(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월27일
(11) 등록번호 10-1690390
(24) 등록일자 2016년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/505* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2014-7010441(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년05월11일
심사청구일자 2014년05월16일
(85) 번역문제출일자 2014년04월18일
(65) 공개번호 10-2014-0052087
(43) 공개일자 2014년05월02일
(62) 원출원 특허 10-2009-7025806
원출원일자(국제) 2007년05월11일
심사청구일자 2012년05월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/011365
(87) 국제공개번호 WO 2008/140449
국제공개일자 2008년11월20일
(56) 선행기술조사문헌
US6071899 A
OUEN et al., Annals of Neurology 59(1). 139-44 January 2006 (01 2006)
SADOWSKI et al., PNAS 103(49): 18787-18792 05 December 2006

(73) 특허권자
토마스 제퍼슨 유니버시티
미합중국 펜실베니아 19107 필라델피아 월너트 스트리트 1020
로언 유니버시티
미국 08028 뉴저지 글래스보로 뮬리카 힐 로드 201
(72) 발명자
시, 이
미국 19061 펜실베이니아주 부스윈 노스 밸런타인 드라이브 21
나겔, 로버트
미국 08012 뉴 저지주 터너스빌 인디언 버치 로드 17
(74) 대리인
양영준, 양영환

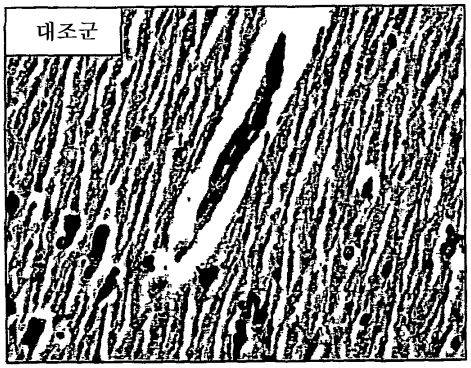
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **신경변성 질환 및 장애의 치료 및 예방 방법**

(57) 요 약

본 발명은 Lp-PLA_2를 억제함으로써 신경변성 질환 및 신경학적으로 관련된 장애를 치료 및 예방하는 데에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다. 이러한 조성물 및 방법은 비정상적인 혈액 뇌 장벽 (BBB) 기능을 나타내는 질환 및 장애, 예를 들어 투과성 BBB를 수반한 신경변성 질환, 예를 들면 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병 및 혈관성 치매를 치료 및 예방하는 데에 유용하다.

대 표 도 - 도1a



명 세 서

청구범위

청구항 1

1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (SB480848)을 포함하는, 증가된 혈액 뇌 장벽 (BBB) 투과성과 연관된 질환 또는 질병을 갖는 대상체에서 증가된 혈액 뇌 장벽 (BBB) 투과성과 연관된 질환 또는 질병을 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물이며,

여기서 증가된 혈액 뇌 장벽 투과성과 연관된 질환 또는 질병은 안구 질병, 다발성 경화증 (MS), 신경변성과 연관된 CNS 질병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), AIDS 치매, 간질, 자가면역성 뇌염, 발작 및 수막염으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

여기서 제약 조성물이 대상체에서 BBB의 투과성을 저하시키는 것인,

제약 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (SB480848)을 포함하는, 투과성 혈액 뇌 장벽 (BBB)과 연관된 신경학적 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 투과성 혈액 뇌 장벽 (BBB)과 연관된 신경학적 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물이며,

여기서 신경학적 질환 또는 장애는 다발성 경화증 (MS) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

여기서 제약 조성물이 대상체에서 BBB의 투과성을 저하시키는 것인,

제약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로, 신경변성 질환 및 장애를 치료 및/또는 예방하는 방법, 보다 특히 Lp-PLA_2 단백질의 발현 및/또는 활성을 억제하는 작용제를 사용하여 비정상적인 혈액 장벽 투과성과 연관된 신경변성 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기존에 선행 분야에서 혈소판 활성화 인자 아세틸 가수분해효소 (PAF 아세틸 가수분해효소)로서 공지되기도 한 지단백질-관련 포스포리파제 A_2 (Lp-PLA_2)는 지단백질 지질 또는 인지질의 가수분해에 관여하는 포스포리파제 A_2 효소의 초족 구성원이다. 이는 손상에 대한 전신 염증 반응에 있어서 주요 역할을 하는 몇 가지 세포, 예를 들어 림프구, 단구, 대식 세포, T 림프구 및 비만 세포에 의해 분비된다.

[0003] LDL이 그의 산화 형태로 전환되는 동안, Lp-PLA_2는 산화적으로 변형된 포스파티딜콜린의 sn-2 에스테르를 가수분해시켜 라이소-포스파티딜콜린 및 산화적으로 변형된 지방산을 제공하는 데에 역할을 한다. Lp-PLA_2는 산화된 LDL과 연관된 절단형 인지질의 sn2 위치를 가수분해한다. 그 결과, 2가지 염증 세포 귀소 매개인자 [비-에스테르화 지방산 (NEFA) 및 LYSO PC]가 생성된다. NEFA와 LYSO PC 둘 다는 단구를 순환시키기 위한 화학유인물질이고, 대식 세포를 활성화시키는 데에 있어서 일정 역할을 하며 산화적 스트레스를 증가시킬 뿐만 아니라 T 림프구의 기능적 및 즉시형 반응에 영향을 미친다. Lp-PLA_2는 인간 및 돼지에서는 지단백질 B를 통하여 LDL 분자와 결합되고, 일단 동맥 벽에서는 산화 LDL이 Lp-PLA_2에 의해 가수분해되기 쉽다.

[0004] 이러한 Lp-PLA_2 작용에 따른 생성물 둘 다는 단구를 순환시키기 위한 강력한 화학유인물질이다. 따라서, 상기 효소는 동맥에 콜레스테롤 에스테르가 부하된 세포 축적에 대해 책임이 있어, 아테롬성 경화증의 초기 단계와 연관된 특징적인 '지방성 띠 (fatty streak)'를 유발시키는 것으로 여겨지므로, Lp-PLA_2 효소를 억제하는 것이 이러한 지방성 띠의 구축을 예방하는 데에 (라이소포스파티딜콜린의 형성 억제에 의해 이루어짐) 유용할 수 있고, 아테롬성 경화증을 치료하는 데에 유용할 수 있다.

[0005] 또한, Lp-PLA_2가 LDL 산화에 있어 직접적인 역할을 한다고 제안되었다. 이는 전반적인 산화 과정에 기여하고 이를 증강시키는 Lp-PLA_2 작용의 다가불포화 지방산-유래된 과산화지질 생성물에 기인한다. 이러한 개념과 일치하여, Lp-PLA_2 억제제는 LDL 산화를 억제한다. 따라서, Lp-PLA_2 억제제는 효소 활성과 연계해서 지질 과산화와 관련이 있는 모든 장애, 예를 들어 아테롬성 경화증 및 당뇨병과 같은 질환 이외에도 류마티스성 관절염, 심근 경색 및 재관류 손상과 같은 기타 질환에도 일반적으로 적용될 수 있다.

[0006] 수 많은 신경학적 장애의 임상 관리는 퇴행성, 외상성 또는 파괴성 신경학적 질환의 진행성과 이용 가능한 약리학적 제제의 심각한 부작용 및 제한된 효능으로 인해 좌절되었다. 헌팅톤병 (Huntington's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 중증 발작 장애 (예: 간질 및 가족성 자율신경 기능이상) 등의 질환은 이러한 질환을 완화시키거나 치유하기 위한 가장 통상적인 약리학적 시도들로부터 교묘하게 벗어났다.

[0007] 진행성 뇌 기능장애인 치매로 인해서는 일상적인 활동 제한이 점차적으로 증가하게 된다. 가장 잘 알려져 있는 치매 유형이 알츠하이머병이다. 이는 65세 이상 집단의 약 10%에게서 발병하고 80세 이상 집단에서는 약 40% 발병한다. 미국 내에서는 현재 대략 4백 5십만명이 이러한 장애를 앓고 있으며, 그 수는 앞으로 가파르게 상승할 것으로 예상되는데, 이는 이러한 인구 집단이 우리 사회에서 가장 급속하게 증가하는 집단이기 때문이다. 2050년까지 예방적 처치가 이루어지지 않는다면, 알츠하이머병에 걸린 미국인 수가 3배로 증가할 것으로 예상되며 (4백 6십만명에서 1천 4백만명으로 증가함), 미국 내에서 이러한 질병에 걸린 환자를 보살피는 데에 드는 비용도 매년 1천억 달러 이상이 될 것이다. 이러한 대유행으로 인해 인간의 신체적 고통과 재정적인 비용 둘 다의 측면에서 사회에 엄청난 영향을 미친다.

[0008] 혈관성 치매는 심혈관계 질환 및 심혈관계 병리학적 변화의 결과로서 허혈성, 허혈성-저산소성 또는 출혈성 뇌 병변으로부터 비롯되는 인지 기능 상실로서 정의된다 [참고: 예를 들어, G. C. Roman, Med. Clin. North. Am., 86, pp. 477-99 (2002)]. 혈관성 치매는 만성 진행성 장애이다. 혈관성 치매 증상으로는 인지 상실, 두통, 불면증 및 기억 상실이 있다. 혈관성 치매는 다중 소강 (lacune), 및 관류저하 병변, 예를 들어 경계 구역 경색증 및 허혈성 뇌실주위 백질뇌증 [빈스완거병 (Binswanger's disease)]에 의해 유발될 수 있다 [G. C. Roman, 상기 참고]. 중국, 일본 및 대한민국과 같은 아시아 국가에서는, 치매 환자의 60% 이상에게서 혈관성 치매가

관찰되고 있다.

[0009] 혈관성 치매의 치료는 전형적으로, 위험 인자 (즉, 고혈압, 당뇨병, 고지방 식이, 흡연, 피브리노겐 과잉혈증, 과호모시스틴혈증, 기립성 저혈압, 심부전증)의 제어와 관련이 있다 [G. C. Roman, 상기 참고]. 호르몬 대체 요법 및 에스트로겐 대체 요법이 여성에게서 치매 발병을 지연시킬 수 있었는지에 관한 연구 조사가 또한 수행되었다 [참고: E. Hogervorst et al., Cochrane Database Syst. Rev., 3, CD003799 (2002)]. 그러나, 이러한 호르몬 대체 요법은 부정적인 부작용을 나타낸다.

[0010] 더우기, 아스피린이 혈관성 치매에 대해 광범위하게 처방되고 있긴 하지만, 아스피린이 혈관성 치매 환자를 치료하는 데에 있어서 실제적으로 유효하다는 명백한 증거는 극히 제한된다 [참고: P. S. Williams et al., Cochrane Database Syst. Rev., 2, CD001296 (2000)]. 니모디핀 (Nimodipine)은 혈관성 치매 환자에 있어서 단기간 이득을 보여주는 약물로서 이에 밀접한 영향을 끼쳤지만, 장기간 항치매 약물로서는 인정받지 못하였다 [참고: J. M. Lopez-Arrieta and J. Birks, Cochrane Database Syst. Rev., 3, CD000147 (2002)]. 또한, 피라세탐 (piracetam)의 임상 효능 데이터는 이러한 약물을 치매 또는 인지 장애를 치료하는 데에 사용하는 것을 뒷받침하고 있지 않다 [참고: L. Flicker and G. (irimley Evans, Cochrane Database Syst. Rev., 2, CD011011 (2001)].

[0011] 현재까지는, 혈관성 치매를 예방하거나 알츠하이머병을 중지시킬 수 있는 치료법이 없다. 이러한 질환의 초기 및 중기 단계 사람들을 위해 현재 사용되고 있는 약물 [코그넥스 (Cognex), 아리셉트 (Aricept), 엑셀론 (Exelon), 라자다인 (Razadyne), 나멘다 (Namenda)]은 제한된 시간 동안 몇몇 증상을 경감시킬 수 있다. 뇌염증이 알츠하이머병에 일조할 수 있기 때문에, 비스테로이드계 소염 약물 (NSAID, Vioxx, Aleve, Celebrex)이 임상 시험에 시험되었지만, 이득은 없는 것으로 밝혀졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] **발명의 요약**

[0013] 본 발명은 Lp-PLA_2를 억제함으로써, 예를 들어 Lp-PLA_2 단백질의 발현 및/또는 활성을 억제함으로써 신경변성 질환 및 장애를 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 특별한 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 치료 및/또는 예방될 수 있는 신경변성 질환은 비정상적인 혈액 뇌 장벽 (BBB) 기능과 연관이 있는데, 예를 들면 투과성 BBB가 있는 신경변성 질환이고, 이에는 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 혈관성 치매 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

과제의 해결 수단

[0014] 한 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법은 신경변성 질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제, 예를 들어 Lp-PLA_2의 발현 및/또는 Lp-PLA_2 단백질의 활성을 억제하는 작용제를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 해당 질환의 어떠한 특별한 단계 (예를 들어, 초기 또는 말기)로만 제한되지 않는다.

[0015] 몇몇 양태에서, BBB 누출을 예방하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 방법은 Lp-PLA_2를 억제함으로써, 예를 들어 Lp-PLA_2의 발현 및/또는 Lp-PLA_2의 단백질 활성을 억제함으로써 제공된다. 따라서, 몇몇 양태는 효소 활성을 차단함으로써 Lp-PLA_2를 억제하는 방법을 제공하고, 몇몇 양태는 Lp-PLA_2 RNA의 발현을 저하 및/또는 하향 조절함으로써 Lp-PLA_2를 억제하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, BBB 누출 또는 BBB 투과성을 예방 및/또는 저하시키면 신경변성 질환 또는 장애와 연관된 증상이 예방 및/또는 저하된다.

[0016] 한 국면에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법은 신경변성 장애 또는 질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게, Lp-PLA_2 단백질의 발현 및/또는 활성을 억제하는 작용제를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 장애 또는 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다. 이러한 양태에서, 신경변성 질환 또는 장애는 신경변성 질환 또는 장애일 수 있고, 예를 들어 알츠하이머병, 혈관성 치매, 파킨슨병 및 헌팅톤병일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 양태에서, 신경변성 질환 또는 장애는 비정상적인 혈액 뇌 장벽과 연관이 있다. 추가의 양태에서, Lp-PLA_2 단백질의 활성 또는 발현을 억제하는 작용제가 투여되는 대상체는 인

간이다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 혈관성 치매가 있거나 혈관성 치매에 걸릴 위험에 놓인 대상체에게, Lp-PLA$_2$ 단백질의 활성 및/또는 발현을 억제하는 작용제를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는 (Lp-PLA$_2$ 단백질을 억제시키면 혈관성 치매 증상이 저하 또는 중지된다), 상기 혈관성 치매가 있거나 혈관성 치매에 걸릴 위험에 놓인 대상체를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 혈관성 치매는 알츠하이머병과 연관이 있다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에게, Lp-PLA$_2$ 단백질의 발현 및/또는 활성을 억제하는 작용제를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에게서 비정상적인 혈액 뇌 장벽과 연관된 질환 또는 장애를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 비정상적인 BBB는 투과성 혈액 뇌 장벽이고, 추가의 양태에서, 상기 질환 또는 장애는 신경변성 질환 또는 장애이다. 이러한 신경변성 질환 및 장애는, 예를 들어 혈관성 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 헌팅톤병 등이지만, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에게, Lp-PLA$_2$ 단백질의 발현 및/또는 활성을 억제하는 작용제를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는 (Lp-PLA$_2$ 단백질을 억제시키면 뇌에서의 베타 아밀로이드 축적 증상이 저하 또는 중지된다), 상기 대상체의 뇌에서 "Aβ" 축적으로서 지칭되는 베타 아밀로이드를 감소시키는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 베타 아밀로이드는 A베타-42이다.

[0020] 몇몇 양태에서, Lp-PLA$_2$를 억제하는 작용제는 Lp-PLA$_2$의 발현을 억제할 수 있는데, 예를 들어 Lp-PLA$_2$ 단백질을 생성시키는 Lp-PLA$_2$ RNA의 해독을 억제할 수 있다. 대체 양태에서, Lp-PLA$_2$를 억제하는 작용제는 Lp-PLA$_2$ 단백질 활성을 억제할 수 있다. 어떠한 작용제도 본원에 기재된 바와 같은 방법에 사용하도록 포괄된다. 몇몇 양태에서, 이러한 작용제는 소분자, 핵산, 핵산 유사체, 단백질, 항체, 펩티드, 앱타머 (aptamer) 또는 그의 변이체 또는 단편일 수 있다. 몇몇 양태에서, 작용제는 핵산 작용제, 예를 들어 RNAi 작용제, 예를 들면 siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA 또는 리보자임, 또는 그의 변이체이지만, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 몇몇 양태에서, Lp-PLA$_2$의 단백질 활성을 억제하는 작용제는 소분자, 예를 들어 Lp-PLA$_2$ 단백질의 가역적 또는 비가역적 억제제인 소분자이지만, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 양태에서, 이러한 소분자는 피리미딘온계 화합물이다. 몇몇 양태에서, Lp-PLA$_2$의 소분자 억제제는, 예를 들어 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (이는 SB480848로서 공지되기도 한다) 또는 그의 염이지만, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 양태에서, Lp-PLA$_2$의 소분자 억제제는, 예를 들어 N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로시클로펜타피리미딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 또는 그의 염이지만, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 양태에서, Lp-PLA$_2$의 소분자 억제제는, 예를 들어 N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 또는 그의 염이지만, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 양태에서, Lp-PLA$_2$의 소분자 억제제는, 예를 들어 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]-아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 또는 그의 염이지만, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 몇몇 양태에서, 신경변성 질환으로 인해 인지 기능이 저하되는 경우, 예를 들어 신경변성 질환이, 예를 들면 알츠하이머병 및/또는 혈관성 치매인 경우, 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하는 상기 질환의 치료 및/또는 예방 방법은 Lp-PLA$_2$의 발현 및/또는 활성을 억제하는 작용제를 포함하는 제약 조성물을 투여한 후 대상체의 인지 기능을 평가하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 추가의 양태에서, 신경변성 질환을 치료 및/또는 예방하고/하거나 대상체에게서 비정상적인 BBB를 치료 및/또는 예방하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 방법은 뇌 혈류량 또는 혈액-뇌 장벽 기능을 평가함으로써 해당 치료를 모니터링하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 당업자는 이러한 방법을 수행하여, 예를 들어 CSF 중의 타우 (tau) 및 Aβ-42의 존재를 평가할 수도 있다.

[0024] 대상체에게 Lp-PLA$_2$의 억제제를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 몇몇 양태에서는, 해당 방법이 부가의 치료제, 예를 들어 신경변성 장애를 치료하는 데에 사용되고 있는 치료제 등을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 신경변성 장애가, 예를 들면 알츠하이머병인 경우, 대상체에게 알츠하이머병을 치료하기

위한 치료제, 예를 들어 ARICEPT 또는 도네페질 (donepezil), COGNEX 또는 타크린 (tacrine), EXELON 또는 리바스티그민 (rivastigmine), REMINYL 또는 갈란타민 (galantamine), 항아밀로이드 백신, A베타-저하성 요법, 두뇌 운동 또는 자극을 추가로 투여할 수 있다.

[0025] 몇몇 양태에서, 신경변성 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 방법은 대상체, 예를 들어 포유류 대상체에게 적용 가능하다. 몇몇 양태에서는, 대상체가 인간이다.

[0026] **상세한 설명**

[0027] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 BBB 누출 및 투과성 및 출혈을 포함한, 혈관성 치매의 병리학적 특징을 나타내기 쉬운 동물을 Lp-PLA_2 억제제로 처리한 경우에, 이 동물에게서 BBB 투과성 징후 및 증상이 저하되고 비정상적인 BBB가 저하되었다는 사실을 밝혀내었다. 예를 들어, Lp-PLA_2 억제제로 처리한 동물은 BBB 투과성이 저하되었고, 신경교 세포 활성화가 적어졌고 신경세포 손상도 덜한 것으로 밝혀졌다. 특히, Lp-PLA_2 억제제로 처리한 동물은 또한, 뇌 및 뇌 혈관계에서의 아밀로이드, 예를 들어 베타-아밀로이드 (또는 A베타-42) 축적이 감소하였다. 따라서, 본 발명자들은 Lp-PLA_2 억제제를 신경변성 질환 및 장애, 특히 비정상적인 혈액 뇌 장벽 기능과 연관된 신경변성 질환 및 장애, 예를 들면 BBB 투과성 또는 증가된 BBB 투과성을 수반한 신경변성 질환을 치료 및/또는 예방하는 데에 사용할 수 있다는 사실을 밝혀내었다. 이러한 질환에는, 예를 들어 혈관성 치매, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0028] 정의

[0029] 편의상, 본 출원의 전문 (명세서, 실시예, 및 첨부된 청구의 범위 포함)에 이용된 특정 용어들이 수집되어 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명의 속하는 분야의 전문가가 통상적으로 인식하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "신경변성 질환"은 신경 조직 및/또는 신경 조직 기능의 점진적이고도 진행적 상실을 특징으로 하는 중추 신경계 장애의 다양한 조합을 지칭한다. 신경변성 질환은 일종의 신경학적 장애 또는 질환인데, 이러한 신경학적 질환은 신경 조직의 점진적이고도 진행적 상실, 및/또는 신경학적 기능 변경, 전형적으로 신경 조직의 점진적이고도 진행적 상실에 따른 결과로서 신경학적 기능 저하를 특징으로 한다. 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 예방 및/또는 치료할 수 있는 신경변성 질환은 비정상적인 혈액 뇌 장벽, 예를 들어 투과성 혈액 뇌 장벽이 있는 신경변성 질환이다. 결함있는 혈액 뇌 장벽이 있는 신경변성 질환의 예에는, 예를 들어 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 혈관성 치매 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 당해 분야에서 "다발-경색 치매"로서 지칭되기도 하는 용어 "혈관성 치매"는 뇌에서의 혈관성 병변을 발생시키는 상이한 기전에 의해 유발된 일군의 증상을 지칭한다. 혈관성 치매의 주요 아유형은, 예를 들어 혈관성 경도 인지 장애, 다발 경색 치매, 전략적 단일 경색에 기인한 혈관성 치매 [시상, 전방 뇌 동맥, 두정엽 (parietal lobe) 또는 대상 회전 (cingulate gyrus)에 영향을 미친다], 출혈성 병변에 기인한 혈관성 치매, 소 혈관 질병 (예를 들어, 소강 병변 및 빈스완저병에 기인한 혈관성 치매 포함), 및 혈관성 치매를 수반한 혼합 알츠하이머병이다.

[0032] 용어 "질환" 또는 "장애"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 이는 기능의 수행을 방해하거나 혼란시키고/시키거나 불쾌감, 기능이상, 곤란과 같은 증상을 유발시키거나 또는 심지어 병에 걸린 사람을 사망시키거나 이와 접촉한 사람을 사망에 이르게 하는, 신체 상태 또는 몇몇 기관 상의 모든 변경을 지칭한다. 질환 또는 장애는 또한, 디스템퍼 (distemper), 병듦, 불안, 만성 병, 장애, 병, 질병, 호소 증상, 가벼운 병 또는 허식에 관한 것일 수 있다.

[0033] 용어 "혈액-뇌 장벽" 또는 "BBB"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 이는 혈액과 뇌 조직 간에 교환되는 것을 면밀히 조절하고 심하게 제한하는 뇌 조직을 통하여 순환되기 때문에 혈액 내에 존재하는 투과성 장벽을 지칭하기 위해 사용된다. 혈액 뇌 장벽 성분에는 모든 혈관의 가장 깊은 내막을 형성하는 내피 세포, BBB와 구조적으로 상관이 있는 인접한 내피 세포들 간의 조밀한 연접부, 내피 세포의 기저 막, 및 혈관의 노출된 외부 표면의 거의 모두를 덮고 있는 가까운 성상세포의 확장된 족양 돌기 (foot process)가 포함된다. BBB는 혈액 내의 대부분의 물질, 예를 들어 대부분의 대분자, 예를 들면 Ig, 항체, 보체, 알부민 및 약물 및 소분자가 뇌 조직 내로 유입되지 못하게 한다.

[0034] 용어 "비정상적인 BBB"는 기능이상 BBB를 지칭하기 위해 사용되는데, 이러한 BBB는 정상적으로 기능적 BBB를 통과하는 분자, 예를 들어 영양분 및 당 (예: 글루코스)을 통과시키지 못한다. 비정상적인 BBB는 정상적으로 기

능하는 BBB가 전형적으로 배제시켰던 분자에 대해 투과성인 경우 (이는 전형적으로, 본원에서 "BBB 투과성"으로 지칭된다)를 지칭할 수 있다.

[0035] 용어 "BBB 투과성" 또는 "투과성 BBB"는 당업자에 의해 "누출성 BBB"로서 흔히 지칭된다. 이들 용어는 BBB 완전성 손상과 혈관 투과성 증가를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 예를 들어, 투과성 BBB는 이러한 BBB를 통하여, 본래의 BBB였으면 정상적으로 뇌 조직으로부터 배제시켰을 분자, 예를 들어 Ig 분자, 보체 단백질, 혈청 알부민 및 수 많은 기타 단백질의 통과를 허용한다. 투과성 BBB의 존재를 결정하기 위한 검정은, 예를 들어 BBB가 정상적으로 기능하는 경우 (즉, BBB가 투과성이 아닌 경우)에는 정상적으로 혈관의 내강에 제한되는 혈관외 Ig가 뇌 조직 내에 존재하는 것을 평가할 수 있다.

[0036] 용어 "작용제"는 정상적으로는 존재하지 않거나 또는 세포에 투여되는 수준에서는 존재하지 않는 모든 실재물을 지칭한다. 작용제는 화학물질; 소분자; 핵산 서열; 핵산 유사체; 단백질; 펩티드; 앱타머; 항체; 또는 그의 단편을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다. 핵산 서열은 RNA 또는 DNA일 수 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으며, 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산, 올리고뉴클레오티드, 핵산 유사체, 예를 들어 펩티드-핵산 (PNA), 가성-상보적 PNA (pc-PNA), 고정 핵산 (LNA) 등을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다. 이러한 핵산 서열에는, 예를 들어 단백질을 암호화하는 핵산 서열, 예를 들면 전사 억제인자로서 작용하는 핵산 서열, 안티센스 분자, 리보자임, 소형 억제성 핵산 서열, 예를 들어 RNAi, shRNAi, siRNA, 마이크로 RNAi (mRNAi), 안티센스 올리고뉴클레오티드 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 단백질 및/또는 펩티드 또는 그의 단편은 관심있는 모든 단백질일 수 있는데, 예를 들어 돌연변이된 단백질; 치료적 단백질 및 절단된 단백질 (이러한 단백질은 정상적으로는 존재하지 않거나 세포 내에서 보다 저 수준으로 발현된다)이지만, 그에 제한되지 않는다. 단백질은 또한, 돌연변이된 단백질, 유전 공학적으로 처리시킨 단백질, 펩티드, 합성 펩티드, 재조합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 미디보디 (midibody), 미니보디 (minibody), 트리아보디, 인간화 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 변형된 단백질 및 그의 단편을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다. 또 다른 한편, 작용제는 핵산 서열을 세포 내로 도입하고 이를 전사시켜 세포 내에 Lp-PLA_2의 핵산 및/또는 단백질 억제제를 생성시킨 결과로서 해당 세포 내에서 세포내적일 수 있다. 몇몇 양태에서, 작용제는 모든 화학물질, 실재물 또는 부분인데, 이에는 합성 및 천연 발생적 비-단백질성 실재물이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 작용제는 화학적 부분을 갖는 소분자이다. 예를 들어, 화학적 부분에는 치환되지 않거나 치환된 알킬, 방향족 또는 헤테로사이클릴 부분, 예를 들면 매크롤리드 (macrolide), 렙토마이신 (leptomycin) 및 관련 천연 생성물 또는 그의 유사체가 포함되었다. 작용제는 목적하는 활성 및/또는 특성을 지닌 것으로 공지될 수 있거나, 또는 다양한 화합물의 라이브러리로부터 선택될 수 있다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "억제하는"이란 Lp-PLA_2 단백질 또는 그의 변이체 또는 상동체의 발현 또는 활성이 목적하는 효과를 가져다 주기에 충분한 정도 및/또는 시간 동안 저하되는 것을 의미한다. 활성 상의 저하는 Lp-PLA_2의 한 가지 이상 특징에 영향을 미치는 것에 기인할 수 있는데, 예를 들어 그의 촉매적 활성을 저하시키거나, Lp-PLA_2의 조인자를 억제하거나, 또는 신경변성 장애 또는 비정상적 BBB (예: 투과성 BBB)를 치료하거나 예방시키는 결과를 가져다 주는 정도의 결합 활성도로 Lp-PLA_2와 결합함으로써 이루어질 수 있다. 특히, Lp-PLA_2의 억제는 Lp-PLA_2 억제에 대한 검정, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2 단백질에 대한 생물학적 검정을 사용함으로써 결정할 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "Lp-PLA_2"는 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 억제시키고자 하는 단백질 표적을 지칭한다. Lp-PLA_2는 기존에 선행 분야에서 혈소판 활성화 인자 아세틸 가수분해효소 (PAF 아세틸 가수분해효소)로서 공지되기도 한 지단백질-관련 포스포리파제 A_2와 상호 교환적으로 사용된다. 인간 Lp-PLA_2는 승인 번호 U20157 (서열 1) 또는 Ref Seq ID: NM_005084 (서열 2)에 상응하는 핵산에 의해 암호화되고/되거나 인간 Lp-PLA_2는 승인 번호 NP_005075 (서열 3)에 상응하는 단백질 서열에 상응한다 (이는 그의 전문이 본원에 구체적으로 참고로 도입된 미국 특허 제5,981,252호에 기재되어 있다).

[0039] RNAi 분자, 예를 들어 siRNA 또는 miRNA의 활성과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 "유전자 무반응 (silencing)" 또는 "무반응된 유전자"는 표적 유전자에 대한 세포 내에서의 mRNA 수준이, miRNA 또는 RNA 간섭 분자가 존재하지 않는 세포 내에서 발견된 mRNA 수준의 적어도 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 약 100% 감소되는 것을 지칭한다. 한 가지 바람직한 양태에서, mRNA 수준은 적어도 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 약 100% 감소된다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "RNAi"는 모든 유형의 간섭 RNA를 지칭하는데, 이에는 siRNAi, shRNAi, 내인성 마이크로RNA 및 인공적 마이크로RNA가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이에는 RNA의 하류 프로세싱 기전에 상관없이 기존에 siRNA로서 확인된 서열이 포함된다 (즉, siRNA가 mRNA를 절단시키는 특이적 생체내 프로세싱 방법을 지니고 있는 것으로 여겨지긴 하지만, 이러한 서열은 본원에 기재된 플랭킹 서열 맥락에서 벡터 내로 혼입될 수 있다).

[0041] 본원에 사용된 바와 같은 "siRNA"는 이중 가닥 RNA를 형성하는 핵산을 지칭하는데, 이중 가닥 RNA는 siRNA가 표적 유전자, 예를 들어 Lp-PLA_2와 동일한 세포에 존재하거나 발현되는 경우에 유전자 또는 표적 유전자의 발현을 저하 또는 억제시킬 수 있는 능력을 지니고 있다. 이중 가닥 RNA siRNA는 상보적 가닥에 의해 형성될 수 있다. 한 양태에서, siRNA는 이중 가닥 siRNA를 형성할 수 있는 핵산을 지칭한다. siRNA의 서열은 완전한 길이의 표적 유전자 또는 그의 아서열에 상응할 수 있다. 전형적으로, siRNA는 길이가 약 15 내지 50개 이상 뉴클레오티드이다 (예를 들어, 이중 가닥 siRNA의 각 상보적 서열은 길이가 약 15 내지 50개 뉴클레오티드이고, 이중 가닥 siRNA는 길이가 약 15 내지 50개 염기쌍, 바람직하게 약 19 내지 30개 염기 뉴클레오티드, 바람직하게 길이가 약 20 내지 25개 뉴클레오티드, 예를 들어 길이가 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 뉴클레오티드이다).

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 "shRNA" 또는 "저분자 헤어핀 RNA" (줄기 루프로서 지칭되기도 함)는 특정 유형의 siRNA이다. 한 양태에서, 이들 shRNA는 저분자, 예를 들어 약 19 내지 약 25개 뉴클레오티드의 안티센스 가닥에 이어 약 5 내지 약 9개 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 루프 및 유사한 센스 가닥으로 구성된다. 또 다른 한편, 센스 가닥은 뉴클레오티드 루프 구조보다 선행될 수 있고, 그 다음에 안티센스 가닥이 올 수 있다.

[0043] 용어 "마이크로RNA" 또는 "miRNA"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고 내인성 RNA인데, 이들 중의 몇몇은 전사 후 수준에서 단백질-암호화 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지되어 있다. 내인성 마이크로RNA는 mRNA의 생산적 활용을 조정할 수 있는 게놈 내에 천연상 존재하는 저분자 RNA이다. 용어 인공적 마이크로RNA에는 mRNA의 생산적 활용을 조정할 수 있는 내인성 마이크로RNA 이외의 모든 유형의 RNA 서열이 포함된다. 마이크로RNA 서열은, 예를 들어 다음 공보에 보고되었다 [참고: Lim, et al., Genes & Development, 17, p. 991-1008 (2003), Lim et al Science 299, 1540 (2003), Lee and Ambros Science, 294, 862 (2001), Lau et al., Science 294, 858-861 (2001), Lagos-Quintana et al, Current Biology, 12, 735-739 (2002), Lagos Quintana et al, Science 294, 853-857 (2001), and Lagos-Quintana et al, RNA, 9, 175-179 (2003); 본원에 참고로 도입된다]. 다중 마이크로RNA를 전구체 분자 내로 혼입시킬 수도 있다. 더우기, miRNA-유사 줄기-루프는 miRNA 및/또는 RNAi 경로를 통하여 내인성 유전자의 발현을 조정할 목적으로 인공적 miRNA 및 저분자 간섭 RNA (siRNA)를 전달하기 위한 비히클로서 세포 내에서 발현될 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 "이중 가닥 RNA" 또는 "dsRNA"는 2개 가닥으로 구성되는 RNA 분자를 지칭한다. 이중 가닥 분자에는 2-가닥 구조를 형성하기 위해 합한 이면을 배가시킨 단일 RNA 분자로 구성된 것이 포함된다. 예를 들어, 단일 가닥 miRNA를 유도시킨 전구세포 분자의 줄기 루프 구조 (프리-miRNA로 불리운다) [참고: Bartel et al. 2004. Cell 116:281-297]는 dsRNA 분자를 포함한다.

[0045] 용어 "환자", "대상체" 및 "개체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 예방적 처치를 포함한 치료가 제공되는 동물, 특히 인간을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 지칭한다. "비-인간 동물" 및 "비-인간 포유류"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 이에는 모든 척추동물, 예를 들어 포유류, 예를 들면 비-인간 영장류 (특히, 고등 영장류), 양, 개, 설치류 (예: 마우스 또는 랫트), 기니아 피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼, 암소, 및 비-포유류, 예를 들면 치킨, 양서류, 파충류 등이 포함된다. 한 양태에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 양태에서, 대상체는 질병 모델로서 실험용 동물 또는 동물 대체물이다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "유전자"는 전사 및/또는 해독 조절성 서열 및/또는 암호화 영역 및/또는 비-해독 서열 (예: 인트론, 5'- 및 3'-비해독 서열 및 조절성 서열)을 포함하는 게놈 유전자일 수 있다. 유전자의 암호화 영역은 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 기능성 RNA, 예를 들어 tRNA, rRNA, 촉매적 RNA, siRNA, miRNA 및 안티센스 RNA일 수 있다. 유전자는 또한, 그에 연결된 5'- 또는 3'-비해독 서열을 임의로 포함하는 암호화 영역 (예: 엑손 및 miRNA)에 상응하는 mRNA 또는 cDNA일 수 있다. 유전자는 또한, 암호화 영역 및/또는 그에 연결된 5'- 또는 3'-비해독 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 시험관 내에서 생성된 증폭된 핵산 분자일 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 함께 공유적으로 연결된 2개

이상의 뉴클레오티드를 의미할 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 단일 가닥의 묘사는 또한, 상보적 가닥의 서열을 한정한다. 따라서, 핵산은 묘사된 단일 가닥의 상보적 가닥을 포괄하기도 한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 핵산의 많은 변이체는 소정의 핵산과 동일한 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 실질적으로 동일한 핵산 및 그의 보체를 포괄하기도 한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건 하에 표적 서열과 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화하는 프로브를 포괄하기도 한다.

[0048] 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 또는 이중 가닥 서열과 단일 가닥 서열 둘 다의 일부를 함유할 수 있다. 핵산은 DNA (게놈 및 cDNA), RNA, 또는 하이브리드일 수 있는데, 핵산은 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오티드의 조합물, 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 크산틴, 히포크산틴, 이소시토신 및 이소구아닌을 포함한 염기의 조합물을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법에 의해 수득할 수 있다.

[0049] 핵산은 일반적으로, 포스포디에스테르 결합을 함유할 것이지만, 하나 이상의 상이한 연쇄, 예를 들어 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 O-메틸포스포로아미다이트 연쇄 및 펩티드 핵산 주쇄 및 연쇄를 가질 수 있는 핵산 유사체가 포함될 수도 있다. 기타 유사체 핵산에는 양성 주쇄; 비이온성 주쇄, 및 비-리보스 주쇄를 갖는 것이 포함되는데, 이에는 본원에 참고로 도입된 미국 특허 제5,235,033호 및 제5,034,506호에 기재된 것이 포함된다. 하나 이상의 비-천연 발생적 또는 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 핵산이 또한, 핵산의 하나의 정의 내에 포함된다. 변형된 뉴클레오티드 유사체는, 예를 들어 핵산 분자의 5'-말단 및/또는 3'-말단에 위치할 수 있다. 뉴클레오티드 유사체의 대표적인 예는 당- 또는 주쇄-변형된 리보뉴클레오티드 중에서 선택될 수 있다. 그러나, 뉴클레오염기-변형된 리보뉴클레오티드, 즉 천연 발생적 뉴클레오염기 대신 비-천연 발생적 뉴클레오염기, 예를 들어 5-위치에서 변형된 우리딘 또는 시티딘, 예를 들면 5-(2-아미노)프로필 우리딘, 5-브로모 우리딘; 8-위치에서 변형된 아데노신 및 구아노신, 예를 들면 8-브로모 구아노신; 데아자 뉴클레오티드, 예를 들면 7 데아자-아데노신; O- 및 N-알킬화 뉴클레오티드, 예를 들면 N6-메틸 아데노신을 함유하는 리보뉴클레오티드가 적합하다는 것을 인지해야 한다. 2' OH 기를 H, OR, R, 할로, SH, SR, NH_2, NHR, NR_2 또는 CN (여기서, R은 C-C6 알킬, 알케닐 또는 알키닐이고, 할로는 F, Cl, Br 또는 I이다)로 대체시킬 수 있다. 리보스-포스페이트 주쇄의 변형은 각종 이유로 인해, 예를 들어 생리학적 환경 하에서의 해당 분자의 안정성과 반감기를 증가시키기 위해 또는 바이오칩 상의 프로브로서 수행할 수 있다. 천연 발생적 핵산 및 유사체의 혼합물을 만들 수 있는데, 또 다른 한편으론 상이한 핵산 유사체의 혼합물, 및 천연 발생적 핵산 및 유사체의 혼합물을 만들 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 복제 기점을 함유하는 핵산 서열을 지칭한다. 벡터는 플라스미드, 박테리오파아지, 세균성 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자가 복제성 염색체외 벡터이거나 또는 숙주 게놈 내로 통합되는 벡터일 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료하는"에는 투과성 BBB 및/또는 혈관성 치매 및/또는 알츠하이머병과 연관된 질병, 질환 또는 장애의 한 가지 이상 부작용 또는 증상을 저하 또는 완화시키는 것이 포함된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료하는"은 알츠하이머병의 생화학적 마커 및/또는 증상을 10% 이상 저하시키는 것을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, 알츠하이머병의 생화학적 마커 상의 저하, 예를 들면 아밀로이드 반점 침착이 10% 정도 저하되거나, 또는 신경교 세포 활성화 상의 저하, 예를 들어 GFAP를 발현하는 세포가 10% 정도 저하되는 것이 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의한 유효한 치료로서 간주될 것이다. 또 다른 예로서, 증상 저하, 예를 들어 기억 상실 속도를 10% 정도 느리게 하거나, 기억 저하 속도를 중지시키거나, 또는 기억 상실을 10% 정도 저하시키거나, 또는 기억을 10% 정도 개선시키는 것이 또한, 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의한 유효한 치료로서 간주될 것이다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 해당 질병 또는 장애의 한 가지 이상 증상, 예를 들어 결함있는 BBB 또는 혈관성 치매의 증상 또는 장애를 저하 또는 중지시키기 위한 제약 조성물의 치료제의 양을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 방법을 이용하는 경우의 유효량은 질환 또는 장애, 예를 들어 혈관성 치매 또는 BBB 투과성의 증상을 10% 이상 저하시키기에 충분한 양으로서 간주될 것이다. 본원에 사용된 바와 같은 유효량에는 질병 증상 발생을 예방 또는 지연시키거나, 질병 증상 과정을 변경시키거나 (예를 들어, 질병 증상의 진행을 느리게 한다) 또는 질병 증상을 역전시키기에 충분한 양이 포함된다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "투여하는" 및 "도입하는"은 상호 교환적으로 사용되고, 본원에 기재된 바와 같

은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를, 이러한 작용제를 목적하는 부위에 적어도 부분적으로 국재시켜 주는 방법이나 경로에 의해 대상체 내에 놓아두는 것을 지칭한다. 본 발명의 화합물은 대상체에게 유효한 치료를 제공하는 데에 적당한 모든 경로에 의해 투여할 수 있다.

[0054] 용어 "벡터"는 "플라스미드"와 상호 교환적으로 사용되고, 이는 이와 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이와 작동적으로 연결되는 유전자 및/또는 핵산 서열의 발현을 지시할 수 있는 벡터가 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 활용되는 발현 벡터는 종종 "플라스미드"의 형태인데, 이는 벡터 형태에서는 염색체와 결합되지 않는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 기타 발현 벡터가 본 발명의 상이한 양태에 사용될 수 있는데, 예를 들면 플라스미드, 에피솜, 박테리오파아지 또는 바이러스성 벡터가 있지만, 이에 제한되지 않고, 이러한 벡터는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있거나 특별한 세포에서 자기 복제할 수 있다. 등가 기능을 제공하는 것으로 당업자에게 공지된 기타 형태의 발현 벡터를 사용할 수도 있다. 발현 벡터는 DNA를 암호화하는 안정한 또는 일시적 발현을 위한 발현 벡터를 포함한다.

[0055] "단수" 형태는 하나이거나 하나 이상 (즉, 적어도 하나)의 대상 물체를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예를 들자면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0056] Lp-PLA_2: 일반적 정보

[0057] Lp-PLA_2는 당해 분야에서 알리아제 (aliase) Lp-PLA_2, LDL-PLA_2, 지단백질-관련 포스포리파제 A_2, PLA2G7, 포스포리파제 A2 (군 VII), 또는 혈소판 활성화 인자 아세틸 가수분해효소 (PAF 아세틸 가수분해효소 또는 PAFAH)로서 지칭되기도 한다. 인간 Lp-PLA_2는 유전자은행 승인 번호 U20157 (서열 1) 또는 Ref Seq ID: NM_005084 (서열 2)에 상응하는 핵산에 의해 암호화되고 인간 Lp-PLA_2는 유전자은행 승인 번호 NP_005075 (서열 3)에 상응하는 단백질 서열에 상응한다 (이는 그의 전문이 본원에 구체적으로 참고로 도입된 미국 특허 제5,981,252호에 기재되어 있다).

[0058] 포스포리파제 A_2 효소 지단백질-관련 포스포리파제 A_2 (Lp-PLA_2), 그의 서열, 단리 및 정제, 상기 효소를 암호화하는 단리된 핵산, 및 상기 효소를 암호화하는 DNA로 형질전환시킨 재조합 숙주 세포가 WO 95/00649 (SmithKline Beecham plc) (그의 전문이 본원에 구체적으로 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. 동일한 군으로부터의 후속 공보에는 이러한 효소가 LDL-PLA_2로서 지칭되어 기재되어 있고 [참고: Tew D et al, Arterioscler Thromb Vas Biol 1996: 16; 591-9], 나중의 특허 출원 [참고: WO 95/09921, Icos Corporation] 및 네이처 (Nature)의 관련 공보 [참고: Tjoelker et al, vol 374, 6 April 1995, 549]에는 Lp-PLA_2와 본질적으로 동일한 서열을 갖는 효소 PAFAH가 기재되어 있다.

[0059] Lp-PLA_2는 저밀도 지단백질 (LDL)을 그의 산화 형태로 전환시키는 동안 포스파티딜콜린을 라이소포스파티딜콜린으로 전환시키는 데에 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이 효소는 산화된 포스파티딜콜린의 sn-2 에스테르를 가수분해시켜 라이소포스파티딜콜린 및 산화적으로 변형된 지방산을 제공하는 것으로 공지되어 있다. Lp-PLA_2 작용의 생성물 둘다는 라이소포스파티딜콜린과 생물학적으로 활성이어서, 특히 단구 화학주성 및 내피 기능이상 유도 (이들 특성 둘 다는 동맥 벽 내에서의 단구-유래된 대식 세포 축적을 촉진시켜 준다) 등에 기인한 몇 가지 프로-아테롬 발생성 활성을 지닌다.

