



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0140562
(43) 공개일자 2022년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4709 (2006.01) A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/4709 (2013.01)
A61P 17/06 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7030884
(22) 출원일자(국제) 2021년02월09일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년09월06일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/004734
(87) 국제공개번호 WO 2021/161983
국제공개일자 2021년08월19일

(30) 우선권주장
JP-P-2020-020399 2020년02월10일 일본(JP)

(71) 출원인
오츠카 세이야쿠 가부시키키가이샤
일본 도쿄도 지요다쿠 간다츠카사마치 2-9

(72) 발명자
사토, 마사요시
일본 5400021 오사카후 오사카시 주오쿠 오테도리
3-2-27 오츠카 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

다카기, 히로코
일본 5400021 오사카후 오사카시 주오쿠 오테도리
3-2-27 오츠카 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

후지이, 가즈유키
일본 5400021 오사카후 오사카시 주오쿠 오테도리
3-2-27 오츠카 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

(74) 대리인
장수길, 이석재

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **염증성 질환의 치료를 위한 신규 의약**

(57) 요약

본 발명은 활성 성분으로서 퀴놀론 화합물을 포함하는, 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

활성 성분으로서 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물을 포함하는, 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약.

청구항 2

제1항에 있어서, 대사물이 (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((7-아미노-5-시아노피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르보닐)옥소)-3,4,5-트리히드록시테트라히드로-2H-피란-2-카르복실산, 7-(6-아미노-5-카르바모일피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르복실산, 또는 에틸 7-(6-아미노-5-시아노피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르복실레이트인 의약.

청구항 3

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 질환이 IL-17-생산 세포와 관련이 있는 염증성 질환인 의약.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 질환이 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 경피증, 다발성 경화증 또는 건선인 의약.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 투여를 위한 의약.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 활성 성분의 1일 용량이 7.5 mg 내지 24000 mg인 의약.

청구항 7

치료 유효량의 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물을 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 8

염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에서의 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물의 용도.

청구항 9

염증성 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약, 보다 상세하게는, 활성 성분으로서 퀴놀론 화합물을 포함하는, 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 많은 불응성 염증성 질환, 예컨대 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 및 건선은, 예를 들어, 의약이 단지 완화만 달성할 수 있고, 환자가 다중 재발을 겪고, 어떠한 치유 요법도 없고, 기존의 약물이 종종 부작용을 갖는 등의 치료의 문제를 가지며, 따라서 이러한 문제가 없는 새로운 약물의 개발이 요구되고 있다.
- [0003] 염증성 질환을 위한 치료 중 하나로서, 항-IL-17A 항체는 건선 (비-특허 문헌 1)에 대해 치료 효과를 나타내지만, 그 효과는 단지 IL-17A에 대한 중화 효과이고, IL-17-생산 세포를 감소시키는 어떠한 효과도 없다. IL-17-생산 세포를 감소시키기 위한 많은 연구, 예를 들어 ROR γ t 억제제 또는 박테리아요법이 이루어졌지만, 어떠한 효과적인 약물-개발도 아직 달성되지 않았다 (비-특허 문헌 2 내지 6).
- [0004] 특허 문헌 1은 장관에 서식하는 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*)에 대한 항박테리아 활성을 나타내는 특정 퀴놀론 항미생물제를 개시한다.
- [0005] 인용 목록
- [0006] 특허 문헌
- [0007] [PL 1] WO2013/029548
- [0008] 비-특허 문헌
- [0009] [NPL 1] Langley RG, et al., N. Engl. J. Med. 2014; 371(4): 326-338.
- [0010] [NPL 2] Bassolas-Molina H, et al., Front. Immunol. 2018; 9: 2307.
- [0011] [NPL 3] Ogita T, et al., J. Biomed. Biotechnol. 2011;2011:378417.
- [0012] [NPL 4] Mu Q, Tavella VJ, et al., Sci. Rep. 2017; 7(1): 13675.
- [0013] [NPL 5] Wu HJ, Ivanov II, et al., Immunity. 2010; 25; 32(6): 815-827.
- [0014] [NPL 6] Krebs CF, et al., Immunity. 2016; 45(5): 1078-1092.

발명의 내용

- [0015] 기술적 문제
- [0016] 본 발명의 주요 목적은 불응성 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 신규 의약을 제공하는 것이다.
- [0017] 문제에 대한 해결
- [0018] 본 발명자들은 광범위하게 연구하였고, 이어서 기지의 퀴놀론 항미생물제인 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산이 많은 염증성 질환의 악화와 관련이 있다고 기지의 IL-17-생산 세포를 감소시킬 수 있고, 불응성 염증성 질환을 치료하는 데 효과적이라는 것을 발견하였다. 새로운 발견에 기초하여, 본 발명이 완성되었다.
- [0019] 본 발명은 하기 실시양태를 포함한다.
- [0020] (항목 1)
- [0021] 활성 성분으로서 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물을 포함하는, 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약.
- [0022] (항목 2)
- [0023] 항목 1에 있어서, 대사물이 (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((7-아미노-5-시아노피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르보닐)옥소)-3,4,5-트리히드록시테트라히드로-2H-피란-2-카르복실산, 7-(6-아미노-5-카르바모일피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르복실산, 또는 에틸 7-(6-아미노-5-시아노피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르복실레이트인 의약.
- [0024] (항목 3)

