



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0022602
(43) 공개일자 2024년02월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
C07D 401/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2022.08)
A61K 31/444 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7001632
- (22) 출원일자(국제) 2022년06월17일
심사청구일자 2024년01월15일
- (85) 번역문제출일자 2024년01월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/099496
- (87) 국제공개번호 WO 2022/262854
국제공개일자 2022년12월22일
- (30) 우선권주장
202110668896.0 2021년06월17일 중국(CN)

- (71) 출원인
난징 웰베스트 파마슈티컬 씨오., 엘티디
중국, 장수 210023, 난징, 쉬안우 디스트릭스,
699-1 쉬안우 에비뉴, 세컨드 플로어
- (72) 발명자
첸, 민
중국, 장수 210023, 난징, 쉬안우 디스트릭스,
699-1 쉬안우 에비뉴, 세컨드 플로어
- (74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 14 항

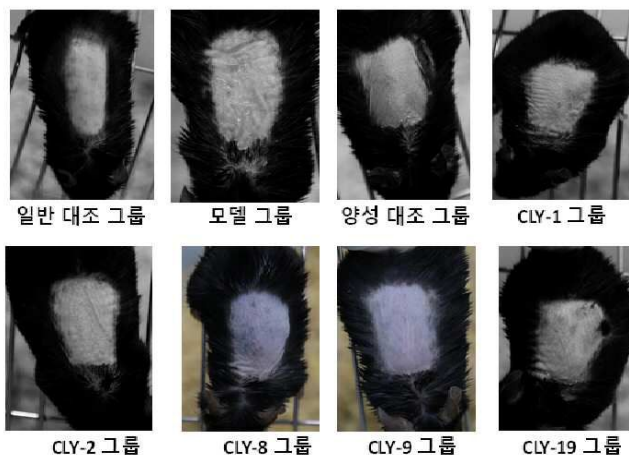
(54) 발명의 명칭 CLY계열 화합물 및 그 제조방법과 약물의 제조용도

(57) 요약

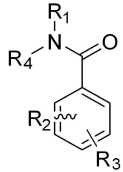
본 발명은 CLY 계열 화합물 및 그 제조 방법 및 약물의 용도를 개시하는데, 상기 CLY 계열 화합물은 식 I 구조를 갖는 화합물, 그 용제 또는 그 약학적으로 허용되는 염이며, 동물 모델 실험에 따르면 화합물 CLY 계열은 기미 쥐 모델의 피부와 혈액 내 타이로시나아제 수준을 현저히 감소시키고 피부 내 간 사이토카인(SCF), C-kit 단백질

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



의 발현을 감소시키하여, 기미의 색소 형성을 억제한다. 피부 상처 치유, 흉터 형성 감소, 탈모 마우스 모델의 모발 성장 촉진 및 모낭 손상 감소, 토끼 귀 여드름 모델 증상 감소, 모공 막힘 및 여드름 감소, CLY 계열 화합물은 급성 GVHD 생쥐의 생존 시간 증가, 임상 증상 감소, 급성 GVHD에 대한 치료 효과, 폐 섬유증 생쥐 모델 폐 조직에서 MMP-2 및 MMP-9 수준을 현저히 감소시키고 TIMP-1 및 VEGF 수준을 증가시킬 수 있으며 말초 혈액에서 SOD 및 CAT 효소 수준을 증가시킬 수 있다. 피부 상처 치유, 흉터 형성 감소, 탈모 마우스 모델의 모발 성장 촉진 및 모낭 손상 감소, 토끼 귀 여드름 모델 증상 감소, 모공 막힘 및 여드름 감소, CLY 계열 화합물은 급성 GVHD 생쥐의 생존 시간 증가, 임상 증상 감소, 급성 GVHD에 대한 치료 효과, 폐 섬유증 생쥐 모델 폐 조직에서 MMP-2 및 MMP-9 수준을 현저히 감소시키고 TIMP-1 VEGF 수준을 증가시킬 수 있으며 말초 혈액에서 SOD 및 CAT 효소 수준을 증가시킬 수 있다. 동시에 말초 혈액의 SOD 및 CAT 효소 수준을 증가시킬 수 있으며 CLY 계열 화합물은 말초 혈액의 IL-17 수치를 낮추고 IL-10과 같은 염증성 지표를 증가시켜 류마티스 관절염 쥐의 관절염 증상을 개선할 수 있습니다. 이 화합물은 단독으로 또는 다른 약물과 함께 사용할 수 있어 위의 질병의 치료를 위한 새로운 약물 옵션을 제공한다.



식 I

(52) CPC특허분류

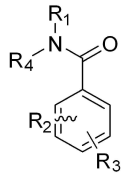
- A61K 31/4545* (2013.01)
- A61P 11/00* (2018.01)
- A61P 17/00* (2018.01)
- A61P 17/02* (2018.01)
- A61P 17/10* (2018.01)
- A61P 17/14* (2018.01)
- A61P 19/02* (2018.01)
- A61P 29/00* (2023.02)
- C07D 401/14* (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

식 I 구조를 갖는 화합물, 그 호변 이성구조체, 그 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염

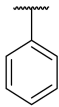
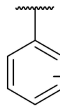
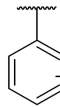


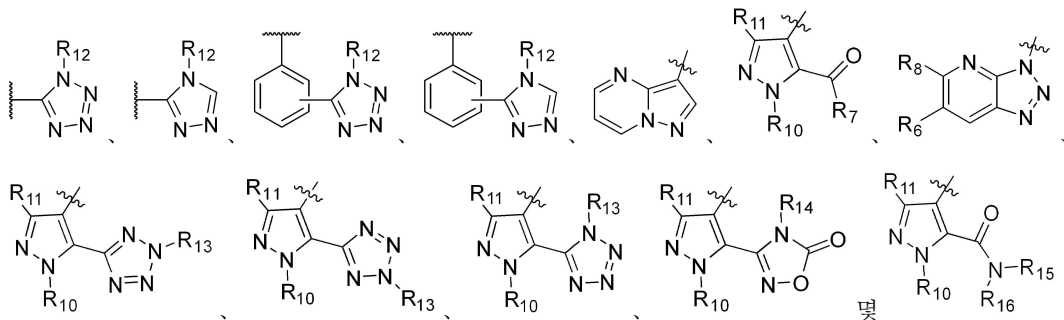
식 I

그중:

R1은 N, O 및 S 중 적어도 하나를 포함하는 치환 또는 비치환된 5~6원계 헤테로고리, 벤젠고리 및 헤테로고리 또는 적어도 2개의 헤테로고리의 병환환이며, 치환기는 H, 할로젠, 하이드록실, 알콕시기 또는 (C1-C4) 알킬기이다.

R2는 H, 할로젠, 수산기, 메톡시, 에톡시, 아미노기, 메틸 또는 에틸이다.

R3는 H, 할로젠, 수산기, 메톡시, 에톡시, 아미노기, (C1-C3) 알킬기, , , ,



R4는 치환 또는 비치환된 5~6원시클로알킬기 또는 N 또는 O에서 선택된 1~3 헤테로원자를 갖는 4~7원 헤테로고리이며, 치환기는 H, -NH2, -OH, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알콕시기, 아미노기, (C1-C4) 알킬아미노기에서 선택된다.

그중:

R6 및 R8은 각각 독립적으로 H, 할로젠 또는 (C1-C4) 알킬이고 R6 및 R8은 동시에 할로젠이다.

R7은 수산기, (C1-C4) 알콕시기, (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기이다.

R10 및 R11은 각각 독립적으로 H, (C1-C4) 알킬 또는 (C3-C6) 사이클로알킬이다.

R12는 H, 할로젠, -OH, -NH2 또는 (C1-C3) 알킬에서 선택된다.

R13은 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기이다.

R14는 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기이다.

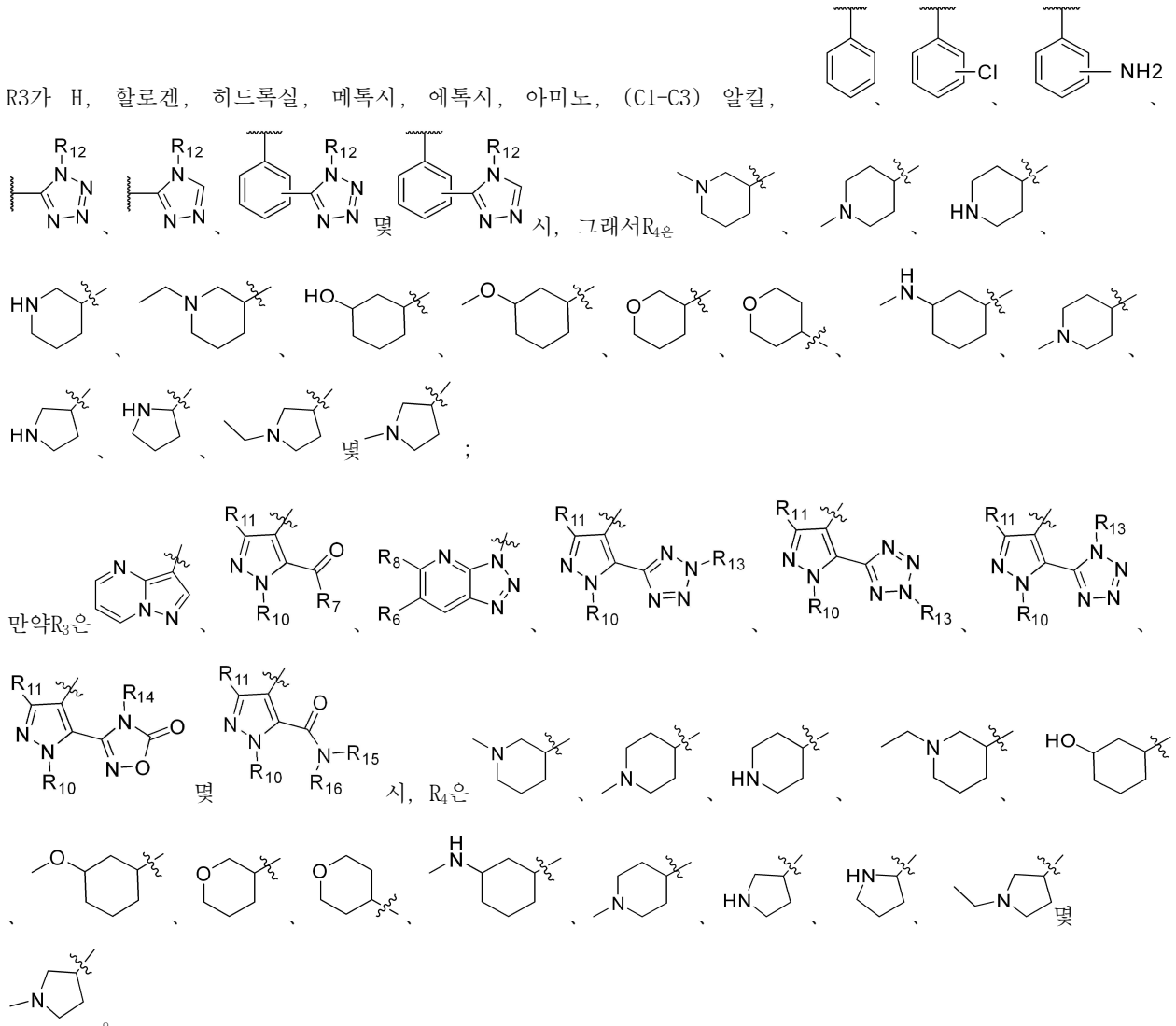
R15는 하이드록실, 테트라졸릴, (C1-C2) 알킬술폰닐 또는 트리플루오로메틸술폰닐이다.

R16은 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기 (C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기 (C1-C4)

알킬기이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염의 호변이성 구조체인, 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물이다.



청구항 3

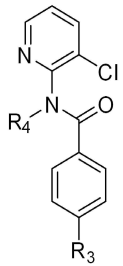
제1항에 있어서, R₂가 H, 히드록실 또는 메틸기인 것을 특징으로 하는 용매화물 또는 약학적으로 허용되는 염인 호변이성 구조체이다.

청구항 4

R₁이 치환 또는 비치환된 피리딘기, 이소퀴놀린기 또는 피롤로피리딘기 인 것을 특징으로 하는 청구항 1에 기재된 화합물 또는 용매화물 또는 약학적으로 허용되는 염. 치환기는 H, 염소 또는 메틸이다.

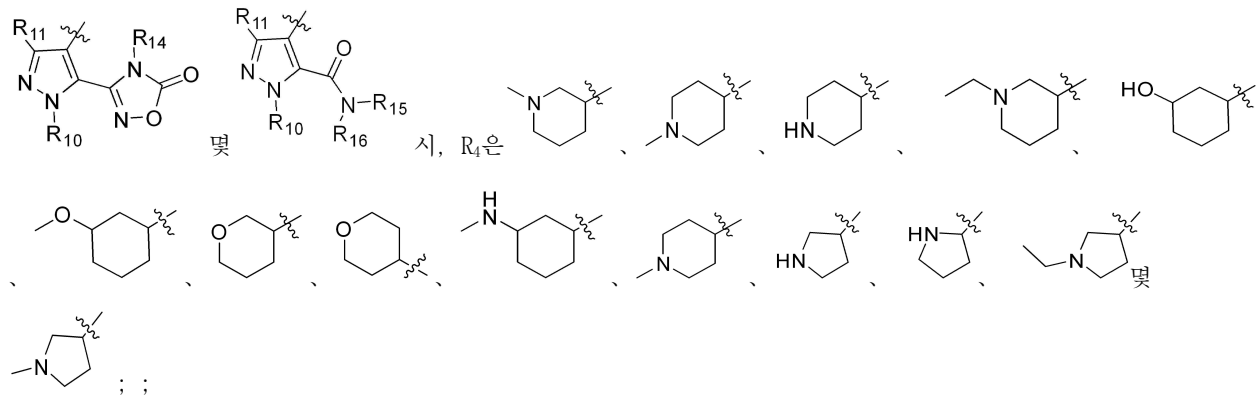
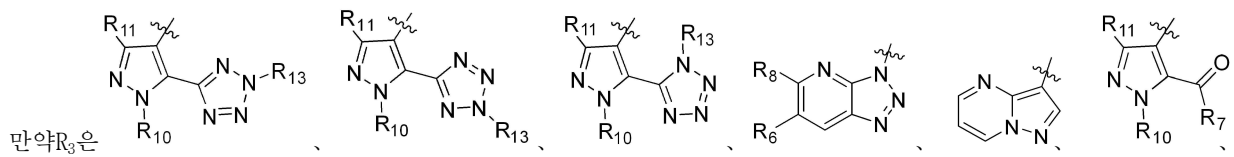
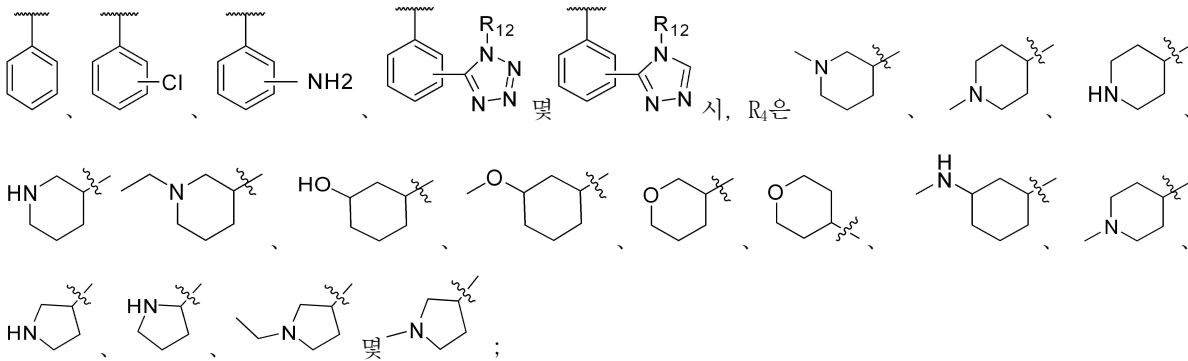
청구항 5

식 I-a 구조를 갖는 화합물, 그호변이 성구조체, 그 용매화물 또는 그약학적으로 허용되는 염
 식 I-a이중 R3가 H, 할로젠, 히드록실, 메톡시, 아미노이다.



식I-a

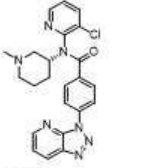
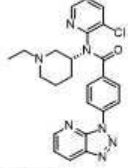
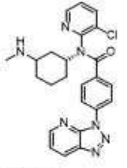
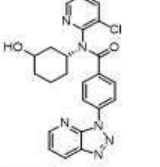
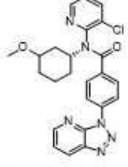
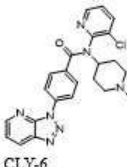
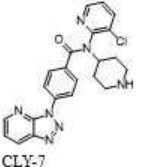
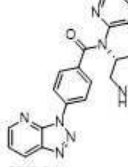
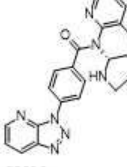
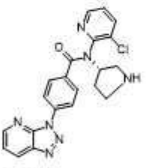
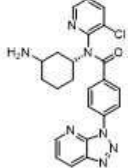
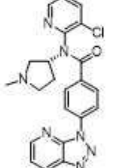
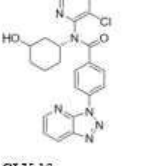
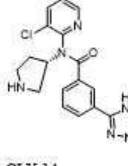
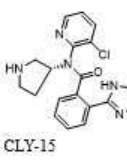
메틸 또는 그이하의치환 또는 비치환그룹에서 선택된 경우,

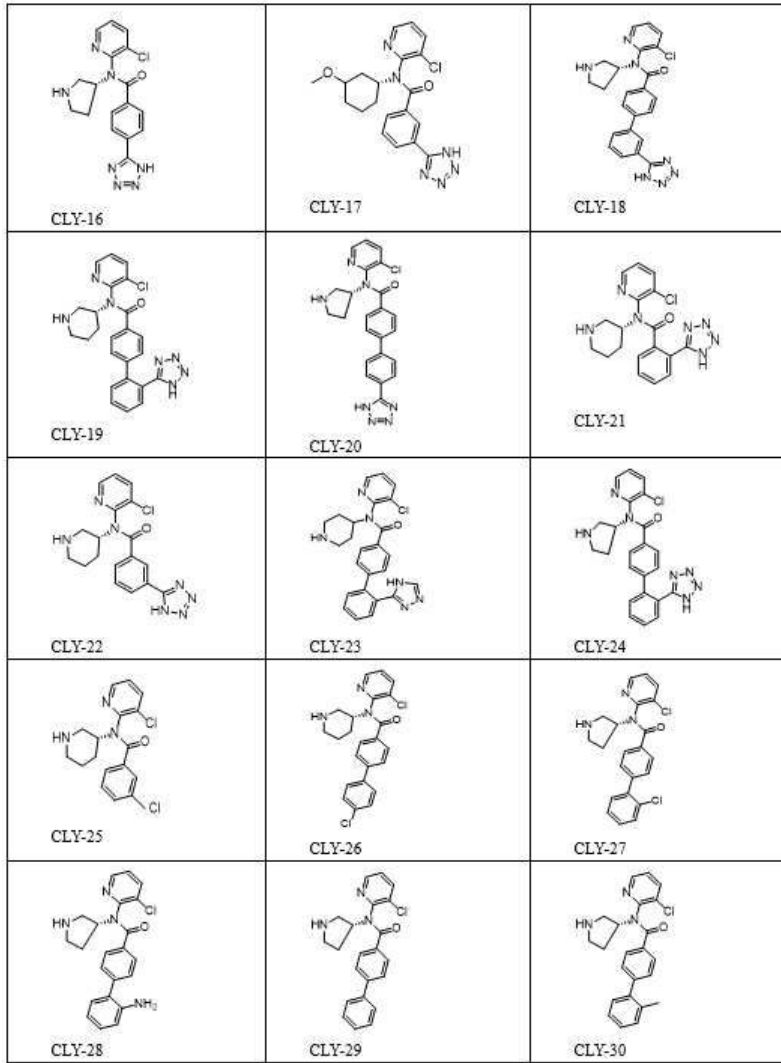


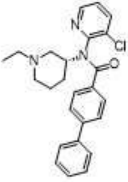
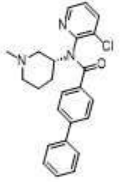
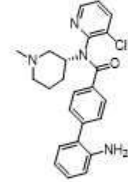
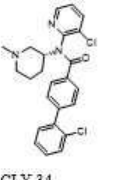
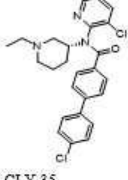
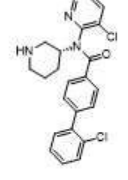
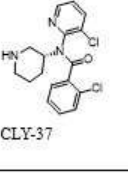
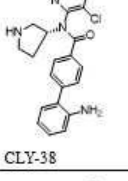
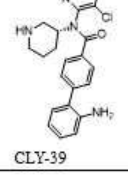
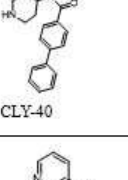
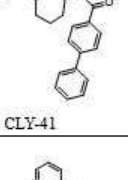
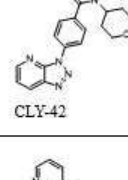
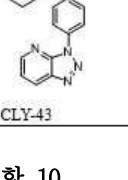
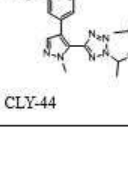
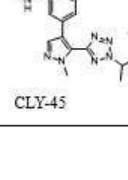
그중 R6, R7, R8, R10, R11, R12, R13, R14,R15,R16의 제한은청 구항 1과일치한다.

청구항 9

용매화물 또는 약학적으로 허용되는 염 인청구항 1 내지 6의 어느 하나에 기재된화합물: 다음 화합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물:

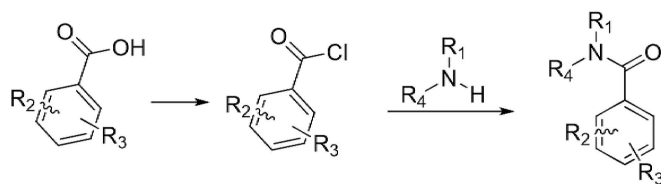
 <p>CLY-1</p>	 <p>CLY-2</p>	 <p>CLY-3</p>
 <p>CLY-4</p>	 <p>CLY-5</p>	 <p>CLY-6</p>
 <p>CLY-7</p>	 <p>CLY-8</p>	 <p>CLY-9</p>
 <p>CLY-10</p>	 <p>CLY-11</p>	 <p>CLY-12</p>
 <p>CLY-13</p>	 <p>CLY-14</p>	 <p>CLY-15</p>



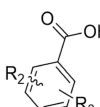
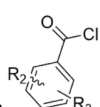
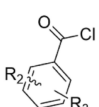
 CLY-31	 CLY-32	 CLY-33
 CLY-34	 CLY-35	 CLY-36
 CLY-37	 CLY-38	 CLY-39
 CLY-40	 CLY-41	 CLY-42
 CLY-43	 CLY-44	 CLY-45

청구항 10

식(I)에 표시된 화합물의 제조 방법 :



I

원료  준비에 의해  , 그후에,  과 R_4-NH-R_1 생성된 다음 최종생성물 I을생산한다.

그중 R1, R2, R3, R4는청구항 1-9 중하나에 정의 된 것 과일치한다.

청구항 11

한약물조성물은그특징지어지는청구항 1 내지 9 중하나에기재된화합물또는청구항 10에기재된화합물에서, 그호변 이성구조체는그용매화물또는그약학적으로허용되는염이활성성분또는주요활성성분이며, 약학적으로허용되는담체로

보충된다.

청구항 12

청구항 1 내지 9 중하나에 기재된 화합물 또는 청구항 10에 기재된 화합물, 그 호변이성구조체, 그 용매 화합물 또는 약학적으로 허용되는 염 또는 청구항 11에 기재된 조성물의 치료 및 예방 약물 제조에 적용된다.

청구항 13

청구항 1 내지 9 중 어느 하나에 기재된 화합물 또는 제 10항에 따라 제조된 화합물로서, 그 용매 화합물 또는 그 약학적으로 허용되는 염 또는 제 11항에 기재된 조성물이 기미, 흉터, 남성 호르몬성 탈모, 지루성 탈모, 반점, 여드름, 비늘병, 한공각화증, 모주각화증, 건선증, 습진, 아토피성 피부염, 이식물 항숙주병, 의항숙주병, 폐섬유화증 또는 류마티스관절염 등의 질병의 약물 적용이다.

청구항 14

청구항 1 내지 9 중하나에 기재된 화합물 또는 청구항 10에 기재된 화합물, 그 호변이성구조체, 그 용매 화합물 또는 그 약학적으로 허용되는 염 또는 청구항 11에 기재된 조성물로 제조된 약학적으로 허용되는 제형 및 임의 투여 방법이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 화학 분야에 속하며, 구체적으로 CLY 계열 화합물, 그 제조 방법 및 약물 제조 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기미는 중년 및 젊은 여성에게 잘 발생하는 후천성 색소 장애 질환으로 발병 기전이 매우 복잡하고 영향 요인이 많으며 다양한 원인에 의한 피부 멜라닌 침착이 기미의 직접적인 원인이다.

[0003] 티로시나아제는 일련의 산화 반응을 거쳐 멜라닌을 생성한다. 티로신은 티로시나아제의 작용으로 멜라닌 체내에서 도파로 산화되고, 도파는 도파 산화효소에 의해 도파퀴논으로 산화되며, 도파퀴논은 결국 티로시나아제에 의해 산화되어 멜라닌을 형성한다. 이 과정에서 일련의 산화 및 항산화 반응 장애는 기미의 발생 및 발달을 유발할 수 있으며 티로신의 증가는 기미 발병의 주요 물질적 기초이다. 일련의 산화 반응의 균형이 흐트러지면 체내에서 활성산소가 과도하게 생성되고 동시에 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD)와 같은 항산화 효소의 활성이 감소하여 막지질의 과산화물을 유발하고 과산화 지질을 형성하며 과산화 지질이 불안정하고 빠르게 분해되어 알데히드를 생성하고 최종 생성물인 말론디알데히드(MDA)가 그에 따라 증가하며 인지질과 단백질을 빠르게 공격하여 색소 세포의 산화적 손상을 유발하고 티로시나아제의 산화 반응을 촉진하고 멜라닌을 증가시키고 피부 기저층에 침착시킨다. 따라서 피부 조직에서 MDA의 양을 줄이고 항산화 효소 SOD의 활성을 높이는 것은 기미의 예방 및 치료에 매우 중요하다. 기미는 반복되기 쉽고 치료가 어렵다. 기미를 해결할 수 있는 제품은 시장에 거의 없으며 기미는 재발하기 쉽다. 하이드로퀴논은 최초의 가장 널리 사용되는 미백제이지만 피부 색소의 불균일한 분포, 강한 자극성, 심지어 암을 유발할 수 있는 등의 이유로 미백 및 기미 치료에 사용이 제한되어 있다. 알부틴은 현재 가장 널리 사용되는 미백제 중 하나이지만 효과는 제한적이다.

[0004] 흉터는 물리적, 생물학적, 화학적 및 기타 요인의 손상이 인간의 피부 연조직에 작용하여 피부 연조직에 심각한 손상을 주어 완전히 정상적으로 복구되지 못하고 섬유조직으로 대체되어 복구되는 것으로 외관과 기능에 영향을 미치는 증상이다. 흉터는 환자에게 큰 육체적 및 정신적 고통, 특히 화상, 화상 및 심각한 외상 후 남은 흉터를 가져온다. 흉터 치료는 어렵고, 현재로서는 붉고 딱딱한 흉터를 부드럽게 하고 얇게 하고, 넓은 흉터를 좁게 하고, 두꺼운 흉터를 가늘게 할 수 있을 뿐 흉터를 완전히 제거할 수는 없다. 따라서 상처 치유 초기에 개입을 시작하는 것이 매우 중요하며 흉터 형성을 효과적으로 줄이고 외관을 개선하며 기형을 교정하고 기능을 회복할 수 있다. 현재 흉터 치료에 일반적으로 사용되는 방법에는 수술 치료, 레이저 치료, 냉동 치료 및 약물 치료가

있다. 일반적으로 사용되는 주요 약물은 글루코코르티코이드와 비타민이다. 글루코코르티코이드는 명백한 항조적 섬유증 효과가 있지만 많은 독성 및 부작용이 있다. 비타민 A는 체내에서 비타민 A 대사의 중간 생성물로 국소 염증을 감소시키고 상피 세포의 성장을 촉진하며 콜라겐 합성을 감소시키고 섬유아세포의 DNA 합성을 감소시키고 세포 성장을 억제할 수 있다. 레티노인의 농도가 높을수록 성장 억제 효과가 더 분명하다. 그러나 레티놀산의 효능은 제한적이며 전신 투여의 독성 및 부작용이 적지 않으며 외용은 피부에 명백한 자극을 주며 농도가 증가함에 따라 증가한다.

