



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0049183  
(43) 공개일자 2012년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/665* (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-7028281  
(22) 출원일자(국제) 2010년04월28일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2011년11월28일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2010/000960  
(87) 국제공개번호 WO 2010/125445  
국제공개일자 2010년11월04일  
(30) 우선권주장  
61/173,416 2009년04월28일 미국(US)

(71) 출원인  
파맥시스 엘티디  
호주, 뉴 사우스 웨일즈 2086, 프렌치스  
포레스트, 로드보로우 로드 2/10  
(72) 발명자  
로버트슨, 알랜 디  
호주, 뉴사우스 웨일즈 2086, 프렌치스 포레스트,  
로드보로우 로드 10 유니트 2  
실바, 디에고  
호주, 뉴사우스 웨일즈 2086, 프렌치스 포레스트,  
로드보로우 로드 10 유니트 2  
맥도날드, 이안 알렉산더  
호주, 뉴사우스 웨일즈 2086, 프렌치스 포레스트,  
로드보로우 로드 10 유니트 2  
(74) 대리인  
김성남

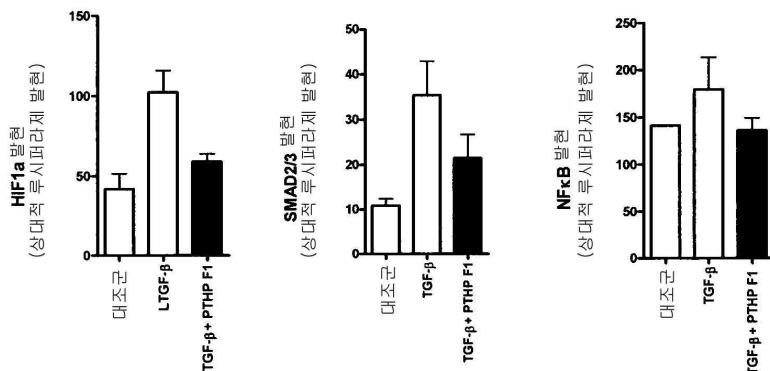
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 창상 및 섬유성 장애의 치료를 위한 포스포테트라하이드로피란 화합물

### (57) 요약

본 발명은 포스포테트라하이드로피란 화합물을 이용하여 섬유성 및 반흔성 장애, 예를 들어, 폐 섬유증, 외과적 처치 관련 섬유증, 창상 치유 장애, 반흔 형성, 경화성 장애, 눈의 섬유성 장애, 눈의 치유 장애, 수술 후 눈의 섬유증, 녹내장, 힘줄의 반흔성 장애, 관절의 반흔성 장애, 신장의 간질성 섬유증, 신사구체 섬유증 및 신장의 세뇨관 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다.

**대 표 도 - 도1**

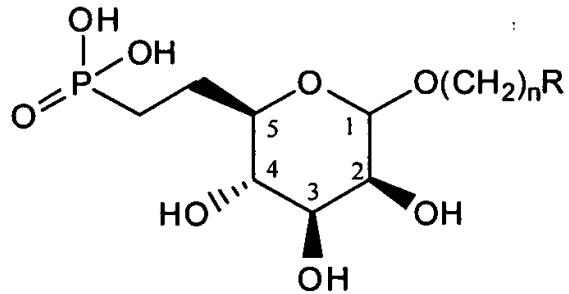


## 특허청구의 범위

### 청구항 1

개체에서 염증 및 창상 치유 과정을 조절하는 방법으로서, 하기 화학식 1을 갖는 유효량의 포스포테트라히드로피란 화합물, 포스포테트라히드로피란 화합물의 염 또는 포스포테트라히드로피란 화합물의 포스포네이트 프로드럭 및 허용 가능한 약학적 담체를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법으로서:

[화학식 1]



상기 식에서  $n$ 은 0 내지 3의 정수이고,  $-O(CH_2)_nR$  기는 축 또는 적도위치에 있고, R은 저급 알킬, 또는 임의적으로 치환된 헤테로아릴 또는 임의적으로 치환된 아릴인데 이 경우의 치환체는  $-Cl$ ,  $-F$ ,  $CF_3$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-(CH_2)_mCO_2R^1$ ,  $-(CH_2)_mOR^2$ ,  $-(CH_2)_mCONHR^2$ ,  $-(CH_2)_mNHR^2$ , 및  $-(CH_2)_mCONR^2R^3$ 로 이루어진 군에서 선택되는데, 여기서의  $m$ 은 0 내지 3의 정수이고,  $R^1$ 은 H, 알킬 및 아릴로 이루어진 군에서 선택되고,  $R^2$  및  $R^3$ 는 H, 알킬, 아릴 및 아실로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되는 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 개체는 과도한 콜라겐, 피브로넥틴 및/또는 다른 세포외 기질 성분의 침착과 관련이 있는 질환 또는 장애를 갖는 방법.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 질환 또는 장애는 폐 섬유증, 녹내장, 경피증, 간 섬유증, 심장 섬유증, 신장 섬유증 또는 신부전인 방법.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 창상 치유 과정은 외과적 처치 이후에 일어나는 방법.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 외과적 처치는 눈 수술을 포함하는 방법.

### 청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 외과적 처치는 내장 및 조직에 대하여 수행되는 방법.

**청구항 7**

제 4 항에 있어서,  
상기 외과적 처치는 상피층에 대하여 수행되는 방법.

**청구항 8**

제 7 항에 있어서,  
상기 외과적 처치는 켈로이드 형성을 초래할 수 있는 방법.

**청구항 9**

제 7 항에 있어서,  
상기 외과적 처치는 미용 및 성형 수술과 관련이 있는 방법.

**청구항 10**

제 4 항에 있어서,  
상기 외과적 처치는 힘줄 손상을 회복하기 위한 것인 방법.

**청구항 11**

제 1 항에 있어서,  
상기 조성물이 염증 및 창상 치유 부위에 투여되는 방법.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서,  
상기 조성물이 폐에 직접 투여되는 방법.

**청구항 13**

제 11 항에 있어서,  
상기 조성물이 눈에 직접 투여되는 방법.

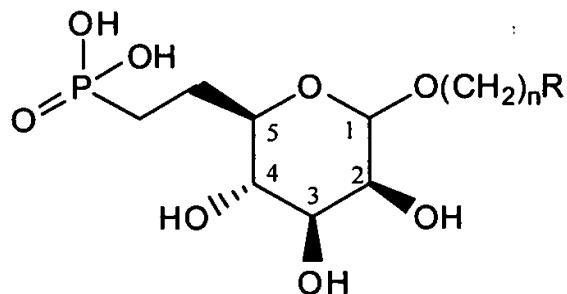
**청구항 14**

제 11 항에 있어서,  
상기 조성물이 외과적 처치 이후에 창상에 직접 투여되는 방법.

**청구항 15**

폐 섭유증을 치료하는 방법으로서, 이러한 치료를 필요로 하는 개체에게, 하기 화학식 1의 화합물, 화학식 1의 화합물의 나트륨염, 화학식 1의 화합물의 포스포네이트 프로드럭을 포함하는 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법으로서:

[화학식 1]



상기 식에서  $n$ 은 0 내지 3의 정수이고,  $-O(CH_2)_nR$  기는 축 또는 적도위치에 있고, R은 저급 알킬, 또는 임의적으로 치환된 헤테로아릴 또는 임의적으로 치환된 아릴인데 이 경우의 치환체는  $-Cl$ ,  $-F$ ,  $CF_3$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-(CH_2)_mCO_2R^1$ ,  $-(CH_2)_mOR^2$ ,  $-(CH_2)_mCONHR^2$ ,  $-(CH_2)_mNHR^2$ , 및  $-(CH_2)_mCONR^2R^3$ 로 이루어진 군에서 선택되는데, 여기서의  $m$ 은 0 내지 3의 정수이고,  $R^1$ 은 H, 알킬 및 아릴로 이루어진 군에서 선택되고,  $R^2$  및  $R^3$ 는 H, 알킬, 아릴 및 아실로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되는 방법.

#### 청구항 16

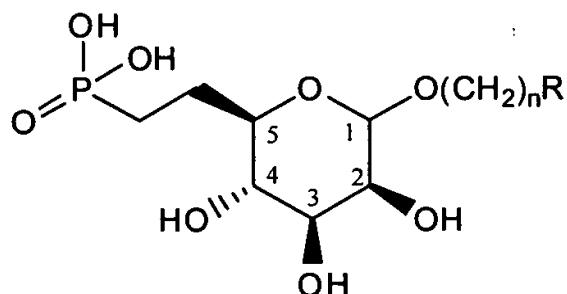
제 15 항에 있어서,

상기 개체는 특발성 폐 섬유증이나 폐의 다른 섬유성 장애로 고생하는 개체인 방법.

#### 청구항 17

폐 섬유증을 치료하는 방법으로서, 이러한 치료를 필요로 하는 개체에게, 하기 화학식 1의 화합물, 화학식 1의 화합물의 나트륨염, 화학식 1의 화합물의 포스포네이트 프로드럭 외에도, N-아세틸 시스테인, 아미노구아닌, 항-VEGF 항체, 바티마스탈트(Batimastat), 보센탄(Bosentan), 텍사메타손, 디플루오로메틸오르니틴, 이타네셉트(Etanercept), 게피티니브(Gefitinib), 이마티니브(Imatinib), 메틸프레드니솔론, 펜톡시펜린(Pentoxifylline), 피페니돈(Pirfenidone), 프레드니솔론, 로시클리타존(Rosiglitazone), TGF-베타 항체, TNF-알파 항체 및 빈블라스틴(Vinblastine)중에서 선택된 한 종의 화합물을 포함하는 유효량의 조성물을 병용 투여하는 것을 포함하는 방법으로서:

[화학식 1]

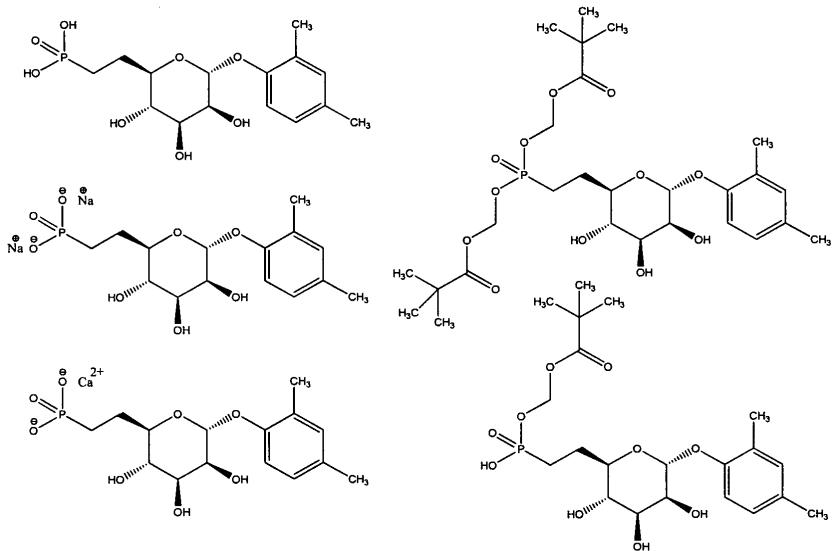


상기 식에서  $n$ 은 0 내지 3의 정수이고,  $-O(CH_2)_nR$  기는 축 또는 적도위치에 있고, R은 저급 알킬, 또는 임의적으로 치환된 헤테로아릴 또는 임의적으로 치환된 아릴인데 이 경우의 치환체는  $-Cl$ ,  $-F$ ,  $CF_3$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-(CH_2)_mCO_2R^1$ ,  $-(CH_2)_mOR^2$ ,  $-(CH_2)_mCONHR^2$ ,  $-(CH_2)_mNHR^2$ , 및  $-(CH_2)_mCONR^2R^3$ 로 이루어진 군에서 선택되는데, 여기서의  $m$ 은 0 내지 3의 정수이고,  $R^1$ 은 H, 알킬 및 아릴로 이루어진 군에서 선택되고,  $R^2$  및  $R^3$ 는 H, 알킬, 아릴 및 아실로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되는 방법.

## 청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 한 항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 하기의 것들로 이루어진 군에서 선택되는 방법:



## 청구항 19

제 1 항 내지 제 17 항 중 한 항에 있어서,

상기 개체가 인간인 방법.

## 청구항 20

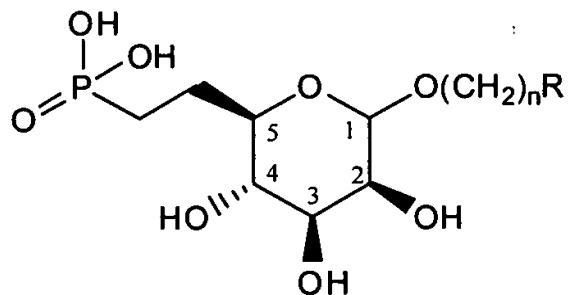
제 18 항에 있어서,

상기 개체가 인간인 방법.

