(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0105048
(43) 공개일자 2008년12월03일

(51) Int. Cl.
*A61K 31/16* (2006.01) *C07F 9/09* (2006.01)
*A61P 37/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7020919
(22) 출원일자 2008년08월26일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2008년08월26일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2007/000567
국제출원일자 2007년03월09일
(87) 국제공개번호 WO 2007/102081
국제공개일자 2007년09월13일
(30) 우선권주장
PCT/IB2006/050748 2006년03월09일
국제사무국(IB)(IB)

(71) 출원인
**옴 파르마**
스위스연방공화국 제네바 1217 메이린 2 뤼 드 브와-드-랑 22
(72) 발명자
**보에르, 쟈끄**
스위스, 쎄아슈-1162 쌩-프레, 슈멩 드 라 모렌느, 31
**샤바롤리, 꺄를로**
프랑스공화국, 에프-01710 뜨와리, 뤼 달르몬뉴, 119
**무멜, 스떼판**
프랑스공화국, 에프-74380 본느, 후뜨 데 잘뤼아, 269
(74) 대리인
**이창훈**

전체 청구항 수 : 총 13 항

# (54) 면역조절 화합물 및 염증성 사이토킨의 과생성에 관련된 질병의 치료

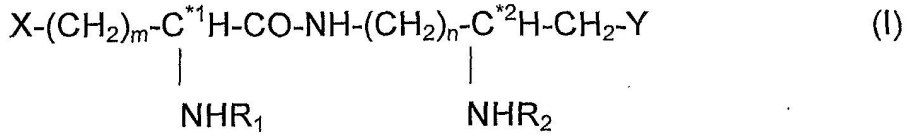
## (57) 요 약

본 발명은 면역조절 화합물을 천식, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 전립선염, 염증성장질환, 당뇨병, 류마티스성 관절염로 이루어진 군에서 선택되는 질병과 같은 염증성 사이토킨의 과생성과 관련된 질병을 치료하는데 사용하는 용도에 관한 것으로, 상기 화합물은 일반식 (I)의 화합물로서, 여기에서 m 및 n은 각각 독립적으로, 1 내지 4 중 어느 하나의 정수이고, X 및 Y는 각각 -COOH, -O-P(O)(OH)$_2$, -O-SO$_2$(OH), -NH$_2$, -OH, -CONH(CH$_2$)$_{n1}$-NH$_2$, -CO-NH-CH(COOH)-(CH$_2$)$_{n1}$-COOH, -CO-NH-CH(COOH)-(CH$_2$)$_{n1}$-NH$_2$, -O-CO-(CH$_2$)$_{n1}$-NH$_2$, -O-CO-(CH$_2$)$_{n1}$-CHOH-CH$_2$OH, -O-CO-(CH$_2$)$_{n1}$-OH, -O-CO-(CH$_2$)$_{n1}$-COOH, -O-CO-(CH$_2$)$_{n1}$-CHO, 또는 -O-CO-(CH$_2$)$_{n1}$-NH-CO-(CH$_2$)$_{n2}$-COOH이며, R$_1$ 및 R$_2$는 각각 2 내지 18 탄소 원자를 갖는 포화 또는 불포화된 선형 또는 분지형-사슬 카복실산에서 유래되는 아실기이며, 이들은 치환되지 않거나 또는 하이드록시, 디하이드록시포스포릴옥시, 탄소수 2 내지 18의 알킬, 탄소수 2 내지 18의 알킬옥시, 탄소수 2 내지 18의 아실부분을 갖는 아실옥시, 아미노, 및 아실아미노에서 선택되는 하나 또는 세개의 치환기를 가진다.

## *특허청구의 범위*

### 청구항 1

하기 일반식 (I)의 면역 조절 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 이성질체를 하나 이상 포함하고, 선택적으로 불활성이며 비독성인 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체와 결합 또는 혼합하여 포함하는 약학적 조성물을 유효량으로 환자에 투여하는 것을 포함하는, 염증성 사이토킨의 과생성에 관련된 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간을 포함하는 온혈 동물을 치료하는 방법:



( 상기 식에서:

- m 및 n은 각각 독립적으로, 1 내지 4 중 어느 하나의 정수이고,

- X 및 Y는 각각 중성 또는 전하 상태의 그룹으로서, 하기 군에서 선택되는 어느 하나이고:

카복실 -COOH,

디하이드록시포스포릴옥시 $-O-P(O)(OH)_2$,

하이드록시설포닐옥시 $-O-SO_2(OH)$,

아미노 $-NH_2$,

하이드록시 -OH,

[아미노($C_1$-$C_{10}$)알킬]아미노카보닐 $-CONH(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

[디카복시($C_1$-$C_5$)알킬]아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

{카복시[아미노($C_1$-$C_5$)알킬]}아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수),

디하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-CHOH-CH_2OH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-OH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

옥소($C_1$-$C_5$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-CHO$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

[카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일]아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH-CO-(CH_2)_{n2}-COOH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수이고, $n_2$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수)

- $R_1$ 및 $R_2$는 각각 2 내지 18 탄소 원자를 갖는 포화 또는 불포화된, 선형 또는 분지형-사슬 카복실산에서 유래되는 아실기이며, 이들은 치환되지 않거나 또는 하이드록시, 디하이드록시포스포릴옥시, 탄소수 2 내지 18의 알킬, 탄소수 2 내지 18의 알킬옥시, 탄소수 2 내지 18의 아실부분을 갖는 아실옥시, 아미노, 및 아실아미노에서 선택되는 하나 또는 세개의 치환기를 가지며,

- $C^{*1}$ 및 $C^{*2}$는 각각 독립적으로 R 또는 S 형 또는 라세미형 RS의 비대칭 탄소이다).

### 청구항 2

제1항에 있어서,

- 상기 X는 하기의 군에서 선택되는 어느 하나이고:

카복실 -COOH,

디하이드록시포스포릴옥시 $-O-P(O)(OH)_2$,

하이드록시설포닐옥시 $-O-SO_2(OH)$,

아미노 $-NH_2$,

[아미노($C_1$-$C_{10}$)알킬]아미노카보닐 $-CONH(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

[디카복시($C_1$-$C_5$)알킬]아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

{카복시[아미노($C_1$-$C_5$)알킬]}아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수),

- 상기 Y는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

디하이드록시포스포릴옥시 $-O-P(O)(OH)_2$,

하이드록시설포닐옥시 $-O-SO_2(OH)$,

아미노 $-NH_2$,

하이드록시 -OH,

아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수),

디하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-CHOH-CH_2OH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-OH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

옥소($C_1$-$C_5$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-CHO$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

[카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일]아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH-CO-(CH_2)_{n2}-COOH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수이고, $n_2$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수).

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서,

- 상기 X는 하기의 군에서 선택되는 어느 하나이고:

카복실 -COOH,

디하이드록시포스포릴옥시 $-O-P(O)(OH)_2$,

하이드록시설포닐옥시 $-O-SO_2(OH)$,

아미노 $-NH_2$,

[아미노($C_1$-$C_6$)알킬]아미노카보닐 $-CONH(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 6 중 어느 하나의 정수),

[디카복시($C_1$-$C_5$)알킬]아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

{카복시[아미노($C_1$-$C_5$)알킬]}아미노카보닐 -CO-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

아미노($C_2$-$C_{12}$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 2 내지 12 중 어느 하나의 정수),

- 상기 Y는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법:

디하이드록시포스포릴옥시 -O-P(O)$(OH)_2$,

하이드록시설포닐옥시 -O-$SO_2$(OH),

아미노 -$NH_2$,

하이드록시 -OH,

아미노($C_2$-$C_{12}$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 2 내지 12 중 어느 하나의 정수),

디하이드록시($C_3$-$C_7$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-CHOH-$CH_2$OH($n_1$은 3 내지 7 중 어느 하나의 정수),

하이드록시($C_2$-$C_6$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-OH($n_1$은 2 내지 6 중 어느 하나의 정수),

카복시($C_3$-$C_6$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-COOH($n_1$은 3 내지 6 중 어느 하나의 정수),

옥소($C_2$-$C_5$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-CHO($n_1$은 2 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

[카복시($C_3$-$C_6$)알카노일]아미노($C_2$-$C_{12}$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-NH-CO-$(CH_2)_{n2}$-COOH($n_1$은 3 내지 6 중 어느 하나의 정수이고, $n_2$은 2 내지 12 중 어느 하나의 정수).

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

- 상기 X는 하기의 군에서 선택되는 어느 하나이고:

-COOH,

-O-P(O)$(OH)_2$,

-O-$SO_2$(OH),

-$NH_2$,

-CO-NH-$(CH_2)_3$-$NH_2$, 또는 -CONH-$(CH_2)_6$-$NH_2$,

-CO-NH-CH(COOH)-$CH_2$-COOH,

-CO-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_4$-$NH_2$, 및

-O-CO-$(CH_2)_5$-$NH_2$

- 상기 Y는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법:

-O-P(O)$(OH)_2$,

-O-$SO_2$(OH),

-$NH_2$,

-OH,

-O-CO-$CH_2$-$NH_2$ (2-아미노에타노일옥시), -O-CO-$(CH_2)_2$-$NH_2$ (3-아미노프로파노일옥시), -O-CO-$(CH_2)_5$-$NH_2$

(6-아미노헥사노일옥시), 또는 -O-CO-$(CH_2)_{11}$-$NH_2$ (12-아미노도데카노일옥시),

-O-CO-$(CH_2)_4$-CHOH-$CH_2OH$ (6,7-디하이드록시헵타노일옥시),

-O-CO-$(CH_2)_5$-OH (6-하이드록시헥사노일옥시),

-O-CO-$(CH_2)_2$-COOH (3-카복실프로파노일옥시),

-O-CO-$(CH_2)_4$-CHO (6-옥소헥사노일옥시), 및

-O-CO-$(CH_2)_5$-NH-CO-$(CH_2)_2$-COOH(3-카복실프로파노일아미노헥사노일옥시).

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 $R_1$ 및 $R_2$는 각각 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법:

-CO-$CH_2$-$C^*$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3($C_{12}$O)$C_{14}$),

-CO-$CH_2$-$C^*$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(HO)$C_{14}$),

-CO-$CH_3$, (C2),

-CO-$CH_2$-NH-CO-$C^*$H[O-CO-$(CH_2)_8$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, ([2($C_{10}$O)$C_8$]$NC_2$),

-CO-$C^*$H[O-CO-$(CH_2)_4$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, (2($C_6$O)$C_8$),

-CO-$(CH_2)_{16}$-$CH_3$, (C18),

-CO-$CH_2$-$C^*$H[O-$CH_2$-$C_6H_5$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(BnO)$C_{14}$),

-CO-$CH_2$-$C^*$H[O-P(O)$(OH)_2$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$ , (3[$(OH)_2$-P(O)O]$C_{14}$),

상기에서, $C^*$는 각 식에서 R, 또는 S 형, 또는 라세미형 RS의 비대칭탄소에 해당한다.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

- 상기 $R_1$은 하기 군에서 선택되는 어느 하나이고:

-CO-$CH_2$-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3($C_{12}$O)$C_{14}$),

-CO-$CH_2$-$C^{**1}$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(HO)$C_{14}$),

-CO-$CH_3$, (C2),

-CO-$CH_2$-NH-CO-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_8$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, ([2($C_{10}$O)$C_8$]$NC_2$),

-CO-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_4$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, (2($C_6$O)$C_8$), 및

-CO-$(CH_2)_{16}$-$CH_3$, (C18),

- 상기 $R_2$는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법:

$-CO-CH_2-C^{**2}H[O-CO-(CH_2)_{10}-CH_3]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $(3(C_{12}O)C_{14})$,

$-CO-CH_2-C^{**2}HOH-(CH_2)_{10}-CH_3$, $(3(HO)C_{14})$,

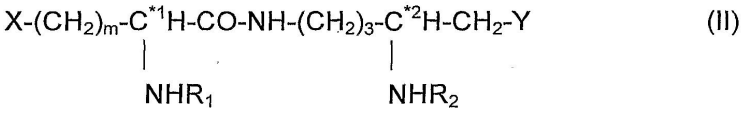
$-CO-CH_2-C^{**2}H[O-CH_2-C_6H_5]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $(3(BnO)C_{14})$, 및

$-CO-CH_2-C^{**2}H[O-P(O)(OH)_2]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $(3[(OH)_2-P(O)O]C_{14})$

상기에서, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$는 각 식에서 R, 또는 S 형, 또는 라세미형 RS의 비대칭탄소에 해당한다.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여되는 화합물이 하기 식 (II)의 화합물인 것을 특징으로 하는 방법:




(II)

(상기 식에서, 상기 X, Y, $R_1$, $R_2$, 및 m은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같고, $C^{*1}$ 은 R형, S 형, 또는 라세미형 RS의 비대칭탄소에 해당하며, $C^{*2}$ 는 R형의 비대칭탄소에 해당한다).

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 투여 화합물이 하기와 같은 식 (II)의 화합물 중에서 선택되는 것인 방법:

- X = $-O-P(O)(OH)_2$, Y = $-O-P(O)(OH)_2$, $R_1$ = $-CO-CH_2-C^{**1}H[O-CO-(CH_2)_{10}-CH_3]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $R_2$ = $-CO-CH_2-C^{**2}HOH-(CH_2)_{10}-CH_3$, m = 2, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$ 는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물, 즉, (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 (1,10)-비스-디하이드로겐포스페이트(OM-294-DP (S,R)),

- X = $-O-P(O)(OH)_2$, Y = $-O-CO-(CH_2)_4-CHOH-CH_2OH$, $R_1$ = $-CO-CH_2-C^{**1}H[O-CO-(CH_2)_{10}-CH_3]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $R_2$ = $-CO-CH_2-C^{**2}HOH-(CH_2)_{10}-CH_3$, m = 2, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$ 는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6,7-디하이드록시헵타노에이트) (OM-197-MP-HD (S,R)),

- X = -OOOH, Y = $-O-CO-(CH_2)_4-CHOH-CH_2OH$, $R_1$ = $-CO-CH_2-C^{**1}H[O-CO-(CH_2)_{10}-CH_3]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $R_2$ = $-CO-CH_2-C^{**2}HOH-(CH_2)_{10}-CH_3$, m = 1, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$ 는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, N-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일]-L-아스파르트산, α-N-{(4R)-5-하이드록시-4-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]펜틸}아미드 5-O-(6,7-디하이드록시헵타노에이트) (OM-197-MC-HD (S,R)),

- X = $-O-P(O)(OH)_2$, Y = $-O-CO-(CH_2)_5-NH_2$, $R_1$ = $-CO-CH_2-C^{**1}H[O-CO-(CH_2)_{10}-CH_3]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $R_2$ = $-CO-CH_2-C^{**2}HOH-(CH_2)_{10}-CH_3$, m = 2, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이

드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트) (OM-197-MP-AC (S,R)), 및

- X = $-NH_2$, Y = $-O-P(O)(OH)_2$, $R_1$ = $-CO-CH_2-C^{**1}H[O-CO-(CH_2)_{10}-CH_3]-(CH_2)_{10}-CH_3$, $R_2$ = $-CO-CH_2-C^{**2}HOH-(CH_2)_{10}-CH_3$,m = 4, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, (5S,11R)-1-아미노-5-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-6-옥소-7-아자-11-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-도데칸-12-올 12-디하이드로겐포스페이트(OM-294-BA-MP (S,R)).

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

유기체내의 활성화된 T 림포사이트, 모노사이트, 또는 항원제시세포에 의한 염증성 사이토킨의 과생성에 관련된 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간을 포함하는 온혈 동물을 치료하는 방법이며, 상기 염증성 사이토킨 또는 염증성 마커는 IL-1β, IL-4, IL-5 IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IFN-γ, TNF-α, 및 MCP-1로 이루어진 군에 속하는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 질환은 천식, 당뇨병, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 전립선염, 염증성장질환, 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군에서 선택되는 하나인 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 조성내의 상기 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 치료학적 유효량으로 점막 또는 비경구 경로를 통해 투여하는 것으로 이루어지는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 치료학적 유효량으로 바람직하게 복강, 피하, 경구, 경비, 설하 또는 에어로솔 경로를 통해 투여하는 것으로 이루어지는 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 정의된 면역조절 분자의 필요 용량은 인간에서 0.01 내지 50 $mg/m^2$인 방법.

## *명 세 서*

### *기 술 분 야*

<1> 본 발명은 면역조절 화합물을 천식, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 전립선염, 염증성장질환, 당뇨병, 류마티스성 관절염로 이루어진 군에서 선택되는 질병과 같은 염증성 사이토킨의 과생성과 관련된 질병을 치료하는데 사용하는 용도에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

<2> 미생물 시그널에 의한 선천 면역 시스템의 활성화 기전의 이해에 있어 최근 중요한 전진이 있었다. 또한 이러한 선천 면역 시스템의 활성화는 적응 면역 반응의 개시 및 생성되는 적응 면역의 형태를 결정하는 데 필수적임이 명확해졌다. 이러한 관찰들은 더욱 합리적인 접근을 통해 면역치료의 발전을 이루도록 새로운 관심을 유발하였다.

<3> 하기 두 발견은 선천 면역의 활성화를 이해하는데 결정적인 역할을 하였다:

<4> (1) 1차 면역 반응의 유도를 담당하는 항원 제시 세포로서의 수지상 세포(DC)의 역할,

<5> (2) 미생물 구조체의 존재를 검출하여 선천 면역 시스템을 자극하는 톨-라이크 리셉터(Toll-like receptors; TLR) 및 다른 "패턴 인식" 리셉터의 발견.

<6> Sallusto 및 Lanzavecchia는 최초로 미성숙 DC가 GM-CSF 및 IL-4로 보충한 매질내 인간 모노사이트에서 생성될 수 있음을 보고하였다(Sallusto F, Lanzavecchia A. J Exp Med 1994,179:1109-18). 그러나, 곧 항원-제시 세포(APC)로서 완전한 기능을 할 수 있는 성숙 DC를 얻기 위해서는 상기 GM-CSF 및 IL-4이외에도 추가적인 성숙 인자들이 요구됨이 명백해졌다. 성숙 DC는 적응 면역 반응을 개시하고 조정할 수 있다.

<7> 이러한 성숙 시그널은 미생물의 산물들에 의해 제공될 수 있다. 이러한 산물들은 TLR을 통해 작용하는 것으로 나타났다. 11개의 TLR들이 동정 되었으며, 서로 다른 미생물 산물들을 인식할 수 있다. TLR4는 특이적으로 공지된 선천 면역 시스템의 가장 강력한 자극자 중의 하나인 박테리아 리포폴리사카라이드 (LPS)를 인식하는 리셉터이다.

<8> 국제출원 WO 2005 007699호는 특히 인간 항-IL-13 항체 분자 및 IL-13 활성을 중화하는 특이적 결합 구성원을 천식, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 섬유증, 염증성 장 질환 및 호지킨 림프종을 포함하는 IL-13 관련 질환의 진단 또는 치료에 사용하는 것을 개시하였다.

<9> 그러나 면역조절에 있어서 IL-13의 정확한 역할을 아는 것이 여전히 요구되고 있고, 하기 최근 간행물에 나타난 바와 같이 IL-13/IL-4 경로의 연구와 관련된 결과를 해석하는 것은 여전히 가설적인 수준에 그치고 있다.

<10> Michael Kabesch 등은 간행물 "IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma"(J. Allergy Clin. Immunol. Volume 117, Number 2)을 통해 천식과 아토피성 질환의 특성인 IgE 생성은 IL-4 및 IL-13 경로의 유전자와 관련된 유전적인 조절하에 있을 수 있다고 진술하였다. 이는 IgE 스위칭이 인간 면역 및 생존에 있어 근원적이고, IgE의 조절이 매우 정교하기 때문이다. 비록 IL-4/IL-13 경로는 주로 IgE 조절에 영향을 주어 천식을 일으키는데 영향을 미칠 수 있지만, 얻어진 결과는 반드시 그렇다고는 할 수 없음을 보여주고 있다.

<11> David B Corry, 및 Farrah Kheradmand에 의한 간행물 "Control of allergic airway inflammation through immunomodulation"(J. Allergy Clin. Immunol. Volume 117, Number 2)에는 천식 관리를 변경한 임상적 시도에 연결된 많은 중요한 결과를 개시하였으며, 더 연구할 가치가 있다. 이들은 B-cell IgE 반응에 요구되는 사이토킨 IL-4가 타입 I 과민 반응에 결정적이고, 따라서 IL-4는 가용성 형태의 IL-4 리셉터 α 사슬(sIL-4Rα)을 사용하는 천식 임상 시험에서 표적화 될 제1 사이토킨 중 하나이며, 이들은 IL-4와 결합하여 이를 불활성화함을 보고하였다. IL-13는 IL-4와 동일한 효과를 나타내나 sIL-4α에 의해 저해되지 않는 다른 사이토킨이다. 결론은 다음 연구에서는 천식 치료를 위해 IL-4 및 IL-13 모두를 동시에 저해하는 시도를 하여야겠다는 것이다.

## *발명의 상세한 설명*

<12> 본 발명은 본 발명자들에 의해 이루어진 입증 즉 이후에 기술되는 분자들이 매우 양호한 안전성을 가지고 TLR4의 효과적인 작용제로서 작용하며, 기능성 모노사이트-유래 DC의 완전한 성숙을 유도할 수 있을 뿐 아니라, TLR4를 발현하는 다른 세포-타입들도 활성화할 수 있다는 사실에 기초한 것이다. 본 발명에 따른 화합물로 처리된 수지상세포(DC)들은 1차 T-세포 활성화를 유발시킬 수 있을 뿐 아니라Th1 세포 면역 반응도 도울 수 있다.

