(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0040384
(43) 공개일자 2007년04월16일

(21) 출원번호 10-2007-7002718
(22) 출원일자 2007년02월02일
심사청구일자 없음
번역문 제출일자 2007년02월02일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/008369
국제출원일자 2005년08월02일
(87) 국제공개번호 WO 2006/013094
국제공개일자 2006년02월09일

(30) 우선권주장 60/598,700 2004년08월03일 미국(US)

(71) 출원인 노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

(72) 발명자 카메니쉬, 기안, 피.
스위스 체하-4125 리헨 하젤라인 73
그로스, 게르하르트
독일 79539 뢰라흐 마쿠스 플뤼게르 스트라쎄 6
오틴거, 이자벨
독일 79108 프라이부르크 바커스트라쎄 11아
바스무스, 다니엘
스위스 체하-4112 배트빌-플뤼 레벤스트라쎄 18

(74) 대리인 장수길
김영

전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 레닌 억제제의 생체이용률을 향상시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 치료가 필요한 포유동물, 특히 인간에게 레닌 억제제 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염 및 배출 단백질 억제제의 조합물을 병용 투여하는 것을 포함하는, 레닌 억제제, 바람직하게는 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체의 생체이용률을 향상시키는 방법을 제공한다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

치료를 필요로 하는 포유동물에게, 레닌 억제제와 배출 단백질 억제제의 조합물을 병용 투여하는 것을 포함하며, 레닌 억제제가 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인, 레닌 억제제의 생체이용률을 향상시키는 방법.

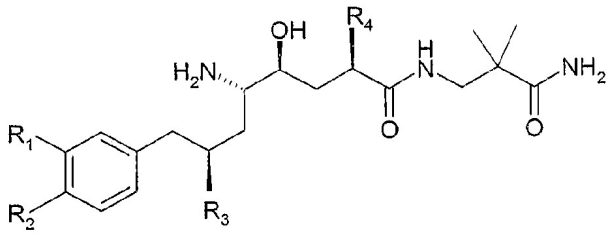
청구항 2.

제1항에 있어서, 배출 단백질 억제제가 MDR1 억제제인 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 화학식 I:

<화학식 I>



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 화합물; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 방법.

청구항 6.

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, MDR1 억제제가 PSC833인 방법.

청구항 7.

치료를 필요로 하는 포유동물에게, 레닌 억제제와 배출 단백질 억제제의 조합물을 병용 투여하는 것을 포함하며, 배출 단백질 억제제가 PSC833인, 레닌 억제제의 생체이용률을 향상시키는 방법.

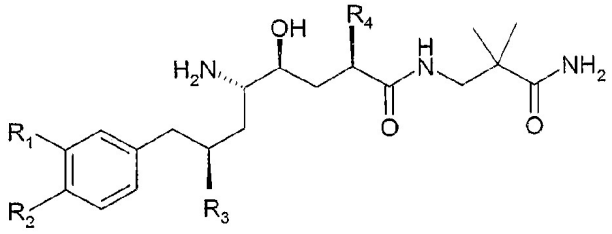
청구항 8.

제7항에 있어서, 레닌 억제제가 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 화학식 I:

<화학식 I>



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 화합물; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 방법.

청구항 12.

배출 단백질 억제제와 조합하여 치료 유효량의 레닌 억제제를 포함하며, 상기 배출 단백질 억제제가 투여 후에 레닌 억제제의 생체이용률이 5% 이상 향상되도록 하는 양으로 존재하고, 상기 레닌 억제제가 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 약제학적 조성물.

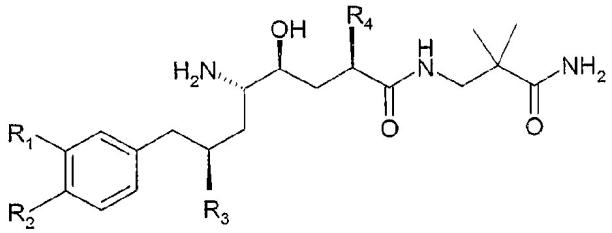
청구항 13.

제12항에 있어서, 배출 단백질 억제제가 MDR1 억제제인 약제학적 조성물.

청구항 14.

제12항 또는 제13항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 화학식 I:

<화학식 I>



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 화합물; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 약제학적 조성물.

청구항 15.

제14항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 약제학적 조성물.

청구항 16.

제15항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 약제학적 조성물.

청구항 17.

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, MDR1 억제제가 PSC833인 약제학적 조성물.

청구항 18.

배출 단백질 억제제와 조합하여 치료 유효량의 레닌 억제제를 포함하며, 상기 배출 단백질 억제제가 투여 후에 레닌 억제제의 생체이용률이 5% 이상 향상되도록 하는 양으로 존재하고, 상기 배출 단백질 억제제가 PSC833인 약제학적 조성물.

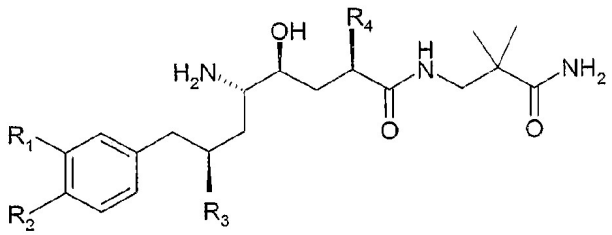
청구항 19.

제18항에 있어서, 레닌 억제제가 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 약제학적 조성물.

청구항 20.

제19항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 화학식 I:

<화학식 I>



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 화합물; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 약제학적 조성물.

청구항 21.

제20항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 약제학적 조성물.

청구항 22.

제21항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 약제학적 조성물.

청구항 23.

δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 레닌 억제제의 생체이용률을 향상시키는 의약품의 제조를 위한 배출 단백질 억제제의 용도.

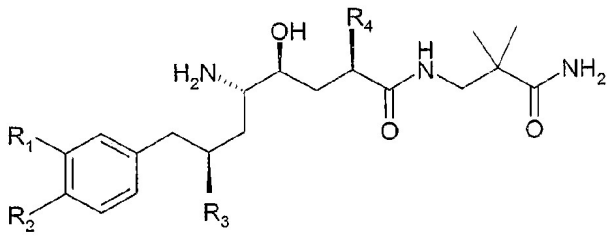
청구항 24.

제23항에 있어서, 배출 단백질 억제제가 MDR1 억제제인 용도.

청구항 25.

제23항 또는 제24항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 화학식 I:

<화학식 I>



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 화합물; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 용도.

청구항 26.

제25항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 용도.

청구항 27.

제26항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 용도.

청구항 28.

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, MDR1 억제제가 PSC833인 용도.

청구항 29.

레닌 억제제 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염의 생체이용률을 향상시키는 의약품의 제조를 위한, PSC833인 배출 단백질 억제제의 용도.

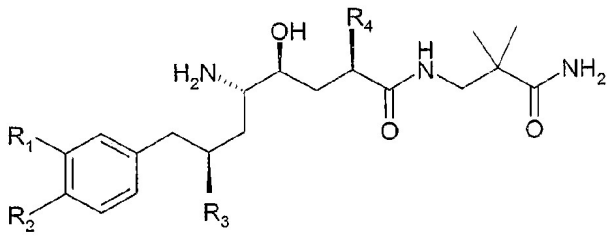
청구항 30.

제29항에 있어서, 레닌 억제제가 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 31.

제30항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 화학식 I:

<화학식 I>



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 화합물; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 32.

제31항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염인 방법.

