생물학적 증세의 시작을 지연시키기 위한 약물의 예방적 투여를 지칭하는 것으로 이해된다.
- [0057] 본원에 사용되는 "제약상 허용가능한 부형제"는 제약 조성물에 형태 또는 경도를 부여하는데 관여하는 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각 부형제는 개체에 투여될 때 본 발명의 화합물의 효능을 실질적으로 감소시킬 수 있는 상호작용 및 제약상 허용가능하지 않은 제약 조성물을 초래할 수 있는 상호작용을 피하도록 뒤섞일 때 제약 조성물의 다른 성분과 상용성이 있어야 한다. 추가적으로, 물론 각 부형제는 이것을 제약상-허용가능하게 만들기 위해 충분히 높은 순도를 가져야 한다.
- [0058] 본원에 사용되는 Th17 활성화 조건은 이펙터 Th17 헬퍼 세포로 조직 내에 상주하는 T 세포를 분화하게 만드는 조직 배양 조건을 지칭한다. 본원에 사용되는 'Th17 활성화'는 용어 'Th17 자극'과 상호교환되어 사용된다.
- [0059] 본원에 사용되는 '대상' 및/또는 '환자'는 인간 대상 및 성인, 청소년 및 소아 환자를 포함하는 환자를 포함한다.
- [0060] 본원에 사용되는 화합물 또는 약제의 '국소' 투여는 상피 또는 피부점막 내층에의 도포 및 이를 통한 흡수를 지칭한다. 하나의 측면에서, 국소 도포는 여드름 병변에의 도포를 포함하는 피부의 표피에의 도포와 같은 대상의 진피 또는 외부 외피에의 도포로 구성되거나 이를 포함한다. 국소 도포에 사용하기 위한 적절한 비히클 및 제약 운반체는 당업계에 알려져 있다.
- [0061] 하나의 실시양태에서, 용어 "제약상 허용가능한"은 연방 또는 주 정부의 규제 당국에 의해 승인가능하거나 미국 약전 또는 동물에, 및 보다 특히 인간에 사용하기 위해 일반적으로 알려진 다른 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "운반체"는 희석제, 아조반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭하며 이것과 함께 치료제가 투여된다.
- [0062] 본원에 사용되는 용어 "한" 및 "하나"는 나열된 성분의 "하나 이상" 또는 "적어도 하나"를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 단수의 사용은 달리 구체적으로 언급하지 않는 한 복수를 포함하는 것이 당업자에게 명확할 것이다.
- [0063] 본원에 사용되는 용어 "및/또는"은 목록의 개별 요소를 부가적으로 및 또한 대안으로 모두 포함하고 따라서 이 것이 연결되어 이들 요소가 "및"으로 또는 각각 "또는"으로 선택적으로 연결된 것과 같이 이해되어야 한다. 더

옥이, 또한 물론 단수로 사용되는 용어는 복수를 포함한다.

