

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

C07D 207/16 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년10월20일  
(11) 등록번호 10-0636713  
(24) 등록일자 2006년10월13일

(21) 출원번호	10-2000-7013421	(65) 공개번호	10-2001-0043906
(22) 출원일자	2000년11월28일	(43) 공개일자	2001년05월25일
번역문 제출일자	2000년11월28일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/011924	(87) 국제공개번호	WO 1999/61421
국제출원일자	1999년05월28일	국제공개일자	1999년12월02일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 시에라리온,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 60/087,064 1998년05월28일 미국(US)

(73) 특허권자 바이오젠 아이텍 엠에이 인코포레이티드  
미국 매사추세츠 02142 캠브리지 캠브리지 센터 14

(72) 발명자 리웬-첵  
미국매사추세츠주02173렉싱턴스프링스트리트192

길알란  
미국매사추세츠주01867-3959리딩헤더드라이브6

(74) 대리인 김태홍  
김진희

김성기

심사관 : 성선영

(54) 신규의 V L A - 4 억제제: o M e P U P A - V

요약

본 발명은 OMePUPA-V, (R)-N-[[4-[[[(2-메틸페닐아미노)카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프로필-3-메틸]-β-알라닌, 세포 부착 억제제, 약학 조성물 및 셀 부착 조절 병리 치료 방법에 관한 것이다.

명세서

기술분야

본 발명은 세포 부착 및 세포 부착이 매개하는 병변의 억제, 경감, 또는 예방하는 데 유용하게 사용되는 신규의 화합물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 이들 화합물을 포함하는 약학적 제제와, 이들을 사용하여 세포 부착 및 세포 부착 매개 병인을 억제 및 예방하는 방법에 관한 것이다. 본발명의 화합물과 약학적 조성물은 치료제 또는 예방제로서 사용가능하다. 이들은 많은 염증 질환 및 자가 면역질환의 치료용으로 사용되기에 특히 적합하다.

배경기술

세포 부착은 세포가 서로 연합하여 특정 목적 부위로 이동하거나 또는 세포외 매트릭스내에 편재화되는 과정을 말한다. 이러한 세포 부착 과정 자체는 다수의 생물학적 현상의 기초가 되는 기본적인 대사중의 하나라 할 수있다. 예를 들면, 세포 부착은 조혈 세포가 내피 세포에 부착되면 이들 조혈세포가 혈관에서 상처 부위로 이동되게 한다. 이 세포 부착은 그와 같은 방식으로 포유동물에서 염증 및 면역 반응등의 다수 병변과 관계한다.

분자를 근거로 하여 세포 부착을 연구한 결과, 다양한 세포 표면 거대 분자--포괄적으로는 세포 부착 분자 또는 수용체로 알려져 있음--가 세포-세포 및 세포-매트릭스간의 상호 반응을 매개하는 것으로 밝혀졌다. 예컨대, "인테그린"이라고 지칭되는 상과(上科) 단백질은 조혈세포와 이의 미소 환경간의 부착성 상호 반응에서 중요한 매개 역할을 한다 (M.E.Hemler, "VLA Proteins in the Integrin Family: Structures, Functions, and Their Role on Leukocytes." Ann.Rev.Immunol., 8, p. 365(1990)). 인테그린은 α 및 β로 지칭되는 두개의 서브 유닛, 즉 현재까지 확인된 17개 이상의 상이한 α서브 유닛(α1-α10, α-L, α-M, α-D, α-X, α-IIb, α-V, 및 α-E) 및 9개 이상의 상이한 β(β1-β9) 서브유닛으로 구성된 비공유 결합 이중 이량체 복합체이다. 이러한 α서브유닛 성분 및 β서브유닛 성분의 유형에 따라 각 인테그린 분자는 아과(亞科)로 분류가능하다.

인테그린 α4β1(최근 항원-4("VLA-4") 또는 CD49d/CD29로 공지됨)은 여러가지 다양한 세포-세포 및 세포-매트릭스 부착성 상호 반응 둘다에 관여하는 백혈구 세포 표면 수용체이다(M.E.Helmer, Ann. Rev. Immunol., 8, p. 365(1990)). 이것은 시토킨이 유도하는 내피 세포 표면 단백질과 혈관세포 부착 분자("VCAM-1")의 수용체로서의 기능을 할뿐 아니라 세포외 매트릭스 단백질의 피브로넥틴("FN")의 수용체로서의 역할을 담당한다(Ruegg등, J. Cell Biol., 177, p 179(1991); Wayner 등., J.Cell Biol., 105 p. 1973(1987);Kramer등., J.Biol. Chem., 264, p. 4684(1989); Gehlsen 등. Science, 24, p. 1228(1988). 항-VLA-4-모노클로날 항체("mAb's")는 실험관내에서 및 생체내에서 VLS-4-의존성 부착 상호반응을 억제하는 것으로 나타났다(Ferguson 등, Proc. Natl. Acad. Sci., 88, p. 8072(1991); Ferguson 등, J. Immunol., 150, p. 1172(1993)). 생체내 실험 결과는 VLS-4-의존성 세포 부착을 억제하면 몇몇 염증 병변 및 자가 면역 병변을 예방, 억제, 또는 변형할 수있음을 제시한다(R, L. Lobb등., "The Pathophysiologic Role of α4 Integrin In Vivo", J. Clin. Invest., 94, pp. 1722-28(1994)).

VLA-4에 결합하는데 필요한 최소의 활성을 갖는 아미노산 서열을 동정하기 위해서, Komoriya등은 특정 종의 피브로넥틴의 CS-1-영역(VLA-4 결합 도메인)에 존재하는 아미노산 서열이 주서열인 다양한 중첩성 펩티드를 합성하였다("The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-Specific Adhesion Site(CS1)Within the Alternatively Spliced

*Type III Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine*", J.Biol. Chem., 266(23), pp15075-79(1991)). Komoriya 등은 8개의 아미노산 펩티드인 Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr를 동정했을 뿐 아니라 이보다 적은 수의 중첩 펩타이드 2개인 Glu-Ile-Leu-Asp-Val 및 Leu-Asp-Val-Pro-Ser를 동정하였는데, 이들은 FN-의존성 세포 부착에 대한 억제 활성을 지녔다. 이 결과가 제시하는 바는 트리펩티드 Leu-Asp-Val이 세포 접촉 활성을 나타내는 최소의 서열이라는 것이다. 이후에 나온 결과는 Leu-Asp-Val이 VLA-4의 활성화 형태를 발현하는 임파구에만 결합하기 때문에 생체내에서 이러한 펩티드를 이용하는 데 있어 의구심이 생긴다는 것을 언급하였다(E.A. Wayner 등은 "*Activation-Dependent Recognition by Hematopoietic Cells of the LDV Sequence in the V Region of Fibronectin*", J. Cell. Biol., 162(2), pp. 489-497(1992)). 그러나, 상술된 것보다 커다란 크기의 LDV를 함유하는 펩티드는 생체내에서 활성이 있는 것으로 차후에 밝혀진 바있다(T.A.Ferguson등., "*Two Integrin Binding Peptides Abrogate T-cell-Mediated Immune Responses In Vivo*", Proc. Natl.Acad.Sci. USA. 88, pp/ 8072-76(1991); and S.M.Wahl 등., "*Synthetic Fibronectin Peptides Suppress Arthritis in Rats by Interrupting Leukocyte Adhesion and Recruitment*", J.Clin. Invest., 94, pp. 655-62(1994)). FN에 대한 VLA-4 및 VLA-5를 둘다 억제할 수 있는 시클릭 펩타이드가 또한 소개된 바있다(예컨대, D.M. Nowlin 등 "*A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits  $\alpha 4\beta 1$  및  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 매개 세포 부착*", J. Biol. Chem., k 268(27), pp. 20352-59(1993) 및 PCT 공보 PCT/US91/04862). 이러한 펩타이드는 몇몇 세포외-매트릭스 단백질의 인식 부위에서 공통의 모티프로 알려진 FN 유래의 트리펩티드 서열인 Arg-Gly-Asp가 주서열로 존재한다.

미국에 공개류중인 출원 제08/376,372호 및 WO98/04913에서 VLA-4 억제제의 기타 다른 예들이 제시되었다. 상기 미국 특허 출원 제376,372호는 세포 부착 억제 작용을 가진  $\beta$ -아미노산 함유의 선형 펩티드 화합물에 관하여 개시하고 있다. 국제 특허 출원 WO 94/15958 및 WO 92/00995(본발명에 참고로 인용)는 세포 부착 조절 작용을 가진 시클릭 펩티드와 펩티도미메틱 화합물에 관하여 설명하고 있다. 또 WO 93/08823 및 WO 92/08464호는 구아니딜-, 우레아- 및 티오우레아- 함유의 세포 부착 조절 화합물에 관하여 기재하고 있다. 미국 특허 제5,260,277호는 구아니딜 세포 부착 조절 화합물에 관하여 제시하고 있다. 상기 문헌들은 모두 본원에 참고로 인용한 것이다.

이러한 기술의 발전에도 불구하고, 경구적으로 생체 유용성이 있으면서 또한 상당 기간동의 작용이 지속되는 것과 같은 약력학 및 약동학 특성이 개선된 저분자량의 VLA-4 의존성 세포 부착 특이적 억제제에 대한 필요성이 대두되었다. 이러한 화합물은 세포 부착 및 VLA-4 결합에 의해 매개된 다양한 병변을 치료, 변경, 예방 또는 억제하는 데 유용하게 사용되는 제제를 제공할 수 있다.

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 개요

본발명의 화합물은 VLA-4가 VCAM-1 및 피브로넥틴 영역등의 그 리간드에 결합하는 것을 차단하는 VLA-4 인테그린 억제제이다. 따라서, 이러한 화합물은 세포 활성화 작용, 세포 이동, 세포 증식 및 분화를 비롯한 세포 부착 과정을 억제하는 데 유용하게 사용한다. 이들 화합물은 VLA-4가 매개하는 세포 부착 및 이러한 부착과 관련하여 나타나는 염증 및 면역반응과 같은 병변을 억제, 예방 및 억압하는 데 유용하게 사용된다. 이러한 병변의 예로는 다발성 경화증, 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 염증성 폐질환, 류마티스성 관절염, 폐혈증성 관절염, I 유형 당뇨병, 조직 이식증, 재발 협착증, 자가 유래의 골수 이식증, 바이러스 감염 질환의 염증 속발증, 심근염, 궤양성 대장염 코헨병을 비롯한 염증성 대장 질환, 특정 유형의 독성 및 면역성 신장염, 접촉성 피부 민감증, 건선, 종양 전이증, 다발성 골수종, 및 동맥경화증등이 있다. 본발명의 화합물은 단독으로 사용되거나 또는 기타 치료제 또는 예방제와 함께 사용되어 세포 부착을 억제, 변경, 예방 또는 억압할 수 있다. 본발명은 또한 VLA-4가 매개하는 세포 부착 억제제를 함유하는 약학적 제제 및 세포 부착 억제제를 위해 본발명의 화합물 및 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

#### 도면의 간단한 설명

도1은 oMePUPA-V로 치료한 후의 양(羊)의 기도에서의 반응도를 도시한 것이다. 본래 *Ascaris suum*에 민감한 양에게 지시된 용량의 oMePUPA-V 또는 등물량의 매질을 분무 투여한 지 2시간 후에 *Ascaris suum* 알레르기원을 항원 투여하였다. 지정된 시간에 폐의 기전을 측정하여 이전 연구에서 나타난 기본값(왼쪽 폐널)에서 변화된 특이적 기도(Airway) 내성값을 기록하였다. 흡입된 카바콜에 대한 기도의 내성은 연구 개시전 및 24 시간후의 알레르기 항원 투여후에 측정되었다(오른쪽 폐널). 기도 반응도는 항원 투여 전 값 및 항원 투여후의 값을 비교하여 얻은 PC<sub>400</sub>비값(카바콜이 400%까지 내성을 증가시키는 데 필요한 양)으로 기록하였다.

도2는 본래부터 *Ascaris suum*에 민감한 양에게 oMePUPA-V의 에어로졸 항원을 지시된 용량으로 분무 투여하거나 또는 *Ascaris suum* 에어로졸을 항원 투여한 결과를 나타낸 것이다. 기도 내성에서의 변화는 에어로졸 항원으로 공격한 후에 측정되었고, 항원 투여후 특이적 폐 내성 피크(cm H<sub>2</sub>O/sec)를 기본값과 비교하였다. \*p<0.05는 PBS 대조군과 비교된 것으로서 1단계 변형분석에 의해 이루어졌으며, 또한 이후에 Dunnett 테스트를 통해 대조군과 여러번 비교를 한 값으로서 PBS 대조군에 비교하여 특이적 폐 내성 피크가 상당히 많이 증가하였음을 나타낸다.

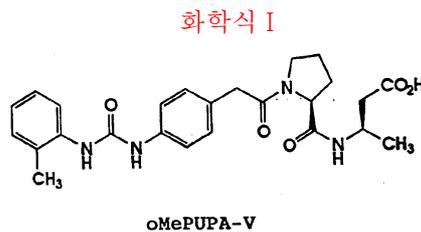
도3은 본래부터 *Ascaris suum*에 민감한 양에게 oMePUPA-V(0.03 mg)을 매일 4번째로 분무 투여 또는 등물량의 매질(에탄올: 노말 염수, 1:2, 상부 패널: 트리스:노말 염수, 1:499, 하단 패널)을 분무 투여 한지 24시간 후에 *Ascaris suum* 에어로졸 알레르기원을 항원투여한 결과를 나타낸 것이다. 폐의 기전은 지정된 시간에 측정하여 이전 연구 기본값(좌측 패널)에서 변화된 특이적 기도에서의 내성값으로 기록하였다. 흡입된 카바콜에 대한 기도 내성을 연구 개시전 및 항원 투여한지 24시간 후에 측정하였다(우측 패널). 기도 반응도는 항원 투여전과 항원 투여후의 PC<sub>400</sub> 비(카바콜이 내성을 400%까지 증가시키는 데 필요한 양)로서 기록하였다.

도4는 DNFB로 사전에 감작시킨 Balb/마우스의 왼쪽 귀 뒤쪽면에 DNFB를 투여하고, 오른쪽 귀의 뒤쪽면에는 매질을 투여하였다. 24시간 후에 귀의 두께를 마이크로미터로 측정하였다. DNFB로 항원 투여한지 4시간 후에 지시된 용량으로 oMePUPA-V를 투여하였다. 양성 대조군(+ CTRL)화합물을 소장에 최대 효율적인 양으로 투여하였다. 값은 8마리에 대하여 평균 ±평균의 표준편차로 나타난다. 상부측 패널은 귀가 완전히 부었음을 보여주었고, 하부 패널은 매질(VEH) 대조군에 비교하여 귀 부종이 억제되는 양(%)을 나타내었다.

도5는 활성화의 다양한 조건하에서 공지된 억제제와 oMePUPA-V간의 경쟁 분석을 조사한 것이다. TBS + 2mM Mn<sup>2+</sup>, 1mM Ca<sup>2+</sup> + 1mM Mg<sup>2+</sup>, 10mM Mg<sup>2+</sup>, 또는 10mM Mg<sup>2+</sup> + 10μg/ml TS2/16 중의 Jurkat 세포(1.5 x 10<sup>6</sup>/ml)를 5nM <sup>3</sup>H-공지된 억제제 단독 또는 5 nM <sup>3</sup>H-공지된 억제제 + 10 nM BIO 1591를 실온에서 30분간 치료하였다. 세포를 이후 원심분리에 의해 펠렛화 한후 이를 100μl의 TBS + Mn<sup>2+</sup>에 넣어 재현탁하고, 이를 신틸레이션 카운팅으로 분석하였다. 이러한 조건하에서 결합된 수를 조사하여 테스트 화합물을 함유하지도 않았으며 <sup>3</sup>H-공지된 억제제와 결합하지 않은 인테그린을 측정하였다.

**발명의 상세 설명**

본 발명은 리간드를 그 수용체에 결합하는 것을 억제함으로써 VLA-4 조절 세포 부착을 억제할 수 있는 화합물을 제공한다. 바람직한 화합물은 하기 화학식 I로 나타낸 (R)-N-[[4-[[[(2-메틸페닐아미노)카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프로필-3-메틸]-β-알라닌(이하, "oMePUPA-V"라 함)이다.



