(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 47/48
C07F 9/10

(45) 공고일자 2004년02월25일
(11) 등록번호 10-0400075
(24) 등록일자 2003년09월19일

(21) 출원번호	10-1995-0704313	(65) 공개번호	10-1996-0701664
(22) 출원일자	1995년09월30일	(43) 공개일자	1996년03월28일
번역문제출일자	1995년09월30일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1994/000669	(87) 국제공개번호	WO 1994/22483
(86) 국제출원일자	1994년03월30일	(87) 국제공개일자	1994년10월13일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 그루지야 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남 중국 라트비아 슬로베니아 트리니다드토바고 우즈베키스탄 AP ARIPO특허 : 말라위 수단
EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아
EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투칼 스웨덴
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

(30) 우선권주장 105244 1993년03월31일 이스라엘(IL)

(73) 특허권자 디-팜, 리미티드
이스라엘 76123 레호보트 피.오.박스 2313
(72) 발명자 알렉산더코작
이스라엘76285레호보트멜쩌스트리트8/9
(74) 대리인 남상선

심사관 : 이유형

(54) 세포로의침투가개선된약제

명세서

<1> 발명의 영역 및 배경

<2> 본 발명은 정상이상(supranormal) 세포내 효소 활성과 관련된 사람의 질환 또는 질병을 치료하는 방법 및 이러한 방법에 유용한 전구약제(prodrug)에 관한 것이다.

<3> 허혈, 발작, 간질, 천식 및 알레르기 등과 같은, 사람의 많은 주요 질환들은, 본원에서 특정 세포내 효소가 비정상적으로 증가됨을 지칭하는 용어인 세포 과자극(hyperexcitation) 현상과 관련되어 있는 것으로 간주된다. 예를 들면, 이러한 질환 상태와 관련있는 정상이상 세포내 포스포리파아제에 의해 세포막이 파손된다. 그러므로, 현재의 약리적 전략은 이러한 해로운 분해 활성을 저해하는 것을 목적으로 하고 있다.

<4> 약리 활성 분자를 전구약제 형태로 세포내로 도입시켜서 이러한 과활성이 전구약제에 작용하여 약리 활성 분자가 건강한 세포보다는 질환이 있는 세포에 축적되도록, 효소 과활성을 특징으로 하는 질환 세포를 선택적으로 표적화할 수 있다는 것은 유용하다.

<5> 이러한 약리 활성 분자의 비제한적 예로는 칼슘 킬레이트화제가 있으며, 이는 칼슘 관련 질환의 치료에 현재 사용되는 약제보다 많은 이점을 가질 것이다.

<6> 세포내 칼슘은 세포가 입은 초기 손상과는 관계없이 세포 치사의 중요한 결정인자이다. 이것은 림프구와 킬러 세포 매개된 표적 세포의 파손, 이식 동안의 기관 파손 및 허혈 손상을 포함하는 다른 유형의 조직 파손의 경우에서의 세포 치사와 관련될 수 있다. 칼슘 채널 차단제 또는 칼슘 킬레이터(chelator)의 세포막 투과성 형태가 조직을 상해로부터 보호하거나 조직 파손을 감소시키는 것으로 제시되어 왔다. 따라서, 본 발명이 이러한 상황과 관련하여 잠재적으로 유용할 것임(칼슘 킬레이터를 사용하는 구체예에서)은 명백할 것이다.

<7> 유사한 개념이 세포내 칼슘 이온의 농도와 관련된 질환이나 질병 이외의 질환이나 질병의 치료에 적용될 수 있음이 또한 자명해질 것이다. 예를 들어, 전구약제 분자에 혼입되어 있는 활성 물질이 단백질 키나아제 억제제인 경우, 전구약제의 투여 후, 억제제는 비정상적인 증식을 나타내는 세포에 축적되고, 이에 따라 항암 요법에 사용될 중요한 수단을 잠재적으로 제공한다.

<8> 증가된 생체이용률 또는 증가된 부위 특이성과 같은 원하는 특성을 공지된 약제에 부여하기 위해

전구약제를 이용하는 것은 약제 개발 분야에서 인지된 개념이다. 또한, 특정 타입의 전구약제를 제조하기 위해 다양한 지질을 이용하는 것은 배경기술 분야에 알려져 있다. 세포내 리파아제에 의한 활성화에 의해 기관의 질환 세포내에 약제를 우선적으로 축적시키는 것을 특징으로 하는 전구약제의 예는 없었다. 오히려, 이들 예는 특정 부위로 운반되거나 특정 기관내에서 방출되는 약제를 제공한다. 이러한 방법은 경구 투여되어 위 점막을 보호하고 장에서 활성 성분을 방출하는, WO 91/16920에 기재된 비스테로이드성 소염제 및 살리실레이트의 인지질 전구약제의 경우에서 예시되었다.

<9> 인지질 전구약제의 다른 예에 있어서, 리포솜 또는 다른 미셀 입자 구조내로 전구약제를 제형화시키는 것은, 예를 들어 WO 90/00555 및 WO 93/00910에 기술된 항바이러스 약제의 인지질 컨쥬게이트의 경우에서와 같이 대식세포 또는 간 세포에 의한 전구약제의 우선적 흡수를 가능하게 해주는 특징이다.

<10> 일반적으로, 바이러스 감염은 정상이상 포스포리파아제 활성과 무관하며, 항바이러스 인지질 컨쥬게이트는, WO 90/00555, WO 90/10448 및 문헌(NTIS Technical Notes, no. 9, page 630, Springfield Virginia, US, 1984)에 기재되어 있는 바와 같은 항바이러스성 뉴클레오티드와 안티센스 올리고 뉴클레오티드의 인지질 컨쥬게이트의 경우에서와 같이 약제가 감염된 세포 또는 질환 세포에서 우선적으로 활성화됨을 설명하거나 제시하지 않는다.

<11> 다른 예에서, 극성 지질의 특이적 유형은 미국 특허 제 5,149,794호에 기술된 항바이러스성 및 항종양성 뉴클레오시드의 경우에서와 같이 전구약제를 세포내 세포기관에 전구약제를 표적화시키는데 이용된다. 또한, 또 다른 유형의 지질은 고혈압 및 인식기능 장애의 치료에 사용되도록, 장으로부터 림프계로 흡수되는 미셀을 형성함으로써 간을 우회하여 중추 신경계에 대한 증가된 접근성을 지니게 되는 ACE 억제제의 글리세린 에스테르를 기술하고 있는 EP A-325160에서와 같은 특이적 유형의 전구약제에 이용되어 왔다. ACE 억제제는 효소적으로 분해되어, 세포외적으로 치료 효과를 발휘한다.

<12> 세포내 운반을 촉진시켜주는 다른 유형의 친지질성 담체는 당 분야에 공지되어 있으며, CH A-679856에는 동통 치료에 살리실로일-카르니틴을 사용하는 것이 기술되어 있고, WO 89/05358에는 페닐 또는 나프틸기와 같은 비극성기와 결합하여 세포내로 운반되는 개질된 올리고누클레오티드 안티센스 약물이 기술되어 있다.

<13> 발명의 요약

<14> 본 발명의 목적은 과활성화된 세포에 약리 활성 화합물을 선택적으로 축적시키는 전구약제를 제공하는데 있다. 본 발명의 또 다른 목적에 따르면, 약리 활성 화합물은 표적 세포내의 효소 활성에 반응하여 전구약제로부터 방출된다. 본 발명의 또 다른 목적에 따르면, 비교적 증가된 수준의 효소 활성을 특징으로 하는 세포에 선택적으로 축적되는 약리 활성 화합물은 세포에 트랩핑되어, 그 안에서 향상된 원하는 활성을 나타낸다.

<15> 따라서, 본 발명은 한 가지 일면에 있어서 세포내 효소 활성에 대해 분해 민감성 (scission-sensitive)인 공유 결합이 존재함을 특징으로 하는, 약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제의 공유 결합 컨쥬게이트인 전구약제를 제공한다.

<16> 본 발명은 또한 정상이상 세포내 효소 활성과 관련된 질환이나 질병에 걸린 사람에게 약제학적으로 허용되는 세포막 투과성 전구약제를 투여하는 것을 포함하여 상기 질환이나 질병에 걸린 사람을 치료하는 방법으로서, 전구약제는 세포막 불투과성 약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제의 공유결합 컨쥬게이트이고, 세포내 효소 활성에 대해 분해 민감성이어서 이러한 활성에 반응하여 파괴되는 공유결합이 존재하므로써, 약리 활성 화합물이 정상이상 세포내 효소 활성을 가진 세포내에 선택적으로 축적됨을 특징으로 하며, 전구약제는 정상이상 효소 활성을 감소시키는데에 효과적인 양으로 투여되는 방법을 제공한다.

<17> 또 다른 일면에서 본 발명은 정상이상 세포내 효소 활성을 가진 세포내에 약제학적으로 허용되는 세포막 투과성 전구약제 중의 세포막 불투과성 약리 활성 화합물을 선택적으로 축적시키므로써 정상이상 세포내 효소 활성과 관련된 사람의 질병이나 질환을 치료하는 약제를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 전구약제는 약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제의 공유 결합 컨쥬게이트이고, 세포내 효소 활성에 분해 민감성이어서 이러한 활성에 반응하여 파괴되는 공유결합이 존재함을 특징으로 한다.

도면의 간단한 설명

<18> 이하 설명에 의해 본 발명은 더 잘 이해될 것이다.

<19> 제 1도는 사람 림프구내의 세포내 유리 칼슘 이온(Ca^{2+}) 수준에 대한 본 발명에 의한 구체예에 따르는 화합물의 효과를 도시한 그래프이다.

<20> 제 2도는 본 발명의 구체예에 따른 화합물의 존재 또는 부재하에 전뇌허혈의 회복을 비교한 그래프이다.

<21> 제 3도는 필로카르핀 유도된 간질에 대한 용량에 따른 변화를 도시한 그래프이다.

<22> 제 4도는 본 발명의 구체예에 따른 화합물에 의해 제공되는 필로카르핀 유도된 간질에 대한 보호작용을 도시한 그래프이다.

<23> 제 5도 및 제 6도는 본 발명의 구체예에 따른 화합물에 의해 제공되는, 필로카르핀에 의해 유도된 특정 심장 기능의 장기간 변화나 관상 동맥 혈관 긴장의 조절의 변화에 대한 보호작용을 도식한 그래프이다.

<24> 제 7도는 본 발명의 구체예에 따른 화합물을 사용한 경우 허혈 재관류 모델에서의 필로카르핀에 의해 손상된 심장의 회복을 도식한 그래프이다.

<25> 제 8도는 본 발명의 구체예에 따른 화합물에 의해 제공되는, 메트라졸 최소 발작 시험에서의 보

호 효과를 도식한 그래프이다.

<26> 제 9도, 제 10도 및 제 11도는 저산소증 재관류 심장병리학에서의 실험 결과를 도식한 그래프이다.

발명의 상세한 설명

<27> 약리 활성 화합물은, 보조제가 글리세롤, C_{3-20} 지방산 모노글리세라이드, C_{3-20} 지방산 디글리세라이드, C_{3-20} 지방산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소포스파티드산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소플라스말로겐, 리소포스포리피드, 리소포스파티드산 아미드, 글리세로인산, 리소포파티달에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 이들 아민의 N-모노- 및 N,N-디-(C_{1-4})-알킬 및 4차 유도체로부터 선택된 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 알코올을 포함할 수 있는 경우에, 예를 들어, 약리 활성 카르복실산일 수 있다. 약리 활성 카르복실산의 예로는 분지쇄 지방족 카르복실산(예를 들어, 발프로산), 살리실산(예를 들어, 아세틸살리실산), 스테로이드계 카르복실산(예를 들어, 리세르산 및 이소리세르산), 모노헤테로시클릭 카르복실산(예를 들어, 니코틴산) 및 폴리헤테로시클릭 카르복실산(예를 들어, 페니실린과 세팔로스포린)이 있다. 약리 활성 카르복실산이 세포내 운반 보조제와 컨쥬게이트될 수 있는 활성 화합물의 예로서 본원에 상세하게 기재되어 있으나, 본 발명은 이에 한정되지 않는다. 따라서, 추가의 예에 의해, 치료적 활성 핵산(RNA와 DNA를 포함함)또는 이들의 단편을 세포내 운반 보조제와 컨쥬게이션시키는 것은 전적으로 본 발명에 속한다.

<28> 비제한적 구체예에서, 본 발명에 따른 전구약제는 칼슘 킬레이트화제를 포함하고, 따라서 과도하게 높은 세포내 칼슘 이온 수준과 관련된 질환이나 질병의 치료에 잠재적으로 이용될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 전구약제는 약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제 간에 하나 이상의 공유결합을 함유하며, 이 공유결합은 세포내 효소 활성에 분해 민감성이어서, 결과적으로 전구약제 분자들의 대부분이 이러한 결합의 분리없이 정상 세포의 안팎을 자유롭게 이동하는 반면, 정상이상 효소 활성만을 갖는 세포에서는 세포에 유입되는 대부분의 전구약제 분자내의 분해 민감성 결합이 파괴되어 약리 활성 화합물을 세포내에 축적시키고 비정상 세포내에 트랩핑시키는데, 이는 약리 활성 화합물이 세포막 불투과성이기 때문이다. 당업자들은 본 발명의 개념이 과다한 세포내 칼슘 이온과 반드시 관련된 것은 아닌 질병과 질환에 어떠한 방식으로 적용되는 지를 이해할 것이므로, 이러한 그 밖의 경우, 전구약제는 칼슘 킬레이터는 아니지만 다른 원하는 약리 활성을 가진 활성 화합물을 포함할 것이다.

