



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0135886
(43) 공개일자 2010년12월27일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7028 (2006.01) *A61K 31/7008* (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7024897

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년04월09일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년11월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/040098

(87) 국제공개번호 WO 2009/126822

국제공개일자 2009년10월15일

(30) 우선권주장

61/043,586 2008년04월09일 미국(US)

(71) 출원인

더 유니버시티 오브 노쓰 캐롤라이나 옛 채플 힐
미합중국 노쓰 캐롤라이나 27599 채플 힐 비뉴 홀
308

(72) 발명자

이건 토마스 마이클

미국, 노쓰캐롤라이나 27514, 채플 힐, 파인허스
트 드라이브 741

(74) 대리인

진용석

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 액틴 세포 골격의 재배열 및 세포간 갭 형성을 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 세포를 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트와 접촉시켜서 세포 골격 재배열 및 세포간 갭 형성을 예방 또는 경감하는 방법을 개시한다. 구체적으로, 본 명세서에 개시된 방법을 사용하여 허혈성 또는 허혈-재관류 현상과 관련된 액틴 세포 골격 재배열 및/또는 세포간 갭 형성을 예방 또는 경감하고, 증가된 액틴 세포 골격 재배열과 관련된 질병 또는 상태를 예방 또는 완화시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1a

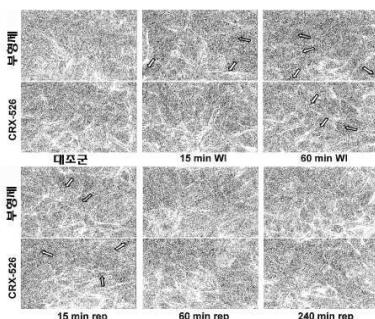


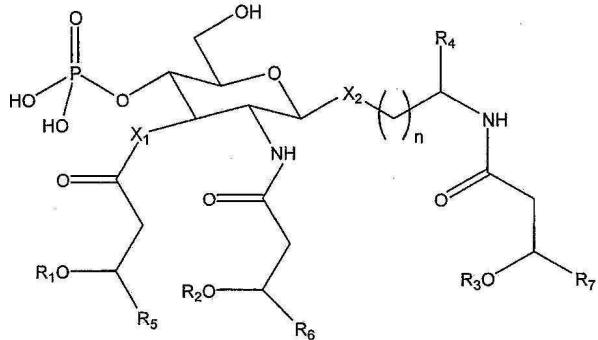
Figure 1A

특허청구의 범위

청구항 1

세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법으로서, 상기 세포를 유효량의 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염과 접촉시키는 것을 포함하는 방법:

화학식 I



상기 식에서,

n은 1 내지 6의 정수이고;

X₁은 0 또는 S이며;

X₂는 0 또는 S이고;

R₁, R₂, 및 R₃은 독립적으로 C₂-C₁₆ 아실이며, 여기서 R₁, R₂, 및 R₃ 중 적어도 하나는 C₂-C₇ 아실이고;

R₄는 H, 히드록시알킬, -C(=O)NH₂, 및 -(CH₂)_mC(=O)OH로 구성되는 군에서 선택되며, 여기서, m은 0 내지 2의 정수이고;

R₅, R₆, 및 R₇은 독립적으로 C₁₀-C₁₂ 알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서, n이 1인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, X₁ 및 X₂가 각각 0인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, R₄가 -C(=O)OH인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, R₁, R₂, 및 R₃이 각각 C₂-C₇ 아실인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이 화학식 I에서 n이 1이고; X₁이 0이며; X₂는 0이고; R₁, R₂, 및 R₃은 각각 -C(=O)(CH₂)₄CH₃이며; R₄는 -C(=O)OH이고; R₅, R₆, 및 R₇은 각각 -(CH₂)₁₀CH₃인 화합물 또는 이의 약학적 허용염인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 세포가 내피 세포인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 세포와 이를 둘러싸는 하나 이상의 세포 사이에 세포간 캡 형성을 예방 또는 경감하는 것인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

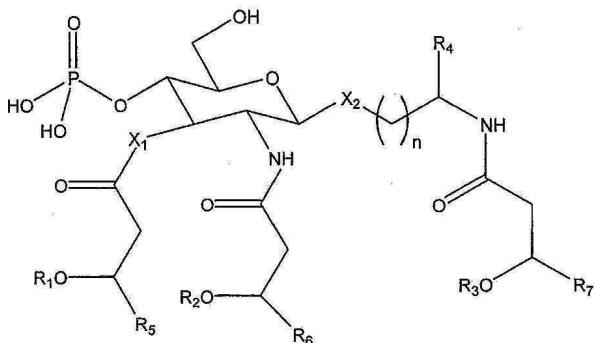
청구항 10

제1항에 있어서, 세포를 접촉시키는 것은 허혈성 또는 허혈-재관류 관련 현상 이전에, 허혈 중에 또는 허혈 간격 이후에 일어나며, 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 허혈성 또는 허혈-재관류 관련 현상과 관련된 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것을 포함하는 것인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 11

환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법으로서, 상기 환자에게 유효량의 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염을 투여하는 것을 포함하는 방법:

화학식 I



상기 식에서,

n은 1 내지 6의 정수이고;

X₁은 O 또는 S이며;

X₂는 O 또는 S이고;

R₁, R₂, 및 R₃은 독립적으로 C₂-C₁₆ 아실이며, 여기서 R₁, R₂, 및 R₃ 중 적어도 하나는 C₂-C₇ 아실이고;

R₄는 H, 히드록시알킬, -C(=O)NH₂, 및 -(CH₂)_mC(=O)OH로 구성되는 군에서 선택되며, 여기서, m은 0 내지 2의 정수이고;

R₅, R₆, 및 R₇은 독립적으로 C₁₀-C₁₂ 알킬이다.

청구항 12

제11항에 있어서, n이 1인, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, X₁ 및 X₂가 각각 0인, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감

하는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, R_4 가 $-C(=O)OH$ 인, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, R_1 , R_2 , 및 R_3 이 각각 C_2-C_7 아실인, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 화학식 I의 화합물이 화학식 I에서 n 이 1이고; X_1 이 0이며; X_2 는 0이고; R_1 , R_2 , 및 R_3 은 각각 $-C(=O)(CH_2)_4CH_3$ 이며; R_4 는 $-C(=O)OH$ 이고; R_5 , R_6 , 및 R_7 은 각각 $-(CH_2)_{10}CH_3$ 인 화합물 또는 이의 약학적 허용염인, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 17

제11항에 있어서, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 환자에게서 증가된 액틴 세포 골격 재배열과 관련된 질병 또는 상태, 또는 그 증상을 예방 또는 완화하는 것인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

청구항 18

제11항에 있어서, 환자가 포유동물인, 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원

본 출원은 2008년 4월 9일에 출원되고, 그 개시 내용이 본 명세서에 전체적으로 참고로 인용된 미국 특허출원 제61/043,586호의 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 명세서에 개시되는 주제는 액틴 세포 골격 재배열 및 세포간 캡 형성을 경감 또는 예방하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 상기 방법을 사용하여 허혈 현상 또는 허혈-재판류 손상에 대한 반응으로 생기는 액틴 세포 골격 재배열을 예방할 수 있다.

[0005] 약어

[0006] °C = 섭씨온도

[0007] AGP = 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트

[0008] ARDS = 성인 호흡 곤란 증후군

[0009] ATP = 아데노신 트리포스페이트

[0010] CI = 냉 허혈

[0011] CO₂ = 이산화탄소

[0012] HMVECs = 인간 폐의 미세혈관의 내피 세포

[0013] hr = 시간

[0014] IRI = 허혈-재판류 손상

[0015]	LDH	= 락테이트 디히드로게나제
[0016]	kg	= 킬로그램
[0017]	μmol	= 마이크로몰
[0018]	mg`	= 밀리그램
[0019]	min	= 분
[0020]	O ₂	= 산소
[0021]	PBS	= 포스페이트 완충염수
[0022]	SIRS	= 전신성 염증 반응 증후군
[0023]	WI	= 온 허혈

배경 기술

[0024] 급성 폐손상은 폐혈증, 전신성 염증 반응 및 성인 호흡 곤란 증후군의 특성이다. 비심인성 폐 부종 및 손상된 가스 교환은 병인과 무관하게 급성 폐 손상의 결과이다. 급성 폐 손상으로 인해 폐 부종을 일으키는 기작은 잘 이해되어 있지는 않다. 폐 이식 이후에 바로 발생하는 급성 폐 손상의 한 형태인 허혈-재관류 손상 (IRI)은 이 환율 및 사망률을 초래하는 빈번한 합병증이다. 문헌 [King 등, *Ann. Thorac. Surg.*, 69, 1681-1685 (2000)] 참조.

[0025] 허혈의 임의의 간격 이후의 재관류는 보체 및 응고 연쇄 반응을 포함하여 선천적인 면역계의 성분과 관련된 염증 반응을 초래한다. 실질 세포 및 골수 세포는 둘다 자유 라디칼인 일산화질소 및 친염증 및 항염증 사이토카인을 만든다. 문헌 [de Perrot 등, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167(4), 490-511 (2003); de Groot and Rauen, *Transplant Proc.*, 39(2), 481-484 (2007); 및 Mollen 등, *Shock*, 26(5), 430-437 (2006)] 참조.

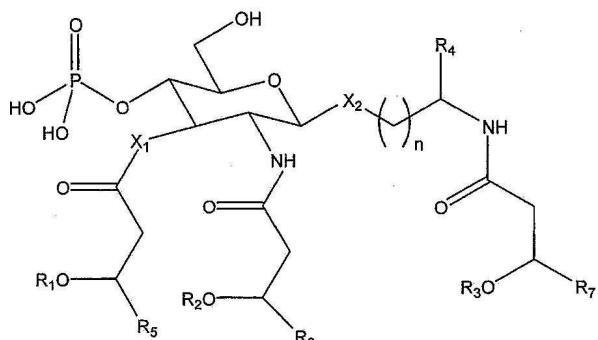
[0026] 폐 IRI에 대해 더 잘 이해하는 것은 급성 폐 손상의 다양한 유형과 관련이 있는 것 같고, 폐 이식 수용자 외에도 상당수의 환자들에게 이득이 될 수 있다. 그러한 지식은 심정지 사체 공여자로부터의 이식용 폐의 복구를 용이하게 하고/하거나 이식 품질 이하의 폐의 구제를 돋는 데 사용할 수도 있다. 이식 가능한 폐의 우선적 필요성을 언급하는 문헌 [Steen 등, *Ann Thorac Surg.*, 83, 2191-2195 (2007)] 참조. 문헌 [Egan 등., *Ann Thorac Surg.*, 52, 1113-1121 (1991)] 및 Egan, *J. Heart Lung Transplant.*, 23(1), 3-10 (2004)] 참조.