본 발명은 또한 oMePUPA-V의 약학적으로 허용 가능한 유도체, 염 및 에스테르류를 포함하고자 한다.

화학식 I 화합물들은 1개 이상의 비대칭 중심을 포함하므로 라세미 화합물, 단일 거울상 이성체, 부부 입체 이성체 혼합물 및 개별적인 거울상 이성체로 존재할 수 있다. 본 발명은 화학식 I 화합물의 모든 이성체 형태를 포함하는 것을 의미한다.

청구 범위의 발명은 또한 화학식 I 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고자 한다. 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 무기 염기 또는 유기 염기 및 무기산 또는 유기 산을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 비독성 염기 또는 산으로부터 제조되는 염을 말한다. 무기 염기에서 유도되는 염은 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 구리, 철(I), 철(II), 리튬, 마그네슘, 망간염, 망간, 칼륨, 나트륨, 아연 등을 포함한다. 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 칼륨 및 나트륨 염이 특히 바람직하다.

약학적으로 허용 가능한 유기 비독성 염기에서 유도되는 염은 1차, 2차 및 3차 아민 염, 자연적으로 생성되는 치환 아민을 포함하는 치환 아민, 고리 아민 및 염기성 이온 교환 수지(예, 아르지닌, 베타인, 카페인, 콜린, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 디에틸아민, 2-디에틸아미노에탄올, 2-디메틸아미노에탄올, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸-모르폴린, N-에틸피페리딘, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, 히드라미민, 이소프로플아민, 리신, 메틸글루카민, 모르폴린, 피페라진, 피페리딘, 폴리아민 레진, 프로카인, 퓨린, 테오브로민, 트리에틸아민, 트리메틸아민, 트리프로필아민, 트로메타민 등)을 포함한다.

본 발명의 화합물이 염기성이면, 염은 무기산 또는 유기산을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 비독성 염으로부터 제조될 수 있다. 그러한 산은 아세트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 캄포르설폰산, 시트르산, 에탄설폰산, 피마르산, 글루콘산, 글루탐산, 브롬화수소산, 염산, 이소티온산, 락트산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄설폰산, 뮤크산, 질산, 파모산, 판토텐산, 인산, 숙신산, 황산, 타르타르산, p-톨루엔설폰산 등을 포함한다. 시트르산, 브롬화수소산, 염산, 말레산, 황산 및 타르타르산이 특히 바람직하다.

또한, 청구 범위의 발명은 프로드러그, 특히 에스테르 프로드러그(여기서, (R)-N-[[4-[(2-메틸페닐아미노)카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프롤릴-3-메틸)-β-알라닌의 카르복실기가 임의의 알콜로 에스테르화 됨)를 포함한다. 바람직한 알콜로는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 또는 직쇄 또는 가지쇄 알킬 C1-10 알콜류를 들 수 있다.

VLA-4의 작용을 상쇄하는 화학식 I 화합물 성능은 VLA-4를 그것의 리간드로 결합시킴으로써 유발되는 증상, 질환 또는 질병을 예방하거나, 치료하거나 또는 전환시키는 데 유용하다. 그러므로, 이 길항약은 세포 활성화, 이동, 증식 및 분화를 포함하는 세포 부착 과정을 억제할 것이다. 따라서, 본 발명의 또 다른 특징은 VLA-4 경로에 의해 조절되는 질병 또는 질환의 치료, 예방, 경감 또는 억제 방법을 제공한다. 그러한 질병 및 질환은, 예를 들면 천식, 다발성 경화증, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 염증성 폐질환, 류마티즘성 관절염, 다발성 골수종, 패혈증성 관절염, 타입 I 당뇨병, 장기 이식 거부 반응, 염증성 장염 등을 포함한다.

본 발명의 화합물은 임의의 선행 기술을 사용하여 합성 수 있으며, 그 중 몇 가지 기술을 본 명세서에 예시하였다. 바람직하게는, 이 화합물들이 쉽게 구입 가능한 출발 물질, 예컨대 α-아미노산 및 그 작용 등가물에서 화학적으로 합성된다. 이러한 화합물을 합성하기 위한 모듈 방법 및 수렴 방법이 또한 바람직하다. 수렴적 접근에서, 예를 들면 최종 생성물의 상당 부분은 성장하는 분자쇄에 소량씩 점증적으로 첨가하는 것보다 합성의 마지막 단계에서 수렴된다.

본 발명의 화합물은 선택적인 생물학적 특성을 향상시키는 적절한 작용기를 부가하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형은 당 업계에 공지되어 있으며, 그 예로는 주어진 생물학적 시스템(예, 혈액, 림프계, 중추신경계)내로 생물학적 침투의 증가, 경구 이용성은 주사 투여를 우한 용해도 증가, 대사 및 배설 속도 변경 등이 있다. 이들 변형의 비제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜을 이용한 에스테르화, 피볼레이트 또는 지방산 치환체를 이용한 유도체화, 카르바메이트로의 전환, 방향족 고리의 히드록실화 및 방향족 고리내 헤테로원자 치환 등이 있다.

본 출원을 통해서 사용된 용어 "환자"는 인간을 비롯한 포유류를 의미한다. 그리고 "세포"는 임의의 세포, 바람직하게는 인간 세포를 비롯한 포유류 세포를 포함한다.

일단 합성되면, 본 발명의 화합물의 활성 및 VLA-4 특이성은 시험관내 및 생체내 분석을 이용하여 측정할 수 있다.

예를 들어, 이들 화합물의 세포 부착 억제 활성은 피브로넥틴 또는 CS1 코팅된 평판에 대한 VLA-4 발현 세포의 결합을 차단하는데 필요한 억제제의 농도를 결정하여 측정할 수 있다. 이러한 유형의 분석에서, 미량역가 웰을 피브로넥틴(CS-1 서열 포함) 또는 CS-1으로 코팅한다. CS-1이 사용되는 경우, 소 혈청 알부민과 같은 담체 단백질에 이를 접합시켜 웰에 결합시켜야 한다. 일단 웰이 코팅되면 시험 화합물의 농도를 다양하게 하여 적절하게 표지된 VLA-4 발현 세포와 함께 첨가한다. 또는, 시험 화합물을 먼저 첨가한 다음 세포를 첨가하기 전에 코팅된 웰과 함께 항온 배양할 수 있다. 세포는 30분 이상 동안 웰내에서 항온배양한다. 항온처리 후, 웰을 비우고 세척한다. 결합 억제는 시험 화합물의 각종 농도 각각에 대해서, 그리고 시험 화합물을 함유하지 않는 대조군에 대해서 평판에 결합된 형광 또는 방사능을 정량하여 측정한다.

이 분석에 이용할 수 있는 VLA-4 발현 세포는 라모스(Ramos) 세포, 주르카트 세포, A375 흑색종 세포와 인간 말초 혈액 림프구(PBL)를 포함한다. 이 분석에 사용된 세포는 임의의 적절한 방식으로, 예컨대 형광 또는 방사능 표지할 수 있다.

직접 결합 분석을 사용하여 본 발명의 화합물의 억제 활성을 정량할 수도 있다. 이 분석에서, IgG1 분자의 힌지 영역 위에 부착된 VCAM(D1D2)의 처음 2개의 면역글로불린 도메인을 함유하는 VCAM-IgG 융합 단백질("VCAM2D-IgG")을 알카

리 포스포타제("AP")와 같은 마커 효소에 접합시킨다. 이 VCAM-IgG 융합체의 합성은 PCT 공개 공보 WO 90/13300에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본원에서 참고로 인용한다. 당업계에 공지된 가교 방법으로 마커 효소에 융합체를 접합시킨다.

그 다음 VCAM-IgG 효소 접합체는, 밀리포어 멀티스크린 분석 시스템(미국 매사추세츠주 베드포어에 소재하는 밀리포어 코포레이션 제푸)에 포함된 것과 같은 다중 웰 침투 평판의 웰내에 배치한다. 시험 억제 화합물의 농도를 다양하게 하여 웰에 첨가한 다음 VLA-4 발현 세포를 첨가한다. 세포, 화합물 및 VCAM-IgG 효소 접합체를 함께 혼합한 다음 실온에서 혼돈처리한다.

혼돈처리 후에, 웰을 진공 배수시켜, 세포와 임의의 결합된 VCAM을 남긴다. 결합된 VCAM의 정량은 VCAM-IgG에 접합된 효소에 대한 적절한 비색 기질을 첨가하고 반응 생성물의 양을 측정하여 결정한다. 반응 생성물이 감소되었다는 것은 결합 억제 활성이 증가하였음을 의미하는 것이다. 특정 분석에 대한 프로토콜은 하기에 개시되어 있다.

본 발명의 화합물의 VLA-4 억제 특이성을 평가하기 위해서, 인테그린의 주요 그룹, 즉  $\beta 2$  및  $\beta 3$ 과 기타  $\beta 1$  인테그린, 예컨대 VLA-5, VLA-6 및  $\alpha 4\beta 7$ 에 대한 분석을 수행한다. 이들 분석은, 적절한 인테그린 발현 세포 및 해당 리간드를 치환한 전술한 부착 억제 및 직접 결합 분석과 유사할 수 있다. 예를 들어, 다형핵 세포(PMN)는  $\beta 2$  인테그린을 그 표면에 발현하여 ICAM에 결합한다.  $\beta 3$  인테그린은 혈소판 응집과 관련되어 있으며 표준 혈소판 응집 분석에서 억제를 측정할 수 있다. VLA-5는 Arg-Gly-Asp 서열에 특이적으로 결합하는 반면, VLA-6은 라미닌에 결합한다.  $\alpha 4\beta 7$ 은 최근 발견된 VLA-4의 유사체로서, 또한 피브로넥틴 및 VCAM에 결합한다.  $\alpha 4\beta 7$ 에 대한 특이성은 전술한 VCAM-IgG 효소 마커 접합체와,  $\alpha 4\beta 7$ 을 발현하지만 VLA-4를 발현하지 않는 세포주, 예컨대 RPMI-8866 또는 JY 세포를 이용한 결합 분석에서 측정한다.

VLA-4 특이 억제제가 확인되자마자, 생체내 시험 평가에 의해 더 특징지어질 수 있다. 본 명세서에 인용 참조한 문헌 [P.L. Chisholm et al., "Monoclonal Antibodies to the Integrin  $\alpha 4$  Subunit Inhibit the Murine Contact Hypersensitivity Response", *Eur. J. Immunol.*, 23, pp. 682~688; J.E. Coligan, et al., Eds., "Current Protocols in Immunology", John Wiley & Sons, New York, 1, pp.4.2.1~4.2.5(1991)]에 기술된 바와 같이, 그러한 시험 평가는 동물의 접촉 과민성 억제를 테스트한다. 시험 평가에서, 동물 피부를 디니트로플루오로벤젠과 같은 자극제에 노출시켜 민감하게 한 다음, 날카로운 면으로 피부를 가볍게 긁는 것과 같은 가벼운 물리적 자극을 한다. 회복한 후, 동일한 절차를 반복하여 동물의 피부를 민감하게 한다. 감각(感作) 몇 일 후, 동물의 한 쪽 귀를 화학 자극제에 노출시키지만 다른 쪽 귀는 비자극성 대조군 용액으로 치료한다. 귀를 치료한 직후, 동물에게 여러 용량의 VLA-4 억제제를 피하 주사 투여한다. 세포 부착 관련 염증의 생체내 억제는 치료한 귀와 치료하지 않은 귀를 비교하여 동물의 귀 부종 감응을 측정함으로써 평가된다. 부종은 캘리퍼스와 귀의 두께 측정 도구를 사용하여 측정된다. 이런 방식으로, 염증을 억제하는 데 있어서 본 발명의 억제제가 가장 적합함을 확인할 수 있다.

본 발명 억제제를 테스트하는 데 사용되는 또 다른 생체내 시험 평가는 양 천식 평가이다. 이 시험 평가는 본 명세서에 인용 참조한 문헌 [W.M. Abraham et al., "a-Integrins Mediate Antigen-Induced Late Bronchial Responses and Prolonged Airway Hyperresponsiveness in Sheep", *J. Clin. Invest.*, 93, pp. 776~87(1994)]에 기술된 바와 같이 수행된다. 이 시험 평가는 알레르기성 양의 *Ascaris* 항원 유도 후기 단계 기도 감응 및 기도 과민성의 억제도를 측정한다. 본 발명의 화합물은 혈소판 집합 평가 방법으로 테스트될 수도 있다.

본 발명의 VLA-4 억제제는 매우 우수한 활성과 선택성을 보여주었다. 일반적으로, 이 화합물들은 VLA-4에 대해 선택적( $\alpha 4\beta 7$  및  $\alpha 5\beta 1$ 에 대해 1000 배 <)이고, 고정적인 PanLabs 및 비-GLP 아메스 평가에서 음성이고, 표준 조약물학 테스트에서 순수하고, 인간에게 사용되는 예상량(1일 1 mg 이하)으로 1일 1회 복용한 양 모델에 효과적이었다.

청구 범위의 화합물은 구조적으로 관련된 VLA-4 억제제에 비해 매우 우수한 효능을 갖는다. 예를 들면, 0.1 mg/kg의 분무 약물을 4일간 1일 1회 복용으로 치료한 다음 마지막 복용 24시간 후의 항원 투여되는 *Ascaris*-민감성 양의 경우, 기존의 테스트된 화합물은 초기 감응을 상당히 약화시키고 후기 단계에 기관지 수축과 비특이성 과민성의 진행을 막았다. 인간에게 해당하는 생물 등가량을 가정해보면, 7 mg의 총 복용량이 70 kg의 사람에게 요구된다. 또한, 경구 흡입 장치로 인간에게 전형적으로 이루어지는 것보다 2배 이상 예상 석출 속도로 약이 기관(氣管) 튜브를 통해 양에게 투여되었다. 또한, 장치 채움과 약 전달을 위해 부형약이 최종 고형 제형에 첨가될 필요가 있다. 이러한 요소는 건조 분말 흡입(DPI) 장치를 통해 한 번의 발동작용으로 전달될 수 있는 공업적 제한량인 1-5 mg을 초과하는, 14 mg 이상의 복용 인간에게 요구됨을 나타낸다. 필요한 복용량이 DPI의 다중 발동작용으로 전달될 수는 있지만, 이것은 전형적인 흡입 스테로이드 용량이 0.2~1.0 mg인 천식 시장의 경쟁에서 불리하다.

항원 투여 2시간 전에 1회 분무 투여될 때, oMePUPA-V는 최소 복용량 0.003 mg/kg으로 초기 감응을 약화시키고, 후기 단계의 기관지 수축을 억제해서 과민성을 정상화한다. 또한, 마지막 복용 24 시간 후의 항원 투여로 1일 0.001 mg/kg 양으로 4일간 복용하면, 최대 감응 제공된다. 그러므로, oMePUPA-V는 선행 화합물보다 30배 내지 100배 이상의 효능이 있는데, 이 복용량은 시판되는 최상의 흡입 스테로이드의 범위내에 있다. 합성 2번째 중간체뿐만 아니라 oMePUPA-V는 결정성이다(참조: 도 1, 표 1).

또한, oMePUPA-V는 공지된 VLA-4 억제제 화합물에 비해 향상된 대사 프로파일을 갖는다. 예를 들면, 에어로졸 투여를 한 다음, 청구항의 화합물은 재빨리 활성이 적은 대사물로 전환되는데, 이 대사물은 기관지 폐포브론코알비올라 세척액 (BALF)에서 회수된 주생성물인 동시에 어미 화합물보다 혈장 반감기가 더 긴 경우의 체내 순환에서 관찰되는 주생성물이었다. 활성이 적은 화합물로의 신속한 대사 전환은 전신 노출을 감소시키는 데 유용한 방법이지만, 고유 활성이 거의 또는 전혀 없는 부산물로 대사되는 화합물이 개발에 있어 덜 복잡하고 지지 이론으로부터 볼때 바람직하다. 화합물은 부산물로 대사되어 거의 고유 활성이 발전시 복잡하지 않게 존재하는 활성 보완 견지에서 바람직하다.

oMePUPA-V의 유효한 단백질 가수분해 생성물은 VLA-4 결합 평가에서 비활성이므로 단백질 가수분해는 비활성 화합물을 생성한다. 그럼에도 불구하고, 쥐, 개 및 양의 생체밖 대사 연구뿐만 아니라 생체내 PK 연구는 oMePUPA-V가 가수분해에 안정함을 나타낸다.