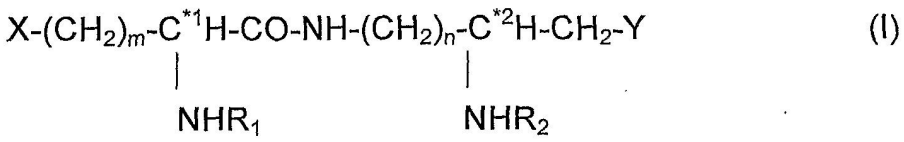
<13> 본 발명자들은 본 발명에 따른 화합물들이 항-CD3 및 항-CD28 항체에 의해 다클론적으로 활성화된 $CD4^+$ T-세포에 의한 IL-13의 분비를 현저하게 저하할 수 있음을 입증하였다.

<14> 또한 본 발명의 화합물 중 하나를 생쥐 천식 모델에 i.p. 또는 i.n. 경로로 투여하였을 때, 항원 감작 및 후속하여 항원에 대한 에어로졸 노출에 의해 생성된 알레르기 반응이 예방되는 것이 입증되었다. 측정된 면역학적 파라미터들은 Th2 반응의 상대적인 감소를 제시하였으며, 이는 본 발명에 따른 화합물들이 천식 모델에서 어떠한 기전을 통해 작용하는지를 설명해 준다. 또한 본 발명자들은 본 발명의 화합물들이 비-비만 당뇨 생쥐(Non Obese Diabetic mice)에서 당뇨의 발병을 감소시킬 수 있음을 입증하였다.

<15> 본 발명은 염증성 사이토킨의 과생성에 관련된 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간을 포함하는 온혈 동물을 치료하는 방법에 관한 것으로,

<16> 하기 일반식 (I)의 면역 조절 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 유효량으로 환자에 투여하는 것을 포함하며,

<17> 상기 약학적 조성물은 하기 일반식 (I)의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 이성질체를 하나 이상 포함하고, 선택적으로 불활성이며 비독성인 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체와 결합 또는 혼



(I)

합하여 포함한다.

<18> 상기 식에서:

<19> - m 및 n은 각각 독립적으로, 1 내지 4 중 어느 하나의 정수이고,

<20> - X 및 Y는 각각 중성 또는 전하 상태의 그룹으로서, 하기 군에서 선택되는 어느 하나이고:

<21> 카복실 -COOH,

<22> 디하이드록시포스포릴옥시 $-O-P(O)(OH)_2$,

<23> 하이드록시설포닐옥시 $-O-SO_2(OH)$,

<24> 아미노-$NH_2$,

<25> 하이드록시-OH,

<26> [아미노($C_1$-$C_{10}$)알킬]아미노카보닐 $-CONH(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<27> [디카복시($C_1$-$C_5$)알킬]아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

<28> {카복시[아미노($C_1$-$C_5$)알킬]}아미노카보닐 $-CO-NH-CH(COOH)-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

<29> 아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH_2$($n_1$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수),

<30> 디하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-CHOH-CH_2OH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<31> 하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-OH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<32> 카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-COOH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<33> 옥소($C_1$-$C_5$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-CHO$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

<34> [카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일]아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 $-O-CO-(CH_2)_{n1}-NH-CO-(CH_2)_{n2}-COOH$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수이고, $n_2$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수)

<35> - $R_1$ 및 $R_2$는 각각 2 내지 18 탄소 원자를 갖는 각각 포화 또는 불포화된 선형 또는 분지형-사슬 카복실산에서 유래되는 아실기이며, 이들은 치환되지 않거나 또는 하이드록시, 디하이드록시포스포릴옥시, 탄소수 2 내지 18의 알킬, 탄소수 2 내지 18의 알킬옥시, 탄소수 2 내지 18의 아실부분을 갖는 아실옥시, 아미노, 및 아실아미노에서 선택되는 하나 또는 세개의 치환기를 가지며,

<36> - $C^{*1}$ 및 $C^{*2}$는 각각 독립적으로 R 또는 S 형 또는 라세미형 RS의 비대칭 탄소이다.

<37> 본 발명은 특히 상기와 같은 방법에 있어서,

<38> X는 하기의 군에서 선택되는 어느 하나이고:

<39> 카복실 -COOH,

<40> 디하이드록시포스포릴옥시 $-O-P(O)(OH)_2$,

<41> 하이드록시설포닐옥시 $-O-SO_2(OH)$,

<42> 아미노-$NH_2$,

<43> [아미노($C_1$-$C_{10}$)알킬]아미노카보닐 -CONH($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<44> [디카복시($C_1$-$C_5$)알킬]아미노카보닐 -CO-NH-CH(COOH)-($CH_2$)$_{n1}$-COOH($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

<45> {카복시[아미노($C_1$-$C_5$)알킬]}아미노카보닐 -CO-NH-CH(COOH)-($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

<46> 아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수),

<47> Y는 하기 군에서 선택되는 방법에 관한 것이다:

<48> 디하이드록시포스포릴옥시 -O-P(O)(OH)$_2$,

<49> 하이드록시설포닐옥시 -O-$SO_2$(OH),

<50> 아미노-$NH_2$,

<51> 하이드록시-OH,

<52> 아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수),

<53> 디하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-CHOH-$CH_2$OH($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<54> 하이드록시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-OH($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<55> 카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-COOH($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수),

<56> 옥소($C_1$-$C_5$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-CHO($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

<57> [카복시($C_1$-$C_{10}$)알카노일]아미노($C_1$-$C_{15}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-NH-CO-($CH_2$)$_{n2}$-COOH($n_1$은 1 내지 10 중 어느 하나의 정수이고, $n_2$은 1 내지 15 중 어느 하나의 정수).

<58> 본 발명은 더욱 특히 하기와 같이 정의된 방법에서,

<59> X는 하기의 군에서 선택되는 어느 하나이고:

<60> 카복실 -COOH,

<61> 디하이드록시포스포릴옥시 -O-P(O)(OH)$_2$,

<62> 하이드록시설포닐옥시 -O-$SO_2$(OH),

<63> 아미노-$NH_2$,

<64> [아미노($C_1$-$C_6$)알킬]아미노카보닐 -CONH($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 6 중 어느 하나의 정수),

<65> [디카복시($C_1$-$C_5$)알킬]아미노카보닐 -CO-NH-CH(COOH)-($CH_2$)$_{n1}$-COOH($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수),

<66> {카복시[아미노($C_1$-$C_5$)알킬]}아미노카보닐 -CO-NH-CH(COOH)-($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 1 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

<67> 아미노($C_2$-$C_{12}$)알카노일옥시 -O-CO-($CH_2$)$_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 2 내지 12 중 어느 하나의 정수),

<68> Y는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 방법에 관한 것이다:

<69> 디하이드록시포스포릴옥시 -O-P(O)(OH)$_2$,

<70> 하이드록시설포닐옥시 -O-$SO_2$(OH),

<71> 아미노-$NH_2$,

<72> 하이드록시-OH,

<73> 아미노($C_2$-$C_{12}$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-$NH_2$($n_1$은 2 내지 12 중 어느 하나의 정수),

<74> 디하이드록시($C_3$-$C_7$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-CHOH-$CH_2$OH($n_1$은 3 내지 7 중 어느 하나의 정수),

<75> 하이드록시($C_2$-$C_6$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-OH($n_1$은 2 내지 6 중 어느 하나의 정수),

<76> 카복시($C_3$-$C_6$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-COOH($n_1$은 3 내지 6 중 어느 하나의 정수),

<77> 옥소($C_2$-$C_5$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-CHO($n_1$은 2 내지 5 중 어느 하나의 정수), 및

<78> [카복시($C_3$-$C_6$)알카노일]아미노($C_2$-$C_{12}$)알카노일옥시 -O-CO-$(CH_2)_{n1}$-NH-CO-$(CH_2)_{n2}$-COOH($n_1$은 3 내지 6 중 어느 하나의 정수이고, $n_2$은 2 내지 12 중 어느 하나의 정수).

<79> 본 발명은 더욱 특히 상기 정의된 방법에 있어서,

<80> X는 하기의 군에서 선택되는 어느 하나이고:

<81> -COOH,

<82> -O-P(O)$(OH)_2$,

<83> -O-$SO_2$(OH),

<84> -$NH_2$,

<85> -CO-NH-$(CH_2)_3$-$NH_2$, 또는 -CONH-$(CH_2)_6$-$NH_2$,

<86> -CO-NH-CH(COOH)-$CH_2$-COOH,

<87> -CO-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_4$-$NH_2$, 및

<88> -O-CO-$(CH_2)_5$-$NH_2$

<89> Y는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 방법에 관한 것이다:

<90> -O-P(O)$(OH)_2$,

<91> -O-$SO_2$(OH),

<92> -$NH_2$,

<93> -OH,

<94> -O-CO-$CH_2$-$NH_2$ (2-아미노에타노일옥시), -O-CO-$(CH_2)_2$-$NH_2$ (3-아미노프로파노일옥시), -O-CO-$(CH_2)_5$-$NH_2$ (6-아미노헥사노일옥시), 또는 -O-CO-$(CH_2)_{11}$-$NH_2$ (12-아미노도데카노일옥시),

<95> -O-CO-$(CH_2)_4$-CHOH-$CH_2$OH (6,7-디하이드록시헵타노일옥시),

<96> -O-CO-$(CH_2)_5$-OH (6-하이드록시헥사노일옥시),

<97> -O-CO-$(CH_2)_2$-COOH (3-카복실프로파노일옥시),

<98> -O-CO-$(CH_2)_4$-CHO (6-옥소헥사노일옥시),

<99> -O-CO-$(CH_2)_5$-NH-CO-$(CH_2)_2$-COOH(3-카복실프로파노일아미노헥사노일옥시).

<100> 본 발명은 더욱 특히 상기 정의된 방법에 있어서, $R_1$ 및 $R_2$는 각각 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 방법에 관한 것이다:

<101> -CO-$CH_2$-C*H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3($C_{12}$O)$C_{14}$),

<102> -CO-$CH_2$-C*HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(HO)$C_{14}$),

<103> -CO-$CH_3$, (C2),

<104> -CO-$CH_2$-NH-CO-C*H[O-CO-$(CH_2)_8$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, ([2($C_{10}$O)$C_8$]N$C_2$),

<105> -CO-C*H[O-CO-$(CH_2)_4$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, (2($C_6$O)$C_8$),

<106> -CO-$(CH_2)_{16}$-$CH_3$, (C18),

<107> -CO-$CH_2$-C*H[O-$CH_2$-$C_6H_5$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(BnO)$C_{14}$),

<108> -CO-$CH_2$-C*H[O-P(O)$(OH)_2$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$ , (3[$(OH)_2$-P(O)O]$C_{14}$),

<109> 상기에서, C*는 각 식에서 R, 또는 S 형, 또는 라세미형 RS의 비대칭탄소에 해당한다.

<110> 본 발명은 더욱 특히 상기 정의된 방법에 있어서,

<111> $R_1$은 하기 군에서 선택되는 어느 하나이고:

<112> -CO-$CH_2$-C**1H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3($C_{12}$O)$C_{14}$),

<113> -CO-$CH_2$-C**1HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(HO)$C_{14}$),

<114> -CO-$CH_3$, (C2),

<115> -CO-$CH_2$-NH-CO-C**1H[O-CO-$(CH_2)_8$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, ([2($C_{10}$O)$C_8$]N$C_2$),

<116> -CO-C**1H[O-CO-$(CH_2)_4$-$CH_3$]-$(CH_2)_5$-$CH_3$, (2($C_6$O)$C_8$), 및

<117> -CO-$(CH_2)_{16}$-$CH_3$, (C18),

<118> 상기 $R_2$는 하기 군에서 선택되는 어느 하나인 방법에 관한 것이다:

<119> -CO-$CH_2$-C**2H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3($C_{12}$O)$C_{14}$),

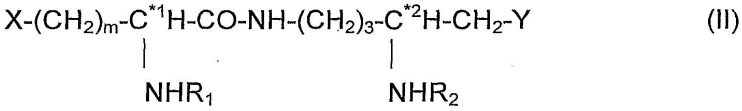
<120> -CO-$CH_2$-C**2HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(HO)$C_{14}$),

<121> -CO-$CH_2$-C**2H[O-$CH_2$-$C_6H_5$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3(BnO)$C_{14}$), 및

<122> -CO-$CH_2$-C**2H[O-P(O)$(OH)_2$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, (3[$(OH)_2$-P(O)O]$C_{14}$)

<123> 상기에서, C**1 및 C**2는 각 식에서 R, 또는 S 형, 또는 라세미형 RS의 비대칭탄소에 해당한다.

<124> 본 발명은 또한 상기 정의된 방법에 있어서, 상기 투여되는 화합물이 하기 식 (II)의 화합물인 것을 특징으로 하는 방법에 관한 것이다:



(II)

<125>

<126> (상기 식에서, 상기 X, Y, $R_1$, $R_2$, 및 m은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 것과 같고, $C^{*1}$ 은 R형, S형, 또는 라세미형 RS의 비대칭탄소에 해당하며, $C^{*2}$ 는 R형의 비대칭탄소에 해당한다).

<127> 본 발명은 특히 상기 정의된 방법에 있어서, 상기 투여 화합물이 하기와 같은 식 (II)의 화합물 중에서 선택되는 것인 방법에 관한 것이다:

<128> - X = -O-P(O)(OH)$_2$, Y = -O-P(O)(OH)$_2$, $R_1$ = -CO-$CH_2$-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, $R_2$ = -CO-$CH_2$-$C^{**2}$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, m = 2, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$ 는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물, 즉, (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 (1,10)-비스-디하이드로겐포스페이트(OM-294-DP (S,R)),

<129> - X = -O-P(O)(OH)$_2$, Y = -O-CO-$(CH_2)_4$-CHOH-$CH_2$OH, $R_1$ = -CO-$CH_2$-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, $R_2$ = -CO-$CH_2$-$C^{**2}$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, m = 2, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$ 는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6,7-디하이드록시헵타노에이트) (OM-197-MP-HD (S,R)),

<130> - X = -OOOH, Y = -O-CO-$(CH_2)_4$-CHOH-$CH_2$OH, $R_1$ = -CO-$CH_2$-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, $R_2$ = -CO-$CH_2$-$C^{**2}$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, m = 1, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$ 는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, N-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일]-L-아스파르트산, α-N-{(4R)-5-하이드록시-4-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]펜틸}아미드 5-O-(6,7-디하이드록시헵타노에이트) (OM-197-MC-HD (S,R)),

<131> - X = -O-P(O)(OH)$_2$, Y = -O-CO-$(CH_2)_5$-$NH_2$, $R_1$ = -CO-$CH_2$-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, $R_2$ = -CO-$CH_2$-$C^{**2}$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, m = 2, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트) (OM-197-MP-AC (S,R)), 및

<132> - X = -$NH_2$, Y = -O-P(O)(OH)$_2$, $R_1$ = -CO-$CH_2$-$C^{**1}$H[O-CO-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$]-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, $R_2$ = -CO-$CH_2$-$C^{**2}$HOH-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$,m = 4, $C^{*1}$은 S형 비대칭탄소이고, $C^{*2}$는 R형 비대칭탄소이며, $C^{**1}$ 및 $C^{**2}$는 R형 비대칭탄소인 식 (II) 화합물 즉, (5S,11R)-1-아미노-5-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-6-옥소-7-아자-11-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-도데칸-12-올 12-디하이드로겐포스페이트(OM-294-BA-MP (S,R)).

<133> 본 발명은 또한 상기 정의된 방법에 있어서, 유기체내의 활성화된 T 림포사이트, 모노사이트, 또는 항원제시세포에 의한 염증성 사이토킨의 과생성에 관련된 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간을 포함하는 온혈 동물을 치료하는 방법이며, 상기 염증성 사이토킨 또는 염증성 마커는 IL-1β, IL-4, IL-5 IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IFN-γ, TNF-α, 및 MCP-1로 이루어진 군에 속하는 어느 하나인 방법에 관한 것이다.

<134> 본 발명은 특히 상기 정의된 방법에 있어서, 상기 질환이 천식, 당뇨병, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 전립선염, 염증성장질환, 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군에서 선택되는 하나인 방법에 관한 것이다.

<135> 본 발명은 특히 상기 정의된 방법에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 조성(formulation)내의

본 발명에 따른 식 (I)의 화합물을 치료학적 유효량으로 점막(mucosal) 또는 비경구(parenteral) 경로를 통해 투여하는 것으로 이루어지는 방법에 관한 것이다.

<136> 본 발명은 또한 특히 상기 정의된 방법에 있어서, 본 발명에 따른 식 (I)의 화합물을 치료학적 유효량으로 바람직하게 복강, 피하, 경구, 경비, 설하 또는 에어로솔 경로를 통해 투여하는 것으로 이루어지는 방법에 관한 것이다.

<137> 본 발명은 더욱 특히 폴록사머 407(루트롤 F-127)과 같은 친수성 폴록사머와 같은 위장관 저항성 담체와 함께 상기 정의된 바와 같은 식(I)의 화합물을 치료학적 유효량으로 포함하고 있는 위장관 저항성의 약학적 조성물에 관한 것이다. 메타크릴레이트 폴리머와 같은 장용성 폴리머가 사용되는 경우, 폴리머 나노입자 또는 마이크로입자와 같은 콜로이드 담체 또한 식(I)의 화합물들을 경구로 수송하는데 적합한 조성물로서 사용될 수 있다.

<138> 보다 통상적인 방법으로 장용성 코팅을 사용하여 수득되는 위장관저항성 정제 또는 캡슐을 사용함으로써 경구 경로로 투여할 수 있다.

<139> 본 발명은 또한 상기 정의된 방법에 있어서, 본 발명의 상기 정의된 식(I)의 면역조절 분자의 필요 용량이 인간에서 0.01 내지 50 $mg/m^2$인 방법에 관한 것이다.

<140> 본 발명은 또한 상기 정의된 식(I)의 화합물 중 하나 이상을 천식, 당뇨병, 아토피 피부염, 알레르기성 비염, 전립선염, 염증성장질환, 및 류마티스성 관절염과 같은 염증성 사이토킨 또는 염증성 질병 마커의 과생성과 관련된 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 의약품을 제조하는데 사용하는 것에 관한 것이다.

<141> 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 식(I)의 화합물, 및 상기 화합물 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 함께 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

<142> 전술한 본 발명의 식(I)의 화합물은 WO 00/00462 및 WO 01/46127에 개시된 방법에 따라 제조할 수 있으며, 상기 문헌은 식(I)의 화합물의 제조 및 이들의 암 치료에의 사용 또는 면역보조제(immunoadjuvants)로서의 사용에 대해 참조할 수 있다.

<143> 이하 본 발명을 보다 자세히 설명하며, OM-294-DP (S,R), OM-197-MP-HD (S,R), OM-197-MC-HD (S,R), OM-197-MP-AC (S,R), 및 OM-294-BA-MP (S,R) 화합물의 제조 및 이들의 생화학적 성질에 대하여 자세히 설명한다.

## *실 시 예*

<159> *실시예 1*

<160> ***(3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1, 10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트) (=OM-197-MP-AC (S,R))(반응도 1)***

<161> 1. (2R)-5-(벤질옥시카보닐아미노)-2-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-1-(2-테트라하이드로피라닐옥시)펜탄 (C-1)

<162> 무수 $CH_2Cl_2$ (83 ml)내의 (2R)-5-(벤질옥시카보닐아미노)-2-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]펜탄-1-올 (PCT WO00146127A1) (2.5 g ; 4.39 mmol)용액에 실온 및 아르곤 가스하에서 3,4-디하이드로-2*H*-피란 (DHP) (1.4 ml, 15.38 mmol), 이후 피리디늄 *p*-톨루엔설포네이트(PPTS) (441 mg, 1.75 mmol)를 차례로 첨가하였다. 상기 용액을 실온에서 18 시간동안 교반하고, $CH_2Cl_2$ (100 ml)로 희석한 후, 5% 수성 $NaHCO_3$ 이후 $H_2O$로 세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고, 여과한 후 농축하였다. 실리카겔상에서 플래쉬 크로마토그라피 (AcOEt/pet. ether 4/1)하여 정제하여 화합물 C-1 (2.86 g ; 100%)을 백색 결정 고체로 수득하였다 (AcOEt/pet. ether 4/1에서 Rf = 0.66; U.V. 및 포스포몰리브데이트).

<163> $C_{39}H_{60}N_2O_6$. IS/MS : *m/z* 653.5 ($[M+H]^+$), 675.5 ($[M+Na]^+$). Mp = 84-86℃.

<164> 2. (2R)-5-아미노-2-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-1-(2-테트라하이드록시피라닐옥시)-펜탄(C-2)

<165> 트라에틸아민 (4 ml)을 함유하는 EtOH (150 ml) 내 화합물 C-1 (2.5 g ; 4.4 mmol) 용액을 탄소상의 10% Pd 존재하에서 실온 및 수소 대기압력하에서 3.5시간 동안 수소화하였다. 여과에 의해 촉매를 제거하고, 에탄올로 세척후, 여액을 농축하고 고진공하에서 건조하여 자유 아민 C-2 (2.15 g ; 96%)을 무정형 백색 고체로 수득하

였다. $C_{31}H_{54}N_2O_4$. IS/MS : *m/z* 519.5 ($[M+H]^+$).