- [0064] 본 출원 전반에 걸쳐, 다양한 실시양태의 기술은 언어 "포함하는"을 사용하지만, 일부 특정 경우에, 실시양태는 언어 "필수적으로 구성되는" 또는 "구성되는"을 사용하여 기술될 수 있다.
- [0065] 질병 또는 병태의 치료를 위한 화합물 또는 작용제의 '유효량'은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0066] 본원에 사용되는 "포유동물"은 소아, 성인 및 노인 환자를 포함하는 인간을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] **실험 부분**
- [0068] **실시예 1: 말초혈 유래 CD4⁺ T 세포 피부-상주 면역 세포 시토카인 생산에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과**
- [0069] 이 실시예에서, 본 발명자들은 염증전 Th17-편중 각테일로 항원투여된 생체 외 인간 피부로부터 IL-17A의 방출을 저해하는 화합물 1의 능력을 연구한다.
- [0070] 생체 외 인간 피부 체외이식에서의 피부-상주 면역 세포의 자극은 IL-17A, IL-17F, 및 IL-22를 포함하지만 이에 제한되지 않는 염증전 시토카인의 생산을 유도하고, 이에 의해 피부 염증 과정을 표적하는 면역조절 치료제를 평가하는 신규 모델 시스템을 제공한다. 이 시스템을 사용하여, 본 발명자들은 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤이 IL-17A 유도를 저해할 수 있다는 것을 밝힌다.
- [0071] 염증전 시토카인의 발현을 조정하는 테스트 화합물의 능력은 피부-상주 면역 세포 활성화 방법을 사용하여 평가되었다. 복부성형 수술로부터 얻어진 생체 외 인간 피부는 지방을 제거하도록 처리되었고 조직은 ~750 마이크론으로 피부분절되었다. 그 다음 피부분절된 피부는 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 및 2 mM L-글루타민 (깁코(Gibco))의 최종 농도로 1 % 펀지존(Fungizone) (인비트로젠(Invitrogen)), 50 µg/ml 겐타마이신 (인비트로젠), 및 0.5 % PSG를 함유하는 항생제/항진균제 용액을 함유하는 PBS로 실온에서 각 5-10 분 2 회 연속 행구어 세정되었다. 절편은 일회용 단일-사용 생검 펀치로 10 mm 직경 원형 절편으로 절단되었고, 그 다음 이것은 30 µl의 64 % 소 콜라겐 용액 (오르가노제네시스(Organogenesis), #200-055)을 함유하는 0.4 µm PCF 막 트랜스웰 (밀리셀(Millicell) #PIHP01250)의 상부 챔버에 놓였다. 피부 샘플은 37 °C에서 30 분 동안 콜라겐 용액 상에 놓이도록 하였다. 그 다음, 트랜스웰 상의 피부 샘플은 6-웰 플레이트 (웰 당 1 개의 샘플)로 이동되었고, 하부 챔버는 1 mL 완전 배지 (각화 배지)로 채워졌고 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤으로 처리되거나 처리되지 않았다.
- [0072] 배양 마지막 날에, 피부 조직은 나중에 qPCR에 의한 분석을 위해 RNA로 수확되었다 (개별 피부 공여자 N=9).
- [0073] 피부-상주 면역 세포는 PBMC에 대한 문헌에 사용된 조건과 유사한 Th17-분극화 조건 하에 계내 활성화되었다. 구체적으로, 인간 피부 체외이식 (조건 당 공여자 당 3 벌 샘플)은 Th17-분극화 조건 존재 하에 T 세포 항원 수용체에 관여하고 공동-자극 신호를 제공하도록 배양 배지에서 CD3 (2 µg/ml; 클론 UCHT1; 비디 파르민젠(BD Pharmingen)) 및 CD28 (1 µg/ml; 클론 #37407; 알앤디 시스템즈(R&D Systems)) 항체로 자극되었고, 이것은 IFNγ (2 µg/ml; 클론 #25723; 알앤디 시스템즈) 및 IL-4 (2 µg/ml; 클론 #3007; 알앤디 시스템즈)에 관한 중화 항체, rh IL-6 (10 ng/ml), rh IL-1b (10 ng/ml), 및 TGFβ (1 ng/ml)를 포함하는 알앤디 시스템즈로부터의 재조합 인간 (rh) 시토카인 뿐만 아니라 서던바이오테크(SouthernBiotech)로부터의 rh IL-21 (10 ng/ml)를 포함한다.
- [0074] 전체 RNA는 퀴아젠(Qiagen)의 미니 RNA 단리 키트 (Cat # 74106)를 사용하여 약 30-40 mg의 조직으로부터 단리되었다. 조직은 1 % 2-β-메르캅토에탄올로 보충된 300 µL의 RLT 완충액을 사용하여 3 번째 사이클마다 2 분 휴지기가 있는 9 회 사이클로 6300 rpm에서 30 초 동안 프리셀리스(Precellys)-24 기계에서 균질화되었다. 프로테이나제 K를 함유하는 RNA아제가 없는 물 (600 µl)이 균질화액에 첨가되었고 15 분 동안 55 °C에서 소화되었다. 소화된 조직은 10,000Xg에서 3 분 동안 스핀 다운되었고 상등액은 제조업자의 프로토콜에 따라 퀴아젠의 알엔이지(RNeasy) 미니 컬럼을 사용하여 RNA 단리에 사용되었다. 각 기술적 복제를 위해, 100 ng의 RNA가 어플라이드 바이오사이언시스(Applied Biosciences) RNA-대-CT(RNA-to-CT) 1 스텝 키트 (AB 카탈로그(Catalog) # 4392938) 뿐만 아니라 정량화될 각 유전자에 특이적인 택맨(TaqMan) 프로브를 사용하여 20 µL PCR 부피에서 주형으로서 사용되었다. 어플라이드 바이오사이언시스의 마스터 믹스(Master Mix)는 ROX 염료 내부 대조군을 갖는다. 원스텝플러스(OneStepPlus) PCR 기계가 RT 단계 및 40 회 증폭 사이클 모두에 사용되었다. 각 유전자는 3 회 반복하여 실행되었고 평균 Ct 값은 상대적 유전자 발현을 계산하기 위해 사용되었다.
- [0075] 상대적 유전자 발현 데이터는 기술적 3 회 반복으로 실행된 PCR 증폭으로부터 3 회 생물학적 반복을 통해 평균

