(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C07D 487/14 (2006.01)
C07D 513/14 (2006.01)
C07D 498/14 (2006.01)
A61K 31/5513 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0033033
(43) 공개일자 2007년03월23일

(21) 출원번호 10-2007-7003578
(22) 출원일자 2007년02월14일
심사청구일자 없음
번역문 제출일자 2007년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/007805
국제출원일자 2005년07월18일
(87) 국제공개번호 WO 2006/008119
국제공개일자 2006년01월26일

(30) 우선권주장 60/588,354 2004년07월16일 미국(US)
60/620,323 2004년10월21일 미국(US)
60/656,378 2005년02월28일 미국(US)
60/656,379 2005년02월28일 미국(US)

(71) 출원인 프로테오시스 악티엔게젤샤프트
독일 55129 마인쯔 카를-짜이스-슈트라쎄 51

(72) 발명자 쉬라텐홀츠 안드레
독일 55129 마인츠 힌터 데어 키르케 43

(74) 대리인 리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 염증성 질환 치료제로서 ＰＡＲＰ 및 ＳＩＲ 조절 활성을갖는 무스카린 길항제

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 혼합 무스카린 억제/PARP 조절의 세포보호 활성, 그리고 특히 M1 무스카린 수용체 및 폴리(ADP-리보오스)폴리머라제(PARP)의 이중 억제제의 상피보호 의약, 특히 중증 폐혈증, 급성 폐 손상, 급성 호흡곤란증후군(RDS), 낭성 섬유증, 천식, 알레르기성 비염, 만성폐색성폐질환(COPD), 폐 섬유증, 전신 경화증, 진폐증, 또는 폐암과 같이 상당한 염증성 성분과 관련된 통상적인 폐질환중 적어도 하나의 예방 및/또는 치료를 위한 의약으로서 M1 무스카린 수용체 및 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제 (PARP) 및/또는 SIR2 조절제의 이중 억제제의 사용 용도에 관한 것이다. 특히 바람직한 화합물은 축합 디아제피논, 예를 들어 피렌제핀과 같은 축합 벤조디아제피논, 또는 올란자핀과 같은 축합 벤조디아제피논으로 대사되는 화합물이다.

대표도

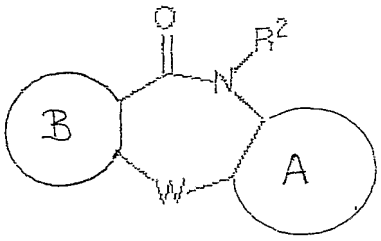
도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

염증성 성분과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 하기 화학식 I의 화합물, 그의 염, 또는 그 유도체의 용도:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

A 및 B는 N, S, 및 O로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환으로서, 할로, C_1-C_4-(할로)-알킬, C_1-C_4-(할로)-알콕시, 아미노, C_1-C_4-알킬-아미노, 또는 디(C_1-C_4-알킬)아미노로 선택적으로 단일 또는 다수 치환되고,

W는 S, O, NR_1, 또는 CHR_1이고,

R1은 수소, Y, 또는 COY이고,

R2는 수소 또는 C_1-C_4-(할로)-알킬이며,

Y는 C_1-C_6 (할로)알킬, 또는 C_3-C_8 시클로-(할로)-알킬이고, 여기에서 알킬기 또는 시클로알킬기는 N, S, 및 O로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환으로 선택적으로 치환되며, 여기에서 환은 할로, C_1-C_4-(할로)알킬, C_1-C_4(할로)알콕시, 아미노, C_1-C_4-알킬 아미노, 디(C_1-C_4-알킬)아미노, 또는 Z로 선택적으로 단일 또는 다수 치환되고,

상기 Z는 그룹 $N(R4)_2$로 ω-치환된 C_1-C_6 (할로)알킬기이고, 여기에서 R4는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_8 알킬, 또는 CO-C_1-C_8 알킬이거나, 두 개의 R4가 함께 N, S, 및 O로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 더 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환을 형성하고, 여기에서 환은 할로, C_1-C_4-(할로)알킬, 또는 C_1-C_4(할로)알콕시로 선택적으로 단일 또는 다수 치환된다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 염증성 또는 염증-관련 폐질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상피 변성 또는 상피-염증성 상태의 예방 또는 치료를 위한, 특히 심한 패혈증, 급성 폐손상, 급성 호흡곤란증후군, 낭성 섬유증, 천식, 알레르기성 비염, COPD, 또는 폐암과 같은 염증성 성분과 관련된 폐질환의 예방 및/또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 4.

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 낭성 섬유증, 특히 CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) Cl^- 채널의 기능적 손상을 갖는 환자에서의 낭성 섬유증의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 위장관계의 궤양성 또는 다른 염증성 혹은 염증-관련 상태, 특히 CFTR Cl^- 채널의 기능적 손상을 갖는 환자에서의 위장관계의 궤양성 또는 다른 염증성 혹은 염증-관련 상태의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 암의 예방 또는 진행과 관련된 염증성 또는 염증-관련 과정의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 류마티스성 관절염 또는 전신성 홍반성 루프스와 같은 자가면역질환과 관련되는 염증성 또는 염증-관련 과정의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 8.

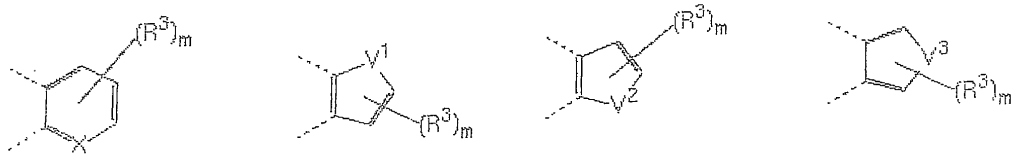
제 1 항에 있어서, 염증성 또는 염증-관련 통증의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 염증성 또는 염증-관련 안과 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 10.

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 환 A 및 B는 하기 구조로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도:



상기 식에서, X는 N 또는 CR3이고,

V1, V2, 또는 V3는 -O-, -S-, 및 NR6로부터 선택되고,

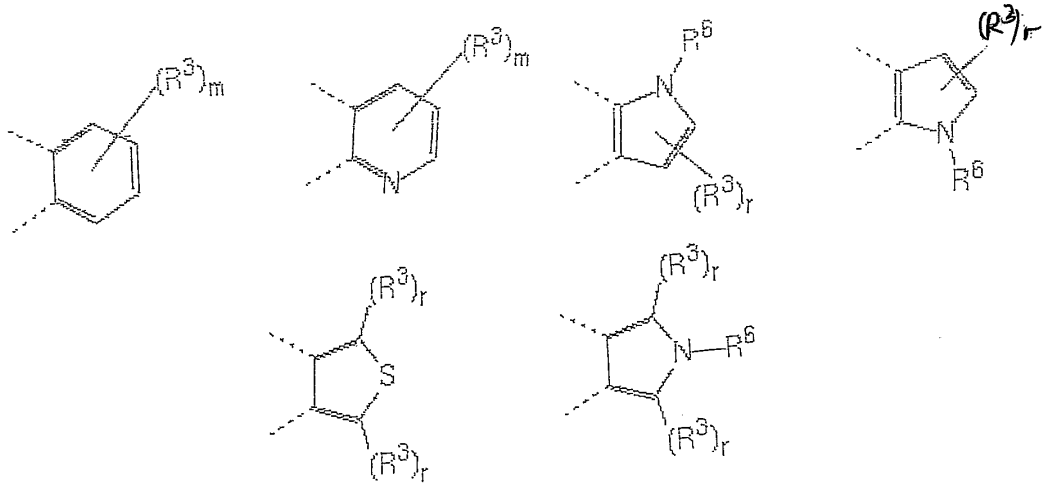
R3는 할로, C_1-C_4-(할로)-알킬, C_1-C_4-(할로)-알콕시, 아미노, C_1-C_4-알킬-아미노, 또는 디(C_1-C_4-알킬)아미노이고,

m은 0-2의 정수이며,

R6는 수소 또는 C_1-C_4-(할로)알킬이다.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 환 A 및 B는 하기 구조로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도:



상기 식에서,

R3는 청구항 제6항에서 정의된 바와 같고,

m은 0-2의 정수이고,

r은 0-1이 정수이고,

R6는 수소 또는 메틸이다.

청구항 12.

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, R1은 Y이고, Y는 C_3-C_8-시클로(할로)알킬인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 13.

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, R1은 COY이고, Y는 하기 화학식으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도:

-(CHR7)q-R8

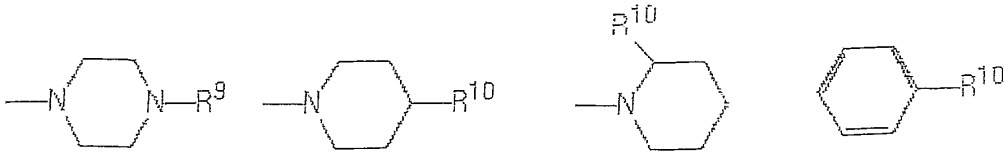
상기 식에서, R7은 수소, 할로, 또는 C_1-C_4-(할로)알킬이고,

q는 1-4의 정수, 바람직하게는 1이고,

R8은 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환이며, 여기에서 환은 C_1-C_4-(할로)알킬, 또는 제1항에서 정의된 바와 같은 ω-아미노-치환된 알킬기 Z로 선택적으로 단일 또는 다수 치환된다.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, R8은 하기 화학식으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도:



상기 화학식에서, R9은 수소 또는 C_1-C_4-(할로)알킬이고, R10은 또는 제1항에서 정의된 바와 같은 ω-아미노-치환된 알킬기 Z이다.

청구항 15.

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 I의 화합물은 피렌제핀 LS-75, 오텐제파드(otenzepad), AQ-RA741, 비라문(viramune), BIBN 99, DIBD, 텔렌제핀(telenzepine), 및 그의 염 또는 그의 유도체로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 16.

염증성 성분과 관련된 질환, 예를 들어 심한 패혈증, 급성 폐손상, 급성 호흡곤란증후군, 낭성 섬유증, 천식, 알레르기성 비염, COPD, 또는 폐암과 같은 폐질환 또는 안과 질환의 예방 및/또는 치료용 의약의 제조를 위한

(i) M1 무스카린 수용체 억제제 및

(ii) PARP 억제제인 화합물의 용도.

청구항 17.

염증성 성분과 관련된 질환, 예를 들어 심한 패혈증, 급성 폐손상, 급성 호흡곤란증후군, 낭성 섬유증, 천식, 알레르기성 비염, COPD, 또는 폐암과 같은 폐질환 또는 안과 질환의 예방 및/또는 치료용 의약의 제조를 위한

(i) M1 무스카린 수용체 억제제,

(ii) PARP 억제제, 및

(iii) SIR2 조절제인 화합물의 용도.

청구항 18.

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서, 상기 화합물은 온건하게 강력한 PARP 억제제인 것을 특징으로 하는 용도.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 복합적인 무스카린 억제/PARP 조절 및/또는 SIR2 조절의 세포보호 활성에 관한 것이며, 구체적으로 상피보호제(epithelioprotective agent), 특히 상당한 염증성 성분과 관련된 질환, 특히 중증 폐혈증, 급성 폐 손상, 급성 호흡곤란증후군(RDS), 낭성 섬유증, 천식, 알레르기성 비염, 만성폐색성폐질환(COPD), 폐 섬유증, 전신 경화증, 진폐증, 또는 폐암과 같은 폐질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약으로서 M1 무스카린 수용체 및 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제 (PARP) 및/또는 SIR2 조절제의 이중 억제제의 사용 용도에 관한 것이다. 특히 바람직한 화합물은 축합 디아제피논, 예를 들어 피렌제핀과 같은 축합 벤조디아제피논, 또는 올란자핀과 같은 축합 벤조디아제피논으로 대사되는 화합물이다.

배경기술

피레제핀 (5,11-디하이드로-11[(4-메틸-1-피페라지닐)-아세틸]-6H-피리도-[2,3-b]-[1,4]벤조디아제핀-6-온)은 국소적인 항궤양 작용을 갖는 M1 무스카린 길항제로서, 위장관 운동, 침샘, 중추신경계, 심혈관 기능, 눈 기능, 비뇨기 기능에 영향을 주는데 필요한 투여량보다 낮은 투여량에서 위장의 분비를 억제한다. 그것은 십이지장 궤양을 치료하고, 그 세포보호 작용으로 인해 십이지장 궤양의 재발을 예방하는데 유익하다. 그것은 또한 시메티딘 및 라니티딘과 같은 다른 항궤양제의 효과를 강화시킨다. 그것은 일반적으로 내약성이 좋다. 피렌제핀의 M1 무스카린 효과는 이러한 효과 및 하기 열거한 다른 적응증에서의 다양한 추가적인 효과를 설명하는 것으로 여겨진다.

피렌제핀의 제법, 약리, 약물동태, 및 작용기전에 대해서는, 다음 문헌을 참고할 수 있다:

제법: FR. Patent. 1,505,795 (1967 to Thomae), CA. 70, 4154w (1969).

약리: W. Ebenem et al. Arzneimittel-Forsch. 27, 356 (1977).

약물동태: R. Hammes et al., ibid. 928.

작용기전: G. Heller et al., Verh. Deut. Ges. Inn. Med. 84, 991(1978), CA. 90, 132984s (1979).

인간 약리: H. Brunnen et al., Arzneimittel-Forsch. 27, 684(1977).

여러 센터에서의 제어된 임상시험: Scand. J. Gastroenterol. 17, Suppl. 81, 1-42 (1982).

약리 및 치료 효능에 대한 리뷰: A. A. Carmine, R. N. Brogden, Drugs 30, 85-126 (1985).

포괄적인 기재: H. A. El-Obeid et al., in Analytical Profiles of Drug Substances, VoI 16, K. Florey, Ed. (Academic Press, New York, 1987) pp 445-506.

피렌제핀의 M1 무스카린 효과는 만성적인 심부전 환자 및 심근경색에서 회복되고 있는 환자 또는 일반적으로 고혈압 환자의 치료에 매우 유용한 미주신경모방성 신경-체액 조절을 가능하게 하는 것으로 여겨진다[Jakubetz J Human cardiac beta1- or beta2- adrenergic receptor stimulation and the negative chronotropic effect of low-dose pirenzepine. Clin Pharmacol Ther - 2000 May; 67(5): 549-57. Hayano T, Shimizu A, lkeda Y, Yamamoto T, Yamagata T, Ueyama T, Furutani Y, Matsuzaki M Paradoxical effects of pirenzepine on parasympathetic activity in chronic

heart failure and control.Int. J. Cardiol. 1999 Jan;68(1):47-56. Pedretti RF, Colombo E, Braga SS, Ballardini L, Caru B Effects of oral pirenzepine on heart rate variability and baroreceptor reflex sensitivity after acute myocardial infarction. J. Am. Coll. Cardiol. 1995 Mar 15;25(4):915-21. Wilhelmy R, Pitschner H, Neuzner J, Dursch M, Konig S Selective and unselective blockade of sympathicus and parasympathicus and vagal enhancement by pirenzepine: effects on heart rate and heart rate variability in healthy subjects. Clin Sci (Colch) 1996; 91 Suppl: 124.].

피렌제핀은 또한 그의 M1 무스카린 억제작용에 기초하여 몇몇 CNS-관련 질환에 이용되어 왔으며, 예를 들어 그것은 항정신병약의 병용 약물로서 이용된다(Hedges D, Jeppson K, Whitehead P Antipsychotic medication and seizures: a review. Drugs Today (Barc). 2003 Jul;39(7):551-7; Schneider B, Weigmann H, Hiemke C, Weber B, Fritze J. Reduction of clozapine-induced hypersalivation by pirenzepine is safe. Pharmacopsychiatry. 2004 Mar; 37(2):43-5). 정신분열증에서의 무스카린 수용체의 강력한 역할이 기본적인 이유인 것으로 여겨진다(Katerina Z, Andrew K, Filomena M, Xu-Feng H. Investigation of m1/m4 muscarinic receptors in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression disorder. Neuropsychopharmacology. 2004 Mar;29(3): 619-25). 또한, 선택적인 무스카린 M1 효능제는 알츠하이머에 유력하게 관여되는 아밀로이드 전구체 단백질의 분비 및 처리에 관여된다(Qiu Y1 Wu XJ, Chen HZ. Simultaneous changes in secretory amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide release from rat hippocampus by activation of muscarinic receptors. Neurosci Lett. 2003 Nov 27;352(1):41-4; Qiu Y, Chen HZ, Wu XJ, Jin ZJ. 6beta-acetoxy nortropane regulated processing of amyloid precursor protein in CHOM 1 cells and rat brain. Eur J Pharmacol. 2003 May 2;468(1):1-8.).

