



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0075503
(43) 공개일자 2010년07월02일

(51) Int. Cl.

C07K 4/12 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/03 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7008232(분할)

(22) 출원일자(국제출원일자) 2000년09월29일

심사청구일자 2010년04월15일

(62) 원출원 특허 10-2009-7012559

원출원일자(국제출원일자) 2000년09월29일

심사청구일자 2009년06월17일

(85) 번역문제출일자 2010년04월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/026952

(87) 국제공개번호 WO 2001/25265

국제공개일자 2001년04월12일

(30) 우선권주장

60/157,404 1999년10월01일 미국(US)

60/211,078 2000년06월13일 미국(US)

(71) 출원인

디엠아이 바이오사이언시스, 인크

미국 콜로라도주 80110 이글우드 스위트 420 사우스 클라크슨 3601

(72) 발명자

바로어, 데이비드

미국 80110 콜로라도주 이글우드 이스트 옥스퍼드 레인 900

커티스, 씨., 제랄드

영국 카디프 씨에프2 5에이취에이 페닐란 타이 드로 로드 플랫 3에이

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강정만

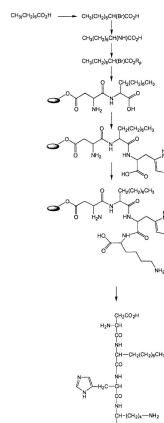
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 금속 결합 화합물 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 동물에서 반응성 산소종 (ROS)에 의한 손상을 저하시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 동물에서 금속의 농도를 저하시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본원에서 상세히 설명한 유효량의 금속 결합 화합물을 동물에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 동물에서 분리한 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 본 발명의 금속 결합 화합물의 유효량을 포함하는 용액과 상기 조직 또는 기관을 접촉시키는 것을 포함한다. 본 발명은 추가로 신규한 금속 결합 화합물, 상기 금속 결합 화합물을 포함하는 제약 조성물 및 본 발명의 금속 결합 화합물을 보유하는 용기를 포함하는 키트를 제공한다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

라우, 에드워드

미국 80301 콜로라도주 보울더 플럼 코트 4281

라오, 나가라자, 케이., 알.

영국 카디프 씨에프4 4큐엔 비치그로브 드라이브로
애비뉴 17

원클러, 제임스, 브이

미국 80206 콜로라도주 덴버 바인 스트리트 720

크룩, 완넬, 엠.

미국 80104 콜로라도주 캐슬 락 캐논리쥐 로드
2935

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식의 금속 결합 펩티드 또는 그의 생리학상 허용되는 염:



상기 식에서,

P_1 는 Xaa_1 Xaa_2 His 또는 Xaa_1 Xaa_2 His Xaa_3 이고;

P_2 는 Cu(I) 결합 부위의 펩티드 서열을 포함하며 또한 P_2 는 10개 이하의 아미노산을 함유하며;

Xaa_1 은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 리신, 히드록시리신, 히스티딘, 아르기닌, 오르니틴, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 메티오닌 또는 α -히드록시메틸세린이고;

Xaa_2 는 글리신, 알라닌, β -알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 리신, 히드록시리신, 히스티딘, 아르기닌, 오르니틴, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 메티오닌 또는 α -히드록시메틸세린이며;

Xaa_3 은 글리신, 알라닌, 발린, 리신, 아르기닌, 오르니틴, 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민 또는 트립토판이고;

펩티드 P_1 - P_2 의 말단 $-COOH$ 는 비치환되거나, 또는 치환되어 $-COR_2$ [여기서, R_2 는 $-NH_2$, $-NHR_1$, $-N(R_1)_2$, $-OR_1$, 또는 $-R_1$ (여기서, R_1 은 알킬, 아릴, 또는 헤테로아릴임)]를 생성하며, 여기에서 알킬은 C_1 - C_{16} 의 직쇄 또는 분지쇄 알킬이고, 아릴은 하나 또는 두개의 방향족 환을 포함하며, 헤테로아릴은 하나 이상의 환 내에 하나 이상의 S, N 또는 O 원자를 함유하는 아릴이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

Xaa_1 이 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌 또는 α -히드록시메틸세린인 펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, Xaa_2 가 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 트레오닌, 세린, 아스파라긴, 메티오닌, 히스티딘 또는 α -히드록시메틸세린인 펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서,

Xaa_3 이 리신인 펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서,

Xaa_1 이 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 또는 α -히드록시메틸세린이고;

Xaa_2 가 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 트레오닌, 세린, 아스파라긴, 메티오닌, 히스티딘 또는 α -히드록시메틸세린이며; 또한

Xaa_3 가, 존재하는 경우, 리신인 펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서,

Xaa₁이 아스파르트산 또는 글루탐산이고; 또한 Xaa₂가 알라닌, 글리신, 발린, 트레오닌, 세린, 또는 α-히드록시 메틸세린인 펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서,

Xaa₂가 알라닌, 트레오닌, 또는 α-히드록시메틸세린인 펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서,

Xaa₁이 아스파르트산이고;

Xaa₂가 알라닌인 펩티드.

청구항 9

제1항에 있어서,

P₂에서 Cu(I) 결합 부위의 서열이 다음 서열 중의 하나인 펩티드:

Met Xaa₄ Met; Met Xaa₄ Xaa₄ Met; Cys Cys, Cys Xaa₄ Cys; Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys;

Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys; 또는 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:8] (여기서 Xaa₄는 아미노산이다).

청구항 10

제5항에 있어서,

P₂에서 Cu(I) 결합 부위의 서열이 다음 서열 중의 하나인 펩티드:

Met Xaa₄ Met; Met Xaa₄ Xaa₄ Met; Cys Cys, Cys Xaa₄ Cys; Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys;

Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys; 또는 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:8] (여기서 Xaa₄는 아미노산이다).

청구항 11

제8항에 있어서,

P₂에서 Cu(I) 결합 부위의 서열이 다음 서열 중의 하나인 펩티드:

Met Xaa₄ Met; Met Xaa₄ Xaa₄ Met; Cys Cys, Cys Xaa₄ Cys; Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys;

Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys; 또는 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:8] (여기서 Xaa₄는 아미노산이다).

청구항 12

제1항에 있어서,

β-알라닌 또는 글리신 이외의 펩티드의 아미노산의 하나 이상이, 존재하는 경우, D-아미노산인 펩티드.

청구항 13

제1항에 있어서,

펩티드 P₁-P₂의 말단 -COOH이 치환되어 -COR₂(여기서 R₂는 -NH₂임))를 생성하는 것인 펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 수술 후 뇌허혈, 고열 뇌손상, 주산기 저산소 허혈, 척추 손상, 발작, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌손상, 뇌혈관 허혈, 심장혈관 허혈, 급성 심근경색, 협심증, 심장 부정맥, 수술 후 심장 허혈, 울혈성 심부전증, 심근 기절(stunning), 이식 수술 후 조직손상, 개심 수술 후 조직손상, 혈관 성형 후 조직손상, 및 조직 또는 기관에 혈액공급이 차단되는 수술 후 조직손상으로 구성된 군으로부터 선택된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 제약조성물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 허혈, 허혈 재관류 손상, 허혈성 질환 또는 증상, 뇌혈관 허혈 및 심장 혈관 허혈로 구성된 군으로부터 선택된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 제약조성물.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 염증 및 염증성 질환 또는 증상으로 구성된 군으로부터 선택된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 제약조성물.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 제약조성물.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 알츠하이머 질환, 근위 축성 축삭경화증, 파킨슨 질환, 다발성 경화증 및 노인성 치매로 구성된 군으로부터 선택된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 제약조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 반응성 산소종 (ROS)에 의한 분자, 세포 및 조직 손상을 저하시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 금속 이온, 특히 Cu(II)에 결합하는 특정 화합물, 특히 특정 펩티드 및 펩티드 유도체에 관한 것이다. 본 발명의 화합물에 의한 금속 이온의 결합은 ROS의 형성 및(또는) 축적을 억제하고(하거나) ROS에 의한 손상을 화합물 자체에 대해 표적화시킨다 (즉, 본 발명의 화합물은 희생적 항산화제(sacrificial antioxidant)로서 기능할 수 있다).

배경기술

[0002] 반응성 산소종(ROS)은 자유 라디칼 (예를 들어, 수퍼옥사이드(superoxide) 음이온 및 히드록실, 퍼옥실 및 알콕실 라디칼) 및 비라디칼 종 (예를 들어, 단일상태 산소 및 과산화수소)를 포함한다. ROS는 심한 세포 및 조직 손상을 야기할 수 있고 다양한 질병 및 질환에서 주요 기능을 수행하는 것으로 보고되었다. 실제로, ROS는 100 개 이상의 질병 및 발병 상태에 관여하고, ROS는 모든 인간 질병에 관련되는 공통적인 발병 기전을 구성할 수 있다고 추정된다 (Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6,205-228 (1995)). ROS, 그의 형성, 세포 및 조직 손상을 야기하는 메카니즘 및 수많은 질병과 질환에서의 그의 기능 등에 대해서는 문헌 [예를 들어, Manso, Rev. Port. Cardiol., 11, 997-999 (1992); Florence, Aust. N Z J. Ophthalmol., 23, 3-7 (1992); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Knight, Ann. Clin. Lab. Sci., 25, 111-121 (1995); Kerr et al., Heart & Lung, 25, 200-209 (1996); Roth, Acta Chir. Hung., 36, 302-305 (1997)] 참고.

[0003] 허혈/재관류는 전 세계적인 질병 및 장애의 주요 원인이다. 산소를 심장에 공급하는 신체 능력이 저하되는 심혈관 허혈은 미국에서 질병 및 사망의 주요 원인이다. 뇌허혈은 뇌혈관 사고 (뇌졸중)의 전조 증상으로서 미국에서 사망의 세번째 원인이다. 허혈은 또한 다른 기관 (예를 들어, 신장, 간, 폐 및 장관)에서, 적출 기관 (예를 들어, 이식 또는 연구 (예를 들어 재관류 기관 모델)를 위해 적출한 기관)에서, 및 혈류가 차단된 수술 (예를

들어, 개심 수술 및 관상동맥 우회수술)의 결과로서 발생한다. 허혈은 한 기관에 제한될 필요가 없고, (예를 들어, 출혈성 쇼크에서) 보다 일반화될 수 있다.

[0004] 세포 및 조직 손상은 산소 결핍의 결과로서 허혈 동안 발생한다. 그러나, 허혈 동안 발생하는 손상은 허혈성 조직 및 기관의 재관류시에 발생하는 극심한 손상과 비교할 때 일반적으로 경미하다 (예를 들어, Manso, Rev. Port. Cardiol., 11, 997-999 (1992); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Knight, Ann. Clin. Lab. Sci., 25, 111-121 (1995); Kerr et al., Heart & Lung, 25, 200-209 (1996); Roth, Acta Chir. Hung., 36, 302-305 (1997) 참조). ROS는 허혈성 조직 및 기관의 재관류에 의해 발생하는 극심한 손상의 원인인 것으로 보고되었다 (예를 들어, Manso, Rev. Port. Cardiol., 11, 997-999 (1992); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Knight, Ann. Clin. Lab. Sci., 25, 111-121 (1995); Kerr et al., Heart & Lung, 25, 200-209 (1996); Roth, Acta Chir. Hung., 36, 302-305 (1997) 참조).

[0005] 금속 이온, 주로 전이금속 이온은 ROS의 생성 및 축적을 야기할 수 있다. 특히, 저장 부위로부터 방출되는 구리 및 철 이온은 허혈/재관류 손상 및 열, 추위, 외상, 과도한 운동, 독소, 방사선 및 감염에 의한 손상을 포함한 손상 후에 ROS 생성의 주요 원인 중의 하나이다 (Roth, Acta Chir. Hung., 36, 302-305 (1997) 참조). 다른 전이금속 이온 (예를 들어 바나듐 및 크롬 이온) 뿐만 아니라 구리 및 철 이온은 ROS의 생성을 촉매화하는 것으로 보고되었다 (예를 들어, Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Halliwell et al., Free Radicals In Biology And Medicine, pages 1-19 (Oxford University 1989); Marx et al., Biochem. J., 236, 397-400 (1985); Quinlan et al., J. Pharmaceutical Sci., 81, 611-614 (1992) 참조). 다른 전이금속 이온 (예를 들어, 카드뮴, 수은 및 니켈 이온) 및 다른 금속 이온 (예를 들어, 비소 및 납 이온)은 천연 항산화제 방어 체계의 분자의 일부를 고갈시켜 ROS의 축적을 증가시키는 것으로 보고되었다 (예를 들어, Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995) 참조). 유리 구리 이온이 필수적으로 임의의 단백질의 아미노기에 비특이적으로 결합한다고 보고되었지만 (Gutteridge et al., Biochim. Biophys. Acta, 759, 38-41 (1983)), 단백질에 결합된 구리 이온은 적어도 구리 이온이 결합된 단백질을 손상시키는 ROS를 계속해서 생성시킬 수 있다 (예를 들어, Gutteridge et al., Biochim. Biophys. Acta, 759, 38-41 (1983); Marx et al., Biochem. J., 236, 397-400 (1985); Quinlan et al., J. Pharmaceutical Sci., 81, 611-614 (1992) 참조).

[0006] 알부민은 세포외 항산화제로서 특징지을 수 있다 (예를 들어, Halliwell and Gutteridge, Arch. Biochem. Biophys., 280, 1-8 (1990); Das et al., Methods Enzymol., 233, 601-610 (1994); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Dunphy et al., Am. J. Physiol., 276, H1591-H1598 (1999) 참조). 알부민의 항산화제 특성은 금속 (특히 구리 이온)에 결합하는 능력, 지방산에 결합하는 능력, 스테로이드에 결합하여 수송하는 능력, 빌리루빈에 결합하여 수송하는 능력, HOCl을 제거하는 능력 등을 포함하여 알부민의 많은 생리학적 기능 중 몇몇 기능에 의한 것으로 보고되었다 (예를 들어, Halliwell and Gutteridge, Arch. Biochem. Biophys., 280, 1-8 (1990); Halliwell and Gutteridge, Arch. Biochem. Biophys., 246, 501-514 (1986); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Dunphy et al., Am. J. Physiol., 276, H 1591-H 1598 (1999) 참조). 알부민은 N-말단에 존재하는 것을 포함하여 몇개의 금속 결합 부위를 갖는다. 인간, 래트 및 소 혈청 알부민을 포함하여 몇몇 알부민의 N-말단 금속 결합 부위는 Cu(II) 및 Ni(II)에 대한 높은 친화도를 보이고, 이들 금속 이온의 높은 친화도 결합에 관여하는 아미노산이 확인되었다 (Laussac et al., Biochem., 23, 2832-2838 (1984); Predki et al., Biochem. J., 287, 211-215 (1992); Masuoka et al., J. Biol. Chem., 268, 21533-21537 (1993) 참조). 고친화도 N-말단 부위 이외의 다른 금속 결합 부위에서 알부민에 결합된 구리는 "느슨한" 금속 결합 부위의 위치에 의해 강요된 부위에서 알부민에 대한 심한 손상을 야기하여 알부민을 "희생적 항산화제"로 특징지우는 유리 라디칼을 생성시키는 것으로 보고되었다 (Marx et al., Biochem. J., 236, 397-400 (1985); Halliwell et al., Free Radicals In Biology And Medicine, pages 1-19 (Oxford University 1989); Halliwell and Gutteridge, Arch. Biochem. Biophys., 280, 1-8 (1990); Quinlan et al., J. Pharmaceutical Sci., 81, 611-614 (1992) 참조).

[0007] 이와 같은 사실에도 불구하고, 뇌허혈 치료를 위해 알부민을 사용하려는 시도는 복잡한 결과를 보였다. 알부민은 뇌허혈 동물 모델에서 신경보호활성을 갖거나 갖지 않는 것으로 보고되었다 (Huh et al., Brain Res., 804, 105-113 (1998) and Remmers et al., Brain Res., 827, 237-242 (1999), Little et al., Neurosurgery, 9, 552-558 (1981) 및 Beaulieu et al., J. Cereb. Blood Flow. Metab., 18, 1022-1031 (1998) 비교).

[0008] 또한, 절제된 심장 보존용 심정지액에 알부민을 사용한 경우에도 복잡한 결과를 얻었다. 문헌 [Dunphy et al., Am. J. Physiol., 276, H 1591-H1598 (1999)]에서 보고된 바와 같이, 절제된 심장 보존용 표준 심정지액에 알부민을 첨가하여도 24시간 동안 용액을 재관류시킨 심장의 기능을 개선시키지 못하였다. 심장은 알부민 및 수개

의 인헨서 (인슐린, ATP, 코르티코스테론 및 피루브산)을 포함하는 심정지액으로 재관류할 때 기능의 개선을 보였다. 이것은 알부민 단독 처리시뿐만 아니라 인헨서 단독 처리시에는 심장 기능을 크게 개선시키지 않았기 때문에 시너지 효과이었다. 알부민 함유 심정지액 사용시에 심장 기능이 개선된다는 초기 보고서는 또한 인헨서와 알부민 사이의 시너지 효과에 기인한 것으로 생각하였다 (Dunphy et al., Am. J. Physiol., 276, H1591-H1598 (1999) 및 Hisatomi et al., Transplantation, 52, 754-755 (1991), 본원에 참고로 인용됨). 다른 연구에서, 알부민을 함유하는 심정지액으로 재관류한 심장은 알부민 비함유 용액에 비해 투여량 의존적 방식으로 재관류 손상을 증가시켰다 (Suzer et al., Pharmacol. Res., 37, 97-101 (1998)). 이들 연구 및 다른 연구를 기초로 하여, Suzer 등은 알부민이 심장보호에 효과적이지 않는다고 결론지었다. 이들은 추가로 심정지액에 알부민을 사용하면 알레르기 반응 가능성 및 혈액 제품의 사용과 관련된 위험성 때문에 안전하지 않을 수 있다고 언급하였다.

[0009] 마지막으로, 알부민이 항산화제라는 특징을 갖지만, 알부민이 소교세포에 의한 수퍼옥사이드 음이온 생성을 증가시키는 것으로도 보고되었다 (Si et al., GLIA, 21, 413-418 (1997)). 이러한 결과 때문에, 상기 저자들은 특정 질환에서 뇌혈관 장애 붕괴에 의해 누출되는 알부민은 소교세포에 의한 수퍼옥사이드 음이온의 생성을 강화시키고, 상기 수퍼옥사이드 음이온의 생성 증가는 뇌허혈/재관류 및 일부 신경변성 질병에서 신경 손상의 병인이라고 추측하였다.

[0010] 상기한 바와 같이, 몇개의 알부민의 N-말단 금속 결합 부위는 Cu(II) 및 Ni(II)에 대한 높은 친화도를 보인다. 이들 부위는 심도있게 연구되었고, 일반적인 아미노 말단 Cu(II)- 및 Ni(II)-결합 (ATCUN) 모티프가 확인되었다 (예를 들어, Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997) 참조). ATCUN 모티프는 N-말단에 유리 NH₂를 갖는 단백질 또는 펩티드, 제3 위치의 히스티딘 잔기 및 2개의 개체 펩티드 질소에 존재하는 것으로 정의될 수 있다 (예를 들어, Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997) 참조).

[0011] 따라서, ATCUN 모티프는 펩티드 서열 Xaa Xaa His (여기서, Xaa는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)에 의해 제공된다 (예를 들어, Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997) 참조). Cu(II) 및 Ni(II)는 ATCUN 모티프의 3개의 아미노산에 의해 제공되는 4개의 질소(유리 NH₂의 질소, 2개의 펩티드 질소 및 히스티딘의 이미다졸 질소)에 의해 경미하게 비틀린 정사각형 평면 형태로 결합된다 (예를 들어, Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997) 참조). ATCUN 모티프를 구성하는 3개의 아미노산의 측쇄기는 Cu(II) 및 Ni(II)의 결합에 관여할 수 있고, 이들 3개의 N-말단 아미노산 근처의 아미노산은 또한 상기 금속 이온의 결합에 영향을 줄 수도 있다 (예를 들어, Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997); Bal et al., Chem. Res. Toxicol., 10, 906-914 (1997) 참조). 예를 들어, 인간 혈청 알부민의 N-말단 금속 결합 부위의 서열은 Asp Ala His Lys [서열 1]이고, Asp Ala His에 의해 제공되는 4개의 질소 외에 N-말단 Asp 및 Lys 잔기의 유리 측쇄 카르복실이 Cu(II) 및 Ni(II)의 결합에 관여하는 것으로 보고되었다 (Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997); Laussac et al., Biochem., 23, 2832-2838 (1984); and Sadler et al., Eur. J. Biochem., 220, 193-200 (1994) 참조).

[0012] 알부민 이외의 다른 천연 단백질 및 ATCUN 모티프를 포함하는 비천연 펩티드 및 단백질에서 발견되는 ATCUN 모티프는 합성되었다 (예를 들어, Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997); Bal et al., Chem. Res. Toxicol., 10, 906-914 (1997); Mlynarz, et al., Speciation 98 : Abstracts, <http://www.iate.uszged.hu/-spec98/abstr/mlynar.html> 참조). ATCUN 함유 펩티드 및 단백질의 Cu(II) 및 Ni(II) 착체는 수퍼옥사이드 디스무타제 (SOD) 활성을 보이는 것으로 보고되었다 (Cotelle et al., J. Inorg. Biochem., 46, 7-15 (1992); Ueda et al., J. Inorg. Biochem., 55, 123-130 (1994) 참조). SOD 활성 보고에도 불구하고, 상기 착체는 DNA, 단백질 및 다른 생체분자를 손상시키는 유리 라디칼을 계속 생성시킨다 (Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997); Bal et al., Chem. Res. Toxicol., 10, 915-21 (1997); Ueda et al., Free Radical Biol. Med. 18, 929-933 (1995); Ueda et al., J. Inorg. Biochem., 55, 123-130 (1994); Cotelle et al., J. Inorg. Biochem., 46, 7-15 (1992) 참조). 그 결과, 체내 구리 및 니켈의 유해한 효과의 적어도 일부는 유해한 유리 라디칼을 생성시키는 ATCUN 함유 단백질에 대한 Cu(II) 및 Ni(II)의 결합 때문이라는 가설이 정립되었다 (Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997); Bal et al., Chem. Res. Toxicol., 10, 915-921 (1997); Cotelle et al., J. Inorg. Biochem., 46, 7-15 (1992). Koch et al., Chem. & Biol., 4, 549-60 (1997) 참조). ATCUN 함유 펩티드의 Cu(II) 착체에 의해 생성되는 손상 효과는 시험관내 암세포를 죽이고 체내에서의 항종양 효과를 생성시키기 위해 이용하였다 (Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997) 참조).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서, 상기한 바와 같은 본 발명의 목적은 반응성 산소종 (ROS)에 의한 분자, 세포 및 조직 손상을 저하시키는 방법인 금속 결합 화합물 및 그의 용도를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 동물에서 반응성 산소종 (ROS)에 의한 손상을 저하시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 유효량의 화학식 P_1-P_2 의 금속 결합 펩티드 또는 생리학상 허용되는 그의 염을 동물에게 투여하는 것을 포함한다.

[0015] 또한, 본 발명은 동물로부터 분리된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 상기 조직 또는 기관을 유효량의 화학식 P_1-P_2 의 펩티드 또는 생리학상 허용되는 그의 염을 포함하는 용액과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0016] 본 발명은 또한 금속 농도의 저하가 필요한 동물에서 금속의 농도를 저하시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 유효량의 화학식 P_1-P_2 의 금속 결합 펩티드 또는 생리학상 허용되는 그의 염을 동물에게 투여하는 것을 포함한다.

[0017] 또한, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 화학식 P_1-P_2 의 펩티드 또는 생리학상 허용되는 그의 염을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0018] 추가로, 본 발명은 동물로부터 분리된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상 저하용 키트를 제공한다. 이 키트는 화학식 P_1-P_2 의 펩티드를 보유하는 용기를 포함한다.