## 청구항 21

폐 섬유증의 치료를 위한 약물의 제조에서 하기 화학식 1의 화합물의 용도로서:

[화학식 1]



상기 식에서 n은 0 내지 3의 정수이고,  $-O(CH_2)_nR$ 기는 축 또는 적도위치에 있고, R은 저급 알킬, 또는 임의적으로 치환된 헤테로아릴 또는 임의적으로 치환된 아릴인데 이 경우의 치환체는  $-Cl$ ,  $-F$ ,  $CF_3$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-(CH_2)_mCO_2R^1$ ,  $-(CH_2)_mOR^2$ ,  $-(CH_2)_mCONHR^2$ ,  $-(CH_2)_mNHR^2$ , 및  $-(CH_2)_mCONR^2R^3$ 로 이루어진 군에서 선택되는데, 여기서의 m은 0 내지 3의 정수이고,  $R^1$ 은 H, 알킬 및 아릴로 이루어진 군에서 선택되고,  $R^2$  및  $R^3$ 는 H, 알킬, 아

릴 및 아실로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되는 용도.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 섬유성 및 반흔성 장애, 예를 들어, 폐 섬유증, 외과적 처치 관련 섬유증, 창상 치유 장애, 반흔 형성, 경화성 장애, 눈의 섬유성 장애, 눈의 치유 장애, 수술 후 눈의 섬유증, 녹내장, 힘줄의 반흔성 장애, 관절의 반흔성 장애, 신장의 간질성 섬유증, 신사구체 섬유증 및 신장의 세뇨관 섬유증을 치료하기 위한 포스포테트라히드로피란(phosphotetrahydropyran) 화합물 및 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

섬유성 과정은 넓은 범위의 생리학적 장애와 관련이 있다. 반흔 형성(scarring)은 신체의 거의 모든 장기 및 조직, 예를 들어 눈, 폐, 중추신경계, 근육, 관절, 신장 등에서 문제가 될 수 있다. 또한, 유사한 과정은 내과 및 외과의 많은 영역에서 공통적인 다른 섬유성 장애를 초래할 수 있다. 예를 들어, 복부 수술은 흔히 복막내 섬유성 유착 및/또는 협착을 초래하는 반면에, 섬유성 망막병증, 녹내장 수술 후 반흔 형성, 공막 지주그물(trabecular meshwork)의 섬유증, 증식성 유리체 망막증, 켈로이드 및 비대성 반흔, 피부 질환(예, 표피 박리증, 공피증), 전신성 경화증, 폐 섬유증, 사구체 신염, 세뇨관 간질성 신장 섬유증, 심근 경색 후 심근 섬유증, 예를 들어 뇌졸중 또는 신경외과적 질환 후 중추신경계의 반흔형성 및 간경변증은 중요한 의학적 문제이다. 부적당한 반흔 형성은 힘줄 손상 후 관절 기능을 약화시킬 수 있다.

[0003]

성인의 창상 치유는 급성 염증, 수축 및 콜라겐 침착, 신속한 창상 봉합 및 감염의 최소화를 위해 최적화될 수 있는 반응에 의해 특징지어진다. 간략히 말해서, 인체 또는 임의의 동물의 신체가 상처를 받는 경우, 그 상처를 치유하기 위해 복잡한 생화학적 과정들이 일어난다. 이러한 과정들은 증식 단계에 관여하는 세포들의 이동 및 분열을 초래하는 시토카인의 방출로 이어지는 염증 단계에서 시작한다. 이러한 단계에서, 콜라겐 침착, 육아 조직 형성 및 창상 수축이 관찰된다. 섬유아세포가 성장하여, 콜라겐 및 피브로네틴을 분비함으로써 새롭고 일시적인 세포외 기질(ECM)을 형성한다. 상피 세포가 이동하여 상처를 덮은 다음, 그 상처는 근섬유아세포의 수축에 의해 더욱 작아진다. 최종적으로 리모델링 단계에서, 콜라겐이 리모델링되고 긴장선을 따라 다시 정렬되고, 더 이상 필요하지 않게 되는 세포는 세포자멸사를 통해 제거된다.

[0004]

염증 및 전섬유성 분자는 상피 세포의 간엽 세포(EMT)로의 전환을 유도하여, 섬유아세포 및 근섬유아세포의 축적, 섬유형성 및 활성화 간엽 세포의 이동을 촉진하여 섬유성 병소를 팽창시킨다. 이러한 세포의 이형분화 과정은 주로 형질전환 성장 인자-베타(TGF-beta)에 의해 조절된다.

[0005]

대부분의 경우, 창상 치유는 잘 구성된 반흔 조직을 초래한다. 그러나, 이러한 과정(cascade)에서의 하나 이상의 단계가 잘 조절되지 않는 경우, 건강 및 외관에 대한 심각한 결과가 초래될 수 있다. 이러한 결과는 예를 들어 경피증, 특발성 폐 섬유증 및 많은 관련 장애에서 관찰되는 콜라겐 및 피브로네틴의 비정상적인 침착으로 인해 발생할 수 있다. 또한, 눈 수술, 복막 수술, 척수 수술을 비롯한 외과적 처치, 및 켈로이드 형성을 초래하는 표면 창상의 치유 후 비정상적인 조직 회복이 일어날 수 있다. 일부의 경우에는 정상적인 조직 회복을 약화시킬 필요가 있을 수 있는데, 예를 들어 눈으로부터 수성 체액을 배출하기 위한 외과적 처치 후, 반흔 형성 과정은 작은 배액 구멍을 조기에 폐쇄시킬 수 있다. 당뇨병 및 고혈압을 비롯한 전신 질환은 신사구체 및 신세뇨관 세포의 손상을 초래하여 신장 섬유증 및 신부전을 초래할 수 있다.

[0006]

반흔 형성 과정은 TGF-베타에 의해 개시된 현상으로서 생화학적인 견지에서 이해될 수 있다. TGF-베타는 잠복성 형질전환 성장 인자-베타(LTGF-beta)로부터 유래된다. 따라서, LTGF-베타를 활성화하여 TGF-베타를 활성화하는 것은 치유 및 섬유성 과정에서 중요한 단계이다. LTGF-베타 결합 단백질(LTBP)에 결합될 수 있는 잠복 관련 웨티드(LAP)에 결합된 TGF-베타를 포함하는 LTGF-베타는 LAP에서 M6P 변형 아미노산의 인식을 통해 세포 표면 양이온 비의존성 만노오스-6-포스페이트(CI-M6P)에 결합한다. 이러한 결합은, 궁극적으로 TGF-베타의 방출을 초래하는 일련의 과정에 의한 LTGF-베타의 활성화를 가능하게 한다.

[0007]

LTGF-베타는 CI-M6P 수용체에 결합하기 때문에, CI-M6P 수용체 질항근은 CI-M6P 수용체 결합 부위를 두고 LAP의 M6P-함유 탄수화물과 경쟁함으로써 치유 과정에서 중요한 역할을 한다. 이러한 방식으로 작용함으로써, 포스포테트라히드로피란(phosphotetrahydropyran) CI-M6P 수용체는 M6P 수용체에의 LTGF-베타의 결합을 약화 또는 완전히 억제할 수 있고, 활성 TGF-베타의 수준을 감소시킬 수 있다.

- [0008] 결합 조직 성장 인자(CTGF)는 이러한 세포 과정에서 중요한 매개체인 것으로 판단되는 분비된 시토카인이다. 특히, CTGF는 콜라겐 및 피브로넥틴의 침착을 증가시킴으로써 세포외 기질 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. CTGF의 과도발현은 세포외 기질 성분의 과도한 축적이 있는 경피증, 섬유증식성 질환 및 반흔 형성과 같은 상태에서 주요한 원인 인자로서 관여하여 왔다.
- [0009] 형질전환 성장 인자 베타(TGF-beta) 및 결합 조직 성장 인자(CTGF)는 창상 치유의 생체 내 모델에서 배위 방식으로 과도 발현되는 것으로 보고되어 왔으므로, TGF-베타에 의해 촉진된 CTGF 발현이 창상 치유에 관여하는 것을 알 수 있다. 피부 섬유증의 마우스 모델에서, TGF-베타 또는 CTGF의 피하 주사는 단독 투여시에는 작은 효과만을 갖지만, 병용 투여시에는 더욱 지속적인 섬유성 반응이 관찰되었다. 따라서, CTGF는 반흔 조직의 생성을 강화하도록 작용하는 TGF-베타의 하부 효과 인자(downstream effector)로 작용할 가능성이 있다. 또한, 안티센스 mRNA 또는 CTGF-결합 항체에 의한 CTGF 발현의 억제는 TGF-베타에 노출된 섬유아세포에서 콜라겐의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 왔으므로, CTGF의 유도는 TGF-베타에 대한 섬유성 반응에 필수적이라는 것을 알 수 있다. CTGF의 억제는 TGF-베타에 의한 자극에 대한 점진적인 섬유성 반응을 방지할 수 있다.
- [0010] 염증, 고혈당, 저산소증 또는 다른 유형의 손상에 의해 유발된 TGF-베타 수준의 증가는 세포의 활성화, 증식 및 이동을 초래하는 여러 가지 세포 및 분자 과정의 조절에 관여한다. TGF-베타는 복잡하고 정황 의존적인 누화(context-dependent crosstalk) 세포 신호전달 경로에서 MAPK, PI3K/Akt, Wnt, Hedgehog, Notch 및 HIF 경로와의 분자 상호작용을 조절한다.
- [0011] 이러한 섬유성 질환 및 반흔형성 장애들 중 많은 것은 오늘날의 약물로는 매우 불충분하게 치료되는데, 한가지 예는 특발성 폐 섬유증(IPF)이다. IPF는 불충분한 기체 교환 및 마른 기침으로 인해 호흡곤란을 초래하는 만성 진행성 간질성 폐 섬유증에 의해 특징지어지는 알려지지 않은 기원의 만성 폐질환이다. 고전적으로 성인의 질환인 IPF는 예후가 나쁘고 효과적인 치료법이 입증되지 않았다. IPF는 보통 진단 후 3년 내에 사망으로 이어지는 데, 폐심증 및 심부전이 사망의 주요 원인이다. 병리조직학적 관찰 결과, 활성화된 섬유아세포에 의한 콜라겐, 피브로넥틴 및 다른 ECM 성분들의 과도 생성과 함께 비정상적인 상피 회복 및 간질성 폐렴을 동반한 폐포 손상이 확인된다.
- [0012] IPF의 발생은 흡연 및 실리카 또는 가축에의 노출과 강하게 관련이 있어왔다. 다른 연구 결과는 바이러스 감염과의 상관관계를 암시하여 왔다. 상기 질병의 병인은 이해된 채로 남아있지만, 그 별명은 조직 재생 및 창상 치유 동안 일반적으로 확인되는 과정과 유사한 섬유아세포 증식 외에도 전염증성 매개체의 방출을 초래하는 폐포 상피세포 손상에 의해 개시되는 모델을 따르는 것으로 보인다. IPF 환자의 경우, 폐손상 주기가 지속되고 치유 과정이 변화되지 않아서, 진행성 섬유증 및 정상 폐조직 구조의 손실이 초래된다.
- [0013] 폐포 조직의 급성 염증이 IPF의 첫 번째 단계인 것으로 제안되어 왔다. 초기 손상에서 시작되는 이러한 염증성 과정은 호중구의 급성 동원(recruitment)에 의해 특징지어지고 단세포, 임파구 및 다른 면역 세포의 폐포 종으로의 이동을 초래한다. 이는 염증성 매개체의 방출을 동반한 상피 및 섬유아세포 활성화를 유도하는데, 이때 TGF-베타, TNF 및 혈소판 유래 성장 인자가 중요한 역할을 한다. 감수성이 강한 개체의 경우, 급성 염증은 완화되지 않고 만성 염증성 변화 대신에, 비정상적인 폐포 조직 수복 및 리모델링을 유발하여 진행성 섬유증을 초래한다. TGF-베타 및 TNF를 비롯한 섬유화성(fibrogenic) 사이토카인은 폐 조직에서 근섬유아세포의 이동 및 축적을 유도하여, 세포외 기질 침착, 콜라겐 축적 및 IPF의 섬유성 성분의 다른 특징을 촉진한다.
- [0014] IPF로 고생하는 환자에서 섬유소 용해성 및 반흔 형성 과정의 후유증 외에도 초기 염증성 손상을 조절하기 위한 약물이 긴급히 필요하다.
- [0015] 눈은 손상 및 조직 파열을 받기 쉽고 빈번하게 수술을 받는 매우 민감한 기관이다. 모든 경우, 비정상적인 창상 치유는 눈의 장애를 초래할 수 있는데, 이러한 장애는 전술한 염증 및 세포 과정과 관련이 있다. 잔기등 그물(TM)의 영역에서 세포외 기질 물질의 과도한 축적은 녹내장의 형태에서 관찰되는데, 이러한 증가는 수성 유출물에 대한 저항성을 증가시켜서 안압(IOP)을 상승시키는 것으로 판단된다.
- [0016] TM은 정상 IOP를 유지하는데 필요한 정상적인 각도로 각막과 홍채의 사이에 위치하는 것으로, 지주 세포, 연결 조직 및 세포외 기질을 포함하는 복잡한 조직이다. 눈의 형태를 유지하고 압력 구배를 제공하여 무혈관성 각막 및 수정체로의 수성 체액의 흐름을 가능하게 하기 위하여 충분한 IOP가 필요하다. 녹내장의 경우에 일반적으로 존재하는 과도한 IOP는 시신경에 유해한 영향을 미치고, 망막 신경절 세포 및 축삭을 손상시키고, 치료되지 않는 경우 시력 상실 및 실명을 초래한다. 세계적으로 녹내장은 비가역적인 시력 손상 및 실명의 주요 원인들 중 하나이다.