발명의 내용

발명의 개요

[0028] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 주제는 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법으로서, 본 방법은 상기 세포를 유효량의 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염과 접촉시키는 것을 포함한다:

화학식 I



[0030]

상기 식에서,

[0031]

n은 1 내지 6의 정수이고;

- [0033] X_1 은 0 또는 S이며;
- [0034] X_2 는 0 또는 S이며;
- [0035] R_1 , R_2 , 및 R_3 은 독립적으로 C_2-C_{16} 아실이며, 여기서 R_1 , R_2 , 및 R_3 중 적어도 하나는 C_2-C_7 아실이고;
- [0036] R_4 는 H, 히드록시알킬, $-C(=O)NH_2$, 및 $-(CH_2)_mC(=O)OH$ 로 구성되는 군에서 선택되며, 여기서, m 은 0 내지 2의 정수이고;
- [0037] R_5 , R_6 , 및 R_7 은 독립적으로 $C_{10}-C_{12}$ 알킬이다.
- [0038] 일부 구현예에서는, n 이 1이다. 일부 구현예에서는, X_1 및 X_2 는 각각 0이다. 일부 구현예에서는, R_4 는 $-C(=O)OH$ 이다. 일부 구현예에서는, R_1 , R_2 , 및 R_3 은 각각 C_2-C_7 아실이다. 일부 구현예에서는, 화학식 1의 화합물은 n 은 1이고; X_1 은 0이며; X_2 는 0이고; R_1 , R_2 , 및 R_3 은 각각 $-C(=O)(CH_2)_4CH_3$ 이며; R_4 는 $-C(=O)OH$ 이고; R_5 , R_6 , 및 R_7 은 각각 $-(CH_2)_{10}CH_3$ 인 화합물 또는 이의 약학적 허용염이다.
- [0039] 일부 구현예에서는, 세포가 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서는, 세포가 내피 세포이다.
- [0040] 일부 구현예에서는, 액틴 세포 골격 재배열의 예방 또는 경감은 세포와 그 세포를 둘러싸는 하나 이상의 세포 사이의 세포간 갭 형성을 예방 또는 경감한다.
- [0041] 일부 구현예에서는, 세포를 접촉시키는 것은 허혈성 또는 허혈-재판류-관련 현상 전에, 허혈 중에 또는 허혈의 임의의 간격 이후에 일어나며, 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 허혈성 또는 허혈-재판류 관련 현상에 관련된 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것을 포함한다.
- [0042] 일부 구현예에서는, 본 명세서에 개시된 주제는 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법으로서, 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0043] 일부 구현예에서는, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 환자의 증가된 액틴 세포 골격 재배열 또는 그 증상과 관련된 질병 또는 상태를 예방 또는 완화한다. 일부 구현예에서, 상기 환자는 포유동물이다.
- [0044] 본 명세서에 개시된 주제의 목적은 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.
- [0045] 상기 언급한 본 명세서에 개시된 주제의 목적은 그 주제에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 달성되며, 기타 목적은 하기 실시예 및 이하에 상세히 설명되는 도면과 관련하여 설명이 진행됨에 따라 명확하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1A는 팔로디안 염색된 인간 폐의 미세 혈관 내피 세포 (HMVEC)의 일련의 사진으로서, 모의 온 허혈이 저산소증 없이 액틴 세포 골격 재배열 및 인간 폐의 미세 혈관 내피 단일층에서의 갭의 형성에 미치는 효과를 나타낸다. HMVEC는 증식하여 모의 온 허혈 (WI) 1 시간 전에 통합 커버 슬립이 있고 1 μ g/ml의 CRX-526 또는 부형제로 항온처리된 P30 접시 상에 융합하였다. 상기 사진은 WI 이전 (대조군), WI의 15 또는 60분 이후, 및 모의 재판류 (rep)의 15, 60 또는 240분 후에 CRX- 526 처리 및 부형제 처리된 세포를 나타낸다. 실험은 3회 실시하였다.
- 도 1B는 도 1A에 나타낸 세포들의 단일층내 갭 면적 %의 그래프이다. 3개의 P30 접시 각각으로부터 3개의 별개의 필드를 분석하였다 ($n = 9$ 사진/시간점). 단일층내 갭 면적 %는 메타모프 (MetaMorph®) 소프트웨어 (미국 캘리포니아 서니베일 소재의 MDS 애널리티컬 테크놀로지스 인코포레이티드)에 의해 정량 분석하였다. 부형제 처리된 세포 데이터는 음영이 있는 막대로 나타낸다. CRX-526 처리된 세포 데이터는 흰 막대로 나타낸다. * = $p < 0.05$, † = $p < 0.01$, ‡ = $p < 0.001$ 독립표본 t 검정.

도 1C는 도 1A에 나타낸 세포에서 비정상적 액틴 %의 그래프이다. 인간 폐 미세 혈관 내피 세포 (HMVECs)의 액틴 세포 골격에서의 상당한 변이성으로 인해, 세포들은 비정상의 심각도를 나누지 않고 이미지에서 "정상" 또는 "비정상" 액틴 분포를 가지는 것으로 표지하였다 ($n=9$ 사진/시간점). 평가는 그룹 동일성 또는 샘플의 시간을

모르는 얼굴을 가린 관찰자에 의해 이루어졌다. 그후, 군집의 비를 계산하였다. 부형제 처리된 세포 데이터는 음영이 있는 막대로 나타낸다. CRX-526 처리된 세포 데이터는 흰 막대로 나타낸다. $\neq = p < 0.001$ 독립표본 t 검정.

도 2A는 (왼쪽에서 오른쪽으로) 일련의 사진으로, 온 (37°C) 세포 배양 배지 내 인간 폐 미세 혈관 내피 세포 (HMVECs) (대조군), 4°C 세포 배양 배지내 냉 허혈 (CI) 4 시간 후의 HMVECs (배지 4 hr CI), 4°C 퍼파텍스 (PERFADEXTM) (스웨덴 컹스배커의 비트로파일) 폐 보존 용액내 냉 허혈 4 시간 후의 HMVECs (부형제 4 hr CI), 및 CRX-526으로 사전 항온배양되고 4°C 퍼파텍스 (스웨덴 컹스배커의 비트로파일)내 냉 허혈을 CRX-526과 함께 4시간 동안 수행한 HMVECs (CRX-526 4 hr CI)의 사진들이다. 사진들은 각 세트의 상태에 대해 찍은 9개의 이미지를 대표하는 것이다.

도 2B는 세포 배양 배지 (배지), 부형제 (즉, 퍼파텍스 (스웨덴 컹스배커의 비트로파일)) 또는 CRX-526으로 1 시간 사전 처리 후의 부형제 내에서 냉 허혈 4 시간 (4hr CI), 온 허혈 (WI) 1 시간 또는 온 허혈 1 시간 및 재판류 15분, 1 시간 또는 4 시간 (각각, 15 min rep, 1 hr rep 및 4 hr rep) 후의 인간 폐 미세 혈관 내피 세포 (HMVECs)의 단일층내 갭 면적 %의 그래프이다. 부형제 없는 세포 배양 배지에서의 HMVECs에 대한 데이터는 흰 막대로 나타낸다. 부형제로 보충되지만 화합물이 없는 배지에서의 HMVECs에 대한 데이터는 진한 음영의 막대로 나타낸다. CRX-526 사전 처리된 세포에 대한 데이터는 연한 음영의 막대로 나타낸다. 갭 면적 %는 메타모프 소프트웨어 (미국 캘리포니아 서니베일 소재의 MDS 앤널리티컬 테크놀로지스 인코포레이티드)에 의해 정량 분석되었다. $* = p < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047]

본 명세서에 개시된 주제는 이제 대표적인 구현예가 제시된 하기 실시예를 참조하여 더 상세히 설명될 것이다. 그러나, 본 명세서에 개시된 주제는 상이한 형태로 구현되며, 여기에 제시된 구현예에 국한된 것으로 해석되어서는 아니된다. 대신에, 이를 구현에는 본 명세서의 개시가 철저하고 완전하며, 당해 분야에서 숙련된 자에게 구현예의 범위를 상세히 전달하도록 제시된다.

[0048]

달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 명세서에 설명된 주제가 속하는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 통상 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 언급된 모든 공개문헌, 특히 출원, 특히 및 기타 참고문헌은 전적으로 참고로 인용된다.

[0049]

명세서 및 특허청구범위 전체에서, 제시된 화학식 또는 화학명은 모든 광학 및 입체 이성질체와, 그러한 이성질체 및 혼합물이 존재하는 라세믹 혼합물을 포함한다.

[0050]

I. 정의

[0051]

하기 용어들은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 잘 이해되는 것으로 생각되지만, 다음의 정의들은 본 명세서에 개시된 주제의 설명을 용이하게 하기 위해 제시된다.

[0052]

하기의 오랜 특허법의 관습에 따라, "a", "an" 및 "the"라는 용어들은 특허청구범위를 포함하여 본 명세서에서 사용될 때 "하나 이상 (one or more)"을 의미한다. 따라서, 예컨대, "a compound" 또는 "a cell"이란 언급은 복수의 그러한 화합물 또는 세포들 등을 포함한다.

[0053]

본 명세서에서 "알킬"이란 용어는 C₁₋₂₀을 포함하여 선형 (즉, 직쇄), 분지된 또는 환상, 포화 또는 적어도 부분적으로 및 일부 경우에는 완전히 불포화된 (즉, 알케닐 및 알키닐) 탄화수소쇄, 예컨대, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, t-부틸, 펜틸, 헥실, 옥틸, 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 옥테닐, 부타디에닐, 프로프닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐, 헵ти닐 및 알케닐기를 의미한다. "분지된 (branched)"이란 메틸, 에틸 또는 프로필 같은 저급 알킬기가 선형 알킬쇄에 부착되어 있는 알킬기를 의미한다. "저급 알킬"이란 탄소수가 1 내지 약 6개, 예컨대, 탄소수가 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개인 알킬기 (즉, C₁₋₇ 알킬)를 의미한다. "고급 알킬"이란 탄소수가 약 8개 내지 약 20개, 예컨대, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개인 알킬기를 의미한다.

[0054]

알킬기는 선택적으로 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 알킬기 치환체로 치환될 수 있다 ("치환된 알킬"). "알킬기 치환체"란 용어는 알킬, 치환된 알킬, 할로, 아릴아미노, 아실, 히드록실, 아릴옥시, 알콕실, 알킬티오, 아릴티오, 아르알킬옥실, 아르알킬티오, 카르복실, 알콕시카르보닐, 옥소 및 시클로알킬을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 알킬쇄를 따라 하나 이상의 산소, 황 또는 치환된 또는 비치환된 질소 원자가 선택적으

로 삽입될 수 있는데, 여기서, 질소 치환체는 수소, 저급 알킬 (본 명세서에 "알킬아미노알킬"로도 언급됨) 또는 아릴이다.

