

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0134775
(43) 공개일자 2020년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/569 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61K 8/63* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)*A61Q 19/00* (2006.01) *A61Q 90/00* (2009.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/569 (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0060748

(22) 출원일자 2019년05월23일

심사청구일자 2019년05월23일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이은직

서울시 서대문구 연세로 50-1, 연세의료원

윤진숙

서울시 서대문구 연세로 50-1, 연세의료원

김진주

서울시 서대문구 연세로 50-1, 연세의료원

(74) 대리인

이재영

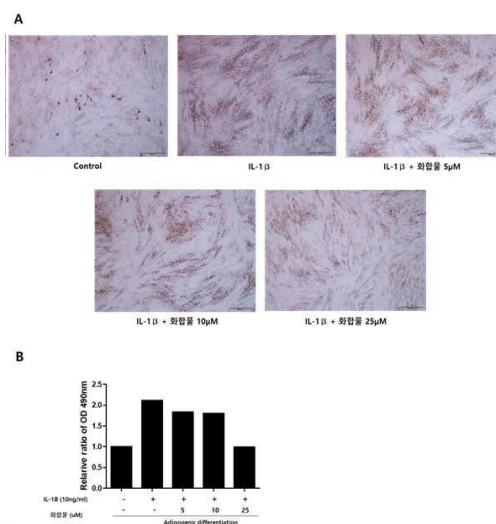
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 안와 섬유모세포의 분화 유도과 관련된 전사인자 단백질의 발현 수준을 억제할 뿐만 아니라, 염증성 사이토카인의 발현 수준을 현저하게 감소시킴으로써, 안와 섬유모세포의 분화를 매우 효과적으로 억제할 수 있다. 이를 통해 본 발명의 상기 조성물은 자가면역질환, 예를 들면 그레이브스 안병증의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 적용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 8/63 (2013.01)
A61P 37/02 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 90/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호 | 2017R1A2B4009565 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 이공분야기초연구사업 > 중견연구자지원사업 |
| 연구과제명 | 갑상선암병증 발생기전에 케모카인의 역할 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 |
| 연구기간 | 2017.03.01 ~ 2020.02.29 |

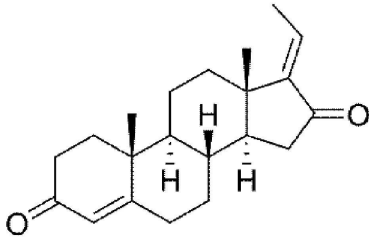
명세서

청구범위

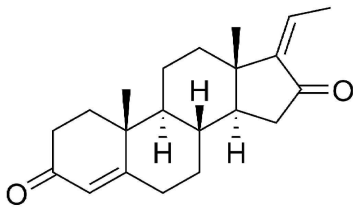
청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 자가면역질환은 그레이브스 안병증(Graves' ophthalmopathy)인 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 안와 섬유모세포(Orbital fibroblast)의 분화를 억제하는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

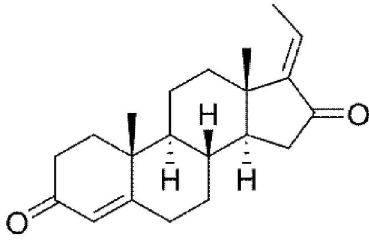
제 1항에 있어서,

상기 조성물은 C/EBP(CCAAT-enhancer-binding proteins) α , C/EBP β , PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors) γ 및 SREBP1(Sterol regulatory element-binding proteins 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 억제하는 것인, 약학 조성물.

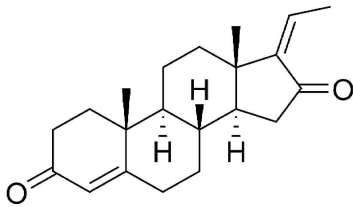
청구항 5

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 자가면역질환은 그레이브스 안병증인 것인, 식품 조성물.

청구항 7

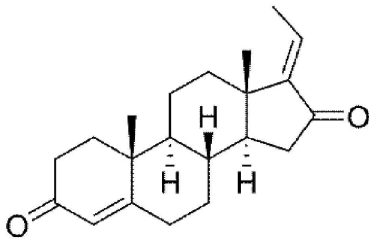
제 5항에 있어서,

상기 조성물은 안와 섬유모세포(orbital fibroblast)의 분화를 억제하는 것인, 식품 조성물.

