



도 1

색인어

Jak3, 선택적 저해제

명세서

기술분야

본 발명은 야누스 티로신 키나제(Janus tyrosine kinase; Jak3)를 함유한 림프구와 림프계 기관의 그외 세포의 증식과 기능을 저해하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 림프구의 기능, 특히 면역 활성화 조절 기능을 차단하는 화학 물질을 이용한 치료 방법과 시험 방법에 관한 것이다. 또한 더 구체적으로는, 본 발명은 야누스 티로신 키나제 3으로 매개된 세포 활성화와 세포 증식을 선택적으로 파괴하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

오늘날 기관의 동종이식의 거부반응을 제거하기 위하여 사용되는 치료학적 전략의 효능은 매우 제한적인데, 이는 강력한 부작용을 발생시키는 면역억제성 약물에 의존하고 있기 때문이다. 현재 면역억제의 임상 요법은, T 세포가 세포 주기의 G1 초기 단계를 진행하는 것을 차단함으로써 T 세포 변형제로 작용하는, 세린-트레오닌 포스파타제 칼시뉴린(calcineurin; CaN) 저해제인 시클로스포린 A(cyclosporin A; CsA)과 타크롤리무스(tacrolimus; FK506)에 의해 주로 이루어지고 있다.<sup>1, 2</sup> 그런 약물과 연관된 부적절한 부작용으로는, 신독성(nephrotoxicity), 신경독성, 당뇨병, 고지질혈증(hyperlipidemia), 고혈압, 다모증(hirsutism) 및 잇몸 증식증(gingival hyperplasia)이 포함된다.<sup>3</sup> 더 새로운 약물, 라파마이신(RAPA)은 RAPA(mTOR)의 세린-트레오닌 키나제 포유류 표적물을 표적으로 하는 것으로서, 또한 점막괴양, 림프증식성 장애(lymphoproliferative disorder), 저칼륨증(hypokalemia), 저밀도 지단백질 증가, 콜레스테롤 증가 및 트리글리세라이드의 증가를 나타낼 수 있다.<sup>4</sup> 임상적으로 입증된 약물의 심각한 단점은 동종 이식의 영구적인 인수성(acceptance)이 확보되지 않으므로, 따라서 이식 환자들에게 그것을 계속적으로 투여하여야 한다는 것이다.

현재 기관의 동종이식에 대한 거부반응을 제거하기 위하여 사용되는 치료학적 전략은, T 세포 신호 경로와 그것을 구성하는 분자에 초점이 맞추어져 있다. T 세포 신호의 연속 반응(cascade)과, 그것의 면역억제 및 이식 내성 유발에 대한 잠재적 역할은 Kirken 및 Stepkowski에 의해 언급되었다.<sup>5</sup> T 세포의 완전한 활성화에는 3가지의 역치-제한적인 연속 신호가 요구된다.<sup>6</sup>

신호 1은 특이 T 세포 리셉터(TCR)가 관여하는 항원에 의해 전달되는 것으로서, 이후 B7/CD28 상호작용에 의해 전달되는 신호 2가 수반된다. TCR 진입이후 수초내에, Zap70, Lck 및 Fyn 단백질 티로신 키나제가 자가활성화되는 동안 CD3 $\zeta$  체인은 티로신(Tyr)이 인산화된다.<sup>7-9</sup> 동시에, 칼슘(Ca<sup>2+</sup>) 고정화는 CaN 포스파타제의 촉매 활성화를 유발하여-활성화된 T 세포의 핵 인자(NFAT)를 핵내로 이동시키고 인터루킨(IL)-2 유전자의 프로모터내 별도의 DNA 결합 요소에 결합하는데 필수적인 단계로서 - 활성화된 T 세포의 핵 인자(NFAT)는 탈인산화된다.<sup>10</sup> 신호 1과 2는, IL-4, -7, -9, -13, -15 및 -21과 같은 T 세포 성장 인자들(TCGFs), 사이토카인 리셉터를 통한 신호 3 전달, T 세포의 클론 증식을 유발하는데 필요한 필수 단계와 협력하여, IL-2의 합성과 분비에 매우 중요하게 작용한다.<sup>11</sup> 이런 사이토카인 리셉터들은, 각 사이토카인에 대한 고유  $\alpha$  체인과 결합되면 야누스 티로신(Tyr), Jak1 및 Jak3를 통하여 세포내 신호들을 전달하며, 신호 전달자와 전사 활성화자(Stat)1, Stat3, Stat5a/b와 Stat6를 활성화하는 공통된  $\gamma$  체인( $\gamma_c$ )을 공유하고 있다.<sup>11-18</sup>

(T 세포에서 신호 1 경로에 참여하는) CaN 효소와 (T 세포에서 신호 3 경로에 참여하는) mTOR 효소는 체내 다양한 조직 어디에서나 발견된다. 이는 T 세포 특이 표적화에 있어서 그의 저해 약물, 예컨대 CsA, FK506 및 RAPA의 효과를 심각하게 제한한다. RAPA는 오늘날 임상적으로 입증된 신호 3에 대한 효과적인 저해제일 뿐이다.<sup>24</sup> 치료학적 조절을 위한 후보 표적물로서 제공되는 다른 신호 경로의 분자들과는 달리, Jak3 발현은 제한된 조직에서 발견되는 양상을 나타내며, T 세포, B 세포, 자연 살상(NK) 세포 및 단핵구나 또는 면역 기관의 일반적인 세포내로 구획된다.

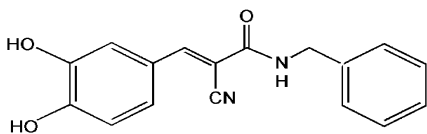
림프계 세포로의 초기 위치화로 인해, Jak3은 독특한 분자로, 그리고 다수의 면역 유래 질환을 제거하기 위한 치료학적 표적물로 확보되었다.<sup>19-21</sup> 이 효소는 거의  $\gamma_c$ 를 통해서만 조합되고 활성화되므로, 따라서 Jak3 또는  $\gamma_c$ 의 유전자 파괴는 심각한 복합성 면역결핍 질환으로 나타나게 된다.<sup>22</sup> 이런 심각한 면역 억제가 나타나는 이유는, 전술한 바와 같이 T 세포 분화와 TCGFs 계열에 의한 보충에 Jak3이 중요한 역할을 하기 때문이다. Jak3은 상기 리셉터 성분과 인접한 막과 결합하므로, 이 리셉터들로부터 발산되는 Stat와 미토젠 활성화성 단백질 키나제(Mapk)의 일련의 반응을 포함한 모든 하부 신호들은 활성화시킨다. 따라서, Jak3의 파괴로 TCGF에 의해 매개되는 모든 신호들이 순차적으로 차단되고, 이후 이러한 세포내에서의 유전자 전사를 조절하는 그것들의 능력들이 차폐되게 된다. 그러나, 이러한 독특하고 중복된 신호 경로의 저해를 통제할 수 있다면, 이 유전자가 불완전한, 환자 및 마우스에서 보이는 바와 같이 면역 활성화에 우호적인 조절을 이룰수 있다. 더욱이, 이론상 이 경로의 표적은 또한 CsA에 반응성이 없는 거부 반응에 대해 원인이 되는 활성화된 증식성 T 세포 개체군을 저해하는 것이다.<sup>21</sup>

특히 림프구에서 Jak3을 표적으로 하는 저해제를 동정하기 위한 노력들은, Jak3을 저해하는 것으로 보고된 소수의 약물들이 체내 다수 조직에서 일상적인 세포 기능에 필요한 다른 티로신 키나제들의 과잉을 또한 저해한다는 사실로 인해 저지되고 있다. 실제, 이러한 단백질 티로신 키나제들은 세포 표면 리셉터로부터 세포외 신호를 핵내로 이동시키고, 이어 림프구 이외 다른 세포에서 성장, 분화 및 기능을 조절하는데 매우 중요하다.

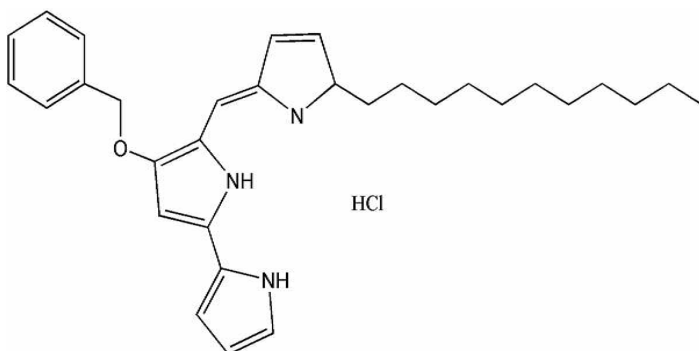
미국 특허공개공보 제 2002/0042513(Uckun et al.)에는, 인슐린 리셉터 티로신 키나제의 구조 상동성을 토대로 한 Jak3 상동성 모델을 이용하여 추산된, 이들의 도킹(docking) 친화성을 기초로 선별된 퀴나졸린계 화합물이 개시되어 있다. 일부 퀴나졸린계 화합물에서 이식 합병증, 자가면역으로 유발된 당뇨병을 치료 또는 예방할 수 있으며 또는 동종이식 생존율을 연장할 수 있는 능력들이 평가되었다.

미국 특허공개공보 제 2002/0032204(Moon et al.)에는 리셉터 티로신 키나제(RTKs), 비-리셉터 단백질 티로신 키나제(CTKs) 및 세린/트레오닌 단백질 키나제(STKs)의 촉매 활성을 매개하는 특정 3-(피롤-2-일메틸리덴)-2-인돌린은 유도체들이 개시되어 있다. 이러한 전구체 약물들은 비정상적인 단백질 키나제 활성화에 의해 매개되는 수많은 질환을 치료하는데 유용할 수 있다. 개시된 화합물들은 양한 고형암을 치유하기 위한 치료학적 접근으로서, RTK, CTK 및/또는 STK 매개성 신호 전달 경로를 매개하기 위한 것이다. 그외 매니치 염기 화합물들이 언급되어 있으며, 세포독성과 항암 특성에 대하여 평가되었다.<sup>34,35</sup> 스티릴 케톤계 화합물과 접합된 항진균성 및 항종양 특성의 일부 매니치 염기들이, 미국 특허공개공보 제 6,017,933호에 기재되어 있다.

최근, Jak3에 대해 선택성을 갖는 두가지 화합물이 동정되었다.<sup>21,24,25</sup> 그중 한가지 물질은 AG-490으로서, 티르포스틴(tyrphostin)계열의 일원으로 벤질리덴 말로노니트릴(benzylidene malononitrile) 유도체이며, 이의 구조식은 다음과 같다:



다른 물질은 PNU156804으로, 이는 독성의 모화합물 언데실프로디기오신(undecylprodigiosin)과 같은 종류의 것이며, 이의 구조식은 다음과 같다:



AG-490과 PNU156804 모두 TCGF와 Jak3 자가키나제(autokinase) 활성화에 의해 매개되는 T 세포 증식을 저해하며, 반면에 Jak3을 발현하지 못하는 무활성의 T 세포에는 한정된 작용을 한다. 이 두가지 물질이 p56Lck 또는 Zap70 티로신 키나제를 포함한, T 세포 리셉터의 활성화에 대한 연속반응의 중간체에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.<sup>23,25</sup>

AG-490 처리 연구에서, 단핵구 세포의 이식 침윤(graft infiltration of mononuclear cell; GIC)이 감소되고, 엑소 비버(*ex vivo*) IL-2의 Stat5a/b DNA 결합이 GIC을 자극하나, 리보뉴클레아제 보호 분석법으로 판단한 바에 따르면 IL2R에는 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다. 따라서, Jak3 저해는 동종이식 생존율을 연장시키고 또한 RAPA가 아닌 CsA의 면역억제성 효과를 증가시키는 것으로 결론지어졌다. 또한 AG-490은 다른 티로신 키나제 계열의 일원들, Lck, Lyn, Btk, Syk, Src, Jak1 또는 Tyk2 키나제들을 저해하지 않으며, 가장 가까운 계열의 일원인 Jak2에 영향을 미친다.<sup>24</sup> AG-490의 나쁜 부작용으로 인해, 면역억제 요법에 있어서 일반적인 임상적 사용이 불가능하다.

반면에 PNU156804는, Jak3를 사용하는 다른 성장 인자들(프로액틴)과 비교하여 IL-2에 의한 Jak3 매개성 T 세포 성장을 저해함으로써 보다 높은 특이성을 나타낸다. 키나제 분석으로, PNU156804가 Jak2에 비해 Jak3의 자가인산화를 우선적으로 저해할 뿐만 아니라 Stat5 경로와 같은 중간체 작용기 분자를 공유하는 것으로 확인되었다.<sup>25</sup> 상기 실험에서, PNU156804는 동종이식 생존율을 연장시키고, CsA와는 상승적으로, RAPA와는 부가적으로 작용하는 것으로 나타났다. 또한 PNU156804는 우선적으로 Jak3을 과쇄하여(Jak2 자가키나제 활성화에 비하여),  $\gamma_c$ -유도성 T 세포 클론 확장을 선택적으로 저해하는 것으로 확정되어 졌다. 현 모델에서는, Jak3가 mTOR의 상위 활성화자인 것으로 유지되고 있다. Jak3은 면역 세포에서 발현되므로, Jak3의 저해는 RAPA와 연관된 부작용없이 mTOR 활성화를 차단할 것이다. 더욱이 CsA( $G_0 - G_1$  전이 차단)과 PNU156804 ( $G_1 - S$  진행 차단)간의 상승작용은 일련의 활성화 신호를 차단함으로써 새로운 면역억제 전략을 제공하고, 따라서 약물 각각의 투여량을 낮추면서도 유리한 치료적 효과를 유지시킬 수 있다.<sup>25</sup> PNU156804는 그러나 인간에서 치료학적으로 이용하기에는 독성이 있는 것으로 이후 확인되었다.

