



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월23일

(11) 등록번호 10-1678699

(24) 등록일자 2016년11월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/343* (2006.01) *A61K 31/4965* (2006.01)  
*A61K 31/506* (2006.01) *A61K 31/5575* (2006.01)  
*A61K 31/5578* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7003547
- (22) 출원일자(국제) 2009년08월12일  
 심사청구일자 2014년08월06일
- (85) 번역문제출일자 2011년02월16일
- (65) 공개번호 10-2011-0045006
- (43) 공개일자 2011년05월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2009/053553
- (87) 국제공개번호 WO 2010/018549  
 국제공개일자 2010년02월18일
- (30) 우선권주장  
 PCT/IB2008/053252 2008년08월13일  
 국제사무국(IB)(IB)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Am J Respir Crit Care Med Vol 165. pp  
 1209-1216, 2002  
 WO2005030187 A2  
 WO2002053557 A1
- (73) 특허권자  
 액테리온 파마슈티칼 리미티드  
 스위스 올슈월 4123, 게버베스트라세 16
- (72) 발명자  
 클로젤, 마틴  
 스위스, 비닝겐 체하-4102, 윈터할데 3비
- (74) 대리인  
 특허법인코리아나

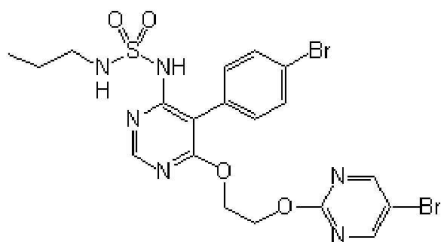
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 김훈석

(54) 발명의 명칭 마시텐탄을 포함하는 치료 조성물

### (57) 요약

본 발명은 프로스타클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 최소한 하나의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염과 공동으로, 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 상기 화합물의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 산물에 관계한다:



(I)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

마시텐탄 (macitentan) 또는 상기 화합물의 제약학적으로 허용되는 염 및 프로스타시클린 (prostacyclin) 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 최소한 하나의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 조합물로서,

이때 상기 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염, 또는 {4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}아세트산 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 조합물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

#### 청구항 3

마시텐탄 또는 상기 화합물의 제약학적으로 허용되는 염 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 최소한 하나의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염으로 이루어진, 고혈압, 폐 고혈압, 당뇨병성 동맥병증, 심부전, 발기 부전, 협심증 및 폐 섬유증질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 치료에서 치료적 이용을 위한 조합물로서,

이때 상기 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염, 또는 {4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}아세트산 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인, 치료적 이용을 위한 조합물.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인, 치료적 이용을 위한 조합물.

#### 청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 조합물은 폐 고혈압의 치료에서 치료적 이용을 위한 것인, 치료적 이용을 위한 조합물.

#### 청구항 6

최소한 하나의 제약학적으로 허용되는 부형제, 그리고, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 최소한 하나의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염과 조합하여, 마시텐탄 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 활성 성분으로서 포함하는, 고혈압, 폐 고혈압, 당뇨병성 동맥병증, 심부전, 발기 부전, 협심증 및 폐 섬유증질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 치료를 위한 제약학적 조성물로서,

이때 상기 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염, 또는 {4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}아세트산 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 제약학적 조성물.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염인 제약학적 조성물.

#### 청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에서, 상기 질환은 폐 고혈압인 제약학적 조성물.

#### 청구항 9

마시텐탄 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 폐 고혈압 치료용 약제로서, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드인 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제와 조합하여 투여되는 약제.

#### 청구항 10

제 9 항에 있어서, 마시텐탄을 포함하는 상기 약제 및 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드를 포함하는 상기 약제는 둘다 경구로 투여되는, 약제.

#### 청구항 11

제 9 항에 있어서, 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 일일 1회 투여되고, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드를 포함하는 상기 약제는 일일 2회 투여되는 약제.

#### 청구항 12

제 10 항에 있어서, 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 일일 1회 투여되고, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드를 포함하는 상기 약제는 일일 2회 투여되는 약제.

#### 청구항 13

제 9 항에 있어서, 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 일일 1회 경구로 투여되고, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드를 포함하는 상기 약제는 일일 2회 경구로 투여되고, 마시텐탄의 투여량 및 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드의 일일 두 투여량 중 하나는 동시에 투여되는 약제.