[0060] 본 발명자들은 BBB 누출을 특징으로 하는 장애에 걸리기 쉬운 동물을 Lp-PLA_2 억제제로 처리한 경우에 본래의 BBB가 나타났고 BBB 투과성 징후가 저하되었다는 사실을 밝혀내었다. 이와 같이 Lp-PLA_2에 대한 억제제로 처리된 동물은 또한, 억제제로 처리되지 않은 동물과 비교해서, 뇌를 세차게 흐르는 혈관 및 뇌 조직 내에서의 베타-아밀로이드 축적이 저하되고 혈관성 치매 징후가 저하된 것으로 나타났다. 따라서, Lp-PLA_2 억제제를 사용하여 BBB 투과성을 수반한 질환 및 장애, 예를 들어 신경변성 질환 등을 치료 및/또는 예방할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 치료 및/또는 예방할 수 있는 신경변성 질환의 예에는 혈관성 치매, 알츠하이머병, 및 기타 신경변성 질환, 예를 들어 헌팅톤병 및 파킨슨병이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0061] Lp-PLA_2를 억제하는 작용제

[0062] 몇몇 양태에서, 본 발명은 Lp-PLA_2의 억제에 관한 것이다. 몇몇 양태에서, 이러한 억제는 Lp-PLA_2를 암호화하는 핵산 전사체의 억제, 예를 들어 메신저 RNA (mRNA)의 억제이다. 또 다른 양태에서, Lp-PLA_2의 억제는 Lp-

PLA_2의 유전자 생성물, 예를 들어 Lp-PLA_2의 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그의 이소형의 발현 억제 및/또는 활성 억제이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유전자 생성물"은 유전자로부터 전사된 RNA, 또는 유전자에 의해 암호화되거나 RNA로부터 해독된 폴리펩티드를 지칭한다.

[0063] 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2의 억제는 작용제에 의한다. 어떠한 작용제도 사용할 수 있는데, 예를 들어 핵산, 핵산 유사체, 펩티드, 파아지, 파아지미드, 폴리펩티드, 펩티드 모방제, 리보솜, 앱타머, 항체, 소형 또는 대형 유기 또는 무기 분자, 또는 그의 모든 조합물이지만, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 방법에 유용한 작용제에는 Lp-PLA 발현의 억제제, 예를 들어 Lp-PLA를 암호화하는 mRNA의 억제제로서 기능하는 작용제가 포함된다.

[0064] 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용한 작용제는 유전자 발현을 억제할 수도 있다 (즉, 유전자의 발현을 저해 및/또는 억제할 수 있다). 이러한 작용제는 당해 분야에서 "유전자 무반응제"로서 지칭되고, 당업자에게 통상적으로 공지되어 있다. 그의 예에는 RNA, DNA 또는 핵산 유사체에 대한 핵산 서열이 포함되지만, 이에 제한되지 않고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으며, 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산, 올리고뉴클레오티드, 핵산, 핵산 유사체, 예를 들어 펩티드 핵산 (PNA), 가성-상보적 PNA (pc-PNA), 고정 핵산 (LNA) 및 그의 유도체 등을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다. 핵산 작용제에는 또한, 예를 들어 전사 억제인자로서 작용하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열, 안티센스 분자, 리보자임, 소형 억제성 핵산 서열, 예를 들어 RNAi, shRNAi, siRNA, 마이크로 RNAi (mRNAi), 안티센스 올리고뉴클레오티드 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같은, Lp-PLA_2 발현의 억제제 및/또는 Lp-PLA_2 단백질 기능의 억제제로서 본 발명의 방법에 유용한 작용제는 어떠한 유형의 실재물일 수도 있는데, 예를 들면 화학물질, 핵산 서열, 핵산 유사체, 단백질, 펩티드 또는 그의 단편이지만, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 양태에서, 상기 작용제는 모든 화학물질, 실재물 또는 부분, 예를 들어 합성 및 천연 발생적 비-단백질성 실재물이다. 특정의 양태에서, 작용제는 화학적 부분을 갖는 소분자이다. 예를 들어 몇몇 양태에서, 이러한 화학적 부분은 본원에 기재된 바와 같은 피리미딘온계 화합물이다.

[0066] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용한 작용제는 Lp-PLA_2의 유전자 발현 또는 Lp-PLA_2 단백질의 기능을 억제하는 단백질 및/또는 펩티드 또는 그의 단편이다. 이러한 작용제에는 단백질 변이체, 돌연변이된 단백질, 치료적 단백질, 절단된 단백질 및 단백질 단편이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 단백질 작용제는 또한, 돌연변이된 단백질, 유전 공학적으로 처리시킨 단백질, 펩티드, 합성 펩티드, 재조합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 미디보디, 미니보디, 트리아보디, 인간화 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 변형된 단백질 및 그의 단편을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다.

[0067] 또 다른 한편, Lp-PLA_2 억제제로서 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용한 작용제는 화학물질, 소분자, 대분자 또는 실재물 또는 부분, 예를 들어 합성 및 천연 발생적 비-단백질성 실재물일 수 있다. 특정의 양태에서, 작용제는 본원에 기재된 바와 같은 화학적 부분을 갖는 소분자이다.

[0068] **소분자**

[0069] 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 소분자이다. Lp-PLA_2의 비가역적 또는 가역적 억제제를 본 발명의 방법에 사용할 수 있다.

[0070] Lp-PLA_2의 비가역적 억제제는 공개특허공보 WO 96/13484, WO96/19451, WO 97/02242, WO97/217675, WO97/217676, WO 97/41098, 및 WO97/41099 (SmithKline Beecham plc) (이들 전문 각각이 본원에 구체적으로 참고로 도입된다)에 기재되어 있고, 이들 공보에는 특히, 효소 Lp-PLA_2의 억제제인 4-티오닐/설피닐/설포닐 아제티딘온 화합물의 각종 시리즈가 기재되어 있다. 이들은 비가역적인 아실화 억제제이다 [참고: Tew et al, Biochemistry, 37, 10087, 1998].

[0071] 인간에게 유효한 Lp-PLA_2 억제제는 당업자에게 흔히 공지되어 있고, 이에는 평가가 진행되고 있는 작용제, 예를 들어 제2상 임상 시험을 포함한 임상 및 전임상 평가가 진행되고 있는 작용제가 포함된다. 수 많은 특허가 스미스클라인 베컴 (SmithKline Beecham)과 그의 후임자 글락소스미스클라인 (GlaxoSmithKline)에 의해 출원되고 공개되었다. 동일인에게 양도된 관련 공개 출원 목록은 다음과 같다: WO01/60805, WO02/30904, WO03/016287, WO00/66567, WO03/042218, WO03/042206, WO03/042179, WO03/041712, WO03/086400, WO03/087088, WO02/30911, WO99/24420, WO00/66566, WO00/68208, WO00/10980, 및 WO2005/021002 (이들 전문 각각이 본원에 구체적으로 참

고로 도입된다). 또한, 미국 가특허원 제60/829,328호 및 제60/829,327호 (둘 다 2006년 10월 13일자로 출원됨)를 참고할 수 있다 (이들 전문 각각이 본원에 구체적으로 참고로 도입된다).

[0072] 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용한 기타 Lp-PLA_2 억제제는 공개특허공보, 예를 들어 WO2006063791-A1, WO2006063811-A1, WO2006063812-A1, WO2006063813-A1 (Bayer Healthcare); 및 US2006106017-A1 (Korea Res. Inst. Bioscience & Biotechnology에게 양도됨) (이들 전문 각각이 본원에 구체적으로 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. Lp-PLA_2 억제제에는 또한, 예를 들어 스타틴을 니아신 [참고: www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568] 및 페노피브레이트 [참고: www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=14817756&taxid=19]와 병용 사용하는 것을 포함하는 것으로 공지된 작용제가 포함된다.

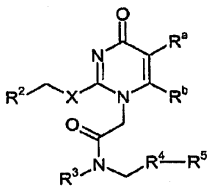
[0073] 상기 문단에 제시된 모든 공개공보가 본원에 참고로 도입된다. 이들 문헌에 기재된 모든 화합물이 신경변성 질환 및 장애, 예를 들어 혈관성 치매 및 알츠하이머병, 및 비정상적인 BBB가 존재하는 본원에 기재된 바와 같은 기타 신경변성 질환을 예방하거나 치료하는 데에 유용하다. 본 실시예에 예시된 바와 같은 본원에 기재된 신경변성 질환 및 BBB 투과성의 돼지 모델을 당업자가 사용하여, 언급된 화합물 또는 기타 Lp-PLA_2 억제제, 예를 들어 항체, 또는 RNAi가 본원에 청구된 바와 같은 신경변성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 유효한지를 결정할 수 있다. 몇몇 양태에서는, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 대상으로 하여 BBB 투과성을 완화시키는 것에 대한 효과를 동물 모델에서 평가할 수 있다. 예를 들어, 본원의 실시예에 기재된 바와 같은 고혈당증 및 고콜레스테롤혈증의 돼지 모델을 사용할 수 있는데, 여기서는 BBB 투과성이 비정상적, 예를 들어 BBB가 투과성이고, BBB 투과성을 당업자에게 흔히 공지된 방법에 의해 Lp-PLA_2에 대한 억제제의 존재 및 부재 하에 평가할 수 있다. 몇몇 양태에서, BBB 기능에 대한 마커를, 예를 들어 미국 특허 제6,884,591호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 바와 같이 사용할 수 있다.

[0074] 특별한 양태에서는, 미국 특허 제6,649,619호 및 제7,153,861호 (이들 전문 각각이 본원에 구체적으로 참고로 도입된다) (및 국제공개공보 WO 01/60805) 및 미국 특허 제7,169,924호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다) (및 국제공개공보 WO 02/30911)에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2 억제제가 혈관성 치매, 예를 들어 알츠하이머병 및/또는 BBB 투과성 장애를 예방 또는 치료하기 위한 본원에 기재된 방법에 유용하다. 몇몇 양태에서, 미국 공개공보 제2005/0033052A1호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다), 및 국제공개공보 WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO 03/042179 , WO 03/041712, WO 03/086400, 및 WO 03/87088에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2 억제제는 가역적 Lp-PLA_2 억제제이다.

[0075] **화학식 I**

[0076] 국제 출원 WO 01/60805 (미국 특허 제6,649,619호 및 동 제7,153,861호는 이것을 기초로 하며, 이들 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함됨. 국제 출원 WO 01/60805의 개시내용도 그 전문이 본 명세서에 기재된 바와 같이 본원에 포함됨)에 개시된 일군의 가역적인 Lp-PLA_2 억제제를 사용할 수 있다. 더 좁은 군의 관심 화합물은 WO 01/60805에 기재되고 미국 특허 제6,649,619호 및 동 제7,153,861호에서 청구되는 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용가능한 염이다:

[0077] <화학식 I>

[0078] 

[0079] 상기 식에서,

[0080] R^a 및 R^b는 이들이 부착된 피리미딘 고리 탄소 원자와 함께 융합된 5원 카르보시클릭 고리를 형성하고,

[0081] R^2는 1개 내지 3개의 불소 원자로 치환된 페닐이고,

[0082] R^3은 메틸, 또는 NR^8R^9로 치환된 $C_{(1-3)}$알킬이거나, 또는

[0083] R^3은 Het-$C_{(0-2)}$알킬 (여기서, Het는 치환되지 않거나 $C_{(1-6)}$알킬로 치환된 N을 갖는 5원 내지 7원의 헤테로시클릴 고리임)이고,

[0084] R^4와 R^5는 함께 4-(4-트리플루오로메틸페닐)페닐 잔기를 형성하고,

[0085] R^8 및 R^9는 동일하거나 상이할 수 있으며, 수소 또는 $C_{(1-6)}$알킬로 구성된 군에서 선택되며,

[0086] X는 S이다.

[0087] 훨씬 더욱 관심이 있는 것은 하기 화합물 또는 이들 화합물의 제약상 허용가능한 염이며, 이것들 모두가 화학식 I의 범위에 속하고 상기 언급한 출원서 및 특허에 개시되어 있다:

[0088] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (본원에 기재한 돼지 연구에 사용됨),

[0089] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(2,3-디플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0090] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노-카르보닐메틸)-2-(3,4-디플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0091] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노-카르보닐메틸)-2-(2,3,4-트리플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0092] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노-카르보닐메틸)-2-(2-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0093] 1-(N-메틸-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0094] 1-(N-(2-(1-피페리디노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노-카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0095] 1-(N-(1-에틸피페리딘-4-일)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노-카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0096] 1-(N-(2-에틸아미노-2-메틸프로필)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0097] N-(2-tert-부틸아미노에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노-카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0098] 1-(N-(1-메틸피페리딘-4-일)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0099] 1-(N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0100] 1-(N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온,

[0101] 1-(N-(2-(에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온.

[0102] 이들 화합물의 제조 방법은 상기한 문헌에 개시되어 있다.

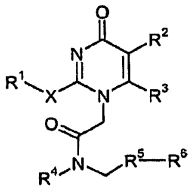
[0103] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온을 제조하는 두번째 방법은 출원 WO 03/016287 (미국 공개 번호 20050014793

A1)에서 찾을 수 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0104] **화학식 II**

[0105] 본 발명의 방법을 실시하는데 유용할 수 있는 추가 군의 화합물은 WO 02/30911에 개시되어 있고, 미국 특허 7,169,924가 이 국제 출원에 상응한다. 이들 문헌 둘다 그 전문이 본원에 포함된다. 이 경우에서의 화학식은 본원에서 하기 화학식 II로 표시된다:

[0106] <화학식 II>

[0107] 

[0108] 상기 식에서,

[0109] R^1은 $C_{(1-6)}$알킬, $C_{(1-6)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오, 히드록시, 할로겐, CN 및 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 아릴기이고,

[0110] R^2는 할로겐, $C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알콕시, 히드록시$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬티오, $C_{(1-3)}$알킬술피닐, 아미노$C_{(1-3)}$알킬, 모노- 또는 디-$C_{(1-3)}$알킬아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬카르보닐아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알콕시$C_{(1-3)}$알킬카르보닐아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬술포닐아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬카르복시 또는 $C_{(1-3)}$알킬카르복시$C_{(1-3)}$알킬이고,

[0111] R^3은 수소, 할로겐, $C_{(1-3)}$알킬 또는 히드록시$C_{(1-3)}$알킬이거나, 또는

[0112] R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리미돈 고리 탄소 원자와 함께 융합된 5원 또는 6원 카르보시클릭 고리를 형성하거나, 또는

[0113] R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리미돈 고리 탄소 원자와 함께 할로겐, $C_{(1-4)}$알킬, 시아노, $C_{(1-6)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오 또는 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 융합된 벤조 또는 헤테로아릴 고리를 형성하고,

[0114] R^4는 수소, 또는 치환되지 않을 수도 있고 히드록시, 할로겐, OR^7, COR^7, 카르복시, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10}, NR^7COR^8, 모노- 또는 디-(히드록시$C_{(1-6)}$알킬)아미노 및 N-히드록시$C_{(1-6)}$알킬-N-$C_{(1-6)}$알킬아미노로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 치환기로 치환될 수도 있는 $C_{(1-6)}$알킬이거나, 또는

[0115] R^4는 Het-$C_{(0-4)}$알킬 (여기서, Het는 N 및 임의로는 O 또는 S를 포함하는 5원 내지 7원의 헤테로시클릴 고리이고, 이때의 N은 COR^7, $COOR^7$ 또는 $CONR^9R^{10}$으로 치환될 수도 있고, 또는 히드록시, 할로겐, OR^7, COR^7, 카르복시, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$ 또는 NR^9R^{10}으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 치환기로 임의로 치환된 $C_{(1-6)}$알킬로 치환될 수도 있음), 예를 들어 피페리딘-4-일, 피롤리딘-3-일이고,

[0116] R^5는 $C_{(1-6)}$알킬, $C_{(1-6)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오, 아릴$C_{(1-6)}$알콕시, 히드록시, 할로겐, CN, COR^7, 카르복시, $COOR^7$, NR^7COR^8, $CONR^9R^{10}$, $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^7SO_2R^8$, NR^9R^{10}, 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬 및 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알콕시로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 고리이고,

[0117] R^6은 $C_{(1-18)}$알킬, $C_{(1-18)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오, $C_{(1-6)}$알킬술포닐, 아릴$C_{(1-6)}$알콕시, 히드록시, 할로겐, CN, COR^7,

카르복시, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^7COR^8, $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^7SO_2R^8$, NR^9R^{10}, 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬 및 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알콕시 또는 $C_{(5-10)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 추가로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 고리이고,

[0118] R^7은 수소 또는 $C_{(1-12)}$알킬, 예를 들어 $C_{(1-4)}$알킬 (예를 들어 메틸 또는 에틸)이고,

[0119] R^8은 수소, $OC_{(1-6)}$알킬 또는 $C_{(1-12)}$알킬, 예를 들어 $C_{(1-4)}$알킬 (예를 들어 메틸 또는 에틸)이고,

[0120] R^9 및 R^{10}은 동일하거나 상이할 수 있으며, 수소 또는 $C_{(1-12)}$알킬로부터 각각 선택되거나, 또는 R^9와 R^{10}이 이들이 부착된 질소와 함께 산소, 질소 및 황으로부터 선택된 1개 이상의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하고 히드록시, 옥소, $C_{(1-4)}$알킬, $C_{(1-4)}$알킬카르복시, 아릴, 예컨대 페닐, 또는 아르알킬, 예컨대 벤질로부터 선택된 1개 또는 2개의 치환기로 임의로 치환된 5원 내지 7원 고리, 예를 들어 모르폴린 또는 피페라진을 형성하며,

[0121] X는 메틸 및 에틸로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 치환기로 임의로 치환된 $C_{(2-4)}$알킬렌이거나, 또는 CH=CH이다.

[0122] 화학식 II의 모든 염도 본 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0123] 특별한 관심의 대상은, WO 02/30911에서 그에 기술된 화학식 I에 대해 기재된 바와 같이 R^1이 할로, C_1-C_6알킬, 트리플루오로메틸 또는 C_1-C_6알콕시로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 페닐기일 수 있는 본원의 화학식 II의 화합물이다. 보다 구체적으로는, 페닐은 치환되지 않거나 1개, 2개, 3개 또는 4개의 할로겐 치환기, 특히 1개 내지 3개의 플루오로기, 가장 특히 2,3-디플루오로, 2,4-디플루오로 또는 4-플루오로로 치환된다.

[0124] 여기서, 화학식 II의 추가의 실시양태에서는 Y가 $-CH_2CH_2-$이다.

[0125] 또한, 관심의 대상은 R^2가 수소 (치환기 없음)이거나 할로, C_1-C_6알킬, 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알킬, 모노 내지 퍼플루오로 C_1-C_4알콕시 또는 C_1-C_6알콕시, 특히 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알킬, 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알콕시 또는 C_1-C_6알콕시인 화학식 II의 화합물이다. 특별한 관심의 대상은 R^2가 수소 이외의 것이고 $(R^2)_n$에서의 n이 1, 2 또는 3이며 치환 패턴이 메타 및/또는 파라, 특히 파라인, 즉 4-위치 치환기인 화학식 II의 화합물이다. 또한, R^2가 4-트리플루오로메틸 또는 4-트리플루오로메톡시인 화합물도 참조한다.

[0126] R^3 및 R^4는 동일하거나 상이할 수 있고, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 n-부틸이다. 특별한 관심의 대상은 R^3 및 R^4가 동일하고 메틸 또는 에틸인 본원의 화학식 II의 화합물이며, 메틸인 경우에 특별한 관심이 있다.

[0127] R^5는 수소 또는 직쇄 또는 분지쇄 $C_{(1-6)}$알킬일 수 있다. 특별한 관심의 대상은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, 이소-부틸, t-부틸, n-펜틸 또는 n-헥실이다.

[0128] 본원의 화학식 II의 화합물 내에는

[0129] R^1이 2,3-디플루오로로 치환된 페닐이고,

[0130] R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리미딘 고리 탄소 원자와 함께 융합된 5원 시클로펜테닐 고리를 형성하고,

[0131] R^4가 2-(디에틸아미노)에틸이고,

[0132] R^5가 페닐이고,

[0133] R^6이 4-위치에서 트리플루오로메틸로 치환된 페닐, 또는 5-위치에서 트리플루오로메틸로 치환된 티엔-2-일이며,

[0134] X가 $(CH_2)_2$인

[0135] 추가의 하위군의 화합물이 존재한다는 것을 알 것이다.

[0136] 특히 관심의 대상이 되는 본원의 화학식 II의 화합물은

[0137] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0138] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0139] N-(2-에틸아미노-2-메틸-프로필)-2-(2-(2-(2,3-디플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)-아세트아미드 바이타르트레이트,

[0140] N-(2-t-부틸아미노에틸)-2-(2-(2-(2,3-디플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0141] N-(1-에틸-피페리딘-4-일)-2-(2-(2-(2,3-디플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0142] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-플루오로-2-(트리플루오로메틸)페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)-아세트아미드 바이타르트레이트,

[0143] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-플루오로-3-(트리플루오로메틸)페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)-아세트아미드 바이타르트레이트,

[0144] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(3-클로로-4-플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0145] (±)-N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2페닐-프로필)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0146] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(2,4-디플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0147] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(2,5-디플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0148] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(3,4-디플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0149] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(2-플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0150] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(3-플루오로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0151] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(3-클로로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0152] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-클로로페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0153] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-메틸페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0154] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페틸-4-일메틸)아세트아미드,

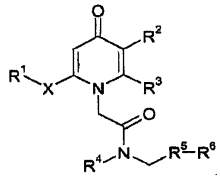
[0155] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-메톡시페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0156] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-(2-(2-(4-(트리플루오로메톡시)페닐)-에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트, 또는

[0157] 임의의 상기 바이타르트레이트 염의 유리 염기 또는 또다른 제약상 허용가능한 염이다.

[0158] 추가로, 관심의 대상은 WO 02/30904에 개시된 하기 화학식 III의 화합물 또는 그의 제약상 허용가능한 염이다:

[0159] <화학식 III>

[0160] 

[0161] 상기 식에서,

[0162] R^1은 $C_{(1-6)}$알킬, $C_{(1-6)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오, 히드록시, 할로겐, CN, 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬, 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알콕시아릴 및 아릴$C_{(1-4)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 아릴기이고,

[0163] R^2는 할로겐, $C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알콕시, 히드록시$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬티오, $C_{(1-3)}$알킬술피닐, 아미노$C_{(1-3)}$알킬, 모노- 또는 디-$C_{(1-3)}$알킬아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬카르보닐아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알콕시$C_{(1-3)}$알킬카르보닐아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬술포닐아미노$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-3)}$알킬카르복시 또는 $C_{(1-3)}$알킬카르복시$C_{(1-3)}$알킬이고,

[0164] R^3은 수소, 할로겐, $C_{(1-3)}$알킬 또는 히드록시$C_{(1-3)}$알킬이거나, 또는

[0165] R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리돈 고리 탄소 원자와 함께 융합된 5원 또는 6원 카르보시클릭 고리를 형성하거나, 또는

[0166] R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리돈 고리 탄소 원자와 함께 할로겐, $C_{(1-4)}$알킬, 시아노, $C_{(1-3)}$알콕시$C_{(1-3)}$알킬, $C_{(1-4)}$알콕시, $C_{(1-4)}$알킬티오 또는 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 융합된 벤조 또는 헤테로아릴 고리를 형성하고,

[0167] R^4는 수소, 또는 치환되지 않을 수도 있고 히드록시, 할로겐, OR^7, COR^7, 카르복시, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10}, NR^7COR^8, 모노- 또는 디-(히드록시$C_{(1-6)}$알킬)아미노 및 N-히드록시$C_{(1-6)}$알킬-N-$C_{(1-6)}$알킬아미노로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 치환기로 치환될 수도 있는 $C_{(1-6)}$알킬이거나, 또는

[0168] R^4는 Het-$C_{(0-4)}$알킬 (여기서, Het는 N 및 임의로는 O 또는 S를 포함하는 5원 내지 7원의 헤테로시클릴 고리이고, 이때의 N은 COR^7, $COOR^7$ 또는 $CONR^9R^{10}$으로 치환될 수도 있고, 또는 히드록시, 할로겐, OR^7, COR^7, 카르복시, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$ 또는 NR^9R^{10}으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 치환기로 임의로 치환된 $C_{(1-6)}$알킬로 치환될 수도 있음), 예를 들어 피페리딘-4-일, 피롤리딘-3-일이고,

[0169] R^5는 $C_{(1-6)}$알킬, $C_{(1-6)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오, 아릴$C_{(1-6)}$알콕시, 히드록시, 할로겐, CN, COR^7, 카르복시, $COOR^7$, NR^7COR^8, $CONR^9R^{10}$, $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^7SO_2R^8$, NR^9R^{10}, 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬 및 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알콕시로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 고리이고,

[0170] R^6은 $C_{(1-6)}$알킬, $C_{(1-6)}$알콕시, $C_{(1-6)}$알킬티오, $C_{(1-6)}$알킬술포닐, 아릴$C_{(1-6)}$알콕시, 히드록시, 할로겐, CN, COR^7,

카르복시, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^7COR^8, $SO_2NR^9R^{10}$, $NR^7SO_2R^8$, NR^9R^{10}, 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬 및 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알콕시 또는 $C_{(5-10)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 추가로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 고리이고,

[0171] R^7 및 R^8은 독립적으로 수소 또는 $C_{(1-12)}$알킬, 예를 들어 $C_{(1-4)}$알킬 (예를 들어 메틸 또는 에틸)이고,

[0172] R^9 및 R^{10}은 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각 수소 또는 $C_{(1-12)}$알킬로부터 선택되거나, 또는 R^9와 R^{10}이 이들이 부착된 질소와 함께 산소, 질소 및 황으로부터 선택된 1개 이상의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하고 히드록시, 옥소, $C_{(1-4)}$알킬, $C_{(1-4)}$알킬카르복시, 아릴, 예컨대 페닐, 또는 아르알킬, 예컨대 벤질로부터 선택된 1개 또는 2개의 치환기로 임의로 치환된 5원 내지 7원 고리, 예를 들어 모르폴린 또는 피페라진을 형성하며,

[0173] X는 $C_{(2-4)}$알킬렌기 (메틸 및 에틸로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 치환기로 임의로 치환됨), CH=CH, $(CH_2)_nS$ 또는 $(CH_2)_nO$ (여기서, n은 1, 2 또는 3임)이다.

[0174] 특별한 관심의 대상은 R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리돈 고리 탄소 원자와 함께 할로겐, $C_{(1-4)}$알킬, 시아노, $C_{(1-4)}$알콕시, $C_{(1-4)}$알킬티오 또는 모노 내지 퍼플루오로-$C_{(1-4)}$알킬로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 융합된 벤조 또는 헤테로아릴 고리를 형성하는 상기 화학식 III의 화합물이다. 바람직하게는, R^1은 할로겐, $C_{(1-6)}$알킬, 트리플루오로메틸, $C_{(1-6)}$알콕시, 바람직하게는 1개 내지 3개의 플루오로, 더욱 바람직하게는 2,3-디플루오로로 임의로 치환된 페닐이다. R^4의 대표적인 예는 1-위치에서 메틸, 이소프로필, 1-(2-메톡시에틸), 1-(2-히드록시에틸), t-부톡시카르보닐 또는 에톡시카르보닐메틸로 치환된 피페리딘-4-일; 2-위치에서 아미노에틸로 치환된 에틸; 1-에틸피페리디닐메틸; 피페리딘-4-일; 3-디에틸아미노프로필; 4-피롤리딘-1-일부틸 및 1-에틸피롤리딘-3-일을 포함한다. 바람직하게는, R^4는 1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일, 1-메틸피페리딘-4-일 또는 1-에틸피롤리딘-3-일이다. R^5의 대표적인 예는 페닐 및 피리딜을 포함한다. 바람직하게는, R^5는 페닐이다. R^6의 대표적인 예는 할로겐 또는 트리플루오로메틸로, 바람직하게는 4-위치에서 또한 헥실로 치환된 페닐을 포함한다. 바람직하게는, R^6은 4-위치에서 트리플루오로메틸로 치환된 페닐이다. R^6의 추가의 대표적인 예는 1개 이상의 $C_{(1-3)}$알킬로 치환된 페닐을 포함한다. 바람직하게는, R^6은 4-위치에서 에틸로 치환된 페닐이다. 바람직하게는, R^5와 R^6이 함께 4-(페닐)페닐 또는 2-(페닐)피리디닐 치환기를 형성하고, 여기서 떨어져 있는 페닐 고리는 할로겐 또는 트리플루오로메틸로, 바람직하게는 4-위치에서 임의로 치환될 수 있다. 바람직하게는, X는 $C_{(2-4)}$알킬렌, 더욱 바람직하게는 $C_{(2-3)}$알킬렌, 가장 바람직하게는 $(CH_2)_2$ 또는 CH_2S이다.

[0175] 화학식 III를 포함하는 화합물의 군에는

[0176] R^1이 2,3-디플루오로로 치환된 페닐이고,

[0177] R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리돈 고리 탄소 원자와 함께 융합된 벤조 또는 피리도 고리를 형성하고,

[0178] R^4가 1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일이고,

[0179] R^5와 R^6이 함께 4-(페닐)페닐 치환기를 형성하고, 여기서 떨어져 있는 페닐 고리는 트리플루오로메틸로, 바람직하게는 4-위치에서 치환되며,

[0180] X가 CH_2S 또는 $(CH_2)_2$인

[0181] 하위군의 화합물이 존재한다는 것을 알 것이다.

[0182] 하기하는 화학식 III의 화합물이 관심의 대상이다:

[0183] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이

페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0184] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0185] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0186] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0187] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0188] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0189] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0190] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0191] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0192] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-에틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0193] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[5-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-7-옥소-7H-티아졸로[4,5-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0194] (±)N-(1-에틸피롤리딘-3-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0195] (±)N-(1-에틸피롤리딘-3-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0196] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0197] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 디히드로클로라이드,

[0198] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 모노파라톨루엔술포네이트,

[0199] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0200] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 모노히드로클로라이드,

[0201] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 디히드로클로라이드,

[0202] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(4-플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0203] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(4-플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0204] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루

오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0205] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(4-플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0206] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(3,4-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0207] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2-플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0208] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(3-클로로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0209] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일)]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0210] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일)]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0211] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0212] N-(2-피롤리딘-1-일에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0213] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0214] N-(2-피페리딘-1-일에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-[N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0215] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)7-플루오로-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0216] N-(2-디에틸아미노에틸)-5-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-7-옥소-7H-티에노[3,2-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0217] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-5,6-디메틸-4-옥소-4H-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0218] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-5-에틸-4-옥소-4H-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0219] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0220] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0221] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-티에노[3,4-b]피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0222] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0223] N-(2-피롤리딘-1-일에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0224] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[6-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-4-옥소-4H-피라졸로[3,4-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0225] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메

틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0226] N-(1-에틸피페리딘-4-일메틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0227] N-(3-디에틸아미노프로필)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0228] N-(4-피롤리딘-1-일부틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0229] N-(3-디에틸아미노프로필)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0230] N-(4-피롤리딘-1-일부틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0231] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[5-(2,3-디플루오로벤질티오)-7-옥소-7H-티에노[3,2-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0232] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[5-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-7-옥소-7H-티아졸로[4,5-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0233] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-에틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0234] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-에틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0235] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-이소프로필바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0236] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-이소프로필바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0237] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0238] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0239] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0240] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0241] N-(1-에톡시카르보닐메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0242] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0243] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(3',4'-디메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0244] N-(1-(t-부톡시카르보닐)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0245] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(3',4'-디플루오로바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0246] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[6-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-티에노-[2,3-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플

루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0247] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0248] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3,4-트리플루오로페닐에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0249] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[6-(2,3-디플루오로벤질티오)-2-메틸-4-옥소-2,4-디히드로-피라졸로[3,4-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0250] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[6-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-에틸-4-옥소-2,4-디히드로피라졸로[3,4-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0251] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[6-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-이소프로필-4-옥소-2,4-디히드로피라졸로[3,4-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0252] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-에틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0253] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[5-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-7-옥소-7H-티아졸로[4,5-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0254] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[5-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-7-옥소-7H-티아졸로[4,5-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0255] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0256] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-트리메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0257] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-트리메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0258] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-트리메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0259] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[5-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-7-옥소-2,7-디히드로피라졸로[4,3-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0260] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[5-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-1-메틸-7-옥소-1,7-디히드로피라졸로[4,3-b]피리딘-4-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0261] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0262] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-7-메틸-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0263] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-7-메틸-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0264] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-7-메틸-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0265] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-7-메틸-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0266] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-7-메틸-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0267] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루

오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0268] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0269] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌-피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0270] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-5,6-트리메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0271] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-테트라메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0272] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-클로로바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0273] N-(1-메틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-클로로바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0274] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-클로로바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0275] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-클로로바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0276] N-(1-이소프로필피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-클로로바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0277] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[6-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-메틸-4-옥소-4H-피라졸로[3,4-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0278] N-(1-(t-부톡시카르보닐)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0279] N-(1-에틸피페리딘-4-일)-2-[6-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-2-(2-메톡시에틸)-4-옥소-4H-피라졸로[3,4-b]피리딘-7-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0280] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[4-옥소-2-(2-(2,3,4-트리플루오로페닐)에틸)-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0281] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,4-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0282] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(3-플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0283] N-(피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0284] N-(피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0285] N-(피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-5,6-트리메틸렌피리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0286] N-(피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0287] N-(피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-[1,8]나프티리딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 트리플루오로아세테이트,

[0288] N-(2-에틸아미노에틸)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐

-4-일메틸)아세트아미드,

[0289] N-(2-에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

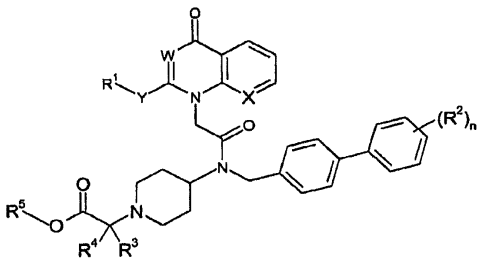
[0290] N-(1-(2-히드록시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트,

[0291] 또는 이들의 유리 염기 또는 또다른 제약상 허용가능한 염.

[0292] **화학식 IV**

[0293] 또한, 관심의 대상은 하기 화학식 IV의 화합물 또는 그의 제약상 허용가능한 염이다:

[0294] <화학식 IV>

[0295] 

[0296] 상기 식에서,

[0297] R^1은 치환되지 않거나 C_1-C_6알킬, C_1-C_6알콕시, C_1-C_6알킬티오, 아릴C_1-C_6알콕시, 히드록시, 할로, CN, COR^6, $COOR^6$, NR^6COR^7, $CONR^8R^9$, $SO_2NR^8R^9$, $NR^6SO_2R^7$, NR^8R^9, 할로C_1-C_4알킬 및 할로C_1-C_4알콕시로 구성된 군에서 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 치환된 아릴기이고,

[0298] W는 CH이고 X는 N이거나, W는 N이고 X는 CH이거나, W와 X가 둘다 CH이거나, 또는 W 및 X는 N이고,

[0299] Y는 C_2-C_4알킬이고,

[0300] R^2는 수소, C_1-C_6알킬, C_1-C_6알콕시, C_1-C_6알킬티오, 아릴C_1-C_6알콕시, 히드록시, 할로, CN, COR^6, 카르복시, $COOR^6$, NR^6COR^7, $CONR^8R^9$, $SO_2NR^8R^9$, $NR^6SO_2R^7$, NR^8R^9, 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_6알킬 또는 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_6알콕시이고,

[0301] n은 0 내지 5이고,

[0302] R^3은 C_1-C_4알킬이고,

[0303] R^4는 C_1-C_4알킬이고,

[0304] R^5는 수소, C_1-C_{10}알킬, C_2-C_{10}알케닐, C_2-C_{10}알키닐, 할로C_1-C_4알킬, C_3-C_8시클로알킬, C_3-C_8시클로알킬, C_3-C_8시클로알킬C_1-C_4알킬, C_5-C_8시클로알케닐, C_5-C_8시클로알케닐C_1-C_4알킬, 3원 내지 8원의 헤테로시클로알킬, 3원 내지 8원의 헤테로시클로알킬C_1-C_4알킬, C_6-C_{14}아릴, C_6-C_{14}아릴C_1-C_{10}알킬, 헤테로아릴 또는 헤테로아릴C_1-C_{10}알킬이고, 여기서의 각각의 기는 C_1-C_6알콕시, C_1-C_6알킬티오, 아릴C_1-C_6알콕시, 히드록시, 할로, CN, NR^8R^9 또는 할로C_1-C_4알콕시인 동일하고/하거나 상이한 기로 임의로 1회 이상 치환되고,

[0305] R^6 및 R^7은 독립적으로 수소 또는 C_1-C_{10}알킬이며,

[0306] R^8 및 R^9는 동일하거나 상이하고, 수소 또는 C_1-C_{10}알킬이거나, 또는 R^9와 R^{10}이 이들이 부착된 질소와 함께 산소,

질소 및 황으로부터 선택된 1개 이상의 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하고 히드록시, 옥소, C_1-C_4알킬, C_1-C_4 알킬카르복시, 아릴 및 아릴C_1-C_4알킬로 구성된 군에서 선택된 1개 또는 2개의 치환기로 임의로 치환된 5원 내지 7원 고리를 형성한다.

[0307] 화학식 IV의 범위에서 임의의 정의된 치환기 및/또는 그의 언급된 라디칼을 배제시키고자 하는 것은 아니지만, 하기하는 R기 및 그의 결합 라디칼이 특별한 관심의 대상이다:

[0308] R^1과 관련하여, 이것은 할로, C_1-C_6알킬, 트리플루오로메틸 또는 C_1-C_6알콕시로부터 선택된 동일하거나 상이할 수 있는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환기로 임의로 치환된 페닐기일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 페닐은 치환되지 않거나 1개, 2개, 3개 또는 4개의 할로겐 치환기, 특히 1개 내지 3개의 플루오로기, 가장 특히 2,3-디플루오로, 2,4-디플루오로 또는 4-플루오로로 치환된다.

[0309] 화학식 I의 추가의 실시양태에서, Y는 $-CH_2CH_2-$이다.

[0310] 본 발명은 또한 R^2가 수소 (치환기 없음)이거나 할로, C_1-C_6알킬, 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알킬, 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알콕시 또는 C_1-C_6알콕시, 특히 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알킬, 모노 내지 퍼플루오로-C_1-C_4알콕시 또는 C_1-C_6알콕시인 화학식 I의 화합물을 제공한다. 특별한 관심의 대상은 R^2가 수소 이외의 것이고, $(R^2)_n$에서의 n이 1, 2 또는 3이며, 치환 패턴이 메타 및/또는 파라, 특히 파라인, 즉 4-위치 치환기인 화합물이다. 예시적인 화합물은 R^2가 4-트리플루오로메틸 또는 4-트리플루오로메톡시인 화합물을 포함한다.

[0311] R^3 및 R^4는 동일하거나 상이할 수 있고, 메틸, 에틸, n-프로필 또는 n-부틸이다. 특별한 관심의 대상은 R^3 및 R^4가 동일하고 메틸 또는 에틸인 화학식 I의 화합물이고, 메틸인 경우에 특별한 관심이 있다.

[0312] R^5는 수소 또는 직쇄 또는 분지쇄 $C_{(1-6)}$알킬일 수 있다. 특별한 관심의 대상은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, 이소-부틸, t-부틸, n-펜틸 또는 n-헥실이다.

[0313] 본원에서 상기 기재한 임의의 화합물은 결정질 또는 비-결정질 형태로 제조될 수 있고, 결정질인 경우에는 예를 들어 수화물로서 용매화될 수 있다. 본 발명의 범위 내에는 화학량론적 용매화물 (예를 들어 수화물)이 포함된다.

[0314] 본원에 기재한 특정 화합물은 1개 이상의 키랄 원자를 함유할 수도 있고, 또는 다르게는 2종의 거울상이성질체로 존재할 수도 있다. 본원에 기재한 바와 같은 방법에 유용한 화합물은 거울상이성질체들의 혼합물 뿐만이 아니라 정제된 거울상이성질체 또는 거울상이성질체적으로 풍부한 혼합물도 포함한다. 또한, 본 발명의 범위 내에는 화학식 I 내지 IV로 표시한 화합물의 개개의 이성질체 뿐만이 아니라 임의의 전체적으로 또는 부분적으로 평형화된 이들의 혼합물도 포함된다. 본 발명은 또한 1개 이상의 키랄 중심이 반전된 이성질체들의 혼합물로서의 청구된 화합물의 개개의 이성질체를 포함한다. 또한, 청구된 화합물의 임의의 호변이성질체 및 이들 호변이성질체들의 혼합물도 화학식 I 내지 IV의 화합물의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다. 상이한 이성질체 형태들은 통상의 방법을 통해 서로 분리되거나 분할될 수도 있고, 또는 임의의 주어진 이성질체가 통상의 합성 방법 또는 입체특이적 또는 비대칭 합성법으로 수득될 수도 있다.

[0315] **화학식 I, II, III 및 IV의 화합물의 합성**

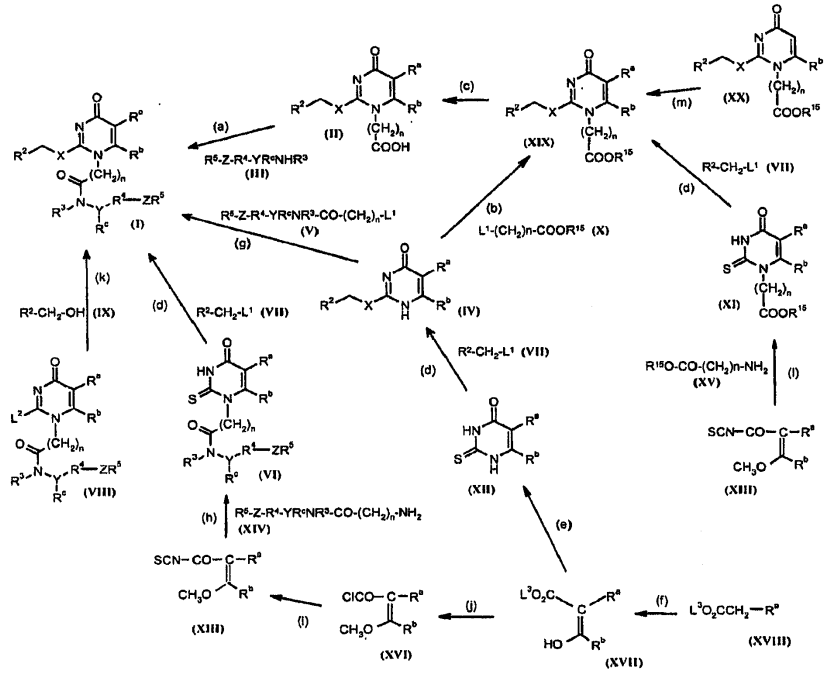
[0316] 화학식 I, II 및 III의 화합물을 제조하는 방법은 특허 문헌에 공개되어 있다. 예를 들어, 화학식 I의 화합물을 제조하는 방법은 WO 01/60805 및 WO 03/016287에서 찾을 수 있다. 화학식 II의 화합물을 제조하는 방법은 WO 02/30911에 기재되어 있다. 화학식 III의 화합물을 제조하는 방법은 WO 02/30904에서 찾을 수 있다. 본 명세서는 미국 가출원 60/829,328 및 동 60/829,327의 방법을 따라한 화학식 IV의 화합물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 문헌은 본원에 구체적으로 참고로 포함된다.

[0317] 몇가지 합성 실시예를 하기 기재한다. 본원의 실시예에 기재된 화합물의 여러가지 일반적인 군을 차별화하기 위해서, 화학식 I과 관련이 있는 물질은 "합성 실시예 (I)-1" 등으로 표시하였고, 화학식 II와 관련이 있는 물질은 "합성 실시예 (II)-1" 등으로 표시하였고, 화학식 III과 관련이 있는 물질은 "합성 실시예 (III)-1" 등으로 표시하였으며, 화학식 IV와 관련이 있는 물질은 "합성 실시예 (IV)-1" 등으로 표시하였다.

[0318] **화학식 I의 화합물의 합성**

[0319] 화학식 I의 화합물은 WO 01/60805에 개시된 바와 같은 공정 반응식 I로 제조될 수 있다:

[0320] <반응식 I>



[0321]

[0322] 여기서,

[0323] L^3은 $C_{(1-6)}$알킬기, 예를 들어 메틸이고,

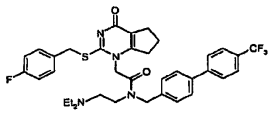
[0324] R^{15}는 $C_{(1-6)}$알킬기, 예를 들어 에틸 또는 t-부틸이며,

[0325] L^1, L^2, R^a, R^b, R^c, R^2, R^3, R^4, R^5, n, X, Y 및 Z는 WO 01/60805에서 정의된 바와 같다.

