



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0101164  
(43) 공개일자 2012년09월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/495* (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7020086(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2004년05월14일  
심사청구일자 2012년08월27일
- (62) 원출원 특허 10-2012-7014047  
원출원일자(국제) 2004년05월14일  
심사청구일자 2012년06월12일
- (85) 번역문제출일자 2012년07월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2004/015340
- (87) 국제공개번호 WO 2004/103304  
국제공개일자 2004년12월02일
- (30) 우선권주장  
60/471,017 2003년05월15일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
디엠아이 바이오사이언시스, 임크  
미국 콜로라도주 80110 이글우드 수이트 420 사우스 클락슨 3601
- (72) 발명자  
바르-오르 데이비드  
미국 80110 콜로라도주 잉글우드 이. 옥스포드 레인 900  
바르-오르 라파엘  
미국 80202 콜로라도주 덴버 원코프 스트리트 #214 1720  
시몬코비츠 리차드  
미국 80126 콜로라도주 하이글란즈 란스 이스트 테라스 드리브 2334
- (74) 대리인  
유미특허법인

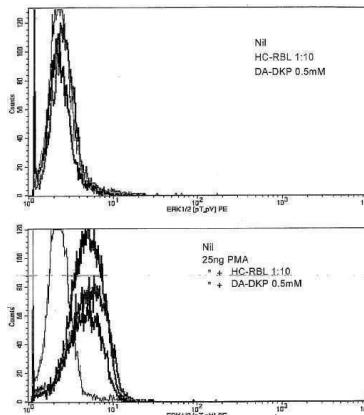
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 T-세포 매개성 질환의 치료 방법

**(57) 요약**

본 발명은 특정 디케토피페라진을 이용한 T 세포 매개성 질병의 치료방법 및 T 세포 활성화의 저해 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 특정 디케토피페라진을 포함하는 약학적 조성물 및 디케토피페라진 합성 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 조성물내 디케토피페라진의 함량 증가 또는 감소에 의한 단백질 및 웹티드의 개선된 약학적 조성물 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 개선된 약학적 조성물에 관한 것이다.

**대 표 도 - 도1**



(30) 우선권주장

60/489,270 2003년07월21일 미국(US)

60/514,930 2003년10월27일 미국(US)

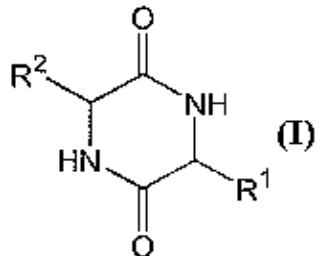
60/517,338 2003년11월04일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

식 I로 표시되는 디케토피페라진 또는 그것의 생리학적으로 허용가능한 염의 유효량을 포함하는, T 세포 매개성 질병의 치료용 조성물:



R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각은

(a) 아미노산의 측쇄이며, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린, α-아미노이소부티르산, 2,4-디아미노부티르산, 2,3-디아미노부티르산, 루신, 이소루신, 노르루신, 세린, 호모세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라진, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 하이드록시라이신, 히스티딘, 아르기닌, 호모아르기닌, 시트룰린, 페닐알라닌, p-아미노페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 티록신, 시스테인, 호모시스테인, 메티오닌, 페니실아민 또는 오르니틴이고; R<sup>1</sup>이 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄이면 R<sup>2</sup>는 라이신 또는 오르니틴의 측쇄일 수 없으며, R<sup>1</sup>이 라이신 또는 오르니틴의 측쇄이면 R<sup>2</sup>는 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄일 수 없고,

(b) R<sup>1</sup>는 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며, R<sup>2</sup>는 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며, 또는 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하고;

(c) 아미노산 측쇄의 유도체이며, 상기 아미노산은 상기 (a)에 기재된 아미노산들 중 하나이고 유도체화된 측쇄는

(i) -NHR<sup>3</sup> 또는 -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub> 기로 치환된 -NH<sub>2</sub> 기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴일 수 있으며,

(ii) -O-P(=O)(H)<sub>2</sub> 또는 -OR<sup>3</sup> 기로 치환된 -OH기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴일 수 있으며,

(iii) -COOR<sup>3</sup> 기로 치환된 -COOH 기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴일 수 있으며,

(iv) -CON(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> 기로 치환된 -COOH 기로, R<sup>4</sup>는 독립적으로 수소이거나 또는 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴일 수 있으며,

(v) -S-S-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH 또는 -S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH로 치환된 -SH기,

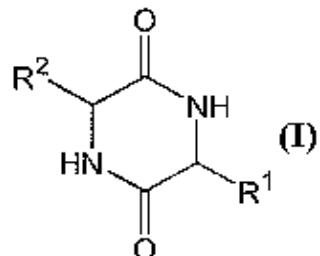
(vi) -CH(NH<sub>2</sub>)- 또는 -CH(OH)- 기로 치환된 -CH<sub>2</sub>-기,

(vii) -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 또는 -CH<sub>2</sub>-OH 기로 치환된 -CH<sub>3</sub>기, 및/또는

(viii) 할로겐으로 치환된 탄소 원자에 결합된 수소이다.

## 청구항 2

식I로 표시되는 디케토피페라진 또는 그것의 생리학적으로 허용가능한 염의 유효량을 포함하는, T 세포의 활성화 저해용 조성물:



$R^1$  및  $R^2$ 는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각은

(a) 아미노산의 측쇄이며, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린,  $\alpha$ -아미노이소부티르산, 2,4-디아미노부티르산, 2,3-디아미노부티르산, 루신, 이소루신, 노르루신, 세린, 호모세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라진, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 하이드록시라이신, 히스티딘, 아르기닌, 호모아르기닌, 시트룰린, 페닐알라닌, p-아미노페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 티록신, 시스테인, 호모시스테인, 메티오닌, 페니실아민 또는 오르니틴이고;  $R^1$ 이 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄이면  $R^2$ 는 라이신 또는 오르니틴의 측쇄일 수 없으며,  $R^1$ 이 라이신 또는 오르니틴의 측쇄이면  $R^2$ 는 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄일 수 없고,

(b)  $R^1$ 은  $-CH_2-CH_2-CH_2-$  또는  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며,  $R^2$ 는  $-CH_2-CH_2-CH_2-$  또는  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며, 또는  $R^1$  및  $R^2$ 는 각각 독립적으로  $-CH_2-CH_2-CH_2-$  또는  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하고;

(c) 아미노산 측쇄의 유도체이며, 상기 아미노산은 상기 (a)에 기재된 아미노산들 중 하나이고 유도체화된 측쇄는

(i)  $-NHR^3$  또는  $-N(R^3)_2$  기로 치환된  $-NH_2$  기로,  $R^3$ 은 독립적으로 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴일 수 있으며,

(ii)  $-O-P_3O_2H_2$  또는  $-OR^3$  기로 치환된  $-OH$ 기로,  $R^3$ 은 독립적으로 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴일 수 있으며,

(iii)  $-COOR^3$  기로 치환된  $-COOH$  기로,  $R^3$ 은 독립적으로 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴일 수 있으며,

(iv)  $-CON(R^4)_2$  기로 치환된  $-COOH$  기로,  $R^4$ 는 독립적으로 수소이거나 또는 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴일 수 있으며,

(v)  $-S-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$  또는  $-S-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ 로 치환된  $-SH$ 기,

(vi)  $-CH(NH_2)-$  또는  $-CH(OH)-$  기로 치환된  $-CH_2-$ 기,

(vii)  $-CH_2-NH_2$  또는  $-CH_2-OH$  기로 치환된  $-CH_3$ 기, 및/또는

(viii) 할로겐으로 치환된 탄소 원자에 결합된 수소이다.

**청구항 3**

동물에서 정상적으로 발견되는 웨티드 또는 단백질을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 상기 단백질 또는 웨티드로부터 유래된 1종 이상의 디케토피페라진을 포함하도록 상기 단백질 또는 웨티드가 처리되어진 것을 특징으로 하는, T 세포 매개성 질환의 치료용 조성물.

**청구항 4**

동물에서 정상적으로 발견되는 웨티드 또는 단백질을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 상기 단백질 또는 웨티드로부터 유래된 1종 이상의 디케토피페라진을 포함하도록 상기 단백질 또는 웨티드가 처리되어진 것을 특징으로 하는, T 세포 활성화의 저해용 조성물.

**청구항 5**

디케토피페라진 형성에 유효한 조건하에서 단백질 용액 또는 웨티드 용액을 열처리하는 단계를 포함하는 디케토피페라진의 합성 방법.

**청구항 6**

디케토피페라진 형성에 유효한 조건하에서 단백질 또는 웨티드의 두개의 N-말단 또는 두개의 C-말단 아미노산들을 결단하는 효소와, 단백질 용액 또는 웨티드 용액을 접촉시키는 단계를 포함하는 디케토피페라진의 합성 방법.

**청구항 7**

조성물내 존재하는 적어도 일부분의 디케토피페라진을 조성물에서 제거하는 단계를 포함하는, 단백질 또는 웨티드의 개선된 약학적 조성물의 제조 방법.

**청구항 8**

조성물내 디케토피페라진 함량이 증가되도록 단백질 또는 웨티드 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 단백질 또는 웨티드의 개선된 약학적 조성물의 제조 방법.

**명세서****기술 분야**

[0001]

본 발명은 특정 디케토피페라진을 이용한 T 세포 매개성 질병의 치료방법 및 T 세포 활성화 저해 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 특정 디케토피페라진을 포함하는 약학적 조성물 및 디케토피페라진 합성 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 조성물내 디케토피페라진의 함량 증가 또는 감소를 위한 단백질 및 웨티드의 개선된 약학적 조성물의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 개선된 약학적 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

T 세포 매개성 질병은 다수 면역계 질환들을 대표하는 질병이다. 특히 T 세포는 자가면역 질환을 발생시키고 영속시키는 것으로 간주되고 있다. 자가면역 질환은 미국에서만도 수백만명이 앓고 있는 80종의 중증 만성 질환들의 한 종류이다. 자가면역 질환은 내인성(자가) 항원에 대한 면역 반응성을 특징으로 한다. 자가 항원에 대한 면역 반응은 자가 반응성 T 세포의 지속적인 활성화 또는 정기적인 활성화에 의해 이루어지며, 자가 반응성 T 세포는 직, 간접적으로 자가면역 질환에서 확인되는 특징적인 조직 상해 및 조직 파괴에 원인이다. 자가 면역 질환 및 그외 T 세포 매개성 질병들에 대한 많은 치료제들이 제시되고 있지만, 여전히 또다른 치료제가 필요한 실정이다.