#### 청구항 14

제 9 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐 고혈압은 폐 동맥 고혈압인 약제.

#### 청구항 15

2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드인 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 폐 고혈압 치료용 약제로서, 마시텐탄 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제와 조합하여 투여되는 약제.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드인 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물을 포함하는 상기 약제 및 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 둘다 경구로 투여되는, 약제.

#### 청구항 17

제 15 항에 있어서, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드인 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물을 포함하는 상기 약제는 일일 2회 투여되고; 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 일일 1회 투여되는 약제.

#### 청구항 18

제 16 항에 있어서, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세타미드인 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물을 포함하는 상기 약제는 일일 2회 투여되고; 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 일일 1회 투여되는 약제.

#### 청구항 19

제 15 항에 있어서, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세타미드인 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물을 포함하는 상기 약제는 일일 2회 경구로 투여되고, 마시텐탄을 포함하는 상기 약제는 일일 1회 경구로 투여되고, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세타미드의 일일 두 투여량 중 하나 및 마시텐탄의 투여량이 동시에 투여되는 약제.

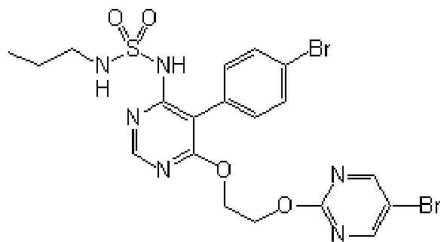
#### 청구항 20

제 15 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐 고혈압이 폐 동맥 고혈압인 약제.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 최소한 하나의 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염과 공동으로, 마시텐탄, 다시 말하면, 하기 화학식 (I)의 화합물:



[0002]

(I)

[0003]

[0004] 또는 상기 화합물의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 산물, 그리고 엔도텔린 (endothelin)이 관련되는 질환의 치료에서 동시에, 독립적으로 또는 일정한 기간 동안 치료적 이용을 위한 이러한 산물에 관계한다.

#### 배경 기술

[0005] PCT publication WO 02/053557에서는 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 엔도텔린 수용체 길항제, 그리고 엔도텔린이 관련되는 다양한 질환 (즉, 심부전, 협심증, 폐 고혈압과 전신 고혈압, 발기 부전)의 치료에서 상기 엔도텔린 수용체 길항제의 용도를 기술한다.

[0006] 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물은 특히 아래의 문서에서 기술되었다:

[0007] - US 4,683,330에서는 화합물 트레프로스티닐, 그리고 이의 염과 유사체를 기술한다;

[0008] - US 4,539,333에서는 에포프로스테놀 나트륨을 기술한다;

[0009] - US 4,692,464에서는 화합물 일로프로스트, 그리고 이의 염과 유사체를 기술한다;

[0010] - US 4,474,802에서는 화합물 베라프로스트, 그리고 이의 염과 유사체를 기술한다;

[0011] - US 7,205,302에서는 무엇보다도, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 5,6-디페닐피라진 유도체, 그리고 이들의 염과 유도체, 특히 코드명 MRE269와 NS-304로 알려져 있는 화합물 (K. Kuwano et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2007), **322**(3), 1181-1188)을 기술한다.

[0012] 그 외에, WO 2004/017993에서는 폐 동맥 고혈압을 치료하기 위한, 프로스타시클린 수용체 작동약 에포프로스테놀 나트륨과 함께 엔도텔린 수용체 길항제 보세탄 (bosentan)의 용도를 기술한다.

### 발명의 내용

## 해결하려는 과제

- [0013] 본 출원인은 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물의 조합 (combination)이 엔도텔린이 관련되는 질환의 치료에서 강한 상승효과 (synergistic effect)를 산출한다는 것을 확인하였다. 부가적으로, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물에 관련된 가능한 부작용 (가령, 홍조 (flushing) 또는 전신 저혈압 (systemic hypotension))이 감소될 것으로 기대된다.
- [0014] 따라서 본 발명의 첫 번째 요부는 마시텐탄 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염, 그리고 최소한 하나의 (바람직하게는, 하나의) 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 산물에 관계한다.
- [0015] 본 발명의 다른 요부는 엔도텔린이 관련되는 질환의 치료에서 동시에, 독립적으로 또는 일정한 기간 동안 치료적 이용을 위한, 최소한 하나의 (바람직하게는, 하나의) 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염과 공동으로 마시텐탄 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 산물이다.