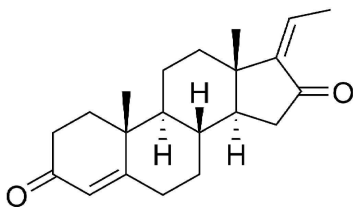
청구항 8

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 자가면역질환은 그레이브스 안병증인 것인, 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자기 항원에 대한 생체의 무반응(Immunologic unresponsiveness) 또는 관용(Tolerance)을 계속 유지하는데 문제가 발생하여, 자기 항원에 대한 면역 반응이 발생하게 되고, 이로 인해 자신의 조직을 공격하는 현상에 의해 다발성 경화증, 제1 형 당뇨병, 류마티스 관절염, 갑상선염 등과 같은 자가면역질환이 발생되게 된다. 그레이브스병(Graves' disease)은 갑상선에 영향을 미치는 자가면역질환의 하나로서, 그레이브스병 환자에서는 갑상선 기능이 활성화되어 갑상선호르몬이 과잉으로 형성되고 분비되게 된다. 이와 같은 병에 의해 갑상선종이 일어나 기도 하나, 약 50 % 환자에서는 눈에 증상이 발생된다.

[0003] 그레이브스 안병증(Graves' orbitopathy) 또는 갑상선 안병증(thyroid associated orbitopathy)은 그레이브스병에 의한 증상이 눈에 발생하는 질환으로서, 경미한 증상만 보이는 경우도 있으나, 일부에서는 심한 결막 부종, 눈꺼풀 후퇴, 안와근 비대와 그로 인한 복시, 사시, 안구 돌출이 발생할 수 있으며, 압박 시신경병증으로 인한 시력 저하가 발생될 수 있다.

[0004] 그레이브스 안병증의 병리기전에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지 않는 상태이다. 갑상선자극호르몬 수용체에 대한 자가 항체가 그레이브스 안병증에서도 주요 병인 중 하나로 알려져 있지만 10 %의 그레이브스 안병증 환자에서는 갑상선기능이 정상인 경우에도 병증이 진행된다는 보고가 있다. 현재까지 밝혀진 병리기전을 정리해보면 크게 염증 반응, 지방세포의 분화 등으로 나누어 볼 수 있다. 심한 활성기의 그레이브스 안병증 환자에서는 안와를 구성하는 뼈조직 내에 존재하는 골세포/지방조직이 증가한다. 이러한 조직의 확장부에는 면역세포인 T-림프구, B-림프구 및 비만세포의 뚜렷한 침윤뿐만 아니라, 친수성의 글루코사미노글리칸(Glucosaminoglycans) 등의 축적이 특징적으로 나타난다. 또한, 안와 내에는 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 지닌 전구세포들도 정상보다 높은 비율로 포함되어 있어, 이들의 분화를 촉진시킴으로써 지방세포의 부피가 증가하여 안구가 앞으로 밀려 돌출됨에 따라 미관상 및 시각기능상 문제를 유발하게 된다.

[0005] 심한 활성기의 그레이브스 안병증에 대한 치료방법으로 고용량의 글루코코티코이드(Glucocorticoids)가 지난 수십 년 동안 사용되어 왔으며, 항염증과 면역억제 효과가 있어 여전히 그레이브스 안병증의 첫 번째 치료방법으로 적용되고 있다. 그러나, 그레이브스 안병증 환자에서 현재까지 질병의 진행을 막거나, 완치시킬 수 있는 약물은 아직까지 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

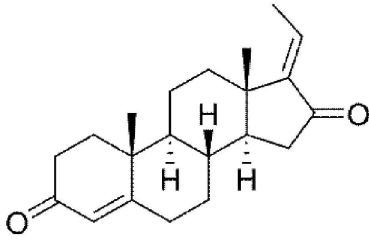
과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 구현 예에서는 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 상기 조성물은 약학 조성물, 식품 조성물 또는 화장품 조성물로 사용될 수 있다.

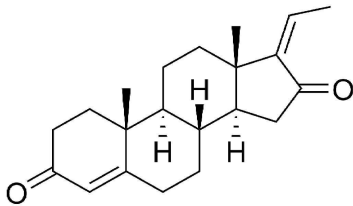
[0010] 본 발명의 상기 조성물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0015] [화학식 2]



[0016]

[0018] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물(이하, '화학식 1'이라 함)은 (8R,9S,10R,13S,14S,E)-17-에틸이덴-10,13-디메틸-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-디카히드로사이클로펜타 [a]펜타트렌-3,16-디온 ((8R,9S,10R,13S,14S,E)-17-Ethylidene-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16-dione)이고, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물(이하, '화학식 2'라 함)은 (8R,9S,10R,13S,14S,Z)-17-에틸이덴-10,13-디메틸-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-디카히드로사이클로펜타 [a]펜타트렌-3,16-디온((8R,9S,10R,13S,14S,Z)-17-Ethylidene-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16-dione)로 표시된다.

