



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년03월12일
A61K 31/205 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0694004
	(24) 등록일자	2007년03월06일

(21) 출원번호	10-2001-7005575	(65) 공개번호	10-2001-0080379
(22) 출원일자	2001년05월03일	(43) 공개일자	2001년08월22일
심사청구일자	2004년10월07일		
변역문 제출일자	2001년05월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/IT1999/000357	(87) 국제공개번호	WO 2000/27387
국제출원일자	1999년11월09일	국제공개일자	2000년05월18일

(81) 지정국

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

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

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

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

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

(30) 우선권주장	PCT/IT98/00318	1998년11월11일	이탈리아(IT)
	RM98A000701	1998년11월11일	이탈리아(IT)

(73) 특허권자

시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이.
이탈리아 로마 00144 비알레 샤케스파아레 47

(72) 발명자

칼바니메노티
이탈리아,로마I-00146,14,비아론가네시

피사노클라우디오
이탈리아,아프틸리아H-04011,30,비아산미첼레

(74) 대리인

백남훈

심사관 : 신진섭

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 세포소멸을 유발시킬 수 있는 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴의 용도

(57) 요약

본 발명은 특히 혈관의 세포소멸 유발로부터 치료 이점을 얻는 병리상태, 예를 들어 혈관 성형술 또는 관상동맥 스텐팅 후의 협착증, 또는 특히 종양의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

세포소멸을 유발시키는 프로피오닐 L-카르니틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 성형술 또는 관상 동맥 스텐팅 후의 협착증 치료용 약제.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

제 4 항에 있어서, 프로피오닐 L-카르니틴의 염이 클로라이드, 브로마이드, 오로테이트, 산 아스파테이트, 산 시트레이트, 산 포스페이트, 푸마레이트 및 산 푸마레이트, 락테이트, 말리에이트 및 산 말리에이트, 산 옥살레이트, 산 셀페이트, 글루코스 포스페이트, 타르트레이트 및 산 타르트레이트로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 특히 혈관의 세포소멸 유발로부터 치료 이점을 얻는 병리상태, 예를 들어 혈관 성형술 또는 관상동맥 스텐팅 후의 협착증 또는 종양의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.

배경기술

순환기 질환에서의 세포 증식

다수의 연구들은 세포 증식이 죽상경화증, 고혈압증의 발병 및 혈관 성형술 또는 관상 동맥 스텐팅 후의 협착증에서 중추적인 역할을 함을 입증하였다(Ross, 1976; Schwartz, 1990).

인간의 죽상경화성 플라크 상에서 수행된 다수의 실험적인 연구들은 세포 증식이 상기 플라크의 초기 상태 및 진행 단계 모두의 결정적인 현상임을 입증하였다.

더욱이, 혈관 중막으로부터 혈관 내막으로 이동하는 평활근 세포의 증식은 혈관 성형술을 통한 혈관 재통 또는 스텐트에 의한 혈관 확장 후의 관상 동맥 협착증의 세포 기전을 나타낸다.

이러한 장애는 급성 관상 동맥 증후군에 걸린 환자의 피부 관통성 혈관 재통의 적용에 주요한 한계가 되며, 따라서 상기는 수술 후 장애의 약 40%에 책임이 있다(Holmes et al., 1984)

따라서, 상기 증식 현상이 혈관성형술 후 첫 주에 해당하는 결정적인 시기에 발생하므로, 혈관 벽의 평활근 세포의 증식을 억제할 수 있는 이용가능한 물질을 제조하는 것이 혈관 성형술 후 협착증의 예방에서 1 차적으로 중요한 목표이다.

실험적인 죽상경화성 병변에서의 증식 억제가 세포증식 억제성 약물, 예를 들어, 에토포시드(Llera-Moya et al., 1992), 스테로이드 호르몬(Cavallero et al.; 1971; 1973; 1975; 1976), 프로게스테론성 호르몬(Spagnoli et al., 1990), 텍사메타손(Asai et al., 1993)에 의해 이루어졌다.

평활근 세포 증식은 또한 베라파밀(Stein et al., 1987)의 경우에서와 같은 DNA 합성의 감소 및 니페디핀(Cheung et al., 1987)에 대해 입증된 바와 같은 2 차 전령 시스템(cAMP)의 방해 모두에 기인한 칼슘 길항물질에 의해 억제된다.

ACE-억제제에 의한 치료는 혈관 내막 비후의 성장을 억제하였다(Powell, 1989).

다른 생체의 연구들은 고지혈증 치료제로서 사용된 HMG-CoA 리덕타제 억제제 심바스타틴에 의한, 주어진 래트 대동맥의 배양된 평활근 세포에 대한 증식 억제 효과를 입증하였다(Corsini et al., 1991). 더욱이, 트리글리세라이드혈 강하 효과를 갖는 일부 물질들, 예를 들어 피브레이트가 인간의 죽상경화성 병변의 진행을 예방할 수 있는 것으로 나타났다(Olsson et al., 1990).

종양에서 관찰된 것과 유사한 방식으로(Kerr, 1994), 죽상경화성 집단 및/또는 혈관 내막 비후에서 집단 감소 현상이 세포 증식과 함께 일어남이 관찰되었으며(Gabbiani, 1995), 따라서 이는 매우 증식성인 세포가 세포소멸에 도움이 되며 이의 조절이 죽상경화증의 발병에 중요한 역할을 함을 시사한다.

세포소멸은 다양한 형태의 인간 및 실험상 심혈관 질환에서 입증되었다(Sharifi AM, Schriffin EL; Am. J. Hypertens. 1998년 9월; 11(9): 1108-16).

