



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년07월05일  
 (11) 등록번호 10-1636395  
 (24) 등록일자 2016년06월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07D 339/04* (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7029417
- (22) 출원일자(국제) 2010년05월13일  
 심사청구일자 2015년04월06일
- (85) 번역문제출일자 2011년12월08일
- (65) 공개번호 10-2012-0018188
- (43) 공개일자 2012년02월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/034701
- (87) 국제공개번호 WO 2010/132657  
 국제공개일자 2010년11월18일
- (30) 우선권주장  
 12/466,170 2009년05월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 WO2006101909 A2\*  
 WO2006101910 A1  
 WO2001036454 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
**이쉐믹스 엘엘씨**  
 미국 매사추세츠 메이나르드 그레이트 로드 63 (우:01754)
- (72) 발명자  
**바구이시, 알렉산더, 비.**  
 미국 01519 매사추세츠 그라프톤 밀버리 스트리트 9  
**비우위키스, 라이니어**  
 미국 01742-5322 매사추세츠 쿡코드 모뉴먼트 스트리트 1360  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**특허법인 남앤드남**

전체 청구항 수 : 총 11 항

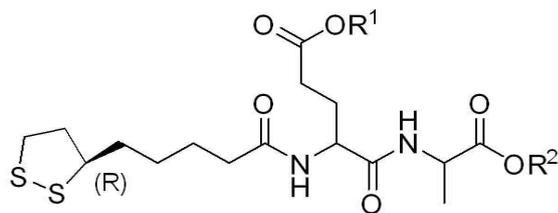
심사관 : 김용원

**(54) 발명의 명칭 허혈 및 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 조성물 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 일부 실시 형태에서, 실질적으로 순수한 구조식 I로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물, 및 그러한 화합물을 세포보호 키나아제를 활성화하는 데 사용하는 방법에 관한 것이다. 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물의 유효량을 (예를 들어, 다회 용량으로) 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이다. 구조식 I에서의 변수의 값 및 바람직한 값은 본 명세서에 정의되어 있다.

[구조식 I]



(72) 발명자

**캐슬, 랄프**

미국 01886 매사추세츠 웨스트포드 사우쓰 웰름스  
포드 로드 41

**케이츠, 스티븐, 에이.**

미국 02494 매사추세츠 니드햄 우드빈 씨클 142

**라더, 알렌, 에스.**

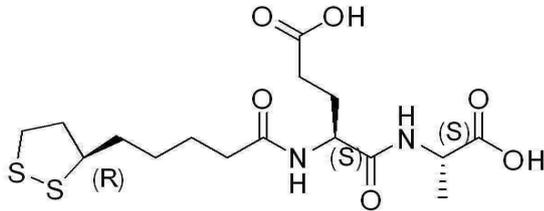
미국 02072 매사추세츠 스토우톤 헌트 드라이브 36

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조식으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하고



상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 90% 이상이 거울상 이성체적으로 순수한, 허혈 또는 허혈 재관류 손상의 치료 또는 예방을 위한 약제 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 약학적으로 허용되는 염이 1가 양이온 또는 2가 양이온을 포함하는, 약제 조성물.

청구항 6

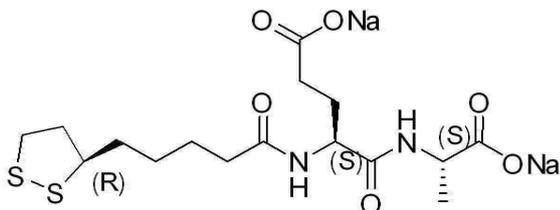
제 5항에 있어서, 1가 양이온이 1가 금속 양이온이고, 2가 양이온이 2가 금속 양이온인, 약제 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 염이 하기 구조식으로 표시되는, 약제 조성물:

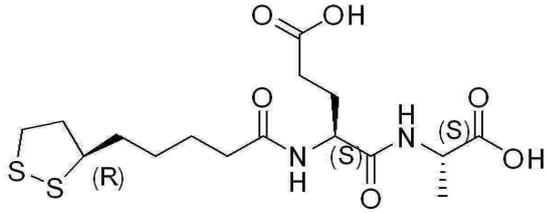


청구항 9

i) 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제; 및 ii) 제 1항에 정의된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 허혈 또는 허혈 재관류 손상의 치료 또는 예방을 위한 약제 조성물.

청구항 10

하기 구조식으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 혼합물로서,



상기 혼합물이 다른 입체 이성체에 대해, 90% 이상의 중량% 광학 순도(percent optical purity)의 상기 화합물을 갖는, 혼합물.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

제 10항에 있어서, 약학적으로 허용되는 염이 1가 양이온 또는 2가 양이온을 포함하는, 혼합물.

**청구항 14**

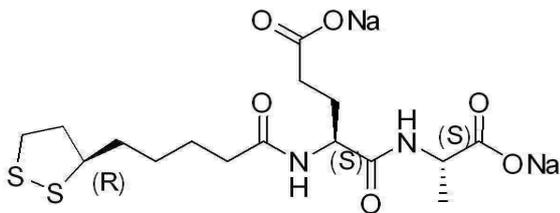
제 13항에 있어서, 1가 양이온이 1가 금속 양이온이고, 2가 양이온이 2가 금속 양이온인, 혼합물.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

제 10항에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 염이 하기 구조식으로 표시되는, 혼합물:



**청구항 17**

i) 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제; 및 ii) 제 10항의 혼합물을 포함하는, 허혈 또는 허혈 재관류 손상의 치료 또는 예방을 위한 약제 조성물.

**청구항 18**

제 10항에 있어서, 화합물이 99% 이상의 중량% 광학 순도를 가지는, 혼합물.

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제

- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

**발명의 설명**

**배경 기술**

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2009년 5월 14일자로 출원된 미국 출원 제12/466,170호의 일부계속출원이다. 상기 출원의 전체적인 교시 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 배경기술

[0004] 미국에서 심혈관 질환은 남성 및 여성 둘 모두에 있어서 주요 사망 원인이다. 미국에서만 매년 백만명 이상의 사람들이 심장 발작을 겪는다. 심근에 대한 감소된 혈류 및 산소를 특징으로 하는 상태(condition)인 심장 허혈은 궁극적으로 심장 발작 또는 심근 경색으로 이어질 수 있는 심혈관 질환의 한 가지 특징이다. 심혈관 질환은 또한 신체의 다른 부위에 제한된 혈류 및 감소된 산소 공급을 가져올 수 있으며, 그 결과 뇌를 포함한 다양한 기관 및 조직에 허혈성 손상(injury)가 발생할 수 있는데, 이때 뇌에 대한 허혈성 손상은 뇌졸중으로 이어질 수 있다.

[0005] 혈류의 재확립, 또는 재관류(reperfusion), 및 허혈성 에피소드 후에 이환된(affected) 부위의 재산소화(re-oxygenation)는 비가역적 손상(damage)을 제한하는 데 중요하다. 그러나, 재관류는 또한 잠재적으로 손상시키는 결과, 예를 들어 재관류 손상을 가져오는데, 이러한 재관류 손상은 허혈성 에피소드 후 관상 동맥 혈류의 회복이 그 원인이며, 재관류 동안의 반응성 산소종 및 질소종의 발생 및 축적으로부터 생긴다. 허혈 재관류 손상은 생화학적으로 허혈성 사건 동안의 산소의 고갈, 그 결과로 인한 세포내 칼슘 수준의 증가, 이에 이어지는 재산소화 및 이에 수반되는 재관류 동안의 반응성 산소종의 발생을 특징으로 한다(문헌[Piper, H. M., Abdallah, C., Schafer, C., The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Annals of Thoracic Surgery* 2003, 75:644]; 문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]). 재관류 손상은 심근 경색 후 심장에 대한 손상의 50%나 되는 것에 대한 원인이 될 수 있다(문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]).

[0006] 미국에서 및 전세계에 걸친 심혈관 질환의 유행은 심장 발작 또는 뇌졸중으로부터 발생하는 허혈 및 허혈 재관류 손상을 효과적으로 예방, 감소, 또는 반대작용(counteract)할 수 있는 치료법 및 치료제의 개발을 필요로 한다. 심근 경색에 의해 야기되는 허혈 및 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 현재의 치료법, 예를 들어 기계적 허혈 전조건화(ischemic preconditioning)는 임상적으로 실행불가능한 것으로 입증되었으며, 다른 치료법, 예를 들어 칼슘의 유입(influx)을 차단하기 위한 길항제 및 반응성 산소종의 포착제(scavenger)는 실망스러운 임상 결과를 내놓았다(문헌[Otani, H., Ischemic preconditioning: From molecule mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10:207]; 문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]).

[0007] 따라서, 심근 질환 및 다른 상태로부터 발생하는 허혈 및 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 새롭고 보다 효과

적인 치료법 및 치료제에 대한 상당한 필요성이 있다.

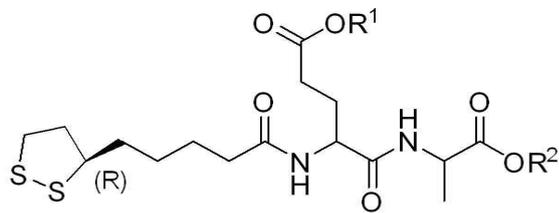
**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

[0008] 본 명세서에 기재된 발명은 아포토시스를 억제하는 세포 신호전달 경로에 관여하는 키나아제를 활성화함으로써, 그리고 반응성 산소종을 포착함으로써, 심근 허혈 및 허혈 재관류 손상을 포함한 허혈, 허혈성 손상 및 허혈 재관류 손상의 치료에 대한 필요성에 대처한다. 특히, 본 발명은 개시된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물, 및 세포보호 키나아제의 활성제로서의 그의 효과적인 사용에 관한 것이다.

[0009] 일 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이며:

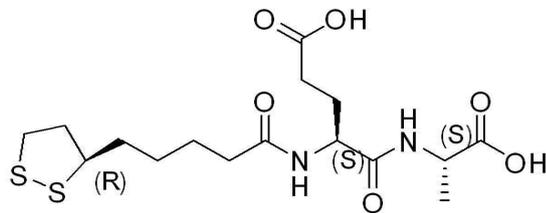
[0010] [구조식 I]



[0011] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

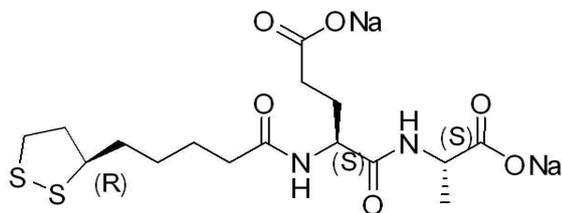
[0013] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

[0014] [구조식 II]



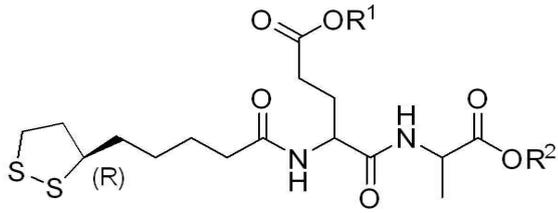
[0015] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 III으로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

[0017] [구조식 III]



[0018] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 i) 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제; 및 ii) 실질적으로 순수한 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이며:

[0020] [구조식 I]

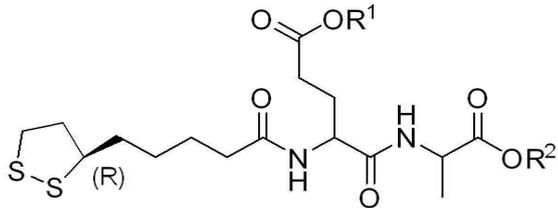


[0021]

[0022] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0023] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 세포를 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 적어도 하나의 세포보호 키나아제(예컨대, Akt 키나아제, IRK 키나아제, IGF1R 키나아제, Src 키나아제)를 활성화하는 방법에 관한 것이며:

[0024] [구조식 I]

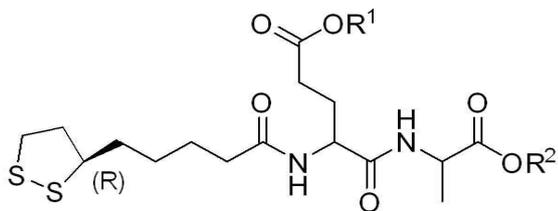


[0025]

[0026] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다. 특정 실시 형태에서, 세포보호 키나아제는 Akt 키나아제이거나, 또는 Akt 키나아제와 동일한 세포 신호전달 경로에서 기능하는 키나아제(예컨대, IRK 키나아제)이다.

[0027] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 포유류 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류 대상에서 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이며:

[0028] [구조식 I]

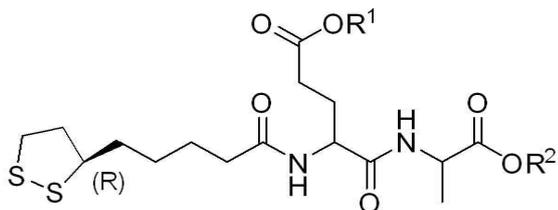


[0029]

[0030] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다. 특정 실시 형태에서, 허혈 또는 허혈 재관류 손상은 심근 허혈 또는 허혈 재관류 손상이다.

[0031] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 아픏토시스를 억제하는 방법에 관한 것이며:

[0032] [구조식 I]

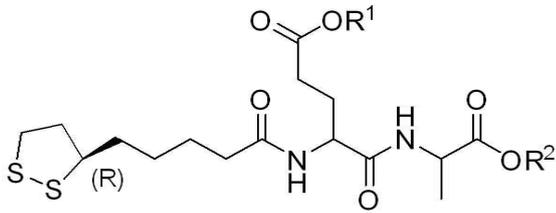


[0033]

[0034] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0035] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 시토줄 칼슘 과부하를 방지하는 방법에 관한 것이며:

[0036] [구조식 I]

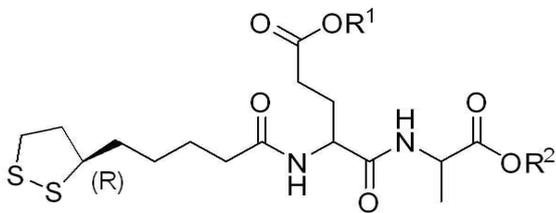


[0037]

[0038] 여기서,  $R^1$  및  $R^2$ 는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0039] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상(예컨대, 허혈을 앓고 있는 대상)에서 폐옥실 라디칼 흡수를 증가시키는 방법에 관한 것이며:

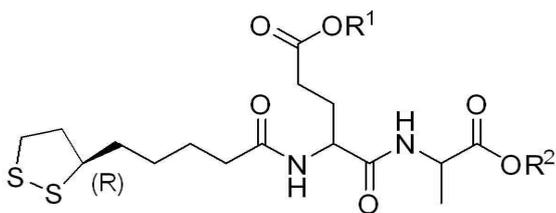
[0040] [구조식 I]



[0041]

[0042] 여기서,  $R^1$  및  $R^2$ 는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

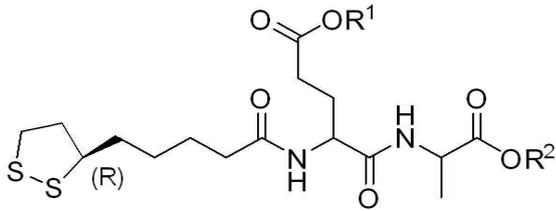
[0043] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 화합물의 다회 용량 투여를 포함하는, 포유류 대상에서 허혈, 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시 형태에서, 본 발명은 하기 구조식으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 적어도 2회의 용량을 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이며:



[0044]

[0045] 여기서, 상기 화합물 내의  $R^1$  및  $R^2$ 는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이고, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 적어도 90%가 거울상 이성체적으로 순수하다. 상기 방법은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 비최종 용량, 및 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 최종 용량을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 최종 용량은 손상 직전에 투여되고, 비최종 용량과 최종 용량은 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능을 화합물의 단회 용량 투여에 비하여 증강시키는 (potentiate) 투여 간격으로 투여된다.

[0046] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 하기 구조식으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 적어도 2회의 용량을 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법을 제공하며:



[0047]

[0048]

여기서, 상기 화합물 내의 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이고, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 적어도 90%가 거울상 이성체적으로 순수하다. 상기 방법은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 비최종 용량, 및 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 최종 용량을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 최종 용량은 손상 전 화합물의 약 2 반감기 이내의 시점에서 대상에게 투여되고, 비최종 용량은 최종 용량의 투여 전에 화합물의 적어도 약 4반감기가 되는 시점에서 대상에게 투여된다.

[0049]

본 명세서에 기재된 화합물 및 방법은 허혈, 허혈성 손상 및 허혈 재관류 손상의 치료에서 예상 외로 효과적이다. 특히, “R” 형태(configuration)의 리포일 부분을 갖는 본 발명의 화합물은 각각이 라세미 혼합물로서보다 거울상 이성체적으로 순수한 화합물로서 제공될 때 생체내에서 더 강력하며, 게다가 “S” 형태의 리포일 부분을 갖는 그들의 입체 이성체적 상대물(counterpart)보다 더 효과적이다. 추가적으로, 규칙적 간격으로 대상에게 약물의 다회 용량을 투여하여 대상에서 약물의 일정한 혈장 농도를 유지하는 것(예컨대, 4시간마다 또는 12시간마다의 경구 투여)이 일반적으로 약물의 효능을 지속시키게 될 것이지만 표준 약리학적 프로토콜에서 잘 받아들여져 있지는 않지만, 본 명세서에 기재된 용량 및 시간 간격으로의 본 발명의 화합물의 다회 용량의 투여는 허혈, 허혈성 손상 및 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 청구된 화합물의 효능을 지속시킬 뿐만 아니라 향상시키기도 한다. 특히, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 청구된 화합물의 다회 용량을, 청구된 화합물의 혈장 농도가 후속 용량을 투여하기 전에 화합물의 초기 최대 농도보다 훨씬 아래까지 감소될 수 있게 하는 투여 간격으로 투여하는 것은 표준 약리학적 프로토콜에 대한 직관에 반대되지만, 화합물 효능의 예상 외의 증강을 가져온다.

**도면의 간단한 설명**

[0050]

도 1은 RLip-EA-OH 및 관련 화합물에 대한 잠재적 작용 기전을 설명하는 제안된 세포 신호전달 경로를 나타낸 도표이다.

도 2는 A549 세포에서, 변화하는 농도에서의 RLip-EA-OH 및 RLip-OH가 Akt 인산화의 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 데이터는 배경이 제거된(background subtracted) 인산화된 Akt 대 전체 Akt의 비의 평균 ± sem (N = 4)으로서 제시된다.

도 3은 A549 세포에서, 변화하는 농도에서의 RLip-EA-OH가 단독으로, 또는 공지된 포스포티딜이노시톨-3'-키나아제 억제제인 LY294002의 존재 하에서 Akt 인산화의 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 데이터는 배경이 제거된 인산화된 Akt 대 전체 Akt의 비의 평균 ± sem (N = 4)으로서 제시된다.

도 4는 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서, 변화하는 농도에서의 RLip-EA-OH, Ac-EA-OH 및 RLip-OH가 칼슘 플럭스에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 데이터는 완충액만의 대조군의 백분율로서 시토졸 칼슘 수준을 평가하여 평균 ± sem (N = 4)으로서 제시된다.

도 5는 심근 허혈 재관류 손상의 래트 모델에서의 RLip-EA-OH의 효능을 나타낸 그래프이다. 데이터는 심근 경색 크기를 전체 위험 면적으로 나눈 비(MI/AR)로서 제시된다. 그 결과는 심장내 주사를 통해 1mg/kg의 RLip-EA-OH(N = 64) 대 식염수 비히클(N = 54)로 처리된 동물들의 메타 분석을 나타낸다. RLip-EA-OH로 처리된 동물들은 식염수 비히클을 투여받은 동물들과 비교하여 유의하게(p < 0.001) 감소된(33%) 경색 면적(사멸 조직) 대 위험 면적 비를 나타내었다.

도 6은 심장 허혈 재관류 손상의 래트 모델에서, 1mg/mL의 RLip-EA-OH의 심장내 투여의 시기가 심근 손상의 감소에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 데이터는 심근 경색 크기를 전체 위험 면적으로 나눈 비(MI/AR)로서 제시되고, 평균 ± sem (N = 12 내지 15/집단)으로서 표시된다. 결과는 RLip-EA-OH에 의한 처리가 폐색 전(pre-occlusion) 15분에 식염수 비히클을 투여받은 동물들과 비교하여, 폐색 전 15분(폐색 전, 38%), 폐색 후 15분

(폐색 동안, 24%), 및 재관류 후 1분 이내(재관류시, 32%)에 투여되었을 때 심근 조직 사멸을 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소시켰음을 나타낸다.

도 7은 심근 허혈 재관류 손상의 래트 모델에서 RLip-EA-OH의 상이한 용량의 영향을 나타낸 그래프이다. RLip-EA-OH를 폐색 전 15분에 정맥내(IV) 또는 좌심실 심장내(intra left ventricular cardiac, IC) 투여에 의해 투여하였다. 데이터는 심근 경색 크기를 전체 위험 면적으로 나눈 비(MI/AR)로서 제시되고, 평균  $\pm$  sem ( $N = 10$  내지 12/집단)으로서 표시된다. 결과는 RLip-EA-OH에 의한 처리가 심근 조직 사멸을 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소시켰으며 용량 의존적이었음을 나타낸다.

도 8은 심근 허혈 재관류 손상의 래트 모델에서 평가된, 정맥내 투여된 RLip-EA-OH에 대한 상이한 단회 및 다회 투여 처방계획의 생체내 효능을 비교하는 그래프를 나타낸다.

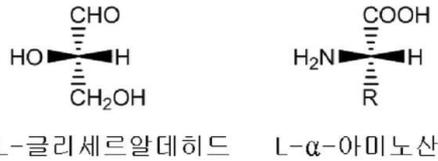
도 9a 및 도 9b는 선형(도 9a) 및 반로그(도 9b) 눈금에서의 사람 평균 혈장 RLip-EA-OH 농도 대 시간 데이터를 그린 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 정의
- [0052] 용어 “알킬”은 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 의미하며, 예를 들어 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, *sec*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *n*-펜틸, *n*-헥실, *n*-헵틸, *n*-옥틸, *n*-노닐, *n*-데실 등을 포함한다.
- [0053] 용어 “사이클로알킬”은 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 단환식, 이환식 또는 삼환식의 포화 탄화수소 고리를 의미하며, 예를 들어 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 사이클로옥틸, 바이사이클로[2.2.2]옥틸, 바이사이클로[2.2.1]헵틸, 스피로[4.4]노난, 아다만틸 등을 포함한다.
- [0054] 용어 “아릴”은 페닐 기, 나프틸 기, 인다닐 기 또는 테트라하이드로나프탈렌 기인 방향족 라디칼을 의미한다. 아릴 기는 1 내지 4개의 치환기로 선택적으로 치환된다. 예시적인 치환기에는 알킬, 알콕시, 알킬티오, 알킬설폰, 할로젠, 트리플루오로메틸, 디알킬아미노, 니트로, 시아노, CO<sub>2</sub>H, CONH<sub>2</sub>, *N*-모노알킬 치환된 아미도 및 *N,N*-디알킬 치환된 아미도가 포함된다.
- [0055] 용어 “헤테로아릴”은 N, O 및 S로부터 선택되는 0 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 포화 또는 불포화 고리에 선택적으로 융합될 수 있는 5원 또는 6원 헤테로방향족 라디칼을 의미하며, 예를 들어 2- 또는 3-티에닐, 2- 또는 3-푸라닐, 2- 또는 3-피롤릴, 2-, 3-, 또는 4-피리딘, 2-피라지닐, 2-, 4-, 또는 5-피리미디닐, 3- 또는 4-피리다지닐, 1*H*-인돌-6-일, 1*H*-인돌-5-일, 1*H*-벤즈이미다졸-6-일, 1*H*-벤즈이미다졸-5-일, 2-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8-퀴나졸리닐, 2-, 3-, 5-, 6-, 7- 또는 8-퀴놀살리닐, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8-퀴놀리닐, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8-이소퀴놀리닐, 2-, 4-, 또는 5-티아졸릴, 2-, 3-, 4-, 또는 5-피라졸릴, 2-, 3-, 4-, 또는 5-이미다졸릴인 헤테로방향족 라디칼을 포함한다. 헤테로아릴은 선택적으로 치환된다. 예시적인 치환기에는 알킬, 알콕시, 알킬티오, 알킬설폰, 할로젠, 트리플루오로메틸, 디알킬아미노, 니트로, 시아노, CO<sub>2</sub>H, CONH<sub>2</sub>, *N*-모노알킬 치환된 아미도 및 *N,N*-디알킬 치환된 아미도가 포함되거나, 또는 옥소에 의해서는 *N*-옥사이드를 형성한다.
- [0056] 용어 “헤테로사이클릴”은 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 4원, 5원, 6원 또는 7원 포화 또는 부분 불포화 복소환식 고리를 의미한다. 예시적인 헤테로사이클릴에는 피롤리딘, 피롤리딘-2-온, 1-메틸피롤리딘-2-온, 피페리딘, 피페리딘-2-온, 2-피리돈, 4-피리돈, 피페라진, 1-(2,2,2-트리플루오로에틸)피페라진, 피페라진-2-온, 5,6-디하이드로피리미딘-4-온, 피리미딘-4-온, 테트라하이드로푸란, 테트라하이드로피란, 테트라하이드로티오펜, 테트라하이드로티오피란, 이속사졸리딘, 1,3-디옥솔란, 1,3-디티올란, 1,3-디옥산, 1,4-디옥산, 1,3-디티안, 1,4-디티안, 옥사졸리딘-2-온, 이미다졸리딘-2-온, 이미다졸리딘-2,4-디온, 테트라하이드로피리미딘-2(1*H*)-온, 모르폴린, *N*-메틸모르폴린, 모르폴린-3-온, 1,3-옥사지난-2-온, 티오모르폴린, 티오모르폴린 1,1-디옥사이드, 테트라하이드로-1,2,5-티아옥사졸 1,1-디옥사이드, 테트라하이드로-1,2,5-티아디아졸 1,1-디옥사이드, 헥사하이드로-1,2,6-티아디아진 1,1-디옥사이드, 테트라하이드로-1,2,5-티아디아졸 1,1-디옥사이드 및 이소티아졸리딘 1,1-디옥사이드가 포함된다. 헤테로사이클릴은 1 내지 4개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다. 예시적인 치환기에는 알킬, 할로알킬 및 옥소가 포함된다.
- [0057] 개시된 화합물 중 일부는 다양한 입체 이성체 형태로 존재할 수 있다. 입체 이성체는 단지 그들의 공간적 배치

만이 상이한 화합물이다. 거울상 이성체는 서로 포괄 수 없는 거울상인 입체 이성체의 쌍들인데, 그 이유는 가장 일반적으로 그들이 키랄 중심으로서 작용하는 비대칭적으로 치환된 탄소 원자를 함유하기 때문이다. “거울상 이성체”는 서로 거울상인 한 쌍의 분자 중 하나를 의미하며, 포괄 수 없다. 부분입체 이성체는 거울상으로서 관련되지 않는 입체 이성체인데, 그 이유는 가장 일반적으로 그들이 2개 이상의 비대칭적으로 치환된 탄소 원자를 함유하기 때문이다. 구조식에서의 기호 “\*”는 키랄 탄소 중심의 존재를 나타낸다. “R” 및 “S”는 하나 이상의 키랄 탄소 원자 주위의 치환기의 형태를 나타낸다. 따라서, “R\*” 및 “S\*”는 하나 이상의 키랄 탄소 원자 주위의 치환기의 상대 형태를 나타낸다.

