



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0082401
(43) 공개일자 2009년07월30일

(51) Int. Cl.

A61K 31/122 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01) *A61K 31/41* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7010021

(22) 출원일자 2007년10월31일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년05월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/083170

(87) 국제공개번호 WO 2008/055205
국제공개일자 2008년05월08일(30) 우선권주장
60/863,715 2006년10월31일 미국(US)

(71) 출원인

알콘 리서치, 리미티드

미국 텍사스 포트 워쓰 사우쓰 프리웨이 6201(우: 76134)

(72) 발명자

폴리노 데브라

미국 텍사스 76036 크로울리 락 힐 드라이브 217

광 이억-허우

미국 텍사스 75052 그랜드 프레리 스타브릿지 레인 125

클락 애보트

미국 텍사스 76017 앤링턴 레이첼 코트 5603

(74) 대리인
이은선, 최규팔

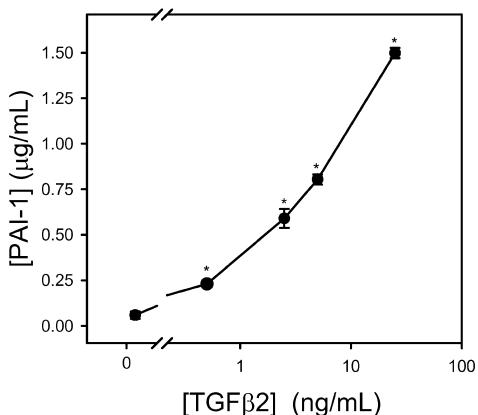
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 안 질환 치료용 PAI-1 결합 조절제

(57) 요약

본 발명은 일 구체예에서 비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합을 조절하는 약제를 포함하는 유효량의 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 녹내장 또는 상승한 IOP의 치료 방법에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 PAI-1 결합을 조절할 것으로 추정되는 후보 물질을 제공하고, 녹내장 또는 상승한 PAI-1을 겪는 대상의 잔기동 그물에서 활성 PAI-1의 양을 감소시키는 후보 물질의 능력을 평가하여 화합물을 선택하고, 선택된 화합물을 제조하는 것을 포함하는, 녹내장 또는 상승한 IOP 치료제로 사용되는 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합을 조절하는 약제를 포함하는 유효량의 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 녹내장 또는 상승한 IOP의 치료 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 조성물이 안과적으로 허용가능한 보존제, 계면활성제, 점성 증진제, 침투 증진제, 겔화제, 소수성 염기, 비히클, 완충제, 염화나트륨, 물 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택되는 화합물을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, β -차단제, 프로스타글란딘 유사체, 탄산탈수효소 억제제, α_2 작용제, 축동제, 신경보호제, 로 키나제 억제제 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택되는 화합물을 조성물의 부분으로 또는 분리 투여로서 투여하는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 조성물이 약제를 약 0.01 중량/부피 퍼센트 내지 약 5 중량/부피 퍼센트로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 조성물이 약제를 약 0.25 중량/부피 퍼센트 내지 약 2 중량/부피 퍼센트로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 약제가 ZK4044, PAI-039, WAY-140312, HP-129, T-686, XR5967, XR334, XR330, XR5118, PAI-1 항체, PAI-1 웨티드 모방체 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합을 조절하는 약제를 포함하는 유효량의 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 이를 요하는 대상에서 PAI-1-관련 안 질환을 치료하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 대상이 고안압증 또는 녹내장을 갖거나 발전할 위험이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 투여가 대상에서 활성 PAI-1의 양을 감소시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 조성물이 안과적으로 허용가능한 보존제, 계면활성제, 점성 증진제, 침투 증진제, 겔화제, 소수성 염기, 비히클, 완충제, 염화나트륨, 물 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택되는 화합물을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 7항에 있어서, β -차단제, 프로스타글란딘 유사체, 탄산탈수효소 억제제, α_2 작용제, 축동제, 신경보호제, 로 키나제 억제제 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택되는 화합물을 조성물의 부분으로 또는 분리 투여로서 투여하는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 7항에 있어서, 조성물이 약제를 약 0.01 중량/부피 퍼센트 내지 약 5 중량/부피 퍼센트로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 7항에 있어서, 조성물이 약제를 약 0.25 중량/부피 퍼센트 내지 약 2 중량/부피 퍼센트로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 7항에 있어서, 약제가 ZK4044, PAI-039, WAY-140312, HP-129, T-686, XR5967, XR334, XR330, XR5118, PAI-1 항체, PAI-1 웨티드 모방체 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법

청구항 15

PAI-1 결합을 조절할 것으로 추정되는 후보 물질을 제공하고;

녹내장 또는 상승한 PAI-1을 겪는 대상의 잔기동 그물에서 활성 PAI-1의 양을 감소시키는 후보 물질의 능력을 평가하여 화합물을 선택하고;

선택된 화합물을 제조하는 것을 포함하는, 녹내장 또는 상승한 PAI-1 치료제로 사용되는 화합물의 제조 방법.

명세서

<1> 관련 출원에 대한 상호-참조

본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에서 전체가 본원에 참조로 인용되는 2006년 10월 31일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 60/863,715호를 우선권으로 주장한다.

기술 분야

<3> 본 발명은 일반적으로 안 질환의 치료에 관한 것이고 더욱 구체적으로는 IOP를 저하시키고/거나 녹내장을 치료 또는 예방하는 약제의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

<4> 원발개방각녹내장(POAG)은 만성 또는 단순 녹내장으로도 알려져 있으며, 미국에서 모든 녹내장의 대부분을 차지 한다. 대부분의 녹내장 형태는 해부학적, 생화학적 또는 생리학적 기본을 이루는 안방수 흐름의 장애에 따른다.

<5> 플라스미노겐 활성체 억제제-1(PAI-1)의 상승된 수준이 녹내장 환자의 안방수에서 관찰되었다(Dan et al., Arch Ophthalmol, 2005). PAI-1 수준은 다른 내인성 자극 중에서도, 사이토킨 TGF β 에 의해 증가된다(Binder et al., News Physiol Sci, 2002). PAI-1은 조직 플라스미노겐 활성체(tPA) 및 유로카니제 플라스미노겐 활성체(uPA) 둘 모두의 활성을 저해한다. tPA 및 uPA 둘 모두는 플라스미노겐이 섬유소 캐스캐이드에서 중요한 중간 체인 플라스민으로 변환하는 것을 촉매화한다(Wu et al., Curr Drug Targets, 2002). 플라스민은 특정의 프로-기질 금속단백분해효소(pro-matrix metalloproteinases; pro-MMP)가 그들의 활성적 세포외 기질(ECM)-분해 형태로 변환되는 것을 촉진하는 것으로 공지되었다(He et al., PNAS, 1989). PAI-1은 또한 부착 수용체로서 작용하는 세포 표면 인테그린과 ECM 성분인 비트로넥틴의 회합을 조절한다(Zhou et al., Nature Structural Biology, 2003). 따라서, PAI-1은 비안구 조직에서 세포의 감소된 부착 및 증가된 분리 둘 다와 관련있다.