혈관 성형술은 세포 이동, 증식 및 세포간질 축적을 포함한 다수의 혈관벽에서의 반응들을 발생시키며, 이들 모두는 신생 혈관내막의 형성 및 협착증의 원인이 된다(Malik N et al; Circulation 1998년 10월 20일; 98(16): 1657-65). 세포소멸의 유도는 또한 폐 혈관 질환과 같은 혈관 질환을 역전시키는데 유리할 수 있다(Cowan K. N. et al., Circ. Res. 1999년 5월 28일; 84(10): 1223-33). 혈관 성형술 후의 협착증은 손상된 혈관 내막 세포에 기인한다.

세포소멸 유발 물질을, 예를 들어 종양의 치료에 사용하는 것은 가능한 부작용들과 함께 일반화된 현상을 야기시킬 위험성을 내포하며, 상기 부작용들은 간세포의 경우에서와 같이 매우 심각할 수도 있다.

일반화된 현상이 없는 전 세포소멸제를 발견할 필요가 있다.

협착증 예방을 위한 제안들을 예를 들어 미국 특허 제 5116864 호 및 5835935 호에서 찾을 수 있다.

미국 특허 제 5,786,326 호는 협착증의 현상을 고찰하고 있으며 철이 SMC의 증식에 중요한 필요조건임을 지적한다. 상기 특허에 논의된 기술은 협착증을 예방하는 수단으로서 철 킬레이트제로서 작용하는 약물을 교시한다. 미국 특허 제 5,786,326 호는 새로운 철 킬레이트제, 즉 엑소켈린을 제공한다.

미국 특허 제 5,786,326 호는 협착증의 현상을 고찰하고 있으며 철이 SMC의 증식에 중요한 필요조건임을 지적한다. 상기 특허에 논의된 기술은 협착증을 예방하는 수단으로서 철 킬레이트제로서 작용하는 약물을 교시한다. 미국 특허 제 5,786,326 호는 새로운 철 킬레이트제, 즉 엑소켈린을 제공한다.

종양에서의 세포소멸

인간의 치료에서 항암제를 사용하는 것이 환자의 생명을 위협할 수도 있는 다수의 독성 효과 또는 부작용을 일으키는 것은 잘 알려져 있다. 실제로, 이러한 합병증들은 상기 항암제의 투여량을 감소시키게 하며, 때로는 치료 자체를 중단하게 한다.

다수의 경우에 상기 투여량의 감소 또는 치료 중단은 병의 재발에 유리하므로 개인의 일반적인 상태를 악화시키게 되며, 결과적으로 이는 때때로 환자에게 치명적이다.

인간의 치료에 사용되는 항암제의 수 및 중요성이 증가함에 따라 그의 주요 한계는 독성 효과 또는 부작용의 발생으로 이어지며, 이는 상기 문제가 여전히 상당한 관심사임을 의미한다.

따라서, 인간 치료에 사용되는 항암제에 의해 야기된 독성 효과 또는 부작용을 실질적으로 감소시킬 수 있는 새로운 약제, 또는 새롭고 적합한 상이한 약제들의 조합을 발견하는 것이 훨씬 더 요구되고 있다.

약리 요법의 일반적인 문제점들 중 하나는 상기 약제의 치료 지수, 즉 독성 투여량 또는 어쨌든 부작용을 발생시키는 투여량에 대한 치료 유효 투여량의 비이다.

의료계에서는 여전히 환자들이 항암 화학요법의 경우에 특히 견디기 힘든 치료에 직면할 수 있게하는 동시에 허용가능한 삶의 질을 유지하게 하는 치료 섭생의 필요성을 인지하고 있다. 이러한 고려사항을 또한 동물, 예를 들어 애완동물의 치료에도 적용한다.

따라서, 진정한 세포독성 활성이 없을지라도 종양 세포를 방해할 수 있고, 항종양 약물의 효과를 발휘할 수 있는 물질, 예를 들어 종양 세포에서 세포소멸을 유발시킬 수 있는 물질이 대단히 유리할 것이다.

WO 97/34596 호에는 암을 비롯한 글루타메이트 매개된 질환의 치료에서의 알카노일 L-카르니틴의 용도가 개시되어 있다.

따라서, 진정한 세포독성 활성이 없을지라도 종양 세포를 방해할 수 있고, 항종양 약물의 효과를 발휘할 수 있는 물질, 예를 들어 종양 세포에서 세포소멸을 유발시킬 수 있는 물질이 대단히 유리할 것이다.

WO 97/34596 호에는 암을 비롯한 글루타메이트 매개된 질환의 치료에서의 알카노일 L-카르니틴의 용도가 개시되어 있다.

본 발명에 이르러, 프로피오닐 L-카르니틴이 그의 뜻밖의 전 세포독성 효과 덕분에 혈관의 평활근 세포 및 종양 세포에 특이적인 억제 작용을 부여하는 것으로 밝혀졌다.

발명의 요약

본 발명의 목적은 특히 혈관에서 세포소멸 유발로부터 치료 이점을 얻는 병리상태, 예를 들어 혈관 성형술 후 또는 관상 동맥 스텐팅 후의 협착증, 또는 특히 중양의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약리학적으 로 허용가능한 염의 용도이다.

상기 연구의 교시는 PLC가 고지혈증 치료제로서 노령의 고지혈증 토끼의 죽상 경화성 병변의 진행을 예방한다는 것이다. 따라서, 죽상경화성 플라크의 세포 증식에 기여하는 지질의 강하에서, PLC는 아테롬 발생 억제제로서 간접적으로 작용한다. PLC에 대해서 증식 억제 작용은 입증되지 않았다.

