



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0126031
(43) 공개일자 2017년11월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/74 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01) A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01) A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01) A61K 33/24 (2006.01)
A61K 47/06 (2017.01) A61K 47/10 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/74 (2013.01)
A61K 31/05 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7032166(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년11월13일
심사청구일자 2017년11월07일
- (62) 원출원 특허 10-2015-7015689
원출원일자(국제) 2013년11월13일
심사청구일자 2015년06월22일
- (85) 번역문제출일자 2017년11월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/069939
- (87) 국제공개번호 WO 2014/078447
국제공개일자 2014년05월22일
- (30) 우선권주장
61/725,881 2012년11월13일 미국(US)
- (71) 출원인
난트 홀딩스 아이피, 엘엘씨
미국, 캘리포니아, 컬버 시티, 제퍼슨 불러바드
9922 (우: 90232)
- (72) 발명자
니아지, 카이반
미국, 캘리포니아 91436, 엔시노, 에스칼론 드라이브 17041
라비자데, 샤흐루즈
미국, 캘리포니아 90077, 로스 엔젤레스, 엔젤로
드라이브 2816
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
강명구

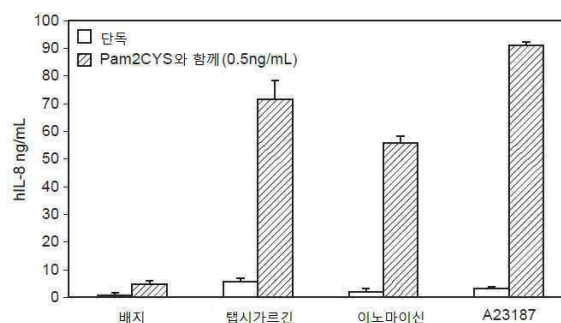
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 칼슘 유동 작동제 및 이의 방법

(57) 요약

칼슘 유동 작동제는 TLR- 또는 NOD-매개된 자극을 증진시키고 따라서 숙주의 면역 반응을 증가시키고 치유 시간을 줄이는 데에 이용된다. 바람직한 칼슘 유동 작동제는 Ca^{2+} 이오노포어(ionophore) 및 SERCA 저해제를 포함하고 TLR 또는 NOD 수용체에 대한 리간드가 존재하는 경우 상승적인 양으로 이용된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/122 (2013.01)
A61K 31/365 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
A61K 31/407 (2013.01)
A61K 31/423 (2013.01)
A61K 33/24 (2013.01)
A61K 47/06 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)

(72) 발명자

교로바토, 저스틴

미국 캘리포니아 90025, 로스 엔젤레스, 아파트
306, 애머스트 애비뉴 1331

순-시용, 패트릭

미국, 캘리포니아 90232, 컬버 시티, 제퍼슨 블러
바드 9920

르 나이, 안-로르

미국, 캘리포니아 91030, 사우스 패서디나, 밀란
애비뉴 2016

버즈코, 올렉산드르

미국, 캘리포니아 90024, 로스 엔젤레스, 아파트
511, 로체스터 애비뉴 10959

명세서

청구범위

청구항 1

박테리아 병원균에 의해 감염된 피부 치료용 제약학적 조성물에 있어서,

제약학적으로 허용되는 담체내 칼슘 유동 작동제를 포함하며,

여기서 제약학적 조성물은 손상된 또는 감염된 피부에 국부적인 적용을 위해 조제됨;

칼슘 유동 작동제는 손상된 또는 감염된 피부에 제제를 적용시, 패턴 인식 수용체의 리간드에 대한 손상된 또는 감염된 피부내 면역 적격 세포의 면역 반응을 증진시키는 양으로 존재하며;

이때 이 양은 리간드 부재시 면역 반응과 비교하여 리간드 존재하에서 상기 면역 반응을 공조적으로 증진시키며;

이때 증진된 면역 반응은 IL-8 분비를 최소 2배 증가시키는 것이며; 그리고

상기 칼슘 유동 작동제는 2,5-디-삼차-부틸하이드로퀴논(DBHQ), 탭시가르긴, 사이클로피아존산, 또는 이오노마이신, A23187중 최소한 하나이며; 그리고

이때 패턴 인지 수용체는 TLR(Toll-Like Receptor)2, TLR4, TLR5, TLR9, NOD(Nucleotide-binding Oligomerization Domain)1 및 NOD2중 최소한 하나인, 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 이때 칼슘 유동 작동제는 탭시가르긴, 이오노마이신, 또는 A23187중 하나인, 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 증진된 면역 반응은 최소 IL-8 분비를 최소 8배 증가시키는, 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 증진된 면역 반응은 최소 IL-8 분비를 최소 15배 증가시키는, 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 약학 조성물은 손상된 또는 감염된 피부에 적용되는 고형 담체를 통해 손상된 또는 감염된 피부에 국부적인 적용을 위해 조제되는, 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 칼슘 유동 작동제는 탭시가르긴인, 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 피부는 TLR 수용체 또는 NOD 수용체에 대한 리간드를 포함하는 박테리아 병원균으로 감염된, 약학 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 칼슘 유동 작동제의 양은 리간드 부재하에 면역 반응에 대한 상기 칼슘 유동 작동제의 최대 효과에 대하여 준최적(suboptimal) 양이 되는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2012년 11월 13일에 제출된, 일련 번호 제61/725881호인 동시 계류중인 가출원에 대한 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다.

[0002] 발명의 분야

[0003] 본 발명의 분야는 제약학적 화합물의 조성 및 방법, 그리고 특히 국부적으로 적용되는 칼슘 유동 작동제의 조성 및 방법이다.

배경 기술

[0004] 다양한 칼슘 유동 작동제는 해당 분야에서 공지되고 매우 상이한 기원을 가진다. 예를 들어, 특정 화합물은 이오노포어(ionophore)로서 작용하고 세포 내로 칼슘 이온을 이입시킴으로써 전형적으로 세포간 칼슘 수준을 올리는 반면에, 다른 화합물은 소포체 및 미토콘드리아와 같은 세포간 저장소로부터 칼슘 분비를 증가시킴으로써 세포간 칼슘 수준을 올린다.

[0005] 공지된 다양한 다른 이오노포어 중, 칼시마이신 (A23187) 및 이오노마이신은 천연 산물 (각각, Gram+ 박테리아 스트렙토마이세스 카르트레우센시스(*Streptomyces chartreusensis*) 및 스트렙토마이세스 콘글로바투스(*Streptomyces conglobatus*)로부터 나옴)이며, 이들은 수년 전에 항생제로서 처음으로 설명되었다. 더욱 구체적으로, A23187 및 이오노마이신 둘 모두, US 3960667 및 US 3873693에서 보고되었던 바와 같은 여러 가지 잠재적인 미생물 병원균에 대항하는 직접적인 항생 활성을 입증한다. 미생물 증식, 가령 박테리아 세포벽 합성 또는 박테리아 리보솜 기능에 특이적인 생화학적 경로를 저해하는 고전적인 항생제 (가령, 페니실린 또는 테트라사이클린)와는 다르게, A23187 및 이오노마이신은 상대적으로 높은 특이성을 가진 기질로서 이가 양이온을 결합시키는 항생 화합물의 개별적인 종류에 속한다. 예를 들어 A23187 결합 친화도는 $Mn^{2+} > Ca^{2+} = Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ 으로 특징지어 지고 이오노마이신은 $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$ 으로 특징지어 진다.

[0006] 반면에, 탭시가르긴은 전형적인 ER 분비자극성이고 세스퀴테르펜 락톤으로서 특징지어질 수 있다. 탭시가르긴은 식물 (탭시아 가르가니카(*Thapsia garganica*))로부터 단리되고 다양한 근형질 세망/소포체 Ca^{2+} ATPases (SERCA)의 비-경쟁적 저해제로서 작용한다. 탭시가르긴:SERCA 결합은 낮은 피코몰 범위에서 일정한 친화도를 입증하고 분할 및 비-분할 세포 모두에 대해 독성이다. 동물에서, 탭시가르긴과의 제한된 피부 접촉은 염증을 야기할 수 있고 만성 재발성 국부적 노출은 강한 DNA 손상제와의 접합에서 이용될 때 비-악성 유두종 형성을 야기할 수 있다. 탭시가르긴 (및 캅시가르기신과 같은 구조적 유사체 등)외에도, 다른 SERCA 저해제는 사이클로피아존산 (CPA) 및 2,5-디-삼차-부틸하이드로-퀴논 (DBHQ)을 포함한다.

[0007] 치료하기 어려운 피부 감염은 만성 피부 궤양으로 고통받는 당뇨 환자의 계속-증가하는 수, 항생 저항성 미생물 상의 존재 (가령, 메티실린-저항성 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 MRSA), 그리고 피사성 근막염 (또는 "살점을 파먹는 박테리아(flesh-eating bacteria) 병")의 발생 빈도 증가를 비롯한 여러 가지 이유로 공중 보건 우려를 나타낸다. 박테리아 외에도, 많은 곰팡이 및 바이러스도 또한, 피부의 유의적인 감염을 야기할 수 있다. 수많은 이들 질환에 대해 항생제가 최고의 치료 선택으로 남아있지만, 환자 자체의 세포 및 그들의 연관된 기능을 자극하여 진행중인 감염으로부터 환자 회복을 추가로 개선하고 그리고 가능하면 기질을 만날시 발병을 제한하기 위해 방어 유기체에 대해 장기간 면역력을 자극하는 것이 바람직할 것이다.

[0008] 더 고등인 유기체에서, 피부를 비롯한 상피 조직은 병원균-기반, 화학적, 및 물리적 습격에 대항하는 중요한 장벽으로서 역할을 한다. 피부의 표피층은 케라틴세포, 면역 세포, 가령 랑게르한스 세포 및 $CD8^{+}$ T 세포, 메르켈 세포 및 멜리닌세포로 구성된다. 질병 감시의 책임이 있는 수지상 세포 (DC)의 아류형인, 랑게르한스 세포 외에도, 케라틴세포 (전체 표피 모집단의 ~95%를 차지함)도 또한, 다양한 패턴 인식 수용체, 가령 톨(toll)-유사 수용체 (TLR) 단백질, C-유형 렉틴 수용체 (CLR), 인플라마솜(inflammasome) 등의 구성원의 이들 발현을 통하여 면역 감시체로서 역할을 한다.

[0009] 케라틴세포에서 그들의 동족 리간드에 의한 이들 수용체의 활성화는 다른 면역 세포 그리고 면역-조절 사이토카인, 가령 TGF- β 및 IL-10를 모집하기 위해 케모카인, 가령 인터류킨-8 (IL-8), CCL2, 및 CCL20의 방출을 야기한다. 표피 아래에서, 진피는 $CD4^{+}$ (Th1, Th2, Th17 등) 및 비-고전적 (가령 $\gamma \delta$, NK- 등) T 림프구, 다양한 항원 제시 세포 (가령 대식세포 및 진피와 형질세포 모양 DC), 비만 세포 및 섬유아세포의 다양한 아류형을 비

못한 매우 여러 가지 세포 유형으로 구성되며, 이들 중 많은 것들이 상기 설명된 다양한 패턴 인식 단백질 발현한다. 따라서, 표피 및 진피 세포 둘 모두, 미생물 침입 또는 유의적인 질병을 초래할 수 있는 다른 물리적 습격을 예방하기 위해 협력한다.

[0010] TLR 단백질 (인간에서 TLR 1-10)은 조직 항상성과 질병과 연관된 리간드의 특이적인 종류에 대한 패턴 인식 수용체 (PRR)로서 역할을 하는 유형 I 막 단백질이고 따라서 여러 가지 면역 및 비-면역 세포 유형 등에서 발견된다. 모든 수용체와 마찬가지로, TLR 신호 전달은 리간드 결합으로써 촉발되며, 리간드는 병원균-연관 분자 패턴 (또는 PAMP) 및 질병-연관 분자 패턴 (DAMP)으로 그룹화될 수 있다.

[0011] TLR-인식된 PAMP는 박테리아 리포단백질/리포펩티드, 리포사카라이드, 플라젤린, 및 메틸화되지 않은 CpG DNA, 곰팡이 세포벽 성분 (가령 지모산), 및 바이러스 핵산 (dsRNA, ssRNA, 및 CpG DNA)을 포함하는 반면에, DAMP는 숙주로부터 직접적 유래되고, 감염의 부재에서 일어날 수 있고, 그리고 TLR 패밀리의 단백질 (TLR2 및/또는 TLR4 중 하나)의 오로지 두 가지 구성원에 의해 주로 인식된다.

[0012] 그들의 적절한 리간드에 의해 일단 활성화되고 나면, TLR은 감염/질병의 정도를 제한하고 조직 수복을 촉발하는 역할을 하는 신호전달 캐스케이드를 개시한다. 후자에 관련하여, TLR 리간드 인식은 항균 활성의 상향-조절을 야기하고 침입 병원균의 파괴를 완결하도록 다양한 면역학적 참가자의 활성화/성숙을 야기한다. 예를 들어, TLR 활성화는 활성 산소종 (ROS)의 방출, 항균 펩티드, 및 선천적 세포, 가령 대식세포, 중성구, 케라틴세포 등에서 식세포 기능의 상향조절을 야기할 수 있다. 질병을 방지하는 데에서의 그들의 역할 외에도, TLR은 또한, 다양한 조직 손상 (화학, 방사선, 수술 및 감염 손상에 의해 유도된 것을 포함) 모델에서 입증된 바와 같은 조직 수복 및 재생에 관련한다.

[0013] 추가적인 종류의 패턴 인식 수용체는 NOD-유사 수용체 단백질 패밀리에 의해 형성되고, 가장 뚜렷한 구성원으로서 NOD1 및 NOD2를 포함한다. NOD1 및 NOD2는 세포간 패턴 인식 수용체이며, 이는 식물의 저항성 단백질에 대한 구조와 유사하고, 각각, D-글루탐산-메소-디아미노피멜산 및 무라밀 디펩티드를 함유한 박테리아 분자를 인식함으로써 선천적 및 후천적 면역을 매개한다. 이들 각각의 리간드에 의한 자극 후, 두 NOD 단백질 모두, 각각의 인식 도메인을 통하여 RIPK2와 상호작용하며, 이는 궁극적으로 전사 인자 NF- κ B의 활성화를 야기한다.

[0014] 신호 전달 (가령 단백질 키나아제 C 작동제 TPA/PMA 또는 지속되는 칼슘 유동 작동제, 가령 A23187, 이오노마이신, 또는 탭티가르긴)의 소분자 작동제의 국부적인 적용에 대한 완전한 피부의 반응을 특성화하기 위한 이전의 노력은 하향적인 결과의 스펙트럼을 입증하였다. 예를 들어, 포르볼 에스테르 TPA의 국부적인 적용은 혈관확장, 미세혈관 투과성 변형, 염증 세포 모집, 및 다양한 세포 유형으로부터 전-면역 인자의 방출을 야기하였다. PKC 작동제와는 대조적으로, 지속된 칼슘 유동 작동제 (SCFA)로의 국부적인 처리는 피부 염증 및 과도한-증식을 야기하였다. 다른 한편으로는, 상대적으로 많은 양의 칼슘 이오노포어 (이오노마이신)의 존재에서 TLR 리간드 (LPS)에 세포의 노출은 임의의 측정가능한 면역자극 효과를 초래하지 않았다 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 10; 109(28): 11282-7). 상대적으로 높은 투여량으로 개별적으로 적용될 때, 칼슘 이오노포어 및 TLR 리간드는 US 2012/0272700A1 및 US 2013/0183343A1에서 논의된 바와 같이 분화를 자극시키거나 수지상 세포를 활성화하는 것으로 공지된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서, 칼슘 유동 작동제에 대한 수많은 조성물 및 용도 및/또는 TLR/ NOD에 대한 리간드가 해당 분야에서 공지되지만, 개선된 면역조절 활성을 제공하는 조성물과 방법이 제공될 필요가 여전히 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 발명의 요약

[0017] 본 발명의 주제는 칼슘 유동 작동제의 다양한 조성 및 방법에 대해 접근하며, 여기서 이들 화합물은 TLR- 또는 NOD-매개된 사건에 대한 면역 반응을 조절하는 데에, 그리고 TLR 및/또는 NOD 리간드 결합에 대한 반응을 상승적으로 증가시키는 데에 이용된다. 특히, 면역 자극에 관한 상승적인 효과는 칼슘 유동 작동제가 준최적 농도로 존재할 때 관찰된다.

[0018] 상이한 관점에서 보면, 발명자는 세포간 Ca^{2+} 의존 TLR/NOD 신호전달을 증폭시키기 위해 칼슘 유동 작동제의 용도

를 고려한다. 따라서, 적합한 다른 용도 중에서, 특히 고려되는 용도는 TLR/NOD-의존 자극 (가령, 감염 또는 손상)에 대한 증진된 반응을 허용하기 위해 조직의 전-조건화, 및/또는 세포간 Ca^{2+} 의존 TLR/NOD 신호전달을 증폭시키기 위해 칼슘 유동 작동제로 상피의 국부적 또는 다른 감염의 치료를 포함한다. 결과적으로, 발명자는 상처 치유를 자극하기 위해, 및/또는 흉터를 감소시키기 위해 피부 감염 및 다른 질병 (가령 당뇨병성 궤양)의 예방 및/또는 치료를 위한 국부적인 제약학적 및 화학 조성물을 또한 고려한다.