화되었다. 모든 데이터는 미처리된 대조군 샘플 (1로 설정됨)에 대해 표준화되었고, 평균 배수 변화 (+/- SEM)가 각 그래프를 위해 계산되었다. 처리군 간의 유의한 차이가 양측 검정 스튜던트 t 테스트, $p \leq 0.05$ 에 의해 확인되었다.

- [0076] 전반에 걸쳐 'Th17 조건' 또는 'Th17 분극화 조건'으로 지칭되는, T-헬퍼 세포-유형 17 (Th17) 분화에 유리한 항체 및 시토카인으로의 생체 외 인간 피부 체외이식의 자극이 Th17형 시토카인, IL-17A 및 IL-17F의 전사 발현 및 단백질 분비에서의 극적인 유도를 이끌어낸다. 화합물 1은 이것이 이 모델에서 시토카인 발현에 영향을 미치는지 보기 위해 조사되었다. Th17-분극화 조건 하에 피부-상주 T 세포의 자극 하루 전의 처리가 대조군-자극된 체외이식 배양과 비교하여 자극 24 시간 후 IL-17A 유전자 발현 수준을 감소시켰다 (도 1). 상대적 전사 수준은 개별 피부 체외이식 (공여자 당 처리군 당 N=3)으로부터 추출된 온전한 RNA로부터 qPCR을 사용하여 측정되었고 델타 델타 Ct 방법에 의해 정량화되었으며, 이것은 내인성 하우스키핑 대조군 유전자 (예를 들어, 베타-액틴)와 관심있는 유전자의 발현 (예를 들어, IL-17A 유전자 발현)을 비교한다.
- [0077] Th17-관련 시토카인의 화합물 1-매개성 저해의 활성 용량 범위를 더 이해하기 위해, IL-17A 단백질 분비가 화합물 1의 적정 용량의 존재 또는 부재 하에 Th17 분극화 조건 하의 배양 5 일 후 말초혈 CD4+ T 세포에서 조사되었다 (도 2). 상등액은 배양 기간의 말기에 수확되었고 분비된 단백질은 매그픽스(Magpix) (자성-기재 루미넥스(Luminex) 기술)에 의해 분석되었다. 이 실험에서, IL-17A 단백질 수준은 용량-의존적 방식으로 화합물 1에 의해 저해되었다.
- [0078] 도 1, 실험 개요에서 볼 수 있는 바와 같이, 다수 피부 공여자에 대한 역제가 비교될 수 있도록 100 %로 설정된 비히클-처리된 (0.2 % DMSO) 샘플에 대한 *il17a* 유전자 발현의 화합물 1 (10 μ M)-유도 역제가 도시된다. 본원에 사용된 화합물 1은 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤을 지칭한다.
- [0079] 도 2는 Th17-분극화된 말초혈 T 세포로부터의 IL-17A 단백질 수준에 대한 화합물 1에 의한 용량 의존적 효과를 도시한다.
- [0080] 항원투여된 생체 외 피부 및 말초혈 CD4+ T 세포에서 IL-17A를 저해하는 화합물 1의 능력은 화합물 1이 여드름과 같이 IL-17A의 분비를 요구하는 염증성 피부 병태의 치료에 효능이 있을 것이라는 주장을 뒷받침한다.
- [0081] 실시예 2: Th17 분극화된 세포 및 Th17 세포 분화에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과
- [0082] 24 시간 동안 선재성 Th17 분극화된 세포에 화합물 1을 처리하면 농도 의존적 방식으로 감소된 IL-17 분비를 보였다. 활성화자 비드가 고정화 항-CD3와 비교하여 IL-17 방출에서의 더 큰 증가를 이끌었지만, 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 억제 효과는 TCR 자극 중 어느 것에 대해 비교가능하였다 (도 3).
- [0083] 30 μ M에서 화합물은 단독으로 자극에 대해 80 - 95 %로 IL-17 수준을 감소시켰다. 레스베라트롤은 30 μ M에서 단지 부분적 억제 및 더 낮은 농도에서 상승이 있는 IL-17에 대한 이상성(biphasic) 효과를 발휘하였다.
- [0084] 30 μ M에서 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤은 완전히 IL-17의 분비를 억제하였고 10 μ M에서 IL-17은 약 80 %로 감소되었다. 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤 100 nM에서, IL-17 분비는 60 % 초과만큼 저해되었다 (도 3 (A-B)). 화합물은 IL-17 단백질의 분비와 동시에 및 동일한 역가로 IL-17A mRNA 발현을 억제하였다 (도 3 (C)).
- [0085] CD4+ T 세포는 냉동 바이알로 올셀즈 엘엘씨(AllCells LLC)로부터 구입되었다.
- [0086] 나타낸 바와 같이, 도 3는 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤이 분화된 Th17 세포에 의한 시토카인 분비를 저해하고 CD4+ T 세포의 Th17 분극화를 강력히 억제하는 것을 도시한다. 도 3 (A)에서: 분화된 Th17 세포는 화합물 1 또는 레스베라트롤 (0.01 - 30 μ M)로 처리되었고 항-CD3/CD28 비드로 자극되었다. 24 시간 후 조정 배지로 분비된 IL-17의 농도가 측정되었다. 도 3 (B - C)에서: CD4+ T 세포는 화합물 1 또는 레스베라트롤 (0.01 - 30 μ M)이 있거나 없는 Th17 분극화 각테일, 항-CD3 및 CD28 항체 존재 하에 5 일 배양 동안 Th17 세포로 분극화되었다. 도 3 (B)는 pg/ml 단위의 총 분비된 IL-17A 단백질로 표현된 화합물 1에 대한 농도-반응 곡선이다. 도 3 (C)는 PPIB로 표준화된 IL-17A mRNA 발현이다. 도 3 (A)에 도시된 결과는 단일 실험으로부터이다. 도 3 (B 및 C)에서의 데이터는 유사한 결과를 갖는 적어도 1 회 반복된 대표 실험으로부터이다.
- [0087] CD4+ T 세포는 본질적으로 문헌 [Yang et al. Nature, 454(7202):350-352, 2008]에 기술된 바와 같이, 10 % HI-FBS, 55 μ M β -ME, 가용성 항-CD28 (3 μ g/mL) 및 IL-1 β (10 ng/mL), IL-6 (30 ng/mL), TGF β (0.5 ng/mL), IL-21 (10 ng/mL), IL-23 (10 ng/mL), 항-IFN γ (10 μ g/mL) 및 항-IL-4 (10 μ g/mL)의 Th17 시토카인/항-시토카인 항체 각테일을 함유하는 이스코브(Iscove)의 변형 돌베코(Dulbecco) 배지 (IMDM)에서 항-CD3 항체

