(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 31/4196

(11) 공개번호 10-2004-0111491
(43) 공개일자 2004년12월31일

(21) 출원번호 10-2004-7015884
(22) 출원일자 2004년10월05일
번역문 제출일자 2004년10월05일
(86) 국제출원번호 PCT/IT2003/000237
(87) 국제공개번호 WO 2003/092681
(86) 국제출원출원일자 2003년04월15일
(87) 국제공개일자 2003년11월13일

(30) 우선권주장 10/137,699 2002년05월03일 미국(US)

(71) 출원인 시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이.
이탈리아 로마 00144 비알레 샤케스파아레 47

(72) 발명자 바티스티니루카
이탈리아, 포메지아 아이-00040, 케이엠.30,400, 비아 폰티나, 시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이

보르셀리노지오반나
이탈리아, 포메지아 아이-00040, 케이엠.30,400, 비아 폰티나, 시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이

데산티스리타
이탈리아, 포메지아 아이-00040, 케이엠.30,400, 비아 폰티나, 시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이

카르미나티파올로
이탈리아, 포메지아 아이-00040, 케이엠.30,400, 비아 폰티나, 시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이

(74) 대리인 백남훈

심사청구 : 없음

(54) 자가면역 질환 치료용 (3－ (2－에틸페닐) －5－메톡시페닐) －1H－ [1, 2, 4] －트리아졸의 용도

요약

본 발명은 자가면역 질환, 특히 다발성 경화증, 전신 홍반성 루프스 및 류마티스성 관절염에 걸린 대상자에게 유효량의 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸을 투여함을 포함하는, 상기 대상자의 치료 방법을 개시한다. 본 발명은 또한 γδT 세포의 억제가 필요한 대상자에게 유효량의 상기 화합물을 투여함을 포함하는, 상기 대상자에서 γδT 세포를 억제하는 방법을 또한 개시한다.

대표도

도 1

색인어

자가면역 질환, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루프스, 류마티스성 관절, (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸, 치료

명세서

기술분야

본 발명은 화합물 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸을 투여함으로써 유효하게 치료되는 자가면역 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

다발성 경화증(MS)은 중추 신경계(CNS) 마이엘린 항원에 대한 자가면역 공격에 의해 매개되는 것으로 생각되는 CNS의 염증성 마이엘린 탈락 질환이다. 동물 모델뿐만 아니라 MS 환자의 조직과 백혈구에 대한 분석으로부터 모은 데이터를 근거로, 항원 특이성은 αβ T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 T 세포 내에 존재하는 것으로 간주되며, 이때 뇌염 유발 활성은 Th1-형 표현형, 즉 인터페론-감마(IFNγ), 림포톡신(LT) 및 종양 괴사 인자-알파(TNFα)의 사이토킨 프로파일 특성의 발현에 따라 변한다. Th2-형 사이토킨 프로파일(IL-4, IL-5 및 IL-13) 또는 조절 사이토킨, 예를 들어 형질전환 성장 인자-베타(TGFβ) 및 IL-10을 발현하는 T 세포는 상기 Th1-표현형의 획득을 차단하고/하거나 작동 사이토킨의 하부 표적, 예를 들어 대식세포의 활성화를 차단시킴으로써 상기 과정을 방해하는 것으로 생각된다.

질병 발현에 대한 항원-반응성 αβ T 세포의 사이토킨 프로파일의 중요한 성질은 이러한 특이적인 사이토킨 프로파일을 획득하게 하는 항원 인식 과정의 성질에 대해 문제를 발생시킨다. 얼마 동안은 항원 보강제의 존재 및 항원 제공 경로가 동물에서 뇌염 유발 활성에 대해 중요한 결정인자인 것으로 공지되었지만, 이들 과정이 획득된 면역 반응의 성질뿐만 아니라 다른 비-항원-특이성 백혈구 집단의 기여를 어떻게 구체화 하는지에 대해서는 단지 최근에야 선천적인 면역 반응과 획득된 면역 반응간의 공유 영역에서 작용하는 상이한 세포 집단들의 확장된 인식으로 보다 활발하게 집중하기 시작하였다.

상기 선천적인 면역 반응은 광범위한 감염 및 독성 인자에 대해 최우선의 방어로서 작용한다. 역사적으로, 이러한 반응은 식세포 활성을 갖는 세포, 예를 들어 대식세포 및 다형핵 세포, 및/또는 효능있는 세포독성 활성, 예를 들어 천연 세포독성 세포(NK 세포), 비만 세포 및 호산구에 기인하였다. 이들 상이한 세포 집단들의 활성은 집합적으로 급성기 단백질로서 공지된 다수의 상이한 가용성 분자들, 예를 들어 인터페론, 보체 연쇄 증폭반응의 특이 성분들 및 사이토킨에 의해 촉진되고 선동되며, 이러한 성분들은 식세포 및 세포독성 활성을 향상시킬뿐만 아니라 조직 손상 부위에 이들 세포를 축적시키는 작용을 한다. 이러한 최우선 방어가 돌파되는 경우, 적응성 면역 반응의 활성화가 이어지며, 이는 누군가의 다수의 상이한 특징들을 나타낼 수 있는 특이적인 면역 반응을 형성시킨다. 이러한 후천적인 면역 반응의 발생은 림프구의 독특한 성질이다.

그러나, 보다 최근에 림프구 중 소수의 부차 집단들이 선천적인 면역 반응의 일부로서 또한 작용할 수도 있는 것으로 인식되고 있다. 림프구의 이러한 특이적인 서브셋들의 완전한 기능 역할이 불충분하게 이해된 채로 남아있는 듯 하지만, 이들에 대한 현재의 관심은 상처 조직 부위에서의 사이토킨의 주변 환경을 한정하여, 발생된 적응성 면역 반응의 성질에 영향을 미치는 그의 역할에 집중하여 왔다. 따라서, 이러한 연구들 중 다수는 Th1-형 사이토킨 프로파일을 한정하는 IFNγ 및 IL-12의 역할 및 Th2-형 사이토킨 프로파일을 한정하는 IL-4의 역할에 집중하였다. 림프구의 3 개의 주요 그룹들, 즉 αβ T 세포, γδ T 세포 및 B 세포 모두의 부차 집단이 이러한 범주 내에 있는 듯 하다. 이들 림프구 집단은 고도로 보존된 항원 수용체 복합체의 사용, 추가적인 패턴-인식 수용체들, 예를 들어 톨-형 수용체 군의 일원 또는 NK 세포 상에서 통상적으로 검출되는 수용체의 발현, 및 높은 수준의 사이토킨 및 케모킨의 빠른 방출에 이은 특이적인 리간드들과의 상호작용을 특징으로 한다.