- [0019] 발명 주제의 하나의 측면에서, 발명자는 패턴 인식 수용체의 리간드에 대한 면역 적격 세포의 면역 반응을 증진시키기 위해 칼슘 유동 작동제의 용도를 고려한다. 예를 들어, 칼슘 유동 작동제가 칼슘 이오노포어인 경우, 바람직한 작동제는 이오노마이신, 칼시마이신, 뷰베리신, 칼슘 이오노포어 II, 칼슘 이오노포어 IV, 칼슘 이오노포어 V, 및 칼슘 이오노포어 VI를 포함하고, 그리고 작동제가 SERCA 저해제인 경우, 바람직한, SERCA 저해제는 DBHQ (2,5-디-삼차-부틸하이드로퀴논), 탭시가르긴, 루테늄 레드, 진저롤, 팍실린, 및 사이클로피아존산을 포함한다. 관찰가능한 다른 현상 중에서도, 증진된 면역 반응은 전형적으로 증가된 IL-8 분비 및/또는 NF- κ B 신호전달의 증가된 활성화로 입증되고, 면역 반응은 특히 (리간드의 부재에서의 칼슘 유동 작동제의 최대 효과에 관하여) 칼슘 유동 작동제가 준최적 농도로 이용되는 경우, 리간드의 존재에서 칼슘 유동 작동제에 의해 상승적으로 증진된다는 점이 바람직하다.
- [0020] 적합한 세포에 관하여, 세포는 면역 적격 세포이고, 이는 바람직하게, 피부의 표피층 또는 진피층에 상주할 것이라는 점이 일반적으로 고려된다. 더욱이, 면역 적격 세포는 패턴 인식 수용체로서 TLR 수용체 및/또는 NOD 수용체를 일반적으로 발현할 것이다. 따라서, 리간드는 전형적으로 PAMP 및 DAMP 리간드를 포함할 것이다.
- [0021] 결과적으로, 발명자는 피부에서 면역 반응을 증진시키기 위해 국부적으로 적용되는 약물의 제조에서 칼슘 유동 작동제의 용도를 또한 고려한다. 이러한 용도에서, 면역 반응은 면역 적격 세포내 패턴 인식 수용체와 (PAMP 또는 DAMP) 리간드의 결합과 일반적으로 연관되고, 그리고 상기 패턴 인식 수용체는 가장 전형적으로 TLR 수용체 또는 NOD 수용체이다. 상기 언급된 바와 같이, 바람직한 칼슘 유동 작동제는 칼슘 이오노포어 (가령, 이오노마이신, 칼시마이신, 칼슘 이오노포어 II, 칼슘 이오노포어 IV, 칼슘 이오노포어 V, 또는 칼슘 이오노포어 VI), 및 SERCA 저해제 (가령, 2,5-디-삼차-부틸하이드로퀴논, 탭시가르긴, 루테늄 레드, 진저롤, 팍실린, 또는 사이클로피아존산 등)를 포함하고, 및/또는 상기 칼슘 유동 작동제는 작동제가 준최적 농도로 리간드의 존재에서 세포내 존재하도록 하는 농도로 약물에서 존재한다.
- [0022] 결과적으로, 그리고 상이한 관점에서 보면, 발명자는 피부의 상처 치유를 증진시키기 위해 국부적으로 적용되는 약물의 제조에서 칼슘 유동 작동제의 용도를 또한 고려한다. 이러한 경우에, 칼슘 유동 작동제는 상처에서 세포의 NF- κ B 신호전달을 활성화하는 데에 효과적인 양으로 국부적으로 존재한다. 이러한 용도는 상처가 (전형적으로 TLR 수용체 및/또는 NOD 수용체에 대한 리간드를 발현하거나 생성하는) 박테리아 병원균으로 감염된 경우 특히 유리하다.
- [0023] 발명 주제의 또 다른 측면에서, 발명자는 제약학적으로 허용되는 담체에서 칼슘 유동 작동제 (가령, 칼슘 이오노포어 또는 SERCA 저해제)를 포함하는 제약학적 조성물을 또한 고려하며, 여기서 제약학적 조성물은 손상된 또는 감염된 피부에 국부적인 적용을 위해 조제되고, 칼슘 유동 작동제는 손상된 또는 감염된 피부에 체제를 적용시, 패턴 인식 수용체 (가령, TLR 수용체 또는 NOD 수용체)의 리간드에 대한 손상된 또는 감염된 피부내 면역 적격 세포의 면역 반응을 증진시키는 양으로 존재한다. 이러한 제약학적 조성물은 예를 들어, 액체, 스프레이, 또는 겔로서 조제될 수 있는 반면에, 제약학적 조성물은 손상된 또는 감염된 피부에 적용되는 고형 담체 (가령, 제약학적 조성물이 스며들어 있는 상처 드레싱(dressing) 또는 반창고(band aid))를 통해 손상된 또는 감염된 피부 국부적인 적용을 위해 조제되는 것으로도 또한 고려된다. 예를 들어, 피부는 TLR 수용체 또는 NOD 수용체에 대한 리간드를 포함한 (가령, 박테리아) 병원균으로 감염될 수 있다.
- [0024] 특정하게 바람직한 제약학적 조성물에서, 칼슘 유동 작동제 (가령, 이오노마이신, 칼시마이신, 또는 탭시가르긴)의 양은 리간드의 부재에서의 면역 반응과 비교하여, 리간드의 존재에서 면역 반응을 상승적으로 증진시킨다.
- [0025] 따라서, 발명자는 패턴 인식 수용체의 리간드 (가령, PAMP)에 대한 패턴 인식 수용체 (가령, TLR 수용체 또는 NOD 수용체)를 발현하는 세포의 면역 반응을 증진시키는 방법을 또한 고려하며, 여기서 상기 방법은 리간드의 존재에서 면역 반응을 증진시키는 양으로 칼슘 유동 작동제 (가령, SERCA 저해제 또는 칼슘 이오노포어)에 세포를 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0026] 가장 전형적으로, 면역 반응은 증가된 IL-8 분비 및/또는 NF- κ B 신호전달의 증가된 활성화로서 입증되고, 리간

드 및 칼슘 유동 작동제는 상승적인 양으로 존재한다는 점이 특히 바람직하다. 발명 주제에 제한되지 않으면서, 세포는 피부 (가령, 손상된 또는 감염된 피부)의 진피층 또는 표피층에 위치된다는 점이 추가로 바람직하다.

[0027] 따라서, 상이한 관점에서 보면, 발명자는 손상된 또는 감염된 피부를 치료하는 방법을 또한 고려하며, 여기서 하나의 단계에서, 손상된 또는 감염된 피부는 면역 반응 (가령, 증가된 IL-8 분비 또는 NF- κ B 신호전달의 증가된 활성화)을 증진시키고 상처 치유를 증가시키는 양으로 칼슘 유동 작동제 (가령, 칼슘 이오노포어 또는 SERCA 저해제)와 접촉된다.

발명의 효과

[0028] 따라서, 발명자는 조직 (가령, 상피 조직) 또는 세포에서 TLR- 또는 NOD-매개된 자극에 대한 면역 반응을 조절하는 방법을 또한 고려하며, 여기서 하나의 단계에서, 조직 또는 세포는 칼슘 유동 작동제가 없는 세포간 칼슘 농도와 비교하여 세포간 칼슘 농도를 증가시키는 데에 효과적인 농도로 칼슘 유동 작동제와 함께 접촉된다 (가령, 국부적으로 적용됨). 가장 전형적으로, 칼슘 유동 작동제 (가령, 칼슘 이오노포어 또는 SERCA 저해제)의 농도는 TLR- 매개된 자극에 대한 면역 반응을 조절하는 데에 효과적이다. 발명 주제의 몇몇 측면에서, TLR- 또는 NOD-매개된 자극은 박테리아, 바이러스, 또는 곰팡이 감염인 반면에, 다른 측면에서 TLR- 또는 NOD-매개된 자극은 조직 손상이다.

[0029] 발명 주제의 다양한 목적, 특징, 측면 및 이점은 동일한 숫자가 동일한 성분을 나타내는 첨부된 도면과 함께, 바람직한 구체예의 다음 상세한 설명으로부터 더욱 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1a-1c는 NF- κ B 신호전달 및 IL-8 생성의 강도에 관하여 다양한 칼슘 유동 작동제 (1A: A23187; 1B: 이오노마이신; 1C: 탭시가르긴)에 대한 용량 반응 곡선을 도시한 그래프이다.

도 2는 예시적인 TLR 리간드 (Pam2CYS)와 다양한 칼슘 유동 작동제의 상승적인 효과를 도시한 예시적인 그래프이다.

도 3a-3e는 IL-8 생성의 강도에 관하여 예시적인 칼슘 유동 작동제 (도 3a: A23187; 도 3b: 이오노마이신; 도 3c: 사이클로피아존산; 도 3d: DBHQ; 도 3e: 탭시가르긴) 및 각각의 TLR 및 NOD 수용체에 대한 예시적인 TLR 및 NOD 리간드의 상승적인 효과를 설명하는 다양한 그래프를 보여준다.

도 4는 NF- κ B 활성화에 관하여 상승적인 작용에서 화합물을 조절하는 상이한 Ca^{2+} 의 효과를 설명하는 그래프를 보여준다.

도 5a-5e는 κ B-LUC THP-1 수용체 세포에 미치는 살아 있는 박테리아 성장의 효과 (도 5a), 탭시가르긴에 의한 NF- κ B 반응의 증대 (도 5b), 및 칼슘 유동 작동제 신호 증폭을 위한 Ca^{2+} 의 세포외 요구 (도 5c-5e)를 도시한 그래프를 보여준다.

도 6은 식균작용 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 최적의 살해를 위해 세포외 Ca^{2+} 에 대한 인간 일차 단핵구 및 과립구의 요구를 설명하는 그래프를 보여준다.

도 7은 선별된 칼슘 유동 작동제를 이용하여 상처 치유의 사진을 보여준다.

도 8은 대조 및 선별된 칼슘 유동 작동제로 상처 치료 후 상처 크기 및 박테리아 유해물질의 존재량(bacterial burden)을 명시하는 그래프를 보여준다.

도 9a-9c는 각각, A23187, 이오노마이신, 및 CPA에 대한 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 항생 민감성에 대한 그래프를 보여준다.

도 10은 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)에 대한 탭시가르긴의 직접적인 항생 효과의 결핍을 도시한 그래프이다

도 11은 탭시가르긴-처리된 세포로 세포간 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 개선된 살해를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 상세한 설명

- [0032] 발명자는 세포간 무 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 칼슘 유동 작동제 (특히 칼슘 이오노포어 및 SERCA 저해제)는 TLR- 또는 NOD-매개된 사건에 대한 숙주의 면역 반응을 조절하고 및/또는 증진시키는 데에 효과적으로 이용될 수 있다는 점을 발견하였다. 특히 주목되는 측면에서, 칼슘 유동 작동제는 칼슘 유동 작동제가 실질적인 준최적 농도로 존재하는 경우 TLR 및/또는 NOD 리간드 결합에 대한 숙주 반응을 상승적으로 증가시켰다.
- [0033] 실제로, 발명자는 아래에서 추가로 상세 설명된 바와 같이, 선천적 면역 세포는 활성화되는 Ca^{2+} -의존 방식으로 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 박테리아 또는 그들의 떨어져 나간 산물 (및 다른 병원균 및 병원균 단편)을 인식함으로써 감염을 제어하는 것을 도우며, 이는 침범된 세포를 준최적 용량의 Ca^{2+} 유동 작동제에 노출 시킴으로써 효과적으로 증대될 수 있다는 점을 발견하였다. 다수의 일반적인 병원균 (가령, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)) 산물은 TLR 및 NOD 수용체에 의해 주로 인식되기 때문에, 발명자는 병원균 산물이 실제로 활성화되고 이러한 활성화는 추가적으로, (칼슘 킬레이트제에 의해 저지되거나 실질적으로 감소될 수 있는) 수많은 Ca^{2+} 유동 작동제를 이용하여 유의적으로 증진될 수 있다는 점을 조사하고 또한 확인하였다. 더욱이, 발명자는 Ca^{2+} 이 식균작용 박테리아의 효과적인 살해를 위한 인간 단핵구 및 과립구 (특히 중성구)에서의 주요 인자라는 점을 또한 입증하였다. 이러한 발견은 또한, 생 감염 후 피부 감염 및 상처 치유의 포유류 (랫과) 모델로 바로 해석되었다.
- [0034] 따라서, 발명 주제의 하나의 측면에서, 발명자는 병원균에 대한 면역 반응의 숙주 세포 능력을 자극시키는 데에 효과적이고 국부적인 상처의 흉터 및 아무는 시간을 감소시키는 데에 효과적인 (전형적으로 국부적인) 치료 및/또는 예방을 위한 다양한 조성물 및 방법을 고려하며, 이때 특히, 상처는 TLR 및/또는 NOD에 대한 리간드를 발현하거나 그렇지 않으면 포함하는 하나 이상의 병원균으로 감염된다. 예를 들어, 발명자는 표면적인 피부 감염 (가령, 박테리아 감염)을 예방하거나 치료하기 위해 SERCA 저해제 (가령, 탭시가르긴) 및/또는 이오노포어 (가령, 이오노마이신 및/또는 A23187 (칼시마이신))의 국부적 적용을 고려한다.
- [0035] 이러한 맥락에서, 발명자는 SERCA 저해제 및/또는 이오노포어의 국부적인 적용이 살아있는 동물 감염 모델에서 상처 치유 동역학에서의 개선에 부수적으로 따르는 표면적인 피부 감염에서 박테리아 유해물질의 존재량 (가령, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*))을 크게 감소시켰다는 점을 발견하였다. 현저하게도, 항박테리아 효과는 칼슘 유동 작동제가 병원균에 대한 살생물제(biocide)로서 작용한 경우 직접적인 항생 효과에 기인하지 않았거나 (SERCA 저해제 탭시가르긴의 경우) 전체적으로 기인하지 않았고 (이오노포어의 경우), 이보다는 면역학적 어쥬반트(adjuvant)로서 칼슘 유동 작동제의 역할에 기인하였다. 임의의 이론 또는 가정에 제한됨 없이, 발명자는 칼슘 유동 작동제가 TLR 또는 NOD 리간드의 존재에서 제공되었을 때 항바이러스 효과가 사이토카인 방출의 상승적인 활성화 및 핵 인자- κB (NF- κB) 신호전달 경로의 활성화로 인한 것일 수 있다는 점을 고려한다.
- [0036] 더욱 현저하게도, TLR 및/또는 NOD 활성화 및 칼슘 유동 작동제 (이오노포어/SERCA 저해제) 사이의 매우 강한 공동 상승작용은 NF- κB 신호전달의 활성화 및 IL-8 생성에 대하여 관찰되었다. 예를 들어, 인간 전단핵구 THP-1 세포는 준최적 용량의 TLR2 리간드 Pam2CSK4의 존재 또는 부재에서 인큐베이션되었고 그리고 또한 준최적 용량의 이오노포어 (여기서: A23187 및 이오노마이신)을 받았던, 유사하게 처리된 세포와 비교되었다. 흥미롭게도 그리고 아래 더욱 상세하게 추가로 나타난 바와 같이, 발명자는 두 작동제 모두가, 개별적인 반응이 누적되고, 따라서 진정한 공동 상승작용을 명시하게 되면 생성될 수준 아래에서 생성되는 IL-8의 양을 유의적으로 증가시켰다는 점을 밝혀내었다. 또 다른 예시에서, $\kappa\text{B-LUC}$ THP-1 세포 (NF- κB -유도된 루시페라아제 발현 카세트를 내포한 THP-1-유래된 세포감염체)는 준최적 용량의 TLR2 리간드 Pam2CSK4의 존재 또는 부재에서 누적되었고 그리고 또한 준최적 용량의 다양한 SERCA 저해제를 받았던, 유사하게 처리된 세포와 비교되었다. 특히, 그리고 아래 더욱 상세히 나타난 바와 같이, 발명자는 검사된 모든 작동제 (여기서, 탭시가르긴, 사이클로피아존산)가 개별적인 반응이 누적되고 따라서 한 번 더 공동 상승작용을 명시한다면 생성될 수준 아래에서 생성되는 루시페라아제의 양을 유의적으로 증가시켰다는 점을 밝혀내었다.
- [0037] 이러한 맥락에서, NF- κB 는 세포 활성화, 염증 사이토카인 분비, 증식, 및 생존을 매개하는 데에 있어 이의 개입을 통하여 적응 면역에 영향을 미치는 반면에, IL-8은 항박테리아 및 항곰팡이 반응에 대해 중요한 선천적인 면역 세포 유형인, 중성구와 같은 면역 세포에 대한 강력한 화학주성인자라는 점에 주목해야 한다. 흥미롭게도, Ca^{2+} 유동 유도제, 이오노마이신의 존재에서 TLR4의 리간드 활성화는 생쥐 대식 세포주에서 아라키돈산-유래된 에이코사노이드 지질의 상승적인 생성을 야기하며, 이는 예방적이고 치유력이 있는 효과를 위해 TLR 리간드와

Ca²⁺ 유동 유도제를 조합할 가능성을 명시한다.