<29> 칼슘 킬레이트화제를 포함하는 전구약제는 예를 들어,

<30> (a) 일반식 $(HOOC-CH_2-)_2-N-A-N-(-CH_2COOH)_2$을 지닌 약제학적으로 허용되는 칼슘 킬레이트화제 (A는 표시된 두개의 질소 원자 간에 직접적 사슬 링크를 지니면서 2 내지 4개의 산소 원자에 의해 차단될 수 있는 연속 사슬 형태로 2 내지 8개의 탄소 원자를 함유하는 포화되거나 불포화된, 지방족, 방향족 또는 헤테로시클릭 결합 라디칼이며, 단, 표시된 두개의 질소 원자에 직접 연결된 사슬 구성원은 산소 원자가 아니다)와,

<31> (b) 1 내지 3개의 OH 라디칼을 함유하는 약제학적으로 허용되는 C_{3-32} 알코올(예를 들어, C_{3-6} 알코올 또는 C_{7-32} 2차 일가 알코올)의 에스테르인 일부 또는 전부 에스테르화된 카르복실산; 부분 에스테르화된 카르복실산과 알칼리 금속과의 염 뿐만 아니라 하나 이상의 잠재적 염형성 질소 원자를 함유하는 에스테르화된 카르복실산의 산부가염이다.

<32> 앞 단락의 에스테르는, 결합 라디칼 A가 $-(CH_2CH_2)_m-$(m은 1 내지 4이고, 질소에 결합되지 않은 탄소 원자 중 2 내지 4개는 산소 원자로 치환될 수 있다) 및 $-CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'-$(라디칼 R-R과 R'-R'의 각 쌍은 결합된 -C=C- 부분과 함께 5 또는 6개의 고리 원자를 함유하는 방향족 또는 헤테로시클릭 고리를 형성하며, R-R에 의해 형성된 고리는 R'-R'에 의해 형성된 고리와 동일하거나 상이하다)로 구성된 군으로부터 선택되어진 에스테르일 수 있다.

<33> 특정 구체예에서, 결합 라디칼 A는 예를 들어 $-CH_2CH_2-$ 및 $-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-$로부터 선택될 수 있거나, $-CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'-$일 수 있으며, 여기서, 라디칼 R-R과 R'-R'의 각 쌍은 결합된 -C=C-부분과 함께, 푸란, 티오펜, 피롤, 피라졸, 이미다졸, 1,2,3-트리아졸, 옥사졸, 이속사졸, 1,2,3-옥사디아졸, 1,2,5-옥사디아졸, 티아졸, 이소티아졸, 1,2,3-티아디아졸, 1,2,5-티아디아졸, 벤젠, 피리딘, 피리다진, 피리디민, 피라진, 1,2,3-트리아진, 1,2,4-트리아진, 및 1,2-, 1,3- 및 1,4-옥사진 및 티아진으로 구성된 군으로부터 선택된, 방향족 또는 헤테로시클릭 고리를 형성하며, R-R에 의해 형성된 고리는 R'-R'에 의해 형성된 고리와 동일하거나 상이하다. 특히 바람직한 구체예에서, 결합 라디칼 A는 $-CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'-$이며, 여기서, 라디칼 R-R과 R'-R'의 각 쌍은 결합된 -C=C-부분과 함께 치환되거나 치환되지 않은 벤젠 고리로부터 선택된, 동일하거나 상이한 고리를 형성하고, 여기서, 치환된 벤젠 고리는 C_{1-3}-알킬, C_{1-3}-알콕시, F, Cl, Br, I 및 CF_3로 구성된 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 치환기 또는 $-O-(CH_2)_n-O-$(n=1 내지 3)인 하나의 2가 치환기를 함유한다.

<34> 전구약제에 혼입되는 칼슘 킬레이트화제는 에틸렌-1,2-디아민-N,N,N',N'-테트라아세트산, 에틸렌-1,2-디올-비스-(2-아미노에틸 에테르)-N,N,N', N'-테트라아세트산, 및 1,2-비스-(2-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산으로부터 선택되는 것이 현재 바람직하다.

<35> 위에서 언급된 바와 같이, 상기 언급된 C_{3-32}, 예를 들어 C_{3-6} 알코올은 1 내지 3개의 OH 라디칼을 함유하고 있다. 2개의 OH 라디칼이 있는 경우, 두 개중 하나는 에스테르화되거나 다른 방식으로 유도체화될 수 있고, 3개의 OH 라디칼이 있는 경우, OH 라디칼중 하나 또는 두개가 에스테르화되거나 유도체화될 수 있다. 에스테르화하거나 다른 방식으로 유도체화하는 기(들) 중의 탄소 원자는, 약제학적으로 허용되는 알코올에 함유될 수 있는 예를 들어 3 내지 6개의 탄소 원자에 고려되지 않는다. 따라서, 이러한 알코

올은 예를 들어 글리세롤, C_{3-20} 지방산 모노글리세라이드, C_{3-20} 지방산 디글리세라이드, C_{3-20} 지방산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소포스파티드산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소플라스말로겐, 리소포스포리피드, 리소포스파티드산 아미드, 글리세로인산, 리소포스파티달에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 이들 아민의 N-모노-C_{1-4}-알킬, N,N-디-C_{1-4}-알킬 및 4차 암모늄 유도체로 구성된 군 중 하나 이상의 성분을 함유할 수 있다. C_{7-32} 2차 알코올의 예는 1-미리스틸미리스틸 알코올이다.

<36> 당업자는 본 발명의 전구약제가, 원하는 약리 활성 물질이 치료하고자 하는 질병이나 질환에서 효소 과활성화원으로 알려진 효소의 작용에 의해 방출되는 방식으로 맞추어질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 막 관련된 칼슘-비의존성 플라스말로겐 선택적 PLA_2 활성은 전허혈의 2분 동안 400%가 넘게 증가하는 것으로 밝혀졌고($P<0.01$), 이는 허혈의 단지 5분 후의 10배(거의 최대)가 넘었으며, 관찰된 전체 허혈 기간(60분 이하)에 걸쳐 활성화된 상태였다[참조: Ford et al, J. Clin. Invest., 1991, 88 (1) : 331-5]. 이러한 사실은 글리세로인산의 유도체의 2 위치에 약리 활성 물질이 결합하며, 리소플라스말로겐을 사용하는 것이 활성 물질이 공유결합되는 세포내 운반 보조제로서 리소포스포리피드 보다 아마도 더욱 효과적일 수 있음을 시사한다.

<37> 세포막의 손상을 야기하는 임의의 물질(예를 들어, 세포독성 화학물질, 물리적 자극제 및 감염제)는 케스케이드를 일으켜서 궁극적으로 허혈과 유사한 질환을 생성시킬 수 있다[참조: Robbins et al, Pathological Basis for Disease, 1984, p. 10, W. B. Sanders Co.]. 본 발명은 세포내에 칼슘 킬레이터를 도입시키므로써 이러한 경우에 세포를 보호하는데에 잠재적으로 사용될 것이다. 이와 관련하여, Na-Ca 교환을 저해하고 칼슘을 근형질에 오버로드(overload)시키는 것으로 보고된 항암제인 아드리아마이신(Adriamycin)이 수축성 심부전을 유발할 수 있다는 것이 주목되는데; 이것은 허혈이 없는 경우에 칼슘 오버로드가 장기 지속성 수축성 기능부전을 일으킬 수 있다는 가설과 일치한다[참조: Kusuoka et al, J. Cardiovasc. Pharmacol., 1991, 18(3) : 437-44].

<38> 상기 지적한 바와 같이, 본 발명의 개념은 Ca^{2+} 이온의 세포내 농도와 관련된 질병이나 질환의 치료에만 국한된 것이 아니므로, 본 발명을 실시하는데 사용되는 물질은 칼슘 킬레이터에 제한되는 것이 아니다. 따라서, 예를 들어 약리 활성 화합물은 발프로산과 같은 항간질성 화합물일 수 있다. 이와 관련하여, 이러한 구체예에 본 발명을 적용하면 다른 경우 보다 발프로산의 유효 용량을 현저하게 낮출 수 있으므로, 원하지 않는 부작용의 발생율을 잠재적으로 및 실질적으로 감소시킬 수 있는 것으로 생각된다. 원칙적으로, 칼슘 킬레이터의 에스테르화와 관련하여 상기 언급한 알코올의 범위 및 이들의 예 중 어느 하나가 본 발명의 개념에 따라 발프로산의 에스테르화에 적용될 수 있다. 비제한적 구체예에서, 발프로산은 예를 들어 1-헵타노일-sn-글리세로-3-포스포릴콜린으로 에스테르화될 수 있다.

<39> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 전구약제에 혼입되는 약리 활성 화합물은 단백질 키나아제 억제제이다. 단백질 키나아제 억제제가 카르복실산인 경우, 전구약제는 예를 들어, 이러한 산과, 글리세롤, C_{3-20} 지방산 모노글리세라이드, C_{3-20} 지방산 디글리세라이드, C_{3-20} 지방산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소포스파티드산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소플라스말로겐, 리소포스포리피드, 리소포스파티드산 아미드, 글리세로인산, 리소포스파티달에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 이들 아민의 N-모노- 및 N,N-디-(C_{1-4})-알킬 및 4차 유도체와 같은 약제학적으로 허용되는 알코올과의 에스테르일 수 있다. 이러한 카르복실산은 예를 들어 노카르디옵시스 종(Nocardiopsis sp.)으로부터의 단백질 키나아제 억제제 K252b이다.

<40> 단백질 키나아제 억제제가 치환가능한 N 결합된 수소 원자를 갖는 아민기를 함유하는 경우, 전구약제는 예를 들어, 이러한 억제제와, 글리세로인산, O-아실화되거나 에스테르화된 글리세로인산 및 모노아실화된 모노에스테르화 글리세로인산으로부터 선택된 인산 유도체와의 아미드일 수 있다. 이러한 단백질 억제제는 예를 들어, $NHCH_2CH_2NHCH_3$와 2-메틸피페라진-1-일과 같은 비환식(acyclic) 또는 헤테로시클릭 아미노알킬 라디칼에 의해 N-치환된이소퀴놀린-5-술폰아미드이다. 단백질 키나아제 억제제가 하나 이상의 페놀성 히드록시기를 함유하는 경우, 전구약제는 예를 들어, 이러한 억제제와, 글리세로인산, O-아실화된 글리세로인산, 에스테르화된 글리세로인산 및 모노아실화된 모노에스테르화 글리세로인산으로부터 선택된 인산 유도체와의 에스테르일 수 있다. 이러한 단백질 키나아제 억제제는 예를 들어 4',5,7-트리히드록시이소플라본이다.

<41> 본 발명을 위해 세포내 운반 보조제를 선택하는 경우, 당업자는 단백질 키나아제 C의 활성화제인 몇몇 1,2-디아실글리세롤[참조: Lapetina et al, J. Biol. Chem., 1985, 260 : 1358 및 Boynton et al Biochem. Biophys. Res. Comm., 1983, 115 : 383] 또는 세포내에서 원하지 않는 생성물을 생성시키는 것으로 여겨지는 세포내 운반 보조제와 같은 보조제를 피해야할 필요성을 고려할 것임은 물론이다.

<42> **실시예**

<43> **실시예 1 : 전구약제 1 및 전구약제 2의 제조**

<44> 도입

<45> "전구약제 1"은 1,2-비스-(2-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산(BAPTA)과 콜린 유도체 $ROCH_2-CH(OH)-CH_2O-(PO_2)-OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$(여기서, R은 헵타노일이다)와의 1:1 에스테르를 명명하기 위해 본원에서 사용되는 명칭이다. BAPTA는 칼슘 킬레이터로서, 사람 세포막은 보통 이에 대해 불투과성인 반면, 그 자체로는 칼슘 킬레이터가 아닌 전구약제 1은 사람 세포막에 대해 투과성이다. 전구약제 1 중의 카르복실산 에스테르 링크는 PLA_2에 의해 분해될 수 있으므로, IgE 림프구와 같은 활성화된 세포는 불활성화된 세포와 비교하여, BAPTA의 선택적 세포내 축적을 나타낼 수 있으며, 이 결과로 활성화된 세포내의 $[Ca^{2+}]_i$ 농도는 불활성화 세포와 비교하여 감소될 수 있다. "전구약제 2"는 BAPTA와 상기 콜린 유도체와의 1:2 에스테르이다.

<46> 제조 과정

<47> (a) 디헵타노일-L-α-레시틴

<48> 오일로 밀봉된 교반기, $CaCl_2$ 튜브 및 적하 깔때기가 구비된 건조된 3구 500㎖ 플라스크에 100㎖의 직경 5㎜ 유리 비드 및 합성 L-α-글리세로포스포릴-콜린의 $CdCl_2$ 부가생성물 11.0g(0.01몰)을 넣었다. 빙수욕에 상기 플라스크를 담가놓고, 급속 교반시킨 혼합물에 60㎖의 클로로포름* 중에 용해된 새로 제조된 헵타노일 클로라이드 29.7g(0.2몰)의 얇은 스트림을 첨가한 후, 클로로포름*(*무수, 무알코올) 100㎖ 중에 용해된 무수 피리딘 11㎖(0.14몰)을 첨가하였다. 30분 후에, 욕 온도를 25℃로 올리고 2시간 동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 필터를 뺀 부흐너에 통해 붓고, 유리 비드를 3×50㎖의 클로로포름으로 세척하고, 결합된 여액을 원심분리하여 정화시켰다. 상청액을 감압하에서 농축시키고, 잔류물을 0.1㎜ 진공 및 욕 온도 30 내지 35℃에서 수 시간 동안 유지시켜 과량의 피리딘을 대부분 제거한 후, 10분 동안 500㎖의 무수 아세톤과 함께 교반하고, 원심분리시켰다. 침전물을 2×100㎖ 무수 아세톤 및 2×100㎖ 무수 에테르로 유사하게 처리하였다. 잔류 고형물을 감압하에서 건조시키고, 클로로포름/메탄올/물의 5:4:1(v/v) 혼합물 200㎖중에 용해시키고, 이 용액을 앰버리트(Amberlites) IR-45와 IRC-50의 동부피 혼합물을 함유하는 길이 120㎝×직경 2.5㎝의 컬럼에 통과시킴으로써 염화카드뮴과 피리딘 히드로클로라이드를 최후 미량까지 제거하였다. 컬럼을 500㎖의 동일한 클로로포름/메탄올/물(v/v) 혼합물로 세척하고, 결합된 유출물을 40 내지 45℃에서 욕으로부터 감압하에서 건조 농축시키고, 잔류물을 0.1㎜ 진공 및 45℃에서 건조시켰다. 미정제 생성물은, 50㎖의 클로로포름중의 용액으로부터 아세톤 150㎖을 사용하여 침전시키고, 원심분리시키고, 침전물을 재결정화에 의해 정제하여 클로로포름과 에테르로부터 2.3g(47.6%)을 얻었다. (디옥타노일-L-α-레시틴도 유사하게 제조될 수 있다).