## 과제의 해결 수단

- [0016] 아래의 단락에서는 본 특허 출원에 이용되는 다양한 용어의 정의를 제공하고, 달리 명시된 정의가 더욱 넓은 또는 더욱 좁은 정의를 제공하지 않는다면, 본 명세서와 특허청구범위 전반에서 균일하게 적용되는 것으로 의도된다.
- [0017] 마시텐탄은 화학식 (I)의 화합물에 대한 권장된 INN이고, 이런 이유로 상기 명칭은 본 특허 출원에서 화학식 (I)의 화합물을 지칭하는데 이용될 것이다.
- [0018] 치료적 이용을 지칭할 때, "동시에" 또는 "동시"는 본 특허 출원에서, 관련된 치료적 이용이 동일한 루트에 의해, 그리고 동일한 시점에서 2가지 이상의 활성 성분의 투여에 있음을 의미한다.
- [0019] 치료적 이용을 지칭할 때, "독립적으로" 또는 "독립적"은 본 특허 출원에서, 관련된 치료적 이용이 대략 동일한 시점에서 최소한 2가지 상이한 루트에 의해, 2가지 이상의 활성 성분의 투여에 있음을 의미한다.
- [0020] "일정한 기간 동안" 치료적 투여는 본 특허 출원에서, 상이한 시점에서 2가지 이상의 성분의 투여, 특히 다른 성분(들)의 투여가 시작되기에 앞서 활성 성분 중에서 한 가지의 전체 투여가 완결되는 투여 방법을 의미한다. 이러한 방식으로 다른 활성 성분(들)을 투여하기에 앞서 수개월 동안 활성 성분 중에서 한 가지를 투여하는 것이 가능하다. 이러한 경우에, 동시 투여는 발생하지 않는다. 일정한 기간 동안 다른 치료적 투여는 시간의 흐름에서, 각 활성 성분에 대한 상이한 투약 빈도를 이용하여 이러한 조합 (combination)의 2가지 이상의 활성 성분의 투여에 있고, 여기서 일정한 시점에서는 이러한 조합의 모든 활성 성분의 동시 투여가 진행되는 반면, 일부 다른 시점에서는 이러한 조합의 활성 성분 중에서 일부만 투여될 수 있다 (가령, 마시텐탄과 NS-304의 조합의 경우에, 일정한 기간 동안 치료적 투여는 마시텐탄이 일일 1회 투여되는 반면 NS-304가 일일 2회 투여되는 것일 수 있다).
- [0021] "엔도텔린이 관련되는 질환"은 특히, 고혈압, 폐 고혈압 (폐 동맥 고혈압 포함), 당뇨병성 동맥병증, 심부전, 발기 부전, 협심증 또는 폐 섬유증을 의미한다.
- [0022] "프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물"은 본 특허 출원에서 기술된 "프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 EC<sub>50</sub>의 결정을 위한 검사"에 종속될 때, 500 nM 이하의 EC<sub>50</sub> 값을 갖는 화합물을 의미한다.
- [0023] 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물의 특정 실례에는 트레프로스티닐과 이의 제약학적으로 허용되는 염, 에포프로스테놀과 이의 제약학적으로 허용되는 염, 일로프로스트와 이의 제약학적으로 허용되는 염, 베라프로스트와 이의 제약학적으로 허용되는 염, 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 (NS-304)와 이의 제약학적으로 허용되는 염, 그리고 {4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}아세트산 (MRE-269)과 이의 제약학적으로 허용되는 염이 포함된다.
- [0024] 용어 "제약학적으로 허용되는 염"은 비-독성, 무기 또는 유기 산 및/또는 염기 부가염 (addition salt)을 지칭한다. "Salt selection for basic drugs", *Int. J. Pharm.* (1986), **33**, 201-217을 참조할 수 있다.
- [0025] 그 외에, 마시텐탄 또는 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물에 대한 임의의 언급은 적절하

게는, 이의 제약학적으로 허용되는 염 역시 지칭하는 것으로 간주된다.