- [0058] “라세미체” 또는 “라세미 화합물”은 등몰량의 2개의 거울상 이성체의 화합물을 의미하며, 여기서 그러한 혼합물은 광학적 활성을 나타내지 않으며, 즉 그들은 편광면을 회전시키지 않는다.
- [0059] “좌선성(levorotatory)”은 편광이 비대칭 화합물을 통과할 때 좌측으로 회전됨을 의미한다. 좌선성을 나타내기 위한 접두사는 “l”이다.
- [0060] “우선성(dextrorotatory)”은 편광이 비대칭 화합물을 통과할 때 우측으로 회전됨을 의미한다. 우선성을 나타내기 위한 접두사는 “d”이다.
- [0061] “기하 이성체”는 탄소-탄소 이중 결합, 사이클로알킬 환, 또는 가교된 이환식 시스템과 관련하여 치환 원자의 배향이 상이한 이성체를 의미한다. 탄소-탄소 이중 결합의 각 측 상의 (수소 이외의) 원자들은 E 형태(치환기들이 탄소-탄소 이중 결합의 반대되는 측들 상에 있음) 또는 Z 형태(치환기들이 동일한 측 상에 배향됨)일 수 있다.
- [0062] 개시된 화합물의 입체화학이 명명되거나 구조로 도시될 때, 명명되거나 도시된 입체 이성체는 나머지 다른 입체 이성체에 대해 상대적으로 적어도 60중량%, 70중량%, 80중량%, 90중량%, 99중량% 또는 99.9중량%이다. 단일 거울상 이성체가 명명되거나 구조로 도시될 때, 도시되거나 명명된 거울상 이성체는 적어도 60중량%, 70중량%, 80중량%, 90중량%, 99중량% 또는 99.9중량%가 광학적으로 순수하다. 중량%광학 순도는 (거울상 이성체의 중량 + 그의 광학 이성체의 중량)에 대한 거울상 이성체의 중량의 비이다.
- [0063] 개시된 화합물이 적어도 하나의 키랄 중심을 갖고, 입체화학을 나타내지 않고서 명명되거나 구조로 도시될 때, 이러한 명칭 또는 구조는 상응하는 광학 이성체가 없는 당해 화합물의 하나의 거울상 이성체, 당해 화합물의 라세미 혼합물 및 하나의 거울상 이성체가 그의 상응하는 광학 이성체에 비하여 풍부한 혼합물을 포함함이 이해되어야 한다.
- [0064] 개시된 화합물이 적어도 2개의 키랄 중심을 갖고, 입체화학을 나타내지 않고서 명명되거나 구조로 도시될 때, 이러한 명칭 또는 구조는 다른 부분입체 이성체가 없는 부분입체 이성체, 다른 부분입체 이성체 쌍들이 없는 한 쌍의 부분입체 이성체, 부분입체 이성체의 혼합물, 부분입체 이성체 쌍들의 혼합물, 하나의 부분입체 이성체가 나머지 다른 부분입체 이성체(들)에 비하여 풍부한 부분입체 이성체의 혼합물 및 하나의 부분입체 쌍이 나머지 다른 부분입체 이성체 쌍(들)에 비하여 풍부한 부분입체 이성체 쌍들의 혼합물을 포함함이 이해되어야 한다.
- [0065] 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 본 발명의 화합물에서, 명칭 “E”, “Z”, “시스” 및 “트랜스”는 코어 분자에 대한 상대 형태를 나타낸다.
- [0066] 아미노산은 다양한 입체 이성체 형태로 존재할 수 있다. 글리세르알데히드의 비대칭 탄소 원자 주위의 기의 배치와 비교하여, 아미노산의 비대칭 탄소 원자 주위의 기의 형태를 설명하는 데 피셔(Fischer) 변환이 일반적으로 사용된다. α-아미노산의 경우, C<sub>α</sub> 원자 주위의 아미노, 카복실, R(즉, 측쇄) 및 H 기는 글리세르알데히드의 하이드록실, 알데히드, CH<sub>2</sub>OH, 및 H 기에 각각 상응한다:



[0067]

[0068]

L-글리세르알데히드와 L- $\alpha$ -아미노산은 동일한 상대 형태를 갖고, D-글리세르알데히드와 D- $\alpha$ -아미노산은 동일한 상대 형태를 갖는다. L 또는 D 명칭은 아미노산이 편광면을 회전하는 능력을 나타내지 않는다. 많은 L-아미노산은 우선성을 갖는다.

[0069]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, “실질적으로 순수한”은 도시되거나 명명된 화합물이 적어도 약 60 중량%임을 의미한다. 예를 들어, “실질적으로 순수한”은 약 60%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%, 또는 70% 내지 100%의 백분율을 의미할 수 있다. 일 실시 형태에서, “실질적으로 순수한”은 도시되거나 명명된 화합물이 적어도 약 75%임을 의미한다. 특정 실시 형태에서, “실질적으로 순수한”은 도시되거나 명명된 화합물이 적어도 약 90 중량%임을 의미한다. 구조식 I로 표시되는 화합물을 포함하는 실질적으로 순수한 조성물은 구조식 IV, 구조식 V, 구조식 VI 또는 구조식 VII로 표시되는 4가지 화합물을 단독으로, 또는 그의 임의의 조합으로 포함할 수 있다.

[0070]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, “유효량”은 투여의 조건 하에서, 시험관내에서, 생체내에서 또는 생체외에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 양이며, 예를 들어 세포에서 하나 이상의 세포보호 키나아제를 활성화하기에 충분한 양, 세포의 아포토시스를 억제하기에 충분한 양 및 (예컨대, 대상에서) 허혈 및 허혈 재관류 손상을 억제(예컨대, 예방, 지연)하기에 충분한 양이다. 치료의 효과는 본 명세서에 기재된 것들을 포함한 당업자에게 공지된 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0071]

본 명세서에 정의된 바와 같이, “치료적 유효량”은 투여의 조건 하에서 치료적 또는 예방적 효과를 필요로 하는 대상에서 원하는 치료적 또는 예방적 효과를 달성하기에 충분한 양이며, 예를 들어 대상에서 (예컨대, 대상에서 하나 이상의 이환된 세포의 아포토시스를 억제함으로써) 허혈 및 허혈 재관류 손상을 억제(예컨대, 예방, 지연)하기에 충분한 양이다. 치료의 효과는 당업자에게 공지된 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0072]

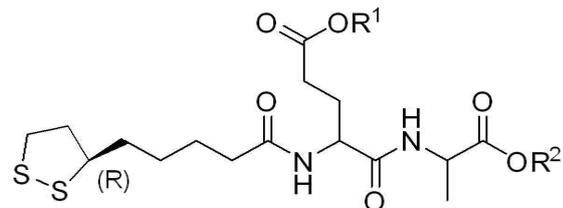
본 발명은 본 명세서에 기재된 리포산 유도체 화합물이 세포보호 및 항산화 특성을 갖는다는 출원인의 발견에 일부 기초한다. 특히, 출원인은 특정 리포산 유도체, RLip-EA-OH가 아포토시스를 억제하고 세포 생존을 촉진하는 세포 신호전달 경로를 매개하는 것으로 알려진 Akt 키나아제 및 다른 키나아제(예컨대, IRK, IGF1R, Src)를 활성화한다는 것을 밝혔다(도 1). 출원인은 RLip-EA-OH가 심근 허혈 재관류 손상의 동물 모델에서 허혈 및 허혈 재관류 손상의 정도를 감소시킬 수 있다는 것을 추가로 밝혔다.

[0073]

일 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이며:

[0074]

[구조식 I]



[0075]

[0076]

여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0077]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 “가수분해성 기”는 본 발명의 분자에 존재할 때, 가수분해시 카르복실

산 또는 그의 염을 생성하는 부분을 말한다. 가수분해는 예를 들어 생리적 환경(예컨대, 혈액, 대사적으로 활성인 조직, 예를 들어 간, 신장, 폐, 뇌) 내에서 산성 또는 염기성 조건 하에서 자발적으로 일어날 수 있거나, 또는 효소(들)(예컨대, 에스테라아제, 펩티다아제, 하이드로라아제, 옥시다아제, 데하이드로게나아제, 리아제 또는 리가아제)에 의해 촉매될 수 있다. 가수분해성 기는 본 발명의 화합물에 대해 생체내에서 유리한 특성, 예를 들어 개선된 수용해성, 혈액 중에서의 개선된 순환 반감기, 개선된 흡수, 개선된 작용 지속시간, 또는 개선된 작용 개시를 부여할 수 있다.

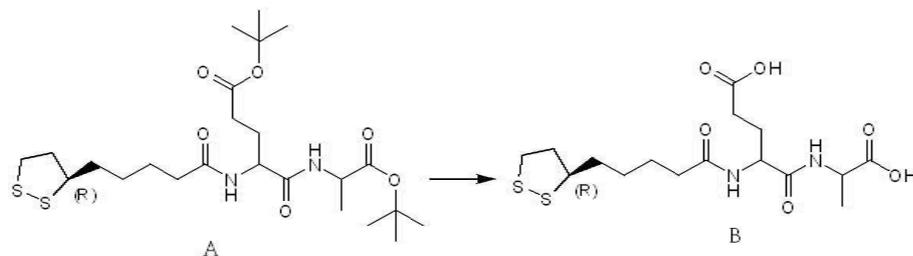
[0078] 일 실시 형태에서, 가수분해성 기는 화합물의 생물학적 활성을 파괴하지 않는다. 대안적인 실시 형태에서, 가수분해성 기를 갖는 화합물은 생물학적으로 불활성일 수 있지만, 생체내에서 생물학적으로 활성인 화합물로 전환될 수 있다.

[0079] 가수분해성 기를 포함하는 본 발명의 화합물은 전구약물로서 작용할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 “전구약물”은 생물학적 조건 하에서 가수분해되거나, 산화되거나, 대사되거나 또는 달리 반응하여 본 발명의 화합물을 제공할 수 있는 화합물을 의미한다. 전구약물은 생물학적 조건 하에서 그러한 반응시 활성으로 될 수 있거나, 또는 그의 미반응된 형태로 활성을 가질 수 있다. 전구약물은 생리적 조건 하에서 (예컨대, 가수분해성 기의 존재로 인해) 감소된 대사를 거칠 수 있으며, 그럼으로써 (예컨대, 혈액 중에서) 전구약물의 개선된 순환 반감기로 이어질 수 있다. 전구약물은 전형적으로 문헌[Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5<sup>th</sup> ed)]에 기재된 것들과 같은 익히 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0080] 일 실시 형태에서, 가수분해성 기는 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알킬, (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)알케닐, (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)알키닐, (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알콕시(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알킬, (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알콕시(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알콕시(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알킬, 아릴 및 아릴(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 각각은 할로, 니트로, 시아노, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 아미노, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬아미노, 디(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬아미노, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬, 할로(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알콕시, 할로(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알콕시, 모르폴리노, 페닐, 및 벤질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 선택적으로 치환된다.

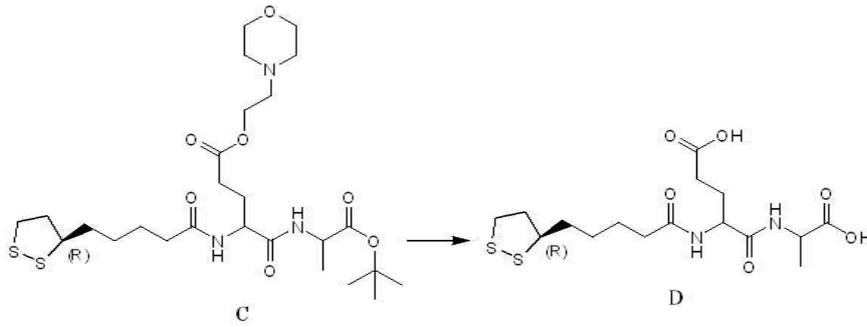
[0081] 다른 실시 형태에서, 가수분해성 기는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, *sec*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 알릴, 에톡시메틸, 메톡시에틸, 메톡시에톡시메틸, 메톡시에톡시에틸, 벤질, 펜타플루오로페닐, 2-*N*-(모르폴리노)에틸, 디메틸아미노에틸 및 파라-메톡시벤질로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0082] 가수분해성 기의 가수분해는 카르복실산을 생성시킨다. 예를 들어, 화합물 A에서의 *tert*-부틸은 약간 산성인 조건에서 절단되어 화합물 B에서의 카르복실산 기를 생성시킨다:



[0083]

[0084] R<sup>1</sup>과 R<sup>2</sup>는 상이한 가수분해성 기일 수 있으며, 그 결과 2개의 상이한 에스테르가 존재하는 화합물 C와 같은 화합물이 생성된다. 상이한 가수분해성 기의 사용은 특정 에스테르의 선택적 가수분해를 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, R<sup>1</sup> 또는 R<sup>2</sup> 중 어느 하나는 산성 환경에서 안정한 가수분해성 기일 수 있고, 나머지 다른 하나는 염기성 환경에서 안정한 가수분해성 기일 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, R<sup>1</sup> 또는 R<sup>2</sup> 중 어느 하나는 특정 효소에 의해 절단되는 가수분해성 기일 수 있는 반면, 나머지 다른 하나는 그 효소에 의해 절단되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 이들 2개의 에스테르의 가수분해는 동시에 일어날 수 있다. 대안적으로, 이들 2개의 에스테르의 가수분해는 단계적으로 일어날 수 있다. 다른 예로, 화합물 C에서의 *tert*-부틸 기는 약간 산성인 조건 하에서 절단되는 반면, 2-*N*-모르폴리노에틸 부분은 R. 니베우스(*R. niveus*)로부터의 리파아제에 의해 효소적으로 절단될 수 있다:



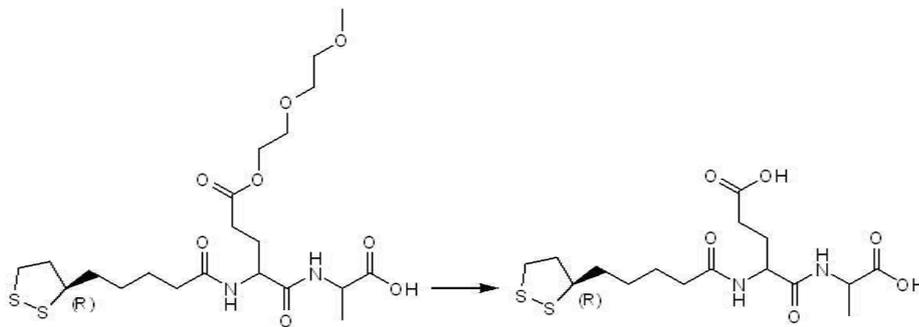
[0085]

[0086]

가수분해성 기의 선택, 도입 및 후속 제거를 위한 방법은 당업자에게 익히 공지되어 있다. (문헌[T.W. Greene 및 P. G. M. Wuts “Protective Groups in Organic Synthesis” John Wiley & Sons, Inc., New York 1999]).

[0087]

대안적으로, R<sup>1</sup> 또는 R<sup>2</sup> 중 단 하나만이 존재할 수 있으며, 그 결과 단일 에스테르가 가수분해되어 카르복실산 또는 그의 염이 생성된다:



[0088]

[0089]

당업자는 다른 가수분해성 보호기가 본 발명의 화합물과 함께 사용되어 본 명세서에 의해 포함되는 전구약물을 얻을 수 있음을 이해할 것이다.

[0090]

본 발명의 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다. 의약에 사용하기 위하여, 본 발명의 화합물의 염은 비독성인 약학적으로 허용되는 염을 말한다.

[0091]

개시된 화합물의 약학적으로 허용되는 염은 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 용어 “약학적으로 허용되는 염”은 알칼리 금속 염을 형성하는 데, 그리고 유리 산 또는 유리 염기의 부가 염을 형성하는 데 일반적으로 사용되는 염을 포괄한다. 약학적으로 허용된다면, 염의 성질은 중요하지 않다.

[0092]

개시된 화합물의 적합한 약학적으로 허용되는 산 부가 염은 무기 산 또는 유기 산으로부터 제조될 수 있다. 그러한 무기 산의 예는 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 질산, 탄산, 황산 및 인산이다. 적절한 유기 산은 지방족, 지환족, 방향족, 아릴지방족, 복소환식, 카르복실 및 설포닉 부류의 유기 산으로부터 선택될 수 있으며, 이의 예는 포름산, 아세트산, 프로피온산, 석신산, 글리콜산, 글루콘산, 말레산, 엠본산(파모산), 메탄설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 판토텐산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 설페닐산, 메실산, 사이클로헥실아미노설폰산, 스테아르산, 알켄산, β-하이드록시부티르산, 말론산, 갈락산, 및 갈락투론산이다. 약학적으로 허용되는 산성/음이온성 염에는 또한 아세테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카르보네이트, 바이타르트레이트, 브로마이드, 칼슘 에테테이트, 캄실레이트, 카르보네이트, 클로라이드, 시트레이트, 디하이드로클로라이드, 에테테이트, 에디실레이트, 에스톨레이트, 에실레이트, 푸마레이트, 글리셉테이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리콜릴아르사닐레이트, 헥실레조르시네이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드록시나프토에이트, 요오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 락토비오네이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메실레이트, 메틸설포에이트, 뮤케이트, 나프실레이트, 니트레이트, 파모에이트, 판토텐에이트, 포스페이트/디포스페이트, 폴리갈락투로네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 서브아세테이트, 석시네이트, 설페이트, 하이드로젠설페이트, 탄네이트, 타르트레이트, 테오클레이트, 토실레이트, 및 트리에티오다이드 염이 포함된다.

[0093]

개시된 화합물의 적합한 약학적으로 허용되는 염기 부가 염에는 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연으로부터 만들어진 금속 염 또는 N,N'-디벤질에틸렌-디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 리신, 아르기닌 및 프로카인으로 부터 만들어진 유기 염이 포함되지만 이로 한정되지

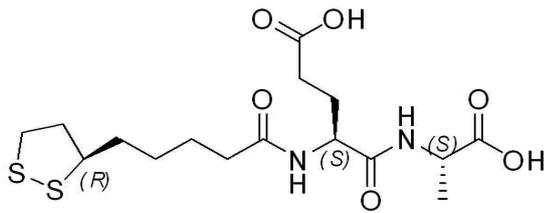
않는다. 모든 이들 염은 개시된 화합물로 표시되는 상응하는 화합물로부터, 예를 들어 개시된 화합물을 적절한 산 또는 염기로 처리함으로써 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염기성/양이온성 염에는 또한 디에탄올아민, 암모늄, 에탄올아민, 피페라진 및 트리에탄올아민 염이 포함된다.

[0094] 일 실시 형태에서, 약학적으로 허용되는 염은 1가 양이온 또는 2가 양이온을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 약학적으로 허용되는 염은 리신 염이다.

[0095] 다른 실시 형태에서, 1가 양이온은 1가 금속 양이온이고, 2가 양이온은 2가 금속 양이온이다. 특정 실시 형태에서, 1가 금속 양이온은 나트륨 양이온이다.

[0096] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

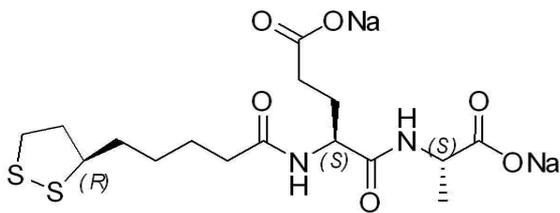
[0097] [구조식 II]



[0098] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, RLip-EA-OH는 구조식 II를 말한다.

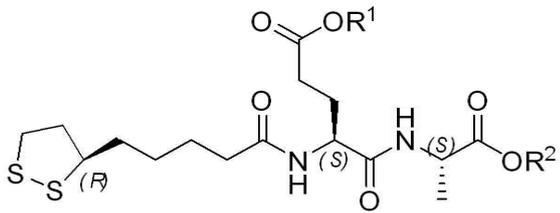
[0100] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 III으로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

[0101] [구조식 III]



[0102] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 IV로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

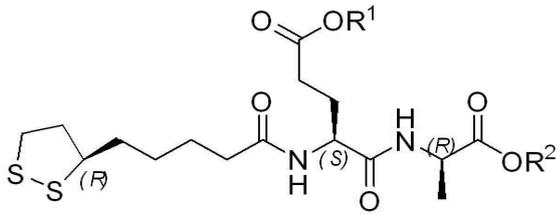
[0103] [구조식 IV]



[0104] R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>의 값은 구조식 I에 대하여 상기에 정의된 바와 같다.

[0105] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 V로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

[0106] [구조식 V]

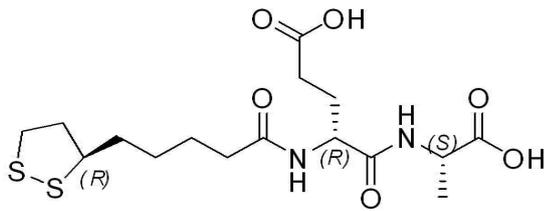


[0109]

[0110] R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>의 값은 구조식 I에 대하여 상기에 정의된 바와 같다.

[0111] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 VI으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

[0112] [구조식 VI]

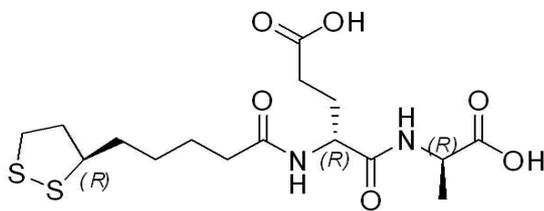


[0113]

[0114] R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>의 값은 구조식 I에 대하여 상기에 정의된 바와 같다.

[0115] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 구조식 VII로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다:

[0116] [구조식 VII]



[0117]

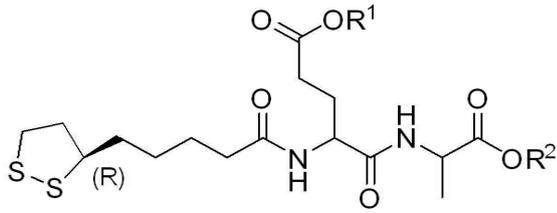
[0118] R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>의 값은 구조식 I에 대하여 상기에 정의된 바와 같다.

[0119] 본 발명의 조성물은 개시된 화합물에 대해 대안적으로 또는 추가적으로, 개시된 화합물로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 또는 그러한 화합물 또는 염의 전구약물 또는 약학적으로 활성인 대사 산물, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 약물 전달의 공지된 방법에 따라 수용 대상(바람직하게는 사람)에게 전달된다. 본 발명의 화합물은 단독으로 투여되거나, 또는 세포보호 키나아제의 활성화 및/또는 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상의 치료에 유용한 것으로 출원인이 알고 있거나 여기는 적어도 하나의 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0120] 대안적으로, 본 발명의 조성물은 조성물 내의 유일한 약학적으로 활성인 제제로서 개시된 화합물로 표시되는 화합물 또는 그의 약제학적 염을 포함할 수 있다.

[0121] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 i) 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제; 및 ii) 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이며:

[0122] [구조식 I]



[0123]

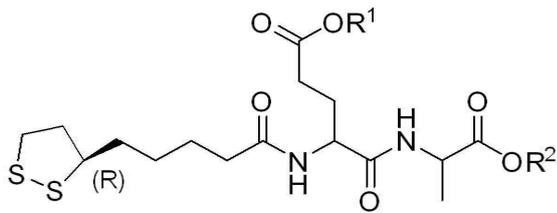
[0124] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0125] 본 발명의 약학적으로 허용되는 조성물은 하나 이상의 비독성인 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제 및/또는 보조제 및/또는 부형제(이들은 본 명세서에서 “담체” 재료로서 총칭됨), 및 필요하다면, 다른 활성 성분과 연합하여 본 명세서에 개시된 하나 이상의 화합물을 포함한다.

