



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월08일

(11) 등록번호 10-1704665

(24) 등록일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 5/12 (2006.01) A61K 38/12 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01) C07D 487/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7024471

(22) 출원일자(국제) 2011년02월19일

심사청구일자 2014년01월27일

(85) 번역문제출일자 2012년09월19일

(65) 공개번호 10-2013-0088004

(43) 공개일자 2013년08월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/025571

(87) 국제공개번호 WO 2011/103524

국제공개일자 2011년08월25일

(30) 우선권주장

P.390493 2010년02월19일 폴란드(PL)

(56) 선행기술조사문현

WO00/47608 A1

US 5216124 A

(73) 특허권자

펩타덤 에스피.지.오.오.

폴란드 바르샤바 피엘-00-071 레지온 141690076
크라코브 서버브 13

로츠 유니버시티 오브 테크놀로지

폴란드 로츠 피엘-90-924 레지온 000001583 제롬
스키에고 116

(72) 발명자

자브록키 앤더스

폴란드 로츠 피엘-94-049, 후발리 4, 24

지멕키 미할

폴란드 보로츠와프 피엘-51-649, 바치아엘레고
32, 3

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재민

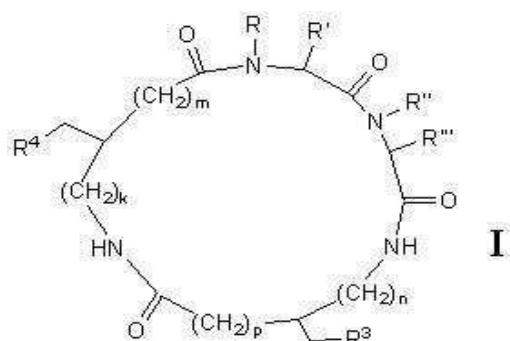
전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 환형 테트라펩티드류 및 이들의 치료적 적용

(57) 요약

다음 구조식 I의 화합물이 제공되어 진다:



여기서 k, m, n, p, R, R', R'', R''', R³ 및 R⁴는 상세한 설명에 정의된 바와 같음. 다른 실시형태 또한 개시되어 진다.

(72) 발명자

카수바 안드레이

폴란드 로츠 피엘-91-163, 코타빈스키에고 46

카츠마렉 츠스토프

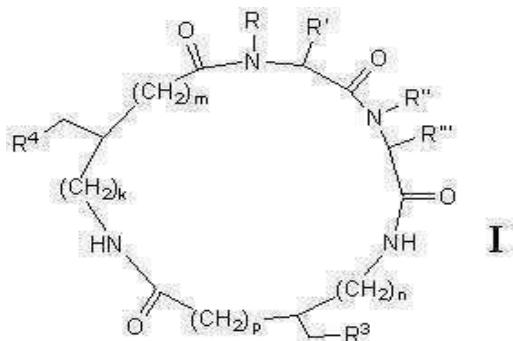
폴란드 로츠 피엘-93-324, 미힐라 8, 9

명세서

청구범위

청구항 1

다음 구조식 I을 가지는 화합물 또는 약학적으로 허용될 수 있는 이들의 염:



여기서,

k, m, n 및 p 중 적어도 하나가 0이 아닌 경우, k, m, n 및 p는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2이고;

R 및 R'은 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되거나, 또는 R 및 R'이 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R 및 R'은 -CR¹R^{1'}-X-CH₂-이고, 여기서 CR¹R^{1'}은 질소 골격에 부착되어 있고, R¹ 및 R^{1'}은 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되고, 그리고 X는 -CH₂-,-CH₂CH₂-,-CH(OH)-,-O-, -S- and -NH-로부터 선택되고;

R" 및 R'''은 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되거나, 또는 R" 및 R'''이 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R" 및 R'''은 -CR²R^{2'}-X'-CH₂-이고, 여기서 CR²R^{2'}은 질소 골격에 부착되어 지고, R² 및 R^{2'}는 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되고, 그리고 X'은 -CH₂- , -CH₂CH₂- , -CH(OH)- , -O- , -S- 및 -NH-로부터 선택되고; 그리고

R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤�테로아릴로부터 선택되며, 상기 아릴은 6-원소의 방향족 고리 화합물 또는 비사이클릭 9- 또는 10-원소의 방향족 고리 화합물 또는 트리사이클릭 13- 또는 14-원소의 방향족 고리 화합물로부터 선택되고, 상기 헤�테로아릴은 O, N, 또는 S로부터 선택된 1-3 헤테로 원자를 포함하는 5- 또는 6-원소의 헤�테로방향족 고리 화합물, 또는 O, N, 또는 S로부터 선택된 1-3 헤테로 원자를 포함하는 비사이클릭 9- 또는 10-원소의 헤�테로방향족 고리 화합물, 또는 O, N, 또는 S로부터 선택된 1-3 헤�테로 원자를 포함하는 트리사이클릭 13- 또는 14-원소의 헤�테로방향족 고리 화합물로부터 선택되고, 상기 치환된 아릴 및 치환된 헤�테로아릴의 치환기는 알킬, 할로겐, 할로알킬, 하이드록시, 저급알록시, 카르복시, 카르보알록시, 카르복사아미도, 시아노, 카르보닐, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 머르캅토, 알킬티오, 술록사이드, 술폰, 아실아미노, 아미디노, 페닐, 벤질, 헤�테로아릴, 펜옥시 또는 벤질옥시로부터 선택됨.

첨구항 2

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 R^3 및 R^4 는 폐닐, 4-하이드록시페닐, 4-*t*-부톡시페닐 및 2-인돌릴로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, R^3 및 R^4 중 하나는 페닐이고, R^3 및 R^4 중 다른 하나는 4-하이드록시페닐, 4-*t*-부톡시페닐 및 2-이돌릴로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화학물.

첨구항 4

제 1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나는 참인 것을 특징으로 하는 화합물.

(a) $-\text{CH}_2-\text{R}^3\text{O}$] 부착된 탄소는 (R)-임체화학을 가지고,

(b) $-\text{CH}_2-\text{R}^4\text{O}$] 부착된 탄소는 (R)-임체화학을 가진다.

청구항 5

제 1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나는 참인 것을 특징으로 하는 화합물.

(a) $-\text{CH}_2-\text{R}^3\text{O}$] 부착된 탄소는 (S)-임체화학을 가지고,

(b) $-\text{CH}_2-\text{R}^4\text{O}$] 부착된 탄소는 (S)-임체화학을 가진다.

청구항 6

제 1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나는 참인 것을 특징으로 하는 화합물.

(a) k, m, n 및 p의 하나는 1이고, 그리고 k, m, n 및 p의 나머지는 0이고,

(b) k, m, n 및 p의 둘은 1이고, 그리고 k, m, n 및 p의 나머지는 0이고,

(c) k 및 m의 적어도 하나는 0이 아니고,

(d) n 및 p의 적어도 하나는 0이 아니고,

(e) k 및 m의 적어도 하나는 0이 아니고 그리고 적어도 하나의 n 및 p는 0이 아니고,

(f) k 및 n 양자는 0이고,

(g) k 및 n 양자는 0이고, m 및 p의 하나는 0이고, 그리고 m 및 p의 다른 것은 1이고,

(h) k 및 n 양자는 0이고, 그리고 m 및 p 양자는 1이다.

청구항 7

제 1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나는 참인 것을 특징으로 하는 화합물.

(a) R 및 R'가 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R 및 R'은 $-(\text{CH}_2)_3-$ 를 형성하고,

(b) R'' 및 R'''가 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R'' 및 R'''은 $-(\text{CH}_2)_3-$ 를 형성하고,

(c) R 및 R'가 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R 및 R'은 $-(\text{CH}_2)_4-$ 를 형성하고,

(d) R'' 및 R'''가 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R'' 및 R'''은 $-(\text{CH}_2)_4-$ 를 형성하고,

(e) R 및 R'가 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R 및 R'은 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 를 형성하고,

(f) R'' 및 R'''가 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R'' 및 R'''은 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 를 형성한다.

청구항 8

제 1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나는 참인 것을 특징으로 하는 화합물.

(a) R 및 R'이 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R 및 R' 그리고 R'가 부착된 탄소는 (S)-임체화학을 가지고,

(a) R'' 및 R'''이 사이클로 형태로 연결되어 결합될 때, R'' 및 R''' 그리고 R'''이 부착된 탄소는 (S)-임체화학을 가진다.

청구항 9

제 1항에 있어서, $-\text{CH}_2-\text{R}^3$ 이 부착된 탄소는 (R)-입체화학을 가지고, $-\text{CH}_2-\text{R}^4$ 이 부착된 탄소는 (R)-입체화학을 가지는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10

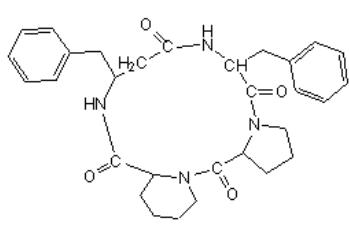
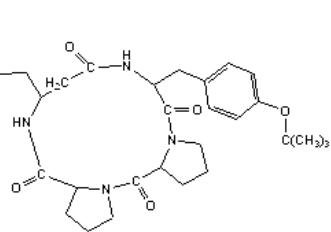
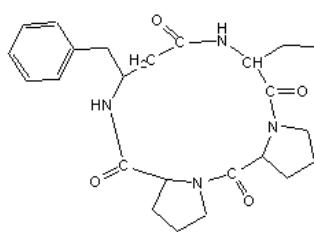
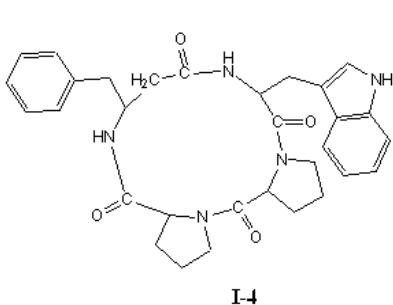
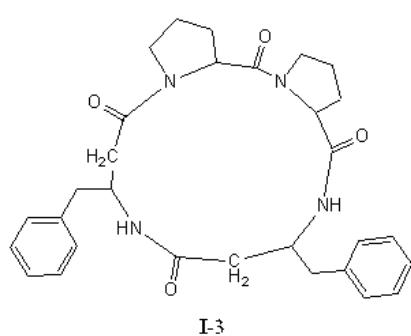
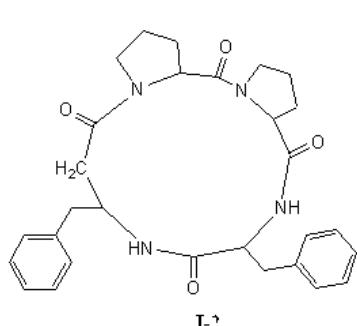
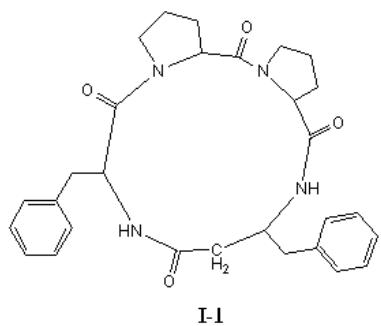
제 1항에 있어서, 구조식 I의 화합물에서의 하나 이상의 아미노 군은 보호된 형태로 되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 11

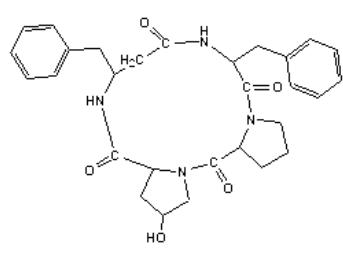
제 1항에 있어서, R' , R''' , $-\text{CH}_2-\text{R}3$ 및 $-\text{CH}_2-\text{R}4$ 가 각각 부착된 탄소 중 적어도 하나는 (R)-입체화학을 가지는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 화합물:

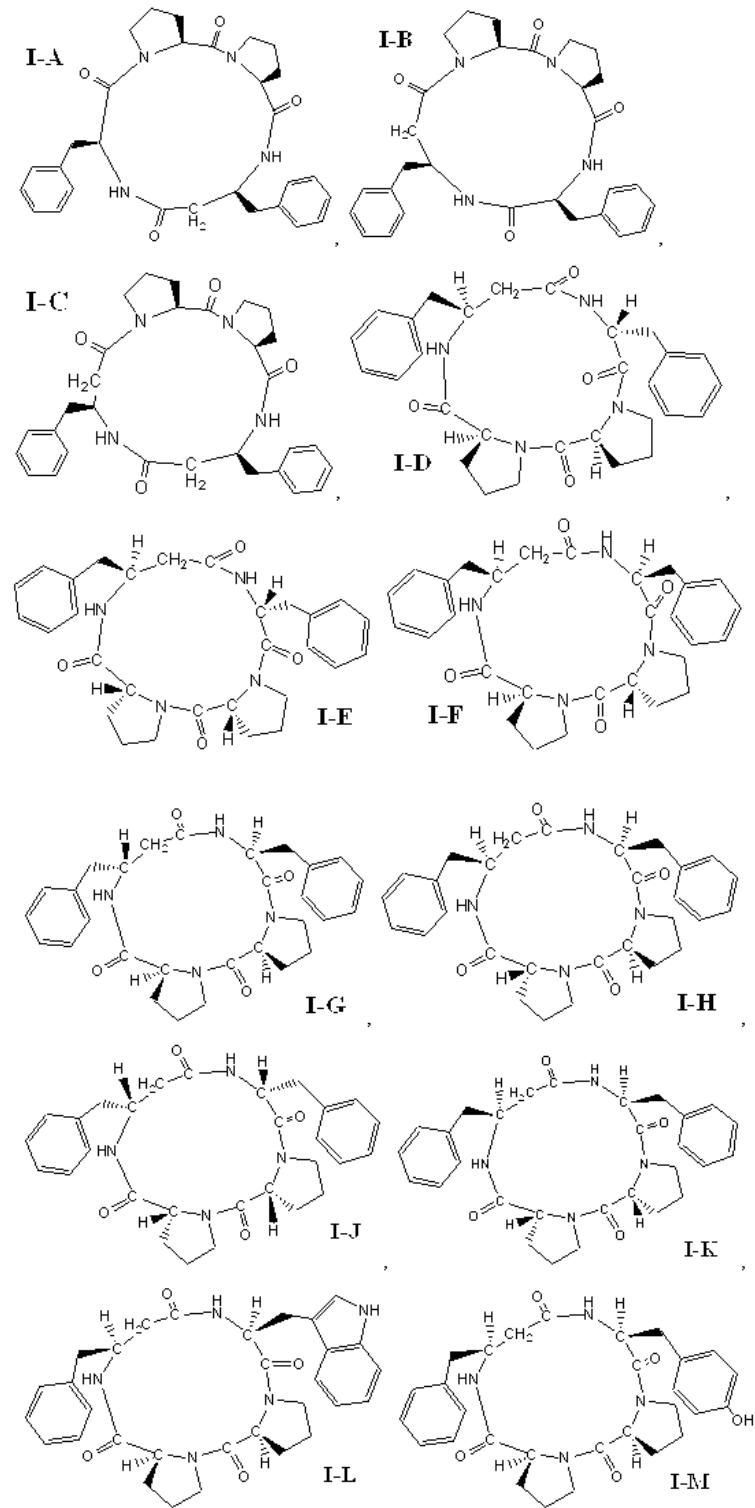


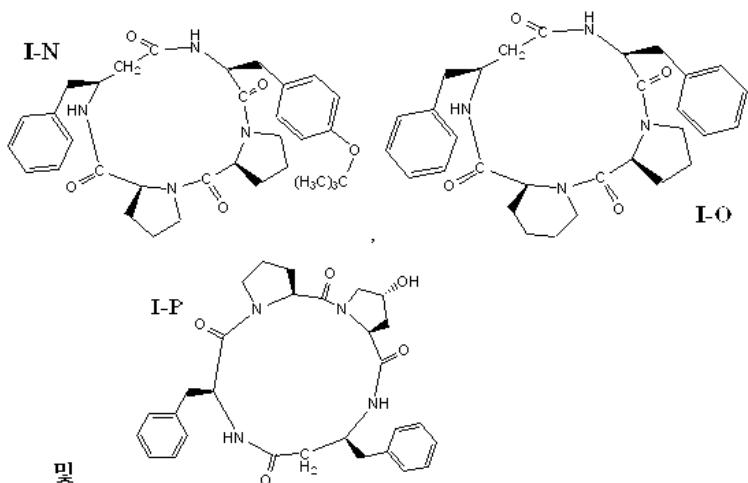
및



청구항 13

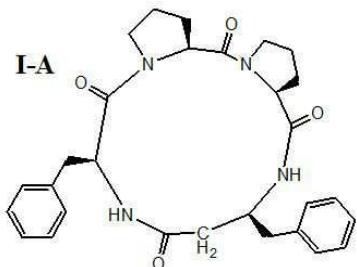
제 12항에 있어서, 상기 화합물은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 화합물:





청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 화합물은 다음의 구조식 I-A의 것인 화합물.



청구항 15

청구항 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 약학적으로 허용될 수 있는 염.

청구항 16

청구항 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 따른 구조식 I의 화합물 및 이들에 대한 약학적으로 허용될 수 있는 탑체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 면역 반응 억제용 약학적 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 화합물은 구조식 I-1의 화합물, 구조식 I-2의 화합물, 구조식 I-3의 화합물, 구조식 I-4의 화합물, 구조식 I-5의 화합물, 구조식 I-6의 화합물, 구조식 I-7의 화합물 및 구조식 I-8의 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용될 수 있는 염으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역 반응 억제용 약학적 조성물.

청구항 18

제 16항에 있어서, 화합물은 구조식 I-A의 화합물, 구조식 I-B의 화합물, 구조식 I-C의 화합물, 구조식 I-D의 화합물, 구조식 I-E의 화합물, 구조식 I-F의 화합물, 구조식 I-G의 화합물, 구조식 I-H의 화합물, 구조식 I-I의 화합물, 구조식 I-J의 화합물, 구조식 I-K의 화합물, 구조식 I-L의 화합물, 구조식 I-M의 화합물, 구조식 I-N의 화합물, 구조식 I-O의 화합물 및 구조식 I-P의 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용될 수 있는 염으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역 반응 억제용 약학적 조성물.

청구항 19

청구항 제 15항에 따른 약학적으로 허용될 수 있는 염 및 이들에 대한 약학적으로 허용될 수 있는 탑체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 면역 반응 억제용 약학적 조성물.

청구항 20

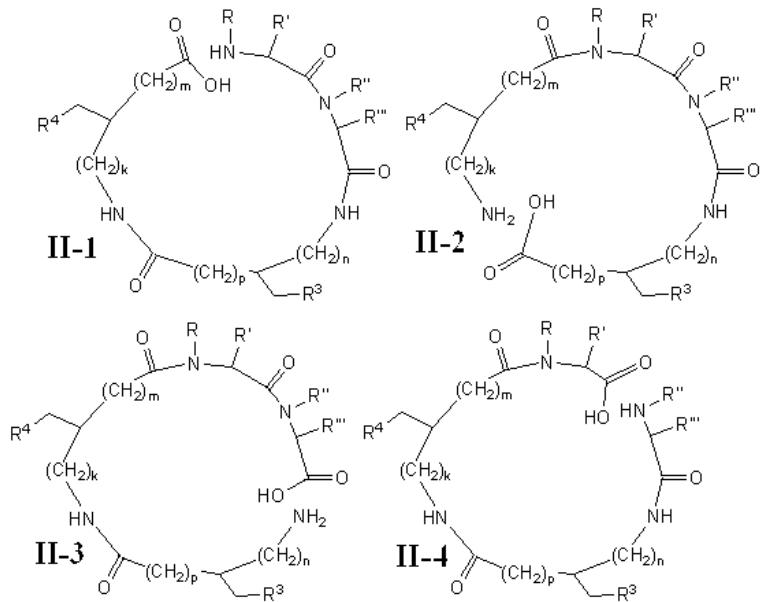
청구항 제1항 내지 제14항의 어느 한 항에 따른 구조식 I의 화합물 및 (a) 환자에 있어 면역 반응을 억제하기 위해, (b) 환자에 있어 면역-매개 질환 또는 증상을 치료하거나 예방하기 위해, 또는 (c) 제이 약물의 독성 프로필을 저하하기 위해 화합물을 사용하기 위한 지시서를 포함하는 키트.

상기 면역-매개 질환 또는 증상은 피부 종양, 류마티스성 관절염, 크론 질환, 염증성장질환, 과민성대장증후군, 신경퇴행질환, 파킨슨병, 심각한 건선; 및 아토피성 피부염으로 구성된 군으로부터 선택됨.

청구항 21

구조식 I의 화합물에 상응하는 다음 구조식 II-1, II-2, II-3 또는 II-4(이후부터는 집합적으로 구조식 II의 화합물로 칭함)를 가지는 화합물을 고리화하는 것을 포함하는 청구항 제1항에 정의된 구조식 I의 화합물의 제조방법:

여기에서, R, R', R'', R''', R3, R4, k, m, n 및 p는 청구항 제1항에 정의된 것과 동일함.



청구항 22

청구항 제21항에 정의된 구조식 II-1의 화합물.

청구항 23

청구항 제21항에 정의된 구조식 II-2의 화합물.

청구항 24

청구항 제21항에 정의된 구조식 II-3의 화합물

청구항 25

청구항 제21항에 정의된 구조식 II-4의 화합물.

청구항 26

제 19항에 있어서, 상기 약학적으로 허용될 수 있는 염은 구조식 I-1을 갖는 화합물의 약학적으로 허용될 수 있는 염인 것을 특징으로 하는 면역 반응 억제용 약학적 조성물.

청구항 27

제 15항에 있어서, 상기 화합물은 구조식 I-1의 화합물인 것을 특징으로 하는 약학적으로 허용될 수 있는 염.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 환형 테트라펩티드류 및 이들의 치료적 적용에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역억제제는 자가 면역 질환의 치료 및 이식에서 공통적으로 사용되어지고 있다. 이를 약물의 생산은 값 비싸고 그리고, 주로 자주 사용되어지는 이들의 약물, 즉 사이클로스포린 A, 타크롤리무스 및 라파마이신은 바람직하지 않은 부작용을 나타냈다. 부작용, 특히는 천연의 펩티드 면역 조절제 및 이들의 아날로그의 부류에 있어서의 부작용을 회피하는 새로운 면역억제제에 대한 연구는 의료 화학에 대한 중대한 도전을 나타낸다.

[0003] 사이클로리노펩티드 A (CLA)는 아주 소수성인 환형의 나노펩티드로서 1959년에 리넨(linen) 씨앗으로부터 처음 분리되어졌다. CLA는 사이클로스포린 A (CsA)의 것에 비하여 강력하게 면역 억제적 효능을 갖는다. CLA의 작용 메카니즘은 CsA, 즉 비록 아주 낮은 친화성이기는 하지만 칼시네우린(calcineurin)의 불활성화를 야기하는 사이클로필린 A와 복합체를 형성한 CLA의 것에 유사한 것으로 나타났다(Gaymes et al., *Febs Lett*, 1997, 418, 224-227). CLA는 체액의 및 세포질의 면역 반응과 이식-대-숙주 반응 양자를 저해하였고; 동종의 피부 이식의 생존을 지연하였고; 뉴질랜드 블랙 마우스의 용혈성 빈혈과 렉트의 포스트-어쥬번트 다발관절염을 완화하고; 그리고, CsA에 유사하게 IL1 및 IL-2 생성을 저해하였다. 불행하게도, CLA의 아주 높은 소수성은 화합물의 치료제로서 잠정적인 적용에 있어서 장애를 나타내었다.

