



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월19일
(11) 등록번호 10-2490204
(24) 등록일자 2023년01월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/145 (2006.01) A01N 1/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/145 (2013.01)
A01N 1/0226 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7026024
- (22) 출원일자(국제) 2019년01월04일
심사청구일자 2020년09월09일
- (85) 번역문제출일자 2020년09월09일
- (65) 공개번호 10-2020-0118851
- (43) 공개일자 2020년10월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/070444
- (87) 국제공개번호 WO 2019/165851
국제공개일자 2019년09월06일
- (30) 우선권주장
62/710,838 2018년03월01일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
International Journal of Radiation Oncology
Biology Physics, 701-707쪽(2011.11.13.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
오브비아 파마슈티컬즈 리미티드
미국 위스콘신 53719 매디슨 사우스 로사 로드 504
- (72) 발명자
팔, 윌리엄 이
중국 장쑤 215123 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 99썸 진지후 애비뉴 나노폴리스 쑤저우 엔더블유-11 룸 204
리, 닝평
중국 장쑤 215123 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 99썸 진지후 애비뉴 나노폴리스 쑤저우 엔더블유-11 룸 204
- (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 27 항

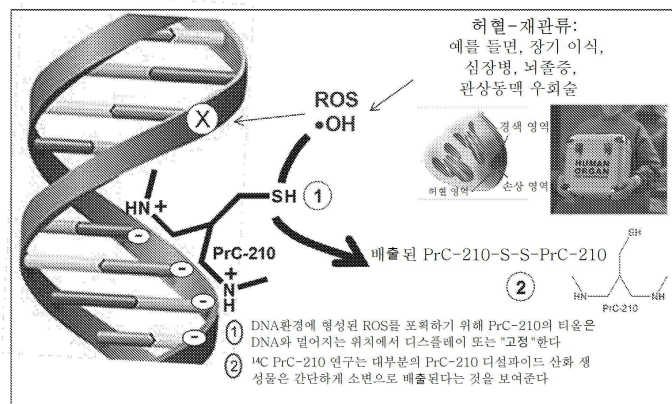
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 신규 아미노티올로 허혈-재관류에 의해 유발된 세포사멸을 감소하는 방법

(57) 요약

신장 이식 및 심근 경색을 포함하는 두 가지 전임상 모델에서, PrC-211 및 PrC-252 등을 포함하는 PrC-210 아미노티올 패밀리의 구성원은, 허혈-재관류 손상의 감소에 아주 효과적이다. PrC-210은 양호한 저항성을 구비하며, 0.5MTD 용량에서 기능 효과(efficacy)는 100%에 도달되며, 경구 또는 IP 경로를 통해 전신 투여될 경우, 선행한 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



설치류 동물 독성은 없다. 허혈-재관류 손상의 가장 중요한 방면이 무엇일 수 있는가에 있어서, 체외에서 PrC-210의 농도가 2-3mM일 경우, PrC-210을 IP 또는 경구 투여하여 처리된 설치 동물에서 동일한 PrC-210의 농도가 측정된 경우, PrC-210은 ROS 제거 분석에서의 DNA 손상을 효과적으로 100% 방지할 수 있다. I-R 신장 손상된 표준 마우스 신장 클램핑/비클램핑 모델에서, 세가지 아미노티올은 전부 약물을 사용하지 않은 대조군에서 나타내는 신장 카스파아제의 수준을 현저히 억제(>80%)시킬 수 있으며; PrC-210 및 이의 유사물도 I-R 신장 마우스에서 BUN 수준을 감소시킨다. 마우스의 심근경색 모델에서, PrC-210을 전신 투여하고, 40분 동안 관상동맥을 결찰하고 전방 동맥을 해제할 경우, 심근 사멸이 현저히 감소되는 것을 관찰하였다. 1차 신생 마우스 심근 세포를 사용하여 진행한 생체외 추가 연구는, PrC-210 패밀리 아미노티올을 동시에 투여함으로써 과산화수소에 의해 유발되는 심근 세포사멸을 현저히 감소시킬 수 있음을 나타냈다. PrC-210 패밀리 아미노티올은 장기 이식 및 심근경색을 포함하는 여러가지 상황에서 허혈-재관류에 의해 유발되는 세포 및 장기 독성 작용을 억제시킨다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

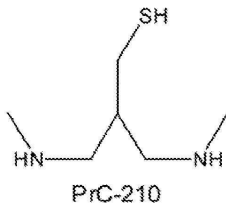
A61P 9/10 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조를 갖는 화합물 PrC-210 또는 이의 약학적 산 부가염을 포함하는 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 억제용 약학적 조성물.



청구항 2

제1항에 있어서,
상기 허혈-재관류 손상은 허혈 이벤트 영향을 받는 세포에서의 세포사멸을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 억제제는 세포사멸의 감소 또는 예방을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 억제제는 카스파아제 활성의 감소 또는 예방을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 억제제는 장기 독성의 예방을 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 억제제는 재관류 동안인 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 억제제는 재관류 전인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 억제제는 심근경색을 앓고 있는 피험자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 심근경색의 위험에 처해 있는 피험자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 뇌졸중을 앓고 있는 피험자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 뇌졸중의 위험에 처해 있는 피험자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 허혈-재관류 손상 (IRI)은 신장에 있는 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 수술을 받는 피험자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 수술은 관상동맥 우회술인 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 허혈-재관류 손상 (IRI) 전, 동안 또는 후인 것인, 약학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 이식 장기에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 기증자로부터 장기를 제거하기 전 이식 장기의 기증자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 기증자로부터 장기를 제거하는 동안인 것인, 약학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제는 장기 이식 전 또는 후에 장기 수용자에 대한 것인, 약학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제제는 장기의 저장 동안인 것인, 약학적 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제제는 이식 장기 보존 용액의 사용을 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제제는 장기를 플러싱하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 허혈-재관류 이벤트 전, 동안 또는 후의 유효 시간에 전신으로 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 1 내지 100 밀리몰 농도로 포함하는 장기 관류 용액.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 용액은 이식 장기 보존 용액의 사용을 추가로 포함하는 것인, 장기 관류 용액.

청구항 26

제24항에 있어서,

상기 용액은 장기를 플러싱하는 것인, 장기 관류 용액.

청구항 27

제24항에 있어서,

상기 용액은 허혈-재관류 이벤트 전, 동안 또는 후의 유효 시간에 전신으로 투여되는 것인, 장기 관류 용액.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명에서는 아미노티올 화합물을 전달하여 허혈 이벤트에 노출된 세포와 접촉하도록 하여, 아미노티올로 세포에 대한 허혈-재관류(I-R) 손상 정도(severity)를 현저히 감소시키는 기술을 제공한다. 여러가지 조건에서, 투여된 아미노티올은 카스파아제의 활성화와 세포자멸의 억제, 및 활성산소(ROS) 물질의 제거와 ROS 유발 DNA 손상의 감소 등을 포함하는 I-R에 의해 유발되는 세포사멸에 관련되는 몇 개의 단계를 감소시킬 수 있다.

배경 기술

[0002] Lorenzen 등(Free Rad. Biol. Med. 2013년 7월)은 허혈-재관류 손상의 보편적인 중요성을 아래와 같이 요약하였다: 즉, "허혈-재관류(I-R) 손상으로 인한 조직 손상은 심각한 이벤트이고, 일반적으로 장기 기능 악화 또는 장기 기능 상실을 초래하게 된다. I-R 손상은 혈관 폐색으로 인한 일시적인 조직 산소결핍 및 후속 혈류 회복 후의 재관류 기간과 관련된다. 재관류 동안에, 활성 산소와 활성 질소 물질의 급증과 염증반응 등 메커니즘을 통해 국소 허혈로 인한 초기 조직 손상이 더욱 심해진다. I-R 손상은 외과수술, 장기 이식, 심근경색, 순환성 쇼크와 독성 손상 등 질환에서 발생된다."라고 기재하고 있다. PubMed에서 "허혈-재관류"로 검색어를 검색하면 21900개를 초과하는 인용결과를 식별해낼 수 있으며, 이러한 예를 보면, 각 장기 부위를 거의 전부 포함할 뿐만 아니라, 이러한 연구는 허혈-재관류 손상과 관련되는 일부 파라미터를 측정하는 임상 연구를 포함하며, 심근경색 동안과 이 후의 심장 락트산 탈수소효소의 혈장 수준(plasma level) 및 뇌동맥을 일정한 시간 경과한 후 해

제하여 일정한 시간 재판류 시킬 때, 랫트 뇌 조직 중 지질 과산화 수준(levels of lipid peroxidation)을 예로 들 수 있다.

[0003] 장기 이식은 I-R에 의해 유발된 세포사멸 및 그 결과의 중요성의 일례를 제공한다. 세계 범위내에서 말기 신부전은 매년 120만이 넘는 사망을 초래한다. 또한, 미국에서는 매년 17000건을 초과하는 신장 이식이 시행되고 있다. 지난 수십년 동안, 단기(short-term) 결과는 개선을 가져왔지만, 장기(long-term) 이식 생존율은 단지 아주 작은 개선만 가져왔다. 대부분의 신장 이식 실패는 이식 신장에서의 I-R 손상(Kloner RA, Circulation, 1989;80:1115-27)에 기인한다. 신장 I-R 손상은 원발성 기능부전(primary non-function) 또는 이식 기능 지연으로 나타난다. 모든 신장 이식 중 약 3분의 1은 이식 기능 지연이 있으며; 순환 정지 후 기증된 신장 중에서 이러한 실패율은 무려 50%에 달한다. 이식 기능 지연은 낮은 이식 생존에 대한 공인된 위험 요소이다. 또한, 신장 기능의 회복을 기다려야 하기 때문에, 이식 기능 지연은 이식 직후 환경에서 자원 이용과 비용의 증가를 초래하게 된다. 따라서, 고품질 장기 이식에서 중요하나 수요를 만족하지 못한 하나의 요건은 I-R 손상을 예방하는 것이다. 특히, 지난 50년간, I-R 손상을 저감하는 장기 보존 전략은 현저한 변화를 가져오지 못했다. 따라서, 신장 이식 분야에서, 평생 이식 생존을 구현하기 위해 이식된 신장에 대한 I-R 손상을 억제하기 위한 새롭고, 안전하며 효과적인 방법에 대한 수요가 시급하다. 신장 이식 중에서 I-R 손상을 성공적으로 억제하면 다른 이식 장기에도 광범위하게 응용될 수 있다. 즉, 관상동맥 우회술, 개심수술과 신경외과수술을 포함하는 외과 수술 과정 중에 혈액 공급을 중단한 다음 회복하는 모든 장기 외과 수술에 더욱 광범위하게 응용될 수 있다.

[0004] I-R 손상을 일으키는 완전한 메커니즘은 복잡하며 아직까지 완전히 장악하지는 못하였으나, 산화적 스트레스, 카스파아제의 활성화, 세포사멸(cell apoptosis), ATP 고갈 및 칼슘 항상성 장애는 모두 해당 메커니즘에 기여되며, 이들은 I-R 손상의 원인(Weight SC, Br J Surg, 1996;83:162-70)으로 광범위하게 인정되고 있다. 재판류 동안, 활성 산소 물질(ROS)의 생성은 DNA의 돌연변이를 야기시킨다. 세포사멸 캐스케이드(Apoptotic death cascades)가 작동되면 최종적으로 세포사멸을 야기시킨다. 장기 이식에 있어서, I-R 손상을 억제하면 이식 수술의 결과를 개선할 수 있으며, 모든 장기 이식 중의 급성 및 만성 거부반응을 감소시킨다.

[0005] 장기 이식과 마찬가지로, ROS 생성, 카스파아제의 활성화 및 세포사멸 캐스케이드가 심근경색 및 재판류에서도 보편적인 것은 실제상 모두 실험방식 또는 천연적으로 장기가 국소 허혈/경색된 후 산소가 함유된 혈액이 장기 에 재판류되도록 경색을 제거함으로써 야기된 장기 독성 모델이기 때문이다.