청구항 33.

제32항에 있어서, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체가 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 방법.

명세서

배경기술

경구 경로는 종종 가장 편리한 약물 투여 경로이나, 안타깝게도 많은 치료제들이 생체이용률이 불량함에 따라 경구용으로 활성적이지 않다.

많은 치료제들의 생체이용률은 세포로부터 외래 물질을 능동적으로 배출하여 다약제내성 효과 등이 나타나게 하는, 소위 "배출 펌프" 단백질의 작용에 의해 저하될 수 있다. 이 약물 배출 단백질은 주로 MDR(다약제내성 단백질) 및 MRP(다약제내성 관련 단백질) 유형의 수송체를 포함한다. 가장 잘 연구된 배출 단백질들 중 일부에는 P-당단백질(Pgp 또는 MDR1) 및 MRP2가 포함된다.

막에 위치하는 배출 단백질이 반복되는 화학치료를 받았던 많은 암 환자들에게 일어나는 후천성 다약제내성 증후군에 기여하는 인자로서 공지되어 있으나, MDR1 등이 소장, 결장, 간 및 혈관 뇌 장벽 내의 내피 세포와 같은 정상 조직에서도 발견된다는 것은 최근에야 파악되었다. 위장(GI)관, 특히 소장 및 결장 내의 그러한 배출 단백질의 존재는 (항암제 빈블라스틴 및 독소루비신을 포함한) 많은 천연물 약물들의 불량한 생체이용률에 기여할 수 있다. 예를 들어, 경구 주입된 많은 화학치료제들은 불량한 생체이용률 및 GI 조직으로의 진입 불능으로 인해 항암 활성을 나타낼 수 없다. 또한, 간세포 내에 존재하는 배출 단백질은 담즙을 통한 제거에 의해 치료제의 생체이용률을 부가적으로 감소시킬 수 있다([Faber 등, *Adv. Drug Del. Rev.,* 55, 107-124, 2003] 참고).

경구 투여된 치료제는 표적 부위에 도달하기 전에 수가지 장벽을 극복해야 한다. 첫 번째 주요 직면 장애는 장 상피이다. 친지성 화합물은 첨부 원형질 막을 가로질러 용이하게 확산할 수 있으나, 그에 후속되는 기저측부 막을 가로질러 문맥 혈관으로의 통과는 결코 보장되지 않는다. ATP-결합 카세트(ABC) 계열의 각종 약물 수송체, 예컨대 MDR1, MRP1 및 MRP2와 같은 ABC 수송체를 포함하는, 첨막에 위치한 배출 펌프 단백질은 화합물을 세포 내부에서 소장강으로 다시 유도하여, 혈관으로 흡수되는 것을 방지함으로써 그것의 경구 생체이용률을 제한할 수 있다. 두 번째로 직면하는 주요 장애는, 약물이 수동적으로 또는 문맥 혈관에서부터 간세포 혈장(혈관) 막 및 담즙(세관) 막을 가로질러 담즙으로의 포화가능한 수송 공정에 의해 수송되는 간이다. ABC 계열의 각종 약물 수송체, 예컨대 MDR1, 유방암 내성 단백질(BCRP) 및 MRP2와

같은 ABC 수송체를 역시 포함하는, 세관 막에 위치한 배출 펌프 단백질은 약물 화합물을 간세포 내부에서 담즙으로 유도하여, 담관에서의 제거를 촉진함으로써 그것의 경구 생체이용률을 제한할 수 있다. 예를 들어, MDR1은 대부분의 HIV 프로테아제 억제제를 수송하고, 그것의 경구 생체이용률, 및 림프구, 뇌, 고환 및 태아 투과를 감소시켜, 이들 약물의 치료 효능에 대한 주요 제한 효과를 초래할 수도 있는 것으로 입증되었다.

그러므로, 생체이용률을 향상시키기 위한 한 접근법은, 약물 물질과 함께, 배출 단백질 억제제, 즉 배출 단백질의 기능을 억제하는 화합물을 병용 투여하는 것일 수 있다. 즉, 배출 단백질 억제제를, 역시 특정 배출 시스템에 대한 기질인 치료제와 함께 병용 투여하는 경우, 세포 내부로부터 소장강으로 되돌려 보내는 배출 기작의 억제 및/또는 담즙으로의 분비의 억제에 의해 치료제의 표적 부위에서의 경구 생체이용률 및/또는 약리학적 활성 농도가 증진될 수 있다.

그러나, 배출 단백질은 낮은 기질 특이성을 나타내고, 많은 종류의 분자들을 수송한다. 특이성은 엄밀히 이해되는 것은 아니며, 특정 약물이 특정 수송체 단백질에 대한 기질인지의 여부를 약물 물질의 분자 구조로부터 예측할 방법이 없다. 따라서, 일반적으로 특별한 약물 또는 화합물이 상기 논의된 배출 펌핑 작용에 적용될지의 여부를 예측할 수 없다. 또한, 특별한 약물이 낮은 경구 생체이용률을 가지는 경우, 일반적으로 낮은 생체이용률이 상기 논의된 배출 단백질에 의해 전적으로 또는 부분적으로 유발되는지의 여부를 예측할 수 없을 뿐만 아니라, 낮은 생체이용률이 배출 단백질 억제제의 병용 투여에 의해 증가될 수 있는지의 여부도 예측할 수 없다([Chan 등, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, 21, 25-51, 2004] 참고).

놀랍게도, 많은 레닌 억제제들, 예컨대 전체 내용이 본원에 참고로 인용되는 미국 특허 No. 5,559,111, No. 6,197,959 및 No. 6,376,672에 개시된 것들이 중요한 배출 시스템의 기질이고, ABC 계열의 구성원, 특히 MDR1 및 MRP2에 의해 능동적으로 수송된다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 따라서, 이 레닌 억제제의 생체이용률은 관련된 배출 기작을 억제함으로써, 특히 MDR1 및/또는 MRP2에 의한 약물 수송을 억제함으로써 향상될 수 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명이 적용되는 레닌 억제제는, 생체내 레닌 억제 활성을 가지고, 이에 따라 약제학적 유용성, 예컨대 고혈압증, 울혈성 심부전, 심비대증, 심장 섬유증, 경색후 심근병증, 당뇨로 인한 합병증, 예컨대 신장병증, 혈관병증 및 신경병증, 관상 혈관 질병, 혈광성형술 후의 재협착, 증강 안내압, 녹내장, 이상 혈관 성장, 고알도스테론증, 불안 상태 및 인지 장애의 치료를 위한 치료제로서의 유용성을 가지는 것들 중 임의의 것이다. 특히, 본 발명은 미국 특허 No. 5,559,111에 개시된 바와 같은 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 아미드 유도체에 관한 것이다.

따라서, 본 발명은 레닌 억제제와 배출 단백질 억제제의 조합물을 치료가 필요한 포유동물, 특히 인간에게 병용 투여하는 것을 포함하는, 레닌 억제제의 생체이용률, 바람직하게는 경구 생체이용률을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 배출 단백질 억제제는, 레닌 억제제의 생체이용률이 배출 단백질 억제제 부재 하에서 얻어진 생체이용률에 비해 향상(예컨대, 인간에게 경구 투여되는 때에는 10%)되도록 하는 양으로 투여된다. 배출 단백질 억제제 및 레닌 억제제는 바람직하게는 조합이 요망되는 치료 효과, 예컨대 항고혈압 효과를 가지도록 하는 양으로 각기 병용 투여된다.