[0005]

반점 대머리(alopecia areata, AA)는 국소 피부가 대체로 정상인 비만흔성 탈모이다. 일반적인 경우 갑작스러운 탈모반으로 심할 경우 두피 전체에 영향을 줄 수 있으며 이때를 전대머리(alopecia totalis, AT)라고 하며 겨드랑이털, 음모를 포함한 온몸의 모든 모발이 영향을 받을 경우 전대머리(alopecia universalis, AU)라고 하며 환자의 용모와 심리에 심각한 영향을 미치기 쉽다. 현재 병인은 완전히 밝혀지지 않았으며 자가면역 기능 이상 또는 불안정, 신경정신적 요인이 중요한 관련 요인으로 간주됩니다. 반점 대두는 치료 가능성이 더 높지만 다른 원인에 의해 발생하는 반점 대두는 치료 확률이 매우 다르다. 일부 반점 대머리 환자는 자연적으로 치유될 수 있으며 일부 반점 대머리 환자는 수년 동안 지속될 수 있다. 미녹시딜은 반점 대머리 치료에 흔히 사용되는 외용 약물로 피부 혈관 확장을 촉진하고 국소 혈액 순환을 개선하며 모발 성장을 촉진할 수 있다. 주로 프레드니솔론, 복합 베타메타손 등을 포함하여 심각한 반점 대두에 일반적으로 사용되는 글루코코르티코이드는 경구, 외용 또는 피내 주사할 수 있다. 글루코코르티코이드 약물이 적합하지 않은 환자의 경우 면역억제제로 치료할 수 있으며 일반적인 약물로는 사이클로스포린, 메토틱렉세린, 글루코코르티코이드 및 면역억제제가 있으며 이러한 약물은 부작용이 더 많다.

[0006]

지루성 탈모라고도 알려진 안드로겐 유래 대머리(AGA)는 안드로겐 의존성 유전성 모발의 일종으로 흔하고 자주 발생하는 질병입니다. 대부분 20~30대 남성에게 발병한다. 탈모는 주로 머리 윗부분에서 시작되며 대부분 이마 양쪽 끝에서 시작되며 윗부분에서 시작하는 경우도 있다. 탈모 부위는 점차 위로 확장되고 머리카락은 점차 가늘어지며 결국 머리 윗부분의 머리카락이 대부분 또는 완전히 빠지지만 후두부와 양쪽 측두부의 머리카락은 의존적이며 말굽 모양이며 이 띠 모양 영역의 머리카락은 정상이다. 탈모 부위에 피부가 밝고 모공이 줄어들거나 약간 부드러운 털이 남다. 탈모의 속도, 범위 및 중증도는 유전 및 개인의 영향을 받는다. 일반적으로 30세 전후가 가장 빠르게 발달하며 심한 전신 대두는 드물다. 여성의 경우 정수리에서 발생하는 미만성 탈모가 많아 정수리 머리카락이 숱이 적어진다. 중국의 역학 조사에 따르면 남성 안드로겐성 탈모의 유병률은 21.3%, 여성 6.0%입니다. 안드로겐성 탈모의 원인과 발병기전은 아직 명확하지 않으며 일반적으로 안드로겐과 그 수용체가 이 질병의 발생에 중요한 역할을 한다고 믿어지며 유형 II 5 α -환원효소는 발병의 중요한 요소입니다. 정상적인 생리학적 조건에서 안드로겐은 체내에서 모발의 성장과 발달을 자극하고 촉진하는 역할을 하지만 특정 부위에서는 모발의 탈실을 유도할 수 있으며 테스토스테론은 체내의 주요 안드로겐으로 5 α -환원효소에 의해 디하이드로테스토스테론으로 전환되며 후자는 최종 모발이 털에서 털로 전환되어 궁극적으로 탈모로 이어질 수 있다. 현재 이상적인 치료법은 없으며 탈발성 질환의 난치성 유형이다. 미녹시딜은 비특이적 탈모 치료제로 FDA에서 승인한 1차 외용제이지만 사용 중 얼굴과 사지 다모증을 유발할 수 있으며 중단 후 치료 효과가 점차 사라진다. 안드로겐은 발병에 큰 역할을 하기 때문에 최근 몇 년 동안 새로운 치료법은 항안드로겐 효과를 통해 모낭의 축소를 중단하려고 시도했다. 페나스테아민은 유형 II 5 α -환원효소 선택적 억제제로 최근 몇 년 동안 페나스테아민이 AGA 치료에 효과적이며 모발의 성장을 지속적으로 개선할 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 그러나 페나스테아민은 성기능 이상, 정자 일과성 감소, 남성의 유방 발달 이상 등의 이상반응을 유발하며, 동물 실험에서 기형 유발 효과가 발견되어 소아 및 가임기 여성에게는 적합하지 않다. 시메티딘은 5개월 이상 계속 복용해야 하며 부작용으로는 남성의 유방 발달, 발기부전, 성욕 저하 등이 있습니다. 경구 피임약은 주로 소고놀론, 레보닐프로게스테론(레보닐메틸프로게스테론), 프로게스테론, 프로게스테론, 노로게스테론(옥심프로게논), 디에스테르 프로게스테론 및 아세틸프로게스테론 등이 있다. 여성 AGA 치료에 많이 사용되며 치료 후 6~12개월이 지나면 모발이 개선된다.

[0007]

여드름(일반적으로 청춘공으로 알려져 있음)은 모낭 피지선에서 잘 발생하는 만성 염증성 질환으로 발병률이 약 9.4%입니다. 여드름의 생성은 사춘기 피부의 생리학적 및 병리학적 변화와 밀접한 관련이 있다. 임상 증상은 주로 여드름, 구진, 농포, 결절, 낭종, 흉터 등이 있으며 이는 환자의 외모와 심리에 심각한 영향을 미친다. 여드름은 여러 발병 기전과 관련이 있으며 모낭이 비정상적으로 각화되어 여드름을 형성하는 것은 이 질병의 발병의 중요한 기초이며 염증과 감염은 여드름의 발병 요인이다. 여드름 환자의 피지선이 크고 피지선 분비가 증가하며 피지내 리놀레산 수치가 상대적으로 감소하여 지방 합성에 영향을 미치고 여포 상피에 지방산이 부족하여 여포의 과도한 각화를 유도하고 상피 세포가 정상적으로 떨어지지 않으며 모낭 피지선의 입구가 과도하게 작아지고 피지가 원활하게 배출되지 않아 여드름이 형성된다. 모낭 피지선의 입구가 막혀 모낭 피지선의 저산소 환경을 형성하여 혐기성 프로피온산균의 증식을 유발하고 피지를 분해하며 화학적 케모카인을 생성하고 백혈구가 응집하여 구

진을 형성한다. 모낭 피지선에 많은 수의 호중구가 응집되어 프로피온산균을 삼킨 후 염증이 발생하여 많은 수의 고름 세포가 축적되어 농포와 낭종을 형성하고 나중에 오목한 흉터를 형성하기 쉽다. 안드로겐 수치 증가는 여드름 생성을 가속화하는 핵심 연결 고리이며, 피부 각화가 모낭 피지선 카테터를 비정상적으로 막아 세균의 체류, 번식 및 염증을 유발합니다. 여드름과 유사한 비정상적인 각화 기전을 갖는 질병은 어류 비늘병, 모주 각화병(모발 이끼라고도 함), 모낭 각화병, 한공 각화증 등이 있으며, 모주 각화병은 모낭 입구가 확대되고 내부에 각질이 있으며, 어류 비늘병은 땀샘과 피지샘이 감소하고 모낭에 각질 색전증이 나타나다. 위의 질병은 반복되기 쉽고 치료가 어렵다. 비정상적인 각질화를 치료하고 각질과 여드름을 제거하는 약물은 주로 레티놀이다. 레티놀은 각질을 억제하고 피지 분비를 감소시키며 각질 형성 세포의 정상적인 각질을 촉진하고 면역 조절 및 항염 효과가 있어 여드름, 구진 및 농포 형성을 감소시킬 수 있으며 여드름, 비늘병, 모주 각질병, 모낭 각질병 및 한공 각질병과 같은 각질 이상 질환을 치료하는 데 임상적으로 널리 사용된다. 그러나 외용은 피부에 자극을 주어 쉽게 붉어지고 따끔거리고 원래의 피부 손상을 악화시키며 장기간 외용은 피부 얇아짐, 광민성 및 피부 장벽 손상 등을 유발할 수 있으며 경구용 내복은 간 손상 및 혈중 지질 상승과 같은 부작용이 있다. 따라서 이러한 질병을 치료하는 더 많은 약물이 임상적으로 필요하다.

[0008] 건선은 흔한 만성 재발성 염증성 피부 질환으로 전 세계적으로 건선 환자의 자연인 유병률은 0.1%~3%이다. 중등도 중증 환자는 대사 증후군 및 심혈관 손상의 위험이 증가한다. 따라서 건선의 조기 진단과 조기 치료는 증상을 조절하고 합병증을 예방하는 데 매우 중요하다. 경증 및 중등도 건선은 외용 치료를 선호한다. 글루코코르티코이드의 외용 효과는 좋지만 장기간의 지속적인 대면적 사용은 적합하지 않으며, 비타민 A산의 외용은 플라크 건선 치료에 더 나은 효과가 있으므로 피부 자극에 주의를 기울여야 하며, 칼슘 포스포트리올과 같은 비타민 D3 유도제도 좋은 효과가 있지만 얼굴과 피부 주름에는 적합하지 않으며, 칼슘 조절 신경 인산 효소 억제제(타크모스, 피메모스 등)는 두피, 피부 주름, 생식기 및 기타 부위에 사용할 수 있지만 장기 및 대면적 사용은 림프암 및 피부암의 위험을 증가시킬 수 있습니다. 면역억제제는 주로 홍피성, 농포성, 관절염 건선에 사용되며, 명백한 감염 또는 범발성 농포성 건선 환자는 항균제를 사용해야 하며, 면역억제제는 중증 환자의 치료에 사용할 수 있지만 장기간 사용하면 부작용이 많고 골수 억제, 간 및 신장 기능 손상, 감염 위험 증가 등이 일반적이다.

[0009] 습진(일명: 아토피 피부염, 이소성 피부염)은 다양한 내부 및 외부 요인에 의해 발생하는 심한 가려움증 및 피부 염증 반응으로 재발하기 쉽다. 습진은 병인이 복잡하다. 경증 및 중등도 습진은 주로 외용 치료 위주이다. 피부 손상에 따라 적절한 제형 및 약물을 선택한다. 아급성 및 만성 습진은 타크모스 연고 및 피메모스 연고와 같은 적절한 글루코코르티코이드 크림, 타르 제제 또는 면역 조절제를 사용해야 합니다. 중증 환자는 글루코코르티코이드와 면역억제제를 체계적으로 사용할 수 있지만 부작용이 많아 장기간 사용해서는 안 된다.

[0010] GVHD(Graft versus host disease)는 이식 후 이체 기증자의 이식된 식물의 T 림프구로 인해 발생하며, 수용자가 일으키는 일련의 '사이토카인 폭풍' 자극은 수용자 항원에 대한 면역 반응을 크게 향상시키고 수용자 표적 세포를 표적으로 세포독성 공격을 수행하며 그 중 피부, 간 및 장이 주요 표적이다. 급성 이식편 항숙주 질환의 발병률은 30%~45%이며, 만성 환자의 발병률은 급성보다이다. 이종 조혈모세포 이식은 혈액 시스템의 종양과 조혈 기능 이상 질환을 치료할 수 있는 효과적인 치료법이다. 급성 이식편 항숙주병은 발병률이 높고 치사율이 높으며 장애율이 높아 악성 혈액 질환의 재발하지 않는 사망의 중요한 원인이다. 스테로이드 호르몬은 급성 GVHD 치료의 1차 치료제이지만 환자의 약 50%가 호르몬 내성을 보이며 GVHD 반응을 조절할 수 없다. T 세포 표면 항원에 대한 단일 항체(CD3, CD25 등), 화학 요법 약물(모티마이코페놀 에스테르, 타크모스 등)과 같은 GVHD 반응에 대한 다른 2차 치료제는 GVHD에 대한 신뢰할 수 있는 치료 효과가 있지만 면역 저하 및 기회 감염으로 인해 이러한 약물의 이점이 심각하게 약화되었으며 결국 환자의 생존 시간을 연장하지 못했습니다. 따라서 호르몬 내성 급성 GVHD를 효과적으로 제어하기 위한 새로운 치료법을 찾는 것이 시급하다.

[0011] 폐 섬유증(pulmonary fibrosis)은 원인을 알 수 없고 발병기전이 복잡한 미만성 폐 질환으로 현재 폐 손상 후 과도한 복구로 인한 세포의 기질 과잉 침착의 결과로 인식되고 있다. 폐 섬유증의 발병 기전은 불분명하며 현재 폐포 상피의 반복적인 손상과 과도한 복구가 질병의 핵심으로 인식되고 있다. 병리학적 특징은 장기간의 만성 폐염증과 폐포의 지속적인 손상으로 인해 세포의 기질인 메탈로프로테아제(MMP)가 응집되고, 특히 MMP-2와 MMP-9가 비정상적으로 증가하고, 메탈로프로테아제 조직 억제제-1(TIMP-1)이 감소하여 평형 관계가 파괴되고, 폐의 많은 세포의 기질이 응집되고, 조직 세포 재구성 및 콜라겐이 과도하게 축적된다는 것이다. 동시에 조직에서 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 발현을 억제하고 폐 미세 정맥 혈관의 투과성을 감소시키며 혈관 내피 세포의 분열 및 증식 및 혈관 재생을 억제하고 폐 조직 손상을 악화시키고 궁극적으로 미만성 폐 간질 질환-폐 섬유증을 유발할 수 있다. 현재 효과적인 항섬유화제가 없으며 항섬유화 과정을 줄이기 위해 글루코코르티코이드 항염증이 일반적으로 사용되지만 치료 효과가 제한적이고 부작용이 많다. 현재의 치료법은 임상적 요구를 충족시키기에는

거리가 멀고 질병의 진행을 통제하고 재발과 합병증을 줄이며 사망률을 줄이기 위해서는 치료 효과가 좋고 부작용이 적은 더 많은 신약을 찾아야 한다.

[0012] 자가면역질환의 발병률이 높으며 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 클론병, 궤양성 대장염, 홍반 루푸스, 피부근염, 경피증, 건조 증후군 등을 포함하여 전 세계적으로 최소 수억 명의 환자가 있으며, 이러한 질병은 심각한 경우 여러 장기에 영향을 미쳐 심장·간·신장·혈관·폐·관절·뇌 등 장기 손상을 일으킬 수 있으며 사망률이 높고 약성 종양 다음으로 높다. 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 궤양성 대장염 및 클론병은 몇 가지 공통적인 발병기전 경로를 가지고 있으며 이러한 질병의 원인과 발병기전은 매우 복잡하여 아직 완치할 수 없으며 질병의 진행을 통제하기 위해 장기간 약물을 사용해야 한다. 임상적으로 일반적으로 사용되는 치료제는 주로 글루코코르티코이드와 면역억제제 등이지만 이러한 약물의 유효율은 약 50%에 불과하고 골수억제, 간 및 신장 기능 손상, 골다공증, 감염 및 종양 유발 취약성 등 부작용이 크기 때문에 장기간 사용이 제한된다. 현재의 새로운 생물학적 제제는 또한 면역 억제 효과가 있고 감염 및 종양을 유발할 위험이 있으며 고가이므로 광범위한 장기 적용이 제한된다.

[0013] 위에서 언급한 질병의 경우 현재의 치료 방법은 임상 요구를 충족시킬 수 없으며 질병의 진행을 통제하고 재발 및 합병증의 발생을 줄이기 위해 치료 효과가 좋고 부작용이 적으며 가격이 저렴한 신약을 더 많이 찾아야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 약용 가치가 있는 CLY 계열 화합물 또는 약학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이다.

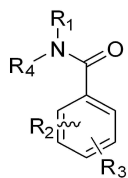
[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 목적은 다음과 같은 조치를 통해 달성할 수 있다.

[0018] 본 발명은 화학식 I의 구조를 갖는 화합물, 이의 상호 변이체, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.



[0019]

식I

[0020]

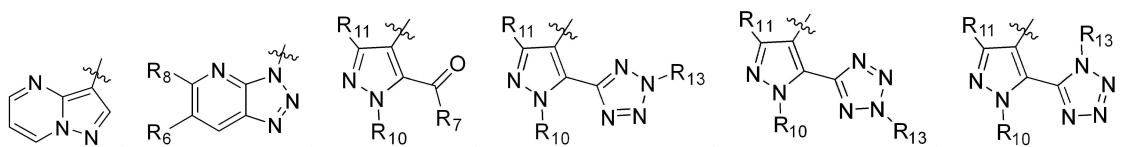
그 중:

[0021]

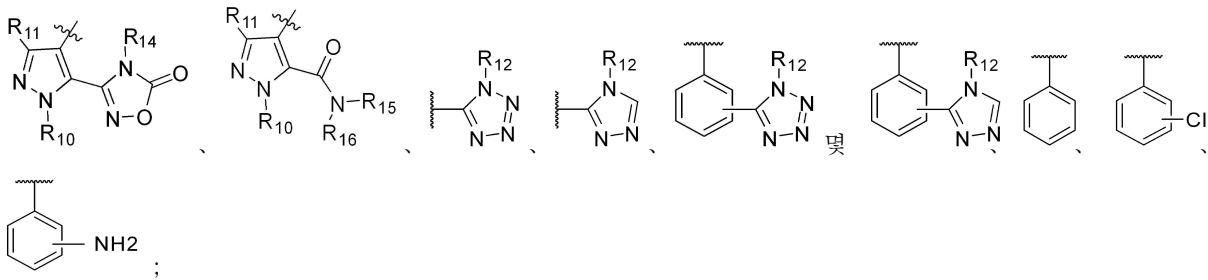
[0022] R1은 N, O, S 중 적어도 하나를 포함하는 치환 또는 비치환된 5~원짜리 헤테로고리, 벤젠고리 및 이 헤테로고리(예: 이소퀴놀린기) 또는 이 헤테로고리의 적어도 2개의 병환환환으로, 여기서 병환은 2개의 고리 구조가 피롤피리딘과 같은 공통적으로 인접한 2개의 원자에 의해 형성된 병환을 말하며, 상기 치환기는 H, 할로젠 또는 (C1-C4) 알킬기이다.

[0023] R2는 H, 할로젠, 수산기, 메톡시, 에톡시, 아미노기, 메틸 또는 에틸이다.

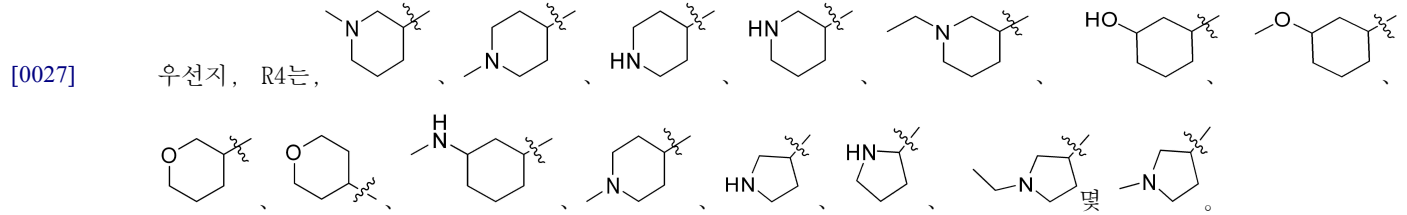
[0024] R3는 H, 할로젠, 수산기, 메톡시, 에톡시, 아미노기, (C1-C3)이다. 알킬기 또는 그이하의 기단:



[0025]

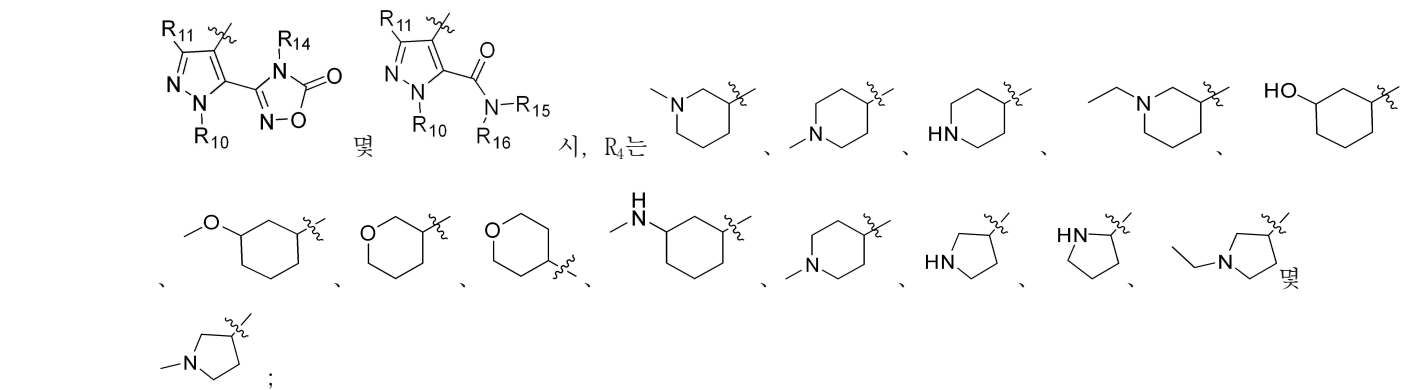
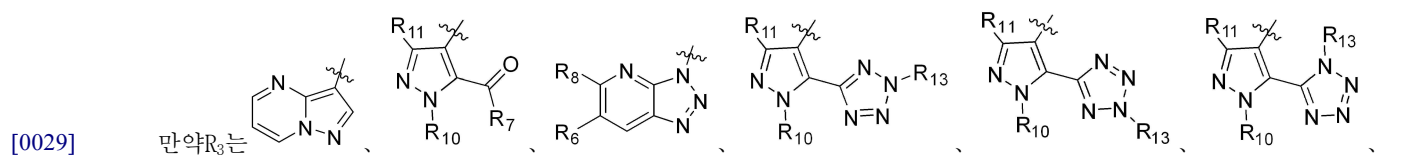
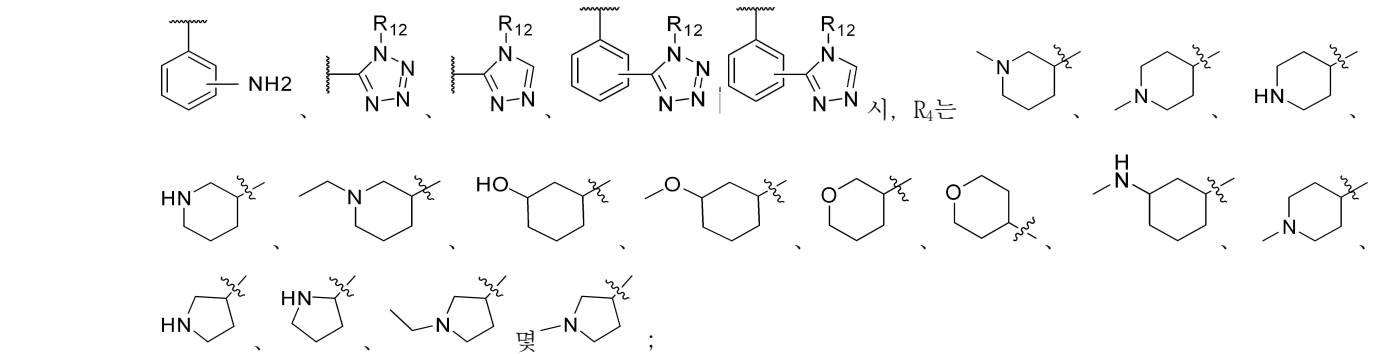


[0026] R₄는 치환 또는 비치환된 5-6원 시클로알킬기 또는 N 또는 O에서 선택된 1-3 헤테로원자를 갖는 4-7원 헤테로고리이며, 치환기는 H, -NH₂, -OH, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알콕시기, 아미노기, (C1-C4) 알킬아미노기에서 선택된다.



[0028] 선호지, 바람직하게는 R₃가 H, 할로젠, 히드록시, 메톡시, 아미노, 메틸 또는 그 이하의 기단

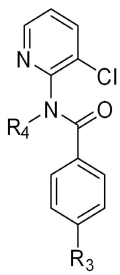
Chemical structures of phenyl and chlorophenyl rings.



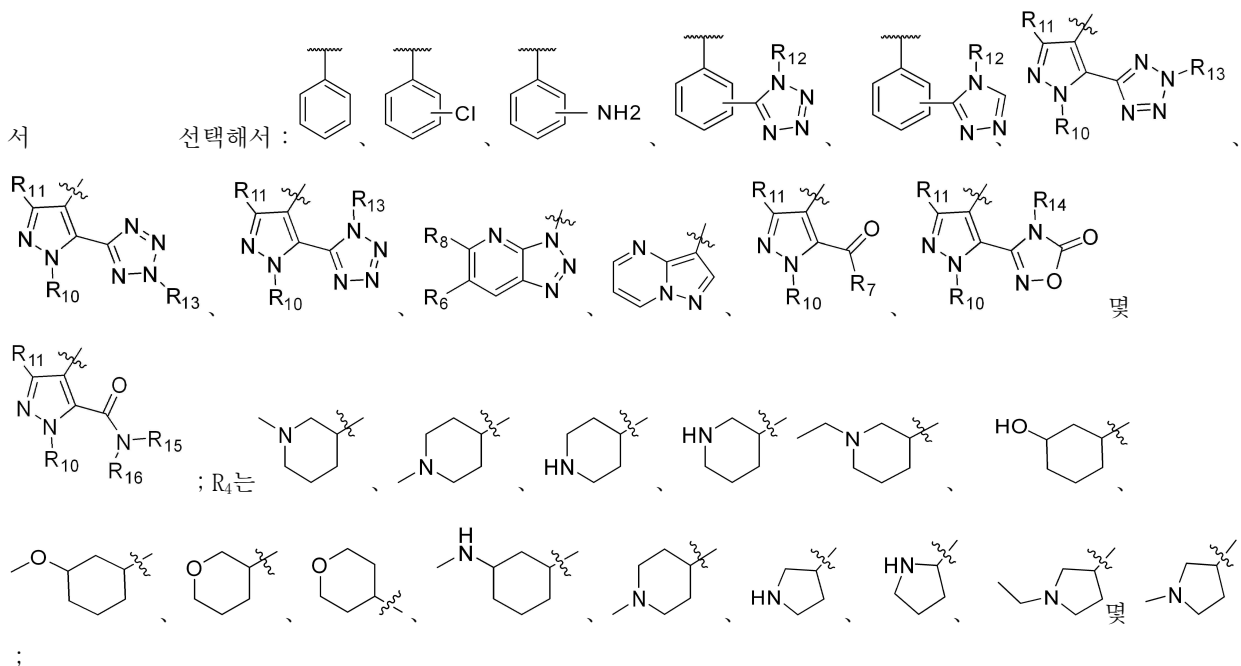
[0030] 그 중:

[0031] R₆ 및 R₈은 각각 독립적으로 H, 메틸, 할로젠 또는 (C1-C4) 알킬이며, R₆ 및 R₈은 할로젠일 수 없으며, 바람직하게는 R₆는 H 또는 메틸이고 R₈은 H이다.