- [0025] 항목 1 또는 항목 2에 있어서, 염증성 질환이 IL-17-생산 세포와 관련이 있는 염증성 질환인 의약.
- [0026] (항목 4)
- [0027] 항목 1 내지 항목 3 중 어느 한 항목에 있어서, 염증성 질환이 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 경피증, 다발성 경화증, 또는 건선인 의약.
- [0028] (항목 5)
- [0029] 항목 1 내지 항목 4 중 어느 한 항목에 있어서, 경구 투여를 위한 의약.
- [0030] (항목 6)
- [0031] 항목 1 내지 항목 5 중 어느 한 항목에 있어서, 활성 성분의 1일 용량이 7.5 mg 내지 24000 mg인 의약.
- [0032] (항목 7)
- [0033] 치료 유효량의 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물을 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법.
- [0034] (항목 8)
- [0035] 염증성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에서의 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물의 용도.
- [0036] (항목 9)
- [0037] 염증성 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 대사물.
- [0038] 발명의 효과
- [0039] 본 발명의 화합물은 많은 염증성 질환의 악화와 관련이 있다고 기지의 IL-17-생산 세포를 감소시킬 수 있다. 따라서, 불응성 염증성 질환, 예컨대 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 경피증, 다발성 경화증 및 건선을 치료 및/또는 예방하기 위한 신규 의약이 기대된다. 게다가, 본 발명의 화합물은 잘 흡수되지 않는 약물이고, 그에 의해 이는 경구로 투여되는 경우 장관에 높은 농도로 분포하지만, 낮은 혈액 전달성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 화합물은 장점, 즉 기존의 퀴놀론 항박테리아제에서의 문제인 전신 부작용의 낮은 위험성을 또한 갖는다.

도면의 간단한 설명

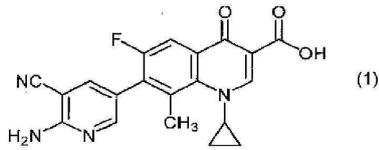
- [0040] [도 1] 도 1은 실시예 1의 결과를 보여준다.
- [도 2] 도 2는 실시예 2의 결과를 보여준다.
- [도 3] 도 3은 실시예 2의 결과를 보여준다.
- [도 4] 도 4는 실시예 8의 결과를 보여준다.
- [도 5] 도 5는 실시예 8의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 화합물 1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산은 화학식 (1)의 구조를 가지며, 이는 클로스트리디움 디피실레에 대한 그의 과정 및 그의 항박테리아 활성을 또한 개시하는 특허 문헌 1에서 화합물 번호 2-18로서 개시된다. 그의 대사물은 각각 하기 화학식 (2) 내지 (4)의 구조를 갖는 (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((7-아미노-5-시아노피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르보닐)옥소)-3,4,5-트리히드록시테트라히드로-2H-피란-2-카르복실산, 7-(6-아미노-5-카르바모일피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-디히드로퀴놀린-3-카르복실산, 및 에틸 7-(6-아미노-5-시아노피리딘-3-일)-1-시클로프로필-6-플루오로-8-메틸-4-옥소-1,4-

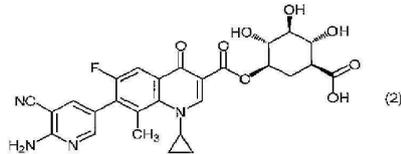
다히드로퀴놀린-3-카르복실레이트이며, 이는 본 발명의 화합물에 포함된다.

[0042] [Chem. 1]



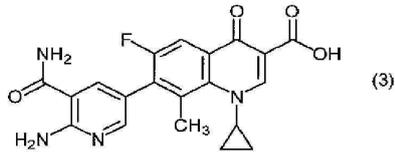
[0043]

[0044] [Chem. 2]



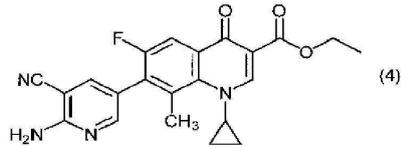
[0045]

[0046] [Chem. 3]



[0047]

[0048] [Chem. 4]



[0049]

[0050] 본 발명의 화합물은 수화물 및/또는 용매화물의 형태일 수 있고, 따라서 본 발명의 화합물은 또한 그의 수화물 및/또는 용매화물을 포괄한다.

[0051] 게다가, 임의의 하나 이상의 ^1H 원자가 ^2H (D) 원자에 의해 대체된 본 발명 화합물이 또한 본 발명의 범주 내에 있다.

[0052] 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 결정에 다형성이 존재할 수 있고, 따라서 이러한 결정 다형성이 또한 본 발명의 범주 내에 있다.