특히, 본 발명은 치료가 필요한 포유동물, 특히 인간에게 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 배출 단백질 억제제의 조합물을 병용 투여하는 것을 포함하는, δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체의 생체이용률을 향상시키는 방법을 제공한다.

레닌 억제제, 특히 δ-아미노-γ-히드록시-co-아릴-알칸산 유도체와 배출 단백질 억제제의 조합의 "병용 투여"라는 용어는, 그 2개 성분이 약제학적 조성물로서, 또는 동일한 단일 투약 형태의 부분으로서 함께 투여될 수 있음을 의미한다. 병용 투여는 또한 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체와 배출 단백질 억제제를 분리하여, 단 동일한 치료 처방법의 부분으로서 투여하는 것을 포함한다. 그 2개 성분은 원하는 경우에 동시 투여될 수 있을지라도, 분리하여 투여되는 경우에는 반드시 본질적으로 동시에 투여될 필요는 없다. 따라서, 병용 투여는 예를 들어, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체 및 배출 단백질 억제제를 별개의 용량 또는 투약 형태로서, 단 동시에 투여하는 것을 포함한다. 병용 투여는 또한 상이한 시점에, 또한 임의의 순서로 분리 투여하는 것을 포함한다.

본 발명의 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염, 그것의 무수 형태 또는 수화물 또는 용매화물의 형태로 이용될 수 있다. 그러한 모든 형태들은 본 발명의 범주 내에서 유용하다.

본원에 사용되는 용어 "배출 단백질 억제제"는 임의의 ABC 수송체의 작용을 억제하는 임의의 화합물, 약제학적 또는 부형화합물, 예컨대 [Bakos 등 *Mol Pharmacol.*, 57, 760-768(2002) 및 Maarten 등 *AIDS*, 16, 2295-2301(2002)]에 기재된 것들을 가리킨다.

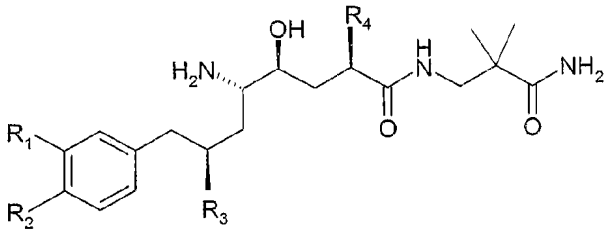
또한, 레닌 억제제의 생체이용률을 증진시키는 배출 단백질 억제제는 다양한 기작들 중 하나 이상에 의해 작동할 수 있음을 주목할 수 있다. 즉, 당업계에 공지되어 있는 바와 같이, 그것은 경쟁적 또는 비경쟁적 억제제일 수 있거나, 그것은 혼합 기작에 의해 작동할 수 있다. 그러한 억제제가 특정 레닌 억제제의 배출에 영향을 줄 수 있는지의 여부는 특히 레닌 억제제 및 배출 단백질 억제제의 상대적 친화도; 레닌 억제제 및 배출 단백질 억제제의 상대적 수용해도(이는, 그것들이 경쟁 상태에 있을 때 생체내 배출 펌프에서 그 2개의 농도에 영향을 주게 되기 때문임); 배출 단백질 억제제의 절대적 수용해도(이는, 배출을 효과적으로 억제하기 위해, 그것이 생체내 배출 펌프에서의 충분한 농도를 달성해야 하기 때문임); 및 배출 단백질 억제제의 용량에 의존한다. 본 발명의 목적을 위해, 배출 단백질 억제제는, 레닌 억제제가 경구 또는 임의의 다른 경로에 의해 투약될 때 레닌 억제제의 전신 노출을 향상시키고, 기질, 및/또는 하나 이상의 약물 배출 단백질/장 상피 세포 또는 간세포에서의 활성의 억제제인 임의의 화합물이다.

상기 기재된 바와 같이, 본 발명은 레닌 억제제와 배출 단백질 억제제의 조합물을 병용 투여하는 것을 포함하는, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체의 생체이용률을 향상시키는 방법을 제공한다.

바람직하게는, 본 발명의 배출 단백질 억제제는 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833이다.

바람직하게는, 화학식 I:

화학식 I



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)을 가지는 본 발명의 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염은 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833과 함께 병용 투여된다.

더욱 바람직하게는, R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I을 가지는 본 발명의 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염은, MDR1 억제제, 예컨대 PSC833과 함께 병용 투여된다.

가장 바람직하게는, SPP100로도 알려진, (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트인 본 발명의 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체는 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833과 함께 병용 투여된다.

상기 개시된 바와 같이, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체 및 배출 단백질 억제제는 약제학적 조성물로서 병용 투여될 수 있다. 성분들은 임의의 통상적 투약 형태로 함께, 통상은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 함께 투여될 수 있다.

경구 투여를 위해, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체 및 배출 단백질 억제제를 포함하는 약제학적 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 분말, 미세유화액, 단위 투약 팩킷(packet) 등의 형태를 가질 수 있다. a) 희석제, 예컨대 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신; b) 윤활제, 예컨대 실리카, 탈크, 스테아르산, 그것의 마그네슘 또는 칼슘 염 및/또는 폴리에틸렌글리콜; 정제를 위해서는 또한 c) 결합제, 예컨대 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 페이스트, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸 셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 및/또는 폴

리비닐피롤리돈; 원하는 경우, d) 붕해제, 예컨대 전분, 아가, 알긴산 또는 그것의 나트륨 염, 또는 발포성 혼합물; 및/또는 e) 흡수제, 착색제, 향료 및 감미제와 함께 활성 성분을 포함하는, 정제 및 젤라틴 캡슐이 바람직하다. 주사가능한 조성물은 바람직하게는 등장성 수용액 또는 현탁액이고, 좌약제는 지방 유화액 또는 현탁액으로부터 유리하게 제조된다.

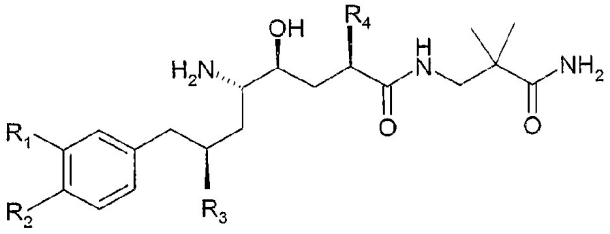
상기 조성물은 무균화되고/되거나, 보조제, 예컨대 보존, 안정화, 습윤화 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압 조절제 및/또는 완충제를 함유할 수 있다. 게다가, 그것은 또한 기타 치료적으로 중요한 물질을 함유할 수 있다. 상기 조성물은 각기 통상적 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제조되고, 약 0.1 내지 75%, 바람직하게는 약 1 내지 50%의 활성 성분을 함유한다.

보다 구체적으로, 본 발명은 배출 단백질 억제제와 조합하여 치료 유효량의 레닌 억제제, 바람직하게는 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 배출 단백질 억제제가 투여 후에 레닌 억제제의 생체이용률이 5% 이상 향상되도록 하는 양으로 존재하는 것인 약제학적 조성물을 제공한다.

바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물은 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833을 포함한다.

바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물은 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833과 조합하여, 화학식:

[화학식 I]



(식 중에서, R_1은 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알콕시 또는 C_{1-4} 알콕시-C_{1-4} 알킬이고; R_2는 C_{1-4} 알킬 또는 C_{1-4} 알콕시이며; R_3 및 R_4는 독립적으로 분지형 C_{1-4} 알킬임)의 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

더욱 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물은 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833과 조합하여, R_1은 3-메톡시프로폭시이고; R_2는 메톡시이며; R_3 및 R_4는 이소프로필인 화학식 I의 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체; 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

가장 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물은 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833과 조합하여 (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 (2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드 헤미푸마레이트를 포함한다.