- [0017] 대부분의 형태의 녹내장은 수성 체액의 흐름에서 해부학적, 생화학적 또는 생리학적 근거를 갖는 장애의 결과이다. 만성 또는 단순 녹내장이라고도 알려진 원발성 개방각 녹내장(POAG)은 미합중국에서 모든 녹내장의 대부분을 차지한다. POAG는 눈으로부터 유체의 배액에 대한 비정상적으로 높은 저항성을 초래하는 TM의 병리학적 변화에 의해 특징지어진다. 이러한 저항성의 결과 IOP가 증가된다.
- [0018] 오늘날의 항녹내장 요법은 수성 체액 형성을 억제하거나 수성 유출액을 증가시키기 위한 약물을 사용하여 IOP를 저하시키고 있다. 불운하게도, 약물 요법만을 사용하는 것은 일부 환자의 경우 안압을 충분히 조절하는데 충분하지 않은데, 수성 체액의 유출을 위한 정상 통로가 심하게 차단된 경우에 특히 그러하다. 이러한 환자는 수성 체액의 정상 유출을 회복시켜서 그 안압을 정상화하거나 적어도 조절하기 위한 외과적 개입을 필요로 할 수 있다. 수성 체액의 유출은 섬유주절제술, 절개후부공막절제술, 원형절제술 및 열옹고막절개술과 같은 여러 가지 눈의 외과적 처치를 통해 개선될 수 있다. 이러한 외과적 처치는 녹내장 여과 수술(GFS)로 통칭된다.
- [0019] GFS, 특히 섬유주절제술이라고도 알려진 보호 공막절개술(guarded sclerostomy)은 환자 질병의 장기 관리에 있어서 중요한 사항이다. 통상적으로, 녹내장 수술은, 조절되지 않은 안압(IOP)을 가지면서 의학적 치료가 최대로 허용되는 환자 또는 레이저 섬유주성형술에 실패한 후의 환자에 대하여 실시되고, 외과의사는 안압이 충분히 조절되지 않는 경우에 녹내장 손상으로 인해 발생할 수 있는 가능한 시력 손실을 제어하도록 수술 후 반흔 형성에 대하여 크게 유의할 필요가 있다.
- [0020] 일반적으로, 녹내장 여과 수술에 이용되는 과정은 수성 체액의 유출을 촉진하기 위하여 누관을 새로이 만드는 것을 포함한다. 여러 가지 과정들이 이용되어 왔지만, 그 과정들은 대표적으로 수술 부위에서 결막의 상승부(elevation)를 만드는 것을 포함한다. 이러한 상승부는 일반적으로 "여과포"(filtering bleb)라고 나타낸다. 양호한 안압 조절과 가장 흔히 관련이 있는 여과포는 비혈관성이고, 낮고 평지거나 다수의 포낭 공간에 의해 높여진다. 연구 결과, 여과포내의 수성 유체는 일반적으로 결막을 통해 여과되고 눈물막과 합쳐지거나, 혈관 또는 혈관주변 결막 조직에 의해 흡수된다는 것이 암시되어 왔다. 녹내장 여과 수술은 초기에는 일반적으로 성공적이지만, 수술 동안에 만든 누관을 궁극적으로 차단할 수 있는 반흔 조직이 흔히 형성된다. 실패한 누관에서 콜라겐의 양의 증가는 섬유아세포의 증식 및 세포외 기질 물질, 특히 콜라겐, 피브로네틴 및 글리코사미노글리칸의 관련된 생성이 관찰되었다는 것을 암시한다.
- [0021] 반흔 형성 과정을 방지하기 위하여, 항대사산물/항섬유성 약물을 사용하는 것이 녹내장 여과 수술에 대한 보조수단으로서 제안되어 왔다. 여러 가지 시험된 약물들 중에서, 하기의 것들이 현재 가장 흔히 사용되고 있다. 5-플루오로우라실(5-FU)은 세포 주기의 S 및 G2 단계에서 DNA 합성을 선택적으로 억제함으로써 작용하는 피리미딘 유사체이다. 미토마이신 C (MCC)는 DNA-의존성 RNA 합성의 억제를 통해 섬유아세포의 콜라겐 합성을 감소시킴으로써 작용하고 직접적인 세포독성 효과를 갖는다. 그러나, 오늘날의 치료법에서는 각막 상피 독성, 결막 창상 누출 빈도의 증가, 저안압 및 저안압 황반병증, 맥락막 출혈 발생의 증가, 합침된 스폰지와 결막하 조직 사이의 약물 전달의 변화성으로 인한 정확한 투여량 측정, 안내 및 안외 독성으로 이어지는 치료 부위와 떨어진 누출, 및 높은 수준의 세포자멸사를 비롯한 심각한 합병증이 있다.
- [0022] 오늘날의 약물 요법의 이러한 한계로 인해, 반흔 형성 과정의 후유증 외에도 초기 염증성 손상을 억제하여 여과포를 더욱 잘 보존하기 위한 새로운 방법이 긴급하게 필요하다.
- [0023] 또 다른 충족되지 않는 의학적 필요는 기능적, 미용적 및 심리적 장애를 유발하는 과도한 피부 반흔 형성을 억제하는 것이다. 외상, 외과적 손상 또는 화상 후 반흔을 임상적으로 관리하는 것은 치료 과정에 걸쳐서 자주 조절되는 임상 요법을 고려하는 외에도, 신체 위치 및 환자의 예전의 반흔 병력을 비롯한 반흔의 지속적인 물리적 평가를 고려하는 것을 포함한다. 비후성 반흔 및 켈로이드에 대한 인정된 통상적인 치료법은 수술, 코르티코스테로이드 주사, 방사선요법, 실리콘 젤 시이팅 및 압력 요법으로 제한된다. 비후성 반흔 및 켈로이드의 원인이 되는 생물학적 기작을 특이적으로 표적하는 치료법은 기존의 요법을 보완하고 현재의 반흔 결과를 개선할 수 있었다.
- [0024] 정상 피부 조직 및 기능의 거시적 파열로 설명되는 피부 반흔 형성은 상처 회복의 결과로서 발생하고 피부증식 성 반응으로 진행한다. 켈로이드는 최초 외상 부위의 가장자리를 지나서 성장하는데 특징이 있고, 가족성 소인과 관련이 있고, 거의 후퇴하지 않는다. 비후성 반흔은 시간에 따라 일반적으로 소산되는 위로 부풀려지는 홍반성 섬유성 병변이고 조직의 구축(contracture)과 관련이 있다.
- [0025] 창상 치유 과정이 비정상적으로 진행되는 경우의 심각한 결과를 고려하여, 그 생화학적 과정의 하나 이상의 단계들을 조절하기 위한 새로운 약물이 긴급히 필요하다. 가장 매력적인 것은 초기 및 진행중인 염증 과정 및 그

이후의 콜라겐 및 피브로넥틴 침착 모두를 조절하기 위한 방법이다. 인간 질병 및 장애가 잘 확인되는 경우, 이러한 방법은 질병 증상을 개선하는 치료 방법이다. 그러나, 이러한 방법은 외과적 개입시에 투여하여 예방적으로 사용될 수 있고 수술 후 한정된 기간 동안 사용될 수 있다.

[0026] 신장 기능 장애 및 신부전으로의 진행은 제2형 당뇨병 및 고혈압을 비롯한 만성 전신 질환의 심각한 결과이다. 제2형 당뇨병에서, 사구체 여과 기능의 장애 및 혈청 및 조직 저산소증에서 높은 포도당 수준에 의해 유발된 세뇨관 장치(tubular apparatus)의 동후화는 진행성 신장 기능 장애로 이어지고 신장 유조직에서 섬유성 조직 침착에 의해 유발되는 거의 불가피한 후기 신기능 부전으로 이어진다. 효과적인 치료제가 없기 때문에, 본 발명의 분야에서는 충족되지 않는 의학적 필요가 있다.

### 발명의 내용

#### 과제의 해결 수단

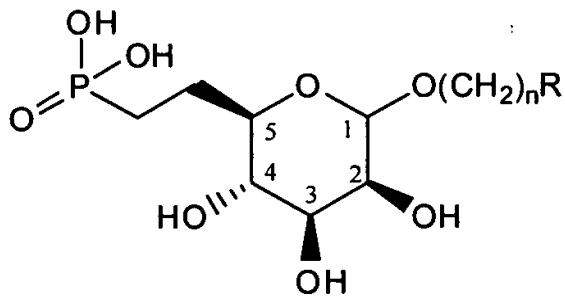
[0027] 일 양태에서, 본 발명은 창상의 치유 또는 섬유성 장애의 완화를 도모하여 반흔형성을 감소 또는 개선하는 방법으로서, 포스포테트라히드로피란 화합물을 사용하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. "창상 또는 섬유성 장애"란 반흔 또는 섬유성 조직의 형성을 초래할 수 있는 임의의 상태를 의미한다.

[0028] 일 구체예에서, 폐 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다. 치료는 정맥 내 투여, 경구 투여, 국소 투여 및 흡입과 같은 것이지만 그로 제한되지 않는 적당한 투여 경로를 이용하여, 치료를 필요로 하는 개체에게, 본 원에 기재한 바와 같은 유효량의 포스포테트라히드로피란 화합물 또는 이의 프로드럭 또는 염을 투여함으로써 달성된다. 대표적으로, 상기 투여될 화합물, 프로드럭 또는 염은 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 담체를 임의적으로 포함하는 약학적 조성물의 형태로 투여된다.

#### 화학적 구조

[0030] 본 발명의 신구 화합물이 근거하는 중심적인 화학적 실체는 하기 화학식 1에서 표시된다:

#### 화학식 1



[0031]

[0032] 상기 식에서 n은 0 내지 3의 정수이고,  $-O(CH_2)_nR$ 기는 축 또는 적도위치에 있고, R은 저급 알킬, 또는 임의적으로 치환된 헤테로아릴 또는 임의적으로 치환된 아릴인데 이 경우의 치환체는 -Cl, -F, CF<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OR<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONHR<sup>2</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHR<sup>2</sup>, 및 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>로 이루어진 군에서 선택되는데, 여기서의 m은 0 내지 3의 정수이고, R<sup>1</sup>은 H, 알킬 및 아릴로 이루어진 군에서 선택되고, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>는 H, 알킬, 아릴 및 아실로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된다.

[0033] 이러한 종류의 화합물들은 "화학식 1의 화합물"로 나타낸다. 또한, 이러한 화합물에는 상기 화학식 1의 화합물의 염, 수화물, 유도체 및 프로드럭이 포함된다.

[0034] 용어 "알킬"은 직쇄, 측쇄 또는 고리형의 완전 포화 탄화수소 기를 나타낸다. 탄소 원자들의 수가 특정되지 않는 경우, 바람직하게 상기 용어는 "저급 알킬"이라고도 나타내어 지는 C<sub>1-6</sub> 알콜을 의미한다. "알킬"기가 류적

의미, 예를 들어 "프로필" "부틸", "펜틸" 및 "헥실"등의 의미로 사용되는 경우, 각각의 용어는 이의 모든 이성질체 형태(직쇄, 측쇄 또는 고리형)를 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 바람직한 알킬은 C<sub>1-4</sub> 알킬이고, 더욱 바람직한 것은 C<sub>1-3</sub> 알킬이다.

[0035] 직쇄 및 측쇄 C<sub>1-5</sub> 알킬의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, n-펜틸 iso-펜틸, 1,2-디메틸프로필, 1,1-디메틸로필이 있다. 시클로알킬기의 예로는 시클로프로필, 시클로프로필메틸, 시클로프로필에틸, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실 등이 있다.

[0036] 본원에서 정의한 바와 같은 알킬기는 하나 이상의 치환체로 임의적으로 치환될 수 있다. 적당한 치환체로는 할로(플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도); 할로알킬(예를 들어, 트리플루오로메틸, 트리클로로메틸); 히드록시; 머캅토; 페닐; 벤질; 아미노; 알킬아미노; 디알킬아미노; 아릴아미노; 헤테로아릴아미노; 알콕시(예를 들어, 메톡시, 에톡시, 부톡시, 프로폭시, 벤질옥시 등); 티오; 알킬티오(예를 들어, 메틸 티오, 에틸 티오); 아실, 예를 들어 아세틸; 아실옥시, 예를 들어 아세톡시; 카르복시(-CO<sub>2</sub>H); 카르복시알킬; 카르복시아미드(예를 들어, -CONH-알킬, -CON(알킬)<sub>2</sub> 등); 카르복시아릴 및 카르복시아미도아릴(예를 들어, CONH-아릴, -CON(아릴)<sub>2</sub>); 시아노; 또는 케토(여기서, CH<sub>2</sub> 기는 C=O로 치환됨)를 들 수 있다.

[0037] 용어 "알콕시" 및 "아실옥시"는 산소에 의해 연결되는 때 알킬 및 아실기를 각각 나타낸다.

[0038] 본원에서 사용되는 용어 "알케닐"은 위에서 정의한 바와 같은 에틸렌계 단일불포화, 이중불포화 또는 다중불포화 알킬 또는 시클로알킬기를 비롯한, 적어도 하나의 C=C 이중 결합을 함유하는 직쇄, 측쇄 또는 고리형 기로부터 형성된 기를 나타낸다. 따라서, 시클로알케닐도 포함된다. 탄소 원자의 수가 특정되지 않는 경우, 알케닐은 바람직하게 C<sub>2-20</sub> 알케닐을 나타낸다. 더욱 바람직한 것은 저급 알케닐(C<sub>2-6</sub>)이고, 바람직하게는 C<sub>2-5</sub>, 더욱 바람직하게는 C<sub>2-4</sub> 또는 C<sub>2-3</sub>이다. 알케닐 및 시클로알케닐의 예로는 에테닐, 프로페닐, 1-메틸비닐, 부테닐, iso-부테닐, 3-메틸-2-부테닐, 1-펜테닐, 시클로펜테닐, 1-메틸-시클로펜테닐, 1-헥세닐, 3-헥세닐, 시클로헥세닐, 1-헵테닐, 3-헵테닐, 1-옥테닐, 시클로옥테닐, 1-노네닐, 2-노네닐, 3-노네닐, 1-데세닐, 3-데세닐, 1,3-부타디에닐, 1,4-펜타디에닐, 1,3-시클로펜타디에닐, 1,3-헥사디에닐, 1,4-헥사디에닐, 1,3-시클로헥사디에닐, 1,4-시클로헥사디에닐, 1,3-시클로펜타디에닐, 1,3,5-시클로헵타트리에닐 및 1,3,5,7-시클로옥타테트라에닐이 있다. 바람직한 알케닐은 직쇄 및 측쇄이다. 본원에서 정의한 바와 같이, 알케닐 기는 치환 알킬에 대하여 위에서 기재한 임의적인 치환체로 임의적으로 치환될 수 있다.