[0326] 관심 화학식 I의 화합물을 제조하는 반응의 예는 다음과 같다:

[0327] 합성 실시예 (I)-1a

[0328] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노카르보닐-메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온

[0329] 

[0330] WO 01/60805의 중간체 B69 (87.1 g, 0.26 mol)를 디클로로메탄 (2.9 리터) 중에 현탁하였다. 1-히드록시벤조트리아졸 수화물 (35.2 g, 0.26 mol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드 (99.7 g, 0.52 mol)를 첨가하고, 상기 현탁액을 5분 동안 교반하였고, 이 시간까지 완전한 용해가 달성되었다. WO 01/60805의 중간체 A30 (91.2 g, 0.26 mol)을 디클로로메탄 (100 mL) 중의 용액으로서 5분에 걸쳐 첨가하고, 상기 용액을 4시간 동안 교반하였다. 포화 염화암모늄 용액:물 혼합물 (1:1, 1 리터)을 첨가하고, 상기 용액을 10분 동안 교반하였다. 유기상을 분리하여 포화 염화암모늄:물 혼합물 (1:1, 1 리터)로 추출하였고, 추출액은 pH 6이었다. 유기상을 분리하여 아세트산 (10 mL)을 함유하는 물 (1 리터)로 추출하였고, 추출액은 pH 5였다. 디클로로메탄 층을 분리하여 포화 탄산나트륨 용액:물:포화 염수 혼합물 (1:3:0.2, 1 리터)로 추출 (pH 10.5)한 후에 포화 염수:물 혼합물 (1:1, 1 리터)로 추출하였다. 갈색 용액을 탈색용 목탄 (35 g)의 존재하에 무수 황산나트륨에서 건조시켜 여과하고, 용매를 진공하에 제거하여 짙은 갈색 발포체를 수득하였다. 상기 발포체를 이소-프로필 아세테이트 (100 mL) 중에 용해하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 짙은 갈색의 고

무성 잔류물을 비등하는 이소-프로필 아세테이트 (500 mL) 중에 용해하고 실온으로 냉각시켜 접종하고 밤새 교반하였다. 이로써 생성된 옅은 크림색 고체를 여과하고, 이소-프로필 아세테이트 (100 mL)로 세척하였다. 고체를 신터(sinter)에서 1시간 동안 흡입 건조시킨 후에 이소-프로필 아세테이트 (400 mL)로부터 재결정화하였다. 밤새 교반한 후, 형성된 고체를 여과하여 이소-프로필 아세테이트 (80 mL)로 세척하고 진공하에 건조시켜서 표제 화합물 110 g을 63.5% 수율로 수득하였다.

[0331] **^{1}H NMR ($CDCl_3$, 약 1.9:1 회전이성질체 혼합물) δ 0.99 (6H, t), 2.10 (2H, m), 2.50 (4H, q), 2.58/2.62 (2H, 2 x t), 2.70/2.82 (2H, 2 x t), 2.86 (2H, t), 3.28/3.58 (2H, 2 x t), 4.45/4.52 (2H, 2 x s), 4.68/4.70 (2H, 2 x s), 4.93 (2H, s), 6.95 (2H, m), 7.31 (2H, d), 7.31/7.37 (2H, 2 x m), 7.48/7.52 (2H, d), 7.65 (2H, m), 7.72 (2H, m); MS (APCI) $(M+H)^+$ 667; mp 125°C** (DSC에 의함 - 비대칭적인 흡열).

[0332] 합성 실시예 (I)-1(b)

[0333] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노카르보닐-메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 바이타르트레이트

[0334] WO 01/60805의 중간체 A30 및 B69로부터 WO 01/60805에서의 실시예 1의 방법으로 제조하였다.

[0335] **^{1}H-NMR (d_6-DMSO, 약 1:1 회전이성질체 혼합물) □ 0.92/0.99 (6H,2x t), 1.99 (2H,m), 2.54 (6H,m), 2.68/2.74 (4H,m), 3.36 (2H,m), 4.21 (2H,s), 4.37/4.44 (2H,2x s), 4,63/4.74 (2H,2x s), 4,89/5.13 (2H,2x s), 7.08/7.14 (2H,2x m), 7.36-7.50 (4H, m), 7.64/7.70 (2H,2x d), 7.83 (4H,m); MS (APCI+) 측정치 (M+1) = 667; $C_{36}H_{38}F_4N_4O_2S$** 요구치 666.

[0336] 합성 실시예 (I)-1(c)

[0337] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)아미노카르보닐-메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 히드로클로라이드

[0338] 실시예 (I)-I(a)로부터의 유리 염기 (3.00 g, 0.0045 mol)를 이소프로판올 (30 mL) 중에 교반하면서 현탁시키고 45℃로 가온하여 투명한 용액을 수득하였다. 이어서, 상기 용액을 주위 온도로 냉각시키고 진한 염산 (0.40 mL, 0.045 mol)을 첨가하였다. 이어서, 생성된 슬러리를 주위 온도에서 35분 동안 교반한 후에 35분 동안 0℃로 냉각시켰다. 이어서, 상기 슬러리를 여과하여 이소프로판올 (10 mL)로 세척한 후에 헵탄 (30 mL)으로 세척하고, 진공하에 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다 (3.00 g, 95%).

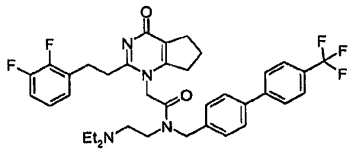
[0339] **^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.38 (6H, t), 2.08 (2H, m), 2.82 (2H, t), 2.99 (2H, t), 3.19 (4H, m), 3.35 (2H, m), 3.97 (2H, s), 4.42 (2H, s), 4.81 (2H, s), 4.99 (2H, s), 6.87 (2H, t), 7.26 (2H, t), 7.33 (2H, d), 7.41 (2H, d), 7.53 (2H, d), 7.71 (2H, d), 11.91 (1H, s).**

[0340] **화학식 II의 합성**

[0341] 화학식 II의 화합물을 제조하는 방법에 관한 설명 및 상기 명명한 화합물을 위한 중간체 및 최종 생성물의 예는 공개된 국제 출원 WO 02/30911에서 찾을 수 있으며, 상기 문헌은 본원에 참고로 포함된다. 본 발명에 유용한 화합물을 제조하는 마지막 단계 방법은 실시예 (II)-1이다.

[0342] 합성 실시예 (II)-1

[0343] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드 바이타르트레이트

[0344] 

[0345] 디클로로메탄 (10 mL) 중 N,N-디에틸-N'-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)-에탄-1,2-디아민 (WO 02/30911의 중간체 D4) (0.50 g, 1.44 mmol), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 (0.56 g, 1.45

mmol), 1-히드록시벤조트리아졸 수화물 (0.12 g) 및 2-(2-[2-(2,3-디플루오로페닐)-에틸]-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일)-아세트산 (WO 02/30911의 중간체 C1) (0.48 g, 1.44 mmol)의 용액을 주위 온도에서 밤새 교반한 후에 디클로로메탄 (30 mL)으로 희석하고 수성 중탄산나트륨으로 세척하여 증발시켰다. 잔류물을 크로마토그래피 (10 g 실리카 카트리지, 에틸 아세테이트-아세톤)로 정제하여 표제 화합물을 황색 발포물 (유리 염기)로서 수득하였다 (0.50 g, 52%).

[0346] **^{1}H-NMR (DMSO, 회전이성질체 혼합물) δ 0.83-0.89 (6H, m), 1.98 (2H, m), 2.40 (4H, m), 2.45-2.82 (10H, m), 3.02 (2H, m), 4.64/4.75 (2H,2x s), 4.96/5.19 (2H,2x s), 7.11-7.40 (5H, m), 7.65 (2H, m), 7.84 (4H, m); MS (APCI+) 측정치 (M+1) = 667; $C_{37}H_{39}F_5N_4O_2$ 요구치 666.**

[0347] d-타르타르산 (0.09 g, 0.60 mmol)을 교반하에 메탄올 (10 mL) 중 상기 유리 염기 (0.40 g, 0.60 mmol)의 용액에 첨가하였다. 생성된 용액을 증발시켜 상기 염을 수득하였다 (0.49 g).

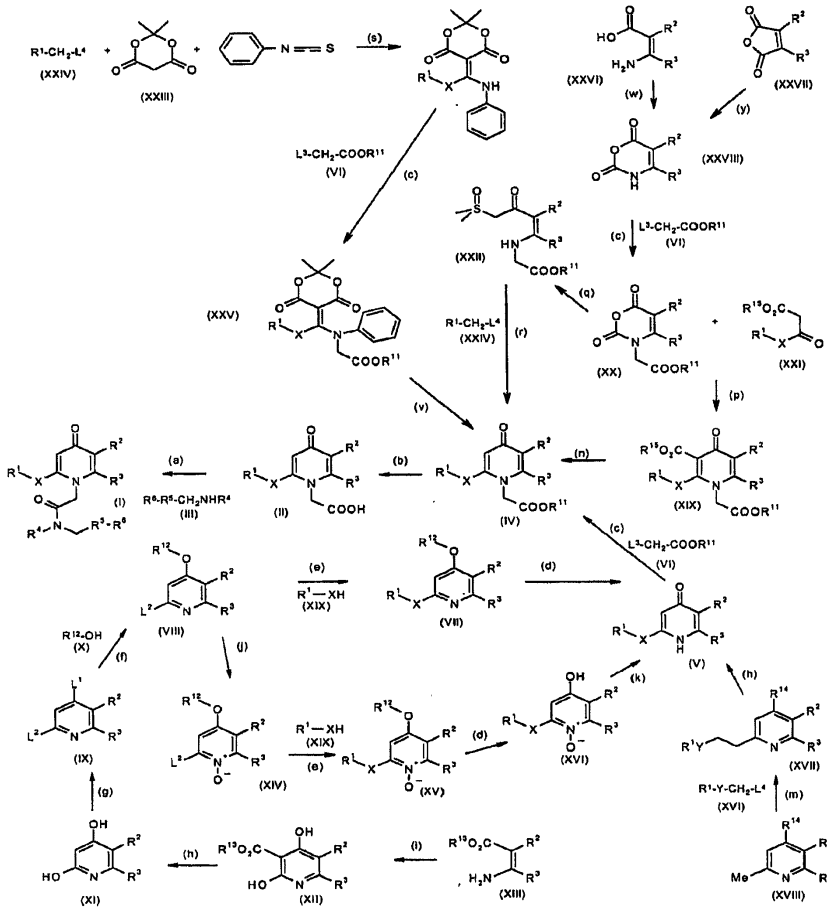
[0348] **^{1}H-NMR (DMSO, 회전이성질체 혼합물) δ 0.85-0.97 (6H, m), 1.91-2.00 (2H, m), 2.40-2.49 (4H, m), 2.54-2.82 (10H, m), 3.02-3.46 (2H, m), 4.20 (2H, s), 4.64/4.75 (2H, 2x s), 4.97/5.18 (2H, 2x s), 7.11-7.40 (5H, m), 7.65 (2H, m), 7.84 (4H, m); MS (APCI+) 측정치 (M+1) = 667; $C_{37}H_{39}F_5N_4O_2$ 요구치 666.**

[0349] 이러한 방법에 따르거나 별법으로는 WO 02/30911에 기재된 다른 방법에 따라서, 화학식 II의 구조를 갖는 앞서 명명한 다른 화합물을 제조할 수 있다.

[0350] **<u>화학식 III의 합성</u>**

[0351] 화학식 III의 화합물의 전체 합성법을 WO 02/30904에 제시된 바와 같은 하기 반응식 III에 예시한다:

[0352] <반응식 III>

[0353] 

[0354] 상기 반응식에서, 에스테르 (IV)는 일반적으로 (VI) (여기서의 R^{11}은 이하 정의됨)을 사용하여 (V)를 N-1 알킬화하여 제조되며, 예를 들어 (VI)은 염기, 예를 들어 THF 중 BuLi 또는 N-메틸 피롤리디논 (NMP) 중 수소화나트륨

의 존재하의 t-부틸 브로모아세테이트 또는 에틸 브로모아세테이트이다 (단계 c).

[0355] X가 CH_2S인 경우, 핵심 중간체 (IV)는 (XX)를 디메틸옥소술포늄 메틸리드 (트리메틸술폭소늄 요오다이드를 저온에서 수소화나트륨으로 처리하여 생성됨)와 반응시켜 황 일리드 (XXII)를 수득 (단계 q)하여 합성될 수 있다. 이후에 (XXII)를 디이소프로필아민의 존재하에 이황화탄소로 처리한 후 $R^1CH_2-L^4$ (여기서, L^4는 이탈기임)로 처리하여 중간체 (IV)를 수득한다 (단계 r).

[0356] 별법으로, X가 CH_2S인 경우에는 R^1X 치환기가 피리딘 (VIII) 또는 피리딘 N-옥시드 (XIV)의 이탈기 L^2 (예를 들어 Cl)를 대체 (단계 e)하며 도입되어 2-치환된 피리딘 (VII) 및 (XV)를 생성할 수 있다. (VII) 또는 (XV)를 4-피리돈 (V)으로 변환시키는 것은, 4-산소를 탈보호 (예를 들어, R^{12} = 알릴인 경우에는 수성 에탄올 중의 $(Ph_3P)_3RhCl$ 사용) (단계 d)하고, 이후에 (XVI)의 경우에는 아세트산 중 Pd/C의 존재하에 수소를 사용하여 N-옥시드 치환기를 제거 (단계 k)함으로써 수행된다. 피리딘 (VIII) 또는 피리딘 N-옥시드 (XIV)는 하기 설명하는 단계 (i), (h), (g), (f) 및 (j)로 제조될 수 있고, R^1-CH_2SH (XIX)는 전형적으로는 티오아세테이트 (상응하는 알킬 브롬화물 R^1-CH_2Br로부터 형성됨)로부터 제조된다:

[0357] (j) (VIII)를 디클로로메탄 중 m-클로로퍼벤조산으로 처리함,

[0358] (f) (IX)를 $R^{12}OH$ (X) (여기서, R^{12}는 알릴임) 및 DMF 중 수소화나트륨으로 처리함,

[0359] (g) (XI)를 옥시염화인으로 처리함,

[0360] (h) 가열하면서 (XII)를 수성 HCl로 처리함,

[0361] (i) (XIII) (여기서, R^{13}은 $C_{(1-6)}$알킬이고, 전형적으로는 R^{13} = Et임)를 알콜 중 디-저급 알킬 말로에이트 및 나트륨 알콕시드로 처리함.

[0362] 별법으로, X가 CH_2S이고 R^2와 R^3이 이들이 부착된 피리돈 고리 탄소 원자와 함께 융합된 벤조 고리를 형성하는 경우, 중간체 (IV)는 하기 설명하는 단계 (s), (c) 및 (v)를 통해 공지의 출발 물질로부터 합성될 수 있다:

[0363] (s) 멜드럼(Meldrum's) 산 (XXIII)을 저온에서 수소화나트륨으로 처리한 후에 페닐이소티오시아네이트와 반응시킨 후 $R^1CH_2-L^4$와 반응시킴,

[0364] (c) 앞서 논의한 바와 같음,

[0365] (v) (XXV)를 트리플루오로아세트산으로 처리함.

[0366] X가 알킬렌인 경우에는 하기 설명하는 단계 (m) 및 (h) (중간체 (XVII), (XVIII)) 또는 단계 (n) 및 (p) (중간체 (XIX), (XX), (XXI))를 이용하는 것이 바람직하다:

[0367] (h) 예를 들어 (XVII) (여기서, R^{14} = Cl임)를 수성 HCl 및 디옥산으로 처리하거나 R^{14} = OR^{12}인 경우에는 예를 들어 단계 (d)의 조건을 이용하여 R^{14}를 탈보호하여 4-치환된 피리딘을 4-피리돈으로 변환시킴,

[0368] (m) 2-메틸피리딘 (XVIII)을 $R^1-Y-CH_2-L^4$ (XVI) (여기서, L^4는 이탈기임) 및 THF 중 BuLi와 같은 강염기로 처리하여 예를 들어 X = YCH_2CH_2인 2-알킬 피리딘을 쇄 연장시킴.

[0369] 별법의 경로에서, 3-에스테르기는 중간체 (XIX) (여기서, R^{15} = $C_{(1-6)}$알킬임)로부터 디페닐 에테르 (여기서, R^{15} = tBu임) 중에서의 가열로 제거 (단계 n)되고, 중간체 (XIX)는 2,6-디옥소-1,3-옥사진 (XX) 및 에스테르 (XXI)로부터 염기, 예컨대 DMF 중 NaH또는 디클로로메탄 중 1,8-디아자바이시클로[5.4.0]운데크-7-엔 처리로 형성된다.

[0370] 공지된 출발 물질로부터의 (XX) 합성은 하기 설명하는 단계 (w) 및 (c) 또는 단계 (y) 및 (c)를 통해 달성될 수 있다:

[0371] (w) (XXVII)를 THF 중 아지도트리메틸실란으로 처리함,

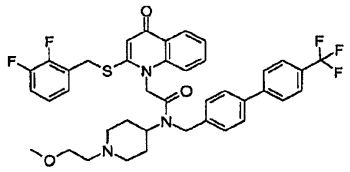
[0372] (y) (XXVI)을 포스겐으로 처리함,

[0373] (c) 앞서 기재한 바와 같음.

[0374] 화학식 III의 화합물의 제조 방법에 관한 추가의 상세사항 및 설명에 대하여는 WO 02/30904를 참조하고, 상기 문헌은 본원에 참고로 포함된다.

[0375] 합성 실시예 (III)-1

[0376] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드

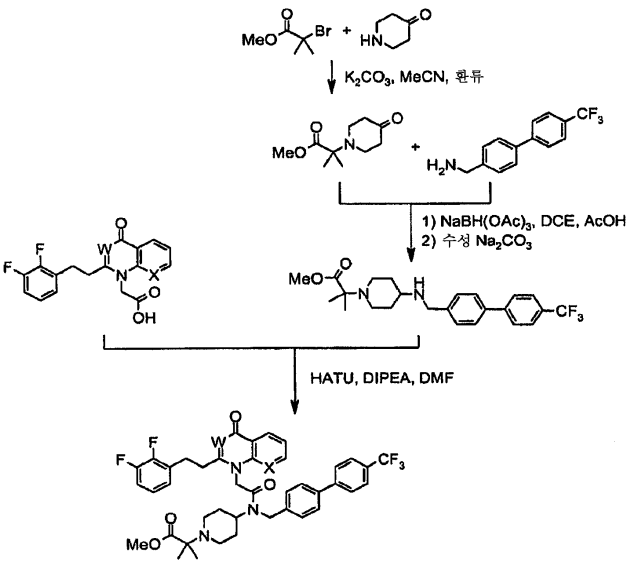
[0377] 

[0378] 용매로서 디클로로메탄 대신에 DMF를 사용하였다는 점을 제외하고는 WO 02/30904에 기재된 실시예 1의 방법으로 상기 유리 염기를 중간체 E1 및 중간체 A42로부터 제조하였다. n-부틸 아세테이트 (10 mL)로부터 상기 물질 1.97 g을 결정화하여 표제 화합물을 수득하였다 (1.35 g).

[0379] ^{1}H-NMR (CD_3OD) δ 1.7-2.05 (4H, m), 2.05-2.3 (2H, 2xt), 2.5-2.65 (2H, m), 2.95-3.1 (2H, m), 3.3 (3H, s), 3.45-3.55 (2H, m), 3.9-4.05 + 4.4-4.5 (1H, 2xm), 4.37 + 4.48 (2H, 2xs), 4.71 + 4.87 (2H, 2xbr s), 5.31 + 5.68 (2H, 2xs), 6.44 + 6.52 (1H, 2xs), 6.95-7.3 (3H, m), 7.35-7.85 (11H, m), 8.2-8.35 (1H, m); MS (APCI+) 측정치(M+1) 736; $C_{40}H_{38}F_5N_3O_3S$ 요구치 735.

[0380] **화학식 IV의 합성**

[0381] 하기하는 흐름도는 본 발명의 화합물을 제조하는 방법을 예시한다:

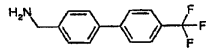
[0382] 

[0383] 또한, 상기 흐름도에 기재한 중간체 중 일부를 제조하는데 유용할 수 있는 화학물질에 대하여는 PCT 출원 공개 WO 03/016287을 참조한다. 이러한 화학물질은 이 경우에 유용한 정도까지 본원에 전문이 기재된 것과 마찬가지로 본원에 참고로 포함된다. 또한, PCT 출원 공개 WO 01/60805, WO 02/30911, WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO 03/041712, WO 03/086400 및 WO 03/87088, 및 동시 계류 중인 상기 미국 가출원 60/829,328 및 동 60/829,327 (둘다 2006년 10월 13일자로 출원됨)에 기재된 합성법을 참조한다. 앞의 경로에서와 다른 중간체, 시약, 용매, 시간, 온도 등을 사용하여 화학식 IV의 화합물을 제조하고자 한다면, 상기한 PCT 출원 공개 및 동시 계류 중인 미국 출원이 유용한 지침을 제공할 수 있다. 이들 출원서의 화학물질이 본 발명의 화합물 제조

와 관련이 있는 경우, 이러한 물질들은 본원에 참고로 포함된다.

[0384] 중간체 (IV)-A1

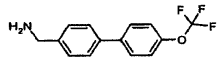
[0385] {[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아민

[0386] 

[0387] 상기 화합물의 제조법은 WO 02/30911에 중간체 D7로서 기재되어 있다.

[0388] 중간체 (IV)-A2

[0389] {[4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아민 히드로클로라이드

[0390] 

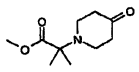
[0391] 에탄올 (2000 mL) 및 진한 염산 (100 mL) 중 4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐카르보니트릴 (4'-트리플루오로메틸 유사체, WO 02/30911의 중간체 D6에 대해 기재된 것과 유사한 방법을 이용하여 {4-[(트리플루오로메틸)옥시]페닐}보론산으로부터 제조함) (66.6 g)의 용액을 환원 완료시까지 25 psi에서 펄맨(Pearlman's) 촉매 (10 g)상에서 수소화하였다. 상기 촉매를 셀라이트를 통한 여과로 제거한 후에 용매를 진공하에 제거하여 원하는 생성물을 수득하였다.

[0392] LCMS Rt = 2.212 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 251.0

[0393] **화학식 IV의 제조를 위한 중간체**

[0394] 중간체 (IV)-A3

[0395] 메틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트

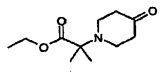
[0396] 

[0397] 메틸 2-브로모-2-메틸프로파노에이트 (80.87 mL, 5 당량), 4-피페리돈 히드로클로라이드 일수화물 (19.6 g, 1 당량), 아세토니트릴 (200 mL) 및 탄산칼륨 (69.1 g, 4 당량)의 혼합물을 17.5시간 동안 기계적 교반하에서 질소하에 환류 가열한 후에 빙조에서 냉각시키고 디에틸 에테르 (100 mL)를 첨가하였다. 셀라이트를 통해 여과한 후에 플래쉬(flash) 크로마토그래피 (실리카, 헥산 중 10%→50% 에틸 아세테이트)를 실시하고 생성물 분획물을 증발시켜서 원하는 생성물을 황색 오일로서 수득하였다 (14.28 g).

[0398] ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.41 (6H,s), 2.47 (4H,m), 2.88 (4H,m), 3.73 (3H,s).

[0399] 중간체 (IV)-A4

[0400] 에틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트

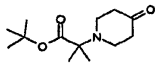
[0401] 

[0402] 에틸 2-브로모-2-메틸프로파노에이트 (48.3 mL, 5 당량), 4-피페리돈 히드로클로라이드 일수화물 (100 g, 1 당량), 아세토니트릴 (1216 mL) 및 탄산칼륨 (353 g, 4 당량)의 혼합물을 20시간 동안 기계적 교반하에서 질소하에 환류 가열한 후에 빙조에서 냉각시키고 디에틸 에테르 (대략 1400 mL)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 진공하에 증발시킨 후에 잉여 브로모에스테르를 증류해 냈다 (50℃ 스틸 헤드(still head) 온도/10 Torr). 플래쉬 크로마토그래피 (실리카, 헥산 중 5%→30% 에틸 아세테이트)를 실시하고 생성물 분획물을 증발시켜서 조 생성물을 황색 오일로서 수득하였다. 남아있는 약간의 브로모에스테르 오염물질을 제거하기 위해서, 이것을 에틸 아세테이트와 2 M 수성 염산 사이에 분배하였다. 유기층은 버리고, 수성 층을 탄산나트륨으로 염기성화하여 염화나트륨으로 포화시키고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 추출물을 건조 및 증발시켜서 원하는 생성물을 황색 오일로서 수득하였다 (54.7 g).

[0403] ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.27 (3H,t), 1.40 (6H,s), 2.47 (4H,m), 2.90 (4H,m), 4.20 (2H,q).

[0404] 중간체 (IV)-A5

[0405] 1,1-디메틸에틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트

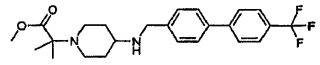
[0406] 

[0407] 1,1-디메틸에틸 2-브로모-2-메틸프로파노에이트 (8.0 g, 1.1 당량), 4-피페리돈 히드로클로라이드 (5.0 g, 1 당량), 아세톤 (50 mL) 및 탄산칼륨 (13.0 g, 3 당량)의 혼합물을 24시간 동안 교반하면서 환류 가열한 후에 여과하고, 여액을 증발시켰다. 조 잔류물을 정제없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0408] **ES+MS m/z $[M+H-tBu]^+$ =186.1**

[0409] 중간체 (IV)-B1

[0410] 메틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트

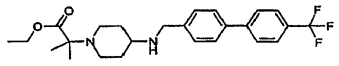
[0411] 

[0412] 메틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트 (중간체 A3) (14.28 g, 1 당량), {[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아민 (중간체 A1) (19.6 g, 0.85 당량), DCE (300 mL), 아세트산 (3.8 mL, 0.90 당량) 및 트리아세톡시수소화붕소나트륨 (20.7 g, 1.25 당량)의 혼합물을 실온에서 질소하에 17.5시간 동안 교반하였다. 수성 탄산나트륨 (2 M 용액, 과량)을 첨가하고 4시간 동안 교반한 후에 상기 혼합물을 디에틸 에테르 및 THF의 혼합물로 추출하였다. 유기 추출물을 물 및 염수로 다시 세척하여 황산나트륨에서 건조시키고, 실리카겔 패드로 여과하여 DCM 중 2.5% 메탄올로 세정하였다. 진공하에 증발시킨 후에 조 생성물을 에테르/헥산으로부터 결정화 (마지막에는 빙조 온도에서)하고, 이것을 건조시킨 후에 백색 고체를 수득하였다 (20.9 g).

[0413] **LCMS Rt = 2.070 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 435.2**
^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.15-1.32 (8H, m), 1.75-187(2H,m), 1.97-2.12 (2H,m), 2.27-2.40 (1H, m), 2.77-2.90(2H,m), 3.60 (3H,s), 3.76 (2H,s), 7.46 (2H, d, J=8.03Hz), 7.67 (2H, d, J=8.28Hz), 7.80 (2H, d, J=8.53Hz), 7.88 (2H, d, 8.03Hz)

[0414] 중간체 (IV)-B2

[0415] 에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트

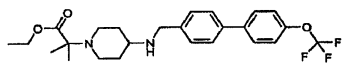
[0416] 

[0417] 에틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트 (중간체 A4) (25.6 g, 1.2 당량), {[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아민 (중간체 A1) (31.1 g, 1.0 당량), DCE (400 mL) 및 아세트산 (6.3 mL, 1.1 당량)의 혼합물을 실온에서 질소하에 교반하였다. 트리아세톡시수소화붕소나트륨 (33.5 g, 1.5 당량)을 첨가하고, 19시간 동안 교반을 계속하였다. 수성 탄산나트륨 (2 M 용액, 과량)을 첨가하고, 1.5시간 동안 교반한 후에 상기 혼합물을 디에틸 에테르 및 THF의 혼합물로 추출하였다. 유기 추출물을 물 및 염수로 다시 세척하고, 실리카겔 패드로 여과하여 황산나트륨에서 건조시키고 진공하에 증발시켰다. 원하는 생성물을 백색 고체로서 수득 (44.2 g)하였고, 이것을 추가의 정제없이 사용하였다.

[0418] **LCMS Rt = 2.194 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 449.3**
^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.06-1.32 (11H,m), 1.74-1.89 (2H,m), 1.99-2.14 (2H, m), 2.25-2.39 (1H. m), 2.69-2.89 (2H, m), 3.75 (2H, s), 4.01-4.12 (2H, m), 7.45 (2H, d, J=7.55 Hz), 7.67 (2H, d, J=7.81 Hz), 7.79 (2H, d, J=8.06 Hz), 7.88 (2H. d, J=8.06Hz)

[0419] 중간체 (IV)-B3

[0420] 에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트

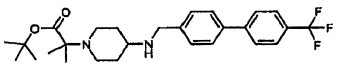
[0421] 

[0422] 에틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트 (중간체 A4) (1.09 g, 1.2 당량), ({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아민 히드로클로라이드 (중간체 A2) (1.28 g, 1.0 당량), DCE (21 mL) 및 아세트산 (0.27 mL, 1.1 당량)의 혼합물을 실온에서 질소하에 교반하였다. 트리아세톡시수소화붕소나트륨 (1.42 g, 1.5 당량)을 첨가하고, 3시간 동안 교반을 계속하였다. 수성 탄산나트륨 (2 M 용액, 과량)을 첨가하고 45분 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 디에틸 에테르/THF 및 물의 혼합물로 분배하였다. 유기 추출물을 물 및 염수로 다시 세척하여 황산나트륨에서 건조시키고 진공하에 증발시켰다. 원하는 생성물을 밝은 황색 고체로서 수득 (2.14 g)하였고, 이것을 추가의 정제없이 사용하였다.

[0423] **LCMS Rt = 2.244 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 465.3**

[0424] 중간체 (IV)-B4

[0425] 1,1-디메틸에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트

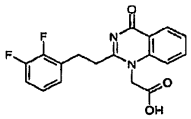
[0426] 

[0427] 1,1-디메틸에틸 2-메틸-2-(4-옥소-1-피페리디닐)프로파노에이트 (중간체 A6) (370 mg, 1.2 당량), {[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아민 (중간체 A1) (397 mg, 1 당량), 트리아세톡시수소화붕소나트륨 (400 mg, 1.5 당량), DCM (10 mL) 및 아세트산 (0.076 mL, 1 당량)의 혼합물을 합하고, LCMS에서 아민 출발 물질이 사라진 것으로 확인될 때까지 (대략 18시간) 실온에서 교반하였다. 수성 탄산나트륨을 첨가한 후에 DCM으로 추출하였다. 유기물을 황산나트륨에서 건조시키고 농축시켜 고체를 수득 (420 mg)하였고, 이것을 추가의 정제없이 사용하였다.

[0428] **LCMS Rt = 2.24 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 477.3**

[0429] 중간체 (IV)-C1

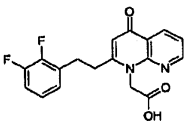
[0430] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산

[0431] 

[0432] 상기 화합물의 제조법은 WO 02/30911에서 중간체 C43으로 기재되어 있다.

[0433] 중간체 (IV)-C2

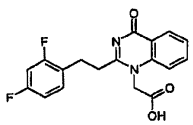
[0434] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]아세트산

[0435] 

[0436] 상기 화합물의 제조법은 WO 02/30904에서 중간체 E21로 기재되어 있다.

[0437] 중간체 (IV)-C3

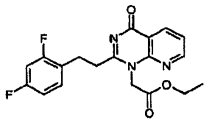
[0438] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산

[0439] 

[0440] 상기 화합물의 제조법은 WO 02/30911에서 중간체 C45로 기재되어 있다.

[0441] 중간체 (IV)-C4

[0442] 에틸 [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세테이트



[0443]

[0444] 에틸 (2,4-디옥소-3,4-디히드로피리도[2,3-d]피리미딘-1(2H)-일)아세테이트 (WO 02/30911, 중간체 B52) (40.8 g, 1.2 당량) 및 3-(2,4-디플루오로페닐)-프로판이미드아미드 (2,3-디플루오로 이성질체, WO 02/30911의 중간체 A1 내지 A3에 대해 기재된 것과 유사한 방법을 이용하여 제조함) (30.0 g, 1 당량)의 혼합물을 150℃ 오일조에서 25분 동안 용융시킨 후에 수조에서 실온으로 신속하게 냉각시켰다. 크로마토그래피 (실리카, 조 생성물을 DCM 중에 로딩하고, 헥산 중 50→100% 에틸 아세테이트로 용출시킴)를 실시하여 원하는 생성물을 수득하였다 (43.56 g).

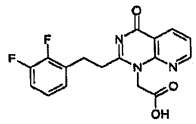
LCMS Rt = 2.521분 ; m/z $[M+H]^+$ = 374.1

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.31 (3H, t), 3.13 (2H, m), 3.26 (2H, m), 4.28 (2H, q), 5.27 (2H, s), 6.82 (2H, m), 7.34 (1H, m), 7.50 (1H, m), 8.65 (1H, m), 8.74 (1H, m).

[0445]

[0446] 중간체 (IV)-C5

[0447] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산

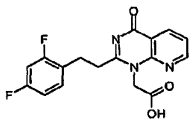


[0448]

[0449] 상기 화합물의 제조법은 WO 02/30911에서 중간체 C35로 기재되어 있다.

[0450] 중간체 (IV)-C5

[0451] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산



[0452]

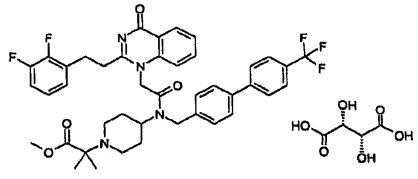
[0453] 에틸 [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세테이트 (중간체 C1) (32.76 g, 1 당량)를 에탄올 (350 mL) 및 물 (70 mL) 중에 용해하여 얼음에서 냉각시킨 후에 수성 수산화리튬 (2 M 용액, 43.42 mL, 0.99 당량)을 첨가하였다. 2시간 동안 실온에서 교반을 계속하였다. 상기 용액을 진공하에 농축시키고, 잔류물을 물 (700 mL) 및 포화 수성 중탄산나트륨 (50 mL) 중에 재용해한 후에 에틸 아세테이트 (200 mL)로 세척하였다. 수성 층을 2 M 염산을 사용하여 pH 2로 산성화하여 침전물을 여과하고, 빙수 (50 mL)로 세척하고 진공하에 건조 (50℃, 16시간)시켜서 원하는 생성물을 수득하였다 (23.2 g).

^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 2.4-2.6 (4H, m), 5.24 (2H, s), 7.04 (1H, m), 7.22 (1H, m), 7.48 (1H, m), 7.60 (1H, m), 8.47 (1H, m), 8.84 (1H, m).

[0454]

[0455] 실시예 (IV)-1

[0456] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0457]

[0458] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C1) (100 mg, 1 당량), 메틸 2-

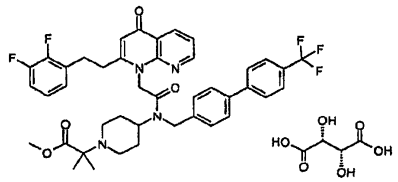
메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B1) (130 mg, 1.03 당량), DIPEA (0.1 mL, 3.6 당량), 아세토니트릴 (2 mL) 및 HATU (130 mg, 1.4 당량)의 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후에 증발시키고 아세토니트릴 중에 재용해하였다. 역상 HPLC (정제 방법 A)로 정제하여 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (128 mg).

[0459] **LCMS Rt = 2.686 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 761.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.33 (3H, s), 1.36 (3H, s), 1.83-2.02 (4H, m), 2.36-2.48 (2H, m), 2.87-2.91 (1H, m), 3.06-3.09 (2H, m), 3.16-3.20 (2H, m), 3.26-3.29 (1H, m), 3.71-3.73 (3H, m), 4.02/4.51 (1H, 2x br m), 4.74 (1H, s), 4.92 (1H, s), 5.12 (1H, s), 5.56 (1H, s), 7.00-7.19 (3H, m), 7.32-7.37 (1H, m), 7.48-7.62 (5H, m), 7.72-7.81 (5H, m), 8.22-8.28 (1H, m).

[0460] L-타르타르산 (1.675 g, 1.0 당량)를 한번에 첨가하여 상기 유리 염기를 바이타르트레이트 염으로 전환시키고 30분 동안 실온에서 교반하였다. 상기 용액을 진공하에 농축시키고 실온의 진공 오븐에서 건조시켜 회백색 분말을 수득하였다.

[0461] 합성 실시예 (IV)-2

[0462] 메틸
2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0463] 

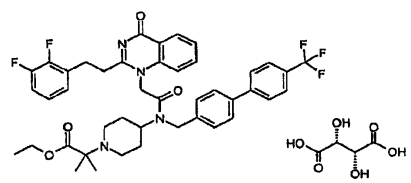
[0464] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 C2) (100 mg, 1 당량), 카르보닐디이미다졸 (50 mg, 1.05 당량) 및 디메틸-아세트아미드 (4 mL)의 혼합물을 60℃에서 30분 동안 교반한 후에 메틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로-메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B1) (132 mg, 1.05 당량)를 첨가하고, 온도를 2시간 동안 80℃로 상승시켰다. 추가 분량의 카르보닐디이미다졸 (0.5 당량)을 첨가하고, 80℃에서 15시간 동안 교반을 계속하였다. 냉각시킨 후, 상기 조 혼합물을 역상 HPLC (정제 방법 A)에 적용하여 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]-아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (99 mg).

[0465] **LCMS Rt = 2.845 분 ; m/z [M+H]+ = 761.3**
1H NMR (CDCl3) δ 1.28 (3H, s), 1.31 (3H, s), 1.73-2.05 (4H, m), 2.25 (1H, t), 2.39-2.46 (1H, m), 2.96-2.99 (1H, m), 3.00-3.12 (4H, m), 3.19 (1H, s), 3.68-3.73 (3H, m), 4.11/4.41 (1H, 2x br m), 4.73 (1H, s), 4.97 (1H, s), 5.51 (1H, s), 6.29-6.34 (1H, m), 7.06-7.20 (2H, m), 7.35-7.41 (1H, m), 7.48-7.58 (2H, m), 7.68-7.84 (6H, m), 8.60-8.68 (1H, m), 8.87-8.91 (1H, m).

[0466] 이것을 합성 실시예 (I)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0467] 합성 실시예 (IV)-3

[0468] 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0469] 

[0470] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C1) (115 mg, 1 당량), 에틸 2-

메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B2) (150 mg, 1 당량), HATU (151 mg, 1.2 당량), DMF (2.7 mL) 및 DIPEA (0.17 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 5시간 동안 진탕시켰다. 상기 반응 혼합물을 에틸 아세테이트/메탄올과 수성 중탄산나트륨 사이에 분배한 후에 유기층을 염수로 세척하고 건조시켰다. 플래쉬 크로마토그래피 (실리카, DCM 중 3%→4% 메탄올)를 실시하여 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (190 mg).

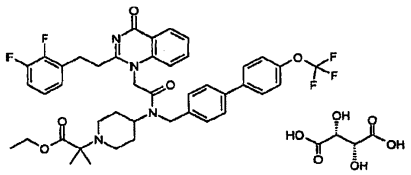
LCMS Rt = 2.55 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 775.3
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.18-1.40 (9H, m), 1.61-2.09 (4H, m), 2.22-2.45 (2H, m), 2.75-2.85 (1H, m), 2.90-3.34 (5H, m), 3.71/4.66 (1H, 2x m), 4.12-4.26 (2H, m), 4.70-4.85 (3H, m), 5.08 (1H, s), 6.80-6.88 (1H,m), 6.95-7.13 (3H, m), 7.27-7.33 (1H, m), 7.34-7.52 (3H,m), 7.56-7.62 (1H, m), 7.63-7.77 (4H, m), 8.29-8.44 (2H, m).

[0471]

[0472] 이것을 합성 실시예 (I)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0473] 합성 실시예 (IV)-4

[0474] 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0475]

[0476] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C1) (124 mg, 1.2 당량), 에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B3) (139 mg, 1 당량), DMF (1.2 mL) 및 DIPEA (0.16 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 30분 동안 진탕시킨 후에 HATU (176 mg, 1.5 당량)를 첨가하고, 4시간 동안 진탕을 계속하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)를 실시하여 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (174 mg).

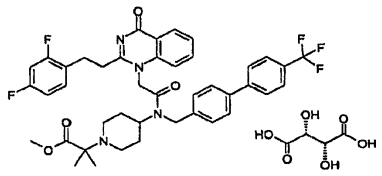
LCMS Rt = 2.77 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 791.3
^{1}H NMR ($CDCl_3$) 특징적인 피크 : δ 1.21-1.42 (9H, m), 1.58-2.08 (4H, m), 2.20-2.48 (2H, m), 2.71-5.1 (13H, br m), 6.79-6.87 (1H, d), 6.92-7.11 (3H, m), 7.30-7.46 (5H, m), 7.48-7.63 (5H, m), 8.26-8.40 (1H, m)

[0477]

[0478] 이것을 합성 실시예 (I)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0479] 합성 실시예 (IV)-5

[0480] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0481]

[0482] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C3) (100 mg, 1 당량), 메틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B1) (130 mg, 1.03 당량), DIPEA (0.1 mL, 2 당량), 아세토니트릴 (2 mL) 및 HATU (130 mg, 1.4 당량)의 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후에 증발시키고 아세토니트릴 중에 재용해하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)로 정제하여 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페

닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (126 mg).

LCMS Rt = 2.698 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 761.3

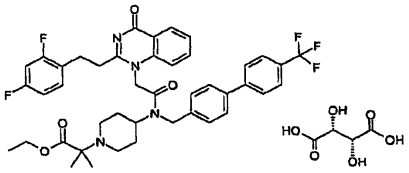
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.30 (3H, s), 1.34 (3H s), 1.81-2.03 (4H, m), 2.29-2.35 (1H, m), 2.39-2.45 (1H, m), 2.82-2.87 (1H, m), 3.00-3.14 (4H, m), 3.19-3.24 (1H, m), 3.70-3.73 (3H, m), 4.00/4.51 (1H, 2x br m), 4.74 (1H, s), 4.91 (1H, s), 5.10 (1H, s), 5.54 (1H, s), 6.77-6.84 (1H, m), 6.87-6.98 (1H, m), 7.28-7.43 (2H, m), 7.48-7.61 (5H, m), 7.73-7.81 (5H, m), 8.23-8.29 (1H, m).

[0483]

[0484] 이것을 합성 실시예 (I)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0485] 합성 실시예 (IV)-6

[0486] 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0487]

[0488] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C3) (120 mg, 1 당량), 에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}-아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B2) (204 mg, 1.3 당량), DMF (1.4 mL) 및 DIPEA (0.183 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 진탕시킨 후에 격렬하게 교반하면서 HATU (206 mg, 1.5 당량)를 첨가하고, 1.5시간 동안 진탕을 계속하였다. 추가 분량의 중간체 D5 (12 mg, 0.1 당량)를 첨가한 후에 2일 동안 진탕을 계속하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)를 실시하여 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]-메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (173 mg).

LCMS Rt = 2.751 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 775.3

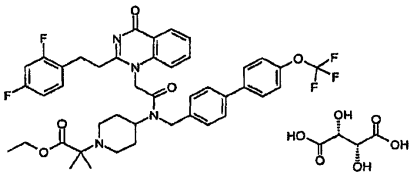
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (회전이성질체들의 혼합물) 특징적인 피크 :1.22-1.47 (9H, m), 1.63-2.10 (4H, m), 2.16-5.11 (15H, br m), 6.75-6.88 (2H, m), 7.14-7.80 (12H, m), 8.26-8.40 (1H, m).

[0489]

[0490] 이것을 합성 실시예 (I)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0491] 합성 실시예 (IV)-7

[0492] 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0493]

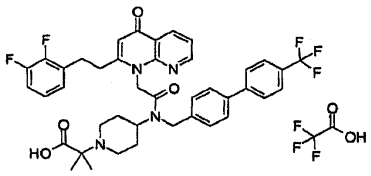
[0494] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C3) (114 mg, 1.1 당량), 에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B3) (139 mg, 1 당량), DMF (1.2 mL) 및 DIPEA (0.16 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 진탕시킨 후에 격렬하게 교반하면서 HATU (176 mg, 1.5 당량)를 첨가하고, 30분 동안 진탕을 계속하였다. 추가 분량의 중간체 D5 (21 mg, 0.2 당량)를 첨가하고 1시간 후에 추가의 HATU (23 mg, 0.2 당량)를 첨가하고, 18시간 동안 진탕을 계속하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)를 실시하여 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]-아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (149 mg).

[0495] LCMS Rt = 2.793 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 791.3
^{1}H NMR ($CDCl_3$) 특징적인 피크 : δ 1.20-1.45 (9H, m), 1.58-2.12 (4H, m), 2.14-2.48 (2H,m), 2.620-5.11 (11H, m), 6.59-6.72 (1H, m), 6.73-6.90 (2H, m), 7.16-7.64 (11H. m), 8.25-8.40 (1H, m).

[0496] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0497] 합성 실시예 (IV)-8

[0498] 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로판산 트리플루오로아세테이트

[0499] 

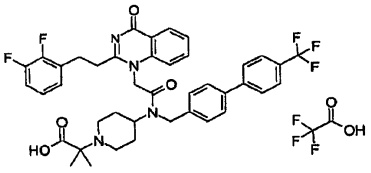
[0500] 1,1-디메틸에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B4) (1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 C2) (1.2 당량), DIPEA (3 당량) 및 DMF (1.0 mL)의 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. HATU (1.5 당량)를 한번에 첨가하고, 5분 더 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 농축시키고, 아세톤으로 용출시키는 실리카 플러그로 여과하고 증발시켜 조 1,1-디메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1,8-나프티리딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸 프로파노에이트를 수득하였다.