[0055] 따라서, 본 명세서에 사용된 "치환된 알킬"이란 용어는 본 명세서에 정의된 대로 알킬기의 하나 이상의 원자 또는 작용기가 예컨대, 알킬, 치환된 알킬, 할로겐, 아릴, 치환된 아릴, 알콕실, 히드록실, 니트로, 아미노, 알킬 아미노, 디알킬아미노, 살레이트 및 머캅토와 같은 또 다른 원자 또는 작용기로 대체되어 있는 알킬기를 포함한다.

[0056] "알케닐"이란 용어는 하나 이상의 탄소-탄소 이중결합을 포함하는 알킬기를 의미한다.

[0057] "아릴"이란 용어는 본 명세서에서 단일의 방향족 고리, 또는 함께 융합되거나 공유결합되거나 메틸렌 또는 에틸렌 부 (이에 국한하지 않음)와 같은 공통의 기에 연결된 다중 방향족 고리일 수 있는 방향족 치환체를 의미하는 것으로 사용된다. 공통의 연결기는 벤조페논에서처럼 카르보닐이거나, 디페닐에테르에서처럼 산소이거나, 디페닐아민에서와 같이 질소일 수도 있다. "아릴"이란 용어는 구체적으로 복소환식 방향족 화합물을 포함한다. 방향족 고리는 페닐, 나프틸, 비페닐, 디페닐에테르, 디페닐아민 및 벤조페논을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, "아릴"이란 용어는 탄소수가 약 5 내지 10개, 예컨대, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개인 환상 방향족, 예컨대, 5- 및 6-원 탄화수소 및 복소환식 방향족 고리를 의미한다.

[0058] 아릴기는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 아릴기 치환체로 선택적으로 치환될 수 있는데 ("치환된 아릴"), 여기서, "아릴기 치환체"는 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 히드록실, 알콕실, 아릴옥실, 아르알킬옥실, 카르복실, 아실, 할로, 니트로, 알콕시카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 아르알콕시카르보닐, 아실옥실, 아실아미노, 아로일아미노, 카르바모일, 알킬카르바모일, 디알킬카르바모일, 아릴티오, 알킬티오, 알킬렌 및 -NR'R" (여기서, R' 및 R"은 각각 독립적으로 수소, 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 치환된 아릴 및 아르알킬일 수 있음)을 포함한다.

[0059] 따라서, 본 명세서에서 사용된 대로, "치환된 아릴"이란 용어는 본 명세서에 정의된 대로 아릴기의 하나 이상의 원자 또는 작용기가 예컨대, 알킬, 치환된 알킬, 할로겐, 아릴, 치환된 아릴, 알콕실, 히드록실, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 살레이트 및 머캅토와 같은 또 다른 원자 또는 작용기로 대체되어 있는 아릴기를 포함한다.

[0060] 아릴기의 구체적인 예로는 시클로펜타디에닐, 페닐, 푸란, 티오펜, 피롤, 피란, 피리딘, 이미다졸, 벤즈이미다졸, 이소티아졸, 이속사졸, 피라졸, 피라진, 트라이진, 피리미딘, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 인돌, 카르바졸 등이 있으나, 이에 국한되지 않는다.

[0061] "알킬렌"이란 탄소수가 1 내지 약 20개, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개인 직쇄 또는 분지된 2가의 지방족 탄화수소기를 의미한다. 알킬렌기는 직쇄, 분지쇄 또는 환상일 수 있다. 알킬렌기는 또한 선택적으로 불포화되고/되거나, 하나 이상의 "알킬기 치환체"로 치환될 수도 있다. 알킬렌기를 따라 하나 이상의 산소, 황 또는 치환된 또는 비치환된 질소 원자가 선택적으로 삽입될 수 있는데 (본 명세서에서 "알킬아미노알킬"로도 언급됨), 여기서, 질소 치환체는 전술한 대로 알킬이다. 알킬렌기의 예로는 메틸렌 (-CH₂-); 에틸렌 (-CH₂-CH₂-); 프로필렌 -(CH₂)₃-; 시클로헥실렌 (-C₆H₁₀-); -CH=CH-CH=CH-; -CH=CH-CH₂-; -(CH₂)_q-N(R)-(CH₂)_r-이 있는데, 전기 식중, q 및 r은 각각 독립적으로 0 내지 약 20의 정수, 예컨대, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20이며, R은 수소 또는 저급 알킬; 메틸렌디옥실 (-O-CH₂-O-); 및 에틸렌디옥실 (-O-(CH₂)₂-O-)이다. 알킬렌기는 약 2 내지 약 3 개의 탄소 원자를 가질 수 있으며, 또한 6 내지 20개의 탄소를 가질 수도 있다.

[0062] "히드록시" 및 "히드록실"이란 -OH기를 의미한다.

[0063] "히드록시알킬"이란 말단이 히드록시인 알킬기를 의미한다. 일부 구현예에서, 히드록시알킬기는 -(CH₂)_nOH 구조를 가진다.

[0064] "카르복실산"이란 용어는 -C(=O)OH 기를 의미한다. "카르복실레이트"란 용어는 카르복실산 기의 H가 제거될 때 형성되는 음이온을 의미한다. 따라서, "카르복실레이트"는 -C(=O)O⁻ 기를 의미한다. 카르복실레이트는 양이온과 염 (즉, 카르복실레이트 염)을 형성할 수 있다. "알킬렌 카르복실레이트" 및 "알킬렌 카르복실산"이란 용어는 카르복실산 또는 카르복실레이트 기를 알킬렌기 (예컨대, -(CH₂)_nC(=O)OH 및 -(CH₂)_nC(=O)O⁻) 상의 하나의 열

란 부착점에 부착시켜 형성된 1가의 기들을 의미한다.

[0065] 본 명세서에 사용되는 대로, "아실"이란 용어는 $-C(=O)R$ 기를 의미하는데, 여기서, R은 상기 정의한 대로 알킬 또는 아릴기이다. 일부 구현예에서, 아실기의 R은 C_1-C_{16} 알킬이다. 일부 구현예에서, 아실부의 알킬기는 칙쇄 알킬 또는 알케닐이다. 일부 구현예에서, 아실기의 R은 C_1-C_{16} 칙쇄 알킬이다.

[0066] "포스페이트"란 용어는 $-P(=O)(OH)_2$ 기를 의미한다. "포스페이트"는 또한 포스페이트 기의 하나 이상의 수소 원자의 제거에 의해 형성된 음이온 종을 포함한다.

[0067] "티올"이란 용어는 R이 알킬, 아실 또는 아릴인 $-S-R$ 구조를 갖는 기를 의미한다. "티올"이란 용어는 또한 R이 알킬, 아실 또는 아릴인 $H-S-R$ 구조를 갖는 화합물을 의미할 수도 있다.

[0068] "아미노"란 용어는 R_1 및 R_2 가 독립적으로 H, 알킬, 아실 및 아릴로부터 선택되는 것인 $-NR_1R_2$ 구조를 갖는 기를 의미한다.

[0069] "카르바모일"이란 용어는 $-C(=O)NH_2$ 기를 의미한다.

[0070] 용어 "단당류"란 화학 구조식 $H(CH_2OH)_nC(=O)(CH_2OH)_mH$ (식중, $n + m$ 의 합계는 2 내지 8의 정수임)을 갖는 화합물의 개방쇄 형태에 기초한 화학식 $(CH_2O)_{n+m}$ 의 탄수화물 단량체 단위를 의미한다. 따라서, 단량체 단위는 3탄당, 4탄당, 5탄당, 6탄당, 7탄당, 9탄당 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 단당류는 화학 구조의 환상화된 형태로 존재할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 화합물은 헤미아세탈 또는 헤미케탈을 포함한다. 일부 구현예에서, 용어 "단당류"란 화학 구조식 $H(CH_2OH)_nC(=O)(CH_2OH)_mH$ (식중, $n + m$ 은 4 또는 5임)를 갖는 화합물에 기초한 환상화된 단량체 단위를 의미한다. 따라서, 단당류로는 알도헥소스, 알도펜토스, 케토헥소스 및 케토펜토스, 예컨대, 아라비노스, 릭소스, 리보스, 크실로스, 리블로스, 크실룰로스, 알로스, 알트로스, 갈락토스, 글루코스, 굴로스, 이도스, 만노스, 탈로스, 프력토스, 프시코스, 소프보스 및 타가토스가 있으나, 이에 국한되지 않는다.

[0071] 용어 "단당류 유사물"이란 단당류의 하나 이상의 히드록실기가 또 다른 화학기, 예컨대, 아민, 티올 또는 알킬기 (이에 국한되지 않음)에 의해 대체되어 있는 단당류를 의미한다.

[0072] 용어 "아미노당"이란 단당류의 하나 이상의 히드록실기가 아민에 의해 대체되어 있는 단당류 유사물을 의미한다. 아미노당의 예는 글루코사민 (즉, 2-데옥시-2-아미노- α -D-글루코파라노스)이다.

[0073] 화합물과 관련하여 본 명세서에서 사용된 "단편"이란 용어는 본래 명칭의 화합물의 전체보다 더 적은, 본래 명칭 화합물의 구조의 임의의 일부를 갖는 화합물을 의미한다. 따라서, 단편은 본래의 화합물보다 더 작으나, 일반적으로 본래의 화합물의 생물학적 활성의 일부 또는 전부를 보유한다.

[0074] "약학적으로 허용가능한"이란 용어는 합리적인 이점/위험 비로 측정될 수 있는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과의 접촉에 적합한, 건전한 의학적 판단의 범위 내에 있는 화합물, 재료, 조성물 및/또는 투여 형태를 의미한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 화합물, 재료, 조성물 및/또는 투여 형태는 인간에게 사용하기에 약학적으로 허용가능하다.

[0075] 일반적으로, 용어 "경감한다 (reducing)"는 것은 예컨대, 기존의 상태 또는 질병의 증상 또는 효과를 어느 정도 경감 또는 완화시킴으로써 그 상태 또는 질병을 치료하는 방법을 의미한다. "예방한다 (preventing)"는 말은 잠재적인 미래의 상태, 질병, 질환 또는 손상, 또는 그 증상이 어느 정도 일어나지 못하게 하는 방법을 의미한다. "예방한다"는 말은 미래의 상태 또는 손상의 효과가 예방 작용의 부재 시에 일어났던 효과보다 더 적은 크기 또는 더 짧은 기간이 되도록 미래의 상태 또는 손상의 효과를 감소시키는 방법, 및 그 효과가 완전히 일어나지 않도록 하는 방법을 의미한다. 따라서, "예방한다"는 것은 의학적 및 수의학적 처치의 예방적 방법을 의미한다.