γδ T 세포: γδ 세포 수용체(TCR)를 발현하는 T 세포는 전체 순환 T 세포 집단의 소수 집단을 구성한다. αβ T 세포와 공통적으로 γδ T 세포는 재배열된 TCR을 발현하지만, TCR 다양성의 획득에 관여하는 기전뿐만 아니라 인식된 항원들의 성질은 분명히 다르다(Chien Y.H. et al., Annu. Rev. Immunol. 1996; 14:511-32). CDR3 길이 분포에 대한 분석뿐만 아니라 결정학 연구는 상기 γδ TCR의 면역 글로불린 중쇄 유전자에 대한 보다 큰 구조적 유사성을 제시하였으며, 이는 γδ T 세포에 의한 항원 인식의 분자 성질이 αβ T 세포에 의해 이용되는 것과 근본적으로 상이하다는 결론을 더욱 지지한다. γδ T 세포는 대부분의 γδ T 세포가 천연 세포독성 세포(NK-R) 상에서 발견

되는 수용체들을 동시에 발현한다는 점에서 αβ T 세포와 또한 상이하다(Battistini L. et al.; J. Immunol. 1997;159:3723-30). T 세포 상의 이들 수용체의 발현은 세포독성, 사이토킨 방출 및 내피 통과 세포 이동을 포함한 다수의 T 세포 기능들을 조절하는 것으로 나타났다(Reyburn H. et al., Immunol. Rev. 1997;155:119-25). 이러한 데이터는 γδ T 세포 기능의 조절이 TCR과 NK-R 모두를 통한 신호 발신에 의한 활성화(또는 억제)를 비롯하여, 대부분의 αβ T 세포에서 발견되는 것과 상이한 듯 함을 가리킨다. NK-R이, 감염에 의해 조절된 MHC의 세포 표면 발현의 변화 또는 상기 세포의 활성화 상태에 예민하게 반응하는 보조자극 분자로서 작용함이 제시되었다(본 문의 Reyburn H. et al.).

건강한 성인에서 γδ T 세포의 대부분은 Vγ9Vδ2 유전자 단편을 이용하는 TCR을 발현한다. 이러한 γδ T 세포의 특정 집단의 확장은 전형적인 MHC-제한 없이 비-단백질 세균 항원, 예를 들어 파이레닐-피로포스페이트 유도체 및 세균 세포 벽의 다른 성분들에 대한 반응에 기인하는 것으로 여겨진다(Salerno A. et al., Crit. Rev. Immunol. 1998;18:327-57). 이러한 유형의 항원에 대한 반응은 중요하게는 Jγ1.2 단편 중에 존재하는 세균 계열 암호화된 리신 잔기의 사용에 따라 변하는 것으로 밝혀졌다(Miyagawa F. et al., J. Immunol. 2001;167:6773-6779). 따라서, 포스페이트 항원에 대한 반응이 사실상 다클론성일 수도 있지만, 보존된 요소들은 응답 세포에 의해 사용된다. γδ T 세포 수용체의 보존 서열이 MS 환 자로부터 단리된 세포 및/또는 조직에서 주목되었으며, 이는 공통 항원에 대한 반응을 시사한다.

γδ T 세포는 NK 수용체의 발현, IL-2rβ의 구성적 발현, 고도로 보존된 TCR 서열의 사용 및 적어도 일부 서브셋들의 CD1 분자에 의한 제한을 포함하여, αβTCR+NK-T 세포와 공통적인 다수의 특징들을 공유한다(Spada F.M. et al., J. Exp. ed. 2000;191:937-48). 이는 일부 γδ T 세포가 선천적인 면역반응과 후천적인 면역 반응간에 유사한 연계를 제공할 수도 있음을 시사할 수 있다(Poccia F. et al., Immunol. Today 1998;19:253-6). Vδ2+ T 세포가 포스페이트 항원에 의해 활성화되어 다량의 사이토킨과 케모킨 모두를 신속하게 방출함이 입증된 것도 상기와 같은 개념과 일치한다(Poccia F. et al., J. Immunol. 1997;159:6009-17; Cipriani B. et al., Blood 2000;95:39-47). 흥미롭게도, V 영역의 사용이 Th1-형 성향을 나타내는 Vδ2+ 세포 및 Th2-형 성향을 나타내는 Vδ1+ 세포와의 Th1 또는 Th2-형 반응을 매개함에 있어서 γδ T 세포의 특정 서브셋들을 관련시킬 수도 있음을 제시하는 누적 데이터들이 존재한다. 따라서 예를 들어, MS 병변의 γδ T 세포는 Vδ2 표현형을 우세하게 발현하고(Battistini L. et al., Mol. Med. 1995;1:554-62) MS 환자의 말초 혈액 중의 Vδ2 세포는 활성화의 증거를 보이는 것으로 나타났다. 그러나, CSF에서는 Vδ1 세포가 우세한 γδ T 세포 집단이다(De Libero G., Springer Semin. Immunopathol. 2000;22:219-38).

마이엘린 탈락 질환에서 γδ T 세포의 잠재적인 역할을 조사한 연구들은 γδ T 세포가 MS 또는 길리안 바레 증후군(GBS) 환자에서 활성화의 증거를 보이지 만, 상기 두 질환에서 이들 세포의 표현형 및 작용 성질에 차이가 있다는 결론을 추가로 지지한다. 특히, 상기 데이터는 MS 환자에서 Vδ2 서브셋이 활성화되며 이들 세포를 높은 수준의 염증전 사이토킨을 분비하도록 유도할 수 있음을 가리킨다.

일단 TCR을 통해 활성화되었으면 γδ T 세포는 또한 NK 세포 표적에 양 또는 음의 방식으로 반응하는 NK 세포로서 작용할 수도 있다(Battistini L. et al., J. Immunol. 1997;159:3723-30; De Libero G. Microbes Infect. 1999;1:263-7). 더욱 또한, 활성 질환이 있는 MS 환자에서 NKRP1A(NK1.1의 인간 상동물)를 동시에 발현하는 순환 Vδ2+ T 세포의 퍼센트가 건강한 공여자에 비해 현저하게 증가하는 것으로 밝혀졌다. Vδ2+ 및 Vδ1+ T 세포를 MS 환자와 건강한 지원자로 분류하여 클로닝시키는 경우 모든 Vδ2+ 클론들이 NKRP1A를 발현하였다. NKRP1A는 IL-12와의 배양에 의해 Vδ2+ 세포 상에서 강하게 상향 조절되는 반면, Vδ1+ 클론에 대한 IL-12에 의한 NKRP1A의 상향 조절은 기록되지 않았다. 내피 통과 이동 분석에서, Vδ2+ NKRP1A+ 클론은 Vδ1+ 클론보다 더 효과적으로 이동하였으며, 이러한 이동 능력은 IL-12와의 배양에 따라 향상되었다. 이동은 항-NKRP1A 항체의 F(ab')2에 의해 강하게 억제되는데, 이는 통상적인 렉틴에 대한 상기 수용체가 내피 통과 세포 이동 과정에 관여함을 시사한다. MS 환자로부터 새로 단리된 PBMC에서, 상기 이동된 집단은 Vδ2+ NKRP1A+ 세포에 풍부함이 또한 입증되었다. 따라서 Vδ2+ 세포 상에서의 NKRP1A의 발현은 혈관 내피를 통해 이동하는 능력의 증가와 관련이 있으며, 미세 환경에 존재하는 IL-12에 의해 활성이 상향조절될 수 있다(Poggi A. et al., J. Immunol. 1999;162:4349-54). 이들 데이터는 함께 EAE에서 입증된 바와 같이, γδ T 세포가 CNS의 염증 부위에 신속하게 보충되어 여기에서 상기 병변의 사이토킨/케모킨 균형에 현저하게 기여할 수 있음을 시사한다(Spahn T.W. et al, Eur. J. Immunol. 1999;29:4060-71; Rajan A.J. et al., J. Immunol. 2000;164:2120-30).

따라서, 작동 γδ+ T 세포의 선천적인 면역 반응에 대한 면역조절 성질을 갖는 화합물의 유용성이 이를 필요로 하는 대상자에게 크게 이로울 수 있다.

