



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0106729  
(43) 공개일자 2007년11월05일

(51) Int. Cl.

C07D 295/145 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01)  
A61P 27/02(2006.01) A61P 27/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7019012

(22) 출원일자 2007년08월20일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년08월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/002008

국제출원일자 2006년01월20일

(87) 국제공개번호 WO 2006/078887

국제공개일자 2006년07월27일

(30) 우선권주장

60/645,778 2005년01월20일 미국(US)

60/663,006 2005년03월18일 미국(US)

(71) 출원인

인스티튜트 포 폴리컬러 메디신, 인코포레이티드  
미국 80110 콜로라도주 앵글우드 스위트 디318  
사우스 로간 스트리트 3531

(72) 발명자

바르-오르 데이비드

미국 80113 콜로라도주 앵글우드 이스트 옥스포드  
레인 900

라오 나가라자 케이. 알.

영국 씨에프14 4큐엔 사우스 웨일즈 버츠그로브  
카디프드라이버그 애비뉴 쉬레야스 17

(74) 대리인

유미특허법인

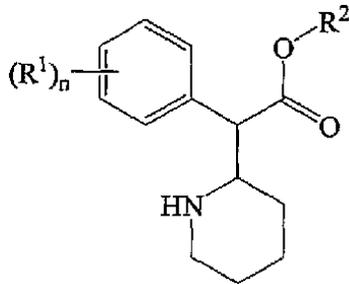
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 메틸페니데이트 유도체 및 그 용도

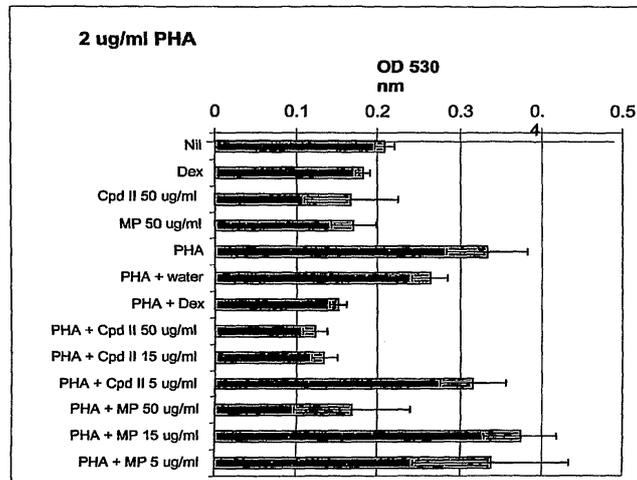
(57) 요약

본 발명은 n, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>가 본원에 정의된 바와 동일한 식(I)의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭을 이용하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 식 I의 특정 신규 화합물 및 이를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

(식 I)



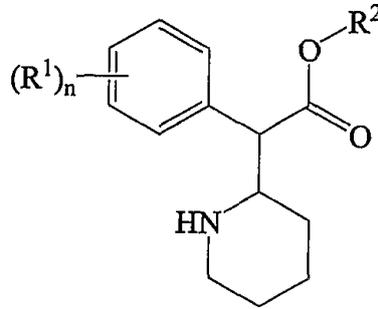
대표도 - 도1A



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 식 I의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 동물의 혈관신생을 저해하는 방법:



I

상기 식 I에서,

n은 1 내지 5의 정수이고,

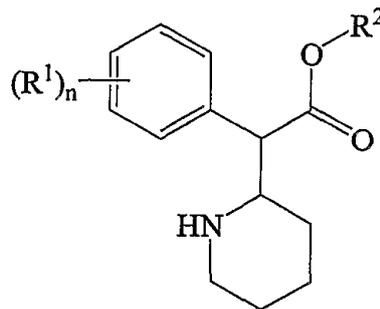
각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 니트로, 설포 또는 설포하이드릴이며,

각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설포하이드릴로 선택적으로 치환되며; 및

R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이다.

**청구항 2**

하기 식 I의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 동물의 혈관신생 질환 또는 상태를 치료하는 방법:



I

상기 식 I에서,

n은 1 내지 5의 정수이고,

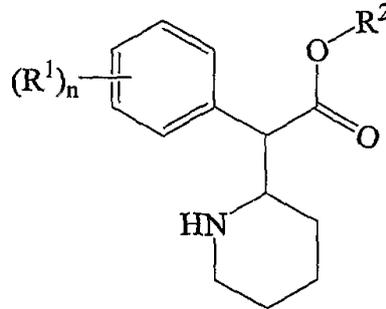
각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 니트로, 설포 또는 설포하이드릴이며,

각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설포하이드릴로 선택적으로 치환되며; 및

$R^2$ 는 수소 또는 저급 알킬이다.

**청구항 3**

하기 식 I의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 동물의 혈관신생성 안 질환 또는 상태를 치료하는 방법:



I

상기 식 I에서,

n은 1 내지 5의 정수이고,

$R^1$ 은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 니트로, 설포 또는 설포하이드릴이며,

각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설포하이드릴로 선택적으로 치환되며; 및

$R^2$ 는 수소 또는 저급 알킬이다.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 혈관신생성 안 질환 또는 상태는 당뇨병성 망막증인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

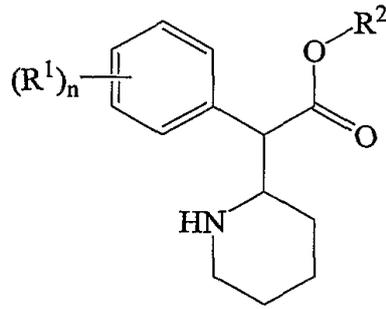
제 3항에 있어서, 상기 혈관신생성 안 질환 또는 상태는 황반부 변성인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제 3항에 있어서, 상기 혈관신생성 안 질환 또는 상태는 미숙아 망막증, 각막 이식 거부 반응, 신생혈관 녹내장, 수정체 후부 섬유증식증(retrolental fibroplasia) 또는 홍채 조홍(rubeosis)인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

하기 식 I의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 동물의 신생물성 질환(neovascular glaucoma)을 치료하는 방법:



I

상기 식 I에서,

n은 1 내지 5의 정수이고,

R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로겐, 아미노, 니트로, 설포 또는 설프하이드릴이며,

각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설프하이드릴로 선택적으로 치환되며; 및

R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이다.

**청구항 8**

제 7항에 있어서, 상기 신생물성 질환은 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 종양은 악성 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제 9항에 있어서, 상기 종양은 방광, 뇌, 유방, 경부, 결장, 직장, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 전립선, 위 또는 자궁의 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제 10항에 있어서, 상기 종양은 뇌, 유방, 결장, 간 또는 췌장의 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 종양은 뇌 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

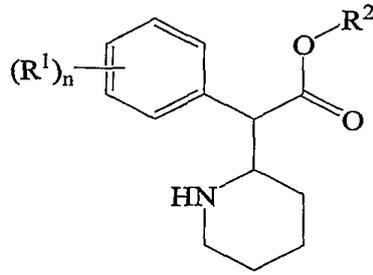
제 12항에 있어서, 상기 뇌 종양은 교아세포종인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 7항에 있어서, 상기 신생물성 질환은 종양 전이인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

하기 식 I의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 동물의 증식성 질환을 치료하는 방법:



I

상기 식 I에서,

n은 1 내지 5의 정수이고,

R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로겐, 아미노, 니트로, 설펜 또는 설펜하이드릴이며,

각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설펜하이드릴로 선택적으로 치환되며; 및

R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이다.

**청구항 16**

제 15항에 있어서, 상기 증식성 질환은 암인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 16항에 있어서, 상기 암은 암종, 육종, 임파종 또는 백혈병인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 15항에 있어서, 상기 증식성 질환은 혈관간 세포(mesangial cell)의 증식성 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 15항에 있어서, 상기 증식성 질환은 섬유성 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제 15항에 있어서, 상기 증식성 질환은 과다증식성 피부 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제 20항에 있어서, 상기 과다증식성 피부 질환은 피부암인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 하이드록시, 할로겐, 아미노, 니트로, 설펜 또는 설펜하이드릴인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 23**

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시 또는 아실인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 24**

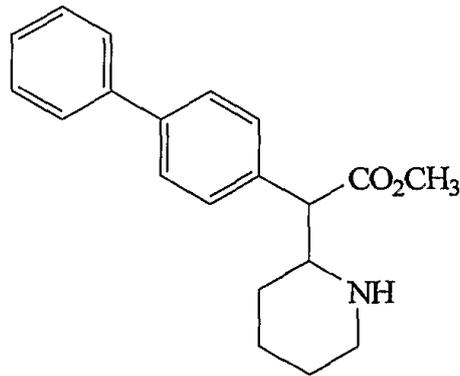
제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 알킬 또는 사이클로알킬인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 25**

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 26**

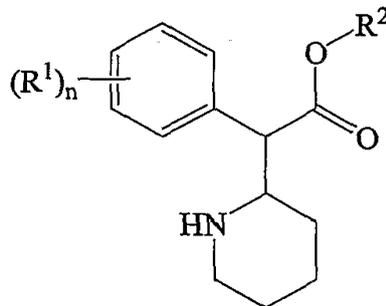
제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식 II인 것을 특징으로 하는 방법:



**II**

**청구항 27**

하기 식 IA의 화합물:



**IA**

상기 식 IA에서,

n은 1 내지 5의 정수이며;

각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 식 -C(O)-R<sup>8</sup>, -OR<sup>7</sup> 또는 -C(O)-O-R<sup>3</sup> 모이어티이며;

R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이며;

R<sup>3</sup>는 수소, 알킬, 사이클로알킬 또는 아릴이며;

R<sup>7</sup>은 아릴이며; 및

R<sup>8</sup>은 사이클로알킬 또는 아릴이다.

**청구항 28**

제 27항에 있어서, R<sup>1</sup>은 식 -OR<sup>7</sup>의 모이어티인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 29**

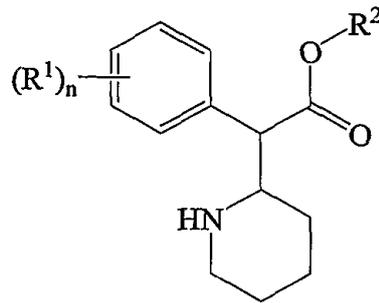
제 28항에 있어서, R<sup>7</sup>은 페닐인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 30**

제 27항 내지 제 29항 중 어느 한항에 있어서, n은 1 또는 2인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 31**

하기 식 IA의 화합물 또는 그의 염 또는 프로드럭, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물:



**IA**

상기 식 IA에서,

n은 1 내지 5의 정수이며;

각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 식 -C(O)-R<sup>8</sup>, -OR<sup>7</sup> 또는 -C(O)-O-R<sup>3</sup> 모이어티이며;

R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이며;

R<sup>3</sup>는 수소, 알킬, 사이클로알킬 또는 아릴이며;

R<sup>7</sup>은 아릴이며; 및

R<sup>8</sup>은 사이클로알킬 또는 아릴이다.

**청구항 32**

제 31항에 있어서, R<sup>1</sup>은 식 -OR<sup>7</sup>의 모이어티인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 33**

제 32항에 있어서, R<sup>7</sup>은 페닐인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 34**

제 31항 내지 제 33항 중 어느 한항에 있어서, n은 1 또는 2인 것을 특징으로 하는 조성물.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 메틸페니데이트 유도체의 용도에 관한 것이다. 이들의 용도는 혈관신생(angiogenesis)을 저해하고, 혈관신생 질환 및 상태를 치료하는 것을 포함한다.

**배경 기술**

<2> 메틸페니데이트는 주의력 장애의 하위유형(주의력 결핍 장애 또는 ADD로 종전에 알려짐)을 포함하여 주의력 결핍/과잉행동 장애(ADHD)로 진단된 어린이와 어른들을 대상으로 하는 선택 치료제이다. 또한, 메틸페니데이트의 일부 유도체는 ADD의 치료제로서(미국특허 제6,025,502호 참고), 그리고 다른 신경 장애 및 상태의 치료제로서(미국특허 제5,859,249, 6,025,502호 및 6,486,177호 및 PCT 출원 WO 99/36403호 참고) 제안되었다.

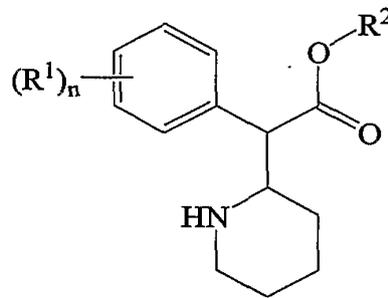
<3> 메틸페니데이트는 가벼운 중추 신경 자극제이며, 암 환자, AIDS 환자 및 그의 중증 환자들의 무감정, 피곤, 인지 기능 감퇴, 우울증 치료제로 제안되기도 하였다. 미국특허 제5,908,850, 6,127,385, 6,395,752 및 6,486,177호, Challman and Lipsky, *Mayo Clin. Proc.*, **75**:711-721 (2000) and Leonard et al., *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **19**:151-180 (2004)을 참조한다.

<4> 메틸페니데이트는 발암성이 아니며, 메틸페니데이트를 복용한 쥐와 인간에서의 암 발생율은 예상치 이하라는 보고가 있었다. Dunnick and Hailey, *Toxicology*, **103**:77-84 (1995), National Toxicology Program, *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, **439**:1-299 (1995), Dunnick et al., *Cancer Lett.*, **102**:77-83 (1996) 및 Teo et al., *Mutat. Res.*, **537**:67-79 (2003)를 참조한다. 그러나, 마우스에서 메틸페니데이트가 발암성이라는 증거가 일부 있다. Dunnick and Hailey, *Toxicology*, **103**:77-84 (1995) 및 National Toxicology Program, *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, **439**:1-299 (1995)를 참조한다. 나아가, 종양의 일부 유형은 감소되는 것으로 보고되었지만, 다른 타입의 종양은 증가되는 것으로 보고되기도 하였다. Dunnick and Hailey, *Toxicology*, **103**:77-84 (1995), National Toxicology Program, *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, **439**:1-299 (1995) 및 Dunnick et al., *Cancer Lett.*, **102**:77-83 (1996)을 참조한다.

**발명의 상세한 설명**

<5> 발명의 개요

<6> 본 발명은 하기 식 I의 화합물을 사용하는 방법을 제공한다:



I

<7>

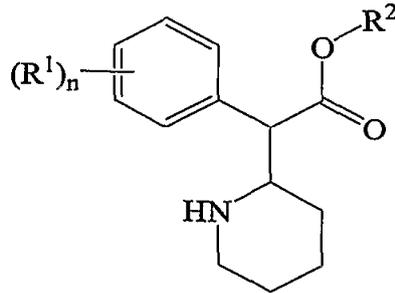
<8> 상기 식 I에서, n은 1 내지 5의 정수이고, 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 니트로, 설포 또는 설포하이드릴이다. 각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설포하이드릴로 선택적으로 치환될 수 있다. R<sup>2</sup>은 수소 또는 저급 알킬이다.

<9> 첫 번째 양태에서, 본 발명은 동물에서 혈관신생을 저해하는 방법을 제공한다. 이 방법은 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

<10> 두 번째 양태에서, 본 발명은 동물에서 혈관신생 질환 또는 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

<11> 세 번째 양태에서, 본 발명은 동물에서 증식성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 프로드럭을 유효량으로 동물에게 투여하는 것을 포함한다.

<12> 본 발명은 또한 하기 식 IA의 화합물을 제공한다:



IA

<13>

<14> 상기 식 IA에서,

<15> n은 1 내지 5의 정수이며;

<16> 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 식 -C(O)-R<sup>8</sup>, -OR<sup>7</sup> 또는 -C(O)-O-R<sup>3</sup>의 모이어티이며;

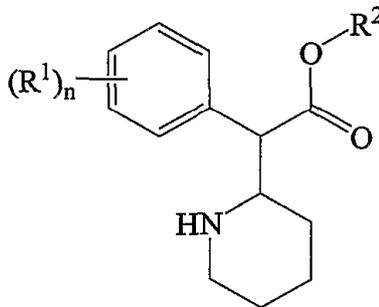
<17> R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이며;

<18> R<sup>3</sup>는 수소, 알킬, 사이클로알킬 또는 아릴이며;

<19> R<sup>7</sup>은 아릴이며; 및

<20> R<sup>8</sup>은 사이클로알킬 또는 아릴이다.

<21> 또한, 본 발명은 하기 식 IA의 화합물, 그의 염 또는 프로드럭과 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다:



IA

<22>

<23> 상기 식 IA에서,

<24> n은 1 내지 5의 정수이며;

<25> 각각의 R<sup>1</sup>은 독립적으로 식 -C(O)-R<sup>8</sup>, -OR<sup>7</sup> 또는 -C(O)-O-R<sup>3</sup>의 모이어티이며;

<26> R<sup>2</sup>는 수소 또는 저급 알킬이며;

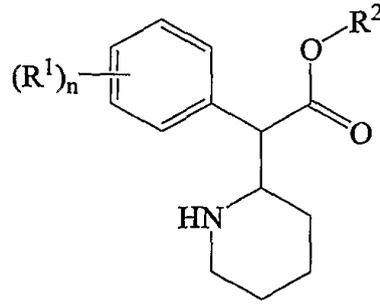
<27> R<sup>3</sup>는 수소, 알킬, 사이클로알킬 또는 아릴이며;

<28> R<sup>7</sup>은 아릴이며; 및

<29> R<sup>8</sup>은 사이클로알킬 또는 아릴이다.

