



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0011515  
(43) 공개일자 2020년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/40 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)  
A61K 31/436 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 31/40 (2013.01)  
A61K 31/155 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0007990(분할)  
(22) 출원일자 2020년01월21일  
심사청구일자 2020년01월21일  
(62) 원출원 특허 10-2018-0008414  
원출원일자 2018년01월23일  
심사청구일자 2018년01월23일  
(30) 우선권주장  
1020170011143 2017년01월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
이뮤노메트테라퓨틱스 인코포레이티드  
미국, 텍사스 77021, 휴스턴, 2450 홀콤  
블러바드, 제이엘에이비에스 옛 텍사스 메디컬 센터  
(72) 발명자  
송정식  
서울특별시 서대문구 연세로 50-1 (신촌동)  
김범석  
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 의과대학 신장  
내과 (신촌동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
리엔목특허법인

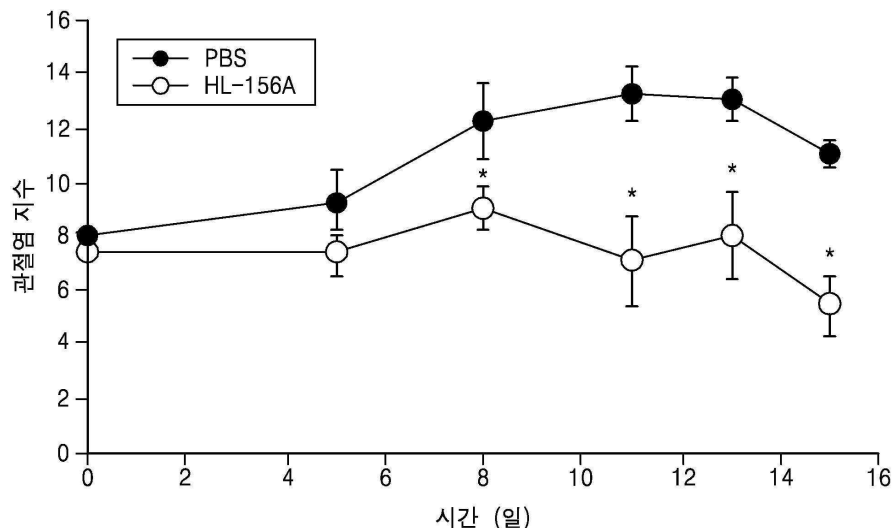
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

일 양상에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 염증성 질환, 자가면역 질환, 이식거부 반응, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법을 제공한다. 이에 따르면, 염증성 질환, 자가면역 질환, 이식거부 반응, 또는 이들의 조합을 유효하게 예방 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

**A61K 31/436** (2013.01)

**손지민**

서울특별시 서대문구 연희로 10길 58-3

(72) 발명자

**하상준**

서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 118동 2205호 (남가좌동, DMC파크뷰자이)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1754

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발 -질병중심중개연구(기반연구)

연구과제명 신약재창출기법에 의한 루푸스신염 바이오에너지텍스조절 후보물질 평가플랫폼 구축

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 의과대학 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A10056084

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업(전략)

연구과제명 암 미세환경 내 조절T세포 특이적 표면분자의 기능적 발굴 및 항암면역치료로의 활용

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

## 명세서

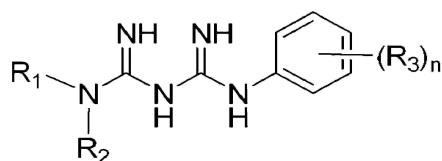
### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물로서,

상기 질환은 자가면역 질환, 이식거부 반응, 패혈증, 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD), 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 세균 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글란딘 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 호지킨병, 및 습진으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 이들과 연결된 질소와 함께 3 내지 8원의 헤테로시클릭 고리이고, 상기 헤테로시클릭 고리는 할로젠, 히드록시, 및 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되거나 비치환되고,

n은 0 내지 5 범위의 정수이고,

R<sub>3</sub>이 하나 이상일 경우, R<sub>3</sub>은 각각 독립적으로 수소, 염소 원자, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알콕시, 할로젠으로 치환된 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬, 및 할로젠으로 치환된 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된다.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 헤테로시클릭 고리는 4원 내지 7원의 질소 함유 헤테로시클릭 고리인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 헤테로시클릭 고리는 5원의 질소 함유 헤테로시클릭 고리인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 헤테로시클릭 고리는 피롤리딘, 아제티딘, 피페리딘, 모르포린, 피페라진, 아제파닐, 및 아지리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 n은 0 내지 3 범위의 정수인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은

N1-피페리딘-N5-페닐 비구아니드;

N1-피페리딘-N5-(3-메톡시)페닐 비구아니드;

N1-피롤리딘-N5-(4-클로로)페닐 비구아니드;

N1-피페리딘-N5-(4-클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(3-클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3-클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-아제판-N5-(3-클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드;  
 N1-아제티딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3-디플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-아제티딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-모르포린-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-(4-메틸)피페라진-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3,5-디메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(4-클로로-3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(4-클로로-3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-아제티딘-N5-(3-클로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(3-클로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3-클로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3,5-디클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(2,4-디클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-피롤리딘-N5-(3,4-디클로로)페닐 비구아니드;  
 N1-피페리딘-N5-(3,4-디클로로)페닐 비구아니드; 또는  
 N1-피페리딘-N5-(3-클로로-5-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은

N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드, N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드, N1-피롤리딘-N5-(3,4-디클로로)페닐 비구아니드, 또는 N1-피페리딘-N5-(3,5-디메톡시)페닐 비구아니드인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 염은 아세트산염 또는 염산염인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 자가면역 질환은 혈구탐식성 림프조직구증(Hemophagocytic lymphohistiocytosis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus), 기쿠치(Kikuchi) 병, 성인 스틸 병(Adult onset Still's disease), 베체트 병(Behcet disease), IgG4-연관성 질환, 제1형 당뇨병, 전신성 경화증(systemic sclerosis), 건선, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 및 그레이브스 갑상선 항진증(Graves hyperthyroidism)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 기억 T 세포의 분화 또는 증식을 억제하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 기억 T 세포는 중심 기억 T 세포(central memory T 세포:  $T_{CM}$ ) 또는 효과 기억 T 세포(effector memory T 세포:  $T_{EM}$ )인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 효과 T 세포(effector T 세포:  $T_{EFF}$ )의 분화 또는 증식을 촉진하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 면역억제제를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 면역억제제는 라파마이신(rapamycin)인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 약학적 조성물은 단일 또는 개별적인 조성물인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 16

청구항 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 인간을 제외한 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 예방 또는 치료하는 방법으로서,

상기 질환은 자가면역 질환, 이식거부 반응, 패혈증, 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD), 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 세균 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글란딘 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 호지킨병, 및 습진으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 인간을 제외한 포유동물은 상기 질환을 앓거나 앓을 위험이 있는 것인 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

페닐 비구아니드 유도체 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

T 림프구는 백혈구 중 하나로서, 백혈구 중 약 30%를 차지한다. T 림프구는 미접촉(naive) T 림프구, 보조(helper) T 림프구, 세포독성(cytotoxic) T 림프구, 및 기억(memory) T 림프구 등의 하위 그룹으로 나뉠 수 있

다. 그 중 기억 T 림프구는 항원을 인식한 T 림프구가 장기간 살아있다가 후에 동일한 항원이 다시 침입하였을 때 빠르게 활성화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 기억 T 림프구에 의한 2차 면역 반응은 면역 기능에 중요한 역할을 수행하지만, 기억 T 림프구에 의해 과도한 면역 반응 또는 자가면역 질환과 같은 질병이 야기될 수 있다.