[0126] 본 발명은 또한 세포에서 세포보호 키나아제를 활성화하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 “세포보호 키나아제”는 활성화될 때, 세포 생존을 촉진 및/또는 세포 사멸(예컨대, 아포토시스)을 억제하는 하나 이상의 세포 신호전달 경로의 성분을 인산화하는 키나아제를 말한다.

[0127] 따라서 일 실시 형태에서, 본 발명은 세포를 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 세포보호 키나아제(예컨대, 인슐린 수용체 키나아제, Akt 키나아제, 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체 키나아제, Src 키나아제)를 활성화하는 방법에 관한 것이며:

[0128] [구조식 I]

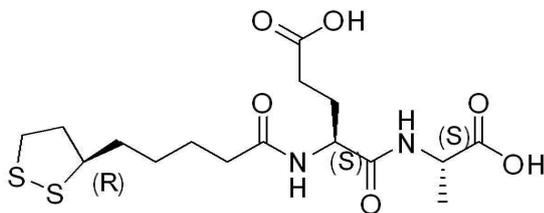


[0129]

[0130] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0131] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 세포를 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 경로가 세포보호를 나타내는 키나아제를 활성화하는 방법에 관한 것이다:

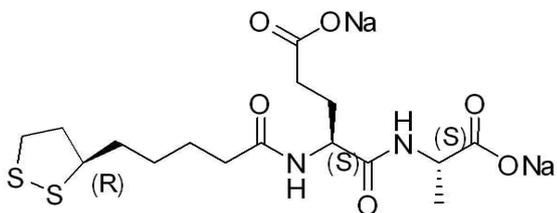
[0132] [구조식 II]



[0133]

[0134] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 세포를 구조식 III으로 표시되는 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 세포보호 키나아제를 활성화하는 방법에 관한 것이다:

[0135] [구조식 III]



[0136]

- [0137] 세포보호 키나아제의 활성화는 세포보호 키나아제를 포함하는 하나 이상의 세포보호 세포 신호전달 경로의 활성화로 이어질 수 있다. 특정 실시 형태에서, 본 발명의 화합물에 의한 세포에서의 하나 이상의 세포보호 키나아제의 활성화는 키나아제(들)가 활성화된 세포의 아포토시스를 억제(예컨대, 예방, 지연)할 수 있다.
- [0138] 세포보호 키나아제의 활성화에 관한 본 발명의 방법은 (예컨대, 배양 세포를 사용하여, 단리된 세포를 사용하여) 시험관내에서, 또는 (예컨대, 본 발명의 화합물(들)을 살아있는 유기체에 투여함으로써) 생체내에서 수행될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 본 발명의 화합물은 사람의 하나 이상의 세포에서 하나 이상의 세포보호 키나아제를 활성화하기 위한 방법에 사용된다.
- [0139] 일 실시 형태에서, 세포보호 키나아제는 Akt 키나아제이다. Akt 키나아제의 활성화는 세포보호를 나타내는 하나 이상의 Akt 세포 신호전달 경로의 활성화로 이어질 수 있다. Akt, PKB 및 Rac-PK로도 알려진 Akt 키나아제는 세린/트레오닌 키나아제의 Akt/PKB 패밀리에 속하며, 세포 생존 및 증식과 관련된 경로를 포함한 많은 다양한 신호전달 경로에 참여하는(문헌[Alessi, 및 Cohen, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1998), 55-62]) 것으로 밝혀져 있다(문헌[Song, G., Ouyang, G., 및 Bao, S., The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005 9:59]; 문헌[Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., Reperfusion injury salvage kinase signaling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007, 12:217]). Akt는 N-말단 지질 결합성 플렉스트린 상동 영역(N-terminal lipid-binding pleckstrin-homology domain) 및 C-말단 촉매 영역으로 이루어진다. 정지 세포에서, 모든 Akt 이소형(isoform)은 세포질 내에 정주하지만, 외부 리간드에 의한 자극 후 세포막으로 이행한다. 이행 및 이어지는 활성화는 PDGF, IGF, EGF,  $\beta$ FGF 및 인슐린을 포함한 몇몇 상이한 리간드에 의해 유도된다. 이 활성화는 PI3-키나아제 활성화에 좌우되며, 각각 PDK-1 및 PDK-2에 의한 Akt의 Thr308 및 Ser473의 계층적(hierarchical) 인산화를 필요로 한다(문헌[Alessi et al., *Curr. Biol.* 8 (1998), 69-81]). 일단 활성화되면, Akt는 아포토시스의 예방, 분화 및/또는 증식의 유도, 단백질 합성 및 인슐린의 대사 효과를 포함한 몇몇 상이한 기능을 매개한다.
- [0140] 본 명세서의 실시예 2에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 세포-기반 시험관내 검정에서 Akt 인산화를 증가시킨다. 세포에서의 Akt 키나아제 인산화는 당업계에서 공지된 하나 이상의 시험관내 Akt 키나아제 인산화 검정을 사용하여 평가될 수 있는데, 이러한 검정에는, 예를 들어 상업적 공급업체로부터 입수가 가능한, 세포에서 Akt 인산화를 시험하기 위한 키트 및 검정(예컨대, Cellomics 포스포(Phospho)-AKT 활성화 키트, Thermo Scientific; Akt 활성 검정 키트, BioVision Incorporated; FACE™ AKT 포스포 AKT(S473)를 위한 세포 내 웨스턴 분석(in-cell Western analysis), Active Motif; PathScan® 포스포-Akt (Thr308) 샌드위치 ELISA 키트, Cell Signaling Technology; AlphaScreen® SureFire® 포스포-AKT 검정 키트, Perkin Elmer; Akt 활성 면역검정 키트, EMD Biosciences)이 포함된다. Akt 키나아제 인산화를 평가하기 위한 예시적인 검정이 본 명세서의 실시예 2에 기재되어 있다. (문헌[Chen, H., Kovar, J., Sissons, S., et. al. A cell based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy. *Analyt Biochem* 2005 338: 136])
- [0141] Akt 활성화는 또한, 예컨대 대상으로부터 입수된 세포 샘플에 대해 수행되는 면역검출 방법에 의해 생체내에서 평가될 수 있다. 포스포 특이적 Akt 항체(예컨대, 포스포-Ser473에 대해 특이적, 포스포-Thr308에 대해 특이적)를 포함한 몇몇 Akt 특이적 항체가 구매가능하다(예컨대, Perkin Elmer).
- [0142] 다른 실시 형태에서, 세포보호 키나아제는 인슐린 수용체 키나아제(insulin receptor kinase, "IRK")이다(문헌[Diesel, B., Kulhanek-Heinze, S., Holtje, M., et. al.,  $\alpha$ -Lipoic Acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis. *Biochemistry*, 2007 46:2146]; 문헌[Hausenloy, D.J., Yellon, D.M. New directions for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004 61:448]). IRK 활성화는 Akt의 인산화 및 활성화로 이어진다(문헌[Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996 15:6541-6551]). IRK의 활성화는 세포보호를 나타내는 하나 이상의 IRK 세포 신호전달 경로의 활성화로 이어질 수 있다. 본 명세서의 실시예 3에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 시험관내 생화학적 검정에서 IRK를 활성화한다. IRK 활성화는 당업계에서 공지된 하나 이상의 시험관내 IRK 활성화 검정을 사용하여 평가될 수 있다. IRK 활성화를 평가하기 위한 예시적인 검정이 본 명세서의 실시예 3에 기재되어 있다. (이동도 변화 키나아제 검정(Mobility Shift Kinase Assay), Caliper Life Sciences, 미국 메릴랜드주 하노버 소재)

- [0143] 다른 실시 형태에서, 세포보호 키나아제는 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(insulin-like growth factor 1 receptor, “IGF1R”) 키나아제이다. IGF1R 키나아제의 활성화는 세포보호를 나타내는 하나 이상의 IGF1R 세포 신호전달 경로의 활성화로 이어질 수 있다. 본 명세서의 실시예 4에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 시험관내 생화학적 검정에서 IGF1R 키나아제를 활성화한다. IGF1R 키나아제 활성화는 당업계에 공지된 하나 이상의 시험관내 IGF1R 키나아제 활성화 검정을 사용하여 평가될 수 있다. IGF1R 키나아제 활성화를 평가하기 위한 예시적인 검정이 본 명세서의 실시예 4에 기재되어 있다.
- [0144] 추가의 실시 형태에서, 세포보호 키나아제는 Src 키나아제이다. Src 키나아제의 활성화는 세포보호를 나타내는 하나 이상의 Src 세포 신호전달 경로의 활성화로 이어질 수 있다. 본 명세서의 실시예 4에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 시험관내 생화학적 검정에서 Src 키나아제를 활성화한다. Src 키나아제 활성화는 당업계에 공지된 하나 이상의 시험관내 Src 키나아제 활성화 검정을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0145] IGF1R 및 Src 티로신 키나아제는 허혈 재관류 손상으로부터 심장을 보호하는 데 있어서 역할을 한다(문헌 [Buddhadeb, D., Takano, H., Tang, X.-L., et al. Role of Src protein tyrosine kinase in late preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol* 2002 283:H549]; 문헌[Pasdois, P., Quinlan, C.L., Rissa, A., et al. Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving Src kinase, mitoKATP, and ROS. *Am J Physiol* 2006, 292:H1470]; 문헌[Suzuki, Y. J. Growth factor signaling for cardioprotection against oxidative stress-induced apoptosis. *Antiox Redox Signal* 2003, 5:741]; 문헌[Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: Targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004 61:448]).
- [0146] 본 발명에 따르면, 본 발명의 화합물에 의한 세포에서의 하나 이상의 세포보호 키나아제의 활성화는 세포의 아포토시스를 억제(예컨대, 예방, 지연)할 수 있다. 아포토시스를 평가하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다. (예컨대, 아포토시스와 관련된 형태학적 변화, 예를 들어 염색질 응축 및 세포질 수축을 검출함으로써) 아포토시스 세포(apoptotic cell)를 시각화하기 위한 현미경적 분석(예컨대, 광 현미경법, 전자 현미경법, 공초점 현미경법, 레이저-주사 현미경법)이 아포토시스 세포를 연구하는 데 전형적으로 사용된다.
- [0147] 아가로오스 겔에서의 DNA 단편화에 대한 연구 또한 아포토시스에 대한 지표인 것으로 여겨진다. 다수의 기술은 단편을 표지하고 이에 따라 아포토시스 세포의 비율을 정량화하기 위한 DNA 단편화를 이용한다. 각각의 DNA 단편은 3'-OH 말단 부분을 갖는다. 이 말단 단편은 표지화 속도가 DNA 단편화의 정도에 비례하도록 다양한 방법으로 (예를 들어, 개질된 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라아제의 도움으로) 표지될 수 있다.
- [0148] 특히, TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)은 아포토시스 과정에서 최종 단계 부근에서 일어나는 단편화된 DNA를 검출하기 위한 기술이다. 아포토시스 세포의 단편화된 DNA는 효소 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라아제(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT; 이는 TUNEL 검정의 원리를 사용하여 중합체성 꼬리(polymeric tail)를 형성함)를 사용하여 DNA 말단의 3'-OH에 플루오레세인-dUTP를 혼입시킬 수 있다. 이어서, 표지된 DNA는 형광 현미경법에 의해 직접 시각화되거나, 또는 유세포측정법(flow cytometry)에 의해 정량화될 수 있다.
- [0149] 일부 현재의 기술은 아포토시스 세포에서 조기에 일어나는 막 인지질에 있어서의 변화를 이용한다. 아포토시스 세포에 의해 외부 환경에 노출된 음으로 하전된 막 인지질이 플루오로크롬 컨쥬게이트된 분자로 표지되고, 형광 세포의 백분율이 용이하게 정량화될 수 있다.
- [0150] 아포토시스는 또한 형광 컨쥬게이트된(fluorescently-conjugated) 아넥신(Annexin) V를 사용하여 검출될 수 있다. 아넥신 V는 음으로 하전된 인지질에 우선적으로 결합하는 항응고 단백질이다. 아포토시스 과정에서의 초기 단계는 막 인지질 비대칭의 붕괴이며, 세포막의 외엽(outer leaflet) 상에 포스파티딜세린(PS)을 노출시킨다. 형광 컨쥬게이트된 아넥신 V는 온전한 살아있는 세포 상에 이러한 포스파티딜세린의 외부화를 검출하는 데 사용될 수 있다. 괴사 세포를 검출하기 위하여 제2 플루오로크롬으로서 프로피듐 요오다이드가 흔히 조합된다. 아포토시스의 유도는 프로카스파아제-3 단백질 분해적 절단(proteolytic cleavage)으로 이어져 활성 18kDa 카스파아제-3 단편을 발생시키고, 이어서 이 단편은 절단을 위한 폴리-ADP-리보오스 폴리머라아제 및 다른 카스파아제를 포함한 아포토시스 경로의 핵심 조절제를 표적으로 한다. 아포토시스 세포에서 다른 활성 카스파아제를 검출하기 위한 검정은 당업계에 공지되어 있다(예컨대, Caspase-Glo<sup>®</sup> 검정, Promega).
- [0151] 아포토시스 세포는 또한 마커로서 활성 18kDa 카스파아제-3 단편을 사용하여 검출될 수 있다. 아포토시스의 유

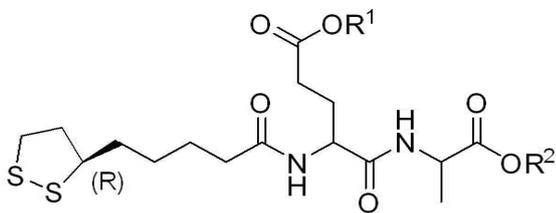
도는 프로카스파아제-3 단백질 분해적 절단으로 이어져 활성 18kDa 카스파아제-3 단편을 발생시키고, 이어서 이 단편은 절단을 위한 폴리-ADP-리보오스 폴리머라아제 및 다른 카스파아제를 포함한 아폽토시스 경로의 핵심 조절제를 표적으로 한다. 단지 활성 18kDa 단편만을 인식하는 몇몇 항체가 상업적 공급업체(예컨대, BD Biosciences, Chemicon, Cell Signaling Technology, Trevigen)로부터 입수가 가능하다.

[0152] 추가적으로, 아폽토시스 세포와 관련된 핵 변화를 모니터링하고 정량화하기 위하여 유세포측정 검정이 사용될 수 있다.

[0153] 아폽토시스의 억제를 검출하기 위한 예시적인 검정이 본 명세서의 실시예 5에 기재되어 있다.

[0154] 세포의 세포보호 키나아제의 활성화는 또한 이환된 조직 또는 기관에서 과도하거나 원하지 않는 아폽토시스 세포 사멸로부터 발생되어 손상 및 기능장애로 이어지는 상태의 치료에 있어서 유용성을 갖는다. 그러한 상태에는 특히 허혈 및 허혈 재관류 손상이 포함된다. 따라서, 본 발명은 또한 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 포유류 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류 대상에서 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이며:

[0155] [구조식 I]

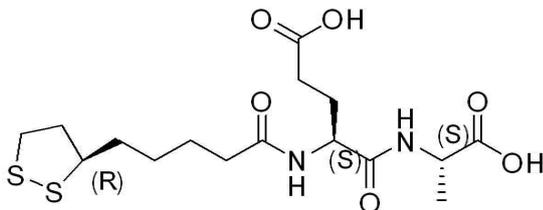


[0156]

[0157] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0158] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 포유류 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류 대상에서 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이다:

[0159] [구조식 II]



[0160]

[0161] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 III으로 표시되는 화합물의 유효량을 포유류 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류 대상에서 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이다:

[0162] [구조식 III]



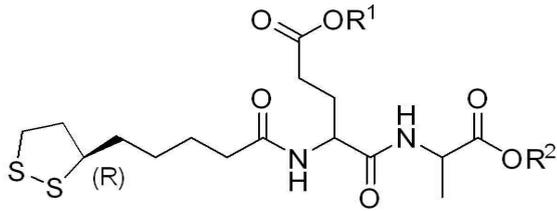
[0163]

[0164] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, “허혈로부터 발생하는 손상”, “허혈에 의해 야기되는 손상” 및 “허혈성 손상”은 허혈, 또는 (예컨대, 차단된 동맥으로 인한) 불충분한 혈액 공급, 및 이에 따라 불충분한 산소 공급에 의해 야기되는 세포, 조직 또는 기관에 대한 손상을 말하며, 이 손상은 조직 또는 기관의 손상 또는 기능장애로 이어진다(문헌[Piper, H. M., Abdallah, C., Schafer, C., *Annals of Thoracic Surgery* 2003, 75:644]; 문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]). 허혈로부터 발생되

는 손상은 다양한 조직 및 기관을 이환시킬 수 있다. 그러한 손상은 본 발명의 화합물 및 방법에 의해 치료될 수 있으며, 그러한 손상에는 예를 들어 심혈관 허혈, 뇌혈관 허혈, 신장 허혈, 간장 허혈, 허혈성 심근병증, 피부 허혈, 장관 허혈, 장 허혈, 위 허혈, 폐 허혈, 척장 허혈, 골격근 허혈, 복근 허혈, 사지 허혈, 허혈성 결장염, 장간막 허혈 및 무증후성 허혈에 의해 야기되는 손상이 포함된다. 따라서, 허혈로부터 발생하는 손상은, 예를 들어 심장, 신장, 간, 뇌, 근육, 장, 위, 폐 또는 피부를 이환시킬 수 있다.

- [0165] 특정 실시 형태에서, 허혈로부터 발생하는 손상은 심근 허혈의 결과이다. 심근 허혈로부터 발생하는 손상은 예를 들어 사람에서 심근 경색(예컨대, 급성 심근 경색)으로부터 발생할 수 있다.
- [0166] 다른 실시 형태에서, 허혈로부터 발생하는 손상은 사람에서 뇌 허혈(예컨대, 뇌졸중)로부터 발생하는 손상이다.
- [0167] 다른 실시 형태에서, 허혈로부터 발생하는 손상은 허혈 재관류 손상이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 “허혈 재관류 손상”는 이전의 허혈성 사건으로 인한 혈류 결핍을경험한 조직 또는 기관 부위에 대한 혈류의 회복으로부터 발생하는 손상을 말한다. 재관류와 관련된 산화적 스트레스는 이환된 조직 또는 기관에 손상을 야기시킬 수 있다. 허혈 재관류 손상은 생화학적으로 허혈성 사건 동안의 산소의 고갈, 이에 이어지는 재산소화 및 이에 수반되는 재관류 동안의 반응성 산소종의 발생을 특징으로 한다(문헌[Piper, H. M., Abdallah, C., Schafer, C., *Annals of Thoracic Surgery* 2003, 75:644]; 문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]).
- [0168] 허혈 재관류 손상은 예를 들어 자연적 사건(예컨대, 심근 경색 후의 혈류의 회복), 외상, 또는 혈액 공급 감소를 겪었던 조직 또는 기관에 혈류를 회복시키는 하나 이상의 외과적 기술 또는 다른 치료적 개입(therapeutic intervention)에 의해 야기될 수 있다. 그러한 외과적 기술에는 예를 들어 관상 동맥 우회 이식술, 관상 동맥 형성술, 기관 이식 수술 등(예컨대, 심폐 우회술)이 포함된다. 특정 실시 형태에서, 본 발명의 화합물 및 방법은 허혈 또는 허혈 재관류 손상에 의해 야기되는 수술기 심장 손상(perio-perative cardiac damage)을 치료하는데 유용하다.
- [0169] 치료적 개입, 예를 들어 외과적 기술에 의해 야기되는 허혈성 손상 및 허혈 재관류 손상의 치료에 있어서는, 본 발명의 화합물이 치료를 받고 있는 대상에게 치료적 개입(예컨대, 심장 수술, 기관 이식) 전에 투여되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 치료를 받고 있는 대상에게, 예를 들어 치료적 개입 전 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 12시간, 약 24시간, 또는 약 48시간에 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 치료를 받고 있는 대상에게, 예를 들어 치료적 개입 전 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 20분, 약 30분 또는 약 45분에 투여될 수 있다.
- [0170] 대안적으로 또는 추가적으로, 본 발명의 화합물은 치료를 받고 있는 대상에게 치료적 개입시에 또는 그 도중에 투여될 수 있다. 예를 들어, 화합물은 치료적 개입 과정 동안에 간격(예컨대, 15분 간격)으로 1회 이상 투여될 수 있다. 대안적으로, 화합물은 치료적 개입의 지속시간 내내 연속해서 투여될 수 있다.
- [0171] 게다가, 본 발명의 화합물은 치료를 받고 있는 대상에게 치료적 개입 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 치료를 받고 있는 대상에게, 예를 들어 치료적 개입 후 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 12시간, 약 24시간, 또는 약 48시간에 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 치료를 받고 있는 대상에게, 예를 들어 치료적 개입 후 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 20분, 약 30분 또는 약 45분에 투여될 수 있다.
- [0172] 본 발명의 화합물은 또한 치료적 개입 전에 생체외 세포, 조직 또는 기관(예컨대, 이식 기술에서 사용되는 조직, 기관 이식술에서 사용되는 기관)에 대한 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 억제하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 기관을 숙주 내로 이식하기 전에(예컨대, 멸균 환경 내에서 기관의 저장 또는 수송 동안), 기관은 본 발명의 화합물과 접촉되어(예컨대, 본 발명의 화합물을 포함하는 용액 중에 임욕되어) 허혈 또는 허혈 재관류 손상을 억제할 수 있다.
- [0173] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 허혈로부터 발생하는 상태, 및 허혈 또는 허혈 재관류에 의해 야기되는 손상은 이환된 세포, 조직 또는 기관에서 아포토시스 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 이는 손상 및 기능장애로 이어진다. 따라서, 본 발명의 화합물은 또한 과도하거나 원하지 않는 아포토시스로 이어지는 허혈 또는 다른 상태 또는 장애를 경험한 세포, 조직 또는 기관(예컨대, 이식 조직 또는 기관, 또는 대상 내의 세포, 조직 또는 기관)에서의 아포토시스를 억제하는 방법에 있어서 유용성을 갖는다. 상기 방법은 상기 세포, 조직, 또는 기관을 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량과 접촉시키거나, 또는 그것을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하며:

[0174] [구조식 I]

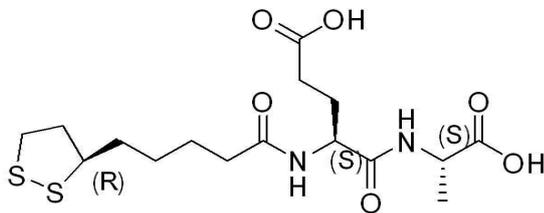


[0175]

[0176] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0177] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 과도하거나 원하지 않는 아폽토시스로 이어지는 허혈 또는 다른 상태 또는 장애를 경험한 세포, 조직 또는 기관에서 아폽토시스를 억제하는 방법에 관한 것이다:

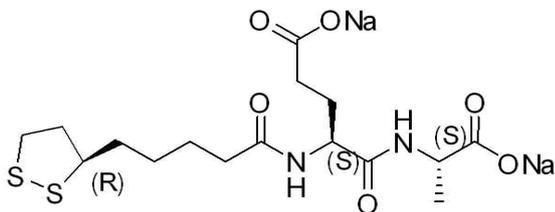
[0178] [구조식 II]



[0179]

[0180] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 III으로 표시되는 화합물의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 과도하거나 원하지 않는 아폽토시스로 이어지는 허혈 또는 다른 상태 또는 장애를 경험한 세포, 조직 또는 기관에서 아폽토시스를 억제하는 방법에 관한 것이다:

[0181] [구조식 III]



[0182]

[0183] 세포, 조직 또는 기관에서의 아폽토시스를 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에 기재된 것들을 포함한다.

[0184] 본 발명의 화합물 및 방법에 의해 치료가능한 원하지 않고/않거나 과도한 아폽토시스와 관련된 상태에는 과도한 아폽토시스와 관련된 신경변성 질환(예컨대, 파킨슨병, 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 망막색소변성증, 간질), 과도한 아폽토시스와 관련된 혈액학적 질환(예컨대, 재생불량성 빈혈, 골수형성이상 증후군, T CD4+ 림프구감소증, G6PD 결핍), 과도한 아폽토시스와 관련된 조직 손상(예컨대, 심근 경색, 뇌혈관 사고, 허혈성 신장 손상, 다낭성 신장병), AIDS, 및 전자간증이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

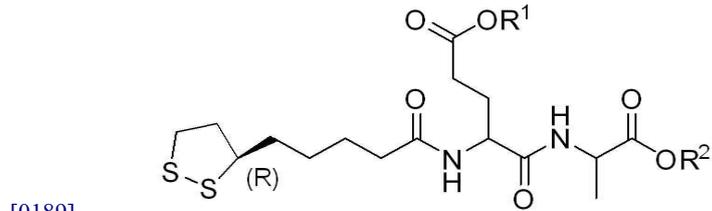
[0185] 허혈 재관류 손상의 특징 중 하나는 허혈성 사건 동안의 산소의 고갈로부터 발생하는 시토졸 칼슘 수준의 증가이다(문헌[Piper, H. M., Abdallah, C., Schafer, C., *Annals of Thoracic Surgery* 2003, 75:644]; 문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]). 자유 라디칼의 증가와 조합된 시토졸 칼슘의 증가는 아폽토시스를 촉발시키는 것으로 주창되어 왔다(문헌[Chen, X., Zhang, X., Hubo, H., et al., *Circ Res* 2005, 97:1009]; 문헌[Lopes-Neblina, F., Toledo, A.H., Toledu-Pereyra, L.H. *J Invest Surg* 2005, 18:335]). 그러나 지금까지, 칼슘의 유입을 차단하는 길항제에 의하거나 또는 반응성 산소종의 포착제에 의한 급성 심근 경색을 가진 환자의 치료는 각각 실망스러운 임상 결과를 내놓았다(문헌[Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121]).