발명의 요약

본 발명에 이르러 3,5-디아릴-s-트리아졸 부류 분자의 화합물, 보다 정확하게는 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸(이후부터 또한 ST1959라고도 칭함)이 자가면역 질환을 효율적으로 치료하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 본 발명에 따른 화합물이 비-세포독성 기전에 의해 γδ T 세포 작동 반응을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

따라서, 본 발명의 목적은 자가면역 질환에 걸린 대상자에게 유효량의 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸을 투여함을 포함하는, 상기 대상자의 치료 방법이다.

특히, 본 발명의 방법에 따라 상기 대상자는 자가면역 질환, 예를 들어 다발성 경화증, 전신 홍반성 루프스, 류마티스성 관절염(RA)에 걸려 있다.

본 발명의 또 다른 태양에서, 본 발명의 추가의 목적은 γδ T 세포의 억제 가 필요한 대상자에게 유효량의 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸을 투여함을 포함하는, 상기 대상자에서 γδ T 세포를 억제하는 방법이다.

본 발명의 바람직한 실시태양에서, 상기 대상자는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간이다.

발명의 상세한 설명

(3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸은 1983년 4월 5일자로 허여된 미국 특허 제 4,379,155 호에 피임 활성을 갖는 광범위한 1,2,4-트리아졸 그룹의 일부로서 개시되었다. 상기 화합물은 피임제로서 철저히 연구되었다(Galliani et al., Pharm. Dyn. 5, 55-61(1982)). 이 후에, 2001년 11월 27일자로 허여된, 젠지 리미티드(Geange Ltd.)에 양도된 미국 특허 제 6,323,230 호에는 상피 조직 질환, 특히 건선, 아토피성 피부염, 궤양성 대장염 및 크론 병의 국소 치료에 유용한 광범위한 질소 헤테로사이클릭 방향족 유도체 그룹이 개시되어 있으며, 상기 투여 경로는 피부 외, 경구 및 직장이다. 상기 언급한 미국 특허 제 6,323,230 호의 내용에 따라, 경구 경로는 특히 작용 부위, 즉 창자 하부의 상피 점막에 상기 화합물을 전달하는데 적합한 경구 제형으로서 이해된다. 실제로, 경구 경로는 원래의 피임 활성을 고려할 때 불활성 대사산물을 형성시키는 빠르고 광범위한 간 1 차 통과 효과로 인해 비 경구 주입(Galliani et al. Pharm. Dyn. 5, 55-61(1982))에 대해 올바른 선택이 아니다(Assandri A. et al. Drug Interactions, IV, 237-261(1982); Assandri A. et al. Xenobiotica 14, 429- 433(1984)). 같은 참고문헌은 본 발명에 따른 화합물이 호르몬 또는 호르몬-억제 또는 림프구용해 활성을 보유하지 않으며, 적혈구 항원(양 적혈구)에 대한 항체 형성을 억제하고, 약제 뒤에 투여될 때 림프구 B 및/또는 T에 대해 선택적인 작용을 발휘하지 않음을 교시한다. 상기 화합물의 면역 프로파일이 문헌[Mistrello G. et al., Immunopharmacology, vol. 10, 1985, 163-169]에 개시되었다. 상기 참고문헌은 본 발명의 화합물을 관절염의 치료에 비 활성인 것으로 나타냈다.

본 발명의 화합물은 γδ T 세포에 대해 억제 활성을 가지며, 따라서 γδ T 세포를 억제하는 화합물을 투여함으로써 유효하게 치료되는 질환의 치료에 유용하다.

본 발명 화합물의 투여를 예를 들어 상기 언급한 미국 특허 제 4,379,155 호 및 제 6,323,239 호에 개시된 바와 같이 통상적인 약학 조성물에 의해 수행한다. 바람직한 투여 경로는 비 제한적으로 피하 경로이다.

하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시한다.

도면의 간단한 설명

도 1 : ST1959는 Vδ2 T 세포 IPP-매개된 팽창을 억제한다.

도 2 : ST1959는 Vδ2 T 세포에서 세포사멸을 유발시키지 않는다.

도 3 : ST1959는 IPP-자극된 T 세포에서 IFNγ 방출을 억제한다.

도 4 : ST1959는 IFNγ 생산 Vδ2 T 세포를 억제한다.

도 5 : ST1959는 마우스 LES 모델에서 신장 손상을 억제하고 생존률을 개선 시킨다.

도 6 : ST1959는 RA를 개선시킨다.

도 7 : 실험적인 자가면역 뇌척수염

도 8 : 실험적인 자가면역 뇌척수염

도 9 : 실험적인 자가면역 포도막염

실시예

실시예 1

다발성 경화증

혈액 샘플을 18 명의 건강한 지원자와, 재발 단계에 있거나 혹은 질환의 첫 번째 에피소드에 있는, 자기 공명 영상 뇌 스캔이 비정상적인 임상적으로 활성인 MS 환자 18 명으로부터 얻었으며; 이들 중 어느 누구도 연구에 돌입하기 전 최소한 3 개월 간 면역억제 치료를 받지 않았다. 환자와 18 명의 건강한 제공자들의 성별과 연령을 조화시켰다.

말초 및 제대혈 단핵 세포를 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 의해 헤파린 첨가 혈액으로부터 단리시키고 완전 배지(RPMI 1640, 10% v/v 열-불활성화된 FCS, 2 mM L-글루타민, 10 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신)에서 1.5 x 10^6 세포/㎖로 배양하였다. 대조용 제공자 또는 MS 환자로부터의 PBMC를 생체 외에서 30 μM 이소펜테닐 피로포스페이트(IPP; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) 및 50 U/㎖ rIL-2(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)의 존재 하에서 9 일간 자극하였다. 배양 3 일 후에, 배양 상등액의 반에 해당하는 분량을 rIL-2가 있는 완전 배지로 대체시켰다. 배양 6 일 후에 Vγ9Vδ2+ T 세포의 팽창이, 각각 PE 또는 FITC에 커플링된 항-CD3 및 항-TCR-Vδ2 mAb를 이용한 이중 염색을 사용한 세포측정 분석에 의해 측정되었다. Vδ2 팽창 지수를, 자극된 배양물 중의 Vδ2+ T 세포의 절대 수를 자극되지 않은 배양물 중의 Vδ2+ T 세포의 절대 수로 나누어 계산하였다.

사이토킨 생산을 상술한 바와 같이 유식 세포측정 분석에 의해 검출하였다. 인간 PBMC를 IPP(100 μM; Sigma-Aldrich) 및/또는 100 U/㎖ rIL-2(Boehringer Mannheim)를 사용하여 6 시간 동안 자극하였다. 브레펠딘 A(10 μg/㎖)를 자극 후 1 시간 째에 가하여 세포 내 이동을 차단시켜 사이토킨이 골지체에 축적되는 것을 허용하였다. 세포를 PBS, 1% BSA 및 0.1% 나트륨 아지드로 2 회 세척하고, 상술한 막 Ag에 특이적인 mAb로 4 ℃에서 15 분간 염색하였다. 이어서 샘플을 4 ℃에서 10 분간 1% 파라포름알데히드로 고정시키고, 1x PBS, 1% BSA 및 0.5% 사포닌으로 희석된 항-IFN-mAb와 함께 배양시켰다. 세포를 최종적으로 1x PBS, 1% BSA 및 0.1% 사포닌으로 2 회 세척하고, FACScan(BD Biosciences) 상에서 획득하였다. 비 특이적인 염색에 대한 대조군을 아이소타입-합치된 mAb로 모니터하고 비 특이적인 염색은 항상 제외시켰다.