<6> 안압(IOP)의 감소 및/또는 POAG 치료에 효과적인 것으로 입증된 약물 요법은 안방수 생산을 감소시키는 제제 및 유출능을 증가시키는 제제 둘 모두를 포함한다. 이러한 치료법은 일반적으로 국소(눈에 직접 적용) 또는 경구의 두개의 가능한 경로 중 하나에 의하여 투여된다. 그러나 약제학적 항-고안압증 접근은 다양한 바람직하지 않은 부작용을 갖는다. 예를 들어, 필로카르핀과 같은 축동제는 시력의 불선명, 두통 및 다른 부정적인 시각적 부작용을 유발할 수 있다. 전신 투여된 탄산탈수효소 억제제는 구역질, 소화불량, 피로감 및 대사 산증을 유발 할 수 있다. 특정 프로스타글란дин은 충혈, 안구 가려움 및 속눈썹 및 눈주위 피부의 어두워짐을 유발한다. 이러한 부정적인 부작용은 환자 순응도를 감소시키거나 치료법을 종료시켜 시력이 계속 약해질 수 있다. 또한,

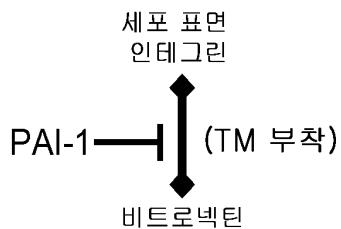
현존하는 특정 녹내장 치료법으로 치료되는 경우, 단순히 잘 반응하지 않는 개체가 있다. 이에 따라, 녹내장 및 고안압증과 같은 안 질환의 치료를 위한 다른 치료제가 필요하다.

<7> 발명의 요약

- <8> 본 발명의 구체예는 안 질환을 치료하고/거나 IOP를 저하시키는데 사용될 수 있는 비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합의 조절을 알아보는 것이다. 일 구체예는 비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합을 조절하는 약제를 포함하는 유효량의 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 녹내장 또는 상승한 IOP의 치료 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명의 다른 구체예는 비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합을 조절하는 약제를 포함하는 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 PAI-1-관련 안 질환의 치료 방법이다.
- <10> 특정의 이들 구체예에서, 약제는 ZK4044, PAI-039, WAY-140312, HP-129, T-686, XR5967, XR334, XR330, XR5118, PAI-1 항체, PAI-1 웨პ티드 모방체 및 이들의 배합물이다.
- <11> 또다른 구체예는 PAI-1 결합을 조절할 것으로 추정되는 후보 물질을 제공하고, 녹내장 또는 상승한 PAI-1을 겪는 대상의 잔기등 그물에서 활성 PAI-1의 양을 감소시키는 후보 물질의 능력을 평가하여 화합물을 선택하고, 선택된 화합물을 제조하는 것을 포함하는, 녹내장 또는 상승한 IOP 치료제로 사용되는 화합물의 제조 방법이다.
- <12> 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 안과적으로 허용가능한 보존제, 계면활성제, 점성 증진제, 침투 증진제, 젤화제, 소수성 염기, 비히클, 완충제, 염화나트륨, 물 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택되는 화합물을 추가로 포함한다.
- <13> 또한 다른 구체예에서, β -차단제, 프로스타글란딘 유사체, 탄산탈수효소 억제제, α_2 작용제, 축동제, 신경보호제, 로(rho) 키나제 억제제 및 이들의 배합물로 구성된 그룹에서 선택되는 화합물은 조성물의 부분 또는 분리 투여로서 투여될 수 있다.
- <14> 상기의 간단한 요약은 본 발명의 특정한 구체예의 특징 및 기술적 이점을 개괄적으로 기술한 것이다. 부가적인 특징 및 기술적 이점은 하기의 본 발명의 상세한 설명에서 기술될 것이다. 본 발명의 특성으로 고려되는 신규한 특징은 임의의 수반된 도면을 참조로 할 때 본 발명의 상세한 설명으로부터 더욱 잘 이해될 것이다. 그러나, 본원에서 제공한 도면은 본 발명을 예시하고, 본 발명의 이해를 전개하는 것을 돋도록 의도되었고, 본 발명의 범위를 한정하기 위한 것은 아니다.

발명의 상세한 설명

- <24> PAI-1은 비안구 조직에서 세포의 감소된 부착 및 증가된 분리와 관련있다. 본원에 개시된 데이터의 검토는 녹내장의 안방수에서 증가된 PAI-1 수준이 잔기등 그물 세포 상에서 TGF β 2의 작용에 기여할 수 있다는 결론을 유도한다. TM 세포 부착의 PAI-1-유도 감소는 세포의 기질 성분 비트로넥틴에 대한 세포의 부착을 방해하는 PAI-1에 기인하는 듯하다. 또한 TM 세포 부착의 PAI-1-유도 감소는 그물 환경으로부터 TM 세포의 이동을 용이하게 할 수 있다. 따라서, TM 세포 부착의 PAI-1-유도 감소 및 TM 세포 이동의 PAI-1-유도 증가는 녹내장 눈에서 보여지는 TM 세포질의 감소의 중요한 요인일 수 있다. 본 발명의 특정 구체예는 PAI-1이 잔기등 그물(TM) 조직에서 이러한 효과를 유도할 수 있다는 것을 인정한다.
- <25> 순환하는 PAI-1은 활성 PAI-1이 신속하고 자발적으로 그의 비활성 형태로 전환하는 능력때문에 보통 잠재형으로 존재한다. 그러나, 비트로넥틴에 결합한 PAI-1은 그의 활성 형태로 안정화되고, 결과적으로 더 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 활성 PAI-1의 해로운 효과를 감소시키기 위한 수단은 PAI-1 및 비트로넥틴의 상호작용을 조절하는 약제를 사용하는 것이다. 따라서, 이러한 약제는 ECM에서 결합하지 않은 비트로넥틴이 그의 세포 표면(인테그린) 수용체와 결합하여 세포의 부착을 증진시키고 TM 조직에서의 세포 상실을 감소시키도록 한다. 비트로넥틴과 결합하는 PAI-1의 능력의 조절은 녹내장의 관리에 실용가능한 치료 접근을 제공할 수 있다.
- <26> 본 발명의 특정 구체예는 하기 도식에 나타낸 바와 같이 비트로넥틴에 대한 PAI-1의 결합을 방해함으로써 녹내장과 같은 안 질환에서 PAI-1의 하향 효과를 표적으로 하는 방법이다;



<27>

<28> 상기 도식에서 PAI-1은 세포외 기질 성분인 비트로넥틴에 대한 잔기동 그물(TM) 세포 표면 부착 수용체(인테그린)의 결합을 감소시킨다. 결과적으로, 세포는 TM으로부터 분리되고 방수 흐름을 통하여 TM의 눈물소관 근처 영역으로 흘러들어간다. 분리된 TM 세포의 이러한 축적 및 그들의 잔해는 증가된 방수 유출 저항 및 증가된 IOP에 기여한다. 따라서 비트로넥틴에 대한 PAI-1 결합의 조절은 TM 세포의 분리를 감소시키고 증가된 유출 저항 및 상승한 IOP를 저하시킬 수 있다. 또한, 그에 따라 TM 조직 세포질은 증가되고, 식균작용과 같은 생체기능을 보존할 수 있다.