**발명의 내용****해결하려는 과제**

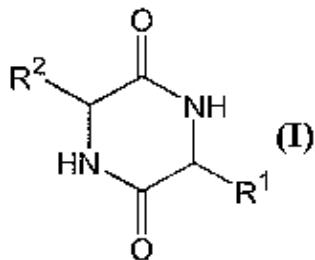
[0003]

발명의 개요

[0004]

본 발명은 T 세포 매개성 질병의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기 식으로 표시되는 디케토피페라진 또

는 그것의 생리학적으로 허용가능한 염의 유효량을 치료를 필요로하는 동물에게 투여하는 단계를 포함한다:



[0005]

상기I에서,

R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각은

(a) 아미노산의 측쇄이며, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린, α-아미노이소부티르산, 2,4-디아미노부티르산, 2,3-디아미노부티르산, 루신, 이소루신, 노르루신, 세린, 호모세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라진, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 하이드록시라이신, 히스티딘, 아르기닌, 호모아르기닌, 시트룰린, 페닐알라닌, p-아미노페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 티록신, 시스테인, 호모시스테인, 메티오닌, 페니실아민 또는 오르니틴이고; R<sup>1</sup>이 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄이면 R<sup>2</sup>는 라이신 또는 오르니틴의 측쇄일 수 없으며, R<sup>1</sup>이 라이신 또는 오르니틴의 측쇄이면 R<sup>2</sup>는 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄일 수 없고,

(b) R<sup>1</sup>는 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며 및/또는 R<sup>2</sup>는 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하고;

(c) 아미노산 측쇄의 유도체이며, 상기 (a)에 기재된 아미노산들 중 하나이고 유도체화된 측쇄는

(i) -NHR<sup>3</sup> 또는 -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub> 기로 치환된 -NH<sub>2</sub> 기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,

(ii) -O-P(=O)<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 또는 -OR<sup>3</sup> 기로 치환된 -OH기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,

(iii) -COOR<sup>3</sup> 기로 치환될 수 있는 -COOH 기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,

(iv) -CON(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> 기로 치환된 -COOH 기로, R<sup>4</sup>는 독립적으로 수소이거나 또는 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴일 수 있으며,

(v) -S-S-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH 또는-S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH로 치환된 -SH기,

(vi) -CH(NH<sub>2</sub>)- 또는 -CH(OH)- 기로 치환된 -CH<sub>2</sub>- 기,

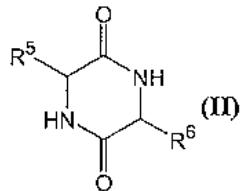
(vii) -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 또는 -CH<sub>2</sub>-OH 기로 치환된 -CH<sub>3</sub> 기, 및/또는

(viii) 할로겐으로 치환된 탄소 원자에 결합된 수소이다.

또한, 본 발명은 T 세포의 활성화를 저해하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효량의 식I로 표시되는 디케토피페라진 또는 그것의 생리학적으로 허용가능한 염을, T 세포의 활성화 저해를 필요로하는 동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명은 하기 식II로 표시되는 디케토피페라진 또는 그의 생리학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로

허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다:



[0021]

상기 식II에서,

R<sup>5</sup> 및 R<sup>6</sup>는 동일하거나 상이하며, 각각은

[0024]

(a) 아미노산의 측쇄이며, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린,  $\alpha$ -아미노이소부티르산, 2,4-디아미노부티르산, 2,3-디아미노부티르산, 루신, 이소루신, 노르루신, 세린, 호모세린, 트레오닌, 라이신, 하이드록시라이신, 히스티딘, 아르기닌, 호모아르기닌, 시트룰린, 페닐알라닌, p-아미노페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 티록신 또는 오르니틴이고; R<sup>5</sup>가 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄이면 R<sup>6</sup>은 라이신 또는 오르니틴의 측쇄일 수 없으며, R<sup>5</sup>가 라이신 또는 오르니틴의 측쇄이면 R<sup>6</sup>은 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄일 수 없고,

[0025]

(b) R<sup>5</sup>는 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며 및/또는 R<sup>6</sup>은 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하고;

[0026]

(c) 아미노산 측쇄의 유도체이며, 상기 (a)에 기재된 아미노산들 중 하나이고 유도체화된 측쇄는

[0027]

(i) -NHR<sup>3</sup> 또는 -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub> 기로 치환된 -NH<sub>2</sub> 기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,

[0028]

(ii) -O-P(=O)(H)<sub>2</sub> 또는 -OR<sup>3</sup> 기로 치환된 -OH기로, R<sup>3</sup>은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,

[0029]

(iii) -CH(NH<sub>2</sub>)- 또는 -CH(OH)- 기로 치환된 -CH<sub>2</sub>- 기,

[0030]

(iv) -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 또는 -CH<sub>2</sub>-OH 기로 치환된 -CH<sub>3</sub> 기, 및/또는

[0031]

(v) 할로겐으로 치환된 탄소 원자에 결합된 수소이다.

[0032]

본 발명은 T 세포 매개성 질환의 다른 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 동물에서 정상적으로 발견되는 웨პ티드 또는 단백질을 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 이를 필요로하는 동물에게 투여하는 단계를 포함하며, 또한 상기 조성물이 상기 단백질 또는 웨პ티드로부터 유래된 1종 이상의 디케토피페라진을 포함하도록 상기 단백질 또는 웨პ티드가 처리되어진다.

[0033]

또한 본 발명은 T 세포 활성화를 저해하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 동물에서 정상적으로 발견되는 단백질 또는 웨პ티드를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 이를 필요로하는 동물에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물이 상기 단백질 또는 웨პ티드로부터 유래된 1종 이상의 디케토피페라진을 포함하도록 상기 단백질 또는 웨პ티드가 처리되어진다.

[0034]

또한, 본 발명은 디케토피페라진 합성 방법을 제공한다. 일예로, 상기 방법은 디케토피페라진 형성에 유효한 조건하에서 단백질 또는 웨პ티드 용액을 열처리하는 단계를 포함한다. 두번째 예에서, 상기 방법은 디케토피페라진 형성에 유효한 조건하에서 단백질 또는 웨პ티드의 두개의 N-말단 또는 두개의 C-말단 아미노산을 절단하는 효소와, 단백질 또는 웨პ티드 용액을 접촉시키는 방법을 포함한다.

[0035]

또한 본 발명은 단백질 또는 웨პ티드의 개선된 약학적 조성물을 제공한다. 상기 개선은 상기 조성물이 디케토피페라진을 감소된 함량으로 포함하는 것이다.

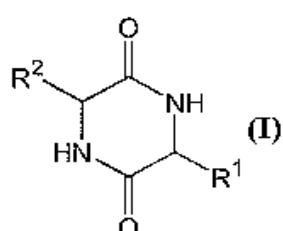
- [0036] 또한, 본 발명은 단백질 또는 펩티드의 개선된 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 조성물로부터 조성물내 존재하는 적어도 일정 부분 이상의 디케토피페라진을 제거하는 단계를 포함한다.
- [0037] 또한 본 발명은 단백질 또는 펩티드의 개선된 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 조성물내 디케토피페라진 함량이 증가되도록 단백질 또는 펩티드 용액을 처리하는 단계를 포함한다.
- [0038] 또한 본 발명은 단백질 또는 펩티드의 개선된 약학적 조성물을 제공한다. 개선은 상기 조성물이 디케토피페라진을 증가된 함량으로 포함하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0039] 발명의 상세한 설명

- [0040] 본 발명은 T 세포 매개성 질환의 치료 방법을 제공한다. 본원에서 "치료"는, 질환 치료를 포함하여 증상, 기간 또는 질환의 증증을 감소시키거나 또는 질환을 예방하는 것을 의미한다.
- [0041] T 세포 매개성 질환에는, 이식 거부반응, 이식 편대 숙주 질환, 원하지 않게 지연된 형태의 과민성 반응(예, 지연형 알레르기 반응), T 세포 매개성 폐 질환, 및 자가면역 질환이 있다. T 세포 매개성 폐질환으로는, 사코이드증(sarcoidosis), 과민성 폐렴(hypersensitivity pneumonitis), 급성 간질성 폐렴(acute interstitial pneumonitis), 폐포염(alveolitis), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis) 및 그외 염증성 폐 손상으로 특징되는 질환을 포함한다. 자가면역 질환으로는, 다발성 경화증, 신경 염(neuritis), 다발근육염(polymyositis), 건선(psoriasis), 백반증(vitiligo), 쇼그伦 증후군(Sjogren's syndrome), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 1형 당뇨병, 자가면역성 체장염(autoimmune pancreatitis), 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases)(예, 크론씨 질병 및 궤양성 대장염), 복부질환(celiac disease), 사구체신염(glomerulonephritis), 피부경화증(scleroderma), 사코이드증, 자가면역성 갑상선 질환(예, 하시모토 갑상선염 및 그레이브스 질환), 중증근무력증(myasthenia gravis), 애디슨 병(Addison's disease), 자가면역성 유베오레티니티스(autoimmune uveoretinitis), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 원발성 담즙성 간경변(primer biliary cirrhosis), 악성 빈혈(pernicious anemia) 및 전신성 루푸스 홍반증(systemic lupus erythematosus)을 포함한다.

- [0042] T 세포 매개성 질환은 하기 식으로 표시되는 디케토피페라진의 유효량을 이를 필요로하는 동물에게 투여함으로써 처리된다:



- [0043]

- [0044] 상기 I에서,

- [0045] R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각은

- [0046] (a) 아미노산의 측쇄이며, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린, α-아미노이소부티르산, 2,4-디아미노부티르산, 2,3-디아미노부티르산, 루신, 이소루신, 노르루신, 세린, 호모세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라진, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 하이드록시라이신, 히스티딘, 아르기닌, 호모아르기닌, 시트룰린, 폐닐알라닌, p-아미노페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 티록신, 시스테인, 호모시스테인, 메티오닌, 페니실아민 또는 오르니틴이고; R<sup>1</sup>이 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄이면 R<sup>2</sup>는 라이신 또는 오르니틴의 측쇄일 수 없으며, R<sup>1</sup>이 라이신 또는 오르니틴의 측쇄이면 R<sup>2</sup>는 아스파라진 또는 글루타민의 측쇄일 수 없고,

- [0047] (b) R<sup>1</sup>은 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시프롤린을 형성하며 및/또는 R<sup>2</sup>은 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-이고, 주변 고리 질소와 함께 프롤린 또는 하이드록시

프롤린을 형성하고;