[0003] 염증성 질환은 염증을 주요 병변으로 하는 질환으로서, 통증, 발열, 부종 등 다양한 증상을 동반한다. 또한, 자가면역 질환은 면역세포가 자기 몸의 장기나 조직을 공격하여 발생하는 질환으로서, 면역 불균형 또는 자기 항원에 대한 내성 상실로 야기된다. 염증성 질환 및 자가면역 질환과 같은 질환을 치료하기 위해 과도한 면역 반응을 억제할 필요가 있다.

[0004] 비구아니드(biguanide) 유도체 화합물로서, N1-고리아민-N5-치환된 페닐 비구아니드 유도체 화합물이 항암, 혈당 강하, 및 지질 저하 효과가 있다고 알려져 있다(한국 공개 특허 10-2013-0019351). 그러나, 면역 반응에 대한 N1-고리아민-N5-치환된 페닐 비구아니드 유도체 화합물의 효과는 알려진 바가 없다.

[0005] 따라서, 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하기 위해, 면역 반응과 관련된 N1-고리아민-N5-치환된 페닐 비구아니드 유도체 화합물의 기능을 탐색할 필요가 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

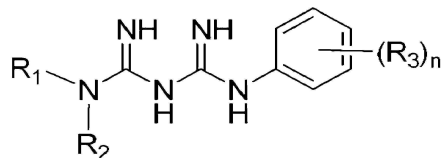
[0006] 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 하기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 이들과 연결된 질소와 함께 3 내지 8원의 헤테로시클릭 고리이고,

[0012] n은 0 내지 5 범위의 정수이고,

[0013] R<sub>3</sub>이 하나 이상일 경우, R<sub>3</sub>은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알콕시, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬티오, 아미노, 아마이드, 술폰아미드, 니트로, 헤테로아릴, 시아노, 술폰산, 및 술포모일로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0014] R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, 및 R<sub>3</sub>은 각각 독립적으로 할로젠, 히드록시, 및 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0015] 용어 "할로젠" 원자는 주기율표의 7족에 속하는 원자를 말한다. 할로젠 원자는 불소, 염소, 브롬, 및 요오드 등을 포함한다.

[0016] 용어 "알킬"은 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 (또는, 직쇄 또는 선형) 탄화수소를 말한다. 상기 알킬은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>5</sub>, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>, 또는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub>인 알킬기일 수 있다. 알킬의 비제한적인 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펀틸, iso-아밀, 또는 n-헥실 등을 들 수 있다.

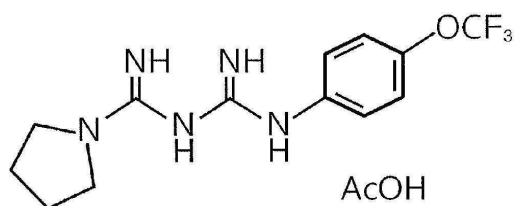
- [0017] 상기 용어 "알콕시"는 산소 원자에 결합된 알킬을 말한다. 상기 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>의 알콕시기는 예를 들면, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>5</sub>, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>, 또는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub>인 알콕시기일 수 있다.
- [0018] 상기 용어 "알킬티오"는 황 원자에 결합된 알킬을 말한다. 상기 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>의 알킬티오기는 예를 들면, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>5</sub>, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>, 또는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub>인 알킬티오기일 수 있다.
- [0019] 상기 용어 "헤테로아릴"은 N, O, P 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 비시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 의미한다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어 1 내지 5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 5 내지 10원의 고리 멤버(ring member)를 포함할 수 있다. 상기 S 또는 N은 산화되어 여러 산화 상태를 가질 수 있다. "헤테로아릴"의 비제한적인 예로는, 티에닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴, 1,2,3-티아디아졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 이소티아졸-3-일, 이소티아졸-4-일, 이소티아졸-5-일, 옥사졸-2-일, 옥사졸-4-일, 옥사졸-5-일, 이소옥사졸-3-일, 이소옥사졸-4-일, 이소옥사졸-5-일, 1,2,4-트리아졸-3-일, 1,2,4-트리아졸-5-일, 1,2,3-트리아졸-4-일, 1,2,3-트리아졸-5-일, 테트라졸릴, 피리드-2-일, 피리드-3-일, 2-피라진-2일, 피라진-4-일, 피라진-5-일, 2-피리미딘-2-일, 4-피리미딘-2-일, 또는 5-피리미딘-2-일 등을 들 수 있다.
- [0020] 상기 용어 "헤테로시클릭고리" 기는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하는 고리식 탄화수소를 말한다. 헤테로시클릭고리는 예를 들어 1 내지 5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 3원, 4원, 5원, 6원, 7원, 또는 8원의 고리 멤버를 포함할 수 있다. 상기 헤테로원자는 황, 질소, 산소 및 붕소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0021] 상기 "치환"은 유기 화합물 중의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자단으로 치환하여 유도체를 형성한 경우 수소 원자 대신에 도입되는 것을 말하고, "치환기"는 도입된 원자단을 말한다.
- [0022] 상기 R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>는 이들과 연결된 질소와 함께 3 내지 8원의 헤테로시클릭 고리일 수 있다. 상기 헤테로시클릭 고리는 4원 내지 7원의 질소 함유 헤테로시클릭 고리일 수 있다. 상기 헤테로시클릭 고리는 5원의 질소 함유 헤테로시클릭 고리일 수 있다. 상기 질소는 1개 내지 3개의 질소 원자일 수 있다. 상기 헤테로시클릭 고리는 예를 들어, 피롤리딘, 아제티딘, 피페리딘, 모르포린, 피페라진, 아제파닐, 및 아지리딘이다.
- [0023] 상기 n은 0 내지 5 범위의 정수일 수 있다. 상기 n은 0 내지 3 범위의 정수일 수 있다. 상기 n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다.
- [0024] 상기 R<sub>3</sub>이 하나 이상일 경우, R<sub>3</sub>은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알콕시, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬티오, 아미노, 아마이드, 술폰아마이드, 니트로, 헤테로아릴, 시아노, 술폰산, 및 술포모일로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 R<sub>3</sub>이 하나 이상일 경우, R<sub>3</sub>은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알콕시, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0025] 상기 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, 및 R<sub>3</sub>은 각각 독립적으로 할로젠, 히드록시, 및 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되거나 비치환될 수 있다. 상기 R<sub>3</sub>은 할로젠, 히드록시, 및 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>6</sub> 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다. 상기 R<sub>3</sub>은 1개, 2개, 또는 3개의 할로젠으로 치환될 수 있다. 상기 R<sub>3</sub>은 예를 들어 트리플루오로메틸기 또는 트리플루오로메톡시기이다.
- [0026] 상기 화학식 1의 화합물은 N1-피페리딘-N5-(3-브로모)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-메틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-에틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-히드록시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-히드록시메틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-플로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(2-플로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-플로로)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(4-클로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-클로로)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-클로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-클로로)페닐 비구아니드; N1-아제판-N5-(3-클로로)페닐 비구아니드; N1-모르포린-N5-(3-브로모)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-아제티딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-