- [0038] 따라서 발명자는 발명 주제의 하나의 측면에서, 이오노포어 (가령, A23187 및/또는 이오노마이신)는 원 위치 면역 세포 반응 및 수복 과정을 변경하기 위해 감염/질병 연관 TLR 및/또는 NOD 리간드로 생체 내에서 상승적인 효과를 유발할 것이라는 점을 고려한다. 이러한 효과는 쉽게 확인될 수 있는데, 그 이유는 발명자가 예방적 및/또는 치료적 성공으로서 박테리아 유해물질의 존재량 및 상처 크기를 이용하여, 예를 들어 모델 시스템으로서 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)로 유도된, 표면적인 피부 감염의 과정을 변경시키기 위해 다양한 이오노포어를 함유한 국부적으로-적용되는 제제의 용도로 아래에서 더 상세히 입증하였기 때문이다.
- [0039] 유사하게도, 발명자는 발명 주제의 또 다른 측면에서, 탭시가르긴 (및 다른 다양한 SERCA 저해제)은 생체 내 원 위치 면역 세포 및 수복 과정을 변경하기 위해 감염/질병 연관 TLR 및/또는 NOD 리간드로 생체 내에서 상승적인 효과를 유발한다는 점을 또한 고려한다. 상기 주목된 바와 같이, 이러한 효과는 쉽게 확인될 수 있는데, 그 이유는 발명자가 예방적 및/또는 치료적 성공으로서 박테리아 유해물질의 존재량 및 상처 크기를 이용하여, 예를 들어 모델 시스템으로서 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)로 유도된, 표면적인 피부 감염의 과정을 변경시키기 위해 다양한 SERCA 저해제 (및 특히 탭시가르긴)를 함유한 국부적으로-적용되는 제제의 용도로 아래에서 더 상세히 입증하였기 때문이다.
- [0040] 그러므로, 발명자는 특히, 패턴 인식 수용체의 리간드에 대한 하나 이상의 면역 적격 세포의 면역 반응을 증진시키기 위해 칼슘 유동 작동제의 용도를 고려한다는 점을 인식해야 한다. 더욱 전형적으로, 적합한 면역 적격 세포는 세포 면역계의 일부인 세포 (가령, B-세포, T-세포, 항원-제시 세포 또는 선천적인 감시 세포, 및 특히 수지상 세포, 대식세포, 비만 세포, 단핵구 등)이고, 그리고 이러한 면역 적격 세포는 피부의 진피층 또는 표피층에 있다는 점이 일반적으로 바람직하다. 결과적으로, 발명자는 피부에서 면역 반응 및/또는 상처 치유를 증진 (가령, 아무는 시간을 감소시킴)시키기 위해 국부적으로 적용되는 약물을 제조하기 위한 칼슘 유동 작동제의 용도를 또한 고려한다. 이러한 용도에서, 면역 반응은 면역 적격 세포에서 패턴 인식 수용체와 리간드의 결합과 연관된다는 점이 일반적으로 고려된다. 다른 패턴 인식 수용체 중에서도, 특히 적합한 패턴 인식 수용체는 TLR 및 NOD 패밀리의 것들, 그리고 특히 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12, 및 TLR13, 이뿐만 아니라 NOD1, NOD2, NOD3, NOD4, NOD5, 및 CIITA를 포함한다. 따라서, 리간드는 상당히 다양할 수 있다는 점이 인식되고 그리고 리간드는 TLR 및/또는 NOD 수용체와 결합하는 것으로 공지된 모든 리간드, 그리고 가장 바람직하게는 병원균-연관 분자 패턴 리간드 (PAMP) 및 손상/질병-연관 분자 패턴 리간드 (DAMP)를 포함한다는 점이 고려되어야 한다. 결과적으로, 적합한 PAMP 리간드는 다양한 리포펩티드, 글리코지질, 리포테이코산, 열 충격 단백질, 베타-글루칸, 피르비노젠, 헤파린 설페이트 단편, 히알루론산 단편, RNA (및 특히 ssRNA), DNA (및 특히, CpG 서열), 프로파일링 등을 포함할 것이다. 이와 같이, 적합한 DAMP는 다양한 핵 및/또는 사이토졸 단백질, 그리고 특히 열 충격 단백질, HMGB1, DNA, RNA, 및 세포외 매트릭스로부터 유래된 단백질의 단편을 포함할 것이다.
- [0041] 발명 주제의 또 다른 측면에서, 발명자는 패턴 인식 수용체의 리간드에 대한 (상기 언급된 패턴 인식 수용체 중 하나 이상을 발현하는) 세포의 면역 반응을 증진시키는 방법을 또한 고려한다. 상기 언급된 바와 같이, 리간드의 성질은 수용체의 유형에 주로 의존할 것이고, 그리고 상기 논의된 바와 같은 모든 수용체 및 리간드는 고려되는 방법에 적합하다. 특히 바람직한 방법에서, 세포는 리간드의 존재에서 면역 반응을 증진시키는 양으로 칼슘 유동 작동제에 노출된다. 물론, 리간드는 치료 요법의 부분으로서 (가령, 칼슘 유동 작동제와 함께) 전달될 수 있다는 점에 주목해야 한다. 하지만, 그리고 더욱 전형적으로, 리간드는 세포내 또는 세포 근처에 존재하는 병원균에 의해 제공, 또는 DAMP로서 숙주에 의해 제공될 것이다. 발명 주제에 제한됨 없이, 증진된 면역 반응은 증가된 IL-8 생성 및 증가된 NF-κB 신호 전달 (가령, 칼슘 유동 작동제의 부재에서의 동일한 유전자의 발현과 비교하여 칼슘 유동 작동제의 존재에서 NF-κB의 조절 하에 유전자의 증가된 발현) 중 적어도 하나로 전형적으로 특징지어질 것이다. 아래 실험적 상세 설명으로부터 쉽게 명확해지는 바와 같이, 증진된 면역 반응은 전형적으로 상승적인 증가이다.
- [0042] 따라서, 발명자는 면역 반응을 증진시키고 아래에서 더 상세히 추가로 나타난 바와 같이 상처 치유를 증가시키는 양으로 칼슘 유동 작동제와 손상된 또는 감염된 피부를 접촉시킴으로써 손상된 또는 감염된 피부를 (예방) 치료하는 방법을 또한 고려한다. 따라서, 상이한 관점에서, 하나 이상의 칼슘 유동 작동제는 조직 또는 세포에서 TLR- 또는 NOD-매개된 자극에 대한 면역 반응을 조절하기 위해 이용될 수 있다는 점을 인식해야 한다.
- [0043] **고려되는 칼슘 유동 작동제**
- [0044] 본 명세서에서 이용하기에 적합한 것으로 고려되는 화합물은 일반적으로, 다양한 감염성 질병 및 외상, 및 특히

질병 및/또는 외상에 대한 숙주 반응이 TLR 또는 NOD 반응 경로와 연관되는 경우, 특히 피부 또는 다른 상피의 감염성 질병의 예방 및/또는 치료에 적합한 것으로 간주된다. 따라서, 발명 주제에 따른 화합물은 세포간 칼슘의 적어도 일시적인, 및 더욱 전형적으로는 지속되는 증가를 초래하는 칼슘 유동 매개체 (및 특히 작동제)일 것이라는 점이 일반적으로 바람직하다.

[0045] 따라서, 특히 바람직한 화합물은 해당 분야에서 잘 알려진 이오노포어 및 SERCA 저해제를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 적합한 이오노포어는 칼슘 이오노포어, 및 특히 이오노마이신, 칼시마이신, 칼슘 이오노포어 II, 칼슘 이오노포어 IV, 칼슘 이오노포어 V, 또는 칼슘 이오노포어 VI인 반면에, 특히 바람직한 SERCA 저해제는 2,5-디-삼차-부틸하이드로퀴논 (DBHQ), 탭시가르긴, 루테늄 레드, 진저롤, 팍실린, 또는 사이클로피아존산을 포함한다. 위는 바람직한 화합물의 목록이지만, 상기 목록은 완전하지 않고, 그리고 개별적인 화합물은 2개 이상의 칼슘 유동 작동제의 혼합물을 형성하도록 (가령, 세포의 및 세포간 작동제를 제공하도록) 조합될 수 있고, 및/또는 추가적인 화합물이 첨가될 수 있다는 점에 또한 주목해야 한다.

[0046] 물론, (적절한 경우) 고려되는 화합물은 이성질체, 호변이성, 또는 다른 입체 이성형 (가령, R-, 및/또는 S-배치, E/Z 배치, 호변이성 이성형, 거울상이성질체, 부분입체이성질체 등)을 일으킬 수 있는 하나 이상의 비대칭 중심 또는 군을 가질 수 있고, 그리고 이러한 형태의 각각 및 이의 혼합물이 본 명세서에서 명확히 고려된다는 점을 인식해야 한다. 추가적으로, 고려되는 칼슘 유동 작동제는 바람직한 물리화학적 파라미터 (가령, Ca^{2+} 에 대하여 수성 용매에서의 용해도, 막 투과성, 선별성 등)를 획득하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다는 점을 인식해야 한다. 따라서, 적합한 칼슘 유동 작동제는 이러한 이오노포어를 생성하는 숙주 군주로부터 완전히 합성, 반-합성, 또는 단리될 수 있다.

[0047] 더욱이, 고려되는 화합물은 또한, 침범된 조직 또는 기관에 대한 전달 및/또는 표적 특이성을 증가시키기 위해 전구약물로 전환될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "전구약물"은 고려되는 화합물의 변형을 나타내며, 여기서 변형된 화합물은 (변형되지 않은 화합물과 비교하여) 더 적은 약물학적 활성을 나타내고 그리고 변형된 화합물은 표적 세포 또는 표적 기관 내에서 변형되지 않은 형태로 다시 전환된다. 예를 들어, 고려되는 화합물에서 전구약물로의 전환은 활성 약물이 안전한 전신적인 투여에 대해 너무 독성인 경우 또는 고려되는 화합물이 소화관에 의해 불량하게 흡수되는 경우, 또는 신체가 고려되는 화합물의 표적에 도달하기 전에 상기 고려되는 화합물을 파괴시키는 경우 유용할 수 있다. 해당 분야에 공지된 전구약물의 제조를 위한 수많은 방법이 있으며, 이들 모두 본 명세서에서 고려된다. 예를 들어, 적합한 전구약물은 Kenneth B. Sloan (ISBN: 0824786297)에 의한 Prodrugs (Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs)에서, 또는 Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology by Bernard Testa (ISBN: 390639025X)에서 설명되며, 이들은 적절한 정도로 본 명세서에 참조로서 편입된다.

[0048] 유사하게도, 고려되는 화합물은 또한, 본 명세서에서 설명된 바와 같은 형태에서 덜 활성일 수 있고, 그리고 생체 내에서 형성된 대사산물 또는 대사산물들로서 더 활성일 수 있다는 점에 주목해야 한다. 예를 들어, 고려되는 화합물은 간기(hepatic phase) I 및/또는 단계 II 효소계에 의해, 또는 위산도, 장 미생물 환경, 또는 다른 생화학적 과정에 의해 형질전환될 수 있다. 따라서, 적합한 화합물은 산화되고, 수산화되고, 탄수화물 등에 결합될 수 있다.

[0049] 고려되는 조성물

[0050] 고려되는 칼슘 유동 작동제는 세포 또는 조직에 전달하는 데에 적합한 조성물로 제공된다는 점이 일반적으로 고려된다. 따라서, 적합한 조성물은 액상 조성물, 겔, 고형 조성물을 포함할 수 있고, 이들 모두 담체와 연관되거나 커플링될 수 있고, 또는 세포 또는 조직에 직접적으로 적용될 수 있다. 가장 전형적으로, 이러한 조성물은 하나 이상의 칼슘 유동 작동제와 함께 수성 용매 또는 그렇지 않으면 제약학적으로 허용되는 담체를 포함할 것이다. 발명 주제의 특히 바람직한 측면에서, 제약학적 조성물은 손상된 또는 감염된 조직, 더욱 바람직하게는 상피 조직, 및 가장 바람직하게는 피부에 국부적인 적용을 위해 조제된다. 더욱이, 칼슘 유동 작동제는 세포 또는 조직에 제제의 적용시, 패턴 인식 수용체 (전형적으로 TLR 및/또는 NOD 수용체) 중 하나 이상의 리간드에 대한 손상된 또는 감염된 세포 또는 조직에서 면역 적격 세포의 면역 반응을 증진시키는 양으로 존재한다는 점이 일반적으로 바람직하다. 칼슘 유동 작동제는 리간드의 부재에서의 면역 반응과 비교하여 리간드의 존재에서 면역 반응을 상승적으로 증진시키는 양으로 존재한다는 점이 추가로 바람직하다.

[0051] 따라서, 발명 주제에 따른 조성물은 국부적, 비강, 흡입, 경구, 비경구 등을 비롯한 다양한 경로를 이용하여 투여될 수 있고, 여기서 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 관절내,

활액내, 척추 강내, 간내, 병소내, 및 두개내 투여 (전형적으로 주사 또는 주입)을 포함한다는 점을 인식해야 한다. 하지만, 더욱 바람직하게, 조성물은 액체, 겔, 또는 고체 형태에서 국부적으로 투여된다.

[0052] 예를 들어, 본 발명의 제약학적 조성물은 눈, 피부, 더 아래쪽 장관, 또는 외과 수술 동안 노출된 부위를 비롯한, 국부적인 적용에 의해 쉽게 접근가능한 부위 또는 기관에 국부적으로 투여될 수 있다. 해당 분야에서 공지된 수많은 국부적인 제제가 있으며, 이러한 제제 모두, 본 명세서에서 이용하기 적합한 것으로 간주된다.

[0053] 예를 들어, 고려되는 조성물은 하나 이상의 담체에서 현탁되거나 용해되는 활성 성분을 함유한 적합한 연고로 조제될 수 있다. 본 발명의 화합물의 국부적인 투여를 위한 담체는 광유, 액체 페트로라툼, 백색 페트로라툼, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 에멀전화 왁스 및 물을 포함한다. 대안으로, 제약학적 조성물은 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 담체에서 현탁되거나 용해되는 활성 성분을 함유한 적합한 로션 또는 크림으로 조제될 수 있다. 적합한 담체는 광유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물을 포함한다. 적어도 몇 가지의 활성 화합물이 매우 소수성이기 때문에, 제제는 상대적으로 불량한 용해도로 고려될 것이고 따라서 나노소포성 입자로서, 에멀전으로서 제조될 수 있고, 또는 흡장 하에 소수성 기초제(hydrophobic base)로 투여될 수 있다는 점이 고려된다.

[0054] 대안으로, 고려되는 제제는 또한, 피부 또는 투여의 다른 부위 내로 주사될 수 있다. 더욱 바람직하게, 고려되는 화합물의 멸균 주사가 가능 형태는 에멀전, 수성 용액, 또는 유성 현탁액을 포함할 것이다. 이들 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 이용하여 해당 분야에서 공지된 기술에 따라 조제될 수 있다. 멸균 주사가 가능 제제는 또한, 비-독성의 비경구로 허용되는 희석제 또는 용매에서 멸균 주사가 가능 용액 또는 현탁액으로서, 예를 들어 1,3-부탄디올에서 용액으로서 제조될 수 있다. 다른 허용가능한 비히클 및 용매 중에서, 특히 고려되는 액체는 물, 링거 용액, 및 등장성 염화 나트륨 용액을 포함한다. 추가로, 멸균, 고정유는 공-용매 또는 현탁 배지 (가령, 천연 또는 합성 모노- 또는 디글리세라이드)로서 이용될 수 있다. 지방산도 또한 이용될 수 있고 그리고 적합한 지방산은 그들의 폴리옥시에틸화된 버전으로 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체, 올리브유, 피마자유를 포함한다. 이러한 오일 용액 또는 현탁액은 장쇄 알코올 희석제 또는 분산제를 추가로 함유할 수 있다.

[0055] 또 다른 예시에서, 고려되는 화합물은 캡슐, 정제, 수성 현탁액, 또는 용액을 비롯한, 임의의 경로로 허용되는 제형으로 경구 투여될 수 있다. 경구 용도를 위한 정제의 경우에, 모든 제약학적으로 허용되는 담체 (가령, 락토오스, 옥수수 전분 등)가 적합한 것으로 간주된다. 유사하게도, 다양한 윤활제가 첨가될 수 있다 (가령, 마그네슘 스테아레이트). 캡슐 형태로 경구 투여를 위하여, 유용한 희석제는 락토오스 및 건조된 옥수수 전분을 포함한다.

[0056] 조성물에서 고려되는 화합물의 양에 관하여, 특정한 양은 특정 제제, 유효 성분, 및 바람직한 목적에 전형적으로 의존할 것이라는 점을 인식해야 한다. 따라서, 고려되는 화합물의 양은 유의적으로 달라질 것이라는 점을 인식해야 한다. 하지만, 화합물은 시험관 내에서 및/또는 생체 내에서 예방적 및/또는 치료학적 효과를 전달하는 데에 효과적인 최소량으로 존재한다. 또 다른 관점에서 보면, 칼슘 유도 작동제는 전형적으로, 상처 또는 그렇지 않으면 병에 걸린 (가령, 감염된) 조직에서, 또는 시험관 내에서 세포의 IL-8 생성을 증가시키고 및/또는 NF- κ B 신호전달을 활성화하는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0057] 더욱이, 칼슘 유도 작동제는 작동제가 리간드의 부재에서의 칼슘 유도 작동제의 최대 효과에 관하여 준최적 농도로 세포에서 (TLR 또는 NOD 리간드의 존재에서) 존재하도록 세포 또는 조직에 제공된다는 점이 일반적으로 바람직하다. 이 맥락에서, 칼슘 유도 작동제의 준최적 농도는 칼슘 유도 작동제로 얻을 수 있는 (NF- κ B 및/또는 IL-8 생성에 관한) 최대 반응보다 훨씬 아래인 농도라는 점에 주목해야 한다. 따라서, 칼슘 유도 작동제의 준최적 농도는 상기 칼슘 유도 작동제에 대한 (NF- κ B 및/또는 IL-8 생성에 관한) 최대 효과를 제공하는 투여량의 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 20 내지 60%, 또는 10 내지 50%를 제공할 농도일 것이다. 예를 들어, 아래의 실험 데이터로부터 나타날 수 있는 바와 같이, 탭시가르진에 대한 예시적인 준최적 농도는 10 내지 50nM (가령, 약 20nM)이며, 이는 도 1C에서 나타날 수 있는 바와 같은 탭시가르진에 대해 얻을 수 있는 최대 효과보다 훨씬 낮다. 이와 같이, A23187에 대한 예시적인 준최적 농도는 100 내지 500nM (가령, 약 316nM)이고, 이는 도 1A에서 나타날 수 있는 바와 같은 A23187에 대해 얻을 수 있는 최대 효과보다 훨씬 낮고, 그리고 이오노마이신에 대한 예시적인 준최적 농도는 300nM 내지 5 μ M (가령, 약 1 μ M)이고, 이는 도 1B에서 나타날 수 있는 바와 같은 이오노마이신에 대해 얻을 수 있는 최대 효과보다 훨씬 낮다. 따라서, 또 다른 관점에서 보면, 준최적 농도는 급성의 독성 효과가 칼슘 유도 작동제에 노출된 세포 또는 조직에 대해 관찰될 수 있는 농도 아래로 특징지어질

것이다.