- [0032] R7은 히드록실기, (C1-C4) 알콕시, (C1-C4) 알콕시 카르보닐옥시(C1-C4) 알킬 또는 (C1-C4) 알킬카르보닐옥시(C1-C4) 알킬기이다.
- [0033] R10 및 R11은 각각 독립적으로 H, (C1-C4) 알킬 또는 (C3-C6) 사이클로알킬이다.
- [0034] R12는 H, 할로젠, -OH, -NH2 또는 (C1-C3) 알킬에서 선택한다.
- [0035] R13은 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시(C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시(C1-C4) 알킬기이다.
- [0036] R14는 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시(C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시(C1-C4) 알킬기이다.
- [0037] R15는 히드록실, 테트라졸릴, (C1-C2) 알킬술포닐 또는트리플루오로메틸술포닐이고, R16은 H, (C1-C4) 알킬, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시(C1-C4) 알킬 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시(C1-C4) 알킬이다.
- [0038] 부분 실시예에서 R1은 이소퀴놀린-1-기이고 R1은 임의로 염소 또는 메틸로 단일 치환되었다.
- [0039] 부분 실시예에서 R2는 H, 히드록실 또는 메틸이었다.
- [0040] 부분 실시예에서 R1은 치환 또는 비치환된 피리딜 또는 피롤로피리딜이며, 치환기는 H, 염소 또는 메틸이다.
- [0041] 부분 실시예에서는 H, 할로젠, -OH, -NH2 또는 메틸에서 R12를 선택하고 일부 실시예에서는 H에서 R12를 선택한다.
- [0042] 본 발명은 화학식 I-a의 구조를 갖는 화합물, 그 호변이성 구조체, 그 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

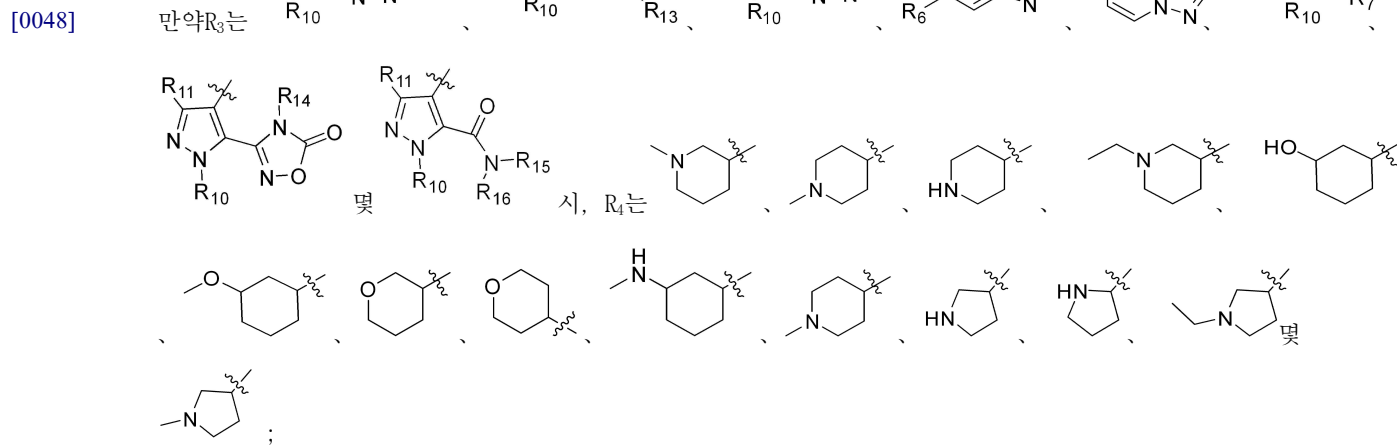
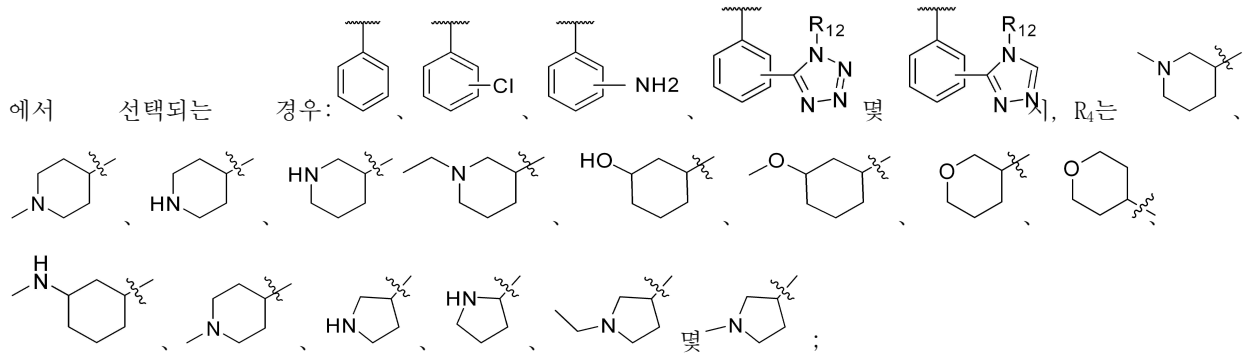


- [0043] 식I-a
- [0044] 그 중 R3는 H, 할로젠, 히드록실, 메톡시, 아미노기, 메틸 또는 치환되거나 비치환된 다음 그룹 중 하나에
- [0045] 그 중 R3는 H, 할로젠, 히드록실, 메톡시, 아미노기, 메틸 또는 치환되거나 비치환된 다음 그룹 중 하나에



[0046] 그 중 R6, R7, R8, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16의 제한은 위의 제한과 일치한다.

[0047] 우선지는 R3가 H, 할로젠, 히드록실 또는 메톡시, 아미노, 메틸 또는 그 이하의 치환 또는 비치환된 다음 기단



[0049] 여기서 R6 및 R8은 각각 독립적으로 H, 메틸, 할로젠 또는 (C1-C4) 알킬이고 R6 및 R8은 동시에 할로젠이며 바람직하게는 R6는 H 또는 메틸이고 R8은 H이다.

[0050] R7은 수산기, (C1-C4) 알콕시기, (C1-C4) 알콕시 카르보닐옥시기(C1-C4) 알콕시기 또는 (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기(C1-C4) 알콕시기이다.

[0051] R10 및 R11은 각각 독립적으로 H, (C1-C4) 알킬 또는 (C1-C4) 사이클로알킬이다.

[0052] R12는 H, 할로젠, -OH, -NH2 또는 (C1-C3) 알킬에서 선택된다.

[0053] R13은 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기(C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기(C1-C4) 알킬기이다.

[0054] R14는 H, (C1-C4) 알킬기, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기(C1-C4) 알킬기 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기(C1-C4) 알킬기이다.

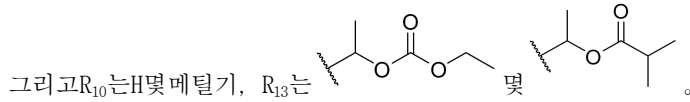
[0055] R15는 히드록실, 테트라졸릴, (C1-C2) 알킬술포닐 또는트리플루오로메틸술포닐이고, R16은 H, (C1-C4) 알킬, (C1-C4) 알킬카르보닐옥시기(C1-C4) 알킬 또는 (C1-C4) 알콕시카르보닐옥시기(C1-C4) 알킬이다.

[0056] 부분 실시예에서, 공식 I-a 구조를 갖는 화합물, 그 호변이성 구조체, 그 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염은 R6가 H이고 R8이 H이다.

[0057] 부분 실시예에서는 R12가 H, 할로젠, -OH, -NH2 또는 메틸기에서 선택되며, 부분 실시예에서는 R12가 H에서 선택된다.

[0058] 부분 실시예에서는 식 I-a 구조를 갖는 화합물, 그 호변이성 구조체, 그 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염, R11은 H, R10은 H 또는 메틸이다.

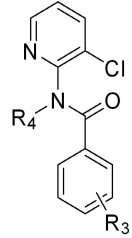
[0059]



[0060]

본 발명은 화학식 I-b 구조를 갖는 화합물, 그 호변이성 구조체, 그 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

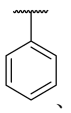
[0061]

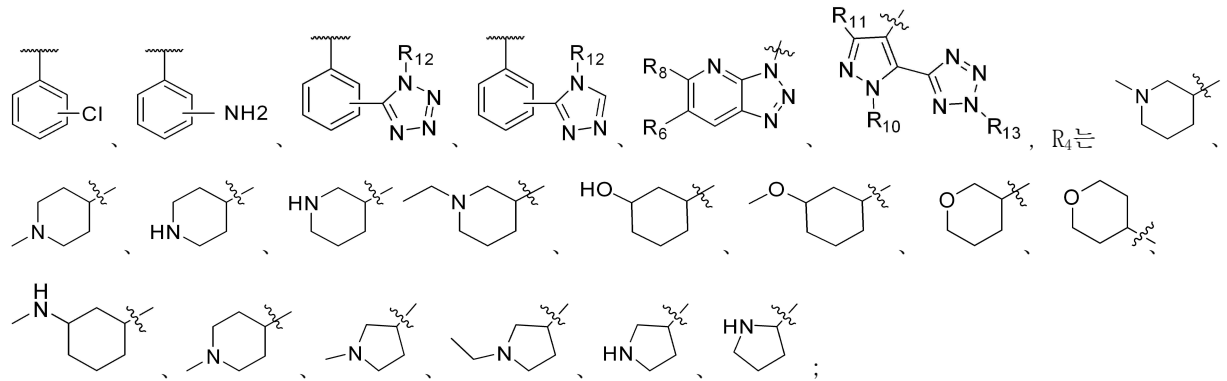


[0062]

식 I-b

[0063]

이 중 R₃는 H, 할로젠, 히드록시, 메톡시, 아미노, 메틸 또는 그 이하의 치환 또는 비치환된 다음 기단: .

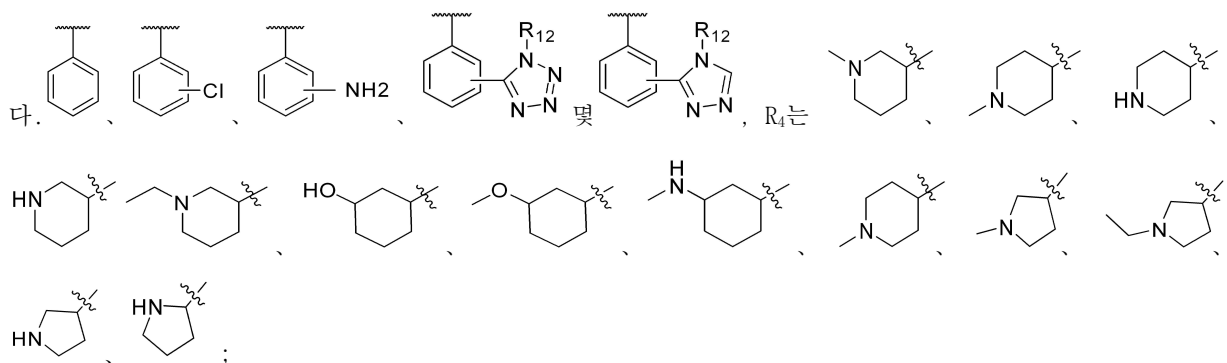


[0064]

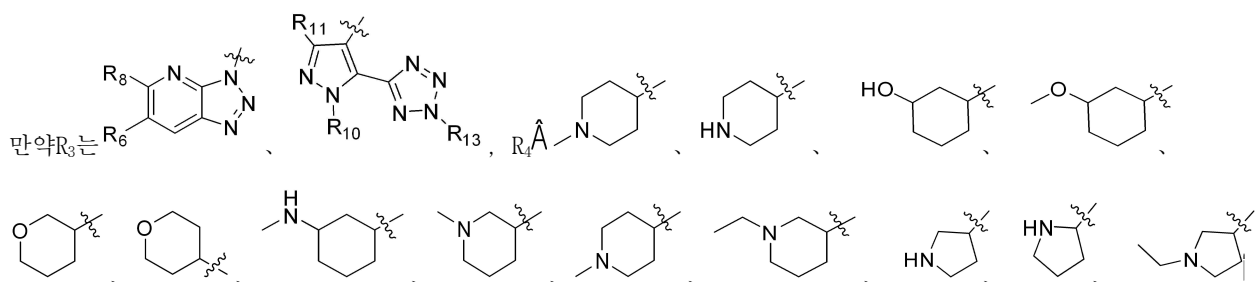
그 중 R₆, R₈, R₁₀, R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃의 제한은 위에서 언급한 섹션의 제한과 일치한다.

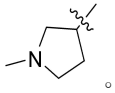
[0065]

우선지는 R₃가 H, 할로젠, 히드록시, 메톡시, 아미노, 메틸 또는 그 이하의 치환 또는 비치환인 경우 다음과 같다.



[0066]

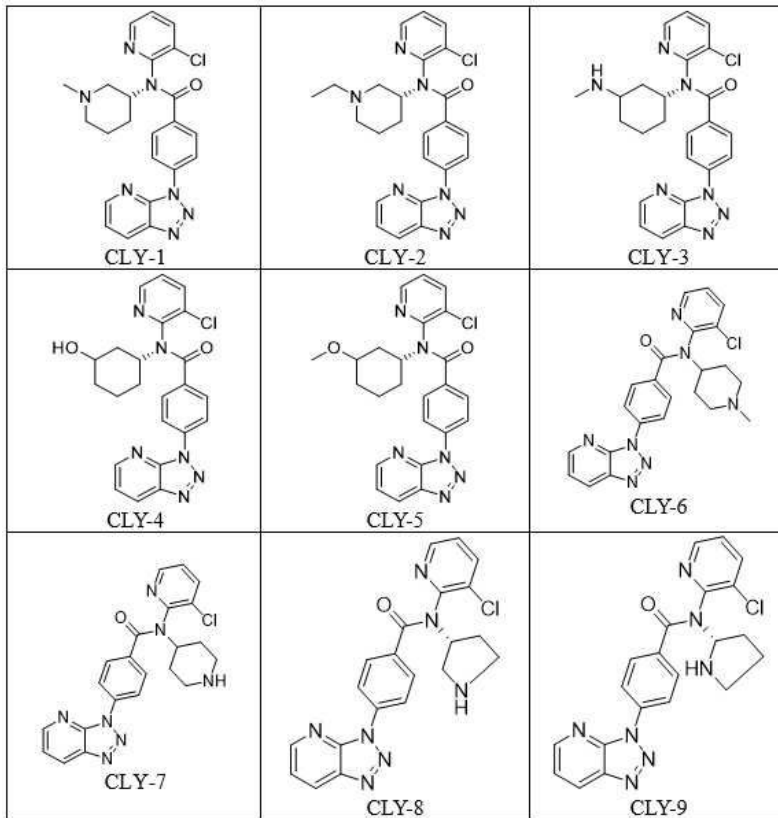




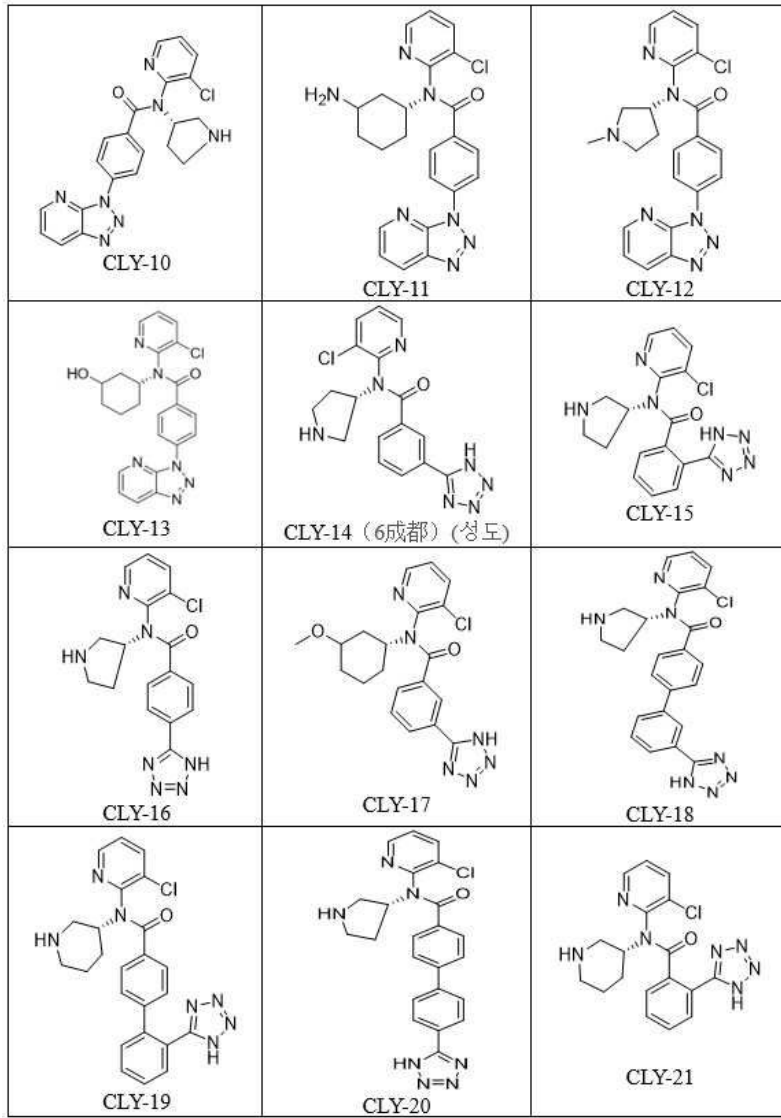
[0067] 그 중 R6, R8, R10, R11, R12 및 R13의 제한은 위에서 언급한 섹션의 제한과 일치한다.

[0068] 부분 실시예에서는 R12가 H, 할로젠, -OH, -NH₂ 또는 메틸기에서 선택되며, 부분 실시예에서는 R12가 H에서 선택된다.

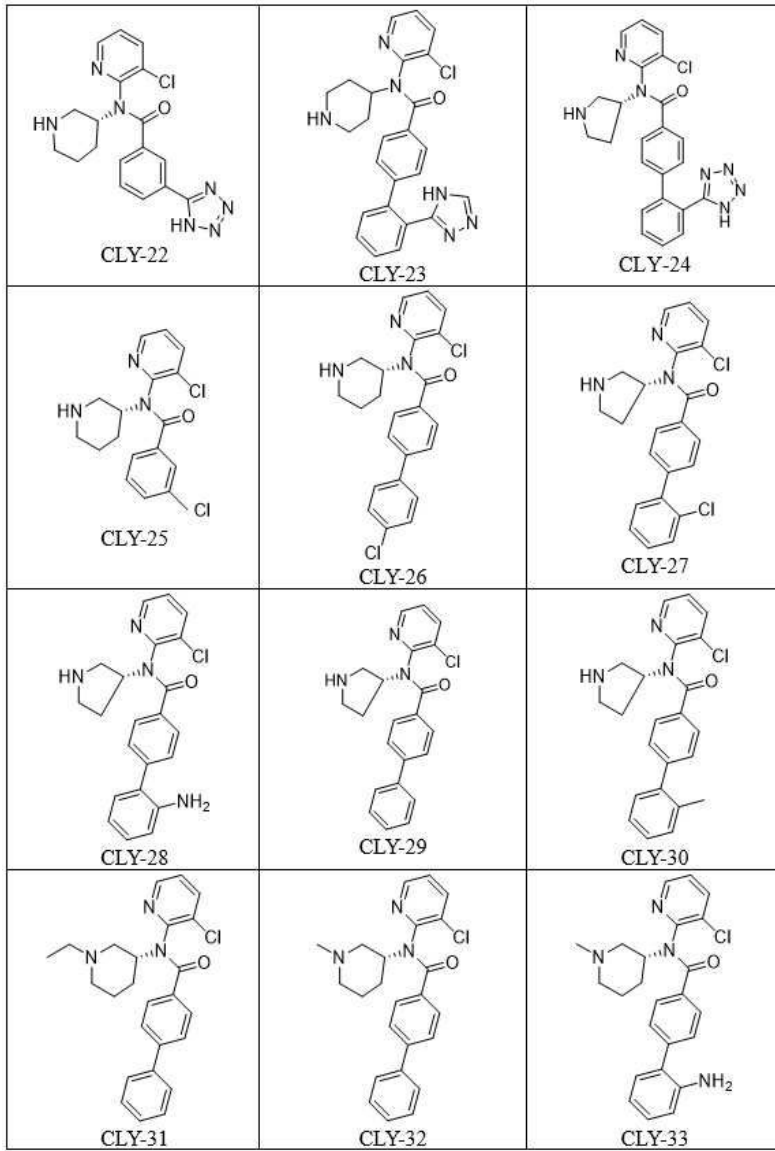
[0069] 부분 구체적으로 실시예에서, 본 발명은 다음과 같은 화합물, 그 상호 변이성 구조체, 그 용매화물 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 제공하지만, 다음과 같은 화합물의 범위에 국한되지 않는다.



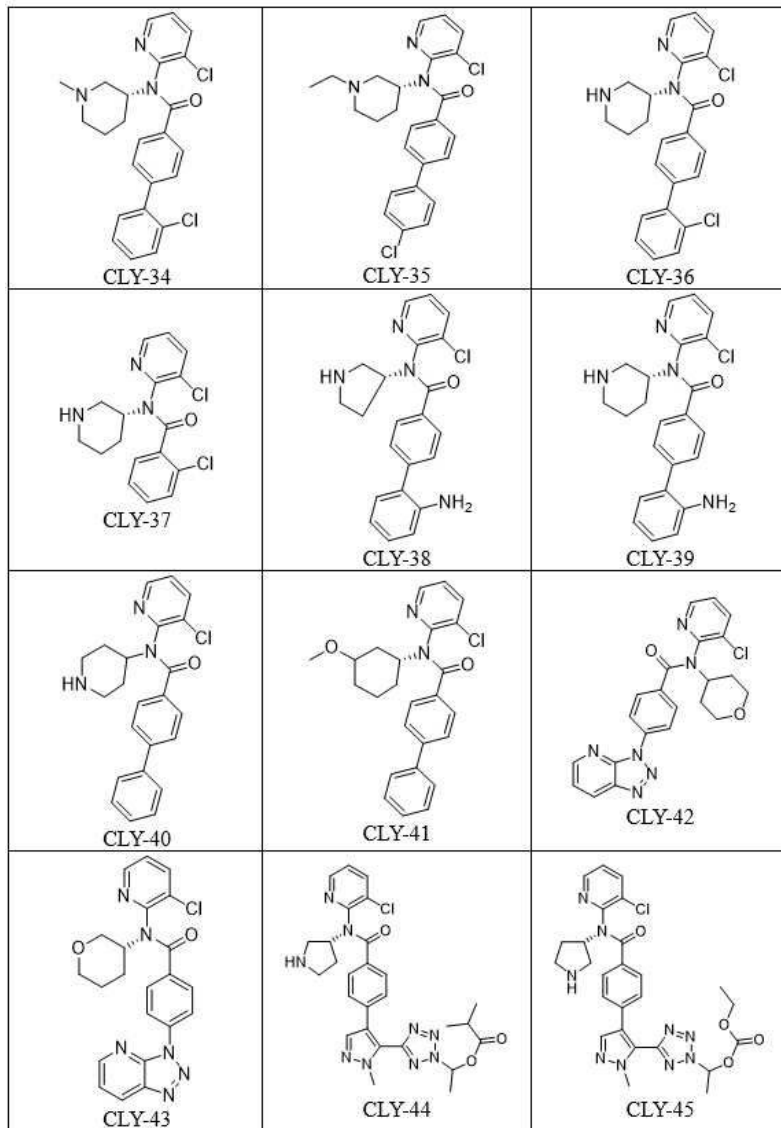
[0070]



[0071]



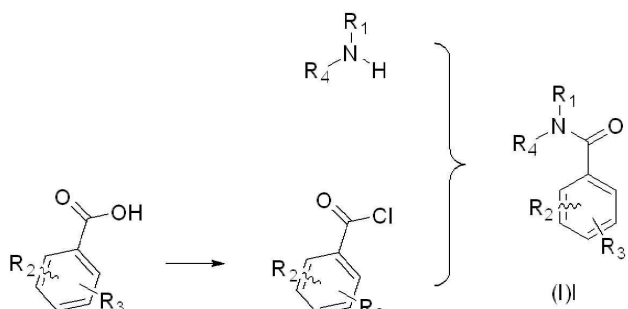
[0072]



[0073]

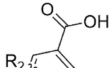
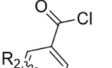


[0074]

본 발명은 또한 식(I)으로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다.



[0075]

[0076]

원료  조재부터 생성하고  , 그리고,  과  최종 생성물을 생산는 I ;

[0077]

이 중 R1, R2, R3, R4의 정의는 위에서 설명한 대로이다.

[0078]

본 발명은 또한 본 발명에 기재된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 담체로 보충하는 활성 성분 또는 주요 활성 성분으로 하는 약물 조성물을 제공한다.

[0079]

본 발명은 또한 질병 치료 및/또는 예방 약물의 제조에 본 발명에 설명된 화합물의 적용을 제공한다.

- [0080] 부분 실시예에서, 본 발명은 기미, 흉터, 남성 호르몬 탈모, 지루성 탈모, 반창고, 여드름, 폐 섬유증, 건선증 및 습진 또는 아토피 피부염과 같은 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 약물 제조에 본 발명에 설명된 화합물의 적용을 제공한다.
- [0081] 본 발명에 언급된 화합물 또는 조성물은 예를 들어 경구, 위장외, 복강내, 정맥내, 동맥내, 경피, 허하, 근육내, 직장내, 뼈투과성, 비강내, 흡입(, 질, 눈내,국소, 피부외, 피하, 지방내, 관절 내 또는 복강 내 또는 칼집 내)의 임의의 투여에 적합한 제제이다.
- [0082] 바람직한 실시 형태에서 본 발명에 언급된 제형은 겔, 에멀전, 페이스트, 도포제, 세제, 스프레이, 용액, 정제, 과립제, 경구용 액제, 캡슐제, 드립제, 관장제 또는 막제 또는 주사제이다.
- [0083] 설명서의 정의:
- [0084] C5~C6 모노올'은 선형 및 분지형 그룹을 포함하여 5개 또는 6개의 탄소 원자를 포함하는 포화 지탄화수소 그룹으로 하이드록실기로 대체된 것을 나타낸다.
- [0085] 헤테로고리'는 4~7개의 고리 원자의 포화 고리 그룹을 나타내며, 고리 원자 중 하나 또는 둘 또는 세 개는 N, O 또는 S(O)_m(이 중 m은 0~2의 정수)에서 선택된 헤테로 원자이고 나머지 고리 원자는 C이며, C 원자 중 하나 또는 두 개는 선택적으로 카르보닐기로 대체될 수 있다.헤테로고리 그룹의 고리는 선택적으로 하나, 둘 또는 세 개의 치환기로 독립적으로 대체될 수 있다.
- [0086] '알킬기'는 선형 및 분지형 그룹을 포함하여 탄소 원자가 1-20개인 포화 지탄화수소기를 나타내다(이 신청서에 언급된 숫자 범위, 예를 들어 '1-4'는 그룹을 의미하며 이때 알킬기이며 탄소 원자 1개, 탄소 원자 2개, 탄소 원자 3개 또는 탄소 원자 4개를 포함할 수 있다. 알킬기는 치환 또는 비치환일 수 있다.
- [0087] '사이클로알킬'은 모두 탄소인 단일 또는 축합된 고리("축합된" 고리는 시스템의 각 고리가 시스템의 다른 고리와 인접한 한 쌍의 탄소 원자 쌍을 공유하는 것을 의미) 그룹을 나타내며, 하나 이상의 고리에는 완전히 연결된 δ 전자 시스템이 없으며, 사이클로알킬기의 예로는 사이클로프로판, 사이클로부탄, 사이클로펜탄, 사이클로헥센, 사이클로헥산, 아다만탄, 사이클로헥산 및 시클로헵타트리엔이 포함된다.
- [0088] '알콕시기'는 -O-(치환되지 않은 알킬기) 또는 -O-(치환되지 않은 사이클로알킬기)를 나타내다. 대표적이 예로는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 시클로프로폭시, 시클로부톡시, 시클로펜톡시, 시클로헥실옥시 등이 포함되지만 이에 국한되지는 않다.
- [0089] 알킬아미노'는 -NH-(치환되지 않은 알킬), -NH-(치환되지 않은 시클로알킬), -N-(치환되지 않은 알킬)₂ 또는 -N-(치환되지 않은 시클로알킬)₂를 나타내다.대표적이 예로는 메틸아미노, 에틸아미노, 프로필아미노, 부틸아미노, 시클로프로필아미노, 시클로부틸아미노, 시클로펜틸아미노, 시클로헥실아미노 등이 포함되지만 이에 국한되지는 않다.
- [0090] '(C1-C4) 알콕시 카르보닐옥시(C1-C4) 알킬'은 (C1-C4) 알킬-O-C(O)-O-(C1-C4) 알킬-을 나타낸다.
- [0091] '(C1-C4)알킬카르보닐옥시(C1-C4)알킬'-은 (C1-C4)알킬C(O)-O-(C1-C4)알킬-을 나타냅니다.본 발명의 화합물 CLY 시리즈 또는 그 약학적으로 허용되는 염은 제약 분야에서 사용될 수 있으며 동물 모델 실험에 따르면 화합물 CLY 시리즈는 기미 마우스 모델의 피부와 혈액에서 티로시나아제 수준을 현저히 감소시키고 피부에서 간 사이토카인(SCF) 및 C-kit 단백질의 발현을 감소시키며 기미 색소 형성을 억제하고 피부 상처 치유를 크게 촉진하고 흉터 형성을 감소시킬 수 있으며 안드로겐성 탈모 마우스 모델의 모발 성장을 현저히 촉진하고 안드로겐에 의한 모낭 손상을 감소시킬 수 있으며 CLY 시리즈는 건선 및 습진 마우스 모델의 염증 반응을 현저하게 억제할 수 있다.CAT 효소 수준은 폐 섬유증을 억제하는 것으로 나타났으며 CLY 계열 화합물은 말초 혈액의 IL-17 수치를 낮추고 IL-10과 같은 염증 지표를 증가시켜 류마티스 관절염 쥐의 관절염 증상을 개선할 수 있습니다.많은 질병이 공통적인 발병 경로를 가지고 있기 때문에 이 화합물의 효능에는 위의 질병이 포함되지만 이에 국한되지는 않다.이 화합물은 단독으로 또는 다른 약물과 함께 사용할 수 있어 위의 질병의 치료를 위한 새로운 약물 옵션을 제공한다.