[0186] 추가적으로, Akt에 의해 활성화되는 생존 촉진 경로(pro-survival pathway)를 통하여, 시토졸 칼슘 과부하가 억

제된다(문헌[Joseph, S.K., Hajnoczky, G., *Apoptosis* 2007, 12:951]; 문헌[Pinton, P., Rizzuto, R., *Cell Death Diff* 2006, 13:1409]; 문헌[Khan, M.T., Wagner, L. II, Yule, D.I., Bhanumathy, C., Joseph, .S.K. 2006, Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *J Biol Chem* 281:3731]). Akt 의존성 신호전달 경로는 또한 Bcl-2의 조절에 의해 세포내 칼슘 과부하를 방지한다(문헌[Raphael, J., Abedat, S., Rivo, J., et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 318:186]; 문헌[Thomenius, M.J. and Distelhorst, C. W., *J Cell Sci* 2003, 116:4493]).

[0187] 따라서, Akt 활성화를 유도하는 본 발명의 화합물은 또한 (예컨대, 허혈을 앓고 있는 대상의) 세포, 조직 또는 기관에서 시토졸 칼슘을 감소시키는 방법에 있어서 유용성을 갖는다. 상기 방법은 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며:

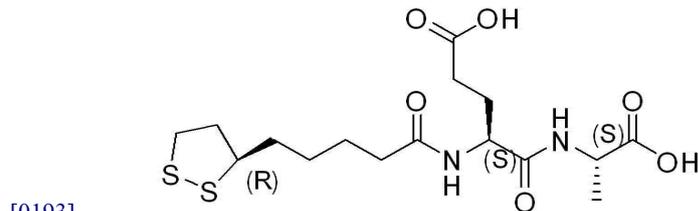
[0188] [구조식 I]



[0190] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

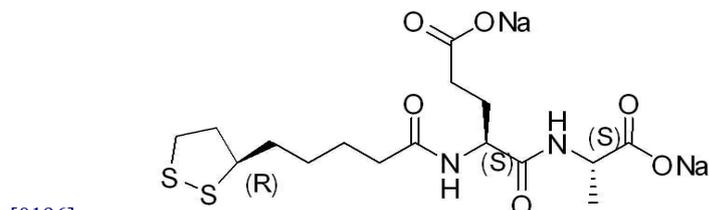
[0191] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 세포, 조직 또는 기관에서 시토졸 칼슘을 감소시키는 방법에 관한 것이다:

[0192] [구조식 II]



[0194] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 III으로 표시되는 화합물의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 세포, 조직 또는 기관에서 시토졸 칼슘을 감소시키는 방법에 관한 것이다:

[0195] [구조식 III]



[0197] 시토졸 칼슘의 수준을 검출하기 위한 예시적인 검정이 본 명세서의 실시예 6에 기재되어 있다.

[0198] 본 발명의 화합물은 또한 퍼옥실 라디칼 흡수에 대한 향상된 능력을 나타낸다. 생물학적 유기체는 뇌, 심장, 폐, 및 근 조직과 같은 조직의 정상적인 대사 활동 과정에서 유해한 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 다양한 자유 라디칼을 발생시킨다(문헌[Halliwell, B. 및 Gutteridge, J. M. C., eds. (Oxford: Clarendon Press, 1989)]). 다양한 중요한 질환 및 약물 부작용에 있어서의 ROS 및 자유 라디칼의 역할에 대한 인식이 지난 수년 사이에 상당히 고조되어 왔다. 많은 연구는 다수의 질환 상태 및 치료 약물의 유해한 부작용이, 사람의 항산화 방어 시스템이 ROS 및 다양한 자유 라디칼의 발생 속도를 유지하는 데 실패한 것과 연관됨을 입증해 왔다(예를 들어, 문헌[Chan, et al., *Adv. Neurol.*, 1996, 71:271-279]; 문헌[DiGuseppi, J. 및 Fridovich, I., *Crit. Rev. Toxicol.*, 1984, 12:315-342] 참조). 예를 들어, 비정상적으로 높은 ROS 수준이 뇌

줄중 동안 허혈에 의해 유도된 무산소증 또는 심근 경색 동안 심장 근육에서 발생된 무산소증의 상태 하에서 발견되어 왔다(예를 들어, 문헌[Walton, M. et al., *Brain Res. Rev.*, 1999, 29:137-168]; 문헌[Pulsinelli, W. A. et al., *Ann. Neurol.*, 1982, 11: 499-502]; 문헌[Lucchesi, B. R., *Am. J. Cardiol.*, 1990, 65:141-231]). 추가적으로, ROS 및 자유 라디칼의 상승은 또한 신장 이식 후의 재관류 손상과 연관되어 왔다.

[0199] 따라서, ROS 및 자유 라디칼의 상승은 많은 질환, 약물 치료, 외상, 및 퇴행성 상태(노화에 따른 산화적 스트레스 유도 손상, 지발성 운동이상증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 퇴행성 안질환, 패혈성 쇼크, 두부 및 척수 손상, 알츠하이머병, 케양성 결장염, 사람 백혈병 및 기타 암, 및 당뇨병을 포함함)에서 발병된 진행 및 합병증과 연관되어 왔다(예를 들어, 문헌[Ratanis, Pharmaceutical Executive, pp. 74-80 (April 1991)] 참조).

[0200] 예를 들어, ROS 및 자유 라디칼 수준의 상승은 허혈성 사건 후 재관류 동안 세포 및 조직에서 발생하는 것으로 알려져 있다. ROS 및 자유 라디칼 수준의 그러한 증가는 이미 스트레스를 받거나 약화된 기관 또는 조직에 상당한 손상을 야기시킬 수 있다. 피옥실 라디칼 흡수 능력을 나타내는 본 발명의 화합물은 뇌졸중, 심장 발작, 또는 신장 질환 및 신장 이식과 같은 질환 및 상태에서 일어나는 재관류 손상 후에 존재하는 고수준의 유해한 자유 라디칼을 처리하는 데 사용될 수 있다. 뇌졸중 및 심장 발작에서와 같이 허혈성 사건이 이미 일어났다면, 본 명세서에 기재된 화합물은 혈액 및 이환된 조직 또는 기관에 이미 존재하는 상승된 ROS 및 자유 라디칼을 해독하기 위하여 사람에게 투여될 수 있다.

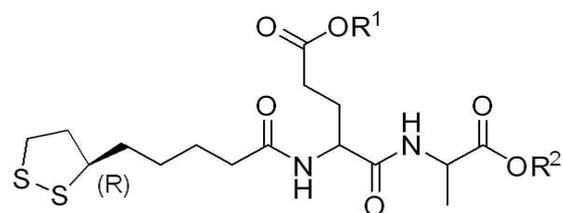
[0201] 대안적으로, 기관 이식, 또는 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상으로 이어질 수 있는 다른 시술(예컨대, 관상동맥 우회 이식술, 관상 동맥 형성술, 심폐 우회술)에서와 같이 허혈성 사건이 예상된다면, 본 명세서에 기재된 화합물은 예방적으로 수술 또는 허혈성 사건 전에, 청구된 화합물의 효능을 증강시키는 본 명세서에 기재된 투여 간격으로 투여될 수 있다.

[0202] 본 명세서에 기재된 화합물은 ROS 및 자유 라디칼의 바람직하지 않은 수준과 관련된 임의의 질환 또는 상태를 치료하는 데, 또는 ROS 및 자유 라디칼의 바람직하지 않은 수준에 의해 야기되는 임의의 질환, 장애 또는 상태를 예방하는 데 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 본 명세서에 기재된 화합물은 또한 다양한 다른 질환 및 조건과 관련된 상승된 ROS 및 다른 자유 라디칼의 치료적 또는 예방적 치료를 제공하기 위해서도 투여될 수 있는데, 이러한 다른 질환 및 조건에는 조산아에서의 산소 독성, 조직 및 기관에 대한 화상 및 물리적 외상, 패혈성 쇼크, 다발성 외상성(polytraumatous) 쇼크, 두부 외상, 뇌 외상, 척수 손상, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 알츠하이머병, ROS 및 자유 라디칼의 연령 관련 상승, 노쇠(senility), 케양성 결장염, 사람 백혈병 및 기타 암, 다운증후군, 관절염, 황반 변성, 정신분열병, 간질, 방사선 손상(UV 유도 피부 손상을 포함함), 및 ROS 및 자유 라디칼의 약물 유도 증가가 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0203] ROS 및 자유 라디칼의 형성으로 인한 산화적 스트레스의 진행성 상승이 또한 노화 과정에서 일어난다(예를 들어, 문헌[Mecocci, P. et al., *Free Radio. Biol. Med.*, 2000, 28: 1243-1248] 참조). 이것은 래트 조직(문헌[Erdinçler, D. S., et al., *Clin. Chim. Acta*, 1997, 265: 77-84]) 및 노인 환자의 혈액 세포(문헌[Congi, F., et al., *Presse. Med.*, 1995, 24: 1115-1118])에서의 지질 퍼옥시데이트 형성의 증가를 발견함으로써 검출되어 왔다. 따라서, 피옥실 라디칼을 흡수할 수 있는 본 명세서에 기재된 화합물은 또한 노화 과정에서 동반되는 ROS 및 자유 라디칼의 상승된 수준으로 인한 증가된 조직 손상 및 감소된 기대 여명(life expectancy)을 예방 및/또는 반대작용하는 방법에 사용하기에 매우 적합할 것이다.

[0204] 따라서, 본 발명의 화합물은 유해한 반응성 산소종(ROS) 및 다른 자유 라디칼에 의해 야기되는 상태 및 장애의 치료에 있어서 유용성을 갖는다. 따라서, 추가로 본 발명은 구조식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상(예컨대, 허혈을 앓고 있는 대상)의 조직에서 피옥실 라디칼 흡수를 증가시키는 방법에 관한 것이며:

[0205] [구조식 I]

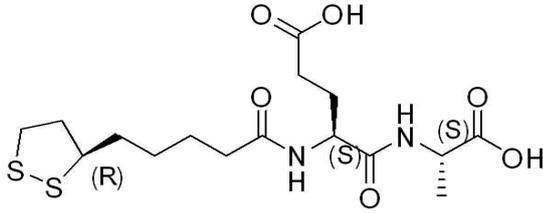


[0206]

[0207] 여기서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 H 또는 가수분해성 기이다.

[0208] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 II로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상의 조직에서 피옥실 라디칼 흡수를 증가시키는 방법에 관한 것이다:

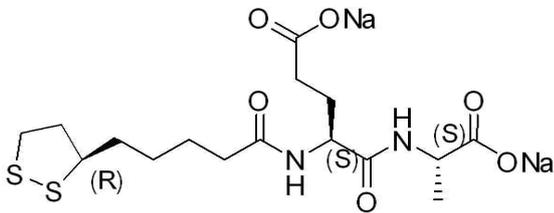
[0209] [구조식 II]



[0210]

[0211] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 구조식 III으로 표시되는 화합물의 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상의 조직에서 피옥실 라디칼 흡수를 증가시키는 방법에 관한 것이다:

[0212] [구조식 III]



[0213]

[0214] 피옥실 라디칼 흡수를 검출하기 위한 예시적인 검정이 본 명세서의 실시예 7에 기재되어 있다. 자유 라디칼 흡수를 검출하는 다른 방법이 미국 특허 제6,890,896호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0215] 본 발명의 화합물에 의한 Akt 키나아제의 활성화는 세포에서의 감소된 또는 불충분한 Akt 활성으로부터 발생하는 상태(허혈성 손상을 포함하지만 이로 한정되지 않음)의 치료에 있어서 유용성을 갖는다. 본 발명의 화합물 및 방법을 사용하여 치료하기에 적합한 감소된 Akt 활성으로부터 발생하는 상태에는, 예를 들어 불충분한 혈관화(예컨대, 당뇨병성 궤양, 괴저, 치유를 촉진시키기 위하여 혈관신생(neovascularization)을 필요로 하는 상처, 버거 증후군, 고혈압, 미세혈관계의 감소를 특징으로 하는 상태)를 특징으로 하는 질환 또는 장애, 및 임의의 신경학적 질환 또는 장애(예컨대, 파킨슨병, 알츠하이머병, 우울증, 불안, 조울정신병, 외상후 스트레스 장애, 경도 인지 장애(mild cognition impairment, MCI), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 헌팅턴병, 척추소뇌 변성 질환, 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS), 픽병(Pick's disease), 정신분열병, 불안 신경증, 강박신경증, 두부 외상, 척수 손상, 뇌혈관 장애, 뇌혈관 치매, 무증상 뇌경색, 폴리글루타민 질환, 프리온 질환, 대뇌 피질기저핵 변성, 진행성 핵상 마비, AIDS 뇌병증, 근육 퇴행위축, 당뇨병성 신경병증)가 포함된다.

[0216] 본 발명의 화합물 및 방법을 사용하여 치료될 수 있는 감소된 Akt 활동으로부터 발생하는 다른 상태에는 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신장병증, 간경화증, 알코올성 간염, 자기 재생 능력의 감소를 특징으로 하는 노인성 질환, 비대사성 골질환, 대사성 골질환, 관절 질환, 치주 질환, 거대세포바이러스 감염, 류마티스성 관절염, 라임 병, 통풍, 폐혈증 증후군, 고열, 궤양성 결장염, 소장결장염, 골다공증, 치주 질환, 사구체신염, 폐의 만성 비 감염성 염증, 사르코이드증, 흡연자의 폐, 육아종 형성, 간의 섬유증, 폐의 섬유증, 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 종양성 질환, 기관지 천식, 제1형 인슐린 의존성 당뇨병, 동맥 경화증, 죽상경화증, 건선, 만성 B 림프구 백혈병, 공통 가변성 면역결핍, 파종성 혈관내 응고, 전신성 경화증, 뇌척수염, 폐 염증, 고 IgE 증후군, 암 전이, 암 성장, 입양 면역 요법, 후천성 호흡 곤란 증후군, 폐혈증, 제관류 증후군, 수술 후 감염, 기관 이식, 및 탈모증이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0217] 감소된 AKT 활성으로부터 발생하는 AKT 매개 장애가 또한 미국 특허 출원 제2004/0122077호; 제2006/0241168호; 및 제2007/0219139호에 개시되어 있으며, 이들 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0218] 본 명세서에 개시된 약제학적 제제는 표준 절차에 따라 제조되고, 치료되는 상태를 감소, 예방, 또는 제거하도록, 또는 그 상태의 진행을 지연 또는 정지하도록 선택되는 투여량으로 투여된다(예를 들어, 문헌[Remington's

Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, 및 문헌[Goodman 및 Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.]을 참조하며, 이의 내용은 사람 치료용 다양한 제제를 투여하는 방법에 대한 전반적 설명을 위해 본 명세서에 참고로 포함된다. 개시된 화합물로 표시되는 화합물의 조성물은 제어 또는 지속 방출 전달 시스템(예컨대, 캡슐, 생분해성 매트릭스)을 사용하여 전달될 수 있다. 개시된 화합물의 조성물의 투여에 적합할 예시적인 약물 전달을 위한 지연 방출 전달 시스템이 미국 특허 제5,990,092호(Walsh에게 발행됨); 제5,039,660호(Leonard에게 발행됨); 제4,452,775호(Kent에게 발행됨); 및 제3,854,480호(Zaffaroni에게 발행됨)에 개시되어 있으며, 이들의 전체 교시 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

- [0219] 본 발명의 화합물로부터 약제학적 조성물을 제조하기 위한 약학적으로 허용되는 담체는 고체 또는 액체일 수 있다. 고체 형태 제제에는 분말, 정제, 환제, 캡슐, 카세이제(cachet), 좌제, 및 분산성 과립이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 전달 시점에서 재구성을 위한 분말 형태일 수 있다. 고체 담체는 희석제, 향미제, 가용화제, 윤활제, 현탁화제, 결합제, 방부제, 정제 봉해제, 또는 봉입 재료(encapsulating material)로서 또한 작용할 수 있는 하나 이상의 물질일 수 있다. 분말에서, 담체는 미분된 활성 성분과의 혼합물 내의 미분된 고체이다.
- [0220] 정제에서는 활성 성분이 필요한 결합 특성을 갖는 담체와 적합한 비율로 혼합되고, 원하는 형상 및 크기로 압축된다.
- [0221] 분말 및 정제는 바람직하게 약 1 내지 약 70%의 활성 성분을 함유한다. 적합한 담체는 탄산마그네슘, 스테아르산마그네슘, 활석, 당, 락토오스, 펙틴, 텍스트린, 전분, 젤라틴, 트래거캔스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 저융점 왁스, 코코아 버터 등이다. 정제, 분말, 카세이제, 로젠지제, 속용용 스트립(fast-melt strip), 캡슐 및 환제는 경구 투여에 적합한 활성 성분을 함유하는 고체 투여형으로서 사용될 수 있다.
- [0222] 액체 형태 제제에는 용액, 현탁액, 정제 관장, 및 에멀전, 예를 들어 물 또는 물 프로필렌 글리콜 용액이 포함된다. 비경구 주사를 위해서는, 액체 제제가 수성 폴리에틸렌 글리콜 용액으로 용액 상태로 제형화될 수 있다.
- [0223] 경구 투여에 적합한 수성 용액은 활성 성분을 물 중에 용해시키고, 필요에 따라 적합한 착색제, 향미제, 안정제, 및 증점제를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 경구 투여에 적합한 수성 현탁액은 미분된 활성 성분을 점성 재료, 예를 들어 천연 또는 합성 검, 수지, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 및 다른 익히 공지된 현탁화제와 함께 물 중에 분산시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0224] 약제학적 조성물은 바람직하게 단위 투여형이다. 그러한 형태에서, 조성물은 활성 성분의 적절한 양을 함유하는 단위 용량으로 세분된다. 단위 투여형은 포장된 제제일 수 있는데, 여기서 포장은 바이알 또는 앰플 내에 이산량의, 예를 들어 정제, 분말, 및 캡슐을 함유한다. 또한, 단위 투여형은 정제, 카세이제, 캡슐, 또는 로젠지제 그 자체일 수 있거나, 또는 포장된 형태의 이들 중 임의의 것의 적절한 양일 수 있다. 단위 용량 제제 내의 활성 성분의 양은 약 0.1mg 내지 약 1000.0mg, 바람직하게는 약 0.1mg 내지 약 100mg(예컨대, 정맥내 투여의 경우), 또는 약 1.0mg 내지 약 1000mg(예컨대, 경구 투여의 경우)로 변하거나 조절될 수 있다. 그러나, 이들 투여량은 환자의 요구사항, 처리되는 상태의 중증도, 사용되는 화합물 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 특정 상황에 대한 적절한 투여량의 결정은 당업계의 기술 내에 있다. 또한, 약제학적 조성물은 필요하다면, 다른 상용성(compatible) 치료제를 함유할 수 있다.
- [0225] 일반적으로, 본 발명의 개시된 화합물 및 약제학적 조성물을 생체내에서 전달하는 방법은 제제를 전달하기 위한 당해 기술분야에서 인식된 프로토콜을 이용하는데, 이때 단지 실질적인 절차적 변경은 당해 기술분야에서 인식된 프로토콜에서의 약물 대신 개시된 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물로 치환한다는 것뿐이다.
- [0226] 본 발명의 화합물은 임의의 경로에 의해, 바람직하게는 그러한 경로에 적합한 약제학적 조성물의 형태로 투여될 수 있으며, 치료되는 상태에 좌우될 것이다. 화합물 및 조성물은 예를 들어 혈관내, 근육내, 피하, 복강내, 경구 또는 국소 투여될 수 있다. 하기의 투여형이 활성 성분으로서 본 발명의 화합물, 또는 화합물의 상용하는 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 화합물을 투여하기 위한 바람직한 방법은 정맥내 투여이다.
- [0227] 일부 실시 형태에서, 조성물은 주사를 통해 비경구 투여될 수 있다. 비경구 투여에는 예를 들어 관절내, 근육내, 정맥내, 뇌실내, 동맥내, 수강내, 피하, 또는 복강내 투여가 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형은 수성 또는 비수성 등장 멸균 주사 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 이들 용액 또는 현탁액은 경구 투여를 위한 제형에서의 사용을 위해 언급된 담체 중 하나 이상을 갖는 멸균 분말 또는 과립으로부터 제조될 수 있다.

다. 화합물은 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올, 옥수수유, 벤질 알코올, 염화나트륨, 및/또는 다양한 완충액(예컨대, 중탄산나트륨, 수산화나트륨) 중에 용해될 수 있다.

- [0228] 경구 투여를 위하여, 약제학적 조성물은 예를 들어 정제, 캡슐, 현탁액 또는 액체의 형태일 수 있다. 조성물은 바람직하게 활성 성분의 치료적 유효량을 함유하는 투여 단위의 형태로 제조된다. 그러한 투여 단위의 예는 정제 및 캡슐이다. 치료적 목적을 위하여, 정제 및 캡슐은 활성 성분 이외에, 결합제, 예를 들어 아카시아 검, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 소르비톨, 또는 트래거캔스; 충전제, 예를 들어 인산칼슘, 글리신, 락토오스, 옥수수 전분, 소르비톨, 또는 수크로오스; 윤활제, 예를 들어 스테아르산마그네슘, 폴리에틸렌 글리콜, 실리카, 또는 활석; 봉해제, 예를 들어 감자 전분, 향미제 또는 착색제, 또는 허용되는 습윤제와 같은 통상적인 담체를 함유할 수 있다. 일반적으로 수성 또는 유성 용액, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 엘릭서제의 형태인 경구 액체 제형은 현탁화제, 유화제, 비수성 제제, 방부제, 착색제 및 향미제와 같은 통상적인 첨가제를 함유할 수 있다. 액체 제제를 위한 첨가제의 예에는 아카시아, 아몬드유, 에틸 알코올, 분획화된(fractionated) 코코넛유, 젤라틴, 글루코오스 시럽, 글리세린, 수소화 식용 지방, 레시틴, 메틸 셀룰로오스, 메틸 또는 프로필 파라-하이드록시벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 또는 소르브산이 포함된다.
- [0229] 국소 사용을 위하여, 본 발명의 화합물은 또한 피부, 또는 코 및 목의 점막에 적용하기에 적합한 형태로 제조될 수 있으며, 크림, 연고, 액체 스프레이 또는 흡입제, 로젠지제, 또는 목 페인트(throat paint)의 형태를 취할 수 있다. 그러한 국소 제형은 활성 성분의 표면 침투를 촉진시키기 위하여 디메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 화학적 화합물을 추가로 포함할 수 있다. 국소 투여에 적합한 담체에는 광유, 바셀린 등을 사용하는 수중유 또는 유중수 에멀전뿐만 아니라, 하이드로겔과 같은 겔도 포함된다. 대안적인 국소 제형에는 샴푸 제제, 경구 페이스트 및 구강 세척제가 포함된다.
- [0230] 눈 또는 귀에의 적용을 위하여, 본 발명의 화합물은 연고, 크림, 로션, 페인트 또는 분말로서 소수성 또는 친수성 베이스로 제형화된 액체 또는 반액체 형태로 제공될 수 있다.
- [0231] 직장 투여를 위하여, 본 발명의 화합물은 코코아 버터, 왁스 또는 기타 글리세라이드와 같은 통상적인 담체와 혼합된 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 좌제를 제조함에 있어서는, 저융점 왁스, 예를 들어 지방산 글리세라이드 또는 코코아 버터의 혼합물을 먼저 용융시키고, 활성 성분을 예를 들어 교반함으로써 그 중에 균질하게 분산시킨다. 이어서, 용융된 균질 혼합물을 통상적인 크기의 주형 내로 붓고, 냉각시키며, 그럼으로써 고화시킨다.
- [0232] 전달은 또한 환자의 뇌강(brain cavity) 또는 체강(body cavity) 내로의 주사에 의해, 또는 정시(timed) 방출 또는 지속 방출 매트릭스 전달 시스템의 사용에 의해, 또는 미셀, 겔 및 리포솜을 사용하는 온사이트(onsite) 전달에 의해 행해질 수 있다. 분무 장치(nebulizing device), 분말 흡입기, 및 에어로졸화된 용액은 그러한 제제를 기도에 투여하는 데 사용될 수 있는 대표적인 방법이다. 전달은 시험관내에서, 생체내에서, 또는 생체외에서 행해질 수 있다.
- [0233] 예를 들어, 본 발명의 화합물에 적합한 정맥내 투여량은 치료당 약 0.001mg/kg 체중 내지 약 100mg/kg 체중, 약 0.01mg/kg 체중 내지 약 100mg/kg 체중, 약 0.01mg/kg 체중 내지 약 10mg/kg 체중, 약 0.01mg/kg 체중 내지 약 1mg/kg 체중일 수 있다. 특정 제제, 환자 및 허혈 또는 허혈 재관류 손상에 대하여 투여의 투여량 및 경로를 결정하는 것은 충분히 당업자의 능력 내에 있다. 바람직하게 투여량은 최소한의 부작용을 야기하거나 초래하지 않는다.
- [0234] 본 발명의 화합물의 치료적 유효량은 단독으로 투여되거나, 또는 하나 이상의 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물과 조합하여 투여될 수 있는 허혈성 손상을 치료하기에 유용한 적합한 치료제에는 칼슘 채널 차단제, 베타 차단제, 니트로글리세린, 아스피린, 항염증성 제제, 나트륨 이뇨 인자, 혈관확장제, 혈전 용해성 및 항혈전성 제제가 포함되지만 이로 한정되지 않는다.
- [0235] 따라서, 본 발명의 화합물은 (예컨대, 하나 이상의 다른 치료제와의) 조합 치료의 일부로서 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 하나 이상의 다른 치료제 전에, 후에 또는 그와 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제는 별개의 제형으로서 또는 합동(joint) 제형으로서 일체히(예컨대, 동시에) 병용 투여될(co-administered) 수 있다. 대안적으로, 제제는 별개의 조성물로서, 숙련된 임상외에 의해 결정된 적절한 시간 프레임(예컨대, 치료의 약제학적 효과의 중첩을 가능하게 하기에 충분한 시간) 이내에 순차적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 다른 치료제는 원하는 치료 효과(예컨대, 관절 염증의 감소 및/또는 억제; 허혈의 감소 및/또는 억제, 허혈성 손상의 감소 및/또는 억제; 허혈 재관류 손상의 감소 및/또는 억제)를 달성하기에 적합한 순서 및 일정으로 다회 용량으로 또는 단회 용량으로 투여될 수 있다. 투여의 적합

한 투여량 및 처방계획은 임상 의에 의해 결정될 수 있으며, 선택된 제제(들), 투여의 약제학적 제형 및 경로, 다양한 환자 인자 및 기타 고려사항에 좌우된다.

