



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0132042
(43) 공개일자 2022년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7076 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/7076 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7032219(분할)

(22) 출원일자(국제) 2017년04월21일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2018-7033797
원출원일자(국제) 2017년04월21일
심사청구일자 2020년04월20일

(85) 번역문제출일자 2022년09월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/028996

(87) 국제공개번호 WO 2017/185061
국제공개일자 2017년10월26일

(30) 우선권주장
62/325,860 2016년04월21일 미국(US)

(71) 출원인
아스트로사이트 파마슈티컬스, 인코포레이티드
미국 02142 메사추세츠주 캠브리지 스위트 1800
퍼스트 스트리트 245
더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍
사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트
리트
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브
헬스 앤드 휴먼 서비씨즈
미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788,
스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스
티튜츠 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜
스퍼
(72) 발명자
코리넥 윌리엄 에스.
미국 06355 코네티컷주 미스틱 롱 와프 드라이브
163
레흐라이터 제임스 디.
미국 78213 텍사스주 산 안토니오 마사 글린 코트
112
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **신경계 및 심혈관계 병태 치료를 위한 화합물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은, 특정 장애 및 병태, 예를 들어 뇌졸중 또는 외상성 뇌 손상과 같은 뇌 손상의 치료를 위한 화합물 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 9/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

(72) 발명자

리스톤 시어도어 이.

미국 06378 코네티컷주 스톤링톤 키즈 웨이 33

제이콥슨 케네스 에이.

미국 20902 메릴랜드주 실버 스프링 워터밀 레인
11218

명세서

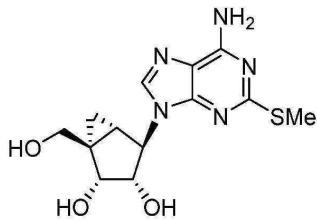
청구범위

청구항 1

외상성 뇌 손상(TBI), 뇌졸중, 신경 변성 병태, 또는 심장 또는 심혈관 질환으로부터 선택되는 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법.

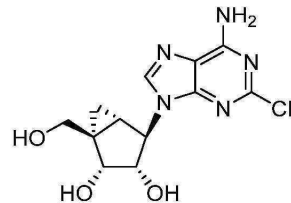
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물이 하기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인, 치료 방법:



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물이 하기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인, 치료 방법:



청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 손상, 질환, 또는 병태가 TBI인, 치료 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 TBI가, 뇌진탕, 폭풍 손상, 전투 관련 손상, 또는 머리에 대한 경증, 중등증, 또는 중증의 타격으로부터 선택되는, 치료 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 손상, 질환, 또는 병태가, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 거미막하 출혈, 뇌 혈관 연축, 또는 일과성 허혈 발작(TIA)으로부터 선택되는 뇌졸중인, 치료 방법.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 신경 보호 또는 신경 복원이, 치료되지 않은 환자에 비하여 상기 환자에서 증가되는, 치료 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경 변성 질환이, 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 헌팅턴 질환(HD), 다발 경화증(MS), 근위축 측삭 경화증(ALS), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 또는 바이러스, 알콜 중독, 종양, 독소, 또는 반복적인 뇌 손상으로 인한 신경 변성 병태로부터 선택되는, 치료 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 신경 변성 질환이 파킨슨 질환인, 치료 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 손상, 질환, 또는 병태가 알츠하이머 질환, 편두통, 뇌 수술, 또는 항암 화학요법 관련 신경계 부작용인, 치료 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TBI, 뇌졸중, 심허혈증, 또는 심근경색증 이후의 상기 회복 기간이, 치료되지 않은 환자에 비해 감소되는, 치료 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 심장 또는 심혈관 질환이, 심허혈증, 심근경색증, 심근병증, 관상동맥 질환, 부정맥, 심근염, 심장막염, 협심증, 고혈압 심장 질환, 심내막염, 류마티스 심장 질환, 선천 심장 질환, 또는 죽상경화증으로부터 선택되는, 치료 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 심장 또는 심혈관 질환이 심허혈증 또는 심근경색증인, 치료 방법.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 뇌졸중, 심허혈증, 또는 심근경색증을 치료하기 위해, 상기 손상이 발생한 이후부터 상기 손상이 소실될 때의 기간 동안 상기 화합물이 장기적으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 A₃R이 부분적 작용화되는(agonized), 치료 방법.

청구항 16

외상성 뇌 손상(TBI), 뇌졸중, 또는 신경 변성 병태로부터 선택되는 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 A₃R은, 다른 A₃R 매개 경로의 활성화를 거의 또는 전혀 갖지 않는 세포내 칼슘 동원의 우선적 활성화를 통해, 또는 Gq11 매개된 세포내 칼슘 동원, cAMP 생산의 Gi 매개된 조절, 또는 ERK1/2 및 Akt의 Gi 매개된 인산화의 우선적 활성화를 통해, 상기 A₃R 수용체의 신경 보호 기능에 대해 편향된 방식(biased manner)으로 작용화되는, 치료 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 손상, 질환, 또는 병태가 TBI인, 치료 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 TBI가, 뇌진탕, 폭풍 손상, 전투 관련 손상, 또는 머리에 대한 경증, 중등증, 또는 중증의 타격으로부터 선택되는, 치료 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 손상, 질환, 또는 병태가, 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 거미막하 출혈, 뇌 혈관 연축, 또는 일과성 허혈 발작(TIA)으로부터 선택되는 뇌졸중인, 치료 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 신경 변성 질환이, 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 헌팅턴 질환(HD), 다발 경화증(MS), 근위축 측삭 경화증(ALS), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 또는 바이러스, 알콜 중독, 종양, 독소, 또는 반복적인 뇌 손상으로 인한 신경 변성 병태로부터 선택되는, 치료 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 신경 변성 질환이 파킨슨 질환인, 치료 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 손상, 질환, 또는 병태가 알츠하이머 질환, 편두통, 뇌 수술, 또는 항암 화학요법 관련 신경계 부작용인, 치료 방법.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 신경 보호 또는 신경 복원이 치료되지 않은 환자에 비하여 상기 환자에서 증가되는, 치료 방법.

청구항 24

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 A₃R이, 완전(full) A₃R 작용제에 비하여 개선된 신경 보호 또는 신경 복원 기능으로 부분적 작용화되는, 치료 방법.

청구항 25

심장 또는 심혈관 질환의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 작용제는, Gq11 매개된 세포내 칼슘 동원, cAMP 생산의 Gi 매개된 조절, ERK1/2 및 Akt의 Gi 매개된 인산화, ATP 민감성 칼륨 채널의 조절, 또는 베타-아레스틴 활성화의 조절인, A₃R 매개 경로들 중 하나 이상의 우선적 활성화를 통해, 완전 A₃R 작용제에 비해 개선된 심장 보호 기능을 갖는 편향된 A₃R의 작용제인, 치료 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 환자가 심허혈증 또는 심근경색증을 앓는, 치료 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 방법이 상기 환자의 심장 보호 또는 손상된 심장 조직의 재생을 증가시키는, 치료 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TBI, 뇌졸중, 심허혈증, 또는 심근경색증 이후의 상기 회복 기간이, 치료되지 않은 환자에 비해 감소되는, 치료 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이, 완전 A₃R 작용제에 비해 개선된 신경 보호 기능을 갖는 상기 A₃R의 부분 작용제인, 치료 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 2016년 4월 21일자로 출원된 미국 가특허출원 제62/325,860호의 이익을 주장하며, 이의 내용은 전문이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은, 뇌, 중추 신경계(CNS), 또는 심혈관계의 특정 병태, 예를 들어 뇌 손상(brain injury), 신경 변성

병태, 또는 심허혈증으로부터의 치료, 개선 또는 회복 촉진을 위한 화합물 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0005] **정부 지원 성명**

[0006] 본 발명은, 국립 보건원이 수여하는 수여번호 제NS093756호 하의 정부 지원으로 완성되었다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가지고 있다.

배경 기술

[0007] 뇌 손상은 걱정될 정도로 일반적인 의학적 병태이며, 전 세계적으로 이환율 및 사망률의 주요 원인 중 하나이다. 뉴런은 제한된 복원력을 갖고 있기 때문에 뇌는 특히 손상되기 쉽다. 개인이 태어날 때, 뇌는 본질적으로 인생에서 가질 모든 뉴런을 갖고 있다. 신체의 다른 세포와는 달리, 뉴런은 출생 직후에 재생산을 정지한다. 이 세포가 손상되거나 죽으면, 교체되지 않고, 결국 종종 사람의 인지 기능 및 감각운동 능력의 장애를 일으키고 돌이킬 수 없는 정도로 퇴행시킨다. 신경 세포 사멸 및 상해를 야기하는 병태는 허혈성 에피소드(예를 들어, 뇌졸중) 및 트라우마로부터 변성 장애(예를 들어, 알츠하이머 질환)에 이른다.

[0008] 중추 신경계(CNS)에 대한 손상은 전 세계적으로 사망 및 장애의 실질적인 원인이다. 예를 들어, CDC에 따르면 약 170만 명이 매년 외상성 뇌 손상(TBI)을 지속하여, 의료 비용 및 생산성 손실 측면에서 연간 600억 달러를 초과하는 미국 경제 비용을 발생시킨다(Finkelstein, E; Corso, P; Miller, T, *The Incidence and Economic Burden of Injuries in the United States*, Oxford University Press: New York, 2006). 또한, 뇌졸중은 미국에서 세 번째로 큰 사망 원인으로, 매년 795,000건의 추정 사례가 발생하며, 주요 장애 원인이며, 연간 340억 달러 이상의 미국 경제 비용을 발생시킨다(NINDS, 2014; stroke.nih.gov; and Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. "Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association," *Circulation*. 2015 ;e29-322).

[0009] 급성기(acute setting)에는 24시간 이내에 환자를 치료할 기회가 있으며, 이는 상해의 범위를 제한할 수 있다. 허혈성 또는 출혈성 뇌졸중 직후에, 뇌에 발작을 일으키는 부위는 통상적으로, 돌이킬 수 없는 상해를 입은 조직의 중심부를, 또한 반음영이라고 불리는 생존가능하지만 위험에 처한 영역을 포함한다. 이 기간 동안 산소 및 포도당이 불충분하게 뇌 세포에 공급되면, 상기 반음영에 추가로 2차 손상이 발생한다. 산소 및 포도당의 부족은 세포 미토콘드리아에 의한 에너지 생산을 감소시킨다. 이러한 에너지 고갈의 즉각적인 효과는 이온 펌프의 실패로, 세포의 칼륨(K^+) 이온의 상승에 의해 뇌 조직에서 재발하는 확산 탈분극의 파동을 발생시킨다. 동시에, 세포 내로의 나트륨 이온(Na^+)의 유입에 이어 염화 이온(Cl^-)이 유입되어, 삼투압 상승으로 인해 세포가 부풀어 올라, 주변 뉴런과 그 과정을 압박하여 궁극적으로 세포 용해(세포 파열) 및 염증 반응을 야기한다. 일반적으로 이러한 이온 항상성의 파괴는, 흥분 독성, 세포 팽윤, 및 인접한 조직에 상해를 가중시키고 이차 메커니즘에 의해 병변을 확장시키는 세포 사멸을 초래한다. 스트레스 받은 뇌 세포를 보호하기 위해 초기 24시간 동안 효과적인 치료가 필요하다. 뇌졸중에서 뇌 상해(brain damage)의 전파는 외상 및 뇌진탕과 같은 다른 형태의 뇌 손상에서 관찰되는 것과 유사하다.

[0010] 급성기 치료 이외에, 효과적인 성상 세포 기능은, 뇌 발작 후 24 내지 96시간의 기간 내에, 알츠하이머와 같은 신경 변성 질환 환자 또는 가장 일반적으로는 노인에게 있어서 수개월-수년의 기간 동안, 보다 광범위한 신경 복원에서 핵심적인 역할을 한다. 뇌 세포의 재생성 불능은, 기능 상실을 복구하기 위해 재구성하기 위해 남아 있는 손상되지 않은 뇌 조직을 필요로 한다. 신경 재구성을 위한 이러한 가능성은 노인들에서 감소된다.

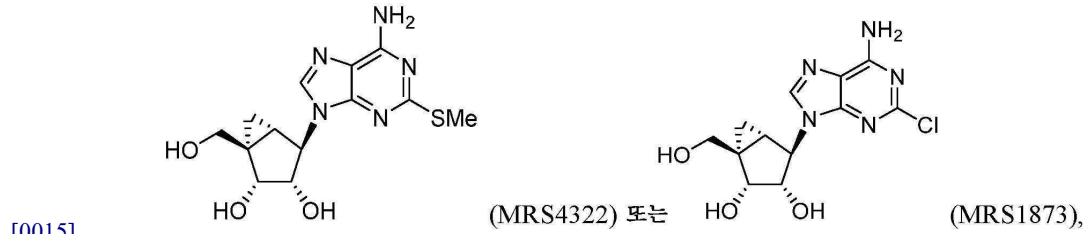
[0011] GPCR 수용체는 심장 보호 효과를 매개하는 것으로 제안되어 왔다. 따라서, 이러한 수용체의 조절을 통한 유사한 작용 메커니즘에 의해 심장 및 심혈관 병태를 치료할 가능성이 있다.

[0012] 뇌 손상, CNS 손상, 심장 및 심혈관 질환 및 관련 병태에 대한, 그리고 알츠하이머와 같은 신경 변성 병태를 앓고 있는 환자의 신경 복원을 촉진하는 보다 효과적인 치료법에 대한 시급하고도 강력한 충족되지 않는 의학적 필요성이 있다.

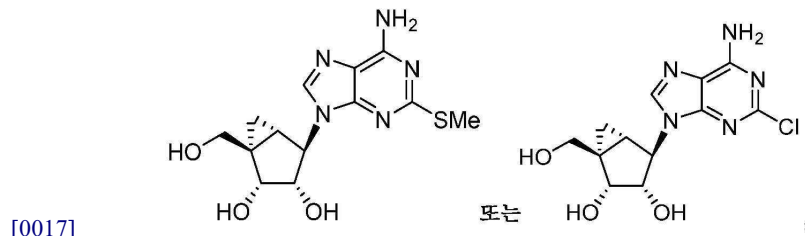
발명의 내용

[0013] 일 양태에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI), 뇌졸중, 신경 변성 병태, 또는 심장 또는 심혈관 질환으로부터 선택되는 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 A_3 아데노신 수용체 (A_3R)의 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법을 제공한다.

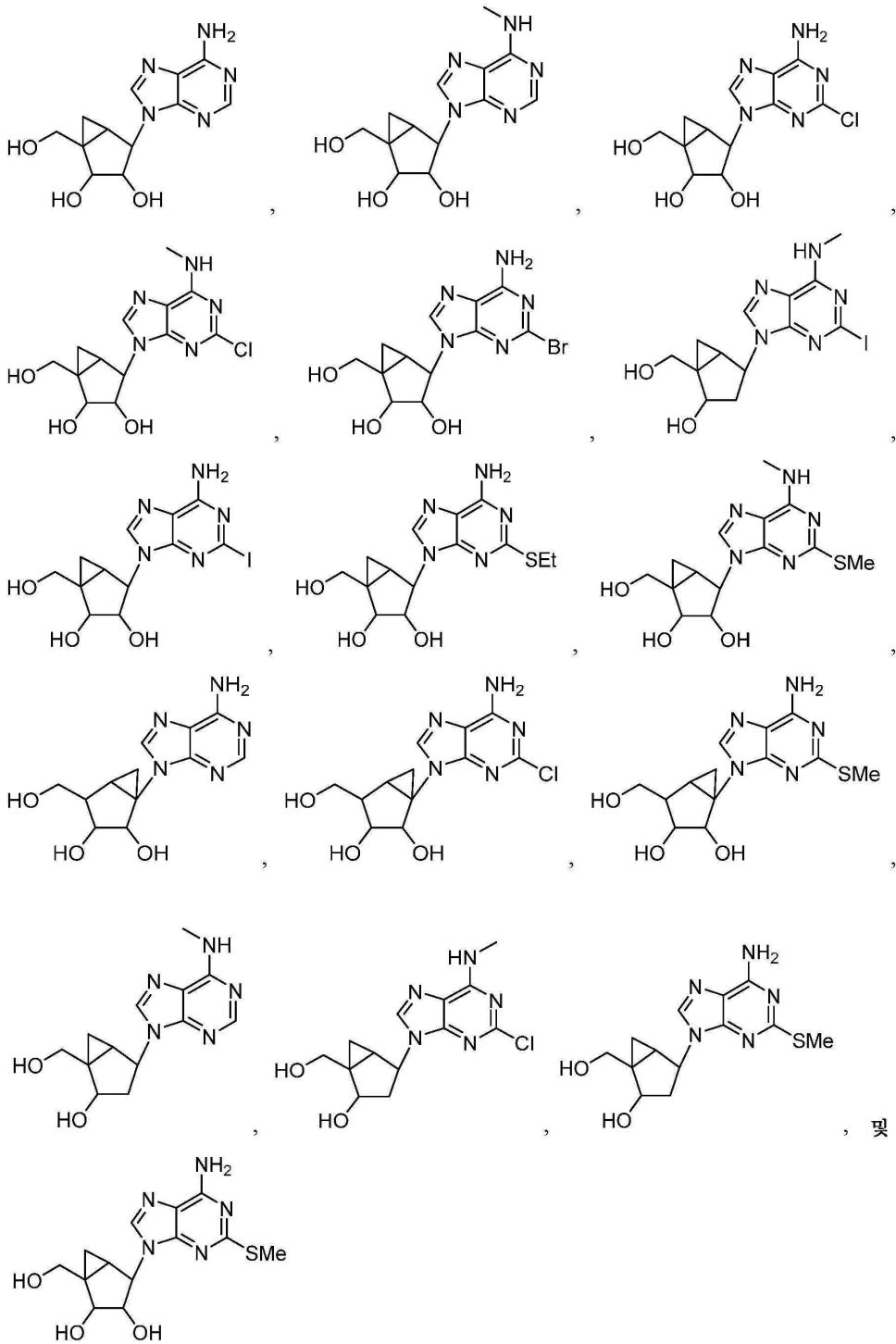
[0014] 일 양태에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI), 뇌졸중, 신경 변성 병태, 또는 심장 또는 심혈관 질환으로부터 선택되는 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 다음으로부터 선택되는 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 편향된 작용제, 부분 작용제, 또는 편향된 부분 작용제, 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이들을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법을 제공한다:



[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI) 또는 뇌졸중으로부터 선택되는 뇌 또는 중추 신경계(CNS) 손상 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 다음으로부터 선택되는 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이들을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌 또는 중추 신경계(CNS) 손상 또는 병태의 치료 방법을 제공한다:



[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 다음으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 화합물(여기서, 각각의 화합물은 노스(north) 또는 사우스(south) 회전 배열(conformation)일 수 있거나, 메타노카르바 당이 D-리보당으로 대체될 수 있다), 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 1인산염, 2인산염, 또는 3인산염, 또는 상기 1인산염, 2인산염, 또는 3인산염의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[0020]

[0021]

또 다른 측면에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI), 방사선 상해, 뇌졸중, 편두통, 심장 또는 심혈관 질환, 또는 신경 변성 장애의 치료 또는 개선 방법으로서, 상기 치료 또는 개선을 필요로 하는 환자에게 상기 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 치료 또는 개선 방법을 제공한다.

[0022]

또 다른 측면에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI), 방사선 상해, 뇌졸중, 편두통, 심장 또는 심혈관 질환, 또는 신경 변성 장애의 치료 또는 개선 방법으로서, 상기 치료 또는 개선을 필요로 하는 환자에게 다음으로부터 선택되는 화합물(여기서, 각각의 당은 노스 또는 사우스 회전 배열에서 메타노카르바 당으로 치환될 수 있거나, 각각의 당은 D-리보당으로 대체될 수 있다); 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 유효량으로 투여함을 포함하는, 치료 또는 개선 방법을 제공한다: 아데노신, ADP, 2-메틸티오-ADP 3나트륨 염, ATP, ATP 2나트륨 염, α , β -메틸렌 ATP, α , β -메틸렌아데노신 5'-트리포스페이트 3나트륨 염, 2-메틸티오아데노신 트리포스페이트 4나트륨 염, 2-MeSATP, BzATP 트리에틸암모늄 염, 이노신, 시티딘, 아실화 시티딘, 시티딘-모노포스페이트(CMP), 시티딘 디포스페이트(CDP), 시티딘 트리포스페이트(CTP), CDP-콜린, CMP-콜린, 데뉴포솔, 데뉴포솔 4나트륨,

GTP, ITP, MRS 541, MRS 542, MRS 1760, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2341, MRS 2365, MRS 2500, MRS 2690, MRS 2698, MRS 3558, MRS 4322, MRS 5151, MRS 5676, MRS 5678, MRS 5697, MRS 5698, MRS 5923, MRS 5930, 벤질-NECA, IB-MECA, C1-IB-MECA, LJ529, DPMA, CCPA, DBXRM, HEMADO, PEMADO, HENECA, PENECA, CP608,039, CP532,903, CGS21680, AR132, VT72, VT158, VT160, VT163, PSB 0474, 우리딘 5'-디포스페이트(UDP), UDP-글루코스, 우리딘 β-티오디포스페이트(UDPβS), 우리딘 5'-트리포스페이트(UTP), 우리딘 γ-티오포스페이트 (UTPγS), 2-티오UTP 4나트륨 염, UTPγS 3나트륨 염, 우리딘-5'-디포스포글루코스, 디우리딘 트리포스페이트, 2-(핵실티오) (HT)-AMP, 디아데노신 펜타포스페이트, 2'-데옥시-2'-아미노-UTP, 2-티오-UTP, 트리아세틸우리딘, 디아세틸/아실 우리딘, 우리딘, 수라민, 디피리다몰 유사체, 디아데노신 테트라포스페이트 Ap₄U, Ap₄A, INS365, INS37217, 또는 INS48823.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1a는, 복강내 투여 후 마우스에서의 MRS4322의 혈장 및 뇌 농도 - 시간 프로파일을 도시한다. 도 1b는, 정맥내 투여 후 신생 돼지에서 MRS4322의 혈장 및 뇌 세포외액 농도 - 시간 프로파일을 도시한다.

도 2는, MRS2365의 복강내 투여 후 마우스에서의 MRS4322의 혈장 및 뇌 농도 - 시간 프로파일을 도시한다.

도 3은, EDTA 처리된 마우스 혈장에서의 MRS2365의 시험관내 안정성을 도시한다.

도 4는, EDTA 처리된 인간 혈장에서의 MRS2365의 시험관내 안정성을 도시한다.

도 5는, EDTA 처리된 마우스 전혈에서의 MRS2365의 시험관내 안정성을 도시한다.

도 6은, EDTA 처리된 인간 전혈에서의 MRS2365의 시험관내 안정성을 도시한다.

도 7은, 90초 항온처리 기간 동안 EDTA 및 헤파린 처리된 마우스 혈장에서의 MRS2365의 시험관내 안정성을 도시한다.

도 8은, 90초 항온처리 기간 동안 EDTA 및 헤파린 처리된 인간 혈장에서의 MRS2365의 시험관내 안정성을 도시한다.

도 9는, 30분 항온처리 후 헤파린 처리된 인간 혈장 중 MRS2365 대사물의 양이온 LC/MS-MS 이온 크로마토그램 및 생성물 이온 스펙트럼을 도시한다.

도 10은, 30분 항온처리 후 헤파린 처리된 인간 전혈 중 MRS2365 대사물의 양이온 LC/MS-MS 이온 크로마토그램 및 생성물 이온 스펙트럼을 도시한다.

도 11은, 헤파린 처리된 인간 혈장 및 전혈에서 양이온 및 음이온 LC/MS-MS에 의해 검출된 MRS2365의 대사물을 나타내는 도식을 도시한다. MRS2365의 두 대사물이 인간 전혈 및 혈장(항응고제로서의 리튬 헤파린)에서 100 μM으로 항온처리 후 관찰되었다: MRS2365의 부분적으로 탈인산화된 대사물로 확인된 M2(즉, 1개의 인산염 그룹이 잔존하는 MRS2347); 및 MRS2365의 완전 탈인산화된 대사물로 확인된 M1(즉, MRS4322).

도 12a 내지 12d는, TBI 또는 샴(sham)(대조 실험)에 노출된 마우스에 대한 MRS4322, C1-IB-MECA 및 MRS2365 치료 결과를 도시한다. TBI는 정상적으로 GFAP 발현의 증가를 유도한다. 마우스는 (뇌의 동측 상의) 샴 또는 TBI를 겪고 TBI 후 30분으로 표지된 치료를 받았다. 손상 후 7일째에 마우스로부터 혈장을 얻은 다음, 동측("Ipsi") 및 반대측("Ctr") 반구(중간 세번제)로부터 뇌 균질물을 얻기 위해 마우스를 희생시켰다. 웨스턴 블롯 분석을 액틴에 대해 정규화했다(도 12a 및 도 12c). 대표 블롯을 동측 뇌 균질물 및 7일째의 혈장에 대하여 도시한다. MRS4322 또는 MRS2365의 투여는 TBI에 노출된 마우스에서의 GFAP 발현의 뇌 수준을 감소시켰다(도 12b 및 12d). 데이터를 대조군 +/- SEM의 평균값으로 나타낸 바와 같이, 세가지 별개의 실험(N=치료당 마우스의 수)으로부터 모으고, 히스토그램으로 플로팅했다. 치료되지 않은 TBI(적색 막대)로부터 *p<0.05 및 **p<0.01.

도 13a 내지 도 13d는, 광 혈전증 유발 뇌졸중 경색 실험의 결과 및 MRS4322 및/또는 특정 아데노신형 A₃ 수용체 길항제 MRS1523의 투여 효과를 도시한다. MRS4322는 뇌졸중 경색의 영향을 감소시켰지만, MRS1523에 의해 이러한 영향이 역전되었다(도 13a). 표지된 바와 같이 비히클(식염수 주입) 중에서의 그리고 MRS4322 및 MRS2365로 치료된 마우스에서의 광 혈전증으로 뇌졸중된 마우스의 뇌의 관상 절개(각 절개 그룹은 단일 마우스로부터 기인한다). 뇌졸중 마우스는 허혈 후 30분 이내에 비히클 또는 치료(IP 주사)를 받았다. 뇌졸중 후 24시간에 마우스를 희생시키고, 이들의 뇌를 제거하고, 절개하고, TTC로 염색시켰다(도 13b). A₃ 수용체 길항제

MRS1523을 사전 주입한 뇌졸중 마우스로부터의 관상 단면(도 13c). 표지된 바와 같이 MRS4322, MRS2365, MRS5698 및 C1-IBMECA의 평균 TTC 염색된 뇌졸중 용적(도 13d). 지시된 바와 같이 A₃ 수용체 길항제 MRS1523으로 예비 치료된 마우스의 뇌졸중 용적. 데이터를 2회의 실험(N=치료당 마우스의 수)으로부터 수집하고, 평균 +/- SEM으로 플로팅했다. **p<0.01 및 ***p<0.001.

도 14a 내지 도 14b는 광 혈전증 유발 뇌졸중 경색 실험의 결과 및 MRS4322, MRS1873 또는 비히클의 투여 효과를 도시한다. 광 혈전증 유발 뇌졸중 경색은 MRS4322 및 MRS1873에 의해 감소된다(도 14a). 표지된 바와 같이 비히클(식염수 주입) 중에서의 그리고 MRS4322 및 MRS1873로 치료된 마우스에서의 광 혈전증으로 뇌졸중된 뇌의 관상 절개. 뇌졸중된 마우스는 허혈 후 30분 이내에 비히클 또는 치료(IP 주입)를 받았다. 뇌졸중 후 24시간에 마우스를 희생시키고, 이들의 뇌를 제거하고, 절개하고, TTC로 염색시켰다(도 14b). 표지된 바와 같이 평균 TTC 염색된 뇌졸중 용적. 데이터를 3회의 실험(N=치료당 마우스의 수)으로부터 수집고 평균 +/- SEM으로 플로팅했다. **p<0.01.

도 15는, 청구된 본 발명에서 사용하기에 적합한 특정 화합물의 구조를 도시한다.

도 16은, 정맥내 투여 후 신생 돼지에서의 MRS4322의 뇌 및 뇌척수액 농도 - 시간 프로파일을 도시한다. 신생 돼지에게 정맥내 투여 후, MRS4322의 농도를 혈장, 뇌, 뇌 세포외액 및 뇌척수액 샘플에서 검출할 수 있었다.

도 17은, CHO 세포에서 발현된 인간 A₃ 수용체에서 MRS4322 대 A₃ 작용제 방사성 리간드 [³H]NECA(10nM)의 경쟁 결합 실험을 도시한다. MRS4322의 계산된 K_i값은 1490±410nM이었다.

도 18은, CHO 세포에서 발현된 마우스 A₃ 수용체에서 MRS4322 대 A₃ 작용제 방사성 리간드 [³H]NECA(10nM)의 경쟁 결합 실험을 도시한다. MRS4322의 계산된 K_i값은 4940 ± 974nM이었다.

도 19는, CHO 세포에서 발현된 인간 A₃ 수용체에서 MRS4322 및 NECA의 cAMP 축적 실험을 도시한다. MRS4322의 계산된 EC₅₀값은 3630 ± 370nM이고; NECA의 EC₅₀값은 41.8 ± 6.3 nM으로 측정됐다.

도 20은, CHO 세포에서 발현된 인간 A₃ 수용체에서 MRS4322 및 NECA의 cAMP 축적 실험을 도시한다. MRS4322의 계산된 EC₅₀값은 759 ± 170nM이고; NECA의 EC₅₀값은 6.85 ± 0.8nM으로 측정됐다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 뇌, CNS, 심혈관 및 기타 손상 및 병태

일부 양태에서, 본 발명은 급성 뇌 외상과 관련된 뇌 손상, 및 뇌 및 CNS의 장기간 질환 및 심장 및 심혈관 질환 및 병태를 예방 및/또는 치료하기 위한 새로운 접근법을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명은, 신경 세포의 주요 천연 관리(caretaker) 세포로 알려져 있는 성상 세포, 및 뇌의 에너지 중 상당 부분을 차지하는 성상 세포 미토콘드리아에 의해 매개되는 신경 보호 및 신경 복원 효과를 이용하여 이러한 손상, 질환 및 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 A₃R 수용체에 의해 매개되는 심장 보호 및 재생 효과에 의해 이러한 손상, 질환 및 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니나, 신경 보호 및 신경 복원 효과와 관련하여, A₃R 및/또는 P2Y₁ 수용체에 의해 매개되는 성상 세포 에너지 대사의 선택적 증강은, 이의 신경 보호 및 신경 복원 기능과 같은 성상 세포 관리 기능을 촉진시켜, 급성 손상 및 장기간 스트레스에 대한 뉴런과 다른 세포의 저항성을 향상시키는 것으로 여겨진다. 일부 경우, A₃R 및/또는 P2Y₁ 수용체에 의해 매개되는 편향된, 즉, 선택적인 또는 우선적인 하나 이상의 경로를 달성하는 것이 유리할 수 있으며, 여기서, 하나 이상의 바람직하지 않은 경로는 활성화되지 않거나 더 적은 정도로 활성화된다. 성상 세포 이외에 또는 이의 대안으로서, 교세포, 소교세포, 뉴런, 내피 세포 및 다른 뇌 및/또는 CNS 세포 유형의 신경 보호 또는 신경 복원 기능이 활성화될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 예를 들어, 뇌 및/또는 CNS의 교세포, 소교세포, 뉴런, 내피 세포 또는 다른 세포에 의해 매개되는 신경 보호 및/또는 신경 회복 효과를 증가시킴으로써, 뇌 손상과 같은 뇌 또는 중추 신경계(CNS)의 특정 상태로부터의 치료, 개선 또는 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료, 개선 또는 촉진을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 치료, 개선 또는 회복의 촉진을 위한 화합물 및 이의 사용 방법을 제공한다.

성상 세포는 뉴런을 지지하고 보호하는데 중요한 역할을 하며, 허혈 손상과 같은 뇌 상해를 야기하는 뇌 손상의

결과에 결정적으로 영향을 미친다. 이러한 뇌 기능에서 작용하는 정상 세포 미토콘드리아 그 자체의 중심 역할은 그다지 중요하지 않다. 예를 들어, 정상 세포 미토콘드리아의 억제는 팽창을 증가시키고 괴사성 세포사를 초래한다. 뉴런은 정상 세포 미토콘드리아 기능이 실패한 경우에만 재발하는 탈분극의 확산(spreading)에 의해 영구적인 손상을 입으며, 정상 세포 미토콘드리아는 탈분극 확산을 개시하는 세포의 K^+ 의 병태 생리학적 상승을 감소시키기 위해 필요하다. 정상 세포에서 퓨린성 수용체의 활성화는, 미토콘드리아 구연산 순환 기능을 향상시키고 호흡과 ATP 생산을 증가시키는 미토콘드리아 Ca^{2+} 를 증가시킨다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은, 정상 세포 퓨린성 수용체의 활성화가 뇌 세포 생존 신호 전달 경로를 강화시켜, 산화 스트레스 동안 정상 세포 및 뉴런 생존력 둘 다를 가능하게 한다는 발견에 관한 것이다. 또한, 활성화된 정상 세포는, 정상 세포와 뉴런 둘 다의 산화 스트레스에 대한 저항을 돕는 중요한 항산화제인 감소된 글루타티온을 생성하고 공급한다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은, 뇌 손상, 허혈-재관류 또는 신경 변성 병태에 의해 야기되는 산화 스트레스와 같은 산화 스트레스 후에 환자의 뇌에서 하나 이상의 세포 유형의 생존 및 생존력의 촉진시키도록 정상 세포 퓨린성 수용체의 조절 방법으로서, 상기 정상 세포 퓨린성 수용체의 조절을 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된 화합물을 투여함을 포함하는, 정상 세포 퓨린성 수용체의 조절 방법을 제공한다.

[0027] 일부 양태에서, 정상 세포의 활성화는, 개시된 화합물을 하나 이상의 퓨린성 수용체, 예를 들어 아데노신 수용체(AR), 예를 들어 정상 세포와 관련되었거나 이에 의해 발현된 수용체와 접촉시켜, 하나 이상의 수용체의 활성화를 조절하여 달성된다. 일부 양태에서, 정상 세포 상의 A_1 , A_{2A} , A_{2B} 및 A_3 과 같은 아데노신 수용체에 대한 영향을 통해, 상기 화합물은 정상 세포를 활성화시켜 상기 개시된 질환 또는 병태 중 하나 이상을 치료한다. 일부 양태에서, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여한 후에, 개시된 화합물은, 하나 이상의 기능, 예를 들어 글루탐산 흡수, 반응성 신경교증, 팽창, 및 대사 스트레스 및 그 결과에 영향을 미치는 신경 영양 및 신경 독성 인자의 방출에 영향을 미치고, 따라서 하나 이상의 질환 또는 병태를 치료한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 AR 작용제이다. 일부 양태에서, 퓨린성 수용체는 A_3 아데노신 수용체(A_3R)이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A_3R 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A_3 수용체(A_3R), 예를 들어 인간 A_3 수용체(h A_3R)에서 부분 작용제 또는 편향된 작용제 또는 편향된 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A_3 수용체에 편향된 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0028] P2Y 수용체는 G-단백질-커플링 수용체이고, 이들 수용체의 상이한 아형은 시냅스 소통(synaptic communication), 세포 분화, 이온 플럭스, 혈관 확장, 혈액 뇌 장벽 투과성, 혈소판 응집 및 신경 조절과 같은 과정에서 중요한 역할을 한다. 퓨린성 P2Y 수용체 군의 특징적인 구성원은, 아데닌 뉴클레오티드에 결합하는 포유류 P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ 및 P2Y₁₃ 수용체; 우라실 뉴클레오티드에 결합하는 P2Y₄, P2Y₆, 및 P2Y₁₄ 수용체; 및 혼합 선택성을 갖는 P2Y₂ 수용체 및 설치류 P2Y₄ 수용체를 포함한다. 일부 양태에서, 정상 세포의 활성화는 개시된 화합물과 하나 이상의 퓨린성 수용체, 예를 들어 정상 세포에 관련되었거나 이에 의해 발현된 P2Y 수용체를 접촉시켜, 하나 이상의 수용체의 활성을 조절함으로써 달성된다. 일부 양태에서, 정상 세포와 관련되었거나 이에 의해 발현된 P2Y 수용체, 예를 들어 P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ 및 P2Y₁₃ 수용체에 대한 효과를 통해, 상기 화합물은 정상 세포를 활성화시켜 개시된 질환 또는 병태 중 하나 이상을 치료한다. 일부 양태에서, P2Y 수용체는 P2Y₁ 수용체이다. 일부 양태에서, P2Y₁ 수용체는 세포내 미토콘드리아 막 상에 위치한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 예를 들면 인간 P2Y₁ 수용체 상의 P2Y₁ 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체, 예를 들어 인간 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에서 평향된 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 뇌 손상, 예를 들어 TBI 또는 진행성 신경 변성 장애로 인한 뇌 손상의 치료 또는 개선 방법으로서, 상기 치료 또는 개선을 필요로 하는 환자에게, 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌 손상의 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, 대상체는 TBI, 뇌진탕, 뇌졸중, 부분 또는 전체 척수 절단 또는 영양 실조를 겪었다. 다른 양태에서, 대상체는 유전적 장애, 노인성신경 변성, 또는 혈관 질환에 의해 유발된 독성 신경병증, 수막뇌병증, 신경 변성; 또는 인용에 의해 본원에 포함되는 US 8,691,775에 개시된 또 다른 질환을 겪었다. 일부 양태에서, 본 발명은, 뇌 손상, 예를 들어 TBI 또는 진행성 신경 변성 장애로 인한 뇌 손상의 치료 또는 개선 방법으로서, 상기 치료 또는 개선을 필요로 하는 환자에게 A_3R

작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌 손상의 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은, 뇌 손상, 예를 들어 TBI 또는 진행성 신경 변성 장애로 인한 뇌 손상의 치료 또는 개선 방법으로서, 상기 치료 또는 개선을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌 손상의 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0030] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 정상 세포 매개된 신경 보호 또는 신경 복원 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 정상 세포 매개된 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 정상 세포 매개된 신경 보호 또는 신경 복원 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 정상 세포 매개된 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은, 정상 세포 매개된 신경 보호 또는 신경 복원 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 정상 세포 매개된 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에서 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제, 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0031] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 허혈성 반응영에서의 뉴런, 아교 세포, 내피 세포 또는 다른 뇌 세포의 생존의 촉진 방법으로서, 상기 촉진을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뉴런, 아교 세포, 내피 세포 또는 다른 뇌 세포의 생존의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 허혈성 반응영에서의 뉴런, 아교 세포, 또는 다른 뇌 세포의 생존의 촉진 방법으로서, 상기 촉진을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 뉴런, 아교 세포, 또는 다른 뇌 세포의 생존의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 허혈성 반응영에서의 뉴런, 아교 세포, 내피 세포 또는 다른 뇌 세포의 생존의 촉진 방법으로서, 상기 촉진을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 뉴런, 아교 세포, 내피 세포 또는 다른 뇌 세포의 생존의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0032] 추가의 양태에서, 환자는 하기와 같은 뇌 손상을 갖거나 이의 발병 위험이 있다. 따라서, 아래에 논의되는 병태들을 치료하는 방법 또한 제공된다.

[0033] *외상성 뇌 손상*

[0034] 외상성 뇌 손상(TBI)은 걱정될 정도로 일반적인 의학적 병태이며, 2020년에는 전 세계적 이환율 및 사망률의 세 번째 주요 원인이 될 것으로 예상된다. TBI에 대한 승인된 치료법은 없으며, 대부분의 TBI 환자는 약리학적 치료 없이 병원에서 퇴원한다(Witt 2006). 뇌진탕과 같은 반복적인 TBI는 수십 년 동안 폭넓은 증상과 장애를 초래하는 노인성 신경 퇴행을 유발할 수 있다(McKee 2013). TBI는 스포츠 관련 손상, 자동차 사고, 낙상, 폭발 영향, 신체적 폭행 등을 통해 발생할 수 있다. 손상은, 정신 상태, 인지 장애 또는 정신 분열의 짧은 교대를 동반하는 "경증"의 뇌진탕으로부터 손상 후 장기간의 무의식 및/또는 기억 상실을 동반하는 "중증"의 뇌진탕까지 이의 복잡성과 중증도가 광범위하다. 미국에서는 매년 약 170만 명이 TBI로 인한 손상을 입어, 의학적 개입을 추구하며(USCSF 및 CDC), CDC는 연간 160만 내지 380만 건의 추가의 뇌진탕 사건이 병원이나 응급실이 아닌, 스포츠 및 기타 레크리에이션 활동에서 발생한다고 추정한다(CDC; Langlois 2006). 운동 선수의 약 5 내지 10%는 매 스포츠 시즌마다 뇌진탕을 얻을 것이다(Sports 뇌진탕 Institute 2012). 풋볼은 남성에서 가장 뇌진탕 위험이 높은 스포츠(75% 뇌진탕 확률)인 반면, 축구는 여성에서 가장 뇌진탕 위험이 높다(50% 뇌진탕 확률). TBI는 아동 및 청소년의 사망 및 장애의 주요 원인이며(CDC), 가장 일반적으로 얻게되는 군 관련 손상이며, 2003년 이래 전개된 미국 서비스 회원의 약 20%가 최소 1건의 TBI를 유지했다(Chronic Effects of Neurotrauma

Consortium (CENC); Warden 2006; Scholten 2012; Taylor 2012; Gavett 2011; Guskiewicz 2005; Omalu 2005). TBI 관련 간접 및 직접 의료비 총액은 연간 770억 달러로 추산된다(UCSF 및 CDC). 최소 5백만 명의 미국인이 TBI의 결과로 활동을 수행하는 데 있어 지속적인 일일 지원을 필요로 한다(CDC 및 Thurman 1999).