발명의 효과

- [0092] 동물 모델 실험에 따르면 화합물 CLY 계열은 기미 쥐 모델의 피부와 혈액 내 티로시나아제 수준을 현저히 감소시키고 피부 내 간 사이토카인(SCF), C-kit 단백질의 발현을 감소시키하여,기미의 색소 형성을 억제한다.피부 상처 치유, 흉터 형성 감소, 탈모 마우스 모델의 모발 성장 촉진 및 모낭 손상 감소, 토끼 귀 여드름 모델 증상

감소, 모공 막힘 및 여드름 감소, CLY 계열 화합물은 급성 GVHD 생쥐의 생존 시간 증가, 임상 증상 감소, 급성 GVHD에 대한 치료 효과, 폐 섬유증 생쥐 모델 폐 조직에서 MMP-2 및 MMP-9 수준을 현저히 감소시키고 TIMP-1 및 VEGF 수준을 증가시킬 수 있으며 말초 혈액에서 SOD 및 CAT 효소 수준을 증가시킬 수 있다. 피부 상처 치유, 흉터 형성 감소, 탈모 마우스 모델의 모발 성장 촉진 및 모낭 손상 감소, 토끼 귀 여드름 모델 증상 감소, 모공 막힘 및 여드름 감소, CLY 계열 화합물은 급성 GVHD 생쥐의 생존 시간 증가, 임상 증상 감소, 급성 GVHD에 대한 치료 효과, 폐 섬유증 생쥐 모델 폐 조직에서 MMP-2 및 MMP-9 수준을 현저히 감소시키고 TIMP-1 및 VEGF 수준을 증가시킬 수 있으며 말초 혈액에서 SOD 및 CAT 효소 수준을 증가시킬 수 있다. 동시에 말초 혈액의 SOD 및 CAT 효소 수준을 증가시킬 수 있으며 CLY 계열 화합물은 말초 혈액의 IL-17 수치를 낮추고 IL-10과 같은 염증 지표를 증가시켜 류마티스 관절염 쥐의 관절염 증상을 개선할 수 있습니다. 이 화합물은 단독으로 또는 다른 약물과 함께 사용할 수 있어 위의 질병의 치료를 위한 새로운 약물 옵션을 제공한다.

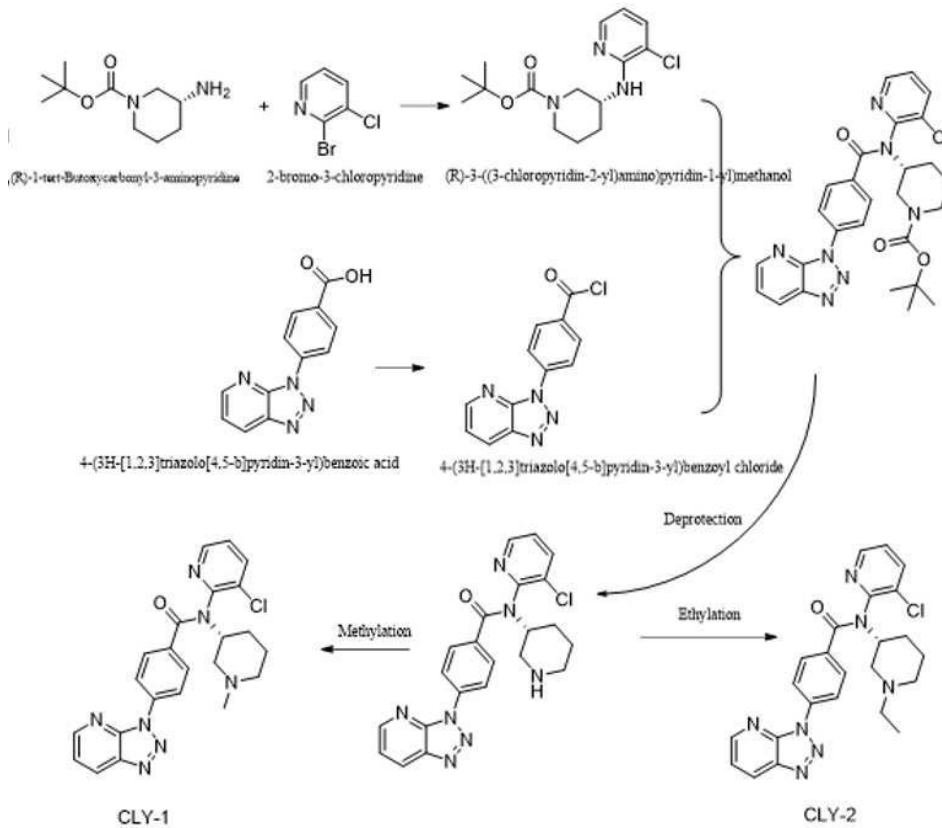
도면의 간단한 설명

- [0093] 그림 1 CLY 계열 화합물은 탈모 모델 쥐의 모발 성장을 크게 촉진할 수 있다.
- 그림 2 CLY 계열 화합물은 쥐의 건선 유사 염증 반응을 크게 감소시킬 수 있다.
- 그림 3은 CLY-2 핵자기 검출 결과를 보여준다.
- 그림 4는 CLY-8 핵자기 검출 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0094] 아래에 본 발명을 실시예에 따라 추가로 설명하면 여기에 설명된 구체적인 실시예는 본 발명을 설명하는 데만 사용되며 본 발명을 제한하는 데 사용되지 않으며, 본 발명의 개념을 전제로 한 본 발명의 제조 방법의 간단한 개선은 모두 본 발명의 보호 범위에 속한다. 다음 실시예에서는 특정 조건을 명시하지 않은 실험 방법을 일반적으로 이 분야의 공지 방법에 따른다. 특별한 설명이 없는 한 다음 실시예에서 사용된 시험 재료는 기존 생화학 시약 상점에서 구입했다.
- [0095] 실시예 1 제조 (R)-4-(3H-[1,2,3]트리아졸조[4,5-b]피리딘-3-일)-N-(3-클로로피리딘-2-일)-N-1(1-1,2,3)벤조아미드(약칭 CLY-1) 및 (R)-4-(3H-[1,2,3]트리아졸조[4,5/b]피리딘-3-일)-N-3-N(약칭 CLY-2):

[0096] 1. 합성 선로



[0097]

[0098] 2. 구체적인 실시 형태:

[0099] (1) (R)-3-((3-클로로피리딘-2-기)아미노)피페리딘-1-tert-부틸포름산의 합성 (R)-1-tert-부톡시카르보닐-3-아미노피페리딘, 2-브로모-3-클로로피리딘, tert-부탄올나트륨, 디옥시헥사사이클린을 250ml 용기병에 넣고 질소보호, 교반 개시, RuPhos3, 리간드 RuPhos를 넣고 100℃로 가열, 7시간 반응, 물 정지, 에틸아세테이트로 나누어 추출하고 에틸아세테이트층을 합한 후 물로 3회 세척하고 에틸아세테이트층을 회수하여 잔류 페이스트를 얻다.

[0100] ((2) 피페리딘아미드의 합성

[0101] 4-3H-[1,2,3]트리아졸[4,5-b]피리딘-3-일)벤조산을 용기병에 넣고 미리 건조된 톨루엔, N, N-디메틸포름아미드를 첨가하고 염화술평시드를 30℃에서 가열 교반하여 맑게 하고 감압하에 용매를 회수하여 잔류 고체를 얻다. 사전 건조된 테트라히드로푸란 50ml, (R)-3-((3-클로로피리딘-2-일)아미노)피페리딘-1-tert-부틸포름레이트를 넣고 맑아질 때까지 저어주고 얼음 수조에 넣고 1시간 동안 교반하고 얼음 수조를 제거하고 2시간 동안 교반하고 물에 붓고 에틸 아세테이트로 추출하고 에틸 아세테이트 층을 세척한 후 감압하에 용매를 회수하여 페이스트를 얻다.

[0102] (3) 피페리딘의 합성

[0103] 피페리딘 아미드, 디클로로메탄, 트리플루오로아세트산을 실온에서 밤새 교반했다. 물에 붓고 중탄산나트륨을 넣어 pH=10~11로 조절하고 디클로로메탄으로 추출하고 세척 후 감압하여 용매를 회수하여 페이스트 형태의 잔류물을 얻고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 피페리딘을 얻다.

[0104] (4) CLY-1의 합성

[0105] 피페리딘을 취하여 디클로로메탄에 녹이고 요오드화메탄을 첨가하고 실온에서 48시간 동안 암실에서 탄산은으로 교반하고 반응액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 직접 분석하여 CLY-1을 얻다.

[0106] CLY-1의 Chemical Formula: C₂₃H₂₂ClN₇O

[0107] 수소 스펙트럼 d4-MeOH : 8.83 (1H), 8.60 (1H), 8.54 (1H), 8.29 (2H), 7.82(1H), 7.61(3H), 7.42 (1H),

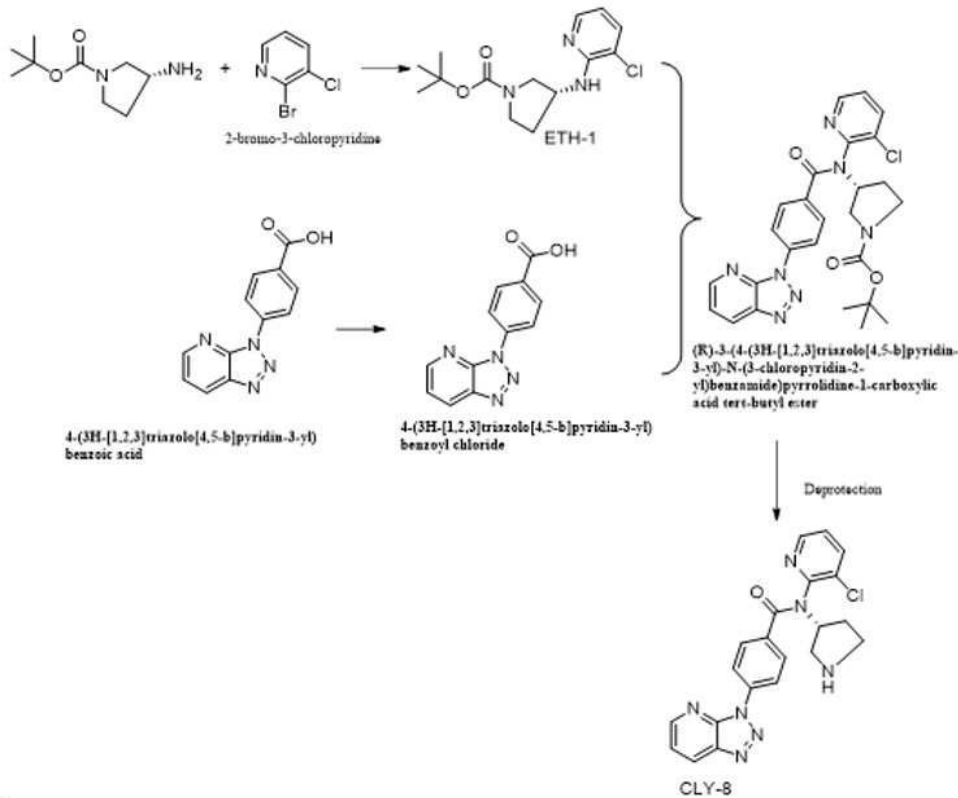
5.06(1H), 3.82(1H), 3.63(1H), 3.39 (1H), 2.95 (1H), 2.40-1.87(6H), 1.55-1.41 (1H)。

[0108] (5) CLY-2의 합성

[0109] 피페리딘을 취하여 디클로로메탄에 녹이고 요오드메탄을 첨가하고 실온에서 48시간 동안 암실에서 탄산은으로 교반하고 반응액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 직접 분석하여 CLY-2를 얻다. CLY-2 질량 스펙트럼은 그림 3에 나와 있다.

[0110] **실시예2제조**(R)-4-(3H-[1,2,3]트리아졸조[4,5-b]피리딘-3-일)-N-(3-클로로피리딘-2-일)-N(피롤리딘-3-일)벤조아미드(약칭 CLY-8)를 제조하는 방법:

[0111] 2. 합성 선로



[0112] ...
 [0113] 2. 구체적인 합성 단계:

[0114] (1) ETH-1의 합성

[0115] (R)-1-tert-부톡시카르보닐-3-아미노피롤리딘 11.8g, 2-브로모-3-클로로피롤리딘 11.0g, tert-부탄올나트륨 10.0g, 톨루엔 70ml를 250ml 3구 플라스크에 넣고 질소로 보호, 교반을 시작하고 아세테이트 팔라듐 0.1g, 나프톨, 트리(디메틸아미노)포스핀, 100℃로 가열하고 7시간 동안 반응을 멈추고 물 500ml를 붓고 아세테이트 1000ml로 나누어 추출하고 아세테이트층을 합친 후 물 200*3으로 세척하여 아세테이트층을 회수하여 잔류 실리콘 페이스트를 얻는다.

[0116] 2) 피롤리딘아미드의 합성

[0117] 4-3H-[1,2,3]트리아졸조[4,5-b]피리딘-3-일)벤조산을 용매에 넣고 옥살로일 클로라이드 및 촉매 N,N-디메틸포름아미드를 첨가하고 25~55℃에서 정화할 때까지 반응시킨 후 감압하여 용매를 회수하고 잔류물에 용매를 첨가하고 (R)-3-(3-클로로피리딘-2-일)아미노)피롤리딘-1-terthexyl carbate를 첨가하고 얼음 수욕조에 넣어 5℃ 이하로 식힌 후 비스(트리메틸실릴)아미드 리튬을 첨가하여 피롤리딘, 즉, (R)-3-(4-(3H-[1,2,3]트리아졸조[4,5-b]피리딘-3-일)-N-(3-클로로피리딘-2-기)벤조아미드)피롤리딘-1-tert 부틸 카르복실레이트이다.

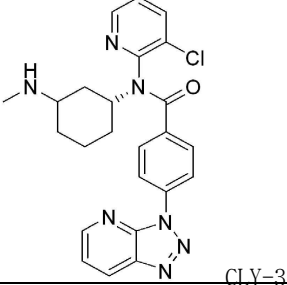
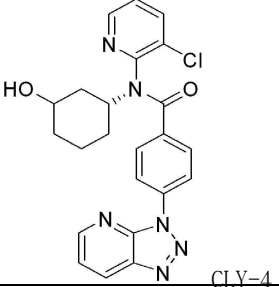
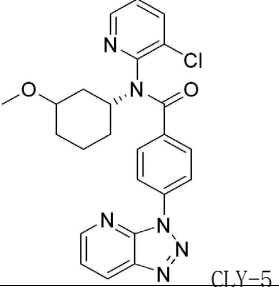
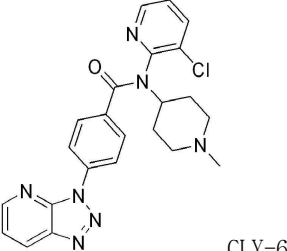
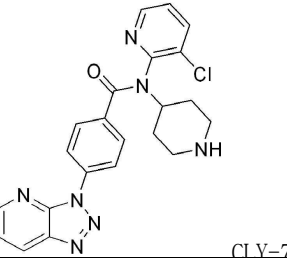
[0118] (3) 화합물 CLY-8의 합성

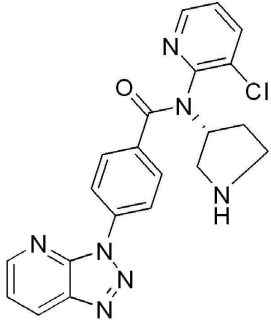
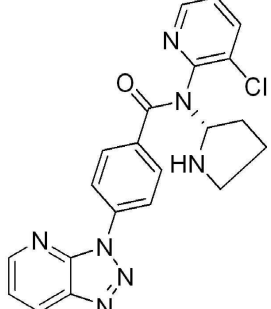
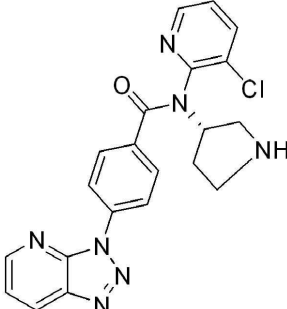
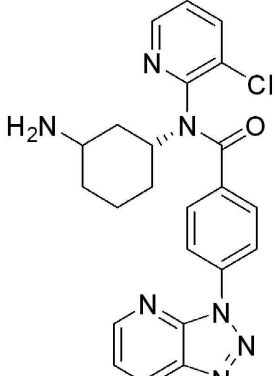
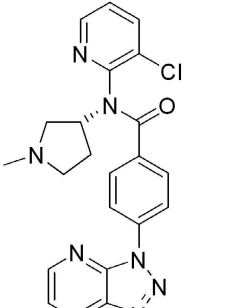
[0119] 피롤리딘 아미드 10g, 디클로로메탄 50ml, 4mol/L 염산메탄올 용액 10ml를 실온에서 밤새 교반합니다. 물 100ml에 붓고 중탄산나트륨을 넣어 pH=10~11로 조정하고 디클로로메탄 100ml로 추출하고 세척 후 감압하여 용매를 회

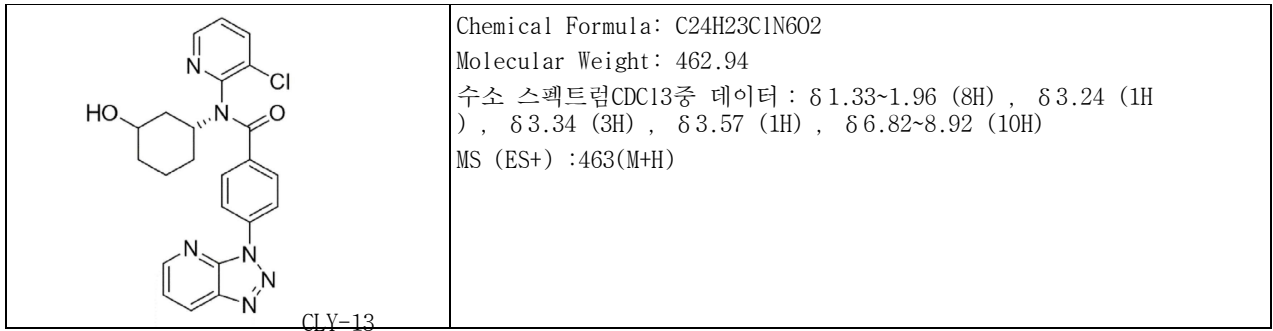
수하여 페이스트 잔류물을 얻고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 화합물(R)-4-(3H-[1,2,3] 트리아졸로즈[4,5-b]피리딘-3-일)-N-(3-클로로피리딘-2-일) -N(약칭 CLY-8), M+H=420.1을 얻다(질량분석 결과 그림 4 참조).

[0120] 위의 동일한 방법을 참조하여 다음 표 1의 화합물도 합성할 수 있다.

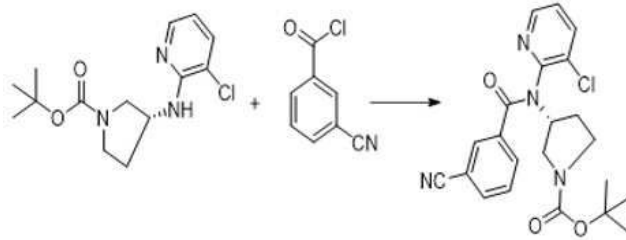
표 1

 <p style="text-align: right;">CLY-3</p>	<p>Chemical Formula: C₂₄H₂₄C₁N₇O</p> <p>Molecular Weight: 461.95</p> <p>수소스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.73 (1) , 1.35 (2) , 1.64 (2) , 1.81 (1) , 2.33 (2) , 2.41 (3) , 2.73 (2) , 4.58 (1) , 6.92 (1) , 7.24 (1) , 7.55 (1) , 7.86 (1) , 8.05 (2) , 8.3 (2) , 8.43 (1) , 8.65 (1)</p> <p>MS (ES+) :462 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-4</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₁C₁N₆O₂</p> <p>Molecular Weight: 448.91</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.71 (1) , 1.31 (2) , 1.59 (2) , 1.71 (1) , 2.23 (2) , 2.63 (2) , 3.98 (1) , 6.92 (1) , 7.24 (1) , 7.55 (1) , 7.86 (1) , 7.95 (2) , 8.31 (2) , 8.43 (1) , 8.65 (1)</p> <p>MS (ES+) :449(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-5</p>	<p>Chemical Formula: C₂₄H₂₃C₁N₆O₂</p> <p>Molecular Weight: 462.94</p> <p>수소스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.69 (1) , 1.25 (2) , 1.64 (2) , 2.33 (2) , 2.61 (3) , 2.73 (2) , 4.28 (1) , 6.92 (1) , 7.24 (1) , 7.55 (1) , 7.86 (1) , 8.01 (2) , 8.32 (2) , 8.43 (1) , 8.52 (1)</p> <p>MS (ES+) :463(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-6</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₂C₁N₇O</p> <p>Molecular Weight: 447.93</p> <p>수소스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 1.97 (4) , 2.33 (3) , 2.36 (2) , 2.72 (2) , 4.7 (1) , 6.92 (1) , 7.24 (1) , 7.55 (1) , 7.8 (1) , 8.11 (2) , 8.32 (2) , 8.43 (1) , 8.53 (1) ,</p> <p>MS (ES+) :448(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-7</p>	<p>Chemical Formula: C₂₂H₂₀C₁N₇O</p> <p>Molecular Weight: 433.90</p> <p>수소스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 1.87 (4) , 2.26 (3) , 2.62 (2) , 4.42 (1) , 6.91 (1) , 7.24 (1) , 7.55 (1) , 7.83 (1) , 8.11 (2) , 8.32 (2) , 8.43 (2)</p> <p>MS (ES+) :434(M+H)</p>

 <p style="text-align: right;">CLY-8</p>	<p>Chemical Formula: C₂₁H₁₈ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 419.87</p> <p>수소스펙트럼CDC₁₃중 데이터 : δ 2.29 (2H) , δ 2.57 (1H) , δ 2.74 (2H) , δ 3.31 (2H) , δ 4.61 (1H) , δ 6.86~8.87 (10H)</p> <p>MS (ES+) :420(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-9</p>	<p>Chemical Formula: C₂₁H₁₈ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 419.87</p> <p>수소 스펙트럼CDC₁₃중 데이터 : δ 1.59 (2H) , δ 2.10 (2H) , δ 2.42 (2H) , δ 2.93 (1H) , δ 5.95 (1H) , δ 6.90~8.97 (10H)</p> <p>MS (ES+) :420(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-10</p>	<p>Chemical Formula: C₂₁H₁₈ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 419.87</p> <p>수소 스펙트럼CDC₁₃중 데이터 : δ 2.29 (2H) , δ 2.57 (1H) , δ 2.74 (2H) , δ 3.31 (2H) , δ 4.61 (1H) , δ 6.86~8.87 (10H)</p> <p>MS (ES+) :420.1(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-11</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₂ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 447.93</p> <p>수소 스펙트럼CDC₁₃중 데이터 : δ 1.51 (2H) , δ 2.04~2.72 (8H) , δ 3.51 (1H) , δ 4.52 (1H) , δ 6.75~8.97 (10H)</p> <p>MS (ES+) :448(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-12</p>	<p>Chemical Formula: C₂₂H₂₀ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 433.90</p> <p>수소 스펙트럼CDC₁₃중 데이터 : δ 1.73 (2H) , δ 2.18 (3H) , δ 2.27~2.72 (4H) , δ 4.41 (1H) , δ 6.89~8.76 (10H)</p> <p>MS (ES+) :434(M+H)</p>



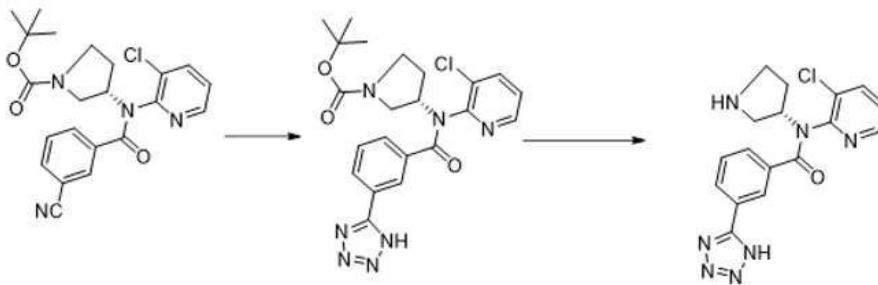
[0122] 실시예3: (R)-N-(3-클로로피리딘-2-일)-N-(피롤리딘-3-일)-3-(1H-테트라졸-5-일)벤조아민(약칭CLY14)의합성이다.



(R)-3-(N-(3-chloropyridin-2-yl)-3-cyanobenzamide)pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester

[0123]

[0124] 1단계, 동일한실시예3에서(R)-3-(N-(3-클로로피리딘-2-기)-3-시아노벤조아미드기)피롤리딘-1-카르복실산tert-부틸을얻을 수 있다.