[0039] 본원에서 사용되는 용어 "알키닐"은 위에서 정의한 바와 같은 에틸렌계 단일불포화, 이중불포화 또는 다중불포화 알킬 또는 시클로알킬 기를 비롯한, 적어도 하나의 C≡C 삼중결합을 함유하는 직쇄, 측쇄 또는 고리형 탄화수소 기로부터 형성된 기를 나타낸다. 탄소원자의 수가 특정되지 않는 경우, 상기 용어는 C<sub>2-20</sub> 알키닐을 나타낸다. 더욱 바람직한 것은 저급 알키닐(C<sub>2-6</sub>)이고, 바람직하게는 C<sub>2-5</sub>, 더욱 바람직하게는 C<sub>2-4</sub> 또는 C<sub>2-3</sub> 알키닐이다. 예로는 에티닐, 1-프로피닐, 2-프로피닐, 부티닐(이성질체 포함), 및 펜ти닐(이성질체 포함)이 있다. 특히 바람직한 알키닐은 C<sub>2-6</sub> 알키닐이다. 바람직한 알키닐은 직쇄 및 측쇄 알키닐이다. 본원에서 정의한 바와 같이, 알키닐은 알킬에 대하여 위에서 정의한 임의적인 치환체로 임의적으로 치환될 수 있다.

[0040] 용어 "아실"은 직쇄 또는 측쇄 알카노일(C(O)알킬), 알케노일(C(O)알케닐) 또는 알키노일(C(O)알키닐)이다. 바람직한 알카노일은 에타노일(=아세틸), 프로파노일, n-부타노일, 2-메틸프로파노일, 펜타노일, 2,2-디메틸프로파노일, 헥사노일, 헵타노일, 옥타노일, 노나노일, 데카노일, 운데카노일, 도데카노일, 트리데카노일, 테틀라데카노일, 펜타데카노일, 헥사데카노일, 헵타데카노일, 옥타데카노일, 노나데카노일, 이코사노일이다. 알카노일의 예로는 프로페노일, 부테노일, 펜테노일, 팔미토일, 올레오일 및 리네오일이 있다. 아실의 탄화수소 사슬은 전술한 바와 같은 하나 이상의 치환체에 의해 임의적으로 추가로 치환될 수 있으므로, "아실"은 치환된 아실도 나타내려는 의미이다.

[0041] 용어 "아릴"은 방향족 탄화수소 고리계의 단일, 다핵, 공액 또는 융합 기를 나타낸다. 아릴의 예로는 페닐, 비페닐 및 나프탈이 있다. 아릴기는 본원에 정의한 바와 같은 하나 이상의 치환체로 임의적으로 치환될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 "아릴"은 치환된 아릴도 나타낸다.

[0042] 용어 "헤테로아릴"은 고리형 탄화수소 기의 하나 이상의 탄소 원자가 헤테로고리형 방향족 기를 제공하도록 헤테로원자로 치환되어 있는 단일, 다핵, 공액 또는 융합 방향족 헤테로 고리계를 나타낸다. 두 개 이상의 탄소

원자가 치환되는 경우, 그 치환 원자는 동일 헤테로원자 또는 둘 이상의 상이한 헤테로원자들 중 둘 이상일 수 있다. 적당한 헤테로원자로는 O, N, S 및 Se가 있다. 헤테로아릴의 예로는 피리딜, 4-페닐피리딜, 3-페닐피리딜, 태에닐, 푸릴, 피롤릴, 인돌릴, 이미다조릴, 옥사졸릴, 피리다지닐, 피라졸릴, 피라지닐, 티아졸릴, 피리미디닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤조푸라닐, 벤조티에닐, 푸리닐, 퀴나졸리닐, 페나지닐, 아크리디닐, 벤조옥사졸릴, 벤조티아졸릴 등이 있다. 본원에서 정의한 바와 같이, 헤테로아릴기는 위에서 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체로 임의적으로 추가로 치환될 수 있다.

[0043] 본원에서 사용되는 용어 "아르알킬"은 기 -Ar-R'을 나타내는데, 여기서 Ar은 아릴기이고 R'은 저급 알킬 또는 치환된 저급 알킬기이다. 아릴기는 다른 위치에서 예를 들어 할로, 저급 알킬, 알콕시, 알킬티오, 저급 알케닐, 저급 알키닐, 아미노, 아미도, 카르복실, 히드록실, 아릴, 아릴옥시, 헤테로고리, 치환 헤테로고리, 헤테로아릴, 치환 헤테로아릴, 니트로, 시아노, 티올, 살파미도 등으로 임의로 치환될 수 있다. 아르알킬 화합물의 예로는 이가 할로메틸기, 히드록시메틸기 또는 알콕시메틸기를 갖는 방향족 화합물이 있다.

[0044] 바람직한 구체예에서, 화학식 1에서의 R은 하나 이상의 할로젠, 알킬, 카르복시, 아미도 또는 아미노기, 예를 들어, -Cl, -F, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OR<sup>2</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONHR<sup>2</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHR<sup>2</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>(여기서, m= 0-3, R<sup>1</sup>은 H, 알킬 또는 아릴이고, R<sup>2</sup> 또는 R<sup>3</sup>는 독립적으로 H, 알킬, 아릴 또는 아실임)로 치환되는 치환된 아릴기이다.

[0045] 화학식 1에서 다른 바람직한 R기로는 폐닐; 2-메틸폐닐; 2,4-디메틸폐닐; 2,4,6-트리메틸폐닐; 2-메틸, 4-시클로폐닐; 아릴옥시알킬(예를 들어, 폐녹시메틸 또는 폐녹시에틸); 벤질; 펜에틸; 2, 3 또는 4-메톡시폐닐; 2, 3 또는 4-메틸폐닐; 2, 3 또는 4-피리딜; 2, 4 또는 5-피리미디닐; 2 또는 3-티오페닐; 2,4, 또는 5-(1,3)-옥사졸릴; 2,4 또는 5-(1,3)-티아졸릴; 2 또는 4-이미다졸릴; 3 또는 5-심트리아졸릴이 있다.

[0046] 용어 "염, 유도체 또는 프로드럭"은 개체에게 투여시 본원에 기재한 바와 같은 화합물을 발생(직접 또는 간접적으로)할 수 있는 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 에스테르, 용매화물, 수화물 또는 다른 화합물을 포함한다. 그러나, 약학적으로 허용되지 않는 염을 이용하여 약학적으로 허용가능한 염을 제조할 수 있기 때문에 이것도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 이해된다. 적당한 약학적으로 허용가능한 염으로는 (a) 약학적으로 허용가능한 무기산, 예를 들어 염산, 황산, 인산, 질산, 탄산, 붕산, 살파산 및 브롬산의 염, 또는 (b) 약학적으로 허용가능한 유기산, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 부틸산, 타르타르산, 말레산, 히드록시말레산, 푸마르산, 말레산, 시트르산, 락트산, 뮤신산, 글루콘산, 벤조산, 숙신산, 옥살산, 폐닐아세트산, 메탄설폰산, 툴루엔설폰산, 벤젠설폰산, 살리실산, 살파닐산, 아스파르트산, 글루탐산, 에데트산, 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 라우르산, 판토텐산, 타닌산, 아스코르브산 및 발레르산의 염이 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0047] 염기성 염으로는 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 암모늄 및 알킬암모늄과 같은 약학적으로 허용가능한 양이온으로 형성된 것들이 있으나 이에 제한되지 않는다. 특히, 예를 들어 나트륨 또는 칼륨 염과 같은 양이온성 염이 본 발명의 범위에 포함되고, 알킬(예를 들어 메틸, 에틸) 포스포에스테르도 포함된다. 바람직한 염은 포스포네이트 작용기의 일칼리 금속염이고, 더욱 바람직한 것은 칼슘 및 모노 및 비스 나트륨염이다.

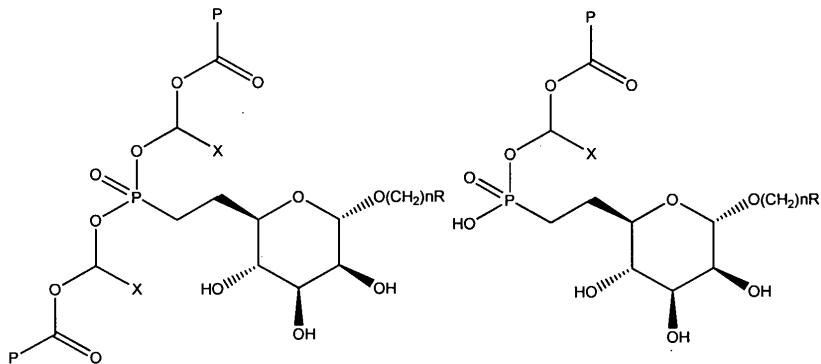
[0048] 염기성 질소 함유기는 (1) 저급 알킬 할라이드, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸 클로라이드, 브로마이드 또는 아이오디드; (2) 디알킬 설포네이트, 예를 들어 디메틸 또는 디에틸 설페이트 등을 이용하여 4차화될 수 있다.

[0049] 본 발명의 화합물은 유리 화합물 또는 용매화물(예를 들어, 수소화물)로서 무정형 또는 결정 형태로 존재할 수 있는데, 두 부류 모두 본 발명의 범위에 속한다. 용매화 방법은 당 업계에서 통상적인 것이다. 바람직한 용매화물은 2 내지 20%로 존재할 수 있는 물이다.

[0050] 화학식 1의 화합물의 임의의 프로드럭이 본 발명의 범위 및 사상에 속한다. 용어 "프로드럭"(pro-drug)은 생체내에서 본 발명의 화합물로 전환되는 유도체를 포함하는 가장 넓은 의미로 사용된다. 이러한 유도체는 당업자가 쉽게 알 수 있고 이의 예로는 (1) 유리 히드록시기가 에스테르(예, 아세테이트)로 전환되거나 (2) 유리 아미노기가 아미드로 전환되는 화합물이 있다. 본 발명의 화합물을 아실화하는 과정은 당 업계에 잘 알려져 있고 적당한 촉매 또는 염기의 존재하에 적절한 카르복시산, 무수물 또는 염화물과 반응시키는 것을 포함한다. 바람직한 프로드럭은 포스폰산 작용성의 모노에스테르 및 디에스테리이고, 더욱 바람직한 것은 X가 수소 또는 치환 알킬인 화학식 2의 옥시메틸렌 간격(spaced) 에스테르이고, 가장 바람직한 것은 X가 수소이고 P가 3차 부틸인 디에스테르이다. 이러한 포스폰산 유도체의 제조 과정은 화학 문헌, 예를 들어 다음 문헌[Baudy, R.B. et al.,

Journal of Medicinal Chemistry, 52, 771-778 (2009)]에 잘 알려져 있다.

## 화학식 2



[0051]

화학식 1에서 기재된 본 발명의 화합물은 특허 출원 WO 2004/104 015호에 기재된 과정에 따라 제조할 수 있다.

[0053]

또한, 본 발명은 외과적 처치 직전 또는 직후에 본 발명의 화합물을 이용하여 반흔 형성의 감소 또는 개선을 도모하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0054]

상기 방법은 감소된 반흔 형성을 갖는 창상의 치유를 도모하거나 섬유성 장애를 치료하기 위한 당 업계에서 알려진 다른 방법과 함께 사용될 수 있다. 다수의 화합물이 폐 섬유증의 블레오마이신 동물 모델에서 활성을 나타냈고 이들 화합물들 중 많은 것은 더욱 좋은 치료 결과를 얻기 위해 본 발명의 화합물과 함께 추가적으로 또는 상승효과적으로 작용하는데, 이러한 화합물은 다음 문헌[Moeller A., et al. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 40, 362-382 (2008)]에 기재되어 있다. 특별한 예로는 N-아세틸 시스테인, 아미노구아니딘, 항-VEGF 항체, 바티마스탈트(Batimastat), 보센탄(Bosentan), 텍사메타손, 디플루오로메틸오르니틴, 이타네셉트(Etanercept), 게피티니브(Gefitinib), 이마티니브(Imatinib), 메틸프레드니솔론, 펜토시펠린(Pentoxifylline), 피페니돈(Pirfenidone), 프레드니솔론, 로시클리타존(Rosiglitazone), TGF-베타 항체, TNF-알파 항체 및 빈블라스틴(Vinblastine)이 있다.

[0055]

본 발명의 화합물 및 조성물은 당업자에 의해 결정되는 바와 같은 임의의 적절하고 효과적인 경로를 통해 투여될 수 있다. 적당한 투여 경로는 예를 들어 다음 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, University of the Sciences in Philadelphia (2005)]에 기재되어 있다.

[0056]

예를 들어, 상기 화합물은 정맥내, 국소, 경구, 근육내, 피내, 흡입 또는 피하 경로로 투여될 수 있다.

[0057]

폐 섬유증 상태로 고생하는 환자를 치료하기 위하여, 바람직한 투여 경로는 경구 투여 및 흡입에 의한 국소 투여이다. 본 발명의 흡입된 화합물은 건조 분말 흡입기, 계측투여 흡입기와 함께 사용하도록 제형화되거나 분무 용액으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 경구용 화합물은 캡슐, 정제 또는 용액으로 제형화될 수 있다.

[0058]

심장 반흔 형성으로 고생하는 환자를 치료하기 위하여, 바람직한 투여 경로는 경구, 정맥내, 피하, 및 외과의사에 의해 이식될 코팅 스텐트이다.