[0058] 아래에서 더욱 상세히 보여지는 바와 같이, 최대 반응 및 준최적 농도는 IL-8 ELISA 검사 및/또는 발광 검사를 이용하여 쉽게 결정될 수 있다. 발명 주제의 바람직한 측면에서, 준최적 농도는 반응이 최대 반응의 70% 이하, 더욱 전형적으로 최대 반응의 50% 이하, 그리고 가장 전형적으로 최대 반응의 30% 이하인 농도일 것이다. 따라서, 준최적 농도는 최대 반응의 1 내지 20%의 범위, 최대 반응의 20 내지 40%의 범위, 최대 반응의 40 내지 60%의 범위, 최대 반응의 60 내지 80%의 범위, 또는 최대 반응의 80 내지 95%의 범위에 있을 것이다. 이와 같이, 리간드는 또한 준최적 농도로 존재할 것이고, 그리고 준최적 농도는 리간드에 대한 반응이 리간드 단독에 대하여 최대 반응의 70% 이하, 더욱 전형적으로 최대 반응의 50% 이하, 그리고 가장 전형적으로 최대 반응의 30% 이하인 농도일 것이라는 점이 주목된다. 따라서, 준최적 농도는 리간드 단독에 대하여 최대 반응의 1-20% 내지 1-40%의 범위, 최대 반응의 20-40% 내지 20-80%의 범위, 최대 반응의 30 내지 70%의 범위, 최대 반응의 40 내지 80%의 범위, 또는 최대 반응의 50 내지 95%의 범위에 있을 것이다.

[0059] 결과적으로, 적어도 몇몇 구체예에서, 고려되는 화합물은 약 0.1 ng/ml 내지 약 100 mg/ml의 양으로, 더욱 전형적으로 약 10 ng/ml 내지 약 10 mg/ml의 양으로, 그리고 가장 전형적으로 약 1 µg/ml 내지 약 100 µg/ml의 양으로 존재한다. 제제가 고체 또는 젤인 경우, 고려되는 화합물은 약 0.1 ng/g 내지 약 100 mg/g의 양으로, 더욱 전형적으로 약 10 ng/g 내지 약 10 mg/g의 양으로, 그리고 가장 전형적으로 약 1 µg/g 내지 약 100 µg/g의 양으로 존재할 것이다. 상이한 관점에서 보면, 칼슘 유동 작동제는 전형적으로, 0.1 µM 내지 10 µM, 10 µM 내지 100 µM, 100 µM 내지 1 mM, 1 mM 내지 10 mM, 또는 10 mM 내지 100 mM의 농도로 제제에 존재할 것이다. 추가로, 그리고 세포 또는 조직에서 칼슘 유동 작동제의 농도 ("효과적인 노출 농도")에 관하여, 효과적인 노출 농도는 각각의 칼슘 유동 작동제에 대하여 1pM 내지 1mM, 그리고 가장 바람직하게는 준최적 농도일 것이라는 점이 일반적으로 바람직하다. 따라서, 탭시가르긴은 1nM 내지 1µM, 더욱 전형적으로 1nM 내지 500nM, 그리고 가장 전형적으로 1nM 내지 50nM의 효과적인 노출 농도를 전형적으로 가지는 반면에 DBHQ 및 CPA는 100nM 내지 500 µM, 더욱 전형적으로 500nM 내지 100 µM, 그리고 가장 전형적으로 1 µM 내지 50 µM의 효과적인 노출 농도를 전형적으로 가질 것이다. 다른 한편으로, 이오노마이신 및 A23187은 10nM 내지 100 µM, 더욱 전형적으로 100nM 내지 50 µM, 그리고 가장 전형적으로 200nM 내지 10 µM의 효과적인 노출 농도를 전형적으로 가질 것이다.

[0060] 따라서, 고려되는 화합물의 적합한 양은 투여량 단위당 0.1 µg 내지 투여량 단위당 약 0.5 그램, 더욱 전형적으로 투여량 단위당 10 µg 내지 투여량 단위당 약 0.05 그램, 그리고 가장 전형적으로 투여량 단위당 50 µg 내지 투여량 단위당 약 100 mg의 범위에 있을 것이다. 따라서, 적합한 투여량은 약 0.01 µg/kg 내지 100 mg/kg, 더욱 전형적으로 1 µg/kg 내지 50 mg/kg, 그리고 가장 전형적으로 10 µg/kg 내지 10 mg/kg의 범위에 있을 것이다.

[0061] 투여량 단위에 관하여, 투여량 단위는 투여량 단위가 바람직한 치료학적 및/또는 예방적 효과를 획득하는 데에 효과적일도록 될 것이라는 점이 일반적으로 고려된다. 상이한 관점에서 보면, 투여량 단위는 IL-8 생성 및/또는 NF-κB 신호전달을 (바람직하게 상승적으로) 증가시키기 위해 충분한 양의 칼슘 유동 작동제를 바람직하게 함유할 것이다.

[0062] 고려되는 화합물 및 조성물이 국부적으로 또는 제약학적 조성물 (가령, 크림, 연고 등)로 적용될 수 있는 반면에, 침범된 조직에 적용하는 수많은 대안 방법도 또한 적절한 것으로 간주된다는 점을 추가로 인식해야 한다. 예를 들어, 고려되는 조성물은 치료 부위에 직접적으로 그리고 가역적으로 적용되는 또는 치료 부위에 근접하여 또는 상기 부위와 접촉하여 주입되거나 그렇지 않으면 배치되는 담체와 커플링되거나 상기 담체 내로 편입될 수 있다. 예를 들어, 고려되는 화합물 및 조성물은 국부적으로 적용되는 및 제거될 수 있는 담체 (가령, 붕대, 거즈 등)의 하나 이상의 부분 내로 또는 (가령, 생분해성 약물-용리 폴리머를 통해) 용해되거나 부식될 수 있거나 될 수 없는 커버링 필름(covering film) 내로 편입될 수 있다. 대안적인 담체는 주입되는 비드 또는 생분해성 약물-용리 폴리머를 포함하며, 여기서 고려되는 화합물 및 조성물은 주입된 장치의 표면의 일부일 수 있고 또는 이러한 장치 상에 코팅될 수 있다.

[0063] 칼슘 유동 작동제의 용량 반응

[0064] 발명자는 면역 반응의 다양한 성분에 미치는 칼슘 유동 작동제의 효과 그리고 특히 NF-κB 신호전달의 활성화 및 IL-8 생성에 미치는 칼슘 유동 작동제의 효과를 식별하기 위해 여러 가지 연구를 수행하였다. 도 1A-1C로부터 쉽게 얻어낼 수 있는 바와 같이, 이오노포어 및 SERCA 저해제 둘 모두, NF-κB 신호전달의 활성화 및 IL-8 생성에서 유의적인 증가를 유발하였다. 용량 반응은 이오노포어 (가령, A23187 및 이오노마이신)의 경우 상대적으로 큰 영역에 걸쳐 그리고 SERCA 저해제 (가령, 탭시가르긴)의 경우 적어도 두 자릿수 이상으로 관찰된다.

- [0065] 더욱 구체적으로, NF- κ B 및 IL-8에서 이오노포어의 용량 반응은 외부로 첨가된 TLR 또는 NOD 리간드의 부재에서 치료에 대한 단핵구-유래된 세포주 및 A23187 및 이오노마이신을 이용한 **도 1A-1B**에서 보여진다. 안정하게 통합된 NF- κ B/루시페라아제 리포터 카세트를 보유한 인간 단핵구 세포주 (THP-1) 형질감염체는 증가하는 농도의 A23187 및 이오노마이신으로 처리되었고 그리고 NF- κ B 리포터-기반 반응은 발광법 (RLU=상대적인 빛 단위, 폐쇄형 원)를 이용하여 모니터링되었던 반면에, 인간 IL-8 (hIL-8) 방출은 샌드위치 ELISA (개방형 원)를 이용하여 정량화되었다. **도 1C**는 NF- κ B 및 IL-8에서 탭시가르킨에 대한 용량 반응을 도시한다. 여기서, 안정하게 통합된 NF- κ B/ 루시페라아제 리포터 카세트를 가공처리하는 인간 단핵구 세포주 (THP-1) 형질감염체는 증가하는 농도의 탭시가르킨 및 NF- κ B로 처리되었고 그리고 NF- κ B 리포터-기반 반응은 발광법 (RLU=상대적인 빛 단위, 폐쇄형 원)를 이용하여 모니터링되었던 반면에, 인간 IL-8 (hIL-8) 방출은 샌드위치 ELISA (개방형 원)를 이용하여 정량화되었다. 유동 작동제 군으로부터 얻어낼 수 있는 바와 같이, 용량 반응은 유의적으로 증가하는 NF- κ B 및 IL-8 반응에서 수십 배보다 크게 증가한다.
- [0066] 인간 IL-8 활성: 10% FBS (Thermo HyClone, Waltham MA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신-펄라이존(fungizone) (Thermo HyClone)으로 보충된 RPMI 1640 (Cellgro, Herndon VA)에서 성장한 150,000개 THP-1 세포 (ATCC TIB-202)로 접종된 96-웰 플레이트 (Thermo Matrix, Waltham MA)에 탭시가르킨 (A.G. Scientific, San Diego CA), 이오노마이신 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), 및 칼슘 이오노포어 A23187 (Sigma-Aldrich)의 농도가 첨가되었다. 첨가 후 24시간에, 25 μ L의 상청액이 제거되고 그리고 제조자의 프로토콜에 따라 Meso Scale Discovery 인간 IL-8 조직 배양 키트 (MSD, Rockville, MD)를 이용하여 인간 IL-8에 대해 어세이되었다. 결과는 Meso Scale Discovery SECTOR Imager 2400를 이용하여 분석되었고 MSD 키트에 의해 제공된 인간 IL-8의 농도에 대해 정상화되었다.
- [0067] NF- κ B 활성화: 10% FBS (Thermo HyClone) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신-펄라이존 (Thermo HyClone)으로 보충된 RPMI 1640 (Cellgro, Herndon VA)에서 성장한 150,000개 THP-1 κ B-LUC THP-1's (NF- κ B 루시페라아제 리포터의 안정한 통합을 포함한 THP-1 세포)로 접종된 96-웰 플레이트 (Thermo Matrix)에 탭시가르킨 (A.G. Scientific), 이오노마이신, 칼슘 이오노포어 A23187의 농도가 첨가되었다. 첨가 후 24시간에, 25 μ L의 Bright-Glo 루시페라아제 어세이 시스템 (Promega, Madison WI)이 각각의 웰에 첨가되었고 그리고 Perkin Elmer TopCount NXT (Perkin Elmer, Waltham MA)를 이용하여 루시페라아제 활성에 대해 분석되었다.
- [0068] **패턴 인식 수용체를 가진 상승제로서 칼슘 유동 작동제**
- [0069] 실험의 초기 세트에서, TLR2 수용체 리간드 Pam2CYS는 칼슘 유동 작동제의 다양한 농도의 존재에서 검사되었고 발명자는 극적으로 상승적인 반응이 유발되는 TLR 리간드의 존재에서 준최적 농도 및 상대적으로 낮은 농도의 다양한 칼슘 유동 작동제를 예상치 않게 찾아내었다.
- [0070] 예를 들어, **도 2**는 예시적인 TLR 리간드와 선별된 칼슘 유동 작동제의 전형적인 상승적인 효과를 도시한 그래프이다. 여기서, 이오노포어 A23187 및 이오노마이신, 그리고 SERCA 저해제 탭시가르킨은 인간 THP-1 전단핵구 백혈병 세포주로부터 사이토카인 방출의 활성화에서 TLR2 리간드 (Pam2CYS)와 공동 상승한다. TLR2 리간드 단독이 약 5 ng/ml IL-8 반응에 대해 제공하였지만, 준최적 용량의 칼슘 유동 작동제 (가령 탭시가르킨의 경우 20 nM, A23187의 경우 316 nM, 및 이오노마이신의 경우 1 μ M)의 첨가는 세포에서 IL-8 생성의 10-배의 양보다 더 많이 생성하였다는 점에 특히 주목해야 한다.
- [0071] 이러한 관찰이 또한 다른 패턴 인식 수용체에 대해서도, 그리고 특히 TLR 및 NOD 수용체 및 다른 리간드에 대해서도 사실인지 조사하기 위하여, 발명자는 수많은 TLR 및 NOD 수용체 그리고 다양한 리간드를 검사하였다. 특히, **도 3A-3E**에서 증명된 바와 같이, 실질적인 공동 상승작용은 칼슘 유동 작동제, 그리고 다양한 TLR 및 NOD 수용체 및 리간드의 유형 및 종류의 다량 선별에 걸쳐 관찰되었고, 따라서 TLR- 및 NOD-매개된 신호는 준최적 투여량의 칼슘 유동 작동제로 (전형적으로 상승적으로) 증진될 수 있다는 점을 확립한다.
- [0072] 더욱 구체적으로, **도 3A**는 톨-유사 수용체 (TLR) 패밀리 구성원 (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9), 및 NOD 패밀리 구성원 (NOD1, NOD2)에 대한 세포 반응을 증대시키기 위한 준최적 용량의 A23187의 상승적인 효과를 도시한 그래프를 보여준다. **도 3B**는 톨-유사 수용체 (TLR) 패밀리 구성원 (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9), 및 NOD 패밀리 구성원 (NOD1, NOD2)에 대한 세포 반응을 증대시키기 위한 준최적 용량의 이오노마이신의 상승적인 효과를 도시한 그래프를 보여준다. **도 3C**는 톨-유사 수용체 (TLR) 패밀리 구성원 (TLR2, TLR4, TLR5), 및 NOD 패밀리 구성원 (NOD1, NOD2)에 대한 세포 반응을 증대시키는 준최적 용량의 사이클로피아존산의 상승적인 효과를 도시한 그래프를 보여준다. **도 3D**는 톨-유사 수용체 (TLR) 패밀리 구성원 (TLR2, TLR4, TLR5), 및 NOD 패밀리 구성원 (NOD1, NOD2)에 대한 세포 반응을 증대시키기 위한 준최적 용량의 2,5-디(삼차-부틸) 하이드로퀴논 (DBHQ)의 상

승적인 효과를 도시한 그래프를 보여준다. 도 3E는 톨-유사 수용체 (TLR) 패밀리 구성원 (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9), 및 NOD 패밀리 구성원 (NOD1, NOD2)에 대한 세포 반응을 증대시키기 위한 준최적 용량의 탭시가르긴의 상승적인 효과를 도시한 그래프를 보여준다. 이 실험에서 이용된 용량은 탭시가르긴의 경우 20 nM, A23187의 경우 316 nM, 이오노마이신의 경우 1 μ M, 사이클로피아존산의 경우 10 μ M, 그리고 DBHQ의 경우 31.6 μ M이었다.

[0073] 쉽게 인식될 수 있는 바와 같이, IL-8 생성에 관한 상승적인 효과는 검사된 TLR 및 NOD 패밀리 구성원 및 적합한 리간드 모두에 대해 관찰되었지만, 검사된 칼슘 유동 작동제 모두 준최적 농도로 이용되었다. 따라서 면역 반응에서, 그리고 특히 IL-8 생성 및 NF- κ B 신호전달에서 칼슘 유동 작동제의 어쥬반트 활성의 뚜렷한 패턴은 면역 반응이 TLR- 또는 NOD-매개된 사건과 연관될 때 명확하다.

[0074] **칼슘 유동의 성질**

[0075] 발명자는 증가된 세포간 칼슘이 상이한 기원을 가질 수 있기 때문에 칼슘 유동의 성질이 중요하였는지를 추가로 조사하였다. 그러한 효과에 대하여, 발명자는 칼슘 유동의 성질과 기여도를 조사하기 위해 다양한 칼슘 신호전달 조절자를 이용하였다. 나타난 데이터로부터 쉽게 얻어낼 수 있는 바와 같이, 세포 내로 세포의 칼슘 유동은 칼슘 신호전달의 상승적인 증폭에 있어 중요하였다. 더욱 구체적으로, 도 4는 NF- κ B 활성화에 관하여 공동 상승작용에 미치는 상이한 Ca^{2+} 조절 화합물의 효과를 설명한다. EGTA는 세포의 킬레이터(chelator)이고, KN-62는 킬레이터 효과를 가지고 있지 않은 (T-세포 활성화에 중요한) Cam 키나아제 II의 저해제라는 점에 주목해야 한다. 도 4로부터 쉽게 인식될 수 있는 바와 같이, Cam 키나아제 II 저해제 KN-62로의 처리는 리포터 유전자 발현 수준을 변경시키지 않지만, 세포의 Ca^{2+} 스캐빈저(scavenger) EGTA는 TLR 리간드 단독으로 획득되는 것이 무엇인지에 따라 수준 아래로 상승적인 신호를 감소시킨다.

[0076] 이전에, TLR2 및 NOD2가 포유류 세포에 의한 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 감염의 감지 및 조절에서 중요한 역할을 한다는 점이 입증되었다. THP-1-유래된 κ B-LUC THP-1 세포가 각각, 포괄적인 TLR2 및 NOD2 리간드 Pam2Cys 및 MDP에 의해 활성화되었고, 그리고 이 활성화는 칼슘 유동 작동제의 첨가를 통해 추가로 증대될 수 있었다는 점을 고려하면 (도 3A-3E), 진짜의 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)-유래된 산물을 인식하는 이들 세포의 능력은 다음과 같이 평가되었다. 요약하자면, 대수적으로 분할하는 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 배양물은 RPMI 1640 (Cellgro)로 3회 세척되었다. 동시에, 10% FBS (Thermo HyClone, Waltham MA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신-펄리마이신 (Thermo HyClone)으로 보충된 RPMI 1640 (Cellgro)에서 배양된 THP-1 κ B-LUC THP-1's (NF- κ B 루시페라아제 리포터 유전자의 안정한 통합을 포함한 THP-1 세포)은 RPMI 1640 (Cellgro)으로 3회 세척되었고 120만(1.2 million)/mL의 농도로 24-웰 0.4 μ m 컷오프 트랜스웰 플레이트 (Corning)의 바닥 구획으로 옮겨졌다. 이후, 세척된 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 배양물의 희석은 명시된, 감염의 초기 다중도 (MOI)로 트랜스웰 시스템의 상부 챔버에 첨가되었다. 세포는 37°C에서 18시간 동안 인큐베이션되었고, 이때 60,000개 세포의 시간 분취량은 384-웰 백색 보텀(bottom) 플레이트 (Thermo)내 웰로 옮겨졌다. 루시페라아제 유전자 발현을 평가하기 위하여, Bright-Glo 루시페라아제 어레이 시약 (Promega)이 각각의 웰에 첨가되었고 그리고 플레이트는 Perkin Elmer TopCount NXT 시스템 (Perkin Elmer)을 이용하여 루시페라아제 활성에 대해 분석되었다. 이전의 결과와 일관되게, κ B-LUC THP-1 리포터 세포는 박테리아 산물의 수동적인 확산을 허용하지만 전체 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 박테리아 및 κ B-LUC THP-1 리포터 세포 사이에서의 직접적인 접촉은 방지하는 배양 시스템에서 살아있는 박테리아와 공동-배양될 때 리포터 활성에서 MOI-의존 증가를 입증한다 (도 5A).