(R)-N-(3-chloropyridin-2-yl)-N-(pyrrolidin-3-yl)-3-(1H-tetrazol-5-yl)benzamide

[0125]

[0126] 2단계, (R)-3-(N-(3-클로로피리딘-2-기)-3-시아노벤조아미드기)피롤리딘-1-tert-부틸카르복실레이트 4.2g, 아지드나트륨 1g, 트리에틸아민염산염 2g을 N, N-디메틸포름아미드 50ml에 넣고 100℃에서 20시간 동안 교반 반응시킨 후 냉각하고 물 200ml에 붓고 진한 염산을 pH2-3으로 적가 되도록 여과하여 고체를 얻고 물로 세척한 후 건조한다. 디클로로메탄 50ml, 메탄올ml를 사용하여 녹인 후 4mol/L 농도의 염화수소 디옥시헥사사이클릭 용액 10ml를 첨가하여 실온에서 밤새 교반하고 감압 농축하여 얻은 고체를 실리카겔 크로마토그래피로 얻은 (R)-N-(3-클로로피리딘-2-기)-N-(피롤리딘-3-기)-3-1H-테트라졸-5-기) 벤조아미드 2.7g, MS(ES+):370(M+H)이다. Chemical Formula: C₁₇H₁₆C₁N₇O

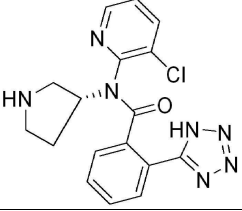
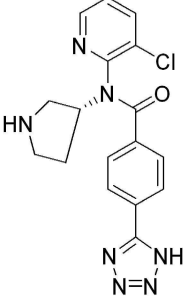
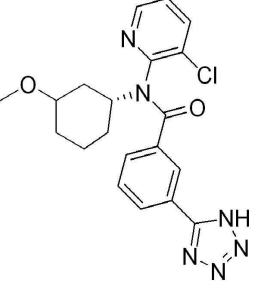
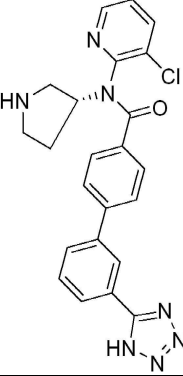
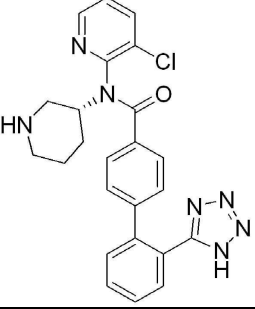
[0127] Molecular Weight: 369.81

[0128] 수소 스펙트럼 CDC13의 데이터:

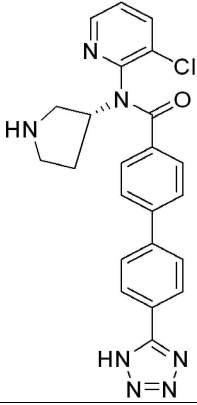
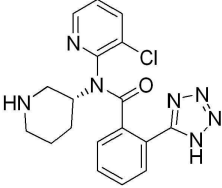
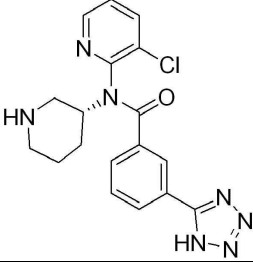
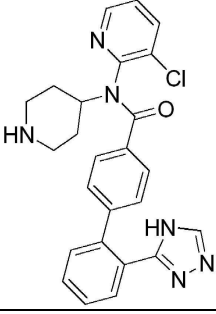
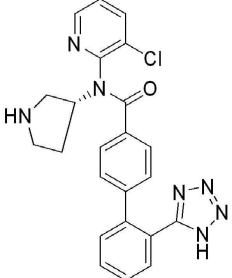
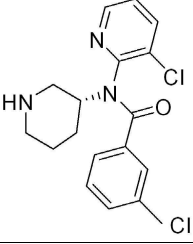
[0129] 0.77 (1H) , 2.29 (2H) , 2.59 (2H) , 3.29 (2H) , 4.53 (1H) , 6.92 (1H) , 7.24 (1H) , 7.43 (1H) , 7.63 (1H) , 7.83 (1H) , 8.21 (1H) , 8.64 (1H) , 8.72 (1H) 이다.

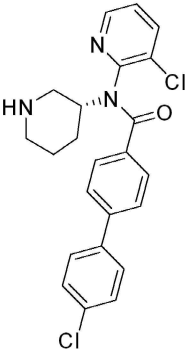
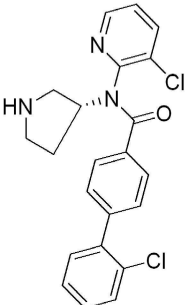
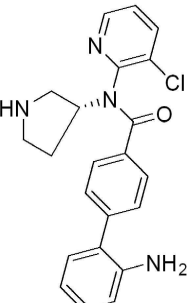
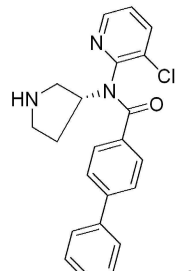
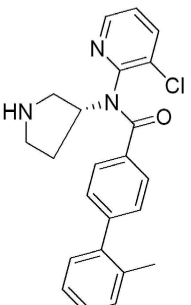
[0130] 동일한 방법을 참조하여 다음 표 2의 화합물도 합성할 수 있다.

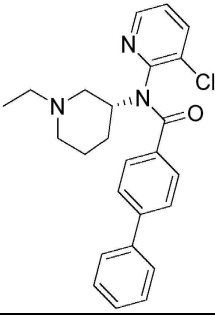
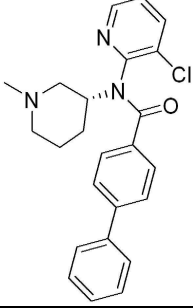
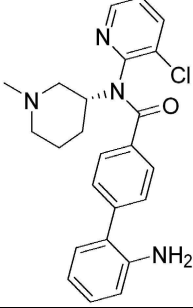
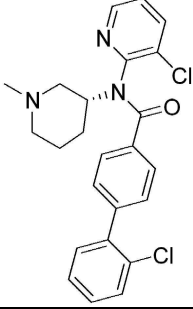
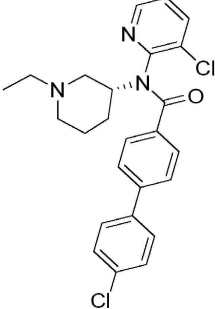
표 2

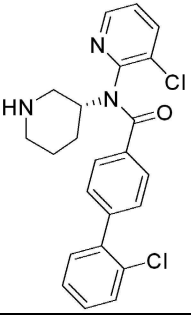
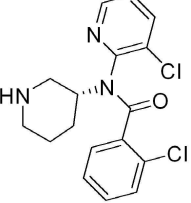
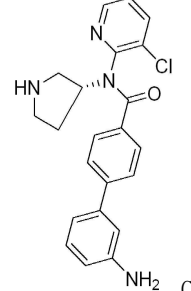
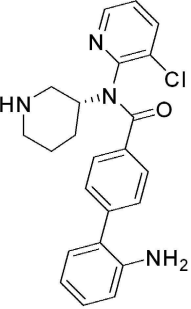
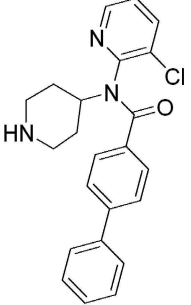
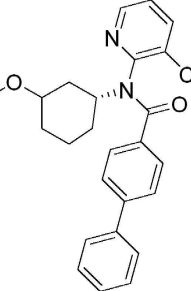
 <p>CLY-15</p>	<p>Chemical Formula: C₁₇H₁₆ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 369.81</p> <p>수소스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.80 (1H) , 2.24 (2H) , 2.61 (2H) , 3.28 (2H) , 4.55 (1H) , 6.90 (1H) , 7.21 (1H) , 7.40 (1H) , 7.57 (1H) , 7.93 (1H) , 8.31 (1H) , 8.74 (1H) , 8.79 (1H) .</p> <p>MS (ES+) :370 (M+H)</p>
 <p>CLY-16</p>	<p>Chemical Formula: C₁₇H₁₆ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 369.81</p> <p>수소스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.72 (1H) , 2.34 (2H) , 2.60 (2H) , 3.31 (2H) , 4.62 (1H) , 6.89 (2H) , 7.37 (1H) , 7.62 (2H) , 7.87 (1H) , 8.57 (1H) , 8.78 (1H) .</p> <p>MS (ES+) :370 (M+H)</p>
 <p>CLY-17</p>	<p>Chemical Formula: C₂₀H₂₁ClN₆O₂</p> <p>Molecular Weight: 412.88</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터:0.57 (1H) , 1.1 (1H) , 1.65 (2H) , 1.73 (1H) , 1.82 (2H) , 1.94 (1H) , 3.35 (3H) , 3.42 (1H) , 4.58 (1H) , 6.92 (1H) , 7.75 (1H) , 7.86 (1H) , 7.94 (1H) , 7.97 (1H) , 8.02 (1H) , 8.55 (1H) , 9.13 (1H) ,</p> <p>MS (ES+) :413 (M+H)</p>
 <p>CLY-18</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₀ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 445.91</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.82 (1H) , 2.32 (2H) , 2.65 (2H) , 3.30 (2H) , 4.64 (1H) , 6.85 (1H) , 7.04 (2H) , 7.36 (1H) , 7.45 (1H) , 7.54 (1H) , 7.62 (2H) , 7.77 (1H) , 7.87 (1H) , 8.27 (1H) , 8.49 (1H) .</p> <p>MS (ES+) :446 (M+H)</p>
 <p>CLY-19</p>	<p>Chemical Formula: C₂₄H₂₂ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 459.94</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 1.68 (1H) , 1.73 (1H) , 1.8 (1H) , 2.56 (1H) , 2.69 (2H) , 3.06 (1H) , 3.34 (1H) , 4.28 (1H) , 6.86 (1H) , 7.05 (2H) , 7.46 (2H) , 7.53 (1H) , 7.6 (1H) , 7.72 (2H) , 7.77 (1H) , 8.26 (1H) , 9.15 (2H) ,</p> <p>MS (ES+) :460 (M+H)</p>

[0131]

 <p style="text-align: right;">CLY-20</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₀ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 445.91</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.78 (1H) , 2.21 (2H) , 2.65 (2H) , 3.30 (2H) , 4.70 (1H) , 6.82 (1H) , 7.01 (2H) , 7.38 (2H) , 7.59 (1H) , 7.65 (2H) , 7.87 (2H) , 8.57 (1H) , 8.79 (1H) .</p> <p>MS (ES+) :446 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-21</p>	<p>Chemical Formula: C₁₈H₁₈ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 383.84</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 1.58 (1H) , 1.73 (1H) , 1.80 (1H) , 2.56 (1H) , 2.71 (2H) , 3.06 (1H) , 3.34 (1H) , 4.28 (1H) , 6.86 (1H) , 7.68 (1H) , 7.77 (1H) , 7.85 (1H) , 7.89 (1H) , 8.32 (1H) , 8.68 (1H) , 9.45 (2H) ,</p> <p>MS (ES+) :384 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-22</p>	<p>Chemical Formula: C₁₈H₁₈ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 383.84</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 1.68 (1H) , 1.73 (1H) , 1.8 (1H) , 2.56 (1H) , 2.71 (2H) , 3.06 (1H) , 3.34 (1H) , 4.28 (1H) , 6.86 (1H) , 7.68 (1H) , 7.77 (1H) , 7.85 (1H) , 7.89 (1H) , 8.02 (1H) , 8.35 (1H) , 10.45 (2H) ,</p> <p>MS (ES+) :384 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-23</p>	<p>Chemical Formula: C₂₅H₂₃ClN₆O</p> <p>Molecular Weight: 458.95</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 1.82 (2H) , 1.9 (2H) , 2.72 (2H) , 3.14 (2H) , 4.72 (1H) , 5.81 (2H) , 6.92 (1H) , 7.02 (2H) , 7.33 (1H) , 7.42 (2H) , 7.75 (2H) , 7.8 (1H) , 8.31 (1H) , 8.49 (1H) , 8.89 (1H) ,</p> <p>MS (ES+) :459 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-24</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₀ClN₇O</p> <p>Molecular Weight: 445.91</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : 0.84 (1H) , 2.29 (2H) , 2.62 (2H) , 3.32 (2H) , 4.65 (1H) , 6.89 (1H) , 6.97 (2H) , 7.26 (1H) , 7.42 (1H) , 7.59 (1H) , 7.67 (2H) , 7.97 (1H) , 8.27 (1H) , 8.67 (1H) , 8.98 (1H) .</p> <p>MS (ES+) :446 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-25</p>	<p>Chemical Formula: C₁₇H₁₇Cl₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 350.24</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터 : δ 1.5~2.07 (4H) , δ 2.01 (1H) , δ 2.42~2.85 (4H) , δ 3.41 (1H) , δ 7.74~8.43 (7H)</p> <p>MS (ES+) :351(M+H)</p>

 <p style="text-align: right;">CLY-26</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₁Cl₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 426.34</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터: δ 1.51~2.02 (4H), δ 2.05 (1H), δ 2.41~2.82 (4H), δ 3.371 (1H), δ 7.64~8.33 (11H)</p> <p>MS (ES⁺) :427(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-27</p>	<p>Chemical Formula: C₂₂H₁₉Cl₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 412.31</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터: 0.77 (1H), 2.22~2.30 (2H), 2.70 (2H), 3.32 (2H), 4.63 (1H), 6.86 (1H), 7.01 (1H), 7.36 (1H), 7.37 (2H), 7.68 (2H), 7.77 (1H), 7.75 (2H), 8.45 (1H)。</p> <p>MS (ES⁺) :413 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-28</p>	<p>Chemical Formula: C₂₂H₂₁ClN₄O</p> <p>Molecular Weight: 392.89</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터: 0.73 (1H), 2.25 (2H), 2.78 (2H), 3.01 (2H), 3.32 (2H), 4.61 (1H), 6.96 (1H), 7.07 (2H), 7.24 (1H), 7.36 (1H), 7.44 (1H), 7.56 (1H), 7.67 (2H), 7.77 (1H), 8.61 (1H)。</p> <p>MS (ES⁺) :393 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-29</p>	<p>Chemical Formula: C₂₂H₂₀ClN₃O</p> <p>Molecular Weight: 377.87</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터: 0.76 (1H), 2.29~2.32 (2H), 2.74 (2H), 3.31 (2H), 4.61 (1H), 6.86 (1H), 7.04 (2H), 7.36 (1H), 7.40 (2H), 7.67 (2H), 7.77 (1H), 7.87 (2H), 8.86 (1H)。</p> <p>MS (ES⁺) :378 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-30</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₂ClN₃O</p> <p>Molecular Weight: 391.90</p> <p>수소 스펙트럼CDCl₃중 데이터: 0.76 (1H), 2.29~2.32 (2H), 2.74 (2H), 2.87 (3), 3.21 (2H), 4.57 (1H), 6.89 (1H), 7.01 (2H), 7.36 (3H), 7.57 (2H), 7.77 (1H), 7.87 (1H), 8.36 (1H)。</p> <p>MS (ES⁺) :392(M+H)</p>

 <p style="text-align: right;">CLY-31</p>	<p>Chemical Formula: C₂₅H₂₆ClN₃O</p> <p>Molecular Weight: 419.95</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 :</p> <p>0.75 (3H) , 0.92 (2H) , 2.12 (2H) 2.29 (2H) , 2.74 (2H) , 3.31 (2H) , 4.61 (1H) , 6.86 (1H) , 7.04 (2H) , 7.36 (1H) , 7.40 (2H) , 7.67 (2H) , 7.77 (1H) , 7.87 (2H) , 8.60 (1H) .</p> <p>MS (ES+) :420 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-32</p>	<p>Chemical Formula: C₂₄H₂₄ClN₃O</p> <p>Molecular Weight: 405.93</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 :</p> <p>0.91 (2H) , 1.78 (1H) , 2.12 (1H) , 2.28 (3H) , 2.69 (1H) , 2.89 (1H) , 3.28 (1H) , 3.36 (1H) , 4.35 (1H) , 6.86 (1H) , 7.04 (2H) , 7.36 (1H) , 7.4 (1H) , 7.4 (1H) , 7.67 (2H) , 7.77 (1H) , 7.87 (1H) , 8.56 (1H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-33</p>	<p>Chemical Formula: C₂₄H₂₅ClN₃O</p> <p>Molecular Weight: 420.94</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 0.92 (2H) , 1.93 (2H) , 2.12 (3H) 2.29 (2H) , 2.74 (2H) , 3.31 (2H) , 4.61 (1H) , 6.86 (1H) , 7.04 (2H) , 7.36 (1H) , 7.40 (2H) , 7.52 (1H) , 7.67 (1H) , 7.73 (1H) , 7.84 (1H) , 8.26 (1H)</p> <p>MS (ES+) :421 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-34</p>	<p>Chemical Formula: C₂₄H₂₃Cl₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 440.37</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 0.92 (2H) , 2.12 (3H) 2.29 (2H) , 2.74 (2H) , 3.31 (2H) , 4.61 (1H) , 6.86 (1H) , 7.04 (2H) , 7.36 (1H) , 7.40 (2H) , 7.52 (1H) , 7.67 (1H) , 7.77 (1H) , 7.87 (1H) , 8.26 (1H)</p> <p>MS (ES+) :441 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-35</p>	<p>Chemical Formula: C₂₅H₂₅Cl₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 454.40</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 0.81 (3H) , 0.92 (2H) , 2.12 (2H) 2.29 (2H) , 2.74 (2H) , 3.31 (2H) , 4.61 (1H) , 6.86 (1H) , 7.04 (2H) , 7.36 (1H) , 7.40 (2H) , 7.67 (2H) , 7.87 (2H) , 8.36 (1H)</p> <p>MS (ES+) :455(M+H)</p>

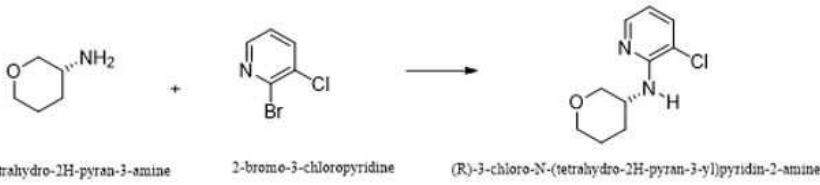
 <p style="text-align: right;">CLY-36</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₁C₁₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 426.34</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 1.68 (2), 1.8 (1), 2.56 (1), 2.69 (2), 3.06 (1), 3.34 (1), 4.28 (1), 4.9 (1), 6.8 (2), 6.86 (1), 7.15 (3), 7.38 (1), 7.76 (3), 8.42 (1),</p> <p>MS (ES+) :427(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-37</p>	<p>Chemical Formula: C₁₇H₁₇C₁₂N₃O</p> <p>Molecular Weight: 350.24</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : δ 1.5~2.07 (4H), δ 2.01 (1H), δ 2.42~2.85 (4H), δ 3.41 (1H), δ 7.74~8.43 (7H)</p> <p>MS (ES+) :351(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-38</p>	<p>Chemical Formula: C₂₂H₂₁C₁₁N₄O</p> <p>Molecular Weight: 392.89</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 0.69 (1H), 2.22 (2H), 2.73 (2H), 2.98 (2H), 3.38 (2H), 4.61 (1H), 6.92 (1H), 7.01 (2H), 7.19 (1H), 7.32 (1H), 7.41 (1H), 7.46 (1H), 7.62 (2H), 7.87 (1H), 8.26 (1H)</p> <p>MS (ES+) :393 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-39</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₃C₁₁N₄O</p> <p>Molecular Weight: 406.91</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 1.73 (2), 1.8 (1), 2.56 (1), 2.71 (2), 3.06 (1), 3.34 (1), 4.28 (1), 4.42 (3), 6.53 (1), 6.72 (2), 6.86 (2), 6.98 (1), 7.26 (1), 7.56 (2), 7.77 (1), 8.43 (1),</p> <p>MS (ES+) :407 (M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-40</p>	<p>Chemical Formula: C₂₃H₂₂C₁₁N₃O</p> <p>Molecular Weight: 391.90</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 1.63~1.73 (2), 1.8 (1), 2.56 (1), 2.69 (2), 3.06 (1), 3.34 (1), 4.28 (1), 4.9 (1), 6.86 (1), 6.92 (2), 7.36 (3), 7.67 (2), 7.77 (1), 7.87 (2), 8.31 (1),</p> <p>MS (ES+) :392(M+H)</p>
 <p style="text-align: right;">CLY-41</p>	<p>Chemical Formula: C₂₅H₂₅C₁₁N₂O₂</p> <p>Molecular Weight: 420.94</p> <p>수소 스펙트럼CDC13중 데이터 : 0.57 (1H), 1.1 (1H), 1.65 (2H), 1.73 (1H), 1.82 (2H), 1.94 (1H), 3.35 (3H), 3.42 (1H), 4.58 (1H), 6.92 (1H), 7.1 (2H), 7.36 (1H), 7.4 (2H), 7.76 (2H), 7.86 (1H), 7.87 (2H), 8.95 (1H),</p> <p>MS (ES+) :421 (M+H)</p>

[0132]

실시예 4: (R)-4-(3H-[1,2,3]트리아졸조[4,5-b]피리딘-3-일)-N-(3-클로로피리딘-2-일)-N-(테트라히드로-2H -피

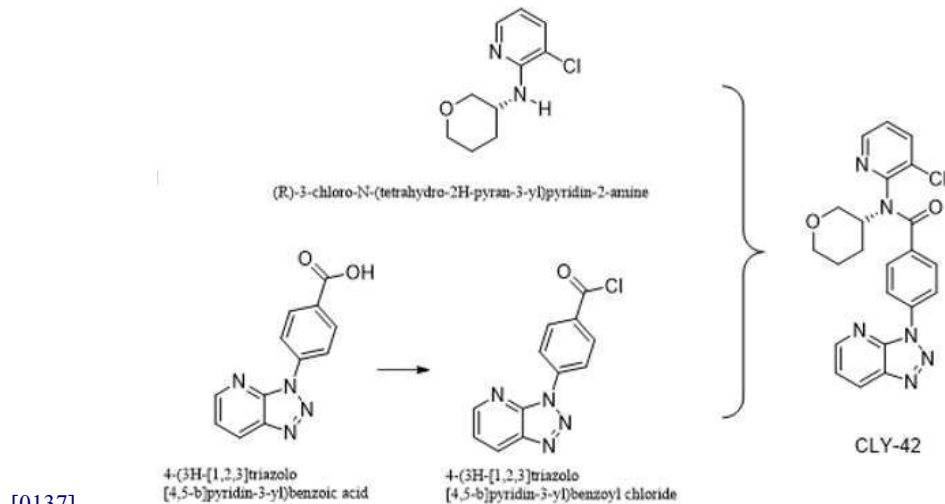
란-3 -일)벤조아미드(약칭 CLY-42)의 합성이다.

[0133] 단계 1: (R)-3-클로로-N-(테트라히드로-2H-피란-3-일)피리딘-2-아민의 합성이 다.

[0134] 

[0135] @-테트라하이드로-2H-피란-3-아민 10.1g, 2-브로모-3-클로로피리딘 14.0g, tert-부탄올나트륨 12.0g, 테트라하이드로퓨란 100ml를 250ml 3구 플라스크에 넣고 질소보호, 교반을 열고 아세테이트 팔라뿔 0.1g, 1,1'-비-2-나프톨, 트리(디메틸아미노)포스핀을 넣고 65℃로 가열하여 12시간 반응시킨 후 반응을 멈추고 물 500ml에 붓고 아세테이트 1000ml로 추출하고 아세테이트층을 합한 후 물 200*3으로 세척하고 에틸 아세테이트 층을 회수하여 잔류 페이스트를 얻고 실리카겔로 샘플을 혼합하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 @-3-클로로-N-(테트라히드로-2H-피란-3-기) 피리딘-2-아민 약 8g을 얻다.

[0136] 2단계:

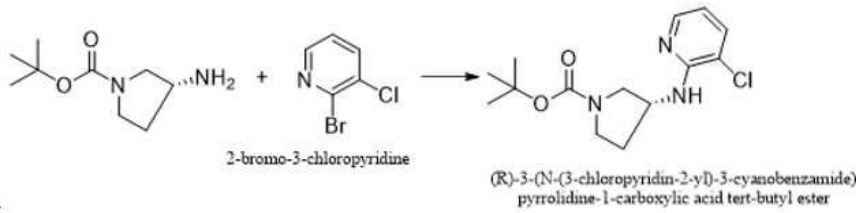


[0137]
 [0138] 4-3H-[1,2,3]트리아졸[4,5-b]피리딘-3-일)안식향산 5g 디클로로메탄 50ml에 옥살로일클로라이드 2.5ml와 촉매 N,N-디메틸포름아미드 0.2ml를 가하고 상온에서 맑게 반응하여 감압 회수 용매 후 잔류물에 테트라히드로프란 50ml 용매를 가하고 이전 단계 생성물(R)-3-클로로-N-(테트라히드로-2H-피란-3)피리딘-2 -아민 4g의 테트라히드로프란 용액을 첨가하여 얼음물욕조에 넣어 5℃ 이하로 식힌 후 비스(트리메틸실릴)아민계 리튬 1M용액 20ml를 넣고 상온에서 밤새 교반 반응시킨 후 물에 붓고 에틸아세테이트로 100ml*3을 추출하고 물로 세척한 후 감압하여 에틸아세테이트를 회수하여 잔류물을 컬럼크로마토그래피로 분석하고(R)-4-(3H-[1,2,3]트리아졸[4,5-b]피리딘-3-일)-N-(3-클로로피리딘-2-일) -N-(테트라히드로-2H -피란-3 -일)벤조아미드 약 6g, MS(ES+):435(M+H)를 얻다.

[0139] 같은 방법으로 (CLY-43) 합성할 수도 있다

[0140] 실시예5:1-(5-(4-(4-(3-클로로피리딘-2-기))(R)-피롤리딘-3-기)카바모일)페닐)-1-메틸-1H -피라졸-5 -기)-2H -테트라졸-2 -기)이소부티레이트(약칭 CLY-44)의 합성이다.

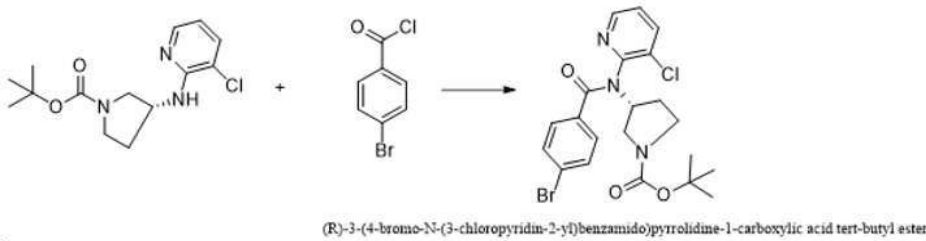
[0141] 1단계 :



[0142] :

[0143] (1)(R)-3-((3-클로로피리딘-2-2-일)아미노)피롤리딘-1-tert-부틸 카르복실레이트의 합성이다.

[0144] (R)-1-tert-부톡시카르보닐-3-아미노피롤리딘 11.8g, 2-브로모-3-클로로피롤리딘 11.0g, tert-부탄올나트륨 10.0g, 톨루엔 70ml를 250ml 3구 플라스크에 넣고 질소로 보호, 교반을 시작하고 아세테이트 팔라듐 0.1g, 나프톨, 트리(디메틸아미노)포스핀, 100℃로 가열하고 7시간 동안 반응을 멈추고 물 500ml를 붓고 아세테이트 1000ml로 나누어 추출하고 아세테이트층을 합친 후 물 200*3으로 세척하고 에틸 아세테이트 층을 회수하여 잔류 페이스트를 얻고 실리카겔로 샘플을 혼합하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 (R)-3-((3-클로로피리딘-2-2-기)아미노)피롤리딘-1-카르복실산tert부틸약7g을 얻다.



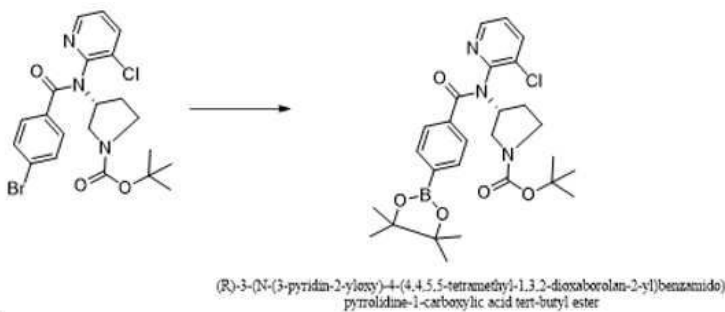
[0145] :

[0146] :

[0147] 0℃에서 (R)-3-((3-클로로피리딘-2-2-기)아미노)피롤리딘-1-카르복실산 tert-부틸 5g 및 4-브로모벤조일클로로 4g을 테트라히드로푸란 용액 100ml에 1M 비스(트리메틸실릴)아미노 리튬 용액 20ml를 적가하고 실온에서 밤새 교반하고 에틸 아세테이트 300ml로 희석한 후 물 200ml*3으로 세척하고 에틸 아세테이트층을 감압 농축하여 잔류물 컬럼 크로마토그래피를 얻다.