IFN-γ 수준을 상술한 바와 같이 표준 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 항체 및 표준을 파밍겐(PharMingen)으로부터 구입하였다. 강화된 단백질-결합 ELISA 플레이트(Nunc Maxisorb; Nunc Maxi Corp., Roskilde, Denmark)를 사용하였다.

Vγ9Vδ2 TCR의 다소 독특한 특징은 천연 및 합성의 비-펩티드성 인항원을 모두 인식하는 능력이다. 이들 항원은 병원성 미생물, 예를 들어 플라스모듐(*Plasmodium*), 프란시셀라(*Francisella*) 및 마이코박테리움(*Mycobacterium*)에서 발견될 수 있다. 이들 중 하나는 5-탄소 이소프레닐 쇄와 피로포스페이트 잔기를 갖는 246-Da 분자인 이소펜테닐 피로포스페이트(IPP)이다. 이들 화합물에 의한 활성화에 따라, Vγ9Vδ2 세포는 팽창하여 염증 전 사이토킨, 예를 들어 TNF-α 및 IFN-γ를 급속히 분비시키고 효능 있는 세포독성 활성을 획득하며, 이는 이들 세포를 Ag 인식 부위에서 염증의 중요한 매개체로서 포함시킨다. IPP는 Vδ2Vγ9 T-세포 서브셋의 증식을 독점적으로 자극하며 또한 동일한 γδ T-세포 집단에서 사이토킨 생산을 유도하는 것으로 알려져 있다. (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸이 IPP 자극에 따라 Vδ2 T 세포 팽창을 억제하는지의 여부를 결정하기 위해서, 건강한 제공자 또는 MS 환자로부터 새로 단리시킨 PBMC를 IL-2, IL-2+IPP, 또는 IL-2+IPP+(3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸(30 μM 또는 60 μM)과 함께 배양시키고, 자극 후 6 일 째에 유식 세포측정 분석을 수행하여 상기 Vδ2 유전자 산물을 발현한 배양물 중에 존재하는 세포의 퍼센트를 측정하였다. 본 발명의 화합물은 Vδ2+ T 세포의 팽창을 IPP와 함께 배양 시 용량 반응 방식으로 효율적으로 억제하였다(도 1). 상기 팽창의 억제 %는 상기 화합물을 MS 환자 또는 건강한 개인으로부터 단리시킨 세포 중에 30 μM의 농도로 사용할 때 각각 39% 및 38%였다. 연구된 두 그룹에서 보다 높은 농도(60 μM)에서 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸에 의해 야기된 억제에 있어서 차이가 주목되었는데, 억제의 71%가 MS 환자로부터 단리된 세포에서 발견된 반면 건강한 개인의 세포에서는 88%였다.

본 발명의 화합물이 Vδ2 T 세포에 대해 독성인지를 측정하기 위해, 고정되지 않은 세포를 PI로 염색하여 세포 막 보전성을 평가하고 유식 세포측정에 의해 분석하였다. IL-2 단독으로 6 일간 배양한 세포에서, 5.96%의 세포가 PI+인 반면, IPP+IL-2를 접종한 세포는 9.66%의 PI+ 세포를 나타내었다. ST1958(30 μM 또는 60 μM)을 가한 경우 PI+ 세포는 각각 15% 및 17.65%였다(도 2). IPP 만을 첨가한 것에 비해 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸을 첨가한 배양물에서 PI+ 사멸 세포가 약간 증가한 것은 상기 화합물이 비-세포독성 기전에 의해 IPP 자극에 따른 Vδ2 T 세포 팽창을 강하게 억제함(30 μM에서 56%의 억제 및 60 μM에서 91% 억제)을 입증한다(도 2).

(3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸이 포스페이트 Ag로 활성화시킨 Vδ2 T 세포에 의해 염증 전 매개체의 방출을 억제하는 지의 여부를 측정하기 위해서, PBMC를 30 μM 및 60 μM의 상기 화합물의 존재 또는 부재 하에서 IPP(30 μ)로 활성화시키고 IFN-γ의 방출을 자극 후 24 시간 째에 ELISA에 의해 측정하였다. 상기 배지 중의 상기 화합물의 존재는 용량 의존적인 방식으로 상기 세포로부터 IFN-γ의 방출을 강하게 억제시켰다(상기 화합물을 30 μM에서 MS 및 건강한 제공자로부터 단리한 세포에 첨가 시 각각 55% 및 65%의 억제; 상기 화합물 을 60 μM에서 MS 및 건강한 제공자로부터 단리한 세포에 첨가 시 각각 74% 및 82%의 억제-도 3).

(3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸의 효과를 IPP로 6 시간 동안 자극한 다음에 Vδ2+IFN-γ + T 세포의 유도에 대해 시험하였다. 상기 데이터는 본 발명의 화합물이 IPP 자극 후에 IFN-γ를 생산하는 Vδ2+ T 세포의 수를 용량 의존적인 방식으로 순 감소시킴을 나타낸다.

30 μM의 농도로 사용된 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸은 건강한 제공자 및 MS 환자로부터 단리된 세포에서 IPP에 의해 유도된 Vδ2+INFγ+세포를 각각 50% 및 25% 억제시킨다. 대조적으로, 60 μM의 화합물에 의해 밝혀진 억제 수준은 2 개의 환자 그룹에 대해 유사하였다; 즉 건강한 제공자로부터 단리된 세포에서 IPP에 의해 유도된 Vδ2+INF-γ+세포를 93% 억제하고, MS 환자로부터 단리된 세포에서는 92% 억제하였다(도 4).

(3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸은 MS 환자와 건강한 개인 모두의 γδ T 세포에 대해 억제 효과를 갖는다. 시험된 모든 상황에서, 건강한 개인으로부터 유도된 세포에 비해 MS 환자로부터 유도된 세포에 대해 촉진된 억제 효과의 차이가 약간, 그러나 의미있게 존재한다, 즉 γδ T 세포 기능의 억제가 건강한 대상자에서 보다 효과적이다. 문헌[Poggi, A. et al., J. Immunol. 162:4349]은 MS 환자의 γδ T 세포가 내피와의 상호작용에 중요한 분자들을 발현하여 염증 조직으로 쉽게 이동하여 마이엘린 탈락에 근원적인 염증 반응을 증폭시키고 결과적으로 신경 기능 장애를 일으키므로, 건강한 개인으로부터 유도된 것에 비해 보다 활성화됨을 앞서 개시하였다. 예비 활성화된 세포의 억제가 휴지기 집단의 억제보다 더 어려운 것으로 생각할 수 있으며, 따라서 이미 개시된 세포 기전의 저지가 필요하다. 그럼에도 불구하고, 대부분의 분석에서 MS 환자의 γδ T 세포 기능의 억제는 60 내지 70%에 달하였다. 이들 Vγ9Vδ2+ T 세포에 의해 인식된 Ag의 광범위한 분포와 염증 전 사이토킨, 예를 들어 IFN-γ 및 TNF-α, 및 케모킨, 예를 들어 MIP-1α 및 MIP-1β가 αβ T 세포와 상이한 것으로 보이는 경로를 통해 생산되는 속도가 제공되는 경우, 이들 세포는 Th1-형 반응을 향해 반응을 기울임으로써 선천적인 면역 반응에서 후천적인 면역 반응으로의 변환에 중요한 역할을 할 수 있다. 이는 Ag 인식 부위에서 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸이 γδ T 세포 활성화를 유효하게 억제할 수 있으며, 이는 선천적인 면역 반응과 후천적인 면역 반응 모두의 활성화를 광범위하게 포함시킬 수 있음을 시사할 수 있다.