피페리딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-디플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-아제티딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-모르포르린-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-(4-메틸)피페라진-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-아미노)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-디메틸아미노)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-아세트아미드)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-아세트아미드)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-(1H-테트라졸-5-일))페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-메틸술폰아미드)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-술폰산)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-메틸티오)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-술파모일)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3,5-디메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-플로로-3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-클로로-3-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-플로로-4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-플로로-4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-플로로-3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(4-클로로-3-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-아제티딘-N5-(3-플로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-플로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-플로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-아제티딘-N5-(3-클로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-클로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-클로로-4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(2,4-디플로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3,4-디플로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3,5-디플로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3,5-디클로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(2,4-디클로로)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3,4-디클로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3,4-디클로로)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-클로로-5-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피롤리딘-N5-(3-브로모-5-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3-브로모-5-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드; N1-피페리딘-N5-(3,4,5-트리플로로)페닐 비구아니드; 또는 N1-피페리딘-N5-(2,4,6-트리플로로)페닐 비구아니드일 수 있다.

[0027] 상기 화학식 1의 화합물은 N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메톡시)페닐 비구아니드, N1-피롤리딘-N5-(4-트리플로로메틸)페닐 비구아니드, N1-피페리딘-N5-(4-플로로)페닐 비구아니드, N1-피페리딘-N5-(4-(1H-테트라졸-5-일))페닐 비구아니드, N1-피롤리딘-N5-(3,4-디클로로)페닐 비구아니드, 또는 N1-피페리딘-N5-(3,5-디메톡시)페닐 비구아니드일 수 있다.

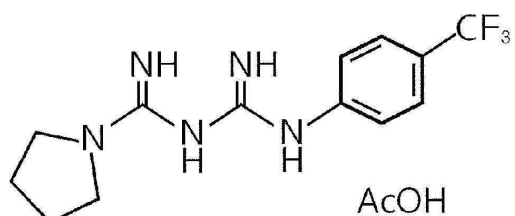
[0028] 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2 내지 7 중 어느 하나의 화합물일 수 있다.

[0029] [화학식 2]



[0030] ("HL-156A" 또는 "HL156A").

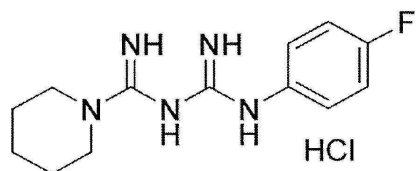
[0031] [화학식 3]



[0032] ("HL-156B" 또는 "HL156B").

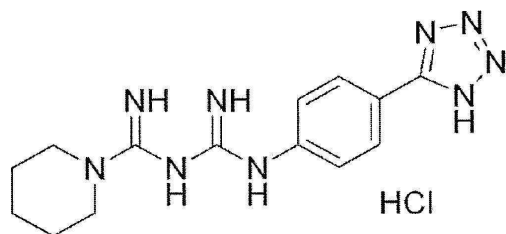
[0033] [화학식 4]





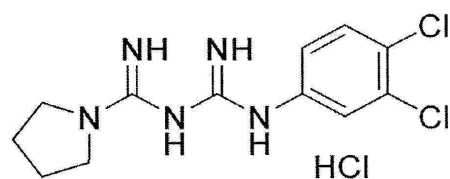
[0034] ("HL-156C" 또는 "HL156C").

[0035] [화학식 5]



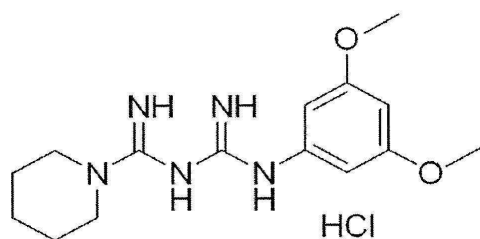
[0036] ("HL-156D" 또는 "HL156D").

[0037] [화학식 6]



[0038] ("HL-156E" 또는 "HL156E").

[0039] [화학식 7]



[0040] ("HL-156F" 또는 "HL156F").

[0041] 상기 용어 "입체이성질체(stereoisomer)"는 분자식 및 구성원자의 연결 방법도 같으나 원자 사이의 공간적 배치가 다른 것을 말한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체(diastereomer) 또는 거울상 이성질체(enantiomer)일 수 있다. 거울상이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체(optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R(Rectus: 시계방향) 및 S(sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스(cis)-트랜스(trans) 이성질체로 나뉠 수 있다.

[0042] 상기 용어 "유도체(derivative)"는 상기 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 말한다.

[0043] 용어 "용매화물(solvate)"는 유기 또는 무기 용매에 용매화된 화합물을 말한다. 상기 용매화물은 예를 들어, 수화물이다.

[0044] 상기 "약학적으로 허용가능한 염"의 용어 "염"은 화합물의 무기산염, 유기산염, 또는 금속염의 부가염을 말한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 초산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젯산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캄실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈락투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산, 또는 아스파르트산염일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염일 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 예를 들어, 아세트산염 또는 염산염이다.

[0045] 상기 "염증성 질환"의 용어 "염증(inflammation)"은 생체 조직의 유해한 자극원, 예를 들어 병원성 미생물, 손

상된 세포, 자극물질 등에 대한 생체 반응 중 하나이다. 염증은 미생물에 의한 감염 또는 상처, 수술, 화상, 동상, 전기자극, 화학물질 등 다양한 원인에 의하여 발생할 수 있다. 상기 염증성 질환은 염증을 주요 병변으로 수반하는 질환을 말한다. 상기 염증성 질환은 예를 들어, 폐혈증, 위염, 장염, 신장염, 간염, 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD), 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 세균 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글란딘 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 및 습진으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0046] 용어 "자가면역 질환(autoimmune disease)"은 면역기능에 이상이 발생하여, 몸 안의 면역세포들이 신체의 장기나 조직을 공격하여 발생하는 질환을 말한다. 상기 자가면역 질환은 장기 특이적 자가항체와 관련된 질환과 장기 비특이적(전신적) 질환으로 구별될 수 있다. 상기 자가면역 질환은 혈구탐식성 림프조직구증(Hemophagocytic lymphohistiocytosis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus), 기쿠치(Kikuchi) 병, 혈관염(vasculitis), 성인 스틸 병(Adult onset Still's disease), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 염증성 근육염(Inflammatory Myositis), 베체트 병(Behcet disease), IgG4-연관성 질환, 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 거대세포 동맥염(Giant cell arteritis), 측두 동맥염(Temporal arteritis), 제1형 당뇨병, 아토피 피부염, 크론병(Crohn's disease), 전신성 경화증(systemic sclerosis), 건선, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 및 그레이브스 갑상선 항진증(Graves hyperthyroidism)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0047] 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 기억 T 세포의 분화 또는 증식을 억제할 수 있다. 상기 기억 T 세포는 중심 기억 T 세포(central memory T 세포: T<sub>CM</sub>), 또는 효과 기억 T 세포(effector memory T 세포: T<sub>EM</sub>)일 수 있다. 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 효과 T 세포(effector T 세포: T<sub>EFF</sub>)의 분화 또는 증식을 촉진할 수 있다. 상기 T<sub>CM</sub>은 CD127 단백질을 발현할 수 있다. 상기 T<sub>EM</sub>은 CD127 단백질을 발현하나, CD62L 단백질을 발현하지 않을 수 있다. 상기 T<sub>EFF</sub>는 CD127 단백질 및 CD62L 단백질 둘다 발현하지 않을 수 있다.