이후의 연구(고혈압증, Vol 28, No 2, 1996년 8월, p. 177-182)에서, 선행 저자들 중 일부는 배수체 세포에 대한 PLC의 효과를 조사하였다. 상기 연구에서 “배수성은 DNA 함량 배가 후의 SMC 유사분열성 분할의 장애와 관련있는 듯 하다”고 설명하였다. 상기 저자들에 따르면, PLC는 배수체 세포의 수를 감소시키지만 SHR에서 혈압을 조절함에 있어서는 효과적 이지 않은 것으로 밝혀졌다. 이들은 또한 배수성 SMC가 고혈압증을 유발시키며, SHR 대동맥에서 배수성 SMC의 병생리학적 중요성은 밝혀지지 않았음을 교시한다. 이어서 세포 주기의 차단을 설명하고 있다. PLC에 의해 발휘되는 가설 또는 기작에서, 상기 화합물이 전 세포소멸 작용을 가질 수도 있음을 제시하고 있지 않다.

프로피오닐 L-카르니틴은 노령의 고지혈증 래트에서 죽상경화성 병변의 진행을 예방하는 것으로서 개시되었다(Spagnoli L.G., Orlandi A., Marino B., Mauriello A., De Angelis C., Ramacci M.T., Atherosclerosis 1995; 114, 29-44). 상기 연구에서, 저자는 프로피오닐 L-카르니틴(또한 PLC라 명명함)의 강력한 아테롬발생 억제 효과를 입증한다. 이러한 효과는, 명백하게 인간에게 적용할 수 있는 모델이 아닌 토끼에서 입증되었지만, 지질 강하 효과를 통해 밝혀졌다. 실제로, 상기 저자는 “[...] 동물들의 수가 매우 많지는 않지만, 전체 트리글리세라이드, IDL- 및 VLDL-트리글리세라이드 [...]의 대단히 현저한 감소를 입증하기에는 충분한 반면, 혈장 콜레스테롤 수준은 약간 일시적으로 변화했다”고 서술하고 있다 (p. 40, 좌측 컬럼, 라인 16-19). 상기 저자는 또한 대식세포 및 플라크를 구성하는 SMC 모두에서 보다 낮은 수준의 증식 활성을 관찰하였다(동일 문헌, 마지막 5 라인). 이어서 상기 저자는 “현재, 우리는 PLC가 어떠한 치료 용도를 갖는지를 추정할 수 없다”고 표명하였다(동일 문헌, 우측 컬럼, 처음 3 라인). 그러나, 상기 연구의 결과는 섬유성 죽상 플라크의 연령-관련된 근대막 비후의 진행 및/또는 전환에서 β -VLDL의 아테롬 발생 역할을 확립시켰다(동일 문헌, 라인 5 내지 10). 상기 저자는 혈장 트리글리세라이드 수준이 플라크 세포 집단의 증식 활성과 직접적으로 관련되며 이들 2 개 인자의 약리학적 조절이 노령의 고콜레스테롤혈증 토끼의 플라크 진행의 현저한 감소와 관련될 수도 있다는 가설을 제공한다. 또한, 일부의 실험 데이터가 트리글리세라이드와 세포 증식간의 상관관계에 대한 가설을 지지함을 기술하고 있다(동일 문헌, p. 41, 우측 컬럼, 라인 20-29). 상기 저자는 “PLC가 [...] 성장 인자의 발현 조절을 통해서 작용하는 것 같지는 않으며(동일 문헌, 마지막 2 라인), PLC가 죽상경화성 플라크의 세포 증식을 직접 억제하는 지의 여부와 관계없이 상기 질문에 답하기 위해서는 추가의 생체의 연구가 필요하다”고 결론지었다(동일 문헌, p. 42, 최종 라인).

상기 연구의 교시는 PLC가 고지혈증 치료제로서 노령의 고지혈증 토끼의 죽상 경화성 병변의 진행을 예방한다는 것이다. 따라서, 죽상경화성 플라크의 세포 증식에 기여하는 지질의 강하에서, PLC는 아테롬 발생 억제제로서 간접적으로 작용한다. PLC에 대해서 증식 억제 작용은 입증되지 않았다.

이후의 연구(고혈압증, Vol 28, No 2, 1996년 8월, p. 177-182)에서, 선행 저자들 중 일부는 배수체 세포에 대한 PLC의 효과를 조사하였다. 상기 연구에서 “배수성은 DNA 함량 배가 후의 SMC 유사분열성 분할의 장애와 관련있는 듯 하다”고 설명하였다. 상기 저자들에 따르면, PLC는 배수체 세포의 수를 감소시키지만 SHR에서 혈압을 조절함에 있어서는 효과적 이지 않은 것으로 밝혀졌다. 이들은 또한 배수성 SMC가 고혈압증을 유발시키며, SHR 대동맥에서 배수성 SMC의 병생리학적 중요성은 밝혀지지 않았음을 교시한다. 이어서 세포 주기의 차단을 설명하고 있다. PLC에 의해 발휘되는 가설 또는 기작에서, 상기 화합물이 전 세포소멸 작용을 가질 수도 있음을 제시하고 있지 않다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 프로피오닐 L-카르니틴(이후부터 간단히 PLC라고도 명명함)이 세포에서 프로그램화된 사망(세포소멸) 현상을 유발한다는 발견의 적용을 바탕으로 한다. 이러한 효과에 의해 혈관벽의 평활근 세포의 증식을 기본으로 하는 혈관 병리상태, 예를 들어 폐 고혈압, 고혈압, 혈관 성형술 또는 관상 동맥 스텐팅 후의 협착증이 치료된다.

유리하게는, PLC는 그의 부작용이 꽤 제한된 널리 공지된 약물이다. 프로피오닐 L-카르니틴의 용례가 미국 특허 제 4415589 호 및 4255449 호, 이탈리아 특허 제 1155772 호, 유럽 특허 제 0793962 호 및 0811376 호, WO 99/17623, PCT/IT97/001113에 개시되어 있다.