- [0048] (c) 아미노산 측쇄의 유도체이며, 상기 아미노산은 상기 (a)에 기재된 아미노산들 중 하나이고 유도체화된 측쇄는
- [0049] (i)  $-\text{NHR}^3$  또는  $-\text{N}(\text{R}^3)_2$  기로 치환된  $-\text{NH}_2$  기로,  $\text{R}^3$ 은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,
- [0050] (ii)  $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$  또는  $-\text{OR}^3$  기로 치환된  $-\text{OH}$ 기로,  $\text{R}^3$ 은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,
- [0051] (iii)  $-\text{COOR}^3$  기로 치환될 수 있는  $-\text{COOH}$  기로,  $\text{R}^3$ 은 독립적으로 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴로 치환 또는 비치환될 수 있으며,
- [0052] (iv)  $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$  기로 치환된  $-\text{COOH}$  기로,  $\text{R}^4$ 는 독립적으로 수소이거나 또는 치환 또는 비치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤�테로사이클로알킬, 아릴, 알킬아릴, 아릴알킬 또는 헤�테로아릴일 수 있으며,
- [0053] (v)  $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  또는  $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 로 치환된  $-\text{SH}$ 기,
- [0054] (vi)  $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$  또는  $-\text{CH}(\text{OH})-$  기로 치환된  $-\text{CH}_2-$ 기,
- [0055] (vii)  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  또는  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  기로 치환된  $-\text{CH}_3$ 기, 및/또는
- [0056] (viii) 할로겐으로 치환된 탄소 원자에 결합된 수소이다.
- [0057] "치환된"은 아미노산 측쇄 식에서 특정 기가 그외 특정 기로 치환되는 것을 의미한다. 예를 들면, 이소루신 측쇄의 식은  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 이다. 말단의  $-\text{CH}_3$ 기는  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  기로 치환되는 경우, 형성된 유도체화된 이소루신 측쇄 식은  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ 가 된다. 다른 예로서, 알라닌 측쇄의 식은  $-\text{CH}_3$ 이다. 수소 원자들중 하나가 염소 원자로 치환되는 경우, 형성된 유도체화된 알라닌 측쇄는  $-\text{CH}_2-\text{Cl}$ 이 된다. 글리신의 측쇄는  $-\text{H}$ 이며, 이 수소가 염소(또는 그외 다른 할로겐) 원자로 치환되는 경우, 형성되는 측쇄는 고리 탄소에 결합된  $-\text{Cl}$ 일 것이다 (예,  $\text{R}^1 = -\text{Cl}$ ).
- [0058]  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  또는 둘 다는, 아스파르산의 측쇄, 글루탐산의 측쇄 또는 상기 측쇄의 유도체이며,  $-\text{COOH}$ 기는  $-\text{COOR}^3$ 기 또는  $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$  기로 치환되며,  $\text{R}^3$  및  $\text{R}^4$ 는 전술한바와 같은, 디케토피페라진이 바람직하다. 화합물들의 상기 기에서,  $-\text{COOH}$ 기는  $-\text{COOR}^3$ 기 또는  $-\text{CON}(\text{R}^4)_2$  기로 치환되고,  $\text{R}^3$  및  $\text{R}^4$ 는 상기와 동일한, 아스파르산 및 알라닌의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Asp-Ala DKP 또는 DA-DKP), 글루탐산 및 알라닌의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Glu-Ala DKP 또는 EA-DKP), 타이로신 및 아스파르산의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Tyr-Asp DKP 또는 YD-DKP), 타이로신 및 글루탐산의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Tyr-Glu DKP 또는 YE-DKP) 및 상기 4종의 디케토피페라진의 아스파르산 또는 글루탐산 측쇄들의 유도체를 포함하는 디케토피페라진이 가장 바람직하다.
- [0059] 또한,  $\text{R}^1$  및  $\text{R}^2$ 가 모두 소수성 측쇄(예, 페닐알라닌의 측쇄)이거나 소수성 측쇄 유도체들인, 디케토피페라진이 바람직하다. "소수성 측쇄 유도체"는 소수성인 유도체화된 측쇄를 의미한다. 특히,  $\text{R}^1$  및/또는  $\text{R}^2$ 가 동일하거나 또는 상이하며, 각각은 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린,  $\alpha$ -아미노부티르산, 루신, 이소루신, 노르루신 또는 페닐알라닌이며, 및/또는  $\text{R}^1$  및/또는  $\text{R}^2$ 는  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 이고 인접 질소 원자(들)과 함께 프롤린을 형성하는, 디케토피페라진이 바람직하다. 화합물들의 상기 기에서, 글리신 및 루신의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Gly-Leu DKP 또는 GL-DKP), 프롤린 및 페닐알라닌의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Pro-Phe DKP 또는 PF-DKP) 및 알라닌 및 프롤린의 측쇄를 포함하는 디케토피페라진(Ala-Pro DKP 또는 AP-DKP)이 가장 바람직하다.
- [0060] 추가적으로,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  또는 둘다가 메티오닌의 측쇄, 아르기닌의 측쇄 또는 이들 측쇄의 유도체인, 디케토피페라진이 바람직하다. 가장 바람직한 기는,  $\text{R}^1$ 이 메티오닌의 측쇄이고  $\text{R}^2$ 가 아르기닌의 측쇄인 디케토피페라진(Met-

Arg DKP 또는 MR-DKP)이다.

아미노산의 "측쇄"는 전술한 모든 아미노산의 공통적인  $\text{NH}_2\text{-CH-}\overset{|}{\text{COOH}}$  벡본에 부착된 아미노산 부분을 의미한다. 예를 들어, 글리신의 측쇄는  $-\text{H}$ 이고, 알라닌의 측쇄는  $-\text{CH}_3$ 이고, 세린의 측쇄는  $-\text{CH}_2\text{OH}$ 이다.

"소수성"은 생리적 pH에서 전하를 띠지 않으며 수계 용액에 반발하는 측쇄 또는 측쇄 유도체이다.

"알킬"은 탄소 원자 1-10개, 바람직하게는 1-6개를 포함하는 포화 직쇄 또는 분지쇄이다. "저급 알킬"은 탄소 원자 1-6개를 포함하는 포화 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소이다.

"사이클로알킬"은 적어도 1개 이상의 고리를 포함하는 포화 고리형 탄화수소이며, 각 고리는 적어도 3개 이상의 탄소 원자를 포함하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 사이클로알킬은 4-8개의 탄소 원자로 이루어진 하나의 고리를 포함한다.

"헤테로사이클로알킬"은 하나 이상의 고리의 하나 이상의 고리 탄소가 O, S 또는 N으로 치환된 사이클로알킬이다.

'아릴'은 적어도 하나 이상의 방향족 고리(예, 페닐)를 가지는 방향족 기이다.

"알킬아릴"은 아릴(예,  $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$  또는  $-\text{CH}_3\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_3$ )에 의해 치환된 H를 가지는 저급 알킬이다.

"아릴알킬"은 저급 알킬(예,  $-\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_3$ )에 의해 치환된 H를 가지는 아릴이다.

"헤테로아릴"은 O, S 또는 N로 치환된 하나 이상의 고리의 하나 이상의 고리 탄소를 가지는 아릴이다.

"치환"은 모이어티가  $-\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{COOH}$  및/또는 할로겐 원자로 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환되는 것을 의미한다.

"할로겐"은 염소, 불소, 브롬 또는 요오드이다. 바람직하게는 염소 또는 브롬이다.

식I의 디케토피페라진은 T 세포의 활성화를 저해하므로, T 세포 매개성 질환의 치료에 효과적이다. 따라서, 식I의 디케토피페라진은 또한 T 세포의 활성화에 의해 초래, 악화 또는 연루되는 염증 및 염증 질환의 치료에 사용될 수 있다. "저해"는 (모두 또는 부분적인) 감소 또는 예방을 의미한다.

디케토피페라진 제조 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 이러한 방법은 본 발명의 디케토피페라진 합성에 사용될 수도 있다. 예컨대, U.S. 특허 4,694,081, 5,817,751, 5,990,112, 5,932,579 및 6,555,543, US 특허 공개 번호 2004/0024180, PCT 출원 WO 96/00391 및 WO 97/48685, 그리고 Smith et al., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 8, 2369-2374(1998)를 참조하며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

예컨대, 디케토피페라진은 최초 디펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 디펩티드는 L-아미노산, D-아미노산 또는 L-아미노산과 D-아미노산의 조합을 이용하여 공지 방법으로 합성할 수 있다. 고상 펩티드 합성 방법이 바람직하다. 또한 디펩티드는 여러 곳으로부터 상업적으로 구입가능하며, 예컨대 DMI Synthesis Ltd., Cardiff, UK(custom synthesis), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO(primarily custom synthesis), Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA(custom synthesis), Fisher Scientific(custom synthesis) 및 Advanced ChemTech, Louisville, KY가 있다.

디펩티드를 합성 또는 구입한 다음, 고리화하여 디케토피페라진을 제조한다. 이는 여러가지 기술에 의해 수행될 수 있다.

예컨대, U.S. 특허 공개 번호 2004/0024180는 디펩타이드 고리화 방법을 개시하고 있다. 간략하게 설명하면, 디펩티드는 종류에 의해 물을 제거하면서 유기 용매내에서 열처리된다. 바람직하게는, 유기 용매는 아세토니트릴, 알릴 알콜, 벤젠, 벤질 알콜, n-부탄올, 2-부탄올, t-부탄올, 아세트산 부틸에스테르, 카본 테트라클로라이드, 클로로벤젠 클로로포름, 사이클로헥산, 1,2-디클로로에탄, 디에틸아세탈, 디메틸아세탈, 아세트산 에틸에스테르, 헵탄, 메틸이소부틸케톤, 3-펜타놀, 톨루엔 및 크실렌과 같이 물과의 저비등성 공비 혼합물이다. 온도는 고리화가 이루어지는 반응 속도에 의존적이며 사용된 공비성 물질 종류에 의존적이다. 반응은 50-200 °C에서 실시되는 것이 바람직하며, 80-150 °C이 더 바람직하다. 고리화 반응이 이루어지는 pH는 당업자라면 쉽게 결정할 수 있다. pH는 2-9가 효과적이며, 3-7이 바람직하다.

[0077]

디펩티드의 하나 또는 두개의 아미노산(예, 아스파르산 또는 글루탐산)은 그것의 측쇄에 카르복시 기를 가지거나 또는 가지도록 유도체화된 경우, 상기 디펩티드는 바람직하게는 미국 특허 6,555,543에 개시된 바와 같이 고리화된다. 즉, 측쇄 카르복시 기가 여전히 보호된 디펩티드는, 중성에서 열처리된다. 전형적으로, 디펩티드는 약 80 °C 내지 약 180 °C에서 열처리될 것이며, 바람직하게는 약 120 °C에서 열처리될 것이다. 상기 용매는 중성의 용매일 것이다. 예컨대, 용매는 알콜(예, 부탄올, 메탄올, 에탄올 및 고급 알콜, 그러나 폐놀은 아님)과 공비성 공용매(예, 툴루엔, 벤젠 또는 크실렌)을 포함할 수도 있다. 바람직하기로는 알콜은 부탄-2-올이며, 공비성 공용매는 툴루엔이다. 상기 열처리는 반응이 완료될 때까지 계속적으로 이루어지며, 시간은 경험에 의해 결정할 수 있다. 일반적으로 디펩티드는 약 8-24시간, 바람직하게는 약 18시간동안의 역류에 의해 고리화될 것이다. 마지막으로 보호성 기를 디케토피페라진에서 제거한다. 이때, 최종 화합물의 키랄리티(chirality)를 유지하기 위해, 강산(황산 또는 염산과 같은 미네랄산), 강 염기(수산화칼륨 또는 수산화나트륨과 같은 알カリ성 염기) 및 강력한 환원제(예, 수소화리튬 알루미늄)의 사용은 피하여야 한다.

[0078]

고상 수지상에서 제조된 디펩티드의 고리화와 수지로부터의 탈착은 단일 단계에서 이루어질 수 있다. 예, 미국 특허 5,817,751를 참조한다. 예를 들어, N-알킬화된 디펩티드가 부착된 수지는 아세트산(예, 1%) 또는 트리에틸아민(예, 4%)의 존재하에 툴루엔 또는 툴루엔/에탄올에 혼탁된다. 일반적으로 보다 빠른 고리화 시간을 위해 선 기본적인 고리화 조건이 바람직하다.

[0079]

아미노산 측쇄가 유도체화된 식I 및 II의 디케토피페라진을 제조하기 위해, 아미노산 유도체들을 디펩티드 합성에 사용할 수 있으며, 당업계에 공지된 바와 같이 디펩티드 및/또는 디케토피페라진은 유도체화될 수 있다. 예, 전술한 문헌들을 참조한다.