<166> 3. (S)-(α)-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-γ-부티로락톤(**C-3**)

<167> 무수 THF (28 ml) 내 (R)-3-도데카노일옥시테트라데칸산 [Bull. Chem. Soc. Jpn 60 (1987), 2205-2214] (2.16 g ; 5.1 mmol) 용액에 -15℃에서 아르곤 하에서, *N*-메틸모폴라인(0.56 μℓ ; 5.1 mmol ; 1eq) 및 이소부틸 클로로포메이트(657 ml ; 5.1 mmol ; 1eq)를 차례로 첨가하였다. -15℃에서 1시간 동안 교반후, L-호모세린 락톤 하이드로브로마이드(916 mg ; 5.1 mmol ; 1eq)를 0.72 M 수성 $NaHCO_3$ (14 ml, 2 eq)내 용액으로 하여 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 혼합물을 $Et_2O$ (130 mL)로 희석하고, 유기상을 분리후 $H_2O$로 세척하고 이후 $MgSO_4$상에서 건조하고 여과 농축하였다. 재결정에 의해 정제(최소부피의 $CH_2Cl_2$ 및 과량의 펜탄, 0℃)하여 화합물 **C-3** (2.17 g ; 85%)를 백색 고체로 수득하였다. $C_{30}H_{55}NO_5$. IS/MS : *m/z* 510.5 ($[M+H]^+$), 532.5 ($[M+Na]^+$). mp = 79-80℃.

<168> 4. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-10-(2-테트라하이드로피라닐)옥시-데칸-1-올 (**C-4**)

<169> 무수 $CH_2Cl_2$ (1.5 mL) 내 화합물 **C-2** (638 mg, 1.23 mmol, 1.3 eq) 용액에 20-21℃에서 화합물 **C-3** (483 mg, 0.95 mmol)을 첨가하였다. 상기 용액을 20-21℃에서 3일 동안 교반하였다; 용매를 감압하에서 증발하였다. 실리카겔 상 플래쉬 크로마토그라피에 의해 정제($CH_2Cl_2$/acetone 5/1 에서 1/1)하여 알콜 **C-4** (829 mg, 85%)을 백색 고체로 수득하였다.$C_{61}H_{109}N_3O_9$. IS/MS : *m/z* 1029.0 ($[M+H]^+$), 1051.0 ($[M+Na]^+$). mp = 81-82℃.

<170> 5. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-10-(2-테트라하이드로피라닐)옥시-데칸-1-올 디벤질 포스페이트 (**C-5**)

<171> 무수 THF (5 ml) 내 알콜 **C-4** (120 mg ; 0.12 mmol) 및 1*H*-테트라졸 (25 mg ; 0.35 mmol ; 3 eq)용액에 실온에서 아르곤하에서 N,N-디벤질디에틸포스포라미다이트 (85%, 95 μℓ ; 0.27 mmol ; 2.3 eq)을 첨가하였다. 교반하에서 45분 후 상기 반응물을 - 40℃로 냉각하고 이후 $CH_2Cl_2$ (3 ml) 내 *m*CPBA (57-86% ; 75 mg ; 0.43 mmol ; 3,7 eq)용액을 첨가하였다. - 40℃에서 45분 후, 상기 혼합물을 데우고 $Na_2S_2O_3$ (3 ml) 포화용액을 첨가하고 상기 혼합물을 10분간 교반하였다. 상기 용액을 에테르로 희석하고, 유기상을 분리시키고 포화 $Na_2S_2O_3$(5x)로, 이후 포화 $NaHCO_3$ (2x)로 세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고 여과 및 농축하였다. 실리카겔 상 플래쉬 크로마토그라피에 의해 정제 ($CH_2Cl_2$/ acetone 4/1 이후 2/1)하여 디벤질 포스페이트 **C-5** (126 mg ; 84%)를 무정형 고체로 수득하였다.

<172> 6. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올1-(디벤질포스페이트) (**C-6**)

<173> 메탄올(25 ml) 내 1% HCl 용액에 0℃에서 $CH_2Cl_2$ (2.5 ml) 내 화합물 **C-5** (700 mg, 0.54 mmol)용액을 첨가하였다. 0℃에서 45분 동안 교반후, 상기 반응 혼합물을 5% 수성 $NaHCO_3$로 중화하고, $CH_2Cl_2$로 희석한 후 유기상을 분리하였다. 수상을 $CH_2Cl_2$ (3x)로 추출하고 이후 유기상을 합하여 $MgSO_4$상에서 건조하고 여과 및 농축하여 알콜 **C-6** (640 mg ; 98%)을 수득하였다.

<174> 7. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1-디벤질포스페이트 10-(6-벤질옥시카보닐아미노헥사노에이트 (**C-7**)

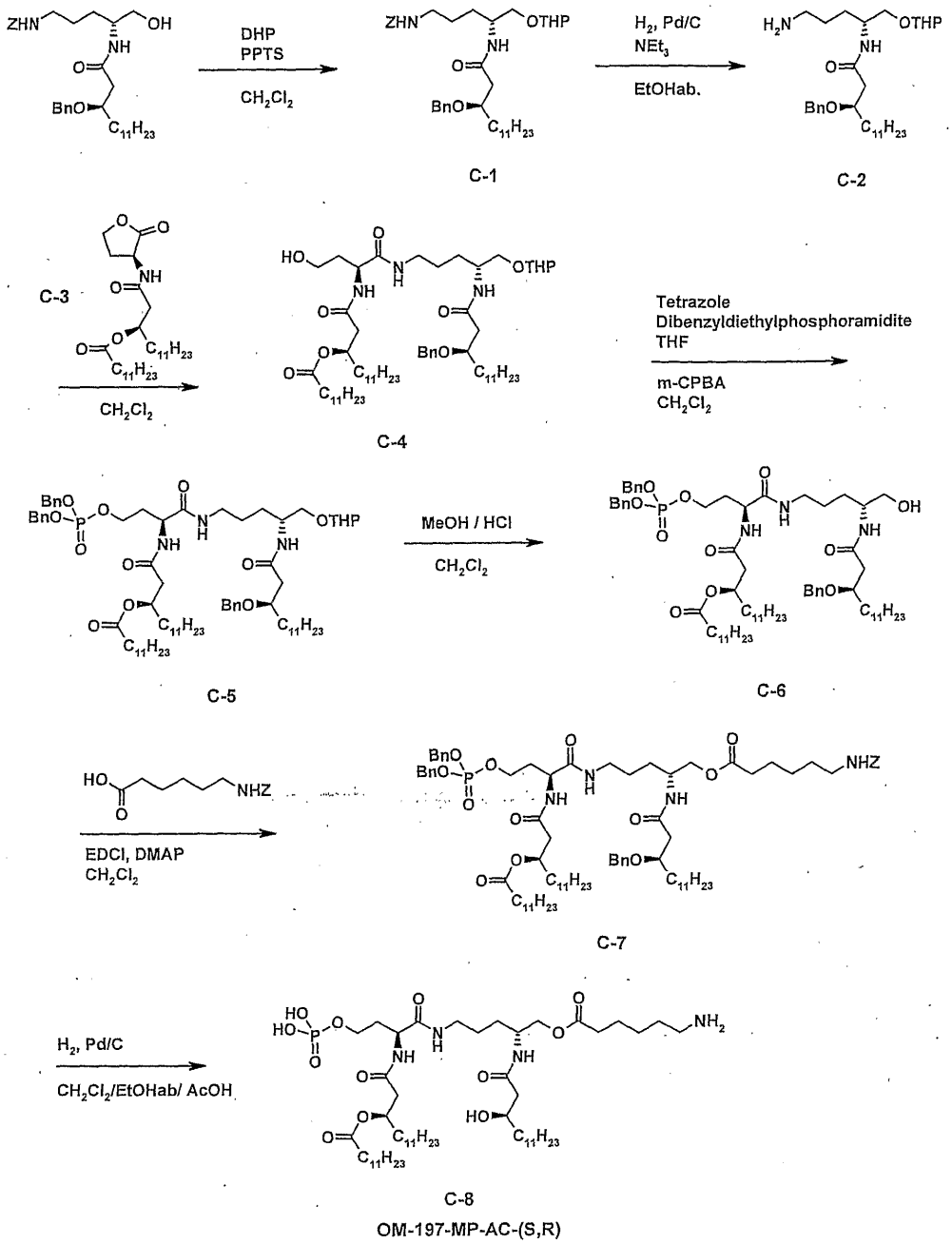
<175> 건조 $CH_2Cl_2$ (25 ml) 내 상기에서 제조된 화합물 **C-6** (640 mg, 0.53 mmol.) 및 6-(벤질옥시카보닐아미노)헥산산 (423 mg, 1.60 mmol.) 용액에 0℃에서 아르곤 흐름하에, 상업적으로 입수한 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드 (306 mg, 1.60 mmol.) 및 4-디메틸아미노피리딘(20 mg, 160 μmol.)을 차례로 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 0℃에서 30분간 교반하고 이후 실온에서 밤새 교반하였다. 상기 반응 매질을 물 및 1N HCl로 세척한 후 상분리하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고, 여과하고, 증발하였다. 실리카겔상에서 플래쉬 크로마토그라피 정제를 수행하여($CH_2Cl_2$/acetone 용출액 4/1 이후 2/1), 커플링 반응 산물 **C-7** (537

mg; 71%)을 회수하였다. $^{13}$C-NMR (62,89 MHz, $CDCl_3$), δ in ppm: 173.18, 171.16, 170.38, 169.60, 156.30, 138.23, 136.50, 135.38, 135.28, 128.42, 128.26, 128.17, 127. 79 , 127.74, 127.44, 76.48, 71.15, 70.84, 69.47, 69.39, 69.31, 66.25, 65.62, 64.37, 49.78, 47.76, 41.41, 41.34, 40.57, 38.97, 34.22, 34.16, 33.96, 33.57, 32.95, 31.70 , 29.15, 28.95, 28.32, 25.87, 25.46, 25.02, 28.80, 24.18, 22.49, 13.94.

<176> 8. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1-디벤질포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트(C-8) (= OM-197-MP-AC (S,R))

<177> 아세트산 (10 ml)을 함유하는 5/2 $CH_2Cl_2$/에탄올 혼합물(70 ml) 내 화합물 C-7 (500 mg, 0.35 mmol.)용액을 실온 및 수소 대기압력하에서 10% Pd를 함유하는 탄소상에서 Pd 존재하에 12 내지 24시간 동안 수소화하였다. 촉매를 여과해 내고, 여액을 증발하여 건조하고, 이후 잔여물을 진공 펌프로 석션 건조하여 C-8을 수득하였다(368 mg, 정량 수율). ES/MS : m/z ratio 1047.9 $[M+H]^+$ ; 1069.8

<178> 반응도 1




<179>

<180> *실시예 2*

<181> *(3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6, 7-디하이드록시헵타노에이트(= OM-197-MP-HD (S,R)) (반응도 2)*

<182> 1. 벤질 6-헵타노에이트 (C-9)

<183> 0℃의 AcOEt (80 mL) 내 6-헵텐산 (4.71 g, 36.75 mmol) 용액에 트리에틸아민(15.3 mL, 110.24 mmol), 벤질브로마이드(13.1 mL, 110.24 mmol) 및 $Bu_4NI$ (6.79 g, 18.37 mmol)을 차례로 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하고 진공 농축하였다. 잔여물을 AcOEt에 취하고, 유기상을 포화 수성 $NaHCO_3$ 및 $H_2O$로 세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고 용매를 진공 제거하였다. 잔여물을 실리카겔상 플래쉬 크로마토그라피하여 (n-heptane/EtOAc, 9:1), 화합물 C-9 (6.00 g ; 75%)를 무색의 오일로 수득하였다. $^{13}$C-NMR (62.89 MHz, $CDCl_3$): 24.42, 28.34, 33.37, 34.13, 66.08, 114.73, 128.19, 128.55, 136.16, 138.37, 173.43.

<184> 2. 벤질 6,7-에폭시헵타노에이트 (C-10)

<185> $CH_2Cl_2$ (50 mL) 내 m-CPBA (2.76 g, 12.29 mmol)용액에 0℃에서 $CH_2Cl_2$ (20 mL)내 **C-9** (1.79 g, 8.19 mmol)용액을 천천히 첨가하였다. 상기 용액을 0℃에서 2시간 동안 이후 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 용액을 $CH_2Cl_2$ 로 희석하고, 유기상을 포화 수성 $Na_2S_2O_3$ 용액(5x)로 세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고 용매를 진공 제거하였다. 잔여물을 실리카겔상 플래쉬 크로마토그라피 하여(*n*-heptane/EtOAc, 5:1) 화합물 **C-10** (1.54 g ; 80%)를 무색의 오일로 수득하였다. $^{13}$C-NMR (62.89 MHz, $CDCl_3$): 24.60, 25.39, 32.00, 34.02, 46.86, 51.91, 66.04, 128.11, 128.46, 136.01, 173.17.

<186> 3. 벤질 6,7-이소프로필리덴헵타노에이트(**C-11**)

<187> 아세톤(50 mL) 내 **C-10** (1.54 g, 6.59 mmol)용액에 실온에서 황산(0.42 mL, 7.9 mmol)을 첨가하였다. 상기 용액을 3시간 동안 교반하고, 디에틸에테르로 희석하고, 유기상을 포화 수성 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고 용매를 진공 제거하여 **C-11** (1.73 g)을 옅은 노란색 오일로 수득하였으며, 이는 다음 단계에서 더 이상의 정제 없이 사용되었다.

<188> 4. 6,7-이소프로필리덴헵탄산 (**C-12**)

<189> $Et_3N$ (3.65 mL, 26.16 mmol)을 함유하는 EtOAc (20 ml) 내 화합물 **C-11** (1.53 g) 용액을 10% Pd 함유 탄소상에서 Pd의 존재하에 실온 및 수소 대기 압력하에서 3시간 동안 수소화하였다. 촉매를 여과하여 제거하고, 여액은 증발 건조하였다. 잔여물을 실리카겔상 플래쉬 크로마토그라피($CH_2Cl_2$/MeOH, 5:1)하여 화합물 **C-12** (0.63 g ; 2 단계에 걸쳐 54%)을 무색의 오일로 수득하였다.

<190> 5. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1-디벤질포스페이트 10-(6, 7-이소프로필리덴헵타노에이트(**C-13**)

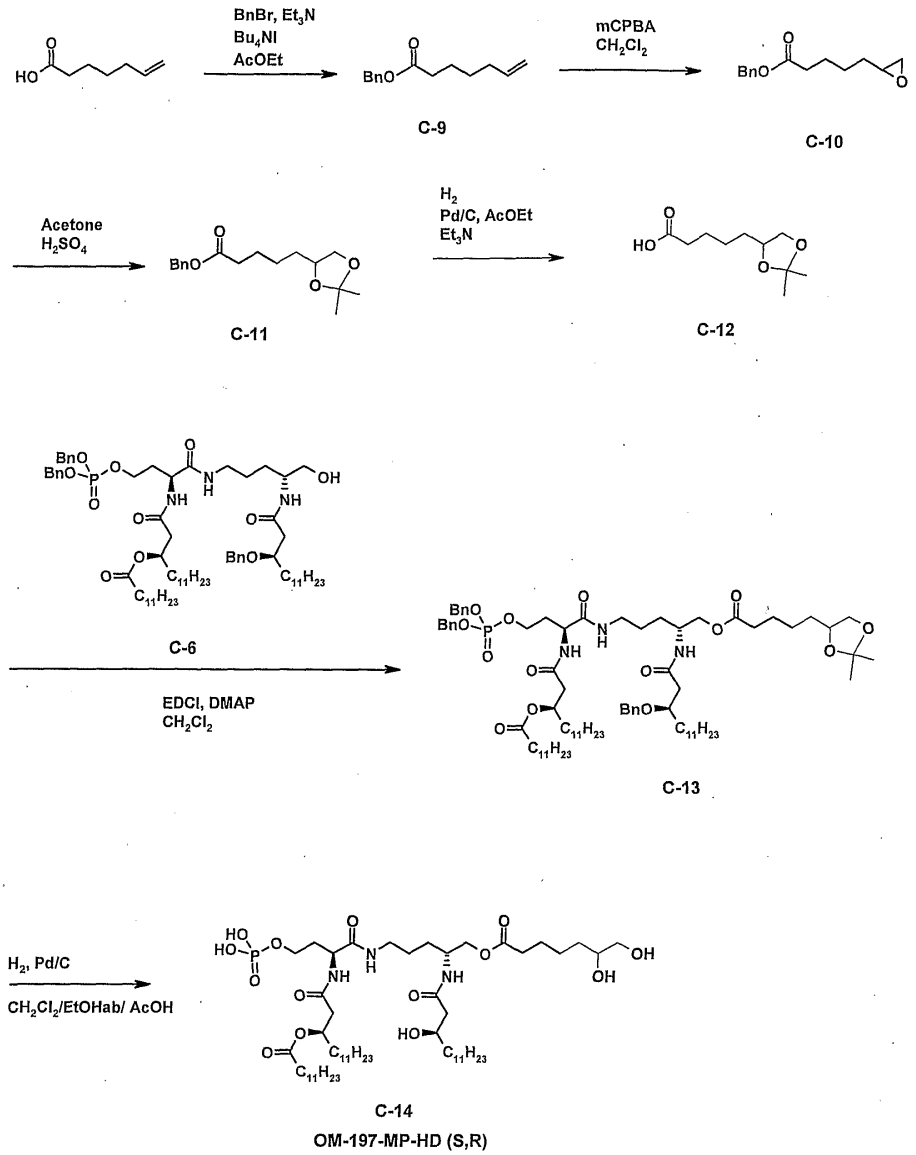
<191> 건조 $CH_2Cl_2$ (5 ml) 내 상기와 같이 제조된 화합물 **C-6** (248 mg, 0.21 mmol.) 및 화합물 6,7-이소프로필리덴헵탄산(**C-12**) (92 mg, 0.45 mmol.)용액에 0℃ 및 아르곤 하에서, 상업적으로 입수한 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드하이드로클로라이드(91 mg, 0.47 mmol.) 및 4-디메틸아미노피리딘(촉매성)을 연속하여 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 0℃에서 30분간 교반하고 이후 실온에서 밤새 교반하였다. 이후 상기 반응 매질을 물 및 1N HCl로 세척한 후 층분리하였다. 유기층을 $MgSO_4$상에서 건조하고, 여과 및 증발하였다. 실리카겔상에서의 플래쉬 크로마토그라피 정제하여($CH_2Cl_2$/MeOH, 99:1), 커플링 반응 산물 **C-13** (240 mg; 83%)을 회수하였다. ES/MS : m/z 1390 $[M+H]^+$ ; 1411 $[M+Na]^+$.

<192> 6. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1-디하이드로겐포스페이트 10-(6,7-디하이드록시헵타노에이트) (**C-14**) (= OM-197-MP-HD (S,R))

<193> 아세트산(3 ml)을 함유하는 5/2 $CH_2Cl_2$/에탄올 혼합물 (21 ml) 내 화합물 **C-13** (180 mg, 0.13 mmol.)용액을 10%

Pd 함유 탄소상에서 Pd의 존재하에 실온 및 수소대기압력하에서 12-36시간 동안 수소화하였다. 촉매를 여과하여 제거하고, 여액은 증발 건조하였다. 상기 잔여물을 진공 펌프에서 석션 건조하여 C-14을 수득하였다(139 mg, 정량 수율). ES/MS : m/z 1079 $[M+H]^+$ ; 1101 $[M+Na]^+$.

<194> **반응도 2**




<195>

<196> *실시예 3*

<197> ***(3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1,10-비스-디하이드로겐포스페이트) (= OM-294-DP (S,R)) (반응도 3)***

<198> 1. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 (C-15)

<199> 무수 $CH_2Cl_2$ (60 mL) 내 (2R)-5-아미노-2-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]펜탄-1-올 (PCT WO00146127A1) (8 g, 18.4 mmol) 용액에 25℃에서 무수 $CH_2Cl_2$ (28 mL) 내 화합물 C-3 (9 g, 17.5 mmol)을 첨가하였다. 상기 용액을 3일 동안 20-21℃에서 교반하였다. 상기 현탁액을 $CH_2Cl_2$ (66 mL)로 희석하고, 30℃로 가열하여 투명한 용액을 얻었다. 아세토니트릴 (320 mL)을 천천히 상기 용액에 가하였다. 20℃로 냉각하고 2시간 동안 교반하였다. 침천물을 여과하고, 아세토니트릴로 세척하고 진공하에서 건조하여 C-15 (13.7 g, 83%)을 백색 고체로 수득하였다. mp = 103℃.