[0076] "허혈 (ischemia)"이란 생물학적 조직 또는 기관으로의 불충분한 혈류로서, 기관 또는 조직이 대사에 대한 수요를 충족시킬 수 없게 만드는 것을 의미한다. 허혈성 기관 또는 조직으로의 재판류 (혈류의 재개)는 과다한 양의 반응성 산소종 (ROS) 및 반응성 질소종 (RNS)의 생산을 유도함으로써 미토콘드리아의 산화성 인산화, ATP의 고갈 (허혈 중에 및 허혈의 결과로서도 발생함), 세포내 칼슘의 증가 및 단백질 키나제, 포스파타제, 프로테아제, 리파제 및 뉴클레이아제의 활성화에서의 변이와 같은 일련의 현상을 초래하여 세포의 기능/본래 상태의 상실을 초래할 수 있다.

[0077] 허혈 재관류 손상 (IRI)이란 허혈에 직면한 기관 조직에서 혈액 순환이 재개된 후에 (예컨대, 기관이 수술에 의해 절제되고, 이식물 또는 자가 이식물에서처럼 재부착될 때) 일어나는 손상을 말한다. 추가적인 예로, 그러한 손상은 기관의 이식을 위해 정지된 후; 관상 동맥을 경피적 관상동맥 성형술 (PTCA), 스텐트 또는 심근경색후의 우회 경로로 처리한 후에; 및 혈전 용해제를 발작 환자에게 투여한 후에 혈액 순환을 재개할 때도 생긴다. 또 다른 예는 심장으로의 혈류가 심장 수술을 위해 종종 심정지액의 사전 투여에 의해 일시적으로 정지될 때이다. 또 다른 예는 지혈대가 팔다리 상에서 팽창될 때 정형외과의에 의해 무혈 영역에서의 수술을 위해 혈류가 팔다리로 가는 것을 차단하는 것이다. 그러한 손상은 다수의 조직, 예컨대, 신장, 간, 폐, 췌장, 골격근, 평활근 연조직, 피부 및 창자에서, 및 심장 및 뇌에서 일어날 수 있다. 따라서, IRI는 뇌, 망막, 간, 부신, 췌장, 척수, 장간막, 팔다리, 장, 뇌, 심근, 중추신경계, 피부 또는 폐의 허혈 재관류 손상 또는 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 구체적으로, 허혈-재관류 손상은 채집된 기관이 공여자의 몸으로부터 제거되고, 혈액원으로부터 분리되며, 따라서 통상 연장된 기간 동안 영양분 및 종종 산소가 고갈되기 때문에 기관 이식에 있어서 심각한 문제이다.

[0078] "부종 (edema)"이란 조직 또는 기관에서 간질액의 증가를 의미한다. 폐에서, "부종"은 폐포액의 증가를 의미할 수도 있다. 일부 구현예에서, 부종은 증가된 내피 세포 투과성을 포함하는 상태와 관련된다.

[0079] "증가된 내피 세포 투과성"이란 다수의 임상적 시나리오, 예컨대, 성인 호흡곤란 증후군 (ARDS), 전신성 염증 반응 증후군 (SIRS)에서 및 다양한 박테리아에 의한 감염의 세팅에서 발생할 수 있는 부종을 초래하는, 기관 또는 조직에서 혈관의 체액 및/또는 혈액내 단백질에 대한 증가된 투과성을 의미한다.

II. 일반적 고려 사항

[0081] 내피 세포 골격, 특히 액틴 스트레스 섬유는 폐 혈관 투과성의 조절에서 역할을 한다. 문헌 [Dudek and Garcia, *J. Appl. Physiol.*, 91(4), 1487-1500 (2001)] 참조. 세포 골격은 세포내 통신 시스템 또는 신호작용 스캐폴드로서 기능할 수 있다는 것도 상정되어 왔다. 문헌 [Ingber, *Faseb J.*, 20(7), 811-827, (2006)] 참조. 본 명세서에 개시되는 주제는 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 CRX-526이 모의 허혈을 따라 세포 골격 재배열을 감소시킨다는 관찰과 관련이 있다.

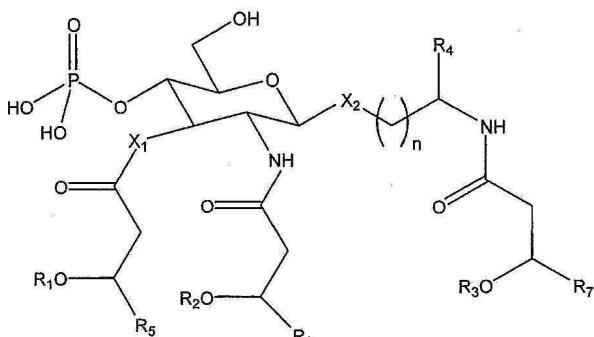
III. 지질 A 유사물

[0083] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 단당류 또는 단당류 유사물을 포함하는 지질 A 유사 화합물의 사용과 관련된다. 일부 구현예에서, 단당류 유사물은 아미노당이다. 일부 구현예에서, 아미노당은 글루코사민이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 (AGP) 또는 그 약학적 허용염의 사용과 관련된다.

III.A. 화학식 I의 화합물

[0085] 일반적으로, AGP는 합성 (즉, 화학적으로 합성된) 지질 A 유사물 또는 이의 약학적 허용염으로서, 하기 화학식 I의 구조를 가질 수 있다:

화학식 I



[0087]

상기 식에서,

[0088]

n은 1 내지 6의 정수이고;

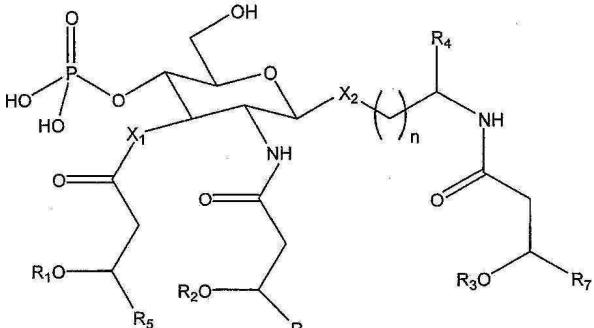
[0089]

X₁은 O 또는 S이며;

- [0091] X_2 는 0 또는 S이고;
- [0092] R_1 , R_2 , 및 R_3 은 독립적으로 C_2-C_{16} 아실이며;
- [0093] R_4 는 H, 히드록시알킬, $-C(=O)NH_2$, 및 $-(CH_2)_mC(=O)OH$ 로 구성되는 군에서 선택되며, 여기서, m 은 0 내지 2의 정수이고;
- [0094] R_5 , R_6 , 및 R_7 은 독립적으로 $C_{10}-C_{12}$ 알킬이다.
- [0095] 일반적으로, 본 명세서에 개시되는 주제에 사용하기 위한 AGP는 탄소수가 8개 미만인 하나 이상의 2차 아실쇄(즉, R_1 , R_2 , 또는 R_3)를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, R_1 , R_2 , 및 R_3 중의 적어도 하나는 $-C(=O)R_8$ 인데, 여기서, R_8 은 C_1-C_6 알킬이다(즉, R_1 , R_2 , 및 R_3 중의 적어도 하나는 C_2-C_7 아실이다). 일부 구현예에서, R_1 , R_2 , 및 R_3 중의 적어도 두 개는 C_2-C_7 아실이다. 일부 구현예에서, R_1 , R_2 , 및 R_3 중의 적어도 하나는 $-C(=O)R_8$ 인데, 여기서, R_8 은 C_5 알킬이다. 일부 구현예에서, R_5 , R_6 , 및 R_7 은 각각 $C_{10}-C_{12}$ 칙쇄의 완전 포화된 알킬이다.
- [0096] 일부 구현예에서는, 상기 화합물이 CRX-526, 즉 화학식 I에서 n 이 1이고; X_1 및 X_2 는 각각 0이며; R_1 , R_2 , 및 R_3 은 각각 $-C(=O)(CH_2)_4CH_3$ 이며; R_4 는 $-C(=O)OH$ 이고; R_5 , R_6 , 및 R_7 은 각각 $-(CH_2)_{10}CH_3$ 인 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염이다.
- [0097] 다양한 AGP의 합성 및 활성은 문헌에 기재되어 있다. 예컨대, 문헌 [[Cluff 등, Infection and Immunity](#), 73(5), 3044-3052 (2005); [Stoever 등, J. Biol. Chem.](#), 279(6), 4440-4449 (2004)]; 및 여기에 인용된 문헌들을 참조. 또한 [존슨 등](#)의 미국 특허 제6,113,918호도 참조.
- [0098] 화학식 I의 화합물은 비대칭 탄소 원자를 보유하며, 그러므로, 엔안티오머 또는 디아스테레오머로서 존재할 수 있다. 디아스테레오머 혼합물은 예컨대, 크로마토그래피 및/또는 분별 결정 같은 알려진 방법에 의해 그 물리화학적 차이에 근거하여 그 개개의 디아스테레오머로 분리할 수 있다. 엔안티오머는 적절한 광학 활성 화합물(예컨대, 알코올)과의 반응에 의해 엔안티오머 혼합물을 디아스테레오머 혼합물로 전환하고, 디아스테레오머를 분리하며, 개개의 디아스테레오머를 상응하는 순 엔안티오머로 전환(예컨대, 가수분해)함으로써 분리할 수 있다. 디아스테레오머, 엔안티오머 및 그 혼합물을 포함하는 모든 그러한 이성질체가 본 명세서에 개시되는 주제의 일부로서 고려된다.
- [0099] III.B. 약학적 허용염
- [0100] 본 명세서에 개시되는 주제의 화합물(예컨대, 화학식 I의 화합물)과 관련하여 본 명세서에서 사용하는 "약학적 허용염(pharmaceutically acceptable salt)"이란 표현은 약학적으로 허용가능한 양이온 염을 포함한다. "약학적으로 허용가능한 양이온 염"이란 표현은 알칼리 금속염(예컨대, 나트륨 및 칼륨), 알칼리 토금속염(예컨대, 칼슘 및 마그네슘), 알루미늄염, 암모늄염, 및 벤자린(N,N' -디벤질에틸렌디아민), 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민(N -메틸글루카민), 베네타민(N -벤질페네틸아민), 에탄올아민, 디에틸아민, 피페라진, 트리에탄올아민(2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올) 및 프로카인과 같은 유기 아민과의 염을 의미하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 사용된 "약학적 허용염"이란 용어는 인간에게 약학적으로 허용가능한 염을 의미한다.
- [0101] 화학식 I의 화합물의 약학적 허용염은 상기 화합물의 유리 산 형태를 통상 1가 이상의 적절한 염기와 공통 용매 중에서 반응시켜서 용이하게 제조할 수 있다. 공통 용매로는 디에틸에테르, 디클라이드 및 아세톤이 있으나, 이에 국한되지 않는다. 염기로는 수산화나트륨, 메톡사이드나트륨, 에톡사이드나트륨, 수소화나트륨, 메톡사이트칼륨, 수산화마그네슘, 수산화칼슘, 벤자린, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 및 트리에탄올아민이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 염은 건조 상태로 농축하거나 비용매의 추가에 의해 분리한다. 다수의 경우에, 염은 산의 용액을 상이한 양이온 염(예컨대, 나트륨 또는 칼륨 에틸헥사노에이트, 마그네슘 올레아이트)의 용액과 혼합하고, 전술한 공통 용매(이것으로부터 희망하는 양이온 염이 침전함)를 이용함으로써 제조하거나, 아니면 농축에 의해 분리할 수 있다.
- [0102] IV. 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법
- [0103] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방