[0019] 본 발명의 상기 화학식 1 또는 화학식 2는 NFκB, ERK(extracellular-signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinases), AKT(protein kinase B) 및 p38과 관련된 세포신호전달을 억제하여, 안와 섬유모세포의 분화와 관련된 전사인자인 C/EBP(CCAAT-enhancer-binding proteins) α, C/EBP β, PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors) γ, SREBP1(Sterol regulatory element-binding proteins 1) 단백질의 발현 수준을 억제할 뿐만 아니라, 염증성 사이토카인의 발현 수준을 현저하게 감소시킴으로써, 안와 섬유모세포의 분화를 매우 효과적으로 억제할 수 있다. 또한, 상기 화학식 1 및 화학식 2는 안와 섬유모세포에서 염증성 사이토카인의 발현 수준이 현저하게 억제되도록 할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구체 예에서는 상기 화학식 1을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 자가면역질환이란, 개체가 자신의 조직에 대해 부적절한 면역 반응을 일으킬 때 나타날 수 있는 질환으로서, 예를 들면, 그레이브병 (Graves' disease), 그레이브스 안병증, 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성 경피증(progressive systemic sclerosis, scleroderma), 전신 홍반성 낭창(lupus), 아토피 피부염, 원형탈모증(alopecia areata), 건선(psoriasis), 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 궤양성 대장염, 베체트병 (Behcet's disease), 크론병, 규소 폐증, 석면 폐증, IgA 신장질환, 연쇄상구균감염후 사구체신염(PSGN), 쇼그렌 증후군(Sjogren Syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 피부근염(dermatomyositis), 다발성 근염(polymyositis), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 자가면역성 용혈성 빈혈 (autoimmune hemolytic anemia), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(myasthenia gravis), 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 섬유조직염(fibromyalgia syndrome) 및 측두 동맥염(temporal arteritis)등일 수 있고, 바람직하게는 그레이브스 안병증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 상기 그레이브스 안병증이란, 자가면역성 갑상선 질환에 의해 안와내 안와 섬유모세포에 염증 반응 또는 지방의 분화가 증가되어 안구가 돌출되는 증상이 발현되는 질환을 의미한다.

[0023] 본 발명의 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 자가면역질환에 의해 발생하는 증상을 차단하거나

나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.

- [0024] 본 발명의 상기 "개선"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 자가면역질환에 의해 발생하는 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 자가면역질환에 의해 발생한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 행위라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상기 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필 하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본 발명에서 상기 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2가 유효성분으로 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50 %의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레마우디오 시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제,

방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.

- [0037] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워겔, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제화장용, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누비의료용, 크림비누, 페이스 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 향산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 상기 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비 이온성 계면활성제가 사용 가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.
- [0042] 본 발명의 상기 화장료 조성물에서 기재된 성분 이외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 향산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.
- [0044] [서열목록]
- [0045] 서열번호 1: Forward primer sequence
- [0046] TTG GCA GCC TTC CTG ATT TC
- [0047] 서열번호 2: Reverse primer sequence
- [0048] AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG
- [0049] 서열번호 3: Forward primer sequence
- [0050] GTT CCA CCC GCA GTA CAG
- [0051] 서열번호 4: Reverse primer sequence
- [0052] GGA GCG GGA AGA ACT TGC
- [0053] 서열번호 5: Forward primer sequence
- [0054] TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG
- [0055] 서열번호 6: Reverse primer sequence
- [0056] GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC
- [0057] 서열번호 7: Forward primer sequence

[0058] GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC

[0059] 서열번호 8: Reverse primer sequence

[0060] GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA

발명의 효과

[0061] 본 발명의 조성물은 안와 섬유모세포의 분화 유도과 관련된 전사인자 단백질의 발현 수준을 억제함으로써, 안와 섬유모세포의 분화를 매우 효과적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 염증성 사이토카인의 발현 수준을 현저하게 억제할 수 있다. 이와 같은 효과를 통해 그레이브스 안병증의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 그레이브스 안병증 환자(A) 또는 정상인(B)으로부터 얻은 안와 섬유모세포에 본 발명에 따른 화합물의 독성 여부를 MTT((4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 어세이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2의 A 내지 D는 본 발명의 일 실시예에 따라 IL-1 β 에 의해 유도된 염증성 사이토카인(Cytokine)의 발현 수준에 본 발명에 따른 화합물이 미치는 영향을 실시간 중합효소연쇄반응(Real time PCR)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 염증성 사이토카인의 발현 수준의 억제 효과를 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 안와 섬유모세포의 분화 억제 효과를 오일-레드 O(Oil-red O) 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 분화와 관련된 전사인자 단백질의 발현 수준의 억제 효과를 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 분화와 관련된 전사인자 단백질의 발현 수준을 억제하는 세포신호 전달에 대해 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0065] 실시예