[0059]

눈 수술을 받았거나, 눈에 대한 상처를 받았거나, 눈내장을 갖는 환자를 치료하기 위하여, 바람직한 투여 경로는 경구, 정맥내, 눈의 병변 부위로의 직접 주사, 안약, 스폰지에 흡수시키고 수술시 창상에 도포, 및 수술에 의해 도입되는 이식체에 함유된 형태이다.

[0060]

척수 및 등 수술을 받은 환자를 치료하기 위하여, 바람직한 투여 경로는 경구, 정맥내, 및 분말, 용액 또는 스폰지에 흡수된 형태로서 수술 동안 상처에의 직접 도포이다.

[0061]

경피증, 신장 섬유증, 및 기타 섬유성 상태로 고생하는 환자를 치료하기 위하여, 바람직한 투여 경로는 경구, 정맥내 및 코팅된 이식편이다.

[0062]

성형 수술을 받았거나, 켈로이드 형성의 가능성성이 있거나 피부 화상을 갖는 환자의 경우, 바람직한 투여 경로는 연고나 크림, 또는 상처 부위에의 간접적인 주사, 경구 및 정맥내 경로이다.

- [0063] 손, 어깨, 팔꿈치, 엉덩이, 무릎 및 발의 힘줄을 비롯한 힘줄에 대한 손상, 듀피트렌 병(Dupuytren's disease), 굳은 어깨(오십견)으로 고생하는 환자의 경우, 바람직한 투여 경로는 국소 주사, 연고 또는 크림, 창상 부위에의 직접 투여, 경구 또는 정맥 내 경로이다.
- [0064] 화합물은 투여 경로에 따라 적당히 제형화되는데, 예를 들어, 흡입에 적당한 액체 또는 입자 형태, 주사용 용액, 피부에의 직접 도포를 위한 연고 또는 크림 형태 등으로 제형화된다. 투여량은 과도한 실험을 하지 않고 당업자에 의해 결정될 수 있다. 정맥 내 투여의 경우, 1 내지 1000 mg의 화합물 투여량이 바람직하고, 더욱 바람직한 투여량은 5 내지 100 mg이다. 경구 투여의 경우, 본 발명의 화합물의 포스포네이트 디에스테르 프로드럭 형태가 5 내지 4000 mg의 양으로 투여되는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 10 내지 500 mg의 양으로 투여된다. 창상 부위에의 직접 주사의 경우, 0.1 내지 1000 밀리몰이 바람직하고, 0.1 내지 100 밀리몰의 투여량이 더욱 바람직하다. 연고 또는 크림 형태로 투여 시, 본 발명의 화합물의 포스포네이트 디에스테르 형태가 50 내지 4000 mg, 더욱 바람직하게는 50 내지 500 mg의 양으로 투여되는 것이 바람직하다.
- [0065] 본원에서 사용되는 용어 "개체(subject)"는 포유동물, 특히 인간을 의미하려는 것이다. 일반적으로, 상기 개체는 본원에 기재된 치료 방법을 이용하여 완화되는 것으로 예상되는 질환, 창상 또는 장애로 고생하게 된다. 질환 또는 장애의 일부 예들이 아래에 나열되어 있다.
- [0066] 화합물 또는 조성물의 "유효량"은 치료되는 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상을 완화하는데 있어서 측정 가능한 효과를 내는 양이다. 상기 증상이 완전히 완화되는 것이 필수적인 것은 아니다.
- [0067] 본 발명은 CI-M6P 수용체의 포스포테트라히드로피란 길항근을 제공함으로써 개체의 눈에서 TGF-베타 신호전달을 약화시키는 방법을 제공한다. 개체의 눈에서 TGF-베타 신호전달을 약화시키는 방법은 포스포테트라히드로피란 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. TGF-베타 신호전달과 관련된 눈의 장애는 예를 들어, 고안압증, 녹내장, 녹내장성 망막증, 시신경 병증(optic neuropathy), 황반 변성, 당뇨성 망막증, 맥락막 신생혈관, 또는 증식성 초자체 망막증일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 구체예는 그 치료를 필요로 하는 개체에서 부적절한 형질전환 성장 인자의 신호전달과 관련된 TGF-베타 신호전달 관련 안 장애를 치료하는 방법이다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라히드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0069] 또한, 외과적 처치 직전 또는 직후에 이러한 포스포테트라히드로피란 화합물을 이용하여 녹내장 여과 수술 후의 반흔 형성 과정을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 개체에서 녹내장성 망막증, 시신경 병증, 황반 변성, 당뇨성 망막증, 맥락막 신생혈관, 증식성 초자체 망막증, 또는 백내장 및 수정체의 기타 섬유성 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라히드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 구체예는 그 치료를 필요로 하는 개체에서 부적절한 형질전환 성장 인자와 관련된 섬유성 안 장애의 염증 성분을 치료하는 방법이다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라히드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0072] 또한, 외과적 처치 직전 또는 직후에 이러한 포스포테트라히드로피란 화합물을 이용하여, 녹내장 여과 수술 이후에 반흔 형성 과정을 개시하는 염증 과정을 약화시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 구체예는 그 치료를 필요로 하는 개체에서 부적절한 형질전환 성장 인자 신호전달과 관련이 있는 섬유성 폐 장애를 치료하는 방법이다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라히드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 TGF-베타 신호전달 관련 폐 장애는 특발성 폐 섬유증, 또는 만성 간질성 폐렴, 박리성 간질성 폐렴, 통상성 간질성 폐렴, 비특이성 간질성 폐렴, 유육종증, 임파구성 간질성 폐렴, 림프관종증(Lymphangiomatosis), 비아데노바이러스성 폐쇄성 기관지염(nonadenoviral bronchiolitis obliterans), 특발성 폐쇄성 기관지염 구성 폐렴(Idiopathic bronchiolitis obliterans organizing pneumonia), 기관지중심성 육아종증(bronchocentric granulomatosis), 비특이적 간질성 폐렴 및 급성 간질성

폐렴을 비롯한 알려지지 않은 기원의 성인 및 어린이의 간질성 폐 질환(ILD) 외에도, 감염, 환경적 노출, 약물 유도된 대상성 장애 및 면역결핍 관련 ILD를 비롯한 알려진 기원의 ILD 외에도, 결합 조직 질환, 자가면역 질환, 폐혈관염, 간 및 장질환, 아밀로이드증 및 신경피부 장애를 비롯한 전신 질환 관련 ILD일 수 있다.

[0074] 본 발명의 또 다른 구체예는 힘줄 손상 또는 건초염으로 고생하는 환자를 치료하는 방법이다. 이러한 질환은 손, 손목, 팔꿈치, 어깨, 등뼈, 사타구니, 무릎, 발목 및 발 등을 비롯한 신체의 임의의 관절에서 발생하고 힘줄 치유의 손상으로 인해 관절 강직 및 관절 기능 상실을 초래한다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라하이드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0075] 본 발명의 또 다른 구체예는 성형 수술 또는 다른 외과적 처치 또는 피부에 대한 창상 또는 화상 후 불충분하거나 부적절한 창상 치유로 고생하는 환자를 치료하는 방법이다. 이의 예로는 화상 또는 성형 수술 후의 피부 회복, 또는 켈로이드 형성의 치료 또는 예방이 있다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라하이드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0076] 본 발명의 또 다른 구체예는 신장 섬유증으로 고생하는 환자를 치료하는 방법이다. 사구체 및 세뇨관 섬유증은 여러 가지 만성 신장 질환의 공통적인 징후이다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라하이드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0077] 본 발명의 또 다른 구체예는 심근 섬유증을 갖는 환자를 치료하는 방법이다. 상기 질환은 심근경색, 심장 비대증, 심장 절개술, 관상 동맥 질환 등을 비롯한 심장 손상의 경험이 있는 개체에서 발생한다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라하이드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0078] 본 발명의 또 다른 구체예는 경피증, 반상경피증, 신경섬유종증, 신원성 섬유성 질환, 들피트렌 구축 등의 전신 및 피부 형태를 비롯한 국소 또는 전신 섬유성 장애로 고생하는 환자를 치료하는 방법이다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라하이드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0079] 본 발명의 또 다른 구체예는 등뼈의 궁절제 또는 임의의 다른 수술 후 과도한 반흔 조직 형성을 갖는 환자를 치료하는 방법이다. 상기 방법은 유효량의 CI-M6P 수용체의 포스포테트라하이드로피란 길항근 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 프로드럭 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

#### 양이온 비의존성 만노오스 6-포스페이트 수용체에 결합하는 만노오스 6-포스페이트의 길항작용

모든 표면 플라즈몬 공명(SPR) 측정은 Biacore 3000 기기(BIAcore사, Piscataway, NJ)를 이용하여 25 °C에서 수행했다. 또한, CM5 연구 등급 센서 칩, 계면활성제 P20 및 아민 결합 키트를 BIAcore사에서 구입했다. 제조사가 추천한 바와 같이 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 및 N-히드록시숙신이미드를 이용하여 표면 활성화 후에 CM5 센서 칩에 정제된 인간  $\beta$ -글루쿠로니다제를 고정화했다. 간략히 말해서, 러닝 버퍼로서 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl 및 0.005% (v/v) P20을 이용하여 10 mM 아세트산 나트륨 버퍼(pH 4.5)에서 10 내지 20  $\mu$ g/mL의 농도로 상기 단백질을 상기 활성화 텍스트란 표면상에 분사했다. 결합 후, 미반응 N-히드록시숙신이미드 에스테르 기를 에탄올아민으로 차단시켰다. 단백질이 생략되었다는 것을 제외하고 대조 표면을 동일한 방법으로 처리했다. 0.005% (v/v) 계면활성제 P20이 첨가된 50 mM MES (2-(N-모르폴리노)에탄올포산)(pH 6.5), 150 mM NaCl, 10 mM MnCl<sub>2</sub> 및 5 mM 2-포스포글리세롤(MES 버퍼)에서 우태혈청으로부터 정제된 sCI-MPR의 시료를 각각 40 mL/min (시험 1) 또는 30 mL/min (시험 2 및 3)의 유속으로 결합 및 대조 흐름 셀에 80 또는 90  $\mu$ L의 체적으로 분사했다. 2분(시험 1) 또는 3분(시험 2 및 3)후, 상기 정제 단백질을 함유하는 용액을 버퍼로 교체하고 그 복합체를 2분간 해리시켰다. 그 센서 칩 표면을 10  $\mu$ L/min의 유속으로 10 mM HCl을 10  $\mu$ L 분사하여 재생시켰다. 그 표면을 다시 분사하기 전에 1 분간 러닝 버퍼에서 다시 평형시켰다. 각각의 단백질 농도에 대한 평형 시의 반응을, BIAevaluation 소프트웨어 패키지(version 4.0.1)를 이용하여 센서그램의 정상 상

태 영역 내에서 10초간의 반응을 평균하여 측정했다. 평형 시의 반응을 억제제 농도의 로그에 대하여 플로팅하고 다음 식  $y = (\min - \max)/(1 + 10(x - \log K_i))$ 을 이용하여 원-사이트 억제 모델(SigmaPlot version 10.0, Systat Software, Inc.)에 비선형 회귀를 통해 대입했다. 모든 반응 데이터는 다음과 같이 삼중으로 대조하였는데, 굴절률 변화의 원인(contribution)의 대조를 병행하여 수행하고 모든 결합 센서그램으로부터 감했다: 1) 베퍼 단독으로부터의 반응; 2) 유도되지 않은 대조 표면으로부터의 반응; 3) 일치하는 농도(matching concentration)의 만노오스-6-포스페이트(M6P) 또는 시험 화합물인 포스포테트라히드로피란(화학식 1)을 함유하는 베퍼로부터의 반응. 평균  $K_i$  값은 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)의 경우 1 내지 20  $\mu\text{M}$ , 만노오스-6-포스페이트의 경우 19  $\mu\text{M}$ 인 것으로 확인되었다.

[0083] 이러한 조건하에서,  $n = 1$  이고  $R = 2,4$ -디메틸페닐인 화학식 1의 화합물은 7.9  $\mu\text{M}$ 의  $K_i$  값을 갖는 것으로 확인되었다.

#### 실시예 2

#### **근섬유아세포 분화의 억제**

[0086] 근섬유아세포 분화를, 부유 콜라겐 젤 배양 및 젤 수축의 정량을 통해 측정했다. 24-웰 조직 배양 플레이트를 우혈청 알부민으로 미리 코팅했다. 트립신화 섬유아세포를 MCDB 배지(Sigma Aldrich)에 혼탁하고 콜라겐 용액(1 부의 0.2M HEPES [pH 8.0], 4 부의 콜라겐[Vitrogen-100, 3 mg/mL], 및 5 부의 MCDB X2)과 혼합하여, 80,000개 세포/mL 및 1.2 mg/mL 콜라겐의 최종 농도를 얻었다. 콜라겐/세포 혼탁액(1 mL)을 각각의 웰에 첨가했다. 중합 후, 1 mL MCDB 배지를 첨가하여 웰로부터 젤을 떼어냈다. 24 시간에 걸쳐서 젤 중량의 감소 및 젤 직경의 감소를 기준으로 젤의 수축을 정량했다. 억제 실험을 위하여, 세포를 포스포테트라히드로피란 시험 화합물의 존재하에 전배양한 다음 분석했다. 웨스턴 블럿 분석을 통해 전체 세포 단백질 추출물에서 CTGF 및 알파 평활근 약틴( $\alpha$ SMA)의 생성을 측정했다. GAPDH 대조구에 대한 신호의 세기를 농도측정법을 이용하여 계산하고, 3번의 독립적인 실험으로부터 얻은 데이터의 평균 및 표준 편차를 계산했다. 포스포테트라히드로피란 화합물(화학식 1)에 대한  $IC_{50}$  값은 0.01 내지 100  $\mu\text{M}$ 인 것으로 확인되었다.