법으로서, 상기 세포를 유효량의 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제시한다:

[0104] 화학식 I



[0105]

[0106] 상기 식에서,

[0107] n은 1 내지 6의 정수이고;

[0108] X₁은 0 또는 S이며;[0109] X₂는 0 또는 S이고;[0110] R₁, R₂, 및 R₃은 독립적으로 C₂-C₁₆ 아실이며;[0111] R₄는 H, 히드록시알킬, -C(=O)NH₂, 및 -(CH₂)_mC(=O)OH로 구성되는 군에서 선택되며, 여기서, m은 0 내지 2의 정수이고;[0112] R₅, R₆, 및 R₇은 독립적으로 C₁₀-C₁₂ 알킬이다.[0113] 일부 구현예에서, R₁, R₂, 및 R₃ 중의 적어도 하나는 -C(=O)R₈인데, 여기서, R₈은 C₅ 직쇄의 완전 포화된 알킬이다. 일부 구현예에서는, R₅, R₆, 및 R₇은 각각 C₁₀-C₁₂ 직쇄의 완전 포화된 알킬이다.[0114] 일부 구현예에서는, n이 1이다. 일부 구현예에서는, X₁ 및 X₂는 각각 0이다. 일부 구현예에서, R₄는 -C(=O)OH이다. 일부 구현예에서, R₁, R₂, 및 R₃은 각각 C₂-C₇ 아실이다.[0115] 일부 구현예에서는, 상기 화합물이 CRX-526, 즉 화학식 I에서 n이 1이고; X₁ 및 X₂는 각각 0이며; R₁, R₂, 및 R₃은 각각 -C(=O)(CH₂)₄CH₃이며; R₄는 -C(=O)OH이고; R₅, R₆, 및 R₇은 각각 -(CH₂)₁₀CH₃인 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염이다.

[0116] 본 명세서에 개시되는 방법의 세포는 임의의 적합한 세포일 수 있다. 적합한 세포로는 골아세포, 파골세포, 연골세포, 지방세포, 섬유아세포, 내피 세포, 상피 세포, 중간엽 세포, 조혈 세포, 감각 세포, 내분비선 및 외분비선 세포, 신경교 세포, 뉴런 세포, 회돌기교세포, 혈액 세포, 장 세포, 뇌 세포, 심장 세포, 폐 세포, 간 세포, 신장 세포, 근육 세포 및 췌장 세포를 들 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 진핵 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 인간 세포이다.

[0117] 일부 구현예에서, 세포는 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 내피 세포 투과성의 조절에 관한 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 내피 세포 투과성을 조절하는 방법으로서, 내피 세포를 화학식 I의 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 세포 투과성의 조절은 접촉된 세포를 둘러싸는 간질액 (및/또는 폐포액)의 정상 수준의 유지 또는 간질액 (및/또는 폐포액)의 감소를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 투과성의 조절은 질병 또는 현상 (예컨대, 감염 또는 허혈-재판류 손상)으로부터 초래되었을 간질액 또는 폐포액의 증가를 예방한다.

[0118] 일부 구현예에서, 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법은 세포와 이를 둘러싸는 하나 이상의 추가 세포 사이에 세포간 갭 형성을 예방 또는 경감한다.

[0119] 액틴 세포 골격 재배열은 폐 부종 또는 다른 기관에서의 부종을 포함하는 부종과 관련될 수 있다. 부종은

염증, 감염, 외상 (예컨대, 수술의), 독소의 흡입, 순환성 질환 또는 높은 고도에의 노출과 관련될 수 있다. 일부 구현예에서, 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 증가된 내피 투과성을 특징으로 하는 상태와 관련되어 있는 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 예방 또는 경감하고자 하는 부종은 기관 이식, 폐의 색전 제거술 (폐동맥으로부터 응고된 혈액의 제거) 또는 폐의 혈전내 막적출술 (폐의 맥관 구조로부터 기관화된 혈병 및 피브린의 외과적 제거) 중에서와 같이 허혈-재관류와 관련된다.

[0120] 일부 구현예에서, 세포는 모의 또는 예측 허혈 또는 허혈-재관류 현상 (기관 이식, 조직 이식, 심장 정지, 지혈대의 적용을 위한 조직의 제거) 이전에 유효량의 화학식 I의 화합물과 접촉시켜, 허혈 또는 후속 재관류 중의 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감한다. 일부 구현예에서는, 세포는 허혈 중에 화학식 I의 화합물과 접촉시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 허혈의 임의의 간격 이후 (예컨대, 재관류 중에) 화학식 I의 화합물과 접촉시킬 수 있다.

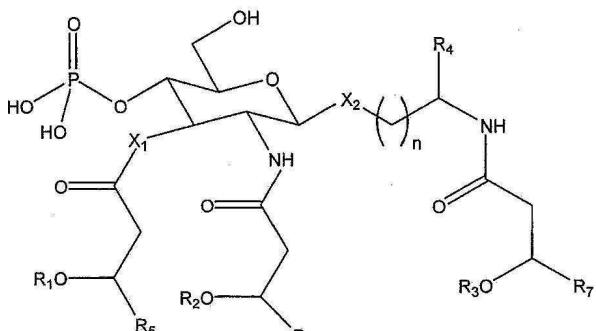
[0121] 일부 구현예에서, 허혈-재관류 현상은 심근경색 또는 발작에 관계된다. 일부 구현예에서, 허혈-재관류 현상은 심장 수술 중의 심장 정지 (즉, 심장 활동이 의도적으로 정지될 때)와, 또는 정형외과 수술 (예컨대, 외과 분야에서 지혈대를 팔다리에 부착하여 출혈을 감소시킬 때)로부터 초래되는 골격근에서의 허혈과 관련된다.

[0122] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 세포가 생체 내에 존재하지 않는, 시험관내 또는 생체외 방법에 관한 것이다. 예컨대, 세포는 세포 배양액에 또는 생체외 조직 또는 기관에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서는, 그러한 시험관내 또는 생체외 방법을 사용하여 화합물이 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 상대적인 능력을 측정하거나, 특정 세포 유형에서 특정 화합물의 투여량을 측정할 수 있다. 일부 구현예에서는, 생체외 방법을 사용하여 이식 목적의 조직 또는 기관에 존재하는 세포를 치료할 수 있다.

V. 환자의 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법

[0124] 일부 구현예에서, 세포는 살아있는 유기체 내에 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시되는 주제는 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염을 환자에게 투여하는 것을 포함한다:

화학식 I



[0126]

상기 식에서,

[0127] n은 1 내지 6의 정수이고;

[0128] X₁은 O 또는 S이며;

[0129] X₂는 O 또는 S이고;

[0130] R₁, R₂, 및 R₃은 독립적으로 C₂-C₁₆ 아실이며;

[0131] R₄는 H, 히드록시알킬, -C(=O)NH₂, 및 -(CH₂)_mC(=O)OH로 구성되는 군에서 선택되며, 여기서, m은 0 내지 2의 정수이고;

[0132] R₅, R₆, 및 R₇은 독립적으로 C₁₀-C₁₂ 알킬이다.

[0133] 일부 구현예에서, R₁, R₂, 및 R₃ 중의 적어도 하나는 -C(=O)R₈인데, 여기서, R₈은 C₅ 직쇄의 완전 포화된 알킬이

다. 일부 구현예에서는, R₅, R₆, 및 R₇은 각각 C₁₀-C₁₂ 칙쇄의 완전 포화된 알킬이다.

[0135] 일부 구현예에서는, n이 1이다. 일부 구현예에서는, X₁ 및 X₂는 각각 0이다. 일부 구현예에서, R₄는 -C(=O)OH이다. 일부 구현예에서, R₁, R₂, 및 R₃은 각각 C₂-C₇ 아실이다.

[0136] 일부 구현예에서는, 상기 화합물이 CRX-526, 즉 화학식 I에서 n이 1이고; X₁ 및 X₂는 각각 0이며; R₁, R₂, 및 R₃은 각각 -C(=O)(CH₂)₄CH₃이며; R₄는 -C(=O)OH이고; R₅, R₆, 및 R₇은 각각 -(CH₂)₁₀CH₃인 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적 허용염이다.

[0137] 일부 구현예에서, 환자의 하나 이상의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열을 예방 또는 경감하는 것은 환자에게서 증가된 액틴 세포 골격 재배열과 관련된 질병 또는 상태, 또는 그 증상을 예방 또는 완화한다. 상기 질병 또는 상태는 부종을 특징으로 하는 임의의 질병 또는 상태일 수 있다. 일부 구현예에서, 부종은 증가된 상피 세포 투과성과 관련된다. 예컨대, 상기 질병 또는 상태는 ARDS 또는 SIRS이다.

[0138] 일부 구현예에서, 상기 질병 또는 상태는 IRI와 관련이 있다. 따라서, 상기 질병 또는 상태는 기관 또는 조직 이식 (이종기관이식 또는 자가이식을 포함), 심장 정지, 심근경색, 발작, 선택적 정형외과 수술, 문맥혈차단술 (Pringle maneuver)을 포함한 간 수술, 또는 혈류가 조직으로 제한되는 기타 수술과 관계된 IRI와 관련될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 상태는 폐 이식과 관계된 IRI와 관련될 수 있다.

[0139] 화학식 I의 화합물의 투여는 임의의 적합한 경로 (즉, 경구, 정맥내, 비경구, 기도 등)를 통해 이루어질 수 있다. 접촉은 허혈성 현상 전에, 허혈 중에 또는 허혈의 임의의 간격 이후 (예컨대, 재판류 중에) 일어날 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서, 환자는 포유동물이다. 일부 구현예에서, 환자는 인간이다. 일부 구현예에서, 세포(들)는 신장 또는 그 일부, 간 또는 그 일부, 심장 또는 그 일부, 망막, 췌장 또는 그 일부, 장 또는 그 일부, 뇌 조직, 골격근, 또는 폐 또는 그 일부 (이에 국한하지 않음)를 포함하는 군에서 선택되는 기관 또는 조직에 존재한다.

