



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월05일
 (11) 등록번호 10-0801207
 (24) 등록일자 2008년01월29일

(51) Int. Cl.

C07F 9/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7001485
 (22) 출원일자 2003년01월30일
 심사청구일자 2006년07월24일
 번역문제출일자 2003년01월30일
 (65) 공개번호 10-2003-0024823
 (43) 공개일자 2003년03월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/IL2001/000713
 국제출원일자 2001년08월01일
 (87) 국제공개번호 WO 2002/11666
 국제공개일자 2002년02월14일
 (30) 우선권주장
 137672 2000년08월03일 이스라엘(IL)

(56) 선행기술조사문헌
 US04670575A1
 (뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 22 항

(73) 특허권자

디-팜 리미티드

이스라엘 레호보트 76122 키리아트 웨이즈만 사이 언스 파크 피.오.박스 2313

(72) 발명자

코작 알렉산더

이스라엘 레호보트 76555 나프탈리 벤 에프라임 스트리트 8

빈니코바 마리나

이스라엘 람라 75122 아하론 부가니움 스트리트 1
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

김정욱, 박중혁, 정삼영

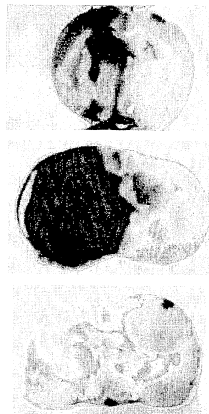
심사관 : 강영진

(54) 분지-사슬 친지질성 분자의 유도체 및 그것의 사용

(57) 요약

본 발명은 생물학적 장벽을 투과성으로 만들고, 종양 성장을 억제하는데 유용한 분지-사슬 친지질성 분자의 신규한 인-유도체를 개시한다. 더 나아가서, 본 발명은 상기 분자를 포함하는 제약학적 조성물 및 그것의 사용을 개시한다.

대표도



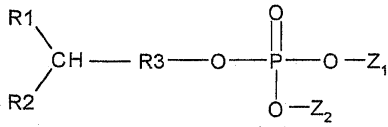
- (72) 발명자
폴리악 미카엘
 이스라엘 브네이-아이시 79845 아파트먼트 23 가네
 이 탈 205 6/6
베이트-안나이 엘리에제르
 이스라엘 예루살렘 96408 아리에 돌킨 스트리트 110
레즈니트스키-코헨 달리아
 이스라엘 네스-지오나 74042 하미니안 하리션 스트리트 22
센데리킨 알렉산더
 이스라엘 아시도드 77622 에벤 에즈라 11/32
- (56) 선행기술조사문헌
 JP63122775 A
 JP12053897 A
 JP01290604 A
 US3260688
- (81) 지정국
 국내특허 : 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 에쿠아도르, 필리핀, 베트남, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨
 AP ARIPO특허 : 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아
 EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘
 EP 유럽특허 : 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키
 OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 I의 화합물 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염.

(화학식 I)



(상기 식에서, R1 및 R2는 동일하거나 또는 상이하하며, 2 내지 30개 탄소 원자를 포함하는 포화 또는 불포화 지방족 사슬이고;

R3은 A-[CH₂]_m-B-[CH₂]_n-C-[CH₂]_p-D이며, 여기에서 m, n 및 p는 각각 독립적으로 0 또는 1 내지 12의 정수이고, A, B, C 및 D는 각각 공유 결합, 아미노, 아미도, 산소, 티오, 카르보닐, 카르복실, 옥시카르보닐, 티오카르보닐 기로부터 독립적으로 선택되며, 단 2개 산소 원자는 서로 직접 연결되지 않고, 또한 R3는 -O-CH₂-CH₂- 또는 -O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-를 포함하며;

Z₁ 및 Z₂의 하나는 부재하거나 수소이고, 나머지 하나는 인 기와 함께 몰린, 에탄올아민 또는 세린의 인 에스테르를 형성한다)

청구항 2

제 1 항에 있어서, R1은 3개 탄소 원자 길이이고, R2는 12 내지 16개 탄소 원자 길이인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, R1은 프로필이고, R2는 도데실인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, R2 및 R3에 있는 탄소 원자의 총수는 합쳐서 6 내지 26개인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, R2 및 R3에 있는 탄소 원자의 총수는 합쳐서 16 내지 22개인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, Z₁은 콜린인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항에 있어서,

2-(4-헥사데카노일옥시)에틸 포스포콜린(3,12-MEG-PC),

2-(4-헥사데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,12-DEG-PC),

2-(2'-[10"-(헥사데실-4-옥시)데실-1-옥시]에톡시)에틸 포스포콜린(3,12-O-G-DEG-PC),

2-(4-옥타데카노일옥시)에틸 포스포콜린(3,14-MEG-PC),

2-(4-옥타데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,14-DEG-PC),

2-(4-에이코사노일옥시)에틸 포스포콜린(3,16-MEG-PC),

2-(4-에이코사노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,16-DEG-PC), 및

2-(2'-프로필에이코사노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,18-DEG-PC)

로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제 1 항에 있어서, 2-(4-헥사데카노일옥시)에틸 포스포콜린인 것을 특징으로 하는 화합물.

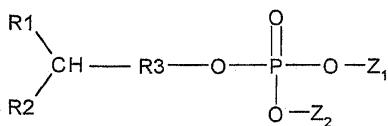
청구항 14

제 1 항에 있어서, 2-(4-헥사데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 15

제약학적으로 허용되는 담체 및 화학식 I의 화합물 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염을 포함하고, 생물학적 장벽을 투과성으로 만드는데 효과적인, 낭모양 황반부종(CME), 노화-관련 황반변성(ARMD), 안내감염, 안내염 증 및 안내암으로부터 선택되는 안과 질환 또는 장애의 치료용 제약학적 조성물.

(화학식 I)



(상기 식에서, R1 및 R2는 동일하거나 또는 상이하하며, 2 내지 30개 탄소 원자를 포함하는 포화 또는 불포화 지방족 사슬이고;

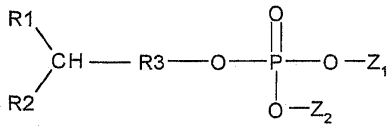
R3은 A-[CH₂]_m-B-[CH₂]_n-C-[CH₂]_p-D이며, 여기에서 m, n 및 p는 각각 독립적으로 0 또는 1 내지 12의 정수이고, A, B, C 및 D는 각각 공유 결합, 아미노, 아미도, 산소, 티오, 카르보닐, 카르복실, 옥시카르보닐, 티오카르보닐 기로부터 독립적으로 선택되며, 단 2개 산소 원자는 서로 직접 연결되지 않고, 또한 R3는 -O-CH₂-CH₂- 또는 -O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-를 포함하며;

Z₁ 및 Z₂의 하나는 부재하거나 수소이고, 나머지 하나는 인 기와 함께 콜린, 에탄올아민 또는 세린의 인 에스테르를 형성한다)

청구항 16

제약학적으로 허용되는 담체 및 화학식 I의 화합물 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염을 포함하는, 중앙 성장을 억제하는데 효과적인 제약학적 조성물.

(화학식 I)



(상기 식에서, R1 및 R2는 동일하거나 또는 상이하며, 2 내지 30개 탄소 원자를 포함하는 포화 또는 불포화 지방족 사슬이고;

R3은 A-[CH₂]_m-B-[CH₂]_n-C-[CH₂]_p-D이며, 여기에서 m, n 및 p는 각각 독립적으로 0 또는 1 내지 12의 정수이고, A, B, C 및 D는 각각 공유 결합, 아미노, 아미도, 산소, 티오, 카르보닐, 카르복실, 옥시카르보닐, 티오카르보닐 기로부터 독립적으로 선택되며, 단 2개 산소 원자는 서로 직접 연결되지 않고, 또한 R3는 -O-CH₂-CH₂- 또는 -O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-를 포함하며;

Z₁ 및 Z₂의 하나는 부재하거나 수소이고, 나머지 하나는 인 기와 함께 콜린, 에탄올아민 또는 세린의 인 에스테르를 형성한다)

청구항 17

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 화학식 I의 화합물은 제 2 항, 제 3 항, 제 5 항 내지 제 7 항, 제 9 항, 제 13 항 또는 제 14 항 중 어느 한 항에 정의된 것인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 18

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 생물학적 활성제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 생물학적 활성제는 치료제인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 20

제 18 항에 있어서, 생물학적 활성제는 항암제인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 21

제 18 항에 있어서, 생물학적 활성제는 진단제인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 22

제 15 항에 있어서, 생물학적 장벽은 피부, 각막, 결막, 코, 기관지, 구강, 질 및 위장관 상피, 혈액막장벽, 혈액뇌장벽, 혈액고환장벽, 혈액중양장벽 및 혈액신장간기로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 23

제 15 항에 있어서, 척수, 뇌, 눈, 고환, 샘 또는 종양으로부터 선택되는 특별격리 부위 또는 기관으로 생물학적 활성제를 투여하는데 유용한 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 24

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 항종양제, 항바이러스제, 항미생물제, 항진균제, 항염증제, 신경보호제 및 생체활성 펩티드 및 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 치료제와 조합되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 25

제 16 항에 있어서, 종양은 중추신경계통에 있는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 26

제 16 항에 있어서, 종양은 암종, 신경아교종, 신경모세포종, 망막모세포종, 림프종, 백혈병, 육종 및 흑색종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 27

제 16 항에 있어서, 상기 종양은 원발성 또는 속발성 종양인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 분지-사슬 친지질성 분자의 신규한 인-유도체, 그것의 제약학적 조성물, 및 가역적이고 선택적인 방식으로 생물학적 장벽의 투과성을 증가시키고, 종양 성장을 억제하기 위한 그것의 사용에 관한 것이다.

배경기술

<2> 많은 약물 및 치료제의 사용에서 주된 제약은 생물학적 장벽을 통과하는 그것들의 능력이 불충분하다는 것이다. 이것은 특히 중추신경계통(CNS)과 같은 특별격리 부위의 질환 및 장애를 치료하는데 심각한 문제를 나타낸다.

<3> 타이트한 이음부에 의해 연결된 분화된 미세혈관 내피세포로 이루어진 혈액뇌장벽(BBB)은, 정상적으로는 뇌의 항상성 환경을 유지하고, 순환계통에 존재하는 독성 제제 및 퇴행성 생성물로부터 뇌를 보호해야 할 책임이 있다. 그러나, 어떤 병적 상황에서 BBB의 존재는 뇌로 치료 물질의 운반을 방해할 수 있으며, 이로써 종양, 감염, 농양 및 퇴행성 질환을 포함하는 중추신경계통 병소의 치료를 방해한다.

<4> 유사한 방식으로, 혈액종양장벽(BTB)의 존재는 종양으로 화학치료제의 전달을 방해하며, 이로써 약물 생체이용율을 감소시키고 필요한 경우의 유효한 치료 효과를 방지한다. 병든 표적에 치료제가 불충분하게 접근하는 문제는 CNS 종양의 경우에 특히 심각하며, 악성 뇌종양을 지닌 환자는 나쁜 예후를 가진다.

<5> 제한된 부위에서 어떤 약물의 임상적으로 유용한 농도를 달성하기 위해서는, 이들 화합물을 높은 전신적 투약량으로 투여하는 것이 주로 필요하다. 높은 전신적 농도는 차례로 심각한 부작용 및 높은 독성 수준에 관련된다.

<6> 이 문제를 공략하기 위한 한 전술은, 예를 들어 이들 약물을 친지질성 캐리어에 연결함에 의해, 친수성 약물 분자의 생물리학적 특징들을 변경시키는 것을 포함한다. 그러한 생물학적 멤브레인을 가로지르는 약물 투과성은 그것의 친지질성에 좌우되므로, 화합물의 친지질성을 증가시키는 것은 이론적으로 그것의 생체이용율을 개선하고 치료 효과를 증가시켜야 한다. 표적화를 위한 신경학적 활성 화합물과의 그러한 공유 극성 지질 콘주게이트가 Yatvin 등의 미국 특허 5,827,819에 개시된다.

<7> BBB 불투과성을 피하는 다른 접근법은 BBB를 일시적으로 개방하여 뇌로 특정 약물 또는 제제의 진입을 용이하게 하는 제제를 사용함에 의한다. 만니톨과 같은 제제가 이런 바람직한 효과를 발휘한다고 알려졌으며, 악성 뇌종양으로 화학치료제를 전달하는데 사용되고 있다(Hiesinger 등 (1986), Annals of Neurology, 19:50-59). 그러나, 뇌종양 치료법에서 이런 종류의 고삼투성 BBB 붕괴의 사용은, BBB를 가로지르는 약물에 더하여, 신경독소와 같은 다른 분자의 진입이 또한 허락되므로 논의의 여지가 있다. 이것은 삼투성 개방법을 사용하는 치료에 관련된 뇌졸중, 발작, 면역반응 및 안구독성의 높은 발생수의 원인일 수 있다.

<8> 또한, 혈액뇌장벽의 투과성을 증가시키는 여러 가지 다른 치료가 개시되었으며, 브라디키닌 작용제(Alkermes의 WO 91/16355) 및 어떤 다른 펩티드(Alkermes의 WO 92/18529)의 사용; 박테리아 세포벽 단편(록펠러 대학의 WO 91/16064)의 사용; 또는 보르데텔라 백일해 사상 혈구응집소 또는 뇌 내피 x-분자에 대한 항체(록펠러 대학의 WO 92/19269)의 사용을 포함한다. 또한, 올레산과 같은 어떤 지방산이 BBB를 가역적으로 개방한다고 보고되었다(Sztrihai 및 Betz (1991), Brain Res. 336: 257-262).

<9> 진단 시약(오레곤 보건과학 대학의 미국 특허 5,059,415) 또는 치료제(오레곤 보건과학 대학의 WO 89/11299)의 투여 전에 혈액뇌장벽의 투과성을 가역적으로 증가시키는 방법의 유용성이 개시되었다.