[0004] 펩티드 사슬의 연속적인 부분에 알라닌 잔기를 포함하는 선형의 CLA 아날로그는 면역억제성인 것으로 밝혀졌다 (Wieczorek et al., *Arch Immunol Ther Exp*, 1992, 40, 213-216). 또한 선형의 CLA 아날로그의 활성은 N-말단으로부터 펩티드 사슬의 짧아짐으로 점진적으로 감소되고, 동시에 C-말단의 테트라- 및 트리펩티드에 대한 활성의 증가를 나타내는 것이 발견되어졌다(Siemion et al., *Arch Immunol Ther Exp*, 1994, 42, 459-465). CLA 분자 안으로 단일의 친수성 트레오닌 잔기의 도입은 물에서 개선된 용해성을 초래하지 않았다. 그러나, 용해성에 있어서의 개선은 생물학적인 활성의 손실이 없이 하나 또는 둘의 페닐로알라닌 잔기의 페닐 고리의 파라-위치에 솔fon 기의 도입에 의해 달성되어졌다(Siemion et al., *Arch Immunol Ther Exp*, 1992, 40, 257-261; Cebrat et al., *J Peptide Res.*, 1997, 49, 415-420). 부가하여, 보다 긴 선형의 펩티드 사슬에 테트라 펩티드

(Pro-Pro-Phe-Phe) 또는 트리펩티드(Pro-Phe-Phe)의 함입은 면역 억제 활성에 유의성을 가지는 것으로 여겨진다는 것이 관찰되어 졌다(Wieczorek et al., *Arch Immunol Ther Exp*, 1993, 41, 291-296; Cebrat et al., *Pol. J Chem*, 1997, 71, 1401).

[0005] 프롤린 잔기 사이에 시스-펩티드 결합이 1,5-이중 치환된 테트라졸 고리로 대체된 일련의 아날로그(시스 형상으로 되는 아미드 결합의 양호한 유사화합물)는 CsA 필적할 수 있는 면역 억제적 활성을 나타냈다(Karczmarek et al., *Biopolymers*, 2002, 63, 343-357).

[0006] 위치 5 및/또는 8에 류이신 잔기가 이들의 하이드록시메틸 아날로그로 치환된 합성 CLA 아날로그는 CLA에 비교하여 물에서의 용해성에서 4-배 증가를 보였지만, 그러나 또한 천연의 CLA에 비교하여 생물학적 활성에 있어서 25%의 감소를 나타냈다(Zubrzak et al., *Biopolymers (Peptide Science)*, 2005, 80, 347-356).

[0007] 일련의 아홉 개의 CLA 아날로그가 β^2 -이소프롤린 및 β^3 -호모프롤린을 갖는 CLA 프롤린 잔기의 대체에 의해 얻어진다. CsA에 비교하여, 이들 CLA 아날로그는 세포질의 면역반응에서 강력한 저해적 특성을 보였다. 이들 아날로그의 대부분은 실용적으로 세포 독성이 없었다(Katarzynska et al., *J Pept Sci*, 2009, 14, 1283-1294).

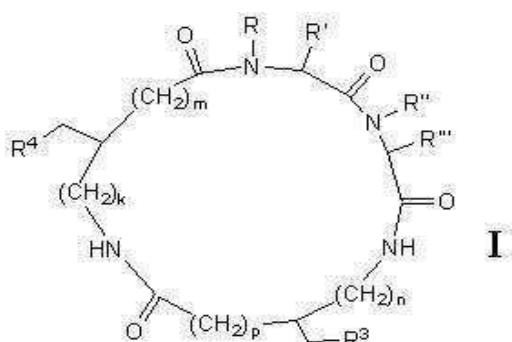
발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기한 종래의 문제점을 해결하는 위한 테트라펩티드류 및 이들의 치료적 적용을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 다음 구조식 I을 갖는 화합물:



[0010]

[0011] 여기서,

[0012] k, m, n 및 p는 각각 독립적으로 0, 1 또는 2이고;

[0013] R 및 R'은 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되거나, 또는 함께 취해질 때, R 및 R'은 -CR¹R^{1'}-X-CH₂-O-이고, 여기서 CR¹R^{1'}은 질소 골격에 부착되어 지고, R¹ 및 R^{1'}는 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되고, 그리고 X는 -CH₂- , -CH₂CH₂- , -CH(OH)- , -O- , -S- and -NH-로부터 선택되고;

[0014] R'' 및 R'''은 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되거나, 또는 함께 취해질 때, R'' 및 R'''은 -CR²R^{2'}-X'-CH₂-이고, 여기서 CR²R^{2'}은 질소 골격에 부착되어 지고, R² 및 R^{2'}는 각각 독립적으로 H 및 C₁₋₃ 알킬로부터 선택되고, 그리고 X'은 -CH₂- , -CH₂CH₂- , -CH(OH)- , -O- , -S- 및 -NH-로부터 선택되고;

[0015] R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤�테로아릴로부터 선택됨;

[0016] 또는 약학적으로 허용될 수 있는 이들의 염이 제공되어 진다.

[0017] 몇몇 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 R³ 및 R⁴는 페닐이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 R³ 및

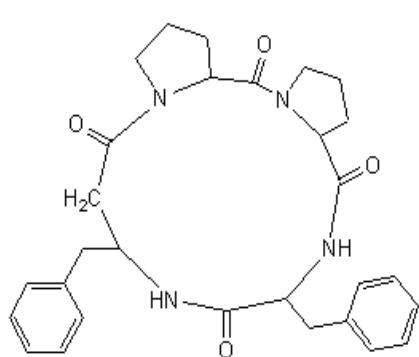
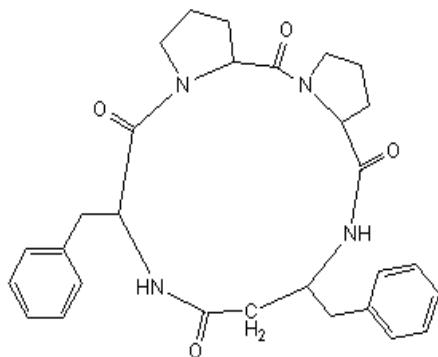
R^4 는 4-하이드록시페닐. 몇몇 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 R^3 및 R^4 는 4-*t*-부톡시페닐이다. 몇몇 실시 형태에 있어서, 적어도 하나의 R^3 및 R^4 는 2-인돌릴이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R^3 및 R^4 양자는 페닐이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 하나의 R^3 및 R^4 는 페닐이고 그리고 다른 R^3 및 R^4 는 4-하이드록시페닐이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R^3 및 R^4 의 하나는 페닐이고 그리고 R^3 및 R^4 의 다른 하나는 4-*t*-부톡시페닐이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R^3 및 R^4 의 하나는 페닐이고 그리고 R^3 및 R^4 의 다른 하나는 2-인돌릴이다. 몇몇 실시형태에 있어서, $-CH_2-R^3$ 이 부착된 탄소는 완전한 (R)-임체화학을 가진다. 몇몇 실시형태에 있어서, $-CH_2-R^3$ 이 부착된 탄소는 완전한 (S)-임체화학을 가진다. 몇몇 실시형태에 있어서, $-CH_2-R^4$ 가 부착된 탄소는 완전한 (R)-임체화학을 가진다. 몇몇 실시형태에 있어서, $-CH_2-R^4$ 가 부착된 탄소는 완전한 (S)-임체화학을 가진다. 몇몇 실시형태에 있어서, k, m, n 및 p 의 하나는 1이고, 그리고 k, m, n 및 p 의 나머지는 0이다. 몇몇 실시형태에 있어서, k, m, n 및 p 의 두 개는 1이고, 그리고 k, m, n 및 p 의 나머지는 0이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 k 및 m 은 0이 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 n 및 p 는 0이 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, 적어도 하나의 k 및 m 은 0이 아니고 그리고 적어도 하나의 n 및 p 는 0이 아니다. 몇몇 실시형태에 있어서, k 및 n 양자는 0이다. 몇몇 실시형태에 있어서, k 및 n 양자는 0이고, m 및 p 의 하나는 0이고, 그리고 m 및 p 의 다른 것은 1이다. 몇몇 실시형태에 있어서, k 및 n 양자는 0이고 그리고 m 및 p 양자는 1이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 네 아미노산 모두는 L-아미노산이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 아미노산의 셋은 L-아미노산이고 그리고 하나의 아미노산은 D-아미노산이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 아미노산의 둘은 L-아미노산이고 그리고 아미노산의 둘은 D-아미노산이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 하나의 아미노산은 L-아미노산이고 그리고 아미노산의 셋은 D-아미노산이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 모든 네 아미노산은 D-아미노산이다.

[0018]

몇몇 실시형태에 있어서, R 및 R' 은 함께 취해져 $-(CH_2)_3-$ 을 형성하는데, 즉, R 및 R' 은 함께 취해져 $-CR^{1'}R^{1'}-X-$ CH_2- 를 형성하고 여기서 R^1 및 $R^{1'}$ 은 양자가 H이고 그리고 X는 CH_2 이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R'' 및 R''' 은 함께 취해져 $-(CH_2)_3-$ 을 형성하는데, 즉, R'' 및 R''' 은 함께 취해져 $-CR^{2'}R^{2'}-X-CH_2-$ 를 형성하고 여기서 R^2 및 $R^{2'}$ 은 양자가 H이고 그리고 X는 CH_2 이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R 및 R' 은 함께 취해져 $-(CH_2)_4-$ 을 형성하는데, 즉, R 및 R' 은 함께 취해져 $-CR^{1'}R^{1'}-X-CH_2-$ 를 형성하고 여기서 R^1 및 $R^{1'}$ 은 양자가 H이고 그리고 X는 $(CH_2)_2$ 이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R'' 및 R''' 은 함께 취해져 $-(CH_2)_4-$ 을 형성하는데, 즉, R'' 및 R''' 은 함께 취해져 $-CR^{2'}R^{2'}-X-CH_2-$ 를 형성하고 여기서 R^2 및 $R^{2'}$ 은 양자가 H이고 그리고 X는 $(CH_2)_2$ 이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R 및 R' 은 함께 취해져 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 을 형성하는데, 즉, R 및 R' 은 함께 취해져 $-CR^{1'}R^{1'}-X-CH_2-$ 를 형성하고 여기서 R^1 및 $R^{1'}$ 은 양자가 H이고 그리고 X는 $CH(OH)$ 이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R'' 및 R''' 은 함께 취해져 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 을 형성하는데, 즉, R'' 및 R''' 은 함께 취해져 $-CR^{1'}R^{1'}-X-CH_2-$ 를 형성하고 여기서 R^2 및 $R^{2'}$ 은 양자가 H이고 그리고 X는 $CH(OH)$ 이다. R 및 R' 이 함께 취해지는 몇몇 실시형태에 있어서, R' 이 부착된 탄소는 완전한 (S)-임체화학을 가진다. R 및 R' 이 함께 취해지는 몇몇 실시형태에 있어서, R' 이 부착된 탄소는 완전한 (R)-임체화학을 가진다. R'' 및 R''' 이 함께 취해지는 몇몇 실시형태에 있어서, R''' 이 부착된 탄소는 완전한 (S)-임체화학을 가진다. R'' 및 R''' 이 함께 취해지는 몇몇 실시형태에 있어서, R''' 이 부착된 탄소는 완전한 (R)-임체화학을 가진다.

[0019]

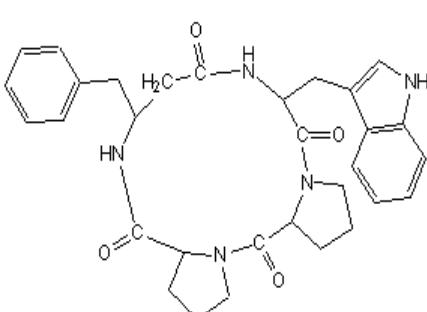
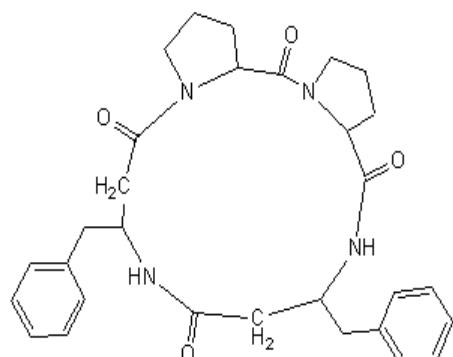
몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된다:



[0020]

[0021]

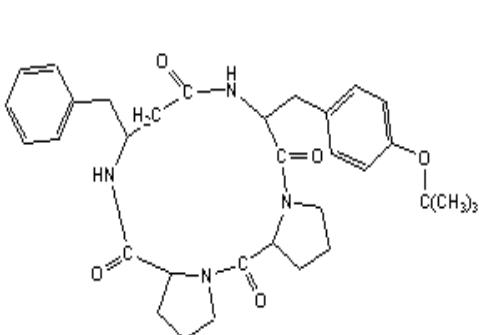
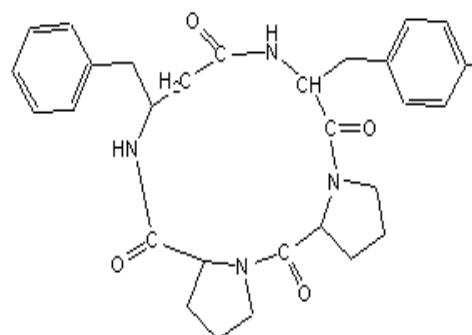
I-1(cyclic(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Phe-)), I-2(cyclic(-Pro-Pro-Phe- β^3 hoPhe-)),



[0022]

[0023]

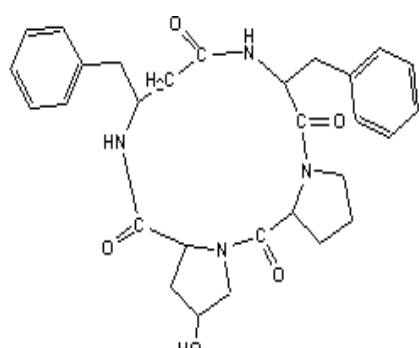
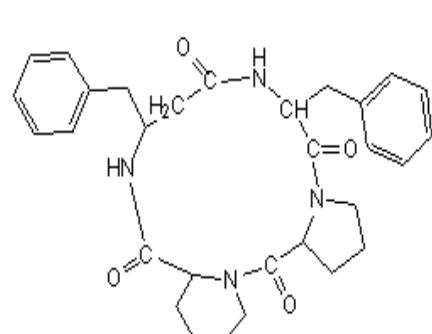
I-3(cyclic(-Pro-Pro- β^3 hoPhe- β^3 hoPhe-)), I-4(cyclic(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Trp-)),



[0024]

[0025]

I-5(cyclic(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Tyr-)), I-6(cyclic(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Tyr(t-Bu-))),



[0026]

[0027]

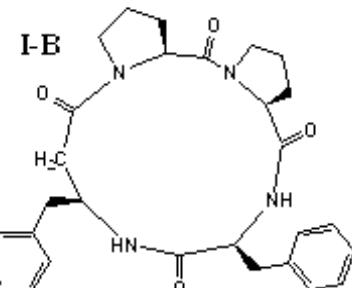
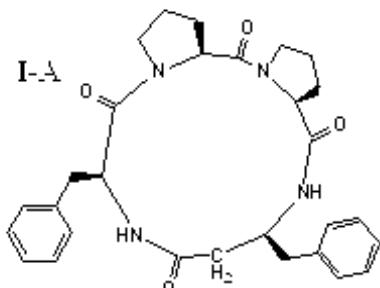
I-7(cyclic(-Pro-Pip- β^3 hoPhe-Phe-)) 및 I-8(cyclic(Pro-Hyp- β^3 hoPhe-Phe-)).

[0028]

몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-1의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-2의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-3의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-4의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-5의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-6의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-7의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 I-8의 화합물이다.

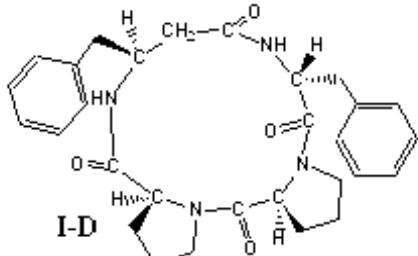
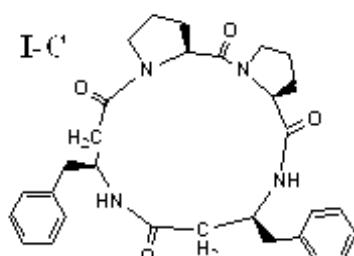
[0029]

몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된다:



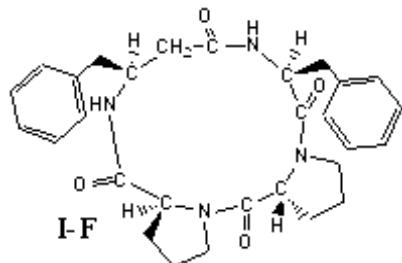
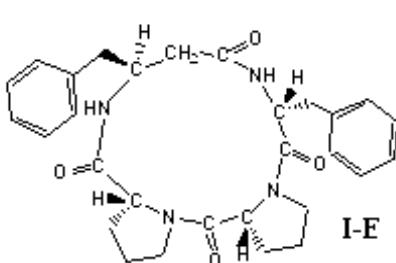
예시: -L₁-Pro-L₂-Pro-L₃-C¹(H₂Phe)-L₄-Phe-).

예시: -L₁-Pro-L₂-Pro-L₃-C¹(H₂Phe)-L₄-C²(H₂Phe)-).



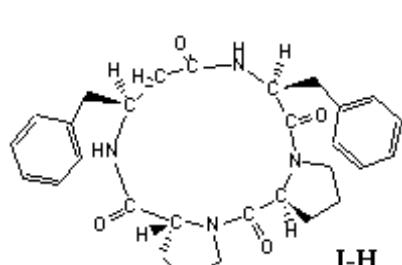
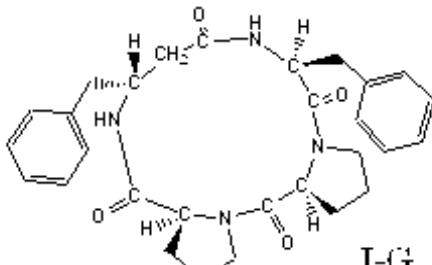
예시: -L₁-Pro-L₂-L₃-C¹(H₂Phe)-L₄-C²(H₂Phe)-.

예시: -L₁-Pro-L₂-L₃-C¹(H₂Phe)-D₁-Phe-).



예시: -D₁-Phe-D₂-Pro-L₃-C¹(H₂Phe)-D₄-Phe-.

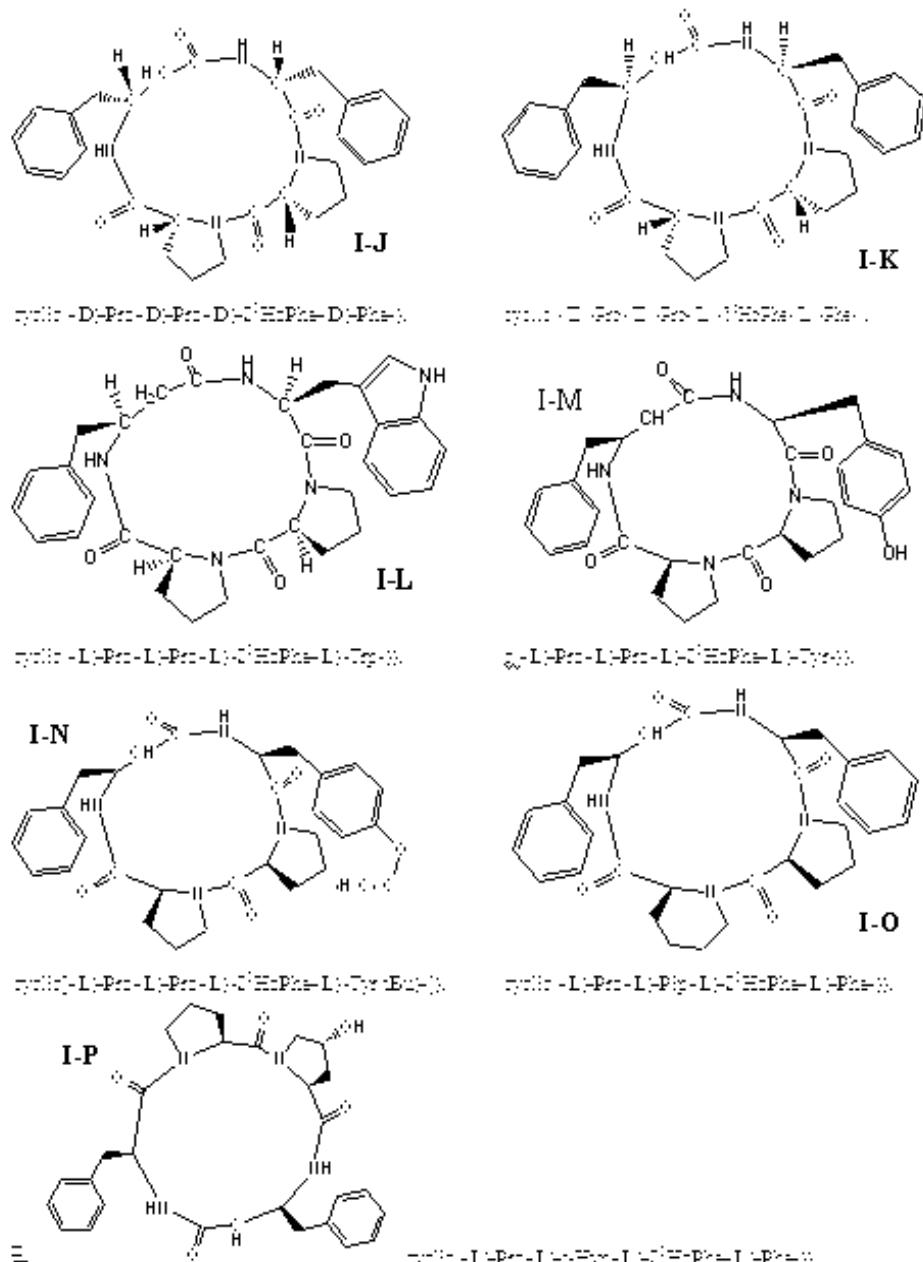
예시: -D₁-Phe-L₂-Pro-L₃-C¹(H₂Phe)-L₄-Phe-.



예시: -L₁-Pro-L₂-D₃-Pro-L₄-C¹(H₂Phe)-L₅-Phe-.

예시: -L₁-Pro-D₂-Pro-L₃-C¹(H₂Phe)-L₄-Phe-.

[0030]



[0031]

[0032]

몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-A의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-B의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-C의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-D의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-E의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-F의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-G의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-H의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-I의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-J의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-K의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-L의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-M의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-N의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-O의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 화합물은 구조식 I-O의 화합물이다.

몇몇 실시형태에 있어서, 구조식 I 내의 하나 또는 그 이상의 아미노 기는 보호된 형태이다.

또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 구조식 I의 화합물 및 이들에 대한 약학적으로 허용될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 제공되어 진다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-1의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-2의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-3의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-4의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은

은 I-5의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-6의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-7의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-8의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-A의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-C의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-D의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-E의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-G의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-H의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-I의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-J의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-L의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-M의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-N의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-O의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-0의 화합물이다.

[0035] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 구조식 I의 화합물의 유효량을 이들을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 환자에 있어서 면역 반응을 억제하는 방법이 또한 제공되어 진다. 몇몇 실시형태에 있어서, 억제되어지는 면역 반응은 염증화반응이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 억제되어지는 면역 반응은 이식 거부 반응이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-1의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-2의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-3의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-4의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-5의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-6의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-7의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-8의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-A의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-B의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-C의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-D의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-E의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-G의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-H의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-I의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-J의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-L의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-M의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-N의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-O의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-0의 화합물이다.