#### 실시예 3

#### **인간 유래 섬유아세포에서 근섬유아세포 분화의 억제**

[0089] 전신 경화증을 갖는 환자의 병변 부위 유래 및 연령, 성별 및 부위가 일치하는 대조구 유래의 진피 섬유아세포를 사용했다. 5% 우태혈청(FCS), 2 mM L-글루타민, 항생제(100 units/mL 페니실린 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  스트렙토마이신) 및 1 mM 피루브산 나트륨(Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 세포를 성장시켰다. 세포를 혈청 기아 상태에서 24 시간 동안 배양한 다음, 무처리 상태로 유지하거나 TGF $\beta$  1 (4 ng/mL)으로 처리했다. TGF $\beta$  1의 첨가 전에 1 내지 100  $\mu\text{M}$  농도의 포스포테트라히드로피란 화합물(화학식 1)을 첨가했다. 24 시간 후 웨스턴 블럿 분석을 통해 전체 세포 단백질 추출물에서 CTGF 및  $\alpha$ SMA 수준을 측정했다. 이러한 조건하에서, 포스포테트라히드로피란 화합물(화학식 1)은 0.01 내지 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 CTGF 및  $\alpha$ SMA 수준을 50% 감소시켰다.

#### 실시예 4

#### **세포외기질 생성의 억제**

[0092] IMR-90 인간 태아 폐 섬유아세포를  $1.5 \times 10^5$  개 세포의 밀도로  $25 \text{ cm}^2$  플라스크에 도말했다. 그 세포를 10% (v/v) 신생 송아지 혈청 및 젠타마이신(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 또는 클로로테트라마이신(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 함유하는 최소 배지에서 배양했다. 서로에 대하여 내성이 있는 세균이 선택되지 않도록 두 종의 항생제를 번갈아 사용했다. 그 세포를 공기 중에서 5%  $\text{CO}_2$ 의 습기있는 분위기에서 37°C로 배양했다. 세포 배양의 유지를 위하여, 배지를 72 시간마다 교환했다. 배양된 IMR 90 인간 폐 섬유아세포 및 IPF 환자의 폐로부터 분리한 원발성 인간 섬유아세포를 TGF-베타(5 ng/mL) 및 여러 가지 농도의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)의 존재하에 배양했다. 세포외 기질의 생성을 노던 블럿 분석을 통한 피브로네틴의 mRNA 정량 및 실시간 PCR에 의해 평가하고  $\beta$ -약틴 수준과 비교했다. 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)은 0.01 내지 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 피브로네틴 생성물을 50% 감소시켰다.

[0093] 인간 근위 세뇨관(HK2) 세포를 정상산소 상태 및 저산소(1%  $\text{O}_2$ ) 상태 모두에서 72 시간 동안 0.1  $\mu\text{M}$  내지 100

$\mu\text{M}$  농도 범위의 포스포테트라히드로피란 화합물(화학식 1) 및 고농도 글루코스(25mM)에 노출시켰다. 세포 및 세포외 피브로네틴, 콜라겐 IV, E-카데린, 비멘틴(Vimentin),  $\alpha$  SMA 및 MMP를 포함하는 섬유성 마커를 웨스턴 블러팅 및 RNA 증폭(실시간 PCR)을 통해 평가했다. 전체 및 활성 TGF $\beta$  1 수준을 민감성 ELISA 키트를 이용하여 검출했다.

[0094] 0.01  $\mu\text{M}$  내지 100  $\mu\text{M}$  투여량의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)은 고농도 글루코스로 자극한 인간 근위 세뇨관 세포에서 섬유성 신호를 효과적으로 감소시킨다. 또한, 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)은 상기 신장 세포에서 상피 간엽 이행(EMT)의 마커를 감소시킨다.

#### 실시예 5

#### **세포외 기질 생성의 병용 억제**

[0097] 실시예 4에서 기재한 과정에 따라 수행했지만, N-아세틸 시스테인, 아미노구아닌, 항-VEGF 항체, 바티마스타트(Batimastat), 보센탄(Bosentan), 텍사메타손, 디플루오로메틸오르니틴, 이타너셉트(Etanercept), 게피티니브(Gefitinib), 이마티니브(Imatinib), 메틸프레드니솔론, 펜톡시펠린(Pentoxifylline), 피페니돈(Pirfenidone), 프레드니솔론, 로시클리타존(Rosiglitazone), TGF-베타 항체, TNF-알파 항체 및 빈블라스틴(Vinblastine)중에서 선택된 한 종의 화합물과 포스포테트라히드로피란 시험 화합물의 조합을 이용하여 IMR-90 인간 태아 폐 섬유아세포를 처리한 결과, 피브로네틴 단백질의 동일한 감소를 달성하는데 필요한 두 화합물들의 농도는 더욱 낮았다. 특정 조합의 경우, 그 효과는 부가적이었지만, 다른 조합의 경우, 그 효과는 상승적이었다.

#### 실시예 6

#### **설치동물 세포에서 상피 간엽 세포 이행(EMT)의 억제**

[0100] 상피 간엽 이행에 대한 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)의 효과를 평가하기 위하여, 쥐의 폐 상피 세포를 상기 화합물 및 TGF-베타의 존재하에서 배양하고 알파-평활근 악틴을 웨스턴 블러팅을 통해 평가했다.

[0101] 엘라스타제 분해(2.0-2.5 U/mL)를 수행한 다음 전술한 바와 같이 IgG-코팅된 세균학적 플레이트 상에 차별적으로 부착하여 성숙한 수컷 Sprague-Dawley 쥐로부터 원발성 쥐 2형 세포(AT2)를 분리했다. 다음에, AT2 세포를  $1 \times 10^6$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 밀도로  $1.1 \text{ cm}^2$ 의  $0.4 \mu\text{m}$  공극 크기의 비코팅된 폴리카보네이트 팁터 컵(Transwell, Corning Costar, Cambridge, MA)상의 최소 한정 무혈청 배지(MDSF)에 도말했다. 처음 24 내지 48 시간의 배양 동안, 배지에 100  $\mu\text{g/mL}$  시스-OH-프롤린(Sigma)을 첨가하여 배양액으로부터 섬유아세포를 선택적으로 제거했다. 다음에, 배양액을 37 °C에서 습기있는 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 6일까지의 기간 동안 유지했다. 배지를 매일 교환하고, 10, 30 또는 100  $\mu\text{M}$  농도의 포스포테트라히드로푸란 시험 화합물(화학식 1) 및 TGF- $\beta$  1 (1.0 ng/mL)의 조합을 첨가했다. 24 시간 후 CTGF, PGDF 또는  $\alpha$ -SMA의 수준을 측정하여 EMT의 억제를 평가했다. 상기 화합물(화학식 1)은 10 내지 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서, TGF-베타에 의해 유발된 자극을 50% 억제했다.

#### 실시예 7

#### **TGF-베타 자극 후 세포 신호전달의 억제**

[0104] NIH-3T3 섬유아세포, IMR-90 세포 및 A549 세포를 페트리 접시에서 배양했다. HIF1a, NFkB, SMAD2/3, Notch, p53 MAPK/ERK 경로를 포함하는 전사 인자 활성화를 위하여, 개똥벌레/레닐라 이중 루시퍼라제 분석 작제물을 이용하여 세포를 형질감염시켰다. 형질 감염 후, 세포를 L-글루타민 및 항생제가 첨가된 0.5% FCS를 함유하는 저혈청 배지에서 맴새 배양했다. 다음에, 세포를 0.01  $\mu\text{M}$  내지 100  $\mu\text{M}$  농도 범위의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)의 존재 또는 부재하에 배양하고, 5 내지 50 ng/mL 농도 범위의 재조합 LTGF-베타 또는 0.5 내지 20 ng/mL 농도 범위의 재조합 TGF-베타를 이용하여 자극했다. 자극 후 20시간째에 세포를 파쇄하고 발광을 측정하여 전사 인자 활성화를 검출했다.

[0105] 0.01  $\mu\text{M}$  내지 100  $\mu\text{M}$  농도 범위의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)은 NFkB, HIF1a 및 SMAD 신호전달 경로의 활성화를 효과적으로 억제했다. 도 1 참조.

#### 실시예 8

#### **블레오마이신 마우스 폐 손상 모델(모델 1)에서의 활성**

[0108] 8 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 마이크로 절연체 재질의 케이지에서 12 시간 명암 주기로 사육한다. 사료 및

물은 자유 접근이 가능하도록 한다.

[0109] 50  $\mu\text{L}$ 의 식염수에 용해된 단일 블레오마이신 주입액(5 mU/gram)을 0일째에 기관내에 주입한다. 대조 동물에는 50  $\mu\text{L}$ 의 식염수를 투여했다. 동물 그룹들은 예방 요법 그룹의 경우 0일째에 또는 치료 요법 그룹의 경우 7일째에 여러 가지 투여량(i.p.)의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)로 하루에 2회 처리한다.

[0110] 15일째에 모든 마우스를 희생시키고 기관내 삽관을 통해 BALF를 수집하여 폐 기도의 세포 유입을 평가한다. 전체 세포 수 및 표현형을 평가한다. 콜라겐 침착을 비롯한 폐 조직병리를 표준 방법에 따라 평가한다.

[0111] 1 내지 100 mg/kg의 투여량으로 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 결과, 체중 증가가 효과적으로 개선되었고, BALF에서의 전체 세포수가 감소했고, 폐포벽 두께 및 콜라겐 침착으로 확인된 바와 같이 전체 폐 섬유증이 감소했다. 도 2 참조.

#### 실시예 9

#### **블레오마이신 폐 손상 모델(모델 2)에서의 활성**

[0114] 8 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 마이크로 절연체 재질의 케이지에서 12 시간 명암 주기로 사육했다. 사료 및 물은 자유 접근이 가능하도록 했다. 50  $\mu\text{L}$ 의 식염수에 용해된 단일 블레오마이신 주입액(5 mU/gram)을 0일째에 기관내 주입한다. 대조 동물에는 50  $\mu\text{L}$ 의 식염수를 투여했다. 동물 그룹들은 피하에 삽입한 삼투 펌프를 이용하여 여러 가지 투여량의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)로 처리한다. 실험 과정 동안 마우스의 체중 감소를 관찰한다. 26일째에, 마우스를 희생시키고 BALF를 수집하여 폐 기도의 세포 유입을 평가한다. 전체 세포수 및 표현형을 평가한다. 콜라겐 침착을 비롯한 폐 조직병리를 평가한다. 26일째에 얻은 혈장에서 활성 및 전체 TGF-베타 수준을 측정한다.

[0115] 1 내지 100 mg/kg의 투여량으로 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 결과, 체중 증가가 효과적으로 개선되었고, BALF에서의 전체 세포수가 감소했고, 콜라겐 침착으로 확인된 바와 같이 전체 폐 섬유증이 감소했고, 혈장 TGF-베타 수준이 감소했다. 도 3 및 4 참조.

#### 실시예 10

#### **블레오마이신 마우스 폐 손상 모델(모델 3)에서의 활성**

[0118] 실시예 9에서 기재된 실험 과정에 따라, 8 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 마이크로 절연체 재질의 케이지에서 12 시간 명암 주기로 사육했다. 사료 및 물은 자유 접근이 가능하도록 했다. 50  $\mu\text{L}$ 의 식염수에 용해된 단일 블레오마이신 주입액(5 mU/gram)을 0일째에 기관내 주입한다. 대조 동물에는 50  $\mu\text{L}$ 의 식염수를 투여했다. 동물 그룹들은 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 PBS와 같은 적당한 매질에 여러 가지 농도로 용해시켜 26일간 매일 폐의 기도내에 투여하여 상기 화합물로 처리했다. 26일째에, 마우스를 희생시키고 BALF를 수집하여 폐 기도의 세포 유입을 평가한다. 전체 세포수 및 표현형을 평가한다. 콜라겐 침착을 비롯한 폐 조직병리를 평가한다. 26일째에 얻은 혈장에서 활성 및 전체 TGF-베타 수준을 측정한다. 1 내지 100 mg/kg의 투여량으로 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 결과, 체중 증가가 효과적으로 개선되었고, BALF에서의 전체 세포수가 감소했고, 콜라겐 침착으로 확인된 바와 같이 전체 폐 섬유증이 감소했고, 혈장 TGF-베타 수준이 감소했다.

#### 실시예 11

#### **블레오마이신 마우스 폐 손상 모델에서의 병용 요법**

[0121] 실시예 8, 9 및 10에 기재된 과정을 수행했지만, N-아세틸 시스테인, 아미노구아닌, 항-VEGF 항체, 바티매스 타트, 보센탄, 텍사메타손, 디플루오로메틸오르니틴, 이타너셉트, 게피티니브, 이마티니브, 메틸프레드니솔론, 웬톡시펠린, 피페니돈, 프레드니솔론, 로시클리타존, TGF-베타 항체, TNF-알파 항체 및 빈블라스틴중에서 선택된 한 종의 화합물과 포스포테트라히드로피란 시험 화합물의 조합을 이용하여 마우스를 처리한 결과, 체중의 증가의 동일한 개선, BALF에서 전체 세포수의 감소, 전체 폐 섬유증의 감소 및 혈장 TGF-베타의 감소를 달성하는데 필요한 두 화합물의 투여량은 더욱 낮았다. 특정 조합의 경우 상기 효과는 부가적인 반면에, 다른 조합의 경우 그 효과는 상승적이었다.