(2 $\mu\text{g/mL}$)로 코팅된 용기에서 5 일 동안 배양함으로써 Th17 아형으로 분화되었다. 선제성 Th17 분극화된 세포, 분극화 5 일 배양 기간에 대한 화합물의 효과를 조사하기 위해, 세포는 수확되었고, 세척되었고, IMDM +10 % HI-FBS에서 2 일 동안 휴지되었다. 그 다음 세포는 항-CD3로 코팅된 또는 코팅되지 않은 및 계열 희석된 화합물을 이미 함유하는 원형 바닥 96-웰 플레이트로 75,000 세포/웰로 접종되었다. 그 다음 코팅되지 않은 웰로 분배된 세포는 T-활성자 CD3/CD28 비드 (비드:세포의 비는 1:1)를 수용하였다. 모든 플레이트는 24 시간 동안 배양되었다. Th17 분극화에 대한 화합물 효과를 조사하기 위해, 모든 Th17 분극화 각테일 구성요소 (상기)로 보충된 IMDM에서 새로 제조된 CD4⁺ 세포는 계열 희석된 화합물을 이미 함유하는 항-CD3 코팅된 원형 바닥 96-웰 플레이트로 낮은 세포 밀도 (20,000 세포/웰)로 바로 접종되었고 5 일 동안 방해받지 않고 배양되었다.