따라서, 본 발명의 첫 번째 태양은 특히 혈관에서 세포소멸 유발로부터 치료 이점을 얻는 병리상태, 예를 들어 혈관 성형술 후 또는 관상 동맥 스텐팅 후의 협착증, 또는 특히 종양의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약리학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 고혈압의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약리학적으로 허용가능한 염의 용도이다.

본 발명의 또 다른 목적은 폐 고혈압의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약리학적으로 허용가능한 염의 용도이다.

본 발명의 더욱 또 다른 목적은 혈관 성형술 또는 관상 동맥 스텐팅 후의 협착증의 예방에 유용한 약제의 제조를 위한 프로피오닐 L-카르니틴 및 그의 약리학적으로 허용가능한 염의 용도이다.

본 원에 개시된 본 발명의 목적은 또한 항암제에 의해 얻어지는 보조 효과에 따른 프로피오닐 L-카르니틴의 통합된 용도이다. 보조 효과로서, 항종양 약물과 프로피오닐 L-카르니틴의 결합 요법에 의해 PLC가 종양 세포에 대해 세포소멸 효과를 발휘하는 것이 목적이며, 따라서 PLC는 항종양 약물의 세포소멸 효과를 지원한다. 이러한 방식으로 항종양 약물의 치료 지수의 개선이 예상된다.

본 원에 개시된 본 발명의 추가의 목적은 종양의 치료에 유용한 약제의 제조에서 프로피오닐 L-카르니틴의 용도이다.

본 원에 개시된 본 발명의 더욱 또 다른 목적은 프로피오닐 L-카르니틴과 항암제 및 관련된 약학 조성물과의 결합이다.

본 원에 개시된 발명과 관련하여, 상기 화합물들의 “통합된 용도”가 의미하는 것은 구별 없이 (i) 프로피오닐 L-카르니틴 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염들 중 하나와 항암제의 공동-투여, 또는 (ii) 임의의 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 비히를 이외에, 상기 유효 성분들을 함께 혼합물로 포함하는 조성물의 투여이다.

따라서 본 원에 개시된 발명은 프로피오닐 L-카르니틴 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염들 중 하나와 항암제의 공동-투여, 및 약학 조성물 모두를 포함하며, 이들을 상기 2 개의 유효 성분을 혼합물로 포함하는 방출 조절된 형태를 포함하여 경구, 비경구 또는 비내로 투여할 수 있다.

하기 상세한 설명으로부터 명백하지만, 본 발명은 또한 항암제, 예를 들어 탁솔, 블레오마이신, 카르보플라틴, 빈크리스틴, 캄프토테신의 통합된 용도를 고려할 수 있다. 모든 이러한 실시태양에서, 프로피오닐 L-카르니틴을 통합된 용도로 사용할 수 있다.

공동-투여는 또한, 별개의 투여 형태의 프로피오닐 L-카르니틴 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염들 중 하나 및 항암제를 포함하고 환자의 상태를 근거로 주치의에 의해 지정된 투여 섭생에 따라 유효 성분들의 통합된 동시 복용 또는 시간-지정된 복용 설명서가 첨부된 패키지 또는 제품을 의미한다.

본 원에 개시된 발명의 실시태양은 또한 금기로 인한 치료의 중단없이 화학요법제의 투여량을 증가시키거나 예정된 치료 프로토콜을 유지시킬 수 있는 가능성에 기인한 치료학적 성공의 증가 덕분에 환자를 치유하고 그의 생명을 연장시키는데 기여한다. 또한, 프로피오닐 L-카르니틴의 보조 효과 덕분에 항암 약물의 투여량 감소를 예견할 수 있다.

본 발명에 따른 약제를 유효 성분(프로피오닐 L-카르니틴 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염)을 소화관내 투여(특히 경구 투여) 또는 비경구 투여(특히 근육내 또는 정맥내 경로를 통해)가 고려된 조성물의 제형화에 적합한 부형제와 혼합하여 수득할 수 있다. 모든 이러한 부형제들은 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지되어 있다.

프로피오닐 L-카르니틴의 약학적으로 허용가능한 염으로서, 원치않는 부작용을 생성시키지 않는 산과의 임의의 염이 고려된다. 이러한 산은 약리학자들 및 약학 기술 전문가들에게 널리 공지되어 있다.

상기 염의 비 제한적인 예로 클로라이드, 브로마이드, 오로테이트, 산 아스파테이트, 산 시트레이트, 산 포스페이트, 푸마레이트 및 산 푸마레이트, 락테이트, 말리에이트 및 산 말리에이트, 산 옥살레이트, 산 설페이트, 글루코스 포스페이트, 타르트레이트 및 산 타르트레이트가 있다.

단일 투여 형태 제형의 몇 가지 예는 하기와 같다.

(a) 정제 제형

유효 성분	
프로피오닐 L-카르니틴 HCl	500 mg
부형제	
미정질 셀룰로즈	54.0 mg
폴리비닐피롤리돈	18.0 mg
크로스포비돈	30.0 mg
스테아르산 마그네슘	15.0 mg
발연 실리카	3.0 mg
하이드록시프로필메틸셀룰로즈	10.0 mg
폴리에틸렌 글리콜 6000	2.5 mg
이산화 티탄	1.8 mg
메타크릴레이트 공중합체	8.3 mg
활석(트리벤티ل화된 것)	2.4 mg

(b) 정맥내 주사가 가능한 병 용기 제형

유효 성분	
프로피오닐 L-카르니틴 HCl	300 mg
부형제	
만니톨	300 mg
용매 바이알: 아세트산 나트륨 3·H ₂ O 주사용 F.U. 용 물	390 mg 5 mL이 되기에 적당한 양

본 발명에 따라 제조된 약제를 당해 분야의 숙련가의 일반적인 통상의 지식에 따라 제조될 수 있는 약학 조성물의 형태로 투여할 것이다.