[0501] 상기 프로포네이트를 단리 없이 TFA 및 DCM의 1:1 혼합물 중에 용해하고, 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 증발 및 정제용 HPLC (방법 A)를 실시하여 상기 화합물을 수득하였다.

[0502] 다른 염은 통상의 수단으로 제조할 수 있다. 유리 염기 역시 통상의 수단으로 제조할 수 있다.

[0503] 합성 실시예 (IV)-9

[0504] 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸} {[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로판산 트리플루오로아세테이트

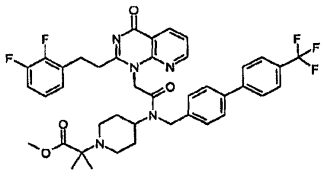
[0505] 

[0506] 1,1-디메틸에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B4) (1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세트산 (중간체 C1) (1.2 당량), DIPEA (3 당량) 및 DMF (1.0 mL)의 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. HATU (1.5 당량)를 한번에 첨가하고, 5분 더 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 농축시키고, 아세톤으로 용출시키는 실리카 플러그로 여과하고 증발시켜 조 1,1-디메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다.

[0507] 상기 프로포네이트를 단리 없이 TFA 및 DCM의 1:1 혼합물 중에 용해하고, 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 증발 및 정제용 HPLC (방법 A)를 실시하여 상기 화합물을 수득하였다.

[0508] 합성 실시예 (IV)-10

[0509] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸-프로파노에이트



[0510]

[0511] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (20.7 g, 1.3 당량), 메틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B1) (20.0 g, 1.3 당량), DIPEA (24.0 mL, 3 당량) 및 DMF (184 mL)의 혼합물을 기계적으로 교반한 후에 HATU (27.1 g, 1.5 당량)를 한번에 첨가하고, 2시간 동안 교반을 계속하였다. 상기 반응 혼합물을 디에틸 에테르/THF (1:1)와 탄산나트륨 (1 M, 과량) 사이에 분배하였다. 유기층을 물과 염수로 세척하여 건조시키고 증발시켰다. 크로마토그래피를 3개의 실리카 컬럼에서 순차적으로 수행하였다 (첫번째는 3:1 EtOAc/헥산, 두번째는 DCM 중 2% MeOH, 세번째는 1:1 EtOAc/헥산→100% EtOAc). 생성물 분획물을 증발시켜 원하는 생성물을 비결정질 분홍색 고체로서 수득하였다 (27.5 g).

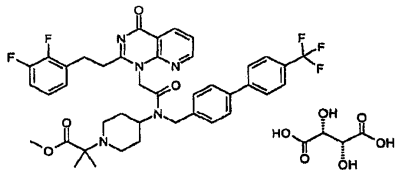
[0512] **LCMS Rt = 2.702 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 762.3**

[0513] 결정화: 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}-아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 (8.0 g) 및 에탄올 (200 mL)의 혼합물을 완전히 용해될 때까지 가온하였다. 상기 용액을 24시간 동안 실온에서 자성 교반한 후에 여과하여 고체 7.5 g을 수집하였다. 이러한 용매화된 결정을 진공을 대략 630 Torr로 24시간 동안 유지시키는 질소 블리드가 있는 60℃ 진공 오븐에 넣어, 용매화되지 않은 결정질 표제 화합물을 수득하였다 (7.15 g). m.p. 150 ℃.

[0514] **^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1.25 (3H, s), 1.30 (3H, s), 1.63-1.99 (4H, m), 2.16-2.28 (1H, m), 2.3-2.43 (1H, m), 2.89-2.98 (1H, m), 2.98-3.08 (2H, m), 3.16-3.30 (3H, m), 3.66-3.69 (3H, m), 4.02/4.38 (1H, 2x br m), 4.69 (1H, s), 4.87 (1H, s), 5.4/5.73 (2H, 2x s), 6.99-7.19 (3H, m), 7.29-7.35 (1H, m), 7.50-7.61 (3H, m), 7.64-7.82 (5H, m), 8.48-8.57 (1H, m), 8.80-8.89 (1H, m)** 하기 도 1 참조.

[0515] 합성 실시예 (IV)-11

[0516] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸-프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0517]

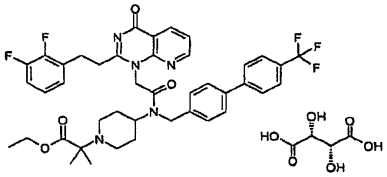
[0518] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 (8.5 g, 1 당량)를 메탄올 (100 mL) 중에 현탁하고, 고체가 용해될 때까지 50℃로 가온하였다. L-타르타르산 (1.675 g, 1.0 당량)을 한번에 첨가하고, 30분 동안 실온에서 교반하였다. 상기 용액을 진공하에 농축시키고 실온의 진공 오븐에서 건조시켜 회백색 분말을 수득하였다.

[0519] **LCMS Rt = 2.697 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 762.3**
^{1}H NMR (d_6-DMSO) □ 1.17 (3H, s), 1.23 (3H, s), 1.47-1.91 (4H, m), 1.98-2.41 (1H, m), 2.16-2.33 (1H, m), 2.80-3.26 (6H, m), 3.50-3.67 (3H, m), 3.95/4.17 (1H, 2x br m), 4.61 (1H, s), 4.85 (1H, s), 5.39/5.69 (2H, 2x s), 7.08-7.39 (4H, m), 7.53-7.70 (3H, m), 7.72-7.97 (5H, m), 8.42-8.54 (1H, m), 8.85-8.95 (1H, m)

[0520] 합성 실시예 (IV)-12

[0521] 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]-아세틸}{[4'-(트리플루

오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0522] 

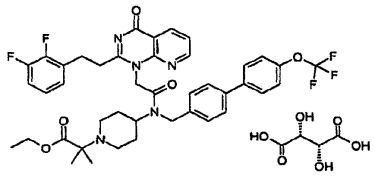
[0523] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (116 mg, 1 당량), 에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B2) (150 mg, 1 당량), HATU (151 mg, 1.2 당량), DMF (2.72 mL) 및 DIPEA (0.17 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 3.25시간 동안 진탕시켰다. 상기 반응 혼합물을 에틸 아세테이트/메탄올과 수성 중탄산나트륨 사이에 분배시켜 유기층을 염수로 세척하여 건조시키고 활성 목탄 (250 mg)으로 처리하였다. 플래쉬 크로마토그래피 (실리카, DCM 중 3%→4% 메탄올)를 실시하여 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]-아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (178 mg).

[0524] **LCMS Rt = 2.58 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 776.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.20-1.40 (9H, m), 1.56-2.02 (4H, m), 2.19-2.44 (2H, m), 2.88-3.20, (4H, m), 3.22-3.40 (2H, m), 3.81/4.58 (1H, 2x m), 4.11-4.27 (2H, m), 4.69/4.84 (2H, 2x s), 5.17/5.49 (2H, 2x s), 6.95-7.14 (3H, m), 7.25-7.31 (1H, m), 7.38-7.54 (3H, m), 7.54, 7.61 (1H, m), 7.62-7.79 (4H, m), 8.57-8.75 (2H, m)

[0525] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0526] 합성 실시예 (IV)-13

[0527] 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0528] 

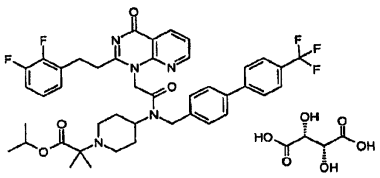
[0529] [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (114 mg, 1.1 당량), 에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B4) (139 mg, 1 당량), DMF (1.2 mL) 및 DIPEA (0.16 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 30분 동안 진탕시킨 후에 HATU (176 mg, 1.5 당량)를 첨가하고, 3시간 동안 진탕을 계속하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)를 실시하여 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소-1(4H)-퀴나졸리닐]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (166 mg).

[0530] **LCMS Rt = 2.87 분; m/z $[M+H]^+$ = 792.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.18-1.42 (9H, m), 1.54-2.04 (4H, m), 2.12-2.46 (2H, m), 2.86-3.21 (4H, m), 3.21-3.41 (2H, m), 3.79/4.57 (1H, 2x m), 4.10-4.27 (2H, m), 4.68 (1H, s), 4.82 (1H, s), 5.17 (1H, s), 5.47 (1H, s), 6.94-7.16 (3H, m), 7.20-7.36 (3H, m), 7.37-7.48 (3H, m), 7.48-7.61 (3H, m), 8.56-8.76 (2H, m).

[0531] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0532] 합성 실시예 (IV)-14

[0533] 1-메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0534]

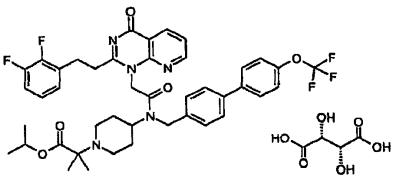
[0535] 1-메틸에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]-메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B3) (420 mg, 1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (300 mg, 1 당량), HATU (396 mg, 1.2 당량), DIPEA (0.22 mL, 1.5 당량) 및 DMF (3.0 mL)의 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 역상 HPLC (정제 방법 A)에 직접 적용하여 1-메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (171 mg).

[0536] **LCMS Rt = 2.837 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 790.3**
^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1.16-1.37 (12H, m), 1.62-2.01 (4H, m), 2.27-2.55 (2H, m), 2.95-3.12 (3H, m), 3.12-3.29 (3H, m), 4.06/4.40 (1H, 2x br m), 4.71 (1H, s), 4.89 (1H, s), 4.92-5.07 (1H, m), 5.43/5.76 (2H, 2x s), 7.00-7.21 (3H, m), 7.29-7.38 (1H, m), 7.49-7.65 (3H, m), 7.65-7.87 (5H, m), 8.48-8.58 (1H, m), 8.81-8.90 (1H, m).

[0537] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0538] 합성 실시예 (IV)-15

[0539] 1-메틸에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)



[0540]

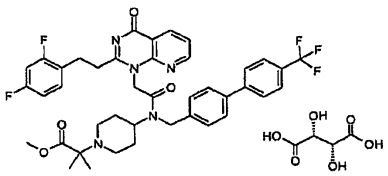
[0541] 1-메틸에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B5) (80 mg, 1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (67 mg, 1 당량), HATU (400 mg, 5 당량), DIPEA (0.22 mL, 1.5 당량) 및 DMF (2.0 mL)의 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 역상 HPLC (정제 방법 A)에 직접 적용하여 1-메틸에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (25 mg).

[0542] **LCMS Rt = 2.952 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 806.4**
^{1}H NMR (DMSO-d6) δ 1.09-1.25 (12H, m), 1.47-1.91 (4H, m), 2.05-2.20 (1H, m), 2.21-2.38 (1H, m), 2.87-3.07 (3H, m), 3.08-3.22 (3H, m), 3.95/4.17 (1H, 2x br m), 4.59 (1H, s), 4.75-4.97 (2H, m), 5.38/5.68 (2H, 2x s), 7.90-7.21 (1H, m), 7.21-7.36 (3H, m), 7.42-7.55 (3H, m), 7.55-7-64 (2H, m), 7.66-7.77 (2H, m), 7.77-7.85 (1H, m), 8.43-8.52 (1H, m), 8.86-8.95 (1H, m)

[0543] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0544] 합성 실시예 (IV)-16

[0545] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0546] 

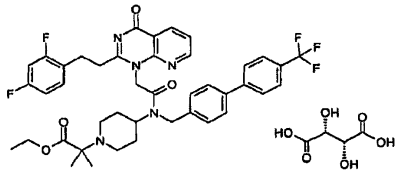
[0547] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,4-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D2) (100 mg, 1 당량), 메틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B1) (130 mg, 1.03 당량), DIPEA (0.16 mL, 3 당량), 아세토니트릴 (2 mL) 및 HATU (130 mg, 1.2 당량)의 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후에 증발시키고 아세토니트릴 중에 재용해하였다. 역상 HPLC에 의한 정제 (정제 방법 B)를 실시하여 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (145 mg).

[0548] **LCMS Rt = 2.716 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 762.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.27 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.69-1.98 (4H, m), 2.22-2.29 (1H, m), 2.36-2.43 (1H, m), 2.96-3.08 (3H, m), 3.13-3.24 (3H, m), 3.69-3.72 (3H, m), 4.04/4.41 (1H, 2x br m), 4.72 (1H, s), 4.91 (1H, s), 5.41/5.73 (2H, 2x s), 6.84-6.97 (2H, m), 7.34-7.44 (2H, m), 7.54-7.63 (3H, m), 7.69-7.83 (5H, m), 8.55-8.60 (1H, m), 8.86-8.91 (1H, m).

[0549] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0550] 합성 실시예 (IV)-17

[0551] 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0552] 

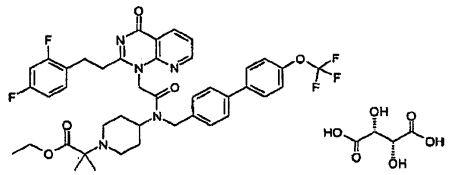
[0553] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,4-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D2) (120 mg, 1 당량), 에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B2) (198 mg, 1.3 당량), DMF (1.4 mL) 및 DIPEA (0.178 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 진탕시킨 후에 격렬하게 교반하면서 HATU (200 mg, 1.5 당량)를 첨가하고, 1.5시간 동안 진탕을 계속하였다. 추가 분량의 중간체 D2 (12 mg, 0.1 당량)를 첨가한 후에 2일 동안 진탕을 계속하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)를 실시하여 에틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (170 mg).

[0554] **LCMS Rt = 2.827 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 776.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) 특징적인 피크 : δ 1.14-1.43 (9H, m), 1.57-2.05 (4H, m), 2.10-2.46 (2H, m), 2.84-3.11 (3H, m), 3.12-3.34 (3H, m), 3.65/3.85 (1H, m), 4.06-4.27 (2H, m), 4.65/4.85 (2H, s), 5.15/5.45 (2H, s), 6.62-6.89 (2H, m), 7.18-7.34 (1H, m), 7.37-7.82 (9H, m), 8.59-8.77 (2H, m).

[0555] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0556] 합성 실시예 (IV)-18

[0557] 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0558] 

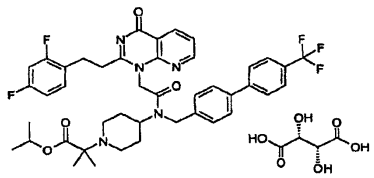
[0559] [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,4-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D2) (114 mg, 1.1 당량), 에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B4) (139 mg, 1 당량), DMF (1.2 mL) 및 DIPEA (0.16 mL, 3 당량)의 혼합물을 실온에서 진탕시킨 후에 격렬하게 교반하면서 HATU (176 mg, 1.5 당량)를 첨가하고, 2시간 동안 진탕을 계속하였다. 역상 HPLC (정제 방법 B)를 실시하여 에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}-메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 백색 고체로서 수득하였다 (149 mg).

[0560] **LCMS Rt = 2.801 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 792.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.18-1.40 (9H, m), 1.61-2.02 (4H, m), 2.20-2.44 (2H, m), 2.83-3.35 (6H, br m), 3.79/4.57 (1H, 2x br m), 4.07-4.27 (2H, m), 4.68/4.81 (2H, 2x s), 5.14/5.46 (2H, 2x br m), 6.62-6.90 (2H, 2x m), 7.18-7.63 (10H, m), 8.59-8.75 (2H, m).

[0561] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0562] 합성 실시예 (IV)-19

[0563] 1-메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0564] 

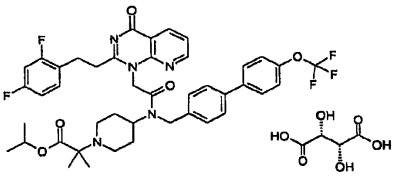
[0565] 1-메틸에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B3) (70 mg, 1 당량), [2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,4-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D2) (52.2 mg, 1 당량), HATU (69 mg, 1.2 당량), DIPEA (0.04 mL, 1.5 당량) 및 DMF (1.0 mL)의 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 역상 HPLC (정제 방법 A)에 직접 적용하여 1-메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (20 mg).

[0566] **LCMS Rt = 2.910 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 790.4**
^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.08-1.27 (12H, m), 1.40-1.90 (4H, m), 2.03-2.35 (2H, m), 2.85-3.24 (6H, m), 3.95/4.17 (1H, 2x br m), 4.61 (1H, s), 4.80-4.97 (2H, m), 5.36/5.67 (2H, 2x s), 6.96-7.10 (1H, m), 7.13-7.28 (1H, m), 7.28-7.38 (1H, m), 7.39-7.54 (1H, m), 7.54-7.68 (3H, m), 7.72-7.98 (5H, m), 8.43-8.52 (1H, m), 8.86-8.95 (1H, m)

[0567] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0568] 합성 실시예 (IV)-20

[0569] 1-메틸에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 2,3-디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0570] 

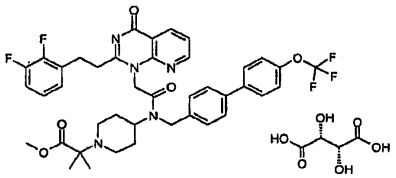
[0571] 1-메틸에틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B5) (80 mg, 1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,4-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D2) (57 mg, 1 당량), HATU (76 mg, 1.2 당량), DIPEA (0.04 mL, 1.5 당량) 및 DMF (1.0 mL)의 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 역상 HPLC (정제 방법 A)에 직접 적용하여 1-메틸에틸 2-{4-[{[2-[2-(2,4-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)-옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (47 mg).

[0572] **LCMS Rt = 2.909 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 806.4**
^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.09-1.27 (12H, m), 1.50-1.90 (4H, m), 2.03-2.17 (1H, m), 2.20-2.37 (1H, m), 2.88-3.18 (6H, m), 3.94/4.17 (1H, 2x m), 4.60 (1H, s), 4.74-4.96 (2H, m), 5.36/5.66 (2H, 2x br s), 6.96-7.09 (1H, m), 7.14-7.32 (2H, m), 7.39-7.55 (4H, m), 7.55-7.66 (2H, m), 7.66-7.87 (3H, m), 8.43-8.54 (1H, m), 8.85-8.96 (1H, m).

[0573] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0574] 합성 실시예 (IV)-21

[0575] 메틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트 디히드록시부탄디오에이트 (염)

[0576] 

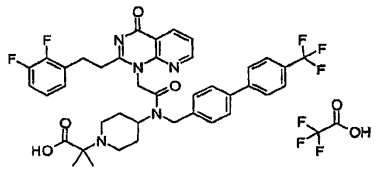
[0577] 메틸 2-메틸-2-{4-[({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1 피페리디닐}프로파노에이트 (중간체 B6) (145 mg, 1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (122 mg, 1 당량), DIPEA (0.084 mL, 1.5 당량) 및 DMF (2.0 mL)의 혼합물을 5분 동안 실온에서 교반하였다. HATU (160 mg, 1.3 당량)를 한번에 첨가하고, 질소하에 1시간 더 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 역상 HPLC (정제 방법 A)에 직접 적용하여 메틸 2-{4-[{[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}({4'-[(트리플루오로메틸)옥시]-4-바이페닐릴}메틸)아미노]-1-피페리디닐}-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다 (116 mg).

[0578] **LCMS Rt = 2.721 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 778.3**
^{1}H NMR ($CDCl_3$) 특징적인 피크 : δ 1.53-1.62 (6H, m), 3.46-5.99 (22H, m), 7.01-7.21 (3H, m), 7.30-7.43 (3H, m), 7.50-7.78 (6H, m), 8.54-8.60 (1H, m), 8.86-8.94 (1H, m).

[0579] 이것을 합성 실시예 (II)에 대해 기재한 것과 유사한 방법을 통해 바이타르트레이트 염으로 전환시켰다.

[0580] 합성 실시예 (IV)-22

[0581] 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로판산 트리플루오로아세테이트

[0582] 

[0583] 1,1-디메틸에틸 2-메틸-2-[4-({[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]프로파노에이트 (중간체 B7) (150 mg, 1 당량), [2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세트산 (중간체 D1) (130 mg, 1.2 당량), DIPEA (0.164 mL, 3 당량) 및 DMF (1.0 mL)의 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. HATU (180 mg, 1.5 당량)를 한번에 첨가하고 5분 더 교반하였다. 상기 조 반응 혼합물을 농축시키고, 아세톤으로 용출시키는 실리카 플러그로 여과하고 증발시켜 조 1,1-디메틸에틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트를 수득하였다.

[0584] **LCMS Rt = 2.823 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 804.4**

[0585] 상기 중간체를 단리 없이 TFA 및 DCM의 1:1 혼합물 중에 용해하고, 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 증발 및 정제용 HPLC (방법 A)를 실시하여 원하는 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸 프로판산 트리플루오로아세테이트를 수득하였다 (70 mg).

[0586] **LCMS Rt = 2.554 분 ; m/z $[M+H]^+$ = 748.2**
^{1}H NMR (d_6-DMSO) d 1.44 (3H, s), 1.51 (3H, s), 1.70-2.30 (4H, m), 2.41-2.56 (2H, m), 2.94-3.54 (6H, m), 4.44-4.95 (3H, m), 5.42/5.76 (2H, 2x br s), 7.07-7.38 (4H, m), 7.54-7.75 (3H, m), 7.76-7.99 (5H, m), 8.42-8.54 (1H, m), 8.85-8.98 (1H, m).

[0587] 다른 염은 통상의 수단으로 제조할 수 있다. 유리 염기 역시 통상의 수단으로 제조할 수 있다.

[0588] 일부 실시양태에서, 본원에 개시한 바와 같은 방법에 유용한 Lp-PLA_2의 억제제로서 유용한 화합물은 다음과 같다:

[0589] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (또한, "SB480848" 또는 USAN 명칭 "다라플라딥"이라 지칭되기도 하며, 이것은 피리미디논-기재의 화합물이고 Lp-PLA_2의 가역적인 억제제이며 본원의 실시예에 사용됨),

[0590] N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드,

[0591] N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드, 및

[0592] 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트.

[0593] 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카르보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (AKA SB480848, 및 본원의 실시예에서 사용됨), N-(2-디에틸아미노에틸)-2-[2-(2-(2,3-디플루오로페닐)에틸)-4-옥소-4,5,6,7-테트라히드로-시클로펜타피리미딘-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸-바이페닐-4-일메틸)아세트아미드, N-(1-(2-메톡시에틸)피페리딘-4-일)-2-[2-(2,3-디플루오로벤질티오)-4-옥소-4H-퀴놀린-1-일]-N-(4'-트리플루오로메틸바이페닐-4-일메틸)아세트아미드, 및 메틸 2-[4-({[2-[2-(2,3-디플루오로페닐)에틸]-4-옥소피리도[2,3-d]피리미딘-1(4H)-일]아세틸}{[4'-(트리플루오로메틸)-4-바이페닐릴]메틸}아미노)-1-피페리디닐]-2-메틸프로파노에이트의 제약상 허용가능한 염 역시 본원에 개시한 바와 같은 방법에서 사용되는 Lp-PLA_2의 억제제로서 유용하다.

[0594] <u>Lp-PLA_2의 핵산 억제제</u>

[0595] 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 핵산이다. Lp-PLA_2의 핵산 억제제는, 예를 들어 RNA 간섭-유도성

분자, 예를 들면 siRNA, dsRNA, stRNA, shRNA 및 그의 변형된 버전 등인데, 이러한 RNA 간섭 분자는 Lp-PLA_2의 유전자 발현을 무반응시킨다. 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2의 핵산 억제제는 안티센스 올리고핵산, 또는 핵산 유사체, 예를 들어 DNA, RNA, 펩티드-핵산 (PNA), 가성-상보적 PNA (pc-PNA), 또는 고정 핵산 (LNA) 등이다. 대체 양태에서, 핵산은 DNA 또는 RNA, 및 핵산 유사체, 예를 들어 PNA, pcPNA 및 LNA이다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으며, 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산, 올리고뉴클레오티드, PNA 등을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다. 이러한 핵산 서열에는, 예를 들어 전사 억제인자로서 작용하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열, 안티센스 분자, 리보자임, 소형 억제성 핵산 서열, 예를 들어 RNAi, shRNAi, siRNA, 마이크로 RNAi (mRNAi), 안티센스 올리고뉴클레오티드 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0596] 몇몇 양태에서, 진핵 세포에 내생적으로 발견되는 RNA 형태인 단일 가닥 RNA (ssRNA)를 사용하여 RNAi 분자를 형성시킬 수 있다. 세포성 ssRNA 분자에는 메신저 RNA (및 전구 세포 프리-메신저 RNA), 저분자 핵 RNA, 저분자 핵소체 RNA, 전이 RNA 및 리보솜성 RNA가 포함된다. 이중 가닥 RNA (dsRNA)는 크기-의존적 면역 반응을 유도시켜 30 bp 보다 더 큰 dsRNA가 인터페론 반응을 활성화시키도록 하는 반면, 보다 짧은 dsRNA는 다이서 (Dicer) 효소의 세포 내인성 RNA 간섭 기구 하류 내로 공급되도록 한다.

[0597] Lp-PLA_2는 Lp-PLA_2 폴리펩티드의 발현을 억제하거나 또는 당업자에게 흔히 공지된 "유전자 무반응" 방법에 의해 저하시킬 수 있다.

[0598] RNA 간섭 (RNAi)은 선택된 표적 폴리펩티드의 발현을 억제하기 위한 강력한 접근 방식을 제공한다. RNAi는 선택적 분해를 위해 표적 폴리펩티드를 암호화하는 메신저 RNA를 표적으로 하는 저분자 간섭 RNA (siRNA) 이중체를 이용한다. 유전자 발현의 siRNA-의존적 전사 후 무반응은 이러한 siRNA에 의해 유도된 부위에서 표적 메신저 RNA 분자를 절단시키는 것을 포함한다.

[0599] RNA 간섭 (RNAi)은 진화적으로 보존된 과정이므로, 표적 유전자와 동일하거나 고도로 유사한 서열의 RNA의 발현 또는 도입로 인해, 표적된 유전자로부터 전사된 메신저 RNA (mRNA)의 서열 특이적 분해 또는 특이적 전사 후 유전자 무반응 (PTGS)이 유발됨으로써 [참고: Coburn, G. and Cullen, B. (2002) *J. of Virology* 76(18):9225], 표적 유전자의 발현을 억제시킨다. 한 양태에서, 이러한 RNA는 이중 가닥 RNA (dsRNA)이다. 상기 과정은 식물, 무척추 동물, 및 포유류 세포에서 보고되었다. 사실상, RNAi는 고분자 dsRNA를 siRNA로 명명된 이중 가닥 단편이 되도록 점진적으로 절단시키는 것을 증진시키는 dsRNA-특이적 엔도뉴클레아제 다이서에 의해 개시된다. siRNA는 표적 mRNA를 인식하고 이를 절단시키는 단백질 복합체 ("RNA 유도된 무반응 복합체" 또는 "RISC"로 명명됨) 내로 혼입된다. RNAi는 또한, 표적 유전자의 발현을 억제하거나 무반응으로 만들기 위해 핵산 분자, 예를 들어 합성 siRNA 또는 RNA 간섭 작용제를 도입함으로써 개시할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "표적 유전자 발현의 억제"에는 RNA 간섭이 전혀 유도되지 않은 상황과 비교해서, 표적 유전자 또는 표적 유전자에 의해 암호화된 단백질의 수준 또는 발현 또는 단백질 활성 상의 모든 저하가 포함된다. 이러한 저하는 RNA 간섭 작용제에 의해 표적화되지 않은 표적 유전자에 의해 암호화된 단백질의 활성 또는 수준 또는 표적 유전자의 발현과 비교해서, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%일 수 있다.

[0600] "저분자 간섭 RNA" (siRNA)는, 예를 들어 RNAi에 의해 표적 유전자의 발현을 억제하는 기능을 하는 작용제로서 정의된다. siRNA는 화학적으로 합성할 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 생성될 수 있거나, 또는 숙주 세포 내에서 생성될 수 있다. 한 양태에서, siRNA는 길이가 약 15 내지 약 40개 뉴클레오티드, 바람직하게 약 15 내지 28개 뉴클레오티드, 보다 바람직하게 약 19 내지 약 25개 뉴클레오티드, 보다 바람직하게 약 19, 20, 21, 22, 또는 23개 뉴클레오티드인 이중 가닥 RNA (dsRNA)이고, 약 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 뉴클레오티드 길이를 갖는 각 쇄 상에 3' 및/또는 5' 오버행을 함유할 수 있다. 오버행의 길이는 두 가닥 간에 독립적인데, 즉 한 가닥 상의 오버행의 길이는 제2 가닥 상의 오버행의 길이에 의존적이지 않다. 바람직하게, siRNA는 표적 메신저 RNA (mRNA)의 특이적 전사 후 유전자 무반응 (PTGS) 또는 분해를 통하여 RNA 간섭을 증진시킬 수 있다.

[0601] siRNA에는 또한, 소형 헤어핀 (줄기 루프로 지칭되기도 함) RNA (shRNA)가 포함된다. 한 양태에서, 이들 shRNA는 저분자 (예를 들어, 약 19 내지 약 25개 뉴클레오티드) 안티센스 가닥에 이어 약 5 내지 약 9개 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 루프 및 유사한 센스 가닥으로 구성된다. 또 다른 한편, 센스 가닥은 뉴클레오티드 루프 구조보다 선행될 수 있고, 그 다음에 안티센스 가닥이 올 수 있다. 이들 shRNA는 플라스미드, 레트로바이러스, 및 렌티바이러스에 함유될 수 있고, 예를 들어 pol III U6 프로모터 또는 또 다른 프로모터로부터 발현될 수 있다 [참고: 예를 들어, Stewart, et al. (2003) RNA Apr;9(4):493-501, 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다].

[0602] RNA 간섭 작용제의 표적 유전자 또는 서열은 세포성 유전자 또는 게놈 서열, 예를 들어 Lp-PLA_2 서열일 수

있다. siRNA는 표적 유전자 또는 게놈 서열, 또는 그의 단편과 실질적으로 상동성일 수 있다. 이러한 맥락에서 사용된 바와 같은 용어 "상동성"은 표적의 RNA 간섭을 발휘하기 위해 표적 mRNA 또는 그의 단편과 실질적으로 동일하거나, 충분히 상보적이거나 또는 유사한 것으로서 정의된다. 천연 RNA 분자 이외에도, 표적 서열의 발현을 억제하거나 간섭하는 데에 적합한 RNA에는 RNA 유도체 및 유사체가 포함된다. 바람직하게는, siRNA가 그의 표적과 동일하다.

[0603] siRNA는 바람직하게, 단지 한 서열 만을 표적으로 한다. RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA 각각을 대상으로 하여, 예를 들어 발현 프로파일링함으로써 잠재적 오프-표적 효과에 관하여 스크리닝할 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [참고: Jackson et al, Nature Biotechnology 6:635-637, 2003]에 기재되어 있다. 발현 프로파일링 이외에도, 오프-표적 효과를 지닐 수 있는 잠재적 서열을 확인하기 위해 서열 데이터베이스 내의 유사한 서열을 알아보기 위하여 잠재적 표적 서열을 스크리닝할 수도 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Jackson et al. (Id.)]에 따르면, 서열 실체의 15개 또는 아마도 11개 정도로 적은 연속되는 뉴클레오티드가 비-표적화 전사체의 무반응을 지시하기에 충분하다. 따라서, 공지된 모든 서열 비교 방법 (예: BLSAT)에 의해 서열 실체 분석을 이용하여 잠재적 오프-표적 무반응을 피하기 위해 제안된 siRNA를 초기에 스크리닝할 수 있다.

[0604] siRNA 분자는 RNA 만을 함유하는 분자로 제한될 필요가 없을 뿐만 아니라 화학적으로 변형된 뉴클레오티드 및 비-뉴클레오티드를 추가로 포괄하고, 또한 이에는 리보스 당 분자가 또 다른 당 분자 또는 유사한 기능을 수행하는 분자를 대체하는 분자가 포함된다. 더우기, 뉴클레오티드 잔기 간의 비-천연 연쇄, 예를 들어 포스포로티오에이트 연쇄를 사용할 수 있다. 예를 들어, RNA에서 발견된 천연 발생적 D-리보뉴클레오시드 대신 D-아라비노푸라노실 구조를 함유하는 siRNA를 본 발명에 따라서 RNAi 분자에 사용할 수 있다 [참고: 미국 특허 제5,177,196호]. 기타 예에는 2'-O-메틸 리보스, 아라비노스 및 특히 D-아라비노스를 함유하는 올리고뉴클레오티드와 유사한 올리고뉴클레오티드 분자와의 치밀한 상보적 가닥 결합 및 뉴클레아제 내성을 제공해 주는, 뉴클레오시드의 헤테로사이클릭 염기와 당 간의 O-연쇄를 함유하는 RNA 분자가 포함된다 [참고: 미국 특허 제5,177,196호].

[0605] RNA 가닥을 리포터 (reporter) 기, 예를 들어 형광단의 반응성 관능기로 유도체화할 수 있다. 특별히 유용한 유도체는 RNA 가닥의 말단(들), 전형적으로 센스 가닥의 3' 말단에서 변형된다. 예를 들어, 3' 말단에서의 2'-히드록실은 각종 기로 용이하고도 선택적으로 유도체화할 수 있다.

[0606] 기타 유용한 RNA 유도체에는 변형된 탄수화물 부분, 예를 들어 2'-O-알킬화 잔기 또는 2'-O-메틸 리보실 유도체 및 2'-O-플루오로 리보실 유도체를 갖는 뉴클레오티드가 혼입된다. RNA 염기를 변형시킬 수도 있다. 표적 서열의 발현을 억제하거나 이를 간섭하는 데에 유용하도록 변형된 모든 염기를 사용할 수 있다. 예를 들어, 할로겐화 염기, 예를 들면 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실을 혼입시킬 수 있다. 이러한 염기를 알킬화시킬 수도 있는데, 예를 들어 7-메틸구아노신을 구아노신 잔기 대신 혼입시킬 수 있다. 성공적으로 억제시켜 주는 비-천연 염기를 혼입시킬 수도 있다.

[0607] 가장 바람직한 siRNA 변형물에는 2'-데옥시-2'-플루오로우리딘 또는 고정 핵산 (LNA) 뉴클레오티드, 및 포스포디에스테르 또는 다양한 수의 포스포로티오에이트 연쇄를 함유하는 RNA 이중체가 포함된다. 이러한 변형물은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [참고: Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003]에 기재되어 있다. siRNA 분자에 대한 대부분의 유용한 변형은 안티센스 올리고뉴클레오티드 기술에 대해 확립된 화학을 이용하여 도입할 수 있다. 바람직하게, 이러한 변형에는 최소한의 2'-O-메틸 변형이 포함되는데, 이러한 변형이 배제되는 것이 바람직하다. 또한, siRNA의 자유 5'-히드록실 기의 변형이 배제되는 것이 바람직하다.

[0608] 그들의 3'-말단 또는 5'-말단, 또는 둘 다에 공유적으로 부착된 각종 "미부"를 갖는 siRNA 및 miRNA 분자가 당해 분야에 또한 공지되어 있고, 이를 사용하여, 본 발명의 방법을 이용하여 전달된 siRNA 및 miRNA 분자를 안정화시킬 수 있다. 일반적으로 언급하자면, RNA 분자의 3' 또는 5' 말단에 부착된 삽입성 기, 각종의 리포터 기 및 친지성 기는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 본 발명의 방법에 따라서 유용하다. 본 발명에 따라서 유용한 변형된 RNA 분자의 제조에 적용 가능한 3'-콜레스테롤 또는 3'-아크리딘 변형된 올리고뉴클레오티드의 합성에 관한 설명은, 예를 들어 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Gamper, H. B., Reed, M. W., Cox, T., Virosco, J. S., Adams, A. D., Gall, A., Scholler, J. K., and Meyer, R. B. (1993) Facile Preparation and Exonuclease Stability of 3'-Modified Oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 21 145-150; and Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S., and Meyer, R. B.,Jr. (1991) Acridine and Cholesterol-Derivatized Solid Supports for Improved Synthesis of 3'-Modified Oligonucleotides. Bioconjugate Chem. 2 217-225

(1993)].

[0609] Lp-PLA$_2$ 발현을 표적화하는 데에 유용한 기타 siRNA는 용이하게 설계하고 시험할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 방법에 유용한 siRNA에는 길이가 약 15 내지 약 40개 또는 약 15 내지 약 28개 뉴클레오티드이며, Lp-PLA$_2$ 유전자와 상동성인 siRNA 분자가 포함된다. 바람직하게, Lp-PLA$_2$ 표적화 siRNA 분자는 약 19 내지 약 25개 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 보다 바람직하게, Lp-PLA$_2$ 표적화 siRNA 분자는 약 19, 20, 21, 또는 22개 뉴클레오티드 길이를 갖는다. Lp-PLA$_2$ 표적화 siRNA 분자는 또한, 3' 히드록실 기를 포함할 수 있다. Lp-PLA$_2$ 표적화 siRNA 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고; 이러한 분자는 평활 말단일 수 있거나 또는 오버행잉 말단 (예를 들어, 5', 3')을 포함할 수 있다. 구체적 양태에서, 이러한 RNA 분자는 이중 가닥이고, 평활 말단이거나 오버행잉 말단을 포함한다.

[0610] 한 양태에서, Lp-PLA$_2$ 표적화 RNA 분자의 하나 이상의 가닥은 길이가 약 0 내지 약 6개 뉴클레오티드 (예를 들어, 피리미딘 뉴클레오티드, 퓨린 뉴클레오티드)인 3' 오버행을 갖는다. 기타 양태에서, 3' 오버행은 길이가 약 1 내지 약 5개 뉴클레오티드, 약 1 내지 약 3개 뉴클레오티드 및 약 2 내지 약 4개 뉴클레오티드이다. 한 양태에서, Lp-PLA$_2$ 표적화 RNA 분자는 이중 가닥인데, 한 가닥은 3' 오버행을 갖고 다른 가닥은 평활 말단일 수 있거나 오버행을 갖는다. Lp-PLA$_2$ 표적화 RNA 분자가 이중 가닥이고 양 가닥이 오버행을 포함하는 양태에서는, 이러한 오버행의 길이가 각 가닥에 대해 동일하거나 상이할 수 있다. 특별한 양태에서, 본 발명의 RNA는 쌍을 형성하고 RNA의 양 3' 말단 상에 약 1 내지 약 3개, 특히 약 2개 뉴클레오티드의 오버행을 갖는, 약 19, 20, 21, 또는 22개 뉴클레오티드를 포함한다. 한 양태에서는, 3' 오버행을 분해에 대항하여 안정화시킬 수 있다. 바람직한 양태에서, RNA는 퓨린 뉴클레오티드, 예를 들어 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오티드를 봉입시킴으로써 안정화시킬 수 있다. 또 다른 한편으론, 피리미딘 뉴클레오티드를 변형된 유사체에 의해 치환시키는 것, 예를 들어 우리딘 2 뉴클레오티드 3' 오버행을 2'-데옥시티미딘에 의해 치환시키는 것이 관용되고, 이는 RNAi의 효율에 영향을 미치지 않는다. 2' 히드록실의 부재는 조직 배양 배지 내에서 오버행의 뉴클레아제 내성을 상당히 증강시킨다.

[0611] Lp-PLA$_2$ mRNA는 siRNA를 사용하여 성공적으로 표적화시켰으며, 이러한 siRNA 또는 이를 제조하기 위한 벡터는 시판되고 있다 [공급처: 예를 들어, Invitrogen]. 몇몇 양태에서, 이러한 Lp-PLA$_2$ siRNA를 사용하여 Lp-PLA$_2$ 단백질의 발현 및/또는 녹다운을 평가하는 것은 시판용 키트, 예를 들어 PLAC 검정 (공급처: diaDexus)을 사용하여 결정할 수 있다. 표적 mRNA의 공지된 서열을 기초로 하여 당업자는 기타를 용이하게 제조할 수 있다. 의혹을 피하기 위해, 인간 Lp-PLA$_2$ cDNA의 서열이, 예를 들어 유전자은행 승인 번호 U20157 (서열 1) 또는 NM_005084 (서열 2)에 제공되어 있다. U20157에서의 서열은 다음과 같다 (서열 1):

```
   1 gctggtcgga ggctcgcagt gctgtcggcg agaagcagtc gggtttggag cgcttgggtc
  61 gcgttggtgc gcggtggaac gcgcccaggg accccagttc ccgcgagcag ctccgcgccg
 121 cgcctgagag actaagctga aactgctgct cagctcccaa gatggtgcca cccaaattgc
 181 atgtgctttt ctgcctctgc ggctgcctgg ctgtggttta tccttttgac tggcaataca
 241 taaatcctgt tgcccatatg aaatcatcag catgggtcaa caaaatacaa gtactgatgg
 301 ctgctgcaag ctttggccaa actaaaatcc cccggggaaa tgggccttat tccgttggtt
 361 gtacagactt aatgtttgat cacactaata agggcacctt cttgcgttta tattatccat
 421 cccaagataa tgatcgcctt gacacccttt ggatcccaaa taaagaatat ttttggggtc
 481 ttagcaaatt tcttggaaca cactggctta tgggcaacat tttgaggtta ctctttggtt
 541 caatgacaac tcctgcaaac tggaattccc ctctgaggcc tggtgaaaaa tatccacttg
 601 ttgtttttttc tcatggtctt ggggcattca ggacacttta ttctgctatt ggcattgacc
 661 tggcatctca tgggtttata gttgctgctg tagaacacag agatagatct gcatctgcaa
 721 cttactattt caaggaccaa tctgctgcag aaatagggga caagtcttgg ctctaccttа
 781 gaaccctgaa acaagaggag gagacacata tacgaaatga gcaggtacgg caaagagcaa
 841 aagaatgttc ccaagctctc agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga
 901 atgcattaga tttaaagttt gatatggaac aactgaagga ctctattgat agggaaaaaa
 961 tagcagtaat tggacattct tttggtggag caacggttat tcagactctt agtgaagatc
1021 agagattcag atgtggtatt gccctggatg catggatgtt tccactgggt gatgaagtat
1081 attccagaat tcctcagccc ctctttttta tcaactctga atatttccaa tatcctgcta
1141 atatcataaa aatgaaaaaa tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca
1201 ggggttcagt ccaccagaat tttgctgact tcacttttgc aactggcaaa ataattggac
1261 acatgctcaa attaaaggga gacatagatt caaatgtagc tattgatctt agcaacaaag
1321 cttcattagc attcttacaa aagcatttag gacttcataa agattttgat cagtgggact
1381 gcttgattga aggagatgat gagaatctta ttccagggac caacattaac acaaccaatc
1441 aacacatcat gttacagaac tcttcaggaa tagagaaata caattaggat taaaataggt
1501 ttttt
```

[0612]

[0613] siRNA의 안티센스 (유도) 가닥이 RISC 내로 흡수되는 것을 최대화시킴으로써 분해를 위해 인간 Lp-PLA$_2$ mRNA를 표적화할 수 있는 RISC의 능력을 최대화시키는 siRNA 서열을 선택한다. 이는 안티센스 가닥의 5' 말단에서 가장 낮은 자유 결합 에너지를 갖는 서열을 스캐닝함으로써 달성할 수 있다. 보다 낮은 자유 에너지는 siRNA 이

중체의 안티센스 가닥의 5'-말단의 풀림을 증강시킴으로써, 안티센스 가닥이 RISC에 의해 흡수되고 인간 Lp-PLA_2 mRNA의 서열-특이적 절단을 지시할 수 있도록 한다.

[0614] 바람직한 양태에서, siRNA 또는 변형된 siRNA는 제약상 허용 가능한 담체에 전달된다. 부가의 담체 작용제, 예를 들어 리포솜을 제약상 허용 가능한 담체에 가할 수 있다.

[0615] 또 다른 양태에서, siRNA는 제약상 허용 가능한 담체 중의 저분자 헤어핀 RNA (shRNA)를 암호화하는 벡터를 개체 기관 내의 세포에 전달함으로써 전달한다. 이러한 shRNA는 전사 후 세포에 의해, 예를 들어 Lp-PLA_2를 표적화할 수 있는 siRNA로 전환시킨다. 한 양태에서, 벡터는 조절성 벡터, 예를 들어 테트라사이클린 유도성 벡터일 수 있다.

[0616] 한 양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 RNA 간섭 작용제는 벡터를 사용하지 않고서도 정맥내 주사, 예를 들어 피하 주사 후 생체내 세포에 의해 능동적으로 흡수되는데, 이는 RNA 간섭 작용제, 예를 들어 본 발명의 방법에 사용된 siRNA의 효율적인 생체내 전달을 예시하고 있다.

[0617] RNA 간섭 작용제, 예를 들어 본 발명의 방법에 사용된 siRNA 또는 shRNA를 전달하기 위한 기타 전략, 예를 들어 벡터 (예: 플라스미드) 또는 바이러스성 벡터 (예: 렌티바이러스성 벡터)에 의한 전달을 이용할 수도 있다. 이러한 벡터는, 예를 들어 다음 문헌에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다 [참고: Xiao-Feng Qin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 183-188]. 기타 전달 방법에는 RNA 간섭 작용제를 염기성 펩티드, 예를 들어 TAT 펩티드의 단편과 접합 또는 혼합하거나, 양이온성 지질과 혼합하거나 또는 입자로 제형화함으로써 염기성 펩티드를 사용하여, RNA 간섭 작용제, 예를 들어 본 발명의 siRNA 또는 shRNA를 전달하는 방법이 포함된다.