<10> 국제 특허출원 공개번호 WO 99/02120에 본 발명의 발명자에 의해, 분지 지방산 및 그것의 어떤 친지질성 유도체가 바이오멤브레인을 가역적으로 투과성으로 만드는데 유용하다는 것이 이전에 개시되었다. 그러나, 포스페이트 부분을 포함하는 화합물은 개시되지 않았다. 더욱이, 포스페이트 부분을 부가하여 분지 지방산을 변형시킴

- <29> 2-(4'-헥사데카닐옥시)에톡시에틸 포스페이트(3,12-(에테르)-DEG-PQ),
- <30> 4-헥사데실 포스포콜린(3,12-PC),
- <31> 2-(4-헥사데카노일옥시)에틸 포스포콜린(3,12-MEG-PC),
- <32> 2-(4-헥사데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,12-DEG-PC),
- <33> 2-{2'-[10''-(헥사데실-4-옥시)데실-1-옥시]에톡시}에틸 포스페이트(3,12-0-~~6~~-DEG-PQ₄),
- <34> 2-{2'-[10''-(헥사데실-4-옥시)데실-1-옥시]에톡시}에틸 포스포콜린(3,12-0-~~6~~-DEG-PC),
- <35> 4-옥타데카노일옥시에틸 포스페이트(3,14-MEG-PQ),
- <36> 2-(4'-옥타데카노일옥시)에톡시에틸 포스페이트(3,14-DEG-PQ),
- <37> 4-옥타데카닐옥시에틸 포스페이트(3,14-(에테르)-MEG-PQ),
- <38> 2-(4'-옥타데카닐옥시)에톡시에틸 포스페이트(3,14-(에테르)-DEG-PQ),
- <39> 4-옥타데실 포스포콜린(3,14-PC),
- <40> 2-(4-옥타데카노일옥시)에틸 포스포콜린(3,14-MEG-PC),
- <41> 2-(4-옥타데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,14-DEG-PC),
- <42> 4-에이코사노일옥시에틸 포스페이트(3,16-MEG-PQ),
- <43> 2-(4'-에이코사노일옥시)에톡시에틸 포스페이트(3,16-DEG-PQ),
- <44> 4-에이코사닐옥시에틸 포스페이트(3,16-(에테르)-MEG-PQ),
- <45> 2-(4'-에이코사닐옥시)에톡시에틸 포스페이트(3,16-(에테르)-DEG-PQ),
- <46> 4-에이코사닐 포스포콜린(3,16-PC),
- <47> 2-(4-에이코사노일옥시)에틸 포스포콜린(3,16-MEG-PC),
- <48> 2-(4-에이코사노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,16-DEG-PC),
- <49> 10-(4'-헥사데카노일옥시)데카닐 포스페이트,
- <50> 10-(8'-펜타데카노일옥시)데카닐 포스페이트,
- <51> 2-[2'-(2''-프로필에이코사노일옥시)-에톡시]에틸 포스페이트(3,18-DEG-PQ), 및
- <52> 2-(2'-프로필에이코사노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린(3,18-DEG-PC)
- <53> 이다.
- <54> 현재, 가장 바람직한 화합물은:
- <55> 2-(4'-헥사데카노일옥시)에톡시에틸 포스페이트, 일나트륨염,
- <56> 2-(4'-헥사데카노일옥시)에톡시에틸 포스페이트, 이나트륨염,
- <57> 2-(4'-헥사데카닐옥시)에톡시에틸 포스페이트,
- <58> 2-(4-헥사데카노일옥시)에틸 포스포콜린, 및
- <59> 2-(4-헥사데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린
- <60> 이다.
- <61> 본 발명의 화합물은 생물학적 장벽의 투과성을 증가시키는데 유용하다. 따라서, 다른 양태로서, 본 발명은 유효량의 상기 묘사된 화학식 I의 화합물 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염, 및 제약학적으로 허용되는 담체

를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다.

- <62> 본 발명의 제약학적 조성물은 제약학적 유효량의 생물학적 활성제를 더 포함할 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 생물학적 활성제는 치료제이다. 치료제는 항종양제, 항바이러스제, 항미생물제, 항진균제, 항염증제, 신경보호제 및 생체활성 펩티드 및 단백질로부터 선택될 수 있지만, 제한은 없다.
- <63> 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 진단제를 더 포함한다.
- <64> 제약학적 조성물은, 특히 생물학적 장벽에 의해 보호된 특별격리 부위에 있는 조직 및 기관으로 생물학적 활성 분자, 예를 들어 치료제 및 진단제의 투여를 용이하게 하는데 유용하다.
- <65> 특정한 구체예에서, 제약학적 조성물은 혈액망막장벽(BRB), 혈액뇌장벽(BBB) 및 혈액종양장벽(BTB)를 가로지르는 약물 전달을 증가시키는데 유용하다. 또한, 본 발명에 따르는 제약학적 조성물은 다른 생물학적 장벽의 투과성을 증가시켜서, 예를 들어 피부, 각막, 결막, 코, 기관지, 구강 및 혈액신장간기를 통한 흡수를 용이하게 하는데 유용할 수 있다.
- <66> 제약학적 조성물은 경구, 비경구 또는 국소 투여에 의하거나, 또는 부위 관류, 관장 또는 기관내 세척에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 제약학적 조성물은 동맥내 또는 경맥내 투여된다.
- <67> 또 다른 양태로서, 본 발명은 생물학적 장벽의 투과성을 증가시키는 방법을 제공한다. 이들 방법은 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염에 상기 장벽을 노출함으로써, 생물학적 장벽의 투과성을 가능하게 하거나 또는 증가시키는 단계를 포함한다.
- <68> 또 다른 양태로서, 본 발명은 특별격리 부위 또는 기관으로 생물학적 활성제를 투여하는 방법을 제공하며, 이 방법은 유효량의 본 발명에 따르는 화합물의 존재 하에서 상기 생물학적 활성제에 상기 부위 또는 기관을 노출함으로써, 특별격리 부위 또는 기관에서 생물학적 활성제의 침투 및/또는 축적을 가능하게 하거나 또는 증가시키는 단계를 포함한다.
- <69> 특별격리 부위 또는 기관은 척수, 뇌, 눈, 고환, 샘 및 종양으로부터 선택될 수 있지만, 제한은 없다.
- <70> 또 다른 양태로서, 본 발명은 활성 성분으로서 본 발명에 따르는 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약학적 조성물의 치료적 유효량을 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양 치료 방법을 제공한다. 상기 종양은 암종(예를 들어, 유방, 결장, 직장 및 방광 암종), 신경아교종(예를 들어, 별아교세포종), 신경모세포종, 망막모세포종, 안내암, 림프종, 백혈병, 육종 및 흑색종으로부터 선택될 수 있지만, 제한은 없다. 종양은 원발성 또는 속발성 종양일 수 있다.
- <71> 더 나아가서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염을 포함하는 제약학적 조성물의 치료적 유효량을 치료제와 조합하여 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 중추신경계통 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 치료제는 화학식 I의 화합물을 포함하는 동일한 제약학적 조성물 내에, 또는 별도의 조성물 내에 포함될 수 있다.
- <72> 바람직한 구체예에서, 치료된 중추신경계통 질환은 뇌종양이고, 치료제는 항암제이다. 다른 바람직한 구체예에서, 치료된 질환은 안과 질환 또는 장애, 예를 들어 낭모양 황반부종(CME), 노화-관련 황반변성(ARMD), 안내감염, 안내염증 및 안내암이다.
- <73> 더 이상의 양태로서, 본 발명은 생물학적 장벽에 의해 보호된 기관에서 상기 진단제의 축적을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 진단제를 유효량의 상기 정의된 화학식 I의 화합물과 조합하여 개체에 투여함으로써, 생물학적 장벽에 의해 보호된 기관에서 진단제의 축적을 증가시키는 단계를 포함한다. 진단제는 화학식 I의 화합물을 포함하는 동일한 제약학적 조성물 내에, 또는 별도의 조성물 내에 포함될 수 있다.
- <74> 한 바람직한 구체예에서, 생물학적 장벽에 의해 보호된 상기 기관은 중추신경계통이다.

실시예

I. 화학 실시예

- <114>
- <115> 분명하게 하기 위해서, 특정한 P-BFA 분자 및 그것의 염의 합성 과정을 아래에 예시한다. 그러나, 제한은 없지만, R1 및/또는 R2가 고리 알킬기(들)을 포함하는 지방족 사슬인 포화 및 불포화 분지-사슬 분자 및 화합물을 포함하는 본 발명의 다른 P-BFA 분자의 합성에, 유사한 과정을 또한 이용할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 제한은 없지만, 나트륨, 칼륨, 암모늄 및 알킬-암모늄 염, 및 2가 반대이온을 갖는 염을 포함하는 P-BFA

분자의 다양한 제약학적으로 허용되는 염이 얻어질 수 있다.

- <116> 모든 합성된 화합물은 NMR, 질량분광학 및 원소분석에 의해 특성화된다.
- <117> 실시예 1
- <118> 알킬 포스페이트의 합성
- <119> 일반식 RO-P(O)(OH)₂의 포스페이트를 제조했다. R은 R₁(R₂)-CH 구조의 분지-사슬 알킬 부분을 표시하며, 여기에서 R₁은 알킬 결사슬에 있는 탄소의 수를 나타내고, R₂는 알킬 주사슬에 있는 탄소의 수를 나타낸다.
- <120> RO-P(O)(OH)₂ 분자의 합성은 3-단계 과정이다.
- <121> 제 1 단계에서, 상응하는 알콜(R-OH)을 알데히드 및 브롬화 알킬로부터 그리나드 반응을 사용하여 제조했다 (Vogel의 "실용 유기화학 교과서", Wiley, 뉴욕, pg. 531, (1996)).
- <122> 제 2 단계에서, 디페닐 포스페이트 에스테르를 알콜 및 디페닐 포스포콜리테이트로부터 제조했다.
- <123> $ROH + ClP(O)(OC_6H_5)_2 + C_5H_5N \rightarrow RO-P(O)(OC_6H_5)_2 + C_5H_5N \cdot HCl$
- <124> 제 3 단계에서, 알카닐 디하이드로젠 포스페이트를 디페닐 에스테르의 수소화 반응에 의해 얻었다.
- <125> $RO-P(O)(OC_6H_5)_2 + 2H_2 \rightarrow RO-P(O)(OH)_2 + 2C_6H_6$
- <126> 4-헥사데카닐 디페닐 포스페이트
- <127> 실온에서 교반하면서 디페닐 포스포로콜리테이트(4.0g, 0.015mole)를 드라이 피리딘(5ml)에 용해된 헥사데칸-4-올(2.4g, 0.01mole) 용액에 서서히 첨가했다. 플라스크를 마개로 막고 48시간 동안 옆에 제쳐둔 후, 내용물을 얼음 냉각된 1N 염산(100ml)에 부었다. 분리된 층유를 에테르로 추출했다. 에테르 층을 1N 염산(3배), 5% 탄산수소나트륨(5배), 및 물(5배)로 세척했다. 건조(MgSO₄)시킨 후 에테르를 제거하고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(석유 에테르(bp. 30-60°C):에테르, 10:1)로 정제했다. 용매를 증발시킨 후 액체 3.5g을 얻었다. 수율 74%.
- <128> 4-헥사데카닐 포스페이트 (3,12-PQ)
- <129> 차가운 아세트산 중 산화백금(아담스 촉매)(0.32g)의 현탁액을 흡수를 멈출때까지 수소 분위기 하에서 흔들었다. 다음에, 아담스 촉매를 2N 염산, 물, 및 마지막으로 차가운 아세트산을 가만히 부어서 잘 세척했다. 차가운 아세트산(40ml)에 용해된 4-헥사데카닐 디페닐 포스페이트(3.2g)를 촉매에 첨가하고, 이 용액을 흡수를 멈출때까지 수소 하에서 흔들었다. 촉매를 여과하고 클로로포름으로 세척했다. 진공에서 여과물로부터 용매를 제거했다. 잔류물을 석유 에테르(bp. 30-60°C)로부터 재결정하고, 65°C에서 건조시켰다. 최종 생성물 2.01g을 얻었다. 수율 92%.
- <130> 4-헥사데카닐 이나트륨 포스페이트 (3,12-PQNa₂)
- <131> 4-헥사데카닐 포스페이트(1g, 0.0031mol)를 에탄올(100ml)에 용해시켰다. NaOH(0.25g, 0.0062mol)를 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 교반한 후 증발시켰다. 에탄올(2x100ml)을 첨가하고 증발시켰다. 에테르(100ml)를 첨가하고 증발시켰다. 잔류물을 아세톤(30ml)으로부터 재결정하고, 65°C(15mmHg)에서 건조시켰다. 최종 생성물 0.9g을 얻었다. 수율 79%.
- <132> ¹H-NMR(CD₃OD): δ 0.89(m, 6H), 1.27(s, 22H), 1.58(m, 4H), 4.22(m, 1H). MS(FAB): m/z 367.06(M+H)⁺.
- <133> 4-헥사데카닐 이나트륨 포스페이트 (3,12-HPQNa)
- <134> 4-헥사데카닐 포스페이트(3.13g, 0.0097mol)를 에탄올(150ml)에 용해시켰다. NaOH(0.37g, 0.0092mol)를 첨가하고, 혼합물을 48시간 동안 교반한 후 증발시켰다. 에탄올(2x150ml)을 첨가하고 증발시켰다. 에테르(2x100ml)를 첨가하고 증발시켰다. 얻어진 고체를 아세톤(100ml)으로 부수고, 1mmHg 대기압 하에서 하룻밤 건조시켰다. 최종 생성물 2.98g을 얻었다. 수율 87%.

- <135> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.87(m, 6H), 1.25(s, 22H), 1.51(m, 4H), 4.12(m, 1H). MS(FAB): m/z 345.11(M+H) $^+$.
- <136> 4-옥타데카닐 이나트륨 포스페이트 (3,14-PQNa₂)
- <137> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.89(m, 6H), 1.27(s, 26H), 1.58(m, 4H), 4.17(m, 1H). MS(FAB): m/z 395.20(M+H) $^+$.
- <138> 4-옥타데카닐 일나트륨 포스페이트 (3,14-HPQNa)
- <139> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.90(m, 6H), 1.28(s, 26H), 1.56(m, 4H), 4.14(m, 1H). MS(FAB): m/z 373.29(M+H) $^+$.
- <140> 8-펜타데카닐 이나트륨 포스페이트 (7,7-PQNa₂)
- <141> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.90(m, 6H), 1.30(s, 20H), 1.60(m, 4H), 4.12(m, 1H). MS(FAB): m/z 352.93(M+H) $^+$.
- <142> 8-펜타데카닐 일나트륨 포스페이트 (7,7-HPQNa)
- <143> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.90(m, 6H), 1.30(s, 20H), 1.60(m, 4H), 4.12(m, 1H). MS(FAB): m/z 353.05(M+Na) $^+$.
- <144> 실시예 2
- <145> 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에틸 포스페이트
- <146> 이 화합물을 알콜: $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ 를 사용하여 실시예 1에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했다. 이 알콜은 2-프로필 펜탄산의 무수 염화물 및 에틸렌 글리콜로부터 얻었다(Vogel의 "실용 유기화학 교과서", Wiley, 뉴욕, pg. 698, (1996)).
- <147> 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에틸 이나트륨 포스페이트
- <148> (3,12-MEG-PO₄Na₂)
- <149> $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 0.87(m, 6H), 1.24(s, 22H), 1.54(m, 4H), 2.33(m, 1H), 3.87(m, 2H), 4.26(m, 2H). MS(FAB): m/z 439.19(M+H) $^+$.
- <150> 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에틸 일나트륨 포스페이트
- <151> (3,12-MEG-HPO₄Na)
- <152> $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 0.87(t, 6H), 1.24(s, 20H), 1.42(m, 2H), 1.56(m, 2H), 2.34(m, 1H), 4.02(m, 2H), 4.28(m, 2H). MS(FAB): m/z 417.19(M+H) $^+$.
- <153> 실시예 3
- <154> 2-[2'-(2'-프로필테트라데카노일옥시)-에톡시]에틸 포스페이트
- <155> 이 화합물을 알콜: $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ 를 사용하여 실시예 1에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했다. 이 알콜은 2-프로필 펜탄산의 무수 염화물 및 에틸렌 글리콜로부터 얻었다(Vogel의 "실용 유기화학 교과서", Wiley, 뉴욕, pg. 698, (1996)).
- <156> 2-[2'-(2"-프로필테트라데카노일옥시)-에톡시]에틸 이나트륨 포스페이트
- <157> (3,12-DEG-PO₄Na₂)
- <158> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.90(m, 6H), 1.30(s, 20H), 1.44(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.39(m, 1H), 3.72(m, 4H), 4.09(m, 2H), 4.24(m, 2H). MS(FAB): m/z 483.03(M+H) $^+$.
- <159> 2-[2'-(2"-프로필테트라데카노일옥시)-에톡시]에틸 일나트륨 포스페이트