바람직하게는, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-γ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체, 예컨대 SPP100, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염의 생체이용률은 5% 이상 향상된다.

약물의 생체이용률은 AUC를 측정함으로써 당업계에 공지된 바와 같이 평가될 수 있고, 여기에서 AUC는 시간을 가로축(X-축)으로 놓고 약물의 혈청 또는 혈장 농도를 세로축(y-축)으로 놓아 플로팅한 곡선하면적(AUC)이다. 일반적으로, AUC에 대한 값들은 시험 모집단 내의 모든 대상들로부터 얻어진 수많은 값들을 나타내고, 따라서 전체 시험 모집단에 대해 평균을 구한 평균 값이다.

레닌 억제제와 배출 단백질 억제제의 병용 투여는 또한 배출 단백질 억제제의 부재 하에서 레닌 억제제를 투약하는 것에 비해 C_{max}를 증가시킬 수 있고, 이는 본 발명의 다른 한 측면으로서 제공된다. C_{max}는 또한 시험 대상의 혈청 또는 혈장 내의 최대 약물 농도에 대한 약자인 것으로 당업계에서 잘 이해되어진다.

본 발명은 분리하여 병용 투여될 수 있는 화합물들의 조합을 이용한 치료에 관한 측면을 가지기 때문에, 본 발명은 또한 키트 형태로 분리된 약제학적 조성물을 조합하는 것에 관한 것이다. 키트는 2개의 분리된 약제학적 조성물, 즉 (1) 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물; 및 (2) 배출 단백질 억제제, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물을 포함한다. (1) 및 (2)의 양은, 분리하여 병용 투여될 때, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체의 생체이용률이 5% 이상 향상되도록 하는 양이다. 키트는 분리된 조성물을 함유하기 위한 용기, 예컨대 분할된 병 또는 분할된 호일 포켓을 포함하고, 여기에서 각 구획은 (1) 또는 (2)를 포함하는 복수개의 투약 형태(예컨대, 정제)를 함유한다. 대안적으로, 키트는 활성 성분-함유 투약 형태를 분리하기 보다는, 분리된 투약 형태를 포함하게 될 각기 전체 용량을 함유하기 위한 분리된 구획들을 함유할 수 있다. 이 유형의 키트의 한 예는, 각 개별 블리스터가 2개 (또는 그 이상 개수의) 정제[1개 (또는 그 이상 개수의) 정제(들)는 약제학적 조성물 (1)을 포함하고, 다른 1개 (또는 그 이상 개수의) 정제(들)는 약제학적 조성물 (2)을 포함함]를 함유하는 블리스터 팩이다. 전형적으로 키트는 분리된 성분들의 투여를 위한 사용설명서를 포함한다. 키트 형태는, 분리된 성분들이 바람직하게는 상이한 투약 형태(예컨대, 경구형 및 비경구형)로 투여되고, 상이한 투약 간격으로 투여될 때, 또는 조합물의 개별 성분들의 적정이 처방 의사에 의해 요망될 때 특히 유리하다. 그러므로 본 발명의 경우, 키트는 하기 것들을 포함한다:

(1) 제1 투약 형태의, 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체, 예컨대 SPP100, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 치료 유효량의 조성물;

(2) 제2 투약 형태의, 투여 후에 레닌 억제제, 특히 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체, 예컨대 SPP100, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염의 생체이용률이 5% 이상 향상되도록 하는 양의 배출 단백질 억제제, 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물; 및

(3) 상기 제1 및 제2 투약 형태를 함유하기 위한 용기.

궁극적으로, 본 발명은 레닌 억제제, 바람직하게는 δ-아미노-ɣ-히드록시-ω-아릴-알칸산 유도체, 예컨대 SPP100, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염의 생체이용률, 바람직하게는 경구 생체이용률을 향상시키는 의약품의 제조를 위한, 배출 단백질 억제제, 특히 MDR1 억제제, 예컨대 PSC833의 용도에 관한 것이다.

약물 물질의 약물 배출과 관련된 배출 단백질(들)이 동정될 수 있고, 상응하는 역학 파라미터들, 즉 마이클리스-멘텐(Michaelis-Menten) 상수 및 최대 약물 수송(K_m 및 J_{max})는, 당업계에 공지된 방법, 예컨대 높은 수준의 선택된 ABC 수송체를 발현하는 Sf9(스포도프테라 프루이기페르다(Spodoptera fruigiperda)) 막 소포를 이용하는 ATP아제 검정에 의해 구해질 수 있다. 이 검정에서, ABC 수송체는 에너지원으로서 ATP 가수분해를 이용함으로써 세포 밖으로 기질을 제거한다. ATP 가수분해는 무기 인산염(Pi)을 생성시키고, 이는 단순 비색 반응에 의해 검출될 수 있다. 수송체에 의해 유리된 Pi의 양은 수송체의 활성에 비례한다. ABC 수송체를 함유하는 막 제제는 상이한 수송체들에 대해 다양화되는 기준선 ATP아제 활성을 나타낸다. 수송된 기질은 이 기준선 ATP아제 활성을 증가시키는 반면, 억제제는 기준선 ATP아제 활성 및/또는 자극제의 존재 하에서 측정된 ATP아제 활성을 억제한다. 활성화 및 억제 연구의 모두를 수행할 수 있다. 본원 실시예 1(도 1)에 설명된 바와 같이, SPP100은 높은 수준의 MDR1을 발현하는 막 소포 내에서의 ATP아제 활성을 약 3 μM의 K_m 값으로 증가시키며, 이는 SPP100 수송에 관련된 배출계가 MDR1일 수 있음을 시사한다.

대안적으로, 약물 물질의 시험관내 수송체 친화도는, 예컨대 [Camenisch 등, *Pharm. Act. Helv.* 71, 309-327(1996)]에 기재된 바와 같이, 또는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, Caco-2 세포 검정에 의해 구해지고, 근사화될 수 있다. 수송체 단백질의 동정, 및 관련 배출계를 억제하는 화합물의 효능도 또한 Caco-2 세포 검정으로 구해질 수 있다. 예를 들어, SPP100는 낮은 투과성 내지 중간 투과성의 화합물(고유 투과도 < 80%)인 것으로 확인되며, 이는 부가적으로 중요한 배출계를 위한 기질이다(도 2). 그러나, MDR1 억제제 PSC833의 존재 하에서는 SPP100의 투과도가 상당히 증가한다. 즉, PSC833은 SPP100의 배출을 억제하며, IC_{50} 값은 약 0.1 μM이다(도 3).

배출 단백질 억제제, 예컨대 MDR1 억제제의 병용 투여의 레닌 억제제의 담관 분비에 대한 인시츄(In situ) 영향은 배출 단백질 억제제의 존재 및 부재 하에 담즙으로 분비되는 화합물의 양을 비교함으로써 조사될 수 있다. 예를 들어, PSC833의 존재 하에서 SPP100의 담즙에 의한 클리어런스는 대조군에 비해 97%만큼 감소되었다(도 4).