<49> (b) 1-헵타노일-sn-3-글리세로포스포릴콜린

<50> 에테르(196㎖)과 메탄올(12㎖) 혼합물중의 상기 (a) 생성물(1.2mmol)의 용액을, 포스포리파아제 A_2의 공급원으로서의 미정제 방울뱀 독액(Crotalus adamanteus) 5mg과 $CaCl_2$ (0.72mM)이 함유된 $(HOCH_2)_3C-NH_2-HCl$(0.1M 50㎖, pH 8.7)의 존재하에서 37℃에서 3시간 동안 격렬하게 교반하였다. TLC(70:25:4(v/v) 클로로포름/메탄올/물)로 반응을 모니터링하였다. 반응이 종결된 후, 유기층을 분리하고, 수성층을 에테르로 세척한 후, 동결건조시켰다. 잔류물을 2:1(v/v) 클로로포름/메탄올로 추출하고, 원심분리시켰다. 맑은 상청액을 증발시켜, 표제 생성물을 90% 수율로 얻었다. 70:25:4(v/v) 클로로포름/메탄올/물을 이용하여 박막 크로마토그래피를 수행한 결과, 생성물은 개시 물질과 헵탄산을 함유하지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 생성물 중의 지방산은 에탄올 에테르로부터의 결정화에 의해 제거될 수 있다. 주의: 이것은 글리세롤-2-에스테르 결합을 분해시키기 위한 일반적인 방법이다(옥타노일-sn-3-글리세로포스포릴-콜린도 유사한 방법으로 제조될 수 있다).

<51> (c) 전구약제 1 및 전구약제 2

<52> 클로로포름(15㎖, P_2O_5로 새로 증류시킴)중의 상기 (b)의 생성물(0.5g,1.04mmol)의 용액을 질소 분위기하에서 BAPTA(모노에스테르 전구약제 1의 경우 0.495g(1.03mmol) 또는, 디에스테르 전구약제 2의 경우, 0.248g(0.51mmol)), N,N'-디시클로헥실-카보디이미드(0.214g, 1.03mmol), 4-디메틸아미노피리린(0.025g, 0.202mmol) 및 $HCONMe_2$ (20㎖, CaH_2로 새로 증류시킴)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2일 동안 교반시켰다. 반응을 TLC(65:35:5(v/v) 클로로포름/메탄올/물)로 모니터링하였다. 침전물을 여과하여 제거하고, 여액을 37℃에서 진공하에 증발 농축시키고, 잔류물을 2:1:2(v/v) 클로로포름/이소프로판올/물중에 용해시켰다. 유기층을 분리하고 건조시킨 후(Na_2SO_4), 규산 (Bio-Sil-HA)의 길이 20cm×직경 1.8cm 컬럼을 통과시켰다. 컬럼을 BAPTA가 없어질 때까지 (TLC) 클로로포름으로 철저하게 세척하고, 클로로포름/메탄올의 1:1(v/v) 구배로 순수한 메탄올이 될 때까지 용리시키고, 용리를 TLC로 모니터링하였다. 용리된 분획을 결합시키고, 증발 농축시켰다. 원하는 표제 생성물(즉, 사용된 BAPTA의 몰당량의 수에 따라 전구약제 1 또는 전구약제 2)을 에테르로부터 결정화시키고, 30℃에서 P_2O_5로 진공하에서 건조시켰다: 수율 0.3g(30%). BAPTA의 몰당량의 수를 적절하게 변화시키므로써 상응하는 트리에스테르 또는 테트라에스테르가 수득될 수 있다는 것은 명백할 것이다(유사 옥타노일 에스테르는 유사하게 제조된다).

<53> **실시예 2: 과활성화된 세포내의 세포내 칼슘 수준을 감소시키기 위한 전구약제 1의 적용**

<54> 방법

<55> Ca^{2+} 민감성 염료인 플루오-3/AM(Molecular Probe Inc., Or.)을 사용하는 유동 혈구 계산법으로 세포내 유리 $[Ca^{2+}]_i$ 함량을 모니터링하였다[참조: Minta et al, 1989 ; Kso ry sl, 1989]. 도너 혈액으로부터 얻은 세포와 천식 환자의 혈액으로부터 얻은 세포를 추가로 DMEM으로 2회 세척하고, 10^7세포/㎖ 농도로 재현탁시켰다. 플루오-3/AM(1mM)을 비이온성 계면활성제 플루로닉 F-127(Wyandotte Corp., MI)로 증강시킨 DMEM 중에 준비하였다. 플루오-3/AM 원액의 분취액을 3μM의 최종 농도로 DMEM/HEPES(로딩 완충액) 중의 세포 현탁액에 첨가하였다. 로딩은 30분 동안 37℃에서 진행시키고, 1시간 동안 23℃에서 부드럽게 교반하면서 계속 진행시켰다. 그 후, 2% 말 혈청이 보충된 새로운 DMEM/HEPES를 사용하여 세포를 원하는 농도로 조정하였다. 염료 부재하에 얻어진 수준 보다 높게 한계 감도를 셋팅시키므로써, 자가형광현상을 제거하였다. 형광세기 데이터를 5000개의 단일 세포로부터 수집하고, 수치를 임의의 형광 단위로 표현하였다. 전구약제 1(1mM)을 DMSO 중에 준비하고, 적합한 경우, 칼슘 처리하기 전에 5분간 최종 농도 3μM로 세포에 첨가하였다.

<56> 결과

<57> 도너 혈액과 천식 환자 혈액으로부터의 림프구를 전구약제 1에 노출시켰다. 세포내에 유리된 BAPTA 킬레이터의 축적을 상기 기술한 것과 같이 플루오-3/AM을 이용한 유동 혈구 계산법으로 $[CA^{2+}]_i$를

계산하여 평가하였다. 결과는 제 1도에 기재되어 있으며, 여기서, $[Ca^{2+}]_i$ 수준은 다음에서 나타난다:

<58> 정상 림프구 (패널 A) ;

<59> 전구약제 1로 처리된 정상 림프구 (패널 B) ;

<60> 천식 환자로부터의 림프구 (패널 C) ;

<61> IgE로 자극한 천식 환자로부터의 림프구 (패널 D) ;

<62> 전구약제 1로 처리된 천식 환자로부터의 림프구 (패널 C') ; 및

<63> 전구약제 1로 처리되고 IgE로 자극한 천식 환자로부터의 림프구(패널 D').

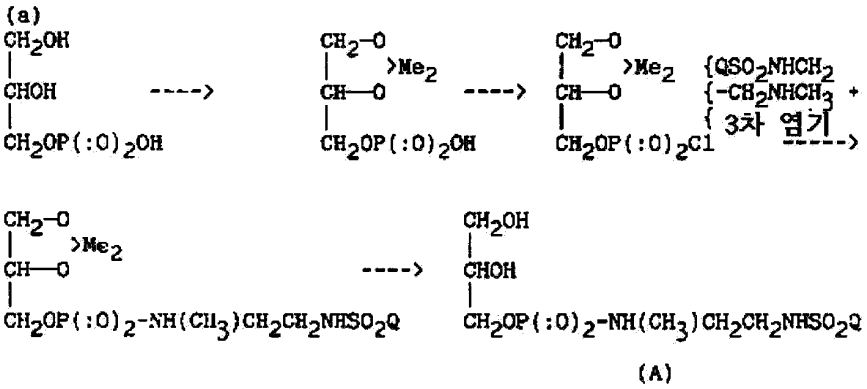
<64> 천식 환자로부터의 림프구가 $[Ca^{2+}]_i$ 수준에 따라 이중 배분을 가진다는 것이 주목된다 (패널 C). 세포의 약 50%가 세포 과활성을 나타내는 높은 $[Ca^{2+}]_i$ 수준을 나타내는 반면, 집단의 제 2 부분은 정상 림프구와 비슷하다(패널 A와 비교). 세포가 전구약제 1로 처리된 패널 C'과 D'의 경우, 과활성 세포의 집단이 정상으로 되돌아온 반면, 불활성화된 세포의 집단은 온전하게 남아있다(패널 C와 비교). 데이터는 전구약제 1이 활성화된 세포내에 킬레이터를 선택적으로 축적시키지만 불활성 세포에서는 그렇지 않음을 입증하고 있다.

<65> **실시예 3 : 종양 치료에 잠재적으로 적용되는 전구약제**

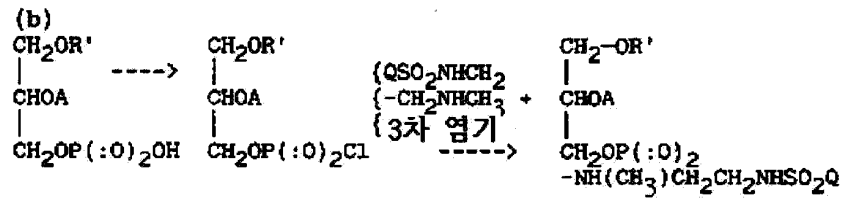
<66> 도입

<67> 본 실시예에서는 전구약제가 단백질 키나아제 억제제를 포함하고 있는 본 발명의 다수의 예시적인 구체예가 제시된다. 전구약제의 투여 후, 억제제는 비정상적 증식을 나타내는 세포내에 축적되어, 항종양 요법에 사용되는 중요한 수단을 잠재적으로 제공해준다.

<68> (i) 화합물 $QSO_2\tilde{N}$ (Q는 5-이소퀴놀릴이고, $\tilde{N}$ 은 $NHCH_2CH_2NHCH_3$ 이다)은 cAMP 의존성 단백질 키나아제의 선택적 억제제이다[참조: Hidaka et al, Biochemistry, 1984, 23 : 5036, 및 Tash et al, J. Cell Biol., 1986, 103 : 649]. 유사하게는, 화합물 $QSO_2\tilde{N}$ (Q는 5-이소퀴놀릴이고, $\tilde{N}$ 은 2-메틸피페라진-1-일이다)은 시클릭 누클레오티드 의존성 단백질 키나아제와 단백질 키나아제 C의 강력한 억제제이다[참조: Hidaka et al, loc cit, 및 Kikuchi et al, Nucl. Acid Res., 1988, 16 : 10171]. 이러한 화합물은 예를 들어 아래와 같이 당업자에게는 잘 알려진 방법으로 세포내 운반 보조제에 공유적으로 컨쥬게이션될 수 있다:



(A)



(B)

<70> 도식(b)에서, R은 플라스말로겐에서 발견되는 것과 같은 지방족 탄화수소기이고(또는 이것은 통상의 합성 과정으로 삽입될 수 있다), A는 지방족 아실 라디칼, 예를 들어 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아릴 및 올레일이다.

<71> 화합물 $QSO_2\tilde{N}$ (Qs는 5-이소퀴놀릴이고, $\tilde{N}$ 은 2-메틸피페라진-1-일이다)은 피페라진 N^4 원자에

의해 유사한 방식으로 결합될 수 있다.

<72> 상기 도시된 전구약제 (A) 및 (B) 중의 P-N 결합은 효소 PLD에 대해 분해 민감성이어서, 기술된 단백질 키나아제 억제제를 세포내적으로 유리시키고, PLD가 정상이상 수준인 세포내에 이러한 억제제를 축적시키는 것으로 예상된다.

<73> (ii) 4',5,7-트리히드록시플라본은 티로신 특이적 단백질 키나아제의 억제제이다[참조: Akiyama et al., J. Biol. Chem., 1987, 262 : 5592]. 이 화합물은 상기 (i)에서 기술된 (a) 및 (b) 방법에 의해 세포내 운반 보조제에 컨쥬게이션될 수 있다. 예시적인 컨쥬게이트는 하기 구조식(C) 및 (D)를 지닌다:

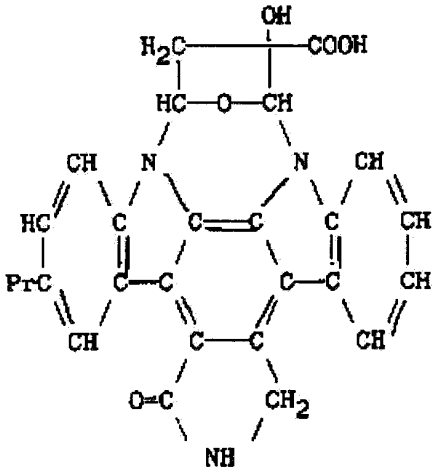
(C) & (D):



(C) (D)

<75> 상기 식에서, R'와 A는 상기 언급된 의미를 지니고, Q'는, 하나의 페놀성 수소 원자가 제거되므로써 하나의 O 원자에 의해 분자의 나머지 부분에 결합하여 P-O 결합을 형성하는, 4',5,7-트리히드록시이소플라본의 잔기이다. 상기 도시된 전구약제 (C)와 (D) 중의 이러한 P-O 결합은 효소 PLD에 대해 분해 민감성이므로, 이에 따라 기술된 단백질 키나아제 억제제를 세포내적으로 유리시키고, PLD가 정상이상 수준인 세포에 이러한 억제제를 축적시키는 것으로 예상된다.

<76> iii) 노카르디옵시스 종으로부터의 단백질 키나아제 억제제 K252b는 하기 일반식을 갖는 것으로 믿어지는 카르복실산이다:



<78> 상기 화합물은 예를 들어 상기 실시예 1에 기술된 방법에 의해 세포내 운반 보조제에 컨쥬게이션될 수 있다. 전형적인 컨쥬게이트는 상기 일반식 중의 카르복실 작용기와, 예를 들어 헵타노일-sn-글리세로포스포릴-콜린 또는 옥타노일-sn-3-글리세로포스포릴-콜린과의 에스테르이다.

<79> **실시예 4 : DP16의 제조 및 생물학적 특성**

<80> 본원에서 "DP16"은 BAPTA와 콜린 유도체 $ROCH_2-CH(OH)-CH_2O-(PO_2)-OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ (R=헥사데카노일)와의 1:1 에스테르를 의미한다. DP16은 실시예 1에서 기술된 방법에 따라 제조되었다.