[0006] 이하는 허혈-재판류 손상의 작은 일부분의 실예(PubMed 검색에 따른 여러 장기의 허혈-재판류 손상) 및 티올을 미리 투여 또는 공동 투여함으로써 위험에 처한 조직에 대한 허혈-재판류 손상 중증도의 감소여부의 실예이다.

표 1

발표된 문헌에 따른 일부 종래의 티올의 보호작용

측정된 허혈-재판류 장기 독성 작용	측정된 ROS 제거제	주 저자
토끼 척수 손상	아미포스틴(amifostine)	F Chronidou
랫트 신장	아미포스틴	MK Chok
마우스 심장	아미포스틴	SZ Wu
랫트 간 이식	NAC	SM Silva
랫트 폐 출혈성 쇼크	NAC	KR Saad
랫트 교환 손상	NAC	STurkmen

[0008] * N-아세틸시스테인

[0009] 티올 화합물 아미포스틴, 시스테인과 N-아세틸시스테인은 일부 허혈-재판류에 의해 장기가 손상된 동물 모델에서 명확한 보호 효과를 나타낸다. 표 1에서 제안된 두 사례에서(MK Chok; SZ Wu) 아미포스틴 전신 투여는 카스파아제-3의 발현에 대하여 효과가 있으며, 항-세포사멸 효과가 있다.

[0010] 그러나, 표 1에서의 각 티올은 모두 명확한 약리 결함이 존재하는데, 이러한 약리 결함은 이들의 임상 응용을 제한하고 있으며, 아미포스틴/WR-1065인 경우는 임상 응용에서 배제되었다. 예를 들면, 아미포스틴은 인간에서 심각한 오심/구토 부작용 및 저혈압/실신 부작용을 일으킨다. 아미포스틴 활성 대사 산물 WR-1065는 랫트 중에서 저혈압 부작용을 나타내며(Ryan, 1996), 또한, 아직까지는 발표되지 않았지만 발명자가 아는 바에 의하면, WR-1065는 아미포스틴 투여와 밀접히 관련되는 오심/구토를 유발할 수 있다. N-아세틸시스테인은 활성이 제한된 약취를 가지는 화합물로, 주로는 간접적으로 GSH 전구체의 역할을 하므로 효과가 비교적 느리다. 이는 오심에서

사망에 이르기까지 심각한 불량 반응을 일으킨다(Sandilands, 2009). 또한, 구토(Pakravan, 2008)와 ана필락시스 반응(Kao, 2003)이 자주 나타난다. 따라서, 허혈-재관류 세포사멸의 영향을 받지 않도록 피험자를 보호하는데 적용할 수 있는 새로운 약품의 개발이 필요한데, 이는 아미포스틴/WR-1065의 임상 응용을 제한하는 오심/구토 및 저혈압/부작용이 없고, 비교적 우수한 임상적 효능을 구비해야 한다.

발명의 내용

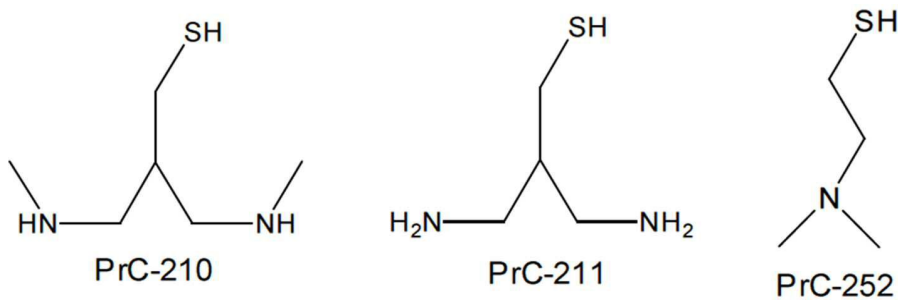
해결하려는 과제

[0011] 발명자가 본 발명에서 제공한 실시예를 통해 어느 정도 발견한 것에 의하면, 본 발명의 화합물은 기존의 아미노티올(예를 들어, 아미포스틴 및 WR-1065)에 관련된 많은 또는 전부의 단점을 극복하여, 본 발명의 분자가 근본적으로 인류에서의 광범위한 사용에 더욱 적합하도록 함으로써, 다양한 의료 응용 환경에서 보호적 및 치료적 이점을 제공한다. 현저하게는, 신장 이식 중 카스파아제/세포사멸(실시예 3-5)을 완전히 억제하고, 또한 심근경색에서 세포사멸/세포사멸을 철저히 억제하는 것을 포함한다(실시예 6).

과제의 해결 수단

[0012] 발견한 것에 의하면, 본 발명의 분자는 허혈-재관류 손상(실시예 3, 4, 5와 6을 참조)을 억제할 수 있으며, 오심/구토(실시예 10을 참조) 및 저혈압/실신(실시예 11을 참조) 등 부작용을 일으키지 않는데, 이러한 부작용은 마침 현재 사용되는 아미노티올(즉, 5탄소 아미노티오포스페이트 프로드러그(five carbon aminothiophosphonate pro-drug)-아미포스틴)의 사용을 크게 제한하는 요소이다. 본 발명 중에 사용되는 아미노티올의 설계 개념은 다음과 같다: (i) 유연한 알킬 사슬 골격은, 하나 또는 여러개의 아민 그룹으로 인해 pH 7.2에서 양전하를 가지게 되어 세포 중 음전하를 가지는 DNA와의 상호 작용을 구현하여 음전하를 둘러싸고 집중되며, 또한, (ii) 자유 티올기가 존재함으로써 허혈-재관류 동안 형성된 산소 자유 라디칼을 제거한다.

[0013] 해당 신규 아미노티올 패밀리 원시적 설계(PrC-210은 현재까지 가장 특징적인 원형)에서 하나의 방법을 탐색해냈는데, 여기서: (i) 약물-DNA 친화도와 이온의 상호 작용이 증가되도록 아미노티올 골격 중 알킬 아민 단편(alkylamine segments)의 수량을 체계적으로 증가함으로써, 이러한 약물-DNA 상호 작용의 증가와 관련되게 성장 억제 작용이 증가되고; 또한, (ii) 알킬 측쇄의 말단에 유리된 티올 ROS 제거제(scavenger)를 배치하거나 "나타(display)"내어 제거제의 일부가 DNA골격과 멀어지는 위치로 가거나 "나타"나게 하여, ROS가 DNA 내의 dG 염기를 공격하기 전에 ROS를 제거하도록 한다. 해당 작업은 PrC-210, PrC-211와 PrC-252를 포함하는 하나의 새로운 아미노티올 분자 패밀리를 생성하였다.

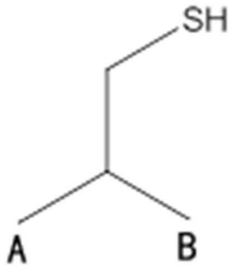


[0014]

[0015] 본 발명에서는 원형(prototype) PrC-210에 대해 상세히 서술하였다. 이러한 화합물, 특히 PrC-210은 아미포스틴, WR-1065, N-아세틸시스테인 또는 시스테인과 같은 기존 기술의 화합물이 나타내는 단점을 나타내지 않았다. 본 발명의 화합물은 높은 기능효과를 구비하고, 효능 개시가 신속하다. 또한, 이는 오심을 일으키지 않을 뿐만 아니라, 저혈압을 일으키지 않으며, 냄새가 전혀 없다.

[0016] 아미노티올 화학:

[0017] 본 발명에서는 아미노티올을 카스파아제와 세포사멸을 억제시키고, ROS 제거를 I-R 손상을 감소시키는 수단으로 사용하며, 이러한 아미노티올의 구조는 다음을 포함한다:



[0018]

[0019]

[0020]

[0021]

[0022]

[0023]

[0024]

여기서, A=-CH₂NHR', B=-CH₂NHR 또는 A=-NRR', B=H이며;

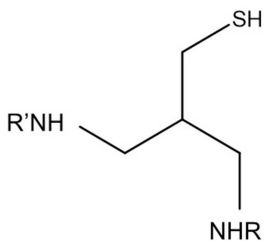
여기서, R과 R'는 독립적으로 H, 알킬기, 헤테로알킬기로 부터 선택되되,

조건은: B=H일 경우, R과 R'는 모두가 H인 것이 아니며,

또는, 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 산부가염이다.

알킬기는 바람직하게 C₁-C₆ 알킬기, 더 바람직하게는 C₁-C₃ 알킬기, 특히 바람직하게는 메틸기를 의미한다. 헤테로알킬기는 바람직하게 C₁-C₆ 헤테로알킬기, 더 바람직하게는 C₁-C₃ 헤테로알킬기, 특히 바람직하게는 C₁-헤테로알킬기를 의미한다.

바람직한 화합물은 아래 식을 구비하는 화합물 및 그의 약?적으로 허용가능한 산부가염이다:



[0025]

[0026]

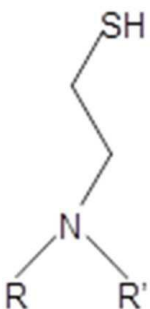
[0027]

[0028]

여기서, R과 R'는 독립적으로 H, 알킬기와 헤테로알킬기로 부터 선택된다.

알킬기는 바람직하게 C₁-C₆ 알킬기, 더 바람직하게는 C₁-C₃ 알킬기, 특히 바람직하게는 메틸기를 의미한다. 헤테로알킬기는 바람직하게 C₁-C₆ 헤테로알킬기, 더 바람직하게는 C₁-C₃ 헤테로알킬기, 특히 바람직하게는 C₁-헤테로알킬기를 의미한다.

다른 바람직한 화합물은 아래의 화합물 및 그의 약학적으로 허용가능한 산부가염이다:



[0029]

[0030]

[0031]

[0032]

여기서, R과 R'는 독립적으로 H, 알킬기, 헤테로알킬기로 부터 선택되되, 조건은 R과 R'에서 적어도 하나는 H가 아니다.

알킬기는 바람직하게 C₁-C₆ 알킬기, 더 바람직하게는 C₁-C₃ 알킬기, 특히 바람직하게는 메틸기를 의미한다. 헤테로알킬기는 바람직하게 C₁-C₆ 헤테로알킬기, 더 바람직하게는 C₁-C₃ 헤테로알킬기, 특히 바람직하게는 C₁-헤테로알킬기를 의미한다.

특별히 언급된 화합물은 PrC-210, PrC-211 및 PrC-252 및 그의 약학적으로 허용가능한 산부가염이다. 특별히 바

람직하게는 PrC-210 또는 그의 약학적으로 허용가능한 산부가염이며, 예를 들면 염산염이다.