[0035] 본 발명에 따른 정상 세포의 활성화는, 이러한 병태들에 대한 신규한 치료 옵션을 제공한다. 따라서, TBI의 치료 또는 TBI로부터의 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, TBI의 치료 또는 TBI로부터의 회복의 촉진 방법이 본 발명의 일 양태에 제공된다. 일부 양태에서, TBI는 뇌에 대한 외상성 손상(예를 들어, 뇌진탕, 폭풍 손상, 전투 관련 손상) 또는 척수에 대한 외상성 손상(예를 들어, 부분 또는 전체 척수 절제)로부터 선택된다. 일부 양태에서, TBI는 머리에 대한 가벼운, 중등의, 무거운 타격으로부터 발생하며, 개방 또는 폐쇄된 머리 상처를 포함하거나, 머리로의 관통 또는 비관통 타격으로부터 발생한다. 일부 양태에서, 본 발명은, TBI의 치료 또는 TBI로부터의 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복의 촉진을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, TBI의 치료 또는 TBI로부터의 회복의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, TBI의 치료 또는 TBI로부터의 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복의 촉진을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, TBI의 치료 또는 TBI로부터의 회복의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0036] 뇌졸중

[0037] 뇌졸중은, 허혈성 차단 또는 뇌 혈관의 출혈성 파열로 인해 산소 및 영양소를 뇌로 전달하는 혈관이 파열되어, 뇌의 파괴된 영역의 뉴런, 아교 세포 및 내피 세포가 사멸시 발생한다. 뇌졸중의 결과는, 상해의 위치와 폭에 따르며, 이러한 상해의 영향은 상해를 입은 뇌 영역에 의해 조절되는 신체 기능에서 관찰된다. 뇌졸중은 편측 또는 양측의 마비, 말하기 및 언어 장애, 기억 상실, 행동 변화 및 심지어 사망까지 유발할 수 있다. 뇌졸중은 미국에서 네 번째로 큰 사망 원인이며, 성인 장애의 주요 원인이다. 매년 약 80만 명이 새로운 뇌졸중 또는 재발 뇌졸중을 경험한다. 매일 2,000명이 넘는 미국인이 뇌졸중을 얻어 400건이 넘는 사건에서 사망한다. 뇌졸중은 2010년 미국에서 19건의 사망 사건 중 약 1건을 차지했다. 20년 동안 약 680만 명의 미국인이 뇌졸중을 일으켰다(AHA 및 Go 2014). 2010년 현재, 뇌졸중의 연간 직접 및 간접 비용은 365억 달러로 추산된다. 뇌졸중의 몇 분 내에, 혈류의 부족은 영구적으로 뇌 조직의 핵심이 상해를 입을 것이다. 이러한 상해를 입은 코어와 정상적인 뇌 조직 사이에는 반음영으로 알려진 조직의 영역이 있으며, 상기 조직은 줄어든 혈류 및 일부 붕괴된 에너지 대사로부터 단계화된 스트레스를 받는다. 뇌졸중 발생 후 처음 24 내지 48시간 동안, 반음영의 뉴런 및 아교 세포에 대한 스트레스는 일부 회복 또는 추가의 세포 사멸로 해결된다.

[0038] 일 양태에서, 본 발명은, 신경 보호 치료법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 뇌졸중 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌졸중 환자의 신경 보호 치료법을 제공한다. 일부 양태에서, 이러한 치료법은 가능하면 반음영의 대부분을 회수하고/회수하거나 추가의 급성 조직 상해를 제한하고/제한하거나 뉴런 회복을 촉진한다. 또 다른 양태에서, 뇌졸중의 치료 또는 뇌졸중으로부터 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복의 촉진을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌졸중의 치료 또는 뇌졸중으로부터 회복의 촉진 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 뇌졸중의 치료 또는 뇌졸중으로부터 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복의 촉진을 필요로 하는 환자에게, A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌졸중의 치료 또는 뇌졸중으로부터 회복의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 뇌졸중의 치료 또는 뇌졸중으로부터 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복의 촉진을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌졸중의 치료 또는 뇌졸중으로부터 회복의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0039] 일부 양태에서, 뇌졸중은 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 거미막하 출혈, 뇌 혈관 연축, 또는 일과성 허혈 발작(TIA)로부터 선택된다. 일부 양태에서, 뇌졸중은 허혈성 이다. 일부 양태에서, 뇌졸중은 출혈성이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 48시간 이내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 24시간 이내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 16시간 이내에 투여된다. 일부 양태에서,

상기 화합물은 뇌졸중 발생 8, 4, 2, 또는 1시간 이내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 후 처음 1 내지 72시간 이내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 후 처음 8 내지 52시간 이내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 후 적어도 처음 8 내지 48시간 내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중 발생 후 적어도 처음 24 내지 48시간 내에 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중의 발생시 치료하기 위해 만성적으로(chronically) 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 일과성 허혈 발작(TIA)을 치료하기 위해 만성적으로 투여된다.

[0040] 일부 양태에서, 상기 화합물은 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 거미막하 출혈, 뇌 혈관 연축, 일과성 허혈 발작(TIA)을 치료하기 위해, 또는 뇌졸중에 대한 발병 위험이 증가된 환자, 예를 들어 과거에 뇌졸중이 있었던 환자 및 추가의 뇌졸중에 대한 위험이 있는 환자, 예를 들어 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80살 이상의 환자를 치료하기 위해 만성적으로 투여된다.

[0041] 일부 양태에서, 상기 화합물은 뇌졸중으로 유발된 허혈-재관류 손상을 치료한다.

[0042] 신경 변성 질환

[0043] 신경 변성 질환은, 뇌 및 척수의 뉴런의 점진적인 퇴행 및/또는 사망으로 인해 치료 불가능하고, 진행성이며, 궁극적으로 쇠약해지는 증후군이다. 신경 퇴행은 운동 장애(운동 불능) 및/또는 인지 기능 장애(치매)를 초래하고, 폭넓은 질환, 예를 들어 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 헌팅턴 질환(HD), 다발 경화증(MS), 근위축 측삭 경화증(ALS), 및 만성 외상성 뇌병증(CTE)를 포함한다. 다수의 신경 변성 질환은 주로 유전적 기원이지만, 다른 원인은 바이러스, 알콜 중독, 종양 또는 독소를 포함할 수 있으며, 현재에 이르러 명확해진 바와 같이 반복적인 뇌 손상이 있다.

[0044] 뉴런은, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환과 같은 장기간의 세포 스트레스와 관련된 다수의 신경 변성 질환이 노인에서 발생하는 이유로 일반적으로 고려되는 상기 요인들로 인해, 시간이 지남에 따라 세포 상해를 축적한다. 치매는 약 60 내지 70%의 경우를 나타내는 AD를 포함하는 신경 변성 질환의 주된 결과를 나타낸다(Kandale 2013). 상기 논의한 바와 같이, 신경 보호 및 신경 복원 메카니즘의 활성화는, 하나 이상의 신경 변성 질환의 진행을 개선할 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은, 신경 변성 질환의 치료 또는 신경 변성 질환으로부터의 회복의 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 회복의 촉진을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 신경 변성 질환의 치료 또는 신경 변성 질환으로부터의 회복의 촉진 방법을 제공한다.

[0045] 일 양태에서, 본 발명은, 신경 변성 질환을 앓는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 신경 변성 질환을 앓는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 신경 변성 질환을 앓는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 A₂R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 신경 변성 질환을 앓는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 신경 변성 질환을 앓는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, 신경 변성 질환을 앓는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₂R 작용제에 편향된 작용제, 부분 작용제, 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제, 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0046] 알츠하이머 질환(AD)

[0047] 2014년, 전체 연령 중 약 520만 명의 미국인이 AD를 가졌으며, 65세 이상의 인구 중 11%가 AD를 가지고 있다(알츠하이머 협회). 2050년에는, AD를 갖고 있는 65세 이상인 사람의 수는, 거의 세 배인 1,380만 명이 될 것으로 예상된다. 미국에서 AD 환자를 돌보는 데 드는 비용은 연간 약 2,140억 달러이며, 이 비용의 70%는 메디케어(Medicare) 및 메디케이드(Medicaid)에서 부담한다. 현재의 추세는 이러한 비용은 2050년에 연간 1.2조 달러로 증가할 것으로 예상된다.

[0048] 본 발명에 따른 정상 세포의 활성화 및 신경 보호 및 신경 복원의 촉진은, AD에 대한 신규한 치료 옵션을 제공한다. 따라서, 일 양태에서, AD를 앓고 있는 환자에서 AD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, AD를 앓고 있는 환자에서 AD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법이 본 발명에 제공된

다. 일부 양태에서, 본 발명은, AD를 앓고 있는 환자에서 AD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, AD를 앓고 있는 환자의에서 AD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, AD를 앓고 있는 환자에서 AD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, AD를 앓고 있는 환자의 AD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0049] 파킨슨 질환(PD)

[0050] 1백만 명이나 되는 미국인이 PD를 갖고 살고 있으며, 검출되지 않는 수천 건의 사례를 제외하고도 매년 약 6만 명의 미국인이 새롭게 진단된다(파킨슨 질환 재단). 의학적 치료, 사회 보장 수당 및 소득 손실을 포함하여 PD의 합쳐진 총 직접 비용 및 간접 비용은 미국에서 연간 약 250억 달러에 달하는 것으로 추정된다(파킨슨 질환 재단 및 Huse 2005).

[0051] 본 발명에 따른 신경 보호 및 신경 복원의 활성화는, PD에 대한 신규한 치료 옵션을 제공한다. 따라서, 본 발명의 일 양태에서, PD를 앓고 있는 환자에서 PD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, PD를 앓고 있는 환자에서 PD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 본 발명은, PD를 앓고 있는 환자에서 PD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, PD를 앓고 있는 환자에서 PD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, PD를 앓고 있는 환자에서 PD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, PD를 앓고 있는 환자에서 PD의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0052] 다발 경화증(MS)

[0053] 미국에서 40만 명 이상의 사람들이 MS를 갖고 있다. 젊은 성인에서, MS는 중추 신경계의 가장 흔한 질환을 나타낸다(다발 경화증 재단). 신경 회복 효과 및 MS 환자의 상해를 입은 CNS에서의 치유 촉진으로, 정상 세포가 MS에 의해 유발되는 신경 세포 수초 코팅의 파괴를 역전시킬 가능성이 있다.

[0054] 따라서, 본 발명에 따른 CNS에서의 신경 보호 및 신경 복원의 활성화는, MS에 대한 신규한 치료 옵션을 제공한다. 따라서, 본 발명의 일 양태에서, MS를 앓고 있는 환자에서 MS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, MS를 앓고 있는 환자에서 MS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 본 발명은, MS를 앓고 있는 환자에서 MS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, MS를 앓고 있는 환자에서 MS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, MS를 앓고 있는 환자에서 MS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게, P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, MS를 앓고 있는 환자에서 MS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

- [0055] 근위축성 측삭 경화증(ALS)/루게릭 질환
- [0056] 미국에서 매년 약 5,600명이 ALS로 진단받고 있으며, 30,000명이나 되는 미국인이 동시에 상기 질환을 가질 수 있다(ALS 협회). 정상 세포의 활성화는 ALS 환자에서 뉴런 및 이의 연결부의 회복 및 복구를 자극할 수 있다.
- [0057] 따라서, 본원의 일 양태에서, ALS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, ALS를 앓고 있는 환자에서 ALS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법이 제공된다. 다른 양태에서, 뉴런 및 이의 연결부의 회복 및 복구의 자극 방법으로서, 상기 회복 및 복구의 자극을 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, ALS 환자의 뉴런 및 이의 연결부의 회복 및 복구의 자극 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 본 발명은, ALS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진을 필요로 하는 환자에게 A₃R 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, ALS를 앓고 있는 환자에서 ALS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, ALS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진을 필요로 하는 환자에게, P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, ALS를 앓고 있는 환자에서 ALS의 치료 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.
- [0058] 만성 외상성 뇌병증(CTE)
- [0059] CTE(타우병증의 한 형태)는 머리에 하나 이상의 (중중 복수의 또는 시간 경과에 따라 반복적인) 중중의 타격을 받은 개인에서 발견되는 진행성 신경 변성 질환이다. CTE는 미식 축구, 축구, 하키, 프로 레슬링, 스텐트 연기, 황소 타기 및 로테오 공연, 모터 크로스, 및 뇌 외상 및/또는 반복 뇌진탕 경험이 있는 기타 접촉 스포츠의 프로 운동 선수에서 가장 자주 진단된다. CTE 환자의 일부는 만성 외상성 뇌근병증(CTEM)이 있는데, 이는 ALS를 모방하는 운동 뉴런 질환 증상을 특징으로 한다. 진행성 근 약화 및 운동 및 보행 이상은 CTEM의 초기 징후로 여겨진다. CTE의 제1 단계 증상은 진행성 주의력 결핍, 지남력 장애(disorientation), 어지럼, 및 두통을 포함한다. 제2 단계 증상은 기억 상실, 사회 불안증, 변덕스러운 행동(erratic behavior), 및 판단력 부족을 포함한다. 제3 단계 및 제4 단계에서, 환자는 진행성 치매, 느려진 운동, 떨림(tremor), 표정 감소, 현기증, 언어 장애, 청력 손실, 및 자살 경향성을 겪으며, 추가로 조음 장애, 연하 곤란, 및 안구 이상, 예를 들어 안검하수를 포함할 수 있다.
- [0060] 따라서, 본원의 일 양태에서, CTE의 치료 또는 예방, 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, CTE를 앓고 있는 환자에서 CTE의 치료 또는 예방, 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법이 제공된다. 또한, 다른 양태에서, 뉴런 및 이의 연결부의 회복 및 복구의 자극 방법으로서, 상기 회복 및 복구의 자극을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, CTE 환자에서 뉴런 및 이의 연결부의 회복 및 복구의 자극 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 제1 단계, 제2 단계, 제3 단계 또는 제4 단계 CTE 중 하나 이상의 증상을 치료한다. 일부 양태에서, 본 발명은, CTE의 치료, 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법으로서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원을 필요로 하는 환자에게 P2Y₁ 작용제를 유효량으로 투여함을 포함하는, CTE를 앓고 있는 환자에서 CTE의 치료, 또는 신경 보호 또는 신경 복원의 촉진 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.
- [0061] 현미경 규모에서, 병리학은 뉴런 사망, 타우(tau) 침착, TAR DNA-결합 단백질 43(TDP 43) 베타-아밀로이드 침착, 백색질 변화, 및 다른 이상을 포함한다. 타우 침착은 치밀한 신경 섬유 매듭(NFT), 신경 돌기, 및 정상 세포 및 다른 신경 교세포로 구성되는 아교 세포 매듭의 존재의 증가를 포함한다. 따라서 일부 양태에서, 본

방법은 뉴런 사망, 타우 침착, TAR DNA-결합 단백질 43(TDP 43) 베타-아밀로이드 침착, 백색질 변화, 및 CTE 관련 다른 이상을 치료, 청소 강화 또는 예방한다.

[0062] 일부 양태에서, 본 발명은, 신경 변성 질환, 예를 들어 상기 및 이하에 개시되는 질환을 치료하기 위한 본원에 개시된 화합물, 예를 들어 A₃R의 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제, 또는 P2Y₁의 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제의 장기 투여를 제공한다.

[0063] 심혈관 질환

[0064] 개시된 화합물은 다양한 심혈관 질환 및 병태의 치료에도 유용하다. 일부 양태에서, 본 발명은, 심장 또는 심혈관 질환, 예를 들어, 심허혈증, 심근경색증, 심근병증, 관상동맥 질환, 부정맥, 심근염, 심장막염, 협심증, 고혈압 심장 질환, 심내막염, 류마티스 심장 질환, 선천성 심장 질환, 또는 죽상경화증의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물, 예를 들어 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 유효량으로 투여함을 포함하는, 심장 또는 심혈관 질환의 치료 방법을 개시한다. 일부 양태에서, 개시된 화합물은, 예를 들어 A₃R 수용체에 편향된 작용, 부분 작용 또는 편향된 부분 작용을 통한 ATP 민감성 칼륨 채널의 조절을 제공한다.

[0065] 일부 양태에서, 심장 또는 심혈관 질환은 심허혈증 또는 심근경색증이다.

[0066] 기타 질환

[0067] 예를 들어 정상 세포의 미토콘드리아 활성을 증가시킴으로써 신경 보호와 같은 유익한 효과를 조절하는 화합물은, 다양한 다른 질환을 치료할 수 있는 효력도 갖는다. 예를 들어, 본 발명에 개시된 신경 보호에서의 정상 세포의 역할로 인해, 예를 들어 A₃R 및/또는 P2Y₁ 수용체의 조절을 통한 정상 세포의 활성화는, 하기 논의되는 다양한 질환 및 병태의 치료에 유용할 수 있다. 따라서 일부 양태에서, 본 발명은, 신경 보호 또는 신경 재생의 치료 또는 촉진 방법으로서, 상기 치료 또는 촉진을 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물, 예를 들어 MRS4322 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효량으로 투여함을 포함하는, 질병 또는 병태를 앓고 있는 환자에서 신경 보호 또는 신경 재생의 치료 또는 촉진 하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 자가면역 질환, 알리지성 질환, 및/또는 이식 거부 및 이식편대숙주 질환으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 WO 2007/20018을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 안구 고혈압 및/또는 녹내장으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 WO 2011/77435를 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 항 민감성 및/또는 후각 장애로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 EP 1624753을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 2형 당뇨 및/또는 통증 조절로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 US 2010/0256086을 참조).

[0068] 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 호흡 질환 및/또는 심혈관 (CV) 질환으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[FASEB J. (2013) 27:1118.4 (abstract of meeting)]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 CNS 기능의 결핍, 학습 결핍 및/또는 인지 결핍으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌 [Neuropsychopharmacology. 2015 Jan;40(2):305-14. doi: 10.1038/npp.2014.173. Epub 2014 Jul 15. "Impaired cognition after stimulation of a P2Y₁ receptor in the rat medial prefrontal cortex," Koch, H. et al. PMID: 25027332]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 신경 변성 질환, 예를 들어 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환, 프리온 질환, 및/또는 근위축 측삭 경화증으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 US 8,691,775를 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 귀 장애, 메니에르 질환, 내림프 수종, 진행성 청력 손실, 어지럼, 현기증, 이명, 방사선 암 치료법 관련 부수적 뇌 상해, 및/또는 편두통 치료로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 US 2009/0306225; UY 31779; 및 US 8,399,018을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 병리학적 수면 교란, 우울, 노인의 수면 장애, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 간질, 정신분열병, 및/또는 알콜 중독 회복에 의해 경험하는 증상으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료

에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 US 2014/0241990을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 수술 동안 말초 신경계의 뉴런 또는 신경에 대한 상해로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 US 8,685,372를 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 암, 예를 들어 전립선 암이다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Biochem Pharmacol. 2011 August 15; 82(4): 418-425. doi:10.1016/j.bcp.2011.05.013. "Activation of the P2Y1 Receptor Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells," Qiang Wei et al.]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 하나 이상의 위장관 병태, 예를 들어 변비 및/또는 설사로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Acta Physiol (Oxf). 2014 Dec;212(4):293-305. doi: 10.1111/apha.12408. "Differential functional role of purinergic and nitrergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation," Mane N1, Gil V, Martinez-Cutillas M, Clave P, Gallego D, Jimenez M.; and Neurogastroenterol. Motil. 2014 Jan;26(1):115-23. doi: 10.1111/nmo.12240. Epub 2013 Oct 8. "Calcium responses in subserosal interstitial cells of the guinea-pig proximal colon," Tamada H., Hashitani H. PMID: 24329947]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 CNS에 의해 매개되는 통증, 예를 들어 신경병성 통증, 염증성 통증, 및/또는 급성 통증으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Br J Pharmacol. 2010 Mar;159(5):1106-17. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00596.x. Epub 2010 Feb 5. "A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain." Ando RD1, Mehesz B, Gyires K, Illes P, Sperlagh B. PMID: 20136836]을 참조).

[0069]

다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 암 of 상기 뇌, 예를 들어 아교모세포종으로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Purinergic Signal. 2015 Sep;11(3):331-46. doi: 10.1007/s11302-015-9454-7. Epub 2015 May 15. "Potentiation of temozolomide antitumor effect by purine receptor ligands able to restrain the in vitro growth of human glioblastoma stem cells." D'Alimonte, I. et al. PMID: 25976165]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 통증이다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 각각의 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Pharmacol Biochem Behav. 2015 Jan;128:23-32. doi: 10.1016/j.pbb.2014.11.001. Epub 2014 Nov 6. "Participation of peripheral P2Y1, P2Y6 and P2Y11 receptors in formalin-induced inflammatory pain in rats." Barragan-Iglesias P. et al. PMID: 25449358; and Neuropharmacology. 2014 Apr;79:368-79. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.005. Epub 2013 Dec 12. "Blockade of peripheral P2Y1 receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced inflammatory pain rats: involvement of p38 MAPK phosphorylation in DRGs." Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Moon JY, Choi SR, Choi HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. PMID: 24333674]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 위장관 장애, 예를 들어 설사로부터 선택된다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Acta Physiol (Oxf). 2014 Dec;212(4):293-305. doi: 10.1111/apha.12408. "Differential functional role of purinergic and nitrergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation," Mane N., Gil V, Martinez-Cutillas M, Clave P, Gallego D, Jimenez M.]을 참조). 다른 양태에서, 상기 질환 또는 병태는 인지 부전이다(이러한 병태의 치료에서의 특정 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 화합물의 사용에 대해서는, 예를 들어, 인용에 의해 본원에 포함되는 문헌[Neuropsychopharmacology. 2015 Jan;40(2):305-14. doi: 10.1038/npp.2014.173. Epub 2014 Jul 15. "Impaired cognition after stimulation of P2Y1 receptors in the rat medial prefrontal cortex," Koch H, Bessalov A, Drescher K, Franke H, Krugel U. PMID: 25027332]을 참조).

[0070]

일부 양태에서, 본 발명은 뇌 손상 또는 신경 변성 병태와 관련된 질환 또는 병태, 예를 들어 간질, 편두통, 방사선 암 치료법 관련 부수적 뇌 상해, 우울, 기분 또는 행동 변화, 치매, 변덕스러운 행동, 자살 경향성, 떨림, 헌팅턴 무도병, 운동 조정 상실(loss of coordination of movement), 난청, 언어 장애, 건강안, 표정 감소, 주의력 결핍, 기억 상실, 인지 곤란, 현기증, 조음 장애, 연하 곤란, 안구 이상, 또는 지남력 장애의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌 손상 또는 신경 변성 병태와 관련된 질환 또는 병태의 치료 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃R 작용제이다.

일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0071] 추가의 양태에서, 본 발명은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환, 다발 경화증, 근위축 측삭 경화증, 및 프리온 질환으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 신경 변성 질환의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 신경 변성 질환의 치료 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃R 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 MRS4322 또는 MRS1873, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0072] 일부 양태에서, 인지 또는 신경 기능의 개선은 개정된 웨슬러 기억 검사(Wechsler Memory Scale)의 지연된 언어 구술 과제에서 약 1 내지 20%의 점수 증가로 측정된다. 예를 들어, 인지 기능의 향상은 약 1 내지 10%, 또는 약 1 내지 5% 사이의 점수 증가로 측정될 수 있다.

[0073] 2. 본 발명의 특정 화합물의 설명

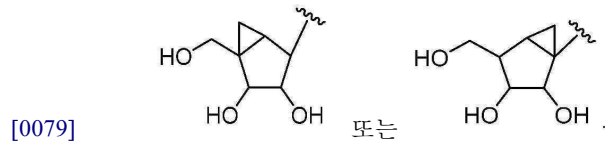
[0074] 일 양태에서, 본 발명은 뇌 또는 중추 신경계(CNS)의 특정 병태, 예를 들어 뇌 손상 또는 신경 변성 병태의 치료, 개선 또는 이로부터의 회복의 촉진에 유용한 화합물을 제공한다. 일부 양태에서, 개시된 화합물은 정상 세포에 의해 매개되는 신경 보호 및 신경 재생을 증가시킴으로써, 상기 병태를 치료, 개선 또는 이로부터의 회복을 촉진한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 대해 선택적이며, 예를 들어, 다른 아데노신 수용체에 비해 적어도 10배 A₃ 수용체에 대해 선택적이거나, 또는 예를 들어 다른 아데노신 수용체에 비해 25배, 50배, 100배, 500배 또는 1000배 이상 선택적이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체를 선택적으로 조절한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 선택적인 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 선택적인 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 편향된 완전 또는 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 편향된 완전 또는 부분 길항제이다.

[0075] 추가의 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 대해 선택적이며, 예를 들어 다른 P2Y 수용체에 비해 P2Y₁ 수용체에 대해 적어도 10배 선택적이거나, 또는 예를 들어 다른 P2Y 수용체에 비해 25배, 50배, 100배, 500배 또는 1000배 이상 선택적이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체를 선택적으로 조절한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 선택적인 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 선택적인 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 편향된 완전 또는 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 편향된 완전 또는 부분 길항제이다.

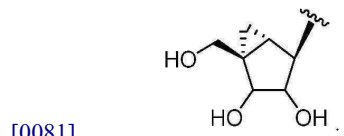
[0076] 용어 "편향된"은 수용체와 관련된 전체는 아닌 하나 이상의 경로를 우선적으로 조절, 활성화, 작용화 또는 길항시키는 화합물을 나타낸다.

[0077] 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 편향된 완전 또는 부분 작용 또는 길항 작용은, A₃ 또는 P2Y₁ 수용체에 연결된 하나 이상의 경로의 선택적 조절을 허용하여, 질병 또는 병태의 개선된 치료 및 (부작용을 유발할 수 있는) 원하지 않는 경로 조절의 회피를 야기할 수 있는 것으로 생각된다. 선택적 조절은 예를 들어, 뇌 손상 또는 신경 변성 질환 또는 병태를 치료하기 위해 본원에 개시된 바와 같은 정상 세포를 우선적으로 활성화시킬 수 있다. 따라서 일부 양태에서, 개시된 화합물은 아데노신 A₃ 수용체 또는 P2Y₁ 수용체에 연결된 하나 이상의 G-커플링된 또는 G-독립적 경로의 편향된 완전 또는 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 또는 P2Y₁ 수용체에 의해 매개되는 경로, 예를 들어 베타-아레스틴 활성화, 세포내 칼슘 동원, cAMP 조절, ATP 의존성 칼륨 채널 활성화, 또는 ERK1/2 인산화, 이러한 경로들과 관련된 다른 하류 세포 활성을 선택적으로 조절한다. 일부 양태에서, 상기 경로는 신경 보호 또는 신경 복원, 또는 심장 보호 또는 심장 재생을 증가시키거나, 이와 관련된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 MRS4322; 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다.

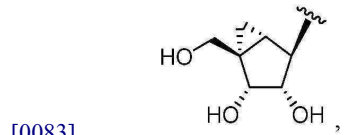
[0078] 본원에 사용되는 용어 "메타노카르바 뉴클레오시드"는, 리보스 당의 테트라하이드로푸란 환에 존재하는 산소가 메틸렌 단위로 치환되고, 생성되는 카보사이클릭 환이 사이클로프로필 환에 융합되어 바이사이클로[3.1.0]헥산을 형성하는, 예를 들어 다음 화학식의 뉴클레오시드 유사체를 나타낸다:



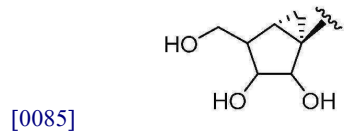
[0080] 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 메타노카르바 뉴클레오시드는 특정 수용체 아형에 의해 선호되는 것으로 생각되는 당 회전 배열 또는 가상 회전 배열(pseudoconformation)을 모방하는 것으로 여겨진다. 일부 양태에서, 노스 메타노카르바 뉴클레오시드는 C3'-엔도/C2'-엑소 당 회전 배열을 모방하거나 선호하는 것이고, 사우스 메타노카르바 뉴클레오시드는 C3'-엑소/C2'-엔도 회전 배열을 모방하거나 선호하는 것이다. 일부 양태에서, (N)-메타노카르바("노스" 메타노카르바) 당은 하기 구조를 갖는다:



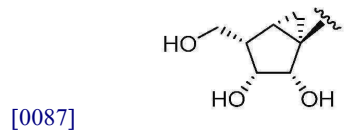
[0082] 일부 양태에서, 본원에서 "D-(N)-메타노카르바 당"으로 나타내는 (N)-메타노카르바 당은 하기 구조를 갖는다:



[0084] 다른 양태에서, 메타노카르바 당은 사우스인 것, 또는 (S)-메타노카르바 위치 배열인 것이다. 일부 양태에서, 이러한 메타노카르바 당은 하기 구조로 나타내어진다:



[0086] 일부 양태에서, 본원에서 "D-(S)-메타노카르바 당"으로 나타내는 (S)-메타노카르바 당은, 하기 구조를 갖는다:



[0088] 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 또는 P2Y₁ 수용체에 기능적으로 선택적이다, 즉, A₃ 또는 P2Y₁ 수용체에 의해 매개되는 경로 중, 예를 들어 하나 이상의 경로를 조절 하나 다른 경로는 조절하지 않음으로써 선택적으로 구별하거나, 하나 이상의 경로를 활성화시키고 하나 이상의 다른 경로를 비활성화함으로써 선택적으로 구별한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 cAMP 신호화에 의해 측정된 바와 같은 길항제이지만, β-아레스틴 동원에 대한 부분 작용제이다. 다른 양태에서, 상기 화합물은 Gq/11-매개된 Ca²⁺ 동원의 작용제 및 아레스틴 동원의 부분 작용제 또는 길항제이다. 일부 양태에서, 본 발명은, 뇌 손상 또는 신경 변성 질환 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 개시된 화합물을 유효량으로 투여함을 포함하는, (예를 들어, 상기 언급한 경로와 같은 경로들 사이의 선택적 작용 또는 길항에 의해) 편향된 또는 기능적으로 선택적인 A₃ 수용체 조절을 통해, 뇌 손상 또는 신경 변성 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 DMPA, CCPA, MRS1760 또는 MRS542로부터 선택된다(문헌[Verzijl D, et al., "Functional selectivity of adenosine receptor ligands," Purinergic Signaling 7: 171-192 (2011)] 참조). 일부 양태에서, 상기 화합물은 DBXRM이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 MRS4322, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다.

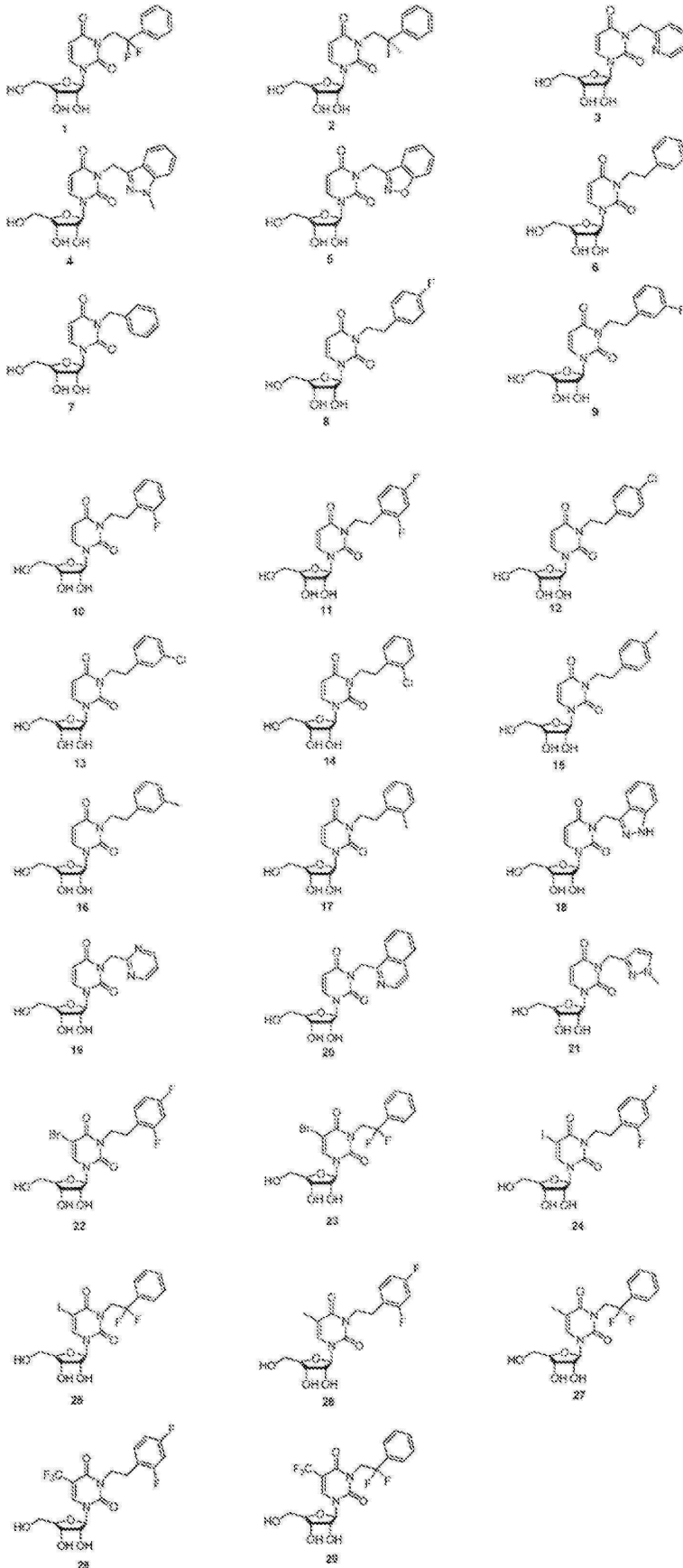
- [0089] 놀랍게도, 본원에서 상세히 개시된 것과 같은 특정 퓨린 뉴클레오시드 모노포스페이트, 디포스페이트, 및 트리포스페이트가, 아마도 세포 막 모두의 표면에 존재하고 혈액 및 혈장을 순환하는 뉴클레오타이드의 탈인산화에 관여하는 엑토뉴클레오티다제, 효소에 의해 신속하게 탈인산화된다는 것을 발견했다(문헌[Ziganshin et al. Pflugers Arch. (1995) 429:412-418] 참조). 어느 뉴클레오티드 유사체가 엑토뉴클레오티다제의 기질이 될지 예측하기는 종종 매우 어렵기 때문에, 생체내에서 탈인산화될 것으로 예상된다. 일부 양태에서, 탈인산화된 화합물은 치료 효능을 담당한다. 따라서 일부 양태에서, 상응하는 인산화된 모노포스페이트, 디포스페이트, 및 트리포스페이트, 또는 포스페이트 에스테르, 예를 들어 이의 알킬 또는 페닐 에스테르는, 치료 효과를 담당하는 제제의 전구 약물 또는 전구체이다.
- [0090] 일부 양태에서, 본 발명의 화합물은 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로지를 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "혈액-뇌장벽" 또는 "BBB"는, 적절한 BBB, 및 혈액-척수 장벽을 나타낸다. 뇌 혈장의 내피, 기저부 막 및 신경 교세포로 구성되는 혈액-뇌 장벽은, 물질의 뇌 내 침투를 제한하는 역할을 한다. 일부 양태에서, 총 약물에 대한 뇌/혈장의 비는, 환자에게 투여 (예를 들어, 경구 또는 정맥내 투여) 후 적어도 약 0.01이다. 일부 양태에서, 전체 약물에 대한 뇌/혈장의 비는, 적어도 약 0.06이다. 일부 양태에서, 전체 약물에 대한 뇌/혈장의 비는, 적어도 약 0.1이다. 일부 양태에서, 전체 약물에 대한 뇌/혈장의 비는 적어도 약 0.2이다.
- [0091] 원형 아데노신 A₃ 작용제, 예를 들어 C1-IB-MECA 및 MRS5698은 일반적으로 >2의 cLogP 값을 갖는 저용해성 친유성 화합물이다. 이러한 친유성은 이러한 화합물의 높은 혈장 단백질 결합, 높은 뇌 결합 및 이에 따른 뇌의 A₃ 수용체와 상호 작용할 수 있는 약물의 낮은 유리 분획에 기여하는 주요 요인이다. 일부 양태에서, 예를 들어 신경계 및 신경 변성 조건에서, 본 발명의 화합물, 예를 들어 MRS4322 및 MRS1873의 물리화학적 특성은 실질적으로 상이하며, 이들 및 관련 화합물은 cLogP <0 인 친수성 화합물로서, 높은 용해도, 낮은 혈장 및 뇌 결합 및 A₃ 수용체와 상호 작용할 수 있는 높은 비결합 약물 농도를 초래한다.
- [0092] 따라서 일부 실시 양태에서, 상기 화합물은 약 0.8, 약 0.7, 약 0.6, 약 0.5, 약 0.4, 약 0.3, 약 0.2, 약 0.1, 약 0.05, 약 0.01 또는 약 0.005 이하의 cLogP를 갖는다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 약 0 이하, 예를 들어 약 -0.1, -0.2, -0.3, -0.4, -0.5, -0.6, -0.7, -0.8 또는 -0.9 이하의 cLogP를 갖는다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 약 0.5 내지 0.9의 혈장 중 비결합 분획을 갖는다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 약 0.6 내지 0.85, 0.7 내지 0.8 또는 약 0.75의 혈장 중 비결합 분획을 갖는다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 적어도 약 0.02, 또는 적어도 약 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.12, 0.15 또는 0.17 이상의 뇌 중 비결합 분획을 갖는다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 약 0.6 내지 0.85, 0.7 내지 0.8, 또는 약 0.75의 그리고/또는 적어도 0.08의 뇌 중 비결합 분획을 갖는다.
- [0093] 본 발명의 화합물은, 통상을 벗어나지 않는 실험을 사용하여 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 화합물은 미국 특허 제7,087,589호 (및 본원에 인용된 참고문헌)에 제공된 절차에 따라 제조될 수 있으며, 이는 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0094] 일부 양태에서, 상기 화합물은 아데노신, ADP, 2-메틸티오-ADP 3나트륨 염, ATP, ATP 2나트륨 염, α, β-메틸렌 ATP, α, β-메틸렌아데노신 5'-트리포스페이트 3나트륨 염, 2-메틸티오아데노신 트리포스페이트 4나트륨 염, 2-MeSATP, BzATP 트리에틸암모늄 염, 이노신, 시티딘, 아실화 시티딘, 시티딘-모노포스페이트(CMP), 시티딘 디포스페이트(CDP), 시티딘 트리포스페이트(CTP), CDP-콜린, CMP-콜린, 데누포솔, 데누포솔 4나트륨 염, GTP, ITP, MRS 541, MRS 542, MRS 1760, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2341, MRS 2365, MRS 2500, MRS 2690, MRS 2698, MRS 3558, MRS 4322, MRS 5151, MRS 5676, MRS 5678, MRS 5697, MRS 5698, MRS 5923, MRS 5930, 벤질-NECA, IB-MECA, C1-IB-MECA, LJ529, DPMA, CCPA, DBXRM, HEMADO, PEMADO, HENECA, PENECA, CP608.039, CP532.903, CGS21680, AR132, VT72, VT158, VT160, VT163, PSB 0474, 우리딘 5'-디포스페이트(UDP), UDP-글루코스, 우리딘 β-티오디포스페이트(UDP β S), 우리딘 5'-트리포스페이트(UTP), 우리딘 γ-티오포스페이트(UTP γ S), 2-티오UTP 4나트륨 염, UTP γ S 3나트륨 염, 우리딘-5'-디포스포글루코스, 디우리딘 트리포스페이트, 2-(헥실티오) (HT)-AMP, 디아데노신 펜타포스페이트, 2'-데옥시-2'-아미노-UTP, 2-티오-UTP, 트리아세틸우리딘, 디아세틸/아실 우리딘, 우리딘, 수라민, 디피리다몰 유사체, 디아데노신 테트라포스페이트 Ap₄U, Ap₄A, INS365, INS37217, 또는 INS48823으로부터 선택되며, 여기서, 각각의 당은 노스 또는 사우스 회전배열의 메타노카르바 당 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 대체될 수 있거나, 각각의 당은 D-리보당 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로 대체될 수 있다.
- [0095] 일부 양태에서, 2-메틸티오-ADP 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 본 발명의 방법에서 유용하다. 이론

에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 2-MeS ADP는, A₃R의 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제인 생체내 2-메틸티오아데노신으로 급속하게 가수분해되는 것으로 여겨진다. 2-메틸티오아데노신은 MRS4322와 매우 유사한 수용체 데이터를 갖는 것으로 여겨진다.