<30> 발명의 상세한 설명

<31> 일 측면에서, 하기 식 I의 화합물은 본 발명의 실시예에 유용하다:



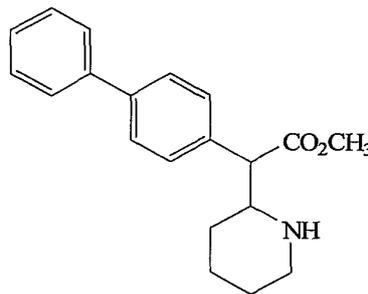
I

<32> 식 I에서, n은 1 내지 5의 정수이다. 바람직하게는, n은 1 또는 2이다.

<34> 각각의 R¹은 동일하거나 상이할 수 있으며, 아릴, 헤테로아릴, 알킬, 사이클로알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아실, 카르복시, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 니트로, 설풀 또는 설풀하이드릴이다. 각각의 알킬은 하이드록시, 아미노 또는 설풀하이드릴로 선택적으로 치환될 수 있다. 더욱 바람직하게는, R¹은 아릴, 알킬 또는 사이클로알킬이며, 더 바람직하게는 아릴이며, 가장 바람직하게는 페닐이다.

<35> 식 I에서, R²는 수소 또는 저급 알킬이다. 바람직하게는, R²는 -CH₃이다.

<36> 특정 일에서, 하기 식 II의 화합물이 본 발명의 실시예에 특히 유용하다:



II

<38> "아실"은 식 -C(O)-R³ 모이어티를 의미하는 것으로, 여기에서 R³는 H, 알킬, 사이클로알킬 또는 아릴이다.

<39> "아미노"는 식 -NR⁴R⁵ 모이어티를 의미하는 것으로, 여기에서 R⁴ 및 R⁵ 각각은 독립적으로, H 또는 저급 알킬이며, 바람직하게는 저급 알킬이다.

<40> "알콕시"는 식 -OR⁶ 모이어티를 의미하는 것으로, 여기에서 R⁶은 알킬이다. 알콕시의 예로 메톡시(-O-CH₃)가 있다.

<41> "알킬"은 1-8개의 탄소 원자를 포함하는 포화 선형 또는 분지형의 1가 탄화수소를 의미한다. 각각의 알킬은 하나 이상의 아미노, 하이드록시 또는 설풀하이드릴기로 선택적으로 치환될 수 있다.

<42> "아릴"은 6 내지 14개의 고리 탄소 원자의 1가 모노-, 바이- 또는 트리사이클 방향족 탄화수소 모이어티를 의미한다. 바람직하게는 페닐이다.

<43> "아릴옥시"는 식 -OR⁷ 모이어티를 의미하는 것으로, 여기에서 R⁷은 아릴이다. 알콕시의 예로서 페녹시가 있다.

<44> "카르복시"는 식 -C(O)-OR³ 모이어티를 의미하는 것으로, 여기에서 R³은 H, 알킬, 사이클로알킬 또는 아릴이다.

<45> "사이클로알킬"은 3 내지 10개의 고리 탄소 원자를 갖는 포화 1가 모노- 또는 바이사이클 탄화수소 모이어티를 의미한다. 바람직하게는, 사이클로알킬은 4-8개의 고리 탄소 원자를 포함한다. 가장 바람직한 사이클로알킬은

사이클로헥실이다.

- <46> "할로겐"은 염소, 불소, 브롬 또는 요오드를 의미한다. 바람직하게는 염소 또는 브롬이다.
- <47> "헤테로아틸"은 각각이 독립적으로 N, O 및 S 중에서 선택되며 나머지 고리 원자는 C인, 1, 2 또는 3개의 고리 헤테로원자를 포함하고 있는 5 내지 12개의 모노사이클 또는 바이사이클 방향족 모이어티를 의미한다.
- <48> "하이드록시"는 -OH를 의미한다.
- <49> "저급 알킬"은 1-4개의 탄소 원자를 포함하는 선형 또는 분지형의 포화 탄화수소를 의미한다.
- <50> "니트로"는 -NO<sub>2</sub>를 의미한다.
- <51> "설프하이드릴"은 -SH를 의미한다.
- <52> "설프"는 -SO<sub>2</sub>H를 의미한다.
- <53> "프로드럭"은 포유류 대상자에게 프로드럭을 투여하였을 때 생체내에서 식 I에 따른 활성 모 약물을 방출하는, 임의의 화합물을 의미한다. 식 I의 프로드럭은, 생체내에서 절단되어 모 화합물을 방출할 수 있도록, 식 I의 화합물에 존재하는 하나 이상의 관능기(들)를 변형시킴으로써 제조된다. 프로드럭은 식 I의 화합물내 하이드록시, 아미노, 또는 설프하이드릴기가 생체내에서 절단되어 각각 유리 하이드록시, 아미노 또는 설프하이드릴기가 형성될 수 있는, 임의의 기에 결합되어 있는 식 I의 화합물을 포함한다. 프로드럭의 예로는 식 I 화합물에서 하이드록시 관능기의 에스테르(예, 아세테이트, 포르메이트, 및 벤조에이트 유도체), 카바메이트(예, N,N-디메틸아미노카보닐) 등이 있으나, 이에 국한되지는 않는다.
- <54> 본원에서, "저해" 또는 "저해하는"은 경감(전체로서 또는 부분적으로) 또는 예방하는 것을 의미한다.
- <55> 질환 또는 상태의 "치료(treating)" 또는 "치료(treatment)"는 (1) 질환 또는 상태를 예방하고, 즉, 질환 또는 상태에 노출되거나 걸리기 쉬울 수 있지만, 아직 상기 질환 또는 상태의 증상을 경험하지 않거나 보이지 않는 포유류에서 질환 또는 상태의 임상적 증상이 발병되지 않게 야기하거나; (2) 질환 또는 상태를 저해하고, 즉, 질환 또는 상태 또는 이의 임상적 증상의 발병을 중지 또는 경감시키거나; 또는 (3) 질환 또는 상태를 완화하고; 즉, 질환 또는 상태를 치유하는 것을 포함하여 질환 또는 상태 또는 이의 임상적 증상의 회복을 야기하는 것을 포함한다.
- <56> "유효량"은 질환 또는 상태를 치료하기 위해 또는 효과를 야기하기 위해 동물에게 투여하였을 때, 그렇게 하기 에 충분한 화합물의 양을 의미한다. "유효량"은 화합물, 질환 또는 상태 및 이의 중증도, 또는 추구하는 효과 및 치료될 동물의 나이, 체중 등에 의존하여 달라질 수 있으며, 아마 달라질 것이다.
- <57> 본 발명에 유용한 식 I의 화합물의 합성 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 미국특허 제5,859,249 및 6,025,502 호, PCT 출원 제WO 99/36403호, Pan et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **264**, 177-182 (1994), Gatley et al., *Life Sci.*, **58**, 231-239 (1996), Deutsch et al., *J. Med. Chem.*, **39**, 1201-1209 (1996), Thai et al., *J. Med. Chem.*, **41**, 591-601 (1998), 및 Wayment et al., *J. Neurochem.*, **72**:1266-1274 (1999), Krim, Lori, Thesis (Ph.d. In Chemistry) (2001), University Of Pennsylvania, Chemistry Library Reading Room (Call No. QD001 2001. K92), University Microfilms Order No. 3031684, ISBN 0-493-44179-4를 참조하며, 이에 인용된 참조문헌과 함께 전체 기술내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- <58> 본 발명의 화합물이 하나 이상의 키랄 센터를 포함한다면, 이 화합물은 거울상선택적으로 합성될 수 있거나, 또는 거울상이성질체 및/또는 부분입체이성질체의 혼합물로 제조 및 분리될 수 있다. 본 발명의 화합물, 이의 출발 물질 및/또는 중간체의 분해는 공지된 공정에 의해, 예컨대, vol 4, *Optical Resolution Procedures or Chemical Compounds*: Optical Resolution Information Center, Manhattan College, Riverdale, N.Y., and in *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Jean Jacques, Andre Collet and Samuel H. Wilen; John Wiley & Sons, Inc., New York, 1981에 기재된 바와 같이 수행할 수 있으며, 이들은 본 명세서에 그 전체가 원용에 의해 포함된다. 기본적으로, 화합물의 분해는 거울상으로 순수한 모이어티의 화학적 또는 효소학적 부착에 의한 부분입체이성질체의 물리적 성질 차이를 토대로 하며, 이는 분획 결정화, 증류 또는 크로마토그래피에 의해 분리 가능한 형태를 발생시킨다.
- <59> 식 I 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은 또한 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 전통적인 무독성 염, 예컨대, 무기산(예컨대, 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산 등), 유기산(예컨대, 아세트

산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 글루탐산, 아스파르트산, 벤조산, 살리실산, 옥살산, 아스코르브산 등), 또는 염기(예컨대, N,N-디벤질에틸렌디아민, D-글루코사민, 또는 에틸렌디아민으로부터 유래되는 약학적으로 허용가능한 금속 양이온 또는 유기 양이온의 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염)으로부터 유래되는 염을 포함한다.

- <60> 염은 예컨대 화합물의 유리 염기 형태를 산과 반응시킴으로써, 기존 방법으로 제조한다.
- <61> 본 발명의 범위는 식 I 화합물 자체의 용도뿐만 아니라 그의 염과 프로드럭까지 망라하는 것으로 이해되어야 할 것이다. 나아가, 본 발명은 식 I 화합물 및 그의 염과 프로드럭의 이성질체(순수 이성질체 및 이성질체의 다양한 혼합물을 포함하여)의 용도도 고려한다.
- <62> 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 혈관신생을 저해하는데 사용될 수 있다. 혈관신생이란 체내에서의 새로운 혈관의 형성 과정이다. 혈관신생은 또한 신혈관신생(neovascularization), 맥관형성(vascularization), 동맥혈화(arterialization) 및 맥관신생(vasculogenesis)과 동일한 의미이거나 또는 이들을 포함하는 것으로 본원에 사용된다.
- <63> 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 또한 혈관신생 질환 및 상태 치료에 사용될 수 있다. 혈관신생 질환 또는 상태는 혈관신생을 수반하거나, 이에 의해 야기되거나, 악화되거나 또는 의존하는 질환 또는 상태이다. 본 발명에 따라 치료가능한 특정 혈관신생 질환 및 상태는 신생물성 질환, 비대(예, 갑상선 호르몬에 의해 유도된 심장 비대), 연결조직 이상(예, 류마티스 관절염 및 동맥경화), 건선, 혈관신생건 안 질환, 심장혈관계 질환, 뇌혈관 질환, 자궁내막증, 용종, 비만, 당뇨 관련 질환 및 혈우병성 관절을 포함한다. 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은, 또한 배아 이식에 필요한 혈관신생을 저해함으로써 산아제한의 방법을 제공할 수 있다.
- <64> 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 혈관신생 안 질환의 치료에 특히 유용할 것이다. 혈관신생 안 질환은 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 황반부 변성, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 수정체 후부 섬유증식증 및 홍채 조홍을 포함한다. 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 당뇨병성 망막증 및 황반부 변성의 치료에 특히 유용할 것이다.
- <65> 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 신생물성 질환을 치료하는데 특히 유용할 수 있을 것이다. 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭으로 치료가능한 신생물성 질환은, 악성 종양(예, 방광, 뇌, 유방, 경부, 결장, 직장, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 전립선, 위 및 자궁), 종양 전이 및 양성 종양(예, 혈관종, 청신경종, 신경섬유종, 트라코마 및 발열 육아종)을 포함한다. 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은, 뇌, 가슴, 결장, 간 및 췌장 종양의 치료에 특히 유용할 것이며, 뇌 종양에 가장 유용할 것이다(예, 교아세포종).
- <66> 혈관신생을 저해할 수 있는 것 이외에, 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 세포의 증식을 저해하고, 암 세포의 성장을 감소시키고, 사이토킨의 생산을 저해하고, Ras 및 RAP-1을 저해하고, 그리고 NF $\kappa$ B 및 AP-1의 생산을 저해할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 즉, 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 혈관신생 질환 및 상태를 포함하여 다양한 증식성 장애, 특히, 신생물성 질환(상기 참고), 및 기타 암 및 기타 증식성 질환의 치료에 특히 유용할 것이다.
- <67> 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭으로 치료가능한 암은 암종, 육종, 임파종, 백혈병, 고형 종양 및 혈액암을 포함한다. 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭으로 치료가능한 특정 암은 뇌암, 머리 및 목 암, 유방암, 난소암, 전립선암, 위암, 결장암, 췌장암, 방광암, 갑상선암, 간암, 폐암, 뼈암 및 피부암을 포함한다. 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭은 뇌암, 유방암, 결장암, 간암, 췌장암, 피부암, 임파종 및 백혈병의 치료에 특히 유용할 것이다.
- <68> 다른 증식성 장애로 혈관간 세포(mesangial cell)의 증식 질환, 섬유성 질환(fibrotic disorders) 및 과다증식성 피부 질환(hyperproliferative skin disorders)을 포함한다. 혈관간 세포의 증식성 질환은 혈관간세포의 비정상적인 증식에 의해 초래되는 질병을 지칭한다. 혈관간 세포의 증식성 질환은 사구체신염, 당뇨병성 신증, 악성 신경화증, 혈전성 미세맥관병증 증후군, 사구체염과 같은 신장 질환을 포함한다. 섬유성 질환은 세포의 매트릭스의 비정상적인 형성을 지칭한다. 섬유성 질환의 예들은 간경변, 폐섬유증 및 아테롬성 동맥경화증을 포함한다. 과다증식성 피부 질환은 건선, 피부암, 및 표피 과잉증식을 포함한다.
- <69> 치료를 필요로 하는 동물을 치료하기 위해, 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭이 동물에게 투여된다. 바람직하게는, 동물은 포유류, 가령 토끼, 염소, 개, 고양이, 말 또는 인간이다. 가장

바람직하게는, 동물은 인간이다.

- <70> 본 발명의 화합물의 효과적인 제형, 투여 방식 및 투약 함량은 경험에 의해 결정될 수 있고, 그러한 결정을 내리는 것은 당업계의 기술 범위에 속한다. 당업자들은 사용되는 특정 화합물, 치료되는 질환 또는 상태, 이 질환 또는 상태의 중증도, 투여 경로, 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 동물에 투여되는 임의 다른 활성 성분(들)의 정체, 동물의 나이, 크기 및 종, 및 의학 및 수의학 분야에 공지된 유사 인자에 따라, 투약 함량이 다를 것임을 이해할 것이다. 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적절한 일일 투여량은 치료 효과를 내기에 효과적인 가장 낮은 투여량인 화합물의 함량일 것이다. 그러나, 일일 투여량은 바른 의학적 판단 범위 내에서 담당 의사 또는 수의사에 의해 결정될 것이다. 바람직하다면, 효과적인 일일 투여량은 하루에 걸쳐서 적절한 간격으로 두 번, 세 번, 네 번, 다섯 번, 여섯 번 또는 그 이상으로서 투여될 수 있다. 본 화합물의 투여는 허용가능한 반응이 수득될 때까지 계속되어야 한다.
- <71> 본 발명에 유용한 화합물(즉, 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭)은 경구, 코, 직장, 질, 비경구(예, 정맥내, 척수내, 복강내, 피하, 또는 근육내), 강내(intracisternally), 경피, 두개골내(intracranially), 대뇌내 및 국소(구강 및 설하)를 포함하는 임의 적절한 투여 방식에 의해 치료를 위한 동물 환자에게 투여할 수 있다. 바람직한 투여 방식은 경구 및 국소이다.
- <72> 본 발명에 유용한 화합물을 단독으로 투여할 수 있으며, 본 발명의 화합물을 약학 제형(조성물)으로 투여하는 것이 바람직하다. 본 발명의 유용한 약학 조성물은 활성 성분(들)으로 하나 이상의 식 I의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드럭을 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및 선택적으로, 하나 이상의 다른 화합물, 활성 성분(들) 또는 다른 물질과 혼합하여 포함한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분들과 양립(compatible)할 수 있으며 동물에 해를 주지 않는다는 의미에서 "허용가능(acceptable)" 하여야 한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 당업계에 잘 알려져 있다. 선택된 투여 방식에 관계없이, 본 발명의 화합물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용가능한 제형으로 조제된다. 예컨대, Remington's Pharmaceutical Sciences를 참조한다.
- <73> 경구 투여용으로 적합한 본 발명의 제형은 캡슐, 교갑(cachet), 환제, 정제, 분말, 과립제, 또는 수용액이나 비수용액 중의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수성 액체 에멀전, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 페스틸(pastilles)(불활성 염기, 가령, 젤라틴, 글리세린 또는 슈크로스 및 아카시아를 사용하여) 등일 수 있으며, 각각은 활성 성분으로 본 발명에 유용한 화합물 또는 화합물들을 미리 결정된 함량으로 포함한다. 본 발명에 유용한 화합물 또는 화합물들은 또한 큰 환약(bolus), 연약(electuary) 또는 페이스트로 투여될 수도 있다.
- <74> 경구 투여용 고체 제형(캡슐, 정제, 환제, 당의정(dragees), 분말, 과립제 등)에서, 활성 성분(들)은 시트르산 나트륨, 인산이칼슘과 같은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 하기 중의 임의 것들과 혼합된다: (1) 녹말, 락토스, 슈크로스, 글루코스, 만니톨 및 실리산과 같은 충전제 또는 연장제(extender); (2) 예컨대 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로스 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제; (4) 한천-한천, 탄산갈슘, 감자 전분, 타피오카 전분, 알긴산, 일부 실리케이이트, 및 탄산나트륨과 같은 붕해제; 파라핀과 같은 용액 지연제; (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제; (7) 예컨대, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테레이트와 같은 습윤제; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리세롤, 소듐 라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물과 같은 윤활제; 및 (10) 착색제. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 약학 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등 뿐만 아니라 락토스 또는 우유 당과 같은 부형제를 이용하여 연질 및 경질-충진 젤라틴 캡슐에 충전제로 사용될 수 있다.
- <75> 정제는 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 몰딩에 의해 제조될 수 있다. 압축된 정제는 결합제(예컨대, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 불활성 희석제, 방부제, 붕해제(예컨대, 소듐 스타치 글리콜레이트 또는 가교된 소듐 카복시메틸 셀룰로스), 계면활성제 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 몰딩된 정제는 불활성 액체 희석제로 축축해진 분말화된 화합물의 혼합물을 적당한 기계에서 몰딩함으로써 만들 수 있다.
- <76> 정제와, 당의정, 캡슐, 환제 및 입자와 같은 본 발명의 약학 조성물의 다른 고체 제형은, 선택적으로 장용성 코팅 및 약학 조제 업계에 잘 알려진 다른 코팅과 같은 코팅 및 셸(shell)로 제조되거나 새김눈이 그어질 수 있다. 또한, 바람직한 방출 프로파일, 다른 폴리머 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 제공하기 위해서 다양한 비율로 예컨대 하이드록시프로필메틸을 사용하여 그 안의 활성 성분의 느리거나 또는 제어된 방출을 야기