<29>

PAI-1 결합 조절제

<30>

다양한 PAI-1 결합 조절제가 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Jensen 등은 야생형 PAI-1에 대하여 강한 친화력을 갖고 uPA-PAI-1 복합체와 저농도 지단백질 수용체 패밀리 원의 결합을 저해하는 작은 펩타이드의 발견을 기술하였다(Jensen et al., Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 binding to endocytosis receptors of the low-density-lipoprotein receptor family by a peptide isolated from a phage display library, Biochem J., 2006, Vol. 399(3):387-396). 조직 플라스미노겐 활성제 (tPA) 및/또는 유로카니나제 플라스미노겐 활성제 (uPA)를 억제시키는 PAI-1의 능력을 변경하는 약제는 PAI-1 결합도 또한 조절할 수 있다. 이러한 약제는 한정하는 것은 아니나, ZK4044 (Liang et al., Characterization of a small molecule PAI-1 inhibitor, ZK4044, Thromb Res., 2005, Vol. 115(4):341-50), PAI-039 (티플락티닌) (Weisberg et al., Pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates angiotensin II/salt-induced aortic remodeling. Arterioscler Thromb Vase Biol., 2005 Feb, Vol. 25(2):365-71; Hennan et al., Evaluation of PAI-039 [1-benzyl-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-indol-3-yl(oxo)acetic acid], a novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, in a canine model of coronary artery thrombosis. J Pharmacol Exp Ther., 2005 Aug, Vol. 314(2):710-6. Epub, 2005 Apr 28; Elokddah et al., A novel, orally efficacious inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1: design, synthesis, and preclinical characterization. J Med Chem., 2004 Jul 1, Vol. 47(14):3491-4), WAY140312 (Crandall et al., Characterization and comparative evaluation of a structurally unique PAI-1 inhibitor exhibiting oral in-vivo efficacy. J Thromb Haemost., 2004 Aug, Vol. 2(8): 1422-8; Crandall et al., WAY-140312 reduces plasma PAI-1 while maintaining normal platelet aggregation. Biochem Biophys Res Commun., 2003 Nov 28, Vol. 311(4):904-8), HP129 (펜도살) (Ye et al., Synthesis and biological evaluation of menthol-based derivatives as inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Bioorg Med Chem Lett., 2003 Oct 6, Vol. 13(19):3361-5) 및 T-686 (Murakami et al., Protective effect of T-686, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 production, against the lethal effect of lipopolysaccharide in mice. Jpn J Pharmacol., 1997 Nov, Vol. 75(3):291-4); Ohtani et al., T-686, a novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, inhibits thrombosis without impairment of hemostasis in rats. Eur J Pharmacol., 1997 Jul 9, Vol. 330(2-3): 151-6; Vinogradsky et al., A new butadiene derivative, T-686, inhibits plasminogen activator inhibitor type-1 production in vitro by cultured human vascular endothelial cells and development of atherosclerotic lesions in vivo in rabbits. Thromb Res., 1997 Feb 15, Vol. 85(4):305-14; Ohtani et al., Inhibitory effect of a new butadiene derivative on the production of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured bovine endothelial cells. J Biochem (Tokyo), 1996 Dec, Vol. 120(6): 1203-8). Bryans et al., Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity by two diketopiperazines, XR330 and XR334, The Journal of Antibiotics, 1996 October, Vol. 49(10):1014-1021, XR5118. Einholm et al., Biochemical mechanism of action of a diketopiperazine inactivator of plasminogen activator inhibitor-1, XR5118, Biochem J, 2003, Vol.373: 723-732)을 포함한다.

<31>

또한 Ye에 의해 개시된 바와 같은 PAI-1 억제제 (Ye et al., Synthesis and biological evaluation of

piperazine-based derivatives as inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Bioorg Med Chem Lett., 2004 Feb 9, Vol. 14(3):761-5; Ye et al., Synthesis and biological evaluation of menthol-based derivatives as inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Bioorg Med Chem Lett., 2003 Oct 6, Vol. 13(19):3361-5) 및 Verbeke (Verbeke et al., Cloning and paratope analysis of an antibody fragment, a rational approach for the design of a PAI-1 inhibitor. J Thromb Haemost., 2004 Feb, Vol. 2(2):289-97) 및 van Giezen (van Giezen et al., The Fab-fragment of a PAI-1 inhibiting antibody reduces thrombus size and restores blood flow in a rat model of arterial thrombosis. Thromb Haemost., 1997 May, Vol. 77(5):964-9)에 의해 개시된 바와 같은 항체 기반의 억제제도 또한 PAI-1 결합을 조절할 수 있다. 다른 PAI-1 결합 조절제는 PAI-1 웨티드 모방체를 포함할 수 있다. 이 단락에서 제목 "PAI-1 결합 조절제"로 인용된 모든 문현의 내용은 이의 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

<32>

전달 방법

<33>

본 발명의 PAI-1-결합 조절제는 전달을 위하여 다양한 유형의 안과 제제에 포함될 수 있다. 화합물은 눈에 직접적으로 전달되거나(예: 국소적 점안제 또는 안연고; 막힌낭(cul-de-sac) 또는 이식된 공막 인접부 또는 안내에 이식된 의약제 전달 스폰지와 같은 서방형 장치; 안구주위, 결막, 서브-테논(sub-tenon), 전방내, 유리체내 또는 소관내 주입) 또는 해당 분야의 숙련자에 의해 잘 공지된 기술을 사용하여 전신적으로 전달될 수 있다(예: 경구적, 정맥내, 피하 또는 근육내 주입; 비경구적, 피부 또는 비강내 전달). 본 발명의 PAI-1-결합 조절제는 안내 삽입체 또는 이식 장치로 제제화될 수 있음이 추가로 예상된다.