[0048] 상기 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합의 발생을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0049] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 희석제 또는 보조제를 포함하는 의미로 사용된다. 상기 담체는 예를 들면, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 풍미제, 유효제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0050] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 임의의 제형으로 준비될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들면, 경구 투여 제형(예를 들면, 분말, 정제, 캡슐, 시럽, 알약, 또는 과립), 또는 비경구 제형(예를 들면, 주사제)으로 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전신 제형, 또는 국부 제형으로 제조될 수 있다.

[0051] 상기 약학적 조성물은 면역억제제를 더 포함할 수 있다. 용어 "면역억제제(immunosuppressive drug)"는 면역 기능을 억제하는 물질을 말한다. 상기 면역억제제는 글루코코르티코이드, 세포증식억제제, 항체 또는 항원-결합 단편, 이뮤노필린(immunophilin)에 작용하는 약물 등일 수 있다. 상기 세포증식억제제는 알킬화제, 대사길항물질(antimetabolite)(예, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 머캅토프린, 및 플루오로우라실) 등이다. 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 예를 들어, T-세포 수용체, 또는 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편이다. 이뮤노필린에 작용하는 약물은 예를 들어 시클로스포린(ciclosporin), 타크롤리무스(tacrolimus), 라파마이신(rapamycin), 및 에베롤리무스(everolimus)이다. 상기 면역억제제는 인터페론, 오피오이드(opioid), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor: TNF) 결합 단백질, 마이코페놀레이트(mycophenolate) 등을 포함한다. 상기 면역억제제는 예를 들어 라파마이신(rapamycin)이다. 상기 약학적 조성물은 단일 또는 개별적인 조성물일 수 있다.

- [0052] 상기 약학적 조성물은 일 양상에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 유효한 양으로 포함할 수 있다. 용어 "유효한 양"은 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 예방 또는 치료의 효과를 나타내기 위해 충분한 양을 말한다. 상기 유효한 양은 당업자가 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 사용된 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 상기 약학적 조성물 당 약 0.5  $\mu\text{g}$  내지 약 2 g, 약 1  $\mu\text{g}$  내지 약 1 g, 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 500 mg, 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 100 mg, 또는 약 1 mg 내지 약 50 mg일 수 있다.
- [0053] 상기 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.
- [0054] 다른 양상은 일 양상에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0055] 상기 방법은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0056] 상기 화학식 1의 화합물, 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 약학적으로 허용가능한 염, 염증성 질환, 자가면역 질환, 예방, 및 치료는 전술한 바와 같다.
- [0057] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 앓거나 앓을 위험이 있는 것일 수 있다.
- [0058] 상기 방법은 상기 개체에게 면역억제제를 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 면역억제제는 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염과 동시, 개별, 또는 순차로 투여될 수 있다.
- [0059] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.
- [0060] 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0061] 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0062] 일 양상에 따른 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법에 따르면, 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 이들의 조합을 유효하게 예방 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1a 및 도 1b는 각각, HL-156A, 라파마이신, 메트포르민, 또는 이들의 조합에 대한 CD4 T 세포의 증식률(%) 및 CD8 T 세포의 증식률(%)을 나타내는 그래프이다(오차 막대: 95% 신뢰구간, Rapa: 라파마이신).
- 도 2a는 HL-156A, HL-156B, HL-156C, HL-156D, HL-156E, 및 HL-156F의 투여에 따른 THP-1 세포에서 생성된 TNF- $\alpha$ 의 양(pg/ml)을 나타내는 그래프이고, 도 2b는 HL-156A 또는 HL-156B 투여시 MH7A 세포에서 생성된 TNF-

$\alpha$ 의 양( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 나타내는 그래프이다.

도 3은 마우스에 HL-156A, 또는 HL-156A과 라파마이신의 조합을 투여한 과정을 나타낸 모식도이다.

도 4a는 유세포 분석 결과를 나타내는 그래프이고, 도 4b는 바이러스 감염 후 시간에 따른 PBMC 중 CD127+CD62L+  $T_{CM}$  세포, CD127+CD62L-  $T_{EM}$  세포, 및 CD127-CD62L-  $T_{EFF}$  세포의 비율(%)을 나타내는 그래프이고, 도 4c는 비장 T 세포 중 CD127+CD62L+  $T_{CM}$  세포, CD127+CD62L-  $T_{EM}$  세포, 및 CD127-CD62L-  $T_{EFF}$  세포의 비율(%)을 나타내는 그래프이다.