[0096] 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃R 작용제, 예를 들어, N⁶-벤질아데노신-5'-N-메틸우로나미드, 예를 들어 IB-MECA 또는 Can-Fite CF-101로도 알려진 N⁶-(3-요오도벤질)-아데노신-5'-N-메틸우로나미드, 또는 2-클로로-N⁶-(3-요오도벤질)-아데노신-5'-N-메틸우로나미드(2-CI-IB-MECA 또는 Can-Fite CF-102로도 알려짐); (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 (1R,2R,3S,4R)-4-(2-클로로-6-((3-클로로벤질)아미노)-9H-퓨린-9-일)-2,3-디하이드록시-N-메틸바이사이클로[3.1.0]헥산-1-카복사미드(메사추세츠 주 소재 Can-Fite Biopharma의 CF502로도 알려짐); (2S,3S,4R,5R)-3-아미노-5-[6-(2,5-디클로로벤질아미노)퓨린-9-일]-4-하이드록시-테트라하이드로푸란-2-카복실산 메틸아미드(CP532,903으로도 알려짐); (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(2-클로로-6-(3-클로로벤질아미노)-9H-퓨린-9-일)-2,3-디하이드록시-N-메틸바이사이클로[3.1.0]헥산-1-카복사미드(MRS3558로도 알려짐), 2-(1-헥시닐)-N-메틸아데노신; (1S,2R,3S,4R)-2,3-디하이드록시-4-(6-((3-요오도벤질)아미노)-4H-퓨린-9(5H)-일)-N-메틸사이클로펜탄카복사미드(Can-Fite의 CF101로도 알려짐); (1S,2R,3S,4R)-4-(2-클로로-6-((3-요오도벤질)아미노)-4H-퓨린-9(5H)-일)-2,3-디하이드록시-N-메틸사이클로펜탄카복사미드(Can-Fite의 CF102로도 알려짐); (1'R,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-{2-클로로-6-[(3-요오도페닐메틸)아미노]퓨린-9-일}-1-(메틸아미노카보닐)-바이사이클로[3.1.0]헥산-2,3-디올(MRS1898로도 알려짐); 또는 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드의 2-디알킬닐 유도체; 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 IB-MECA(CF101로도 알려짐), 또는 CI-IB-MECA(CF102로도 알려짐); 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 상기 개시된 것들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다.

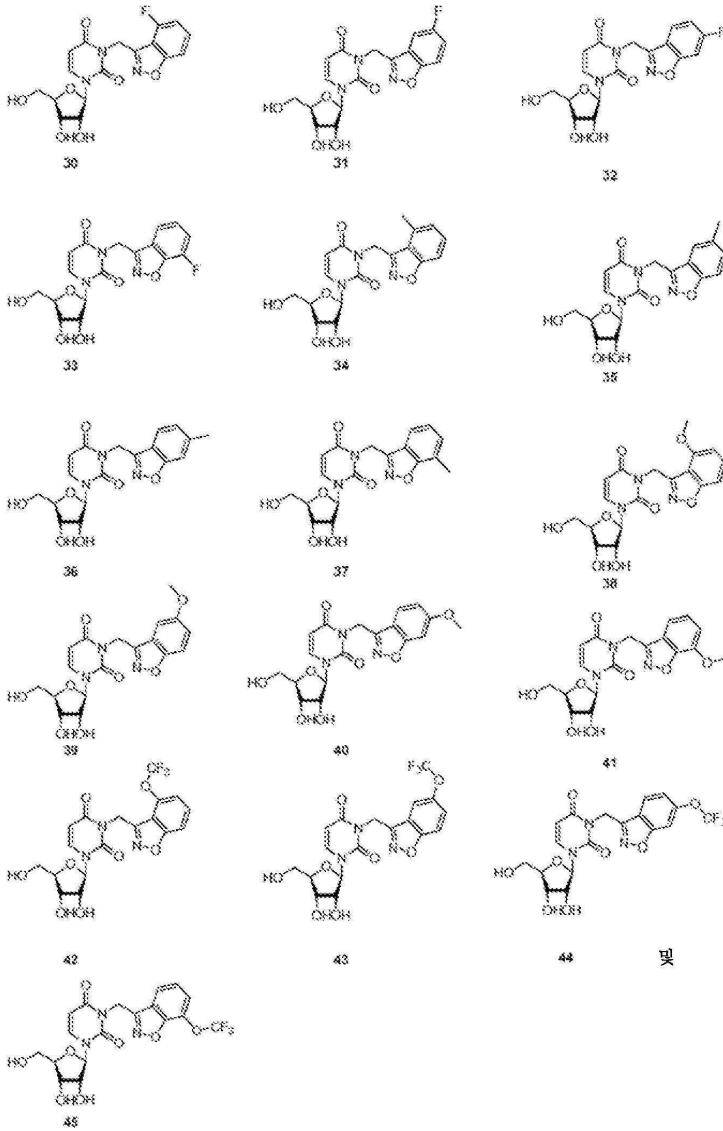
[0097] 공유 리간드, 예를 들어 2-사이클로헥실-N-(3,4-디클로로페닐)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민(Can-Fite의 CF602로도 알려짐)의 존재하에 수용체 활성을 향상시키는 A₃R 알로스테릭 조절제도 포함된다. 그러나, 상기 나열된 A₃R 작용제는 결코 배타적이지 않으며, 다른 이러한 작용제도 사용될 수 있다. 중합체에 공유 결합된 A₃R 작용제도 투여된다. 예를 들어, A₃R 작용제는, 작용제가 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머에 결합된 접합체의 형태로 투여될 수 있다.

[0098] 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 특정 우리딘 유사체에 의한 편향된 작용을 포함하는 완전 또는 부분 작용은, 개시된 질환 또는 병태의 개선된 치료를 유도할 수 있는 하나 이상의 경로를 선택적 조절할 수 있게 하고, (부작용을 유발할 수 있는) 원하지 않는 경로 조절을 피할 수 있게 한다. 일부 양태에서, 선택적 조절은 개시된 뇌 손상 또는 신경 변성 질환 또는 병태를 치료하기 위해 성상 세포 또는 다른 아교 세포, 예를 들어 미세아교 세포 및 희소 돌기 아교 세포를 우선적으로 활성화시킨다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 특정 우리딘 유사체 화합물은 WO 2014/160502에 개시되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 인용에 의해 포함된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃R 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 아데노신 수용체, 예를 들어 A₁, A_{2A}, A_{2B} 또는 A₃ 수용체에 편향된 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 A₃ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 P2Y₁ 수용체에 편향된 작용제, 부분 작용제 또는 편향된 부분 작용제이다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 하기로 구성되는 그룹 또는 이들의 인산화된 유사체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



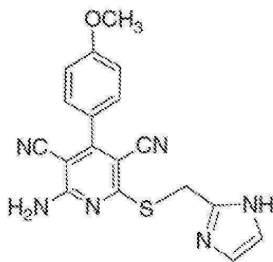
[0099]

[0100]



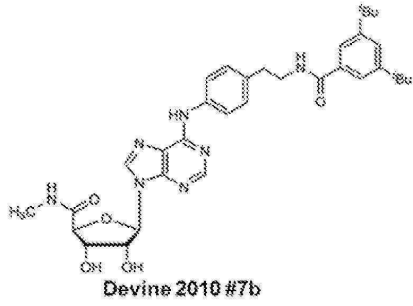
[0101]

[0102] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:

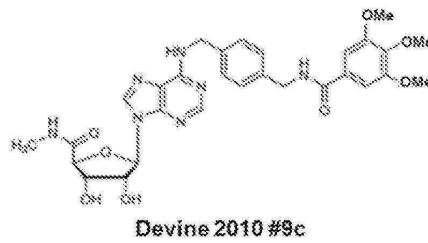
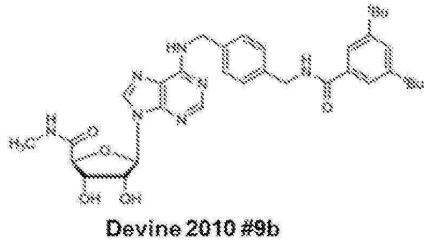
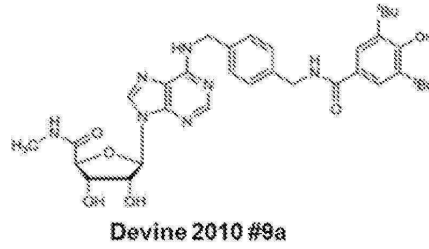
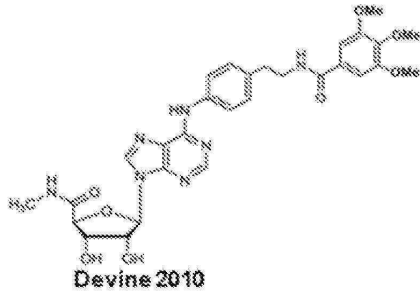


[0103]

[0104] (Beukers MW *et al.*, (2004) "New, non-adenosine, high-potency agonists for the human adenosine A2B receptor with an improved selectivity profile compared to the reference agonist N-ethylcarboxamidoadenosine," *J. Med. Chem.* 47(15):3707-3709 참조);



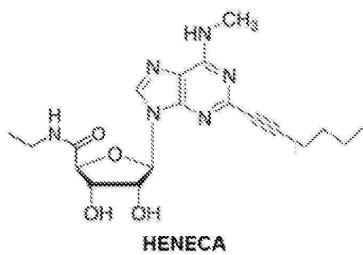
[0105]



[0106]

[0107]

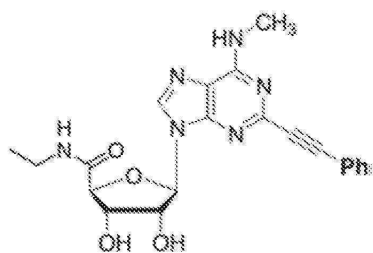
(Devine SM et al. "Synthesis and Evaluation of new A₃R agonists," *Bioorg Med Chem* 18, 3078-3087. 2010; and Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011 참조);



[0108]

[0109]

(Ben DD *et al.* "Different efficacy of adenosine and NECA derivatives at the human A₃ receptor: Insight into the receptor activation switch," *Biochem Pharm* 87, 321-331. 2014; and Camaioni E, Di Francesco E, Vittori S, Volpini R, Cristalli G. "Adenosine receptor agonists: synthesis and biological evaluation of the diastereoisomers of 2-(3-hydroxy-3-phenyl-1-propyn-1-yl)NECA," *Bioorg Med Chem* 1997;5:2267-75 참조);

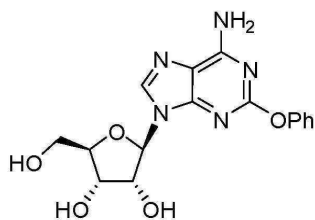


PENECA

[0110]

[0111]

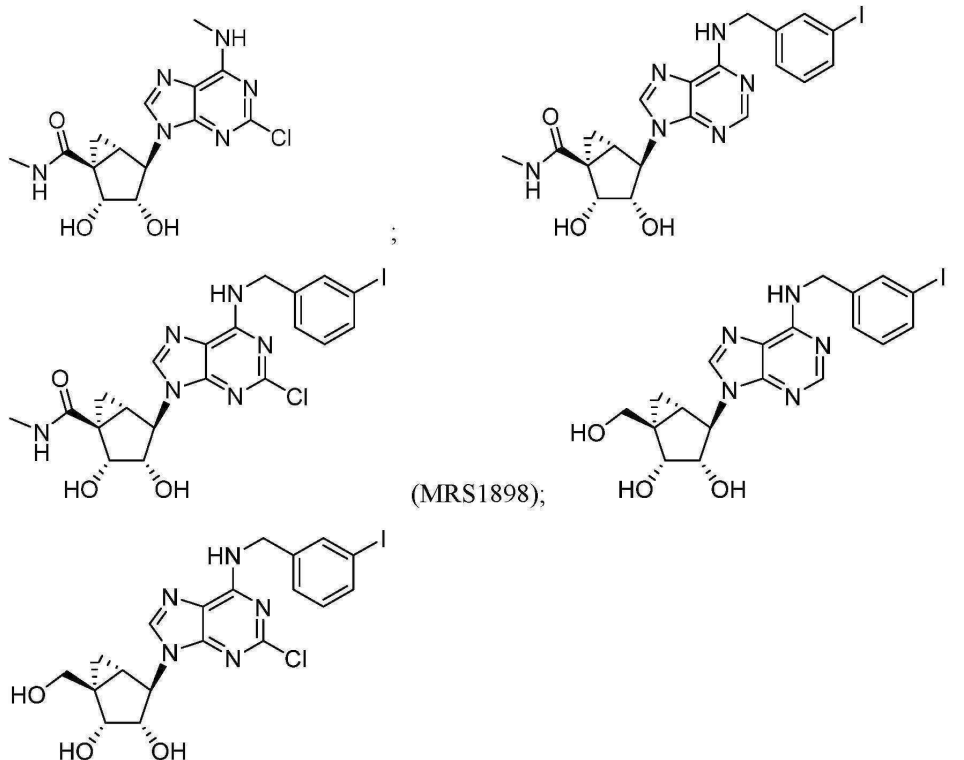
(Klotz, K.N. "2-Substituted N-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A3 adenosine receptors," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999 Aug;360(2):103-8; and Cristalli G *et al.* (1995) "2-Aralkynyl and 2-heteroalkynyl derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide as selective A2a adenosine receptor agonists," *J Med Chem* 38 :1462-1472 참조);



[0112]

[0113]

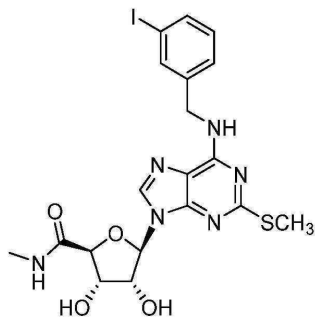
(Kim S *et al.* "3D quantitative SAR at A3R," *J Chem Inf. Model* 47, 1225-1233 2007 참조);



[0114]

[0115]

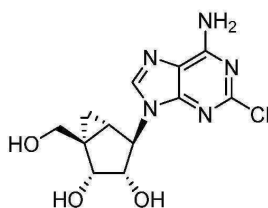
(Lee, K. *et al.* "Ring-Constrained (N)-Methanocarpa Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists," *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11, 1333-1337 참조);



[0116]

[0117]

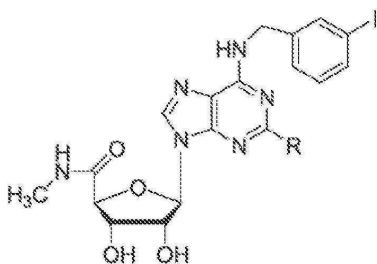
(Kenneth A. Jacobson *et al.* Chapter 6. A3 Adenosine Receptor Agonists: History and Future Perspectives pp 96-97. Book - Springer: A3 Adenosine Receptors from Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics, 2009 참조);



[0118]

[0119]

(Lee K *et al.* "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists," *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11, 1333-1337; and Gao *et al.* "Structural Determinants of A3R Activation: Nucleoside Ligands at the Agonist/Antagonist Boundary," *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 4471-4484 참조);



R = H: IB-MECA (CF101)
R = Cl: Cl-IB-MECA (CF102)

[0120]

[0121]

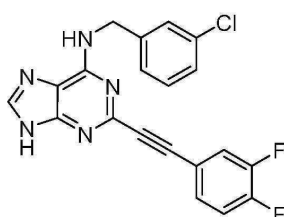
(Muller CE, Jacobson KA, "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, 1808, 1290-1308 참조);



[0122]

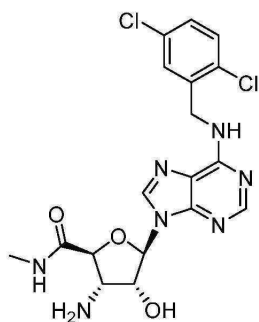
[0123]

(MRS5930; Jacobson KA *et al.* "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors," *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015 참조);



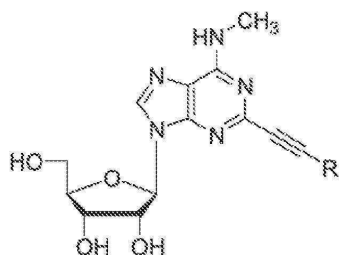
[0124]

[0125] (MRS5923; Jacobson KA *et al.* "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors," *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015 참조);



[0126] CP532,903

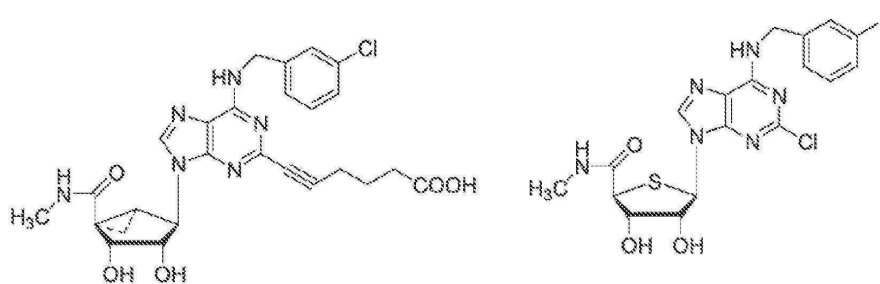
[0127] (Tracey WR *et al.* "Novel n6-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human A3R reduce ischemic myocardial injury," *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285. 2003; Muller CE, Jacobson KA, "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011; and Wan TC *et al.* "The A3R Agonist CP-532,903 Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury," *J. of Pharmacology and Exptl Therapies* 324,1. 2008 참조);



R = *n*C₄H₉: HEMADO
R = Ph: PEMADO

[0128]

[0129] (Volpini R *et al.* "HEMADO as Potent and Selective Agonists of hA3R," *J Med Chem* 45, 3271-3279. 2002; Muller CE *et al.* "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011; and Volpini R *et al.* "Synthesis and Evaluation of Potent and Highly Selective Agonists for hA3R," *J of Med Chem* 52, 7897-7900. 2009 참조);

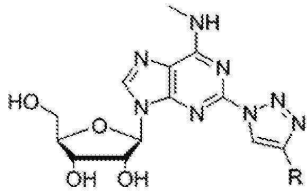


MRS5151 ;

LJ529 ;

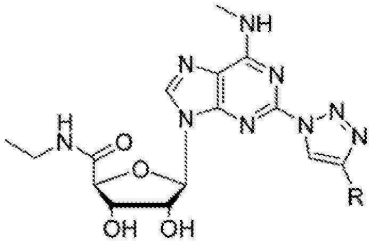
[0130]

[0131] (Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011 참조);



[0132]

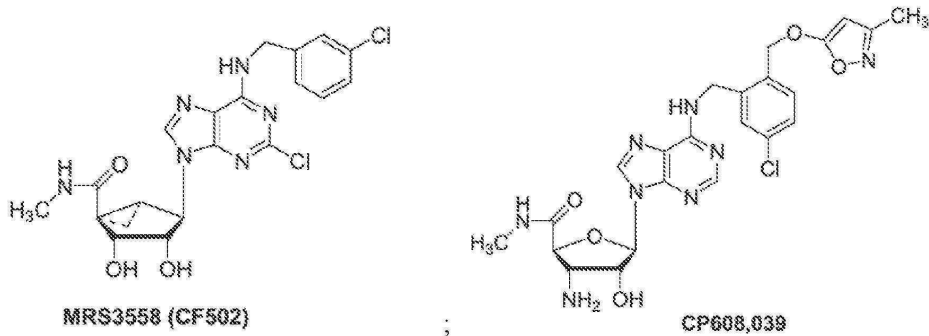
[0133] (여기서, R은 H 또는 사이클로헥틸메틸이다);



[0134]

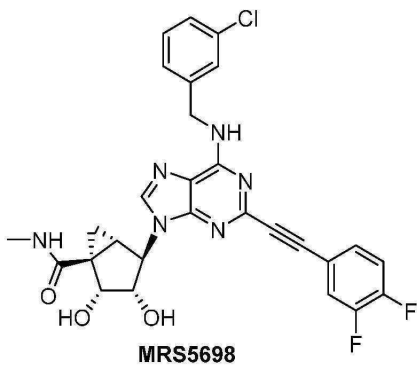
[0135] (여기서, R은 H, 부틸, 또는 피리딘-2-일이다)

[0136] (Cosyn L. et al., "2-triazole-substituted adenosines," J Med Chem 2006. 49. 7373-7383 참조);



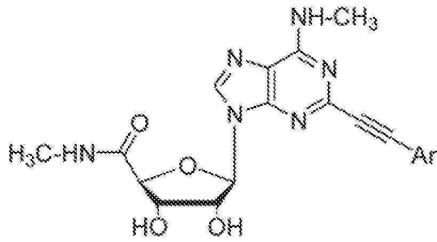
[0137]

[0138] (Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," Biochimica et Biophysica Acta 1808, 1290-1308. 2011 참조);



[0139]

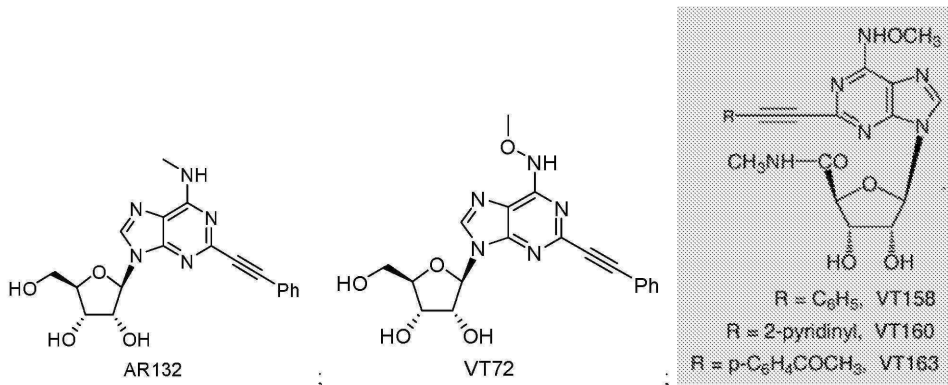
[0140] (Jacobson KA et al. "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors," Comp. and Struct. Biotechnology Jour 13. 286-298. 2015 참조);



[0141]

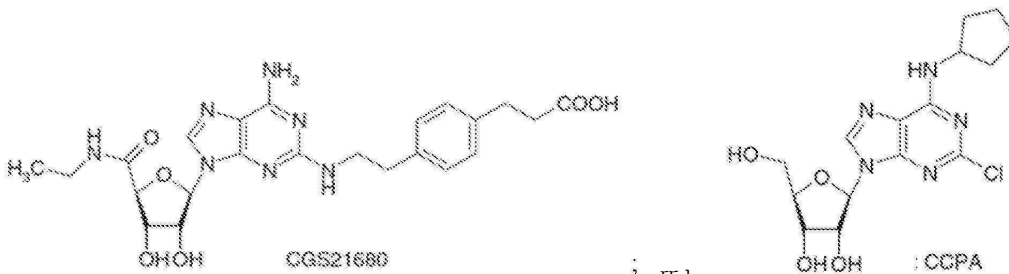
[0142] (여기서, Ar은 페닐, *p*-CH₃CO-페닐, *p*-플루오로페닐, 또는 2-피리딜로부터 선택된다)

[0143] (Volpini R et al. "Synthesis and Evaluation of Potent and Highly Selective Agonists for hA3R," J Med Chem 52, 7897-7900. 2009 참조);



[0144]

[0145] (Pugliese AM *et al.*, "Role of A3R on CA1 hippocampal neurotransmission during OGD," Biochem Pharmacology 74. 2007 참조);

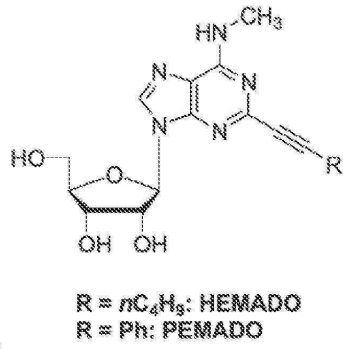
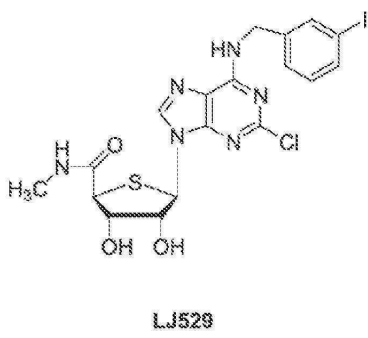
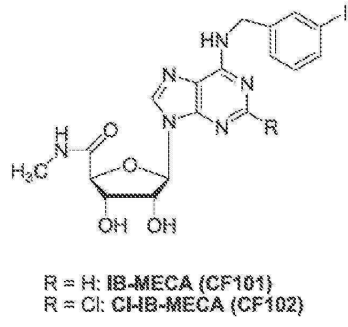
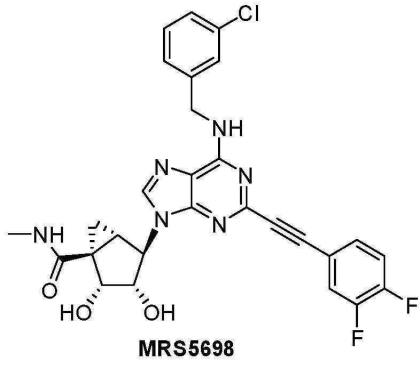


[0146]

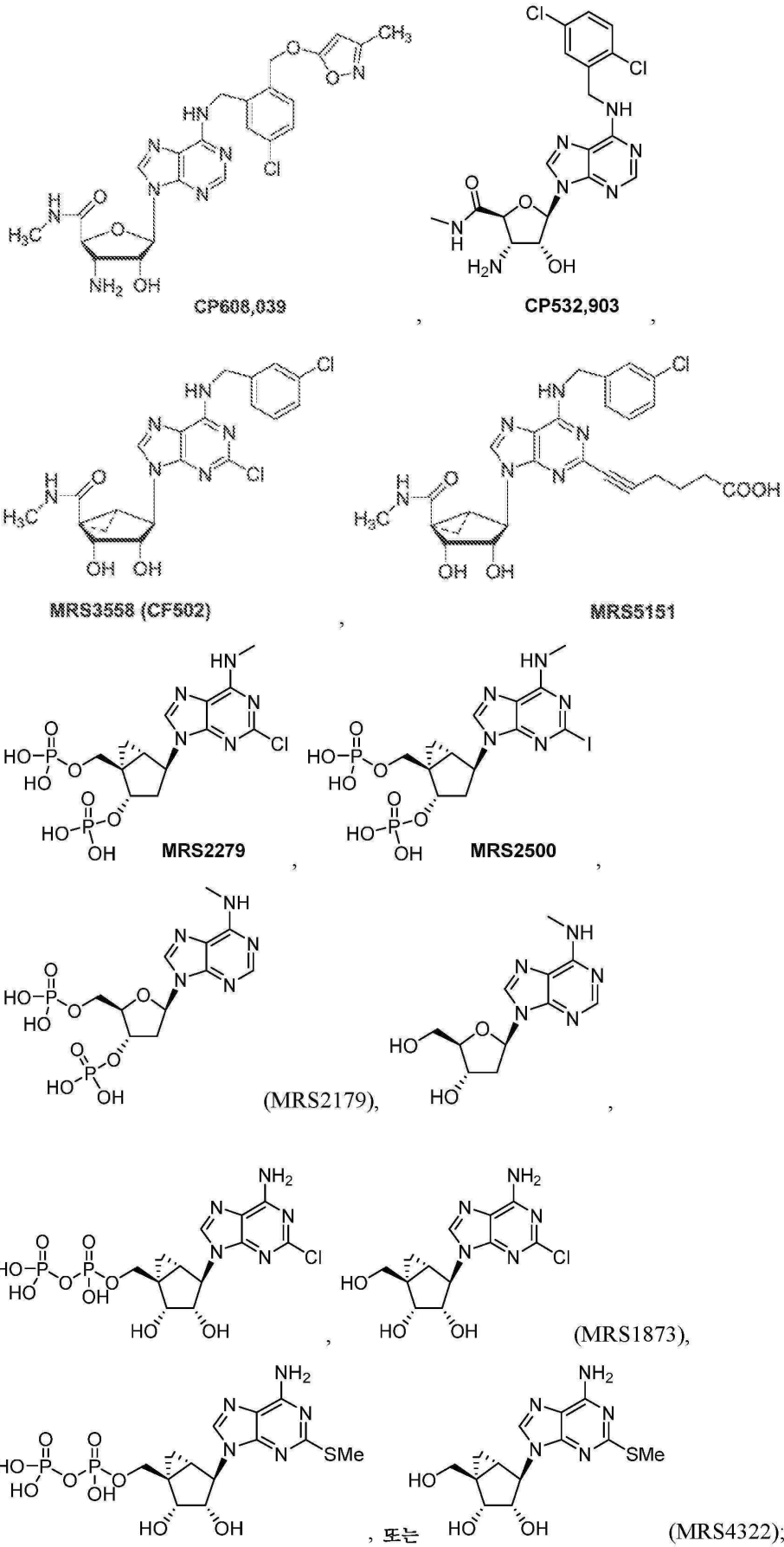
[0147] (Klotz KN "Adenosine receptors and their ligands NS's," Arch Pharmacol. 362. 382-391. 2000 참조).

[0148] 일부 양태에서, 상기 화합물은 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 상기 개시된 것, 또는 이들의 약제학 적으로 허용되는 염으로부터 선택된다.

[0149] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



[0150]



[0151]

[0152]

[0153]

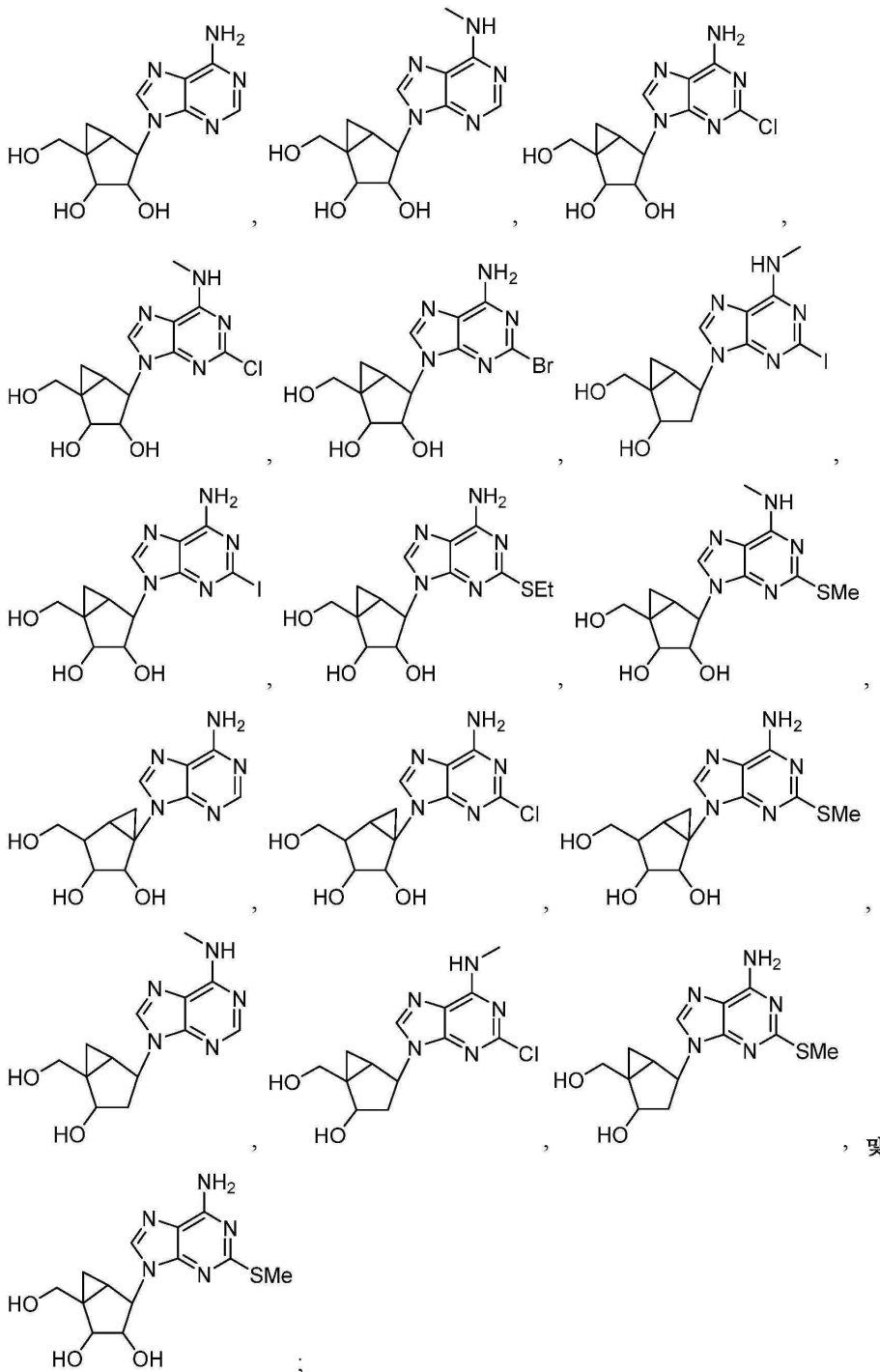
일부 양태에서, 상기 화합물은 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 상기 개시된 것, 또는 이들의 약제학 적으로 허용되는 염로부터 선택된다.

[0154] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



[0155]

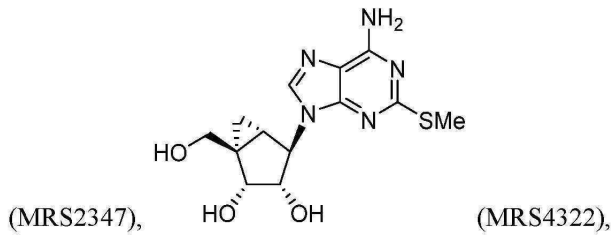
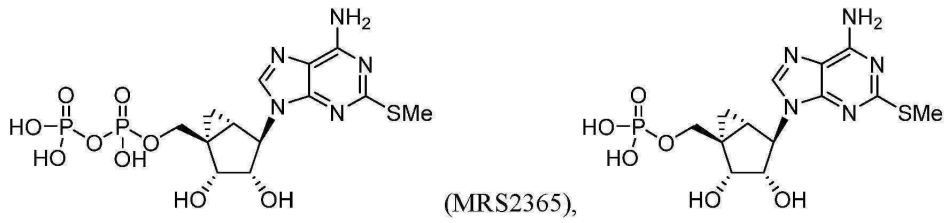
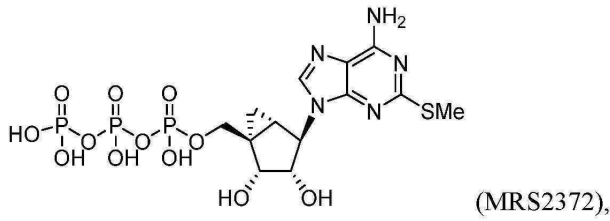
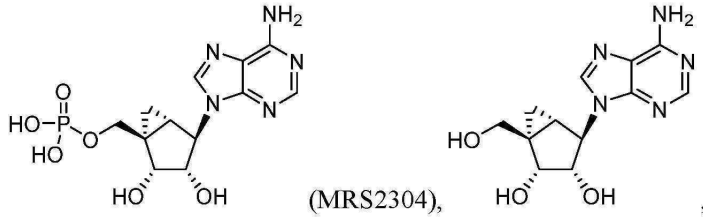
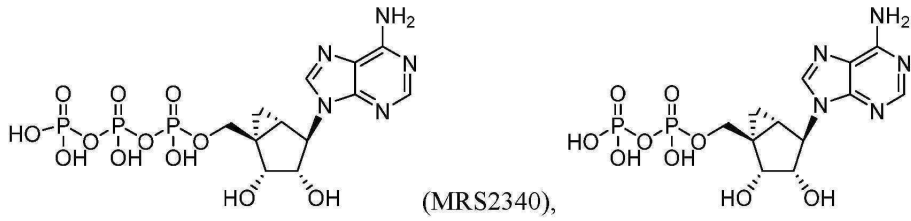
[0156] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염; 또는 이들의 모노포스페이트, 디-포스페이트, 또는 트리포스페이트 또는 상기 모노포스페이트, 디-포스페이트, 또는 트리포스페이트의 약제학적으로 허용되는 염으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다:



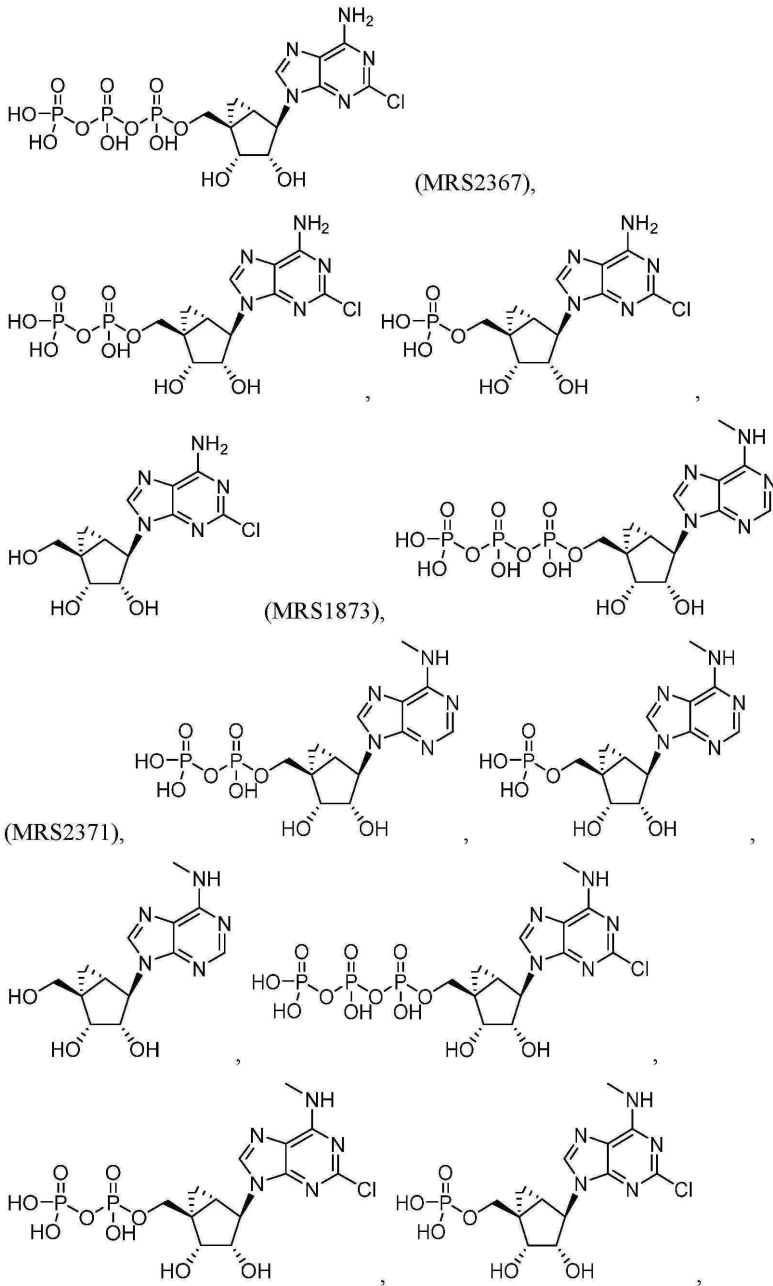
[0157]

[0158] (여기서, 각각의 화합물은 노스 또는 사우스 회전 배열일 수 있거나, 상기 메타노카르바 당은 D-리보당으로 대체될 수 있다).