<34>

본원에 개시한 PAI-1-결합 조절제는 눈으로 전달하기 위하여 국소적 안과 제제내에 바람직하게 포함된다. 화합물은 멸균 수성 안 혼탁액 또는 용액을 형성하기 위하여 안과적으로 허용가능한 보존제, 계면활성제, 점성 증진제, 침투 증진제, 완충제, 염화나트륨 및 물과 결합될 수 있다. 안 용액 제제는 화합물을 생리적으로 허용가능한 등장성 수성 완충제에 용해시켜 제조될 수 있다. 또한, 안 용액은 화합물을 용해시키는 것을 돋기 위해 안과적으로 허용가능한 계면활성제를 포함할 수 있다. 또한, 안 용액은 점성을 증가시키기 위한 약제, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등을 함유하여 결막낭에서 제제의 보유를 개선시킬 수 있다. 제한하는 것은 아니지만, 젤란 및 크산탄 검을 포함하는 젤화제가 또한 사용될 수 있다. 멸균 안 연고 제제를 제조하기 위해, 활성 성분은 적절한 비히클, 예를 들어, 광유, 액체 라놀린 또는 백색 바셀린에서 보존제와 결합된다. 멸균 안 젤 제제는 유사한 안 제제에 대하여 공개된 제제에 따라, 예를 들어, 카보폴-974 등의 배합물로부터 제조된 친수성 염기 중에 혼탁시켜 화합물을 제조할 수 있고; 보존제 및 등장화제(tonicity agent)가 포함될 수 있다.

<35>

PAI-1-결합 조절제는 바람직하게, pH가 약 4 내지 8인 국소적 안 혼탁액 또는 용액으로 제제화된다. 화합물은 상승한 IOP를 경험한 환자에서 IOP를 저하시키고/거나, 녹내장 환자에서 정상적인 IOP 수준을 유지하기에 충분한 양으로 국소적 혼탁액 또는 용액에 포함된다. 이러한 양은 본원에서 "IOP를 조절하기에 유효한 양" 또는 더욱 간략하게는 "유효량"으로 언급된다. 화합물은 보통 이들 제제 중에 0.01 내지 5 중량/부피% ("w/v%")의 양, 바람직하게는 0.25 내지 2 w/v%의 양으로 함유될 것이다. 따라서, 국소적 전달의 경우 임상의의 결정에 따라, 이들 제제 1 내지 2방울이 눈의 표면에 1일 1 내지 4회 전달될 수 있다.

<36>

PAI-1-결합 조절제는 또한, 다른 상승한 IOP 또는 녹내장 치료제, 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만 로 키나 아제 억제제, β -차단제, 프로스타글란딘 유사체, 탄산탈수효소 억제제, α_2 작용제, 축동제, 세레토닌성 작용제 및 신경보호제와 배합하여 사용될 수 있다.

<37>

본원에서 "PAI-1-결합 조절제"는 이러한 조절제뿐만 아니라 이들의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. PAI-1-결합 조절제의 약제학적으로 허용가능한 염은 PAI-1-결합 조절제 활성을 유지하는 염이고 인체에서 허용 가능한 것이다. 본원에서 약제는 아미노 또는 카르복시 치환기를 가질 수 있으므로 염은 산 또는 염기 염일 수 있다. 염은 산, 예를 들어, 아세트산, 벤조산, 신남산, 시트르산, 에탄술폰산, 푸마르산, 글리콜산, 브롬화수소산, 염산, 말레산, 말론산, 만델산, 메탄술폰산, 질산, 옥살산, 인산, 프로피온산, 피루브산, 살리실산, 숙신산, 황산, 타르타르산, p-톨루엔술폰산, 트리플루오로아세트산 등으로 형성될 수 있다. 염은 염기, 예를 들어, 1차, 2차 또는 3차 아민, 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 구리, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 칼륨, 나트륨, 아연 등으로 형성될 수 있다.

<38>

생물학적 활성의 결정

<39>

PAI-1 결합 조절제는 또한 그들의 생물학적 활성을 결정하는데 사용할 수 있는 결합 검사 또는 기능 검사를 사

용하여 선택될 수 있다. 이러한 검사는 앞서 기술된 방법을 사용하여 당업자들에 의해 개발될 수 있다. 다른 검사는 실시예에서 하기에 나타낸 데이터이거나 이로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 후에 기술되는 TM 세포 이동 검사는 추정되는 PAI-1 결합 조절제가 검사 약제로서 첨가되는 경우 사용될 수 있다.

<40> 생체 내 생물학적 활성 검사

<41> 안전하게 IOP를 저하시키는 특정 PAI-1-결합 조절제의 능력은 뉴질랜드 알비노 토끼 및/또는 사이노몰거스 원숭이(Cynomolgus monkey)를 사용한 생체 내 검사로서 특정 구체예에서 평가될 수 있다.

<42> 뉴질랜드 알비노 토끼에서 안구 안전성 평가

<43> 뉴질랜드 알비노 토끼의 두 눈에 비히를 중 시험 화합물의 한 $30 \mu\text{l}$ 분취액을 국소 투여하였다. 투여 후 0.5 시간 및 그 다음 2 시간에 걸쳐 매 0.5 시간마다 또는 효과가 더 이상 분명하지 않을 때까지 지속적으로 동물을 관찰하였다.

<44> 뉴질랜드 알비노 토끼에서 급성 IOP 반응

<45> 0.1% 프로파라카인으로 광 각막을 마취한 후 안압(IOP)을 Mentor Classic 30 공기안압계로 결정하였다. 각 측정 후, 한 방울 또는 두 방울의 염수로 눈을 세척하였다. 기준선 IOP 측정 후, 시험 화합물을 하나의 $30 \mu\text{l}$ 분취액으로 각 동물의 한쪽 또는 양쪽 눈에 한 방울씩 떨어뜨리거나, 또는 한쪽 눈에는 화합물을 반대쪽 눈에는 비히를 한 방울씩 떨어뜨렸다. 그 다음, 0.5, 1, 2, 3, 4 및 5 시간에 IOP 측정을 수행하였다.

<46> 사이노몰거스 원숭이에서 급성 IOP 반응

<47> 이전에 기술된 바와 같이 0.1% 프로파라카인으로 광 각막을 마취한 후 안압(IOP)을 Alcon 공기안압계로 결정하였다(Sharif et al., J. Ocular Pharmacol. Ther., 2001, Vol. 17:305-317; May et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003, Vol. 306:301-309). 각 측정 후, 한 방울 또는 두 방울의 염수로 눈을 세척하였다. 기준선 IOP 측정 후, 시험 화합물을 하나 또는 두 $30 \mu\text{l}$ 분취액으로 사이노몰거스 원숭이의 선택된 눈에 한 방울씩 떨어뜨렸다. 그 다음, 1, 3 및 6 시간에 IOP 측정을 수행하였다. 모든 동물의 오른쪽 눈에 레이저 잔기동 그물성형(trabeculoplasty)을 수행하여, 고안압증을 유도하였다. 모든 왼쪽 눈은 정상이었으며, 정상 IOP를 가졌다.