- <160> (3,12-DEG-HPO₄Na)
- <161> ¹H-NMR(CD₃OD): δ 0.90(m, 6H), 1.30(s, 20H), 1.44(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.39(m, 1H), 3.72(m, 4H), 4.09(m, 2H), 4.24(m, 2H). MS(FAB): m/z 461.31(M+H)⁺.
- <162> 추가 화합물을 유사한 방식으로 제조했다. 예를 들어, 화합물 2-[2'-(2''-프로필에이코사노일옥시)-에톡시]에틸 포스페이트를 알콜: C₃H₇-C(C₁₈H₃₇)H-C(O)-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-를 사용하여 제조했다. 이 알콜은 2-프로필에이코사산의 무수 염화물 및 디-에틸렌 글리콜로부터 얻었다.
- <163> 2-[2'-(2''-프로필에이코사노일옥시)-에톡시]에틸 일나트륨 포스페이트
- <164> (3,18-DEG-HPO₄Na)
- <165> ¹H-NMR(CD₃OD): δ 0.90(m, 6H), 1.30(s, 34H), 1.44(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.39(m, 1H), 3.72(m, 4H), 4.09(m, 2H), 4.24(m, 2H). MS(FAB): m/z 544.31(M+H)⁺.
- <166> 실시예 4
- <167> 2-{2'-[10''-(헥사데실-4-옥시)데실-1-옥시]에톡시}에틸 포스페이트 일나트륨염 (3,12-O-6-DEG-HPO₄Na)
- <168> 이 화합물을 알콜: C₃H₇-C(C₁₂H₂₅)H-O-(CH₂)₁₀-O-CH₂CH₂-O-CH₂-CH₂-OH-를 사용하여 실시예 1에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했다. 이 알콜은 2단계 과정으로 얻었다. 먼저, 4-헥사데칸올 토실레이트(Vogel의 "실용 유기화학 교과서", Wiley, 뉴욕, pg. 698, (1996))를 일나트륨 1,10-데칸디올과 반응시켜, 10-(헥사데실-4-옥시)데칸올을 생성시킨다. 제 2 단계에서, 10-(헥사데실-4-옥시)데칸올 토실레이트(단계 1에서 처럼 생성된)를 나트륨 2-(2-히드록시에틸옥시)에틸레이트와 반응시켜, 2'-[10''-(헥사데실-4-옥시)데실-에틸옥시에탄올을 제조했다.
- <169> ¹H-NMR(CD₃OD): δ 0.90(m, 6H), 1.30(s, 38H), 1.44(m, 2H), 1.59(m, 2H), 3.15(m, 1H), 3.37(m, 4H), 3.45-3.62(6H), 3.95(m, 2H). MS(FAB): m/z 565.45(M+H)⁺.
- <170> 실시예 5
- <171> 2(4-헥사데칸옥시)에톡시에틸 포스페이트의 합성
- <172> 이 화합물을 알콜: C₃H₇-C(C₁₂H₂₅)H-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-를 사용하여 실시예 1에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했다. 이 알콜은 2-(2-히드록시에틸옥시)에틸레이트 및 4-헥사데칸올 토실레이트로부터 얻었다(Vogel의 "실용 유기화학 교과서", Wiley, 뉴욕, pg. 698, (1996)).
- <173> 4-헥사데칸술폰닐 클로라이드
- <174> 4-헥사데칸올(12.29g, 0.051mol) 및 p-톨루엔술폰닐 클로라이드(12g, 0.063 mol)를 피리딘(100ml)에 용해시키고, 실온에서 하룻밤 교반했다. 디클로로메탄 (400ml)을 첨가했다. 다음에, 디클로로메탄 용액을 물, H₂SO₄(3%), 물, NaHCO₃ (3%) 및 물로 잘 세척하고, 무수 황산마그네슘(10g)으로 건조시켰다. 용매를 증발시킨 후, 미정제 4-헥사데칸술폰닐 클로라이드 20g을 얻었다.
- <175> 2(4-헥사데칸옥시)에톡시에탄술폰닐 클로라이드
- <176> 60°C에서 나트륨(3.5g, 0.15mol)을 디-(에틸렌 글리콜)(140ml, 1.5mol)에 조금씩 첨가했다. 동일한 온도에서 얻어진 용액에 THF(300ml) 중의 4-헥사데칸올 토실레이트(미정제 20g)를 첨가했다. 용액을 6시간 동안 교반하면서 환류시켰다. 실온에서 이 혼합물에 물(100ml)을 첨가했다. 혼합물을 에틸 아세테이트(300ml)로 추출했다. 용매를 증발시킨 후, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(석유 에테르(bp. 30-60°C):에테르, 1:1)로 정제했다. 2(4-헥사데칸올)에톡시에틸 4g을 얻었다. 4-헥사데칸올로부터 출발하여 수율은 24%이다.
- <177> 2(4-헥사데칸옥시)에톡시에틸 이나트륨 포스페이트
- <178> (3,12-에테르-DEG-PO₄Na₂)

- <179> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.9(m, 6H), 1.28(s, 22H), 1.43(m, 4H), 3.30(m, 1H), 3.60(m, 4H), 3.69(m, 2H), 4.07(m, 2H). MS(FAB): m/z 455.45(M+H) $^+$.
- <180> 실시예 6
- <181> 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린 (3,12-DEG-PC)
- <182> 식 $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-PO}^-(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 의 포스포콜린을 다음과 같이 제조했다:
- <183> 드라이 에테르(250ml)에 용해된 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에톡시에탄올(15.8g, 0.044mol) 및 트리에틸아민(10ml, 0.075mol)의 냉각 용액(0°C)에 드라이 에테르 200ml 중의 2-클로로-2-옥소-1,3,2-디옥사포스포란(7ml, 0.075mol)을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반했다. 침전된 결정 $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} \cdot \text{HCl}$ 을 여과하고, 용매를 진공에서 제거했다. 잔류물을 무수 아세트니트릴에 용해된 트리메틸아민 용액(0.27M) 500ml에 용해시키고 압력병으로 옮겼다. 압력병을 60-65°C의 오일배스에 48시간 동안 방치했다. 다음에, 병을 냉각시켜 열었다. 용매를 제거하고, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 1:9:1)로 정제했다. 용매 증발 후 얻어진 오일을 65°C에서 72시간 동안 동결건조시켰다. 담황색 왁스 17.4g을 얻었다. 수율 75%.
- <184> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.9(t, 6H), 1.29(s, 22H), 1.46(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.38(m, 1H), 3.25(s, 9H), 3.69(m, 6H), 3.99(m, 2H), 4.29(m, 4H). MS(FAB): m/z 524.6(M+H) $^+$.
- <185> 다음 화합물들을 상술된 과정과 유사한 과정에 의해 합성했다.
- <186> 2-(2'-프로필에이코사노일옥시)에톡시에틸 포스포콜린 (3,18-DEG-PC)
- <187> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.9(t, 6H), 1.29(s, 34H), 1.46(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.38(m, 1H), 3.25(s, 9H), 3.69(m, 6H), 3.99(m, 2H), 4.29(m, 4H). MS(FAB): m/z 608.6(M+H) $^+$.
- <188> 2-(2'-[10"-(헥사데실-4-옥시)데실-1-옥시]에톡시)에틸 포스포콜린
- <189> (3,12-0-C₁₀-DEG-PC)
- <190> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.9(t, 6H), 1.29(s, 34H), 1.46(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.38(m, 1H), 3.25(s, 9H), 3.69(m, 6H), 3.99(m, 2H), 4.29(m, 4H). MS(FAB): m/z 608.6(M+H) $^+$.
- <191> 실시예 7
- <192> 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에틸 포스포콜린의 합성
- <193> $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-PO}^-(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 의 포스포콜린을 실시예 6에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했으며, 단 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에톡시에탄올 대신, 상응하는 알콜, 즉 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에탄올을 사용했다.
- <194> 2-(2'-프로필테트라데카노일옥시)에틸 포스포콜린 (3,12-MEG-PC)
- <195> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.9(t, 6H), 1.29(s, 22H), 1.46(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.39(m, 1H), 3.24(s, 9H), 3.66(m, 2H), 4.07(m, 2H), 4.28(m, 4H). MS(FAB): m/z 480.7(M+H) $^+$.
- <196> 실시예 8
- <197> 일킬포스포콜린의 합성
- <198> 식 $\text{RO-PO}^-(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 의 포스포콜린 화합물을 실시예 6에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했으며, 단 R-OH를 초기 단계에서 알콜로 사용했다. R은 $\text{R-C}(\text{R}_2)\text{H-}$ 형의 분지-사슬 알킬을 표시한다.

- <199> 4-헥사데카닐 포스포콜린 (3,12-PC)
- <200> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.91(t, 6H), 1.28(s, 22H), 1.57(m, 4H), 3.21(s, 9H), 3.62(m, 2H), 4.25(m, 3H).
MS(FAB): m/z 408.68(M+H)⁺.
- <201> 4-옥타데카닐 포스포콜린 (3,14-PC)
- <202> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.9(t, 6H), 1.28(s, 26H), 1.57(m, 4H), 3.21(s, 9H), 3.61(m, 2H), 4.23(m, 3H).
MS(FAB): m/z 436.91(M+H)⁺.
- <203> 8-펜타데카닐 포스포콜린 (7,7-PC)
- <204> $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 0.92(t, 6H), 1.32(s, 20H), 1.59(m, 4H), 3.23(s, 9H), 3.63(m, 2H), 4.26(m, 3H).
MS(FAB): m/z 394.35(M+H)⁺.
- <205> 실시예 9
- <206> ω -분지 P-BFA의 합성
- <207> ω -분지 P-BFA 화합물을 관련된 ω -알콜을 사용하여 실시예 1 및 실시예 6에 설명된 것과 동일한 과정에 의해 제조했다.
- <208> ω -분지 P-BFA의 제조는 6-단계 합성이다. 출발 시약은 1-브로모- ω -알콜 및 n-알킬-m-알킬케톤이다.
- <209> 제 1 단계는 Kocienski("보호기"; Georg. Thieme Verlag Stuttgart. 뉴욕. pg. 83-84 (1994))에 의해 설명된 과정에 따라서 디히드로피란(DHP)으로 1-브로모- ω -알콜의 히드록실기를 보호하는 것이다.
- <210> 단계 1:
- <211>
$$\text{Br}(\text{CH}_2)_\omega\text{OH} + \text{DHP} \rightarrow \text{Br}(\text{CH}_2)_\omega\text{OTHP}$$

$$\text{I} \qquad \qquad \qquad \text{II}$$
- <212> THP는 테트라히드로피라닐 에테르를 표시한다.
- <213> 제 2 및 제 3 단계는 다음과 같은 3차 알콜의 표준 그리나드 합성(Vogel의 "실용 유기화학 교과서", Wiley, 뉴욕, pg. 475, 538, (1996))이다.
- <214> 단계 2:
- <215>
$$\text{Mg} + \text{Br}(\text{CH}_2)_\omega\text{OTHP} \rightarrow \text{BrMg}(\text{CH}_2)_\omega\text{OTHP}$$

$$\text{III}$$
- <216> 단계 3:
- <217>
$$\text{BrMg}(\text{CH}_2)_\omega\text{OTHP} + \text{RR}'\text{-CO} \rightarrow \text{RR}'\text{C}(\text{OH})\text{-(CH}_2)_\omega\text{OTHP}$$

$$\text{IV}$$
- <218> R, R'는 알킬기를 표시한다.
- <219> 제 4 단계는 Carey 및 Tremper(JACS, v.91, p. 2967, (1969))에 의해 설명된 과정에 따라서 이온성 수소화 반응에 의해 화합물(IV)의 3차 히드록시기를 환원하는 것이다.
- <220> 단계 4:
- <221>
$$\text{RR}'\text{C}(\text{OH})\text{-(CH}_2)_\omega\text{OTHP} + \text{SiHET}_3 \rightarrow \text{RR}'\text{CH}(\text{CH}_2)_\omega\text{OTHP}$$

$$\text{V}$$
- <222> 제 5 단계는 얻어진 ω -분지 알콜(V)의 보호기를 절단하는 것이다("보호기"; Georg. Thieme Verlag Stuttgart. 뉴욕. pg. 83-84 (1994)).
- <223> 마지막 단계인 제 6 단계는 ω -분지 알콜을 상응하는 ω -분지 BFA로 산화시키는 것이다. 이것은 Manger 및 Lee(Tetrahedron letters, v.22, N.18, p. 1655, (1981))에 의해 설명된 과정에 따라서 수행되었다.

- <224> 단계 6:
- <225> $RR'CH(CH_2)_nOH + [O] \rightarrow RR'CH(CH_2)_n COOH$

<226> II. 물리화학적 특성

<227> 실시예 10

<228> 시험관내에서 DP-BFA의 친지질성 측정

<229> 유기용액 대 수용액에서 이들 화합물의 용해도를 비교함에 의해 분지 지방산의 다양한 유도체의 친지질성 값을 추정했다. 유기용액 및 수용액으로서 옥탄올 및 생리 식염수를 각각 사용했다. 분배 계수(Pc) 값, 즉 옥탄올/식염수 분포를 셰이크-플라스크 기법에 의해 측정했다. 옥탄올 및 물에서의 결과, 즉 mg/ml 용해도, 및 계산된 LogPc를 표 1에 나타낸다.

표 1

옥탄올-식염수 분배 계수(Pc)

| 분자* | 옥탄올 mg/ml | 물 mg/ml | LogPc |
|--------------------------------|--------------|------------|-------|
| 7,7 | >50 | >25 | 1.33 |
| 3,12 | >20 | >10 | 0.99 |
| 3,14 | >20 | >10 | 1.26 |
| 3,16 | >20 | 9.4 | 1.26 |
| 7,7-PO ₄ | >10 | >10 | <5 |
| 3,12- PO ₄ | <5 | <2.5 | 1.9 |
| 3,14- PO ₄ | >10 | <0.5 | 1.11 |
| 3,12-MEG-PO ₄ | >10 | >10 | 1.09 |
| 3,12-DEG-PO ₄ | >5 | 8 | 1.31 |
| 3,12-(에테르)-DEG-PO ₄ | >5 | >5 | 0.83 |
| 3,12-PC | >10 | >10 | |
| 3,12-MEG-PC | >10 | >10 | 1.22 |
| 3,12-DEG-PC | >50 | >10 | 0.73 |

* 분지 지방산 및 그것의 PO₄ 유도체의 나트륨염

- <230>
- <231> 실시예 11
- <232> 구조-기능 상관성

<233> 이 연구에서, 분지-사슬 분자의 물리화학적 특성과 그것들의 생물학적 효과 사이의 상관성을 평가했다. 이 연구의 목표는 분지-사슬 분자의 사슬 길이와 래트 뇌의 에반스블루(EB) 유출에서 그것들의 효능 사이에 상관성이 있는지를 밝히는 것이었다(EC₅₀ 값의 측정에 사용된 과정에 대한 실시예 18 참조). 한 분지-사슬은 3개 탄소 원자이고, 제 2 탄화수소 사슬은 7 내지 16개 탄소 원자인, 3,n-형의 다양한 분지 지방산을 사용했다. 결과를 도 1에 그래프로서 나타낸다.