<81> 허혈과 관련된 DP16의 평가에 대한 도입

<82> 온목동맥의 좌우 양측 폐색은 전허혈을 유도하는 가장 간단하고 직접적인 방법이다. 래트의 경우, 24시간 후에 거의 64% 치사율을 보였다. 치사의 원인은 주로 뇌 팽화(부종)와 초점성 병소(경색)이었다. 전허혈은 온목동맥을 격리시키고 목의 배쪽면에서 절개함으로써 달성되었다. 침샘을 측방향으로 옮기고, 목혈관 신경집을 노출시켰다. 미주 신경과 교감 신경 둘 모두를 온목동맥으로부터 분리한 후, 온목동맥을 영구 결찰시켰다. 체중 300g당 0.1㎖ 롬푼(Rompun)(2%, Bayer, FRG)과 0.1㎖ 케타민(0.1g/㎖, Park Davis, UK)을 근육내에 주사하거나 할라탄으로 스프라그-다울리 래트 (250-300g)를 마취시켰다. 동맥을 결찰시킨 후 적당한 때에 DP16(0.001-0.1 mg/kg)을 복강내 투여하였다. 모든 실험군과 대조군에는 14마리의 수컷 래트가 포함되었다. t 기준에 따라 통계적 분석을 수행하였다.

<83> 상세한 실험 설명과 허혈 시험 결과

<84> 색전성 발작: 스프라그-다울리 래트(300g)를 할라탄으로 마취시켰다. 오른쪽 온목동맥을 노출시키고, 외경동맥과 익구개 동맥을 No. 0 실크 쓰레드(thread)로 결찰시켰다. 온목동맥을 헤파린처리한 염수로 미리 충전된 플라스틱관으로 캐뉼러화시켰다. 그 후, 캐뉼러에 구체의 현탁액을 주입한 후 (0.5㎖ 기밀해밀톤 주사기), 0.5㎖ 염수를 밀어넣었다. 그 후, 온목동맥을 영구히 결찰시켰다. 폴리스티렌 15㎛ 구체를 정상 염수 중의 0.05% 트윈 80중에 준비시킨 후, 5분간 전출력 처리하였다. 100㎕의 분취액을 취하여 즉시 주사기에 옮겼다.

<85> 허혈 태아 뇌 모형 : 20일째 임신중인 스프라그-다울리 래트를 사용하였다. 상기 동물에 체중 300g당 0.1㎖ 케타민(0.1g/㎖, Park Davis, UK)과 0.1㎖ 롬푼(2%, Bayer, FRG)를 근육내 주사하여 마취시켰다. 복부를 절개하고, 두개의 자궁뿔을 노출시키고, 수술이 끝날 때까지 습윤상태를 유지시켰다. $NaHCO_3$(1.32 g%)를 함유하는 등장 염용액 중의 1 내지 2mCi/2㎖ [^{3}H] 아라키돈산(Na^+, 240mCi/mmol from New England Nuclear, Boston, MA) 및/또는 1.5mCi/2㎖ [^{14}C] 팔미트산(Na^+, 819mCi/mmol from Amersham, Searle, UK)를 태아에 뇌내 주입시키는 것을 자궁벽을 통해 천문내로 수행하였다. 뇌 부종을 감소시키기 위해 주문 제작한 주사기(33 게이지, 0.375" 길이; Hamilton, Reno, NV)를 사용하였다. 주사 후, 생리적 온도를 유지하기 위해 태아를 복강에 복귀시켰다. 1시간 후에 태반 다양체내의 혈관을 클램핑하여 20분 동안 혈류 제한하였다(제한기). 요망되는 경우 언제든지, 클램프를 제거하여 순환을 회복시켰다(재관류기). 항상 제한된 태아 및 겉보기 수술된 태아 둘 모두를 수술 분만시키기 전에 복강에 유지시켰다. 자궁 가로 절개를 통한 분만 후, 외견상 부종이 없는 생존한 태아를 지체없이 치사시키고, 절제한 태아의 뇌를 추후 처리를 위해 즉시 적당한 유기 용매 중에서 균질화시켰다.

<86> 태아 대뇌 반구 모형 : 태아를 자궁뿔로부터 생존 상태로 분리하여, 목을 자른 후 15초 내에 대뇌 반구를 절개하였다. 혈액과 뇌막을 없앤 대뇌 반구를 분리하고, 각각 (50 ± 2.5mg)을 24-웰 팔콘(Falcon) 배양 접시의 웰에 넣었다. 조직을 차가운 둘베코(Duobecco) 개질된 이글 배지(DMEM, Grand Island Biol. Co)로 신속하게 2회 세척한 후, 37℃에서 산소가 플러슁되고 여러 첨가물이 보충된 DMEM 0.6 내지 1.2㎖ 중에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 배지의 분취액(0.1㎖)을 방사선면역측정(RIA)기법에 의한 에이코사노이드 측정을 위해 취하였다. 포름산 5㎖로 산성화시킨 후, 이소프로판올 0.1㎖와 디에틸에테르 0.5㎖을 첨가하였다. 혼합 및 저속 원심분리(2500g×5분) 후, 유기층을 수집하고, 질소 스트림하에서 건조시켰다. 형성된 잔류물을 0.1% 우혈청 알부민을 함유하는 인산나트륨 완충액(pH 7.4) 0.1㎖중에 용해시켰다. 샘플을 최종 부피 0.3㎖로 적당한 폴리클로날 항혈청과 ^{3}H-표지된 트레이서(tracer)(4000cpm/tube)와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이팅시켰다. 결합되지 않은 물질을 0.3㎖ 덱스트린 코팅된 목탄 (Pharmacia, Sweden)으로 침전시켰다. 4℃에서 원심분리시킨 후, 상청액의 분취액(0.4㎖)을 바이알에 옮기고, 섬광 액체를 첨가한 후, 샘플을 팩커드 트리카브(Packard Tricard) 섬광 계수기로 계수하였다. 등장성 $NaHCO_3$ (1.32% w/v)중에 용해된 [^{3}H] 아라키돈산(240Ci/mmol)(New England Nuclear, Boston, MA)을 자궁벽과 천문을 통해 태아의 뇌에 주사하였다. 주사 후, 태아를 생리 조건하에서 유지시키기 위해 복강으로 복귀시켰다. 1시간 후에, 태아를 분만시키고, 즉시 치사시켰다. 대뇌 반구를 후속 체외 인큐베이션 또는 지질 추출을 위해 신속하게 절제하였다.

<87> 결과, 양측 전뇌 허혈은 수술후 6 또는 7일째까지 실험 동물의 점진적 감소를 초래하였다. 제 2도에 도시된 바와 같이 DP16은 보호되지 않은 래트를 사용한 대조군과 비교하여, 허혈후 회복율을 250% 증가시켰다($P<0.01$). 이러한 데이터는 다른 방식으로 태아 허혈 질환을 치료할 수 있는 DP16의 잠재적 능력을 입증한다.

<88> 심장 허혈 관류된 심장 모델 : 흰색 래트를 경부 탈구로 치사시키고 이들의 심장을 신속히 분리하여 랑겐도르프(Langendorff) 관류된 심장 모델을 이용하여 개질된 크렙스-헨셀라이트(Krebs-Henselleit) 완충액으로 60mmHg에서 재관류시켰다. 심장을 10분의 예비평형 기간 동안 관류시킨 후, 전허혈(유동없음)이 되게 하거나 지시된 시간 동안 지속적으로 관류시켰다. 심실 조직을 신속히 절제하고 곧바로 차가운 균질화 완충액(10mM 이미다졸, 10mM KCl, 0.25M 수크로오스[1등급], pH 7.8)에 침지시켜 관류를 종료시켰다. 재관류 동안의 포스포리파아제 A2의 활성화와 이의 가역성을 근세포 무산소 대사 및 전자 현미경 분석에서의 변화와 일시적으로 상관시켰다.

<89> 관상동맥 폐색에 의해 야기되는 심실 세동의 모델: 개(11.6-20.7kg)를 마취시키고, 좌회선 혈류, 좌측 심실 압력 및 심실 일렉트로그램을 측정하도록 장치하였다. 좌측 전방의 하행 동맥을 결찰시킨 후, 전방 벽 심근경색을 발생시켰다. 심혈관 장치에 대한 모든 리드(lead)를 동물의 목뒤로 나오게 하기 위해 피부 아래로 관통시켰다. 적당한 약을 사용하여 수술후 고통을 최소화시키고 염증을 방지하였다. 허혈 시험은 3-4주 후에 수행하였다.

<90> **간질성 질환의 치료와 관련된 DP16의 특성**

<91> 실험적 간질의 필로가르핀(Pilocarpin) 기재 모델

<92> 아세틸콜린, 아세틸콜린에스테라아제 억제제 및 아세틸콜린 유사체는 뇌내적 또는 전신적으로 적용되는 경우에 효과적인 간질발생제이다[참조: Leite et al., Neurosci. & Biobeh. Rev., 1990, 14 : 511-17]. 무스카린 콜린성 효능제의 전신 투여가 카인산과 엽산에 의해 생성되고, 부검된 사람 간질중에서 흔히 관찰되는 국소적으로 유사한 광범위한 뇌 손상을 수반하는 뇌파 및 행동 변연 발작을 생성시키는 것으로 여러 종에서 입증되었다. 효능있는 무스카린 콜린성 효능제인 필로카르핀의 전신 주입은 스터링 스펠(stirring spell), 안면 자동증과 운동 변연 발작을 포함하는 일련의 행동 변화를 일으킬 수 있고, 이러한 변화는 1 내지 2시간에 걸쳐 전개되어 점증적으로 변연 상태로 되고, 일반적 간질성 상태로 이어진다.

<93> 결과. 필로카르핀의 주사 직후, 무동증, 실조성 비틀거림, 안면자동증과 심장 진전이 동물의 행동에 우세하게 나타난다. 간질의 추가 전개는 용량에 의존성이다(제 3도). 300-350mg/kg의 용량으로 필로카르핀을 투여하면, 경직(rearing), 앞다리 간대경련, 타액분비, 격렬한 턱 저작 운동과 쓰러짐을 수반한 변연 발작 증상이 나타난다. 20 내지 30분 후에 개시된 운동성 변연 발작은 2 내지 8분마다 재발하여 간질 상태에 이르렀다. 필로카르핀 용량을 400mg/kg까지 증가시킨 경우, 변연 발작이 사라지고, 초기 행동상의 변화가 있은지 15 내지 25분 후, 태아의 일반적인 긴장-간대성 경련이 유발되었다. 본 발명자들은 이 용량을 LD_{100}으로서 간주한다.

<94> 필로카르핀 전에 DP16의 투여하면, 동물의 치사를 방지하고, 간질양 징후가 감소하였다. 제 4도에 도시된 바와 같이, DP16은 10^{-8} 내지 10^{-5} mg/kg의 용량에서 치료 효과를 나타내었다. 이러한 간질의 특

정 모형(필로카르핀 400mg/kg: 래트)의 경우, 평가된 DP16의 치료 지수(ET)는 0.5mg/kg/5×10^{-7}mg/kg=1×10^{6}이다. 수득된 데이터는 DP16이 간질성 질환 치료에 매우 유망한 전구약제임을 시사한다.

<95> 필로카르핀과 심장독성

<96> 필로카르핀 처리를 한 래트에서 두가지 유형의 치사가 나타났는데, 첫번째는 태아 경련에 기인된 것이고, 두번째 간질 발작에 직접 기인하지 않은 지연 치사이다. 본 발명자들은 필로카르핀 유도된 경련 후에 래트의 지연 치사의 실질적 원인을 알아내고자 하였다. 이러한 동물의 거시적 부검을 통해 폐 부종과 출혈, 팽창되고 동일한 경우에 변형된 심장과 같은 심폐 손상의 징후가 나타난다. 생존한 동물에서 0.1% 트리판 블루로 심장을 염색하면 집중적으로 염료가 흡수된 부분, 즉, 손상된 부분 및 옅은 지역, 즉 경색을 나타내는 심근증의 점적상이 나타난다. 따라서, 본 발명자들은 필로카르핀 투여 후, 후-필로카르핀-발작-심장병(PSCP)이라 일컬어지는 심장 손상이 전개된 것으로 간주할 수 있다. 필로카르핀의 경련 용량과 부경련(subconvulsive) 용량으로 투여한 후 생존한 래트를 이용해 생체내 및 시험관내에서 DP16 평가와 관련된 PSCP의 연구를 수행하였다.

<97> PSCP 실험 : 모든 실험에 성체(2 내지 3개월) 수컷 스프라그-다울리 래트를 이용하였다. 래트에게 표준 연탄 음식과 물을 먹이고 자연 조명하에서 표준 플라스틱 우리(각 우리당 4-5마리)에서 유지시켰다. 필로카르핀-스코폴라민 간질 상태 모델(필로카르핀)을 상기 기술한 바와 같이 수행하였다. 23마리의 군에서, 필로카르핀을 100 내지 400mg/kg 체중(B/W) 범위의 다른 투여량으로 각기 다른 시간 동안 복강내에 투여하였으며: 17마리로 된 제 2 군은 필로카르핀 투여전에 DP16으로 처리하였는데, 여기서, 다음의 용량 범위로 필로카르핀을 투여하기 전에 30분 동안 DP16을 주사하고, 그 효과를 이후 기간에서 조사하였다.