현재 이용가능한 약물 일부들은 급성 거부반응을 차단하지만, 지속적인 면역 억제 없는 상태에서의 만성적인 이식 파괴 및 영구적인 동종이식 인수성(acceptance, 예 이식 내성)의 문제점들이 줄어들지 않고 남아있는 실정이다. 이러한 문제점들을 충분히 처리할 수 있는 치료학적 방법과 부작용을 방지할 수 있는 약제가 요구되고 있다. 이를 위하여, T 세포 신호 전달을 이해하고 신호 경로들에서 특정 분자를 표적화하기 위한 전략을 고안하는데, 많은 연구들이 행해지고 있다. TCGF에 의해 활성화되는 T 세포 및 B 세포의 신호 3 경로에 포함되는 고유의 분자를 선택적으로 또는 특이적으로 저해하는 약물을 개발하는 것이 당면 과제이다. 이러한 물질들은 다른 세포에 작용하지 않고 T 세포의 클론 확장을 차단할 상당한 가능성이 있다. 전술한 바와 같이, Jak3은 숙주 편대 이식 질환 및 이식 편대 숙주 질환과 같은 의도하지 않은 면역 반응을 조절하는 신호 3 경로의 고유 표적 물질이다.

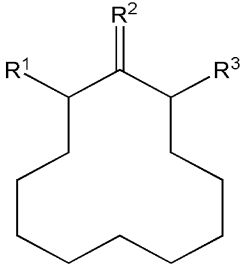
## 발명의 상세한 설명

### 개요

본 발명은 야누스 티로신 키나제3(Jak3)을 발현하는 모든 종류의, 바람직하기로는 T 세포, B 세포, 자연 살상세포, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포(dendritic cell)를 포함한 림프계 기관 또는 골수 기관의 세포("림프구 또는 골수 세포")의 기능 및/또는 증식을 파괴하거나 또는 저해할 수 있는 새로운 방법을 제공함으로써 종래에 문제점들을 극복하고자 한다. 따라서, 본 발명의 특정 양태로서, 림프구의 기능 및/또는 증식 파괴 또는 저해는, 상기 세포에 특정 화합물 바람직하기로는 매니치 염기 화합물의 처리에 의해 수반됨으로써, 치료학적 면역억제가 달성된다. 본 발명의 특정 양태로서, 생체내 및 생체의 치료 및 처리 방법은 우선적으로 Jak3를 파괴하나 그의 광범위하게 퍼져있는 단백질 티로신 키나제에는 실질적으로 영향을 미치지 않는 면역억제성 물질로 작용할 수 있는 것으로 공지되지 않았거나 또는 인식되지 않았던, 특정 매니치 염기 화합물 또는 다른 화합물의 이용을 제공한다. 치료학적으로 이용하는 경우, 이러한 물질들은 또한 전체적으로 또는 일 특정 범위 이상으로 오늘날 사용되는 상용 면역억제제와 관련된 심각한 부작용을 회피할 수 있다. 이러한 방법들은 그의 Jak3을 발현하는 림프계 또는 골수 기관의 세포에서의 Jak3 의존적 질병 뿐만 아니라, 기관 이식의 거부반응을 완화시키고, 자가면역 질환, 기도 과민성(예, 천식), 알레르기 경감을 촉진시키고, Jak3 의존성 백혈병 및 림프종의 증식을 억제시키는데 임상적으로 유용할 것으로 예상된다.

따라서, 본 발명의 일부 양태에 있어서, T 림프구, 단핵구 또는 수지상 세포와 같이 Jak3을 포함하거나 발현하는 림프구 세포 또는 골수 세포에서, 림프구 세포 또는 골수 세포의 증식 및/또는 활성을 저해하는 생체의 방법을 제공한다. 상기 방법은 Jak3을 선택적으로 저해할 수 있는 화합물의 존재하에 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 양태에 있어서, 화합물은 화학식 1로 표시된다.

(화학식 1)

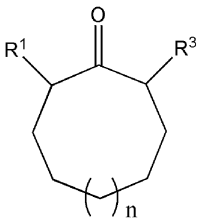


상기 화학식 1에서,

$R^1$ 은 H,  $=CH_2$ ,  $CH_2N(CH_3)_2$ ,  $CH_2SC(O)CH_3$ ,  $CH_2SC_6H_5$ ,  $CH_2SCH_2-(4-C_6H_4OCH_3)$ ,  $CH_2SC(O)C_6H_5$  또는  $CH_2N(CH_2CH_3)_2$ 이고;  $R^2$ 는 O이고; 및  $R^3$ 는  $CH_2N(CH_3)_2$ ,  $CH_2N(CH_2CH_3)_2$  및  $CH_2-(N-모르필)$ 이다. 바람직한 양태로서, 상기 화합물은 화학식 1에서  $R^1$  및  $R^3$ 이 각각  $CH_2N(CH_3)_2$ 인 649641P(NC1153)이다. 다른 바람직한 양태로서, 649641P(NC1153)의 메조(meso) 입체이성체인 WP938이다.

일 특정 양태에 있어서, 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 그것의 염화합물 1종 이상을 Jak3의 활성을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 Jak3을 발현하는 림프구 또는 골수 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는, 림프구 또는 골수 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법을 제공한다.

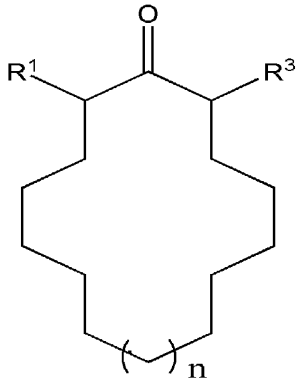
(화학식 2)



상기 화학식 2에서, n은 1, 2, 3, 4 또는 6이고;  $R^1$ 은 H,  $=CH_2$ , 또는  $CH_2N(CH_3)_2$ 이고; 및  $R^3$ 은  $CH_2N(CH_3)_2$ 이다.

일 특정 양태에 있어서, 화학식 3으로 표시되는 화합물 또는 그것의 염화합물 1종 이상을 Jak3의 활성을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 Jak3을 발현하는 림프구 또는 골수 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는, 림프구 또는 골수 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법을 제공한다.

(화학식 3)



상기 화학식 3에서, n은 1 또는 2이고; R<sup>1</sup>은 H 또는 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이고; R<sup>3</sup>은 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이다.

전술한 바와 같이 림프구 또는 골수 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법에 대한 일부 양태로서, 상기 림프구 세포는 활성화된 T 세포이고, 상기 방법은 신호 3 경로가 간섭되어 상기 세포 분열이 차단되는 것을 포함한다. 일 양태에 있어서, 상기 림프구 세포는 야누스 티로신 키나제 3을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 상기 화합물과 접촉되며, 그외 다른 단백질 티로신 키나제의 활성은 실질적으로 저해되지 않는다. 일부 양태에 있어서, 키나제 분석시 T 세포와 같은 림프구 집단에서 Jak3 활성은 Jak2보다 적어도 50 배이상 높게 저해된다. 일부 양태에 있어서, 상기 방법은 IL2에 의해 활성화된 Jak3와 Stat5a/b를 저해하기에 충분한 농도에서, 프롤액틴(PRL)에 의한 Jak2와 Stat5a/b 활성화를 저해할 수 없거나 거의 저해할수 없는 1종 이상의 화합물을 선별하는 단계를 포함한다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 치료용 면역억제제로 유용한 물질을 동정하는 생체의 시험 방법을 제공한다. 이런 방법은 (a) 세포 배양 배지에서 무활성의 Jak3 의존적 T 림프구 집단을 수득하는 단계; (b) 선택적으로, 상기 무활성의 T 림프구가 증식되도록 자극하기 위하여, 사이토카인으로 전처리하는 단계; (c) 단계 (a) 및 (b)의 무활성의 림프구 또는 자극화된 림프구를 전술한 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 화합물 또는 그것의 염 화합물로 처리하는 단계; (d) 단계 (c)의 림프구를 세포 증식이 촉진되는 조건하에서 배양하는 단계; (e) 단계 (d) 이후 세포 증식 정도를 평가하는 단계; (f) 선택적으로, 상기 화합물의 Jak2 의존적 T 림프구의 증식에 대한 저해 효과를 평가하는 단계; (g) 선택적으로, 상기 화합물의 세포 독성을 평가하는 단계; (h) 단계 (e), (f) 및 (g)의 평가로부터, 세포독성에 기인하지 않는 Jak3 의존적 림프구 또는 다른 Jak3 발현성 세포류의 증식이 현저히 저해되는 경우, 상기 화합물이 생체내 T 세포 매개성 면역억제제 또는 T 세포 증식 저해제로서 생체내 치료학적 용도를 갖는 후보 약물로 가능성이 있음을 제시하는 것으로 결정하는 단계; (i) 선택적으로, 단계 (e)과 (f)의 평가를 비교하여, 단계 (f)에서 평가된 저해 효과가 단계 (e)에서 평가된 저해 효과에 비하여 현저히 낮은 경우 상기 비교로부터 상기 화합물이 Jak3 활성을 저해하는데 있어 어느 정도 이상으로 선택적인지 Jak2 활성 저해와 비교하여 결정하는 단계를 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 있어서, 포유류의 투여대상에 세포의 부적합한 기능을 억제하는 생체내 방법을 제공하며, 상기 세포는 Jak3을 포함한다. 상기 방법은 전술한 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 1종 이상의 화합물, 그것의 대사산물 또는 그것의 유도체를, 세포에서 신호 3 경로를 간섭하는 유효량으로 세포에 접촉시켜 세포 기능을 저해하는 단계를 포함한다. 상기 접촉은 이러한 1종 이상의 화합물, 활성 대사산물과 같은 화합물의 성숙형, 또는 투여대상의 체내에서 상기 화합물로 전환시킬 수 있는 상기 화합물의 전구체, 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염 화합물을, 약학적으로 허용가능한 담체내로 함유하는 약학적 조성물을, 치료학적으로 유효한 함량으로 투여대상에 투여하여 Jak3 의존적 세포 기능을 저해하는 것을 포함한다. 상기 투여는 연속적으로 또는 주기적으로 수행될 수도 있다. 일 양태에서, Jak3- 함유 세포는 T 세포이고, 약학적 조성물의 투여 함량은 T 세포에서 세포 분열을 효과적으로 차단하는 정도이다. 바람직한 일특정 양태에서, 화합물, 그것의 대사산물, 유도체 또는 전구체의 신독성은 시클로스포린 A보다 낮다.

본 발명의 특정 양태에 있어서, 부적합한 면역 반응을 억제하기 위하여 포유류의 투여대상을 치료학적으로 처리하는 방법을 제공하며, 상기 투여대상은 부적합한 면역 반응이 있거나 경험할 위험이 있는 것이다. 이 방법은 포유류 투여대상에 부적합한 림프구 기능을 억제하는 전술한 방법을 수행하는 단계를 포함하며, 상기 약학적 조성물의 치료학적 유효량은 부적합한 면역 반응을 경감 또는 예방하는 정도이다. 특정 양태에서, 상기 방법은 또한 Jak3 저해제 이외의 면역억제성 물질, 예컨대 시클로스포린 A 또는 FK506을 치료학적 유효량으로 상기 투여대상에 투여하는 단계를 포함한다. 이는 신호 1 경로를 통하여 T 세포 활성화를 차단함으로써 T 세포 기능을 저해하는 장점과 또한 신호 3 경로의 간섭을 통하여 활성화된 T 세포의 세포 분열을 차단하는 장점을 제공한다.

본 발명의 특정 양태에 있어서, 이식된 기관에 대한 T 세포 매개성 면역반응을 억제하여 상기 기관에 대한 거부반응을 완화 또는 저지하기에 효과적인, 상술한 포유류의 투여대상에서 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 단계를 포함하는, 포유류 이식 수용체에서 기관 이식 거부반응을 완화하는 방법을 제공한다.

본 발명의 특정 양태에 있어서, T 세포 매개성 항-동종이식 면역반응을 억제하여 급성 거부반응을 완화 또는 방지하기에 효과적인, 상술한 포유류의 투여대상에서 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 단계를 포함하는, 포유류의 동종이식 수용체에서 급성 동종이식 거부반응을 완화하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, Jak3 저해제 조성을 연속적으로 또는 주기적으로 투여하는 것을 포함하는 만성 동종이식 거부반응의 예방 방법을 제공한다.

본 발명의 특정 양태에 있어서, 포유류 이식 수용체에서 이식 내성을 유도하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 T 세포 매개성 이식 거부반응을 억제하기에 효과적인, 상술한 포유류 투여대상체에 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 것을 포함한다.

본 발명의 특정 양태에 있어서, 자가면역질환의 포유류 투여대상에서 상기 질환의 경감을 촉진하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 투여대상에서 T 세포 매개성 자가면역 반응을 억제하여 내인성 Jak3 의존적 T 세포에 의해 매개되는 투여대상자 자가 조직에 대한 자가면역 공격을 소거 또는 저지하기에 효과적인, 상술한 포유류 투여대상에서 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 것을 포함한다.

본 발명의 특정 양태에 있어서, 알레르기가 있는 포유류 투여대상자에서 기도의 과민성을 완화하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 투여대상체에서 T 세포 매개성 과민 반응을 억제하여 기도 조직의 과민성을 소거 또는 저지하기에 효과적인, 상술한 포유류 투여대상에서 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 것을 포함한다.