- [0033] 상기 서술된 경로를 사용하여 상기 분자 및 이러한 분자의 유사물을 합성한다(US 7,314,959; Copp, RR et al., Synthesis and Growth Regulatory Activity of a Prototype Member of a New Family of Aminothioli Radioprotectors. Bioorganic Medic. Chem. Letters 21: 7426-7430, 2011).
- [0034] 본 발명 중에 사용되는 화합물, 특히 PrC-210 아미노티올은 I-R 손상을 감소함에 있어서 현재 사용할 수 있는 다른 티올 또는 아미노티올보다 더욱 적합하며, 간결하게 개요하면 아래와 같다:
- [0035] 1. 본 발명의 화합물, 특히 PrC-210 및 그의 PrC-211와 PrC-252 유사물은 30분 동안 또는 40분 동안의 I-R 손상을 거친 마우스 신장과 마우스 심장에서 아주 효과적으로 세포자멸과 관련된 카스파아제의 수준을 아주 효과적으로 억제시킬 수 있다(실시에 3-6).
- [0036] 2. PrC-210은 아주 효과적인 생체의 ROS 제거제이다(실시에 1과 2를 참조).
- [0037] 3. 생체의(Eppendorf 튜브; 실시에 1과 2)와 1차 마우스 심근세포(실시에 7) 환경에서, PrC-210은 모두 효과적인 ROS 제거제이다. ~3mM 농도에서, PrC-210은 DNA 손상을 90% 억제시키며(pUC19 DNA 손상, 도 2 참조); 3mM은 0.5MTD 용량의 PrC-210(즉, 252 $\mu\text{g}/\text{gm}$ b.w.)을 투여받은 마우스에서 측정된 것과 동일한 PrC-210 티올 혈중 농도이되, 여기서 0.5MTD 용량의 PrC-210은 마우스가 100% 치사량의 방사선에 저항하여 100% 생존하도록 하며; 이러한 마우스의 사망은 주요하게 이온화 방사선에 의해 2차적으로 형성된 세포 ROS에 의해 야기된다.
- [0038] 4. PrC-210은 한 개의 알킬 측쇄를 포함하는 것으로 설계되며, 해당 알킬 측쇄는 PrC-210 알킬-아민 골격이 이온적으로 회합되는 DNA 골격으로부터 적어도 3개 결합 길이(bond-lengths)의 위치에서 한 개의 티올 그룹을 나타낸다. 티올을 DNA골격 주위의 환경에 위치하도록 하여, ROS가 DNA 골격 내의 dG 염기를 공격하기 전에 더욱 효과적인 ROS 제거를 구현할 수 있다고 예상된다.
- [0039] 5. PrC-210은 아미포스틴과 다르게 저혈압 반응을 유발하지 않는다. 이는 PrC-210이 문진 환경(out-clinic setting)에서의 무감독 환자에게 사용될 수 있음을 의미한다. 또한, 이는 PrC-210이 예를 들면 심근경색, 뇌졸중 또는 관상동맥 우회술과 같은 중환자 간호 환경(critical care settings)의 환자에게 사용될 수 있으며, 환자 간호가 현저히 증가되지 않아도 됨을 의미한다. 또한, 이는 본 발명에서 사용되는 다른 화합물에도 적용됨을 확신한다.
- [0040] 6. PrC-210은 아미포스틴과 다르게 그 어떤 오심 또는 구토 반응을 일으키지 않는다. 이는 PrC-210이 문진 환경(out-clinic setting)에서의 무감독 환자에게 사용될 수 있음을 의미한다. 또한, 이는 PrC-210이 예를 들면 심근경색, 뇌졸중 또는 관상동맥 우회술과 같은 중환자 간호 환경(critical care settings)의 환자에게 사용될 수 있으며, 환자 간호가 현저히 증가되지 않아도 됨을 의미한다. 또한, 이는 본 발명에서 사용되는 다른 화합물에도 적용됨을 확신한다.
- [0041] 7. 본 발명의 화합물은 거부감 있는 냄새(objectionable odor)가 없다. PrC-210은 황 냄새(실시에 12 참조)가 기본상 없다. 이는 티올계인 N-아세틸시스테인 및 시스테인과 다르다, 즉 상기 양자는 허혈-재관류 손상 측면에서 각각 아주 작거나 중등 정도의 기능 효과를 구비하나, 임상적인 사용량에서의 사용의 보편적인 냄새 때문에 임상에서 여전히 인간에게 사용되지 못한다.
- [0042] 8. 아미포스틴은 포스파타아제를 통해 효소적 활성화 단계를 거쳐야만 유리된 티올로 변할 수 있으며, 이는 이에 관련되는 시간 의존성 약물동력학을 구비한다. N-아세틸시스테인(NAC)은 내원성 티올(endogenous thiol)-글루타티온의 생물적 합성을 증가함으로써 이의 대부분 보호 기능 효과를 구현하여 NAC가 허혈-재관류 손상을 억제시키는 것과 관련되는 더 긴 시간(몇시간 내지 하루)의 시간 의존성 요소가 존재한다. 반면에, 이러한 화합물과는 다르게 본 발명의 화합물은 효과가 빠르다. 본 발명의 화합물이 혈액, 장기 보존 용액 또는 임의의 부위에 투여되는 순간, 그들은 활성을 발휘하게 된다. 심근경색, 뇌졸중 또는 다른 심혈관 및/또는 혈관이벤트/병증상태 동안에 기능 활성을 구비하는 속효성 화합물을 순환계에 전달(경색 주변에 일부를 전달되도록 하고, 경색이 제거된 후 대량으로 전달되도록 함)하는 것은 경색과 관련되는 장기 손상 완화 측면에서 아주 유용할 수 있다.
- [0043] 이식 장기가 이식에 관련되는 혈액 공급 정지 및 재공급 과정에서 발생하는 I-R 손상을 받지 않도록 보호하기 위해, 본 발명에서 사용되는 화합물(예를 들면 PrC-210)의 1종 또는 여러 종을 복합되게 투여하여 장기를 보호할 수 있다. 그의 주요 용도는 장기 보존 용액의 첨가제이다. 일반적으로, 이는 본 발명에서 사용되는 화합물(예를 들면 PrC-210)이 첨가되어 있는 용액으로 공여 장기를 플러싱하는 것에 관련된다. 공여 장기를 플러싱하는데 사용되는 용액은 상용적인 장기 보존 용액 중 하나일 수 있으며, 여기에는 본 발명에서 사용되는 화합물

(예를 들면 PrC-210)이 첨가되었다. 실시예 14에서는 상용적인 장기 보존 용액인 "UW"용액의 조성을 제공하였으며, 기타 본 분야에서 공지된 보존 용액일 수도 있다. 본 발명에서 사용되는 1종 또는 2종 이상의 화합물을 첨가한 임의의 다른 적합한 용액을 사용하여 공여 장기를 플러싱할 수 있다. 예를 들면, 알부민과 헤파린을 함유하는 링거젯산용액(Lactated Ringer's solution)을 사용하여 공여 장기를 플러싱(flushing)할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 화합물의 반감기에 기반하여 화합물의 적합한 농도를 선택하며, 이는 상이한 장기(신장, 심장, 폐 등), 저장온도에 적응해야 하며, 중요한 것은 장기 수용자에게 이식하기 전 4°C에서 장기를 보존하는 지속시간에 적응해야 하는 것이다. 예를 들면, PrC-210은 pH 7.2에서 반감기가 3.5시간이며, 아미노티올의 첨가 범위는 5-100mM 사이 일 수 있다. 첨가형 보존 용액으로 공여 장기를 "플러싱"할 때 여러가지 형식을 취할 수 있는 바, 가장 보편적으로는, 외과 의사가 단순히 장기 유출물이 "맑아"질 때까지 적출된 장기에 대해 플러싱하는 것이다. 이는 또한 공여자가 사망한 것으로 선언되면, 장기는 원위치에 유지하도록 공여자의 혈액량을 첨가형 보존 용액으로 전신 대체하는 것일 수 있다. 후자에 따른 방법은 동일한 공여자로부터 유래되는 여러개 장기에 대해 플러싱 및 기증할 수 있다.

[0044] 장기 이식 전, 또한 펌프로 첨가형 보존 용액, 완충액, 혈액 또는 혈액 대체물이 연속 순환되게 분리된 장기를 통과시킴으로써 해당 장기를 유지시킬 수 있다.

[0045] 이식 전 공여 장기는 일반적으로 5-8시간 또는 더욱 긴 시간동안 저장하기 때문에 장기의 저장과정에서 본 발명에서 사용하는 화합물은 대부분 활성이 없는 형태로 변화될 수 있다. 예를 들면, PrC-210의 경우, 장기 이식 및 새로 이식된 장기와 관련되는 혈류 재개 시 발생하는 공지된 ROS가 급증하기 전에, 1-2 반감기 또는 더 많은 PrC가 이의 비활성 디설파이드 형태(disulfide form)로 변화된다. 이러한 원인 때문에, 수용자의 체내에 수술로 장기를 이식하기 전의 몇분 동안, "부하용량(loading dose)"으로 장기에 투여할 수 있다. 장기 및 이의 내부 순환에 따라, 본 발명에서 사용되는 화합물이 부하용량 액체 중에서의 농도는 5 내지 500mM사이에서 변화될 수 있다. 외과 의사는 50-100cc의 주사기를 이용하여 장기에 대해 플러싱할 수 있고, 간단히 첨가형 용액(augmented solution)을 장기의 주요 동맥에 넣는다. 몇 분 동안 기다린 후, 이식 직전에 식염수 또는 젯산링거용액을 단독으로 사용하여 2차 플러싱을 진행함으로써, 본 발명에서 사용되는 화합물로 장기의 실질 세포 중의 "로딩"을 구현하면서, 이식 후 장기 수용자의 전신 혈액 중에 분포된 이러한 화합물의 양을 크게 감소시킨다.

[0046] 새로 이식된 장기에서의 지속적인 염증 및 이와 관련되는 ROS, 카스파아제와 세포 자멸의 발생은 본 분야에서 공지된 것이므로, 장기 이식 수술이 끝난 후의 18시간 내지 4일 동안에도 본 발명에서 사용된 화합물(예를 들면 PrC-210)을 환자에게 투여하는 것은 유익한 것이다. 동물을 이용한 연구로부터 알 수 있다시피, 장기 세포사멸을 방지한 설치동물 중, PrC-210의 혈액농도는 1-3mM이다. 따라서, 이식 후 장기 수용자에게 사용되는 본 발명에서 사용된 화합물의 혈액 농도의 목표는 0.5-5mM 범위에 있을 것이다. 정맥 투여 또는 경구 투여를 통해 본 발명에서 사용되는 화합물을 환자에게 투여할 수 있다. PrC-210에 관해, 동물 연구를 통해 이 두가지 경로는 모두 효과적임을 나타냈다(Soref, C, Int J Rad Onc Biol Phys 82:e701-e707, 2012).

[0047] 이전의 연구에 따르면, PrC-210은 건조한 결정 재료로서, 진공 상태의 바이얼에 저장되면 수년 동안 이의 티올 형태로 안정하게 보관된다. pH 6인 물에 용해시켰을 경우, 실온에서 PrC-210의 이의 디설파이드 형태로의 현저한 변환은 2주 이상 일어나지 않았다. pH 7.2인 경우, PrC-210 티올의 반감기는 3.5시간이다. 이러한 경우, 본 발명에서 사용된 화합물(예를 들면 PrC-210)을 결정 또는 동결 건조 분말 형태로 불활성 기체(예를 들면 질소)로 플러쉬한 바이얼에 저장하고, 그 후 식염수로 이를 다시 용해시키고 보존 용액 또는 IV 백에 첨가하는 것이 적절하다. 불활성 기체로 플러쉬한 병 중에서의 본 발명에서 사용되는 화합물의 캡슐 형태는 안정적으로 분자를 저장하는 다른 1종의 방법이다. 그 후 해당 캡슐을 환자에게 경구 투여하거나 캡슐을 일정한 부피의 보존 용액 또는 완충액 중에 용해시킨 후, 플러싱하여 취출한 장기를 보존 시킨다.

[0048] 대부분의 심장 외과 수술에 대해 말하자면, 먼저 혈류를 기계적 인공심폐기로 전이시키고, 다음 냉장된 심정지액으로 심장을 플러싱하는데, 여기서 용액 중의 이온 함량은 취출된 심장의 자발적인 박동을 방지하도록 설계되었다. 표준적인 심정지액의 구성 방법은 실시예 13에 제시되어 있다. 그리고 관상 동맥 우회술 또는 관상 성형 수술과 같은 수술 과정에서는 분리된 비 박동 심장에 대해 수술조작을 행한다. 본 발명에서 사용되는 화합물(예를 들면 PrC-210)이 첨가된 심정지액은 심장의 실질 세포가 아래와 같은 이벤트의 영향을 받지 않도록 보호할 수 있다: ROS과 관련 카스파아제 및 세포자멸의 급증은 산소 함유 혈류가 심장에 회복된 후(즉, 예를 들면 관상 동맥 우회술 후), 심장에서 즉시 발생된다. 첨가형 심정지액은 5-500mM의 PrC-210과 같은 본 발명에서 사용되는 화합물을 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 화합물을 심장 수술 후 환자의 정맥내에 만성 투여(chronic intravenous administration)(18시간 내지 4일)하는 것도 실용적인 선택이다.