[0019] 화학식 P_1-P_2 에서,

[0020] P_1 는 $Xaa_1 Xaa_2 His$ 또는 $Xaa_1 Xaa_2 His Xaa_3$ 이고,

[0021] P_2 는 $(Xaa_4)_n$ 이다.

[0022] Xaa_1 은 글리신(Gly), 알라닌(Ala), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 아스파르트산(Asp), 아스파라긴(Asn), 글루탐산(Glu), 글루타민(Gln), 리신(Lys), 히드록시리신(Hylys), 히스티딘(His), 아르기닌(Arg), 오르니틴(Orn), 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr), 트립토판(Trp), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met) 또는 α -히드록시메틸세린(HMS)이다. Xaa_1 는 Asp, Glu, Arg 또는 HMS가 바람직하다. Xaa_1 는 Asp 또는 Glu이 보다 더 바람직하다. Xaa_1 는 Asp가 가장 바람직하다.

[0023] Xaa_2 는 Gly, Ala, β -Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Hylys, His, Arg, Orn, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met 또는 HMS이다. Xaa_2 는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Asn, Met, His 또는 HMS이 바람직하다. Xaa_2 는 Ala, Val, Thr, Ser 또는 HMS이 보다 더 바람직하고, Xaa_2 는 Ala, Thr 또는 HMS가 더욱 더 바람직하고, Ala이 가장 바람직하다.

[0024] Xaa_3 은 Gly, Ala, Val, Lys, Arg, Orn, Asp, Glu, Asn, Gln 또는 Trp이고, Lys이 바람직하다.

[0025] Xaa_4 는 임의의 아미노산이다.

[0026] 마지막으로, n은 0 내지 100, 바람직하게는 0 내지 10, 보다 바람직하게는 0 내지 5, 가장 바람직하게는 0이다.

[0027] 바람직한 실시형태에서, 존재할 경우 β -Ala 이외의 P_1 의 하나 이상의 아미노산은 D-아미노산이다. 바람직하게는, D-아미노산은 is Xaa_1 , His, 또는 둘 모두이다. 가장 바람직하게는, β -Ala 이외의 P_1 의 모든 아미노산은 D-아미노산이다. 다른 바람직한 실시형태에서, β -Ala 이외의 다른 P_1 의 하나 이상의 아미노산은 D-아미노산이고, P_2 의 아미노산의 50% 이상도 역시 D-아미노산이다. 가장 바람직하게는, P_2 의 모든 아미노산은 D-아미노산이다.

- [0028] 또다른 바람직한 실시형태에서, P_1 및(또는) P_2 의 하나 이상의 아미노산은 (a) 금속 이온에 결합하는 P_1 의 능력을 변경시키지 않으면서 펩티드의 친지질성을 증가시키는 치환체, (b) 금속 이온에 결합하는 P_1 의 능력을 변경시키지 않으면서 단백질 분해 효소로부터 펩티드를 보호하는 치환체 또는 (c) 금속 이온에 결합하는 펩티드의 능력을 개선시키는 비펩티드성 금속 결합 관능기인 치환체로 치환된다.
- [0029] 본 발명은 동물에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는 다른 방법을 제공한다. 이 방법은 비펩티드성 금속 결합 관능기가 부착된 금속 결합 펩티드 (MBP)의 유효량을 동물에게 투여하는 것을 포함한다. 금속 결합 펩티드 (MBP)는 P_1 - P_2 가 아니라 임의의 금속 결합 펩티드일 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 동물에서 분리된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는 다른 방법을 제공한다. 이 방법은 상기 조직 또는 기관을 비펩티드성 금속 결합 관능기가 부착된 금속 결합 펩티드 (MBP)의 유효량을 포함하는 용액과 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0031] 본 발명은 또한 금속 농도의 저하가 필요한 동물에서 금속 농도를 저하시키는 다른 방법을 제공한다. 이 방법은 비펩티드성 금속 결합 관능기가 부착된 금속 결합 펩티드 (MBP) 유효량을 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 비펩티드성 금속 결합 관능기가 부착된 금속 결합 펩티드 (MBP)를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0033] 추가로, 본 발명은 동물로부터 분리된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상 저하용 키트를 제공한다. 이 키트는 비펩티드성 금속 결합 관능기가 부착된 금속 결합 펩티드 (MBP)를 보유하는 용기를 포함한다.
- [0034] 본 발명은 동물에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는 또다른 방법을 제공한다. 이 방법은 화학식 P_3 -L- P_3 (여기서, 각각의 P_3 은 동일하거나 상이하고, 금속 이온에 결합할 수 있는 펩티드이고, L은 C-말단 아미노산을 통해 2개의 P_3 펩티드를 연결하는 화학기임)의 금속 결합 펩티드 이량체의 유효량을 동물에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 2개의 P_3 펩티드 중 하나 또는 둘 모두는 P_1 이다.
- [0035] 또한, 본 발명은 동물에서 분리된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는 또다른 방법을 제공한다. 이 방법은 상기 조직 또는 기관을 화학식 P_3 -L- P_3 의 금속 결합 펩티드 이량체의 유효량을 포함하는 용액과 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0036] 본 발명은 또한 금속 농도의 저하가 필요한 동물에서 금속 농도를 저하시키는 또다른 방법을 제공한다. 이 방법은 화학식 P_3 -L- P_3 의 금속 결합 펩티드 이량체의 유효량을 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 화학식 P_3 -L- P_3 의 금속 결합 펩티드 이량체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0038] 추가로, 본 발명은 동물로부터 분리된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상 저하용 키트를 제공한다. 이 키트는 화학식 P_3 -L- P_3 의 금속 결합 펩티드 이량체를 보유하는 용기를 포함한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 화학식 P_1 - P_2 (여기서, β -Ala 이외의 P_1 의 하나 이상의 아미노산은 D-아미노산임)의 펩티드 또는 생리학상 허용되는 그의 염을 제공한다.
- [0040] 본 발명에서 제공되는 다른 펩티드는 화학식 P_1 - P_2 의 펩티드 또는 생리학상 허용되는 그의 염으로서, 여기서 P_1 및(또는) P_2 중의 하나 이상의 아미노산은 (a) 금속 이온에 결합하는 P_1 의 능력을 변경시키지 않으면서 펩티드의 친지질성을 증가시키는 치환체, (b) 금속 이온에 결합하는 P_1 의 능력을 변경시키지 않으면서 단백질 분해 효소로부터 펩티드를 보호하는 치환체 또는 (c) 금속 이온에 결합하는 펩티드의 능력을 개선시키는 비펩티드성 금속 결합 관능기인 치환체로 치환된다.
- [0041] 또한, 본 발명은 화학식 P_1 - P_2 (여기서 P_1 는 상기 정의된 바와 같고, P_2 는 금속 결합 부위의 서열을 포함하는 펩티드 서열임)의 펩티드를 제공한다. 특히, P_2 는 $(Xaa_4)_m Xaa_3 His Xaa_2 Xaa_5$, $(Xaa_4)_m His Xaa_2 Xaa_5$, $(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His Xaa_3$, 또는 $(Xaa_4)_m Xaa_5 Xaa_2 His$ (여기서 Xaa_5 는 유리 측쇄기 $-NH_2$ 를 갖는 아미노산이고, m은 0 내지 5임) 중 하나의 서열을 가질 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 비펩티드성 금속 결합 관능기가 부착된 금속 결합 펩티드 (MBP)를 제공한다.

[0043] 마지막으로, 본 발명은 화학식 P₃-L-P₃의 금속 결합 펩티드 이량체를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1a 내지 도 1d는 가능한 치환 지점을 보여주는 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 화학식.

도 2a 및 도 2b는 도 1c (도 2a) 및 도 1b (도 2b)의 화학식의 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 유도체의 합성 모식도.

도 3a 및 도 3b는 시클로헥산 디아민 유도체의 화학식.

도 3c 및 도 3d는 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 시클로헥산 디아민 유도체의 합성 모식도.

도 4는 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 테트라아세트산 유도체의 화학식.

도 5는 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 비스피리딜에틸아민 유도체의 화학식.

도 6a 및 도 6b는 결합된 금속 이온 M이 존재 (도 6a) 및 존재하지 않는 (도 6a) 메소포르피린 IX의 화학식.

도 6c는 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 메소포르피린 IX 유도체의 화학식.

도 7은 단당류의 화학식.

도 8은 분리된 심장을 37°C에서 랑겐도르프 방식으로 동일한 종의 서포트 동물 혈액으로 관류하는 부생 (parabiotic) 혈액 관류 시스템의 모식도.

도 9는 도 8에 도시된 부생 혈액 관류 시스템에서 약물 및 염수를 사용한 분리된 관류 심장의 처리 모식도.

도 10은 도 8 및 도 9에 도시된 혈액 관류된 래트 심장 모델에서 허혈 동안 연축(contracture)에 대한 약물 (D-Asp D-Ala D-His D-Lys)의 효과를 보여주는 연축 대 허혈 기간 그래프. 도 10에서 -□-는 염수 대조군이고, -O-는 약물이다.

도 11은 도 8 및 도 9에 도시된 혈액 관류된 래트 심장 모델에서 좌심실 확장기 압력(LVDP; 20분 예비개입 기준치의 백분율로 표현)의 허혈 후 회복에 대한 약물 D-Asp D-Ala D-His D-Lys의 효과를 보여주는 LVDP 대 재관류 기간의 그래프. *는 $p \leq 0.05$ 를 나타낸다. 도 11에서, -□-는 염수 대조군이고, -O-는 약물이다.

도 12는 도 8 및 도 9에 도시된 혈액 관류된 래트 심장 모델에서 좌심실 확장말기 압력(LVEDP)의 허혈 후 회복에 대한 약물 D-Asp D-Ala D-His D-Lys의 효과를 보여주는 LVEDP 대 재관류 기간의 그래프. *는 $p \leq 0.05$ 를 나타낸다. 도 12에서, -□-는 염수 대조군이고, -O-는 약물이다.

도 13은 도 8 및 도 9에 도시된 혈액 관류된 래트 심장 모델에서 심박동의 허혈 후 회복에 대한 약물 D-Asp D-Ala D-His D-Lys의 효과를 보여주는 심박동(20분 예비개입 기준치의 백분율로 표현) 대 재관류 기간의 그래프. *는 $p \leq 0.05$ 를 나타낸다. 도 13에서, -□-는 염수 대조군이고, -O-는 약물이다.

도 14는 도 8 및 도 9에 도시된 혈액 관류된 래트 심장 모델에서 관류압의 허혈 후 회복에 대한 약물 D-Asp D-Ala D-His D-Lys의 효과를 보여주는 관류압(20분 예비개입 기준치의 백분율로 표현) 대 재관류 기간의 그래프. 도 14에서, -□-는 염수 대조군이고, -O-는 약물이다.

도 15a 및 도 15b는 히드록실 라디칼 생성에 대한 분석에서 532 nm에서의 흡광도 (A532) 대 인큐베이션 시간의 그래프. 도 15a에서, ■= 아스코르베이트 단독, ◆ = 구리 및 아스코르베이트, ▲= 테트라펩티드 (L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1]), 구리 및 아스코르베이트 (테트라펩티드/구리 비율 = 1:1), X = 테트라펩티드, 구리 및 아스코르베이트 (테트라펩티드/구리 비율 = 2:1). 도 15b, ◆ = 구리 및 아스코르베이트, ■= 테트라펩티드, 구리 및 아스코르베이트 (테트라펩티드/구리 비율 = 2:1).

도 16은 수퍼옥사이드 디스무타제 활성에 대한 크산틴 옥시다제 분석에서 1:1의 테트라펩티드/구리 비율에서 억제율(%) 대 테트라펩티드 (L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1])-구리 착체 농도의 그래프.

도 17은 수퍼옥사이드 라디칼 생성에 대한 분석에서 560 nm에서의 흡광도 (A560) 대 시간의 그래프. 도 17에서, ■= 아스코르베이트 단독, ◆ = 구리 및 아스코르베이트, △ = 테트라펩티드 (L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1]), 구리 및 아스코르베이트 (테트라펩티드/구리 비율 = 1:1), X = 테트라펩티드, 구리 및 아스코르베이트 (테

트라펩티드/구리 비율 = 2:1).

도 18은 상이한 방식으로 처리한 DNA의 전기영동 후의 겔. 레인 1 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA (비처리 대조군); 레인 2 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA 및 50 μM CuCl_2 ; 레인 3 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA 및 2.5 mM 아스코르베이트; 레인 4 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA, 2.5 mM 아스코르베이트, 50 μM CuCl_2 및 200 μM 테트라펩티드 (L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1]) (테트라펩티드/구리 비율 = 4:1); 레인 5 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA, 2.5 mM 아스코르베이트, 50 μM CuCl_2 및 100 μM 테트라펩티드 (테트라펩티드/구리 비율 = 2:1); 레인 6 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA, 2.5 mM 아스코르베이트, 50 μM CuCl_2 및 50 μM 테트라펩티드 (테트라펩티드/구리 비율 = 1:1); 레인 7 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA, 2.5 mM 아스코르베이트, 50 μM CuCl_2 및 25 μM 테트라펩티드 (테트라펩티드/구리 비율 = 1:2); 레인 8 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA, 2.5 mM 아스코르베이트, 50 μM CuCl_2 및 12.5 μM 테트라펩티드 (테트라펩티드/구리 비율 = 1:4); 레인 9 - 17 $\mu\text{g/ml}$ 플라스미드 DNA, 2.5 mM 아스코르베이트 및 50 μM CuCl_2 (양성 대조군); 및 레인 10 - DNA 래더.

도 19a는 본 발명에 따른 펩티드 이량체의 화학식.

도 19b 및 도 19c는 본 발명에 따른 펩티드 이량체의 합성 예시도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 발명은 화학식 P_1 - P_2 의 펩티드를 제공한다. P_1 는 $Xaa_1 Xaa_2 His$ 또는 $Xaa_1 Xaa_2 His Xaa_3$ 이고, 여기서 Xaa_1 , Xaa_2 및 Xaa_3 은 상기 정의한 바와 같다. P_1 은 원소주기율표의 1b-7b 또는 8족의 전이금속 이온 (V, Co, Cr, Mo, Mn, Ba, Zn, Hg, Cd, Au, Ag, Co, Fe, Ni 및 Cu 포함) 및 다른 금속 이온 (As, Sb 및 Pb 포함)에 결합하는 금속 결합 펩티드 서열이다. P_1 에 의한 금속 이온의 결합은 상기 금속 이온에 의한 ROS의 생성 및(또는) 축적을 저해 (즉, 저하 또는 억제)하고(하거나) 결합한 금속 이온에 의해 계속 생성될 수 있는 ROS에 의한 손상을 펩티드 자체에 대해 표적으로 만든다. 그 결과, P_1 에 대한 금속 이온의 결합이 존재하지 않을 경우 ROS에 의해 야기될 수 있는 손상이 저하된다. 특히, P_1 은 Cu(II), Ni(II), Co (II) 및 Mn (II)에 높은 친화도로 결합한다. 따라서, 구리 및 니켈에 의한 ROS의 생성 및 축적에 의해 야기되는 손상을 특히 효과적으로 저하시킬 수 있다.
- [0046] P_1 에서, Xaa_1 은 Asp가 가장 바람직하고, Xaa_2 는 Ala이, Xaa_3 은 Lys이 가장 바람직하다. 따라서, P_1 의 바람직한 서열은 Asp Ala His 및 Asp Ala His Lys [서열 1]이다. 가장 바람직한 P_1 서열은 Asp Ala His Lys [서열 1]이다. Asp Ala His은 Cu(II) 및 Ni(II)의 고친화도 결합에 필요한 인간 혈청 알부민의 N-말단 금속 결합 부위의 최소 서열이고, Lys은 상기 부위에 대한 상기 금속 이온의 결합에 기여하는 것으로 보고되었다. P_1 의 다른 서열은 인간 이외의 다른 동물에서 사용하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0047] P_2 는 $(Xaa_4)_n$ (여기서, Xaa_4 는 임의의 아미노산이고, n 은 0 내지 100임)이다. n 이 클 경우 ($n > \text{약 } 20$), 펩티드는 세포외에서 ROS에 의한 손상을 저하시킬 것이다. 펩티드가 작을수록 세포에 보다 잘 도입되기 때문에, 보다 작은 펩티드는 세포내 및 세포외 모두에서 ROS에 의한 손상을 저하시키는데 사용할 수 있다. 또한, 펩티드가 작을수록 단백질 분해가 더 어렵다. 따라서, P_2 에서 n 은 0 내지 10이 바람직하고, 0 내지 5가 보다 바람직하고, 0이 가장 바람직하다. P_2 는 임의의 서열일 수 있지만, P_2 는 (1) 전이금속에 결합하거나, (2) 펩티드의 세포막을 통과하는 능력 및(또는) 표적 조직에 도달하는 능력 (예를 들어 뇌혈관 장벽을 통과할 수 있는 능력)을 증강시키기 위해 소수성이거나, 또는 (3) 펩티드의 활성을 안정화 또는 증강시키는 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, P_1 과 함께 P_2 는 인간, 래트 또는 소 혈청 알부민과 같은, 구리 및 니켈에 대한 고친화도를 갖는 N-말단 금속 결합 부위를 갖는 단백질의 N-말단 서열일 수 있다. n 이 100인 경우에, 펩티드는 상기 알부민의 도메인 1의 서열을 가질 것이다.
- [0048] 전이금속 이온에 대한 결합 부위를 포함하는 많은 펩티드의 서열은 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 4,022,888, 4,461,724, 4,665,054, 4,760,051, 4,767,753, 4,810,693, 4,877,770, 5,023,237, 5,059,588, 5,102,990, 5,118,665, 5,120,831, 5,135,913, 5,145,838, 5,164,367, 5,591,711, 5,177,061, 5,214,032, 5,252,559, 5,348,943, 5,443,816, 5,538,945, 5,550,183, 5,591,711, 5,690,905, 5,759,515, 5,861,139, 5,891,418, 5,928,955 및 6,017,888, PCT 출원 공개 WO 94/26295, WO 99/57262 및 WO 99/67284, 유럽 특허 출

원 327263, Lappin et al., Inorg. Chem., 17, 1630-34 (1978), Bossu et al., Inorg. Chem., 17, 1634-40 (1978), Chakrabarti, Protein Eng., 4, 57-63 (1990), Adman, Avances In Protein Chemistry, 42, 145-97 (1991), Cotelle et al., J Inorg. Biochem., 46, 7-15 (1992), Canters et al., FEBS, 325, 39-48 (1993), Regan, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Smuct., 22, 257-281 (1993), Ueda et al., J Inorg. Biochem., 55, 123-30 (1994), Ueda et al., Free Radical Biol. Med., 18, 929-33 (1995), Regan, TIBS, 20, 280-85 (1995), Ueda et al., Chem. Pharm. Blill., 43, 359-61 (1995), Bal et al., Chem. Res. Toxicol., 10, 906-914 (1997), Bal et al., Chem. Res. Toxicol., 10, 915-21 (1997), Koch et al., Chem. Biol., 4, 549-60 (1997), Kowalik-Jankowska et al., J. Inorg. Biochem., 66, 19396 (1997), Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997), Prince et al., TIBS, 23, 19798 (1998), Mlynarz, et al., Speciation 98 : Abstracts, <http://www.iate.uszeged.hu/~spec98/abstr/mlynar.html>, 및 Aitken, Molec. Biotechnol., 12, 241-53 (1999), Whittal et al., Protein Science, 9, 332-343 (2000) 참조). P₂는 상기 펩티드의 금속 결합 부위의 1 이상의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면 Koch et al., Chem. Biol., 4, 549-60 (1997)에는 P₂가 Cu(I) 결합 부위의 서열: Met Xaa₄ Met; Met Xaa₄ Xaa₄ Met; Cys Cys, Cys Xaa₄ Cys; Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys; Met Xaa₄ Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys; 또는 Gly Met Thr Cys Xaa₄ Xaa₄ Cys [SEQ ID NO:8] (여기서 Xaa₄는 아미노산이다)중 하나의 서열을 가질 수 있음이 기술되어 있다.

[0049] P₂가 금속 결합 부위를 포함할 경우, P₁과 P₂의 금속 결합 부위 사이에 짧은 스페이서 서열을 포함하여 P₁과 P₂의 금속 결합 부위가 상호협력하여 효과적으로 금속 이온에 결합할 수 있도록 하는 서열을 갖는 것이 바람직하다 (2:1의 펩티드:금속 착체에 유사; 실시예 10 참조). 바람직하게는, 스페이서 서열은 1-5, 바람직하게는 1-3, 중성 아미노산으로 구성된다. 따라서, 스페이서 서열은 Gly, Gly Gly, Gly Ala Gly, Pro, Gly Pro Gly 등일 수 있다.

[0050] 특히, P₂가 금속 결합 부위를 포함할 경우, 서열 (Xaa₄)_m Xaa₃ His Xaa₂ Xaa₅, (Xaa₄)_m His Xaa₂ Xaa₅, (Xaa₄)_m Xaa₅ Xaa₂ His Xaa₃, 또는 (Xaa₄)_m Xaa₅ Xaa₂ His 중의 하나를 포함하는 것이 바람직하다. Xaa₂, Xaa₃ 및 Xaa₄는 상기 정의한 바와 같고, m은 is 0-5, 바람직하게는 1-3이다. Xaa₄ 아미노산은 P₁과 P₂의 금속 결합 부위 사이에 짧은 스페이서 서열을 형성하여 P₁과 P₂의 금속 결합 부위가 상호협력하여 금속 이온에 결합할 수 있도록 하는 것이 바람직하고, Xaa₄는 중성 아미노산 (상기 문단 참조)이 바람직하다. Xaa₅는 유리 측쇄 -NH₂를 갖는 아미노산, 바람직하게는 Orn 또는 Lys, 보다 바람직하게는 Orn이다 (Harford and Sarkar, Acc. Chem. Res., 30, 123-130 (1997) 참조 (펩티드 서열 내의 Orn의 유리 측쇄 -NH₂는 ATCUN 모티프의 유리 N-말단 -NH₂를 성공적으로 치환하는 것으로 보고되었다)). 따라서, 예를 들어, P₁-P₂는 Asp Ala His Gly Gly His Ala Orn [서열 2]일 수 있다.

[0051] 펩티드의 아미노산은 L-아미노산, D-아미노산, 또는 이들의 조합물일 수 있다. 바람직하게는, P₁의 아미노산의 적어도 하나는 β-Ala를 제외하고 D-아미노산 (바람직하게는 Xaa₁ 및(또는) His)이다. 가장 바람직하게는, β-Ala 외의 다른 모든 P₁의 아미노산은 D-아미노산이다. 또한, 바람직하게는 약 50%의 P₂ 아미노산은 D-아미노산이고, 가장 바람직하게는 P₂의 모든 아미노산은 D-아미노산이다. D-아미노산은, D-아미노산을 포함하는 펩티드가 단백질 분해 효소, 예를 들어 동물 (인간 포함)에게 펩티드 투여시에 접촉하거나 펩티드를 포함하는 용액으로 관류되는 절제된 기관에 존재하는 효소에 대해 저항성을 갖기 때문에 바람직하다. 또한, D-아미노산의 사용은 펩티드가 고친화도로 구리에 결합하는 능력을 포함하여 금속 이온에 결합하는 펩티드의 능력을 변경시키지 않을 것이다.