[0077] 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)-생성된 산물의 인식이 칼슘 유동의 조절을 통하여 추가로 증대될 수 있었는지 결정하기 위하여, κ B-LUC THP-1 리포터 세포는 멸균 여과된 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 조건화 (즉 폐(spent)) 또는 사용되지 않은 멸균 배지의 1:100 희석 (V/V)의 존재에서 인큐베이션되었고 그리고 상기 설명된 바와 같은 준최적 용량 (20 nM)의 탭시가르긴 또는 디메틸 설펍사이드 (DMSO) 비히를 대조로 처리되었다. 요약하자면, 조건화 배지는 37°C의 흔들리는 인큐베이터에서 하룻밤 동안 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)과 함께 RPMI에서 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)를 배양함으로써 생성되었으며, 그 다음 박테리아는 원심분리로 펠렛화되었으며 상청액은 0.2 μ m 여과기 (VWR Radnor PA)를 이용하여 여과-멸균되었다. κ B-LUC THP-1 세포는 상기 설명된 바와 같은 루시페라아제 어레이에 앞서 18시간 동안 조건화/폐 배지의 존재에서 인큐베이션되었다. 흥미롭게도, 조건화/폐 박테리아 배양에 대한 κ B-LUC THP-1 리포터 세포의 반응은 탭시가르긴의 존재에서 유의적으로 증진되었다 (도 5B).

[0078] 준최적 탭시가르긴 처리에 의해 획득된 박테리아 산물에 의한 κ B-LUC THP-1 세포의 활성화에서 관찰된 증진이 또한 칼슘 이오노포어 A23187 및 이오노마이신에 대해서도 해당되는 지를 결정하기 위하여, 각각, 316 nM 및 1

μM 의 준최적 용량에서 이들 이오노포어를 이용하여 실험이 반복되었다. 세 가지 모든 경우에서, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 조건화/폐 배지의 인식은 임의의 칼슘 유동 작동제의 존재에서 유의적으로 증진되었다 (도 5C-5E). 아마도 동일한 관심으로, 칼슘 유동-유도된 공동 상승작용은 도면에서 쉽게 볼 수 있는 바와 같이 세포의 킬레이터 EGTA (1mM)의 첨가해 의해 저해될 수 있었다.

[0079] **인간 세포에서 세포외 칼슘의 역할**

[0080] 인간 세포에서 반응은 칼슘 유동의 성질에 의해 영향받는지를 조사하기 위하여, 발명자는 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)로 감염된 일차 인간 단핵구 및 과립구를 검사하였다. 도 6에서의 데이터로부터 보여질 수 있는 바와 같이, 식균작용 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 최적 살해를 위해 세포의 Ca^{2+} 에 대한 인간 일차 단핵구 및 과립구의 명확한 요건이 있다. 요약하자면, 일차 인간 단핵구는 제조자의 제시에 따라 Dynabeads Untouched Human Monocyte 키트 (Life Technologies, Grand Island, NY)를 이용하여, 상업적으로 이용가능한 말초 혈액 단핵 세포 제조물 (Human Buffy Coat Leukocytes, Innovation Research, Novi MI)로부터 정제되었다. 일차 인간 과립구는 제조자의 지시 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)로 Ficoll-Paque 밀도 원심분리에 의해 정상적인 공여자 혈액을 두 분획으로 분리시킴으로써 정제되었다. 이후, 말초 혈액 단핵 세포 분획은 폐기되었고 적혈구/과립구 분획은 제조자의 프로토콜 (Biolegend, San Diego CA)에 따라 적혈구 세포 용해 완충액(Red Blood Cell Lysis Buffer)으로 처리되었고, 그 다음 Hank(Hank) 완충 염 용액(Cellgro)에서 2회 세척되어 세포용해 시약 및 세포 파편이 제거되었다. 그 다음, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 배양물은 트립신 소이 브로스(tryptic soy broth) (Cellgro)에서 하룻밤 동안 성장되었다. 결과적인 배양물은 실험의 시작에 앞서 로그기(log phase) 성장을 보장하기 위해 새로운 배양물을 접종하는 데에 이용되었다. 박테리아 배양물은 펠렛화되었고 (10분 동안 2000 X g) 그리고 Hank 완충 염 용액 (Cellgro)으로 3회 세척되었다. 상기와 같이 제조된 일차 단핵구/과립구는 이후, 적용가능하고 30분 동안 얼음에서 냉각된 10% 인간 혈청 (Innovative Research, Novi MI) 및 1mM EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO)로 보충되었다. 30분 후, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) (3.33의 MOI)가 첨가되었고 그리고 혼합물은 추가적인 20분 동안 얼음에서 인큐베이션되어 결합이 동시 발생하였다. 이후, 튜브는 37°C에서 20분 동안 인큐베이션되었다. 20분 후, 10U/mL의 리소스타핀 (Sigma-Aldrich)이 각각의 튜브에 첨가되어 비-내재화된 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)가 제거되었다. 바람직한 시점 (20, 30, 60 분)에서 20 μL 분취량이 제거되었고 10mL의 물에서 희석되었다. 희석 튜브는 와동되었고 10분 동안 실온에서 두는 것을 허용하여 일차 세포의 적절한 세포용해를 보장하였다. 10분 후, 희석 튜브는 2000 X g으로 10분 동안 원심분리되었고 여기서 남아 있는 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)는 20배 농축되었다. 이후 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)-함유 샘플은 트립신 소이 한천 (Cellgro)에 삼중복으로 도말되었고 다음날 군집 계수(colony enumeration)를 허용하기 위해 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션되었다.

[0081] **감염 및 상처 치유에서 생체내 모델**

[0082] 위에서 이미 언급된 바와 같이, 칼슘 유동 작동제는 면역 활성화와 관련된 경로를 활성화하기 위해 TLR 및 NOD 리간드와 공동 상승한다. 따라서, 감염 및 손상에서 TLR 및 NOD 리간드의 우세함을 고려하여, 발명자는 이들 맥락에서 칼슘 유동 작동제의 도입이 질병의 지속 기간을 크게 감소시키고 및/또는 수복 기능을 증대시킬 것이라는 점을 고려한다. 이러한 모델을 실증하기 위해, 다양한 칼슘 유동 작동제는 상처 치유 동역학을 변경하고 박테리아 클리어런스(clearance)에 영향을 주는 그들의 능력에 대해 전-감염 치료 실험으로 검사되었다.

[0083] 칼슘 유동 작동제, 가령 이오노포어 A23187 및 이오노마이신 또는 SERCA 펌프 저해제 탭시가르긴이 박테리아 감염의 전-치료로서 이용될 수 있는지 결정하기 위하여, 발명자는 비히클 단독으로, 또는 2 mM A23187, 이오노마이신, 또는 탭시가르긴을 함유한 체제를 6-8 주령 수컷 C57B1/6 생쥐의 면도된 등쪽 피부에 처리하였다. 하루 후에, 발명자는 2×10^6 CFU의 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)로 5마리 생쥐 군의 등쪽 피부를 표면적으로 감염시켰고 그리고 그 다음주 동안 박테리아 유해물질의 존재량 및 상처 크기를 평가하였다. 이 모델을 이용하여, 발명자는 칼슘 유동 작동제가 도 7에서 입증된 바와 같은 (크기로 측정된 바와 같은) 상처 치유에 미치는 유의한 효과를 가질 것인지에 대해 조사하였다. 흥미롭게도, 이오노포어 또는 탭시가르긴으로 처리된 동물은 대조 처리 동물과 비교하여 감염 제3일, 제5일 및 제7일에 유의적으로 더 작은 상처 크기 (스튜던트(Student) T-검정으로 결정된 바와 같이 $p < 0.01$)를 입증하였다. 추가로, 이오노포어 또는 탭시가르긴을 함유한 체제로 전-처리된 동물은 비히클 대조와 비교하여 제7일에 감염 부위에서 유의적으로 더 적은 박테리아를 보유하였다 (도 8).

[0084] 국부적 전달: A23187 및 이오노마이신 및 탭시가르긴은 차후 체제에 대한 적절한 농도에 대해 탈수된 에탄올

(Spectrum Chemicals, Gardena CA)에서 재구성되었다. 전-감염 생체내 연구에서, 국부적 제제는 75% 탈수된 에탄올 (Spectrum Chemicals), 22% 사이클로헥산 (Sigma-Aldrich), 및 3% 디메틸 설폭사이드 (Sigma-Aldrich)로 구성되었다. 각각의 국부적 제제는 1.0 센티미터 지름을 가진 원형 조각의 Whatman 종이 (Whatman, GE Healthcare의 분과)를 침수시킴으로써 그리고 5분 동안 상기 원형을 각각의 수용자의 피부에 적용시킴으로써 전달되었다.

[0085] 피부 접종을 위한 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 제조: 요약하자면, 중간-로그기(mid-logarithmic phase) 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 박테리아는 2회 세척되었고 언급된 농도로 멸균 식염수 (0.9%)에서 재현탁되었다. 생쥐: C57BL/6 유전적 배경에서의 6-8 주령, 수컷 생쥐가 모든 실험에서 이용되었다 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME).

[0086] 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 피부 감염 상처의 생쥐 모델: 상처 감염을 위한 동물을 준비하기 위하여, 생쥐의 뒤쪽 상부 등과 목의 피부는 #40 클리퍼(clipper)를 이용하여 면도되었다. 그 다음, 3개의 평행 8mm 길이의 전체-두께 스칼펠(scalpel) (제11호 블레이드(blade))로 진피가 컷팅되었다. 결과적 상처는 마이크로피페터(micropipettor)를 이용하여 10 μ l의 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) (mL 당 2×10^8 CFU)로 접종되었다. 전체 병소 크기 (cm²) 측정은 참조로서 밀리미터 자를 이용하여 사진 찍은 동물로부터 전체 픽셀 수를 결정함으로써 정량화되었다.

[0087] 생체내 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 박테리아 유해물질의 존재량의 정량화: 생체내 박테리아 유해물질의 존재량을 결정하기 위하여, 감염된 생쥐는 감염 후 제7일에 희생되었고 병소는 외과적으로 수확되었다. 수확된 조직은 균질화되었고 박테리아 수는 적절한 고형 성장 배지에 도말한 후 결정되었다.

[0088] 항박테리아 효과

[0089] 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)에 대한 그들의 내재하는 항생 활성에 관하여 이들 및 이전 결과와 일관되게, 발명자는 메티실린-민감성 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) (MSSA)에서 직접적인 항생 활성을 대해 두 가지 이오노포어 모두의 직접적인 항생 활성을 확인하였다. 예측되는 바와 같이, 두 가지 이오노포어 모두, 액체 배양 어세이에서 MSSA에 대하여 활성이 있으며, 여기서 A23187은 더욱 활성인 화합물이었다. 흥미롭게도, 두 화합물 모두 메티실린-저항성 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) (MRSA) 균주에 대하여 유의적인 항생 활성을 입증하였다.

[0090] 예를 들어, 도 9A 및 9B는 각각, A23187 및 이오노마이신에 대한 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 항생 민감성을 보여주는 그래프이고, 도 9C는 CPA에 대한 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 항생 민감성을 보여준다. 그래프에서 얻어낼 수 있는 바와 같이, 두 가지 이오노포어 모두 몇 가지 직접적인 항생 효과를 가졌지만, 그 효과는 직접적인 항생제로서 카나마이신을 이용한 대조군보다는 실질적으로 더 적었다. 대조적으로, 도 10은 심지어 높은 농도에서도, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)에 대한 SERCA 저해제 탭시가르긴의 직접적인 항생 효과의 결핍을 도시한 그래프이다. 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)의 항생 민감성을 결정하기 위하여, 배양물은 트립신 소이 브로스 (Cellgro)에서 하룻밤 동안 성장되었다. 결과적 배양물은 실험 시작에 앞서 로그기 성장을 보장하기 위해 새로운 배양물을 접종하는 데에 이용되었다. 일단 박테리아가 로그기에 도달하면, 박테리아는 적절한 OD₆₀₀ ~ .05에 희석되었고 24-웰 플레이트로 옮겨졌다. 관심 화합물이 첨가되었고 플레이트는 37°C의 흔들리는 인큐베이터에서 인큐베이션되었다. 분취량은 다양한 시점에 제거되었고 그들 각각의 OD₆₀₀은 BioTek Synergy2 마이크로플레이트 판독기 (BioTek, Winooski, VT)를 이용하여 측정되었다. 탁도가 관심 화합물의 첨가에 의해 영향 받았던 웰에 대하여, 분취량은 제거되었고 트립신 소이 한천 (Cellgro)에 도말되었고 그리고 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션되었고 다음날 수가 계산되었다. 따라서, 칼슘 유도 작동제는 아마도 증진된 IL-8 생성 및 증가된 NF- κ B-유도된 전사로 인하여 간접적인 효과를 통한 항균 처리에 효과적이라는 점을 인식해야 한다.

[0091] 더욱이, 발명자는 간접적인 항생 효과가 예방적인 방식에서 이용될 수 있다는 점을 또한 발견하였다. 예를 들어, 발명자는 탭시가르긴 처리된 전단핵구 THP-1 세포는 탭시가르긴으로 처리되지 않은, 유사하게 성숙된 세포보다 더 큰 항균 활성을 나타내었다는 점을 입증한다 (도 11). 요약하자면, 대수적으로 분할하는 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)는 펠렛화되었고 (10분 동안 2000 X g) 그리고 행크 완충된 염 용액 (Cellgro)으로 3회 세척되었다. 동시에, 2일 분화된, 그 다음 1일 20 nM 탭시가르긴 또는 비히클로 처리된 THP-1 세포 (1 μ M 레티노산 및 1 μ M 콜레칼시페롤을 이용, Sigma-Aldrich)가 수집되었고 그리고 행크 완충된 염 용액으로 세척되었다. 분화된 세포는 10% 인간 혈청 (Innovative Research)으로 보충되었고 30분 동안 얼음에서 냉각되었

다. 30분 후, 스타필로코커스 아우레우스 (*S. aureus*) (10의 MOI)가 추가적인 20분 동안 얼음에 첨가되어 결합이 동시 발생하였다. 이후, 튜브는 37℃에서 20분 동안 인큐베이션되었다. 20분 후, 10U/mL의 리소스타핀 (Sigma-Aldrich)이 첨가되어 비-내재화된 박테리아가 제거되었다. 바람직한 시점 (20, 30, 60 분)에 20μL 분취량이 제거되었고 10mL의 물에서 희석되었다. 희석 튜브는 와동되었고 10분 동안 실온에서 두는 것을 허용하여 일차 세포의 적절한 세포용해를 보장하였다. 10분 후, 희석 튜브는 2000 X g으로 10분 동안 원심분리되었고 그리고 남아 있는 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)는 20배 농축되었고 트립신 소이 한천 (Cellgro)에 삼중 복으로 도말되었으며 그리고 균집 계수에 앞서 37℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션되었다.

[0092] 결과적으로, 하나 이상의 이오노포어는 상처 치유를 개선하기 위해 및/또는 피부 감염의 치료를 위해 국부적인 예방제 및/또는 치료제로서 이용될 수 있다는 점을 인식해야 한다. 직접적인 항생 방식보다는 면역저해 방식에서 이러한 조성물 및 방법의 용도가 특히 중요하며, 이는 유리하게 어려움을 피할 것이고 그렇지 않으면 항생 요법으로 인한 저항성 강화(build-up)와 연관될 것이다. 물론, 수많은 다른 병원균이 본 명세서에서 고려되고 그리고 실제로 현재 공지된 모든 피부 병원균 (박테리아, 바이러스, 기생충, 및 곰팡이)를 포함한다는 점을 인식해야 한다.

[0093] 고려되는 화합물로의 처리 중에 유의적인 상승적인 효과가 관찰되었고, 여기서 공동 상승작용은 이오노포어 및 TLR 리간드 사이에서 면역 세포를 활성화하는 데에서 일어났다. 이러한 공동 상승작용은 질병을 막기 위해 면역 반응의 변형이 이미 유도된 치료 (가령, Aldara를 이용한 약물 요법) 또는 다른 면역-활성화 요법을 위해 특정한 관심이 될 수 있었다. 따라서, 발명자는 이오노포어가 발병 전과 후에 표면적인 피부 감염을 방지하는데에 치료학적으로 이용될 수 있다는 점을 고려한다. 더욱이, 그리고 피부의 이중 물리적 장벽 및 면역학적 기능 그리고 면역 세포에서 이오노포어의 활성/조절 작용을 입증하는 풍부한 시험관내 데이터를 고려하여, 발명자는 이오노포어를 함유한 국부적인 제제가 피부의 급성 (가령, 손상으로부터) 또는 만성 (가령, 당뇨병성 궤양 등에서 관찰된 바와 같음)의 표면적인 상처, 화상, 및 다른 염증/자가면역 질환 (가령, 건선, 습진 등)에 대한 치료를 요구하는 환자에게 치료학적으로 이로울 것이라는 점을 또한 고려한다.