[0049] 또한, 외과 수술 개입(surgical intervention)을 포함하지 않는 많은 기타 종류의 허혈-재관류 손상이 존재하는데, 본 발명에서 사용되는 화합물(예를 들면 PrC-210)을 전신적 투여(일반적으로는 IV를 포함)하면 I-R 손상 정도를 줄일 수 있다. 새로 재관류된 조직 중에 대량의 ROS가 생성되기 때문에 혈액에 의해 전달되는 화합물은 생성된 ROS에 대한 실시적인 제거를 실현하여(실시예 2 참조), I-R 손상 후 조직 환경에의 카스파아제 및 세포사멸의 생성을 크게 감소시킨다. 이러한 비수술적인 I-R 손상 상황의 두 개의 실례는 아래와 같은 내용을 포함한다: i) 심장병 및 혈관성형술이나 관상동맥 우회술을 통해 해제된 심근경색(실시예 6을 참조하면, 이에 관련되는 마우스 모델의 재현 및 PrC-210 전신 투여와 관련되어 심장 세포사멸이 현저히 감소됨을 확인할 수 있음), ii) 뇌졸중 및 이의 카테터 또는 약리학적 해결 방안이다. 상기 언급된 실시 방안에서, 전신 투여되는 화합물의 일부는 순환 경색 부위를 통과하거나 순환 경색 주위에 "누설"된다. 이로써, i) 화합물은 국소 허혈 조직내의 반응성 분자(예를 들면 아산화 질소)를 제거할 수 있으며; ii) 화합물은 상기 국소 허혈 조직으로 흐르는 혈류를 재건된 후 형성된 대량의 ROS를 제거한다. 이러한 비수술적 I-R 손상 환경에서, 해당 화합물은 몇초/분의 시간 내에 1-20mM 화합물의 치료적 전신 혈액 수준에 도달되도록 충분히 높은 농도로 급성 정맥내 주입 투여될 수 있다.

[0050] 모든 PrC-210 및 이의 유사체 제형에서, 아미노 티올은 유기산염(일반적으로 HCl)의 형태로 합성되며(Copp, R Bio Med Chem Lett 21:7426-7430, 2011), 이는 거의 수 몰(multi-molar)에 달하는 농도로 수용액에 즉시 용해될 수 있다.

[0051] 본 분야 당업자에게 있어서, 본 발명에 포함되는 교시에 기반하면, 본 발명의 다른 실시 방안도 자명할 것이다.

발명의 효과

[0052] 신장 이식 및 심근 경색을 포함하는 두 가지 임상 전 모델에서, PrC-211 및 PrC-252 등을 포함하는 PrC-210 아미노티올 패밀리의 구성원은, 허혈-재관류 손상의 감소에 아주 효과적이다. PrC-210은 양호한 저항성을 구비하며, 0.5MTD 용량에서 기능 효과(efficacy)는 100%에 도달되며, 경구 또는 IP 경로를 통해 전신 투여될 경우, 선명한 설치류 동물 독성은 없다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 PrC-210에 의해 부여된 세포의 허혈-재관류 손상에 대한 제안된 보호 메카니즘 중 하나를 나타내는 개략도이다.

도 2는 PrC-210가 반응에 첨가될 때 히드록실 라디칼 ($\cdot\text{OH}$) 유도성 pUC19 플라스미드 DNA의 절단(nicking)을 억제하는 용량 의존적 능력에서 일반적으로 인용되는 12개의 "항산화제" 대비 효능을 보여준다.

도 3은 $\cdot\text{OH}$ 손상이 발생되기 전 적어도 30초 동안 반응 혼합물에 PrC-210을 첨가하면 $\cdot\text{OH}$ 가 유발하는 pUC19 플라스미드 손상을 완전히 예방할 수 있음을 나타낸다.

도 4는 마우스 신장 I-R 손상 24 시간 후, 신장 카스파아제 및 신장 기능에 대한 PrC-210의 영향을 나타낸다. (A) 실험설계: 모든 군에 대해 30분 동안 좌측(LT) 허혈(클램핑) 30분 및 우측(RT) 신장절제술을 실시한 후, 24시간의 재관류를 진행한다. LT 신장 클램핑 20분 전에 아미노티올(PrC-210, PrC-211 또는 PrC-252)을 1회 복강내(IP) 주사 투여한다. 24시간 때 혈청과 LT 신장을 수집한다. (B) 실시예 3에서와 같이, 신장 조직 상층액의 카스파아제 활성을 측정한다. 우선, 60분 이상의 카스파아제의 측정 조건의 선형성(Linearity)을 확립된다. (C) 클램핑 24시간 후 수집된 혈청에서 BUN 수준을 측정한다.

도 5는 클램핑 24시간 후 PrC-210이 용량 의존적으로 좌측 신장 카스파아제 활성에 대해 억제함을 나타낸다. 클램핑 20분 전에 PrC-210의 사용량을 1회 IP주사 투여하고 24시간 때 카스파아제의 활성을 측정한다. PrC-210의 사용량은 전에 야생형 마우스에서 확정된 IP 최대 내성 용량(MTD, 즉 504ug/g 체중(b.W.))의 분획으로 표시한다.

도 6은 신장이 I-R에 의해 30분 동안 손상된 후, 24시간 때 신장 카스파아제 수준을 감소시키는 각 도시된 아미노티올(및 이의 구조)의 기능을 나타낸다. 좌측 신장의 30분 클램핑을 개시하기 20분 전에 1회 복강내 주사방식으로 0.24MTD 용량의 각 아미노티올을 마우스에 투여한다. 24시간 후, 신장을 수집하고 카스파아제의 활성을 측정한다.

도 7은 전신 용량의 PrC-210을 투여받고, 10분 후 심근경색 허혈-재관류 모델에서 좌측 관상동맥 결찰과 해제(40분 후)를 진행한 마우스의 심근 사멸이 현저히 감소되었음을 나타낸다. 심장에 대하여 관상동맥 결찰-해제를

진행하여 I-R 손상 후 24시간에 심장 중의 살아있는 조직(live tissue)에 대하여 염색을 진행한다.

도 8은 심근조직세포 배지에 PrC-210을 동시에 첨가함으로써 과산화수소가 유발하는 심근세포사멸을 현저히 감소할 수 있음을 나타낸다.

도 9는 PrC-210은 X선에 복사된 인간 혈액 임파구 중의 γ -H2AX 병소(즉 ROS에 의해 유발된 DNA 이중쇄 절단)를 현저히 억제시킴을 나타낸다. 인간 전혈 샘플에 지정된 농도(0 내지 23mM)의 PrC-210을 첨가하고 2시간 후, 전혈 샘플에 대하여 100mGy 복사를 진행한다.

도 10의 왼쪽 도는 이미포스틴이 페렛 모델에서 오심과 구토반응을 유발함을 나타내고, 오른쪽 도는 PrC-210이 페렛 모델에서 오심과 구토반응을 유발하지 않음을 나타낸다.

도 11은 PrC-210이 저혈압 부작용을 일으키지 않음을 나타낸다. 왼쪽 상단 도면은 이미포스틴을 투여한 후 기록한 혈압을 나타낸다. 왼쪽 하단 도면은 PrC-210을 투여한 후 기록한 혈압을 나타낸다.

도 12는 마우스의 위에 (A) 1회 복강 내 주사 또는 (B) 1회 경구 가비지(oral gavage)를 통해 분자를 전달한 후, 다양한 시간에 활성 PrC-210 티올 형태의 마우스 혈장 수준을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

실시예 1

본 발명에서 제공한 기술의 실시방안을 개발하는 과정에서, 실험에 따르면 초나선 형태(Supercoil)와 절단된 형태(nicked form)를 구비하는 형태로 나타내도록 아카로스 겔상에서 pUC19 플라스미드를 분리할 수 있음을 증명하였다(도 2, 도 A). 결과에서 나타낸 바와 같이, 초나선 플라스미드 DNA 주쇄 중의 하나 또는 여러개의 결합이 X선 조사과정에서 생성된 활성 산소 물질(ROS)에 의한 화학적 공격(chemical attack)을 받아 파괴될 경우, 초나선 플라스미드 DNA가 절단된 형태로 되고 전기 영동 과정 중 아카로스 겔 상에서 초나선 플라스미드 DNA와 분리된다. 해당 실시예 중, X선 복사 동안에 생성된 ROS는 표준 국소 허혈 및 재관류 순환 동안에 형성된 동일한 ROS물질을 간단하게 모방하였다. 네이키드 플라스미드 DNA(naked plasmid DNA)에 대한 ROS-공격은 이완된 플라스미드(relaxed plasmid) 형태를 초래하여 겔 상에서 더욱 느리게 이동한다. 해당 실시예에서, x선 복사하기 15분 전에 지정된 소분자를 플라스미드 시험관에 단독 첨가하여 x선 복사 기간에 생성된 대량의 ROS에 대해 어떤 보호가 부여되는지를 확인(있을 경우)한다. 시험 분자를 pUC19 플라스미드 배양물(plasmid incubations)에 첨가한 15분 후, 시험관은 30분 동안 90Gy 방사를 받는다. (A) 배양물의 분액 시료(Aliquots)를 전기 영동하고, 브롬화 에티듐 염색된 겔에 대하여 정량 영상화를 진행하였다. Image J 소프트웨어를 사용하여 하위 밴드(초나선 형태)와 상위 밴드(열린 형태)의 강도를 정량화 한다. (B) Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 밴드의 강도를 플로팅(plotted) 한다. (C) 일부 측정된 분자의 구조를 나타낸다. 배양물에 PrC-210, WR-1065 또는 시스테아민을 첨가함으로써 각 ROS-유발 손상된 플라스미드 DNA에 대한 용량-의존적 억제가 발생한다.

실시예 2

본 발명의 실험은 플라스미드 DNA를 \cdot OH 발생기($H_2O_2 + UV$ light; Floyd et al., J Biochem Biophys Methods 1984; 10: 221-235)의 60초 펄스에 노출시킨 후, pUC19 플라스미드 DNA의 초나선 형태 및 절단된(nicked) / \cdot OH 손상 형태의 아카로스겔 분리를 나타낸다(도 3). 초나선 DNA과 물(라인 a, b)또는 20mM PrC-210(라인 c-h)을 지정시간 동안 배양시킨 후, \cdot OH 발생기 중에 1분 동안 노출시킨다. 각 반응의분액 시료에 대해 전기 영동하고 EtBr로 염색하여 디지털 이미지화 한다. 반응 및 겔화의 3회 반복을 완성하고, Image J 소프트웨어를 사용하여 밴드의 강도를 정량화 한다. 라인 a와 g의 초나선 밴드의 강도를 비교하기 위한 P값을 지정한다. \cdot OH 손상 전 30초내에 PrC-210을 첨가하면 ROS DNA 손상을 완전히 억제할 수 있다.

실시예 3

실험에 따르면, PrC-210 (0.24MTD=0.116 mg/g체중)을 1회 복강(IP) 주사하면, 신장에 대한 I-R 손상 24시간 후 신장 카스파아제의 수준이 84% 낮아지며, 혈액 요소 질소(BUN) 수준도 유사하게 낮아짐을 증명한다(도 4). (A) 실험설계: 모든 군에 대해 좌측(LT) 허혈(클램핑(clamp)) 30분 및 우측(RT) 신장절제술을 실시한 후, 24시간 재관류를 진행한다. LT 신장 클램핑 20분 전에 1회 복강내 주사하는 방식으로 PrC-210을 투여한다. 24시간 때, 혈청 및 LT 신장을 수집한다. (B) 신장 상청액 카스파아제 활성의 측정은 다음과 같다: Apo-ONE 형광 기질 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 신장 파쇄액 상청액 중의 카스파아제-3과 카스파아제-7의 활성을 측정한다.