- [0026] 바람직하게는, 본 발명에 따른 산물은 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물이 동시에 또는 일정한 기간 동안 발생하는 치료적 이용에 의도되는 산물일 것이다.
- [0027] 본 발명의 한 가지 바람직한 변형에 따라서, 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물은 동시에 투여되도록 의도될 것이다.
- [0028] 본 발명의 다른 바람직한 변형에 따라서, 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물은 일정한 기간 동안 투여되도록 의도될 것이다.
- [0029] 본 발명에 따른 산물의 치료적 이용에 의도되는 기간은 최소한 1주일, 그리고 바람직하게는 최소한 1 개월 이상 (가령, 6개월)일 것이다. 이러한 기간은 또한, 산물을 복용하는 환자의 전체 수명일 수도 있다. 본 발명에 따른 특정 투여 방식에 따라, 마시텐탄의 투여는 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물의 투여와 교대로 수행되고, 그리고 이런 투여 간에 간격은 2일 또는 3일 (더욱 바람직하게는, 1일)을 초과하지 않을 것이다. 본 발명에 따른 다른 특정 투여 방식에 따라, 마시텐탄과 NS-304의 조합의 경우에, 일정한 기간 동안 치료적 투여는 마시텐탄이 일일 1회 투여되는 반면 NS-304가 일일 2회 투여되는 것일 수 있다.
- [0030] 바람직하게는, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 (NS-304)와 이의 제약학적으로 허용되는 염, 그리고 {4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}아세트산 (MRE-269)과 이의 제약학적으로 허용되는 염에서 선택될 것이다. 본 발명의 한 가지 특히 바람직한 변형에 따라, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물은 2-{4-[(5,6-디페닐피라진-2-일)(이소프로필)아미노]부톡시}-N-(메틸설포닐)아세트아미드 (NS-304) 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염일 것이다.
- [0031] 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물의 투여 루트는 바람직하게는, 동일하다. 특히, 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물에 대한 공통의 투여 루트는 경구 루트일 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 산물의 정확한 투여량이 치료 의사에 의해 결정되어야 하지만, 환자 체중 kg당 일일 0.05 내지 2 mg (바람직하게는 0.1 내지 1 mg) 용량의 마시텐탄이 적절할 것으로 예상된다. 유사하게, 환자 체중 kg당 일일 2회 0.5 내지 30  $\mu$ g (바람직하게는 1.5 내지 15  $\mu$ g) 용량의 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물이 적절할 것으로 예상된다.
- [0033] 바람직하게는, 본 발명에 따른 산물에 의한 치료가 의도되는 질환은 고혈압, 폐 고혈압, 당뇨병성 동맥병증, 심부전, 발기 부전, 협심증과 폐 섬유증에서 선택될 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 산물에 의한 치료가 의도되는 질환은 고혈압과 폐 고혈압에서 선택될 것이다. 특히, 본 발명에 따른 산물에 의한 치료가 의도되는 질환은 폐 고혈압 (그 중에서도 특히, 폐 동맥 고혈압)일 것이다.
- [0034] 본 발명은 또한, 최소한 하나의 (바람직하게는, 하나의) 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염, 그리고 최소한 하나의 부형제와 공동으로, 활성 성분으로서 마시텐탄 또는 상기 화합물의 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 제약학적 조성물에 관계한다.
- [0035] 게다가, 본 발명은 엔도텔린이 관련되는 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에서 최소한 하나의 (바람직하게는, 하나의) 프로스타시클린 수용체 (IP) 작동약 특성을 갖는 화합물 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염과 공동으로, 마시텐탄 또는 상기 화합물의 제약학적으로 허용되는 염의 용도에 관계한다.
- [0036] 그 외에, 본 발명에 따른 산물에 대하여 지시된 선호 (preference)는 본 발명의 제약학적 조성물과 용도에 당연히 준용된다.
- [0037] 본 발명의 특정 구체예는 아래의 실시예에서 기술되고, 이들 실시예는 본 발명을 더욱 상세하게 설명하는 역할을 하고 이의 범위를 결코 한정하지 않는다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 실시예
- [0039] 본 발명의 유용성을 예증하기 위하여, 일일 10 mg/kg의 용량으로 경구 투여된 마시텐탄, 그리고 일일 2회 1 mg/kg의 용량으로 경구 투여된 NS-304의 합동 (association)이 2가지 상이한 고혈압 모형, 다시 말하면, 폐 고혈



압 모노크로탈린 (monocrotaline) 쥐 모형 및 자발적 고혈압 쥐 모형에서 검사될 수 있다. 다른 합동 역시 유사하게 검사될 수 있다. 이용되는 프로토콜은 하기 "발명 화합물의 약리학적 특성" 부분에서 상술된다.