[0080]

그외 디펩티드 고리화 방법 및 디케토피페라진 제조 방법들이 공지되어 있으며 본 발명의 실시에 이용가능한 디케토피페라진 제조에 적용될 수 있다. 예, 전술한 문헌들을 참조한다. 또한, 본 발명의 이용에 적합한 다수의 디케토피페라진은 하기한 바와 같이 단백질 및 펩티드로부터 제조할 수 있다. 또한 본 발명의 실시에 이용될 수 있는 디케토피페라진은 예를 들어, DMI Synthesis Ltd., Cardiff, UK (custom synthesis)로부터 구입할 수 있다.

[0081]

식 I 및 II의 디케토피페라진은 개별적인 키랄 센터, 축 또는 표면의 배위를 변경시켜 수득할 수 있는 가능한 모든 입체 이성질체를 포함한다. 즉, 식I 및 II의 디케토피페라진은 모든 광학 이성질체(거울상 이성질체)뿐만 아니라 모든 가능한 부분입체 이성질체를 포함한다.

[0082]

또한 본 발명의 디케토피페라진의 생리학적으로 허용가능한 염 역시 본 발명의 실시에 이용할 수 있다. 생리학적으로 허용가능한 염으로는, 무기산(예, 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산 등), 유기산(예, 아세트산, 프로페온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말트산, 주석산, 시트르산, 글루탐산, 아스파르산, 벤조산, 살리실산, 옥살산, 아스코르빈산 등), 또는 염기(예, N,N-디벤질에틸렌디아민, D-글루코사민 또는 에틸렌디아민으로부터 유래된 약학적으로 허용가능한 금속 양이온 또는 유기 양이온의 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염)으로부터 유래된 염과 같은 공지의 무독성 염을 포함한다. 상기 염은 일반적인 방법, 예컨대 산을 이용한 화합물의 유리 염기 형태를 중화함으로써 제조된다.

[0083]

전술한 바와 같이, 본 발명의 디케토피페라진 또는 그것의 생리학적으로 허용가능한 염은 T 세포 매개성 질병의 치료 또는 T 세포 활성화 저해에 사용될 수 있다. 이를 위해, 디케토피페라진 또는 그것의 생리학적으로 허용가능한 염은 치료를 필요로하는 동물에게 투여된다. 바람직하기로는, 상기 동물은 토끼, 염소, 개, 고양이, 말 또는 인간과 같은 포유류이다. 본 발명의 화합물의 유효한 투약 형태, 투여 모드 및 투여량은 경험에 의해 결정할 수 있으며, 이러한 결정은 당업자에 의해 이루어진다. 당업자라면 채택된 특정 화합물, 치료되어야 하는 질병 또는 증상, 질환 또는 증상의 중증, 투여 경로, 화합물의 배설율, 치료 기간, 그외 동물에게 투여중인 약물 특성, 동물의 나이 신체 크기 및 종과 그외 의학 및 수의학 분야에서 알려진 인자들에 따라 투여량이 변경될 수 있음을 이해한다. 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적합한 1일 투여량은 치료 효과를 발휘하는데 유효한 최저 투여량의 화합물 함량일 것이다. 그러나 1일 투여량은 내과의사 또는 수의학자의 의학적인 판단 범위내에서 결정될 것이다. 적절하다면, 1일 유효 투여량은 하루에 적절한 시간 간격을 두면서 개별적으로 2, 3, 4, 5, 6, 또는 그 이상의 횟수로 나누어 투여될 수 있을 것이다. 화합물의 투여는 수용가능한 반응이 나타날 때까지 계속되어야 한다.

[0084]

본 발명의 화합물(즉, 디케토피페라진 및 그것의 생리학적으로 허용가능한 염)은, 경구, 코, 직장, 질, 비경구(예, 정맥내, 척수내, 복막내, 피하내 또는 근육내), 대조내(intracisternally), 경피, 두개내(intracranially), 대뇌내 및 국소(볼 및 설하)를 포함한, 적합한 모든 투여 경로에 의한 치료법으로, 동물 환

자에게 투여될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 경구 및 정맥내이다.

[0085] 본 발명의 화합물은 단독으로 투여되는 것도 가능하지만, 약학적 제형(조성물)으로 화합물을 투여하는 것이 바람직하다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 성분으로서 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 약학적으로 허용 가능한 담체 1종 이상과 혼합된 형태로 포함하며, 택일적으로 그외 1종 이상의 화합물, 약물 또는 그외 물질을 포함한다. 각 담체는 상기 제형의 그외 성분들과 혼화되며 동물에게 무해하다는 의미에서 "허용가능"하여야 한다. 약학적으로 허용가능한 담체들은 당업계에 잘 알려져 있다. 투여 경로 선택과는 무관하게, 본 발명의 화합물들은 당업자가 알고 있는 일반적인 방법에 의해 약학적으로 허용가능한 투약 형태로 제형화된다. 예, *Remington's Pharmaceutical Sciences*를 참조한다.

[0086] 본 발명의 경구 투여에 적합한 제형은, 각각 활성 성분으로서 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 미리 결정된 함량으로 포함하고 있는 캡슐제, 사케트제(cachets), 환제, 정제, 분제, 과립제, 수제 또는 비수계성 용액 또는 혼탁액, O/W 유화액, W/O 유화액, 엘리시르, 시럽, 향정(pastille)(젤라틴 및 글리세린과 같은 무활성의 베이스 또는 슈크로스 및 아카시아를 이용함) 등의 형태일 수 있다. 본 발명의 화합물 또는 화합물들은 또한 큰 환약(bolus), 연약(electuary) 또는 페이스트(paste)로 투여될 수도 있다.

[0087] 본 발명의 경구 투여용 고형 투약 형태(캡슐제, 정제, 환제, 드래그제, 분제, 과립제 등)에 있어서, 활성 성분(즉, 본 발명의 디케토피페라진 및/또는 생리학적으로 허용가능한 염 1종 이상)은 구연산나트륨 또는 인산제2칼슘과 같은 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 하기 모든 성분들과 혼합된다: (1) 총진제 또는 증량제, 예, 전분, 락토스, 슈크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 살릭산; (2) 결합제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로스 및/또는 아카시아; (3) 습윤제(humectants), 예, 글리세롤; (4) 봉괴제, 예, 아가-아가, 탄산칼슘, 감자 전분, 타피오카 전분, 알기닌산, 특정 실리케이트 및 탄산나트륨; (5) 완염용액제, 예 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤제(wetting agent), 예, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테레이트; (8) 흡수제, 예, 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예, 탈크, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴황산나트륨 및 이들의 혼합물; 및 (10) 착색제. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 약학적 조성물은 또한 완충화제를 포함할 수도 있다. 유사한 타입의 고형 조성물은 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등 뿐만 아니라 락토스 또는 우유당과 같은 부형제를 이용하여, 연질 및 경질 충진성 젤라틴 캡슐내에 충진제로서 사용될 수도 있다.

[0088] 정제는 택일적으로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 몰딩에 의해 제조될 수 있다. 압축성 정제는 결합제(예, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 무활성의 희석제, 보존제, 봉괴제(예, 전분글리콜산나트륨 또는 가교된 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨), 표면 활성제 또는 분산제를 이용하여 제조될 수도 있다. 몰드형 정제는 무활성의 희석액으로 수분을 가한 분말형 화합물의 혼합물을 적당한 기계내에서 몰딩함으로써 제조될 수 있다.

[0089] 본 발명의 약학적 조성물의 정제 및 그외 고형의 투약 형태, 예컨대 드래그제, 캡슐제, 환제 및 과립제는 선이 표시되거나 또는 장 코팅제 및 약학 제형 업계에 잘 알려진 그외 코팅제와 같은 코팅제 및 셀이 존재하는 형태로 제조될 수 있다. 또한 이는 예컨대 적합한 방출 특성을 제공하기 위한 여러가지 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 그외 폴리머 기질, 리포좀 및/또는 미세구를 이용하여 이에 함유된 활성 성분의 느린 방출 또는 조절성 방출을 제공하도록 제조될 수 있다. 이는 예컨대 박테리아 체류성 필터를 통한 여과로 제균화될 수도 있다. 또한 이러한 조성물은 선택적으로 불투명화제를 포함할 수 있으며 단지 활성 성분만 방출되거나 바람직하게는 위장관 특정 부위, 선택적으로 지연성 형태로 방출되는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 함침 조성물의 예로는 폴리머성 물질 및 약스가 있다. 또한 활성 성분은 미세캡슐화된 형태일 수 있다.

[0090] 본 발명에 따른 화합물들의 경구 투여를 위한 액상 투여 형태로는, 약학적으로 허용가능한 유화제, 미세유화제, 용액, 혼탁제, 시럽 및 엘리시르를 포함한다. 활성 성분이외에도 상기 액상 투여 형태는 예컨대 물 또는 그외 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸알콜, 이소프로필알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물과 같이 당업계에 일반적으로 사용되는 무활성의 희석제를 포함할 수도 있다.

[0091] 무활성의 희석제 뿐만 아니라, 경구용 조성물은 또한 습윤제, 유화제, 혼탁화제, 감미제, 조미료, 착색제, 향료 및 보존제와 같은 보강제를 포함할 수 있다.

[0092] 활성 성분 뿐만 아니라 혼탁제는, 예컨대 에톡실화된 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄

에스테르, 미세결정 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가-아가, 트라가칸트 및 이들의 혼합물과 같은 혼탁화제를 포함할 수도 있다.

[0093] 본 발명의 약학적 조성물의 직장 투여용 또는 질 투여용 제형은, 좌제일 수 있으며, 본 발명에 따른 1종 이상의 화합물 및, 예컨대 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제용 왁스 또는 살리실레이트를 포함한 적절한 무자극성 부형제 또는 담체 1종 이상을 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 이는 실온에서는 고체이지만 체온 조건에서는 액체화되므로, 따라서 직장 또는 질내에서 용해되어 활성 화합물이 방출될 것이다. 또한 질 투여로 적합한 본 발명의 제형은, 당업계에 적절한 것으로 공지된 담체를 함유하는 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 발포체 또는 분무 제형을 포함한다.

[0094] 본 발명의 따른 화합물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투약 형태로는, 분말, 분무제, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치, 점적제 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 멸균 조건하에서 약학적으로 허용가능한 담체, 임의의 완충제 또는 필요에 따라 추진제와 혼합될 수 있다.

[0095] 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 활성 성분 뿐만 아니라 동물성 및 식물성 지방, 오익, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리산, 탈크, 산화철 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0096] 분말 및 분무제는 활성 성분이외에도 락토스, 탈크, 실리산, 수산화알루미늄, 규산 칼슘, 폴리아미드 분말 또는 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다. 분무제는 부가적으로 클로로플루오로하이드로카본과 같은 통례의 추진제 및 부탄 및 프로판과 같은 비치환된 휘발성 탄화소수를 부가적으로 포함한다.