[0067] [준비예] 안와 섬유모세포(Orbital fibroblast)의 배양

[0068] 도 1에서와 같이 그레이브스 안병증(Graves' orbitopathy; GO) 환자 또는 그레이브스가 아닌 정상인(Non Graves' orbitopathy; nonGO)으로부터 채취된 지방 조직을 잘게 절단한 뒤, 제2 형 콜라게나제(Type 2 collagenase, 시그마 알드리치, 미국)를 넣고, 37 °C에서 60분 동안 배양하여 전구지방세포(Preadipocyte)를 수득하였다. 상기 전구지방세포를 HBSS(Hank's balanced salt solution, 시그마 알드리치, 미국)를 이용하여 2 ~ 3회 세척하고, 37 °C, 5 % CO₂의 조건에서 배양함으로써 그레이브스 안병증(Graves' orbitopathy; GO) 환자의 안와 섬유모세포(이하, 'GO 안와 섬유모세포'라고 함) 및 그레이브스가 아닌 정상인의 안와 섬유모세포(이하, 'nonGO 안와 섬유모세포'라고 함)를 최종적으로 얻었다. 이때, 배양액은 10 % 우태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS)와 항생제(100 U/ml의 페니실린 및 10 mg/ml의 스트렙토마이신)가 포함된 RPMI 배양 배지를 사용하였다.

[0070] [실시예 1] 세포 독성 여부 확인

- [0071] 본 발명의 상기 준비예의 nonGO 안와 섬유모세포 또는 GO 안와 섬유모세포에 (8R,9S,10R,13S,14S,E)-17-에틸이텐-10,13-디메틸-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-디카히드로사이클로펜타 [a]펜타트렌-3,16-디온 ((8R,9S,10R,13S,14S,E)-17-Ethylidene-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16-dione) (이하, '화합물'이라 함.)을 0, 5, 10, 25 또는 50 μ M의 농도로 처리하였다. 그런 다음, 24시간 또는 48시간 배양 후, MTT((4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 어세이를 통해 세포 독성을 확인하여, 그 결과를 도 1의 A 및 B에 나타내었다.
- [0072] 도 1의 A 및 B에서 보는 바와 같이, GO 또는 nonGO 안와 섬유모세포에 화합물을 처리하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군(CONTROL)과 비교하여 25 μ M의 농도까지 독성이 나타나지 않았다.
- [0073] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물은 비교적 고농도에서 nonGO 또는 GO 안와 섬유모세포에 독성을 유발하지 않는 것을 알 수 있다.

[0075] **[실시예 2] 염증성 사이토카인의 발현 수준에 미치는 영향 확인 (1)**

- [0076] 본 발명의 상기 준비예의 GO 또는 nonGO 안와 섬유모세포에 염증 반응을 유도하는 IL-1 β 를 처리하였다. 그런 다음, 상기 세포들에 0, 5, 10 또는 25 μ M 농도의 화합물을 처리하고, 24시간 동안 배양한 뒤, 트리졸(Trizole)을 이용하는 통상의 방법에 따라 상기 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA와 CYBER Green universal PCR master mix 및 프라이머(하기 표 1)를 혼합하고, ABI 7300 real-time PCR thermocycler(Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)를 사용하여 프라이머에 해당하는 각각의 유전자를 증폭하여, 그 결과를 도 2의 A 내지 D에 나타내었다. 여기서, MCP-1 유전자의 경우 상업적으로 판매되는 프라이머(Cat. no. Hs00234140_m1, Thermo Fisher, 미국)를 사용하였다.

표 1

| 유전자 이름 | 구분 | 서열 번호 | 프라이머 서열 |
|--------|----|--------|-----------------------------------|
| IL-6 | F | 서열번호 1 | 5'-TTG GCA GCC TTC CTG ATT TC-3' |
| | R | 서열번호 2 | 5'-AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG-3' |
| IL-8 | F | 서열번호 3 | 5'-GTT CCA CCC GCA GTA CAG- 3' |
| | R | 서열번호 4 | 5'-GGA GCG GGA AGA ACT TGC-3' |
| COX-2 | F | 서열번호 5 | 5'-TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG-3' |
| | R | 서열번호 6 | 5'-GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC-3' |
| GAPDH | F | 서열번호 7 | 5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3' |
| | R | 서열번호 8 | 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3' |