실시예

<48> 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구체예를 설명하기 위하여 포함된다. 이후 실시예에 기재된 기술은 본 발명을 수행하는데 충분히 작용하도록 본 발명자들에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 이의 수행을 위하여 바람직한 모드의 구성이 고려될 수 있음을 당업자들은 이해할 것이다. 그러나 당업자들은 본 발명의 기재에서 많은 변화가 개시된 특정 구체예에서 이루어질 수 있으며, 본 발명의 취지 및 범위에서 벗어나는 일 없이 동일하거나 유사한 결과가 수득될 수 있음을 이해할 것이다.

<49> 실시예 1 - TGF β 2는 TM 세포에서 PAI-1 함량을 증가시킨다.

<50> 도 1은 잔기동 그물 세포 배양 (GTM-3)에서 TGF β 2가 PAI-1 함량을 증가시킴을 보여주는 실험 결과를 나타낸다. PAI-1 중재 효과는 TM 조직을 비롯한 다양한 조직에서 앞서 관찰된 세포의 기질의 TGF β 2-중재 측적에 기여할 수 있다. 도 2는 이러한 TGF β 2-중재 PAI-1 증가가 TGF β 2로 처리한 세포 배양에서 지속됨을 증명한다. TGF β 2-처리는 TM 세포 상등액에서 PAI-1의 농도-의존 및 시간-의존 측적을 가져왔다(도 1 및 2). PAI-1 수준은 TGF β 2에 반응하여 점진적으로 증가하였고, 처리 후 약 24 시간 후에 일정 수준에 도달하였다.

<51> 실시예 2 - 약생형 PAI-1은 TM 세포의 부착을 감소시킨다.

<52> 도 3은 비트로넥틴 기질에 대하여 배양된 인간 TM 세포의 부착을 감소시키는 재조합 인간 PAI-1(2 시간 처리)의 능력을 증명하는 실험적 데이터를 나타낸다; 동일한 모델에서, 비트로넥틴과 결합하지 않는 돌연변이 PAI-1은 부착에 영향을 미치지 않았다(도 7). 도 4는 TM 세포 부착에 있어서 PAI-1의 농도를 증가시키는 효과를 나타낸다. 부착에 있어서 PAI-1의 효과는 용량-의존적이었고, 약 $0.6 \mu\text{M}$ 의 EC₅₀으로 평가되었다. 그러므로 이러한 TM 세포 부착에 대한 방해는 녹내장, 특히 POAG에서 보여진 것과 같이 가속된 TM 세포 상실을 촉발시킨다. 분리된 TM 세포는 안방수 유출, 증가된 유출 저항을 유도한다고 고려되는 과정 및 상승한 IOP의 차단에 기여할 수 있다. 그물 조직에서의 TM 세포의 상실은 또한 손상된 조직파편 제거를 유도하여 감소된 식작용(phagocytic capacity)의 결과를 가져올 수 있다.

<53> 도 3을 다시 언급하자면, 2 시간 동안 TGF β 2로 처리한 세포는 대조군과 비교하여 측정가능한 부착의 손실이 없

었다. TGF β 2로 단기간 처리한 효과의 부족은 2 시간 처리 기간 동안 불충분한 TGF β 2-중재 PAI-1 유도에 기인하는 듯하다(도 2 참조). SV40-형질전환(GTM-3) 세포의 반응은 비형질전환(GTM730) 세포의 반응과 매우 유사하였다.

<54>

<55> 실시예 3 - 야생형 PAI-1은 시간이 지남에 따라 분해된다.

<56> 도 5는 야생형 PAI-1-중재의 부착 상실이 일시적이고, 부착 수준이 24 시간 후에 거의 대조군 수준으로 돌아오는 것을 가르키는 실험 데이터를 보여준다. 도 6은 비트로넥틴 기질에 대한 GTM-3 및 GTM730의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1($1 \mu\text{g/mL}$, 1 시간) 대 안정한 내분해성 PAI-1 돌연변이($1 \mu\text{g/mL}$, 1 시간)의 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 도 5의 내용을 보자면, 데이터는 시간이 지남에 따라 분해되는는 것으로 증명되었다. 그러므로 PAI-1의 효과는 야생형 단백질보다 더 내분해성이 안정한 PAI-1 돌연변이(K154T, Q139L, M354I 및 H150H 변이의 혼합물)의 사용으로 증가되었다.

<57> 실시예 4 - 부착에 있어서 야생형 PAI-1 효과는 비트로넥틴-중재이다.

<58> 도 7은 비트로넥틴 기질에 대한 GTM-3 세포의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1($1 \mu\text{g/mL}$, 1 시간) 대 안정한 내분해성 PAI-1 돌연변이($1 \mu\text{g/mL}$, 2 시간) 대 비-비트로넥틴 결합 PAI-1 돌연변이($1 \mu\text{g/mL}$, 1 시간)의 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 돌연변이 PAI-1은, 비트로넥틴과 부착하는 것이 가능적으로 아직 알려져 있지 않지만, 비트로넥틴 기질에 대한 TM 세포 부착에 있어서의 효과는 없는 반면, 야생형 비트로넥틴-결합 PAI-1은 대조군 수준의 약 50%로 부착을 감소시켰다.

<59> 도 8은 GTM-3 세포의 이동에 대한 야생형 PAI-1(4 시간)의 농도-의존적 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 야생형 PAI-1은 TM 세포 부착을 감소시키는 유사한 농도에서 TM 세포의 이동을 감소시켰다.

<60> 실시예 1-4를 위한 방법

<61> **인간 TM 세포 배양:** 인간 TM 세포를 사후 인간 기증자의 조직으로부터 앞서 기술한 바와 같이 분리하고, 특성화한 후, 배양하였다. 형질전환된(GTM-3) 세포주의 생성 및 특성화를 또한 앞서 기술한 바와 같이 하였다(Pang et al. Preliminary characterization of a transformed cell strain derived from human trabecular meshwork. *Curr. Eye Res.*, 1994, Vol. 13:51 -63).

<62> **PAI-1 ELISA:** TM 세포 배양물의 24-웰 플레이트를 24 시간 동안 혈청을 걸여시킨 다음 추가의 24 시간(또는 지정한 시간) 동안 무혈청 배지에서 TGF β 2와 함께 인큐베이션시켰다. 처리한 배양물 상등액의 분취액을 인간 PAI-1 ELISA 키트(American Diagnostica)로 분비된 PAI-1 함량에 대하여 정량하였다.