[0097] 경피 패치는 본 발명의 화합물의 조절성 전달을 신체에 제공하는 추가적인 이점을 가진다. 이러한 투약 형태는 엘라스토머성 매트릭스 물질(elastomeric metrix material)과 같은 적절한 매질에 본 발명의 화합물 1종 이상을 용해, 분산 또는 혼입함으로써 제조할 수 있다. 또한 흡수 증진제를 사용하여 본 발명의 화합물의 피부를 통한 유동률을 증가시킬 수 있다. 이러한 유동율은 속도 조절성 막을 제공하거나 또는 화합물을 폴리머 매트릭스 또는 젤내 분산시킴으로써 조절할 수 있다.

[0098] 약학적 조성물은 흡입, 취입(insufflation) 또는 코나 안내 투입에 의한 투여에 적합한 물질을 포함한다. 흡입에 의한 호흡관 상부(코) 또는 하부 투여시, 본 발명의 화합물은 취입기, 흡입기(nebulizer) 또는 압입화된 팩(pressurized pack) 또는 에어로졸 분무를 제공하는 그의 용이한 수단으로 편리하게 전달된다. 압입화된 팩은 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 및 그의 적합한 가스와 같은 적절한 추진제를 포함할 수도 있다. 압입화된 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계측 함량을 전달하기 위한 밸브를 구비함으로써 정할 수 있다.

[0099] 또한, 흡입 또는 취입에 의한 투여시, 상기 조성물은 건조 분말 형태, 예컨대 본 발명의 화합물 1종 이상과 락토스 또는 전분과 같은 적당한 분말 베이스의 분말 혼합 형태를 취할 수 있다. 분말 조성물은 예컨대 캡슐 또는 카트리지내에 단위 투약 형태로 존재하거나 또는 예컨대 분말을 흡입기, 취입기나 정량식 흡입기(metered-dose inhaler)를 사용하여 투여할 수 있는 젤라틴 팩 또는 블리스터 팩(blister pack)내 존재할 수 있다.

[0100] 코내 투여시, 본 발명의 화합물들은 점비제 또는 액상 분무제에 의해, 예컨대 플라스틱병의 분무기나 정량락식 흡입기에 의해 투여될 수도 있다. 전형적인 분무기로는 Mistometer(Wintrop) 및 Medihaler(Riker)가 있다.

[0101] 점안제 또는 점비제와 같은 점적제는, 또한 하나 이상의 분산제, 가용화제 또는 혼탁제를 포함하는 수계 또는 비수계 베이스와 함께 제형화될 수 있다. 분무액은 압입화된 팩으로부터 용이하게 전달된다. 점적제는 간단하게 뚜껑이 장착된 점안기 병이나, 특수 모양의 경계에 의해 액체 내용물이 점적형태로 전달되도록 고안된 플라스틱 병에 의해 전달될 수 있다.

[0102] 본 발명의 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물은, 본 발명에 따른 조성물 1종 이상을, 약학적으로 허용가능한 멸균된 등장성 수계 또는 비수계 용액, 분산제, 혼탁제 또는 유화제나, 사용 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산제로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합된 형태로 포함하며, 항산화제, 완충제, 정해진 수용체의 혈액과 등장을 형성하도록 하는 용질, 혼탁성 제제 또는 증점성 제제를 포함할 수도 있다.

[0103] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 수계 및 비수계 담체의 적합한 예로는, 물, 에탄올, 폴리올(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합, 올리브유와 같은 식물성 오일 및 에틸 올레이트와 같이 주사가능한 유기 에스테르가 있다. 적합한 유동성은, 예컨대 렉시틴과 같은 코팅 물질의 사용, 분산제의 경우 소요 입자 크기 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

- [0104] 또한 이러한 조성물은 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보강제를 포함할 수도 있다. 또한 당, 염화나트륨 등과 같은 등장성 제제를 조성물내에 함유하는 것이 적합할 수 있다. 또한 주사가능한 약학적 형태는 알루미늄 모노스테레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 장기간의 흡수를 제공할 수 있다.
- [0105] 일부 경우들에서는, 약물의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근육내 주사시 약물 흡수는 느리게 하는 것이 적합하다. 이는, 수용성이 낮은 결정질 또는 비결정질의 물질의 혼탁액을 사용함으로써 수행될 수 있다. 이후 약물의 흡수율은 이의 용해율에 의존적이며, 용해율은 결정의 크기 및 결정질 형태에 의존적일 수 있다. 또한, 비경구로 투여된 약물의 지연성 흡수는 오일 비히클내에 약물을 용해 또는 혼탁하여 실현된다.
- [0106] 주입가능한 디포트(depot) 형태는, 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 폴리머내에 약물의 미세캡슐 기질을 형성함으로써 제조된다. 약물대 폴리머의 비율과 사용하는 폴리머의 특성에 따라, 약물의 방출율을 조절할 수 있다. 그외 생분해성 폴리머의 예로는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수불)이 있다. 주입가능한 디포트 제형은 또한 약물을 리포좀 또는 신체 조직과 혼화가능한 미세유화제내에 포집시킴으로써 제조된다. 주입가능한 물질은 예컨대 세균 체류성 필터로 여과하여 제균할 수 있다.
- [0107] 제형은 용기 예컨대, 바이얼 또는 앰플로 포장된 단위 투여량 또는 다중 투여량으로 존재될 수 있으며, 동결건조 상태로 보관되어 사용 직전에 멸균 액상 담체, 예컨대 주사용수 첨가만을 필요로 할 수 있다. 즉석 주입액 및 주입 혼탁액은 전술한 형태의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조할 수도 있다.
- [0108] 본 발명의 이용에 적합한 디케토피페라진은 알부민, 면역글로불린 및 에리트로포이에틴을 함유하는 일부 상업적으로 이용가능한 정맥용 약학적 조성물내에 존재하는 것으로 확인되었다. 상기 약학적 조제물에 존재하는 디케토피페라진은 종종 상기 약학 조성물의 제조에 사용된 열처리 단계에 의해 형성된다. 상기 열처리로 인해 단백질의 두개의 N-말단 및/또는 두개의 C-말단 아미노산들의 절단 및 고리화가 이루어지며, 디케토피페라진이 형성된다.
- [0109] 따라서, 본 발명에 이용되는 디케토피페라진은 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴 및 그외 단백질 및 웨프티드의 용액들을 열처리함으로써 제조할 수 있다. 예컨대, 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴 또는 그외 단백질 웨프티드의 중성 pH의 인산 완충액내에서 제조한다. 바람직하기로는, 상기 용액은 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산의 양자 첨가(protonation)를 이루기 위한 고농도 용액(예, 약 100-500 mM)이다. 상기 용액은 디케토피페라진을 형성하기 위해, 약 2시간 내지 수일, 바람직하기로는 약 4일간 60 °C에서 열처리된다. 바람직하기로는 단백질 변성을 피해야 한다. 이는 시간을 짧게 하거나 및/또는 카프릴산 또는 N-아세틸 트립토판 각각을 약 0.02 M로 첨가함으로써 피할 수 있다.
- [0110] 본 발명에 사용되는 디케토피페라진은 또한 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴 또는 그외 단백질 웨프티드에, 단백질 또는 웨프티드로부터 두개의 N-말단 아미노산을 절단할 수 있는 효소(예, 디펩티딜 웨프티다제) 또는 단백질 또는 웨프티드로부터 두개의 C-말단 아미노산을 절단할 수 있는 효소(예, 카르복시펩티다제)를 접촉시킴으로써 제조할 수 있다. 적합한 디펩티딜 웨프티다제 및 카르복시펩티다제는 예컨대 시그마사로부터 구입가능하다. 반응은 pH 6-8에서, 바람직하게는 인산 완충액과 같은 완충액내에서, 단백질이 변형되지 않으면서 반응을 높일 수 있는 높은 온도(예, 37 °C)에서 실시되어야 한다.
- [0111] 수많은 단백질과 웨프티드의 아미노산 서열들은 공지되어 있으며, 적합한 N-말단 및/또는 C-말단 서열을 가진 단백질 또는 웨프티드를 선택하고 전술한 방법을 이용하여 적합한 디케토피페라진을 제공할 수 있다. 또한 적합한 서열의 웨프티드는 공지 방법으로 합성하여 사용할 수 있다.
- [0112] 디케토피페라진은 이를 포함하는 용액으로부터 정제할 수 있으며, 예컨대 알부민, 면역글로불린 및 에리트로포이에틴을 포함하는 상업적으로 구입가능한 약학적 조성물들을 공지 방법, 예컨대 크기 차 크로마토그래피(size-exclusion chromatography, 예, Centricon filtration), 친화성 크로마토그래피(예, 적합한 디케토피페라진(들)에 대한 항체 또는 항체들, 또는 절단된(truncated) 단백질 또는 웨프티드에 대한 항체나 항체들이 부착된 비드 컬럼을 이용함), 음이온 교환 또는 양이온 교환에 의해 정제할 수 있다. 정제된 디케토피페라진을 사용할 수 있으며 전술한 약학적 조성물내로 혼입될 수 있다.
- [0113] 디케토피페라진을 정제하지 않고, 동물에서 정상적으로 발견되는 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴 및/또는 그외 단백질이나 웨프티드를 포함하는 약학적 조성물을 투여하여 T-세포 매개성 질병 치료 및 T 세포 활성화 저해를 수행할 수 있다. 이러한 단백질 및/또는 웨프티드를 포함하는 현재 상업적으로 구입가능한 조성물은 그것이 디케토피페라진을 함유하고 있는 경우 사용할 수 있지만, 최종적으로 개선된 조성물을 투여하기 전에 적합한 디케토피페라진의 함량을 증가시키기 위해, 전술한 방법에 따라 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴, 그외

펩티드 및/또는 그외 단백질을 처리하는 것이 매우 바람직하다. 동물은 바람직하기로는 인간이며, 상기 단백질 및/또는 펩티드는 바람직하게는 인간의 단백질 및/또는 펩티드이다. 상기 조성물의 경우 투여가 바람직하다.

[0114] 단백질 및/또는 펩티드 조성물의 유효량은 경험적에 의해 결정할 수 있으며, 이러한 결정은 당업계의 권한내이다. 특히 단백질 및/또는 펩티드 조성물의 유효량을 결정하기 위해, 조성물내 존재하는 1종 이상의 디케토피페라진의 함량을 측정할 수 있으며, 유효량의 디케토피페라진이 전달되기에 충분한 함량으로 조성물은 동물에게 투여될 수 있다. 당업자는, 사용된 특정 조성물, 치료되는 질병 또는 증상, 질환 또는 증상의 종류, 투여 경로, 배설율, 치료 기간, 동물에게 투여중인 그외 약물의 특성, 동물의 나이, 신체 크기 및 종과, 의학 및 수의학 분야에서 알려진 그외 인자들에 따라 달라짐을 인지한다. 일반적으로, 단백질 및/또는 펩티드 조성물의 적정 1일 투여량은 치료 효과 발휘에 효과적인 최저 투약 함량일 것이다. 그러나 1일 투여량은 내과의사 또는 수의학자의 의학적인 판단 범위내에서 결정될 것이다. 적절하다면, 1일 유효 투여량은 하루에 적절한 시간 간격을 두면서 개별적으로 2, 3, 4, 5, 6, 또는 그 이상의 횟수로 나누어 투여될 수 있을 것이다. 투여는 허용 가능한 반응이 이루어질 될때까지 계속되어야 한다.