[0053] "제약상 허용되는 염"은 산 부가염으로서, 무기 산과의 염, 예컨대 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로아이오다이드, 술페이트, 퍼클로레이트, 및 포스페이트; 유기 산과의 염, 예컨대 옥살레이트, 말로네이트, 말레이트, 푸마레이트, 락테이트, 말레이트, 시트레이트, 타르트레이트, 벤조에이트, 트리플루오로아세테이트, 아세테이트, 메탄술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 및 트리플루오로메탄술포네이트; 및 아미노산과의 염, 예컨대 글루타메이트 및 아스파르테이트; 및 염기와의 염, 알칼리 금속 염, 예컨대 나트륨 염 및 칼륨 염; 알칼리-토금속 염, 예컨대 칼슘 염; 및 암모늄 염을 포함한다.

[0054] 본원에서 "염증성 질환"은 그가 염증성 질환인 한 제한되지 않고, 바람직하게는 이는 IL-17-생산 세포와 관련이 있는 염증성 질환을 의미한다. 예를 들어, 이는 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 경피증, 다발성 경화증 및 건선을 포함한다.

[0055] 본 발명의 화합물은 경구 투여, 비경구 투여 및 직장 투여로부터 선택된 임의의 경로를 통해 투여될 수 있다. 1일 용량은 화합물, 투여 경로, 환자의 상태, 환자의 연령 등에 따라 달라진다. 예를 들어, 경구 투여의 경우, 이는 일반적으로 인간 또는 포유동물의 체중 kg당 약 0.125 mg 내지 약 400 mg, 바람직하게는 약 0.25 mg 내지 약 200 mg, 보다 바람직하게는 약 0.5 mg 내지 약 100 mg, 보다 더 바람직하게는 약 1 mg 내지 약 50 mg의 용량으로, 1회 내지 수회로 투여될 수 있다. 예를 들어, 인간의 1일 용량은 약 7.5 mg 내지 약 24000 mg, 바람직하게는 약 15 mg 내지 약 12000 mg, 보다 바람직하게는 약 30 mg 내지 약 6000 mg, 보다 더 바람직하게는 약

60 mg 내지 약 3000 mg을 포함한다.

- [0056] 본 발명의 투여 형태는 정제, 캡슐, 과립, 분말, 시럽, 현탁액, 주사, 좌제, 점안제, 연고, 도포제, 첩부제 및 흡입제를 포함한다. 이들 투여 형태는 통상적인 방식으로 제조될 수 있다. 투여 형태가 액체의 것인 경우, 이는 이를 물, 적절한 수용액, 또는 다른 적절한 용매와 혼합함으로써 사용시 용액 또는 현탁액을 제조하는 제제일 수 있다. 정제 및 과립은 널리 기지의 방식으로 코팅될 수 있다. 투여 형태는 제약상 허용되는 첨가제를 사용하여 기지의 방식으로 제조될 수 있다.
- [0057] 본원에서 사용된 첨가제는, 의도된 용도에 따라서, 부형제, 붕해제, 결합제, 유동화제, 윤활제, 코팅제, 착색제, 가용화제, 가용화 작용제, 증점제, 분산제, 안정화제, 감미제 및 향미제를 포함한다. 예를 들어, 그들은 락토스, 만니톨, 인산수소칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 저-치환 히드록시프로필셀룰로스, 옥수수 전분, 부분 예비젤라틴화 전분, 카르멜로스 칼슘, 크로스카르멜로스 소듐, 크로스포비돈, 소듐 스타치 글리콜레이트, 히드록시프로필셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 폴리비닐 알콜, 연질 무수 규산, 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 소듐 스테아릴 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 산화티타늄, 활석, 철 세스퀴산화물 및 황색 산화제2철을 포함한다.
- [0058] 본 발명의 화합물이 단일 투여 형태로 제제화되는 경우에, 투여 형태는 본 발명의 화합물을 전체 조성물당 0.1 내지 85 % (w/w)로 포함할 수 있지만, 본 발명이 그에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 이는 전체 조성물당 10 내지 70 % (w/w)이다.
- [0059] 게다가, 본 발명의 화합물은 효과를 증진시키고/거나 부작용을 완화시키는 목적을 위해 또 다른 약물과 조합하여 또는 또 다른 약물과의 조합물로서 사용될 수 있다. 조합하여 사용될 수 있는 다른 약물은 예를 들어, 스테로이드, 에컨대 프레드니솔론 및 부데소니드, 면역억제제, 에컨대 아자티오프린, 시클로포스파미드 및 타크롤리무스, 생물제약, 에컨대 리톡시맙 및 벨리무맙을 포함한다.
- [0060] 실시예
- [0061] 실시예를 참조함으로써 하기에 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명이 그에 제한되어서는 안된다. 본원에 사용된 본 발명의 화합물 (하기에, "시험 물질"로서 지칭됨) 및 참조 약물을 하기에 제시된 바와 같이 획득하였다.
- [0062] 시험 물질 [1-시클로프로필-6-플루오로-1,4-디히드로-8-메틸-7-(2-아미노-3-시아노-5-피리딜)-4-옥소-3-퀴놀린-카르복실산]: 오츠카 파마슈티칼 캄파니, 리미티드(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)로부터 획득함.
- [0063] 실시예 1. 정상 마우스에서의 IL-17A-생산 세포에 대한 효과
- [0064] 정상 BALB/c 마우스에게 시험 물질을 투여하여 장간막 림프절, 서혜 림프절 및 비장에서 IL-17A-생산 CD4-양성 T 세포에 대한 시험 물질의 영향을 평가하였다.
- [0065] (시험 물질의 제조)
- [0066] 시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4°C에서 저장하였다.
- [0067] (약물 투여)
- [0068] 21일 동안 1일 1회 20 mg/kg의 용량으로 정상 BALB/c 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 각각의 군의 설정은 표 1에 제시되었다.