<200> 2. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-옥소-5-아자-9-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미

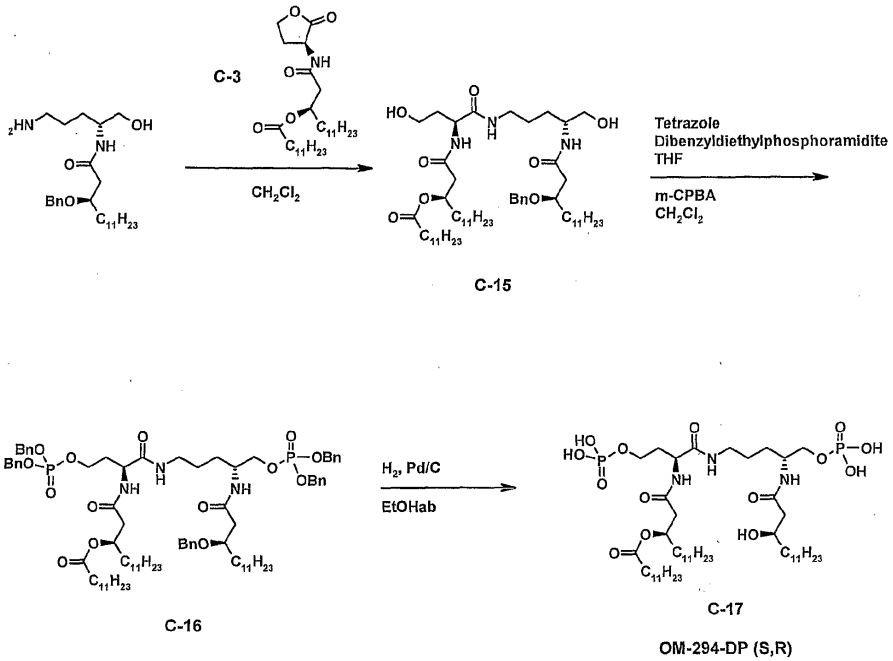
노]-데칸-1,10-디올1,10-비스-(디벤질포스페이트) (C-16)

<201> 무수 THF (46 mL) 내 C-15 (1.02 g ; 1.08 mmol) 및 1*H*-테트라졸 (454 mg ; 6.48 mmol ; 6 eq)용액에 실온 및 아르곤 하에서 N,N-디벤질디에틸포스포아미다이트(85%, 1.50 mL ; 4.97 mmol ; 4.6 eq)를 첨가하였다. 교반하 30분 후, 상기 반응 혼합물을 -20℃로 냉각하고, $CH_2Cl_2$ (30 mL)내 *m*CPBA (57-86% ; 1.32 g ; 7.67 mmol ; 7.4 eq)용액을 첨가하였다. -20℃에서 45분 후에, 상기 용액을 0℃로 가열하고, 포화 용액 $Na_2S_2O_3$ (25 mL)을 첨가한 후 10분간 상기 혼합물을 교반하였다. 에테르로 희석하고, 유기상을 분리하여 포화 $Na_2S_2O_3$로 (5x), 이후 포화 $NaHCO_3$ (2x)세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$상에서 건조하고 여과 및 농축하였다. 실리카겔상에서 플래쉬 크로마토그라피 정제하여($CH_2Cl_2$/ acetone 4/1 이후 3/1) C-16를 무색 오일로 수득하였다 (1.38 g ; 87%).

<202> 3. (3S, 9R)-3-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-데칸-1,10-디올 1,10-비스-(디하이드로겐포스페이트) (C-17) (= OM-294-DP (S,R))

<203> 이소프로판올 (150 mL) 내 C-16 (2.7 g, 1.84 mmol)용액을 10% Pd 탄소 (320 mg)상에서 실온 및 수소대기압력하에서 3시간 동안 수소화하였다. 촉매를 밀리포어막을 통과시켜 여과로 제거하고, 여액은 농축하고 고진공하에서 건조하여 C-17 (1.8 g; 98%)를 무정형 고체로 수득하였다.

<204> **반응도 3**




<205>

<206> *실시예 4*

<207> ***N-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-L-아스파르트산, α-N-{(4R)-5-하이드록시-4-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-펜틸}아미드 5-O-(6, 7-디하이드록시헵타노에이트) (=OM-197-MC-HD (S,R)) (반응도 4)***

<208> 1. N-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-L-아스파르트산, α-N-{(4R)-5-하이드록시-4-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]펜틸}아미드-β-벤질에스테르, 5-O-(6, 7-이소프로필리덴헵타노에이트) (C-18)

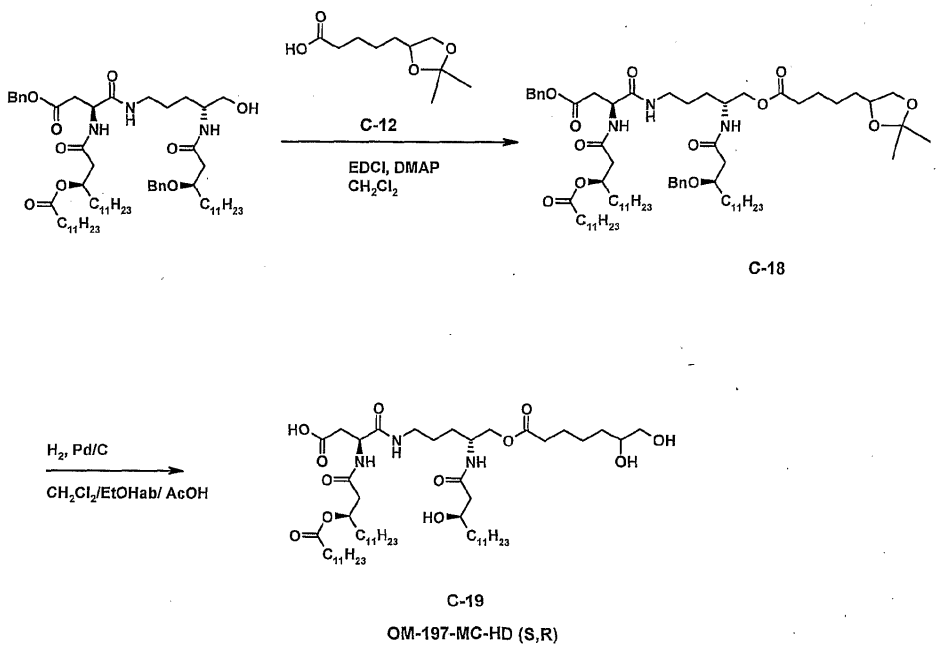
<209> 건조 $CH_2Cl_2$ (30 mL) 내 화합물 N-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-L-아스파르트산, α-N-{(4R)-5-하이드록시-4-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]펜틸}아미드-β-벤질에스테르 (PCT WO00146127A1) (1.14 g, 1.09 mmol.) 및 화합물 6,7-이소프로필리덴헵탄산 (C-12) (487 mg, 2.48 mmol.) 용액에 0℃ 에서 아르곤 흐름하에, 상업적으로 입수한 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(485 mg, 2.53 mmol.) 및 4-디메틸아미노피리딘(43 mg, 0.35 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 0℃에서 30분간, 이후 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 매질을 물 및 1N HCl로 세척하고 층분리하였다. 유기층을 $MgSO_4$상에서 건조하고, 여과 및 증발하였다. 실리카겔상에서 플래쉬 크로마토그라피하여($CH_2Cl_2$/Acetone, 9:1), 커플링

반응 산물 C-18 (1.20 g; 76%)을 백색 고체로 수득하였다. ES/MS : m/z 1255 $[M+Na]^+$.

<210> 2. N-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-L-아스파르트산, α-N-{(4R)-5-하이드록시-4-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]펜틸}아미드 5-O-(6, 7-디하이드로헵타노에이트) (C-19) (= OM-197-MC-HD (S,R))

<211> 아세트산(5 mL)을 함유하는 2/1 $CH_2Cl_2$/에탄올 혼합물(50 mL) 내 화합물 C-18 (1.20 g, 0.97 mmol.) 용액을 10% Pd 함유 탄소상에서 Pd의 존재하에 실온 및 수소대기압력하에서 12-36시간 동안 수소화하였다. 촉매를 여과하여 제거하고, 여액은 증발 건조하였다. 상기 잔여물을 진공 펌프에서 석션하여 C-19 (1 g, 정량 수율)을 수득하였다. ES/MS : m/z 1012 $[M+H]^+$ ; 1034 $[M+Na]^+$.

<212> **반응도 4**




<213>

<214> *실시예 5*

<215> ***(5S,11R)-1-아미노-5-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-6-옥소-7-아자-11-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-도데칸-12-올 12-디하이드로겐포스페이트 (= OM-294-BA-MP (S,R)) (반응도 5)***

<216> 1.$N^{\alpha}$-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노] $N^{\varepsilon}$-벤질옥시카보닐-L-리신 (C-20)

<217> 무수 THF (4 ml) 내 (R)-3-도데카노일옥시테트라데칸산 P-109 [Bull. Chem. Soc. Jpn 60 (1987), 2205-2214] (153 mg ; 0.36 mmol) 용액에 -15℃ 및 아르곤 하에서 *N*-메틸모폴라인 (40㎕ ; 0.36 mmol ; 1eq) 및 이소부틸클로로포메이트 (47 ml ; 0.36 mmol ; 1eq)을 연속하여 첨가하였다. -15℃에서 교반 30분 후에, $Et_3N$ (0.16 mL)을 함유하는 $CH_3CN/H_2O$ (3.5/1 (4.5 mL) ) 내 상업적으로 입수한 H-L-리신(Z)-OH (100 mg ; 0.36 mmol ; 1eq) 용액을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 이후 유기용매를 증발하고 수상을 0℃로 냉각하고, 10% 수성 시트르산 용액으로 산성화하여 pH를 3으로 낮추고 AcOEt (3x)로 추출하였다. 유기층을 $MgSO_4$,상에서 건조하고, 여과 증발하였다. 실리카겔상에서 플래쉬 크로마토그라피를 수행하고(1/1 petroleum ether/AcOEt 용출액으로 0.25% 아세트산 함유) 이후 톨루엔을 공증발하여 C-20 (172 mg ; 70%)을 백색 결정성 고체로 수득하였다. MS: (IS+) *m/z* 690.0 $[M+H]^+$, 707.0 $[M+NH_4]^+$, 712.0 $[M+Na]^+$, 727.5 $[M+K]^+$.

$^{13}$C-NMR (62.89 MHz, $CDCl_3$), δ in ppm: 174.90, 173.73, 170.66, 156.98, 136.53, 128.57, 128.17, 128.05, 71.27, 66.79, 52.24, 41.32, 40.47, 34.59, 34.24, 31.99, 31.45, 29.72, 29.43, 29.25, 25.29, 25.07, 22.76, 22.27, 14.19.

<218> 2.(5S,11R)-1-벤질옥시카보닐아미노-5-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일-아미노]-6-옥소-7-아자-11-[(R)-

3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-도데칸-12-올(**C-21**).

<219> 무수 $CH_2Cl_2$ (3 ml) 내 **C-20** (150 mg; 0.22 mmol.) 및 (2R)-5-아미노-2-[(R)-3-벤질옥시-테트라데카노일아미노]펜탄-1-올 **WZ-10b** (PCT WO00146127A1) (95 mg; 0.22 mmol.; 1.0 eq) 용액에 0℃에서 상업적으로 입수한 HOAt (1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸) (36 mg, 0.26 mmol., 1.2 eq.) 및 상업적으로 입수한 N, N'-디이소프로필카보디이미드(41 ㎕, 0.22 mmol., 1.2 eq.)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 0℃에서 1시간, 이후 실온에서 밤새 교반하였다. 이어 상기 혼합물을 물, 1N HCl 용액 및 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하고 층분리하였다. 유기층을 $MgSO_4$상에서 건조하고 여과한 후 증발하였다. 실리카겔상에서 플레쉬 크로마토그라피 정제하여 (3/1 $CH_2Cl_2$/acetone 용출액), **C-21** (165 mg ; 68%)을 백색 결정성 고체로 수득하였다. MS: (IS+) *m/z* 1105.8 $[M+H]^+$, 1128.0 $[M+Na]^+$, $^{13}$C-NMR (62.89 MHz, $CDCl_3$), δ in ppm: 173.56, 172.20, 171.87, 170.23, 156.82, 138.32, 136.69, 128.53, 128.47, 128.09, 128.00, 127.91, 127.82, 76.77, 71.48, 71.15, 66.59, 64.77, 53.1, 51.39, 41.71, 41.63, 40.46, 39.45, 34.57, 34.51, 34.12, 31.97, 29.70, 29.51, 29.41, 29.25, 28.69, 25.38, 25.29, 25.19, 25.09, 22.74, 22.50, 14.18.

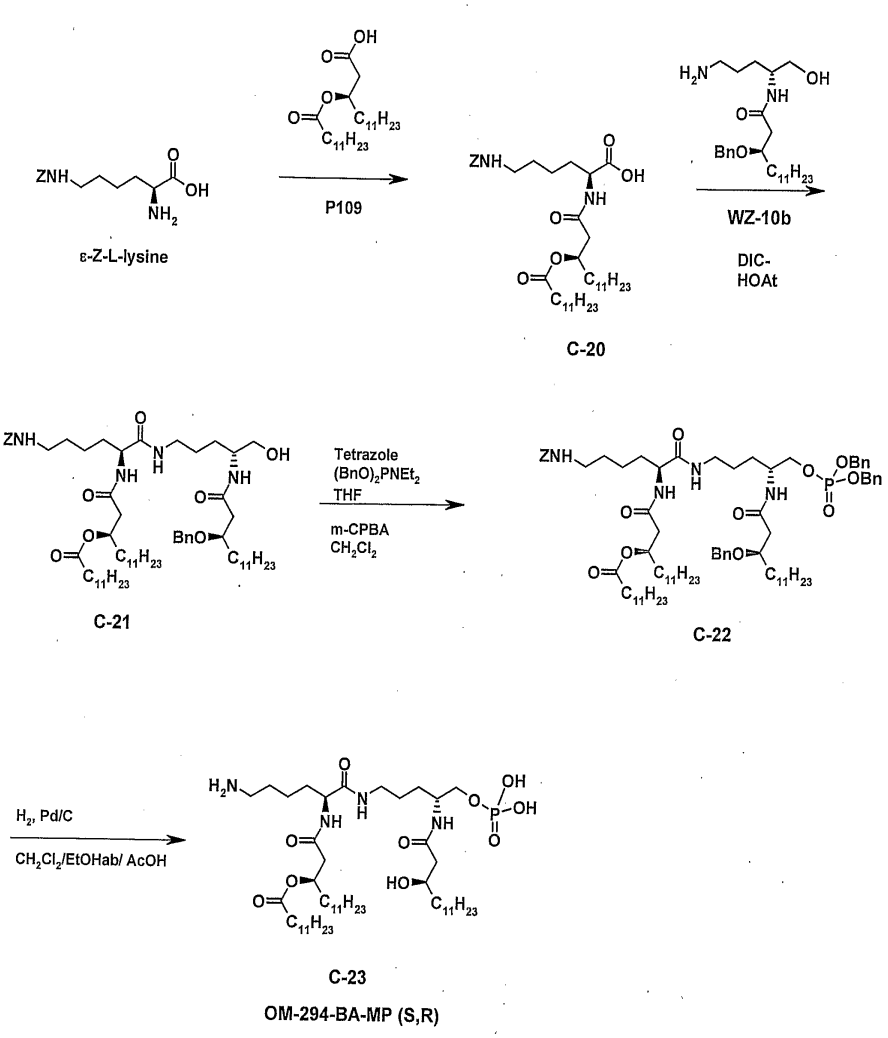
<220> 3. (5S,11R)-1-벤질옥시카보닐아미노-5-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-6-옥소-7-아자-11-[(R)-3-벤질옥시테트라데카노일아미노]-도데칸-12-올 12-디벤질 포스페이트(**C-22**).

<221> 무수 THF (8 mL) 내 **C-21** (150 mg ; 0.14 mmol) 및 1*H*-테트라졸(29 mg ; 0.41 mmol ; 3 eq) 용액에 실온 및 아르곤 하에서 N,N-디벤질디에틸포스포라미다이트 (85%, 110 mL ; 0.31 mmol ; 2.3 eq)를 첨가하였다. 교반하 30분 후, 상기 반응 혼합물을 -20℃로 냉각하고, 이후 $CH_2Cl_2$ (6 mL) 내 *m*CPBA (57-86% ; 87 g ; 0.50 mmol ; 3.7 eq)용액을 첨가하였다. -20℃에서 45분 둔 후, 상기 용액을 0℃로 가열하고, 포화 $Na_2S_2O_3$ 용액(5 mL)을 가하고, 10분 동안 상기 혼합물을 교반하였다. 에테르로 희석하고, 유기상을 분리하여 포화 $Na_2S_2O_3$ (5x)로 이후, 포화 $NaHCO_3$ (2x)로 세척하였다. 상기 유기상을 $MgSO_4$,상에서 건조하고, 여과하고 농축하였다. 실리카겔상에서 플래쉬 크로마토그라피 정제하여($CH_2Cl_2$/ acetone 4/1 이후 2/1) **C-22** (149 mg ; 81%)를 무정형 고체로 수득하였다. MS: (IS+) *m/z* 1366.0 $[M+H]^+$, 1383.5 $[M+NH_4]^+$, 1388.5 $[M+Na]^+$, 1088.0 $[M-(BnO)_2OPOH)+H]^+$, $^{13}$C-NMR (62.89 MHz, $CDCl_3$), δ in ppm: 173.51, 171.77, 171.27, 169.95, 156.67, 138.32, 136.69, 135.66 (d), 135.55 (d), 128.69, 128.51, 128.43, 128.03, 127.77, 127.69, 76.49, 71.28, 71.20, 69.66 (d), 69.58 (d), 68.72 (d), 66.51, 52.82, 48.62 (d), 41.76, 41.46, 40.46, 39.01, 34.54, 34.06, 31.96, 29.68, 29.49, 29.39, 29.22, 27.95, 25.29, 25.18, 25.05, 22.73, 22.45, 14.17.

<222> 4. (5S,11R)-1-아미노-5-[(R)-3-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-6-옥소-7-아자-11-[(R)-3-하이드록시테트라데카노일아미노]-도데칸-12-올 12-디하이드렌포스페이트(**C-23**) (= OM-294-BA-MP (S,R))

<223> 아세트산(3 mL)을 함유하는 3/1 $CH_2Cl_2$/에탄올 혼합물 (20 mL) 내 화합물 **C-22** (130 mg, 0.095 mmol.)용액을 10% Pd 함유 탄소상에서 Pd의 존재하에 실온 및 수소대기압력하에서 36시간 동안 수소화하였다. 촉매를 여과하여 제거하고, 여액은 증발 건조하였다. 잔여물을 진공 펌프에서 석션하여 **C-23** (84 mg, 91%)을 수득하였다. MS: (IS+) *m/z* 962.0 $[M+H]^+$, 984.0 $[M+Na]^+$.

<224> **반응도 5**




<225>

<226> **본 발명에 따른 화합물의 생물학적 활성**

<227> ***실시예 6***

<228> 쥐 DC 세포상에서 LPS 유도 염증(IL-12 및 TNF-α) 및 항-염증성 (IL-10) 사이토킨에 대한 OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP의 인 비트로 조절 효과

<229> 프로토콜:

<230> 하기와 같이 골수세포를 분리 배양하였다.

<231> 6주령의 두 마리의 수컷 C57BL/7(Charles River Laboratories France)에서 대퇴와 경골을 떼어내고 근육과 힘줄을 제거한 후, 70% 에탄올로 소독하였다. 각 뼈의 양끝을 절단하고, 26 게이지 니들 주사기를 사용하여 골수를 HBSS (Gibco BRL)로 세척하였다. 생성되는 세포 현탁액을 500g의 속도로 5분간 원심분리하고 HBSS로 세척하였다. 상기 세포를 2 mM L-글루타민(Sigma), 100 U/ml 페니실린 (Sigma), 100 μg/ml 스트렙토마이신 (Sigma), 50 μM β-머캅토에탄올 (Sigma), 10% 열-불활성화된 FCS (Sigma) 및 15 ng/ml 쥐 rGM-CSF (R&D)을 보충한 RPMI-1640 (Gibco BRL)내에 $3x10^5$ 세포/ml의 농도로 재현탁 하였다.

<232> 골수(BM) 유래 수지상세포(DC)를 생성하기 위하여, BM 류코사이트를 100-mm 박테리아 페트리 디쉬(Falcon 1029)에 37° C, 5% $CO_2$에서 8일간 배양하였다. 0일, 10 ml의 세포 현탁액을 디쉬 마다 파종하였다. 3일째, 10 ml의 즉시 조제한 배지를 각 플레이트에 첨가하고, 6일째, 9 ml의 최상층 배지를 조심스럽게 각 플레이트에서 제거한 후, 10 ml의 새로 조제한 배지로 대체하였다.

<233> 8일령의 BM 세포 배양의 비-부착성 세포들을 수거하여, 500g의 속도로 5분간 원심분리하고,10 ng/ml GM-CSF을

포함하는 보충 RPMI내에 $1.25x10^6$ 세포/ml의 농도로 재현탁 하였다. 이후 상기 세포를 24-웰 조직 배양 플레이트($1x10^6$ 세포/웰)에 파종하고, OM-294-DP 또는 OM-197-MP-AC (0.01-100 μg/ml/200 μl/웰) 존재하 또는 비존재하에서, 37℃, 5% $CO_2$ 에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후, LPS (E.coli 026 :B6, Sigma)를 1 μg/ml의 농도로 가하고, 각 플레이트들을 더 인큐베이션하였다. 20시간 인큐베이션 후, 각 상등액을 수거하여 사이토킨을 분석하였다.

<234> CD 배양 상등액내 IL-12p70, IL-10, 및 TNF-α 농도는 OptEIA 매치 Ab 페어(BD Pharmingen)을 사용하여 ELISA로 측정하였다. 수퍼시그널 ELISA 피코 케미일루미너션트 퍼옥시다제 기질 (BD Pharmingen)을 사용하여 발광법(Wallac 1420 multilabel counter Victor-2)에 의해 검출하였다. 제조자 지시에 따라 상기 분석을 시행하였다.

<235> 결과:

<236> a) LPS-유도 1L-12 및 1L-10 생성에 대한 OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP의 효과

<237> LPS-유도 1L-12 및 1L-10 생성에 대한 결과를 도 1에 나타내었다.

<238> b) LPS-유도 TNF-α생성에 대한 OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP의 효과

<239> LPS-유도 TNF-α생성에 대한 결과를 도 2에 나타내었다.

<240> 결론

<241> 상기 결과들은 명백하게 OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP 둘다 염증성 사이토킨(IL-12 및 TNF-α)의 생성을 감소시키고, 대조적으로 항-염증성 사이토킨 IL-10의 생성은 현저히 증가시키는 것을 보여주며, 이는 본 발명의 화합물들이 치료적인 항-염증제로서 작용할 수 있음을 보여준다.