도 5는 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 HL-156A의 투여시 시간에 따른 관절염 지수 변화를 나타내는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0064] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] **실시예 1. HL-156 화합물의 염증 및 자가면역 질환 치료 효과의 확인**
- [0066] **1. 시험관 내에서 T 세포 활성화에 대한 HL-156 화합물의 효과**
- [0067] 정상 C57BL/6 마우스(오리엔트 바이오)로부터 비장을 적출하고, 적출된 비장 조직에 2%(v/v) 우태아혈청(FBS)이 포함된 RPMI 용액을 가한 혼합물을 40  $\mu\text{m}$  스트레이너(strainer)를 사용하여 균질화하였다.
- [0068] CD90.2 자성 비드(Miltenyi Biotec)를 사용하여, 균질화된 비장 조직으로부터 T 세포를 분리하였다. 분리된 T 세포는 CellTrace™ Violet(CTV)을 사용하여 표지하였다. 그 후, 항-CD3/28 Dynabeads®를 사용하여, 표지된 T 세포를 3일 동안 활성화시켰다.
- [0069] T 세포를 활성화시키는 동안 5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$ , 또는 135  $\mu\text{M}$ 의 HL-156A(한올바이오파마 Inc.), 및/또는 20 nM의 라파마이신(rapamycin)(LC Laboratories)을 가하여, HL-156A, 또는 HL-156A과 라파마이신의 조합이 T 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 음성 대조군으로서 5%(v/v)의 DMSO가 첨가된 PBS를 사용하였다. 비교군으로 20 nM의 라파마이신 또는 2 mM의 메트포르민(metformin)(한올바이오파마 Inc.)을 가한 T 세포를 이용하였다.
- [0070] 활성화된 T 세포는 알로피코시아닌(Allophycocyanin: APC)-표지된 항-CD4 항체(BD Biosciences) 및 페리딘인 클로로필 단백질 복합체(Peridinin Chlorophyll Protein Complex: PerCP)-표지된 항-CD8 항체(eBioscience)를 사용하여 면역염색하였다. 면역염색된 T 세포는 유세포 분석 방법으로 T 세포의 표면 분자 표현형을 분석하였다. 유세포 분석 결과로부터 T 세포에 처리한 물질에 대한 T 세포의 증식률(%)을 산출하고, 화합물에 따른 CD4 T 세포의 증식률(%) 및 CD8 T 세포의 증식률(%)을 각각 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.
- [0071] 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, HL-156A는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 증식을 농도에 비례하여 유의하게 저해되었다. 또한, HL-156A과 라파마이신의 조합은 각각의 화합물에 비해 T 세포의 증식을 저해하여, HL-156A과 라파마이신의 조합은 상승적인 효과가 있음을 확인하였다.
- [0072] **2. 염증성 인자의 생성에 대한 HL-156 화합물의 효과**
- [0073] **1) THP-1 세포주에서 종양 괴사 인자-알파 생성의 저해**
- [0074] 인간 단핵구 THP-1 세포주(ATCC)를 준비하고, 37°C의 온도 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.
- [0075] 준비된 THP-1 세포를 96 well 플레이트에 약  $1 \times 10^5$  개의 밀도로 접종하고, 세포 배양액에 HL-156A, HL-156B, HL-156C, HL-156D, HL-156E, 및 HL-156F(모두 한올바이오파마 Inc.)를 1  $\mu\text{M}$  또는 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 가하였다. 그 후, 세포 배양액에 25 ng/ml의 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate: PMA, Sigma-Aldrich)를 가하고 세포를 24 시간 동안 배양한 후, 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide: LPS)를 가하여 THP-1 세포의 면역반응을 유도하였다. 음성 대조군으로 LPS를 가하지 않거나, LPS를 가하였으나 약물을 가하지 않은 그룹을 사용하였다.
- [0076] THP-1 세포를 24 시간 동안 배양한 후, TNF ELISA 키트(Invitrogen)로 배양액 중 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )의 양을 측정하였다. 투여된 약물에 따른 THP-1 세포에서 생성된 TNF- $\alpha$ 의 양

(pg/ml)을 도 2a 및 표 1에 나타내었다.

**표 1**

투여군	평균	표준 편차	표준 오차	p-값 (t-검정)
LPS 미투여	0	0	0	
약물 미투여	5250	483.5	279.1	
HL-156A 10 $\mu$ M	3025	377.2	217.8	0.045
HL-156A 1 $\mu$ M	6750	330.3	190.7	
HL-156B 10 $\mu$ M	2875	130.3	75.22	0.007
HL-156B 1 $\mu$ M	6125	662.9	382.7	
HL-156C 10 $\mu$ M	6375	904	521.9	
HL-156C 1 $\mu$ M	4825	1517	875.6	
HL-156D 10 $\mu$ M	5150	621.9	359	
HL-156D 1 $\mu$ M	6125	377.2	217.8	
HL-156E 10 $\mu$ M	1925	238.5	137.7	0.001
HL-156E 1 $\mu$ M	4725	735.5	424.6	
HL-156F 10 $\mu$ M	4650	310.5	179.3	0.026
HL-156F 1 $\mu$ M	6425	635.8	367.1	

\* p-값은 약물 미투여군에 비교한 스튜던트 t-검정(student t-test)임. 도 2a 및 표 1에 나타난 바와 같이, HL-156A, HL-156B, HL-156E, 및 HL-156F는 세포 내에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 저해하였다. TNF- $\alpha$ 는 전신성 염증과 관련된 사이토카인이고 면역세포를 조절하는 작용을 하므로, HL-156 화합물은 염증 반응을 억제할 수 있음을 할 수 있음을 확인하였다.

## 2) 윤활막세포에서 종양 괴사 인자-알파 생성의 저해

인간 윤활막세포(synoviocyte) 세포주 MH7A(가톨릭대학교 김완욱 교수 제공)를 준비하고, 37°C의 온도 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

준비된 MH7A 세포를 96 웰 플레이트에 약  $3 \times 10^4$  개의 밀도로 접종하고, 리포폴리사카라이드(LPS)를 가하여 MH7A 세포의 면역반응을 유도하였다. 그 후, 세포 배양액에 HL-156A 또는 HL-156B를 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 또는 10  $\mu$ M의 농도로 가하였다. 음성 대조군으로 LPS를 가하였으나 약물을 가하지 않은 그룹을 사용하였다.

MH7A 세포를 24 시간 동안 배양한 후, TNF- $\alpha$  ELISA 키트(Peprotach)로 배양액 중 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하였다. 약물의 투여에 따른 TNF- $\alpha$ 의 양을 표 2에 나타내고, HL-156A 또는 HL-156B 투여시 MH7A 세포에서 생성된 TNF- $\alpha$ 의 양( $\mu$ g/ml)을 도 2b에 나타내었다.

**표 2**

투여군	평균	표준 편차	표준 오차	p-값 (t-검정)
TNF- $\alpha$ 대조군	1	0.19	0.1097	
TNF- $\alpha$ HL156A 0.1 $\mu$ M	0.82	0.09539	0.05508	NS
TNF- $\alpha$ HL156A 1 $\mu$ M	0.75	0.04583	0.02646	NS
TNF- $\alpha$ HL156A 10 $\mu$ M	0.72	0.03606	0.02082	NS
TNF- $\alpha$ 대조군	3.53	0.2358	0.1361	
TNF- $\alpha$ HL156B 0.1 $\mu$ M	3.11	0.2088	0.1206	NS
TNF- $\alpha$ HL156B 1 $\mu$ M	2.56	0.291	0.168	0.0068
TNF- $\alpha$ HL156B 10 $\mu$ M	2.17	0.1389	0.08021	0.0099

\* p-값은 각 약물 투여군의 대조군에 비교한 스튜던트 t-검정임.\* NS: 유의하지 않음(not significant)

표 2 및 도 2b에 나타난 바와 같이, HL-156A 및 HL-156B는 세포 내에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도-의존적으로 저해하였다. 따라서, HL-156 화합물은 윤활막 세포에서 염증 반응을 억제하거나 관절염을 예방 또는 치료할 수 있음



을 확인하였다.

[0086] **3. 생체 내에서 T 세포 활성화에 대한 HL-156 화합물의 효과**

[0087] 정상 C57BL/6 마우스(오리엔트 바이오)에  $2 \times 10^5$  pfu(plaque forming unit)의 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus: LCMV) 암스트롱(Armstrong) 균주(Emory University School of Medicine)를 복강 내로 주입하였다(제 0일).