[0052] 본 발명의 펩티드는 당업계에 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, L-아미노산, D-아미노산 또는 L- 및 D-아미노산의 조합물을 포함하는 펩티드는 표준 고상 펩티드 합성 방법으로 합성할 수 있다. 적합한 기술은 당업계에 공지되어 있고, 문헌 [Merrifield, in Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds. 1973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963) ; Davis et al., Biochem. Int'l, 10, 394-414 (1985) ; Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (1969); 미국 특허 3, 941,763 및 5, 786,335; Finn et al., in The Proteins, 3rd ed., vol. 2, pp. 105-253 (1976); 및 Erickson et al. in The Proteins, 3rd ed., vol. 2, pp. 257-527 (1976), 폴란드 특허 315474 (synthesis of HMS-containing peptides)]에 기재된 기술을 포함한다. 별법으로, 펩티드가 L-아미노산만을 포함할 경우, 재조합 DNA 기술에 의해 합성할 수

있다. 재조합 DNA 방법 및 이 방법에 적합한 숙주 세포, 벡터 및 다른 시약은 공지되어 있다 (예를 들어 Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1982), Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989) 참조).

[0053] 본 발명은 추가로 단백질 분해 효소에 대해 보다 저항성이 크거나, 보다 지용성(보다 용이하게 세포막을 통과하고(하거나) 뇌와 같은 표적 기관에 도달하도록 함)이거나 또는 두 특성을 모두 갖는, L-아미노산, D-아미노산 또는 L- 및 D-아미노산의 조합물로 구성된 펩티드 P_1 - P_2 의 유도체를 포함한다. 도 1a에 도시된 바와 같이, P_1 은 P_1 의 금속 결합 기능을 변경시키지 않으면서 화살표로 표시된 영역에서 변형될 수 있다. 특히, P_1 은 1번 또는 2번 탄소에서 R_1 로 치환될 수 있고, P_1 의 말단 -COOH는 보호기 R_2 로 치환될 수 있다 (도 1b 내지 도 1d). P_2 는 P_2 가 단백질 분해 효소에 대해 보다 저항성이 크거나, 보다 지용성이거나 또는 두 특성을 모두 갖도록 P_1 에 대해서 설명한 바와 유사한 방식으로 변형될 수 있다.

[0054] R_1 은 탄소수 1 내지 16의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기일 수 있고, 용어 "알킬"은 R 및 S 이성질체를 포함한다. R_1 은 또한 1 또는 2개의 고리를 포함하는 아릴 또는 헤테로아릴일 수 있다. 용어 "아릴"은 하나 이상의 방향족 고리 (예를 들어, 페닐, 나프틸 및 디페닐)을 포함하는 화합물을 의미한다. 용어 "헤테로아릴"은 하나 이상의 고리가 S, N 또는 O 중 하나 이상의 원자를 포함하는 아릴을 의미한다. 이들 치환은 금속 이온에 결합하는 P_1 의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는다. 특히, 고친화도로 구리와 결합하는 P_1 의 능력은 상기 치환에 의해 감소하지 않는다. 예를 들어, 2번 탄소 (도 1c 참조, R_1 은 n-부틸임)에 부착된 n-부틸과 같은 치환체의 일부는 알킬기의 유도 효과에 의해 구리와 같은 금속 이온에 대한 펩티드의 친화도를 증가시켜야 한다. 아릴, 헤테로아릴 또는 장쇄 알킬 (탄소수 약 6 내지 16)에 의한 2번 탄소의 치환 (도 1c)은 지질막을 통한 펩티드의 수송을 증가시켜야 한다.

[0055] 상기한 바와 같이, 고상 합성법에 의해 펩티드를 합성하는 방법은 공지되어 있다. 상기 방법은 도 1b 및 도 1c에 도시된 바와 같은 유도체를 제조하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 도 1c에 도시된 P_1 의 유도체 (R_1 은 옥틸임)는 도 2a에 도시된 바와 같이 제조할 수 있다. 도 2a에서, 타원형 성분은 중합체 수지를 의미하고, R_p 는 표준 카르복실 보호기이다. 도 2a에 도시된 바와 같이, 옥탄산 (새로 증류됨)은 무수 브롬, 이어서 삼염화인으로 처리된다. 혼합물을 약 100°C로 가열하여 이 온도에서 4시간 동안 유지한다. 증류에 의해 α -브로모옥탄산을 무색 액체로서 수득한다. 브롬산의 아미노화는 산 및 암모니아 용액을 40 내지 50°C에서 30시간 동안 정치시켜 수행한다. 아미노산의 옥틸 유도체는 메탄올 세척으로 브롬화암모늄을 제거하여 수득한다. 전통적인 분할 방법은 목적하는 광학상 순수한 D-형태를 제공한다. R_1 이 알킬, 아릴 또는 헤테로아릴인 다른 유도체는 도 2a에 도시된 방법으로 제조할 수 있다.

[0056] 또한, R_1 이 페닐인, 도 1b에 도시된 P_1 의 유도체는 도 2b에 도시된 방법으로 제조할 수 있다. 도 2b에서, 중합체는 수지이고, t-Bu은 t-부틸이고, Bz는 벤질이다. R_1 이 알킬, 아릴 또는 헤테로아릴인 다른 유도체는 도 2b에 도시된 방법으로 제조할 수 있다.

[0057] R_2 는 $-NH_2$, $-NHR_1$, $-N(R_1)_2$, $-OR_1$, 또는 R_1 일 수 있고(도 1d 참조), 여기서 R_1 은 상기 정의된 바와 같다. 상기 유도체는 당업계에 공지된 방법에 의해 수지로부터 펩티드를 제거하기 전에 고상 펩티드 합성의 마지막 단계로서 제공될 수 있다. R_2 치환은 금속 이온에 결합하는 P_1 의 능력을 실질적으로 저하시키지 않는다.

[0058] 또한, P_1 및 P_2 는 금속 이온에 결합하는 비펩티드성 관능기로 치환될 수 있다. 이들 금속 결합 관능기는 펩티드의 하나 이상의 매달린 기에 부착될 수 있으며, 생성 펩티드 유도체는 P_1 에 의해 제공되는 결합 부위 이외에 금속 이온에 결합할 수 있는 하나 이상의 부위 및 임의로 P_2 에 의해 제공되는 결합 부위를 보유할 수 있다. 그 결과, 상기 펩티드 유도체의 금속 이온에 결합하는 능력은 대응하는 비변형 펩티드에 비해 개선된다. 예를 들어, 상기 펩티드 유도체는 하나 대신에 동일한 종류의 금속 이온 2개 (예를 들어 2개의 Cu(II))에 결합할 수 있거나, 한 종류의 금속 이온 대신에 2개의 상이한 금속 이온 (예를 들어, 하나의 Cu(II) 및 하나의 Fe(III))에 결합할 수 있거나, 또는 대응하는 비변형 펩티드보다 한개의 금속 이온에 더 잘 (예를 들어 더 큰 친화도로) 결합할 수 있다.

[0059] 금속 결합 관능기는 폴리아민 (예를 들어 디아민, 트리아민 등)을 포함한다. 적합한 디아민은 1,2-알킬디아민,

바람직하게는 알킬 디아민 (여기서 알킬은 2 내지 10개의 탄소 원자를 함유함, 예를 들어 $H_2N-(CH_2)_n-NH_2$ ($n = 2-10$))을 포함한다. 적합한 디아민은 또한 1,2-아릴디아민, 바람직하게는 벤젠 디아민 (예를 들어, 1,2-디아미노벤젠)을 포함한다. 적합한 디아민은 추가로 1,2-시클릭 알칸 디아민을 포함한다. "시클릭 알칸"은 각각 5 내지 7개의 탄소 원자를 포함하는 1 내지 3개의 고리를 포함하는 화합물이다. 바람직하게는, 시클릭 알칸 디아민은 1,2-디아미노시클로hexan (시클로hexan 디아민)이다.

[0060] 특히 바람직한 디아민은 1,2-디아미노시클로hexan이다 (도 3a 및 도 3b). 이전에 수행된 연구 [Rao & P. Williams (J. ChromatographyA, 693, 633 (1995))]는 시클로hexan 디아민 유도체가 다양한 금속 이온에 결합함을 밝힌 바 있다 (도 3a, PYR은 피리딘임). 생성되는 금속 킬레이터는 아미노산 및 펩티드를 분할하는데 성공적으로 사용되었고, 이것은 그 분자가 α -아미노산에 대한 매우 높은 친화도를 갖고 많은 면에서 특유한, 매우 안정한 배위결합 착체를 형성한다는 것을 보여준다. 1,2-디아미노시클로hexan은 본 발명의 펩티드가 부착될 수 있는 반응성 아미노 관능기를 갖는다 (도 3b참조, M은 금속 이온이고, 적어도 하나의 R_4 는 -알킬-CO-펩티드, -아릴-CO-펩티드, -아릴-알킬-CO-펩티드, 또는 -알킬-아릴-CO-펩티드임 (도 3c 및 도 3d 참조)). 다른 R_4 는 동일하거나 -알킬-COOH, -아릴-COOH, -아릴-알킬-COOH 또는 알킬-아릴-COOH일 수 있다. 도 3b에 도시된 종류의 유도체는 복수개의 금속 결합 부위를 갖고, 이에 따라 비치환된 펩티드보다 용이하게 금속 이온에 결합할 것으로 예상할 수 있다. 또한, 시클로hexan 관능기의 존재에 의해, 화합물은 그의 지질막을 통한 수송을 돕는 지질 유사 특성을 가질 것이다.

[0061] 본 발명의 펩티드의 시클로hexan 디아민 유도체는 2개의 별개의 경로에 의해 제조할 수 있다. 제1 경로는 알데히드를 사용한 초기 축합 및 환원을 수반한다 (도 3c 참조, Bz는 벤질임). 많은 알데히드 (알킬 및 아릴)은 실온에서 시클로hexan 디아민과 용이하게 반응하여 옥심을 형성한다. 옥심은 혐기성 조건 하에서 수소화붕소나트륨을 사용하여 환원시켜 2가산 유도체를 생성시킬 수 있다. 이어서, 카르복시 잔기는 카르복시 보호된 P_1 에 존재하는 유리 아미노기와 반응하여 펩티드의 시클로hexan 디아민 유도체를 생성시킨다. 제2 경로는 도 3d에 도시한 바와 같은 직접 알킬화이다. 예를 들어, 시클로hexan 디아민은 브로모아세트산으로 처리하여 디아세트산 유도체를 생성시킨다. 카르복시 잔기는 이어서 카르복시 보호된 P_1 에 존재하는 유리 아미노기와 반응하여 유도체를 생성시킨다. 도 3d에서, R_5 는 H 또는 다른 펩티드이다. R_5 가 H일 경우, 유도체는 당업계에서 공지된 방법에 의해 추가로 반응시켜 일반적인 카르복실산 유도체, 예를 들어 에스테르를 생성시킬 수 있다. 금속 결합 시험에 의하면, 상기기의 존재 여부는 전체 분자의 금속 결합 능력에 관계가 없음이 밝혀졌다. 그러나, 상기기는 치환체에 따라 분자를 소수성 또는 친수성으로 만들 수 있고, 이것은 분자를 막을 통하여 전달하거나 또는 표적 조직으로 전달하는 것에 대한 효과를 가질 수 있다. 상기 2가지 합성 경로는 상기한 다른 디아민을 사용한 디아민 펩티드 유도체의 합성에도 사용될 수 있다.

[0062] 추가의 적합한 폴리아민 및 폴리아민 유도체 및 이들을 펩티드에 부착시키는 방법은 미국 특허 5,101,041 및 5,650,134에 기재되어 있다. 펩티드에 부착시키기 적합한 다른 폴리아민 킬레이터는 공지되어 있다 (예를 들어 미국 특허 5,422,096, 5,527,522, 5,628,982, 5,874,573 및 5,906,996 및 국제 출원 공개 WO 97/44313, WO 97/49409 및 WO 99/39706 참조).

[0063] 이웃자리 2가산 (vicinal diacid)이 금속 이온에 결합하고 구리에 대한 친화도가 특히 높다는 것은 공지되어 있다. 따라서, 이웃자리 2가산 관능기를 갖는 펩티드는 금속 결합에 매우 효과적일 것으로 생각된다. 적합한 이웃자리 2가산은 임의의 1,2-알킬 2가산, 예를 들어 디아세트산 (숙신산), 및 임의의 1,2-아릴 2가산을 포함한다.

[0064] 펩티드의 아미노기는 아세트산과 반응하여 2가산 유도체를 생성시킬 수 있다 (도 4 참조). 이것은 수지 결합된 펩티드의 아미노기를 할로젠화 아세트산 (예를 들어 브로모아세트산 또는 클로로아세트산) 또는 할로젠화 아세트산 유도체 (예를 들어 벤질옥시에스테르)과 반응시켜 편리하게 수행할 수 있다. 고상 합성 공정은 용매로 세척함으로써 미반응 물질의 제거를 가능하게 한다. 최종 산물은 가수분해에 의해 수지로부터 방출된다. 본 발명의 펩티드의 다른 2가산 유도체를 동일한 방법으로 제조할 수 있다.

[0065] 폴리아미노폴리카르복실산은 금속, 예를 들어 구리 및 철에 결합하는 것으로 공지되어 있다. 본 발명의 펩티드의 유도체 제조에 적합한 폴리아미노폴리카르복실산 및 이를 펩티드에 부착시키는 방법은 미국 특허 5,807,535 및 5,650,134, 및 국제 출원 공개 WO 93/23425, 미국 특허 5,739,395에 기재되어 있다.

[0066] 또한, 이웃자리 폴리히드록실 유도체도 본 발명에 포함된다. 적합한 이웃자리 폴리히드록실은 단당류 및 다당류 (즉, 이당류, 삼당류 등)를 포함한다. 단당류가 바람직하다 (도 7 참조). 단당류는 2개의 주요 범주, 즉 푸라노

스 및 피라노스로 분류된다. 푸라노스 고리계의 대표적인 예의 하나는 글루코스이다. 글루코스의 히드록실기는 벤질 또는 불안정한 t-부틸옥시 관능기로서 보호될 수 있고, 알데히드는 테트라펩티드의 아민기 (예를 들어 리신의 아민기)와 반응하도록 유리되어 있다. 온화한 환원/가수분해는 단당류 펩티드 유도체를 생성시킨다. 다른 단당류 펩티드 유도체는 상기 방식으로 제조할 수 있다.

[0067] 비스피리디에틸아민 유도체는 2가 금속 이온과 강한 착체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 펩티드에 부착될 경우, 상기 관능기는 구리를 포함한 금속 이온에 대한 추가의 킬레이팅 부위를 제공한다. 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 비스피리디에틸 유도체는 도 5에 도시되어 있다. 상기 테트라펩티드 유도체의 금속 결합 능력은 유도체화되지 않은 펩티드에 비해 3배 이상 증가될 것으로 예상된다. 상기 비스피리디에틸아민 유도체의 제조는 2가산 유도체 합성과 일부 유사성을 갖는다. 테트라펩티드의 2개의 아미노기 (하나는 Asp, 다른 하나는 Lys의 아미노기)는 2-브로모에틸피리딘과 반응하여 4 치환된 펩티드 유도체를 생성시킨다. 반응은 수지 결합된 테트라펩티드를 브로모에틸피리딘과 반응시켜 수행한 후, 산물을 수지로부터 절단한다.

[0068] 페난트롤린은 2가 금속 이온에 결합할 수 있는 또다른 헤테로시클릭 화합물이다. 펩티드의 페난트롤린 유도체는 비스피리디에틸아민 유도체와 동일한 방식으로 합성할 수 있다.

[0069] 포르피린은 모든 생명체에서 발견되는 일군의 화합물이고, 금속에 결합할 수 있는 테트라피롤계 거대고리를 포함한다. 헴, 클로로필 및 코린은 각각 철, 마그네슘 및 코발트를 함유하는 상기 화합물 유형의 대표적인 예이다. 메소포르피린 IX (도 6a 및 도 6b, 여기서 M은 금속 이온임)은 헴으로부터 유래한 것이고, 구리에 대한 특이적 친화도를 갖는 것으로 관찰되었다. 본 발명의 펩티드에 상기 구조를 부가하면 복수개의 구리 결합 부위를 갖는 포르피린-펩티드 유도체를 생성시킨다 (도 6c 참조). 금속 결합시의 기능 이외에, 도 6c에 도시된 테트라펩티드의 위치 3 및 3'의 이미다졸 잔기는 구리 이외의 다른 금속 결합 부위를 제공하여 포르피린-금속 착체를 안정화시킬 수 있다. 특히, 시아노코발아민 (비타민 B-12)는 포르피린 핵 내의 금속으로서 코발트를 포함하고, 착체는 이미다졸기에 의해 안정화된다. 이로부터 유추하면, 포르피린-테트라펩티드 유도체는 포르피린 핵에서 정상적인 생리학적 조건에서 코발트 (또는 다른 금속)에 결합하고, 착체는 His 이미다졸기에 의해 안정화될 것으로 예상된다.

[0070] 도 6c에 도시된 포르피린-펩티드 유도체를 제조하기 위해서, 표준 고상 펩티드 합성법을 사용하여 메소포르피린 IX 상의 카르복실기를 활성화시켜 펩티드의 아미노기와 커플링시킬 수 있다. 일반적으로, 수지 결합된 펩티드의 리신 잔기의 유리 아미노기는 카르복시 활성화된 포르피린 핵과 커플링될 수 있다. 축합 산물은 표준 방법을 사용하여 수지로부터 절단될 수 있다. 이 방법을 사용하여 본 발명의 펩티드의 다른 포르피린 유도체를 합성할 수 있다.

[0071] 다른 적합한 포르피린 및 거대고리 킬레이터 및 이를 펩티드에 부착시키는 방법은 미국 특허 5,994,339 및 5,087,696에 기재되어 있다. 펩티드에 부착될 수 있는 다른 포르피린 및 거대고리 킬레이터는 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,422,096, 5,527,522, 5,628,982, 5,637,311, 5,874,573 및 6,004,953, 국제 출원 공개 WO 97/44313 및 WO 99/39706 참조).

[0072] 다른 상이한 금속 킬레이터 및 이를 단백질에 부착시키는 방법은 미국 특허 5,683,907에 기재되어 있다.

[0073] 디티오카르바메이트는 철을 포함하여 금속에 결합하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 펩티드의 유도체 제조에 적합한 디티오카르바메이트는 미국 특허 5,380,747 및 5,922,761에 기재되어 있다.

[0074] 또한, 히드록시피리돈은 철 킬레이터인 것으로 알려져 있다. 본 발명의 펩티드의 유도체 제조에 적합한 히드록시피리돈은 미국 특허 4,912,118 및 5,104,865, 및 국제 출원 공개 WO 98/54138에 기재되어 있다.

[0075] 또다른 비펩티드성 금속 킬레이터는 당업계에 공지되어 있거나 개발될 수 있다. 화합물을 단백질 및 펩티드에 부착시키는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 비펩티드성 금속 킬레이터를 본 발명의 펩티드에 부착시키는 것은 당업자가 용이하게 수행할 수 있다 (예를 들어, 상기 부착 방법 설명에서 언급한 특허 참조).

[0076] 예상할 수 있는 바와 같이, 비펩티드성 금속 결합 관능기는 펩티드 P₁-P₂와 동일한 방식으로 또다른 금속 결합 펩티드 (MBP)에 부착할 수 있다. 생성되는 펩티드 유도체는 MBP의 금속 결합 부위 이외에 하나 이상의 금속 결합 관능기를 포함할 수 있다. 바람직하게는 MBP는 바람직하게는 2-10, 보다 바람직하게는 3-5의 아미노산을 포함한다. 바람직하게는, MBP는 하나 이상의 D-아미노산을 포함하고, 가장 바람직하게는 MBP의 모든 아미노산은 D-아미노산이다. 상기한 바와 같이, 많은 금속 결합 펩티드의 서열은 알려져 있다. 이들 펩티드 및 이들 펩티드의 금속 결합 부위를 포함하는 펩티드는 상기한 P₁-P₂와 동일한 방식으로 제조할 수 있다. 하나 이상의 금속 결

합 관능기가 부착된 상기 펩티드의 유도체는 펩티드 P_1 - P_2 의 유도체에 대해 상기한 바와 동일한 방식으로 제조할 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명은 화학식 P_3 -L- P_3 의 금속 결합 펩티드 이량체를 제공한다. P_3 은 금속 이온에 결합할 수 있는 임의의 펩티드이고, 각각의 P_3 은 동일하거나 상이하다. 각각의 P_3 은 바람직하게는 2-10, 보다 바람직하게는 3-5의 아미노산을 포함한다. 상기한 바와 같이, 금속 결합 펩티드는 공지되어 있고, 각각의 P_3 은 상기 펩티드의 하나 이상의 금속 결합 부위의 서열을 포함할 수 있다. 각각의 P_3 은 비펩티드성 금속 결합 관능기로 치환되는 것을 포함하여 P_1 및 P_2 에 대해 설명한 바와 같이 치환될 수 있지만 (특히 도 6c 참조), 두 P_3 펩티드는 모두 치환되지 않는 것이 바람직하다. 또한, P_3 은 P_3 의 금속 결합 능력을 제공하기 위해서 상기한 바와 같은 비펩티드성 금속 결합 관능기로 치환된 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 각각의 P_3 은 비치환된 금속 결합 펩티드 (즉, 금속 이온에 결합하는 펩티드 서열을 포함하는 비치환된 펩티드)이다. 가장 바람직하게는, P_3 이 중의 하나 또는 둘 모두는 P_1 이다 (즉, 이량체는 서열 P_3 -S- P_1 , P_1 -S- P_3 또는 가장 바람직하게는 P_1 -S- P_1 을 갖는다). P_1 은 상기 정의한 바와 같다.

[0078] L은 각각의 P_3 의 C-말단 아미노산에 부착되는 링커이다. L은 생리학상 허용되는 C 말단 아미노산을 통해 2개의 P_3 펩티드를 연결시킬 수 있는 임의의 화학기일 수 있다. "생리학상 허용되는"은 링커 L을 포함하는 펩티드 이량체가 이량체 내에 링커 L을 도입한 결과로서 펩티드 이량체가 투여되는 동물 (인간 포함) 또는 기관에 무독성이라는 것을 의미한다. 바람직하게는, L은 금속 이온에 협력하여 결합할 수 있도록 2개의 P_3 기를 연결한다 (2:1의 펩티드:금속 착체와 유사, 실시예 10 참조). L은 또한 중성인 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는, L은 바람직하게는 아마이드 결합에 의해 P_3 에 부착된 탄소수 1-18, 바람직하게는 2-8의 직쇄 또는 분지쇄 알칸 또는 알켄 잔기 (예를 들어, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2(CH_3)CH_2-$, $-CHCH-$ 등) 또는 탄소수 3-8, 바람직하게는 탄소수 5-6의 시클릭 알칸 또는 알켄 잔기이다 (도 19a, 화합물 D_1 참조). 펩티드 이량체에 소수성을 부여하기 때문에 상기 링커가 특히 바람직하다. 다른 바람직한 실시형태에서, L은 질소 함유 헤테로시클릭 알칸 잔기 (도 19a, 화합물 D_2 , D_3 및 D_4 참조), 바람직하게는 피페라지드 (도 19a, 화합물 D_2 참조)이다. 또다른 바람직한 실시형태에서, L은 글리세릴 에스테르 (도 19a, 화합물 D_5 참조, R은 바람직하게는 탄소수 1-6의 알킬 또는 아릴 임)이다. 이들 바람직한 링커는 2개의 펩티드 P_3 가 협력하여 금속 이온에 결합하게 하고, 생체적합성이며, 펩티드 이량체는 용이하게 대량으로 제조할 수 있다. "생체적합성"은 링커 L을 포함하는 펩티드 이량체가 투여되는 동물 (인간 포함) 또는 기관에서 링커에 의한 바람직하지 않은 부작용을 생성하지 않는 것을 의미한다.

[0079] 펩티드 이량체의 합성 방법은 도 19b 내지 도 19d에 도시되어 있다. 일반적으로, 두개의 P_3 기의 C 말단 아미노산 (당업계에 공지된 방법 및 보호기로 보호됨)이 L에 부착되고, 생성되는 아미노산 이량체는 표준 펩티드 합성 방법에 사용된다.