- [0236] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 화합물의 다회 용량을 비표준의 연장된 투여 간격으로 투여하는 것이 화합물의 단회 용량 투여에 비하여 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능을 증가시킬 수 있다는 놀라운 발견에 추가로 기초한다. 따라서, 임의의 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물의 다회(즉, 2회 이상) 용량을 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상에서 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시 형태에서, 상기 방법은 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 전에, 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 적어도 2회의 용량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 용량은 비최종 용량 및 최종 용량을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, “최종 용량”은 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 전에 대상에게 투여되는 본 발명의 화합물의 마지막 용량을 말한다. 바람직하게 최종 용량은 손상 직전에 투여된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, “최종 용량” 및 “손상”와 관련하여 용어 “직(immediate)”은 시간적으로 가깝거나 매우 가까운 것을 의미하며, 이 시간 내에는 최종 용량과 손상 사이에 개입 용량이 없다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, “손상 직전”은 손상 전 약 0분(예컨대, 손상의 개시시에) 내지 약 2시간 범위의 시점을 의미한다. 최종 용량의 투여를 위한 예시적인 시점에는 예를 들어 손상 전 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 30분, 약 45분, 약 60분 및 약 90분이 포함된다.
- [0237] 용어 “비최종 용량”은 최종 용량보다 앞선 본 발명의 화합물의 용량을 말하는데, 여기서는 비최종 용량과 최종 용량 사이에 대상에게 투여되는 화합물의 개입 용량이 없다. 일반적으로, 비최종 용량은 손상 전 약 48시간 이내, 바람직하게는 손상 전 약 24시간 이내, 더 바람직하게는 손상 전 약 12시간(예컨대, 손상 전 약 10시간, 약 8시간, 약 6시간, 또는 약 4시간) 이내가 되는 시점에서 대상에게 투여될 것이다.
- [0238] 본 발명에 따르면, 비최종 용량과 최종 용량은 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능을 화합물의 단회 용량 투여에 비하여 증강시키는 투여 간격으로 투여된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 “증강시킨다”는 약물의 효과를 향상 또는 증가시키거나, 또는 약물의 생화학적 또는 생리적 작용 또는 효과를 촉진 또는 강화시키는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 표현 “화합물의 효능을 증강시킨다”는 특히, 그것이 치료 요구되고 있는 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상의 하나 이상의 증상의 치료에 관한 것일 때, 대상에서 화합물의 생화학적 또는 생리적 작용 또는 효과를 향상 또는 증가시키는 것을 의미한다.
- [0239] 전형적으로, 약리학적 제제의 효능은 그의 혈장 농도와 직접 관련되는데, 이때 혈장 농도가 떨어짐에 따라 효능이 감소된다. 따라서, 표준 다회 투여 처방계획에서는 치료를 받고 있는 대상에서 소정의 또는 최적의 혈장 농도를 유지하도록 설계된 투여 일정으로 약리학적 제제가 투여된다. 제제가 최적의 간격(들)보다 더 긴 투여 간격으로 투여될 때, 제제의 혈장 농도는 다음 용량이 투여되기 전에 바람직하지 않을 정도로 낮은 수준으로 떨어질 수 있으며, 이와 함께 효능 감소가 수반된다. 그러나 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물의 다회 용량을 표준 간격보다 훨씬 더 긴 투여 간격(예컨대, 화합물의 적어도 약 4 반감기의 투여 간격)으로 투여하는 것은 예상 외로 화합물의 효능을 향상시킨다.
- [0240] 당업자는 측정되는 생화학적 또는 생리적 파라미터(들)에 대한 표준 검정을 사용하여, 대상의 치료 전과 치료 후에 대상에서 생화학적 또는 생리적 파라미터를 측정함으로써, 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능을 용이하게 평가할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물의 효능은 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 전과 후의 다양한 시점에서 대상으로부터 입수된 혈액 샘플에서 특정 심장 효소(예컨대, 크레아틴 키나아제(CK-MB), 트로포닌-T, 트로포닌-I)를 포함한 대리 심장 바이오마커의 수준을 분석함으로써 결정될 수 있으며, 여기서 효소 수준에 있어서의 통계학적으로 유의한 감소는 화합물이 손상의 치료에 있어서 효능을 가졌음에 대한 지표이다. 예시적인 평가에서, 손상 전에 (예컨대, 손상 전 약 6 내지 약 48시간에) 대상으로부터 하나 이상의 혈액 샘플을 수집하고, CK-MB 및 트로포닌-T 수준에 대하여 분석한다. 이어서, 손상 후 다양한 시점에서(예컨대, 손상 후 6.0, 12.0, 18.0, 및 24.0시간에) 대상으로부터 혈액 샘플을 입수하고, 이들 샘플 중 하나 이상에서 CK-MB 및 트로포닌-T 수준을 분석한다.
- [0241] 본 발명의 화합물의 효능은 또한 심전도(electrocardiogram, ECG) 모니터링에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 투약 전에(예컨대, 투약 전 약 5분에) 대상에 전자 데이터 저장장치를 갖는 연속 12-리드(lead) ECG 모니터링 장치를 장착한 후에 표준 연속 12-리드 ECG 모니터링이 수행될 수 있다. 이어서, 손상 전과 후에 (예컨대, 손상 후 약 24시간까지) ECG 판독치가 얻어질 수 있다. 비정상적인 ECG 트래이스로부터 정상적인 ECG 트래이스로의 변화(예컨대, 상승된 ST 단편의 감소)는 화합물이 손상의 치료에 있어서 효능을 가졌음에 대한 지표이다.

- [0242] 추가적으로, 본 명세서의 실시예 8에 기재된 바와 같이, 본 발명의 화합물의 효능은 또한 심근 경색 면적(MI) 대 허혈 위험 면적(AR)의 비를 결정함으로써 평가될 수 있는데, 여기서 MI/AR 비의 통계학적으로 유의한 감소는 화합물이 손상을 치료하는 있어서 효능을 가졌음에 대한 지표이다.
- [0243] 상기에 기재된 것들(예컨대, 심장 효소 수준, ECG 트레이스, MI/AR 비)을 포함한 임의의 적합한 효능 측정을 사용하여, 당업자는 화합물이 단회 용량 투여에 비하여 다회 용량으로 투여될 때 화합물의 효능이 더 큰지의 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 다회 투여 처방계획에 대한 화합물의 효능의 측정이 동일한 경로에 의한 단회 용량 투여에 대한 그의 효능의 상응하는 측정과 비교될 수 있다. 단회 용량으로서 투여될 때 주어진 투여량(예컨대, 5.0mg/kg 정맥내)에 대한 상응하는 효능 측정은, 예를 들어 선행 모집단 연구(예컨대, 임상 시험)에 기초한 전형적 또는 표준 효능 측정일 수 있다. 대안적으로, 화합물의 주어진 용량의 단회 용량 투여의 효능은 동일한 손상에 의하여 치료 중인 다른 환자에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0244] 보다 구체적으로는, 이들 파라미터를 측정하는 표준 프로토콜에 따른 임상 연구로부터의 데이터가 주어진 모집단(예컨대, 치료를 필요로 하는 대상, 예를 들어 본 명세서에 기재된 특정한 외과적 수술을 받고 있는 환자를 포함하는 모집단)에서 본 발명의 화합물의 효능을 증강시키기 위해 적합한 투여량 및 투여 간격을 결정하는 데 사용될 수 있다. 대상 또는 대상들의 모집단에서의 측정된 파라미터에 있어서의 통계학적으로 유의한 감소 또는 증가는 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능을 증강시키는 용량(들) 및 투여 간격(들)에 대한 지표이다.
- [0245] 화합물의 단회 용량 투여에 비하여 다회 투여 방법에서 본 발명의 화합물의 효능을 증강시키는 비최종 용량과 최종 용량 사이의 투여 간격은 전형적으로 적어도 약 4시간 길이, 예를 들어 약 4 내지 약 12시간, 바람직하게는 약 4 내지 약 8시간, 더 바람직하게는 약 4 내지 약 6시간의 범위에 있다.
- [0246] 상기에 기재된 바와 같이, 약리학적 체계의 효능은 일반적으로 그의 혈장 농도에 상관되는데, 이때 혈장 농도가 떨어짐에 따라 효능이 감소된다. 화합물의 혈장 농도는 그의 반감기와 직접 관련되어 있기 때문에, 치료를 받고 있는 대상에서 소정의 또는 최적의 혈장 농도를 유지하기에 적절한 투여 간격을 결정하는 데 화합물의 반감기가 흔히 사용된다. 따라서, 화합물의 효능을 증강시키기 위한 투여 간격은 또한 화합물의 반감기의 관점에서 정의될 수 있다. 따라서, 다른 실시 형태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에서 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 상기 손상 전에, 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 2회 용량을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 2회 용량은 비최종 용량과 최종 용량을 포함하며, 여기서
- [0247] (a) 최종 용량은 손상 전 화합물의 약 2 반감기 이내의 시점에서 대상에게 투여되고;
- [0248] (b) 비최종 용량은 최종 용량의 투여 전에 화합물의 적어도 약 4 반감기가 되는 시점에서 대상에게 투여된다.
- [0249] 바람직하게 화합물의 최종 용량은 손상 전 화합물의 약 0.25 반감기 내지 약 2 반감기, 더 바람직하게는 손상 전 화합물의 약 0.25 내지 약 1 반감기 범위의 시점에서 대상에게 투여된다. 따라서, 최종 용량은 손상 전 화합물의 약 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 또는 약 2.0 반감기에 대상에게 투여될 수 있다.
- [0250] 비최종 용량은 최종 용량의 투여 전에 화합물의 적어도 약 4 반감기가 되는 시점에서 대상에게 투여되며, 이에 는 최종 용량의 투여 전에 약 4 반감기, 약 5 반감기, 약 6 반감기, 약 7 반감기, 약 8 반감기, 약 9 반감기, 약 10 반감기, 약 12 반감기, 약 15 반감기, 약 20 반감기, 및 약 30 반감기에 투여하는 것이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 예시적인 간격은 본 명세서에 기재된 이유로 표준 투여 처방계획에서 전형적으로 사용되는 것 보다 더 길다.
- [0251] 화합물의 반감기는 화합물의 농도가 그의 (초기) 최대 값의 절반(50%)으로 떨어지는 데 필요한 시간의 척도이며, 표준 방법을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 예를 들어 1 반감기에서 화합물의 상대 농도는 그의 초기(즉, 시간 0) 농도의 50%이고, 2 반감기에서 화합물은 그의 초기 농도의 25%로 존재하며, 3 반감기에서 화합물은 그의 초기 농도의 12.5%로 존재하고, 4 반감기에서 화합물은 그의 초기 농도의 6.25%로 존재하며, 5 반감기에서 화합물은 그의 초기 농도의 3.12%로 존재하고, 6 반감기에서 화합물은 그의 초기 농도의 1.56%로 존재하는 등이다. 따라서, 화합물의 반감기는 화합물이 투여된 대상의 혈액 중의 그의 농도의 하강 속도의 척도로서의 역할을 한다.

[0252] 1차 과정에서, 반감기는 다음과 같이 계산된다:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k}$$

[0253]

[0254] 여기서, k는 임의의 1차 속도 상수이다.

[0255] 당업자는 예를 들어 화합물을 대상에게 투여하고, 화합물의 투여 후 다양한 시점에서 대상으로부터 혈액 샘플을 입수하며, (예컨대, 질량 분석법에 의해) 혈액 샘플 중의 화합물의 수준 및/또는 농도를 분석하고, 임의의 적합한 소프트웨어 프로그램 또는 알고리즘을 사용하여 데이터를 처리함으로써 본 발명의 화합물의 반감기를 결정할 수 있다. 예를 들어, 화합물의 반감기 및 다른 PK 파라미터가 WinNolin<sup>®</sup> 소프트웨어 제품(Pharsight<sup>®</sup>; 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)을 사용하여 용이하게 계산될 수 있다.

[0256] 반감기를 측정하는 표준 프로토콜에 따른 임상 연구로부터의 데이터가 본 명세서에 기재된 임의의 화합물의 반감기를 결정하는 데 사용될 수 있다. 이 정보는 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능을 증강시키기에 적합한 용량(들) 및 투여 간격(들)을 결정하는 데 있어서 임상의 또는 의사에 의해 사용될 수 있다.

[0257] 래트 및 사람에서의 화합물 RLip-EA-OH의 상이한 투여량에 대한 반감기가 본 명세서의 실시예 12 및 실시예 13의 표 15 내지 표 17에 기재되어 있다.

[0258] 바람직하게 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 농도는 최종 용량의 투여 시점에서 대상으로부터 입수된 혈액 샘플(예컨대, 혈청, 혈장, 전혈(whole blood))에서, 투약 후 그의 최대 농도(C<sub>max</sub>) 또는 최대 관찰 혈장(또는 혈액) 수준의 약 10% 이하이다. 예를 들어, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 농도는 최종 용량의 투여 시점에서 대상으로부터 입수된 샘플에서 그의 최대 농도(C<sub>max</sub>)의 약 0%, 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9 또는 약 10%일 수 있다. 화합물의 C<sub>max</sub>는 예를 들어 화합물이 투여된 대상으로부터 혈액 샘플을 채취하고, 적절한 분석법(예컨대, 질량 분석법)을 사용하여 화합물의 농도에 대하여 샘플을 분석함으로써 결정될 수 있다. 얻어진 데이터를 사용하여, C<sub>max</sub>는 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어 프로그램(예컨대, WinNolin<sup>®</sup> 소프트웨어 제품(Pharsight<sup>®</sup>; 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재))을 사용하여 전형적으로 계산된다. 대상에서 화합물의 C<sub>max</sub>를 결정하는 것은 숙련된 임상의 또는 의사에 의해 용이하게 실시될 수 있다.

[0259] 일 실시 형태에서, 비최종 용량과 최종 용량은 등가이다. 대안적으로, 비최종 용량과 최종 용량은 양이 상이할 수 있고/있거나(예컨대, 약 1.0mg/kg의 비최종 용량과 약 0.5mg/kg의 최종 용량, 여기서 두 용량 모두는 정맥내 제공됨), 투여 경로가 상이할 수 있다(예컨대, 정맥내 비최종 용량과 심장내 최종 용량). 바람직하게 비최종 용량 및 최종 용량은 대상에게 약 0.5mg/kg 내지 약 5.0mg/kg 범위의 투여량으로 정맥내 투여된다. 본 발명의 화합물을 위한 다른 바람직한 투여 경로에는 예를 들어 심장내(IC), 복강내(IP) 및 경구(PO)가 포함된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 화합물 RLip-EA-OH는 (볼루스(bolus) IV 및 주입(infusion)에 의해) 정맥내, 경구 및 심장내 투여에 의해 투여될 때 I/R 손상의 래트 모델에서 효과적이었다.

[0260] 대상에게 제공되는 본 발명의 화합물의 투여량은 환자의 요구사항, 치료되는 상태의 중증도, 투여 경로 및 사용되는 화합물에 따라 달라질 수 있다. 특정 상황에 대한 적절한 투여량의 결정은 당업계의 기술 내에 있다. 예를 들어, 사람에게 투여하기에 적합한 투여량은 동물(예컨대, 래트) 모델에 대해 수행된 실험에서 입수된 데이터로부터 추정될 수 있다. 사람이 아닌 동물 모델의 투여량 데이터를 사람의 투여량으로 추정하기 위한 안내는 예를 들어 문헌[FDA Draft Guidance: Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (2005)]에서 찾을 수 있다.

[0261] 임의의 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 다회 투여 방법은 또한 본 발명의 화합물의 1회 이상의 추가의 용량을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 그러한 추가의 용량은 비최종 용량 및 최종 용량 전에, 그러나 이들 사이는 아닌 시점에서(즉, 비최종 용량 전에) 투여될 수 있다. 그러한 선행 용량은 전형적으로 손상 전 약 7일 이내, 예를 들어 손상 전 약 6일 이내, 약 5일 이내, 약 4일 이내, 약 3일 이내, 약 2일 이내 또는 약 1일 이내에 투여된다. 다회 투여 처방계획에서 비최종 용량의 투여 전에 본 발명의 화합물을 투여하기에 적합한 다른 시점에는 손상 전 약 18시간, 약 15시간, 약 12시간, 약 10시간 및 약 8시간이 포함되지만 이로 한정되지 않

는다.

- [0262] 대안적으로 또는 추가적으로, 본 발명의 다회 투여 처방계획에서 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상이 일어난 후에 화합물의 1회 이상의 용량이 대상에게 투여될 수 있다. 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 후에 본 발명의 화합물의 용량을 투여하기에 적합한 시점에는 앞서 본 명세서에 기재된 것들, 예를 들어 손상 후 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간 또는 약 4시간이 포함된다.
- [0263] 따라서, 본 발명의 화합물은 그를 필요로 하는 대상에게 2회 이상의 용량, 예를 들어 2회 용량, 3회 용량, 4회 용량, 5회 용량, 6회 용량, 7회 용량, 8회 용량, 9회 용량 또는 10회 용량으로 투여될 수 있다. 그러한 용량은 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 전 약 7일 내지 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 후 약 7일의 시간 기간에, 바람직하게는 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 전 약 2일 내지 허혈성 손상 또는 허혈 재관류 손상 후 약 1일의 범위에 걸칠 수 있다.
- [0264] 비최종 용량 전 및/또는 손상 후의 추가의 용량은 비최종 용량 및 최종 용량과 동일한 투여 간격 및/또는 투여 경로로 투여될 수 있거나, 또는 비최종 용량 및 최종 용량과 상이한 투여 간격 및/또는 투여 경로로 제공될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 그를 필요로 하는 대상에게 3회 용량으로 투여될 수 있으며, 여기서 이들 용량은 손상 전 8시간(즉, 비최종 용량 전의 추가의 용량), 5시간(즉, 비최종 용량) 및 0.25시간(즉, 최종 용량)에 제공된다.
- [0265] 유사하게, 비최종 용량 전이나 손상 후에 투여되는 각각의 추가의 용량은 비최종 용량 또는 최종 용량과 등가인 용량으로 또는 1회 이상의 다른 상이한 용량으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 그를 필요로 하는 대상에게 비최종 용량, 최종 용량 및 1회의 추가의 용량을 포함하는 3회 용량으로 투여될 수 있으며, 여기서 비최종 용량과 최종 용량은 0.5mg/kg으로 정맥내 제공되고, 추가의 용량은 1.0mg/kg으로 정맥내 제공된다.
- [0266] 본 발명의 특정 화합물, 환자 및 허혈 또는 허혈 재관류 손상에 대하여 적절한 다회 투여 처방계획을 결정하는 것은 충분히 당업자의 능력 내에 있다.
- [0267] [실시예]
- [0268] 실시예 1: 화합물의 합성
- [0269] 재료 및 방법:
- [0270] RLip-EA-OH(Lip-EA)의 합성
- [0271] R리포산(RLip-OH, 1.00g)을 디옥산 중에 용해시켰다. 반응 플라스크를 포일로 덮어서 이 용액을 직사광으로부터 보호하였다. DIEA(0.845mL) 및 DSC(1.24g)를 순차적으로 첨가하고, 반응물을 실온에서 밤새 교반 통기시켜 동일 계내에서(*in situ*) Lip-NHS를 형성하였다. 글루타밀-알라닌(H-EA-OH, 1.11g) 및 DIEA(2.65mL)의 수용액을 제조하고 Lip-NHS의 용액에 첨가하였다. 조합된 용액을 밤새 교반하고, 이어서 분별 깔때기로 옮겼다. 에틸 아세테이트에 이어 5% KHSO<sub>4</sub>(aq)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 유기 상을 수집하고 5% KHSO<sub>4</sub>(aq)에 이어 포화 NaCl(aq)로 세척하였다. 유기 상을 다시 수집하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키며, 여과 후에 진공 중에서 증발시켜 담황색 포말로서 조(crude) RLip-EA-OH를 얻었다. 2:1 물-아세트니트릴(0.5% HOAc)을 이용하는 RP-HPLC에 의한 정제를 위하여 조 포말의 일부를 용해시키고, 그 생성물을 물(0.5% 아세트산) 중의 증가하는 아세트니트릴(0.5% 아세트산)의 구배를 사용하는 YMC Pack Pro C18 역상 컬럼 상에서 단리하였다. 생성물 함유 분획을 분석용 HPLC에 의해 확인하고, 모으며(pool), 냉동시키고, 동결건조시켜 100% HPLC 순도(220nm에서의 면적%)로 RLip-EA-OH(165mg)를 얻었다. 생성물 NMR은 구조와 일치하였으며, 관찰된 질량은 405(M-1)이고 계산치는 406이었다.
- [0272] 유사한 절차를 사용하여 R/SLip-EA-OH, 및 SLip-EA-OH를 제조하였다. RLip-EA-OH 및 SLip-EA-OH의 각각의 제조를 위하여 광학적으로 순수한 RLip-OH 및 SLip-OH 출발 재료를 얻었다. 광학적 순도는 광학적 회전에 의해 검정하였으며, 출하 규격(release specification)을 충족하였다. 생성물 구조 및 동정(identity)은 MS, HPLC 체류 시간 이동(retention time shift)(Lip-OH 출발 재료와의 관계)에 의해, 그리고 대부분의 경우에는 NMR에 의해 확인되었다. 본 명세서에 기재된 화합물에 대한 화합물 구조, 명칭, 및 적절한 약어가 표 1에 포함되어 있다. 이 실시예에 기재된 화합물에 대한 분석 데이터가 표 2에 나타나 있다.

[0273] RLip-OH는 상업적으로 입수하였다(Labochim, 이탈리아 밀란 소재). R/SLip-EA-OH 및 Ac-EA-OH는 위탁에 의해 입수하였다.

[0274] RLip-EA-OH (Lip-EA)의 디리신 염의 제조

[0275] RLip-EA-OH(20.0g)를 에탄올-물(19:1) 중에 용해시켰다. 2 당량의 리신(14.4g)을 RLip-EA-OH의 에탄올성 용액에 첨가하고, 슬러리를 가온 환류하였다. 30분 동안 환류 후, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 생성물인 RLip-EA-OH의 디리신 염을 여과에 의해 회수하고, 무수 에탄올로 행구고, RLip-EA-OH의 디리신 염의 96% 회수율을 위하여 일정 중량으로 건조시켰다.

**표 1**

화합물 약어, 구조, 및 화학명

[0276]

화합물 약어	화합물 구조	정식 명칭*
RLip-OH		(R)-리포산
RLip-LGlu-LAla-OH; RLip-EA-OH		N-(R)-리포일-L-글루타밀-L-알라닌
R/SLip-LGlu-LAla-OH; R/SLip-EA-OH		N-(R/S)-리포일-L-글루타밀-L-알라닌
SLip-LGlu-LAla-OH; SLip-EA-OH		N-(S)-리포일-L-글루타밀-L-알라닌
R/SLip-LGlu-DAla-OH; R/SLip-EA-OH		N-(R/S)-리포일-L-글루타밀-D-알라닌
Ac-LGlu-LAla-OH; Ac-EA-OH		N-아세틸-L-글루타밀-L-알라닌

[0277] \*천연 아미노산 및 통상의 유사체에 대해서는 표준 명명법을 사용하였음[문헌[J. Biol. Chem.1972, 247:977-983]]; 리포일 = 1,2-디티올란-3-펜타노일

**표 2**

표 1에 열거된 화합물에 대한 분석 데이터

[0278]

화합물	NMR*	HPLC 순도 #	질량 분석법	광학 회전
RLip-OH <sup>†</sup>	NA	99.9%	NA	+121.7
RLip-LGlu-LAla-OH	디티올란 -CH-S- m, 1H, δ 3.10 글루타밀, 알라니닐 αC-H m, 2H, δ 4.38	100%	계산치: 406 관찰치(M-1): 405	+36.1

R/SLip-LGlu-LAla-OH <sup>†</sup>	디티올란 -CH-S-m, 1H, $\delta$ 3.10 글루타밀, 알라니닐 $\alpha$ C-H m, 2H, $\delta$ 4.38	99.6%	계산치: 406 관찰치: 406	-24.2
SLip-LGlu-LAla-OH	NA	96.5%	계산치: 406 관찰치(M-1): 405	-69.5
R/SLip-LGlu-DAla-OH <sup>†</sup>	NA	99.6%	계산치: 406 관찰치: 406	NA
Ac-LGlu-LAla-OH <sup>†</sup>	NA	99.6%	계산치: 261 관찰치: 261	NA

[0279]

\* 메탄올(d<sub>4</sub>) 또는 DMSO(d<sub>6</sub>) 중에서 얻어진 <sup>1</sup>H NMR

[0280]

#  $\lambda$  = 220nm에서의 면적%

[0281]

† 상업적으로 또는 위탁을 통해 구매함, 분석 증명서로부터의 분석 데이터

[0282]

NA = 적용 불가

[0283]

실시예 2: RLip-EA-OH 처리는 배양 세포에서 용량 의존적 방식으로 Akt 인산화/활성화를 유도한다

[0284]

Akt는 세포의 세포막 내에서 기지의 수용체를 통한 신호 전달 경로의 활성화에 의한 인산화를 통해 활성화된다. 인산화된 Akt는 고정 및 투과화된 세포에서 동일계내에서 특이적 항체를 사용하여 용이하게 검출된다.