<234> 도 1에서 볼 수 있는 대로, BFA 3,12, 3,14 및 3,16은 BBB의 투과성화에서 활성인 것으로 밝혀졌다. 사용된 실험 조건 하에서, 시험된 분자들 중 가장 효능 있는 화합물은 BFA-3,12이다.

<235> III. 생물학 실시예

<236> III-a) 시험관내 연구

<237> 실시예 12

<238> 시험관내 비교 독성 연구

<239> 다양한 DP-BFA 분자를 배양된 중국 햄스터 난소(CHO) AA8 셀라인에서 스크린하여 그것들의 독성을 확인했다. LC₅₀ 값, 즉 세포 집단의 50%에서 사망을 일으키는 농도를 용량 반응 곡선으로부터 계산했다. 인-BFA의 LC₅₀ 값을 상응하는 분지 지방산(= 탄소-BFA)의 값과 비교했다.

<240> 방법:

<241> 세포 멤브레인의 보전 및 그에 따른 독성 추정을 위한 분석법으로서 락테이트 탈수소효소(LDH) 방출을 사용했다. 10% FCS를 함유하는 RPMI-1640 배지에 96웰 플레이트에서 세포(2x10⁵/ml)를 접종했다. 2일 후에, 시험 DP-BFA 화합물 또는 대조표준 화합물인 미리스트산을 500에서 1μg/ml까지 농도를 감소시키면서 플레이트에 첨가했다. 세포를 1시간 후에 채집했다. 세포사를 나타내는 완전한 용해 및 최대 락테이트 탈수소효소 방출을 증명하기 위해서, 채집 45분 전에 용해액 16.5μl를 첫번째 6개 웰에 첨가했다. 다른 대조표준은 2개 블랭크 웰 및 추가 약물 없이 세포만 함유하는 5개 웰을 포함했다. 원심분리(1500rpm, 5분) 후, 상청액 75μl를 LDH 분석 믹스(Tox-7 키트, Sigma) 45μl를 갖는 새 플레이트로 옮겼다. 실온에서 10 내지 20분 후, 엘리사 리더를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정했다.

<242> 상이한 DP-BFA와 함께 1시간 인큐베이션 후 얻어진 독성 데이터를 표 2에 요약한다. 각 실험은 3번 수행되었다.

표 2

세포 배양물에 대한 BFA 및 그것의 인-유도체의 독성

| 시험된 화합물 | LC ₅₀ (μM) |
|--|-----------------------|
| 7,7-Na | 65 |
| 7,7-PO ₄ Na ₂ | 320 |
| 3,12-Na | 165 |
| 3,12-PO ₄ Na ₂ | 320 |
| 3,12-DEG-PO ₄ Na ₂ | 320 |

<243> 일반적으로, 세포는 탄소-BFA에 더 민감하고, 시험된 인-BFA 유도체에 덜 민감한 것으로 밝혀졌다. 탄소-BFA의 준-독성용량(sub-toxic dose)은 1시간 인큐베이션 후 30 내지 100 μM로 추정되었다. 동일한 조건 하에서, 시험된 인-BFA 유도체의 준-독성용량은 160 μM에서 640 μM 이상까지의 범위로 추정되었다.

<245> 결론:

<246> 일반적으로, 인-BFA는 상응하는 탄소-BFA 분자보다 대략 2 내지 5배 덜 독성인 것으로 밝혀졌다.

<247> 실시예 13

<248> 상피세포 이음부에 대한 DP-BFA의 효과

<249> 사람 샘암종 셀라인(A431)을 사용하여 세포-세포 이음부에 대한 다양한 BFA 유도체의 효과를 조사했다. 이들 세포는 장 세포의 분극된 구조 특징을 가진다.

<250> 이 연구에서, 타이탄 이음부 복합체에 관련된 단백질(Anderson 등, (1993) Current Opinion in Cell Biology 5:772-778)인 ZO₂의 세포하 분포의 정량적 변화를 모니터했다.

<251> 유리 커버-슬립 상에서 혈청을 갖는 DMEM에서 배양된 A431 세포를 준-독성용량의 DP-BFA의 존재 또는 부재 하에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 3% 파라포름알데히드와 0.5% 트리톤 X-100의 혼합물로 세포를 고정하여 2분간 투과성으로 만든 후, 3% 파라포름알데히드만으로 20분 더 고정시켰다. 고정된 세포를 헹구고, 실온에서 45분간 토끼 단일클론 항체 ZO₂(Zymed Laboratories, Inc. 미국)와 함께 인큐베이션하고, PBS로 3번 세척하고, 형광 표지된 2차 항체와 함께 45분간 인큐베이션했다. 염색된 커버-슬립을 엘마놀(Mowiol 4-88, Hoechst, 독일 프랑크 프루트)에 장착한 후 현미경 시험했다. 면역-형광 표지된 ZO 단백질의 분포를 모니터했다.

<252> 과바나듐산염과 함께 1시간 동안 인큐베이션했던 A431 세포는 포스포티로신 인산분해효소를 억제하며, 따라서 세포 이음부를 붕괴시키는데, 이것을 양성 대조표준으로 사용했다.

<253> ZO₂의 형광 영상은 DP-BFA가 A431 세포의 타이탄 이음부 붕괴에 대해 분명한 효과를 가진다는 것을 나타냈다.

- <254> 실시예 14
- <255> 상피세포 단층의 투과성에 대한 DP-BFA의 효과
- <256> 이 연구의 목표는, 생물학적 장벽, 그리고 특히 장 장벽에 대한 시험관내 모델 시스템으로 사용한 상피세포 단층의 투과성을 변형시키는데 있어, DP-BFA 화합물의 동태학 및 전체적인 효과를 평가하는 것이었다.
- <257> 생물학적 장벽의 투과성화에 대한 DP-BFA의 효과를 측정하기 위해서 2가지 접근법을 취했다. 한 접근법은 상피세포 단층을 가로질러서 방사성 표지된 화합물을 전달하는 것이었다. 두번째 접근법은 세포층의 투과성 수준을 나타내는 척도로서 전기저항의 변화를 모니터링하는 것이었다.
- <258> 상피세포를 멤브레인 필터(0.4마이크론, 1cm²) 상에서 배양한다. 상피세포 단층을 갖는 멤브레인을 두 구획, 즉 제공 챔버와 수용 챔버 사이에 둔다. 정해진 비독성 농도의 시험 P-BFA 화합물, 및 ¹⁴C-수크로스 방사성 추적자(0.5ml 완충액 중 1Ci)를 위쪽(제공 챔버)에 첨가한다. 90분의 실험 시간 동안 10분 간격으로 각 0.5ml의 샘플을 아래쪽(수용 챔버)으로부터 수집한다. 1% FCS를 함유하는 조직 배양 배지에서 70rpm으로 셰이킹하면서 인큐베이션을 실시한다. 상부 챔버 및 멤브레인을 각 샘플링 시점에서 새 수용자 챔버로 옮긴다. 이것은 상부 챔버의 추적자 농도를 일정하게 유지하고, 양쪽 챔버의 액체 부피를 변함 없이 유지하기 위해서 행한다. 트리룩스 마이크로베타 계수기(Wallac, 핀란드)로 수집된 샘플의 방사성 추적자 농도를 추정한다. 추적자 전달율을 계산하고, 투과성 계수로 표현한다.
- <259> 인큐베이션 시작 및 종료시에, 밀리셀-ERC(Millipore)를 사용하여 상피-횡단 전기저항(TEER)을 측정함에 의해 실험에 사용된 상피 단층의 보전을 모니터링한다.
- <260> 상술된 것과 동일한 실험 시스템을 사용하지만 방사성 추적자는 첨가하지 않은 병행 실험을 수행한다. 90분간 10분 마다 상피-횡단 전기저항(TEER)을 모니터링했다.
- <261> 결론:
- <262> i) P-BFA가 상피세포 단층을 가로지르는 수크로스의 통과를 유의하게 증가시키고, ii) 단층의 TEER을 감소시킨다는 사실은 P-BFA 화합물이 생물학적 장벽을 투과성으로 만든다는 결론을 지지한다.
- <263> 실시예 15
- <264> 정상 및 악성 세포 종류에 대한 다양한 DP-BFA의 세포독성 활성
- <265> 분지-사슬 지방산(DP-BFA)의 다양한 인-유도체의 세포독성 활성을 정상 및 악성 세포 종류를 포함하는 세포 배양물에서 시험관내 분석했다. 다음의 세포 시스템을 사용했다.
- <266> 일차 섬유모세포(사람)
- <267> 정상 골수(BM)세포(마우스)
- <268> 일차 기관지 상피세포(사람, Clonetics, 카탈로그 번호 CC-2541)
- <269> Caco-2 - 결장암 셀라인(사람, ATCC, HTB-37)
- <270> C6 신경아교종 셀라인(랫트, ATCC, CRL-2199)
- <271> Neuro2a - 신경모세포종 셀라인(마우스, ATCC, CCL-131)
- <272> SKBR-3 - 유방암 셀라인(사람, ATCC, HTB-30)
- <273> HL60 - 골수성 백혈병 셀라인(사람, ATCC, CCL-240)
- <274> U937 - 골수성 백혈병 셀라인(사람)
- <275> 37°C에서 2mM L-글루타민, 100유닛/ml 페니실린, 100ug/ml 스트렙토마이신 및 10% FCS를 함유하는 MEM에 마이크로타이터 플레이트에서 세포를 접종했다. 지시된 다양한 DP-BFA의 부재(대조표준군) 또는 존재 하에서 세포들의 선형 성장 상 동안, 배양된 세포를 인큐베이션했다. 시험된 DP-BFA의 최종 농도는 1.5 내지 200마이크로몰의 범위였다. 골수세포에 대해서 5일, 모든 나머지 셀라인에 대해서 3일째인 인큐베이션 종료시에, 첨가된 P-BFA의 세포에 대한 세포독성 효과를 비색 MTT 분석을 사용하여 추정했다. MTT 분석(Mosmann (1983) J. Immunol Methods 65: 55-63)은 미토콘드리아 환원효소 활성을 측정하며, 세포 생활력의 정량적 평가를 위해 사

용한다. 대조표준군과 비교하여 세포 생활력에 50% 감소를 일으키는 약물 농도를 EC₅₀으로 정의한다. 시험된 DP-BFA 화합물의 EC₅₀ 값을 상이한 분석된 셀라인 각각에 대해 확인된 용량 반응 곡선으로부터 계산했다.

<276> 결과를 표 3에 요약한다. 각 EC₅₀ 값은 1 내지 5번의 독립적 실험으로부터 유래된 EC₅₀ 값의 평균이다.

<277> 표 3의 결과로부터 볼 수 있는 대로, 다양한 DP-BFA 분자는 상이한 세포에 대한 그것들의 세포독성 효과에 있어 상이한 정도로 활성이었다. 시험된 화합물 중에서, 악성 세포에 대한 가장 효능 있는 세포독성제는 3,12-DEG-PO₄, 3,12-(에테르)-DEG-PO₄, 3,12-MEG-PC, 3,12-DEG-PC, 3,18-DEG-PC 및 3,14-PC였다. 이들 화합물 중 2개, 즉 3,12-DEG-PO₄ 및 3,12-(에테르)-DEG-PO₄가 정상 상피세포에 대해 최저 세포독성 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 다른 화합물 3,12-DEG-PC는 정상 섬유모세포 및 정상 골수세포에 대해 최저 세포독성 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다.

표 3

다양한 셀라인에 대한 DP-BFA의 독성

| 셀라인 | Caco-2 | C6 신경아교종 | Neuro2a | SKBR | HL60 | U937 | 정상 인유모세포 | 정상 발수 | 정상 상피 |
|--|-----------------------|-------------|---------|------|------|------|-------------|----------|----------|
| 화합물 | EC ₅₀ (μM) | | | | | | | | |
| 3,12-Na | 100 | | 76 | 130 | | 68 | | | |
| 3,12-PO ₄ -Na ₂ | >200 | | 105 | >200 | | 90 | | | |
| 3,12-MEG- PO ₄ Na ₂ | >200 | | 60 | >200 | | 75 | | | |
| 3,12-DEG- PO ₄ Na ₂ | 40 | 38 | 58 | 60 | | 25 | 65 | 62 | >200 |
| 3,12-(에테르)- DEG-PO ₄ Na ₂ | 47 | 40 | 37 | 58 | | 10 | 65 | 68 | >200 |
| 3,12-PC | 150 | | | 62 | 47 | | | | |
| 3,12-MEG-PC | 75 | | 70 | 50 | 20 | 9 | 160 | 95 | 94 |
| 3,12-DEG-PC | 113 | 95 | 134 | 40 | 11 | 6 | 170 | 166 | 90 |
| 3,18-DEG-PC | | | | | 13 | 6 | | 80 | 60 |
| 3,14-PC | | | | | 7 | 4 | | 160 | 72 |

<278> 결론:
<279>

<280> 인-BFA 화합물은 세포-종류 특이적 세포독성 효과를 나타낸다. 이들 화합물 중 몇개는 악성 셀라인에 대해 시험되었을 때 가장 효능 있는 세포독성제로서 나타난 반면, 상이한 조직으로부터의 정상 세포에 대해 시험되었을 때는 훨씬 덜 독성이었다.

<281> 실시예 16

<282> 3,12-DEG-PC는 신경모세포종 셀라인에서 caspase-3의 활성화 및 DNA 단편화를 유도한다

<283> 더 나아가, 다양한 DP-BFA에 의해 발휘된 세포독성 효과의 근간이 되는 가능한 메카니즘을 탐구하기 위해서, 세포자살, caspase-3 활성화 및 DNA 단편화에 대한 2가지 확인된 마커(Lincz (1998) Immunol. Cell Biol. 76:1-19)를 연구했다.

<284> 37°C에서 2mM L-글루타민, 100유닛/ml 페니실린, 100ug/ml 스트렙토마이신 및 10% FCS를 함유하는 MEM에 Neuro2a 신경모세포종 세포(ATCC, CCL-131)를 접종했다. 세포가 로그 성장 상에 있을 때인 24시간 후에, 3,12-DEG-PC를 25 μM, 50 μM 또는 100 μM의 최종 농도로 첨가했다. 부형제만 존재할 때의 세포 성장을 대조표준군으로 사용했다.

<285> caspase-3 활성화 및 DNA 단편화에 대한 분석을 약물과 함께 각각 6시간 및 24시간 인큐베이션한 후 얻어진 세포 용해액에 대해 수행했다. caspase-3 활성을 불소성 기질 Ac-DEVD-AMC(Pharmingen, Becton Dickinson, 카탈로그 번호 66081U)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 분석했다. DNA 단편화를 세포사 검출 엘리사 플러스 키트

(Roche, 카탈로그 번호 1774 425)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 정량했다.