[0088] **실시예 3:** 피지선세포에서 지방생성에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과.

[0089] 피지선세포에서 지방생성의 조절에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과는 시험관 내 분석법을 사용하여 평가되었다. 간략하게, 인간 불멸화된 피지선세포 (tsSV40 및 hTERT)가 접종되었고 피지선세포 성장 배지에서 전면생장으로 성장할 수 있게 하였다. 전면생장되면, 세포는 큰 T 항원 분해를 개시하도록 37 °C에서 이동되었다. 2 일 후, 세포는 1 μM T0901317 및 비히클 (DMSO) 또는 화합물 1을 함유하는 피지선세포 표지 배지로 자극되었다. 화합물 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤은 10, 3, 1, 0.3 및 0.1 μM 의 농도로 테스트되었다. 다음 날, 배지는 1 μM T0901317 및 원래의 처리 또는 1 μM 인슐린을 더한 비히클을 함유하는 피지선세포 표지 배지로 대체되었다. 웰 당 2 μl 의 14C-아세테이트가 첨가되었고 플레이트는 4 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 2 시간 후, 웰 당 10 μl 의 CTB 시약이 표준화를 위해 첨가되었다. 인큐베이션은 남은 2 시간 동안 계속되었고 플레이트는 CTB 신호에 대해 Ex. 560 Em. 590에서 해독되었다. 그 다음 세포는 세척되었고, 트립신이 처리되었고 지질 추출을 위해 유리 바이알로 이동되었다. 결과는 대조군 (LXR+인슐린 군)에 대한 지질 생산 %로 표현되었다.

[0090] 도 4에 도시된 바와 같이, 데이터는 대조군 (LXR+인슐린 군)에 대한 억제 %를 나타낸다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 나타낸다. 데이터는 3 회 반복으로부터이다.

[0091] 화합물 1은 피지선세포 지방생성 분석법에서 활성이 없는 것으로 밝혀졌다. 대조군 (LXR + 인슐린)에 대해 피지선세포 모델에서의 화합물 1이 증가된 지방생성을 향한 경향이 있었다.

[0092] **실시예 4** 각질세포 생존율에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과

[0093] 각질세포 생존율에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과는 시험관 내에서 평가되었다. 각질세포 과증식이 차단을 증가시키고 여드름에서 면포 형성을 촉진시킬 수 있다. 화합물 1이 10 및 30 μM 에서 명백히 세포독성인 것이 밝혀졌다. 원발성 각질세포에서 세포자멸을 유도하는 화합물 1의 능력은 여드름 환자에서 효능에 기여할 수 있다. 데이터는 도 5에 도시된다.

[0094] 원발성 인간 각질세포는 HKGS 성장 보충액을 함유하는 에피라이프(EpiLife) 배지에서 배양되었고 플레이트 당 250,000 개의 세포로 조직 배양 플레이트에 접종되었다. 다음 날, 배양 배지는 제거되었고 그 다음 각질세포는 비히클 대조군 (DMSO) 또는 증가하는 농도의 화합물 1 (1, 10, 30 μM)을 함유하는 배양 배지로 처리되었다. 배양 48 시간 후, 각질세포는 조직 배양 플레이트로부터 제거되었고 세포 생존율은 유동 세포 계측법을 사용하여 세포자멸성 마커 (아넥신 V 및 프로피듐 아이오다이드)에 대한 염색으로써 평가되었다. 생존가능한 각질세포의 백분율은 세포자멸성 마커 모두에 대해 염색되지 않은 세포로서 정량되었다.

[0095] **실시예 5:** *피. 아크네스*에 대한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 효과.