[0285]

재료 및 방법:

[0286]

Akt 활성화에 대한 사이토블롯(cytoblot) 검정

[0287]

세포 내 웨스턴 블롯, 또는 사이토블롯을 사용하여, RLip-EA-OH가 인산화된 Akt를 증가시키는 능력을 평가하였다. A549 세포(사람 비소세포 폐암 세포주)를 선택하였는데, 그 이유는 이들 세포는 인산화된 Akt의 수준을 증가 또는 감소시키도록 조작될 수 있기 때문이다. 세포를 배양 플레이트 상에 접종하고 바닥에 부착되도록 두었으며, 이어서 처리하고, 고정시키며, 투과화하였다. 투과화 후, 세포를 포스포-Akt 또는 전체 Akt에 대해 특이적인 항체로 처리하였다. 이어서, 세포를 형광 2차 항체로 처리하여 결합된 1차 항체의 양을 정량화하였다. 전체 Akt 및 포스포-Akt를 동시에 검출하였다.

[0288]

A549 세포를 흑색 벽의 투명 바닥의 세포 배양 처리된 384웰 마이크로타이더 플레이트 내에서 70% 컨플루언시로 평판배양하였다. 세포를 밤새 항온배양하여 세포가 부착되게 하였다. 배지를 저농도 혈청(0.1%, 소태아 혈청 [FBS])으로 변경시키고, 세포를 추가 24시간 동안 항온배양하였다. 세포를 시험 화합물로 처리하고, Akt 검정을 위하여 고정시키고 투과화하였다. 고정액(fixative)은 인산염 완충 식염수 중의 3.7% 포르말데히드였다. 투과화 완충액은 인산염 완충 식염수 중의 0.5% Triton X-100이었다. 세포의 투과화 후, 2개의 인산화 부위(트레오닌-308 및 세린-473) 중 하나에서 전체 Akt 및 인산화된 Akt의 양을 7개의 시험 농도에서 결정하였으며, 이때 각각은 4중 복제로 수행하였다. 분석을 위하여 포스포-Akt 데이터를 전체 Akt에 대해 정규화하고 배경을 제거하였다.

[0289]

밤새 혈청 기아(starvation)를 행하여 기초적인 Akt 인산화를 감소시킨 후, 세포를 비히클, RLip-EA-OH, 또는 RLip-OH로 자극하였다. 세포를 45분 또는 3시간 동안 처리하고, 각각 세린-473 또는 트레오닌-308에서의 인산화에 대해 연구하였다.

[0290]

인산화된 Akt에 대한 면역조직화학 검정

[0291]

H9c2 세포에서 면역세포화학에 이어 현미경법을 사용하여 시각화하여, 인산화된 Akt를 증가시키는 RLip-EA-OH의 능력을 검정하였다. H9c2 세포는 래트 심근세포로부터 유래되는 세포주이며, 인산화된 Akt의 수준을 증가 또는 감소시키도록 조작될 수 있다. 세포를 배양 플레이트 상에 접종하고 바닥에 부착되도록 하며, 처리하고, 고정시

키며, 투과화하였다. 투과화 후, 세포를 초기에 특이적인 포스포-Akt 항체로 처리하고, 이어서 형광 2차 항체로 처리하여 결합된 1차 항체의 양을 정량화하였다.

[0292] H9c2 세포를 12웰 세포 배양 처리된 플레이트 내에서 70% 컨플루언시로 평판배양하였다. 세포를 밤새 항온배양하여 세포가 부착되게 하였다. 배지를 저농도 혈청(0.5%, 소태아 혈청[FBS])으로 변경시키고, 세포를 추가 48시간 동안 항온배양하였다. 세포를 3시간 동안 비히클, RLip-EA-OH(50 μM)로 처리하거나 LY294002(25 μM)와의 병용처리(co-treatment)로 처리하고, 인산염 완충 식염수 중의 3.7% 포름알데히드로 고정시키며, 인산염 완충 식염수 중의 0.5% Triton X-100으로 투과화하였다. 투과화 후, 세포를 트레오닌-308에서 인산화된 Akt에 대해 특이적인 항체로 처리하고, 이어서 형광 표지된 2차 항체로 처리하였다.

[0293] 결과:

[0294] 기재된 바와 같이 사이토블롯 검정을 사용하여 A549 세포에서 전체 Akt에 대한 Akt 인산화에 미치는 RLip-EA-OH 및 RLip-OH의 영향을 평가하였다. RLip-EA-OH 및 RLip-OH로 처리한지 45분 후, 세린 473에서의 인산화된 Akt의 3배 및 2배 증가가 각각 관찰되었다(도 2). RLip-EA-OH 및 RLip-OH 둘 모두는 용량 의존적 방식으로 전체 Akt에 대한 인산화된 Akt의 양을 증가시켰다. RLip-EA-OH가 대부분의 용량 수준에서 RLip-OH보다 더 효과적이었다.

[0295] 공지된 포스포티딜이노시톨-3'-키나아제 억제제인 LY294002(문헌[Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994, 269:5241-5248])의 존재 및 부재 하에서의 RLip-EA-OH 처리를 또한 평가하였다. 세포를 3시간 동안 처리하고, 티로신-308에서의 인산화에 대해 연구하였다. RLip-EA-OH 단독으로 처리한지 3시간 후, 증가된 Akt 인산화를 관찰하였다. RLip-EA-OH 처리에 따른 Akt의 증가된 인산화는 5 μM LY294002와의 병용처리에 의해 완전히 억제되었다(도 3).

[0296] 추가적으로, 기재된 바와 같이 면역조직화학 검정을 사용하여 H9c2 세포에서 Akt 인산화에 미치는 RLip-EA-OH의 영향을 평가하였다. RLip-EA-OH 처리를 비히클 처리 또는 LY294002 존재 하에서의 RLip-EA-OH 처리와 비교하였다. 비히클로 처리된 세포는 형광을 거의 나타내지 않았다. 형광 세기는 RLip-EA-OH로 3시간 동안 처리된 세포에서 훨씬 더 밝았다. 세포를 RLip-EA-OH의 첨가 전 추가 30분 동안 LY294002와 병용처리한 것은 Akt 인산화로 부터의 형광 세기를 감소시켰다.

[0297] 실시예 3: RLip-EA-OH는 인슐린 수용체 티로신 키나아제(IRK)를 활성화한다

[0298] 재료 및 방법: IRK 활성화 검정

[0299] 인산화 및 비인산화된 기질 둘 모두를 검출하기 위한 Caliper LabChip<sup>®</sup> 3000 및 12-시퍼(sipper) LabChip<sup>®</sup> (Caliper Life Sciences, Discovery Alliances and Services Division, 미국 메릴랜드주 하노버 소재)을 사용하여 이동도 변화 검정에 의해 인슐린 수용체 키나아제 활성을 용이하게 측정하였다. 이동도 변화 키나아제 검정은 마이크로유체 칩을 사용하여 형광 펩타이드 기질의 인산화된 생성물로의 전환을 측정한다. 마이크로타이퍼 플레이트 웰로부터의 반응 혼합물을 캐필러리 시퍼(capillary sipper)를 통해 칩 상에 도입하고, 전기영동에 의해 비인산화된 기질과 인산화된 생성물을 분리하고, 레이저 유도 형광에 의해 검출하였다. 시간이 지남에 따른 형광 신호의 시그처는 반응의 정도를 나타내었다. 티로신 키나아제의 촉매 서브유닛은 ATP 및 기질의 존재 하에서 내인성 활성 수준을 가지며, 따라서 결과는 대조군의 %로서 제시된다.

[0300] 구체적으로, 각각의 시험 화합물을 100% DMSO를 사용하여 그의 검정 농도의 25배로 희석하고, 디티오테리톨(DTT, 2mM) 및 인슐린 수용체 키나아제 영역(Millipore 카탈로그 번호 14-466, 80nM)을 함유하는 12 μL의 검정 완충 용액(100mM HEPES, 10mM MnCl<sub>2</sub>, 5mM B-GP, 및 0.002% Brij)에 첨가한 후, 15분 동안 실온에서 전항온배양(pre-incubation)하였다. 전항온배양 후, 3 μM의 형광 펩티드 기질 및 ATP(1620 μM)를 함유하는 검정 완충액(12 μL)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 추가 1.5시간 동안 추가로 항온배양하였으며, 1.5시간의 시점에서는 기질의 약 50%가 생성물로 전환되었다. 샘플을 LabChip 3000 상에 놓고서 부모 기질 및 인산화된 생성물의 양을 측정하였다.

[0301] 결과:

[0302] 상기에 기재된 IRK 활성화 검정을 사용하여, 인슐린 수용체 티로신 키나아제(IRK)를 활성화하는 능력에 대하여 화합물을 100 μM에서 평가하였다. 이 검정의 결과가 표 3에 나타나 있다.

**표 3**

[0303] 100 μM의 화합물이 인슐린 수용체 키나아제의 활성화에 미치는 영향

화합물	대조군 초과 평균 %활성 (± SEM)
RLip-EA-OH	78 ± 15
R/SLip-EA-OH	14 ± 1
SLip-EA-OH	4 ± 12
R/SLip-EA-OH	1 ± 6

[0304] 실시예 4: RLip-EA-OH는 IGF1R 키나아제 및 Src 티로신 키나아제를 활성화한다

[0305] 재료 및 방법: IGF1 및 Src 티로신 키나아제 활성화 검정

[0306] IGF1R 및 Src 티로신 키나아제는 ATP 및 기질의 존재 하에서 내인성 활성 수준을 갖는다. 인산화 및 비인산화된 기질 둘 모두를 검출하기 위한 Caliper LabChip® 3000 및 12-시퍼 LabChip® (Caliper Life Sciences, Discovery Alliances and Services Division)을 사용하여 이동도 변화 검정을 사용하여 이 활성을 용이하게 측정하였다. 효소, 기질 및 ATP 농도를 각각의 검정에 대하여 최적화하였다. IGF1R 검정의 경우, 효소, 펩티드 및 ATP의 최종 농도는 각각 20nM, 1.5 μM, 및 1220 μM이었다. Src 검정의 경우, 효소, 펩티드 및 ATP의 최종 농도는 각각 2.5nM, 1.5 μM, 및 17 μM이었다.

[0307] IGF1 수용체 키나아제(IGF1R) 및 Src의 활성화에 미치는 영향에 대하여 다수의 농도에서 RLip-EA-OH를 평가하였다. 100 μM 농도의 상이한 Lip-EA 화합물이 키나아제 활성화에 미치는 영향이 표 4a에 나타나 있다. 시험된 화합물은 상이한 선택성을 갖고서 IGF1R 및 Src를 활성화하였다.

[0308] 300 μM의 RLip-EA-OH 또는 RLip-OH가 상이한 티로신 키나아제의 활성화에 미치는 영향을 또한 평가하였다(표 4b). 이 농도에서, RLip-EA-OH는 RLip-OH보다 비히클 대조군 대비로, IRK 및 Src 티로신 키나아제 둘 모두에 있어서 상당히 더 큰 활성화를 유도하였다.

**표 4**

a. 100 μM의 화합물이 IGF1R 및 Src 키나아제의 활성화에 미치는 영향

화합물	대조군 초과 IGF1R %활성 (± SEM)	대조군 초과 Src %활성 (± SEM)
RLip-EA-OH	42 ± 1	70 ± 1
R/SLip-EA-OH	27 ± 3	43 ± 1
R/SLip-EA-OH	17 ± 12	29 ± 1
SLip-EA-OH	-4 ± 10	19 ± 1

b. 300 μM의 RLip-EA-OH 및 RLip-OH가 IRK, IGF1R 및 Src 티로신 키나아제의 활성화에 미치는 영향. 이 데이터는 비히클 대조군 초과 활성화의 %증가이다.

티로신 키나아제	300 μM에서의 활성화의 %증가	
	RLip-EA-OH	R- -Lip-OH
IRK	77 ± 7	48 ± 1
IGF1R	33 ± 3	37 ± 4
Src	78 ± 2	15 ± 1

[0309]

[0310]

실시예 5: RLip-EA-OH는 배양 세포에서 아포토시스를 방지하고 세포 생존을 촉진시킨다

[0311]

재료 및 방법: 주르카트(Jurkat) 세포에서의 세포 생존 검정

[0312]

세포 사멸 매개 단백질인 수용체 상호작용 단백질(Receptor-Interacting Protein, RIP)이 결핍된 주르카트 세포를 사용하여, RLip-EA-OH가 아포토시스를 예방하고 세포 생존을 촉진시키는 능력을 평가하였다. 주르카트 세포주는 사람 T 림프구로부터 유래된다. RIP 결핍 주르카트 세포는 중앙 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor alpha, TNF α)로 처리될 때 아포토시스를 일으키기 쉽다. 이들 세포를 비히클 또는 RLip-EA-OH로 처리하고, 이어서 TNF α를 사용하여 아포토시스를 촉발시켰다. RLip-EA-OH가 TNF α 유도 아포토시스에 대항하여 세포를 보호하였는지를 평가하기 위하여 세포 생존을 평가하였다.

[0313]

RIP 결핍 주르카트 세포를 웰당 20,000 세포수로 하여 96웰 플레이트 내로 시딩(seeding)하고, RLip-EA-OH(각각의 농도에 대하여 6개의 웰) 또는 DMSO로 2시간 동안 처리하였다. 전처리 후, 약물의 각각의 용량에 대하여 3개의 웰을 10ng/mL의 사람 재결합 TNF α에 노출시켰다(나머지 다른 3개의 웰에는 TNF α를 첨가하지 않았다). TNF α를 처리하고 24시간 후에, ATP 세포 생존력을 결정하였으며(CellTiter-Glo, Promega), 이들 값을 사용하여 세포의 %생존을 계산하였다.

[0314]

RLip-EA-OH의 부재 하에서, 세포의 약 20%는 TNF α 처리를 견뎌내지 못했다. 세포를 RLip-EA-OH로 처리한 것은 용량 의존적 방식으로 TNF α 유도 세포 사멸을 방지하였다(표 5).

**표 5**

[0315]

RIP 결핍 주르카트 세포에서 RLip-EA-OH가 TNF α 유도 아포토시스에 미치는 영향

RLip-EA-OH (μM)	0*	0.006	0.012	0.05	0.1	0.2	1.5
%생존 (%)	82	84	95	96	98	101	106
SD	0.1	3	7	5	3	6	3

- [0316] \* 대조군
- [0317] 실시예 6: RLip-EA-OH는 배양 세포에서 카르바콜 자극에 의한 세포내 칼슘의 증가를 용량 의존적 방식으로 억제한다
- [0318] 재료 및 방법: 시토졸 칼슘 과부하 검정
- [0319] 시토졸 칼슘은 카르바콜에 의해 자극될 때 CHO M1-WT3 세포에서 증가하며([Molecular Devices, FlexStation Application Note 2, Comparison of FLIPR<sup>®</sup> and FLEXstation<sup>™</sup> for Calcium Mobilization Assays]), 이는 칼슘과 결합하는 형광 염료를 사용하여 검출될 수 있다. 카르바콜 자극 후의 형광의 증가는 시토졸 칼슘의 증가로서 해석된다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포가 96웰 배양 플레이트의 바닥에 부착되게 두었다. 형광 염료 및 시험 샘플을 플레이트 상에 놓고 세포에 의해 흡수되게 두었다. 플레이트 리더(plate reader)(Flexstation II, Molecular Devices, 미국 캘리포니아주 서니베일 소재)를 사용하여 2초마다 형광 수준을 측정하였다. 카르바콜을 사용하여 세포를 자극하였으며, 카르바콜 자극 후 기준선 초과 형광에서 피크 증가로서 형광 데이터를 보고하였다. 데이터를 대조군 샘플에서의 피크 카르바콜 응답에 대해 정규화하였다.
- [0320] 세포주 CHO-M1-WT3으로부터의 CHO 세포를 10% FBS 및 5 µg/mL G418로 보충된 Hams F12 배지 내에서 성장시켜 M1 무스카린 수용체의 발현을 유지하였다. 실험 전날 밤에, 세포를 흑색 벽의 투명 바닥 96웰 마이크로플레이트 (“검정 플레이트”)d의 웰당 100 µL의 부피로 30,000 세포수/웰의 농도로 시딩하였다. 세포를 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 향온배양하였다. 다음 날, 2.5mM 수용성 프로베네시드 및 지시된 농도에서의 시험 화합물 또는 비히클과 함께 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 중의 Fluo-4 NW 또는 Calcium-3과 37°C에서 60분 동안 세포를 향온배양하였다. 각각의 웰에서의 최종 부피는 200 µL였다. 세포를 FlexStation 시스템 내에 넣고서, 200nM의 최종 농도에 대하여 50 µL의 1 µM 카르바콜의 첨가 전과 후의 형광을 모니터링하였다. 카르바콜 첨가 전 17초 동안 그리고 카르바콜 첨가 후 43초 동안 형광을 측정하였다. Fluo-4 염료는 485nm의 파장에서 여기시켰으며, 발광이 525nm에서 측정되었다. Calcium-3 염료는 494nm의 파장에서 여기시켰으며, 발광이 525nm에서 측정되었다. 피크 형광 - 기준선 형광(카르바콜 첨가 전에 형광의 평균으로서 계산됨)으로서 칼슘 응답을 기록하였다.
- [0321] 결과:
- [0322] CHO M1-WT3 세포에서 RLip-EA-OH, RLip-OH 및 Ac-EA-OH가 칼슘 과부하를 방지하는 능력을 결정하였다. 무스카린 M1 수용체를 발현하는 CHO 세포의 시토졸 칼슘의 피크 상승을 카르바콜 자극에 따라 측정하였다. RLip-EA-OH는 용량 의존적 방식으로 시토졸 칼슘의 플럭스를 감소시킨 반면, RLip-OH 및 Ac-EA-OH는 최소한의 효과를 가졌다(도 4). RLip-EA-OH는 카르바콜 자극에 의한 시토졸 칼슘의 증가에 대하여 억제 효과를 가졌으며, 그 억제는 용량 의존적이다. RLip-OH 및 Ac-EA-OH는 단지 약간의 시토졸 칼슘 감소 활성을 가졌다.
- [0323] 실시예 7: RLip-EA-OH는 RLip-OH보다 더 큰 퍼옥실 라디칼 흡수 능력을 보여준다
- [0324] 재료 및 방법: 산소 라디칼 흡수 능력(ORAC) 검정
- [0325] 퍼옥실 라디칼은 재관류 동안 세포에 의해 생성되는 반응성 산소종의 하나이다. 퍼옥실 라디칼의 존재는 플루오레세인 산화에 의해 검출될 수 있다. 퍼옥실 라디칼의 존재 하에서, 플루오레세인 형광은 시간이 지남에 따라 감소될 것이다. 산소 라디칼 포착제의 존재 하에서, 감소 속도는 감소된다. 대조군의 감소 속도와 포착제의 존재 하에서의 감소 속도 사이의 변화를 사용하여 시험 화합물의 퍼옥실 라디칼 포착 능력을 측정한다.
- [0326] 시험된 각각의 화합물을 10nM 플루오레세인을 함유하는 10mM 인산염 완충액(pH = 7.4) 중에 25 µM 내지 250 µM 범위의 농도로 희석하였다. 이 완충액 및 화합물을 37°C에서 10분 동안 향온처리하였다. 향온처리 후, 플레이트 리더(Molecular Devices Flexstation II, Ex = 485, Em = 520)를 사용하여 플루오레세인 형광을 측정하였다. 기준선 형광 측정을 15분 동안 기록한 후, 2,2'-아조비스(2-메틸프로피온아미드) 디하이드로클로라이드(AAPH)를 첨가하였다. 형광 감소를 90분 동안 기록하였다. 화합물을 사용했을 때의 형광 감소에서 화합물이 없었을 때의

형광 감쇠를 빼었다. 감쇠 대 농도의 기울기를 흡수 능력으로서 기록하였다.

[0327] 결과:

[0328] 리포일 함유 화합물에 대한 퍼옥실 라디칼 흡수 능력을 결정하였다(표 6a 및 표 6b). RLip-EA-OH는 RLip-OH보다 더 큰 퍼옥실 라디칼 흡수 능력을 나타내었다. 이들 결과는 또한 아세틸-글루타밀알라닌은 주목할 만한 퍼옥실 라디칼 흡수 능력을 갖지 않기 때문에, ORAC 검정에서 퍼옥실 라디칼을 포착하는 데에는 리포일 부분이 중요하다는 것을 나타낸다.

**표 6**

a. RLip-OH 대비 ORAC 검정 결과

화합물	ORAC 값
RLip-OH	100 ± 6 *
RLip-EA-OH	131 ± 6
Ac-EA-OH	8 ± 5 †

값은 3 내지 4 회 실험의 평균이다.

b. RLip-EA-OH 대비 ORAC 검정 결과

화합물	ORAC 값
RLip-EA-OH	100 ± 11
R/SLip-EA-OH	102 ± 10
SLip-EA-OH	89 ± 4

값은 3 내지 4 회 실험의 평균이다.

[0329]

[0330] 실시예 8: RLip-EA-OH는 생체내에서 허혈 재관류 손상에 대하여 심근을 보호한다

[0331] 재료 및 방법: 심근 I/R 손상의 래트 모델

[0332] 심근 I/R 손상의 래트 모델을 생체내 스크린으로서 사용하여 어떤 리포산 유도체 화합물이 (예컨대, 심근 허혈 재관류 손상에 대하여) 심장-보호를 나타내는지 결정하였다. 이 모델은 관 폐색(coronary occlusion) 및 심장 외과 시술, 예를 들어 관상 동맥 우회 이식술(coronary artery bypass grafting, CABG) 후의 심장 환자에서 관찰되는 허혈 재관류 손상과 유사하다(문헌[Matsui, T., Tao, J., del Monte, F., Lee, K.-H. et al., Akt Activation Preserves Cardiac Function and Prevents Injury After Transient Cardiac Ischemia *In vivo*, *Circulation* 2001, 104:330]).

[0333] 일반적 절차

[0334] 좌관상 동맥의 회선지를 일시적으로 결찰하여 좌심실 부분에서 국소 허혈을 유도하고, 이어서 형광 미소구체를 주사하여 허혈 부위의 윤곽을 나타내었다. 재관류 후 24시간에 동물을 희생시키고, 심장을 절제하며, 절개하고, 트리페닐테트라졸륨염으로 염색하였다. 심근 경색 면적(MI), 허혈 위험 면적(AR) 및 좌심실 면적(LV)을 측정함으로써 약리학적 개입의 직접적인 영향을 결정하였다. AR에 대한 MI(MI/AR 비)의 감소를 비히클 대조군 대비 약물 효능의 1차 척도로서 사용하였다.

[0335] 상세 절차

- [0336] 300 내지 350g의 수컷 스프라그-돌리 래트를 이들 실험에 사용하였다. 유도실 내에서 3 내지 4% 이소플루란을 사용하여 마취를 유도하였다. 유도 후, 1.5 내지 2.0% 이소플루란(경구적으로 기관 내로 도입된 16게이지 혈관 카테터(angiocatheter)를 통해 설치류 호흡기(Rodent Ventilator)에 의해 투여됨)을 사용하여 수술면(surgical plane)에서 마취를 유지하였다. 호흡기를 분당 60 내지 65 호흡수의 속도에서 2.5cc로 설정하여 수술 동안 호흡을 유지하였다. 온도 제어기에 부착된 직장 프로브 및 가열 램프를 사용하여 동물의 심부 온도(core temperature)를 모니터링하고 37°C로 유지하였다.
- [0337] 좌전 개흉술(left anterior thoracotomy)을 실시하고, 수직 심막절개술(vertical pericardotomy)을 사용하여 심장을 노출시켰다. 11mm 바늘에 심혈관용 7.0 모노필라멘트 봉합사를 사용하여, 좌관상 동맥(LCx)의 회선지를 대동맥으로부터 약 4mm 되는 곳에서 결찰하여 좌심실에서 허혈을 유도하였다.
- [0338] 결찰 후 10 내지 20분에 형광 미소구체(300  $\mu$ L)를 좌심실강 내로 주사하여 허혈 영역의 윤곽을 표시하였다. 결찰 후 30분에 봉합사를 제거하여 허혈 영역을 재관류시키고 허혈 영역을 재관류에 대하여 체크하였다.
- [0339] 이어서, 근육층을 위한 흡수성 봉합사(Dexon 5-0)를 사용하여 가슴을 층 봉합(close in layers)하고, 모노필라멘트 Nylon 5-0 봉합사를 사용하여 피부층을 봉합하였다. 동물을 회복시키고, 이어서 콜로니로 되돌려 보냈다.
- [0340] 재관류시키고 24시간 후에, 케타민 염산염을 사용하여 마취를 유도하고, 개흉하였다. 15% 염화칼륨 수용액(w/v)을 LV 강 내로 주사하여 동물을 희생시켜 확장기에 심장을 정지시켰다. 심장을 대동맥 판막의 원위부에서 절제하고, 식염수로 세척하여 혈액을 제거하였다. 심실의 기저(base)와 심첨(apex) 사이에서 심장의 시상방향 슬라이스(sagittal slice)를 얻었다. 심장 조직의 5개의 슬라이스를 얻었으며, 각각은 두께가 2mm였다. 이들 슬라이스를 식염수 용액 중의 1% 2,3,5-트리페닐-2H-테트라졸륨 클로라이드(TTC) 중에 침지하고, 이어서 어두운 곳에서 30분 동안 저장하여 염색하였다.
- [0341] (TTC 염색을 관찰하기 위하여) 명시야 하에서, 그리고 (미소구체를 관찰하기 위하여) 형광 하에서 슬라이스의 영상을 얻었다. 미소구체의 부재에 의해 위험 면적을 측정하였으며, TTC 염색의 부재에 의해 경색 면적을 측정하였다.
- [0342] 결과:
- [0343] 심근 허혈 재관류 모델에서의 RLip-EA-OH 처리된 동물들(n = 64) 대 식염수 비히클 처리된 동물들(n = 54)의 메타 분석은, 심실강내 주사로서 투여된 RLip-EA-OH(1mg/kg IC)가 위험 면적(AR)에 대한 심근 경색(MI) 크기를 효과적으로 감소시켰음을 보여주었다. 비히클 처리된 동물들 및 RLip-EA-OH 처리된 동물들에 대한 MI:AR 비는 각각 0.373(n = 54) 및 0.250(n = 64)였으며, 이는 집단들 사이의 차이가 33%인 것에 상응한다(p < 0.001)(도 5). RLip-EA-OH 처리 후의 심근 조직 절단면에서 심장 손상 면적의 유의한 감소가 관찰되었다.
- [0344] 래트 심근 허혈 재관류 모델에서 RLip-EA-OH의 투여 시기를 조사하였다. RLip-EA-OH를 허혈 전(pre-ischemia)(폐색 전 15분), 허혈 내(intra-ischemia)(폐색 후 15분), 또는 허혈 후(post-ischemia)(재관류 후 1분 이내)에 1mg/kg IC로 투여하였다. RLip-EA-OH는 식염수 비히클을 투여받은 동물들과 비교하여 폐색 전(38%), 폐색 동안(24%), 및 재관류시에(32%) 심근 조직 사멸을 유의하게(p < 0.05) 감소시켰다(도 6). RLip-EA-OH는 예방적으로 또는 치료적으로 어느 것으로 투여받든지 간에 심근 손상을 감소시키는 데 있어서 1mg/kg IC에서 효과적이었다. 추가적으로, RLip-EA-OH는 폐색 전 15분에 정맥내 투여될 때 다양한 투여량에서 효과적이었다(도 7). 이들 결과는 RLip-EA-OH 투여가 허혈 재관류 손상으로 인한 심장의 손상을 효과적으로 감소시킴을 나타낸다.
- [0345] 실시예 9: RLip-EA-OH 거울상 이성체는 심근 허혈/재관류 손상을 감소시키는 데 있어서 부모 부분 RLip-OH, 라세미 혼합물 R/SLip-EA-OH, 및 SLip-EA-OH 거울상 이성체보다 더 효과적이다
- [0346] 본 명세서의 실시예 8에 기재된 심근 허혈 재관류 손상의 래트 모델을 사용하여, 심근 I/R 손상의 치료에 있어서의 순수한 RLip-EA-OH 거울상 이성체의 효능과 부모 부분 RLip-OH, 순수한 SLip-EA-OH 및 라세미 혼합물 R/SLip-EA-OH의 효능을 비교하였다.