하도록 제형화될 수도 있다. 또한, 예컨대, 박테리아 보유 필터를 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다. 또한 이들 조성물은 선택적으로 불투명화제를 포함할 수도 있으며, 그리고 임의 지연된 방식으로 위장관의 특정 위치에서 활성 성분만을 방출하거나 활성 성분을 우선적으로 방출하는 조성물일 수도 있다. 사용할 수 있는 임베딩 조성물의 예들은 폴리머 물질과 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 미세캡슐화된 형태일 수도 있다.

<77> 본 발명의 화합물의 경구 투여용 액체 제형은 약학적으로 허용가능한 에멀전, 미세에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분 이외에도, 액체 제형은 예컨대, 물 또는 다른 용매와 같이 당업계에 통상 사용되는 불활성 희석제, 가용화제 및 유화제, 가령 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩(groundnut) 오일, 옥수수 오일, 배아(germ)유, 올리브 오일, 캐스터 오일 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

<78> 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한 습윤제, 유화제, 현탁제, 감미제, 향미제, 착색제, 향료 및 방부제와 같은 보강제(adjuvant)를 포함할 수 있다.

<79> 현탁제는 활성 성분(들) 이외에도, 예컨대, 에톡실화된 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트 및 이들의 혼합물과 같은 현탁제를 포함할 수 있다.

<80> 본 발명의 화합물 또는 화합물들의 안구로의 안내 주입을 위한 약학 제형은 용액, 에멀전, 현탁액, 미립자(particles), 캡슐, 미소구체, 리포솜, 매트릭스 등을 포함한다. 미국특허 제6,060,463호, 미국특허출원 공개 제2005/0101582호, 및 PCT 출원 제 WO 2004/043480호를 참조하며, 이들 문헌의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 예컨대, 안내 주입용 약학 제형은 하나 이상의 본 발명의 화합물을, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 멸균 등장성 수용액 또는 비수용액, 현탁액 또는 에멀전과 조합하여 포함할 수 있는데, 이들은 항산화제, 완충제, 현탁제, 증점제 또는 점도강화제(히알루론산 폴리머)를 포함할 수 있다. 적합한 수용성 또는 비수용성 담체의 예로서, 물, 염수(바람직하게 0.9%), 수중의 텍스트로스(바람직하게 5%), 완충제, 디메틸설폭사이드, 알콜 및 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)이 있다. 이들 조성물은 또한, 습윤제 및 유화제 및 분산제와 같은 보강제를 포함할 수도 있다. 나아가, 주입가능한 약학 형태의 연장된 흡수는 폴리머 및 젤라틴과 같은 흡수를 늦추는 제제를 포함함으로써 야기할 수 있다. 주입가능한 저장(depot) 형태는 폴리락타이드-폴리글리콜라이드와 같은 생분해성 폴리머로 만든 미소구체 또는 미세캡슐내에 약물을 혼합시킴에 의해 만들 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예들로는, 폴리(오르토에스테르), 폴리(글리콜)산, 폴리(락트)산, 폴리카프로락톤 및 폴리(무수물)이 있다. 주입가능한 저장 제형은 또한 눈 조직에 친화적인 미소에 멀전 또는 리포솜(디팔미토일 포스파티딜콜린과 같은 상용 성분으로 이루어짐)에 약물을 포획시킴으로써 제조된다. 약물 대 폴리머 또는 지질의 비율, 특정 폴리머 또는 지질 성분의 특성, 사용되는 리포솜의 유형에 따라, 그리고, 미소캡슐 또는 미소구체가 코팅되었는지 아닌지에 따라, 미소캡슐, 미소구체 및 리포솜으로부터의 약물 방출율이 제어될 수 있다.

<81> 또한 본 발명의 화합물은 눈 임플란트로서 수술에 의하여 투여될 수도 있다. 예컨대, 확산가능한 폴리비닐 알콜 또는 폴리비닐 아세테이트 벽을 가지며 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 포함하는 저장소 컨테이너를 공막 내에 또는 공막상에 이식할 수 있다. 다른 예로서, 본 발명의 화합물 또는 화합물들은 폴리카프로락톤, 폴리(글리콜)산, 폴리(락트)산, 폴리(무수물)과 같은 폴리머 또는 세박산과 같은 지질로 만들어진 폴리머 매트릭스 내로 혼합될 수 있으며, 공막상에 또는 눈 안에 이식될 수 있다. 이는 국소 또는 국부 마취한 동물에서 일반적으로 수행되며, 각막 뒤에 절개한 작은 절개를 통해 달성된다. 이후, 매트릭스가 절개를 통해 삽입되며 공막으로 봉합된다.

<82> 본 발명의 바람직한 양태는 본 발명의 화합물들을 눈에 국부적으로 국소 투여하는 것이고, 본 발명의 특히 바람직한 양태는 눈에 적용하기에 적합한 국소 약학적 조성물이다. 눈에 적용하기에 적합한 국소 약학적 조성물은 용액, 현탁액, 분산액, 점적제(drops), 젤, 하이드로젤 및 연고를 포함한다. 예컨대, 미국특허 제5,407,926호 및 PCT 출원 제2004/058289, WO 01/30337 및 WO 01/68053호를 참조하며, 이들 모든 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

<83> 혈관신생 질환 또는 상태의 치료를 위한 눈에 적용하기에 적합한 국소 제형은 수용성 또는 비수용성 기재(base) 중의 하나 이상의 본 발명의 화합물을 포함한다. 국소 제형은 또한 흡수증진제, 투과증진제, 증점제, 점도강화제, pH 조절 및 유지제, 삼투압 조절제, 방부제, 계면활성제, 완충제, 염(바람직하게는 염화나트륨), 현탁제, 분산제, 가용화제, 안정화제 및 긴장성(tonicity) 물질을 포함할 수 있다. 혈관신생 질환 또는 상태 치료를 위

해, 눈에 적용하기에 적합한 국소 제형은 바람직하게는 본 발명의 화합물 또는 화합물들의 눈으로의 흡수 또는 침투를 촉진시키기 위해, 흡수 또는 투과 증진제를 포함할 것이며, 및/또는 본 발명의 화합물 또는 화합물들의 눈 체류시간을 증가시킬 수 있는 증점제 또는 점도강화제를 포함할 것이다. PCT 출원 제 WO 2004/058289, WO 01/30337 및 WO 01/68053호를 참조한다. 예시적인 흡수/투과 증진제는 메틸셀포닐메탄을 단독으로 또는 디메틸실록사이드, 카복실산 및 계면활성제와 조합하여 포함한다. 예시적인 증점제 및 점도강화제로는 텍스트란, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 다당류 젤, Gelrite®, 셀룰로스 폴리머(예컨대, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스), 카복실 함유 폴리머(예컨대, 아크릴산 폴리머 또는 공중합체), 폴리비닐 알콜 및 히알루론산 또는 그의 염을 포함한다.

- <84> 액체 제형(예, 용액, 현탁액, 분산액 및 점적제)은 예컨대, 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 예컨대, 물, 염수, 수성 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등과 같은 비히클에 용해, 분산, 현탁 등에 의해 용액, 분산액 또는 현탁액을 형성함으로써 제조할 수 있다. 바람직하다면, 약학적 조성물은 또한 습윤 또는 유화제, pH 완충제 등, 예컨대, 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 아세트산나트륨, 트리에탄올아민 올레이트 등과 같은 무독성의 보조제를 소량 포함할 수도 있다.
- <85> 또한 수용액 및 현탁액은 본 발명의 화합물 또는 화합물들 이외에도, 방부제, 계면활성제, 완충제, 염(바람직하게 염화나트륨), 긴장성 제제 및 물을 포함할 수 있다. 현탁액을 사용하는 경우, 입자 크기는 눈 자극을 최소화하기 위해 10 μm 미만이어야 한다. 용액 또는 현탁액을 사용하는 경우, 눈으로 전달되는 양은 눈에서 과도하게 흐르는 것을 방지하기 위해 50 μl를 초과해서는 안 된다.
- <86> 콜로이드성 현탁액은 일반적으로 미소입자로부터 만들어진다(즉, 미소구체, 나노구체, 미소캡슐 또는 나노캡슐로 미소구체와 나노구체는 일반적으로 제형이 트랩핑, 흡수 또는 아니면 포함된 폴리머 매트릭스의 단일체(monolithic) 입자인 반면, 미소캡슐과 나노캡슐에서 제형은 실제 캡슐화된다). 미소입자의 크기 상한은 약 5 μ 내지 약 10 μ이다.
- <87> 안 연고는 미네랄 오일, 액체 라놀린, 백색 바셀린, 이들 둘 또는 셋의 조합 또는 폴리에틸렌-미네랄 오일 젤과 같은 적절한 기재 내에 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 포함한다. 선택적으로, 방부제가 포함될 수 있다.
- <88> 안용 젤은 Carprobol-940, 또는 에탄올, 물 및 프로필렌 글리콜의 조합(예, 40:40:20 비율)과 같은 친수성 기재 내에 현탁된 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 포함한다. 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 또는 암모니아화 글리시리진산과 같은 젤화제가 사용된다. 방부제 및/또는 긴장성 제제가 선택적으로 포함될 수 있다.
- <89> 하이드로젤은 팽윤성 젤 형성 폴리머, 예컨대, 증점제 또는 점도강화제로 상기에서 열거된 바와 같은 것들을 혼합함으로써 형성되는데, 단 당업계에서 "하이드로젤"로서 언급되는 제형은 전형적으로 "증점된" 용액" 또는 현탁액으로 언급되는 제형보다 더 높은 점도를 갖는다. 이렇게 미리형성된 하이드로젤과 대조적으로, 제형은 또한 눈에 적용 이후 그 자리에서(in situ) 하이드로젤을 형성하도록 제조될 수도 있다. 이러한 젤은 실온에서는 액체이나 더 높은 온도, 예컨대, 체액과 접촉하였을 때에는 젤이다(이리하여 "열가역적" 하이드로젤이란 용어로 지칭). 이러한 성질을 부여하는 생물학적으로 양립가능한 폴리머는 아크릴산 폴리머 및 공중합체, N-이소프로필아크릴아미드 유도체 및 산화에틸렌과 산화프로필렌의 ABA 블록(전통적으로 "폴록사머(poloxamers)"로 언급되며, BASF-Wayndotte로부터 Pluronic® 상표 하에 구입가능하다)을 포함한다.
- <90> 바람직한 분산액은 리포솜으로, 이 경우 제형은 리포솜 내에 밀봉된다(수성 지질 칸막이와 이중층이 교차하는 미세 소낭).
- <91> 점안제는 수성 또는 비수성 기재로 조제될 수 있으며, 하나 이상의 분산제, 가용화제 또는 현탁제를 포함한다. 점적제는 또한 특수하게 성형된 마개 수단에 의해 액체 내용물 소량을 전달하기에 적합한 플라스틱 병에 의하거나 또는 단순한 점안기-뚜껑달린 병에 의해 전달될 수 있다.
- <92> 본 발명의 화합물은 또한 눈에 삽입된 약물-함침 고상 담체 수단에 의해 국소적으로 적용될 수도 있다. 약물 방출은 폴리머의 분해 또는 생체부식(bioerosion), 삼투압 또는 이들의 조합에 의해 일반적으로 작용된다. 수개의 매트릭스 유형 전달 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 시스템은 본 발명의 바람직한 화합물로 함침되거나 적셔진 친수성 연성 콘택 렌즈와 눈에 배치 후 제거될 필요가 없는 생분해가능하거나 또는 가용성 장치를 포함한다. 이들 가용성 눈 삽입체는 눈에 견딜 수 있으며 투여될 본 발명의 화합물과 친화적인 임의 분해성 물질로 이루어질 수 있다. 이러한 물질은 폴리(비닐알콜), 폴리아크릴아미드 폴리머 및 공중합체, 에틸아크릴레이트 및 비닐피롤리돈과 가교된 폴리펩티드 또는 키틴(chitin)과 같은 다당류를 포함하나, 이에 국한되지는 않는다.