[0036] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 구조식 I의 화합물의 유효량을 이들을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에 있어서 면역-매개 질환 또는 증상을 치료 또는 예방하는 방법이 또한 제공되어 진다. 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 제이의 약물과 조합하여 구조식 I의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 제이의 약물의 독성 프로필을 저하하는 방법이 또한 제공되어 진다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 자가-면역 질환, 염증화 과정, 이식 거부 및 알러지성 반응으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 건선, 편평태선 및 기타 구진비늘 장애로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 습진 및 피부염으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 습진 또는 피부염은 습진, 아토피성 습진, 지루피부염 및 한포로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 태양광선에 대한 피부 반응이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 비-특이적 피부 가려움증 및 벌레 물림으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 두드러기이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 일차 피부 종양(즉, 멜라노마); 류마티스성 관절염(자가 면역 및 감염에 의해 유발된 양자 모두); 크론 질환, 염증성장질환, 과민성대장증후군; 신경퇴행질환(즉, 다발성 경화증); 파킨슨병; 이식-대-숙주 반응; 심각한 건선; 및 아토피성 피부염으로 구성된 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 구조식 I의 화합물은 화학적 치료 약물의 독성 효과를 감소하기 위해 화학 치료 약물과 조합하여 투여되어 진다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-1의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-2의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-3의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-4의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-5의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-6의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-7의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-A의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-B의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-C의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-D의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있

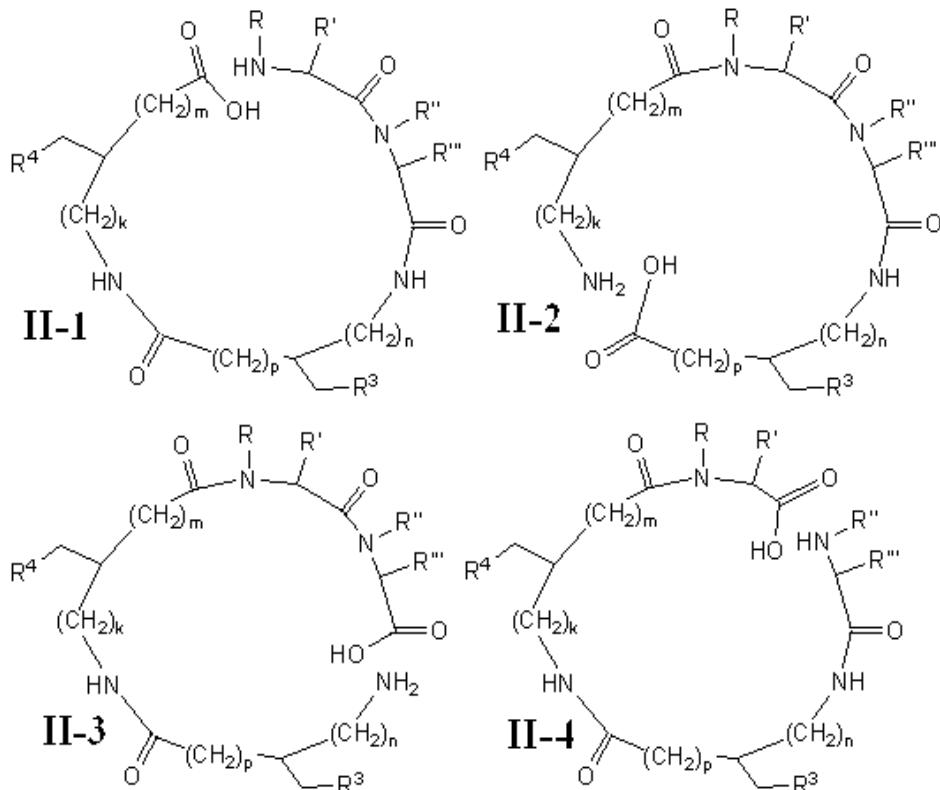
어서, 이 화합물은 구조식 I-E의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-F의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-G의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-H의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-I의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-J의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-K의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-L의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-M의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-N의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-O의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-0의 화합물이다.

[0037]

본 발명의 일 실시형태에 따르면, 구조식 I의 화합물 및 (a) 환자에 있어 면역 반응을 억제하기 위해, (b) 환자에 있어 면역-매개 질환 또는 증상을 치료하거나 예방하기 위해, 또는 (c) 제이 약물의 독성 프로필을 저하하기 위해 화합물을 사용하기 위한 지시서를 포함하는 키트가 또한 제공되어 진다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역 반응은 염증화반응이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역 반응은 이식 거부 반응이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 자가-면역 질환, 염증화 과정, 이식 거부, 알러지성 반응으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 건선, 편평태선 및 기타 구진비늘 장애로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 습진 및 피부염으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 습진 또는 피부염은 습진, 아토피성 습진, 지루피부염 및 한포로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 태양광선에 대한 피부 반응이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 비-특이적 피부 가려움증 및 벌레 물림으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 두드러기이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 면역-매개 질환 또는 증상은 일차 피부 종양(즉, 멜라노마); 류마티스성 관절염(자가 면역 및 감염에 의해 유발된 양자 모두); 크론 질환, 염증성장질환, 과민성 대장증후군; 신경퇴행질환(즉, 다발성 경화증); 파킨슨병; 이식-대-숙주 반응; 심각한 건선; 및 아토피성 피부 염으로 구성된 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에 있어서, 지시서는 화학 치료 약물의 독성 효과를 감소하기 위해 화학 독성 약물과 조합하여 구조식 I의 화합물을 투여하는 것을 지시한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-1의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-2의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-3의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-4의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-5의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-6의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-7의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 I-8의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-A의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-B의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-C의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-D의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-E의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-F의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-G의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-H의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-I의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-J의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-L의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-M의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-N의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-O의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 I-0의 화합물이다.

[0038]

본 발명의 일 실시형태에 따르면, 구조식 I의 상당하는 화합물을 위해 구조식 II-1, II-2, II-3 또는 II-4를 가지는 화합물을 환형으로 하는 것을 포함하는 구조식 I의 화합물을 제조하는 방법이 제공되어 지고, 여기서 R, R', R'', R''', R³, R⁴, k, m, n 및 p는 구조식 I에서 정의된 것과 같다(이후에서는 집합적으로 구조식 II의 화합물로 언급되어 짐):



[0039]

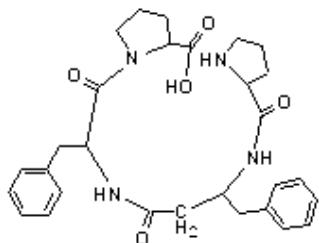
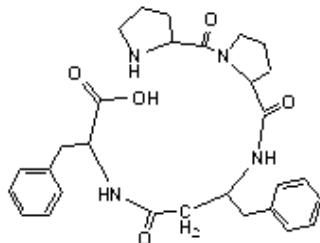
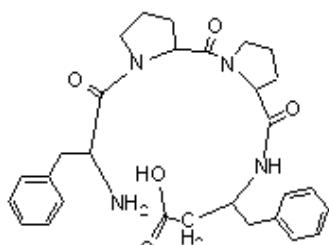
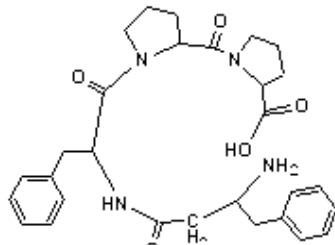
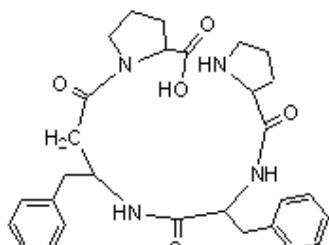
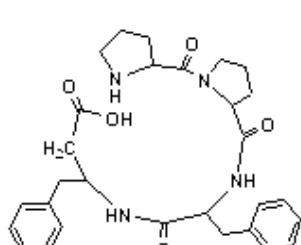
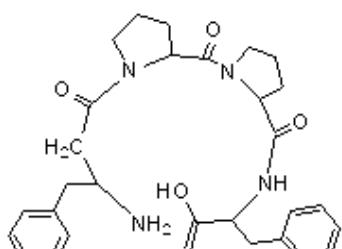
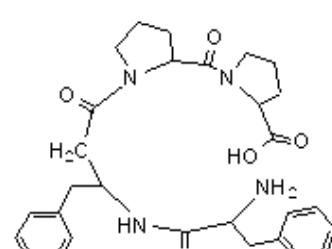
몇몇 실시형태에 있어서, 본 방법은 구조식 II-1, II-2, II-3 또는 II-4의 화합물을 합성하는 것을 더 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 구조식 II-1, II-2, II-3 또는 II-4의 화합물은 고체-상 합성에 의해 형성되어 진다.

[0040]

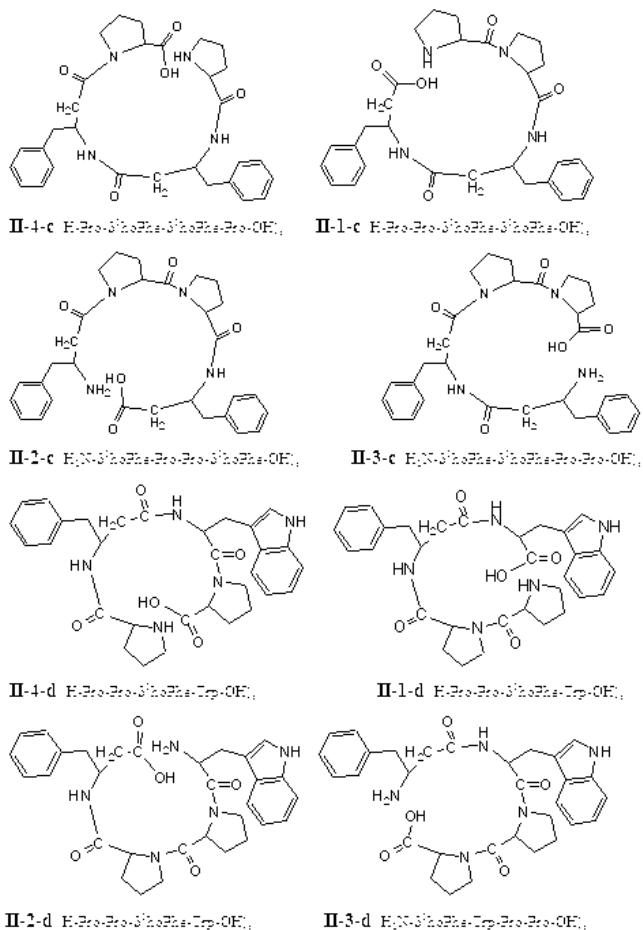
본 발명의 일 실시형태에 따르면, 구조식 II-1, II-2, II-3 및 II-4 그 자체의 화합물뿐만 아니라, 이들 화합물의 보호된 형태(즉, 여기서 N-말단 아미노기 또는 결사슬 아미노기와 같은 하나 또는 그 이상의 아미노기가, 예를 들어 tert-부록시카르보닐에 의해 보호됨) 및 고체-상 수지에 결합되어 질 때 보호되거나 또는 비보호된 형태로 되는 이들 화합물들이 제공되어 진다. 이후에서는, 주어진 내용에서 달리 특정되어 지지 않거나 비논리적 이지 않다면, 구조식 II 또는 그 예하-속이나 그 예하-종이 언급되어 질 때에는, 이러한 언급은 이것이 (a)(i) 적어도 부분적으로 보호되어 지거나 또는 (a)(ii) 완전하게 비- 또는 탈보호되어 지거나; (b)(i) 수지에 (1)직 접적으로 또는 (2) 링커를 통하여 결합되어 지고, 또는 (b)(ii) 수지에 결합되지 않거나 또는 (a) 및 (b)의 조합인 형태로 되는 이러한 화합물을 포함하기 위한 것으로 의도되어 진다. 더욱이, 여기에서 기술되어 진 바와 같이, 편의를 위하여, 유리, 비-보호된 선형의 켈티드는 N-말단에 H_2N^- 를 그리고 C-말단에 $-\text{COOH}$ 를 가지는 종성 문자로 알려져 있지만, 그러나 이들 부분에 대해서뿐만 아니라 어떤 이온화라 수 있는 결사슬 부분(즉, 결사슬 내의 아민 부분이나 카르복실 산)에 대한 실질적인 전하는 주변의 pH에 의존할 것이고 그리고 필수적으로 나타나지 않을 것이다.

[0042]

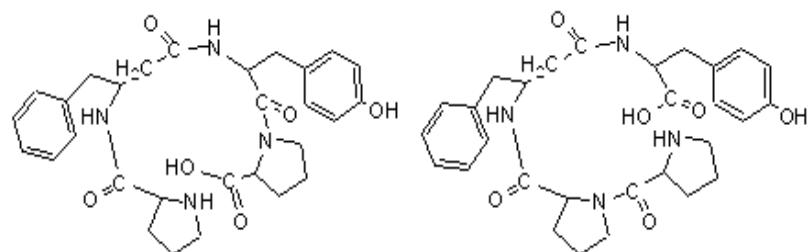
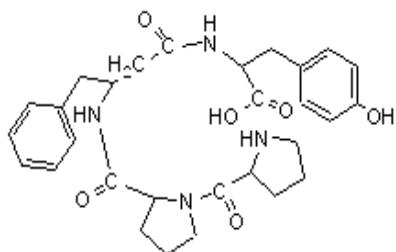
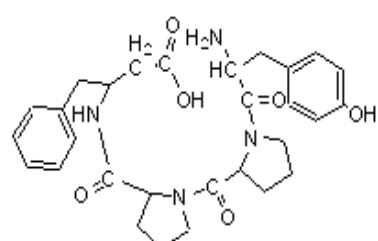
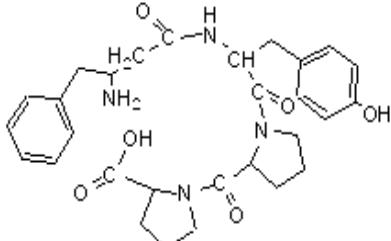
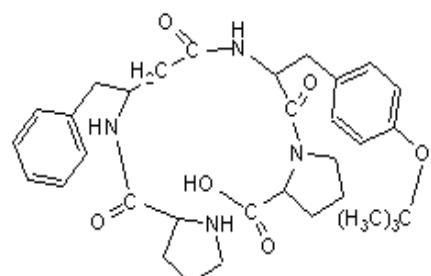
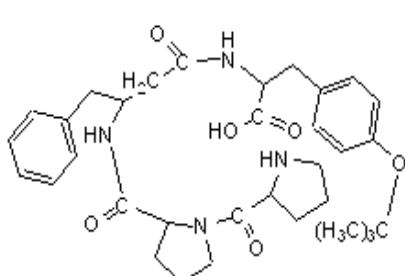
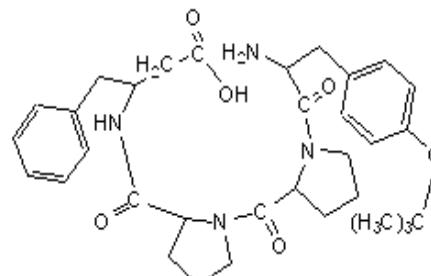
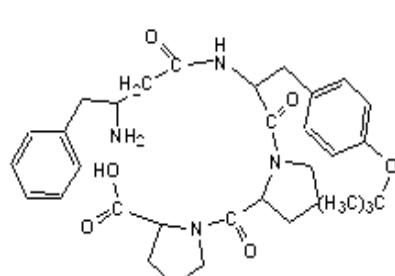
몇몇 실시형태에 있어서, 구조식 II의 화합물은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다:

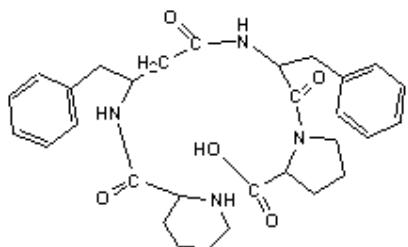
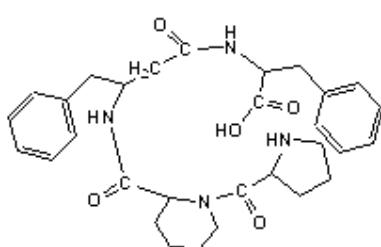
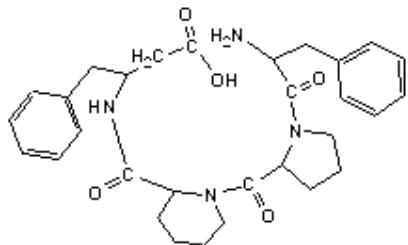
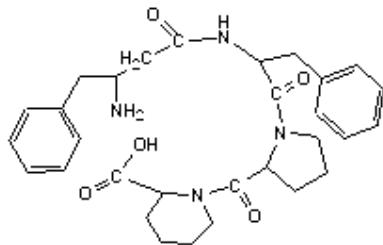
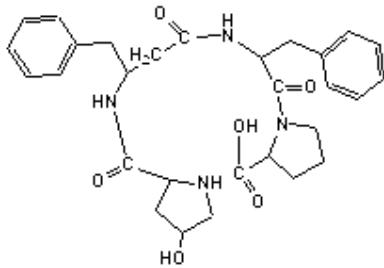
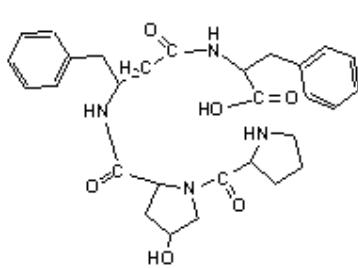
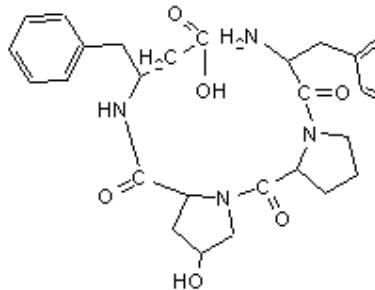
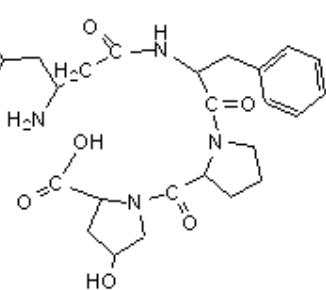
II-4-a H-Pro-3'- α -Phenyl-Phenyl-Pro- α -OH₂II-1-a H-Pro-Pro-3'- α -Phenyl-Phenyl-Pro- α -OH₂II-2-a H-N-Phen-Pro-Pro-3'- α -Phen- α -OH₂II-3-a H-N-3'- α -Phen-Phen-Pro-Pro- α -OH₂II-4-b H-Pro-Pro-Phen-3'- α -Phen- α -OH₂II-1-b H-Pro-Pro-Phen-3'- α -Phen- α -OH₂II-2-b H-N-3'- α -Phen-Pro-Pro-Phen- α -OH₂II-3-b H-N-Phen-3'- α -Phen-Phen-Pro-Pro- α -OH₂

[0043]



[0044]

II-4-e H-Pro-3-hoPhe-Trp-Pro-OH₂II-1-e H-Pro-Pro-3-hoPhe-Trp-Pro-OH₂II-2-e H₂N-Trp-Pro-Pro-3-hoPhe-OH₂II-3-e H₂N-3-hoPhe-Trp-Pro-Pro-OH₂II-4-f H-Pro-3-hoPhe-Trp-Pro-Pro-OH₂II-1-f H-Pro-Pro-3-hoPhe-Trp-Pro-t-Bu-OH₂II-2-f H₂N-Trp-t-Bu-Pro-Pro-3-hoPhe-OH₂II-3-f H₂N-3-hoPhe-Trp-t-Bu-Pro-Pro-OH₂

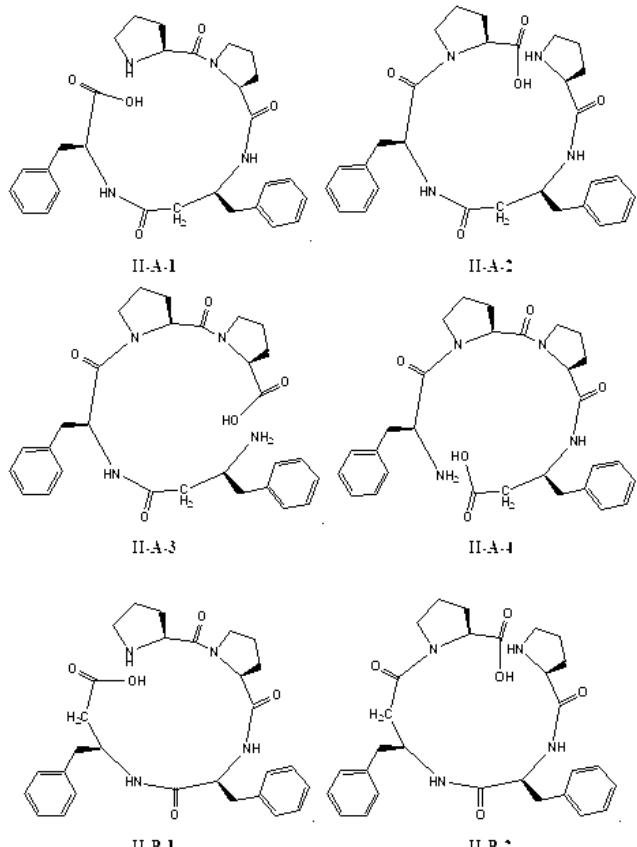
II-4-g $\text{H}_2\text{N}-\text{Pip}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{Phen}-\text{Phen}-\text{Pro}-\text{OH}$,II-1-g $\text{H}_2\text{N}-\text{Pro}-\text{Pip}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{Phen}-\text{Phen}-\text{OH}$,II-2-g $\text{H}_2\text{N}-\text{Phen}-\text{Pro}-\text{Pip}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{OH}$,II-3-g $\text{H}_2\text{N}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{Phen}-\text{Pro}-\text{Pip}-\text{OH}$,II-4-h $\text{H}_2\text{N}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{Phen}-\text{Pro}-\text{OH}$ II-1-h $\text{H}_2\text{N}-\text{Pro}-\text{Hyp}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{Phen}-\text{OH}$ II-2-h $\text{H}_2\text{N}-\text{Phen}-\text{Pro}-\text{Hyp}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{OH}$, andII-3-h $\text{H}_2\text{N}-\text{3}'\text{O}(\text{H})\text{Phen}-\text{Phen}-\text{Pro}-\text{Hyp}-\text{OH}$.

[0046]

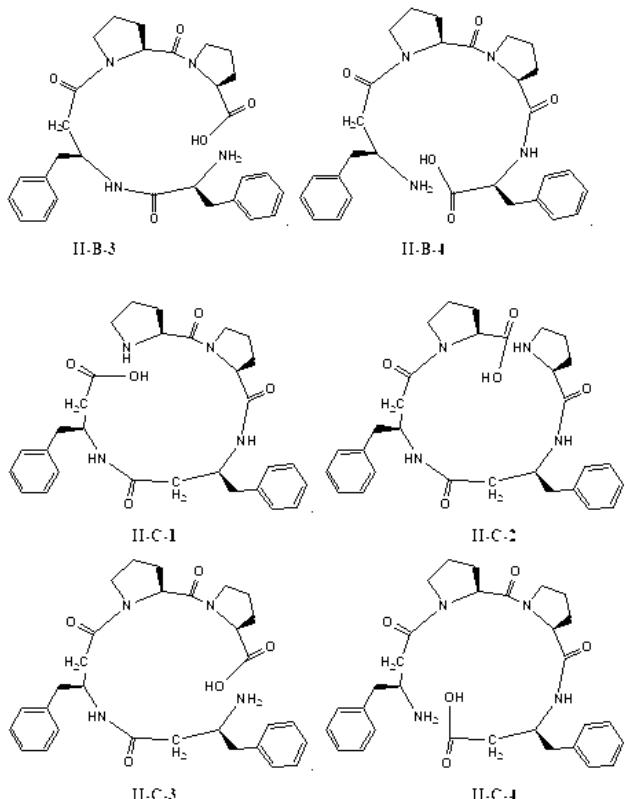
몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-a의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-1-a의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-a의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-a의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-b의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-1-b의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-b의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-b의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-c의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-1-c의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-c의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-c의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-d의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-d의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-d의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-e의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-e의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-e의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-f의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-1-f의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-f의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-f의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-g의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-1-g의 화합

물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-g의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-g의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-4-h의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-1-h의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-2-h의 화합물이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이 화합물은 구조식 II-3-h의 화합물이다.