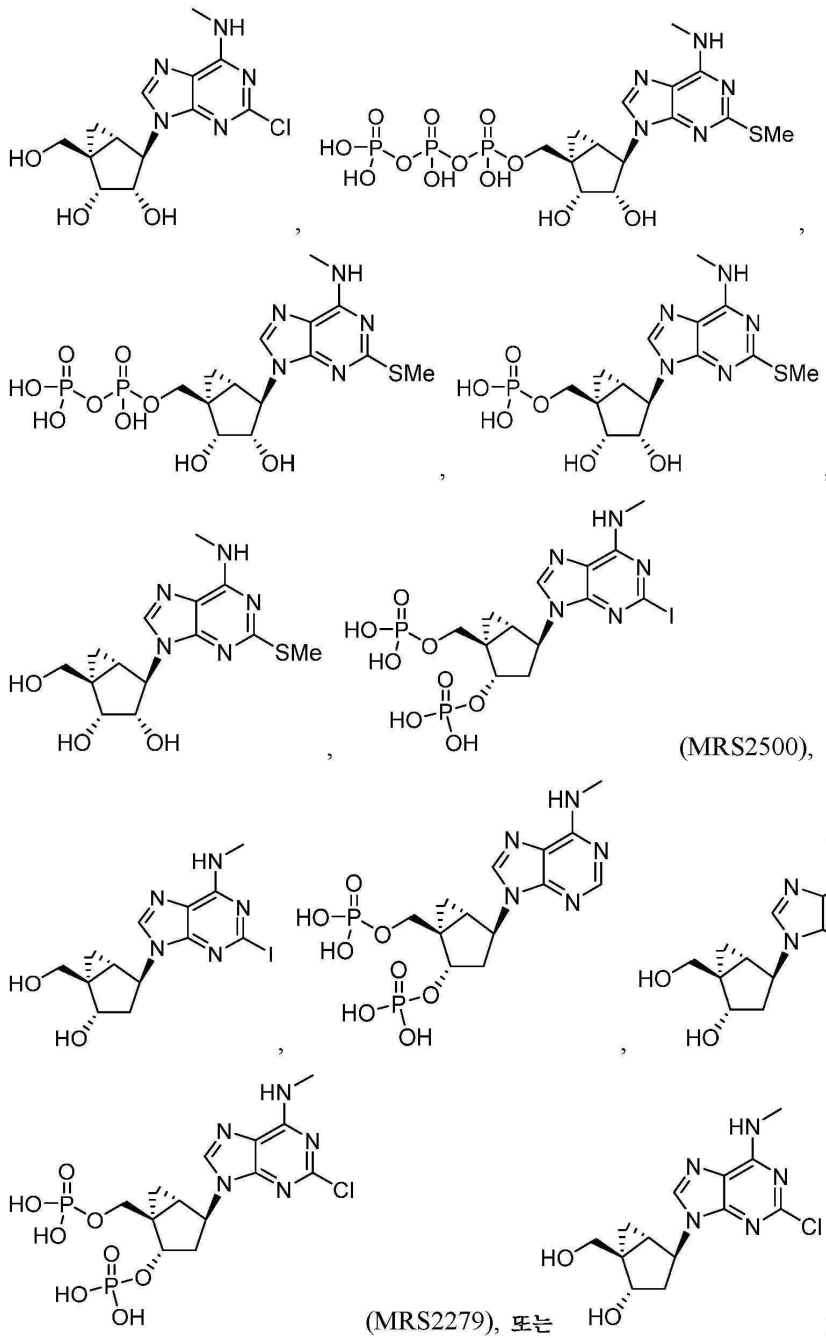
[0159] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



[0160]



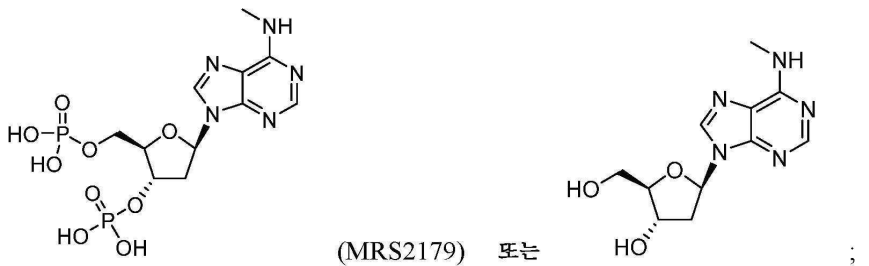
[0161]



[0162]

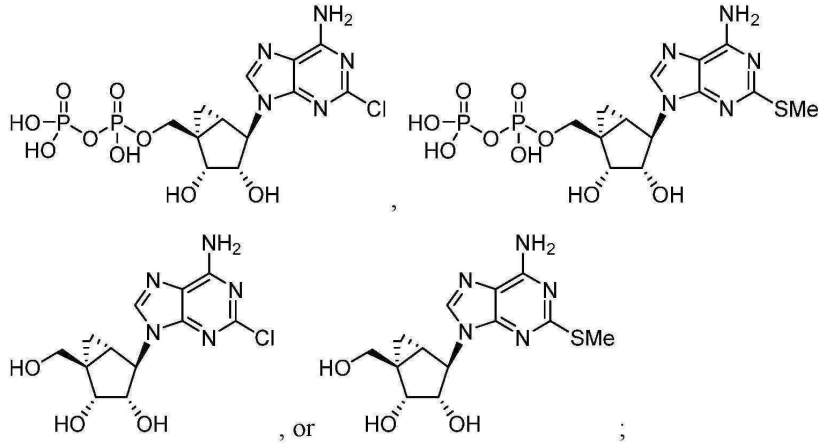
[0163] 일부 양태에서, 상기 화합물은 (N)-메타노카르바 뉴클레오시드, 예를 들어 상기 개시된 것, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다.

[0164] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



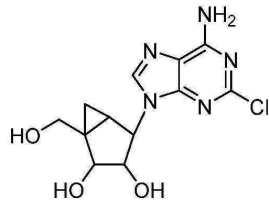
[0165]

[0166] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



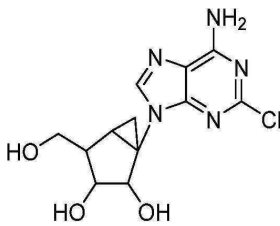
[0167]

[0168] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



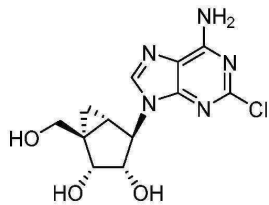
[0169]

[0170] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



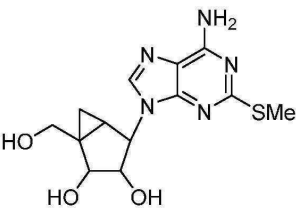
[0171]

[0172] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



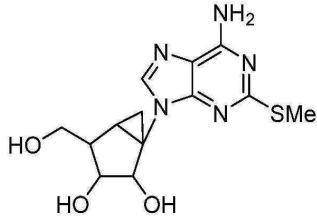
[0173]

[0174] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



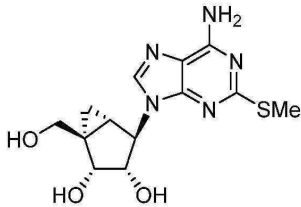
[0175]

[0176] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



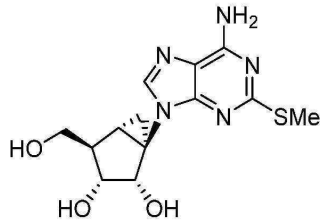
[0177]

[0178] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



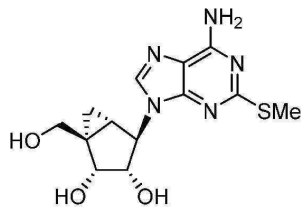
[0179]

[0180] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



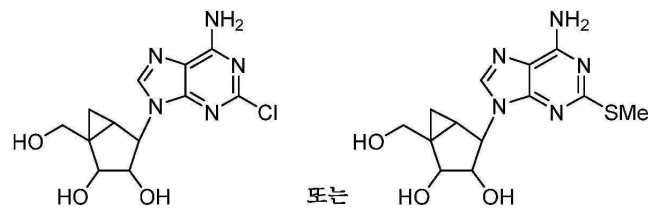
[0181]

[0182] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물이다:



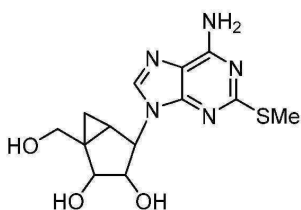
[0183]

[0184] 일 양태에서, 본 발명은 개시된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다:



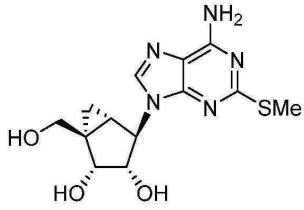
[0185]

[0186] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



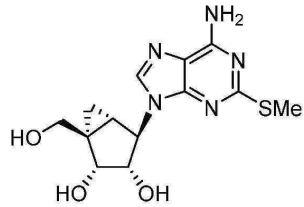
[0187]

[0188] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



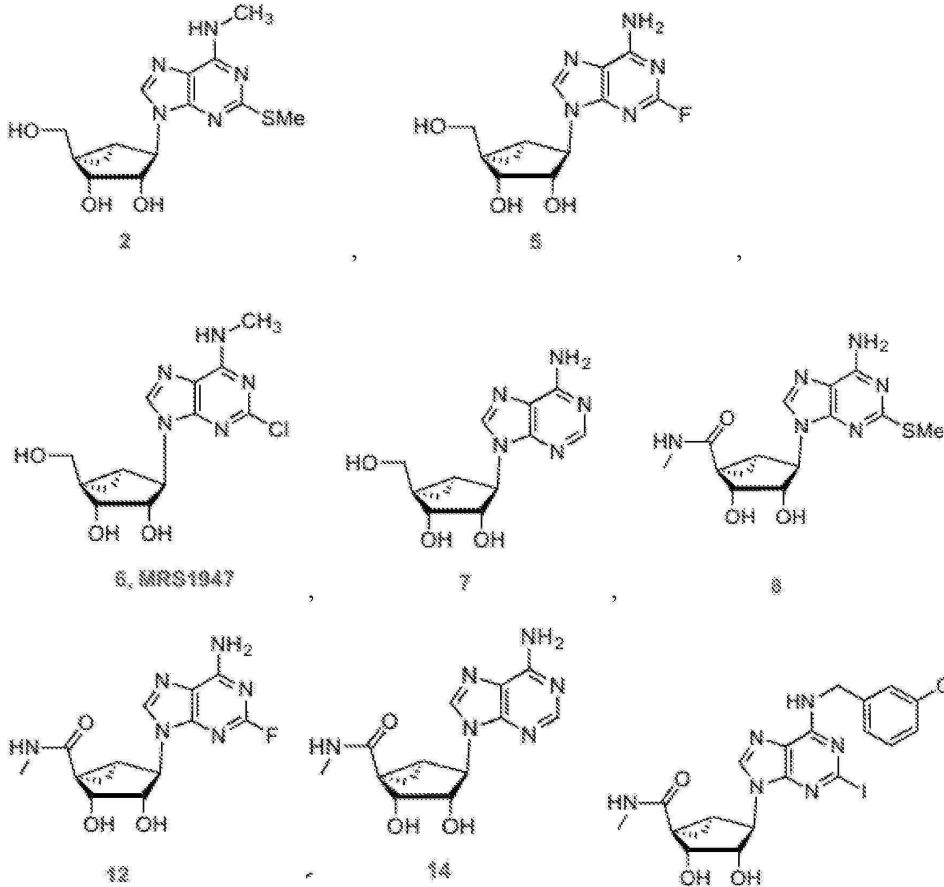
[0189]

[0190] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물이다:

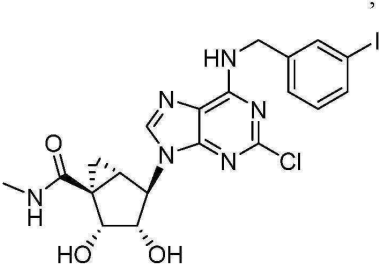
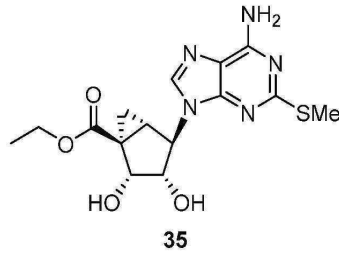
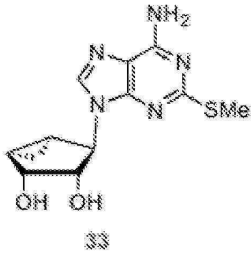


[0191]

[0192] 일부 양태에서, 상기 화합물은 도 15의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다:



[0194]

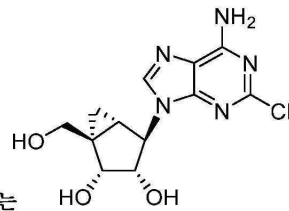
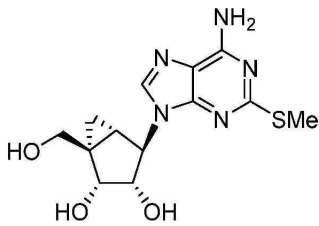


(MRS1898), 또는 MRS1873;

[0195]

[0196]

일 양태에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI) 또는 뇌졸중으로부터 선택되는 뇌 또는 중추 신경계(CNS) 손상 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 다음으로부터 선택되는 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 뇌 또는 중추 신경계(CNS) 손상 또는 병태의 치료 방법을 제공한다:

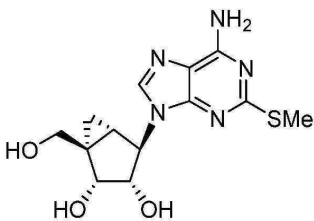


또는

[0197]

[0198]

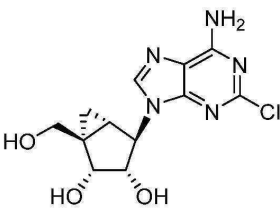
일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



[0199]

[0200]

일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



[0201]

[0202]

일부 양태에서, 상기 뇌 또는 중추 신경계(CNS) 손상 또는 병태는 TBI이다.

[0203]

일부 양태에서, 상기 TBI는 뇌진탕, 폭발 손상, 전투 관련 손상, 또는 머리에 대한 경증, 중등증, 또는 중증의 타격으로부터 선택된다.

[0204]

일부 양태에서, 상기 화합물은 상기 TBI 또는 뇌졸중 발생 24시간 이내에 투여된다.

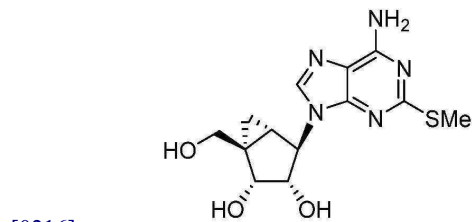
[0205]

일부 양태에서, 상기 화합물은 상기 TBI 또는 뇌졸중 발생 8시간 이내에 투여된다.

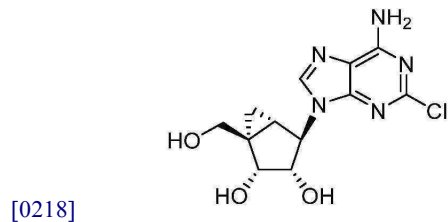
- [0206] 일부 양태에서, 상기 화합물은 상기 TBI 또는 뇌졸중 발생 후 적어도 처음 8 내지 48시간 동안 투여된다.
- [0207] 일부 양태에서, 상기 뇌 또는 중추 신경계(CNS) 손상 또는 병태는 뇌졸중이다.
- [0208] 일부 양태에서, 뇌졸중을 치료하기 위해, 상기 화합물은 뇌졸중이 발생한 이후부터 상기 뇌졸중이 소실될 때의 기간 동안 만성적으로 투여된다.
- [0209] 일부 양태에서, 신경 보호 또는 신경 복원은, 비치료된 환자에 비해 상기 환자에서 증가된다.
- [0210] 일부 양태에서, 상기 화합물은 인간 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)에 편향된 부분 작용제이다.
- [0211] 일부 양태에서, 상기 A₃R은 상기 A₃R 수용체의 신경 보호 기능에 대해 편향된 방식으로 부분적 작용화된다.
- [0212] 일부 양태에서, 상기 화합물은 경구, 정맥내, 또는 비경구 투여된다.
- [0213] 일 양태에서, 본 발명은, 신경 보호 또는 신경 복원의 증가 방법으로서, 상기 증가를 필요로 하는 환자에게 다음으로부터 선택되는 화합물들, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, TBI 또는 뇌졸중을 앓고 있는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원의 증가 방법을 제공한다:



- [0215] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

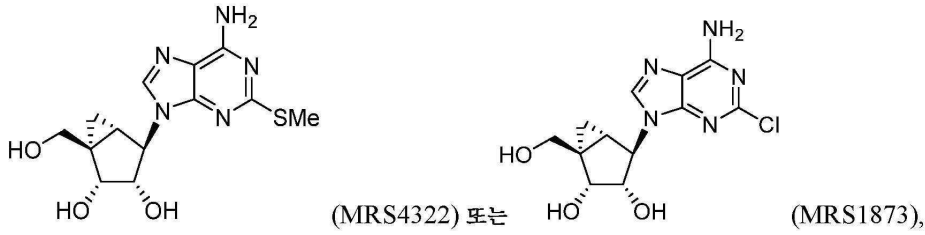


- [0217] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

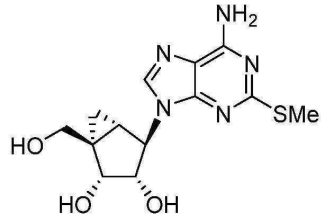


- [0219] 일부 양태에서, 상기 신경 보호 또는 신경 복원은 비치료된 환자에 비해 상기 TBI 또는 뇌졸중 이후의 회복 기간을 감소시킨다.
- [0220] 일부 양태에서, 상기 화합물은 인간 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)에 편향된 부분 작용제이고, 상기 A₃R은 상기 A₃R 수용체의 신경 보호 기능에 대해 편향된 방식으로 부분적 작용화된다.
- [0221] 일부 양태에서, 상기 화합물은 경구, 정맥내, 또는 비경구 투여된다.
- [0222] 일부 양태에서, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 적어도 0.7의 혈장 중 비결합된 분획을, 또는 적어도 0.08의 뇌 중 비결합된 분획을, 또는 이들 둘 다를 갖는다.
- [0223] 일 양태에서, 본 발명은, 외상성 뇌 손상(TBI), 뇌졸중, 신경 변성 병태, 또는 심장 또는 심혈관 질환으로부터 선택되는 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 다음 화합물로부터 선

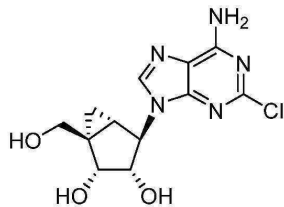
택되는 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 작용제, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 손상, 질환, 또는 병태의 치료 방법을 제공한다:



일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



일부 양태에서, 상기 손상, 질환, 또는 병태는 TBI이다.

일부 양태에서, 상기 TBI는 뇌진탕, 폭발 손상, 전투 관련 손상, 또는 머리에 대한 경증, 중등증, 또는 중증의 타격으로부터 선택된다.

일부 양태에서, 상기 손상, 질환, 또는 병태는 허혈성 뇌졸중, 출혈성 뇌졸중, 거미막하 출혈, 뇌 혈관 연축, 또는 일과성 허혈 발작(TIA)로부터 선택되는 뇌졸중이다.

일부 양태에서, 상기 신경 변성 질환은 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 헌팅턴 질환(HD), 다발 경화증(MS), 근위축 측삭 경화증(ALS), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 또는 바이러스, 알콜 중독, 종양, 독소, 또는 반복적인 뇌 손상에 의해 발생된 신경 변성 병태로부터 선택된다.

일부 양태에서, 상기 손상, 질환, 또는 병태는 파킨슨 질환이다.

일부 양태에서, 상기 손상, 질환, 또는 병태는 알츠하이머 질환, 편두통, 뇌 수술, 또는 항암 화학요법과 관련된 된 신경계 부작용이다.

일부 양태에서, 상기 심장 또는 심혈관 질환은 심허혈증, 심근경색증, 심근병증, 관상동맥 질환, 부정맥, 심근염, 심장막염, 협심증, 고혈압 심장 질환, 심내막염, 류마티스 심장 질환, 선천성 심장 질환, 또는 죽상경화증으로부터 선택된다.

일부 양태에서, 상기 심장 또는 심혈관 질환은 심허혈증 또는 심근경색증이다.

일부 양태에서, 뇌졸중, 심허혈증, 또는 심근경색증을 치료하기 위해, 상기 손상이 발생한 이후부터 상기 손상이 소실될 때까지의 기간 동안 상기 화합물은 만성적으로 투여된다.

일부 양태에서, 신경 보호 또는 신경 복원이, 비치료된 환자에 비해 상기 환자에서 증가된다.

일부 양태에서, 상기 A₃R은, 다른 A₃R 매개되는 경로의 활성화를 거의 또는 전혀 갖지 않는 세포내 칼슘 동원의 우선적 활성화를 통해, 또는 Gq11 매개되는 세포내 칼슘 동원, cAMP 생산의 Gi 매개되는 조절, 또는 ERK1/2 및

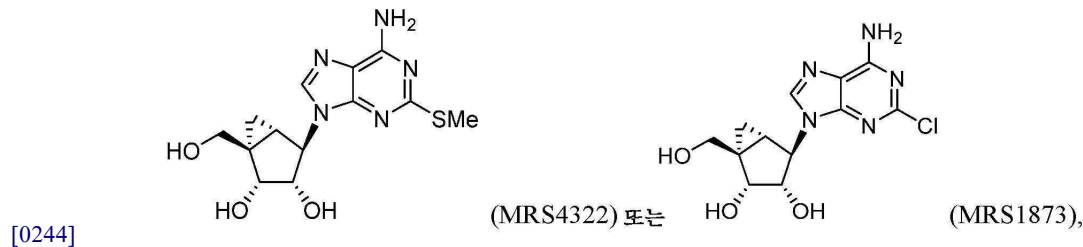
Akt의 Gi 매개되는 인산화의 우선적 활성화를 통해, 상기 A₃R 수용체의 신경 보호 기능에 대해 편향된 방식으로 작용화된다.

[0240] 일부 양태에서, 상기 A₃R은, 다른 A₃R 매개되는 경로의 활성화를 거의 또는 전혀 갖지 않는 세포내 칼슘 동원의 우선적 활성화를 통해, 또는 Gq11 매개되는 세포내 칼슘 동원, cAMP 생산의 Gi 매개되는 조절, 또는 ERK1/2 및 Akt의 Gi 매개되는 인산화의 우선적 활성화를 통해, 상기 A₃R 수용체의 심장 보호 기능에 대해 편향된 방식으로 작용화된다.

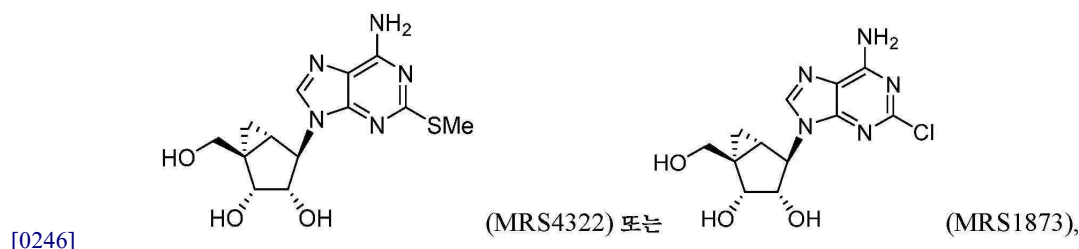
[0241] 일부 양태에서, 상기 방법은, 항암 화학요법 또는 뇌 수술과 관련되거나 이로 인한 신경성 병태를 앓고 있는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원을 증가시킨다.

[0242] 일부 양태에서, 상기 화합물은 경구 투여된다.

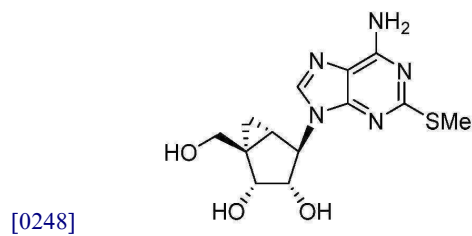
[0243] 일 양태에서, 본 발명은, 신경 보호 또는 신경 복원의 증가 방법으로서, 상기 증가를 필요로 하는 환자에게 다음으로부터 선택되는 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 작용제, 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, TBI 또는 뇌졸중을 앓고 있는 환자의 신경 보호 또는 신경 복원을 증가시켜, 상기 TBI 또는 뇌졸중을 치료하는 방법을 제공한다:



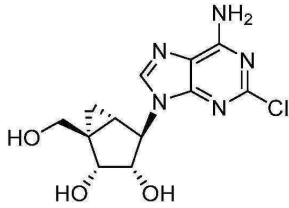
[0245] 일 양태에서, 본 발명은, 심장 보호 또는 상해를 입은 심장 조직의 재생의 증가 방법으로서, 상기 증가를 필요로 하는 심허혈증 또는 심근경색증을 앓고 있는 환자에게, 다음으로부터 선택되는 A₃ 아데노신 수용체(A₃R)의 작용제, 이들의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 유효량으로 투여함을 포함하는, 심장 보호 또는 상해를 입은 심장 조직의 재생을 증가시켜, 상기 심허혈증 또는 심근경색증을 치료하는 방법을 제공한다:



[0247] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



[0249] 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:



- [0250]
- [0251] 일부 양태에서, 상기 TBI, 뇌졸중, 심허혈증, 또는 심근경색증 이후의 회복 기간은 비치료된 환자에 비해 감소된다.
- [0252] 일부 양태에서, 상기 A₃R은 상기 A₃R 수용체의 신경 보호 기능에 대해 편향된 방식으로 부분적 작용화된다.
- [0253] 일부 양태에서, 상기 A₃R은 상기 A₃R 수용체의 심장 보호 기능에 대해 편향된 방식으로 부분적 작용화된다.
- [0254] 일부 양태에서, 상기 화합물은 경구 투여된다.
- [0255] 일부 양태에서, 상기 화합물은 완전(full) A₃R 작용제에 비해 개선된 심장 보호 기능을 갖는 A₃R의 편향된 작용제이다.
- [0256] 일부 양태에서, 상기 화합물은, 다음 A₃R 매개되는 경로들 중 하나 이상의 우선적 활성화를 통해, 완전 A₃R 작용제에 비해 개선된 심장 보호 기능을 갖는 A₃R의 편향된 작용제이다: Gq11 매개되는 세포내 칼슘 동원, cAMP 생산의 Gi 매개되는 조절, ERK1/2 및 Akt의 Gi 매개되는 인산화, 또는 베타-아레스틴 활성화의 조절.
- [0257] 일부 양태에서, 상기 화합물은, 다른 A₃R 매개되는 경로의 활성화를 거의 또는 전혀 갖지 않는 세포내 칼슘 동원의 우선적 활성화를 통해, 다음 A₃R 매개되는 경로들 중 하나 이상의 우선적 활성화를 통해, 완전 A₃R 작용제에 비해 개선된 심장 보호 기능을 갖는 A₃R의 편향된 작용제이다.
- [0258] 일부 양태에서, 상기 화합물은 완전 A₃R 작용제에 비해 개선된 심장 보호 기능을 갖는 A₃R의 부분 작용제이다.
- [0259] 개시된 방법 또는 개시된 약제학적 조성물을 사용하기 위한 조성물에 존재해야 하는 개시된 화합물(즉, 활성제)의 양은, 일반적으로 치료적 유효량일 것이다. "치료학적 유효량" 또는 용량(또는 "유효량")은 바람직한 치료 결과, 예를 들어 신경 보호의 활성화, 신경 재생 및/또는 인지 또는 신경 기능의 개선을 초래하기에 충분한 활성제의 양을 나타낸다. 활성제 조성물의 독성 및 치료 효능은, 세포 배양물 또는 실험 동물에서 당업계에 공지된 절차, 예를 들어 LD₅₀(시험 그룹의 50%에 치명적인 용량) 및 ED₅₀(시험 그룹의 50%에서 치료학적으로 유효한 용량)의 측정에 대한 절차로 측정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량비는 치료 지수이며, LD₅₀/ED₅₀의 비로 표현할 수 있다. 큰 치료 지표를 나타내는 조성물이 유리하다. 세포 배양 검증 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 정하는 데 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 상기 조성물의 투여량은 독성을 거의 또는 전혀 갖지 않는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 놓인다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 변할 수 있다.
- [0260] 일부 양태에서, 유효 용량 및/또는 원하는 치료 결과는, 시험 대상체 또는 환자의 인지 기능 또는 적어도 두 가지 측정에 대한 또 다른 파라미터를 비교함으로써 확립되지만, 두 가지 이상의 측정을 사용할 수도 있다. 초기 인지 기능 측정은 시험 대상체 또는 환자의 초기 기저선을 설정한다. 인지 기능은 확립된 인지 검사, 예를 들어 개정된 웨슬러 기억 검사의 지연 언어 구술 과제를 사용하여 측정할 수 있다. 인지 시험으로 치료한 후의 추가 시험은 두 번째 측정을 확립할 것이다. 제1 측정에 대한 제2 측정의 비교가 적어도 약 1%의 개선을 나타낼 때, 유효량이 설정된다. 일부 양태에서, 개정된 웨슬러 기억 검사의 지연 언어 구술 과제에 의해 측정된 인지 기능의 개선은 약 1 내지 20%이다. 일부 양태에서, 상기 개선은 약 1 내지 10%이다. 일부 양태에서, 상기 개선은 약 1 내지 5%이다. 치매의 단계를 측정하지 않는 한, 인지 기능 개선을 결정하는 다른 방법이 동등하게 적용 가능하다는 것이 당업자에 의해 이해된다.
- [0261] 따라서, 본 발명은, 인지 기능 또는 신경 기능의 개선을 필요로 하는 환자에게, 개시된 화합물을 유효량으로 투여함으로써 인지 기능 또는 신경 기능을 개선시키는 방법을 포함하며, 여기서, 상기 신경 및 인지 기능의 향상

은, 개정된 웨슬러 기억 검사의 지연 언어 구술 작업 과제 점수의 1 내지 20%의 점수 증가로 측정된다.

[0262] 개시된 치료 방법은, 원하는 치료 효과를 얻기 위해 필요에 따라 개시된 화합물의 투여를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 원하는 치료 효과를 유지하는데 필요한 만큼 투여될 수 있다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 약 1 내지 12개월간 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 1 내지 6개월간 투여된다. 일부 양태에서, 상기 화합물은 1 내지 3개월간 투여된다.

[0263] 본 발명의 일 양태에서, 개시된 화합물은 약 5 내지 10g/일의 양으로 투여된다. 일부 양태에서, 화합물의 각각의 용량은 약 5 내지 10g/용량의 양이다. 예를 들어, 본 발명의 개시된 화합물을 약 0.05 내지 10mg/kg/일, 약 0.1 내지 7.5mg/kg/일, 약 0.1 내지 2mg/kg/일, 또는 0.5mg/kg/일의 투여량으로, 1일 1회 또는 분할 용량으로 1일 2 내지 4회 경구 투여하여, 만족스러운 결과가 얻어졌다. 비경구 투여의 경우, 예를 들어 i.v. 점적 또는 주입에 의해 예를 들어 약 0.01 내지 5mg/kg/일, 약 0.05 내지 1.0mg/kg/일, 및 약 0.1 내지 1.0mg/kg/일의 투여량이 사용될 수 있다. 따라서, 환자에게 적합한 1일 투여량은 약 2.5 내지 500mg p.o., 약 5 내지 250mg p.o., 약 5 내지 100mg p.o., 또는 약 0.5 내지 250mg i.v., 약 2.5 내지 125mg i.v., 및 약 2.5 내지 50mg i.v.이다.

[0264] 3. 용도, 제형 및 투여

[0265] 약제학적으로 허용되는 조성물

[0266] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 개시된 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체, 애주번트, 또는 비히클을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은, 이러한 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명의 조성물은 환자에게 경구 투여하기 위해 제형화된다.

[0267] 본원에서 사용되는 용어 "환자"는 동물, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0268] 약제학적으로 허용되는 담체, 애주번트, 또는 비히클이란 용어는, 이들을 포함하여 제형화되는 화합물의 약리학 적 활성을 파괴하지 않는 비독성 담체, 애주번트, 또는 비히클을 나타낸다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체, 애주번트, 또는 비히클은, 이온 교환제, 알루미나, 스테아르산알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민, 완충 물질 예를 들어 포스페이트, 글리신, 소르브산, 소르브산 칼륨, 포화 야채 지방산의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들어 프로타민 설페이트, 인산 수소2나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 삼규산염마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스-기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 울 팻(wool fat)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0269] "약제학적으로 허용되는 유도체"는, 수용자에게 투여시, 직접적으로 또는 간접적으로, 본 발명의 화합물 또는 이의 억제 활성 대사물 또는 잔기를 제공할 수 있는, 본 발명의 화합물의 임의의 비독성 염, 에스테르, 에스테르의 염 또는 다른 유도체를 의미한다.

[0270] 본 발명의 조성물은, 경구, 비경구, 흡입 스프레이에 의해, 국소, 직장, 코, 볼, 질 또는 매립된 저장소를 통해 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "비경구"는, 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 윤활막내, 흉골내, 수막강내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 일부 양태에서, 조성물은 경구, 복막내 또는 정맥내 투여된다. 본 발명의 조성물의 멸균 주사가 가능한 형태는 수성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 상기 멸균 주사가 가능한 제제는, 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사가 가능 용액 또는 현탁액, 예를 들어 1,3-부탄디올 중의 용액일 수도 있다. 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매는, 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 무균의 고정 오일이 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다.

[0271] 이러한 목적을 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 블랜드 고정 오일이 사용될 수 있다. 지방산, 예를 들어 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체는, 천연의 약제학적으로 허용되는 오일, 예를 들어 올리브 오일 또는 피마자 오일, 특히 이의 폴리옥시에틸화 버전에서와 같이 주사제의 제제에 유용하다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 장쇄 알콜 희석제 또는 분산제, 예를 들어 카복시메틸 셀룰로오스, 또는 유액 및 현탁액을 포함하는 약제학적으로 허용되는 투여 형태의 제형에서 일반적으로 사용되는 유사한 분산제를 함유할 수도 있다. 다른 통상적으로 사용되는 계면활성제, 예를 들어 Tween, Span 및 약제학적으로 허용되는 고체, 액체 또는 다른 투여 형태의 제조에 통상적으로 사용되는 생체이용성 증강제도 제형의 목적으로 사용될

수 있다.

- [0272] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은, 캡슐제, 정제, 수성 현탁액 또는 용액을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는 임의의 경구적으로 허용되는 투여 형태로 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 통상적으로 사용되는 담체는 락토오스 및 옥수수 전분을 포함한다. 운활제, 예를 들어 스테아르산 마그네슘도 통상적으로 첨가된다. 캡슐제 형태의 경구 투여를 위해, 유용한 희석제는 락토오스 및 건조 옥수수 전분을 포함한다. 수성 현탁액이 경구용으로 필요한 경우, 활성 성분을 유화제 및 현탁제와 혼합한다. 원하는 경우, 특정 감미료, 향미제 또는 착색제를 첨가할 수도 있다.
- [0273] 다르게는, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 직장 투여용 좌약 형태로 투여될 수 있다. 이들은 실온에서 고체이지만 직장 온도에서 액체인 적절한 비자극성 부형제와 제제를 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 따라서 직장에서 녹아 약물을 방출할 수 있다. 이러한 물질은 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0274] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은, 특히 치료 표적이 눈, 피부 또는 하부 창자의 질환을 포함하여 국소 적용에 의해 쉽게 접근 가능한 영역 또는 기관을 포함하는 경우, 국소 투여될 수 있다. 적합한 국소 제형은 이러한 영역 또는 기관 각각에 대해 용이하게 제조된다.
- [0275] 하부 장관에 대한 국소 적용은 직장 좌제 제형(상기 참조) 또는 적합한 관장 제형으로 실시될 수 있다. 국소 경피 패치도 사용할 수 있다.
- [0276] 국소 적용을 위해, 제공된 약제 학적으로 허용되는 조성물을 하나 이상의 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적합한 연고로 제형화할 수 있다. 본 발명의 화합물의 국소 투여용 담체는, 미네랄 오일, 액체 바셀린, 백색 바셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 다르게는, 제공되는 약제학적으로 허용되는 조성물은, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적합한 로션 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 적합한 담체는 미네랄 오일, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알콜, 2-옥틸도데칸올, 벤질 알콜 및 물을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0277] 안과용으로, 제공되는 약제학적으로 허용되는 조성물은, 등장성의 pH 조절된 무균 식염수 내의 미세화된 현탁액으로서, 또는 벤질알코늄 클로라이드와 같은 방부제를 포함하거나 포함하지 않는 등장성의 pH 조절된 무균 식염수 중의 용액으로서 제형화될 수 있다. 다르게는, 안과용으로, 약제학적으로 허용되는 조성물은 바셀린과 같은 연고에 제형화될 수 있다.
- [0278] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은, 비강 에어로졸 또는 흡입법에 의해 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 약제학적 제형 분야에서 널리 공지된 기술에 따라 제조되며, 벤질 알콜 또는 다른 적절한 방부제, 생체 이용률을 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 다른 통상적인 가용화제 또는 분산제를 사용하여 식염수 중 용액으로 제조될 수 있다.
- [0279] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 경구 투여용으로 제형화된다. 이러한 제형은 식품과 함께 또는 식품 없이 투여될 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 식품 없이 투여된다. 다른 양태에서, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 식품과 함께 투여된다.
- [0280] 다른 양태에서, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 정맥내(IV) 투여용으로 제형화된다.
- [0281] 단일 투여 형태로 조성물을 제조하기 위해 담체 물질과 병용될 수 있는 본 발명의 화합물의 양은, 치료되는 숙주, 치료의 특정 방식에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 제공되는 조성물은, 이러한 조성물을 투여받는 환자에게 0.01 내지 100mg/kg 체중/일의 투여량의 억제제를 투여할 수 있도록 제형화된다.
- [0282] 임의의 특정 환자에 대한 특정 투여량 및 치료 요법은, 사용되는 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 배출 속도, 약물 병용, 치료 의사의 판단 및 치료되는 특정 질환의 중증도를 포함하는 다양한 요인에 따라 다를 것이라는 것을 이해해야 한다. 본 발명의 조성물 중의 화합물의 양도 상기 조성물 중의 특정 화합물에 따라 것이다.
- [0283] *화합물 및 약제학적으로 허용되는 조성물의 용도*
- [0284] 본원에 개시된 화합물 및 조성물은 일반적으로 다양한 질환 및 병태, 예를 들어 뇌 손상 및 신경 변성 질환의 치료, 및 본원에 개시된 다양한 방법에 대하여 유용하다.