<286> 결과를 표 4에 요약한다. 측정된 caspase 활성은 단백질 함량으로 정규화된 대조표준 플레이트에서의 활성의 퍼센트로서 표현한다. DNA 단편화는 $\lambda=405\text{nm}$ 에서의 OD 값으로 표현하며, 세포 배양 용해액으로부터 2번 기록한 값의 평균이다.

표 4

3,12-DEG-PC로 치료된 Neuro2a 세포에서 세포자살 마커

| 첨가 약물 | Caspase 활성 (대조표준의 %) | DNA 단편화 (OD _{405nm}) |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 없음(대조표준) | 100% | 0.030 |
| 3,12-DEG-PC, 25 μM | 210% | 0.036 |
| 3,12-DEG-PC, 50 μM | 540% | 0.153 |
| 3,12-DEG-PC, 100 μM | - | 0.389 |

<287>
<288> 표 4의 결과로부터 볼 수 있는 대로, 화합물 3,12-DEG-PC와 함께 Neuro2a 세포를 인큐베이션한 것은 caspase-3 활성을 약 5배 증가시켰고, DNA 단편화도 유의하게 증가시켰다. 결장 암종으로부터 유래된 다른 악성 셀라인인 caco-2에서 화합물이 시험되었을 때도 유사한 결과가 얻어졌다.

<289> 결론:

<290> 세포자살은 어떤 악성 세포에서 BFA의 포스포콜린 유도체의 세포독성 효과를 발휘하기 위한 가능한 메카니즘일 수 있다.

<291> III-b) 생체내 연구

<292> 실시예 17

<293> BBB 투과성화에 대한 DP-BFA의 효과를 측정하기 위한 생체내 모델 시스템

<294> DP-BFA에 의한 BBB의 투과성화를 2개의 마커가 뇌에 축적되는 것을 모니터링함에 의해 래트 모델 시스템에서 조사했다. 2개 마커는 a) 생체내에서 알부민과 빠르게 결합하며, 세포주위 운반에 대한 인디케이터인 에반스블루(EB)(MW 70kD) 염료; 및 b) 세포 공간을 거쳐 운반되며, 세포횡단 운반을 모니터링할 수 있게 하는 플루오레세인 나트륨염(F-Na)(MW 376D)이다. BBB 붕괴시 에반스블루-알부민 복합체는 뇌의 세포간 공간에 비가역적으로 축적된다. 훨씬 더 적은 추적자 플루오레세인이 세포내적으로 운반되어 뇌에 있는 세포간 및 세포내 공간 모두를 점유할 수 있다.

<295> Sprague-Dawley 래트에서 혈액뇌장벽 투과성화가 DP-BFA에 잠깐 노출함에 의해 유도되었다. 이 동물을 Rumpun-Imalgen으로 마취시키고, DP-BFA 시험 화합물을 바깥 목동맥 역행에 의해 뇌로 투여했다(Smith, Q. R. 혈액뇌장벽의 생리학 및 제약학 중 연구 방법. 편집. Bradbury, M. W. B. Spinger-Verlag. 베를린-하이델베르크-뉴욕; 1992:24-52). 날개입천장 동맥을 묶어서 주입된 용액이 바깥 머리 혈관구조를 향해 빠져나오는 것을 피했다. DP-BFA 용액을 하바드 장치 주사기 펌프를 사용하여 30초 또는 30분에 걸쳐 주입했다. 총목동맥을 통한 혈액 흐름은 주입할 때만 중단되었다.

<296> 모든 시험된 DP-BFA 분자는 트로메타민 완충액(Sigma) 또는 PBS(pH 7.4)에 용해된 등삼투압 만니톨(5%) 용액으로 200 내지 1000배 희석됨에 의해, 물 또는 에탄올에 용해된 스톡 용액으로부터 제조했다.

<297> 에반스블루(EB, 25mg/ml) 및 플루오레세인(F-Na, 1.25mg/ml) 마커를 1ml 용액으로 시험 DP-BFA의 투여 후 즉시, 또는 작용의 가역성을 조사했던 경우에는 특정한 시간 간격 후 정맥내 주사했다. F-Na(12.5mg/ml - 100 μl /분)의 지지 정맥내 주입을 8분간 수행했다. 목동맥 "섬광" 후 10분에서 뇌를 식염수(60ml)로 세척했다. 이용할 수 있는 한, 뇌 동측 및 반대측 반구 및 종양을 50% 트리클로로아세트산(TCA)으로 개별적으로 균질화했다. 이용할 수 있는 한, 피질 및 종양에서의 마커 농도를 형광분광법으로 측정했다(Uyama, O. 등, (1988) J. Cereb. Blood Flow Metab. 8:282-284; Abraham 등, (1996) Neurosci. Lett. 208:85-88). 마커 함량을 1g 뇌조직 당 μg 마커로서 계산했다. 통계적 유의성을 위해 표준 오차 및 스튜던트 테스트를 사용했다.

- <298> 실시예 18
- <299> 다양한 사슬 길이의 분지-사슬 지방산의 BBB 투과성에 대한 효과
- <300> 이 연구의 제 1 단계에서, 상이한 사슬 길이의 BFA 분자를 혈액뇌장벽(BBB)을 투과성으로 만드는데 있어서의 그것들의 효과에 대해 스크린했다.
- <301> 실험을 250 내지 320g 중량의 수컷 Sprague-Dawley 래트에 대해 수행했다. 실시예 17에 설명된 과정에 따랐다.
- <302> BBB 개방에 대한 시험된 화합물의 효과를 2개의 파라미터에 의해 평가했다.
- <303> a) 효능 - 에반스블루 알부민($\mu\text{g EB/g 뇌조직}$)의 축적에 관하여 추정된 BBB 개방도; 및
- <304> b) 역가 - EC_{50} 및 최소 유효 농도(MEC) 값에 관하여 측정됨
- <305> EC_{50} 은 에반스블루 유출의 최대 효과의 50%를 야기하는 시험 화합물의 농도이다. MEC는 대조표준 동물에 축적된 에반스블루 양의 3배를 축적할 수 있게 하는 농도로서 정의되며, 우리의 경우는 총 $3\mu\text{g EB/g 뇌}$ 이다. EC_{50} 및 MEC 값이 낮아질수록 시험 화합물의 역가는 높아진다.
- <306> BBB 투과성에 대한 상이한 DP-BFA 효과의 평가 결과를 표 5에 나타낸다.

표 5

BBB 투과성에 대한 분지-사슬 지방산의 효과

| 분자 | EC_{50} (μM) | MEC | $\mu\text{g EB/g 뇌}$ (EC_{50} 에서) |
|---------|------------------------------------|---------------|--|
| 3,7-Na | >450 | - | 0.8 |
| 3,10-Na | ~700 | - | 0.8 |
| 3,12-Na | 20 ± 3 | 6.5 ± 0.7 | 32 ± 4 |
| 3,14-Na | 40 ± 5 | 9.1 ± 1.2 | 16.5 ± 2.5 |
| 3,16-Na | 137 ± 17 | 18 ± 2 | 34 ± 5 |
| 7,7-Na | 184 ± 21 | 132 ± 19 | 4.2 ± 0.6 |

- <307>
- <308> 표 5의 결과로부터 볼 수 있는 대로, DP-BFA 사슬 길이에 따라서 에반스블루 유출의 정도에 실질적인 변동이 있다. 가장 짧은 사슬 길이를 갖는 분자들은 이 모델 시스템에서 거의 완전히 비효과적이다. 가장 높은 효능을 갖는 BFA 분자는 3,12-Na 및 3,16-Na이며, 각각 $30\mu\text{g EB/g 뇌}$ 이상의 축적을 도출한다. 사용된 실험 시스템에서, 시험된 화합물들 중 가장 낮은 EC_{50} 및 MEC 값을 갖는 3,12-Na가 가장 효능 있는 투과성화제이다.
- <309> 결론:
- <310> 사용된 실험 시스템의 조건 하에서, BFA 3,12-Na가 역가 및 효능 모두에 관하여 가장 효과적인 투과성 증진제인 것으로 밝혀졌다. 따라서, BFA-3,12에 기초한 DP-BFA 유도체를 더 상세히 연구했다.
- <311> 실시예 19
- <312> BBB 투과성에 대한 상이한 DP-BFA의 효과
- <313> BBB 투과성에 대한 다양한 DP-BFA의 효과를 실시예 17에 설명된 래트 뇌의 모델 시스템에서 시험했다. 효능, 즉 BBB 개방 수준은 뇌에 축적된 에반스블루의 양($\mu\text{g EB/g 뇌}$)으로 표현했다. 시험된 분자의 역가는 그것들의 계산된 EC_{50} 및 최소 유효 농도(MEC) 값에 의해 추정했다.

표 6

BBB 투과성화에 대한 상이한 DP-BFA의 효과(랫 뇌에서)

| 분자 | EC ₅₀ (μM) | MEC | μg EB/g 뇌 (EC ₅₀ 에서) |
|--|-----------------------|-----------|---------------------------------|
| 3,12- PO ₄ -Na ₂ | 55 ± 1 | 3.3 ± 0.5 | 20 ± 3 |
| 3,14- HPO ₄ -Na | 67 ± 11 | 6.2 ± 0.9 | 10 ± 1 |
| 7,7-HPO ₄ -Na | 150 | - | 1 |
| 3,12-MEG-PO ₄ Na ₂ | 18 ± 3 | 11 ± 2 | 5 ± 1 |
| 3,12-DEG-PO ₄ Na ₂ | 20 ± 2 | 3.3 ± 0.5 | 18 ± 3 |
| 3,12-(에테르)-DEG-PO ₄ Na ₂ | 54 ± 5 | 7.3 ± 1.4 | 26 ± 5.2 |
| 3,12-PC | 76 ± 14 | 23 ± 4 | 10 ± 1 |
| 3,12-MEG-PC | 19.5 ± 1.5 | 10 ± 1 | 15 ± 2 |
| 3,12-DEG-PC | 70 ± 12 | 15 ± 2 | 14 ± 2 |
| | 25% | - | 10 ± 2 |

<314>

<315>

표 6에서 볼 수 있는 대로, 다양한 DP-BFA 분자가 BBB를 가로지르는 에반스블루 추적자에 결합된 알부민의 통과를 촉진한다. 시험된 화합물은 그것들의 역가 및 효능에 차이가 있다.

<316>

이 실험 조건 하에서, 3,12-BFA의 가장 효능 있는 유도체는 20 μM의 EC₅₀ 값 및 3.3 μM의 최소 유효 농도(MEC)를 갖는 3,12-DEG-PO₄Na₂였다. BBB 투과성을 증가시키는데 있어 가장 효과적인 화합물은 3,12-(에테르)-DEG-PO₄Na₂, 3,12-PO₄Na₂ 및 3,12-DEG-PO₄Na₂였다. EC₅₀ 농도의 3,12-(에테르)-DEG-PO₄Na₂, 3,12-PO₄Na₂ 및 3,12-DEG-PO₄Na₂로 치료한 후, 랫 뇌에서 에반스블루 염료의 축적 수준은 각각 26, 20 및 18 μg EB/g 뇌였다.

<317>

실시예 20

<318>

BBB를 가로지르는 알부민 결합된 에반스블루 및 플루오레세인의 운반에 대한 DP-BFA의 효과

<319>

상이한 크기의 분자에 대한 BBB 투과성화에 대한 다양한 DP-BFA의 효과를 정상 랫 뇌의 모델 시스템에서 생체 내 시험했다.

<320>

a) 세포주위 운반에 대한 인디케이터로서 알부민에 결합된 에반스블루(MW 70kD); 및 b) 작은 크기의 분자를 표시하는 플루오레세인 나트륨염(MW 376D)의 2개 마커의 운반을 따랐다.

<321>

에반스블루(EB) 염료 및 플루오레세인 나트륨염(F-Na)을 실시예 17에 설명된 프로토콜에 따라서 30초에 걸쳐 바깥 목동맥으로 주입했다. 시험 화합물은 EC₅₀ 농도로 사용했다. 대조표준 동물은 부형제 용액으로 치료했다.

<322>

에반스블루 유출은 뇌조직 1g 당 축적된 총 EB 양의 퍼센트로서 표현한다. 뇌로 플루오레세인의 운반은 이 분자의 혈청 농도에 좌우되며, 혈청에서 F-Na 수준의 퍼센트로서 나타낸다.

<323>

뇌에서 F-Na 대 EB의 축적비를 계산했고, 결과를 표 7에 나타낸다.

표 7

EB-알부민 및 플루오레세인에 대한 BBB 투과성에 대한 상이한 DP-BFA의 효과

| 분자 | % F-Na/ g 뇌 | % EB/ g 뇌 | F-Na / EB 비* |
|--|-------------|-------------|-----------------|
| 대조표준 | 0.3 ± 0.08 | 0.04 ± 0.01 | 9.5 ± 1.6 |
| 만니톨 - 25% | 2.4 ± 0.4 | 0.6 ± 0.21 | 4.0 ± 0.5 |
| 3,14-Na | 3.8 ± 0.5 | 0.8 ± 0.07 | 4.7 ± 1.7 |
| 3,12-Na | 6.4 ± 1.1 | 1.8 ± 0.2 | 4.9 ± 0.9 |
| 3,12-PO ₄ -Na ₂ | 8.2 ± 0.9 | 2.9 ± 0.6 | 5.9 ± 1.0 |
| 3,12-MEG-PO ₄ -Na ₂ | 5.0 ± 0.8 | 0.8 ± 0.1 | 8.4 ± 0.9 |
| 3,12-DEG-PO ₄ -Na ₂ | 9.0 ± 1.4 | 1.4 ± 0.2 | 9.0 ± 1.2 |
| 3,12-(에테르)-DEG-PO ₄ Na ₂ | 4.4 ± 0.9 | 4 ± 0.8 | 1.1 ± 0.2 |
| 3,12-PC | 3.0 ± 0.5 | 0.8 ± 0.1 | 7.8 ± 1.3 |
| 3,12-MEG-PC | 5.2 ± 0.8 | 0.9 ± 0.2 | 6.9 ± 0.1 |
| 3,12-DEG-PC | 2.9 ± 0.5 | 0.6 ± 0.1 | 6.8 ± 0.8 |

* - 각각의 비의 평균

<324>

<325>

표 7에서 볼 수 있는 대로, 정상 BBB(= 대조표준)는 EB-알부민 복합체보다 플루오레세인에 대해 약 10배 더 투과성이다. 고삼투성 투과성화제인 만니톨은 F-Na보다 더 큰 정도로 EB에 대한 BBB 투과성을 증가시켰다(F-Na/EB 비 = 4). 유사하게, 시험된 분자 지방산 3,14-Na 및 3,12-Na는 4.7 및 4.9의 F-Na/EB 비를 각각 나타냈다.