본 발명의 일부 양태에 있어서, T 세포 매개성 과민 반응을 억제하여 기도 조직의 과민성을 소거 또는 저지하기에 효과적인, 상술한 포유류 투여대상에서 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 것을 포함하는, 알레르기가 있는 포유류 투여대상에서 기도의 과민성을 완화하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 상술한 백혈병 또는 림프종의 포유류 투여대상에서 부적합한 림프구 기능을 억제하는 방법을 수행하는 것을 포함하는, Jak3 의존적 백혈병 또는 림프종의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 바람직한 양태에 있어서, 상기 화합물, 그것의 대사산물 또는 그것의 유도체는 다른 키나제(예, Jak2) 활성 저해에 비하여 Jak3 활성을 선택적으로 또는 특이적으로 억제할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 함량은 백혈병 또는 림프종 세포의 증식을 저해 또는 차단하는데 효과적인 정도이다..

본 발명의 추가적인 양태에서, T 세포 매개성 면역 반응과 관련된 생물학적 과정을 설명하거나 또는 신규한 면역억제성 약물을 동정하는데 유용한, 생체의 방법을 제공한다. 일부 양태에 있어서, (a) Jak3을 포함하는 T 세포에 다양한 농도 범위의 검사대상 화합물을 접촉시켜 상기 화합물이 상기 범위내 한가지 이상의 농도에서 Jak3 활성을 저해하는지 여부를 결정함으로써, T 세포 기능 파괴에 대한 검사대상 화합물의 활성을 시험하는 단계; (b) 상기 검사대상 화합물의 Jak3 저해활성을 Jak3 저해 활성이 입증된 화학식 1, 2 또는 3의 화합물, 바람직하기로는 649641P(NC1153)과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 시험 결과 및 비교 결과를 활용하여 상기 검사대상 화합물이 치료용 면역억제성 물질로서 생체내에서 이용가능한 후보 약물인지 결정하는 단계를 포함하는, 신규한 면역억제성 약물을 동정하는 생체의 방법을 제공한다. 일부 양태에 있어서, 상기 방법은 (d) 1종 이상의 다른 키나제(예, Jak2)의 저해 활성에 대하여 검사대상 화합물을 실험하는 단계; (e) 상기 검사대상 화합물의 Jak3 저해 활성을 1종 이상의 다른 키나제의 저해 활성과 비교하는 단계; 및 (f) 상기 비교 결과를 이용하여 상기 검사대상 화합물을 선택적 Jak3 저해제로 동정하는 단계를 더 포함한다.

본 발명의 다른 양태에서, 특정 Jak3 선택적 또는 특이적 저해제를 이용한 생체내 시험 방법을 제공한다. 이러한 방법은 동물 모델에서 T 세포 매개성 면역 반응을 연구하는데 유용할 것이며, 649641P(NC1153), WP938 및 도 14B 내지 39B 에 기재된 그의 화합물들은 Jak3 특이 저해제에 대한 후보물질의 활성을 비교하는데 표준물질로 제공될 수 있다. 동종이식 생존율에 대한 면역억제성 후보 약물의 효용을 시험하는 생체내 방법은, (a) 적합한 공여체 동물로부터 적출한 동종이식물을 적합한 수용체 동물로 이식하는 단계; (b) 동물에 대한 기본적인 영양과 건강한 상태를 조성하는 조건을 유지시키는 단계; (c) 하나 이상의 동물 각각에 후보 약물을 투여하여 처리된 공여체 또는 그룹을 제공하는 단계; (d) 하나 이상의 동물에 청구항 1항에 기재된 화합물을 투여하여 양성 대조군으로 제공하는 단계로서, 상기 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>은 각각 CN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이고 R<sup>2</sup>는 O인 단계; (e) 선택적으로, 미처리된 수용체 동물 하나 이상을 두어 이를 미처리된 대조군 수용체 또는 대조군으로 제공하는 단계; (f) 각 수용체에서 각각의 동종이식에 대한 동종이식 생존 시간을 측정하는 단계; (g) 각 동물이식에 대한 조직학

적 실험을 수행하여 각 동종 이식에서 후보 약물과 관련된 구조적 변화를 조사하는 단계; (h) 각 동종이식에서 동종이식 생존 시간과 조직학적 구조 변화를 유도하는 후보 약물을 비교하는 단계; 및 (i) 단계 (h)의 비교를 이용하여, 이식체의 생존 시간 증강과 미처리 대조 수용체(들)의 동종이식체(들) 또는 양성 대조 수용체(들)의 동종이식체(들)에 비교하여 약물 처리된 동종이식체에서의 약물 유도성 구조적 손상 결핍을, 상기 후보 약물이 면역억제성 물질로 생체내 치료학적으로 사용되는 것이 효과적임을 나타내는 것으로 판단하는 단계를 포함한다. 일부 양태에 있어서, 상기 방법은 또한 상기 후보 약물이 생체외에서 Jak3 의존적 T 세포 증식을 선택적으로 저해할 수 있음을 판단하는 단계를 포함한다.

다른 실시예에 있어서, 생체내 면역억제 가능성이 있는 후보 약물을 평가하는 생체내 방법을 제공한다. 상기 후보 약물은 Jak3 의존적 T 세포의 세포외 증식을 선택적으로 저해할 수 있는 것으로 처음 동정되는 것이 바람직하다. 상기 방법은 (a) 적합한 공여체 동물로부터 적절한 동종이식체를 적절한 수용체 동물로 이식하는 단계; (b) 동물에 대한 기본적인 영양과 건강한 상태를 조성하는 조건을 유지시키는 단계; (c) 하나 이상의 동물 각각에 후보 약물을 투여하여 처리된 공여체 또는 그룹을 제공하는 단계; (d) 하나 이상의 동물에 649641P(NC1153)을 투여하여 표준 수용체 또는 그룹으로 제공하는 단계; (e) 바람직하기로, 미처리된 수용체 동물 하나 이상을 두어 이를 미처리된 대조군 수용체 또는 대조군으로 제공하는 단계; (f) 각 수용체에서 각각의 동종이식에 대한 동종이식 생존 시간을 측정하는 단계; (g) 각 동종이식에 대한 조직학적 실험을 수행하여 각 동종 이식에서 후보 약물 관련 구조적 변화를 조사하는 단계; (h) 각 동종이식에서 동종이식 생존 시간과 조직학적 구조 변화를 유도하는 후보 약물을 비교하는 단계; 및 (i) 단계 (h)의 비교를 이용하여, 이식체의 생존 시간 증강과 미처리 대조 수용체(들)의 동종이식체(들) 또는 양성 대조 수용체(들)의 동종이식체(들)에 비해 약물 처리된 동종이식체에서의 약물 유도성 구조적 손상 결핍을, 상기 후보 약물이 면역억제성 물질로 생체내 치료학적으로 사용되는 것이 효과적임을 나타내는 것으로 판단하는 단계를 포함한다. 본 발명의 이들 및 그의 양태들, 구성 및 효과는 아래 기재 및 도면에 참조로 명백하게 명시될 것이다.

## 상세한 설명

본원의 연구에서, 생화학적 중간체-야누스 티로신 키나제 3(Jak3) 효소-가 성숙 T 세포의 활성화, 기능 및 동종이식 거부반응에 중요함을 확인하였다. 본원에서 동정된 특정 화합물들은, 특히 매니치 염기(Mannich base)로 분류되는 화합물은 Jak3을 선택적으로 저해하는 것으로서, CsA, FK506, 및 RAPA와 같은 기존의 면역억제성 약물들을 능가하는 치료학적 효과를 제공할 수도 있다. 진술한 종래기술에서 설명한 바와 같이, RAPA는 mTOR를 저해하나 반면에 CsA와 FK506는 CaN를 차단하고, 이런 두가지 표적 분자 모두 어디에서나 발현되는 양상을 나타내어, 잠재적 독성 부작용을 초래한다. 이와는 대조적으로 Jak3 발현은 T 림프구와 B 림프구를 포함한 림프계 구획에만 한정되어 있다.

우선적으로, TCGF 의존적 경로의 전 계열을 저해하는 Jak3 길항제(antagonist)를 동정하고 특성화하기 위한 일련의 시험들을 실시하였다. 매니치 염기 그룹 또는 그의 화합물들은 다양한 농도 범위에서 선택적 Jak3 저해 활성화에 대해 스크리닝 하였다. 프롤액틴(PRL)에 의해 자극되는 즉 Jak2-의존적 T 세포 증식에 비하여 IL-2에 의해 자극되는(즉, Jak3-의존적) T 세포 증식을 선택적으로 저해하는 것으로 측정된 것들은, 구조적 유사성 있는 화합물들과 함께, 도 14B - 39B에 이들의 구조식을 나타내었다. 각 화합물의 저해 활성화는 도 14A-39A에 나타내었다. 도 22A는 도 21A와 유사한 분석결과를 보이나, 도 21B와 동일 화합물과의 순도에 있어서 약간의 차이가 있다. 매니치 염기와 더불어, 구조적으로 유사한 화합물들(도 25B 및 26B)도 시험하였다. 실시예에서 명시된 바를 제외하곤는 후술되는 재료들 및 일반적인 방법들을 이용하였다. 본원에서 NCI 약물 데이터베이스 번호 NC1153으로 언급된 대표적인 화합물 649641P과 도 18B에 도시된 메조 입체 이성체(WP938로 표시함)는 생체외에서 동일한 선택적 Jak3 저해를 나타내는 것으로서, 단독으로 또는 CsA 병용시 약물 에 의한 독성 뿐만 아니라 동종이식 생존 연장에 대한 능력을 추가적으로 실험하였다.

## 일반적인 방법 및 재료

**세포 배양 및 처리.** 피터 굿트 박사(밴쿠버, 캐나다)에 의해 처음 발생시킨 랫 T 세포주 Nb2-11c는, 10% 우태아혈청(Intergen, cat. no. 1020-90), 2 mM L-글루타민, 5 mM HEPES, pH 7.3, 및 페니실린-스트렙토마이신(각각 50 IU/ml 및 50 mg/ml)가 함유된 RPMI-1640에서 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 생육한다. 등질원심분리(isocentrifugation, Ficoll<sup>®</sup>; EM Science, Gibbstown, NJ)로 분리한 정상적인 인간 T 림프구의 신선한 외식편은, 공지된 바와 같이 72시간동안 피토헤마글루티닌(PHA)-활성화되었다.<sup>23</sup> T 림프구는 사이토카인에 노출전에 세척하고 1% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배지에서 24시간 배양하여 무활성으로 만들었다. 이후 세포에 도면 설명에서 언급한 바와 같이 다양한 농도의 649641P(NC1153)를 처리하였다. 매니치 염기 649641P(NC1153)는 캐나다 사스켓츄완 사스카톤 사스켓츄완 대학교 약

학과 조나단 딘목 박사로부터 관대하게도 제공받았다. 모든 세포는 1 nM의 재조합 인간 IL-2(Hoffman-LaRoche, Basel, Switzerland), IL4 또는 IL7(PeproTech), 또는 국립 당뇨병, 소화성 및 신장 질환 연구원(베데스다, MD)의 호르몬 및 뇌하수체 프로그램으로부터 제공받은 양의 프롤액틴(PRL)으로 37°C에서 자극시켰다. 세포 펠렛은 -70°C에서 동결하였다.

**중식 분석.** 무활성의 인간 원시 T 세포(primary T-cell), YT 또는 랫의 Nb2-11c T 세포( $5.0 \times 10^4$ /well)는 편평한 바닥의 96웰 마이크로타이타 플레이트에 1 nM IL-2, -4, -7 (PeproTech, Rock Hill, NJ), 또는 PRL가 있거나 없는 조건에서 200  $\mu$ l의 배지에 접종하였다. 이후 세포에 16시간동안 매니치 염기를 처리하고, 이후 4시간동안 [ $^3$ H]-티미딘(0.5  $\mu$ Ci/200  $\mu$ l)을 처리한 다음 유리섬유 필터상에 세포를 포획하였다. [ $^3$ H]-티미딘 혼성(incorporation)을 공지된 바와 같이 액체 신틸레이션 계수기나<sup>23</sup> 또는 공지된 표준 방법으로 분석하였다.

**막 단백질의 가용화, 면역침전 및 웨스턴 블롯 분석.** 동결한 세포 펠렛은 기준에 기술된 바와 같이<sup>16</sup>, 얼음위에서 녹이고 1% TX-100 라이시스 완충액( $10^8$  cells/ml)에 용해시킨 후 원심분리하여 맑게하였다. 인간의 T 세포의 경우, Jak3의 COOH 말단(amino acid [a.a.] 1104-1124), 인간 Stat5a (a.a. 775-794)의 카르복시 말단 또는 인간 Stat5b (a.a. 777-787)의 카르복시 말단으로부터 유래된 펩타이드에 대한 다클론성 토끼 항혈청 5  $\mu$ l/ml과 함께 상층액을 상하 회전하면서 2시간동안 4°C에 방치하였다.<sup>26</sup> Ab와 면역침전된 단백질은 단백질A-세파로스 비드(Pharmacia, Piscataway, NJ)로 30분간 반응시켜 포획하였고, 정제를 위해 침전시킨 후 2X SDS-샘플 완충액(0.125 M Tris pH 6.8내에 20% 글리세롤, 10% 2-머캅타에탄올, 4.6% SDS, 0.004% 브로모페놀 블루)에서 4분간 끓여 용출시켰다. phosphoMapk 분석으로, 총 세포 라이세이트 25  $\mu$ g을 SDS-샘플 완충액에 용해시키고, 환원 조건의 10%(다른 모든 것들은 7.5%으로) SDS-PAGE로 분리하였다. 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Immobilon ; cat. no. 1PVH 00010, Millipore, Bedford, MA)로 이동시켰다.<sup>27</sup> 쥐과 동물의 항-포스포티로신(anti-phosphotyrosine) 단일클론성 항체(mAbs; UBI; 4G10; cat. no. 05-321, Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) 또는 포스포 p44/42 Mapk(New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, Cat no. 9101)중 어느 한가지로 웨스턴 블롯을 실시하였다. 블롯들은 상기 항체들과 웨스턴하고, 토끼 항포스포-Erk1/2 또는 단일클론성 pan-Erk(Pharmingen, San Diego, CA, Cat no. E17120)는 블롯팅 완충액에 1:1000로 희석하여 사용하거나,<sup>27</sup> 또는 공지된 표준 방법을 사용하였다. 토끼 항포스포-티로신(aPY)으로 블롯들은 웨스턴하고, 단일클론성 마우스 항--Fyn 또는 항-Lck 항체(BD Biosciences, San Diego, CA, Cat no. 610163 [Fyn] and 610097 [Lck])는 기준에 기술된 바와 같이<sup>27</sup> 블롯팅 완충액에 1:1000로 희석하였다.