간단히 말하자면, 해동된 신장을 8배를 넘는 과량의 용해 완충액(50mM Na HEPES, pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM DTT, 10% 글리세롤을 포함)과 혼합하고, 4°C에서 스테인리스 스틸 블레이드 균질기(5000rpm)로 30초 동안 균질화시킨다. 그리고 4°C인 Eppendorf 5418 마이크로 원심분리기에서 16000Xg으로 20분 동안 원심 분리시킨다. 얻은 상청액을 즉시 냉동하여 -70°C에 저장한다. 소 혈청 알부민을 사용하여 Bradford 방법을 통해 상청액 단백질을 측정한다. 카스파아제의 측정은 다음과 같다: 상기 용해 완충액으로 38 μg의 상청액 단백질을 총 체적이 50 μL 되도록 희석하고, 흑색 96-웰 플레이트의 웰에서 50 μL의 Apo-ONE 기질과 혼합하여 60분 동안 반응을 시작한다. 37°C에서 상기 플레이트를 200rpm으로 60분 동안 진탕시킨다. BMG Clariostar 형광 패널 판독기를 사용하여 499nm 여기 파장과 521nm 방사 파장에서 DEVD 카스파아제 기질 펩타이드의 분해(DEVD caspase substrate peptide cleavage)를 측정한다. 각 실험은 카스파아제 표준품을 포함한다. (C) 클램핑 후 24시간 때 수집한 혈청 중의 BUN 수준을 I-R 손상 후 24시간 내의 신장 건강의 기능 지표로서 측정한다.

- [0061] 실시예 4
- [0062] 실험에 따르면 세가지 사용량 범위(0.105MTD, 0.152MTD, 0.230MTD=0.053, 0.077, 0.116mg/g체중)로 PrC-210을 1회 IP 주사하면, 신장에 대한 I-R 손상 24시간 후 측정된 신장 카스파아제는 PrC-210 용량 의존적으로 낮아짐을 증명한다(도 5).
- [0063] 실시예 5
- [0064] 실험을 통해 각각 0.24MTD 용량(PrC-210 MTD=504ug/gm체중; PrC-211 MTD=500ug/gm체중; PrC-252 MTD=287ug/gm체중)으로 PrC-210, PrC-211 또는 PrC-252를 1회 IP 주사하면, 신장에 대해 I-R 손상시킨 후 24시간 때 신장 카스파아제 수준은 현저히 낮아짐을 증명한다(도 6).
- [0065] 실시예 6
- [0066] 실험에 따르면, 좌측 관상동맥을 고의로 결찰한 마우스에 대하여 PrC-210 (0.252mg/g 체중, 30분 후 0.05mg/gm 체중)을 2회 IP 주사하면(도 7을 참조), 40분 동안 결찰된 동맥을 해제시킨 후 24시간 때 염색된 죽은 조직의 총 심근 백분율은 평균 36% 낮아짐을 증명한다. PrC-210을 주사한 마우스에서 수술에 의해 유발되는 "경색"(동맥을 40분 동안 결찰시킴)으로 인한 심근 조직의 죽음 정도는 대조군으로 식염수를 주사한 마우스에서의 심근 조직의 죽음 정도보다 현저히 낮다(P=0.0143).
- [0067] 실시예 7
- [0068] 실험에 따르면, 3일령 마우스로부터 유래되는 1차 신생 심근세포(30000개/96웰)를 함유하는 배양홀의 조직 배양 배지에 2.3mM의 PrC-210을 첨가하면, 증가되는 농도로 H₂O₂를 세포에 첨가하여 유발된 심근 세포사멸을 현저히 감소시킬 수 있음을 증명한다(도 8을 참조). 본 실시예에서, H₂O₂를 첨가하기 전 15분 또는 30초에, PrC-210을 배지에 첨가하면 동일한 결과를 나타내는데, H₂O₂에 의해 유발되는 세포사멸은 약 80% 제거되었다.
- [0069] 실시예 8
- [0070] 본 발명의 실험이 나타낸 바와 같이, PrC-210은 x선 복사된 인간 혈액 림프구에서 γ-H2AX 병소(foci)(DNA 이중가닥 절단의 표시)의 형성을 고도로 현저히 억제시킨다(도 9). 인간 전혈 샘플에 지정된 농도(0 내지 23mM)의 PrC-210을 첨가하고, 2시간 후 샘플에 대하여 100mGy의 복사를 진행한다. 압도: 인간 림프구 중 γ-H2AX 병소(녹색)의 면역 염색; 세포핵은 4,6-디아미디노-2-페닐인돌로 염색; 약물을 접수하지 않았거나, 23mM PrC-210(100mGy + PrC-210)을 수여받은 후 2시간 때 100mGy의 x선으로 전혈 샘플에 대해 복사를 진행한다.
- [0071] 실시예 9
- [0072] 실험에 따르면(표 2), 랫트에 x선 복사 30분 전에 1회 IP 주사 또는 4회 국소 응용하는 것으로 지정된 아미노티올을 투여한 후, 랫트 등부 피부의 지정된 구형 영역(1.5 x 3.0cm)에 17.2Gy의 단일 x선 조사량으로 조사를 진행할 경우, 방사성 피부염이 완화됨을 증명한다. 약물 응용 및 복사 후 13일 때, 복사 후 피부 영역내에서 x선에 의해 유발되는 방사성 피부염의 중증도에 대하여 평가를 진행한다. 이러한 아미노티올 ROS 제거제 분자를 랫트 피부에 국소 투여 또는 복강내 투여하면, 랫트 피부 복사 기간 동안 x선에 의해 생성된 ROS가 일으키는 방사성 피부염을 100% 억제시킨다.

표 2

[0073]

국소(또는 복막내(IP))투여된 아미노티올의 방사성 피부염 예방

분자 명칭	MW	(1)약물 투여량	(2)약물 응용 경로	n	(3) 이온화 방사선-ROS에 의해 유발된 피부염(%청결 피부 ^a)
용매(Vehicle)	-	-	외용	12	0%
PrC-210	148	370mM (50:30:20) ^b 1200mM (0:90:10) ^b	외용	10	100
				4	100
		200ug/g b.w	IP	2	100
PrC-211	120	1400mM (50:30:20) ^b 2200mM (0:90:10) ^b	외용	3	55
					100
			IP	3	87
PrC-252	105	실험1 300mM 600mM 900mM 1800mM	외용	3	10
				3	45
				3	57
				3	68
			외용	3	70
				2	100
		180ug/g b.w	IP		
아미포스틴	214	100mM	외용	4	0

[0074] ^a 17.3Gy 방사선량을 랫트 등의 1.5cm x 3.0cm 직사각형 구역에 조사한 후 13일 동안 딱지 물질(scab material) 없는 조사된 피부의 백분율

[0075] ^b (에탄올: 프로필렌 글리콜: 물)

[0076] 실시예 10

[0077] 실험에 따르면, 인간과 동일한 오심/구토 반응을 구비하는 페럿이 피하 주사 방식으로 마우스 0.5MTD 용량 아미포스틴의 페럿 당량 용량(equivalent dose)을 투여받을 경우, 페럿 네마리 모두(여기서, 062와 089의 데이터를 나타냄)가 명확한 오심과 구토가 발생하였다(도 10, 왼쪽 도). 이는 마우스 0.5MTD 용량 아미포스틴의 인간 당량 용량을 투여받은 인간 사례에서 보고된 오심/구토의 높은 발생율을 복제하였다.

[0078] 도 10의 오른쪽 도에 나타난 바와 같이, 10마리의 페럿 각각에 피하 주사 방식으로 마우스 0.5MTD 용량 PrC-210의 페럿 당량 용량을 투여받을 경우, 이 10마리 페럿(123과 A43의 데이터를 나타냄)에서 어떠한 확인가능한 오심 또는 구토 반응도 발생하지 않았다.

[0079] 양성 대조군으로서, 아미포스틴 또는 PrC-210 유발용량을 투여한 후 2주 동안 휴식시키고 모든 페럿에 1회 유발용량(single challenge dose)의 공지된 구토유발제(emetogen)인 로페라미드(loperamide)를 투여하였으며, 14마리 페럿 전부가 강렬한 오심과 구토 반응을 나타낸다. 이러한 데이터는 도 10에서 삼도로 나타났다.

[0080] 실시예 11

[0081] 실험에 따르면, 혈압을 측정하도록 동맥 삽관이 되어 있는 랫트가 마우스 0.5MTD 용량의 아미포스틴의 랫트 당량 1회 IP 용량을 투여받을 경우, 즉시 비가역적 혈압 강하가 발생되며, 유발용량의 IP 에피네프린은 혈압에 대하여 식별가능한 효과를 나타내지 않음을 증명한다(도 11). 기록 기간 동안 랫트의 만성 저혈압은 식별가능한 눈 표현형/독성(ocular phenotype/toxicity)과 관련된다.

[0082] 마우스 0.5MTD 용량의 PrC210의 랫트 당량 1회 IP 용량을 투여받은 카테터가 삽관되어 있는 랫트는 혈압 강하가 나타나지 않았고, 유발용량의 IP 에피네프린은 혈압이 현저히 높아지게 한다.

[0083] 실시예 12

[0084] 실험에 따르면, PrC210은 통상적인 티올 화합물의 유해한 냄새(즉 황 냄새)를 구비하지 않음을 증명한다. 대략 예상하는 PrC-210의 1회 인간 투여량의 상한의 PrC-210 용액 및 2-머캅토에탄올(2-ME)의 계열 희석액에 실험 피

험자를 노출시킨다. PrC-210과 2-ME 희석액의 냄새를 비교하는 것을 통해, 각 피험자는 PrC-210에 대한 "냄새 점수"를 지정하였다; 냄새 점수는 1회 인간 투여량의 PrC-210의 황 티올 냄새에 가장 가까운 2-ME 희석액의 황 티올 냄새를 의미한다. 한 명의 피험자가 지정한 냄새 점수는 8이고, 다른 한 명의 피험자가 지정한 냄새 점수는 7이며, 이는 각각 1:18750 및 1:93750으로 희석된 2-ME에 대응된다. 이러한 결과는 1회 최대 인간 투여량 농도의 PrC-210의 티올 냄새는 2-ME보다 약 56250배 낮다는 것을 표시한다(예를 들어, 93750-18750=75000; 75000 ÷ 2=37500; 37500+18750=56250). 2-ME를 56250배로 희석하면 냄새는 거의 없게 된다.

표 3

[0085]

2-ME 바이얼	2-ME 희석배수	피험자 1 PrC-210 냄새점수 ^A	피험자 2 PrC-210 냄새점수 ^A	평균 PrC-210 냄새점수
				7.5
1	1			PrC-210 1회 최대 투여량의 티올 냄새는 2-ME보다 56250배 낮음 즉, 93750 - 18750 = 75000 ÷ 2 = 37500 + 18750 = 56250-배 희석 [이는 거의 냄새가 없다]
2	5			
3	25			
4	125			
5	625			
6	3,125		7	
7	18,750			
8	93,750	8		
9	468,750			
10	2,343,750			

[0086]

^A 즉, 2-ME(2-머갑토포에탄올) 바이얼의 "티올 냄새" 득점은 PrC-210 약병의 "티올 냄새" 득점과 동일하되, PrC-210 바이얼에는 PrC-210 1회 인간 투여량의 상한범위로 계산된 용량을 포함한다.

[0087]

실시예 13

[0088]

일반적으로 심정지액(Cardioplegia Solution)을 사용하여 인간의 심장을 플러싱(flush)하고, 이 과정에서 심장이 박동을 멈추게 한다. 그리고 박동되지 않는 심장에 대하여 외과 수술(예를 들어, 관상 동맥 우회술 또는 관막 성형수술)을 진행한다. 해당 심정지액의 하나의 예는 다음 성분들을 포함한다(용액 1 리터당):

[0089]

-110mmol 나트륨

[0090]

-16mmol 마그네슘

[0091]

-160mmol 클로라이드

[0092]

-16mmol 칼륨

[0093]

-1.2mmol 칼슘

[0094]

pH가 7.4-7.8에 도달되도록 하는 충분한 탄산수소나트륨.