[0618] 인지된 바와 같이, dsRNA, 예를 들어 siRNA 또는 shRNA는 유도성 벡터, 예를 들면 테트라사이클린 유도성 벡터를 사용하여 전달할 수 있다. pTet-On 벡터 (공급처: BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하는 것으로 문헌 [참고: Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106]에 보고된 방법을 사용할 수 있다. 몇몇 양태에서, 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스성 벡터, 또는 외래 유전자를 삽입하고 진핵 세포 내로 도입하도록 적응시킨 기타 적합한 모든 비히클일 수 있다. 벡터는 작동제 또는 길항제 핵산 분자의 DNA 서열을 RNA로 전사하는 것을 지시할 수 있는 발현 벡터일 수 있다. 바이러스성 발현 벡터는, 예를 들어 레트로바이러스, 렌티바이러스, 엡슈타인 바르 (Epstein Barr) 바이러스, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스에 근거한 벡터 및 아데노-관련에 근거한 벡터, 또는 상기 모두의 하이브리드 바이러스를 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다. 한 양태에서, 벡터는 에피솜성이다. 적합한 에피솜성 벡터의 사용은 길항제 핵산 분자를 대상체 내에서 고 카피수 염색체외 DNA로 유지시켜 줌으로써 염색체 통합의 잠재적 효과를 없애는 수단을 제공해 준다.

[0619] 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용한 RNA 간섭 분자 및 핵산 억제제는 공지된 모든 기술, 예를 들어 직접적인 화학적 합성 기술, 재조합 다이서 단백질 또는 드로소필라 (Drosophila) 배아 용해물에 대한 노출에 의한 보다 긴 이중 가닥 RNA의 프로세싱을 통하는 기술, S2 세포로부터 유래된 시험관내 시스템을 통하는 기술, 파아지 RNA 폴리머라제, RNA-의존적 RNA 폴리머라제 및 DNA에 의거한 벡터를 사용하는 기술을 이용하여 생성시킬 수 있다. 세포 용해물 또는 시험관내 프로세싱의 사용은 이러한 용해물로부터 저분자, 예를 들어 약 21 내지 23개 뉴클레오티드 siRNA를 후속 단리시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 화학적 합성은 통상적으로, 2개의 단일 가닥 RNA-올리고머를 만듦으로써 선행되고, 이어서 이러한 2개의 단일 가닥 올리고머를 이중 가닥 RNA가 되도록 어닐링시킨다. 기타 예에는 WO 99/32619 및 WO 01/68836에 기재된 방법이 포함되는데, 이 공개공보에는 siRNA의 화학적 및 효소적 합성이 교시되어 있다. 더우기, 특이적 siRNA를 설계하고 제작하기 위한 수 많은 상업적 서비스가 이용 가능하다 [참고: 예를 들어, QIAGEN Inc., Valencia, CA and AMBION Inc., Austin, TX].

[0620] 몇몇 양태에서, 작용제는 Lp-PLA_2의 발현 및/또는 Lp-PLA_2 단백질의 활성을 억제하는 단백질 또는 폴리펩티드 또는 RNAi 작용제이다. 이러한 양태에서는, 예를 들어 천연 발생적 프로모터의 전부 또는 일부를 이종 프로모터의 전부 또는 일부로 대체시킴으로써 상기 작용제의 발현 증가를 제공하도록 세포를 변형 (예를 들어, 상동 재조합에 의함)시킬 수 있는데, 이로써 상기 세포는 Lp-PLA_2의 천연 억제제, 예를 들어 Lp-PLA_2의 단백질 또는 miRNA 억제제를 보다 고 수준으로 발현한다. 이종 프로모터는 이것이 상기 작용제를 암호화하는 목적하는 핵산과 작동적으로 연결되는 방식으로 삽입된다 [참고: 예를 들어, PCT 국제공개공보 WO 94/12650 (Transkaryotic Therapies, Inc.), PCT 국제공개공보 WO 92/20808 (Cell Genesys, Inc.), 및 PCT 국제공개공보 WO 91/09955 (Applied Research Systems)]. 세포를 유도성 조절 요소의 제어 하에 해당 작용제를 포함하는 내인성 유전자를 발현하도록 공학 처리시킬 수도 있는데, 이러한 경우에 내인성 유전자의 조절 서열은 상동 재조합에 의해 대체시킬 수 있다. 유전자 활성화 기술이 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: 미국 특허 제5,272,071호 (Chappel);

미국 특허 제5,578,461호 (Sherwin et al.); PCT/US92/09627 (WO93/09222) (Selden et al.); 및 PCT/US90/06436 (WO91/06667) (Skoultchi et al.)]. 상기 작용제는 형질전환된 숙주 세포를 miRNA를 발현시키기에 적합한 배양 조건 하에 배양함으로써 제조할 수 있다. 이어서, 이로써 생성되고 발현된 작용제는 공지된 정제 공정, 예를 들어 여과 및 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 상기 배양물 (즉, 배양 배지 또는 세포 추출물)로부터 정제할 수 있다. Lp-PLA_2의 단백질 또는 핵산 작용제 억제제의 정제에는 또한, 단백질과 결합하게 될 작용제를 함유하는 친화 칼럼; 콘카나발린 (concanavalin) A-아가로스, 헤파린-토요펄 (heparin-toyopearl™) 또는 시바크롬 블루 (Cibacrom blue) 3GA 세파로스 등의 친화 수지 상에서의 하나 이상의 칼럼 단계; 페닐 에테르, 부틸 에테르 또는 프로필 에테르 등의 수지를 사용하는 소수성 상호 작용 크로마토그래피를 포함하는 하나 이상의 단계; 면역친화 크로마토그래피; 또는 상보적 cDNA 친화 크로마토그래피가 포함될 수 있다.

[0621] 한 양태에서, Lp-PLA_2의 핵산 억제제는, 예를 들어 당업자에게 공지된 모든 합성 방법에 의해 핵산을 화학적으로 합성함으로써 합성적으로 수득할 수 있다. 이와 같이 합성된 Lp-PLA_2의 핵산 억제제는 당해 분야에 공지된 모든 방법에 의해 정제할 수 있다. 핵산을 화학적으로 합성하는 방법에는 포스포트리에스테르, 포스페이트 또는 포스포르아미다이트를 사용하는 시험관내 화학적 합성 및 고체 상 기술, 또는 데옥시뉴클레오시드 H-포스포네이트 중간체를 통하는 방법이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다 [참고: 미국 특허 제5,705,629호 (Bhongle)].

[0622] 몇몇 상황, 예를 들어 뉴클레아제 안정성 증가가 요망되는 경우에는, 핵산 유사체 및/또는 변형된 뉴클레오시드간 연쇄를 갖는 핵산이 바람직할 수 있다. 변형된 뉴클레오시드간 연쇄를 함유하는 핵산은 당해 분야에 널리 공지되어 있는 시약 및 방법을 사용하여 합성할 수도 있다. 예를 들어, 포스포네이트 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미데이트 메톡시에틸 포스포르아미데이트, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 디이소프로필실릴, 아세트아미데이트, 카바메이트, 디메틸렌-설파이드 ($-CH_2-S-CH_2$), 디메틸렌-설폭시드 ($-CH_2-SO-CH_2$), 디메틸렌-설폰 ($-CH_2-SO_2-CH_2$), 2'-O-알킬, 및 2'-데옥시-2'-플루오로 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연쇄를 함유하는 핵산을 합성하는 방법이 당해 분야에 널리 공지되어 있다 [참고: Uhlmann et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-584; Schneider et al., 1990, Tetrahedron Lett. 31:335 및 이에 인용된 참고 문헌]. 미국 특허 제5,614,617호 및 제5,223,618호 (Cook, et al.), 제5,714,606호 (Acevedo, et al.), 제5,378,825호 (Cook, et al.), 제5,672,697호 및 제5,466,786호 (Buhr, et al.), 제5,777,092호 (Cook, et al.), 제5,602,240호 (De Mesmacker, et al.), 제5,610,289호 (Cook, et al.) 및 제5,858,988호 (Wang)에는 또한, 뉴클레아제 안정성과 세포성 흡수를 증강시키기 위한 핵산 유사체가 기재되어 있다.

[0623] shRNA 분자를 포함한 합성 siRNA 분자는 당업자에게 공지된 수 많은 기술을 사용하여 수득할 수 있다. 예를 들어, siRNA 분자는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 적당하게 보호된 리보뉴클레오시드 포스포르아미다이트 및 통상적인 DNA/RNA 합성기를 사용하여 화학적으로 합성하거나 또는 재조합적으로 생성시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Elbashir, S.M. et al. (2001) *Nature* 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001) *Genes & Development* 15: 188-200; Harborth, J. et al. (2001) *J. Cell Science* 114:4557-4565; Masters, J.R. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98:8012-8017; and Tuschl, T. et al. (1999) *Genes & Development* 13:3191-3197]. 또 다른 한편으론, 시판용 RNA 합성 공급업체가 여러 개 있다 [예를 들어, Proligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA), Pierce Chemical (part of Perbio Science, Rockford, IL , USA), Glen Research (Sterling, VA, USA), ChemGenes (Ashland, MA, USA), 및 Cruachem (Glasgow, UK)]. 그 자체로서의 siRNA 분자는 합성하기가 몹시 곤란한 것은 아니고, RNAi에 적합한 양으로 용이하게 제공된다. 또한, dsRNA는 플라스미드 벡터, 레트로바이러스 및 렌티바이러스에 의해 암호화된 줄기 루프 구조로서 발현될 수 있다 [참고: Paddison, P.J. et al. (2002) *Genes Dev.* 16:948-958; McManus, M.T. et al. (2002) *RNA* 8:842-850; Paul, CP. et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:505-508; Miyagishi, M. et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Sui, G. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:5515-5520; Brummelkamp, T. et al. (2002) *Cancer Cell* 2:243; Lee, N.S., et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:500-505; Yu, J.Y., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:6047-6052; Zeng, Y., et al. (2002) *Mol. Cell* 9:1327-1333; Rubinson, D.A., et al. (2003) *Nat. Genet.* 33:401-406; Stewart, S.A., et al. (2003) *RNA* 9:493-501]. 이들 벡터는 일반적으로, dsRNA의 상류에 *polIII* 프로모터를 갖고 있고, 센스 및 안티센스 RNA 가닥을 별개로 발현하고/하거나 헤어핀 구조로서 발현할 수 있다. 세포 내에서, 다이서는 저분자 헤어핀 RNA (shRNA)를 유효 siRNA로 프로세싱한다.

[0624] 본 발명의 siRNA 분자의 표적화 영역은 출발 코돈의 하류 약 25 내지 50개 뉴클레오티드, 약 50 내지 75개 뉴클레오티드, 또는 약 75 내지 100개 뉴클레오티드로부터 시작하는 소정의 표적 유전자 서열 (예: Lp-PLA_2 암호화 서열) 중에서 선택될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 5' 또는 3' UTR 및 출발 코돈 근처 영역을 함유할 수 있다. 본 발명의 siRNA 분자를 설계하는 한 가지 방법은 23개 뉴클레오티드 서열 모티프 AA(N19)TT (여기서, N은 모든 뉴클레오티드일 수 있다)를 확인하고, 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%의 G/C 함량을 지닌 표적물을 선별하는 것을 포함한다. 이러한 서열의 "TT" 부분은 임의적이다. 또 다른 한편, 이러한 서열이 전혀 발견되지 않는 경우에는, 모티프 NA(N21) (여기서, N은 모든 뉴클레오티드일 수 있다)를 사용하여 조사를 연장할 수 있다. 이러한 상황 하에서는, 센스 siRNA의 3' 말단을 TT로 전환시켜 센스 및 안티센스 3' 오버행의 서열 조성과 관련하여 대칭적인 이중체를 생성시킬 수 있다. 이어서, 안티센스 siRNA 분자는 상기 23개 뉴클레오티드 서열 모티프의 뉴클레오티드 위치 1 내지 21에 대한 보체로서 합성할 수 있다. 대칭 3' TT 오버행를 사용하는 것이, 센스 및 안티센스 표적 RNA-절단성 저분자 간섭 리보핵단백질 입자 (siRNP)를 대략 등가 비로 사용하여 siRNP를 형성하도록 하는 데에 유리할 수 있다 [Elbashir et al. (2001) 상기 참고 및 Elbashir et al. 2001 상기 참고]. NCBI, BLAST, 더웬트 (Derwent) 및 GenSeq 뿐만 아니라 시판용 올리고합성 소프트웨어 (예: Oligoengine®)을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 서열 데이터베이스 분석을 또한 이용하여, EST 라이브러리에 대항하여 siRNA 서열을 선별하여 단지 1개 유전자 만을 표적화시키도록 할 수 있다.

[0625] RNA 간섭 작용제의 전달: RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA, 또는 RNA 간섭 작용제를 함유하는 벡터를 표적 세포 (예를 들어, 뇌 세포 또는 기타 목적하는 표적 세포, 뇌 및 말초 신경계 내의 세포)에 전달하는 방법에는, 예를 들어 (i) RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA를 함유하는 조성물을 주사하는 방법 또는 (ii) 세포, 예를 들어 뇌 세포를 RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA를 포함하는 조성물과 직접 접촉시키는 방법이 포함될 수 있다. 또 다른 양태에서, RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA는 피하 주사 또는 카테터 주입를 통하여 모든 혈관, 예를 들어 정맥, 동맥, 세정맥 또는 세동맥에 직접 주사할 수 있다. 몇몇 양태에서는, Lp-PLA_2 작용제, 예를 들어 Lp-PLA_2 siRNA를 특이적 기관, 예를 들어 간, 골수에 전달하거나 또는 전신 투여할 수 있다.

[0626] 투여는 단일 주사 또는 2회 이상 주사일 수 있다. RNA 간섭 작용제는 제약상 허용 가능한 담체 중에서 전달된다. 하나 이상의 RNA 간섭 작용제를 동시에 사용할 수 있다. Lp-PLA_2 mRNA를 표적으로 하는 RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA는 단독으로 전달하거나, 또는 기타 RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA, 예를 들면 기타 세포성 유전자에 대해 지시된 siRNA와 병용해서 전달할 수 있다. Lp-PLA_2 siRNA는 또한, 신경변성 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해 사용되고 있는 기타 제약 작용제와 병용해서 투여할 수 있다.

[0627] 한 양태에서는, 특이적 세포를 RNA 간섭으로 표적화하여, RNA 간섭의 비-특이적 표적화에 의해 유발된 RNA 간섭의 잠재적 부작용을 제한한다. 이러한 방법은, 예를 들어 RNA 간섭을 세포 내로 효과적으로 전달하기 위해 사용되는 RNA 간섭 결합성 부분과 세포 표적화 부분을 포함하는 융합 분자 또는 복합체를 이용할 수 있다. 예를 들어, 항체-프로타민 융합 단백질이 siRNA와 혼합되는 경우에는, 이러한 융합 단백질이 siRNA와 결합하고, 이러한 siRNA는 해당 항체에 의해 인식된 항원을 발현하는 세포 내로 선택적으로 전달되어, 상기 항원을 발현하는 세포에서만 유전자 발현이 무반응된다. siRNA 또는 RNA 간섭-유도성 분자 결합성 부분은 단백질 또는 핵산 결합성 도메인 또는 단백질의 단편이고, 결합성 부분은 표적화 부분의 일부와 융합된다. 표적화 부분의 위치는 구조물의 카복실-말단 또는 아미노-말단 끝이거나 또는 융합 단백질의 중앙일 수 있다.

[0628] 문헌 [참고: Xia, H. et al (2002) *Nat Biotechnol* 20(10): 1006]에 기재된 바와 같이 바이러스-매개된 전달 기전을 또한 이용하여 siRNA를 시험관내 및 생체내 세포에 전달할 수 있다. 문헌 [참고: Rubinson, D.A., et al. (2003) *Nat. Genet.* 33:401-406 and Stewart, S.A., et al. (2003) *RNA* 9:493-501]에 기재된 바와 같이 shRNA의 플라스미드- 또는 바이러스-매개된 전달 기전을 또한 이용하여 shRNA를 시험관내 및 생체내 세포에 전달할 수 있다.

[0629] RNA 간섭 작용제, 예를 들어 siRNA는 혈관 또는 혈관외 순환, 혈액 또는 림프계, 및 뇌척수액을 통하여 세포 내로 도입될 수도 있다.

[0630] 특별한 RNA 간섭 작용제의 용량은 특별한 표적 유전자의 RNA 간섭, 예를 들어 해독 후 유전자 무반응 (PTGS)을 수행하여, 표적 유전자에 의해 암호화된 단백질의 활성 또는 수준을 억제하거나 표적 유전자 발현을 억제시키는 데에 필요한 양일 것이다.

[0631] RNAi 분자는 그의 표적 서열과 완벽하게 매칭되지 않는 것으로 또한 공지되어 있다. 그러나, 바람직하게 siRNA의 안티센스 (유도) 가닥의 5' 및 중앙부은 표적 핵산 서열에 대해 완벽하게 상보적이다.

[0632] 따라서, 본 발명에서 Lp-PLA_2의 핵산 억제제로서 기능하는 RNAi 분자는, 예를 들어 변형되지 않은 및 변형된 이중 가닥 (ds) RNA 분자, 예를 들어 저분자-측두 RNA (stRNA), 저분자 간섭 RNA (siRNA), 저분자-헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로RNA (miRNA), 이중 가닥 RNA (dsRNA)이지만, 그에 제한되지 않는다 [참고: 예를 들어, Baulcombe, Science 297:2002-2003, 2002]. dsRNA 분자, 예를 들어 siRNA는 3' 오버행, 바람직하게 3'UU 또는 3'TT 오버행을 함유할 수도 있다. 한 양태에서, 본 발명의 siRNA 분자에는 약 30 내지 40개 초과 염기, 약 40 내지 50개 염기, 약 50개 이상 염기의 ssRNA를 포함하는 RNA 분자가 포함되지 않는다. 한 양태에서, 본 발명의 siRNA 분자는 그들 길이의 약 25% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 90% 초과가 이중 가닥이다. 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2의 핵산 억제제는 Lp-PLA_2 mRNA와 결합하여 이의 발현을 억제하는 모든 작용제인데, Lp-PLA_2 mRNA 또는 서열 1 또는 2에 의해 암호화된 핵산의 전사 생성물의 발현이 억제된다.

[0633] 본 발명의 또 다른 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 촉매적 핵산 구조물, 예를 들어 RNA 전사체를 절단함으로써 야생형 단백질의 생성을 방지시킬 수 있는 리보자임이다. 리보자임은 리보자임 촉매적 부위를 플랭킹하는 표적에 대해 상보적인 서열의 2개 영역을 통하여 특별한 서열을 표적으로 하고 이와 어닐링된다. 결합 후, 리보자임은 표적을 부위 특이적 방식으로 절단한다. 본원에 기재된 유전자 생성물의 서열을 특이적으로 인식하고 이를 절단하는, 예를 들어 Lp-PLA_2 또는 그의 상동체 또는 변이체를 절단하는 리보자임의 설계 및 시험은 당업자에게 널리 공지된 기술에 의해 달성할 수 있다 [참고: 예를 들어, Lleber and Strauss, (1995) Mol Cell Biol 15:540.551, 이의 전문이 본원에 참고로 도입된다].

[0634] Lp-PLA2의 단백질 및 펩티드 억제제

[0635] 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 Lp-PLA_2의 단백질 및/또는 펩티드 억제제 또는 억제제 단편, 예를 들어 돌연변이된 단백질; 치료적 단백질 및 재조합 단백질이지만, 그에 제한되지 않는다. 단백질 및 펩티드 억제제에는, 예를 들어 돌연변이된 단백질, 유전적으로 변형된 단백질, 펩티드, 합성 펩티드, 재조합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 인간화 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 변형된 단백질 및 그의 단편이 포함될 수 있다.

[0636] 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 Lp-PLA_2의 우성 음성 변이체, 예를 들어 Lp-PLA_2의 비-작용성 변이체이다.

[0637] 항체

[0638] 몇몇 양태에서, 본 발명의 방법에 유용한 유전자 및/또는 유전자 생성물의 억제제에는, 예를 들어 항체, 예를 들면 모노클로날, 키메라, 인간화 및 재조합 항체, 및 그의 항원-결합성 단편이 포함된다. 몇몇 양태에서, 중화 항체를 Lp-PLA_2 효소의 억제제로서 사용할 수 있다. 항체는 토끼 또는 마우스와 같은 동물을 항원으로 면역시킴으로써 이러한 동물에게서 용이하게 생성된다. 면역된 마우스는 다량의 모노클로날 항체를 생성시키기 위해 배양될 하이브리도마를 제조하기 위한 B 세포의 공급원을 제공하는 데에 특히 유용하다.

[0639] 본 발명의 한 양태에서, 본원에서 확인된 유전자 생성물에 대한 억제제는 항체 분자 또는 항체 분자의 에피토프-결합성 부분 등일 수 있다. 항체는 광범위한 표적 항원 및 합텐에 대한 높은 결합 활성도와 독특한 특이성을 제공한다. 본 발명의 실시에 유용한 모노클로날 항체에는 완전 항체 및 그의 단편이 포함되고, 이는 통상적인 기술, 예를 들어 하이브리도마 합성, 재조합 DNA 기술 및 단백질 합성에 따라서 생성된다.

[0640] 유용한 모노클로날 항체 및 단편은 모든 종 (인간 포함)으로부터 전달될 수 있거나 또는 한 가지 이상 종으로부터의 서열을 이용하는 키메라 단백질로서 형성될 수 있다. 인간 모노클로날 항체 또는 "인간화" 뮤린 항체가 또한 본 발명에 따라서 사용된다. 예를 들어, 뮤린 모노클로날 항체는 뮤린 Fv 영역을 암호화하는 (즉, 항원 결합 부위를 함유하는) 뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보성 결정 영역을 인간 불변 도메인 영역 및 Fc 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 유전적으로 재조합함으로써 "인간화"시킬 수 있다. 인간화 표적화 부분은 숙주 수용자 내의 항체 또는 폴리펩티드의 면역반응성을 저하시키도록 인식하여, 유럽 특허 출원 제0,411,893 A2호에 기재된 바와 유사한 방식으로 불리한 면역 반응 가능성을 저하시키고 반감기를 증가시킬 수 있다. 뮤린 모노클로날 항체는 바람직하게, 인간화 형태로 이용되어야 한다. 항원 결합 활성은 항체의 가변부 (Fv)의 경쇄 및 중쇄 상에 위치하는 (각각 3개) 6개의 상보성 결정 영역 (CDR)의 아미노산의 서열 및 입체 형태에 의해 결정된다. 경쇄의 가변 영역 (VL)과 짧은 펩티드 스페이서 서열을 통하여 연결된 중쇄의 가변 영역 (VH)으로 구성

된 25-kDa 단일 쇄 Fv (scFv) 분자가 지금까지 개발된 가장 작은 항체 단편이다. scFv 분자를 이러한 scFv에 대한 유전자를 함유하는 섬유상 파아지의 표면 상에 디스플레이하는 기술이 개발되었다. 광범위한 항원 특이성을 지닌 scFv 분자가 scFv-파아지 라이브러리의 단일 대형 풀에 제시될 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 고친화성 모노클로날 항체 및 그의 키메라 유도체의 몇몇 예가 유럽 특허 출원 EP 186,833; PCT 특허공개공보 WO 92/16553; 및 미국 특허 제6,090,923호에 기재되어 있다.

[0641] 키메라 항체는 상이한 동물 종으로부터 유래된 2가지 이상의 절편 또는 부분을 특징으로 하는 면역글로불린 분자이다. 일반적으로, 키메라 항체의 가변 영역은 비-인간 포유류 항체, 예를 들어 뮤린 모노클로날 항체로부터 유래되고, 면역글로불린 불변 영역은 인간 면역글로불린 분자로부터 유래된다. 바람직하게, 두 영역과 조합물은 통상적으로 결정된 바와 같이 면역원성이 낮다.

[0642] scFv 분자의 한 가지 단점은 표적 항원과의 1가 상호 작용이다. 그의 표적 항원에 대한 scFv의 결합성을 개선시키는 가장 용이한 방법 중의 한 가지는 다량체의 창출을 통하여 그의 작용성 친화도를 증가시키는 것이다. 동일한 scFv 분자를 연합하여 디아보디, 트리아보디 및 테트라보디를 형성시키는 것은 수 많은 동일한 Fv 모듈을 포함할 수 있다. 따라서, 이들 시약은 다가이지만, 단일 특이적이다. 각각 상이한 모 Ig로부터 유래된 VH 및 VL 도메인을 포함하는 2가지 상이한 scFv 분자를 연합하면, 완전히 작용성인 이중-특이적 디아보디가 형성될 것이다. 이중-특이적 scFv의 독특한 적용은 2개 (인접한)의 표면 에피토프를 통하여 동일한 표적 분자 상에 2개 부위를 동시에 결합시키는 것이다. 이들 시약은 단일 scFv 또는 Fab 단편에 비해 상당한 결합 활성도 이점을 획득하게 한다. 수 많은 다가 scFv에 의거한 구조물, 예를 들어 미니항체, 키메라 미니항체, 미니보디, $(ScFv)_2$, 디아보디 및 트리아보디를 공학 처리하였다. 이들 분자는 일정 범위의 결합가 (2개 내지 4개 결합 부위), 크기 (50 내지 120 kDa), 가요성 및 생성 용이성에 걸쳐 있다. 단일 쇄 Fv 항체 단편 (scFv)은 VH 도메인과 VL 도메인이 12개 이상 잔기의 폴리펩티드 링커에 의해 연결되는 경우에 주로 단량체성이다. 이러한 단량체 scFv는 모든 조건 하에 12개 및 25개 아미노산 길이의 링커와 열역학적으로 안정적이다. 비-공유적 디아보디 및 트리아보디 분자는 공학 처리하기가 용이하고, 단일 scFv 분자의 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 연결시키는 펩티드 링커를 단축시킴으로써 생성된다. scFv 이량체는 고도의 가요성을 부여해 주는 양친매성 나선에 의해 연결되고, 미니항체 구조는 이중 나선을 통하여 연결된 2개의 미니항체 (4개의 scFv 분자)를 함유하는 이량체성 이중-특이적 (DiBi) 미니항체를 창출시키도록 변형시킬 수 있다. 유전자 융합되거나 디설파이드 결합된 scFv 이량체는 중간 정도의 가요성을 제공하고, C-말단 Gly4Cys 서열을 부가하는 간단한 클로닝 기술에 의해 생성된다. scFv-CH3 미니보디는 직접적으로 (LD 미니보디) 또는 극히 가요성인 힌지 영역을 통하여 (플렉스 미니보디) IgG CH3 도메인과 연결된 2개의 scFv 분자로 구성된다. 분자량이 대략 80 kDa인 경우, 이들 2가 구조물은 항원과 상당히 결합할 수 있다. 플렉스 미니보디는 마우스에서 인상적인 종양 국재화를 나타낸다. 이중- 및 삼중-특이적 다량체는 상이한 scFv 분자를 연합함으로써 형성시킬 수 있다. 작용성 친화도 상의 증가는 Fab 또는 단일 쇄 Fv 항체 단편 (scFv) 단편을 복합체 형성시켜 이량체, 삼량체 또는 보다 큰 응집체로 만든 경우에 달성될 수 있다. 1가 scFv 및 Fab 단편에 비해 다가 scFv의 가장 중요한 이점은 표적 항원에 대한 작용성 결합 친화도 (결합 활성도) 상의 증가이다. 고 결합 활성도를 위해서는, scFv 다량체가 별개의 표적 항원과 동시에 결합할 수 있어야 한다. scFv 단량체와 비교해서 scFv 디아보디에 대한 작용성 친화도 상의 증가는 상당하고, 이는 2개 이상의 표적 항원에 대한 다중 결합 및 하나의 Fv가 해리되는 경우의 재결합으로부터 비롯되는, 이탈 속도 저하에서 주로 관찰된다. 이러한 scFv 분자가 연합되어 다량체를 형성하는 경우, 이는 단일 표적 항원에 대한 고 결합 활성도를 지니거나 또는 상이한 표적 항원에 대한 다중 특이성을 지니도록 설계할 수 있다. 항원에 대한 다중 결합성은 Fv 모듈 내에서의 정확한 정렬과 배향에 좌우된다. 다가 scFv 표적에서의 완전한 결합 활성도를 위해서는, 항원 결합 부위가 동일한 방향을 향하는 점이어야만 한다. 다중 결합이 입체적으로 가능하지 않은 경우에는, 작용성 친화도 상의 가시적 증가가 재결합 증가 효과에 기인하는 것으로 예상되는데, 이러한 효과는 확산 속도와 항원 농도에 의존적이다. 그의 특성을 개선시켜 주는 부분들과 접합된 항체가 또한 본 발명에 고려된다. 예를 들어, 그의 생체내 반감기를 증가시켜 주는 PEG와의 항체 접합체가 본 발명에 사용될 수 있다. 면역 라이브러리는 본래 그대로의 또는 면역시킨 동물 또는 환자의 B 림프구로부터의 가변 항체 단편을 암호화하는 유전자를 대상으로 하여 PCR 증폭시킴으로써 제조한다. 면역글로불린 유전자에 대해 특이적이거나 또는 면역글로불린 유전자 계열에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드의 조합물을 사용한다. 면역글로불린 생식세포계 유전자를 사용하여 반합성 항체 레퍼토리 (repertoire)를 제조할 수 있는데, 가변 단편의 상보성 결정 영역은 변성 프라이머를 사용하여 PCR함으로써 증폭시킨다. 이들 단일-포트 라이브러리는 다수의 항원에 대항한 항체 단편을 1개의 단일 라이브러리로부터 단리시킬 수 있다는 이점을 지니고 있다. 파아지-디스플레이 기술을 사용하여 항체 단편의 친화도를 증가시킬 수 있는데, 신규 라이브러리는 무작위, 코돈에 의거하거나 부위 지시된 돌연변이 유발에 의해, 개개 도메인 쇄를 본래 그대로의 레퍼토리로부터의 단편 쇄로 셔플링하거나, 또는 세

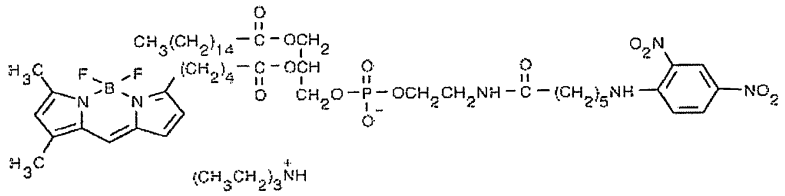
균성 변이자주를 사용함으로써 기존의 항체 단편으로부터 제조된다.

[0643] 또 다른 한편으론, SCID-hu 마우스, 예를 들어 공급처 (Genpharm)에 의해 개발된 모델을 사용하여 항체 또는 그의 단편을 생성시킬 수 있다. 한 양태에서, 다가 상호 작용 효과를 이용함으로써 창출된, 신규 유형의 고 결합 활성도 결합성 분자 (펜타보디로 지칭된다)가 고려된다. 짧은 펩티드 리간드는 반강성 힌지 영역을 통하여 연골 올리고머성 매트릭스 단백질의 코일드 코일 (coiled-coil) 어셈블리 도메인과 융합시키면 오량체성 다가 결합성 분자가 생성되었다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 리간드 및/또는 키메라 억제제는 이중-특이적 항체를 사용함으로써 조직- 또는 종양-특이적 표적을 표적으로 할 수 있는데, 예를 들어 항-리간드 항체 (Ab)와 특이적 표적에 대항하여 유도된 Ab의 화학적 연쇄에 의해 생성될 수 있다. 화학적 접합체의 단점을 피하기 위해, 항체의 분자성 접합체를, 세포 표면 분자에서 리간드 및/또는 키메라 항체를 지시하는 재조합 이중-특이적 단일-쇄 Ab의 생성에 사용할 수 있다. 또 다른 한편으론, 표적화 부분에 부착된 2개 이상의 활성 작용제 및/또는 억제제를 투여할 수 있는데, 각 접합체에는 표적화 부분, 예를 들어 상이한 항체가 포함된다. 각 항체는 상이한 표적 부위 에피토프와 반응성이다 (동일하거나 상이한 표적 부위 항원과 연합된다). 작용제가 부착된 상이한 항체는 목적하는 표적 부위에 부가적으로 축적된다. 항체에 의거하거나 항체에 의거하지 않는 표적화 부분을 이용하여 리간드 또는 억제제를 표적 부위에 전달할 수 있다. 바람직하게, 조절되지 않거나 질병 관련 항원에 대한 천연 결합성 작용제가 이러한 목적을 위해 사용된다.

[0644] **Lp-PLA$_2$ 억제제를 확인하기 위한 생물학적 검정:**

[0645] Lp-PLA$_2$ 단백질의 억제를 알아보기 위한 스크린:

[0646] 몇몇 양태에서, 본 발명의 방법은 혈관성 치매, 예를 들어 알츠하이머병을 치료하고/하거나 BBB의 투과성과 연관된 장애를 치료하기 위한 Lp-PLA$_2$의 억제제의 용도에 관한 것이다. 필요에 따라, Lp-PLA$_2$ 단백질을 억제하는 작용제는 미국 특허 제5,981,252호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 바와 같은 생물학적 검정을 사용하여 평가한다. 이러한 한 가지 검정은 재조합 Lp-PLA$_2$ 단백질에 대한 상기 작용제의 효과를 시험하는 것이다. 한 가지 검정에서는, 예를 들어 아연 킬레이팅 칼럼, 블루 세파로스 친화 크로마토그래피 및 음이온 교환 칼럼을 사용하여, 바쿨로바이러스 감염된 Sf9 세포로부터 균질해지도록 재조합 Lp-PLA$_2$를 정제한다. 정제 및 한외여과시킨 후, 상기 효소를 4℃ 하에 6 mg/ml으로 저장할 수 있다. 검정 완충액은 실온 하에 Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM) 및 1 mM CHAPS, pH 7.4를 포함한다. 활성은 384 웰 미세역가 판을 수반한 형광측정 판 판독기를 사용하여, 기질로서 N-((6-(2,4-디니트로페닐)아미노)헥사노일)-2-(4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-펜타노일)-1-헥사데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 트리에틸암모늄 염 (PED6, Molecular Probes catalogue reference D-23739)의 가수분해에 대한 535 nm 하에서의 방출 상의 증가로써 측정한다. 반응은 효소 (대략 400 pM 최종 중량부) 및 기질 (5 μM 최종)을 총 용적 10 마이크로리터로 억제제에 부가함으로써 개시시킨다.



[0647] (PED6)

[0648] 본원에 기재된 바와 같은, 예를 들어 합성 실시예란 표제 섹션에 기재된 바와 같은 화합물을 시험한 결과, 이는 0.1 내지 10 nM 범위의 IC_{50} 값을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.

[0649] **신경변성 질환 또는 장애를 치료하기 위한, Lp-PLA$_2$를 억제하는 작용제의 용도**

[0650] BBB 투과성과 연관된 장애:

[0651] 특정 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 해부학적 장벽에 덧붙여 기능적 장벽인 BBB는 최적의 CNS 기능을 위해 일정한 환경을 유지하는 데에 있어 상당히 중요하다. 대부분의 대사 기질 (즉, 당 및 아미노산)은 소수성이고, BBB 내피 세포의 내강 및 복내강 측면 둘 다에서 발현되는 특이적 담체-매개된 수송 시스템에 의해서만 BBB를 횡단한다. 담체와 효소의 분포에 있어서는 현저한 선단/기저 차이가 존재하는데, 이는 특수 BBB 내피를 말초

내피와 구별시켜 준다. BBB 투과성 약화에 관여하는 병리생리학과 기전을 이해하는 데에 있어서 상당한 진전이 있었다. "병든 BBB"의 임상 영향력은 뇌에 악영향을 미치는 많은 질병에서 발생하는데, 이러한 BBB는 붕괴되거나, 또는 혈관 투과성이 현저하게 증가되는 방식으로 변형된다. 특정 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 각종 분자가 내피를 통과할 수 있는 몇 가지 방식이 존재한다. 이에는 세포간 경로, 소포 수송, 또는 손상된 내피를 통한 직접적인 세포 관통 침투가 포함된다.

[0652] 비정상적인 BBB 또는 BBB 기능이상은 특별한 질병 과정, 예를 들어 신경변성 질환 및 장애의 원인이거나 그 결과일 수 있다. BBB 투과성 증가가 보고된 질병에는 종양, 허혈증, 고혈압, 치매, 간질, 감염증, 다발성 경화증, 및 외상이 포함된다. BBB 기능에 대한 질병의 효과는 뇌에서의 뇌 혈류량과 혈관 긴장도에 부차적으로 영향을 미쳐 BBB를 가로지르는 수송에 추가로 영향을 미칠 것이다.

[0653] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 사용하여 Lp-PLA_2를 억제하는 것은 BBB 투과성이 일어나고/나거나 BBB 붕괴가 일어나는 장애 또는 질환을 치료하는 데에 유용하다. 작용제, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 사용하여 Lp-PLA_2를 억제하는 것은 본래의 BBB를 유지하는 것이 요망되는 장애 또는 질환을 치료 또는 예방하는 데에 유용하다.

[0654] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 신경변성 질환 및 장애를 예방 및 치료하는 데에 유용하다. 신경학적 질환 및 신경변성 질환 및 장애의 예에는 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병 (PD), 헌팅톤병 (HD), 혈관성 치매, 노화 및 경도 인지 장애가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0655] 기타 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 BBB 투과성이 일정 역할을 한 것으로 결정되었거나 또는 일정 역할을 하는 것으로 결정될 수 있는 질환, 예를 들어 고오스몰혈증; 산성 pH; 화상 뇌병증; 유도 뇌병증; 자가면역성 뇌염; 다발성 경화증; 허혈증 후 재관류; 급성 고혈압; 미소파 조사; 간 뇌병증; 발작; 종양; 발생; 과다혈량; 체온저하; 방사선 후; 고압 질환; 수막염; 림프정지성 뇌병증; 당뇨병; 베른니케스-코르사코프 (Wernickes-Korsakoff) 증후군; 가족성 정신 지체 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 예방 및 치료하는 데에 유용하다.

[0656] 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제에 의한 치료를 받을 수 있는 대상체에는 현재 증상을 나타내는 대상체 뿐만 아니라 증상을 나타내지는 않지만 질병 발생 위험에 놓인 대상체 (예를 들어, 무증상 대상체)가 포함된다. 알츠하이머병의 경우에는, 어느 누구라도 충분히 오래 생존하고 있다면 알츠하이머병으로 인해 고통받을 위험에 놓여 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 대상체 환자의 위험을 전혀 평가하지 않고서도 일반 집단에게 예방적으로 투여할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 방법은 알츠하이머병의 공지된 유전적 위험을 지닌 개체에게 특히 유용하다. 이러한 개체로는 상기 질병을 경험한 친척이 있는 개체, 및 본원에 기재된 바와 같은 유전적 또는 생화학적 마커 분석에 의해 그의 위험이 결정된 개체가 있다.

[0657] 혈관성 치매 질환

[0658] 혈관성 치매는 허혈성 또는 출혈성 뇌 병변 뿐만 아니라 연장된 관류저하 동안 발생하는 병변으로부터 비롯되는 수 많은 이질적 병리학적 상태들로 구성된다.

[0659] 피질하 허혈성 형태의 혈관성 치매는 혈관성 인지 장애 및 치매의 흔한 유형이고, 노인에게서 인지력 저하의 주요 원인 중의 하나이다. 피질하 허혈성 혈관성 치매는 주로, 소강 및 광범위한 백색질 병변을 유발시키는 소-혈관병으로부터 비롯되고, 대-혈관 치매 또는 피질 혈관성 치매와 비교될 수 있다 [참고: Roman GC, Neurology. 1993;43:250-260, Roman GC Lancet Neurol. 2002;1:426-436]. 피질하 허혈성 혈관성 치매의 허혈성 병변은 전방-피질하 회로에 특별히 영향을 미치는데, 이는 혈관성 치매의 주요 인지 및 임상 신경학적 효과를 설명하는 관찰 결과이다 [참고: Ishii N, Neurologyl 986; 36: 340-45, Cummings JL, Arch Neurol 1993; 50:873-80]. 피질하 허혈성 혈관성 치매는 또한, 울혈성 심부전증 [참고: Roman GC. Neurol Res. 2004;26:454-458], 심방세동 [참고: de Leeuw FE, Neurology. 2000;54:1795-1801], 및 폐쇄성 수면 무호흡증 [참고: Kamba M, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2001; 71; 334-339]에 기인한 영속적인 고혈압 [참고: de Leeuw FE, Brain. 2002; 125:765-772] 및 관류저하에 의해 유발된다.

[0660] 노인에게서 흔한 소견인 허혈성 백색질 병변은 피질하 허혈성 혈관성 치매와 인지 장애에 있어서 특징적인 병리학적 변화이고, 인지 기능이상은 병변 중증도와 관계가 있다 [참고: Hachinski VC, Arch Neurol. 1987;4:21-23, Pantoni L, Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1999;13(suppl 3):S49-S54, de Groot JC, Neurology 2001; 56:1539-1545]. 뇌혈관성 백색질 병변은 여러 유형의 혈관성 치매, 예를 들어 빈스완거병, 뇌 아밀로이드 혈관

병증, 및 피질하 경색 및 백질뇌염을 수반한 뇌 상염색체 우성 동맥증 (CADASIL)에 있어서 핵심 병리상태를 구성한다. 이들 뇌혈관성 백색질 병변은 주로 심부 백색질 내의 몇 가지 동맥 또는 세동맥의 중증 협착증으로부터 비롯되는 만성 뇌 관류저하에 의해 유발된다 [참고: Pantoni L, Stroke 1997;28:652-659, de Groot JC, Neurology 2001; 56:1539-1545, Roman GC, Neurol. Res. 2004;26:454-458, Capizzano AA, Am J Neuroradiol 2000;21:621-630].

[0661] 알츠하이머병

[0662] 알츠하이머병 (AD)은 노인성 치매를 유발시키는 진행성 질병이다 [참고: Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff et al., Nature 373, 476-477 (1995); Games et al., Nature 373, 523 (1995)]. 광범위하게 언급하면, 상기 질병은 2가지 범주, 즉 노령층 (65세 이상)에게서 발생하는 후기 발병과 노인기 훨씬 전에, 즉 35세와 60세 사이에 발생하는 조기 발병에 속한다. 양 유형의 질병에서는, 병리상태가 동일하긴 하지만, β 비정상은 보다 조기 연령시에 시작하는 증례에서 보다 중증이고 확산되는 경향이 있다. 상기 질병은 육안적 수준에서 신경세포 상실의 직접적인 결과로서 MRI 영상에서 관찰된 바와 같은 두개둥근천장으로부터 벗어난 상당한 뇌 수축을 특징으로 하고, 뇌에서 두 가지 유형의 육안적 병변, 노인성 반점 및 신경섬유 매듭을 특징으로 한다. 노인성 반점은 전형적으로 중앙에 집중되고 뇌 조직 박편을 현미경으로 분석함으로써 가시적인 세포외 아밀로이드 침착물과 150 ㎛까지 가로지르는 붕괴된 신경 돌기를 포함하는 부위이다. 신경섬유 매듭은 쌍으로 서로의 주변에서 꼬인 2개 필라멘트로 이루어진 타우 단백질의 세포내 침착물이다.

[0663] 상기 반점의 주요 구성분은 Aβ 또는 β-아밀로이드 펩티드로 지칭되는 펩티드이다. Aβ 펩티드는 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)로 지칭되는 전구체 단백질의 39 내지 43개 아미노산의 내부 단편이다. APP 단백질 내에서의 몇 가지 돌연변이가 알츠하이머병의 존재와 상관 관계가 있었다 [참고: 예를 들어, Goate et al., Nature 349, 704 (1991) (valine^{717} to isoleucine); Chartier Harlan et al. Nature 353, 844 (1991) (valine^{717} to glycine); Murrell et al., Science 254, 97 (1991) (valine^{717} to phenylalanine); Mullan et al., glycine); Murrell et al., Science 254, 97 (1991) (valine^{717} to phenylalanine); Mullan et al., Nature Genet. 1, 345 (1992) (a double mutation changing lysine^{595}-methionine^{596} to asparagine^{595}-leucine^{596})]. 이러한 돌연변이는 APP를 Aβ로 프로세싱하는 것을 증가 또는 변경시킴으로써, 특히 APP를 증가 량의 장 형태의 Aβ (즉, Aβ 1-42 및 Aβ 1-43)으로 프로세싱하는 것을 증가 또는 변경시킴으로써 알츠하이머병을 유발시키는 것으로 여겨진다. 기타 유전자, 예를 들어 프레세닐린 (presenilin) 유전자 PS1 및 PS2에서의 돌연변이는 증가 량의 장 형태의 Aβ를 생성시키기 위해 APP를 프로세싱하는 것에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 여겨진다 [참고: Hardy, TINS 20, 154 (1997)]. 이들 관찰 결과는 Aβ, 및 특히 그의 장 형태가 알츠하이머병의 원인이 되는 요소라는 것을 나타낸다.