[0080] 예를 들어, 각각의 펩티드가 서열 Asp Ala His Lys를 갖는 펩티드 이량체는 산 클로라이드로서 또는 펩티드 합성에 사용되는 표준 커플링제를 사용하여 보호된 리신을 유리 디아민 관능기에 커플링시켜 합성할 수 있다 (도 19b 및 도 19c 참조). 많은 적합한 디아민은 시판되고 있거나 또는 적합한 디아민은 공지의 방법으로 용이하게 합성할 수 있다.

[0081] 예를 들어, 리신 이량체 (2) (도 19b)는 다음과 같이 제조할 수 있다. 무수 디메틸포름아미드 (DMF; 100 mL; 무수 아르곤 플러싱됨) 중의 9-플로오레닐메틸옥시카르보닐 (Fmoc)- 및 t-벤질옥시카르보닐 (Boc)-보호된 D-Lys (Fmoc-D-Lys (Boc)-OH) (20 mmole)의 교반 용액에 부탄-1,4-디아민 1 및 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,2,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TBTU; 0.5 mmole)를 첨가한다. 용액을 실온에서 36시간 동안 교반한다. bis-보호된 리신 (2)를 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피 및 에틸아세테이트/메탄올 혼합물을 사용한 용출에 의해 분리한다. 이어서, 통상의 펩티드 합성 방법을 사용하여 펩티드 이량체 (3)을 보호된 리신 이량체 (2)로부터 제조한다 (도 19b 참조).

[0082] 각각의 펩티드가 서열 Asp Ala His Lys를 갖는 다른 펩티드 이량체는 다음과 같이 합성할 수 있다. 먼저, 상이한 보호된 리신 이량체 (4)는 피페라진 (5)의 2개의 아미노 중심을 아실화하여 합성한다 (도 19c; Chambrier et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 10824-10829 (1999) 참조). 이어서, 나머지 아미노산 잔기를 표준 펩티드

합성 방법을 사용하여 첨가하여 펩티드 이량체 (6)을 생성시킨다 (도 19c 참조).

[0083] 각각의 펩티드가 서열 Asp Ala His Lys을 갖고 L이 글리세릴 에스테르인 펩티드 이량체는 다음과 같이 합성할 수 있다. 도 19d에서 화학식 7의 3-치환된 프로판-1,2-디올 (R은 알킬 또는 아릴임)은 시판되는 제품을 구할 수 있다. 리신 디에스테르 (8) (여기서, R은 메틸임)은 다음과 같이 제조할 수 있다 (도 19d). 무수 톨루엔 (100 mL; 무수 아르곤 플러싱됨) 중의 Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (20 mmole)의 교반 용액에 3-메톡시프로판-1,2-디올 (200 mmole) 및 이미다졸 (15 mmole)을 첨가한다. 용액을 실온에서 36시간 동안 교반한다. 용매를 진공 제거하고, 잔사를 에틸아세테이트에 용해시킨다. 상기 용액을 시트르산 용액 (2%), 물, 0.5 N NaHCO₃ 용액 및 물로 세척한 후, 유기층을 황산마그네슘으로 건조시킨다 (용매를 제거하면 담황색 잔사가 생성된다). bis-보호된 리신 (8)은 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피 및 에틸아세테이트/메탄올 혼합물을 사용한 용출에 의해 분리한다. 이어서, 통상의 펩티드 합성 방법을 사용하여 펩티드 이량체 (9)를 보호된 리신 이량체 (8)로부터 제조한다 (도 19d 참조).

[0084] 금속 결합 화합물의 생리학상 허용되는 염도 본 발명에 포함된다. 생리학상 허용되는 염은 종래의 무독성 염, 예를 들어 무기산 (예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등), 유기산 (예를 들어 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산 등) 또는 염기 (예를 들어 제약상 허용되는 금속 양이온의 히드록시드, 카르보네이트 또는 비카르보네이트)에서 유래한 염을 포함한다. 염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물의 유리 염기 형태를 산으로 중화시켜 제조된다.

[0085] 본 발명의 금속 결합 화합물은 동물의 ROS에 의한 손상의 저하 또는 과도한 금속 이온 농도의 저하에 사용할 수 있다. 이를 위해, 본 발명의 금속 결합 화합물은 동물에 투여된다. 바람직하게는, 동물은 포유동물, 예를 들어 토끼, 염소, 개, 고양이, 말 또는 인간이다. 본 발명의 상이한 화합물의 유효 투여 형태, 투여 방식 및 투여량은 경험적으로 결정할 수 있고, 이러한 결정은 당업자가 용이하게 실시할 수 있다. 유효 투여량은 약 2 내지 약 200 mg/kg, 바람직하게는 약 10 내지 약 40 mg/kg, 가장 바람직하게는 약 20 mg/kg이다. 그러나, 투여량은 사용되는 특정 금속 결합 화합물, 치료되는 질병 또는 질환, 질병 또는 질환의 심도, 투여 경로, 화합물 분비 속도, 치료 기간, 동물에 투여되는 임의의 다른 약물의 특성, 동물의 나이, 크기 및 종류, 및 의학 및 수의학에 공지된 요인에 따라 상이하다는 것을 당업자는 이해할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물의 적합한 1일 투여량은 치료 효과 생성에 효과적인 최저 투여량일 것이다. 그러나, 1일 투여량은 의사 또는 수의사의 의학적 판단에 의해 결정될 것이다. 필요한 경우, 유효 1일 투여량은 2, 3, 4, 5, 6회 이상의 하위 투여량으로서 1일에 걸쳐 적합한 간격으로 분할 투여될 수 있다. 화합물의 투여는 적합한 반응이 달성될 때까지 계속되어야 한다.

[0086] 본 발명의 화합물은 경구, 비내, 직장내, 질내, 비경구 (예를 들어 정맥내, 척추내, 복강내, 피하 또는 근내), 조내, 경피, 구개골내, 뇌내 및 국소 (구강 및 설하 포함)를 포함하여 임의의 적합한 투여 경로에 의해 치료를 요하는 동물 환자에게 투여될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 경구 및 정맥내 투여이다.

[0087] 본 발명의 금속 결합 화합물은 단독으로 투여할 수 있지만, 제약 제제 (조성물)로서 화합물을 투여하는 것이 바람직하다. 본 발명의 제약 조성물은 활성 성분으로서 본 발명의 금속 결합 화합물(들)을 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 및 임의로 하나 이상의 다른 화합물, 약물 또는 다른 물질과 혼합하여 포함한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 상용성이고 동물에 유해하지 않다는 측면에서 "허용가능한" 것이어야 한다. 제약상 허용되는 담체는 당업계에 공지되어 있다. 선택되는 투여 경로에 무관하게, 본 발명의 화합물은 당업자에게 공지된 통상의 방법에 의해 제약상 허용되는 투여 형태로 제제화된다 (예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences 참조).

[0088] *경구 투여에 적합한 본 발명의 제제는 각각 활성 성분으로서 소정량의 본 발명의 화합물을 포함하는 캡슐, 새세이, 환약, 정제, 분말, 과립의 형태로, 또는 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액제로서 또는 수중 유 또는 유중수 액체 에멀전으로서, 또는 엘릭시르 또는 시럽제로서, 또는 향정 (불활성 기재, 예를 들어 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아를 사용) 등의 형태일 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 볼러스, 연약 또는 페이스트로서 투여될 수도 있다.

[0089] 경구 투여를 위한 본 발명의 고체 투여 형태 (캡슐, 정제, 환약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 활성 성분은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 예를 들어 나트륨 시트레이트 또는 이칼슘 포스페이트, 및(또는) (1) 충전제 또는 증량제, 예를 들어 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및(또는) 규산, (2) 결합제, 예를 들어 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및(또는) 아카시아, (3) 보습제, 예를 들어 글리세롤, (4) 붕해제, 예를 들어 아가-아가, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리카이트 및 탄산나트륨, (5) 용액 지연제, 예를 들어 파라핀, (6) 흡수 촉진제, 예를 들어 4급 암모늄 화합물, (7) 습윤

제, 예를 들어 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테레이트, (8) 흡수제, 예를 들어 카올린 및 벤토나이트 점토, (9) 윤활제, 예를 들어 탈크, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고휘 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 술페이트 및 이들의 혼합물 및(또는) (10) 착색제와 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환약의 경우, 제약 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 형태의 고체 조성물은 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등 뿐만 아니라 락토스 또는 유당과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 젤라틴 캡슐로서 사용될 수 있다.

[0090] 정제는 임의로 1종 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 성형함으로써 제조할 수 있다. 압축 정제는 결합제 (예를 들어 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 봉해제 (예를 들어 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로스), 계면활성제 또는 분산제를 사용하여 제조할 수 있다. 성형 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤화된 분말상 화합물의 혼합물을 적합한 기계로 성형하여 제조할 수 있다.

[0091] 정제 및 본 발명의 제약 조성물의 다른 고체 투여 형태, 예를 들어 당의정, 캡슐, 환약 및 과립은 코팅 및 외피, 예를 들어 장용피 및 제약업계에 공지된 다른 코팅을 사용하여 임의로 제조할 수 있다. 또한, 이들은 예를 들어 목적하는 방출 프로필을 제공하도록 비율을 변경할 때 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 리포좀 및(또는) 마이크로스피어를 사용하여 내부의 활성 성분의 서방성 또는 지연 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다. 제약 조성물은 예를 들어 세균 보유 필터를 통한 여과에 의해 멸균처리될 수 있다. 또한, 이들 조성물은 불투명화제를 임의로 포함할 수 있고, 활성 성분만을 방출하거나 또는 임의로 지연된 방식으로 위장관의 특정 부분에서 우선적으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 함침 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 미세캡슐 형태일 수도 있다.

[0092] 본 발명의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분 이외에, 액체 투여 형태는 당업계에 통상 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 용해제 및 유화제, 예를 들어 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 올리브유, 캐스터 오일 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0093] 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 보조제, 예를 들어 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 풍미제, 착색제, 방향제 및 보존제를 포함할 수 있다.

[0094] 현탁액은 활성 성분 이외에 현탁화제, 예를 들어 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미결정질 셀룰로스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트라가칸트 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0095] 직장 또는 질내 투여를 위한 본 발명의 제약 조성물의 제제는 실온에서 고체 상태이지만 체온에서 액체 상태이기 때문에 직장 또는 질내에서 용융되어 활성 화합물을 방출하는 좌약으로서 제공될 수 있고, 1종 이상의 본 발명의 화합물을 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 1종 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합하여 제조할 수 있다. 질내 투여에 적합한 본 발명의 제제는 적합한 것으로 당업계에 공지된 담체를 포함하는 페사리, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제제를 포함한다.

[0096] 본 발명의 화합물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치, 점적제 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 멸균 조건 하에서 제약상 허용되는 담체 및 임의의 완충제 또는 필요한 경우 추진제와 혼합될 수 있다.

[0097] 연고, 페이스트, 크림 및 겔은 본 발명의 화합물 이외에 부형제, 예를 들어 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0098] 분말 및 스프레이는 본 발명의 화합물 이외에 부형제, 예를 들어 락토스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 분말 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 스프레이는 통상의 추진제, 예를 들어 클로로플루오로히드로카본 및 휘발성 불포화 탄화수소, 예를 들어 부탄 및 프로판을 포함할 수 있다.

[0099] 경피 패치제는 본 발명의 화합물의 신체에 대한 조절된 전달을 제공하는 추가의 잇점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 본 발명의 화합물을 적당한 매질, 예를 들어 엘라스토퍼 매트릭스 물질에 용해, 분산 또는 포함시켜 제조할 수 있다. 흡수 증진제는 피부를 통한 화합물의 유입을 증가시키기 위해서 사용될 수 있다. 상기 유입 속도는

속도 조절막을 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 겔에 화합물을 분산시켜 조절할 수 있다.

- [0100] 비경구 투여에 적합한 본 발명의 제약 조성물은 1종 이상의 본 발명의 화합물을 1종 이상의 제약상 허용되는 멸균의 등장 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 직전에 항산화제, 완충액, 제제를 목적하는 피투여자 혈액과 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁화제 또는 농후제를 포함할 수 있는 멸균 주사액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합하여 포함한다.
- [0101] 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브유, 및 주사가능 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레레이트를 포함한다. 적합한 유동성은 예를 들어 코팅 물질, 에스테르 레시틴의 사용, 분산액의 경우 필요한 입도의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0102] 또한, 상기 조성물은 보조제, 예를 들어 습윤제, 유화제 및 분산제를 포함할 수 있다. 또한, 등장제, 예를 들어 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직하다. 추가로, 주사가능 제약 형태의 흡수 연장은 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함시켜 달성할 수 있다.
- [0103] 일부 경우, 약물의 효과를 연장시키기 위해서, 피하 또는 근내 주사로부터 약물의 흡수를 지연시키는 것이 바람직하다. 이것은 수용해도가 낮은 결정 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용하여 달성할 수 있다. 이때, 약물 흡수 속도는 입자 크기 및 결정 형태에 따라 변할 수 있는 용해 속도에 따라 결정된다. 별법으로, 비경구투여된 약물의 지연 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해 또는 현탁시켜 달성된다.
- [0104] 주사가능 침착(depot) 형태는 생분해성 중합체, 예를 들어 폴리락타이드-폴리글리콜라이드 내에 약물의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 약물 대 중합체의 비율 및 사용되는 특정 중합체의 특성에 따라 약물 방출 속도를 조절할 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 무수물 중합체를 포함한다. 침착 주사가능 제제는 신체 조직과 상용성인 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 포획시켜 제조한다. 주사가능 물질은 예를 들어 세균 보유 필터를 통한 여과에 의해 멸균시킬 수 있다.
- [0105] 제제는 단위 투여 또는 다중 투여 밀봉 용기, 예를 들어 앰플 및 바이알로 제공될 수 있고, 사용 직전에 멸균 용액 운반체, 예를 들어 주사수의 첨가만을 필요로 하는 동결건조 조건에서 보관할 수 있다. 즉시 주사 용액 및 현탁액은 상기한 바와 같은 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조할 수 있다.
- [0106] 상기한 바와 같이, ROS는 상이한 질병 및 질환에서 주요 기능을 수행하는 것으로 보고되었다 (Manso, Rev. Port. Cardiol., 11, 997-999 (1992); Florence, Aust. NZJ. Ophthalmol., 23, 3-7 (1992); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995); Knight, Ann. Clin. Lab. Sci., 25, 111-121 (1995); Kerr et al., Heart & Lung, 25, 200-209 (1996) 참조). 과량의 금속 이온이 관여되거나 이에 의해 야기되는 질병도 알려져 있다. 본 발명의 금속 결합 화합물은 임의의 상기 질병 또는 질환, 및 ROS 또는 전이금속이 관여하는 다른 질병 및 질환의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 금속 결합 화합물로 치료될 수 있는 구체적인 질병 및 질환은 성인 호흡 장애 증후군, 노화, AIDS, 아테롬성 경화증 (고혈압, 노쇠, 발기부전), 관절염, 천식, 자가면역질환, 암 (예를 들어 신장, 간, 결장 및 뇌), 발암, 이온화 방사선에 의해 야기되는 세포 손상 (예를 들어 방사선 종양), 만성 육아종성 질병, 간경변, 크론 질병, 당뇨병 (당뇨성 망막병증, 신장병, 발기부전 및 말초혈관질환), 눈병 (예를 들어 백내장, 중심동맥 폐색, 양성 단클론 감마병증, 황반변성), 기종, 염증, 허혈, 신생물질환, 신경학적 외상, 신경변성 질환 (예를 들어 알츠하이머 질병, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨 질병, 다발성 경화증 및 노인성 치매), 헤르페스, 말초혈관 질환, 폐 색전증, 신장병 (투석 환자), 재관류, 쇼크, 화학치료제 투여시에 발생하는 조직 손상, 수술 (예를 들어 이식 수술, 개심 수술 및 조직에 혈액 공급이 차단되는 수술, 및 수술에 의한 사지 허혈 (지혈 손상))후 조직 손상, 독성 반응 (예를 들어 제조제 중독, 전이금속 (구리, 코발트 및 니켈) 중독, 일산화탄소 중독 및 항생물질 독성), 외상성 압괴상 및 율슨 질병 (선천성 구리 과다증)을 포함한다. 본 발명의 금속 결합 화합물로 치료될 수 있는 구체적인 허혈 질환 및 질병은 중추신경계 허혈 [수술 후 뇌허혈, 고열 뇌손상, 주산기 저산소증(뇌성마비), 척추 손상, 발작 (혈전, 색전 또는 출혈성 뇌혈관 사고), 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌손상], 심장 허혈 [급성 심근경색, 협심증, 부정맥, 수술후 심장 허혈, 울혈성 심부전증, 심근 "stunning"], 허혈성 장질환, 태반 허혈, 폐색전, 조직 또는 기관에 혈액 공급이 차단되는 수술 [혈관성형술, 심장 우회로 조성술, 이식 수술 (공여자 기관 및 수용자 모두)], 수술후 사지 허혈 (지혈 손상)을 포함한다.
- [0107] 본 발명의 화합물은 예방적으로 투여하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 허혈 조직 또는 기

관의 재관류 전 및(또는) 재관류와 동시에 (예를 들어 혈관성형술 또는 혈전 용해 약물, 예를 들어 조직 플라스미노겐 활성제 처리 전에 또는 이와 동시에) 투여하는 것이 바람직하다. 물론, 본 발명의 화합물의 은 재관류 완료 후에 일정 기간 동안 계속 투여야 한다. 이와 유사하게, 본 발명의 화합물은 수술 (예를 들어 개심 수술 또는 기관을 동물에게 이식하는 수술) 전에 및(또는) 수술 동안 투여하여야 하고, 화합물의 투여는 수술 후 일정 기간 동안 계속되어야 한다. 예방 투여의 다른 예로서, 본 발명의 화합물은 심각한 상태의 증상 (예를 들어 뇌혈관 허혈 또는 심혈관 허혈)을 보이는 환자에 투여될 수 있고, 환자에 대해 상태를 진단하기 위해 시험된다. 이러한 방식으로, 환자는 상기 상태를 진단하는 시간 동안 보호될 수 있고, 본 발명의 금속 결합 화합물을 사용한 치료는 또한 다른 요법 (예를 들어 뇌혈관 허혈에 대한 조직 플라스미노겐 활성제의 투여)이 실시되는 시간을 연장시킬 수 있다. 다른 예로서, 본 발명의 화합물은 환자가 방사선 치료 (예를 들어 종양 방사선 치료 또는 골수 이식 전에)를 받을 때 투여할 수 있다.

[0108] 또한, 본 발명의 화합물은 둔적 외상 (blunt trauma) 환자 치료에도 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 화합물은 낮은 알부민 수준을 갖는 다중 둔적 외상 환자 치료에 매우 유리할 수 있고, 이것은 낮은 알부민 수준이 상기 환자의 사망 예후이기 때문이다. 보다 구체적으로, 다중 둔적 외상 환자 34명에 대해 연구를 실시하였다. 상기 환자들을 1998년 미국 코네티컷주 덴버 소재의 Swedish Hospital의 중환자실에 수용하였다. 환자의 알부민 수준의 사전 지식이 없는 상태에서 연령, 손상 심도 스코어 (ISS) 및 손상 형태 및 영역에 의해 외상 의사가 2군의 환자로 분류하였다. 한 군은 사망한 환자로 구성되었고, 다른 군은 생존자로 구성되었다. 분류 후에, 독립적인 관찰자에 의한 의료 기록으로부터 승인 알부민 수준을 얻고, 두 군의 알부민 수준을 비교하였다. 17명의 생존자의 경우, 평균 알부민 수준은 3.50 ± 1.00 g/dl이었다. 사망한 17명의 환자의 경우, 평균 알부민 수준은 2.52 ± 0.73 g/dl이었다. 편차 (%)는 각각 28.6 및 28.9이었고, p-값은 0.0026 (95% 신뢰구간 0.3462-0.4771)이었다.

[0109] 본 발명의 화합물은 ROS에 의한 손상을 저하시키기 위해 단독으로 투여될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 화합물은 "유리 라디칼 제거제"와 조합하여 투여될 수 있다. "유리 라디칼 제거제"는 수퍼옥사이드 디스무타제, 카탈라제, 글루타티온 퍼옥시다제, 엽셀렌, 글루타티온, 시스테인, N-아세틸 시스테인, 페니실아민, 알로푸리놀, 옥시푸리놀, 아스코르브산, α -토코페롤, 트롤록스 (수용성 α -토코페롤), β -카로틴, 지방산 결합 단백질, 페노잔, 프로부콜, 시아니다놀-3, 디머캅토프로판올, 인다과미드, 예목시핀, 디메틸 술폭시드 등을 포함한다 (예를 들어, Das et al., Methods Enzymol., 233, 601-610 (1994); Stohs, J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol., 6, 205-228 (1995) 참조). 본 발명의 화합물은 물론 소정의 질환에 대한 표준 요법 (예를 들어 당뇨병 치료를 위한 인슐린)과 함께 투여할 수 있다.

[0110] 또한, 본 발명의 금속 결합 화합물은 동물에서 절제된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상을 저하시키기 위해 사용될 수도 있다. 이를 위해, 조직 또는 기관은 유효량의 본 발명의 금속 결합 화합물을 포함하는 용액과 접촉한다. 많은 적합한 용액이 공지되어 있다 (예를 들어 Dunphy et al., Am. J. Physiol., 276, H1591-H1598 (1999); Suzer et al., Pharmacol. Res., 37, 97-101 (1998); Hisatomi et al., Transplantation, 52, 754-755 (1991); 미국 특허 5,710,172 참조). 상기 용액에 포함되는 펩티드의 유효량은 경험적으로 결정할 수 있고, 이것은 당업자에게 용이한 것이다. 절제된 조직 또는 기관은 수용자에게 이식 또는 연구 목적 (예를 들어 약물 스크리닝을 위해 관류된 간을 사용)으로 사용될 수 있다.

[0111] 본 발명은 또한 동물로부터 절제된 조직 또는 기관에서 ROS에 의한 손상을 저하시키기 위한 키트를 제공한다. 이 키트는 1 이상의 시약을 보유하는 용기 및 절제된 기관 보존에 유용한 다른 물품의 패키지 조합물이다. 키트는 본 발명의 금속 결합 화합물을 보유하는 용기를 포함한다. 적합한 용기는 병, 백, 바이알, 시험관, 주사기 및 당업계에 공지된 다른 용기를 포함한다. 키트는 또한 시판되는 사용자 입장에서 바람직할 수 있는, 당업계에 공지된 다른 물품, 예를 들어 희석제, 완충액, 빈 주사기, 튜브, 가제 패드, 살균 용액 등을 포함할 수 있다.