유사하게, 배출 단백질 억제제, 예컨대 MDR1 억제제의 병용 투여의 레닌 억제제의 생체이용률에 대한 생체내 영향은 배출 단백질 억제제의 존재 및 부재 하에서 약동학 파라미터, 즉 C_{max} 및 AUC를 비교함으로써 조사될 수 있다. 경구 투약된 래트에 있어, 본원의 실시예 4(도 5)에 설명된 바와 같이, SPP100의 용량 정규화 AUC(O-t_{last})는 SPP100을 단독 투약한 대조군에 비해 PSC833의 존재 하에서 약 70배 증가시켰다.

상기 설명은 본 발명의 바람직한 실시양태를 포함한 본 발명을 충분히 개시한다. 본원에 구체적으로 개시된 실시양태들의 변형예 및 개량예가 하기 특허청구범위의 범주 내에 속한다. 추가적 노력없이, 당업자는 선행 상세한 설명을 이용하여, 본 발명을 최대한도로 이용하게 됨을 이해한다. 그러므로, 본원의 실시예는 단지 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범주를 결코 제한하지 않는 것으로 간주하도록 한다.

실시예

실시예 1:

ATP아제 검정

인간 MDR1, 인간 MRP1 또는 인간 MRP2에 의해 매개되는 배출을, 37℃에서 pH 7.4의 수송 완충액 내에서 상이한 농도들의 약물 물질[0.046, 0.137, 0.41, 1.23, 3.7, 11.1, 33.3 및 100 μM]과 함께, 자극제(MDR1에 대해서는 베라파밀(Verapamil)[40 μM], MRP1에 대해서는 NEM-GS[10 mM], 및 MRP2에 대해서는 프로베네시드(Probenecid)[1 mM])의 부재 및 존재 하에서 정제된 막 소포를 인큐베이션함으로써 측정한다.

원액 또는 그것의 희석액이 검정 혼합물에 첨가될 때 상기 언급된 최종 농도가 얻어지고 사용된 유기 용매가 최종 부피의 2%(v/v)가 되도록 하는 방식으로, 통상의 유기 용매, 예컨대 디메틸술폭시드, 에탄올, 메탄올 및 아세토니트릴 중, 관심 치료제의 5 mM 원액을 제조할 것이다. 이 검정에 사용된 모든 용액들은 pH 7.4에 유지될 것이다.

-80℃에 유지되는 막 소포는 ATP아제 실험을 위해 사용될 것이다. 수송체 매개 배출은, 문헌 [Sarkadi, B. Price, E. Boucher, R. Germann, U. 및 Scarborough, *G. J. Biol. Chem.* 1992, 267:4854-4858]에 기재된 바와 같이 구해질 수 있다. 간략히 말해, 시험 약물, 자극제, Na_3VO_4 60 mM 및 글루타티온 2 mM(단지 이는 MRP1 및 MRP2 수송체의 경우에 한함)의 존재 및 부재 하에서의 막 현탁액을 96-웰에 피펫으로 주입하고, 5분간의 예비인큐베이션을 위해 37℃로 옮겼다. 25 mM Mg-ATP 용액을 첨가한 후, 37℃에서(MDR1에 대해서는 20분, MRP1에 대해서는 60분, 및 MRP2에 대해서는 30분 동안) 인큐베이션함으로써 ATP아제 반응을 개시한다. 그 후, 각 인큐베이션에 SDS(5%)를 첨가함으로써 ATP아제 반응을 중단한다. 몰리브산암모늄/아세트산아연 비색 검출 시약을 첨가한 후, 플레이트를 37℃에서 부가 25분 동안 인큐베이션한다.

인큐베이션한 후, OD를 730 nm에서 측정한다. 미리 구해진 인산염 표준 곡선을 이용하여, 유리된 Pi[nmol/웰]를 계산할 수 있다. OD 값은 수행된 실험(n = 2)의 평균±표준편차로 제시될 것이다. 모든 통계학적 분석들은 마이크로소프트 엑셀(Microsoft EXCEL) 5.0c를 이용하여 수행된다.

각 약물, 검정된 약물-농도에 대한 소위 특정 (Na_3VO_4 감성) 수송체 ATP아제 활성을 계산하기 위해, Na_3VO_4의 존재 하에 구해진 Pi 값을 Na_3VO_4 없이 측정된 Pi 값으로부터 빼야 한다. 유리된 Pi/mg 막 단백질/분으로 표시되는 Na_3VO_4 감성 수송체 활성은, 그 수를 각 웰에 첨가된 막 단백질의 양 및 인큐베이션 시간(분)으로 나눔으로써 구해질 수 있다(도 1).

실시예 2:

Caco-2 세포 검정

수송 실험을 위해, 21-25 일 동안 PET 필터 상에 성장된 Caco-2 세포 단층을 사용한다. PET 필터 상에 성장된 Caco-2 세포 단층, 및 Caco-2 세포 없이 단독의 PET 필터를 가로지르는 화합물의 배출을 하기와 같이 구한다: 수송 실험 전에, 수용체 구획 내의 배지(첨부 측의 경우에는 0.2 mL, 및 기저측부 측의 경우에는 1.0 mL)를 37℃에서 예비인큐베이션된 수용체 용액(관심 억제제를 함유하는 당 용액의 경우, HBSS)으로 대체한다. 실험을 개시하기 위해, 공여체 구획 내의 배지(첨부 측에 대해서는 0.35 mL, 및 기저측부 측의 경우에는 1.15 mL)를 37℃에서 예비인큐베이션된 공여체 용액(관심 억

제제를 함유하는 당 용액의 경우, HBSS 중 화합물)으로 치환한다. 분취량의 150 μL을 약 1 내지 120분 후에 공여체 및 수용체 측으로부터 제거한다. 첨부에서 기저측부 방향, 및 기저측부에서 첨부 방향 모두에서의 수송 실험을 쉐이킹 없이 인큐베이터에서 37℃에서 3벌로 수행한다.

세포의 동일한 배치(batch) 내에서 총 6개의 대표적 세포 단층(각 화합물에 대해서는 3개)에서 120분 동안 첨부 측에서 기저측부 측으로의 ≤0.1 μM의 [^{3}H]-만니톨 및 ≤0.1 μM의 [^{3}H]-프로판올롤의 투과도를 측정함으로써, 수송 실험에 대한 Caco-2 세포의 적합성을 조사한다.

액체 섬광 계수에 의해 방사능 샘플을 분석한다. 액체 크로마토그래피/탄뎀 질량 분광법(LC-MS/MS)에 의한 분석까지, 다른 모든 비방사능 표지 샘플을 -20℃에서 동결 유지시킨다.

하기 방정식을 이용하여 시험한 화합물의 수송 값을 구한다(Artursson 등, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 175: 880-885, 1991):

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot A \cdot C_0}$$

(식 중에서, P_{app}(cm/분)는 겉보기 투과도 계수이고, ΔQ는 시간 t에서 수용체 구획에서 발견되는 화합물의 양이며, Δt(분)은 인큐베이션 시간이고, C_0(μg/mL)은 공여체 구획 내의 화합물의 초기 농도이고, A(cm^2)는 막의 표면적이다).

표지된 샘플에 대해, 정량 한도(LOQ)는 측정된 블랭크 값보다 상당히 더 크고, 측정값의 표준 오차가 20% 미만인 방사능 규모에서 얻어지는 최저 샘플 농도 값으로 취해진다. 이 연구의 조건 하에서, 절대 방사능의 LOQ는 12 nmol/L에 상응하는 [^{14}C]-표지 SPP100에 경우, 2 dpm이다.