- [0285] 본 발명에서 이용되는 화합물의 활성은, 시험관내, 생체내 또는 세포주에서 검정될 수 있다. 시험관내 검정은 단백질에 대한 조절 또는 결합을 결정하는 검정을 포함한다. 화합물을 검정하기 위한 상세한 조건을 하기 실시예에 나타낸다.
- [0286] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은, 본원에 개시되는 바와 같이, 질환 또는 장애 또는 이들의 증상 중 하나 이상의 진행을 역전, 경감, 이의 개시를 지연시키는 것을 나타낸다. 일부 양태에서, 치료는 하나 이상의 증상이 발현된 후에 투여될 수 있다. 다른 양태에서, 치료는 증상이 없을 때 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는, 증상의 (예를 들어, 증상의 병력에 비추고/비추거나 유전적 또는 다른 감수성 요인에 비추어) 발병 이전에 감수성이 있는 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들어 재발을 예방하거나 지연시키기 위해 증상이 호전된 후에도 치료를 계속할 수 있다.
- [0287] 본 발명의 방법에 따른 화합물 및 조성물은, 개시된 질환 또는 병태, 또는 관련된 병태 또는 증상의 중증도의 치료 또는 완화에 효과적인 임의의 양 및 임의의 투여 경로를 사용하여 투여될 수 있다. 필요한 정확한 양은 대상체의 종, 연령, 및 일반 상태, 질병 또는 병태의 중증도, 특정 제제, 투여 방식 등에 따라 개체마다 다양할 것이다. 본 발명의 화합물은 바람직하게는 투여의 용이함 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제형화된다. 본원에서 사용되는 표현 "투여 단위 형태"는, 치료될 환자에게 적합한 물리적으로 이산된 단위 체제를 나타낸다. 그러나, 본 발명의 화합물 및 조성물의 총 일일 사용량은 건전한 의학적 판단 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 것이라는 것이 이해될 것이다. 임의의 특정 환자 또는 유기체에 대한 특정 유효 용량 수준은, 치료되는 장애 및 상기 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성; 환자의 연령, 체중, 일반 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로 및 사용되는 특정 화합물의 배설 속도; 치료 기간; 사용되는 특정 화합물과 병용되거나 동시에 사용되는 약물, 및 의학 분야에서 잘 알려진 요소를 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "환자"는, 동물, 일부 양태에서는 포유 동물, 또는 특정 다른 양태에서는 인간을 의미한다.
- [0288] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은, 치료되는 질환 또는 병태의 중증도에 따라 인간 및 다른 동물에게 경구, 설하, 직장, 비경구, 수조내, 질내, 복막내, (분말, 연고, 또는 점적에 의해) 국소, 안구내 (예를 들어 점안액), 불, 경구 또는 코 스프레이 등으로 투여될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 화합물은 원하는 치료 효과를 얻기 위해, 1일 1회 이상, 대상체의 체중을 기준으로 하여 약 0.01 내지 약 50mg/kg 또는 약 1 내지 약 25mg/kg의 투여량 수준으로 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.
- [0289] 경구 투여용 액상 투여 형태는, 약제학적으로 허용되는 유액, 미세 유액, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 활성 화합물 이외에, 액상 투여 형태는 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제 예를 들어 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸 포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩, 옥수수, 배아유, 올리브, 피마자, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 외에도, 경구 조성물은 애주버트, 예를 들어 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미료, 향미제 및 방향제를 포함할 수도 있다.
- [0290] 주사가능한 제제, 예를 들어 멸균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액은, 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 공지된 분야에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능한 제제는 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중 멸균 주사 용액, 현탁액 또는 에멀전, 예를 들어 1,3-부탄디올 중의 용액일 수도 있다. 허용되는 비히클 및 용매 중 물, 링거 용액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액을 사용할 수 있다. 또한, 무균 고정 오일이 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하여 임의의 블렌드 고정 오일을 사용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용된다.
- [0291] 주사 제형은, 예를 들어 세균 보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용에 앞서 멸균 수 또는 다른 멸균 주사가능한 매질에 용해 또는 분산될 수 있는 멸균 고정 조성물 형태로 멸균제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다.
- [0292] 본 발명의 화합물의 효과를 연장시키기 위해, 종종 피하 또는 근육내 주사로부터 상기 화합물의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이는 수용성이 낮은 결정질 또는 비정질 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 달성될 수 있다. 이렇게 하여, 화합물의 흡수 속도는 용해 속도에 따르며, 이는 결정 크기 및 결정성 형태에 따라 달라질 수 있다. 다르게는, 비경구 투여된 화합물 형태의 지연 흡수는, 상기 화합물을 오일 비히클에 용해 또는 현탁시킴으로써 달성된다. 주사가능한 저장소 데포(depot) 형태는 폴리락타이드-폴리글리콜라이드와 같은 생분해성 중합체에 상

기 화합물의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성함으로써 만들어진다. 화합물 대 중합체의 비 및 사용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 화합물 방출 속도를 조절할 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사 제형은 신체 조직과 양립할 수 있는 리포솜 또는 미세 유액에 상기 화합물을 포획함으로써 제조된다.

[0293] 직장 또는 질 투여용 조성물은 바람직하게는, 본 발명의 화합물을, 주위 온도에서는 고체이지만 체온에서는 액체이며, 따라서 직장 또는 질강에서 녹아 활성 화합물을 방출하는 적합한 비자극성 부형제 또는 담체, 예를 들어 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 좌약 왁스와 혼합하여 제조될 수 있다.

[0294] 경구 투여용 고형 투여 형태는, 캡슐제, 정제, 환제, 분말, 및 과립제를 포함한다. 이러한 고형 투여 형태에서, 활성 화합물은 적어도 하나의 불활성의 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 예를 들어 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제, 예를 들어, 전분, 락토오스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산, b) 결합제, 예를 들어 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리디논, 수크로스, 및 아카시아, c) 습윤제, 예를 들어 글리세롤, d) 붕해제, 예를 들어 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 및 탄산나트륨, e) 용액 지연제, 예를 들어 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예를 들어, 4급 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예를 들어 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예를 들어, 카올린 및 벤토나이트 클레이, 및 i) 윤활제, 예를 들어, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투여 형태는 완충제를 포함할 수도 있다.

[0295] 유사한 유형의 고형 조성물은, 락토오스 또는 유당, 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질-충전 및 경질-충전 젤라틴 캡슐제 내의 충전제로서 사용될 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고형 투여 형태는 약제학적 제형 분야에 널리 공지된 장용 코팅 및 기타 코팅과 같은 코팅 및 외피로 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 활성 성분(들)만을 방출되거나, 장관의 특정 부분에서 임의로 지연된 방식으로 방출되는 조성물일 수도 있다. 사용될 수 있는 임베딩(embedding) 조성물의 예는 중합체성 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고형 조성물은 락토오스 또는 유당, 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질-충전 및 경질-충전 젤라틴 캡슐제 중의 충전제로서 사용될 수 있다.

[0296] 상기 활성 화합물은 상기 주의한 바와 같은 하나 이상의 부형제와 함께 미세 캡슐화된 형태일 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고체 투여 형태는 장용 코팅, 방출 제어 코팅 및 약제학적 제형 분야에 널리 공지된 다른 코팅과 같은 코팅 및 외피로 제조될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 화합물은 하나 이상의 불활성 희석제, 예를 들어 수크로스, 락토오스 또는 전분과 혼합될 수 있다. 이러한 투여 형태는, 통상적인 실시예에서와 같이, 불활성 희석제 이외의 추가의 물질, 예를 들어 정제화 윤활제 및 다른 정제화 애주번트, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트 및 미세 결정질 셀룰로오스를 포함할 수 있다. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 투여 형태는 완충제를 포함할 수도 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 활성 성분(들)만을 방출되거나, 장관의 특정 부분에서 임의로 지연된 방식으로 방출되는 조성물일 수도 있다. 사용될 수 있는 임베딩 조성물의 예는 중합체성 물질 및 왁스를 포함한다.

[0297] 본 발명의 화합물의 국소 또는 경피 투여용 투여 형태는, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치를 포함한다. 활성 성분은 약제학적으로 허용되는 담체 및 임의의 필요한 방부제 또는 필요할 수 있는 완충제와 함께 멸균 조건 하에서 혼합된다. 안과 제제, 점이제 및 점안제도 본 발명의 범위 내에 속한다. 또한, 본 발명은 경피 패치를 사용하며, 상기 경피 패치는 신체에 대한 화합물의 제어된 전달을 제공한다. 이러한 투여 형태는 화합물을 적절한 매질에 용해 또는 분산시켜 제조할 수 있다. 흡수 촉진제는 피부를 가로지르는 화합물의 플럭스를 증가시키기 위해 사용될 수도 있다. 속도는 속도 제어막을 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 겔에 화합물을 분산시킴으로써 조절될 수 있다.

[0298] 치료되는 특정 병태 또는 질환에 따라, 상기 병태를 치료하기 위해 정상적으로 투여되는 추가의 치료제도 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 특정 질환 또는 병태를 치료하기 위해 정상적으로 투여되는 추가의 치료제는 "치료되는 질환 또는 병태에 적절한 것"으로 알려져 있다.

[0299] 하기 실시예에 나타내는 바와 같이, 특정 예시적 양태에서, 화합물은 다음의 일반 절차에 따라 제조되고 사용된다. 일반적인 방법이 본 발명의 특정 화합물의 합성을 도시함에도 불구하고, 하기의 일반적인 방법 및 당업자에게 공지된 다른 방법이 본원에 개시된 바와 같이 모든 화합물 및 이들 화합물 각각의 서브클래스 및 화학종에 대하여 적용될 수 있는 것이 이해될 것이다.

- [0300] 본원에서 인용된 각각의 문헌의 내용은 이들의 전문이 인용에 의해 본원에 포함된다.
- [0301] **실시예(exemplification)**
- [0302] **실시예 1: 마우스에 복강내 투여 후의 MRS4322의 약동학**
- [0303] **목적**
- [0304] 본 연구는, 마우스 광 혈전증 및 외상성 뇌 손상 모델에 사용된 용량을 복강내 투여한 후 MRS4322의 혈장 및 뇌 농도를 측정하기 위해 고안되었다.
- [0305] **방법**
- [0306] 화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. 분석 등급 톨부타미드를 Seventh Wave Laboratories(미주리주 메릴랜드 하이츠 소재)의 상업 공급품으로부터 입수했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.
- [0307] 동물: 텍사스대 보건 과학 센터(텍사스주 산 안토니오 소재)가 공급하는 약 0.02kg의 체중의 암컷 C576BL/6J 마우스를 본 연구에 사용했다. 모든 연구는 승인 된 텍사스대 보건 과학 센터 IACUC 프로토콜하에 실시되었다.
- [0308] 약물 투여: MRS4322를 DMSO 중에 가용화시킨 뒤, 식염수로 희석하여 투여 용액을 제조했다. MRS4322의 최종 투여 용액 농도는 100 μ M이었다. 체중 20g당 100 μ L의 투여 용액을 각 마우스에 복강내 투여하고; MRS4322를 0.16mg/kg 또는 0.5 μ mol/kg으로 복강내 투여했다. 각 샘플링 시점에 대해 3마리의 마우스에게 MRS4322를 투여했다.
- [0309] 조직 샘플링: 투여 후 0, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2 및 8시간에 혈액 및 뇌 샘플을 수득했다. 각 시점에서, 마우스(3/시점)를 일산화탄소 챔버에서 안락사시켰다. 헤파린이 들어있는 Microtainer 튜브에 심장 뚫기로 전혈을 채취하여, 혈장을 제조하기 위해 곧바로 원심 분리하고; 혈장을 -80°C에서 보관했다. 각 시점에서, 전체 뇌 샘플을 단두에 의해 수득하고, 빙냉 인산 완충 식염수로 세정하고 칭량했다. 이후 즉시 뇌 샘플을 액체 질소에서 급속 동결시키고 -80°C에서 보관했다.
- [0310] **생분석**
- [0311] MRS4322의 혈장 및 뇌 농도는 내부 표준으로서 톨부타미드를 사용하는 LC-MS/MS에 의해 측정했다. 하기 표는 사용된 LC 및 MS/MS 조건을 요약한다.

표 1: MRS4322 혈장 및 뇌 농도 측정을 위한 생분석 방법

생분석 방법			
시스템 구성요소			
모델	제조사	모델	
HPLC	Shimadzu	Prominence LC-20AD Binary Pumps	
오토샘플러	Leap	Prominence Sil-30AC	
질량 분석계	AB Sciex	4000 Qtrap	
HPLC 방법			
컬럼	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)		
용리	구배, 0.4 mL/min		
	이동상 A: 0.1% 포름산		
	이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산		
마우스 혈장 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로 사용			
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.10/182.00 Da			
피트	선형	가중치	1 / (x * x)
절편	0.000447		
기울기	0.00141		
상관 계수	0.9996		
사용 면적			
마우스 뇌 균질물 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로서 사용			
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.10/182.00 Da			
피트	선형	가중치	1 / (x * x)
절편	0.0000465		
기울기	0.000883		
상관 계수	0.9996		
사용 면적			

[0312]

[0313]

[0314]

[0315]

[0316]

각 조직 매트릭스에 대해, 표준 곡선이 생성되고 LLOQ/ULOQ 농도가 결정되었다. MRS4322 혈장 농도 표준 곡선의 교정 범위는 2.42 내지 242ng/mL였다. MRS4322 뇌 농도의 교정 범위는 2.41 내지 233ng/mL였다.

MRS4322의 뇌 농도의 생분석을 위해, 뇌 샘플을 4x 희석하여 빙냉 인산 완충 식염수에서 균질화시켰다. 생성된 희석된 뇌 균질물의 분취량들을 아세토니트릴로 처리하고 LC-MS/MS로 분석했다. 4x 균질물 희석으로 인해, MRS4322 뇌 표준 곡선의 보정 범위는 9.64 내지 932ng/gm로 변환되었다. 다수의 샘플에서 MRS4322는 검출 가능했지만, 9.64ng/gm의 뇌 LLOQ 아래로 떨어졌지만 배경 이상이었고, 이 경우, 최종 보고된 뇌 농도는 MS 피크 높이를 기준으로 외삽되었다.

결과

마우스에 복강내 투여 후, MRS4322의 농도는 혈장 및 뇌 샘플 둘 다에서 검출 가능했다(도 1a 및 표 2). 하기 실시예 11에 개시되고 도 1b 및 도 16에 도시된 바와 같이, MRS4322의 농도는 신생 돼지 혈장 및 뇌 샘플에서 검출 가능하다는 것에 주의해야 한다. 신생 돼지에게 정맥내 투여 후, 혈장, 뇌, 뇌 세포외액 및 뇌척수액 샘플

플에서 MRS4322의 농도가 검출가능했다(도 1b 및 도 16, 표 13).

표 2: 복강내 투여 후 마우스의 MRS4322 의 혈장 및 뇌 농도

그룹	매트릭스	시험 항목	용량 (mg/kg)	시간 (h)	대상체에 의한 혈장 농도 (ng/mL)					
					A	B	C	평균	SD	N
1	혈장	MRS4322	0.16	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0.083	40.2	42.5	65.8	49.5	14.2	3
				0.25	37.5	41.6	46.3	41.8	4.40	3
				0.5	14.8	26.8	21.6	21.1	6.00	3
				1	7.35	4.23	85.0*	5.79	NA	2
				2	0.539 [†]	0.638 [†]	1.15 [†]	0.776	0.328	3
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
그룹	매트릭스	시험 항목	용량 (mg/kg)	시간 (h)	대상체에 의한 뇌 농도 (ng/g)					
					A	B	C	평균	SD	N
1	뇌	MRS4322	0.16	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0.083	2.04 [†]	2.18 [†]	2.55 [†]	2.11	0.100	3
				0.25	3.08 [†]	3.03 [†]	3.43 [†]	3.06	0.0400	3
				0.5	1.77 [†]	3.00 [†]	1.81 [†]	2.39	0.870	3
				1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0

BLQ = 정량 한한 이하(혈장의 경우 2.40 ng/mL, 뇌의 경우 4x 희석으로 인해 9.64 ng/g)

* 1 시간에서의 값이 85.0 인 동물 F는 이상치였으며, 요약 통계에서 제외했다

[†] 계산된 농도는 <LLOQ 이었다. 보고된 값들은 외삽된다

[0317]

[0318]

혈장 농도는 Tmax, Cmax, 반감기 및 AUC의 초기 추정을 가능케했다(표 3).

표 3: 복강내 투여 후 마우스에서의 MRS4322 의 혈장 약동학

그룹	매트릭스	분석물	용량 (mg/kg)	동물 ID	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	AUC _{0-∞} (hr*ng/mL)	반감기 (hr)
1	혈장	MRS4322	0.16	A	40.2	0.083	24.2	24.4	0.306
				B	42.5	0.083	27.5	27.8	0.288
				C	65.8	0.083	37.6	38.2	0.337
				N	3	3	3	3	3
				평균	49.5	0.083	29.8	30.1	0.310
				SD	14.2	0.000	7.01	7.19	0.0247
				CV%	28.6	0.0	23.5	23.8	8.0

주: BLQ 값은 0으로 전환되었으며, 외삽된 값은 포함되었으며, 1 시간에서의 동물 F는 PK 분석에서 제외되었다

[0319]

[0320]

뇌 농도가 검출가능했지만, 데이터는 Cmax 및 Tmax 이외의 반감기 또는 다른 약동학 파라미터의 평가에 대해서는 불충분했다. 그러나, 이용 가능한 혈장 및 뇌 데이터에 기초하여, 총 약물의 뇌/혈장 비는 혈장 및 뇌의 평균 Cmax 농도에 기초하여 약 0.06이었다.

[0321]

이 결과는, 광 혈전증 및 외상성 뇌 손상의 모델에서 사용된 투여 조건 하에서 마우스에게 복강내 투여한 뒤 MRS4322의 순환 혈장 농도가 검출가능하다는 것, 및 MRS4322가 이들 투여 조건 하에 뇌에 분포된다는 것을 확인한다.

[0322]

실시예 2: MRS2365를 마우스에 복강내 투여한 후 MRS4322의 약동학

[0323]

목적

- [0324] 본 연구는, 마우스 광 혈전증 및 외상성 뇌 손상 모델에 사용된 용량에서 P2Y₁ 작용제인 MRS2365의 복강내 투여 후에 MRS4322의 혈장 및 뇌 농도를 측정하기 위해 고안되었다.
- [0325] 방법
- [0326] 화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. MRS2365를 Tocris Biosciences(영국 브리스톨 소재)로부터 입수했다. 분석 등급 톨부타미드를 Seventh Wave Laboratories(미주리주 메릴랜드 하이츠 소재)의 상업 공급품으로부터 입수했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.
- [0327] 동물: 텍사스대 보건 과학 센터(텍사스주 산 안토니오 소재)가 공급하는 약 0.02kg의 체중의 암컷 C576BL/6J 마우스를 본 연구에 사용했다. 모든 연구는 승인 된 텍사스대 보건 과학 센터 IACUC 프로토콜 하에 실시되었다.
- [0328] 약물 투여: MRS2365를 인산 완충 식염수 중에 가용화시킨 뒤, 인산 완충 식염수로 희석하여 투여 용액을 제조했다. MRS2365의 최종 투여 용액 농도는 100 μM이었다. 체중 20g당 100 μL의 투여 용액 용적을 각 마우스에 복강내 투여하고; MRS2365를 0.5 μmol/kg 또는 0.24mg/kg으로 복강내 투여했다. 각 샘플링 시점에 대해 3마리의 마우스에게 MRS2365를 투여했다.
- [0329] 조직 샘플링: 투여 후 0, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2 및 8시간에 혈액 및 뇌 샘플을 수득했다. 각 시점에서, 마우스(3/시점)를 일산화탄소 챔버에서 안락사시켰다. 헤파린이 들어있는 Microtainer 튜브에 심장 뚫기로 전혈을 채취하여, 혈장을 제조하기 위해 곧바로 원심 분리하고; 혈장을 -80°C에서 보관했다. 각 시점에서, 전체 뇌 샘플을 단두에 의해 수득하고, 빙냉 인산 완충 식염수로 세정하고 칭량했다. 이후 즉시 뇌 샘플을 액체 질소에서 급속 동결시키고 -80°C에서 보관했다.
- [0330] 생분석: 이전의 연구들은 복강내 또는 정맥내 투여 후에 MRS2365의 검출가능한 순환 및 뇌 농도가 관찰되지 않았음을 입증하였고, 따라서 본 연구는 대사물인 MRS4322의 검출 및 정량에만 초점을 맞추었다. MRS4322의 혈장 및 뇌 농도는 내부 표준으로서 톨부타미드를 사용하는 LC-MS/MS에 의해 측정했다. 하기 표는 사용된 LC 및 MS/MS 조건을 요약한다.

표 4: MRS4322 의 혈장 및 뇌 농도 측정을 위한 생분석 방법

생분석 방법			
시스템 구성요소			
모델	제조사	모델	
HPLC	Shimadzu	Prominence LC-20AD Binary Pumps	
오토샘플러	Leap	Prominence Sil-30AC	
질량 분석계	AB Sciex	4000 Qtrap	
HPLC 방법			
컬럼	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)		
용리	구배, 0.4 mL/min		
	이동상 A: 0.1% 포름산		
	이동상 B: 0.1% 아세트오니트릴 중 포름산		
마우스 혈장 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로서 사용			
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.10/182.00 Da			
피트	선형	가중치	1 / x
절편	0.000704		
기울기	0.00151		
상관 계수	0.9998		
사용 면적			
마우스 뇌 균질물 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로서 사용			
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.10/182.00 Da			
피트	선형	가중치	1 / x
절편	0.000209		
기울기	0.000864		
상관 계수	1.00		
사용 면적			

[0331]

[0332]

각 조직 매트릭스에 대해, 표준 곡선이 생성되고 LLOQ/ULOQ 농도가 결정되었다. MRS4322 혈장 농도 표준 곡선의 교정 범위는 2.26 내지 241ng/mL였다. MRS4322 뇌 농도의 교정 범위는 2.35 내지 242ng/mL였다.

[0333]

MRS4322의 뇌 농도의 생분석을 위해, 뇌 샘플을 4x 희석하여 빙냉 인산 완충 식염수에서 균질화시켰다. 생성된 희석된 뇌 균질물의 분취량들을 아세트오니트릴로 처리하고 LC-MS/MS로 분석했다. 4x 균질물 희석으로 인해, MRS4322 뇌 표준 곡선의 보정 범위는 9.40 내지 968ng/gm로 변환되었다. 다수의 샘플에서 MRS4322는 검출 가능했지만, 9.40ng/gm의 뇌 LLOQ 아래로 떨어졌지만 배경 이상이었고, 이 경우, 최종 보고된 뇌 농도는 MS 피크 높이를 기준으로 의심되었다.

[0334]

결과

[0335]

마우스에 MRS2365의 복강내 투여 후, MRS4322의 농도는 혈장 및 뇌 샘플 둘 다에서 검출 가능했다(도 2 및 표 5).

표 5: MRS2365의 복강내 투여 후 마우스에서의 MRS4322의 혈장 및 뇌 농도

그룹	매트릭스	시험 항목	용량 (mg/kg)	시간 (h)	대상체에 의한 혈장 농도 (ng/mL)					
					A	B	C	평균	SD	N
1	혈장	MRS4322	0.24 MRS2365	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0.083	24.5	64.1	82.8	57.1	29.8	3
				0.25	46.5	43.2	47.4	45.7	2.20	3
				0.5	22.3	25.1	31.0	26.1	4.40	3
				1	2.30	4.02	3.53	3.28	0.890	3
				2	BLQ	1.02*	0.680*	0.850	NA	2
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
그룹	매트릭스	시험 항목	용량	시간 (h)	대상체에 의한 뇌 농도 (ng/g)					
					A	B	C	평균	SD	N
1	뇌 ^a	MRS4322	0.24 MRS2365	0	2.76*	10.0	4.61*	5.79	3.76	3
				0.083	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0.25	3.92*	3.26*	4.16*	3.78	0.470	3
				0.5	3.19*	2.80*	2.70*	2.90	0.260	3
				1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0

BLQ = 정량 하한 이하 (혈장의 경우 2.26 ng/mL; 뇌의 경우 4 배 희석으로 인해 9.40 ng/g)

* 프로젝티드 값; 이들 값은 정량 한계 이하였다

^a 0 및 0.083 샘플들은 수령시 잘못 표지되었을 수 있음

[0336]

[0337]

혈장 농도는 Tmax, Cmax, 반감기 및 AUC의 초기 추정을 가능케했다(표 6).

표 6: MRS2365의 복강내 투여 후 마우스에서의 MRS4322의 혈장 약동학

그룹	매트릭스	분석물	용량 (mg/kg)	동물 ID	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	AUC _{INF} (hr*ng/mL)	반감기 (hr)
1	혈장	MRS4322	0.24 MRS2365	A ^a	46.5	0.25	21.7	22.3	0.17
				B	64.1	0.08	30.0	30.5	0.34
				C	82.8	0.08	34.8	35.1	0.28
				N	3	3	3	3	3
				평균	64.5	0.14	28.8	29.3	0.27
				SD	18.2	0.10	6.65	6.51	0.09
				CV%	28.2	69.5	23.1	22.2	33.1

BLQ 값은 0으로 전환되었으며; 외삽된 값은 PK 분석에 포함되었다

[0338]

[0339]

뇌 농도가 검출가능했지만, 데이터는 Cmax 및 Tmax 이외의 반감기 또는 다른 약동학 파라미터의 평가에 대해서는 불충분했다. 그러나, 이용 가능한 혈장 및 뇌 데이터에 기초하여, 총 약물의 뇌/혈장 비는 혈장 및 뇌의 평균 Cmax 농도에 기초하여 약 0.10이었다.

[0340]

이 결과는, 광 혈전증 및 외상성 뇌 손상의 모델에서 사용된 투여 조건 하에서 마우스에게 P2Y₁ 작용제 MRS2365를 복강내 투여한 뒤 MRS4322의 순환 혈장 농도가 검출가능하다는 것, 및 MRS4322가 이들 투여 조건 하에 뇌에 분포된다는 것을 확인한다.

[0341]

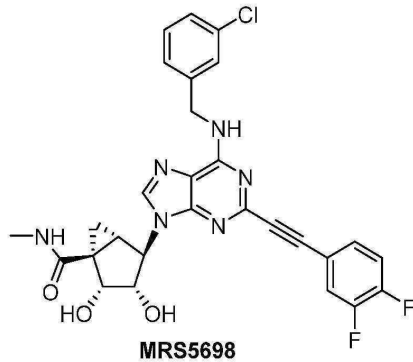
MRS4322 혈장 및 뇌 농도는, MRS4322 그 자체의 복강내 투여 후(실시에 1 참조) 그리고 P2Y₁ 작용제 MRS2365의 복강내 투여 후의 두 가지 상이한 연구로 결정되었다. 이러한 연구 둘 다에서 MRS4322 또는 MRS2365는 0.5 μmol/kg의 등가물 용량으로 투여되었다. 두 연구의 결과를 비교해 보면, 관찰된 MRS4322의 혈장 농도는 사실상 동일했고, MRS4322의 뇌 농도는 매우 유사했다(도 1과 도 2 비교). 등가물 용량의 MRS4322 또는 MRS2365 투여

후 MRS4322의 반감기 및 AUC 값에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이 데이터는 마우스에 복강내 투여 후 MRS2365가 MRS4322로 신속하고 완전하게 대사되어, MRS4322의 혈장 및 뇌 약동학이 MRS4322 자체의 복강내 투여 후와 매우 유사함을 나타낸다.

[0342] **실시예 3: 마우스에서의 MRS4322의 혈장 및 뇌 결합**

[0343] **목적**

[0344] 본 연구는 마우스에서 MRS4322의 혈장 및 뇌가 없는 분획을 결정하고, 유리 분획을 원형 아데노신 A₃ 수용체 작용제인 MRS5698의 분획과 비교하기 위해 고안되었다. MRS5698은 다음의 화학 구조를 갖는다:



[0345]

[0346] **방법**

[0347] 화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. MRS5698을 Tocris Biosciences(영국 브리스톨 소재)로부터 입수했다. 분석 등급 설펜메탁사졸 및 와파린을 Seventh Wave Laboratories(미주리주 메릴랜드 하이츠 소재)의 상업 공급품으로부터 입수했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.

[0348] 동물 및 조직 제조: 동물 및 조직 제조: 수컷 CD-1 마우스로부터의 혈장을 BioreclamationIVT(뉴욕주 웨스트버리 소재)로부터 입수하고, 사용시까지 -80°C에서 저장했다. 수컷 CD-1 마우스의 뇌를 BioreclamationIVT(뉴욕주 웨스트버리 소재)로부터 입수했다.

[0349] 혈장 한외 여과물 블랭크 샘플을, 냉동 혈장을 해동시킨 후 가습된 5% CO₂ 챔버에서 37°C에서 60분 동안 예비 가온시킴으로써 제조했다. 800 μL의 분취량을 Centrifree Centrifugal Filters(Ultracel 재생 셀룰로오스 (NMWL 30,000amu) Lot R5JA31736)에 옮기고, 2900RPM으로 37°C에서 10분간 원심분리하고, 혈장 물 여과물을 수집하여 표준물, 블랭크 및 QC 표준물의 준비에 사용했다.

[0350] 뇌를 칭량하고 Omni 조직 균질화기를 사용하여 pH 7.4의 1:9 인산염 완충 식염수로 균질화했다. 4 마리의 마우스로부터의 뇌를 균질화시키고, 모으고 혼합하여 하나의 샘플을 형성했다.

[0351] 혈장 결합 결정: MRS4322, MRS5698, 설펜메탁사졸 및 와파린을 DMSO 중에 가용화시킨 뒤 1:1의 아세트니트릴:물에 희석하여 100 μM 투석 원액을 제조했다. 설펜메탁사졸 및 와파린을 알려진 혈장 결합 값을 가진 연구 표준물로서 사용했다. 혈장 샘플을 가습된 5% CO₂ 항온처리기에서 37°C에서 60분간 예비 가온했다. 예비 가온된 혈장의 3mL의 분취량들을, 100 μM 원액을 사용하여 각각 MRS4322, MRS5698, 설펜메탁사졸 또는 와파린으로 스파이크(spike)하여, 각 화합물에 대하여 1 μM의 최종 시험 농도를 생성했다. 스파이크된 혈장 샘플을 가습된 5% CO₂ 챔버에서 37°C에서 회전 믹서로 최소 60분 동안 항온처리했다. 60분 후, 각 샘플의 800 μL의 분취량을 Centrifree 원심분리 필터에 첨가했다. 필터를 2900rpm에서 10분 동안 37°C에서 원심분리시켰다. 3개의 100 μL 분취량의 잔류 혈장을 생분석을 위한 한외 여과물과 함께 수집했다.

[0352] 뇌 결합 결정: MRS4322, MRS5698, 설펜메탁사졸 및 와파린을 DMSO 중에 가용화시킨 뒤 1:1의 아세트니트릴:물에 희석하여 100 μM 투석 원액을 제조했다. 수집된 균질화된 뇌를, 37°C로 유지되는 가습된 5% CO₂ 항온처리기에서 60분간 예비 가온했다. 뇌 균질물의 3mL의 분취량들을, 100 μM 원액을 사용하여 각각 MRS4322, MRS5698, 설펜메탁사졸 또는 와파린으로 스파이크하여, 각 화합물에 대하여 1 μM의 최종 스파이크 농도를 생성했다. 스파이크된 수집된 뇌 균질물을 가습된 5% CO₂ 항온처리기 중의 Nutator 믹서에서 37°C에서 60분 동안

항온처리했다. 60분 후, 각 샘플의 3개의 800 μL의 분취량을 Centrifree 원심분리 필터에 첨가했다. 필터를 2900rpm에서 10분 동안 37°C에서 원심분리시켰다. 잔류 뇌 균질물 및 한외 여과물의 분취량을 생분석을 위해 수집했다.

[0353] 생분석

[0354] 스파이크된 혈장, 뇌 균질물 및 관련 한외 여과물에서의 MRS4322 및 MRS5698의 혈장 및 뇌 농도는, 내부 표준으로서 톨부타미드를 사용하는 LC-MS/MS에 의해 결정되었다. 설파메탁사졸 및 와파린의 관련 농도도 표준 조건을 사용하여 LC-MS/MS로 측정했다(데이터는 도시하지 않음). 하기 표는 사용된 LC 및 MS/MS 조건을 요약한다(표 7 및 표 8). 생분석 방법은 모든 매트릭스에 대해 동일했다: 표준 곡선 통계(예를 들어, 피트, 절편, 경사, 상관 계수)가 각 매트릭스에 대해 결정되었지만 유의한 차이가 없었으므로, 각 매트릭스에 대해 도시되지 않았다.

표 7 : 혈장, 뇌 균질물, 혈장 한외 여과물 및 뇌 균질물 한외 여과물 농도를 측정하기 위한

MRS4322의 생분석 방법

혈장, 뇌 균질물, 혈장 한외 여과물 및 뇌 균질물 한외 여과물 샘플의 생분석			
시스템 구성요소			
모델	제조사	모델	
HPLC	Shimadzu	Prominence LC20AD Binary Pumps	
오토샘플러	CTC Leap	HTC PAL	
질량 분석계	AB Sciex	API 4000	
HPLC 방법			
컬럼	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)		
용리	구배, 0.4 mL/min		
	이동상 A: 0.1% 물 중 포름산		
	이동상 B: 0.1% 아세토니트릴 중 포름산		
질량 분석계 Conditions for MRS4322			
피크명: MRS4322			
Q1/Q3 질량: 324.10/182.00 Da			
피크명: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da			
피트	선형	가중치	1/x
절편	0.0181		
기울기	0.00192		
상관 계수	0.9988		

[0355]

표 8: 혈장, 뇌 균질물, 혈장 한외 여과물 및 뇌 균질물 한외 여과물 농도를

측정하기 위한 MRS5698의 생분석 방법

시스템 구성요소			
모델	제조사	모델	
HPLC	Shimadzu	Prominence LC20AD Binary Pumps	
오토샘플러	CTC Leap	HTC PAL	
질량 분석계	AB Sciex	API 4000	
HPLC 방법			
컬럼	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)		
용리	구배, 0.4 mL/min		
	이동상 A: 0.1% 물 중 포름산		
	이동상 B: 0.1% 아세토니트릴 중 포름산		
질량 분석계 Conditions for MRS5698			
피크명: MRS5698			
Q1/Q3 질량: 565.10/395.90 Da			
피크명: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da			
피트	선형	가중치	1 / x
절편	0.107		
기울기	0.00786		
상관 계수	0.9986		

[0356]

[0357]

각 조직 매트릭스에 대해, 표준 곡선이 생성되고 LLOQ/ULOQ 농도가 결정되었다. MRS4322 및 MRS5698 혈장 농도 표준 곡선의 교정 범위는 400 내지 1200nM이었다. MRS4322 및 MRS5698 혈장 한외 여과 표준 곡선의 교정 범위는 100 내지 1200nM이었다. MRS4322 뇌 균질물 및 뇌 균질물 한외 여과물 표준 곡선의 보정 범위는 각각 400 내지 1200 nM 및 100 내지 1200nM이었다. MRS5698 뇌 균질물 및 뇌 균질물 한외 여과물 표준 곡선의 보정 범위는 각각 400 내지 1200 nM 및 1 내지 500nM이었다.

[0358]

결과

[0359]

혈장 한외 여과를 이용하여 MRS4322 및 MRS5698에 대한 혈장 결합 및 유리 분획을 측정했다. MRS4322에 대한 혈장 결합은 25.8%였고, 관련 유리 분획은 0.742였다(표 9).

[0360]

MRS5698 농도는 혈장 한외 여과물에서 검출되지 않았으며, MRS5698은 Centrifree 장치의 기증자 측으로부터 얻은 잔류 스파이크된 혈장 샘플에서 완전히 회복되었다(데이터는 표시되지 않음). 이는 낮은 MRS5698 한외 여과물 농도가 화합물의 낮은 분석 회수 때문이 아님을 나타낸다. 전반적으로, 이들 데이터는 문헌(Tosh, D.K. et al. Purinergic Signaling (2015) 11:371-387)에 보고된 마우스의 혈장 및 조직에서의 MRS5698의 높은 단백질 결합률(99.88%)과 일치한다. 연구 표준물인 설파메톡사졸 및 와파린의 결합은 문헌의 값과 일치했다.

표 9: 마우스 혈장 중 MRS4322 및 MRS5698의 비결합 및 결합 분획

기질	비결합 분획		% 결합		N
	평균	SD	평균	SD	
MRS4322	0.742	0.065	25.8	6.5	3
MRS5698	*	*	*	*	3
설파메톡사졸	0.345	0.027	65.5	2.7	3
와파린	0.0485	0.0031	95.1	0.3	3

* MRS5698의 혈장 한외 여과물 농도는 BLQ였다

[0361]

[0362]

뇌 균질물 한외 여과를 이용하여 MRS4322 및 MRS5698에 대한 뇌 결합 및 유리 분획을 측정했다. MRS4322에 대한 뇌 결합은 87%였고, 관련 유리 분획은 0.13였다(표 10).

[0363]

MRS5698 농도는 뇌 균질물 한외 여과물에서 검출되지 않았다. 추정 목적으로, MRS5698 뇌 균질물 한외 여과물의 LLOQ를 뇌 결합률 값을 계산하기 위해 사용했다. 얻어진 뇌 결합률 값은 99.99%였다. 전반적으로, 이들 데

이터는 문헌(Tosh, D.K. et al. Purinergic Signaling (2015) 11:371-387)에 보고된 마우스의 혈장 및 조직에서의 MRS5698의 높은 단백질 결합률(99.88%)과 일치한다. 연구 표준물인 설파메탁사졸 및 와파린의 결합은 문헌의 값과 일치했다.

표 10: 마우스 뇌 균질물 중 MRS4322 및 MRS5698의 비결합 및 결합 분획

검정	기질	비결합 분획		% 결합		N
		평균	SD	평균	SD	
1	MRS4322	0.130	0.010	87.0	1.0	3
	MRS5698	<0.000122*	---	>99.99*	---	3
	설파메탁사졸	0.431	0.049	56.9	4.9	3
	와파린	0.208	0.038	79.2	3.8	3

* MRS5698은 한외 여과물에서 검출되지 않았으며; 검정 LLOQ는 추정 결합값을 계산하기 위해 사용했다

[0364]

[0365]

전반적으로, 이들 데이터는 MRS4322가 혈장 및 뇌 둘 다에서 아데노신 A₃ 작용제인 MRS5698보다 실질적으로 더 높은 유리 분획 및 더 낮은 단백질 결합을 갖는다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 주어진 총 혈장 또는 뇌 농도에 대해, MRS5698에 대하여 사용 가능한 것보다 실질적으로 더 높은 농도의 MRS4322가 작동기 자리와 상호 작용할 수 있음을 나타낸다.

[0366]

실시예 4: 마우스 및 인간의 혈액 및 혈장에서의 MRS2365의 시험관내 안정성 및 대사

[0367]

목적

[0368]

본 연구는, 마우스 및 인간 혈액 및 혈장에서 P2Y₁ 작용제 MRS2365의 시험관내 안정성 및 대사 경로를 결정하기 위해 고안되었다.

[0369]

방법

[0370]

화학 물질: MRS2365를 Tocris Biosciences(영국 브리스톨 소재)로부터 입수했다. MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다. 에날라프릴 및 프로카인을 각각 마우스와 인간의 혈장 및 혈액 안정성 표준으로 사용했다.

[0371]

조직 제조: 수컷 CD-1 마우스 및 인간로부터의 혈장을 BioreclamationIVT(뉴욕주 웨스트버리 소재)로부터 입수하고, 사용시까지 -80°C에서 저장했다. 전혈을, Seventh Wave Laboratories(미주리주 메릴랜드 하이츠 소재)에서 수컷 CD-1 마우스 및 인간 지원자로부터 입수했다. 혈장 및 혈액 샘플은 항응고제로서 EDTA(1mM) 또는 리튬 헤파린을 사용하여 제조했다.

[0372]

혈장 안정도 측정: MRS2365, 에날라프릴 및 프로카인을 pH 7.4의 인산염 완충 식염수에 가용화시켰다. (혈액과 EDTA 또는 항응고제인 리튬 헤파린으로부터 제조된) 혈장 샘플을 37°C로 유지된 가습된 5% CO₂ 항온처리기에서 60분간 예비 가온했다. 안정한 항온처리를 MRS2365(최종 농도 1 μM)의 첨가로 개시했다. EDTA 생성 혈장의 안정성에 대한 초기 평가는 0, 10, 30, 60, 120 및 240분의 항온처리 시점을 이용했다(도 3 및 도 4). EDTA 생성 및 헤파린 생성 혈장을 비교하는 후속 연구는 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 및 30분의 항온처리 시점을 이용했다(도 7). 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 및 90초의 시점을 사용하여, EDTA 생성 및 헤파린 생성 혈장을 비교하는 추가의 혈장 안정성 항온처리를 실시했다(도 8). 대사물 정찰 분석을 위해, MRS2365를 100 μM 농도의 헤파린 처리된 인간 혈장에서 10분 또는 30분 동안 항온처리했다(도 9). 모든 연구에서, 혈장은 즉시 microtainer 튜브에 넣고, 드라이 아이스에서 얼려 분석할 때까지 -80°C에서 보관했다.

[0373]

혈액 안정도 측정: MRS2365, 에날라프릴 및 프로카인을 pH 7.4의 인산염 완충 식염수에 가용화시켰다. (EDTA 또는 리튬 헤파린 처리된) 혈액 샘플을 37°C로 유지된 가습된 5% CO₂ 항온처리기에서 60분간 예비 가온했다. 안정한 항온처리를 MRS2365(최종 농도 1 μM)의 첨가로 개시했다(도 5 및 도 6). 혈액 샘플 분취량을 0, 1, 2.5, 7.5, 10 및 30분에 수득하고 microtainer 튜브에 넣었다. 대사물 정찰 분석을 위해, MRS2365를 100 μM 농도의 헤파린 처리된 인간 전혈에서 10분 또는 30분 동안 항온처리했다(도 10). 모든 연구에서, 혈장은 즉시 4°C에서 원심분리에 의해 제조하여 microtainer 튜브에 넣고, 드라이 아이스에서 얼려 분석할 때까지 -80°C에서

보관했다.

[0374] 생분석

[0375] MRS2365의 혈장 및 뇌 농도를, 내부 표준으로서 톨부타미드를 사용하는 LC-MS/MS에 의해 측정했다. 하기 표는 사용된 LC 및 MS/MS 조건을 요약한다(표 11). 생분석 방법은 모든 매트릭스에 대해 동일했다: 표준 곡선 통계(예를 들어, 피트, 절편, 경사, 상관 계수)가 각 매트릭스에 대해 결정되었지만 유의한 차이가 없었으므로, 각 매트릭스에 대해 도시되지 않았다.