<63> **TM 세포 부착:** TM 세포 부착을 InnoCyte ECM Cell Adhesion Assay (Calbiochem)를 사용하여 결정하였다. TM 세포(20,000/웰; 무혈청 배지)를 비트로넥틴이 코팅된 96-웰 플레이트에 접종하였다. 이어서 시험 약제를 첨가한 다음, 지정한 시간 동안 세포 배양 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 이어서 비-부착 세포를 기울여 따라서 제거하고 웰을 PBS로 부드럽게 세정하였다. 상대적인 세포 부착을 형광 염료(칼세인- AM) 흡수를 사용하여 결정하였다.

<64> **TM 세포 이동:** TM 세포의 이동을 InnoCyte Cell Migration Assay (Calbiochem)를 사용하여 평가하였다. TM 세포(50,000/웰; 무혈청 배지)를 키트가 장착된 이동 챔버의 상부 웰 어셈블리에 과종하였다. 하부 웰을 시험 약제 용액으로 채운 다음 챔버를 세포 배양 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 4 시간 후, 상부 웰 어셈블리를 제거하고 상등액을 부드럽게 기울여 따라서 비부착된 세포를 제거하였다. 이어서 상부 웰 어셈블리를 분리 베퍼 및 칼세인-AM의 혼합물을 함유하는 새로운 하부 플레이트에 두었다. 60분 후, 각각의 하부 웰의 분취액을 새로운 블랙 96 웰 플레이트로 옮기고 상대적인 형광을 결정하였다.

<65> 제제 실시예 5-8

<66> 실시예 5

성분	농도(w/v %)
PAI-1 결합 조절제	0.01-2%
하이드록시프로필 메틸셀룰로오스	0.5%
2염기성 소듐 포스페이트(무수물)	0.2%

염화 나트륨	0.5%
디소듐 EDTA(에데테이트 디소듐)	0.01%
폴리소르베이트 80	0.05%
벤즈알코늄 클로라이드	0.01%
수산화나트륨/염산	pH 7.3-7.4로 조정하기 위한 양
정제수	100%가 되도록 하기 위한 적정량

<68> 실시예 6

<69>

성분	농도(w/v %)
PAI-1 결합 조절제	0.01-2%
메틸 셀룰로오스	4.0%
2염기성 소듐 포스페이트(무수물)	0.2%
염화 나트륨	0.5%
디소듐 EDTA(에데테이트 디소듐)	0.01%
폴리소르베이트 80	0.05%
벤즈알코늄 클로라이드	0.01%
수산화나트륨/염산	pH 7.3-7.4로 조정하기 위한 양
정제수	100%가 되도록 하기 위한 적정량

<70> 실시예 7

<71>

성분	농도(w/v %)
PAI-1 결합 조절제	0.01-2%
구아 검	0.4-6.0%
2염기성 소듐 포스페이트(무수물)	0.2%
염화 나트륨	0.5%
디소듐 EDTA(에데테이트 디소듐)	0.01%
폴리소르베이트 80	0.05%
벤즈알코늄 클로라이드	0.01%
수산화나트륨/염산	pH 7.3-7.4로 조정하기 위한 양
정제수	100%가 되도록 하기 위한 적정량

<72> 실시예 8

<73>

성분	농도(w/v %)
PAI-1 결합 조절제	0.01-2%
백색 바셀린 및 광물유 및 라놀린	연고 경도
2염기성 소듐 포스페이트(무수물)	0.2%
염화 나트륨	0.5%
디소듐 EDTA(에데테이트 디소듐)	0.01%
폴리소르베이트 80	0.05%
벤즈알코늄 클로라이드	0.01%
수산화나트륨/염산	pH 7.3-7.4로 조정하기 위한 양

<74>

본 발명 및 그의 구체예를 상세하게 기술하였다. 그러나 본 발명의 목적은 본 상세한 설명에 기술된 임의의 방법, 제조, 물질의 조성, 화합물, 수단, 방법 및/또는 단계의 특정 구체예에 한정되는 것을 의미하지 않는다. 본 발명의 취지 및/또는 본질적인 특성에서 벗어남이 없이, 개시된 물질을 다양하게 변형, 치환 및 변경시킬 수 있다. 따라서, 본 분야의 숙련자는 본원에 기술된 구체예와 실질적으로 동일한 결과를 성취하거나 실질적으로 같은 기능을 수행하는 후의 변형, 치환 및/또는 변경이 본 발명의 관련 구체예에 따라 이용될 수 있는 것을 본 개시물로부터 쉽게 인지할 것이다. 요컨대, 다음의 청구항은 그의 범위 내에서 본원에 개시된 과정, 제조, 물

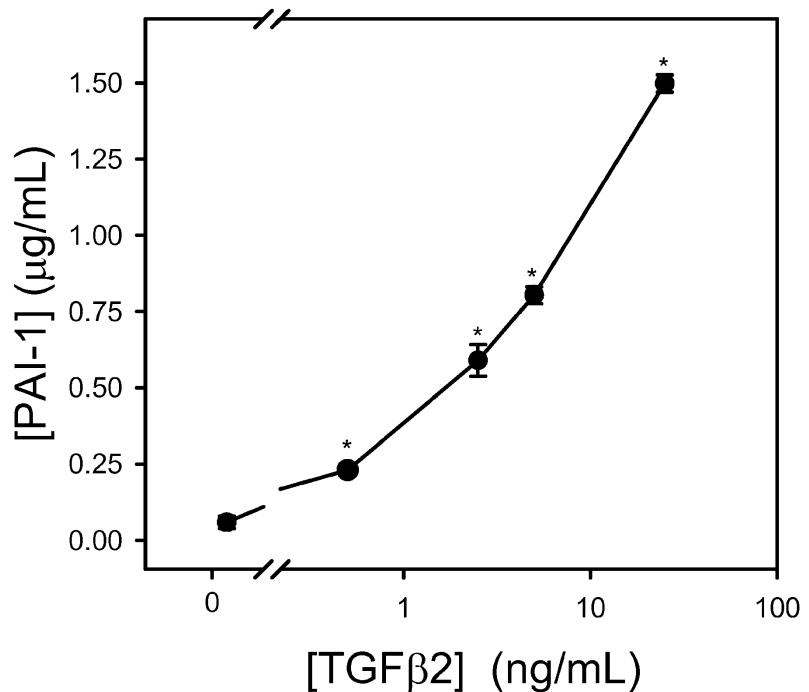
질의 조성, 화합물, 수단, 방법, 단계 및/또는 단계에 대한 변형, 치환 및 변경을 포함하는 것으로 의도된다.