피렌제핀은 암 또는 정신분열증 치료에서의 부작용(예: 구토 또는 침분비 과다)를 억제하기 위해 올란자핀 또는 클로자핀과 함께 사용된다 (Bai YM, Lin CC, Chen JY, Liu WC. Therapeutic effect of pirenzepine for clozapine-induced hypersalivation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. J Clin Psychopharmacol. 2001 Dec;21(6):608-11).

피렌제핀은 또한 유망한 효과 및 허용 가능한 안전 프로파일로 근시 진행, 특히 어린이의 근시 진행을 늦추는데 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Gilmartin B. Myopia: precedents for research in the twenty-first century. Clin Experiment Ophthalmol. 2004 Jun;32(3):305-24; Bartlett JD, Niemann K, Houde B, Allred T, Edmondson MJ, Crockett RS.A tolerability study of pirenzepine ophthalmic gel in myopic children. J Ocul Pharmacol Ther. 2003 Jun;19(3):271-9.).

또한, 피렌제핀은 당뇨의 치료에 대해 시험되었다(Issa BG, Davies N, Hood K, Premawardhana LD, Peters JR, Scanion MF. Effect of 2 week treatment with pirenzepine on fasting and postprandial glucose concentrations in individuals with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003 May;26(5):1636-7). 이러한 연구들에 따르면, 피렌제핀이 상대적으로 안전한 화합물인 것으로 나타났다.

무스카린 수용체의 신경보호 또는 세포보호 역할에 대한 증거는 존재하지 않는다. 오직 그 무스카린 수용체의 역할은 강력하게 흥분독성 글루타메이트 분비를 조절하는데 있어서만 논의되어 왔다(e.g. Sholl-Franco A, Marques PM, Ferreira CM, de Araujo EG.IL-4 increases GABAergic phenotype in rat retinal cell cultures: involvement of muscarinic receptors and protein kinase C. J Neuroimmunol. 2002 Dec; 133(1-2):20-9. Calabresi P, Picconi B, Saulle E, Centonze D, Hainsworth AH, Bemardi G.Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release? Stroke. 2000 Mar;31(3):766-72; discussion 773). 무스카린 수용체는 뇌간의 NMDA 수용체의 mRNA 발현을 조절한다. 뇌졸중, 전간, 및 외상에서의 흥분독성 신경 파괴를 매개하는데 있어서의 글루타메이트 수용체의 중축적인 역할이 잘 확립되어 있다. 비록 칼슘이온이 흥분독성의 주요 조절제라고 여겨진다고 하더라도, 새로운 증거에 의해 총 Ca^{2+} 부하보다는 특정 2차 메신저 경로가 신경 퇴화를 매개하는 역할을 한다는 것이 제안된다. 산화질소 및 PARP-1과 같은 글루타메이트 수용체의 억제 신호 하행은 흥분독성 상해를 감소시킬 수 있다는 것을 보여주는 증거가 존재한다(Aarts MM, Tymianski M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. Curr MoI Med. 2004 Mar;4(2):137-47).

폴리(ADP-리보실)화 (Poly(ADP-ribosyl)ation)는 DNA 손상에 대한 즉각적인 세포 반응이며, 폴리(ADP-리보오스)폴리머라제 (PARP-1)에 의해 촉매작용이 이루어진다. DNA 손상에 의해 직접적으로 자극될 때, PARP-1은 다양한 생리학적 및 병태생리학적 현상에 연루된다. 생리학적으로, 그것은 게놈의 안정성을 유지하기 위해 중요하다. 병태생리학적으로, PARP-1 과활성은 세포 스트레스와 연관된 수많은 질병에 기여한다. PARP의 단백질 분해는 아폽토시스의 전체적인 표시

중의 하나인 DNA 분절과 함께 일어난다. PARP는 보통 DNA 복구 작용을 하는 DNA 손상 센서 효소이지만, DNA 손상에 의해 광범위하게 활성화될 때 세포의 사멸을 촉진시키며, 이것은 주로 NAD^+(PARP-1의 기질) 및 ATP의 고갈로 인한 세포의 기능 부전 및 세포 사멸을 일으킨다. PARP의 과활성화는 혈관 뇌졸중 및 괴사성 신경 사멸을 일으키는 다른 신경퇴행성 질환에서 두드러지는 것으로 보인다. 그러므로, PARP 억제제, 특히 PARP-1 억제제는 최근 들어 광범위한 치료 효능을 갖는 강력한 세포-/신경 보호 선두 구조로서 집중적인 관심을 끌었다(e.g. Cosi C, Guerin K, Marien M, Koek W, Rollet K. The PARP inhibitor benzamide protects against kainate and NMDA but not AMPA lesioning of the mouse striatum in vivo. Brain Res. 2004 Jan 16;996(1):1-8. Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Gamier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. J Neurosci. 2003, 23:10681-90. Pogrebniak A, Schemainda I, Pelka-Fleischer R, Nussler V, Hasmann M. Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors transiently protect leukemia cells from alkylating agent induced cell death by three different effects. Eur J Med Res. 2003 Oct 22;8(10):438-50. 전임상시험이 여러 회사에서 시행되었다: INOTEK PHARMACEUTICALS, USA, http://www.inotekcorp.com/news/index.htm: Guilford Pharmaceuticals Inc. http://www.guilfordpharm.com/ etc.

몇몇 부가적인 증거로 인해 신경보호 및 복구뿐만 아니라 기억 형성에 있어서의 결정적인 PARP-1의 역할에 초점이 맞춰졌다. PARP1-넉아웃 마우스로부터 유래된 피질 배양물 또는 PARP1 억제제로 처리된 배양물은 대개 저혈당성 신경 손상에 내성이 있다. 아주 최근의 발견에서도 장기간 기억 형성에 대한 PARP1의 역할이 나타났다(Suh et al., J. Neurosci. 23 (2003), 10681-10690; Ghen-Ammon et al., Science 304 (2004), 1820-1822).

비록, 그중 어느 것도 임상시험에 들어가지는 않았지만, 현재 10 개 미만의 PARP-1 억제제가 개발중에 있다. 이러한 부류는 대부분이 만족한 만한 시장을 가지고 있지 않은 다양한 심각한 질병과 관련이 있기 때문에, PJ34와 같은 분자의 개발은 상당한 임상적 및 재정적 전망을 제공한다 (http://www.bioportfolio.com/LeadDiscoverv/PubMed- 030215.htm: Faro R, Toyoda Y, McCulIy JD, Jagtap P, Szabo E, Virag L, Bianchi C, Levitsky S, Szabo C, Sellke FW. Myocardial protection by PJ34, a novel potent poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor. Ann Thorac Surg. 2002. 73:575-81).

그러나, PARP 억제제의 세포 사멸 예방 효과의 중요한 균형이 존재하는 것으로 보이며, 그것은 독립적으로 세포 에너지 대사를 유지하고, 엔도뉴클레오라이틱(endonucleolytic) DNA 분해의 활성을 억제하며, 세포의 기포(blebbing) 및 개별적인 PARP 억제제의 독성 프로파일을 억제하는 그것의 능력에 의해 매개되는 것으로 보인다.

발명의 상세한 설명

심각한 DNA 손상으로 인한 PARP-1 과활성은 세포 NAD^+(즉, PARPs의 기질) 및 ATP(ATP는 NAD^+의 재합성을 위해 필요하기 때문)의 고갈을 유발하며, 이는 세포 괴사를 유발할 수 있다, 즉 약한 유전독성 스트레스가 PARP-1을 활성화하고 DNA 복구를 자극시키는 반면에, 심한 손상은 NAD^+ 고갈 및 괴사성 세포 사멸을 유도한다(Beneke S, Diefenbach J, Poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. Int J Cancer. 2004. 111: 813-8). 후자는 염증 및 병리학적 조직손상과 관련이 있기 때문에, PARP 활성의 조절제는 병리학적 손상을 줄일 수 있다.

보존된 촉매 부위를 갖는 PARP-관련 단배질의 거대 패밀리는 효소 폴리(ADP-리보실)화 반응을 잠재적으로 많은 측면의 세포 생물학에까지 미치게 하며, 이는 항암 효능과 수많은 소염 및 신경퇴행성 질환의 치료를 향상시키기 위한 약물학적 전략을 향상시킬 수 있다(Ame JC, Spenlehauer, C, de-Murcia G. The PARP superfamily. Bioessays, 2004. 26: 882-93.; Benekeet al., 2004 ibid). PARP 관련 단백질에 의해 유발되는 염증 과정의 관여는 본 발명의 주제이며, 그리하여 PARP 또는 관련 단백질이 본 명세서에 기재된 분자에 의해 억제된다.

신경보호의 기능적 세포 모델 및 일 세트의 신경 바이오마커를 이용하여, 새로운 신경보호 작용양상에 대해 시험 화합물들의 스크리닝을 수행하였다. 놀랍게도, 피렌제핀 및 관련 화합물들이 PARP 억제제 또는 PARP 결합 분자로서 이전에 알려져 있지 않은 작용 양상을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이러한 이전에 알려져 있지 않은 신경보호 효과로 인해, 화합물들은 세포보호, 특히 폐의 염증성 질환 치료를 위한 이중 작용양상, 즉 M1/PARP1 작용 양상을 갖는 관련 화합물의 개발 및 최적화를 위한 세포보호 약물 및 새로운 선두 구조로서 적절하다.

SIR2는 효모 및 현미경적 벌레인 캐노르하디티스 엘레간스(Caenorhabditis elegans)의 수명을 연장시키는 것, 특히 광범위한 신경퇴행성 질환(예: 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 근위축성 측상 경화증(루게릭병), 다양한 종류의 신경병증, 및 다발성 경화증)의 새로운 치료법과 관련된 병든 신경 세포 가지의 퇴화를 강력히 지연시키는 것과 연관된 단백질이다. 마우스

의 신경 세포에서, SIR2 그룹으로서 알려져 있는 단백질 패밀리에 속하는 단백질 SIRT1은 세포 몸체로부터 기계적으로 절단되거나 화학요법제에 의해 노출되는 신경세포에서의 액손의 손상를 지연시킨다. 이전에는, 액손의 퇴화 과정이 뉴런이 소정의 조건 하에서 활성화시키는 활성 자가-파괴적 과정(self-destructive preocess)일 수 있다는 증거가 발견되었다. SIRT1의 활성 증가는 자가 파괴적 과정의 전부 또는 일부를 차단시키는 것으로 보인다. 또한, SIR2 단백질의 활성을 증가시키는 약물을 통한 암 예방의 가능성이 검토되었다(Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. R. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. Science. 2004, 305: 1010-3).

PARP1 및 SIR2 단백질 간의 강력한 크로스-토크(cross-talk)에 대해 상당히 주의가 집중되어 있다: PARP-1은 광범위한 DNA 손상에 의한 PARP-1의 과흥분의 결과로서 세포 사멸을 유발하지만, 자매염색분체교환(Sister Chromatid Exchange, SCE)을 제한함으로써 게놈의 완전무결함을 보호하는 것으로 여겨진다. 지속적인 PARP-1 활성화는 기질인 NAD^+를 고갈시키고, 생성물인 니코틴아미드를 상승시킨다. NAD+ 의 감소 및 니코틴아미드의 상승은 SIR2 NAD^+-의존 데아세틸라제의 활성을 하향조절할 수 있으며, 이는 SIR2에 의한 탈아세틸화가 고농도의 NAD^+에 의존하며, 니코틴아미드의 생리학적 수준에 의해 억제되기 때문이다. 광범위한 생물학적 활성을 매개하는 두 개의 전통적인 경로의 가능한 연관성은 보존된 다세포의 진핵세포에서의 PARP-1 및 SIR2 유전자 패밀리의 심오한 진화적 역할을 뜻할 수 있다(Zhang, J. Bioessays, 25 (2003), 808-814).

놀랍게도, 피렌제핀 및 관련 화합물들은 또한 이전에 알려지지 않은 SIR2 조절제, 예를 들어 SIR2 결합분자로서의 작용 양상을 가지며, LS-75(PBD)는 약한 SIR2 억제제인 것으로 더욱 밝혀졌다. 이러한 미지의 신경보호효과로 인해, 상기 화합물들은 세포보호 약물, 특히 항염증성 약물로서 적절하며, 세포보호, 특히 염증성 폐질환의 치료를 위한 복합적인 작용양상(즉, M1/PARP1/SIR2)을 갖는 관련 화합물들의 개발 및 최적화를 위한 새로운 선두 구조로서 적절하다.

많은 급성 감염 질환, 즉 원인상 바이러스성, 세균성, 또는 원충성 감염 질환 간의 유사성은, 생물체가 타고난 면역계와 상호작용할 때 개시되는 염증성 사이토카인의 과생산에 의해 유도되는 것으로 널리 인정되고 있다. PARP-1 활성은 이러한 과정에서의 확립된 염증 촉진 매개체이다(Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Cowden WB. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. Clin- Microbiol-Rev. 2004. 17: 509-39). 예를 들어, 이것은 심한 패혈증, 급성 폐손상, 급성 호흡곤란증후군, 및 낭성 섬유증과 같은 상당한 염증성 요소와 관련된 통상적인 폐 질환과 관련이 있다. 유사한 염증이 알레르기성 비염 및 천식과 같은 알레르기성 질환(Carlsen KH. Therapeutic strategies for allergic airways diseases. Paediatr- Respir-Rev. 2004. 5: 45-51) 또는 원인이 불명확한 만성폐색성폐질환(COPD)와 같은 다른 질환(Hageman GJ, Larik I, Pennings HJ, Haenen GR, Wouters EF, Bast A. Systemic poly(ADP-ribose)polymerase-1 activation, chronic inflammation, and oxidative stress in COPD patients. Free-Radic-Biol-Med. 2003. 15; 35: 140-8. Boulares AH, Zoltoski AJ, Sherif ZA, Jolly P, Massaro D, Smulson ME. Gene knockout or pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 prevents lung inflammation in a murine model of asthma. Am J Respir Cell MoI Biol. 2003 Mar; 28(3): 322-9.), 또는 암 진행에서 관여된다.

천식의 예를 고려하면, 그 질병은 기도 점막에서의 특정 패턴의 염증을 특징으로 한다. PARP의 유전자 넉아웃 또는 PARP의 약리학적 억제는 천식 모델의 동물에서 폐의 염증을 차단하며, 이러한 결과는 이 효소가 천식 치료에 있어서 새로운 치료 전략 개발의 표적이라는 것을 암시해 준다(Boulares e al. 2003 ibid. Virag L, Bai P, Bak I1 Pacher P, Mabley JG, Liaudet L, Bakondi E, Gergely P, Kollai M, Szabo C. Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on inflammatory cell migration in a murine model of asthma. Med Sci Monit. 2004 Mar; 10(3): BR77-83). 효과적이면서 상대적으로 저렴한 치료법이 현재 이용 가능함에도 불구하고, 천식환자의 약 5%가 부적절하게 관리되고 있으며, 만성적인 항염증 치료가 많은 환자들에게 필요하다. 경구 요법을 현재의 흡입 요법과 조합하면 이러한 천식을 향상시킬 수 있지만, 경구 요법은 전식적인 부작용 문제를 니타낸다. 그러므로, 경구 투여용 약물은 보통의 생리학적 기전에서 단지 최소한의 부작용을 갖는 것이 바람직하다(Barnes PJ. New drugs for asthma. Nat Rev Drug Discov. 2004. 3:831-44).

패혈증은 "세포변성 저산소증(cytopathic hypoxia)"라고 불리는 현상인 산소를 소비하는 세포의 능력의 후천적 손상과 관련이 있으며, 이는 적어도 일부는 PARP 활성에 의해 매개되는 NAD^+/NADH의 세포 내 수준의 고갈에 의해 매개되는 것으로 여겨진다 (Khan AU, Delude RL, Han YY, Sappington PL, Han X, Carcillo JA, Fink MP. Liposomal NAD(+) prevents diminished O(2) consumption by immunostimulated Caco-2 ceils. Am J Physiol Lung Cell MoI Physiol. 2002 May, 282(5): L1082-91). 실제로, PARP 억제는 패혈증에 의해 유도되는 병리학적 급성 폐 손상을 감소시킨다 (Murakami K1 Enkhbaatar P, Shimoda K, Cox RA, Burke AS, Hawkins HK, Traber LD, Schmalstieg FC, Salzman AL, Mabley JG, Komjati K, Pacher P, Zsengeller Z, Szabo C, Traber DL. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates acute lung injury in an ovine model of sepsis. Shock. 2004 Feb; 21(2): 126-33).