**랫 신장 이식.** Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN)로부터 받은 수컷 성체 ACI(RT1<sup>a</sup>) 랫과 루이스(LEW; RT1<sup>b</sup>) 랫(160-200 g)은 동물복지위원회의 지침서에 따라 관리하였다. 랫들은 빛과 온도가 통제되는 사면체에 수용하였고, 음식과 물을 선택적으로 공급하였다. 신장은 오노와 린드세이<sup>28</sup>의 표준 초미세외과 기법을 이용하여 LEW 공여체로부터 ACI 수용체로 이형(heterotopically) 이식하였다. 면역억제성 약물을 평가하기 위하여, 이식 수용체에 매일 정맥 주사(i.v.) 또는 경구 위관 영양법(p.o.)으로 매니치 염기 화합물을 단독으로 또는 CsA와 병용 처리하거나 또는 RAPA를 경구 위관 영양법으로 매일 투여 처리하였다. 수용체의 대조군은 미처리하였다. 일부 수용체에는 CsA 또는 RAPA를 단독으로 처리하였다. 이식 생존 시간은 신장 이식을 유지하는 동물의 생존 수명으로 정의하였다. 그 결과, 평균 생존 시간(MST)  $\pm$  표준편차(SD)는 제한의 생존 시간에 의한 통계학적 유의성으로 평가하였다. 또한 매니치 염기와 CsA 또는 RAPA간의 상호작용을 중간 효과 분석<sup>29,30</sup>으로 평가하였다. 컴퓨터 소프트웨어로 병용지수(combination index)(CI)를 계산하였다: CI<1는 상승효과를 나타내고, CI>1는 길항적 작용을 나타내고, 또는 CI=1는 부가적인 상호작용을 나타낸다.<sup>30</sup>

**조직병리학적 평가.** LEW(RT1<sup>b</sup>) 동종이식 신장의 ACI(RT1<sup>a</sup>) 수용체는 하기 실험예에서와 같이 처리하였다. 이식 7일 후, 신장 동종이식은 보우인의 고정화제(Poly Scientific R&D Corp., Bay Shore, NY)에 두었다. 각 신장은 1회 가로로 절단후 이어 3회 연속 절개로 이루어지는 슬라이드 제조에 사용되는 동일한 방식으로 단편화하였다. 이후, 3회 더 연속 슬라이스하여 다른 절개를 만든 후 슬라이드를 제조하였다. 각 신장마다 12개의 슬라이드를 헤마톡실린-에오신(H&E)으로 기준에 공지된 바에 따라<sup>31</sup> 염색하거나 또는 공지의 표준 기법으로 염색하였다. 거부 정도는 심장 및 폐 이식 공동체에서 확인한 표준법<sup>32</sup>에 따라 등급을 매겼다. 특히, 신장은 10% 포르말린으로 고정화시키고 하룻방동안 처리하였다; 3- $\mu$  조직학적 단편들은 연속적인 헤마톡실린-에오신(H&E) 반응시약으로 염색하였다. 두명의 병리학자를 통하여 광학 현미경 기준의 반정량적(semi-quantitative) 스케일을 이용하여 혈관병증(vasculopathy), 사구체 변화 및 뇨세관사이질 손상을 다수의 신장 단편들에서 조사하였다. 뇨세관과 가수체 변화는 0 = 변화없음; 1+ = <5%; 2+ = 5-25%; 3+ = 26-50%; 및 4+ = >50% 관여(involve)로 각각 등급화하였다. 유사한 혈관 계수는 0 = 없음; 1+ = 최소; 2+ = 가변음; 3+ = 보통; 및 4+ = 심각에 해당된다.

**EMSA. 젤 이동성 변동 분석.** 약물 또는 비히클 대조군(DMSO)으로 처리된 세포는 원심분리(20,000  $\times$ g, 1분간 4 °C)로 펠렛화한 다음, 5배 부피배의 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 100 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml 아플로티닌, 1  $\mu$ g/ml 펩스테틴 A 및 2  $\mu$ g/ml 루펩틴(leupeptin)로 세척하고, 원심분리한 후, 1% NP-40가 함유된 상기 동일 완충액으로 라이시스하여 20분간 얼음위에 방치하였다. 핵을 함유한 펠렛은 동일 부피의 저염 완충액(10 mM HEPES, 25% 글리세롤, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA 및 프로테아제 저해제)과 고염 완충액(800 mM KCl을 함유하는 저염 완충액)에 재현탁하였다. 이 분획은 4 °C에서 10분간 원심분리하고, 상층액은 핵 단백질 추출물로 확보하여 0°C에 보관하였다. 젤 이동성 변동 분석으로,  $\beta$ -카세인 유전자의 프로모터에 대응하거나(5'-AGATTTCTAGGAATTCATCC-3') 또는 NF- $\kappa$ B 결합 요소에 대응하는(5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3') Stat5 DNA 결합 서열을 이용하여 Stat5a/b DNA 결합 활성을 검출하였다. 두 프로브 모두 말단이 [<sup>32</sup>P]dATP로 표지된 것이다. 표지된 올리고뉴클레오타이드는 결합 각테일(50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50% glycerol) 15  $\mu$ l내의 핵 추출 단백질 5  $\mu$ g과 함께 4°C에서 2시간 방치하였다. 거대변동 분석(supershift assay)으로, 도면 설명에서 언급한 바와 같이, 핵 추출물은 정상적인 토기 혈청 또는 Stat5a, Stat5b 또는 p50/p65 NF $\kappa$ B(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA; Cat no. sc-1190X 및 sc-372X, 각각) 중 어느 하나의 1  $\mu$ g과 1시간동안 4 °C에서 전반응시킨 후, 15분간 상온에서 [<sup>32</sup>P]-표지된 DNA 올리고뉴클레오타이드와 반응시켰다. DNA-단백질 복합체는 0.25X TBE를 함유한 5% 폴리아크릴아미드 겔상에 100 V에서 1시간동안 0.25 x TBE 완충액으로 전개하여 분리하였다. 샘플을 주입하고, 겔은 상온에서 약 2시간 150 V로 전개한 다음 진공하에서 열처리하여 건조한 후 X-레이 필름(X-Omat, Kodak)에 -70°C에서 감광하였다.

**매니치 염기 및 다른 화합물.** 초기에 사용한 화합물 649641P(NC1153)은 캐나다 사스캐추완 사스카툰 사스캐추완 대학교 약학과 조나단 딘목 박사로부터 제공받았다. 649641P(NC1153)와 도 14B-39B의 화합물을 포함한 다른 화합물들은, 텍사스 호우스턴 텍사스시스템 대학교 앤더슨 암 센터의 발데마르 브리에베 박사에게 의해 제조되었다. 본원의 화합물들은 상업적으로 구입가능한 출발 물질과 Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, Wis.)와 Sigma (St. Louis, Mo.)와 같은 제공사로부터 구입가능한 시약을 이용하여 적절한 방식을 통하여 제조될 수 있다. Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Volumes 1-5 and Supplementals (Elsevier Science Publishers, 1989); Organic Reactions, Volumes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991), March's Advanced Organic Chemistry, (John Wiley and Sons, 4th Edition) 및 Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989)에 기재된 바와 같이, 표준적인 화학 합성 기법과 과정들이 사용될 수 있다. 화합물 합성에 대한 추가적인 지침은 정기적인 문헌들, 예컨대 the publications of Dimmock<sup>34, 35</sup>와 하기로부터 확인될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

도 1A는 1 nM 인간 IL-2(■), IL-4(●) 또는 IL-7(▲)의 존재 또는 무존재하에 배양하고 미처리 대조군으로 표준화한, yc/Jak3 의존적 PHA-활성화된 인간 T 세포 증식에서 649641P(NC1153)의 투여량 의존적 영향을 나타낸 그래프이다.

도 1B는 Jak2 활성화자(PRL[o]) 또는 Jak3 활성화자(IL-2[■])의 존재하에 배양하였을 때, Jak3 의존적 랫 T 세포 증식에서 649641P(NC1153)의 Jak2에 대한 저해 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2A 내지 2C는 인산화에 있어서 649641P(NC1153)에 의한 저해 또는 무저해를 나타낸 웨스턴 블롯이다. 도 2A는 인간 YT 세포에서 IL-2 활성화성 Jak3 티로신 인산화를 나타낸 것이다. 도 2B는 인간 YT 세포에서 IL-2 활성화성 Stat5a 티로신 인산화에 대한 649641P(NC1153)의 효과를 나타낸 것이다. 도 2C는 인간 YT 세포에서 IL-2 활성화성 Stat5b 티로신 인산화에 대한 649641P(NC1153)의 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 PHA 활성화된 T 세포에서 IL-2 활성화된 p44/42 ERK1/2 인산화에 대한 649641P(NC1153) 효과를 나타낸 웨스턴 블롯이다.

도 4는 YT 세포에서 활성화된 Fyn과 Lck에 대한 649641P(NC1153)의 효과없음을 나타낸 웨스턴 블롯이다.

도 5는 CsA 및 649641P(NC1153)의 루이스 대 AC1 수용체 랫 심장 동종이식체간의 생존율 범위에 대한 병용지수를 나타낸 그래프이다.

도 6A 내지 E는 랫의 신장 구조에 대한 649461P(NC1153), RAPA 및 CsA의 영향을 나타낸 현미경사진(200x 배율)이다. 도 6A는 649461P(NC1153)이다. 도 6B는 RAPA이다. 도 6C는 CsA이다. 도 6D는 CsA와 RAPA(시롤리무스 또는 SRL)의 병용 효과를 나타낸 것이다. 도 6E는 CsA와 649641P(NC1153)의 병용 효과를 나타낸 것이다.

도 7A-D는 649641P(NC1153)가 Jak3 함유성 T 세포의 성장을 특이적으로 저해함을 나타낸 그래프이다. 도 7A는 PHA-활성화된 인간 T 세포의 증식이 이후 IL-2로 자극화되는 NCI 물질에 의해 차단됨을 나타낸 막대 그래프이다. 도 7B는 하룻밤 동안 50  $\mu$ M NCI153(라이트 주)로 또는 (헤비 주)로 처리되지 않았으며 IL-2R- $\alpha$ , - $\beta$  및 - $\gamma$  체인을 염색한 PHA 활성화된 T 세포 모세포의 FACS 분석이다. 도 7C는 비-Jak3 발현 Jurkat 세포(◆)과 Jak3 함유 PHA 활성화된 T 세포(□)에서 NCI153 농도에 대한 세포 성장 저해 그래프이다. 도 7D는 Jak3와 공통의 감마 체인을 활용하는 사이토카인에 의해 자극화된 T 세포에서 NCI153에 대한 세포 성장 저해를 나타낸 그래프이다.

도 8은 Jak3 자가키나제 활성이 생체의 분석을 통해 649641P(NC1153)에 의해 직접적으로 차단됨을 보이는 막대 그래프이다. 면역정제된 Jak3의 자가키나제 활성을 분석하였고, 100  $\mu$ M ATP 및/또는 약물이 존재 또는 비존재하는 경우에서의 포스포티로신 웨스턴 블롯을 실험하여 이를 대조군과 비교하였다. 649641P(NC1153)는 약 2.5  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub>를 보였으며, 이는 도 1A 및 B의 증식 결과와 유사하다.

도 9A -C는 649641P(NC1153)의 선택성을 나타낸다. 도 9A는 투여량 의존적인 방식(상위 패널)으로 649641P(NC1153)의 농도를 증가시켜 처리한 PHA 활성화된 T 세포에서, 649641P(NC1153)는 Jak3에 의해 유발된 전사 인자-Stat5a/b를 저해함을 나타내는 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)이다. TNF- $\alpha$ 에 의한 비-Jak3 매개성 NfkB의 활성화는, 동일한 처리 조건(하위 패널)에서 영양을 받지 않았다. 도 9B는 649641P(NC1153)는 밀접하게 관련된 Jak2/Stat5a 신호 경로를 저해하지 못하는 것을 나타낸 웨스턴 블롯 자동방사그래프이다. 프롤액틴[PRL] (+) 또는 (-)는 세포가 프롤액틴으로 자극되는 것인지를 Jak2 활성화로 나타낸다. 프로스포티로신 웨스턴 블롯으로 Jak2-Stat5 활성화가 검출되지만 649641P(NC1153)에 의한 저해는 검출되지 않는다. 도 9C는 649641P(NC1153)가 Jak3 이외의 다른 다수의 키나제의 활성화에는 영향을 미치지 못함을 나타낸 막대 그래프이다. 성장 인자 티로신 카나제들(FGFR3 및 PDGFR $\alpha$ ), Src 계열의 티로신 카나제들(Src, Fyn, Lck, Yes, Zap70) 또는 세린 트레오닌 카나제들(PKC 및 PKA)의 기질 인산화를 차단하기 위하여, 649641P(NC1153)는 10(□) 또는 50  $\mu$ M(■)에서 실험하였다. 대조군의 활성화는 점선으로 나타낸다.