표 11: 시험관내 안정성 측정에서 혈장 및 혈액 농도의 측정을 위한 MRS2365 에

대한 생분석 방법

생분석 방법 - 혈장 및 혈액		
시스템 구성요소		
모델	제조사	모델
HPLC	Shimadzu	Prominence
오토샘플러	Leap	CTC Pal
질량 분석계	AB Sciex	API 4000
HPLC 방법		
컬럼	Luna C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)	
용리	구배, 0.4 mL/min	
	이동상 A: 2 mM 아세트산암모늄, pH 7.65	
	이동상 B: 2 mM 아세트오니트릴 중 아세트산암모늄	
혈장 및 혈액 중 MRS2365 에 대한 MS 검출 및 교정		
피크명: 톨부타미드 내부 표준으로서 사용 Q1/Q3 질량: 269.00/170.00 Da		
피크명: MRS2365 내부 표준: 톨부타미드 Q1/Q3 질량: 482.11/384.00 Da		
피트	선형	가중치 1 / (x * x)
절편	0.00004	
기울기	0.00002	
상관 계수	0.9854	
사용 연적		

[0376]

[0377] 각 조직 매트릭스에 대해, 표준 곡선이 생성되고 LLOQ/ULOQ 농도가 결정되었다. MRS2365 혈장 및 혈액 농도 표준 곡선의 교정 범위는 5 내지 5000ng/mL였다. 품질 관리 샘플을 32, 160, 800 및 4000ng/mL의 농도로 사용했다.

[0378] 혈장 및 혈액 샘플을 LC-MS/MS 기반 "대사물 정찰" 프로토콜을 이용하여 MRS2365 대사물에 대해 정성 분석했다. 다른 뉴클레오타이드(예를 들어 ATP, ADP)의 대사 경로를 검토한 결과, MRS2365의 가장 가능성 있는 대사물은 탈인산화된(즉, 모노포스페이트) 대사물(MRS2347, mw = 403.07)이고/이거나 완전히 탈 인산화 된 리보사이드 대사물(MRS4322, mw = 323.10)일 것이라는 가설을 세웠다. 리보사이드 MRS4322가 우선적으로 양이온을 생성하는 동안 인산화된 화합물이 음이온을 우선적으로 생성할 것으로 예상되었기 때문에, 혈액 및 혈장 샘플을 모 화합물(parent compound) 및 대사물에 대한 양이온 및 음이온 LC/MS-MS로 분석했다. 양이온 모드에서, 추출된 이온 크로마토그램은 323.7 내지 324.7 및 403.7 내지 404.7의 범위에서 질량을 모니터링하여, MRS4322 및 MRS2347 각각에 대해 정찰했다. 이 범위의 모든 이온 피크를 추가로 분석하여 이들 이온 크로마토그램 피크에 대한 생성물 이온 스펙트럼을 생성했다. 음이온 모드에서, 추출된 이온 크로마토그램은 각각 321.70 내지 322.70, 401.70 내지 402.70 및 481.70 내지 482.70의 범위에서 질량을 모니터링하여, MRS4322, MRS2347 및 MRS2365 각각에 대해 정찰했으며, 피크를 추가로 분석하여 생성물 이온 스펙트럼을 생성했다. MRS4322 및 MRS2347의 실제 표준을 이용할 수 없었기 때문에, 이온화 효율의 전위 차이로 인해 이온 피크 높이/면적을 비교할 수 없으므로, 대사물의 정성적 식별만 가능했다.

[0379] 결과

[0380] 마우스 및 인간 혈장에서의 MRS2365의 혈장 안정성을 평가하는데 2개의 시간 경과 프로토콜을 사용했다. 예비

데이터는 240분의 시간 과정에 걸쳐 EDTA 제조 플라즈마로 생성되었다. 후속 연구는 항온처리 후 1 내지 30 분의 시점을 이용했고, 최종 연구는 항온처리 후 5 내지 90초의 보다 짧은 시간 과정을 이용했다. 모든 프로토콜에서, 항응고제로서 EDTA 또는 리튬 헤파린 중 하나를 사용하여 혈액으로부터 제조된 혈장에서의 혈장 안정성을 분석했다. 혈장 및 전혈에서의 에날라프릴(마우스) 및 프로카인(인간)에 대한 시험관내 안정성 데이터는 공개된 값과 일치했다(데이터는 나타내지 않음).

[0381] EDTA 제조된 혈장을 이용하는 혈장 안정성 연구에서, MRS2365는 항온처리 후 240분의 항온처리 과정 동안 본질적으로 안정했다(도 3 및 도 4). 반감기 값은 항온처리 시간 과정에 따라 계산할 수 없으므로, >240분이다. 후속 대사물 정찰 분석에서, MRS2347 또는 MRS4322는 검출할 수 없었다. 이러한 데이터는 MRS2365가 마우스 및 인간 혈장에서 시험관내에서 안정함을 시사했다.

[0382] 항 응고 인자로서 EDTA로 처리한 마우스 및 인간 전혈에서 MRS2365의 안정성을 평가할 때 유사한 관찰이 이루어졌다(도 5 및 도 6). 이러한 연구에서 EDTA 처리된 마우스 전혈에서의 MRS2365의 반감기는 47분으로, EDTA가 이 매트릭스에서 MRS2365의 청소를 완전히 억제하지 못했다는 것을 시사한다. 그러나, MRS2365는 EDTA 처리한 인간 전혈에서 다시 완전히 안정적이었으며 예상 반감기는 >240분이었다. 이 전혈 연구에서 대사물은 검출되지 않았다.

[0383] 이들 데이터는, MRS2365가 심장 출력에 근접한 속도로 신속하게 청소되는 것으로 보이는, 혈장 제조용 혈액 항응고제로서 헤파린을 사용하는 마우스에서의 MRS2365의 초기 생체내 약동학 평가와 일치하지 않아, 화합물의 광범위한 간외 청소를 시사한다. EDTA는, 세포 막 표면에 존재하고 혈액 및 혈장 내에서 순환하는, 뉴클레오타이드의 탈인산화에 관여하는 효소인 엑토뉴클레오타이드제의 효소 활성화에 필요한 2가 양이온을 킬레이트화하는 것으로 알려져있다(문헌[Ziganshin et al. Pflugers Arch. (1995) 429:412-418] 참조). 따라서 P2Y₁ 작용제 뉴클레오타이드 유사체 MRS2365의 1차 대사 경로는, 상기 개시한 연구에서 혈장과 전혈을 제조하는 데 사용된 EDTA에 의해 완전히 억제되었을 가능성이 있다.

[0384] 이러한 가능성을 조사하기 위해, EDTA 또는 리튬 헤파린에 의해 생성된 혈장 중 MRS2365의 안정성을 비교하기 위해 추가의 안정성 연구를 실시했는데, 리튬 헤파린은 엑토뉴클레오타이드제에 대한 억제 효과는 보고되지 않은 항응고제이다. 연구는 헤파린 처리된 혈장 및 전혈을 사용하여 0 내지 30분의 시간에 걸쳐 처음 실시되었다. MRS2365 농도의 정량화는 시험관내 반감기를 계산하기에는 불충분한 데이터로, 모든 시점에서 매우 낮은 농도의 MRS2365를 나타냈다(데이터는 나타내지 않음). 이 연구에서 최단 시간(0분 및 1분)에서도 낮은/검출불가능한 MRS2365 농도가 관찰됐기 때문에, EDTA 처리된 그리고 헤파린 처리된 혈장 둘 다의 시험관내 안정성을 비교하고, 시험관내 반감기를 계산하고자 시도하기 위해, 상당히 보다 짧은 시간(0 내지 90초) 동안 연구를 반복했다. 이러한 보다 짧은 연구에서, MRS2365는 EDTA 처리 마우스 및 인간 혈장에서 상대적으로 안정했으며(도 5 및 도 6), MRS2365 농도의 가변성은, 짧은 시간 경과와 개시시의 불완전한 혼합 및 90초 항온처리 과정 동안 여러 시점의 샘플링에서의 다양성으로 인한 것 같다. 그러나, 헤파린 처리된 혈장에서, MRS2365 농도는 최단 시점(0초 및 5초)에서도 극히 낮았다. MRS2365는 인산염 완충 식염수에서 항온처리한 경우 완전히 안정했다.

[0385] 함께, 이러한 데이터는 MRS2365가 본질적으로 용액에서 안정적이지만, EDTA에 의해 억제되는 과정에 의해 마우스 및 인간의 혈장 및 혈액에서 급속하게 분해된다는 것을 시사한다. MRS2365가 뉴클레오타이드 유사체이고, EDTA가 뉴클레오타이드를 탈인산화시키는 엑토뉴클레오타이드제의 공지된 억제제인 것을 고려하면, 이러한 데이터는, 마우스에서 MRS2365에 대해 생성된 생체내 약동학적 데이터와 일치하는, MRS2365가 혈장 및 전혈에서 급속한 탈인산화에 대해 감수성임을 강력히 시사한다.

[0386] 마우스 및 인간 혈장 및 전혈에서의 불안정성의 원인인 MRS2365의 탈인산화 가능성을 추가로 조사하기 위해, 100 μM의 MRS2365를 10분 또는 30분 동안 항온처리한 후, 헤파린 처리된 인간 혈장 및 전혈에서 대사물 정찰을 실시했다. 보다 더 높은 기질 농도가 임의의 형성된 대사물의 검출을 보장하기 위해 사용되었다. 양이온화 조건 하에서의 대표적인 이온 크로마토그램 및 생성물 이온 스펙트럼이 예시된다(도 7 및 도 8). 음이온화 크로마토그램 및 생성물 이온 스펙트럼은 유사한 결과를 얻었다(데이터는 나타내지 않음). 화학적 표준물의 부재로 인해 대사물의 절대 농도가 결정되지는 않더라도, 대사물 M1의 상대적 존재량은 항온처리 후 10분부터 30분까지 대사물 M2와 비교하여 증가했다. 두 이온화 조건 하에서의 대사물 M2 및 M1의 모 이온 크로마토그램 및 결과 생성물 이온 스펙트럼은, 탈인산화된 모노포스페이트 대사물인 MRS2347 및 완전히 탈인산화된 리보사이드 대사물인 MRS4322 각각의 질량 및 구조와 일치했다(도 9). 대사물 둘 다의 검출 및 대사물 M2(MRS2347)에 대한 대사물 M1(MRS4322)의 존재량의 증가는, 인간 혈장 및 혈액에서 MRS2365의 단계적인 탈인산화가, 모노인산화된 중간체인 MRS2347을 통해 진행되어 비인산화된 리보사이드 MRS4322로 추가로 탈인산화되는 것을 시사했다.

- [0387] 함께, 이들 데이터는, MRS2365가 모 화합물을 탈인산화시키는 순환 엑토뉴클레오티다제에 의해 혈장 및 혈액에서 신속하게 대사되어, 비인산화 리보사이드 MRS4322를 궁극적으로 생성한다는 가설을 뒷받침한다. 이 과정은 엑토뉴클레오티다제 활성화에 필요한 2가 양이온을 킬레이트하는 것으로 알려진 제제인 EDTA에 의해 억제된다.
- [0388] **실시예 5: 마우스에서 TBI 후 MRS4322의 신경 보호 효능**
- [0389] **목적**
- [0390] 본 연구는, 외상성 뇌 손상(TBI)을 앓는 마우스에서의 MRS4322의 신경 보호 효능을 측정하고, MRS2365 및 아데노신 A₃ 수용체 완전 작용제인 C1-IB-MECA로 치료된 유리 마우스를 비교하기 위해 고안되었다.
- [0391] **방법**
- [0392] 화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. C1-IB-MECA를 Tocris Biosciences(영국 브리스톨 소재) 및 복수의 다른 공급자로부터 상업적으로 입수가 가능했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.
- [0393] 동물 및 외상성 뇌 손상(TBI): TBI는 문헌[Talley-Watts *et al.* 2012 (*J. Neurotrauma* 30, 55-66)]에 기재된 바와 같이 제어된 폐쇄된 두개골 손상 모델로 실시했다. 상기 개시된 방법에 따라, 공압 충격 장치를 사용하여 중등도의 TBI를 발생시켜 두개골 및 경질 물질을 손상시키지 않은 채로 남겨두었다. 이를 달성하기 위해, C57BL/6 마우스를 100% 산소 중 이소플루란(3% 유도, 1% 유지)으로 마취시켰다. 온도 조절식 가열 수술 테이블을 사용하여 체온 37°C를 유지했다. 무균 수술 기법을 사용하여 두피에 작은 정중선 절개를 만들었다. 5mm 스테인레스 스틸 디스크를 두개골에 위치시키고, 체질 감각 피질 위에 브레그마와 람다 사이의 오른쪽 두정골에 슈퍼 글루(super glue)를 사용하여 고정시켰다. 이후, 마우스를 공압 충격 팁 바로 아래의 스테이지에 위치시킨다. 마우스에 중등도의 손상을 입히는 보정된 충격이 2mm의 깊이에서 4.5mm/s로 전달되었다. 두피 절개는 4-0 나일론 봉합사(nylon braided suture)를 사용하고 절개 부위에 항생제 연고를 사용하여 폐쇄했다. 마우스를 Thermo-Intensive Care Unit(Braintree Scientific 모델 FV-1; 37°C; 27% O₂)에 배치하고, 완전히 깨어나 자유롭게 움직일 때까지 모니터링했다. 손상 30분 후 또는 삼(손상되지 않음)에서, 마우스를 비히클(식염수) 또는 약물(MRS4322, C1-IB-MECA 또는 MRS2365)으로 치료했다. MRS4322, C1-IB-MECA 및 MRS2365의 용량은 각각 0.16, 0.24 및 0.2mg/kg이었고, 각각 약 0.5 μmol/kg의 등가물 용량에 해당했다.
- [0394] GFAP에 대한 웨스턴 블롯 분석: 선택된 생존 시간에서, 마우스를 이소플루란 하에 마취시키고 희생시켰다. 뇌를 제거하고, 충격받은 그리고 충격을 받지 않은 뇌 반구의 해부를 위해 얼음에 배치했다. 단리된 조직을, 위튼 유리 다운스(Wheaton glass dounce)(20회 타격)를 사용하여 얼음 위에서 칠링된(chilled) 균질화 완충제(0.32M 수크로스, 1mM EDTA, 1M Tris-HCl pH = 7.8)에서 신속하게 균질화시켰다. 균질물을 2 mL 튜브에 옮기고, 4°C에서 10분간 1000g으로 원심 분리하고, 상청액을 수집하고 분석했다. 단백질 농도는 1:50 희석을 사용하여 BCA 분석에 의해 측정했다. 100 μg의 단백질을 각 샘플에 대한 분취량으로 제거하고, β-머캅토에탄올을 함유하는 Laemmli 완충제를 첨가하고, 상기 샘플을 95°C에서 3분간 가열 블록에 배치했다. 샘플을 12% 겔에 로딩하고, 80V에서 20분간, 이어서 130V에서 40분간 가동했다(run). 샘플을 100V에서 1시간 동안 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 상기 막을 30분 동안 TBS-T 중 5% 우유로 차단시켰다. GFAP(1:1000-Imgenex IMG-5083-A)를 첨가하고, 4°C에서 밤새 두었다. 상기 막을 10분 동안 3회 TBS-T로 세척했다. GFAP에 대한 2차 항체(Donkey anti-rabbit HRP conjugated(ImmunoJackson Laboratories; 711-035-152; 1:20000))를 실온에서 1시간 동안 적용했다. 상기 막을 15분 동안 (3회) TBS-T로 세척하고, Western Lightning Plus-ECL 키트(PerkinElmer, Inc.)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 현상했다.
- [0395] **결과**
- [0396] MRS4322는 TBI 후 마우스 뇌에서 GFAP 발현을 감소시킨다.
- [0397] 아교 세포 섬유 산성 단백질(GFAP) 발현은, TBI 후 반응성 신경 아교증의 바이오마커로 사용되었다(Talley-Watts *et al.* 2012; Sofroniew, 2005). 본 발명자들은 손상 후 7일째에 희생된 삼, TBI 또는 TBI 재치료된(MRS4322 또는 MRS2365) 마우스에서 GFAP 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 실시했다. 우선, 웨스턴 블롯 분석은, TBI가, 손상 후 7일째에 뇌의 동측(충격이 중심인 곳) 및 반대측 둘 다에서 GFAP 발현의 유의한 증가를 유발한다는 것을 확인했다(도 12a). GFAP 발현은, 초기 외상 후 30분 이내에 주사된 MRS4322 또는 MRS2365로 치료한 마우스의 블롯에서 유의하게 낮았다(도 12a). 로딩 대조군의 경우, 베타-액틴 웨스턴 블롯을 사용하여 각

라인 아래에 도시했다. 도 12a에 도시된 웨스턴 블롯은 모두 대표적인 실험으로부터 얻었으며, 동일한 겔 상에서 실시했다. 3회의 개별적인 실험으로부터 평균하고 GFAP/액틴 비의 상대적인 변화(이미지 J 소프트웨어에서 측정된 밴드 강도)를 도시하는 데이터는 도 12b의 평균 +/- SEM으로 도시한다. 데이터를 통합하기 위해, 값들을 7일째의 TBI 수준(100%)으로 정규화했다. 주어진 실험 치료를 위한 총 마우스의 수는 도 12b에서 N으로 나타낸다.

[0398] MRS4322 및 아데노신 A₃ 수용체 작용제는 TBI 후 마우스 혈장에서 GFAP 발현을 감소시킨다.

[0399] 혈장의 GFAP 수준은, 외상 후 혈액 뇌 장벽(BBB)의 파손으로 인해 TBI의 바이오마커로 사용했다. 결과적으로 본 발명자들은 TBI 마우스로부터 7일째에 혈장 샘플을 수집했다. 뇌 조직과 유사하게, 본 발명자들은, 웨스턴 블롯 분석에 의해 7일째에 GFAP 수준이 쉽게 검출된다는 것을 발견했다(도 12c). 보다 중요하게는, 본 발명자들은 MRS4322 또는 C1-IB-MECA(아데노신 A₃ 수용체 작용제)로 치료된 TBI-마우스의 혈장을 얻은 웨스턴 블랏이, 액틴에 비해 GFAP 수준이 유의하게 감소하는 것을 발견했다(도 12c). 각각의 실험 조건에 대한 평균 GFAP/액틴 비의 막대 그래프를 도 12d에 도시한다. 실험 치료당 총 마우스의 수는 값 N으로 나타낸다.

[0400] MRS4322는 마우스의 A₃ 수용체의 저친화도(4900nM) 작용제이다. 반대로, C1-IB-MECA는 마우스의 고친화도(0.18nM) 작용제이며, 이 두 화합물의 친화도의 차이는 약 25,000배이다. 그러나, 마우스 광 혈전증성 뇌졸중 및 TBI 모델에서, MRS4322는 A₃ 길항제 MRS1523에 의해 차단되는 중요한 효능을 보여주는 반면, C1-IB-MECA는 비활성(뇌졸중) 또는 약한 활동성(TBI, 도 12)이다. 이는 수용체 친화도의 관점에서 명확하지 않은 결과이다. 이러한 발견에 대한 본 발명자들의 현재의 설명은, MRS4322 및 C1-IB-MECA에 대해 생성한 독점적인 ADME/PK 데이터에 기초한다. C1-IB-MECA는 혈장 단백질에 강하게 결합하고(유리 분획 0.002) 뇌 조직에 강하게 결합하는(유리 분획 0.002) 친유성 화합물(cLogP 약 2.5)이다. MRS4322는 혈장(0.74) 및 뇌(0.13)에서 매우 큰 비결합 분획을 갖는 매우 친수성인 화합물(cLogP < 0)이다. 결합되지 않은 약물만이 막을 통과하여 분포되고 수용체와 상호 작용할 수 있다. 따라서, 수용체 친화도가 낮더라도, 이러한 마우스 모델에서 A₃ 수용체와 상호 작용할 수 있는 MRS4322의 분획은, C1-IB-MECA보다 적어도 1,000배 이상 높다. 본 발명자들은 화합물의 물리화학적 특성과 ADME/PK 특성의 이러한 중요한 차이가, 이러한 마우스 모델에서 C1-IB-MECA(및 또 다른 친유성이고 완전 A₃R 작용제와 고도로 결합되고/고친화성인 MRS5698)와 비교하여 MRS4322의 명백하지 않은 효능에 기여한다고 여긴다.

[0401] 편향된 작용. 아데노신 A₃ 수용체는 G 단백질-커플링 다면 발현 수용체이다, 즉, 이러한 수용체의 작용은 다수의 G 단백질, 및 베타-아레스틴을 통해 다중 하류 경로를 잠재적으로 활성화시킨다. A₃ 수용체 작용에 의해 활성화되는 경로는 현재, Gq11 매개되는 세포내 칼슘 동원, cAMP 생산의 Gi 매개되는 조절, 및 ERK1/2 및 Akt 인산화의 Gi 매개되는 조절로 확인되지만, 이들로 제한되지는 않을 수 있다. 본 발명자들의 발견의 일 양태는, 세포내 칼슘의 A₃ 매개 동원이 정상 세포에서 미토콘드리아 ATP 생산을 촉진시키는 것이다.

[0402] 수용체 약리학의 새로운 개념은 편향된 작용이다. 이 개념은, 다면 발현 수용체에 대해 실제로 상이한 부류의 작용제가 존재하며, 이들 중 일부는 모든 하류 경로를 활성화시킬 수 있는 반면, 다른 것들은 하류 경로의 서브 세트를 활성화시키는 편향을 보여주는 것으로 설명한다. 약물 발견 및 수용체 약리학에서, 편향된 작용은 보다 적은 타겟 이탈(off-target) 효과, 즉, 더 적은 부작용을 갖는 경로 활성화에서의 증가된 특이성의 가능성을 도입한다. A₃ 수용체에 대한 편향된 작용에 대한 증거가 있다. 그러나, C1-IB-MECA 및 MRS5698과 같은 원형의 고친화성 작용제는, 상기 언급한 하류 경로의 편향된 활성화를 입증하지 않는 전체 작용제이다. 따라서, 특정 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, MRS4322는 다른 A₃ 매개 경로의 활성화가 거의 또는 전혀 갖지 않고 세포내 칼슘 동원을 우선적으로 활성화시키는 편향된 작용제라고 여겨진다. 이러한 발견은 완전/비편향된 작용제인 C1-IB-MECA 및 MRS5698에 비해 마우스 뇌졸중 및 TBI 모델에서 관찰되는 MRS4322 효능을 설명한다.

[0403] **실시예 6: 마우스의 뇌졸중 후 MRS4322의 신경 보호 효능**

[0404] **목적**

[0405] 본 연구는 뇌졸중을 겪은 마우스의 MRS4322의 신경 보호 효능을 측정하고, A₃ 수용체 길항제 MRS1523를 포함하거나 포함하지 않는 MRS2365로 치료한 마우스와 완전 A₃R 작용제인 MRS5698 및 C1-IB-MECA로 치료한 마우스를 비교하기 위해 고안되었다. MRS1523은 다음 구조식을 갖는다:



[0406]

[0407]

방법

[0408]

화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. C1-IB-MECA, MRS5698 and MRS2365를 Tocris Biosciences(영국 브리스톨 소재) 및 복수의 다른 공급자로부터 상업적으로 입수가능했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.

[0409]

광 혈전증 유도 뇌졸중: 광 혈전증은 문헌[Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401)]에 개시된 바와 같이 실시됐다. 간단히 말해, 로즈 벵갈(Rose Bengal)은 혈장에 주입되어 여기되면 내피 벽에 상해를 입히고 국소 혈전증(혈전)을 유발하는 싱글렛 산소를 생성하는 형광 염료이다. 이 기술을 사용하여, 마우스에게 인공 뇌 척수액(aCSF) 중 멸균된 로즈 벵갈(RB, 미국 소재 Sigma)의 꼬리 정맥 주사를 0.1mL 제공했다. RB 농도는 20mg/mL였다. 피질 영역을 이미징 시야(field)의 중심에 두고 0.8-NA 40x 수침 대물 렌즈(도쿄 소재 Nikon)를 사용하여 녹색 레이저(543nm, 5mW)로 조명했다. 표적하는 혈장 또는 다운스트림 모세관이 확실히 폐쇄될 때까지 혈전 형성을 실시간으로 모니터링했다. 안정한 혈전은 높은 형광 영역으로 끝나는 비형광 혈장 분할에 의해 후속적으로 확인했다. 대조 실험에서, 레이저 조명이나 로즈 벵갈 자체가 혈전 형성을 일으키지 않았다. 치료제인 MRS4322(0.16mg/kg, 0.5 μmol/kg) 또는 MRS2365(0.24mg/kg; 0.5 μmol/kg)를 복강내(i.p.) 주사를 통해 주입했다. A₃ 수용체 길항제인 MRS1523을 사용한 실험에서, 연구 과정 전반에 걸쳐 수용체 길항 작용을 보장하기 위해, 0 및 2시간 시점에서 마우스에게 복강내 주사(2mg/kg)를 투여했다.

[0410]

동물 및 광 혈전증 유도된 뇌졸중: 뇌졸중을 문헌[Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401)]에 기재된 바와 같이 실시했다. 본 연구에서는 암컷 C57B1/6 마우스(4 내지 6개월)를 사용했다. 본 문헌의 방법으로부터, 마우스를 100% 산소를 포함하는 3% 이소플루란에서 마취시키고, 후속적으로 비강을 통해 1% 이소플루란으로 유지시켰다. 마취 깊이는 생체 신호, 핀치 제거 및 눈 깜박임에 따라 모니터링하고 규제했다. 체온을 되먹임 제어 가열 패드(Gaymar T/Pump)에 의해 37°C로 유지시켰다. 산소 포화도, 호흡수 및 심박수를 포함하는 생체 신호를 MouseOx 시스템(STARR Life Sciences)을 사용하여 지속적으로 모니터링했다. 각 마우스의 털을 다듬고, 두피에 작은 절개를 하여 두개골을 노출시켰다. 주문 제작한 스테인레스 강판을 VetBond Tissue Adhesive(미네소타주 세인트 폴 소재 3M)로 두개골에 접착했다. 실험에 따라 우측 주 체감각 피질(브레그마의 ~1.5 mm 후방 및 중간선에서 2mm 측면)에 두개가 얇아진 두개골 이미징 창을 생성했다. 간단히 말해서, 두개골의 넓은 영역을 먼저 전기 드릴로 얇게 한 뒤, 외과용 블레이드로 추가로 얇게 했다. 얇은 두개골의 최종 두께는 약 50 μm였다. 두개 이미징 창을 생성한 후, 마우스를 현미경 스테이지로 옮겨, 광 혈전증 또는 이미징 실험에 사용했다. 반복 이미징 실험을 위해, 상기 판을 두개골로부터 조심스럽게 분리하고, 두피를 봉합했다(Ethicon 6-0 실크 봉합사). 각 실험 후, 마우스는 다음 시점까지 케이지로 되돌려지거나 희생되었다. 모든 절차는 산 안토니오의 텍사스 보건 과학 센터의 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았다. 뇌졸중 후 30분 또는 삼(손상되지 않음) 마우스를 비히클(식염수) 또는 약물(MRS4322, MRS2365, MRS5698 또는 C1-IBMECA)로 치료했다.

[0411]

광 혈전증 후 경색 평가. 뇌 경색의 크기를 문헌[Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401)]에 개시된 바와 같이 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드(TTC) 염색을 사용하여 평가했다. 간단히 말하면, 뇌 절편에서 RB 유발 병변이 TTC로 염색되었다. TTC는 미토콘드리아 효소 석시닐 데하이드로게나제에 의해 감소될 때 건강한 뇌 조직을 적색으로 염색시키는 무색 염료이다(Bederson JB et al., 1986). 피사성 조직에서의 염색의 부재는 뇌 경색의 영역을 정의하는데 사용되었다. 마우스를 경추 탈구로 희생시키고, 뇌를 제거한 다음, 빙냉 HBSS에 3분 동안 배치했다. 뇌를 연속적으로 뇌 주형(KOPF)으로 옮기고, 1mm 절편들로 얇게 썰어 37°C의 2% TTC에 담갔다(5분). 절편들을 4°C에서 밤새 10% 완충된 포르말데히드 용액으로 고정시켰다. 1200dpi에서 병변 크기를 분석하기 위해 평판형 스캐너(HP scanjet 8300)에서 이미징했다.

[0412]

결과

[0413]

MRS4322 치료는 뇌졸중 후 뇌 경색을 감소시킨다. 상기 개시된 바와 같이 RB로 꼬리 정맥 주사한 마우스에서

다중 혈장 광 혈전성 뇌졸중이 유발되었다. 혈전 형성 30분 이내에 마우스에게 비히클(식염수 조절), MRS4322(0.16mg/kg, 0.5 μmol/kg) 또는 MRS2365(0.24mg/kg, 0.5 μmol/kg)를 복강내 주사했다. 뇌졸중의 개시 24시간 후, 뇌 경색 크기를 상기한 바와 같은 TTC 염색으로 평가했다. 대표적인 TTC 염색된 뇌 절편이 도 13a에 도시되어 있다. 본 발명자들은 MRS4322와 MRS2365 둘 다가 뇌 경색의 크기를 현저하게 감소시킨 것을 발견했다. 비히클, MRS4322, MRS2365, MRS5698 또는 C1-IBMECA로 치료된 마우스에 대한 뇌 경색의 평균 크기의 히스토그램 플롯이 도 13c에 도시된다. 이 데이터는 2회의 독립적인 실험에서 수집했다. N은 시험한 마우스의 총 수를 나타낸다.

[0414] A₃ 수용체 길항제 MRS1523은 뇌졸중 후 MRS4322 및 MRS2365 치료의 신경 보호를 억제한다. 다혈관 광혈전성 뇌졸중을 상기 개시한 바와 같이 마우스에 유발시켰다. 그러나, 이 실험에서, 수용체 길항 작용을 보장하기 위해 0시간 및 2시간 시점에서 마우스를 A₃ 수용체 길항제인 MRS1523(2mg/kg)의 복강내 주사로 치료했다. 이후, 상기 개시된 농도의 혈전 형성 30분 이내에 마우스에게 비히클, MRS4322, MRS2365, MRS5698 또는 C1-IBMECA를 주사했다. 24시간 후, 뇌 경색 크기를 TTC 염색으로 평가했다. 대표적인 TTC로 염색된 뇌 절편이 도 13b에 도시되어 있다. 본 발명자들은 MRS1523으로 예비 치료된 마우스의 뇌 경색의 크기가 MRS4322 또는 MRS2365 또는 MRS5698을 사용한 치료에 의해 감소되지 않는다는 것을 발견했다. 본 실험에 대한 뇌 경색의 평균 크기의 히스토그램 플롯이 도 13d에 도시된다. 데이터는 2회의 독립적인 실험으로부터 수집했다. N은 시험한 마우스의 총 수를 나타낸다.

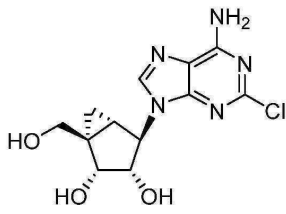
[0415] **실시예 7: 마우스의 뇌졸중 후 MRS1873의 신경 보호 효능**

[0416] **목적**

[0417] 본 연구는, MRS4322의 2-클로로 유사체에 상응하는 MRS1873의 신경 보호 효능을 측정하기 위해 고안되었다. 뇌졸중을 앓는 마우스에서 실험을 실시하고, MRS4322로 치료한 마우스와 비히클로 치료한 마우스를 비교했다.

[0418] **방법**

[0419] 화학 물질: MRS1873 및 MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. MRS1873은 다음 구조식을 갖는다:



MRS1873

[0420]

[0421] 광 혈전증 유도 뇌졸중: 광 혈전증은 문헌[Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401)]에 개시된 바와 같이 실시됐다. 간단히 말해, 로즈 벵갈은 혈장에 주입되어 여기되면, 내피 벽에 상해를 입히고 국소 혈전증(혈전)을 유발하는 싱글렛 산소를 생성하는 형광 염료이다. 이 기술을 사용하여, 마우스에게 인공 뇌 척수액(aCSF) 중 멸균된 로즈 벵갈(RB, 미국 소재 Sigma)의 꼬리 정맥 주사를 0.1mL 제공했다. RB 농도는 20mg/mL였다. 피질 영역을 이미징 시야의 중심에 두고 0.8-NA 40x 수침 대물 렌즈(도쿄 소재 Nikon)를 사용하여 녹색 레이저(543nm, 5mW)로 조명했다. 표적하는 혈장 또는 다운스트림 모세관이 확실히 폐쇄될 때까지 혈전 형성을 실시간으로 모니터링했다. 안정한 혈전은 높은 형광 영역으로 끝나는 비형광 혈장 분할에 의해 후속적으로 확인했다. 대조 실험에서, 레이저 조명이나 로즈 벵갈 자체가 혈전 형성을 일으키지 않았다. 치료제인 MRS1873(100uL의 100 μM) or MRS4322(100uL의 100 μM)를 복강내(i.p.) 주사를 통해 주입했다.

[0422] 동물 및 광 혈전증 유도된 뇌졸중: 뇌졸중을 문헌[Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401)]에 기재된 바와 같이 실시했다. 본 연구에서는 암컷 C57Bl/6 마우스(4 내지 6개월)를 사용했다. 본 문헌의 방법으로부터, 마우스를 100% 산소를 포함하는 3% 이소플루란에서 마취시키고, 후속적으로 비강을 통해 1% 이소플루란으로 유지시켰다. 마취 깊이는 생체 신호, 핀치 제거 및 눈 깜박임에 따라 모니터링하고 규제했다. 체온을 되먹임 제어 가열 패드(Gaymar T/Pump)에 의해 37°C로 유지시켰다. 산소 포화도, 호흡수 및 심박수를 포함하는 생체 신호를 MouseOx 시스템(STARR Life Sciences)을 사용하여 지속적으로 모니터링했다. 마우스의 털을 다듬고, 두피에 작은 절개를 하여 두개골을 노출시켰다. 주문 제작한 스테인레스 강관을 VetBond Tissue Adhesive(미네소타

주 세인트 폴 소재 3M)로 두개골에 접착했다. 실험에 따라 우측 주 체감각 피질(브레그마의 ~1.5mm 후방 및 중간선에서 2mm 측면)에 두개가 얇아진 두개골 이미징 창을 생성했다. 간단히 말해서, 두개골의 넓은 영역을 먼저 전기 드릴로 얇게 한 뒤, 외과용 블레이드로 추가로 얇게 했다. 얇은 두개골의 최종 두께는 약 50 μm였다. 두개 이미징 창을 생성한 후, 마우스를 현미경 스테이지로 옮겨, 광 혈전증 또는 이미징 실험에 사용했다. 반복 이미징 실험을 위해, 상기 판을 두개골로부터 조심스럽게 분리하고, 두피를 봉합했다(Ethicon 6-0 실크 봉합사). 각 실험 후, 마우스는 다음 시점까지 케이지로 되돌려지거나 희생되었다. 모든 절차는 산 안토니오의 텍사스 보건 과학 센터의 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았다. 뇌졸중 30분 후 또는 삼(손상되지 않음) 마우스를 비히클(식염수) 또는 약물(MRS4322 또는 MRS2365)로 치료했다.

[0423] 광 혈전증 후 경색 평가. 뇌 경색의 크기를 문헌[Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401)]에 개시된 바와 같이 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드(TTC) 염색을 사용하여 평가했다. 간단히 말하면, 뇌 절편에서 RB 유발 병변이 TTC로 염색되었다. TTC는 미토콘드리아 효소 석시닐 테하이드로게나제에 의해 감소될 때 건강한 뇌 조직을 적색으로 염색시키는 무색 염료이다(Bederson JB et al., 1986). 괴사성 조직에서의 염색의 부재는 뇌 경색의 영역을 정의하는데 사용되었다. 마우스를 경추 탈구로 희생시키고, 뇌를 제거한 다음, 빙냉 HBSS에 3분 동안 배치했다. 뇌를 연속적으로 뇌 주형(KOPF)으로 옮기고, 1mm 절편들로 얇게 썰어 37°C의 2% TTC에 담갔다(5분). 절편들을 4°C에서 밤새 10% 완충된 포름알데히드 용액으로 고정시켰다. 1200dpi에서 병변 크기를 분석하기 위해 평판형 스캐너(HP scanjet 8300)에서 이미징했다.

[0424] 결과

[0425] MRS1873 치료는 뇌졸중 후 뇌 경색을 감소시킨다. 상기 개시된 바와 같이 RB로 꼬리 정맥 주사한 마우스에서 다중 혈장 광 혈전성 뇌졸중이 유발되었다. 혈전 형성 30분 이내에 마우스에게 비히클(식염수 조절), MRS1873(100ul의 100uM) 또는 MRS4322(100ul의 100uM)를 복강내 주사했다. 뇌졸중의 개시 24시간 후, 뇌 경색 크기를 상기한 바와 같은 TTC 염색으로 평가했다. 대표적인 TTC 염색된 뇌 절편이 도 14b에 도시되어 있다. 본 발명자들은 MRS1873과 MRS4322 둘 다 뇌 경색의 크기를 현저하게 감소시킨 것을 발견했다. 비히클, MRS1873 및 MRS4322 치료된 마우스에 대한 뇌 경색의 평균 크기의 히스토그램 플롯이 도 14b에 도시된다. 이 데이터는 3회의 독립적인 실험에서 수집했다. N은 시험한 마우스의 총 수를 나타낸다.

[0426] 효능에 대한 약동학 및 근거

[0427] MRS1873은 MRS4322의 2-C1 유사체이며, 또한 아데노신 A₃ 작용제이다. MRS1873의 물리화학적 특성은 저분자량, 친수성(cLogP < 0) 및 위상학적 극성 표면적 측면에서 MRS4322의 특성들과 동일하다. 혈장 및 뇌 결합, 청소 및 분포와 같은 ADME/PK 파라미터는 이러한 물리화학적 특성에 의해 유도되므로, 본 발명자들은 MRS4322 및 MRS1873에 대한 유사한 약동학을 입증했다. 또한, 뇌졸중의 쥐 광 혈전성 모델에서 MRS4322 및 MRS1873에 대해 유사한 효능을 입증했다.

[0428] 실시예 8: A₃ 아데노신 수용체(A₃R)에서 화합물의 편향된 작용 측정을 위한 실험 프로토콜

[0429] 하기 검정은 개시된 화합물, 예를 들어 MRS4322 또는 MRS1873이 A₃ 수용체에 편향된 작용(기능적 선택성 또는 작용제 트래피킹(trafficking)으로도 알려짐)을 나타내는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0430] 물질. Fluo-4, 돌베코 개질 이글 배지(DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium) 및 페니실린-스트렙토마이신을 Invitrogen(캘리포니아주 칼스배드 소재)로부터 입수할 수 있었다. 아데노신 데아미나제(ADA) 및 하이그로마이신-B는 Roche(스위스 바젤 소재)로부터 입수할 수 있었다. 태아 소 혈청(FBS)은 ThermoTrace(호주 멜번 소재)로부터 입수할 수 있었다. AlphaScreen SureFire 세포의 신호 조절 키나제 1 및 2(ERK1/2), Akt 1/2/3 및 cAMP 키트는 PerkinElmer(메사추세츠주 보스턴 소재)로부터 입수할 수 있었다. MRS 접두어가 붙은 모든 화합물은 이전에 개시된 바와 같이 합성할 수 있다(Tosh et al., 2012a, b). 다른 모든 제제는 Sigma-Aldrich(미주라주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.

[0431] 세포 배양. 인간 A₃R의 서열을 이전에 개시된 방법(Stewart et al., 2009)을 사용하여, 게이트웨이 진입 벡터인 pDONR201으로 클로닝되어, 게이트웨이 목표 벡터인 pEF5/FRT/V5-dest로 옮겨질 수 있다. A₃-FlpIn-CHO 세포는 이전에 개시된 방법(May et al., 2007)을 사용하여 생성하고, 10% FBS 및 선택 항생제 하이그로마이신-B(500 μg/ml)가 보충된 DMEM에서 5% CO₂를 함유하는 가슴된 항온처리기에서 37°C로 유지될 수 있다. 세포 생존, ERK1/2 인산화, Akt1/2/3 인산화, 및 칼슘 동원 검정을 위해, 세포들을 96-웰 배양 판에 4x10⁴ 세포/웰의 밀도

로 씨딩할 수 있다. 6시간 후, 세포들을 무혈청 DMEM으로 세척하고, 검정 전에 5% CO₂에서 37°C로 12 내지 18 시간 동안 무혈청 DMEM에서 유지시켰다. cAMP 검정을 위해, 세포들을 2x10⁴ 세포/웰의 밀도로 96-웰 배양 플레이트에 씨딩하고, 검정에 앞서 5% CO₂에서 37°C로 밤새 항온처리할 수 있다.