[0664] β-아밀로이드 펩티드로서 공지되기도 한 Aβ, 또는 A4 펩티드 [참고: 미국 특허 제4,666,829호; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)]는 39 내지 43개 아미노산의 펩티드이고, 알츠하이머병의 특징적 반점의 주요 성분이다. Aβ는 보다 큰 단백질 APP를 β 및 γ 세크레타제 (secretase)로 지칭되는 2개 효소에 의해 프로세싱함으로써 생성된다 [참고: Hardy, TINS 20, 154 (1997)]. 알츠하이머병과 연관된 APP 내에서의 공지된 돌연변이는 β 또는 γ 세크레타제 부위에 근접하여 발생하거나 Aβ 내에서 발생한다. 예를 들어, 위치 717은 APP를 Aβ로 프로세싱하는 데에 있어서 APP의 γ-세크레타제 절단 부위에 근접하고, 위치 670/671은 β-세크레타제 절단 부위에 근접하다. 상기 돌연변이는 절단 반응물과 상호 작용함으로써 Aβ를 형성시켜, 이로써 생성된 42/43 아미노산 형태의 Aβ 양이 증가하도록 함으로써 AD 질병을 유발시키는 것으로 여겨진다.

[0665] Aβ는 전통적 및 대안적 보체 케스케이드 둘 다를 고정 및 활성화시킬 수 있다는 별난 특성을 지니고 있다. 특히, 이는 C1q와 결합하고 궁극적으로는 C3bi와 결합한다. 이러한 연합은 대식 세포와의 결합을 촉진시켜 B 세포의 활성화를 유발시킨다. 또한, C3bi는 추가로 붕괴된 다음, B 세포 상의 CR2와 T 세포 의존적 방식으로 결합하여 이들 세포의 활성화를 10,000 증가시킨다. 이러한 기전은 Aβ를 유발시켜 기타 항원 보다 과량으로 면역 반응을 발생시킨다.

[0666] 알츠하이머병에 관한 대부분의 치료 전략은 전형적으로 APP로부터의 Aβ42의 생성 저하를 통하여 및/또는 뇌에서 상기 펩티드의 침착에 직접적으로 기인하는 공급원으로부터 현존하는 Aβ42 수준을 저하시키는 몇몇 수단을 통하여, 뇌에서의 Aβ42 침착을 저하시키거나 없애고자 한다 [참고: De Felice and Ferreira, 2002]. 산발적

알츠하이머병 발생에 있어서 노화와 관련하여 원인이 되는 인자에 관하여 부분적으로 열거하면, 세포내 축적을 선호하는 신경세포로부터의 Aβ의 청소율과 Aβ 펩티드 생성 간의 균형에 이동이 있고, 신경세포에 의해 Aβ 펩티드가 주변 세포외 공간 내로 분비되는 것이 증가하며, 이들 세포에 대한 산화적 손상 수준이 증가하고, 포괄적 뇌 관류 저하와 이와 관련하여 병든 신경세포에서 대상성 대사 이동이 있다 [참고: Cohen et al., 1988; Higgins et al., 1990; Kalaria, 2000; Nalivaevaa et al., 2004; Teller et al., 1996; Wen et al., 2004].

[0667] 신경세포 및 반점 내에 침착되는 Aβ42는 알츠하이머병 발병 기전 동안 신경세포의 외부 (외인성 Aβ42)로부터 유래될 수도 있었다. 혈액 내의 가용성 Aβ 펩티드의 수준은 궁극적으로 알츠하이머병 뇌 [참고: Zlokovic et al., 1993]에 침착되는 외인성 Aβ 펩티드의 공급원으로서 혈액을 수반한 건강한 개체의 뇌 [참고: Seubert et al., 1992] 내에서의 CSF 및 간질성 공간 내에서 보다 훨씬 더 높은 것으로 공지되어 있다. 그러나, 내피 세포를 가로질러 능동적으로 수송되는 미량의 Aβ를 제외하고, 정상의 건강한 개체에서는 혈행성 Aβ 펩티드가 뇌 조직으로 접근하는 것이 혈액-뇌 장벽 (BBB)의 완전성에 의해 효과적으로 차단되는 것으로 널리 공지되어 있다 [참고: Kandimalla et al., 2005; Poduslo et al., 1999]. BBB는 국소 성상세포의 족양 돌기에 의해 추가로 지지되는 기저판 상에 휴면하고 있는 뇌 내피 세포로 구성된 복합 구조이다 [참고: Gloor et al., 2001; Risau et al., 1998]. 이는 혈액 성분이 뇌 조직 내로 통과하는 것을 상당히 조절시켜 주고, 거의 모든 단백질 및 기타 거대분자에 대해 고도로 비투과성이면서도, 이와 동시에 필수 분자는 선택적으로 유입시켜 줄 수 있다 [참고: Mayhan, 2001]. 노화가 BBB의 완전성을 손상시킬 수 있는 혈관에 대한 변성 변화와 연관이 있다는 많은 명백한 증거가 밝혀졌다. 예를 들어, 노인에게서 비교적 흔한 수 많은 신경변성 질환, 예를 들어 혈관성 치매 및 AD가 적어도 부분적으로는, 뇌의 미소혈관계 내에서 발생하는 뇌혈관성 병리상태로부터 유래된다 [참고: Breteler, 2000; Buee et al., 1997; de la Torre, 1997; Esiri et al., 1999; Kalaria et al., 1996]. 신경혈관계와 신경변성 질환 간의 연계성은 널리 공지된 사실이므로, 아밀로이드 반점 및 신경섬유 매듭을 포함한 알츠하이머 병리상태는 발작 병변 근처에서 후속적으로 발생한다 [참고: Jellinger, 2002; Kalaria, 1996; Kalaria, 2002; Natte et al., 1998].

[0668] 알츠하이머병에 대한 유전적 위험 마커에는 APP 유전자 내에서의 돌연변이, 특히 하디 (Hardy) 및 스웨디쉬 (Swedish) 돌연변이로 각각 지칭되는 위치 717 및 위치 670 및 671에서의 돌연변이가 포함된다 [Hardy, TINS, 상기 참고]. 기타 위험 마커는 프레세닐린 유전자 PS1 및 PS2, 및 ApoE4 내에서의 돌연변이, 알츠하이머병의 가족력, 고콜레스테롤혈증 또는 아테롬성 경화증이다. 현재 알츠하이머병으로 인해 고통받고 있는 대상체는 상기 언급된 위험 인자의 존재 뿐만 아니라 특징적 치매로부터 인식될 수 있다. 또한, 알츠하이머병에 걸린 대상체를 확인하기 위한 수 많은 진단 시험을 이용할 수 있다. 이에는 CSF 타우 및 Aβ42 수준을 측정하는 것이 포함된다. 타우 수준 상승과 Aβ42 수준 증가가 알츠하이머병의 존재를 의미한다. 알츠하이머병으로 인해 고통받고 있는 개체는 또한, MMSE 또는 ADRDA 기준에 의해 진달할 수 있다. 분석용 조직 샘플은 전형적으로, 환자로부터의 혈액, 혈장, 혈청, 점액 또는 뇌척수액이다. 이 샘플을 대상으로 하여, 모든 형태의 Aβ 펩티드, 전형적으로 Aβ42에 대한 면역 반응의 징후에 관하여 분석한다. 면역 반응은, 예를 들어 Aβ 펩티드와 특이적으로 결합하는 항체 또는 T-세포의 존재로부터 결정할 수 있다. Aβ에 대해 특이적인 항체를 탐지하는 ELISA 방법이 실시예 섹션에 기재되어 있다.

[0669] 무증상 환자에게서는, 치료를 어떠한 연령 (예를 들어, 10, 20, 30세)에서도 시작할 수 있다. 그러나 통상적으로, 환자가 40, 50, 60 또는 70세에 도달하기 전에는 치료를 시작하는 것이 필요치 않다. 치료는 전형적으로, 일정 시간에 걸쳐 다수 투여하는 것을 수반한다. 치료는 시간 경과에 따른 BBB의 투과성 또는 CSF 내에서의 Aβ 펩티드의 존재를 검정함으로써 모니터링할 수 있다. Aβ 펩티드가 여전히 CSF 내에 존재하거나 또는 BBB가 여전히 투과성이거나 결함이 있는 경우에는, 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 이용한 부가의 치료 및/또는 알츠하이머병에 대한 부가의 요법 처치가 권장된다. 잠재적 다운 (Down) 증후군 환자의 경우에는, 치료제를 임신부 또는 출생 직후에 투여함으로써 출생 전에 시작할 수 있다.

[0670] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 또한, 일반적으로 기타 신경변성 장애 또는 인지 장애, 예를 들어 치매, 우울증, 혼동, 크로이츠펠트-야코브 (Creutzfeldt-Jakob) 또는 광우병, 헌팅톤병, 운동 협조성 상실, 다발성 경화증, 파킨슨병, 피크 (Pick)병 및 기타 뇌 저장 장애 (예: 아밀로이드증, 강글리오시드증, 지질 저장 장애, 점액성 다당류증), 실신 및 혈관성 치매를 치료하는 데에 유용하다. 따라서, 신경변성 질환에 무증후적으로 병든 대상체에 대해 치료할 수 있고; 인지 기능을 개선시킬 수 있다. 치료 효능은 뇌 혈류량 (CBF) 및/또는 혈액-뇌 장벽 (BBB) 기능을 모니터링함으로써 결정할 수 있다. 예를 들어, CSF 내에서의 타우 또는 Aβ의 존재를 측정할 수 있다. 몇몇 양태에서는, 예를 들어 미국 특허 제6,884,591호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 바와 같은, BBB 기능에 대한 마커를 사용할 수 있다. 몇몇 양태에서

는, 당업자에게 공지된 영상화 기술, 예를 들어 고도의 조영 능력을 지닌 MRI 기계를 이용하여 BBB 기능을 모니터링할 수 있다. 이러한 양태에서는, MRI 직전에 특이적 MRI 조영제를 혈관 주사하는데, 조영제는 정상적인 BBB를 지닌 대상체에서는 혈관 내에 잔존하는 반면, 투과성 BBB를 나타내는 개체에서는 뇌 조직 내로 침투하여 MRI 상에서 "구름"으로서 나타난다. 이러한 방법을 사용하여, BBB 붕괴의 위치 및 정도의 정량적 측정을 MRI 소프트웨어를 이용하여 결정할 수 있다. 따라서, Lp-PLA_2의 억제제를 이용한 치료 효능은 본원에 기재된 바와 같은 투여 이전과 비교해서 Lp-PLA_2 억제제의 투여 후 BBB 붕괴 정도 저하 및/또는 "구름" 상의 측정 가능한 수준 저하를 탐지함으로써 결정할 수 있다.

[0671] 몇몇 방법은 작용제 투여량을 투여하기 전에 대상체의 CSF 내에서의 베타 아밀로이드 수준의 기준선 값을 결정하고, 이러한 값을 치료 후 CSF 내에서의 베타 아밀로이드에 대한 값과 비교하는 것을 수반한다. CSF 내에서의 베타 아밀로이드 수준 상의 감소, 예를 들어 10% 감소는 긍정적 치료 결과의 지표이다 (즉, 해당 작용제의 투여가 CSF 내에서의 베타 아밀로이드 감소를 달성하였거나 증대시켰다). CSF 내에서의 베타 아밀로이드 수준에 대한 값이 상당히 변하지 않은 경우, 또는 증가한 경우, 이는 부정적인 치료 결과의 지표이다. 일반적으로, 해당 작용제를 이용한 초기 치료 과정이 진행되고 있는 대상체는 본원에 기재된 바와 같은 작용제의 연속적인 투여에 의해 CSF 내에서의 베타 아밀로이드가 감소하는 것으로 예상된다.

[0672] 치료 효능을 결정하기 위한 기타 방법에서는, 베타 아밀로이드의 대조군 값 (즉, 평균 및 표준 편차)은 대조군 집단에 대해 결정한다. 전형적으로, 대조군 집단 내의 개체는 선행 치료를 받은 적이 없고, 알츠하이머병을 앓고 있지 않다. 이어서, 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2의 억제제를 투여한 후 대상체의 CSF 내에서의 베타 아밀로이드 측정 값을 대조군 값과 비교한다. 대조군 값과 비교해서 대상체의 CSF 내에서의 베타 아밀로이드가 감소하는 것은 (즉, 대상체에서 베타 아밀로이드의 10% 이상이 감소한다) 긍정적 치료 결과를 나타낸다. 유의적 감소 결여는 부정적 치료 결과를 나타낸다.

[0673] 기타 방법에서는, CSF 내에서의 베타 아밀로이드의 대조군 값을, CSF 내에서의 베타 아밀로이드를 감소시키는 데에 있어서 유효한 치료제를 이용한 치료가 진행되어 온 대상체의 대조군 집단으로부터 결정한다. 대상체의 CSF 베타 아밀로이드 측정 값을 대조군 값과 비교한다.

[0674] 기타 방법에서는, 현재에는 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제에 의한 치료를 받고 있지 않지만, 기존에 치료 과정을 진행한 적이 있는 대상체를 대상으로 하여 CSF 내에서의 베타 아밀로이드에 관하여 모니터링하여 치료 재개가 요구되는 지를 결정한다. 시험 대상체의 CSF 베타 아밀로이드 측정 값을 기존의 치료 과정 후에 대상체에게서 기존에 달성된 CSF 베타 아밀로이드 수준과 비교할 수 있다. 기존의 측정치와 비교해서 CSF 베타 아밀로이드 상의 유의적 감소 (즉, 10% 이상 감소)는 치료가 재개될 수 있다는 지표이다. 또 다른 한편, 대상체의 CSF 내에서의 베타 아밀로이드 수준을 치료 과정을 진행한 후 대상체 집단에게서 결정된 CSF 베타 아밀로이드 대조군 수준과 비교할 수 있다. 또 다른 한편, 대상체의 CSF 베타 아밀로이드 수준을 질병 증상이 없는, 특히 BBB 투과성 증상이 없는, 예방적으로 처치된 대상체 집단, 또는 질병 증상 완화를 나타내는 치료적으로 처치된 대상체 집단에게서의 대조군 값과 비교할 수 있다.

[0675] 알츠하이머병에 걸렸거나 걸릴 위험에 놓인 대상체를 확인하는 방법

[0676] 본원에 기재된 바와 같은 방법을 이용한 치료를 받을 수 있는 대상체에는 신경변성 질환 증상을 나타내는 대상체, 예를 들어 알츠하이머병 증상을 나타내는 대상체 뿐만 아니라 증상을 나타내지는 않지만 신경변성 질환, 예를 들어 알츠하이머병에 걸릴 위험에 놓인 대상체가 포함된다.

[0677] 대상체를 대상으로 하여, 수 많은 생화학적 및 유전적 마커를 기준으로 하여 알츠하이머병에 걸릴 가능성에 관하여 스크리닝할 수 있다.

[0678] 알츠하이머병에 대한 유전적 마커를 이용하여 알츠하이머병 발생 위험이 증가된 대상체를 진단할 수도 있다. 몇몇 가족에게서의 유전적 비정상을 추적한 결과 염색체 21인 것으로 밝혀졌다 [참고: St. George-Hyslop et al., Science 235:885-890, 1987]. 하나의 유전적 마커는, 예를 들어 APP 유전자 내에서의 돌연변이, 특히 하디 및 스웨디쉬 돌연변이로 각각 지칭되는 위치 717 및 위치 670 및 671에서의 돌연변이이다 [Hardy, TINS, 상기 참고]. 기타 위험 마커는 프레세닐린 유전자 PS1 및 PS2, 및 ApoE4 내에서의 돌연변이, 알츠하이머병의 가족력, 고콜레스테롤혈증 또는 아테롬성 경화증이다. APP, PS1 또는 PS2 돌연변이를 수반한 대상체는 알츠하이머병 발생이 높은 것으로 예상된다. ApoE는 감수성 유전자이고, e4 이소형의 ApoE (ApoE4 이소형)을 수반한 대상체는 알츠하이머병 발생 위험이 증가된다. ApoE4 이소형을 수반한 대상체에 대한 시험이 미국 특허 제

6,027,896호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. 기타 유전적 연계성은 알츠하이머병 위험 증가와 연관이 있는데, 예를 들어 신경 솔틸린 (sortilin)-관련 수용체 SORL1 내에서의 변이가 후기 발병 알츠하이머병 발생 가능성을 증가시킬 수 있다 [참고: Rogaeva at al, Nat Genet. 2007 Feb;39(2):168-77]. 기타 잠재적 알츠하이머병 감수성 유전자에는, 예를 들어 ACE, CHRNB2, CST3, ESR1, GAPDHS, IDE, MTHFR, NCSTN, PRNP, PSEN1, TF, TFAM 및 TNF가 포함되고, 이를 사용하여 알츠하이머병 발생 위험이 증가된 대상체 [참고: Bertram et al, Nat Genet. 2007 Jan;39(1):17-23] 뿐만 아니라 알파-T 카테닌 (catenin) (VR22) 유전자 상의 변이 [참고: Bertram et al, J Med Genet. 2007 Jan;44(1):e63) and Insulin-degrading enzyme (IDE) and Kim et al, J Biol Chem. 2007;282:7825-32]를 확인할 수 있다.

[0679] 간단한 안구 시험을 기준으로 하여 알츠하이머병 발생 위험이 증가된 대상체를 진단할 수도 있는데, 렌즈 내에 녹내장 및/또는 A베타가 존재하면 대상체는 알츠하이머병 발생 위험이 증가한 것으로 확인된다. 알츠하이머병을 탐지하는 방법에는 준-탄성 광 산란 장치 [참고: Goldstein et al., Lancet. 2003;12;361:1258-65] (공급처: Neuroptix)를 사용하고, 준-탄성 광 산란 (QLS) 및 형광성 리간드 스캐닝 (FLS) 및 뉴로프틱스 (Neuroptix™) QEL 스캐닝 장치를 사용하여 안구 내의 아밀로이드 응집체를 비-침습성 정량적 측정할 수 있고, 알츠하이머병에 대한 조기 진단으로서 렌즈의 특이적 부위에서의 침착물을 조사 및 측정하는 것이 포함된다. 이러한 비-침습성 안구 시험 방법을 사용하여 알츠하이머병 발생 위험에 놓인 대상체를 진단하는 방법은 미국 특허 제7,107,092호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0680] 현재 알츠하이머병으로 인해 고통받고 있는 개체는 상기 언급된 위험 인자의 존재 뿐만 아니라 특징적 치매로부터 인식할 수 있다. 또한, AD에 걸린 개체를 확인하기 위한 수 많은 진단 시험이 이용 가능하다. 이에는 CSF 타우 및 Ax3b242 수준 측정이 포함된다. 타우 수준 상승과 Ax3b242 수준 감소가 알츠하이머병의 존재를 의미한다.

[0681] 알츠하이머병을 임상적으로 진단하기 위해 활용되는 2가지 대체 "기준"이 있다: DSM-IIIR 기준 및 NINCDS-ADRDA 기준 [National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) 및 Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA)] [참고: McKhann et al., Neurology 34:939-944, 1984]. 간략하게 언급하면, DSM-IIIR 하의 알츠하이머병의 진단 기준에는 (1) 치매, (2) 일반적으로 점진적으로 악화되는 과정을 거치는 잠행성 발병, 및 (3) 가족력, 신체 검사 및 실험실 시험에 의한 치매의 기타 모든 구체적 원인의 배제가 포함된다. DSM-IIIR 기준 맥락에서, 치매는 "기억, 판단, 추상적 사고 및 기타 고급 피질 기능과 같은 지적 능력의 다각적 상실, 및 인격과 행동 상의 변화"를 포함하는 것으로 인지된다 [참고: DSM-IIR, 1987].

[0682] 이와는 달리, NINCDS-ADRDA 기준은 "예상되는", "가능한" 및 "확정" 알츠하이머병을 포함한 3가지 범주의 알츠하이머병을 나타낸다. "가능한" 알츠하이머병의 임상 진단은 치매를 유발시키기에 충분한 기타 신경학적, 정신학적 또는 전신 장애의 부재 하에서의 치매 증후군를 기준으로 하여 이루어질 수 있다. "예상되는" 알츠하이머병의 임상 진단에 대한 기준에는 (a) 임상 조사에 의해 확립되고 미니-멘탈 시험과 같은 시험에 의해 자료가 제공된 치매 [참고: Foldstein et al., J. Psych. Res. 12:189-198, 1975]; (b) 2개 이상의 인지 부위에서의 결함; (c) 기억 및 기타 인지 기능의 점진적인 악화; (d) 의식 장해 없음; (e) 40세와 90세 사이 연령, 가장 종종은 65세 이후 연령에게서의 발병; 및 (f) 치매를 기대할 수 있었던 기타 뇌 질환 또는 전신 장애의 부재가 포함된다. 알츠하이머병의 확정 진단에 대한 기준에는 생검으로부터 수득되거나, 또는 부검 후에 수득된 조직병리학적 증거가 포함된다. 확정 알츠하이머병의 확인은 뇌 생검 표본 (이는 종종 수득하기가 곤란하다)으로부터의 조직학적 검사를 요구하기 때문에, 알츠하이머병의 조기 진단에 좀처럼 사용하지 않는다.

[0683] 알츠하이머병의 신경병리학적 진단을 사용할 수도 있는데, 여기서는 신경피질 (전방, 측두, 및 두정엽), 해마 및 편도 내의 수 많은 반점 및 매듭을 분석한다 [참고: Khachaturian, Arch. Neurol. 42:1097-1105; Esiri, "Anatomical Criteria for the Biopsy diagnosis of Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 239-252, 1990].

[0684] 알츠하이머병을 진단하기 위해 정량적 뇌파 분석 (EEG)을 수행할 수도 있다. 이러한 방법은 알츠하이머병을 진단하기 위하여 베타, 알파, 세타 및 델타 밴드의 푸리에 (Fourier) 분석을 이용한다 [참고: Riekkinen et al., "EEG in the Diagnosis of Early Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 159-167, 1990].

[0685] 신경 위축 정도를 정량화함으로써 알츠하이머병을 진달할 수도 있는데, 이는 이러한 위축이 일반적으로 알츠하이머병에 따른 결과로서 용인되기 때문이다. 이들 방법의 예에는 컴퓨터 단층촬영술 스캐닝 (CT), 및 자기 공

명 영상화 (MRI)가 포함된다 [참고: Leedom and Miller, "CT, MRI, and NMR Spectroscopy in Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 297-313, 1990].

[0686] 양전자 방출 단층촬영술 (PET) [참고: Parks and Becker, "Positron Emission Tomography and Neuropsychological Studies in Dementia," Alzheimer's Disease's, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 315-327, 1990], 단일 양자 방출 컴퓨터 단층촬영술 (SPECT) [참고: Mena et al., "SPECT Studies in Alzheimer's Type Dementia Patients," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 339-355, 1990], 및 크세논 흡입 방법 [참고: Jagust et al., Neurology 38:909-912; Prohovnik et al., Neurology 38:931-937; and Waldemar et al., Senile Dementias: II International Symposium, pp. 399407, 1988]에 의해 감소된 혈류량 또는 대사를 측정함으로써 후방 측두두저 뇌 피질에서의 감소된 뇌 혈류량 또는 대사를 평가함으로써 알츠하이머병을 진단할 수도 있다.

[0687] 알츠하이머병을 면역학적으로 진단할 수도 있다 [참고: Wolozin, "Immunochemical Approaches to the Diagnosis of Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 217-235, 1990]. 문헌 [참고: Wolozin et al., Science 232:648-650, 1986]에는 알츠하이머병 환자의 반점과 신경세포 매듭에서 발현되는 68-kDa 단백질 "A68"과 반응하는 모노클로날 항체 "Alz50"을 생성하였다고 기재되었다, 이러한 항체 Alz50 및 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석을 이용하여, 몇몇 알츠하이머병 환자의 뇌척수액 (CSF)에서 A68을 탐지하였지만, 정상의 노인 환자의 CSF에서는 그렇치 못하였다 [참고: Wolozin and Davies, Ann. Neurol. 22:521-526, 1987].

[0688] 알츠하이머병의 신경화학적 마커를 사용하여 알츠하이머병을 진단할 수도 있다. 알츠하이머병과 연관된 신경화학적 마커에는 아세틸콜린에스테라제의 수준 감소 [참고: Giacobini and Sugaya, "Markers of Cholinergic Dysfunction in Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 137-156, 1990], 소마토스타틴 (somatostatin) 감소 [참고: Tamminga et al., Neurology 37:161-165, 1987], 세로토닌과 5-히드록시인돌아세트산 간의 음성적 관계 [참고: Volicer et al., Arch Neurol. 42:127-129, 1985], 호모바닐산의 보다 큰 프로벤산-유도된 상승 [참고: Gibson et al., Arch. Neurol. 42:489-492, 1985] 및 신경세포-특이적 에놀라제 감소 [참고: Cutler et al., Arch. Neurol. 43:153-154, 1986]가 포함된다.

[0689] 치매에 걸렸거나 걸릴 위험에 놓인 대상체를 확인하는 방법 및 기억 평가 방법

[0690] 현 표준 실시를 이용하여 각종 유형의 치매를 진단할 수 있고, 일단 진단되면 장시간에 걸쳐 질병의 진행 과정을 모니터링할 수 있다. 이러한 한 가지 방법에는 다음 중의 한 가지 이상이 포함된다: (i) 기억 평가, (ii) 광범위한 신경정신학적 조사, (iii) 노인 신경학자에 의한 조사 및 (iv) 뇌의 MRI 영상화. 질병 진행 과정은 시간 경과에 따른 이들 파라미터 상의 변화로써 기록된다. 몇몇 양태에서, 이들 평가 중의 한 가지 이상 파라미터 상의 변화를 이용하여 시간 경과에 따른 대상체 내에서의 Lp-PLA_2 억제제 효능을 평가할 수 있다.

[0691] 다음 프로그램 (UMDNJ New Jersey Institute for Successful Aging)과 같은 기억 평가를 사용할 수 있다. 단기간 기억 및/또는 인지 저하 증상을 호소하는 성인 환자를 노인 신경학, 신경정신학 및 사회 서비스에 의한 평가를 포함한 기억 평가 프로그램에서 관찰한다. 환자는 가능한 또는 예상되는 기억 장애 또는 치매 혐의를 두고 공동 사회 임상의와 의사로부터 유도 지시되거나 또는 자기 자신에 관하여 언급할 수 있다. 이러한 기억 평가에서 초기 평가 시점에서는, (i) 기억 평가, (ii) 광범위한 신경정신학적 조사, (iii) 노인 신경학자에 의한 조사 및 (iv) 뇌의 MRI 영상화와 같은 평가 모두를 동일자로 수행하였다. 신경정신학적 평가는 결함의 중증도와 어레이를 결정하는 데에 있어서 도움을 주는 인지 기능에 관한 광범위한 상세 목록을 검색하여 포착한다. 이에는 판단, 통찰력, 행동, 적응, 실행 관리, 일반적 지적 기능, 시각공간 기능, 기억 및 새로운 학습 능력의 평가가 포함된다. 존재한다면, 우울증도 확인한다. 신경학적 평가는 일반적인 병력 뿐만 아니라 인지 변경 병력도 포착하고, 전형적으로 완벽한 신경학적 조사를 수행한다. 신경학적 조사는 또한, 비타민 B12, 엽산염, 기본 대사 프로파일, CBC, TSH, ALT, AST, C-반응성 단백질, 혈청 호모시스테인, 및 RPR을 포함한 치매의 가역적 원인을 배제시킨 실험실 연구를 포함할 수 있다. 뇌 영상화는 구조적 뇌 영상, 예를 들어 뇌 MRI를 제공하지만, 당업자에게 공지된 기타 뇌 영상화 방법을 사용할 수도 있다. 병력, 신경정신학적 검사, 신경학적 조사, 실험실 연구 및 신경영상화의 데이터 매트릭스를 사용하여 진단을 공식화한다.

[0692] 치매 진단은 2001년에 공개된 미국 신경학 실시 파라미터 아카데미의 지침에 기초할 수 있다. 알츠하이머병의 진단은 NINDS-ADRDA 기준에 기초할 수 있다. 혈관성 치매의 진단은 캘리포니아주 AD 진단 및 치료 센터 기준에

기초할 수 있다. 후속 모임에서는 이러한 진단 결과를 갖고 환자 및 가족과 의사 소통할 수 있다. 진단 결과에 따라, 해당 환자 또는 대상체가 치매 및/또는 기억 상실에 걸렸거나 걸린 것으로 예상된다면, 임상의는 본원에 기재된 바와 같은 Lp-PLA_2 억제제의 유효량 투여를 이용한 치료를 권할 수 있다. 후속 모임에 종종 사회 복지사가 참여하는 것이 환자와 그의 가족에게 현재 필요한 것과 앞으로 필요한 것에 관해 도움을 줄 수 있고 이를 알려줄 수 있다.

[0693] 혈관성 치매 또는 알츠하이머병과 같은 신경변성 질환 또는 장애에 걸렸거나 걸릴 위험에 놓인 환자를 진단하는 기타 방법에는 본원에 기재된 바와 같은 방법, 예를 들어 PLAC 검사 (diaDexus로부터 시판중임)를 이용하여 Lp-PLA_2 활성 및/또는 발현을 측정하는 것이 포함된다.

[0694] BBB 붕괴 또는 BBB 투과성을 나타내거나 그 위험에 놓인 대상체를 확인하는 방법

[0695] BBB 붕괴의 직접적인 탐지는 MRI 및 조영제의 주사를 이용하여 평가할 수 있다. MRI의 해상도 및 특수 조영제의 사용에 있어서의 개선책을 이용하여 BBB 투과성을 탐지할 수 있다. 한 가지 방법에서는, 대상체에게 뇌 영상화, 예를 들어 MRI 영상화 직전에 조영제를 투여한다. 본래의 BBB의 경우에는, 조영제가 뇌 혈관으로 한정되는 반면, 붕괴된 BBB를 갖는 대상체에서는 조영제가 뇌 조직 내로 "확산"되는데, 이는 가시화될 수 있다. 따라서, 대상체에게서의 BBB 붕괴의 뇌 위치, BBB 붕괴 크기 및 BBB 손상 정도, 예를 들어 혈관성 누출 정도는 BBB 투과성의 측정 가능한 파라미터로서 직접적이고도 정량적으로 평가할 수 있다. 더우기, 이러한 방법을 사용하여, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 이용하여 대상체를 치료함으로써 비롯되는 상기 파라미터 상의 모든 개선을 평가할 수 있다. BBB 붕괴 및 이와 연관된 뇌 내로의 혈관성 누출을 직접적으로 가시화하는 것이 BBB 투과성을 나타내는 대상체를 Lp-PLA_2 억제제로 치료한 경우의 유리한 효과를 모니터링하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용하다. Lp-PLA_2 억제제가 투여된 대상체에게서 BBB 투과성의 측정 가능한 파라미터, 예를 들어 BBB 붕괴 위치, BBB 붕괴 크기 및 혈관성 누출 정도 중의 한 가지 이상이 개선된다는 것은 Lp-PLA_2 억제제 투여에 따른 긍정적인 결과를 나타낸다. BBB 투과성 파라미터는 직접적인 가시화에 의해 모니터링할 수 있고, MRI-관련 영상 분석에 의해 정량화할 수 있으며 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용하다.

[0696] 혈관성 치매 및 알츠하이머병 모델에서의 Lp-PLA_2 억제제 평가

[0697] 몇몇 양태에서는, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 대상으로 하여 BBB 투과성을 완화시키는 효과에 관하여 알아보기 위하여 동물 모델에서 평가할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 고혈당증 및 고콜레스테롤혈증 (HG/HC) 돼지 모델을 사용할 수 있는데, 여기서는 BBB 투과성이 손상되었는데, 예를 들어 BBB가 투과성이며, 이러한 BBB 투과성은 당업자에게 흔히 공지된 방법에 의해 Lp-PLA_2에 대한 억제제의 존재 및 부재 하에서 평가할 수 있다. 몇몇 양태에서는, BBB 기능에 대한 마커를, 예를 들어 미국 특허 제6,884,591호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 바와 같이 사용할 수 있다.

[0698] 몇몇 양태에서는, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 대상으로 하여 혈관성 치매를 알아보기 위하여 동물 모델에서 평가하여, 혈관성 치매 발생 및 치료에 대한 Lp-PLA_2 억제제의 효과를 분석할 수 있을 뿐만 아니라 혈관성 치매의 발생, 예후 및 회복에 대한 약물 투여량을 평가할 수 있다.

[0699] 혈관성 치매의 동물 모델에는, 예를 들어 랫트에서의 경동맥 폐쇄증이 포함된다 [참고: 예를 들어, Sarti et al., Persistent impairment of gait performances and working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar rat, BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 136: 13-20 (2002)]. 따라서, 만성 뇌 관류저하 결과로서 랫트 뇌에서 뇌혈관성 백색질 병변을 실험적으로 유도시킬 수 있다. 이 모델은 양 총 경동맥을 영구적으로 폐쇄시킴으로써 창출된다. 예를 들어, 비스타 (Wistar) 랫트를 마취시키고, 중간선 경추 절개를 통하여 양측 총 경동맥을 노출시키고, 이러한 총 경동맥을 실크 봉합사를 이용하여 양측으로 이중 연결시킨다. 이러한 연결 후의 뇌 혈류량 (CBF)은 초기에는, 대조군의 약 30 내지 50% 정도로 감소한다. 나중, 약 1주 내지 1개월 후에는 CBF 값이 대조군의 40 내지 80% 범위이다. 백색질 병변에서의 매트릭스 메탈로프로테이나제 활성 증가 뿐만 아니라 혈액-뇌 장벽 붕괴가 또한 관찰되었다. 이들 변화는 인간 뇌혈관성 백색질 병변에서 관찰된 것과 극히 유사한 것으로 보인다. 더우기, 이들 결과는 염증성 및 면역학적 반응이 백색질 변화의 발병 기전에 있어 일정 역할을 한다고 제안하고 있다.

[0700] 이러한 생리학적 변화는 폐쇄된 경동맥 랫트 모델에서 학습 및 기억 상의 문제와 상관이 있다. 따라서, 경동맥

폐쇄된 랫트의 걸음 걸이 수행 능력은 기준선과 비교해서 시관이 경과함에 따라 저하되었는데, 예를 들어 90일째에, 양측 총 경동맥 폐쇄를 수반한 랫트는 모의-작동된 랫트와 비교해서 대상 인식 및 Y 미로 자발적 변경 검사에서 수행 저하를 나타내었다. 따라서, 이와 같이 양측 총 경동맥을 영구적으로 폐쇄시킨 실험용 만성 뇌 관류저하 랫트 모델은 백색질의 희박화와 함께 상당한 학습 장해를 알아보기 위한 모델로서 유용하다. 이 모델은 만성 뇌 관류저하의 병리생리학에 대한 Lp-PLA_2 억제제의 유효성을 평가하고, 뇌혈관성 질환 환자에게서 인지 장애와 백색질 병변을 예방하기 위한 최적의 투여량 및 투여 섭생을 결정하기 위한 데이터를 제공하는 데에 유용한 도구이다.

[0701] 따라서, 혈관성 치매를 치료 또는 예방하기 위한, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제의 유효성은 경동맥 폐쇄증 랫트에게서 백색질 병변의 발생 및 중증도, 걸음 걸이 수행 능력, 기억 및 학습 능력을 관찰함으로써 결정할 수 있다. 유사하게, Lp-PLA_2 억제제의 투여량 및 투여 스케줄은 혈관성 치매 치료를 받고 있는 인간 환자의 기억 및 학습 능력에 따라서 조정할 수 있다.

[0702] 몇몇 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제의 최적의 투여량은 Lp-PLA_2의 활성 및/또는 발현을 저하시키는 양, 예를 들어 핵산, 예를 들면 Lp-PLA_2 유전자에 의해 암호화된 mRNA의 발현을 저하시키거나 또는 Lp-PLA_2 단백질의 발현 또는 활성을 저하시키는 양이다. 기타 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제의 최적의 투여량은 신경변성 질환 또는 장애를 예방하는 데에 있어서 또는 신경변성 질환 또는 장애 증상을 저하시키는 데에 있어서 최대의 예방 효과를 가져다 주는 양이다.

[0703] 기타 양태에서, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제의 최적의 투여량은 동맥 폐쇄증에 의해 유발된 조직 손상에 대한 최대의 유익한 효과를 생성시키는 양이다. 유효 투여량은 혈관성 치매에 특징적인 하나 이상의 마커, 증상 또는 조직학적 증거를 적어도 통계상 또는 임상적으로 상당히 약화시켜 준다. 혈관성 치매에 특징적인 마커, 증상 또는 조직학적 증거에는 기억 상실, 혼동, 액손 수송 상의 교란, 탈수초화, 메탈로프로테이나제 (MMP)의 유도, 신경교 세포의 활성화, 림프구 침윤, 부종, 및 조직 손상과 추가의 혈관 손상을 유발시키는 면역학적 반응이 포함된다. 대조군 환자 또는 동물이 증상 또는 조직 손상의 악화를 경험하는 상태 하에서 증상이 안정화되거나 조직 손상이 감소하는 것은 억제성 치료 효능의 한 지표이다.

[0704] <u>BBB 투과성을 수반한 기타 신경변성 질환:</u>

[0705] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 이용하는, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 신경변성 질환 및 장애를 예방 및 치료하는 데에 유용하다. 신경학적 질환 및 신경변성 질환의 부가 예에는, 예를 들어 폴리글루타민 반복 장애, 예를 들어 헌팅톤병, 척수소뇌 실조증 (예를 들어, 유형 1, 2, 3, 6, 7 및 17), 마카도-조셉병 (Machado-Joseph disease), 척수 및 연수 근위축증 [SBMA 또는 케네디병 (Kennedy's disease)], 실정핵뇌간 팔리도루이시안 위축증 [Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy (DRPLA)], 및 폴리글루타민 확장으로부터 비롯되는 기타 신경학적 질환, 또는 비-암호화 DNA 반복 서열 확장으로부터 비롯되는 질병, 예를 들어 취약 X 증후군, 취약 XE 정신 지체, 프리이드라이히 (Friedreich) 운동실조증, 근긴장성 퇴행위축, 척수소뇌 실조증 (유형 8, 10 및 12) 또는 기타 신경변성 질환, 예를 들어 척수 근위축증 (Werdnig-Hoffman disease, Kugelberg-Welander disease), 피크병, 및 해면성 뇌병증이 포함된다.

[0706] 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 이용하는, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제가 유용한 부가의 신경변성 질환에는, 예를 들어 연령 관련 기억 장해, 아기로필릭 그레인 (agyrophilic grain) 치매, 괌의 파킨슨증-치매 합병증, 자가면역 질환 [예: 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 루푸스], 빈스완거병, 뇌 및 척수 종양 (신경섬유종증 포함), 뇌 아밀로이드 혈관병증 [참고: Journal of Alzheimer's Disease vol 3, 65-73 (2001)], 뇌성 마비, 만성 피로 증후군, 대뇌피질 기저핵 변성증, CNS 실질의 발생적 기능이상에 기인한 질환, 뇌혈관계의 발생적 기능이상에 기인한 질환, 치매-다중 경색, 치매-피질하, 루이체 (Lewy body)를 수반한 치매, 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV)의 치매, 별개의 조직학이 결여된 치매, 권투선수 치매, 석회화를 수반한 확산성 신경섬유 매듭, 신경변성과 관련된 안구, 귀 및 전정 (vestibular) 시스템의 질병 (황반 변성 및 녹내장 포함), 다운 증후군, 운동이상증 (발작성), 근육긴장이상, 본태성 떨림, 파르 (Fahr) 증후군, 염색체 17과 연계된 전측두엽 치매 및 파킨슨증 (FTDP-17), 전측두엽 변성, 전두엽 치매, 간성 뇌병증, 유전성 경직성 하반신마비, 수두증, CSF 기능이상과 관련된 가성 뇌종양 및 기타 질환, 가우처병 (Gaucher's disease), 할레르보르덴-스파츠 (Hallervorden-Spatz)병, 코르사코프 (Korsakoffs) 증후군, 경도 인지 장애, 단일사지성 근위축증, 운동 신경세포병, 다계통 위축증, 다발성 경화증 및 기타 탈수초화 질환 (예: 백색질 형성장애증), 근통성 뇌척수염, 간대성근경련증, 화

학약품, 약물 및 독소에 의해 유도된 신경변성, AIDS의 신경학적 징후 (AIDS 치매 포함), 세균성 및/또는 바이러스 감염에 따른 신경학적/인지 징후 및 결과, 예를 들어 장바이러스, 니만-피크 (Niemann-Pick)병, 신경섬유매듭을 수반한 비-괌 운동 신경세포병, 비-케톤성 고글리신혈증, 올리보-폰토 (olivo-ponto) 소뇌 위축증, 안인두 근 퇴행위축, 비-마비성 폴리오 및 폴리오 후 증후군을 포함한 폴리오 척수염의 신경학적 징후, 원발성 측삭 경화증, 크로이츠펠트-야코브병을 포함한 프리온병 (변이체 형태 포함), 쿠루 (kuru), 치명적 가족성 불면증, 게르스트만-슈트라우슬러-쉐인커 (Gerstmann-Straussler-Scheinker) 병 및 기타 전염 가능한 해면상 뇌병증, 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 혈관병증, 뇌염후 파킨슨증, 진행성 근 위축증, 진행성 연수 마비, 진행성 피질하 신경교증, 진행성 핵상 마비, 하지 불편 증후군, 레트 (Rett) 증후군, 샌드호프 (Sandhoff) 병, 경직, 산발적 전측두엽 치매, 선조흑질 변성, 아급성 경화성 범뇌염, 설파이트 옥시다제 결핍증, 시덴햄 (Sydenham) 무도병, 매듭 전용 치매, 타이-사키 (Tay-Sach) 병, 투렛트 (Tourette) 증후군, 혈관성 치매, 및 윌슨병 (Wilson disease)이 포함된다.

[0707] 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 이용하는, Lp-PLA$_2$를 억제하는 작용제가 유용한 부가의 신경변성 질환에는 상기 열거되지 않은 기타 치매, 예를 들어 기타 혼합 치매, 전측두엽 치매, 피크병, 진행성 핵상 마비 (PSP), 관련 치매를 수반한 파킨슨병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 다계통 위축증, HIV-유도형 치매, 백색질병-관련 치매, 경도 인지 장애 (MCI)가 포함된다.

[0708] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 이용하는, Lp-PLA$_2$를 억제하는 작용제는 대상체에게서 BBB 투과성을 예방 및 치료하는 데에 유용하다. BBB 투과성이 일어나는 질환 및 장애의 부가 예에는, 예를 들어 다발성 경화증, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 당뇨병성 망막병증, 프리온 장애, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 근육강직 증후군, 척수소뇌 실조증, 프라이드라이히 실조증, 모세혈관확장성 운동실조증, 연수척수 위축증 (케네디 증후군), 척수 근 위축증, 신경세포 저장병 (지질갈색소증), 미토콘드리아성 뇌근육병증, 백색질 형성장애증, 척수 속/둔기 외상의 신경 후유증, 고혈압성 뇌혈관계 질환, 예를 들어 소강 경색, 틈새 출혈, 고혈압성 뇌병증이 포함된다. BBB 투과성은 또한, 뇌종양, 예를 들어 '동굴 모양' (고 영양분으로서 또한 공지됨) 혈관 공급물을 갖는 뇌종양에서 일어난다.

[0709] BBB 투과성은 또한, 스트렙토코쿠스성 감염증과 연관된 신경학적 후유증; 스트렙토코쿠스성 감염증과 연관된 소아 자가면역성 신경정신 장애 (PANDAS), 투렛트 증후군, 강박병 (OCD)에서 일어난다. BBB 투과성은 또한, 다음 질환 및 장애에서 일어난다: 모든 혈관병증 (예: 루푸스, 고혈압 등)과 연관된 마취 후 신경정신학적 기능장애 및 신경정신 장애. BBB 투과성은 또한, 감염증 (확립 감염시 CNS 내로 유입되거나, CNS 내에서 증식하거나, 또는 CNS로부터 배출된다), 예를 들어 HIV, 삼기 매독, 신경보렐리아증 [라임병 (Lyme Disease)], 단순 포진 바이러스 유형 1 (HSV-1)/ 단순 포진 바이러스 유형 2 (HSV-2), 수두 대상포진 바이러스 (대상 포진), 시토메갈로바이러스, 회색질척수염, 광견병, 진행성 다초점성 백질뇌병증, 아급성 경화성 범뇌염 (홍역 후), 원충 감염증 (독성 플라시모시스, 아메바증 및 파동편모충증), 리케치아 감염증 (발진 티푸스 및 록키산 홍반열), 후생동물 질환, 말라리아, 및 뇌염/수막염 대상체에게서 일어난다. 몇몇 양태에서, 뇌염/수막염은 패혈증으로부터 비롯된다.

[0710] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 작용제를 이용하는, Lp-PLA$_2$를 억제하는 작용제는 자폐증이 있거나 자폐증 위험에 놓인 대상체에게서 발생하는 BBB 투과성을 예방 및/또는 치료하는 데에 유용하다. 자폐증은 대부분이, 사회성 결여, 언어 이상 및 상동적 반복 행동 표현을 특징으로 하는 유전적 장애이다 [참고: American Psychiatric Association, 1994]. 신경병리학적 및 신경영상화 연구는 뇌 크기 및 중량 증가를 보고하였다 [참고: Bailey et al., 1998; Kemper and Bauman, 1998; Sparks et al., 2002; Herbert et al., 2003; Palmen et al., 2004]. 자폐적 뇌에 관한 많은 연구 결과는 특히 해마, 곶능선 및 편도에서 전반적인 세포 크기 감소 및 세포 팩킹 밀도 증가를 보고하였는데 [참고: Kemper and Bauman, 1993], 이는 상주 신경세포가 작은 수상돌기 나무 및 가능한 불완전 성숙 또는 저지된 발생을 나타낸다는 지표이다.