**[표 1]**  
기존의 억제제와 비교한 oMePUPA-V의 특성

특성	기존 화합물	oMePUPA-V
VLA-4-VCAM-1g 결합에 대한 IC50	1.5 nM	2.7 nM
α4β7-VCAM-1g 결합에 대한 IC50	2.7 μM	> 100 μM
α5β1-FN 부착에 대한 IC50	> 100 μM	> 100 μM
양 모델에서 최소 유효량		
단일 용량	0.1 mg/kg	0.003 mg/kg
반복 용량	0.03-0.1mg/kg	0.001mg/kg
결정도	무	유
시험관내 약물 스크린 85 시험	1 주 히트	없음
ACE 활성	ACE 기질	없음
글루쿠로니드화	저 레벨	계획형
아메스 테스트(돌연변이성)	없음	없음
보조 약물학(부작용)	없음	
전신 노출, 10 mg 분무 용량(양)	40 ng/ml × hr	완료
대사 프로파일	활성 대사산물	
경구 이용성	<1%	<1%
벌크 안정성(40 °C, 75% RH)	"불안정"	>4 주 안정
제형화된 안정성(40 °C)	0.2% 분해/일	>4 주 안정

본 발명의 화합물은 경구, 비경구, 흡입 분무, 국소, 직장, 비강, 협측, 질내 또는 이식된 저장소를 경유하여 투여할 수 있는 약학 조성물로 제형화할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액내, 흉골내, 초내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 임의의 화합물 또는 이의 약학적 허용 유도체와 임의의 약학적 담체를 함께 포함한다. 본원에서 사용한 용어 "담체"는 허용 가능한 보조제 및 부형제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 사용할 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체의 비제한적인 예로는, 이온 교환제, 알루미늄, 스테아르산알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충액 물질, 예컨대 인산염, 글리신, 소르브산, 소르브산칼륨, 포화된 식물성 지방산의 부분적 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 황산포타슘, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스계 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 울 지방 등이 있다.

본 발명에 따라서, 약학 조성물은 멸균 주사성 제제, 예컨대 멸균 주사성 수성 또는 유성의 현탁액 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적절한 분산제나 습윤제와 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 멸균 주사성 제제는 비독성의 비경구적으로 허용 가능한 담체 또는 용매내 멸균 주사성 용액 또는 현탁액, 예컨대 1,3-부탄디올 중 용액일 수 있다. 사용할 수 있는 허용 가능한 부형제 및 용매로는, 물, 링거 용액 및 등장 염화나트륨 용액 등이 있다. 또한, 멸균 불휘발성유는 용매 또는 현탁 매체로서 통상적으로 사용된다. 이를 위해서, 임의의 자극이 적은 불휘발성유, 예컨대 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 사용할 수 있다. 올리브유 또는 피마자유와 같은 천연 약학적 허용 오일, 특히 폴리옥시에틸화된 형태에서와 같이 지방산, 예컨대 올레산 및 그의 글리세라이드 유도체는 주사성 제제에 유용하다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 장쇄 알코올 희석제 또는 분산제를 함유할 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은, 임의의 경구적으로 허용 가능한 투여 형태, 비제한적인 예로서 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액으로 경구 투여할 수 있다. 경구용 정제의 경우에, 통상적으로 사용되는 담체는 락토스 및 옥수수 전분이다. 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제를 보통 첨가한다. 캡슐 형태의 경구 투여를 위해서, 유용한 희석제로는 락토스와 건조 옥수수 분말이 있다. 수성 현탁액을 경구 용도로 사용해야 하는 경우, 활성 성분은 유화제 및 현탁제와 혼합한다. 필요에 따라, 일부 감미제, 향미제 또는 착색제를 첨가할 수 있다.

대안적으로, 본 발명의 약학 조성물은 직장 투여용 좌약 형태로 투여할 수 있다. 이들은 실온에서 고체이지만 직장 온도에서는 액체여서 직장내에서 용융되어 약물을 방출할 수 있는 적절한 비자극 부형약과 제제를 혼합하여 제조할 수 있다. 이러한 물질로는 코코아 버터, 밀납 및 폴리에틸렌 글리콜 등이 있다.

본 발명의 약학 조성물은, 특히 치료 표적이 국소 투여로 쉽게 접근할 수 있는 부위 또는 기관, 예컨대 안구, 피부 또는 저부 장관 질병인 경우 국소적으로 투여할 수 있다. 적절한 국소 제제는 이들 각각의 부위 또는 기관에 대해 쉽게 조절할 수 있다.

저부 장관에 대한 국소 투여는 직장 좌약 제제(상기 참조) 또는 적절한 관장제의 형태로 실시할 수 있다.

국소 적용의 경우, 약학 조성물은 1종 이상의 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적절한 연고로 제형화할 수 있다. 본 발명의 화합물의 국소 투여용 담체의 비제한적인 예로는 광유, 유동 파라핀, 백색 바셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물 등이 있다. 대안적으로, 약학 조성물은 1종 이상의 약학적 허용 담체내에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적절한 로션 또는 크림으로 제형화할 수 있다. 적절한 담체의 비제한적인 예로는 광유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아틸 알코올, 2-옥틸도데칸올, 벤질 알코올 및 물 등이 있다.

안과 용도의 경우, 약학 조성물은 벤질알코올 클로라이드와 같은 보존제의 존재 또는 부재하에 등장성, pH 조정된 멸균 염수내 마이크론화된 현탁액으로서, 또는 바람직하게는 등장성의 pH 조정된 멸균 염수내 용액으로서 제형화할 수 있다. 대안적으로, 안과 용도의 경우, 약학 조성물은 파라핀과 같은 연고내에서 제형화할 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 연무기, 건조 분말 흡입기 또는 계량된 용량 흡입기를 사용한 비강 에어로졸 또는 흡입으로 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 약학 제제 분야에 공지된 기법에 따라 제조하며, 벤질 알코올 또는 기타 적절한 보존제, 생체이용도를 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 기타 통상적인 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수 중 용액으로서 제조하였다. 또한, 본 발명의 조성물은 건조 분말 제제용 락토스와 같은 임의의 약학적 허용 담체를 포함할 수 있다.

담체 물질과 혼합하여 단일 용량 형태를 생성할 수 있는 활성 성분은 처리된 숙주, 및 특정 투여 경로에 따라서 다르다. 그러나, 어떤 특정 환자에 대한 특정 용량 및 치료 방법은 각종 인자, 예컨대 사용된 특이적 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식사, 투여 시간, 배설 속도, 약물 조합 및 치료 의사의 판단과 처리되는 특정 질병의 경중에 따라 다르다. 활성 성분의 양은 성분이 동시투여되는 치료제 또는 예방제에 좌우될 수도 있다.

세포 부착을 저해 또는 억제하는데 유효한 본 발명의 화합물의 투여량 및 투여 속도는 각종 인자, 예컨대 억제제의 특성, 환자의 크기, 치료 목적, 처리하고자 하는 병의 상태, 사용된 특정 약학 조성물 및 치료 의사의 판단에 좌우된다. 1일 체중 1 kg 당 약 0.001~약 100 mg, 바람직하게는 약 0.01~약 50 mg, 더욱 바람직하게는 약 10 mg 용량 레벨의 활성 성분 화합물이 유용하다.

정맥내 투여용 조성물이 사용되는 경우, 적절한 용량 범위는 약 0.001~약 25 mg, 더욱 바람직하게는 약 0.01~약 1 mg이다.

또 다른 양태에 따라서, 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물은 코르티코스테로이드, 기관지 확장 제제, 친식 억제제(마스트세포 안정화제), 소염제, 항류마티스성 제제, 면역억제제, 항대사산물, 면역조절제, 건선 억제제 및 항당뇨병제로 구성된 군에서 선택된 추가의 제제를 포함할 수도 있다. 이들 각각의 부류에 포함된 특정 화합물은, 본원에서 참고로 인용한 문헌 ["*Comprehensive Medicinal Chemistry*", Pergamon Press, Oxford, England, p970-986 (1990)] 중 적절한 그룹 표제하에 목록화된 임의의 것들로부터 선택할 수 있다. 테오필린, 설과살라진 및 아미노살리실레이트(소염제); 시클로스포린, FK-506 및 라파마이신(면역억제제); 시클로포스파미드 및 메토트렉세이트(항대사산물); 스테로이드(흡입형, 경구형 또는 국소형) 및 인터페론(면역조절제)과 같은 화합물들도 이 그룹에 포함된다. 또한, 본 발명의 화합물은 추가의 세포 부착 억제제와 함께 투여할 수 있다. 청구된 VLA-4 억제제와 조합하여 1종 이상의 추가의 제제를 투여하는 경우, 활성 성분은 함께 제형화할 수 있다. 또는 대안적으로 조합하여 투여할 수 있다. 청구된 본 발명의 VLA-4 억제제와 조합한 1종 이상의 활성 제제는 거의 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 당업자는 전달하고자 하는 제제, 바람직한 결과 및 환자와 치료할 증상에 따라서 가장 적절한 적용 방법을 쉽게 결정할 수 있다.

기타 양태에 따라서, 본 발명은 환자내 세포 부착 관련 염증 및 세포 부착 관련 면역 또는 자가면역 반응을 예방, 억제 또는 저해하는 방법을 제공한다. VLA-4 관련된 세포 부착은 각종 염증, 면역 및 자가면역 질병에서 중추적인 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 화합물에 의한 세포 부착의 억제는 염증, 면역 및 자가면역 질병을 치료 또는 예방하는 방법에 이용할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 방법으로 치료하고자 하는 질병은 친식, 관절염, 건선, 이식 거부반응, 다발성 경화증 당뇨병 및 염증성 장 질환으로부터 선택된다.

이들 방법은 본 발명의 화합물을 단일 치료로, 또는 소염제나 면역억제제와 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 조합 치료는 단일 용량 형태의 제제를 투여하거나 또는 동시에 또는 상이한 시간에 다중 투여 형태로 투여할 수 있다.

## 실시예

### 실시예 1

#### oMePUPA-V의 제조

oMePUPA-V, (R)-N-[[4-[[2-메틸페닐아미노]카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프롤릴-3-메틸)-β알라닌은 통상적으로 제조된 숙신이미딜 Boc-(L)-프롤린(Boc-Pro-OSu; 바캡) 및 (R)-벤질-3-아미노부티레이트 헤미황산염(셀진 코포레이션)로부터 수렴(convergent) 합성법으로 생성하였다. Et<sub>3</sub>N의 존재하의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 중의 출발 물질을 커플링시킨 후, 디옥산 중의 4 N의 HCl을 사용하여 Boc기를 가수분해하여 HCl염을 얻고, 이를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O로부터 재결정시켰다. 해당 산, MPUPA-OH(리서카, 인코포레이티드)로부터 제조한 숙신이미딜-2-[4-2-(메틸페닐아미노카보닐)]아미노 페닐 아세테이트(MPUPA-OSu)를 사용하여 상기 HCl염을 커플링시켜 결정질 oMePUPA-V-*b*[*b*질 에스테르를 얻고, 이를 THF/H<sub>2</sub>O(9:1)중에서 접촉 수소화 처리(10% Pd/C)하여 oMePUPA-V를 얻었다. 20% 수성 아세톤으로부터 재결정시켜 백색 고형물인 최종 생성물을 얻었다.

#### 물성 요약

화학명: (R)-N-[[4-[[2-(메틸페닐아미노)카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프롤릴-3-메틸)-*b*-알라닌

실험식: C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

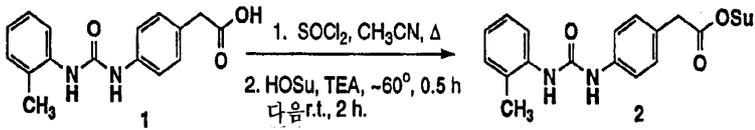
분자량: 466.53

외형: 깨끗한 백색 분말

융점: 153.6°C ~ 154.4°C

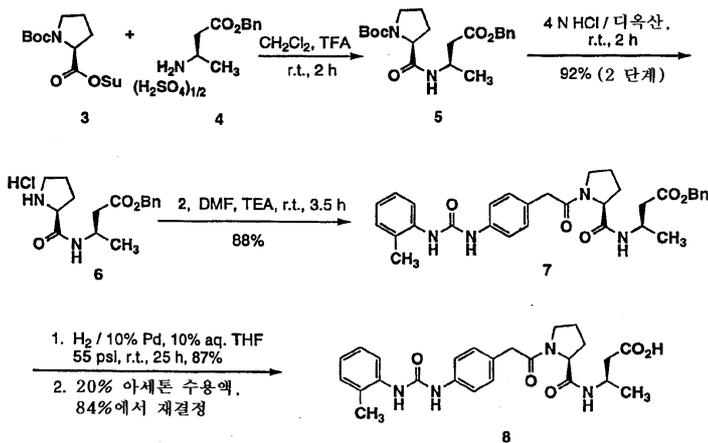
반응식 1

MPUPA-OH(1)으로부터 MPUPA-OSu(2)의 생성



반응식 2

Boc-(L)-Pro-OSu(3) 및 벤질-(R)-3-아미노부티레이트 헤미황산염(4)으로부터의 oMePUPA-V(8)의 합성



oMePUPA-V의 합성

oMePUPA-V를 생성하는데 사용한 합성 반응은 반응식 1 및 반응식 2에 도시하였다. 출발 물질은 통상의 공급원 및 약정 제조업자로부터 입수하였으며, (1)은 미국 오하이오주 페인즈빌에 소재하는 리서카 인코포레이티드에 의해 대량으로 생성되며, (3)은 미국 펜실베이니아주 킹 오브 프러셔에 소재하는 바켄 바이오사이언스, 인코포레이티드로부터 입수하였으며, (4)는 미국 뉴저지주 워렌에 소재하는 셀진 코포레이션으로부터 입수하였다.

oMePUPA-V의 제법

일반적 분석 방법( $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , MS, IR 및 HPLC)

$^1\text{H NMR}$ 은 Bruker AC 300 또는 Varian 500 또는 Varian 600 기기로 측정하였으며, 표준 물질을 DMSO- $\text{d}_6$  (d 2.49 ppm)로 사용한 DMSO- $\text{d}_6$  또는, 표준 물질을 잔류  $\text{CHCl}_3$  (d 7.24 ppm)로 사용한  $\text{CDCl}_3$ 로 시료를 측정하였다.

$^{13}\text{C NMR}$ 은 Varian 500 또는 Varian 600 기기로 측정하였으며, 표준 물질을 DMSO- $\text{d}_6$  (d 40.5 ppm)로 사용한 DMSO- $\text{d}_6$  또는, 표준 물질을  $\text{CDCl}_3$  (d 77.0 ppm)로 사용한  $\text{CDCl}_3$ 로 시료를 측정하였다.

질량 스펙트럼은 휴렛 팩커드 모델 1500 AutoSampler가 구비된 Fisons VG Platform LC-MS-DS 질량 분광계 시스템으로 측정하였으며, 데이터는 Fisons VG MassLynx 질량 분광계 워크스테이션을 사용하여 프로세싱 처리하였다. HRMS 작업은 표준 물질 SOP#MS-002, MS-006, MS-012 및 MS-023을 사용하는 VG 분석 ZAB 2SE 고고 자기장 질량 분광계 상의 고속 원자 충돌을 사용한 M-Scan(PA)로 실시하였다. 세슘 이온총을 사용하여 얻은 질량 스펙트럼을 위한 이온을 생성하였으며, 이를 PDP-11-250J 데이터 시스템을 사용하여 기록하였다.

IR 스펙트럼은 Perkin Elmer 1600 시리즈 FTIR로 수행하였다,

분석 HPLC 크로마토그래피는 하기와 같이 수행하였다.

1. Perkin Elmer 785A UV 검출기(214 nm로 조정)가 구비된 Perkin Elmer 시리브 200 HPLC 자동샘플링기 시스템 및 PE Nelson 1020 적분기가 부착된 Applied Biosystems 783A UV 검출기(254 nm로 조정)를 사용하여 프로그램 1 (Equilibrate @ 20% B, 주입 시료, 20% B(1 분), 20%-70% B(24 분), 70%-100%(17 분)을 사용한 크로마토그램을 얻었다. 면적 비율(%) 값만을 기록하였다.