P_{app} 값은 수행된 수송 실험(n = 3)의 평균±표준 편차로 제공된다. 임의의 2개의 주어진 데이터 세트 간의 차이에서의 통계적 유의는 t-시험에 의해 조사된다. 차이의 유의성을 부여하기 위한 확률 수준은 $p < 0.025$이다. 모든 통계학적 분석들은 마이크로소프트 엑셀 5.0c을 이용하여 수행되었다.

120분의 시간 내에서 SPP100의 1 μM 농도의 경우, 약 $0.2 \cdot 10^{-5}$ cm/분의 첨부에서 기저측부로의 수송이 검출가능하다. 한편 기저측부에서 첨부로의 수송은, 첨부에서 기저측부로의 경우보다 상당히 더 큰 약 $10 \cdot 10^{-5}$ cm/분의 투과도 값으로 일어났다.

SPP100의 1, 5, 10 및 50 μM의 농도의 경우, 첨부에서 기저측부로의 수송의 점차적 증가가 관찰되고, 이는 10 μM에서 약 $7 \cdot 10^{-5}$ cm/분의 고원(plateau) 투과도 값에 접근한다. 한편, 기저측부에서 위로의 수송은 농도가 증가함에 따라 상당히 변화하지 않는다.

SPP100(1, 5, 10 및 50 μM)의 Caco-2 수송에 대한 회복값은 일반적으로 매우 높으며(< 100%), 이는 SPP100가 필터 지지체 또는 플라스틱 인큐베이션 환경에 결합하지 않음을 가리킨다.

세포 간극 마커 만니톨 및 세포막 통과 마커 프로판올롤에 대한 첨부에서 기저측부로의 배출은 항상 각기 $3 \cdot 10^{-5}$ cm/분 및 $90 \cdot 10^{-5}$ cm/분의 역치 P_{app} 값 미만이다. 구해진 첨부에서 기저측부로의 필터 투과도는 일반적으로 상응하는 Caco-2 투과도 데이터보다 높고, 이는 필터 확산이 Caco-2 수송에 대한 속도 제한 단계가 아님을 가리킨다(도 2 및 3).

실시예 3:

인시츄 담관내 삽관 래트 시험

래트에서 SPP100의 담관 분비에 있어서의 MDR1 및/또는 MRP2의 관련을 명료히 하기 위해, 하기 연구를 이용할 수 있다. 그러므로, PSC833(MDR1 및 MRP2의 공지 억제제) 또는 프로베네시드(MRP2의 공지 선택적 억제제)의 투여 전 및 후에, [^{14}C]-표지 SPP100 헤미푸마레이트를 일정하게 정맥 주입하는 동안 SPP100의 담즙에 의한 클리어런스를 담관내 삽관 및 마취된 수컷 래트에서 평가한다.

사용될 수 있는 동물은 예컨대 수컷 알비노 HAN:WIST 래트이며, 각 처리군 당 4 내지 5마리가 있다.

[^{14}C]-표지 SPP100 헤미푸마레이트를 0.9% 염화나트륨 용액으로 투여하고, PSC833 및 프로베네시드를 1/3/1 비의 에탄올/폴리에틸렌 글리콜 200/5% 글루코스 용액의 혼합물에 넣어 투여한다.

모든 처리 군들에서, [^{14}C]-표지 SPP100 헤미푸마레이트 볼루스 용액(0.015 mg 염기/mL)를 볼루스 정맥내 주입(2 mL/kg)한 후, [^{14}C]-표지 SPP100 헤미푸마레이트 주입 용액(0.022 mg 염기/mL)을 후속하여 정맥내 주입(6.67 mL/h/kg) 함으로써, 혈장 내 모 화합물의 일정한 농도를 달성한다.

2시간 후에 하기 화합물들의 정맥내 볼루스 투여를 수행한다:

· 처리군 1: 에탄올/폴리에틸렌 글리콜 200/5% 글루코스 용액의 1/3/1 - 혼합물(5 mL/kg; 비히클);

· 처리군 2: 10 mg/kg의 용량의 PSC833; 및

· 처리군 3: 50 mg/kg의 용량의 프로베네시드. 모든 처리군 혈액 샘플들을 처리 후 0.5, 1, 1.33, 1.67, 2, 2.33, 2.67, 3 시간의 시점에 수집하여, 혈액을 즉시 혈장으로 보낸다. 20분 간격으로 1 내지 3시간 틀에서 담즙을 수집한다.

검출 방법:

· 모든 샘플들에서의 총 방사능: LSC; 혈장 및 담즙에 대해 LOQ 3.4 μg/L; 및

· 샘플들의 선택된 풀에서의 대사물 패턴의 검출: 방사능 검출 하에서의 HPLC

비히클(에탄올/폴리에틸렌 글리콜 200/5% 글루코스 용액)을 정맥내 투여한 후에 [^{14}C]-표지 SPP100 헤미푸마레이트를 담관내 삽관된 래트에 일정하게 주입하는 동안, 혈장 중 ^{14}C 농도 및 [^{14}C]-표지 화합물의 담즙에 의한 클리어런스에 대한 영향은 검출되지 않는다.

PSC833 투여 후에 ^{14}C 농도는 혈장 내 시간 의존적 증가 및 담즙 내에서의 현저한 감소의 경향을 나타낸다. 그 결과, [^{14}C]-표지 화합물의 담즙에 의한 클리어런스는 PSC833 투여 전에 수득된 값의 대략 7%에 상당한다.

프로베네시드 투여 후에 [^{14}C]-표지 화합물의 혈장 농도에 대한 영향이 담관내 삽관 래트에서 관찰되지 않는다. 그러나, 프로베네시드는 담즙 유동을 증가시키고(투여 후의 값은 투여 전의 값보다 약 65% 더 큼), 담즙 내 [^{14}C] 농도를 감소시키는(그 값은 투여전 값보다 약 40% 더 낮음) 결과를 초래한다. 그럼에도 불구하고, 담즙에 의한 클리어런스는 양쪽 시간대(프로베네시드 투여 전 및 후)에서 유사하다.

이 결과로부터(도 4), MDR1은 SPP100 및 SPP100-관련 화합물의 담즙에 의한 클리어런스에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다는 결론이 내려질 수 있다. 또한, MRP2는 SPP100 및 SPP100-관련 화합물의 담관 분비와 관련되지 않은 것으로 보인다.

실시예 4:

생체내 생체이용률 실험

PSC833를 경구 병용 투여하거나 투여하지 않으면서, SPP100 헤미푸마레이트를 단일 경구 투여한 후, 수컷 래트에서 SPP100의 상대적 경구 생체이용률을 조사하기 위해 하기 연구를 이용할 수 있다. 병용 투여된 PSC833의 용량 의존성을 밝히기 위해, 상이한 용량(0, 5, 12.5, 25 및 50 mg/kg)의 PSC833은 SPP100 헤미푸마레이트의 한정된 용량(6 mg 유리 염기/kg)에서 제공된다.

사용될 수 있는 동물은 예컨대 수컷 알비노 HAN:VIST 래트이며, 각 처리군 당 5마리가 있다.

SPP100 헤미푸마레이트를 0.9% 염화나트륨 용액 중 첨가하고, PSC833는 1/3/1 비의 에탄올/폴리에틸렌 글리콜 200/ 5% 글루코스 용액의 혼합물(비히클) 중 투여한다.