<326>

BFA의 상이한 인-유도체는 차별적인 방식으로 2개 마커에 대한 BBB 투과성에 영향을 미친다. 3,12-PO₄는 EB-알부민 복합체에 대한 BBB의 투과성을 플루오레세인에 대한 투과성의 증가보다 약 1.5배 더 증가시킨 것으로 밝혀졌다. 한편, 3,12-DEG-PO₄는 더 생리학적인 방식으로 BBB의 투과성을 증가시켰는데, 즉 EB 유출과 동일한 정도로 F-Na 운반을 증가시켰다. 3,12-DEG-PQ에 노출된 래트 뇌에서 F-Na/EB 비는 대략 9였다.

<327>

결론:

<328>

다양한 DP-BFA 화합물은 상이한 방식으로 BBB 투과성에 영향을 미친다. 어떤 DP-BFA, 예를 들어 3,12-(에테르)-DEG-PO₄Na₂ 및 3,12-PO₄(각각의 F-Na/EB 비는 1.1 및 5.9)는 저분자량을 갖는 분자에 비해 큰 분자의 운반을 선호하는 BBB의 선택적 개방을 유도했다. 반대로, 다른 분자, 예를 들어 3,12-DEG-PO₄는 F-Na와 같은 작은 분자 및 EB-알부민과 같은 큰 분자의 운반을 동등하게 증가시켰다.

<329>

실시예 21

<330>

BBB 개방에 대한 DP-BFA 효과의 지속기간

<331>

래트 뇌에서 에반스블루 및 플루오레세인 유출에 대한 DP-BFA의 효과를 DP-BFA 투여 후의 다양한 시점에서 시험했다.

<332>

다양한 DP-BFA 화합물을 실시예 17에 설명된 과정에 따라서 Sprague-Dawley 래트의 바깥 목동맥으로 30초에 걸쳐 주입했다. 시험 화합물은 EC₅₀ 농도로 사용했다. 뇌에서 에반스블루 및 플루오레세인 유출을 DP-BFA 투여 후 10, 30, 60, 120 및 250분에서 측정했다. 래트 뇌에서 에반스블루(μg/g) 및 플루오레세인(혈청 중 %)의 함량을 시점 당 2 내지 3마리 동물의 평균을 사용하여 계산했다.

<333>

상술된 실험 시스템에서 얻어진 결과는 BBB 투과성화에 대한 DP-BFA 효과가 가역적이라는 것을 증명한다. 더욱이, 그것은 DP-BFA의 BBB 개방 효과가 비교적 짧게 지속된다는 것을 시사한다. 대부분의 시험된 DP-BFA-3,12

유도체는 1시간 미만 동안 BBB 투과성을 유지하며, 약 30분의 $D_{1/2}$ 을 가진다. $D_{1/2}$ 은 EC_{50} 농도의 시험 화합물을 사용하여 BBB를 적어도 50% 개방한 경우의 지속기간으로 정의된다. 포스포콜린 부분을 포함하는 두 화합물 3,12-PC 및 3,12-MEG-PC는 다른 시험된 3,12-BFA 유도체보다 4배 더 긴 $D_{1/2}$, 즉 약 120분의 $D_{1/2}$ 을 나타냈다.

<334> 결론:

<335> DP-BFA는 가역적인 방식으로 래트 뇌에서 BBB 개방에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 다양한 DP-BFA는 투과성 화 효과의 상이한 지속기간을 가진다.

<336> 실시예 22

<337> 독성학 및 안전성 연구

<338> DP-BFA 분자를 안전성 및 독성에 대해 평가했다. 시험 화합물의 용량을 증가시키면서 실시예 17에 설명된 프로토콜에 따라서 래트에 동맥내 투여했다. 동물 생활력을 24시간 동안 모니터링하여 치사 농도(LC)를 어렵혔다. LC는 사망을 일으켰던 최소 농도로서 정의된다.

표 8

상이한 DP-BFA의 비교 안전성 데이터(래트에서)

| 분자* | LC (μM) | MEC | 안전성 LC /MEC |
|--------------------------|----------|-----------|-------------|
| 3,12 | 40 ± 10 | 6.5 ± 0.7 | 6.1 |
| 3,14 | 78 ± 11 | 9.1 ± 1.2 | 8.6 |
| 3,16 | 431 ± 55 | 18 ± 2 | 23.9 |
| 7,7 | 360 ± 67 | 132 ± 19 | 2.7 |
| 3,12-PO ₄ | 63 ± 12 | 3.3 ± 0.5 | 19.1 |
| 3,14-PO ₄ | 134 ± 18 | 6.2 ± 0.9 | 21.6 |
| 3,12-MEG-PO ₄ | 80 ± 15 | 11 ± 2 | 7.5 |
| 3,12-DEG-PO ₄ | 30 ± 5 | 3.0 ± 0.5 | 10 |
| 3,12-PC | 80 ± 16 | 23 ± 4 | 3.5 |
| 3,12-MEG-PC | 15 ± 2 | 10 ± 1 | 1.5 |
| 3,12-DEG-PC | 300 ± 60 | 15 ± 2 | 20 |

* 나트륨염

<339> 안전성 지수는 치사 용량(LC)과 최소 유효 농도(MEC) 사이의 비로서 정의되며, 여기에서 MEC는 부형제만으로 처리된 대조표준 동물에 축적된 에반스블루 양의 3배를 축적하는, 즉 총 3μg EB의 축적을 도출하는 계산된 시험 화합물 농도에 해당한다. LC/MEC 비가 높아질수록 안전성 지수도 높아진다.

<341> 결론:

<342> 포스페이트기의 도입은 유의한 방해 역가 없이 2 내지 3배까지 안전성 지수를 증가시켰다.

<343> 실시예 23

<344> BTB 투과성화에 대한 DP-BFA의 효과를 측정하기 위한 생체내 모델 시스템(중양을 지닌 래트)

<345> 혈액중양장벽(BTB)을 조정하는 DP-BFA 화합물의 능력을 연구하기 위해서, C6 신경아교종을 지닌 래트의 모델 시스템을 사용했다.

<346> Sprague-Dawley(SD) 래트를 Bartus 등(Exp Neurol (1996); 142:1428)에 의해 설명된 과정에 따라서 C6 신경아교종 세포로 접종했다. 정위 장치에 고정된 래트의 전두 두피뼈에 작은 천공 구멍을 만들었다. 2.5×10^5 의 C6 신경아교종 세포를 함유하는 배지 10μl 또는 5μl를 해밀턴 주사기를 사용하여 전두 피질에 접종했다. 좌표는 정수리점의 뒤로 1mm, 옆으로 2.5mm, 깊이로 3mm였다. 바늘을 그 장소에 5분간 남겨 두었다. 바늘을 제거한 후 근육과 두피를 봉합했다. 래트를 접종 후 6 내지 8일에서 조사했는데, 이 때 충분한 크기(20 내지

60mg)의 증양이 발생했다. 증양을 F-Na 시각화 및 절제 후에 칭량했다. 래트의 뇌 부분에 조직학 시험을 행했고, 동측 증양 조직, 증양 주위 조직, 및 반대측 조직으로 에반스블루 및 플루오레세인이 흡수되는 것을 모니터링했다.

<347> 증양을 지닌 대조표준 래트(본 발명의 화합물로 치료되지 않은)에 대해 수행된 실험으로부터 얻어진 결과(나타내지 않음)는, EB 및 플루오레세인에 대한 혈액증양장벽(BTB)의 투과성이 무손상 BBB에 대해 밝혀진 것보다 각각 약 2배 및 4배 더 높다는 것을 나타냈다.

<348> 실시예 24

<349> BBB 및 BTB 개방에 대한 다양한 BFA 분자의 효과(증양을 지닌 래트의 연구)

<350> 실시예 23에 설명된 C6 신경아교종을 지닌 래트의 양측 증양 모델 시스템을, 혈액증양장벽(BTB)에 대한 효과와 비교하여, 혈액뇌장벽(BBB)을 투과성으로 만드는 능력에 대해 DP-BFA의 다양한 유도체를 스크리닝하기 위해 사용했다. 실시예 23에 설명된 실험 과정에 따라, 단 증양을 지닌 래트를 DP-BFA로 더 치료했다. 시험 화합물을 대략 EC₅₀ 값의 농도로 실시예 17에 설명된 과정에 따라서 30초에 걸쳐 바깥 목동맥으로 편측 주입했다. 부형제만으로 치료된 동물을 대조표준군으로 사용한다. 비증양(NT) 조직에 대한 증양(T) 조직에서의 알부민 결합된 에반스블루 염료의 축적을 측정함에 의해 투과성화 효과를 정량했다.

<351> 계산된 효능값 및 특이성 지수를 표 9에 요약한다. 특이성 지수는 증양에 축적된 EB 수준과 비증양 뇌조직에 축적된 EB 수준 사이의 비(T/NT)로서 정의된다.

표 9

다양한 DP-BFA에 의한 BBB 및 BTB 개방의 비교

| 분자 | EC ₅₀ * (μ M) | BTB EB μ g /g 증양 | BBB EB μ g /g 비증양 뇌 | 특이성 증양/비증양 |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------|
| 3,12-Na | 22 ± 4 | 44 ± 8 | 43 ± 9 | 1.1 ± 0.3 |
| 3,12-PO ₄ | 10 ± 2 | 14 ± 6 | 2.5 ± 1.5 | 6.3 ± 1.3 |
| 3,12-MEG-PO ₄ | 22 ± 3 | 25 ± 3 | 21 ± 4 | 1.2 ± 0.2 |
| 3,12-DEG-PO ₄ | 7 ± 2 | 34 ± 8 | 2.0 ± 0.2 | 22 ± 5 |
| 3,12-PC | 52 ± 7 | 17 ± 2 | 10 ± 2 | 1.8 ± 0.5 |
| 3,12-MEG-PC | 20 | 12 | 6 | 2 |
| 3,12-DEG-PC | 60 | 11 | 5 | 2 |
| 만니톨 | 25% | 12 ± 2 | 7 ± 2 | 2.1 ± 0.5 |

* 증양을 지닌 래트의 EC₅₀ 값

<352> 표 9에서 볼 수 있는 대로, 대부분의 시험 화합물은 증양 및 비증양 뇌조직에서 유사한 EB 축적 수준, 즉 약 1 내지 2의 T/NT 비를 나타냈다. 만니톨(25%)의 경우, 증양에서 EB 축적이 비증양 뇌에서의 축적의 약 2배였다. 사용된 실험 시스템에서, 화합물 3,12-DEG-PO₄는 혈액증양장벽(BTB)의 개방에 대해 높은 특이성을 나타냈으며, 이것은 비증양 조직의 EB 수준보다 22배 더 높았던 증양에서의 EB 축적으로써 맹백하다(T/NT 비 = 22).

<354> 결론:

<355> 3,12-DEG-PO₄는 C6 신경아교종 증양에서 BTB의 개방에 대해 가장 특이적인 효과를 나타냈다. 이 화합물은 정상 혈액뇌장벽(BBB)보다 더 큰 정도로 C6 신경아교종의 혈액증양장벽(BTB)을 투과성으로 만든다. 따라서, DP-BFA 유도체는 BTB를 특이적 및 선택적으로 개방할 수 있는 제제로서 작용한다.

<356> 실시예 25

<357> SD 증양을 지닌 래트에서 편측 DP-BFA 투여

<358> 10 μ M 3,12-DEG-HP0₄Na(도 2A), 40 μ M 3,12-Na BFA(도 2B) 또는 25% 만니톨(도 2C)을 바깥 목동맥으로 편측 주입한 후, 신경아교종 증양으로 에반스블루 및 플루오레세인 침투를 시험했다. 관련 화합물을 실시예 23에 설명

된 대로 C6 신경아교종 세포를 접종한 후 9 내지 12일째에 래트 뇌에 주입했다.

<359> 양측 신경아교종을 갖는 래트에 3,12-DEG-PO₄ 투여 후의 에반스블루 염색이 동측 반구에 있는 종양 조직에만 있다는 것을 도 2A로부터 분명히 볼 수 있다. 한편, DP-BFA의 탄소 대응물, 즉 BFA-3,12 및 고삼투성 체제인 만니톨은 종양 및 비종양 뇌조직을 동등하게 투과성으로 만들었다.

<360> 실시예 26

<361> 혈액망막장벽(BRB) 투과성화에 대한 DP-BFA의 효과

<362> DP-BFA에 의한 혈액망막장벽(BRB)의 투과성화를 공막에 있는 혈관으로부터 형광 마커인 플루오레세인 나트륨염(F-Na)의 누출을 모니터함에 의해 래트에서 조사했다.

<363> 250 내지 350g 중량의 Sprague-Dawley(SD) 래트를 케타민(100mg/ml) 및 크실라신(2%) 용액을 0.1ml/100g 체중으로 주사하여 마취시켰다. 마취된 동물에 목정맥으로 0.25ml F-Na(12.5mg/ml)를 주사했다. 안과 수술용 INAMI L-0960 현미경에 c-마운트와 함께 부착된 3-CCD 칼라 카메라(teli CS5850)를 사용하여 망막 혈관을 기록했다. 현미경은 F-Na 검출을 위한 광원 및 적합한 필터를 갖춘다. 10분 후에 망막이 F-Na로부터 깨끗해졌다. 이 시점에서, F-Na의 2차 정맥내 주사와 동시에, 1.5ml의 3,12-DEG-HPO₄Na(12.5μg/ml)를 30초에 걸쳐 동맥내 주사했다. 약물의 투여 후 t=0 및 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 10분에서 혈관 사진을 찍었다. 동일한 실험을 제 2 군의 대조표준 래트에서 반복했으며, 이 경우 3,12-DEG-HPO₄Na 대신 1.5ml의 부형제(Tab-만니톨 5%)를 동맥내 주사했다.

<364> 망막 높이에 있는, 동물 눈의 뒷부분에 있는 혈관에서의 F-Na의 분포를 모니터링함에 의해, F-Na만 투여한 후 10분째에 모든 형광 염료가 망막 혈관을 둘러싼 영역으로부터 완전히 깨끗해졌다. 그러나, 3,12-DEG-HPO₄Na의 주사와 조합된 F-Na의 정맥내 주사는 망막 높이에 있는 혈관 주변에 F-Na 축적을 가져온다. 혈관으로부터 F-Na의 이런 누출은, 3,12-DEG-HPO₄Na의 존재 하에서 혈관망막장벽의 투과성화에 대한 표시이다. DP-BFA 약물 대신 부형제만 투여된 대조표준 동물에서의 결과는 F-Na만 주사된 동물에서와 유사했는데, 즉 투여 후 10분째에 망막 높이에 있는 혈관 또는 혈관을 둘러싼 영역에서 형광물질을 검출할 수 없었다. 도 3A 내지 3C에 묘사된 결과는 눈의 혈관조영술을 나타내는데, 즉 눈 혈액의 사진이 F-Na만(도 3A), 또는 3,12-DEG-HPO₄Na(도 3B) 또는 부형제(도 3C)와 조합하여 투여한 후 30초 및 10분에서 기록된 망막 높이에서 찍혀진 영상을 공급한다.

<365> 이 관찰에 따라서, F-NA 투여 후 10분에서, F-Na 및 부형제만으로 주사된 대조표준 동물의 유리체에서보다, 3,12-DEG-HPO₄Na로 치료된 동물의 유리체에서 더 많은 양의 F-Na가 검출될 수 있었다(도 4A 내지 4B). 유리체에 형광 신호의 축적은 BRB 투과성화 및 망막 높이에 있는 혈관으로부터 F-Na 누출 때문이다.