적합하게 선택된 투여 경로, 경구, 비경구 또는 정맥내 경로에 따라 약학 조성물은 적합한 형태가 될 것이다.

본 발명에 따른 약제가 포함된 약학 조성물의 예는 고체 또는 액체 경구 형태, 예를 들어 정제, 모든 유형의 캡슐, 환제, 용액, 현탁액, 단일 또는 분할 용량 형태의 유화액, 시럽, 바로 사용할 수 있거나 즉석에서 마실 수 있는 단위 투여형이 있다. 다른 예로 비경구 형태, 근육내, 피하 또는 정맥내 투여를 위한 주사용 형태가 있다. 방출이 조절되거나 프로그래밍된 형태도 또한 적합하다.

투약, 약량학 및 일반적인 치료 섭생을 의사의 지식, 환자의 상태 및 치료하려는 병리상태에 따라 의사가 결정할 것이다.

PLC와 다른 유효 성분들과의 연합이, 동일한 약제로 또는 별도로(동시에 또는 후속적으로) 공동-투여되든지 간에, 또한 본 발명에 포함된다.

첫 번째 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 혈관 성형술 후의 협착증에 관한 것이다.

상기 첫 번째 바람직한 실시태양에 따라, PLC의 약리학적 투여량은 100 mM의 혈중 농도를 초과하지 않는 것이다.

하기의 실시예들은 본 발명을 추가로 예시한다.

실시예

실시예 1

체중 270 내지 290 mg의 위스타 수컷 래트들을 실험에 사용하였다. 상기 래트들을 냄부탈(체중 kg 당 35 mg)로 복강내 마취시키고 대동맥의 흉부 부분으로부터, 약간 변형시킨(Orlandi 1994) 바우가르트너와 스투더(Baugartner and Studer)의 방법(1996)에 따라 포가티(Fogarty) 2F 벌룬 탐침(Baxter USA)에 의해 내피를 기계적으로 제거하였다. 상기 동물들을 5 개의 그룹으로 랜덤화시키고, 각각의 그룹을 표 1에 기록하였다.

2 개의 그룹을 프로피오닐 L-카르니틴(PLC, 120 mg/kg, p.c. 사망)으로 약리학적으로 처리하였으며, 하나의 그룹은 ACE-억제제(에날라프릴, 1 mg/kg, p.c. 사망)로 처리하고; 나머지 2 개의 그룹은 대조군이였다. 더욱 또한, 일부의 벌룬 시술하지 않은 동물을 블랭크로 하였다.

[표 1]

최종 위스타 래트 수	처리	지속 기간(일)
7	내피 제거 + PLC	3
7	내피 제거	3
8	내피 제거 + ACE-길항물질	15
8	내피 제거 + PLC	15
8	내피 제거	15
5	블랭크	-

동물들을 내피 제거 후 3 일 및 15 일째에 죽였다. 죽이기 2 시간 전에, 세포 증식을 확인하기 위해서 모든 래트에게 브로모데옥시유리딘 용액(BrDU)(45 mg/kg)을 정맥내 투여하였다. 죽이기 1 시간 전에, 일부 무작위로 선택된 동물들에게 대동맥 파열의 정도를 평가하기 위해서 블루 에반스(0.9% NaCl 용액 중의 1%) 1 ml를 투여하였다.

죽일 때, 동물들을 냄부탈로 복강내로 마취시키고, 3% 텍스트란 70을 함유하는 등장성 염수로 세척한 후에 완충된 포르말린으로 20 분간 관류시켰다. 동맥들을 단리시키고, 염수로 가볍게 세척하고 종방향으로 절개하였다. 경동맥, 심장 및 소장을 또한 절제하였다. 상기 기관들을 모두 실온에서 24 시간 동안 동일한 정작액으로 후-정착시켰다.

일부의 대동맥 단편들을 전자 현미경 검사에 사용하였다. 대동맥을 말아올려 파라핀에 넣었다. 5 μ m 두께의 일련의 단면들을 헤마톡실린-에오신, 베르호예프-반 기슭 및 모벳의 펜타크롬으로 염색하고 형태학 및 형태계측학적 연구에 사용하였다.

일부의 비-관류 동물들에서, 대동맥 조직의 단편들을 조직 카르니틴의 측정 및 후속적인 분자 생물학의 연구를 위해 액체 질소에서 냉동시켰다.

면역조직화학 염색

손상된 동맥의 뚜렷한 세포 증식을 설명하기 위해서, 파라핀 중의 일련의 대동맥 부분들로부터 파라핀을 제거하고, 이를 재 수화시키고, 3% H₂O₂ 용액에 20 분간 담그고 37 °C에서 트립신(트리스-HCl 중의 0.05 M, pH 7.6)과 함께 배양하였다. 그 후에, 상기 부분들을 37 °C에서 2N HCl로 30 분간 처리하고, 0.1 M 나트륨 테트라보레이트로 세척하고, 정상적인 말 혈청(Vector) 및 후속적으로 항-BrDU 단클론 항체(Ylem)와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 이어서 상기 준비물을 비오틸린화된 항-마우스 IgG(Vector) 및 스트렙토아비딘-ABC-POD 착체(Ylem)와 반응시켰다.

상기 반응을 최종 색원체로서 디아미노벤지딘(DAB)을 사용하여 입증하였다. BrDU에 대한 포지티브 핵의 수를 전체 핵의 수에 대해 카운트하였다. 이러한 카운트는 두 명의 연구자들에 의해 별도의 맹검법으로 수행되었다. 상기 2 개의 카운트 간의 차이는 항상 0.5% 미만이었다.

모든 데이터를 T 스튜던트 시험에 의해 분석하였다. 상기 그룹들 간의 차이를 $P < 0.05$ 에 대한 유의수준으로 간주하였다.