[0115] 전술한 바와 같이, 디케토피페라진은 1회 이상의 열처리 단계(살균)가 관여한 방법으로 제조된, 알부민, 면역글로불린 및 에리트로포이에틴의 상업적으로 구입가능한 정맥용 약학적 조성물에서 발견되는 것으로 확인되었다. 또한 디케토피페라진은 아마도 조성물 제조에 열처리 단계가 관여된, 단백질 및 펩티드의 다른 약학적 조성물내에 존재한다. 전술한 바와 같이, 다수의 디케토피페라진은 T 세포 활성화를 저해하는 능력을 가지고 있다. 따라서, 여러가지 상황에서, 디케토피페라진을 함유하는 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴 또는 기타 단백질 또는 펩티드 조성물을 환자에게 투여하는 것은 적합하지 않을 수 있다. 예를 들어, 알부민은 외상 환자에게 종종 투여되며, 면역 글로불린은 종종 감염 또는 면역 결핍성 환자에게 투여되며, 에리트로포이에틴은 악성 빈혈 또는 면역계가 빈번하게 타협하는 만성 질환자에게 투여된다. 따라서, 본 발명은 이러한 조성물로부터 적어도 일부분 이상의, 바람직하기로는 실질적으로 모든 디케토피페라진을 제거하는 방법을 제공한다. 디케토피페라진은 전술한 바(예, 크기차 크로마토그래피(예, Centricon filtration), 친화성 크로마토그래피(예, 적합한 디케토피페라진(들)에 대한 항체 또는 항체들, 또는 절단된(truncated) 단백질 또는 펩티드에 대한 항체나 항체들이 부착된 비드 컬럼을 이용함), 음이온 교환 또는 양이온 교환)와 같이 제거하여, 알부민, 면역글로불린, 에리트로포이에틴, 다른 단백질 및 펩티드의 개선된 조성물을 제공할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0116] 도 1. 항CD3 OKT3 항체로 자극하고, 25 ng의 포르발 미리스트산(PMA), 1:10 희석의 HC-RBL(열처리한 사람 모유의 분자량 3 kD 이하의 MR-DKP를 함유하는 분획) 및 0.5 mM DA-DKP로 37 °C에서 15분간 반응시킨 후 20일째에 분리한, TriPS 세포(인플루엔자로 면역화된 헵어글루틴 특이적 공여체로부터 분리한 CD4+ T 세포주)에 있어서, 카운트 트레싱(Tracings of count) 대 ERK1/2 농도.

도 2. 항-CD3 OKT3 항체로 자극화한 후 12일 후에 중앙 피사 인자  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 및 IL-16의 TriPS 세포로부터의 분비 저해를 나타낸 막대 그래프. 인간 모유(HC) 2626(MR-DKP 포함함) 밴드 DA-DKP에 의한 TNF  $\alpha$  및 IL-16의 분비 저해를 나타낸다. 고농도의 인간 모유의 용해 작용으로 인해, 최대 분비는 HC2626을 1:100 및 1:1000 희석 액으로 사용하였을 때 관찰되었다. 0.5 mM DA-DKP를 이용한 경우 용해가 관찰되지 않았으며 TNF  $\alpha$  및 IL-16 분비가 감소되었다.

도 3. 항-CD3 OKT3 항체를 이용하여 자극화한 다음 10일 후 TriPS 세포로부터 TNF  $\alpha$  분비 저해를 나타낸 막대그래프이다. HC 2626에서 보여진 바와 같이, HC RBL 및 DA-DKP는 적정 반응에 대해 추가적으로 평가되어져야 함을 나타낸다. 강력한 활성을 나타낼 수 있다.

도 4. 항-CD3 OKT3 항체를 이용하여 자극화한 후 여러가지 시간대에 TriPS 세포로부터의 TNF  $\alpha$  분비 저해를 나타낸 막대 그래프이다. 자극 주기의 초기에, DA-DKP 및 HC RBL 효과는 저해적이이나, 주기 후기(14일)에는 자극적인 효과를 나타낸다. HC 2626은 모든 시간 대에서 저해하는데, 이는 아마 다른 성분들로 인한 것이다.

도 5. 항-CD3 OKT3 항체를 이용하여 자극화한 후 7-10일 후에 H4#9.25 세포(마이엘린계 단백질에 특이적인 다발 경화증 환자의 부검 뇌 조직으로부터 분리한 D4+ T 세포 주)로부터의 TNF  $\alpha$  분비 저해를 나타낸 막대 그래프이다. 상기 T 세포주로부터의 TNF  $\alpha$  분비는 또한 HC 2626, HC RBL 및 DA-DKP에 의해 저해됨을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0117] 실시예 1: 랫 장에서의 Asp Ala DKP (DA-DKP) 및 Glu Ala DKP (EA-DKP) 흡수

- [0118] 직장의 유분 팔약근으로부터 랫의 장 가장자리를 분리하였고, 장간막 동맥을 통해 소 혈청 알부민을 함유한 적혈구 기저 관류액을 이용하여 관류시켰다. 장에서 유출되는 관류액은 간문맥혈의 도관에 의해 수집하였고, 재순환시켰다(재-산화 후). 평형 시기 이후에, 약 1 mg의 Asp-Ala 디케토피페라진(DA-DKP) 또는 1.4 mg의 Glu-Ala 디케토피페라진(EA-DKP)을 함유한 용액(약 1 ml)을 십이지장의 루멘내로 주입하였다.
- [0119] 투약 후, 관류액 연속 시료들을 투약 후 2시간 경과시까지 일정 시간 차로로 모았다. 상기 시료는 원심분리하고, 혈장은 액체 크로마토그래피-분자량 스펙트로미트리(LC-MS)로 2종의 환형 디펩티드에 대해 분석하였다.
- [0120] 그 결과, 관류 2시간 후에, 장 루멘으로부터 순환으로 흡수되어진 DA-DKP와 EA-DKP의 함량은 각각 투여량의 95%와 100%(실제 112%)이었다.
- [0121] 따라서, 2종의 환형 펩티드는 신속하고 효과적으로 장 루멘으로부터 혈액으로 흡수되지만, 이동중에 장 벽 투과를 통한 대사는 입증되지 않았다. 따라서, 잠재적 치료제는 경구로 주어질 수도 있다.
- [0122] 비변형 DA-DKP와 EA-DKP의 위장관으로부터 혈액으로의 신속한 흡수와, 관류한 랫 간 분리물에서의 2종의 화합물의 초회 통과 간 청소율(first pass hepatic clearance) 부족(데이터 미첨부함)은, 전-전신 청소율(pre-systemic clearance)이 낮음을 나타낸다. 이후 경구 투여가 이상적인 투여 경로일 것이다.
- [0123] 또한, 관류한 랫 간 분리물에 대한 실험들에서, 신장의 펩티다제에 의해 대부분 대사되는 죽쇄 펩티드와는 달리, 2종의 환형 디펩티드에 대한 신장 청소율은 비교적 낮은 것으로 나타났다.
- [0124] 이러한 결과를 종합하며, 디케토피페라진을 매일 낮은 투여량으로 사용하는 투약 요법은 치료학적 목적에 알맞음을 시사한다.
- [0125] 경구 투여후 랫에서의 예비 약물 동력학 결과는, 상기 2종의 환형 디펩티드의 결과와 일관되며, 1.1-3.7 mg/kg(체중)(DA-DKP) 및 1.5-4.8 mg/kg(체중)(EA-DKP)으로 투여후  $T_{max}$  값은 30-60분이며,  $C_{max}$  값은 4-6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (DA-DKP) 및 0.6-1.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (EA-DKP)이었다( $T_{max}$ 은 최대 농도에 도달하였을때의 시간이고,  $C_{max}$ 는 도달한 최대 농도이며; 이들 모두 수득한 데이터에 대한 곡선 일치 식으로부터 계산함).
- [0126] 예비 데이터는, DA-DKP와 그외 디케토피페라진이 혈관-뇌 장벽을 통과하는 것으로 나타났다. 따라서, DA-DKP와 그외 디케토피페라진은 다발성 경화증과 같은 신경계 질환 치료에 이용가능하다.
- [0127] 실시예 2: 인간의 Met-Arg DKP(MR-DKP)를 포함하는 인간의 모유 분획 및 Asp-Ala DKP (DA-DKP)에 의한 인간 T-림프구의 사이토카인 생성 저해
- [0128] A. 재료
- [0129] 본 실시예는, DA-DKP, MR-DKP를 포함하는 인간 모유(HC 2626) 및 MR-DKP를 또한 함유하는 인간 모유의 저분자량 분획(HC RBL; 탈지 모유를 센트리콘 여과하여 제조한 분자량 3000미만의 성분을 포함하는 인간 모유 분획)이 인간 T 림프구의 사이토카인 생성을 저해함을 입증한다. DA-DKP와 MR-DKP는 DM1 Synthesis, Ltd., Cardig UK로부터 제공받았다. 상기 2종의 디케토피페라진은 감염에 대한 생리적 반응시 자연적으로 형성되는 작은 화합물들이다. 또한 이들은 인간의 정맥내 면역글로불린(IVIg), 인간 알부민 및 그외 생물학적 제조물에서 때때로 발견된다.
- [0130] B. T 세포의 사이토카인 생성 저해
- [0131] 2개의 상이한 CD4+ 인간 T 림프구 클론을 테스트하였다. 세포주들중 하나(TRiPS)를 인플루엔자 면역화된 공여체로부터 분리하였고 이는 햄어글루티닌 펩티드 307-319에 특이적이다. 다른 세포주(H4#9.25)는 다발성 경화증 공여체의 검시 뇌 조직으로부터 분리하였고, 이는 마이엘린 염기성 단백질(아미노산 87-99)에 특이적이다. 두 개의 T 림프구 클론은 (1) 특이 항원과 HLA-DR2 양성 표시 세포 또는 (2) 항-CD3 및 항-CD28 항체 중 어느 하나로 시험관내에서 자극하면, 인터루킨 8(IL-8), 1L-16, 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 및 종양 괴사 인자  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )를 생산한다.
- [0132] T 림프구 세포주를 사전 자극한 후 18-20일째에 약  $4 \times 10^5$  세포를 이용하여 계대(passage)에 대해 자극하였다. 세포는 차가운 Iscove's Modified Dulbecco Minimal Essential Medium(TMDM, Sigma) 및 10% 소태아 혈청(FBS; American Type Culture Collection (ATCC))으로 1회 세척하고, 항-CD3 모노클로날 항체 OKT3(마우스 복수에서 수득)의 1:500 희석물을 포함하는 차가운 IMDM 배지 1.0 ml로 재현탁하였다. 세포는 얼음 위에 30분간 두어 항체와 반응시킨 다음 FBS가 무첨가된 차가운 배지로 세척하고, 50 U/ml의 인간 IL2(Xenometrix)가 첨가된 배지내

에서 공급 세포로 4000R-조사된 인간 공여체의 정상적인 말초 혈액의 백혈구(PBL) 약  $2 \times 10^6$ 를 혼합하였다. 여기에 FBS가 첨가된 새로운 IMDM 배지 및 IL-2를 첨가하여 3일간 배양하였다. 배양일은 OKT3으로 자극한 그날부터 계산하였다. 7일(최대 증식) 경과한 세포, 일반적으로는 14일(재자극에 가장 민감함) 경과한 세포 및 최대 21일(노화에 이르는 휴지기 세포) 결과한 세포를 실험에 사용할 수 있다.