2. Waters 717 자동샘플링기를 사용하여 783A 과장 UV 검출기가 부착된 Applied Biosystems 400 용매 전달 시스템을 사용하여 프로그램 1(Equilibrate @ 15% B, 주입 시료, 15% B(1 분), 15%-40% B(25 분), 40% B(10 분)을 얻었다. 휴렛 팩커드 3396 시리즈 II 적분기를 사용하여 데이터를 프로세싱 처리하였다. 적분기는 감쇠도=8, 한계값=5, 면적 주입=10000, 피크 폭=0.04, 차트 속도=0.2의 변수로 조정하였다.

모든 HPLC 작업은 Vydac C-18 컬럼(5 m 공극 크기, 4.5 mm×25 cm, cat. #218TP54).

용제 A(물+0.1% TFA)

용제 B(아세트니트릴+0.1% TFA)

유속=1 ml/분

구배 프로그램은 하기와 같다.

프로그램 1: Equilibrate @ 20% B, 주입 시료, 20% B(2 분), 20%-70% B(25 분), 100% B(5 분).

**[4-[[[2-메틸페닐]아미노]카보닐]아미노]페닐]아세트산(1, MPUPA-OH; 리서카 인코포레이티드에 의해 제조된 물질)에 대한 물성 데이터**

mp: 210°C ~ 215°C(분해)

IR (KBr) 3295(br band), 3034(br band), 1707, 1637, 1603, 1551, 1516, 1457, 1414, 1302, 1241, 1189, 1118 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.28(bs, 1H), 9.0(s, 1H), 7.91(s, 1H), 7.88(d, J=7.8Hz, 1H), 7.43(d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.19(d, J=8.4 Hz, 2H), 7.16(m, 2H), 6.94(dd, J=7.8, 8.4Hz, 1H), 3.51(s, 2H), 2.25(s, 3H);

<sup>13</sup>CNMR(150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 173.0(C), 152.7(C), 138.5(C), 137.5(C), 130.2(CH), 129.8(CH), 128.3(CH), 127.5(CH), 126.2(CH), 122.7(CH), 121.0(CH), 118.1(CH), 40.1(CH<sub>2</sub>), 17.9(CH<sub>3</sub>);

MS(EI) m/z 285(M+ 1)<sup>+</sup>, 193, 152, 134, 132, 109, 108, 106, 93, 91, 57;

C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 원소 분석

이론치: C, 67.59; H, 5.67; N, 9.85

실측치: C, 67.60; H, 5.70; N, 10.01.

**숙신아미달[4-[[[2-메틸페닐]아미노]카보닐]아미노]페닐]아세테이트(2, MPUPA-OSu)의 제조**

아세트니트릴(600 ml) 중의 o-메틸페닐우레아 페닐아세트산(1, MPUPA-OH; 150 g, 0.501 mol; 리서카, 인코포레이티드 시판)의 환류 현탁액에 염화티오닐(41 ml, 0.558 mol)을 10 분에 걸쳐 격렬히 교반하면서 첨가하였다. 다량의 HCl이 생성되었다. 반응 혼합물을 교반을 지속하면소 실온으로 1.5 시간에 걸쳐 냉각시켰다. 반응 혼합물은 분홍색 슬러리로 되

있으며, 여기에 고품의 N-히드록시숙신이미드(HOSu; 75.5 g, 0.636 mol)을 한 부분으로 첨가하였다. 이 혼합물에 트리 에틸아민(174 ml)을 30 분간 적가하고, 이때 반응 혼합물의 온도는 수조를 사용하여 60°C로 유지하였다. 교반을 2시간 동안 지속한 후, 증류수(500 ml)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 고품물을 여과하고, 2 l의 증류수 및 아세토니트릴(2×200 ml)로 세정한 후, 공기 건조시키고, 진공하(~0.1 mmHg)의 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 상에서 추가로 건조시켜 베이지색 분말인 미가공 생성물 (175 g, 97% 수율)을 얻었다. 미가공 생성물(174 g)을 목탄(10 g) 탈색을 이용하여 아세토니트릴(3.5 l)로부터 재결정시켜 백색 분말인 MPUPA-OSu(2; 68% 수율) 129 g을 얻었다(순도 >99%).

mp 211.2 - 211.8°C ;

IR(KBr): 3905-3203(br band), 1816, 1783, 1654, 1368, 1304, 1244, 1116, 1201 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): d 9.04(s, 1H), 7.92(s, 1H), 7.82(d, 1H), 7.44(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.24(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.15(m, 2H), 6.93(dd, J = 7.4, 7.3Hz, 1H), 4.02(s, 2H), 2.80(s, 4H), 2.23(s, 3H);

MS(EI, ES<sup>+</sup>) m/z 382 [(M+ 1)<sup>+</sup>], 239, 108, 106.

#### 숙신이미딜 Boc-(L)-프롤린(Boc-Pro-OSu, 3: 바켄 바이오사이언스에서 입수한 물질임)의 물성 데이터

mp 132 - 136°C;

IR(KBr): 3456, 2940, 1731, 1619, 1561, 1541, 1497, 1454, 1395, 1337, 1259, 1202, 1118, 1060 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 4.51(dd, J = 3.8, 8.7Hz, 1H), 3.56(m, 1H), 3.44(m, 1H), 2.80(s, 4H), 2.32(m, 1H), 2.27(m, 1H), 1.94(m, 2H), 1.43(s, 9H);

MS(EI) m/z 335(M+ N<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 279, 213, 138, 114, 86;

HPLC 97.1%.

#### 벤질 (R)-3-아미노부티레이트 헤미황산염(4: 셀진 코포레이션에서 입수한 물질임)의 물성 데이터

mp 249.4 - 249.8°C;

IR(KBr) 3515, 3383, 2989, 2945, 2880, 1821, 1788, 1744, 1701, 1476, 1454, 1421, 1394, 1368, 1260, 1241, 1202, 1159, 1077 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 7.85(bs, 2H), 7.26(s, 5H), 5.06(ABq, J = 12.3Hz, 2H), 4.35(m, 2H), 3.73(m, 1H), 2.92(dd, J = 6.4, 17.1Hz, 1H), 2.66(dd, J = 6.4, 17.0Hz, 1H), 1.35(d, J = 6.5Hz, 3H);

MS(EI) m/z 195(M+ 3)<sup>+</sup>, 197(M+ 2)<sup>+</sup>, 106, 92, 91;

HPLC 99.0%.

#### N-(t-부톡시카보닐)-L-프롤린-3-메틸-(R)-β-알라닌 벤질 에스테르(5)의 제법

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(200 ml) 중의 벤질-R-3-아미노부티레이트 헤미황산염(4; 66.7 g, 213 mmol)의 잘 교반된 현탁액에 Boc-(L)-Pro-OSu(3; 53.9 g, 222 mmol) 및 Et<sub>3</sub>N(95 ml, 681 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc(1.5 l) 및 H<sub>2</sub>O(250 ml) 사이에 분배하고, 유기층을 10%의 구연산(3×250 ml), H<sub>2</sub>O(250 ml), 중탄산나트륨 포화 용액(250 ml), H<sub>2</sub>O(250 ml) 및 염수(3×250 ml)로 세정한 후, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시킨 후, 이를

rotavap(40°C; ~80 mmHg)상에서 1차로 농축시킨 후, 고압(실온, 16 시간, 0.2 mmHg)하에 농축시켜 점성의 오일인 중간체(5)(88.1 g)을 얻었으며, 이는 잔류 EtOAc 및 CHCl<sub>2</sub>를 함유하며(NMR에 의함), 순도가 >98%(HPLC)이었다. 이 물질은 이후의 반응에서 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30(m, 5H), 6.44(bs, 1H), 5.10(dd, J = 12.3, 14.1Hz, 2H), 4.32(m, 1H), 4.13(m, 1H), 3.34(bs, 2H), 2.48(d, J = 5.1Hz, 2H), 2.1(m, 2H), 1.75(bs, 2H), 1.40(s, 9H), 1.17(d, J = 6.0Hz, 3H);

MS(EI) m/z 413 [M+ Na]<sup>+</sup>, 313, 239, 191, 194, 165, 91.

#### L-프롤릴-3-메틸-(R)-β-알라닌 벤질 에스테르 염산염(6)의 제법

상기의 반응으로 부터 얻은 중간체(5)에 디옥산(240 ml) 중의 4N HCl 용액을 점진적으로 첨가하였다. 기체가 격력하게 발생하였다(주의: 발열). 반응 혼합물을 실온(2 시간)에서 교반한 후, 이를 rotavap(45°C; ~80 mmHg)상에서 1차로 농축시킨 후, 고압(실온, 14 시간, ~0.2 mmHg)하에 밤새 농축시켜 점성이 매우 큰 물질을 얻었으며, 이를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O(600 ml/700 ml)로부터 결정화시켜 백색 고형물인 HCl 염(6) 64.0 g(2 단계의 총 수율 92%)을 얻었다(HPLC 순도 99.6%).

mp 119.8 - 120.5°C;

IR(KBr): 3217, 3072, 2904, 2756, 1736, 1681, 1560, 1446, 1387, 1352, 1295, 1244, 1178, 1096 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.21(bs, 1H), 8.71(d, J = 8.0Hz, 1H), 7.77(bs, 1H), 7.24(m, 5H), 5.00(s, 2H), 4.52(bs, 1H), 4.22(apparent t, J = 6.5Hz, 1H), 3.33(bs, 2H), 2.67(dd, J = 5.5, 15.5Hz, 1H), 2.44(m, 2H), 1.89(m, 3H), 1.15(d, J = 6.5Hz, 3H);

<sup>13</sup>CNMR(125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.03(C=O), 167.67(C=O), 135.58(C), 128.43(CH), 128.13(CH), 128.06(CH), 66.34(CH<sub>2</sub>), 59.71(CH), 46.55(CH<sub>2</sub>), 43.34(CH), 40.42(CH<sub>2</sub>), 30.50(CH<sub>2</sub>), 24.23(CH<sub>2</sub>), 19.92(CH<sub>3</sub>);

MS(EI) m/z 285(M+ 1)<sup>+</sup>, 193, 152, 134, 132, 109, 108, 106, 93, 91, 57;

C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl의 원소 분석

이론치: C, 58.80; H, 7.094; N, 8.57;

실측치: C, 58.95; H, 6.99; N, 8.46.

#### [[4-[[[(2-메틸페닐아미노)카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프롤릴-3-메틸)-(R)-β-알라닌 벤질 에스테르(7)의 제조

DMF(125 ml) 중의 HCl 염(6)(61.77 g, 189 mmol)의 용액에 MPUPA-OSu(2; 69.39 g, 181.9 mmol)을 첨가한 후, Et<sub>3</sub>N(90 ml; pH ~10)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 3.5 시간 동안 교반한 후, EtOAc(1 ℓ)로 희석한 후, 이를 H<sub>2</sub>O(3×250 ml)로 추출하였다. 이 시점에서 생성물은 침전되기 시작하였다. 구연산 10% 용액(250 ml)을 유기상에 첨가하고(주의: 발열!), 이를 흔들면 다량의 침전물이 형성되었다. 고형물을 소결 유리 깔때기(2 L.M)상에서 여과하였다. 고형물을 구연산(10%, 2×25- ml), H<sub>2</sub>O(250 ml), 중탄산나트륨 포화 용액(2×250 ml), H<sub>2</sub>O(250 ml) 및 염수(3×250 ml)로 세정한 후, 밤새(~14 시간) 흡인(~80 mmHg)을 사용한 깔때기상에서 건조시켜 회백색의 고형물을 얻었으며, 이를 THF/Et<sub>2</sub>O(1 ℓ/1.4 ℓ)로부터 재결정시켜 백색 고형물인 화합물 7(HPLC 순도 99.6%) 83.3 g을 얻었다.

여과액을 구연산(10%, 3×250 ml), H<sub>2</sub>O(250 ml), 중탄산나트륨 포화 용액(2×250 ml), H<sub>2</sub>O(250 ml) 및 염수(3×250 ml)로 추가로 세정하였다. 각각의 수성 세정으로, 추가의 화합물이 침전되었으나, 세정을 지속하였으며, 침전물을 잃지 않도록

록 주의를 기울인다, 여과에 의해 백색 고형물인 생성물 4.02 g을 얻었다. 여과액을 마지막으로 Et<sub>2</sub>O(1 ℓ)로 희석하고, 여과한 후, 고형물을 Et<sub>2</sub>O (3×100 ml)로 세정하여 백색 고형물 1.67 g의 추가의 분획을 얻었다. 이 반응의 총 수율은 88%이었다.

mp 153 - 153.5°C;

IR(KBr) 3342, 3307, 3119, 2966, 1737, 1702, 1643, 1590, 1543, 1514, 1455, 1414, 1308, 1238, 1179 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): a 3:2 회전 이성체 혼합물, (큰 형태 피크): d 9.00(bs, 1H), 7.91(bs, 1H), 7.84(d, J=8.3Hz, 1H), 7.68(d, J= 8.3Hz, 1H), 7.40 - 7.28(m, 7H), 7.13(3H), 7.06(d, J=8.8Hz, 1H), 6.92(t, J= 7.3Hz, 1H), 5.06(ABq, J= 12.2Hz, Dn = 8.9Hz, 2H), 4.18(dd, J= 3.4, 8.8Hz, 1H), 4.10(5중선, J= 6.8Hz, 1H), 3.57(m, 2H), 3.50 - 3.22(m, 3H), 2.62 - 2.37(m, 2H), 2.23(s, 3H), 2.18 - 1.68(m, 3H), 1.05(d, J= 6.8Hz, 3H) 및 (작은 형태 피크) : d 9.00(bs, 1H), 7.91(bs, 1H), 7.84(d, J= 8.3Hz, 1H), 8.15(d, J= 8.3Hz, 1H), 7.40 - 7.28(m, 7H), 7.13(3H), 7.06(d, J= 8.8Hz, 1H), 6.92(t, J= 7.3Hz, 1H), 5.01(ABq, J= 12.2Hz, Dn = 19.0Hz, 2H), 4.32(dd, J= 2.4, 8.8Hz, 1H), 4.22(5중선, J= 6.8Hz, 1H), 3.57(m, 2H), 3.50 - 3.22(m, 3H), 2.67 - 2.37(m, 2H), 2.23(s, 3H), 2.18 - 1.68(m, 3H), 1.10(d, J= 6.8Hz, 3H);

<sup>13</sup>CNMR(125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): a 회전 이성체 혼합물 (큰 형태 피크): d 170.80(C=O), 170.52(C=O), 169.18(C=O), 152.61(C=O), 138.10(C), 137.38(C), 136.04(C), 130.05(CH), 129.63(CH), 129.47(CH), 128.58(C), 128.28(CH), 127.89(CH), 127.85(C), 126.02(CH), 122.50(CH), 117.90(CH), 117.81(CH), 65.44(CH<sub>2</sub>), 59.61(CH), 47.04(CH<sub>2</sub>), 41.75(CH), 40.41(CH<sub>2</sub>), 40.00(CH<sub>2</sub>), 29.29(CH<sub>2</sub>), 24.13(CH<sub>2</sub>), 19.88(CH<sub>3</sub>), 17.78(CH<sub>3</sub>) 및 (작은 형태 피크): d 170.94(C=O), 170.52(C=O), 169.31(C=O), 152.61(C=O), 138.10(C), 137.38(C), 136.04(C), 130.05(CH), 129.63(CH), 129.47(CH), 128.65(C), 128.28(CH), 127.89(CH), 127.85(C), 126.02(CH), 120.940(CH), 117.90(CH), 117.81(C), 65.44(CH<sub>2</sub>), 59.91(CH), 46.51(CH<sub>2</sub>), 42.01(CH), 40.13(CH<sub>2</sub>), 39.84(CH<sub>2</sub>), 31.75(CH<sub>2</sub>), 22.11(CH<sub>2</sub>), 20.05(CH<sub>3</sub>), 17.18(CH<sub>3</sub>);

MS(EI) m/z 579 [M+ Na]<sup>+</sup>, 557, 454, 426, 357, 336, 293, 267, 201;

C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>의 원소 분석

이론치 : C, 69.05; H, 6.52; N, 10.07;

실측치 : C, 68.87; H, 6.52; N, 9.93.