형태계측학적 분석

15 일 후의 혈관 내막 비후의 존재를, 서로로부터 1 cm 떨어져 상 위에 겹쳐진 그리드(400 포인트로 이루어짐)를 사용하여 베르호에프-반 기슨 염색된 부분들에 대해 평가하였다.

상기 분석을 하마마츠(Hamamatsu) DVS 3000 상 분석기에 의해 조절되고 폴리바-라이케르트(Polyvar-Reichert) 현미경에 연결된 하마마츠 C3077 카메라를 통해 조직학적 준비물에 대해서 수행하였다. 형태계측학적 평가는 X116 배율로 수행하였다. 혈관 내막 및 보통의 피막 상의 겹침 점들을 카운트함으로써 a) 동맥 벽에 속한 혈관 내막의 상대적인 부피; b) 동맥 벽에 속한 중막의 상대적인 부피를 평가하였다.

3 내지 12 개의 대동맥 부분들을 각각의 동물들에 대해 상이한 수준으로 사용하였다. 상기 숫자는 통계학적으로 의미있는 샘플을 수득하는데 필요한 장(fields)의 수를 나타내는 사스 공식(Sach's formula)에 따른 상기 구조물의 크기 함수였다.

초미세구조 연구

작은 대동맥 샘플들을 전자 현미경 분석을 위해 선택하였다. 대동맥을 오스뮴 테트라옥사이드 중에 후-정착시키고 EPON 812에 묻었다. 초박형 부분들을 우라닐 아세테이트에 이어서 납 시트레이트로 염색하고 히타치(Hitachi) H-7100 FA 전송 전자 현미경을 사용하여 검사하였다.

조직 및 혈장 카르니틴 분석

2 내지 3 ml의 혈액 샘플을 각각의 동물로부터 기계적으로 내피를 제거하기 전 및 죽일 때 회수하였다. 혈장을 20 분간의 원심분리(300 rpm)에 의해 분리시키고 페이스(Pace) 등의 방법에 따라 혈장 카르니틴을 분석하기 위해 냉동시켰다.

대동맥 벽 샘플을 각각의 그룹으로부터 무작위적으로 선택된 일부의 비-관류 동물들로부터 회수하고, 액체 질소 중에서 냉동시키고 상기 페이스 등의 문헌에 따라 카르니틴을 분석하기 위해서 -80°C 에서 보관하였다.

결과

초미세구조 연구

전자 현미경 분석을 위해 작은 대동맥 샘플들을 선택하였다. 대동맥을 오스뮴 테트라옥사이드 중에서 후-정착시키고 EPOC 812에 묻었다. 초박형 부분들을 우라닐 아세테이트에 이어서 납 시트레이트로 염색하고 히타치 H-7100 FA 전송 전자 현미경을 사용하여 검사하였다.

조직 및 혈장 카르니틴 분석

2 내지 3 ml의 혈액 샘플을 각각의 동물로부터 기계적으로 내피를 제거하기 전 및 죽이기 직전에 회수하였다. 혈장을 20 분간의 원심분리(3000 rpm)에 의해 분리시키고 페이스 등의 방법에 따라 혈장 카르니틴을 분석하기 위해 냉동시켰다.

대동맥 벽 샘플을 각각의 그룹으로부터 무작위적으로 선택된 일부의 비-관류 동물들로부터 회수하고, 액체 질소 중에서 냉동시키고 상기 페이스 등의 문헌에 따라 카르니틴을 분석하기 위해서 -80°C 에서 보관하였다.

결과

손상 형태

기계적 손상 3 일 후에, 래트의 대동맥은 내피 세포 피막의 부족을 제외하고 현저한 조직학적 변화를 나타내지 않았다.

15 일 후에, 풍부한 세포의 세포간질 중에 잠긴 등글거나 길어진 세포로 존재하는 혈관 내막 비후(또는 신생 내막)의 존재에 의해 동맥의 리모델링을 관찰할 수 있었다. 면역 조직화학 연구는 특히 신생 내막 내부의 풍부한 평활근(SMC)의 존재를 명백하게 입증한다.

증식에 대한 연구

a) 내피 제거 후 3 일째: 포지티브 핵을 염색하는 항-BrDU의 카운트는 검사된 2 개의 그룹들 간에 상당한 차이를 나타내었다. 정량적인 분석(표 2)은 BrDU-포지티브 핵의 수가 대조군에 대해 PLC-처리된 동물의 중막에서 현저하게 더 낮음을 명백하게 입증한다(대조군에 대해 59.3% 감소, $p < 0.02$). 상기 두 그룹 모두에서, BrDU-포지티브 핵의 분포는 외막 부분에 대해 보통 막의 루멘 부분에 2:1의 비로 보다 더 집중되어 있다.

b) 내피 제거 후 15 일째: 표 3은 각각의 그룹에서 SMC의 증식 지수가 중막에 대해 내막에서 현저하게 더 높음($p < 0.001$)을 나타낸다. PLC, 에날라프릴 및 대조군 동물들의 비교에 의한 내막 및 중막에서 BrDU-포지티브 핵의 수의 현저한 차이는 관찰되지 않는다.

형태계측학적 분석

표 3에 개시된 바와 같이, 내피 손상으로부터 15 일 후에, 내막의 상대적인 부피는 대조군 동물에 비해 PLC-처리된 동물(대조군에 대해 31.11% 감소, $p < 0.02$) 및 ACE 길항물질-처리된 동물(대조군에 대해 26.14% 감소, $p < 0.01$) 모두에서 현저하게 낮다.