[0112] 실시예

[0113] 실시예 1: 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 합성

[0114] 본 실시예는 표준 고상 합성법을 사용하여 모두 L-아미노산으로 구성된 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]의 합성에 대해 설명한다. 먼저, Wang 수지 (0.6 mmole; Nova Biochem) 상의 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐 (Fmoc)-보호된 Asp (v COO-에스테르; 톨솔포닐)를 가끔씩 진탕하면서 30분 동안 피페리딘/디메틸포름아미드 (DMF) (40% v/v; 3 ml)의 용액에 현탁시켰다. 이 시간 종료시에, 용매를 따라내고, 수지를 DMF 및 디클로로메탄 (DCM; 5 x 3 ml)으로 순차적으로 세척하였다. 닐히드린 시험을 수행하여 반응을 모니터링하였다. 수지를 DMF (~1 ml)로 팽창시켰다. DMF 중의 알라닌의 C-보호된 t-벤질옥시카르보닐 (Boc) 에스테르를 첨가한 후, 디이소

프로필아민 (8 당량)과 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,2,3,3-테트라메틸우로늄테트라플루오로보레이트 (TBTU-) (4 당량)의 혼합물을 첨가하였다. 수지를 24시간 동안 교반하고, 반응을 Ninhidrin 시험에 의해 모니터링하였다. 상기 기간 종료시에, DMF를 따라내고, 수지를 DMF 및 DCM로 세척하였다. 용액을 따라내고, 비드를 DCM (3 x 2 mL)로 세척하였다. 디펩티드-수지의 보호기를 제거하고, 비드를 DMF에 현탁시켰다. 히스티딘의 아미노 보호된 (벤질옥시) 유도체 (4 mmole)을 첨가한 후, 디이소프로필아민 (8 당량)과 TBTU-(4 당량)의 혼합물을 첨가하였다. 수지를 약 24시간 동안 교반하고, 반응을 Ninhidrin 시험으로 모니터링하였다. 이 기간 종료시에, DMF를 따라내고, 수지를 DMF 및 DCM로 세척하였다. 트리펩티드-수지를 질소 스트림 중에서 단시간 건조시키고, 질소 포화된 DMF 중에 현탁시켰다. 보호된 리신을 첨가한 후, 디이소프로필아민 (8 당량)과 TBTU-(4 당량)의 혼합물을 첨가하였다. 수지를 약 24시간 동안 교반하고, 반응을 Ninhidrin 시험으로 모니터링하였다. 이 기간 종료시에, DMF를 따라내고, 수지를 DMF 및 DCM으로 세척하였다. Boc 보호기를 조심스럽게 제거하여 일반적으로 5 mmole/g이 로딩된, 수지에 결합된 테트라펩티드를 수득하였다. 수지 결합된 테트라펩티드(0.25 gm; 5 mmolar)를 트리플루오로아세트산(TFA)으로 처리하여 24 시간 동안 교반하였다. 이 기간 종료시에, Ninhidrin 시험 결과는 청색을 보였고, 이것은 수지로부터 테트라펩티드가 방출되었음을 나타낸다. 일부 환경에서, 5% (V/V)의 DMF를 TFA에 첨가하면 수지로부터 펩티드의 방출 속도를 촉진하였다. 감압에서 TFA를 제거하여 TFA 염으로서 테트라펩티드 (모두 D)를 수득하여 5°C에서 24시간 동안 진공 건조시켰다. 잔사는 백색 분말이었고, 분광법으로 특성화하였다.

[0115] 테트라펩티드의 많은 에난티오머를 상기 방식으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 펩티드 합성에 D-아미노산을 사용하면 모두 D-아미노산을 포함하는 테트라펩티드를 형성한다. 또한, L-아미노산과 D-아미노산의 조합물을 사용할 수도 있다.

[0116] **실시예 2:** Asp Ala His Lys [서열 1]의 시클로헥산디아민 유도체의 제조

[0117] 타르타르산 염으로서 시스/트랜스 1,2-디아미노시클로헥산 (알드리히-시그마사)을 분할하여 트랜스-디아미노시클로헥산을 제조하였다. R-트랜스 이성질체는 75°C에서 용융되고, S-트랜스 이성질체는 43-45°C 사이에서 용융된다 (Ph. D. Thesis, P. D. Newman, University College, Cardiff, U. K., 1994). 트랜스-디아미노시클로헥산 (10 gm)을 이어서 무수 톨루엔 (30mL)에 현탁시키고, 빙조에서 5°C로 냉각시키고, 톨루엔 (25 mL) 중의 브로모아세트산 (8 gm)을 적가하였다. 첨가 완료시에, 반응 온도를 30°C로 승온시키고, 이 온도를 추가로 5시간 동안 유지하였다. 톨루엔을 증발시키고, R-트랜스 1, 2-디아미노시클로헥산 디아세트산을 헥산/톨루엔으로부터 결정화시켜 백색 고형물을 수득하였다 (수율 70%). 생성물의 특성을 분광법으로 분석하였다.

[0118] 실시예 1에서 제조한 수지 결합된 테트라펩티드 (20 mg)을 DMF (5 mL)에 현탁시키고, R-트랜스 1,2-디아미노시클로헥산 디아세트산 (20 mg)으로 처리한 후, 디이소프로필아민 (8 당량)과 TBTU-(4 당량)의 혼합물을 첨가하였다. 수지를 롤러 상에서 약 24시간 동안 교반하였다. 이어서, 수지를 DMF, 이어서 DCM (5 x 3 mL)으로 세척하고, 부분 건조시켰다. 수지 연결의 가수분해는 수지 결합된 반응산물을 TFA (5 mL; 5hr)로 처리하여 수행하였다. 수지를 분리하여 DCM으로 세척하였다. 세척물을 TFA와 조합하여 진공 농축하였다. 잔사 (시클로헥산디아민 테트라펩티드; 도 3d에 도시한 화학식, R₅는 H임)의 특성을 분광 분석으로 분석하였다.

[0119] **실시예 3:** 테트라펩티드 테트라아세트산의 제조

[0120] 실시예 1에서 제조한 수지 결합된 테트라펩티드 (20 mg)을 DMF (5 mL) 중에 현탁시키고, 과량 (10배)의 클로로아세트산으로 처리하였다. 수지를 실온에서 48시간 동안 교반한 후, 추가로 1시간 동안 60°C로 가열하였다. DMF를 여과에 의해 제거하고, 수지를 DMF, 이어서 DCM (5 x 3 mL)으로 세척하였다. 부분 건조된 수지를 추가로 처리하지 않은 상태로 다음 단계에 사용하였다. 수지 연결의 가수분해는 수지 결합된 반응산물을 TFA (5 mL; 5hr)로 처리하여 수행하였다. 수지를 분리하여 DCM으로 세척하였다. 세척물을 TFA와 조합하여 진공 농축하였다 (수율 30%). 생성물 (도 4에 도시한 화학식)의 특성을 분광법으로 분석하였다.

[0121] **실시예 4:** 메소포르피린 IX 테트라펩티드의 제조

[0122] 실시예 1에서 제조한 수지 결합된 테트라펩티드 (20 mg)을 DMF (5 mL)에 현탁시키고, 메소포르피린 IX 디카르복실산 (10 μ mole; 도 6a에 도시된 화학식)으로 처리한 후, 디이소프로필아민 (8 당량)과 TBTU- (4 당량)의 혼합물을 첨가하였다. 수지를 암실에서 유지된 롤러 상에서 약 24시간 동안 교반하였다. 수지를 DMF, 이어서 DCM (5 x 3 mL)으로 세척하고, 부분 건조시켰다. 수지 연결의 가수분해는 수지 결합된 반응산물을 TFA (5 mL; 5hr)로 처리하여 수행하였다. 수지를 분리하여 DCM/TFA 혼합물(1:1.5 mL)로 세척하였다. 세척물을 조합하여 진공 농축하였다. 포르피린 테트라펩티드 (도 6c에 도시한 화학식)를 준예비 HPLC로 정제하였다 (수율 60%). 그 구조는

분광법으로 확인하였다.

[0123] 상기 과정을 사용하여 다른 포르피린-펩티드, 예를 들어 메소포르피린 I 및 관련 분자를 합성할 수 있다.

[0124] **실시예 5:** 테트라비스피리딜에틸 테트라펩티드의 제조

[0125] 실시예 1에서 제조한 수지 결합된 테트라펩티드 (20 mg)을 DMF (5 mL)에 현탁시키고, 브로모에틸피리딘 (20 μ mole)으로 처리하였다. 이어서, 피리딘 (0.5 mL)을 첨가하였다. 수지를 물러 상에서 약 48시간 동안 교반하였다. 수지를 DMF, 이어서 DCM (5 x 3 mL)으로 세척하여 모든 미반응 모노머를 제거하고, 30분 동안 진공 건조시켰다. 수지 연결의 가수분해는 수지 결합된 반응산물을 TFA (5 mL; 5hr)로 처리하여 수행하였다. 수지를 분리하여 DCM/TFA 혼합물 (1:1.5 mL)로 세척하였다. 세척물을 조합하여 진공 농축하였다. 피리딜에틸 테트라펩티드 유도체 (도 5에 도시한 화학식)를 준예비 HPLC로 정제하였다 (수율 50%). 그 구조는 분광법으로 확인하였다.

[0126] 상기 과정을 다른 헤테로사이클, 예를 들어 페난트롤린 및 관련 분자에 적용할 수 있다.

[0127] **실시예 6:** Asp Ala His Lys [서열 1]의 아릴 유도체의 제조

[0128] 도 1b에 도시한 화학식 (R_1 은 페닐임)의 유도체를 제조하였다. 무수 에탄올 (100 mL) 중의 디에틸아세트아미도 말로네이트 (10 gm)를 에탄올 (5 gm; 50 mL) 중의 에톡시화나트륨의 슬러리에 첨가하여 30분 동안 환류로 가열하였다. 생성물을 10°C로 냉각시키고, 에틸 α -브로모페닐 아세테이트 (5 gm)와 반응시켰다. 반응이 종결될 때까지 진행시키고 (24 h), 과량의 에톡시화 나트륨을 묶은 산으로 중화시켰다. 트리에스테르를 에틸아세테이트에 추출시키고, 용매를 제거하여 점성의 액체를 수득하였다. 조생성물을 염산 (100 mL)으로 가수분해시키고, 탈카르복실화하여 페닐 치환된 아스파르트산 (10 gm)을 수득하였다. N-벤조일옥시 t-부틸 유도체는 표준 반응 순서를 사용하여 제조하였다. DMF 중의 실시예 1에서 제조한 수지 결합된 트리펩티드 (Lys His Ala) (20 mg)에 N-벤조일옥시-t-부틸 아스파르트산 유도체, 이어서 디이소프로필아민 (8 당량)과 TBTU- (4 당량)의 혼합물을 첨가하였다. 수지를 약 24시간 동안 교반하고, 반응을 닌히드린 시험으로 모니터링하였다. 이 기간 종료시에, DMF를 따라내고, 수지를 DMF 및 DCM으로 세척하였다. 용액을 따라내고, 비드를 DCM (3 x 2 mL)으로 세척하였다. 조심스러운 가수분해에 의해 테트라펩티드 유도체를 분리하였다. 테트라펩티드의 입체이성질체는 예비규모 HPLC로 분리하였다.

[0129] **실시예 7:** 테트라펩티드 Asp Ala His Lys [서열 1]에 의한 ROS 생성의 억제

[0130] 서열 L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1]의 테트라펩티드 (L-테트라펩티드)를 Ansynth Services, QCB, Genosys 및 Bowman Research를 포함하여 합성 펩티드를 제공하는 하나 이상의 회사로부터 획득하였다. 표준 고상 합성법에 의해 펩티드를 제조하였다 (실시예 1 참조).

[0131] ROS의 생성을 억제하는 L-테트라펩티드의 능력은 문헌 [Gutteridge and Wilkins, Biochim. Biophys. Acta, 759, 38-41 (1983) and Cheeseman et al., Biochem. J., 252, 649-653 (1988)]에 기재된 바와 같이 시험하였다. Cu(II) 및 H_2O_2 를 혼합하여 Fenton-형 반응에서 히드록실 라디칼을 생성시켰다. 히드록실 라디칼은 당 2-데옥시-D-리보스 (DNA의 당 잔기)를 공격하여 단편을 생성시킨다. 낮은 pH에서 단편을 가열하면 말론알데히드를 생성시키고, 2-티오바르비투르산 첨가시에 분홍색 색원체를 생성시키고, 이것은 532 nm에서 분광광도계로 측정할 수 있다. 따라서, 532 nm에서의 흡광도는 2-데옥시-D-리보스의 척도이다.

[0132] L-테트라펩티드를 사용하여 분석을 수행하였다. 그 결과를 표 1에 요약하였다. 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, L-테트라펩티드가 1:1.2 및 1:2의 Cu(II):테트라펩티드 비율로 존재할 경우, 2-데옥시-D-리보스의 분해가 각각 38% 및 73% 억제되었다. L-테트라펩티드는 히드록실 라디칼에 의한 2-데옥시-D-리보스의 분해를 분명하게 억제하였다.

표 1

	CuCl ₂ (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	테트라펩티드 (mM)	532 nm에서의 OD	억제율
대조군	0.1	2.0	0.0	0.124	
테트라펩티드	0.1	2.0	0.12	0.077	38
대조군	0.1	2.0	0.0	0.175	
테트라펩티드	0.1	2.0	0.2	0.048	73

[0133]

- [0134] 또한, 모두 D-아미노산으로 이루어진 서열 Asp Ala His Lys를 갖는 테트라펩티드 (D-테트라펩티드)를 사용하여 유사한 분석을 수행하였다. D-테트라펩티드는 Ansynth Services 및 QCB를 포함하여 합성 펩티드를 제공하는 하나 이상의 회사로부터 획득하였다. 펩티드를 표준 고상 합성법에 의해 제조하였다 (실시에 1 참조).
- [0135] *ROS의 생성을 억제하는 D-테트라펩티드의 능력은 문헌 [Zhao and Jung, Free Radic Res, 23 (3), 229-43 (1995)]에 기재된 바와 같이 시험하였다. Cu(II) 및 아스코르브산을 혼합하여 Fenton-형 반응에서 히드록실 라디칼을 생성시켰다. 과산화수소 대신에 아스코르브산 사용시의 잇점은 과산화물과는 달리 아스코르브산은 다른 분석 (즉, LDH 분석)을 방해하지 않는다는 것이다. 히드록실 라디칼은 당 2-데옥시-D-리보스를 공격하여 단편을 생성시킨다. 낮은 pH에서 단편을 가열하면 말론알데히드를 생성시키고, 2-티오바르비투르산 첨가시에 분홍색 색원체를 생성시키고, 이것은 532 nm에서 분광광도계로 측정할 수 있다. 따라서, 532 nm에서의 흡광도는 2-데옥시-D-리보스의 척도이다.
- [0136] 최적 Cu(II) 및 아스코르브산 농도의 확립은 본 프로토콜 개발의 제1 단계이었다. 먼저, 체내에서 발견되는 생리학적 농도(결합 및 비결합 Cu(II))를 기초로 하여 1 μ M의 일정한 Cu(II) 농도를 사용하였다. 아스코르브산 농도는 선행 범위를 확립하기 위해 변경하였다. 선택된 아스코르브산 농도는 500 μ M이었고, 이것은 상기 농도가 532 nm에서 가장 큰 흡광도를 보이고 선행 범위 내에 포함되기 때문이다. 흥미로운 것은, 낮은 농도에서는 히드록실 라디칼 생성제로서 작용하고 높은 농도에서는 항산화제로서 작용하는 아스코르브산의 이중 효과에 의해 500 μ M보다 큰 아스코르브산 농도에서는 히드록실 라디칼이 꾸준히 감소한다는 것이다.
- [0137] Cu(II) 및 아스코르브산의 상기 농도를 사용하여 D-테트라펩티드에 대한 적정 곡선을 만들었다. 아스코르브산 첨가 전에 D-테트라펩티드를 Cu(II)와 함께 15분 동안 실온에서 예비인큐베이션하였다. 이것은 D-테트라펩티드가 Cu(II)에 결합하도록 만들어 ROS 생성을 억제하기 위해서 실시하였다.
- [0138] 표에서 알 수 있는 바와 같이, Cu(II):D-테트라펩티드 비율이 4:1 내지 4:7일 때, 히드록실 라디칼의 생성이 거의 내지는 전혀 억제되지 않았다. 상기 비율이 1:2 이상인 경우에는 히드록실 라디칼 생성이 완전히 억제되었다.

표 2

Cu(II):D-테트라펩티드	Cu(II) (μ M)	아스코르브산 (μ M)	D-테트라펩티드 (μ M)	A532	억제율(%)
1:0	10	500	0	0.767	
4:1	10	500	2.5	0.751	
2:1	10	500	5	0.743	
1:1	10	500	10	0.751	
4:5	10	500	12.5	0.789	
2:3	10	500	15	0.774	
4:7	10	500	17.5	0.737	
1:2	10	500	20	0.029	96.2
1:4	10	500	40	0.016	97.9

- [0139]
- [0140] **실시예 8:** 랭겐도르프 재관류 모델에서 Asp Ala His Lys D-테트라펩티드의 시험
- [0141] 혈액 관류 심장을 이전 연구에서 개시한 바와 같이 준비하였다 (Galinanes et al., Circulation, 88: 673-683 (1993); Kolocassides et al., Am. J. Physiol., 269: H1415-H1420 (1995); Hearse et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 31: 1961-1973 (1999), 도 8 참조). 그 과정을 아래에서 설명한다.
- [0142] 영국의 Bantin and Kingman Universal에서 구입한 수컷 위스타르 (Wistar) 래트를 사용하였다. 모든 래트는 National Society for Medical Research에서 제시한 "Principles of Laboratory Animal Care" 및 National Academy of Sciences에서 준비하여 미국 National Institutes of Health에서 출판한 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Publication No. 85-23, 1996 개정)에 따라 관리하였다.
- [0143] 서포트 래트 (300-400 g)을 나트륨 펜토바르비톤 (60 mg/kg, 복강내 투여)으로 마취시키고, 헤파린 (1000 IU/kg 정맥내 투여)으로 항응고 처리하였다. 우측 대퇴부 정맥 및 좌측 대퇴부 동맥을 절개하여 노출시키고, 관류되는 심장에 혈액의 복귀 및 공급을 위해 캐놀라(각각 18G 및 22G Abbocath-T 카테테르)를 설치하였다. 체외 회로를 준비하여 Gelofusine(등록상표) 혈장 치환기 (B. Braun Medical Ltd., Aylesbury, UK)로 프라이밍하여 분리된

심장에 연결하기 전에 15분 동안 유지시켰다. 이 기간은 프라이밍 용액이 래트 혈액과 적합하게 혼합되고 전체 제조물이 안정해지도록 하기 위한 것이었다. 각각 500 ml의 Gelofusine은 20.00 g의 숙신화 젤라틴 (평균 분자량 30,000), 3.65 g의 염화나트륨, 주사수 (총 500 ml이 되도록 하는 양, 전해질 mmol/500 ml: 양이온 Na 77, 음이온 Cl 62.5, pH 7.4)를 포함한다. 공여자 심장을 관류하기 전에, 동일종의 래트의 혈액 7-8 ml을 추가로 중앙 저장소에 공급하였다. 이것은 혈액이 재순환되지 않고 대신에 2분 동안 수집될 때 실험 동안 혈액을 서포트 래트에 적절하게 공급하기 위한 것이었다. 연동 펌프 (Gilson Minipuls 3)을 서포트 래트의 동맥 유출부에 위치시키고 체외 회로를 통한 유동을 10분에 걸쳐 2.5 ml/min의 수치로 점진적으로 증가시켰다. 상기 점진적인 증가는 2.5 ml/min의 유속이 즉시 확립될 경우 발생할 수 있는 동맥압 저하를 억제하였다. 혈액은 캐놀라 (관류되는 심장 대동맥이 부착됨)를 통해 펌핑되어 증력에 의해 저장소 및 필터를 통해 동물의 정맥 유입선으로 복귀되었다. 관류 캐놀라 상의 공기 충전 주사기는 분리된 심장의 수축 및 펌프의 연동 작용의 결과로 발생하는 관류압의 변동을 완충시키는 기능을 수행하는 적응실로서 작용하였다. 서포트 동물이 35% Venturi 안면 마스크를 통해 95% O₂ + 5% CO₂의 혼합물을 호흡하도록 하였다. 유속은 혈액 pO₂ 및 pCO₂를 생리학적 범위 내에서 유지하도록 조정하였다. 체온은 자동 온도 조절된 가열 패드를 사용하여 37.0 (±0.5)℃에서 안정화시키고, 직장 온도로 모니터링하였다. 혈압은 동맥선에 부착된 압력 변환기에 의해 모니터링하였다. 모든 압력 변환기는 실험 내내 계속 작동하는 MacLab (ADInstruments, 호주)에 연결하였다. 서포트 래트의 혈액 기체 (pO₂, pCO₂, pH), 적혈구 용적, 글루코스 및 전해질 수준 (Na⁺, K⁺, Ca²⁺)를 공여체 심장을 체외 회로에 부착시키기 전에 및 각 실험 종료시에 모니터링하였다. 실험 동안 최소량의 공여체 혈액 (동일한 종의 다른 동물로부터)을 제조물의 부피 및 안정성을 유지하기 위해 필요한 만큼 수혈하였다. 다른 헤파린 및 펜토바르비톤을 필요한 중앙 저장소에 투여하였다.

[0144] 심장을 분리하기 위해서, 각각의 래트 (270-350 g)를 디에틸에테르로 마취시키고, 헤파린 (1000 IU/kg, 정맥내 투여)으로 응고를 방지하였다. 이어서, 심장을 즉시 절제하여 차가운 (4℃) Gelofusine(등록상표)에 침지시켰다. 대동맥에 신속하게 캐놀라를 삽입하고, 2.5 ml/min의 일정한 유속으로 서포트 동물로부터의 동맥 혈액을 랑겐도르프 방식(Langendorff, Pflugers Archivesfur die Gestamte Physiologie des Menschen and der Tiere, 61: 291332 (1895))으로 관류시켰다. 좌측 동맥 부속물을 제거한 후, 압력 변환기에 부착된 유체 충전 풍선 카테테르(좌심실 수축기 및 확장기 압력 및 좌심실 발생압의 측정용)를 모자형 밸브를 통해 좌심실에 도입하였다. 4-8 mmHg의 좌심실 확장말기 혈압 (LVEDP)이 얻어질 때까지 풍선을 물로 팽창시켰다. 심박동을 혈압 기록으로부터 계산하여 분당 박동수 (bpm)으로 표현하였다. 관류압은 동맥 캐놀라의 사이드암(sidearm)을 통해 측정하였다. 모든 압력 변환기는 실험 동안 계속 작동하는 MacLab에 연결하였다.

[0145] 절제된 심장을 2개의 처리군을 랜덤하게 분류하고 (도 9 참조; 6 심장/군), (i) 30분의 허혈 기간 직전에 2분 염수를 주입하고 관류 개시시에 2분 염수를 주입한 염수 대조군 및 (ii) 30분의 허혈 기간 직전에 2분 약물을 주입하고 (따라서, 약물은 후속 허혈 기간 동안 혈관에 포획됨) 관류 개시시에 2분 약물을 주입한 약물 투여군에 사전에 20분 동안 호기적으로 관류시켰다. 심장을 이어서 37℃에서 염수에 침지시키면서 30분 동안 전체적인 0-유동(global, zero-flow) 허혈 상태에 적용하였다. 허혈은 펌프로부터 동맥 캐놀라에 이어지는 라인을 캠핑하여 개시시키고, 유동을 우회관을 통해 분리된 심장으로부터 서포트 동물로 우회시켰다. 이어서, 수축 기능을 계속 측정하면서 40분 동안 재관류시켰다.

[0146] 실험을 수행하는 연구자는 알지 못하는 약물은 테트라펩티드 D-Asp D-Ala D-His D-Lys이었다. 테트라펩티드는 16.7 mg/mL의 농도로 염수에 용해되어 영국의 Bowman Research에서 공급받았다. 어떠한 희석이나 변형없이 공급된 상태로 주입하였다. 생리적 식염수는 영국의 Baxter에서 공급받았고, 대조군에 사용하였다. 신선한 염수 및 약물 용액을 매일 사용하였다.

[0147] 0.25 ml/min의 일제 유속으로 설정된 연동 펌프 (Gilson Minipuls 3)를 사용하여 대동맥 캐놀라 사이드암에 약물 또는 비허클을 주입하였다. 대동물 캐놀라를 통한 혈류는 2.5 ml/min이고 약물 주입은 0.25 ml/min이기 때문에, 심장에 전달되는 최종 농도는 Bowman Research에 의해 공급되는 농도의 1/11이었다. 2분 동안의 예비허혈 비허클 또는 약물 주입 동안 및 도 9에 나타난 시점에서 동맥 및 정맥 혈액 시료를 채취하여 원심분리한 후 분석을 위해 동결시켰다. 이어서, 처음 2분의 재관류 기간 동안 주입을 반복하고, 이 동안 혈액은 채취하지 않고 재순환시켰다.