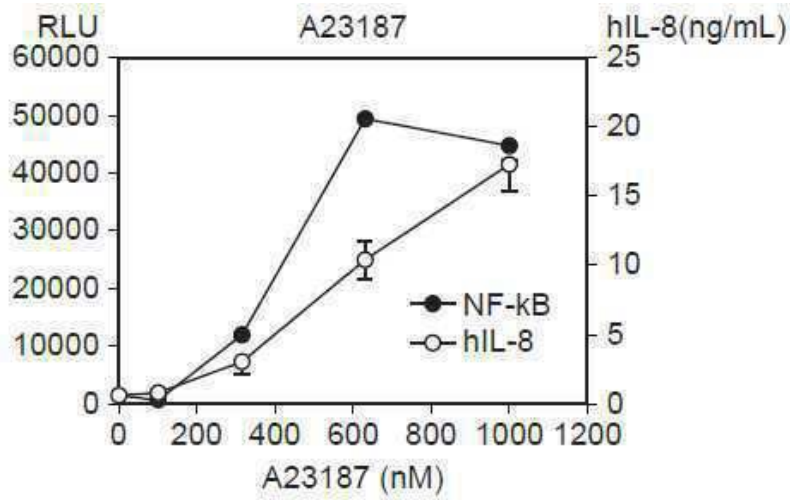
[0094] 피부 외에도, 상피 조직은 위장관 (소화강을 포함), 호흡관 및 비뇨생식관 내벽의 세포를 포함한다. 후자 외에도, 나머지 조직은 미생물 그리고 다른 인자, 가령 꽃가루 및 인공 환경의 오염물질에 지속적으로 노출되고, 이는 국부적인 염증 및/또는 병소 형성을 야기하거나 그렇지 않으면 악화시킬 수 있다. 위장관 (입을 포함)을 통하여 TLR 수용체를 활성화하는 미생물의 유병률로 인하여, 구강 종양 및 있을 수 있는 염증성 장 질환의 치료에서 이오노포어를 활용하는 것이 또한 고려된다.

[0095] 결과적으로, 국부적으로-적용되는 탭시가르긴은 면역 세포를 활성화하는 데에서 TLR 리간드와 공동 상승하는 데에 치료제로서 이용될 수 있다는 점을 인식해야 한다. 가장 두드러지게, 발명자는 감염에 앞서 탭시가르긴 또는 다른 칼슘 유동 작동제로 처리된 피부가 살아 있는 박테리아를 없애고 대조-처리된 피부보다 더 빠르게 치유된다는 점을 발견하였다. 또한 중요한 것으로, 발명자는 탭시가르긴의 내재하는 항생 특성으로 인하여 생체 내에서 관찰된 차이가 없을 수도 있다는 점을 보여주었다. 결과로서, 발명자는 탭시가르긴 또는 다른 칼슘 유동 작동제가 병원균 발생 후 TLR/NOD 리간드를 생성하거나 함유하는 병원균 (가령, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*))에 의해 야기된 표면적인 피부 감염을 방지하는 데에 치료학적으로 이용될 수 있다는 점을 고려한다. 피부의 이중 물리적 장벽 및 면역학적 기능 그리고 면역 세포에서 탭시가르긴 또는 다른 칼슘 유동 작동제의 활성/조절 작용 입증하는 풍부한 시험관내 데이터를 고려하여, 발명자는 탭시가르긴을 함유한 국부적인 제제가 피부의 급성 (가령, 손상으로부터) 또는 만성 (가령, 당뇨병성 궤양 등에서 관찰된 바와 같음)의 표면적인 상처, 화상, 및 다른 염증/자가면역 질환 (가령, 건선, 습진 등)에 대한 치료를 요구하는 환자에게 치료학적으로 이롭다는 점을 고려한다.

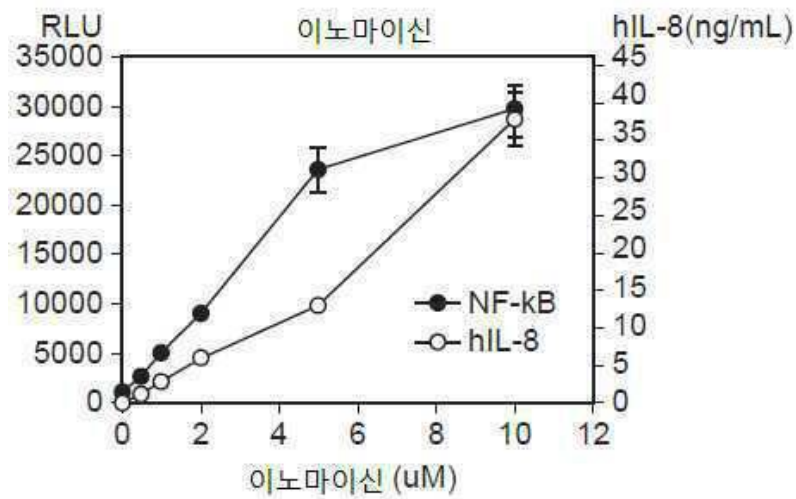
[0096] 따라서, 칼슘 유동 작동제의 특이적인 구체에 및 적용이 개시되었다. 하지만, 이미 설명된 것들 외에도 더 많은 변형이 본 명세서에서의 발명적 개념으로부터 벗어남이 없이 가능성 있다는 점이 해당 분야의 통상의 기술자에게 명확해져야 한다. 따라서, 발명 주제는 첨부된 청구 범위의 정신에서 제외하고 제한되지 않아야 한다. 더욱이, 명세서와 청구 범위 둘 모두를 해석하는 데에서, 모든 용어는 맥락과 일치하는 가장 넓고 가능성 있는 방식으로 해석되어야 한다. 특히, 용어 "포함하다" 및 "포함하는"은 비-독점적인 방식으로 요소, 성분, 또는 단계를 나타내는 것으로서 해석되어야 하고, 이는 참조되는 요소, 성분, 또는 단계가 명확하게 참조되지 않은 다른 요소, 성분, 또는 단계와 함께 조합되고, 또는 활용되고, 또는 존재할 수 있다는 점을 명시한다.

도면

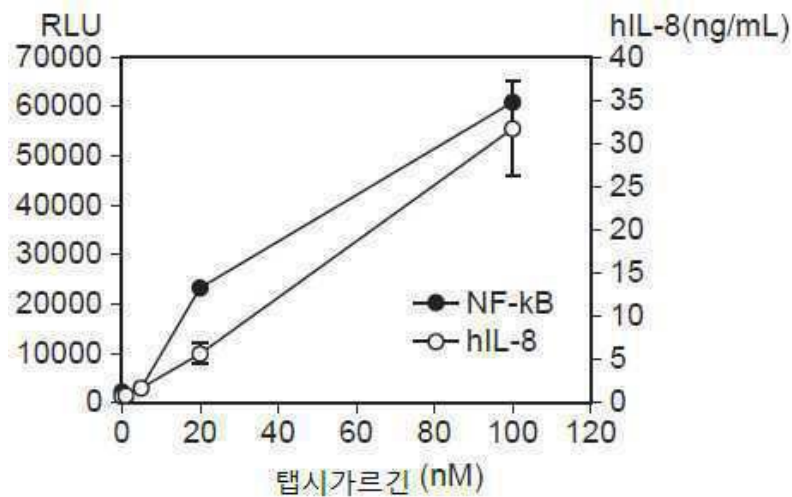
도면1a



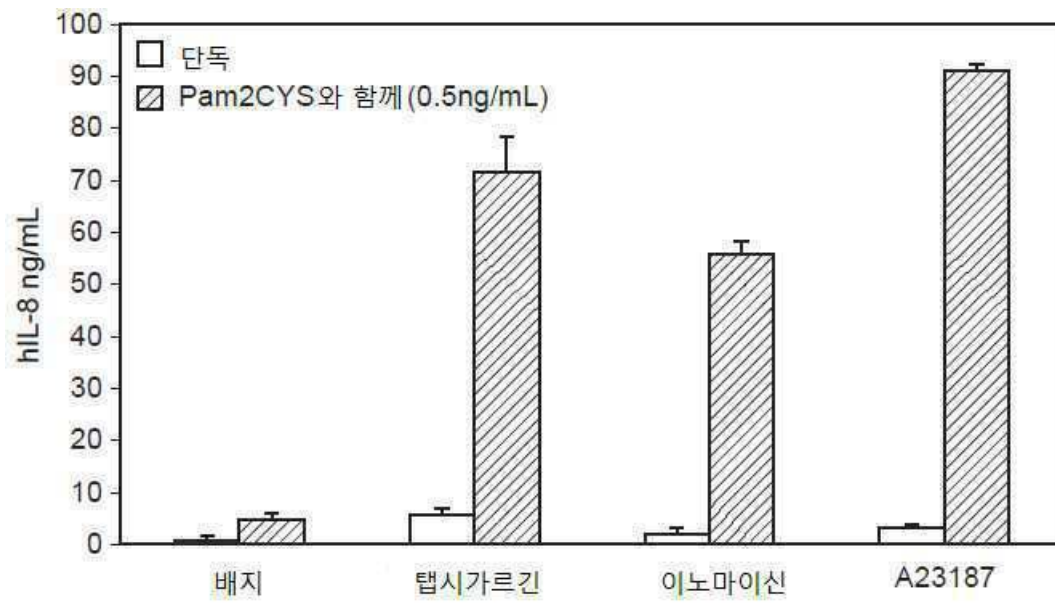
도면1b



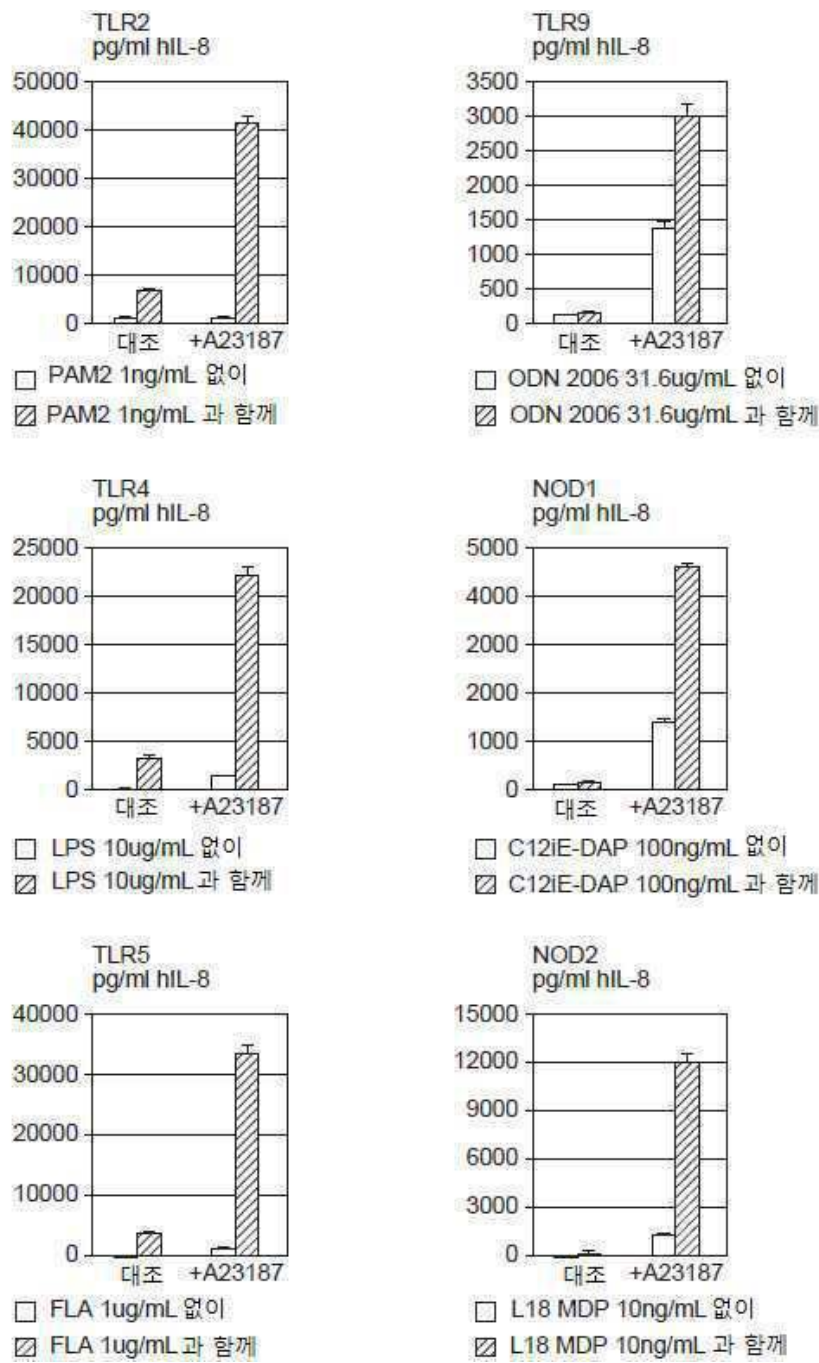
도면1c



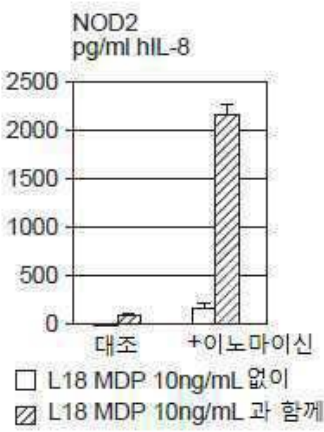
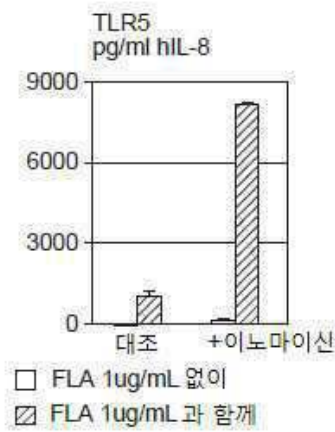
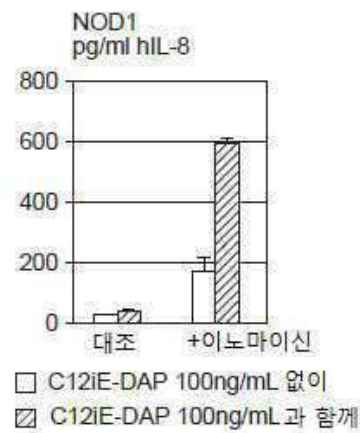
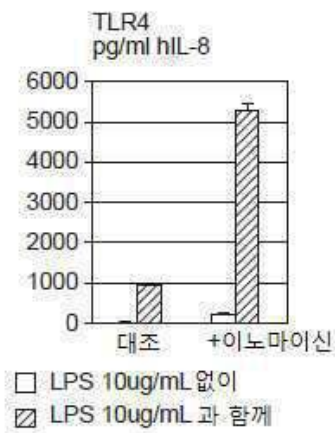
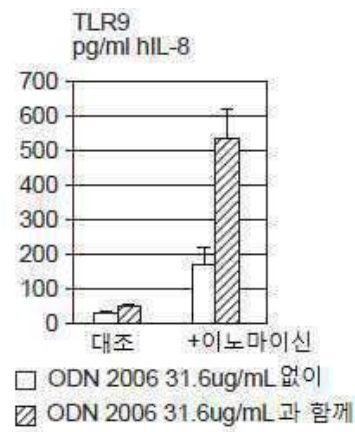
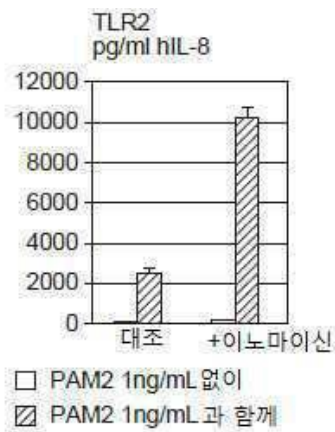
도면2



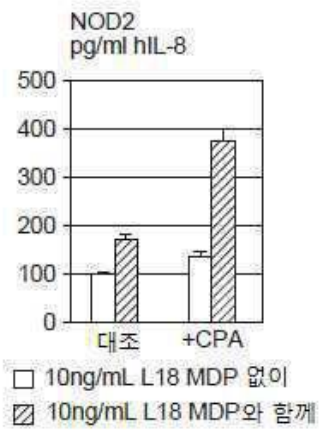
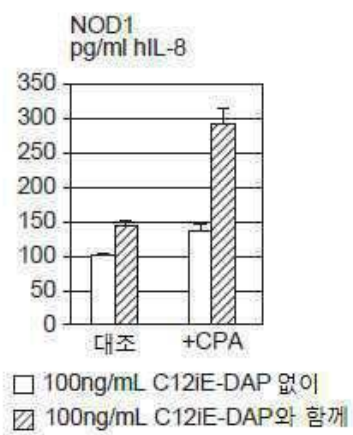
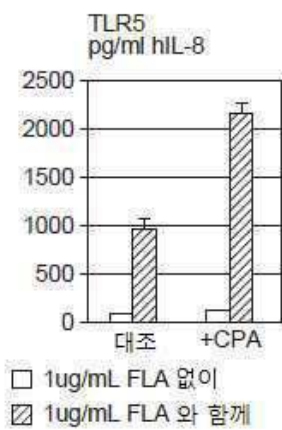
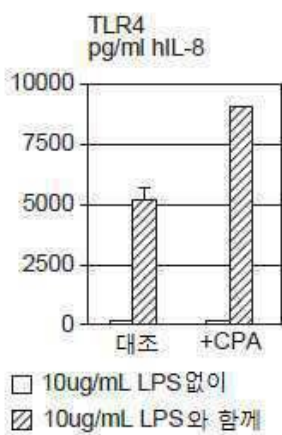
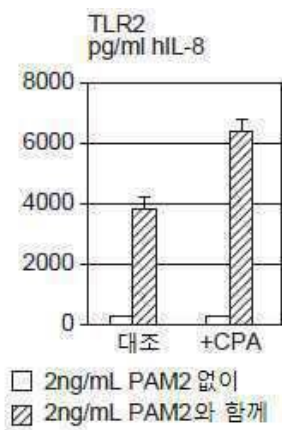
도면3a