도 10A-D는 동종이식 생존율에서 NC1153의 생체내 영향을 나타낸 것이다. 도 10 A는 7일간 매일 정맥 주사(왼쪽)나 또는 경구 위관영양법(오른쪽)으로 649641P(NC1153)를 처리한 루이스 신장으로 동종이식된 ACI 랫 수용체의 생존율을 나타낸 것이다. 도 10B는 14일간 매일 경구 위관 영양법으로 649641P(NC1153)가 처리된 동일한 수용체에서의 이식 생존율을 나타낸 것이다. 도 10C는 7일간 처리하고, 매일 경구 위관 영양법으로 160 mg/kg의 NC1153을 1주일에 3회 90일간 처리한 동일 수용체에서의 이식 생존율을 나타낸 것이다. 도 10D는 7일간 처리한 LEW 신장으로 동종이식된 ACI 랫 수용체에 CsA와 함께 NC1153을 매일 경구 위관 영양법으로 처리하였을때의 상승효과를 나타낸 것이다. 649641P(NC1153) 단독(■). CsA 단독(□). 649641P(NC1153) 및 CsA(연한 막대).

도 11A-F는 649641P(NC1153)가 신독성이 없으며 지질 대사에 영향을 미치지 않음을 나타내는 분석 결과에 대한 그래프로, 혈청 크레아티닌 수치(도 11A), 혈청 크레아티닌 소거능(도 11B), 혈청 콜레스테롤(도 11C), 트리글리세라이드(도 11D), LDL-콜레스테롤(도 11E) 및 HDL-콜레스테롤(도 11F)로 평가하였다. 결과는 mg/dL로 나타내었다. 조직학적 형상은 도 6A-E에 나타낸 바와 같다.

도 12 A-B는 도 10A-D와 유사하며, 다만 이것들은 WP938(도 18B에서 보여진)로 고안된 649641P(NC1153)의 메조입체이성형으로 LEW 신장으로 동종이식된 ACI 수용체의 동종이식 생존율을 실험한 결과이다. 도 12A는 미처리한, CsA 단독 처리한, 그리고 WP938 단독 처리한 랫에서 평균 생존율을 나타낸다. 도 12B는 CsA 단독 1회 투여, WP938 단독 1회 투여를 CsA/WP938 병용을 동일하게 투여한 것과 비교한 것이다; CI 수치 0.44는 상승 작용을 나타낸다.

도 13A-F는 WP938 단독 또는 CsA 병용시 독성 분석 결과이다. 도 13A는 혈청 크레아티닌 수치이다. 도 13B는 트레아티닌 소거능이다. 도 13C는 콜레스테롤 수치를 나타낸다. 도 13D는 트리글리세라이드를 나타낸다. 도 13E는 HDL 수치를 나타낸다. 도 13F는 LDL 수치를 나타낸다.

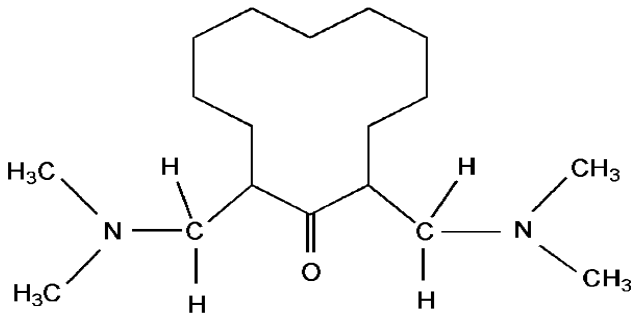
도 14A, B - 39A, B는 다수 화합물의 화학식과 이들의 생체의 분석에서 T 세포의 Jak3-의존적 또는 Jak3 비의존적 증식을 저해하는 활성을 나타낸 것이다. (A) IL-2 자극화된(연한 원); PRL 자극화된(진한 원). (B) 각 화합물의 구조식(염 화합물로 나타냄).

**실시예**

아래 무제한적 실시예들에서 Jak3 선택적 저해제 화합물의 특성과 이의 용도를 예시하나, 본 발명을 한정하는 의도는 아니다.

**실시예 1. 매니치 염기 649641P(NC1153)의 생체의 효과**

649641P(C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O; MW 369.41)로 표시되는 매니치 염기는 또한 그것의 입체이성체의 혼합물인 NC1153로도 언급되며, 화학식



을 갖는 것으로서, 전술한 바와 같이 Jak3에 대한 선택적 저해 능력을 시험하기 위하여 Jak2 의존적 증식에 비해 Jak3 의존적으로 증식하는 T 세포에 첨가되었다. 도 1A는  $\gamma$ c/Jak3 의존적 PHA 활성화된 인간 T 세포의 증식에 대한 649641P(NC1153)의 영향을 나타낸 그래프이다. 무활성의 PHA로 활성화된 인간 T 세포(5.0 x 10<sup>4</sup> cells/well)를 649641P(NC1153)(세로축)의 농도를 증가시킨 상태에서 1 nM 인간 IL-2(■), IL-4(●) 또는 IL-7(▲)의 존재 또는 무존재하는 조건으로 37°C에서 16시간 배양하였다. 이후 세포들에 4시간동안 [<sup>3</sup>H]-티미딘(0.5  $\mu$ Ci/200  $\mu$ l)를 가하고, 횡좌표로 도시한 혼성된 방사성 프로브는 DMSO 처리 샘플의 총 cpm에 대한 저해율로 나타내었다(n = 6).

도 1B는 Jak2 활성화자(프롤액틴; PRL[o]) 또는 Jak3 활성화자(인터루킨-2; IL-2[■])의 존재하에 배양한 T 세포의 증식에 대한 649641P(NC1153)의 영향을 나타낸 그래프이다. 랫의 T 세포주(Nb2-11c)는 PRL/Jak2 또는 IL-2/Jak3 자극중 어느 하나에 반응하므로, 이를 선택하였다. 무활성의 랫 T 세포(5.0 x 10<sup>4</sup> cells/well)를 Jak2 활성화자(1 nM PRL[o]) 또는 Jak3 활성화자(1 nM IL-2[■])의 존재하에, 649641P(NC1153)(세로좌표; 0-100 mM)의 농도를 증가시키면서 37°C에서 16시간 배양하였다. 분석 마지막 4시간동안 세포에 [<sup>3</sup>H]-티미딘(0.5  $\mu$ Ci/200  $\mu$ l)를 가하고, DNA-혼성된 방사성 프로브는 횡좌표로 도시하고 DMSO 처리 샘플의 총 cpm에 대한 저해율로 나타내었다(n = 4). 도 1A-B에 나타난 바와 같이, 649641P(NC1153)는 PRL/Jak2-의존적 세포 증식이 아닌  $\gamma$ c/Jak3-의존적 세포 증식을 선택적으로 저해한다. 특히, 649641P(NC1153)는 IL-2, IL-4 및 IL-7에 대한 반응시 Nb2-11c 세포 증식을 동일하게 저해하는 것으로 입증되었으나, 동일한 화합물은 Jak2-의존적 증식보다는 Jak3-의존적 증식에 3배 이상 효율적이었다.

도 2A-C에서, Jak3/Stat5 신호에 대한 649641P(NC1153)의 영향을 나타내었다. 인간 YT 세포를 (a - b)가 없거나 또는 (c - i)가 존재하는 상태에서 649641P(NC1153)를 증가시키면서(1-100 mM) 2시간 배양하였고, 10분간 100 nM IL-2의 존재하에(+) 또는 무존재(-)하에 두었다. 세포는 항-Jak3 pAb로 면역침전시키고, 도 2A의 상위 패널에 나타난 바와 같이 항-포스포티로신 mAb로 웨스턴 블롯한 다음, 제거한 후 항-Jak3로 다시 블롯하였다(도 2A, 하위 패널). 이러한 웨스턴 블롯 실험 결과는, 도 1A에서 확인된 바와 동일하게, Jak3의 티로신 인산화는 인간 YT 세포(1-100  $\mu$ M)에서 649641P(NC1153)의 투여량-의존적 양상으로 저해되었다. 도 2B에서, 인간 YT T 세포를 또한 (a - b)가 없거나 또는 (c - i)가 존재하는 상태에서 649641P(NC1153)를 증가시키면서(1-100  $\mu$ M) 2시간 배양하였고, 10분간 100 nM IL-2의 존재하에(+) 또는 무존재(-)하에 두었다. 세포는 항-Stat5a pAb로 면역침전시키고, 항-포스포티로신 mAb(도 2B, 상위 패널)로 웨스턴 블롯한 다음 제거한 후 Stat5a로 다시 블롯을 실시하였다(도 2B, 하위 패널). 3번째 실험으로, 도 2C에 나타난 바와 같이, 인간 YT 세포를 또한 (a - b)가 없거나 또는 (c - i)가 존재하는 상태에서 649641P(NC1153)를 증가시키면

서(1-100  $\mu$ M) 16시간 배양하였고, 10분간 100 nM IL-2의 존재하에(+) 또는 무존재(-)하에 두었다. 세포는 항-Stat5a pAb로 면역침전시키고, 항-포스포티로신 mAb(도 2C, 상위 패널)로 웨스턴 블롯한 다음 제거한 후 Stat5a로 다시 블롯을 실시하였다(도 2C, 하위 패널).

IL-2은, 또한 2Rb 체인의 Tyr338에 결합하여 T 세포 증식을 유도하는 Shc, 어댑터 단백질을 통하여 Shc/Ras/Raf/Erk 경로를 강하게 활성화한다. 도 3은 649641P(NC1153)의 농도 증가에 따른 IL-2 매개성 p44/42 ERK1/2 인산화 효과에 대해서 전술한 결과들과 유사한 실험결과를 나타낸 것이다. 무활성의 PHA로 활성화된 T 세포에 2시간동안 DMSO(대조군; 라인 a - b)를 처리하거나 또는 649641P(NC1153)의 농도를 증가시켜 (c - i) 처리하였고, 이후 1  $\mu$ g 존재하에 10분간 37°C에서 자극하였다. 세포는 라이시스(lysis)하고, 세포 라이세이트(lysate) 전체는 10% SDS-PAGE로 분리하여 항-포스포-p44/42 Erk1/2로 웨스턴 블롯(상위 패널)된 PVDF 막으로 이동시킨 후 제거하여 pan Erk 항체(하위 패널)로 블롯을 실시하였다. 화살표는 p44/42 Erk1/2의 위치를 나타낸다. 이러한 결과를 통하여, 649641P(NC1153)가 인간 T 세포에서 IL2-매개성 Erk1/2 활성화를 차단한다는 것이 확인되었다.

YT 세포는 티로신 인산화 상태에 대한 실험으로 확인될 수 있는 활성화된 Fyn 및 Lck 키나제를 계속적으로 발현한다. YT 세포를 다양한 농도의 649641P(NC1153) (1-100  $\mu$ M)하에서 2시간 배양하였다. 세포 추출물은 항-Fyn 또는 항-Lck 항체로 면역침전하고, 항-포스포티로신 항체( $\alpha$ PA)로 웨스턴 블롯한 다음 제거하여 항-Fyn 또는 항-Lck 항체로 블롯팅하였다. 도 4는 전술한 실험들의 결과를 나타낸 것이다: YT 세포 추출물은 항-Fyn 항체로 면역침전하고, 항-포스포티로신 항체( $\alpha$ PA)(1번줄)로 웨스턴 블롯한 다음 제거하여 항-Fyn 항체로 블롯팅하였다(2번줄); YT 세포 추출물은 항-Lck 항체로 면역침전하고(IP), 항-포스포티로신 항체( $\alpha$ PA)(3번줄)로 웨스턴 블롯한 다음 제거하여 항-Lck 항체로 블롯팅하였다(4번줄). YT 세포를 비히클 단독 존재하는 조건에서(라인 a 및 b), 또는 649641P(NC1153) 농도를 증가시키는 조건에서(1-100  $\mu$ M) (라인 c-i) 배양하였다. 이 결과들은 649641P(NC1153)가 Fyn 또는 Lck 키나제 활성을 차단하지 않음을 나타낸다.

상기 결과들은 저해제들은 Jak3 및 Jak2 반응성 세포 성장을 저해하지만(IC<sub>50</sub> 약 10-25  $\mu$ M), 649641P(NC1153)는 IC<sub>50</sub> 약 2.5  $\mu$ M로 세포 성장을 저지하는데 더 효과적임을 나타낸다. 또한 649641P(NC1153)는 동일한 농도(IC<sub>50</sub> 약 2.5  $\mu$ M)에서 IL4 또는 IL7에 의한 세포 성장을 효과적으로 저해한다. 이러한 물질은 포스포-웨스턴 블롯에서 측정된 바와 같이, Jak3의 티로신 인산화와 그것의 기질, 즉 Stat5a/b, 어댑터 단백질 Shc 및 Erk1/2을 저해하였다. 649641P(NC1153)는 IC<sub>50</sub> 약 10  $\mu$ M를 나타내는 기존 PNU156804 Jak3 저해제에 비해 효과적이다. 또한 올리고뉴클레오타이드 프로브에 결합하는 Stat5a/b DNA는, 649641P(NC1153)에 의해 크게 손상됨에도 불구하고, 이 화합물은 TNF- $\alpha$  유도성NF-kB DNA 결합에 작용하지 않으므로 전사 인자에 특이적이다. 649641P(NC1153) 화합물은 비-Jak3 발현성 인간 Jurkat T 세포의 DNA 합성과 TCR 신호 중간체들 LCK 또는 Fyn 티로신 키나제의 활성화를 모두 저해하지 않는다.