실시예 2

루프스

약 6 주 된 마우스 MRL/lpr(암컷)을 잭슨(Jackson)(USA)으로부터 수득하였다. 상기 마우스는 대략 8 주 째에 루푸스형 병리상태를 자발적으로 나타낸다. ST1959의 투여를 6 주 째에 시작하여 참기름 0.1 ㎖ 중의 2.5 ㎎/㎏으로 주 2 회 피하 수행하였다. 하나의 시험 그룹과 하나의 대조용(참기름) 그룹을 연구에 포함시켰다(마우스 12 마리/그룹). 1 주일에 한번 신장 손상을 단백뇨와 뇨 백혈구 의 검출에 의해 모니터하였다. 도 5a에 보고된 데이터는 상기 두 그룹에서 100 ㎎/dℓ 이상의 뇨 단백을 갖는 동물의 평균 %를 나타낸다. 패널 b는 뇨 백혈구의 점수(0 내지 3)를 가리킨다. 모든 측정은 멀티스틱스(Multistix) 10SG(UK)를 사용하여 수행하였다. 패널 c는 상기 두 그룹의 생존 %를 나타내고 대조군에 비해 ST1959 처리된 동물의 사망 개시의 지연, 및 각각 60 및 25%의 보다 높은 전체 생존률을 가리킨다. ST1959의 투여는 패널 d에 나타난 바와 같이 처리된 동물의 체중에 영향을 미치지 않았으며, 따라서 이는 독성의 결여를 암시한다.

실시예 3

콜라겐 유발된 관절염

마우스 DBA/1J를 찰스 리버스(Charles Rivers, Italy)로부터 얻었다. 0 일 및 +21 일 째에 동 분량의 완전 프로인트 항원 보강제 + 결핵균 2 ㎎/㎖ 및 소 II 형 콜라겐 4 ㎎/㎖로 구성된 유화액 100 ㎕/마우스를 i.d.로 투여함으로써 관절염을 유발시켰다. 마우스를 ST1959 o.s. 처리된 것, 사이클로스포린(CSA) o.s. 처리된 것, 비히클(참기름)을 포함한 연구 그룹(8 마우스/그룹)으로 랜덤하게 할당하였다. 모의 마우스를 콜라겐이 없는 유화액으로 처리하고 추가의 투여는 제공하지 않았다. 상기 화합물을 0 일 째 또는 +21 일 째에 출발하여 참기름 0.1 ㎖ 중에서 주 당 3 회 s.c. 또는 o.s.으로 투여하였다. 각각의 사지에 대해 염증 및 안킬로시스(anchilosis)의 점수를 0 내지 3으로 하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, ST1959 s.c. 처리는 염증(6a)과 안킬로시스(6b) 모두를 현저하게 감소시켰다. 대조적으로, 경구 투여는 어떠한 치료 효과도 발생시키지 않았다. ST1959의 s.c. 용량은 그의 LD_{50} 의 1/1500이었다. 매우 고 용량(100 ㎎/㎏)의 사이클로스포린 처리를 양성 대조군으로서 포함시켰다.

실시예 4

실험적인 자가면역 뇌척수염(EAE)

암컷 루이스 래트(7 주된 것)를 할란(Harlan)으로부터 구입하였다. 열 사멸시킨 결핵균(Mt) H34Ra 350 μg/200 μℓ/래트를 함유하는 불완전 프로인트 항원 보강제(200 μℓ/래트)에 유화시킨 마이엘린 기본 단백질(MBP) 100 μg/200 μℓ/래트를 각각의 뒷 발바닥에 주입함으로써 EAE를 유발시켰다(Hoban C. J., Exp. Opin. Ther. Patents, 8, 7, 831-854, 1998; Ledeen R. W. et al., Neurochemical Research, 23, 3, 277-289, 1998; Nagai H. et al., Gen. Pharmac., 30, 2, 161-166, 1998; Sommer N. et al., Nature Medicine, 1, 3, 1995; Simmonds S. et al., Immunology Methods Manual, Academic Press Ltd, 1997).

뇌염 유발 시험감염에 이어서, 마우스를 매일 관찰하고 EAE의 임상적인 징후를 하기와 같이 0 내지 6 범위의 규모로 기록하였다:

0: 임상적 징후 없음; 1: 늘어진 꼬리; 2: 뒷발의 부분적인 마비; 3: 뒷발의 완전한 마비; 4: 앞발의 마비.

래트를 대조군(유화액 + MBP), 모의(유화액), 처리된 것(유화액 + MBP + 참 기름 중의 ST1959 0.25, 0.50, 1.58 또는 5.00 ㎎/5 ㎖/㎏, 피하)을 포함한 연구 그룹들로 랜덤하게 할당하였다. ST1959를 면역화 후 3 내지 22 일까지 매일 투여하였다.

대조용 동물들은 면역화 후 10 일째부터 단일 상의 EAE의 임상적 징후를 나타내었고 22 일 후에는 완전히 회복되었으며; ST1959는 질병의 중증도, 발병률 및 개시(도 7, 8)를 4 개의 상이한 용량들에서 감소시켰다.

실시예 5

실험적인 자가면역 포도막염(EAU)

수컷 루이스 래트(7 주된 것)를 할란으로부터 구입하였다. 열 사멸시킨 결핵균(Mt) H34Ra(800 μg/200 μℓ/래트)를 함유하는 불완전 프로인트 항원 보강제(200 μℓ/래트)에 유화시킨 합성 인간 망막 항원 S-Ag 125 μg/200 μℓ/래트를 각각의 뒷 발바닥에 주입함으로써 EAU를 유발시켰다. 래트에게 면역화 직후 꼬리 정맥으로 보르데텔라 백일해 독소(PBS 중의 1 μg/300 μℓ/래트)를 제공하였다(Barton K. et al., Eye, 8, 60-65, 1994; Forrester J. V. et al., Chem. Immunol. Basel, Karger, 73, 159-185, 1999; Smith J. R. et al., Immunology and Cell Biology, 76, 497-512, 1998; Zamir E. et al., Free Radical Biology amp; Medicine, 27(1-2), 7-15, 1999).

뇌염 유발 시험감염에 이어서, 마우스를 매일 관찰하고 EAU의 임상적인 징후를 하기와 같이 기록하였다:

임상 징후 없음: 0

홍채 충혈:

낮음: 1

중간: 2

심함: 3

앞방축농:

낮음: 1

중간: 2

심함: 3

양쪽 눈에 대한 최대 누적 임상 점수: 12

래트를 대조군(유화액 + S-Ag), 모의(유화액), 처리된 것(유화액 + S-Ag + 참기름 중의 ST1959 0.50 ㎎/5 ㎖/㎏, 피하)을 포함한 연구 그룹들로 랜덤하게 할당하였다. ST1959를 면역화 후 3 내지 22 일까지 매일 투여하였다.

대조용 동물들은 면역화 후 10 일째부터 EAU의 임상적 징후를 나타내었고 20 일 후에는 나아졌으나 완전히 회복되지는 않았으며; ST1959는 0.50 ㎎/5 ㎖/㎏에서 질병의 중증도를 감소시켰다(도 9).

(57) 청구의 범위

청구항 1.
자가면역 질환 치료용 약제의 제조를 위한 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸의 용도.

청구항 2.
제 1 항에 있어서, 질환이 다발성 경화증인 용도.

청구항 3.
제 1 항에 있어서, 질환이 전신 홍반성 루프스인 용도.