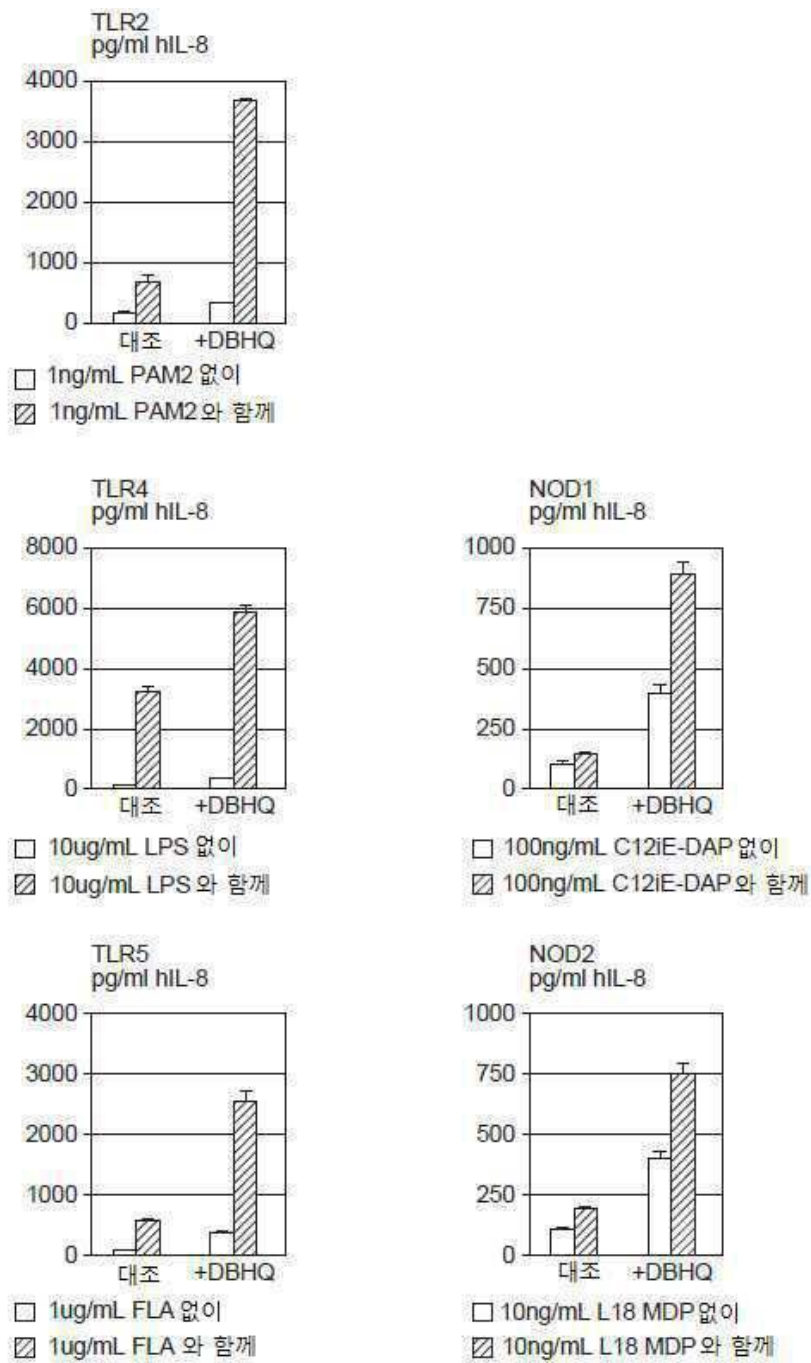
도면3b



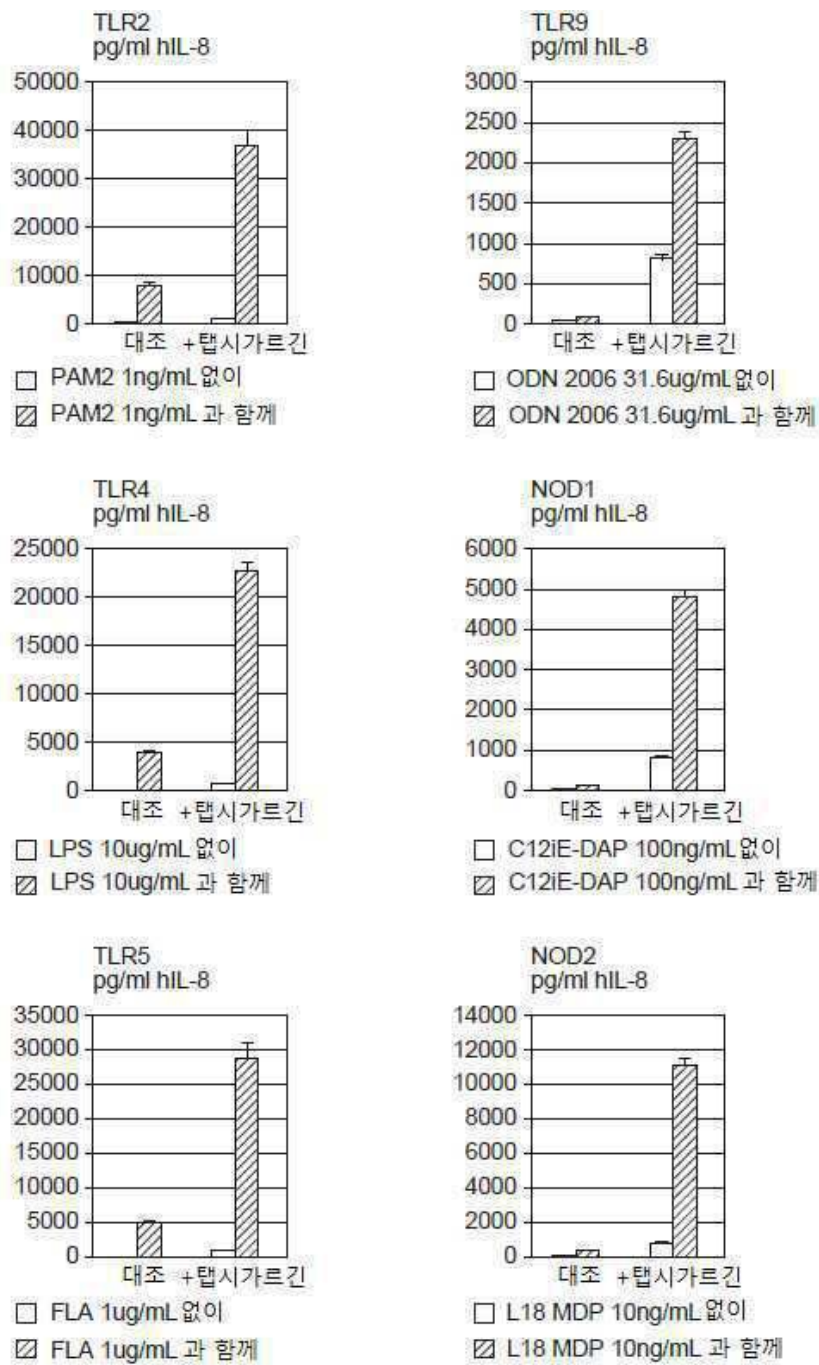
도면3c



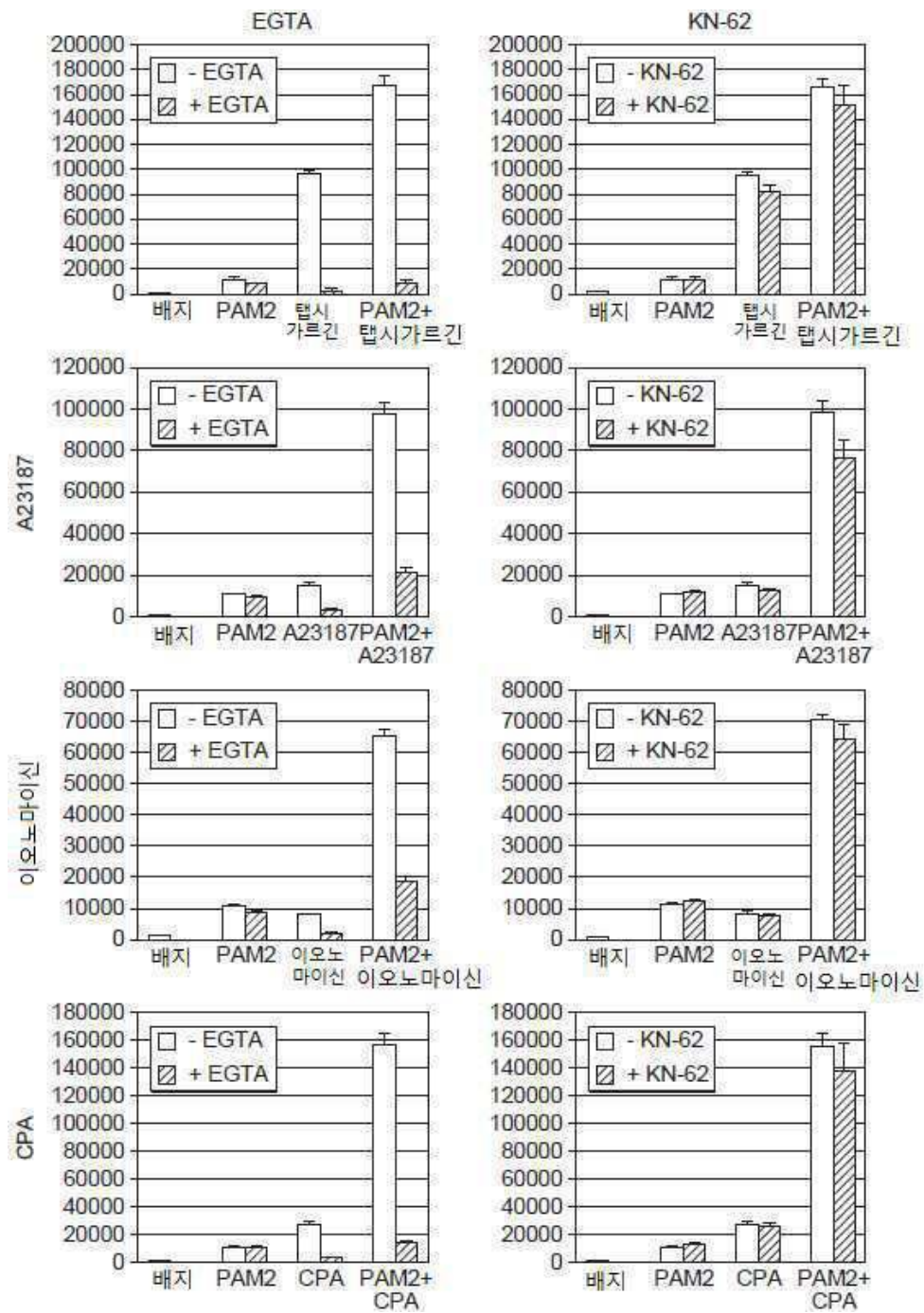
도면3d



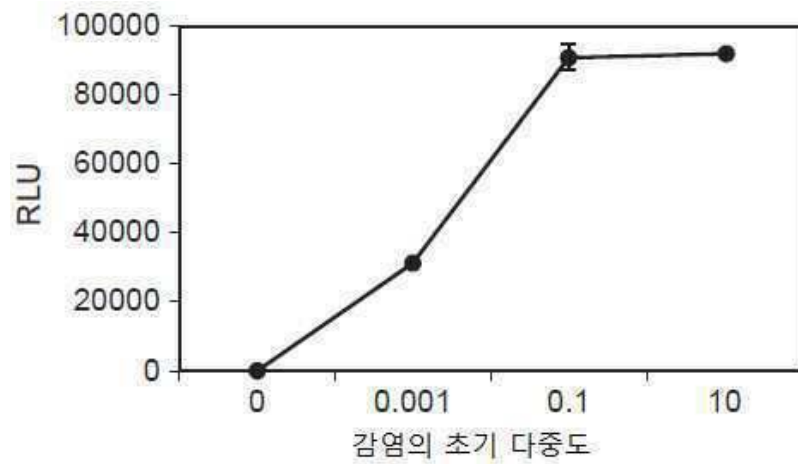
도면3e



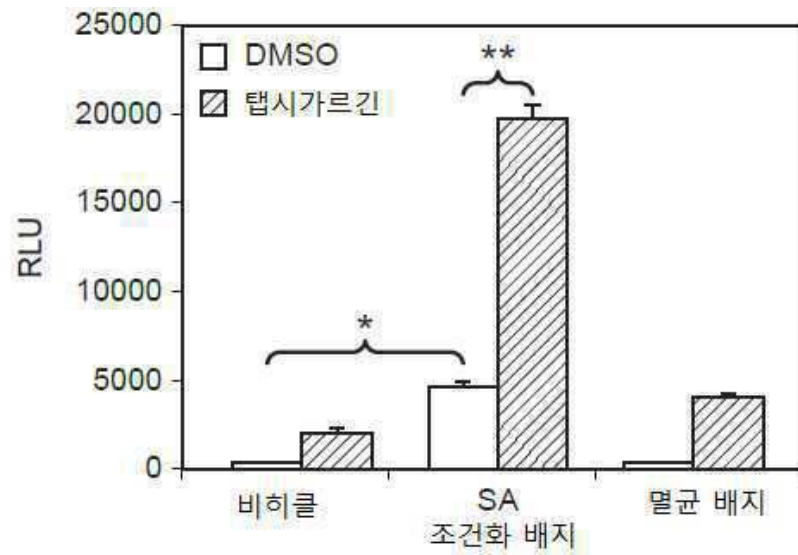
도면4



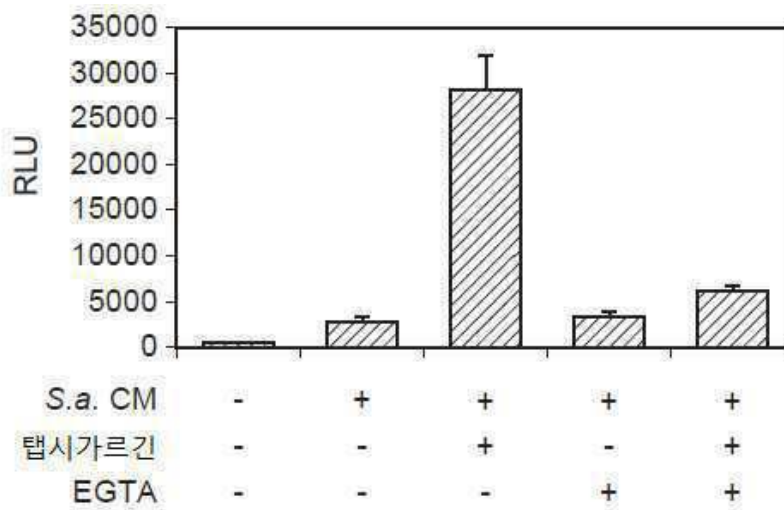
도면5a



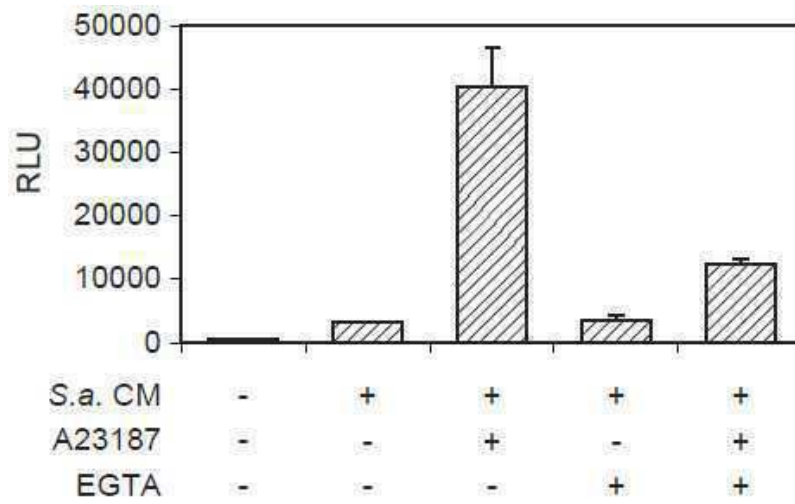
도면5b



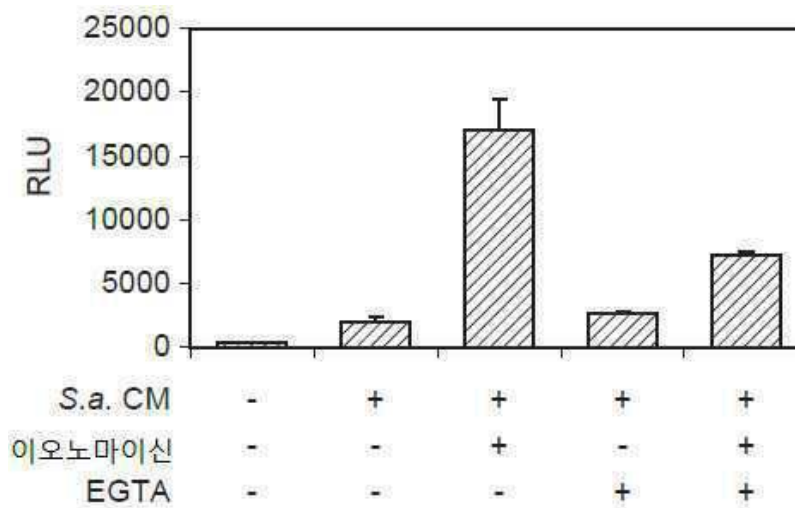