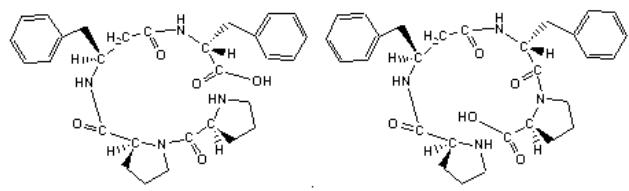
몇몇 실시형태에 있어서, 구조식 II의 화합물은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다:



[0049]

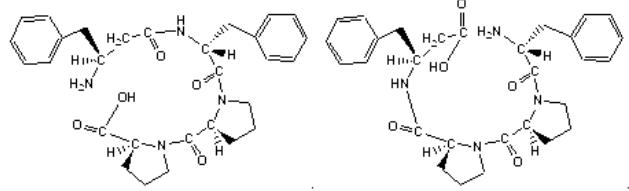


[0050]



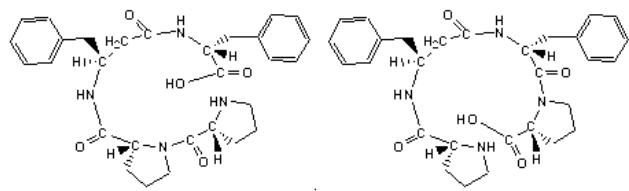
II-D-1

II-D-2



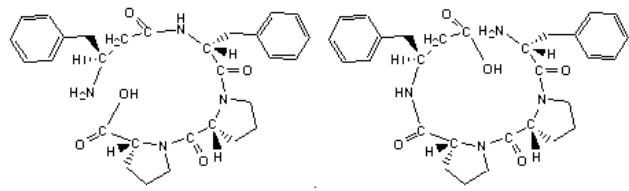
II-D-3

II-D-4



II-E-1

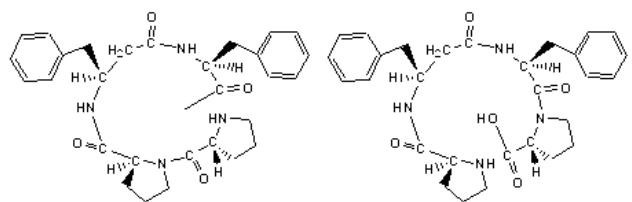
II-E-2



II-E-3

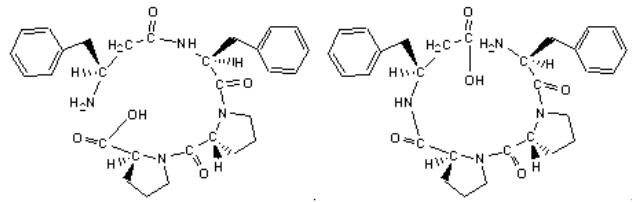
II-E-4

[0051]



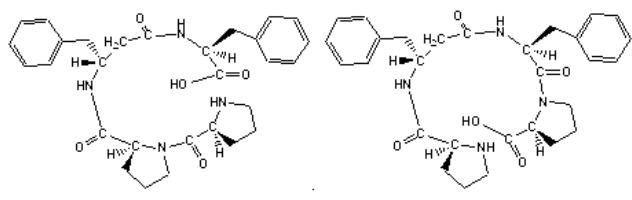
II-F-1

II-F-2



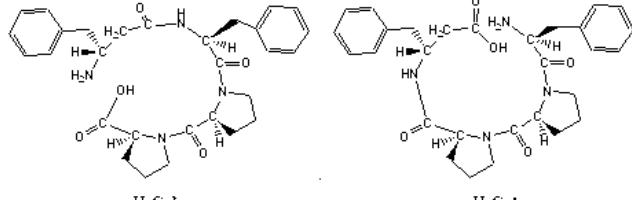
II-F-3

II-F-4



II-G-1

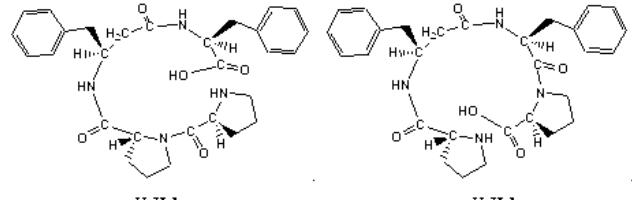
II-G-2



II-G-3

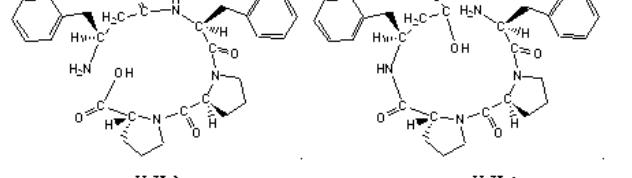
II-G-4

[0052]



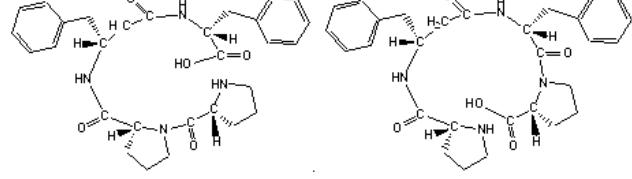
II-H-1

II-H-2



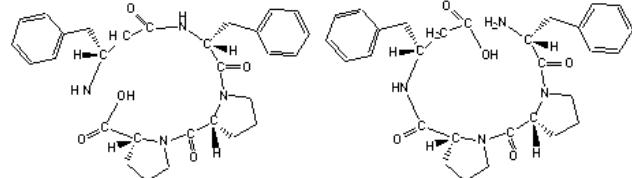
II-H-3

II-H-4



II-J-1

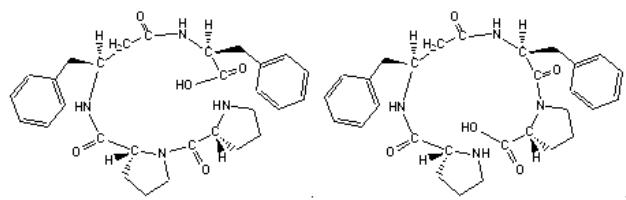
II-J-2



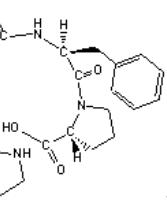
II-J-3

II-J-4

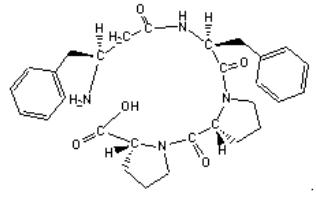
[0053]



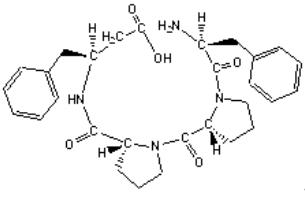
II-K-1



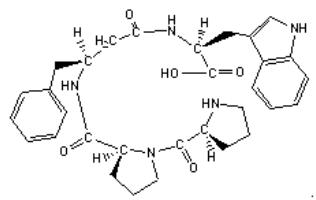
II-K-2



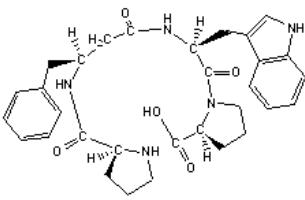
II-K-3



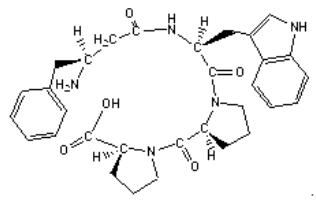
II-K-4



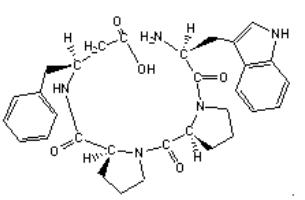
II-L-1



II-L-1

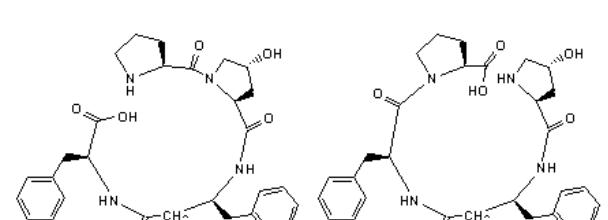
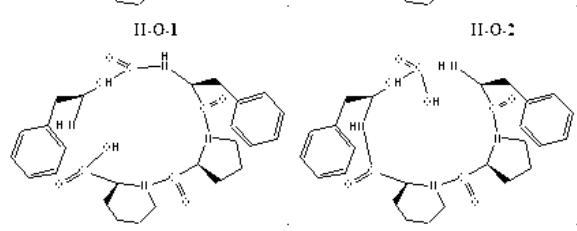
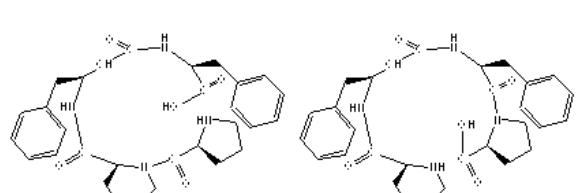
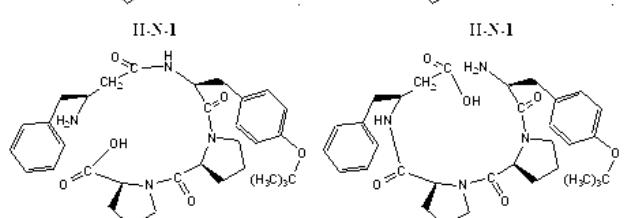
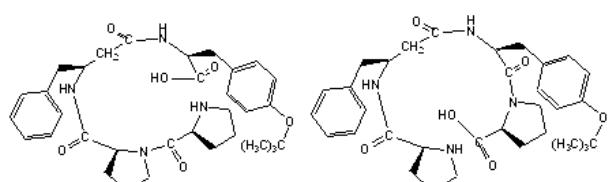
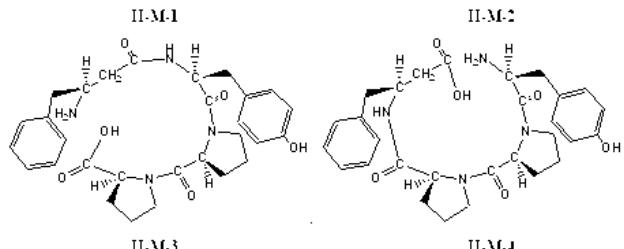
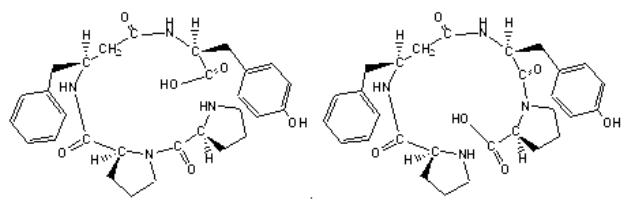


II-L-3



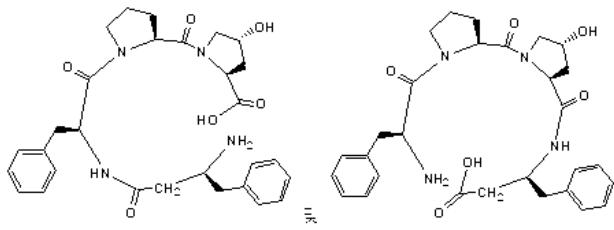
II-L-4

[0054]



[0055]

[0056]



[0057]

[0058]

발명의 상세한 설명

[0060]

구조식 I의 화합물이 면역억제 및/또는 항-염증성 활성을 나타내는 반면 동시에 공지된 화합물보다 낮은 독성을 나타내는 것이 밝혀졌다. 따라서, 구조식 I의 화합물은 면역억제 및/또는 항-염증성 제제로서 유용할 수 있다. 여기서 사용된 것으로서, 용어 "면역-매개"는 생체의 면역 체계가 과잉 반응을 하거나 및/또는 생체를 공격하는

질환 또는 증상을 언급한다.

[0061] 본 명세서 전체를 통하여 용어 및 치환체는 이들의 정의를 보유한다.

[0062] "알킬"은 선형, 분지형 또는 환형의 포화된 탄화수소 구조 및 이들의 조합을 포함하는 것으로 의도되어 진다. 저급 알킬은 1 내지 6 탄소 원자의 알킬 기를 언급한다. 저급 알킬의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸 s- 및 t-부틸 등을 포함한다. 바람직한 알킬 기는 C_{20} 또는 그 이하의 것이다. 시클로알킬은 알킬의 서브셋트이고 그리고 3 내지 8 탄소 원자를 갖는 환형 탄화수소 기를 포함한다. 시클로알킬 기의 예는 c-프로필, c-부틸, c-펜틸, 노르보닐 등을 포함한다.

[0063] C_1 내지 C_{20} 탄화수소는 알킬, 시클로알킬, 폴리시클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴 및 이들의 조합을 포함한다. 이들의 예는 벤질, 펜틸, 시클로헥실메틸, 캄포릴 및 나프탈렌에틸을 포함한다. 용어 "카르보사이클"은 어떤 산화 상태가 아닌 전체적으로 탄소로 구성된 고리 시스템을 포함하는 것으로 의도되어 진다. 따라서, (C_3 - C_{10}) 카르보사이클은 사이클로프로판, 벤젠 및 사이클로헥산과 같은 시스템을 언급하고; (C_8 - C_{12}) 카르보폴리사이클은 노르보르난, 데칼린, 인단 및 나프탈렌과 같은 시스템을 언급한다.

[0064] 알콕시 및 알콕실은 산소 원자를 통하여 모 구조에 부착된 직쇄, 분지형, 환형 형상 및 이들의 조합의 1 내지 8 탄소 원자의 기를 언급한다. 이 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 시클로프로필옥시, 시클로헥실옥시 등을 포함한다. 저급-알콕시는 하나 내지 네 개의 탄소를 포함하는 기를 언급한다.

[0065] 옥사알킬은 하나 또는 그 이상의 탄소가 산소에 의해 대체된 알킬 잔기를 언급한다. 이 예는 메톡시프로폭시, 3,6,9-트리옥사데실 등을 포함한다.

[0066] 아실은 카르보닐 기능성을 통하여 모 구조에 부착된 직쇄, 분지형, 환형 형상, 포화, 불포화 및 방향족 및 이들의 조합의 1 내지 8 탄소 원자의 기를 언급한다. 아실 잔기 내에 하나 또는 그 이상의 탄소가 모체에 대한 부착점이 카르보닐에 잔존하기만 하면 질소, 산소 또는 황에 의해 대체되어 질 수 있다. 이 예는 아세틸, 벤조일, 프로피오닐, 이소부티릴, t-부톡시카르보닐, 벤질옥시카르보닐 등을 포함한다. 저급-아실은 하나 내지 네 개의 탄소를 포함하는 기를 언급한다.

[0067] 아릴은 6-원소의 방향족 고리; 비사이클릭 9- 또는 10-원소의 방향족 고리 시스템; 또는 트리사이클릭 13- 또는 14-원소의 방향족 고리 시스템을 의미한다. 방향족 6- 내지 14-원소의 카르보사이클릭 고리는, 예를 들어 벤젠, 나프탈렌, 인단, 테트라린 및 플루오렌을 포함한다.

[0068] 헤테로아릴은 O, N, 또는 S로부터 선택된 1-3 헤테로 원자를 포함하는 5- 또는 6-원소의 헤테로방향족 고리; O, N, 또는 S로부터 선택된 1-3 헤테로 원자를 포함하는 비사이클릭 9- 또는 10-원소의 헤테로방향족 고리 시스템; 또는 O, N, 또는 S로부터 선택된 1-3 헤테로 원자를 포함하는 트리사이클릭 13- 또는 14-원소의 헤테로방향족 고리 시스템을 의미한다. 5- 내지 10-원소의 방향족 헤테로사이클 고리는, 예를 들어 이미다졸, 피리딘, 인돌, 티오펜, 벤조피라논, 티아졸, 퓨란, 벤즈이미다졸, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 퀴녹사졸린, 피리미딘, 피라진, 테트라졸 및 피라졸을 포함한다.

[0069] 아릴알킬은 아릴 잔기가 알킬을 통하여 모 구조에 부착된 치환체를 언급한다. 이 예는 벤질, 펜틸 등이다. 헤테로아릴알킬은 헤테로아릴 잔기가 알킬을 통하여 모 구조에 부착된 치환체를 언급한다. 이 예는, 예를 들어 피리디닐메틸, 피리디닐에틸 등을 포함한다.

[0070] 헤테로사이클은 하나 내지 셋의 탄소가 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택된 헤테로원자에 의해 대체된 시클로알킬 또는 아릴 잔기를 의미한다. 질소 및 황 헤테로 원자는 임의적으로 산화되어 질 수 있고, 그리고 질소 헤테로 원자는 임의적으로 4가 화합물로 되어 질 수 있다. 헤테로사이클의 예는 피롤리딘, 피라졸, 피롤, 인돌, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 테트라하이드로이소퀴놀린, 벤조퓨란, 벤조디옥산, 벤조디옥솔(통상적으로는 치환체로서 발생할 때 메틸렌디옥시페닐로 언급되어짐), 테트라졸, 모르폴린, 티아졸, 피리딘, 피리다진, 피리미딘, 티오펜, 퓨란, 옥사졸, 옥사졸린, 이소옥사졸린, 디옥산, 테트라하이드로퓨란 등을 포함한다. 헤테로아릴은 헤테로사이클이 방향족인 헤테로사이클의 서브셋인 것으로 인지되어 져 있다. 헤테로사이클의 잔기의 예는 부가적으로 피페라지닐, 2-옥소피페라지닐, 2-옥소피페리디닐, 2-옥소-피롤리디닐, 2-옥소아제페닐, 아제페닐, 4-피페리디닐, 피라졸리디닐, 이미다조릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 피라지닐, 옥사졸리디닐, 이소옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 퀴누클리디닐, 이소티아졸리디닐, 벤즈이미다조릴, 티아디아졸릴, 벤조피라닐, 벤조티아졸릴, 테트라하이드로퓨릴, 테트라하이드로피라닐, 티에닐, 벤조티에닐, 티아모르폴리닐, 티아모르폴리닐설

폭사이드, 티아모르폴리닐술폰, 옥자디아조릴, 트리아조릴 및 테트라하이드로퀴놀리닐을 포함한다.

[0071] 치환된 알킬, 아릴, 시클로알킬, 헤테로사이클 등은 각각의 잔기에서 세 개까지의 H 원자가 알킬, 할로겐, 할로알킬, 하이드록시, 저급알콕시, 카르복시, 카르보알콕시(또한 알콕시카르보닐으로 언급됨), 카르복사아미도(또한 알킬아미노카르보닐로 언급됨), 시아노, 카르보닐, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 머르캅토, 알킬티오, 술폭사이드, 술폰, 아실아미노, 아미디노, 폐닐, 벤질, 헤테로아릴, 펜옥시, 벤질옥시, 또는 헤테로아릴옥시로 대체된 알킬, 아릴, 시클로알킬, 또는 헤테로사이클을 언급한다.

[0072] 용어 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다.

[0073] 다음의 약어 및 용어는 전체를 통해서 지시된 의미를 가진다

[0074] Boc = t-부틸옥시 카르보닐

[0075] c- = 시클로

[0076] DCM = 디클로로메탄 = 메틸렌 클로라이드 = CH_2Cl_2

[0077] DIEA = N,N-디이소프로필에틸 아민

[0078] DIPEA = 디이소프로필에틸아민

[0079] DMF = N,N-디메틸포름아미드

[0080] Fmoc = 9-플루오레닐메톡시카르보닐

[0081] HATU = 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로니움 헥사플루오로포스페이트

[0082] HBTU = 0-(벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로니움 헥사플루오로포스페이트

[0083] HOAc = 아세트산

[0084] HOAt = 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸

[0085] HOBt = 1-하이드록시벤조트리아졸

[0086] Hyp = 4-하이드록시프롤린

[0087] Me = 메틸

[0088] Pip = 피페콜린산

[0089] Phe = 폐닐알라닌

[0090] Pro = 프롤린

[0091] PyBOP = 0-(벤조트리아졸-1-일)-트리스피롤리딘포스포니움 헥사플루오로포스페이트

[0092] rt = 실온

[0093] TBTU = 0-(벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로니움 테트라플루오로보레이트

[0094] TFA = 트리플루오로아세트 산

[0095] t-Hyp = *trans*-4-하이드록시프롤린

[0096] Trp = 트립토판

[0097] Tyr = 티로신

[0098] Tyr(tBu) = (0-tert-부틸) 티로신

[0099] 더욱이 유기화학자(즉, 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자)에 의해 이용되는 약어의 포괄적인 리스트는 제널 오브 오르가닉 케미스트리(Journal of Organic Chemistry)의 각 권의 제일 부분에 나타난다. 전형적으로는 "약어의 표준 리스트"로 표제된 표에 나타난 리스트는 레퍼런스로 여기에 합체되어 진다. 부가하여, 부가적 메틸렌기가 골격에 존재하는 비-천연적으로 발생하는 아미노산에 대하여서는, 표지 " $\beta^3 - \text{HO}^-$ " (또는 "베타 3-homo-")은 말단 질소 원자와 탄소 원자를 가지는 사이드-사슬 사이에 골격에 있어서 여분의 메틸렌($-\text{CH}_2-$)을 갖

는 아미노산을 언급하는 것으로 여기서 사용되어 지고; 표지 " β^2 - Ho-" (또는 "베타 2-homo-")은 말단 탄소 원자와 탄소 원자를 가지는 사이드-사슬 사이에 골격에 있어서 여분의 메틸렌을 갖는 아미노산을 언급하는 것으로 여기서 사용되어 진다.

[0100] 본 발명의 실시형태는 염의 형태, 특별하게는 산 부가 염의 형태로 구조식 I의 화합물을 포함한다. 적절한 염은 유기산 또는 무기산의 양자로 형성된 것을 포함한다. 이러한 산 부가 염은 정상적으로는, 비록 비-약학적으로 허용될 수 있는 염이 미지의 화합물의 제조 및 정제에 이용되어 질 수 있는 것일 지라도, 약학적으로 허용될 수 있는 것일 것이다. 따라서, 바람직한 염은 하이드로클로릭, 하이드로브로믹, 설퍼릭, 시트릭, 타르타릭, 포스포릭, 락틱, 피루빅, 아세틱, 석씨닉, 옥살릭, 퓨말릭, 말레이, 옥살로아세틱, 메탄술포닉, 에탄술포닉, p-톨루엔술포닉, 벤젠술포닉 및 이세티오닉 산으로부터 형성된 것을 포함한다.

[0101] 본 발명의 일 실시형태에 따른 구조식 I의 화합물은 환형의 테트라펩티드이다. 이들 펩티드의 합성은 이 기술 분야에서 공지된 방법론을 사용하여 그 자체로 합성되어 지는 상당하는 선형의 펩티드를 환형화함에 의해 성취되어 질 수 있다; 참고, 예를 들어, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964); Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985); Kelley & Winkler in *Genetic Engineering Principles and Methods*, Setlow, J. K. ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19 (1990); Stewart & Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984); Mergler et al. (1988) *Tetrahedron Letters* 29:4005-4008; Mergler et al. (1988) *Tetrahedron Letters* 29:4009-4012; Kamber et al. (eds), *Peptides, Chemistry and Biology*, ESCOM, Leiden (1992) pp. 525-526; Riniker et al. (1993) *Tetrahedron Letters* 49:9307-9320; Lloyd-Williams et al. (1993) *Tetrahedron Letters* 49:11065-11133; Andersson et al. (2000) *Biopolymers* 55:227-250; Bray, *Nature Reviews* 2:587-593 (2003), U.S. 특허번호 4,105,603, 3,972,859, 3,842,067, 3,862,925, 6,015,881, 6,197,927, 및 7,439,222 참고. 이러한 합성은 공지된 기술에서와 같이, 액체-상 또는 고체-상 합성을 통해 또는 이를 양자의 조합에 의해 달성되어 질 수 있다.

[0102] 합성의 액체 상 방법(때로는 용액 상 방법으로 언급되어짐)은 균일성 상에서 모든 반응이 진행되어 진다. 연속적인 아미노산은 원하는 펩티드 물질이 형성되어 질 때까지 용액에서 결합되어 진다. 합성 동안에, 연속적인 중간체 펩티드는 침전 및/또는 수세를 통하여 정제되어 진다.

[0103] 고체 상 펩티드 합성(SPPS)에 있어서, 제일 아미노산 또는 펩티드 기는 수지와 같은 불용성 지지체에 결합되어 진다. 연속적인 아미노산 또는 펩티드 기는 원하는 펩티드 물질이 형성되어 질 때까지 제일 아미노산 또는 펩티드 기에 부가되어 진다. 고체 상 합성의 제품은 따라서 불용성 지지체에 결합된 펩티드이다. SPPS 기술을 통하여 합성된 펩티드는 그런 다음 수지로부터 단리되어 지고 그리고 단리된 펩티드는 분리되어 진다.