[0148] 3단계

[0149] (R)-3-(N-(3-클로로피리딘-2-일)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보란-2-일)벤조아미드)피롤리딘-1-카르복실산 tert 부틸의 제조

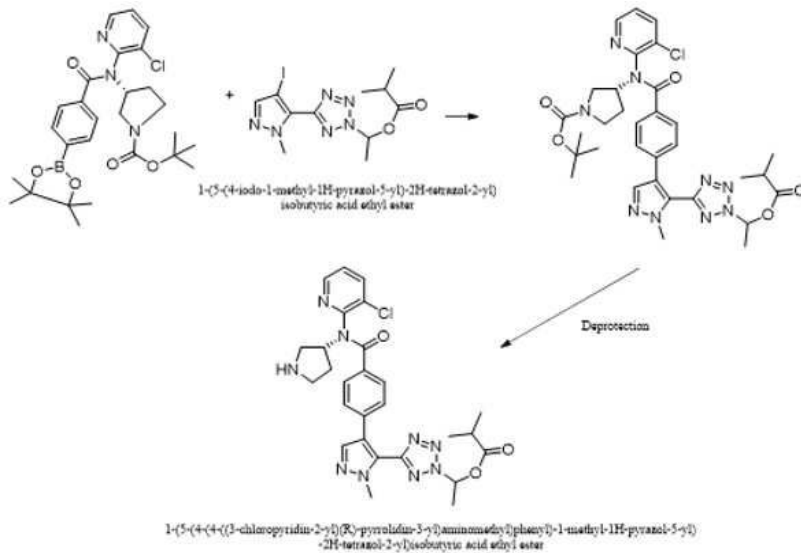


[0150] :

[0151] (R)-3-(4-브로모-N-(3-클로로피리딘-2-2-일)벤조아미드)피롤리딘-1-카르복실산 tert-부틸 3g, 비스(호나톨 합성)디보론 3g, 초산칼륨 2g을 1,4-디옥시헥사사이클 30ml에 넣고 교반하고 질소 보호, 염화팔라듐 0.6g을 넣고 100℃로 가열하여 5시간 동안 교반하고 감압 농축하고 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분석하여 3.1g(R)-3 - (N - (3 - (3 - (N - (3 - (3 -

[0152] 4단계 :

[0153] 1-(5-(4-(4-(3-클로로피리딘-2-기))((R)-피롤리딘-3-기)카바모일)페닐)-1-메틸-1H -피라졸-5-기)2H테트라졸2기)이소부티레이트합성이다.



[0154]

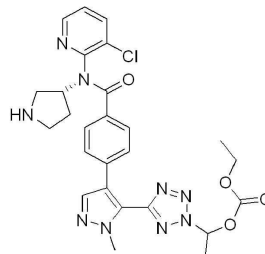
[0155]

[0156]

(R)-3-(N-(3-클로로피리딘-2-일)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보란-2β)벤조아미드)피롤리딘-1-테트라하이드로부틸 카복시레이트 3g, 1-(4-(N-4,4,5,5-테트라졸-2-일)이소부티레이트 2.5g, 트리칼륨인산 5g, 메탄술폰산(2'-디사이클로포스포닐-2',6'-메틸)-1,1'-벤zil)(2반응용액을 상온으로 내린 후 에틸아세테이트 200ml로 희석하여 에틸아세테이트층을 분취하고 물 100ml*3으로 세척한 후 무수황산나트륨으로 건조하고 감압하여 에틸아세테이트를 회수하여 잔류물을 얻습니다. 잔류물을 디클로로메탄 30ml로 녹이고 4mol/L, 1,4-디옥시헥사시클로염화수소용액 4ml를 가하고 2시간 동안 교반하고 감압하여 용매를 건조시키고 실리카겔 크로마토그래피로 분리하여 1-(5-(4-(3-클로로피리딘-2-일))-(R)-피롤리딘-3-일)카바모일)페닐)-1, 메틸-1H-피라졸-5-일)-2H-테트라졸-2-일) 이소부티레이트 약 0.5g을 얻다. MS (ES+) : 565 (M+H).

[0157]

동일한 방법을 참조하여(CLY-45) 합성할 수도 있다.



[0158]

실시예 6 쥐의 약동학적 특성에 관한 연구

[0159]

1. 실험 방법:

[0160]

수컷 SD 쥐를 구입하여 무작위로 할당하고, 위의 각 화합물 실험에 사용된 12마리의 쥐를 무작위로 두 그룹으로 나누었으며, 그 중 6마리는 정맥 주사(1mg/kg)로 투여하였고, 투여 후 0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 및 24시간에 채혈하여 혈장을 분리하였고, 나머지 6마리 쥐는 위내 투여(5mg/kg), 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 및 24시간에 혈장을 채취하여 분리했습니다. LC/MS/MS 방법을 사용하여 혈장 내 각 화합물의 농도를 결정하고 Phoenix WinNonlin 6.2를 사용했다. 1 소프트웨어는 관련 약동학 매개변수를 계산하고 쥐의 생체 이용률을 계산하며 각 화합물의 약동학 특성을 평가한다.

[0161]

2. 실험 결과

[0162]

위의 모든 화합물 중 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-5, CLY-8, CLY-11, CLY-14, CLY-17, CLY-18, CLY-19, CLY-21, CLY-26, CLY-28, CLY-30, CLY-32, CLY-35, CLY-36, CLY-37, CLY-44수컷 SD 쥐에서 생체이용률이 각각 69.8%, 72.6%, 69.5%, 59.5%, 53.8%, 78.2%, 63.5%, 52.3%, 52.5%, 46.9%, 66.3%, 49.6%, 48.5%, 42.6%, 46.2%, 58.6%, 62.2%, 68.6%, 56.5%, 및 50.6%로 더 우수하여 위의 화합물이 좋은 약동학적 특성을 가지고 있음을 나타낸다.

[0163]

실시예 7 기니피그 기미 모델에 대한 화합물 CLY의 영향

- [0164] **1. 실험 방법**
- [0165] **1.1 실험 재료**
- [0166] 1.1.1 시약: 프로게스테론(20mg/ml)은 상하이 일반 약업 유한회사에서, 알부틴 연고는 상하이 신선봉 약업 유한 회사에서, 티로신, 말론디알데히드(MDA), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD) 키트는 난징 건설 생물 공학 연구소에 서 구입했다.
- [0167] 1.1.2 기기: DY89-II 전동 유리 균질기는 Ningbo Xinlan Bio Technology Co., Ltd에서 구입했으며 시스템 바이오 현미경(Image-Pro Plus 6.0)은 미국 Media Cyberne
- [0168] 1.1.3 실험 동물: 체중(230±30)g의 SPF 등급의 건강한 순수 계통의 암컷 기니피그, 상하이 슬레이크 실험 동물 기술 유한공사이다.
- [0169] 1.1.4 치료 크림의 제조 방법: 부형제 매트릭스 구성 요소에는 메틸실리콘 오일(15%), 스테아르산(6%), 화이트 바셀린(5%), 액체 파라핀(5%), 옥타데칸알코올(5%), 글리세롤(20%), 알킬아릴폴리에탄올에테르(1%), 지방알코올 폴리옥시에틸렌에테르(1%), 트윈-807(1%), 에틸파라벤(0.1%) 및 증류수(약 31-55%)가 포함되며 각각 적당량의 CLY 계열 화합물과 혼합하여 0.25% 혼합 에멀전을 형성합니다. 이 실시예에서 사용된 크림 매트릭스는 활성 성분을 제거하기 위해 크림의 매트릭스 성분을 나타냅니다. tics에서 구입했다.
- [0170] **1.2 동물 그룹화 및 모델링**
- [0171] 체중번호에 따라 모델대조군(크림바르기 매트릭스), 블랭크대조군(크림바르기 매트릭스), CLY-1치료군(크림바르기 0.25% CLY-1크림바르기), CLY-2치료군(크림바르기 0.25% CLY-2크림바르기), CLY-3치료군(크림바르기 0.25% CLY-3크림바르기), CLY-4치료군(클라리-4크림을 0.25% CLY-5크림을 피부에 바름)으로 구분하며, CLY-5 치료군(피부에 0.25% CLY-5 크림 도포), CLY-14 치료군(피부에 0.25% CLY-14 크림 도포), CLY-19 치료군(피부에 0.25% CLY-19 크림 도포), CLY-36 치료군(피부에 0.25% CLY-36 크림 도포), 양성 치료군(피부에 0.25% 알부틴 크림 도포)은 각 그룹에 6마리이다. 블랭크 대조군을 제외하고 다른 그룹의 기니피그에 20mg/ml 프로게스테론 주사(7.5mg/kg)를 1일 1회 30일 연속 주사하여 기미 모델을 확립했습니다. 기니피그의 등쪽 모델 영역의 피부는 균 일하고 안정적이며 명확한 경계를 가진 짙은 갈색 반점으로 모델 복제에 성공했다. 모델링 후 모델 대조군, 블랭크 대조군, 각 CLY 계열 치료군 및 양성 치료군의 기니피그 등에 해당 크림을 30일 연속 1일 1회 도포하여 개입 했다.
- [0172] **1.3 관찰 지표**
- [0173] (1) 티로신, MDA 함량, SOD 활성 측정
- [0174] 모든 기니피그에서 예비 피부 조직 1개를 취하여 예냉 생리식염수로 헹구고 피하지방 및 기타 결합조직을 제거 한 후 닦아내고 각 피부 조직을 0.5g씩 잘라 예냉 생리식염수 2.0ml가 들어 있는 5개의 작은 시험관에 넣고 고속분산기를 10r/min의 속도로 균질화하고 10초 동안 1회 반복한 후 3500r/min의 속도로 15분간 원심분리하여 상층 액을 취한다. 티로신 측정은 고성능 액상법, MDA 측정은 티오바르비투르산법, SOD 측정은 크산틴 산화효소법, 키트의 지침에 따라 티로신, MDA 함량 및 SOD 활성을 검출한다.
- [0175] (2) 피부 멜라닌 세포의 병리학적 형태학적 관찰
- [0176] 모든 기니피그는 예비 피부 조직 1개, 약 2cm×1cm, 10% 파라포름알데히드 고정, 병리 조직 검사, 면역 조직 화학 염색, 멜라닌 세포 염색 및 수 관찰, 문헌에 따라 양성 세포: 없음, 0점, <15%, 0.5점; <30%, 1점; >30%, 2 점입니다. 각 슬라이스에 대해 5개의 시야를 관찰하고 피부 표피 및 부속 상피 세포질에서 갈색 반응을 보이는 양성 표적을 찾은 후 BX50F4 복향 병리학적 이미지 분석 시스템을 사용하여 정량적으로 분석하여 기니피그당 5 개 시야 멜라닌 양성 표적의 평균 면적, 통계 필드 면적에 대한 표적 대 표적 수 비율(표면 밀도), 통계 필드 면적에 대한 표적 수 비율(수 밀도), 평균 그레이스케일, 평균 광학 밀도 및 적분 광학 밀도를 얻다.
- [0177] **1.4 통계학적 방법**
- [0178] 통계는 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하였으며, 측정 데이터는 평균±표준편차(x±s)로 표현하였으며, 다중군간 비교는 일원분산분석을 사용하였으며, 그룹간 비교는 t검정을 사용하였으며, P<0.05는 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다.
- [0179] **2. 실험 결과**

[0180] (1) 각 그룹의 기니피그 티로신, MDA 함량 및 SOD 활성

[0181] 각 그룹의 기니피그 티로신, MDA 함량 및 SOD 활성의 검출 결과는 표 3에 나와 있다. 기니피그 피부의 티로신과 MDA 함량은 모델군이 블랭크군보다 높았고 SOD 활성은 블랭크군보다 낮았으며, 이는 피부 기미 모델이 성공적으로 확립되었음을 의미하며 모델군과 비교하여 CLY 계열 치료군과 양성 치료군의 피부 내 티로신과 MDA 함량은 낮은 반면 SOD 활성은 증가했으며 그 차이는 통계적으로 유의했다(P<0.05).

표 3

[0182] 각 그룹의 기니피그 티로신, MDA 함량 및 SOD 활성 비교

조별	n	티로신 (ug)	MDA (nmol/ml)	SOD (NU/ml)
모형 대조팀	6	0.68±0.16	13.73±1.62	86.63±12.72
블랭크 대조팀	6	0.42±0.06*	10.16±0.95*	107.12±7.35*
CLY-1 치료팀	6	0.45±0.07*	11.32±1.15*	103.65±9.63*
CLY-2 치료팀	6	0.43±0.06*	10.86±1.19*	105.23±9.82*
CLY-3 치료팀	6	0.51±0.07*	11.57±1.18*	97.45±9.23*
CLY-4 치료팀	6	0.53±0.06*	11.62±1.15*	95.12±8.65*
CLY-5 치료팀	6	0.43±0.04*	10.65±1.14*	105.89±9.86*
CLY-14 치료팀	6	0.54±0.06*	11.62±1.21*	95.13±9.16*
CLY-19 치료팀	6	0.56±0.07*	11.75±1.26*	96.53±9.21*
CLY-36 치료팀	6	0.58±0.08*	11.83±1.27*	93.42±9.03*
양성 치료팀	6	0.49±0.09*	11.82±1.43*	101.26±10.36*

[0183] **모델군과의 비교 P<0.05

[0184] (2) 각 그룹의 기니피그 멜라닌 세포의 면적, 수량 및 깊이

[0185] 각 그룹의 기니피그 멜라닌 세포의 면적, 수 및 깊이는 표 4 및 표 5에 나와 있습니다. 블랭크 그룹과 비교하여 모델 그룹의 기니피그 피부 멜라닌 침착 면적이 증가하고 멜라닌 세포의 수가 증가하며 광학 밀도가 증가하고 착색이 짙어지며 모델 그룹과 비교하여 각 CLY 계열 치료 그룹과 양성 치료 그룹의 기니피그 피부의 멜라닌 침착 면적이 감소하고 멜라닌 세포의 수가 감소하며 광학 밀도가 작아지고 착색이 얇아진다.

표 4

[0186] 각 그룹의 기니피그 멜라닌 세포의 면적과 수 비교

조별	n	면적 (um ²)	면밀도	개수	수밀도
모형 대조팀	6	2335.12±436.45	0.013±0.005	3.24±1.23	5.53±1.69
블랭크 대조팀	6	316.97±55.12*	0.003±0.001*	1.14±0.38*	1.67±0.81*
CLY-1치료팀	6	372.31±58.32*	0.005±0.002*	1.93±0.55*	1.91±0.96*
CLY-2치료팀	6	366.26±62.15*	0.004±0.002*	1.75±0.53*	1.88±1.34*
CLY-3치료팀	6	436.32±79.12*	0.008±0.003*	2.13±0.61*	2.82±1.25*
CLY-4치료팀	6	496.56±86.23*	0.009±0.003*	2.45±0.67*	2.95±1.41*
CLY-5치료팀	6	345.31±56.21*	0.004±0.001*	1.43±0.32*	1.75±1.29*
CLY-14치료팀	6	417.53±73.16*	0.006±0.002*	1.98±0.56*	2.16±1.38*
CLY-19치료팀	6	405.62±73.45*	0.006±0.003*	1.95±0.52*	2.18±1.35*
CLY-36치료팀	6	495.32±79.43*	0.007±0.004*	1.98±0.59*	2.67±1.38*
양성 치료팀	6	489.13±95.67*	0.006±0.002*	2.39±0.72*	2.29±1.65*

[0187] *모델군과의 비교 P<0.05

표 5

[0188] 각 그룹의 기니피그 멜라닌 세포 깊이

조별	n	평균 그레이스케일	평균광밀도	적분광밀도
모형 대조팀	6	0.68±0.16	13.59±1.45	87.65±11.32
블랭크 대조팀	6	0.39±0.06*	10.16±0.95*	108.63±8.12*

CLY-1치료팀	6	0.43±0.07*	11.23±1.21*	103.34±9.71*
CLY-2치료팀	6	0.41±0.06*	10.68±1.18*	106.96±9.84*
CLY-3치료팀	6	0.52±0.08*	11.42±1.32*	95.36±9.86*
CLY-4치료팀	6	0.58±0.09*	11.61±1.38*	92.45±9.36*
CLY-5치료팀	6	0.40±0.05*	10.59±1.13*	107.06±9.57*
CLY-14치료팀	6	0.46±0.06*	11.26±1.22*	101.38±9.92*
CLY-19치료팀	6	0.45±0.06*	11.28±1.24*	102.65±9.97*
CLY-36치료팀	6	0.47±0.07*	11.53±1.22*	97.62±9.91*
양성 치료팀	6	0.49±0.09*	11.91±1.36*	97.96±10.37*

[0189] *모델군과의 비교 P<0.05

[0190] 3. 실험 결론

[0191] CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-5, CLY-14, CLY-19 및 CLY-36은 피부 조직에서 SOD 효소의 활성을 증가시키고 티로신과 MDA의 함량을 감소시키며 멜라닌 세포와 흑색종 세포의 티로시나아제 활성을 억제하고 피부 세포의 산화 환원 반응을 향상시키며 자유 라디칼 생성을 감소시키고 멜라닌 형성을 억제하여 기미를 치료할 수 있다.

[0192] 실시예 8 화합물 CLY 시리즈가 쥐 흉터 모델에 미치는 영향

[0193] 1. 실험방법

[0194] 1.1 치료 크림의 제조 방법: 부형제 매트릭스 구성 성분에는 메틸실리콘 오일(15%), 스테아르산(6%), 바이바셀린(5%), 액체 파라핀(5%), 옥타데칸올(5%), 글리세롤(20%), 알킬아릴폴리에탄올에테르(1%), 지방알코올폴리옥시에틸렌에테르(1%), 트윈-807(1%), 에틸과라벤(0.1%) 및 증류수(약 31-55%)가 포함되며, 각각 적당량의 CLY 계열 화합물과 혼합하여 혼합 유제를 형성한다. 이 실시예에서 사용된 에멀전 매트릭스는 활성 성분을 제거하기 위한 에멀전의 매트릭스 성분을 나타낸다.

[0195] 1.2 실험 동물 그룹화 및 모델링: SPF 등급 수컷 쥐, 체중 (210±28)g, 난의대 동물센터에서 유래했다. 쥐는 체중에 따라 번호를 매기고 무작위 목록법 모델 대조군(크림 바르기 매트릭스), CLY-1 처리군(0.5% CLY-1 크림 바르기), CLY-2 처리군(0.5% CLY-2 크림 바르기), CLY-3 처리군(0.5% CLY-3 크림 바르기), CLY-4 처리군(크림 바르기), CLY-8 치료군(피부에 0.5% CLY-8 크림 도포), CLY-14 치료군(피부에 0.5% CLY-14 크림 도포), CLY-19 치료군(피부에 0.5% CLY-19 크림 도포), CLY-36 치료군(피부에 0.5% CLY-36 크림 도포)은 각 그룹에 6마리씩 있습니다. 각 그룹의 쥐에게 2% 펜토바르비탈 나트륨(120mg/kg)을 복강내 주사하여 마취하고 수술대에 고정시킨 후 등 왼쪽에서 4X5cm의 온전한 피부를 선택하고 8% 황화나트륨을 제모하고 조직을 절단하여 제모된 곳에서 각각 2.4cm 직경의 원형 근막 깊이의 상처로 절단하여 근육 표면의 근막 일부를 파괴한다. 동물은 쥐가 물어뜯고 핏을 것을 방지하기 위해 별도의 케이지에서 사육된다. 상처 표면을 매일 2%요오드팅크로 소독하고 쥐의 상처 치유 상태를 관찰한다.

[0196] 2. 실험 결과

[0197] 2.1 쥐의 상처 관찰 결과

[0198] 상처 표면은 매일 정기적으로 소독하고 1일, 3일, 5일, 7일, 12일, 20일에 쥐의 상처 표면을 관찰합니다. 5일째부터 각 CLY 계열 치료군의 상처 회복 속도는 모델군보다 유의하게 빨랐고 상처 면적은 점차 작아졌습니다. 12일째에 각 치료군의 상처는 기본적으로 회복되었지만 모델군에는 여전히 약 0.5cm² 크기의 상처가 있었다. 20일째에는 각 그룹의 상처 표면이 회복되었고 모델 대조군은 명백한 흉터를 남겼지만 각 치료군은 다양한 양의 색소 침착만 남겼다.

[0199] 3. 실험 결론

[0200] CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-8, CLY-14, CLY-19 및 CLY-36은 모두 피부 상처 치유를 크게 촉진하고 흉터(반흔) 형성을 감소시킬 수 있다.

[0201] 실시예 9 화합물 CLY 시리즈가 쥐 탈모 모델에 미치는 영향

[0202] 실시예 9 화합물 CLY 시리즈가 쥐 탈모 모델에 미치는 영향

[0203] 1. 실험방법

[0204]

1.1 재료

[0205]

(1) 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-8, CLY-14, CLY-19, CLY-36 탱크의 제조 방법: 75% 에탄올을 적당량 이상의 화합물과 혼합하여 다양한 농도의 탱크를 제조한다.

[0206]

(2) 양성치료제 : 5% 미녹시딜탱크(상품명 : 만디, 저장완마약업유한공사)

[0207]

(3) 실험 동물: SPF 등급 Wistar 쥐, 수컷은 상하이 슬레이크 실험 동물 유한 책임 회사에서 파생되었다.

[0208]

1.2 동물 그룹화 및 모델링

[0209]

Wistar 쥐는 체중에 따라 무작위로 음성대조군(외용 75% 에탄올), 모델군(외용 75% 에탄올), 양성대조군(외용 5% 미놀디르탱크), CLY-1 외용치료군(외용5% CLY-1탱크), CLY-2 외용치료군(외용5% CLY-2탱크), CLY-3 외용치료군(외용으로 5% CLY-3탱크), CLY-4 외용으로 치료군(외용으로 5% CLY-4탱크), CLY-4 외용 치료군(외용 5% CLY-4 탱크), CLY-5 외용 치료군(외용 5% CLY-5 탱크), CLY-14 외용 치료군(외용 5% CLY-14 탱크), CLY-19 외용 치료군(외용 5% CLY-36 탱크), 그리고 정맥주사군(2mg/kg)입니다.d), CLY-2 정맥주사군(2mg/kg.d), CLY-3 정맥주사군(2mg/kg.d), CLY-4 정맥주사군(2mg/kg.d), CLY-5 정맥주사군(2mg/kg.d), CLY-14 정맥주사군(2mg/kg.d), CLY-19 정맥주사군(2mg/kg.d), CLY-36 정맥주사군(2mg/kg.d), 각 그룹에 10마리씩 있다. 실험 전 각 쥐는 관찰 영역으로 털을 제거하기 위해 등쪽 4cm x 5cm 면적을 선택했습니다.음성 대조군을 제외하고, 쥐에게 피하주사된 프로피온산 테스토스테론 주사제[5ml/(kg·d)]를 60일 연속 1일 1회 주사하여 SA 모델을 설정했습니다.테스토스테론 프로피오네이트를 4주 동안 피하 주사한 후 쥐는 점차적으로 모발이 떨어졌고, 남아있는 모발은 가늘고 부서지기 쉬워져 탈모 모델이 성공적으로 확립되었음을 증명했다.동시에 피부에 도포하여 투여하고, 투여 간격은 8시간 간격으로 1일 2회 해당 약물군의 쥐의 등 관찰 부위에 2mL/(단·회)로 도포합니다.정맥 주사는 1일 1회이다.음성대조군과 모델대조군은 75% 에탄올 용액 2mL/(단·회)를 60일 연속 1일 2회 도포한다.

[0210]

1.3 관찰지표 및 시험방법

[0211]

투여 15일마다 각 쥐의 등 관찰 구역에서 10개의 모발을 뽑고 버니어 캘리퍼스로 모발 길이를 측정했습니다.투여 60일 후 실험 관찰 구역의 피부를 채취하여 일상적인 조직 탈수, 파라핀 포매, HE 염색, 광학 현미경 검사를 수행하여 쥐 피부 모낭 및 피지선의 조직 병리학적 변화를 관찰했다.각 그룹의 병변에 대해 반정량적 분석을 수행했습니다.등급 기준은 피부 진피 조직 세포와 피하 모낭 및 피지선 구조는 정상적으로 '1'로 기록된다. 피부 진피는 증식하지 않고 모낭 및 피지선 병변의 한계, 피하 염증은 '±'로 기록된다. 피부 진피 조직은 증식하지 않으며 모낭은 명백한 증식, 피지선은 명백한 증식, 피하 염증은 '+'로 기록됩니다. 피부 진피 조직은 단편적으로 증식하고 뚜렷하지 않으며 소량의 모낭은 낭포성 변성, 피지선은 약간 비대하고 피하에는 명백한 증식하지 않다. 피지선은 증식이 있고 증식선은 세포핵이 적으며 개별 쥐의 피하에 경미한 염증성 증식이 있으면 '+++'로 기록된다.

[0212]

2. 실험 결과

[0213]

2.1 CLY가 쥐의 모발 성장에 미치는 영향

[0214]

투여 15일, 30일, 45일, 60일차에 각 처리군의 쥐의 모발 길이는 모델 대조군보다 길었고, 그 차이는 통계적으로 유의하였고(P<0.01), 양성 처리군과 비교하여 통계적으로 유의하였다(P<0.05). 표 6 참조

표 6

[0215]

쥐의 모발 성장 길이에 대한 각 그룹의 영향

조별	15일 모발 길이(mm)	30일 모발 길이(mm)	45일 모발 길이(mm)	60일 모발 길이(mm)
음성대조팀	9.4*	10.5*	13.4*	15.5*
모형대조팀	6.3	7.5	9.6	11.6
양성대조팀	7.6*	8.5*	13.1*	16.2*
CLY-1외용팀	8.3*	9.3*	14.2*	17.6*
CLY-2외용팀	9.1*	10.1*	15.3*	18.9*
CLY-3외용팀	7.5*	8.6*	12.45*	16.3*
CLY-4외용팀	7.2*	8.3*	12.26*	16.1*
CLY-5외용팀	9.2*	10.2*	15.5*	18.9*
CLY-14외용팀	8.2*	9.1*	13.89*	17.4*
CLY-19외용팀	8.5*	9.4*	14.02*	17.6*

CLY-36외용팀	8.1*	8.7*	13.81*	17.1*
CLY-1정맥팀	8.7*	9.6*	14.6*	17.9*
CLY-2정맥팀	9.2*	10.3*	15.6*	19.1*
CLY-3정맥팀	7.3*	8.9*	13.9*	16.8*
CLY-4정맥팀	7.1*	8.6*	13.5*	16.3*
CLY-11정맥팀	8.6*	9.3*	14.7*	17.6*
CLY-19정맥팀	8.8*	9.7*	14.9*	17.8*
CLY-36정맥팀	8.6*	9.2*	14.2*	17.3*

[0216] **모델 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.01).

[0217] 2.2 CLY가 쥐 관찰 구역의 피부 조직 진피의 얇은 모낭 형태에 미치는 영향

[0218] 모델 그룹의 부분 피부 진피 조직 세포는 다양한 정도의 단편적으로 두꺼워졌고 쥐의 피하에 가벼운 림프구가 증식했으며 부분 쥐의 피하 모낭은 명백한 낭포성 변화와 다양한 크기의 모낭이 있었고 모낭의 내강에서 탈락각 화물이 증가했다. 주변은 경미한 섬유화, 모낭 주변 세포가 사라지거나 세포층이 현저히 감소했다. 각 치료군에서 쥐의 피부 진피 조직 세포, 피하 모낭 및 피지선 병변은 모델군에 비해 다양한 정도로 감소했다. 모델 대조군과 비교하여 각 치료군에서 쥐의 피부 손상 모낭 수는 유의하게 감소하였고 그 차이는 통계적으로 유의했다(P<0.01). 모델 대조군과 비교하여 각 치료군에서 쥐의 피부 진피 조직 세포, 피하 모낭 및 피지선 병변이 유의하게 감소하였고 그 차이는 통계적으로 유의했습니다(P<0.01). 양성 치료군과 비교하여 그 차이는 통계적으로 유의했습니다(P<0.05). 표 7을 참조하십시오.