MS(EI) m/z 285(M+ 1)<sup>+</sup>, 193, 152, 134, 132, 109, 108, 106, 93, 91, 57;

C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl의 원소 분석

이론치: C, 58.80; H, 7.094; N, 8.57;

실측치: C, 58.95; H, 6.99; N, 8.46.

#### N-[[4-[[[2-메틸페닐아미노]카보닐]아미노]페닐]아세틸]-L-프롤릴-3-메틸)-(R)-β-알라닌 벤질 에스테르(8; oMePUPA-V)의 제조

THF/H<sub>2</sub>O(9; 800 ml) 중의 oMePUPA-OBn(7; 80.18 g)의 용액을 Pd/C(10%, 2.44 g)의 존재하에 ~55 psi에서 수소화시켰다. 25 시간 후, 반응 혼합물을 소결된 유리 깔때기 상에서 등록상표 Solka Floc (144 g, 파이버 세일즈 앤 디벨롭먼트 코포레이션)을 통해 여과하였다. 여과액을 또다른 등록상표 Solka Floc(115 g)의 패드를 통해 재여과하고, ~250 ml로 농축시킨 후, 이를 격렬히 교반한 톨루엔(3 ℓ)에 점진적으로 부었다. 현탁액을 0.5 시간 동안 교반하고, 여과(2 ℓ소결된 유리 깔때기)하고, 생성된 백색 분말을 일차로 흡인(~80 mmHg, 0.5 시간)과 함께 깔때기 상에서 건조한 후, 진공 오븐(14 시

간, 45°C; N<sub>2</sub> 흐름하의 25 inHg의 진공으로 조절한 압력)내에서 건조시켰다. 백색 덩어리를 막자와 막자사발을 사용하여 미분으로 분쇄하여 백색 고형물인 oMePUPA-V 58.3 g(수율 87%)을 얻었다. 생성물은 아세톤/H<sub>2</sub>O(320 ml/75 ml)로부터 재결정시켰다. 결정을 수집하고, 일차로 흡인(1 시간, 80 mmHg)과 함께 깔때기 상에서 건조한 후, 진공 오븐(25 시간, 45°C; N<sub>2</sub> 흐름하의 25 inHg의 진공으로 조절한 압력)내에서 건조시켜 백색 고형물인 oMePUPA-V 47.0 g(재결정으로부터 회수함 84%)을 얻었다(HPLC 순도 99.1%)

mp 153.6 - 154.4 °C;

IR(KBr) 3354, 3307, 1719, 1643, 1590, 1543, 1514, 1449, 1414, 1308, 1237 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3:2 회전 이성체 혼합물, (큰 형태 피크): δ 12.21(bs, 1H), 8.99(s, 1H), 7.91(s, 1H), 7.87(d, J = 8.2Hz, 1H), 7.68(d, J = 7.9Hz, 1H), 7.40(d, J = 8.6Hz, 2H), 7.17(d, J = 5.9Hz, 2H), 7.15(d, J = 7.6Hz, 1H), 7.12(dd, J = 7.9, 8.2Hz, 1H), 6.94(dd, J = 7.3, 7.3Hz, 1H), 4.22(dd, J = 3.3, 8.8Hz, 1H), 4.06(m, J = 6.6Hz, 1H), 3.47(dd, 1H), 3.44(d, J = 15.0Hz, 1H), 3.37(dd, 1H), 3.29(d, J = 15.4Hz, 1H), 2.46(dd, 1H), 2.27(m, 1H), 2.25(s, 3H), 1.99(m, 1H), 1.80m(m, 1H), 1.78(m, 1H), 1.76(m, 1H), 1.07(d, J = 6.6Hz, 3H) 및 (작은 형태 피크): δ 12.21(bs, 1H), 8.99(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.87(d, J = 8.2Hz, 1H), 8.12(d, J = 8.2Hz, 1H), 7.40(d, J = 8.6Hz, 2H), 7.16(d, J = 5.9Hz, 2H), 7.15(d, J = 7.6Hz, 1H), 7.12(dd, J = 7.9, 8.2, 1H), 6.94(dd, J = 7.33, 7.3Hz, 1H), 4.34(dd, J = 1.8, 8.4Hz, 1H), 4.18(m, J = 6.6Hz, 1H), 3.60(m, 2H), 3.59(m, 1H), 3.48(m, 1H), 2.47(dd, J = 6.6, 15.4Hz, 1H), 2.40(dd, J = 6.6, 15.4Hz, 1H), 2.25(s, 3H), 2.15(m, 1H), 1.83(m, 1H), 1.91(m, 1H), 1.77(m, 1H), 1.12(d, J = 6.6Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR(150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (큰 형태 피크): δ 172.4(C=O), 170.9(C=O), 169.3(C=O), 152.6(C=O), 138.2(C), 137.5(C), 130.2(CH), 129.8(CH), 129.6(CH), 128.7(C), 127.4(C), 126.1(CH), 122.6(CH), 120.9(CH), 118.0(CH), 117.9(CH), 59.7(CH), 46.6(CH<sub>2</sub>), 41.7(CH<sub>2</sub>), 40.6(CH<sub>2</sub>), 40.2(CH<sub>2</sub>), 29.4(CH<sub>2</sub>), 22.2(CH<sub>2</sub>), 19.9(CH<sub>3</sub>), 17.9(CH<sub>3</sub>) and (작은 형태 피크): δ 172.5(C=O), 171.0(C=O), 160.5(C=O), 152.7(C=O), 138.19(C), 137.5(C), 130.2(CH), 129.8(CH), 129.6(CH), 128.8(C), 127.4(C), 126.1(CH), 122.6(CH), 120.9(CH), 118.0(CH), 117.9(CH), 59.9(CH), 47.1(CH<sub>2</sub>), 42.0(CH<sub>2</sub>), 39.8(CH<sub>2</sub>), 4.03(CH<sub>2</sub>), 31.8(CH<sub>2</sub>), 24.2(CH<sub>2</sub>), 20.2(CH<sub>3</sub>), 17.9(CH<sub>3</sub>);

MS(EI) m/z 468 [M+ Na]<sup>+</sup>, 336, 267, 137;

C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>의 원소 분석

이론치: C, 64.36; H, 6.48; N, 12.01;

실측치: C, 64.07; H, 6.40; N, 11.85.

## 실시예 2

### 알레르기성 폐렴의 양 모델에서의 활성화

체중이 27~50 kg인 알레르기성 양을 사용하였다. 이들 양은 모두 분사 흡입된 아스카리스 섬(*Ascaris suum*) 알레르기원에 대해 과거 초기 및 만기의 기관지 반응을 나타내 보이는 것이었다. 양은 의식이 있었으며, 머리를 고정시킨 엎드린 자세로 변형된 쇼핑 카트 내에 숙박시켰다. 2% 리도케인으로 비강을 국소 마취시킨 후, 밸룬 카테터를 한쪽 비공을 통해 하부 식도 내로 투입시켰다. 이어서, 양에 유도 기구로서 가요성의 광학 섬유 기관지경을 사용하여 나머지 한쪽 비공을 통해 커프스형 기관내 튜브를 삽관하였다. 본 연구에 사용된 모든 프로토콜은 인간의 케어를 보장하고 실험 동물의 사용을 관할하는 마운트 시나이 메디칼 센터 애니멀 리서치 커미티(Mount Sinai Medical Center Animal Research Committee)에서 승인한 것이었다. 흉막압은 위와 식도의 연결부로부터 5~10 cm 떨어진 지점에 식도 밸룬 카테터(공기 1 mL가 채워짐)를 설치하고 이를 사용하여 측정하였다. 이 지점에서, 최종 날숨 흉막압은 -2~-5 cmH<sub>2</sub>O이었다. 밸룬을 배치한 후에는, 실험 기간 동안 동일한 위치에 유지되도록 고정시켰다. 기관 내 외측압은 기관내 튜브를 통과하여 그 단부로부터 원거리에 위치한 측공 카테터(내경, 2.5 mm)를 사용하여 측정하였다.

기관 및 흉막압 카테터는 경폐압의 측정을 위한 차동압 변환기(MP45, 미국 캘리포니아 노스리지 소재의 벨리다인 제품)에 연결시켰으며, 상기 경폐압은 기관압과 흉막압 사이의 차이로 정의된다. 기류(airflow)는 기관내 튜브의 인접 단부를 호흡 속도 묘사기(Fleische, 미국 펜실베이니아주 블루벨 소재의 다이나 사이언시스, 인코포레이티드 제품)에 연결시켰다. 경폐압 및 기류의 신호는, 경폐압의 변화를 중간 호흡량에서의 기류 변화(디지털 통합을 통해 산출)로 나누어 평균 폐흐름 저항( $R_L$ )을 온라인 계산하기 위한 80-386 DOS 퍼스널 컴퓨터에 연결시킨 다채널 생리학적 기록계를 사용하여 기록하였다. 연하 인공물이 없는 상태에서 5회 이상 호흡의 평균을 사용하여  $R_L$ 을  $\text{cmH}_2\text{O}/\text{L}/\text{초}$ 의 단위로 구하였다.  $R_L$ 을 측정할 직후, 흉부 가스 부피( $V_{tg}$ )를 일정 부피의 체혈량계로 측정하여 특이적 폐저항( $SR_L=R_L \times V_{tg}$ )을  $\text{L} \times \text{cmH}_2\text{O}/\text{L}/\text{초}$ 의 단위로 구하였다.

모든 액체 투여 에어로졸은, 앤더슨 다단식 충격기에 의해 측정된 질량 중간 공기역학 직경이  $3.2 \mu\text{m}$ 인 에어로졸을 갖추고 있는 1회용 의료 공기 제트 분사기(Raindrop(등록상표), 미국 캔사스주 레넥사 소재의 푸리탄 베네트 제품)를 사용하여 발생시켰다. 분사기는 솔레노이드 밸브 및 압축 공기(20 psi) 공급원으로 구성된 약량계에 연결시켰다. 분사기의 배출구는 플라스틱 T 피스 내로 배향시켰고, 상기 피스의 한쪽 단부는 피스톤 호흡기(미국 메사츄세츠주 에스 나틱 소재의 하바드 어파라투스 제품)의 흡입구에 연결시켰다. 솔레노이드 밸브는 호흡기의 흡입 사이클의 초기 1분 동안 작동시켰다. 에어로졸은 500 mL의 호흡량 및 20 호흡수/분의 속도로 전달시켰다. 기관지 반응을 평가하기 위해, 완충제의 흡입 직후, 그리고 카바콜을 점점 많은 농도(완충된 생리 식염수 중의 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0% w/v)로 10회 호흡을 통해 연속 투여한 직후에  $SR_L$ 을 측정하여, 카바콜에 대한 누적 농도 반응 곡선을 작성하였다. 자극 시험은,  $SR_L$ 이 생리 식염수 투여 후 값 또는 최고 농도의 카바콜 투여 후의 값으로부터 400% 이상 증가하였을 때 중단하였다. 기관지 반응은 투여 반응 곡선으로부터의 삼관을 통해  $SR_L$ 이 생리식염수 투여 후의 값보다 400% 정도 증가한 누적 카바콜 농도(호흡 단위)( $PC_{400}$ )를 측정하여 평가하였다. 하나의 호흡 단위(BU)는 1% w/v 카바콜 분사 용액의 1회 호흡으로 정의하였다.

oMePUPA-V의 투여량을 에탄올:일반 생리식염수(1:2) 또는 에탄올:200 mM 인산나트륨(1:5) 또는 트리스 완충액 중 하나에 용해시켰다. 트리스를 사용하는 경우, 필요한 임의의 희석은 일반 생리 식염수를 사용하여 실시하였다. 투여 형태는 총 부피가 3~5 mL가 되도록 제조하였다.

모든 연구에서, 기준 기도 반응(즉,  $PC_{400}$ )은 연구를 개시하기 3 내지 4일 전에 측정하였다. 1회 투여 예비 처리 연구에서는,  $SR_L$ 을 측정하고, 동물은 상기 화합물 또는 부형제로 처리하였다.  $SR_L$ 은 처리 2 시간 후(알레르기원 투여 직전)에 재측정하고, 동물에게 알레르기원을 투여하였다. 다회 투여 연구에서는, 알레르기 투여 전 4일째부터 동물을 4일 동안 1일 1회 처리하고, 최종 투여 24 시간 후에 알레르기원을 투여하였다.  $SR_L$ 은 화합물 또는 부형제 처리의 최종 투여 이전과 이후에 측정하였다. 모든 연구에서,  $SR_L$ 은 알레르기원 투여 직후, 알레르기원을 투여하고 1 내지 6 시간 후 1시간 마다, 그리고 알레르기원을 투여하고 6.5 내지 8 시간 후 30 분마다 재측정하였다. 알레르기원 투여 후 기도 반응( $PC_{400}$ )은 알레르기원을 투여하고 24 시간 후에 측정하였다.

값은 평균  $\pm$  표준 오차로 표현하였다.  $SR_L$ 의 변화는 알레르기원 처리 이전의 기준( $SR_L$ )과의 차이로서 각 양에 대해 계산하였다. 알레르기원 투여 후  $SR_L$ 의 변화는 약 0~4 시간에 걸쳐 발생한 조기 기도 반응(EAR)으로 특징화하였다. 이후에는, 알레르기원 투여 후 약 4~8 시간에 걸쳐 발생한 만기 기도 반응(LAR)이 이어졌다. EAR 곡선과 LAR 곡선 아래의 면적은 사다리꼴 법칙을 이용하여 각 동물에 대해 산정하였다. 위약 대조군에 비해 EAR 곡선 또는 LAR 곡선 아래 면적의 유의적인 감소는, 알레르기원에 의한  $SR_L$ 의 변화에 대한 치료 효과로 간주하였다. 알레르기원 투여 전, 그리고 투여하고 24 시간 후에 측정된 카바콜에 대한 기도 반응( $PC_{400}$ )은 각 양의  $PC_{400}$  비율(투여 후/투여 전의  $PC_{400}$  값)로 표현하였다. 위약 대조군에 비해  $PC_{400}$  비율이 유의적으로 증가한 것을 치료 효과로 간주하였다. 위약 대조군과의 비교는 대조군과 다방면으로의 비교를 위해 원웨이 분산 분석 및 더넷 시험(1 테일)을 순차적으로 이용하여 실시하였다.  $p < 0.05$ 에서의 비교는 통계적으로 유의적인 수준이 있는 것으로 간주하였다.

도 1은 투여 후 2시간 쯤에 알레르기원 투여한 아스카리스 섬 민감성 양에 있어 분무된 oMePUPA-V의 억제 투여량 반응을 나타낸 것이다. 좌측 패널은 특이적 폐저항( $SR_L$ )( $\text{cm H}_2\text{O}/\text{초}$ )의 변화를 나타낸 것이다. 우측 패널은 알레르기원 투여 후 24시간째에 측정된 흡입된 카바콜에 대한 기도 반응( $PC_{400}$  비율, 알레르기원 투여 전/후)을 나타낸 것이다. 0.01 mg 및 0.03 mg의 투여량에서 oMePUPA-V는 조기 또는 만기 기도 반응을 억제하거나, 또는 알레르기원 투여 후 24시간째 카바

콜에 대한 과민 반응을 변경시키지 않았다. 0.1, 1 및 3 mg의 투여량에서는, 조기 기도 반응을 억제시켰고, 만기 기도 반응을 최대도 억제시켰다. 또한, 이들 투여량에서는 알레르기원 투여 후 24 시간째에 카바콜에 대한 과민 반응을 억제시켰다. 이 데이터의 통계적 분석 결과는 표 2에 제시하였다.

**[표 2]**

처리	투여량(mg)	부형제	n	EAR ( $\Delta$ SLR x h)	LAR ( $\Delta$ SLR x h)	PC <sub>400</sub> (투여 후/전)
알레르기원 투여 전 2시간 째 투여						
PBS			12	5.85 ±0.62	4.85 ±0.69	0.49 ±0.03
oMePUPA-V	0.01	EtOH:NS	2	6.87 ±0.05	5.11 ±1.46	0.44 ±0.04
	0.03	EtOH:NS	2	10.62 ±3.91	3.98 ±0.23	0.43 ±0.00
	0.10	EtOH:NS	4	2.54 ±0.74*	0.67 ±0.17*	1.18 ±0.11*
	1.00	EtOH:PBS	2	2.14 ±0.70*	0.27 ±0.34*	1.05 ±0.11*
	3.00	EtOH:PBS	2	2.47 ±0.62	0.68 ±0.07*	1.07 ±0.08*
* 대조군과의 다방면 분석을 위해 원웨이 분산 분석 및 더넷 시험을 순차적으로 p < 0.05 하에 PBS 대조군과 비교했을 때, EAR 또는 LAR이 통계적 유의 수준으로 감소하거나, PBS 대조군에 비해 PC <sub>400</sub> 비율이 유의적으로 증가하였음을 지시하는 것이다.						