표 1			
	군	용량	n
1	용매 대조군	-	3
2	시험 물질 투여군	20 mg/kg/일	3

- [0069]
- [0070] (장간막 림프절 세포, 서혜 림프절 세포 및 비장세포의 제조)
- [0071] 21일 동안 약물 투여를 받은 마우스를 경추 탈구에 의해 안락사시킨 다음, 장간막 림프절, 서혜 림프절 및 비장을 단리하였다. 각각의 단리된 조직을 PBS-첨가된 플레이트 상에서 시린지의 아래 부분으로 분쇄하고, 분쇄된 조직을 세포 스트레이너가 설치된 50 mL 튜브에 넣었다. 튜브 내 분쇄된 조직을 5분 동안 500 g로 실온에서 원심분리하고, 수득된 세포 펠릿을 10 % FBS-함유 RPMI-1640 배지에 현탁시켜 하기 나타낸 실험에 사용하였다.

- [0072] (IL-17A-생산 CD4-양성 T 세포의 비율의 평가)
- [0073] 상기 제조된 각각의 세포 현탁액을 96-웰 둥근-바닥 플레이트에 시딩하고, 브레페르딘 A의 존재 하에 PMA/이오노마이신으로 자극하였다. 4-시간 인큐베이션 후에, 세포 표면을 BV510-표지된 항-CD4 항체로 염색하고, 세포를 고정하고, BD 시토픽스/시토피코로 투과시킨 다음, 세포 내 IL-17A를 APC-표지된 항-IL-17A 항체로 염색하였다. 염색된 세포를 유동 세포측정기로 분석하고, 그에 의해 CD4-양성 T 세포 중 IL-17A-양성 세포의 비율을 평가하였다.
- [0074] (결과)
- [0075] 장간막 림프절 세포, 서혜 림프절 세포 또는 비장세포를 PMA/이오노마이신으로 자극함으로써 수득된 CD4-양성 T 세포 중 IL-17A-양성 세포의 각각의 비율을 도 1에 나타내었다. 수득된 결과에 따르면, IL-17A-생산 세포는 모든 조직에 대해 시험 물질 투여군에서 감소하였고, 이는 시험 물질이 IL-17A-생산 세포를 감소시키는 작용을 가질 수 있다는 것을 시사한다.
- [0076] 실시예 2. SLE에 대한 마우스 모델의 신장에서 IL-17A-생산 세포에 대한 효과
- [0077] SLE에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 신장에서 IL-17A-생산 세포에 대한 시험 물질의 효과를 평가하였다.
- [0078] (이미퀴모드-유도된 SLE 모델의 제조)
- [0079] 이미퀴모드-함유 약물인 베젤나(BESELNA) 크림 5 % (모치다 파마슈티칼 캄페니, 리미티드(MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)) (0.03 mL, 1.5 mg의 이미퀴모드 함유)를 1주 3회 이소플루란의 흡입 마취 하에 작은 브러시로 BALB/c 마우스의 우측 외이 안쪽에 도포하였다. 이미퀴모드의 도포를 시험의 처음부터 시험의 말기까지 계속 수행하였다.
- [0080] (시험 물질의 제조)
- [0081] 시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4°C에서 저장하였다.
- [0082] (약물 투여)
- [0083] 이미퀴모드-도포를 시작한 후 14일째부터, 42일 동안 1일 1회 20 mg/kg의 용량으로 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 각각의 군의 설정은 표 2에 제시되었다.

표 2	군	용량	n
1	비처리군 (이미퀴모드-도포하지 않음)	-	6
2	용매 대조군	-	6
3	시험 물질 투여군	20 mg/kg/일	5

비고: 시험 물질 투여군에서, 마우스 1마리가 약물 투여 중 제외되는 사고가 나서 시험 마우스의 수가 5마리 마우스가 되었다.

- [0084] (해부 및 사전 처리)
- [0085] 42일 동안 약물 투여를 받은 마우스를 경추 탈구에 의해 안락사시킨 다음, 한 쌍의 신장을 단리하였다. 단리된 신장 중 하나는 유전자 발현 분석을 위해 액체 질소로 빠르게 동결시키고, 다른 하나는 시험을 시작할 때까지 PBS-첨가된 플레이트 상에 저장하였으며, 이는 IL-17A-생산 세포의 평가를 위해 사용된다.
- [0086] (신장으로부터의 면역 세포의 제조)
- [0087] IL-17A-생산 세포를 평가하기 위한 신장을 각각의 군당 10 % FBS-함유 RPMI-1640 배지가 첨가된 플레이트 위로 옮기고, 가위로 1 내지 2-mm 큐브로 절단하였다. 콜라게나제 D를 플레이트에 첨가하여 농도를 5 mg/mL로 조정하였다. 샘플을 40분 동안 5 % CO₂ 하에 37°C에서 인큐베이션하고, 70 μm 세포 스트레이너가 장착된 50 mL 튜브로 옮겼다. 신장 블록을 세포 스트레이너 상에서 시린지의 아래 부분으로 분쇄하고, 세포 스트레이너를 PBS로 세척하였다. 수득된 세포 현탁액을 10분 동안 500g로 실온에서 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, PBS를 잔류물에 첨가하여 그를 현탁시켰다. 세포를 현탁시키기 위해 사용한 PBS와 동일한 부피의 80 % 퍼콜(Percol1)