표 7

[0219] 쥐의 피부 모낭과 피지선에 대한 각 군의 영향(마리)

조별	개수	-	±	+	++	+++	P값*
음성대조팀	10	10	0	0	0	0	<0.01
모형대조팀	10	0	0	1	4	5	-
양성대조팀	10	0	2	4	3	1	<0.01
CLY-1외용팀	10	0	5	4	1	0	<0.01
CLY-2외용팀	10	0	6	3	1	0	<0.01
CLY-3외용팀	10	0	4	5	1	0	<0.01
CLY-4외용팀	10	0	3	4	3	0	<0.01
CLY-5외용팀	10	0	6	4	0	0	<0.01
CLY-14외용팀	10	0	5	4	1	0	<0.01
CLY-19외용팀	10	0	5	3	2	0	<0.01
CLY-36외용팀	10	0	5	2	3	0	<0.01
CLY-1정맥팀	10	0	6	4	0	0	<0.01
CLY-2정맥팀	10	0	7	3	0	0	<0.01
CLY-3정맥팀	10	0	5	4	1	0	<0.01
CLY-4정맥팀	10	0	4	5	1	0	<0.01
CLY-5정맥팀	10	0	8	2	0	0	<0.01
CLY-11정맥팀	10	0	6	3	1	0	<0.01
CLY-19정맥팀	10	0	6	2	2	0	<0.01
CLY-36정맥팀	10	0	6	1	3	0	<0.01

[0220] 참고: *는 모델 대조군과 통계적으로 유의한 차이입니다(P<0.01).

[0221] **3. 실험 결론**

[0222] CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-5, CLY-14, CLY-19 및 CLY-36은 외용 및 계통 적용 모두에서 쥐 탈모 모델의 모발 성장을 크게 촉진하고 피하 모낭 및 피지선의 손상을 줄일 수 있으며 명백한 부작용은 없다.

[0223] 실시예 10 화합물 CLY 계열이 생쥐 탈모 모델에 미치는 영향

[0224] **1. 실험 방법**

[0225]

1.1 재료

[0226]

(1) 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-8, CLY-11, CLY-19, CLY-36 탱크의 제조 방법: 60% 에탄올을 위의 화합물과 혼합하여 2% 농도의 탱크를 제조한다.

[0227]

(2) 양성치료제 : 2% 미녹시딜탱크(중국의학과학원 피부병연구소 생산)

[0228]

(3) 실험 동물: SPF 등급 수컷 건강한 C57BL/6 마우스, 암컷과 수컷은 각각 반, 6-8주령, 체중 20-25g이며 청두 약강 바이오테크놀로지 유한회사에서 제공했다.

[0229]

1.2 동물 그룹화 및 모델링

[0230]

동물실은 12시간~12시간 밤낮으로 교대하여 23~25° C의 온도에서 자유롭게 마시고 먹으며 실험동물은 동물실에 들어가 적응 사육 1주일 후 실험에 들어갑니다. 실험용 쥐는 음성대조군(외용 60% 에탄올), 모델군(외용 60% 에탄올), 양성대조군(외용 2% 미놀디르탱크), CLY-1 외용치료군(외용 2% CLY-1탱크), CLY-2 외용치료군(외용 2% CLY-2탱크), CLY-3 외용도치료군(외용으로 2% CLY-4탱크), CLY-8 외용도치료군(외용으로 2% CLY-8탱크), CRy-11 외용으로 치료군(외용으로 2%, CLY-11탱크) CLY-19 외용 치료군(2% CLY-19 탱크), CLY-36 외용 치료군(2% CLY-36 탱크)입니다. 각 그룹에는 6마리가 있으며 반은 수컷입니다. 실험용 쥐의 등 4cmX5cm 면적의 영역을 선택하여 털을 제거하고 3% 피크르산 용액으로 제모 영역을 노란색으로 칠하여 제모 실험 관찰 영역을 결정한다. 음성 대조군을 제외하고 다른 그룹의 쥐에게 60일 연속 1일 1회 피하주사 8ml/(kg·d) 프로피온산 테스토스테론 주사를 경구 후 피하 주사하여 SA 모델을 설정했습니다. 주형을 만들어 동시에 투여하고, 투여 간격은 2시간 간격으로 1일 2회 해당 약물군의 쥐의 등 관찰 부위에 1ml/(단·회)로 도포합니다. 정상대조군과 모델대조군은 부형제(60% 에탄올 용액)를 1ml/(단·회), 연속 60일 동안 1일 2회 도포한다.

[0231]

1.3 관찰지표 및 시험방법

[0232]

투여 15일마다 각 마우스의 등쪽 관찰 영역에서 10개의 모발을 뽑고 버니어 캘리퍼스로 모발 길이를 측정했다. 투여 60일 후 실험 관찰 구역의 피부를 채취하여 일상적인 조직 탈수, 파라핀 포매, HE 염색, 광학 현미경 검사를 수행하여 생쥐 피부 모낭 및 피지선의 조직 병리학적 변화를 관찰했다. 각 그룹의 병변에 대해 반정량적 분석을 수행했다. 등급 기준은 피부 진피 조직 세포와 피하 모낭 및 피지선 구조는 정상적으로 '1'로 기록된다. 피부 진피는 증식하지 않고 모낭 및 피지선 병변의 한계, 피하 염증은 '±'로 기록된다. 피부 진피 조직은 증식하지 않으며 모낭은 명백한 증식, 피지선은 명백한 증식, 피하 염증은 '+'로 기록됩니다. 피부 진피 조직은 단편적으로 증식하고 뚜렷하지 않으며 소량의 모낭은 낭포성 변성, 피지선은 약간 비대하고 피하에는 명백한 증식하지 않다. 피지선은 증식이 있고 증식선은 세포핵이 적으며 개별 피하에 경미한 염증성 증식은 '+++'로 기록된다.

[0233]

2. 실험 결과

[0234]

2.1 CLY 시리즈가 생쥐의 모발 성장에 미치는 영향

[0235]

투여 15일, 30일, 45일, 60일째에 각 그룹의 마우스의 모발 길이는 모델 대조군보다 길었고 그 차이는 통계적으로 유의하였고(P<0.01), 양성 치료군과 비교하여 그 차이는 통계적으로 유의했습니다(P<0.05). 표 8을 참조하십시오. 각 그룹의 마우스의 모발 성장은 그림 1에 나와 있습니다.

표 8

쥐의 모발 성장 길이에 대한 각 그룹의 영향

[0236]

조별	15일 모발 길이(cm)	30일 모발 길이(cm)	45일 모발 길이(cm)	60일 모발 길이(cm)
음성대조팀	0.565*	0.802*	0.920*	0.993*
모형대조팀	0.373	0.619	0.643	0.703
양성대조팀	0.591*	0.814*	0.825*	0.842*
CLY-1팀	0.653*	0.851*	0.858*	0.951*
CLY-2팀	0.676*	0.865*	0.869*	0.962*
CLY-3팀	0.646*	0.843*	0.847*	0.946*
CLY-4팀	0.641*	0.837*	0.841*	0.939*
CLY-8팀	0.682 *	0.872*	0.886*	0.971*
CLY-11팀	0.637*	0.831*	0.834*	0.932*
CLY-19팀	0.623*	0.826*	0.828*	0.915*
CLY-36팀	0.628*	0.824*	0.823*	0.919*

[0237] **모델 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.01).

[0238] 2.2 CLY가 생쥐 관찰 구역의 피부 조직 진피의 얇은 모낭 형태에 미치는 영향

[0239] 모델 그룹의 일부 피부 진피 조직 세포는 다양한 정도로 단편적으로 두꺼워졌고 쥐의 피하에 경미한 림프구가 증식했으며 일부 쥐의 피하 모낭은 명백한 낭포성 변이를 보였고 모낭 크기가 다양했으며 모낭의 내강에서 탈락 각화물이 증가했다. 주변은 경미한 섬유화, 모낭 주변 세포가 사라지거나 세포층이 현저히 감소했다. 각 처리군의 생쥐 피부 진피 조직 세포, 피하 모낭 및 피지선 병변은 모델군에 비해 다양한 정도로 감소했다. 모델 대조군과 비교하여 각 처리군에서 쥐의 피부 손상 모낭 수는 유의하게 감소하였고 그 차이는 통계적으로 유의했다(P<0.01). 모델 대조군과 비교하여 각 처리군에서 쥐의 피부 진피 조직 세포, 피하 모낭 및 피지선 병변이 유의하게 감소하였고 그 차이는 통계적으로 유의했습니다(P<0.01). 표 9를 참조하십시오.

표 9

[0240] 쥐 피부 모낭과 피지선에 대한 각 그룹의 영향(마리)

조별	개수	-	±	+	++	+++	P값*
정상대조팀	6	6	0	0	0	0	<0.01
모형대조팀	6	0	0	0	1	5	-
양성대조팀	6	0	2	1	3	0	<0.01
CLY-1팀	6	0	3	2	1	0	<0.01
CLY-2팀	6	0	4	2	0	0	<0.01
CLY-3팀	6	0	3	1	2	0	<0.01
CLY-4팀	6	0	2	2	2	0	<0.01
CLY-8팀	6	0	4	2	0	0	<0.01
CLY-11팀	6	0	3	1	2	0	<0.01
CLY-19팀	6	0	3	2	1	0	<0.01
CLY-36팀	6	0	3	1	2	0	<0.01

[0241] 참고: *는 모델 대조군과 통계적으로 유의한 차이입니다(P<0.01).

[0242] 3. 실험 결론

[0243] CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-5, CLY-14, CLY-19 및 CLY-36은 외용 및 계통 적용 모두에서 쥐 탈모 모델의 모발 성장을 크게 촉진하고 피하 모낭 및 피지선의 손상을 줄일 수 있으며 명백한 부작용은 없습니다.

[0244] 실시예 11 CLY 시리즈가 토끼 귀 여드름 모델에 미치는 영향

[0245] **1. 실험 방법**

[0246] **1.1 재료**

[0247] (1) 치료 크림의 제조 방법: 부형제 매트릭스 구성 성분에는 메틸실리콘 오일(15%), 스테아르산(6%), 백바셀린(5%), 액체 파라핀(5%), 옥타데칸알코올(5%), 글리세롤(20%), 알킬아릴폴리에탄올에테르(1%), 지방알코올폴리옥시에틸렌에테르(1%), 트윈-807(1%), 에틸파라벤(0.1%) 및 증류수(약 31-55%)가 포함되며, 각각 적당량의 CLY 계열 화합물과 혼합하여 혼합 유제를 형성합니다. 이 실시예에서 사용된 에멀전 매트릭스는 활성 성분을 제거하기 위한 에멀전의 매트릭스 성분을 나타낸다.

[0248] (2) 양성치료제 : 0.1% 아다파린젤 (상품명 : 다프윈, 프랑스제약사제)

[0249] (3) 실험 동물: 1.8~2.1kg의 일반 뉴질랜드 토끼, 수컷으로 상하이 슬레이크 실험 동물 유한 책임 회사에서 파생되었다.

[0250] **1.2 동물 그룹화 및 모델링**

[0251] 뉴질랜드 토끼는 체중에 따라 번호를 매기고 무작위 목록 방법을 사용하여 모델 대조군(크림 바르기), 블랭크 대조군(크림 바르기), 양성 처리군(다프벤 바르기), CLY-1 외용 처리군(CLY-1 크림 0.25% 피부 바르기), CLY-2 외용 처리군(CLY-2 크림 0.25% 피부 바르기), CLY-3 외용 처리군(CLY-3 크림 0.25% 피부 바르기)CLY-4 외용치

료군(피부용 0.25% CLY-4 크림 도포), CLY-8 외용치료군(피부용 0.25% CLY-8 크림 도포), CLY-9 외용치료군(피부용 0.25% CLY-9 크림 도포), CLY-14 외용치료군(피부용 0.25% CLY-14 크림 도포), 씨엘리-19 외용치료군(피부용 0.25% 씨엘리-19 크림 도포), 씨엘리-1 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-2 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-3정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-4 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-8 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-9 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-14 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-19 정맥주사군(1mg/kg.d), CLY-36정맥주사군(1mg/kg.d), 각 그룹에 10마리씩 있다. 오른쪽 귀 안쪽 제모 처리는 관찰 구역으로 모든 토끼의 왼쪽 귀 안쪽을 자체 음성 대조군으로 사용하고 95% 알코올을 도포하고 모델군과 치료군의 오른쪽 귀 안쪽에는 2% 콜타르(Alfa Aesar 중국회사, 95% 알코올로 2% 콜타르 용액으로 제조)를 도포하고 멸균 면봉을 사용하여 토끼 귀 안쪽 귀 카테터 개구부에 약 2cm×2cm 범위, 1일 1회, 매회 0.5mL를 도포하고 미지근한 물로 이전 도포 부위를 14일 동안 연속적으로 도포하여 여드름 미세 여드름 모델을설정한다. 귀 두께, 경도, 거칠기, 모낭 입구에 검은색 각진 유무 등 국소 피부의 변화를 육안으로 관찰한다. 최종 도포 18시간 후 재료를 제거하고 5mm 펀치를 사용하여 도포 부위에 피부 조직을 천공하여 10% 포름알데히드로 고정하고 파라핀 포매 절편 후 HE 염색 후 병리학적 조직 관찰 및 분석을 수행한다.

[0252] 1.3 관찰지표

[0253] 여드름 모델의 조직학적 판단 및 등급 기준은 조직학적 수준에 따라 3등급이다. 레벨 0 '1'은 갈매기 부분에 느슨한 각화 세포만 있고 여드름 생성은 없으며 레벨 1은 토끼 귀 표면의 피부가 붉거나 모낭 갈매기 부분에 소량의 조밀한 각화 물질이 보이고 갈매기 부분이 확장되지 않고 '+', 레벨 2는 모낭 갈매기 부분에 중등도의 조밀한 각화 물질이 보이고 피지선으로 확장되어 피지선 도관의 증식과 함께 갈매기 확장 '2+', 레벨 3은 모낭에 광범위한 각질 물질이 있는 것으로 모낭의 촘촘한 각질 색전술은 모낭의 심각한 확장, 피지선 카테터 상피의 명백한 증식, 피부 볼록 및 흉터, 일부 피지선의 퇴행적 '3+'를 유발한다.

[0254] 현미경으로 조직병리학적 변화를 관찰하고 Biomias99 이미지 분석 시스템을 사용하여 슬라이스에서 5개의 다른 표피의 두께를 측정하여 평균값을 계산하고 4개의 슬라이스에서 동일한 위치에 가장 완전한 구조를 가진 2개의 모낭의 면적과 4개의 피지선의 직경을 감지하고 각각의 평균값을 계산한 다음 각 그룹의 토끼 좌, 우 외이도 데이터를 감산하여 각 토끼의 좌, 우 귀 표피 두께 차이, 모낭 면적 차이 및 피지선 직경의 차이를 얻는다.

[0255] 1.4 통계학적 처리

[0256] 통계 분석은 SPSS16 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 자신의 좌우 대조군은 쌍을 이루는 t-검정을 사용하였고, 각 그룹 간의 비교는 t-검정을 사용하였으며, P<0.05는 그 차이가 통계적으로 유의함을 나타낸다.

[0257] 2. 실험 결과

[0258] 육안 관찰: 콜타르를 바른 지 14일 후 모든 그룹의 토끼는 왼쪽 귀 피부가 부드럽고 외이도 모낭이 가지런히 배열되어 있으며 여드름, 구진, 농포 등은 발견되지 않았다. 모델 대조군 토끼의 오른쪽 귀에 콜타르를 바른 후 귀의 두께가 증가하고 피부가 딱딱해지며 표면이 거칠어지며 대부분의 모낭 입구에서 검은 머리 가시가 보이고 모낭 입구가 용기되어 구진이 나타나며 축수가 더 단단하고 일부는 조각으로 융합됩니다. 각 외용 치료군의 오른쪽 귀는 피부가 약간 건조하고 비대하며 소량의 검은머리 여드름이 보인다. 각 정맥주사군은 토끼의 오른쪽 귀에서 대부분의 모낭성 구진이 사라지고 피부가 얇고 부드러워지며 여드름이 현저히 감소하고 모공이 현저히 축소되고 부스러기가 없으며 기본적으로 정상 토끼 귀에 가깝다. 왼쪽 귀와 비교하여 양성 치료군의 토끼 오른쪽 귀는 피부가 약간 붉어지고 약간의 부스러기가 제거되었으며 소량의 여드름이 나타났다.

[0259] 조직 절편 관찰: 모델군의 왼쪽 귀는 표피가 얇고 모낭이 보이며 진피와 표피의 경계가 명확하다. 모델군의 오른쪽 귀 모델링 후 표피가 두꺼워지고 각질이 과도하며 과립층과 극층이 두꺼워지고 각질이 있어 모낭 입구를 막고 모낭이 확장되어 피지선으로 확장되며 모낭 갈매기 부분이 각질 물질로 가득 차서 모낭 갈매기 부분이 확대되어 포트 모양이 되고 진피의 얇은 층 모세혈관이 확장되고 모낭 주위에 염증 세포가 흩어져 있고 소량의 호중구가 있다.

[0260] 각 그룹의 현미경 실험 여드름 조직학적 분류(표 10 참조)는 모델 그룹의 토끼 오른쪽 귀(실험 대조군)와 왼쪽 귀(공백 대조군)의 차이가 통계적으로 유의하여(P<0.05) 토끼 귀 여드름 모델이 성공적으로 모델링되었음을 나타낸다. 각 치료군의 토끼 오른쪽 귀와 모델군의 토끼 오른쪽 귀를 비교하면 그 차이가 통계적으로 유의하여(P 모두 <0.05), 양성 대조군과 각 치료군이 여드름 피부 손상을 개선할 수 있음을 나타낸다.

표 10

[0261]

각 그룹의 여드름의 조직학적 분류

조별/조직학 등급분류	n	-	1+	2+	3+
모형팀왼쪽 귀	10	10	0	0	0
모형팀오른쪽 귀	10	0	1	4	5
CLY-1외용팀	10	5	3	2	0
CLY-2외용팀	10	6	2	2	0
CLY-3외용팀	10	4	4	2	0
CLY-4외용팀	10	3	5	2	0
CLY-8외용팀	10	8	1	1	0
CLY-9외용팀	10	5	4	1	0
CLY-14외용팀	10	5	3	2	0
CLY-19외용팀	10	5	2	3	0
CLY-36외용팀	10	5	1	4	0
CLY-1정맥팀	10	7	2	1	0
CLY-2정맥팀	10	8	1	1	0
CLY-3정맥팀	10	6	2	2	0
CLY-4정맥팀	10	5	3	2	0
CLY-8정맥팀	10	9	1	0	0
CLY-9정맥팀	10	7	3	0	0
CLY-14정맥팀	10	7	2	1	0
CLY-19정맥팀	10	8	1	1	0
CLY-36정맥팀	10	7	1	2	0
양성 치료팀	10	5	2	3	0

[0262]

표11에서 보는 바와 같이 모델군 토끼의 오른쪽 귀(실험대조군) 표피두께, 모낭화적, 피지선직경은 왼쪽 귀(공백대조군)와 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보였으며(P<0.05), 토끼 귀 여드름 모델의 성공적인 복제를 증명하였으며, 각 치료군의 토끼 오른쪽 귀 표피두께, 모낭화적 및 피지선직경은 모델군 토끼의 오른쪽 귀와 비교하여 감소하였고, 그 차이는 통계적으로 유의하여(P<0.05), 양성 대조군과 각 치료군이 여드름 피부 병리학적 손상을 개선할 수 있음을 시사한다.

표 11

[0263]

각 그룹의 귀 표피 두께, 모낭 면적 및 피지선 직경

조별	n	표피 두께 (mm)	모낭 면적 (mm ²)	피지선 직경 (mm)
모형팀왼쪽 귀	10	0.1326±0.0078*	0.1083±0.0938*	0.0452±0.0656*
포형팀오른쪽 귀	10	0.2981±0.0249	0.4768±0.1531	0.4512±0.1526
CLY-1외용팀	10	0.2376±0.0182*	0.2736±0.0967*	0.0825±0.0389*
CLY-2외용팀	10	0.2348±0.0169*	0.2639±0.0934*	0.0687±0.0375*
CLY-3외용팀	10	0.2385±0.0198*	0.2923±0.0987*	0.0837±0.0412*
CLY-4외용팀	10	0.2436±0.0215*	0.3254±0.1126*	0.0958±0.0456*
CLY-8외용팀	10	0.2237±0.0168*	0.2115±0.0832*	0.0663±0.0307*
CLY-9외용팀	10	0.2389±0.0189*	0.2834±0.0981*	0.0715±0.0412*
CLY-14외용팀	10	0.2372±0.0176*	0.2745±0.0946*	0.0786±0.0392*
CLY-19외용팀	10	0.2365±0.0181*	0.2766±0.0953*	0.0795±0.0398*
CLY-36외용팀	10	0.2387±0.0186*	0.2773±0.0945*	0.0805±0.0406*
CLY-1정맥팀	10	0.2287±0.0171*	0.2256±0.0863*	0.0536±0.0312*
CLY-2정맥팀	10	0.2265±0.0165*	0.2232±0.0859*	0.0496±0.0298*
CLY-3정맥팀	10	0.2316±0.0196*	0.2287±0.0883*	0.0575±0.0354*
CLY-4정맥팀	10	0.2363±0.0235*	0.2465±0.0923*	0.0625±0.0386*
CLY-8정맥팀	10	0.1843±0.0156*	0.1845±0.0653*	0.0572±0.0289*
CLY-9정맥팀	10	0.2126±0.0167*	0.2327±0.0865*	0.0614±0.0396*
CLY-14정맥팀	10	0.2295±0.0173*	0.2246±0.0856*	0.0552±0.0325*
CLY-19정맥팀	10	0.2276±0.0165*	0.2235±0.0843*	0.0523±0.0316*
CLY-36정맥팀	10	0.2282±0.0171*	0.2241±0.0846*	0.0536±0.0319*

양성 치료팀	10	0.2389±0.0176*	0.2789±0.0926*	0.0723±0.0387*
--------	----	----------------	----------------	----------------

[0264] **모델군의 오른쪽 귀와 비교 P<0.05

[0265] 3. 실험 결론

[0266] 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-8, CLY-9, CLY-14, CLY-19 및 36은 모두 토끼 귀 여드름 모델의 증상을 현저히 감소시키고 모공 막힘 및 여드름 형성을 감소시킬 수 있으며 여드름에 대한 명백한 치료 효과가 있음을 보여준다.

[0267] 실시예 12 화합물 CLY 시리즈는 생쥐 건선 유사 염증 반응을 억제한다.

[0268] 1. 재료:

[0269] 양성 약물(글루코코르티코이드 약물)은 푸르푸로네이트 모미손 크림(엘로손), 상하이 선령보아제약유한공사 제품이다.

[0270] 동물은 SPF 등급의 건강한 순수 생쥐(C57BL/6)이고 8주령이다.

[0271] CLY 크림의 제조 방법: 매트릭스 구성 성분에는 메틸실리콘 오일(15%), 스테아르산(6%), 화이트 바셀린(5%), 액체 파라핀(5%), 옥타데실 알코올(5%), 글리세롤(20%), 알킬 아릴 폴리 에탄올 에테르(1%), 지방 알코올 폴리옥시에틸렌 에테르(1%), 트웨인-807(1%), 에틸 파라벤(0.1%) 및 증류수(약 31-55%)가 포함되며 적절한 양의 CLY 계열 화합물 용액과 혼합 에멀전을 형성한다.

[0272] 본 실시예에서 사용된 크림 매트릭스는 활성 성분을 제거하기 위해 CLY 크림의 매트릭스 성분을 나타낸다.

[0273] 2. 실험 방법:

[0274] (1) SPF 등급 암컷 C57BL/6 생쥐를 구입한 지 8주된 생쥐를 무작위로 블랭크 대조군, 모델군, 양성 대조군(외용 엘로손 크림), CLY-1 치료군(외용 0.5% CLY-1 크림), CLY-2 치료군(외용 0.5% CLY-2 크림), CLY-8 치료군(외용 0.5% CLY-8 크림), CLY-14 치료군(외용 0.5% CLY-14 크림), 각 그룹(외용 0.5%CRy-19 크림)CLY-36 치료 그룹(외용 0.5% CLY-36 크림), 각 그룹에는 5마리씩 있다. 펜토바르비탈 나트륨 80mg/kg을 복강내 주사하여 마취한 후, 약 2cm×3cm의 면적으로 등을 면도하고 1일 동안 단일 케이지에서 사육했다.

[0275] (2) 블랭크 대조군은 바셀린을 부분적으로 도포하고 모델군, 양성 대조군 및 CLY 치료군의 등에는 매일 정기적으로 5% 이미다퀸모트 크림 62.5mg을 도포하고 연속 6일 동안 매일 사진을 찍고 PASI 점수를 매겼다.

[0276] (3) 모델링 첫날, 블랭크 대조군과 모델군은 1일 2회 크림 매트릭스를 사용하였고, 치료군은 1일 2회 0.5% CLY 계열 크림으로 처리하였다.

[0277] 3. 실험 결과:

[0278] ((1) 그림 2에서 보는 바와 같이 5% 이미다퀸모트 크림을 6일 동안 연속 도포한 후, 모델군 생쥐의 등쪽 도포 부위는 명백한 홍반, 비늘 및 침윤이 나타났고, 각 CLY 치료군 생쥐의 등쪽 도포 부위는 모델군보다 유의하게 경미했으며, 치료군의 홍반, 비늘 및 침윤은 양성 약물 치료군에 가깝다. CLY 계열 화합물이 건선 유사 마우스 모델의 염증 반응을 유의하게 억제할 수 있음을 보여준다.

[0279] 실시예 13 CLY 계열 화합물은 쥐 습진 모델의 염증 반응을 억제한다.

[0280] 1. 실험 재료:

[0281] 오브알부민(OVA): PBS는 20g/L로 제조되어 -20° C에서 보관된다.

[0282] 카포트리올 도포제(상품명: 달렉스 도포제) : 덴마크 레오제약유한공사 제품입니다.

[0283] 양성 약물(글루코코르티코이드 약물)은 푸르푸로네이트 모미손 크림(상품명: 엘로손), 상하이 선령보아제약유한공사 제품이다.

[0284] CLY 크림의 제조 방법: 매트릭스 구성 성분에는 메틸실리콘 오일(15%), 스테아르산(6%), 화이트 바셀린(5%), 액체 파라핀(5%), 옥타데실 알코올(5%), 글리세롤(20%), 알킬 아릴 폴리 에탄올 에테르(1%), 지방 알코올 폴리옥시에틸렌 에테르(1%), 트웨인-807(1%), 에틸 파라벤(0.1%) 및 증류수(약 31-55%)가 포함되며 적절한 양의 CLY 계열 화합물 용액과 혼합 에멀전을 형성한다. 본 실시예에서 사용된 크림 매트릭스는 활성 성분을 제거하기 위

해 CLY 크림의 매트릭스 성분을 나타낸다.

[0285] 동물은 SPF 등급의 건강한 순수 생쥐(C57BL/6)이고 8주령이다.

[0286] 2. 실험 방법:

[0287] SPF 등급 암컷 C57BL/6 쥐의 8주령(0.02kg)을 구입하여 각 군에 6마리씩 무작위로 블랭크 대조군, 모델군, 양성 약물군, CLY-1 처리군(외용 0.1% CLY-1 크림), CLY-2 처리군(외용 0.1% CLY-2 크림), CLY-3 처리군(외용 0.1% CLY-3 크림), CLY-4 처리군(외용 0.1% CLY-4 크림)CLY-8 치료 그룹(외부 0.1% CLY-8 크림), CLY-14 치료 그룹(외부 0.1% CLY-14 크림), CLY-19 치료 그룹(외부 0.1% CLY-19 크림) 및 CLY-36 치료 그룹(외부 0.1% CLY-36 크림)이다.