청구항 4.
제 1 항에 있어서, 질환이 류마티스성 관절염인 용도.

청구항 5.
제 1 항에 있어서, 질환이 포도막염인 용도.

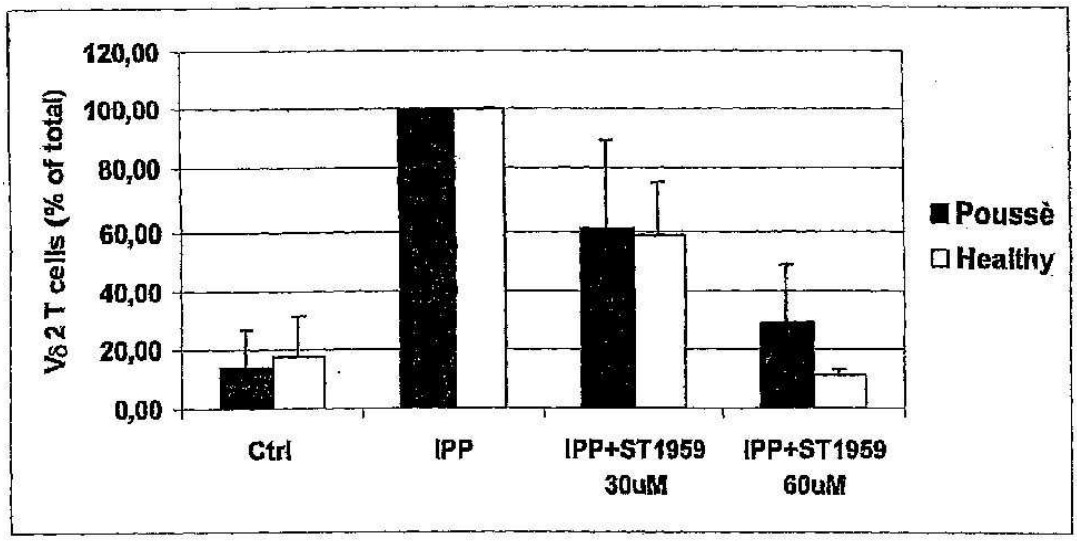
청구항 6.
γδ T 세포 억제용 약제의 제조를 위한 (3-(2-에틸페닐)-5-메톡시페닐)-1H-[1,2,4]-트리아졸의 용도.

청구항 7.
제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 약제가 포유동물용인 용도.

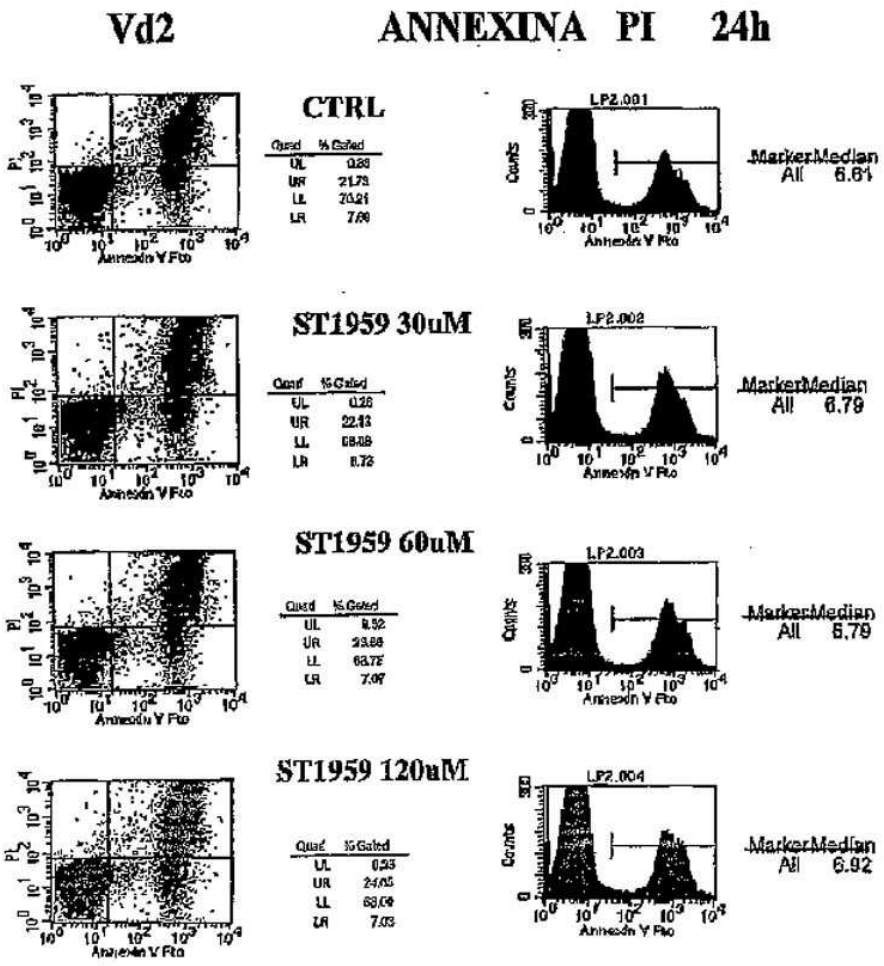
청구항 8.
제 7 항에 있어서, 포유동물이 인간인 용도.