- <93> 본 발명에 따른 화합물의 다른 유형의 국소 투여(즉, 눈에 아니라) 또는 경피 투여를 위한 제형은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치, 점적제 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 멸균 상태 하에 약학적으로 허용가능한 담체 및 필요할 수 있는 임의 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 활성 성분 이외에 동물 및 식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 녹말, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크, 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과 같은 부형제를 포함할 수 있다. 분말 및 스프레이는 활성 성분 이외에도, 락토오스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질들의 혼합물과 같은 부형제를 포함할 수 있다. 스프레이는 클로로플루오로하이드로카본과 같은 통례적 추진제 및 부탄 및 프로판과 같은 휘발성 비치환 탄화수소를 추가적으로 포함할 수 있다. 경피 패치는 조절된 방식으로 본 발명의 화합물을 신체에 전달하는 추가적인 이점을 갖는다. 이러한 제형은 탄성 매트릭스 물질과 같은 적절한 배지 내에 하나 이상의 본 발명의 화합물을 용해, 분산 또는 혼입시킴으로써 제조할 수 있다. 흡수증진제도 피부를 통해 화합물의 유입을 증가시키기 위해 사용할 수 있다. 이러한 유입율은 폴리머 매트릭스 또는 젤 내에 화합물을 분산시키거나 속도 제어성 막의 제공에 의해 조절될 수 있다.
- <94> 직장 또는 질 투여용 약학 조성물의 제형은 하나 이상의 본 발명의 화합물을, 예컨대 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약 왁스 또는 살리실산을 포함하는, 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조할 수 있으며, 실온에서는 고체이나 체온에서는 액체로 직장 또는 질강에서 녹아 활성 화합물을 방출할 수 있는 좌약으로 제시될 수 있다. 질 투여에 적합한 본 발명의 제형은 당업계에서 적합한 것으로 알려진 이러한 담체를 포함하는 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제형을 포함한다.
- <95> 약학 제형은 흡입 또는 통기에 의해 투여되기에 적합한 것 또는 비강 또는 안내 투여용으로 적합한 것을 포함한다. 흡입에 의해 상기도(비강) 또는 하부 기도에 투여하기 위한, 본 발명의 화합물은 취입기, 분무기, 또는 가압된 팩 또는 기타 편리한 에어로졸 스프레이 전달 수단으로 편리하게 전달된다. 가압된 팩은 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적당한 기체와 같은 적당한 추진제를 포함할 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 함량을 전달하도록 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다.
- <96> 대안적으로, 흡입 또는 통기에 의한 투여를 위해, 조성물은 건조 분말, 예컨대, 하나 이상의 본 발명의 화합물과 락토오스 또는 녹말과 같은 적당한 분말 베이스로 된 분말 혼합물의 형태를 취할 수 있다. 분말 조성물은 예컨대, 캡슐 또는 카트리지, 또는 분말이 흡입기, 주입기 또는 계량된 투약 흡입기의 도움으로 투여될 수 있는 예컨대, 젤라틴 또는 발포제 팩에, 단위 투여량으로 존재할 수 있다.
- <97> 비강내 투여를 위해, 본 발명에 유용한 화합물은 점비제(nose drop)에 의하거나 또는 플라스틱 병 분무기(atomizer) 또는 계량된 투약 흡입자에 의한 액체 스프레이에 의해 투여할 수 있다. 액체 스프레이는 가압된 팩으로부터 편리하게 전달된다. 분무기의 전형적인 예는 Mistometer (Wintrop)와 Medihaler (Riker)이다.
- <98> 점안제 또는 점비제와 같은 점적제는 수성 또는 비수성 베이스와, 또한 하나 이상의 분산제, 가용화제 또는 현탁제를 포함하여 조제될 수 있다. 점적제는 단순한 뚜껑이 있는 점안기 병에 의해, 또는 특수하게 성형된 마개 수단에 의해 액체 내용물 소적을 전달하는 플라스틱 병에 의해 전달될 수 있다.
- <99> 비경구 투여에 적합한 약학 조성물은 하나 이상의 본 발명에 유용한 화합물을 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 멸균 등장성 수용액 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전 또는 사용 직전에 주입가능한 멸균 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합하여 포함하며, 항산화제, 완충액, 해당 수여자의 혈액과 등장성이게 하는 용질이나, 현탁 또는 증점제를 포함할 수 있다.
- <100> 본 발명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적당한 수성 또는 비수성 담체로는 예컨대, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적당한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대, 올리브유 및 주입가능한 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트가 있다. 적절한 유동성은 예컨대 렉시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우 필수 입자 크기의 유지에 의해 그리고, 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- <101> 이러한 조성물은 또한 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보강제도 포함할 수 있다. 본 조성물에 당, 염화나트륨 등과 같은 등장성 물질을 포함하는 것이 바람직할 수도 있다. 나아가, 주입가능한 제형의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 달성될 수 있다.
- <102> 일부 경우에, 활성 성분(들)의 효과를 연장시키기 위해, 경피 또는 근육내 주입으로부터 활성 성분(들)의 흡수

를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이는 물 용해도가 불량한 결정질 또는 비결정질 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 달성될 수 있다. 이후, 활성 성분(들)의 흡수율은 분해율에 의존하는데, 이는 다시 결정 크기 및 결정 형태에 의존할 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 활성성분(들)의 지연된 흡수는 오일 비히클에 활성성분(들)을 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다.

<103> 주입성 저장 형태는 폴리락타이드-폴리글리콜라이드와 같이 생분해성 폴리머에 활성성분(들)의 미소캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 활성성분(들) 대 폴리머의 비 및 사용되는 특정 폴리머의 특성에 의존하여, 활성성분(들)의 방출율이 조절될 수 있다. 기타 생분해성 폴리머로는 예컨대, 폴리(오로트에스테르) 및 폴리(무수물)이 있다. 주입성 저장 제형은 체조직과 친화적인 리포솜 또는 미소리포솜에 활성성분(들)을 트랩핑함으로써 제조되기도 한다. 주입성 물질은 예컨대 박테리아-보유 필터를 통해 여과에 의해 멸균될 수 있다.

<104> 제형은 예컨대, 앰플 및 바이얼과 같은 단위-투약 또는 다중-투약 밀봉 용기로 제시되며, 사용 직전에 주입하는 멸균 액체 담체, 예컨대, 물의 첨가만을 요하는 동결건조 조건에 저장될 수 있다. 즉석 주입 용액 및 현탁액은 상기 기술된 유형의 정제, 멸균 분말 및 입자로부터 제조할 수 있다.

**실시예**

<114> 본 발명의 추가적인 목적, 이점 및 신규 특징은 하기 실시예에 의해 당업자들에게 더욱 자명해질 것이나, 이는 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

<115> 실시예 1:

<116> 알려진 알레르기가 있는 인간 지원자 GR283로부터 아무런 항응고제가 포함되어 있지 않은 유리 채혈관으로 전혈액을 채혈하였다. 이 혈액이 응혈되게 둔 후 원심분리로 혈청을 제거한 다음 30분간 56°C의 수조에 두어, 열에 의해 불활화하였다. GR283 유래 전혈액을 헤파린이 포함된 유리 채혈관에 채혈하여, 다음과 같이 말초 혈액 림프구(PBL)의 분리에 사용하였다. 전혈액을 실온에서 Histopaque 1077 용액 상에 적층하여, 실온에서 15분간 2000 rpm으로 원심분리하였다. 이후, 플라즈마-Histopaque 경계에서 세포를 제거하고 37°C에서 배양 배지(10% 열-불활화한 GR283 혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신이 가미된 IMDM 배지)로 행구었다.

<117> 배양 배지 중의 식 II의 화합물(상기 참고) 및 메틸페니데이트(둘 모두 펜실베니아 필라델피아 소재의 펜실베니아 대학 Dr. Jeffrey D. Winkler)를 96-웰 플레이트의 웰에, 식 II의 화합물 및 메틸페니데이트를 최종 농도 5 µg/ml, 15 µg/ml 및 50 µg/ml로 첨가하였다. 멸균 18 MΩ 물, 식 II의 화합물용 용매, 및 텍사메타손(Sigma) (수중 최종 농도 10 µg/ml)을 대조군으로 사용하였다. 이후, 배양 배지 중의 GR283의 PBL을 최종 농도 150,000 세포/웰로 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 24시간, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 배양 배지 중의 피토타글루티닌(PHA)을 최종 농도 2 µg/ml, 5 µg/ml 또는 20 µg/ml로, 최종 총 부피 200 µl/웰로 첨가하여, 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 72시간 인큐베이션하였다. 모든 배양은 삼배수로 수행하였다.

<118> 배양 종료시에, 독립 현미경에 장착된 디지털 카메라로 대표적인 웰을 촬영하여 세포 응집을 검사하였다. 식 II의 화합물은 투여량-의존적인 방식으로 5 µg/ml의 PHA에 의해 유도된 세포 응집량을 감소시켰다. 식 II의 화합물은 세포 응집을 약하게 하였으며, 이는 세포 표면상의 세포 유착성 분자의 발현 감소로 인한 것으로 추정된다.

<119> 세포 증식은 각 웰에 20 µl의 Promega 세포 역가 용액을 첨가하고, 4시간 더욱 플레이트를 인큐베이션하여 분석하였다. Promega 세포 역가 용액은 살아있는 세포에 의해 포르마잔 염료로 환원되는 테트라졸륨 염료를 포함하고 있는 용액으로, 이러한 환원은 웰에 존재하는 살아있는 세포의 수와 비례한다. 4시간 인큐베이션한 후, 각 웰의 광학 밀도(OD)를 530 nm에서 측정하였다. 세포가 포함되어 있지 않는 블랭크 웰에 대한 530 nm의 OD를 실험 웰의 OD에서 제하였다. 증식 분석 결과는 도 IA-C에 제시되어 있다. 도 IA-C에서 알 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II) 및 텍사메타손(Dex)은 투여량-의존적인 방식으로 PHA에 의해 자극된 PBL의 증식을 현저하게 저해하였다. 메틸페니데이트(MP)는 최대 투여량 및 최소 PHA 투여량에서 현저한 효과를 나타내었다. 그러나, 메틸페니데이트는 PHA-자극된 PBL의 증식을 현저하게 감소시키진 않았다.

<120> 실시예 2:

<121> 공지 알레르기가 있는 인간 지원자, GR467로부터 전혈액을 채혈하여, 실시예 1에 기재된 바와 같이 처리하여 열-불활화한 혈청 및 PBL를 수득하였다. 배양 배지(열-불활화한 GR467 혈청을 사용하여 제조) 중의 식 II의 화합물 및 메틸페니데이트를 96-웰 플레이트에 식 II의 화합물 최종 농도 5 µg/ml, 15 µg/ml 및 25 µg/ml으로, 메틸

페니테이트의 최종 농도 15  $\mu\text{g/ml}$ 으로 첨가하였다. 물과 텍사메타손(최종 농도 10  $\mu\text{M}$ )을 대조군으로 사용하였다. 이후, 배양 배지 중의 GR467 PBL을 웰에 최종 농도 150,000 세포/웰로 첨가하고, 플레이트를 24시간동안, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, PHA를 최종 농도 2  $\mu\text{g/ml}$ , 최종 총 부피 200  $\mu\text{l}$ /웰로 가하여, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 72시간 더 세포를 인큐베이션하였다. 모든 배양은 삼배수로 수행하였다.

- <122> 배양 종료시에, 실시예 1에 기재된 바와 같이 세포 증식을 결정하였다. 결과는 도 2에 제시되어 있다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II) 및 텍사메타손(Dex)은 PHA에 의한 무자극된 또는 자극된 PBL 둘다의 증식을 현저하게 저해하였지만, 메틸페니테이트는 그렇지 않았다.
- <123> PBL을  $1.3 \times 10^6$  세포/웰로, 15  $\mu\text{g/ml}$  식 II의 화합물, 15  $\mu\text{g/ml}$  메틸페니테이트 또는 10  $\mu\text{M}$  텍사메타손과 함께, 1 ml 튜브에서 24시간, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 인큐베이션함으로써, PBL에 의한 사이토카인의 방출을 측정하였다. 인큐베이션한 후, PHA를 최종 농도 2  $\mu\text{g/ml}$ 로 가하여, 세포를 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 96시간 더욱 인큐베이션하였다. 이후, 10분간 1000 rpm으로 원심분리하여 세포를 제거하고, 배양 배지를 수집하였다.
- <124> IL-13은 활성화된  $\text{T}_\text{H}2$  세포에 의해 생산되며, IL-13의 일차 표적은 B-세포와 단핵세포이다. IL-13은 체액성 면역 반응을 자극하며 천식 발병과 연관되어 있다. IL-13은 림프종 세포주에 의해 분비되며 자가분비성 성장 인자일 수 있다. IL-13은 또한 체장암에서 발견된다. 그러나, IL-13은 신경교종 및 신장세포 암종과 같은 다른 유형의 종양 성장을 저해하는 것으로도 보고되었다.
- <125> IFN  $\gamma$ 는 활성화된 T-세포 및 다른 세포에서 생산되는 전염증성 사이토카인이다. IFN  $\gamma$ 는 호중구, 내피세포 및 대식세포를 활성화시킬 뿐만 아니라 MHC 분자의 발현 증가를 야기한다. IFN  $\gamma$ 는 세포-매개 면역성 반응을 이끈다. IFN  $\gamma$ 는 확립된 종양의 면역-매개된 거부에서 중요한 역할을 수행한다. IFN  $\gamma$ 는 일부 종양에 대한 항증식 효과를 가지며, 그외에는 세포자살 효과를 가질 수 있으며, 혈관신생성 케모카인의 생성을 유도할 수 있으며, 종양 세포의 면역성을 향상시킨다.
- <126> 배양배지로의 IL-13과 인터페론 감마(IFN  $\gamma$ )의 방출을 ELISA로 측정하였다. ELISA를 수행하기 위해, 인간 IL-13 및 IFN  $\gamma$ 에 대한 매칭된(matched) 항체 쌍을 각각 Pierce Biotechnology와 Biosource로부터 구입하였다. ELISA 스트립 웰 플레이트를 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 IL-13 항체(포스페이트-완충 식염수(PBS) 내) 및 4  $\mu\text{g/ml}$ 의 IFN  $\gamma$  (PBS) 항체로, 실온에서 밤새 코팅하였다. 이후, PBS 중의 4% BSA 용액을 사용하여 플레이트를 1시간 동안 블로킹한 다음, 이배수로 50  $\mu\text{l}$ /웰의 실험 배양 배지를 첨가하였다. 1시간 동안 실온에서 플레이트를 인큐베이션한 다음 0.1% Tween 20가 첨가된 50 mM Tris pH 8.0으로 행구었다. 이후, IL-13에 대한 바이오틴화된 이차 항체 400 ng/ml 및 IFN  $\gamma$ 에 대한 바이오틴화된 이차 항체 500 ng/ml 용액을, 블로킹 완충액으로 준비하여, 각 웰에 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 플레이트를 1시간 인큐베이션한 다음, 행구었다. 스트렙토아비딘 HRP(Pierce Biotechnology) 접합체의 1:8000 희석액을 블로킹 완충액 중에 준비한 다음, 웰에 100  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여, 30분간 인큐베이션하였다. 각 웰에 100  $\mu\text{l}$ 의 Pierce Biotechnology TMB 기질을 첨가한 후, 마지막 세척 과정을 수행하였다. 30분간 발색시킨 다음 100  $\mu\text{l}$ 의 0.18 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 중단시켰다. 450 nM 필터가 장착된 마이크로 플레이트 판독기로 OD를 측정하였다.
- <127> IL-13에 대한 결과는 도 3에 도시되어 있다. 나타낸 바와 같이, 식 II의 화합물 (Cpd. II)과 텍사메타손(Dex)은 PHA에 의해 유도된 IL-13 방출을 현저하게 저해하였다. 메틸페니테이트(MP)는 IL-13의 방출을 저해하지 않았다. 실제, 메틸페니테이트는 PHA-자극된 세포의 IL-13 방출을 증가시켰다.
- <128> IFN  $\gamma$ 에 대한 결과는 도 4에 도시되어 있다. 나타낸 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II)과 텍사메타손(Dex)은 무자극된 세포 및 PHA에 의해 자극된 세포 둘다에서 IFN  $\gamma$  방출을 현저하게 저해하였다. 메틸페니테이트(MP)는 무자극된 세포에 의한 IFN  $\gamma$ 의 방출에 일부 효과를 보였지만, PHA로 자극된 세포에서의 IFN  $\gamma$  방출은 현저하게 저해하지 않았다. 실제로, 메틸페니테이트는 PHA-자극된 세포에 의한 IFN  $\gamma$ 의 방출을 증가시켰다.
- <129> 실시예 3:
- <130> 정상인 지원자 GR191로부터 전혈액을 채혈하여, 실시예 1에 기재된 바와 같이 처리하여 열-불활화한 혈청 및 PBL를 수득하였다. 배양 배지(열-불활화한 GR191 혈청으로 제조) 중의 식 II의 화합물 및 메틸페니테이트를, 96-웰 플레이트에 식 II의 화합물 최종 농도 5  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  및 50  $\mu\text{g/ml}$ , 및 메틸페니테이트 최종 농도 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하였다. 물, 마우스의 신경 성장 인자(Upstate Biotechnology, Inc)(NGF) (최종 농도 250 ng/ml) 및 텍사메타손(최종 농도 10  $\mu\text{M}$ )을 대조군으로 사용하였다. 이후, 배양 배지 중의 GR191의 PBL을

최종 농도 150,000 세포/웰로 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, PHA를 최종 농도 2 µg/ml, 최종 총 부피 200 µl/웰로 첨가하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 72시간 동안 더욱 세포를 인큐베이션하였다. 모든 배양은 삼배수로 수행하였다.

<131> 배양 종료시에, 실시예 1에 기재된 바와 같이 세포 증식을 결정하였다. 결과는 도 5A-B에 제시되어 있다. 도 5A-B에서 알 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II) 및 텍사메타손(Dex)은 PHA 무자극된 세포 또는 자극된 PBL 둘다의 증식을 현저하게 저해하였지만, 메틸페니데이트는 그렇지 않았다.

<132> PBL에 의한 사이토카인 방출은, 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15 µg/ml 및 50 µg/ml 식 II의 화합물 또는 10 µM 텍사메타손과 함께, 1 x 10<sup>6</sup> 세포/ml로 1 ml 튜브에서 PBL를 인큐베이션함으로써 측정하였다. 인큐베이션한 후, PHA를 최종 농도 5 µg/ml로 첨가하여, 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 72시간 동안 더욱 인큐베이션하였다. 모든 배양은 삼배수로 수행하였다. 이후, 10분간 1000 rpm으로 원심분리하여 세포를 제거하였다.

<133> 상층액을 수집하여 상층액 중의 IL-13 및 종양 괴사 인자 알파(TNF α)의 농도를 ELISA로 측정하였다. IL-13 ELISA는 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였다. 결과는 도 6에 제시되어 있다. 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II) 및 텍사메타손(Dex)은 PHA-자극된 PBL에서의 IL-13 방출을 현저하게 저해하였다.

<134> TNF α는 활성화된 T-세포 및 다른 세포에 의해 생산되는 전염증성 사이토카인이다. TNF α는 내피 세포가 유착성 분자를 발현하도록 야기하며, 염증 부위에 면역 세포를 보충시키는 역할할 수 있다. NFκB 및 AP-1를 통한 세포 생존 및 캐스파제(caspase) 활성을 통한 세포 사멸 이들 모두에 대한 신호를 포함하여, 여러가지 많은 세포내 신호들이 TNF α에 의해 유도된다. NFκB는 세포 생존의 중요 조절자이며, 복합적인 종양 유형에서 암화 과정의 프로모터이다.