[0096] 항균 상승작용의 이 개념을 평가하기 위해 이용되는 박테리아 균주는 임상적 단리물 *피. 아크네스* 6601, 6602, AN24, 100372, 및 기준 균주 ATCC6919이었다. 이들은 어퍼 프로비던스(Upper Providence) 장소에서 감염성 질병 CEDD에 의해 보유한 내부 배양 GSK 컬렉션으로부터 수용되었다. 박테리아 접종물이 제조되었고, 최소 억제 농도 (MIC)의 측정은 CLSI 지침 방법에 대해 기술된 바와 같이 (문헌 [Bhate, K. et al. Brit. J. Derm. 168:474-485, 2013]) 보충된 브루셀라(Brucella) 혈액 아가 상에서 수행되었다. 간략하게, 희석된 항균제가 달 귀진 용융 아가에 첨가되었고 무균상태로 페트리 디쉬로 부어졌고 교체될 수 있게 하였다. 혐기성 환경에서 인큐베이션 24 시간 후 박테리아 콜로니는 현탁되었고 0.5 맥파랜드(MacFarland) 표준과 동등한 탁도로 조정되었다. 1-2 마이크로리터의 접종물이 각 항생제 함유 아가 플레이트 상에 놓였고 30 분 동안 흡수할 수 있게 하였다. 그 다음 플레이트는 반전되었고 성장에 대한 관찰 전 48-72 시간 동안 혐기적으로 인큐베이션되었다. 박테리아 성장을 억제하는 가장 낮은 약물 농도는 MIC로 명명되었다.

[0097] 128 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC는 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤으로 테스트된 모든 *피. 아크네스* 균주에 대해

관찰되었다 (표 1).

**표 1. *피. 아크네스*에 대한
화합물 1의 MIC ($\mu\text{g/ml}$).**

	화합물 1
6601	128
6602	128
AN24	128
100372	128
ATCC6919	128

이들 결과를 기초로 화합물 1은 이 박테리아 종에 대해 MIC < 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 을 갖는 클린다마이신과 같은 진정한 항생제와 대조적으로 *피. 아크네스*에 대해 항균제로서 활성이 있다고 간주되지 않을 것이다.

실시예 6: 코르티코스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 비타민 D 유사체, 및 레티노산 수용체 길항제의 그것과 상이한 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스티벤의 생물학적 프로파일

화합물 1 및 텍사메타손 (저역가 코르티코스테로이드), 플루티카손 프로피오네이트 (중간 역가 코르티코스테로이드), 클로베타솔 프로피오네이트 (고역가 코르티코스테로이드), 칼시트리올 (비타민 D의 활성형), 타크롤리무스 (면역억제 약물), 및 레티노산 수용체 길항제 (LE 135)와 같은 피부과 병태에 사용되는 다른 활성제의 효과는 다이버시티 패널 바이오맵(Diversity Panel BioMAP) 시스템에 사용된 원발성 인간 세포 유형에 대해 시험관 내에서 비교를 통해 연구되었다 (문헌 [Berg et al. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 53(1):67-74, 2006]).

이용되는 바이오맵™ 다이버시티 플러스 시스템(BioMAP™ Diversity Plus System)은 다중 질병-관련 신호 경로를 활성화하는 상이한 질병 상태를 모방하기 위해, 선택된 작용제로 자극되는 인간 세포 (내피 세포, 말초혈 단핵 세포, B 세포, 상피 세포, T 세포, 대식세포, 섬유아세포, 각질세포 및 평활근 세포)의 특정 조합을 이용하는 12 개의 분석법 시스템을 포함하였다. 이 연구 동안 총 148 개의 표현형 판독기 (분석법)가 측정되었다. 화합물 1은 이 연구에서 이용된 하나 이상의 테스트 농도에서 염증성, 면역 기능, 조직 리모델링 및 항-증식 활성화에 책임이 있는 25 개 초과 바이오마커를 조정하는 이것의 능력을 입증하였다. 처리된 샘플에서의 각 파라미터에 대한 측정 값은 비를 산출하기 위해 8 개의 DMSO 대조군 샘플로부터 (동일한 플레이트로부터)의 평균 값으로 나누어졌다. 그 다음 모든 비는 로그10으로 변환되었다. 유의성 예측 포락선은 역사적 대조군 (99 % 및 95 %)에 대해 계산되었다. 7 개의 기준 화합물 텍사메타손, 클로베타솔 프로피오네이트, 플루티카손 프로피오네이트, 칼시트리올, 타크롤리무스 (FK-506), SR-2111 (ROR γ 역 아고니스트) 및 LE-135 (RAR 길항제)의 바이오맵™ 프로파일은 화합물 1과 비교되었고, 선택된 역치 > 0.7 보다 큰 피어슨(Pearson) 상관관계를 갖는 그것과 유사한 프로파일이 확인되었다. 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스티벤의 프로파일은, 0.7 이하의 피어슨 스코어로, 텍사메타손, 클로베타솔 프로피오네이트, 플루티카손 프로피오네이트, 칼시트리올, 타크롤리무스 (FK-506), SR-2111 (ROR γ 역 아고니스트) 및 LE-135 (RAR 길항제)의 그것과 통계적으로 상당히 상이한 것이 밝혀졌다 (표 2). 이들 결과는 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스티벤, 또는 그의 제약상 허용가능한 염이 비교 화합물의 그것과 구별되는 작용 메커니즘을 통해 작동하고 있다는 것을 나타낸다.