[0288] 모델링: 정상 대조군 쥐의 양쪽 귀에는 75% 에탄올 14.3ul를 도포하고, 동시에 모델군, 양성 약물군 및 각 치료군은 매일 정기적으로 양쪽 귀에는 1nmol/L 카포트리올 도포제 14.3ul를 도포하고, 공기 건조 후 20g/L OVA 25ul를 도포하고, 1일 1회 12일 동안 연속적으로 도포한다.

[0289] 모델링 시작 4일 후부터 블랭크 대조군과 모델군 생쥐의 귀 피부에 크림 기질을 바르고 양성 약물군 생쥐의 귀 피부에 엘락손, 각 치료군 생쥐의 귀 피부에 치료용 크림을 매일 아침저녁으로 2회 연속 10일 동안 매일 사진을 찍고 점수를 매겼다. 마우스의 귓바퀴 두께는 모델링 전 및 14일에 귀 두께 측정기로 측정하고 기록했다.14일째에 측정 후 쥐를 목을 빼고 희생시키고 혈액을 채취하여 혈청을 분리했다.

[0290] 토끼 항-마우스 인터루킨(IL)-4 항체로 마이크로플레이트를 코팅하고 4° C에서 밤새 ELISA 키트의 지침에 따라 염색하고 반응을 종료하고 혈청 IL-4 수준을 검출했다.ELISA 키트는 모두 미국 Raybiotech에서 구입했다.

[0291] 3.실험 결과:

[0292] (1) 귀 귀 두께 비교: 모델링 전 그룹 간의 귀 두께 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(P>0.05). 모델링 후 각 그룹의 귀 귀 두께는 표 12에 나와 있다.모델군은 각 치료군, 양성 약물군, 블랭크 대조군보다 유의하게 높았고 (P 모두 <0.01), 양성 약물군과 각 치료군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P 모두 >0.05).

표 12

모델링 후 각 그룹의 생쥐 귀 두께

분조	모형팀	양성팀	공백팀	CLY-1	CLY-2	CLY-3	CLY-4	CLY-8	CLY-14	CLY-19	CLY-36
귀두께 (mm)	0.372 ±0.04	0.236 ±0.00	0.218 ±0.00	0.251 ±0.01	0.246 ±0.01	0.297 ±0.03	0.323 ±0.04	0.245 ±0.02	0.278 ±0.02	0.253 ±0.01	0.248 ±0.01
	8	9	4	6	2	9	1	1	3	5	6

[0294] (2)혈청 IL-4 농도: 모델링 전 혈청 IL-4 농도에는 통계적으로 유의한 차이가 없었습니다(P>0.05).모델링 후 각 그룹의 생쥐 말초혈액 내 혈청 IL-4 수치는 표 13에 나와 있다.모델군은 유의하게 다른 군(P 모두 <0.01)이었고, 양성 약물군과 치료군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

표 13

모델링 후 각 그룹의 생쥐 말초혈액 내 IL-4 수치

분조	모형팀	양성팀	공백팀	CLY-1	CLY-2	CLY-3	CLY-4	CLY-8	CLY-14	CLY-19	CLY-36
IL-4수준 (pg/ml)	9.26 ±0.75	5.46 ±0.11	5.14 ±0.06	6.76 ±0.19	5.58 ±0.18	7.32 ±0.21	7.51 ±0.26	5.53 ±0.15	6.45 ±0.18	5.72 ±0.15	5.86 ±0.16

[0296] 4. 실험 결론:

[0297] 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-3, CLY-4, CLY-8, CLY-14, CLY-19 및 CLY-36은 모두 혈청 IL-4 수준을 감소시켜 습진 마우스 모델의 염증 반응을 억제할 수 있다.

[0298] 실시예 14 CLY 계열 화합물이 쥐 이식물의 숙주병 저항성 쥐 모델에 미치는 영향

[0299]

1. 실험방법

[0300]

1.1 실험 동물: 6-8주령 SPF 등급 수컷 C57BL/6 마우스(H-2b) 및 암컷 BALB/c 마우스(H-2d), 체중 16-21g, 모든 실험 마우스는 SPF 등급 격리 케이지에서 사육되었으며 사료 및 깔짚은 멸균 처리되었으며 마우스는 1주일 동안 사육한 후 실험을 수행했다.

[0301]

1.2 동물 그룹화 및 모델링

[0302]

골수 세포의 준비: 쥐를 위해 목을 부러뜨리고 75% 에탄올에 5분 동안 담그고 무균 상태에서 쥐의 두 대퇴골과 경골을 제거하고 2% 소테아혈청을 포함하는 RPMI 1640 배지에 넣는다. RPMI 1640 배지로 골수강을 헹구고 골수 세포를 제거하고 멸균 세척 튜브를 붙여 골수 현탁액을 만들고 200 메쉬 필터로 여과한 후 1500 r/min에서 10분 동안 원심분리하고 세포 펠렛을 수집하고 생리 식염수를 추가하여 재현탁한다. 또한 소량의 세포 현탁액을 취하여 적혈구 용해액으로 적혈구를 제거한 후 핵세포의 양을 센다. 그리고 골수 현탁액의 유핵 세포 농도를 $5 \times 10^{10} L^{-1}$ 로 조정했다.

[0303]

비장 단핵세포의 제조: 비장 외피를 무균적으로 절단하여 200메쉬의 여과망에 올려 부피분율이 2%인 소테아혈청을 함유한 RPMI 1640 배지에 담그고 멸균 주사기 손잡이로 비장을 부드럽게 분쇄하고 여과망을 배지로 여러 번 헹구고 여과된 비장 세포 현탁액을 수집하고 1500r/min에서 10분 동안 원심분리하여 비장 세포 침전물을 수집한다. PBS 재현탁 후 단세포 현탁액을 붙여 넣어 마우스 비장 림프구 분리액 상층에 부드럽게 놓고 1800r/min으로 20분간 원심분리하여 백맥층 세포를 수집하고 PBS로 2회 세척하고 세포 계수 후 세포 밀도를 $5 \times 10^{10} L^{-1}$ 로 조정하고 나중에 사용하기 위해 4° C의 냉장고에 넣는다.

[0304]

C57BL/6 마우스는 골수 이식을 위한 쥐로 사용되었고 BABL/c 마우스는 수용자 쥐로 사용되었다. BABL/c 마우스는 체중에 따라 번호가 매겨지고 무작위 목록 방법을 사용하여 대조군, 모델군 및 CLY 계열 치료군(각 그룹은 5mg/kg 정맥 주사)으로 나뉜다. d 해당 CLY 화합물), 각 그룹에는 6마리가 있다. 이식 1주일 전에 BALB/c 쥐에게 200mg/L 젠타마이신을 함유한 멸균 산성화수를 먹였고 이식 24시간 이내에 쥐에게 8.5Gy 전신 조사(세습 공급원)를 제공했다. 모델군과 각 CLY 계열 치료군의 꼬리 정맥에 C57BL/6 마우스 골수 유핵세포(세포 1×10^7 포함)와 비장 단핵세포(세포 5×10^6 포함)의 혼합물 0.5mL를 주입하여 마우스 급성 GVHD 모델을 만들고 대조군 BABL/c 마우스 꼬리 정맥에 생리 식염수 0.5mL를 주입했다. CLY 계열 치료군은 동시에 CLY 계열 화합물 용액을 각각 5mg/kg씩 정맥 주사했다. d, 나머지 그룹에는 생리 식염수 5mg/kg d을 주입했다.

[0305]

1.3 관찰지표 및 시험방법

[0306]

1.3.1 쥐의 GVHD 증상 점수: 이식 후 매일 체중, 모피, 자세, 활동성, 설사 및 정신 상태를 포함한 쥐의 일반적인 상태를 관찰하고 쥐의 급성 GVHD 여부를 판단한다. 임상 GVHD 증상 채점 기준에 따라 이식 11일 후 각 그룹의 마우스에 대한 임상 GVHD 증상을 채점했다.

표 14

[0307]

GVHD 증상에 대한 채점 기준

표준	0 급	1 급	2 급
체질량감소	< 10%	>10% 그리고 < 25%	> 25%
자세	정상	설 때 활동이 보입니다	명백한 활동이 활동에 영향을 미칩니다
활동도	정상	경도 내지 중등도 감소	자극적이지 않고 활동적이지 않다
모피 무늬	정상	털의 경도 내지 중등도	모피가 뚜렷하게 굵슬굵슬하고 문란함
피부 완전도	정상	발톱이나 꼬리에 비늘이 빠짐	노출이 심한 피부

[0308]

1.3.2 생쥐의 생존시간 분석: 이식 후 3주 후에 각 그룹의 생쥐의 생존 데이터를 수집하고 kaplan-meier 방법으로 생존 곡선을 그리고 Log-rank 분석 방법은 각 그룹의 생쥐 생존율의 차이를 비교한다..

[0309]

1.3.3 조직병리검사: 이식 2주 후 GVHD가 발생한 쥐 3마리를 각 군에서 채취하고 등 피부조직, 간, 소장조직을 채취하여 40g/L 파라포름알데히드 고정, 파라핀 고정 포매 절편, 헤마톡실린-에오신 염색, 광학현미경으로 각 조직의 병리학적 변화를 관찰한다.

[0310]

2. 실험 결과

- [0311] 2.1 CLY 계열 화합물이 급성 GVHD 생쥐의 임상 증상 및 생존 시간에 미치는 영향
- [0312] 2.1.1 임상 증상: 대조군 마우스의 체중과 활동은 감소했지만 GVHD 증상은 없었다. 급성 GVHD 그룹의 생쥐는 이식 후 6일째에 활동, 체중 감소, 활동 감소, 떨림 및 설사 증상이 나타나기 시작한 반면, CLY 계열 치료 그룹에서도 GVHD 증상이 발생했지만 증상은 유의하게 감소했다. 이식 11일 후 임상증상 점수 결과 급성 GVHD군은 7.48 ± 0.77 , CLY-1군, CLY-2군, CLY-5군, CLY-8군, CLY-11군, CLY-36군은 각각 5.28 ± 0.53 , 4.68 ± 0.42 , 4.91 ± 0.46 , 4.56 ± 0.39 , 5.06 ± 0.41 , 4.93 ± 0.39 였으며 CLY 계열 치료군의 임상증상 점수는 급성 GVHD군보다 낮았다 ($P < 0.01$).
- [0313] 2.1.2 쥐의 생존율: aplan-meier 방법으로 생존곡선을 그리고 Log-rank 분석법으로 각 그룹의 쥐의 생존율 차이를 비교한 결과 급성 GVHD군, CLY-1군, CLY-2군, CLY-5군, CLY-8군, CLY-11군, CLY-36군 쥐의 생존율은 각각 12.13%, 61.26%, 68.36%, 58.79%, 63.13%, 62.60%, 67.75%로 나타났습니다. 급성 GVHD 그룹과 비교하여 CLY 시리즈 그룹은 쥐의 생존 시간을 연장할 수 있다 ($P < 0.01$).
- [0314] 2.1.3 피부, 간, 소장 조직의 병리학적 변화: 이식 2주 후, GVHD 증상이 발생한 쥐의 피부, 간 및 소장 조직을 채취하여 헤마톡실린-에오신 염증을 관찰한 결과, 각 그룹의 병리학적 변화를 관찰한 결과, 각 그룹의 병리학적 조직이 얇아지고 명백한 염증 세포 침윤이 관찰되지 않았으며, 간 병리학적 절편에서 급성 GVHD 그룹의 쥐 간에서 다발성 괴사 병변이 발생하고 많은 수의 염증 세포 침윤이 관찰되었으며, CLY 계열 화합물 그룹의 쥐 간에는 작은 괴사 병변만 관찰되었다.
- [0315] **3. 실험 결론**
- [0316] CLY 계열 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-5, CLY-8, CLY-11, CLY-36은 모두 급성 GVHD 생쥐의 생존 시간을 크게 향상시키고 임상 증상을 감소시키며 급성 GVHD에 치료 효과가 있음을 보여준다.
- [0317] 실시예 15 CLY 계열 화합물이 쥐의 폐섬유화 모델에 미치는 영향
- [0318] **1. 실험방법**
- [0319] 1.1 재료:
- [0320] (1) 시약: 블레오마이신(4mg/개, 텐진 타이허 제약 유한회사), 쥐 항-쥐 MMP 모노클로날 항체(NEO Mark-ers사), 쥐 항-쥐 TIMP-1 폴리클로날 항체(우한 박사, ELISA) 키트(미국 R&D사), Quantscript RT Kit 역전사 키트(다렌 TaKaRa사)입니다.
- [0321] (2) 실험 동물: SPF 등급 Wistar 쥐는 절반의 수컷과 암컷, 51-55일령, 체중(180 ± 21)g이며 난징 의과대학 동물 센터에서 유래했습니다.
- [0322] 1.2 동물 그룹화 및 모델링
- [0323] 쥐는 체중에 따라 번호를 매기고 무작위 목록 방법을 사용하여 블랭크 대조군, 모델 그룹 및 CLY 계열 치료 그룹으로 나뉘며 각 그룹에는 12마리, 수컷에는 절반씩이다. 각 그룹의 쥐에 2% 펜도바르비탈 나트륨(120mg/kg)을 복강내 주사하여 마취하고 수술대에 고정하고 목 기관 절개를 통해 약물을 주입했다. 블랭크 대조군에는 생리식염수(1.25ml/kg)를 주입하고 모델군과 CLY 치료군에는 각각 5U/mL 블레오마이신 용액(5mg/kg)을 14일 연속 1일 1회 주입했다. 모델링 1주일 후부터 각 치료 그룹에 해당하는 CLY 화합물 용액(3mg/kg)을 꼬리 정맥 주사했다. d), 블랭크 대조군과 모델군에는 동일한 양의 생리식염수를 14일 연속 1일 1회 정맥 주사했다.
- [0324] 1.3 관찰지표 및 시험방법
- [0325] 각 그룹의 동물은 모델링 및 치료 14일째에 꼬리 정맥을 통해 말초 정맥혈을 채취하여 말초 혈액 슈퍼옥사이드 디스무타제(SOD) 및 카탈라제(CAT) 수치를 검출했다. 각 군에서 채혈 후 쥐를 2회(모델링 후 14일 치료)로 나누어 희생시키고 동물의 오른쪽 폐조직을 채취하여 $-4^{\circ}C$ 의 냉장고에 보관하여 VEGF 검출을 위해 왼쪽 폐조직을 채취하여 파라핀을 포매하여 절편하고 면역조직화학염색으로 쥐의 폐조직에서 MMP 아형 및 TIMP-1 발현을 검출한다. 오른쪽 폐 조직을 분쇄하고 조직 균질액을 취하여 3000r/min의 속도로 원심분리하고 상층액을 취하여 ELISA법으로 폐 조직 VEGF 단백질을 검출하고 역전사 중합효소 사슬법으로 VEGF-mRNA 발현을 측정한다.
- [0326] 2. 실험 결과
- [0327] 2.1 CLY 계열 화합물이 쥐의 폐조직 MMP에 미치는 영향

[0328] 블랭크 대조군 쥐의 폐 조직 TIMP-1 및 MMP 아형은 모두 소량의 발현을 보였다. 모델군 쥐의 MMP-2 및 MMP-9 발현은 모델링 후 증가하고 TIMP-1은 감소하여 블랭크 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보였으며(P<0.05), 성공적인 모델링을 나타냅니다. MMP-2 및 MMP-9의 발현은 CLY 계열 화합물군에서 감소하였고, TIMP-1의 발현은 상향 조절되었으며, 모델군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P 모두 <0.05).

[0329] 표 15 참조

표 15

[0330] 각 군에서 쥐의 폐조직 TIMP-1과 MMP 발현 비교(n=6, x±s)

조별	TIMP-1	MMP-2	MMP-9
모형대조팀	5.71±0.63	3.86±0.29	5.17±0.39
공백대조팀	8.95±0.56*	2.41±0.18*	3.29±0.22*
CLY-1팀	7.82±0.45*	2.43±0.21*	3.32±0.23*
CLY-2팀	8.06±0.49*	2.51±0.24*	3.36±0.25*
CLY-8팀	8.82±0.53*	2.44±0.21*	3.31±0.21*
CLY-14팀	8.13±0.38*	2.52±0.23*	3.53±0.26*
CLY-36팀	7.63±0.52*	2.59±0.23*	3.46±0.25*

[0331] 참고: * 모델 대조군과 비교하여 P<0.05이다.

[0332] 2.2 CLY 계열 화합물군이 폐조직에서 VEGF에 미치는 영향

[0333] 각 그룹의 쥐 폐 조직에서 VEGF 단백질 및 VEGF-mRNA의 발현은 표 16에 나와 있다. 모델군의 VEGF 단백질과 VEGF-mRNA의 발현은 유의하게 감소하였고, 블랭크 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보였으며(P<0.05), 이는 폐섬유화 모델이 성공적으로 모델링되었음을 나타낸다. 모델 그룹과 비교하여 CLY 계열 화합물 그룹의 VEGF 단백질 및 VEGF-mRNA 발현의 차이는 통계적으로 유의했다(P<0.05).

표 16

[0334] 각 그룹의 폐 조직에서 VEGF 단백질 및 VEGF-mRNA 발현 수준 비교(n=6, x±s)

조별	VEGF 단백질 (pg/ml)	VEGF-mRNA
모형대조팀	37.23±4.16	0.52±0.19
공백대조팀	54.26±3.95*	0.83±0.13*
CLY-1팀	52.16±3.61*	0.76±0.11*
CLY-2팀	51.18±3.69*	0.71±0.12*
CLY-8팀	53.16±3.62*	0.79±0.13*
CLY-14팀	49.86±3.58*	0.76±0.13*
CLY-36팀	53.87±3.73*	0.83±0.13*

[0335] 참고: * 모델 대조군과 비교하여 P<0.05이다.

[0336] 2.3 CLY 계열 화합물이 말초혈액에서 SOD, CAT 효소 활성화에 미치는 영향

[0337] 각 그룹의 쥐의 말초 혈액 SOD 및 CAT 효소 수준은 표 17에 나와 있다. 모델군 쥐의 말초혈액 SOD 및 CAT 효소 활성화는 감소하여 블랭크 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보였고(P<0.05), CLY 계열 화합물군 쥐의 말초혈액 SOD 및 CAT 효소 활성화는 모두 향상되었으며 모델군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.05).

표 17

[0338] 각 그룹의 말초 혈액 내 SOD 및 CAT 효소 수준 비교(n = 6, x ± s)

조별	SOD (U/ml)	CAT (kU/g)
모형대조팀	143.36±15.23	8.87±1.21
공백대조팀	223.65±13.28*	15.16±1.29*
CLY-1팀	214.58±13.53*	14.13±1.22*

CLY-2팀	216.62±13.55*	14.28±1.39*
CLY-8팀	220.86±13.78*	14.75±1.22*
CLY-14팀	216.48±13.16*	13.96±1.36*
CLY-36팀	221.76±13.57*	13.26±1.26*

[0339] 참고: * 모델 대조군과 비교하여 P<0.05이다.

[0340] 3. 실험 결론

[0341] 화합물 CLY-1, CLY-2, CLY-8, CLY-14, CLY-36은 모두 폐섬유화 마우스 모델의 폐 조직에서 MMP-2, MMP-9 수치를 유의하게 감소시키고 TIMP-1 및 VEGF 수치를 증가시킬 수 있으며 동시에 말초 혈액의 SOD 및 CAT 효소 수치를 증가시킬 수 있으며 폐섬유화에 대한 억제 효과가 있음을 보여준다.

[0342] 실시예 16, CLY 계열 화합물은 류마티스 관절염(RA) 생쥐의 관절 증상 및 염증 지표를 개선할 수 있다.

[0343] 1. 실험재료와 방법

[0344] (1) 실험 재료

[0345] Freund's Adjuvant Complete(FCA, 미국 Sigma에서 구입), IL-10 ELISA 키트(엘리사 생명공학 유한회사), IL-17 ELISA 키트(미국 Raybiotech)이다.

[0346] (2) 실험동물 그룹화 및 처리

[0347] 5주령 암컷 Wistar 쥐 18마리를 대조군, RA 모델군, CLY 계열 화합물 처리군으로 무작위로 나누었으며 각 그룹에는 6마리였습니다. 대조군은 75% 알코올로 쥐의 오른쪽 발가락을 소독하고 생리 식염수 0.15mL를 쥐의 오른쪽 발 중족 피하에 주사했다. RA 모델 그룹: 실험 시작 첫날 각 쥐를 일상적으로 소독하고 FCA 0.15mL를 쥐의 오른쪽 발바닥 피하에 주사했다. CLY 계열 화합물 치료군: 실험 시작 후 첫날, 각 쥐를 일상적으로 소독하고 FCA 0.15mL를 쥐의 오른쪽 발바닥 피하에 주사하고, 7일 후부터 매일 10mg/kg의 용량으로 CLY 계열 화합물을 투여하고, RA 모델군과 대조군은 매일 생리식염수(10mg/kg)를 투여한다. d), 21일 연속. CLY 계열 화합물의 중재 후 21일째에 쥐의 심장에서 3mL의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 ELISA 방법으로 쥐의 혈청 내 IL-10 및 IL-17 수치를 검출했다.

[0348] (3) 관찰지표

[0349] 중재 21일 후, 각 그룹의 쥐에 관절염 점수를 매겨 각 그룹의 오른쪽 발가락 관절 부종을 측정했습니다. RA 쥐의 염증 반응에 따라 발목 관절의 중증도는 0~4등급으로 0점, 정상, 1점, 발목 관절이 약간 붉고 약간 부어오름, 2점, 발목 관절에서 중족 관절 또는 손바닥 관절에 붉은 반점 및 약간 부어오름, 3점, 발목 관절에서 장관절 또는 중족 발가락 관절에 붉은 반점 및 중간 정도의 붓기, 4점 발목에서 발가락 관절이 심하게 부어올랐다. 관절염 점수로 각 쥐의 사지 점수를 합산했으며 가장 높은 점수는 16점이었다.

[0350] 2. 실험 결과

[0351] (1) 쥐의 일반적인 성능

[0352] 대조군과 비교하여 RA 모델 그룹의 쥐는 식욕 부진, 무기력, 활동 제한 및 왼쪽 및 오른쪽 발가락이 점차 부어 올랐다. CLY 계열 화합물은 중재 21일 후에 다른 그룹에 비해 개선되었다.

[0353] (2) 쥐의 체중, 관절 부종 및 관절염 점수

[0354] 약물 중재 21일 후, 대조군의 체중이 다른 군보다 높았고, 그 차이는 통계적으로 유의하였고(P 모두 <0.05), RA 모델군의 오른쪽 발가락 관절 부종 및 관절염 점수는 대조군보다 높았고, 그 차이는 통계적으로 유의하였고(P<0.05), CLY 계열 화합물 치료군의 관절 부종 및 관절염 점수는 RA 모델군보다 낮았으며, 그 차이는 통계적으로 유의했다(표 18 참조).

표 18

각 그룹의 쥐 관절염 지수 비교

조별	N	체질 (g)	부종도 (mm)	관절 채점
대조팀	6	367.1±18.62*	8.5±0.32*	--

RA 모형팀	6	295.4±9.63#	10.4±1.45#	6.63±0.39#
CLY-1 팀	6	354.5±13.48*	9.7±0.68*	4.35±0.37*
CLY-2 팀	6	358.2±13.92*	9.4±0.53*	4.21±0.29*
CLY-8 팀	6	363.5±13.63*	9.5±0.72*	4.32±0.41*
CLY-36 팀	6	352.6±12.96*	9.3±0.51*	4.46±0.42*

[0356] 참고: *RA 모델 그룹과 비교 P<0.05, # 치료 그룹과 비교 P<0.05

[0357] (3) 각 그룹의 쥐 혈청 내 IL-17 및 IL-10 수준 비교

[0358] 대조군과 CLY 계열 화합물 처리군의 혈청 IL-10 함량은 RA 모델군보다 높았고(P 모두 <0.05), 대조군과 CLY 계열 화합물 처리군의 혈청 IL-17 수치는 RA 모델군보다 낮았으며 그 차이는 통계적으로 유의했다(P 모두 <0.05) (표 19 참조).

표 19

[0359] 각 그룹의 쥐 혈청 IL-10 및 IL-17 수준 비교

조별	N	IL-17 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
대조팀	6	36.83±3.28*	72.57±8.42*
RA 모형팀	6	60.16±6.05#	45.76±5.63#
CLY-1 팀	6	46.15±4.23*	65.36±6.78*
CLY-2 팀	6	46.23±3.96*	67.03±7.02*
CLY-8 팀	6	43.51±4.16*	66.75±6.78*
CLY-36 팀	6	44.18±3.97*	58.96±5.89*

[0360] 참고: *RA 모델 그룹과 비교 P<0.05, # 치료 그룹과 비교 P<0.05

[0361] 3. 실험적 결론

[0362] CLY 계열 화합물은 말초 혈액의 IL-17 수치를 낮추고 IL-10과 같은 염증 지표를 증가시켜 류마티스 관절염 쥐의 관절염 증상을 개선할 수 있다.

도면

도면1



일반 대조 그룹



모델 그룹



양성 대조 그룹



CLY-1 그룹



CLY-2 그룹



CLY-3 그룹



CLY-4 그룹



CLY-8 그룹



CLY-10 그룹



CLY-14 그룹

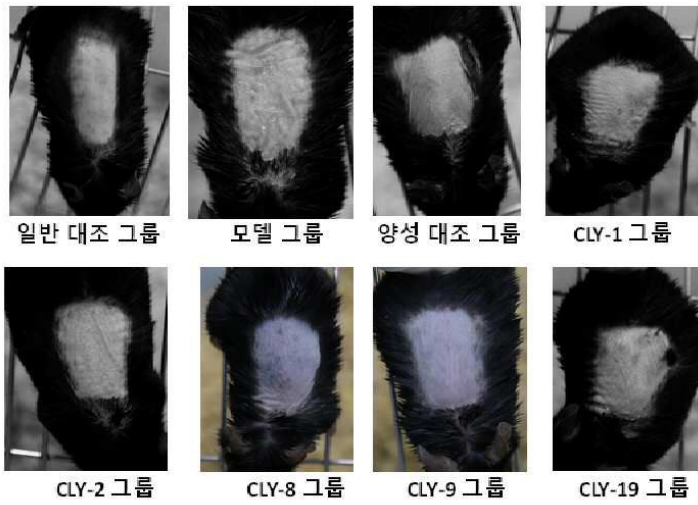


CLY-19 그룹

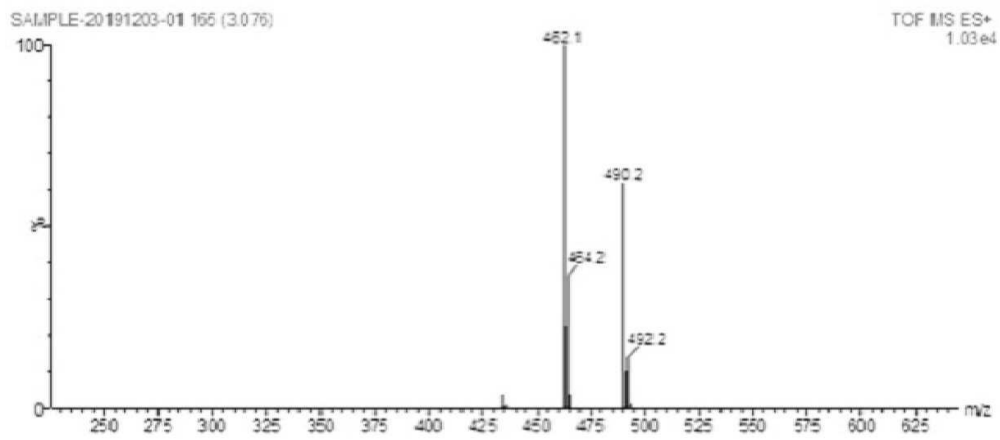


CLY-36 그룹

도면2



도면3



도면4