<98> 3개의 표준 리드 중의 생체내 ECG(Birtcher- Cardio-Tracer, model 375, USA)를 케타민 마취하에서 (3.3mg/kg Imalgene 100, Rhone Meroeux, France and 7mg/kg Rompun, Bayer Leverkusen, Germany, i.m.) 기록하였다. 필로카르핀 주사 전(대조군), 필로카르핀 투여 24시간 후(급성 기간) 및 필로카르핀 투여후 3 내지 14일째에 심장기능이 비교적 안정화된 후의 기간에 ECG를 기록하였다. 일부의 ECG 기록은 랑겐도르프의 관류 단리된 심장 준비를 확정하기 전의 기간에 넴부탈 마취(35mg/kg, 복강내)하에 이루어졌다. 관류-저산소증 재관류 단리된 심장 모델(PHR)을 두가지 변형, 즉, 1. 일정한 관류 압력 (PP)-60mmHg 하에서, 또는 2. 연동 운동 펌프(Ismates SA, Laboratoriumstechnic, Switzerland)로 유량을 조정하므로써 상기와 같은 PP로 처음 10 내지 15분의 관류 후 설정된 일정 유량하에서 37℃로 조정된 통상의 랑겐도르프 기법(비재순환성 관류 시스템)으로 수행하였다. 일정한 PP의 경우, 유출되는 유량의 부피를 전자 저울(Precisa 1000C-3000D, Switzerland)로 측정하였다. 조절 기간에 설정된 일정 유량의 경우, 유량은 후속 실험 기간 동안 변하지 않았으며, PP는 빈번하게 기록되었다. 30분의 조절 기간 후, 관류를 30분 동안 중단시키고, 이어서 재관류 기간을 30분 계속하였다. 직접적 ECG를 심실첨(리드 1), 오리컬럼(auriculum)(리드 2)와 그 사이(리드 3)으로부터 기록하였다. 관상동맥 혈관의 관류 저항(CVPR)을 PP/유량/심장 무게와 같은 임의 단위로 계산하였다. 상기 프로토콜을 수행한 후, 심장을 염료 트리판 블루(0.1%)로 관류시켜서, 세포 손상과 경색을 평가하였다.

<99> 결과와 검토

<100> 생체내 ECG 결과가 제 5도에 도시되어 있으며, 도면에서 투명 막대는 일부 ECG 결과를 나타내는데, 조절 기간에서의 개별적 ECG로부터의 평균 ± SE로서 표현된다. 막대의 첫번째 그룹은 PSCP의 급성 단계에서의 필로카르핀 주사 후의 ECG를 입증하고 있다: R 피크의 통계학상 중요한 감소가 리드 1과 2(각각 대조군의 47% 및 16%) 아래에서 나타난다. PSCP의 DP16 처리는 처리된 7마리의 래트중 5마리의 급성 단계에서의 전기 활성을 정상화시켰다. ECG의 크기는 부분적으로 상응하는 생리 작용의 세기와 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, R파의 필로카르핀 유도된 변화 및 DP16에 의한 정상화는 적어도 PSCP 하에서의 심실의 약화를 치료할 수 있는 DP16의 능력을 반영할 수 있다. 대조 래트는 필로카르핀 투여 후 3 내지 14일에서 R파의 상대적 정상화를 디스플레이한다. 그러나, R 정상화는 리드 3(36%)와 리드 2(61%)하의 매우 증가된 S파 깊이와 다소 상호관련된다(이는 가변성이 크다는 점에서 아직은 통계상 중요하지 않다). S파 깊이의 증가는 필로카르핀 처리된 대조 래트에서 심근 허혈의 손상을 반영하였고, 이는 아마도 경색을 제시한다. 안정화 단계에서의 PSCP의 급성 단계동안, DP16은 대조 래트에서 나타나는 ECG 변화의 출현을 방지한다. DP16에 의해 보호된 래트와 보호되지 않은 쥐래트사이의 차이는 통계적으로 중요하다(P<0.01). 이 PSCP 기간중에 대조 필로카르핀에서, DP16 처리된 동물에서 심장 박동이 현저하게 증가하였다. 이와 같은 빈맥은 경색 병리생리학의 특징인 혈역학적 부전증과 아마도 관련된다. 그러므로, 필로카르핀 주사 후 장기간 동안의 생체내 ECG 조사는 뇌기능의 확실한 변화(PSCP)를 밝혀냈고, 이는 일부 동물에서는 DP16 처리로 치료될 수 있었다.

<101> 랑겐도르프의 심장 모델. 제 6도는 단리된 랑겐도르프의 심장의 관상 동맥 혈관 관류 저항(CVPR)을 나타낸 것이다. 조절의 처음 30분 동안, 단리된 랑겐도르프의 심장 CVPR은 지속적으로 증가하였고, 이 증가는 20분후가 통계학적으로 중요하다. 필로카르핀 투여 후, 관류된 모든 심장에서, 초기 관류 유량은 대조군에서 보다 컸으며, 이후 CVPR은 상당히 감소하였다(바닥선). 이러한 관상 동맥 긴장의 감소는 저산소증에 의해 유발된 심장내 노르아드레날린 결핍증 또는 마비와 아마도 관련있다. 필로카르핀 적용이전에 DP16으로 처리한 쥐에서는 초기와 최종 관류 기간 모두에서 CVPR 조절의 손상이 방지되었으며, 따라서 저산소 조건하에서 관상동맥 혈관 기능을 정상화시킬 수 있는 DP16의 능력과 관련된 증거를 제공한다. 30분 동안의 관류 정지 및 후속 재관류는 제 7도에서 도시된 바와 같이 임의의 등급으로 분류한 널리 공지된 광범위한 클래스의 심장 손상을 특징으로 한다. 처리하지 않은 래트로부터의 대조 심장은 대부분 관류 중단 후 명백한 변화범위를 나타내면서 복귀하였다(손상된 심근 흥분도, 전도도 및 수축도로서) 대조군의 평균 회복점은 6.3±0.6(n=7)이다. PSCP의 상이한 단계의 필로카르핀 처리된 래트에서 얻은 심장은 병리적 사건의 범위 및 중증도의 증가를 나타내었는데 평균 회복점은 3.3±0.8, n=7, P<0.05이었다. 회복은 종종 심실 세동을 수반하였다. 일부 심장들은 완전히 회복되지 않거나 심방 활성만이 회복되었다. 필로카르핀 투여 전 DP16 처리는 재관류 정지 후 회복할 수 있는 손상된 심장의 능력을 증가시켰다: 평균점은 6.4±0.6(n=9)였다. 이러한 군의 래트에서, 본 발명자들은 완벽한 회복의 경우를 종종 관찰하였다.

따라서, 필로카르핀 유도된 심장 손상(PSCP)의 DP16 처리는 심장 기능을 명백하게 개선시켰다.

<102> **DP16의 항간질 효과의 연구 : 메트라졸 최소 발작 시험**

<103> 방법

<104> 3 내지 4주령 수컷 BALB/c 마우스(18 내지 27g)로 가능한 항간질 약제로서의 DP16 실험을 수행하였다. 동물에게 적당한 규정식을 섭취시키고, 실험 기간의 짧은 기간 동안을 제외하고 음식물과 물로의 접근을 자유롭게 하였다. 처리 전과 실험 기간 동안 마우스를 투명한 플라스틱 우리에서 한시간 별도로 수용하였다. 약제를 0.01mg/kg체중으로 조정된 주사 용적으로 정상 염수에 용해시켰다. DP16을 0.1-300㎍/kg의 용량으로 복강내에 투여하였다(0.1㎍/kg : n=10, 5㎍/kg : n=10, 25㎍/kg : n=20, 75㎍/kg : n=20 및 150㎍/kg : n=20, 300㎍/kg : n=10 마우스). 대조군 마우스에는 정상 염수를 복강내 주입하였다. DP16이나 염수 투여 후 30분 안에 메트라졸(50g/kg, 피하)을 투여하였다. 후속하여, 이후 30분간 간질 징후가 관찰되었다. 실험군에서의 간대성 반사(MJ)가 없거나 상대적으로 지연되는 것은 가능한 항간질 활성의 표시로서 간주되었다. 데이터는 컴퓨터 통계 패키지 "스타트뷰(StatView) II"로 c2(chi-square) 방법에 따라 분석하였다.

<105> 결과 및 결론

<106> 50㎍/kg의 피하 용량의 메트라졸은 모든 대조군 마우스에서 1011분의 잠복기간을 지니면서 간대성 반사(MJ)를 야기시켰다(n=11). 최소 메트라졸 유도된 발작의 출현에 대한 DP16의 효과를 제 8도에 나타내었다. 0.1㎍/kg의 DP16으로 처리된 마우스는 메트라졸에 대해 대조군(비처리됨) 마우스와 동일한 반응을 보였다. 5 내지 300㎍/kg 용량의 DP16은 상당한 보호 효과를 나타내었다($p<0.001$). 시험 결과는 메트라졸 유도된 발작에 대한 DP16의 현저한 용량 의존적 항간질 효과를 제시한다.

<107> **DP16의 심장 보호 효과 연구:**

<108> 1. 생체외 래트 심장 저유동 재관류 모델에 대한 체외 실험

<109> 방법 및 결과

<110> 광범위하게 이용되는 체외 랑겐도르프의 심장 정지 유동 재관류 및 저유동 모델(Neely and Rovetto, 1975)은 약리학적 실험을 위한 통상의 상태였다. DP16의 심장보호 효과는 체외 래트 심장의 정상 유동 관류에 이은, 저유동 후의 재관류(LFR)의 결합된 실험 패러다임으로 평가되었다. ECG와 관류 압력(PP)의 진전을 약제 평가의 기준으로 간주하였다. DP16의 존재하의 실험에서 모은 데이터를 약제 보충이 없는 경우의 데이터(대조군 1)와 비교하였다. BAPTA 및 리소포스파티딜콜린(LPC)를 포함하는 DP16를 포함하는 성분의 혼합물로 일련의 추가 실험(대조군 2)을 수행하였다. DP16(1-100㎍/L)을 표준 관류 완충액에 용해시켰다. BAPTA와 LPC의 혼합물을 원액으로서 DMSO중에 용해시켰다: 대조군 2에 대한 관류 완충액 중의 BAPTA, LPC 및 DMSO의 최종 농도는 각 성분이 100㎍/L였다.

<111> 20mmHg 미만의 관류 압력(pp)의 심한 감소(저유동 기간)는 주로 종종 부정맥을 수반하는 안정한 AV 블럭(제 9.2도, 참조: 제 9.1도의 정상 유동)에 의해 극에 달하는 동서맥을 야기시켰다(9회 실험, 대조군 1). 장기간(>0.5h) 저유동 조건은 보통 발작적 빈부정맥과 심실 세동(VF)으로 끝났다. VF가 동율동을 일시적으로 회복시킬 수 있기 전에 재관류를 개시시켰다. 그러나, 대부분의 대조군 실험에서의 재관류는 부정맥과 관상 혈관 긴장을 증가시킨 후 비가역적 VF를 야기시켰다(제 9.3도). 저유동 기간에서의 AV 블럭 성립 후, 약제를 관류 배지에 보충하였다. BAPTA와 LPC의 혼합물에 의한 실험에서는 AVB에 대한 치료적 효과가 전혀 관찰되지 않았다(제 10.3 도 및 제 10.4도, 참조: BAPTA와 LPC가 없는 경우 제 10.1도는 정상 유동이고, 제 10.2도는 저유동 관류임). 반면에 DP16의 첨가는 아트레오벤트리큘라(atreoventricular) 동기성의 완전한 또는 일시적 구제를 야기하였다(각각 4회 및 1회)(제 11.3도). 또한, DP16은 재관류 기간에 현저한 심장보호 효과를 나타내었다: 동율동의 완전 회복은 5회 실험 중 네 번 관찰되었다(제 11.4도; 참조 DP16이 없는 경우 제 11.1도의 정상 유동 및 제 11.2도의 저유동 관류). ECG 분석은 DP 작용의 대사 유형을 주로 밝혀냈다: 심방(심장 박동의 분명한 증가) 및 심실(정상 동율동의 회복) 흥분도의 강화. 그러나 AV 전도도 잔류 지연(PQ 간격 증가)이 관찰되었다.

<112> 결론

<113> 이 실험에서 얻어진 데이터는 허혈 재관류 병리학에서의 DP16의 현저한 심장보호 활성을 제시한다.

<114> **DP16의 심장보호 효과 연구:**

<115> 2. 생체내 심근 손상 모델에 대한 실험

<116> 방법 및 결과

<117> 효능있는 β-아드레노리셉터 효능제 이소프로테레놀(ISO)을 일반적으로 허용되는 실험적 심근 병리학의 모델에 투여하였다. DP16의 심장보호 효과를 82마리의 스프라그-다울리 암컷 래트(250-350g)로 실험하였다. ISO(85㎍/kg, 피하)를 래트에 2회 연속 주사하여 심근 손상을 유도시켰다. 적당한 때에, ISO 주사 이후 30 내지 180분이 지나서, DP16(0.01㎍/kg, 복강내)를 주사하였다. DP16의 효과를 ECG 분석과 혈청 글루타믹-옥살로아세타트 트랜스아미나아제(SGOT) 및 락타트데히드로게나아제(LDH) 활성 측정으로 평가하였다. ISO 간섭 이후의 대조군 래트의 치사율은 17.1±5.9%이다(41마리 중 7마리). 살아남은 래트는 리드 1과 2 ECG에서 현저한 과급성 편위 ST-단편을 나타내었다. ECG에 대한 병리학적 징후는 실험 기간 동안 악화되었다. 두번째 ISO 주사 후 48 시간이 지나서, 모든 처리된 동물들은 ST 단편의 병리학적 변위를 보였다. DP16의 투여는 두 경우에 치사율을 감소시켰다(30마리 중 2마리). DP16이 투여된 동물은 ECG에서 현저하게($P<0.05$) 적은 변화를 나타내었다. ST 단편의 병리학적 변위는 단지 ECG의 28% 및 40%에서 발견되었다(각각 ISO 주사 후 24시간 및 48시간 후). 생화학적 측정은 ISO 처리된 대조군 래트에서의 SGOT와 LDH의 1.7 내지 1.9배 증가를 입증하였다. DP16으로의 처리는 SGOT 및 LDH 활성의 비정상적 수준을 나타내는 실험 동물의 비율을 실질적으로 감소시켰다.

<118> 결론

<119> 상기 데이터는 심근 병리학의 생체내 모델에서의 DP16의 상당한 심장보호 효과를 시사한다.

<120> 일반적 결론. DP16으로 명명된 전구약제는, 본 발명의 전구약제 형태로 사용되는 양의 10^5 내지 10^6 배의 양으로 통상적인 형태의 상응하는 약제의 경우와 비교하여, 간질의 모델 뿐만 아니라 발작과 허혈의 실험적 모델에서 현저한 치료 및 보호 효과를 나타내었다.