[표 2]

기계적 내피 제거 후 래트 대동맥의 평활근 세포의 증식에 대한 프로피오닐 L-카르니틴(PLC)의 생체내 처리: 3 일 후의 세포 핵 증식율(항-브로모데옥시유리딘 포지티브)(\pm s.e.m)				
	시간 간격	포지티브 핵/ 전체 핵%	감소율%	차이
대조군 동물의 보통 막	3 일	6.36 ± 1.27		
PLC 처리된 동물의 중막	3 일	2.59 ± 0.56	59.3	$p < 0.02$

[표 3]

기계적 내피 제거 후 래트 대동맥의 평활근 세포의 증식에 대한 프로피오닐 L-카르니틴 (PLC) 및 ACE-길항물질 에날라프릴의 생체내 처리: 세포의 증식율(항-브로모데옥시유리딘 포지티브) 및 15 일 후의 내막 부피와 대동맥 벽 부피 간의 비율(\pm s.e.m.)(예비 결과)				
	시간 간격	포지티브 핵/전체 핵%	내막 부피/벽	감소율(CTR에 대한%)
대조군 동물의 내막	15 일	2.65 \pm 0.44(a)	29.73 \pm 1.54	
PLC 처리된 동물의 내막	15 일	1.99 \pm 0.32(b)	20.48 \pm 2.73(d)	31.11
에날라프릴 처리된 동물의 내막	15 일	2.43 \pm 0.39(c)	21.96 \pm 1.20(e)	26.14
대조군 동물의 중막	15 일	0.24 \pm 0.05		
PLC 처리된 동물의 중막	15 일	0.24 \pm 0.09		
에날라프릴 처리된 동물의 중막	15 일	0.27 \pm 0.09		
박피시키지 않은 동물의 중막		0.24 \pm 0.05		
(a) 내막 대 중막: $p<0.0001$; (b) 내막 대 중막: $p<0.0001$; (c) 내막 대 중막: $p<0.001$; (d) 내막 부피/벽 대 대조군: $p<0.02$; (e) 내막 부피/벽 대 대조군: $p<0.01$				

증식/세포소멸의 조절에서 프로피오닐 L-카르니틴의 효과

생체 외에서 자생적으로 고혈압인 래트(SHR)의 대동맥으로부터 분리된 평활근(SMC) 및 대조군으로서 정상 혈압인 래트(WKY)로부터 분리된 SMC에 대한 프로피오닐 L-카르니틴(PLC)의 효과를 평가하기 위한 실험을 수행하였다.

이러한 생체 외 연구는 PLC가 배양 지수 증식기 동안 투여될 때 세포 수/ml로서 평가되는 세포 성장뿐만 아니라 삼중수소화된 티미딘의 결합을 통해 평가되는 DNA 합성을 감소시킴을 입증하였다(표 4 및 5).

[표 4]

배양 2, 3 4 및 6 일째의 세포 수/ml				
	2 일	3 일	4 일	6 일
SHR CTRL	5x10 ⁴ \pm 2	15x10 ⁴ \pm 3	28x10 ⁴ \pm 7	42x10 ⁴ \pm 7
SHR PLC	7x10 ⁴ \pm 4	4x10 ⁴ \pm 2	7x10 ⁴ \pm 4	20x10 ⁴ \pm 5
WKY CTRL	4x10 ⁴ \pm 1	2x10 ⁴ \pm 2	7x10 ⁴ \pm 2	13x10 ⁴ \pm 4
WKY PLC	3x10 ⁴ \pm 2	4x10 ⁴ \pm 2	6x10 ⁴ \pm 2	8x10 ⁴ \pm 3

[표 5]

배양 6 일째의 삼중수소화된 티미딘 결합	
	$\mu\text{Ci}/\mu\text{gDNA}$
SHR CTRL	2.99 E-05
SHR PLC	1.81 E-05
WKY CTRL	2.1 E-05
WKY PLC	2.56 E-05

PLC 존재 하의 평활근 세포의 추가의 특징으로서, 세포소멸 세포의 퍼센트를 기본적인 상태 및 산화적인 스트레스 상태 모두에서 측정하였다. 총 1000 개의 세포 상에 존재하는 세포소멸성 세포의 수를 특정 DNA를 핵스트(Hoechst) 33258로 염색한 후에 카운트하여 세포소멸을 평가하였다. 상기 실험의 결과는 SHR 배양액에서 PLC가 기본적인 상태에서 세포소멸 퍼센트를 현저하게 증가시키며 이러한 증가는 스트레스 상태 하에서 더욱 뚜렷함을 입증하였다.

WKY 배양액에서, 세포소멸 퍼센트는 무시할만하다(표 6).

[표 6]

기본적인 상태 및 산화적인 스트레스 하의 세포소멸 %		
	기본적인 상태	산화적인 스트레스
SHR CTRL	0	2
SHR PLC	2	10
WKY CTRL	0	0
WKY PLC2	0	2

SHR 평활근 세포에서 관찰된 양상은 자생적인 고혈압 래트를 특성화하는 c-myc의 탈조절된 발현과 어떻게 해서든지 관련이 있을 수 있다(Negoro et al., 1988). 더욱 또한, c-myc는 세포소멸에 이은 증식 중단을 유발하는데 능동적으로 협력함이 관찰되었으며(Bennet et al., 1993; Bissonette et al., 1993), 따라서 상기 나타낸 데이터는 PLC 증식 억제 효과가 DNA 복제를 방해하는 것과 관련이 있을 수도 있음을 시사한다.

실시예 2

세포주

이스티투토 주프로필라티코 오브 브레샤(Istituto Zooprofilattico of Brescia)로부터 수득한 인간 기원 종양 세포를 배양하였다. 실험에 사용된 세포는 U266, 다발성 골수종, HeLa, 자궁 경부 종양, K562, 만성 골수성 백혈구였다. HeLa와 K562를 RPMI+ 10% FCS에서 배양한 반면, U266 세포주는 RPMI+ 15% FCS에서 배양하였으며, 이들 두 배지는 모두 페니실린/스트렙토마이신(50 U/ml 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하였다. 세포들을 6-웰 플레이트(Falcon)에 도말하였다. 50% 융합된 세포를 분석하였다.