<242> ***실시예 7***

<243> 인간 $CD4^+$ T 세포에 대한 4개의 트리아실화 유도체 시리즈의 직접적인 효과

<244> 프로토콜:

<245> 본 발명의 4개의 화합물 시리즈(OM-197-MP-AC, OM-197-MC-HD, OM-294-BA-MP, OM-197-MP-HD)를 하기에 요약한 바와 같이 직접 테스트하였다:

<246> 자연 그대로의 $CD4^+$ T 세포를 건강한 혈액 공여자에서 자성적으로 분류해 내었다(버피 코트). 상시 세포를 트리아실 유도체 비존재 또는 존재하(0,02; 0,2; 2 and 20 ㎍/ml)에 플레이트-결합 항-CD3 (5 ㎍/ml) 및 가용성 항-CD28 (1 ㎍/ml)를 사용하여 자극하였다. 6일 후, 배양 상등액내 사이토킨 레벨(IFN-γ 및 IL-13)을 ELISA로 측정하였다.

<247> 결과:

<248> 상기 사이토킨 생성에 대한 결과를 도 3에 나타내었다. T-세포 증식 또한 검사하였으나, 본 발명의 화합물에 의해 변경되지 않았다.

<249> 결론:

<250> $CD4^+$ T 세포에 의한 IL-13 생성 (흰색 막대)는 OM-197-MP-AC, OM-197-MC-HD, OM-294-BA-MP, OM-197-MP-HD의 존재하에 감소된 반면, IFN-γ생성(검은색 막대) 및 T 세포 증식은 특별한 변화를 나타내지 않았다. 이는 테스트된 4개의 트리아실화 분자들의 존재로 인해 Th1 반응 쪽으로 이동되는 것을 나타낸다.

<251> *실시예 8*

<252> 천식 모델에서 OM-197-MP-AC의 효과

<253> 전 실시예에서 테스트된 트리아실화 분자들이 천식의 병리에 관련되는 것으로 생각되는 사이토킨(즉 IL-13)의 생성을 감소시키는 것으로 밝혀졌기 때문에, 본 실험에서는 상기 시리즈내 한 화합물(OM-197-MP-AC)의 천연 T-헬퍼 세포의 Th2 분화 조절 및 후속되는 알레르기성 천식의 발명에 대한 인 비보 효과를 조사하였다.

<254> 본 실험에서, 먼저 LACK-유도 알레르기성 천식의 발병에서 감작 단계에서 주어진 OM-197-MP-AC 의 효과(파트 a)를 조사하고, 이후 상기 테스트 분자의 치료적 효과(파트 b)를 조사하였다.

<255> 파트 a) 천식의 "예방적" 효과

<256> 프로토콜:

<257> 마우스 및 알레르기 천식의 유도

<258> 6주령의 암컷 Balb/c ByJ 마우스를 Centre d'Elevage Janvier (CERJ, Le Genest-St-Isle, France)에서 구매하였다. 모든 마우스들을 2 mg의 Alum 내에 침전한 10㎍ LACK 단백질(PerBio Science France SAS, Brebieres, France)을 제0일 및 7일에 2번 복강 주사하여 감작시켰다.

<259> 동물은 하기와 같은 그룹으로 분류하였다:

<260> -LACK-감작 및 식염수 부하 마우스(4 마리)

<261> -LACK-감작 및 부하 마우스(8마리)

<262> -OM-197-MP-AC-처치, LACK-감작 및 부하 마우스 (8 마리)

<263> 세번째 그룹의 마우스는 1 mg/Kg의 OM-197-MP-AC를 복강 주사로 처치하였다 (마우스당 20 ㎍). 처치는 -1, 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10 및 11일째 이루어졌다.

<264> 그룹 B 및 C의 마우스들은 16일부터 21일째 되는 날까지 날마다 LACK 용액(0.15%)을 20-분 에어로졸 투여하고, 반면 식염수 그룹의 마우스들은 대조로서 식염수를 투여받았다.

<265> 기도 과잉반응성(AHR):

<266> 마지막 항원을 부하하고 하루 후 모든 마우스들에 대해 흡입 메타콜린(아세틸메틸콜린, 시그마)의 농도 증가(6-25 mg/ml)에 대한 AHR을 전혈 혈량측정법(Emka)에 의해 측정하였다. AHR는 증강 포즈로 표시하였으며(Penh, 도 4), 이 증강 포즈는 기도 순응 및 저항 계산치와 전적으로 관련되는 무디멘션 파라미터로서, 기도 저항, 임페던스, 및 흉막내 압력과 관련되는 수치이다.

<267> 시약:

<268> - LACK 재조합 단백질은 Mougneau 등, 1995에 기재된 대로, 대장균에서 생산하여 정제하였다.

<269> - OM-197-MP-AC는 OM PHARMA 배치DL040906에서 공급받았으며, 0.98 mg/ml의 농도이다.

<270> - 항-IgE EM-95 mAbs는 DNAX (Palo Alto, CA, USA)로부터 받았다.

<271> - 메타콜린(아세틸메틸콜린)은 시그마에서 구매하였다(Saint Quentin Fallavier, France).

<272> - CBA 어레이 비드 (Flex set)는 BD 바이오사이언스에서 구매하였다.

<273> 항체역가:

<274> 마지막 에어로졸 처치 하루 후 심장 펑쳐에 의해 모든 마우스들을 출혈치사하였다. 전체 IgE는 ELISA로 정량하였으며, 래트 EM-95 항-IgE mAbs를 코팅 항체로 사용하고, 비오틴 결합 래트 항-IgE mAbs을 이차 항체로 사용하였다(Julia et al., 2002에 개시된 바에 따라).

<275> 기관지폐포세척(BAL; bronchoalveolar lavage)세포의 분석(호산구 퍼센트):

<276> 각 마우스들을 출혈시키고, 기관(trachea)에 카눌라를 삽입하였다. 폐는 데운 PBS 1ml로 3차례 세척하였다. 세포들을 PBS로 세척하고 300㎕로 재현탁한 후, Burker-Turk 챔버로 계수하였다. 분별 BAL 세포계수를 위해, 시토스핀제제를 만들고, 라이트/김사(Wright/Giemsa)염색하였다. 각 중성구, 호산구 및 다른 단핵구 세포 수를 현미경 검사로 측정하였다. 호산구 퍼센트를 도 5에 도시하였다.

<277> 폐 사이토킨 함량 분석:

<278> 처치 및 미처치 동물들의 폐 사이토킨 함량을 조사하기 위해, LACK-감작 및 PBS-부하된 wt 마우스("대조"그룹), LACK-감작 및 부하 wt 마우스("천식" 그룹), 및 OM-197-MP-AC-처치 wt 마우스("OM-197" 그룹)의 폐들로부터 단백질 추출물을 제조하였다. 이로부터, IL-4, IL-5, IL-13 함량을 FACSArray을 사용하여 멀티플렉스 분석으로 측정하였다.

<279> 결과:

<280> 기도 과잉반응성 측정(AHR):

<281> 처치 또는 미처치 LACK-감작 마우스들(상기 참조)을 5일간 연속하여 날마다 LACK 에어로졸을 부하하였다. 마지막 에어로졸 처치 하루 후, 에어로졸된 메타콜린의 농도 증가에 대한 AHR을 전혈 혈량측정법에 의해 측정하였다.

<282> 예측된 바와 같이, LACK-감작 및 식염수-부하된 마우스들은 메타콜린에 ㄴ노ns출시 AHR을 나타내지 않았으나, 미처치 LACK-감작 및 부하된 마우스들은 매우 강한 AHR을 나타내었으며, 이는 높은 Penh값으로부터 확인되었다(도 4). 이와 극명하게 대조되게, OM-197-MP-AC로 처치하고, LACK-감작 및 부하된 마우스들은 AHR을 나타내지 않았다.

<283> 결론:

<284> 메타콜린 존재하에서 측정된, 에어로졸 항원에 대한 마우스 노출시 기도 과잉반응성은 OM-197-MP-AC 처치에 의해 대조 수준(식염수)으로 경감되었다.

<285> 기관지폐포세척(BAL)내 호산구 퍼센트 규명

<286> 그 결과를 도 5에 나타내었다. 식염수 에어로졸을 부하한 LACK-감작 마우스들은 BAL에서 호산구를 나타내지 않았으나, LACK 에어로졸을 부하받은 LACK-감작 마우스들은 BAL에 호산구를 나타내었다. 또한 OM-197-MP-AC-처치 마우스는 미처치 마우스들 보다 3배 더 적은 호산구를 나타내었다(도 5).

<287> 결론

<288> OM-197-MP-AC처치는 BAL 호산구를 매우 감소시켰다.

<289> 혈청내 면역글로불린(Ig) 측정

<290> IgE에 대한 결과를 도 6에 나타내었다:

<291> 전체 IgE의 역가는 마우스에 OM-197-MP-AC 화합물을 처치한 경우 상당히 감소하였다(도 6).

<292> 결론

<293> 따라서, OM-197-MP-AC 처치한 마우스의 혈청은 미처치 감작, 부하 마우스(즉 "천식 동물")에 비교하여 2 배 더 적은 전체 IgE을 함유하였다.

<294> 폐 사이토킨의 측정:

<295> 알레르기성 기도 염증에 대한 OM-197-MP-AC의 예방적 효과를 알아보기 위하여, 처치 및 미처치 wt 마우스 양쪽의 폐에서 단백질을 추출하고, 천식에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 사이토킨(IL-4, IL-5 및 IL-13)을 CBA 어레이 비드 및 FACSarray를 사용하는 멀티프렉스 분석으로 정량하였다. 데이터들은 전체 단백질 양으로 정규화하고 폐 단백질 mg 당 사이토킨 pg으로 나타내었다.

<296> LACK-감작 및 PBS-부하 마우스(도 7에서 "대조)의 폐에서 IL-4, IL-13, 및 IL-5은 검출 한계 미만으로 나타난 반면, LACK 부하된 경우 이들 사이토킨의 양은 급격하게 증가되었다(도 7의 "천식" 참조). 반면 OM-197-MP-AC을 처치한 LACK-감작 및 부하 마우스의 폐에는 미처치 마우스보다 5 배 더 적은 IL-4 (p=0.0003,) 5 배 더 적은 IL-5 (p=0.0003); 및 3.5 배 적은 IL-13 (p=0.003)을 함유하였다 ( 도 7의 "OM-197" 참조).

<297> IL-4, IL-5, 및 IL-13이외, 다른 사이토킨들을 CBA 어레이 비드 및 FACSarray를 사용하는 멀티프렉스 분석으로 정량하였다. 그 중 중요한 결과는 하기와 같다. IFN-ɣ 또한 LACK-감작 및 부하 마우스의 경우 LACK-감작 및 PBS-부하 마우스에 비하여 폐에서 상향 조절되는 것으로 나타났다. OM-197-MP-AC-처치 마우스의 경우 미처치 마우스에 비해 IFN-ɣ가 폐에서 2 배 더 적은 량으로 존재했다. KC는 인간 IL-8 또는 CXCL8의 기능성 동종 케모카인이며, 중성구 및 호산구 모두에서 발현되는 CXCR2과 결합한다. 실제로 KC는 과립구를 염증 조직내로 모이게 한다. KC는 LACK-감작 및 PBS-부하 마우스에서 매우 적은 양으로 존재하는 반면, LACK 에어로졸 부하에 의해 그 발현이 매우 급격하게 상승하였다. 폐에서 생성된 KC의 양은 OM-197-MP-AC의 처치에 의해 반으로 감소하였다.

<298> 전염증성 사이토킨, IL-6가 LACK-감작 및 PBS-부하 마우스의 폐에서 발견되었으며, LACK 에어로졸 부하에 의해 약간 증가하였다. OM-197-MP-AC-처치 마우스는 비처치 마우스에 비해 폐에서 1.5-배 더 적은 IL-6를 나타내었다. 케모카인 MCP-1의 경우 LACK-감작 및 PBS-부하 마우스의 폐에서 발현되는 것으로 밝혀졌으며, LACK 에어로졸 부하에 의해 약간 상향 조절되었다. OM-197-MP-AC 처치된 마우스의 폐에는 미처치 동물에 비하여 1.8

배 더 적은 양의 MCP-1가 존재하였다.

<299> 처치 및 미처치 마우스의 폐 내 TNF-α의 양은 서로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

<300> IL-9은 어떠한 샘플에서도 검출되지 않았다.

<301> 상기 모든 데이터들은 OM-197-MP-AC의 예방적 투여가 알레르기성 기도 염증 및 AHR을 일으키는데 불가결한 Th2 사이토킨들을 강력하게 감소시킬 뿐 아니라, 폐 염증 및 호산구와 같은 염증성 효과세포를 소집하는데 기여하는 기타 사이토킨이나 케모카인들을 감소시키는 것을 명백히 보여준다.

<302> 실시예 8a에 대한 결론:

<303> 이 실험은 알레르기성 천식의 발병에 있어서, 본 발명의 분자 OM-197-MP-AC의 예방적 효과를 입증하였다. 감작 단계 바로전에 OM-197-MP-AC를 처치함으로써, AHR의 발병을 억제시킬 수 있고, BAL 호산구를 매우 강하게 감소시킬 수 있다. 또한 OM-197-MP-AC 처치된 마우스의 혈청내 전체 IgE 양도 현저히 감소하였다.

<304> 이들 데이타들은 또한 OM-197-MP-AC 처치가 주로 천식에 관련된 사이토킨 및 기타 염증성 사이토킨의 분비를 감소시킴을 보여주었다. 다른 가능한 기전으로서 OM-197-MP-AC가 Th2 경로 및 후속하는 기도 염증을 조절하는 특정 면역억제 반응을 유도할 수 있다.

<305> 파트 b) 천식에 대한 "치료적" 효과

<306> 프로토콜:

<307> 전술한 프로토콜(파트 a)와 주요 차이점은 하기와 같다:

<308> - 마우스들에 OM-197-MP-AC를 단지 15, 17 및 19일째 되는 날 (즉 제2 감작 1주후)에 1 mg/Kg (마우스당 20 ㎍)의 용량으로 복강 주사하였다.

<309> - FACSArray를 사용한 멀티플렉스 분석으로 측정된 폐 사이토킨은 IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ, 및 IL-10이다.

<310> 결과:

<311> BAL 내 전체 세포수 및 호산구 수:

<312> 마지막 에어로졸 처치일 2일 후에 마우스들을 치사하고 BAL 세포들을 수거하였다. 예상한대로, 미처치 LACK-감작 마우스들은 LACK 부하에 의해 BAL 내로 다량의 세포 유입을 나타내었다(PBS-부하 마우스들에 비해 20배 더 많은 세포수를 나타냄) (도 8). 매우 흥미롭게도 BAL 세포 동원은 OM-197-MP-AC의 치료적 투여에 의해 미처치 마우스들에 비해 90% 감소하였으며($p < 0.01$)(도 9) (Figure 9), 호산구의 수도 40-45배 더 적었다.

<313> 결론:

<314> OM-197-MP-AC은 치료적으로 3번 투여되었으며, 이로써 폐 세포 유출 및 BAL 내 호산구를 급격하게 감소시킬 수 있었다.

<315> 폐 사이토킨의 측정

<316> OM-197-MP-AC의 치료적 처치에 의해 기도 호산구가 급격하게 감소되었기 때문에, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 및 IFN-γ의 폐 함량을 측정하였다 (도 10). 실제 미처치된 마우스에 비교하여, 처치된 마우스의 폐에서 Th2-사이토킨들: IL-4, IL-5 및 IL-13의 함량은 매우 감소하였다. OM-197-MP-AC 처치에 의해 IL-4 수준은 90%, IL-13은 85%, 및 IL-5은 70% 감소되었다($p<0.00005$ 내지 0.005).

<317> 결론:

<318> 명백하게 OM-197-MP-AC을 단지 세번 치료적으로 투여하는 것 만으로도 Th2 사이토킨의 수준을 감소시킬 수 있었다. 모든 마우스에서 IFN-γ 수준이 여전히 낮고(1.5 내지 3 pg / ml), 처치 마우스에서 감소 되는 것에 비추어, 이는 Th1 사이토킨으로의 시프트에 기인되는 것이 아닌 것으로 판단되었다. Th2 이면서 면역억제성 사이토킨인 IL-10의 양도 낮았으며, 처치에 의해 그다지 증가하지 않았다.

<319> IgE 수준의 측정:

<320> OM-197-MP-AC의 치료적 처치 후 마우스들의 면역 상태를 규명하기 위하여, 처치 마우스 및 미처치 마우스의 혈청내 LACK-특이적 IgE 수준을 ELISA로 분석하였다. LACK 에어로졸에 노출시 LACK-특이적 IgE 수준은 7배 증가하였으나, OM-197-MP-AC-처치 마우스의 경우 비처치 LACK 부하 마우스에 비하여 2배 더 적은 LACK-특이적 IgE 혈

장 수준을 나타내었다($p<0.05$).

<321> 결론:

<322> OM-197-MP-AC을 치료적으로 처치할 경우 명백하게 혈장 LACK-특이적 IgE 수준을 감소시켰다.

<323> 실시예 8b에 대한 결론

<324> 본 발명의 산물, OM-197-MP-AC은 치료적으로 처치하는 경우 호산구 수준, IL-4, IL-5, 및 IL-13와 같은 Th2 사이토킨의 수준, 및 알레르겐-특이적 IgE의 수준을 감소시킴이 입증되었다.

<325> 실시예 8의 결론

<326> 전술한 바와 같이 수 많은 천식-관련 표지에 대한 영향에 의해 판단해 볼 때, OM-197-MP-AC은 명백하게 인 비보 천식 모델에서 예방적으로 그리고 치료적으로 활성을 나타내었다.

<327> *실시예 9*

<328> 천식 쥐 모델에서 다른 투여경로로 처치된 OM-197-MP-AC의 효과

<329> 상기 실시예 8의 결과는 OM-197-MP-AC가 복강 루트로 투여되었을 때, 쥐의 LACK 천식 모델에서 알레르기 반응을 예방하는데 효과적임을 보여준다. 따라서 이 모델에서 인간에 사용하기에 더욱 적합한 투여 경로들(경비(intranasal), 경위(intragastric), 피하(subcutaneous))에 있어서도 효과적인지 조사하였다.

<330> 프로토콜:

<331> 43마리의 6주령 암컷 BALB/c ByJ 마우스들을 Centre d'Elevage Janvier (CERJ, Le Genest-St-Isle, France)에서 구매하였다. 모든 마우스들을 2 mg의 Alum 내에 침전한 10㎍ LACK 단백질(PerBio Science France SAS, Brebieres, France)을 제1일 및 8일에 2번 복강 주사하여 감작시켰다(Julia 등., 2002).

<332> OM-197-MP-AC는 0일부터 12일까지 하기 기재된 바와 같이 처치하였다. 제16일부터 제20일 까지 모든 마우스들에 하기에 기재한 바와 같이 LACK (0.15%) 용액 또는 PBS를 부하(chanllenge)하였다.

<333> 실험군은 하기와 같다:

<334> - 그룹 A: 미처치, LACK-감작 및 PBS-부하 마우스 (3 마리)

<335> - 그룹 B: 미처치, LACK-감작 및 부하 마우스(7마리)

<336> - 그룹 C: OM-197-MP-AC-처치(복강), LACK-감작 및 부하 마우스(5마리)

<337> - 그룹 D: OM-197-MP-AC-처치(경위), LACK-감작 및 부하 마우스(7마리)

<338> - 그룹 E: OM-197-MP-AC-처치(피하), LACK-감작 및 부하 마우스(7마리)

<339> - 그룹 F: OM-197-MP-AC-처치(경비), LACK-감작 및 부하 마우스(7마리)

<340> - 그룹 G: OM-197-MP-AC-처치(에어로솔), LACK-감작 및 부하 마우스(7마리)

<341> 그룹 C, D, E, 및 G의 마우스들은 제 0, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11일에 처치하였다. 반면 그룹 F의 마우스 (경비 루트)들은 오직 제 0, 4, 7, 및 11일에 처치하였다.그룹 C 및 E의 마우스는 각각 복강 및 피하로 1 mg/Kg (마우스당 20 ㎍)의 OM-197-MP-AC를 처치하였다. 그룹 D의 마우스는 위내로 50 mg/Kg (마우스당 1mg)의 OM-197-MP-AC를 처치하였다. 그룹 F의 마우스는 20㎍의 OM-197-MP-AC을 20 ㎕의 부피로 하여 (OM-197-MP-AC를 2 mg/ml의 농도로, 각 콧구멍마다 10㎕씩 투여.) 그룹 G의 마우스에는 0.2% OM-197-MP-AC 에어로졸 용액(2 mg/ml)을 10분간 처치하였다.

<342> 시약:

<343> - LACK 재조합 단백질은 Mougneau 등, 1995에 기재된 대로, 대장균에서 생산하여 정제하였다.

<344> - OM-197-MP-AC는 OM PHARMA에서 공급받았으며, 배치#050323의 농도 2.2 mg/ml, 및 배치 #050322의 농도 2.17 mg/ml을 경구 및 기타 다른 모든 투여에 각각 사용하였다.

<345> - 비오틴 결합 항-IgE (R35-118)는 BD 바이오사이언스에서 구매하였다 (Le Pont de Claix, France). 항-IgE EM-95 mAbs는 DNAX (Palo Alto, CA, USA)로부터 받았다.

<346> - 경비처치는 이소플루란(Aerrane, Baxter)을 사용하여 쥐들을 가볍게 마취한 후 시행하였다.

<347> 항체역가:

<348> 마지막 에어로졸 처치 2일 후 심장 펑쳐에 의해 모든 마우스들을 출혈치사하였다. 전체 IgE는 ELISA로 정량하였으며, 래트 EM-95 항-IgE mAbs를 코팅 항체로 사용하고, 비오틴 결합 래트 항-IgE mAbs을 이차 항체로 사용하였다(Julia et al., 2002에 개시된 바에 따라).