선천적으로 *Ascaris Suum*에 민감한 양에 지시된 투여량의 oMePUPA-V를 에어로졸 투여한 후 2시간 째, 또는 역치 수준 이하 투여량의 oMePUPA-V 또는 등량의 PBS를 4일 동안 반복적으로 매일 투여하는 경우 최종 투여 후 24 시간 째에 *Ascaris Suum* 에어로졸을 투여하였다. 예비 연구 기준값으로부터 특이적 기도 저항의 변화로 보고되는 폐 역학치는 알레르기원 투여 후 8 시간 동안 측정하였다. 조기 기도 반응(0~4 시간, EAR)과 만기 기도 반응(4~8 시간, LAR)은 시간에 대한  $\Delta$ 특이적 폐 저항 곡선 아래 평균 면적  $\pm$ s.e.m.으로 표현하였다. 흡입된 카바콜에 대한 기도 저항은 연구 개시 전, 그리고 알레르기원 투여 후 24 시간 째에 측정하였다. 기도 반응은 알레르기원 투여 이전 값과 이후 값을 비교하여 PC<sub>400</sub>(저항을 400% 증가시키는 데 필요한 카바콜 양) 비율로 보고하였다.

**1회 투여 자극**

기준 저항과 비교하여 기도 저항의 변화가 없는 것으로 볼때, 상기 연구에 사용된 oMePUPA-V의 투여량은 *Ascaris Suum* 알레르기원의 투여 후 어떤 것도 자극 효과를 나타내 보이지 않았다. 이는 도 2에 제시하였다,

**반복 투여 연구**

도 3은 1회 투여의 급성 예비 처리로서 사용했을 때 비효과적인 것으로 나타나는 0.03 mg 투여량으로 oMePUPA-V를 4일 동안 1일 1회 투여하고, 최종 투여 후 34시간 째에 항원을 투여했을 때 보호 효과를 제공한다는 것을 말해준다. 상부 및 하부 좌측 폐넬은, 2개의 다른 제제를 사용했을 때 이 효과가 나타났음을 말해준다. 추가 24 시간 후 카바콜에 대한 과민 반응 역시 도 3의 상부 및 하부 좌측 폐넬에 제시된 바와 같이 최대도 억제되었다. oMePUPA-V의 보호 효과는 EAR 및 LAR에 대해, 그리고 카바콜에 대한 과민 반응에 대해 유의적인 수준이었으며, 정량 분석 결과는 표 3에 제시하였다.

이 연구 결과는, VLA-4의 소분자 억제제인 oMePUPA-V를 에어로졸로 1회 예비 처리하면 알레르기성 양 모델에 있어 알레르기원에 의해 유도된 조기 및 만기 기도 반응과 알레르기원에 의해 유도된 AHR에 대해 보호 효과를 제공할 수 있음을 말해준다. 기도에 대한 자극 효과는 1회 예비 처리로서 제시된 투여량의 oMePUPA V에서는 전혀 관찰되지 않았다. 또한, 이들 결과는 다회 처리 시 oMePUPA V의 유효량이 감소할 수 있다는 것을 말해준다. 총체적으로, 이들 데이터는 VLA-4 부착 경로는 알레르기원 투여 후 알레르기성 양의 기도에 개시되는 장기 염증 발생의 병리 생리학적 지시 인자 (LAR 및 AHR)에 중요한 작용을 한다는 강한 근거를 제공해준다.

**[표 3]**

처리	투여량(mg)	부형제	n	EAR ( $\Delta$ SLR x h)	LAR ( $\Delta$ SLR x h)	PC <sub>400</sub> (투여 후/전)
4일 동안 1일 1회 투여, 최종 투여 후 24 시간째 알레르기원 투여						
PBS			8	4.33 $\pm$ 0.81	4.96 $\pm$ 0.40	0.38 $\pm$ 0.03
oMePUPA-V	0.03	EtOH:NS	4	1.53 $\pm$ 0.34*	0.59 $\pm$ 0.16*	1.06 $\pm$ 0.04*
	0.03	트리스:NS	4	1.40 $\pm$ 0.35*	0.02 $\pm$ 0.06*	1.04 $\pm$ 0.04*
* 대조군과의 다방면 분석을 위해 원웨이 분산 분석 및 더넷 시험을 순차적으로 p < 0.05 하에 PBS 대조군과 비교했을 때, EAR 또는 LAR이 통계적 유의 수준으로 감소하거나, PBS 대조군에 비해 PC <sub>400</sub> 비율이 유의적으로 증가하였음을 지시하는 것이다.						

선천적으로 *Ascaris Suum*에 민감한 양에게, 역치 수준 이하 투여량의 oMePUPA-V 또는 등량의 PBS를 4일 동안 반복적으로 매일 투여하는 경우 최종 투여 후 24 시간째에 *Ascaris Suum* 에어로졸로 항원 투여하였다. 예비 연구 기준값으로부터 특이적 기도 저항의 변화로 보고되는 폐 역학치는 알레르기원 투여 후 8 시간 동안 측정하였다. 초기 기도 반응(0~4 시간, EAR)과 만기 기도 반응(4~8 시간, LAR)은 시간에 대한  $\Delta$ 특이적 폐 저항 곡선 아래 평균 면적  $\pm$ s.e.m으로 표현하였다. 흡입된 카바콜에 대한 기도 저항은 연구 개시 전, 그리고 알레르기원 투여 후 24 시간 째에 측정하였다. 기도 반응은 알레르기원 투여 이전값과 이후 값을 비교하여 PC<sub>400</sub>(저항을 400% 증가시키는 데 필요한 카바콜 양) 비율로 보고하였다.

### 실시에 3. 지연형 과민 반응 모델에서의 활성화

#### 양의 적혈구 연구

잭슨 랩에서 입수한 8~10 주령의 특이 항원이 없는 암컷 Balb/c 마우스를 모든 실험에 사용하였다. 상기 마우스에게 사료와 물을 마음대로 먹을 수 있을 만큼 제공하였다. 동일한 양에서 취한 알제버(Alsever) 용액 중의 양의 적혈구(sRBC)를 칼스 리버 팜 서비스즈(매사추세츠주 사우스브리지)에서 주 단위로 입수하였다. sRBC를 4°C에서 10분 동안 1000g로 원심 분리하여 펠렛을 만들고, 눈에 보이는 담황갈색 피막을 제거하였다. 그 후, 혈구를 염수 중에서 세척하였다. 혈구 펠렛을 염수에 재현탁시키고, 혈구계를 사용하여 계수하였다. 혈구를 인산염 완충 염수(PBS)에서 2x10<sup>8</sup> sRBC/ml까지 희석하였다. 0일째에, PBS 100  $\mu$ l 중의 2x10<sup>7</sup> sRBC를 피하 주사하여 마우스를 감염시켰다. 5일째에, 상기와 같이 sRBC를 제조하였으나, 최종 농도 4x10<sup>9</sup> sRBC/ml까지 PBS 중에서 희석하였다. 상기 제제 중 25  $\mu$ l를 우측 뒷발에 피하 주사하였다.

화합물의 장내 투여를 위해, oMePUPA-V(Lot#2770-029)를 0.02M TRIS 중의 60% PEG 400의 매체에서 제형화하여 원액 농도 5 mg/ml를 만들었다. PEG/TRIS 매체 중에서 적절한 희석액을 만들어 100  $\mu$ l의 부피로 장내 투여하였다. 항-VLA-4 항체(PS/2)를 농도 4.3 mg/kg으로 염수 중에서 희석하여 100  $\mu$ l 부피로 복강내 투여하였다. 모든 처리물은 sRBC를 재투여한 직후에 투여하였다.

각부 재투여 20 시간 후에 미츠토요에서 입수한 장력 캘리퍼(모델 #304-196, 펜실베이니아주 랭카스터 소재의 다이어)를 사용하여, 재투여하지 않은 대조군(좌측) 및 재투여한(우측) 뒷발의 부종도를 측정하였다. 데이터는 각부 두께의 변화율로서 제시하는데, 이는 우측 뒷발 두께로부터 좌측 뒷발 두께를 공제하여 측정한다. 각부 두께의 변화는 두 개의 테일이 있는 스튜던츠 t-시험을 사용하여 비교하였다.

항-VLA-4-항체 PS/2를 4.3 mg/kg의 투여량으로 복강내 투여한 결과 부종을 약 30% 억제한 반면에, 20 mg/kg의 투여량으로 장내 투여된 oMePUPA-V는 상기 모델에서 효과가 없었다(데이터 미제시). 마우스에서의 sRBC에 의해 유도된 DTH 모델에서 장내 경로에 의해 20 mg/kg의 투여량으로 투여된 oMePUPA-V의 효능을 연구하였으나, 효능은 관찰되지 않았다.

### 실시에 4. 지연형 과민 반응 모델에서의 활성화

#### 접촉 과민 반응 모델

비오겐의 무비루스 동물 시설의 미세 분리 케이지 중의 케이지에 네 마리씩 수용되고, 마우스 먹이 및 수도물이 마음껏 먹을 수 있도록 제공된 20g의 암컷 무비루스 Balb/c 마우스(메인주 바 하버 소재의 잭슨 래보러토리즈)를 모든 연구에 사용

하였다. 마우스를 케타민:크실라진(90:10 mg/kg, 복강내 투여)으로 마취시켰다. 털을 세밀하게 깎아서 치골에 대한 검상돌기인 복부 피부의 3 cm<sup>2</sup> 패치를 노출시키고, 피부를 70% 에탄올로 문질렀다. 4:1 v/v 아세톤:올리브유 매체 중의 0.5% DNFB 25  $\mu$ l 부피를 노출된 복부 피부에 균일하게 발랐다. 피부를 도포용 피펫 끝으로 가볍게 긁어서 가벼운 염증을 야기하였다. 마우스를 그 케이지에 반듯이 눕히고 마취로부터 회복시켰다. 초기 감각 24 시간 후에, 마우스를 동일한 복부 피부 위치에서 매체 중의 0.5% DNFB 25  $\mu$ l로 다시 감각시키고, 다시 피펫 끝으로 가볍게 긁었다. 마취하지 않은 마우스를 구속하면서 제2 감각을 실시하였다. 5일째(초기 감각 대략 120 시간 후)에, 감각제의 자극 수준 미만의 투여량(4:1 v/v 아세톤:올리브유 매체 중의 0.2% DNFB)을 사용하여 면역 반응을 일으켰다. 마우스를 90:10 mg/kg의 케타민:크실라진(복강내 투여)으로 마취시키고, 0.2% DNFB 10  $\mu$ l를 좌측 귀의 배면에 도포하였다. 우측 귀에는 유사한 도포량의 4:1 v/v 아세톤:올리브유 매체를 도포하였다. 후속 24 시간이 지난 후에, 도 4에 도시한 바와 같이 이상성(biphasic) 귀 부종 반응이 나타났다. 항원 재투여 24 시간 후에, 마우스를 케타민:크실라진으로 다시 마취시키고, 두 귀의 귀 두께를 기술자의 마이크로미터를 사용하여 10<sup>-4</sup> 인치의 정확도로 측정하였다.

화합물(100  $\mu$ l) 또는 적합한 매체(등장성 인산염 완충 염수[PBS] 중의 디메틸설폭사이드[DMSO], 100  $\mu$ l)를 5일째에 면역 반응을 일으킨 지 4 시간 후에 가바즈에 의해 경구 투여하였다. 8 마리의 마우스 군을 시험되는 각 처리에 사용하였다. oMePUPA-V(배치 번호 2044-076)를 0.5% 인산나트륨 완충액(pH8.8) 및 3% DMSO를 첨가하여 증류수에 용해시켰다. 각 마우스에 대한 귀의 부종 반응은 재투여 24 시간 후에 매체 투여 및 DNFB 투여 귀 두께 사이의 차이로서 계산하였다. 통상적인 DNFB-유도된 귀 부종은 65~75x10<sup>-4</sup> 인치였다. 귀의 부종 반응의 억제에는 그 매체 대조군과 처리군을 비교하여 측정하였다. 처리 군 사이의 차이의 통계적 유의 수준은 분산의 일방 분석에 이어 더넷 시험을 사용(p<0.05를 사용함)하여 대조군(SPSS 인코포레이티드의 시스타트)에 대한 다중 비교에 대해 평가하였다. 값은 평균  $\pm$ 평균의 표준편차(SEM)로 표현하였다.

도 4는 매체(DMSO, PBS), 양성 대조 화합물(0.03  $\mu$ g/kg으로 제공됨) 또는 DNFB 투여 4 시간 후에 장내 투여된 0.03 또는 0.3  $\mu$ g/kg의 pMePUPA-V(상부 패널)를 투여받은 마우스에서 DNFB 재투여 24 시간 후에 측정된 귀의 부종 반응을 비교한 것이다. 처리에 의해 유도된 억제는 하부 패널에 도시되어 있다. 두 투여량의 oMePUPA-V는 양성 대조 화합물에 의해 나타나는 것과 유사한 정도로 귀의 부종 반응을 상당히 억제하였다.

DNFB 재투여 4 시간 후에 제공된 oMePUPA-V의 단일의 장내 0.03 또는 0.3 mg/kg의 투여량은 마우스 접촉 과민 반응 모델에서 귀의 부종 반응을 상당히 억제할 수 있다.

## 실시에 5. 생화학

5.1 VCAM-Ig 직접 결합 분석(DBA)에서 VCAM-Ig 알칼리 포스파타제 접합체를 사용하여 측정된 oMePUPA-V의 수용체 친화도

VCAM-Ig는 공개된 대로 작제하고 정제하였다(Jakubowski, A. 등, Cell Adhesion and Communications 3:131-142, 1995). 색소 형성성 기질을 절단할 목적으로 송아지 장 알칼리 포스파타제에의 접합을 공개된 대로 수행하였다(Lobb, R.R. 등, Cell Adhesion and Communications 3:385-397, 1995). VLA-4에의 결합은 인간 T 세포주인 Jurkat( $\alpha$ 4 $\beta$ 1)에 대해 평가하였다. VCAM-Ig-AP 및 oMePUPA-V는 1mM Mn<sup>+2</sup>의 존재 하에 상기 세포의 표면 상에서  $\alpha$ 4 $\beta$ 1에의 결합에 대해 경쟁하였다.

VCAM-Ig 직접 결합 분석에서, oMePUPA-V는 8  $\pm$  1 nM(n=9)의 IC50과 함께 농도 의존적으로 1mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 Jurkat 세포에 대한 결합에 대해 VCAM-Ig-AP와 경쟁한다. 그 결과를 표 4에 나타낸다.

5.2 정제된 VLA-4 단백질/단백질 분석에서 VCAM-Ig 알칼리 포스파타제 접합체를 사용하여 측정된 oMePUPA-V의 수용체 친화도

VLA-4를 항체 친화도 크로마토그래피에 의해  $\alpha$ 4-형질감염된 K562 세포의 서브클론을 다량 발현시키는 세제 추출물로부터 정제하고, 미량역가 웰에 고정화하여 단백질/단백질 경쟁 결합 분석을 확립하였다. VCAM-Ig-AP를 oMePUPA-V(Lot #2) 및 1 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 또는 부재 하에 정제된 VLA-4 피복된 평판에 결합시켰다. 평판들을 405 nm에서 판독하고 소프트웨어 v.2.32 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

정제된 VLA-4에 대한 VCAM-Ig 접합체의 결합은 특이 중화성 항- $\alpha 4$  단일클론 항체(HP1/2)에 의해 완전히 차단되었다. VLA-4 단백질/단백질 분석에서 oMePUPA-V에 대해 얻어진 두 IC50은 VCAM-Ig-AP 경쟁 결합 분석 및 CS1 세포 부착 분석으로부터 Jurkat 세포 상에서 얻은 IC50과 마찬가지로 표 4에 나타난다.