- [0080] 도 2의 A 내지 D에서 보는 바와 같이, IL-1 β 에 의해 염증 반응이 유도된 GO 안와섬유모세포(G01, G02, G03) 또는 nonGO 안와 섬유모세포(NL1, NL2, NL3)에 화합물이 처리되었을 때, 농도에 의존적으로 염증성 사이토카인에 해당하는 IL-6, IL-8, MCP-1 및 COX-2 mRNA의 발현 수준이 감소되었다.
- [0081] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 화합물은 그레이브스 안병증에서 염증 반응을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

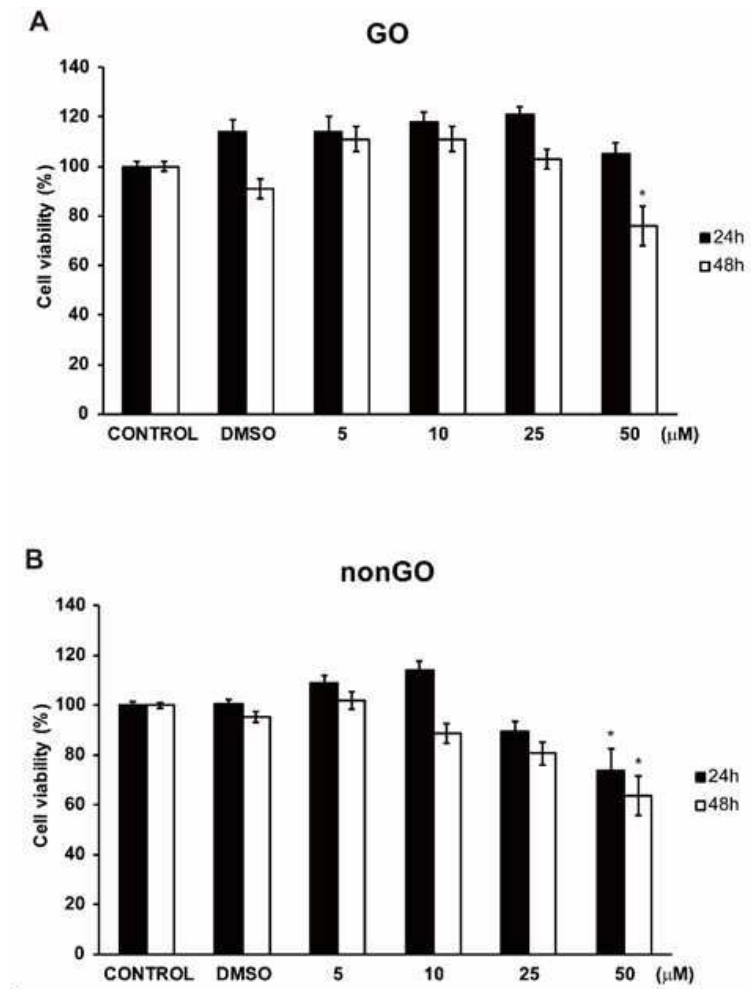
[0083] **[실시예 3] 사이토카인의 발현 수준에 미치는 영향 확인 (2)**

- [0084] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로, GO 또는 nonGO 안와 섬유모세포에 0, 5, 10 또는 25 μ M 농도의 화합물을 전처리 하고, 상기 세포들에 IL-1 β 를 처리하여 염증 반응을 유도한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양이 완료된 세포들로부터 추출된 단백질을 정량한 뒤에 동일한 양의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 넣고 전기영동하였다. 이후, 상기 겔에 존재하는 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 IL-6, IL-8, COX-2, MCP-1 및 β -액틴에 특이적인 항체와 반응시킨 뒤, 2차 항체와 반응시켜 시각화하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