<349> 기관지폐포세척(BAL) 세포의 분석(호산구 퍼센트):

<350> 각 마우스들을 출혈시키고, 기관(trachea)에 카눌라를 삽입하였다. 폐는 데운 PBS 1ml로 3차례 세척하였다. 세포들을 PBS로 세척하고 300㎕로 재현탁한 후, Burker-Turk 챔버로 계수하였다. 분별 BAL 세포계수를 위해, 시토스핀제제를 만들고, 라이트/김사(Wright/Giemsa)염색하였다.

<351> 결과:

<352> a) 각 중성구, 호산구, 림포사이트, 및 다른 단핵구 세포 수를 현미경 검사로 측정하고, 테스트된 각 투여 루트에 대한 결과를 도 11에 도시하였다.

<353> 실시예 8에서 보고한 바와 같이, OM-197-MP-AC가 복강 투여된 쥐들은 BAL 내 호산구의 퍼센트 및 수 모두 감소되었다. 그러나, OM-197-MP-AC 가 피하 또는 경구 투여된 마우스의 BAL 세포 함량은 미처치 마우스와 비교하여 차이가 없었다. 대조적으로, OM-197-MP-AC이 경비투여된 마우스의 BAL 내에는 호산구 빈도(미도시) 및 수(도 11) 모두 반으로 감소하였다. 또한 OM-197-MP-AC이 에어로졸 투여된 마우스의 경우, 경비 투여된 마우스들과 동일한 경향을 나타내었다.

<354> 결론

<355> OM-197-MP-AC는 최소한 복강 및 경비 루트로 투여되는 경우, 알레르겐에 감작된 마우스의 기관지폐포세척 내 호산구의 수를 매우 효과적으로 감소시킨다.

<356> b) 이후, 혈장 IgE수준을 상기 방법 부분에서 기술한 대로 측정하였다. 전 데이타(실시예 8)와 일치하게, OM-197-MP-AC를 복강 투여한 마우스는 전체 IgE의 양이 경감되었다(도 12). 또한 OM-197-MP-AC를 경비 투여한 마우스 또한 전체 혈청 IgE의 역가가 경감된 것으로 나타났다. 반면, 경구, 피하 또는 에어로솔로 처치한 마우스의 경우 미처치 마우스와 유사한 전체 혈청 IgE를 나타내었다.

<357> 결론

<358> 본 천식모델에서 복강 또는 경비 루트로 투여된 OM-197-MP-AC는 전체 IgE를 상당히 감소시킨다.

<359> *실시예 10*

<360> 쥐 천식 모델에서 포뮬레이션된 OM-197-MP-AC의 경구 루트 투여에 의한 증강된 효과

<361> 상기 실시예 9의 결과는 포뮬레이션되지 않는 상태의 OM-197-MP-AC는 쥐 천식 LACK 모델에서, 경구 루트로 투여되었을 때, 알레르기 반응의 예방에 다소 비효과적임을 보여주었다. 따라서 이 모델에서 경구 루트에 의한 OM-197-MP-AC의 활성을 증가시킬 수 있는 포뮬레이션을 조사하였다. 이 연구에서, 트리아실화 OM PHARMA 화합물 OM-197-MP-AC는 위-장관 저항성 포뮬레이션(OM-197-MP-AC/루트롤®F 127(폴록사머 407이라고도 함))으로 투여되는 경우 마우스가 알레르기성 기도 염증을 일으키지 않도록 보호할 수 있었다.

<362> 프로토콜:

<363> OM-197-MP-AC/루트롤®F 127 포뮬레이션은 농도 4.35 mg/ml의 OM-197-MP-AC 용액 12.875 ml과 농도 50 mg/ml의 루트롤®F 127 5.6 mL을 혼합함으로써 제조하였다. 투여 부피는 330 ㎕이었다.

<364> 시약 및 장치

<365> - 식염수는 대조 에어로졸로서 투여되었다.

<366> - 재조합 LACK 단백질은 대장균에서 생산되고, NiNTA 친화 칼럼 상에서 정제되었다.

<367> - 알루미늄하이드록사이드(Alum)은 Pierce에서 구매하였다.

<368> - 세포원심분리는 시토스핀 4(Thermo-Shandon, Cheshire, U.K.)를 사용하였으며, 시토슬라이드는 Thermo-Shandon에서 구매하고, 라이트 및 김사 염색은 Sigma에서 구입하였다.

<369> - 에어로졸은 ultra-son nebulizer Ultramed (Medicalia, Forenze, Italy)를 사용하여 투여하였다.

<370> -CBA 비드 어레이 IL-4는 BD 바이오사이언스에서 구입하였다.

<371> - 유세포분석기 FACSarray는 BD 바이오사이언스에서 구입하였다.

<372> 동물:

<373> 6주령 암컷 BALB/c ByJ 마우스들을 Centre d'Elevage Janvier (CERJ, Le Genest-St-Isle, France)에서 구매하고, 동물 사육시설내 특히 무균상태에서 보관하였다. 세이프사(Augy, France) 제공의 표준 식단으로 사육하였다.

<374> 프로토콜:

<375> 15 마리의 BALB/c 마우스들(실시예 8 및 9에서 보인바와 같은 대조 그룹 A 및 B의 마우스 포함)을 사용하였다.

<376> A: 미처치 LACK-감작 및 식염수-부하 마우스(3 마리)

<377> B: 미처치 LACK-감작 및 부하 마우스(6 마리)

<378> **예방적 처치**

<379> F: OM-197-MP-AC (경구)-처치 LACK-감작 및 부하 마우스(6 마리)

<380> 그룹 F의 마우스는 상기 포뮬레이션된 OM 197 MP AC 1 mg을 제 0, 2, 3, 4, 7, 9, 10 11, 및 12일에 경구 투여하였다.

<381> 제1일 및 8일, LACK/Alum을 복강 주사하여 마우스들을 감작하였다. 16일 내지 20일, 그룹A를 제외한 모든 마우스들에 LACK(0.15%)을 에어로졸하여 부하하였다. 그룹 A는 대신 식염수(NaCl 0.9%)를 40분간 투여하였다.

<382> 22일째 되는 날, 모든 마우스를 치사시키고, 이로부터 BAL 및 기관지 주위 림프절을 제거한 폐를 수거하였다. 시토스핀 및 라이트/김사 염색후 현미경 검사하여 BAL 세포를 계수하고 및 세포 함량을 측정하였다. 또한 수거된 각 그룹의 폐를 액체 질소에 냉동한 후 사이토킨 함량 분석에 사용하였다. 사이토킨 함량 측정을 위해, LACK-감작 및 PBS-부하 마우스(그룹 A), LACK-감작 및 부하 마우스(그룹 B), 및 포뮬레이션된 OM-197-MP-AC-처치된 wt 마우스(그룹 F)의 폐로부터 단백질 추출물을 제조하였다. IL-4 양은 FACSArray을 사용하여 멀티플렉스 분석에 의해 측정하였다.

<383> 결과:

<384> 각 중성구, 호산구, 림포사이트 및 기타 단핵구 세포의 수들을 현미경 검사에 의해 측정하고, 이를 도 13에 나타내었다.

<385> 실시예 8에서 보인 OM-197-MP-AC(포뮬레이션 되지 않음)을 경구 처치한 마우스의 BAL 세포 함량 결과(및 도 11)와 상반되게, 루트롤과 포뮬레이션된 OM-197-MP-AC을 경구 투여한 쥐의 BAL 내에서는 중성구, 호산구, 림포사이트 및 기타 다른 단핵구 세포수가 반으로 감소하였다($p<0.05$)(도 13).

<386> 또한 처치 및 미처치 마우스의 폐에서의 IL-4 함량을 분석하였다. 그 결과, PBS-부하 마우스의 경우 폐 IL-4 함량은 매우 낮아 거의 검출이 불가능한 정도였으나, LACK-부하 미처치 마우스의 경우 IL-4 함량이 20배 증가하였다. 포뮬레이션된 OM-197-MP-AC를 경구투여한 결과 폐 IL-4 양은 75 %감소하였다($p<0.01$) (도 14).

<387> 결론:

<388> 적절하게 포뮬레이션되는 경우, OM-197-MP-AC 경구투여에 의해 알레르겐에 감작된 마우스의 기관지폐포세척내 호산구의 수는 상당한 정도로 감소되었다. 이러한 감소는 IL-4의 감소와 상관관계가 있었다.

<389> *실시예 11*

<390> 비비만성 당뇨(NOD)마우스에 대한 OM-197-MP-AC 의 효과.

<391> 상기에서 OM-197-MP-AC의 쥐 천식 모델에서의 인 비보 효능에 대한 예를 제공하였다. 본 실시예는 OM-197-MP-AC가 다른 염증성 병리: 당뇨병에 대해서도 활성을 나타내는 것을 보여준다.

<392> 프로토콜:

<393> 이상에서 본 발명의 OM-197-MP-AC 및 다른 트리아실화 분자들이 천식 동물에서 기도 염증을 감소시킴을 보였다. 본 연구에서, OM-197-MP-AC가 다른 쥐 염증 질환 모델: NOD 당뇨 모델(비비만성 당뇨)에서도 보호효과를 나타내는지 여부를 조사하였다.

<394> 10마리의 6주령 NOD 마우스 그룹에 10주 동안 0.01, 0.1, 및 1 mg/kg of OM-197-MP-AC을 투여하였다. 6마리의 암컷 MOD 마우스 그룹에 200 ㎕ PBS을 일주일에 3회 복강 투여하고 이를 대조그룹으로 하였다.

<395> 본 실험에서, 상기 처치는 마우스들이 16주령이 될 때까지 계속되었다. 이 시점은 대조 동물들이 명백한 당뇨병을 나타내는 시기이다.

<396> 당뇨 유병율에 대한 결과를 대조 동물에서 얻어진 것과 비교하였다. 당뇨 여부는 일주일에 한번씩 테스트 스트립((Glukotest® Roche, France)을 사용하여 뇨중 당을 테스트하여 체크하고, 당뇨병이 발현된 경우 일주일에 2번 시행하였다. 당뇨는 테스트 스트립(Glucotrend®)으로 당혈증(> 3mg/ml)을 평가하여 확증하였다.

<397> 상기 상이한 실험군에서의 당뇨발병율을 Kaplan-Meier 방법, 즉 비파라미터누적생존플롯을 사용하여 도시하였다(도 15). 커브간 통계적 비교는 상관 *x2* 값을 제공하는 logrank (Mantel-Cox) 테스트를 사용하여 수행하였다. OM-197-MP-AC는 1 mg/kg의 용량에서 매우 활성적이었으며 (p = 0.0321), 0.1 mg/kg의 용량에서 긍정적인 경향을 나타내었다 (p=0.0543).

<398> OM-197-MP-AC를 0.3 mg/kg의 용량으로 사용한 다른 실험에서, 27주에 0.0362의 유의성을 나타내는 p 값을 얻었으며, 27주에는, 82%의 대조 그룹 동물들이 당뇨를 나타낸 반면, OM-197-MP-AC 처치 그룹(0.3 mg/kg) 의 경우 단지 27%만이 당뇨를 나타내었다.

<399> *실시예 13*

<400> 독성 검사: LAL 내독소성

<401> 내독소성(Endotoxicity)은 리물루스 아메보사이트 용해물 크로마제닉 테스트(Limulus Amoebocyte Lysate chromogenic test ;Chromogenic - LAL of Bio-Whittaker, kit n° 50-650U)를 사용하여 OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP에 대해 측정하였다.

<402> 프로토콜:

<403> 본 테스트는 리포폴리사카라이드(LPS) 또는 유사한 구조의 산물에 의한 LAL 내 존재하는 효소 캐스캐이드에 의한 활성화에 기초한 것이다. 이 효소 활성화는 펩타이드에 결합된 크로모겐의 프로테아제에 의한 분해에 의해 입증된다. 효소 반응은 37℃에서 수행되며, 시간에 따른 크로모겐의 형성을 405 nm에서 측정한다. 0.2 유니트에 도달하는데 필요한 시간을 기록하고, 내독소활성을 LPS 표준(표준 곡선)에 관련하여 산출한다. 결과는 대장균 LPS 표준화 제제를 기준으로 EU(내독소 단위)로 표시한다(1 EU는 0.08ng LPS 동등량이다).

<404> 결과:

<405> OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP 모두 크로모겐 LAL 분석에서 리물루스 활성을 거의 나타내지 않거나 나타내지 않았다.

<406> 결론:

<407> OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP는 LPS에 비해 매우 약한 내독소성을 보인다(최소한 $10^6$ 배 감소).

<408> *실시예 14*

<409> 독성: 토끼 발열성 시험

<410> 최종적으로 OM-197-MP-AC 및 OM-294-DP에 대해 토끼내에서 발열원성으로 작용할 가능성이 있는지 테스트하였다.

<411> 프로토콜:

<412> 3마리의 뉴질랜드 백토끼/그룹에 OM-197-MP-AC 또는 OM-294-DP을 다른 용량으로 정맥주사하였다(유럽 약전 2001, 방법 2.6.8에 따라).

<413> 제품: OM-197-MP-AC 0.0009, 0.009, 0.09, 0.9 mg/kg 및 OM-294-DP 0.001, 0.01, 0.1,및 1 mg/kg.

<414> 동물: 판독: 체온 상승

<415> 결과:

<416> OM-197-MP-AC는 테스트된 최고 용량(0.9 mg/kg)에서도 발열 역치에 도달하지 않았으며, OM-294-DP의 발열원성은 0.01 내지 0.1 mg/kg의 경우에만 도달되는 것으로 나타나, 양 화합물 모두 인 비보에서 발열원성이 아닌 것으로 간주되었다.

<417> *REFERENCES*

<418> - Byl, B., Libin, M., Bauer, J., Martin, O. R., De Wit, D., Davies, G., Goldman, M., and Willems, F. (2003). OM197-MP-AC induces the maturation of human dendritic cells and promotes a primary T cell response. Int Immunopharmacol 3, 417-425.

<419> - Julia, V., Hessel, E. M., Malherbe, L., Glaichenhaus, N., O'Garra, A., and Coffman, R. L. (2002). A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. Immunity 16, 271-283.

<420> - Mougneau, E., Altare, F., Wakil, A. E., Zheng, S., Copolla, T., Wang, Z.-E., Waldmann, R., Locksley, R., and Glaichenhaus, N. (1995). Expression cloning of a Leishmania major protective T cell antigen. Science 268, 563-566.

<421> - Veran, J., Mohty, M., Gaugler, B., Chiavaroli, C., and Olive, D. (2004). OM-197-MP-AC adjuvant properties: the in vitro maturation of normal and leukemic dendritic cells in a serum-free culture model. Immunobiology 209, 67-77.

## *도면의 간단한 설명*

<144> 도 1은 LPS (1 ㎍/ml) 단독 또는 먼저 표시된 농도(㎍/ml)의 OM-197-MP-AC (A) 또는 294-DP (B)를 90분간 투여하고, 이후 LPS(1 ㎍/ml)에 의해 추가적으로 20 시간 동안 자극시킨 쥐 DC에서의 IL-12(좌측 패널) 및 IL-10(우측 패널)의 분비를 도시한 것으로, 상등액을 DC 배양액에서 수거하고 IL-12 및 IL-10의 존재를 ELISA로 분석한 것이다.

<145> 도 2는 LPS (1 ㎍/ml) 단독 또는 먼저 표시된 농도(㎍/ml)의 294-DP (294) 또는 OM-197-MP-AC (197)을 90분간 투여하고, 이후 LPS(1 ㎍/ml)에 의해 추가적으로 20 시간 동안 자극시킨 쥐 DC에서의 TNF-α의 분비를 도시한 것으로, 상등액을 DC 배양액에서 수거하고 TNF-α의 존재를 ELISA로 분석한 것이다.

<146> 도 3은 4개의 테스트 화합물(OM-197-MP-AC, n=5; OM-197-MC-HD, n=5; OM-294-BA-MP, n=7; OM-197-MP-HD, n=3)의 용량증가가 다클론 활성화에 따른 인간 $CD4^+$ T 세포의 IFN-γ 및 IL-13 생산에 미치는 영향을 도시한 것으로, 각 결과는 독립적인 실험 n의 메디안(±p25/p75)로 표시되었으며, 미처치 세포(100%로 간주, 점선)에 대한 처치 세포의 증식 또는 사이토킨 생성 퍼센트(%)를 보여주며, 통계 분석은 비파라미터 비쌍 Mann-Whitney t 테스트(양측 검정; 2-tailed)를 사용하여 수행하였다.

<147> 도 4는 마지막 항원 부하 하루 후 흡입된 메타콜린의 농도 증가(6-25 mg/ml) 에 반응하여 전혈 혈량측정법(Emka)에 의해 측정된 AHR을 도시한 것으로, 동물들은 프로토콜 섹션에 기재된 대로 처치되었으며, 결과(평균 "증강 포즈 값" ±SEM)은 식염수-부하 마우스(음성 대조군, n=4), 미처치 LACK-부하 마우스(양성 대조군, n=8), 및 OM-197-MP-AC-처치 LACK 부하 마우스(n=8)에 대해 나타내었다.

<148> 도 5는 라이트/김사 염색한 사이토스핀 제제의 현미경 검사에 의해 분석한 기관지폐포 세척내 호산구 퍼센트를 도시한 것으로, 연구 대상 그룹은 도 4에서 사용된 그룹과 동일하며, 점선은 미처치 천식 동물에서 얻은 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

<149> 도 6은 프로토콜 섹션에 기재된 대로 마우스를 처치하고, 마지막 에어로졸 부하 하루 후 심장 펑쳐에 의해 마우스를 출혈치사한 후 전체 IgE을 래트 EM-95 항-IgE mAbs을 코팅 항체로 비오틴 결합 래트 항-IgE mAbs을 2차 항체로 하여 ELISA로 정량하며(Julia 등, 2002), 각 점은 단일 동물에 해당하며, 연구된 그룹은 도 4 및 도 5에서 사용된 그룹과 동일하다.

<150> 도 7은 LACK-감작 및 PBS-부하 wt 마우스 (대조), LACK-감작 및 부하 wt 마우스(천식), OM-197-MP-AC-처치 wt 마우스 (OM-197)의 좌측 폐에서 단백질 추출물(400 ㎕)을 얻고, IL-4, IL-5 및 IL-13 함량을 FACSArray을 사용한 멀티플렉스 분석에 의해 측정하고 그 결과를 pg / ml로 표시한 것으로, 점선은 미처치 천식 동물에서 얻어진 값을 그라프에 걸쳐 표시한 것이다.

<151> 도 8은 LACK-감작 및 PBS-부하 wt 마우스 (대조), LACK-감작 및 부하 wt 마우스(천식), OM-197-MP-AC-처치 wt 마우스 (OM-197)들을 테스트 그룹으로 하고, 각 마우스들을 방법 섹션에 기술한 바와 같이 치료적으로 3번 처치하고, 기관에 카뉼라를 삽입한 각 출혈치사된 마우스에서 세척(lavages)을 수행하고, 폐를 데운 PBS 1ml로 3차례 세척하고, 세포들을 PBS로 세척하고 300㎕로 재현탁한 후, Burker-Turk 챔버로 계수하며, 분별 BAL 세포계수를 위해, 시토스핀제제를 만들어 라이트/김사(Wright/Giemsa)염색하여, 현미경 검사에 의해 측정된 BAL 내 전체 세포수를 도시한 것이며, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

<152> 도 9는 라이트/김사 염색된 시토스핀 제제의 현미경 검사에 의해 분석된 BAL 내 호산구 퍼센트를 도시한 것으로, 마우스들은 방법 섹션에 기술한 대로 3번 치료적 처치되었고, 도 8에 설명된 바와 같이 BAL 에서 세포들을 수확하였으며, 각 그룹은 도 8에 사용된 것과 동일하며, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

<153> 도 10은 폐 사이토킨 함량을 분석하기 위해, 폐를 수거하고 이 중 좌폐를 사용하여, 각 좌폐 당 단백질 추출물 400㎕을 회수하고, FACSArray를 사용한 멀티플렉스 분석으로 각 사이토킨을 측정하여 그 결과를 pg / ml으로 나타낸 것으로, 각 (치료) 그룹은 도 8 및 9에서 사용된 그룹과 동일하며, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

<154> 도 11은 쥐 BAL 내의 호산구, 중성구 및 림포사이트의 수를 도시한 것으로, 세포들은 프로토콜 섹션에 기술한 바와 같이 수득하고 세척하였으며, 분별 BAL 세포 계수를 위해 시토스핀 제제를 만들고 라이트/김사로 염색하고, 각 슬라이드당 최소한 400 세포가 기록되었으며, 호산구, 중성구 및 림포사이트의 수는 현미경 검사로 측정하였고, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

<155> 도 12는 마지막 에어로졸 부하 2일 후 심장 펑쳐에 의해 출혈 취사된 쥐로부터 얻어진 혈청 내 알레르겐-특이적 IgE를 측정한 것으로, LACK-특이적 IgE는 ELISA로 측정되었고, 각 마우스마다 얻어진 결과(ng/ml)를 도시하고, 각 그룹 당 평균값은 바로 나타내었고, *는 $P<0.05$를 의미하며, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

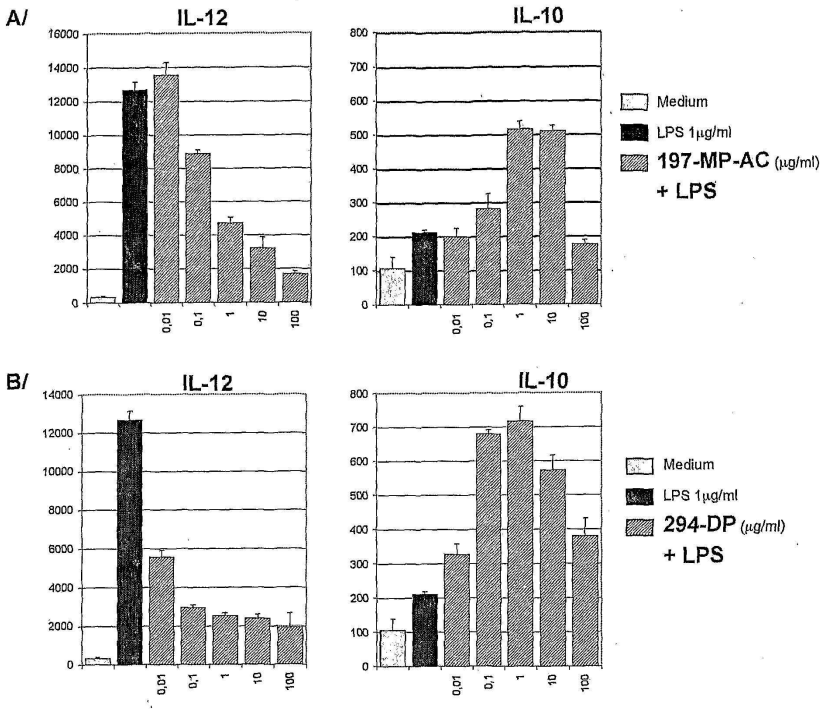
<156> 도 13은 쥐 BAL 내 호산구, 중성구, 및 림포사이트의 수를 도시한 것으로, 세포들은 프로토콜 섹션에 기술된 대로 얻고 세척하였으며, 분별 BAL 세포 계수를 위해, 시토스핀 제제를 만들어 라이트/감사 염색하였으며, 각 슬라이드당 최소한 400 세포가 기록되었으며, 호산구, 중성구 및 림포사이트, 및 다른 세포(마크로파지, 수지상 세포 및 폐세포)의 수는 현미경 검사로 측정하였고, 테스트된 3 그룹은 실시예 10의 프로토콜 섹션에 기술된 것이며, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

<157> 도 14는 폐 사이토킨 함량을 분석하기 위해, 폐를 수거하고 이 중 좌폐를 사용하여, 각 좌폐 당 단백질 추출물 400㎕을 회수하여, FACSArray를 사용한 멀티플렉스 분석으로 IL-4을 측정하고 그 결과를 pg / ml으로 나타낸 것으로, 테스트된 3 그룹은 실시예 10의 프로토콜 섹션에 기술된 것이며, 점선은 비처치 천식 마우스에서 얻어진 값을 그라프 전체에 걸쳐 표시한 것이다.