[0088] 상기 마우스에 5 mg/kg 체중 또는 20 mg/kg 체중의 용량으로 HL-156A를 2일에 한번씩 투여하였다. 또한, 라파마이신 투여군에서, 75  $\mu$ g/kg 체중의 라파마이신을 매일 마우스에 투여하였다. HL-156A와 라파마이신의 병용 투여군에서, 5 mg/kg 체중의 HL-156A를 마우스에 2일에 1회 투여하고, 75  $\mu$ g/kg 체중의 라파마이신을 매일 투여하였다. 음성 대조군으로서 5%(v/v)의 DMSO가 첨가된 PBS를 사용하였다. HL-156A 또는 라파마이신은 LCMV 암스트롱 균주를 투여하기 하루 전 날부터(제 -1일) 투여 후 30일까지 복강 주사로 주입하였다. 바이러스 주입 후 제 8일, 제 15일, 및 제 30일에 채혈하여 마우스의 말초 혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 수득하였다. 제 31일에 마우스를 희생시키고, 실시예 1.1에 기재된 바와 같이, 마우스의 비장을 적출하였다. 비장 조직으로부터 항-GP33 항체를 사용하여 LCMV에 특이적인 항원 gp33을 발현하는 CD8 T 세포(GP33+ CD8 T 세포)를 분리하였다. 마우스에 HL-156A, 또는 HL-156A과 라파마이신의 조합을 투여한 과정을 나타낸 모식도를 도 3에 나타내었다.

[0089] 실시예 1.1에 기재된 바와 같이, 분리된 GP33+ CD8 T 세포를 피코에리트린(Phycoerythrin: PE)-표지된 항-CD127 항체(eBioscience) 및 플루오레세인 이소티오시아네이트(Fluorescein isothiocyanate: FITC)-표지된 항-CD62L 항체(BioLegend)를 사용하여 면역염색하고, 유세포 분석 방법으로 T 세포의 표면 분자 표현형을 분석하였다. 유세포 분석 결과, HL-156A, 또는 HL-156A과 라파마이신의 조합을 투여한 경우, 바이러스 감염 후 시간에 따른 바이러스-특이적 CD8+ T 세포의 분화 변화를 도 4a에 나타내었다.

[0090] 분리된 T 세포 중 CD127 및 CD62L을 발현하는(CD127+CD62L+) 중심 기억 T 세포(central memory T 세포:  $T_{CM}$ ), CD127은 발현하지만 CD62L은 발현하지 않는(CD127+CD62L-) 효과 기억 T 세포(effector memory T 세포:  $T_{EM}$ ), 및 CD127 및 CD62L 모두 발현하지 않는(CD127-CD62L-) 효과 T 세포(effector T 세포:  $T_{EFF}$ )의 비율(%)을 산출하였다. HL-156A, 또는 HL-156A과 라파마이신의 조합을 투여한 경우, 바이러스 감염 후 시간에 따른 PBMC 중 CD127+CD62L+  $T_{CM}$  세포, CD127+CD62L-  $T_{EM}$  세포, 및 CD127-CD62L-  $T_{EFF}$  세포의 비율(%)을 도 4b에 나타내었다. 또한, 제 31일에 비장 T 세포 중 CD127+CD62L+  $T_{CM}$  세포, CD127+CD62L-  $T_{EM}$  세포, 및 CD127-CD62L-  $T_{EFF}$  세포의 비율(%)을 도 4c에 나타내었다.

[0091] 도 4b 및 도 4c에 나타난 바와 같이, HL-156A는 PBMC 중  $T_{CM}$  세포 및  $T_{EM}$  세포의 분화를 저해하였고,  $T_{EFF}$  세포의 증식을 촉진하였다. 반면에, 라파마이신은 PBMC 중  $T_{CM}$  세포 및  $T_{EM}$  세포의 분화를 촉진하였고,  $T_{EFF}$  세포의 증식을 억제하였다. 따라서, 라파마이신과 달리, HL-156A는 기억 T 세포의 분화 또는 생성을 억제하고 효과 T 세포의 증식을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다. 그러므로, HL-156A는 T 세포와 관련된 질환, 예를 들어 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 치료 및 예방할 수 있는 효과가 있음을 확인하였다.

[0092] **4. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 HL-156 화합물의 관절염 치료 효과**

[0093] 마우스 당 250  $\mu$ g의 가열-멸균된 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) H37Ra (BD Sciences)를 함유한 완전 프로인트 아쥬반트(complete freund's adjuvant: CFA)에 소 유형 II 콜라겐(Bovine Type II Collagen)을 용해시켜 콜라겐 용액을 준비하였다.

[0094] DBA/1 마우스에 준비된 콜라겐을 마우스 당 100 g의 양으로 피내 투여하여 마우스를 면역화하였다. 면역화 후 21일에, 불완전 프로인트 아쥬반트(Freund's incomplete adjuvant: IFA)에 용해시킨 소 유형 II 콜라겐을 마우스에 100  $\mu$ g의 양으로 마우스의 꼬리에 피하로 주사하여 면역을 상승(boost)시켰다.

[0095] 마우스의 관절염 지수는 하기 기준을 이용하여 관절염 지수를 측정하였다:

[0096] 등급 0: 부종(swelling) 또는 홍반(erythema);

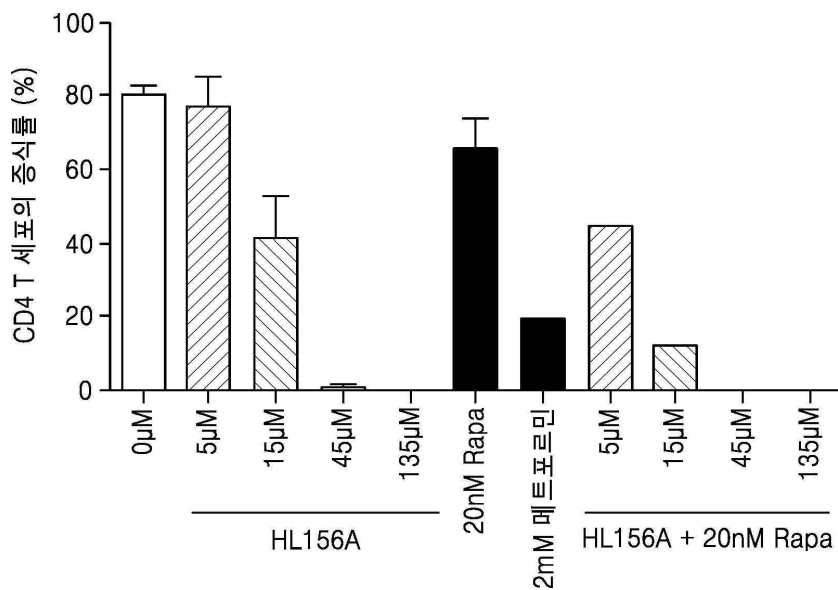
[0097] 등급 1: 경미한 부종 및 홍반, 발가락 염증;

[0098] 등급 2: 가장자리(distal) 내지 가운데(mid)-사지에 한정된 중등도 부종 및 홍반;