[0432] 세포 생존 검정. 배지를 제거하고, A₃R 리간드의 존재 및 부재하에 ADA(1U/ml) 및 페니실린-스트렙토마이신 (0.05U/ml)을 함유하는 HEPES 완충 식염수 용액(10 mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산(HEPES), 146mM NaCl, 10mM D-글루코스, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 1.3mM CaCl₂, 및 1.5mM NaHCO₃, pH 7.45)으로 대체했다. 이후, 플레이트를 가습된 항온처리기에서 37°C로 24시간 동안 유지한 후, 5mg/ml의 요오드화 프로피듐을 세포들에 가한다. EnVision 플레이트 판독기(PerkinElmer)에서 각각 320nm 및 615nm로 세트된 여기 및 방사로 플레이트를 판독할 수 있다. 테이터는 각각 HEPES 완충액에서 t = 0시간에서, 그리고 Milli-Q 물에서 t = 24시간에서 측정하여, 100% 세포 생존 및 0% 세포 생존율로 정규화될 것이다.

[0433] ERK1/2 및 Akt1/2/3 인산화 검정. 각 리간드에 대한 ERK1/2 및 Akt1/2/3 인산화의 농도-반응 곡선이, 1U/ml ADA를 함유하는 무혈청 DMEM (37°C에서 5분간 노출)에서 수행될 수 있다. 작용제 자극은, 배지를 제거하고, 각 웰에 SureFire 용해 완충액 100ml를 첨가하여 종결시킬 수 있다. 플레이트를 5분 동안 진탕한다. pERK1/2의 검출은, 384-웰 ProxiPlate에서 총 용적 11ml의, 용해물:활성 완충액:반응 완충액:AlphaScreen 수용체 비드:AlphaScreen 공여체 비드의 80:20:120:1:1 v/v/v/v/v 희석을 포함할 수 있다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 어두운 곳에서 항온처리한 후, 각각 630nm 및 520 내지 620nm로 여기 및 방출이 세트된 EnVision 플레이트 판독기(PerkinElmer)로 형광을 측정할 수 있다. Akt 1/2/3 인산화의 검출은, 384-웰 Proxiplate에서 총 용적 91의, 용해물:활성화 완충액:반응 완충액:AlphaScreen 수용체 비드의 40:9.8:39.2:1 v/v/v/v 희석을 사용할 수 있다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 어두운 곳에서 항온처리한 후, 총 용적 11μl의, 희석 완충액:AlphaScreen 공여체 비드의 19:1 v/v 희석을 첨가할 수 있다. 플레이트를 추가로 2시간 동안 실온에서 항온처리한 다음, 여기 및 방출이 각각 630nm 및 520 내지 620nm로 세트된 EnVision 플레이트 판독기(PerkinElmer)에 의해 형광을 측정할 수 있다. 작용제 농도-반응 곡선은 10% FBS(5분 자극)에 의해 매개되는 인산화에 대해 표준화된다.

[0434] 칼슘 동원 검정. 96-웰 플레이트로부터 배지를 제거하고, 1U/ml ADA, 2.5mM 프로베네시드, 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA), 및 1M Fluo4를 함유하는 HEPES 완충 식염수 용액으로 교체할 수 있다. 플레이트는 어두운 곳에서 37°C에서 1시간 동안 가습된 항온처리기에서 항온처리될 수 있다. FlexStation 플레이트 판독기(캘리포니아 주 서니베일 소재 Molecular Devices)는 작용제의 부재 및 존재하의 HEPES 완충 식염수 용액을 첨가하여, 75초 동안 1.52초마다 형광(여기, 485nm; 방출, 520nm)을 측정할 수 있다. 피크와 기저선 형광 사이의 차이는, 세포내 Ca²⁺ 동원에 대한 마커로 측정할 수 있다. A₃R 작용제 농도-반응 곡선은 세포 수 및 로딩 효율의 차이를 설명하기 위해 100 μM ATP에 의해 매개되는 반응에 대해 표준화될 수 있다.

[0435] cAMP 측정 검정의 억제. 배지를 자극 완충액(140mM NaCl, 5mM KCl, 0.8 MgSO₄, 0.2mM Na₂HPO₄, 0.44mM KH₂PO₄, 1.3mM CaCl₂, 5.6mM D-글루코스, 5mM HEPES, 0.1% BSA, 1 U/ml ADA, 및 10 μM 롤리프람, pH 7.45)으로 교체하고, 37°C에서 1시간 동안 항온처리할 수 있다. cAMP 측정의 억제 A₃-FlpIn-CHO 세포를 A₃R 작용제와 함께 10분간 예비 가온배양 한 다음, 3 μM 포스콜린을 추가의 30분 동안 첨가하여 검정할 수 있다. 반응은 완충액의 신속한 제거 및 50μl의 빙냉 100% 에탄올의 첨가에 의해 종료될 수 있다. 50μl의 검출 완충액(0.1% BSA, 0.3% Tween-20, 5mM HEPES, pH 7.45)의 첨가 전에 에탄올을 증발시킨다. 플레이트를 10분 동안 진탕한 후, 10μl의 용해물을 384-웰 Optiplate로 옮겼다. 검출은 5μl의 1:49 v/v 희석의 AlphaScreen 공여체 비드:자극 완충액의 첨가를 사용할 수 있다. 이후, AlphaScreen 공여체 비드:검출 완충액:3.3 U/μl 비오틀화된 cAMP의 15μl의 1:146:3 v/v/v 희석액을 총 용적 30μl로 형성한다. 공여체 비드/비오틀화된 cAMP 혼합물은 첨가하기 전에 30분 동안 평형화될 수 있다. 플레이트를 실온에서 어두운 곳에서 밤새 항온처리한 다음, 여기 및 방출이 각각 630nm 및 520 내지 620nm로 세트된 EnVision 플레이트 판독기(PerkinElmer)로 형광을 측정할 수 있다. 작용제 농도-반응 곡선은 3 μM 포스콜린(0%) 또는 완충액(100%) 단독으로 매개되는 반응에 대해 표준화될 수 있다.

[0436] 분자 모델링. 인간 A₃R의 상동성 모델을 사용하여, 본 연구에서 조사한 모든 화합물에 대해 도킹(docking) 모의를 실시할 수 있다. 특히, 이전에 보고된 세가지 모델, 작용제 결합된 hA_{2A}AR 결정 구조(PDB ID: 3QAK)에 기초하는 모델, 하이브리드 A_{2A}AR-β2 아드레날린성 수용체 템플릿에 기초하는 모델, 및 하이브리드 A_{2A}AR-옵신 템

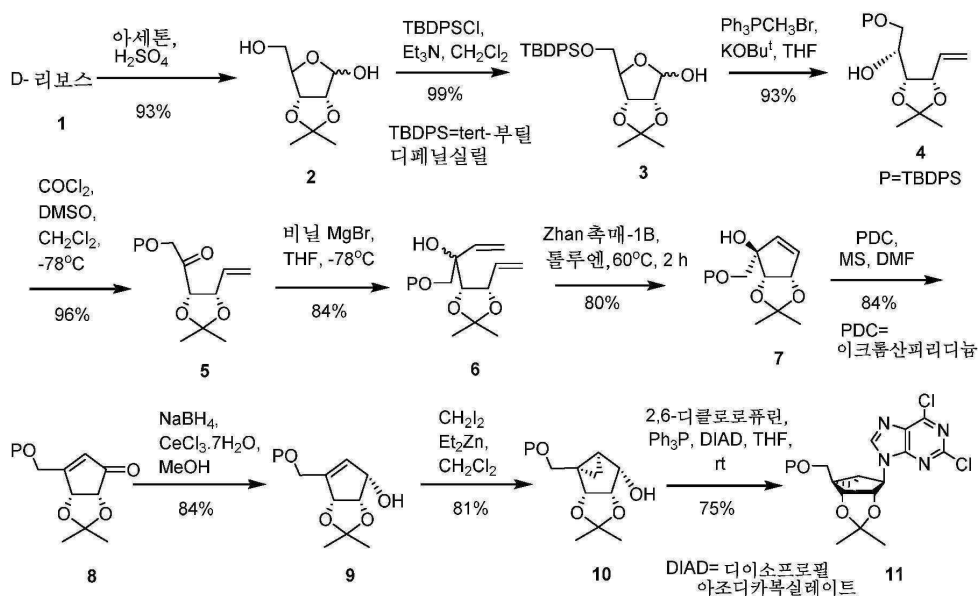
플릿($\beta 2$ 아드레날린 수용체 X선 구조체 PDB ID: 3SN6, 읍신 결정 X선 결정 구조체 PDB ID: 3DQB)에 기초하는 모델을 사용할 수 있다(Tosh et al., 2012a). 하이브리드 템플릿에 기초하는 모델은 $A_{2A}AR$ 기초 모델과 비교하여 TM2의 바깥쪽 움직임 보여줄 것이다. A_3R 리간드의 구조는 Schrodinger 스위트(suite)에 구현된 Builder 및 LigPrep 도구를 사용하여 도킹으로 구성되고 제조될 수 있다(Schrodinger Release 2013-3, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2013). A_3R 모델에서 리간드의 분자 도킹은, 슈뢰딩거 스위트의 글라이드 패키지 부분을 사용하여 실시할 수 있다. 특히, 글라이드 그리드는, 아데노신 수용체, 즉, Phe(EL2), Asn(6.55), Trp(6.48), 및 His(7.43)의 결합 포켓의 일부 핵심 잔기의 중심에 집중될 수 있다. 글라이드 그리드는 $14\text{\AA} \times 14\text{\AA} \times 14\text{\AA}$ 의 내부 상자(리간드 직경 중간점 상자) 및 (모든 리간드 원자가 포함되어야 하는 상자인) 내부로부터 각 방향으로 25\AA 로 연장되는 외부 상자를 사용하여 구성할 수 있다. 리간드의 도킹은 XP(extra precision) 절차를 사용하여 강성 결합 자리에서 실시될 수 있다. 각 리간드에 대한 최고 스코어링 도킹 회전 배열은, 실험 데이터와 일치하여 제안된 결합 회전 배열을 선택하기 위해 단백질-리간드 상호 작용의 육안 검사 및 분석에 적용될 수 있다.

[0437] 데이터 분석. 통계 분석 및 곡선 피팅은 Prism 6(캘리포니아주 산 디에고 소재 GraphPad Software)를 사용하여 실시할 수 있다. 신호 편향을 정량화하기 위해, 작용제 농도-반응 곡선을 이전에 개시된 바와 같이, 작용의 블랙-레프(Black-Leff) 작업 모델의 유도를 사용하여 비선형 회귀에 의해 분석할 수 있다(Kenakin et al., 2012; Wootten et al., 2013; van der Westhuizen et al., 2014). 변환 계수인 τ / KA [로그로 표시, $\text{Log}(\tau / KA)$]는, 편향된 작용을 정량화하기 위해 사용할 수 있다. 작용제 반응에 대한 세포 의존 효과를 설명하기 위해, 변환 비를 기준 작용제인 IB-MECA에 대해 얻은 값으로 정규화하여, $A\text{Log}(\tau / KA)$ 를 생성할 수 있다. 상이한 신호 경로에서 각 작용제에 대한 편향을 측정하기 위해, $A\text{Log}(\tau / KA)$ 는 기준 경로인 pERK1/2에 대하여 정규화하여, $A\text{Alog}(\tau / KA)$ 를 생성할 것이다. 편향은 $10^{A\text{Alog}(\tau / KA)}$ 로 정의할 수 있으며, 편향이 없으면, 로그로 나타낼 때 1과 통계적으로 다른 값이 되거나 0이 된다. 모든 결과는 평균 6 S.E.M.으로 나타낼 수 있다. 통계 분석은 F 시험 또는 Tukey 또는 Dunnett의 사후 검정(post hoc test)을 사용하는 편도 분석을 포함하며, 통계적 유의성은 P, 0.05로 결정된다.

[0438] **실시예 9: MRS4322의 합성 경로**

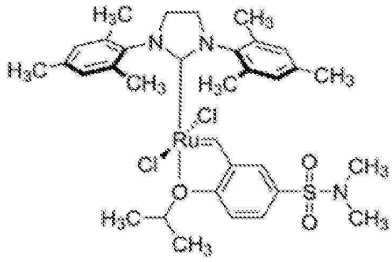
[0439] MRS4322 및 유사한 화합물, 예를 들어 MRS1873은 당업계에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어, MRS4322는 문헌[Choi, W. J. et al. J. Org. Chem. 2004, 69, 2634-2636, Tosh, D. K. et al. Purinergic Signalling 2015, 11, 371-387; and Chem. Eur. J., 2009, 15, 6244-6257]에 개시된 경로에 따라 D-리보스로부터 제조할 수 있다. 아래의 반응 도식 1 및 2는 합성 경로를 도시한다.

[0440] **반응 도식 1: MRS4322의 합성**



[0441]

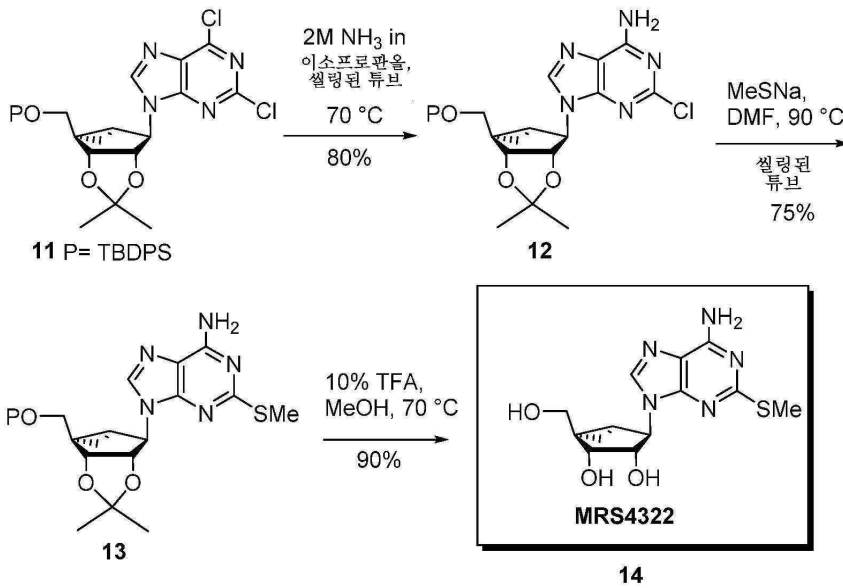
[0442] Zhan 촉매-1B는 하기 구조를 갖는다:



[0443]

[0444] 반응 도식 2는 상기 합성의 나머지를 도시한다.

[0445] 반응 도식 2: MRS4322의 합성(이어서)



[0446]

[0447] **실시예 10: 개시된 화합물의 심장 보호에 대한 근거**

[0448] 본 발명자들은, P2Y₁ 작용제의, 아데노신 A₃ 작용제인 MRS4322와 같은 화합물로의 매우 신속하고 정량적인 탈인산화를 입증했다. 놀랍게도, 이러한 아데노신 A₃ 작용제는 본원에 개시된 바와 같이 뇌졸중 및 외상성 뇌 손상의 다중 쥐 모델에서 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 임의의 특정 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명에 개시되는 A₃ 작용제, 예를 들어 MRS4322 및 MRS1873이 심장 보호제로서 효과적이라고 여겨진다.

[0449] MRS2365 및 관련 인산화 뉴클레오타이드의, MRS4322 및 MRS1873과 같은 화합물로의 신속하고 정량적인 탈인산화를 나타내는 본 발명자들의 데이터는, 이러한 P2X₄ 작용제의 의도된 심장 보호 효능이 실제로 탈인산화된 대사물의 아데노신 A₃ 작용에 기인한다는 주장을 뒷받침한다. 실제로, 본 발명자들은 MRS1873이 뇌졸중 및 외상성 뇌 손상 모델에서 효능이 있는 아데노신 A₃ 작용제임을 입증했다.

[0450] **실시예 11: 신생 돼지에게 정맥내 투여 후의 MRS4322의 약동학 및 결합**

[0451] 목적

[0452] 본 연구는 신생 돼지에게 정맥내 투여 후의 MRS4322의 혈장, 뇌 및 CSF 농도를 측정하기 위해 고안되었다.

[0453] 방법

[0454] 화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다.

[0455] 동물. 펜실베이니아 대학의 생물 공학과(필라델피아주 필라델피아 소재)에서 제공받은, 약 7.5Kg 체중의 4주령 암컷 신생아 돼지를 본 연구를 위해 사용했다. 연구 동안 약물 농도 결정을 위한 뇌 세포외액 샘플을 얻기 위

해, 동물들에게 뇌 미세 투석(brain microdialysis) 프로브를 장착했다. 모든 연구는 승인된 펜실베이니아 대학교 IACUC 프로토콜에 따라 실시했다.

[0456] 약물 투여: MRS4322를 DMSO에 가용화시킨 다음, 식염수로 희석하여 투여 용액을 제조했다. 각 신생 돼지(n = 3)에 정맥내 볼러스 투여에 의해 10mL 용적의 투여 용액을 투여했다.

[0457] 조직 샘플링: 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 4 및 6시간에 혈액 샘플을 수득했다. 뇌 세포외액 샘플은, 투여 후 1, 4 및 6시간에 이식된 미세 투석 프로브로부터 얻었다. 각 시점에서 전혈(1mL)을 얻고, 헤파린이 들어있는 진공 채혈관에 넣고, 곧바로 혈장 제조를 위해 원심분리했다. 혈장을 -80°C에서 보관했다. 뇌 세포외액 및 뇌척수액 샘플을 -80°C에서 보관했다. 안락사시(투여 후 6시간), 뇌척수액 샘플을 얻어 동결시키고, 단두에 의해 피질 및 해마로부터 뇌 샘플을 얻고, 빙냉 인산 완충 식염수로 세정하고, 칭량했다. 이후 즉시 뇌 샘플을 액체 질소에서 급속 동결시키고, -80°C에서 보관했다.

[0458] 생분석

[0459] MRS4322의 혈장, 뇌, 뇌 세포외액 및 뇌척수액 농도를, 톨부타미드를 내부 표준으로 사용하는 LC-MS/MS에 의해 측정했다. 하기 표는 사용된 LC 및 MS/MS 조건을 요약한다.

표 12: MRS4322 의 혈장, 뇌, 뇌 세포외액 및 뇌척수액 농도 측정을 위한 생분석

방법

시스템 구성요소			
모델	제조사	모델	
LC	Waters	Acquity I Class	
오토샘플러	Waters	Acquity Sample Manager	
MS 검출	AB Sciex	API 5500 QQQ	
HPLC 방법			
컬럼	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)		
용리	구배, 0.6 mL/min		
	이동상 A: 0.1% 포름산		
	이동상 B: 0.1% 아세트니트릴 중 포름산		
돼지 혈장 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로서 사용			
Q1/Q3 질량: 271.00/155.00 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.08/182.10 Da			
피트		선형	가중치 1 / x
절편		0.000570	
기울기		0.00699	
상관 계수		0.9998	
사용 면적			
돼지 뇌 균질물 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로서 사용			
Q1/Q3 질량: 271.00/155.00 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.08/182.10 Da			
피트		2 차	가중치 1 / x
a0		0.000244	
a1		0.00675	
a2		-0.00000134	
상관 계수		0.9999	
사용 면적			
돼지 ECF 및 CSF 중 MRS4322 에 대한 MS 검출 및 교정			
피크명: 톨부타미드			
내부 표준으로서 사용			
Q1/Q3 질량: 271.00/155.00 Da			
피크명: MRS4322			
내부 표준: 톨부타미드			
Q1/Q3 질량: 324.08/182.10 Da			
피트		2 차	가중치 1 / x
a0		0.000297	
a1		0.00783	
a2		0.000000130	
상관 계수		0.9998	
사용 면적			

[0460]

[0461]

각 조직 매트릭스에 대해, 표준 곡선이 생성되고 LLOQ/ULOQ 농도가 결정되었다. 전체 MRS4322 매트릭스 표준 곡선의 교정 범위는 0.1 내지 1000ng/mL였다.

[0462]

MRS4322의 뇌 농도의 생분석을 위해, 뇌 샘플을 4x 희석하여 빙냉 인산 완충 식염수에서 균질화시켰다. 생성된 희석된 뇌 균질물의 분취량들을 아세트니트릴로 처리하고 LC-MS/MS로 분석했다.

[0463]

결과

[0464]

신생 돼지에 정맥내 투여 후, MRS4322의 농도는 혈장, 뇌, 뇌 세포외액 및 뇌척수액 샘플에서 MRS4322의 농도가 검출가능했다(도 1b 및 도 16, 표 13).

표 13: 정맥내 투여 후 신생 돼지에서의 MRS4322의 혈장, 뇌, 뇌 세포외액 및

뇌척수액 농도

시험 항목	매트릭스	경로	용량 (mg/kg)	시간 (h)	대장체에 의한 혈장 농도 (ng/mL)										
					161128U	161128U-1	161128U-2	Mean	SD	N					
MRS4322	혈장	IV	0.2	0	15.3	9.08	20.8	15.1	5.9	3					
				0.25	133	120	163	139	22	3					
				0.5	85.3	54.1	98.7	79.4	22.9	3					
				1	58.9	51.4	63.0	57.8	5.9	3					
				2	27.2	18.7	46.8	30.9	14.4	3					
				4	23.3	21.9	28.7	24.6	3.6	3					
MRS4322	뇌 피질	IV	0.2	6	5.34	3.80	6.15	5.10	1.19	3					
				뇌 해마	6	6.17	4.56	5.39	5.47	0.95	3				
					매트릭스	경로	용량 (mg/kg) <td rowspan="6">시간 (h) <td colspan="6">대장체에 의한 세포외액 농도 (ng/mL)</td> </td>	시간 (h) <td colspan="6">대장체에 의한 세포외액 농도 (ng/mL)</td>	대장체에 의한 세포외액 농도 (ng/mL)						
									161128U	161128U-1	161128U-2	Mean	SD	N	
									1	1.56	0.641	1.70	1.30	0.57	3
									4	0.893	0.579	1.35	0.941	0.388	3
6	0.602	0.459	1.08						0.714	0.325	3				
161128U	161128U-1	161128U-2	Mean	SD					N						
1.37	1.04	1.75	1.39	0.36	3										

BLQ = 정량 하한 이하(혈장의 경우 0.0975ng/mL)

[0465]

표 14: 정맥내 투여 후 신생 돼지에서의 MRS4322의 혈장 약동학

시험 항목	경로	용량 (mg/kg)	동물 ID	C0 (ng/mL)	Cmax (ng/mL)	Tmax (hr)	AUClast (hr*ng/mL)	AUCINF (hr*ng/mL)	Cl (mL/min/kg)	Vz (L/kg)	반감기 (hr)
MRS4322	IV	0.2	161128U	207	133	0.25	238	344	9.68	4.04	4.82
			161128U-1	266	120	0.25	203	233	14.3	2.86	2.31
			161128U-2	269	163	0.25	307	401	8.31	2.25	3.13
			N	3	3	3	3	3	3	3	
			평균	248	139	0.25	249	326	10.8	3.05	3.42
			SD	34.9	22.1	0.00	52.9	85.3	3.13	0.907	1.28
			CV%	14.1	15.9	0.0	21.2	26.1	29.1	29.8	37.4

[0466]

[0467]

혈장 농도는 Tmax, Cmax, 혈장 청소, 분포 체적, 반감기 및 AUC의 초기 평가를 허용했다(표 14).

[0468]

뇌, 뇌 세포외액 및 뇌척수액의 MRS4322 농도는 검출 가능하지만, Cmax 및 Tmax 이외의 반감기 또는 다른 약동학 파라미터를 측정하기에는 데이터가 불충분했다. 그러나, 모든 매트릭스에 대해 샘플을 얻었을 때 투여 후 6시간에 이용 가능한 혈장 및 뇌 데이터에 기초하여, 총 약물의 뇌/혈장 비는 혈장 및 뇌의 평균 농도를 기준으로 약 0.3이었다.

[0469]

이러한 결과는 신생 돼지에 대한 정맥내 투여 후에 MRS4322의 순환 혈장 농도가 검출가능하고, MRS4322가 이러한 투여 조건 하에서 뇌에 잘 분포되어 있음을 확인한다.

[0470]

실시예 12: 신생 돼지에서의 MRS4322의 혈장 및 뇌 결합

- [0471] 목적
- [0472] 본 연구는 신생 돼지에서 MRS4322의 혈장 및 뇌 유리 분획을 결정하기 위해 고안되었다.
- [0473] 방법
- [0474] 화학 물질: MRS4322를 국립 당뇨병, 소화기 및 신장 질환 연구소(메릴랜드 주 베세스다 소재)의 예의 Ken Jacobson 박사로부터 입수했다. 분석 등급 설펜메탁사졸 및 와파린을 Seventh Wave Laboratories(미주리주 메릴랜드 하이츠 소재)로부터 입수했다. 다른 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수했다.
- [0475] 동물 및 조직 준비. 암컷 신생 돼지로부터 혈장 및 뇌 샘플을 펜실베이니아 대학교로부터 얻은 다음, 사용하기 전까지 -80°C에서 보관했다.
- [0476] 혈장 한외 여과물 블랭크 샘플을, 냉동 혈장을 해동시킨 다음, 37°C에서 60분 동안 가습된 5% CO₂ 챔버에서 혈장을 예비 가온함으로써 제조했다. 800ul의 분취량을 Centrifree Centrifugal Filters(Ultracel 재생 셀룰로오스(NMWL 30,000amu), Lot R5JA31736)로 옮기고, 37°C에서 2900RPM으로 10분간 원심분리했다. 혈장 물 여과물을 수집하여, 표준, 블랭크 및 QC 표준의 제조에 사용했다.
- [0477] 뇌를 칭량하고, Omni 조직 균질기를 사용하여 pH 7.4의 1:9 포스페이트 완충 식염수로 균질화했다. 4마리의 마우스로부터의 뇌를 균질화시키고, 모으고, 혼합하여 하나의 샘플을 형성했다.
- [0478] 혈장 결합 결정: MRS4322, 설펜메탁사졸 및 와파린을 DMSO 중에 가용화시킨 뒤 1:1의 아세트니트릴:물에 희석하여 100 μM 투석 원액을 제조했다. 설펜메탁사졸 및 와파린을 알려진 혈장 결합 값을 가진 연구 표준물로서 사용했다. 혈장 샘플을 가습된 5% CO₂ 항온처리기에서 37°C에서 60분간 예비 가온했다. 3개의 예비 가온된 혈장의 3mL의 분취량들을, 100 μM 원액을 사용하여 MRS4322, 설펜메탁사졸 또는 와파린으로 스파이크하여, 각 화합물에 대하여 1 μM의 최종 시험 농도를 생성했다. 스파이크된 혈장 샘플을 가습된 5% CO₂ 챔버에서 37°C에서 회전 믹서로 최소 60분 동안 항온처리했다. 60분 후, 각 샘플의 800ul의 분취량을 Centrifree 원심분리 필터에 첨가했다. 필터를 37°C에서 2900rpm에서 10분 동안 원심분리시켰다. 3개의 100ul 분취량의 잔류 혈장을 생분석을 위한 한외 여과물과 함께 수집했다.
- [0479] 뇌 결합 결정: MRS4322, 설펜메탁사졸 및 와파린을 DMSO 중에 가용화시킨 뒤 1:1의 아세트니트릴:물에 희석하여 100 μM 투석 원액을 제조했다. 수집된 균질화된 뇌를, 37°C로 유지되는 가습된 5% CO₂ 항온처리기에서 60분간 예비 가온했다. 뇌 균질물의 3mL의 분취량들을, 100 μM 원액을 사용하여 각각 MRS4322, 설펜메탁사졸 또는 와파린으로 스파이크하여, 각 화합물에 대하여 1 μM의 최종 스파이크 농도를 생성했다. 스파이크된 수집된 뇌 균질물을 가습된 5% CO₂ 항온처리기 중의 Nutator 믹서에서 37°C에서 60분 동안 항온처리했다. 60분 후, 각 샘플의 3개의 800ul의 분취량을 Centrifree 원심분리 필터에 첨가했다. 필터를 2900rpm에서 10분 동안 37°C에서 원심분리시켰다. 잔류 뇌 균질물 및 한외 여과물의 분취량을 생분석을 위해 수집했다.
- [0480] 생분석
- [0481] 스파이크된 혈장, 뇌 균질물 및 관련 한외 여과물에서의 MRS4322의 혈장 및 뇌 농도는, 내부 표준으로서 톨부타미드를 사용하는 LC-MS/MS에 의해 결정되었다. 설펜메탁사졸 및 와파린의 관련 농도도 표준 조건을 사용하여 LC-MS/MS로 측정했다(데이터는 도시하지 않음). 하기 표는 사용된 LC 및 MS/MS 조건을 요약한다(표 15 및 표 16). 생분석 방법은 모든 매트릭스에 대해 동일했으며, 표준 곡선 통계(예를 들어, 피트, 절편, 경사, 상관 계수)가 각 매트릭스에 대해 결정되었지만 유의한 차이가 없었으므로, 각 매트릭스에 대해 도시되지 않았다.

표 15: 혈장, 뇌 균질물, 혈장 한외 여과물 및 뇌 균질물 한외 여과물 농도를 결정하기

위한 MRS4322 의 생분석 방법

혈장, 뇌 균질물, 혈장 한외 여과물 및 뇌 균질물 한외 여과물 샘플의 생분석

시스템 구성요소		
모델	제조사	모델
HPLC	Shimadzu	Prominence LC20AD Binary Pumps
오토샘플러	CTC Leap	HTC PAL
질량 분석계	AB Sciex	API 4000
HPLC 방법		
컬럼	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μm)	
용리	구배, 0.4 mL/min	
	이동상 A: 0.1% 물 중 포름산	
	이동상 B: 0.1% 아세토니트릴 중 포름산	
질량 분석계 Conditions for MRS4322		
피크명: MRS4322		
Q1/Q3 질량: 324.10/182.00 Da		
피크명: 틀부타미드		
Q1/Q3 질량: 271.20/155.20 Da		
파트	선형	가중치 1 / x
절편	0.0181	
기울기	0.00192	
상관 계수	0.9988	

[0482]

[0483]

[0484]

[0485]

각 조직 매트릭스에 대해, 표준 곡선이 생성되고 LLOQ/ULOQ 농도가 결정되었다. MRS4322 혈장 농도 표준 곡선의 교정 범위는 5 내지 1,000nM였다. MRS4322 혈장 한외 여과 표준 곡선의 교정 범위는 5 내지 1,000nM였다. MRS4322 뇌 균질물 및 뇌 균질물 한외 여과 표준 곡선의 교정 범위는 각각 5 내지 1,000nM였다.

결과

혈장 한외 여과를 이용하여 MRS4322에 대한 혈장 결합 및 유리 분획을 측정했다. 혈장 결합은 MRS4322에 대하여 21.6 %였고, 관련 유리 분획은 0.784였다(표 16). 연구 기준 설파메탁사졸 및 와파린의 결합은 문헌의 값과 일치했다.

표 16: 신생 돼지 혈장 중 MRS4322 의 비결합 및 결합 분획

기질	비결합 분획		% 결합		N
	평균	SD	평균	SD	
MRS4322	0.784	0.061	21.6	6.1	3
설파메탁사졸	0.606	0.016	39.4	1.6	2
와파린	0.0159	0.0021	98.4	0.2	3

[0486]

[0487]

* MRS5698 의 혈장 한외 여과물 농도는 BLQ 였다

뇌 균질물 한외 여과를 이용하여 MRS4322에 대한 뇌 결합 및 유리 분획을 측정했다. 뇌 결합률은 MRS4322에 대하여 74.7%였고; 관련 자유 분획은 0.253이었다(표 17). 연구 기준 설파메탁사졸 및 와파린의 결합률은 문헌의 값과 일치했다.

표 17: 신생 돼지 뇌 균질물 중 MRS4322 의 비결합 및 결합 분획

기질	비결합 분획		% 결합		N
	평균	SD	평균	SD	
MRS4322	0.253	0.043	74.7	4.3	3
설파메탁사졸	0.309	0.029	69.1	2.9	3
와파린	0.189	0.006	81.1	0.6	3

[0488]

[0489]

이러한 데이터는, 제공된 총 혈장 또는 뇌 농도에 대하여, MRS4322의 실질적인 비결합 약물 농도가 아데노신 A₃ 수용체와의 상호 작용에 대해 뇌에서 이용 가능할 것을 나타낸다. 이러한 발견은 마우스에서 관찰된 결과와도 일치한다.

[0490] **실시예 13: MRS4322의 약리학적 특성확인**

[0491] 화합물 MRS4322를, 세포 막 제제를 사용하여 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에서 재조합 발현된 인간 및 마우스 A₃ 아데노신 수용체에서의 경쟁 결합 연구로 조사했다. [³H]NECA를 A₃ 작용제 방사성 리간드로 사용했다. CHO 세포가 기본적으로 아데노신 수용체를 발현하지 않기 때문에, 비선택적 작용제 NECA를 사용할 수 있다. MRS4322에 의한 방사성 리간드의 농도-의존 변위가 결정되었다.

[0492] 또한, cAMP 실험은 인간 A₃ 또는 마우스 A₃ 아데노신 수용체를 재조합 발현하는 CHO 세포에서 실시했다. 비선택적 작용제 NECA를 대조군으로 사용했다.

[0493] **결과**

[0494] MRS4322는 방사성 리간드 결합 연구에서 [³H]NECA에 대하여, 인간 A₃ 수용체에서 1490 ± 410nM의 K_i값을, 마우스 A₃ 수용체에서 4900 ± 974nM의 K_i값을 나타냈다.

[0495] A₃ 아데노신 수용체를 발현하는 CHO 세포에서의 기능적 cAMP 측정 실험에서, MRS4322는 인간 A₃ 수용체에서 3630 ± 370nM의 EC₅₀값으로, 마우스 A₃ 수용체에서 759 ± 170nM의 EC₅₀값으로 작용 활성을 나타냈다. GPCR에서 작용제의 EC₅₀값은 수용체 발현 수준에 따른다. 인간 A₃ 수용체 세포주는 마우스 A₃ 수용체를 갖는 세포주보다 낮은 발현 수준을 갖는 것으로 보이는데, 그 이유는 보다 높은 EC₅₀값이 관찰되었기 때문이며, 이는 대조군 작용제 NECA에 대한 경우이기도 하다.

표 18: 방사성리간드 결합 연구에서 측정된, CHO 세포에서 안정적으로 발현된

아데노신 수용체에서의 작용제의 친화도 [K_i± SEM (nM)]

수용체	인간 A ₃ R	마우스 A ₃ R
작용제	[³ H]NECA	[³ H]NECA
MRS4322	1490 ± 410	4940 ± 974
NECA	6.18 (K_D)^a	15.1 (K_D)^a

^aAlnouri M.W. et al. Selectivity is species-dependent: Characterization of standard agonists and antagonists at human, rat, and mouse adenosine receptors. Purinergic Signal.

2015, 11, 389-407. 본 연구 및 발간된 연구에서 동일한 세포주가 사용되었다.

[0496]

표 19: cAMP 축적 검정에서 측정된, CHO 세포에서 안정적으로 발현된 A₃

아데노신 수용체에서의 작용제의 효력

	인간 A ₃ R	마우스 A ₃ R
	EC₅₀ ± SEM (nM) (NECA의 최대 효과를 기준으로 한 100 μM 농도에서의 %로 나타낸 효능)	
작용제		
MRS4322	3630 ± 370 (70 ± 12)	759 ± 170 (72 ± 18)
NECA	41.8 ± 6.3	6.85 ± 0.88

[0497]

[0498]

도 17은, CHO 세포에서 발현된 인간 A₃ 수용체에서의 MRS4322 대 A₃ 작용제 방사성 리간드 [³H]NECA(10nM)의 경쟁 결합 실험을 도시한다. MRS4322에 대해 계산된 K_i값은 1490 ± 410nM이었다.

[0499]

도 18은, CHO 세포에서 발현된 마우스 A₃ 수용체에서의 MRS4322 대 A₃ 작용제 방사성 리간드 [³H]NECA(10nM)의 경쟁 결합 실험을 도시한다. MRS4322에 대해 계산된 K_i값은 4940 ± 974nM이었다. 도 19는, CHO 세포에서 발현된 인간 A₃ 수용체에서의 MRS4322 및 NECA의 cAMP 축적 실험을 도시한다. MRS4322에 대해 계산된 EC₅₀값은 3630 ± 370nM이었고; NECA의 경우 41.8 ± 6.3 nM의 EC₅₀값이 측정되었다. 도 20은, CHO 세포에서 발현된 마우스 A₃ 수용체에서의 MRS4322 및 NECA의 cAMP 축적 실험을 도시한다. MRS4322에 대해 계산된 EC₅₀값은 759 ± 170nM이었고; NECA의 경우 6.85 ± 0.8nM의 EC₅₀값이 측정됐다.

[0500]

이러한 결과는 MRS1873에 대한 공지된 결합 데이터보다 낮지만, 연관된다. 인간 A₃, K_i 데이터: MRS1873 K_i = 353nM; EC₅₀ = 803 nM, 문헌[J. Med. Chem. 2002 45:4471-4484. "Structural Determinants of A3 Adenosine Receptor Activation: Nucleoside Ligands at the Agonist/Antagonist Boundary," Gao, Z-G. et al.]에 공개.

[0501]

이전의 논문은 인간 A₃ K_i를 85nM으로 기재하고 있다: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2001 11:1333-1337. "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists: Independent 5'-Uronamide and 2'-Deoxy Modifications," Lee, K. et al.

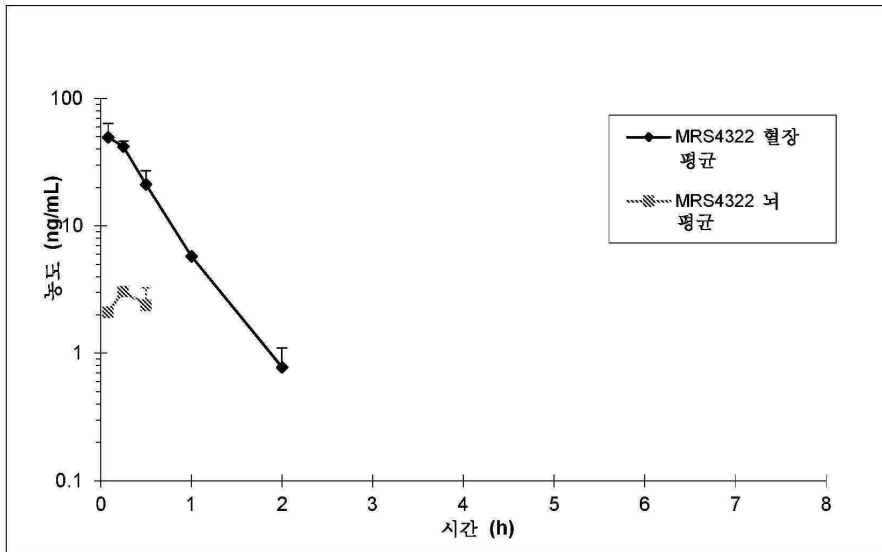
[0502]

본 발명의 다수의 양태가 개시되었지만, 상기 개시된 특정 양태는 본 발명의 화합물 및 방법을 이용하는 다른 양태를 제공하기 위해 통상적인 실험을 사용하여 변형될 수 있음이 이해된다. 따라서, 본 발명의 범위는 제공된 특정 양태가 아니라 이하의 청구범위에 의해서만 한정되어야 함을 이해할 수 있을 것이다.