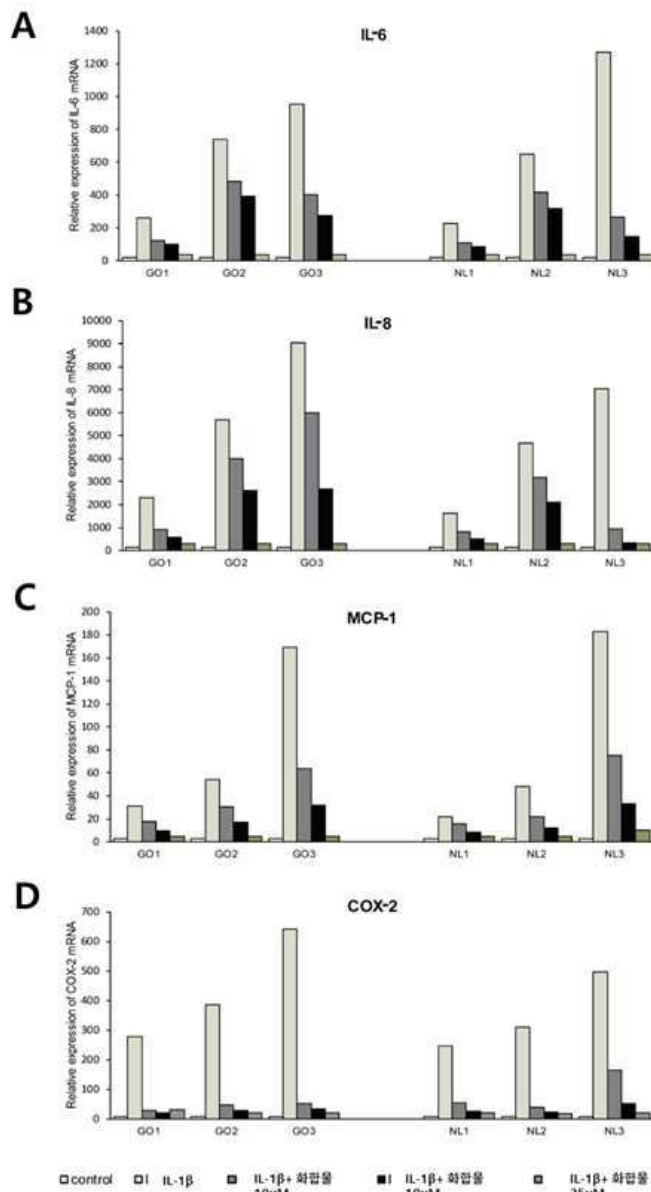
- [0085] 도 3에서 보는 바와 같이, IL-1 β 에 의해 염증 반응이 유도됨으로써 증가된 IL-6, IL-8, COX-2 및 MCP-1 단백질의 발현 수준이(도 3의 두번째 컬럼) 증가된 반면, GO 또는 nonGO 안와 섬유모세포에 화합물이 처리됨으로써 농도에 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다.
- [0087] **[실시예 4] 안와 섬유모세포의 분화 확인**
- [0088] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로, GO 또는 nonGO 안와 섬유모세포에 0, 5, 10 또는 25 μ M 농도의 화합물을 전처리하고, 상기 세포들에 IL-1 β 를 처리하여 염증 반응을 유도한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 세포를 3.7 % 포르말린으로 1시간 동안 상온에서 반응시켜 고정시켰다. 그 뒤, 상기 고정된 세포에 증류수를 사용하여 3:2의 비율로 희석된 0.5 %(w/v)의 오일 레드 O(Oil Red O) 시약을 넣고 반응시켰다. 반응이 완료된 세포에 100% 이소프로판올을 넣어 용해시키고 현미경을 이용하여 세포 형태를 확인하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 4의 A 및 B에 나타내었다.
- [0089] 도 4의 A 및 B에서 보는 바와 같이, IL-1 β 의 처리로 인해 증가된 안와 섬유모세포(도 4의 A의 IL-1 β , 및 도 4의 B의 두번째 컬럼)의 분화도가 화합물을 처리하였을 때, 농도에 의존적으로 감소되었다. 구체적으로, 25 μ M 농도의 화합물이 처리된 안와 섬유모세포의 분화도의 경우, IL-1 β 를 처리하지 않은 정도로 감소되었다(도 4의 A의 IL-1 β +화합물 25 μ M, 및 도 4의 B의 다섯번째 컬럼).
- [0090] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물은 안와 섬유모세포의 분화를 현저하게 억제할 수 있고, 나아가 이를 통해 그레이브스 안병증의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 적용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0092] **[실시예 5] 안와 섬유모세포에서 전사인자의 발현 수준 확인**
- [0093] 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 염증 반응 유도 및 화합물을 처리한 뒤, 안와 섬유모세포의 분화와 관련된 전사인자인 C/EBP(CCAAT-enhancer-binding proteins) α , C/EBP β , PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors) γ , SREBP1(Sterol regulatory element-binding proteins 1) 및 β -액틴 단백질에 특이적인 항체를 이용해 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0094] 도 5에서 보는 바와 같이, IL-1 β 를 처리하였을 때 증가된 전사인자 단백질의 발현 수준이 화합물의 처리 농도에 의존적으로 감소되었다.
- [0095] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물은 안와 섬유모세포의 분화와 관련된 전사인자 단백질의 발현 수준을 매우 효과적으로 감소시킴으로써 안와 섬유모세포의 분화가 억제되도록 할 수 있고, 이를 통해 궁극적으로 그레이브스 안병증의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 적용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0097] **[실시예 6] 세포 신호전달 경로 확인**
- [0098] 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 염증 반응 유도 및 화합물을 처리한 뒤, NF κ B, ERK(extracellular-signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinases), AKT(protein kinase B) 및 p38과 관련된 세포 신호전달경로 단백질 및 그의 인산화(Phospho) 단백질에 특이적인 항체를 이용해 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0099] 도 6에서 보는 바와 같이, IL-1 β 를 처리하였을 때 증가된 인산화-ERK, 인산화-JNK 단백질의 발현 수준이 화합물의 처리 농도에 의존적으로 감소되었다.
- [0100] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물이 안와 섬유모세포에서 분화와 관련된 전사인자 단백질의 발현 수준을 억제하는 것은 NF κ B, ERK, JNK, AKT 및 p38과 관련된 세포신호전달을 통해 유도되는 것임을 알 수 있다.
- [0102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