낭성 섬유증에서, 실제로 모든 환자는 슈도모나스 아에루지노사(Pseudomonas aeruginosa)에 의해 감염되며, 그러한 감염은 일단 확립되면 좀처럼 제거되지 않는다. 슈도모나스 아에루지노사로부터 분비되는 인자에 의한 T 림프구의 활성화는, 주로 호중구(즉, 다형핵 세포)에 의해 폐 상피가 심각하게 침윤되고 그로 인해 기도 염증 및 질병의 병태를 유발하는 것을 특징으로 하는 그 질병의 병인에서 연루되는 림프구 매개 염증반응을 생성시키는 것으로 여겨진다(Bruno TF, Buser DE, Syme RM, Woods DE, Mody CH. Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is a mitogen but not a superantigen for human T lymphocytes. Infect-Immun. 1998; 66: 3072-9).

COPD에서, 전신 염증은 또한 PARP-1 활성화에 의해 유발되며, 이로 인해 COPD 환자의 병태생리가 나타난다(Hageman et al., 2003, ibid).

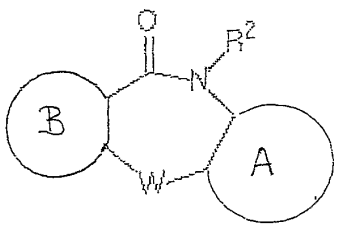
몇몇 질병이 폐암 위험의 증가와 관련이 있으며, 이러한 질명으로는 특발성 폐섬유증, 전신 경화증, 및 몇몇 형태의 진폐증 등이 있다. 지속적인 폐 염증은 암 형성을 유발하는 것으로 인정되고 있으며(Borm PJ, Schins RP, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. Int-J-Cancer. 2004 May 20; 110(1): 3-14. Artinian V, Kvale PA. Cancer and interstitial lung disease. Curr-Opin-Pulm-Med. 2004 Sep; 10(5): 425-34), 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)는 암의 발생을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Gwyn K, Sinicrope FA. Chemoprevention of colorectal cancer. Am J Gastroenterol. 2002 Jan; 97(1): 13-21). 또한, PARP 활성은 염증-유도 발암과 직접적인 관련이 있다(Martin-Oliva D, O<1>Valle F, Munoz- Gamez JA, Valenzuela MT, Nunez Ml, Aguilar M, Ruiz-de-Almodovar JM, Garcia-del-Moral R, Oliver FJ. Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. Oncogene. 2004 Jul 8; 23(31): 5275-83).

류마티스성 관절염(RA) 환자는 지속적인 높은 수준의 염증을 나타낸다. 항염증제는 RA에 대한 표준 치료법에 해당한다(Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Gibofsky A, Kavenaugh AF, Keystone EC, Klareskog L, Russell AS, van-de-Putte LB, Weisman MH. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other immune mediated inflammatory diseases (May 2003). Ann-Rheum- Dis. 2003 Nov; 62 Suppl 2: ii2-9). PARP는 또한, 몇몇 PARP-1 대립형질 유전자가 RA에 대한 감수성과 관련이 있기 때문에, RA의 발병과 관련이 있는 것으로 여겨지며(Pascual M, Lopez-Nevot MA, Caliz R, Ferrer MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martin J. A poly(ADP-ribose) polymerase haplotype spanning the promoter region confers susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2003 Mar; 48(3): 638-41), 현대의 류마티스성 관절염의 역학은 폐결핵의 역학과 현저히 유사하기 때문에, PARP-1 대립 유전자가 질병 감염을 극복하기 위한 유전자의 선택적 압력에 의해 선택되는 것으로 가정되어 왔다(Mobley JL. Is rheumatoid arthritis a consequence of natural selection for enhanced tuberculosis resistance Med Hypotheses. 2004; 62 (5): 839-43). 따라서, PARP 억제제는 만성 RA의 치료 및 그 예방 모두에 공헌할 수 있다. 이러한 원리는 전신성 홍반성 루프스(lupus erythematosus)와 같은 다른 자가면역질환에도 합리적으로 확장될 수 있다. 실제로, 본 명세서에 기재된 PARP 활성 및 염증 간의 기능적 관련성의 광범위한 발생이 이루어진다면, 그 원리는 유사하게 많은 염증성 질환에 적용된다.

이와 함께, 상기한 바와 같은 논의는 PARP 활성이 많은 병리학적 과정, 특히 폐에서의 병리학적 과정에서 연루되며, PARP 활성은 염증에 중요하다는 것을 보여준다. 본 발명자들은 서로 다른 종류의 세포(예: 3T3 섬유아세포)의 LPS 유발 시험(challenge)과 같은 염증과정의 실험모델에서, 화합물이 세포보호효과를 갖는다는 것을 입증하였다. 이러한 효과는 PARP-1 및 COX-2에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블랏 염색으로써 모니터되는 아폽토시스 마커 및 염증 마커의 해당 변화를 수반한다.

따라서, 본 발명이 일 측면은 세포 보호 의약, 특히 염증성 구성요소(예: 염증성 폐질환)와 관련된 질병의 예방 또는 치료용 상피 보호 의약의 제조를 위한 하기 화학식 I의 화합물, 그의 염, 또는 그 유도체의 용도에 관한 것이다.

화학식 I



상기 화학식 I에서,

A 및 B는 N, S, 및 O로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환으로서, 할로(예: F, Cl, Br, 또는 I), C_1-C_4-(할로)-알킬, C_1-C_4-(할로)-알콕시, 아미노, C_1-C_4-알킬-아미노, 또는 디(C_1-C_4-알킬)아미노로 선택적으로 단일 또는 다수 치환되고,

W는 S, O, NR_1, 또는 CHR_1이고,

R1은 수소, Y, 또는 COY이고,

R2는 수소 또는 C_1-C_4-(할로)-알킬이며,

Y는 C_1-C_6 (할로)알킬, 또는 C_3-C_8 시클로-(할로)-알킬이고, 여기에서 알킬기 또는 시클로알킬기는 N, S, 및 O로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환으로 선택적으로 치환되며, 여기에서 환은 할로, C_1-C_4-(할로)알킬, C_1-C_4(할로)알콕시, 아미노, C_1-C_4-알킬 아미노, 디(C_1-C_4-알킬)아미노, 또는 Z로 선택적으로 단일 또는 다수 치환되고,

상기 Z는 그룹 $N(R4)_2$로 ω-치환된 C_1-C_5 (할로)알킬기이고, 여기에서 R4는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_8 알킬, 또는 CO-C_1-C_8 알킬로 치환되거나, 두 개의 R4가 함께 N, S, 및 O로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 더 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환을 형성하고, 여기에서 환은 할로, C_1-C_4-(할로)알킬, 또는 C_1-C_4(할로)알콕시 선택적으로 단일 또는 다수 치환된다.

본 발명에 있어서 용어 "(할로)알킬"이란 과할로겐화에 충분한 적어도 하나의 할로겐(예: F, Cl, Br, I)을 선택적으로 함유하는 알킬기를 말한다.

용어 "염"이란 바람직하게는 적절한 양이온 및/또는 음이온을 갖는 화학식 I의 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염을 말한다. 적절한 음이온의 예로는 적절한 유기 양이온(예: 암모늄 또는 치환된 암모늄 양이온) 뿐만 아니라, Li^+; Na^+; 및 K^+와 같은 알칼리금속 양이온, Mg^+ 및 Ca^+와 같은 알칼리 토금속 양이온이 있다. 약제학적으로 허용 가능한 음이온의 예로는 클로라이드, 설페이트, 하이드로겐 설페이트, 포스페이트와 같은 무기 음이온 또는 아세테이트, 시트레이트, 타르트레이트와 같은 유기 음이온 등이 있다.

화학식 I의 화합물의 유도체는 생리학적 조건 하에서 화학식 I의 화합물로 전환되는 임의의 분자(예: 화학식 I의 화합물의 에스테르, 아미드) 또는 화학식 I의 화합물의 대사 반응의 산물인 분자를 말한다.

바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 염증성 또는 염증과 관련된 PARP-1 및/또는 SIR2-관련 질환, 즉 PARP-1 기능부전, 특히 PARP-1 활성의 기능부전적 증가에 의해 유발되고/거나 동반되는 질환, 및/또는 SIR-2 기능부전, 특히 SIR-2 활성의 기능부전적 증가에 의해 유발되고/거나 동반되는 질환을 예방 또는 치료하기 위해 이용된다. 예를 들어, 이러한 질환들은 심한 패혈증, 급성 폐손상, 급성 호흡곤란증후군, 낭성 섬유증, 천식, 알레르기성 비염, 또는 COPD 또는 폐암과 같은 염증성 구성요소와 연관된 폐질환을 포함한다. 또한, 이러한 질환들은 신경염증성 질환, 특히 중추신경계, 예를 들어 뇌의 신경염증성 질환을 포함한다.

또 다른 바람직한 적응증은 낭성 섬유증, 특히 CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) Cl^- 채널의 기능적 손상을 갖는 환자에서의 낭성 섬유증, 또는 위장관계의 궤양성 또는 다른 염증성 상태, 특히 CFTR Cl^- 채널의 기능적 손상을 갖는 환자에서의 위장관계의 궤양성 또는 다른 염증성 상태의 예방 또는 치료이다.

또 다른 바람직한 적응증은 암 예방 또는 진행과 관련된 염증성 또는 염증-관련 과정의 예방 또는 치료이다.

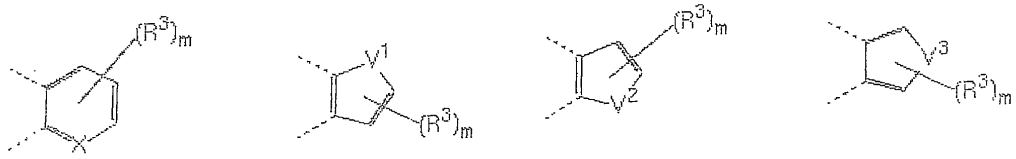
또 다른 바람직한 적응증은 류마티스성 관절염 또는 전신성 홍반성 루프스와 같은 자가면역질환과 관련된 염증 또는 염증 관련 질환의 예방 또는 치료, 특히 그러한 치료가 보다 잘 이루어질 것 같은 유전적 또는 다른 마커가 인식되는 환자의 치료를 위한 것이다.

또 다른 바람직한 적응증은 통증, 특히 염증성 또는 염증-관련 통증, 예를 들어 만성 통증의 예방 또는 치료를 위한 것이며, 이는 아폽토시스 촉진 기전이 다양한 만성 통증의 개시 상태에서 역할을 하기 때문이다(Maione S et al. Apoptotic genes expression in the lumbar dorsal horn in a model neuropathic in rat. Neuroreport 2002 Jan 21;13(1): 101-6).

또 다른 바람직한 적응증은 염증성 또는 염증-관련 안과 질환, 특히 황반변성(예: 습성 또는 건성 황반 변성), 녹내장(예: 급성, 원발성, 이차성, 또는 낮은 우각(low angle) 녹내장), 당뇨망막변증, 전방 또는 후방 시각신경병증, 색소성 망막염, 시신경 신경염, 또는 중심동맥폐색(central artery obstruction)을 위한 것이다.

치료 적용을 위해, 화학식 I의 화합물은 단독으로 또는 다른 약물, 예를 들어 천식 치료용 의약, 클로자핀, 올란자핀, 항당뇨병 치료제 또는 항암제와 함께 사용될 수 있다.

화학식 I의 화합물에서, 환 A 및 B는 바람직하게는 하기 화학식으로부터 선택된다:



상기 식에서, X는 N 또는 CR3이고,

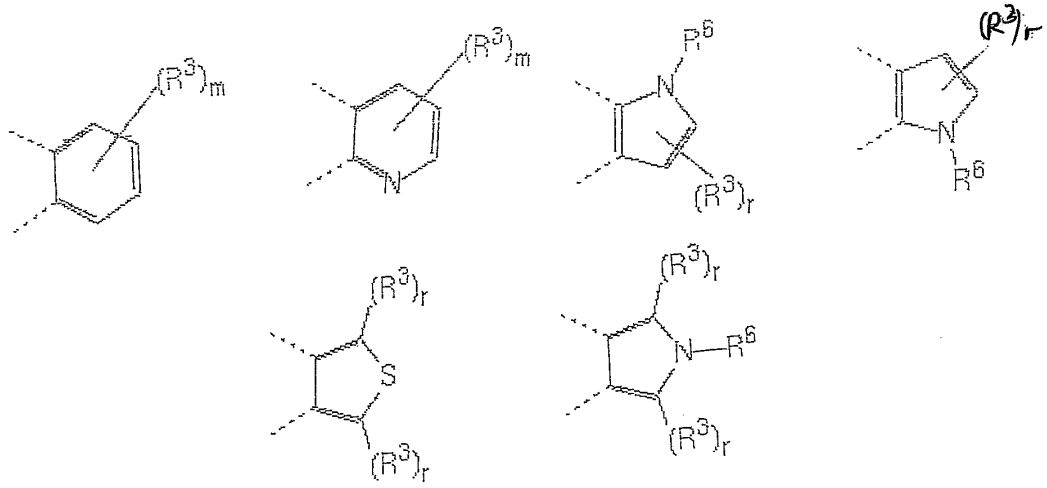
V1, V2, 또는 V3는 -O-, -S-, 및 NR6로부터 선택되고,

R3는 각각 독립적으로 할로, C_1-C_4-(할로)-알킬, C_1-C_4-(할로)-알콕시, 아미노, C_1-C_4-알킬-아미노, 또는 디(C_1-C_4-알킬)아미노이고,

m은 0-2의 정수이며,

R6는 수소 또는 C_1-C_4-(할로)알킬이다.

보다 바람직하게는, 환 A는 하기 화학식로부터 선택된다:



상기 화학식에서,

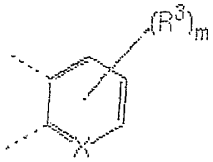
R3는 앞서 정의된 바와 같고,

m은 0-2의 정수이고,

r은 0-1이 정수이며,

R6는 수소 또는 메틸이다.

보다 바람직하게는, 환 B는 하기 화학식으로부터 선택된다:



상기 화학식에서,

X, R3, 및 m은 앞서 정의된 바와 같다.

일 구현예에서, R1은 Y이다. 이러한 경우에, Y는 바람직하게는, C_3-C_8 시클로(할로)-알킬, 예를 들어 시클로프로필, 시클로부틸, 또는 시클로펜틸이다.

또 다른 구현예에서, R1은 COY이고, Y는 하기 화학식으로부터 선택된다:

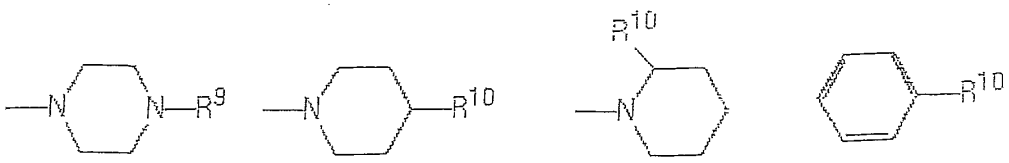
-(CHR7)q-R8

상기 식에서, R7은 수소, 할로, 또는 C_1-C_4-(할로)알킬이고,

q는 1-4의 정수이고, 바람직하게는 1이고,

R8은 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5- 또는 6- 멤버의 환이며, 여기에서 환은 C_1-C_4-(할로)알킬, 또는 상기 정의된 바와 같은 ω-아미노-치환된 알킬기 Z로 선택적으로 단일 또는 다수 치환된다.

이러한 구현예에서, R8은 바람직하게는 하기 화학식으로부터 선택된다:



상기 화학식에서, R9은 수소 또는 C_1-C_4-(할로)알킬이고, R10은 또는 상기 정의된 바와 같은 ω-아미노-치환된 알킬기 Z이다.

R9은 바람직하게는 메틸기이다. ω-아미노-치환된 알킬기 Z는 바람직하게는 적어도 하나의 C_1-C_6 알킬기로 치환된 말단 아미노기(예: 디에틸아미노, 또는 디이소부틸아미노기), 또는 CO(C_1-C_6)알킬기 및 수소, 또는 C_1-C_2 알킬기로 치환된 말단 아미노기를 갖는 C_1-C_4-(할로)알킬기이다.