## 실시예 2. 동종이식 생존율에 대한 매니치 염기 649461P(NC1153)의 효과

생체내 효과를 확인하기 위하여, 신장 동종이식의 수용체에 이식후 즉시 7일간 649641P(NC1153)를 처리하였다. LEW (RT1<sup>l</sup>) 신장으로 동종이식된 ACI (RT1<sup>a</sup>) 수용체는 7일간 매일 2.5, 5.0, 10.0, 또는 20.0 mg/kg의 649641P(NC1153)를 단독으로 또는 2.5, 5.0, 10.0 또는 20.0 mg/kg의 CsA를 경구 위관 영양법(p.o.)으로 병용하여, 정맥내로(i.v.) 주사하였다. 649641P(NC1153)를 단독으로 정맥내로 또는 경구 위관 영양법으로 주입한 경우 랫의 동종이식 생존율은 투여량 의존적인 양상으로 연장되었으며, 이는 표 1에 나타나 있다. 80 mg/kg의 649641P(NC1153)을 p.o. 주입한 경우, 10 mg/kg의 649641P(NC1153)를 i.v.로 주입한 경우와 유사한 생존을 나타내었으므로, 경구 생체이용률은 약 12.5%로 추산되었다. 평균 생존 시간(MST)과 SD는 각 그룹의 5-6개의 개체들로부터 산출하였다. 병용지수(CI)는 중위 효과 분석(median effect analysis)으로 계산하였다(CI<1는 상승작용을, CI>1 길항작용을, 그리고 CI=1은 부가적인 작용을 의미한다.) 29.30.

표 1

신장 동종이식 생존(649641P(NC1153)의 정맥내 투여)

649641P(NC1153) (mg/kg/d) i.v. x 7 일	CsA (mg/kg/d) p.o. x 3 일	649641P:CsA 비율	MST ± SD	P	CI
-	-	-	8.8 ± 0.5	-	-
2.5	-	-	9.5 ± 1.5	NS	-
5.0	-	-	12.2 ± 1.5	0.01	-
10.0	-	-	18.8 ± 1.1	0.01	-
20.0	-	-	24.8 ± 4.6	0.01	-
-	2.5	-	12.6 ± 1.67	0.01	-
-	5.0	-	17.2 ± 4.21	0.01	-
-	10.0	-	21.7 ± 5.32	0.01	-
-	20.0	1:1	24.5 ± 4.58	0.01	-
2.5	2.5	-	18.8 ± 4.1	0.01	0.56
2.5	5.0	1:2	30.0 ± 8.2	0.01	0.21
2.5	7.5	1:3	30.4 ± 11.3	0.01	0.27
2.5	10.0	1:4	41.4 ± 9.8	0.01	0.11
5.0	2.5	2:1	20.0 ± 2.9	0.01	0.53
5.0	5.0	1:1	27.6 ± 5.3	0.01	0.38
5.0	7.5	1:1.5	33.2 ± 11.8	0.01	0.26
10.0	2.5	4:1	25.4 ± 4.0	0.01	0.60
10.0	5.0	2:1	29.8 ± 6.5	0.01	0.46

649641P(NC1153)를 단독으로 경구 위관 영양법으로 처리하거나 또는 CsA와 병용 처리하였을때의 신장 동종이식 생존 효과를 표 2에 나타내었다. LEW (RT1<sup>b</sup>) 신장으로 동종이식된 ACI (RT1<sup>a</sup>) 수용체에 7일간 매일 1회 649641P(NC1153)을 단독으로 40, 80, 또는 160 mg/kg/d의 경구 위관 영양법으로 처리하거나 또는 CsA 2.5, 5.0, 10.0 또는 20.0 mg/kg/d를 병용하여 경구 위관 영양법으로 처리하였다. MST와 SD는 각 그룹의 5-6 개체들로부터 계산하였다. 병용지수(CI)를 계산하였다.

표 2

신장 동종이식 생존 (649641P(NC1153)의 경구 위관 영양법에 의한 투여)

649641P(NC1153) (mg/kg/d) p.o. x 7 일	CsA (mg/kg/d) p.o. x 3 일	649641P:CsA 비율	MST ± SD	P	CI
-	-	-	8.8 ± 0.5	-	-
40.0	-	-	12.3 ± 1.26	0.0006	-
80.0	-	-	18.6 ± 5.32	0.0015	-
160.0	-	-	31.0 ± 3.9	0.0001	-
-	2.5	-	12.6 ± 1.67	0.0008	-
-	5.0	-	17.2 ± 4.21	0.0009	-
-	10.0	-	21.2 ± 4.96	0.0001	-
-	20.0	-	24.5 ± 4.28	0.0001	-
20.0	10.0	2:1	33.6 ± 10.04	0.0002	0.30
40.0	5.0	8:1	28.8 ± 9.87	0.0006	0.49
40.0	10.0	4:1	36.0 ± 10.05	0.0001	0.36
80.0	5.0	16:1	36.6 ± 4.72	0.0001	0.51

표 2의 MST ± SD 결과는 게한(Gehan)의 생존 시간에 의해 통계학적 유의성에 대해 평가되었다.

병용지수(CI) 대 CsA/649641P(NC1153) 비율은 표 1의 결과로 평가하였으며, 이러한 데이터는 도 5의 그래프로 나타내었다. CsA의 경구 생체이용률이 90%인 것을 고려하ous, CsA/649641P(NC1153) 비율이 4:1, 3:1, 2:1 및 1.5:1인 경우

(CI = 0.1 - 0.27) CsA/649641P(NC1153) 비율이 1:1, 1:2, 또는 1:4 (CI = 0.38 - 0.60)인 경우에 비하여 보다 향상된 상승효과가 관찰되었다. 중간 효과 분석과 병용지수(CI)를 이용하여 649641P(NC1153)와 CsA간의 상호작용 특성을 평가하였다. CI값(0.6 - 0.1; 도 5)으로 확인한 바와 같이 649641P(NC1153)와 CsA 병용 투여는 상승효과가 있었으며; 649641P(NC1153)/CsA 비율이 1:2 내지 1:4일때 가장 효과적이었다(CI = 0.1 - 0.27; 표 1).

상기 결과들을 요약하면, 649641P(NC1153)는 신장 동종이식 생존율을 투여량 의존적으로 연장시킨다: 7일간 투여량 20 mg/kg/day으로 649641P(NC1153)를 정맥내 투여하였을때 MST는  $24.8 \pm 0.6$  일( $p=0.00003$  vs. 미처리 대조군; MST =  $8.8 \pm 0.5$  일)이고, 7일 또는 14일간 투여량 240 mg/kg/day으로 649641P(NC1153)를 경구 위관 영양법으로 투여하였을때 MST는  $47.8 \pm 09.59$ 일 또는  $> 60$ 일(둘다  $p < 0.00001$ )이었다. CsA 단독(2.5, 5, 10 또는 20mg/kg/d, 3일간)으로 처리시 투여량 의존적인 효과가 확인되었으며, 최고 투여량에서 MST는  $24.50 \pm 0.58$ 일( $p < 0.0001$ )이었다. 병용 처리하는 경우 각각의 물질을 단독 처리하였을때 비해 이식 생존율에서 상당한 상승작용이 나타났다. 예컨대, 2.5 mg/kg/day의 649641P(NC1153)을 단독으로 7일간 정맥 투여하였을때의 MST는  $9.5 \pm 1.4$ 일이고, 10 mg/kg/day의 CsA를 단독으로 3일간 처리하였을때 MST는  $21.2 \pm 5.3$ 일이지만, 두가지 약물을 병용 처리하는 경우 MST는  $41.4 \pm 9.8$ 일 ( $p=0.00002$ )로 생존율이 연장되었다. 가장 우수한 결과는 649641P : CsA를 4:1 및 2:1 투여량 비율로 처리시 관찰되었으며, 각각의 CI 값은 0.11 및 0.27이었다. 이로서, 신규의 선택적 Jak3 저해제인 649641P(NC1153)는 생체내 신장 동종 이식 모델에서 면역억제제로 동정될 수 있으며, CsA와의 병용시 현저한 상승효과가 있음을 단정할 수 있다.

### 실시예 3. 649641P(NC1153)의 신독성 검사

조직 실험으로, 조직은 아래와 같이 처리된, LEW (RT1<sup>b</sup>) 신장을 동종이식한 ACI (RT1<sup>a</sup>) 수용체로부터 수득하였다: 7일간 저염식이한 수용체에 14일간 10 mg/kg의 649641P(NC1153)를 정맥투여하거나, 0.16 mg/kg의 RAPA를 정맥투여하거나, 10 mg/kg의 CsA를 경구 위관 영양법으로 투여하거나, 10 mg/kg의 CsA 경구 위관 영양법 투여와 0.16 mg/kg의 RAPA 정맥 투여를 병용하거나, 또는 10 mg/kg의 CsA 경구 위관 영양법 투여와 10 mg/kg의 649641P(NC1153) 정맥 투여를 병용 처리하였다. 14일째에, 랫을 희생시키고, 신장 조직은 표준 방법에 따라 H&E으로 염색하였다. 도 6A-E의 현미경사진은, 649641P(NC1153) 단독 또는 CsA 병용 처리시 신장에 대한 영향을 나타낸다. 모든 현미경 사진은 200x 배율이다. 각 그룹당 5마리의 랫에서 유사한 결과가 관찰되었다. a색으로 신장 조직을 확인하였다. 649641P(NC1153)(도 6A) 또는 RAPA(도 6B) 단독 투여시 신장에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, CsA 단독 처리시(도 6C) 공포형성(vacuolization)과 위축(atrophy)으로 가시화된 바와 같이, 30%의 세관 손상이 관찰되었다. CsA/RAPA(SRL) 그룹에서는, 90%의 세관에서 대규모의 공포형성과 위축 및 농축핵이 관찰되었다(도 6D). CsA/RAPA 그룹과 대비하여, CsA/649641P(NC1153) 병용처리한 랫의 신장에서는 CsA만 단독으로 처리한 그룹에서 관찰되는 것과 유사한 변화가 관찰되었다(도 6E). 요컨대, 649641 또는 RAPA 단독 처리는 신독성을 야기한다. 그러나, CsA 단독은 신독성이 있으며, 이러한 효과는 649641P(NC1153)가 아닌 RAPA와 병용시 강력해질 수 있다.

진술한 조직학적 연구와 더불어, 649641P(NC1153)로 처리된 동물에서 SRL과 관련된 독성 종류를 조사하였다. 본 실험에서, 동물은 649641P(NC1153) 단독 처리 또는 CsA와의 병용 처리한 것이다. Wistar-Furth 랫에 649641P(NC1153) (10mg/kg/d iv 또는 40/mg/kg/d per gavage) 또는 SRL(1.6mg/kg/d per gavage)를 단독으로, 또는 CsA(10mg/kg/d per gavage)와 병용하여 제공하였다. 만성 신독성을 조사하기 위하여 염 감소(0.05% NaCl)된 식이를, 또는 지방이 보충된(17.7% 트리글리세라이드, 5.02% 콜레스테롤) 식이를 7일간 실시한 다음, 랫 그룹들에 7, 14 또는 28일간 처리 코스(n=6/drug/duration)를 진행시켰다. 크레아티닌 소거능(CrCL); 총, 저 및 고 밀도 콜레스테롤 분획들; 트리글리세라이드(TG); 골수 세포충실성(cellularity); 말초혈액수(PBC); 및 혈액의 화학적 성질을 Fishers t 테스트로 분석하였다.

본 실험에서, 649641P(NC1153)는 몸무게 증가( $p=0.0002$ )를 초래하나 CsA나 SRL에 의한 몸무게 감소를 강화시키진 않는 것으로 확인되었다. CrCL 값은 미처리군(2.0 0.1mL/min)과 649641P(NC1153) 단독 처리군(1.9 0.1mL/min)에서 동일하였으나, SRL 단독 처리군(1.7 0.1mL/min;  $p < 0.02$ )과 CsA 단독 처리군(1.3 0.1mL/min;  $p < 0.001$ )에서는 감소하였다. CsA 단독 처리군과 비교하였을때, 648641P의 첨가시 CrCL 값(1.38 0.2mL/min;  $p=0.68$ )은 감소되지 않았으나, 반면에 SRL 첨가시 CrCL값이 현저히 감소되었다(0.9 0.2mL/min;  $p=0.03$ ). 저염 식이한 미처리군과 비교하면, 649641P(NC1153) 처리군에서는 혈청 CHOL이 감소되고( $82.0 \pm 5.0$  vs  $65.5 \pm 9.4$ mg/dL;  $p=0.03$ ), HDL는 증가되었으나( $p=0.004$ ) TG 또는 LDL 수치에는 변화가 없었다. 648641P는 SRL+ CsA( $107.8 \pm 8.4$ mg/dL;  $p=0.0005$ )와는 대조적으로, CsA의 고콜레스테롤 효과를 증가시키지 않았다(단독시  $77.5 \pm 7.0$ , 병용시  $64.1 \pm 12.7$ mg/dL). 고염 식이군에서, SRL는 CHOL( $689.5 \pm 67.4$ ;  $p=0.00001$ )과 그외 지질 분획에 현저한 영향을 유발하였으며, CsA는 매우 작은 영향을 유발하였으며( $545.7 \pm 95.7$ mg/dL;  $p=0.0002$ ), 649641P(NC1153)는 미처리군에서 크지 않은 변화를 유발하였다( $323.8 \pm 51.1$ mg/dL;  $p=0.01$  vs  $237.5 \pm 31.4$ mg/dL). 649641P(NC1153)는 HDL, LDL 또는 TG 수치에 영향을 미치지 않는다. SRL ( $p < 0.04$ )와는 대조적으로 648641P와 CsA에서는 미처리 랫과 비교하여 PBC가 감소되지 않았다. 반면에 SRL/CsA 군에서는 저세

포성 골수(hypocellular marrow)(30-40%가 지방조직으로 대체됨)가 관찰되나, 649641P/CsA 집단에서는 무리쳐 랫과 별다른 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로, 649641P(NC1153)는 신독성, 골수 독성이 없으며, 고지방 유발에 적절한 지질독성이 있는 것으로 볼 수 있다. 649641P(NC1153)는 SRL을 혼란시키는 방식으로 CsA의 부작용을 악화시키지 않으므로, 림프계 요소에 선택적으로 작용할 것으로 여겨진다.