[0095]

실시예 14

[0096]

장기 보존 용액의 하나의 예로서 "Belzer UW Cold Storage Solution"은 위스콘신 대학에서 발명한 것으로서, 일반적으로 장기 수용자에게 이식하기 전까지, 4°C에서 장기 기증자로 부터 취출한 장기를 플러싱하여 유지시키기 위해 사용되는데, 이는 다음과 같은 성분을 포함한다:

표 4

[0097]

Belzer UW ® Cold Storage Solution

구성분	G/L	MMOL/L
히드록시에틸전분(Pentafraction)	50.0	NA
락토바이오닉애씨드(락톤)	35.83	105
인산2수소칼륨	3.4	25

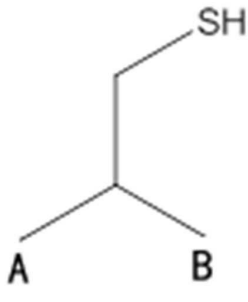
황산마그네슘 7수화물	1.23	5
라피노오스5수화물(Raffinose pentahydrate)	17.83	30
아데노신	1.34	5
알로푸리놀	0.136	1
총 글루타티온	0.922	3
수산화칼륨*	5.61	100
수산화나트륨/염산(pH 7.4로 조절)		
주사용 증류수, 충분한 양		

[0098] 실시예 15

[0099] 실험에 따르면(도 12), 마우스에 0.5MTD IP PrC-210 용량(252ug/gm 체중)을 1회 IP 주사로 0.5MTD 경구 PrC-210 용량(900ug /gm 체중)을 또는 단일 경구 캐비지로 투여한 경우, 활성 형태 PrC-210 티올의 식별가능한 혈장 수준(discernible plasma levels)을 장기간 측정할 수 있음을 증명한다. 혈장 농도가 1-3mM인 PrC-210 티올은 복사에 의해 유발되는 사망을 완전 억제시키는 것과 관련된다. 반면, 용매 처리하고 복사받은 마우스는 복사에 의해 유발되는 사망이 100% 발생된다.

[0100] 본 발명 실시방안

[0101] 1. 상기 세포를 하기 화합물과 접촉시키는 단계; 를 포함하며;

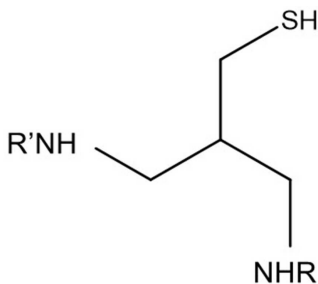


[0102] 여기서, A=-CH₂NHR', B=-CH₂NHR 또는 A=-NRR', B=H이며;

[0104] 여기서, R과 R'는 독립적으로 H, 알킬기, 헤테로알킬기로 부터 선택되며,

[0105] 조건은 B=H일 경우, R과 R'는 모두 H가 아닌 것을 특징으로 하는 허혈 이벤트 영향을 받는 세포에서 허혈-재관류 세포사멸을 감소 또는 예방하는 방법.

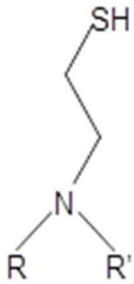
[0106] 2. 실시방안 1에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 구비하는 화합물이며:



[0107]

[0108] 여기서, R과 R'는 독립적으로 H, 알킬기와 헤테로알킬기로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

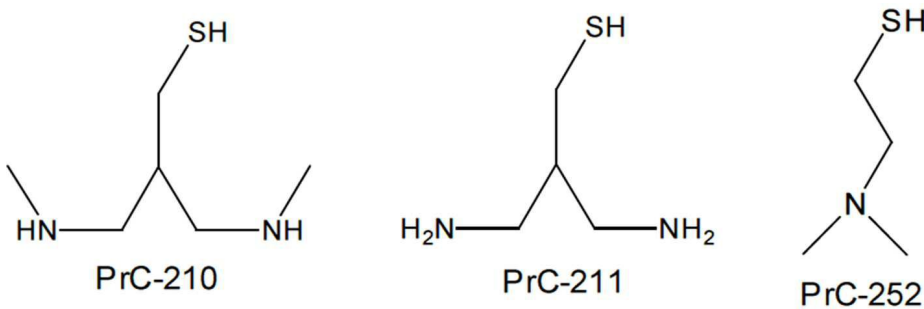
[0109] 3. 실시방안 1에 있어서, 상기 화합물은 하기에 따른 구조를 포함하며:



[0110]

[0111] 여기서, R과 R'는 독립적으로 H, 알킬기, 헤테로알킬기로부터 선택되며, 조건은 R과 R'는 적어도 하나가 H가 아닌 것을 특징으로 하는 방법.

[0112] 4. 실시방안 1에 있어서, 상기 화합물은 PrC-210, PrC-211와 PrC-252로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.



[0113]

[0114] 5. 실시방안 1에 있어서, 세포사멸을 감소 또는 예방하는 것을 통해 세포사멸을 감소 또는 예방하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0115] 6. 실시방안 1에 있어서, 상기 화합물과 접촉하지 않는 세포에 비해, 상기 화합물과 접촉하는 세포 중의 카스파아제의 활성이 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

[0116] 7. 상기 임의의 한 실시방안에 있어서, 활성 산소 물질을 제거하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0117] 8. 상기 임의의 한 실시방안에 있어서, 세포의 DNA가 활성 산소 물질의 영향을 받지 않도록 보호하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0118] 9. 실시방안 1에 있어서, 상기 세포는 이식 장기의 일부분인 것을 특징으로 하는 방법.

[0119] 10. 실시방안 9에 있어서, 수용자에게 이식하기 전에 세포와 상기 화합물을 접촉시키는 것을 특징으로 하는 방법.

[0120] 11. 실시방안 9에 있어서, 상기 화합물은 장기 보존 용액 또는 장기를 플러싱하기 위한 용액의 일부분인 것을 특징으로 하는 방법.

[0121] 12. 실시방안 9에 있어서, 장기를 제거하기 전 및 장기를 제거하는 동안에 상기 화합물을 공여자에게 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0122] 13. 실시방안 1에 있어서, 피험자(Subject)에게 상기 화합물을 전신 투여하면 상기 피험자에서 허혈-재관류에 의한 세포사멸을 감소 또는 방지하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0123] 14. 실시방안 13에 있어서, 상기 화합물은 상기 피험자가 허혈-재관류에 의한 장기 독성 작용의 영향을 받지 않도록 보호하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0124] 15. 실시방안 13에 있어서, 상기 화합물은 재관류 전과 재관류 동안의 허혈-재관류에 의한 세포사멸을 예방하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0125] 16. 실시방안 13에 있어서, 상기 피험자는 이식 수용자인 것을 특징으로 하는 방법.

[0126] 17. 실시방안 13에 있어서, 상기 피험자는 심장병(Heart attack)을 앓고 있거나 심장병의 위험에 처해 있는 것

을 특징으로 하는 방법.

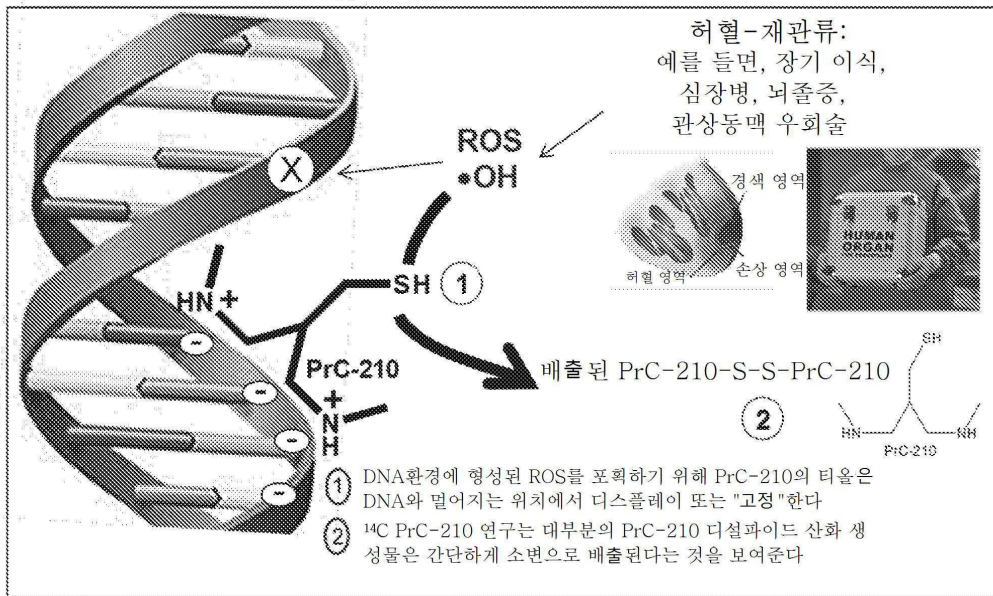
- [0127] 18. 실시방안 13에 있어서, 상기 피험자는 뇌졸중을 앓고 있거나 뇌졸중의 위험에 처해 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0128] 19. 실시방안 13에 있어서, 허혈-재관류 이벤트 전, 허혈-재관류 이벤트 진행 동안 또는 허혈-재관류 이벤트 후의 유효 시간(effective time before, during or after the ischemia-reperfusion event)에 유효량의 상기 화합물을 전신 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0129] 20. 상기 임의의 한 실시방안에 있어서, 상기 화합물은 산부가염의 형태인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0130] 21. 실시방안 1에 있어서, 상기 세포는 심장 외과 수술의 일부분으로 심정지액이 관류된 심장의 일부분인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0131] 22. 실시방안 1에 있어서, 상기 화합물을 장기가 I-R 손상을 받지 않도록 보호하는 임의의 플러싱 용액에 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0132] 23. 실시방안 1에서 정의된 화합물을 약 1 내지 약 100밀리몰의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 장기 관류 용액.
- [0133] 24. 실시방안 1에 정의된 바와 같은 화합물의 단위용량에 있어서, 관통 가능한 격막을 가지는 공기를 제거한 바이알에서 상기 화합물이 산성염의 결정 또는 동결건조 분말 형태로 구성되고, 상기 격막은 상기 화합물의 최종 농도가 1 내지 100mM에 달하게 장기 보존 용액, 심정지액 또는 IV백에 첨가되도록 액체의 재구성이 구현될 수 있는 상기 화합물의 단위용량.
- [0134] 25. 실시방안 1에서 정의된 화합물을 약 1 내지 약 100밀리몰의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 심정지액.
- [0135] 26. 0.5-5mM의 혈장 농도에 도달되도록 환자에게 경구 전달되는 것을 특징으로 하는 실시방안 1에 정의된 화합물의 건조된 정제 또는 캡슐 형태.
- [0136] **참고문헌**
- [0137] Abt, G., Vaghef, H., Gebhart, E., Dahlgren, C.V., and Hellman, B. The role of N-acetylcysteine as a putative radioprotective agent on X-ray-induced DNA damage as evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat. Res.*, 384: 55-64, 1997.
- [0138] Chok MK, Conti M, Almolki A, Ferlicot S, et al. Renoprotective potency of amifostine in rat renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Dec; 25(12): 3845-51. doi: 10.1093/ndt/gfq314. Epub 2010 Jun 4.
- [0139] Chronidou F¹, Apostolakis E, Papapostolou I et al. Beneficial effect of the oxygen free radical scavenger amifostine(WR-2721) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *J Cardiothorac Surg*. 2009 Sep 17; 4: 50. doi: 10.1186/1749-8090-4-50.
- [0140] Kao, L.W., Kirk, M.A., Furbee, R.B., Mehta, N.H., Skinner, J.R., and Brizendine, E.J. What is the rate of adverse events after oral N-acetylcysteine administered by the intravenous route to patients with suspected acetaminophen poisoning? *Ann. Emerg. Med.*, 42: 741-750, 2003.
- [0141] Kataoka, Y., Murley, J.S., Baker, K.L., and Grdina, D.J. Relationship between phosphorylated histone H2AX formation and cell survival in human microvascular endothelial cells(HMEC) as a function of ionizing radiation exposure in the presence or absence of thiol-containing drugs. *Radiat. Res.*, 168: 106-114, 2007.
- [0142] Olsson, B., Johansson, M., Gabrielsson, J., and Bolme, P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 34: 77-82, 1988.
- [0143] Pakravan, N., Waring, W.S., Sharma, S., Ludlam, C., Megson, I., and Bateman, D.N. Risk factors and mechanisms of anaphylactoid reactions to acetylcysteine in acetaminophen overdose. *Clin. Toxicol.*, 46: 697-702, 2008.
- [0144] Peebles, D.D., Soref, C.M., Copp, R.R., Thunberg, A.L., and Fahl, W.E. ROS-Scavenger and

radioprotective efficacy of the new PrC-210 aminothiols. *Radiat. Res.*, 178: 57-68, 2012.