화학식 I의 화합물의 구체적인 예는 FR 1,505,795, US 특허 3406168, 3660380, 4021557, 4210648, 4213984, 4213985, 4277399, 4308206, 4317823, 4335250, 4424222, 4424226, 4724236, 4863920, 5324832, 5620978, 6316423에 개시되어 있는 피렌제핀 및 관련 화합물, US 3406168, 5324832 및 5712269에 개시되어 있는 오텐제파드 및 관련 화합물, US 특허 5,716,952, 5,576,436 및 5,324,832에 개시되어 있는 AQ-RA741 및 관련 화합물, EP-A-0429987 및 US 특허 5366971, 5705499에 개시되어 있는 비라문(viramune) 및 관련 화합물, US 특허 6,022,683, 및 5,935,781에 개시되어 있는 BIBN 99 및 관련 화합물, EP-A-0035519 및 US 특허 4,381,301에 개시되어 있는 DIBD, 텔렌제핀(telenzepine) 및 관련 화합물, 또는 그들이 염 또는 유도체이다. 상기 문헌은 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

보다 바람직한 화합물은 US 특허 5,817,679, 6,060,473, 6,077,846, 6,117,889, 6,255,490, 6,403,584, 6,410,583, 6,537,524, 6,579,889, 6,608,055, 6,627,644, 6,635,658, 6,693,202, 6,699,866 및 6,756,392에 개시되어 있는 7-아자바이시클로-[2.2.1]-헵탄 및 헵텐 화합물, US 특허 6,306,861, 6,365,592, 6,403,594, 6,486,163, 6,528,529, 6,680,319, 6,716,857 및 6,759,419에 개시되어 있는 헤테로시클릭 화합물(예: 피롤리디논, 테트라하이드로피리딘, 이속사조카르복사미드, 티에노피란 카르복사미드) 또는 알바멜린 타르트레이트와 같은 벤조피란 및 관련 화합물, US 특허 3,177,252에 개시되어 있는 메토클로프라마이드 및 관련 화합물, US 특허 2,648,667에 개시되어 있는 QNB 및 관련 화합물, 그리고 그들의 염 및 유도체이다. 상기 문헌은 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

또한, 본 발명은 클로제핀 및 올렌제핀과 같이 대사되어 화학식 I에 따른 디아릴 디아제피논으로 변화하는 화합물을 포함한다.

본 발명의 또 다른 측면은 신경보호 의약, 바람직하게는 상기 나타낸 질병의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한, 이중의 M1 무스카린 수용체 억제제이면서 PARP 억제제인 화합물의 용도에 관한 것이다.

이중 억제제 화합물은 바람직하게는 PARP에 대한 IC_{50} 값이 100 내지 10000 μM 이고, 바람직하게는 250 내지 1000 μM인 온건히 강력한 PARP 억제제이다. IC_{50} 값의 결정은 실시예에 나타낸 바와 같이 수행하였다.

본 발명의 또 다른 측면은 신경- 또는 세포보호 의약, 바람직하게는 상기 나타낸 바와 같은 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 이중의 M1 무스카린 수용체 억제제이면서 PARP 억제제이고, 추가적으로 SIR2 조절제 또는 결합 분자인 화합물의 용도에 관한 것이다.

상기 화합물은 바람직하게는 상기 나타낸 바와 같이 온건히 강력한 PARP 억제제이다. 또한, 상기 화합물은 바람직하게는 SIR2에 대한 IC_{50} 값이 1 내지 10,000μM 이고, 바람직하게는 5 내지 5,000 μM인 SIR2 억제제이다. IC_{50} 값의 결정은 실시예에 나타낸 바와 같이 수행하였다.

상기 나타낸 바와 같은 화합물은 바람직하게는 그것이 필요한 개체에게 약제학적 조성물로서 투여하며, 그러한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 및/또는 아주반트를 함유할 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 정제, 캅셀, 액상 현탁제, 에어로졸, 스프레이 등의 형태로 투여할 수 있다. 상기 의약은 공지된 방법에 따라 투여할 수 있으며, 그 중에서도 특히 경구투여, 폐 투여, 및 정맥내 투여가 바람직하다. 활성성분의 투여량은 질병의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 대개 1 내지 2000 mg/일의 범위로 투여된다.

본 발명은 인간 및 수의학적 약물, 특히 인간의 약물에 사용될 수 있다.

본 발명을 이후의 도면 및 실시예를 통해 보다 상세히 설명한다.

실시예

실시예 1

PARP1 억제

1. 물질 및 방법

1.1 생물학적 시험 시스템: 화학적 허혈 및 신경보호를 위한 세포 배양 모델

모든 실험에서, 129/sv 마우스[Okabe et al., 1996] 유래의 D3 배아줄기(ES) 세포를 12일 동안 배양하고, 2, 4, 7, 및 9 일째에 앞서 기재된 바와 같이 계대배양 하였다[Sommer et al., 2004].

상해 조건: 세포(24-웰 플레이트)를 37℃에서 24 시간동안 신선한 배지 중에서 20 nM EPO의 존재 또는 부존재 하에서 예비배양 하였다. 세포를 낮은 농도의 K^+ 용액(140 mM NaCI, 4.7 mM KCI, 1.2 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM 글루코오스, 15 mM Hepes-NaOH, pH 7.35)으로 1 회 세척하였다. 세포(EPO 예비배양을 하거나 하지 않음)를 낮은 농도의 K+ 용액 또는 1 mM KCN이 보강된 글루코오스-부재 낮은 농도의 K^+ 용액(화학적 허혈 용액 [Kume et al., 2002]) 중 어느 하나로 45 분(37℃)까지 배양하였다. 살아남은 뉴런의 수를 평가하기 위한 활력 대조군(vitality control)을 낮은 투여량의 글루타메이트(10 μM)를 이용한 간단한 자극에 의해 수행하였다. 그런 다음, 세포를 얼음같이 차가운 인산 완충 식염수(PBS)로 3 회 세척하고 나서, 단백질을 수득하였다. 현탁된 세포를 500 X G에서 펠렛으로 하였으며, 9 M 요소 4% CHAPS로 세포용해(lysis)하였다. 세포 용해물(lysate)을 동일한 완충용액으로 미리 평형(preequilibration)시킨 NAP-10 컬럼(Amersham Bioscience)로 탈염시키고, 단백질 함량을 결정하였다.

1.2. 칼슘-이미징

칼슘 이미징에 의한 기능적 테스트는 본질적으로 [Sommer et al., 2004]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간략하게는, 세포를 37℃의 암소에서 45 분간 DMEM 중의 2μM의 퓨라-2AM에 로딩하였다. $[Ca^{2+}]$의 상대적인 변화의 측정을 Polychrom IV Monochromator(Xe-lamp, USHIO)가 장착된 역상 형광현미경(Olympus IX70 S1F2) 상에서 수행하였다. 여기 파장(λ_1, λ_2) 및 방출 파장은 각각 340, 380, 및 510 nm 였다. 적절한 자극 후의 데이터 수집 및 분석을 MetaFluor 소프트웨어(Universal Imaging Corporation)를 이용하여 수행하였다. 이미지 레졸루션은 168 x 129 픽셀(비닝(binning) 8 x 8, 픽셀 사이즈 6.8 x 6.8 ㎛)이었다. 형태학적 기준 및 가끔의 면역염색(미도시)에 의해 뉴런으로 규명되고, 칼슘 수준이 제 1 자극 후에 휴지기로 돌아온 세포만을 대상으로 하였다. 대조군은 말 그대로 제로 칼슘(음성) 및 5 μM 이오노마이신(양성), 10 μM 글루타메이트(양성), 및 탈분극화(55 mM K+)(양성)을 포함하였다. 약리학적 물질을 관류 시스템을 구비한 멀티-밸브, 단일-출구 촛점 약물 적용 장치(ALA Scientific)에 의해 적용하였다. 비율 이미지를 실험에 걸쳐 비교를 위해 배경 형광 스케일에 대한 상대적인 형광 변화의 백분율로서 나타내었다[Sommer et al., 2004에 기재된 바와 같음]. 각각의 자극 이벤트 20 동안, 이미지 페어(image pairs)가 얻어졌다.

1.3 화학적 프로테오믹스법: 피렌제핀-친화 태그의 합성

피렌제핀은 비가역적인, 즉 공유적으로 부착되는, 표적 단백질의 친화 시약(Fishhook)의 합성을 위한 개시 구조로서 이용하였다. 화합물의 결합 부위 내에서 또는 근처에서의 라이신에 결합하는 반응성의 -SCN 기를 도입한다. 비오틴화된 링커는 결합 단백질을 풍부하게 하는 역할을 한다. 합성방법은 도 1에 기재되어 있다. 합성은 본 명세서에 참고로 통합되는, 함께 계류중인 US 출원 60/588,354 및 60/620,323에 자세하게 기재되어 있다. 도 1에서, 합성 방법은 도시되어 있다. 친화 시약으로서 이용된 최종 생성물은 티오시아네이토 11-[2-(4-바이오사이티닐-피페라진-1-일)-아세틸}-5,11-디하이드로-벤조[e]피리도-[3,2-b][1,4]디아제핀-6-온(11)이다.

1.4. 피렌제핀의 2 차 결합부위의 규명 및 특성분석

D3 ES 세포 및 다른 세포주의 조 세포 추출물의 분획으로부터 표적에 공유결합하기 위해, 친화 시약 11(affinity reagent 11)을 이용하였으며, 그 결과 친화 정제에 의해 얻어진 물질을 1D PAGE, 면역염색, 및 질량분광분석법에 의해 분석하였다.

1.4.1. 분획화, 분리, 웨스턴 블랏, 질량분광분석법

그런 다음, 분획화(fractionation), 분리(isolation), 및 추가적인 분석법을 공표된 표준 방법에 따라 수행하였다(Sommer et al. 2004). 상업적인 항-PARP 항체를 웨스턴 블랏 염색을 위해 사용하였다. 피렌제핀-태그의 단백질의 독립적인 규명을 위한 질량분광분석법을 최근에 다른 곳에서 기재된 바와 같이 수행하였다(Vogt et al., 2003, Cahill et al., 2003).

모노클로날 항-PARP 항체를 BD BioScience(Ca# 556 362; clone C2-10)으로부터 구입하였다. 이차 항-마우스 알칼린 포스파타제 컨쥬게이트를 Sigma(Ca# A9316)로부터 구입하였다. NBT/BCIP-웨스턴 블랏 검출 시약은 Roche Diagnostics (Cat.# 1681451)로부터 구입하였으며, Wetern Lightening CDP-Star 화학발광검출 키트

(chemiluminescence detection kit)는 Perkin Elmer(Cat.# NEL616001KT)에서 구입하였다. 항-PARP 웨스턴 블랏 실험을 위해, 단백질을 10% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리하고 니트로셀룰로오스 상에서 블랏팅(blotting) 하였다. 블랏을 0.1% Tween-20 (TBS-T)를 함유하는 Tris 완충 식염수 중에서 5% 탈지분유로 차단하였다. 항-PARP 항체를 분유 TBS-T 중에서의 1:1000 희석을 이용하여 4℃에서 밤새 배양하였다. 그런 다음, 블랏을 TBS-T를 이용하여 3 회 세척하였다. 이차 항체를 NBT/BCIP 검출을 위해 1:1000의 희석에서, 그리고 CDP-Star 검출을 위해 1:5000의 희석에서 이용하였다. 다양한 SIR2 함유 분획 유래의 겔을 니트로셀룰로오스 막 상에서 블랏팅하고, 그에 따라 가시화하였다.

SIR-2 염색을 위해, 다음 항체를 이용하였다: 일차 Ab: A-SiR 2(Upstate, biomol 07-131; Lot: 22073); 5% BSA/ 1xTBST 중에서의 1:5000; 이차 Ab: A-토끼 PE(A-0545); 5% BSA/1xTBST 중에서의 1:1000:

COX-2 염색은 Alexis(ALX-210-711-1)항-COX-2(사이클로옥시게나아제-2) 유래의 항체; 토끼, 폴리클로날; 1:1000 희석를 이용함으로써 얻어졌다; 이차 항체는 항-토끼-AP(Sigma, A3937, 1:1000) 이었다.

iNOS 염색은 폴리클로날 항-iNOS, Alexis, 1:1000을 이용하여 수행하였다. 블랏을 TBS/1.0% Tween 중에서 세척하고, 적절한 이차 항체-홀스래디쉬 퍼옥시다아제 컨쥬게이트(항-토끼 IgG, Sigma, 1:2000)와 함께 배양하였다.

1.4.2 PARP 억제 테스트

R&D System 유래의 PARP 억제 어세이(Cat. No. TA4669)를 공급자의 지시사항에 따라 이용하였다.

1.4.3 SIR2 활성 어세이

SIR2 활성의 측정을 위해, NAD-의존 히스톤 데아세틸라제 활성에 대한 정량적 테스트 키트인 CycLex® SIR2 어세이 키트(Cat# CY-1151)를 제조사(CycLex Co., Ltd. 1063-103 Ohara, Tera-Sawaoka Ina, Nagano 396-0002 일본)의 지시사항에 따라 이용하였다. SIR 어세이에서 시험한 모든 물질을 라이실-엔도펩티다아제에 대한 그의 영향에 대해 크로스-체크 하였다. 이러한 조절을 위해, 라이실-엔도펩티다아제 활성을 직접적으로 측정하기 위해, 이미 탈아세틸화된 기질인 펩타이드를 이용하였다.

1.4.4. 뉴런 및 비뉴런 세포에서의 염증을 위한 실험 모델

3T3 섬유아세포, A549 세포, V56 배아줄기세포, 및 신경적으로 차별화된 V56 배아 줄기세포들의 LPS 유발 검사를, 세포를 피렌제핀 및 관련 화합물의 존재 또는 부존재 하에서 60 분간 100 ng/ml 리포폴리사카라이드(LPS, E. coli 0111:B4 LPS from Sigma)에 노출시킴으로써 동일하게 수행하였다. 세포 펠렛을 1D 폴리아크릴아미드 겔의 Cox-2 및 iNOS 항체로 웨스턴 블랏 염색함으로써 더 조사하였다.

2. 결과

2.1. 화학적 허혈에서의 피렌제핀의 신경 보호적 효과

도 2는 방법 섹션에서 대략 설명한 기능적 모델에서 피렌제핀 및 LS-75의 신경보호적 효과를 보여준다.

대조군 세포는 4.8±3.4%의 생존율을 가진 반면에(첫 자극에서의 세포수: 189, 그리고 화학적 허혈 후의 이차 자극에서 세포수), 피렌제핀-치료 세포는 72.1 ± 4.4%(첫 자극에서의 세포 수: 68 그리고 화학적 허혈 후의 이차 자극에서 세포수: 49)의 생존율을 가졌다(도 2b). 하기 파트(도 2f)에서, 세 개의 서로 다른 기능적 모델: 기재된 바와 같은 화학적 허혈의 유도, 100 μM NMDA(또는 Sommer et al. 2004에서와 같은 100 μM HCA)에 의한 흥분독성 세포사멸의 유도, 및 β-아밀로이드1-40 10 μM 에 의한 신경 사멸의 유도에서 피렌제핀 및 LS-75의 신경보호적 효과에 대한 요약을 제공한다; 이러한 세 개의 모든 유발 검사는 최초의 칼슘 과부하를 유도하며, 이는 종국적으로는 신경의 기능 부전 및 세포 사멸을 일으킨다. 이것은 아폽토틱 마커인 PARP-1 및 염증성 마커인 Cox-2에 대해 염색한, 피렌제핀/LS-75 적용의 존재 또는 부존재 하에서 세포 분획의 웨스턴 블랏에 의해 도 2c에 나타내었다. 이러한 실험의 통계학에 대한 부가적인 정보를 도 2d 및 2e에 나타내었다.

2.2 피렌제핀의 표적으로서의 PARP의 규명

그런 다음, 본 발명자들은 도 1에 나타낸 바와 같이 반응성 피렌제핀 유도체의 합성을 진행하였다; 피렌제핀을 비가역적인, 즉 공유적으로 결합된 표적 단백질의 치환 시약의 합성을 위한 개시 구조로서 이용하였다. 반응성 -SCN 기는 화합물의 결합 부위 내에서 또는 근처에서 라이신에 결합한다. 비오틴화 링커는 결합되는 단백질을 풍성하게 하는 역할을 한다. D3 배아줄기세포의 조 세포 추출물의 분획화로부터 표적을 공유적으로 결합시키기 위해 최종적인 친화도 시약인 티오시아네이토-11-[2-(4-비오티닐화-피페라진-1-일)-아세틸]-5,11-디하이드로-벤조[e]피리도 [3,2-b] [1,4] 디아제핀-6-온 (화합물 (11), 도 1)을 이용하였으며, 그런 다음 친화 정제된 물질을 1D PAGE(도 3a), 질량 분광분석법, 및 면역염색에 의해 분석하였다. 은 염색된 겔의 MALDI-TOF 분석 결과 풍부한 분획에서 PARP-1 및 SIR-2가 존재하는 것으로 나타났으며, 이는 각각 독립적으로 모노클로날 항-PARP 항체(113 및 89 kD에서의 밴드, 도 3b) 및 SIR-2에 대한 구체적인 항체(110 kD, 도 3c)로 1D 겔의 해당 웨스턴 블랏 염색을 함으로써 확인되었다.