<121> **실시예 5 : 전구약제 3의 제조**

<122> "전구약제 3"은 본원에서 1,2-비스-(2-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산(BAPTA)과 1-미리스틸미리스틸 알코올의 1:1 에스테르를 명명한 명칭이고, 하기와 같이 제조된다. 디에틸포름아미드(25㎖, CaH_2로 새롭게 증류), 1-미리스틸미리스틸 알코올(0.451g, 1.1mmol), N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(0.216g, 1.1mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘(0.025g, 0.202mmol) 중의 BAPTA(0.5g, 1.05mmol)의 용액을 자석 교반기가 구비된 50㎖ 플라스크에서 아르곤하에 실온에서 2일 동안 함께 교반하였다. 2시간 후, N,N'-디시클로헥실우레아가 침전되기 시작하였다. 반응을 TLC(90:10 v/v 클로로포름 : 메탄올)로 모니터링하였다: 생성물의 R_f=0.62. 침전물을 여과로 제거하고 여액을 진공하에 35℃에서 농축시켰다. 잔류물을 클로로포름:이소프로파놀:물의 2:1:2 v/v 혼합물 25㎖로 추출하였다. 유기층을 분리하고 1% NaCl 수용액으로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시켰다. 그 후, 증발시키고, 잔류물을 키에젤겔 60(230-400 mesh ASTM)의 160×30mm 컬럼을 통과시키고, 목적하는 생성물을 90:10(v/v) 클로로포름:메탄올 혼합물로 용리시켰다. 1-미리스틸미리스틸 알코올을 몰로트코프스키(Molotkovski, V.G)와 버겔슨(Bergelson, L.D.)의 방법에 따라 제조하였다[참조: Biologicheska Chimia, 1982, 8 (9): 1256-1262]. 전구약제 3 중의 BAPTA-1-미리스틸미리스틸 알코올 에스테르 결합은 에스테라제에 의해 분해되기 쉽다.

<123> **실시예 6 : TVA16의 제조 및 생물학적 특성**

<124> "TVA16"은 본원에서 발프로산과 콜린 유도체 $ROCH_2-CH(OH)-CH_2O-(PO_2^-)-OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$(R=헥사데카노일)의 1:1 에스테르를 명명한 명칭이며, 하기와 같이 제조된다. 클로로포름(25㎖, P_2O_5로 새로 증류), 발프로산(0.159g, 1.1mmol), N,N'-디시클로헥실카보디이미드(0.216g, 1.1mmol) 및 4-디메틸아미노피리린(0.025g, 0.202mmol) 중의 1-헥사데카노일-sn-글리세로-3-포스포릴콜린(1.04mmol)의 용액을 자석 교반기 및 유리 비드(10g, 5mm 직경)가 구비된 50㎖ 플라스크에서 아르곤하에 실온에서 2일 동안 함께 교반시켰다. 2시간 후, N,N'-디시클로헥실우레아가 침전하기 시작하였다. 반응은 TLC(65:25:4 (v/v) 클로로포름:메탄올:물)로 모니터링하였다(생성물의 R_f=0.41). 침전물과 유비 비드를 여과하여 제거하고 여액을 진공하에 35℃ 에서 농축시켰다. 잔류물을 클로로포름:이소프로파놀:물의 2:1:2 (v/v) 혼합물 25㎖로 추출하였다. 유기층을 분리하고, 1% NaCl 수용액으로 세척하고, Na_2SO_4로 건조시켰다; 그 후, 증발시키고, 잔류물을 키에젤겔 60(230-400 mesh ASTM)의 160×30mm 컬럼을 통과시켜 목적하는 생성물을 65:25:4(v/v)의 클로로포름:메탄올:물 혼합물로 용리시켰다(R_f=0.4).

<125> TVA16의 시험 샘플을 메트라졸(80mg/kg)을 피하 투여하기 한시간 전에 3마리의 마우스군에 0.01 내지 100mg/kg으로 복강내 투여하였다. 효과적인 투여량은 다음 30분 내에 경련(각 동물당 2포인트로 기록됨) 및/또는 치사(동물당 1포인트로 기록됨)를 방지하는 양이었다. 이를 기초로, ED_{100}이 계산될 수 있으며, 하기 표의 공지 진경제와 비교된다.

공지 약제와 TVA16의 진경 활성(ED_{100}, mg/kg)

클로르디아제폭사이드	25	무스키몰(복강내)	2.5
디아제팜	2.5	니페디핀	>100
디페닐히단토인	>100	니모디핀	>300
플루나리진	>300	페노바르비탈	50
글루테티미드	150	나트륨 발프로에이트	500
메프로바메이트	200	베라파밀	>100
MK-801	0.5	TVA16	0.6

<127> 상기 데이터로부터 TVA16은 현저한 진경 활성을 가지며 나트륨 발프로에이트 보다 500배가 넘게 효능이 있음을 알 수 있다.

<128> 본 발명은 구체적으로 설명되어 있으나, 당업자는 많은 변화와 변형이 이루어질 수 있음을 인지할 것이다. 그러므로, 본 발명은 구체적으로 설명된 구체예에 제한되는 것으로 해석되지 않아야 하며, 본 발명의 범위, 사상, 개념은 첨부되는 특허 청구의 범위를 참조하여 보다 쉽게 이해될 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제를 공유결합된 형태로 포함하는 약제학적으로 허용되는 세포막 투과성 약제로서, 약리 활성 화합물은 하기 일반식의 카르복실산 및 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 세포내 운반 보조제는 글리세롤, C_{3-20} 지방산 모노글리세라이드, C_{3-20} 지방산 디글리세라이드, C_{3-20} 지방산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소포스파티드산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소플라스말로겐, 리소포스포리피드, 리소포스파티드산 아미드, 글리세로인산, 리소포스파티달에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 이들 아민의 N-모노- 및 N,N-디-(C_{1-4})-알킬 및 4차 유도체로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함하는 약제학적으로 허용되는 알코올이며, 상기 약리 활성 화합물은 국한성 조직 허혈, 발작, 간질, 천식 및 알레르기로 구성된 군으로부터 선택된 정상이상(supranormal) 효소 활성과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는데에 효과적이고, 상기 공유결합은 정상이상 세포내 효소 활성에 대해 분해 민감성(scission-sensitive)이어서 이러한 정상이상 활성의 존재하에서 분해되는 약제:

$$(HOOC\text{-}CH_2\text{-})_2\text{-}N\text{-}A\text{-}N\text{-}(\text{-}CH_2COOH)_2$$

상기 식에서,

A는 n개의 비인접 산소 원자(n은 0, 2, 3 및 4로부터 선택되는 수이다)에 의해 차단된 2 내지 8개의 탄소 원자를 포함하는 지방족, 방향족 또는 헤테로시클릭 유기 라디칼로부터 선택된 결합 라디칼이어서, n이 2 내지 4인 경우에 카르복실산 화합물은 에스테르이고; 단, 카르복실산 화합물이 에스테르인 경우, A 측면의 질소들은 n개의 비인접 산소 원자중 어느 것에도 결합되지 않는다.

청구항 2

약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제를 공유결합된 형태로 포함하는 약제학적으로 허용되는 세포막 투과성 약제로서, 약리 활성 화합물은 하기 일반식의 카르복실산 및 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 세포내 운반 보조제는 약제학적으로 허용되는 C_{7-32} 2차 일가 알코올이고, 상기 약리 활성 화합물은 국한성 조직 허혈, 발작, 간질, 천식 및 알레르기로 구성된 군으로부터 선택된 정상이상(supranormal) 효소 활성과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는데에 효과적이고, 상기 공유결합은 정상이상 세포내 효소 활성에 대해 분해 민감성(scission-sensitive)이어서 이러한 정상이상 활성의 존재하에서 분해되는 약제:

$$(HOOC\text{-}CH_2\text{-})_2\text{-}N\text{-}A\text{-}N\text{-}(\text{-}CH_2COOH)_2$$

상기 식에서,

A는 n개의 비인접 산소 원자(n은 0, 2, 3 및 4로부터 선택되는 수이다)에 의해 차단된 2 내지 8개의 탄소 원자를 포함하는 지방족, 방향족 또는 헤테로시클릭 유기 라디칼로부터 선택된 결합 라디칼이어서, n이 2 내지 4인 경우에 카르복실산 화합물은 에스테르이고; 단, 카르복실산 화합물이 에스테르인 경우, A 측면의 질소들은 n개의 비인접 산소 원자중 어느 것에도 결합되지 않는다.

청구항 3

약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제를 공유결합된 형태로 포함하는 약제학적으로 허용되는 세포막 투과성 약제로서, 약리 활성 화합물은 하기 일반식의 카르복실산 및 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 세포내 운반 보조제는 3 내지 6개의 탄소 원자 및 1 내지 3개의 히드록시 라디칼을 함유하는 약제학적으로 허용되는 알코올이고,상기 약리 활성 화합물은 국한성 조직 허혈, 발작, 간질, 천식 및 알레르기로 구성된 군으로부터 선택된 정상이상(supranormal) 효소 활성과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는데에 효과적이고, 상기 공유결합은 정상이상 세포내 효소 활성에 대해 분해 민감성(scission-sensitive)이어서 이러한 정상이상 활성의 존재하에서 분해되는 약제:

$$(HOOC\text{-}CH_2\text{-})_2\text{-}N\text{-}A\text{-}N\text{-}(\text{-}CH_2COOH)_2$$

상기 식에서,

A는 n개의 비인접 산소 원자(n은 0, 2, 3 및 4로부터 선택되는 수이다)에 의해 차단된 2 내지 8개의 탄소 원자를 포함하는 지방족, 방향족 또는 헤테로시클릭 유기 라디칼로부터 선택된 결합 라디칼이어서, n이 2 내지 4인 경우에 카르복실산 화합물은 에스테르이고; 단, 카르복실산 화합물이 에스테르인 경우, A 측면의 질소들은 n개의 비인접 산소 원자중 어느 것에도 결합되지 않는다.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 라디칼 A가 $-(CH_2CH_2)_m-$(m은 1 내지 4이다) 및 $-CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'-$(여기서, 라디칼 R-R과 R'-R'의 각 쌍은 결합된 -C=C- 부분과 함께 5 내지 6개의 고리 원자를 함유하는 방향족 또는 헤테로시클릭 고리를 형성하며, R-R에 의해 형성된 고리는 R'-R'에 의해 형성된 고리와 동일하거나 상이함)로부터 선택되고, $-(CH_2CH_2)_m-$ 중의 p개의 탄소는 산소에 의해 치환되고, p는 0, 2, 3 및 4로부터 선택된 숫자임을 특징으로 하는 약제.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 라디칼 A가 $-CH_2CH_2-$ 및 $-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-$로부터 선택됨을 특징으로 하는 약제.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 라디칼 A가 -CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'-이고, 여기서, 라디칼 R-R과 R'-R'의 각 쌍은 결합된 -C=C- 부분과 함께, 푸란, 티오펜, 피롤, 피라졸, 이미다졸, 1,2,3-트리아졸, 옥사졸, 이속사졸, 1,2,3-옥사디아졸, 1,2,5-옥사디아졸, 티아졸, 이소티아졸, 1,2,3-티아디아졸, 1,2,5-티아디아졸, 벤젠, 피리딘, 피리다진, 피리미딘, 피라진, 1,2,3-트리아진, 1,2,4-트리아진, 및 1,2-, 1,3- 및 1,4-옥사진 및 -티아진으로부터 선택된 방향족 또는 헤테로시클릭 고리를 형성하며, R-R에 의해 형성된 고리는 R'-R'에 의해 형성된 고리와 동일하거나 상이함을 특징으로 하는 약제.

청구항 7

제 6항에 있어서, 결합 라디칼 A가 -CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'-이고, 여기서, 라디칼 R-R과 R'-R'의 각 쌍은 결합된 -C=C- 부분과 함께 치환되거나 치환되지 않은 벤젠 고리로부터 선택된 동일하거나 상이한 고리를 형성하며, 치환된 벤젠 고리는 C_{1-3}-알킬, C_{1-3}-알콕시, F, Cl, Br, I 및 CF_3로부터 선택된 1 내지 4개의 치환기를 함유하거나 -O-$(CH_2)_n$-O- (n은 1 내지 3이다)인 하나의 2가 치환기를 함유함을 특징으로 하는 약제.

청구항 8

제 1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 에스테르가 에틸렌-1,2-디아민-N,N,N',N'-테트라아세트산, 에틸렌-1,2-디올-비스-(2-아미노에틸에테르)-N,N,N'N'-테트라아세트산, 및 1,2-비스-(2-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산으로부터 선택된 킬레이트화제를 포함함을 특징으로 하는 약제.

청구항 9

제 1항에 있어서, 약제가 1,2-비스-(2-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산과 헵타노일-sn-3-글리세로포스포릴-콜린 또는 옥타노일-sn-3-글리세로포스포릴-콜린과의 모노-, 디-, 트리- 및 테트라에스테르로부터 선택된 에스테르임을 특징으로 하는 약제.

청구항 10

약리 활성 화합물과 세포내 운반 보조제를 공유결합된 형태로 포함하는 약제학적으로 허용되는 세포막 투과성 약제로서, 세포내 운반 보조제는 글리세롤, C_{3-20} 지방산 모노글리세라이드, C_{3-20} 지방산 디글리세라이드, C_{3-20} 지방산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소포스파티드산의 히드록시-C_{2-6}-알킬 에스테르, 리소플라스말로겐, 리소포스포리피드, 리소포스파티드산 아미드, 글리세로인산, 리소포스파티달에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 이들 아민의 N-모노- 및 N,N-디-(C_{1-4})-알킬 및 4차 유도체로부터 선택되는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 알코올을 포함하며, 상기 약리 활성 화합물은 간질을 포함하는 정상이상 효소 활성과 관련된 질병 또는 질환을 치료하는데에 효과적이고, 상기 공유결합은 정상이상 세포내 효소 활성에 대해 분해 민감성이어서 이러한 정상이상 활성의 존재하에서 분해되며, 상기 약리 활성 화합물이 발프로산 및 이의 약제학적으로 허용되는 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 약제.