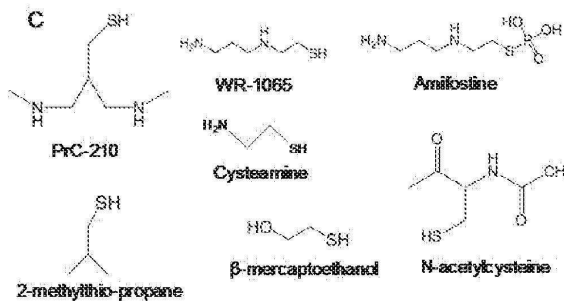
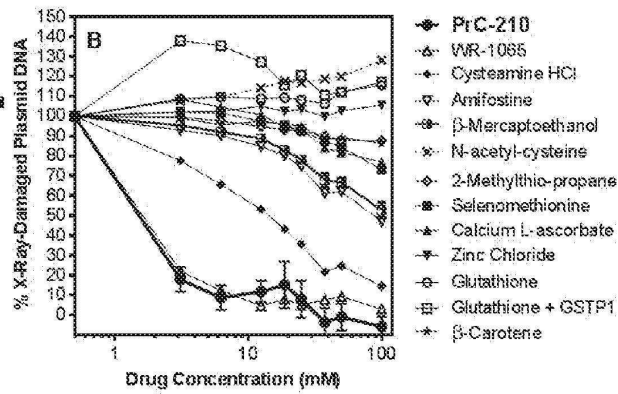
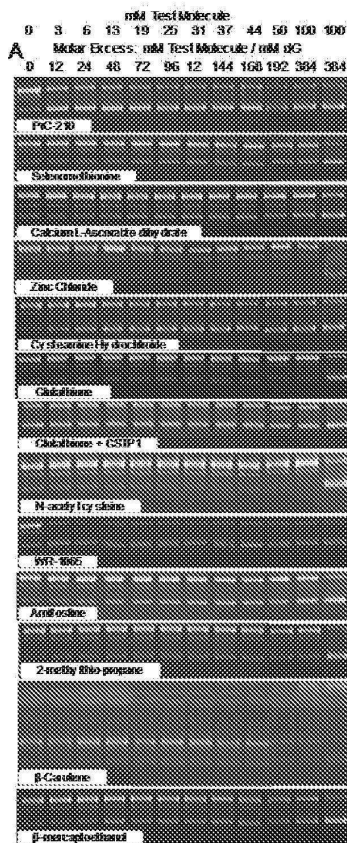
- [0145] Prescott, L. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? *Ann. Emerg. Med.*, 45: 409-413, 2005.
- [0146] Ryan, S.V., Carrithers, S.L., Parkinson, S.J., Skurk, C., Nuss, C., Pooler, P.M., Owen, C.S., Lefer, A.M., and Waldman, S.A. Hypotensive mechanisms of amifostine. *J. Clin. Pharmacol.*, 36: 365-373, 1996.
- [0147] Saad KR, Saad PF, Dantas Filho L, Brito JM, et al. Pulmonary impact of N-acetylcysteine in a controlled hemorrhagic shock model in rats. *J Surg Res.* 2013 Jun 1; 182(1): 108-15. doi: 10.1016/j.jss. 2012.07.037. Epub 2012 Aug 2.
- [0148] Samuni, A.M., DeGraff, W., Cook, J.A., Krishna, M.C., Russo, A., and Mitchell, J.B. The effects of antioxidants on radiation-induced apoptosis pathways in TK6 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 37: 1648-1655, 2004.
- [0149] Sandilands, E.A., and Bateman, D.N. Adverse reactions associated with acetylcysteine. *Clin. Toxicol.*, 47: 81-88, 2009.
- [0150] Silva SM¹, Carbonel AA, Taha MO, Montero EF. Proliferative activity in ischemia/reperfusion injury in hepatectomized mice: effect of N-acetylcysteine. *Transplant Proc.* 2012 Oct; 44(8): 2321-5. doi: 10.1016/j.transproceed. 2012.07.009.
- [0151] Soref, C.M., Hacker, T.A., and Fahl, W.E. A new orally active, aminothiol radioprotector-free of nausea and hypotension side effects at its highest radioprotective doses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 82: e701-e707, 2012.
- [0152] Turkmen S, Mentese A, Karaguzel E, Karaca Y, et al. A comparison of the effects of N-acetylcysteine and ethyl pyruvate on experimental testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertil Steril.* 2012 Sep; 98(3): 626-31. doi: 10.1016/j.fertnstert. 2012.05.034. Epub 2012 Jun 19.
- [0153] Wu SZ, Tao LY, Wang JN, Xu ZQ, Wang J, Xue YJ, et al. Amifostine Pretreatment Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 4130824. doi: 10.1155/2017/4130824. Epub 2017 Mar 14.