친화 태그 배양에서, 0.5 mL의 NP 40 줄기세포 추출물(단백질 2.3 mg)을 1 μM 친화 태그와 함께 37℃에서 60 분간 배양하였다. 잉여의 친화 태그를 NAP10 겔 여과에 의해 제거하였다. 반응 혼합물을 스트렙타비딘 아가로오스에 결합하였다. 용리는 용리 완충액(2% SDS, 62.5 mM, Tis-pH 6.8)으로 실온에서 10 분간 그리고 95℃에서 10 분간 수행하였다. PARP에 대한 결합을 위해, 마우스 모노클로날 항체(BD Bioscience 1:2000)를 이용하였다. 검출 항체로서, 항-마우스 알칼린 포스파타아제 항체 컨쥬케이트(1:1000 및 NBT/BCIP 기질)을 이용하였다.

2.3 PARP 억제 시험

도 4a에 도시된 SIR-2 및 PARP-1 활성에 대한 효소 테스트 결과, 친화 태그가 두 개의 단백질 모두와 상호작용한다고 할지라도, 피렌제핀 및 LS-75는 각각 200 및 18 μM의 IC_{50} 값을 갖는 PARP-1 억제제일 뿐만 아니라, SIR-2를 억제하는 것으로 보이지만 IC_{50} 값이 1-5 mM 미만으로서 매우 높은 농도에서만 억제하는 것으로 보이는 것으로 나타났다. 도 4의 표는 대조군들로서 니코틴 아미드가 본 어세이에서 약 55 μM의 SIR-2 억제에 대한 IC50 값을 가지며, 페난트리돈과 같은 전형적인 PARP-1 억제제는 본 어세어에서 7 μM의 IC50 값을 가졌고, 이는 이전의 보고(North, B.J., Verdin, E. Sirtuins: SIR2- related NAD-dependent protein deacetylases. Genome Biol, 5, 224f, 2004; Southan GJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Curr Med Chem. 2003 Feb;10(4):321-40)와 일치한다.

본 발명에 적절한 구조적으로 관련이 있는 바람직한 화합물의 추가적인 예는 하기와 같다:

● 6H-피리도[2,3b][1,4]벤조디아제핀-6-온 (PBD 또는 LS-75)(PARP1 억제 시험 및 세포 기초 신경보호 어세이에 사용된 코어 구조)

● 단페나신 하이드로브로마이드(danfenacin hydrobromide)(Enablex^{TM}, Novartis, M3 무스카린 길항제, 2004년 시판),

● 알바멜린 타르트레이트(alvameline tartrate)(Lu 25-109T, Lundbeck, M1 효능제, M2 & M3 길항제, AD 치료에 효과가 없었기 때문에 제 3 상 임상시험에서 중단되었음)

● 임파트로피움 (M1, M2, 및 M3 길항제, 기관지 확장제)

● 티오트로피움 브로마이드(Spiriva, Boehringer, M1, M2 및 M3 길항제, 기관지 확장제, 2001-2년 이후에 시판).

● 메토클로프라마이드, 무스카린 길항제(비선택적 약물), 도파민 D2 길항제

● 텔렌제핀 디하이드로클로라이드, Sigma,

● 클로제핀,

● 비라문,

● 피펜졸레이트, Sigma

● QNB, Sigma

2.4. 염증성 유발 검사(LPS 노출) 후의 일반적인 세포 보호 효과

본 발명자들은 3T3 섬유아세포(도 5a), A549 세포(도 5b), 미분화된 V56 배아줄기세포(도 5c) 및 신경세포로 분화된 V56 배아줄기세포(도 5d)를 리포폴리사카라이드(Sigma 사의 E.coli 0111: B4 LPS)로 60 분간 자극시켰다. 염증 마커로서, 본 발명자들은 다시 1D PA 겔의 웨스턴 블랏의 적절한 항체 염색에 의해 Cox-2 및 iNOS의 발현을 다시 정량하였다. 결과에 따르면, i) 피렌제핀 및 LS-75와 같은 관련 물질은 LPS-유도 사멸로부터 세포를 보호하고(도 5a-d), ii) 이러한 보호 효과는 유도 가능한 염증성 마커인 iNOS 및 Cox-2의 발현 감소를 동반한다(도 2와 유사, 미도시)는 것을 알려준다. 세포의 생존을 트립판 블루 염색에 의해 평가하였다.

2.5. 피렌제핀 및 관련 물질의 콜레스테롤-풍부 멤브레인 도메인 어셈블리에 대한 효과의 영향/의존성

PARP-1 및 SIR-2에 대한 직접적인 영향 다음으로, 상기 물질들은 다수의 관련 신호전달 경로에서 중요한 것으로 여겨지는, 콜레스테롤이 풍부한 지질 래프트(raft)인 일과성 멤브레인 도메인(transient membrane domain)을 경유하여 그들의 효과를 일으키는 것으로 보인다(Cuschieri J. Implications of lipid raft disintegration: enhanced anti-inflammatory macrophage phenotype. Surgery. 2004 Aug;136(2):169-75.; Chu CL, Buczek-Thomas JA, Nugent MA. Heparan sulphate proteoglycans modulate fibroblast growth factor-2 binding through a lipid raft-mediated mechanism. Biochem J.2004 Apr 15;379(Pt 2):331-41; Argyris EG, Acheampong E, Nunnari G, Mukhtar M, Williams KJ, Pomerantz RJ. Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. J Virol. 2003 Nov;77(22):12140-51; Nagy P, Vereb G, Sebestyen Z, Horvath G, Lockett SJ, Damjanovich S, Park JW, Jovin TM, Szollosi J. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. J Cell Sci. 2002 Nov 15;115(Pt 22):4251-62).

도 6에서, 본 발명자들은 피렌제핀 및 PBD/LS-75와 같은 관련 화합물의 신경 보호 효과가 "래프트(raft)"-붕괴 조건의 존재 하에서 일어나지 않는다는 것을 보여주며(도 6a; β-메틸-사이클로덱스트린 또는 필리핀(filipin)), 본 발명자들은 피렌제핀 및 PBD/LS-75와 같은 관련 화합물은 적어도 어느 정도로는 콜레스테롤-풍부 멤브레인 래프트(rafts)의 존재를 필요로 한다는 결론이 내린다.

2.6 세포 조건 하에서의 PARP 억제

폴리-ADP-리보실화 단백질(일차 항체: 항-폴리-(ADP-리보오스)-항원; 마우스, Biomol; Cat# SA-216; 이차 항체: 항-마우스, AP; Sigma A9316)에 대한 특정 항체를 이용하여 세포 조건 하에서 PARP 억제를 결정하기 위한 세미정량적 어세이를 수행하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, KCN/글루코오스 손실에 의한 신경 세포의 허혈성 상해(방법 섹션에서 기재된 바와 같이)는 특히 100-250 kD 범위의 단백질 호스트에서, 항체로 염색하는 것의 실질적인 증가를 유도한다. 이러한 효과는 신경 보호성 농도의 LS-75의 부가에 의해 역전되며; 여기에서, 본 발명자들은 허혈성 상해 동안 1 및 10 μM의 LS-75 각각의 존재에 의해 폴리-ADP-리보실화 단백질의 감소를 보여준다.

이와 함께, R & D 어세이에서, 히스톤 혼합물 및 비오틴화 NAD 및 재조합 모노머 PARP-1을 이용하였으며; IC 50은 ~ 20 μM이다. 세포 조건 하에서, PARP-1은 토포아이소머라제 1, 14-3-3g, 및 PARP-1 자체를 포함한 핵단백질의 호스트를 폴리-ADP-리보실화 한다. 따라서, 세포 조건 하에서, PARP-1의 자가-변경 및 다이머화는 그의 활성을 조절하는 것이며, 또한 PARG(폴리-ADP-리보실-글리코하이드록실라제)와 긴밀한 상호작용이 존재한다.

적절한 웨스턴 블랏에 의한 폴리-ADP-리보실화 단백질의 정량은 정확하게 용량-반응 관계와 in vitro 신경보호의 시간 프레임과 매칭된다: 따라서, 본 발명자들은 R&D 어세이의 조건이 오직 PARP-1 활성의 세포 조건을 부분적으로 반영한다는 결론을 내린다.

2.7. 피렌제핀 및 관련 화합물의 뇌-혈액 관문(BBB) 통과

피렌제핀 및 그 대사체인 LS-75의 뇌-혈액 관문(BBB) 통과를 결정하였다. 도 6에 이미 나타낸 바와 같이, 예를 들어 LS-75의 허혈 동안의 신경보호 효과는, 콜레스테롤 고갈 약물인 메틸-b-사이클로덱스트린이 신경보호를 차단하기 때문에(지질 래프트-형성) 콜레스테롤의 존재에 의존적인 것으로 보인다. 이것은 이러한 래프트가 내재하는 신호 전달에 있어서 중요한 역할을 한다는 아이디어와 일맥상통한다(도 7 참조). 도 9에 나타나 있는 바와 같이, 본 발명자들은 시험 동물의 혈청 및 뇌척수액(CSF) 중의 피렌제핀 및 그의 두가지의 주요 대사체(dm-피렌제핀 및 LS-75)를 정량하기 위해, 표준 HPLC

검출을 이용하였다(Dusci et al., (2002) J.Chromatogr. B, 773, 191 ff. and Huq et al., (2003) Simplified method development for the extraction of acidic, basic and neutral drugs with a single SPE sorbent-strata X; Phenomenex Inc. Torrance, CA1 USA; Application note SPE/TN-004에 따름). 이러한 실험들을 위해, 각각 32마리의 랫트 세트에게 50 mg/kg의 피렌제핀 또는 LS-75를 투여하고, 3 시간 또는 6 시간 후에 죽인 다음, 그들의 혈장 및 CSF를 수집하였으며(128 마리의 동물); 이러한 실험의 원리의 근간이 되는 피렌제핀의 약물동태학 및 생체이용율에 관한 입수 가능한 정보에 대한 문헌은 예를 들어, Jaup and Blomstrand, 1980, Scand. J. Gastroenterol. 66, 35ff.; Homon et al., 1987, Therapeutic Drug Monitoring 9, 236ff이다.

실험 결과에 따르면, 약 2-3 시간에서 혈장 중의 피렌제핀 및 dm-피렌제핀의 피크 농도가 나타났으며; 랫트에서, 이러한 두 물질이 뇌로 실질적으로 전혀 통과하지 않는 것으로 보인다(도 10). 또 다른 세트의 동물 실험에서, 본 발명자들은 동일한 세트의 시험 랫트를, 피렌제핀 및 LS-75를 50 mg을 경구로 개비지(gavage) 투여하기 전에, 콜레스테롤 생합성의 속도-제한 효소인 3-히드록시-3-메틸글루타릴 조효소(HMG Co-A)의 강력한 억제제인 메바스타틴(Mevastatin) 0.15 mg/일의 농도로 14 일간 예비처리 하였다. 본 발명자들은 혈장 중에서 피렌제핀, dm-피렌제핀, 및 LS-75의 농도가 약 50% 초과하는 것을 발견하였으며, CSF에서는 LS-75 농도가 훨씬 낮은 것으로 나타났다(미도시). 이것은 피렌제핀이 콜레스테롤이 풍부한 멤브레인 부분에 분배된다는 징후이며, 이는 또한 LS-75의 BBB 통과와 관련이 있다.

2.8 in vitro에서의 신경 보호 효과

LS-75를 직접적으로 적용할 경우, 도 11에 나타낸 바와 같이 BBB를 통한 실질적인 통과가 존재한다; 중요한 점은 피렌제핀을 적용한 후라고 하여도, 보다 긴 피크 시간으로서 대사체 LS-75의 뇌에서의 양이 점점 증가하는 것을 관찰하였다. 다시 말해서, 피렌제핀은 보다 활성형의 PARP-1 억제제인 LS-75를 뇌로 전달하는 매체(vehicle)로서 작용하며; 이것은 절대적으로 새로운 원리: 피렌제핀의 무스카린 결합 부위는 전체 분자(말초에서는 항 PARP-1 활성이 높지 않음)를 콜레스테롤이 풍부한 래프트로 강력하게 타게팅하는 역할을 하며, 그 결과 분자의 활성형 파트(이 경우, 대사체 및 PARP-1 억제제 LS-75)를 뇌로 전달한다는 것이다. 본 발명자들은 콜레스테롤-풍부 래프트 또는 래프트 단백질(여기에서는 무스카린 수용체)에 결합하는 하나의 모이어티를 가지며, 그리고 그 결과 전체 분자의 활성 파트의 BBB 통과를 가능하게 하는(여기에서는, PARP-1 억제제(LS-75)를 뇌 중에 풍부하게 하는) 관련 화합물의 이중 역할을 청구한다.

외상성 뇌 손상(TBI)과 관련된 in vivo 실험에서, 본 발명자들은 외상에 대한 타측성 부위의 뉴런의 신경 보호 효과를 입증할 수 있었다. TBI에서, 매우 종종 손상 부위의 타측성 부위에서 이차적인 신경 퇴행이 일어나며, 이는 아마도 칼슘/글루타메이트 유발 프로아폽토틱 기전에 의한 것으로 보인다.

모델은 경질막에 천두공을 통해 직접적인 쇼크를 적용하였으며, 동물을 다음 스킴을 따라 치료하였다: 매체(vehicle), LS-75, 연구를 개시하는 그룹당 동물 8 마리, 2 마리의 여유 동물; 동물을 상해를 입힌 지 44 시간 후에 희생시키고, 종말점은 생존, 상해 후 징후, FLB(Fast Luxol Blue) 및 EMAP(Endothelial, Monocyte, Activating Peptide) 염색에 의한 병변 크기였다. 투여량은 상해 2 시간 전 i.p. 100 mg/kg; 상해 2 시간 후 40 mg/kg i.p.; 상해 8 시간 후 40 mg/kg i.p.; 상해 17 시간 후 40 mg/kg i.p.; 상해 25 시간 후 40 mg/kg i.p.; 상해 34 시간 후 70 mg/kg i.p.로 하였고; 제제화: LS-75를 막자사발 및 막자로 DMSO 슬러리(용액이 아님)로서 제조였고, 4% DMSO 최종 농도에 도달하도록 갈면서 식염수를 서서히 부가할 것이다.

현탁액은 실온에서 보관하고 그 제제를 연구기간 동안 사용하였다. 투여량을 변화시키기 위해, 투여되는 부피를 변화시킬 수 이다. 100 mg/kg에 해당하는 부피는 4 mL/kg 이었다.

도 12 및 13에 해당 결과를 나타내었다. 실험동물 모델에서 외상성 뇌손상(TBI)을 유도한 지 44 시간 후에, 2차성 병변이 매체 대조군에 비해 LS-75 치료 동물에서 약 50% 감소하였다. EMAP는 44 시간에 깨끗한 라벨링을 생성시켰다. EMAP 라벨은 대개 즉각적인 손상 부위와 관련이 있었다. 분석을 신경생리학자에 의해 맹검("blinded")으로 수행하였으며, 그는 다음과 같이 촌평하였다: "하나의 그룹에서의 EMAP 염색은 병변에 대해 제한되는 것으로 보이는 반면에, 또 다른 그룹에서는 보다 광범위(diffuse)한 것으로 보이며 혈관과 관련이 있다". 광범위한 염색은 매체(vehicle) 그룹에서 나타났다.

형태학적 염색인 HE 및 Luxol Fast Blue는 모두 타측성 뇌반구에 있는 세포에서의 변화를 보여주는데 유용하였다. 그러나, Luxol Fast Blue는 보다 쉽게 관찰되는 염색을 생성시켰으며, 그리하여 본 연구에서 집중되었다. LFB에 의한 염색에서의 증가는 세포가 변환중이라는 것을 나타내며, 아마도 인지질의 이동을 나타내고, 따라서 신경의 손상을 반영한다.

2.9. 결론

본 발명자들의 실험의 결과는 피렌제핀 및 관련 화합물들, 특히 PBD/LS-75가 PARP에 결합하고 PARP 억제제로서 작용한다는 것을 보여준다.

피렌제핀 및 LS-75와 같은 관련 화합물들의 이러한 특성은 이전에는 알려져 있지 않았으며, 따라서 피렌제핀 및 관련 화합물들이 의학적 적용을 위한 세포보호제로서 이용될 수 있다는 결론을 내릴 수 있다. 이중적인 작용 억제 방식(M1 무스카린 수용체 및 PARP 억제)으로 인해, 이러한 화합물들은 순수한 PARP 억제제에 비해 우수한 특성을 가질 수 있다.