[0711] 자가면역은 자폐증의 발병 기전에 기여할 수 있는데, 자가항체가 신경세포와 결합하면 결정적 단계에서 정상적인 신경발생 패턴이 붕괴된다. 뇌에 대한 자가항체가 자폐적 어린이 [참고: Singh et al., 1988] 및 몇 가지 자가면역 요인, 예를 들어 뇌-특이적 자가항체 [참고: Gupta et al., 1996; Singh and Rivas, 2004], 림프구 기능 장해 [참고: Warren et al., 1996], 비정상적인 사이토킨 조절 및 바이러스성 연합 [참고: Singh, 2001]에서 보고되었다. 문헌 [참고: Singh and Rivas (2004)]에는 자폐적 어린이의 혈청에 뇌-특이적 자가항체가 정착되어 있고, 4 내지 12세 연령의 68명 자폐적 어린이에게서 꼬리 핵, 뇌 피질 및 소뇌에 대한 항체가 각각 49%, 18% 및 9% 탐지되었지만, 정상 어린이에게서는 그렇치 못하였다는 것이 보고되었다.

[0712] 또 다른 연구 결과, 투렛트 증후군 어린이는 항-선조체 항체를 보유하고 있고, 이들 항체를 랫트 선조체 내로 실험적으로 주입시키면 랫트에게서 투렛트 증후군과 유사한 신경세포 기능이상이 유발된 것으로 밝혀졌다 [참고: Hallet et al., 2000]. 항신경세포 자가항체의 존재와 신경학적 질환 간의 강력한 연계성은 스트렙토코쿠스성 감염증 이후의 증례, 예를 들어 강박 장애 (OCD), 시덴햄 무도병, 투렛트 증후군, 스트렙토코쿠스와 연관된 소아 자가면역성 신경정신 장애 (PANDAS), 종양연관성를 나타내는 어린이와, 인지와 기억 상실 둘 다를 나타내는 전신성 홍반성 루푸스에 걸린 노인 환자에게서 가장 현저하게 밝혀졌다 [참고: Swedo et al., 1989; Kalume et al., 2004; Tanaka et al. 2004].

[0713] 뇌 내의 신경세포에 대한 자가항체의 접근은 적어도 정상적인 건강한 개체에서는 혈액-뇌 장벽 (BBB)의 완전성으로 인해 자연적으로 제한될 것이다. 항체가 뇌 신경세포에 대한 접근을 획득하는 경우에는, 혈액-뇌 장벽에 결함이 있거나 이러한 장벽이 발생적으로 지연될 수 있다. 생후 6개월 정도에서 BBB의 확립, 신생아의 정상적인 면역 레퍼토리의 발생 및 신경발생 상의 장애 간의 연계성은 궁극적으로 자폐증을 유발시킬 수 있다. 후기 태내 기간과 생후 처음 수 개월 동안에는 환경적 신호 수용을 제어하는 중요한 신경세포 경로와 이들 신호에 대한 개별적이고도 적당한 반응 경로가 확립되고 정련된다. 이 시점에서 BBB의 형성에 있어서의 발생적 지연 또는 결함으로 인해, 자폐증을 유발시키는 정상적인 신경세포 와이어링 패턴에 손상을 가할 수 있었던 혈행성 항신경세포 자가항체에 신경세포가 노출될 수 있다.

[0714] 신경변성 질환 및/또는 BBB 투과성 모델을 대상으로 한 Lp-PLA_2 억제제의 평가

[0715] 신경변성 질환을 치료하는 데에 있어서 Lp-PLA_2 억제제의 적합성 여부는 신경변성 질환에 대한 수 많은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 예를 들어, 척수소뇌 운동실조증 유형 1 (SCA-1)의 특징적인 아택신 (ataxin)-1 발생 운동실조증의 확장된 폴리글루타민 반복 돌연변이체에 대해 트랜스제닉 (transgenic)인 마우스는 공지되어 있고 [참고: Burright et al., 1995, Cell 82: 937-948; Lorenzetti et al., 2000, Hum. Mol. Genet. 9: 779-785; Watase, 2002, Neuron 34: 905-919], 이를 사용하여 신경변성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 Lp-PLA_2 억제제의 효능을 결정할 수 있다. 예를 들어, 헌팅톤병 [참고: Mangiarini et al., 1996, Cell 87: 493-506, Lin et al., 2001, Hum. Mol. Genet. 10: 137-144], 알츠하이머병 [참고: Hsiao, 1998, Exp. Gerontol, 33: 883-889; Hsiao et al., 1996, Science 274: 99-102], 파킨슨병 [참고: Kim et al., 2002, Nature 418: 50-56], 근위축성 측삭 경화증 [참고: Zhu et al., 2002, Nature 417: 74-78], 피크병 [참고: Lee & Trojanowski, 2001, Neurology 56 (Suppl. 4): S26-S30], 및 해면상 뇌병증 [참고: He et al., 2003, Science 299: 710-712]에 대한 부가의 동물 모델을 사용하여 유사한 방식으로 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제의 효능을 평가할 수 있다.

[0716] 동물 모델은 포유류 모델로만 제한되지 않는다. 예를 들어, 드로소필라 (Drosophila) 균주는 수 많은 신경변성 장애에 대해 허용된 모델을 제공한다 [참고: Fortini & IBonini, 2000, Trends Genet. 16: 161-167; Zoghbi & Botas, 2002, Trends Genet. 18: 463-471]. 이들 모델에는 돌연변이된 파리 유전자를 보유하고 있는 파리 뿐만 아니라 임의로 표적화된 돌연변이를 수반한 인간 트랜스유전자 (transgene)를 보유하고 있는 파리가 포함된다. 이들 중에서 입수 가능한 드로소필라 모델은, 예를 들어 척수소뇌 운동실조증 [예를 들어, SCA-1 (참고: WO 02/058626), SCA-3 (참고: Warrick et al., 1998, Cell 93: 939-949)], 헌팅톤병 [참고: Kazemi-Esfarjani & Benzer, 2000, Science 287: 1837-1840], 파킨슨병 [참고: Feany et al, 2000, Nature 404: 394-398; Auluck et al., 2002, Science 295: 809-810], 연령-의존성 신경변성 [참고: Genetics, 2002, 161:4208], 알츠하이머병 [참고: Selkoe et al., 1998, Trends Cell Biol. 8: 447-453; Ye et al., 1999, J. Cell Biol. 146: 1351-1364], 근위축성 측삭 경화증 [참고: Parkes et al., 1998, Nature Genet. 19: 171-174], 및 부신백색질형성장애증이다.

[0717] 모델 유기체로서 드로소필라를 사용하는 것이 인간 신경변성 경로를 밝히는 데에 있어서 중요한 도구인 것으로 입증되었는데, 이는 드로소필라 게놈이 기능 면에서 극도로 잘 보존되어 있는 수 많은 관련 인간 오르토로그 (ortholog)를 함유하고 있기 때문이다 [참고: Rubin, G. M., et al., Science 287: 2204-2215 (2000)]. 예를 들어, 드로소필라 멜라노가스터 (Drosophila melanogaster)는 신경계 기능에 관여하는 인간 APP와 상동성인 유전자를 수반하고 있다. APP-유사 (APPL) 유전자는 신경세포 이소형인 APP695와 대략 40% 동일하고 [참고: Rosen et al., Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A. 86:2478-2482 (1988)], 인간 APP695는 신경계에서만 발현된다. APPL 유전자가 결핍된 파리는 행동에 있어 결함을 나타내고, 이는 인간 APP 유전자에 의해 구제될 수 있는데, 이는 이들 두 유전자가 2가지 유기체에서 유사한 기능을 한다는 것을 제안하고 있다 [참고: Luo et al., Neuron

9:595-605 (1992)]. 알츠하이머병에 대한 드로소필라 모델은 미국 특허 출원 제2004/0244064호, 제2005/0132425호, 제2005/0132424호, 제2005/0132423호, 제2005/0132422호, 제2005/0132421호, 제2005/0108779호, 제2004/0255342호, 제2004/0255341호, 제2004/0250302호 (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0718] 또한, 세포성 및 생리학적 수준에서 인간에게서의 질병 상태를 충실히 모방하고 있는, 폴리글루타민 반복 질병 [참고: Jackson, G. R., et al.. Neuron 21:633-642 (1998); Kazemi-Esfarani, P. and Benzer, S., Science 287:1837-1840 (2000); Fernandez-Funez et al., Nature 408: 101-6 (2000)], 파킨슨병 [참고; Feany, M.B. and Bender, W.W., Nature 404:394-398 (2000)] 및 기타 질병의 드로소필라 모델을 확립시켰고, 이는 상기 질병에 관여할 수 있는 기타 유전자를 확인하는 데에 성공적으로 이용되었다. 트랜스제닉 파리는 변경된 각종 표현형, 예를 들어 운동 표현형, 행동 표현형 (예: 식욕, 교배 행위, 및/또는 수명), 및 형태학적 표현형 (예: 세포, 기관 또는 부속물의 외형, 크기 또는 위치; 또는 파리의 크기, 외형 또는 성장 속도)을 유발시킬 수 있는 진행성 신경변성을 나타낸다.

[0719] 화합물이 투여된 동물을 대상으로 하여, 화합물이 투여되지 않은 동물과 비교해서 증상에 관하여 평가한다. 처리되지 않은 동물과 비교해서 Lp-PLA_2 억제제로 처리된 동물에게서, 증상 중증도 상의 측정 가능한 수준의 변화 (즉, 한 가지 이상 증상의 감소, 즉 10% 이상 감소), 또는 증상 발병 지연은 치료 효능의 지표이다.

[0720] 예를 들어, 행동 시험을 수행함으로써 기억 및 학습에 관하여 알아보기 위해 동물을 평가할 수 있다. 당업자에게 흔히 공지되어 있는 기억 및 학습에 관한 모든 행동 시험을 사용할 수 있는데, 예를 들어 설치류 동물 모델에 대한 모리스 (Morris) 수 미로 시험이 있지만, 이에 제한되지 않는다. 처리되지 않은 동물과 비교해서 Lp-PLA_2 억제제가 투여된 동물에게서 모리스 수 미로 시험을 수행할 수 있는 능력이 측정 가능한 수준으로 증가한다는 것은 치료 효능의 지표이다.

[0721] BBB 질환 또는 장애를 치료하는 데에 있어서 Lp-PLA_2 억제제의 적합성 여부는 BBB 비정상 및/또는 BBB 투과성이 일어나는 수 많은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 사용될 수 있는 한 가지 방법은 BBB를 가로질러 뇌 중의 신경세포와 상호 작용할 수 있는 혈행성 성분, 예를 들어 Ig 또는 아밀로이드 베타 (Aβ) 펩티드의 능력을 평가하는 것이다. BBB를 가로지르는 혈행성 성분, 예를 들어 Ig 또는 아밀로이드 베타 (Aβ) 펩티드를 평가하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 방법에 유용한 한 가지 방법은 형광성 표지된 A베타42를 이용하고, 이는 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Clifford et al., 2007, Brain Research 1142: 223-236, 이의 전문이 본원에 참고로 도입된다]. 이러한 모델에서, 결함있는 BBB를 가로지를 수 있는 혈행성 Aβ 펩티드의 능력은, 백일해 독소를 이용한 처리에 의해 투과성이 된 BBB를 수반한 마우스 내로 미부 정맥 주사를 통하여 도입된 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-표지된 Aβ42 및 Aβ40을 이용하여 평가하였다. Aβ40과 Aβ42 둘 다는 투과된 BBB를 가로질러, 주사한지 48시간 후 뇌에서 광범위한 Aβ42-양성 신경세포를 수반한 특정의 신경세포 아유형 (신경교세포는 아니다)과 선택적으로 결합하는 것으로 밝혀졌다. 대조군으로서, 본래의 BBB를 수반한 동물 (식염수 주사된 대조군)은 혈행성 Aβ 펩티드가 뇌로 유입되는 것을 차단시켰다. 이러한 동물 모델을 사용하여, Lp-PLA_2 억제제의 존재 또는 부재 하에 백일해 독소 및 FITC-표지된 Aβ42를 주사한지 48시간 후에 뇌에서 Aβ42-양성 신경세포를 평가함으로써 BBB 붕괴 또는 BBB 투과성의 예방 또는 치료에 대한 Lp-PLA_2 억제제의 능력을 평가할 수 있다. Lp-PLA_2 억제제가 투여되지 않은 동물과 비교해서 Lp-PLA_2 억제제가 투여된 동물의 뇌에서 Aβ42-양성 신경세포가 감소한다는 것은 Lp-PLA_2 억제제가 BBB 투과성을 치료 및/또는 예방하는 데에 유효하다는 지표이다.

[0722] BBB 투과성의 동물 모델에서 기타 추적 분자를 사용할 수도 있다. 뇌 조직에서 표지된 혈행성 성분, 예를 들어 형광성-표지되거나 35S 표지된 A베타 펩티드, 125I 또는 35S-표지된 면역글로불린 (Ig), 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 에반스 블루 (evans blue), 형광성 또는 자기 마이크로비드 (공급처: Molecular Probes) 및 상이한 분자량의 덱스트란을 탐지할 수 있다.

[0723] 백일해 독소는 보르데텔라 페르투시스 (*Bordetella pertussis*)로부터 유래되고, 주사 후 24시간 정도로 조기에 그리고 수 주 기간까지 마우스에서 BBB의 투과성을 효과적으로 증가시키는 것으로 공지되어 있으며 [참고: Amiel, 1976; Bruckener et al., 2003], 맥락막 얼기의 상피 및/또는 뇌 모세혈관 내피에서 BBB 완전성 붕괴와 연계되는 백일해 기침과 연관된 신경학적 후유증 발생에 관여하는 것으로 예상된다. 백일해 독소는 또한, 다발성 경화증에 대해 광범위하고 사용되고 있는 마우스 모델인 실험용 자가면역성 뇌척수염 (EAE) 발생을 증강시키기 위해 사용되었다 [참고: Ben-Nun et al., 1997; Linthicum et al., 1982; Yong et al., 1993)].

[0724] 조성물의 제형화

[0725] 화합물, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 약물로서 사용될 수 있거나, 또는 본원에 기재된 한 가지 이상 유용성을 지닌 제약 조성물을 제형화하기 위해 사용할 수 있다. 이들 화합물은 시험관 내에서 배양 중인 세포에 투여할 수 있거나, 생체 내에서 체내 세포에 투여할 수 있거나, 또는 개체 외부 세포에 생체외 투여하고, 이를 동일한 개체 또는 또 다른 개체의 체 내로 다시 투여할 수 있다. 이러한 세포는 분해될 수 있거나 또는 고형 조직으로서 제공될 수 있다.

[0726] 화합물, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 사용하여 약물 또는 기타 제약 조성물을 생성시킬 수 있다. 제약상 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제, 및 해당 조성물을 개체에게 전달하는 데에 유용한 성분을 추가로 포함하는 조성물의 사용은 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 담체 및 기타 성분을 본원에 기재된 바와 같은 작용제에 부가하는 것은 당해 분야의 기술 수준 내이다.

[0727] 제약 조성물은 혈액-뇌 장벽을 통하여 통과되거나 내피와 직접적으로 접촉하도록 적응시킨 제형으로서 투여할 수 있다. 몇몇 양태에서, 조성물은 전신 전달용으로 적응시킨 제형으로서 투여할 수 있다. 몇몇 양태에서, 조성물은 특이적 기관, 예를 들어 간, 골수로의 전달 또는 전신 전달용으로 적응시킨 제형으로서 투여할 수 있다.

[0728] 또 다른 한편, 제약 조성물은 생체외 세포 배양 배지에 가할 수 있다. 활성 화합물 이외에도, 상기 조성물은 제약상 허용 가능한 담체 및 투여를 촉진시키고/시키거나 흡수를 증강시키는 것으로 공지된 기타 성분 (예: 식염수, 디메틸 설폭시드, 지질, 중합체, 친화성에 의거한 세포 특이적-표적화 시스템)을 함유할 수 있다. 조성물은 젤, 스폰지 또는 기타 투과성 매트릭스 (예: 펠릿 또는 디스크로서 형성됨)에 혼입될 수 있고, 지속적인 국소 방출을 위해 내피에 근접하여 위치시킬 수 있다. 조성물은 1회분 용량으로 투여하거나 또는 상이한 시점에 투여되는 다수 회분 용량으로 투여될 수 있다.

[0729] 제약 조성물은 공지된 모든 경로에 의해 투여할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 점막, 폐, 국부 또는 기타 국소성 또는 전신 경로 (예: 경장 및 비경구)에 의해 투여할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"이란 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 통상적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 이에는 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 심실내, 포막내, 안와내, 심장내, 피내, 복막내, 경기관지, 피하, 표피하, 관절내, 포막하, 지주막하, 척수내, 뇌척수내, 및 흉골내 주사, 주입 및 기타 주사 또는 주입 기술이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같은 "전신 투여", "전신 투여된", "말초 투여" 및 "말초 투여된"이란 본원에 기재된 바와 같은 작용제가 동물의 시스템 내로 유입되어, 대사 및 기타 유사 과정을 진행하도록 이러한 작용제를 투여 (예를 들어, 피하 투여)하는 것을 의미한다.

[0730] "제약상 허용 가능한"이란 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제점 또는 합병증을 유발시키지 않으면서, 엄격한 의학적 판단 범주 내에서 합리적 유익/유해 비로 균형이 잡힌 정도로, 인간 및 동물 조직과 접촉해서 사용하는 데에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 본원에서 이용된다.

[0731] 본원에 사용된 바와 같은 "제약상 허용 가능한 담체"는 대상 작용제를 하나의 기관 또는 신체 일부로부터 또 다른 기관 또는 신체 일부로 전달 또는 수송하는 데에 관여하는 제약상 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클, 예를 들어 액상 또는 고형 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 피막화 물질을 의미한다. 각 담체는 제형의 기타 성분과 화합성이란 의미에서 "허용 가능"해야만 하는데, 예를 들어 담체는 치료에 대한 작용제의 영향력을 저하시키지 않는다. 달리 언급하면, 담체는 제약상 불활성이다.

[0732] 투여량 및 투여 시기, 제형, 및 투여 경로에 있어서의 적합한 선택은 혈관성 치매 대상체, 예를 들어 알츠하이머병에 걸렸거나 위험에 놓인 대상체에게서 선호되는 반응을 달성하고 (즉, 효능), 그에 대한 과도한 독성 또는 기타 유해성을 피하기 위해 (즉, 안전성) 이루어질 수 있다. 따라서, "유효한"이란 목적하는 효과를 달성하기 위한 통상적인 조건 조작을 포함하는 상기 선택을 지칭한다.

[0733] 거환 제형을 단기간에 걸쳐 1일 1회씩 개체에게 투여하는 것이 통상적인 투약 스케줄이다. 또 다른 한편, 유효 1일 용량은 1일 2회 내지 12회분으로 투여할 목적으로 수 회분으로 나눌 수 있다. 제약 조성물 중의 활성 성분의 투여량 수준은 개체, 특히 뇌의 혈관 내피 주변에 해당 화합물 또는 그의 유도체의 일시적 또는 지속적 농도를 달성시키고, 목적하는 치료 반응 또는 보호를 가져다 주도록 다양하게 할 수 있다. 그러나, 당해 분야 기술 내에서는, 목적하는 치료 효과를 달성하는 데에 요구되는 용량 수준 보다 낮은 수준에서 시작하고, 목적 효과가 달성될 때까지 그 투여량을 점차적으로 증가시킨다.

[0734] 투여된 Lp-PLA_2 억제제의 양은 당업자에게 공지된 요인, 예를 들어 화합물의 생체 활성 및 생체내 이용 효율 (예: 체내 반감기, 안정성 및 대사); 화합물의 화학적 특성 (예: 분자량, 소수성 및 용해도); 투여 경로 및 스케줄 등에 좌우된다. 특별한 모든 개체에 대해 달성하고자 하는 구체적 용량 수준은 연령, 성별, 건강, 병력, 체중, 한 가지 이상의 기타 약물과의 병용 여부, 및 질병 중증도를 포함한 각종 요인에 좌우될 수 있다는 것을 또한 인지해야 할 것이다.

[0735] 혈관성 치매, 알츠하이머병 또는 결함있는 BBB와 연관된 질환의 치료와 관련한 용어 "치료"는 특히, 기존 질병의 진행을 느리게 하거나 저하시키는 것 뿐만 아니라 질병 발생을 예방하거나, 질병 과정을 변경시키거나 (예를 들어, 질병의 진행을 느리게 한다), 질병 증상을 역전시키거나, 대상체에게서 한 가지 이상 증상 및/또는 하나 이상의 생화학적 마커를 저하시키거나, 한 가지 이상 증상이 악화 또는 진행되지 못하게 하거나, 회복을 증진시키거나, 예후를 개선시키거나, 또는 질병이 없는 대상체에게서 질병을 예방하는 것을 지칭한다. 소정의 대상체의 경우, 증상의 개선, 증상 악화, 퇴행 또는 진행은 객관적 또는 주관적 측정 기준에 의해 결정할 수 있다. 하나 이상의 생화학적 마커의 변형, 예를 들어 투과성, 뇌에서의 혈관외 Ig의 존재, 또는 CSF 내에서의 베타 아밀로이드의 존재를 측정할 수 있다.

[0736] 몇몇 양태에서, 치료 효능은 발병률 또는 사망률 상의 개선 (예를 들어, 선택 집단에 대한 생존율 곡선 증가)으로서 측정할 수 있다. 예방적 방법 (예를 들어, 재발을 방지하거나 저하시킨다)이 치료로서 간주되기도 한다.

[0737] 몇몇 양태에서, 치료는 또한, 기존의 기타 투여 방식, 예를 들어 알츠하이머병을 치료하기 위한 기존의 작용제, 예를 들면 ARICEPT 또는 도네페질, COGNEX 또는 타크린, EXELON 또는 리바스티그민, REMINYL 또는 갈란타민, 항-아밀로이드 백신, A베타-저하성 요법, 두뇌 운동 또는 자극과 병용하는 것을 포함할 수 있다 [참고: Zlokovic, Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 1533-1660, 2002].

[0738] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 기타 작용제, 예를 들어 신경변성 질환을 예방 및/또는 치료하기 위한 치료제와 병용할 수 있다. 이러한 작용제는 신경변성 질환 또는 장애의 치료 및/또는 예방을 위해 현재 사용되고 있거나 또는 개발 중인 모든 작용제일 수 있는데, 이는 신경변성 장애 또는 질환의 예방적 및/또는 치료적 효과를 지닐 수 있고/있거나 이의 증상을 저하시킬 수 있다.

[0739] 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 알츠하이머병 및/또는 혈관성 치매를 예방 및/또는 치료하기 위해 사용하는 양태에서는, 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 치매의 대증 요법으로서 유용한 것으로 청구되는 것으로 당업자에게 흔히 공지된 약물과 병용해서 사용할 수 있다. 이러한 약물의 예에는 콜린작동성 전달을 변형시키는 것으로 공지된 작용제, 예를 들어 M1 무스카린성 수용체 작동제 또는 알로스테릭 (allosteric) 조정제, M2 무스카린성 길항제, 아세틸콜린에스테라제 억제제 (예: 테트라히드로아미노아크리딘, 도네페질, 갈란타민 및 리바스티그민), 니코틴성 수용체 작동제 또는 알로스테릭 조정제 (예: α7 작동제 또는 알로스테릭 조정제 또는 α4β2 작동제 또는 알로스테릭 조정제), 페록시솜 증식제-활성화 수용체 (PPAR) 작동제 (예: PPARγ 작동제), 5-HT4 수용체 부분 작동제, 히스타민 H3 길항제 및 역 작동제, 5-HT6 수용체 길항제 또는 5HT1A 수용체 길항제, AMPA 양성 조정제 (알파-아미노-3-히드록시-5-메틸이속사졸-4-프로피오네이트, 글루타메이트 수용체 아유형) 및 N-메틸-D-아스파르트산 (NMDA) 수용체 길항제 또는 조정제 [예: 메만틴 (memantine)]가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0740] 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제를 알츠하이머병의 치료에 사용하는 경우, 본원에 기재된 바와 같이 Lp-PLA_2를 억제하는 작용제는 치매의 대증 요법으로서 유용한 것으로 청구되는 상기 언급된 약물 및/또는 질병 완화제와 병용해서 사용할 수 있다. 질병 완화제에는, 예를 들어 감마 세크레타제 억제제 및 조정제, 및 인간 베타-세크레타제 (BACE) 억제제가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 질병 완화제는, 예를 들어 감마 세크레타제 억제제 및 조정제, 베타-세크레타제 (BACE) 억제제, 및 능동 및 수송 면역을 포함한 기타 모든 항-아밀로이드 접근 방식, 예를 들면 미국 특허 출원 제2005/0170359호에 기재된 바와 같은 방법에 의해 확인된 작용제 뿐만 아니라 국제 특허 출원 WO05/07277, WO03/104466 및 WO07/028133, 및 미국 특허 제6,866,849호, 제6,913,745호 (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 작용제이지만, 이에 제한되지 않는다.

[0741] 따라서, Lp-PLA_2를 억제하는 하나 이상의 작용제를 하나 이상의 기타 의료 과정과 함께 이용하는 병용 요법을 실시할 수 있다.

[0742] 또한, 치료는 Lp-PLA_2 발현 또는 활성을 억제하는 다수의 작용제를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 기타 작용제에는 스타틴을 니아신 [참고: www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568] 및 페노피브레이트 [참고: www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=14817756&taxid==19]와 병용 사용하는 것이 포함된다.

[0743] 유사하게, 본 발명에 따르는 진단을 기타 진단 과정과 함께 실시할 수 있다. 예를 들어, 혈관계, 뇌 또는 척수(예: 혈액 또는 연수막 관)의 내피를 대상으로 하여 질병-특이적 분자성 진단 키트 (예: 특별 주문된 어레이, 다중체 QPCR, 다중체 프로테옴성 어레이)를 이용하여 유전자 발현 프로파일 상의 변화에 관하여 검정할 수 있다. 또한, 비침습성 진단 과정 (예: CAT, MRI, SPECT, 또는 PET)을 병용해서 사용하여 진단의 정확도 및/또는 민감도를 개선시킬 수 있다. 조기에 신뢰할 만한 수준의 진단이 경도 내지 중간 정도의 알츠하이머병에만 유효하거나 또는 그의 진행 지연에만 유효한 치료에 특히 유용하다.

[0744] 대상체에게 투여되는 양은 바람직하게, 그의 투여로부터 비롯되는 이점을 능가하는 독성 효과를 유도시키지 않는 양이다. 추가의 목표는 인식된 표준 치료와 비교해서 개체에서의 질병 증상 수를 감소시키고, 질병 중증도를 저하시키고/시키거나 이러한 질병 증상으로부터의 고통을 완화시키는 것이다.

[0745] 본 발명에 따르는 화합물의 생성은 정부 기관 (예: 미국 식약청)에 의한 의약품 안전성 시험실시기준 (GLP) 및 의약품 적정 제조기준 (GMP)에 따라 규제될 것이다. 이는 QA/QC의 모니터링 뿐만 아니라 정확하고도 완벽한 기록 보관을 요구한다. 기관 및 시설내 패널이 환자 프로토콜을 감독하는 것은 고지에 입각한 동의가 있은 것으로 고려되며; 안전성, 생체 활성, 적당한 투여량 및 제품 효능은 동일 상에서 연구하고; 결과는 통계상 유의적이며; 윤리적 지침을 따른다. 독성 화학약품의 사용 뿐만 아니라 동물 모델을 이용한 프로토콜에도 유사한 감독이 요구되고, 규제에 따른 응낙도 요구된다.

[0746] Lp-PLA_2 발현 및/또는 활성 억제를 목적으로 한 결과를 분석하는 방법, 투여량, 제형, 투여량 용량, 및 섭생은 다양할 수 있다. 따라서, 최소 및 최대 유효 투여량은 투여 방법에 따라서 다양하다. 혈관성 치매와 연관된 임상 및 조직학적 변화를 억제하는 것은 특이적 투여량 범위에서 일어날 수 있지만, 이는 해당 투여량이 투여되는 유기체, 투여 방식, Lp-PLA_2를 억제하는 작용제가 기타 공자극 분자와 연계해서 투여되는 지의 여부 및 Lp-PLA_2 억제제의 특이적 투여 섭생에 따라서 다양하다. 예를 들어, 일반적으로 비내 투여는 경구, 경장, 직장 또는 질 투여 보다 적은 투여량이 요구된다.

[0747] 본 발명에 사용하기 위한 경구 또는 경장 제형의 경우에는, 당해 분야에 널리 공지된 고형 담체를 이용하는 통상적인 과정에 따라서 정제를 제형화할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용될 경구 제형에 이용된 캅셀제는 모든 제약상 허용 가능한 물질, 예를 들어 젤라틴 또는 셀룰로스 유도체로부터 만들 수 있다. 경구적으로 투여된 투여 형태에 대한 지속 방출 경구 전달 시스템 및 장용 코팅이 또한 고려되는데, 이는 예를 들어, 미국 특허 제4,704,295호 (발명의 명칭: "Enteric Film-Coating Compositions", 1987년 11월 3일자로 허여됨); 미국 특허 제4,556,552호 (발명의 명칭: "Enteric Film-Coating Compositions," 1985년 12월 3일자로 허여됨); 미국 특허 제4,309,404호 (발명의 명칭: "Sustained Release Pharmaceutical Compositions," 1982년 1월 5일자로 허여됨); 및 미국 특허 제4,309,406호 (발명의 명칭: "Sustained Release Pharmaceutical Compositions," 1982년 1월 5일자로 허여됨)에 기재되어 있다.

[0748] 고형 담체의 예에는 전분, 당, 벤토나이트, 실리카 및 기타 통상적으로 사용되고 있는 담체가 포함된다. 본 발명의 제형에 사용될 수 있는 담체 및 희석제의 추가의 비-제한적 예에는 식염수, 시럽, 덱스트로스 및 물이 포함된다.

[0749] 장용 코팅된 제형

[0750] 본원에 기재된 바와 같은 화학식 I 내지 IV 등의 Lp-PLA_2 억제제에 대한 소형 화학적 실재물을 투여하기 위한 제형에 관하여 특히 유용한 한 가지 양태는 Lp-PLA 억제제를 장용 중합체 케이스와 함께 포함하는 정제 제형이다. 이러한 제제의 예가 WO2005/021002에 보고되었다. 코어 내의 활성 물질은 미분되거나 가용화된 형태로 존재할 수 있다. 활성 물질 이외에도, 코어는 압축 정제 분야에 통상적인 부가제를 함유할 수 있다. 이러한 정제 중에서 적당한 부가제는 희석제, 예를 들어 무수 락토스, 락토스 일수화물, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 인산이칼슘 또는 그의 혼합물; 결합제, 예를 들어 미세결정성 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시프로필-셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 예비-젤라틴화 전분 또는 아카시아 검 또는 그의 혼합물; 붕해제, 예를 들어 미세결정성 셀룰로스 (결합제와 붕해제 기능 둘 다를 충족시킨다), 가교결합된 폴리비닐피롤리돈, 나트륨 전분 글리콜레이트, 크로스카멜로스 나트륨 또는 그의 혼합물; 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트 또는 스테아

르산, 활탁제 또는 유동 보조제, 예를 들어 콜로이드상 실리카, 탈크 또는 전분, 및 안정화제, 예를 들어 건조성 무수 실리카, 착색제, 향미제 등을 포함할 수 있다. 바람직하게, 정제는 희석제로서 락토스를 포함한다. 결합제가 존재하는 경우, 이는 바람직하게, 히드록시프로필메틸 셀룰로스이다. 바람직하게, 정제는 윤활제로서 마그네슘 스테아레이트를 포함한다. 바람직하게, 정제는 붕해제로서 크로스카멜로스 나트륨을 포함한다. 바람직하게, 정제는 미세결정성 셀룰로스를 포함한다.

[0751] 희석제는 코어의 10 내지 80 중량% 범위로 존재할 수 있다. 윤활제는 코어의 0.25 내지 2 중량% 범위로 존재할 수 있다. 붕해제는 코어의 1 내지 10 중량% 범위로 존재할 수 있다. 미세결정성 셀룰로스가 존재하는 경우, 이는 코어의 10 내지 80 중량% 범위로 존재할 수 있다.

[0752] 활성 성분은 바람직하게, 코어의 10 내지 50 중량%, 보다 바람직하게 코어의 15 내지 35 중량%를 차지한다 (자유 염기 당량으로서 계산됨). 코어는 치료적으로 적합한 모든 투여량 수준의 활성 성분을 함유할 수 있지만, 바람직하게 활성 성분의 자유 염기로서 150 mg 이하를 함유한다. 특히 바람직하게, 코어는 활성 성분의 자유 염기로서 20, 30, 40, 50, 60, 80 또는 100 mg을 함유한다. 활성 성분은 자유 염기로서, 또는 모든 제약상 허용 가능한 염으로서 존재할 수 있다. 활성 성분이 염으로서 존재하는 경우, 해당 정제가 염의 자유 염기로서 계산된 활성 성분의 목적 량을 함유하도록 중량을 조정한다. 바람직하게, 활성 성분은 히드로클로라이드 염으로서 존재한다.

[0753] 코어는 그의 성분들의 치밀한 혼합물로부터 만들 수 있다. 성분들을 직접적으로 압축시킬 수 있거나, 또는 압축 전에 과립화시킬 수 있다. 이러한 과립은 당해 분야에 공지된 바와 같은 통상적인 과립화 공정에 의해 형성될 수 있다. 대체 양태에서, 과립은 장용 케이스로 개별적으로 코팅한 다음, 표준 캡슐 케이스에 봉입시킬 수 있다.

[0754] 코어는 장용 중합체를 포함하는 케이스에 의해 둘러싸여진다. 장용 중합체의 예는 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 셀룰로스 아세테이트 석시네이트, 메틸셀룰로스 프탈레이트, 에틸히드록시셀룰로스 프탈레이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 폴리비닐부티레이트 아세테이트, 비닐 아세테이트-말레산 무수물 공중합체, 스티렌-말레산 모노-에스테르 공중합체, 메틸 아크릴레이트-메타크릴산 공중합체 또는 메타크릴레이트-메타크릴산-옥틸 아크릴레이트 공중합체이다. 이들은 단독으로 사용하거나, 또는 상기 언급된 것 이외의 기타 중합체와 병용해서 또는 함께 사용할 수 있다. 케이스에는 생체 내에서 분해되지 않을 뿐만 아니라 가용화되지 않는 불용성 물질, 예를 들어 알킬 셀룰로스 유도체, 예를 들면 에틸 셀룰로스, 가교결합된 중합체, 예를 들면 스티렌-디비닐벤젠 공중합체, 히드록실기를 갖는 다당류, 예를 들면 덱스트란, 이관능성 가교결합제로 처리된 셀룰로스 유도체, 예를 들면 에피클로로히드린, 디클로로히드린 또는 1,2-, 3,4-디에폭시부탄이 포함될 수도 있다. 케이스에는 또한, 전분 및/또는 덱스트린이 포함될 수 있다.

[0755] 바람직한 장용 코팅재는 단독으로 사용되거나 가소제와 함께 사용되는 시판용 에우드라지트® (Eudragit®) 장용 중합체, 예를 들어 에우드라지트® L, 에우드라지트® S 및 에우드라지트® NE이다. 이러한 코팅재는 액상 매질을 사용하여 정상적으로 적용하고, 가소제의 성질은 매질이 수성인지 아니면 비수성인지에 따라서 좌우된다. 수성 매질에 사용하기 위한 가소제에는 프로필렌 글리콜, 트리에틸 시트레이트, 아세틸 트리에틸 시트레이트 또는 시트로플렉스® (Citrotlex®) 또는 시트로플렉스® A2가 포함된다. 비수성 가소제에는 이들이 포함되고, 또한 디에틸 및 디부틸 프탈레이트 및 디부틸 세바케이트가 포함된다. 바람직한 가소제는 트리에틸 시트레이트이다. 포함되는 가소제의 양은 당업자에게 명백할 것이다.

[0756] 케이스에는 또한, 항고정제, 예를 들어 탈크, 실리카 또는 글리세릴 모노스테아레이트가 포함될 수 있다. 바람직하게, 항고정제는 글리세릴 모노스테아레이트이다. 전형적으로, 케이스에는 약 5 내지 25 wt% 가소제 및 약 50 wt% 이하의 항고정제, 바람직하게 1 내지 10 wt%의 항고정제가 포함될 수 있다.

[0757] 경우에 따라, 중합체의 수성 현탁제를 형성시키는 데에 도움을 주는 계면활성제가 포함될 수 있다. 가능한 계면활성제의 많은 예가 당업자에게 공지되어 있다. 계면활성제의 바람직한 예는 폴리솔베이트 80, 폴리솔베이트 20, 또는 나트륨 라우릴 설페이트이다. 존재하는 경우, 계면활성제는 케이스의 0.1 내지 10%, 바람직하게 0.2 내지 5%, 특히 바람직하게 0.5 내지 2%를 형성할 수 있다.

[0758] 한 양태에서는, 코어와 장용 코팅 사이에 실 코트 (seal coat)가 포함된다. 실 코트는 장용 케이스가 코어 내의 모든 알칼리성 성분에 의한 가능한 화학적 공격을 받지 못하도록 하기 위해 사용될 수 있는 코팅재이다. 실 코트는 보다 매끄러운 표면을 제공함으로써, 장용 케이스의 보다 용이한 부착을 허용해줄 수도 있다. 당업자는

적합한 코팅재를 알고 있을 것이다. 바람직하게, 실 코트는 오파드리 (Opadry) 코팅으로 만들고, 특히 바람직하게 이는 오파드리 화이트 (Opadry White) OY-S-28876이다.

[0759] 한 양태에서, 제약상 활성 성분은 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 또는 그의 염이다.

[0760] WO2005/021002에 기재된 바와 같은, 상기 장용 코팅된 제형의 한 가지 예는 히드로클로라이드 염으로서 다양한 양의 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온 (본 예에서 "활성"으로 지칭된다)을 포함한다.

[0761] 이러한 예에서는, 락토스 일수화물, 미세결정성 셀룰로스, 활성 성분, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스 및 크로스카멜로스 나트륨의 절반을 10 리터 필더 (Fielder) 고전단 블렌더 (적합한 모든 고전단 블렌더가 사용될 수 있다) 내로 스크리닝하고, 초퍼 오프시키면서 300 rpm으로 5분 동안 블렌딩하였다. 이어서, 블렌딩을 지속하면서 혼합물에 약 750 ml 물을 가함으로써 이를 과립화하였다. 이 과립을 글래트 (Glatt) 3/5 유동상 건조기에서 건조시키고, 코밀 (Comil)을 파르마텍 (Pharmatec) 5 리터 통 블렌더 내로 스크리닝한 다음, 제형에 제공된 모든 무수 락토스 + 나머지 크로스카멜로스 나트륨과 함께 5분에 걸쳐 20 rpm으로 블렌딩하였다. 마그네슘 스테아레이트를 상기 블렌더 내로 스크리닝하고, 혼합 공정을 10 rpm 하에 1분 더 지속하였다. 9.5 mm 둥근 정상 볼록 펀치가 장착된 리바 피콜라 (Riva Piccolla) 회전식 정제 압착기 (적합한 모든 정제 압착기를 사용할 수 있다)를 사용하여, 상기 윤활시킨 혼합물을 압축시켰다. 실 코트, 및 후속 장용 코트는 코팅 중합체 제조업자에 의해 권장되는 바와 같은 코팅 공정에 대한 파라미터를 사용하여 마네스티 (Manesty) 10 코터 내에 코트 성분의 수성 현탁액을 분무함으로써 적용한다 (다시 언급하면, 적합한 모든 코터를 사용할 수 있다).

[0762] 이러한 종류의 기타 장용 코팅된 제제는 이들 물질 또는 그의 등가물을 사용하여 당업자에 의해 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0763] 본 발명은 Lp-PLA$_2$를 억제함으로써 신경변성 질환 및 신경학적으로 관련된 장애를 치료 및 예방하는 데에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다. 이러한 조성물 및 방법은 비정상적인 혈액 뇌 장벽 (BBB) 기능을 나타내는 질환 및 장애, 예를 들어 투과성 BBB를 수반한 신경변성 질환, 예를 들면 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병 및 혈관성 치매를 치료 및 예방하는 데에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0764] 도 1은 DM/HC-유도된 출혈 및 BBB 누출의 명백한 증거를 도시한 것이다. 패널 A는 패널 B에서 DM/HC 뇌에서의 출혈과 비교해서 대조군 뇌에서는 출혈이 없다는 것을 도시한 것인데, 검은색 화살표는 혈관 외부의 염증 세포를 나타내고, 백색 화살표는 내피 세포 표면 상의 염증 세포 부착 증가를 나타낸다. 패널 C는 패널 D에 도시된 바와 같은 DM/HC 동물 뇌에서의 BBB 누출과 비교해서, 대조군 동물에서는 혈관 투과성이 없는 본래의 BBB를 도시한 것인데, C 및 D 내의 화살표는 작은 혈관을 둘러싸고 있는 면역글로불린 (Ig)-양성 "누출 구름 (leak cloud)"의 경계를 나타낸다.

도 2는 DM/HC 뇌에서 누출된 Ig가 신경세포와 결합하여 수상돌기 (dendrite) 허탈을 유도시킨다는 것을 도시한 것이다. 좌측 및 우측 패널은 신경세포 체로부터 출현되는 수상돌기 트렁크의 "코르크따개 (corkscrew) 형태"로써 밝혀진 바와 같이 특징적 수상돌기 허탈을 나타내는 Ig 양성 (Ig-pos) 신경세포를 도시한 것이다.

도 3은 DM/HC-유도된 성상세포 활성화의 명백한 증거를 도시하고, DM/HC 처리된 동물의 뇌에서 "병든 신경세포" 근처에 활성화 성상세포에 대한 마커로서 GFAP 면역염색을 도시한 것이다.

도 4는 신경세포 및 국소 뇌 미소혈관계에서 A베타-42의 DM/HC 유도된 축적의 명백한 증거를 도시한 것이다. 패널 A는 A베타-42에 대해 집중적으로 면역양성인 신경세포 및 혈관 평활근 층에서 A베타-42의 침착 (뇌혈관성 아밀로이드증)을 나타내는 세동맥을 도시한 것이고, 패널 B는 A베타-42에 대해 면역양성인 신경세포가 수상돌기 수축의 지표인 "코르크따개형 수상돌기"를 갖는다는 것을 도시한 것이다.

도 5는 Lp-PLA$_2$ 억제제가 BBB 누출과 신경세포에 대한 Ig 결합을 예방한다는 것을 도시한 것이다. 패널 A 내지 F는 전혀 처리되지 않은 DM/HC 동물 (n=6)로부터의 뇌의 BBB 손상 (투과성)의 대표적 영상이고, 패널 G 내지 L은 Lp-PLA$_2$ 억제제로 처리된 DM/HC 동물 (n=6)로부터의 뇌의 필적하는 영역의 본래 BBB의 대표적 영상이다. 패

널 A-F는 패널 G-L과 비교해서 신경세포에 대한 Ig 결합과, 국소 뇌 미소혈관계로부터 뇌 조직 내로 다량의 Ig가 누출된다는 것을 보여준다.

도 6은 Lp-PLA_2 억제제가 혈관으로부터 혈장 성분 (Ig 포함)의 유출을 차단시킴으로써 DM/HC 동물에서 신경세포의 건강을 보존시켜 준다는 것을 도시한 것이다. 그 결과, Ig는 Lp-PLA_2 억제제로 처리된 DM/HC 동물의 혈관 내강에 한정되어, Ig에 대해 면역음성인 신경세포와 세동맥 벽이 된다.

도 7은 Lp-PLA_2 억제제가 신경세포에서의 A베타-42 축적을 예방한다는 것을 도시한 것이다. 패널 A 내지 F는 전혀 처리되지 않은 DM/HC 동물 (n=6)로부터의 뇌의 A베타-42 면역염색의 대표적 영상이고, 패널 G 내지 L은 Lp-PLA_2 억제제로 처리된 DM/HC 동물 (n=6)로부터의 뇌의 필적하는 영역의 A베타-42 면역염색의 대표적 영상이다. 패널 A-F에 도시된 바와 같이, A베타-42의 증가된 면역반응성은 패널 G-L에서 A베타-42에 대한 면역음성 신경세포와 비교해서, 신경세포에 대한 A베타-42 결합과 신경세포 내에서의 축적을 보여준다.

도 8은 Lp-PLA_2 억제제가 뇌혈관성 아밀로이드증을 저하시켰다는 것을 도시한 것이다. 패널 A는 전혀 처리되지 않은 DM/HC 동물로부터의 뇌에서 세동맥의 평활근 세포 층에서의 A베타-42 면역염색 (즉, 뇌혈관성 아밀로이드증)을 나타내는 반면, 패널 B는 Lp-PLA_2 억제제로 처리된 DM/HC 동물로부터의 뇌의 필적하는 영역 내에서 동맥성 A베타-42 면역염색이 거의 또는 전혀 없다는 것을 나타낸다.