전술한 실험들로부터, 649641P(NC1153)가 Jak3 활성을 차단하고, 단독 처리시 동종이식 생존율을 연장시키고, CsA와의 병용 처리시 상승작용을 하는 것으로 확정되었다. 바람직한 화합물, 649641P(NC1153)는 Jak2 의존적 T 세포 증식에 비하여 Jak3 의존적 T 세포 증식을 생체외에서 선택적으로 저해하고, 어떠한 신독성 부작용을 유발하지 않으면서 기관의 동종이식의 생존율을 생체내에서 연장시킨다. 이롭게는, 649641P(NC1153)는 시클로스포린과 상승작용을 하여, 시클로스포린에 의해 유발되는 신독성을 증가시키지 않으면서 기관의 동종이식시 생존율을 연장시킨다. 또한 649641P(NC1153)는 기존에 개시된 화합물 AG490과 PNU156804에 비하여 Jak2 매개성 세포 활성이 아닌 Jak3 매개성 세포 활성에 대해 보다 높은 특이성을 나타낸다. 649641P(NC1153)의 투여와 관련된 전술한 바람직한 약학적 특성이 전적으로 649641P(NC1153)과 Jak3간의 직접적인 상호작용에 의한 것이지, 또는 예를 들면 Jak3 저해가 649641P(NC1153)의 대사산물이나 또는 그것의 유도체에 의해 생체내에서 어느 정도까지 매개되는 것인지는, 현재 불명확하다. 후자의 경우, 의학적으로 확인된다면 그러한 활성의 대사산물 또는 유도체 중의 직접 투여가 649641P(NC1153)를 치료학적으로 대체할 수 있을 것으로 생각해볼 수 있다. 또한, 생체내에서 작용하여 본원의 선택적 Jak3 저해제 화합물 중 하나를 산출하는 전구체 화합물 역시 개체의 개별적 필요성이 표명된다면, 치료학적으로 투여될 수 있다.

#### **실시예 4. 치료학적 용도**

649641P(NC1153) 화합물은 면역억제성 요법과 림프계 세포, 골수 세포 또는 그외 Jak3을 발현하는 세포를 치료하는데 의학적으로 유용한 화합물 그룹들을 대표하는 것이다. 상기 화합물은 특히 인간에서 T 세포 관련 질환에 유용한 것으로 여겨지며, 그리고 수의학적 적용과 Jak3 의존적 림프계 세포 또는 골수 세포의 기능을 억제하며, 다른 단백질 키나제의 활성에는 영향을 미치지 않거나, 또는 그런 키나제에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 치료학적으로 허용가능한 범위 내에서 적합한 모든 용도에 유용한 것으로 여겨진다. 치료는 상기 화합물을 림프구 또는 그외 Jak3를 발현하는 림프계 기관 또는 골수 기관에서 유래된 세포에서 신호 3 경로를 효과적으로 방해하는 함량으로 투여하며, 그것의 기능을 저해하는 것을 포함한다. 예를들면, 세포 분열을 저지한다. 이러한 투여는 화합물의 산 형태 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염 형태를 활용할 수 있으며, 또는 화합물의 생물학적 활성형의 대사산물의 형태일 수 있다. 대안으로는, 투여 대상의 체내에서 화합물의 하나 이상의 활성형 형태로 대사될 수 있는 전구체 화합물로 투여되어, Jak3 의존적 림프구 기능을 파괴하고, 바람직하기로는 세포 분열을 저지할 수 있다. 투여는 연속적으로 또는 주기적일 수 있다.

의학적 입장에서, 개체가 부적합한 면역 반응의 억제를 필요로 할 경우, 649641P(NC1153) 또는 그것의 전구체 또는 활성의 대사산물을 함유하는 약학적 조성물의 유효량을 처리하여 의도하지 않은 면역 반응을 완화 또는 예방할 것이다. 다른 면역억제성 물질, 즉, Jak3 저해를 통하여 작용하지 않는 시클로스포린 A 또는 FK506과 같은 물질의 치료학적 유효량을 병용처리함으로써, 개체에서 독성이 거의 없으면서도 보다 나은 결과를 이룰 수 있다. 이러한 용도의 예로는, 포유류의 이식 또는 동종이식 수용체에서의 기관 이식 거부반응 또는 동종이식 거부반응의 경감과, 또는 이식 내성 유도를 포함한다. 다른 예로, 치료학적 목적은 내인성 Jak3 의존적 T 세포에 의해 매개되는 자가면역 질환의 경감을 촉진하여 투여대상자의 고유 조직에 대한 자가면역 공격이 소실 또는 정지시키는 것일 수 있다. 또 다른 용도로는, 649641P(NC1153)의 약학적 조제를 투여하여 T세포 매개성 과민 반응을 억제함으로써 포유류의 투여대상자에서 기도 과민증을 완화시키는 것이다. 이와 유사하게, 알레르기 환자는 T 세포 매개성 알레르기 반응을 억제하기 위하여 처리될 수 있으며 따라서 알레르기 반응이 소실 또는 정지될 수 있다. 649641P(NC1153)를 함유하는 약학적 조성물의 투여는 또한 Jak3 의존성 백혈병 또는 림프종의 증식을 저해할 것으로 예상된다. 649641P(NC1153)의 치료학적 처치의 가장 중요한 이점은, Jak3 활성을 선택적으로 저해함으로써, 림프계 구획(및 Jak3 발현성 골수세포)에 제한적이며, Jak2와 그외 체내의 수많은 조직에 존재하는 다른 다나백질 키나제 활성에는 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않으며, 거의 부작용도 예측되지 않는다는 것이다.

**약학적 조성물** 치료학적 용도로 적합한 약학적 조성물은 649641P(NC1153) 화합물을 그것의 산 형태로, 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염 형태로 또는 그것의 수화물로 포함하며, 적합한 담체를 함께 포함한다. 약학적으로 허용가능한 염 화합물 및 수화물은, 제약 화학자에게 명확한 화합물의 염 형태 및 수화된 형태를 의미하며, 즉, 가용성, 감칠맛(palatability), 흡수도, 분포, 대사 및 배출과 같은 화합물의 약학 동력학적 특성 또는 물질적 특성에 우호적으로 작용하는 것을 의미한다. 성질에 보다 도움이 되는 다른 인자들은 또한 화합물의 형태를 선택하는데 중요한 것으로, 천연 원료의 단가, 결정화 용이성, 수율, 안정성, 가용성, 검습기성(hygroscopicity) 및 제조된 벌크 약물의 유동성(flowability)을 포함한다. 화합물이 음전하로 하전되면, 반대이온, 예컨대 소듐 또는 포타슘과 같은 알칼리 금속 양이온으로 균형을 맞출 수 있다. 그외 적합한 반대이온성 화합물로는, 갈슘, 마그네슘, 아연, 암모늄 또는 테트라에틸아모늄, 테트라부틸아모늄, 콜린,

트리에틸하이드로암모늄, 메글루민, 트리에탄올하이드로암모늄 등과 같은 알킬암모늄 양이온 화합물이 있다. 적당량의 양이온성 화합물은 분자와 결합하여, 전체 전하를 중성으로 유지한다. 이와같이, 상기 화합물이 양성으로 하전되면, 예컨대 프로토네이트되면, 적당량의 음이온성 화합물이 존재하여 전체 전하를 중성으로 유지시킨다.

약학적으로 허용가능한 염은 또한 산 부가 염을 포함한다. 따라서, 상기 화합물은 무기 또는 유기 산 또는 염기로부터 유래된 염의 형태로 사용될 수 있다. 예로는, 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 비설페이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시클로펜탄플로피오네이트, 디플루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트, 락테이트, 말레이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코틴네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 피설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 토실레이트 및 언데카노에이트를 포함한다. 염기 염으로는 암모늄 염, 소듐 염 및 포타슘 염과 같은 알칼리 금속 염, 칼슘 염 및 마그네슘 염과 같은 알칼라인 토류 금속 염, 디시클로헥시아민 염과 같은 유기 염기를 갖는 염, N-메틸-D-글루카민과 아르기닌, 라이신 등과 같은 유기 염기를 갖는 염을 포함한다. 또한 질소를 함유하는 염기성 기들은, 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로라이드, 보르마이드 및 요오드화물과 같은 저가 알킬 할라이드, 디메틸, 디에틸, 디부틸과 같은 디알킬 설페이트, 디아밀 설페이트, 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테라일 클로라이드, 브로마이드 및 요오드화물과 같은 장쇄 할라이드, 벤질 및 펜에틸 브로마이드와 같은 아르알킬 할라이드 및 그외 물질로 쿼터라이즈 시킬 수 있다.

본원에서 Jak3 저해제 화합물은, 공지된 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 약학적 조성물로 제형화될 수 있다. 상기 화합물은 가루 또는 결정형이거나, 용액 또는 현탁액 형태일 수 있다. 그것은 경구로, 비경구로(정맥내로 또는 근육내로), 국소적으로, 경피내로 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 상기 담체는 적합성에 따라 고체 또는 액체 형을 사용할 수 있다. 고체 담체의 예로는, 락토스, 테라 알바, 슈크로스, 탈크, 젤라틴, 한틴, 펙틴, 아카시아, 마그네슘 스테아레이트, 스테아릭 산 등을 포함한다. 액체 담체의 예로는, 시럽, 땅콩 오일, 올리브 오일, 물 등을 포함한다. 경구 용도의 담체로는, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트 단독 또는 왁스와 조합한 형태와 같이, 공지된 시간 지연 물질을 포함할 수 있다. 국소 도포제는 소수성 염기 또는 친수성 염기와 같은 담체로 연고, 크림, 로션으로 제형화되거나, 액체, 유성액 또는 알콜성 액체내에서 페인트로 제형화되거나, 또는 건고형 회석제내에서 가루로 제형화될 수 있다. 경구용 고체 투여 형태의 예로는, 정제(tablet), 캡슐제, 트로키제, 정제(lozenges) 등을 포함한다. 투여형태의 크기는 매우 다양할 수 있으나, 바람직하기로는 약 25 mg 내지 약 500 mg일 수 있다. 경구용 액체 투여 형태의 예로는, 액제, 현탁제, 시럽제, 유제, 연질 젤라틴 캡슐제 등을 포함한다. 주사용 투여 형태의 예로는, 멸균된 주입가능한 액체, 예컨대 액제, 유제 및 현탁제를 포함한다. 주사용 고체의 예로는 주사전에 액체에 타거나, 용해하거나 또는 현탁하는 가루가 포함된다. 주사용 조성물에서, 담체는 일반적으로 멸균된 물, 식염수 또는 다른 주입가능한 액체, 예컨대 근육내 주사용 땅콩 오일로 구성된다. 또한 다양한 약학적으로 허용가능한 완충화성 물질, 보존제 등이 포함될 수 있다.

**투약(Dosage).** 본원에서 Jak3 선택적 저해제 화합물의 치료학적 용도를 실현시키기 위한 약학적 조성물은, 의도한 목적, 즉 Jak3 활성의 파괴 또는 저해 또는 Jak3 관련 장애의 치료 또는 예방을 성취하기에 충분한 함량으로 활성 성분을 함유하는 조성물을 포함한다. 치료학적 유효량 또는 투여량은 본원에서와 같이 세포 증식 분석으로부터 처음 추정될 수 있다 이후, 투약은 동물 모델에서의 용도로 제형화될 수 있으며, 세포 배양에서 결정된 바에 따라 IC<sub>50</sub>(즉, IL2 의존적 증식에 대한 최대 저해의 절반을 이룰 수 있는 화합물의 농도이며, PRL 의존적 증식은 거의 또는 전혀 저해하지 않는 농도)에 해당되는 순환성 농도 범위를 이룰 수 있다. 이러한 정보는 인간과 그외 동물에서 표준적인 약학적 실시예에 따라, 유용한 투여량의 범위를 좀더 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 투여량은 적용되는 투약 형태와 투여 경로에 의존적으로 변경될 수 있다. 예를들면, 목적인 Jak3 저해 효과를 개시 및/또는 유지하기에 충분한 활성 중의 혈장 농도를 제공하기 위하여, 투여량 함량과 간격은 개별적으로 적정될 수 있다. 혈장 수치는 통상적으로 최소 효용 농도(MEC)로 언급된다. MEC는 화합물마다 다양하며, 전술한 바와 같이 생체의 데이터로부터 추산될 수 있다. 예를들면, T 세포 집단에서 Jak3 자가키나제 활성을 50-90%로 저해하기 위한 필수적인 농도는 본원에서 기술한 분석을 이용하여 확정할 수 있다. HPLC 분석 또는 바이오분석을 사용하여 혈장 농도를 결정할 수 있다. 투약 간격 역시 MEC 값을 이용하여 결정할 수 있다. 바람직하기로는, 상기 화합물은 일정 주기의 시간동안 MEC 이상의 혈장 수치를 유지하는 요법으로 투여될 것이다. 국소 투여 또는 선택적 흡수를 포함하는 치료에서, 화합물, 그것의 활성 대사산물 또는 유도체의 효과적인 국소 투여 농도는 혈장 농도로 충분히 반영되지 않을 수 있다. 이러한 경우, 공지된 다른 방법을 사용하여, 적절한 투여량과 간격을 결정할 수 있다. 성인에 있어서 적합한 경구 투여량의 예로는 1일당 약 0.1 내지 약 80 mg/kg를 단일 또는 분할 투여하는 것이다. 적합한 비경구 투여량의 예로는, 1일 당 약 0.1 내지 약 80 mg/kg를 정맥 주사 또는 근육 주사로 단일 또는 분할 투여하는 것이다. 국소 투여량의 예로는 약 0.1 mg 내지 약 150 mg을 1일 1 내지 4회 외용하는 것이다. 흡입 투여량의 예로는 1일 당 약 0.01 mg/kg 내지 약 1 mg/kg이다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태, 질병의 특성 및 그외 인자들을 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다.