5.3 CS1 세포 부착 분석에서 평가된 oMePUPA-V의 수용체 친화도

a. CS1/BSA 접합체에서의 Jurkat 세포의 부착

펩티드 NH-시스테인-티로신-CS-1을 합성하고 CS1/BSA 비 10:1로 BSA-SMCC에 결합시켰다(SMCC는 BSA 상의 유리 아미노기 및 합성 펩티드의 유일한 시스테인과 반응하는 이중 이중 작용성 가교제임). 웰을 최종 농도 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석된 접합체 100  $\mu\text{l}$ 로 하루밤 동안 피복하였다. 다음날 웰을 PBS 중의 BSA로 1 시간 동안 차단한 다음, 3회 세척하였다.

인간의 T 세포주인 Jurkat를 형광성 염료 (2',7'-비스-(2-카르복시에틸)-5- 및 -6)카르복시 플루오레세인 아세톡시메틸 에스테르인 2  $\mu\text{M}$  BCECF-AM(오레곤주 유진 소재의 몰레칼라 프로브스 인코포레이티드; 카타로그 #B-1150)로 표지하였는데, 이 염료는 내부로 함입되고 탈에스테르화되어 염료를 생세포 내에 포집한다. 1mM Mn를 함유하는 완충액 중의 Jurkat 세포( $1 \times 10^5$  세포/웰)를 3배의 연속 희석물의 억제제의 존재 하에 피복된 평판에 첨가하였다. 각 농도는 이중으로 분석하였다. 실온에서 30분 후에, 평판을 뒤집고, 3회 세척하거나, BSA만으로 피복된 대조군 웰에 부착된 세포가 없을 때까지 세척하였다. CS1-부착 세포는 여기 파장 485nm 및 방출 파장 530nm를 사용하여 사이토플루오르 형광 평판 판독기에서 정량 분석하였다.

화합물 부재시 CS1/BSA에 부착된 세포들은 0%의 억제 대조구로서 작용한 반면에, BSA에만 부착된 세포들은 100%의 억제 대조구로서 작용하였다. 이때 IC50은 Deltagraph 소프트웨어(version 5.0)를 사용하여 측정하였다.

$\text{Mn}^{2+}$  존재하에서 표시된 Jurkat 세포들의 부착은 EDTA에 의하여 완벽하게 차단되었으며 항  $\alpha 4\beta 1$  mAb, HP1/2를 중화시켰는데, 이는 곧 결합이 특이적이라는 사실을 시사해 주는 것이다. 표4는 CS1/BSA 부착 검정법에서 oMePUPA-V의 활성 및 결합 검정법의 결과를 나타낸다.

oMePUPA-V는  $\text{Mn}^{2+}$  함유 완충액에서 유력한 VLA-4의 길항약으로서 작용한다. 이는  $\text{Mn}^{2+}$  존재하에서 검정되는 경우, 80배나 높은 활성을 나타낸다. oMePUPA-V는 작동적 길항약으로서 이의 활성은 투여량 의존성이며 Jurkat 세포가 CS1에 부착되는 것을 완벽하게 차단할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 부착 검정법에서의 절대값은 상기 결합 검정법에서 관찰되는 값들보다 더욱 큰 경향이 있다. 이는 부착의 다가성에 기인할 수 있다. 모든 검정법에서, EDTA 및 HP1/2에 의하여 결합이 억제되는 현상은 VLA-4에 특이적으로 결합됨을 나타내는 것이다.

**[표 4]**

VCAM-Ig 경쟁적 결합 검정법, CS1 세포 부착 검정법 및 정제된 VLA-4 단백질/단백질 검정법에서 측정된 1 mM의  $\text{MnCl}_2$ 의 존재시 oMePUPA-V의 수용기 친화성

	IC50 $\pm$ SD [nM]
검정법	oMEPUPA-V
Jurkat 세포 VCAM-Ig 결합	8 $\pm$ 1 (n=9)
Jurkat 세포 CS1 부착	22 $\pm$ 2 (n=4)
정제된 VLA-4 VCAM-Ig 결합	0.1 (n=2) (0.1, 0.1)

6.4 oMePUPA-V 억제의 특이성

a. VCAM-Ig 직접 결합 및 CSI 부착 검정법에서 JY 세포를 사용하여 측정된 oMePUPA-V의 특이성

$\alpha 4\beta 7$ 에 대한 결합은  $Mn^{2+}$  존재하에서 JY 세포상에서 평가된다. 결합 검정법에서, VCAM-Ig 및 oMePUPA-V는 JY 세포상에서  $\alpha 4\beta 7$ 에 경쟁적으로 결합한다 (검정법 방법에 관한 섹션 4.1.1. 참조). 세포 부착 검정법에서, oMePUPA-V는 이것이 JY 세포( $\alpha 4\beta 7$ )가 CS1/BSA 컨쥬게이트에 결합하는 것을 차단하는 능력에 대하여 시험된다.

oMePUPA-V는  $\alpha 4\beta 7$  이 VCAM-Ig 또는 CS1/BSA 에 결합하는 것을 차단하지 않는다. 항  $\beta 7$  Mab인 Fib27(Pharmigen)는 상기 반응들을 완벽하게 차단시켰는데, 이는 상기 결합이  $\alpha 4\beta 7$  특이적이라는 것을 시사하는 것이다. 따라서 oMePUPA-V는 VLA-4 에 대한 특이적 억제자로서의 기능을 갖는다. 그 결과를 표 5에 나타내었다.

b. K562 세포가 Fn-120으로 피복된 웰에 부착되는 성질을 이용하여 측정된 oMePUPA-V의 특이성.

처리되지 않은 96 웰 폴리스티렌의 편평한 바닥 플레이트를 4°C에서 밤새 동안 5  $\mu g/ml$  의 Fn-120 로 피복시켰다. 이후 상기 플레이트를 인산염으로 완충된 염수(PBS)로 2회 세정한후 다시 실온에서 1 시간 동안 1% 의 소 혈청 알부민(BSA)으로 차단시켰다. 이후 상기 플레이트를 1 mM  $MnCl_2$ 를 함유하는 TBS 완충액(검정법 완충액)으로 2 회 세척하였다.

K562 세포를 2 $\mu M$  의 형광 염료, BCECF-AM (섹션 4.1.3 참조)으로 라벨링시키고 실온에서 30 분 동안 플레이트에 결합시켰다. 이후 상기 플레이트를 뒤집어서 3회 세정한후 부착된 세포들을 여기 파장이 485 nm이며 방사 파장이 530 nm인 Cytofluor 형광 플레이트 판독기로 정량하였다.

K562 가 Fn-120 에 부착되는 것은 중화 항  $\alpha 5$  항체, ILA1 (Pharmigen)에 의하여 완벽하게 차단되는데, 이는 VLA-5를 통한 결합이 특이적이라는 사실을 시사하는 것이다. 100  $\mu M$  의 투여량으로 투여하였을 경우에는 oMePUPA-V 에 의한 Fn120K 단편으로의 K562 세포의 결합이 차단되지 않았다. 이하 표 5를 참조하십시오.

c. oMePUPA-V 방법의 특이성을 평가하기 위하여 수행된 응집 검정법

gp IIbIIIa 에 대한 활성을 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma)을 사용하는 표준적인 혈소판 응집 측정법에 의하여 측정하였다. ADP를 사용하여  $Ca^{2+}$  과  $Mg^{2+}$  이 주요 2가 양이온으로서 존재하는 혈장의 존재하에서의 응집 반응을 개시하였다. GRGDSP@ 100  $\mu g/ml$  를 양성 대조구로서 사용하였다.

결과 :

각각의 투여량, 즉 1, 10 및 100  $\mu M$  의 oMePUPA-V 에 대해서 시험하였다. 어떠한 투여량에서도 ADP 에 의해서는 혈소판 응집을 유도하지 않았다. 결과를 표 5에 나타내었다. oMePUPA-V 는 VLA-4 에 대하여 매우 특이적이었다(10,000 배 초과). 관련 인테그린,  $\alpha 4\beta 7$  및 VLA-5, 또는  $\beta 3$  인테그린, gp IIbIIIa 에 대한 측정 가능한 활성(100  $\mu M$  초과)은 보이지 않았다.

**[표 5]**

**$\alpha 4\beta 7$  VCAM-Ig 경쟁 결합 분석,  $\alpha 4\beta 7$  및 VLA5 부착 분석, 그리고 혈소판 응집 연구에서 측정된 oMePUPA-V의 억제 활성**

세포군	리간드	2가 양이온	oMePUPA-V IC50 $\pm$ SD [nM]
JY ( $\alpha 4\beta 7$ )	VCAM-Ig DBA	$Mn^{2+}$	3% 억제 @ 100 $\mu M$ (n = 3)
JY ( $\alpha 4\beta 7$ )	CS1/BSA 부착	$Mn^{2+}$	0% 억제 @ 100 $\mu M$ (n = 4)
K562 (VLA-5)	Fn-120 부착	$Mn^{2+}$	0% 억제 @ 100 $\mu M$ (n = 3)
혈소판 (IIbIIIa)	피브리노겐 응집	$Ca^{2+}/Mn^{2+}$	0% 억제 @ 100 $\mu M$ (n = 1)

**실시에 6. LIBS 유도에 대한 oMePUPA-V의 검정법**

**6.1 LIBS 항체 9EG7 을 사용하는 Jurkat 상에서의 측정법**

a. α4β1 길항약에 의한 LIBS 유도 여부에 관하여 시험관내에서 FACS 분석법을 통하여 평가하였다. Jurkat 세포 (2 × 10<sup>5</sup>/웰) 를 37℃ 에서 20 분 동안 2mM 의 MgCl<sub>2</sub> (Mg<sup>2+</sup> TBS) 을 함유하는 TRIS 완충된 염수만으로, 또는 시험 화합물을 일련으로 희석시켜 예비 항온 처리시켰다. 상기 시료들을 얼음조에 옮긴후, LIBS 항체, 9EG7 으로 최종 농도가 10 μg/ml 이 될 때까지 보강시켰다. 이후 상기 세포들을 Mg<sup>2+</sup> TBS 로 2 회 세정한후 Mg<sup>2+</sup> TBS 내 FITC 컨주게이팅된 염소 항체 IgG의 1 : 200 희석액에 재현탁시키고 다시 4℃에서 30 분 동안 항온 처리하였다. 이후 세포들을 2회 세정하고 Mg<sup>2+</sup> TBS 내에 재현탁시켰다. 평균 형광 강도 (MFI)를 FACS 분석기 (Beacon Dickinson FACScan)로 측정하였다. 그 결과를 MFI 값으로 나타내었다. 데이터를 Microsoft Excel v 5.0 및 Deltagraph v 4.0 소프트웨어로 분석하였다.

도 5는 oMePUPA-V 가 2 mM 의 Mg<sup>2+</sup> 완충액 (패널 B)의 경우에 비하여 LIBS 에피토프의 노출을 유도하는것을 나타내는 것이다. 상기 유도는 농도 의존성이었으며 1 mM 의 Mg<sup>2+</sup> (패널 A)가 존재할 경우에 관찰되는 유도의 양과 유사하였다. LIBS 항체의 제거 및 항체의 검출, 또는 상기 검출 항체만을 제거하면 라벨링이 감소되었다 (패널 B). 상기 반응의 ED50은 -20 nM 이었다.

결론 :

다음 데이터들은 oMePUPA-V 가 VLA-4의 형태를 천연 리간드에서 관찰되는 것과 동일한 방식으로 변형시킨다는 것을 나타내는 것이다. LIBS 수치들은 일반적으로 oMePUPA-V 에 대해서 각각 8 nM 및 22 nM 로 정의되는 결합 및 부착 검정법에 의하여 한정되는 범위내에 존재한다.

**6.2 복수 종 수용기 스크리닝법**

a. 다수의 종으로부터 얻어진 VCAM-Ig 알칼리성 포스파타아제 컨주게이트 및 말초 혈액 림프구 또는 비장 세포를 사용하는 VCAM-Ig 직접 결합 검정법에서 측정된 oMePUPA-V 의 수용기 친화성.

양 PBL [Abraham, W.M.외 다수 공저, *J.Clin.Invest.* 93:776-787, 1994]에 기술된 방법을 사용하여 PBL 을 인간, 양 및 개의 말초 혈액으로부터 각각 분리하였다. VCAM-Ig-AP 경쟁적 결합 검정법을 사용하여 oMePUPA-V가 상이한 세포 형태에 부착되는 정도를 비교하였다.

Mn<sup>2+</sup> 존재하에서 다수의 종으로부터 얻어진 말초 혈액 림프구 또는 비장 세포상에서의 oMePUPA-V 에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 표 6에 나타내었다. Mn<sup>2+</sup> 존재하에서, oMePUPA-V 는 유사한 IC<sub>50</sub> 정도로 VCAM-Ig 가 인간, 래트, 개, 양 및 마우스로부터 얻어진 림프구에 결합하는 것을 억제하였다. 종 특이성을 뒷받침할 만한 뚜렷한 증거는 없다. 이는 VLA-4 및 이의 천연 리간드, CS-1 및 VCAM 에 대한 종들 사이에서 관찰되는 높은 서열 보존성과 일치하는 것이다.

**[표 6]**

다수의 종으로부터 얻어진 VCAM-Ig 알칼리성 포스파타아제 컨주게이트 및 말초 혈액 백혈구 또는 비장 세포를 사용하는 VCAM-Ig 경쟁적 결합 검정법에서 측정된 oMePUPA-V 의 수용기 친화성

종	소스	2가 양이온	IC <sub>50</sub>
인간	PBLs	Mn <sup>2+</sup>	6 ± 1 (n=3)
양	PBLs	Mn <sup>2+</sup>	3 ± 1 (n=3)
개	PBLs	Mn <sup>2+</sup>	13 ± 2 (n=3)
마우스	비장 세포	Mn <sup>2+</sup>	4 ± 1 (n=3)

래트	비장 세포	Mn <sup>2+</sup>	5 ± 1 (n=3)
----	-------	------------------	-------------

실시예 7: oMePUPA-V의 수용체 동력학

1. <sup>3</sup>H-기지 억제제를 프로브로 이용한 경쟁 분석

37°C 조직 배양기에서 10% 태아 송아지 혈청이 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 Jurkat 세포를 배양하였다. 결합 연구를 위해서 세포를 원심분리하여 침전시키고, TBS(50 mM 트리스 HCl, 150 mM 염화나트륨, 0.1% 송아지 혈청 알부민, 2 mM 포도당, 10 mM HEPES pH 7.4)로 두번 세척한 다음, 약 2 x 10<sup>6</sup> 세포/ml가 되게 TBS에 현탁시키고, 노이바우어 (Neubauer) 헤모사이토미터를 이용하여 세포수를 측정하였다. 1.5 x 10<sup>6</sup> 세포/ml이 되도록 세포를 완충액에 추가로 희석시켜서, 각 실험을 위해 규정된 특수 처리를 수행하였다. 그 후, 원심분리를 통해 세포를 모아 분석 완충액 100 µl에 재현탁시킨 다음, 2.9 ml의 신티버스 II(ScintiVerse II)(피셔 사이언티픽)를 함유한 방사능 계측기용 유리병에 옮겼다. 방사능 계측을 통해 세포에 결합된 방사능을 정량하였다. 이러한 조건하에서 결합된 계측은 시험 화합물이 차지하지 않은, <sup>3</sup>H-기지 억제제에 결합하는 것이 자유로운 인테그린을 측정한다. 모든 분석은 1 ml의 표준 시료 부피를 갖는 실리콘 처리된 1.5 ml 에펜도르프 튜브에서 수행하였다. 세포에 대한 <sup>3</sup>H-기지 억제제의 비특이적 결합(백그라운드)은 금속 이온의 부재하에 결합된 억제제를 측정함으로써 결정되었다. 총 결합 계측치에서 비특이적인 계측치를 뺀으로써 특이적 결합 계측치를 계산하였다.