<135> 실시예 2에 기술된 바와 같이, Pierce Endogen사의 매칭된 항체 쌍을 이용하여(코팅 항체에서는 2 µg/ml, 그리고 이차 항체는 250 ng/ml), TNF α ELISA를 수행하였다. 결과는 도 7에 제시하였다. 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II) 및 텍사메타손(Dex)은 PHA-자극된 PBL에서의 TNF α 방출을 현저하게 저해하였다.

<136> 유세포 측정기로 세포를 더욱 분석하였다. 사멸 세포 또는 사멸성 세포 집단을 측정하기 위해, 아넥신(annexin)을 사용하였다. 세포 활성화 수준을 확립하기 위해, 항-CD69 항체를 사용하였다. T-세포 수용체 α β(TCR)에 대한 항체도 또한 사용하였다. 제조함 아넥신 5(PE 및 FITC 접합체) 및 항체 모두 Caltag(Burlingham, CA)에서 구입하고, 제조업자의 설명서에 따라 사용하였다. 이후 결과를 관찰하였다.

<137> 세포 사멸:

<138> 식 II의 화합물 50 µg/ml 및 15 µg/ml을 이용한 TCR-양성 세포의 아넥신 염색은, 7.3%(배경)에서 45% 및 23%로 증가하였으며, 이는 T-세포 집단에서의 세포 사멸 증가를 의미한다. 5 µg/ml의 PHA에 의한 자극은, TCR-양성 세포의 아넥신 염색을 67%로 증가시켰다. 이는 PHA가 T-세포 집단에서 세포 사멸을 유도할 수도 있음을 나타낸다. 세포 사멸은 PHA 및 15 µg/ml의 식 II의 화합물 처리시, 약간 감소하였다(PHA 및 IMM 0001에 의한 TCR-양성 세포의 아넥신염색 62% 대 PHA 단독으로 67%). PHA 및 50 µg/ml의 식 II의 화합물은 아넥신 염색에 의해 나타낸 바와 같이 세포의 TCR-양성 서브유닛에서 87%의 세포 사멸을 야기하였다. 이들 결과는 식 II의 화합물이 50 µg/ml보다 높은 농도에서 상당한 T-세포 사멸을 야기하는 반면, 더욱 낮은 15 µg/ml 농도에서는 그렇지 않았다. 텍사메타손은 TCR-양성 세포의 PHA-유도성 증가를 탈피시켰으며(84%에서 48로 감소), 이는 대조군 화합물이 잘 작동함을 나타낸다.

<139> T-세포의 활성화:

<140> CD69 + TCR 염색(활성화된 T 세포)은 어떠한 대조군에서도 검출되지 않았다(nil, 식 II의 화합물 단독 및 텍사메타손 단독). PHA는 CD69 + TCR 염색을 84%로 증가시켰다. PHA만 T-세포 활성화를 야기하였고, CD 69 염색 증가로 검출가능하였다. PHA-자극된 세포의 CD69 + TCR 염색은 식 II의 화합물 50µg/ml에서는 84%에서 54%로, 그리고 15 µg/ml에서는 64%로 낮아졌다. 텍사메타손은 PHA-자극된 세포의 CD69 + TCR 염색을 감소시키는데 있어, 식 II의 화합물보다 덜 효과적이었다. 즉, 식 II의 화합물이 T-세포 활성화를 감소시키는데 텍사메타손보다 더 효과적이며, 강력한 항염증제이다.

- <141> 실시예 4:
- <142> 정상 지원자, GR-192로부터 전혈액을 채혈하여, 실시예 1에 기재된 바와 같이 처리하여 열-불활화한 혈청 및 PBL을 수득하였다. 이후, 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15 µg/ml의 식 II의 화합물(10% 열-불활화한 GR-192 혈청을 사용하여 만들어진 배양 배지 중의) 또는 10 µM 텍사메타손과 함께, 1.3 x 10<sup>6</sup> 세포/ml로 1 ml 튜브에서 GR-192 PBL을 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, PHA를 최종 농도 2 µg/ml로 첨가하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 96시간 동안 더욱 세포를 인큐베이션하였다. 모든 배양은 삼배수로 수행하였다. 이후, 10분간 1000 rpm으로 원심분리하여 세포를 제거하고 배양 배지를 수집하였다.
- <143> IL-8의 배양 배지로의 방출은 ELISA로 측정하였다. IL-8은 초기 염증 사이토카인으로, 유력한 호중구의 화학유인물질 및 활성화인자이다. 또한, T-림프구와 호산구의 화학유인물질 및 활성화인자로 보고되기도 하였다. IL-8은 면역 세포(림프구, 중핵세포, 단핵세포 및 대식세포를 포함), 섬유아세포 및 내피세포에 의해 생산된다. IL-8은 강력한 혈관신형 활성을 가지고 있다.
- <144> ELISA를 수행하기 위하여, 인간 IL-8에 대해 매치되는 항체 쌍을 각각 Pierce Biotechnology와 Biosource로부터 구입하였다. ELISA 스트립 웰 플레이트를 IL-8(포스페이브-완충 식염수(PBS))에 대한 2 µg/ml 항체로 실온에서 철야 코팅하였다. 이후, 1시간 동안 PBS 중의 4% BSA 용액을 사용하여 블로킹한 다음, 이배수로 실험 배양 배지 50 µl/웰을 가하였다. 1시간 동안 실온에서 플레이트를 인큐베이션한 다음 0.1% Tween 20가 첨가된 50 mM Tris pH 8.0로 행구었다. 이후, IL-8에 대한 바이오틴화된 이차 항체 100 ng/ml 용액을 블로킹 완충액 중에 제조하여, 웰 당 100 µl씩 첨가하였다. 1시간 동안 플레이트를 인큐베이션한 다음 다시 행구었다. 스트렙아비딘 HRP(Pierce Biotechnology) 접합체 1:8000 희석액을 블로킹 완충액 중에 제조하고, 100 µl을 웰에 첨가하여 30분간 인큐베이션하였다. 최종 세척 단계를 수행한 다음 100 µl의 Pierce Biotechnology TMB 기질을 각각의 웰에 첨가하였다. 30분간 발색 반응을 유도한 다음 100 µl의 0.18 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 중단시켰다. 450 nm 필터가 장착된 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 OD를 측정하였다.
- <145> 결과는 도 8에 도시되어 있다. 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II)과 텍사메타손(Dex)은 PHA에 의해 유도된 IL-8 방출을 현저하게 저해하였다.
- <146> 인플루엔자-면역화된 공여자로부터 분리되었으며 헵타글루티닌 펩타이드 307-319에 특이적인 CD-4 양성의 인간 T-림프구 세포주(TRiPS)를 사전 자극한지 18-20 일에 약 4 x 10<sup>5</sup> 세포를 사용하여 계대 배양(passage)를 자극하였다. 세포를 10% 소 태아혈청(FBS; American Type Culture Collection (ATCC))이 첨가된 차가운 Iscove의 IMDM(Modified Dulbecco Minimal Essential Medium, Sigma)로 1번 행군 다음, 항-CD3 단일클론 항체 OKT3의 1:500 희석액(마우스 복수로부터 제조)을 포함하는 1.0 ml의 차가운 IMDM 배지에 재현탁하였다. 세포를 얼음 위에서 30분간 항체와 인큐베이션 한 다음, FBS가 첨가되지 않은 차가운 배지로 행군 다음, 50 U/ml의 인간 IL-2 (Xenometrix)가 첨가된 배지 중에, 공급자 세포로서 대략 2 x 10<sup>6</sup> 4000R-조사된 정상 인간 공여자 말초 혈액 백혈구(PBL)과 합하였다. 3일째에 IL-2 및 FBS가 첨가된 신선한 IMDM 배지를 첨가하여 배양을 연장시켰다. 배양일은 OKT3로 자극한 날부터 세었다. 세포는 7일째(최대 증식)에 실험 출발용으로 사용할 수 있으며, 전형적으로 14일째(재-자극에 가장 민감), 최대 21일째(노화에 이르는 휴면 세포들)에 사용할 수 있다.
- <147> 활성화 실험은 세포 분주물을 취하여 따뜻한(37°C) IMDM으로 두 번 행구어 수행하였다. 각각의 특이적인 분석을 위해, 2x10<sup>5</sup> 살아있는 세포를 15 µg/ml의 식 II의 화합물 또는 10 µM 텍사메타손을 포함하는 총 부피 0.9 ml의 따뜻한 IMDM 배지에서 37°C에서 15분간 미리 인큐베이션하였다. 이후, 0.1 ml의 따뜻한 IMDM 중의 활성화 자극원으로서 2 x 10<sup>5</sup> CD3/CD28 Dynabeads (Dyna1) 분주물을 첨가하여, 배양물을 37°C에서 24시간 인큐베이션하였다. 원심분리하여 세포를 펠릿하고, 세포 배양액의 상층액을 회수하였다.
- <148> 상기 기술된 바와 같이, 특이적 IL-8 ELISA에 의해 사이토카인 함량을 분석하였다. 식 II의 화합물이 TRiPS 세포주에 의한 IL-8 생산에 아무런 효과가 없다는 것이 밝혀졌다.
- <149> 실시예 5:
- <150> THP-1은 ATCC(American Type Culture Collection)(catalog no. TIB-202)로부터 수득한 단핵세포주이다. THP-1을 배지(10 % FCS와 8 ng/ml 모노티오글리세롤을 포함하는 RPMI, Sigma)에 250,000 세포/ml 농도로 첨가하여, 15 µg/ml의 식 II의 화합물 또는 10 µM 텍사메타손과 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 인큐베이션하였다. 1

시간 후, 리포폴리사카라이드(LPS)(Sigma)를 배양액에 최종 농도 200 ng/ml로 첨가하고, 세포를 4시간 또는 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 세포를 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 상층액의 IL-8 및 TNF α 농도를 ELISA로 측정하였다.

<151> 실시예 4에 기술된 바와 같이, ELISA를 수행하여, 상층액의 IL-8 농도를 측정하였다. 결과는 하기 표 1에 제시되어 있다. 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II)과 덱사메타손(Dex)은 LPS-자극된 단핵세포에서의 IL-8 방출을 현저하게 저해하였다.

<152> TNF α ELISA는 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였다. 결과는 하기 표 2에 제시되어 있다. 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 식 II의 화합물(Cpd. II)과 덱사메타손(Dex)은 LPS-자극된 단핵세포에서의 TNF α 방출을 현저하게 저해하였다.

<153> 표 1

샘플	배양시간	평균 IL-8 농도 (pg/ml)	% 저해
대조군(첨가제 무)	4시간	75.96 ± 12.73	N/A
LPS	4시간	2844.60 ± 180.55	N/A
LPS + Cpd II	4시간	2185.00 ± 78.30	23%
LPS + Dex	4시간	2102.18 ± 52.20	26%
대조군(첨가제 무)	24시간	46.09 ± 22.42	N/A
LPS	24시간	6653.20 ± 193.18	N/A
LPS + Cpd II	24시간	4490.20 ± 264.46	33%
LPS + Dex	24시간	2300.00 ± 283.41	66%

<155> 표 2

샘플	배양시간	평균 TNF α 농도 (pg/ml)	% 저해
대조군(첨가제 무)	24시간	1.415 ± 1.464	N/A
LPS	24시간	138.655 ± 0.601	N/A
LPS + Cpd II	24시간	65.370 ± 0.891	53%
LPS + Dex	24시간	94.759 ± 8,755	32%

<157> 실시예 6:

<158> Jurkat T-림프구 백혈구 세포주를 ATCC(American Type Culture Collection), Rockville, MD (catalog no. TEB- 152)로부터 입수하였다. Jurkat 세포를 1x10<sup>5</sup> 세포/ml로 10% FCS가 첨가된 IMDM 배지(ATCC)중에, 7.5 μg/ml 또는 15 μg/ml의 식 II의 화합물(Cpd II)과 함께 72시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, HEPES 완충 염수로 평균 다음 3개의 동일 부피로 나누어, 5 μM 에티디움 브로마이드 다이머-1 (ETH-D1)(Molecular Probes) 및 5 μM 칼세인 AM 용액(Promega)과 함께, 96-웰 배양 플레이트에서, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 인큐베이션하여, 세포 생존성을 분석하였다. 여기/방출 485/530 nm 및 530/645 nm에서 플레이트 판독기로 각 웰을 측정하였다. 사멸 세포 대 살아있는 세포의 상대적인 백분율은, ETH-D1 형광을 칼세인 AM 형광으로 나누어 계산하였다. 결과는 하기 표 3에 나타난다.

<159> 표 3

샘플	상대 백분율 사멸/생존
대조군(첨가제 무)	20.85% ± 1.42%
7.5 μg/ml Cpd II	16.74% ± 2.15%
15 μg/ml Cpd II	40.79% ± 1.81%

<161> 실시예 7:

<162> 1 ml의 내피 성장 배지-2(EGM-2)(Cambrex) 중의, 계대 4(즉, 네 번 배가시킨 집단)의 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVECs), 인간 기원의 로트 넘버 9713(ATCC)을, 내피 기저 배지-2(endothelial basal medium-2, EBM-2)(Cambrex) 중의 식 II의 화합물(Cpd II) 30  $\mu\text{g}$  또는 EBM-2 중의 30  $\mu\text{g}$  메틸페니데이트(MP)와 혼합하였다. 물(두 개의 테스트 화합물용 비히클)을 대조군으로 사용하였고, 50  $\mu\text{M}$ 의 PI3 키나아제 저해제 LY 294002(Sigma)를 양성 대조군으로 포함시켰다. 이후, BD Biosciences, Rockville, MD로부터 구입한 관 형성 분석 키트에 포함된 플레이트의 웰에, 세포를 10,000 세포/웰로 접종(seeding)하였다. 플레이트의 웰은 세포외 매트릭스 단백질 젤을 포함하였다. 소 태아혈청(FCS)(ATCC)을 최종 농도 5%로 첨가하여, 관 형성을 개시하였다. 이후, 플레이트를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 18시간 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 도립 현미경에 장착된 디지털 카메라(위상대비(PC)가 10으로 설정된 Olympus IMT-2)로 플레이트를 촬영하였다.

<163> 혈관신생 신호가 존재하는 조건에서 내피 세포를 세포외 매트릭스 단백질 젤 상에 배양하면, 이들은 모세 혈관과 대충 유사한 구조로 스스로 정렬한다. 기저 관 형성을 본 분석에서 확인하기 위해, 세포를 Cpd II 및 MP 용액에 존재하는 바와 동일 함량의 물로 처리하였다. 이 처리는 다중 분기점이 있는 내피세포의 격자 구조를 형성시킨다. Cpd II 및 LY 294002 처리는 웰에서 분지(branch) 함량과 세포 상호작용 정도를 감소시켜, 세포는 분리된 클러스터로 남는다. MP는 내피세포의 모세혈관과 유사한 구조로 조직화되는 능력에 있어 관찰되는 효과가 없었다. 이러한 데이터는, MP가 아닌 Cpd II가 이 단계의 혈관신생을 간섭함을 시사한다.

<164> 실시예 8:

<165> 50 ng/ml의 혈관 내피 성장 인자(VEGF)(Sigma)가 첨가된 EGM-2 또는 EGM-2 완전 배지(2% FCS, 하이드로코티손, 인간 섬유아세포 성장 인자 B, VEGF, 재조합 인슐린 유사 성장 인자-1, 아스코르베이트, 인간 내피 성장 인자, 젠타마이신 및 헤파린)(Cambrex) 중의 계대 4 HUVEC, 로트 번호 9713을, 5,000 세포/웰로 96-웰 조직 배양 플레이트에 넣었다. 하기 첨가제를 세포에 첨가하였다: 물(비히클 대조군); 식 II의 화합물(Cpd II) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Cpd II 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 또는 Cpd II 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 인큐베이션한 후, 실시예 1에 기술된 바와 같이, 프로메가 세포 역가 분석으로 세포 증식을 평가하였으나, 프로메가 세포 역가 시약을 첨가한 후 단 2시간만 인큐베이션하였다.

<166> 결과는 하기 표 4에 나타난다. 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, Cpd II는 투여량-의존적인 방식으로 웰에서 검출되는 세포 수를 감소시켰다. Cpd II 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 관찰된 감소는 통계학적으로 유의하였다. 성장 인자가 첨가되지 않은 웰은 포함되어 있지 않지 때문에, Cpd II에서 관찰된 세포수 감소는 증식 저해 또는 세포독성 효과에 의한 것인지 알 수 없다.