이러한 화합물 및 다른 관련 화합물들의 세포보호 특성은 알려져 있지 않은 이른바 무스카린/PARP의 이중 작용 방식으로 인한 것이다. 이러한 새로운 혼합 형태의 활성은 상기한 바와 같은 다양한 적응증의 치료를 위한 새로운 세포 보호제의 규명을 위해 현존하는 화합물 라이브러리의 새로운 고효율 스크리닝을 위해 이용될 수 있다.

일반적으로, 본 발명은 신경학적 질환의 예방 또는 치료를 위해 이중 M1/PARP1 조절 활성을 갖는 화합물의 세포보호 특성에 관한 것이다.

실시예 2

SIR2 억제 또는 상호작용

1. 물질 및 방법

1.1 SIR2 활성 테스트

SIR2 활성의 측정을 위해, NAD-의존 히스톤 아세틸라제 활성을 위한 정량적 시험 키트 CycLex® SIR2 Assay Kit (Ca# CY-1151)를 제조사의 지시사항에 따라 이용하였다(CycLex Co., Ltd. 1063-103 Ohara, Tera-Sawaoka Ina, Nagano 396-0002 Japan).

1.2 웨스턴 블랏

다양한 SIR2 함유 분획 유래의 겔을 표준 방법에 따라 니트로셀룰로오스 멤브레인 상에 블랏팅하였다. 단백질을 ECL (enhanced chemiluminescence)을 이용하여 가시화하였으며, SIR2 염색을 위해 다음 항체를 이용하였다: 일차 항체: A-SiR 2(Upstate, biomol 07-131; Lot:22073); 5% BSAr/1xTBST 중의 1:5000; 이차 항체: A-토끼 PE(A-0545) 5% BSA/1xTBST 중의 1:1000.

2. 결과

2.1. SIR2의 피렌제핀 친화 태그와의 상호작용, 피렌제핀의 표적으로서 SIR2의 규명

도 3c는 실시예 1에 따라 제조된 피렌제핀 친화 태그가 SIR2에 비가역적으로 결합하고, 이러한 부가적인 타겟이 풍부해지도록 하는 것을 나타내며, 이는 V56 세포의 추출물의 1D 겔을 특정 항체로 면역 염색함으로써 입증되었다. 도 3의 기호에 대한 상세한 설명을 제공한다.

2.2. SIR2 활성 테스트

Sommer et al., (2004)에 기재된 바와 같은 설치류 배아줄기세포 유래의 원료 추출물 및 상업적으로 이용 가능한 SIR2 활성 시험을 이용하여, 다음 값을 약물로 치료하지 않은 원료 추출물과 비교하여 기록하였다.

도 4에 SIR-2 활성 시험의 결과를 나타내었다. 피렌제핀 및 PBD/LS-75는 명백히 SIR-2와 결합하며 약한 억제효과를 갖는다. 이것은 관련 화합물의 새로운 구조/활성 관계 연구를 위한 해당 스크리닝에 대한 통로를 개방한다.

2.3 결론

본 실험의 결과는 피렌제핀 및 관련 구조들이 SIR-2에 결합하고 약한 SIR-2 억제제로서 작용할 수 있다는 것을 명백히 보여준다.

피렌제핀 및 관련 화합물들의 이러한 특성은 예전에는 알려져 있지 않았다. 이러한 작용방식으로 인해, 이러한 화합물들은 세포보호제로서 이용될 수 있으며, 순수한 PARP 억제제에 비해 우수한 특성을 가질 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한 일반적으로 복합적인 M1/PARP1/SIR-2 조절 활성을 갖는 세포보호 특성에 관한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 물질들은 그들의 효과를 도 6에 나타낸 바와 같이 지질 래프트라고 불리는 콜레스테롤이 풍부한 멤브레인 도메인을 경유하여 매개하는 것으로 보이며, 따라서 상기 물질들은 일반적으로 뉴레귤린(neuregulin), 헤파란설페이트 결합 단백질, NMDA 수용체, 니코틴 수용체, $GABA_A$ 수용체, ErbB 수용체 등과 같은 이러한 지질 래프트와 연관된 특별한 단백질 어셈블리를 경유하여 작용하거나 표적으로 한다. 지질 래프트 어셈블리의 요약을 도 7에 나타내었다.

실시예 3

신경세포 및 비신경세포의 LPS 유발 검사 및 화학적 허혈에서의 COX-2 및 iNOS 발현

본 명세서에 기재된 다양한 세포 상해 모델에서, 본 발명자들은 항상 세포의 초기 칼슘 과부하를 관찰하며, 이는 결과적으로 아폽토시스 세포 사멸을 유발하고, Cox-2와 같은 아폽토틱 및 예비적 염증 마커의 증가와 동시에 일어난다(도 2c 및 LPS 실험에 대한 해당 결과 참조).

결론

피렌제핀 및 PBD/LS-75와 같은 관련 화합물의 신경- 및 보다 일반적으로는 세포보호 효과는 한편으로는 PARP-1 및 SIR-2 결합 및 억제에 의해 매개되는 것으로 보이며, 다른 한편으로는 이른바 지질 래프트에서의 특별한 막 결합(associated) 단백질 콤플렉스의 어셈블리를 필요로 하는 것으로 보인다.

상기 물질과 관련하여 여기에서 적용된 모든 서로 다른 세포 유발 검사의 공통된 특징은 초기의 세포독성 칼슘 과부하이며, 이는 결과적으로 염증 및 아폽토시스로 진행되며, 이는 PARP-1/iNOS/Cox-2 염색에 의해 입증되었다. 따라서, 본 발명은 칼슘 과부하 및 염증/아폽토시스가 주된 역할을 하는 것으로 보이거나 잠재적으로 중요한 것으로 여겨지는 모든 질병의 적응증의 치료로서 이러한 물질의 이용을 포괄한다. 이것은 알츠하이머병 및 파킨슨씨병, 외상성 뇌손상, ALS, 다발성 경화증, 편두통, 및 만성 통증 증후군, 그리고 상기 언급된 다른 비뉴런성 질환과 관련된 염증성 상태를 포함한다.

추가 참고논문

1. Cahill MA, Wozny W, Schwall G, Schroer K, Holzer K, Poznanovic S, Hunzinger C, Vogt JA, Stegmann W, Matthies H, Schrattenholz A. (2003). Analysis of relative isotopologue abundances for quantitative profiling of complex protein mixtures labelled with the acrylamide/D3-acrylamide alkylation tag system. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003, 17:1283-1290.

2. Sommer S, Hunzinger C, Schillo S, Klemm M, Biefang-Arndt K, Schwall G, Pütter S, Hoelzer K, Schroer K, Stegmann W Schrattenholz A (2004) Molecular analysis of homocysteic acid-induced neuronal stress. Journal of Proteome Research 3, (3), 572-581.

3. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RDG (1996), Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev. 59: 89-102.

4. Kume T, Nishikawa H, Taguchi R, Hashino A, Katsuki H, Kaneko S, Minami M, Satoh M, Akaike A. (2002) Antagonism of NMDA receptors by sigma receptor ligands attenuates chemical ischemia-induced neuronal death in vitro. Eur J Pharmacol. 455:91-100.

5. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.(1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry. 1996; 68:850-858.

6. Vogt JA, Schroer K, Holzer K, Hunzinger C, Klemm M, Biefang-Arndt K, Schillo S, Cahill MA, Schrattenholz A, Matthies H, Stegmann W. (2003). Protein abundance quantification in embryonic stem cells using incomplete metabolic labelling with 15N amino acids, matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, and analysis of relative isotopologue abundances of peptides. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17:1273-1282

7. Vuong GL, Weiss SM, Kammer W, Priemer M, Vingron M, Nordheim A, Cahill MA, (2000) Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labelling of proteins. Electrophoresis, 2000; 21: 2594-2605.

8. Bakondi E, Bai P, Erdelyi K, Szabo C, Gergely P, Virag L. Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. Exp Dermatol. 2004 Mar;13(3):170-8.

9. Bai P, Bakondi E, Szabo E, Gergely P, Szabo C, Virag L. Partial protection by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxity in thymocytes. Free Radic Biol Med. 2001 Dec 15;31 (12):1616-23.

10. Virag L, Szabo C. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. FASEB J. 2001 Jan;15(1):99-107.

도면의 간단한 설명

도 1: 피렌제핀-관련 비가역적 친화-태그 (11)의 합성

도 2: 피렌제핀 및 그의 대사체 LS-75의 화학적 구조(도 2a); 1 μM 피렌제핀의 신경보호 in vitro 효과는 기재된 상태 하에서 화학적 허혈로부터 신경손상을 예방한다(도 2b). 허혈 상해 또는 LS-75에 의한 각각의 구조 동안, 아폽토시스 및 염증반응의 마커인 PARP-1, Cox-2, 및 iNOS의 농도는 해당 웨스턴 블랏에 의해 정량된다(도 2c). KCN(45 분 3mM KCN) 및 β-아밀로이드(10 μM β-아밀로이드 1-40)을 이용한 유발 검사 후에 피렌제핀 및 LS-75의 존재 하에서 신경이 생존하는 것으로 나타났다(도 2d 및 e). 세 가지 서로 다른 유발 검사(흥분독성, 허혈, 및 β-아밀로이드-유도) 후의 이러한 실험의 요약을 피렌제핀 및 LS-75의 신경보호적 EC50-값으로 나타내었다(도 2f).

도 3: 친화성 강화(affinity enrichment) 후에 얻어진 분획 1D 겔의 은 염색(silver staining)을 도 3a에 나타내었다: 레인 1-6, 8-17은 대조군이고, 레인 7은 113 및 89 kD에서 두드러진 밴드 및 110 kD에서 약한 밴드를 갖는 피렌제핀 친화 태그가 농축된 물질이다; 3b: 특이적인 항 PARP-1 항체를 갖는 V56 세포 추출물의 1D 겔의 면역염색. 레인 16은 All Blue Marker이고, 17은 요소 추출물이고, 18a는 NP-40 추출물이며; 레인 19-22는 피렌제핀 친화 컬럼에서 용리된다: 3c: 방법 섹션에 따라 제조된 피렌제핀-친화 태그는 SIR-2에 비가역적으로 결합하고 단백질의 농축을 제공하며, 이는 V56 세포 추출물의 1D 겔을 특이적인 항 SIR-2 항체로 면역염색함으로써 입증되었다. 레인 28 및 39는 분자량 마커이고; 29 및 38은 원료 추출물이고; 30/31은 1을 용리하며 추출물을 비가역적인 피렌제핀-친화 태그와 함께 밤새 배양한 후에 1을 통해 흐른다, 32/33: 대조군, 원료 추출물을 비가역적인 피렌제핀-친화 태그로 차단된 스트렙타비딘 아가로오스 비드와 함께 밤새 배양; 34/35: 대조군, 원료 추출물을 5'-AMP-세파로오스 비드와 함께 밤새 배양(Sigma, A3019); 36/37: 대조군, 비가역적인 피렌제핀-친화 태그에 결합된 스트렙타비딘 아가로오스 비드 없이, 원료 추출물을 밤새 배양.

도 4: 피렌제핀 및 그 유도체인 LS-75에 의한 SIR-2 및 PARP-1의 억제

위 부분에서, 해당 효소 활성을 피렌제핀 및 LS-75의 농도를 증가시켜 가면서 플랏하였다. 음의 대조군으로서, 전형적인 PARP-1 억제제 페난트리돈(phenanthridone) 및 전형적인 SIR-2 억제제로서 니코틴 아미드를 이용하였다(도 4a). 도면의 아랫 부분의 표는 모든 물질의 각각의 IC50-값을 나타내며, LS-75는 온건하게 강력한 PARP-1 억제제인 것으로 보인다. 피렌제핀은 다소 약한 PARP-1 억제제이다. 두 가지 물질 모두 약한 SIR-2 억제제이다(도 4b).

도 5: 피렌제핀 및 LS-75(여기에 나타냄)는 LPS 유발 검사(60 분간 100 ng/ml)으로부터 보호한다: 5a 3T3 섬유아세포의 보호; 5b A 549 세포의 보호; 5c 미분화 V56 배아줄기세포의 보호; 5d 신경으로 분화된 V56 배아줄기세포의 보호.

도 6: 피렌제핀 및 LS-75(여기에 나타냄)의 효과는 콜레스테롤이 풍부한 지질 래프트의 존재에 의존한다. 메틸-β-사이클로덱스트린의 부가에 의한 콜레스테롤 고갈에 의한 이러한 래프트의 붕괴가 확립된 방법은 신경 보호 효과(그리고, 또한 일반적인 세포보호 효과, 미도시)를 감소시킨다.

도 7: 신경 지질 래프트의 조직화 및 구성성분

이러한 기능적 막 성분들은 특정 세트의 막 단백질의 어셈블리 및 활성을 조절하는 뉴레굴린(NRG), 헤파란설페이트 결합 단백질(HSPG), 및 다이머 ErbB 수용체(ErbB)의 활성-의존적 상호작용에 의해 조직화되며, 이는 가장 중요한 신경생리학적/신경병리학적 과정의 일부에 필수적이다. 그들 중의 몇몇은 알츠하이머병(AD로 표시) 및/또는 정신분열증(SCH로 표시)의 유전적 위험 인자로서 최근 규명되었다. nAChRa7은 니코틴성 아세틸콜린 수용체 이형(isoform)(AD, SCH)이며, NMDAR은 친이온적 글루타메이트 수용체 이형이고, NRG는 뉴레굴린(AD, SCH)이고, APP는 아밀로이드 전구체 단백질(AD)이고, $GABA_AR$은 γ-아미노부티르산-개폐 클로라이드-채널이고; pTyr은 포스포-티로신을 나타내고; Cho: 래프트 지질은 콜레스테롤(AD에 대한 위험인자인 ApoE4와 관련됨) 및 스핑고지질을 함유한다 Ex: 세포외; M: 막 부분; In: 세포내; 지질 래프트는 또한 비신경 세포에서도 중요한 역할을 하고 기전은 일반적으로 염증 및 아폽토시스와 관련이 있다.

도 8: LS-75는 세포 조건 하에서 폴리-ADP-리보실화를 예방한다:

KCN/글루코오스 고갈에 의한 신경 세포의 허혈 상해는 이러한 항체로 특히 100-250 kD 범위의 단백질 숙주를 염색하는 것의 실질적인 증가를 유도한다. 이러한 효과는 신경 보호 효과가 있는 농도의 LS-75를 부가함으로써 역전된다; 여기에서, 본 발명자들은 1 및 10 μM의 LS-75의 존재에 의해, 허혈 상해 동안 폴리-ADP-리보실화 단백질이 감소되는 것을 입증한다. 이러한 효과의 IC 50은 1 μM 미만(약 0.3 μM) 이다.

도 9: 피렌제핀 및 그들의 두 가지의 주요 대사체인 데스메틸-피렌제핀(dm-피렌제핀) 및 LS-75(PBD)의 HPLC 및 자외선 흡광도 검출법에 의한 혈장 및 뇌척수액(CSF) 중의 농도 결정; AU는 임의적인 유닛이고; 피렌제핀 및 dm-피렌제핀은 244 nm에서 검출되고; LS-75(PBD)는 330 nm에서 검출되고; 두 가지 파장 모두에서 흡수하는 클로자핀은 항상 내부 표준물질로서 이용되고; 각각의 체류시간들은 해당 피크 이후 몇 분 뒤에 나타난다.

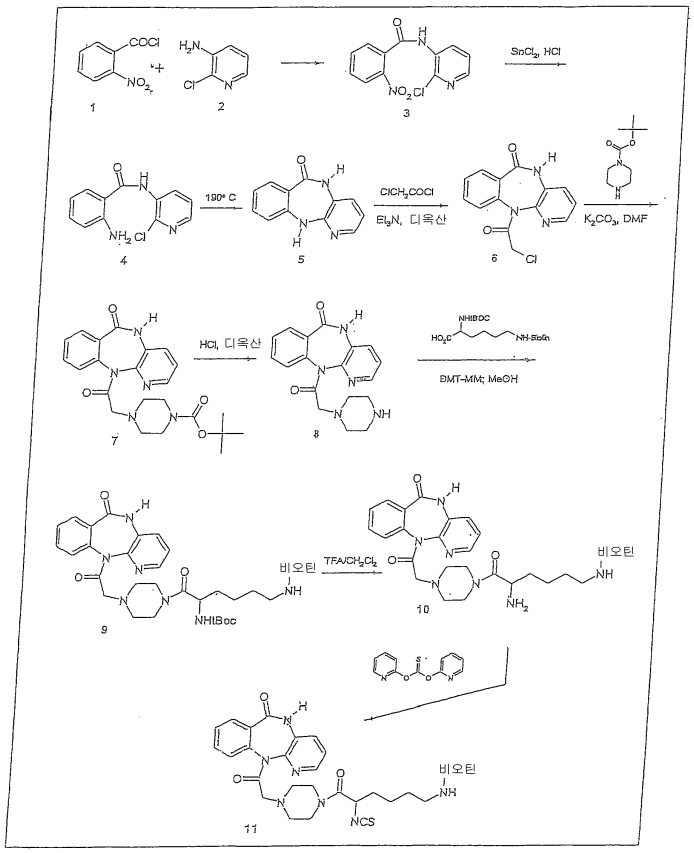
도 10: 피렌제핀 및 dm-피렌제핀의 피크 농도는 50 mg의 피렌제핀을 경구 투여한지 약 3 시간 후에 도달되고, 그래프의 좌측부는 3 시간 후, 그리고 그래프의 우측부는 6시간 후, 시험 랫트의 혈장(PLS) 및 뇌척수액(CSF)의 해당 농도를 나타낸다.