도면의 간단한 설명

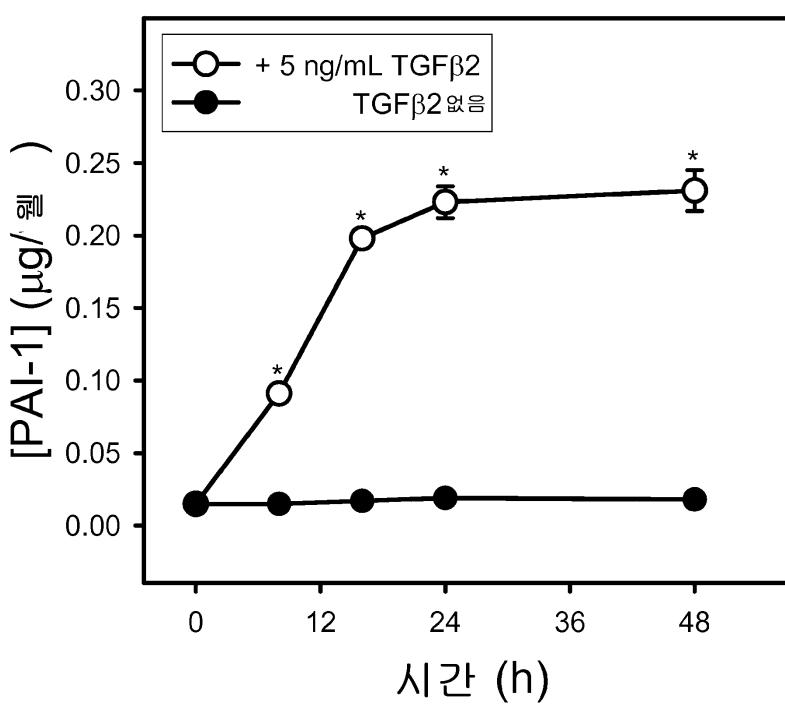
- <15> 본 발명의 더욱 완전한 이해 및 그의 이점은 수반된 그림의 도면과 관련하여, 하기 설명을 참조함으로써 얻어질 수 있다:
- <16> 도 1은 인간 잔기동 그물(GTM-3) 세포 상등액에서 PAI-1의 수준에 대한 TGF β 2(24 시간)의 농도-의존적 효과를 나타내는 실험 결과의 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 3으로 표시되었다. 일원분산분석(One-Way ANOVA) 후, 던넷(Dunnett) 검정에 의해 상응하는 비히를 그룹에 대하여 *p < 0.05;
- <17> 도 2는 다양한 시간 동안 TGF β 2(5 ng/mL)로 처리하거나 처리하지 않은 GTM-3 세포 상등액에서의 PAI-1 수준을 나타내는 실험 결과의 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 3으로 나타내었다. 스튜던트 t-검정에 의해 상응하는 비히를 시점 그룹에 대하여 *p < 0.05;
- <18> 도 3은 비트로넥틴 기질에 대하여 형질전환(GTM-3) 및 비-형질전환된 (GTM730) 세포의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1(1 μ g/mL, 2 시간) 및 TGF β 2(5 ng/mL, 2 시간)의 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 12-44로 나타내었다. 일원분산분석 후, 던넷 검정에 의해 상응하는 비처리 그룹에 대하여 *p < 0.05;
- <19> 도 4는 비트로넥틴 기질에 대한 GTM-3 세포의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1(2 시간)의 농도-의존적 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 4로 나타내었다. 일원분산분석 후, 던넷 검정에 의한 비히를 그룹에 대하여 *p < 0.05;
- <20> 도 5는 비트로넥틴 기질에 대한 GTM-3 세포의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1(1 μ g/mL)의 시간-의존적 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 12-44로 나타내었다;
- <21> 도 6은 비트로넥틴 기질에 대한 GTM-3 및 GTM730 세포의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1(1 μ g/mL, 1 시간) 대 안정한 내분해성 PAI-1 돌연변이(1 μ g/mL, 1 시간)의 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 4로 나타내었다. 스튜던트 t-검정에 의해 상응하는 비처리 그룹에 대하여 *p < 0.05. 스튜던트 t-검정에 의해 상응하는 PAI-1(야생형) 처리 그룹에 대하여 **p < 0.05.
- <22> 도 7은 비트로넥틴 기질에 대한 GTM-3 세포의 부착에 있어서의 야생형 PAI-1(1 μ g/mL, 2 시간) 대 비-비트로넥틴 결합 PAI-1 돌연변이(1 μ g/mL, 2 시간)의 효과를 나타내는 실험 결과의 막대 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 4-24로 나타내었다. 일원분산분석 후, 던넷 검정에 의한 비처리 그룹에 대하여 *p < 0.05.
- <23> 도 8은 GTM-3 세포 이동에 대한 야생형 PAI-1(4 시간)의 농도-의존적 효과를 나타내는 실험 결과의 그래프이다. 데이터는 평균 및 SEM, n = 4-32로 나타내었다. 일원분산분석(One-Way ANOVA) 후, 던넷(Dunnett) 검정에 의한 비히를 그룹에 대하여 *p < 0.05.

