



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0108301
(43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4164 (2006.01) A61K 31/4168 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01) A61K 31/17 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7006669
(22) 출원일자(국제) 2011년08월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년03월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/047426
(87) 국제공개번호 WO 2012/024161
국제공개일자 2012년02월23일
(30) 우선권주장
61/374,124 2010년08월16일 미국(US)

(71) 출원인
알러간, 인코포레이티드
미합중국92612
캘리포니아앨바인두폰트드라이브2525
(72) 발명자
길, 다니엘 더블유.
미합중국 캘리포니아주 92625, 코로나 델 마르,
포인트 델 마르 2541
도넬로, 존 이.
미합중국 캘리포니아주 92629, 다나 포인트, 페퀴
토 드라이브 34041
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최경준

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 알파-2B 아드레날린성 수용체 효현제로 조절 T 세포를 활성화시키는 방법

(57) 요약

본 발명에서는 알파 2 수용체 효현제를 투여함으로써, 조절 T-세포를 상향조절하고, 그리고 이런 상향조절로부터 이익을 얻는 질환을 치료하는 방법이 개시된다.

(72) 발명자

러스, 로렌 엠.비.

미합중국 캘리포니아주 92688, 랜초 산타
마가리타, 산타 로레타 42

비스워나스, 비나

미합중국 캘리포니아주 92602, 얼바인, 폴레나 3

특허청구의 범위

청구항 1

환자에서 조절 T 세포 기능을 상향조절하는 방법에 있어서, 이런 상향조절을 필요로 하는 환자에 알파-2B 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

환자에서 조절 T 세포 기능을 상향조절하는 방법에 있어서, 이런 상향조절을 필요로 하는 환자에 유의미한 알파-2A 수용체 효현제 활성이 결여된 알파-2 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 조절 T 세포는 CD25+, FoxP3+ T 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

신경염, 췌라인 바레 증후군, 류머티스성 관절염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 이식편 대 숙주 질환, 자가면역성 포도막염, 눈 염증, 안구건조증 질환, 아토피성 피부염, 건선, 염증성 장 질환, 천식, 그리고 재생 불량성 빈혈에서 선택되는 질환을 치료하는 방법에 있어서, 이런 치료가 필요한 환자에 알파-2B 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

신경염, 췌라인 바레 증후군, 류머티스성 관절염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 이식편 대 숙주 질환, 자가면역성 포도막염, 눈 염증, 안구건조증 질환, 아토피성 피부염, 건선, 염증성 장 질환, 천식, 그리고 재생 불량성 빈혈에서 선택되는 질환을 치료하는 방법에 있어서, 이런 치료가 필요한 환자에 유의미한 알파-2A 수용체 효현제 활성이 결여된 알파-2 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 5중 어느 한 항에 있어서, 효현제가 최초 기간 동안 투여되고, 그 다음, 휴약 기간이 경과한 이후, 두 번째 기간 동안 효현제가 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

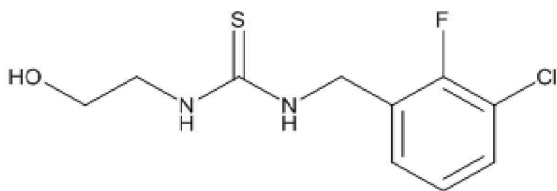
청구항 6에 있어서, 최초, 두 번째, 그리고 휴약 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14 일, 또는 1, 2, 3 또는 4주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7중 어느 한 항에 있어서, 알파-2 효현제는 티오우레아, 이미다졸, 이미다졸린, 옥사졸 및 옥사졸린; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

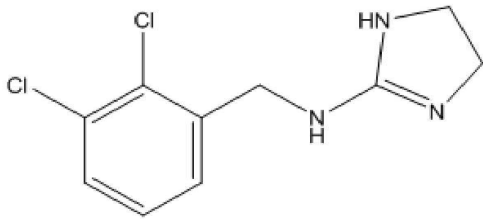
청구항 8에 있어서, 상기 티오우레아는 하기 화학식의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 방법:



청구항 10

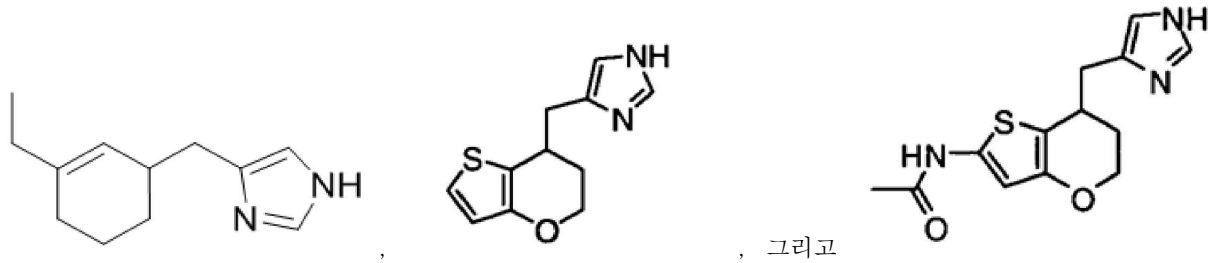
청구항 8에 있어서, 상기 이미다졸린은 하기 화학식의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 것을 특징

으로 하는 방법:



청구항 11

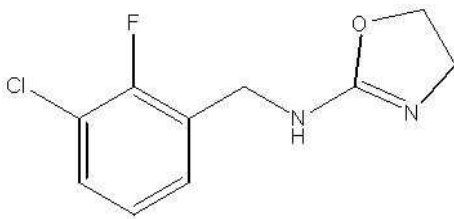
청구항 8에 있어서, 이미다졸은 하기와 같이 구성된 군에서 선택되는 화합물인 것을 특징으로 하는 방법:



; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염.

청구항 12

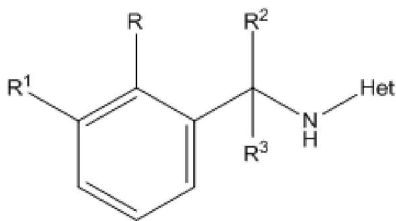
청구항 8에 있어서, 상기 옥사졸린은 하기 화학식의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 방법:



청구항 13

청구항 1 내지 7중 어느 한 항에 있어서, 알파-2 효현제는 화학식 I의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 방법:

[화학식 I]



여기서:

R과 R¹은 독립적으로 할로겐 또는 알킬이고;

R²는 H, 또는 치환되지 않거나 헤테로아릴 또는 아릴로 치환될 수 있는 알킬이고; 그리고

Het는 이미다졸리닐 및 옥사졸리닐로 구성된 군에서 선택되는 헤테로시클릴 기이다.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

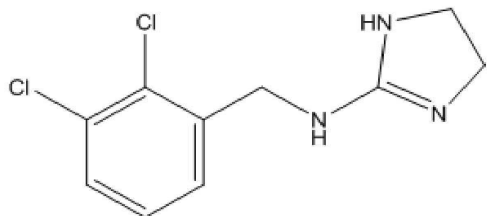
화학식 I에서,

R과 R¹은 독립적으로 할로겐 또는 메틸이고; 그리고

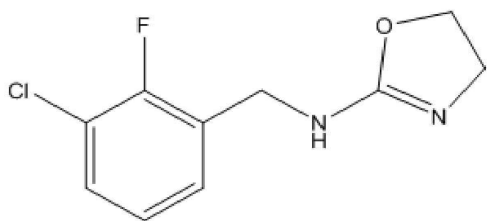
R² 알킬은 피리딜인 헤테로아릴로 치환되는 메틸인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

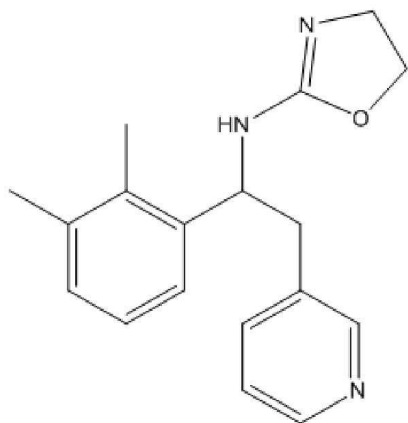
청구항 13에 있어서, 화학식 I의 화합물은 하기와 같이 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:



,



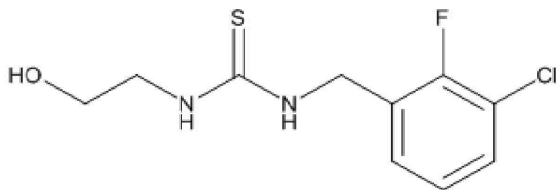
, 그리고



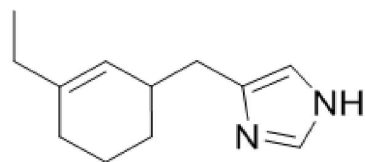
; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염.

청구항 16

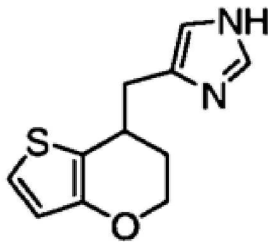
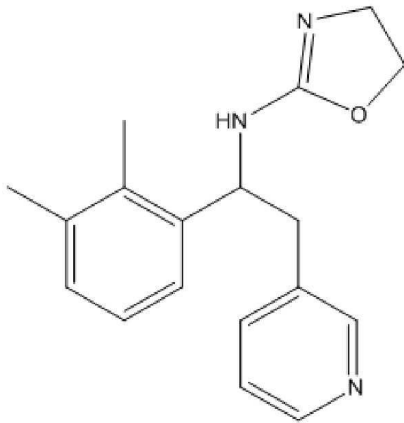
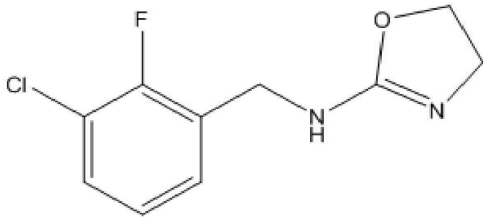
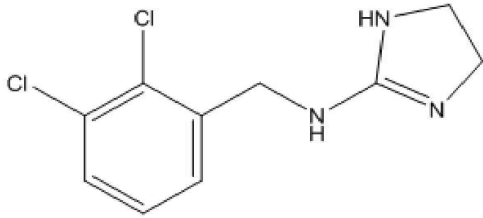
청구항 1 내지 7중 어느 한 항에 있어서, 알파-2 효현제는 하기와 같이 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:



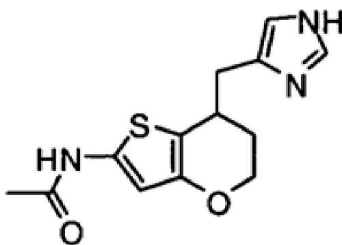
,



,



, 그리고



; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염.

명세서

기술분야

[0001] 발명자: Daniel W. Gil, John E. Donello, Veena Viswanath, 그리고 Lauren M. B. Luhrs

[0002] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0003] 본 출원은 2010년 8월 16일자 제출된 U. S. 특허가출원 일련 번호 61/374,124에 우선권을 주장하고, 이것은 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.

배경 기술

[0004] 배경 기술

[0005] 본 발명에서는 T 세포의 아류형에 알파-2B 아드레날린성 수용체가 존재하고, 그리고 알파-2 수용체 효현제가 이런 T 세포의 활성을 조절하고, 따라서 신경염, 궤레인 바레 증후군, 류머티스성 관절염, I형 당뇨병, 다발성 경화증 (MS), 이식편 대 숙주 질환 (GVHD), 자가면역성 포도막염, 눈 염증, 건조각막결막염 (안구건조증 증상), 쇼그렌 증후군, 아토피성 피부염, 건선, 염증성 장 질환, 과민성 대장 증상, 천식, 그리고 재생 불량성 빈혈을 비롯하여, T 세포 기능장애가 일정한 역할을 하는 질환을 치료하는데 이용될 수 있다는 발견이 개시된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 발명의 간단한 요약

[0007] 본 발명에서는 환자에서 조절 T 세포 기능을 상향조절하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 이런 상향조절을 필요로 하는 환자에 알파-2B 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0008] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 환자에서 조절 T 세포 기능을 상향조절하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 이런 상향조절을 필요로 하는 환자에 유의미한 알파-2A 수용체 효현제 활성이 결합된 알파-2 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0009] 다른 구체예에서, 전술한 두 단락에서 언급된 조절 T 세포는 CD25+, FoxP3+ T 세포이다.

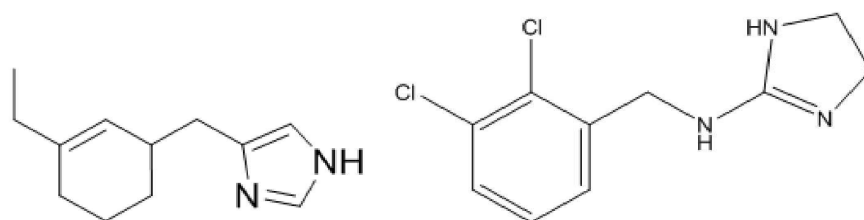
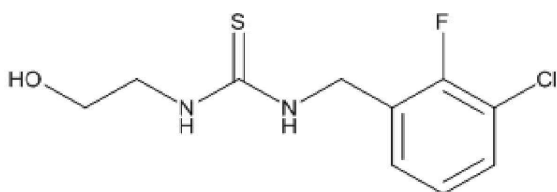
[0010] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 신경염, 궤레인 바레 증후군, 류머티스성 관절염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 이식편 대 숙주 질환, 자가면역성 포도막염, 눈 염증, 안구건조증 질환, 아토피성 피부염, 건선, 염증성 장 질환, 천식, 그리고 재생 불량성 빈혈에서 선택되는 질환을 치료하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 이런 치료가 필요한 환자에 알파-2B 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함한다.

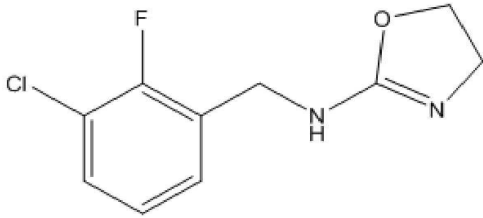
[0011] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 신경염, 궤레인 바레 증후군, 류머티스성 관절염, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 이식편 대 숙주 질환, 자가면역성 포도막염, 눈 염증, 안구건조증 질환, 아토피성 피부염, 건선, 염증성 장 질환, 천식, 그리고 재생 불량성 빈혈에서 선택되는 질환을 치료하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 이런 치료가 필요한 환자에 유의미한 알파-2A 수용체 효현제 활성이 결합된 알파-2 수용체 효현제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0012] 다른 구체예에서, 본 발명의 알파-2 수용체 길항제는 최초 기간 동안 투여되고, 그 다음, 휴약 기간이 경과한 이후, 두 번째 기간 동안 다시 한 번 투여된다.

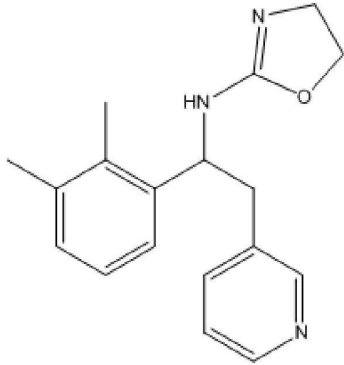
[0013] 다른 구체예에서, 본 발명의 알파-2 수용체 길항제는 최초 기간 동안 투여되고, 그 다음, 휴약 기간이 경과한 이후, 두 번째 기간 동안 다시 한 번 투여되고, 여기서 최초, 두 번째, 그리고 휴약 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 또는 1, 2, 3 또는 4주이다.

[0014] 다른 구체예에서, 본 발명의 알파-2 수용체 길항제는 하기와 같이 구성된 군에서 선택된다:

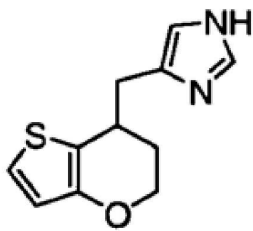




[0017]

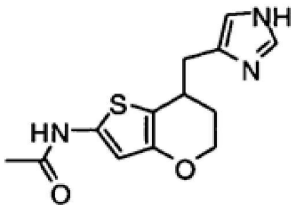


[0018]



[0019]

, 그리고



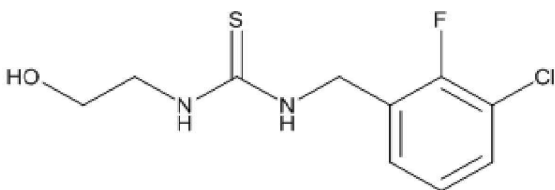
[0020]

; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염.