<167> 표 4

샘플	배지	530 nm에서 평균 OD	p 값(비히클 대조군 대비)
대조군(첨가제 무)	EGM-2 + VEGF	0.141±0.004	N/A
비히클 대조군(물 첨가)	EGM-2 + VEGF	0.224±0.011	N/A
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpd II	EGM-2 + VEGF	0.189±0.014	0.0324
15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpd II	EGM-2 + VEGF	0.132±0.022	0.0069
30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpd II	EGM-2 + VEGF	0.046±0.012	0.0003
대조군(첨가제 무)	EGM-2 + 성장 인자	0.243±0.002	N/A
비히클 대조군(물 첨가)	EGM-2 + 성장 인자	0.299±0.011	N/A
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpd II	EGM-2 + 성장 인자	0.271±0.022	0.1131
15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpd II	EGM-2 + 성장 인자	0.239±0.019	0.0283
30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpd II	EGM-2 + 성장 인자	0.066±0.003	0.0001

<169> 실시예 9:

<170> HepG2는 인간 간암 세포주로, ATCC로부터 입수하였다. HepG2 세포는 10% FCS를 포함하는 IMDM 배지 중에 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에 컨플루언스로 배양하였다. 이후, 세포를 다음과 같이 트립신화하였다. 각 플라스크내 배지를 흡입하고, 5 ml의 0.025% 트립신/EDTA (Cambrex)로 교체하였다. 세포가 플라스크로 더 이상 부착되지 않을때까지 현미경에서 모니터링하였다. 이후, 5 ml의 트립신 중화 용액(TNS)(Cambrex)을 각 플라스크에 첨가하여, 반

응을 중단시켰다. 10분간 1000 rpm로 세포 상층액을 원심분리하고, 상층액을 흡입 제거하였다. 세포를 신선한 배지 중에 재구성하여 계수하였다. 이후,  $1.22 \times 10^6$  세포/ml를 포함하는 배지중의 세포 현탁물 4 ml를 추가적인 배지 1 ml과 혼합하였다. 다음으로, 제조된 세포 현탁물 0.5 ml/웰을 24-웰 배양 플레이트(약 500,000 세포/웰)의 각 웰에 첨가하였다. 세포를 하기 표 5에 나타낸 바와 같이 처리하고, 37°C에서, 또는 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 함께 24시간 인큐베이션하였다. 웰에서 상층액을 제거한 다음 원심분리하여, 찌꺼기를 제거하였다. 다음으로, 상층액으로 에리트로포이에틴(EPO) 생산을 분석하였다. R & D Systems, Minneapolis, MN (catalog no. DE900)사의 키트를 제조업자의 지침서에 따라 사용하여, ELISA로 EPO를 측정하였다.

<171> 결과는 하기 표 5에 나타낸다. 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, Cpd II는 HepG2 세포에서의 EPO 방출을 현저하게 저해하였다. EPO 감소는 혈관실생 저해 효과를 가질 것이다. 생존성 분석은 수행하지 않았지만 세포의 형태는 현미경 분석으로 보건데 정상이었다.

<172> 표 5

처리	평균 단위/ml EPO	p 값 대 하이폭시아 단독
대조군(무처리)	74.90±2.65	N/A
하이폭시아(5% CO <sub>2</sub> )	108.39±2.81	N/A
하이폭시아 + 15 µg/ml Cpd II	71.60±2.01	0.005
하이폭시아 + 25 µM LY 294002	52.99±1.04	0.016

<174> 실시예 10:

<175> ITSS(인슐린, 트랜스페린 및 소듐 셀레나이트)(Sigma)가 보강된 500 µl의 EGM-2 완전 배지(혈청 또는 아스코르베이트 무첨가)에, 계대 4 HUVEC, 로트 번호 9713을 20,000 세포/웰로 48-웰 조직 배양 플레이트의 각 웰에 넣었다. 계대 4 HUVEC, 인간 기원의 로트 번호 7016(ATCC)을, ITSS가 보강된 500 µl의 EGM-2 완전 배지(혈청 또는 아스코르베이트 무첨가)에 20,000 세포/웰로 48-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 넣었다. 하기 첨가제를 세포에 첨가하였다: 물(비히클 대조군) 및 15 µg/ml의 식 II의 화합물(Cpd II). 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 인큐베이션한 후, LPS를 최종 농도 200 ng/ml로 첨가하여, 세포를 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 철야 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 상층액을 회수하여, 실시예 4에 기술된 바와 같이 ELISA로 상층액의 IL-8 함량을 측정하였다.

<176> 결과는 하기 표 6에 나타낸다. 표 6에서 알 수 있는 바와 같이, Cpd II는 7016 HUVEC에 의한 IL-8 방출을 완전히 소거하였으며, 9713 HUVEC에 의한 IL-8 방출은 90%로 감소시켰다.

<177> 표 6

세포	처리	IL-8 (pg/ml)
7016 HUVECs	대조군(오직 LPS)	53.5
7016 HUVECs	LPS + 15 µg/ml Cpd II	검출 이하
9713 HUVECs	대조군(오직 LPS)	485.0
9713 HUVECs	LPS + 15 µg/ml Cpd II	49.8

<179> 실시예 11:

<180> 계대 4 HUVEC, 인간 기원 로트 번호 8710(ATCC)을 EGM-2 배지에 5,000 세포/웰로 24-웰의 조직 배양 플레이트에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 72시간 인큐베이션하였다. 이후, 배지를 신선한 배지로 교체하고, 하기 첨가제를 세포에 첨가하였다: 물(비히클 대조군); 식 II의 화합물(Cpd II) 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml 또는 30 µg/ml; 메틸페니데이트(MP) 15 µg/ml; LY 294002 10 µM; 또는 덱사메타손(Dex) 10 µM. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 인큐베이션한 후, TNF α(Pierce)를 최종 농도 10 ng/ml를 첨가하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 18시간 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 상층액을 수득하여, 실시예 4에 기술된 바와 같이 ELISA로 상층액내 IL-8 함량을 측정하였다.

<181> 결과는 하기 표 7에 나타낸다. 표 7에서 알 수 있는 바와 같이, Cpd II는 투여량-의존적인 방식으로 TNF α에

의해 자극된 IL-8의 방출을 감소시켰지만, 가장 높은 농도(30 µg/ml)에서는 일부 세포 사멸이 나타났다. Dex와 MP는 IL-8 방출을 약간 감소시켰고, LY 294002는 IL-8 방출을 현저하게 감소시켰다.

<182>

표 7

<183>

처리	평균 IL-8 (pg/ml)	p 값	% 저해
첨가제 없이	207.15±66.17		
30 µg/ml Cpd II	0		
15 µg/ml Cpd II	400.35		
10 ng/ml TNF α	34695±301.9		
10 ng/ml TNF α + 물	35572±967.74		
10 ng/ml TNF α + 30 µg/ml Cpd II	4829.8±214.13		86.93%
10 ng/ml TNF α + 15 µg/ml Cpd II	20817±674.63	0.002	41.72%
10 ng/ml TNF α + 10 µg/ml Cpd II	22050±727.27	0.003	38.24%
10 ng/ml TNF α + 5 µg/ml Cpd II	34482±2127.22	0.124	3.08%
10 ng/ml TNF α + 1 µg/ml Cpd II	53657±3935.18	0.011	(-51.1%)
10 ng/ml TNF α + 15 µg/ml MP	30183±3448.01	0.051	15.24%
10 ng/ml TNF α + 10 µM LY 294002	9196.1±150.97		74.58%
10 ng/ml TNF α + 10 µM Dex	35952±2197.14	0.072	6.88%

<184>

실시예 12:

<185>

전사 인자 NFκB(핵인자 κB)는 면역, 급성 상태 및 염증 반응의 매개자를 코딩하는 광범위하게 다양한 유전자의 발현 조절과 연관되어 있다. NFκB는 세포 생존의 중요 조절자이며, 암화의 프로모터이다. 포유류에는 5종의 NFκB 서브유닛이 있다: p50, p65(Re1A), c-Rel, p52 및 Re1B. p50/p65 헤테로다이머 및 p50 호모다이머는 NFκB 신호 경로에서 가장 일반적으로 발견되는 다이머이다. NFκB는 리포폴리사카라이드와 같은 박테리아 세포벽 성분 또는 TNF α 나 IL-1β 와 같은 염증성 사이토카인을 포함하여, 많은 자극제에 의해 활성화될 수 있다.

<186>

활성자 단백질-1(AP-1)은 세포 주기중에 활성화되는 전사 인자로, 세포 생존, 분화 및 적응 반응(adaptive response)을 촉진시킨다. AP-1 단백질은 증식 및 세포 주기 진행에 참여하는 많은 유전자의 발현에 기능을 한다. 예컨대, ras, rasF 및 mek와 같은 성장 인자 신호에 의한 전이 경로에서 작용하는 종양유전자(oncogene)에 의한 세포 형질전환은, AP-1 구성성분 단백질 발현의 현저한 증가를 야기한다. 따라서, AP-1 조절성 유전자는 악성화 및 전이 중에 관찰되는 침습적인 과정을 지지한다. AP-1은 ATF1-4, c-Fos, c-Jun, c-Myc 및 C/EBP를 포함하는 구조적으로 관련있는 전사 인자의 거대 패밀리에 속한다. AP-1은 c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB 및 JunD를 포함하는 Fos와 Jun 패밀리로부터 유래된 헤테로다이머 복합체 단백질 혼합으로 구성되어 있다. 일차적으로, AP-1 다이머는 TPA-반응 요소(TRE)로 DNA에 결합한다. AP-1 발현은 혈청, 성장 인자, 포르볼 에스테르(phorbol ester), 종양유전자, TGF-β, TNF 및 인터페론 패밀리의 사이토카인, 신경 탈분극 및 세포 성 스트레스와 같은 복수개의 자극에 의해 유도된다.

<187>

계대 5 HUVEC, 인간 기원 로트 번호 8750을 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에서 EGM-2 배지 중에 컨플루언트로 배양하였다. 2% FCS, GA1000(젠타마이신), 헤파린 및 아스코르브산(둘다 Cambrex)을 포함하는 EGM-2 배지가 있는 플라스크(총 부피 5 ml/플라스크)에 하기 첨가제를 넣었다: 식 II의 화합물(Cpd II) 1 µg/ml; Cpd II 5 µg/ml; Cpd II 15 µg/ml; 메틸페니데이트(MP) 15 µg/ml; 또는 LY 294002 10 µM. 플라스크를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 철야 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, VEGF를 최종 농도 10 ng/ml로 첨가하고, 플라스크를 30분간 더욱 인큐베이션하였다.

<188>

이후, Active Motif North America, Carlsbad, CA로부터 핵 추출 키트와 TransAM™ NFκB p65/NFκB p50 전사 인자 분석 키트를 이용하여, 제조업자의 지침서에 따라 NFκB의 함량을 측정하였다. 간단히, 핵 추출 키트로 세포의 핵 추출물을 준비하였다. 이후, 핵 추출물을 TransAM™ 키트의 96-웰 플레이트의 웰에 넣었다. NFκB 보존적인 결합부가 있는 올리고뉴클레오타이드를 웰에 고정하고, 핵 추출물에 포함된 활성화된 NFκB를 상기 올리고뉴클레오타이드에 결합시켰다. 이후, NFκB p65 또는 p50 서브유닛에 대한 항체를 첨가하고, 올리고뉴클레오타이드에 결합된 NFκB 복합체를 검출하였다. 다음으로, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)가 접합되어 있는 이차 항

체를 첨가하고, 분광광도계(450 nm에서 측정)로 정량되는 비색 판독을 실시하였다.

<189> Active Motif North America, Carlsbad, CA의 핵 추출 키트 및 TransAM™ NFκB p65/NFκB p50 전사 인자 분석 키트를 제조업자의 지침서에 따라 사용하여, c-Jun의 양을 측정하였다. 간단하게, 세포의 핵 추출물을 핵 추출 키트를 이용하여 준비하였다. 이후, 핵 추출물을 TPA-반응 요소(TRE)가 포함되어 있는 올리고뉴클레오티드가 고정되어 있는 96-웰 플레이트의 웰에 가하였다. 핵 추출물에 포함된 활성화 단백질-1(AP-1) 다이머를 상기 올리고뉴클레오티드에 결합시켜, c-Jun에 특이적인 항체를 사용하여 검출하였다. 다음으로, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)가 접합되어 있는 이차 항체를 첨가하여, 분광광도계(450 nm에서 측정)로 정량화되는 비색 판독을 실시하였다.

<190> 결과는 하기 표 8 및 9에 나타낸다. 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, HUVEC의 VEGF 처리는 TransAM 분석에 의해 검출된 바와 같이 활성화된 NFκB의 복제(doubling)을 대체적으로 야기하였다. Cpd II는 15 μg/ml 및 5 μg/ml에서 활성화된 NFκB의 함량을 기저 수준으로 다시 감소시켰다. 표 9에서 알 수 있는 바와 같이, HUVEC의 VEGF 처리는 c-Jun의 증가를 초래하였다. Cpd II는 15 μg/ml 및 5 μg/ml 농도에서 c-Jun 양적 증가를 완전히 소거하였다.

<191> 표 8

샘플	평균 OD 450 nm (NFκB)
대조군(첨가제 무)	0.070±0.002
오직 VEGF	0.111±0.007
VEGF + 15 μg/ml Cpd II	0.060±0.008
VEGF + 5 μg/ml Cpd II	0.065±0.010
VEGF + 1 μg/ml Cpd II	0.097±0.013
VEGF + 15 μg/ml MP	0.093±0.011
VEGF + 10 μM LY 294002	0.138±0.008

<193> 표 9

샘플	평균 OD 450 nm (c-Jun)
대조군(첨가제 업이)	0.204±0.016
오직 VEGF	0.261±0.013
VEGF + 15 μg/ml Cpd II	0.204±0.010
VEGF + 5 μg/ml Cpd II	0.185±0.025
VEGF + 1 μg/ml Cpd II	0.221±0.008
VEGF + 15 μg/ml MP	0.230±0.016
VEGF + 10 μM LY 294002	0.340±0.020

<195> 실시예 13:

<196> 계대 8(인간 장골 동맥 내피 세포(HIAEC), ATCC; catalog no. CC-2545)을 EGM-2 배지가 있는 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에서 컨플루언스로 증식시켰다. 실험하기 18시간 전에, 배지를 0.1% FCS, 헤파린, GA1000(젠타마이신) 및 소 뇌하수체 추출물(모두 Cambrex)을 포함하는 EGM-2 배지로 교체하여, 세포를 휴면 상태로 두었다. 실험을 수행하기 위해, 배지를 플라스크에서 흡입한 다음, 첨가제를 신선한 배지가 있는 플라스크에 첨가하였다(총 부피 5 ml / 플라스크): 식 II의 화합물(Cpd II) 15 μg/ml 또는 10 μM LY 294002. 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 동안 플라스크를 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, VEGF 또는 TNF α를 최종 농도 10 ng/ml로 첨가하고 플라스크를 30 분간 더 인큐베이션하였다. 이후, Active Motif North America, Carlsbad, CA의 핵 추출 키트와 TransAM™ NFκB p65/NFκB p50 전사 인자 분석 키트로, 실시예 12에 기술된 바와 같이 NFκB의 함량을 측정하였다.

<197> 결과는 하기 표 10에 나타낸다. 표 10에서 알 수 있는 바와 같이, HUVEC의 TNF α 처리는 TransAM 분석으로 검출된 바와 같이 활성화된 NFκB의 함량의 매우 큰 증가를 유발하였다. Cpd II는 15 μg/ml 농도에서 활성화된 NFκB의 함량을 약 82%로 감소시켰다. VEGF를 이용한 처리는 TNF α에서와 같이 활성화된 NFκB의 증가 수분을

초래하지 않았지만, 증가된 양은 Cpd II에 의해 70%로 감소하였다.

<198>

표 10

<199>

샘플	평균 OD 450 nm (NF κ B)	저해 %
대조군(첨가제 무)	0.174±0.004	
TNF α 단독	0.881±0.021	
TNF α + 15 μg/ml Cpd II	0.302±0.003	81.89%
TNF α + 10 μM LY 294002	0.810±0.007	10.04%
오직 VEGF	0.220±0.007	
VEGF + 15 μg/ml Cpd II	0.066±0.005	70.00%

<200>

실시예 14:

<201>

8일 TRiPS 세포 1x10<sup>6</sup>을, 무첨가하거나("Nil"), 100,000 세포 당 1 μl의 CD3/CD28 Dynabead(Dynal, Oslo, Norway)("CD3/CD28 비드"), 또는 CD3/CD28 비드 중 하나와, 15 μg/ml의 식 II의 화합물(Cpd II)을 함께 37°C에서 30분간 1 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 세포 용혈성 포유류 세포 추출 시약(Sigma)으로 세포를 용해시켰다. 원심분리하여 세포 찌꺼기를 펠렛화한 후 상층액(세포 추출물)을 수득하였다.