[0148] 기정의된 배제 기준은 (i) 서포트 동물은 공여자 심장의 캐놀라 삽입 전에 80 mmHg 이상의 안정한 수축기 혈압을 보이지 않는 경우 연구로부터 배제하거나, (ii) 공여자 심장은 20분 기준선 예비개입 관류시에 LVDP가 100 mmHg 이하인 경우 연구로부터 배제하거나, 또는 (iii) 혈액화학적 수치가 정상 범위를 벗어날 때 배제한다고 언

급하였다.

- [0149] 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표현한다. 모든 회복 수치는 각각의 개별 심장에 대해 예비개입 기준값 (실험 개시 20분 후에 측정)의 백분율로서 표현한다. two-tailed unpaired Student's t 시험을 사용하여 두 군 사이의 2개의 평균을 비교하였다. 차이는 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.
- [0150] 우수한 대조군을 확보하고 기정의된 배제 기준을 적용하기 위해서, 각각의 서포트 동물 (공여자 심장의 재관류 직전 및 각 실험 종료시에) 및 각각의 관류된 심장의 혈액 화학 (pH, pO_2 , pCO_2 , 헤마토크리트, Na^+ , K^+ 및 Ca^{2+} , 글루코스) 및 기준선 수축 기능을 측정하여 시스템의 안정성 및 재현성을 모니터링 하였다. 표 3은 각각의 측정 지표의 작은 변화만이 존재함을 나타내고, 이것은 양 시험군에 유사한 관류 조건이 적용되고 모든 수치가 허용 가능한 생리학적 범위 내에 있음을 확인하였다. 서포트 래트의 수축기 혈압 및 심박동은 도 4에 도시하였다. 15분 기준선 관독시에 양 시험군 사이에 유의한 차이가 없음을 알 수 있다.
- [0151] 표 5는 20분의 호기적 관류 기간 종료시에 (즉, 약물 또는 비히클의 주입 직전에) LVDP, 심박동 및 관류압에 있어 양군 사이에 유의한 차이가 없음을 보여준다. 따라서, 연구의 1차 종결점인 LVDP의 경우, 평균값은 염수 대조군 및 약물 처리군에서 177.3 ± 10.6 mmHg 및 177.2 ± 5.6 mmHg이었다.
- [0152] 예상된 바와 같이, 심근허혈은 심근 수축을 중지시키고 확장 상태에서 초기에 심정지를 야기하였다. 그러나, 시간 경과에 따라 허혈 손상이 발생하면서 확장기 상태가 증가하여 심장이 허혈성 연축(contracture) 상태가 되었다. 각각의 연구군에서 허혈성 연축의 발생에 대한 시간 프로파일은 도 10에 도시하였다. 표 6에서 알 수 있는 바와 같이, 약물 치료군에서 50% 연축 시간을 지연시키는, 보호 효과를 시사하는 경향이 일부 있지만, 모든 측정 지표에서 차이가 존재하지 않았다.
- [0153] 도 11은 양 시험군에서 LVDP (기준선 예비개입 값의 백분율로서 표현)의 평균 회복에 대한 프로파일을 도시한 것이다. 염수 대조군의 심장이 서서히 빈약하게 회복되고, 40분의 재관류 기간 종료시까지 LVDP는 예비개입 대조군의 $15.3 \pm 3.2\%$ 에 불과하였음을 알 수 있다. 이와 대조적으로 약물군의 심장은 보다 신속하고 훨씬 우수하게 ($50.5 \pm 9.3\%$) 회복하였다.
- [0154] 도 12는 40분의 재관류 기간 동안 양 시험군의 좌심실 확장말기 압력의 절대값을 보여준다. 두 군에서, 허혈 동안 발생한 연축에 따른 LVEDP의 높은 수준은 시간이 경과하면서 예비개입 대조군 값에 근접하였다. 그러나, 약물군은 염수 대조군에서 관찰된 것보다 보다 신속하고 보다 완전하게 LVEDP를 정상화시켰고, 차이는 모든 연구 시점에서 상당하였다. 이것은 약물군의 재관류 동안 관찰된 회복 증가와 일치한다.
- [0155] 도 13에 도시된 바와 같이, 염수 대조군과 약물군에서 얻은 심박동 비교 결과, 본질적으로 동일함을 알 수 있다 (115.0 ± 3.8 대 $127.2 \pm 22.8\%$).
- [0156] 도 14에 도시된 바와 같이, 40분의 재관류 기간 동안의 관류압은 양군에서 실질적으로 일정하고, 40분의 재관류 기간 종료시에 양군 사이에 크게 상이하지 않았다. 염수 대조군에서, 재관류 종료시의 평균값은 그의 예비개입 대조군의 $109.9 \pm 8.2\%$ 이고, 약물군은 예비개입 수치의 $87.4 \pm 8.0\%$ 이었다. 따라서, 약물군의 수치가 재관류 기간에 걸쳐 보다 낮은 경향이 있지만(관찰된 심보호와 일치함), 이러한 변화는 통계적인 유의성에는 도달하지 않은 것이다.
- [0157] 상기 파일럿 연구 결과는 분리된 혈액 관류 래트 심장에서 Asp Ala His Lys는 허혈후 기능 회복을 약 3.5배 ($15.3 \pm 3.2\%$ 내지 $50.5 \pm 9.3\%$) 증가시키는 것으로 평가되는, 유의하고 실질적인 보호 특성을 보인다는 것을 의미한다.

표 3

분리된 공여자 심장 관류 혈액의 조성

지표	공여자 심장에 부착된 수치		실험 종료시	
	염수 대조군	약물*	염수 대조군	약물*
pH	7.29 ±0.01	7.26 ±0.01	7.33 ±0.02	7.31 ±0.02
pCO ₂ (mmHg)	60.0 ±3.2	67.7 ±2.2	57.6 ±4.9	65.6 ±4.7
pO ₂ (mmHg)	230.6 ±14.8	281.7 ±23.2	241.0 ±37.2	252.3 ±33.9
해마토크리트(%)	27.5 ±0.9	27.3 ±1.8	26.8 ±1.7	27.0 ±1.5
Na ⁺ (mmol/L)	146.7 ±0.3	146.2 ±0.6	145.7 ±0.2	146.2 ±0.5
K ⁺ (mmol/L)	3.3 ±0.1	3.2 ±0.1	4.2 ±0.2	4.2 ±0.1
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.2 ±0.1	1.2 ±0.1	1.4 ±0.1	1.4 ±0.1
글루코스 (mmol/L)	8.9 ±0.6	10.2 ±0.3	10.2 ±0.5	10.2 ±0.7
산소포화율(%)	99.6 ±0.1	99.8 ±0.1	98.7 ±1.2	99.7 ±0.1
군당 4-6마리의 서포트 동물 존재, 모든 수치는 평균 ±SEM으로 표시, *약물은 D-Asp D-Ala D-His D-Lys.				

[0158]

표 4

서포트 혈액 관류 래트의 기준선 수축기 혈압 및 심박동

후속 처리군	대조군 수치 (t=15분 호기적 관류)	
	수축기 압력 (mmHg)	심박동 (bpm)
염수 대조군	96.4 ±2.6	296.6 ±9.8
약물*	98.1 ±3.8	297.6 ±8.7
모든 수치는 평균 ±SEM으로 표시, 군당 6마리의 서포트 동물 존재, *약물은 D-Asp D-Ala D-His D-Lys.		

[0159]

표 5

상이한 개입 전의 분리된 혈액 관류 래트 심장에서 기준선 좌심실 발생압 (LVDP),

심박동 및 관류압

후속 처리군	대조군 수치 (t=20분 호기적 관류)		
	LVDP (mmHg)	심박동 (bpm)	관류압 (mmHg)
염수 대조군	177.3 ±10.6	236.6 ±17.9	94.6 ±7.5
약물*	177.2 ±5.6	257.3 ±29.7	99.6 ±7.3
모든 수치는 평균 ±SEM으로 표시, 군당 6마리의 서포트 동물 존재, *약물은 D-Asp D-Ala D-His D-Lys.			

[0160]

표 6

30분의 전체적인 0-유동 허혈 동안의 허혈 연축

군	연축			
	개시(분)	50% 도달 시간(분)	피크 (mmHg)	피크 도달 시간(분)
염수 대조군	9.2 ±1.6	15.1 ±0.5	93.7 ±3.0	19.8 ±0.6
약물*	11.9 ±1.7	16.5 ±0.9	89.5 ±3.0	21.7 ±1.2

모든 수치는 평균 ±SEM으로 표시, 군당 6개의 심장,
*약물은 D-Asp D-Ala D-His D-Lys.

[0161]

[0162]

실시예 9: 뇌 허혈 모델에서 Asp Ala His Lys 시험

[0163]

문헌 (Koizumi et al, Jpn. J. Stroke, 8: 1-8 (1986); Chen et al., J. Cereb. blood Flow J Metab., 12 (4): 621-628 (1992))에 기재된 바와 같이, 성체 위스타르 래트 수컷 (270-300 g, Charles River Laboratories)에 병소 허혈성 경색을 만들었다. 수술 전에 래트에 먹이와 물을 충분히 공급하였다. 3.5% 할로탄으로 마취시킨 후, 안면 마스크를 사용하여 70% N₂/30% O₂ 중의 1.0% - 2.0% 할로탄으로 마취 상태를 유지하였다. 피드백 조절 물 가열 시스템(미국 오하이오주 신시내티 소재 Hamilton Industries의 K-20/64N aquatic blanket에 연결된 YSI 73A 직장 프로브, Fisher)를 사용하여 수술 동안 직장 온도를 37℃로 유지하였다. 기존 연구는 직장 및 뇌 온도는 상기 허혈 모델에서 허혈 동안 및 후에 동일한 것으로 밝혀졌다 (Chen et al., J. Cereb. blood Flow Metab., 12 (4): 621-628 (1992)). 의료용 실리콘 튜브 (미국 조지아주 데카터스 소재의 Technical Products, Inc.)를 사용하여 우측 대퇴부 동맥에 캐놀라를 삽입하여 혈액 기체 및 혈압을 측정하고, 대퇴부 동맥에 주입용 캐놀라를 삽입하였다. 피하 통로를 통해 캐놀라를 끌어당겨 목을 통해 빼내었다. 동맥 혈액 기체를 허혈 전후에 모든 동물에서 측정하였다.

[0164]

허혈 수술을 위해, 우측 경동맥을 그의 분기점에서 노출시켰다. 불로 가열하여 끝부분을 둥글게 만든 4-0 나일론 봉합선으로 끝이 중앙 뇌동맥 (MCA)의 기점을 폐색할 때까지 외부 경동맥으로부터 내부 경동맥으로, 이어서 두개골 내부 경동맥을 통해 18.5-19.5 mm (동물의 체중에 따라) 진입시켰다. 이어서, 동물을 마취 상태로부터 회복시켰다. MCA 폐색 24시간 후에 재마취시키고, 내부 동맥 봉합선을 외부 경동맥으로 끌어당겼다.

[0165]

폐색 1분 전에, 동물에게 1분에 걸쳐 비히클 단독 (대조군) 또는 비히클 중의 약물 (D-Asp D-Ala D-His D-Lys)을 정맥내로 주입하였다. 약물의 종류는 실험자에게 비밀로 하였다. 약물은 인산염 완충 염수 (pH 7.4) 중의 농축 원액 (16.67 mg/ml)으로서 연구자에게 공급되었고, -80℃에서 보관되었다. 실시예 7에서 설명한 바와 같이 시험관내 유리 라디칼 형성 저하 능력을 측정하여 사용 전에 약물이 생물학적으로 활성인지를 결정하였다. 사용 전에 원액을 해동시키고, 20 mg/kg의 투여량을 제공하기 위해 충분한 양을 투여하였다. 약물 또는 비히클의 정맥내 투여 종료시에, 나일론 봉합사를 즉시 진입시켜 MCA를 폐색시켰다. MCA 폐색 2시간 후에 1분에 걸쳐 약물 또는 비히클의 정맥내 주입을 반복하였다. 제2 주입 종료시에, 재관류시키기 위해 나일론 봉합사를 폐색 MCA로부터 즉시 뒤로 당겼다. 또한, 제2 주입 후에, 동물을 다시 마취시키고, 캐놀라를 제거하였다. 동물을 우리로 다시 수용하여 물과 먹이를 자유롭게 섭취하게 하였다.

[0166]

허혈 전 및 치사 전에 동물의 체중을 측정하였다. 문헌 [Zea Longa et al., Stroke, 20: 84-91 (1989)]에 기재된 바와 같이 신경학적 조사를 재관류 1시간 및 24시간 후에 실시하였다. 스코어는 다음과 같다: 0, 정상; 1, 반대쪽 (좌측) 앞발을 충분히 뻗지 못함 (온화한 병소 신경학적 결손); 2, 왼쪽으로 회전 (중등의 병소 신경학적 결손); 3, 왼쪽으로 구름 (심한 병소 신경학적 결손); 및 4, 자발적인 보행 없고, 의식 수준 저하.

[0167]

MCA 폐색 24시간 후에, 케타민 (44 mg/kg) 및 크실라진 (13 mg/kg)을 근내 투여하여 마취시키고, 해파린 처리된 염수, 이어서 10% 완충된 포르말린을 심장을 통해 관류시켰다. 뇌를 분리하여 래트 뇌 간질을 사용하여 2-mm 두께(coronal) 슬라이스로 절단하였다(Activational System, Inc., Warren, MI; 총 7 슬라이스). 이어서, 슬라이스를 파라핀에 함침시키고, 각 슬라이스의 전면으로부터 6-mm 절편을 절단하여 해마톡실린 및 에오신(H 및 E)으로 염색하였다. 컴퓨터 연결된 이미지 분석 시스템 (Global Lab Image system, Data Translation, Marlboro, MA) 및 "간접" 방법 (Swanson et al., J. Cerebral Blood Flow Metabol., 10: 290-293 (1990))을 사용하여 경색을 측정하였다. 동측 (우측) 반구의 경색 영역 및 온전한 대측 (좌측) 반구 영역을 각각의 슬라이스에 대해 결정하고, 경색 영역을 온전 영역으로부터 공제하여 슬라이스당 경색 영역을 계산하였다. 이어서, 경

색 영역을 합산하여 슬라이스 두께로 곱하여 뇌당 경색 부피(mm^3)를 산출하였다.

[0168] 그 결과를 하기 표 7 내지 10에 나타내었다. 데이터의 일부는 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. 연속 데이터는 반복 측정치 ANOVA 및 적절한 경우 Bonferroni 보정을 실시한 paired 또는 unpaired two tailed t-시험으로 분석하였다. 비연속적 행동 데이터는 Mann-Shitney U-시험으로 분석하였다.

표 7

경색 부피

처리군*		대조군	
동물	경색 부피 (mm^3)	동물	경색 부피 (mm^3)
#1	11.5	#2	44.5
#3	14.7	#4	32.3
#5	43.3	#6	39.4
#7	10.9	#8	22.2
평균	20.1	평균	34.6
S.E.M.	7.7	S.E.M.	4.8

* D-Asp D-Ala D-His D-Lys로 처리됨

[0169]

표 8

신경학적 규모

처리군*			대조군		
동물	0일 ^a	1일 ^b	동물	0일 ^a	1일 ^b
#1	2	1	#2	2	2
#3	2	1	#4	2	2
#5	2	2	#6	2	2
#7	2	1	#8	2	2

* D-Asp D-Ala D-His D-Lys로 처리

^a 허혈 수술일

^b 허혈 수술 1일 후

[0170]

표 9

체중

처리군*			대조군		
동물	0일 ^a	1일 ^b	동물	0일 ^a	1일 ^b
#1	300	272	#2	300	251
#3	300	266	#4	300	256
#5	295	256	#6	278	230
#7	295	255	#8	300	250

* D-Asp D-Ala D-His D-Lys로 처리

^a 허혈 수술일

^b 허혈 수술 1일 후

[0171]

표 10

혈액 기체 및 혈압

MCA 폐색 10분전					MCA 폐색 10분후				
동물	pH	pCO ₂	pO ₂	BP ^c	동물	pH	pCO ₂	pO ₂	BP ^c
#1	7.437	38.5	117.1	96	#1	7.422	40.2	130.1	106
#3	7.430	38.3	110.5	89	#3	7.423	40.1	130.1	98
#5	7.518	38.5	147.0	98	#5	7.471	36.5	105.3	92
#7	7.423	33.4	97.4	86	#7	7.433	34.0	139.9	89
#2	7.401	35.5	120.1	90	#2	7.423	40.1	130.1	103
#4	7.440	38.5	121.1	93	#4	7.421	39.5	129.3	101
#6	7.425	35.9	110.0	88	#6	7.453	36.2	105.3	92
#8	7.417	39.5	120.7	90	#8	7.428	36.9	111.0	93

실시예 10: ROS 생성의 억제

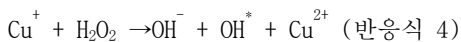
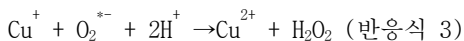
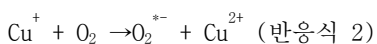
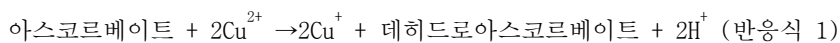
테트라펩티드 L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1] 및 다른 펩티드 및 화합물의 ROS 생성 억제 능력을 시험하였다. 시험된 다른 펩티드는 L-Asp L-Ala L-His L-Lys L-Ser L-Glu L-Val L-Ala L-His L-Arg L-Phe L-Lys [서열 3]; L-Ala L-His L-Lys L-Ser L-Glu L-Val L-Ala L-His L-Arg L-Phe L-Lys [서열 4]; L-His L-Lys L-Ser L-Glu L-Val L-Ala L-His L-Arg L-Phe L-Lys [서열 5]; 및 아세틸화-L-Asp L-Ala L-His L-Lys L-Ser L-Glu L-Val L-Ala L-His L-Arg L-Phe L-Lys [서열 6]이었다. 펩티드는 Ansynth Services, QCB, Genosys 및 Bowman Research를 포함하여 1 이상의 펩티드 제공 회사로부터 구입하였다. 다른 시험 화합물은 히스티딘 (Sigma Chemical Co.), 카탈라제 (Sigma Chemical Co.) 및 슈퍼옥사이드 디스무타제 (Sigma Chemical Co.)이었다.

1. 히드록실 라디칼 생성의 억제

히드록실 라디칼은 가장 반응성이 높은 산소 유래종으로 추정된다. 히드록실 유리 라디칼은 매우 활성이 높고, 수명이 짧고, 독성을 갖는다.

몇몇 연구자들은 과산화수소 및 슈퍼옥사이드 라디칼의 독성은 히드록실 유리 라디칼로 전환됨으로써 발생한다고 제시하였다. 슈퍼옥사이드 라디칼은 Haber-Weiss 반응을 통해 히드록실 라디칼로 직접 전환될 수 있다. 별법으로, 슈퍼옥사이드 라디칼은 과산화수소로 전환될 수 있고, 이것은 다시 Fenton 반응을 통해 히드록실 라디칼로 전환된다. 두 경로는 모두 구리와 같은 전이금속을 필요로 한다 (Acworth and Bailey, The Handbook Of Oxidative Metabolism (ESA, Inc. 1997)).

또한, 구리는 아스코르베이트의 존재 하에 히드록실 라디칼을 생성시키는 것으로 알려져 있다. 하기 반응식이 제시되었다 (Biaglow et al., Free Radic. Biol. Med., 22 (7): 1129-1138 (1997)).



상기 언급한 화합물의 히드록실 라디칼 생성 억제 능력은 문헌 [Gutteridge and Wilkins, Biochim. Biophys. Acta, 759: 38-41 (1983)]에 기재된 바와 같이 시험하였다. Cu(II) 및 아스코르브산을 혼합하여 히드록실 라디칼을 생성시켰다. 이어서, 데옥시리보스를 첨가하고, 존재할 경우 히드록실 라디칼이 데옥시리보스를 공격하여 단편을 생성시켰다. 낮은 pH에서 단편을 열처리하여 말론알데히드를 생성시키고, 2-티오바르비투르산 (TBA)을 첨가하여 분홍색 색원체를 생성시키고, 이를 532 nm에서 분광광도계로 측정하였다. 따라서, 532 nm에서의 흡광도는 데옥시리보스에 대한 손상의 척도이고, 따라서 히드록실 라디칼 형성의 척도이다.

분석을 수행하기 위해서, 완충액 (20 mM KH₂PO₄ 완충액, pH 7.4) 중의 CuCl₂ 및 완충액 중의 시험 화합물 중의

하나 또는 완충액만을 시험관에 첨가하였다 (CuCl_2 의 최종 농도는 10 μM 임). 시험관을 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 완충액 중의 0.5 mM 아스코르브산 및 완충액 중의 1.9 mM 2-데옥시-D-리보스를 각각의 시험관에 첨가하고, 시험관을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 최종적으로, 50 mM NaOH 중의 1 ml의 1% (w/v) TBA 및 1 mM의 진한 아세트산을 각각의 시험관에 첨가하고, 시험관을 끓는 물 중에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 시험관을 15분 동안 냉각시킨 후, 532 nm에서의 흡광도를 관독하였다.

[0185] 테트라펩티드 L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1]은 2:1 이상의 테트라펩티드/구리 비율에서 상기 분석에서 히드록실 라디칼의 형성을 완전히 억제하는 것으로 밝혀졌다. 2:1 미만의 테트라펩티드/구리 비율은 효과가 없었다.

[0186] 시간 진행 결과는 도 15a에 도시하였다. 도 15a에서 알 수 있는 바와 같이, 구리 및 아스코르베이트 (펩티드 무첨가)는 TBA-반응성 물질을 신속하게 생성시키고, 30분에 최대치에 도달하였다. 2:1의 테트라펩티드/구리 비율에서 테트라펩티드는 TBA-반응성 물질의 형성을 억제하였다. 흥미로운 사실은, 1:1의 테트라펩티드/구리 비율에서 테트라펩티드는 TBA-반응성 물질의 생성을 지연시켰다는 것이다. 이러한 데이터는 1:1의 테트라펩티드/구리 비율이, 구리에 결합함으로써 히드록실 라디칼로부터 일부를 보호하여 테트라펩티드에 대한 부위 지정 히드록실 공격을 야기한다는 것을 시사한다. 테트라펩티드가 충분히 파괴되면, 구리가 방출되어 데옥시리보스를 공격하는 히드록실 라디칼을 생성시킨다.

[0187] 2:1의 테트라펩티드/구리 비율에서 테트라펩티드를 보다 긴 시간 동안 인큐베이션할 경우, TBA-반응성 물질을 형성하는 그의 능력이 서서히 상실되었다 (도 15b 참조). 도 15b에서 알 수 있는 바와 같이, TBA-반응성 물질의 생성은 처음 4시간의 인큐베이션 동안 95% 억제되었다. 24 시간 내에 억제 수준은 50%로 저하되었고, 48시간 내에 억제 수준이 20%로 저하되었다. 이러한 데이터는 TBA-반응성 물질이 테트라펩티드의 존재시에도 계속 생성된다는 것을 시사한다. 또한, 테트라펩티드는 실험 시간 경과 동안 분해되고 있음을 시사한다. 이러한 분해는 테트라펩티드를 공격하여 분해시키면서 구리를 방출시키는 테트라펩티드/구리 착체에 근접한 유리 라디칼의 형성에 의한 것일 가능성이 보다 크다. 히드록실 라디칼과 같은 유리 라디칼은 매우 반응성이 크기 때문에, 접촉하는 제1 전자 풍부 분자, 이 경우에 있어서는 테트라펩티드를 공격할 것이다.