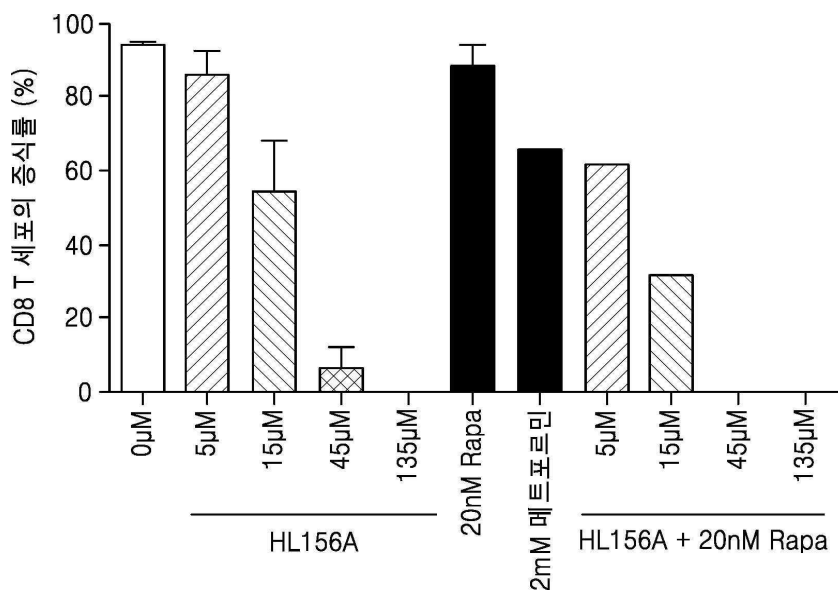
- [0099] 등급 3: 발목까지 확장되고, 더욱 명확한 부종 및 홍반; 및
- [0100] 등급 4: 발목, 발, 및 발가락의 심각한 부종, 홍반, 및 관절 경직.
- [0101] 각각의 다리에 대해 0 내지 4의 점수를 매겨, 각 마우스당 최대 16점의 관절염 지수를 부여하였다.
- [0102] 평균 관절염 지수가 8인 마우스를 무작위적으로 선별하였다. HL-156A 화합물을 PBS에 희석하고, 선별된 마우스에 60 mg/체중 kg의 HL-156A 화합물을 2일에 1번씩 복강내로 투여하였다. 그 후, 마우스의 관절염 지수를 측정하고, 시간에 따른 관절염 지수 변화를 도 5에 나타내었다(\*:  $p < 0.05$ ).
- [0103] 도 5에 나타난 바와 같이, HL-156A 화합물은 시간의 경과에 따라 관절염 지수를 감소시켰다. 따라서, HL-156A 화합물은 관절염을 치료 및 예방할 수 있는 효과가 있음을 확인하였다.