[0347] 결과:

[0348] RLip-OH(2mg/kg IC) 또는 RLip-EA-OH(1mg/kg IC)로 처리된 동물들의 메타 분석이 식염수 비히클 대조군과 비교하여 %감소로서 표 7에 나타나 있다. Ac-EA-OH, 즉 리포일 무함유 화합물을 또한 평가하였으며, 비히클과 통계학적으로 유사한 것으로 밝혀졌다(데이터가 나타나 있지 않음). 이 결과는 RLip-EA-OH에 의한 처리 후에 I/R 손상으로부터의 심장보호가 RLip-OH에 의한 처리보다 더 우수하였음을 입증한다.

**표 7**

[0349] 심근 허혈 재관류 손상의 래트 모델에서 조사된 RLip-OH 대 RLip-EA-OH의 효능 비교

화합물	비히클 대비 MI:AR 비의 감소(%)
RLip-EA-OH	31 ± 3*
RLip-OH	19 ± 7 <sup>#</sup>

[0350] \* RLip-EA-OH 처리된 동물들(n = 75) 대 비히클 처리된 동물들(n = 89)의 메타 분석에 기초한 결과

[0351] <sup>#</sup> RLip-OH 처리된 동물들(n = 18) 대 비히클 처리된 동물들(n = 19)의 메타 분석에 기초한 결과

[0352] RLip-EA-OH(1mg/kg IC) 또는 R/SLip-EA-OH(1mg/kg IC)로 처리된 동물들의 분석이 식염수 비히클 대조군과 비교하여 %감소로서 표 8에 나타나 있다. 이 결과는 RLip-EA-OH에 의한 처리 후에 I/R 손상으로부터의 심장보호가 R/SLip-EA-OH에 의한 처리보다 더 우수하였음을 입증한다.

**표 8**

[0353] 심근 허혈 재관류 손상의 래트 모델에서 조사된 RLip-EA-OH 대 R/SLip-EA-OH의 효능 비교

화합물	비히클 대비 MI:AR 비의 감소(%)
RLip-EA-OH	31 ± 3*
R/SLip-EA-OH	19 ± 5 <sup>#</sup>

[0354] \* RLip-EA-OH 처리된 동물들(n = 75) 대 비히클 처리된 동물들(n = 89)의 메타 분석에 기초한 결과

[0355] <sup>#</sup> R/SLip-EA-OH 처리된 동물들(n = 26) 대 비히클 처리된 동물들(n = 25)의 메타 분석에 기초한 결과

[0356] 단일 이성체 화합물 RLip-EA-OH와 SLip-EA-OH를 비교한 연구 결과가 표 9에 나타나 있다. 허혈성 에피소드 전 15분에 단회 볼루스(IC)로 화합물을 1mg/kg 또는 2mg/kg으로 투여하였다. 동일한 양의 RLip-EA-OH 및 SLip-EA-OH를 첨가함으로써 라세미 혼합물을 제조하였다. 라세미 R/SLip-EA-OH를 또한 평가하였다. 데이터는 위험 면적(AR)에 대한 심근 경색(MI) 크기의 감소로서 제시된다. 이 결과는 RLip-EA-OH에 의한 처리 후에 I/R 손상으로부터의 심장보호가 상응하는 SLip-EA-OH에 의한 처리보다 더 우수하였음을 입증한다.

**표 9**

[0357] Lip-EA-OH 처리된 동물들에서 위험 면적(AR)에 대한 심근 경색(MI) 크기의 감소. 9 내지 10마리의 동물/집단에 기초한 결과.

화합물	처리량 (mg/kg)	MI/AR	SEM
RLip-EA-OH	2	0.290	0.038
RLip-EA-OH + SLip-EA-OH	1 + 1	0.331	0.035
RLip-EA-OH	1	0.337	0.02
SLip-EA-OH	2	0.400	0.042
SLip-EA-OH	1	0.401	0.026

- [0358] 실시예 10: 다회 용량의 화합물을 비표준의 연장된 투여 간격으로 투여함으로써 RLip-EA-OH의 투여량을 증가시키는 것은 그의 생체내 효능을 증강시킨다
- [0359] 재료 및 방법:
- [0360] 상세 절차
- [0361] 실시예 8에 기재된 바와 같이, 심근 I/R 손상의 래트 모델을 사용하는 생체내 실험을 수행하였다. 표 10에 나타난 바와 같이, 몇몇 단회 및 다회 투여 처방계획을 시험하였다. 0.25시간 전 및/또는 0.25시간의 시점에서의 정맥내 용량 투여를 위해 카테터 삽입된(경정맥) 래트를 사용하였다.
- [0362] 결과:
- [0363] RLip-EA-OH의 단회 볼루스 투여는 I/R 손상에 대하여 넓은 시간 기간에 걸쳐(즉, 수술 전 15분, 3시간, 6시간, 또는 24시간에; 혈관 폐색시에; 그리고 혈관 내로의 재관류시에) MI 손상을 감소시키는 데 있어서 효능을 보여 주었다. 이 약물은 또한 동맥 폐색시 및 재관류시에도 효과적인 것으로 밝혀졌지만, 임의의 보다 조기의 시점(예컨대, -15분)에서 관찰된 정도만큼은 아니었다. 래트 모델에서 I/R 손상에 대한 효능의 이러한 넓은 시간 기간은 RLip-EA-OH의 짧은 혈청 반감기(즉, 래트에서 30mg/kg의 용량으로 20 µg/mL의 C<sub>max</sub>일 때 약 9분)를 고려하면 역설적이다.
- [0364] RLip-EA-OH는 I/R 손상의 래트 모델에서 허혈 전에 단회 IV 볼루스(표 10, 엔트리 1, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 및 4b)로서 상이한 용량으로 투여될 때 종형(bell-shaped) 용량 응답 곡선을 나타내었다. 허혈 전 15분에 또는 허혈 전 3시간에 투여된 단회 10mg/kg IV 볼루스 용량은 래트 모델에서 MI 손상에서 약 33% 감소를 가져온 반면에(표 10, 엔트리 4a 대 7 참조), 허혈 전 보다 조기의 시점(6시간 또는 24시간)에서의 동일한 용량의 투여는 MI 손상에서 약간 더 낮은 감소를 가져왔다(표 10, 엔트리 8, 9). RLip-EA-OH의 보다 낮은 단회 용량(1, 3 또는 5mg/kg)은 그만큼은 효과적이지 않았으며, RLip-EA-OH의 보다 높은 단회 용량(20mg/kg 또는 40mg/kg)은 유사한 시점에서 투여되었을 때, 보다 낮은 최적의 용량에서 관찰된 MI 손상의 감소를 개선하지 않았고, 일부 경우에는 효능에 유해한 영향을 미쳤다(표 10, 엔트리 4a 대 6, 엔트리 7 대 10 또는 11을 비교한다). 따라서, 시술 전에 투여된 10mg/kg 용량이 래트 모델에서 보다 낮거나 보다 높은 단회 용량보다 우수한 효능을 나타내었다. 시험된 최고 용량에서, 그 효능은 플라세보 수준 아래로는 떨어지지 않았다. 허혈 전 15분에 단회 IV 볼루스로서의, 또는 허혈 전에 60분 주입으로서의 RLip-EA-OH의 투여는 MI 손상에서 유사한 감소를 제공하였다(표 10, 엔트리 2a 대 2b, 엔트리 3a 대 3b, 엔트리 4a 대 4b를 비교한다).
- [0365] 예상 외로, 다회(2회 또는 3회) 용량의 투여에 의한 RLip-EA-OH의 투여량의 증가는 최적의 단회 용량과 비교하여 MI 손상의 감소를 개선하였다(표 10, 엔트리 12 대 15, 엔트리 7 대 15; 표 11, 엔트리 1a 대 1b; 엔트리 2a 대 2b; 표 12, 엔트리 B 대 C). 특히, RLip-EA-OH의 2회 또는 3회 용량의 투여는 최종 용량이 허혈 전 약 0.25시간에 투여되었을 때에는 단회 용량에 비하여 MI 손상의 개선된 감소를 제공하였으며(표 10, 엔트리 12 13, 및 15 대 14, 16 및 17), 재관류시에는 그렇지 않았다(표 10, 엔트리 12 및 15 대 16 및 17을 비교한다).
- [0366] 메타 분석은 최적의 단회 볼루스 용량(-3시간에서 10mg/kg)이 MI를 29%로 감소시킨 반면에, 다회 투여(-3시간 및 -0.25시간에서 10mg/kg)는 MI를 43%로 감소시켰음을 밝혔다(표 12).

**표 10**

[0367] I/R 손상의 래트 모델에서 비히클 대조군과 비교한 RLip-EA-OH의 효능

엔트리	용량(mg/kg)	시기(h)	비히클 대비 MI/AR의 %감소
1	1	-0.25	3
2a	3 (볼루스)	-0.25	6
2b	3 (1시간 주입)	- 1 h	12
3a	5 (볼루스)	-0.25	27*
3b	5 (1시간 주입)	- 1 h	27*

4a	10 (볼루스)	-0.25	33*
4b	10 (1시간 주입)		33*
5	15	-0.25	30*
6	20	-0.25	9
7	10	-3	33*
8	10	-6	24*
9	10	-24	24*
10	20	-3	26*
11	40	-3	17
12	10 및 10	-3 및 -0.25	43*
13	20 및 10	-3 및 -0.25	38*
14	10 및 10	-24 및 -3	32*
15	10 및 10 및 10	-24 및 -3 및 -0.25	42*
16	10 및 10 및 10	-3 및 -0.25 및 재관류시 에	15
17	10 및 10	-3 및 재관류시에	34*

[0368] \* 결과는 비히클보다 유의하게 우수하였다(p < 0.05).

**표 11**

[0369] I/R 손상의 래트 모델에서 RLip-EA-OH 단회 용량 및 다회 용량 처방계획의 비교 효능

엔트리	용량(mg/kg)	시기(h)	MI/AR의 %감소 <sup>§</sup>
1a	10 및 10	-3 및 -0.25	43*
1b	10	-3	29
2a	10 및 10	-3 및 -0.25	43*
2b	10	-0.25	28

[0370] \* 결과는 단회 용량보다 유의하게 우수하였다(p < 0.05).

[0371] <sup>§</sup> MI/AR의 백분율 감소는 비히클 대조군 대비 값이었다.

**표 12**

[0372] I/R 손상의 래트 모델에서 단회 용량 및 다회 용량에 대한 RLip-EA-OH 효능의 메타 분석

엔트리	MI/AR	N	SD	SE	T-검정	P-값
A- 비히클	0.366	25	0.076	0.015	B 대 A	7.66E-06
B- 단회 (10_0)	0.261	26	0.073	0.014	C 대 A	3.17E-11
C- 다회 (10_10)	0.207	25	0.052	0.010	C 대 B	0.0039

[0373] 실시예 11: RLip-EA-OH의 다회 용량을 비표준의 연장된 투여 간격으로 투여하는 것은 심장 기능장애 및 사망의 발생률을 감소시킨다

[0374] 재료 및 방법

[0375] 개입을 필요로 하는 부정맥 및 심장 정지와 관련된 급성 심장 기능장애의 발생률 및 이들의 동반이환(co-morbidity)으로 인한 사망의 발생률을, 본 명세서에 기재된 심근 I/R 손상의 래트 모델에서 RLip-EA-OH를 투여하기 위한 상이한 투여량 및 투여 처방계획에 대하여 조사하였다. 실시예 10에 기재된 투여 간격을 사용하여 실시예 8에 기재된 바와 같이 생체내 실험을 수행하였다. 처리물질(즉, 비히클, RLip-EA-OH)을 좌심실내 주사, IV

볼루스, IV 주입, 또는 경구로 투여하였다. 구체적으로는, 허혈 동안에 발생되고 개입(직접적인 기계적 심장 소생술)을 필요로 하는 스스로 호전되지 않는(non-self-resolving) 심장 기능장애(즉, 연장된 세동 부정맥, 갑작스런 심장 정지)의 발생률, 및 심장 기능장애와 관련된 사망률을 관찰하였다.

[0376] 결과:

[0377] RLip-EA-OH의 다회 투여 및 단회 투여는 비히클 대조군에 비하여 생명을 위협하는 심장 기능장애 및 이와 관련된 심장 기능장애를 경감시키기 위한 개입의 필요성의 발생률뿐만 아니라, 이러한 생명을 위협하는 심장 기능장애와 관련된 사망률을 감소시켰다(표 14). 다회 투여 처방계획은 단회 용량 투여보다 유의하게 우수한 효능을 나타내었다.

표 14

[0378] I/R 손상의 래트 모델에서 RLip-EA-OH의 단회 용량 및 다회 용량 투여 후의 급성 심장 기능장애의 발생률 및 관련 사망률

처리	비히클	다회 용량 (3x)	다회 용량 (2x)	단회 용량
부정맥/정지로 인한 개입(%)	14/20 (70)	4/18 (22)	3/19 (16)	6/17 (35)
사망률 (%)	5/20 (25)	1/18 (5)	1/19 (5)	2/17 (12)

[0379] 실시예 12: 래트에서 RLip-EA-OH의 약동학적 평가

[0380] RLip-EA-OH에 대한 전신 노출을 평가하기 위하여, 비히클(2마리/성별) 또는 RLip-EA-OH의 단회 정맥내 주입 용량을 30, 100, 또는 200mg/kg(6마리/성별/집단)의 동일한 용량 수준으로 래트의 집단에 투여하였다. 비히클 처리된 집단의 경우, 모든 래트로부터 투여 전과, 투여 후 30분(+2분)에서만 혈액 샘플을 수집하였다. RLip-EA-OH 처리된 집단의 경우, 3마리의 래트/성별/집단으로부터 투여 후 10분, 30분, 45분, 및 1, 2, 3, 및 4시간(±2분)에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0381] 대퇴 정맥 내에 외과적으로 배치된 카테터 내로 0.2mL/분 이하의 주입 속도로 시린지 펌프를 사용하여 IV 주입에 의해 투여하였다. 각각의 동물에 대한 용량 부피는 가장 최근에 측정된 체중에 기초하였으며, 용량은 0.1mL 단위로 반올림하였다.

[0382] 독성동태(toxicokinetic) 동물의 꼬리 정맥으로부터 약 0.5mL의 전정맥혈(whole venous blood) 샘플을 수집하여 혈장을 제공하고 혈장 중의 RLip-EA-OH 농도를 측정하였다.

[0383] 샘플을 K3EDTA가 들어 있는 튜브 내에 넣고, 냉장 하에서 3000 rpm에서 적어도 10분 동안 원심분리될 때까지 얼음 위에서 저장하였다. 원심분리 후, 혈장을 제거하고, 분석을 위하여 미국 인디애나주 웨스트 라피엣 소재의 BASi로 수송될 때까지 -70°C 이하에서 냉동된 상태로 저장하였다.

[0384] 미국 인디애나주 웨스트 라피엣 소재의 BASi에서, 다중 반응 모니터링 모드로, 포지티브 터보 이온 스프레이와 함께 입증된 LC/MS/MS 방법을 사용하여 혈장 RLip-EA-OH 농도를 측정하였다. 이 검정에 대하여 정량화 가능한 범위는 0.05 내지 50 µg/mL였으며, QC 샘플을 0.15, 10 및 37.5 µg/mL로 포함시켰다. WinNonlin 버전 5.1을 사용하여 표준 파라미터의 계산에 의해 독성동태 분석을 수행하였다.

[0385] 이 분석의 결과가 표 15에 나타나 있다.

표 15

[0386] 30mg/kg용량에 대한 RLip-EA-OH에 대한 래트 약동학적 데이터

C <sub>max</sub> (µg/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-∞</sub> (h*µg/mL)	CL (L/h/kg)	V <sub>ss</sub> (L/kg)
20	0.15	약 7.0	4.5	1.2

[0387] 실시예 13: 사람에서 RLip-EA-OH의 약동학적 평가

[0388] 재료 및 방법:

[0389] 생물학적 분석 방법

[0390] BASi, Inc.(미국 인디애나주 웨스트 라피엣 소재)에서, 다중 반응 모니터링 모드로, 포지티브 터보 이온 스프레이와 함께 LC/MS/MS 방법을 사용하여 혈장 및 소변 RLip-EA-OH 농도를 측정하였다. 사람 혈장에 대하여 정량화 가능한 범위는 1.00 내지 500ng/mL였으며, QC 샘플을 3.00, 75.0 및 375ng/mL로 포함시켰다.

[0391] 데이터 세트의 분석

[0392] PK 모집단은 RLip-EA-OH를 투여받은 대상을 포함하였으며, 투여 후 1회 이상의 PK 측정을 가졌다. 임의의 대상이 투약에 대하여 순응하지 않거나 불완전한 데이터를 갖는 것으로 확인되었다면, 분석에 있어서 그들의 포함에 대해서는 사례별로 결정하였다. 24명의 대상(6명의 RLip-EA-OH 대상/코호트(cohort))으로부터의 혈장 샘플을 분석하였다(표 16 및 표 17).

[0393] 결과:

[0394] 평균 혈장 RLip-EA-OH 농도 대 시간 데이터가 도 9a 및 도 9b에 각각 선형 및 반로그 눈금상에 나타나 있다. 혈장 농도는 다단계적으로(in a multi-phasic manner) 빠르게 감소되었다.

[0395] 비구획(noncompartmental) 방법 및 구획(compartmental) 방법 둘 모두에 대한 PK 파라미터의 요약이 표 14 및 표 15에 제공되어 있다. RLip-EA-OH의 평균 말기 단계(terminal-phase)  $t_{1/2}$ 는 짧았으며, 20mg 용량에서의 평균 0.86시간 내지 300mg 용량에서의 평균 1.45시간의 범위에 있었다.  $AUC_{inf}$  증가는 용량에서의 증가보다 약간 더 컸으며, 583 내지 16483h\*ng/mL의 범위에 있었다. CL은 용량이 증가함에 따라 약간 감소하였으며, 300mg 용량의 경우의 19.3 L/h 내지 20mg 용량의 경우의 35.3 L/h의 범위에 있었다. 중앙 구획의 분포의 부피( $V_c$ )는 약 6 리터로 상대적으로 작았다.  $V_{ss}$ 는 2배 내지 3배 더 커서 약 12 내지 18리터의 범위에 있었으며, 용량이 증가함에 따라 감소하였다.

[0396] 요중 배설 데이터는 투여된 용량의 약 30 내지 45%가 16시간의 수집 간격에 걸쳐 요중에 그대로 배설되었음을 나타내었다. 요중 배설의 대부분은 처음 4시간 내에 일어났다.

**표 16**

비구획 약동학적 파라미터의 요약

[0397]

	RLip-EA-OH 20mg (N = 6)	RLip-EA-OH 60mg (N = 6)	RLip-EA-OH 150mg (N = 6)	RLip-EA-OH 300mg (N = 6)
$C_{max}$ (ng/mL)				
평균 (SD)	1827 (475)	6557 (1086)	17067 (1980)	42233 (9569)
중앙값	1845	6840	16950	42150
최소, 최대	1220, 2420	5190, 7990	14900, 20000	32000, 58100
$AUC_{0-t}$ (ng-h/mL)				
평균 (SD)	581 (108)	2252 (586)	6976 (1473)	16453 (4383)
중앙값	556	1975	6901	16516
최소, 최대	466, 717	1718, 3109	4972, 9328	11633, 23073
$AUC_{inf}$ (ng-h/mL)				
평균 (SD)	583 (108)	2256 (587)	6989 (1478)	16463 (4383)

중앙값	558	1978	6922	16524
최소, 최대	467, 718	1722, 3114	4977, 9341	11644, 23082
V <sub>ss</sub> (L)				
평균 (SD)	18.5 (3.1)	14.9 (2.4)	13.6 (2.4)	11.7 (2.2)
중앙값	18.7	14.8	13.2	11.1
최소, 최대	14.4, 22.4	11.3, 18.6	9.9, 16.6	8.9, 15.1
CL (L/h)				
평균 (SD)	35.3 (6.3)	28.0 (6.4)	22.3 (4.8)	19.3 (5.1)
중앙값	35.9	30.3	21.8	18.2
최소, 최대	27.9, 42.8	19.3, 34.9	16.1, 30.1	13.0, 25.8
t <sub>1/2</sub> (h)				
평균 (SD)	0.86 (0.31)	1.21 (0.23)	1.23 (0.19)	1.45 (0.58)
중앙값	0.76	1.26	1.25	1.14
최소, 최대	0.61, 1.41	0.84, 1.50	0.97, 1.52	0.99, 2.35
그대로 배출된 비율(%)				
평균 (SD)	28.5 (9.6)	39.1 (4.0)	32.5 (13.9)	43.6 (8.8)
중앙값	31.0	40.6	33.3	46.3
최소, 최대	16.2, 37.6	32.4, 43.0	17.5, 48.3	32.4, 54.9
신장 청소율 (L/h)				
평균 (SD)	10.09 (3.94)	10.85 (2.36)	7.44 (4.29)	8.47 (2.59)
중앙값	11.15	11.25	5.88	8.42
최소, 최대	4.85, 15.28	8.09, 13.18	3.51, 14.56	5.11, 11.98

표 17

구획 약동학적 파라미터의 요약

[0398]

	RLip-EA-OH 20mg (N = 6)	RLip-EA-OH 60mg (N = 6)	RLip-EA-OH 150mg (N = 6)	RLip-EA-OH 300mg (N = 6)
추산된 C <sub>max</sub> (ng/mL)				
평균 (SD)	2358 (771)	6867 (1441)	18085 (2342)	46257 (13787)
중앙값	2477	6288	18442	43432
최소, 최대	1365, 3337	5525, 9048	14178, 20643	31037, 70140
V <sub>1</sub> (L)				
평균 (SD)	6.61 (3.20)	6.62 (1.65)	6.09 (1.42)	4.91 (1.56)
중앙값	6.13	6.69	5.86	5.59
최소, 최대	2.56, 10.7	4.68, 8.68	4.04, 8.32	2.50, 6.53
AUC <sub>inf</sub> (ng-h/mL)				
평균 (SD)	621 (130)	2259 (612)	7034 (1581)	16450 (4422)
중앙값	614	1912	6925	16424
최소, 최대	474, 787	1771, 3163	4889, 9608	11503, 22598
V <sub>ss</sub> (L)				
평균 (SD)	16 (4)	14 (2)	13 (3)	11 (3)
중앙값	16	15	13	11
최소, 최대	11, 20	10, 17	9, 17	8, 16
CL (L/h)				

평균 (SD)	33.4 (7.0)	28.0 (6.5)	22.2 (5.1)	19.4 (5.3)
중앙값	32.7	31.4	21.8	18.3
최소, 최대	25.4, 42.2	19.0, 33.9	15.6, 30.7	13.3, 26.1
t <sub>1/2</sub> (h)				
평균 (SD)	1.0 (0.4)	1.5 (0.5)	1.8 (0.8)	1.5 (0.6)
중앙값	0.8	1.4	1.4	1.2
최소, 최대	0.6, 1.6	1.1, 2.6	1.1, 3.3	1.0, 2.5

[0399] [참고문헌]

[0400] Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 1996, 15, 6541-6551.