[0021] 다른 구체예에서, 알파-2 효현제는 티오우레아, 이미다졸, 이미다졸린, 옥사졸 및 옥사졸린; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염으로 구성된 군에서 선택된다.

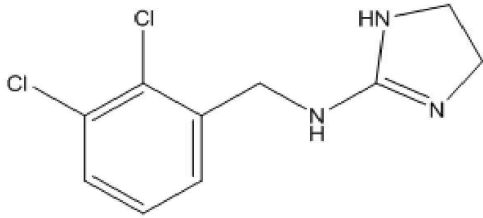
[0022] 다른 구체예에서, 알파-2 효현제는 티오우레아, 이미다졸, 이미다졸린, 그리고 옥사졸린; 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염으로 구성된 군에서 선택된다.

[0023] 다른 구체예에서, 알파-2 효현제 티오우레아는 하기 화학식의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염이다:



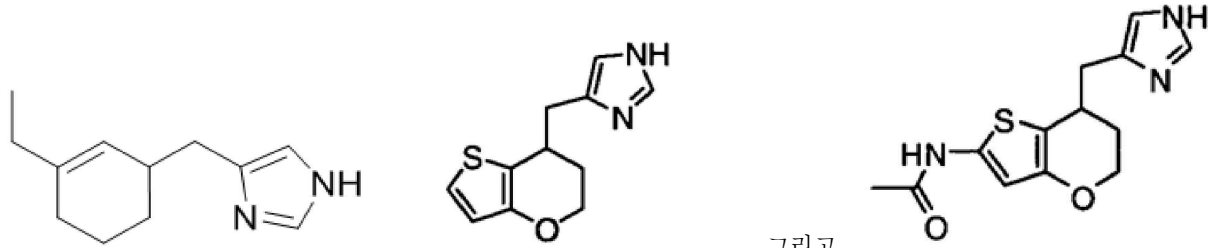
[0024]

[0025] 다른 구체예에서, 알파-2-효현제 이미다졸린은 하기 화학식의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염이다:



[0026]

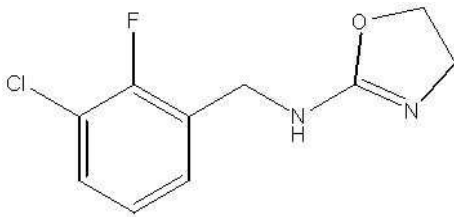
[0027] 다른 구체예에서, 알파-2-효현제 이미다졸은 하기와 같이 구성된 군에서 선택되는 화합물이다:



[0028]

; 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염.

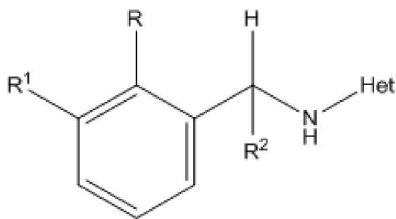
[0029] 다른 구체예에서, 알파-2-효현제 옥사졸린은 하기 화학식의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염이다:



[0030]

[0031] 다른 구체예에서, 본 발명의 알파-2-효현제는 화학식 I의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염이다:

[0032] [화학식 I]



[0033]

[0034] 여기서:

[0035] R과 R¹은 독립적으로 할로젠 또는 알킬이고;

[0036] R²는 H, 또는 치환되지 않거나 헤테로아릴 또는 아릴로 치환될 수 있는 알킬이고; 그리고

[0037] Het는 이미다졸리닐 및 옥사졸리닐로 구성된 군에서 선택되는 헤테로시클릴 기이다.

[0038] 다른 구체예에서, 화학식 I에서,

[0039] R과 R¹은 독립적으로 할로젠 또는 메틸이고; 그리고

[0040] R² 알킬은 피리딜인 헤테로아릴로 치환되는 메틸이다.

과제의 해결 수단

[0041] 발명의 상세한 설명

[0042] 알파-2 수용체 효현제

- [0043] 알파-2 수용체 효현제는 알파-2 아드레날린성 수용체를 활성화시키는 화합물이다. A, B, 그리고 C로 명명된, 이러한 수용체의 3가지 아류형이 존재한다. 화합물은 알파-2B 아드레날린성 수용체에서 브리모니딘에 비하여 25% 이상의 효능을 가지면, "알파-2B 수용체 효현제"이다; 화합물은 알파-2C 아드레날린성 수용체에서 브리모니딘에 비하여 25% 이상의 효능을 가지면, "알파-2C 수용체 효현제"이다; 그리고 화합물은 알파-2B와 알파-2C 아드레날린성 수용체 둘 모두에서 브리모니딘에 비하여 25% 이상의 효능을 가지면, "알파-2B/2C 수용체 효현제"이다. 이들 정의는 상호 배타적이지 않다: 알파-2B 수용체 효현제인 화합물은 또한, 알파-2B/2C 수용체 효현제일 수 있다; 그리고 알파-2C 수용체 효현제인 화합물은 또한, 알파-2B/2C 수용체 효현제일 수 있다.
- [0044] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 알파-2A 수용체 아류형에서 유의미한 활성이 결여된 알파-2 효현제를 이용한다. 효현제는 알파-2A 수용체 아류형에서 브리모니딘의 효능의 40% 이하를 가지면, 유의미한 알파-2A 수용체 활성이 결여된다. 이런 이유로, 본 발명의 화합물에는 알파-2B 수용체 효현제; 유의미한 알파-2A 활성이 결여된 알파-2B 수용체 효현제; 알파-2C 수용체 효현제; 유의미한 알파-2A 활성이 결여된 알파-2C 수용체 효현제; 알파-2B/2C 수용체 효현제; 그리고 유의미한 알파-2A 활성이 결여된 알파-2B/2C 수용체 효현제가 포함된다. 전술한 임의의 화합물은 비록 그들이 알파-2 수용체 이외의 수용체에 결합한다 하더라도 이용될 수 있다; 가령, 알파-1 수용체 효현제가 이용될 수 있는데, 단서로서 이들 알파-1 효현제 역시 알파-2B와 알파-2C 수용체 아류형 중에서 한쪽 또는 양쪽에서 브리모니딘에 비하여 25% 이상의 효능을 갖고, 그리고 유의미한 알파-2A 수용체 활성이 결여된다.
- [0045] 내재성 활성으로 알려진 효능은 화합물에 의해 달성되는 최대 수용체 활성화의 적도 (measure)이고, 그리고 알파-아드레날린성 수용체 활성화의 임의의 인정된 분석평가, 예를 들면, cAMP 또는 수용체 선별과 증폭 기술 (RSAT)를 이용하여 결정될 수 있다. 효능은 약물의 최대 효과 대 각 수용체 아류형에 대한 표준 효현제의 최대 효과의 비율 또는 백분율로서 표시된다. 그 자체로 알파-2B 수용체 효현제 (이것은 알파-2B 아드레날린성 수용체에서 브리모니딘의 100% 효능을 갖는다)인 브리모니딘은 알파-2B 아드레날린성 수용체에 대한 표준 효현제로서 이용된다.
- [0046] 효현제 활성은 예로써, 수용체 선별과 증폭 기술 (RSAT) 분석평가 (Messier *et al.*, *Pharmacol. Toxicol.* 76:308-11 (1995); 환형 AMP 분석평가 (Shimizu *et al.*, *J. Neurochem.* 16:1609-1619 (1969)); 그리고 시토센서 마이크로피지오메트리 (cytosensor microphysiometry) 분석평가 (Neve *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:25748-25753 (1992))를 비롯한 다양한 일과적 분석평가 중에서 임의의 한 가지를 이용하여 특성화될 수 있다. 이런 분석평가는 일반적으로, 단일 알파-아드레날린성 수용체 아류형만을 자연적으로 발현하는 세포를 이용하거나, 또는 단일 재조합 알파-아드레날린성 수용체 아류형을 발현하는 형질감염된 세포를 이용하여 수행된다. 아드레날린성 수용체는 인간 수용체, 또는 유사한 약리학을 갖는 인간 수용체의 동족체 (homolog)일 수 있다.
- [0047] RSAT 분석평가는 합류성 세포의 혼성 집단에서 수용체-내포 세포의 선별적 증식 (selective proliferation)을 유발하는 접촉 저해의 수용체-매개된 상실을 측정한다. 세포 수에서 증가는 원하는 경우에, 고처리량 또는 초고처리량 분석평가 형식에서 적절한 검출가능 마커 유전자, 예를 들면, 베타-갈락토시다아제로 평가된다. G 단백질, Gq를 활성화시키는 수용체는 증식성 반응을 유도한다. Gi에 정상적으로 결합하는 알파-아드레날린성 수용체는 Gq/i5로 명명된 Gi 수용체 인식 도메인을 내포하는 하이브리드 Gq 단백질과 공동-발현될 때, RSAT 반응을 활성화시킨다. Conklin *et al.*, *Nature* 363:274-6 (1993)).
- [0048] 한 가지 실험으로서, RSAT 분석평가는 본질적으로 하기와 같이 수행될 수 있다. NIH-3T3 세포는 15 cm 접시에서 2×10^6 세포의 밀도로 도말되고, 그리고 10% 소 혈청으로 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지에서 지속된다. 하루 후, 세포는 p-SV- β -갈락토시다아제 (5-10 μ g), 수용체 (1-2 μ g) 및 G 단백질 (1-2 μ g)을 인코딩하는 포유동물 발현 플라스미드로 인산칼슘 침전 (calcium phosphate precipitation)에 의해 공동-형질감염된다. 담체 DNA, 예를 들면, 40 μ g 연어 정자 DNA 역시 형질감염 효율을 증가시키기 위해 포함될 수 있다. 익일에 새로운 배지가 첨가된다; 1일 내지 2일 후, 세포는 수확되고 50개의 분석평가 분취량에서 동결된다. 형질감염된 세포는 해동되고, 그리고 100 μ l의 세포가 예로써, 96-웰 평판에서 삼중으로 분석된 다양한 농도에서, 조사되는 화합물의 100 μ l 분취량에 첨가된다. 배양은 37°C에서 72 내지 96시간 동안 계속된다. 인산염-완충된 염수로 세척후, β -갈락토시다아제 활성은 200 μ l의 색원체 기질 (chromogenic substrate) (인산염 완충된 염수에서 3.5 mM 0-니트로페닐- β -D-갈락토피라노시드/0.5% NP-40)을 첨가하고, 30°C에서 하룻밤 동안 배양하고, 그리고 420 nm에서 광학 농도를 측정함으로써 결정된다. 흡광도는 효소 활성의 적도이고, 이것은 세포 수에 좌우되고 수용체-매개된 세포 증식을 반영한다. 각 수용체에서 각 약물의 EC₅₀과 최대 효과 (즉, 효능)가 결정된다.
- [0049] 유의미한 알파-2A 수용체 활성이 결여된 것들을 비롯한 알파-2B와 -2C 수용체 효현제는 당분야에 공지되어

있다. 알파-2 효현제의 구조, 합성, 그리고 활성을 비롯하여, 알파-2 효현제에 관한 상세한 정보는 U.S. 특허 번호 6,329,369, 번호 6,534,542, 번호 6,545,182, 번호 6,787,517, 번호 6,841,684, 그리고 번호 7,091,232; U.S. 특허 출원 공개 번호 2003/0092766, 번호 2004/0132824, 번호 2004/0220402, 번호 2005/0075366, 그리고 번호 2005/0267186; 그리고 U.S. 특허 출원 번호 11/172,229, 번호 11/232,323, 번호 11/232,341, 번호 60/613,870, 번호 60/695,650, 번호 60/747,444, 번호 60/884,718, 번호 60/917,828, 번호 60/911,422, 번호 60/911,478, 그리고 번호 60/948,389에서 찾아볼 수 있고, 이들의 내용은 본 발명에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.

[0050] 본 발명의 방법에서 임의의 알파-2 수용체 효현제의 임의의 제약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 이성질체, 또는 라섬체가 이용될 수 있다.

[0051] "알킬"은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있고 사슬 내에 약 1개 내지 약 20개 탄소 원자를 포함하는 지방족 탄화수소 기를 의미한다. 바람직한 알킬 기는 사슬 내에 약 1개 내지 약 12개 탄소 원자를 내포한다. 더욱 바람직한 알킬 기는 사슬 내에 약 1개 내지 약 6개 탄소 원자를 내포한다. 가지형은 하나 또는 그 이상의 저급 알킬 기, 예를 들면, 메틸, 에틸 또는 프로필이 선형 알킬 사슬에 부착되는 것을 의미한다. "저급 알킬"은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 사슬 내에 약 1개 내지 약 6개 탄소 원자를 갖는 기를 의미한다. "알킬"은 치환되지 않거나, 또는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 또는 그 이상의 치환기에 의해 선택적으로 치환될 수 있고, 각 치환기는 할로, 알킬, 아릴, 헤테로시클릴, 헤테로아릴, 시클로알킬, 시아노, 히드록시, 알콕시, 알킬티오, 아미노, 옥심 (가령, =N-OH), -NH(알킬), -NH(시클로알킬), -N(알킬)₂, -O-C(O)-알킬, -O-C(O)-아릴, -O-C(O)-시클로알킬, -SF₅, 카르복시 및 -C(O)O-알킬로 구성된 군에서 독립적으로 선택된다. 적절한 알킬 기의 무제한적 실례에는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필 및 t-부틸이 포함된다.

[0052] "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 내포하고, 직쇄 또는 분지쇄일 수 있고, 그리고 사슬 내에 약 2개 내지 약 15개 탄소 원자를 포함하는 지방족 탄화수소 기를 의미한다. 바람직한 알케닐 기는 사슬 내에 약 2개 내지 약 12개 탄소 원자를 갖는다; 그리고 더욱 바람직하게는, 사슬 내에 약 2개 내지 약 6개 탄소 원자를 갖는다. 가지형은 하나 또는 그 이상의 저급 알킬 기, 예를 들면, 메틸, 에틸 또는 프로필이 선형 알케닐 사슬에 부착되는 것을 의미한다. "저급 알케닐"은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 사슬 내에 약 2개 내지 약 6개 탄소 원자를 의미한다. "알케닐"은 치환되지 않거나, 또는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 또는 그 이상의 치환기에 의해 선택적으로 치환될 수 있고, 각 치환기는 할로, 알킬, 아릴, 시클로알킬, 시아노, 알콕시 및 -S(알킬)로 구성된 군에서 독립적으로 선택된다. 적절한 알케닐 기의 무제한적 실례에는 에테닐, 프로페닐, n-부테닐, 3-메틸부트-2-에닐, n-펜테닐, 옥테닐 및 데세닐이 포함된다.

[0053] "알킬렌"은 앞서 정의된 알킬 기로부터 수소 원자의 제거에 의해 획득된 이중기능성 기를 의미한다. 알킬렌의 무제한적 실례에는 메틸렌, 에틸렌 및 프로필렌이 포함된다.

[0054] "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 내포하고, 직쇄 또는 분지쇄일 수 있고, 그리고 사슬 내에 약 2개 내지 약 15개 탄소 원자를 포함하는 지방족 탄화수소 기를 의미한다. 바람직한 알키닐 기는 사슬 내에 약 2개 내지 약 12개 탄소 원자를 갖는다; 그리고 더욱 바람직하게는, 사슬 내에 약 2개 내지 약 4개 탄소 원자를 갖는다. 가지형은 하나 또는 그 이상의 저급 알킬 기, 예를 들면, 메틸, 에틸 또는 프로필이 선형 알키닐 사슬에 부착되는 것을 의미한다. "저급 알키닐"은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 사슬 내에 약 2개 내지 약 6개 탄소 원자를 의미한다. 적절한 알키닐 기의 무제한적 실례에는 에티닐, 프로피닐, 2-부티닐 및 3-메틸부티닐이 포함된다. "알키닐"은 치환되지 않거나, 또는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 또는 그 이상의 치환기에 의해 선택적으로 치환될 수 있고, 각 치환기는 알킬, 아릴 및 시클로알킬로 구성된 군에서 독립적으로 선택될 수 있다.

[0055] "아릴"은 약 6개 내지 약 14개 탄소 원자, 바람직하게는 약 6개 내지 약 10개 탄소 원자를 포함하는 방향족 단일환형 또는 다중환형 고리 시스템을 의미한다. 아릴 기는 동일하거나 상이할 수 있고, 그리고 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 "고리 시스템 치환기"로 선택적으로 치환될 수 있다. 적절한 아릴 기의 무제한적 실례에는 페닐 및 나프틸이 포함된다.