도 11: 시험 동물의 혈장 및 CSF에서의 LS-75의 검출은 물질이 혈액뇌관문(BBB)을 통과하고, 피렌제핀 투여 후에 뇌에서 농도가 증가하는 것을 보여준다. 도 11의 좌측부는 3 시간 및 6 시간 후에 혈장(PLS) 및 CSF에서의 LS-75 농도를 나타내며; 6 시간 후에는 CSF에서의 LS-75 농도가 실질적으로 증가하고; 좌측부에서는, LS-75의 투여 후(3 및 6 시간 이후)의 LS-75의 농도를 나타낸다: LS-75의 25-30%가 혈액뇌관문을 통해 통과한다.

도 12 및 13: 조절되는 피질 충격 손상(CCI: Controlled Cortical Impact Injury)(머리뼈절개술, 경막 상의 금속 피스톤) 외상 관련 해체를 보호 효과의 측면에서 평가하였다: 세포 손상의 마커(fast luxol blue 및 EMAP)는 타측부 히포캄푸스에서, 대조군에 비해 LS-75 치료 동물군에서 40-60% 감소하였다.

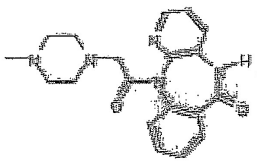
도면

도면1

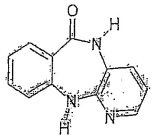


도면2

2a

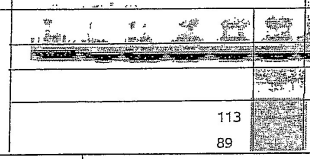
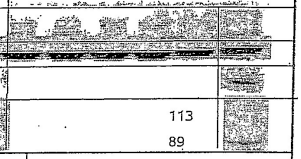


피렌제핀



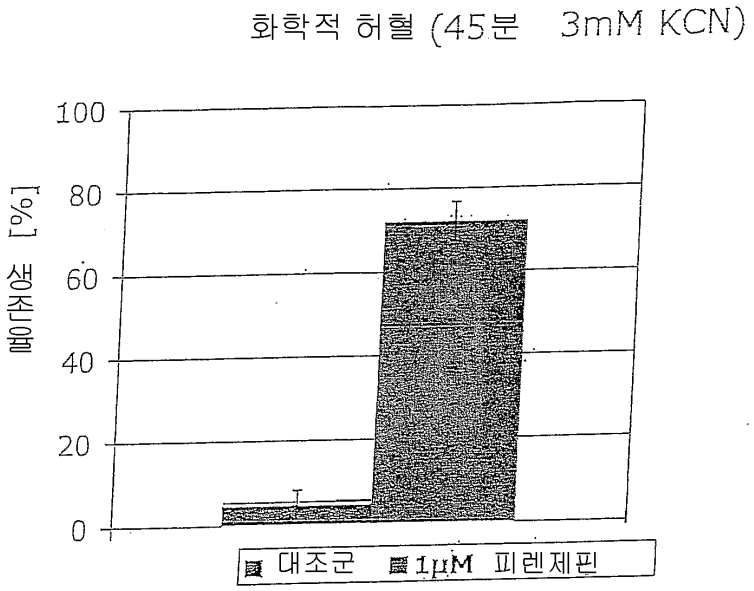
LS 75

2c 화학적 허혈, 1-45 분, 3 mM KCN, 글루코오스 고갈

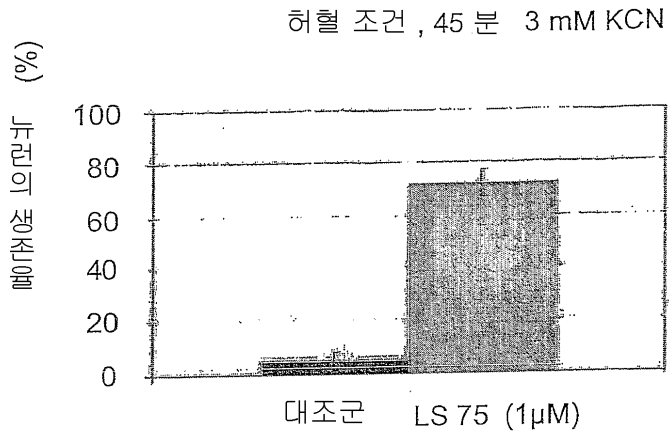
1 μM LS-75 (PBD)	+	-
(분)	1 2 5 10 30 45	1 2 5 10 30 45
Cox-2 (68 & 69 kD) β-액틴 (41 kD) iNOS (131 kD) PARP-1 (113 & 89 kD)		

2f (μM)	EC_{50} 흥분독성 패러다임 (NMDA, HCA)	EC_{50} ß- 아밀로이드 독성 (10 μM Aß 1-40)	EC_{50} 화학적 허혈 (45 분 , 3 mM KCN)
LS 75	1	0.1	0.3
피렌제핀	2	0.1	0.5

도면2b

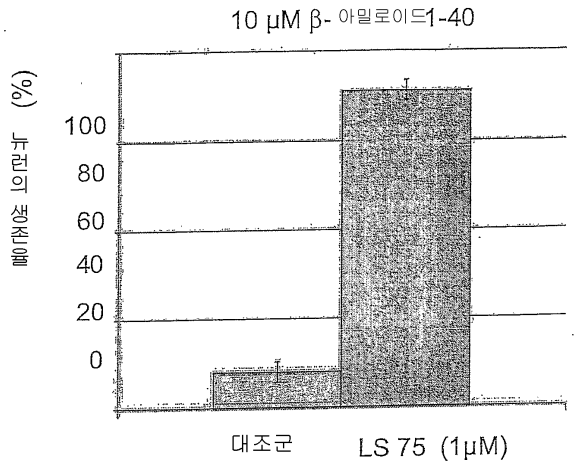


도면2d



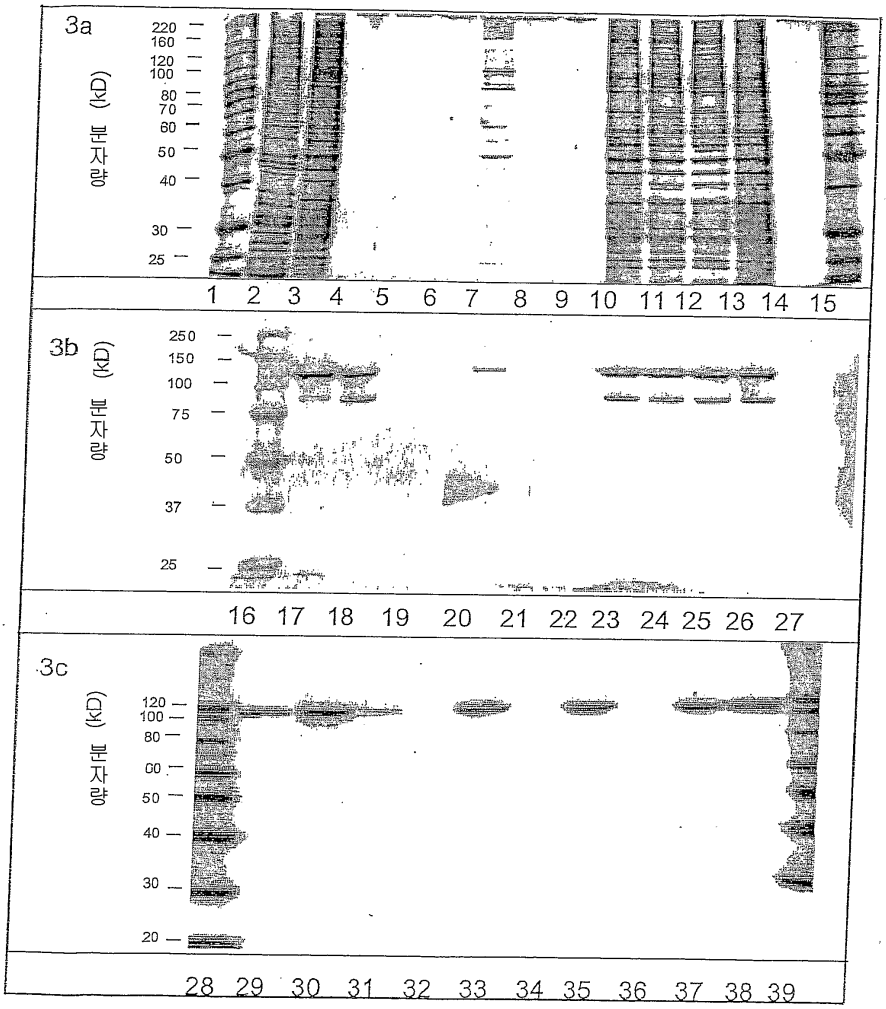
	세포수 1. 자극	세포수 2. 허혈 후의 자극	생존율[%]
대조군	376	20	5,3 ± 1,6
LS 75 (1μM)	294	218	74,15 ± 3,6
피렌제핀 (1μM)	350	235	67,1 ± 5,6

도면2e

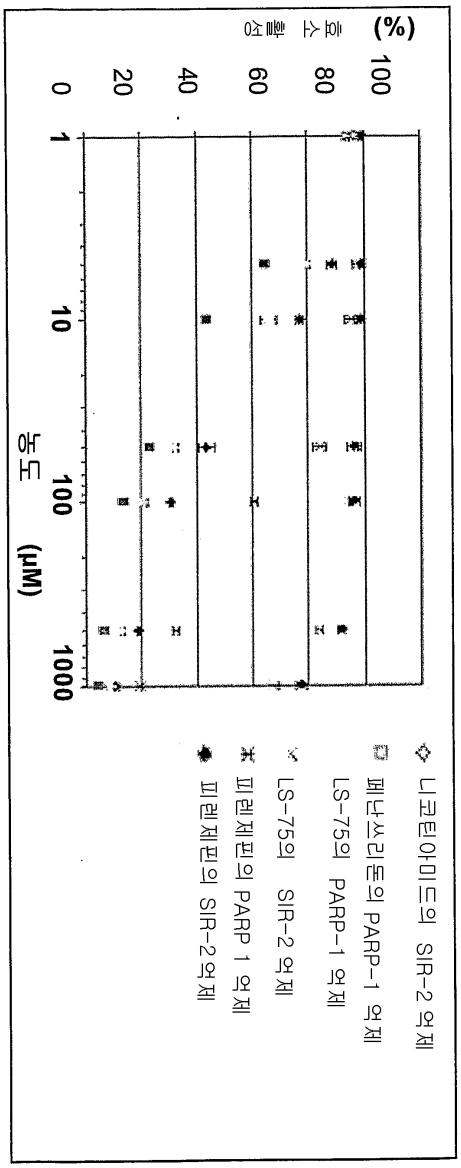


	세포수 1. 자극	세포수 2. ß-A 후의 자극	생존 세포 [%]
ß- 아밀로이드1-40	220	22	10.0 ± 2.9
ß- 아밀로이드1-40 + LS 75 (1 μM)	274	244	89.1± 2.7

도면3

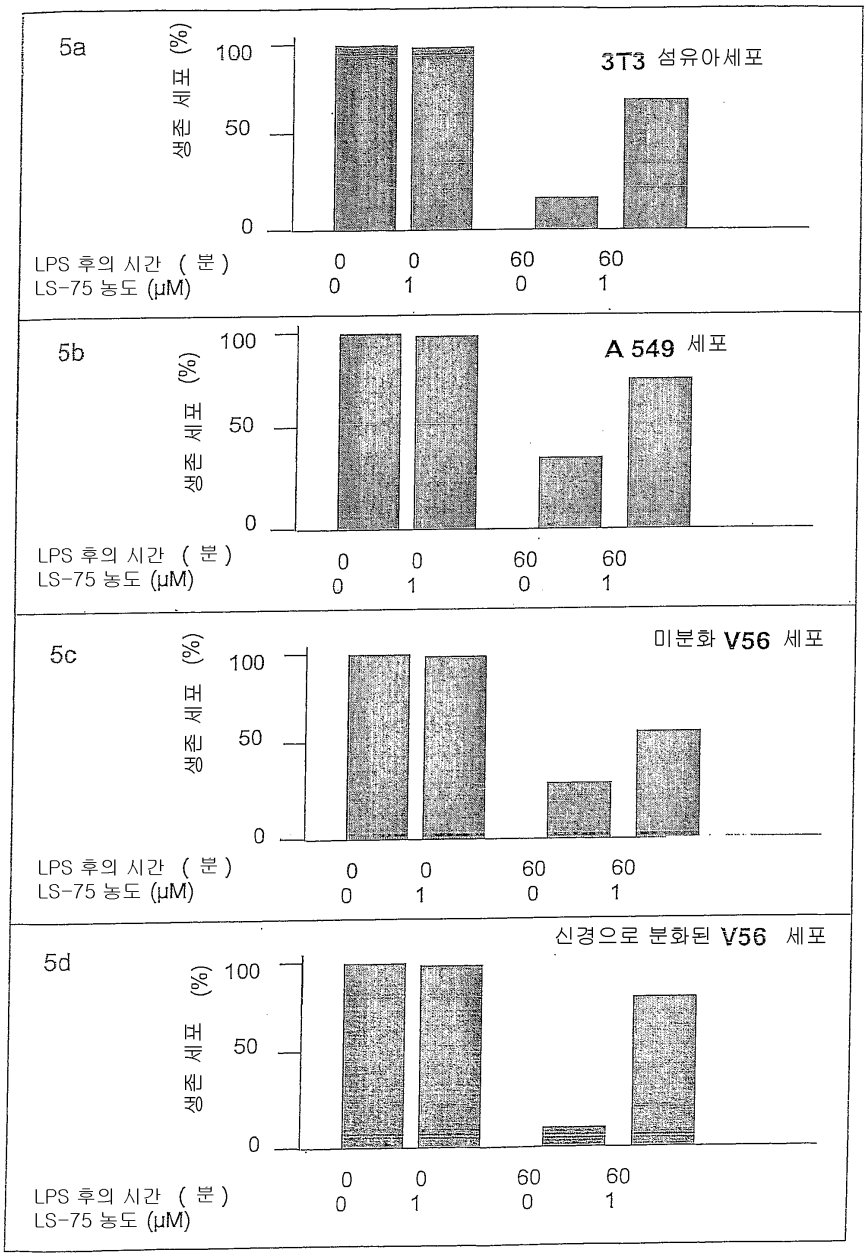

3a
분자량 (kD)
220
160
120
100
80
70
60
50
40
30
25
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3b
분자량 (kD)
250
150
100
75
50
37
25
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
3c
분자량 (kD)
120
100
80
60
50
40
30
20
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