VI. 약학 조성물

[0142] 본 명세서에서, "활성 화합물"이란 용어는 세포 골격 재배열 및/또는 세포간 갭 형성을 억제할 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. 구체적으로, 이 용어는 화학식 I의 화합물 및 그 염을 의미한다. 활성 화합물은 세포에 접촉시키거나 임의의 적합한 방법을 통해 환자에 투여할 수 있다. 본 명세서에서, "유효량"이란 용어는 다양한 병리학적 상태 및 후유증을 억제 또는 예방할 수 있는 활성 화합물(들)의 양을 의미한다. "억제하다" 또는 "억제하는"이란 용어는 병리학적 상태, 예컨대, 증가된 세포 골격 재배열에 관련된 질병 또는 상태에 대한 위험 하에 있는 환자의 조직 손상 (예컨대, 폐 조직 손상)으로부터 초래되거나 관련된 상태의 진행을 금지, 예방, 치료, 완화, 개선, 정지, 제한, 경감, 서행 또는 역전시키거나 또는 그 심도를 경감하는 것을 의미한다. 본 명세서에 개시되는, 활성 화합물을 투여하는 방법은 적절한 약물 치료 (급성) 및/또는 예방적 (예방) 투여를 포함한다.

[0143] 투여되는 활성 화합물의 양 및 시기는 물론 치료되는 환자, 질병의 심도, 투여의 방식 및 처방 의사의 판단에 좌우될 수 있다. 따라서, 환자에 따른 변이성으로 인해, 이하에 제시되는 투여량은 하나의 가이드라인이며, 의사는 화합물의 용량을 적정하여 의사가 환자에게 적합하다고 고려하는 치료를 달성할 수 있다. 의도하는 치료의 정도를 고려함에 있어서, 의사은 환자의 나이, 기존 질병의 존재 및 기타 질병의 존재와 같은 다양한 인자를 고려할 수 있다. 약학 제제는 이하에 상세히 논의하는 바와 같이 경구, 정맥내 또는 에어로졸 투여용으로 제조될 수 있다.

[0144] 본 명세서에 기재된 구현예의 범위 내에서 사용되는 임의의 특정 활성 화합물의 치료학적 유효 투여량은 화합물마다 및 환자마다 다소 다를 수 있으며, 환자의 상태 및 투약 경로에 의해 좌우될 수 있다. 일반적인 가정으로서, 모든 중량을 염이 이용되는 경우를 포함하여 활성 화합물의 중량을 기준으로 계산하여, 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 투여량이 치료적 효능을 가질 수 있다. 보다 더 높은 수준에서의 독성 우려는, 모든 중량을 염이 이용되는 경우를 포함하여 활성 염기의 중량을 기준으로 계산하여, 정맥내 투여량을 약 10 mg/kg까지와 같이 더 낮은 수준으로 제한할 수 있다. 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 투여량이 경구 투여에 이용될 수 있다. 통상, 약 0.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg의 투여량이 근육내 주사에 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 정맥내 또는 경구 투여를 위해 약 1 μmol/kg 내지 약 50 μmol/kg, 또는 선택적으로 약 22 μmol/kg 내지 약 33 μmol/kg의 화합물을 투여할 수 있다.

- [0145] 본 명세서에 기재한 시험관내 및 생체내 분석법은 화합물의 활성을 비교할 수 있는 방법을 제공한다. 이러한 비교의 결과는 액틴 세포 골격 재배열로부터의 보호를 유도하기 위해 인간을 비롯한 포유동물에서 투여량 수준을 결정하는 데에 유용하다. 그러한 분석법은 화학식 I의 화합물 및 기타 화합물의 활성의 비교치를 제공한다. 이러한 비교의 결과는 상기 투여 수준을 결정하는 데에 유용하다.
- [0146] 본 명세서에 개시되는 방법에 따르면, 본 명세서에 기재되는 약학적 활성 화합물은 고체 또는 액체로서 경구적으로 투여하거나, 액체, 혼탁액 또는 유제로서 근육내로, 정맥내로 또는 기도 (예컨대, 흡입에 의해)를 통해 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 화합물 또는 염은 리포좀 혼탁액으로서 흡입에 의해, 정맥내로 또는 근육내로 투여할 수 있다. 흡입을 통해 투여할 때 활성 화합물 또는 염은 입자 크기가 약 0.5 내지 약 5 미크론, 및 선택적으로 약 1 내지 약 2 미크론인 복수의 고체 입자 또는 액적 형태일 수 있다.
- [0147] 약학 제제는 임의의 약학적 허용 담체 내에 본 명세서에 기재된 활성 화합물 또는 그 약학적 허용염을 포함할 수 있다. 용액이 요구되는 경우, 수용성 화합물 또는 염과 관련하여 물이 선택되는 담체이다. 수용성 화합물 또는 염과 관련하여, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 또는 그 혼합물과 같은 유기 부형제가 적합할 수 있다. 후자의 예에서, 유기 부형제는 상당한 양의 물을 함유할 수 있다. 어느 경우의 용액은 그 후 당업자에게 공지된 적합한 방식으로 및 통상 0.22 미크론 필터를 통한 여과에 의해 멸균할 수 있다. 멸균의 후속으로, 용액은 발열원이 제거된 유리병과 같이 적합한 용기 내로 조제할 수 있다. 조제는 선택적으로 무균법에 의해 행해질 수 있다. 유리병 상에는 멸균된 마개를 막을 수 있고, 필요한 경우 유리병 내용물을 동결건조시킬 수도 있다.
- [0148] 활성 화합물 또는 그 염 (예컨대, 화학식 I의 화합물) 외에도, 약학 제제는 pH-조정 첨가제와 같은 기타 첨가제를 함유할 수 있다. 구체적으로, 유용한 pH-조정제로는 염산과 같은 산, 젖산나트륨, 초산나트륨, 인산나트륨, 구연산나트륨, 붕산나트륨 또는 글루콘산나트륨과 같은 염기 또는 완충제가 있다. 또한, 상기 제제는 항미생물 방부제를 함유할 수 있다. 유용한 항미생물 방부제로는 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 벤질 알코올이 있다. 항미생물 방부제는 통상 상기 제제가 다중 투여용으로 고안된 유리병에 보관될 때 이용된다. 본 명세서에 기재된 약학 제제는 당해 분야에 널리 알려진 기술을 사용하여 동결건조시킬 수 있다.
- [0149] 경구 투여를 위해, 약학 조성물은 용액, 혼탁액, 정제, 환제, 캡슐, 산제 등의 형태를 취할 수 있다. 구연산나트륨, 탄산칼슘 및 인산칼슘과 같은 다양한 부형제를 함유하는 정제는 폴리비닐피롤리돈, 슈크로스, 젤라틴 및 아카시아와 같은 결합제와 함께 전분 (예컨대, 감자 또는 타피오카 전분) 및 특정 복합 실리케이트와 같은 다양한 봉괴제와 함께 이용한다. 또한, 스테아르산마그네슘, 라우릴황산나트륨 및 활석과 같은 윤활제는 정제화 목적으로 종종 매우 유용하다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 연질 및 경질로 채워진 젤라틴 캡슐내 충전제로서 이용하기도 한다. 이와 관련한 재료로는 또한 락토스 또는 유당 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜도 있다. 수성 혼탁액 및/또는 엘릭시르를 경구 투여용으로 요구될 경우, 본 명세서에 개시된 주제의 화합물은 다양한 감미제, 방향제, 찹색제, 유화제 및/또는 혼탁제, 그리고 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 글리세린 및 그 다양한 유사 조합물과 함께 배합될 수 있다.
- [0150] 본 명세서에 기재된 주제의 또 다른 구현예에서는, 본 명세서에 기재된 활성 화합물 또는 그 염을 밀봉 용기 내의 단위 투여 형태로 포함하는 주사 가능하고 안정한 멸균 제제가 제공된다. 상기 화합물 또는 염은 환자에게 주사하기에 적합한 액체 제제를 형성하기 위해 적합한 약학적 허용 담체와 재구성될 수 있는 동결건조물의 형태로 제공된다. 상기 화합물 또는 염은 실질적으로 수불용성일 때 생리학적으로 허용가능한 충분한 양의 유화제를 충분한 양으로 이용하여 수성 담체 중의 화합물 또는 염을 유화시킬 수 있다. 특히 유용한 유화제로는 포스파티딜 콜린 및 레시틴이 있다.
- [0151] 본 명세서에 제공된 추가의 구현예로는 본 명세서에 개시된 활성 화합물의 리포좀 제제가 있다. 리포좀 혼탁액을 형성하는 기술은 당해 분야에 널리 알려져 있다. 화합물이 전통적인 리포좀 기술을 사용하는 수용성 염일 경우, 그것은 지질 소포 내로 도입시킬 수 있다. 그러한 경우에는, 활성 화합물의 수 용해도로 인해, 활성 화합물은 리포좀의 친수성 중심 또는 핵 내에 실질적으로 혼입될 수 있다. 이용되는 지질층은 임의의 전통적인 조성물일 수 있고, 콜레스테롤을 함유하거나 콜레스테롤이 부재할 수 있다. 당해 활성 화합물이 다시 전통적인 리포좀 형성 기술을 이용하여 수불용성일 경우, 상기 염은 리포좀의 구조를 형성하는 소수성 지질 이중층 내에 실질적으로 혼입될 수 있다. 어느 경우에도, 생성되는 리포좀은 표준 초음파 분해 및 균질화 기술을 사용하여 크기를 감소시킬 수 있다. 본 명세서에 개시되는 활성 화합물을 포함하는 리포좀 제제는 동결건조시켜 동결건조물을 생성시킬 수 있고, 이것은 물과 같은 약학적 허용 담체와 재구성시켜 리포좀 혼탁액을 재생시킬 수 있다.