일련의 경쟁 연구를 수행하여 oMePUPA-V 및 기지 억제제가 VLA-4의 동일한 위치에서 경쟁한다는 것을 확인하였다. 첫째로, <sup>3</sup>H-기지 억제제를 등몰량, 몰량의 10 배, 몰량의 100배의 oMePUPA-V와 혼합하고, Jurkat 세포와 배양하여 비방사능 억제제가 기지 억제제의 결합과 경쟁하는 능력을 평가하였다. oMePUPA-V의 처리는 <sup>3</sup>H-기지 억제제 결합의 용량 의존적인 억제를 일으켰다. <sup>3</sup>H-기지 억제제 결합과 경쟁하는데 요구되는 oMePUPA-V 농도는 방사능이 없는 것을 경쟁제로 사용하였을때 요구되는 것 보다 10배 이상이며, 이는 Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성화된 VLA-4에 대한 낮은 친화력을 보이는 사실과 일치한다. 두번째로, 먼저 VLA-4이 방사능 프로브를 차지하게 하기 위해서 Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성화된 Jurkat 세포를 <sup>3</sup>H-기지 억제제로 처리한 다음, 과량의 비방사능 oMePUPA-V를 첨가하였다. 과량의 비방사능 oMePUPA-V 또는 기지 억제제의 계속적인 처리는 방사능 프로브를 치환시키는 능력과 구별되지 않는다. 셋째로, Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성화된 Jurkat 세포를 oMePUPA-V 포화량으로 처리한 다음, oMePUPA-V의 해리 속도를 측정하였다. Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성화된 VLA-4에 대한 기지 억제제의 연장된 반감기와는 달리, oMePUPA-V는 10분 이하의 t<sub>1/2</sub>로 oMePUPA-V-VLA-4로부터 재빨리 해리되었다. oMePUPA-V와 기지 억제제의 t<sub>1/2</sub>가 큰 차이를 보이는 것은 VLA-4에 대한 oMePUPA-V의 더 낮은 친화력이 더 빠른 해리율의 결과라는 것을 제시한다.

해리 데이터는 VLA-4에 대한 oMePUPA-V의 결합은 VLA-4의 활성상태에 상당히 의존한다는 것을 나타내며, 기지 억제제에서 보여진 활성화에 대한 동일한 선택성을 나타낸다. Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성화된 VLA-4와 마찬가지로, Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성화된 VLA-4로부터의 oMePUPA-V 해리의 t<sub>1/2</sub>은 경쟁 형태에서 측정할 수 있는 가장 단시간인 10분 이하였다. 반면에, 활성화 항체인 TS2/16이 첨가된 Mg<sup>2+</sup>의 존재하에서는 t<sub>1/2</sub>가 20분으로 연장되었다. 가능한 모든 활성화 상태를 상세히 평가하지는 않았지만, 차이점을 재빨리 인식할 수 있는 간단한 스크린을 고안하였다. 이 분석에서는, 정해진 농도의 oMePUPA-V(10 nM)를 5 nM의 <sup>3</sup>H-기지 억제제와 혼합한 다음, 이러한 조건하에 다양한 활성 상태에서 결합을 수행하였다. oMePUPA-V가 VLA-4에 대해 비정상적으로 높거나 낮은 친화력을 보인다면, 이것을 <sup>3</sup>H-기지 억제제의 양의 차이에 의해 알 수 있을 것이다. 상이한 활성화 조건하에서 결합된 <sup>3</sup>H-기지 억제제 퍼센트의 차이는 억제제의 공지 특성을 기초로 하여 추측할 수 있다.

결합 연구는 oMePUPA-V가 이것의 친화력과 일치하는 농도에서 VLA-4에 대해 결합을 위해 기지 억제제와 경쟁한다는 것을 확인시켜주며, 이 두 화합물이 인테그린의 동일한 위치에서 경쟁한다는 것을 증명한다. 다양한 VLA-4 활성화 상태하에서 oMePUPA-V 및 기지 억제제의 결합 유사성은 이들의 결합 기작이 유사하다는 것을 제시한다.

2. 판랩(Panlabs) 및 세렙(Cerep) 스크린에서의 oMePUPA-V 분석

판랩 프로필링 스크린, 디스커버리 스크린과 방사능 리간드, 효소, 기능 분석의 면역스크린 패널 및 세랩 막 수용체 패널에서 oMePUPA-V를 분석하였다. NK1 수용체 분석을 포함하는 어떠한 분석에서도 10 µM의 oMePUPA-V에 대해서는 유의적인 활성이 관찰되지 않았으며, 이는 약간의 활성을 나타낸 기지 억제제와 대조적이다.

또한, 세랩은 oMePUPA-V가 인간 ACE 프로테아제 활성에 대한 억제 효과를 나타내지 않는다고 보고하였다. ACE 프로테아제는 인간 내피세포(HUVEC)에서 유래하였다. <sup>3</sup>H-HGG를 HUVEC에 첨가하면 ACE에 의해 <sup>3</sup>H-히푸릭산 및 글리실글리신으로 전환된다. 강력한 ACE 억제제인 캡토프릴은 990 pM의 IC<sub>50</sub>으로 전환을 차단한 반면, 10 µM의 oMePUPA-V는 차단하지 못했다.

**약학적 특성:**

oMePUPA-V는 백색 내지 회백색의 결정형 분말이다. 이것은 DMSO에 대해 가용성이며, 물에 대한 용해도가 0.120 mg/mL이다. DSC, TGA 및 고온 상 현미경을 통해 연구된 oMePUPA-V의 열 반응은 이 물질의 녹는점이 약 160°C라는 것을 나타낸다. DSC 및 TGA 분석은 약 130°C에서 oMePUPA-V가 회발성 불순물을 잃는다는 것을 제시하는데, 이것은 수산화물 단량체가 비수화되는 것과 일관성을 갖는다.

**조성물**

분무화 조성물

5 mg/mL의 oMePUPA-V 분무화 조성물 100 mL의 제조 방법은 다음과 같다.

200 mL의 완충 원액을 다음과 같이 제조한다:

1. USP사의 트로메타민 0.286 g을 적절한 용기에 담는다.
2. USP사의 염화나트륨 1.676 g을 동일한 용기에 담는다.
3. USP사의 주입용 물 200 mL을 첨가한다.

균질한 상태가 될 때까지 혼합한다.

1. oMePUPA-V 0.500 g을 적절한 용기에 담는다.
2. 단계 1에서 제조한 100 mL의 완충액을 첨가한다.
3. 균질한 상태가 될 때까지 혼합한다.
4. 멸균 여과하여 적절한 용기에 담는다.
5. 적절한 덮개로 밀봉한다.

**일반적인 조성물 특성:**

pH: 7.4, 삼투압: 290 mOsm

**실시에 9: 안정성 표시 HPLC 절차**

컬럼: 조르박스(등록상표명) SB-C18, 3 µm 입자, 4.6 x 150 mm

가드 컬럼: 조르박스(등록상표명) SB-C18, 5 µm 입자, 4.6 x 12.5 mm

컬럼 온도: 40℃

자동샘플러 온도: 4℃

이동상 A: 물 중의 0.1%(w/v) 트리플루오로아세트산(TFA)

B: 90%(v/v) 아세토니트릴, 10%(v/v) 물 중의 0.1%(w/v) TFA

변화도

시간(분)	% B
0 - 3	15
3 - 18	15 내지 100
18 - 21	100
21 - 28	15

주입: 트리스/염화나트륨/물(대형 중간물) 또는 0.1% TFA/45% 아세토니트릴(최종 산물)중의 0.2 mg/mL 용액 10  $\mu$ l.

검출: UV 254 nm(주로 사용) 및 215 nm

대조군: 끓는 물에서 20분 동안 가열한 oMePUPA-V.

예비 정성법을 수행하였다.

### 약물 안정성

하기 저장 조건하에서 2주 동안 저장한 대형 중간물에서는 어떠한 분해도 관찰되지 않았다: 밀폐된 병에 넣어 40℃에서 저장; 밀폐된 병에 넣어 50℃에서 저장; 25℃, RH 60%; 및 40℃, RH 75%. 4주 경과 후, 하나 또는 두개의 분해 피크가 40℃ 및 50℃에서 저장한 것에서 검출되었으나, 각각의 불순물 피크 수준은 0.02%보다 훨씬 낮았다.

### 용액 안정성

- a) 실온에서 2개월 동안 저장한 트리스/염화나트륨 중의 5 mg/mL 분무화 조성물은 총 1%(254 nm) 및 2 내지 3%(215 nm)의 수준에서 이 큰 용출 분해 피크를 나타냈다.
- b) 끓는 물에서 20분 동안 분무화 조성물을 가열하면 순도가 254 nm에서는 99.9%에서 98.7%로, 215 nm에서는 100%에서 93.6%로 감소되었다.
- c) 중성 pH의 트리스/염화나트륨/물 중의 0.2 mg/mL 용액은 2 내지 8℃에서 1주 이상 안정하다.

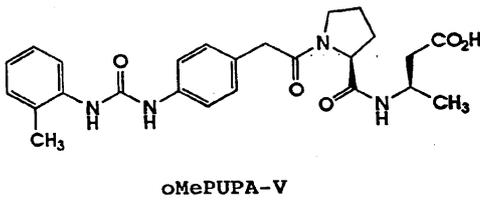
본 발명의 정신 또는 범위에서 벗어나지 않는 한, 청구된 본 발명에 가해질 수 있는 다양한 변경 및 변화는 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구 범위 및 이들의 대응물의 범위내에 드는 본 발명의 변경 및 변화를 포함한다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

하기 화학식 I의 세포 부착 억제 화합물 및 그것의 약학적으로 허용 가능한 에스테르 또는 염, 단 상기 에스테르는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸 및 직쇄 또는 가지쇄 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알코올의 에스테르로 이루어지는 군으로부터 선택됨.:

화학식 I



**청구항 2.**

제1항의 화합물과 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 천식, 알레르기성 비염, 다발성 경화증, 동맥 경화증, 염증성 장 질환 또는 다발성 골수종 치료용 약학 조성물.

**청구항 3.**

제2항에 있어서, 코르티코스테로이드, 기관지 확장제, 항천식제, 항염증제, 항류머티스제, 면역억제제, 항대사제, 면역조절제, 항건선제 및 항당뇨제로 이루어지는 군에서 선택된 제2의 약물을 더 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 4.**

제1항의 억제 화합물과 1종 이상의 세포 부착 억제 화합물을 포함하는 천식, 알레르기성 비염, 다발성 경화증, 동맥 경화증, 염증성 장 질환 또는 다발성 골수종 치료용 약학 조성물.

**청구항 5.**

제4항에 있어서, 상기 1종 이상의 세포 부착 억제 화합물이 VLA-4 억제제인 것인 약학 조성물.

**청구항 6.**

삭제

**청구항 7.**

제4항에 있어서, 상기 조성물은 다발성 경화증 치료용인 조성물.

**청구항 8.**

삭제

**청구항 9.**

삭제

**청구항 10.**

제4항에 있어서, 상기 조성물은 염증성 장 질환 치료용인 조성물.

청구항 11.

제1항의 화합물의 에스테르를 포함하는 천식, 알레르기성 비염, 다발성 경화증, 동맥 경화증, 염증성 장 질환 또는 다발성 골수종 치료용 약학 조성물.

청구항 12.

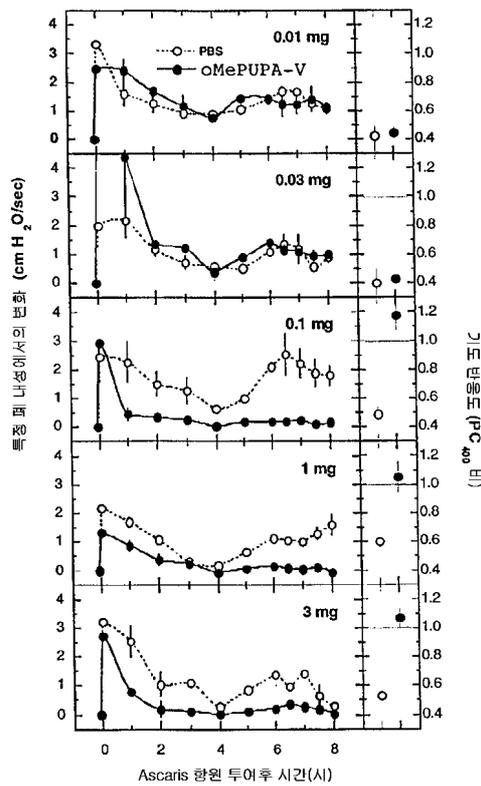
삭제

청구항 13.

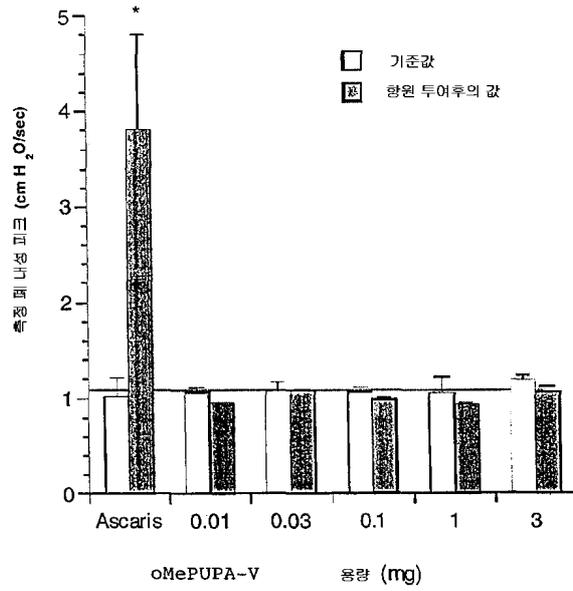
제4항에 있어서, 상기 조성물은 천식 치료용인 조성물.

도면

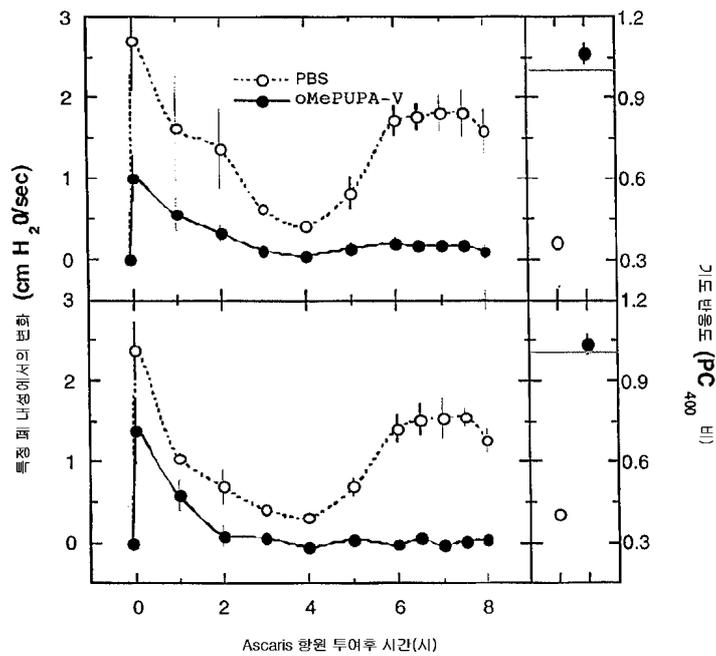
도면1



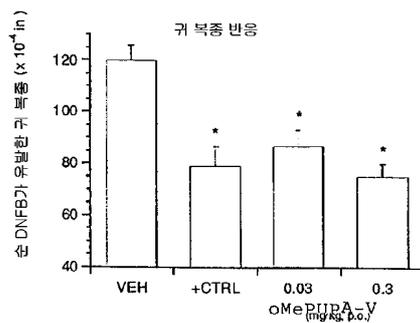
도면2



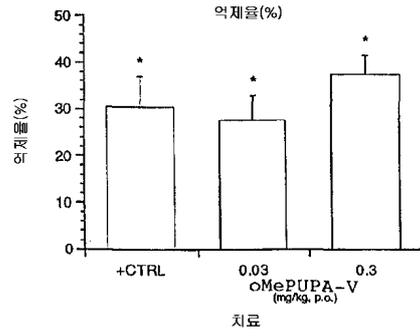
도면3



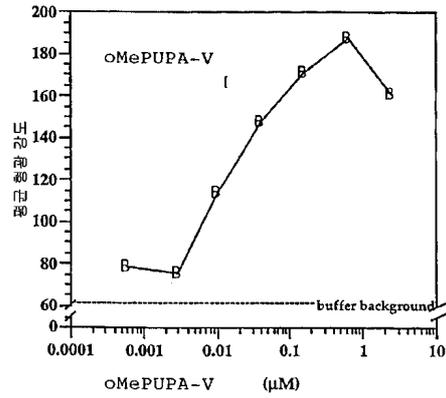
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