[0401] Alessi and Cohen, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1998), 55-62.

[0402] Alessi et al., *Curr. Biol.* 8 (1998), 69-81.

[0403] Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5<sup>th</sup> Ed., Wolff, M.E., ed., New York: John Wiley, and Sons, Inc., 1995, 172-178, 949-982.

[0404] Bird TD, *In: Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14<sup>th</sup> Ed., Fauci AS et al., eds, New York: McGraw-Hill, 1998, Chapter 26.

[0405] Buddhadeb, D., Takano, H., Tang, X.-L., et al., Role of Src protein tyrosine kinase in late preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol* 2002, 283:H549.

[0406] Chan et al., *Adv. Neurol.*, 71:271-279 (1996);

[0407] Chen, X., Zhang, X., Hubo, H., et al., Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res* 2005, 97:1009.

[0408] Congi, F., et al., *Presse. Med.*, 24: 1115-1118 (1995).

[0409] Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T.O., Tsichlis, P.N. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase: Activation by growth factors, v-src and vHa-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem* 1996, 271: 30835.

[0410] Diesel, B., Kulhanek-Heinze, S., Holtje, M., et. al., α-Lipoic Acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis. *Biochemistry*, 2007 46:2146.

[0411] DiGuseppi, J. and Fridovich, I., *Crit. Rev. Toxicol.*, 12:315-342 (1984)

[0412] Erdinçler, D. S., et al., *Clin. Chim. Acta*, 265: 77-84 (1997).

[0413] Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.

[0414] Greene, T.W., Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.

[0415] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., eds. (Oxford: Clarendon Press, 1989)

[0416] Hausenloy, D.J., Yellon, D.M. Reperfusion injury salvage kinase signaling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007, 12:217.

[0417] Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004, 61:448.

[0418] Joseph, S.K., Hajnoczky, G., IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca<sup>2+</sup> release and beyond.

*Apoptosis* 2007, 12:951.

- [0419] Khan, M.T., Wagner, L. II, Yule, D.I., Bhanumathy, C., Joseph, .S.K. 2006, Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *J Biol Chem* 281:3731.
- [0420] Kulik, G., Klippel, A., Weber, M.J. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol* 1997, 17:1595.
- [0421] Lopes-Neblina, F., Toledo, A.H., Toledu-Pereyra, L.H. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2005, 18:335.
- [0422] Lucchesi, B. R., *Am. J. Cardiol.*, 65:141-231 (1990).
- [0423] Mecocci, P. et al., *Free Radio. Biol. Med.*, 28: 1243-1248 (2000).
- [0424] Matsui, T., Tao, J., del Monte, F., Lee, K.-H. et al, Akt Activation Preserves Cardiac Function and Prevents Injury After Transient Cardiac Ischemia *In vivo*, *Circulation* 2001, 104:330.
- [0425] Molecular Devices, FlexStation Application Note 2, Comparison of FLIPR<sup>®</sup> and FLEXstation<sup>™</sup> for Calcium Mobilization Assays
- [0426] Moini, H., Tirosh, O., Park, Y.C., et al., R- $\alpha$ -Lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 2002, 397:384.
- [0427] Otani, H., Ischemic preconditioning: From molecule mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10:207.
- [0428] Packer, L., Witt, E.H., and Tritschler, H.J., Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995, 19:227.
- [0429] Pasdois, P., Quinlan, C.L., Rissa, A., et al., Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving Src kinase, mitoKATP, and ROS. *Am J Physiol* 2006, 292:H1470.
- [0430] Pinton, P., Rizzuto, R., Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Diff* 2006, 13:1409.
- [0431] Piper, H. M., Abdallah, C., Schafer, C., The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Annals of Thoracic Surgery* 2003, 75:644.
- [0432] Pulsinelli, W. A. et al., *Ann. Neurol.*, 11: 499-502 (1982).
- [0433] Raphael, J., Abedat, S., Rivo, J., et al., Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling by modulation of Bcl-2 family proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 318:186.
- [0434] Ratanis, Pharmaceutical Executive, pp. 74-80 (April 1991).
- [0435] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.
- [0436] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al., Heart disease and stroke statistics - 2008 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008, 117:e25-e146.
- [0437] Suzuki, Y.J., Growth factor signaling for cardioprotection against oxidative stress-induced apoptosis. *Antiox Redox Signal* 2003, 5:741.
- [0438] Thomenius, M.J. and Distelhorst, C. W., Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *J Cell Sci* 2003, 116:4493.
- [0439] 미국 특허 제3,854,480호 (Zaffaroni에게 발행됨).
- [0440] 미국 특허 제4,452,775호 (Kent에게 발행됨).

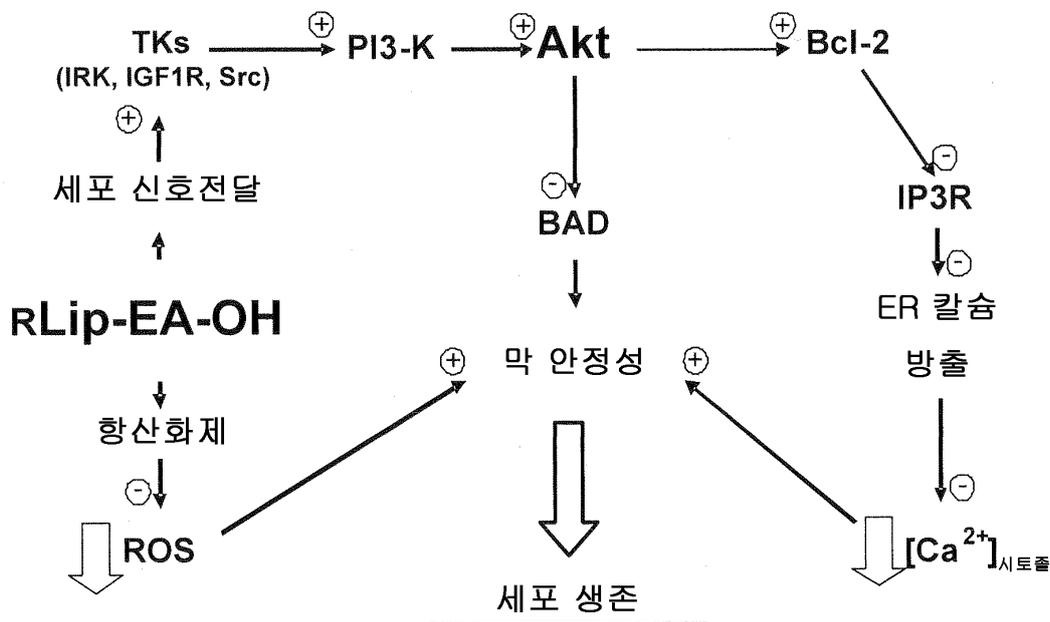
- [0441] 미국 특허 제5,039,660호 (Leonard에게 발행됨).
- [0442] 미국 특허 제5,990,092호 (Walsh에게 발행됨).
- [0443] 미국 특허 제 6,890,896호.
- [0444] 미국 특허 출원 제2004/0122077호.
- [0445] 미국 특허 출원 제2006/0241168호.
- [0446] 미국 특허 출원 제2007/0219139호.
- [0447] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994, 269:5241-5248
- [0448] Walton, M. et al., *Brain Res. Rev.*, 29:137-168 (1999)
- [0449] Yellon D. M., Hausenloy D. J., Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* 2007, 357:1121.

[0450] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참고문헌의 교시 내용은 전체적으로 참고로 포함된다.

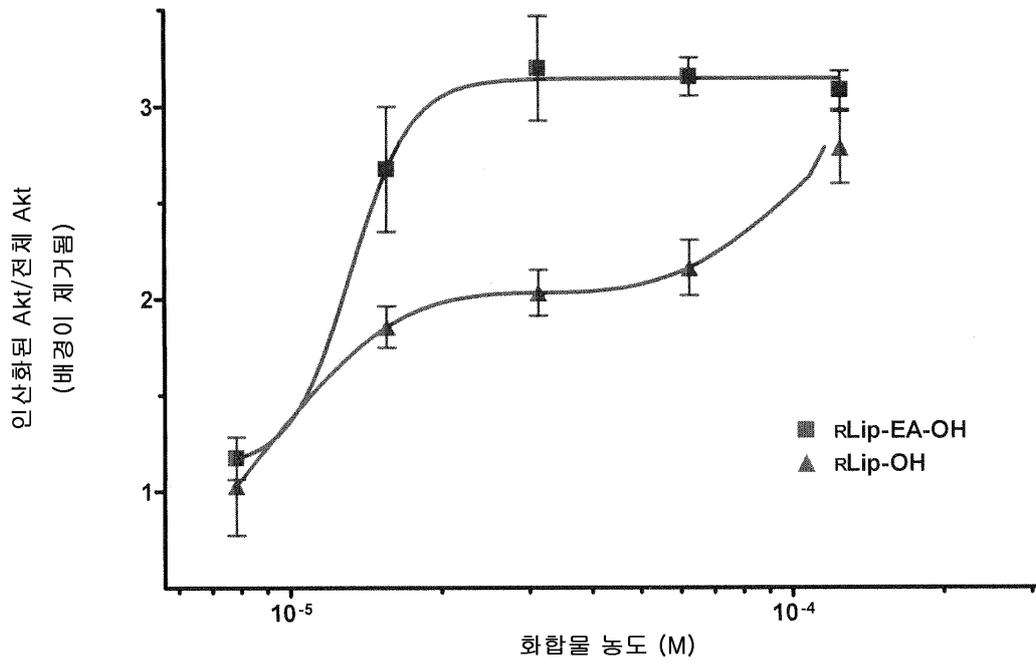
[0451] 본 발명은 특별히 그의 예시적인 실시 형태를 참고하여 보여주고 설명되어 있지만, 첨부된 특허청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주를 벗어남이 없이 형태 및 세부사항에 있어서의 다양한 변경이 본 발명에서 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

**도면**

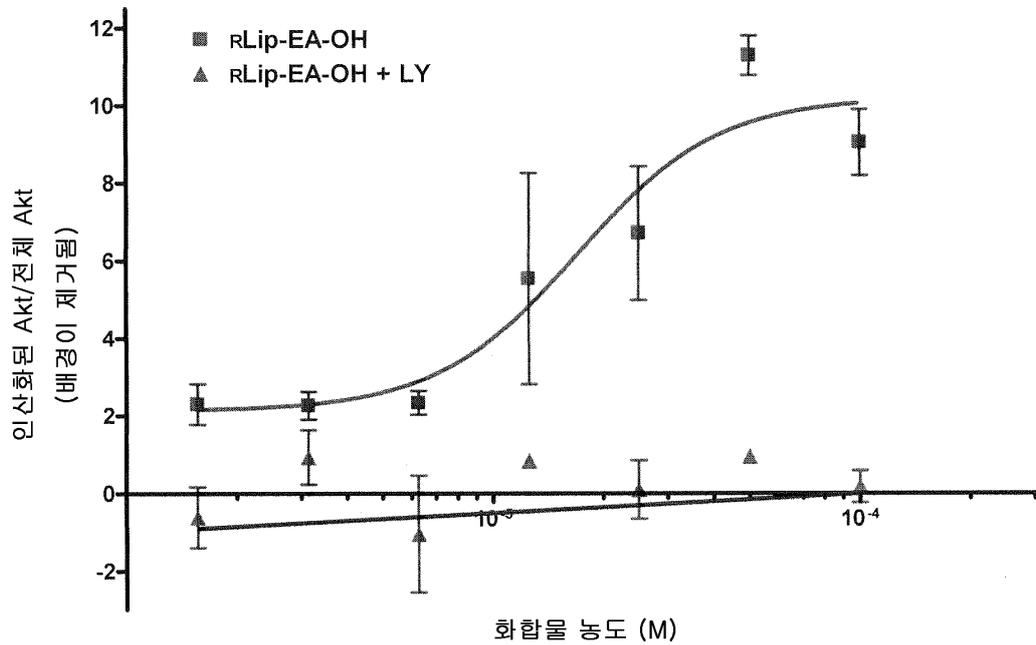
**도면1**



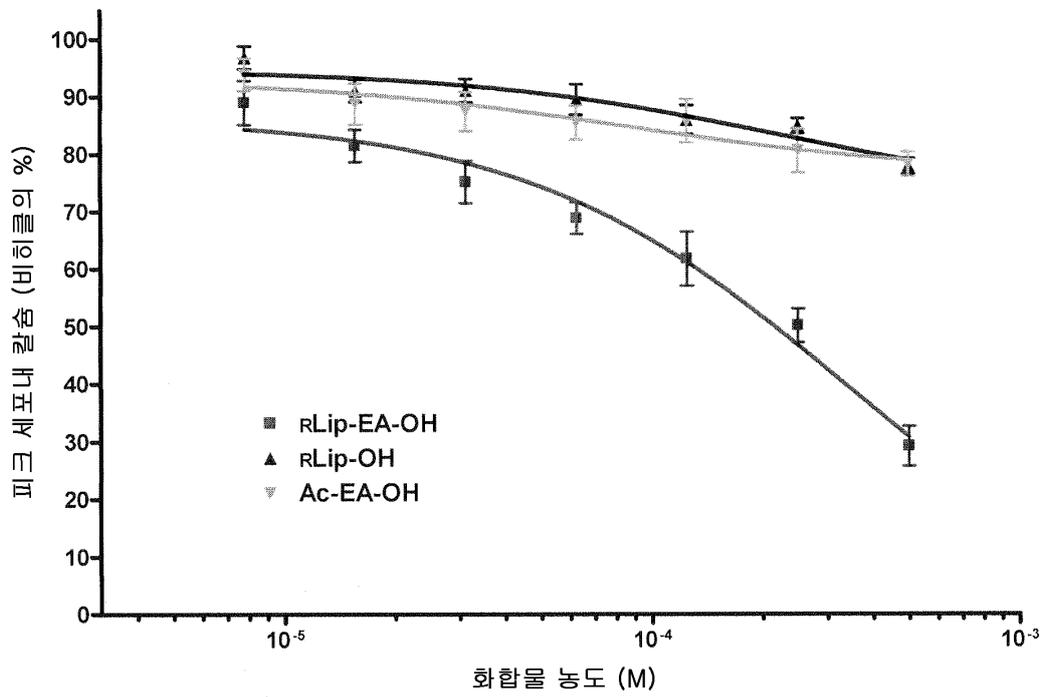
도면2



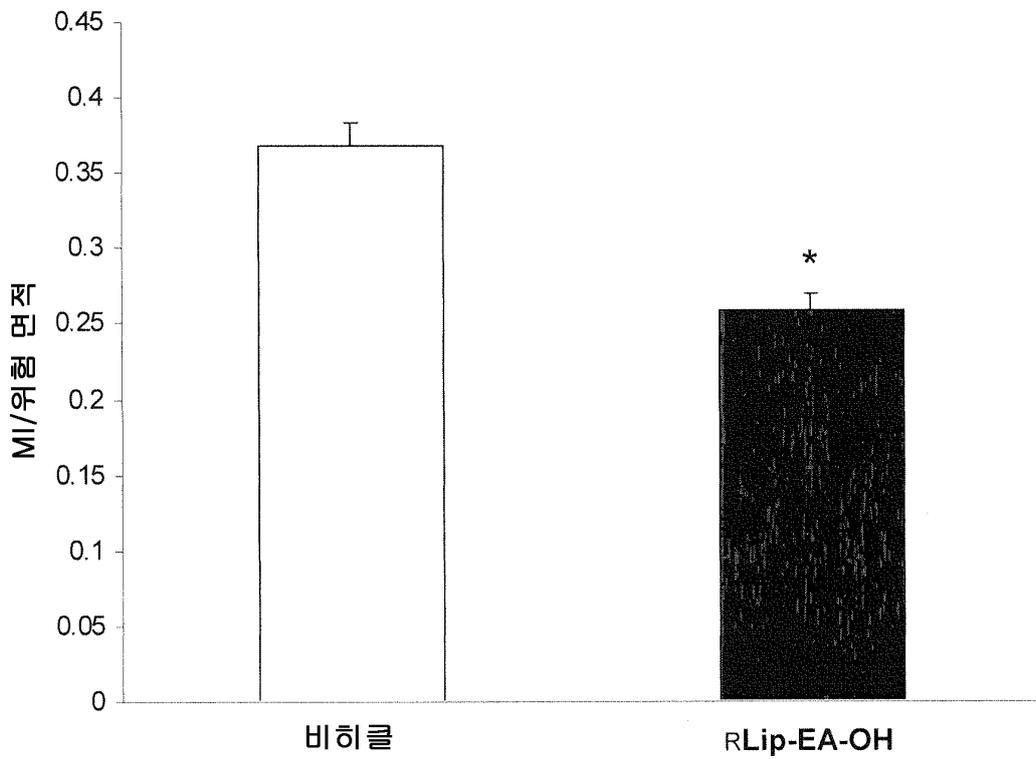
도면3



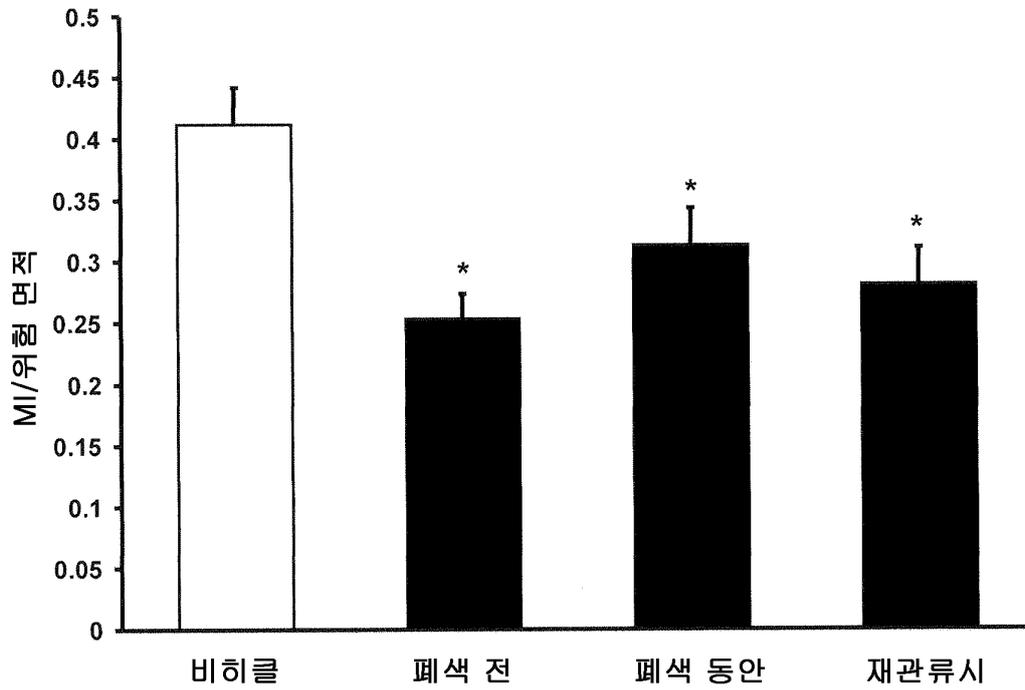
도면4



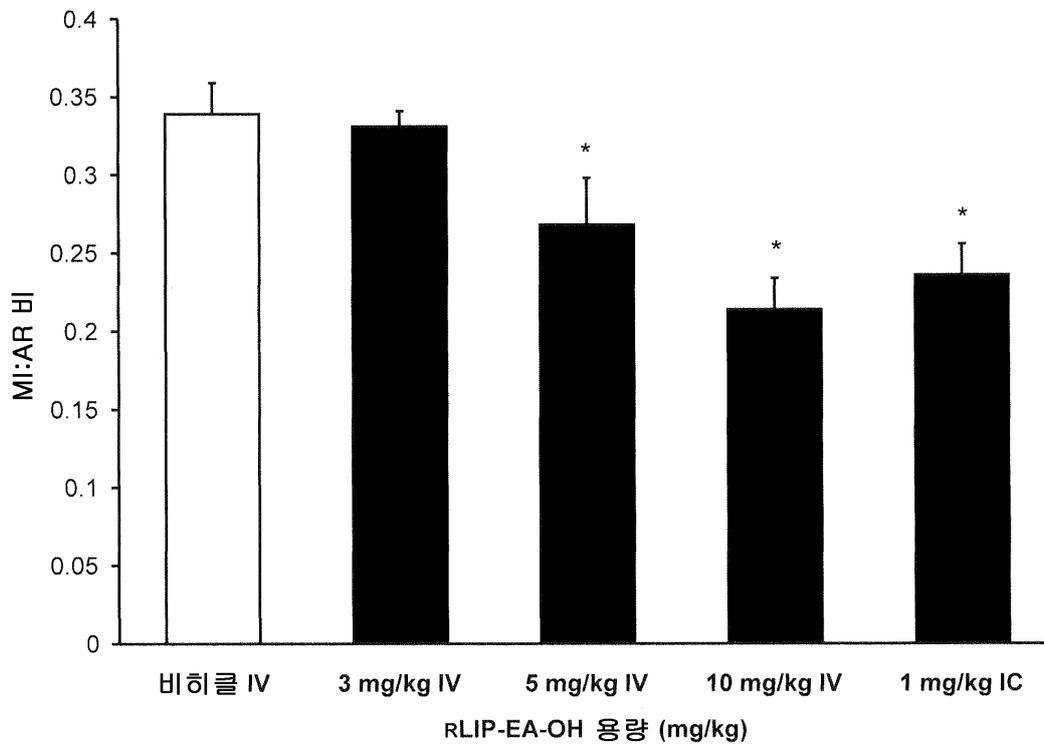
도면5



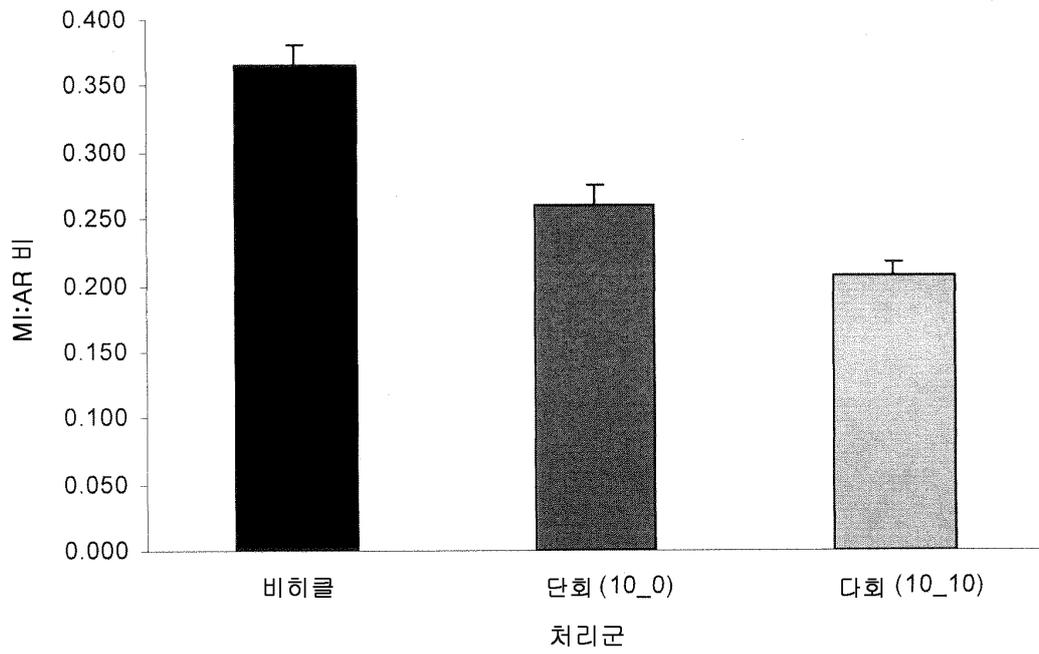
도면6



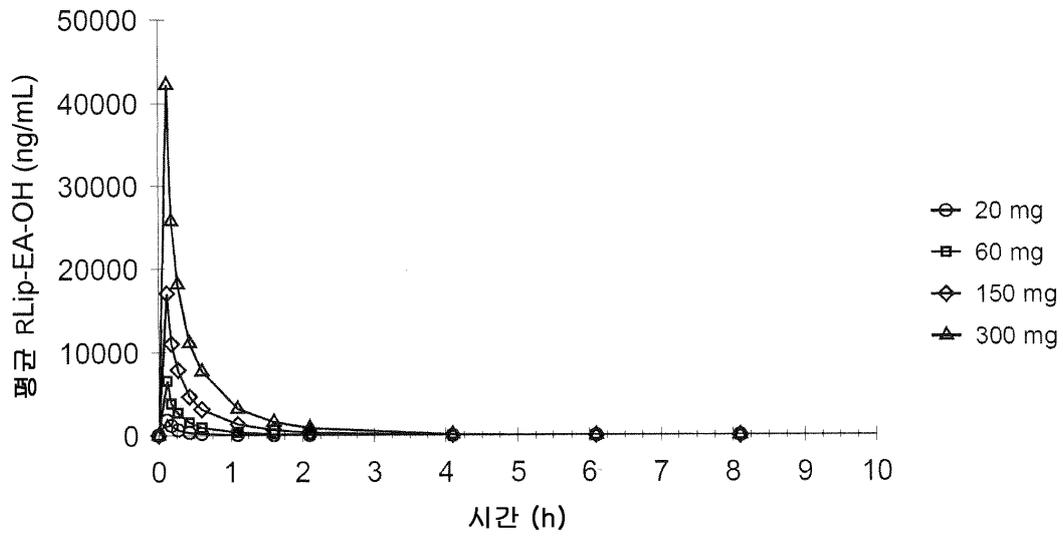
도면7



도면8



도면9a



도면9b