- [0152] 약학 제제는 흡입에 의한 에어러졸로서 투여하기에 적합한 것이 제공되기도 한다. 이러한 제제는 본 명세서에 기재된 목적 화합물 또는 그 염의 용액 또는 혼탁액이나, 이 화합물 또는 염의 복수의 고체 입자를 포함한다. 목적하는 제제는 소형 챔버에 넣고 분무할 수 있다. 분무는 압축 공기에 의해 또는 초음파 에너지에 의해 수행하여 상기 화합물 또는 염을 포함하는 복수의 액적 또는 고체 입자를 형성할 수 있다. 액적 또는 고체 입자는 약 0.5 내지 약 10 미크론, 및 선택적으로 약 0.5 내지 약 5 미크론 범위의 입자 크기를 가질 수 있다. 고체 입자는 미세화와 같이 당해 분야에 공지된 적합한 방식으로 고체 화합물 또는 그 염을 가공하여 얻을 수 있다. 선택적으로, 고체 입자 또는 소적의 크기는 약 1 내지 약 2 미크론일 수 있다. 이와 관련하여, 상업적 분무기가 상기 목적을 달성하는 데 이용될 수 있다. 상기 화합물은 그 개시 내용이 전적으로 본 명세서에 참고로 인용되는 미국 특허 제5,628,984호에 제시된 방식으로 호흡 가능한 입자의 에어러졸 혼탁액을 통해 투여될 수 있다.
- [0153] 에어러졸로서 투여하기에 적합한 약학 제제가 액체 형태일 경우, 제제는 물을 포함하는 담체에 수용성 활성 화합물을 포함할 수 있다. 분무화에 적용될 때 희망하는 크기 범위 내의 소적 형태를 생성할 만큼 충분히 제제의 표면장력을 낮추는 계면활성제가 존재할 수 있다.
- [0154] 언급된 대로 수용성 및 수불용성 활성 화합물이 둘다 제공된다. 본 명세서에 사용되는 대로, "수용성"이란 용어는 약 50 mg/ml 이상의 양의 물에 용해될 수 있는 임의의 조성물을 규정하는 것을 의미한다. 또한, 본 명세서에 사용되는 대로, "수불용성"이란 용어는 약 20 mg/ml 미만의 물에서 용해도를 갖는 임의의 조성물을 규정하는 것을 의미한다. 일부 구현예에서는 수용성 화합물 또는 염이 바람직한 반면에, 다른 구현예에서는 수불용성 화합물 또는 염 역시 바람직할 수 있다.
- [0155] 투여의 한 가지 방식에서, 본 명세서에 개시된 주제의 화합물들은 수술 직전에 (예컨대, 심장 수술 또는 이식 수술 같은 수술 전 24 시간 내에) 및/또는 허혈의 위협이 있는 수술 후에 (예컨대, 수술후 24 시간 내에) 투여 할 수 있다. 또 다른 투여 방식에서, 상기 화합물은 수술 전의 초기 적재 용량 (예컨대, 거환 주사 또는 주입)에 이어서, 수술 전, 수술 중 및 수술 후의 일정 주입으로 투여한다. 활성 화합물은 또한 만성 일일 방식으로 투여할 수도 있다.
- [0156] 다양한 약학 조성물의 제조 방법 및 활성 성분의 특정한 양은 알려져 있거나, 당해 분야에서 숙련된 자에게는 본 개시 내용을 고려하여 결정될 수 있다. 약학 조성물의 제조 방법의 예의 경우, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 16th Edition (1980)] 참조. 본 명세서에 개시된 주제에 따른 약학 조성물은 예컨대, 활성 화합물(들)을 0.0001 % 내지 95% 함유할 수 있다. 어떤 경우에도, 투여될 조성물 또는 제제는 치료 대상 환자의 질병/상태를 치료하기에 효과적인 양으로 활성 화합물(들)을 함유할 수 있다.
- [0157] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 주제의 방법을 사용하여 체외 조직 또는 기관에서 또는 한 조직 또는 기관 공여자로부터 이식 수용자로 이식되는 조직 또는 기관에서 액틴 세포 골격 재배열 및/또는 세포간 갭 형성을 예방 또는 경감할 수 있다. 체외 조직 또는 기관은 개인에 속하지 않은 ("생체외"란 용어를 쓰기도 함) 조직 또는 기관이다. 조직 및 기관 이식의 경우, 제거되는 공여 조직 및 기관은 채집 중에, 수송 중에 및 수용자에게 이식 후에 재관류 손상에도 민감하다. 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 이식 조직 또는 기관의 생존능을 예컨대, 이식 가능 조직 또는 기관을 유지 또는 보존하는 데 사용된 용액을 보충함으로써 증가시킬 수 있다. 예컨대, 상기 방법 및 조성물을 사용하여 수송 중의 이식 가능 조직 또는 기관을 세척하거나, 상기 방법 및 조성물을 이식 전, 이식 중 또는 이식 후에 이식 가능 조직 또는 기관과 접촉시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 주제의 제제를 조직 또는 기관이 공여자에 존재하는 동안 조직 또는 기관과 접촉시킬 수 있다.
- [0158] 본 명세서에 개시된 주제의 용액은 관류 장치 (예컨대, 생체외 관류 회로)에 사용할 수 있다. 본 명세서에 사용된 관류 장치는 특정 기관을 주입하거나 화합물 또는 조성물을 포함하는 용액으로 전신 순환하는 데 사용되는 임의의 기계 장치이다. 그러한 장치는 하나 이상의 저장소를 보유할 수 있다. 상기 장치는 기관, 정맥 또는 동맥 내로 삽입될 수 있는 저장소로부터 유도되는 튜브, 카테테르 또는 카뉼라를 포함할 수 있다. 상기 장치는 용액의 전달 온도, 속도 또는 부피를 제어하기 위한 전기 펌프 및 장치를 구비한 전기기계 장치일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 장치는 하나 이상의 용액이 적합한 온도, 구체적인 임상적 상황에 대한 속도 또는 부피, 기관의 중량, 또는 기관의 크기로 전달되도록 프로그래밍할 수 있다 (예컨대, 심폐 우회 수술 대 신장 이식 대간 이식).
- [0159] VII. 환자

[0160] 일부 구현예에서는, 본 명세서에 기재된 방법은 "환자 (subject)"라는 용어에 포함시키고자 하는 모든 척추동물 종과 관련하여 유효한 것으로 이해되지만, 본 명세서에 개시된 주제에서 치료되는 환자는 인간 환자가 바람직하다. 본 명세서에 기재된 방법은 특히 온혈 척추동물의 세포에서 액틴 세포 골격 재배열의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 따라서, 상기 방법은 포유동물 및 조류의 치료에 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법의 환자는 기관 이식 수용자이다.

[0161] 보다 구체적으로, 본 명세서에는 인간뿐만 아니라, 멸종 위기로 인해 중요한 포유동물 (예컨대, 시베리아 호랑이), 경제적으로 중요한 포유동물 (인간 소비용으로 농장에서 길러지는 동물) 및/또는 인간에게 사회적으로 중요한 포유동물 (애완동물로 또는 동물원에서 보호되는 동물), 예컨대, 인간 이외의 육식동물 (예컨대, 고양이와 개), 돼지류 (돼지, 사육돼지 및 맷돼지), 반추동물 (예컨대, 소, 황소, 양, 기린, 사슴, 염소, 들소 및 낙타), 및 말과 같은 포유동물의 치료 방법이 제시된다. 본 명세서에는 조류의 치료 방법 역시 제시되는데, 예컨대, 멸종 위기에 있고 동물원에서 또는 애완동물로서 보호되는 종류의 조류뿐만 아니라 가금류, 및 더 구체적으로 집에서 키우는 가금류, 즉 칠면조, 병아리, 오리, 거위, 뿔닭 등과 같은 가금류의 치료 방법 역시 인간에게 경제적으로 중요성이 있기 때문에 제시된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 방법의 구현예로는 집돼지 (돼지 및 사육돼지), 반추동물, 말, 가금류 등 (이에 국한되지 않음)을 포함하는 가축의 치료 방법을 포함한다.

[0162] 실시예

[0163] 하기 실시예는 예시적인 구현예를 제시한다. 본 개시 사항 및 당해 분야의 일반적인 숙련도를 고려하면, 당업자는 하기 실시예들이 단지 예시 목적이며, 다양한 변형, 개조 및 변경이 본 명세서에 개시된 주제의 범위를 벗어남이 없이 이용될 수 있다는 것을 이해할 수 있다.

[0164] 실시예 1. 일반 방법

[0165] 온 폐 IRI의 세포 배양 모델

[0166] 허혈 모델에 대해 100% 산소 중의 영양분 고갈을 이용하는 IRI의 시험관내 정상 체온 (37°C) 모델이 밀봉된 플렉시글라스[®] 용기 중의 배양 접시에 새로운 배지를 공급함으로써 만들어진 재판류 모델과 함께 개발되었다. 5% CO_2 로 습윤화된 인큐베이터에서 37°C 로 클로네텍스[®] EGM-2MV 불릿키즈[®] (미국 매릴랜드 워커스빌 소재의 캠브렉스 바이오 사이언스) 내에서 유지된 인간 폐의 미세혈관 내피 세포 (HMVECs) (미국 매릴랜드 워커스빌 소재의 캠브렉스 바이오 사이언스)를 콜라겐 피복된 30 μm 직경의 유리 바닥 접시 커버슬립 (미국 매사추세츠 애쉬랜드 소재의 마텍 코퍼레이션) 상에 2000 세포/ cm^2 로 파종하고 100% 융합될 때까지 증식시켰다. 37°C 에서 배양 접시를 수용하는 밀봉된 플렉시글라스[®] 용기를 95% O_2 /5% CO_2 로 통기시켰다. 온 허혈 (WI) 모델을 만들기 위해, 세포 배지를 2 mL 의 영양분이 고갈되고 발열원이 없는 임상 등급의 링거 락테이트로 갑자기 대체하였다. 접시들을 WI 1 시간 전에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CRX-526 (미국 미네소타 둘루스 소재의 글락소스미스클라인) 또는 부형제 (2% 글리세린)으로 사전 처리하였다. 배지가 교체될 때마다 CRX-526 또는 부형제를 첨가하였다. 모의 WI의 1 시간 후에, 링거 락테이트를 EGM2-MV 발열원이 없는 배지로 대체하여, 방 공기 중에서 챔버를 5% CO_2 로 통기시키면서 재판류를 가장하였다. WI 및 재판류 중에 접시들을 3회 제거하고, 팔로이딘 염색을 위해 4% 파라포름알데히드 중에 즉시 고정시켰다. 습윤화된 5% CO_2 인큐베이터에서 37°C 의 EGM2-MV 배지에 억제제 또는 부형제와 함께 유지된 세포들을 대조군으로 이용하였다. 배지를 실험 접시에서 교체함과 동시에 배양 배지를 교체하였다. 밀봉된 입구를 통해 삽입된 프로브는 피코레코디드 소프트웨어 (영국 세인트 네오츠 소재의 피코테크놀로지)에 의해 출력 데이터를 기록하는 전압계를 사용하여 플렉시글라스[®] 박스에서 대표 접시 중의 온도 및 pH를 연속적으로 기록하였다.