<366> 결론:

<367> 3,12-DEG-HPO₄Na는 혈액망막장벽의 투과성화를 가능하게 하며, 그 결과 망막 및 유리체에 F-Na가 축적된다.

<368> 실시예 27

<369> DP-BFA의 항종양 활성

<370> 다양한 P-BFA의 항종양 효과를 실시예 17에 설명된 모델 시스템에서 생체내 연구했다. 시험된 P-BFA를 에반스블루 및 플루오레세인 유출에 대한 BBB 및 BTB의 투과성화에 효과적이라고 이미 측정된 농도로 동맥내 투여했다. 실시예 23에 설명된 종양 접종의 실험 과정에 따랐다.

<371> C6 신경아교육종 세포 접종 후 3 내지 4일째에, 래트를 바깥 목동맥을 통해 캐놀러를 삽입하고, 시험 P-BFA를 실시예 17에 설명된 대로 30초에 걸쳐 주입했는데, 단 이 실험에서는 마커를 투여하지 않았다. 치료된 래트를 7 내지 9일까지 내버려 둔 후 죽였다. 관상 절편을 얻어서 예오신-헤마톡실린으로 염색하고, 조직학적으로 조사하여 종양 부피를 측정했다. 부형제만으로 치료된 동물을 대조표준으로 사용한다. 통계적 유의성을 위해 표준 오차 및 스튜던트 테스트를 사용했다. 결과를 표 10에 요약한다.

<372> 표 10의 결과로부터 볼 수 있는 대로, P-BFA 화합물은 생체내에서 신경아교종 종양 성장에 대해 세포증식억제성 효과를 나타낸다. 사용된 실험 조건 하에서, 3,12-DEG-PO₄ 화합물이 가장 두드러진 항종양 효과를 나타냈다. 다른 화합물, 예를 들어 3,12-MEG-PC가 또한 더 적은 정도였지만 유의한 항종양 활성을 나타냈다.

표 10

종양 성장에 대한 다양한 P-BFA의 항종양 효과

| 분자 | P-BFA 농도 (μM) | 종양 부피 (mm^3) \pm SE | P (대조표준에 대한) |
|--|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| 대조표준 | 0 | 8.1 \pm 2.22 | - |
| 3,12-MEG-HPO ₄ Na | 30 | 4.2 \pm 1.6 | >0.1 |
| 3,12-PC | 50 | 3.8 \pm 0.8 | >0.1 |
| 3,12-MEG-PC | 10 | 2.88 \pm 0.6 | <0.05* |
| 3,12-DEG-PC | 60 | 3.9 \pm 1.0 | >0.1 |
| 3,12-DEG-HPO ₄ Na | 5 | 1.5 \pm 0.3 | <0.01* |
| 3,12-DEG-PO ₄ Na ₂ | 30 | 1.6 \pm 0.4 | <0.01* |

SE - 평균의 표준 오차
* 통계적으로 유의한 차이

<373>

<374> 실시예 28

<375> DP-BFA의 항종양 효과

<376> DP-BFA의 항종양 효과를 C6 신경아교종을 지닌 래트의 모델 시스템에서 종양 부피 및 외형을 모니터링함에 의해 평가했다. Sprague-Dawley(SD) 래트를 다음과 같이 PBS 5 μl 중의 2.5x10⁵ C6 신경아교종 세포로 접종했다. 래트를 두개골이 평평한 자세로 정위 헤드 홀더에 올려 놓았다. 골막의 반전 후, 정수리점 - 왼쪽 중심선으로부터 옆으로 1.0, 3.50mm, 깊이로 3.50mm의 좌표에 따라서 1mm 드릴로 천공 구멍을 미리 만들었다. 세포 현탁액을 10 μl 해밀톤 주사기를 사용하여 3.50mm 깊이에 손으로 주사했다. 종양을 지닌 래트를 접종 후 72시간에서, 3ml/분의 속도로 30초에 걸쳐 바깥 목동맥으로 3,12-디-에틸렌 글리콜 포스페이트(3,12-DEG-PO₄; 나트륨염) 또는 부형제(등삼투압 완충액, pH=7.4)을 5 내지 20 μM 범위의 단일 용량으로 주입하여 치료했다. 날개입천장 동맥을 묶고, 주입할 때 총목동맥을 클램프로 집었다.

<377> C6 종양 세포 접종 후 5일째에, 래트를 케타민/크실라진(1:1) 0.1ml/100g 체중으로 마취시키고, 식염수로 관류하고 4% 포르말데히드 용액으로 고정했다. 뇌를 꺼내어 48시간 동안 수크로스 용액에서 동결보호했다. 다음에, 뇌를 관상 절편으로 얇게 썰어서 헤마톡실린-에오신으로 염색하고, 병리 평가를 행했다.

<378> 치료되지 않은 동물과 비교하여 종양 크기의 유의한 감소가 치료된 동물에서 관찰되었다. 종양 부피는 부형제 치료된 동물에서 8.1 \pm 2.2mm³(N=7), 3,12-DEG-PO₄로 치료된 동물에서 1.6 \pm 0.2mm³(N=12)이었다. 게다가, 미소 환경 및 종양의 성질에도 차이가 있었다. 부형제 치료된 종양을 지닌 래트는 피질, 백색질 및 수막에서 현저한 국부 세포 확장을 나타냈다. C6 신경아교종은 불규칙적이며 매우 침투성으로 보였고, 혈관주위 림프 공간을 통해 침입하려는 경향이 높았다. 반대로, 세포 접종 후 3일째에 1번 DP-BFA를 사용한 치료는 종양 성장의 특성을 유의하게 변화시켰다. 혈관주위 공간을 통한 C6 신경아교종 침입성이 줄어들었고, 한정된 경계를 갖는 고상 종양이 관찰되었다. 일부 제한된 침입이 접종 영역 근처의 수막과 뇌실막 밑에서 발견되었다.

<379> 결론:

<380> 3,12-DEG-PO₄는 종양 침입성 및 성장율을 억제함으로써 유의한 항종양 효과를 나타냈다. 따라서, DP-BFA 화합물은 종양의 확산 및 침입성을 억제하는데 유용할 수 있다.

<381> 당업자는 본 설명의 원리가 많은 구체에 및 변형 또는 변경을 받아들일 수 있으며, 이것 모두가 본 발명의 범위 내에 있음을 인정할 것이다. 실시예는 비제한적으로 구성되도록 의도되며, 본 발명의 범위는 다음의 청구항에 의해 정의되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- <75> 도 1은 래트 뇌로 에반스블루-알부민 복합체의 유출에서 다양한 사슬 길이의 3,n-형 α-분지 지방산과 이들 화합물의 효능을 상호 관련시킨 그래프이다.
- <76> 도 2A 내지 2C는 10 μM 3,12-DEG-HPO₄Na(도 2A), 40 μM 3,12-DEG-HPO₄Na(도 2B) 또는 만니톨 25%(도 2C)의 편측 투여 후 양측 신경아교종을 지닌 래트의 뇌절편에서 에반스블루 축적을 나타낸다.
- <77> 도 3A 내지 3C는 F-Na만 투여하거나(도 3A), 또는 3,12-DEG-HPO₄Na(도 3B) 또는 부형제(도 3C)와 조합하여 투여한 후 30초 및 10분에서 기록된 래트 눈 뒷부분의 플루오레세인 나트륨염(F-Na) 혈관조영술을 나타낸다.
- <78> 도 4A 내지 4B는 실시예 26에 설명된 과정에 따라서 3,12-DEG-HPO₄Na(도 4A) 또는 부형제(도 4B)와 함께 F-Na를 투여한 후 10분에서 기록된 눈 앞부분에서의 F-Na 축적을 나타낸다.

<79> 발명의 상세한 설명

- <80> 본 발명은 생물학적 장벽의 투과성을 증가시키고, 종양 성장을 억제하기 위한 화합물, 조성물 및 방법에 관한 것이다.
- <81> 제한된 부위(예를 들어, 뇌, 눈, 고환 등)로 치료제 또는 진단제의 전달을 용이하게 하는 바람직한 제제는 제한하는 생물학적 장벽을 투과성으로 만들 수 있는 것이다. 그러나, 바람직한 투과성화는 허용할 수 없는 정도의 부작용을 야기하지 않는 차별적인 방식으로 달성되어야 한다. 예를 들어, 뇌종양을 치료하는 경우 무손상의 이로운 뇌조직에 있는 BBB보다 훨씬 큰 정도로 BTB를 투과성으로 만드는 제제를 사용하는 것이 유리할 것이다. 이 경우에, 특이적 투과성화는 병적 조직에 독성 약물의 우선적인 축적을 가능하게 하며, 주위의 건강한 뇌조직에는 최소한의 손상을 일으키거나 또는 일으키지 않는다. 유사한 고려사항이 다른 생물학적 장벽에도 적용된다. 예를 들어, 일시적이고 특이적인 방식으로, 피부 및 장 장벽을 가로지르는 약물 또는 다른 이로운 분자의 전달을 증가시킬 수 있는 제제를 가지는 것이 바람직하다.
- <82> 본 발명은 신규한 화합물에 관한 것이며, 이들 화합물이 가역적이고 선택적인 방식으로 생물학적 장벽의 투과성을 증가시킬 수 있다는 예기치 않은 발견을 기초로 한다. 본 발명의 교시에 따라서, 신규한 화합물은 상기 정의된 화학식 I 또는 제약학적으로 허용되는 그것의 염이다.
- <83> 본 명세서에서, 화학식 I의 화합물은 "DP-BFA"로 집합적으로 언급되거나, 또는 분지-사슬 친지질성 분자의 인-유도체 및 간단히 "P-BFA"라는 일반명에 의해 교환가능하게 언급될 것이다. 포스페이트 부분을 지니지 않은 분지-사슬 친지질성 분자는 "BFA" 또는 "탄소-BFA"로 언급될 것이다.
- <84> 한 바람직한 구체예에서, P-BFA는 일반적 구조 R1(R2)-CH-의 α-분지 친지질성 분자의 인-유도체이다. 본 발명에 따르는 다른 구체예에서, P-BFA는 일반적 구조 R1(R2)-CH-[CH₂]_m-의 분지 친지질성 분자의 인-유도체이며, 여기에서 m은 1 내지 12로서, 예를 들어 β(m=1), γ(m=2) 위치 등에서 분지된 ω-분지 친지질성 분자로 언급된다.
- <85> 이후, 특이적 DP-BFA는 분지-사슬 친지질성 분자의 결사슬 및 주사슬 상의 탄소 원자의 수를 각각 나타내는 그것들의 특정한 R1 및 R2에 의해 언급될 것이다.
- <86> R3이 모노-에틸렌 글리콜 또는 디-에틸렌 글리콜인 화학식 I의 화합물은 각각 R1,R2-MEG-PO₄ 및 R1,R2-DEG-PO₄로 언급될 것이다. 어떤 경우에, 분지-사슬 부분과 인접한 화학기를 연결하는 결합이, 예를 들어 3,12-O-C₁₀-DEG-PO₄, 3,12-(에테르)-DEG-PO₄ 등과 같이 구체적으로 표시된다. Z₁이 콜린인 화학식 I의 화합물은 R1,R2-PC로 언급될 것이다.
- <87> 본 발명의 치료에 따라서, 화학식 I의 화합물의 구조에 있는 여러 가지 구성요소를 변화시킴에 의해, 분자의 안정성 및 생물학적 장벽에 대한 그것들의 투과성화 효과에 있어 미세 조절을 달성하는 것이 가능하다. 예를 들어, 알킬기 R1 및 R2에 있는 탄소 원자의 수 및 포화 수준을 변화시키는 것은 분자의 총체적인 소수성에 영향을 미치며, 이로써 특이적 생물학적 멤브레인을 가로지르는 그것의 능력의 최적화가 가능하게 된다.
- <88> 현재, 본 발명에 따르는 바람직한 화합물은 DP-BFA 분자이며, 여기에서 R1의 탄소 사슬의 길이는 2 내지 14개이고, R2 및 R3에 있는 탄소 원자의 총수는 합쳐서 6 내지 26개이다. 현재, 더 바람직한 화합물은 α-분지-사슬

화합물이며, 여기에서 R1은 3개 탄소 원자이고, R2는 12 내지 16개 탄소 원자이다.