[0104] 더욱 자세하게는, 고체 상 합성은 불활성 고체 지지체에 대해 보호된 아미노산을 커플링함에 의해 추정 펩티드의 카르복실 말단에서 실행된다. 불활성 고체 지지체는 최초 아미노산의 C-말단에 대한 앵커로서 작용할 수 있는 어떠한 거대분자일 수 있다. 전형적으로, 거대 분자의 지지체는 Stewart & Young, *supra*의 페이지 2 및 4에, 도 1-1 및 1-2에 도시된 바와 같이 횡-가교 폴리머 수지(즉, 폴리아미드 또는 폴리스틸렌 수지)이다. 몇몇의 경우에 있어서, C-말단 아미노산은 폴리스틸렌 수지에 연결되어 벤질 에스테르를 형성하였다. 거대 분자 지지체는 펩티드 앵커 지지체가 펩티드 합성에서 블럭된 아미노산의 α -아미노 기를 탈보호하기 위해 사용된 조건 하에서 안정하도록 선택되어 진다. 만일 염기-불안정 α -보호기가 사용되어 진다면, 그런 다음 이것이 펩티드와 고체 지지체 사이에 산-불안정 연결을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 산-불안정 에스테르 수지는 Stewart & Young, *supra*의 16페이지에 기술된 바와 같이 염기-불안정 Fmoc-아미노산 펩티드 합성에 효과적이다. 대안적으로, 산 분해에 대해 다르게 불안정한 펩티드 앵커 및 α -보호기가 사용되어 질 수 있다. 예를 들어, 페닐아세트 아미도메틸(Pam) 수지와 같은 아미노메틸 수지가 Stewart & Young, *supra*의 11 내지 12 페이지에 기술된 바와 같이 Boc-아미노산 펩티드 합성과 연계하여 잘 수행한다. Guiller et al., *Chem Rev.* 2000, 100, 2091-2157에는, 펩티드 합성을 포함하여 고체-상 유기 합성 및 조합 화학에서 링커 및 단리 전략을 검토하였다.

[0105] 초기 아미노산이 불활성 고체 지지체에 연결되어 질 후, 초기 아미노산의 α -아미노 보호기는, 예를 들어 트리메틸아민(TEA)에서 중성화 및 염화메틸렌 안에서 예를 들어 트리플루오로아세트 산(TFA)으로 제거되어 진다. 초기 아미노산의 α -아미노기의 탈보호에 따라, 합성에서 다음의 α -아미노 및 결 사슬 보호된 아미노산이 부가되어 진다. 잔여의 α -아미노 및, 만일 필요하다면, 결 사슬 보호된 아미노산은 그런 다음 고체 지지체에 연결된 중간체 화합물을 얻기 위해 농축에 의하여 원하는 순서로 순차적으로 연결되어 진다. 대안적으로, 몇몇의 아미노산은 성장하는 고체 상 펩티드 사슬에 대해 펩티드 분획의 부가가 따라 원하는 펩티드의 분획을 형성하기 위해 상호 커플되어 질 수 있다.

- [0106] 두 개의 아미노산 사이, 또는 아미노산과 펩티드 사이 또는 펩티드와 펩티드 사이의 응축 반응은 액시드 방법, 혼합된 산 무수물 방법, DCC (N,N'-디시클로헥실카르보이미드) 또는 DIC (N,N'-디이소프로필카르보이미드) 방법, 활성 에스테르 방법, p-니트로페닐 에스테르 방법, BOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스 [디메틸아미노] 포스포늄 혼사플루오로포스페이트) 방법, N-하이드록시숙신산 이미도 에스테르 방법 등과 같은 통상적인 응축 방법과 우드워드 시약(Woodward reagent) K 방법에 따라 수행되어 질 수 있다.
- [0107] 적절한 보호기로 아미노산의 어떤 반응성 결-사슬 기를 보호하는 것은 펩티드의 화학적 합성에 있어서 통상적인 것이다. 최종적으로는, 이들 보호기는 원하는 펩티드 사슬이 순차적으로 조합되어 전 후 제거되어 진다. 또한 아미노산 또는 펩티드 분획 상에 α -아미노 기의 보호가 일반적인 반면 아미노산 또는 펩티드 분획의 C-말단 카르복실 기는 고체 상 폴리펩티드 사슬에 다음의 아미노산 또는 펩티드 분획의 부가를 허용하기 위해 α -아미노 보호기의 선택적 제거가 뒤따른, 성장하는 고체 상 폴리펩티드 사슬의 유리 N-말단 아미노 산과 반응한다. 따라서, 중간체 화합물은 개개의 잔기가 여전히 결-사슬 보호기를 담지하는 펩티드 사슬 내에서 원하는 시퀀스에 위치된 각 아미노산 잔기를 포함하는 중간체 화합물이 생산되어 지는 것이 폴리펩티드 합성에서 일반적이다. 이들 보호기는 고체 상으로부터 제거에 따르는 원하는 폴리펩티드 생성물을 생성하기 위해 실질적으로 동시에 제거되어 질 수 있다.
- [0108] α - 및 ω -아미노 결 사슬은, 예를 들어 벤질옥시카르보닐 (약어로 Z), 이소니코티닐옥시카르보닐 (iNoc), o-클로로벤질옥시카르보닐 [Z(2Cl) 또는 2-Cl-Z], p-니트로벤질옥시카르보닐 [Z(NO₂)], p-메톡시벤질옥시카르보닐 [Z(OMe)], t-부톡시-카르보닐 (Boc), t-아밀옥시카르보닐 (Aoc), 이소보닐옥시카르보닐, 아다만틸옥시-카르보닐 (Adoc), 2-(4-비페닐)-2-프로필옥시카르보닐 (Bpoc), 9-플루오레닐메톡시카르보닐 (Fmoc), 메틸솔포니에톡시카르보닐 (Msc), 트리플루오로아세틸, 프탈릴 (Pht), 포밀 (For), 2-니트로-페닐솔페닐 (Nps), 디페닐포스피노티오일 (Ppt), 및 디메틸포스피노티오일 (Mpt) 기 등으로 보호되어 질 수 있다. 결 사슬 보호기의 부가적인 예는 아세틸(Ac), 벤조일 (Bz), tert 부틸 (t-Bu), 트리페닐메틸 (트리틸, Trt), 테트라하이드로파라닐, 벤질 (Bz1), 2,6-디클로로벤질, 니트로, p-톨루엔솔포닐 (Tos), 크산틸 (Xan), 벤질, 메틸, 에틸, 및 t-부틸 에스테르, 그리고 방향족 또는 지방족 우레탄-타입 보호기, 니트로 베라트릴 옥시카르보닐 (Nvoc)과 같은 광 변성 기, 및 트리메틸실릴에틸옥시카르보닐 (TEOC)과 같은 불소 변성 기를 포함한다.
- [0109] 아미노 말단 기(또한 여기서는 N-말단 보호기로 언급됨)의 예는: (1) 포밀, 아크릴릴(Acr), 벤조일(Bz) 및 아세틸(Ac)과 같은 아실-타입 보호기; (2) p-클로로벤질옥시카르보닐, p-니트로벤질옥시카르보닐, p-브로노벤질옥시카르보닐, p-메톡시벤질옥시카르보닐과 같은 치환된 Z 및 벤질옥시-카르보닐 (Z)과 같은 방향족 우레탄-타입 보호기; (3) t-부틸옥시카르보닐 (BOC), 디이소프로필메톡시카르보닐, 이소프로필옥시카르보닐, 에톡시카르보닐, 알릴옥시카르보닐과 같은 지방족 우레탄-타입 보호기; (4) 9-플루오레닐-메틸옥시카르보닐 (Fmoc), 시클로펜틸옥시카르보닐, 아다만틸옥시카르보닐, 및 시클로헥실옥시카르보닐과 같은 시클로알킬 우레탄-타입 보호기; 및 (5) 폐닐티오-카르보닐과 같은 티오우레탄-타입 보호기를 포함한다. 바람직한 보호기는 9-플루오르에닐메틸옥시카르보닐 (Fmoc), 2-(4-비페니릴)-프로필(2)-옥시카르보닐 (Bpoc), 2-페닐프로필(2)-옥시카르보닐 (Poc), 및 t-부틸옥시카르보닐 (Boc)을 포함한다.
- [0110] 카르복시 관능기를 위한 보호기는 벤질 에스테르 (OBz1), 시클로헥실 에스테르 (Chx), 4-니트로벤질 에스테르 (ONb), t-부틸 에스테르 (Obut), 4-페리딜메틸 에스테르 (OPic) 등에 의해 예시되어 진다. 아미노 및 카르복실기 이외의 관능기를 처리하는 아르기닌, 시스테인, 및 세린과 같은 특정한 아미노산이 적절한 보호기에 의해 보호되어 진다는 것이 때로 바람직하다. 예를 들어, 아르기닌의 구아니디노는 니트로, p-파라톨루엔솔포닐, 벤질옥시카르보닐, 아다만틸옥시카르보닐, p-메톡시벤즈솔포닐, 4-메톡시-2,6-디메틸벤즈솔포닐 (Nds), 1,3,5-트리메틸페닐솔포닐 (Mts) 등으로 보호되어 질 수 있다. 시스테인의 티올 기는 p-메톡시벤질, 트리틸 등으로 보호되어 질 수 있다.
- [0111] 구조식 I의 화합물이 그대로의 화학물질로서 투여되어 지는 것이 가능할 수 있지만, 바람직하기로는 이들이 약학적 조성물로서 되는 것이다. 또 다른 측면에 따르면, 본 발명의 실시형태에 따라 구조식 I의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용될 수 있는 염이나 솔베이트와 함께 이들의 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 담체 및 임의적으로 하나 또는 그 이상의 다른 구성성분을 포함하는 약학적 조성물이 제공되어 진다. 담체는 반드시 제형의 다른 구성성분과 양립성의 관점에서 "허용될 수 있는" 것이어야 하고 그리고 이들의 수용체에게 해가 되어서는 안 된다.
- [0112] 제형은 경구용, 비경구용(피하로, 표피 내로, 근육 내로, 정맥 내로, 그리고 동맥 내로를 포함함), 직장 및 국부(피부로, 볼로, 설하로 그리고 안구로를 포함) 투여에 적절한 것을 포함한다. 가장 적절한 경로는 수용체의

증상 및 질환에 의존할 수 있다. 제형은 통상적으로는 단위 복용량으로 될 수 있고 그리고 약학의 기술분야에서 잘 알려진 어느 방법에 의해 제조되어 질 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 방법은 구조식 I의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용될 수 있는 염이나 솔베이트("활성 성분")를 하나 또는 그 이상의 부가 구성성분을 구성하는 담체와 조합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미세하게 분할된 고체 담체 또는 이들 양자와 균일하게 그리고 밀접하게 조합함에 의해 그리고 그런 다음, 필요하다면, 원하는 제형으로 제품을 성형함에 의해 제조되어 진다.

[0113] 경구 투여에 적절한 본 발명의 일 실시형태에 따른 제형은 소정의 양의 활성성분을 각각 함유하는 캡슐, 카세 또는 타블렛; 파우더 또는 그레뉼; 수성 액체 또는 비수성 액체 내의 용액이나 혼탁액; 또는 유중수 액체 에멀젼이나 수중유 액체 에멀젼과 같은 별도의 단위로서 나타날 수 있다. 활성 성분은 또한 볼러스, 지약이나 페이스트로 제조되어 질 수 있다.

[0114] 타블렛은 임의적으로 하나 또는 그 이상의 부가 구성성분과 압축 또는 몰딩에 의해 제조되어 질 수 있다. 압축된 타블렛은 임의적으로 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 윤활, 표면 활성 또는 분산제와 혼합하여 파우더나 그레뉼과 같은 자유-유동 형태로 활성성분을 적절한 머신에서 압축함에 의해 제조되어 질 수 있다. 성형 타블렛은 불활성 액체 희석제로 가습된 분말 화합물의 혼합물을 적절한 기계로 몰딩함에 의해 제조되어 진다. 타블렛은 여기 안에 있는 활성 구성성분의 지속된, 지연된 또는 조절된 방출을 제공하기 위해 임의적으로 도포되어 지거나 또는 스코어되어 지고 그리고 제형화되어 진다.

[0115] 비경구적 투여를 위한 제형은 항-산화제, 완충액, 정균제, 및 의도된 수용체의 혈액과 등장인 제형으로 하는 용액으로 포함할 있는 수성 또는 비-수성 멸균 주사 용액을 포함한다. 비경구용 투여를 위한 제형은 또한 혼탁 제제 및 농후화 제제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 혼탁액을 포함한다. 제형은 다중-복용 용기의 단위-복용으로, 예를 들어 기밀하게 된 앰플 및 바이알로 제조되어 질 수 있고, 그리고 멸균 액체 담체, 예를 들어 식염수, 인산-완충 식염수(PBS) 등을 사용 바로 직전에 단지 부가하는 것만을 필요로 하는 동결-건조된(냉동) 상태로 저장되어 질 수 있다. 즉석 주사 용액 및 혼탁액은 이미 기술된 것과 같은 종류의 멸균 파우더, 그레뉼 및 타블렛으로부터 제조되어 질 수 있다.

[0116] 직장 투여를 위한 제형은 코코아 버터 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 통상의 담체를 갖는 좌제로서 제시되어 질 수 있다.

[0117] 구강에 국부적인 투여를 위한, 예를 들어 볼 내로 또는 설하로 투여를 위한 제형은 슈크로스 및 아카시아와 같은 방향 기재 또는 트리가칸쓰에 활성 성분을 포함하는 로젠지 및 젤라틴 및 글리세린 또는 슈크로스 및 아카시아와 같은 기재 내에 활성 성분을 포함하는 패스틸을 포함한다.

[0118] 바람직한 단위 복용 제형은 아래에 언급되어 지는 바와 같이 활성 성분의 유효한 복용량, 또는 이들의 적절한 분획을 포함하는 것이다.

[0119] 특별하게 상기에서 언급된 구성성분에 부가하여, 본 발명의 실시형태에 따른 제형은 어떤 제형의 타입에 대해 이 기술 분야의 통상적인 다른 제제를 포함할 수 있고, 예를 들어 경구 투여로 적절한 것은 방향 제제를 포함할 수 있다는 것으로 이해되어 쳐야 한다.

[0120] 기술된 바와 같이, 본 발명의 실시형태에 따르면, 본 발명의 실시형태에 따른 화합물은 어떤 질환이나 증상의 치료 또는 예방을 위해 사용되어 질 수 있다. 여기서 사용된 것으로 용어 "예방"은 질병의 공격을 차단하거나 또는 둔화하기 위해 미리 치료제를 투여하는 것을 언급한다. 의약 기술분야(본 청구항의 사용 방법에 대한 것)에 있어서 통상의 기술자는 용어 "예방하다"가 절대적인 용어가 아니다는 것을 인식한다. 의료 분야에 있어, 이것은 증상의 심각성이나 유사성을 실질적으로 감소하기 위해 약물의 예방적인 투여를 언급하는 것으로 이해되어지고 그리고 이것은 본 출원인의 청구항에서 의도된 관점이다. 독자의 주의는 이 기술 분야에서 표준 교과서인 "의사의 데스크 레퍼런스"에 대한 것으로 되는데, 여기서는 용어 "예방하다"가 수 백번 나온다. 의료 기술에서 통상인이 이 용어를 완전한 의미에서 해석하는 사람은 없다. 유사하게, 본 발명의 실시형태에 따른 화합물이 면역 반응을 억제하기 위해 사용되어 질 수 있다라고 기술되어 진 것에서, "억제하다"는 반응의 정도를 감소하는 것을 포함하는 것으로 이해되어 질 것이고 그리고 필수적으로 절대적으로 반응을 방지하는 것으로 이해되지는 않는다.

[0121] 본 출원에 있어서 본 발명자에게 청구항으로부터 곧 배제되지 않는 화합물은 특허되어 질 수 없는 것이 시험에 의해 밝혀질 수 있다. 이 경우에 있어, 본 출원인의 청구항에서 종 및 속의 배제는 특히 소송의 산물로 고려되어 지는 것이고 그리고 이들의 발명의 상세한 설명이나 발명자의 관념의 반영이 아니다. 조성물의 관점에서 본

발명은 공공의 소유인 것을 제외한 구조식 I 및 II의 모든 화합물이다.

도면의 간단한 설명

[0122]

본 발명의 실시형태는 도면을 참고로 보다 잘 이해되어 질 것이며; 여기서

도 1은 실시예 2에서 기술된 실험으로부터 유래된 귀 두께의 항원-특이적 증가를 나타내는 것이고;

도 2는 실시예 2에서 기술된 실험에서 관찰된 귀밀샘 림프절에서 전체의 세포 수를 나타내는 것이고;

도 3은 실시예 2에서 기술된 귀밀샘 림프절에서 살아 있는 세포와 죽은 세포의 함량을 나타내는 것이고;

도 4는 실시예 2에서 기술된 실험에서 등록된 드레이닝 림프절에서 세포 종류의 수와 참가를 나타내고;

도 5는 실시예 3에서 기술된 것과 같은 인간 혈액으로부터 단핵 세포에 대한 구조식 IA의 화합물의 독성을 나타내고;

도 6은 실시예 4에서 기술된 것과 같은 양 적혈구에 마우스의 체액 면역 반응에 대한 구조식 IA의 화합물의 복강내 투여의 효과를 나타내고;

도 7은 실시예 5에서 기술된 것과 같은 난백 일부분에 세포질의 면역 반응에 대한 구조식 IA의 화합물의 복강내 투여의 효과를 나타내고;

도 8A 및 8B는 실험실 내에서 PMBC 생존에 대한 본 발명의 실시형태에 따른 웨티드의 효과를 나타내고;

도 9A 및 9B는 실험실 내에서 PHA-유도 PMBC 증식에 대한 본 발명의 실시형태에 따른 웨티드의 효과를 나타내고;

도 10A 및 10B는 실시예 7에 기술된 바와 같이, 항원적 챌린지에 대한 반응에서 귀 두께의 변화에 대한 몇몇 화합물의 효과를 나타내고;

도 11은 실시예 7에 기술된 바와 같이, 이반스 블루 테스트에서 모세 혈관의 침투성을 나타내고;

도 12는 실시예 7에 기술된 바와 같이, 드레이닝 림프절에서 전체 세포 수를 나타내고;

도 13은 실시예 7에 기술된 바와 같이, 순환하는 백혈구의 수에 대한 화합물의 효과를 나타내고;

도 14는 실시예 7에 기술된 바와 같이, 다른 경우에 있어서 존재하는 백혈구의 종류를 나타내고; 그리고

도 15는 실시예 7에 기술된 바와 같이, 마우스 심방에서 세포의 수 및 조성에 대한 형태적 데이터를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0123]

실시예 1. 사이클릭 테트라펩티드류의 합성

[0124]

본 발명의 시릿형태에 따른 사이클릭 테트라펩티드류는 용액-상 방법 또는 고체-상 방법과 같은 공지된 웨티드 합성 방법의 사용에 의해 합성되어 질 수 있다. 일반적으로 이 합성은 다음의 두 가지의 연속적인 단계를 포함한다: (1) 선형의 테트라펩티드의 합성 그리고 (2) 환형의 테트라펩티드를 얻기 위한 고리화. 선형의 테트라펩티드는 고리화 반응에 앞서 보호된 형태로 제조되어 질 수 있고 그리고 그런 다음 탈보호되어 진다.

[0125]

상세한 설명을 위하여, 고체 지지체(Wang-타입 수지에 부착된 Fmoc-L-페닐알라닌, 또는 2-클로로 트리틸 수지에 부착된 L-베타-3-호모페닐알라닌이나 L-프롤린의 하나) 상에서 선형의 테트라펩티드류의 합성은 다음의 프로토콜에 따라 수행되어 진다:

[0126]

- 수지는 15분 동안 디메틸포름아미드(DMF) (0.25 mmol, 10 ml/g 수지) 내에서 팽윤된다.

[0127]

- Fmoc 기는 DMF (2 x 20 min) 내에서 20 피페리딘 용액으로 제거되어 진다.

[0128]

- 수지는 DMF로 수세된다(3 x 2 min).

[0129]

- 수지는 메탄올(MeOH)로 수세된다(3 x 2 min).

[0130]

- 수지는 디클로로메탄(DCM)으로 수세된다(3 x 2 min).

[0131]

- 수지 상에 아미노산 또는 웨티드 아미노 기가 20시간 동안 무수 DMF (4 ml/mmol)에 용해된 Fmoc-보호 아미노

산 (4 eq), HBTU 또는 TBTU (4 eq) 및 DIPEA (4 eq)의 혼합물로 쉐이킹함에 의해 아실화되어 진다.

[0132] 7. 수지는 DCM로 수세되어 진다(3 x 2 min).

[0133] 8. 수지는 MeOH로 수세되어 진다(3 x 2 min).

[0134] 9. 수지는 DCM로 수세되어 진다(3 x 2 min).

[0135] 10. 카이저 테스트(Kaiser test) (프롤린을 제한 모든 아미노산에 대해)가 사용되어 모든 아미노 기가 아실화되어 켰는지를 평가한다.

[0136] 만일 카이저 테스트의 결과가 부정적이라면, 수지는 DMF로 수세되고(1 x 2 min.) 그리고 새로운 커플링 사이클이 프로토콜의 2번부터 시작되어 진다. 만일 카이저 테스트의 결과가 긍정적이라면, 아실화는 제일 커플링에 대해 사용된 시약의 절반 양으로 반복되어 진다. 프롤린의 아실화의 경우에는, 카이저 테스트는 아실화 반응의 정도를 결정하기에 충분하게 민감하지 않고 그리고 이런 이유 때문에 프롤린의 경우에는 커플링 절차가 절반 양의 시약으로 반복되어 진다. 반복된 아실화반응의 경우에 있어서, 다음의 수세가 수행되어 진다:

[0137] 7A. DCM로 수세 (3 x 2 min)

[0138] 8A. MeOH로 수세 (3 x 2 min)

[0139] 9A. DCM로 수세 (3 x 2 min)

[0140] 마지막 커플링 후에, 수지는 프로토콜의 3 내지 5번에 따라 수세되어 진다. Fmoc 기는 2번에서 기술된 바와 같이 웨티드로부터 제거되어지고, 그리고 수지는 3 내지 5번에서와 같이 DMF, MeOH 및 DCM로 다시 수세되어 진다. 중합체 지지체로부터 웨티드의 단리 전에, 수지는 실온에서 감압된 분위기 하에서 KOH 펠렛 상에서 건조기 내에서 밤 세워 건조되어 진다.

[0141] 웨티드는 건조된 Wang-타입 수지로부터 트리플루오로아세트 산/물/트리아이소프로필실란 95:2.5:2.5의 혼합물(v/v/v; 10ml/1g의 웨티딜-수지)로 단리되어 진다. 얻어진 용액은 부분적으로 감압 하에서 실온에서 증류되어지고 그리고 웨티드는 10배 부피의 에테르로 침전되어 진다. 여과를 한 후, 조 웨티드는 0.05M 수성 HCl 안에 용해되어지고 그리고 증류되어 건조된다. 잔사는 물에서 용해되어지고 그리고 동결건조되어 진다.

[0142] 웨티드는 초산/디클로로메탄/트리플루오르에탄올의 1:3:1 혼합물(v/v/v; 10ml/1g의 웨티딜-수지)로 처리에 의해 2-Cl-트리틸 수지로부터 단리되어 진다. 얻어진 단리 용액에 더하여 수집된 수세 용액은 여과되고, 대류 온도 및 감압에서 건고되고, 그리고 잔사는 최소 부피의 DCM에 용해되고, 20배 부피의 혼산으로 희석되고, 그리고 다시 증류되어 진다(이회). 조 탈리 웨티드는 물에 용해되어지고 그리고 동결건조되어 진다.

[0143] 동결건조된 웨티드가 진공 하에서 KOH 및 P₂O₅ 상에서 건조기 내에서 건조되어지고 난 후, 이것은 고리화를 위해 준비되어 진다.

[0144] 상기 프로토콜에 따른 전형적인 합성에 있어서, Wang 수지(278 mg, 0.2 mmol, 0.72 mmol/g)에 부착된 Fmoc-Phe로부터 출발하여 그리고 순차적으로 Fmoc-L- β ³-homoPhe-OH, Fmoc-Pro-OH 그리고 다시 Fmoc-Pro-OH의 커플링 후, 동결건조 후에 수율이 순도 94% (HPLC)를 갖는 조 선형의 웨티드 91mg(82%)으로 된다.