[0133] 활성화 실험은 세포 분주물을 회수하여 따뜻한(37 °C) IMDM 배지로 2회 세척하여 수행하였다. 각 특이 분석에서,  $2 \times 10^5$  생존 세포는 특정 함량의 치료 첨가제(예, HC 2626, DA-DKP, PMA 등)가 함유된 따뜻한 IMDM 배지 최종 부피 0.9 ml에서 15분간 37 °C에서 전배양하였다. 자극 활성화를 위해,  $2 \times 10^5$  CD3/CD28 Dynabeads (Dyna1)를 따뜻한 IMDM 배지 0.1 ml에 첨가하여 37 °C에서 하룻밤(18시간)동안 배양하였다. 세포 배양물은 원심분리하여 세포를 펠렛화한 후 상층을 회수하였다. 특이 ELISA(예, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8, IL-16; Endogen)으로 사이토카인을 분석하였다.

[0134] 도 1-5에 나타난 바와 같이, 인간 모유(HC 2626)는 2종의 T 림프구 세포주에 의한 시험관내 사이토카인의 생산을 투여량에 의존적으로 저해하였다. 또한 도 1-5에 나타난 바와 같이, HC RBL와 DA-DKP는 자극 주기 초기에 2종의 T 림프구 세포주에 의한 시험관내 사이토카인의 생산을 투여량에 의존적으로 저해하였다. 그러나, HC RBL 및 DA-DKP는 주기 후반(14일 또는 그 이후)에 자극 효과를 보였다(도 4). HC 2626와 ETC RBL 둘다 MR-DKP(질량분광계로 측정)를 포함하지만, HC 2626은 세포 주기 후기에 저해 효과의 원인일 수 있는 MR-DKP 이외에도 다른 성분들(2003년 11월 25일자 출원한 10/723,247에 개시된 바와 같이, 항염증성일 수 있는 상대적으로 탈인산화된 단백질 형태인 카세인을 포함함)을 포함한다. 따라서, HC RBL와 HC 2626(둘다 MR-DKP를 포함함), MR-DKP 및 PA-DKP는 자극 주기 초기에 T 세포에 의한 사이토카인 생산을 저해하므로, 다발 경화증과 같은 T 세포 매개성 질환 및/또는 면역 질환시 염증성 사이토카인 반응을 하향 조절하는데 유용하다. 또한 이러한 결과는, HC RBL, ETC 2626, MR-DKP 및 DA-DKP가 휴지기 T 세포에 대한 작용없이 항원 특이 T 세포에만 선택적으로 작용할 것임을 나타낸다.

### C. 작용 기작

[0135] DA-DKP와 HC 2626(MR-DKP 함유)의 작용기작을 조사하였다. 이를 위해, 18일된 TRIPS 세포  $1 \times 10^6$ 을 아무것도 첨가하지 않거나("Nil"), CD3/CD28 Dynabeads (CD3/CD28 beads)를 첨가하거나, CD3/CD28 beads 및 0.5 mM DA-DKP를 첨가하거나 또는 CD3/CD28 beads 및 HC 2626 1:500 희석물을 첨가하여, 37 °C에서 30분간 배양하였다. 배양한 후, 세포는 세포-용해성 포유류 세포 추출용 반응시약(Cell-Lytic Mammalian Cell Extraction Reagent (Sigma))으로 용해하였다.

[0136] 이후 세포 추출물은 2배수 Hypromatrix 어레이에서 2시간동안 상온에서 배양한 다음, 제조사(Hypromatrix)의 프로토콜에 따라 2회 세척하였다. Hypromatrix 어레이는 표 1에 나열된 전사 인자에 대한 항체가 블록팅되어 있는 나일론 막이다. 인산화된 타이로신, 인산화된 세린 및 인산화된 트레오닌(Zymed)에 특이적인 항체 각테일을 첨가하여 1시간 배양하였다. 이후, 비오틴으로 표지된 항-면역글로불린 항체를 가하였다. 항-면역글로불린-비오틴을 세척하여 제거하고, 스트렙타비딘-페록시다제를 첨가한 다음, 어레이를 최종적으로 세척하고 페록시다제 반응성인 발광 기질을 첨가하였다.

[0137] 필름에 노출시켜 가시화하였고, 표 2에서처럼 0(음성) 또는 +에서 +++(양성)으로 수치화하였다. 표 2에서, 일부 사이토카인 전사 인자의 활성화(ERK1/2) 및 미리 형성된 사이토카인의 방출은 HC 2626(MR-DKP 함유) 및 DA-DKP에 의해 저해되었다.

### 표 1

Hypromatrix 어레이(custom): 단백질 인산화

번호	약어	화합물
1	Akt 1/2	단백질 키나제 B, 항-세포자살성 키나제
2	c-Cb1	TcR 저해 경로; Tyr <sup>292</sup> 인산화는 Syk 및 ZAP-70의 결합 및 불활성화를 활성화함.
3	CBP	csk 결합 단백질(PAG); csk를 분비하기 위한 통합 막 단백질 일시적 (및 저농도) Tyr-de-인산화
4	CREB	cAMP 반응 요소 결합 단백질; IL-2 프로모터의 활성화/하향 조절을 위한, POated(unk)

5	csk	COOH-말단 src 키나제; Ser <sup>364</sup> -인산화, Tyr-인산화(활성)는 lck를 인산화 및 불활성화함.
6	ERK	세포외 신호 관련 키나제
7	c-fos	TcR 자극에 의해 활성화된 AP-1 성분; N- 및 C-unk 잔기 둘다에 인산화
8	NFATC	활성화된 T 세포의 핵 인자; 무활성의 순수 상태
9	c-jun	TcR 활성화에 의해 활성화된 AP-1 성분; JNK-MAPK에 의해 Ser <sup>63</sup> 에 인산화
10	I <sub>K</sub> B- $\alpha$	NF <sub>K</sub> B의 저해자
11	pI <sub>K</sub> B- $\alpha$	세린 인산화 및 NF <sub>K</sub> B 저해자 불활성화
12	p38 MAPK	미토겐-활성화 단백질 키나제
13	PI3 키나제/p85	글루코코르티코이드 및 베타2-아드레날린성-R에 의해 활성화됨
14	pten	세포질 3'-이노시톨 포스파타제; 종양 억제 유전자는 PI-PO를 무활성의 형태로 변환함으로서 PI3' 키나제에 길항작용한다.
15	c-Raf-1	
16	Rap1	음성적인 TcR 조절성 GTPase
17	Ras	키나제; 아네르기중에 불활성화됨
18	fyn	세포막 결합된 즉각 TcR 신호 키나제
19	lck	세포막 결합된 즉각 TcR 신호 키나제, 활성형은 Tyr <sup>395</sup> 인산화된 형태;
20	ZAP70 키나제	CD3 $\zeta$ 으로부터시그널; POated at ? lck/fyn, ZAP70 POates LAT(T 세포 활성화에 대한 링커) at Tyr's and Tyr's on SLP-76

[0140]

[ 표 2 ]

[0141]

결과

화합물	Nil	CD3/CD28	DKP	HC2626
Akt 1/2	+	++	+++	++
c-Cbl	--	--	--	--
CBP	+	++	++	++
CREB	--	--	--	--
csk	+	++	+	+
ERK1	+	+	+	+
c-fos	--	--	--	--
NFATC	--	--	--	--
c-jun	++	+	+	+
I <sub>K</sub> B- $\alpha$	++	++	+	+
pI <sub>K</sub> B- $\alpha$	--	--	--	--
p38 MAPK	++	+++	+++	+++
PI3 kinase/p85	+	++	+	++
pten	--	--	--	--
c-Raf-1	--	--	--	--
Rap1	+	++	++	+
Ras	--	--	--	--
fyn	+	+	+	+
lck	--	--	--	--
ZAP70 kinase	--	--	--	--

[0142]

실시예 3: Gly-Leu DKP (GL-DKP) 및 Ala-Pro DKP (AP-DKP)에 의한 T 립프구의 시험관내 사이토카인 생산 저해

[0144]

GL-DKP 및 AP-DKP(DM1 Synthesis, Ltd., Cardiff, UK)를 TRiPS 및 H4#9.25 세포주를 이용하여 실시예 2에 따라

테스트하였다. GL-DKP 및 AP-DKP는 2종의 T 림프구 세포주에 의한 시험관내 사이토카인의 생산을 투여량 의존적인 양상으로 저해하는 것으로 확인되었다. 작용 기작은 실시에 2에서와 같이 현재 연구중에 있으며, 사이토카인 전사 인자의 활성화 및 전-형성된 사이토카인의 방출 모두에 작용하는 것으로 확인된다.

**[0145]** 실시예 4: Asp Ala DKP (DA-DKP) 및 Tyr Gin DKP (YE-DKP)에 의한 인간 T 림프구의 시험관내 사이토카인 생산 저해

**[0146]** 인간 유래의 정상 림프구를 정상인 공여체의 말초 혈액으로부터 Histopaque(Sigma)를 이용하여 분리하였다. 림프구  $3\text{--}4 \times 10^5$ 을 혈청이 첨가되지 않은 IMDM 1 ml에 혼탁하였다. 항-CD3 항체(Pharmingen, San Diego, CA)의 1:2000 희석물 25  $\mu\text{l}$ 을 첨가하고 37 °C에서 18시간 배양하여 세포를 자극하였다.

**[0147]** 이후, 3종의 DKP 조제물중 하나와 텍사메타손(최종 농도  $10^{-5}\text{M}$ )을 3배수로 배양물에 첨가하였다. 3종의 DKP 조제물은 다음과 같다:

1. DA-DKP(DMI Synthesis, Ltd., Cardiff, UK; 배양물내 최종 농도 25  $\mu\text{g/ml}$ ).

2. DKP-ZLB, 25% 알부민 조제물(ZLB Bioplasma, AG 3000 Berne 22 Switzerland) 60 °C에서 4일간 열처리한 후, 질량분광계를 사용하여 0.5 mM의 DA-DKP가 (배양물내 최종 농도 14  $\mu\text{g/ml}$ )로 함유되어 있음을 확인함).

3. DPK- $\gamma$ -glob --- 인간 완충화된 염수, pH 7.4내에 12 mg/ml의  $\gamma$ -글로불린을 포함한  $\gamma$ -글로불린 조제물 (Sigma, number G-4386)을 센트리콘 3000 필터로 여과하고, 여과물(MW 3000 미만의 성분들)을 사용하였다. 여과물은 네거티브 일레즈로스프레이 질량분광계와 연계된 음이온 교환 HPLC로 결정한 바와 같이, Tyr-Glu DPK (YE-DKP)의 분자량인 292를 포함한다. 여과물은 배양물에 최종 1:4로 희석하여 사용하였다.

**[0151]** DPK 조제물 또는 텍사메타손의 첨가 후, 배양물은 37 °C에서 18시간 배양하였다. 이후, 각 배양물로 분비된 IL-2, IFN $\gamma$  및 TNF $\alpha$ 의 함량을 ELISA(Pierce Biotechnology, Rockford, IL 61105)로 측정하였다.