#### 실시예 12

#### **실험적 녹내장 여과 수술의 토끼 모델에서 포스포테트라히드로피란 시험 화합물의 평가**

- [0124] New Zealand White 토끼(18마리)의 좌측 눈을 변형 녹내장 여과 수술했다. 상기 동물들에게 40 mg/mL 농도의 PXS-25(그룹 1), 0.4 mg/mL 농도의 미토마이신(Mitomycin) C (MMC)(그룹 2), 또는 시험 화합물 및 미토마이신 C(그룹 3)을 수술중에 투여했다.
- [0125] 여과 수술은 좌측 눈에 대하여만 실시했다. MMC, 시험 화합물(화학식 1) 또는 이들의 조합은 Weck-Cel로부터 절단한 8 X 10 mm 크기(건조 크기)의 큰 스폰지를 이용하여 전달한 후 플랩(flap)을 절단하고 공막절개를 실시했다. 그 스폰지 조각을 예정 여과 부위 상의 결막과 공막 사이에 3분간 위치시켰다. 다음에, 그 부위를 30 mL의 생리식염수로 철저히 세척했다. 수술 후 첫 번째 날 상기 동물들을 검사한 다음, 수포가 불충분할 때(bleb failure)까지 매주 검사했다. 상기 검사는 8주 후에 종료했다. 플루오레세인(fluorescein) 추적 조사를 다음과 같이 수행했다. 나트륨 플루오레세인을 안구전방(anterior chamber)에 주입하고, 슬리트 램프 기반 디지털 비디오를 이용하여 배액 경로를 기록했다. 그 동물들을 희생시키고, 조직 절편을 제조하여 면역조직화학적으로 염색하고 반흔 형성 및 염증의 신호를 관찰했다. 그 결과, 시험 화합물(화학식 1)은 수포 외에도 미토마이신을 보존하였는데, 건강한 조직이 수술 개입 부위를 둘러싸고 있었다. 이와 대조로, 미토마이신만을 투여한 동물의 경우, 육안으로 확실히 보이는 죽은 조직이 수포 주위를 둘러싸고 있었다.
- [0126] 실시예 13
- [0127] **토끼 창상 치유 모델에서 창상 회복의 개선**
- [0128] 투여 경로 당 4 마리의 New Zealand White 토끼를 사용한다. 시험하기 24 시간 전에, 각 토끼의 등 부위의 털을 제거한다. 그 동물들의 귀 주변의 정맥에 펜토바비톤을 주사하여 마취시킨다. 주사 직전에, 피부를 70% 이소프로필 알코올로 세척한 다음, 1% 요오드 용액으로 세척한다. 두 개의 윤곽을 그린 부위에 수술용 가위를 이용하여 한 변이 약 1 cm인 전체 두께의 사각형 창상을 만든다. 그 절개부는 근막은 판통하지 않는다. 토끼들은 단독으로 케이지에 수용한다.
- [0129] 포스포테트라하이드로피란 시험 화합물(화학식 1)은 창상에 직접 도포하거나(진피 경로; 주격을 이용하여 100 mM 용액 도포) 창상의 각 면에 주사(피하 경로; 29 게이지 바늘을 이용하여 100 mM 용액을 피하에 주사)한다. 진피 경로의 경우, 토끼는 창상 봉합시까지 매일 4 시간 동안 토끼 홀더에 위치시켜서 시험 항목이 제거되지 않도록 한다. 처리는 창상 봉합시까지 계속한다. 창상이 봉합된 것으로 판단될 때까지(약 10일) 창상 부위(폭 x 길이)를 매일 측정한다. 다음에, 그 동물을 희생시키고 창상 조직 및 주변 조직을 절개하고, 판지에 부착하고 10% 중성 완충 포르말린에 평평하게 고정한다. 혈마톡실린 및 이오신(H&E)으로 염색한 절편에 대하여 조직병리 검사를 실시하여 일반 조직 및 세포 형태를 검사한다.
- [0130] 포스포테트라하이드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 이용한 처리 결과, 과도한 반흔 형성이 감소되어 반흔의 외관 상태가 개선되었고 상처 부위의 피부 섬유증이 감소되었다.
- [0131] 실시예 14
- [0132] **마우스에서 LPS에 의해 유발된 급성 폐 염증에 대한 시험 화합물의 평가**
- [0133] 연령이 일치하는 무균 수컷 C57BL/6 마우스(25.30 ± 0.39 g; 6-7 주령)를 이소플루란과 산소의 혼합물을 이용하여 일시적으로 마취시켰다. 매질(vehicle)로 처리한 그룹에는 식염수를 정맥내 주사(i.v.)하고 15분 후 리포폴리사카라이드(LPS, 3 mg/kg)를 기도내 주입(i.t.)했다. 또 다른 그룹에는 1 mg/kg 또는 2.5 mg/kg의 텍사메타손을 정맥내 주사하고 1 시간 후 LPS를 주입했다. 상기 동물에게 포스포테트라하이드로피란을 5, 15 및 30 mg/kg의 양으로 정맥내 주사하고 15분 후 LPS를 주입했다. 또 다른 그룹의 마우스를 모의군(식염수/PBS)으로 이용하고 싱염수를 정맥내 주사하고 PBS(인산염 완충 식염수)를 기도 내 주입했다.
- [0134] LPS 투여 후 3 시간째에, 우레탄(25%, 100 mL/g 체중)을 이용하여 동물을 마취시켰다. 심장 천공을 통해 혈액 시료(= 1 mL)를 채취하고, 경추 탈골을 통해 그 동물들을 희생시켰다. 기도에 삽관하고 그 폐를 2 mL의 EDTA (1 mM) 함유 PBS를 이용하여 세척했다. 각 회마다 0.5 mL씩 4회 부드럽게 주입 및 흡입하여 세척액을 수집하고 원심분리했다. Neubauer 챔버를 이용하여 Turk 용액을 통해 새로운 유체 시료의 전체 세포수를 측정했다. Cytospin 기법을 이용하여 감별 세포수(differential cell count)를 측정했다. 기관지 폐포 세척(BAL) 상등액의 분취량을 더 이상 처리하지 않고 -80 °C에서 보관했다.
- [0135] 상기 동물로부터 각 폐엽의 절편을 즉시 제거하고, 청량하고, 미엘로페옥시다제(MPO) 분석을 위해 액체 질소에서 동결하거나 폐부종 평가를 위해 오븐에 위치시켰다. MPO 활성의 측정 결과는 백혈구 축적 지수로서 사용하였는데, MPO 활성의 한 단위는 다음 식에 따라 25 °C에서 1 분당 1 μmol 과산화수소를 분해하는 것으로 정의하

였다: MPO (U/g) = Vmax/s x 60/0.0113/0.5. 데이터는 MPO 활성(U/g 젖은 조직)으로 나타냈다. 폐부종을 측정하기 위하여, 좌측 폐엽을 제거하고, 청량하고, 60 °C에서 48 시간 동안 건조시켜 건조 중량에 대한 습윤 중량을 측정했다.

[0136] LPS 대조군의 BAL 유체로부터 회수한 염증 세포의 총수는 텍사메타손 및 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(5 및 30 mg/kg)과 비교하여 유의적인 차이가 없었다. 그러나, 15 mg/kg의 투여량의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(n = 1 및 R = 2,4-디메틸페닐)로 처리한 마우스 그룹의 경우에는 전체 세포의 유의적인 억제가 확인되었다(도 5).

[0137] 매질 대조군의 BAL 유체로부터 회수한 세포의 약 30%는 호중구였다. 시험 화합물을 이용한 마우스의 전처리 결과, 매질(식염수) 대조군과 비교하여 호중구 수가 유의적으로 감소했다(86.7%, P<0.05). 마찬가지로, 동물을 텍사메타손으로 처리한 결과, 급성 폐 염증을 갖는 동물의 BAL 유체에의 세포 유입이 거의 차단되었다(도 6 참조).

[0138] 실시예 15

#### **마우스에서 티오글리콜레이트에 의해 유발된 복막염의 모델에서 시험 화합물의 평가**

[0140] 21.30 ± 0.39 g 체중 범위의 무균 C57BI/6 마우스(6-7 주령)를 할로탄(halothane)으로 마취시킨 다음, 증가하는 투여량의 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(5 또는 15 mg/kg, -15 분), 텍사메타손(1 mg/kg, -60 분) 또는 각각의 매질(식염수 0.9 %, pH 7.4)를 정맥내(iv) 투여했다. 브루어(Brewer)의 티오글리콜레이트를 복막내 주사하여 복막 염증을 유발시켰다. 살균 식염수에서 티오글리콜레이트를 새로이 제조하고(3%, w/v), 1.5 mL를 복강에 주사했다. 3 시간 처리 후, 동물을 마취하에 경추 탈골시켜 죽이고, 5 mL의 얼음 냉각 PBS를 이용하여 복막 세척을 통해 세포를 회수했다. 그 세척물은 얼음 위에 즉시 보관했다. 복막 삼출 세포(PEC)를 5 mL의 얼음 냉각 PBS에 추가로 회석시켰다. 전체 세포수는 Turk 용액을 이용하여 Neubauer 챔버에서 측정한 반면에, 감별 세포수는 시토스핀 제제를 이용하여 측정했다. 동물 준비 동안 미소출혈로 인해 발생할 수 있는 복강내에 백혈구축적의 가능성을 배제하도록 복막 세척액을 현미경 검사로 조심스럽게 확인한 결과 적혈구에 대하여 음성이었다.

[0141] 데이터는 n개의 동물로부터의 평균(± SEM)으로 나타낸다. Software Graphpad prism v4를 이용하여 데이터의 통계 분석을 수행했다. 비교데이터는 ANOVA 이후 Dunnett 사후 검정 및 ANOVA (비대응 Student T 검정)을 이용하여 분석했다. 0.05 미만의 통계적 P 값을 유의적인 것으로 간주했다. 포스포테트라히드로피란 시험 화합물 및 텍사메타손의 투여량 의존적 항염증 작용을 기록했다.

[0142] 도 7은 복막에서 티오글리콜레이트에 의해 유발된 백혈구 이동에 대한 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(n = 1 및 R = 2,4-디메틸페닐; 5 - 45 mg/kg, 정맥내, -15 분) 및 텍사메타손(1 mg/kg, 정맥내, -60 분)을 이용한 전처리의 효과를 도시한다. 다핵(PMN)성 동원(A), 단핵성(MN) 동원(B) 및 전체 세포(C)의 결과는 복강당 세포의 수로 도시한다. 그 결과는 11 마리의 마우스를 이용한 대표적인 실험으로부터 얻은 것이다. 각 시점에 대한 유의적인 p 값이 도시되어 있다(Dunnett 사후 검정 및 비공유 T-검정).

[0143] 도 7에서 요약된 데이터는 티오글리콜레이트, 텍사메타손 (1 mg/kg) 또는 시험 화합물의 복막 내 주사 후 처음 3 시간 동안 복강에서 관찰된 과정(적혈구 유입)의 결과를 나타낸다. 무처리 C57BL/6 마우스의 경우, 복막의 전체 세포수가 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1; n = 1 및 R = 2,4-디메틸페닐; 5 및 15 mg/kg)으로 처리한 마우스의 경우와 비교하여 현저히 높았다.

[0144] 실시예 16

#### **블레오마이신에 의해 유발된 경피증 동물 모델에서의 활성**

[0146] 본 실시예는 다음 문헌[Liu S 외, Arthritis & Rheumatism, 58, 2189-2195 (2008)]에 기재된 방법에 따라 수행한다. 100 μL의 블레오마이신(0.1 units/mL, 인산염 완충 식염액(PBS)에서) 또는 PBS를 C57BI/6 마우스의 제모한 등부위의 단일 위치에 4 주간 하루에 한번 피하 주사한다. 실험의 종료 시, CO<sub>2</sub>를 투여하여 마우스를 죽이고, 피부 시료를 채취하여 조직학적, 면역조직학화학적 및 히드록시프롤린 분석을 수행한다.

[0147] 피부의 생역학적 특성의 정량 분석을 수행한다. 피부의 생역학적 특성을 반영하기 위해 강직성을 측정한다. 동물을 마취시키고, 이들의 등을 제모하고 발모했다. 유리 시험 챔버를 마우스의 등 부위에 장착한다. 이러한 유리 챔버는, 진공을 발생하고 피부 상의 부위로 레이저 빔을 유도하는 BTC-2000 동적 피부 분석기에 연결한다.

블레오마이신 처리의 종료 시에 피부 강직성을 측정한다.

[0148] 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 2주간 하루에 2회 10 내지 100 mg/kg의 투여량으로 복막내 투여한다. 그 외의 그룹은 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 2주간 하루에 한번 피하 주사로 국소 투여하여 처리한다. 4주의 실험 후, 피부의 절편( $0.5 \mu\text{m}$ )을 마이크로토(microtome)을 이용하여 절단하고, Superfrost Plus 슬라이드 상에 수집한다. 다음에, 절편을 실렌에서 왁스제거하고, 저하하는 농도의 알코올에 연속적으로 침적시켜 재수화시킨다. 절편을 혜마톡실린 및 이오신 (H&E)으로 염색한다. H&E은 핵을 청색으로 염색하는데, ECM 성분 및 세포질은 여러 농도의 핑크색으로 염색한다. 염증에 대한 시험 화합물(화학식 1)의 효과를 다음과 같이 0 내지 3의 척도로 등급화한다: 0 = 염증 세포 없음, 1 = 염증 세포 거의 없음, 2 = 염증 세포가 적당히 있음, 3 = 염증 세포가 광범위하게 존재함. 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 마우스 유래의 피부는 1 내지 2 등급인 반면에, 시험 화합물을 투여하지 않은 블레오마이신 처리 마우스는 3 등급이다.