- <89> 화학식 I의 바람직한 화합물은, 분지 친지질성 분자의 포스페이트기에서 분지점까지 세어서 20개 이하의 탄소 원자 길이를 갖는 지방족 사슬을 포함한다. 상기 정의된 화학식 I의 R3 부분에 있는 탄소 원자의 이런 추정된 수는, DP-BFA 분자에 의한 효과적인 멤브레인 동요에, 그리고 이로써 바람직한 투과성화 효과의 도출에 가장 적합하다. 상기 언급된 지방족 사슬이 연속하는 탄화수소 사슬일 수 있거나, 또는 R3의 정의에 포함된 바와 같이, 산소, 황, 질소 및 인 원자의 군으로부터 선택된 1개 이상의 헤테로 원자에 의해 가로막힐 수 있다는 것이 주목되어야 한다.
- <90> 본 발명에 따르는 한 바람직한 구체예에서, 화학식 I의 분자의 R3은 에스테르 결합에 의해 분지-사슬 부분과 적어도 1개의 글리콜 부분을 연결하는 카르보닐기를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, R3은 에테르 결합에 의해 분지-사슬 부분과 적어도 1개의 글리콜 부분을 연결하는 공유 결합을 포함한다. 생리화학적 조건 하에서, 에테르 결합은 일반적으로 효소적 절단에 덜 민감하며, 따라서 에스테르 결합보다 더 안정할 것으로 예상된다.
- <91> 다양한 생물학적 장벽을 투과성으로 만드는 DP-BFA 화합물의 능력에 영향을 미칠 수 있는 다른 요인은 분자에 있는 상이한 화학기들의 극성이다. 또한, 이것은 차별적인 투과성화 효과의 미세 조정에 기여할 수 있다.
- <92> 본 발명의 바람직한 화합물은 화학식 I의 일- 또는 이-염 화합물인 염 형태이다. 적합한 염은, 제한은 없지만 Na^+ , Li^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , 모노-, 디-, 트리- 및 테트라-알킬암모늄으로부터 선택될 수 있는 1가 또는 2가 반대이온을 포함하는 어떤 제약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 더 바람직한 화합물은 1가 염을 포함한다. 특히 바람직한 것은 일- 또는 이-나트륨염인 나트륨염 형태의 DP-BFA 분자이다.
- <93> 본 발명의 화합물은 본 분야에 잘 공지된 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다. 이들 방법 중 일부가 이후 실시예에 예시된다. 또한, 당업자에게 공지된 다른 과정이 사용될 수 있다.
- <94> 본 발명의 화합물은 시험관내에서 타이트한 세포 이음부를 붕괴시키는데, 그리고 생체내에서 생물학적 장벽의 투과성화를 증가시키는데 유용하다고 밝혀졌다. 더욱이, 본 발명은 인-분지-사슬 친지질성 분자의 어떤 유도체가 BBB 및 BTB 장벽의 개방에 대해 차별적인 효과를 가진다는 예기치 않은 발견을 기초로 한다. 따라서, 본 발명의 다양한 P-BFA 화합물은 최소한의 독성 및 부작용을 야기하면서 생물학적 장벽의 투과성화를 발휘하는데 유용할 수 있다.
- <95> 어떤 DP-BFA 화합물은 상이한 크기의 분자에 대해 생물학적 장벽을 차별적으로 투과성으로 만들 수 있다는 점에서 선택적이다. 이 특징은 인-BFA 제제의 더 높은 안전 수준의 덕분일 수 있다. 어떤 DP-BFA는 그것들의 효과의 지속기간에 차이가 있는데, 이것은 제한하는 장벽의 일시적인 선택적 투과성화가 바람직한 어떤 치료 환경에서 다른 이로운 요인으로서 판명될 수 있다.
- <96> 본 발명의 화합물 및 그것들을 포함하는 제약학적 조성물은 생물학적 장벽을 가로지르는 생물학적 활성 제제의 전달을 가능하게 하거나 또는 용이하게 할 수 있다.
- <97> 용어 "생물학적 활성제"는 생물학적 반응을 도출하거나, 생물학적 시스템에 대한 효과를 가지거나, 또는 표시 도구로서 사용할 수 있는 모든 천연발생 및 합성 화합물을 포함하도록 의도된다. 생물학적 활성제는 치료제 또는 진단제일 수 있다.
- <98> 치료제는 항종양제, 항증식제, 항염증제, 신경 제제, 항박테리아제, 항진균제 및 항바이러스제를 포함할 수 있지만, 제한은 없다. 본 발명의 화합물과 조합한 이들 화합물은 제한된 부위에서의 병적 상태, 질환 및 장애의 치료에, 예를 들어 종양, 감염, 농양 및 퇴행성 장애를 포함하는 중추신경계통 및 병소의 치료에 특히 유용하다.
- <99> 진단제는 영상제, 조영제 및 염료를 포함할 수 있지만, 제한은 없다. 진단제의 예는 방사성 표지된 물질(예를 들어, 테크네튬-99m 및 불화물-18 기체 제제) 및 가돌리늄 기체 화합물과 같은 조영제를 포함한다. 본 발명의 화합물은, 예를 들어 뇌의 병소를 진단하고 특성화하는 방법에 유용할 수 있다. 이 경우에, BBB 투과성을 증가시키는데 사용된 본 발명의 화합물은, 모니터될 수 있는 방식으로 표지된 화학 제제와 함께 공동-도입(동일한 또는 별도의 조성물로)될 수 있다.
- <100> 모니터되는 화학 제제는, 예를 들어 뇌 세포 또는 구조에 대한 일반적 인디케이터, 또는 어떤 뇌영역 또는 뇌병소에 특이적이고 배타적으로 결합하거나 또는 축적되는 것일 수 있다. 다음에, 표지한 제제의 존재를 측정하기 위해 뇌가 분석될 수 있다. 분석은 본 분야에 공지된 스캐닝 및 영상 수단을 사용하여 수행될 수 있다(예를 들

어, 자기공명영상기법(MRI), 양전자방출단층촬영술(PET) 및 컴퓨터단층촬영술(CT)).

- <101> 본 발명의 다른 구체예에서, DP-BFA 화합물은 장에서의 또는 피부를 통한 약물 흡수의 증진에 유용할 수 있다. 장 및 피부에 있는 생물학적 장벽은 위장관 또는 피부 상피를 가로지르는 많은 물질의 수동적 확산을 방지하며, 이로써 어떤 유용한 화학물질, 영양소 및 약물의 효과적인 흡수를 방지한다. 이런 장애가 바람직한 유용한 화학물질, 영양소 및 약물을 DP-BFA 화합물과 조합하여 적용함에 의해 극복될 수 있다.
- <102> 광범위한 생물학적 활성 화합물이 화학식 I의 분자 친지질성 분자와 조합하여 사용하는데 적합하며, 따라서 본 발명에 따르는 제약학적 조성물이나 치료 또는 진단 방법에서 유용한 화합물로서 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명에 따르는, P-BFA 화합물은 바람직한 생물학적 활성제와 조합하여 투여된다. 바람직한 생물학적 활성제는 화학식 I의 화합물의 동일한 제약학적 조성물 내에 포함되거나, 또는 별도의 조성물로 투여될 수 있다는 것이 명백해야 한다. 바람직하게, 2가지 활성제, 즉 화학식 I의 화합물 및 바람직한 생물학적 활성제(들)는 동시에 또는 서로 짧은 시간 내에 투여된다. 생물학적 활성제(들)는 P-BFA 화합물 투여 전에 또는 투여에 이어서 투여될 수 있으며, 단 생물학적 장벽에 대한 P-BFA의 효과가 제한된 부위로 관련 제제의 통과를 용이하게 하기에 충분한 그러한 시간차 내일 것이다.
- <103> 또한, 바람직한 활성제는 P-BFA 투여 동시에 즘해 투여되지 않더라도, 이미 혈액 내에 존재할 가능성이 있다 (체내에서 천연 생성되거나, 또는 느린 방출 약물로서 생성되는). 어떤 예들은 신경전달물질과 같은 생체활성 펩티드 및 단백질, 성장인자, 호르몬, 항체 등을 포함한다. 이런 경우 필요조건은, 충분한 양의 바람직한 생물학적 활성제가 그것의 생물학적 효과를 발휘하면서, 동시에 표적 장벽의 투과성화 효과가 발생하는 것이다.
- <104> 생물학적 장벽의 투과성화에서 본 발명의 화합물의 개선된 활성은 투여된 약물의 생체이용율을 증가시키며, 이로써 저용량의 약물에 반응하지 않는 상태에 대해서까지 이들 약물의 치료적 유용성을 확장시킨다. 이것은 특히 제한된 부위, 예를 들어 뇌 및 눈의 질환 및 장애의 치료에 관련된다.
- <105> 여기에 더하여, 본 발명의 화합물은 그것들이 약물의 유용한 투약량을 감소시키고, 그 결과 바람직하지 않은 전신적 부작용을 줄인다는 점에서 유리하다. 더욱이, 본 발명의 분자는 장벽의 선택적 투과성화를 가능하게 하므로, 그것들은 특이적 부위(예를 들어, 종양)에서 약물 흡수를 우선적으로 증가시킬 수 있으며, 이웃한 세포 및 조직에서는 그렇지 않을 수 있다.
- <106> 종양을 지닌 래트에서 P-BFA의 투과성화 효과를 생체내 시험하는 동안, 놀랍게도 시험된 화합물 중 일부가, 종양에 대해 주목할 만한 세포독성 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌으며, 이것은 치료된 종양의 성장을 유의하게 억제하는 그것들의 능력으로 증명된다. 따라서, 본 발명의 어떤 화합물이 항암제로서 유용할 수 있다는 것이 확인되었다. 더욱이, 본 발명의 화합물 중 일부는, 시험관내에서 다양한 정상 및 종양 세포에 대해 그것들의 효과를 시험했을 때, 차별적인 세포독성 활성을 나타낸다.
- <107> 본 발명의 원리에 따라서, 다양한 DP-BFA 분자가 특이적 표적 부위 및 특이적 표시에 적합하도록 구체적으로 제한될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 분자는 BBB 및 BTB 장벽을 개방하는데 있어 차별적인 방식으로 작용한다는 것이 밝혀졌다. 이 경우에, 어떤 DP-BFA에 의한 BTB의 투과성화는 BBB에 대한 효과에 비해 더 큰 정도로 된다. 어떤 DP-BFA 분자의 효과의 다른 유리한 특징은 가로지르는 것이 허락된 화합물에 관한 어떤 식별 수준의 보존이다. 따라서, DP-BFA는 탄소-BFA 또는 만니톨과 같은 고삼투성 제제에 비해 더욱 선택적인 방식으로 장벽 투과성화에 영향을 미친다. 결과적으로, P-BFA 화합물은 본 분야에 공지된 다른 투과성화제와 비교하여 더 적은 독성 부작용을 일으킬 것으로 예상된다. 더욱이, 그것들의 투과성화 효과가 가역적이라고 밝혀졌기 때문에, 본 발명의 화합물은 또한 약물의 만성적 투여에도 유용할 수 있다.
- <108> 명세서 및 청구항에 언급된 대로, P-BFA의 "유효량"은 본 발명에 따르는 바람직한 이로운 효과를 발휘하는 본 발명 화합물의 양으로 간주한다. 본 발명의 한 양태에 따라서, 그것은 관심의 분자에 대한 관련 장벽의 투과성을 유의하게 증가시키는 P-BFA의 양이다. 즉, 충분한 양의 관심의 분자가 생물학적 장벽을 가로질러서 그것의 치료적 또는 예방적 효과를 발휘하는 것을 허용하거나, 또는 진단적 과정을 허용하도록, 관련 장벽의 투과성을 증가시키는 P-BFA의 양이다. 본 발명의 다른 양태에 따라서, 그것은 항암제로서 치료적으로 유효한 P-BFA의 양이다. 즉, 제어되지 않는 세포 성장을 억제하는 P-BFA의 양이다.
- <109> 유효량은 개체의 배이스스에 대해 측정될 것이며, 적어도 부분적으로는 개체의 크기, 특이적 질환, 치료될 증상의 심함 등의 고려사항에 기초할 것이다. 따라서, 유효량은 그러한 요인들 및 다만 통상의 실험을 사용하여 당업자에 의해 쉽게 확정될 수 있다.
- <110> 사용되는 용량 범위 및 섭생은 투여 경로, 수혜자의 나이, 성별, 건강 및 체중, 특정 DP-BFA의 효능, 및 투여되

는 관련된 유용한 약물 또는 제제에 좌우될 것이다. 당업자는 원하는 지속기간 및 작용도를 얻기 위해서 DP-BFA 조성물 및 투약량을 조정할 수 있을 것이다.

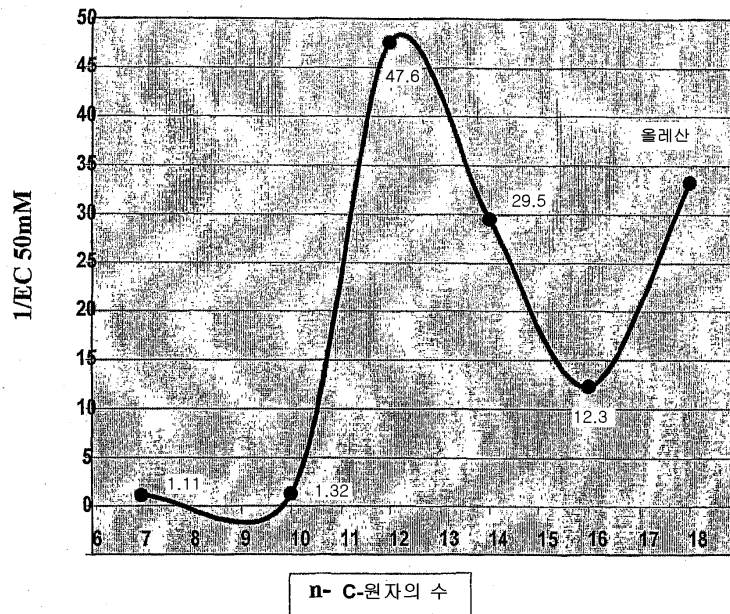
<111> 제약학적 조성물은 액체, 에어로졸 또는 고체 투약량 형태일 수 있으며, 적합한 투여 경로가 요구하는 바에 따라서, 제한은 없지만 용액, 현탁액, 미셀, 에멀전, 마이크로에멀전, 에어로졸, 연고, 젤, 좌약, 캡슐, 정제 등을 포함하는 어떤 적합한 조제물로 조제될 수 있다.

<112> 제한은 없지만, 경구, 정맥내, 근육내, 피하, 흡입, 비강내, 국소, 직장 또는 다른 공지된 경로를 포함하는 어떤 적합한 투여 경로가 본 발명에 의해 포함된다. CNS에 대한 투과성화 효과의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 동맥내 또는 경막내 투여된다. 항암제로서 사용하기 위해서, 본 발명의 관련된 제약학적 조성물은 바람직하게, 경구 또는 정맥내 투여되거나, 또는 국소적으로 또는 부위 관류, 관장 또는 기관내 세척에 의해 적용된다.

<113> 이제, 본 발명이 다음의 비제한적 실시예에 의해 설명될 것이다.

도면

도면1



도면2



도 2A

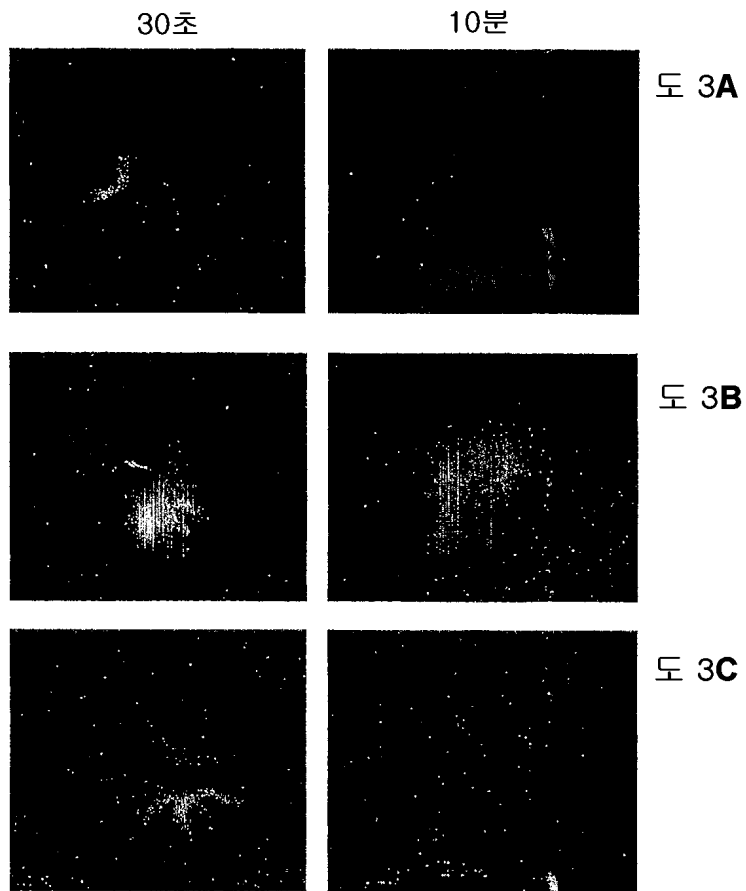


도 2B

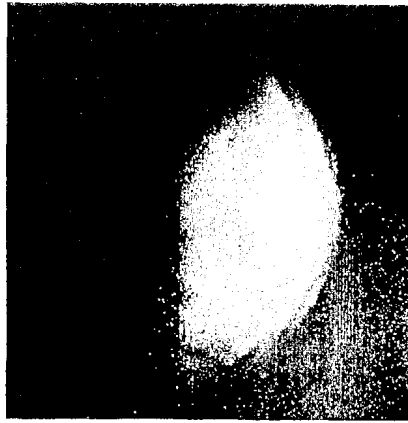


도 2C

도면3



도면4



도 4A



도 4B