도면

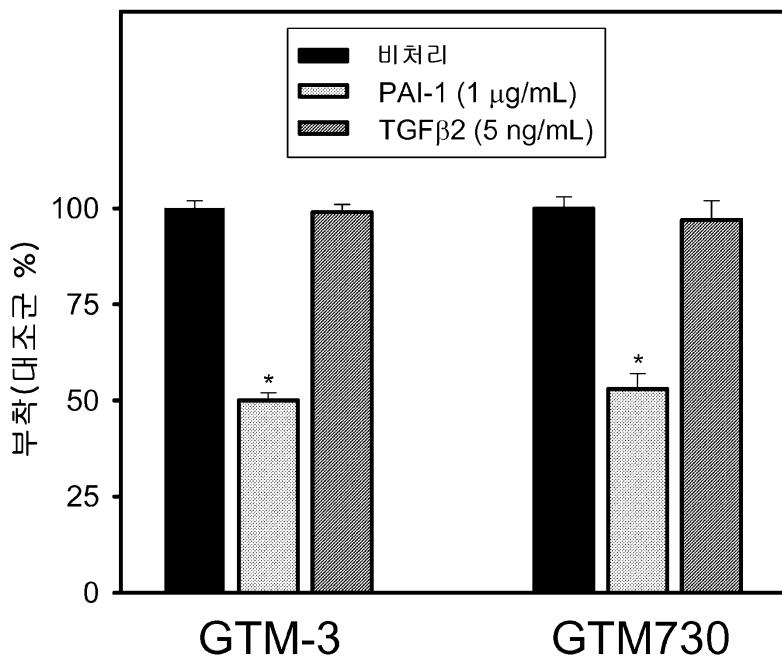
도면1



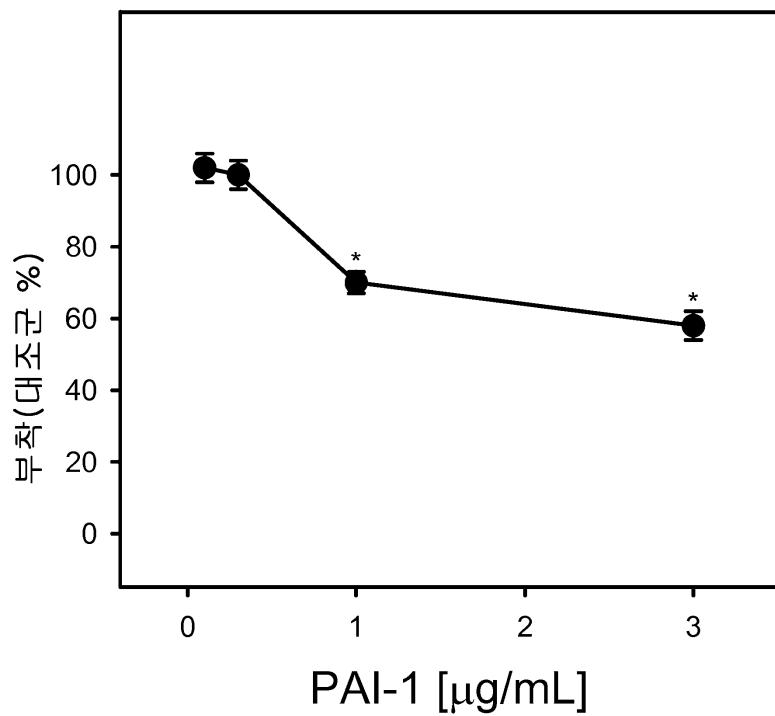
도면2



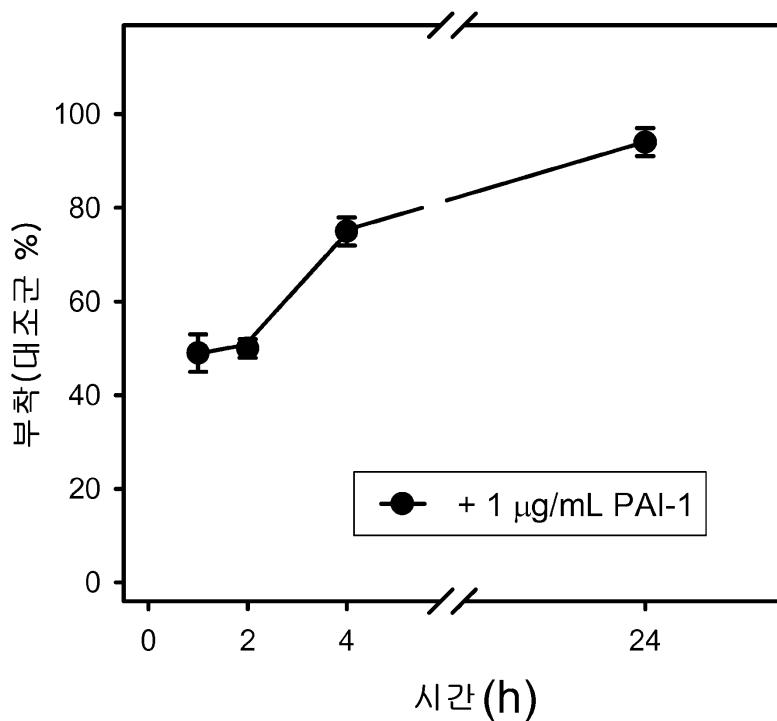
도면3



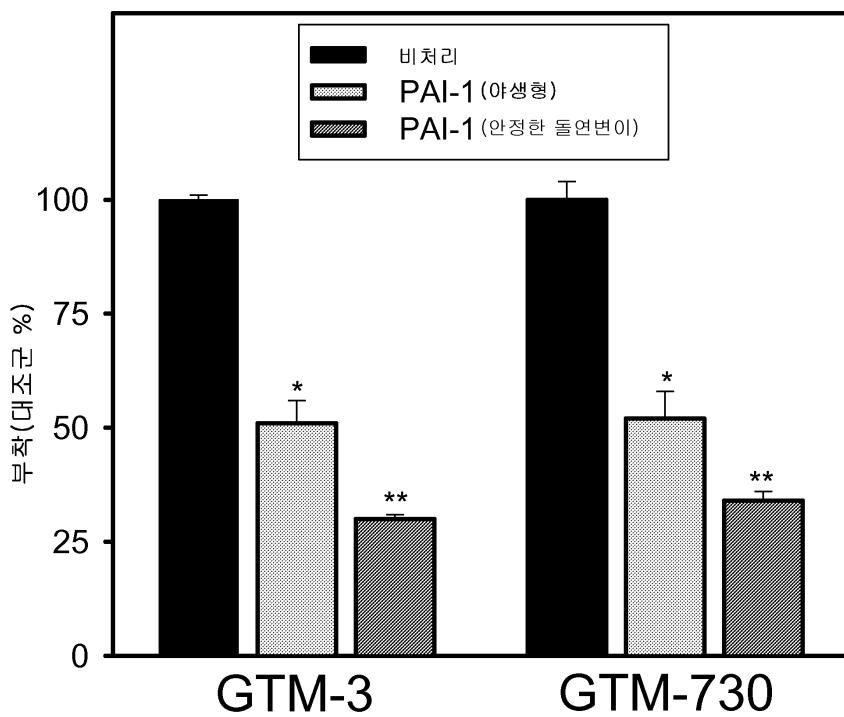
도면4



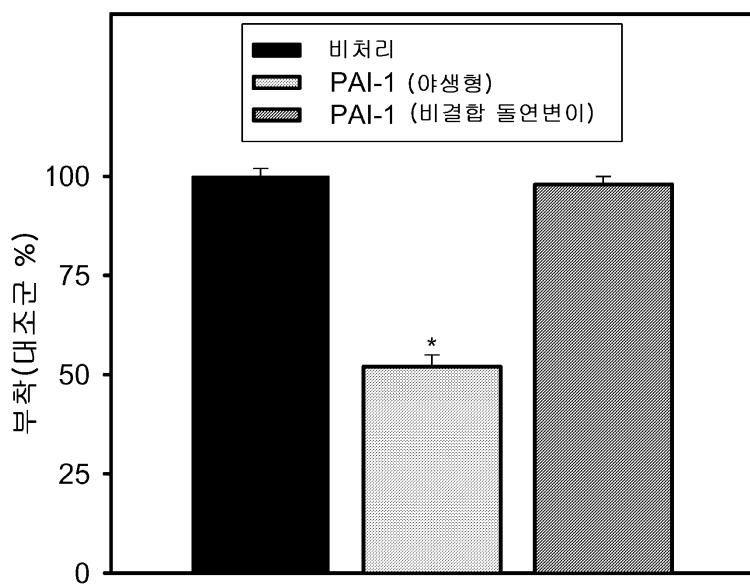
도면5



도면6



도면7



도면8