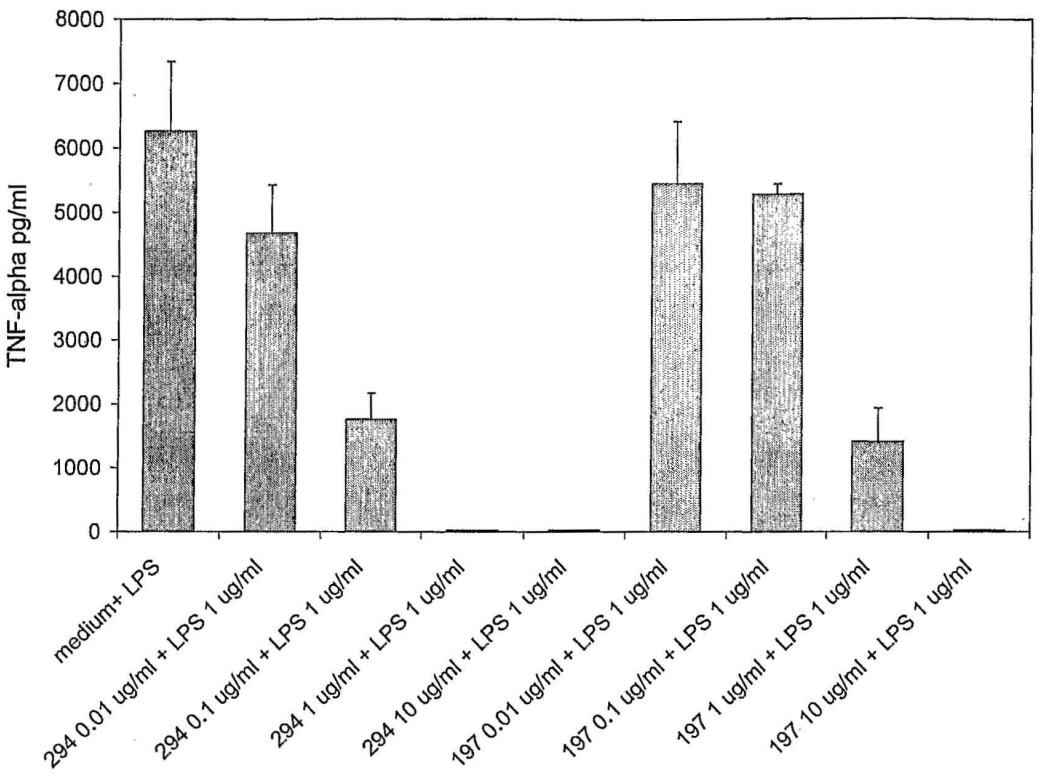
<158> 도 15는 NOD 마우스에서 당뇨병의 발현을 나타낸 것으로, 마우스들은 PBS(6 마리) 또는 3개의 표시된 용량의 OM-197-MP-AC (10 마리로 된 3 그룹)을 복강 처치하였으며, 당뇨 여부는 일주일에 한번씩 뇨중 당을 테스트(Glukotest®)하여 체크하고, 당뇨병이 발현된 경우 일주일에 2번 시행하였으며, 테스트 스트립(Glucotrend®)으로 당혈증(> 3mg/ml)을 평가하여 확증하였으며, 상이한 실험 그룹에서의 당뇨발병율은 Kaplan-Meier 방법, 즉 비파라미터누적생존플롯을 사용하여 도시하였으며, 커브간 통계적 비교는 상관 x2 값을 제공하는 logrank (Mantel-Cox) 테스트를 사용하여 수행하였다: OM-197-MP-AC는 1 mg/kg $p = 0.0321$; 0.1 mg/kg $p=0.0543$.

## 도면

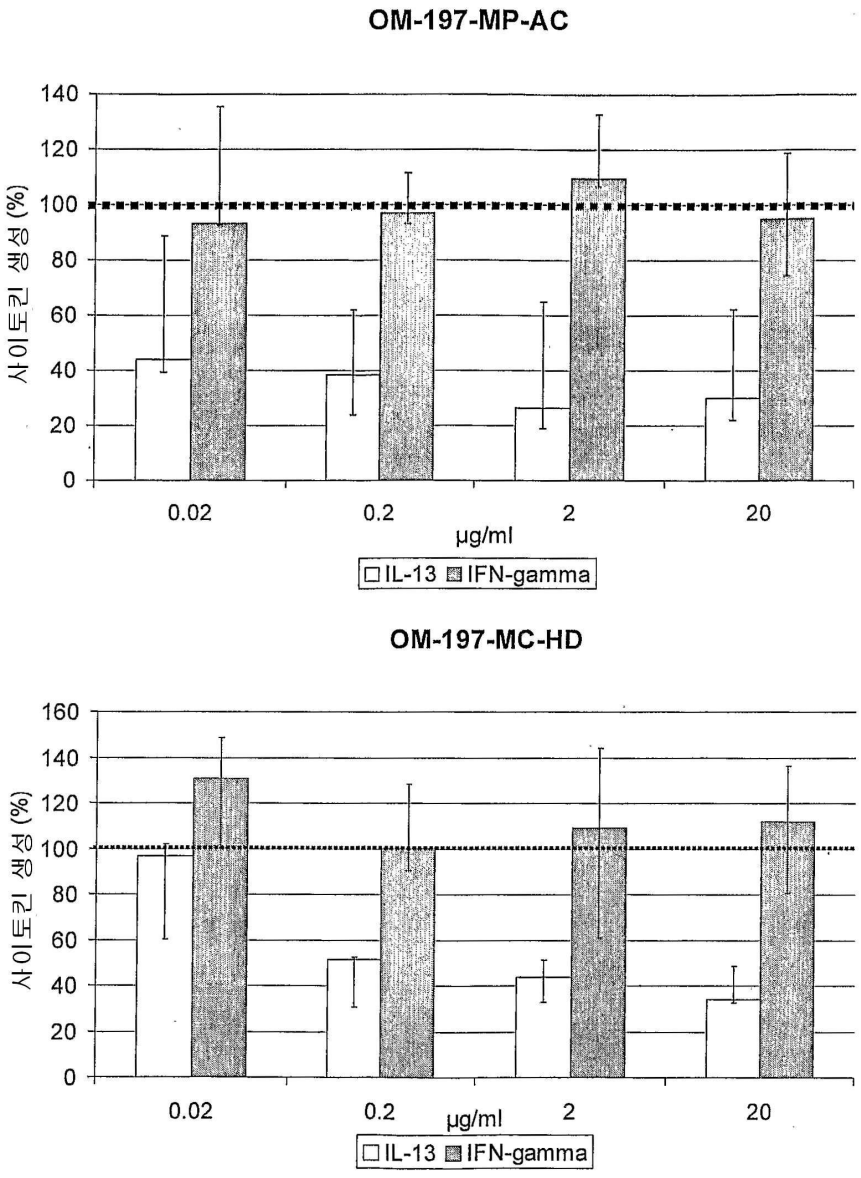
### 도면1


A/
IL-12
IL-10
Medium
LPS 1μg/ml
197-MP-AC (μg/ml)
+ LPS
B/
IL-12
IL-10
Medium
LPS 1μg/ml
294-DP (μg/ml)
+ LPS

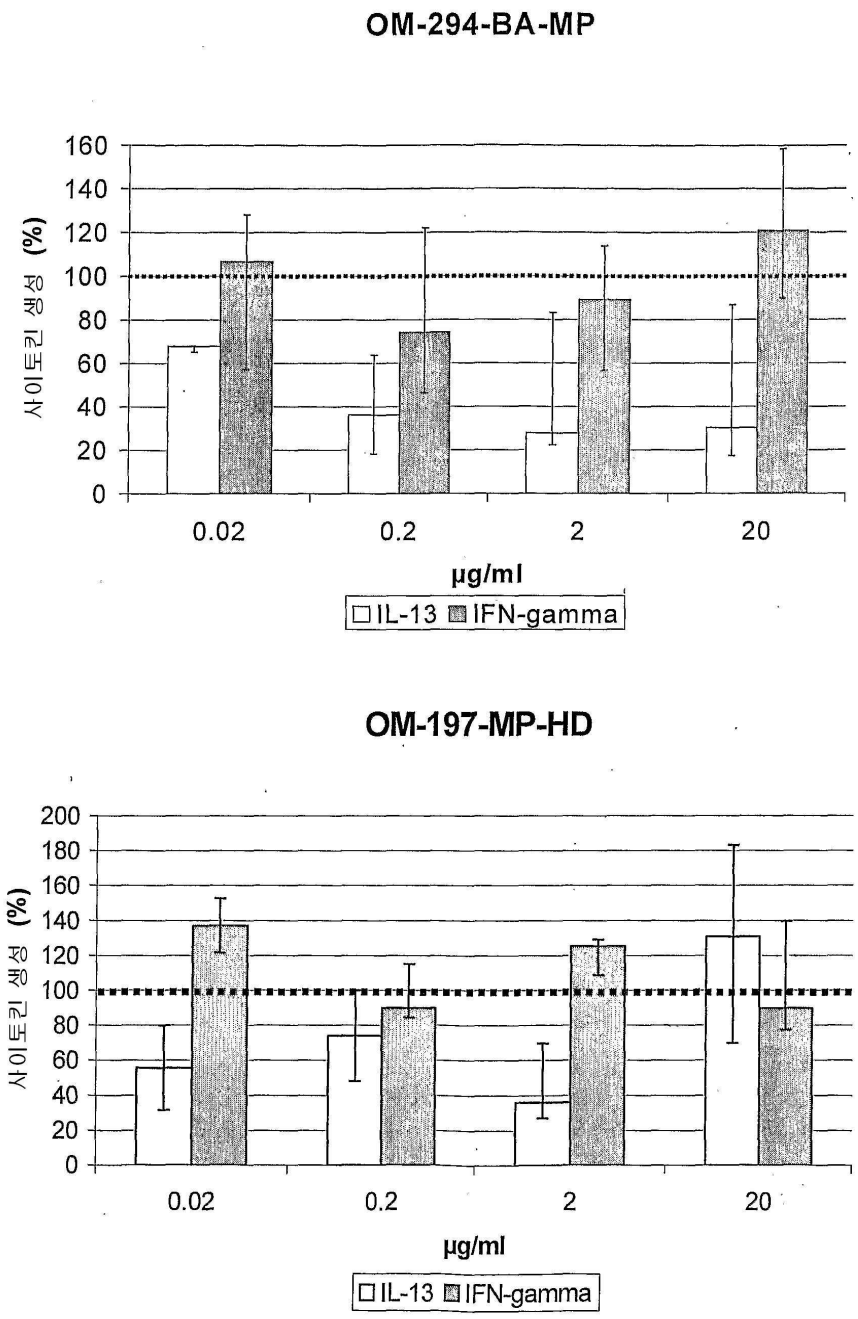
### 도면2


TNF-alpha pg/ml
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
medium+ LPS
294 0.01 ug/ml + LPS 1 ug/ml
294 0.1 ug/ml + LPS 1 ug/ml
294 1 ug/ml + LPS 1 ug/ml
294 10 ug/ml + LPS 1 ug/ml
197 0.01 ug/ml + LPS 1 ug/ml
197 0.1 ug/ml + LPS 1 ug/ml
197 1 ug/ml + LPS 1 ug/ml
197 10 ug/ml + LPS 1 ug/ml

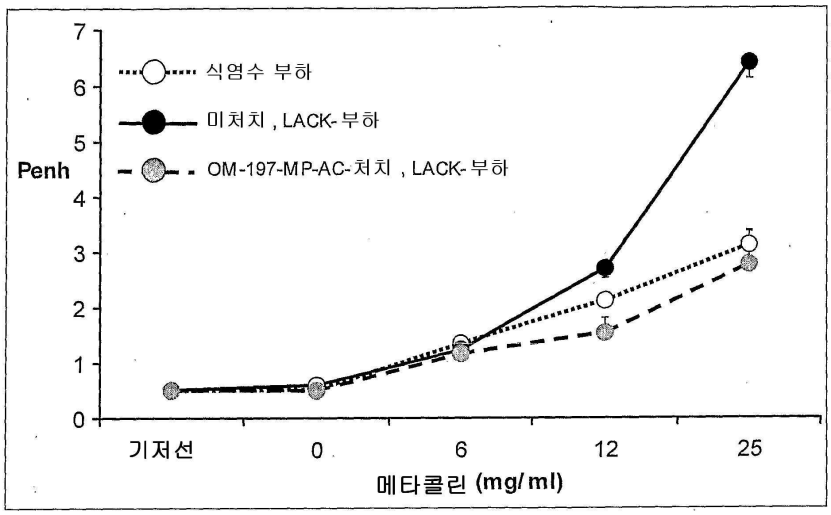
도면3a


OM-197-MP-AC
사이토킨 생성 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0.02
0.2
2
20
μg/ml
IL-13
IFN-gamma
OM-197-MC-HD
사이토킨 생성 (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0.02
0.2
μg/ml
2
20
IL-13
IFN-gamma

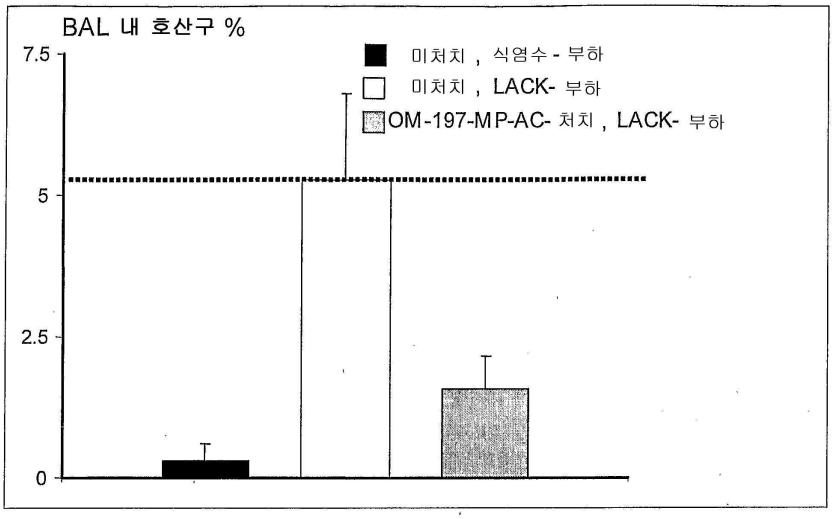
도면3b


OM-294-BA-MP
160
140
120
100
80
60
40
20
0
사이토킨 생성 (%)
0.02
0.2
2
20
μg/ml
IL-13
IFN-gamma
OM-197-MP-HD
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
사이토킨 생성 (%)
0.02
0.2
2
20
μg/ml
IL-13
IFN-gamma

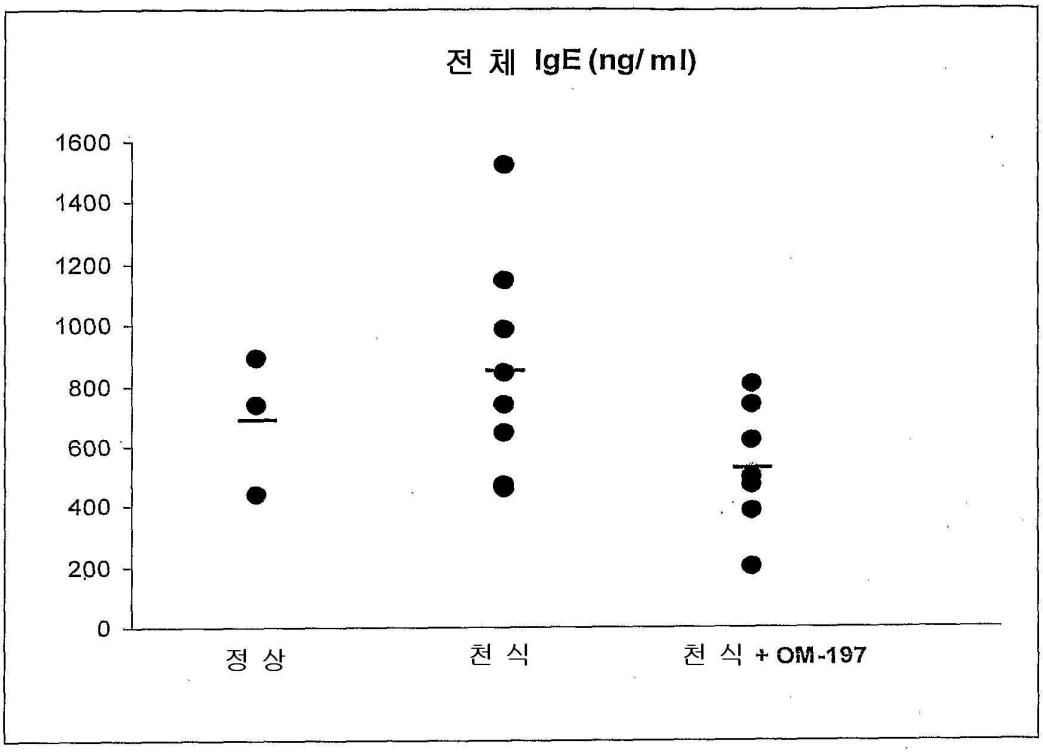
도면4


식염수 부하
미처치, LACK-부하
OM-197-MP-AC-처치, LACK-부하
Penh
0
1
2
3
4
5
6
7
기저선
0
6
12
25
메타콜린 (mg/ml)