용액을 현탁액에 첨가하여 40 % 퍼콜 세포-현탁액을 제조하고, 이를 80% 퍼콜 용액이 이미 첨가된 50 mL 튜브에 쌓았다. 튜브 안의 샘플을 30분 동안 1500 g로 실온에서 원심분리하고, 80 % 퍼콜과 40 % 퍼콜 사이 층을 수집하고, 이를 PBS로 희석하였다. 희석된 샘플을 10분 동안 500 g로 실온에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 잔류물을 10 % FBS-함유 RPMI-1640 배지에서 현탁시키고, 현탁액을 5분 동안 500 g로 4℃에서 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 잔류물을 10 % FBS-함유 RPMI-1640 배지에서 현탁시키고, 이를 하기의 시험에 사용하였다.

[0089] (IL-17A-생산 T 세포의 비율의 평가)

[0090] 각각의 투여군의 세포-현탁액을 96-웰 둥근-바닥 플레이트 상에 시딩하고, 이를 브레페르딘 A의 존재 하에 PMA/이오노마이신으로 자극하였다. 4-시간 인큐베이션 후에, 세포 표면을 FITC-표지된 항-TCRβ 항체, PerCP/Cy5.5-표지된 항-CD8 α 항체, BV421-표지된 항-CD3 항체, BV510-표지된 항-CD4 항체로 염색하고, 세포를 고정하고, BD 시토폭스/시토펜으로 투과시킨 다음, 세포 내 IL-17A를 APC-표지된 항-IL-17A 항체로 염색하였다. 염색된 세포를 유동 세포측정기로 분석하고, 그에 의해 CD4-양성 T 세포 (CD3⁺TCRβ⁺CD4⁺CD8 α⁻), CD4-음성 CD8-음성 T 세포 (CD3⁺TCRβ⁺CD4⁻CD8 α⁻), 또는 TCRβ 채-음성 T 세포 (CD3⁺TCRβ⁻) 내 IL-17A-양성 세포의 비율을 평가하였다.

[0091] (IL-17A 유전자 발현의 평가)

[0092] 동결보존된 신장을 아이소젠(ISOGEN)으로 균질화하고, RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 역전사시켜 cDNA를 제조하였다. 수득된 cDNA를 주형으로서 사용함으로써, Actb 유전자 및 I17a 유전자의 발현 분석을 행하였다. 샘플을 각각 개별적으로 처리하고, 분석 결과를 배수 변화로 나타냈고, 여기서 Actb 유전자는 내인성 대조군이며, 비처리군의 평균은 표준 대조군이다.

[0093] (결과)

[0094] 신장으로부터 제조된 면역 세포를 PMA/이오노마이신으로 자극함으로써 수득된 CD4-양성 T 세포 (CD3⁺TCRβ⁺CD4⁺CD8 α⁻), CD4-음성 CD8-음성 T 세포 (CD3⁺TCRβ⁺CD4⁻CD8 α⁻), TCRβ 채-음성 T 세포 (CD3⁺TCRβ⁻) 내 IL-17A-양성 세포의 각각의 비율을 도 2에 나타내고, 신장에서의 IL-17A 유전자 발현의 분석 결과를 도 3에 나타내었다.

[0095] 각각의 세포주에서의 IL-17A-생산 세포 비율의 분석 결과에 따르면, 데이터는 시험 물질 투여군에서 신장에서의 IL-17A-생산 세포가 감소하였다는 것을 보여주고, 이는 또한 IL-17A 유전자 발현의 분석 결과에도 나타나고, 시험 물질이 SLE 모델의 신장에서의 IL-17A-생산 세포를 감소시키는 작용을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0096] 실시예 3. SLE에 대한 마우스 모델의 신장 기능에의 효과

[0097] SLE에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 신장 기능에 대한 시험 물질의 효과를 평가하였다.

[0098] (시험 물질의 제조)

[0099] 시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 0.5, 1, 및 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4℃에서 저장하였다.

[0100] (약물 투여)

[0101] 표 3에 따르면, 1일 1회 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 물질의 투여를 시험의 말기까지 계속하였다.