청구항 11

제 10항에 있어서, 약리 활성 화합물이 1-헥사데카노일-sn-글리세로-3-포스포릴콜린에 공유결합됨을 특징으로 하는 약제.

청구항 12

제 1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 알코올이 리소포스파티딜콜린임을 특징으로 하는 약제.

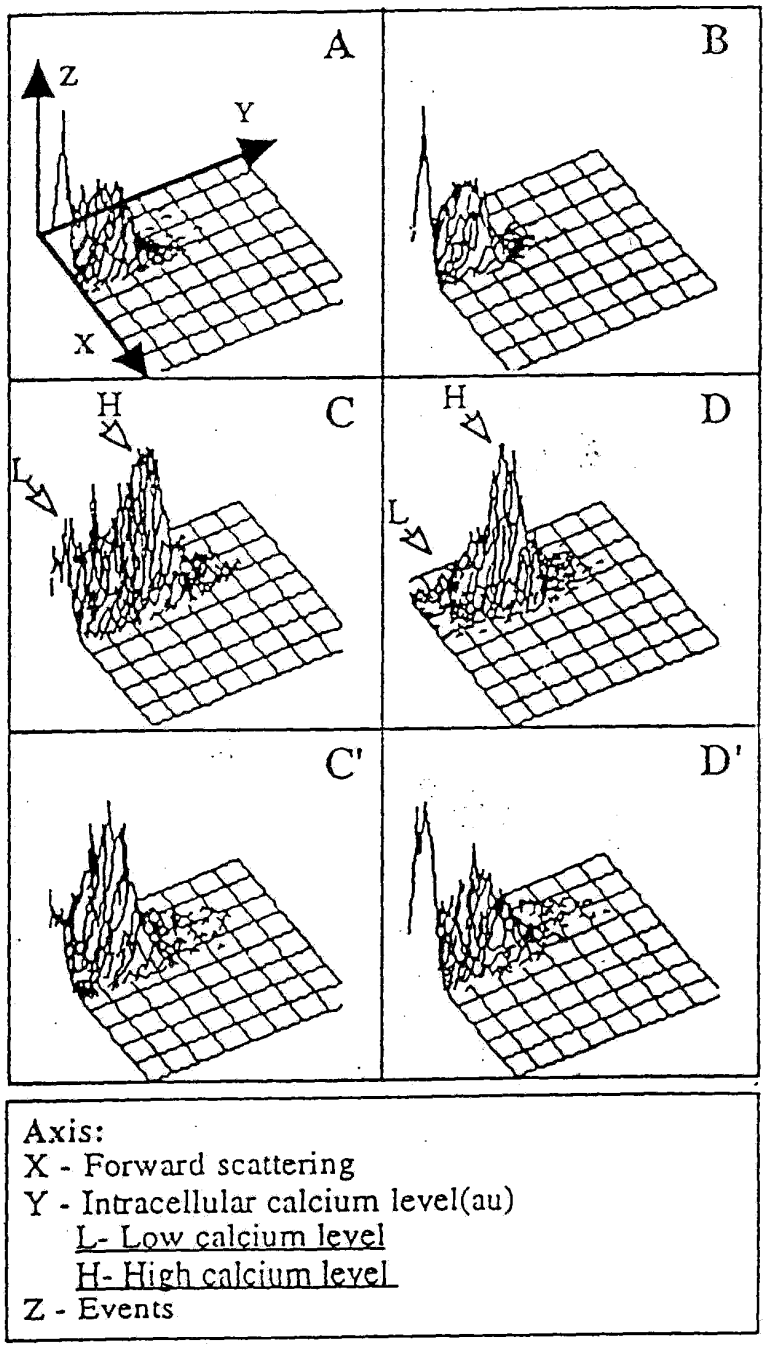
요약

본 발명은 약리학적 활성 화합물과 세포내 운반 보조제의 공유결합 컨쥬게이트이고, 세포내 효소 활성에 분리-민감성인 공유결합이 있음을 특징으로 하는, 약제학적으로 허용될 수 있는 프러드러그와 관련된 것이다. 이 프로드러그는, 초정상 세포내 효소 (예를 들어 포스포리파제 및/또는 에스터라제) 활성과 관련된 질병이나 질환이 있는 사람에게 투여하면 이러한 활성에 반응하여 결합이 끊어져서, 약리학적 활성 화합물이 이러한 초정상 세포내효소 활성을 가진 세포내에 선택적으로 축적되어 초정상 세포내 효소 활성과 간련된, 사말의 질병이나 질환을 치료하는 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