[0056] "헤테로아릴"은 약 5개 내지 약 14개 고리 원자, 바람직하게는 약 5개 내지 약 10개 고리 원자를 포함하는 방향족 단일환형 또는 다중환형 고리 시스템을 의미하고, 여기서 이들 고리 원자 중에서 하나 또는 그 이상은 단독으로 또는 공동으로, 탄소 이외의 원소, 예를 들면, 질소, 산소 또는 황이다. 바람직한 헤테로아릴은 약 5개 내지 약 6개 고리 원자를 내포한다. "헤테로아릴"은 동일하거나 상이할 수 있고, 그리고 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 "고리 시스템 치환기"에 의해 선택적으로 치환될 수 있다. 헤테로아릴 루트 이름 (root name) 앞에 접두사 아자, 옥사 또는 티아는 각각, 적어도 하나의 질소, 산소 또는 황 원자가 고리 원자로

서 존재한다는 것을 의미한다. 헤테로아릴의 질소 원자는 상응하는 N-산화물로 선택적으로 산화될 수 있다. "헤테로아릴"에는 또한, 앞서 정의된 바와 같은 아릴에 융합된 앞서 정의된 바와 같은 헤테로아릴이 포함될 수 있다. 적절한 헤테로아릴의 무제한적 실례에는 피리딘, 피라지닌, 푸라닐, 티에닐, 피리미디닐, 피리돈 (N-치환된 피리돈 포함), 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 피라졸릴, 푸라자닐, 피롤릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 퀴놀살리닐, 프탈라지닐, 옥스인돌릴, 이미다조[1,2-a]피리디닐, 이미다조[2,1-b]티아졸릴, 벤조푸라자닐, 인돌릴, 아자인돌릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조티에닐, 퀴놀리닐, 이미다졸릴, 티에노피리딘, 퀴나졸리닐, 티에노피리미디닐, 피롤로피리딘, 이미다조피리딘, 이소퀴놀리닐, 벤조아자인돌릴, 1,2,4-트리아지닐, 벤조티아졸릴 등이 포함된다. 용어 "헤테로아릴"은 또한, 부분적으로 포화된 헤테로아릴 모이어티, 예를 들면, 테트라히드로이소퀴놀릴, 테트라히드로퀴놀릴 등을 지칭한다.

[0057] "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 아릴과 알킬이 앞서 기술된 바와 같은 아릴-알킬-기를 의미한다. 바람직한 아르알킬은 저급 알킬 기를 포함한다. 적절한 아르알킬 기의 무제한적 실례에는 벤질, 2-펜에틸 및 나프탈레닐메틸이 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 알킬을 통한다.

[0058] "알킬아릴"은 알킬과 아릴이 앞서 기술된 바와 같은 알킬-아릴-기를 의미한다. 바람직한 알킬아릴은 저급 알킬 기를 포함한다. 적절한 알킬아릴 기의 무제한적 실례에는 톨릴이다. 부모 모이어티에 결합은 아릴을 통한다.

[0059] "시클로알킬"은 약 3개 내지 약 10개 탄소 원자, 바람직하게는 약 5개 내지 약 10개 탄소 원자를 포함하는 비-방향족 단일- 또는 다중환형 고리 시스템을 의미한다. 바람직한 시클로알킬 고리는 약 5개 내지 약 7개 고리 원자를 내포한다. 시클로알킬은 동일하거나 상이할 수 있고, 그리고 앞서 정의된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 "고리 시스템 치환기"로 선택적으로 치환될 수 있다. 적절한 단일환형 시클로알킬의 무제한적 실례에는 시클로프로필, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 등이 포함된다. 적절한 다중환형 시클로알킬의 무제한적 실례에는 1-데칼리닐, 노르보닐, 아다만틸 등이 포함된다.

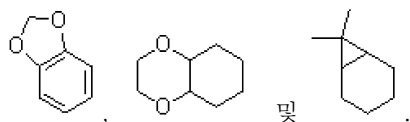
[0060] "시클로알킬알킬"은 부모 코어에 알킬 모이어티 (앞서 정의됨)를 거쳐 연결된, 앞서 정의된 바와 같은 시클로알킬 모이어티를 의미한다. 적절한 시클로알킬알킬의 무제한적 실례에는 시클로헥실메틸, 아다만틸메틸 등이 포함된다.

[0061] "시클로알케닐"은 약 3개 내지 약 10개 탄소 원자, 바람직하게는 약 5개 내지 약 10개 탄소 원자를 포함하고 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 내포하는 비-방향족 단일 또는 다중환형 고리 시스템을 의미한다. 바람직한 시클로알케닐 고리는 약 5개 내지 약 7개 고리 원자를 내포한다. 시클로알케닐은 동일하거나 상이할 수 있고, 그리고 앞서 정의된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 "고리 시스템 치환기"로 선택적으로 치환될 수 있다. 적절한 단일환형 시클로알케닐의 무제한적 실례에는 시클로펜테닐, 시클로헥세닐, 시클로헵타-1,3-디에닐 등이 포함된다. 적절한 다중환형 시클로알케닐의 무제한적 실례는 노르보닐에닐이다.

[0062] "시클로알케닐알킬"은 부모 코어에 알킬 모이어티 (앞서 정의됨)를 거쳐 연결된, 앞서 정의된 바와 같은 시클로알케닐 모이어티를 의미한다. 적절한 시클로알케닐알킬의 무제한적 실례에는 시클로펜테닐메틸, 시클로헥세닐메틸 등이 포함된다.

[0063] "할로젠"은 플루오르, 클로르, 브롬, 또는 요오드를 의미한다. 플루오르, 클로르와 브롬이 바람직하다.

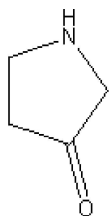
[0064] "고리 시스템 치환기"는 예로써, 고리 시스템 상에서 가용한 수소를 대체하는 방향족 또는 비-방향족 고리 시스템에 부착된 치환기를 의미한다. 고리 시스템 치환기는 동일하거나 상이할 수 있고, 이들 각각은 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 아르알킬, 알킬아릴, 헤테로아르알킬, 헤테로아릴알케닐, 헤테로아릴알키닐, 알킬헤테로아릴, 히드록시, 히드록시알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아르알콕시, 아실, 아로일, 할로, 니트로, 시아노, 카복시, 알콕시카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 아르알콕시카르보닐, 알킬설폰닐, 아릴설폰닐, 헤테로아릴설폰닐, 알킬티오, 아릴티오, 헤테로아릴티오, 아르알킬티오, 헤테로아르알킬티오, 시클로알킬, 헤테로시클릴, $-SF_5$, $-OSF_5$ (아릴의 경우), $-O-C(O)-$ 알킬, $-O-C(O)-$ 아릴, $-O-C(O)-$ 시클로알킬, $-C(=N-CN)-NH_2$, $-C(=NH)-NH_2$, $-C(=NH)-NH$ (알킬), 옥심 (가령, $=N-OH$), $-NY_1Y_2$, $-알킬-NY_1Y_2$, $-C(O)NY_1Y_2$, $-SO_2NY_1Y_2$ 및 $-SO_2NY_1Y_2$ 로 구성된 군에서 독립적으로 선택되고, 여기서 Y_1 과 Y_2 는 동일하거나 상이할 수 있고, 그리고 수소, 알킬, 아릴, 시클로알킬, 그리고 아르알킬로 구성된 군에서 독립적으로 선택된다. "고리 시스템 치환기"는 또한, 고리 시스템 상에서 2개의 인접한 탄소 원자에서 2개의 가용한 수소 (각 탄소에서 1개의 H)를 동시에 대체하는 단일 모이어티를 의미할 수도 있다. 이런 모이어티의 실례는 메틸렌 디옥시, 에틸렌디옥시, $-C(CH_3)_2-$ 등이고 이들은 하기와 같은 모이어티를 형성한다:



[0065]

[0066] "헤테로아릴알킬"은 부모 코어에 알킬 모이어티 (앞서 정의됨)를 거쳐 연결된, 앞서 정의된 바와 같은 헤테로아릴 모이어티를 의미한다. 적절한 헤테로아릴의 무제한적 실례에는 2-피리디닐메틸, 퀴놀리닐메틸 등이 포함된다.

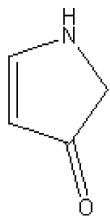
[0067] "헤테로시클릴"은 약 3개 내지 약 10개 고리 원자, 바람직하게는 약 5개 내지 약 10개 고리 원자를 포함하는 비-방향족 포화된 단일환형 또는 다중환형 고리 시스템을 의미하고, 여기서 고리 시스템 내에 원자 중에서 하나 또는 그 이상은 단독으로 또는 공동으로, 탄소 이외의 원소, 예를 들면, 질소, 산소 또는 황이다. 고리 시스템 내에서 인접한 산소 및/또는 황 원자는 존재하지 않는다. 바람직한 헤테로시클릴은 약 5개 내지 약 6개 고리 원자를 내포한다. 헤테로시클릴 루트 이름 앞에 접두사 아자, 옥사 또는 티아는 각각, 적어도 하나의 질소, 산소 또는 황 원자가 고리 원자로서 존재한다는 것을 의미한다. 헤테로시클릴 고리 내에 임의의 -NH는 예로써, -N(Boc), -N(CBz), -N(Tos) 기 등으로서 보호된 상태로 존재할 수 있다; 이런 보호 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주된다. 헤테로시클릴은 동일하거나 상이할 수 있고, 그리고 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 "고리 시스템 치환기"에 의해 선택적으로 치환될 수 있다. 헤테로시클릴의 질소 또는 황 원자는 상응하는 N-산화물, S-산화물 또는 S,S-이산화물로 선택적으로 산화될 수 있다. 적절한 단일환형 헤테로시클릴 고리의 무제한적 실례에는 피페리딘, 피롤리딘, 피페라지닌, 모르폴리딘, 티오모르폴리딘, 티아졸리딘, 1,4-디옥사닌, 테트라히드로푸라닌, 테트라히드로티오펜, 락탐, 락톤 등이 포함된다. "헤테로시클릴"에는 또한, =O가 동일한 고리 탄소 원자에서 2개의 가용한 수소를 대체하는 앞서 기술된 바와 같은 헤테로시클릴 고리가 포함된다. 이런 모이어티의 실례는 피롤리돈이다:



[0068]

[0069] "헤테로시클릴알킬"은 부모 코어에 알킬 모이어티 (앞서 정의됨)를 거쳐 연결된, 앞서 정의된 바와 같은 헤테로시클릴 모이어티를 의미한다. 적절한 헤테로시클릴알킬의 무제한적 실례에는 피페리디닐메틸, 피페라지닐메틸 등이 포함된다.

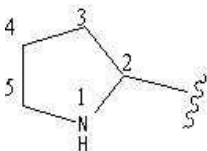
[0070] "헤테로시클레닐"은 약 3개 내지 약 10개 고리 원자, 바람직하게는 약 5개 내지 약 10개 고리 원자를 포함하는 비-방향족 단일환형 또는 다중환형 고리 시스템을 의미하고, 여기서 고리 시스템 내에 원자 중에서 하나 또는 그 이상은 단독으로 또는 공동으로, 탄소 이외의 원소, 예를 들면, 질소, 산소 또는 황 원자이고, 그리고 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합 또는 탄소-질소 이중 결합을 내포한다. 고리 시스템 내에서 인접한 산소 및/또는 황 원자는 존재하지 않는다. 바람직한 헤테로시클레닐 고리는 약 5개 내지 약 6개 고리 원자를 내포한다. 헤테로시클레닐 루트 이름 앞에 접두사 아자, 옥사 또는 티아는 각각, 적어도 하나의 질소, 산소 또는 황 원자가 고리 원자로서 존재한다는 것을 의미한다. 헤테로시클레닐은 하나 또는 그 이상의 고리 시스템 치환기에 의해 선택적으로 치환될 수 있고, 여기서 "고리 시스템 치환기"는 앞서 정의된 바와 동일하다. 헤테로시클레닐의 질소 또는 황 원자는 상응하는 N-산화물, S-산화물 또는 S,S-산화물로 선택적으로 산화될 수 있다. 적절한 헤테로시클레닐 기의 무제한적 실례에는 1,2,3,4-테트라히드로피리디닐, 1,2-디히드로피리디닐, 1,4-디히드로피리디닐, 1,2,3,6-테트라히드로피리디닐, 1,4,5,6-테트라히드로피리미디닐, 2-피롤리닐, 3-피롤리닐, 2-이미다졸리닐, 2-피라졸리닐, 디히드로이미다졸릴, 디히드로옥사졸릴, 디히드로옥사디아졸릴, 디히드로티아졸릴, 3,4-디히드로-2H-피라닐, 디히드로푸라닐, 플루오르디히드로푸라닐, 7-옥사비시클로[2.2.1]헵테닐, 디히드로티오펜, 디히드로티오피라닐 등이 포함된다. "헤테로시클레닐"에는 또한, =O가 동일한 고리 탄소 원자에서 2개의 가용한 수소를 대체하는 앞서 기술된 바와 같은 헤테로시클레닐 고리가 포함된다. 이런 모이어티의 실례는 피롤리디논이다:



[0071]

[0072] "헤테로시클레닐알킬"은 부모 코어에 알킬 모이어티 (앞서 정의됨)를 거쳐 연결된, 앞서 정의된 바와 같은 헤테로시클레닐 모이어티를 의미한다.

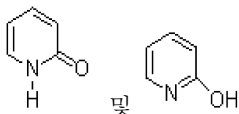
[0073] 주의할 점은 본 발명의 헤테로-원자 내포 고리 시스템에서, N, O 또는 S에 인접한 탄소 원자에서 히드록실 기가 존재하지 않을 뿐만 아니라, 다른 헤테로원자에 인접한 탄소에서 N 또는 S 기가 존재하지 않는다는 것이다. 따라서 예로써 하기 고리:



[0074]

내에서, 어떤 -OH도 2와 5로 표시된 탄소에 직접적으로 부착되지 않는다.

[0075] 또한, 호변이성 형태 (tautomeric form), 예를 들면, 하기 모이어티:



[0076]

및 는 본 발명의 일정한 구체예에서 동등한 것으로 간주된다.

[0077] "알킬닐알킬"은 알킬닐과 알킬이 앞서 기술된 바와 같은 알킬닐-알킬- 기를 의미한다. 바람직한 알킬닐알킬은 저급 알킬닐 및 저급 알킬 기를 내포한다. 부모 모이어티에 결합은 알킬을 통한다. 적절한 알킬닐알킬 기의 무제한적 실례에는 프로파르길메틸이 포함된다.

[0078] "헤테로아르알킬"은 헤테로아릴과 알킬이 앞서 기술된 바와 같은 헤테로아릴-알킬- 기를 의미한다. 바람직한 헤테로아르알킬은 저급 알킬 기를 내포한다. 적절한 아르알킬 기의 무제한적 실례에는 피리딜메틸, 그리고 퀴놀린-3-일메틸이 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 알킬을 통한다.

[0079] "히드록시알킬"은 HO-알킬- 기를 의미하고, 여기서 알킬은 앞서 정의된 바와 같다. 바람직한 히드록시알킬은 저급 알킬을 내포한다. 적절한 히드록시알킬 기의 무제한적 실례에는 히드록시메틸과 2-히드록시에틸이 포함된다.

[0080] "아실"은 H-C(O)-, 알킬-C(O)- 또는 시클로알킬-C(O)- 기를 의미하고, 여기서 이들 다양한 기는 앞서 기술된 바와 같다. 부모 모이어티에 결합은 카르보닐을 통한다. 바람직한 아실은 저급 알킬을 내포한다. 적절한 아실 기의 무제한적 실례에는 포르밀, 아세틸과 프로파노일이 포함된다.

[0081] "아로일"은 아릴-C(O)- 기를 의미하고, 여기서 아릴 기는 앞서 기술된 바와 같다. 부모 모이어티에 결합은 카르보닐을 통한다. 적절한 기의 무제한적 실례에는 벤조일과 1-나프토일이 포함된다.

[0082] "알콕시"는 알킬-O- 기를 의미하고, 여기서 알킬 기는 앞서 기술된 바와 같다. 적절한 알콕시 기의 무제한적 실례에는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시 및 n-부톡시가 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 에테르 산소를 통한다.

[0083] "아릴옥시"는 아릴-O- 기를 의미하고, 여기서 아릴 기는 앞서 기술된 바와 같다. 적절한 아릴옥시 기의 무제한적 실례에는 페녹시와 나프톡시가 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 에테르 산소를 통한다.

[0084] "아르알킬옥시"는 아르알킬-O- 기를 의미하고, 여기서 아르알킬 기는 앞서 기술된 바와 같다. 적절한 아르알킬옥시 기의 무제한적 실례에는 벤질옥시 및 1- 또는 2-나프탈렌메톡시가 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 에테르 산소를 통한다.