[0149] 콜라겐 합성에 대한 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)의 효과를 평가하기 위하여, van Gieson 염료를 이용한 반정량적인 분석을 수행한다. Van Gieson 염색 결과, 성숙 콜라겐 섬유의 경우 진한 적색이 나타나고, 미성숙 콜라겐 섬유의 경우 핑크색이 나타난다. 근육 및 피브린은 적색 핵을 갖는 황색으로 나타난다. 콜라겐 섬유의 양은 다음과 같은 척도를 이용하여 기록한다: 0 = 콜라겐 섬유 없음, 1 = 콜라겐 섬유 거의 없음, 2 = 적당량의 콜라겐 섬유, 3 = 과도한 양의 콜라겐 섬유. 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 마우스의 피부는 1 내지 2 등급인 반면에, 시험 화합물을 투여하지 않은 블레오마이신 처리 마우스는 3 등급이다.

[0150] 전술한 바와 같이 절편을 절단하고 처리한다. 문헌의 과정에 따라  $\alpha$ -SMA의 면역 표지를 수행하고,  $\alpha$ -SMA 발현에 대한 시험 화합물(화학식 1)의 효과를 다음과 같이 0 내지 3의 척도로 등급화한다: 0 =  $\alpha$ -SMA를 발현하는 세포가 없음; 1 =  $\alpha$ -SMA를 발현하는 세포가 거의 없음, 2 =  $\alpha$ -SMA를 발현하는 세포가 적당량 있음; 3 =  $\alpha$ -SMA를 발현하는 세포가 과도한 양으로 존재함. 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 마우스의 피부는 1 내지 2 등급인 반면에, 시험 화합물을 투여하지 않은 블레오마이신 처리 마우스는 3 등급이다.

[0151] 알려진 과정에 따라 창상 조직에서 콜라겐 합성의 마커로서 히드록시프롤린 분석을 수행한다. 피부 조직을 식염수에서 균질화하고, 120°C에서 30 분간 2N NaOH로 가수분해하고, 550 nm에서 히드록시프롤린 표준 곡선을 통해 클로라민 T 및 Ehrlich 시약을 이용하여 Neumann 및 Logan 반응의 변형법을 통해 히드록시프롤린 함량을 측정한다. 값은 단백질의 mg 당 히드록시프롤린의  $\mu\text{g}$ 으로 표시한다. 시험 화합물(화학식 1)은 1 내지 100 mg/kg-day의 농도에서 히드록시프롤린 함량을 유의적으로 감소시켰다.

[0152] 실시예 17

#### 당뇨병에 의해 유발된 신장 섬유증에서의 활성

[0154] C57BI/6J 마우스를 정상 식이를 이용하여 표준 동물 수용 조건하에서 유지했다. 마우스에게, 구연산나트륨 베피 (pH 4.5)에 용해된 STZ (Sigma, St Louis, MO)를 2일 연속하여 복막내 주사했다(125 mg/kg/day). 일반적인 혈당계(Roche)를 이용하여 꼬리 정맥 시료채취를 통해 혈당을 측정했다. 당뇨병은 STZ후 2주까지 >16 mM의 오전 혈당 눈금으로 정의되었다. 혈당 수준이 30 mM를 초과한 경우, 당뇨 마우스에게 0.4 U의 인슐린(Novo Nordisk)을 매일 투여하여 체중 감소를 방지하면서 혈당 수준이 고글리세롤혈증 범위(16-30 mM)내에 있도록 하였다. STZ 후 4개의 시점(2, 8, 12 및 18 주)에서 죽인 10마리의 마우스 그룹에서 당뇨성 신장병을 평가했다. 정상적인 26 주령의 마우스( $n = 10$ )의 그룹을 대조군으로 사용했다.

[0155] 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 시험 기간 동안 하루에 2번 1 내지 100 mg/kg의 투여량으로 복막내 투여하거나, 피하에 삽입한 삼투 펌프를 이용하여 0.01 내지 100  $\mu\text{M}$ 의 혈중 농도 범위로 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 안정하게 전신에 노출시켜서 투여한다.

[0156] 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)을 이용한 처리 결과, 사구체 비대증, 과세포성 및 혈관간 세포 팽창(mesangial expansion)이 감소되고, 세뇨관 팽창 및 위축이 감소되고 면역조직병리법으로 평가한 간질성 팽창이 감소된다. 신실질부에서의 피브로넥틴 및 콜라겐 침착은 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1)로 처리한 동물의 경우에 크게 감소되었다.

[0157] 실시예 18

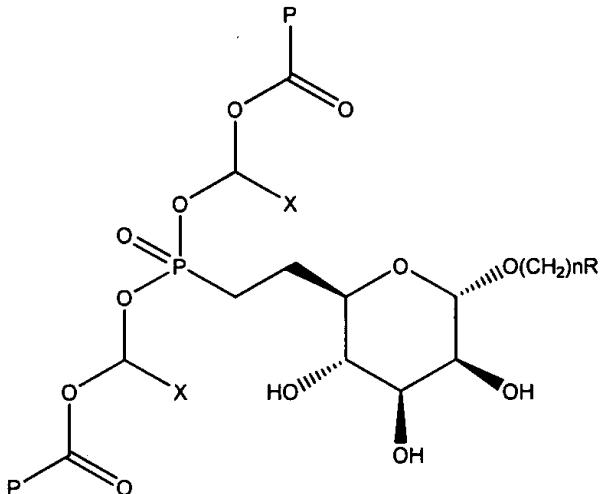
#### 쥐 및 개에서 본 발명의 화합물의 생체내이용률의 측정

[0159] 포스포테트라히드로피란 시험 화합물(화학식 1;  $n = 1$  및  $R = 2,4$ -디메틸페닐)을 쥐에게 10 mg/kg의 양으로 위관법을 통해 투여하거나 1 mg/kg의 양으로 정맥내 투여했다. 15분 및 30 분, 1 시간, 2시간, 3시간, 4시간, 8

시간, 12 시간 및 24 시간째에 혈액 시료를 채취했다. 50% 아세토니트릴/물(20  $\mu\text{L}$ )을 첨가하여 혈장 시료를 제조했다. 트리클로로아세트산(물에서 20%, 40  $\mu\text{L}$ )을 첨가하여 단백질 침전을 수행하고, 볼텍싱(20초)하고, 4 °C에서 60 분간 보관한 후, 마이크로원심분리기에서 5분간 원심분리(10,000 rpm)하였다. 다음에, 그 상등액을 분리하고 25  $\mu\text{L}$ 를 LC-MS 분석용 칼럼에 직접 주입했다. 알고 있는 농도의 시험 화합물로 스파이크한 혈액 시료와 비교한 데이터의 분석 결과, 시험 화합물의 생체내이용률은 7.7%인 것으로 확인되었다.

[0160] 하기 화학식 2의 화합물( $X = \text{H}$ ,  $P = 3\text{-부틸}$ )을 이용하여 상기 실험을 반복한 때, 그 생체내이용률은, 포스포테트라하이드로파란 시험 화합물(화학식 1;  $n = 1$  및  $R = 2,4\text{-디메틸페닐}$ )을 혈장에서 정량시에 얻은 농도의 52%인 것으로 확인되었다.

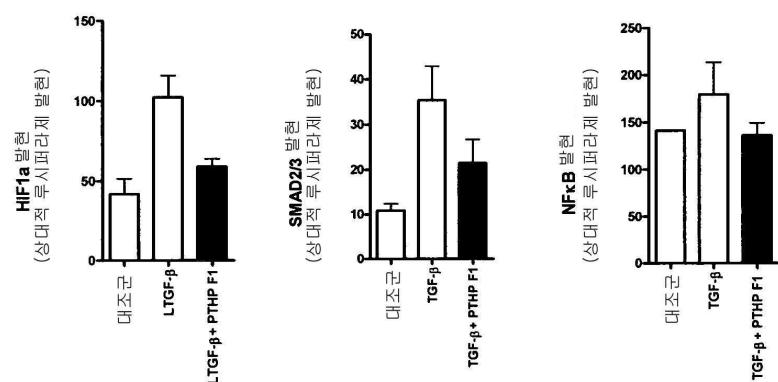
[0161] [화학식 2]



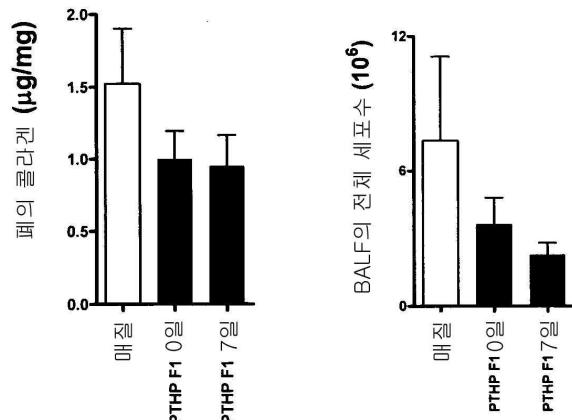
[0162]

## 도면

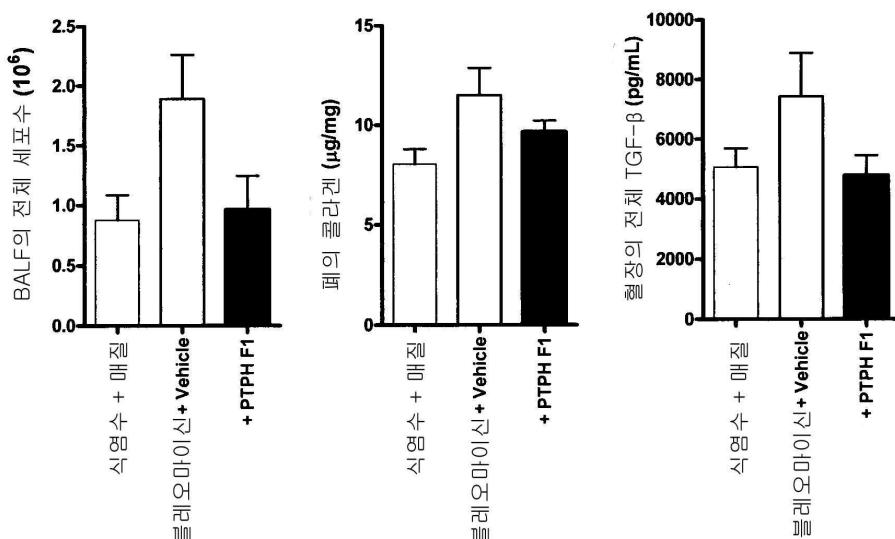
### 도면1



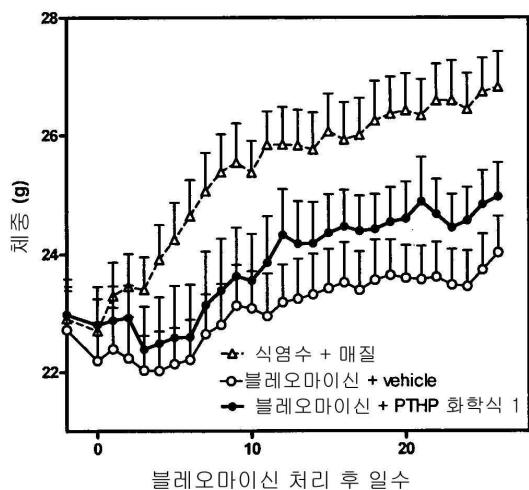
## 도면2



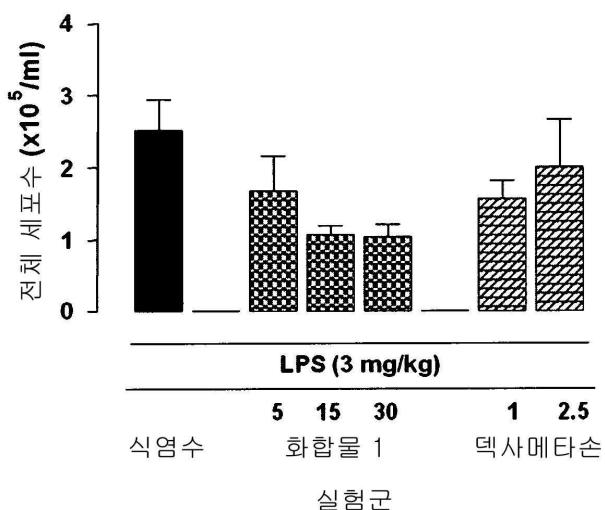
## 도면3



## 도면4

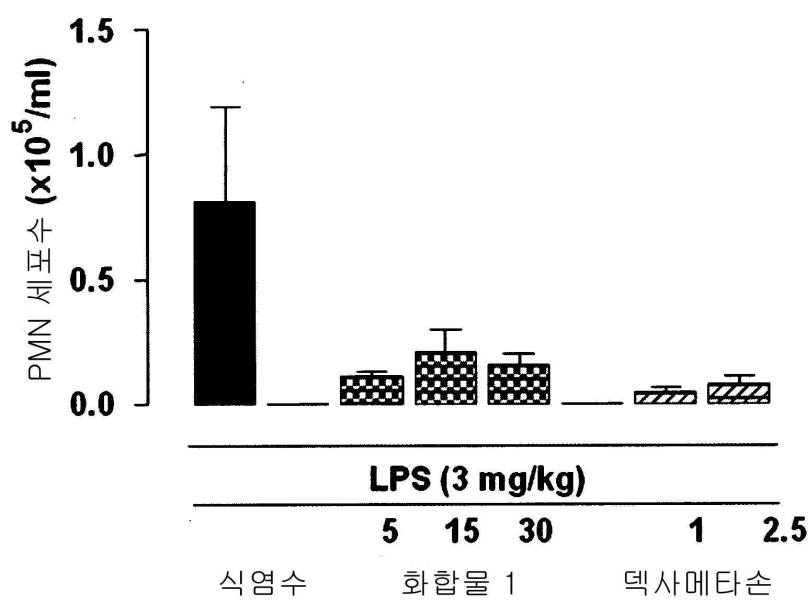


## 도면5



화학식 1의 화합물; n=1 및 R = 2,4-디메틸페닐

## 도면6



화학식 1의 화합물; n=1 및 R = 2,4-디메틸페닐

## 도면7