먼저, 비히클(5 mL/kg), 및 두 번째 SPP100 헤미푸마레이트(2 mL/kg)를 위관영양법(gavage)(시간 차: 2 - 3 분)에 의해 래트에 투약한다. 모든 래트에 6 mg 유리 염기/kg의 용량으로 SPP100 헤미푸마레이트를 제공한다. 하기 PSC833 용량들이 투여된다:

- 처리군 1 및 6: 에탄올/폴리에틸렌 글리콜 200/5% 글루코스 용액의 1/3/1-혼합물(5 mL/kg; 비히클);

- 처리군 2: PSC833 50 mg/kg;

- 처리군 3: PSC833 25 mg/kg;

- 처리군 4: PSC833 12.5 mg/kg; 및

- 처리군 5: PSC833 5 mg/kg.

투여 후, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 및 48시간 후, 혈액 샘플을 설하 수집한다. 생화학적 분석을 위해 혈장을 사용한다.

분석 방법:

SPP100에 대해 SRM 양성 방식으로 APCI를 이용하는 HPLC-MS/MS에서, 혈장 내 최저 LOQ는 0.6 ng/mL 내지 0.7 ng/mL의 범위 내이다.

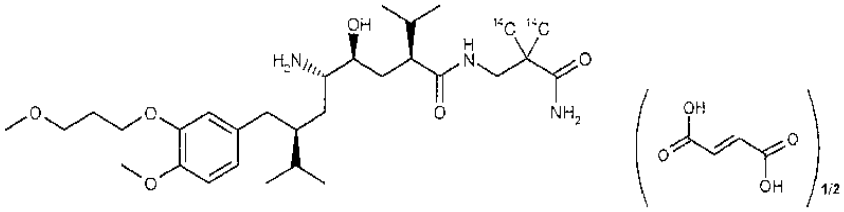
SPP100 헤미푸마레이트(6 mg 염기/kg) 및 비히클을 경구 투여한 래트에서, SPP100은 단지 투약 후 2시간 이내에 혈장에서 검출된다. C_{max}는 대략 24.8±27 ng/mL에 달하고, t_{max}는 투약 후 0.44±0.1 시간에 도달한다. 용량 정규화 AUC ($0-t_{last}$) 값은 2.38±3.4[(ng*h/mL)/(mg/kg)]이다.

SPP100 헤미푸마레이트(6 mg 염기/kg) 및 PSC833(5, 12.5, 25 및 50 mg/투약)을 경구 투약한 래트에서, SPP100은 투약 후 24 또는 48시간 이내에 혈장 내에서 검출된다. 비히클을 제공한 래트에 비해, 각각 5, 12.5, 25 및 50 mg/kg의 PSC833 용량에 대해, C_{max}는 35.7±18, 115±93, 81.4±19 및 26.7±18 ng/mL의 값으로 증가하고, t_{max}은 4.8±1.8, 4.95±4.2, 15.2±18 및 3.06±1.9 h으로 증가한다. 용량 정규화 AUC($0-t_{last}$) 값은 각각 5, 12.5, 25 및 50 mg/kg의 병용 투여된 PSC833 용량의 경우, 비히클 군에서보다 약 23, 69, 76 및 17배 더 높다. 25 mg/kg의 용량에 비해 50 mg/kg의 PSC833 용량에서 비교적 낮은 f_{rel} 값이 얻어지는 이유는 제시할 수 없었다(도 5).

이 결과로부터, ABC 배출 수송체 단백질 MDR1 및 MRP2 중 적어도 하나 또는 양자 모두가 경구 투여 후에 SPP100의 전신 노출 정도에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보인다는 결론을 내릴 수 있다.

<u>실시예 5</u>:

(2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 [^{14}C]-(2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드, [^{14}C]-SPP100, 헤미푸마레이트



A. 시아노-[^{14}C]-디메틸-아세트산 메틸 에스테르

실온에서 메탄올(2 mL) 중 나트륨 메톡시드(119 mg; 2.2 mmol)의 용액을 앰플에 둔다. 메틸 시아노아세테이트(99 mg, 1.0 mmol)를 0℃에서 첨가한다. 혼합물을 실온에서 수분간 쉐이킹한 후, 질소 하에 -192℃로 냉동시키며, [^{14}C]-표지 메틸 요오다이드(2.04 GBq/mmol에서의 3.7 GBq, 1.82 mmol, 아머샴 바이오사이언시스로부터 입수가능)를 반응 혼합물에 진공 전달한다. 앰플을 진공 하에 봉지하고, 1시간에 걸쳐 실온으로 천천히 가온한다. 앰플을 16시간 동안 50℃에서 진동(vibration)시킨다. 이어서, 앰플을 -192℃로 재냉동시키고, 휘발성 용매 및 미반응 [^{14}C]-메틸 요오다이드를 동결건조에 의해 제거한다. 이어서, 조 시아노-[^{14}C]-디메틸-아세트산 메틸 에스테르를 GC로 분석하여, <0.2% 모노-메틸화 부산물이 형성됨을 확인한다. 이어서, 그 물질을 추가 정제없이 다음 단계를 위해 사용한다.

B. 2-시아노-2,2-[^{14}C]-디메틸-아세트아미드

실온에서 30분 동안, 또는 몰 농도가 5 M 이상이 될 때까지, 무수 메탄올을 포함하는 플라스크로 암모니아 기체를 버블링한다. 실온에서 조 표제 A 화합물인 시아노-[^{14}C]-디메틸아세트산 메틸 에스테르에 MeOH(3 mL, 16.5 mmol) 중 새로 제조된 5.5 M NH_3을 첨가한다. 반응물을 2시간 동안 실온에서 교반한 후, 출발 물질 모두를 하기 방법에 따라 GC 분석에 의해 입증되는 바, 니트릴 생성물로 전환시킨다: 70℃에서 10분간, 이어서 10℃/분으로 온도를 200℃로 점진적으로 증가시킨 후, 10분간 200℃에 유지함. 반응 완료 후, 동결건조에 의해 용매를 제거하고, 생성물을 플래쉬 크로마토그래피(에틸아세테이트 → 에틸아세테이트/10% 메탄올)로 정제하여, 2.813 GBq의 2-시아노-2,2-[^{14}C]-디메틸-아세트아미드를 수득한다.

C. 3-아미노-2,2-[^{14}C]-디메틸-프로피온아미드

실온에서 새로 정제된 표제 B 화합물인 2-시아노-2,2-[^{14}C]-디메틸-아세트아미드(2.813 GBq, 77 mg, 0.69 mmol)에 새로 제조된, MeOH 중 NH_3의 5.5 M 용액을 첨가한 후, 5% Rh/Al_2O_3(33 mg)을 첨가한다. 반응물을 5시간 이내로 55℃에서 교반하고, 모든 출발 물질이 생성물로 전환될 때까지 GC에 의해 매 1시간마다 모니터한다. GC 방법: 80℃에서 1분, 이어서 20℃/분으로 240℃로 점진적으로 증가시킨 후, 240℃에서 1분간 유지시킴. 반응 완료 후, 혼합물을 셀라이트(하이플로(Hyflo))를 통해 여과시키고, 회전 증발기로 용매를 제거하며, 생성물을 플래쉬 크로마토그래피(CH_2Cl_2/2% MeOH/NH_3 → CH_2Cl_2/5%MeOH/NH_3 → CH_2Cl_2/10% MeOH/NH_3)로 정제하여, 2.7 GBq의 3-아미노-[^{14}C]2,2-디메틸-프로피온아미드를 백색 고체로 수득한다. 이 생성물을 1주를 초과하는 시간 동안 고체로서 저장될 수 있다. 장기 저장을 위해, 3-아미노-2,2-[^{14}C]-디메틸-프로피온아미드를 50 MBq/mL 이하의 농도가 되도록 -80℃에서 EtOH/20% 톨루엔 중에 용해시킬 수 있다.