[0085] "알킬티오"는 알킬-S- 기를 의미하고, 여기서 알킬 기는 앞서 기술된 바와 같다. 적절한 알킬티오 기의 무제한적 실례에는 메틸티오와 에틸티오가 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 황을 통한다.

[0086] "아릴티오"는 아릴-S- 기를 의미하고, 여기서 아릴 기는 앞서 기술된 바와 같다. 적절한 아릴티오 기의 무제한적 실례에는 페닐티오가 포함된다.

적 실례에는 페닐티오와 나프틸티오가 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 황을 통한다.

[0087] "아르알킬티오"는 아르알킬-S- 기를 의미하고, 여기서 아르알킬 기는 앞서 기술된 바와 같다. 적절한 아르알킬 티오 기의 무제한적 실례는 벤질티오이다. 부모 모이어티에 결합은 황을 통한다.

[0088] "알콕시카르보닐"은 알킬-O-CO- 기를 의미한다. 적절한 알콕시카르보닐 기의 무제한적 실례에는 메톡시카르보닐과 에톡시카르보닐이 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 카르보닐을 통한다.

[0089] "아릴옥시카르보닐"은 아릴-O-C(=O)- 기를 의미한다. 적절한 아릴옥시카르보닐 기의 무제한적 실례에는 페녹시카르보닐과 나프톡시카르보닐이 포함된다. 부모 모이어티에 결합은 카르보닐을 통한다.

[0090] "아르알콕시카르보닐"은 아르알킬-O-C(=O)- 기를 의미한다. 적절한 아르알콕시카르보닐 기의 무제한적 실례는 벤질옥시카르보닐이다. 부모 모이어티에 결합은 카르보닐을 통한다.

[0091] "알킬설포닐"은 알킬-S(O₂)- 기를 의미한다. 바람직한 기는 알킬 기가 저급 알킬인 것들이다. 부모 모이어티에 결합은 설포닐을 통한다.

[0092] "아릴설포닐"은 아릴-S(O₂)- 기를 의미한다. 부모 모이어티에 결합은 설포닐을 통한다.

[0093] 용어 "치환된"은 지정된 원자에서 하나 또는 그 이상의 수소가 지시된 기로부터 선택으로 대체되는 것을 의미하고, 단서로써 현재 환경 하에 지정된 원자의 정상 원자가 (normal valency)가 초과되지 않아야 하고, 그리고 이러한 치환이 안정된 화합물을 산출해야 한다. 치환기 및/또는 변수의 조합은 이런 조합이 안정된 화합물을 산출하는 경우에만 허용된다. "안정된 화합물" 또는 "안정된 구조"는 반응 혼합물로부터 유용한 정도의 순도까지 분리, 그리고 유효한 치료제로의 조제를 견뎌낼 만큼 충분히 강건한 화합물을 의미한다.

[0094] 용어 "선택적으로 치환된"은 특정된 기, 라디칼 또는 모이어티로 선택적 치환을 의미한다.

[0095] 화합물에 대한 용어 "정제된", "정제된 형태에서" 또는 "분리되고 정제된 형태에서"는 합성 과정 (가령, 반응 혼합물), 또는 자연 공급원 또는 이들의 조합으로부터 분리된 이후, 상기 화합물의 물리적 상태를 지칭한다. 따라서 화합물에 대한 용어 "정제된", "정제된 형태에서" 또는 "분리되고 정제된 형태에서"는 본 명세서에서 기술되거나 당업자에게 공지된 표준 분석 기술에 의해 특성화될 수 있을 만큼 충분한 순도에서, 본 명세서에서 기술되거나 당업자에게 공지된 정제 과정 또는 과정들 (가령, 크로마토그래피, 재결정화 등)로부터 획득된 이후, 상기 화합물의 물리적 상태를 지칭한다.

[0096] 또한, 본 명세서의 본문, 반응식, 실시예 및 표에서 임의의 탄소뿐만 아니라 불포화된 원자가를 갖는 헤테로원자는 이들 원자가를 충족시키는 충분한 수의 수소 원자(들)를 갖는 것으로 추정된다. 그리고, 이들 수소 원자 중에서 임의의 하나 또는 그 이상은 중수소일 수 있다.

[0097] 화합물에서 기능 기가 "보호된" 것으로 불릴 때, 이것은 화합물이 반응에 종속될 때, 상기 기가 보호된 부위에서 원치 않는 부반응을 미리 배제시키는 변형된 형태로 있다는 것을 의미한다. 적절한 보호 기는 당업자에 의해, 그리고 표준 교과서, 예를 들면, T. W. Greene *et al*, *Protective Groups in organic Synthesis* (1991), Wiley, New York를 참조함으로써 인식될 것이다.

[0098] 임의의 변수 (가령, 아릴, 헤테로환, R² 등)가 임의의 구성물 또는 화학식 I에서 1번 이상 발생할 때, 각 경우에서 이의 정의는 모든 다른 경우에서 이의 정의와 독립한다.

[0099] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "조성물"은 특정된 양으로 특정된 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라 특정된 양으로 특정된 성분의 조합으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 발생하는 임의의 산물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0100] *제약학적으로 허용되는 염*

[0101] 알파-2 수용체 효현제는 그들의 제약학적으로 허용되는 염으로서 이용될 수 있다.

[0102] "제약학적으로 허용되는 염"은 부모 화합물의 활성을 유지하고, 그리고 부모 화합물과 비교하여 투여된 개체에서 및 투여된 환경에서 임의의 추가적인 유해한 또는 원치 않는 효과를 부과하지 않는 임의의 염이다. 제약학적으로 허용되는 염은 또한, 산, 다른 염, 또는 산 또는 염으로 전환되는 프로드러그의 투여의 결과로서 생체내에

서 형성될 수 있는 임의의 염을 지칭한다.

[0103] 산성 기능 기의 제약학적으로 허용되는 염은 유기 또는 무기 염기로부터 유래될 수 있다. 염은 일가 또는 다가 이온을 포함할 수 있다. 특히, 무기 이온 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 그리고 마그네슘이 관심된다. 유기 염은 아민, 특히 암모늄 염, 예를 들면, 모노, 디와 트리알킬 아민 또는 에탄올 아민으로 만들어질 수 있다. 염은 또한, 카페인, 트로메타민 및 유사한 분자로 형성될 수 있다. 염화수소산 또는 일부 다른 제약학적으로 허용되는 산은 염기성 기, 예를 들면, 아민 또는 피리딘 고리를 포함하는 화합물과 염을 형성할 수 있다.

[0104] 프로드러그

[0105] 본 발명의 조성물과 방법에 임의의 알파-2 수용체 효현제의 프로드러그가 이용될 수 있다.

[0106] "프로드러그"는 투여후 치료적으로 활성 화합물로 전환되는 화합물이고, 그리고 상기 용어는 당분야에서 일반적으로 이해되는 바와 같이 본 명세서에서 폭넓게 해석되어야 한다. 본 발명의 범위를 한정할 의도 없이, 전환은 에스테르 기 또는 일부 다른 생물학으로 불안정한 기의 가수분해에 의해 일어날 수 있다. 반드시 그러한 것은 아니지만 일반적으로, 프로드러그는 비활성이거나, 또는 전환되는 치료적으로 활성 화합물보다 활성이 덜하다. 본 발명에서 개시된 화합물의 에스테르 프로드러그가 구체적으로 예기된다. 에스테르는 C1의 카르복실산 (즉, 자연 프로스타글란딘의 말단 카르복실산)으로부터 유래되거나, 또는 에스테르는 상기 분자의 다른 부분, 예를 들면, 페닐 고리에서 카르복실산 기능 기로부터 유래될 수 있다. 한정 의도 없이, 에스테르는 알킬 에스테르, 아릴 에스테르, 또는 헤테로아릴 에스테르일 수 있다. 이러한 문맥 ("프로드러그"의 정의)에서, 용어 "알킬"은 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖고, 그리고 선형, 가지형, 또는 환형 알킬 모이어티를 지칭한다. C₁₋₆ 알킬 에스테르가 특히 유용한데, 여기서 상기 에스테르의 알킬 부분은 1개 내지 6개 탄소 원자를 갖고, 그리고 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, *n*-부틸, *sec*-부틸, *is*-부틸, *t*-부틸, 펜틸 이성질체, 헥실 이성질체, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 그리고 1-6개 탄소 원자를 갖는 이들의 조합 등을 포함하지만 이들에 국한되지 않는다.

[0107] 본 발명의 알파-2 수용체 효현제는 합성적으로 생산되거나, 또는 프로드러그의 투여후 체내에서 생산될 수 있다. 따라서 용어 "알파-2 수용체 효현제"는 제조 공정에 의해 생산된 화합물 및 다른 약물이 투여될 때에만 생체내에서 형성되는 화합물 둘 모두를 포함한다.

[0108]

[0109] 이성질체 및 라세미

[0110] 본 발명의 조성물과 방법에서 알파-2 수용체 효현제의 거울상이성질체, 입체이성질체, 또는 기타 이성질체가 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물과 방법에서 임의의 비율에서 라세미 혼합물, 또는 한쪽 또는 양쪽 라세미체가 이용될 수 있다.

[0111] 용량

[0112] 투여의 정확한 용량과 빈도는 환자의 질환의 심각도와 성격, 투여 방식, 이용되는 특정 화합물의 효능과 약력학, 그리고 담당 의사의 판단에 좌우된다. 용량 결정은 당업자의 능력 범위 내에 있는 일과적인 문제이다. 일반적으로, 알파-2 수용체 효현제는 치료 효과적 용량, 다시 말하면, 원하는 치료 효과를 발생시킬 만큼 충분한 용량으로 투여된다.

[0113] 한 구체예에서, 본 발명의 화합물 (알파-2B 수용체 효현제; 유의미한 알파-2A 활성이 결여된 알파-2B 수용체 효현제; 알파-2C 수용체 효현제; 유의미한 알파-2A 활성이 결여된 알파-2C 수용체 효현제; 알파 2B/2C 수용체 효현제; 그리고 유의미한 알파-2A 활성이 결여된 알파 2B/2C 수용체 효현제)은 장기적인 경감 - 다시 말하면, 이들 화합물이 휴약된 이후, 1일 또는 그 이상 동안 지속하는 경감을 제공한다. 따라서 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 화합물을 최초 기간 동안 환자에 투여하고, 그 다음, 휴약 기간이 경과한 이후, 두 번째 기간 동안 상기 화합물을 다시 한 번 투여하는 단계를 포함한다. 최초, 두 번째, 그리고 휴약 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 또는 1, 2, 3 또는 4주일 수 있고, 그리고 동일하거나 상이할 수 있다. 따라서 예로써, 본 발명의 화합물이 3일 동안 투여될 수 있고, 그 다음, 상기 화합물이 마지막으로 투여되고 3일 이후에, 상기 화합물이 3일 동안 다시 한 번 투여될 수 있다; 또는 본 발명의 화합물이 2주 동안 투여

될 수 있고, 그 다음, 상기 화합물이 마지막으로 투여되고 1주 이후에, 상기 화합물이 1주 동안 다시 한 번 투여될 수 있다.

[0114] 다른 구체예에서, 최초와 두 번째 기간은 가변적이고, 그리고 휴약 기간은 고정된다. 이런 구체예에서, 최초와 두 번째 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 또는 1, 2, 3 또는 4주이다. 따라서 예로써, 본 발명의 화합물이 적어도 3일 동안 투여될 수 있고, 그 다음, 상기 화합물이 마지막으로 투여되고 6일 이후에, 상기 화합물이 적어도 3일 동안 다시 한 번 투여될 수 있다; 또는 본 발명의 화합물이 적어도 1주 동안 투여될 수 있고, 그 다음, 상기 화합물이 마지막으로 투여되고 1주 이후에, 상기 화합물이 적어도 1주 동안 다시 한 번 투여될 수 있다.

[0115] 부형제 및 제형

[0116] 당업자는 알파-2 수용체 효현제가 당분야에 널리 공지된 제약학적으로 허용되는 부형제와 혼합될 수 있다는 것을 쉽게 이해할 것이다.

[0117] 전신 투여되는 제약학적 조성물은 분말, 알약, 정제 등으로서, 또는 경구 또는 비경구 투여, 흡입 또는 눈이나 피부에 국소 투여에 적합한 용액, 에멀전, 현탁액, 에어로졸, 시럽 또는 엘릭시르로서 조제될 수 있다.

[0118] 고형 제형 또는 약제의 경우에, 비-독성 고형 담체에는 제약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 폴리알킬렌 글리콜, 활석, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스 및 탄산마그네슘이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 고형 제형은 코팅되지 않거나, 또는 이들은 위장관 내에서 봉해와 흡수를 지연시키고, 따라서 더욱 긴 기간에 걸쳐 지속된 작용을 제공하는 공지된 기술에 의해 코팅될 수 있다. 가령, 시간 지연 물질 (time delay material), 예를 들면, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 이용될 수 있다. 이들은 또한, 조절 방출 (control release)을 위한 삼투성 치료 정제를 형성하는 U.S. 특허 번호 4,256,108, 번호 4,166,452, 그리고 번호 4,265,874에서 기술된 기술에 의해 코팅될 수 있다. 액상의 제약학적으로 투여가능 제형은 예로써, 용액 또는 현탁액을 형성하기 위한 물, 염수, 수성 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등과 같은 담체에서 본 발명의 유용한 화합물 중에서 하나 또는 그 이상 및 선택적인 제약학적 어쥬번트의 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 원하는 경우에, 투여되는 제약학적 조성물은 또한, 미량의 비독성 보조 물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 등을 내포할 수 있다. 이런 보조 작용제의 전형적인 실례는 아세트산나트륨, 모노라우린산 소르비탄, 트리에탄올아민, 아세트산나트륨, 올레산트리에탄올아민 등이다. 이런 제형을 제조하는 실제 방법은 공지되어 있거나, 또는 당업자에게 명백할 것이다; 가령, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 16th Edition, 1980을 참조한다. 투여되는 제제의 조성물은 어떤 경우든, 원하는 치료 효과를 제공하는데 효과적인 양으로 본 발명의 유용한 화합물 중에서 하나 또는 그 이상의 일정량을 내포한다.

[0119] 비경구 투여는 일반적으로, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사로 특징된다. 주사가능물질은 액상 용액 또는 현탁액, 주사에 앞서 액상 용액 또는 현탁액에 적합한 고형 형태, 또는 에멀전으로서 전통적인 형태로 제조될 수 있다. 적절한 부형제는 예로써, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등이다. 이에 더하여, 원하는 경우에, 투여되는 주사가능 제약학적 조성물은 또한, 미량의 비-독성 보조 물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 등을 내포할 수 있다.

[0120] T 세포 활성화

[0121] T 세포는 유전자 재배열 (gene rearrangement)의 결과로서 발생하는 특정한 T 세포 수용체 (TCRs)를 갖는 림프구의 한 부류이다. T 세포는 다양한 역할을 갖는데, 이들은 유전자 발현의 별개의 패턴에 의해 인식될 수 있는 T 세포의 상이한 부분집합의 분화를 동반한다. 몇몇 주요 T 세포 부분집합, 예를 들면, TCR- α/β , 그리고 TCR γ/δ 및 불변성 자연 킬러 세포는 수용체 발현에 기초하여 인지된다. 다른 T 세포 부분집합은 표면 분자 및 이들로부터 분비된 사이토킨에 의해 정의된다. 가령, T 보조 세포 (CD4 세포)는 사이토킨을 분비하고, 그리고 B 세포와 세포독성 T 세포가 생존하고 효과기 기능 (effector function)을 수행하는데 도움을 준다. 세포독성 T 세포 (CTLs)는 일반적으로, CD8 세포이고, 그리고 이들은 표적 세포, 예를 들면, 감염된 세포 또는 종양 세포를 죽이도록 전문화된다. 자연 킬러 (NK) 세포는 T 세포에 관련되지만 TCR을 갖지 않고, 그리고 비록 이들이 T 세포와 일부 기능을 공유하고, 그리고 사이토킨을 분비하고 일부 종류의 표적 세포를 죽일 수 있긴 하지만, 더욱

짧은 수명을 갖는다.