[0167] 팔로이딘 염색 및 이미지 분석

[0168] HMVEC를 실온에서 10분 동안 4% 파라포름알데히드에 고정시키고, PBS로 3회 세척하였다. 세포들을 1% BSA 및 0.05% 트윈-20이 있는 PBS 중에서 알렉사플로르[®] 568 팔로이딘 (미국 캘리포니아 칼스배드 소재의 인비트로젠)의 1/100 희석액으로 1 시간 동안 항온처리했다. F-액틴에 대해 염색한 커버슬립을 즉시 20X 및 40X 배율의 레이카 DMIRB 역전된 형광/DIC 현미경 (미국 일리노이 바녹번 소재의 레이카 마이크로시스템스 인코포레이티드)으로 검사하여 세포 모양의 변화 및 F-액틴 세포 골격을 평가하였다. 각각의 접시에 대해, 코닥 (미국 뉴욕 로체스터) 디지털 카메라로 40X로 접시 중앙 근처에 인접한 시야에 대해 동일한 노출 시간에 3개의 사진을 찍었다. 마스크를 쓴 관찰자는 각각의 세포의 액틴 스트레스 섬유 패턴을 정상 또는 비정상으로 평가하였다. 캡

면적의 정량 분석은 메타모프® 소프트웨어 (미국 캘리포니아 서니베일 소재의 MDS 애널리티컬 테크놀로지스 인코포레이티드)를 사용하여 실행하였다.

[0169] 세포 배양 실험에 대한 생존능의 측정

3회 실행된 별개의 실험에서, P35 접시 상에 융합 증식된 HMVEC는 모의 IRI를 경험하였다. 동일한 시점에, 세포 및 세포 배양 배지 또는 링거 락테이트는 제조자의 지시를 따라 시토톡스96 비방사성 세포독성 분석법 (미국 위스콘신 매디슨 소재의 프로메가)을 사용하여 락테이트 디히드로게나제 (LDH) 활성에 대해 평가하였다. 대조군 샘플을 역시 0 시간 및 24 시간에 취하여 실험 모델과는 별도로 세포 생존능을 평가하였다. 배양 배지 및 링거 락테이트를 배경 대조군으로 사용하여 다른 샘플로부터 흡광도 수치를 정규화하였다. 세포 독성은 배지 LDH 활성을 총 LDH 활성 (세포 펠릿 + 배지)으로 나누어서 계산하였다. 생존능은 역수이고, 각각의 시점에서의 생존능 비율로서 표현하였다.

[0171] 통계 분석

모든 데이터는 평균 ± SEM으로 보고한다. 그룹은 스타티스틱® (미국 오클라호마 털사 소재의 스탯소프트 인코포레이티드)를 사용하는 튜키의 사후 검증법과 함께 아노바에 의해 또는 짹비교 t 검정 또는 독립표본 t 검정에 의해 비교하였다.

[0173] 실시예 2. CRX-526에 의해 예방된 내피 단일층에서의 모의 온 허혈 관련 액틴 세포 골격 재배열 및 캡의 형성

허혈의 시험관내 모델을 사용하여 폐의 미세 혈관 내피 세포에 집중하면서 세포 골격 재배열의 억제를 실험하였다. 종래의 허혈 관련 연구는 변화된 폐 상피액 제거 역시 폐 부종의 원인이 될 수 있지만, 내피 기능 장애 때문이었던 [문헌 [Jones 등, *J. Appl. Physiol.*, 83, 247- 252 (1997)] 참조] 허혈 1 시간 후의 쥐 폐의 크게 증가된 여과 계수 및 W/D를 입증하였다. 문헌 [Matthay 등, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(3), 206-213 (2005)] 참조. 기타 종래의 연구는 IRI의 세포 배양 모델에서 저산소증-재산소화를 이용하였다. 문헌 [Powell and Jackson, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 285(1), L189-198 (2003); 및 Zhang 등, *J. Biol. Chem.*, 278(2), 1248-1258 (2003)] 참조. 그러나, pH 6.8로의 폐의 산성화가 현저한 저산소증 없이 심장마비 1 시간 후에 37°C에서 제자리에 남겨진 쥐의 폐에서 관찰되었다. 문헌 [Koukoulis 등, *J. Heart Lung Transplant*, 24(12), 2218-2225 (2005)] 참조. 따라서, 저산소증은 폐 허혈, 특히 100% 산소로 팽창된 폐에서의 허혈의 일반적인 특징인 것으로는 보이지 않는다. 그러므로, 본 명세서에 개시된 시험관내 모델은 영양분 고갈 및 산성화의 전개가 생체내에서 더 점진적일 것이지만, 생체내 현상을 정확히 반영하는 것으로 여겨진다.

실시예 1에 기재하는 바와 같이, 통합 커버 슬립이 있는 P30 접시 상에 융합 증식된 HMVEC를 95% O₂/5% CO₂로 통기된 1 µg/ml의 CRX-526 또는 부형제와 함께 항온배양하였다. 배지를 온(37°C) 링거 락테이트로 교체하고, 100% O₂로 통기하여 온 허혈을 가장하였다. 1 시간 후에, 링거 락테이트를 온 세포 배양 배지로 교체하고, 챔버를 95% 방 공기/5% CO₂로 통기하여 재관류를 가장하였다. 모의 온 허혈 중에, 액틴 스트레스 섬유는 내피 단일층에서의 캡 형성 (도 1A에서 흰색 화살표 참조)과 관련된 세포에서 사라지거나 또는 더 주변적으로 되었다 (도 1A에서 음영이 있는 화살표 참조). 모의 재관류 4 시간 후에 (240 min rep) 및 모의 재관류 24 시간 후 (도시하지 않음)에, 단일층은 융합되고 액틴 세포 골격 패턴은 대조군과 유사하였다.

CRX-526의 존재 하에, 단일층 캡 면적은 허혈 중에 크게 감소되었고, 단일층은 모의 재관류 후에 더 신속히 다시 융합되었다. 도 1B 참조. 변화된 액틴 세포 골격을 가진 세포의 비율은 또한 CRX-526에 의해 단일층에서 감소되었다. 도 1C에 나타낸 바와 같이, 약 40%의 세포들이 새로운 대조군 접시에서 액틴 세포 골격의 일정 정도의 주변 지향성을 가진다. 액틴의 주변 지향성은 부형제에 노출된 단일층과 비교하여, WI 60분후 및 모의 재관류 (rep) 15분후 CRX-526의 존재하에 크게 감소되었다. LDH 분석법으로 정량분석되는 세포 생존능은 모든 시점에서 대조군 및 치료군에서 동등하였다.

배지를 링거 락테이트로 교체하면 pH의 급격한 강하, 즉 7.2로부터 6.5로의 강하가 초래되는데, 이는 배지를 교체할 때 역전된다. 내피 세포 단일층에서의 캡 형성이 pH의 변화만으로 인한 것인지를 처리하기 위해, 챔버를 10% CO₂ (pH 6.8)로 통기시키거나 또는 HCl의 첨가에 의해 배지의 pH를 100% O₂로 통기시킬 때는 6.5로 또는 5% CO₂로 통기시킬 때는 5.6으로 감소시킴으로써, 세포 배양 배지의 pH를 1 시간 동안 변화시키는 실험을 실시하였다. 변화된 배지를 1 시간 후에 정상 배지로 교체하여 pH를 갑자기 회복하였다. 단일층의 본래 상태의 변화는 pH만을 변화시켰을 때는 나타나지 않았다.

[0178] 실시예 3. 모의 냉 IRI

[0179] 상기 실시예 2에서 기재한 바와 같이 모의 온 IRI에 적용된 HMVEC에서 액틴 세포 골격 재배열 및 캡 형성에 대한 CRX-526의 현저한 효과를 고려하여, CRX-526의 효과를 냉 IRI의 모의 모델에서도 연구하였다. 도 2A는 온 세포 배양 배지를 세계에서 가장 통상적으로 이용되는 폐 보존액인 냉 퍼파텍스™ (스웨덴 킹스배커의 비트로파일)로 교체할 때의 HMVEC에 미치는 효과를 도시한 것이다. 세포 배양 접시가 4°C의 온도에 이르기까지 약 1 시간이 걸리며, 따라서, 도 2A에서 냉 허혈 (CI)의 4 시간 후의 세포들의 사진은 온 배지를 냉 퍼파텍스™ (스웨덴 킹스배커의 비트로파일) 또는 배지로 교체한 지 5 시간 후의 세포들의 외관을 나타낸다. 액틴 세포 골격이 모든 접시에서 흐트러질 때, 캡은 CRX-526 처리된 세포에 훨씬 덜 명백하다. 도 2B 참조.

[0180] 본 명세서에 개시된 주제의 다양한 상세가 본 명세서에 개시된 주제의 범위를 이탈하지 않고 변형될 수 있다는 것은 이해될 것이다. 또한, 상기의 설명은 단지 예시하기 위한 것일 뿐이며, 한정하기 위한 것이 아니다.

도면

도면1a

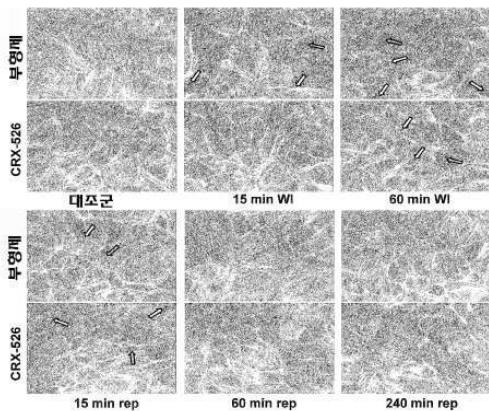
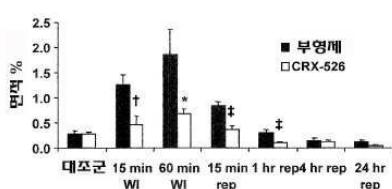


Figure 1A

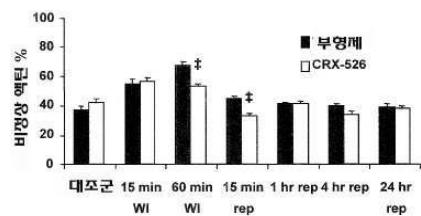
도면1b

Figure 1B



도면1c

Figure 1C



도면2a

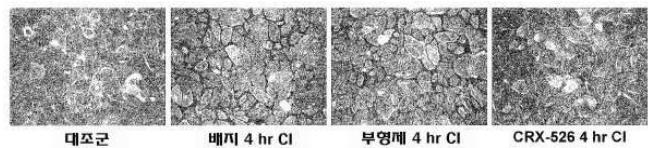


Figure 2A

도면2b

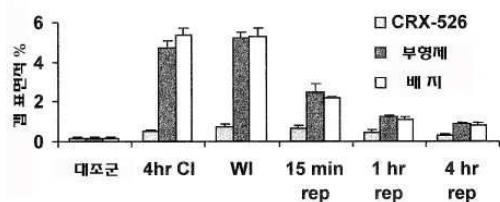


Figure 2B