	군	용량	n
1	비처리군 (이미퀴모드-도포하지 않음)	-	3
2	용매 대조군	-	10
3	시험 물질 (0.5) 투여군	5 mg/kg/일	10
4	시험 물질 (1) 투여군	10 mg/kg/일	10
5	시험 물질 (2) 투여군	20 mg/kg/일	10

[0102]

[0103] (이미퀴모드-유도된 SLE 모델의 제조)

[0104] 약물-투여를 시작한 후 29일째부터, 이미퀴모드-함유 약물인 베젤나 크림 5 % (모치다 과마슈티칼 캄퍼니, 리미티드) (0.03 mL, 1.5 mg의 이미퀴모드 함유)를 1주 3회 이소플루란의 흡입 마취 하에 작은 브러시로 BALB/c 마우스의 우측 외이 안쪽에 도포하였다. 이미퀴모드의 도포를 시험의 말기까지 계속 수행하였다.

[0105] (신장 기능의 평가)

[0106] 약물-투여를 시작하기 전날에, 이미퀴모드-도포를 시작하기 전날에, 및 이미퀴모드-도포를 시작한 후 14일째, 28일째, 42일째, 및 56일째에 밤새 배설된 소변을 대사 케이지로 수집하였다. 수집된 소변을 10분 동안 3000 g로 4℃에서 원심분리한 다음, 알부민의 농도 및 크레아티닌의 농도를 측정하였다. 수득된 결과에 기초하여, 알부민/크레아티닌의 비를 계산하여 분석에 사용하였다.

[0107] 실시예 4. 류마티스 관절염에 대한 마우스 모델에의 효과

[0108] 류마티스 관절염에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 병리학적 상태에 대한 시험 물질의 효과를 평가하였다.

[0109] (시험 물질의 제조)

[0110] 시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 0.5, 1, 및 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4℃에서 저장하였다.

[0111] (약물 투여)

[0112] 표 4에 따르면, 1일 1회 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 물질의 투여를 시험의 말기까지 계속하였다.

표 4			
	군	용량	n
1	비처리군 (콜라겐 면역화시키지 않음)	-	3
2	용매 대조군	-	10
3	시험 물질 (0.5) 투여군	5 mg/kg/일	10
4	시험 물질 (1) 투여군	10 mg/kg/일	10
5	시험 물질 (2) 투여군	20 mg/kg/일	10

[0113] (류마티스 관절염 모델의 제조 및 병리학적 상태의 평가)

[0115] 약물-투여를 시작한 후 29일째부터, 제II형 콜라겐을 면역화하여 제II형 콜라겐-유도된 관절염을 만들었다. 관절염을 유도하기 위한 방법 및 그의 병리학적 상태를 평가하기 위한 방법은 문헌 [Depis, et al. (Arthritis Rheum. 2012 Oct; 64(10): 3189-98)]을 참조할 수 있다.

[0116] 실시예 5. 경피증에 대한 마우스 모델에의 효과

[0117] 경피증에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 병리학적 상태에의 시험 물질의 효과를 평가하였다.

[0118] (시험 물질의 제조)

[0119] 시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 0.5, 1, 및 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4℃에서 저장하였다.

[0120] (약물 투여)

[0121] 표 5에 따르면, 1일 1회 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 물질의 투여를 시험의 말기까지 계속하였다.

	군	용량	n
1	비처리군 (블레오마이신 투여하지 않음)	-	3
2	용매 대조군	-	10
3	시험 물질 (0.5) 투여군	5 mg/kg/일	10
4	시험 물질 (1) 투여군	10 mg/kg/일	10
5	시험 물질 (2) 투여군	20 mg/kg/일	10

[0122]

[0123]

(경피증 모델의 제조 및 병리학적 상태의 평가)

[0124]

약물-투여를 시작한 후 29일째부터, 경피증-유사 증상을 유도하기 위해 마우스에게 블레오마이신을 피하로 투여하였다. 경피증-유사 증상을 유도하기 위한 방법 및 그의 병리학적 상태를 평가하기 위한 방법은 문헌 [Park, et al. (Front Immunol. 2018 Jul 10; 9: 1611)]을 참조할 수 있다.

[0125]

실시예 6. 다발성 경화증에 대한 마우스 모델에의 효과

[0126]

다발성 경화증에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 병리학적 상태에 대한 시험 물질의 효과를 평가하였다.

[0127]

(시험 물질의 제조)

[0128]

시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 0.5, 1, 및 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4°C에서 저장하였다.

[0129]

(약물 투여)

[0130]

표 6에 따르면, 1일 1회 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 물질의 투여를 시험의 말기까지 계속하였다.

	군	용량	n
1	비처리군 (EAE-유도하지 않음)	-	3
2	용매 대조군	-	10
3	시험 물질 (0.5) 투여군	5 mg/kg/일	10
4	시험 물질 (1) 투여군	10 mg/kg/일	10
5	시험 물질 (2) 투여군	20 mg/kg/일	10

[0131]

[0132]

(다발성 경화증에 대한 마우스 모델의 제조 및 병리학적 상태의 평가)

[0133]

약물-투여를 시작한 후 29일째부터, 미엘린 단백질로부터 유도된 펩티드를 면역화하여 다발성 경화증에 대한 마우스 모델로서 기지의 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)을 유도하였다. EAE를 유도하기 위한 방법 또는 그의 병리학적 상태를 평가하기 위한 방법은 문헌 [Chiba, et al. (Int Immunopharmacol. 2011 Mar; 11(3): 366-72)]을 참조할 수 있다.