각각의 세포주를 하기의 계획에 따라 PCL로 처리하였다:

a) 1 mM PLC로 24 시간 동안(도 1 내지 3);

1 mM PLC로 48 시간 동안(도 1 내지 3);

b) 1 mM PLC로 24 시간, 이어서 분자 없는 배지로 24 시간(도 4 내지 6).

각 처리의 끝에서, 세포들을 1:2로 희석시킨 트리판 블루 0.5%의 존재 하에서 버커(Burker) 챔버에서 카운트하였다. 각각의 실험 그룹에 대해 3 개의 웰로부터 나온 샘플을 카운트하였다.

인간 기원의 종양 세포주를 1 mM 프로피오닐 L-카르니틴으로 처리한 것은 24 시간 후 및 48 시간 후 모두 증식을 억제시키는 능력을 나타낸다. 특히 HeLa의 경우 대조군에 대해서 24 시간 및 48 시간 후의 억제율은 각각 25% 및 17%이었고; U266의 경우는 대조군에 대해서 24 시간 및 48 시간 후에 46% 및 26%; K562의 경우는 대조군에 대해서 24 시간 및 48 시간 후에 37% 및 39%이었다.

PLC 억제 효과는 배양 배지로부터 상기 물질을 제거한 후에도 지속된다. 실제로, 이 경우에는 세포를 1 nM PLC로 24 시간 처리한 다음, PLC 함유 배지를 제거하고 새로운 배지를 상기 물질없이 가하였다. 억제 값은 HeLa, U266 및 K562에 대해서 각각 20%, 26% 및 21%이었다.

참고 문헌

Spagnoli L.G. Giorn. Arterioscl. 1983; 8: 117-145

Asai K, Funaki C, Hayashi T. et al. Arterioscl. Thromb. 1993; 13: 892-899

Baumgartner H.R., Studer A, Pathol. Microbiol. (Base) 29: 393-405, 1966

Bennet M.R., Evan G.I., Newby A.C., Circ. Res. 1994; 74: 525-536

Bissonette R.P., Shi Y., Mahboubi A., Glynn J.M. and Green D.R., Curr. Commun. Cell. Mol. Biol. 1993

Bonanno E., Ghibelli L., Coppola S., Spagnoli L.G., 인간 병리 상태의 세포 사멸에 대한 국제 회의. Lecce, June 22-25, p. 54, 1995

Bouchaton-Piallat M.L., Gabbiani F., Desmouliere A. and Gabbiani G. Am. J. Pathol. 146: 1059-1064, 1995

Cavallero C., De Lellis C., Di Tondo U. et al. In: Cavallero C., editor. 아테롬발생 시의 동맥 벽. Padova: Piccin Medical Book, 1975: 25-42

Cavallero C., Di Tondo U. Mingazini L. et al., 죽상경화증 1973; 17: 49-62

Cavallero C., Di Tondo U. Mingazzini P. et al., 죽상경화증 1976; 25: 145-152

Cavallero C., Turolla E. and Ricevuti G., 죽상경화증 1971; 13: 9-20

Cheung W.T., Shi M.N., Young J.D. et al., Biochem. Pharmacol. 1987; 36: 2183-2189

Clowes A.W., Schwartz S.M., Cir. Res. 56: 139-145, 1985

Corsini A., Raiteri M., Soma M. et al., Pharmacol. Res. 1991; 23: 173-180

Curi R., Bond J.A., Calder P.C. and Newsholme E.A., Gen. Pharmac. 1993; 24, 591-597

Holmes D.R.J., Vliestra R.E., Smith H.C., Am. J. Cardiol. 1984; 77C-81C.

Kerr J.F.R., Winterford C.M., Harmon B.V., Cancer 73: 2013-2026, 1994

- Llera-Moya M., Rothblat G.H., Glick J.M. et al., *Arterioscler. Thromb.* 1992; 12: 1363-1370
- Mauriello A., Sangiorgi G., Orlandi A., Schiaroli S., Pertumo S., Spagnoli L.G.,
Negoro N., Inariba H., Inoue T., Kanayama Y., Takeda T.
- Olsson A.G., Ruhn G., Erikson U., *J. Int. Med.* 227: 381, 1990
- Orlandi A., Ehrlich H.P., Ropraz P. et al., *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 982-989
- Orlandi A., Ropraz P. and Gabbiani G., *Exp Cell Res* 1994; 214: 528-536
- Powell J.S., Clozel J-P., Muller R.K.M., Kuhn H., Hefti F., Hosang M., Baumgarner H., *Science* 245: 186-188, 1989
- Ross R., Glomset J.A., *N. Engl. J. Med.* 295: 369-377, 1976
- Schwartz S.M., Heimark R.L., Majesky M.V., *Physiol. Rev.* 70: 1177-1209, 1990
- Spagnoli L.G., *Giorn. Arterioscl.* 1983; 8: 117-145
- Spagnoli L.G., Orlandi A., Marino B., Mauriello A., De Angelis C., Ramacci M.T., *죽상경화증* 1995; 114, 29-44
- Spagnoli L.G., Orlandi A., Marino B. et al., *죽상경화증* 1995; 114: 29-44
- Spagnoli L.G., Orlandi A., Mauriello A., et al., *Pathol. Res. Pract.* 1992; 4-5: 637642
- Spagnoli L.G., Orlandi A., Mauriello A. et al., *죽상경화증* 1991; 89: 11-24
- Spagnoli L.G., Palmieri G., Mauriello A. et al., *죽상경화증* 1990; 82: 27-36
- Spagnoli L.G., Sambuy Y., Palmineri G. et al., *Artery* 1985; 13: 187-198
- Stein O., Halperin G., Stein Y., *죽상경화증* 1987; 7: 585-592