D. (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-4-히드록시-2-이소프로필-7-[4-메톡시-3-(3-메톡시-프로폭시)-벤질]-8-메틸-노난산 [^{14}C]-(2-카르바모일-2-메틸-프로필)-아미드, [^{14}C]-SPP100, 헤미푸마레이트

표제 C 화합물인 3-아미노-2,2-[^{14}C]-디메틸-프로피온아미드를 이용하여, 당업계에 공지되어 있는 방법, 예컨대 미국 특허 No. 6,730,798에 기재된 방법에 따라, 표제 D 화합물인 [^{14}C]-표지 SPP100 헤미푸마레이트를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 높은 수준의 MDR1을 발현하는 막 소포 내에서의 ATP아제 활성에 대한 레닌 억제제 SPP100의 영향을 나타낸다.

도 2는 첨부(AP)에서 기저측부(BL) 방향, 및 BL에서 AP 방향으로 Caco-2 세포 단층을 가로지르는 레닌 억제제 SPP100의 이방향 수송을 나타낸다.

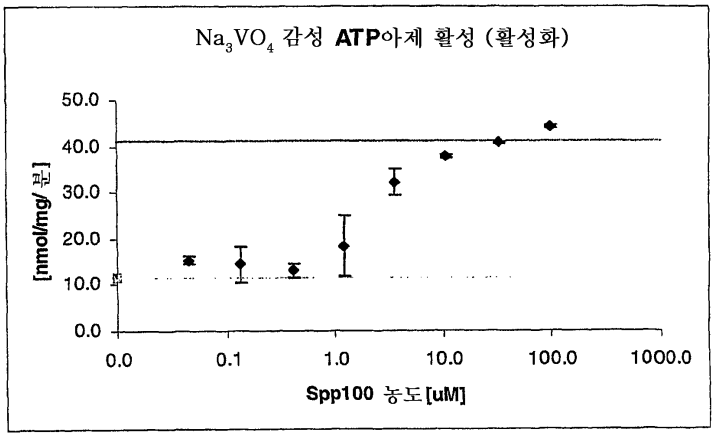
도 3은 Caco-2 세포 단층을 가로지르는 레닌 억제제 SPP100의 투과도에 대한 MDR1 억제제 PSC833의 영향을 나타낸다.

도 4는 지속적 정맥내 주입시 레닌 억제제 SPP100의 혈장 내 농도 및 담즙에 의한 클리어런스에 대한 MDR1 억제제 PSC833의 영향을 나타낸다.

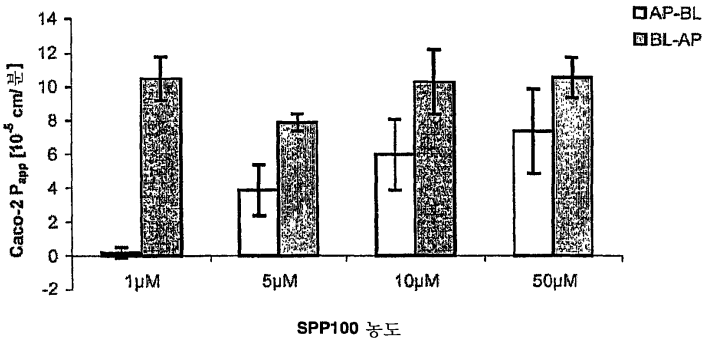
도 5는 PSC833의 부재 및 존재 하에서의 단일 경구 적용 후의 래트의 혈장 내 레닌 억제제 SPP100의 용량-정규화된 곡선하면적(AUC) 값을 나타낸다.

도면

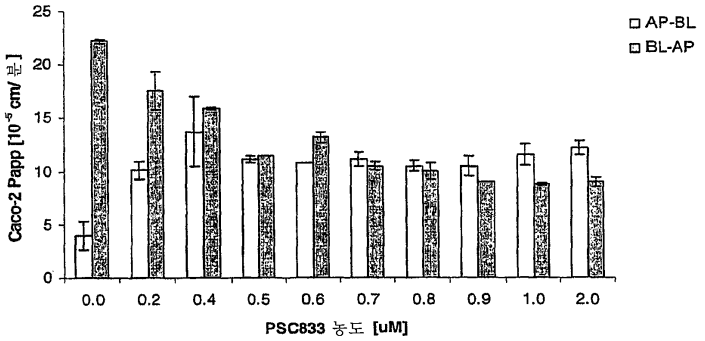
도면1



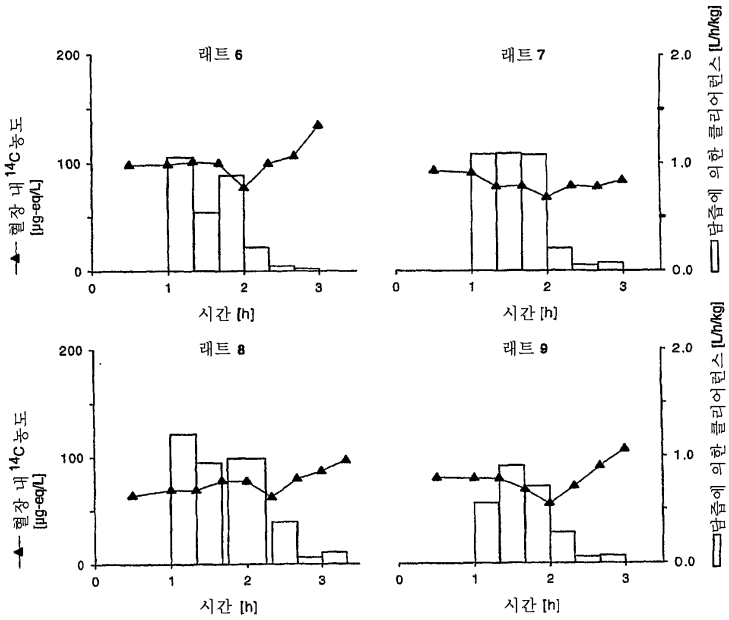
도면2



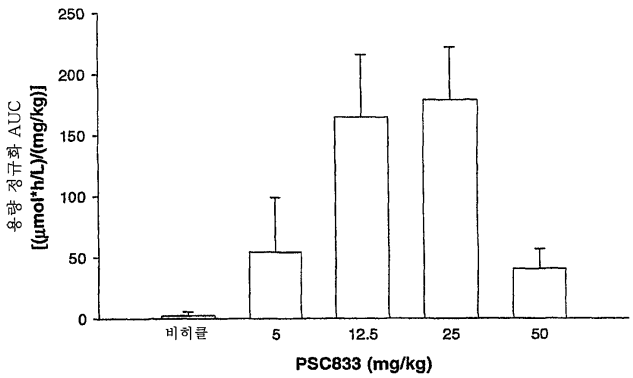
도면3


AP-BL
BL-AP
Caco-2 Papp [10⁻⁶ cm/ 분]
PSC833 농도 [uM]

도면4


래트 6
래트 7
래트 8
래트 9
혈장 내 14C농도 [μg-eq/L]
담즙에 의한 클리어런스 [L/h/kg]
시간 [h]

도면5


용량 정규화 AUC [(μmol*h/L)/(mg/kg)]
비히클
PSC833 (mg/kg)