도면5c



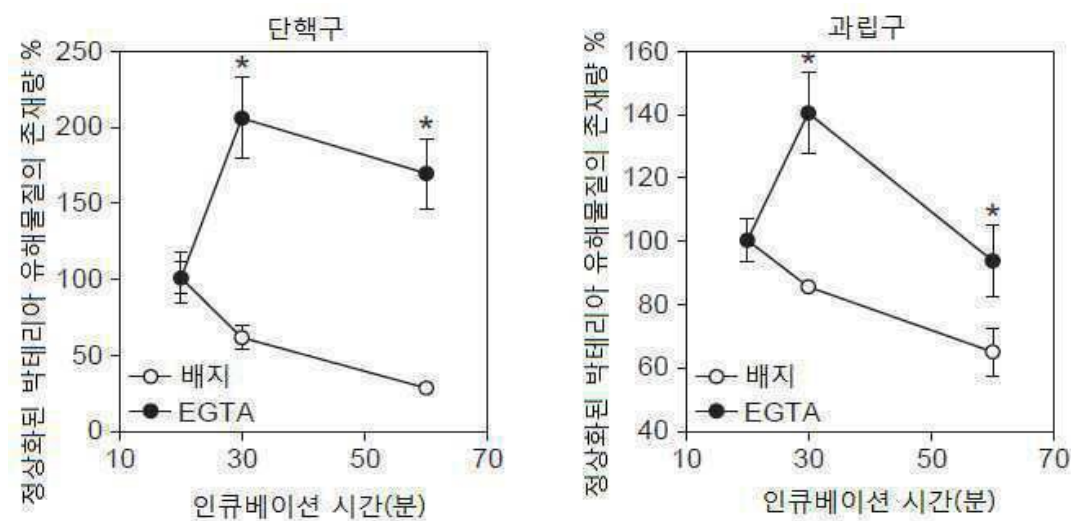
도면5d



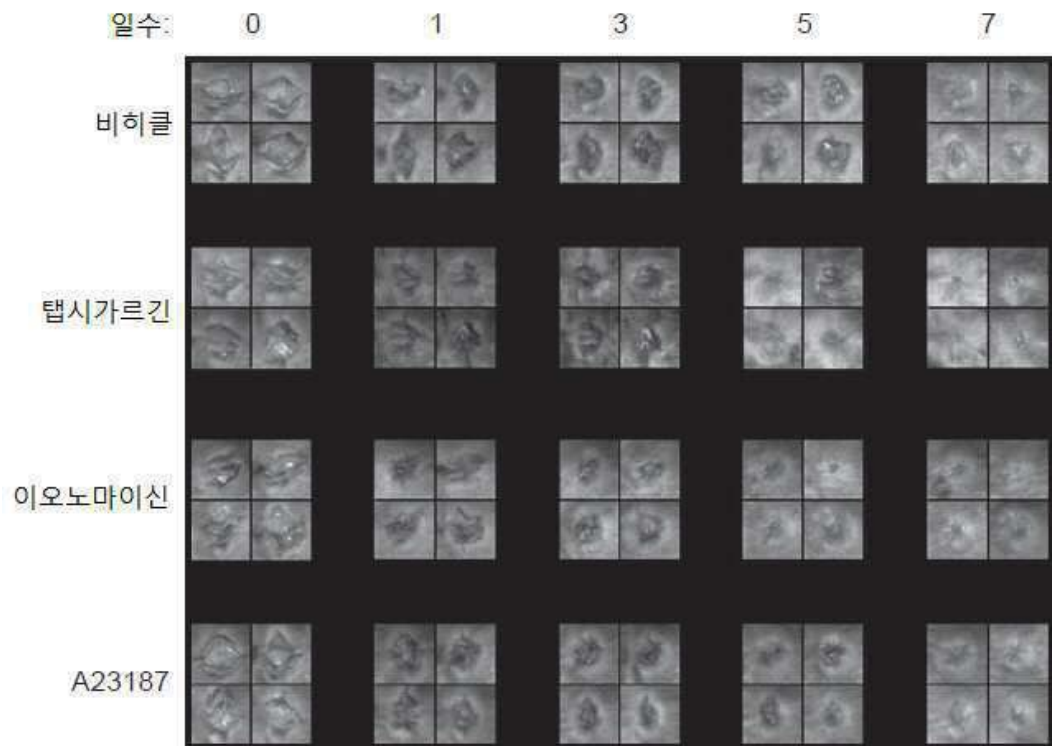
도면5e



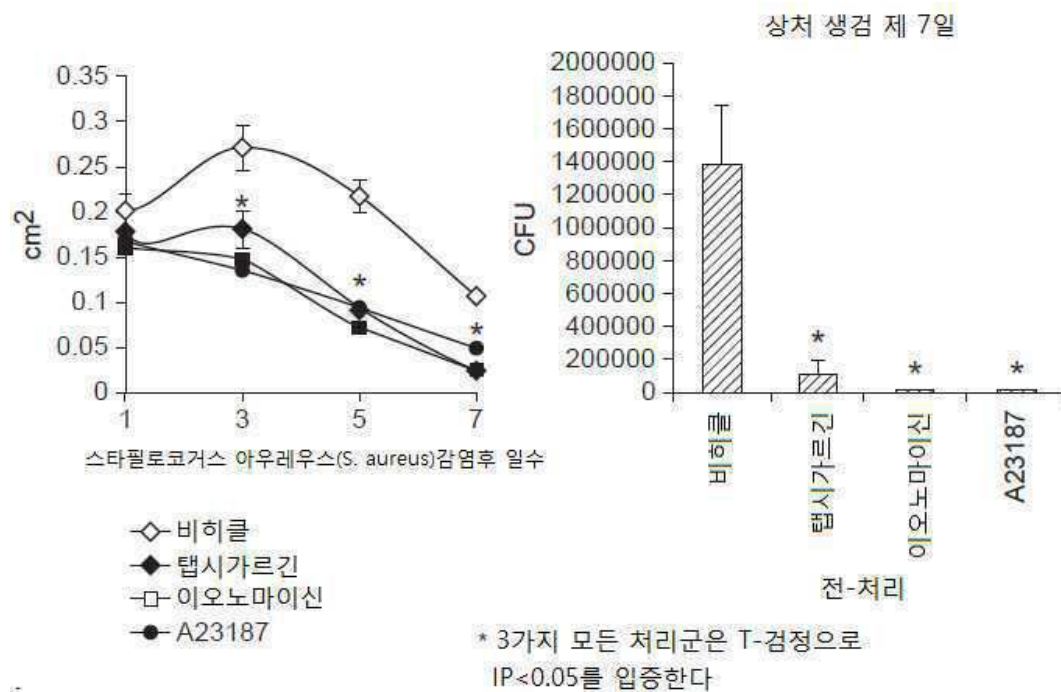
도면6



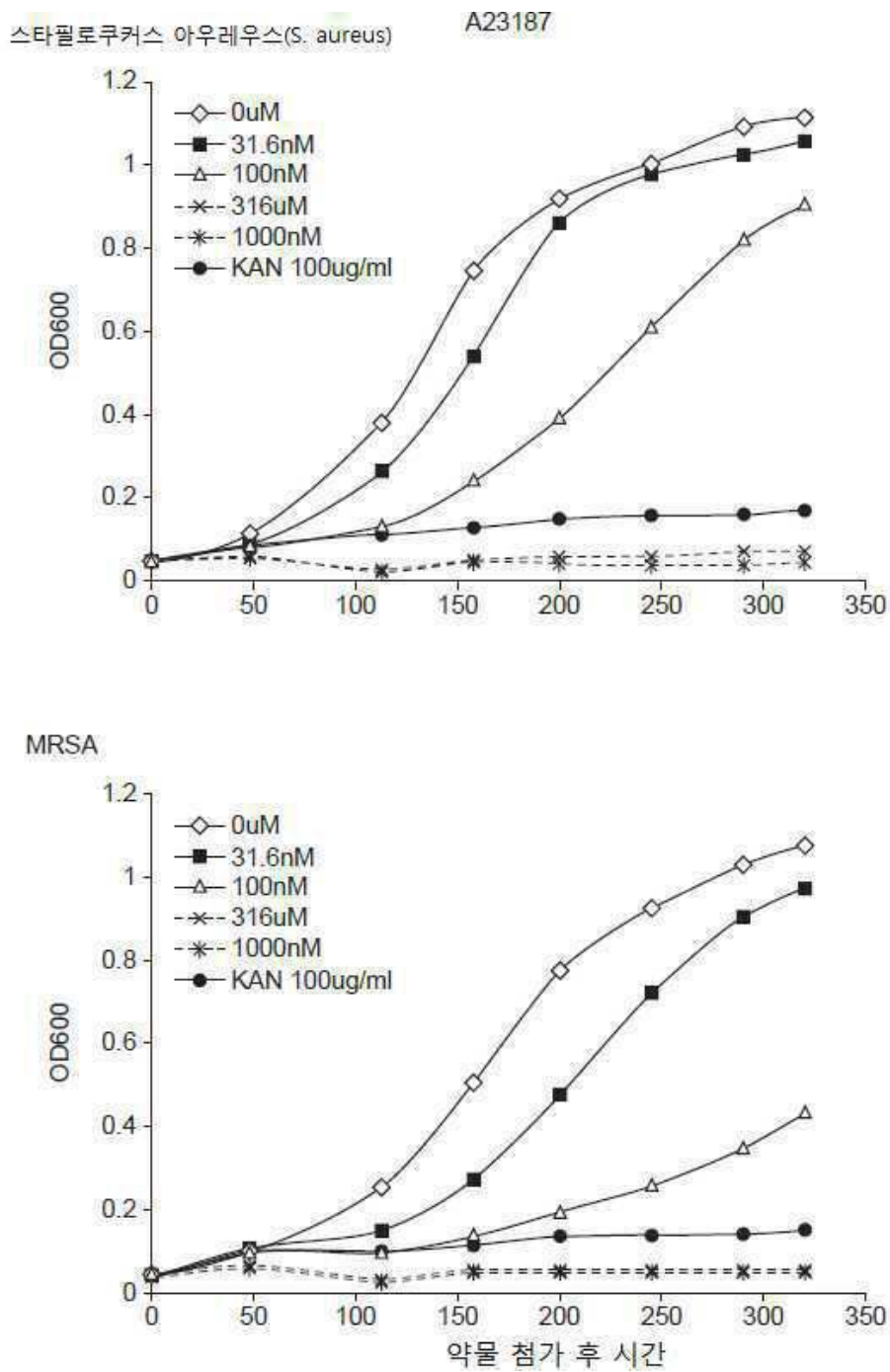
도면7



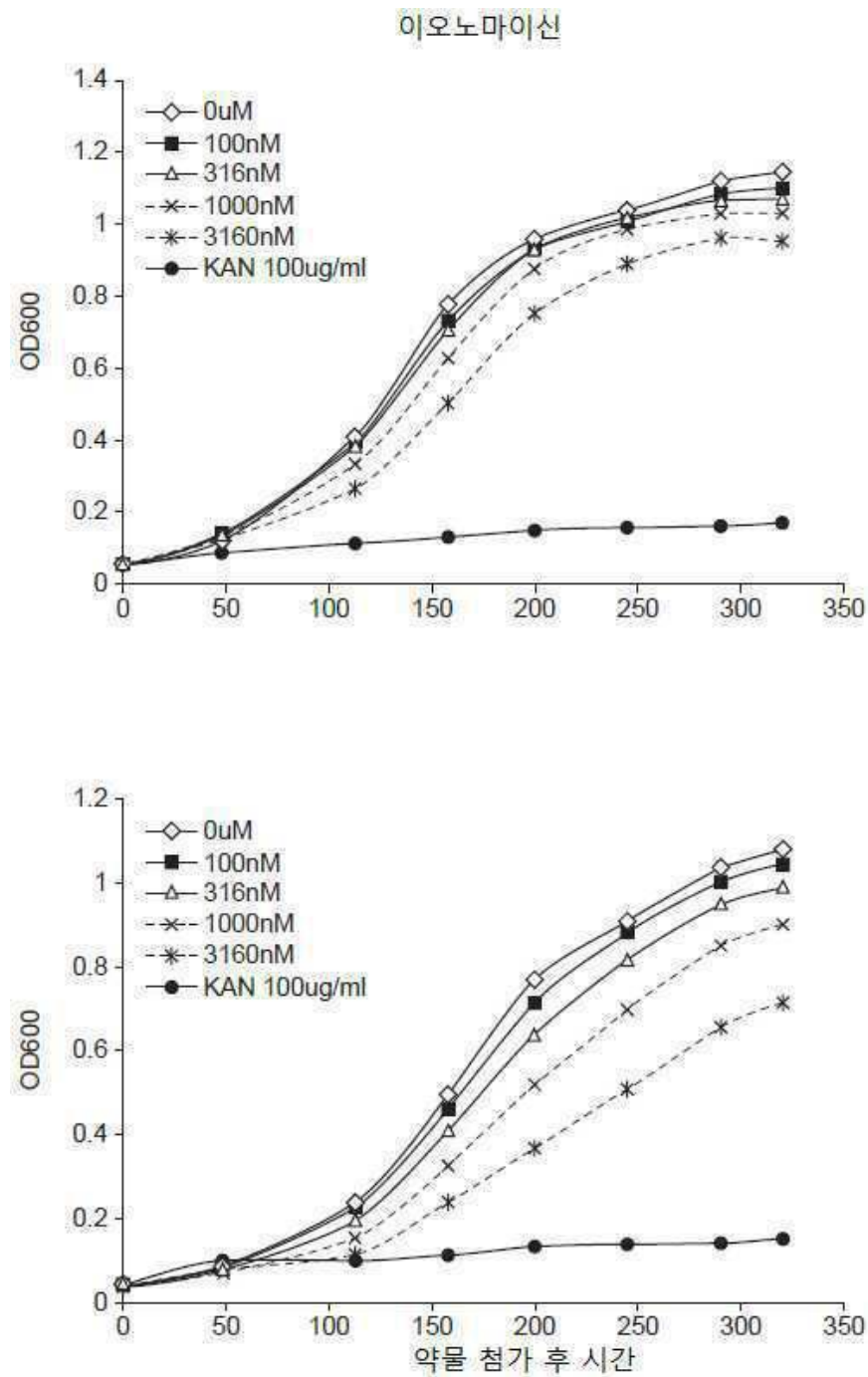
도면8



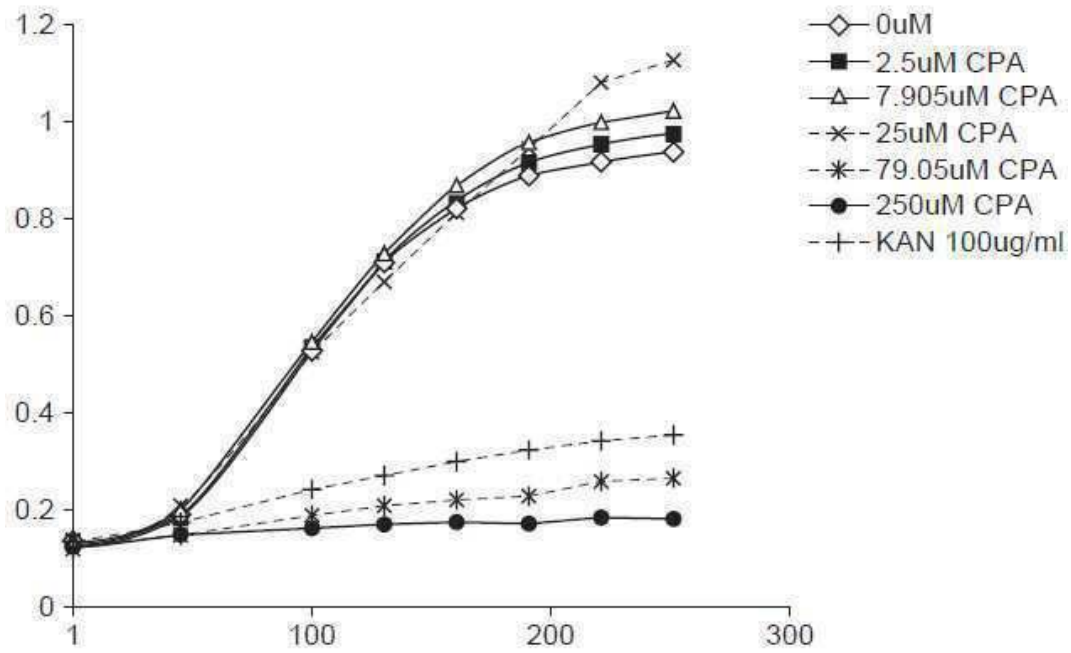
도면9a



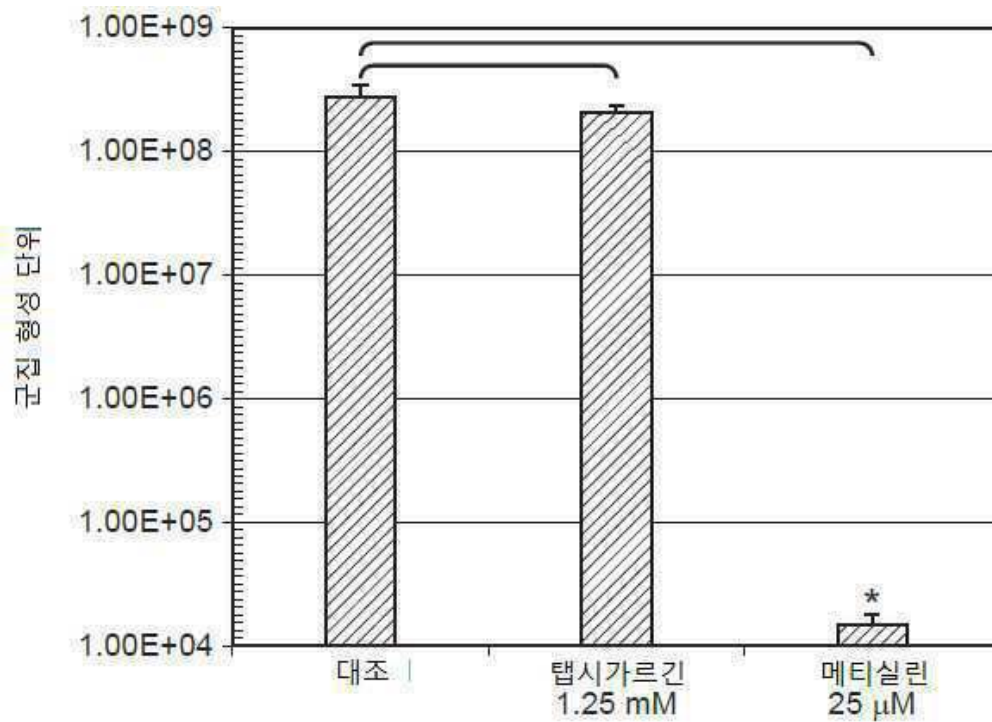
도면9b



도면9c



도면10



도면11