[0122] 인간과 생쥐 말초 혈액은 T 조절 표현형 ("Treg")을 발현하는, 다시 말하면, CD4와 CD25 항원 둘 모두에 양성인 T 세포 림프구의 작은 집단 (즉, CD25에 대해서도 명백하게 양성인 CD4⁺ T 세포)을 내포한다. CD4⁺CD25⁺ 세포의 이러한 집단은 생쥐 (여기서, 이들은 림프절과 비장 CD4⁺ T 세포 집단의 6-10%를 구성한다)에서 최초 특성화되었고, 비록 일부 공여자가 CD4⁺와 CD25⁺ 세포의 더욱 명백한 집단을 보이긴 하지만, 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 5-10%, 또는 CD4⁺ T 세포의 2-7%만을 대략적으로 나타낸다. 인간 말초 혈액 PBMC의 약 1-2%는 CD4 양성 (CD4⁺)이고 CD25 명백한 양성 (CD25⁺)인 세포이다.

[0123] Treg 세포의 여러 부분집합이 존재한다 (Bluestone *et al.*, *Nature Rev. Immunol.*, 3:253 (2003)). 조절 세포의 한 가지 부분집합은 흉선에서 발달한다. 흉선 유래된 Treg 세포는 사이토킨-독립성 기전에 의해 기능하고, 이것은 세포 대 세포 접촉을 수반한다 (Shevach, *Nature Rev. Immunol.* 2:389 (2002)). 이들은 자기관용 (self-tolerance)의 유도과 유지 및 자가면역의 예방에 필수적이다 (Shevach, *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-449 (2000); Stephens *et al.*, 2001; Taams *et al.*, 2001; Thornton *et al.*, 1998; Salomon *et al.*, *Immunity* 12:431-440 (2000); Sakaguchi *et al.*, *Immunol. Rev.* 182:18-32 (2001)). 이들 전문적 조절 세포는 흉선 말살 (thymic deletion)을 모면하거나, 또는 흉선외 (extrathymic) 항원을 인식하는 자기반응성 T 세포의 활성화와 증식을 예방하고, 따라서 이들은 항상성 (homeostasis)과 면역 조절뿐만 아니라 자가면역의 발생으로부터 숙주를 보호하는데 결정적이다 (Suri-Payer *et al.*, *J. Immunol.* 157:1799-1805 (1996); Asano *et al.*, *J. Exp. Med.* 184:387-396 (1996); Bonomo *et al.*, *J. Immunol.* 154:6602-6611 (1995); Willerford *et al.*, *Immunity* 3:521-530 (1995); Takahashi *et al.*, *Int. Immunol.* 10:1969-1980 (1998); Salomon *et al.*, *Immunity* 12:431-440 (2000); Read *et al.*, *J. Exp. Med.* 192:295-302 (2000)). 따라서 면역 조절 CD4⁺CD25⁺ T 세포는 종종, "전문적 억제자 세포"로서 지칭된다.

[0124] 하지만 Treg 세포는 또한, 성숙 말초 CD4⁺ T 세포의 활성화에 의해 발생할 수 있다. 여러 연구에서 말초 유래된 Treg 세포는 면역억제성 사이토킨, 예를 들면, 전환 성장 인자-베타 (TGF- β)와 IL-10을 생산함으로써 그들의 저해 활성을 매개하는 것으로 지시되었다 (Kingsley *et al.*, *J. Immunol.* 168:1080 (2002); Nakamura *et al.*, *J. Exp. Med.* 194:629-644 (2001)). 항원-특이적 활성화 이후, 이들 Treg 세포는 CD4⁺ 또는 CD25⁺ T 세포의 증식을 비-특이적으로 억제할 수 있다 (Baecher-Allan *et al.*, *J. Immunol.* 167(3):1245-1253 (2001)에 의한 저용량 고정화된 항-CD3 mAb-기초된 공동-배양 억제자 분석평가에서 FACS 분류에 의해 증명됨).

[0125] 최근에, Riley *et al.*, "Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning," *Immunity*, 30(5), 656-665 (2009)에서는 조절 T 세포가 면역 활성화에 관련된 여러 병리학적 질환에서 매우 중요하다는 것을 증명하였다 (Riley *et al.*, 2009). CD25⁺, FoxP3⁺ Treg는 전통적인 CD4⁺ 보조 T 세포, B 세포 항체 생산, CD8⁺ 세포독성 활성 및 항원-제시 세포 기능과 성숙을 비롯한 일련의 세포 유형의 기능을 억제함으로써 면역 반응 염증과 조직 파괴를 차단하는 능력을 갖는다 (Tang & Bluestone, 2008). Treg의 감소된 빈도 또는 기능장애가 많은 인간 질환에서 보고되었다 (Tran & Shevach, 2009).

[0126] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 이런 상향조절이 유익한 환자에서 조절 T 세포 기능을 상향조절하기 위해 알파-2 효현제를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 조절 T 세포는 CD25⁺, FoxP3⁺ T 세포이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 신경염, 췌관염, 류머티스성 관절염, I형 당뇨병, 다발성 경화증 (MS), 이식편 대 숙주 질환 (GVHD), 자가면역성 포도막염, 눈 염증, 안구건조증 질환, 아토피성 피부염, 건선, 염증성 장 질환, 천식, 그리고 재생 불량성 빈혈과 같은 질환을 치료하기 위해 알파-2 효현제를 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0127] 도면의 간단한 설명

도 1에서는 qPCR를 통해 인간 T 세포 부분집합에서, α_{2B} -수용체가 발현되지만 α_{2A} -수용체는 발현되지 않는다는 것을 보여준다.

도 2에서는 이질통증성 신경성 통증의 SNL 쥐 모델에서 화합물 B에 의한, CD4⁺/CD25⁺ Treg 세포인 비장 CD4⁺ T

세포의 빈도에서 지속된 증가를 보여준다.

도 3에서는 α_{2B} -수용체 효현제 화합물 B가 확립된 MS 통증에서 진통성이라는 것을 보여주고, 그리고 Treg 세포의 조절을 보여준다.

도 4에서는 화합물 B가 재발 경감 EAE의 단백지질-유도된 모델에서 질환의 임상 과정에 대한 유의미한 효과를 갖는다는 것을 보여준다.

도 5에서는 화합물 B가 재발 경감 EAE의 PLP-유도된 모델에서 CNS 내에 면역 세포의 존재를 유의미하게 감소시킨다는 것을 보여준다.

도 6에서는 화합물 C가 재발 경감 EAE의 단백지질-유도된 모델에서 질환의 임상 과정에 대한 유의미한 효과를 갖는다는 것을 보여준다.

도 7에서는 화합물 C가 재발 경감 EAE의 PLP-유도된 모델에서 척수 내에 조절 T 세포의 빈도를 유의미하게 증가시킨다는 것을 보여준다.

도 8에서는 화합물 B가 EAAU 쥐의 수양액에서 임상 질환 및 염증 세포 수에 대한 유의미한 효과를 갖는다는 것을 보여준다.

도 9에서는 화합물 B가 EIU 쥐의 수양액에서 단백질 농도에 대한 유의미한 효과를 갖는다는 것을 보여준다.

도 10에서는 화합물 B가 쥐 EIU 모델에서 혈액 호중구와 림프구의 수준을 정상화시킨다는 것을 보여준다.

도 11에서는 건조 스트레스의 개시 시점에 시작되는 화합물 B로 공여자의 치료가 수용자 눈물 TNF-알파와 IL17 수준을 유의미하게 감소시킨다는 것을 보여준다.

도 12에서는 건조 스트레스에 생쥐의 노출후 시작되는 치료 양식에서 화합물 C로 치료가 배상 세포 손실 및 결막 내로 T 세포 침윤을 유의미하게 감소시킨다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0128] 실시예

[0129] 본 발명은 하기 실시예에 의해 설명된다. 이것은 설명의 목적으로만 제공된다; 훨씬 많은 구체예가 가능하다.

[0130] 조절 T 세포에서 알파-2B 작용에 대한 증거

[0131] 본 발명자들은 α_{2B} -선택적 화합물이 면역-관련된 기전을 통해 신경성 통증 상태를 조절하는 지를 조사하였다. α_{2B} 효현제, 화합물 A로 치료는 IL-2 수준의 척수 신경 결찰 수술-유도된 증가를 약화시켰다 (표 1). IL-2는 T-림프구 증식을 조절하는데 필수적인 친-염증성 사이토킨이다. 이러한 조사 결과는 급성과 만성 이질통증 반전에 대한 α_{2B} 효현제 효과 (본 발명에 참고문헌으로 편입되는 U.S. 특허 번호 7,345,065에서 기술됨)가 면역 세포, 특히 T 세포에 의해 매개될 수도 있다는 것을 지시한다. 본 발명자들은 또한, qPCR을 통해 인간 T 림프구의 상이한 아류형에서 α_{2B} 수용체가 발현되지만 α_{2A} 수용체는 발현되지 않는다는 것을 발견하였다. 본 발명자들이 아는 바로는, 이것은 T 세포에서 α_{2B} -수용체 아류형의 발현의 최초 증명이다 (도 1). α_{2B} -수용체 효현제에 의해 매개된 지속적인 통증 완화 기전에서 면역 세포의 역할에 대한 추가의 증거는 상이한 구조를 갖는 두 번째 α_{2B} 효현제, 화합물 B의 진통성 효과가 면역억제성 약물 FK506으로 차단될 수 있다는 사실에 의해 획득되었다 (표 2). 이러한 조사 결과는 α_{2B} -수용체-유도된 장기적인 이질통증 반전이 활성화된 림프구의 존재를 필요로 한다는 것을 암시하는데, 그 이유는 FK506이 T-림프구 활성화의 강력한 차단제인 것으로 밝혀졌기 때문이다 (Small et al, 1996). 이러한 조사 결과는 상이한 구조를 갖는 또 다른 α_{2B} 효현제, 화합물 C로 확증되었는데, 여기에서 FK506은 척수 신경 결찰 모델에서 화합물 C의 장기적인 진통성 활성을 차단할 수 있었다 (표 3).

[0132] 게다가, 본 발명자들은 α_{2B} -수용체-매개된 효과에 관여하는 T 세포의 아류형을 조사하고, 그리고 α_{2B} -수용체 효현제로 치료된 신경성 통증을 앓는 동물 내에 림프 기관에서 조절 T 세포 (Treg)의 숫자에서 유의미하고 지속적인 증가를 관찰하였다 (도 2). 본 발명자들은 무경험 동물에서 Treg 세포 수에 대한 화합물의 효과 없음을 관찰하였다. 이것은 Treg 세포에 대한 α_{2B} -수용체 효현제의 효과가 항원 자극에 의존하고, 그리고 Treg 세포의 항원

-선별적 확장이 있을 수 있음을 암시한다.

[0133] 다발성 경화증의 모델에서 알파-2B 효현제의 효과

[0134] 본 발명자들은 α_{2B} -수용체 효현제의 이러한 기전이 병리학적 T 세포 활성화의 두 번째 모델, 다발성 경화증의 모델, 그리고 두 번째 종류에까지 일반화될 수 있다는 것을 증명하였다. 실험적 자가면역성 뇌수막염 (experimental autoimmune encephalomyelitis)의 재발-경감 형태를 유발하는 단백질질 단백질로 면역화된 생쥐에서, 화합물 B (삼투성 미니펄프에 의해 3 mg/kg/일)는 Treg 수를 선별적으로 증대시키고 통증을 감소시켰다 [도 3].

표 1

[0135] 화합물 A (삼투성 미니펄프를 통해 2.4mg/kg/일) 또는 운반제로 치료된 SNL 쥐로부터 다양한 조직에서 IL-2의 수준의 약화

	동측 DRGL4	동측 DRGL5, L6	동측 척수	혈청
무경험	68 ± 8.5	138 ± 0.88	397.33 ± 44.58	233.33 ± 56.25
SNL 쥐 운반제	139.33 ± 15.76	586 ± 7.21	523 ± 44.80	768.33 ± 271.94
SNL 쥐 화합물 A 24시간	101.63 ± 20.55	211 ± 33.72**	345 ± 19.34	978 ± 77.13
SNL 쥐 화합물 A 5일	69.52 ± 9.42 **	138.35 ± 22.59**	351.75 ± 17.19*	380.25 ± 61.67

[0136] 데이터는 평균 pg/ml ± 평균의 표준 오차로서 표시된다. n = 모든 군에서 3-4.

[0137] 운반제에 비하여 유의성 값: *p< 0.05; **p< 0.01.

표 2

[0138] 이질통증성 신경성 통증의 SNL 쥐 모델에서 화합물 B +/- FK506에 의한 통증 반전

	이질통증 반전 %	
SNL 쥐 (잠복성)에서 약물 용량	24시간후	7일후
운반제 (50% DMSO)	-1.98 ± 6.90	-7.23 ± 6.22
3mg/kg FK506 BID SC	-5.77 ± 3.43	-6.39 ± 4.85
1mg/kg/일 화합물 B 삼투성 미니펄프 (7일 동안 치료)	78.50 ± 7.85 **	73.35 ± 11.95 **
1mg/kg/일 화합물 B 삼투성 미니펄프 + 3mg/kg FK506 BID SC (7일 동안 화합물 B 치료 및 5일 동안 FK506 치료)	57.06 ± 14.52*	16.43 ± 19.42

표 3

[0139] 이질통증성 신경성 통증의 SNL 쥐 모델에서 화합물 C +/- FK506에 의한 통증 반전

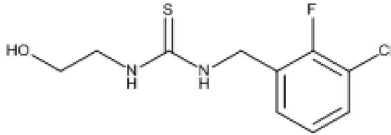
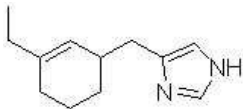
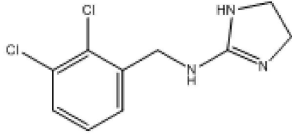
	이질통증 반전 %	
SNL 쥐 (잠복성)에서 약물 용량	24시간후	23일후
운반제 (50% DMSO)	0.94 ± 5.65	1.72 ± 5.08

3mg/kg FK506 BID SC	-0.53 ± 6.21	2.01 ± 5.86
5일 동안 1mg/kg/일 화합물 C TID 경구	66.06 ± 10.71 **	81.48 ± 6.00 **
5일 동안 1mg/kg/일 화합물 C TID 경구 + 5일 동안 3mg/kg FK506 BID SC	49 ± 13.15*	21.82 ± 4.26

[0140] 데이터는 평균 %MPE (이것은 약물전 기준선으로부터 이질통증 반전 %를 나타낸다) ± 평균의 표준 오차로서 표시된다. n = 모든 군에서 6. 유의성 값 대 운반제: *p< 0.05; **p< 0.01.

[0141] 하기 표 4에서는 화합물 A, B와 C의 구조를 도시한다:

표 4

화합물	구조
A	
B	
C	

[0143]

[0144] 다른 T 세포 매개된 질환 모델에서 연구

[0145] 신경성 통증의 Chung 모델 및 MS-유도된 통증 모델에서 α_{2B}-수용체 효현제 매개된 효과의 기전의 연구는 림프 기관에서 추정 조절 T 세포 (Treg)의 숫자에서 의미미하고 계속적인 증가를 지시하였다. 본 발명자들은 질환의 임상 과정 및 자가면역성 포도막염, 내독소-유도된 포도막염, 그리고 안구건조증 질환에서 효과에 대해, MS 모델에서 α_{2B}-수용체 효현제를 더욱 조사하였다.

[0146] 실험적 자가면역성 뇌수막염 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)의 재발-경감 형태를 유발하는 단백질질 단백질로 면역화된 생쥐에서, 임상 질환의 발생 동안 화합물 B로 치료는 MS의 증상을 약화시키는데 유의미한 효과를 갖는다 (도 4). 7-10일자부터 치료는 14일 (p<0.01)과 24일자에 재발 동안 임상 스코어를 감소시켰다. 생쥐가 연속적으로 치료될 때 유사한 결과가 획득된다. EAE에서, 친-염증성 CD4⁺ T 세포 및 기타 염증 세포는 말초에서 증식하고 중추 신경계 (CNS)에 침투하고, 이것은 진행성 마비로 특징되는 탈수초화를 유발한다. 연구의 종결 시점에서 유세포분석법에 의한 CNS에서 면역 세포 침윤의 분석은 화합물 B로 치료가 면역 세포의 존재를 유의미하게 감소시킨다는 것을 드러냈다 (도 5). 이것은 화합물 B가 CNS에서 병원성 T 세포의 존재를 예방하여 약화된 뇌척수염을 결과한다는 것을 지시한다. 화합물 C 역시 EAE에서 유사한 효능을 보였다. 7-13일자부터 TID 경구 투약 (3mg/kg/일) 이후에, 임상 스코어는 운반제-치료된 생쥐와 비교하여 13-24일자부터 유의미하게 감소하였다 (도 6). 37일자에 유세포분석법에 의한 CNS에서 면역 세포의 분석은 화합물 C가 척수에서 조절 T 세포 (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺)의 빈도를 증가시킨다는 것을 드러냈다 (도 7). 본 발명자들은 또한, 눈 T 세포 매개된 염증의 모델에서 알파 2B 효현제의 유용성을 조사하기 위한 연구를 수행하였다. 실험적 자가면역성 포도막염 (EAAU)은 두부 체절에서 질환을 유발하는 항원-특이적, T 세포-매개된 자가면역 반응을 대표한다. EAAU 유도 (3일의 경구 TID 투약, 그 이후에 삼투성 미니펌프를 통해 투약) 이후에, 1-18일자 또는 7-18일자부터 1 mg/kg/일로 투약된 화합물 B는 전방 염증을 부분적으로 제거하는데 효과적이었다.