<202>

이후, 세포 추출물(상층액)을 Hypromatrix Inc., Worcester, MA사의 Custom AntibodyArray™를 사용하여 제조업자의 지침안에 따라 분석하였다. Custom AntibodyArray™은 하기 열거된 단백질에 대한 항체가 블로팅된 나일론 막이다. 간단하게는, 세포 추출물을 실온에서 천천히 저으면서 2시간 동안 복제(duplicate) Custom AntibodyArray™와 함께 배양한 다음, Tris 완충액(150 mM NaCl, 25 mM Tris, 0.05% Tween-20, pH 7.5)으로 3번 행구었다. Tris 완충액 중의 인산화된 티로신, 인산화된 세린 및 인산화된 트레오닌에 특이적인 HRP-표지 항체를 첨가하고, 이 어레이를 2시간 인큐베이션하였다. Tris 완충액으로 3번 더 씻은 후, 퍼옥시다아제-반응성 발광 기질을 첨가하였다. 어레이를 X-선 필름에 노출시켜 가시화하였다. X-선 필름의 밀도(Densitometry)는 스캐닝 및 컴퓨터 분석에 의해 측정하였다. 결과는 하기 표 11에 요약되어 있다.

<203>

표 11

<204>

단백질	CD3/CD28 자극된 TRiPS 세포에서 단백질에 대한 Cpd II의 효과
RAP1	활성화됨
RAP2	활성화됨
JAK2	활성화됨
STAT4	활성화됨
STAT5b	활성화됨
PI3 키나아제 P85	활성화됨
MEK1	기저 수준 아래로 감소된 수준 (Nil 대조군)
JNK1	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
JNK2	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
JNK3	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
MEKK1	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
IκB-β	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
IκB-r	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
IL-2	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
IL-4	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)
IL-7γ	기저 수준으로 다시 감소된 수준 (Nil 대조군)

14-3-3	약간 감소된 수준
STAT6	약간 감소된 수준
IκB-ε	약간 감소된 수준
IκB-α	약간 감소된 수준
VAV	효과 없음
STAT2	효과 없음

<205> 실시예 15:

<206> MC/9 마우스 섬유아세포 세포주(ATCC, catalog no. CRL-8305)의 세포를 25,000 세포/웰로 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 두었다. 배양 배지는 10% FCS가 포함된 DMEM(Delbecco's Modified Eagle's Medium)(Cambrex)이다. Nil 대조군 웰에는 첨가제를 첨가하지 않았다. 나머지 웰에는 25 ng/ml의 마우스 신경 성장 인자(NGF) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 또는 25 ng/ml NGF 중 어느 하나와 5% TSTIM(BD Biosciences사의 콘카나발린 A를 포함하며 랫에서 준비한 배양 보충물)을 가하였다. 또한, 다음과 같은 첨가제를 세포에 첨가되었다: 물(비히클 대조군); 5 μg/ml의 식 II의 화합물(Cpd II); 15 μg/ml의 Cpd II; 또는 30 μg/ml의 Cpd II. 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>에서 72시간 인큐베이션한 후, 실시예 1에 기술된 바와 같이 프로메가 세포 역가 분석으로 세포 증식을 평가하였다. 결과는 하기 표 12에 나타낸다.

표 12

첨가제	평균 OD 530 nm
첨가제 없이	0.058±0.008
NGF	0.116±0.029
NGF + 물	0.101±0.022
NGF + 1 μg/ml Cpd II	0.117±0.015
NGF + 5 μg/ml Cpd II	0.108±0.012
NGF + 15 μg/ml Cpd II	0.049±0.016
NGF + TSTIM	0.490±0.047
NGF + TSTIM + 물	0.365±0.026
NGF + TSTIM + 1 μg/ml Cpd II	0.428±0.027
NGF + TSTIM + 5 μg/ml Cpd II	0.373±0.016
NGF + TSTIM + 15 μg/ml Cpd II	0.326±0.024

<209> 실시예 16:

<210> THP-1 세포를 250,000 세포/ml 농도로 배지(10% FCS와 8 ng/ml 모노티오글리세롤을 포함하는 RPMI)에 접종하여, 5 μg/ml의 식 II의 화합물(Cpd II) 또는 15 μg/ml의 Cpd II와 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 인큐베이션하였다. 1시간 후, 리포폴리사카라이드(LPS)를 배양액에 최종 농도 200 ng/ml로 첨가하고, 세포를 24시간 더 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 실시예 12에 기술된 바와 같이, NFκB와 c-Jun의 함량을 측정하였다. 또한, Active Motif North America, Carlsbad, CA의 핵 추출 키트 및 TransAM™ NFκB p65/NFκB p50 전사 인자 분석 키트로 제조사의 지침안에 따라 c-Fos 함량을 측정하였다. 간략하게는, 세포의 핵 추출물을 핵 추출 키트로 제조하였다. 이후, 핵 추출물을, TPA-반응 요소(TRE)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 고정화된 96-웰 플레이트의 웰에 가하였다. 핵 추출물에 포함된 활성자 단백질-1(AP-1) 다이머를 상기 올리고뉴클레오타이드에 결합시킨 다음, c-Fos에 특이적인 항체를 사용하여 검출하였다. 이후, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)에 결합된 이차 항체를 첨가하여, 분광광도계(450 nm에서 측정)에 의해 정량화되는 비색 판독을 실시하였다. 결과는 도 9A-B에 도시되어 있다.

<211> 실시예 17:

<212> 10일 TRiPS 세포  $1 \times 10^6$ 을  $15 \mu\text{g/ml}$ 의 식 II의 화합물(Cpd II)과 함께  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 CD3/CD28 비드( $100,000$  세포당  $1 \mu\text{l}$ ) (Dynal)와 함께  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분간 인큐베이션하였다. 세포를 온화한 완충액(하기 기술된 Pierce EZ-Detect 활성화 키트에 공급)으로 용혈시켜, 세포 추출물을 제조하였다. 수득되는 추출물의 단백질 농도는 비신코닌산(bicinchoninic acid; BCA) 분석(Pierce)에 의해 결정하였고, 즉각적인 사용을 위해 얼음 위에 두었다.

<213> Ras와 RAP-1 각각에 대해 GST-RAF-1-RBD 및 GST-Ra1GDS-RBD를 이용하는 제조업자의 지침안에 따라, Pierce EZ-Detect 활성화 키트를 사용하여 풀다운(Pulldown) 분석을 수행하였다. 간략하게, 각 추출물 유래의 총 단백질  $400 \mu\text{g}$ 을 제조합 단백질 및 글루타티온 수지와 조합하여, 가볍게 교반하면서 1시간 동안  $4^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 이후, 수지를 행구어 비결합 단백질을 제거하고, 환원제를 포함하는 SDS-PAGE 로딩 염료(loading dye) 하에 끓여 활성화된 Ras와 RAP-1 단백질을 제거하였다. Ras와 RAP-1 웨스턴 블롯을 수행하여, 키트와 함께 공급된 항체를 사용하여 단백질을 가시화하였다. X-선 필름 분석(densitometry)은 스캐닝 및 컴퓨터 분석에 의해 수행하였다.

<214> 결과는 표 13에 나타난다. 표 13에서 알 수 있는 바와 같이, Cpd II와의 TRiPS 세포 배양은 Ras 단백질의 매우 강한 저해를 초래하였다. CD3/CD28 비드를 이용한 세포 자극은 예상한 바와 같이 RAP-1 단백질 함량을 증가시킨 않았지만, Cpd II도 RAP-1를 저해하는 것으로 나타났다.

<215> 표 13

처리	RAS 분석에서의 집적 광학 밀도	RAP-1 분석에서의 집적 광학 밀도
무처리	66.83	259.27
CD3/CD28 비드 단독	245.91	213.66
CD3/CD28 비드 + $15 \mu\text{g/ml}$ Cpd II	84.98	87.26

<217> 전술한 본 발명은 예시하고 설명하기 위한 목적으로 제시되었다. 전술한 사항은 본 발명을 본원에 개시된 형태 또는 형태들로 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 설명에서 하나 이상의 양태 및 일부 변형 및 수정이 포함되어 있지만, 본 발명을 숙지한 후 당업자의 기술 및 지식 수준내에서 행해질 수 있는 바와 같은, 다른 변형 및 수정도 본 발명의 범위에 포함된다. 대안적이고, 상호호환가능하며 및/또는 동등한 구조, 기능, 범위 또는 단계가 본원에 개시되어 있거나 또는 개시되어 있지 않던지 간에, 청구한 사항에 대한 대안적이고, 상호호환가능하며 및/또는 동등한 구조, 기능, 범위 또는 단계를 포함한, 대안적인 양태를 허용가능한 수준으로 포함하는 권리를 갖는 것으로 의도되며, 어떠한 특허 가능한 대상도 공용으로 제공하고자하는 의도는 아니다.

**도면의 간단한 설명**

<105> 도 1A-C는 각각 피토휘마글루티닌(PHA)  $2 \mu\text{g/ml}$ ,  $5 \mu\text{g/ml}$  및  $20 \mu\text{g/ml}$ 로 자극된 말초 혈액 림프구(PBL) 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한  $530 \text{ nm}$ 에서의 OD 그래프이다.

<106> 도 2는  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한  $530 \text{ nm}$ 에서의 OD 그래프이다.

<107> 도 3은  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한 IL-13의 농도 그래프이다.

<108> 도 4는  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한 IFN  $\gamma$  농도 그래프이다.

<109> 도 5A-B는 각각  $2 \mu\text{g/ml}$  및  $5 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한  $530 \text{ nm}$ 에서의 OD 그래프이다.

<110> 도 6은  $5 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한 IL-13 농도 그래프이다.

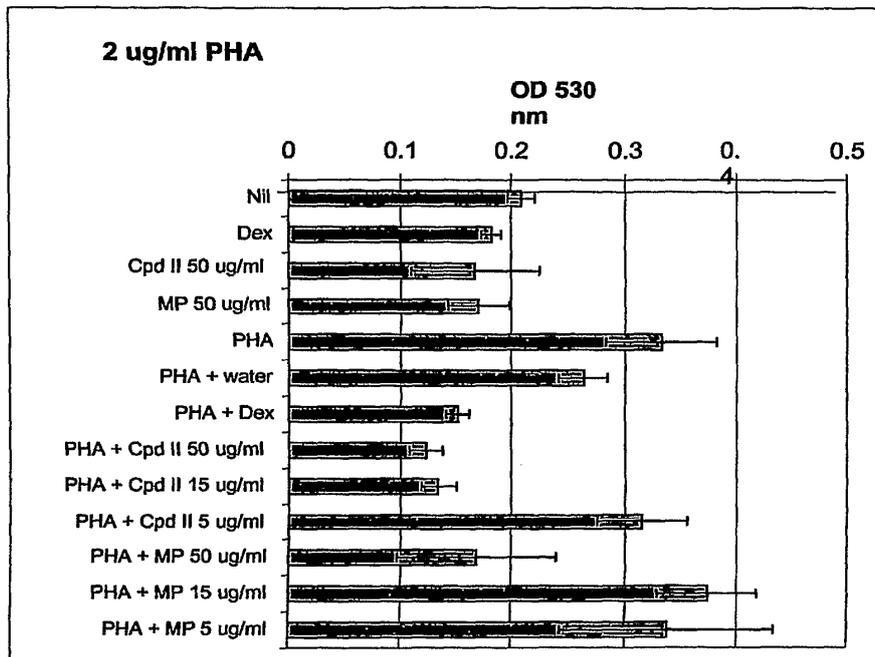
<111> 도 7은  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한 TNF  $\alpha$  농도 그래프이다.

<112> 도 8은  $2 \mu\text{g/ml}$  PHA로 자극된 PBL 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한 IL-8 농도 그래프이다.

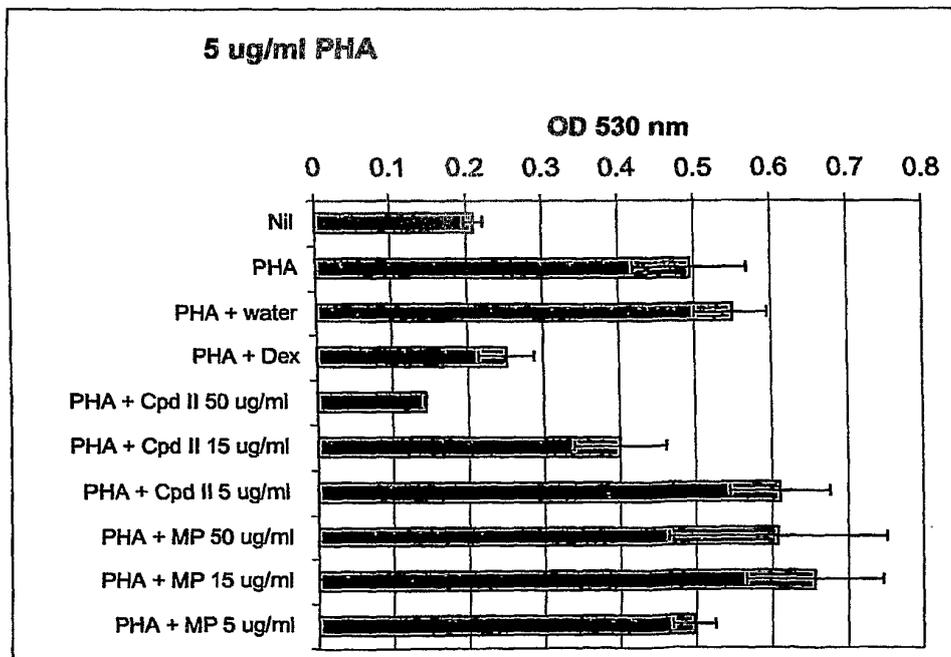
<113> 도 9A-B는 리포폴리사카라이드(LPS)로 자극된 THP-1 단핵세포 배양액에서의 다양한 첨가제에 대한 OD 그래프이다. 도 9B에서, 각 경우에서 상부 암회색 막대는 c-Jun이고, 하부 연회색 막대기는 NF  $\kappa$ B이다.