[0040] **발명 화합물의 약리학적 특성**

[0041] **실험 방법:**

[0042] 하기에 기술된 실험 방법은 발명 화합물의 약리학적 특성을 입증하는데 이용될 수 있다.

[0043] 쥐에서 폐 고혈압의 모노크로탈린 모형

[0044] 수컷 Wistar 쥐는 Harlan (Netherlands)으로부터 구입되고 지역 가이드라인 (local guideline) (Basel-Landschaft cantonal veterinary office)에 따른 조건 하에 유지된다. 모든 쥐는 12:12 시간 밝음:어둠 주기 (light:dark cycle)에서 기후-통제된 조건 (climate-controlled condition) 하에 수용되고, 그리고 사료와 물에 자유롭게 접근한다. 원격측정 시스템 (telemetry system)이 2.5% 이소플루란 (isoflurane) (70% O<sub>2</sub> + 30% N<sub>2</sub>O에서)의 흡입에 의한 마취 하에 이식된다. 무균 조건 하에, 압력 무선 주파수 전달체 (pressure radio-frequency transmitter)가 복강 (peritoneal cavity) 내로 이식되고, 그리고 감지 카테터 (sensing catheter)가 폐 동맥에 삽입된다. 상기 전달체가 복부 근계 (abdominal musculature)에 봉합되고, 그리고 피부가 닫혀진다. 수신기 플랫폼 (receiver platform)이 무선 신호 (radio signal)를 디지털화된 입력 (digitized input)으로 변환하고, 이는 전용 퍼스널 컴퓨터 (Compaq, Deskpro)로 보내진다. 폐 동맥 혈압 치수는 대기압 참조 (ambient pressure reference)로부터 입력을 이용함으로써 조정된다. 원격측정 장치 (telemetry unit)는 Data Sciences (St. Paul, MN, USA)로부터 구입된다. 모노크로탈린 (MCT; Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)은 3 ml/kg의 부피에서 단일 피하 (sc) 주사 (60 mg/kg)로서 투여되고, 그리고 대조 연령-대응된 쥐에는 동등한 부피의 염수가 투여된다.

[0045] **변형 1: 장기적인 효과 평가:**

[0046] 이들 동물은 실험 군에 무작위로 선정되고, 그리고 실험은 4주의 지속 기간 동안 MCT 주사후 24시간 이내에 시작된다. 마시텐탄 및 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물은 경구 루트로 투여된다. 폐 동맥 혈압에 대한 마시텐탄, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물, 그리고 이들의 조합의 효과는 5분 간격으로 데이터를 수집함으로써 측정된다. 각 쥐에 대한 폐동맥압의 시간 평균이 계산된다. 기록의 종결 시점에서, 쥐는 희생된다. 심장은 제거되고 칭량되며, 그리고 장기 중량 대(對) 체중 (BW)의 비율이 계산된다. 우심실 (right ventricle, RV) 및 좌심실 (left ventricle) + 격막 (septum)은 분리되고 칭량된다; RV/BW 비율은 우심실 비대 (right ventricular hypertrophy)의 지수로서 이용된다. RV/BW 비율이 낮을수록, 우심실 비대를 감소시키기 위하여 조사된 이들 항목(들)의 효과가 더욱 강하다.

[0047] **변형 2: 단기적인 효과 평가:**

[0048] MCT 주사후 4주 시점에, 이들 쥐는 폐 고혈압이 나타나기 시작하고, 그리고 평균 폐동맥압에 대한 마시텐탄, 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 특성을 갖는 화합물, 그리고 이들의 조합의 단일 경구 투여의 개별 효과가 평가될 수 있다.

[0049] 자발적 고혈압 쥐 모형

[0050] 자발적 고혈압 쥐 (SHR)가 모노크로탈린-처리된 쥐를 대체하는 점을 제외하고, 쥐에서 폐 고혈압의 모노크로탈린 모형에서와 동일한 프로토콜이 이용된다. 이들 SHR 쥐는 Harlan (Netherlands)으로부터 구입된다.