[0147] 화합물 B는 전방 포도막염의 임상 스코어를 감소시키고 수양액에서 염증 세포 수를 감소시켰다 (도 8). 이에 더하여, 화합물 B는 혈액에서 감소된 호중구 세포 수, 혈액에서 정상화된 림프구 집단 및 비장에서 정상화된 CD4⁺ T 세포 집단에 의해 증명되는 바와 같이, 면역 반응을 정상화시키는데 효과적인 것으로 나타났다. 화합물 B의

유사한 효과는 또한, 급성 내독소-유도된 포도막염 (EIU) 모델에서 관찰되었다. 화합물 B (삼투성 미니펄프에 의해 1mg/kg/일 전달됨)는 치료되지 않거나 운반제-치료된 (식염수) 대조와 비교할 때, EIU 쥐의 수양액에서 단백질 삼출을 유의미하게 저해하였다 (도 9). 혈액 호중구에서 증가 및 LPS 자극의 결과로서 혈액 림프구 집단에서 감소는 화합물 B에 의해 유의미하게 정상화되지만 운반제 치료에 의해서는 정상화되지 않았다 (도 10). 안구 건조증 질환의 모델에서 입양 전달 (adoptive transfer) 연구는 눈 염증에 대한 α_{2B} 효현제 효과가 T 세포를 수반한다는 것을 증명한다. 3 mg/kg/일 화합물 B 또는 운반제 (3일의 경구 TID 투약, 그 이후에 삼투성 미니펄프를 통해 투약)로 치료된 생쥐에서 10일의 송풍기-유도된 건조 스트레스 이후에, CD4+ T 세포가 수확되고 동계 누드 (syngeneic nude) 생쥐에 이전되었다. 화합물 B-치료된 생쥐로부터 T 세포 (10일간 송풍기에 노출 동안)가 제공된 수용자 생쥐는 안구건조증 질환의 원인이 되는 핵심 사이토킨, 사이토킨 IL-17과 TNF α 의 수준이 유의미하게 감소하였다 (도 11). 화합물 B는 또한, 치료 양식에서 조사되었는데, 여기서 치료 (삼투성 미니펄프를 통해 3 mg/kg/일)는 송풍기에 미리 노출된 생쥐에 제공되었다. 이러한 양식에서도, 화합물 B는 배상 세포 손실 및 결막 내로 T 세포 침윤을 시클로스포린 A에 필적하는 정도로 유의미하게 예방하였다 (도 12). 이들 연구는 화합물 B, 화합물 C 및 기타 α_{2B} 효현제의 기전이 면역 조절을 수반한다는 가설을 뒷받침한다.

[0148] 방법

[0149] 쥐에서 척수 신경 결찰 모델

[0150] 쥐에서 SNL (또는 Chung) 모델은 신경성 통증의 인정된 표준 동물 모델이고, 그리고 증상 (경계 행동, 기계적 이질통증) 및 약리학적 작용제에 의한 완화에 대하여 인간 작열통 상태를 모방하는 것으로 생각된다. 가령, 모르핀은 촉각성 이질통증을 완화시키지 못하는 반면, 가바펜틴 (Gabapentin) (30 mg/kg p.o.)은 이질통증의 50% 완화를 유발한다. SNL 모델은 L-5와 L-6 척수 신경을 단단하게 결찰함으로써 수행되는데, 이것은 기존 문헌 (Kim and Chung, 1992)에서 기술된 바와 같이 촉각성 이질통증 또는 가벼운 접촉에 대한 민감성을 발생시킨다. 수컷 Sprague-Dawley 쥐 (100-120 그램; Charles River, Wilmington, MA)는 이소플루란/산소 혼합물의 흡입을 통해 마취되었다. 수술 부위는 제모되고 베타딘으로 준비되었다. 절개는 흉추 (thoracic vertebra) XIII로부터 천골 (sacrum)을 향하여 만들어졌다. 근육은 L4 - S2 수준에서 척추 (spinal vertebra) (좌측)로부터 분리되었다. L6 척추는 위치가 확인되고, 그 다음, L4 - L6 척수 신경을 가시적으로 확인하기 위해 작은 론저 (rongeur)로 횡돌기 (transverse process)가 조심스럽게 제거되었다. L5와 L6 척수 신경은 분리되고 6-0 명주실로 단단하게 결찰되었다. 완전한 항상성이 확증되고, 그 다음, 상처가 봉합되었다. 수술의 지속 시간은 대략 20분이었다. 소량의 항생제 연고가 절개된 구역에 발라지고, 그리고 이들 동물은 조절된 열-온도 램프 하에 플라스틱 회복 우리로 옮겨졌다. 동물은 수술후 임의의 국소 또는 국부 마취제가 제공되지 않았는데, 그 이유는 이들이 연구되는 현상인 통증 증상의 발생을 저해할 것이기 때문이다.

[0151] 이질통증은 기존 문헌 (Dixon, 1980)에서 기술된 바와 같이 엽-다운 방식으로 수술 뒷발의 중간 발바닥 구역 (mid plantar area)에서 일련의 8가지 Von Frey 헤어로 자극에 의해, Chung 수술을 받은 동물에서 정량되었다. Von Frey 헤어는 50% 역치가 확립될 때까지 반응에 따라 엽-다운 방식으로 적용된다. Von Frey 헤어는 그들을 구부릴 만큼의 힘으로, 수술 발의 발바닥 표면에 적용된다. 양성 반응은 발을 날째게 움츠릴 때 기록된다. 8가지 Von Frey 헤어: 3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93 및 5.18이 이용되어 0.25 - 15 그램의 그램 중량 (gram force)이 산출되었다.

[0152] Von Frey 분석:

$$\text{이질통증 반전 \%} = \left[\frac{\text{약물후 역치} - \text{약물전 역치}}{15 - \text{약물전 역치}} \right] \times 100$$

[0153]

[0154] 평균 $\pm$ SEM:

[0155] 평균 = 이질통증 반전의 평균

[0156] SEM = n의 표준편차 (STDEV)/ 제곱근 (SQ ROOT)

- [0157] 화합물로 검사는 안정된 이질통증을 확립하기 위해 수술후 2-3주 시점에 수행된다. 모든 실험 동물에서, Alzet 삼투성 미니펌프로 약물 투여에 앞서, 그리고 투약후 24시간과 5-23일자 시점에서 기준선 측정이 수행되었다. 조사자는 약물 군의 정체에 맹검이었다. 이질통증 반전 %는 하기와 같이 계산된다: $[(\text{약물후 역치} - \text{약물전 역치}) / (15 - \text{약물전 역치})] \times 100$.
- [0158] 생쥐에서 단백질질-유도된 실험적 자가면역성 뇌척수염
- [0159] 실험적 자가면역성 뇌척수염 (EAE)의 생쥐 모델은 MS의 면역병인 (immunopathogenesis)의 기초가 되는 기전을 이해하기 위해 광범위하게 이용되고 있다. 미엘린 단백질, 예를 들면, 미엘린 결합 단백질 (MBP), 단백질질 단백질 (PLP) 및 미엘린 희돌기교세포 당단백질 (MOG)로 면역화된 생쥐는 MS를 앓는 환자와 많은 유사성을 나타낸다 (Friese et al., 2006). T 세포, 대식세포, 그리고 항체를 비롯한 면역계의 성분은 EAE 생쥐에서 미엘린 파괴에 대한 중요한 공헌자이다. 게다가, 염증은 또한, 꼬리 긴장 (tail tone)의 상실, 비정상적 보행 및 부분-내지-완전 뒷다리 마비를 비롯한 신경계 기능장애의 임상 징후에서 정점에 이루는 다초점성 영역 탈수초화를 발생시킨다. PLP-유도된 EAE 모델은 Allergan에 의해 최적화된 다중-표적화된 개념인, CNS 염증과 탈수초화 및 MS-연관된 통증의 병원성 기전을 동시에 조사하는 능력을 제공한다. 무균 기술을 이용하여, 단백질질 단백질 미엘린 펩티드 (PLP) (139-159: CHCLGKWLGHDPKFGITYAL)는 불완전 Freund 어쥬번트 (IFA) (2 mg/ml PLP의 최종 농도)와 1:1 혼합된다. 8-10주령 암컷 SJL 생쥐 (Taconic)는 26G 바늘을 이용하여 오른쪽과 왼쪽 뒷옆구리에 100 μ l PLP/IFA (200 μ g PLP/주사)가 피하 주사된다 (0일자). 이러한 프로토콜을 이용하여 면역화된 생쥐는 경감/임상적 향상의 기간이 산재하는 거동 장애 (motor impairment)의 에피소드로 재발 경감 임상 과정을 경험한다. 게다가, 이들 생쥐는 임상 경감의 기간 동안 가장 현저한 강건한 통증 표현형을 나타낸다.
- [0160] 이러한 프로토콜을 이용하여, SJL 생쥐에서 PLP-유도된 EAE의 발생은 (~90-100%)의 발생률에서 발생하고 일반적으로, 면역화후 ~12일자 시점에서 명백하고 14-21일자 시점에서 피크 질환에 도달하였다. PLP-EAE 생쥐는 꼬리 긴장의 부분 상실에서 부분-내지-완전 뒷다리 마비로 진행되는 신경계 손상의 신체 증상을 보인다. 75%까지의 생쥐는 거동 장애의 에피소드 (뒷다리 약화와 마비)를 거느리는 경감의 기간으로 재발 경감 임상 과정을 경험할 것이다. 조직학적으로, 생쥐는 뇌와 척수의 백색질로 (white matter tract) (수초화된 축삭돌기를 내포하는 구역) 내에 광범위한 염증, 염증 세포의 진행성 침윤과 축적, 탈수초화 및 축삭돌기 손실을 나타낸다. 심각한 EAE를 앓는 생쥐는 광범위한 세포 침윤물, 탈수초화의 만연된 병소를 나타낸다. PLP-면역화된 생쥐는 전형적으로, 신경계 손상의 첫 번째 에피소드 (14-21일자) 동안 가장 심각한 임상 질환을 나타낸다. 일반적으로, 통증 표현형은 최초 탈수초화 사건으로부터 경감후 시작 시점에 가장 현저하고, 그리고 생쥐가 안락사될 때까지 지속된다.
- [0161] 생쥐는 0-5의 등급에서 행동 비정상에 대해 일과적으로 시각적으로 채점되었다; 0 - 비정상 없음, 1 - 꼬리 긴장의 부분 상실 (부분적으로 무기력한 꼬리), 2 - 꼬리 긴장의 상실 및 뒷다리 약화, 3 - 불안 보행과 부분 뒷다리 마비, 4 - 완전한 뒷다리 마비 및 5-폐사. 채점은 생쥐가 희생될 때까지 면역화후 7일자에 시작하여 2일마다 내지 3일마다 수행되었다. 이질통증은 앞서 기술된 바와 같은 Von Frey 헤어 방법에 의해 측정되었다. 연구의 종결 시점에서, 비장, 경부 림프절, 척수와 뇌가 유세포분석법을 수행하기 위해 수집되었다.
- [0162] 생쥐에서 건성 건조 스트레스 (DS)
- [0163] C57BL/6 (C57BL/6NTac) 및 B6.Cg/NTac-FoxnlnuNE9는 Taconic, Inc. (Germantown, NY)로부터 구입되었다. 생쥐는 6-10주령에서 이용되었다. 동물 연구 승인은 Allergan Animal Care and Use Committee로부터 받았다. 모든 연구는 Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research를 준수하였다. 기존 문헌에서 기술된 바와 같이, 안구건조증은 왼쪽과 오른쪽 옆구리 사이에 교대로 하루 3회 스크폴라민 브롬화수소산염 (0.5 mg/0.2 ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 피하 주사로 생쥐를 처리함으로써 유도되었다 (Neiderkorn et al, 2006). 생쥐는 후드 (AirClean Systems, Raleigh, NC)에서 16 시간/일 동안, 팬 (우리의 각 측면에서 1개의 팬)으로부터 기류를 허용하는 우리의 각 측면에서 천공된 플라스틱 스크린을 내포하는 우리에게 배치되었다. 실내 습도는 40% 미만으로 유지되었다. 건조 스트레스 (DS)는 10 연속일 동안 유도되었다. 비장과 경부 림프절 (CLN)이 DS와 NS에 종속된 생쥐로부터 회수되고, 그리고 비장 또는 CLN CD4+ 세포의 1 공여자-등가물 (donor-equivalent)이 동계 누드 생쥐에 i.p. 이전되었다. T 세포의 1 비장 등가물은 5×10^7 세포에 상당하다. 3일후, 샘플은 분석을 위해 수집되었다. 눈물

수집을 위해, 1.5 μ L의 PBS가 각 눈에 배치되고, 그리고 이후, 1 μ L의 눈물이 양쪽 눈으로부터 수집되고 8 μ L의 사이토킨 분석 완충액 (Beadlyte; Millipore, Billerica, MA)에 배치되었다. 완충액 및 눈액 (tear fluid)은 측면 안각 (lateral canthus)의 눈물 띠 (tear meniscus)에 배치된 1- μ L 용적 유리 모세관 튜브 (Drummond Scientific, Broomhall, PA)를 이용한 모세관 작용 (capillary action)에 의해 수집되었다. 샘플은 분석평가 때까지 -80°C에서 동결되었다. 조직학적 분석은 결막 내에서 배상 세포와 T 세포를 정량하기 위한 CD4에 대한 항체로 누선 샘플 염색 및 H&E 염색으로 수행되었다. 치료 양식에서 화합물을 조사하기 위해, 이들 동물은 2주 동안 건조 스트레스에 노출되고, 이후 통상의 하우징 우리에서 7일 동안 휴식하였다. 이들 동물은 이후, 만성 안구건조증 질환의 재발 형태를 모방하기 위해 추가의 7일 동안 건조 스트레스에 재-노출되었다. 화합물 B로 약물 치료는 건조 스트레스에 재-노출 2일전에 시작되었다. 양쪽 연구에서, 화합물 B는 3mg/kg/일로 투약되었다. 입양 전달, 눈물 사이토킨 분석 및 조직학적 분석은 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다.

[0164] 쥐에서 실험적 자가면역성 전방 포도막염

[0165] 수컷 Lewis 쥐 (180-200g)는 소 눈으로부터 150 μ g (100 μ L에서)의 정제된 MAA 복합체로 단일 왼쪽 뒷발바닥 주사에 의해 면역화되었다. MAA 단백질은 인산염-완충된 염수 (PBS, pH7.2)에서 현탁되고, 그리고 1 μ g/100 μ L의 백일해 독소 (Pertussis Toxin, PTx) 에멀전 혼합물을 내포하는 완전 Freund 어췌버트 (CFA, VWR Scientific)에서 유화 (1:1 v/v)되었다. 대조 동물은 CFA와 PTx로 유화된 PBS가 주사되었다.

[0166] 눈내 염증의 평가는 면역화후 7일자부터 수행되고, 동물은 면역화후 7일과 19일자 사이에 2일마다, 슬릿 램프 검경 (slit lamp microscopy)을 이용하여 포도막염의 임상 징후와 증상에 대해 조사되었다. 수양액은 염증 세포의 숫자 및 단백질 수준을 평가하기 위해 수집되었다. 세포 계산은 광 현미경 하에 10ul에서 혈구계산기 (hemacytometer)로 수행되었다. 단백질 농도는 BSA를 단백질 표준으로서 이용하여, Bio-Rad로부터 단백질 분석 평가 용액으로 측정되었다. 친-염증성 사이토킨 및 케모킨 수준은 Luminex (Biosource-Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 측정되었다. 혈액, 비장, 그리고 눈은 혈액 백혈구 분화, 유세포분석법에 의해 비장 T 세포 활성화 상태, 그리고 조직병리학을 결정하기 위해 11일, 14일, 그리고 19일자에 수확되었다.