[0103] 표 2.

비교 화합물	화합물 1에 대한 피어슨 상관관계 스코어
덱사메타손	0.03
클로베타솔 프로피오네이트	0.11
플루티카손 프로피오네이트	0.20
칼시트리올	-0.03
FK-506	0.10
SR2211	0.13
LE135	0.25
레스베라트롤	0.19

[0104]

[0105]

식물로부터 생성된 히드록실화된 스틸벤 유도체인 레스베라트롤에서의 스틸벤 약물작용발생단의 구조적 유사성을 고려할 때, 화합물 1은 그들의 상대적 활성 프로파일을 평가하기 위해 레스베라트롤과 나란히 스크리닝되었다. 3,5-디히드록시-4-이소프로필-트랜스-스틸벤의 활성 프로파일은 레스베라트롤 및 화합물 1 간의 낮은 피어슨 상관관계 스코어에 의해 나타난 바와 같이 레스베라트롤의 그것과 상당히 상이하다 (표 2). 이것을 더 확인하기 위해, 두 화합물은 149 개의 생화학적 분석법 패널을 통해 비교되었다. 활성에서 중첩이 거의 없고, 두 화합물은 상이한 프로파일의 활성을 나타낸다 (도 5). 따라서, 화합물 1의 기능 및 활성은 레스베라트롤의 활성에 관한 공개된 문헌을 기초로 예측될 수 없다.

[0106]

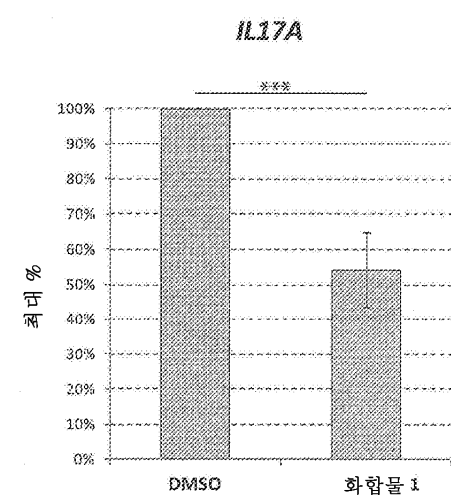
특허 및 특허 출원을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 이 명세서에 인용된 모든 간행물은 각 개별 간행물이 완전히 기재된 것처럼 구체적으로 및 개별적으로 본원에 참고문헌으로 도입되도록 나타난 것과 같이 본원에 참고문헌으로 도입된다.

[0107]

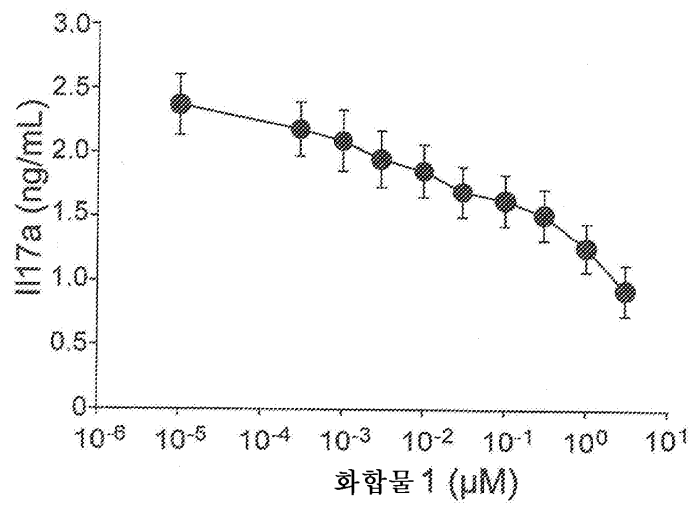
상기 설명은 그의 바람직한 실시양태를 포함하는 본 발명을 완전히 개시한다. 본원에 구체적으로 개시된 실시양태의 변형 및 개선은 다음의 청구범위의 범위 내에 있다. 추가의 고심 없이, 당업자가 전술한 설명을 이용하여 본 발명을 최대한으로 이용할 수 있는 것으로 믿어진다. 따라서, 본원의 실시에는 임의의 방법으로 본 발명의 범위를 제한하지 않고 단지 예시로서 해석되어야 한다. 독점적 재산 또는 특권이 청구되는 본 발명의 실시양태는 다음과 같이 정의된다.