[0051] 프로스타시클린 수용체 (IP) 작용약 EC<sub>50</sub>의 결정을 위한 검사:

[0052] 인간 IP 수용체를 안정적으로 발현하는 CHO 세포는 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>의 가습된 공기에서 37°C에서, 10% 소 태아 혈청 (fetal bovine serum)을 포함하는 Ham의 F-12 배지에서 배양된다. 세포는 24-웰 (well) 평판에서 1 x 10<sup>5</sup> 개 세포/웰로 접종되고 48시간 동안 배양된다. 세척 및 37°C에서 1시간 동안 분석 완충액 (assay buffer)과 함께 배양 이후에, 이들 세포는 IBMX (500 μM)의 존재에서 다양한 농도의 검사 화합물에 노출된다. 상층액의 제거후, 반응은 0.2 M 과염소산 (perchloric acid)의 첨가로 중단된다. 점착성 세포는 세포내 cAMP를 추출하기 위하여 -80°C에서 2시간동안 동결되고 해동된다. 상층액은 튜브에 수집되고, 2M KHCO<sub>3</sub> 용액에 의해 중화되고,

이후 EIA 시스템으로 cAMP 수준의 측정을 위한 시료를 획득하기 위하여 4℃에서 10분 동안 14,000 g로 원심분리된다. 배양 평판에 부착된 세포 잔해의 단백질 함량은 1N NaOH 용액에서 용해화 (solubilization) 이후에 측정된다. cAMP의 수준은 pmol cAMP/ mg 단백질로서 표시된다. EC<sub>50</sub> 값은 농도-반응 곡선 (concentration-response curve)의 비-선형 회귀 분석 (non-linear regression analysis)으로부터 결정되고, 관찰된 극대 효과 (maximal effect)의 절반의 반응을 유도하는 검사 화합물 농도의 음의 대수 (negative logarithm)로서 정의된다.

**실험 결과:**

**실시예 1: 모노크로탈린 처리된 쥐에서 평균 폐동맥압에 대한 마시텐탄, NS-304, 그리고 이들의 조합의 단기적인 효과:**

"실험 방법" 부분의 "쥐에서 폐 고혈압의 모노크로탈린 모형" 섹션에서 기술된 바와 같은 모노크로탈린 모형에 따라 모노크로탈린으로 처리된 폐 고혈압 수컷 Wistar 쥐에서 실험이 수행되었다.

모노크로탈린 처리후 25 내지 30일 시점에, 6 마리 생쥐의 4가지 군이 구성되고 조사되었다:

- 첫 번째 군은 마시텐탄 및 NS-304로 치료되지 않았다 (대조 군);
- 두 번째 군은 마시텐탄 단독 (10 mg/kg per os)으로 치료되었다;
- 세 번째 군은 NS-304 단독 (30 mg/kg per os)으로 치료되었다;
- 네 번째 군은 마시텐탄 (10 mg/kg per os)과 NS-304 (30 mg/kg per os)의 조합으로 치료되었다.

평균 폐동맥압은 시간의 흐름에서 측정되었다. 평균 폐동맥압과 시간 간에 관계는 그래프로서 플롯팅 (plotting)되었다. 곡선 아래 면적 (Area Under Curve, AUC)은 상이한 치료제(들)의 경구 투여후 쥐의 각 군에 대하여 계산되었다 (평균 폐동맥 혈압이 증가하면 양의 면적 (positive area)이 관찰되고, 그리고 평균 폐동맥 혈압이 감소하면 음의 면적 (negative area)이 관찰된다). 획득된 결과는 하기 표 1에 요약된다.

**표 1**

쥐 군 [치료]	AUC
1 군 [대조: 치료 없음]	106 ± 134
2 군 [마시텐탄 (10 mg/kg per os)으로 치료]	-381 ± 147
3 군 [NS-304 (30 mg/kg per os)로 치료]	-99 ± 128
4 군 [마시텐탄 (10 mg/kg per os) 및 NS-304 (30 mg/kg per os)로 치료]	-758 ± 164

폐 동맥 고혈압의 모노크로탈린 모형에서 획득된 이들 데이터는 사전에 모노크로탈린이 투여된 쥐의 치료에서 마시텐탄과 NS-304의 조합의 상승효과 (synergistic effect)를 증명한다.