[0167] 쥐에서 내독소-유도된 포도막염:

[0168] 암컷 Lewis 쥐 (180-200 그램)는 Charles River Laboratory로부터 구입되었다. 쥐는 100 μ L의 1 mg/ml LPS (Sigma) 용액 (무균 무발열원 염수에서) 또는 150 μ L의 무균 무발열원 염수가 발바닥 주사되었다 (왼쪽 뒷발). 동물은 LPS 주사 이후에 24시간 시점에 희생되었다. 수양액은 수집되고, 그리고 염증 세포 수, 사이토킨과 케모킨 농도의 수준 및 전체 단백질 농도를 결정하기 위해 분석되었다. 혈액 백혈구 분화 및 조직병리학 역시 필요한 경우에 결정되었다.

[0169] 제제:

[0170] 화합물 A는 50% DMSO (Sigma, St. Louis, MO)에서 조제되었다. 이러한 용액은 0.5 ul/시간의 속도로 약물을 전달하여 2.4mg/kg/일의 최종 용량을 결과하도록 설정된 삼투성 미니펌프 (모델 1007D, Alzet Corp., Palo Alto, CA) 내로 적하되었다. 이들 연구를 위한 운반제는 0.5 ul/시간/kg의 속도로 삼투성 미니펌프를 통해 투여된 50% DMSO이다.

[0171] 화합물 B는 50% DMSO (디메틸 설펝사이드; Sigma, St. Louis, MO)에서 조제되었다. 이러한 용액은 0.3 또는 1mg/kg의 용량에서 경구 TID 투약되었다. 삼투성 미니펌프 (모델 1007D, Alzet Corp., Palo Alto, CA)에서 투약의 경우에, 화합물은 1 또는 3mg/kg/일의 최종 분량을 전달하도록 설정된 펌프 내로 적하되었다. 이들 연구를 위한 운반제는 50% DMSO이었다.

[0172] 화합물 C는 100% DMSO (Sigma, St. Louis, MO)에서 먼저 조제되고, 이후 10 mg/ml 용액의 경우 30% DMSO; 3 mg/ml 용액의 경우 15% DMSO에서 하향 희석되고 물에서 추가 희석이 만들어졌다. 상기 화합물은 1 또는 3 mg/kg/일 각각의 총 일일량 (total daily dose)을 위해 0.3 또는 1 mg/kg의 용량에서 경구 TID 투약되었다.

[0173] 유세포분석법

[0174] 얇은 경부 림프절 세포와 비장 세포는 부드러운 기계적 처리에 의해 획득되었다. $CD4^{+}$ 세포는 제조업체의 프로토콜에 따라 $CD4^{+}$ 분리 칼럼 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA)을 이용함으로써 분리되었다. 뇌와 척수는 기계적으로 분해되고, 그리고 CNS의 단핵 세포는 37.5% Percoll (Sigma-Aldrich)을 이용하여 분리되었다.

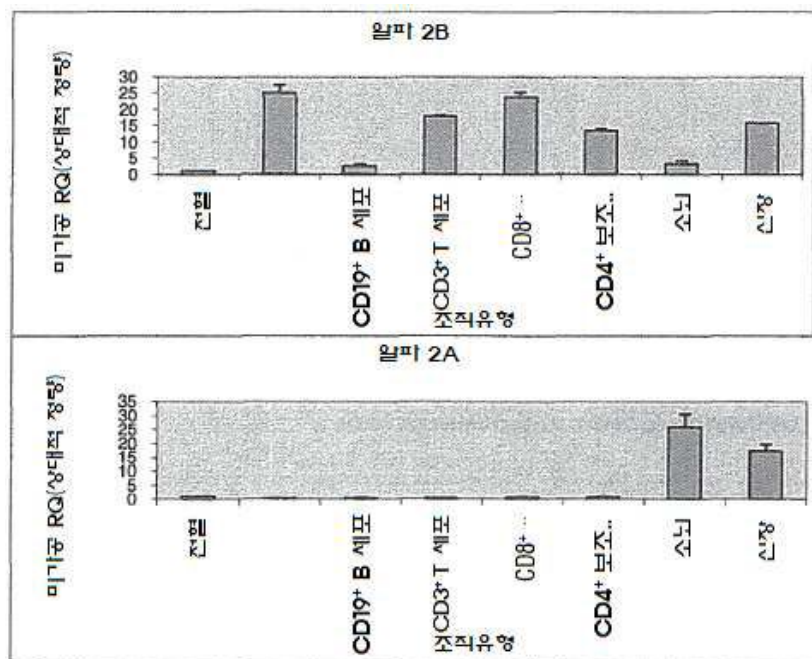
[0175] $CD4$ (보조 T 세포), $CD8$ (킬러 T 세포), $CD25$ (활성화된 보조 T 세포와 조절 T 세포), $CD45$ (대식세포와 미세교세포) 및 F4/80 (대식세포와 미세교세포)의 표면 발현을 결정하기 위해, 5×10^5 세포/100 μ L FACS 완충액 (PBS, 0.02% 나트륨 아지드 [Sigma-Aldrich] 및 2% 소 혈청 알부민)은 BD biosciences, Mountain View, CA로부터 적절한 항체와 함께 배양되었다. 아이소타입 대조 항체가 이들 각 항체에 대해 이용되었다. 이들 세포는 FACS 완충액에서 2회 세척되고 5×10^5 세포/100 μ L 완충액에서 재현탁되었다. 비오틴-표지된 항체를 내포하는 튜브는 1.5 μ L의 보조 염색 색소 (Streptavidin PerCP; BD-Pharmingen)를 수용하고 어둠 하에 20분 동안 얼음 위에 배치되었다. 발현이 분석되었다 (CellQuest 소프트웨어가 장착된 FACSCalibur; BD Biosciences, Mountain View, CA).

[0176] 사이토킨의 Luminex 분석

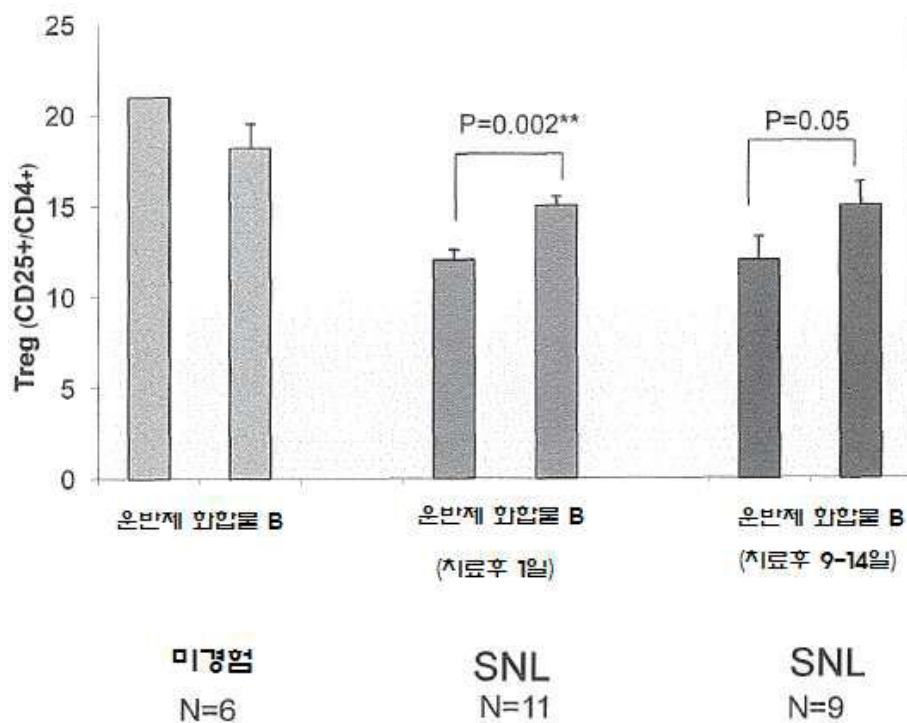
[0177] 사이토킨의 수준은 민감성, 형광 복합 면역비드 분석평가 (Luminex; Biosource-Invitrogen, Carlsbad, CA)로 측정되었다. Millipore로부터 9 plex 쥐 사이토킨/케모킨 (RCYT0-80K-09) 패널이 이용되었다. 샘플에서 사이토킨 수준은 상응하는 Millipore 사이토킨 Beadmate 쌍을 이용함으로써 분석되었다. Luminex 분석평가를 위해, 96-웰 필터 평판 (Millipore)은 25 μ L의 Beadlyte 사이토킨 분석평가 완충액으로 미리 적셔졌다. 이들 웰로부터 완충액을 흡출하기 위해 진공 매니폴드 (vacuum manifold) (Millipore, Billerica, MA)가 이용되었다. 25 μ L의 샘플이 각 웰에 배치되었다. 이들 비드 (25 μ L)는 웰 내로 피펫팅 (pipetting)되었다. 각 사이토킨에 대한 표준 곡선은 Millipore로부터 구입된 표준의 25 μ L의 적절한 희석액을 배치함으로써 이중으로 산출되었다. 평판은 어둠 하에 4°C에서 부드럽게 교반하면서 하룻밤동안 배양되었다. 비드는 Beadlyte 사이토킨 분석평가 완충액 (Millipore)으로 세척되고, 그리고 세척 완충액은 진공 매니폴드를 이용하여 제거되었다. 25 μ L의 적절한 비오틴-접합된 이차 항체 (Millipore)는 부드럽게 교반하면서, 실온에서 90분 동안 각 웰에 첨가되었다. 비드는 부드럽게 교반하면서, 실온에서 30분 동안 Beadlyte 스트렙타비딘-피코에리트린 (Beadlyte 분석평가 완충액에서 1:25 희석)과 함께 배양되었다. 비드는 세척되고, 125 μ L의 Beadlyte 완충액에서 재현탁되고, 그리고 Luminex 100 장치 (Luminex Corporation, Austin, TX)에 의해 분석되었다. 사이토킨 최소당 50개 비드로부터 획득된 평균 형광 강도는 Upstate Beadview 소프트웨어를 이용하여 분석되었다. 표준 곡선은 4- 또는 5-파라미터 로지스틱 곡선을 이용하여 산출되었다 (이중으로 가동된 제로 표준을 비롯한 8 데이터 포인트). 결정계수 (R-squared) 값은 0.99와 1의 사이에 있었다. 데이터는 pg/ml 또는 ng/ml 값으로 표시된다.

도면

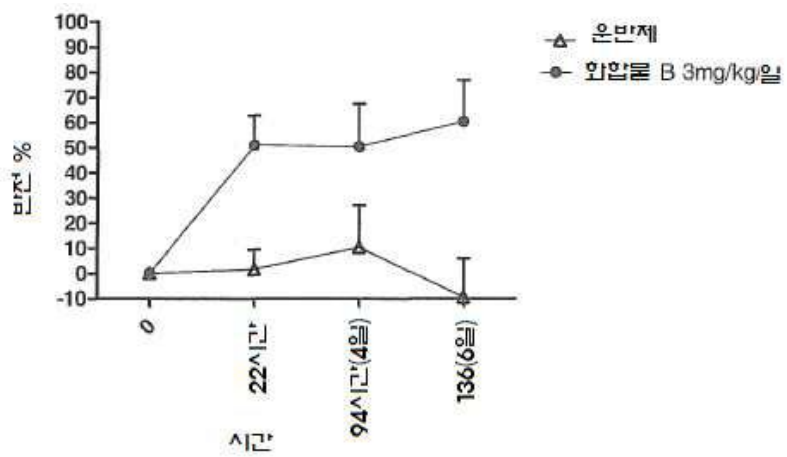
도면1



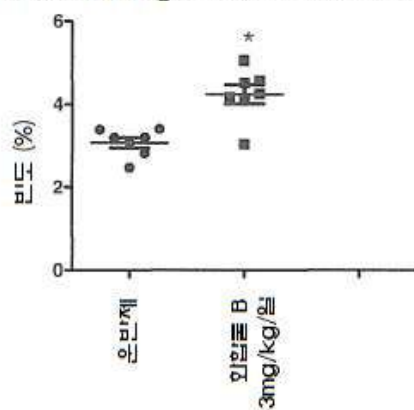
도면2



도면3

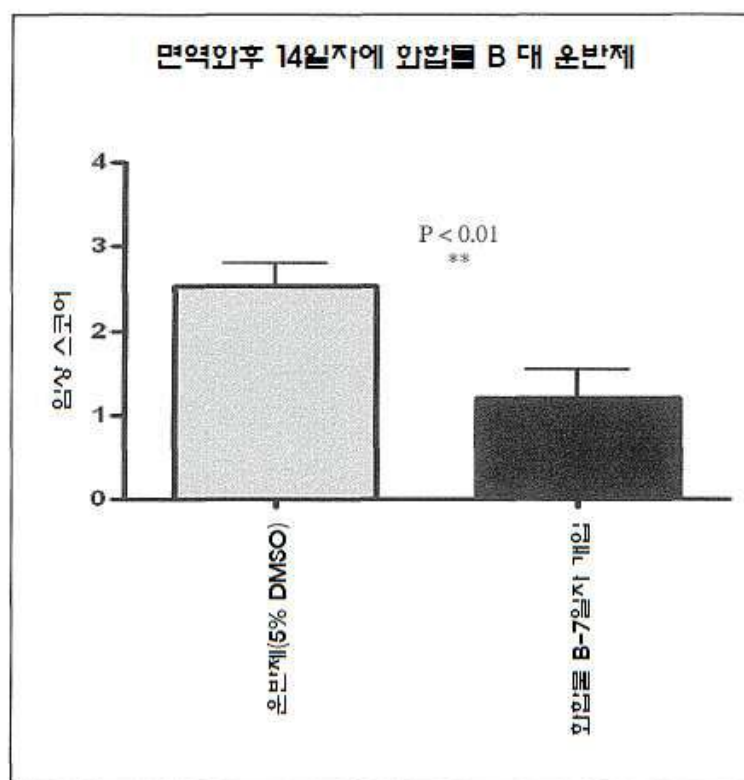
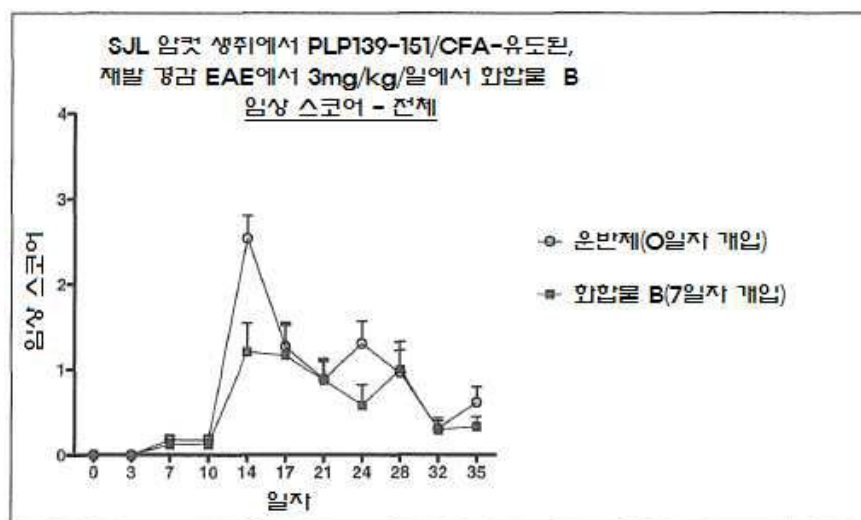