[0145] 조 웨티드는 분석적 역상 (RP) HPLC 컬럼 상에서 반응 용액의 샘플을 주입함에 의해 혼적되어지는 선형의 전구체의 사라짐으로, PyBOP/HOAt/2,4,6-콜리딘(3:3:5)의 보조로 DCM 용액(웨티드 농도 2 x 10⁻⁴ millimoles/Liter) 내에서 고리화되어 진다. 고리화 반응의 말단에, 용액은 감압하에서 건고되어지고 그리고 잔사는 에틸 아세테이트(1밀리몰의 웨티드 당 1000ml의 용매) 그리고 물 내 0.5 N HCl(1밀리몰의 웨티드 당 100ml의 용액) 사이에서 분획화되어 진다. 유기 상은 물 내의 0.5 N HCl(2x), 물(1x), 1M NaHCO₃(3x) 그리고 물(1x)로 연속적으로 수세되어 진다. 유기 용매는 감압 하에서 제거되어지고 그리고 잔사의 고체는 디옥신에서 용해되어지고 그리고 동결 건조되어 진다. 조 생성물은 용매 A (물 내의 0.05% TFA) 내에서 용매 B (82% 아세토니트릴/물 내에 0.038% TFA)의 용리 기울기를 사용하여 예비적 Vydac C₁₈ 또는 Kromasil C₈ 역상 컬럼(250 mm/22 mm, 100A, 10 μ m) 상에서 정제되어 진다.

[0146] 고리화 반응의 예로서, 500ml DCM 내에 H-Pro-Pro- β ³-hPhe-Phe-OH x HCl (55.7mg, 0.1mmol)의 용액이 2,4,6-콜리딘(67.5 μ L, 0.5mmol)의 존재하에서 PyBOP(157mg, 0.3mmol) 및 HOAt(40mg, 0.3mmol)로 처리되어, 작업 및

정제 후 HPLC로 결정된 순도 99%를 가지는 환형 테트라펩티드 13.5mg(27%)를 얻는다.

[0147] 이러한 방식으로, 구조식 I-A 내지 I-P의 화합물이 합성되어 진다. 다음의 표 1은 구조식 I-A 내지 I-P의 화합물에 대한 약간의 데이터를 제공한다.

표 1

No.	MS (MH^+)/MW 계산	HPLC (Vydac C ₁₈ 250x4.6mm, 5 μm , 300A, 1mL/min, 15분 내 45-75% B. A:0.05% TFA/물, B:0.038%TFA/82% 아세토니트릴/물)	
		t _R (min)	순도(%, λ 214nm)
I-A	503.45/502.6	4.79	99.35
I-B	503.47/502.6	5.96	99.00
I-C	517.49/516.6	5.26	99.00
I-D	503.25/502.6	5.10	98.12
I-E	503.20/502.6	5.83	97.15
I-F	503.25/502.6	6.70	99.08
I-G	503.25/502.6	5.87	98.71
I-H	503.26/502.6	6.23	98.79
I-J	503.30/502.6	4.80	100.0
I-K	503.27/502.6	4.65	97.44
I-L	542.1/541.6	4.72	99.47
I-M	519.3/518.6	5.81	100.0
I-N	575.3/574.7	7.25	98.43
I-O	517.3/516.6	6.52	97.05
I-P	MS+Na ⁺ = 541.47, MS+K ⁺ = 557.44/ 518.25	9.15 (C-8 Kromasil col., 15분 내 기울 기 40-80% B)	99.00

[0149] 실시예 2. BALB/c 마우스 내에서 옥사졸론에 대한 접촉 민감성의 모델에서 0.1% 고약으로 펩티드의 치료적 유효성

[0150] 본 실험의 목적은 화합물 I-A의 치료적 작용과 일반적으로 허용된 동물 모델에 있어서의 그의 독성을 입증하기 위한 것이다. 아래에서 기술된 실험에서, 구조식 I-A의 화합물은 통상적으로 사용된 약학적 담체 상에 기재된 0.1% wt/wt 고약, 즉, 50% 바셀린과 50% 라놀린으로 구성된 고약의 형태로 치료적 제형으로 적용되어 진다. 피부 질환의 치료를 위해 광범위하게 사용되는 타크로리무스(Protopic™) 및 피메크로리무스(Eliidel™)와 같은 참고 제형과 비교하여, 마우스 내에서 옥사졸론에 대한 접촉 민감성의 이펙터 페이스의 감소에서 본 제형의 유용성이 연구되어 졌다.

물질 및 방법

[0152] 마우스: 연구를 위해 BALB/c 암컷 마우스로, 8-10주령의 것으로, 폴란드 우치의 인스티튜트 오브 라보라토리 메디신(Institute of Laboratory Medicine)으로부터 공수받았다. 마우스는 상업적으로, 펠렛화된 음식과 물은 마음대로 먹도록 공급하였다. 지역 윤리 위원회로부터 연구 승인을 받았다.

[0153] 시약: 수중유 크림 및 연고를 "Nepentes"에 의해 공급받았다. 사이클릭 테트라펩티드(화합물 I-A)는 상기한 바와 같이 합성되어 졌다. Protopic™(tacrolimus)가 아일랜드 아스텔라스(Astellas)로부터 구입되어 졌다; Eliidel™(pimecrolimus)은 노바트리스(Novartis)로부터 구입되었다; Hydrocortisone™(hydrocortisone)은 폴란드의 아프로팜 파마시아 폴스카(Aflofarm Farmacja Polska)로부터 구입되었다. DMSO는 프루카(Fluka)로부터 얻어졌다; 옥사졸론, 아세톤, 이반스 블루, 지엠사, 메이-그린발트 및 포르말린은 시그마사로부터 입수되었다.

[0154] 옥사졸론에 대한 접촉 민감성: 이 시험은 얼마간의 수정을 하여 Noonan et al. (*Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1978, 56, 523-532)에 따라 수행되어 졌다. 마우스는 복부가 면도(2×2 cm의 영역)되어 지고 그리고 24시간 후 100 μl 의 0.5% 아세톤 내 옥사졸론이 면도된 영역에 적용되어 졌다. 접촉 민감성 반응은 귀의 양 사이드 상에 50 μl 의 1% 아세톤 내 옥사졸론의 적용에 의해 5일 후에 도출되어 졌다. 귀 부종은 스프링 캘리퍼를 사용하여 48시간 후에 측정되어 진다. 결과는 귀 두께의 항원-특이적 증가로 나타났다(즉, 마우스의 백그라운드(BG) 귀 두께가 측정된 두께로부터 차감됨).

- [0155] **화합물의 적용:** 도시된 실험에서, 구조식 I-A의 화합물은 옥사졸론의 제 이차 복용으로 반응의 유도 24시간 및 26시간 후에 귀의 양 사이드(각 귀당 전체 $50\mu\text{g}$ 의 부피) 상에 0.1% 연고로 국부적으로 적용되어 졌다. 레페런스 화합물은 상업적으로 이용할 수 있는 제형의 형태로 유사한 양식으로 사용되어 졌다.
- [0156] **림프 절 세포 수의 결정:** 표피 상의 귀밑샘, 아래턱뼈의 그리고 부가적인 아래턱뼈의 림프절이 분리되고, 인산 완충 용액(PBS) 내에서 스테인레스 스크린에 대해 압압됨에 의해 균질화되고, 두번 수세되고 그리고 0.2% 트리판 블루를 함유하는 PBS 내에서 재-현탁되어 졌다. 전체 및 비생존하는 세포 수가 광학 현미경 및 뷔커의 혈구계를 사용하여 결정되어 졌다. 단지 항원의 유도 복용만으로 처리된 마우스가 백그라운드 대조군으로 되었다.
- [0157] **순환 백혈구 수 및 혈액 사진의 결정:** 마우스는 할로탄 마취되어 지고 그리고 쇄골 이탈 후 레트로오비탈 망으로부터 채혈되었다. 혈액 백혈구의 수는 투르크 용액에서 혈액의 희석에 의해 그리고 혈구계에서 세포를 계수함에 의해 결정되어 졌다. 혈액 파쇄물이 현미경 글라스 상에 준비되고, 건조되고 그리고 지엠사 및 메이-그륀발드 시약으로 염색되어 졌다. 이 파쇄물은 연속적으로 조직학적으로 검사되어 졌다. 순환하는 백혈구 수는 주어진 세포 종류의 백분율로 혈액 세포의 조성과 1mm^3 당으로 나타난다. 단지 항원의 유도 복용만으로 처리된 마우스가 백그라운드 대조군으로 되었다.
- [0158] **조직학적 분석:** 심방이 48시간 동안 4% 포르말린 용액에 고정되어 지고, 24시간 동안 수세되고, 알코올 시리즈에서 탈수되어 지고 그리고 파라핀에 매입되어 진다. 파라핀 블럭은 $6\mu\text{m}$ 섹션으로 미크론 HM310 마이크로톰(microtome)에서 슬라이스되어 졌다. 분획은 해마토실린 및 에오신으로 그리고 톨루이딘 블루로 염색되어 진다. 조직학적 분석은 니콘 에클립스 801 광학 현미경에서 수행되어 졌다. 심방의 횡-분획을 함유하는 조직학적 슬라이드 상에서, 혈관주위 및 상피하의 연결조직에서 뉴트로필, 매크로파지, 림프구 및 마스트 세포의 형태학적 측정이 수행되어 졌다. 세포는 400배 확대로 0.07mm^2 의 영역 상에서 계수되어 졌다. 형태학적 분석이 이매진 소프트웨어 NIS-Elements (Nikon)의 도움으로 수행되어 졌다. 모든 검사된 군에 대하여, 뉴트로필, 매크로파지, 림프구 및 마스트 세포의 25회 계산이 수행되어 졌다.
- [0159] **통계학:** 결과는 평균 ± 표준 편차(SE)로 표시되었다. 브라운-포르시쓰(Brown-Forsyth)의 시험이 군 사이 변화의 균일성을 결정하기 위해 사용되어 졌다. 변화가 균일할 때, 변화의 분석(원-웨이 ANOVA)이 적용되어 지고, 군들 사이의 차이의 유의성을 측정하기 위해 터키(Tukey)의 시험으로 포스토 호크(post hoc) 비교가 뒤따랐다. 비변수적 데이터는 텍스트에 나타난 바와 같이, 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis)의 변화 분석으로 평가되어 졌다. 유의성은 $p < 0.05$ 에서 결정되어 졌다. 통계학적 분석은 원도우에 대해 STATISTICA 7을 사용하여 수행되어 졌다. 통계학적 분석은 이 상세한 설명에 나타난 모든 데이터에 적용되어 진다.
- [0160] **결과:**
- [0161] 도 1에 포함된 데이터는 옥사졸론에 대해 완전하게 전개된 접촉 민감성으로 마우스에서 구조식 I-A의 화합물(도 1 및 이어지는 도면에서 "4B8M"로 표지된 것) 및 레페런스 제형의 치료적 효능을 나타낸다. 제형은 상기 방법에서 기술된 바와 같이 국부적으로 적용되어 졌다. 도 1은 단지 귀 두께의 항원-특이적 증가 (단지 항원의 유도 복용만이 주어진 비-감응된 마우스에서 측정된 백그라운드 값을 차감하는 결과로)를 나타낸다. 화합물 I-A는 귀부종의 약 80% 저해를 야기했고; Protopic™ 및 Elidel™는 각각 약 30% 및 50% 저해를 야기했다.
- [0162] 귀에서 염증화 과정의 강도는 드레이닝 림프절에서의 세포 수와 상호관련되어 졌다. 따라서, 염증화 반응의 저해는 드레이닝 림프절에서의 세포 수의 감소와 연계되어 졌다. 도 2는 구조식 I-A의 화합물뿐만 아니라 Elidel™ 양자가 비-감응된 마우스에서 등록된 준위로 드레이닝 림프절에서 림프구의 수를 감소했다는 것을 보여준다. 그러나, Protopic™로 처리된 마우스에서 림프절 세포의 수는 비처리된 마우스의 것과 유사하였다.
- [0163] 도 3은 드레이닝 림프절에서 생존하는 그리고 죽은 세포의 비율을 백분율로서 표현하여 나타낸다. 구조식 I-A의 화합물은 비처리된 마우스인 대조군에 비하여 거의 없는 독성효과를 나타냈다. 보다 높은 독성 효과는 Elidel™에 의하여 유도되었고 그리고 Protopic™은 림프절 세포에 대해서는 예외적으로 독성이다.
- [0164] 제형의 치료적인 효율성에 대한 보충적인 정보는 염증이 생긴 심방의 세포 수와 조성의 조직학적 분석으로부터 유래되어 질 수 있다. 도 4는 국부적인 염증화 과정에 포함된 기본적 세포 타입의 수 및 참여를 묘사한다. 도 4에서, Mast = 비만세포, L = 림프구, M = 매크로파지, Ne = 뉴트로필. 비처리된 마우스로부터의 심방(K+)은 뉴트로필의 높은 침입에 의해 특징되어 진다. 구조식 I-A의 화합물의 적용은 거의 완전하게 대조군에서 관찰된 변화를 뒤집었다(매크로파지 함량에 있어서 얼마간의 증가를 갖는 뉴트로필 수의 정상화반응). 다음으로 Protopic™은 전체 세포 침투의 감소 없이 각 세포 타입의 비율에 있어서의 약간의 변화를 야기했다. Elidel™은 전체

세포 수의 온화한 감소를 야기했다.

[0165] 실시예 3. 인간 혈액의 단핵 세포에 대한 화합물 I-A의 독성 대 시클로리노펩티드의 독성

[0166] 구조식 I-A의 화합물의 독성을 평가하기 위해, 인간 말초혈관 단핵 혈액 세포(PBMC)가 선택되어졌다. 이 분획은 대략적으로 80% 림프구와 20% 모노사이트로 구성된다. 레퍼런스 화합물로서는 시클로리노펩티드(CLA)가, 구조식 I-A의 화합물이 CLA의 시퀀스의 일부를 공유하기 때문에 선택되어졌다. CLA는 시클로스포린 A에 필적할 면역 억제 특성을 나타냈지만, 그러나 거의 독성이 없다.

[0167] 물질 및 방법

[0168] 세포독성 시험: 단일 공여자로부터 정맥의 혈액이 혼화된 주사기에 취해지고 그리고 인산염 완충 식염수 (PBS)로 두번 희석되어지고 그리고 Lymphoprep™(Polfa, Kutno, Poland) 상에 적용되어졌다(1.077g/ml의 밀도). 1200 x에서 20분 동안 원심분리 후, 인터페이스로부터의 단핵 세포가 수집되어지고 그리고 PBS로 3회 수세되어진다. 세포는 RPMI-1640 배지, L-글루타민, 소디움 피루베이트, 2-머캅토에탄올, 각 100 μ g/ml의 스트렙토마이신 및 페니실린, 그리고 10% 송아지 태반 혈청으로 구성된 표준 배양 배지에서 재현탁되어진다. 세포는 $2 \times 10^5 / 100\mu\text{l}$ 의 밀도로 96-웰 평탄-바닥 배양 플레이트에 분배되어진다. 화합물(구조식 I-A 및 CLA)은 최초로는 DMSO(5mg/500 μl)에 그리고 연속적으로 배양 배지에 용해되어진다. DMSO, 적절하기로는 배양 배지로 희석된 것이 대조군으로 사용되어졌다. 세포 배양 인큐베이터 안에서 24시간 배양한 후, 세포 생존성이 색도계 방법 (Hansen et al., *J Immunol Methods*, 1989, 119, 203-210)에 의해 결정되어졌다.

[0169] 결과는 도 5에 4회 반복 웰(세포 배양) \pm SE로부터 평균 광학적 밀도 값으로 제시되어 나타냈다. 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 구조식 I-A의 화합물("4B8M"으로 리스트된 것)은 10 내지 100 μ g/ml 농도 범위에서 인식할 수 있는 독성을 나타내지 않았다. 한편 CLA는 40 μ g/ml에서 통계학적으로 유의성 있는 독성 효과를 나타냈다.

[0170] 실시예 4. 생체 내에서 SRBC에 대한 체액성 면역 반응 상에 펩티드의 효과

[0171] 8 내지 12주령의 CBA 암컷 마우스가 폴란드 우치의 인스티튜트 오브 라보라토리 메디신으로부터 공수받았다. 마우스는 펠렛화된 음식과 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 지역 윤리 위원회가 이 연구를 승인했다. 양 적혈구 (SRBC) 폴란드의 브로츠월프 대학의 라이프 앤드 엔바이런먼탈 사이언스에 의해 공급되어지고 그리고 RPMI-1640 배지에서 유지되어졌다.

[0172] 생체 내에서 SRBC에 대한 일차적 체액성 면역 반응: 마우스는 복강 내로 0.2ml의 5% SRBC 혼탁액(0.5ml의 SRBC 펠렛이 0.9% NaCl 10ml의 부피에 재-현탁되어짐)으로 면역되어진다. 4일 후, 지라에서 항체-형성 세포(AFC)의 수가 아가 갤에서 국부적 용혈의 어세이를 사용하여 결정되어진다(per Mishell et al., *J Exp Med*, 1967, 126, 423-442). 결론은 5 마우스의 평균 \pm 표준 편차로서 그리고 생존하는 지라세포의 10^6 당 AFC 수로 표시되어도 6에 나타내어진다.

[0173] 마우스는 상기에 기술된 바와 같이 SRBC로 면역되어지고 그리고 2시간 후 10 또는 100 μ g의 구조식 I-A의 화합물이 제공되어진다. 시클로스포린 A(CsA)가 레퍼런스 약물로 작용되었다. SRBC에 대한 항체-형성 세포의 수가 4일 후에 측정되어졌다. 도 6에 나타난 바와 같이, 구조식 IA의 화합물이 CsA보다 양 복용량에서 보다 저해적이다.

[0174] 실시예 5. 오브알부민에 대한 생체 내에서 세포질의 면역 반응에 대한 펩티드의 효과

[0175] 숫컷 CBA 마우스 8 내지 12주령이 폴란드 우치의 인스티튜트 오브 라보라토리 메디신으로부터 공수받았다. 마우스는 펠렛화된 음식과 물에 자유롭게 접근하도록 하였다. 오브알부민은 시그마사로부터 그리고 어쥬번트는 디프코사로부터 구입되었다.

[0176] 지연된 타입 과민감성 (DTH) 시험: 마우스는 테일 베이스에 프로인드 캠플리트 어쥬번트에서 에멀젼화된 5 μ g의 오브알부민(OVA)으로 피하로 감작되어졌다. 4일 후에 마우스는 발 뒷꿈치에 프로인드 캠플리트 어쥬번트에서 50 μ g의 OVA로 챙린져되어졌다. 다음 24시간에 따라, 뒷꿈치 두께는 캘리퍼를 사용하여 측정되어졌다. 대조군(백그라운드 반응 마우스)은 감작되어 지지는 않았지만 OVA의 챙린져 복용을 수용하였다. 구조식 I-A의 화합물 및 레퍼런스 화합물이 항원의 감작 복용 2시간 전 및 24시간 후 두번 100 μ g 복강 내 복용으로 마우스에 투여되어졌다. 결과는 5마리 마우스에서 측정된 뒷꿈치 두께의 항원-특이적 증가의 평균 값으로 그리고 DTH 단위(일 DTH 단위 = 10^{-2} cm) \pm 표준편차로 표현된 도 7에 나타냈고, 이는 면역화 후 2시간 및 24시간에 두 복용량으로

주어진 구조식 I-A의 화합물이 OVA에 대해 지연된-타입 과민감성 반응을 저해했다는 것을 보여준다. 이 억제적 작용은 CLA 및 CsA의 것보다 더욱 강력하였다.

[0177] 실시예 6

[0178] 사이클릭 테트라펩티드류는 1-100 μ g/ml 농도 범위에서 전 혈액 세포 배양에 의해 종양괴사 인자 알파(TNF- α) 생성의 리포폴리사카라이드(LPS)-유도 생성에 대한 그리고 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 피토헤마글루티닌 A (PHA)-유도 증식 상에 대한 이들의 효과에 대해 실험실 내에서 시험되어 졌다. 화합물은 또한 인간 PBMC에 대한 1-100 μ g/ml 농도 범위에서 세포 독성에 대해 시험되어 졌다.

[0179] 물질 및 방법:

[0180] 시약: RPMI-1640 배지(Cibi/Life Technologies, UK), 송아지 태반 혈청(FCS, Gibco), DMSO, 피토헤마글루티닌 A (PHA), *E. coli* 균주 0111:B4 (Sigma)로부터 리포폴리사카라이드(LPS), 93-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT), SDS 및 DMF(Sigma). 배양 배지는 RPMI-1640, 10% FCS 부가, L-글루타민, 소디움 피루베이트, 2-머캅토에탄올 및 항체(스트렙토마이신 및 페니실린)로 구성되어 진다. 사이클릭 테트라펩티드류는 먼저 DMSO(5mg/ml)에 용해되어 지고, 원하는 농도로 배양 배지에 용해되어 진다.

[0181] PBMC의 분리: 정맥 혈액이 단일 공여자(남성, 62세 연령)로부터 혈관화된 주사기에 취해지고 그리고 인산염 완충 식염수(PBS)로 두번 흐석되어 진다. PBMC가 4°C에서 20분 동안 800 \times g에서 피콜-유로풀린(Ficoll-uroponine) 기울기(밀도 1.077g/ml) (Lymphoprep; PAA Laboratories) 상에서 원심분리에 의해 분리되어 진다. 림프구(20%) 및 모노사이트(80%)로 구성되는 계면 상 세포가 그런 다음 Hanks' 배지로 삼회 수세되어 지고 그리고 2×10^6 cells/ml의 밀도로 배양 배지에 재현탁되어 진다.

[0182] PHA에 대한 PBMC의 증식적 반응: 분리된 PBMC는 100 μ l 할당량 (2×10^5 cells/well)으로 96-웰 평평-바닥 플레이트 안에 분배되어 진다. PHA가 5 μ g/ml의 농도로 사용되어 졌다. 화합물은 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도로 시험되어 졌다. 적절한 흐석으로 DMSO가 대조군으로 되었다. 세포 배양 인큐베이터에서 배양 4일 후, 세포의 증식적 반응이 색도계 MTT 방법(Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, pp. 203-210)에 의하여 결정되어 졌다. 데이터는 4회 반복 웰 표준편차(SE)로부터의 평균 OD 값으로 나타내어 졌다. 배양액 "대조군(-)"은 미토겐(PHA)을 함유하지 않았다. 배양액 "대조군(PHA)"은 PHA를 함유하지만 사이클릭 테트라펩티드는 함유하지 않았다.

[0183] 독성 시험: 2×10^5 /100 μ l/well의 밀도로 PBMC가 배양 배지에 재-현탁되어 지고, 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도에서 사이클릭 테트라펩티드류로 세포 배양 인큐베이터 안에서 24시간 동안 배양되어 졌다. 세포 생존은 MTT 색도계 방법 (Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, pp. 203-210)에 의해 결정되어 졌다. 데이터는 4회 반복 웰 표준편차(SE)로부터의 평균 OD 값으로 나타내어 졌다. 배양액 "대조군(-)"은 배양 배지 내에 단지 세포만을 함유했다.

[0184] TNF 알파 활성의 결정(per Espevik et al., J. Immunol. Methods, 95 (1986):99-103): 인간 전 혈액이 RPMI-1640 배지로 10배 흐석되어 지고 그리고 1ml 할당량으로 24-웰 배양 플레이트에 분배되어 졌다. LPS가 배양액에 1 μ g/ml의 농도로 부가되어 졌다. 연구된 펩티드는 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도로 사용되어 졌다. 밤 세워 배양 후, 상등액은 수확되어 지고 그리고 시토킨 결정화 전까지 -20°C에서 동결되어 진다. TNF- α 활성은 바이오어세이트를 사용하여 결정되어 진다. 간단하게는, WEHI 164.13 세포(ATCC CRL 1751)가 사회 반복으로 2×10^4 cells/well 농도로 접종되어 진다. 분석된 상등액의 증가하는 흐석은 액티노마이신 D (1 μ g/ml)의 존재에서 표적 세포와 혼합되어 진다. 배양 20시간 후, MTT가 웰에 부가되어 지고, 그리고 배양액은 부가적으로 4시간 동안 배양되어 진다. 다음으로, 용혈 완충액(50% DMF를 갖는 20% SDS, pH 4.7)이 부가되어 지고 그리고 Dynatech 5000 스펙트로포토미터에서 630nm의 레퍼런스 파장으로 550nm에서의 광학적 밀도가 24시간 후에 측정되어 졌다. 분석의 검출 한계는 약 2.5pg/ml이다. 일 단위의 TNF- α 활성은 50% 세포사가 일어나는 곳의 상등액 흐석의 역으로서 정의되어 진다. 배양액 "대조군(-)" 표지된 것은 LPS를 함유하지 않았다. 배양액 "대조군(LPS)" 표지된 것은 LPS를 함유하고 그리고 연구된 어떠한 화합물도 함유하지 않았다. 통계학적인 분석은 데이터가 단일 배양액 (웰)으로부터 유래되기 때문에 적용되어 지지 않았다.