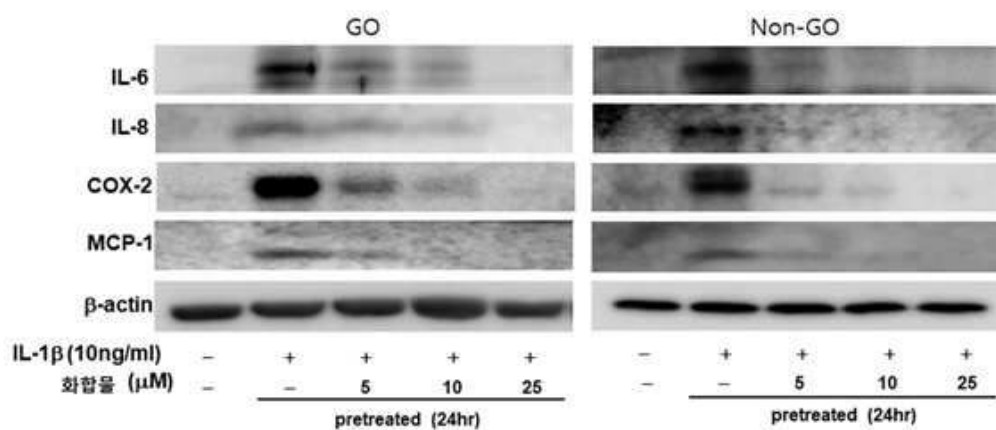
도면1



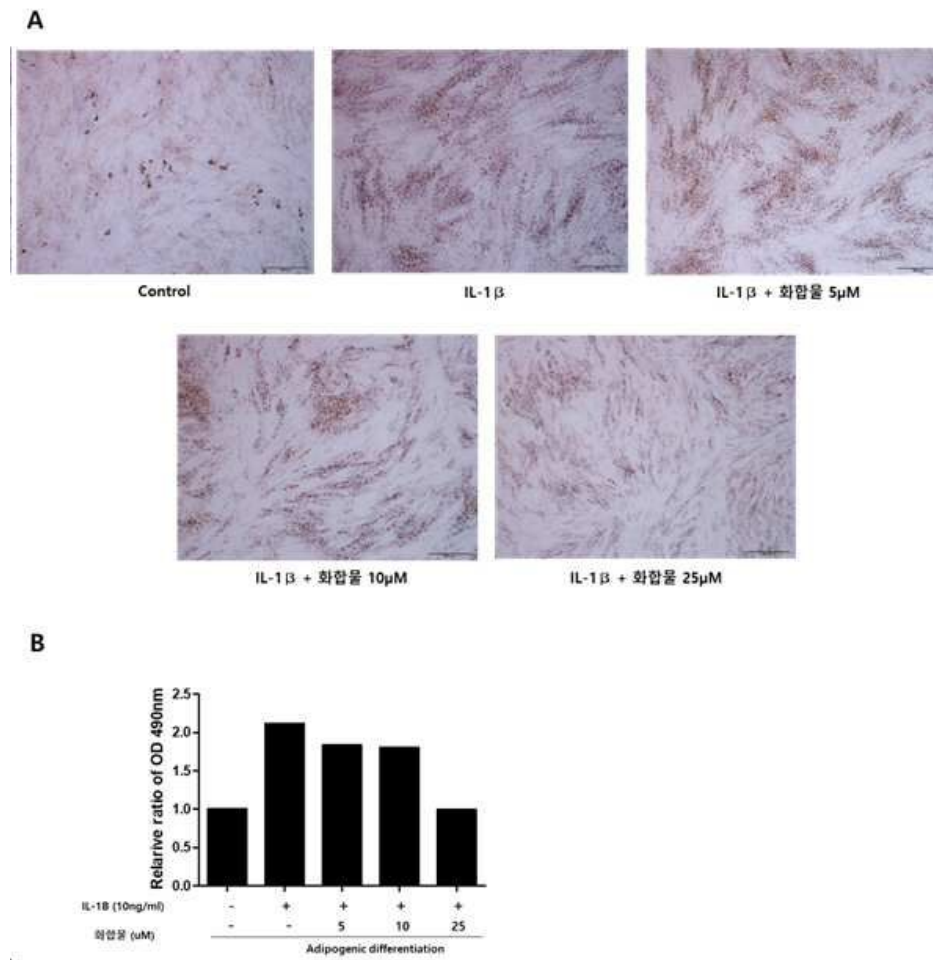
도면2



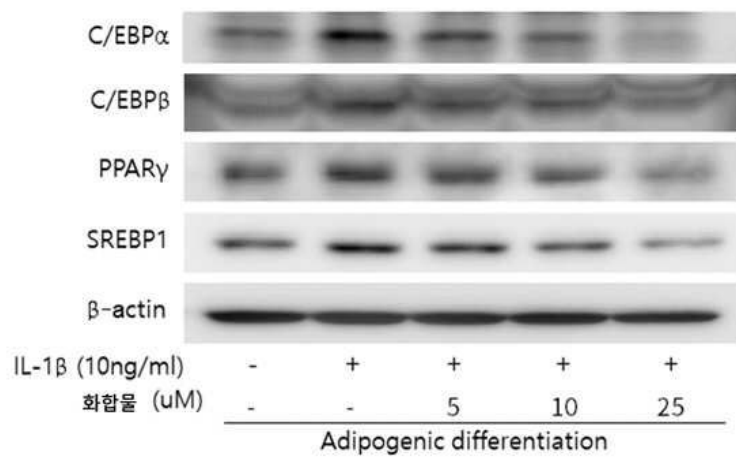
도면3



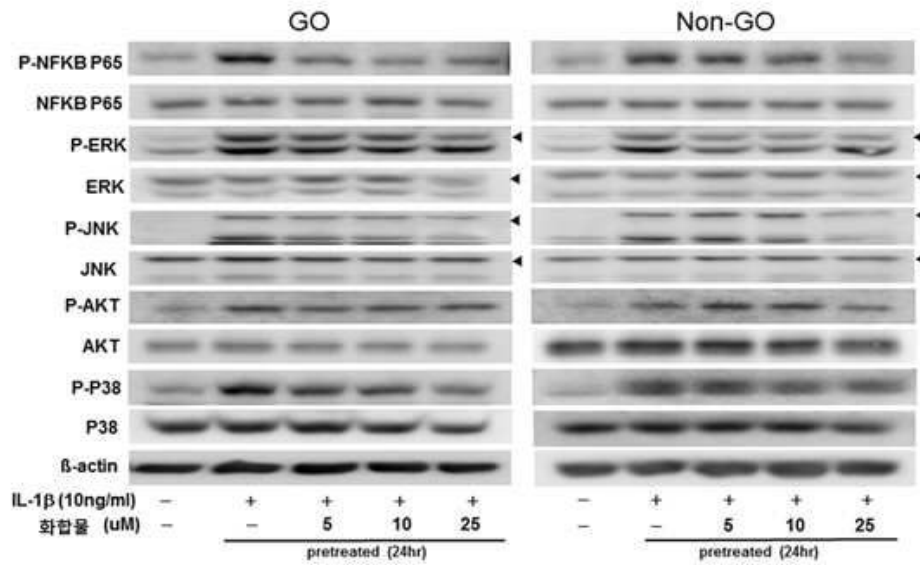
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A composition for preventing, improving or treating of autoimmune diseases

<130> PDPB192180

<160> 8

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer sequence

<400> 1

ttggcagcct tcctgatttc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Reverse primer sequence

<400> 2

aacttctcca caaccctctg

20

| | | |
|------------|-------------------------|----|
| <210> | 3 | |
| <211> | 18 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | Forward primer sequence | |
| <400> | 3 | |
| | gttccacccg cagtacag | 18 |
| <210> | 4 | |
| <211> | 18 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | Reverse primer sequence | |
| <400> | 4 | |
| | ggagcgggaa gaacttgc | 18 |
| <210> | 5 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | Forward primer sequence | |
| <400> | 5 | |
| | tcaatgagga gacttgctg | 20 |
| <210> | 6 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | Reverse primer sequence | |
| <400> | 6 | |
| | gatgagttgt catgtcctgc | 20 |
| <210> | 7 | |
| <211> | 21 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | Forward primer sequence | |

| | | |
|-------------------------|-------------------------|----|
| <400> | 7 | |
| gccaaggtca tccatgacaa c | | 21 |
| <210> | 8 | |
| <211> | 21 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | Reverse primer sequence | |
| <400> | 8 | |
| gtccaccacc ctgttgctgt a | | 21 |