도면

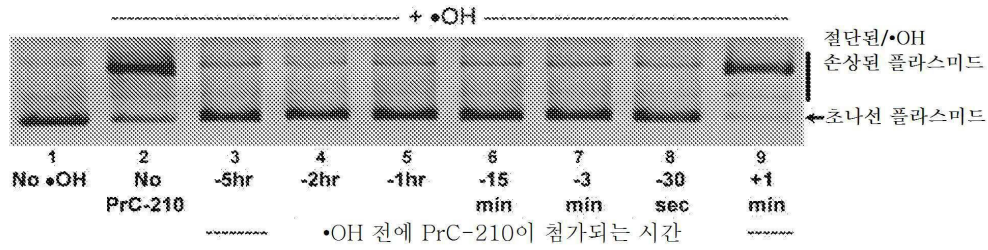
도면1



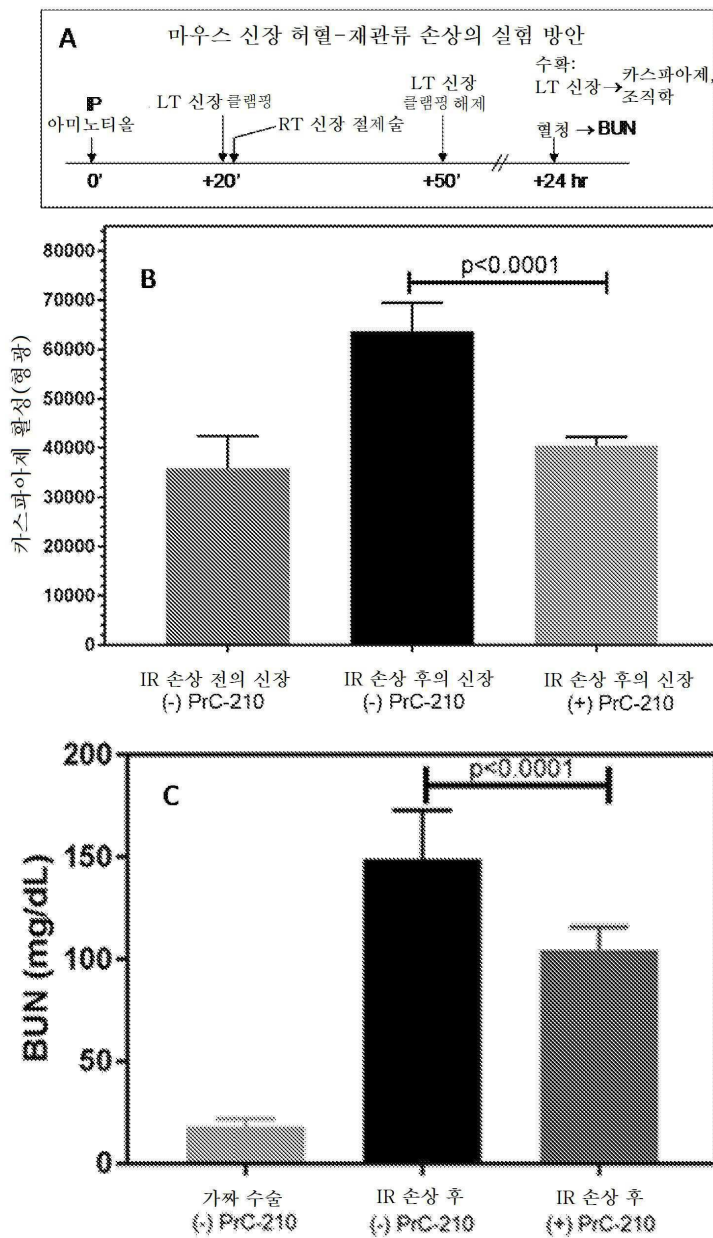
도면2



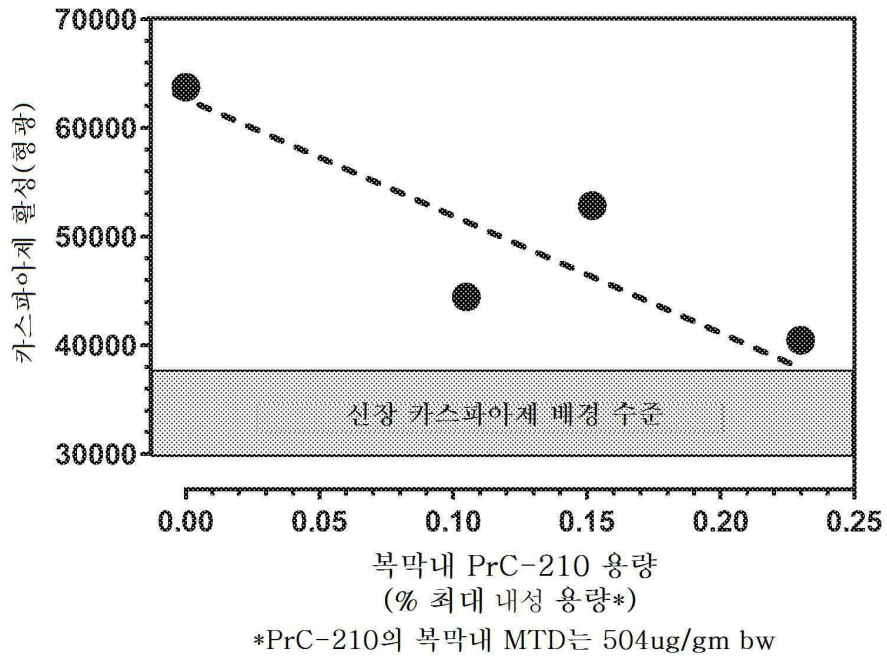
도면3



도면4

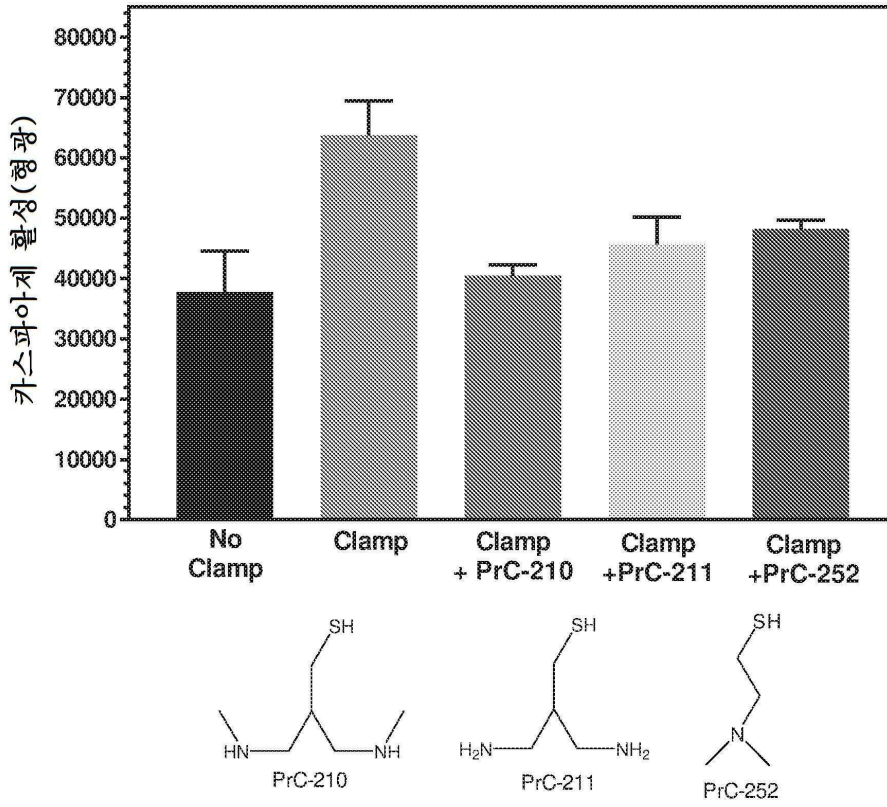


도면5

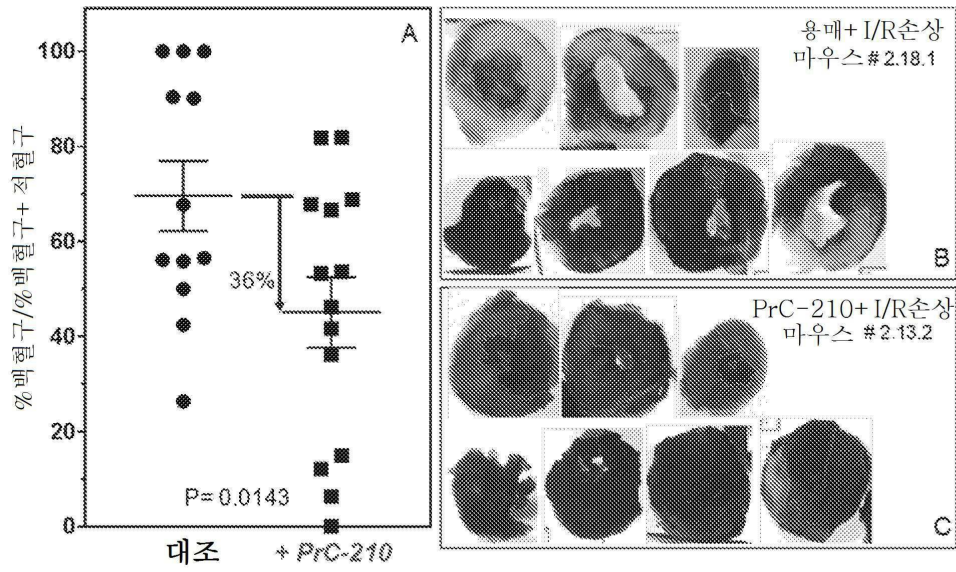


도면6

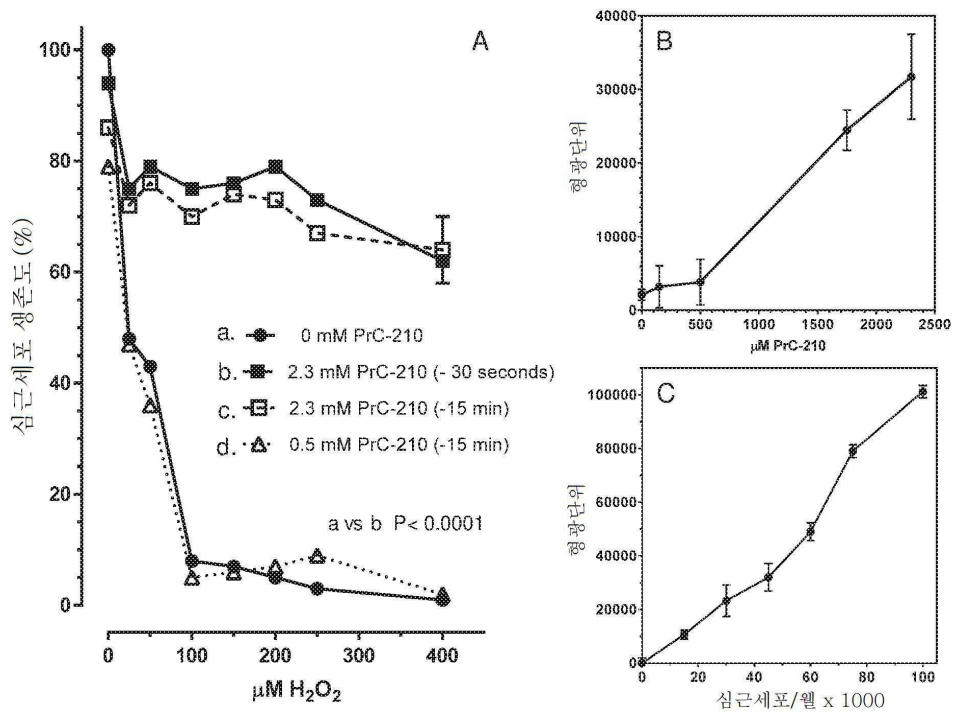
마우스 신장 I-R 카스파아제 개요



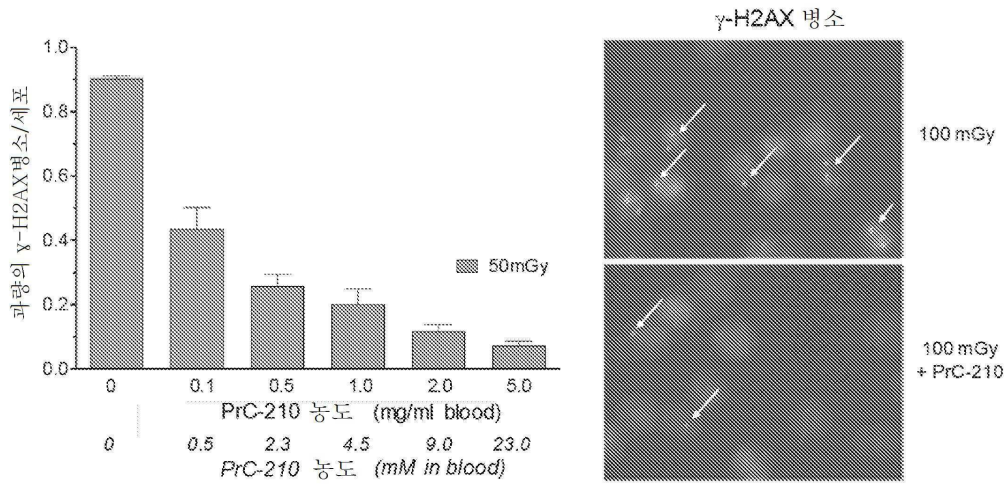
도면7



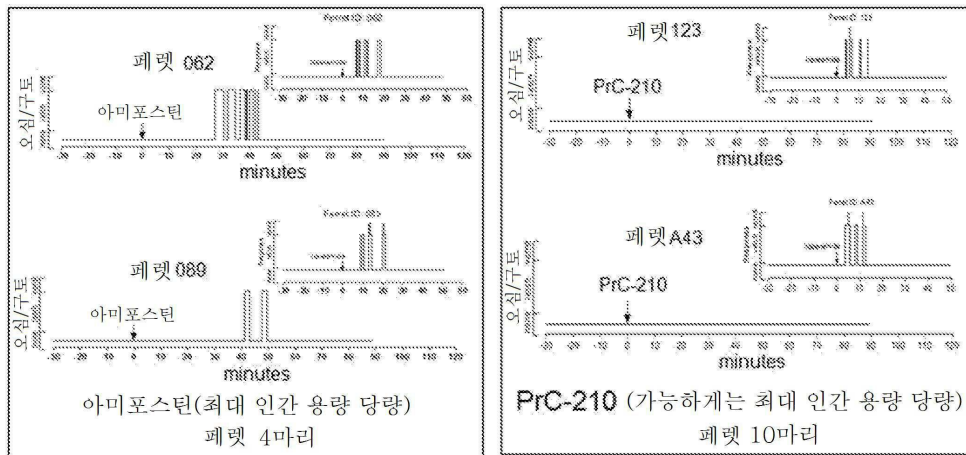
도면8



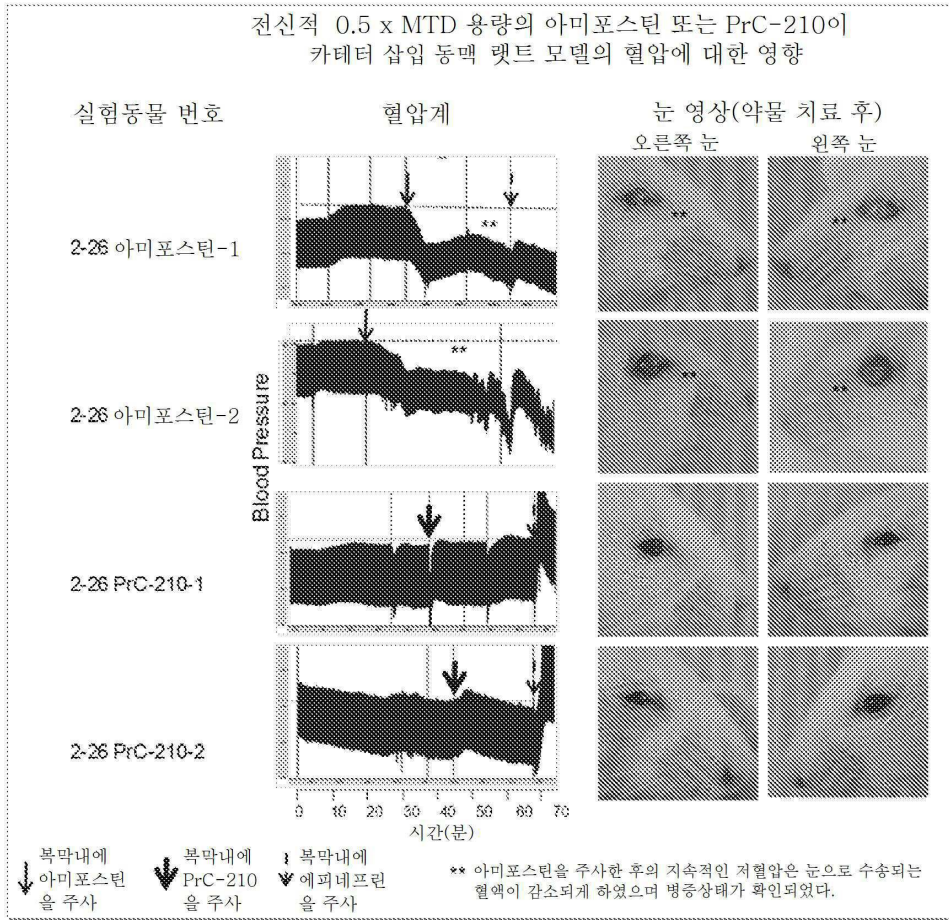
도면9



도면10



도면11



도면12