[0185] 세포 성장 및 사에 대한 색도계 MTT 분석: 이 분석은 "per Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, 119 pp. 203-210"에 따라 수행되었다. 간략하게는, 25 μ l의 MTT(5mg/ml) 저장 용액이 세포 배양의 종단에 웰 당 부가되어 지고 그리고 플레이트는 세포 배양 인큐베이터에서 3시간 동안 배양되어 졌다. 그런 다음, 100 μ l의 추출 용액(50% DMF를 갖는 20% SDS, pH 4.7)이 부가되어 졌다. 부가적으로 밤 세워 배양한 후, 광학 밀도가 550nm에

서 측정되었다(Dynatech 5000).

[0186] 응용할 때, 결과는 평균 \pm 표준편차(SE)로 나타났다. 브라운-포스թ(Brown-Forsyth)의 시험은 군들 사이의 변화의 균일성을 결정하기 위해 사용되어졌다. 변화가 균일할 때, 변화의 분석(원-웨이 ANOVA)이 적용되어지고, 군들 사이의 차이의 유의성을 측정하기 위해 터키의 시험으로 포스토 호크 비교가 뒤따랐다. 유의성은 $p < 0.05$ 에서 결정되어졌다. 통계학적 분석은 윈도우에 대해 STATISTICA 6.1을 사용하여 수행되어졌다.

결과

[0188] PBMC의 생존에 대한 화합물의 효과: 24시간 배양에서 PMBC 생존에 대한 웨티드의 효과는 도 8A 및 8B에 나타났다. 웨티드 4B8M(화합물 I-A)는 레퍼런스 화합물로서 포함되어졌다. DMSO의 적절한 희석은 대조군 배양에 부가되어졌다. 결과는 연구된 농도 범위에서 화합물의 독성 신호를 보이지 않았다. 도면에서, P01 = 화합물 I-D, P02 = 화합물 I-E, P03 = 화합물 I-F, P04 = 화합물 I-G, P05 = 화합물 I-H, P06 = 화합물 I-J, P07 = 화합물 I-K, P08 = 화합물 I-L, P10a = 화합물 I-M, P10b = 화합물 I-N, 그리고 P11 = 화합물 I-O.

[0189] 도 8A 및 8B는 PBMC의 생존에 대한 시험된 웨티드의 효과를 보여준다. 도 8A: 통계학(모든 비교 대 적절한 희석에서의 DMSO): 100 μ g/ml: 4B8M NS($P = 0.9999$); P01 NS($P=1.0000$); P02 NS($P=1.0000$); P03 NS($P=1.0000$); P04 NS($P = 0.9047$); P05 NS($P=1.0000$); P06 NS($P=0.9999$); P07 NS($P=1.0000$); 10 μ g/ml: 4B8M NS($P = 1.0000$); P01 NS($P=1.0000$); P02 NS($P=1.0000$); P03 NS($P=1.0000$); P04 NS($P=1.0000$); P05 NS($P=1.0000$); P06 NS($P=1.0000$); P07 NS($P=1.0000$); 1 μ g/ml: 4B8M NS($P = 1.0000$); P01 NS($P=1.0000$); P02 NS($P=1.0000$); P03 NS($P=1.0000$); P04 NS($P=1.0000$); P05 NS($P=1.0000$); P06 NS($P=0.8253$); P07 NS($P=1.0000$) (ANOVA). 도 8B: 통계학(모든 비교 대 적절한 희석에서의 DMSO): 100 μ g/ml: 4B8M NS($P=0.0669$); P08 NS($P = 0.9957$); P10b NS($P=1.0000$); 10 μ g/ml: 4B8M NS($P=0.9999$); P08 NS($P=1.0000$); P10b NS($P = 1.0000$); 1 μ g/ml: 4B8M NS($P=0.3176$); P08 NS($P=0.9999$); P10b NS($P = 1.0000$) (ANOVA).

[0190] PHA-유도 PMBC 증식에 대한 웨티드의 효과: PMBC의 증식적 반응에 대한 웨티드의 효과는 도 9A 및 9B에 나타났다. 웨티드 4B8M은 레퍼런스 화합물로서 포함되어졌다. DMSO의 적절한 희석은 대조군 배양에 부가되어졌다.

[0191] 도 9A: PHA-유도 PMBC 증식에 대한 웨티드의 효과: 통계학(모든 비교 대 적절한 희석에서의 DMSO): 1 μ g/ml: 4B8M NS ($P=0.9995$); P01 NS($P=1.0000$); P02 NS($P=1.0000$); P03 NS($P=1.0000$); P04 NS($P=0.9047$); P05 NS($P=0.5198$); P06 NS($P=1.0000$); P07 NS($P=0.1445$); 10 μ g/ml: 4B8M NS($P=1.0000$); P01 NS($P=0.9999$); P02 NS($P=1.0000$); P03 NS($P=0.9930$); P04 NS($P=0.4297$); P05 NS($P=1.0000$); P06 NS($P=1.0000$); P07 NS($P=0.8647$); 100 μ g/ml: 4B8M NS($P=1.0000$); P01 NS($P=1.0000$); P02 NS($P=0.9982$); P03 P=0.0001; P04 NS($P=0.9970$); P05 NS($P=0.2037$); P06 NS($P=0.1257$); P07 NS($P=1.0000$) (ANOVA).

[0192] 도 9B: PHA-유도 PMBC 증식에 대한 웨티드의 효과: 통계학(모든 비교 대 적절한 희석에서의 DMSO): 1 μ g/ml: 4B8M NS($P=0.9919$); P08 NS($P=0.9999$); P10b NS($P=1.0000$); 10 μ g/ml: 4B8M NS($P=1.0000$); P08 NS($P=1.0000$); P10b NS($P=0.2763$); 100 μ g/ml: 4B8M NS($P=0.4941$); P08 NS($P=1.0000$); P10b NS($P=0.9933$) (ANOVA).

[0193] 전 혈액 세포 배양에서 LPS-유도 TNF- α 생성에 대한 웨티드의 효과: 전 혈액 세포 배양에서 LPS-유도 TNF- α 생성에 대한 웨티드의 효과는 표 2 및 3에 나타났다. 웨티드 4B8M은 레퍼런스 화합물로서 포함되어졌다. DMSO의 적절한 희석은 대조군 배양에 부가되어졌다.

표 2

LPS-유도 TNF- α 생성에 대한 웨티드의 효과

화합물	화합물 농도 (μ g/ml)	TNF- α (pg/ml)	% 저해 vs. DMSO
대조군 (-)	-	92	-
대조군 (LPS)	-	6668	-
단지 DMSO	1	8167	-
	10	8006	-
	100	196	-
4B8M (화합물 I-A)	1	7364	9.8
	10	7176	10.4
	100	178	9.2

P01 (화합물 I-D)	1	7016	14.1
	10	5757	28.1
	100	141	28.1
P02 (화합물 I-E)	1	6614	19.0
	10	6346	20.7
	100	176	10.2
P03 (화합물 I-F)	1	6052	25.9
	10	5222	34.8
	100	76	61.2
P04 (화합물 I-G)	1	5463	33.1
	10	5302	33.8
	100	58	70.4
P05 (화합물 I-H)	1	7123	12.8
	10	7203	10.0
	100	110	43.9
P06 (화합물 I-J)	1	8033	1.6
	10	7658	4.4
	100	203	0.0
P07 (화합물 I-L)	1	6453	21.0
	10	7284	9.0
	100	163	16.8

표 3

[0195]

LPS-유도 TNF 알파 생성에 대한 웨티드의 효과

화합물	화합물 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TNF 알파(pg/mL)	% 저해 vs. DMSO
대조군 (-)	-	223	-
대조군 (LPS)	-	4260	-
단지 DMSO	1	4550	-
	10	4351	-
	100	854	-
4B8M (화합물 I-A)	1	4097	10.0
	10	4416	-
	100	979	-
P08 (화합물 I-M)	1	4039	11.2
	10	3363	22.7
	100	269	68.5
P10b (화합물 I-O)	1	3792	16.7
	10	3739	14.0
	100	282	67.0

[0196]

실시예 7. 마우스에서 툴루엔 디이소시아네이트-유도 귀 염증화에 대한 화합물 I-A의 저해적 효과

[0197]

툴루엔 디이소시아네이트(TDI)에 의해 유도된 BALB/c 마우스에서 귀 염증을 억제하는 화합물 I-A의 효능. 상업적으로 이용할 수 있는 ProtopicTM(tacrolimus) 및 ElidelTM(pimecrolimus)이 레퍼런스 약물로 작용되었다.

[0198]

물질 및 방법

[0199]

마우스: 8-10주령의 BALB/c 암컷 마우스가 폴란드 우치의 인스티튜트 오브 라보라토리 메디신(Institute of Laboratory Medicine)으로부터 공수받았다. 마우스는 상업적으로, 펠렛화된 음식과 물은 마음대로 먹도록 공급하였다. 지역 윤리 위원회로부터 연구를 승인받았다.

[0200]

시약: 화합물 I-A는 상기한 바와 같이 합성되어 졌다. ProtopicTM(tacrolimus)가 아일랜드 아스텔라스(Astellas)로부터 구입되어 졌다; ElidelTM(pimecrolimus)은 노바트리스(Novartis)로부터 구입되었다; DMSO는 프루카(Fluka)로부터 얻어졌다; TDI, 아세톤, 이반스 블루, 트리판 블루, 지엠사, 메이-그仑발트, 헤마톡실린,

에오신, 틀루이딘 블루 및 포르말린은 시그마사로부터 입수되었다.

- [0201] TDI에 대한 면역 반응. 이 시험은 약간의 변화를 가하여 Yamamoto, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 550, 166-172에 따라 수행되어졌다. 마우스는 복부가 면도(2×2 cm의 영역)되어 지고 그리고 24시간 후 $100\mu\text{l}$ 의 3% 아세톤 내 TDI가 3일 연속으로 적용되어졌다. 14일 후에 반응은 귀의 양 사이드 상에 $50\mu\text{l}$ 의 0.3% TDI의 적용에 의해 도출되어졌다. 절차는 매 3일마다 5회 반복되어졌다. 귀 두끼는 스프링 캘리퍼(Mitutoyo)를 사용하여 TDI로 각각의 챌린지 후 5시간 및 24시간에 측정되어 진다.
- [0202] 화합물의 적용: 화합물 I-A는 TDI로 각각의 챌린지 후 1시간에 귀의 양 사이드(각 귀당 전체 $100\mu\text{l}$ - $50\mu\text{l}$ 의 부피) 상에 0.1% 연고의 형태로 국부적으로 적용되어졌다. 레퍼런스 화합물은 유사한 양식으로 적용되어졌다.
- [0203] 림프 절 세포 수의 결정: 표피 상의 귀밀샘, 아래턱뼈의 그리고 부가적인 아래턱뼈의 림프절이 분리되고, 인산 완충 용액(PBS) 내에서 스테인레스 스크린에 대해 압압됨에 의해 균질화되고, PBS로 두 번 수세되고 그리고 0.2% 트리판 블루를 함유하는 PBS 내에서 제-현탁되어졌다. 전체 및 비생존하는 세포 수가 광학 현미경 및 뷔커의 혈구계를 사용하여 계수되어졌다.
- [0204] 순환 백혈구 수 및 혈액 사진의 결정: 마우스는 할로탄 마취되어 지고 그리고 쇄골 이탈 후 레트로오비탈 망으로부터 채혈되었다. 혈액 백혈구의 수는 투르크 용액에서 혈액의 희석에 의해 그리고 혈구계에서 세포를 계수함에 의해 결정되어졌다. 혈액 파쇄물이 현미경 글라스 상에 준비되고, 건조되고 그리고 지엠사 및 메이-그륀발드 시약으로 염색되어졌다. 이 파쇄물은 연속적으로 조직학적으로 검사되어졌다. 세포 수는 주어진 세포 종류의 백분율로 혈액 세포의 조성과 $1\mu\text{l}$ 당으로 나타난다.
- [0205] 이반스 블루 시험. 마우스는 정맥 내로 1mg의 이반스 블루가 0.2ml 의 0.9% NaCl 내에서 주입되어졌다. 30분 후, 마우스는 희생되어지고, 귀는 잘려지고, 계량되고, 그리고 37°C 에서 18시간 동안 $50\mu\text{l}$ 의 1M KOH에 함침되어진다. 염료는 $450\mu\text{l}$ 의 0.2M 인산 및 아세톤(5:13 비율)을 사용하여 귀로부터 추출되어진다. 샘플은 15분 동안 $3,000\text{rpm}$ 에서 원심분리되어진다. 상동액의 광학 밀도(OD)는 630nm 에서 측정되어진다. 이반스 블루의 양($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 표준 곡선 상에서 기초되어 결정되어진다. 결과는 100mg 의 젖은 조직 당 이반스 블루의 양으로 표시되어진다. 단지 항원의 유도 복용만으로 처리된 마우스는 백그라운드 대조군으로 작용했다.
- [0206] 조직학적 분석: 심방이 48시간 동안 4% 포르말린 용액에 고정되어지고, 24시간 동안 수세되고, 알코올 시리즈에서 탈수되어지고 그리고 파라핀에 매입되어진다. 파리핀 블럭은 $6\mu\text{m}$ 섹션으로 미크론 HM310 마이크로토(microtome)에서 슬라이스되어졌다. 분획은 해마토실린 및 에오신으로 그리고 틀루이딘 블루로 염색되어진다. 조직학적 분석은 니콘 애클립스 801 광학 현미경에서 수행되어졌다. 혈관주위 및 상피하의 연결조직에서 뉴트로필, 매크로파지, 림프구 및 마스트 세포의 형태학적 측정이 심방의 횡-분획을 함유하는 조직학적 슬라이드 상에서 수행되어졌다. 세포는 400배 확대로 0.07mm^2 의 영역 상에서 계수되어졌다. 형태학적 분석이 이매진 소프트웨어 NIS-Elements (Nikon)을 사용하여 수행되어졌다. 모든 검사된 제제에 대하여, 뉴트로필, 매크로파지, 림프구 및 마스트 세포의 25회 계산이 수행되어졌다.
- [0207] 통계학적 분석: 도 10A 및 10B에서의 결과는 평균 ± 표준 편차(SE)로 표시되었다. 브라운-포르시쓰(Brown-Forsyth)의 시험이 군 사이 변화의 균일성을 결정하기 위해 사용되어졌다. 변화가 균일할 때, 변화의 분석(원-웨이 ANOVA)이 적용되어지고, 군들 사이의 차이의 유의성을 측정하기 위해 터키의 시험으로 포스토 호크 비교가 뒤따랐다. 비변수적 데이터는 텍스트에 나타난 바와 같이, 크루스칼-윌리스(Kruskal-Wallis)의 변화 분석으로 평가되어졌다. 유의성은 $p < 0.05$ 에서 결정되어졌다. 통계학적 분석은 윈도우에 대해 STATISTICA 7을 사용하여 수행되어졌다.
- [0208] 결과
- [0209] 귀의 두께에 대한 화합물의 효과: TDI에 대한 체액성 면역 반응은 상기 방법에서 기술된 것과 같이 하여 유도되어졌다. 마우스는 항원으로 각 챌린지 한 시간 후에 테트라펩티드 (구조식 I-A, 도 10A 및 10B에서 4B8M로 표기됨) 및 레퍼런스 화합물로 국부적으로 처리되어졌다. 처리의 효과는 도 10A 및 10B에 나타내어졌다. 여기서는 도면에 나타난 시험의 일에 투여 5시간(도 10A) 및 24시간(도 10B) 후에 귀 두께 측정을 보여준다. TDI에 대한 대조군 반응은 각 항원 챌린지 후 점진적으로 평가되어졌다(5시간 측정에서 가장 잘 보임). 결과는 귀의 팽창을 감소하는데 있어 화합물의 차별화된 유효성을 나타냈다.
- [0210] 도 10A: 14일: 대조군 vs 4B8M $P=0.0005$; 대조군 vs Protopic™ $P=0.0002$; 대조군 vs Elidel™ $P=0.0152$; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ NS; 17일: 대조군 vs 4B8M $P=0.0001$; 대조군 vs Protopic™ $P=0.0001$; 대

조군 vs Elidel™ P=0.0377; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P=0.0002; 20일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0001; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P=0.0001; 23일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0001; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P=0.0001; 27일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0001; 대조군 vs Elidel™ P=0.0001; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P=0.0001 (ANOVA). 도 10B: 14일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0001; 대조군 vs Elidel™ P=0.0004; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ NS; 17일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0023; 대조군 vs Elidel™ P=0.0004; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ NS; 20일: 대조군 vs 4B8M P=0.0006; 대조군 vs Protopic™ P=0.0003; 대조군 vs Elidel™ P=0.0156; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ NS; 23일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0001; 대조군 vs Elidel™ P=0.0039; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P=0.0027; 27일: 대조군 vs 4B8M P=0.0001; 대조군 vs Protopic™ P=0.0001; 대조군 vs Elidel™ P=0.0023; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P=0.0016 (ANOVA).

[0211]

피부 베셀의 침투성에 대한 화합물의 효과: 모세혈관 베셀의 침투성은 도 11에 나타내어 졌고, 여기서 이반스 블루 시험에서 모세혈관 베셀의 침투성을 보여준다. 상기에 기술된 바와 같이, 절차는 TDI로 오차 챕린지 24시간 후(28일에)에 수행되어 졌다. 도 11에 도시된 바와 같이, 혈액 베셀 침투성의 비율은 각각의 마우스 군에서 귀 두께에 대한 화합물의 효과와 염격하게 상호관련되어 진다. 통계학: BG vs 대조군 P = 0.0248; 대조군 vs 4B8M(I-A) P = 0.030; 대조군 vs Protopic™ NS; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M(I-A) vs Protopic™ NS; 4B8M(I-A) vs Elidel™ NS(ANOVA).

[0212]

드레이닝 램프절에서 세포의 수에 대한 화합물의 효과: 도 12는 드레이닝 램프절에서의 세포의 전체 수를 도시한다. 도 12에 나타난 바와 같이, 화합물 I-A로 처리된 마우스는 거의 백그라운드 수준(비-감작 마우스)으로 램프절 세포 수의 감소를 나타냈다. 통계학: BG vs 대조군 P = 0.0001; 대조군 vs 4B8M (I-A) P = 0.0001; 대조군 vs Protopic™ NS; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M(I-A) vs Protopic™ P = 0.0183; 4B8M (I-A) vs Elidel™ P = 0.0001 (Kruskal-Wallis의 ANOVA).

[0213]

순환하는 백혈구의 수에 대한 화합물의 효과: 도 13은 순환하는 백혈구의 수에 대한 화합물의 효과를 나타낸다; 연구된 제제의 적용은 비감작된 마우스인 대조군에서 관찰된 수준으로 순환하는 백혈구의 수를 낮춘다. 통계학: BG vs 대조군 P = 0.0001; 대조군 vs 4B8M (I-A) P = 0.0001; 대조군 vs Protopic™ P = 0.0001; 대조군 vs Elidel™ P = 0.0001; 4B8M (I-A) vs Protopic™ NS; 4B8M (I-A) vs Elidel™ NS (ANOVA).

[0214]

혈액 세포 조성물에 대한 화합물의 효과: TDI에 완전하게 전개된 반응을 한 대조군 마우스에서의 혈액 조성은 백그라운드 마우스인 대조군에 비하여 뉴트로필과 에오시노필의 증가된 함량에 특징이 있다(각 경우에 있어 백혈구의 종류의 브레이크다운을 나타내는 도 14 참고). 혈액 사진은 4B8M(I-A)의 적용에 의해 정상화되어 졌지만 (뉴트로필과 에오시노필의 함량 감소) 그러나 Protopic™ 또는 Elidel™의 투여에 따라서는 그렇지 않았다. 통계학: 밴드(B): BG vs 대조군 NS; 대조군 vs 4B8M (I-A) NS; 대조군 vs Protopic™ P = 0.0500; 대조군 vs Elidel™ P = 0.0500; 4B8M (I-A) vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ NS (Kruskal-Wallis의 ANOVA); 분획(S): BG vs 대조군 P = 0.0131; 대조군 vs 4B8M (I-A) NS; 대조군 vs Protopic™ NS; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M (I-A) vs Protopic™ P = 0.0163; 4B8M (I-A) vs Elidel™ NS (Kruskal-Wallis의 ANOVA); 에오시노필(E): BG vs 대조군 P = 0.0001; 대조군 vs 4B8M (I-A) P = 0.0001; 대조군 vs Protopic™ NS; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M (I-A) vs Protopic™ NS; 4B8M vs Elidel™ P = 0.0146 (ANOVA of Kruskal-Wallis); 림프구(L): BG vs 대조군 P = 0.0001; 대조군 vs 4B8M (I-A) P = 0.0043; 대조군 vs Protopic™ NS; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M (I-A) vs Protopic™ P = 0.0345; 4B8M (I-A) vs Elidel™ NS (Kruskal-Wallis의 ANOVA).

[0215]

심방에서 세포 조성물에 대한 화합물의 효과: 도 15는 심방에서 세포의 수 및 조성물에 대한 형태학적 데이터를 제공한다. 연구된 마우스 군 중에서 다른 심방 내의 세포 종류의 조성은 도 15에 나타냈다. 비-감작된 마우스인 대조군에서 현저한 잔류 세포 종류는 마스토사이트와 뉴트로필이다(각각 분석된 영역 당 10 및 5세포). 치료제로 처리되지 않은, 감작된 대조군 마우스에 있어서, 마스토사이트의 수는 두 배 증가했고 그리고 뉴트로필은 거의 5-배 증가했다(각각 20 및 23 세포). Protopic™ 및 화합물 I-A는 세포 수를 14 및 14.8로 감소하여 효과적 이었다. 통계학: Ne(뉴트로필): BG vs 대조군 P = 0.0001; 대조군 vs 4B8M (I-A) P = 0.0151; 대조군 vs Protopic™ P = 0.0001; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M (I-A) vs Elidel™ P = 0.0003 (Kruskal-Wallis의 ANOVA); M(마크로파지): BG vs 대조군 P = 0.0144; 대조군 vs 4B8M (I-A) NS; 대조군 vs Protopic™ NS; 대조군 vs Elidel™ P=0.0255; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M (I-A) vs Elidel™ P = 0.0031 (Kruskal-Wallis의 ANOVA); L(림프구): BG vs 대조군 NS; 대조군 vs 4B8M (I-A) NS; 대조군 vs Protopic™ NS;

대조군 vs Elidel™ P = 0.0023; 4B8M vs Protopic™ NS; 4B8M (I-A) vs Elidel™ P = 0.0001(Kruskal-Wallis의 Anova); Mast(마스토사이트): BG vs 대조군 P = 0.0001; 대조군 vs 4B8M (I-A) NS; 대조군 vs Protopic™ P = 0.0001; 대조군 vs Elidel™ NS; 4B8M (I-A) vs Protopic™ NS; 4B8M (I-A) vs Elidel™ P = 0.0001(Kruskal-Wallis의 ANOVA).

[0216] 설시예 8 - 화합물 I-B 및 I-C의 실험실 내 시험

[0217] 방법

[0218] 콘카나발린 A (ConA)에 대한 지라세포의 증식적 반응: 지라는 적혈구를 용혈하기 위해 0.83% NH₄Cl 용액 내에서 플라스틱 스크린에 대하여 압착되어 졌다(실온에서 5분 동안 배양). 세포는 그런 다음 Hank's 배지로 두 번 수세되어지고, 찌꺼기를 제거하기 위해 글라스 울 컬럼을 통과하고, 10% 송아지 태반 혈청, L-글루타민, 소디움 피루베이트, 2-머캅토에탄올, 스트렙토마이신 및 페니실린(100 µg/ml)으로 보충된 RPMI-1640으로 구성된 "배양 배지"로 언급된 배양 배지에서 재현탁되어 진다. 세포는 그런 다음 2×10^5 cells/100µl/well의 밀도로 96-웰 편평-바닥 조직 배양 플레이트(Nunc) 안에 분배되어 진다. Con A(2.5 µg/ml)가 부가되어 세포 증식을 유도한다. 화합물이 1 - 100 µg/ml의 복용량으로 배양액에 부가되어 진다. 배양 삼일 후, 세포 증식은 색도계 MTT 방법(Hansen MB, *J Immunol Methods*, 1989, 119, 203-210)을 사용하여 결정되어 졌다. 결과는 550nm에서 평균 광학 밀도(OD)±사회 반복 결정(웰)으로부터의 SE로서 나타냈다.