[0188] 테트라펩티드에 의한 히드록실 라디칼 형성 억제에 대한 pH의 효과를 2:1의 테트라펩티드/구리의 비율에서 시험하였다. 상기 비율에서, 테트라펩티드는 pH 7.0-8.5에서 TBA-반응성 물질의 형성을 95% 이상 억제하였다. 이것은 생리학적 pH 수준 및 허혈 동안 예상되는 pH 수준이다(산과다증은 허혈 조직에서 발생한다). pH 6.0에서, 테트라펩티드는 TBA-반응성 물질의 형성의 억제에 효과가 없고, 이것은 구리에 결합하는 히스티딘의 능력 저하 때문일 가능성이 있다. 히스티딘의 이미다졸 고리 상의 질소 원자는 pKa 6.0의 구리 결합에 참여한다. 따라서, 6.0의 pH에서, 히스티딘은 단지 구리의 50%에 결합할 수 있다. 구리의 다른 50%는 결합하지 않거나 다른 아미노산에 의해 느슨하게 테트라펩티드에 결합할 것이고, 따라서 TBA-반응성 물질의 생성에 참여할 수 있다.

[0189] 히스티딘 및 상이한 위치에 히스티딘을 갖는 복수개의 펩티드를 1:1 및 2:1의 펩티드:구리 비율에서 히드록실 라디칼 생성 억제 능력에 대해 시험하였다. 또한, 아세틸화 아스파르트산(Ac-Asp)을 N-말단 아미노산으로서 갖는 펩티드도 시험하였다. 그 결과를 표 11에 나타내었다. 표 11에서, 억제율 (%)은 완충액 단독의 흡광도로 나눈, 완충액 단독에 비교할 때 흡광도의 감소율이다.

[0190] 표 11의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 제2 및 제3 위치에 히스티딘을 갖는 펩티드는 2:1의 펩티드:구리 비율에서 95% 이상의 억제율을 보였고, 1:1의 펩티드:구리 비율에서는 효과가 없었다. 흥미로운 사실은, 2:1의 펩티드:구리 비율에서 제1 위치에 히스티딘을 갖는 펩티드 및 N-말단 아미노산으로서 아세틸화 아스파르트산을 갖는 펩티드는 일부의 보호 효과 (각각 약 47% 및 약 28%)를 보이지만, 이러한 보호는 각각 펩티드의 제7 및 제9 위치의 히스티딘에 의한 것이라는 사실이다. 2:1의 히스티딘:구리 비율에서 히스티딘 단독은 일부 보호 (약 20% 억제)를 보였다.

[0191] 카탈라제는 히드록실 라디칼 형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Gutteridge and Wilkins, *Biochim. Biophys. Acta*, 759: 38-41 (1983); Facchinetti et al., *Cell. Molec. Neurobiol.*, 18 (6): 667682 (1998); Samuni et al., *Eur. J. Biochem.*, 137: 119-124 (1983)). 따라서, 카탈라제 (0-80 nM)를 본 분석에서 시험한 결과, 분홍색 색원체 형성을 억제하는 것을 밝혀졌다 (데이터 비제시). 이러한 발견은 카탈라제가 과산화수소를 물로 분해하고 상기 반응식 3 및 4와 일치하기 때문에 상기 분석에서 과산화수소가 형성되었음을 시사한다. 또한, 카탈라제는 1:1의 테트라펩티드/구리 비율로 L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1] 테트라펩티드가 존재할 경우, 분홍색 색원체 형성을 억제한다 (데이터 비제시). 상기에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 비율에서 구리는 산화환원 반응에 계속 참여하여 히드록실 라디칼을 생성시킬 수 있다. 상기 실험은 과산화수소가 히드록실 라디칼 형성의

중요한 전구체라는 것을 보여준다.

표 11

화합물 (비율) ^a	532 nm에서의 흡광도	532 nm에서의 흡광도	억제율(%)
구리 단독 (완충액 대조군)	0.767 [*]	0.954	0
히스티딘/구리(2:1)		0.760	20.3
His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^b /구리(1:1)		0.716	24.9
His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^b /구리(2:1)		0.509	46.6
Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^c /구리(1:1)		0.843	11.6
Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^c /구리(2:1)		0.047	95.1
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^d /구리(1:1)	0.645		13.2
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^d /구리(2:1)	0.040		95.8
Ac-Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^e /구리(1:1)	0.633		16.9
Ac-Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys ^e /구리(2:1)	0.692		27.5
Asp Ala His Lys ^f /구리(1:1)	0.751 [*]		1.3
Asp Ala His Lys ^f /구리(2:1)	0.029 [*]		96.2
^a 모든 아미노산은 L-아미노산임. ^b 서열 5 ^c 서열 4 ^d 서열 3 ^e 서열 6 ^f 서열 1 [*] 실시예 7의 표 2에서 구한 데이터			

[0192]

[0193]

B. 수퍼옥사이드 디스무타제(SOD) 활성 분석

[0194]

효소 수퍼옥사이드 디스무타제(SOD)는 수퍼옥사이드의 과산화수소로의 체내 분해 기능(반응식 3에 유사)을 하는 천연 효소이다. 과산화수소는 카탈라제에 의해 무독화될 수 있다.

[0195]

상기한 분석에서의 활성에 대해 SOD를 평가한 결과, 활성을 갖지 않는 것으로 밝혀졌다 (데이터 비제시). SOD는 실제로 수퍼옥사이드 라디칼을 과산화수소로 전환시키기 때문에 상기 결과는 놀라운 것이 아니다. 과산화수소는 환원 구리에 의해 히드록실 라디칼로 전환될 수 있다.

[0196]

구리 착체가 SOD 활성을 갖는다는 사실이 문헌에 보고되었다 (Athar et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 39 (4): 813-821 (1996); Ciuffi et al., Pharmacol Res., 38 (4): 279-287 (1998); Pogni et al., J. Inorg. Biochem., 73: 157-165 (1999); Willingham and Sorenson, Biochem. Biophys. Res. Commun., 150(1): 252-258 (1988); Konstantinova et al., Free Rad. Res. Comms., 12-13: 215-220 (1991); Goldstein et al., J. Am. Chem. Soc., 112: 6489-6492 (1990)). 이러한 발견은 SOD 자체가 그 활성 부위에 구리를 갖기 때문에 놀라운 것이 아니다.

[0197]

테트라라프티드 L-Asp L-Ala L-His L-Lys [서열 1]의 구리 착체의 SOD 활성을 분석하였다. 크산틴 옥시다제 분석 (Beauchamp and Fridovich, Anal. Biochem., 44: 276-287 (1971))을 사용하여 수퍼옥사이드 라디칼을 생성시켰다. 크산틴 옥시다제는 전자 수용체로서 작용하는 산소와 함께 크산틴을 요산으로 전환시킨다. 이것은 수퍼옥사이드 라디칼을 생성시킨다. 수퍼옥사이드 라디칼은 니트로 블루 테트라졸륨(NBT)을 환원시킬 수도 있다. 환원된 NBT는 560 nm의 λ_{max} 를 갖는다. 구리는 크산틴 옥시다제 활성을 억제하는 것으로 알려져 있고 (Konstantinova

et al., FreeRad. Res. Comms., 12-13: 215-220 (1991)), 따라서 구리를 포함하는 모든 실험은 공지의 구리 킬레이터인 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함하였다. EDTA-구리 착체의 SOD 활성을 시험한 결과, SOD 활성을 갖지 않는 것으로 밝혀졌다 (데이터 비제시).

[0198] SOD 활성 분석을 수행하기 위해서, 0.1 mM 크산틴 옥시다제 (Sigma Chemical Co.), 25 μ M NBT (Sigma Chemical Co.), 50 mM 탄산나트륨 및 1.2 μ M EDTA (Sigma Chemical Co.)를 큐벳에서 혼합하였다 (모두 최종 농도, 최종 pH 10.2). 상이한 양의 테트라펩티드-구리 착체 (테트라펩티드/구리 비율 1:1 및 2:1) 및 20 nM 크산틴 옥시다제 (Sigma Chemical Co.)를 첨가하여 반응을 개시시켰다. 테트라펩티드와 구리 (CuCl_2 로서)를 혼합하여 큐벳에 첨가하기 직전에 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여 테트라펩티드-구리 착체를 제조하였다. 시료를 시간 0 및 5분 동안 매 60초 동안 560 nm에서 판독하였다.

[0199] 1:1 비율의 테트라펩티드와 구리의 착체는 NBT 환원 억제에 의해 입증되는 바와 같이 SOD 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (도 16 참조). 그러나, 착체의 효과는 상기 분석에서 IC_{50} 값 (50% 억제하는 양)을 기준으로 SOD 자체보다 약 500배 덜 효과적이었다. 2:1 비율의 테트라펩티드와 구리의 착체는 SOD 활성을 갖지 않는 것으로 밝혀졌다 (데이터 비제시).

[0200] 1:1 테트라펩티드-구리 착체가 크산틴 옥시다제 활성을 방해하지 않는다는 것을 입증하기 위해, 요산 생성을 295 nm에서 측정하였다 (Athar et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 39 (4): 813-821 (1996); Ciuffi et al., Pharmacol Res., 38 (4): 279-287 (1998)). 상기 분석은 NBT가 존재하지 않는다는 것을 제외하고는 SOD 분석과 유사하다. 대신에, 요산은 5분 동안 매 60초마다 295 nm에서 분석하였다. 1:1 테트라펩티드-구리 착체는 요산 생성을 600 nM의 농도에서 단지 11% 억제하는 것으로 밝혀졌다 (데이터 비제시). 따라서, 1:1 테트라펩티드-구리 착체는 실질적인 SOD 활성을 갖는다. 이에 의해, 수퍼옥사이드가 상기 착체에 의해 과산화수소로 전환되기 때문에 상기 착체가 히드록실 라디칼 생성 억제에 효과적이지 않은 이유를 설명할 수 있다.

[0201] 수퍼옥사이드 라디칼 생성을 1:1 또는 2:1 테트라펩티드-구리 착체를 포함하는 용액에서 측정하였다. 이 분석은 TBA 분석법과 크산틴 옥시다제 분석을 조합한 것이다. NBT를 모든 시험관에 첨가하여 수퍼옥사이드 라디칼에 의한 그의 환원을 정량화하였다. 또한, 시료는 아스코르베이트 및 구리를 포함하였고, 37°C에서 인큐베이션하였다. 5, 15, 30 및 60 분에 시료를 인큐베이터에서 제거하여 560 nm에서 판독하였다. 그 결과로도 도 17에 도시하였다. 2:1 테트라펩티드-구리 착체를 포함하는 시료에서, NBT 환원은 시간 경과에 따라 증가하였고, 30분에 최대치에 도달하였다. 1:1 테트라펩티드-구리 착체를 포함하는 시료도 NBT 환원을 증가시키고 60분에 최대 감소치에 도달하였다. 상기 데이터는 수퍼옥사이드가 2:1 테트라펩티드-구리 착체를 함유하는 시료에서 축적되지만, 1:1 테트라펩티드-구리 착체는 수퍼옥사이드 디스무타제를 모방한다는 것을 시사한다.

[0202] 히드록실 라디칼이 생성될 가능성이 큰 반응은 다음과 같다.

[0203] $\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^{\bullet}$ (반응식 5)

[0204] 1:1 테트라펩티드-구리 착체는 수퍼옥사이드 라디칼 ($\text{O}_2^{\bullet-}$)을 과산화수소(H_2O_2)로 전환시킬 수 있다는 것은 이미 밝혀진 바 있다. 이것은 착체의 SOD 활성이다. 2:1 테트라펩티드-구리 착체는 테트라펩티드의 2개의 분자가 구리의 모든 6개의 배위결합을 채우기 때문에 상기 전환을 촉진시킬 수 없다. 이것은 2:1 테트라펩티드-구리 착체가 과산화수소의 형성을 억제하고, 환원된 구리와 반응하여 Fenton 반응을 통해 히드록실 라디칼을 생성시킬 수 있기 때문에 2:1 테트라펩티드-구리 착체가 매우 효과적인 이유를 설명한다. 1:1 테트라펩티드-구리 착체는 또한 수퍼옥사이드 라디칼을 제거함으로써 유익한 효과를 제공한다. 인체가 과산화수소를 생성시키지만, 인체의 대부분의 기관은 과산화수소를 제거할 수 있는 충분한 효소 카탈라제를 갖는다. 그러나, 뇌에서 카탈라제 활성은 최소인 것으로 보고되었다 (Halliwell et al., Methods in Enzymol., 186: 1-85 (1990)). 따라서, 구리가 허혈을 수반하는 산과다증에 의해 방출되기 때문에 뇌는 허혈 기간 동안 특히 약한 기관이다.

[0205] C. DNA 보호

[0206] DNA 가닥 분해를 문헌 [Asaumi et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 39 (1) : 77-86 (1996)]의 방법에 따라 측정하였다. 17 μ g/ml의 플라스미드 pBR322 DNA를 50 μ M CuCl_2 및 0-200 μ M의 테트라펩티드와 함께 실온에서 15분 동안 예비인큐베이션하였다. 이어서, 2.5 mM 아스코르베이트를 각 반응물에 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물의 총 부피는 16 μ L이었다. 이어서, 물 중의 0.25% (w/v) 브로모페놀 블루, 0.25% (w/v) 크실렌 시아놀 FF 및 40% (w/v) 수크로스를 포함하는 3 μ L의 로딩 완충액을 첨가하였다. 70

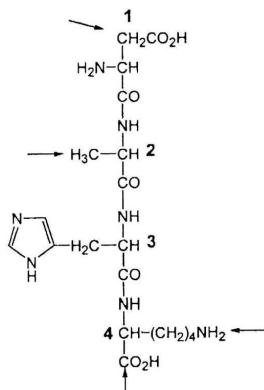
볼트에서 90분 동안 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동에 의해 시료를 분리하였다. 겔을 2 $\mu\text{g/ml}$ 에티뮴 브로마이드를 함유하는 1X TBE (트리스-보레이트-EDTA 완충액)에서 30분 동안 염색하였다. 이어서, 겔을 전기영동 전에 1X TBE 중에서 5분 동안 탈색시켰다.

[0207]

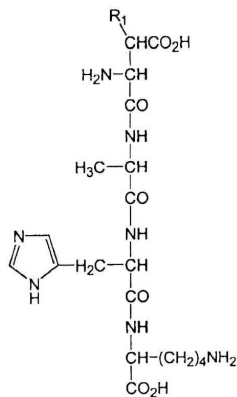
그 결과는 테트라펩티드가 DNA 가닥 분해물 형성 억제에 매우 효과적임을 보여주었다 (도 18 참조). 최적 보호 테트라펩티드:구리 비율은 2:1 이상이었고, 그 이유는 상기 비율에서 슈퍼헬리컬 환상 DNA가 계속 가시적으로 관찰되었기 때문이다. 1:1 이하의 테트라펩티드:구리 비율에서, 닉(nick)이 형성된 환상 DNA, 선형 DNA 및 보다 손상된 DNA(스미어(smear))가 관찰되었다.

도면

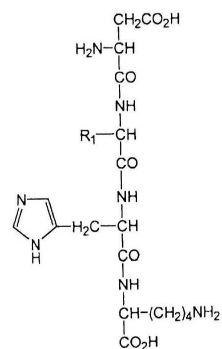
도면1a



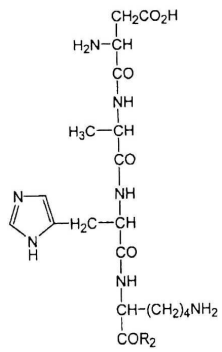
도면1b



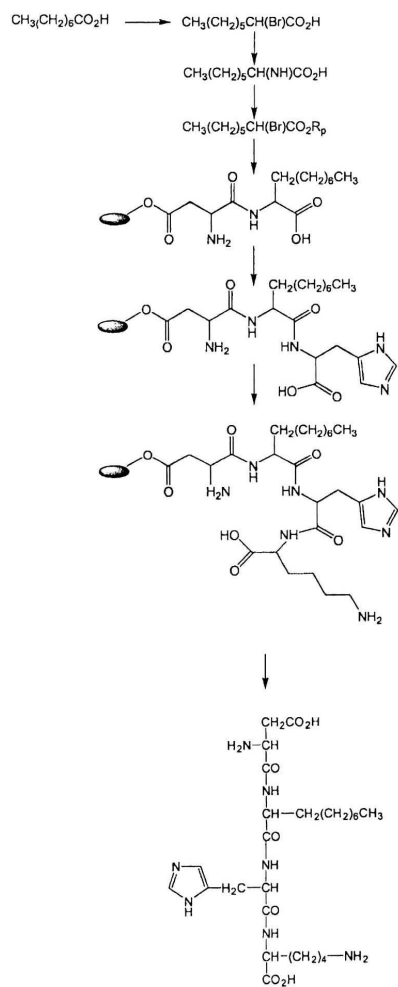
도면1c



도면1d

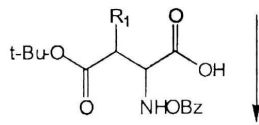


도면2a



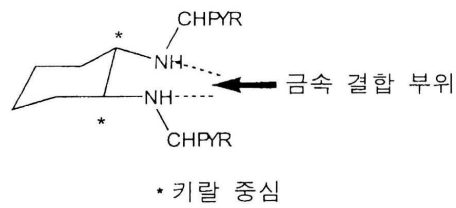
도면2b

폴리머----Lys(α N 및 C- 보호)-His(N- 보호)-Ala-NH₂

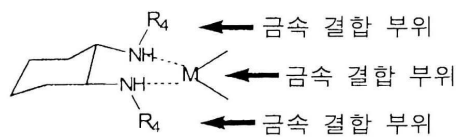


폴리머----Lys(α N 및 C- 보호)-His(N- 보호)-Ala-Asp
(R₁으로 치환됨)