[0134]

실시예 7. 건선에 대한 마우스 모델에의 효과

[0135]

건선에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 병리학적 상태에 대한 시험 물질의 효과를 평가하였다.

[0136]

(시험 방법)

[0137]

(시험 물질의 제조)

[0138]

시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 0.5, 1, 및 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4°C에서 저장하였다.

[0139]

(약물 투여)

[0140]

표 7에 따르면, 1일 1회 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 물질의 투여를 시험의 말기까지 계속하였다.

	군	용량	n
1	비처리군 (이미퀴모드-도포하지 않음)	-	3
2	용매 대조군	-	10
3	시험 물질 (0.5) 투여군	5 mg/kg/일	10
4	시험 물질 (1) 투여군	10 mg/kg/일	10
5	시험 물질 (2) 투여군	20 mg/kg/일	10

[0141]

[0142] (건선에 대한 마우스 모델의 제조 및 병리학적 상태의 평가)

[0143] 약물-투여를 시작한 후 29일째부터, 이미퀴모드-함유 약물인 베젤나 크림 5 % (모치다 파마슈티칼 캠퍼니, 리미티드)를 건선-유사 증상을 유도하기 위해 마우스의 우측 외이 뒤쪽 및 우측 외이에 도포하였다. 건선-유사 증상을 유도하기 위한 방법 및 그의 병리학적 상태를 평가하기 위한 방법은 문헌 [van der Fits, et al. (J Immunol. 2009 May 1; 182(9): 5836-45)]을 참조한다.

[0144] 실시예 8. 건선에 대한 마우스 모델에의 효과

[0145] 건선에 대한 마우스 모델에게 시험 물질을 투여하고, 병리학적 상태 및 IL-17A-생산 세포에 대한 시험 물질의 효과를 평가하였다.

[0146] (시험 방법)

[0147] (시험 물질의 제조)

[0148] 시험 물질을 칭량하고, 이를 5 % 수성 아라비아 검에 현탁시켜 농도를 2 mg/mL로 조정하였다. 제조된 현탁액을 차광하여 4°C에서 저장하였다.

[0149] (약물 투여)

[0150] 표 8에 따르면, 1일 1회 마우스에게 시험 물질을 경구로 투여하였다. 물질의 투여를 시험의 말기까지 계속하였다.

	군	용량	n
1	비처리군 (이미퀴모드-도포하지 않음)	-	3
2	용매 대조군	-	10
3	시험 물질 투여군	20 mg/kg/일	10

[0151]

[0152] (이미퀴모드-유도된 건선에 대한 마우스 모델의 제조)

[0153] 약물-투여를 시작한 후 29일째부터, 이미퀴모드-함유 약물인 베젤나 크림 5 % (모치다 파마슈티칼 캠퍼니, 리미티드) (0.03 mL, 1.5 mg의 이미퀴모드 함유)를 1주 3회 이소플루란의 흡입 마취 하에 작은 브러시로 BALB/c 마우스의 우측 외이 안쪽에 도포하여 건선-유사 증상을 유도하였다.

[0154] (외이 두께의 측정)

[0155] 이미퀴모드-도포를 시작한 후, 외이의 두께를 1주 1회 캘리퍼로 측정하였다.

[0156] (해부 및 수집)

[0157] 이미퀴모드-도포를 시작한 후 44일째에, 마우스를 경부 척추 골절 탈구에 의해 안락사시키고, 그의 우측 외이를 수집하였다. 수집된 외이를 액체 질소로 빠르게 동결시키고, -80°C에서 동결기에 저장하였다.

[0158] (외이에서의 IL-17A 유전자 발현의 평가)

[0159] 동결된 외이를 아이소젠으로 분쇄하고, RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 역전사시켜 cDNA를 제조하였다. 수득된 cDNA를 주형으로서 사용하여, 18S rRNA 유전자 및 IL-17A 유전자의 발현을 실시간 PCR에 의해 분석하였다. 샘플을 각각 개별적으로 처리하고, 분석 결과를 배수 변화로 나타냈으며, 여기서 18S rRNA 유전자는 내인성 대조군이고, 비처리군의 평균은 표준 대조군이다.

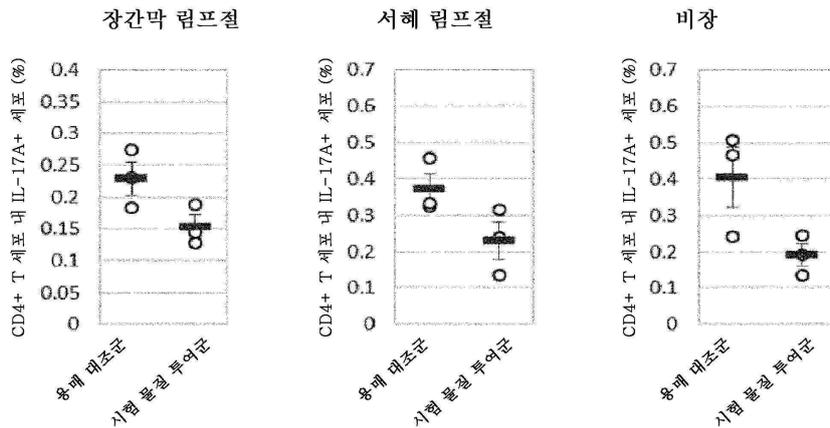
[0160] (결과)

[0161] 측정된 외이 두께의 결과는 도 4에 제시되고, 외이 내 IL-17A 유전자 발현의 평가 결과는 도 5에 제시된다.