도면

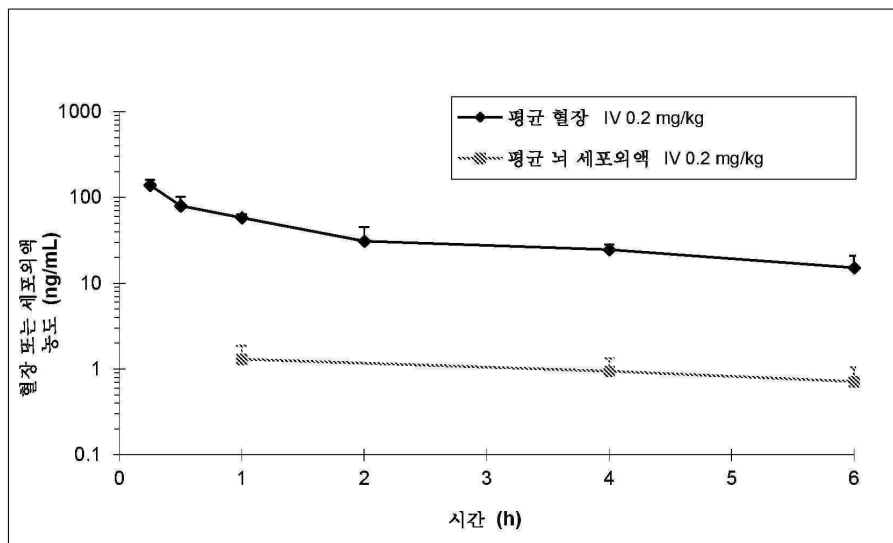
도면1a

마우스에서의 MRS4322 혈장 & 뇌 농도 vs 시간 프로파일

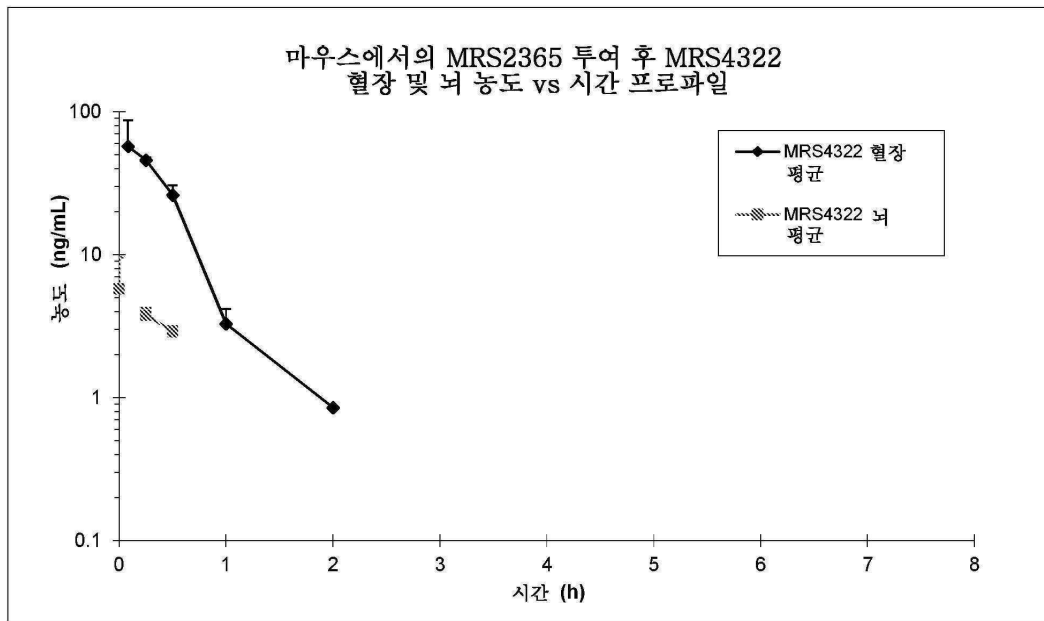


도면1b

신생 돼지에서의 MRS4322 혈장 & 뇌 농도 vs 시간 프로파일

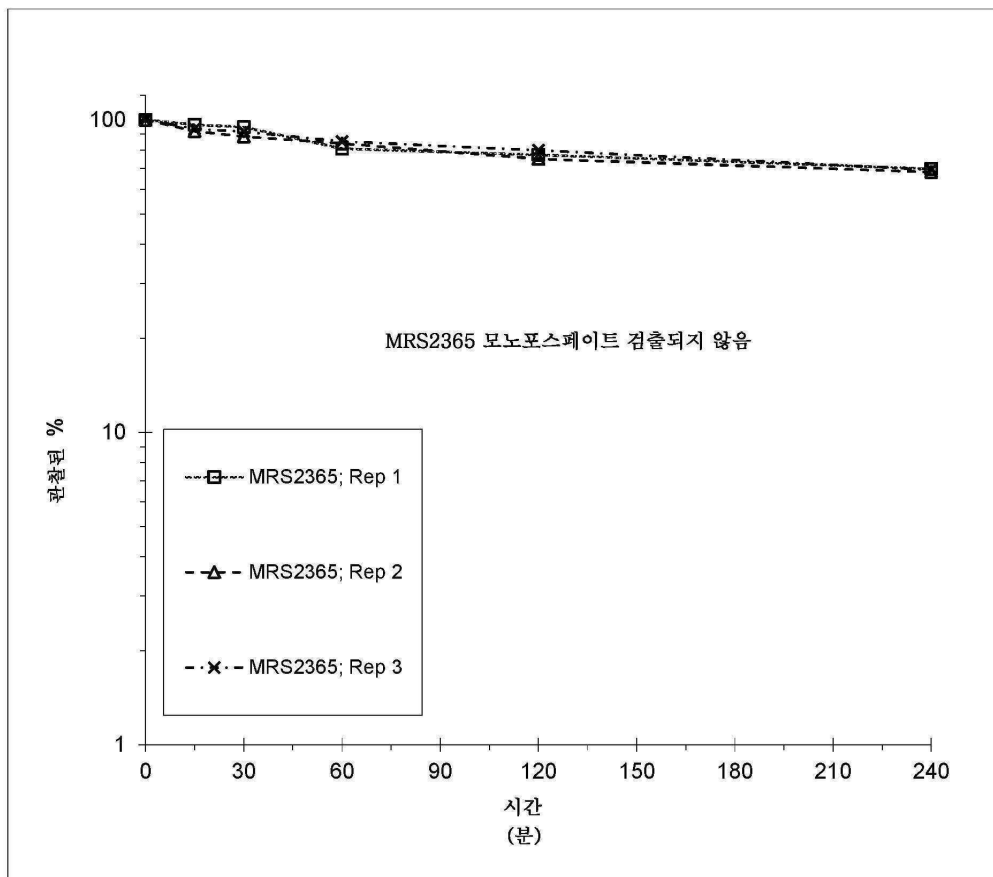


도면2

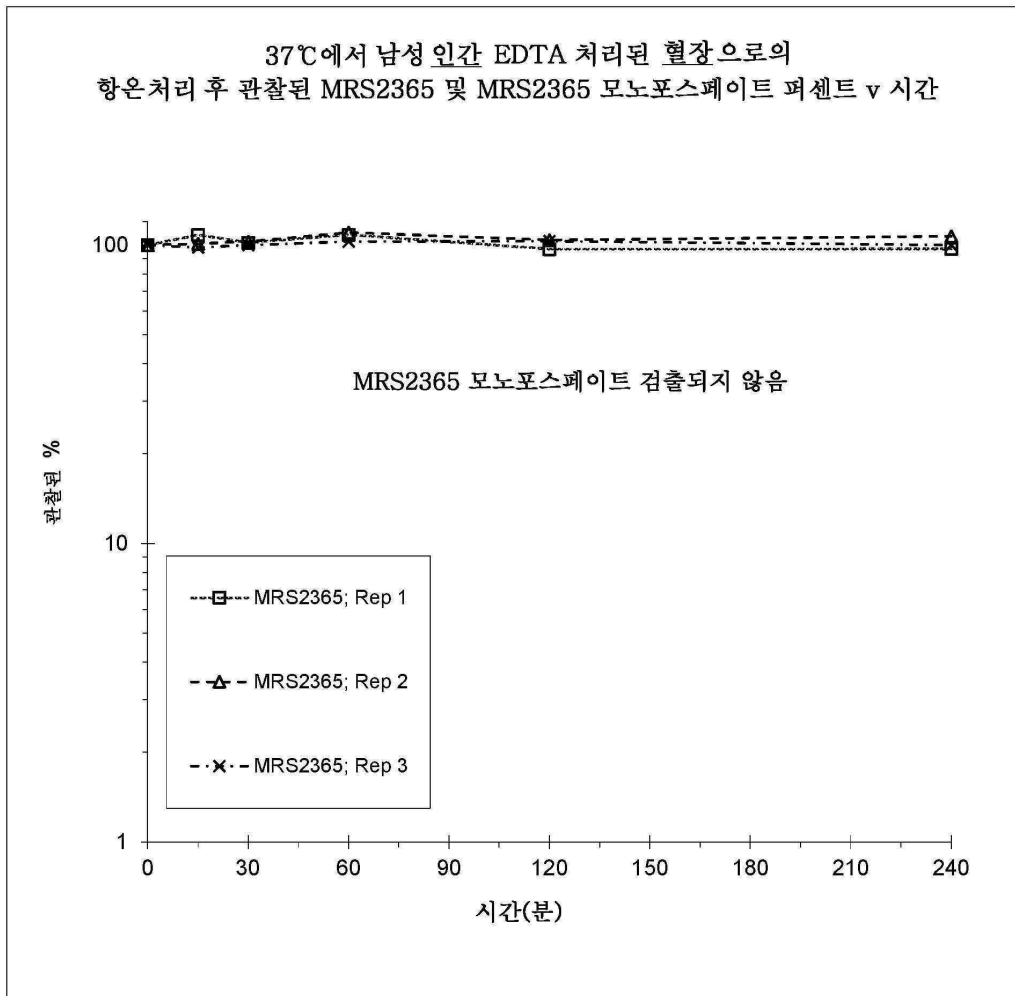


도면3

37°C에서 수컷 CD-1 마우스 EDTA 처리된 혈장으로의 항온배양 후
관찰된 MRS2365 및 MRS2365 모노포스페이트 퍼센트 v 시간

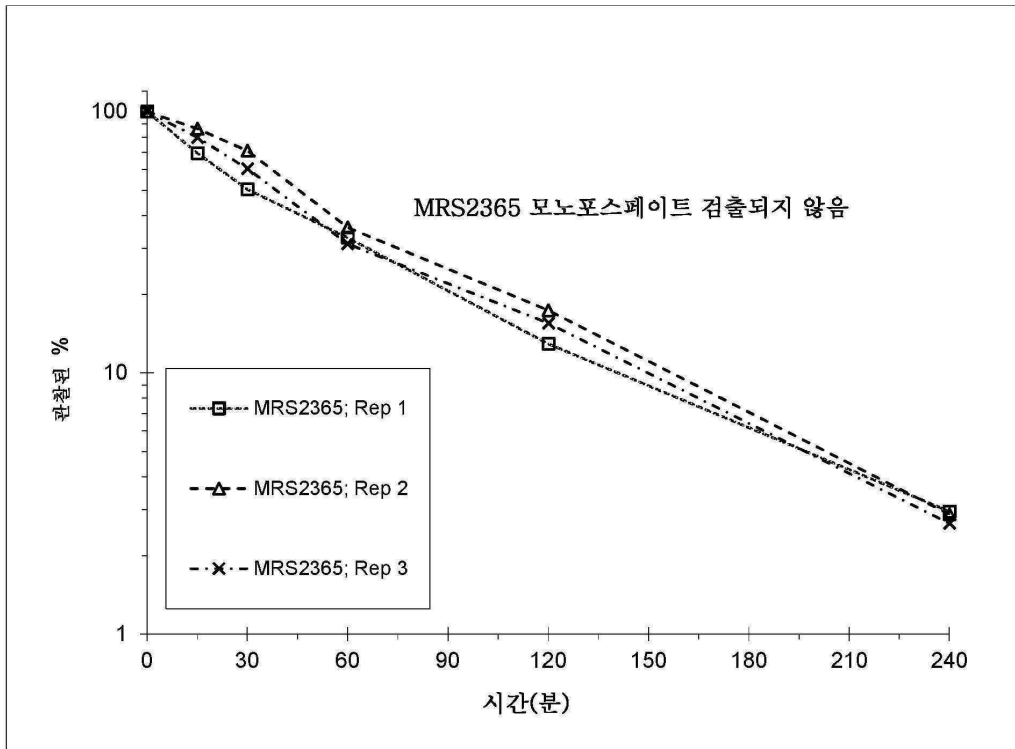


도면4

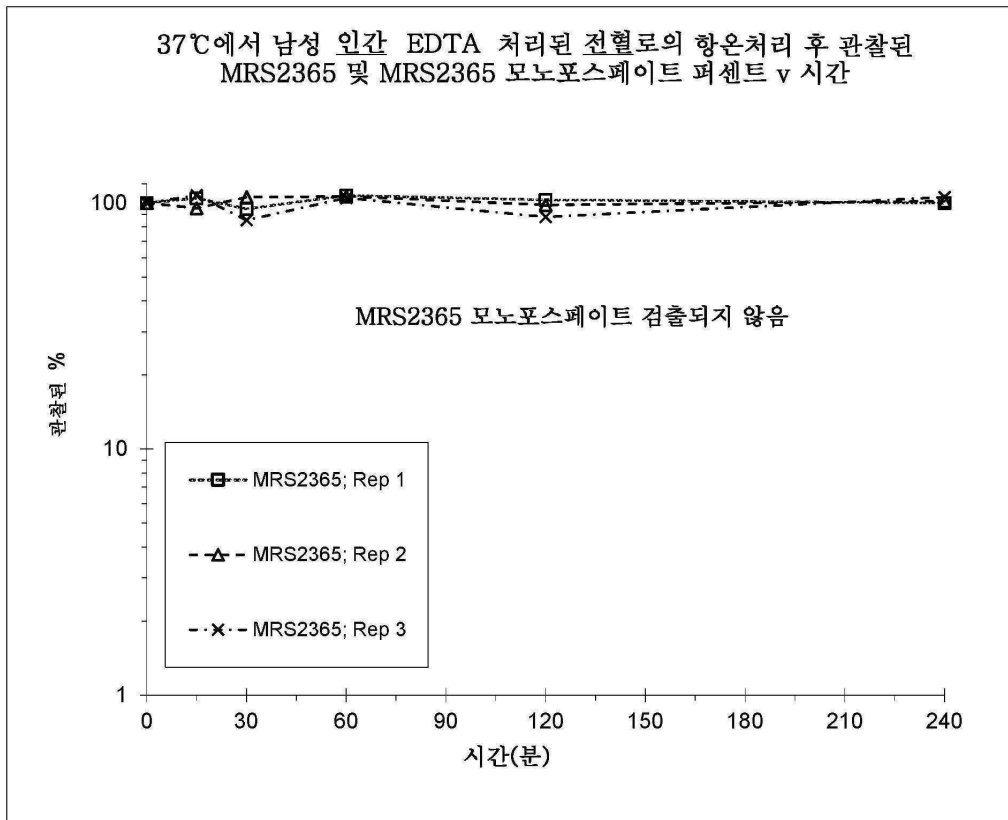


도면5

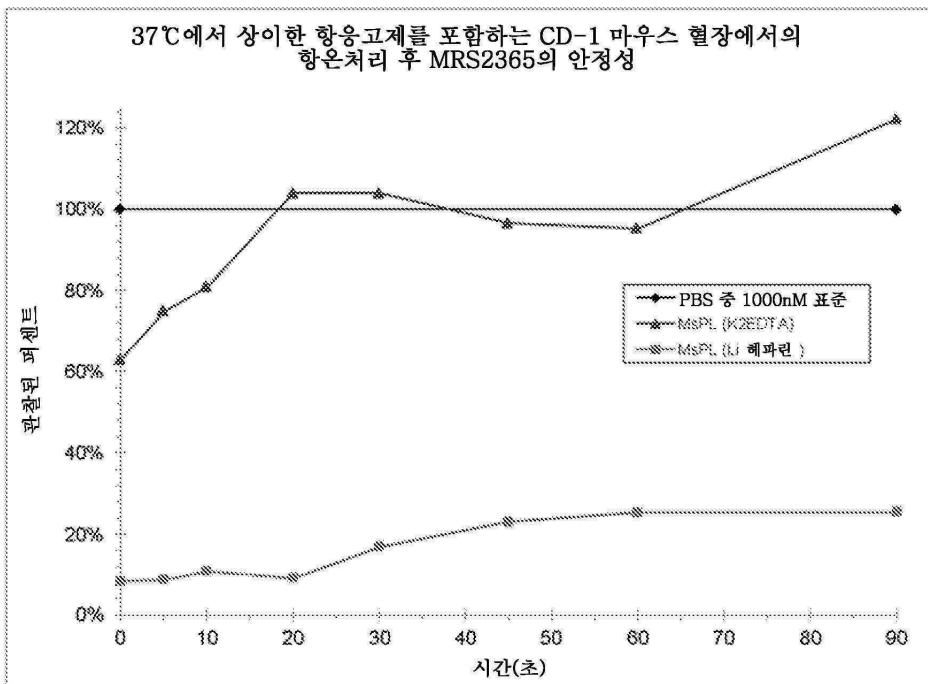
37°C에서 수컷 CD-1 마우스 EDTA 처리된 전혈로의
 항은처리 후 관찰된 MRS2365 및 MRS2365 모노포스페이트 퍼센트 v 시간



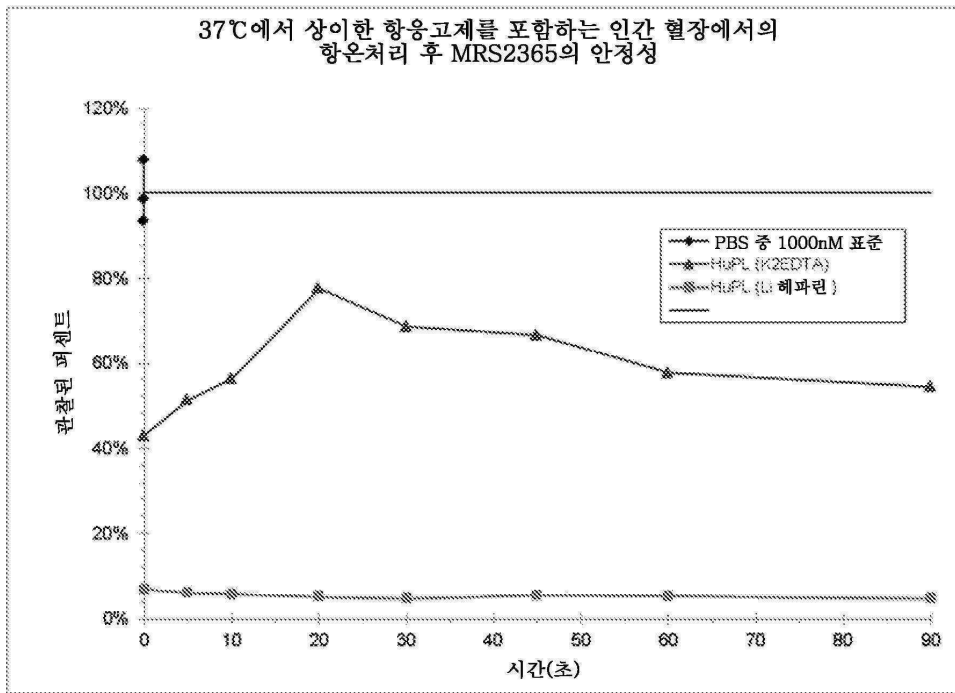
도면6



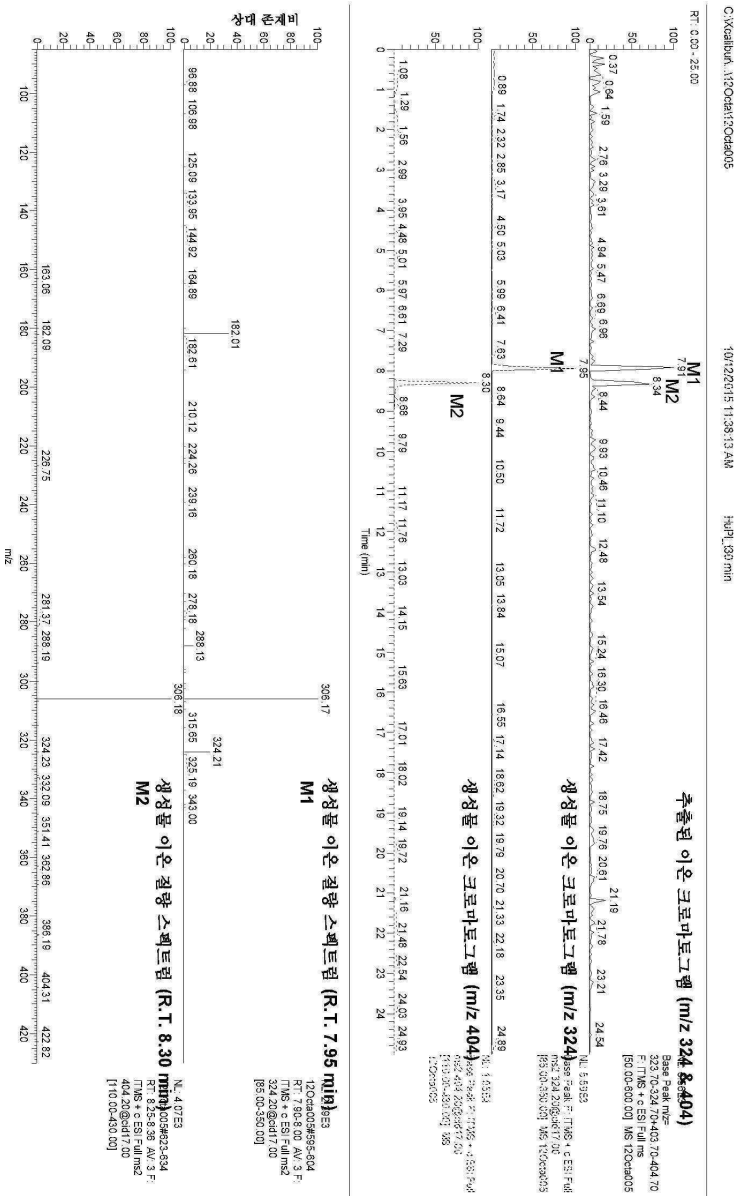
도면7



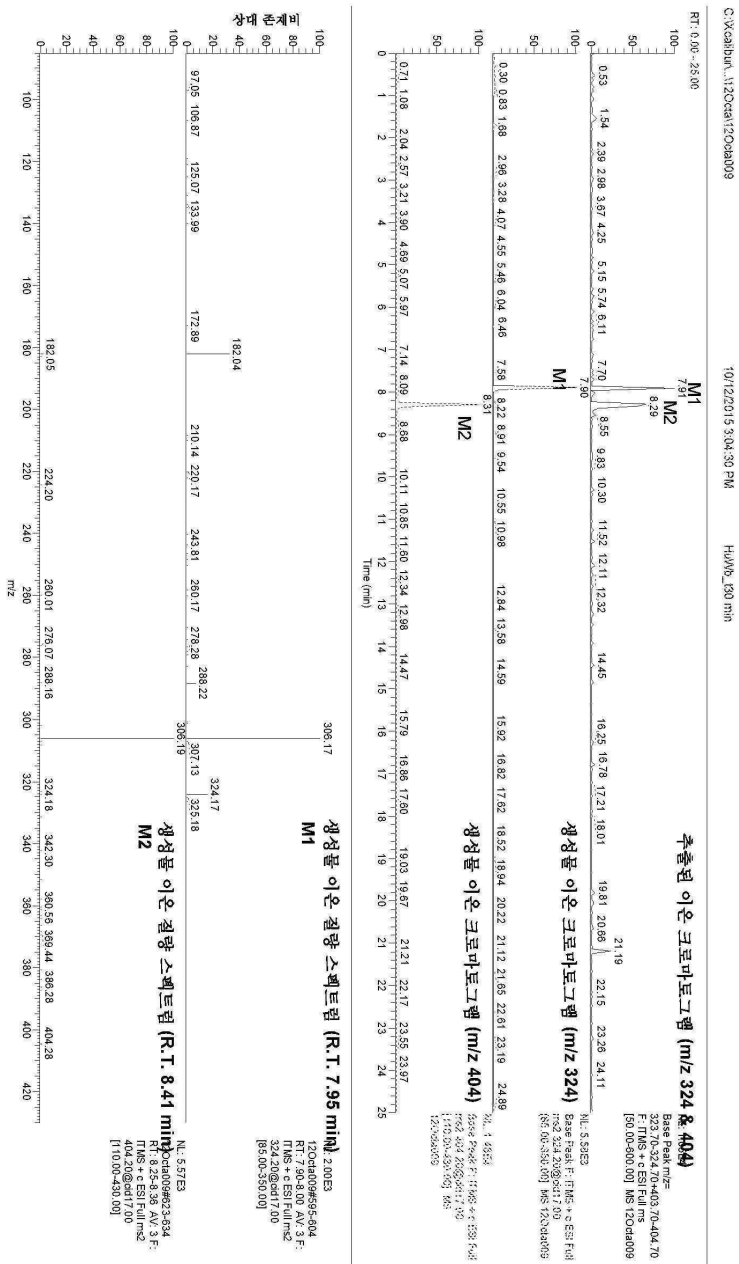
도면8



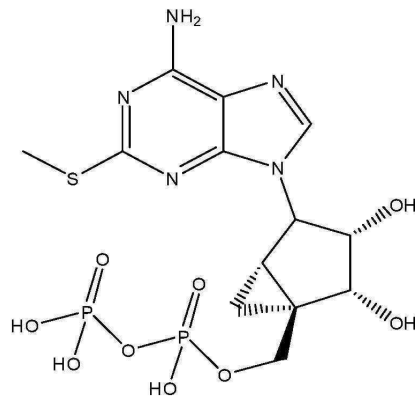
도면9



도면10

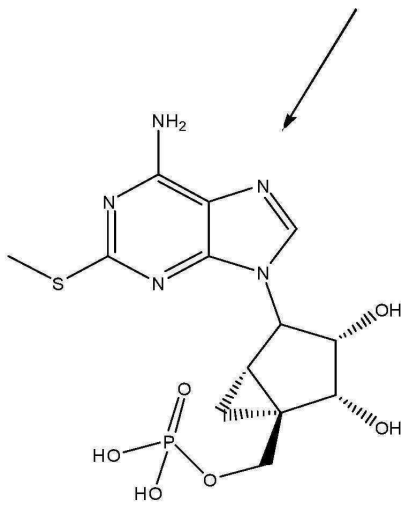


도면11



MRS 2365

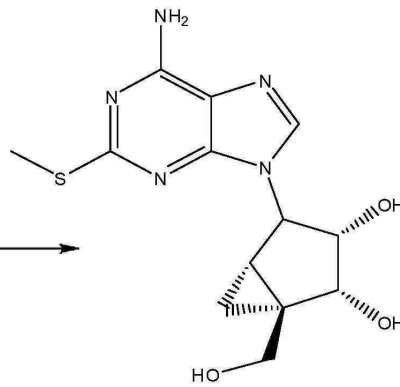
Chemical Formula: $C_{13}H_{19}N_5O_9P_2S$
Exact Mass: 483.0379



M2

Chemical Formula: $C_{13}H_{18}N_5O_6PS$
Exact Mass: 403.0715

MRS2347

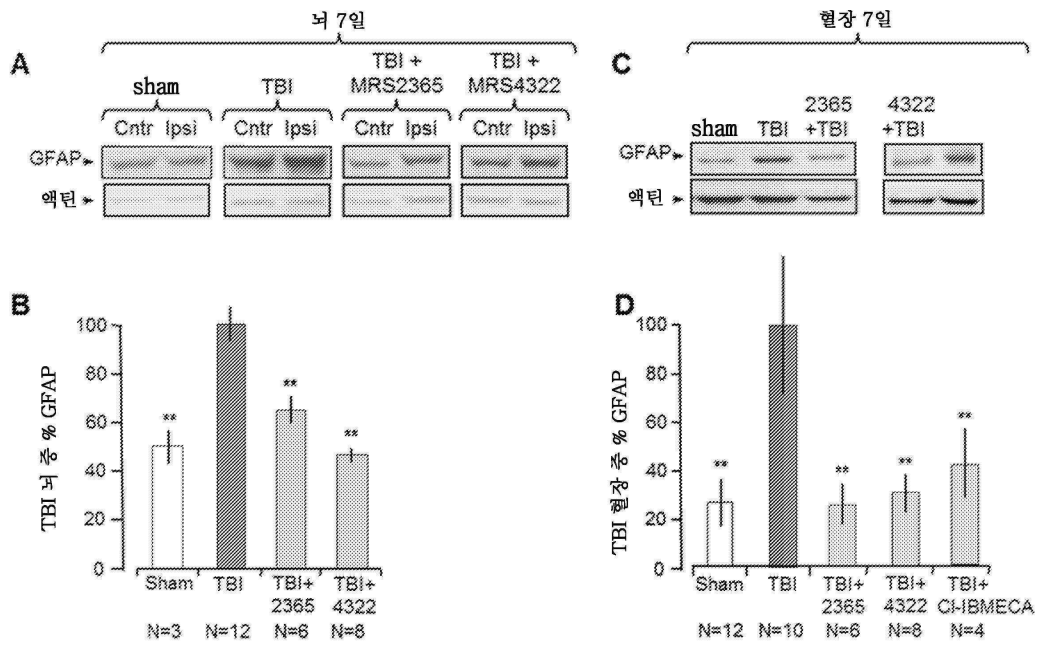


M1

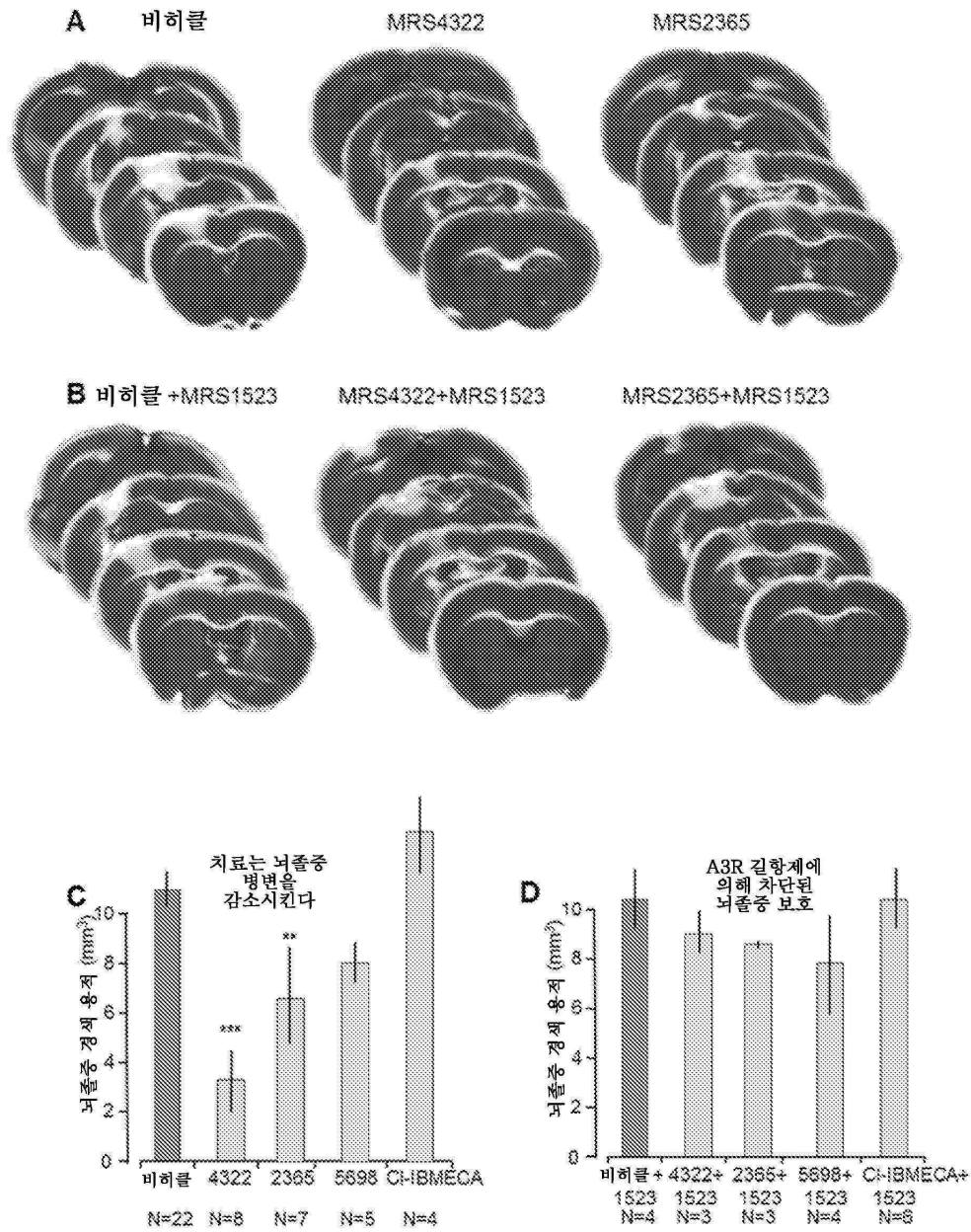
Chemical Formula: $C_{13}H_{17}N_5O_3S$
Exact Mass: 323.1052

MRS4322

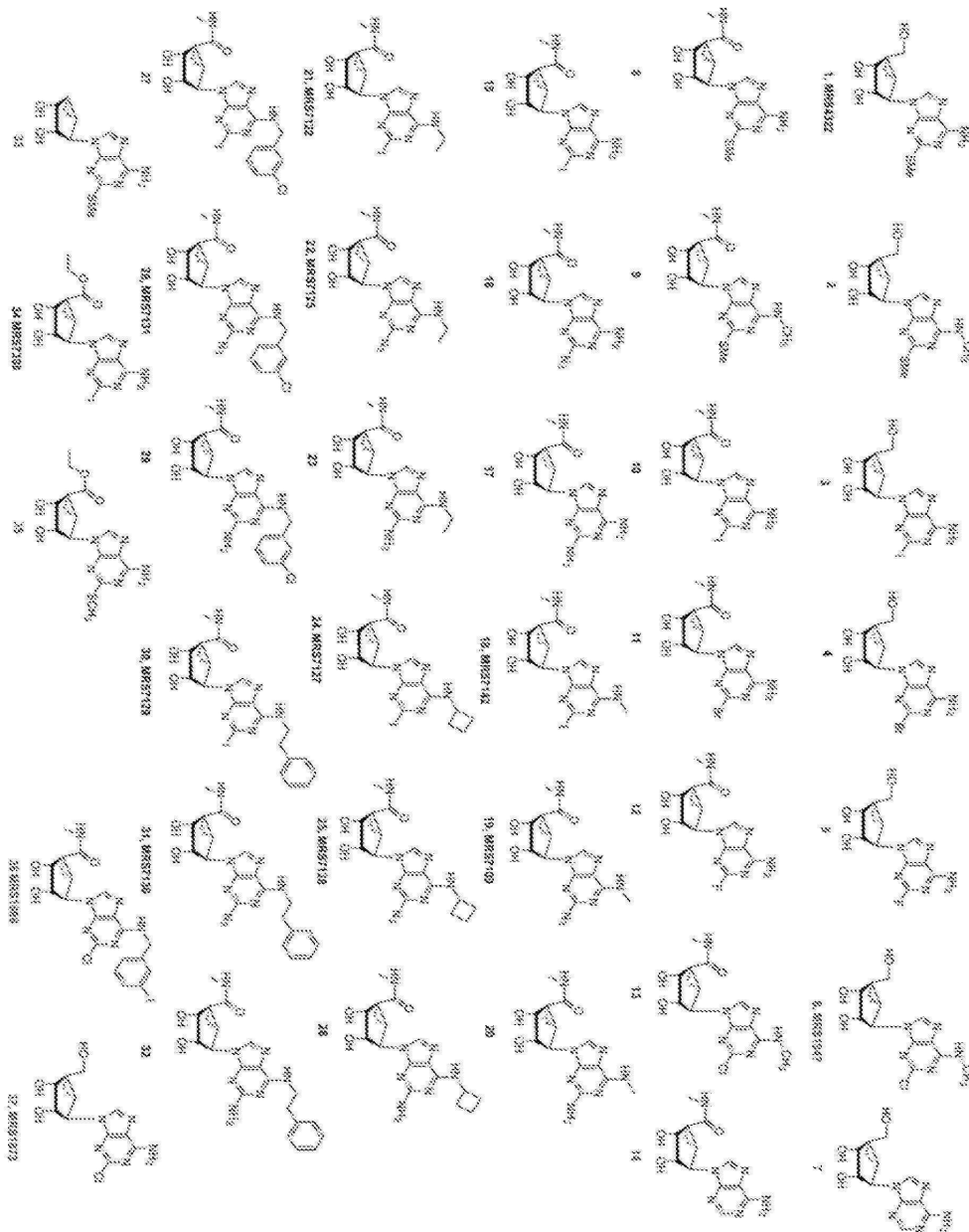
도면12



도면13

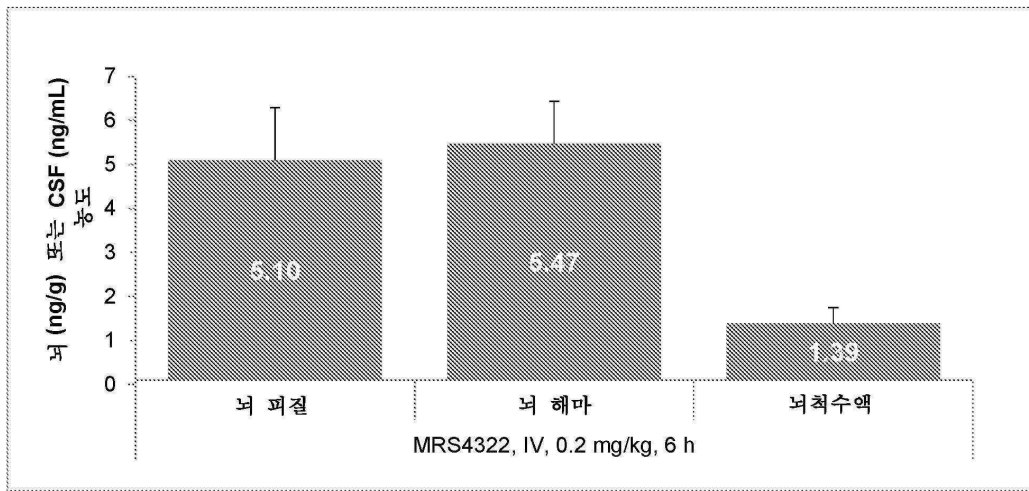


도면15



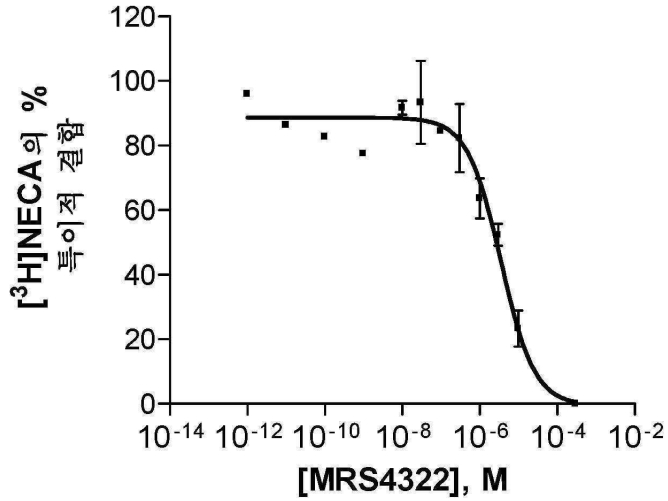
도면16

정맥내 투여 후 신생 돼지에서 MRS4322의 뇌 및 뇌척수액 농도-시간 프로파일



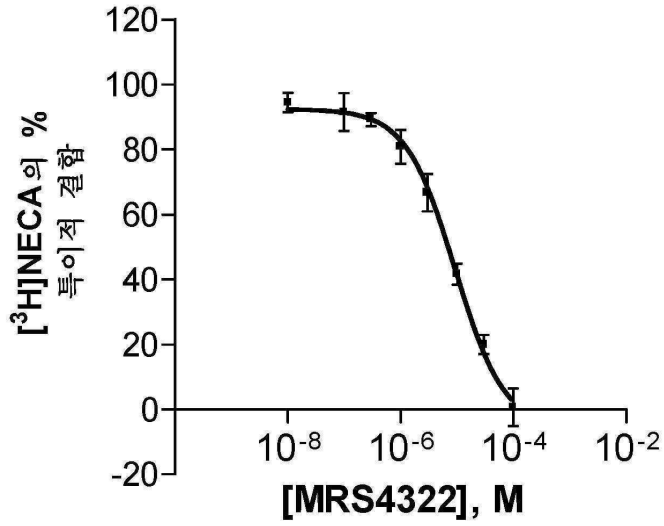
도면17

인간 A3 수용체에서의 MRS4322의 경쟁 결합 실험



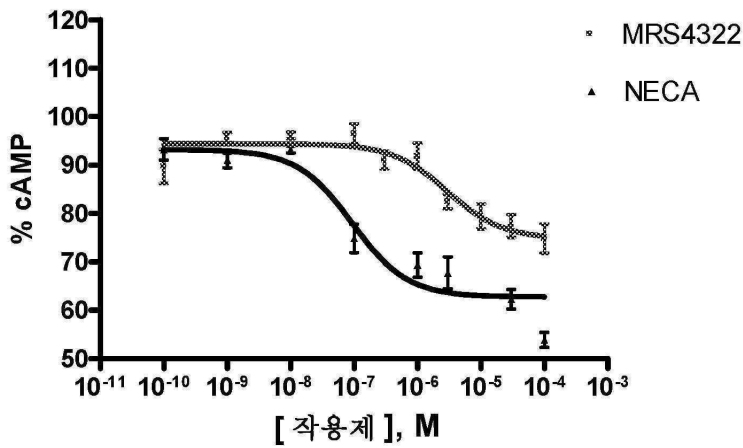
도면18

마우스 A3 수용체에서의 MRS4322의 경쟁 결합 실험



도면19

인간 A3 수용체에서의 MRS4322 및 NECA의 cAMP 측정 실험



도면20

마우스 A3 수용체에서의 MRS4322 및 NECA의 cAMP 축적 실험