도면

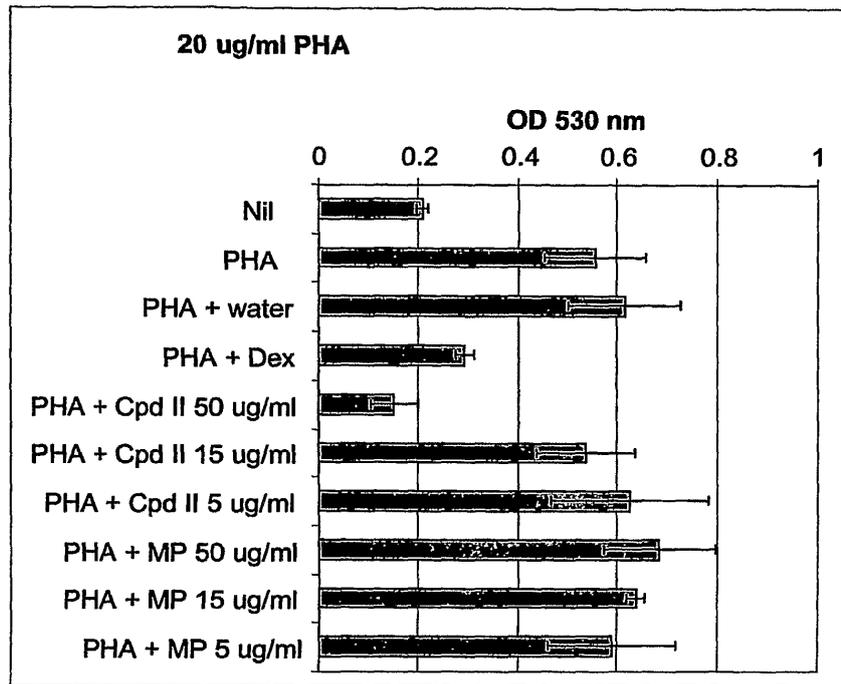
도면1A



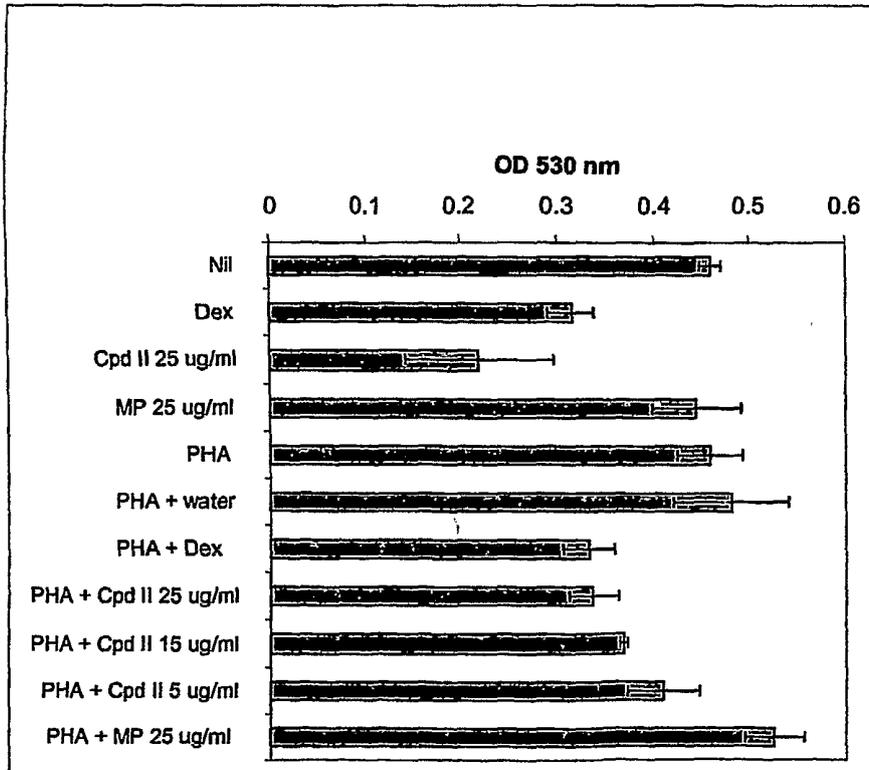
도면1B



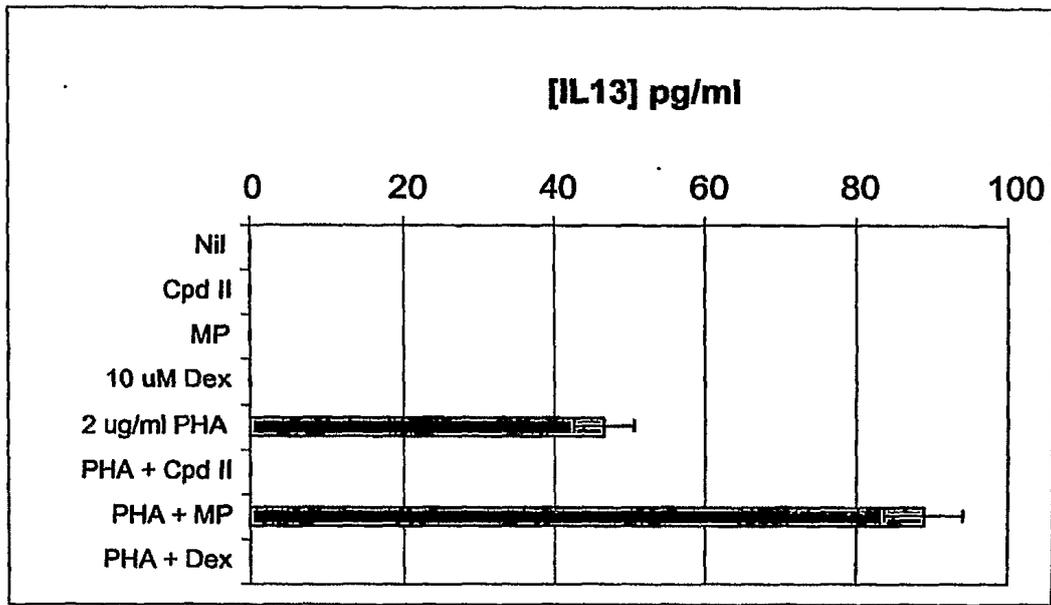
도면1C



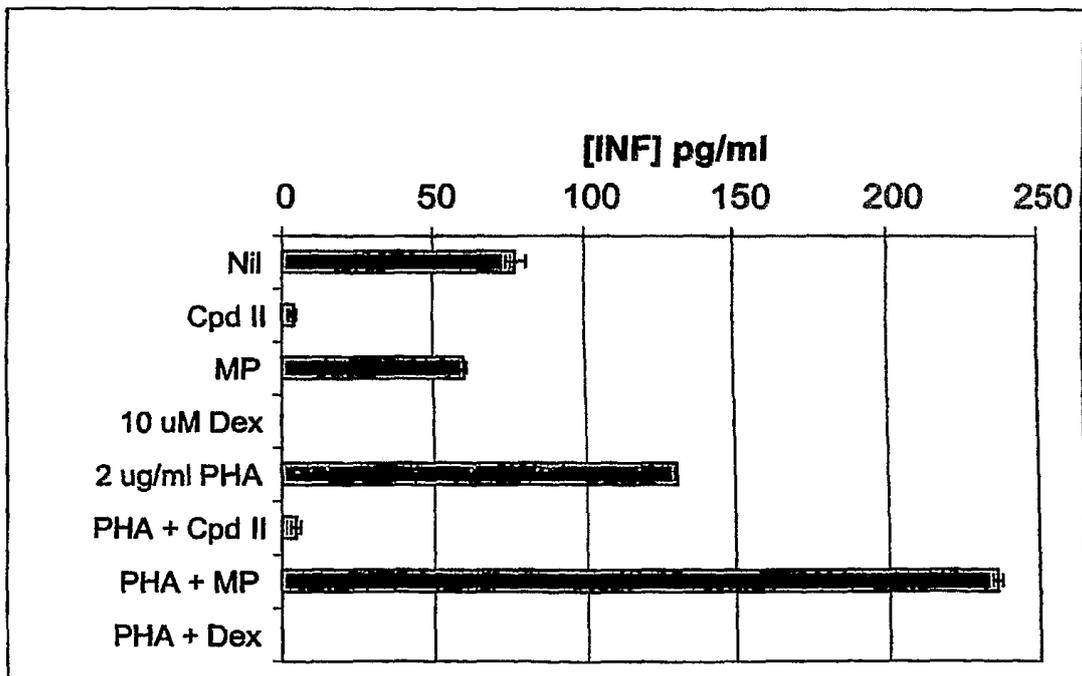
도면2



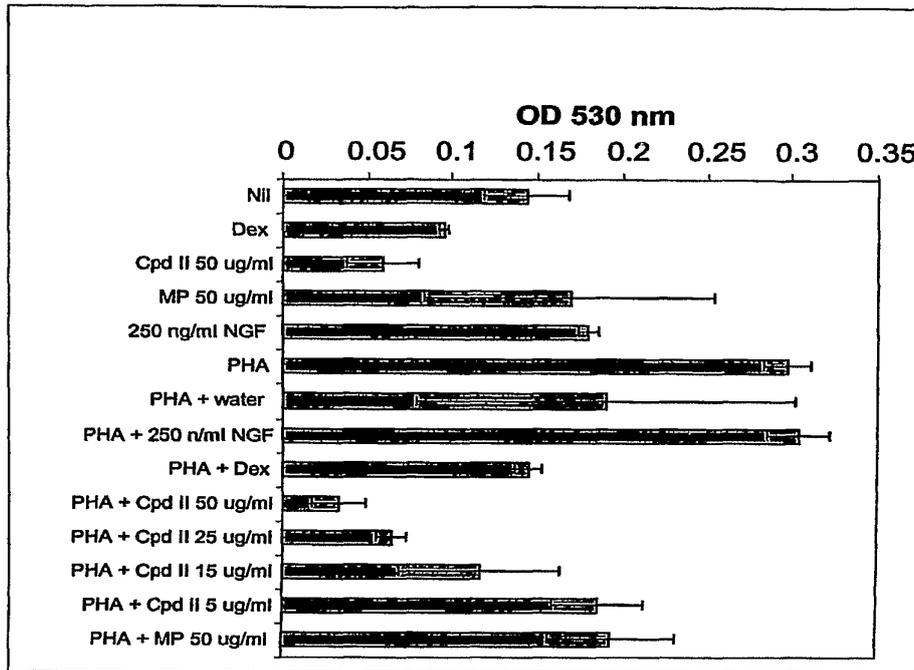
도면3



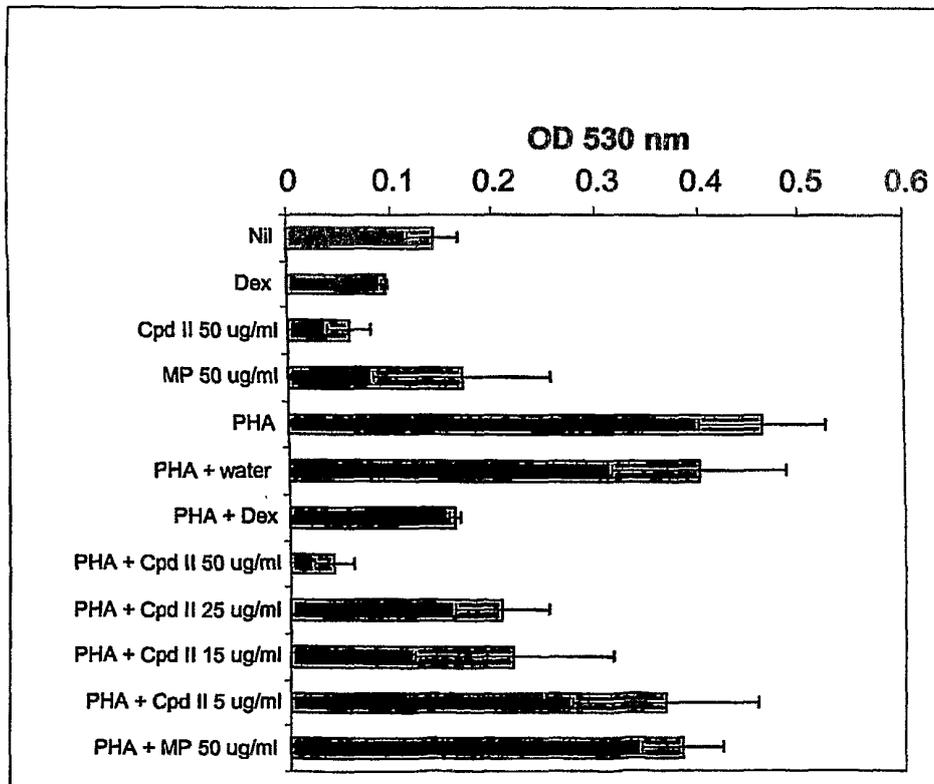
도면4



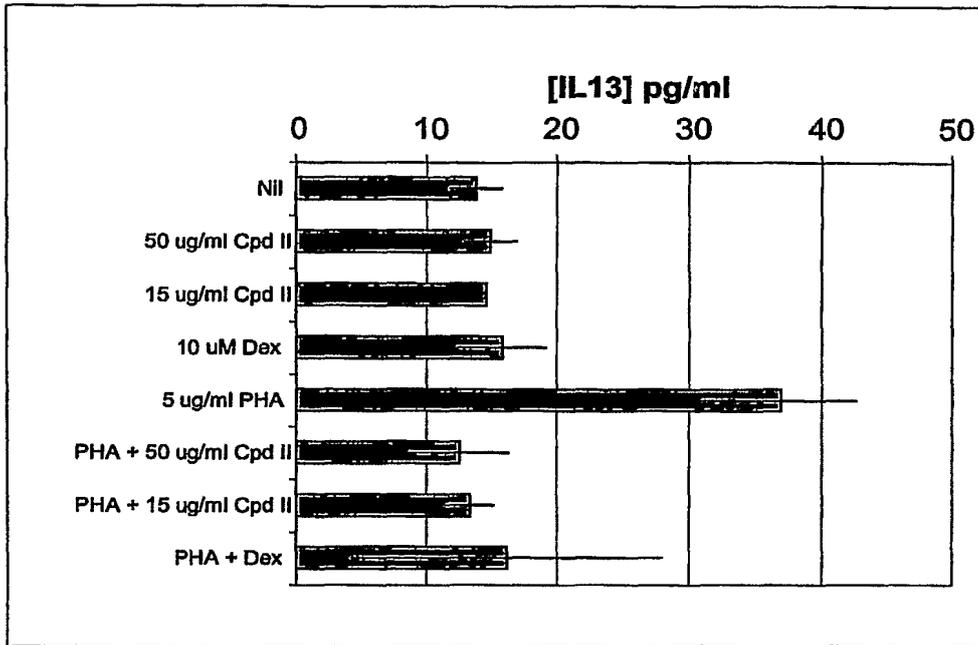
도면5A



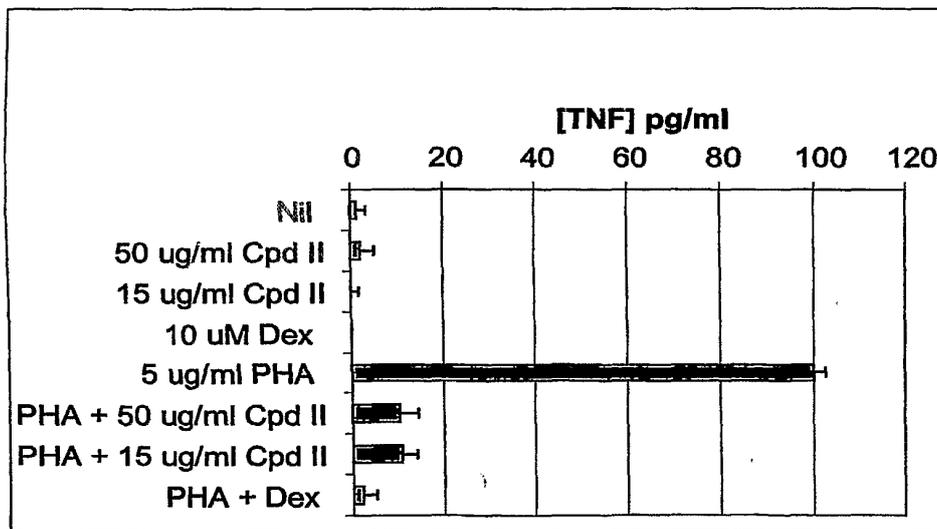
도면5B



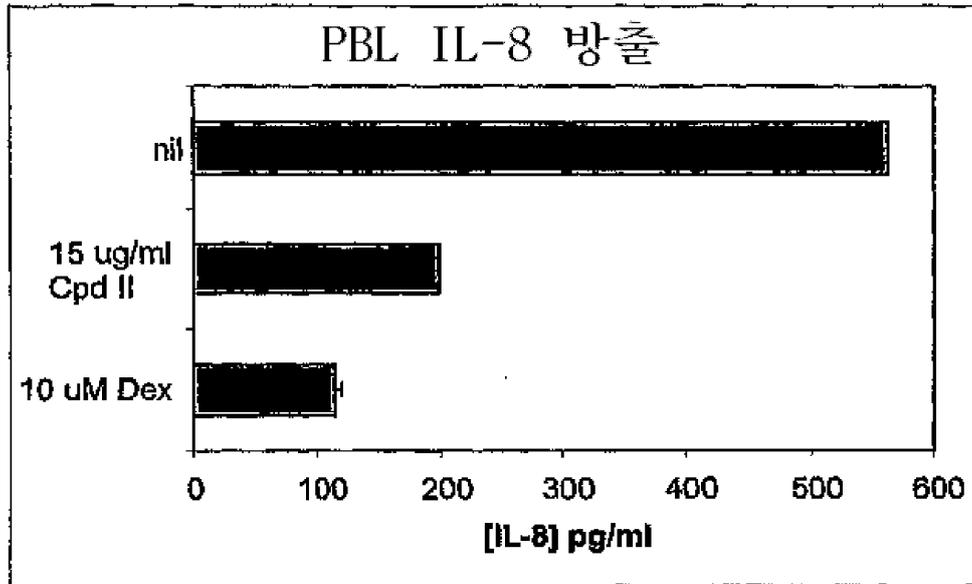
도면6



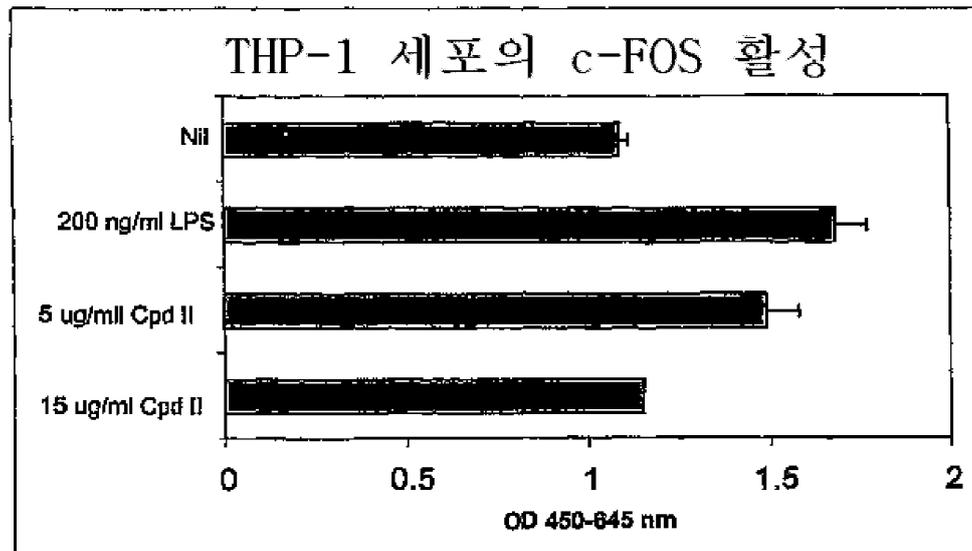
도면7



도면8



도면9A



도면9B