도면

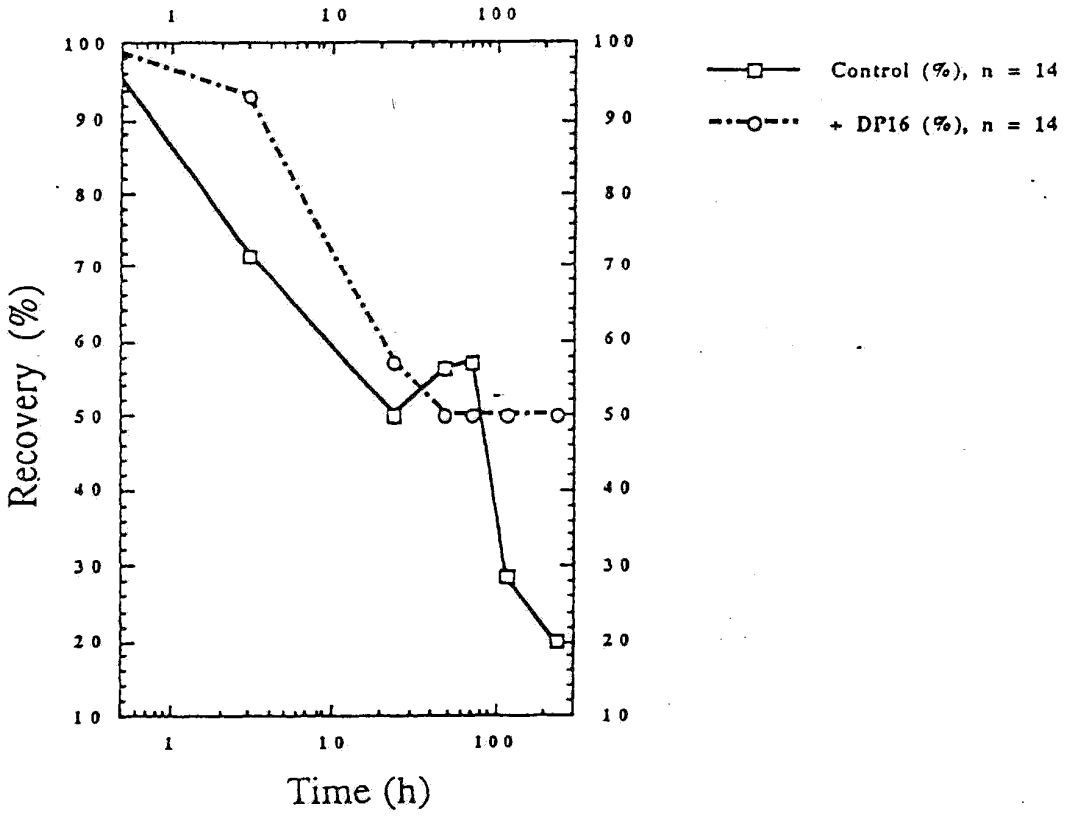
도면1

사람 림프구에서의 칼슘 농도에 대한 프로드러그의 효과



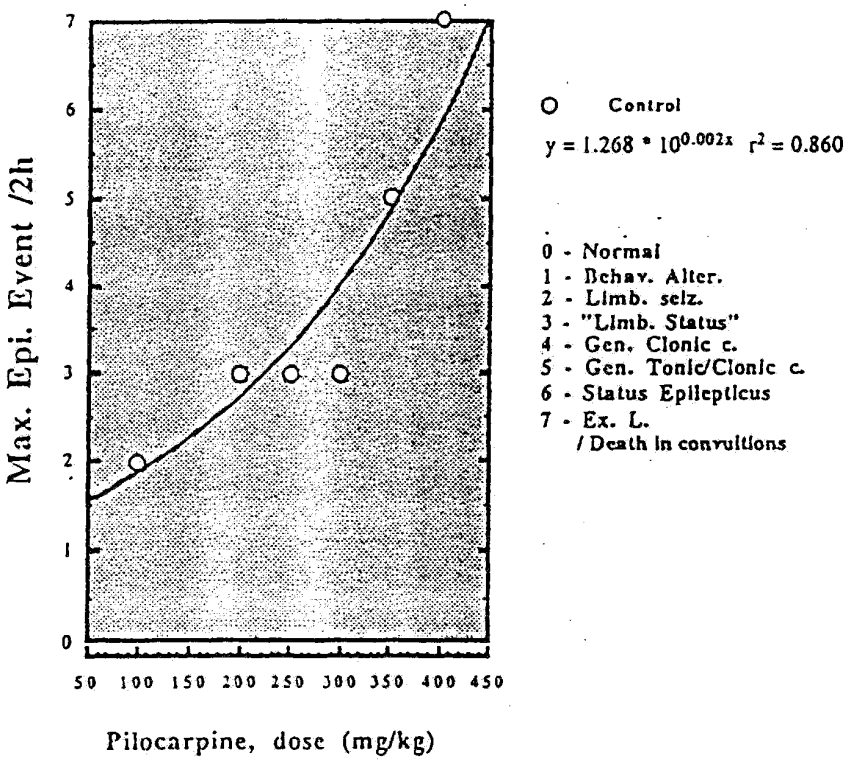
도면2

전허혈의 회복



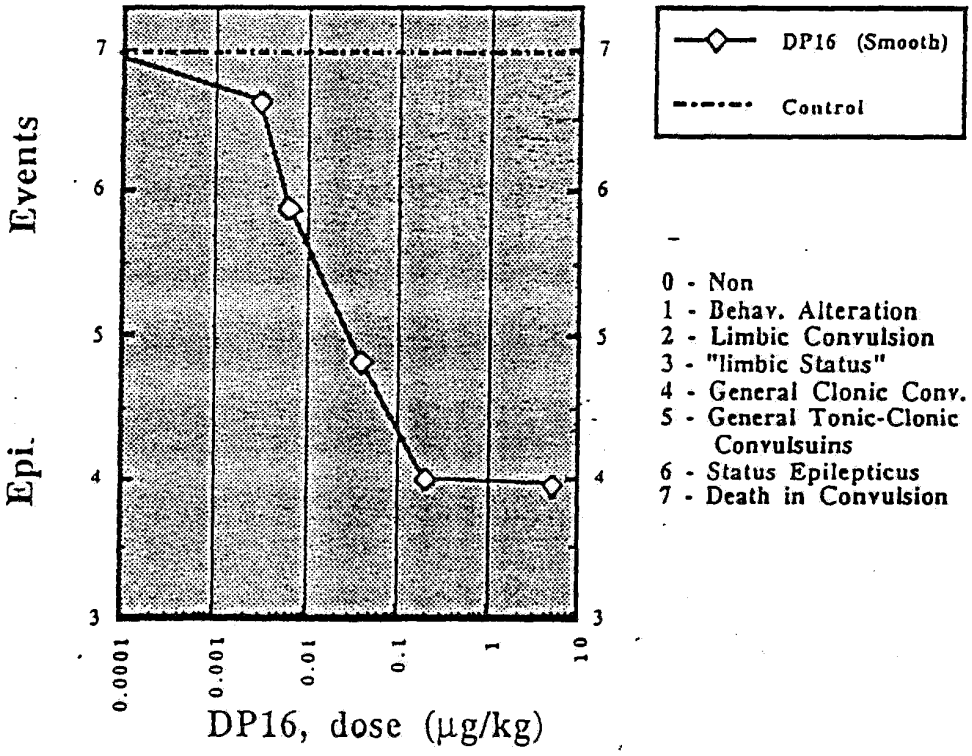
도면3

필로카핀-유도 간질 사상



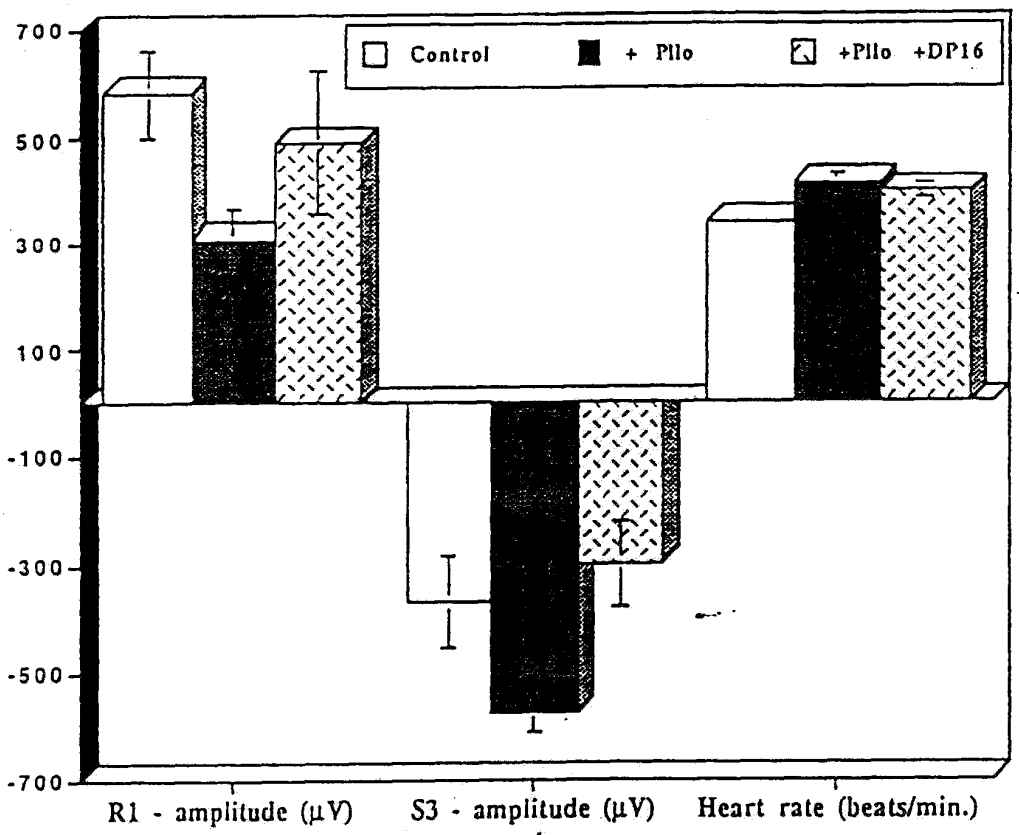
도면4

필로카핀-유도 간질 사상에 대한 보호



도면5

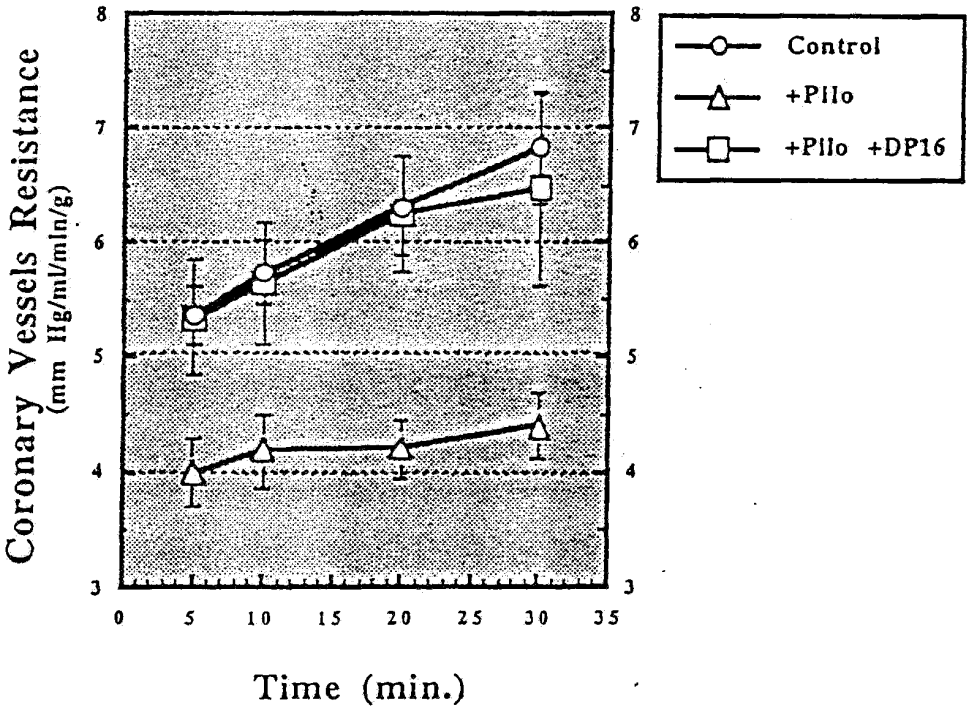
필로카핀에 의해 유도된 특정 심장 기능의 장기간 변경에 대한 보호



ECG Events

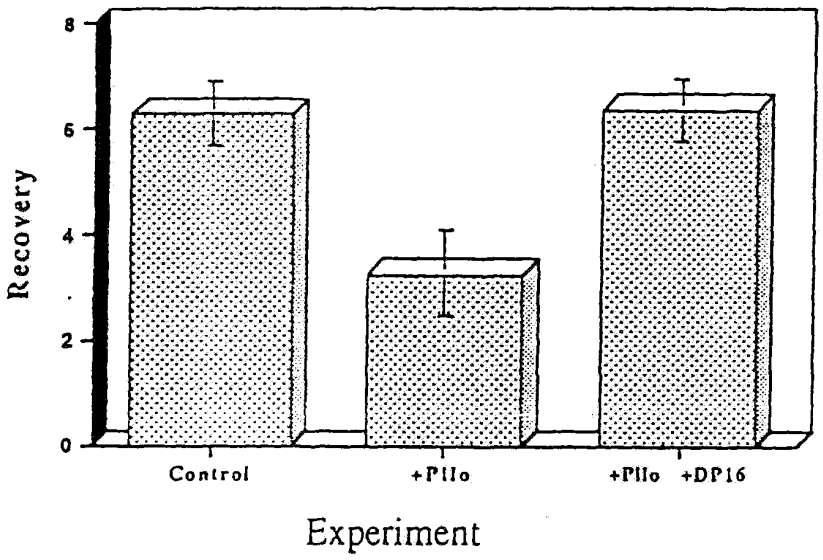
도면6

필로카핀에 의해 유도된 관상 동맥 혈관의 색조절의 장기간 변화에 대한 보호



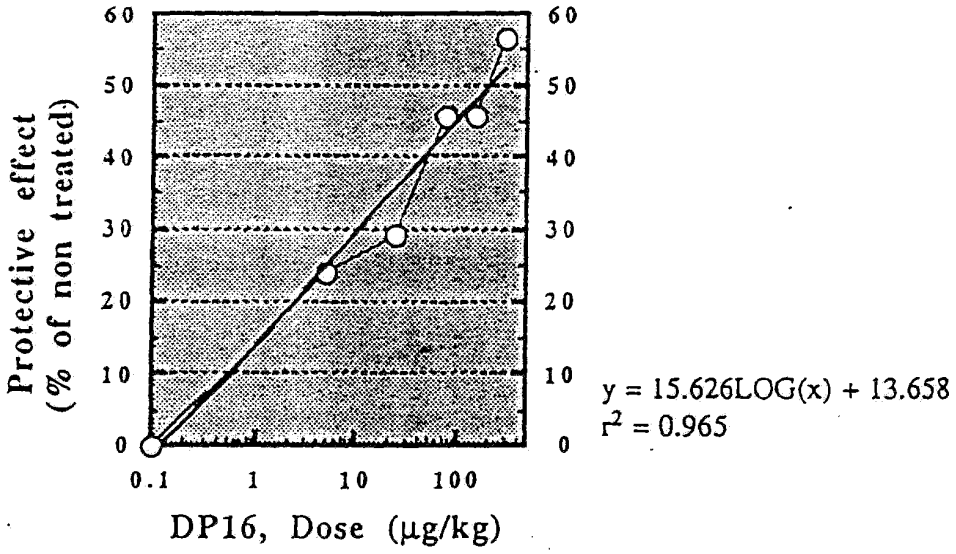
도면7

허혈-재관류 모델에서의 필로카핀에 의해 손상된 심장의 회복



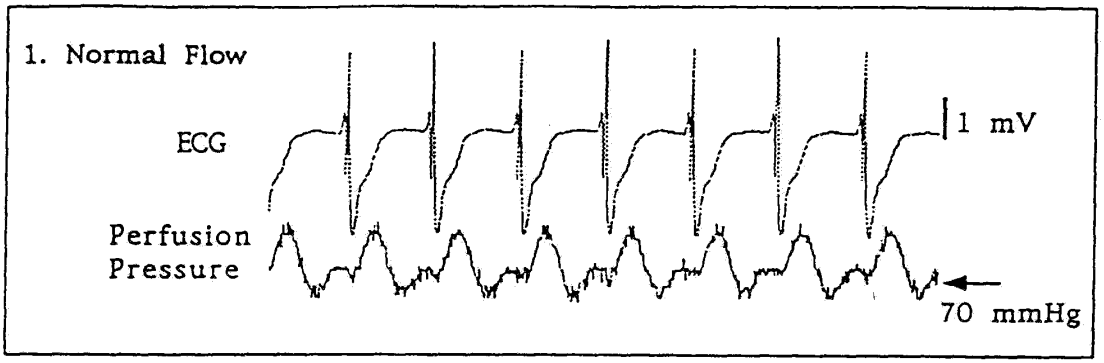
도면8

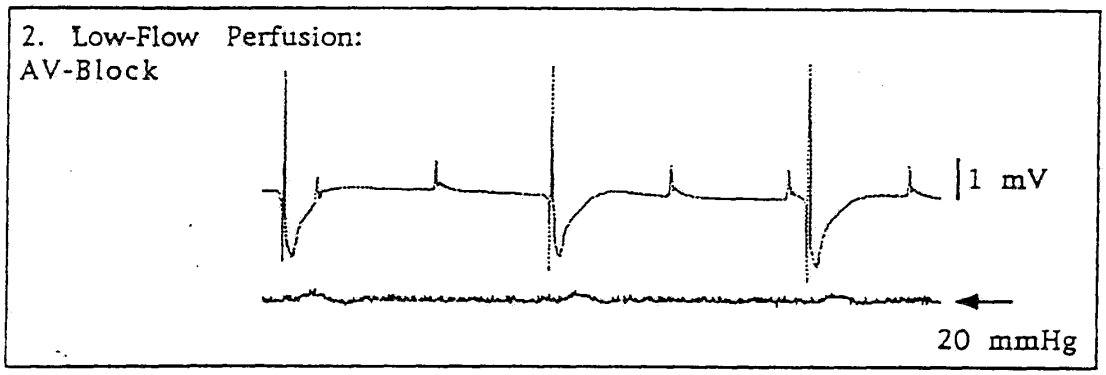
메트라졸 최소 발작 시험에서의 보호

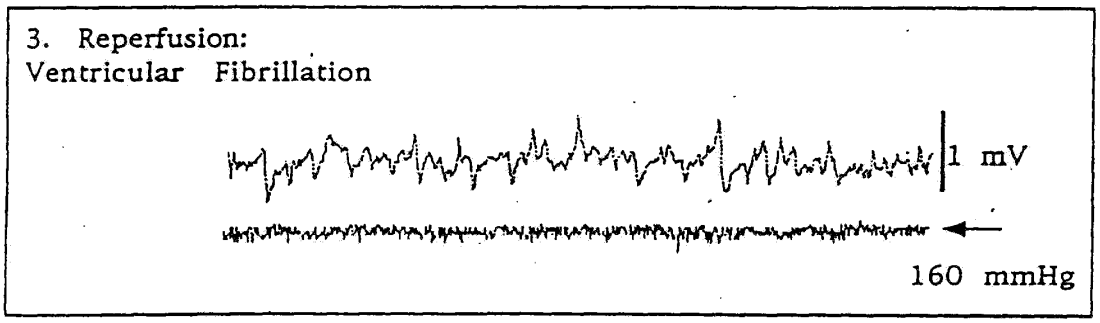


도면9

저산소증-재관류 심장병리학(대조 표준 1)

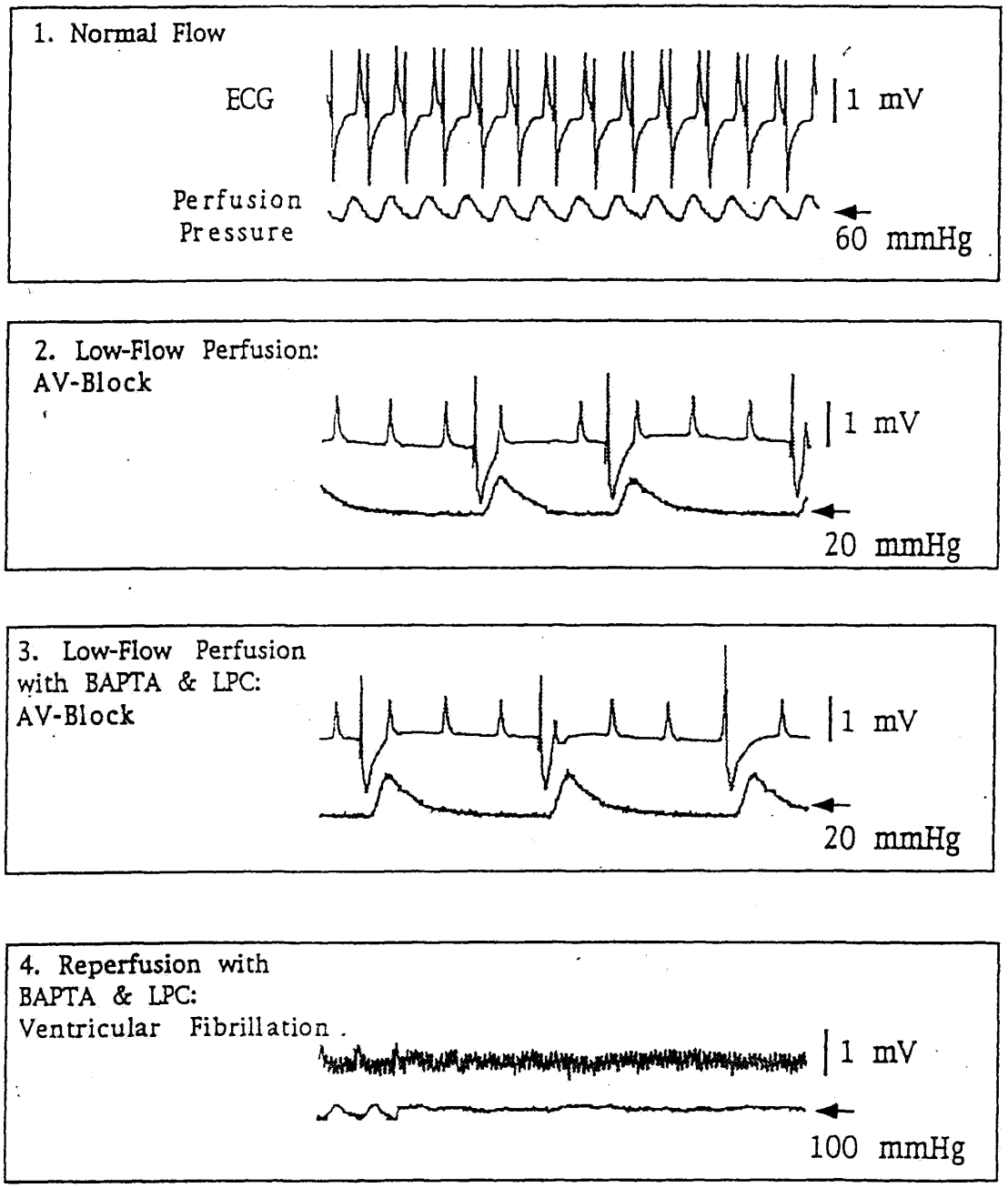






도면10

저산소증-재관류 심장병리학(대조 표준2)



도면11

저산소증-재관류 심장병리학(처리)