경부 림프절 내에 CD25hi(Treg)인 CD4+ T 세포의 빈도

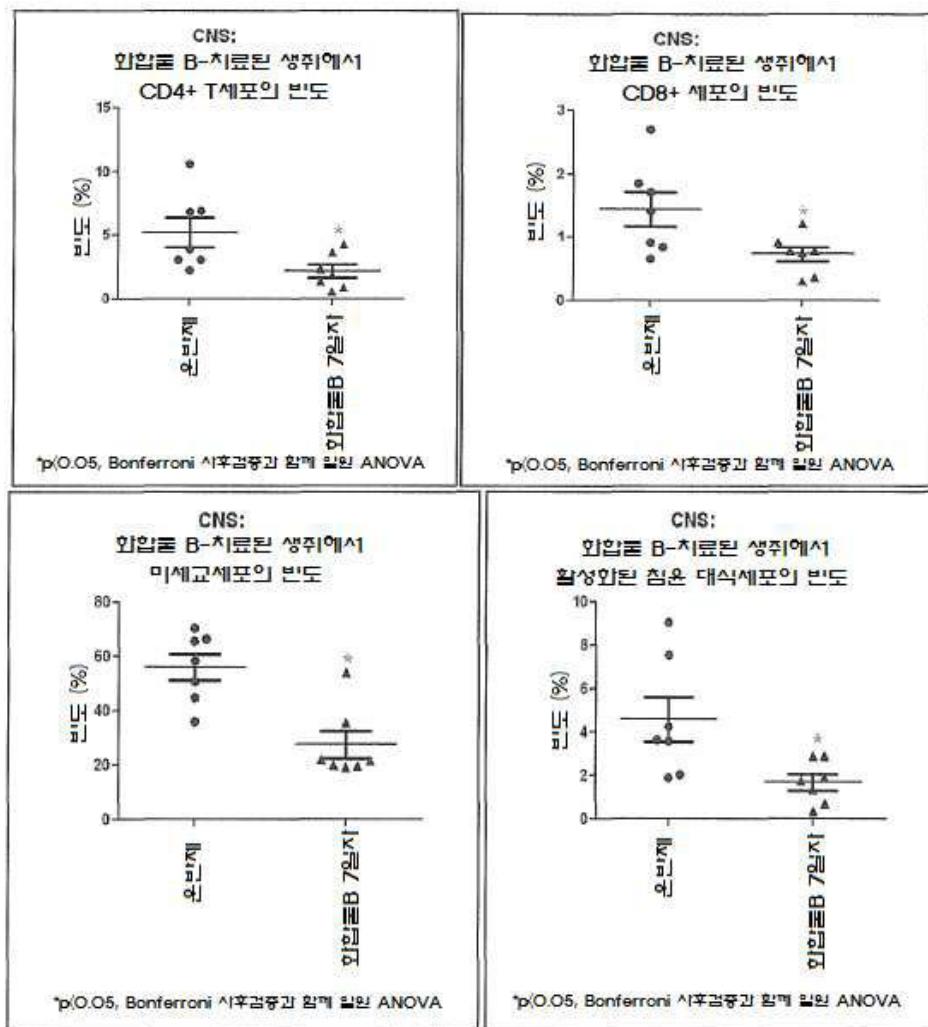


*온반제와 비교하여 $p < 0.01$, Bonferroni 사후검증과 함께 일원 ANOVA

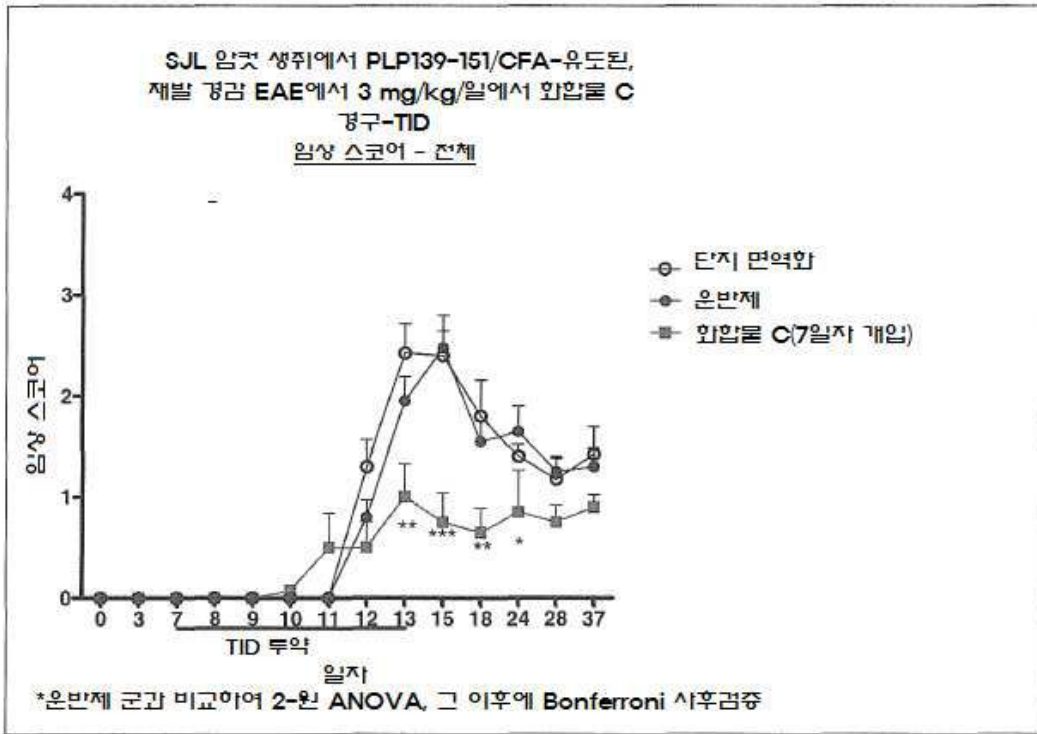
도면4



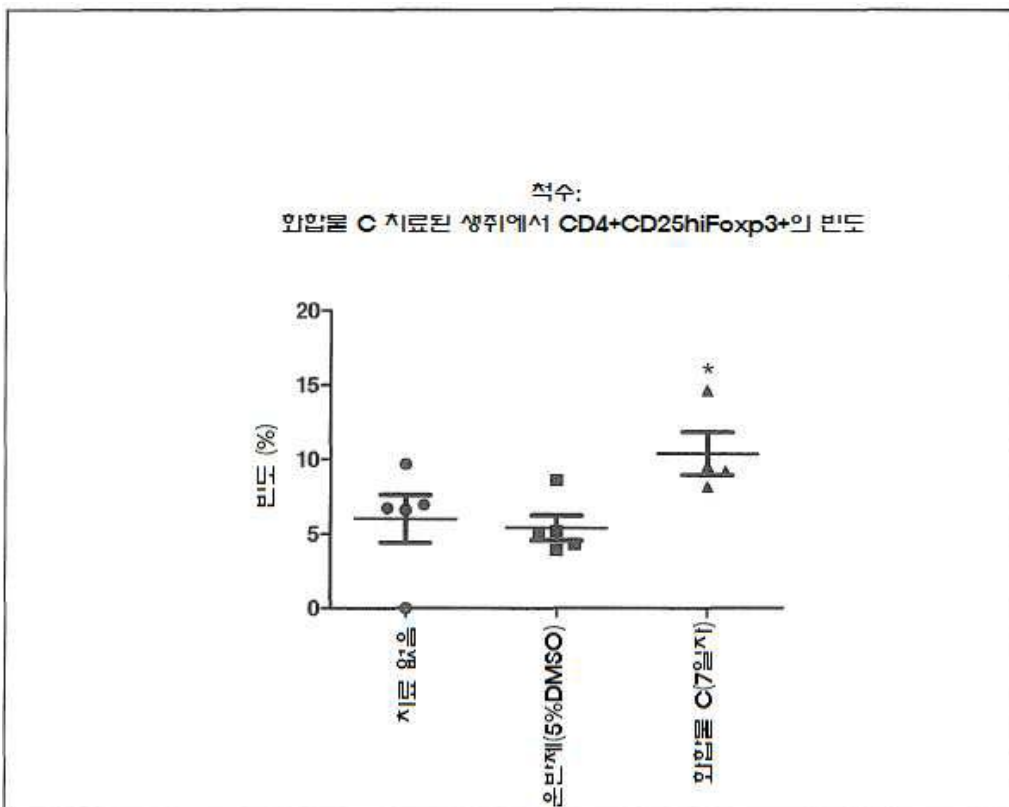
도면5



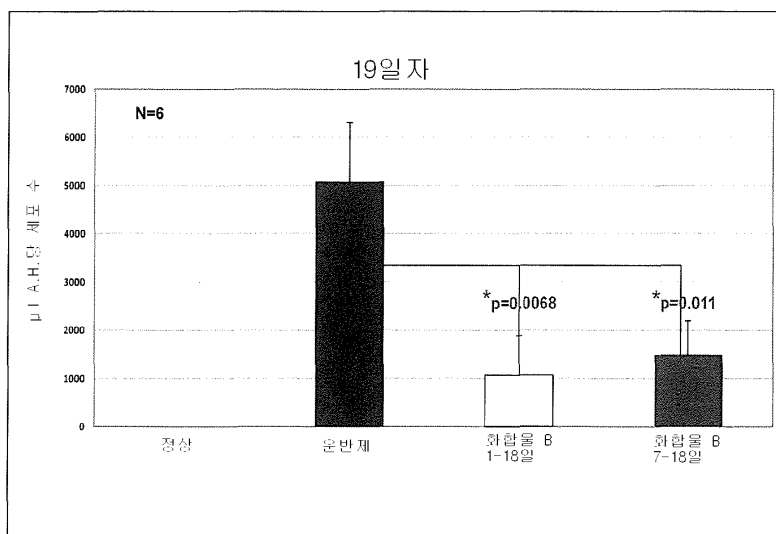
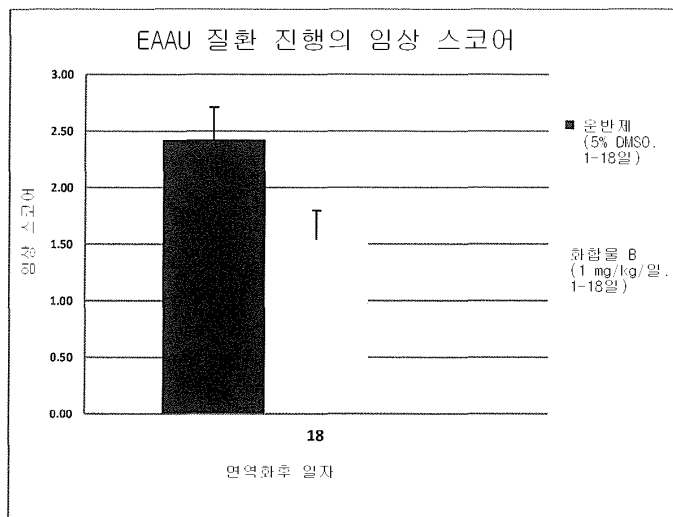
도면6



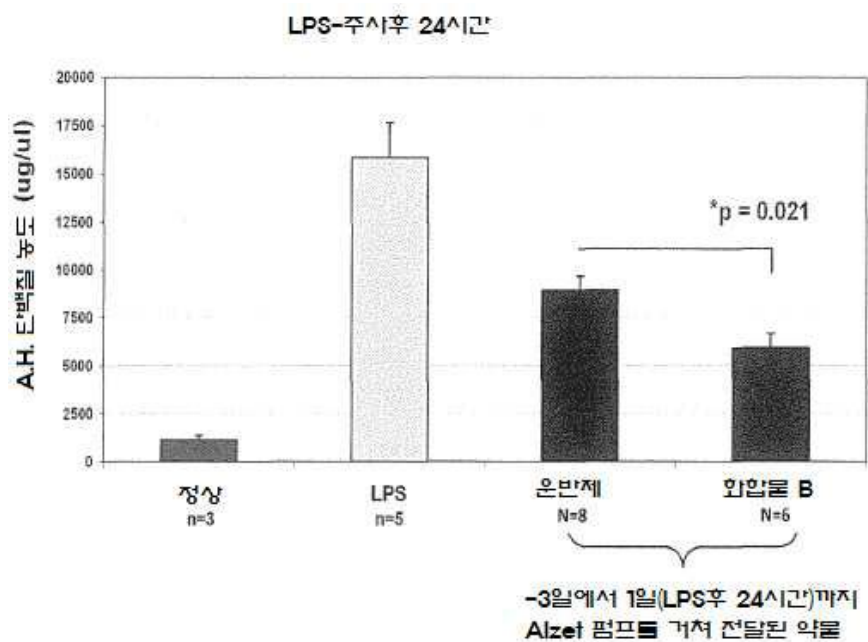
도면7



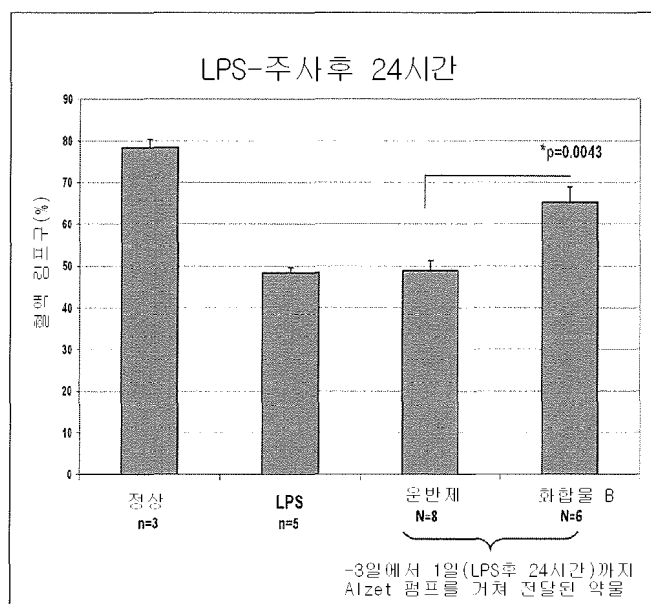
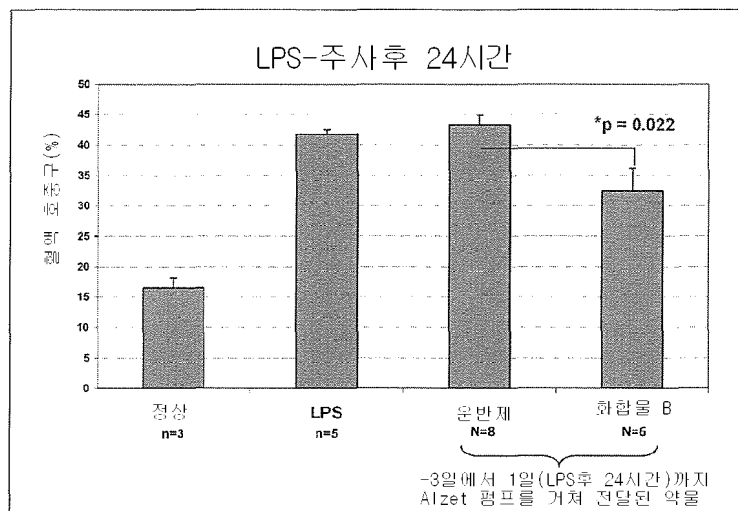
도면8



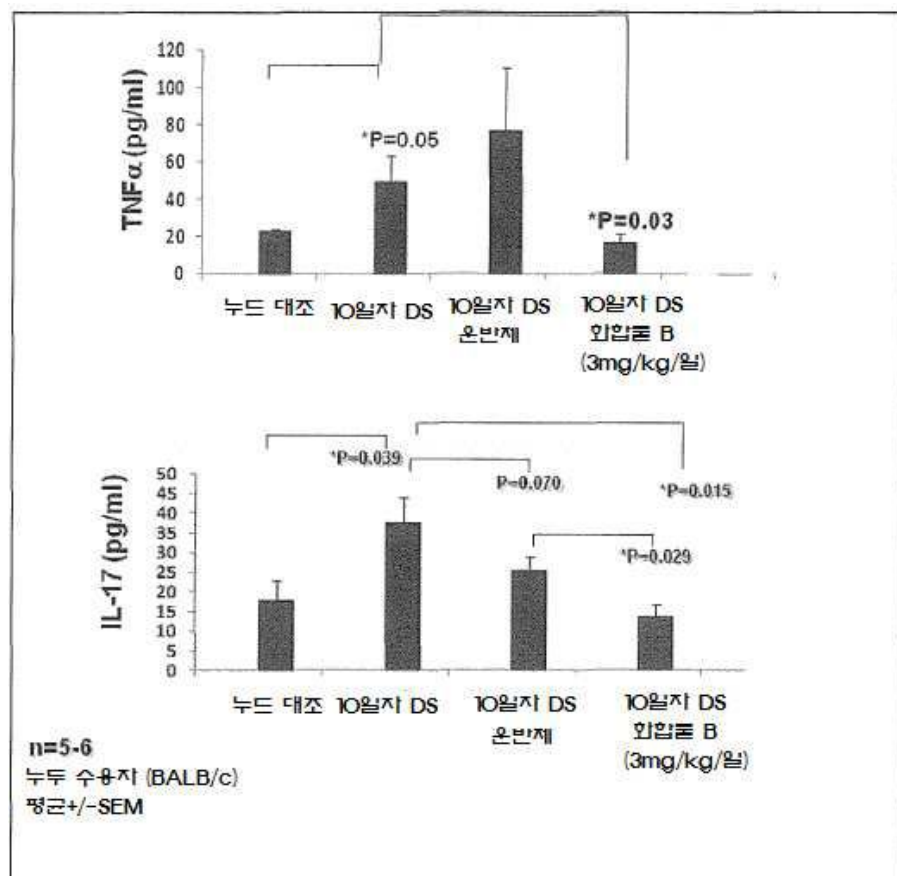
도면9



도면10



도면11



도면12