[0219] 양 적혈구(SRBC)에 대한 실험실 내에서 이차 체액성 면역 반응: 마우스는 0.2ml의 5%(v/v) SRBC 혼탁액으로 비경구적으로 감작되어 졌다. 4일 후에 이를 마우스로부터 지라가 분리되고 그리고 단일 세포 혼탁액이 PBS 용액에서의 균질화에 의해 제조되어 진다. PBS 내의 세포가 원심분리에 의해 수세되어 진 후, 세포는 배양 배지에 5×10^6 cells/ml의 밀도로 재현탁되어 진다. 세포는 순차적으로 1ml 할당량으로 24-웰 배양 플레이트에 분배되어지고 그리고 0.05ml의 0.005% SRBC가 각 웰에 항원으로서 부가되어 진다. 화합물이 4일 배양 기간의 시작 시에 1-100 µg/ml의 농도 범위로 배양액에 부가되어 진다. 배양액에서 항체-형성 세포(AFC)의 수가 Mishell et al., *J Exp Med*, 1967, 126, 423-442에 따른 아가 갤에서 지엽적 헤모라이시스의 방법을 사용하여 결정되어 졌다.

[0220] 독성 시험: 배양 배지에 2×10^5 cells/100µl/well의 밀도로 재-현탁된 지라세포는 화합물(1-100 µg/ml)로 세포 배양 인큐베이터 안에서 24시간 동안 배양되어 졌다. 세포의 생존은 MTT 색도계 방법에 의하여 결정되어 졌다. 결과는 4웰로부터 550nm에서 평균 광학 밀도(OD)로서 나타냈다. 각 화합물 농도에서 세포의 생존가능성이 각각의 화합물 농도에 상응하는 적절한 DMSO 대조군(100% 생존)에 비교되어 졌다.

[0221] 결과

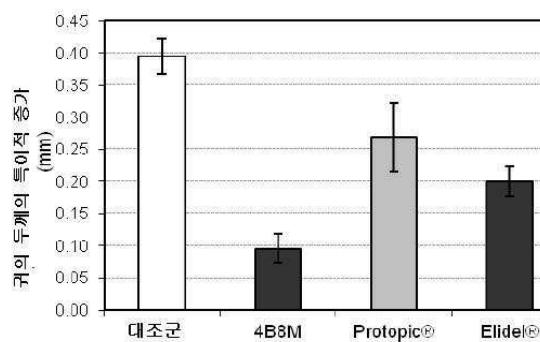
[0222] 50-100 µg/ml 농도에서, 화합물 I-C는 콘카나발린 A-유도 마우스 지라세포 증식에 대한 강력한 저해적 효과를 나타냈다. 100 µg/ml에서, 이 화합물은 지라세포에 대해 70% 독성을 나타냈다. 10 µg/ml 및 100 µg/ml에서, 화합물 I-C는 마우스 지라세포 배양에서 SRBC에 대한 실험실 내 체액성 면역 반응의 모델에서 각각 33% 및 80% 억제를 보였다. 오브알부민에 대한 지연된 형태의 과민감성의 모델에서, 화합물 I-C는 100 µg의 복용량에서 26.9% 저해를 보여, 화합물 I-A의 72.7% 저해에 비교되어 졌다.

[0223] 100 µg/ml 농도에서, 화합물 I-B는 콘카나발린 A-유도 지라세포 증식에 대한 약한 항증식적 효과를 입증하였다; 이러한 효과는 보다 낮은 농도에서는 관찰되어 지지 않았다. 화합물 I-B는 이 농도에서 30% 독성을 가졌다.

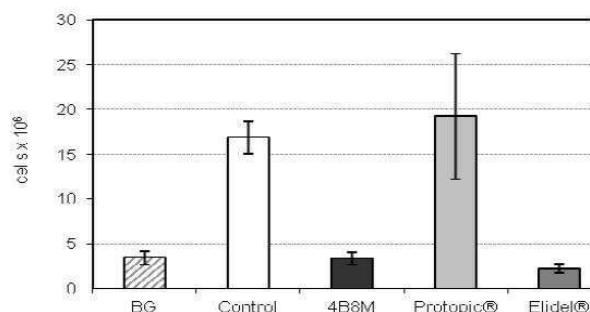
[0224] 비록 상기한 본 발명이 상세한 설명의 목적을 위해 보다 자세하게 기술되어 졌지만, 어떠한 변경 또는 수정이 여기에서 기술된 본 발명의 범주로부터 이탈함이 없이 이루어질 수 있는 것은 이 기술분야의 통상인에게 아주 명백하게 될 것이다.

도면

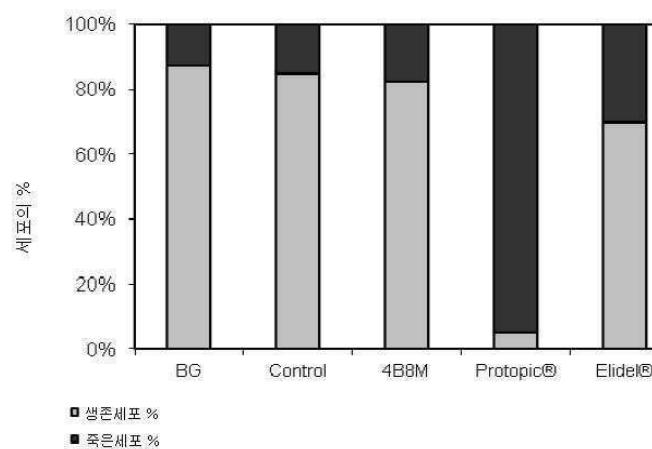
도면1



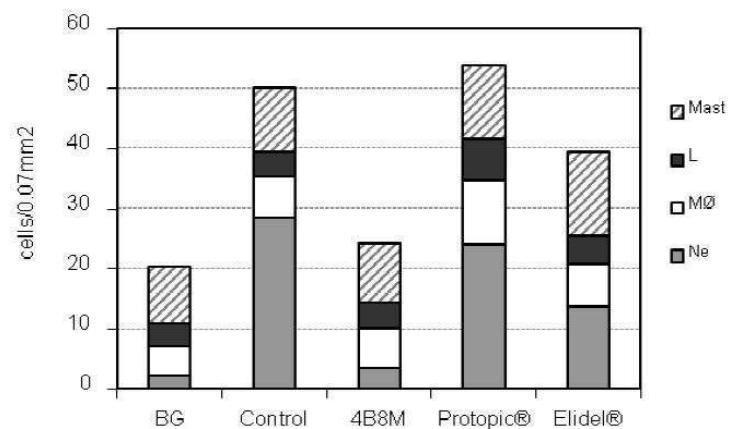
도면2



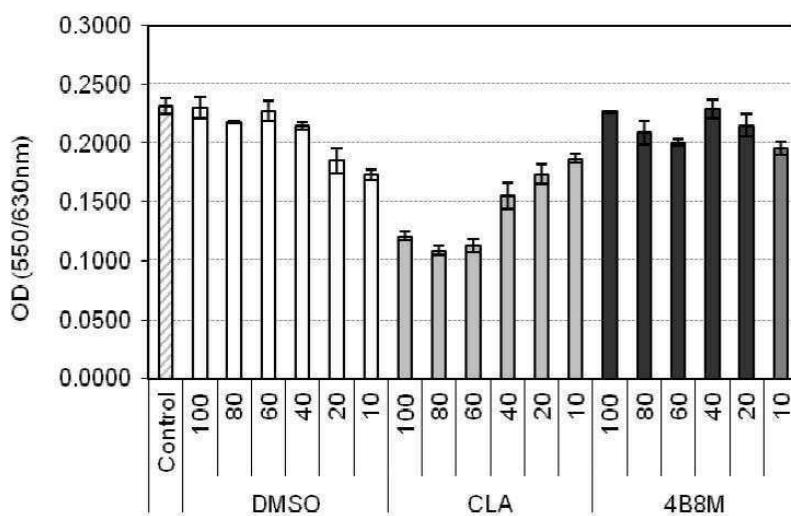
도면3



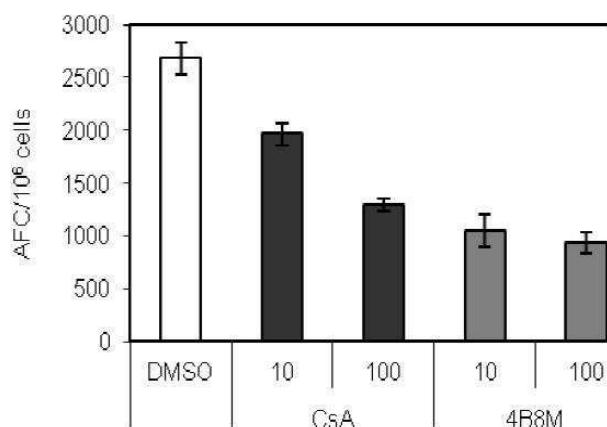
도면4



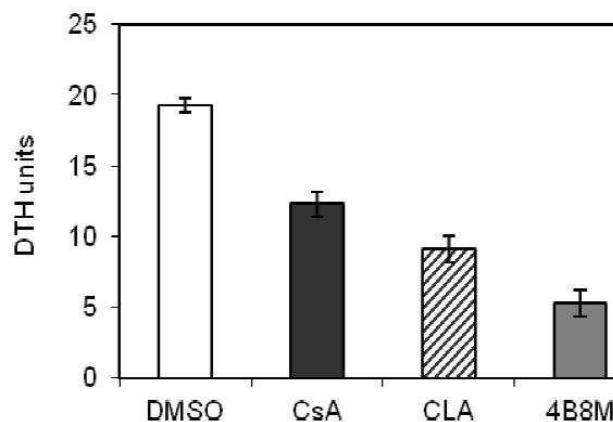
도면5



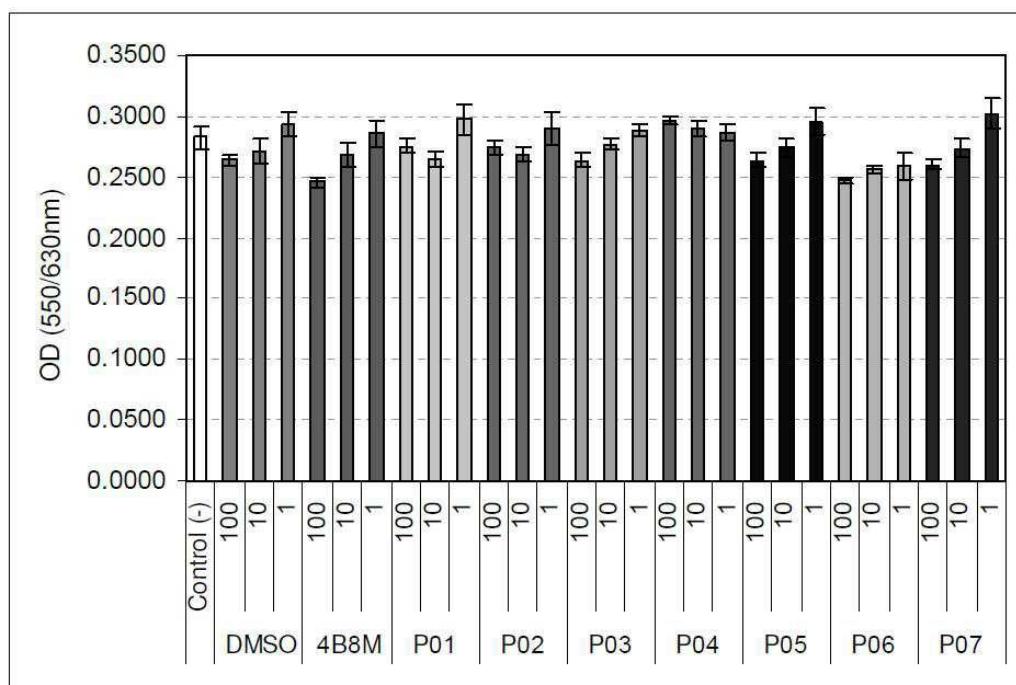
도면6



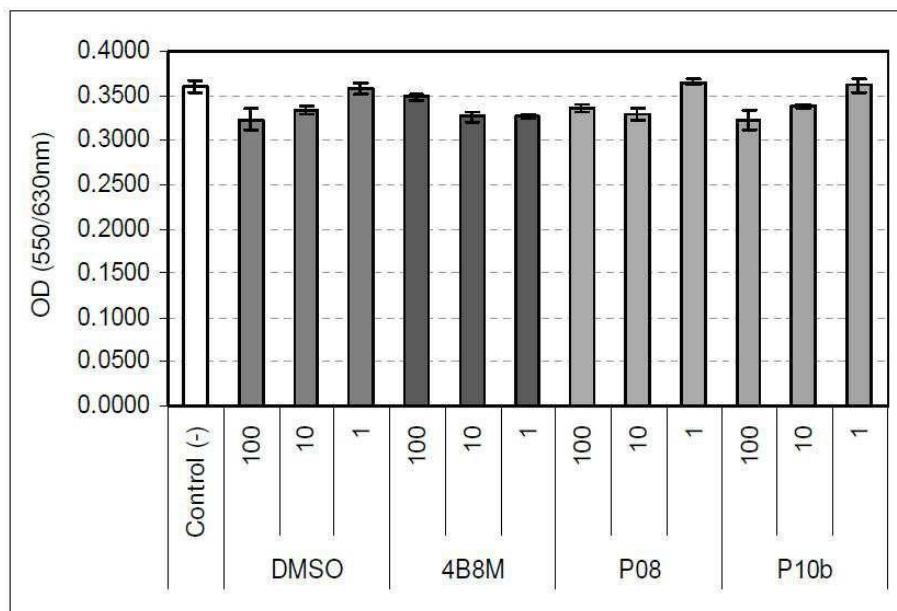
도면7



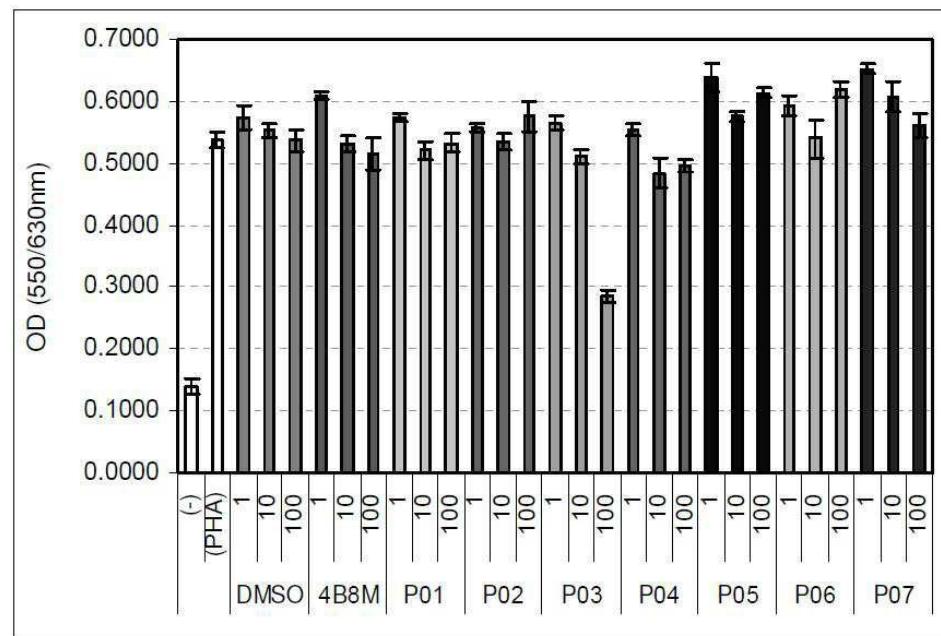
도면8a



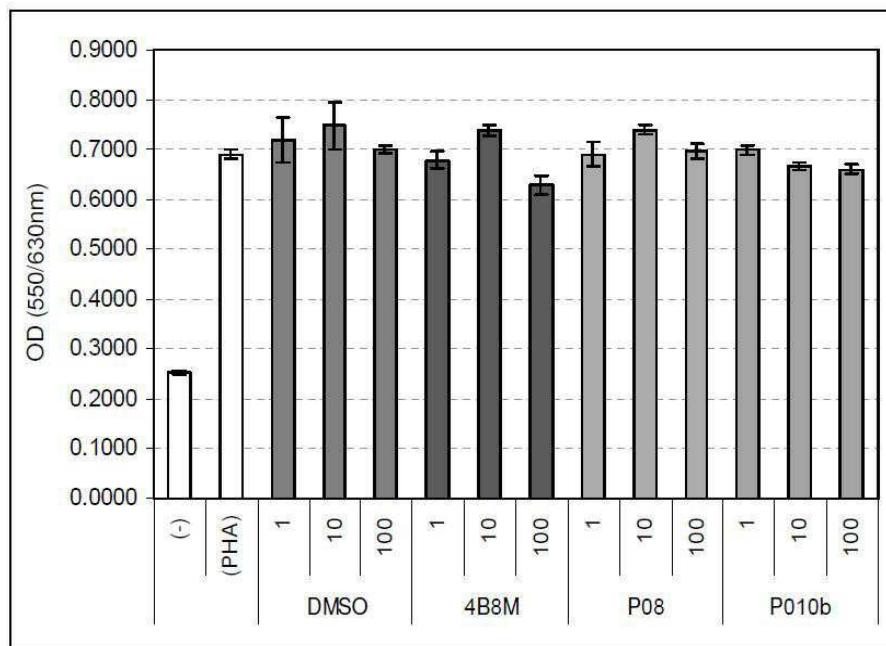
도면8b



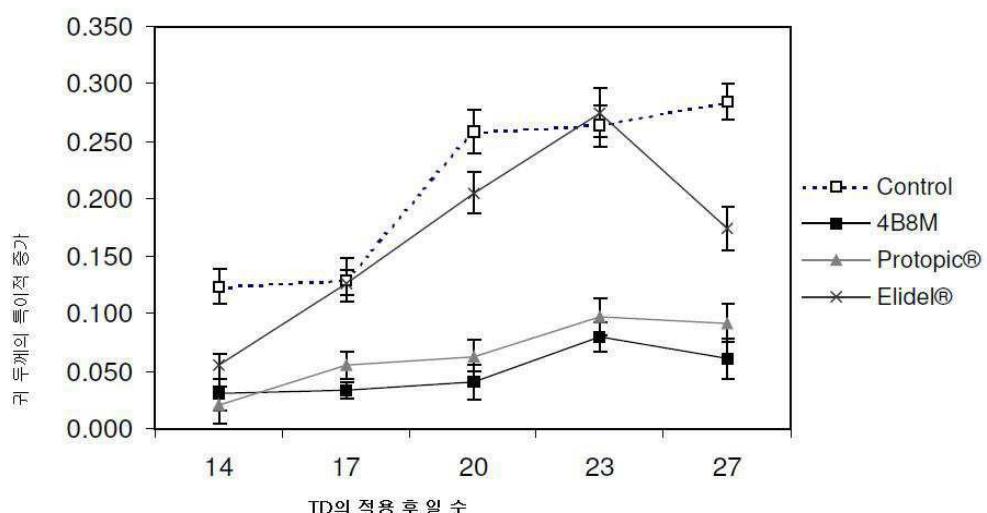
도면9a



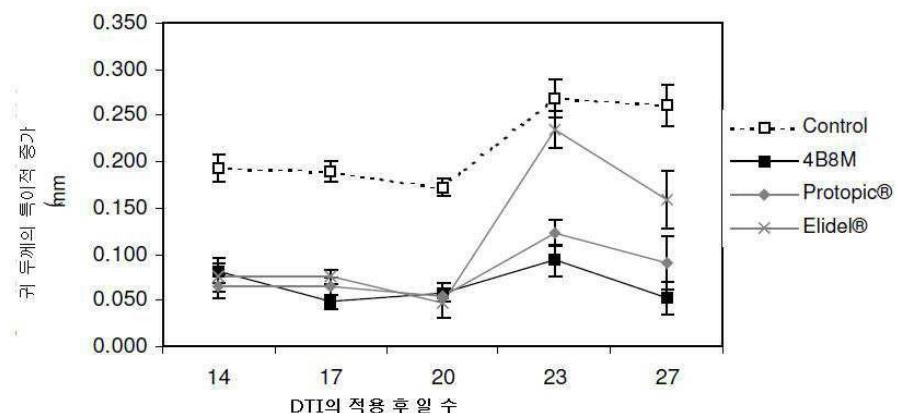
도면9b



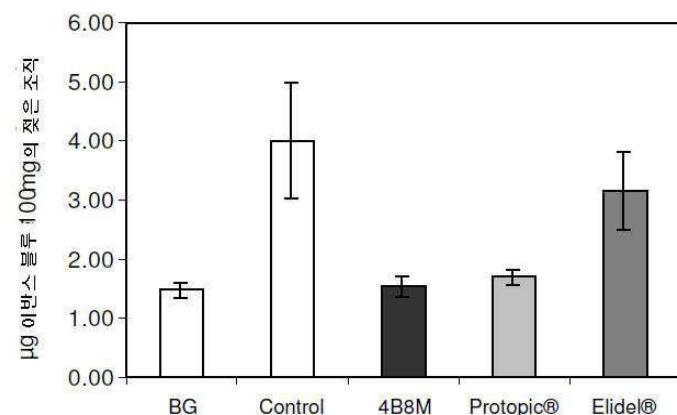
도면10a



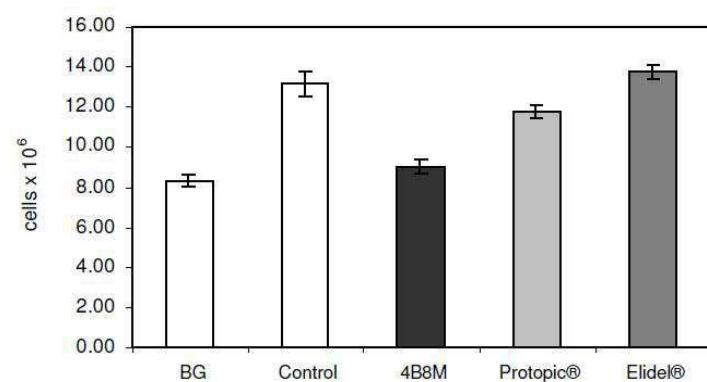
도면10b



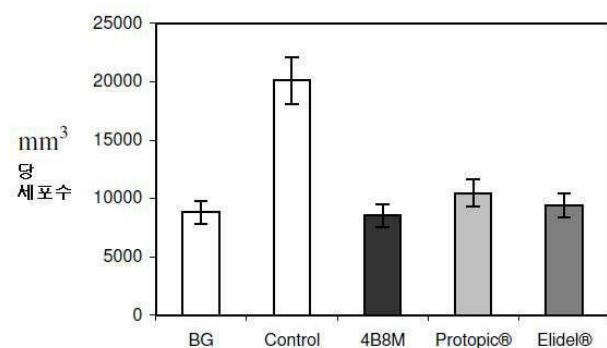
도면11



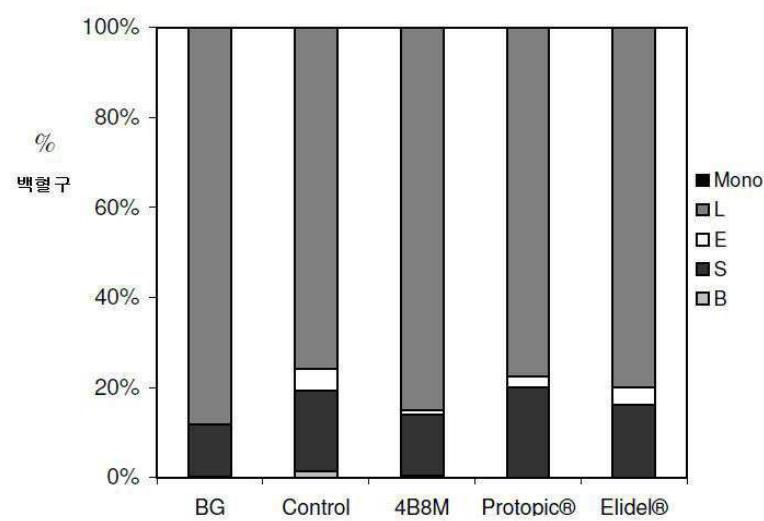
도면12



도면13



도면14



도면15