도면

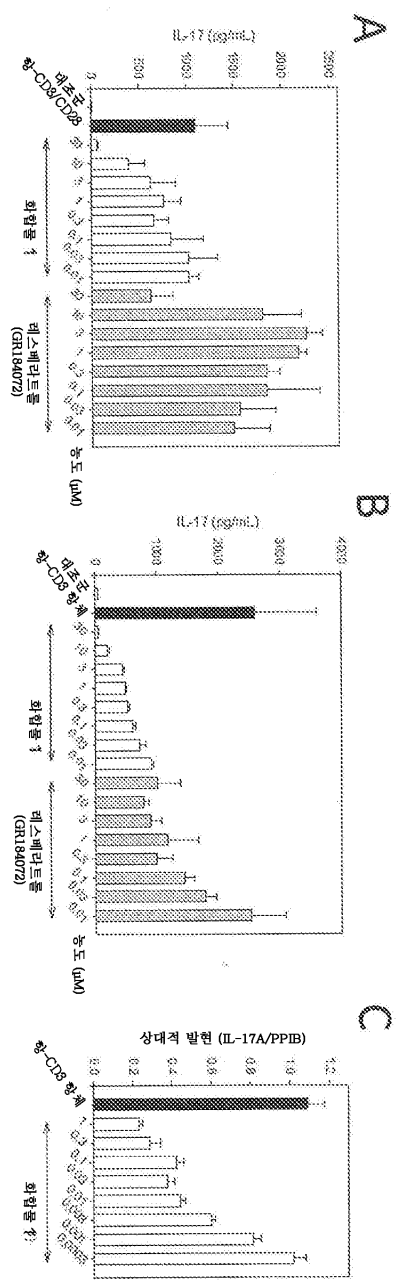
도면1



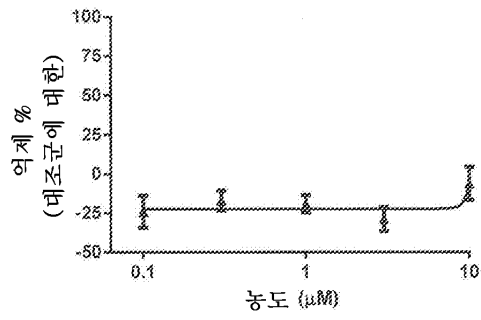
도면2



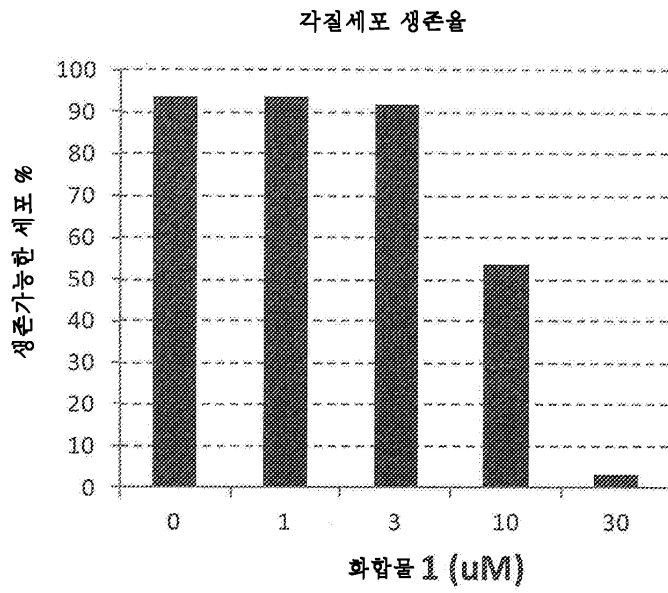
도면3



도면4



도면5



도면6