도면4

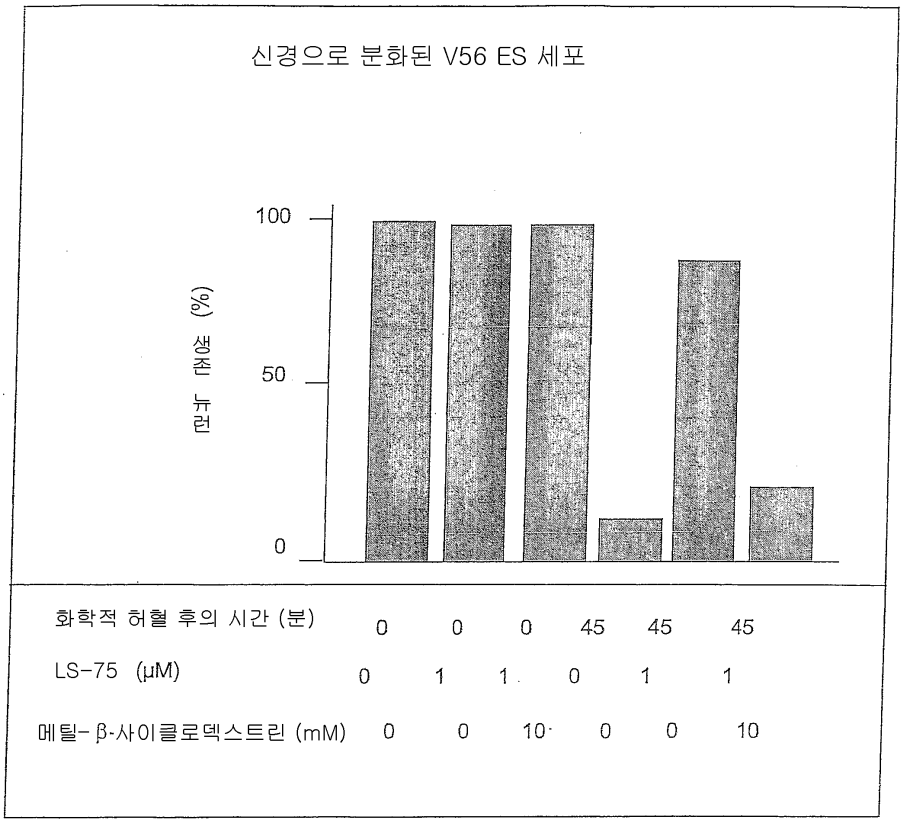


	IC 50 (μM) PARP-1	IC 50 (μM) SIR-2
니코틴 아미드	-	55
페난쓰리돈	7	-
LS-75	18	> 2000
피렌제핀	200	> 4000

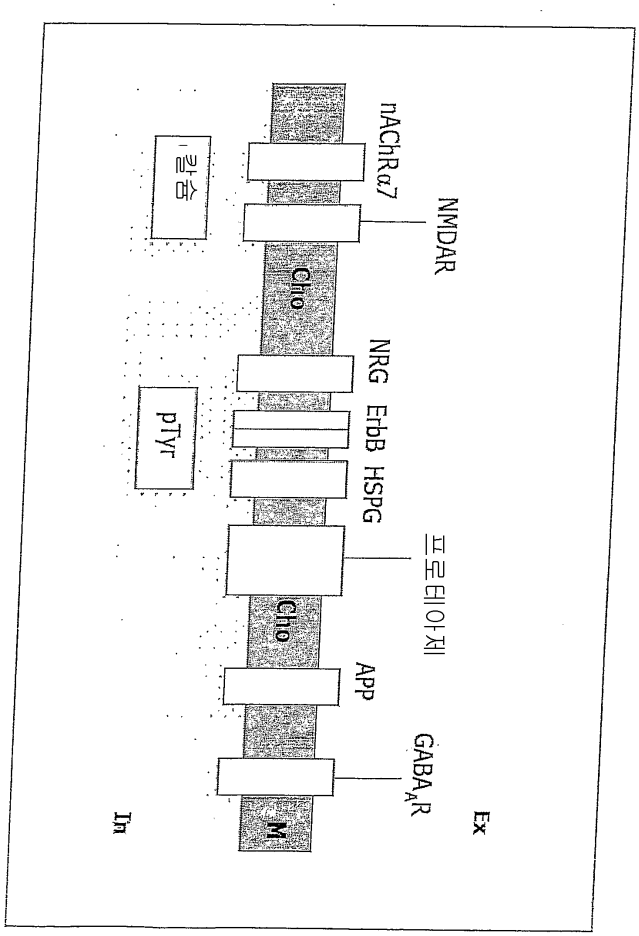
도면5


5a
3T3 섬유아세포
5b
A 549 세포
5c
미분화 V56 세포
5d
신경으로 분화된 V56 세포
세포 존재율 (%)
100
50
0
LPS 후의 시간 (분)
LS-75 농도 (μM)
0 0 60 60
0 1 0 1

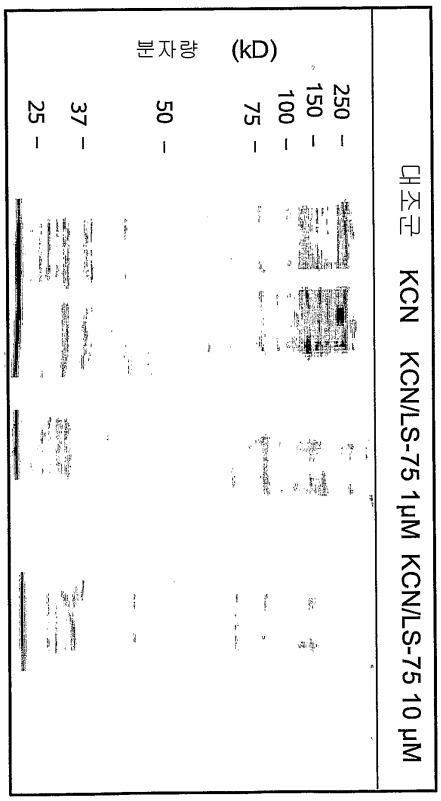
도면6


신경으로 분화된 V56 ES 세포
100
50
0
(%) 생존 뉴런
화학적 허혈 후의 시간 (분) 0 0 0 45 45 45
LS-75 (μM) 0 1 1 0 1 1
메틸-β-사이클로덱스트린 (mM) 0 0 10 0 0 10

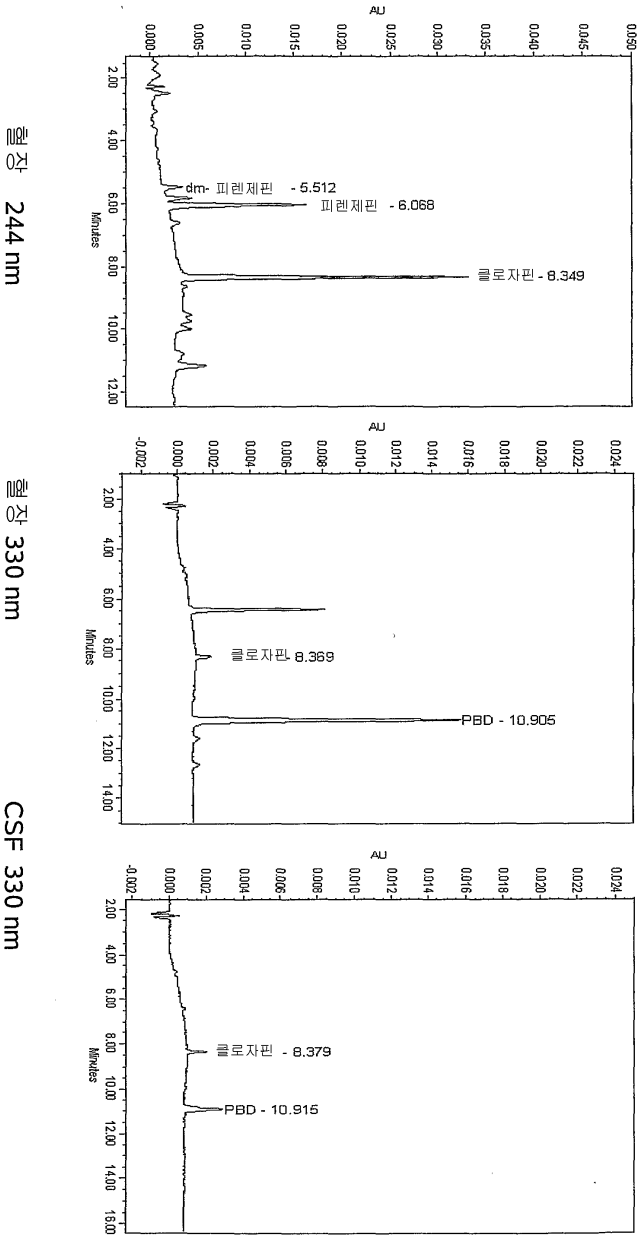
도면7


칼슘
pTyr
nAChRα7
NMDAR
Cho
NRG
ErbB
HSPG
프로테아제
Cho
APP
GABA$_A$R
M
Ex
In

도면8



도면9

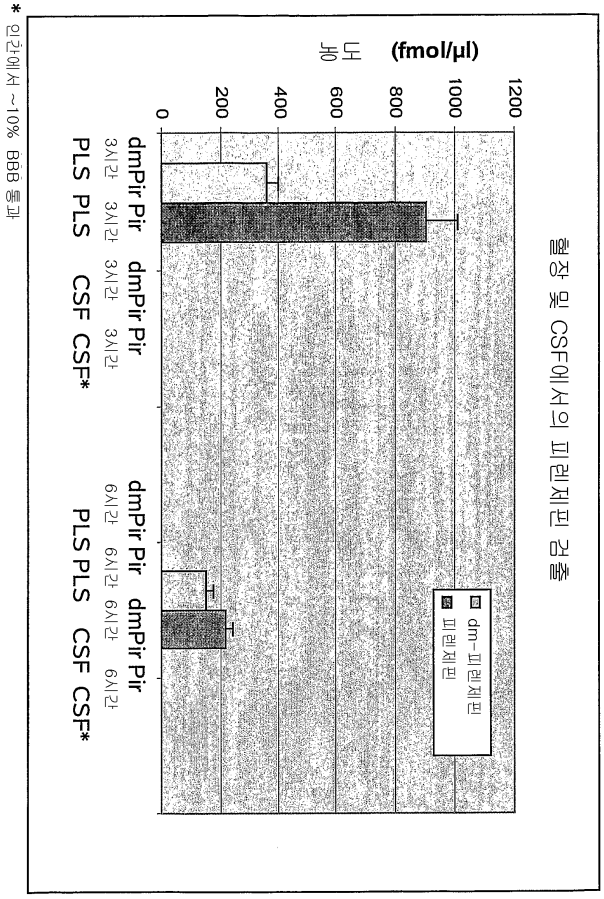


흡광 244 nm

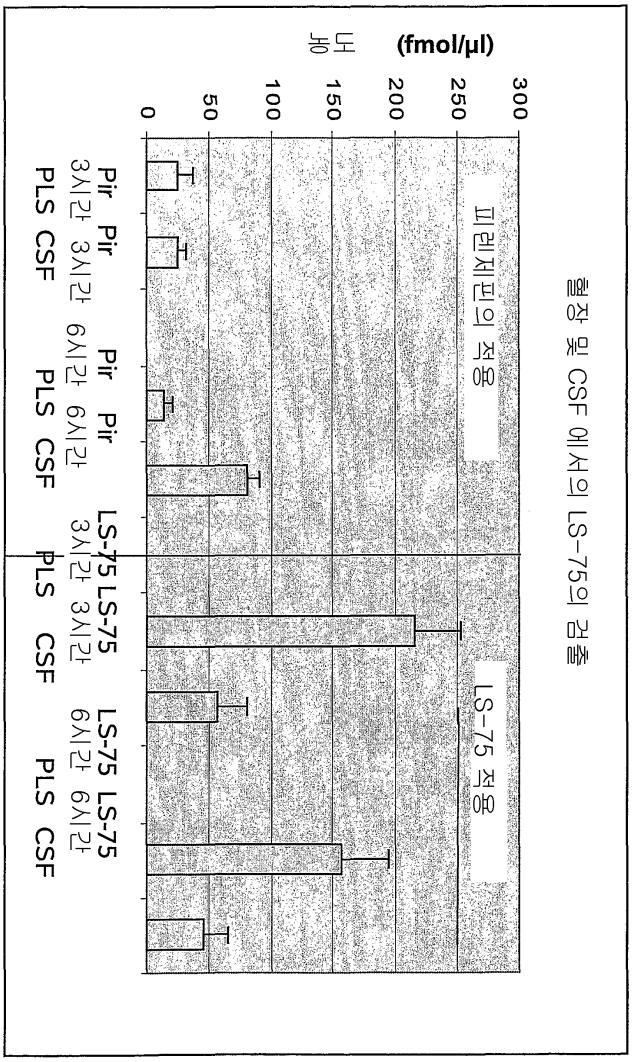
흡광 330 nm

CSF 330 nm

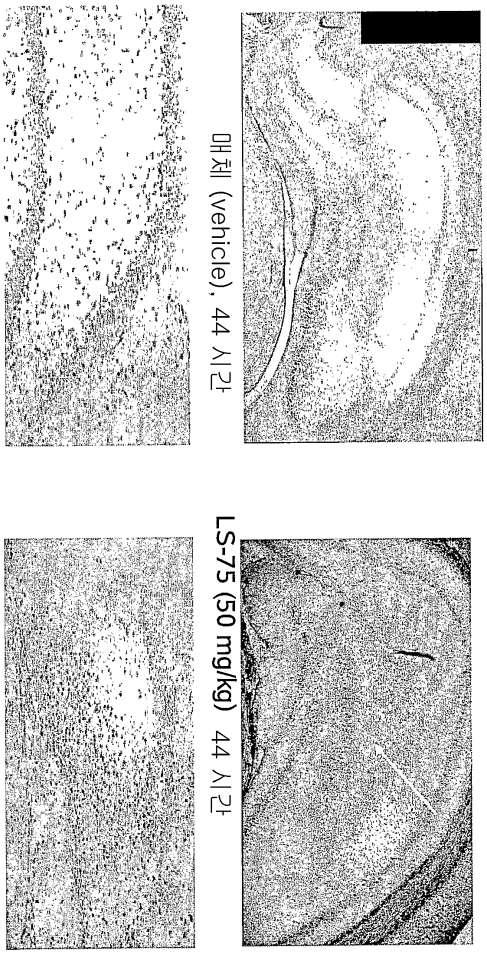
도면10


혈장 및 CSF에서의 피렌제핀 검출
농도 (fmol/μl)
0
200
400
600
800
1000
1200
dm-피렌제핀
피렌제핀
dmPir Pir dmPir Pir dmPir Pir dmPir Pir
3시간 3시간 3시간 3시간 6시간 6시간 6시간 6시간
PLS PLS CSF CSF* PLS PLS CSF CSF*
* 인간에서 ~10% BBB 통과

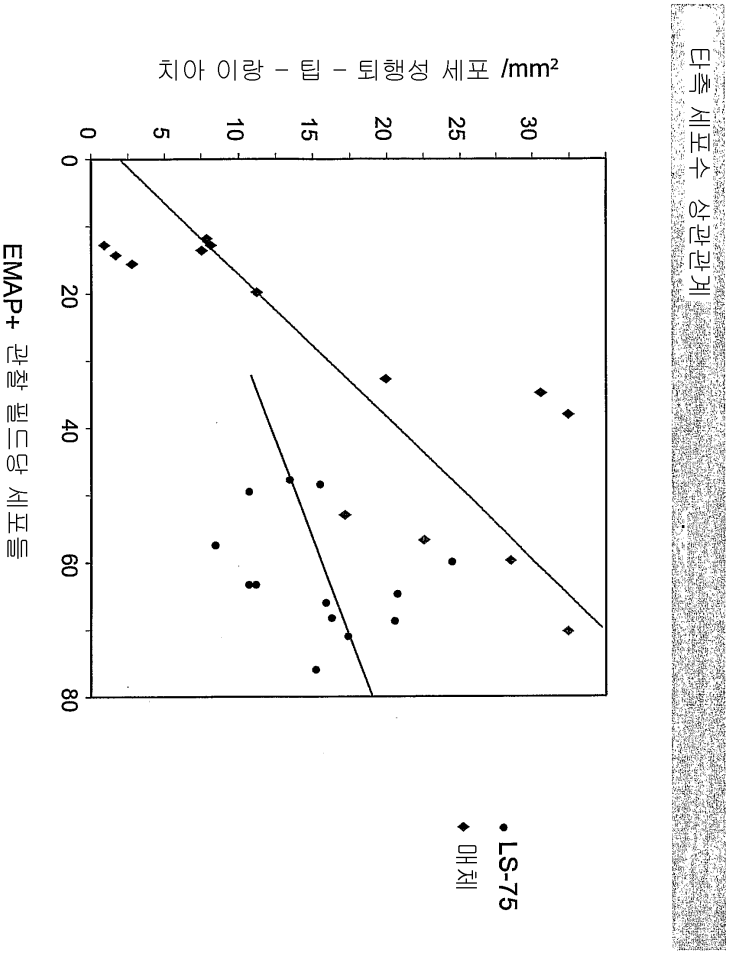
도면11


혈장 및 CSF 에서의 LS-75의 검출
피레지핀의 적용
LS-75 적용
농도 (fmol/μl)
300
250
200
150
100
50
0
Pir 3시간
Pir 3시간
Pir 6시간
Pir 6시간
LS-75 3시간
LS-75 3시간
LS-75 6시간
LS-75 6시간
PLS
CSF
PLS
CSF
PLS
CSF
PLS
CSF

도면12



도면13


단축 세포수 상관관계
치아 이랑 - 팁 - 퇴행성 세포 /mm²
0
5
10
15
20
25
30
0
20
40
60
80
EMAP+ 관찰 필드당 세포들
• LS-75
◆ 매체