도면

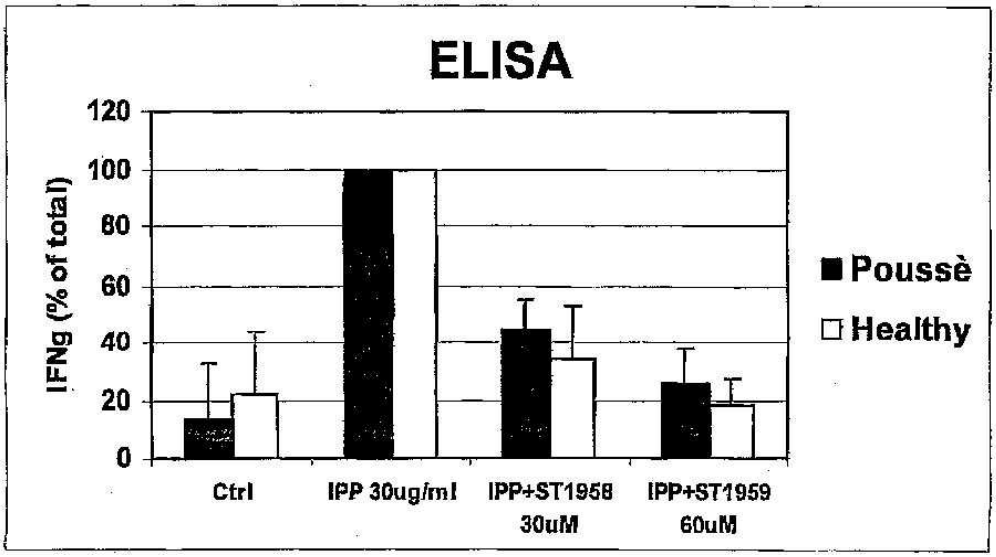
도면1



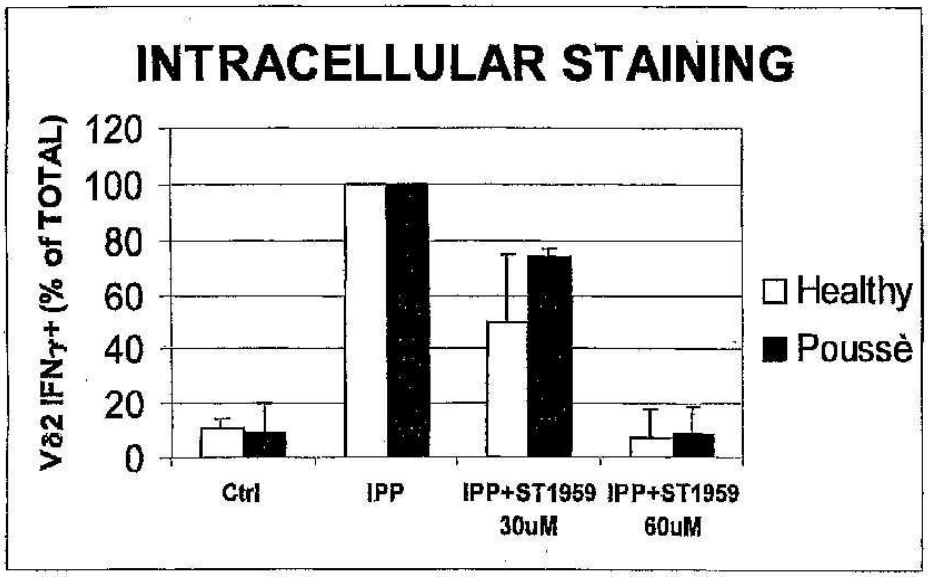
도면2


Vd2
ANNEXINA PI 24h
CTRL
ST1959 30uM
ST1959 60uM
ST1959 120uM
MarkerMedian
All 6.79
All 6.92

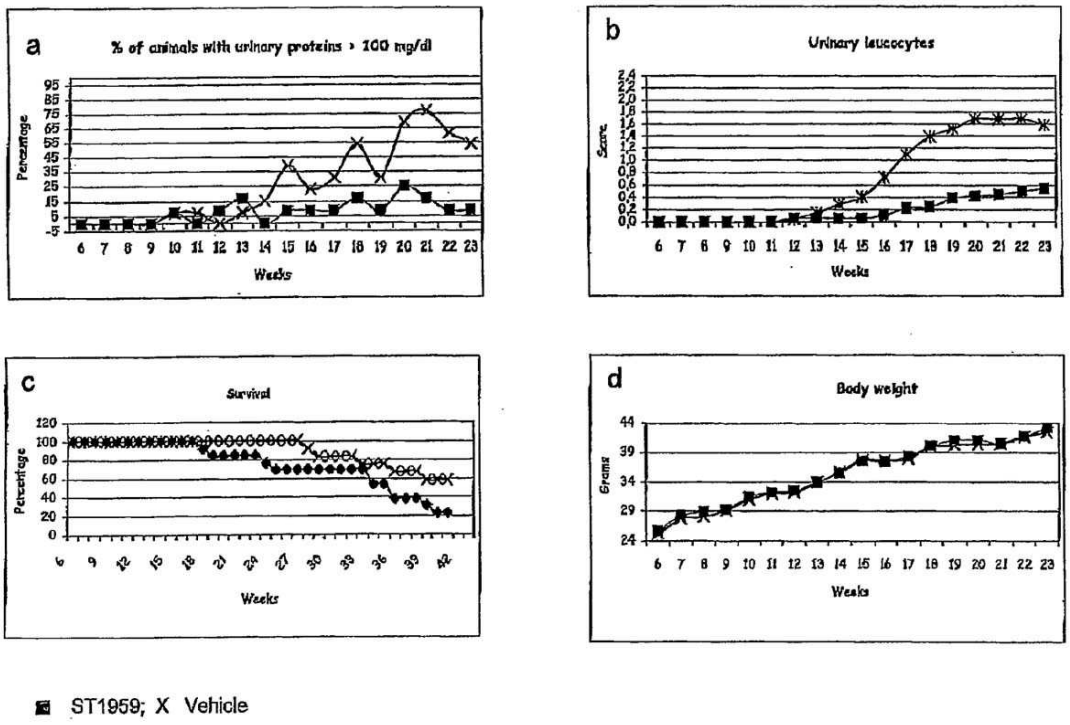
도면3


ELISA
IFNg (% of total)
120
100
80
60
40
20
0
Ctrl
IPP 30ug/ml
IPP+ST1958 30uM
IPP+ST1959 60uM
Poussè
Healthy

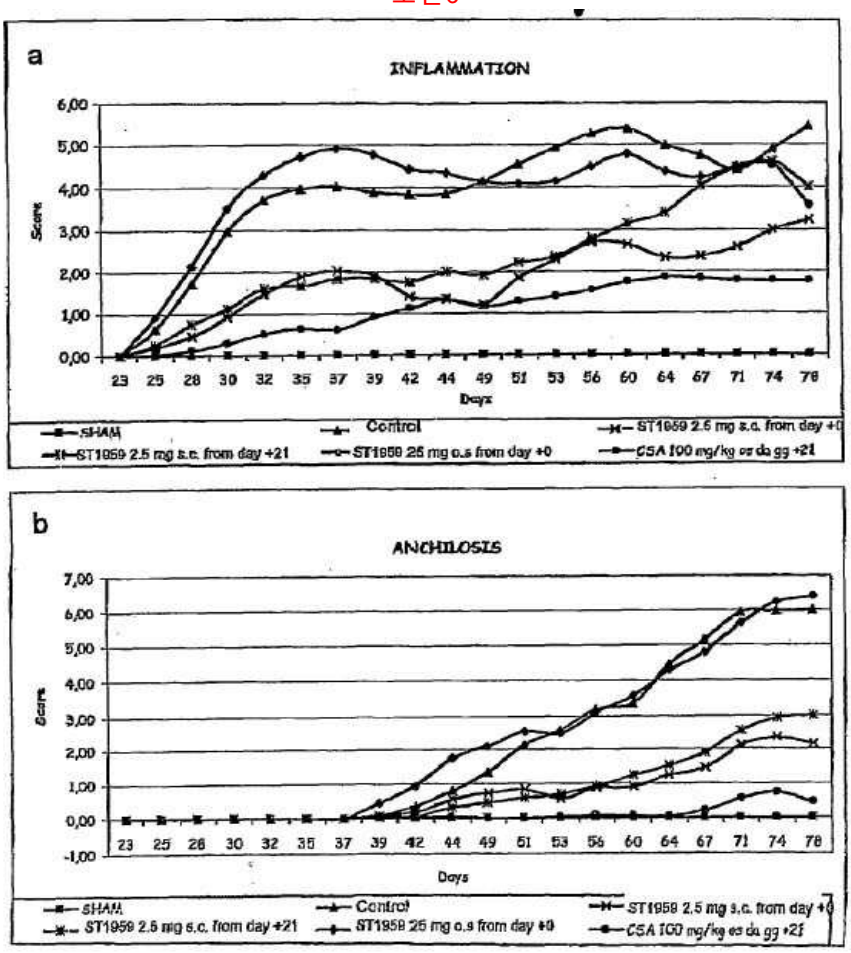
도면4


INTRACELLULAR STAINING
Vδ2 IFN-γ++ (% of TOTAL)
120
100
80
60
40
20
0
Ctrl
IPP
IPP+ST1959 30uM
IPP+ST1959 60uM
Healthy
Poussè