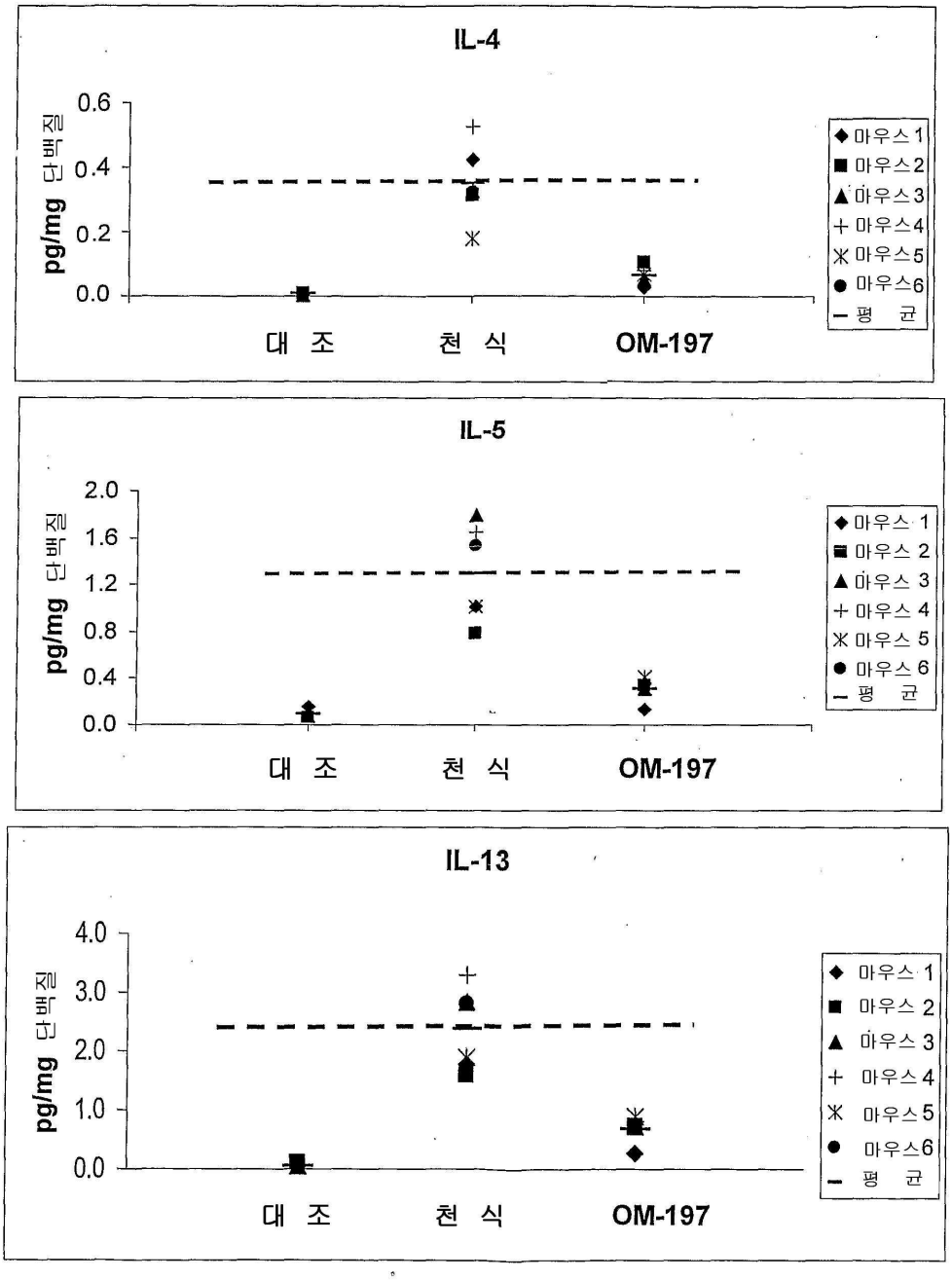
도면5


BAL 내 호산구 %
미처치, 식염수-부하
미처치, LACK-부하
OM-197-MP-AC-처치, LACK-부하
7.5
5
2.5
0

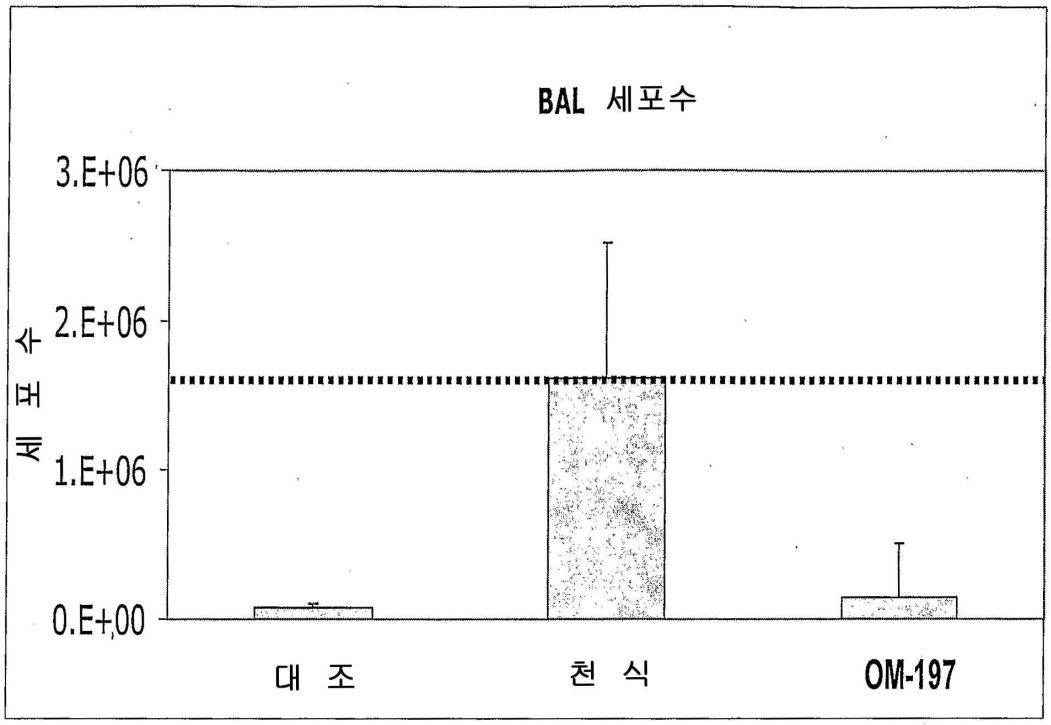
도면6



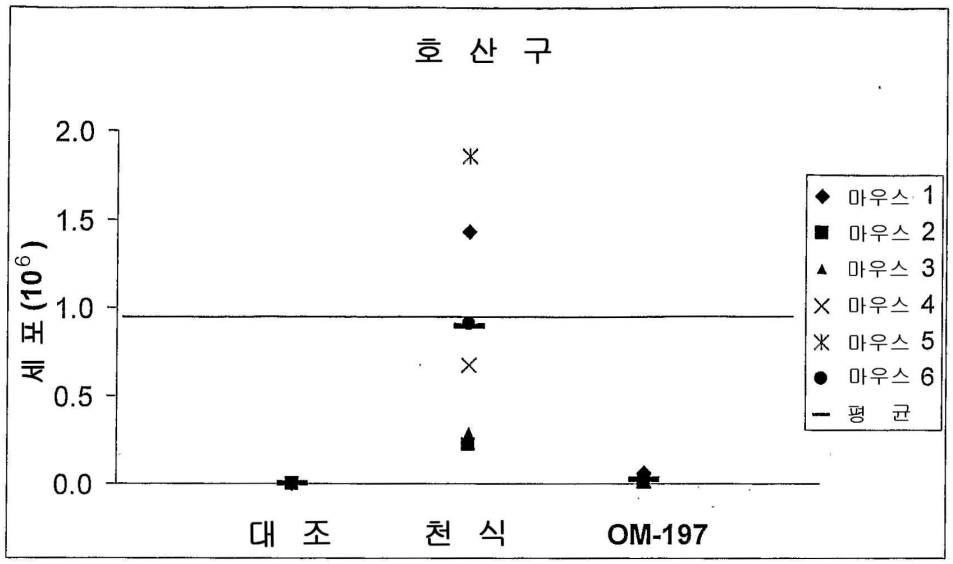
도면7


IL-4
pg/mg 단백질
0.6
0.4
0.2
0.0
대 조
천 식
OM-197
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균
IL-5
pg/mg 단백질
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
대 조
천 식
OM-197
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균
IL-13
pg/mg 단백질
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
대 조
천 식
OM-197
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균

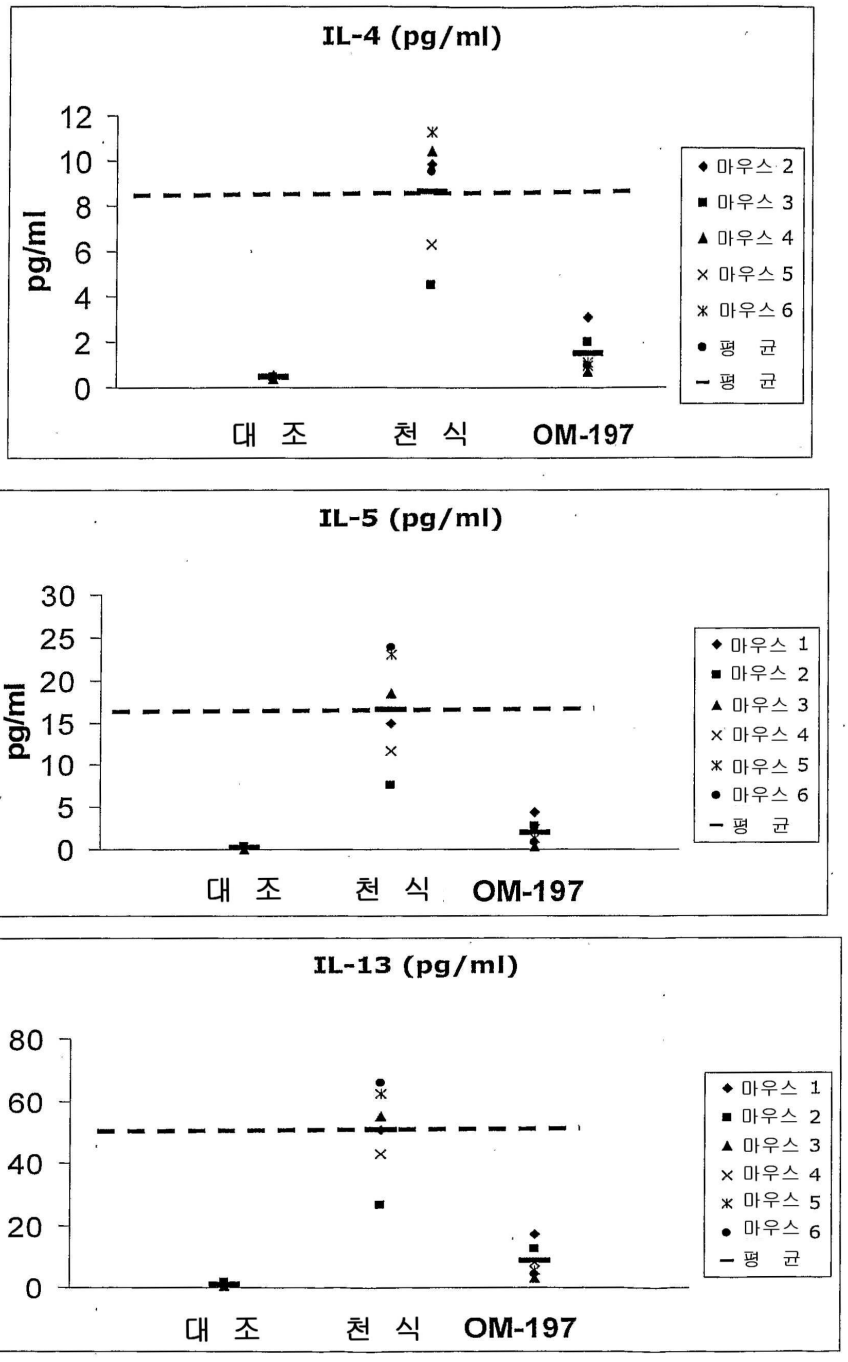
도면8


BAL 세포수
3.E+06
2.E+06
1.E+06
0.E+00
세포수
대 조
천 식
OM-197

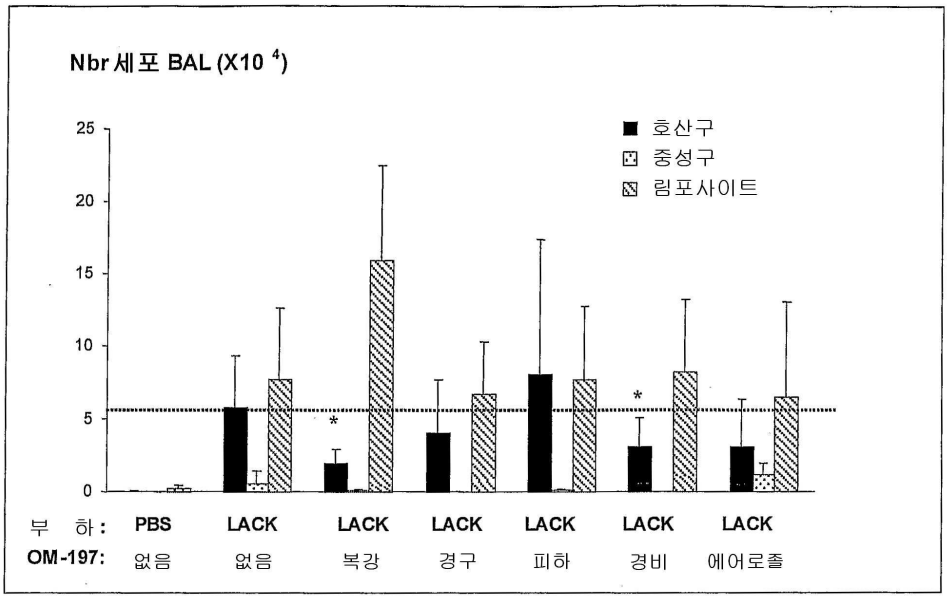
도면9


호 산 구
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
세포 ($10^6$)
대 조
천 식
OM-197
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균

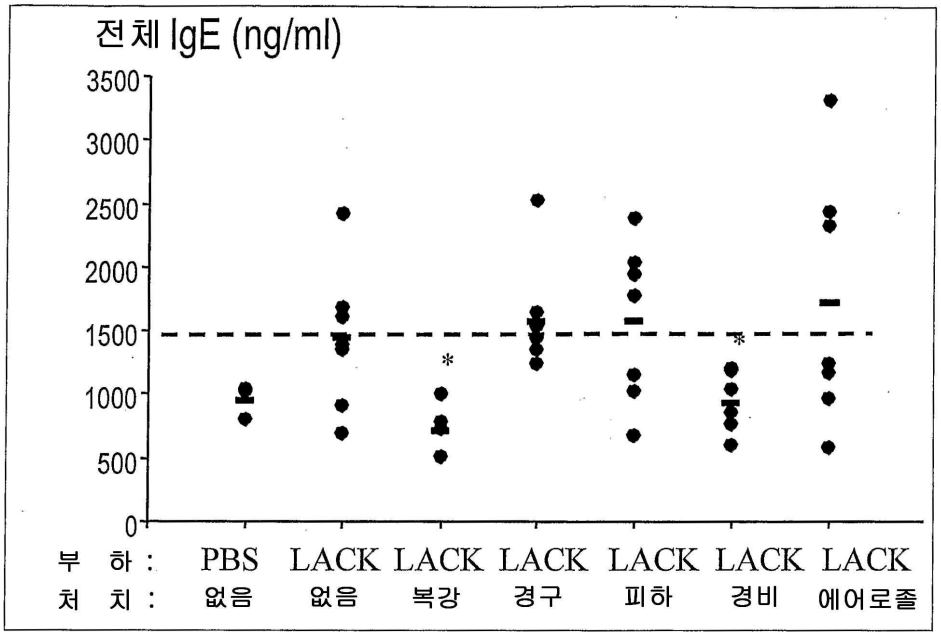
도면10


IL-4 (pg/ml)
pg/ml
12
10
8
6
4
2
0
대 조
천 식
OM-197
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균
평 균
IL-5 (pg/ml)
pg/ml
30
25
20
15
10
5
0
대 조
천 식
OM-197
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균
IL-13 (pg/ml)
80
60
40
20
0
대 조
천 식
OM-197
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균

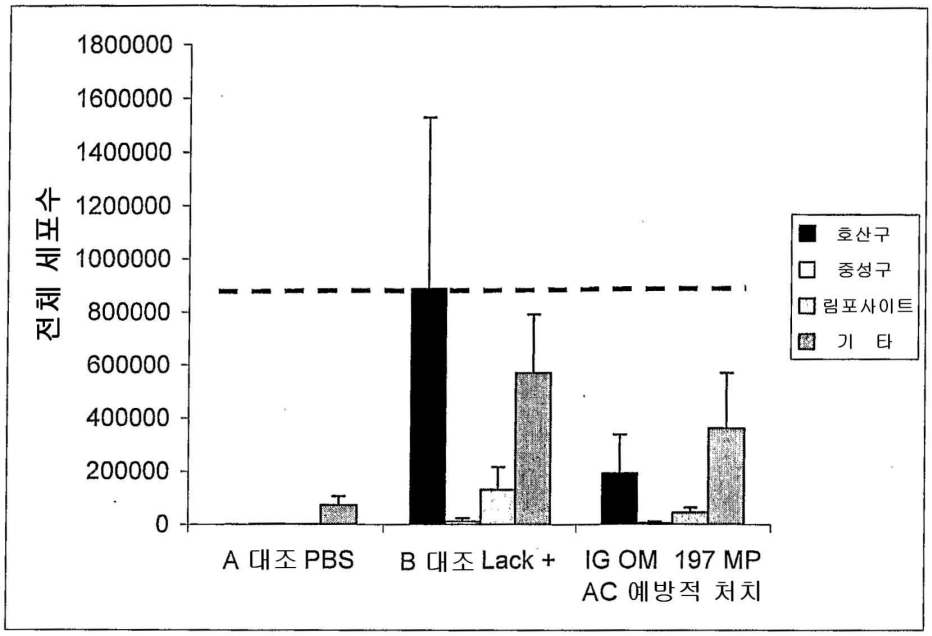
도면11


Nbr 세포 BAL (X10 4)
25
20
15
10
5
0
호산구
중성구
림포사이트
부 하: PBS LACK LACK LACK LACK LACK LACK
OM-197: 없음 없음 복강 경구 피하 경비 에어로졸

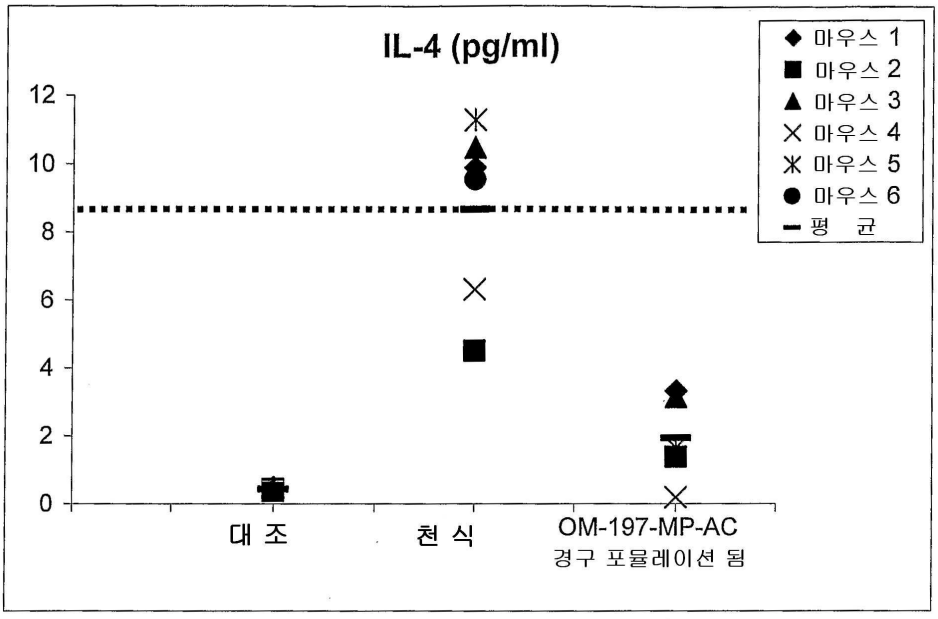
도면12


전체 IgE (ng/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
부 하: PBS LACK LACK LACK LACK LACK LACK
처 치: 없음 없음 복강 경구 피하 경비 에어로졸

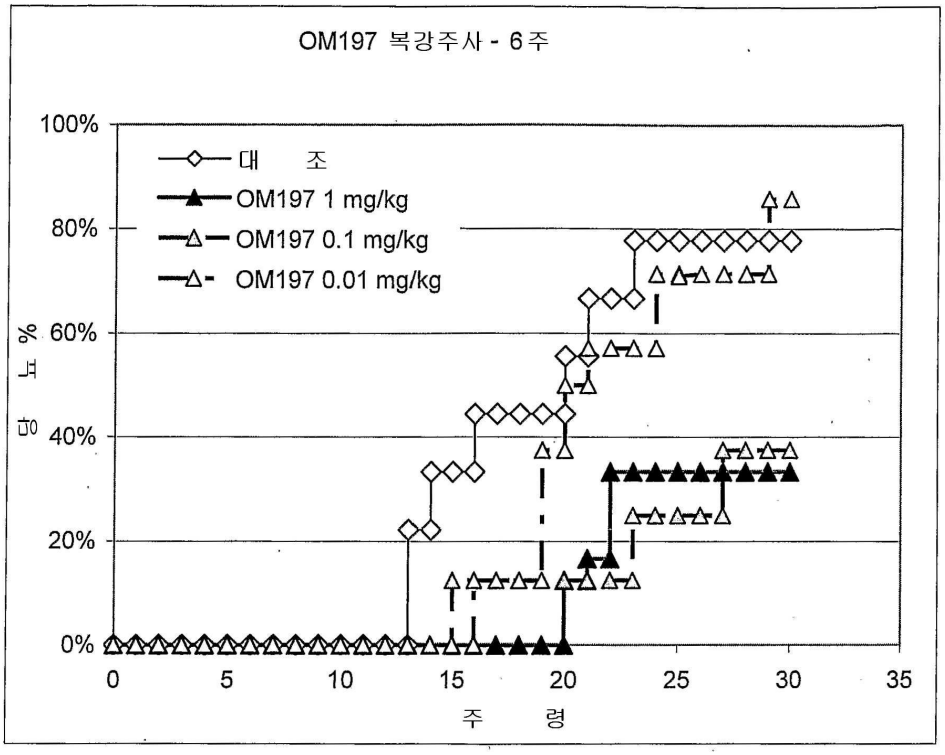
도면13


1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
전체 세포수
호산구
중성구
림포사이트
기 타
A 대조 PBS
B 대조 Lack +
IG OM 197 MP
AC 예방적 처치

도면14


IL-4 (pg/ml)
12
10
8
6
4
2
0
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
마우스 5
마우스 6
평 균
대 조
천 식
OM-197-MP-AC
경구 포율레이션 됨

도면15


OM197 복강주사 - 6주
100%
80%
60%
40%
20%
0%
대 조
OM197 1 mg/kg
OM197 0.1 mg/kg
OM197 0.01 mg/kg
당 뇨 %
0
5
10
15
20
25
30
35
주 령