**[0152]** 그 결과는 하기 표 3에 나타낸다. 표에서 확인된 바와 같이, DPK- $\gamma$ -글로브를 이용한 경우 3종의 사이토카인의 분비가 가장 많이 감소되었다. CD69+ T 세포 측정을 위한 유세포기에서, 또한 T 세포 리셉터 복합체가 내재화(internalization) 되었음에도 불구하고, 텍사메타손이 CD69+ T 세포의 수를 약 50%로 감소시키는데 반해, DPK- $\gamma$ -글로브는 90%로 감소시킨 것으로 확인되었다.

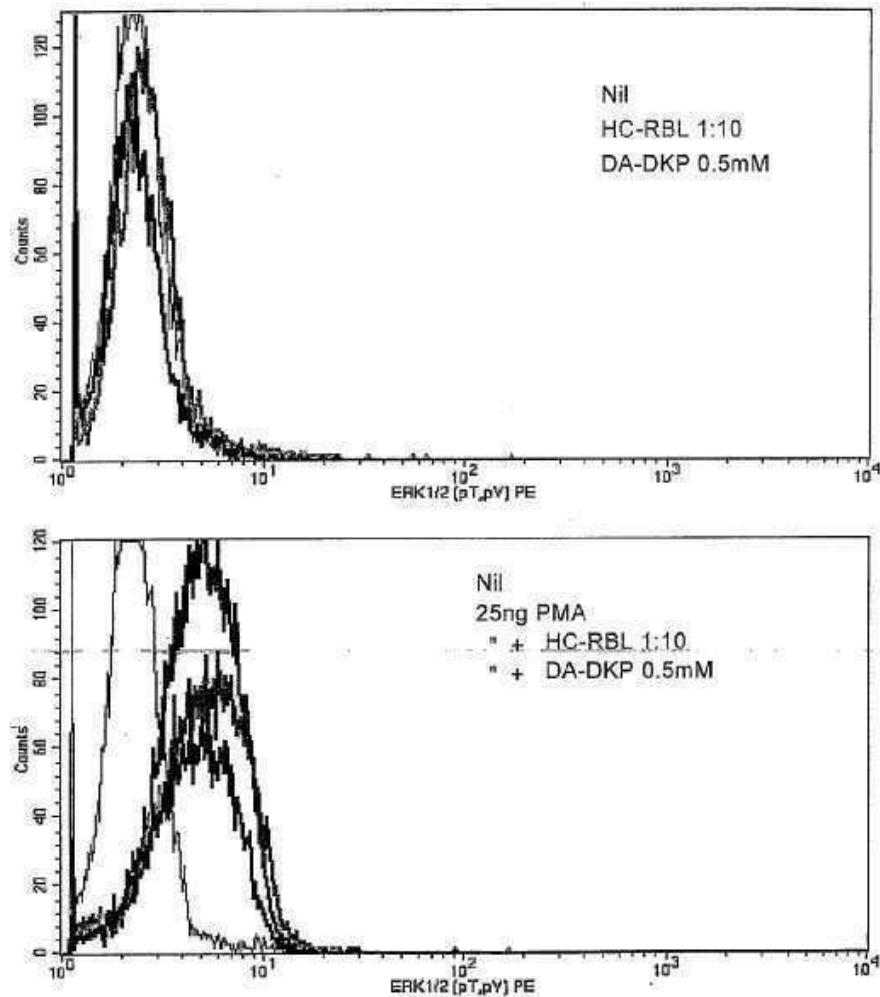
**[0153]** [표 3]

자극	처리	U/ml IL-2	pg/ml IFN $\gamma$	pg/ml TNF $\alpha$
Nil	---	0.24 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 0.5
CD3	---	2.6 $\pm$ 0.5	289 $\pm$ 35	98 $\pm$ 3.2
CD3	DA-DKP	1.4 $\pm$ 0.3	306 $\pm$ 17	74 $\pm$ 4.7
CD3	DKP-ZLB	1.4 $\pm$ 0.4	311 $\pm$ 18	130 $\pm$ 2.9
CD3	DKP- $\gamma$ -glob	0.24 $\pm$ 0.25 (91% 감소)	2.1 $\pm$ 0.1 (99% 감소)	1.6 $\pm$ 0.6 (98% 감소)
CD3	텍사메타손	0.9 $\pm$ 0.1 (65% 감소)	76 $\pm$ 7.32 (74% 감소)	4.1 $\pm$ 0.3 (96% 감소)

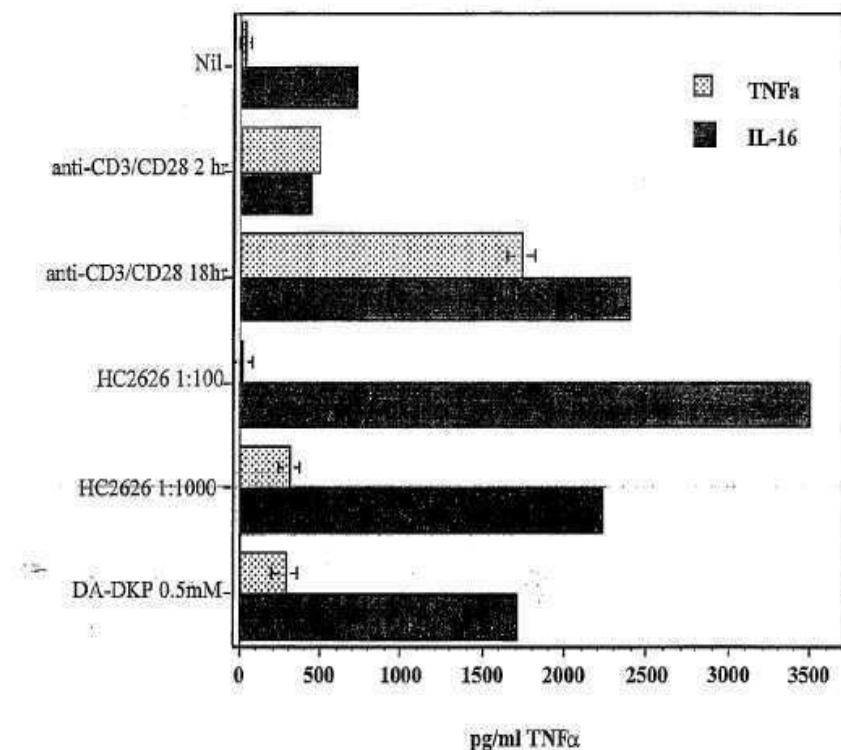
**[0154]**

도면

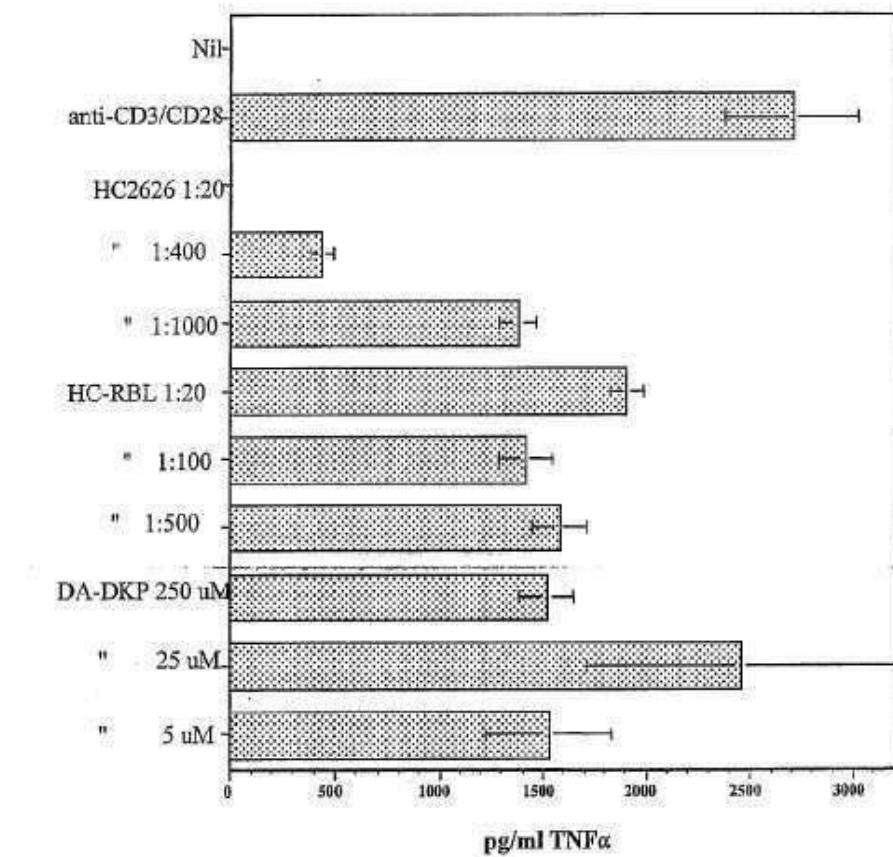
도면1



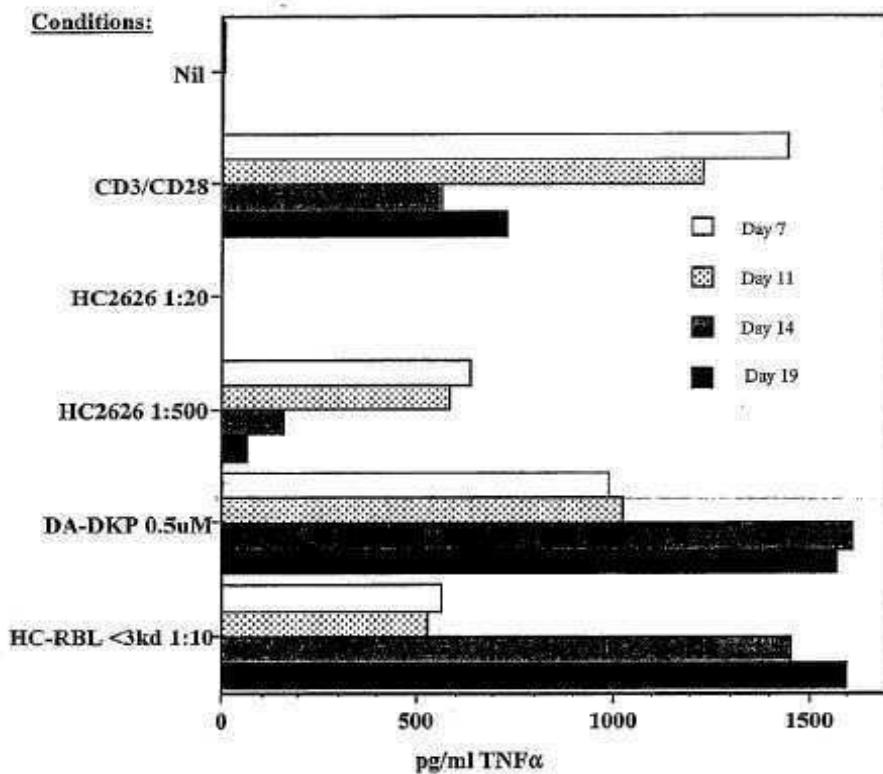
## 도면2



## 도면3



## 도면4



## 도면5