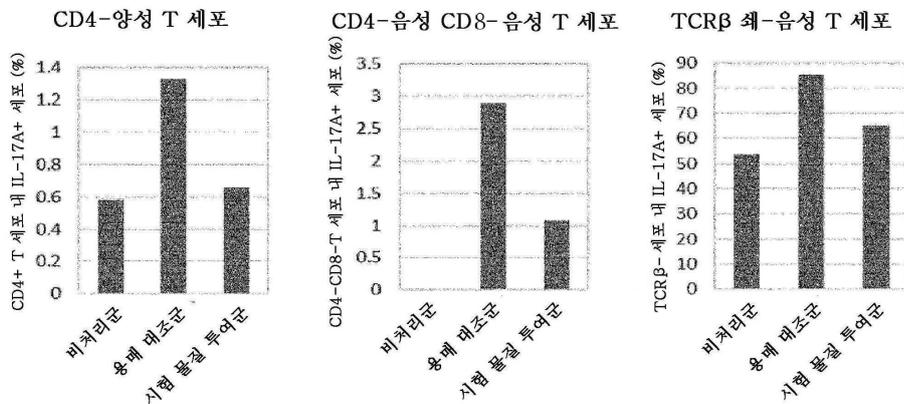
[0162] 이미퀴모드가 도포된 외이의 두께를 계속-측정한 결과는 외이의 과형성이 시험 물질 투여군에서 억제되었다는 것을 나타내었다. 외이에서의 IL-17A 유전자 발현의 평가 결과는 IL-17A 유전자 발현이 시험 물질 투여군에서 낮아졌다는 것을 나타내었다. 따라서, 이는 시험 물질이 IL-17A-생산 세포를 감소시키고, 건선에 대한 모델에서 외이의 과형성을 억제할 수 있다는 것을 나타내었다.

도면

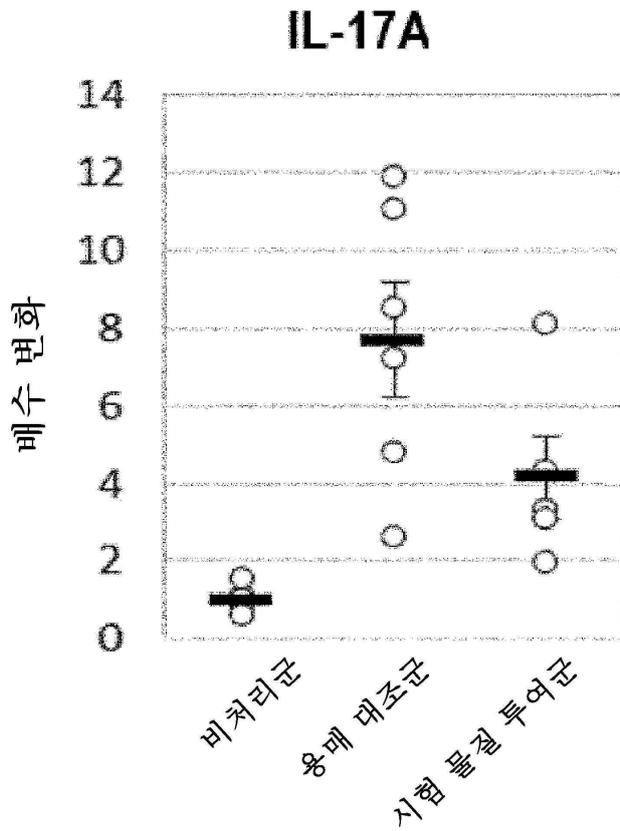
도면1



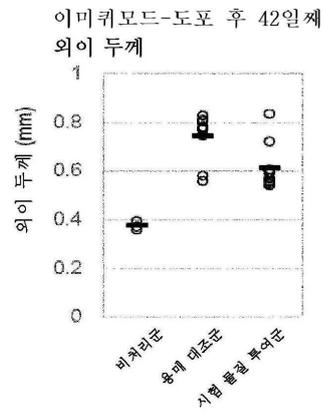
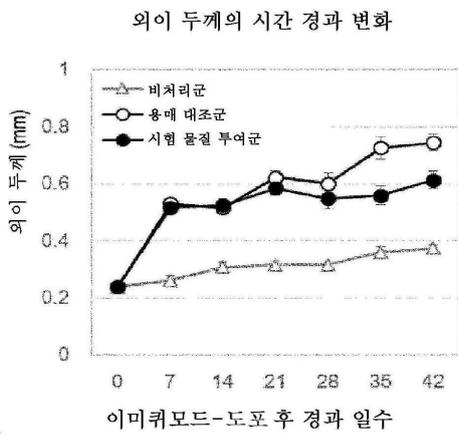
도면2



도면3



도면4



도면5

외이 내 IL-17A 유전자 발현