## 도면

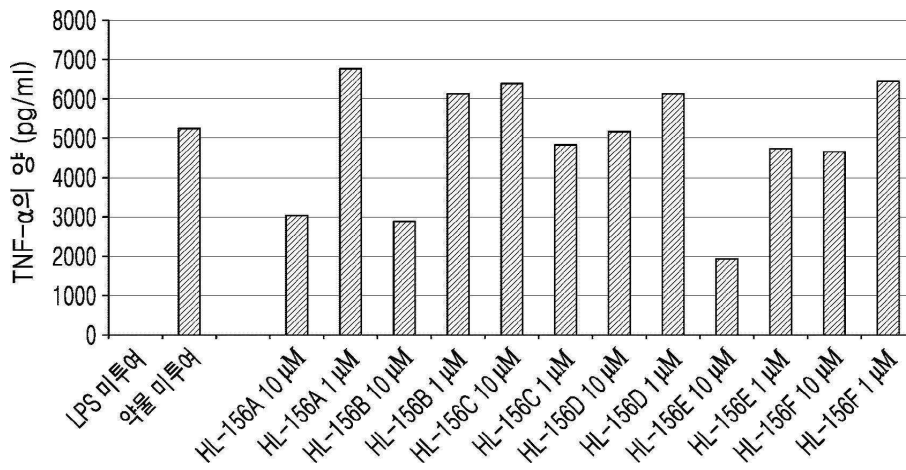
### 도면1a



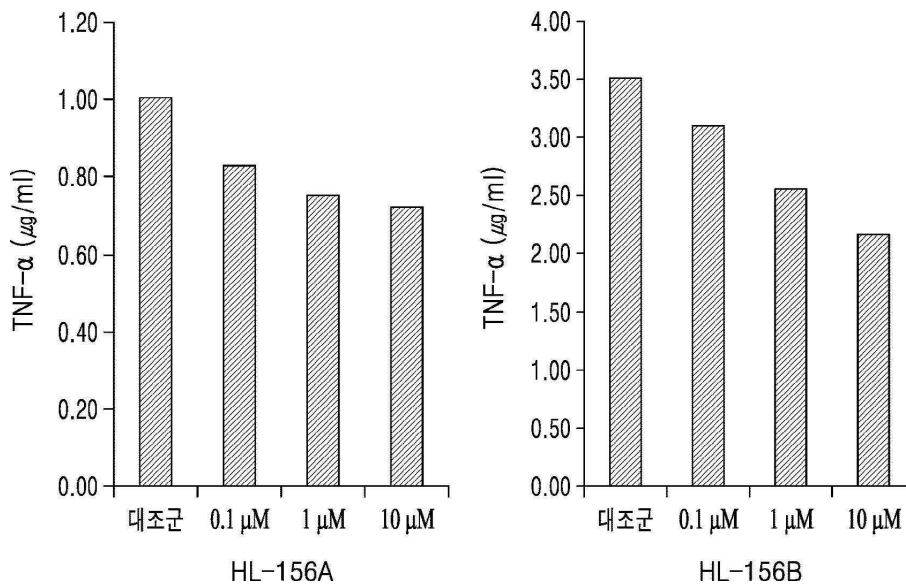
### 도면1b



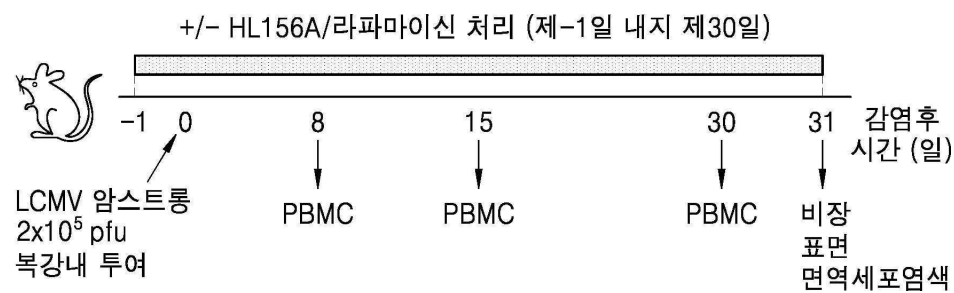
도면2a



도면2b

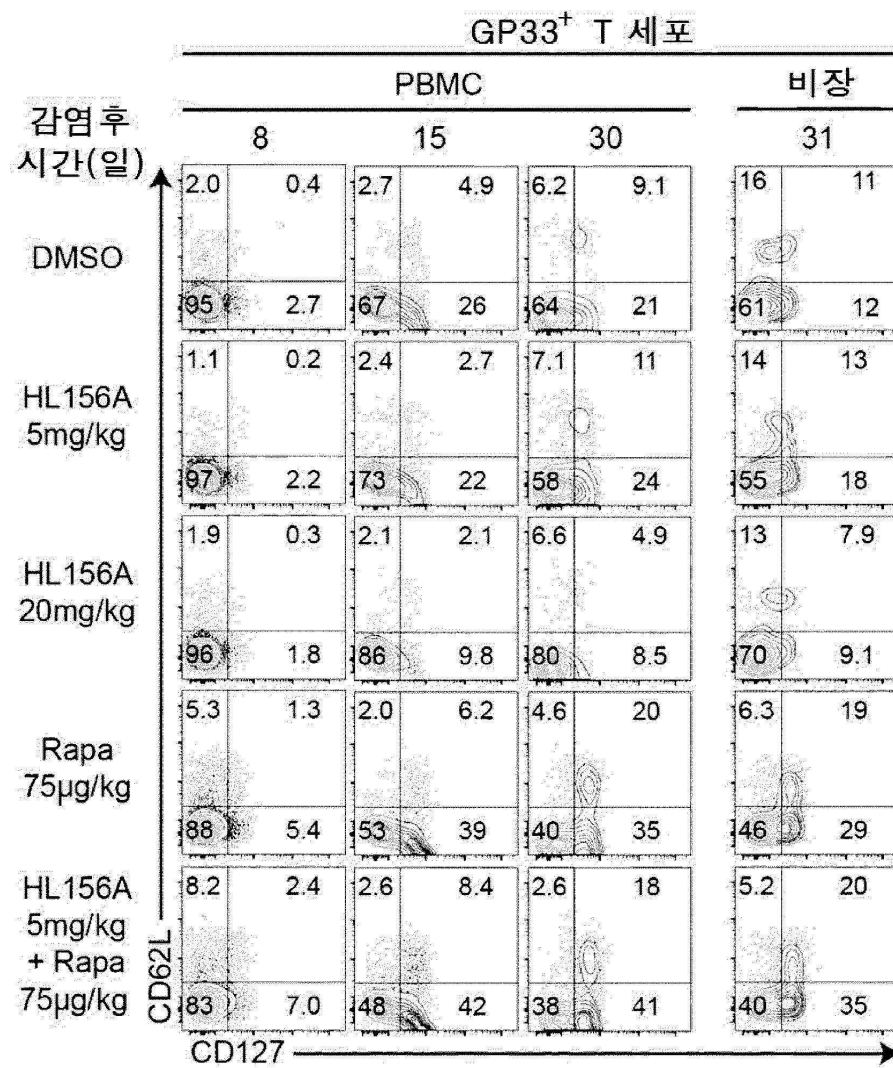


도면3

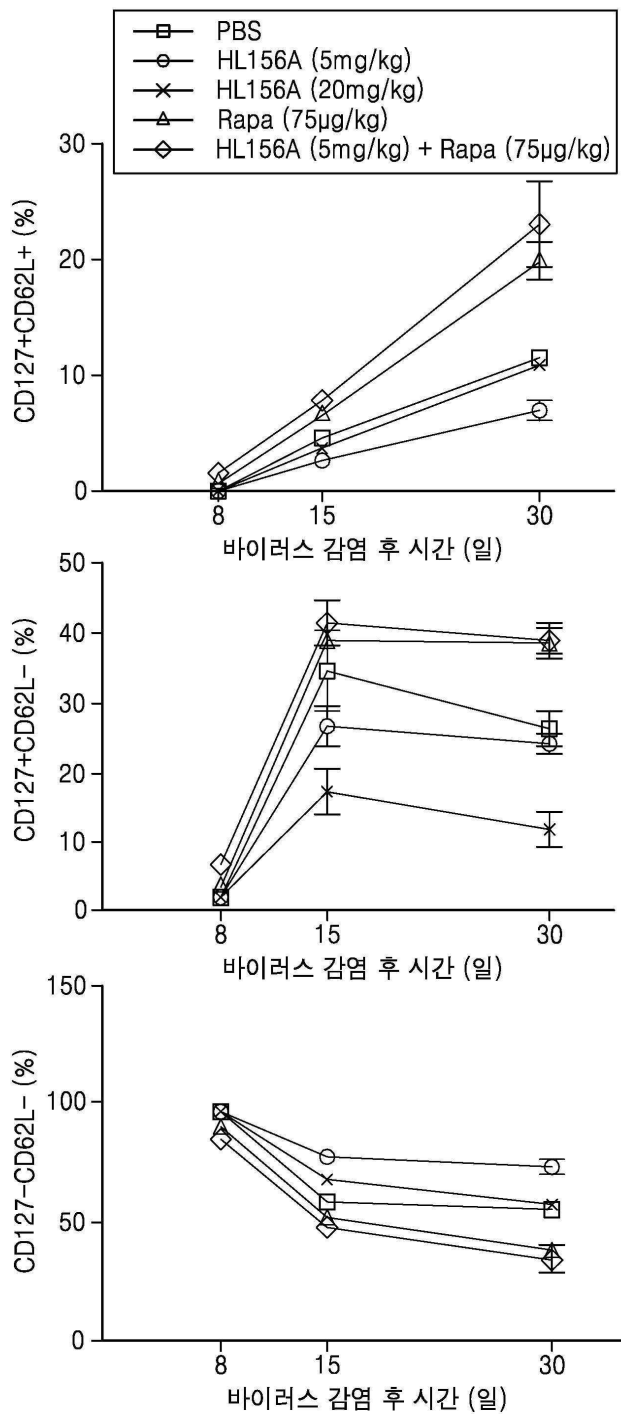




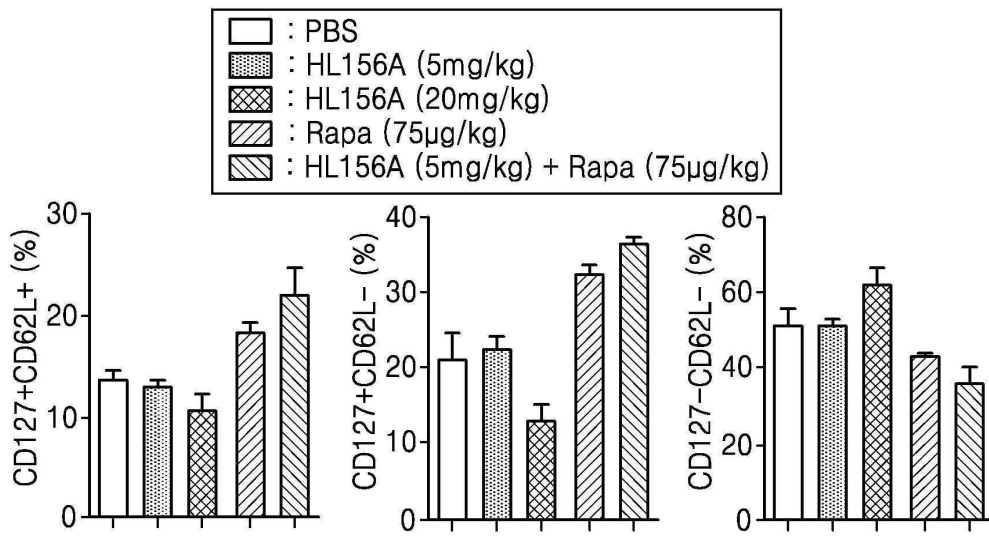
도면4a



도면4b



도면4c



도면5