도 9는 돼지 뇌의 대표적 영상을 도시한 것인데, 패널 A는 완전한 본래 뇌를 나타내고, 패널 B는 중간선을 따라 반으로 자른 뇌를 나타내며, 화살표는 뇌 줄기 및 해마 위치 뿐만 아니라 면역조직화학적 분석을 위해 사용된 뇌 영역 그리드를 표시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0765] 본원에 제시된 실시예는 Lp-PLA_2를 억제함으로써 신경변성 장애, 예를 들어 혈관성 치매 및 혈액 뇌 장벽 장애, 예를 들면 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본원 전반에 걸쳐, 각종 공보가 참고된다. 이들 공보의 명세서 및 그의 전문이 이들 공보에 참고로 인용된 문헌은 본 발명이 속하는 기술 분야를 보다 잘 기재하기 위해 본원에 참고로 도입된다. 다음 실시예는 본 발명에 대한 청구의 범위를 제한하는 것이 아니라, 단지 특정 양태를 예시하는 것이다. 당업자의 생각에 떠오른 예시 방법 상의 어떠한 변동도 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 여겨진다.

[0766] **방법**

[0767] *동물 모델*: 인간 유사 아테롬성 경화증을 모방한 당뇨병/당뇨병성 고콜레스테롤혈증 돼지 모델 (DM/HC)을 발생시켰다. 체중이 25 내지 30 kg인 약 4개월생 농장 돼지에게 125 mg/kg의 스트렙토조토신 (streptozotocin) (공급처: Sicor Pharmaceuticals, Irvine, CA)을 정맥내 단일 주사하여 이 돼지를 당뇨병으로 만들었다. 1 내지 2주 동안 안정화시킨 후, 혈장 혈당치가 상승된 (>150 mg/dl) 동물에게 표 1에 제시된 바와 같이 아테롬 발생성 (고-지방) 식이 (공급처: Animal Specialties, Quakertown, PA)를 공급하여 콜레스테롤치 수준이 대략 250 내지 800 mg/dl에 도달하도록 하였다. 이러한 콜레스테롤 수준 유지는 표 2에 제시된 바와 같은 방법에 의해 결정하였다.

표 1

2.0% 콜레스테롤 식이에 대한 성분

성분	중량/중량 %
푸리나 (Purina)* 돼지 발육군 식사	47.5 %
돼지 기름	25.0 %
카세인	11.1 %
건조 전유	7.9 %
땅콩유	2.37 %
콜레스테롤	2.0 %
웨손 (Wesson) 염 혼합물	2.37 %
푸리나* 비타민 혼합물	1.58 %
나트륨 콜레이트	1.58 %
탄산칼슘	0.4 %
콜린 클로라이드	0.2 %

[0768]

[0769] *Purina Mills, LLC, Checkerboard Square, St. Louis, Missouri, 63164, USA. 이들 사료는 다음 제조업체 (Animal Specialties and Provisions, LLC, Quakertown, PA USA)에 의해 제조하였다.

[0770] 0.5% 콜레스테롤 식이의 경우, 성분은 0.5% 콜레스테롤과 20% 돼지 기름을 제외하고는 유사하였다. 동물은 3 내지 5세때 거세시킨 요크셔 (Yorkshire) 수컷 돼지이다 (공급처: Archer Farms, Darlington, MD). 이들 사료는 제조업체 (Animal Specialties and Provisions, LLC, Quakertown, PA USA)의 의해 제조하였다.

[0771] 1 내지 2일경에는 동물에게 정상 음식을 공급한 다음, 3 내지 14일경에는 0.5% 콜레스테롤, 2% 돼지 기름 식이를 공급하고, 14일경에는 콜레스테롤 수준을 측정하며, 이에 따라 식이를 조정하여 콜레스테롤이 <300 mg/dl인 경우에는 2% 콜레스테롤, 10% 돼지 기름으로 증가시켰다. DM/HC를 유도시킨 후, 콜레스테롤 수준이 300 내지 800 mg/dl로 안정적일 때까지 콜레스테롤을 측정하고, 콜레스테롤 안정화 후에는, 콜레스테롤을 매달 측정하였다. 콜레스테롤 수준이 초기 안정화 기 이후에 불안정한 경우에는, 동물 식이를 초기 2주 측정 스케줄로 되돌아갔다. 매달 콜레스테롤 수준을 결정하였는데, 이에는 총 콜레스테롤, LDL, HDL, VLDL 및 트리글리세라이드의 수준이 포함된다. 안정한 콜레스테롤 수준을 위해 동물 식이를 조정하는 것은 표 2에 제시된 요약에 따라서 결정하였다.

표 2

콜레스테롤 및 식이 조정

콜레스테롤 수준	식이 조정	다음 측정	콜레스테롤 수준	식이 조정	다음 콜레스테롤 측정
<250 mg/dl	25% 돼지기름 식이로 변화	2주	<300 mg/dl	25% 돼지기름 식이 지속	2주
			300-800 mg/dl	75% 돼지기름으로 변화 (25% 돼지기름); 25% 정상 식이	2주
			>800 mg/dl	100% 10% 돼지기름 식이로 변화	2주
			>1000 mg/dl	10% 돼지기름 식이의 50:50 혼합물로 변화	2주
			>1500 mg/dl	정상 식이로 변화	2주*
300-800 mg/dl	변화없음, 10% 돼지기름 식이	2주	< 300 mg/dl	25% 돼지기름 식이로 변화	2주
			300-800 mg/dl	변화없음	규칙적 스케줄
			>800 mg/dl	10% 돼지기름 식이를 수반한 50:50 혼합물로 변화	2주
			>1000 mg/dl	10% 돼지기름 식이를 수반한 25:75 혼합물로 변화	2주
			>1500 mg/dl	정상 식사	2주
800-1000 mg/dl	10% 돼지기름과 정상 음식 식이의 50:50 혼합물로 변화	2주	< 300 mg/dl	10% 돼지기름 식이의 25:75 혼합물로 변화	2주
			300-800 mg/dl	식이 상의 변화없음 (50:50) 10% 돼지기름	2주
			>800 mg/dl	10% 돼지기름의 25:75 혼합물로 변화	2주
			>1000 mg/dl	10% 돼지기름의 25:75 혼합물로 변화	2주
			>1500 mg/dl	정상 음식	2주*
>1000 mg/dl	10% 돼지기름과 정상 음식 식이의 25:75 혼합물	2주	< 300 mg/dl	10% 돼지기름과 정상 음식 식이의 50:50 혼합물로 변화	2주
			300-800 mg/dl	식이 상의 변화없음 10% 돼지기름과 정상 음식 식이의 25:75 혼합물	2주
			>800 mg/dl	식이 상의 변화없음	2주
			>1000 mg/dl	정상 음식	2주*
			>1500 mg/dl	정상 음식	2주*
>1500 mg/dl	정상 음식 식이	2주	< 300 mg/dl	10% 돼지기름 식이의 100%로 변화	2주
			300-800 mg/dl	10% 돼지기름과 정상 음식 식이의 50:50 혼합물로 변화	2주
			>800 mg/dl	정상 음식	2주*
			>1000 mg/dl	정상 음식	2주*
			>1500 mg/dl	정상 음식	2주*

[0772]

[0773] 250-800 mg/dl에서 콜레스테롤을 안정화시킨 후 1개월 째에, 동물을 무작위로 2개 실험군, 즉 치료하지 않은 군 및 치료 군 [1일 10 mg/kg의 SB-480848; 1-(N-(2-(디에틸아미노)에틸)-N-(4-(4-트리플루오로메틸페닐)벤질)-아미노카보닐메틸)-2-(4-플루오로벤질)티오-5,6-트리메틸렌피리미딘-4-온으로서 지칭되기도 함]을 수반한 DM/HC (고혈당증 및 고콜레스테롤혈증) 군으로 분류하였다. 무작위로 분류시킨지 6개월 후에 동물을 희생시켰다. 동물 프로토콜은 펜실바니아 대학의 시설내 동물 보호와 사용 위원회에 의해 승인되었다.

[0774] 2개의 당뇨병/고콜레스테롤혈증 군을 평가하였다: 1. DM/HC 군 및 2. Lp-PLA_2 억제제가 투여된 DM/HC 동물. 실험에는 대조군 (DM/HC 군 - 17마리 돼지) 및 실험군 (Lp-PLA_2 억제제가 투여된 DM/HC 동물 - 20마리 돼지). 또한, 실험 동물에서는 혈중 콜레스테롤 수준이 300 내지 800 mg/dl로 유지되었는데, 이러한 범위는 보다 우수한 시험 모델을 제공하는 것으로 결정되었다. 혈중 콜레스테롤 수준은 표 4에 제시된 바와 같이 모든 동물에게서 격월로 모니터링하였고, 표 2에 제시된 바와 같이, 이에 따른 사료의 지방 함량을 조정하였다. 콜레스테롤과 돼지 기름 %는 각각 0.5 내지 2% 및 10 내지 25%였고, 모든 동물에게는 이러한 범위 내의 콜레스테롤 및 돼지 기름 농도가 함유된 사료가 제공되었다. 혈액 샘플은 기준선, 1개월, 3개월 및 6개월째에 수득하였다. 매번 1 ml/kg 미만의 혈액을 수득하였다. 격월로, 혈중 콜레스테롤 수준 시험, 총 콜레스테롤, LDL, HDL, VLDL 및 트리글리세라이드의 수준, 혈당, Lp-PLA_2 및 일차 골수 세포 (PBMC)를 시험하였다 [표 4 참고].

[0775] 통계적 유효성을 위한 최소한 요구 사항의 정당성을 증명하기 위해 선택된 동물 수는 각 실험당 2개 군의 동물이다: 1. 대조군 (n=17); 당뇨병 및 과지질혈증; 2. 실험군 (n=20); 표 3에 제시된 바와 같이, 10 mg/kg Lp-PLA_2 억제제가 투여된 당뇨병, 과지질혈증.

[0776] 체중이 25 내지 35 kg인 농장 가축용 요크셔 보아르 (Yorkshire boars) 돼지는 지역 농장에서 구입하였고, 이는 수의사의 보호 하에 우리에서 사육하였다. 연구를 시작하기 3 내지 5일 전에 상기 동물을 거세하였다. 시험

동물에게 스트렙토조아신 (125 mg/kg) 1회분을 30분 내에 정맥내 주입함으로써 당뇨병에 걸리게 하였다. 동물이 당뇨병에 걸리지 않은 경우에는, 두 번째 용량 (50 mg/kg)을 투여하였다. 가능한 초기 저혈당증 발병을 피하기 위해, 처음 2일 동안은 20 g의 글루코스 분말을 사료에 가하였다. 처음 14일 동안은 사료를 공급하기 전에 매일 혈당계를 이용하여 혈당을 측정한 다음, 매주 1회씩 측정하였다.

[0777] 시험 동물은 대조군 동물과 별도로 사육하여 식분증에 기인한 약물의 동물간 전이를 피하였다. 모든 동물에게 아테롬 발생성 식이를 매일 2회씩 공급하고 물은 자유롭게 마실 수 있게 했다. 특별 주문된 식이는 0.5 내지 2% 콜레스테롤 및 10 내지 25% 돼지 기름을 함유하였는데, 그의 성분은 표 1에 제시되어 있다.

표 3

[0778] 동물 및 과정 스케줄 (2개 군으로 분류됨):

	동물 수	시간 스케줄
군 1: DM/HC	N=20	7개월
군 2: Lp-PLA_2 억제제가 투여된 DM/HC	N=17	7개월
총	N=37	7개월

표 4

[0779] 과정 요약

	출발	28일	57일	85일	113일	141일	168일	196일
혈청 글루코스, LDL, HDL, 트리글리세라이드	X	X	X	X	X	X	X	X
Lp-PLA_2 (동결된 혈청-EDTA)	X	X	X	X	X	X	X	X
PBMC	X		X		X			X
조직 수거								X

[0780] 1일 투여는 29일째에 시작하였는데, 이때 각 시험 동물에게 10 mg/kg SB-480848의 1일 용량을 공급하였다 (개사료에서의 거환 당량으로서 제공됨). 동물은 한밤중부터 동트기 전까지 금식시켰다. 196일째에 동물을 안락사시키고 조직을 즉시 수거하였다.

[0781] *뇌 조직 제조.* 동물을 안락사시킨 후 1시간 내에 전체 뇌를 꺼냈다. 우측 반구는 1주 이상 동안 10% 포르말린에 고정시켰다. 이어서, 뇌 조직을 슬라이싱하고 파라핀에 봉매시켰다. 각 동물에 대해, 면역조직화학 (IHC)을 알아보기 위하여 총 약 11개 조직 블록을 생성시켰다 (예시 참고). 좌측 반구로부터는, RNA 및 단백질 분석을 위해 뇌 피질 (다수 위치로부터의 뇌 피질), 해마 및 뇌 줄기를 보존시켰다.

[0782] *사후 인간 뇌 조직을 돼지 뇌 조직과 비교하기 위해 사용하였다.* 산발성 AD에 걸린 것으로 임상적으로 진단된 환자 (n=21, 연령 범위=72-84)로부터의 해마 및 내비 피질 (entorhinal cortex), 및 정상적인 연령 적합 신경학적 정상 개체 (n=13, 연령 범위=69-81)로부터의 대조군 조직은 다음 공급처 [the Harvard Brain Tissue Resource Center (Belrnont, MA) 및 the Cooperative Human Tissue Network (Philadelphia, PA)]로부터 획득하였다. 이들 뇌에 대한 사후 간격은 <24h이고, 각 뇌 표본에 대한 AD의 병리학적 확증은 다음 연구소 [the National institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of AD (1997)]에 의해 규정된 기준에 따라서 수행하였다. 연령 적합 대조군으로부터의 뇌 표본은 동일한 기준을 이용하여 스크리닝하였다. 조직은 기존에 보고된 바와 같이 [참고: D'Andrea et al., 2001; Nagele et al., 2002] 신경염성 (아밀로이드) 반점 및 신경섬유 매듭의 존재에 관하여 알아보기 위해 면역조직화학적으로 성상 확인하였다. 대조군 조직은 육안적 병리 상태를 전혀 나타내지 않았고, 최소한의 국한된 현미경적 AD-유사 신경병리 상태를 나타내었다. 조직을 확립된 프로토콜에 따라서 통상적인 파라핀 봉매 및 절편법 처리하였다. 5 마이크로미터 절편을 일련으로 절단시키고, 슈퍼프로스트 (SuperFrost) 플러스+ 마이크로슬라이드 (공급처: Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 위에 올려놓고 밤새 건조시켰다.

[0783] *인간 및 돼지 뇌 조직의 조직학 및 면역조직화학 (IHC).*

[0784] 기존에 보고된 바와 같이 [참고: D'Andrea et al., 2001; Nagele et al., 2002], 파라핀-봉매된 조직 상에서 면역조직화학을 수행하였다. 간략하게 언급하면, 파라핀을 크실렌으로 제거하고 에탄올 농도를 등급별로 일련으로 감소시킴으로써 재수화시킨 후, 2분 동안 표적 완충액 (공급처: Dako, Carpenturia, CA)에서 절편을 미세파 처리함으로써 단백질 항원성을 증강시켰다. 또 다른 한편으론, 동결된 절편을 아세톤에서 2분 동안 처리하고, 다시 공기 건조시켰다. 0.3% H_2O_2에서 30분 항온 배양한 후, 절편을 정상 차단성 혈청에서 30분 동안 처리한 다음, 실온 하에 1시간 동안 적당한 희석 하의 일차 항체와 함께 항온 배양하였다. PBS에서 철저히 세정한 후, 이차 바이오틴-표지된 항체를 30분 동안 적용하였다. 면역반응물을 아비딘-퍼옥시다제-표지된 바이오틴 복합체 (공급처: ABC, Vector Labs, Foster City, CA)로 처리하고, 절편을 3,3-디아미노벤지딘-4 HCl (DAB)/H_2O_2 (공급처: Biomeda, Foster City, CA)로 처리함으로써 가시화하였다. 절편을 헤마토크실린으로 약간 반대염색하고, 에탄올 농도를 등급별로 일련으로 증가시킴으로써 탈수시키며, 크실렌에서 정화시키고 페르마운트 (Permount)에 올려 놓았다. 대조군은 비-면역 혈청, 예비 흡수된 항체 또는 일차 항체의 생략으로 처리된 뇌 절편으로 이루어졌다. 표본을 조사하고, 니콘 (Nikon) FXA 현미경으로 사진을 찍은 다음, 니콘 DXM1200F 디지털 카메라를 이용하여 디지털 영상을 기록하고, 영상 프로 플러스 (Phase 3 Imaging, Glen Mills, PA) 영상화 소프트웨어를 이용하여 처리하였다.

[0785] 전방 피질로부터의 일련의 조직학적 절편을 다음과 같이 염색하였다: 헤마토크실린 및 에오신 (H&E)은 혈관 구조와 출혈을 나타내기 위한 것이고; IHC는 BBB 누출 (혈관성 누출 및 BBB 투과성에 대한 마커로서의 돼지 면역글로불린), 성상세포 (신경교 섬유상 산성 단백질)의 활성화 및 신경세포 (미소관 관련 단백질-2), 아밀로이드 반점 (A베타-42)의 형태학적 외관 및 구조적 완전성을 나타내기 위한 것이다.

[0786] **실시예 1**

[0787] Lp-PLA_2 활성의 억제는 혈관성 치매 & 알츠하이머병을 예방시켜 준다:

[0788] DM/HC는 뇌내 출혈과 혈액 뇌 장벽 (BBB) 손상을 유도시켰다.

[0789] BBB의 주요 기능은 신경세포 기능이 남아있는 환경이 생체 항상성이 되도록 뇌 내로 유입되거나 뇌를 떠나는 물질 전반에 걸쳐 정확한 제어를 유지시키는 것이다. BBB가 손상되면, 정상적으로는 제외되는 혈액 성분이 뇌 조직 내로 유입되고, 신경세포 기능을 방해하며, 면역 반응을 촉발시키고 신경염증을 유발시키는데, 이들 모두는 혈관성 치매와 알츠하이머병 발병에 일조한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 대조군 혈관 (좌측)과는 달리, 출혈 (상단 우측, H&E 200x) 및 BBB 누출 (바닥 우측, 돼지 면역글로불린에 대한 IHC 100x)이 DM/HC 뇌에서 인지되었다. 검은색 화살표는 혈관 외부 염증 세포 (상단) 및 혈관주위 누출 구름 (바닥 우측, BV: 혈관)을 표시한다. 부가적으로, 내피 세포 표면 상에서는 염증 세포 부착이 증가된다 (백색 화살표, 상단 우측). IHC를 사용하여 (i) 결함있는 BBB로부터 비롯되는 혈관성 노출을 탐지하고, (ii) 뇌 조직에서 누출된 물질의 운명을 추적하였다. 인간 알츠하이머병 (AD) 뇌에서 관찰되는 것과 유사하게, 누출된 면역글로불린 (Ig)은 주요 수상돌기 트렁크의 리코일과 트위스팅에 의해 입증된 바와 같이, 신경세포와 결합하고 수상돌기 나무의 허탈을 유발시킨다 (즉, "코르크따개형 수상돌기" 외관) (도 2).

[0790] 연구 기간 동안, Lp-PLA_2 억제제가 투여된 동물은 처리되지 않은 대조군 동물과 비교해서 외부 자극에 대해 보다 반응성이었고, 우리에서의 활성이 증가된 것으로 입증되었으며, 영양 공급과 조작 대해 보다 기민하게 반응하는 경향이 있었다는 사실이 관찰되었다. 또한, 유사한 혈청 글루코스 및 콜레스테롤 수준에도 불구하고, Lp-PLA_2 억제제로 처리된 동물은 대조군 동물과 비교해서 체중이 기준선 26.9 kg 및 30.3 kg 체중으로부터 각각 증가하였다는 것이 입증되었다 (대조군 동물에 대한 50.9 kg과 비교해서 62.5 kg이다). 보다 병든 동물 (즉, 처리되지 않은 대조군 동물)이 음식물을 먹지 않는 한에서는, Lp-PLA_2 억제제가 투여된 동물의 체중이 그의 전반적인 웰빙 지수를 직접적으로 반영하고 있다. Lp-PLA_2 억제제에 의해 염증을 억제하는 것이 전신 염증 환경 하에서 보다 큰 웰빙과 건강을 가져다 주는 것으로 관찰되었다.

[0791] **실시예 2**

[0792] DM/HC 동물은 조기 알츠하이머병 병리 상태를 나타내었다

[0793] 성상세포의 활성화 및 신경세포 내에서의 Aβ42의 세포내 축적은 알츠하이머병 (AD)의 발병 기전에 있어서 조기의 주요 사건으로서 인식되어 왔고, 이는 AD 환자의 뇌에서 잘 보고되었다. 도 3에 도시된 바와 같이, CV 위험 요인에 노출된 후 7개월 정도로 단기간에 DM/HC는 신경교 섬유성 산성 단백질 (GFAP)의 발현 상승으로써 표시된

바와 같이, 성상세포의 활성화를 유도시켰다. 집중적인 GFAP 면역염색을 나타내는 성상세포는 비정상적인 형태를 보여주는 신경세포에 바로 근접하여 관찰되었다. 더우기, 신경세포 및 혈관성 평활근 세포 (SMC)는 Aβ42에 대항한 항체와의 면역 반응성이 증가한 것으로 입증되었다 (도 4). 주목해야할 것은 성상세포가 Aβ42에 대항하여 음성 면역 반응성을 나타내었다는 것인데, 이는 Aβ42 축적이 신경세포 및 혈관성 SMC에서 비교적 선택적으로 일어난다는 것을 입증해준다. 이러한 소견은 신경세포와 혈관성 SMC가 Aβ42를 축적하기 가장 쉬운 세포라는 것을 입증해주는데, 이는 조기 알츠하이머병 환자의 뇌에서 관찰된 사실과 거의 동등한 수준이다. Aβ42-양성 신경세포가 또한 병든 신경세포의 특징을 나타내었다는 것을 인지하는 것이 중요한데, 이들 중의 몇몇은 "크로크따개 수상돌기 트렁크"를 나타내며, 이는 신경세포의 수상돌기 나무가 허탈 과정에 있다는 지표이다 (도 5). Aβ42(+) 신경세포와는 달리, Aβ42-음성 신경세포는 건강한 외관을 나타내었다.

[0794] **실시예 3**

[0795] Lp-PLA_2 활성의 억제는 DM/HC-유도된 BBB 누출을 저하시켰다

[0796] 도 5에 도시된 바와 같이, DM/HC는 6마리 동물 모두에게서 광범위한 BBB 누출을 유도시킨 반면, Lp-PLA_2 억제제로 처리된 동물은 무시할 만한 수준의 BBB 누출을 나타내었다. 갈색 염색은 혈액 성분 (본 경우에는 Ig)이 소동맥으로부터 누출되어 주변 뇌 조직 내로 유입되고, 신경세포에 대한 광범위한 Ig 결합이 일어났다는 것을 표시한다. 이와는 달리, 처리된 동물에서는 혈관으로부터의 Ig 누출이 없었고, 신경세포에 대한 Ig 결합이 없으며, 수상돌기 허탈이 없었다 (도 5 & 도 6).

[0797] **실시예 4**

[0798] Lp-PLA_2 활성의 억제는 신경세포에서의 DM/HC-유도된 A베타-42 축적을 예방시켰고 뇌혈관성 아밀로이드증을 최소화시켰다

[0799] DM/HC 동물은 신경세포 손상 뿐만 아니라 신경세포 내에서의 변동 가능한 정도의 A베타42 축적을 나타낸 반면 (도 7, 좌측 패널), Lp-PLA_2 억제제로 처리된 동물 (도 7, 우측 패널)은 신경세포 A베타-42 면역반응성을 나타내지 않았다. 부가적으로, 병든 신경세포는 처리되지 않은 동물과 비교해서 처리된 동물에서 거의 관찰되지 않았다. 유사하게, Lp-PLA_2 억제제는 또한, 혈관성 SMC에서의 A베타42 축적을 예방하였으므로, 뇌혈관성 아밀로이드증을 최소화시켰다 (도 8).

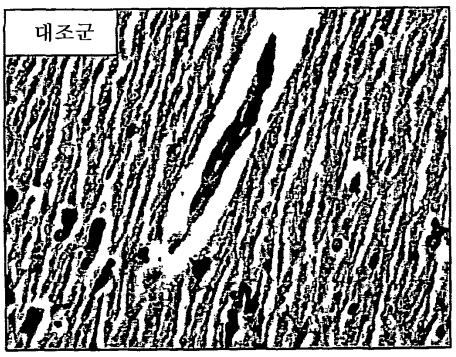
[0800] 요약하면, Lp-PLA_2를 억제하면 대사성 위험 인자-유도된 BBB 붕괴, 신경세포에 대한 Ig 결합 및 신경세포에서의 A베타42 축적이 예방되었다. Lp-PLA_2를 억제하면 또한, 활성화 신경교 세포 (예를 들어, 성상세포 활성화)가 감소되었고, 뇌혈관에서의 A베타42 침착 (즉, 뇌혈관성 아밀로이드증)이 최소화되었다.

[0801] **참고 문헌**

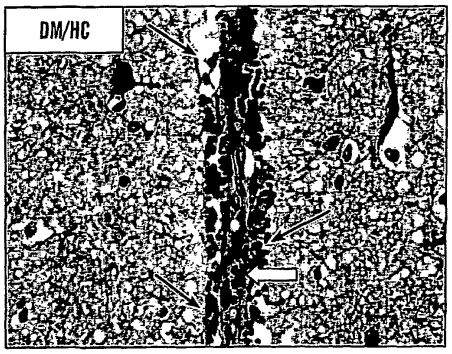
[0802] 본원 및 본 명세서 전반에 걸쳐 인용된 참고 문헌은 본원에 참고로 도입된다.

도면

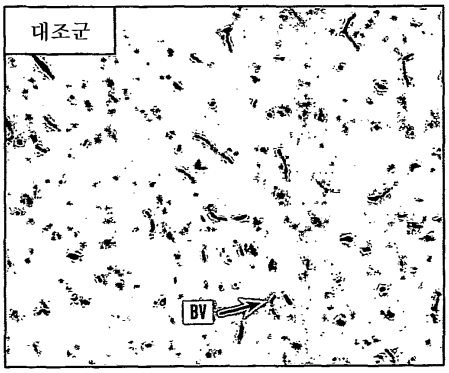
도면1a



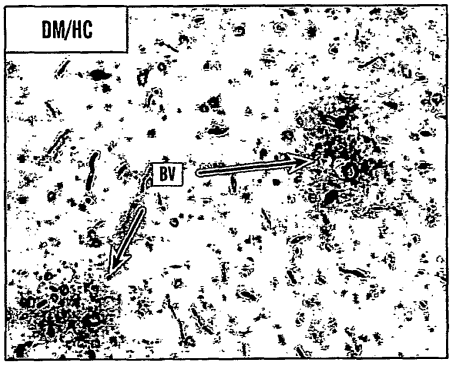
도면1b



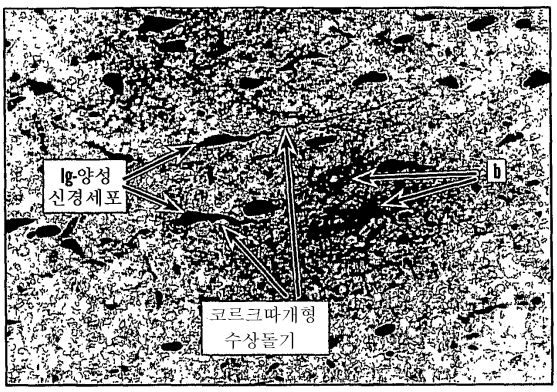
도면1c



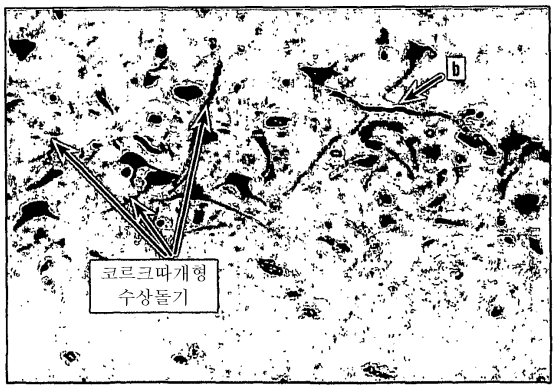
도면1d



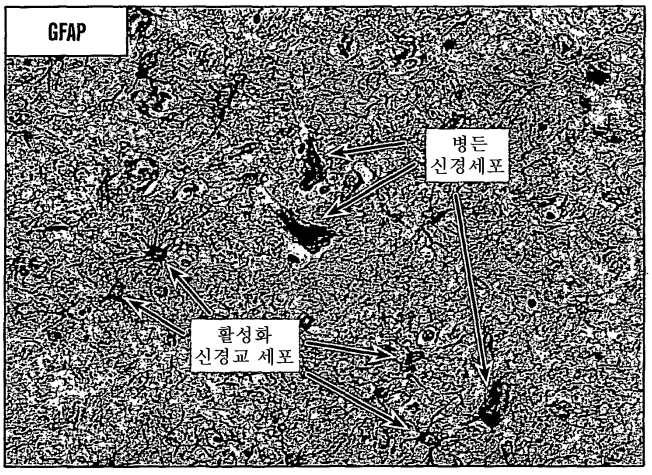
도면2a



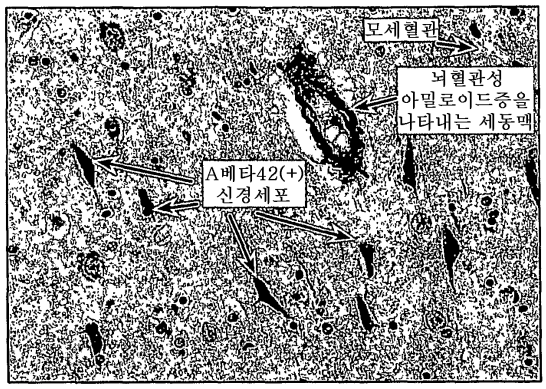
도면2b



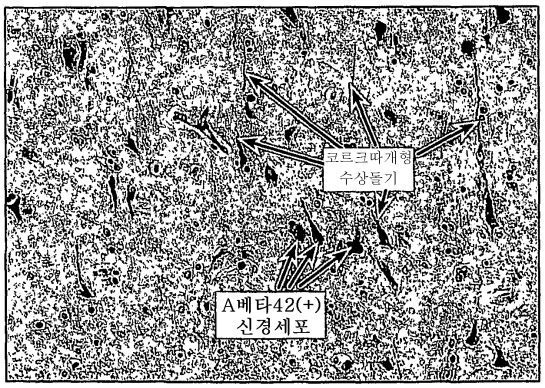
도면3



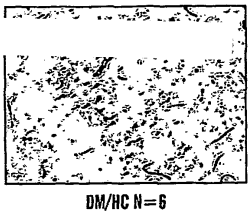
도면4a



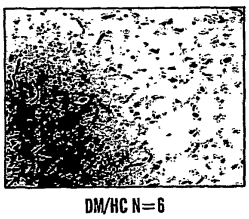
도면4b



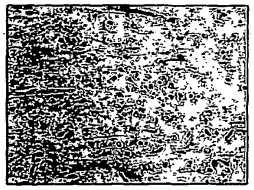
도면5a



도면5b

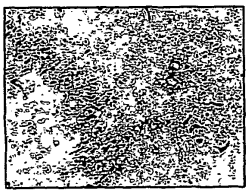


도면5c



DM/HC N=6

도면5d



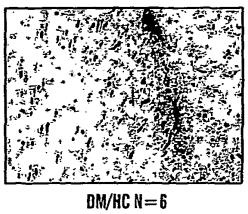
DM/HC N=6

도면5e



DM/HC N=6

도면5f



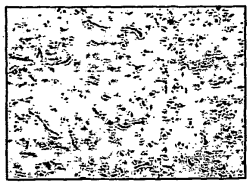
DM/HC N=6

도면5g



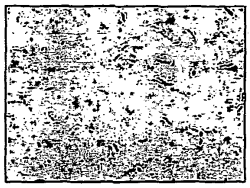
처리됨 N=6

도면5h



처리됨 N=6

도면5i



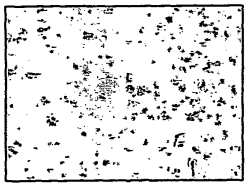
처리됨 N=6

도면5j



처리됨 N=6

도면5k



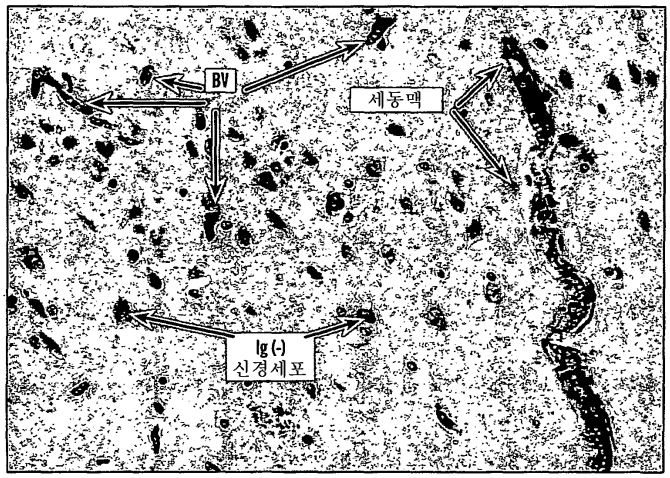
처리됨 N=6

도면5l

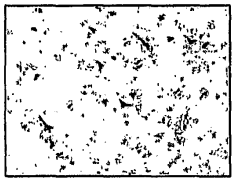


처리됨 N=6

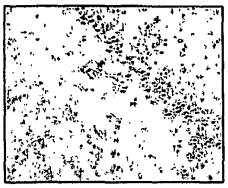
도면6



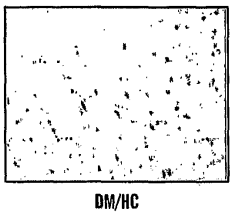
도면7a



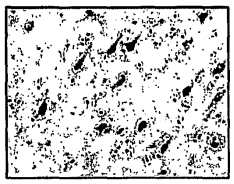
도면7b



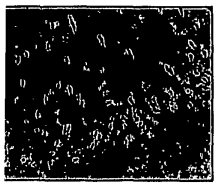
도면7c



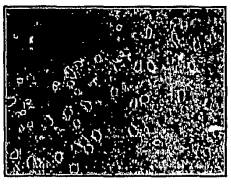
도면7d



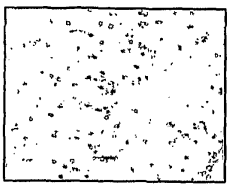
도면7e



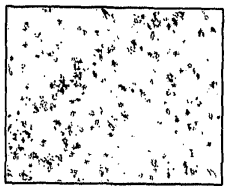
도면7f



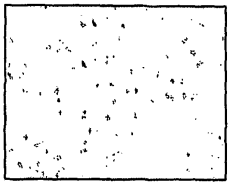
도면7g



도면7h

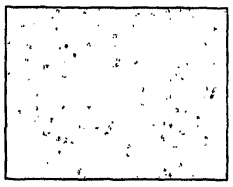


도면7i



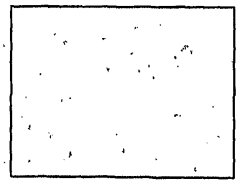
처리됨

도면7j



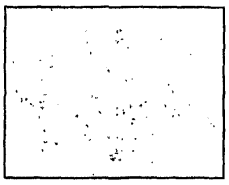
처리됨

도면7k



처리됨

도면7l



처리됨

도면8a



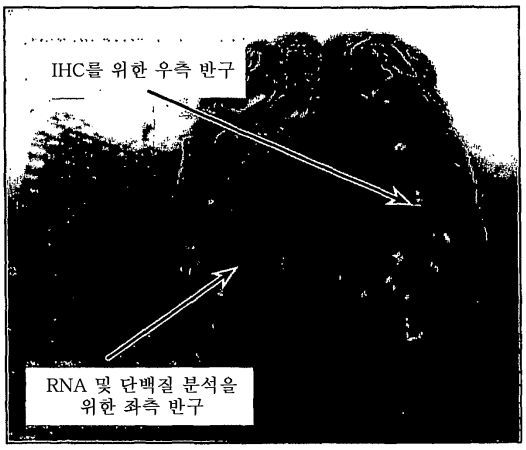
DM/HC

도면8b

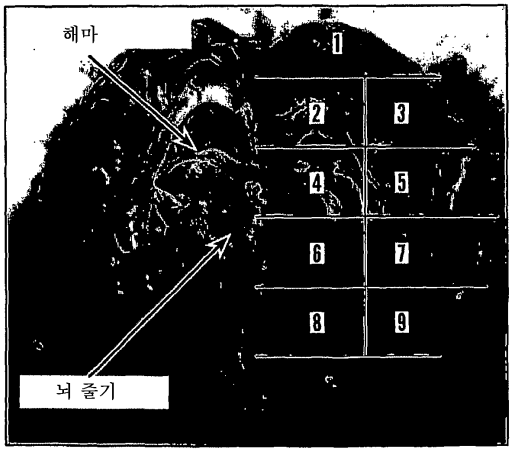


처리됨

도면9a



도면9b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SHI, YI

NAGELE, ROBERT

<120> METHODS OF TREATMENT AND PREVENTION OF

NEURODEGENERATIVE DISEASES AND DISORDERS

<130> 003252-059733-US

<140>

<141>

<150> 60/928,920

<151> 2007-05-11

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1505

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gctggtcgga ggctcgcagt gctgtcggcg agaagcagtc gggtttggag cgcttgggtc 60

gcgttggtgc gcggtggaac gcgcccaggg accccagttc ccgcgagcag ctccgcgccg 120

cgcctgagag actaagctga aactgctgct cagctcccaa gatggtgcca cccaaattgc 180

atgtgctttt ctgcctctgc ggctgcctgg ctgtggttta tccttttgac tggcaataca 240

taaatcctgt tgcccatatg aaatcatcag catgggtcaa caaaatacaa gtactgatgg 300

ctgctgcaag ctttggccaa actaaaatcc cccggggaaa tgggccttat tccgttggtt 360

gtacagactt aatgtttgat cacactaata agggcacctt cttgcgttta tattatccat 420

cccaagataa tgatcgcctt gacacccttt ggatcccaaa taaagaatat ttttggggtc 480

ttagcaaatt tcttggaaca cactggctta tgggcaacat tttgaggtta ctctttggtt 540

caatgacaac tcctgcaaac tggaattccc ctctgaggcc tggtgaaaaa tatccacttg 600

ttgttttttc tcatggtctt ggggcattca ggacacttta ttctgctatt ggcattgacc 660

tggcatctca tgggtttata gttgctgctg tagaacacag agatagatct gcatctgcaa 720

cttactattt caaggaccaa tctgctgcag aaatagggga caagtcttgg ctctaccttа 780

gaaccctgaa acaagaggag gagacacata tacgaaatga gcaggtacgg caaagagcaa 840

aagaatgttc ccaagctctc agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga 900

atgcattaga tttaaagttt gatatggaac aactgaagga ctctattgat agggaaaaaa 960

tagcagtaat tggacattct tttggtggag caacggttat tcagactctt agtgaagatc 1020

agagattcag atgtggtatt gccctggatg catggatgtt tccactgggt gatgaagtat 1080

attccagaat tcctcagccc ctctttttta tcaactctga atatttccaa tatcctgcta 1140

atatcataaa aatgaaaaaa tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca 1200

ggggttcagt ccaccagaat tttgctgact tcacttttgc aactggcaaa ataattggac 1260

acatgctcaa attaaaggga gacatagatt caaatgtagc tattgatctt agcaacaaag 1320

cttcattagc attcttacaa aagcatttag gacttcataa agattttgat cagtgggact 1380

gcttgattga aggagatgat gagaatctta ttccagggac caacattaac acaaccaatc 1440

aacacatcat gttacagaac tcttcaggaa tagagaaata caattaggat taaaataggt 1500

ttttt 1505

<210> 2

<211> 1561

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cgcacgccac ccgcccgccg cctgccagag ctgctcggcc cgcagccagg gggacagcgg 60

ctggtcggag gctcgcagtg ctgtcggcga gaagcagtcg ggtttggagc gcttgggtcg 120

cgttggtgcg cggtggacac gagggacccc agttcccgcg agcagctccg cgccggccct 180

gagagactaa gctgaaactg ctgctcagct cccaagatgg tgccacccaa attgcatgtg 240

cttttctgcc tctgcggctg cctggctgtg gtttatcctt ttgactggca atacataaat 300

cctgttgccc atatgaaatc atcagcatgg gtcaacaaaa tacaagtact gatggctgct 360

gcaagctttg gccaaactaa aatcccccgg ggaaatgggc cttattccgt tggttgtaca 420

gacttaatgt ttgatcacac taataagggc accttcttgc gtttatatta tccatcccaa 480

gataatgatc gccttgacac cctttggatc ccaaataaag aatatttttg gggtcttagc 540

aaatttcttg gaacacactg gcttatgggc aacattttga ggttactctt tggttcaatg 600

acaactcctg caaactggaa ttcccctctg aggcctggtg aaaaatatcc acttgttgtt 660

ttttctcatg gtcttggggc attcaggaca ctttattctg ctattggcat tgacctggca 720

tctcatgggt ttatagttgc tgctgtagaa cacagagata gatctgcatc tgcaacttac 780

tatttcaagg accaatctgc tgcagaaata ggggacaagt cttggctcta ccttagaacc 840

ctgaaacaag aggaggagac acatatacga aatgagcagg tacggcaaag agcaaaagaa 900

tgttcccaag ctctcagtct gattcttgac attgatcatg gaaagccagt gaagaatgca 960

ttagatttaa agtttgatat ggaacaactg aaggactcta ttgataggga aaaaatagca 1020

gtaattggac attcttttgg tggagcaacg gttattcaga ctcttagtga agatcagaga 1080

ttcagatgtg gtattgccct ggatgcatgg atgtttccac tgggtgatga agtatattcc 1140

agaattcctc agcccctctt ttttatcaac tctgaatatt tccaatatcc tgctaatatc 1200

ataaaaatga aaaaatgcta ctcacctgat aaagaaagaa agatgattac aatcaggggt 1260

tcagtccacc agaattttgc tgacttcact tttgcaactg gcaaaataat tggacacatg 1320

ctcaaattaa agggagacat agattcaaat gcagctattg atcttagcaa caaagcttca 1380

ttagcattct tacaaaagca tttaggactt cataaagatt ttgatcagtg ggactgcttg 1440

attgaaggag atgatgagaa tcttattcca gggaccaaca ttaacacaac caatcaacac 1500

atcatgttac agaactcttc aggaatagag aaatacaatt aggattaaaa taggtttttt 1560

a 1561

<210> 3

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Val Pro Pro Lys Leu His Val Leu Phe Cys Leu Cys Gly Cys Leu
1 5 10 15

Ala Val Val Tyr Pro Phe Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His
20 25 30

Met Lys Ser Ser Ala Trp Val Asn Lys Ile Gln Val Leu Met Ala Ala
35 40 45

Ala Ser Phe Gly Gln Thr Lys Ile Pro Arg Gly Asn Gly Pro Tyr Ser
50 55 60

Val Gly Cys Thr Asp Leu Met Phe Asp His Thr Asn Lys Gly Thr Phe
65 70 75 80

Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro Ser Gln Asp Asn Asp Arg Leu Asp Thr Leu
85 90 95

Trp Ile Pro Asn Lys Glu Tyr Phe Trp Gly Leu Ser Lys Phe Leu Gly
100 105 110

Thr His Trp Leu Met Gly Asn Ile Leu Arg Leu Leu Phe Gly Ser Met
115 120 125

Thr Thr Pro Ala Asn Trp Asn Ser Pro Leu Arg Pro Gly Glu Lys Tyr
130 135 140

Pro Leu Val Val Phe Ser His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Ala Ile Gly Ile Asp Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala
165 170 175

Val Glu His Arg Asp Arg Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp
180 185 190

Gln Ser Ala Ala Glu Ile Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr
195 200 205

Leu Lys Gln Glu Glu Glu Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln

210 215 220

Arg Ala Lys Glu Cys Ser Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp
225 230 235 240
His Gly Lys Pro Val Lys Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu
245 250 255
Gln Leu Lys Asp Ser Ile Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His
260 265 270
Ser Phe Gly Gly Ala Thr Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg
275 280 285

Phe Arg Cys Gly Ile Ala Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp
290 295 300
Glu Val Tyr Ser Arg Ile Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu
305 310 315 320
Tyr Phe Gln Tyr Pro Ala Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser
325 330 335
Pro Asp Lys Glu Arg Lys Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln
340 345 350

Asn Phe Ala Asp Phe Thr Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met
355 360 365
Leu Lys Leu Lys Gly Asp Ile Asp Ser Asn Ala Ala Ile Asp Leu Ser
370 375 380
Asn Lys Ala Ser Leu Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys
385 390 395 400
Asp Phe Asp Gln Trp Asp Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu
405 410 415

Ile Pro Gly Thr Asn Ile Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln
420 425 430
Asn Ser Ser Gly Ile Glu Lys Tyr Asn
435 440

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (3)..(21)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 4

aannnnnnnn nnnnnnnnnn ntt 23

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Cys
1 5