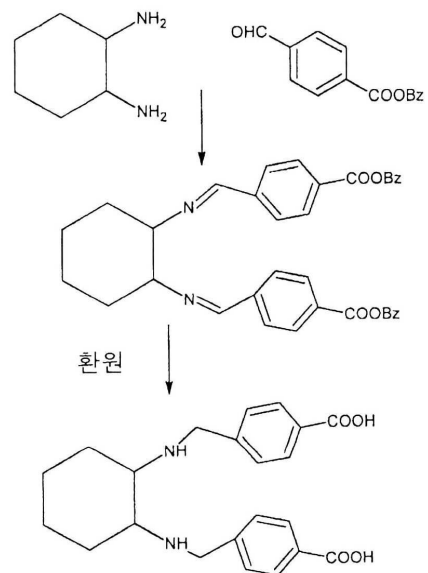
도면3a



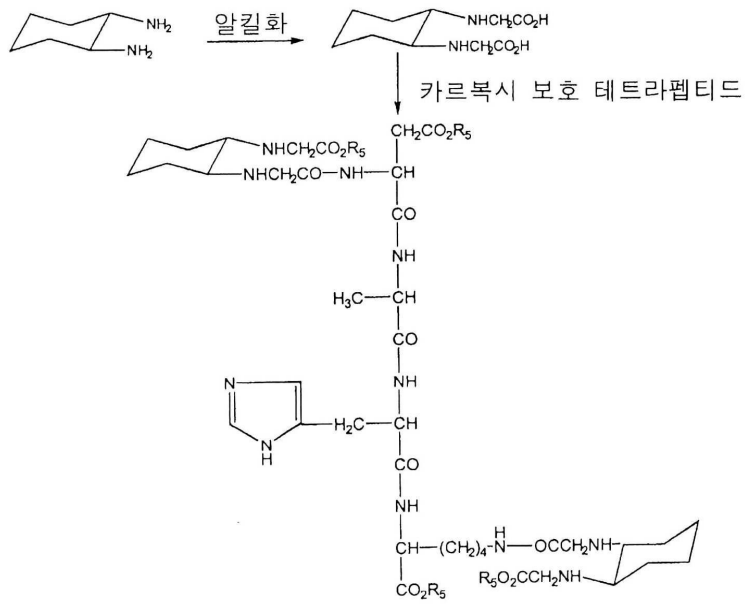
도면3b



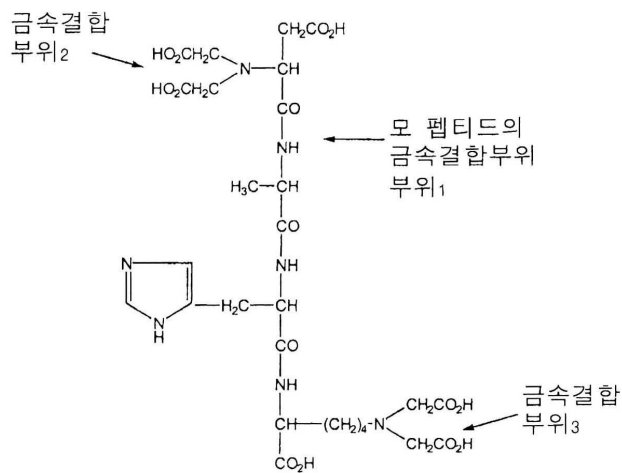
도면3c



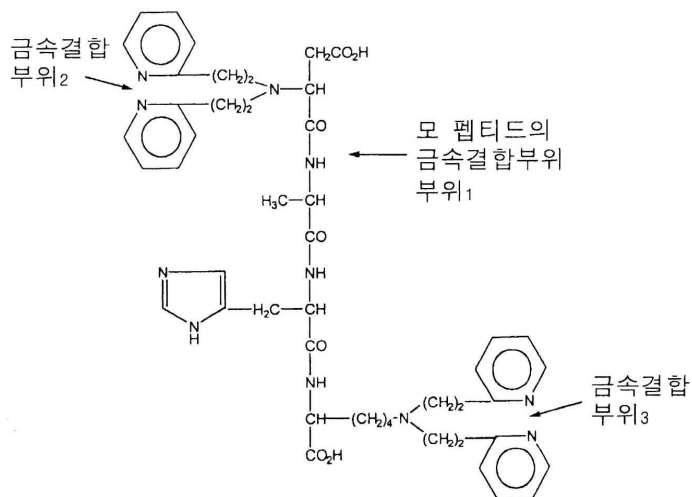
도면3d



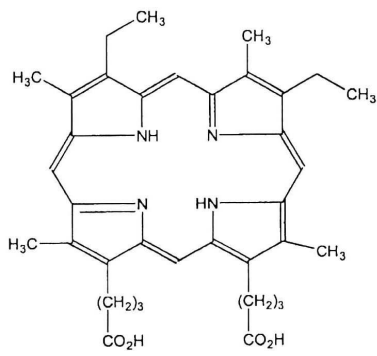
도면4



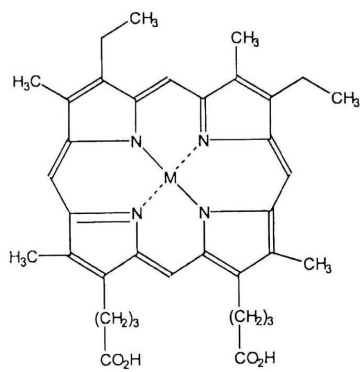
도면5



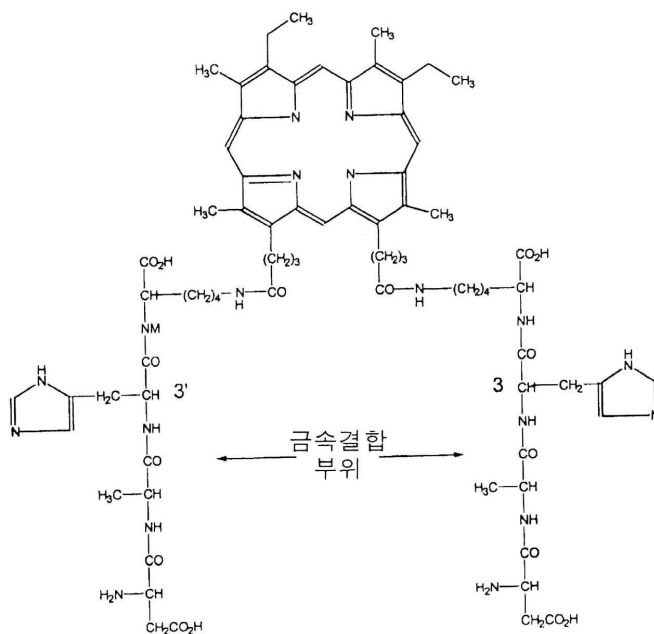
도면6a



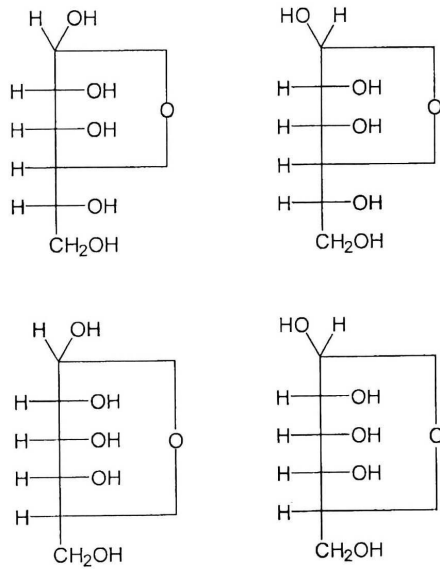
도면6b



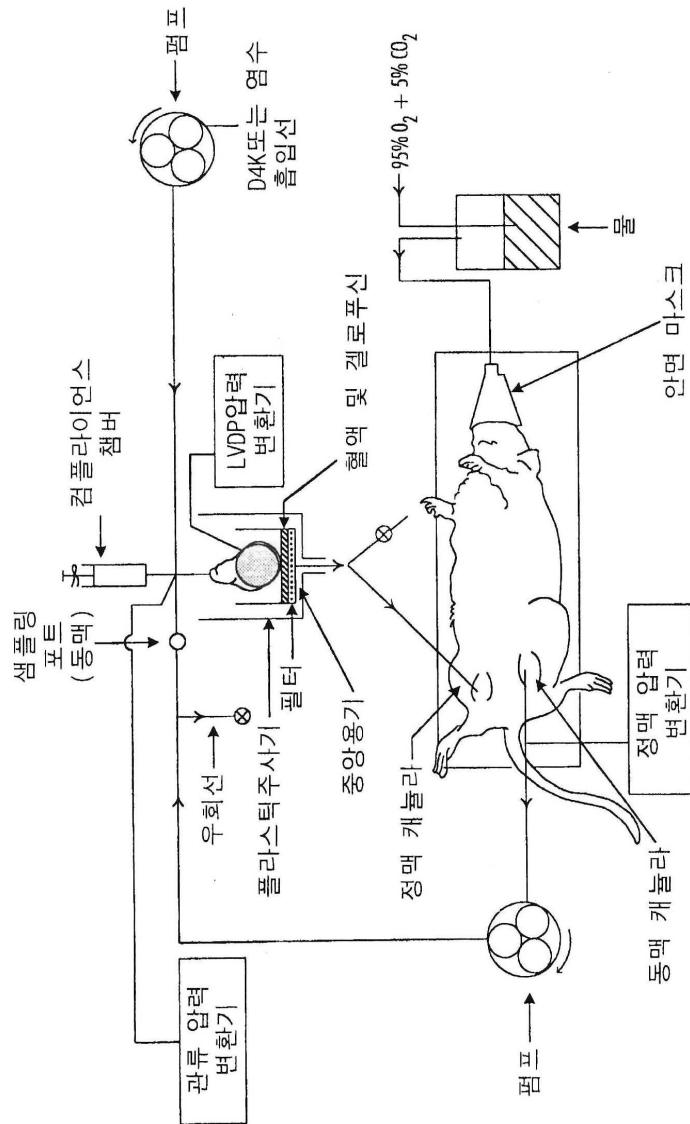
도면6c



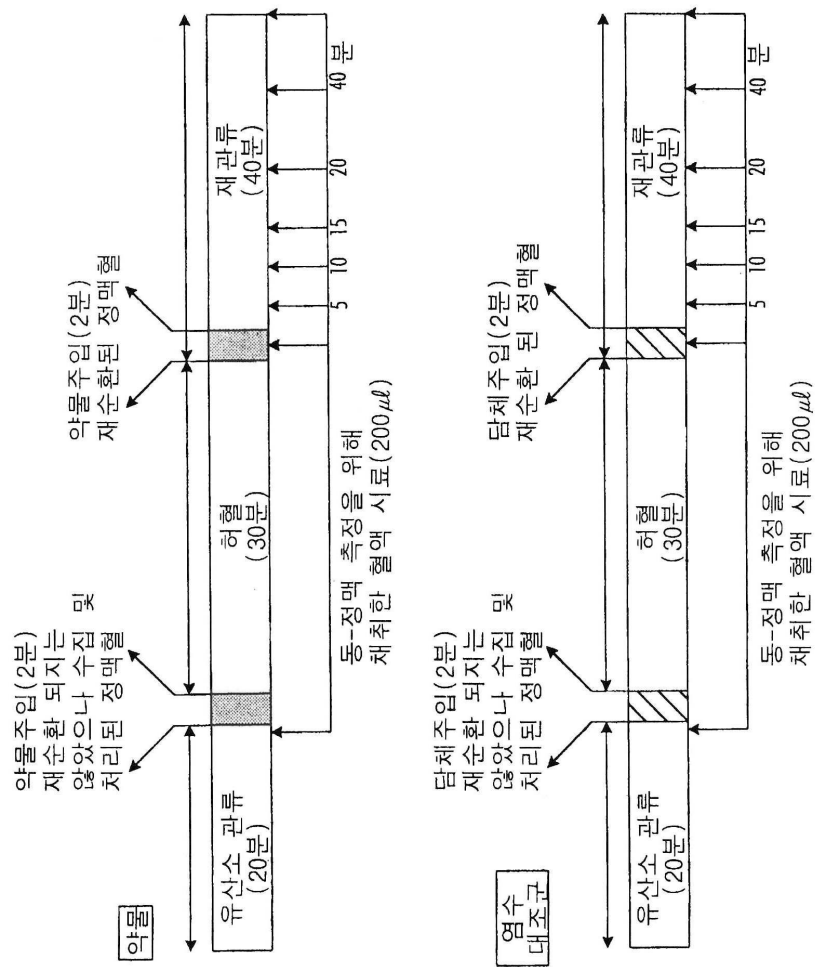
도면7



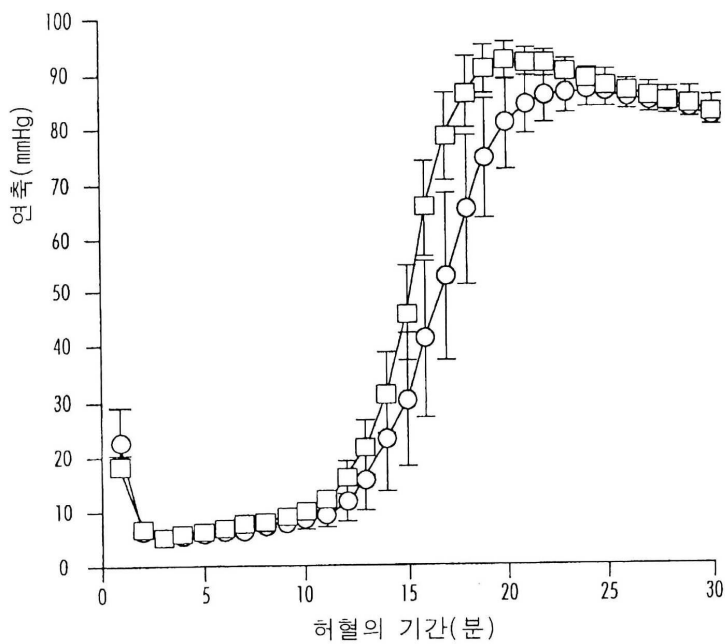
도면8



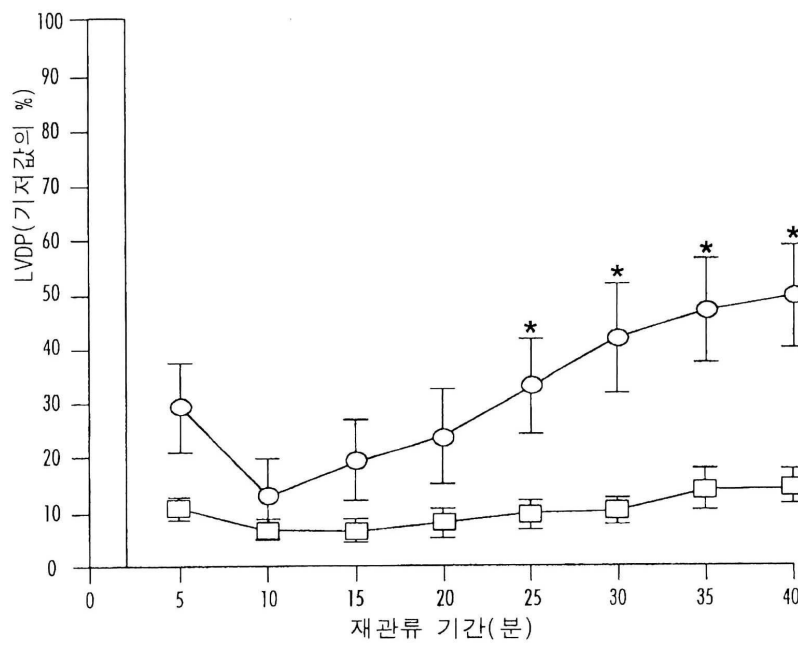
도면9



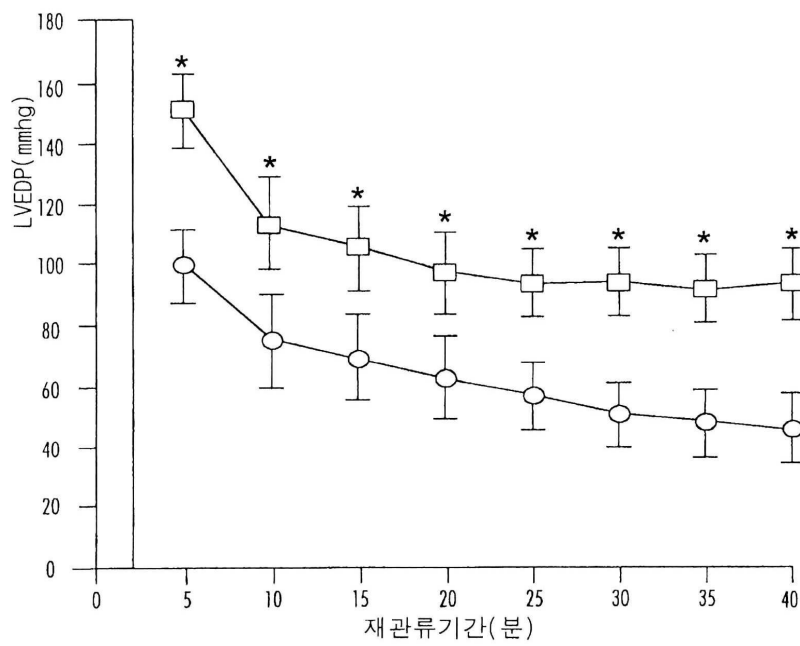
도면10



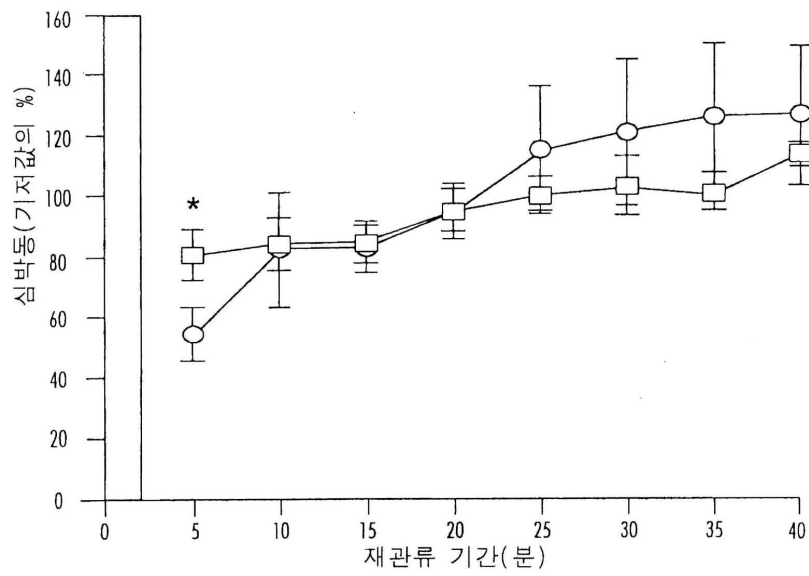
도면11



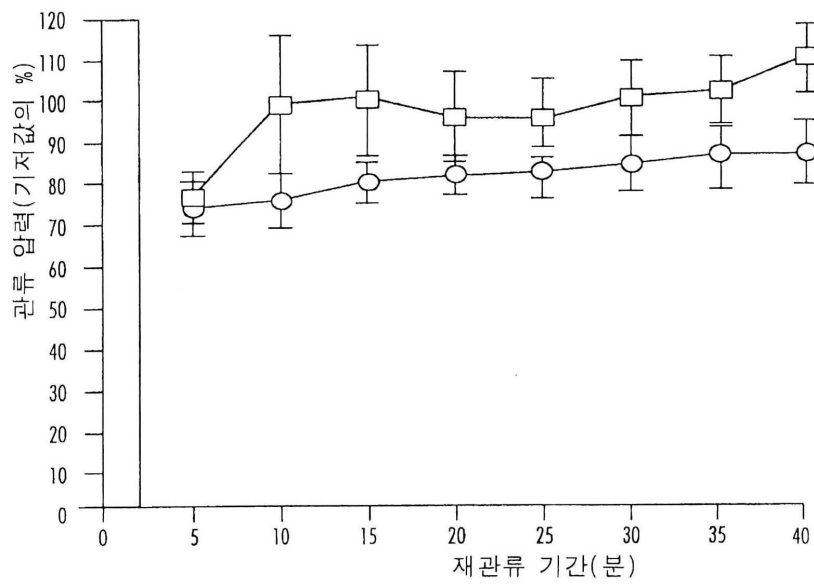
도면12



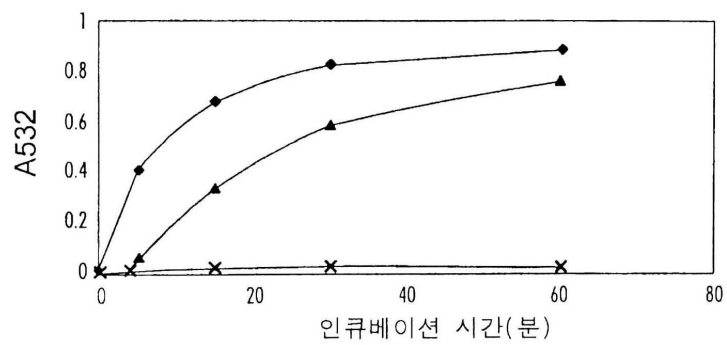
도면13



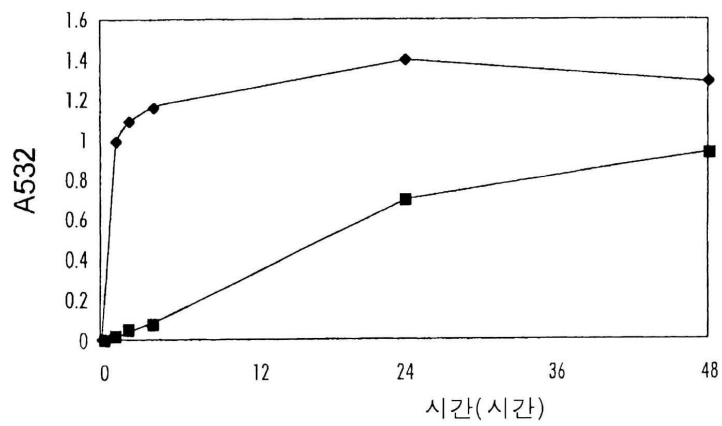
도면14



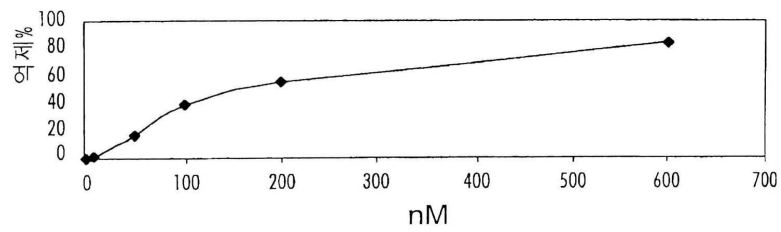
도면15a



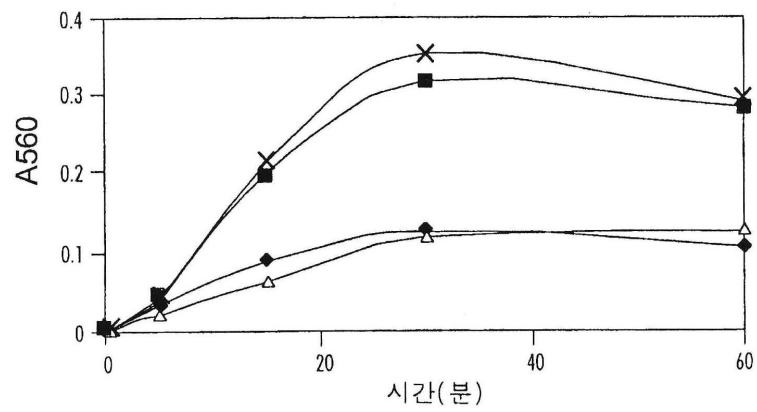
도면15b



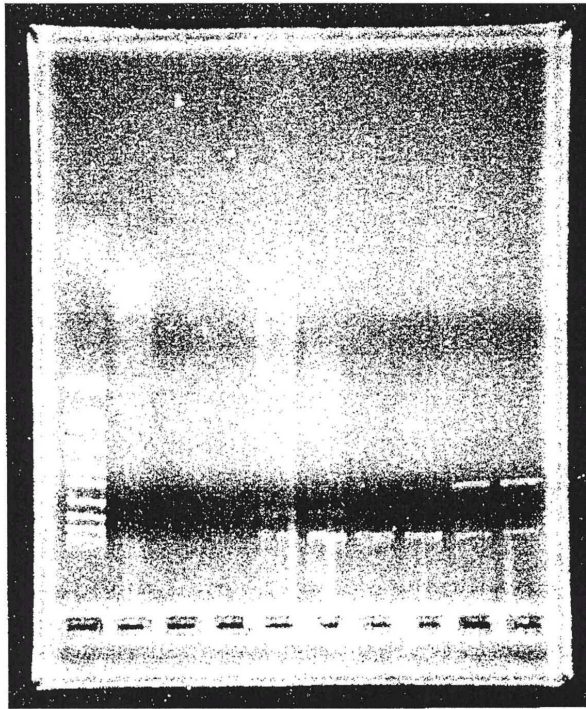
도면16



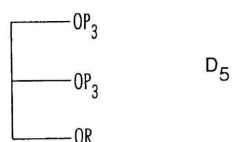
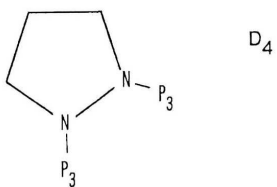
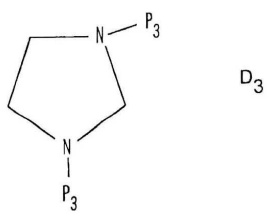
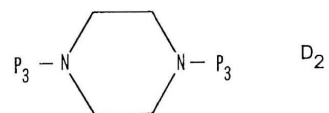
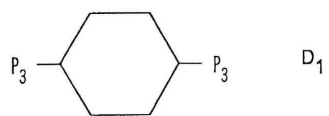
도면17



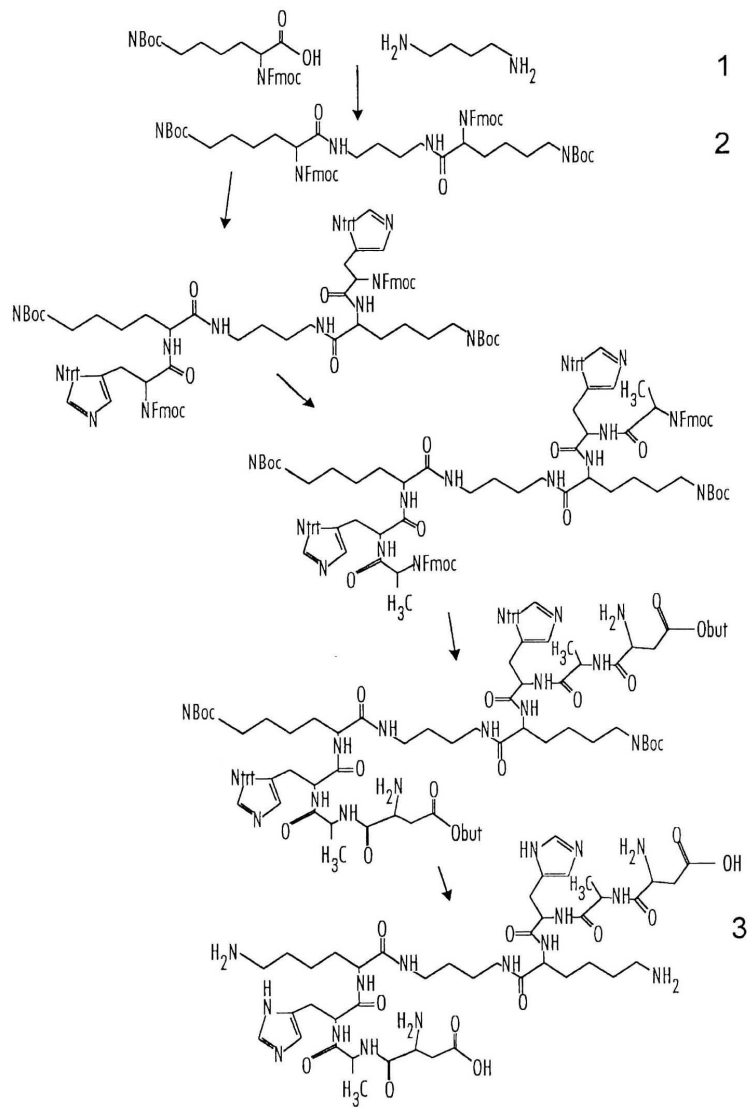
도면18



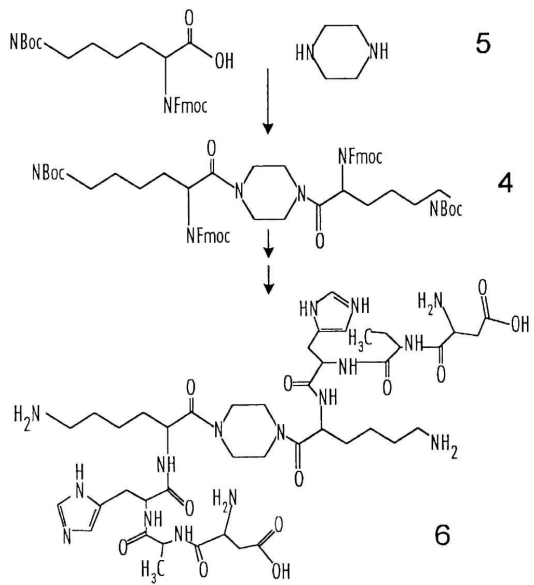
도면19a



도면19b



도면19c



도면19d