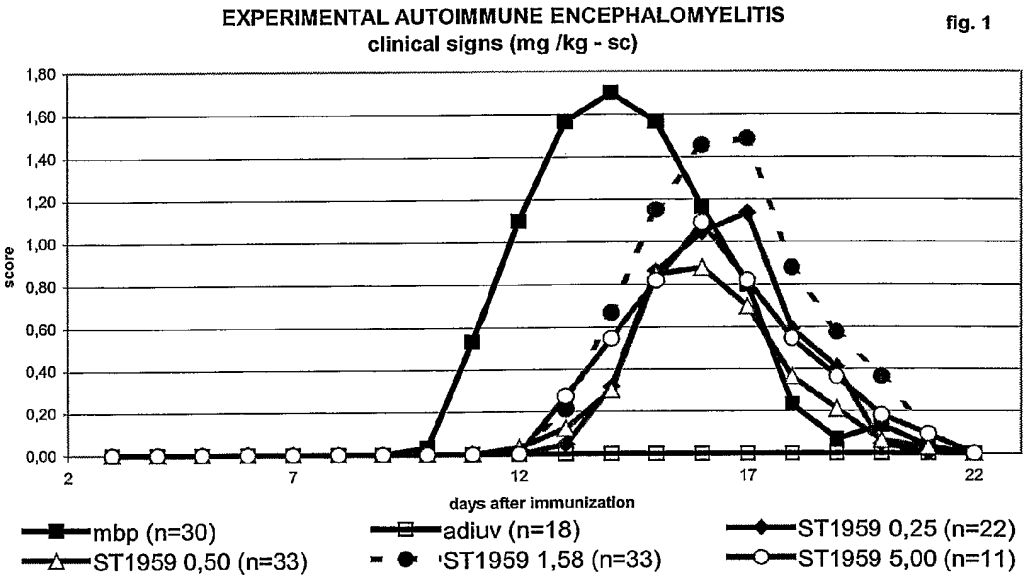
도면5


a
% of animals with urinary proteins > 100 mg/dl
Percentage
Weeks
b
Urinary leucocytes
Score
Weeks
c
Survival
Percentage
Weeks
d
Body weight
Grams
Weeks
ST1959; X Vehicle

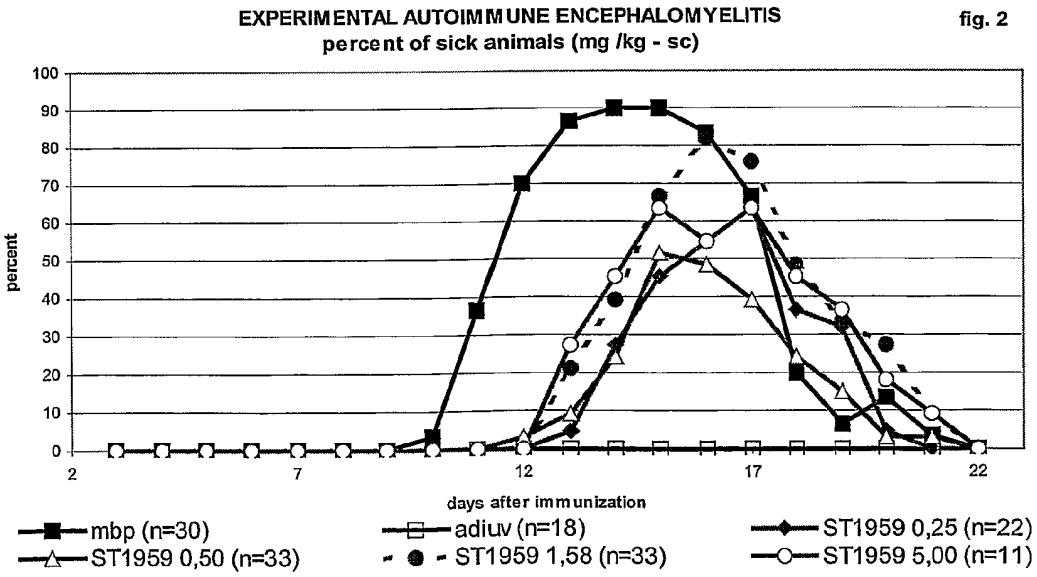
도면6


a
INFLAMMATION
Score
Days
SHAM
Control
ST1959 2.5 mg s.c. from day +0
ST1959 2.5 mg s.c. from day +21
ST1959 25 mg o.s from day +0
CSA 100 mg/kg os da gg +21
b
ANCHILOSIS
Score
Days
SHAM
Control
ST1959 2.5 mg s.c. from day +0
ST1959 2.5 mg s.c. from day +21
ST1959 25 mg o.s from day +0
CSA 100 mg/kg os da gg +21

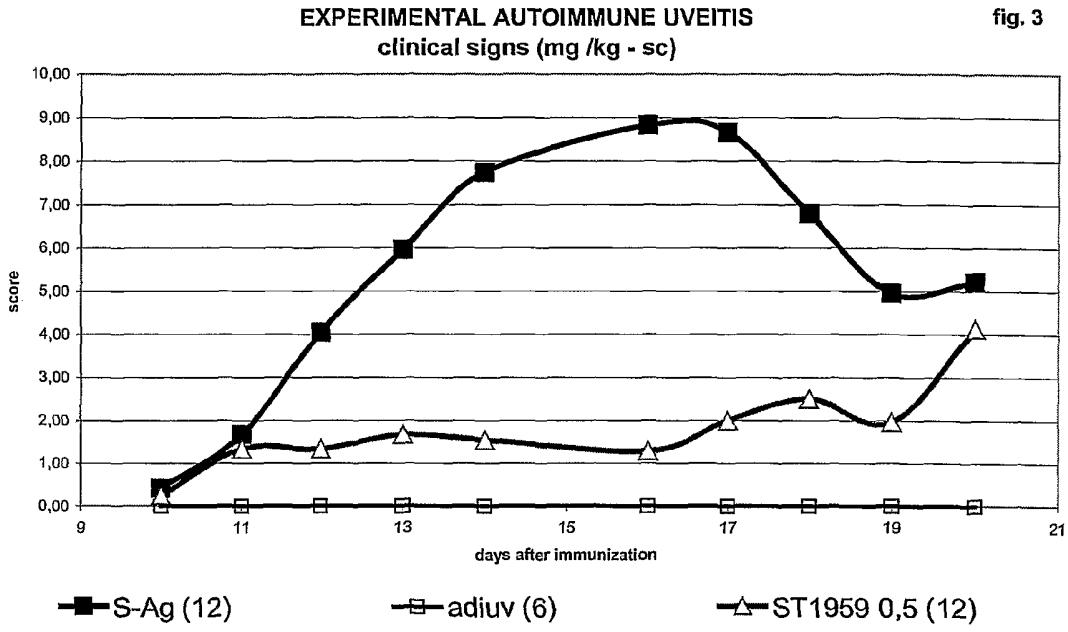
도면7


EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS
clinical signs (mg /kg - sc)
fig. 1
score
days after immunization
mbp (n=30)
adiuv (n=18)
ST1959 0,25 (n=22)
ST1959 0,50 (n=33)
ST1959 1,58 (n=33)
ST1959 5,00 (n=11)

도면8


EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS
percent of sick animals (mg /kg - sc)
fig. 2
percent
days after immunization
mbp (n=30)
adiuv (n=18)
ST1959 0,25 (n=22)
ST1959 0,50 (n=33)
ST1959 1,58 (n=33)
ST1959 5,00 (n=11)

도면9


EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE UVEITIS
clinical signs (mg /kg - sc)
fig. 3
score
days after immunization
S-Ag (12)
adiuv (6)
ST1959 0,5 (12)