### 실시예 5. 부가적인 Jak-3 선택적 저해제 화합물

상기 실시예들에서, 649641P(NC1153)가 선택적으로 또는 특이적으로 Jak3를 함유하는 T 세포의 증식과 기능을 저해하고, 동종이식 생존율을 연장시키고 저독성임이 입증되었다. 이러한 평가들에서, 649641P(NC1153)가 면역 관련 장애의 개체를 치료하는데 있어서 치료학적 가능성이 있음이 확실하다. 이 화합물은 또한 생체와 분석과 생체내 연구에서 Jak3의 저해 및 파괴에 선택성이 있는 후보 약물 화합물을 평가하는데 비교용 표준물질로 이용 가치가 있다.

전술한 바와 같이, 본 발명의 실험 코스에서, Jak3의 선택적인 저해제로 제공될 수 있는 부가적인 후보 약물을 검색하기 위하여 NCI 약물 발견 데이터베이스를 검색하였다. "시드(seed)" 화합물이며 Jak3 저해 가능성이 있는 티포스틴, AG490과 유사한 상관관계수(correlation coefficient)를 갖는 화합물을 조사하였다.

**COMPARA 알고리즘.** NCI 약물 데이터베이스는 전 세계에서 수집된 10억개의 화합물로 구성되어 있다. 이것은 거대 제약회사에서부터 실험실을 운영하는 개인으로부터 기증된 약물을 포함하고 있다. 많은 경우, 이러한 화합물에 시험이 포함되어 있으며, 라이브러리로 작성되어 있다. 그러나 많은 화합물은 최초 제안된 기능에 대해 효과가 없거나, 일부의 경우에는 제공한 회사에서 더 이상 사용하지 않아, 제조업체에서 제조되지 않고 있다. 약물의 상태에 개의치 않고, 그것의 구조와 활성은 매주 갱신되는 라이브러리 데이터베이스에 추가되고 있다.

특정 약물을 60개의 별도의 인간 세포주(예, 상피, 폐, 결장, 단핵구/대식세포, T-B 세포, 유방-전립선 등)에 대해 투약 반응을 실험하여, 데이터베이스를 구축하였다. 3가지 매개변수, 세포 성장 저해(IC<sub>50</sub>), 세포독성(LC<sub>50</sub>) 및 세포분열억제 효과(TGI)가 측정된다. 또한 이들은 각 화합물에 대한 평균 그래프 "시그니처(signature)"를 포함한다. 양성 수치(우측으로 놓인)를 갖는 약물은 평균을 초과하는 세포 민감성을 나타낸다. 음성 수치(좌측으로 놓인)를 갖는 약물은 세포주가 평균에 비해 테스트 물질에 덜 민감함을 의미한다. COMPARE는 AG-490의 경우처럼, 이전에 결정된 "시드"에 생체의 활성을 토대로 각 화합물의 등급순으로 나열한 알고리즘이다. 각 약물에 대한 평균 그래프는 피어르선의 상관관계수(PCC)를 이용한 스칼라 지수 평가로 전환된다. 결국, 가장 유사한 효과를 갖는 약물이 높은 등급 상관관계(접근 1)를 보일 것이며, 시드 화합물과 유사한 활동 기작을 가질 것이다.

COMPARE는 유사한 활동 기작의 화합물을 동정하는데 성공적이다. 이는 예컨대 세포 성장을 차단하는 유사한 약물이 유사 세포종에서 동일한 증추적인 표적 경로를 표적으로 할 것이라는 전제를 근거로 한 이론적 모델이다. 특정 경로에 많이 의존하는 세포는 (Jak3/Stat5를 발현하는 세포와 같이) 상기 경로의 저해에 민감할 것이며, 반면에 이런 분자들이 발현되지 못하거나 이런 경로에 거의 의존적이지 않는 세포에서는 동일 약물이 거의 또는 전혀 효과가 없다. 이는 세포 패널을 교차하여 유사 활동 기작의 약물을 같이 그룹화하도록 한다.

오늘날 이행된 다수의 다른 시험들에서, 이러한 접근방식이 동일한 분자 표적에 선택적으로 작용하는 신규한 물질을 동정하는데 성공적이었으며, 따라서, 특유의 평균 그래프 패턴을 확보하였다. COMPARE 알고리즘은 구조 차이가 있으나 시드와 동일한 활동 기작을 갖는 화합물에서 유사한 평균 패턴을 동정할 수 있다. 특정 관독된 정보(read-out)(JAK3 Stat5 인산화)내에서 매치된 것을 확인하기 위하여 실험실 연구가 필요하다. COMPARE는 약물의 유사한 활동 기작처럼 화학적 구조에 필수적으로 의존하지 않는다. 이는 일정 표적물에 대한 특정 저해제로서 인식된 적이 없는 구조적으로 신규한 화합물 클래스를 동정하도록 한다. 이러한 접근방식의 유효성은 p53, Raf, 토포아이스머라제(topoisomerase)와 튜블린 결합성 단백질의 저해제를 동정함으로써 입증되어왔다. 활동 기작이 알려진 구조적 클래스가 발견되며, 이후 이용가능한 유사체의 추가적인 검색과 신규 물질의 합성이 실시되어 특징을 밝히고 관심 대상 약물로 활용한다.

전술한 NCI 약물 데이터베이스 검색으로 동정된 화합물들로, 649641P(NC1153)와, 649641P에 대한 몇종의 컨제너(congener) 또는 구조적 유사체들이 있다. 화합물 637712, 640674, 643423, 655906, 673137, 683332 및 693812(NCI 데이터베이스 번호로 표시됨)의 T 세포 증식에 대한 효과를 평가하였고, AG490, PNU156804 및 649641P(NC1153)와 비교하였다. 비교 분석 결과는 도 7A의 막대 그래프로 나타낸다. PHA로 활성화된 인간 T 세포의 증식은 이러한 NCI 물질에 의해 저해되며, IL-2로 자극된다. NC1153의 구조식은 도에 나타나 있다. NC1153는 IL2 리셉터 발현에 영향을 미치지 못한다.

또한, 도 7B는 하룻밤 동안 50 μM NC1153(라이트 주)로 처리하거나 또는 (헤비 주)로 처리하지 않은 후 IL-2R-α, -β 및 -γ 체인에 대하여 염색한, PHA로 활성화된 T 세포 모세포의 FACS 분석을 나타낸 그래프이다. 점선은 NC1153으로 전처리한 세포이다. 이 결과는 IL-2 리셉터의 존재가 NC1153에 의해 영향을 받지 않음을 나타낸다. 이러한 사실은, IL2 신호의 소실이 리셉터 발현 변화에 원인이 아니므로, 따라서 Jak3은 IL2 리셉터의 말단에서 발생된다. 도 7C에 나타낸 바와 같

이, NC1153 화합물은 Jak3을 발현하지 않는 세포의 성장은 차단하지 않는다. Jak3을 발현하지 못하는 Jurkat 세포(◆)에서는, 세포 성장과 이후 NC1153 처리에서 유의할만한 변화를 보이지 않으며, 이는 Jak3를 함유하는 PHA 로 활성화된 T 세포(□)와는 대조적이다. 데이터는 비히클 대조군에 대한 %로 표준화하였다. NC1153은 Jak3을 활용하는 사이토카인과 공통 감마 체인에 의해 세포 성장을 저해한다(도 7D). 도 1A에서와 같이, 649641P(NC1153)로 처리된 T 세포의 T 세포 증식은, 미처리된 대조군으로 표준화된 IL2, IL4 또는 IL7에 의한 성장을 투여량 의존적인 방식으로 저해한다. 따라서, NC1153의 저해 효과는 단지 IL-2에 의해 자극화된 세포에 한정되어 있지 않다. 실제, Jak3을 이용하는 사이토카인 전 계열은 NC1153에 의해 차단된다.

도 8을 참조하여, 6496421P (NC1153)가 Jak3 신호 경로를 저해하는 직접적인 증거를 제시한다. "PY-Jak3"로 표시된 밴드는 IL-2와 ATP가 존재하거나 존재하지 않는 상태에서 표시된 NC1153 농도에서의 활성 Jak3이다. "Jak3"로 표시된 밴드는 총 Jak3 단백질(활성형 + 무활성형)를 존재함을 나타낸다. Jak3 저해가 하위 경로를 차단하는 것인지 확인하기 위하여, 도 2A-C에 나타난 바와 같이, Jak3 자가키나제 활성화에 대해 면역정제된 Jak3을 실험하였고, 100 μM의 ATP 또는 약물이 존재 또는 비존재하는 상태에서 포스포티로신 웨스턴 블롯으로 테스트하여, 대조군과 비교하였다. 도 7A 및 7D에 나타난 바와 같이, 649641 (NC1153)는 증식 데이터와 동일하게 약 2.5 μM의 IC<sub>50</sub>을 나타내었다.

도 9A-C는 NC1153이 비-Jak3 신호 경로를 저해하지 않음을 나타낸다. 도 9A에서, NC1153은 NC1153의 농도를 증가하면서 처리한 PHA로 활성화된 T 세포에서 EMSA 분석(상위 패널)에서 관찰된 바와 같이 투여량 의존적인 방식으로, Jak3에 의해 유도된 전사 인자-Stat5a/b를 저해한다. "cold compete"로 기재된 레인은 비표지된 프로브이다. 그러나, TNF-α에 의한 비-Jak3 매개성 NfκB 활성화(아래 패널)는 동일한 처리 조건에서 영향을 받지 않았다. 도 9B의 결과는 NC1153가 가장 가깝게 연관된 Jak2/Stat5a 신호 경로를 저해하지 못함을 나타낸다. 랫 Nb2 세포를 NC1153의 농도를 증가시키면서 처리하고, 프롤액틴으로 자극하였다. 포스포티로신 웨스턴 블롯으로 활성화를 검출하였으나, NC1153에 의한 저해는 검출되지 않았다. Stat5a/b 활성화에서, Jak3 매개성 Jak3 자가키나제 활성화는 생체의 분석에서 직접적으로 NC1153에 의해 차단되었다. NC1153은 다수의 키나제의 활성화에 영향을 미치지 못하였다. 키나제 분석에서 Jak2에 비하여 Jak3에 대한 저해가 약 50배 높게 도 9B 및 도 8에서 확인되었다. 도 9C에서 보여진 바와 같이, 성장인자 티로신 키나제(FGFR3 및 PDGFRα), Src 계열 티로신 키나제(Src, Fyn, Lck, Yes, Zap70) 또는 세린 트레오닌 키나제(PKC 및 PKA)의 기질 인산화를 방해하기 위하여, NC1153은 10 또는 50 μM에서 실험하였다. 대조군의 활성화는 점선으로 도시하였다.

도 10A-D는 동종이식 생존율에서의 649641P(NC1153)의 생체내 효과를 요약한 것이다(표 1에 나타냄). Lewis (LEW) 신장으로 동종이식된 ACI 랫 수용체에 7일간 정맥 주사 또는 경구 위관 영양법으로 NC1153를 처리하였다. 다양한 투여량에 대한 동종이식 생존 시간(일)은 도 10A에 나타내었으며, 생존 개체는 표 1에 나타내었다. Lewis (LEW) 신장으로 동종이식된 ACI 랫 수용체에 14일간 매일 경구 위관 영양법으로 NC1153를 투여하였다. 도 10B에서 이식 생존율(일)은 NC1153의 다양한 투여량에서 관찰되었다. Lewis (LEW) 신장으로 동종이식된 ACI 랫 수용체에 7일간 처리하고, 매일 경구 위관 영양법으로 160 mg/kg의 NC1153을 1주일에 3회 90일간 처리하였다. 도 10C에서, 처리된 수용체의 75%가 처리 90일 이후까지 살아남았으며, 200일을 초과하여 생존하였다. 이식에 대한 내성 유발을 LEW 공여체 (>100 days; n=3)의 인수성(acceptance)으로 검증하였으나, BUF (7.0 ± 1.0 days; n=3) 심장 이식체의 1/3은 장기간 생존하는 수용체로 검증되지 않았다. LEW 심장으로 동종이식된, 방사조사(400 rads)된 ACI 랫 수용체에 내성의 수용체로부터 정제한 30 x 10<sup>6</sup> T 세포를 전이시켜 내성 기작을 실험하였다. 내성의 T 세포로 전이된 수용체(40.0 ± 5.0 days; n=6 vs 15 ± 1.0 days; n=5 in irradiated controls)는 2개의 심장이 >100일간 뛰면서 LEW 심장 동종이식에 대한 지연된 거부반응을 유의적으로 나타내었으며, 1/3은 거부되었다(12 ± 1.0 days; n=2). 이러한 결과는, T 세포 조절성 세포에 의해 이식 내성이 어느정도 매개됨을 나타낸다(미기재). 도 10D는 표 2의 결과를 요약하여 나타낸 것으로, LEW 신장으로 동종이식된 ACI 랫 수용체에 7일간 NC1153와 CsA를 각각 단독으로 또는 병용하여 매일 경구 위관 영양법으로 처리한 것에 관한 것이다. 각 투여량에서 각 처리 그룹의 MST를 나타내었고, 하위 차트에서는 NC1153-CsA 병용의 상승작용을 의미하는 작은 CI 수치가 나타나 있다.

도 11A-F에서, 649641P(NC1153)는 신독성이 없으며, 지질 대사에 영향을 미치지 않는다. 저염 식이한 랫(7 days prior and during 14 day therapy)에 경구 위관 영양법으로 160 mg/kg의 NC1153를 단독으로 또는 5 mg/kg의 CsA를 병용 처리하였고, 일부 동물은 경구 위관 영양법으로 0.8 mg/kg의 라파마이신(RAPA)을 단독으로 또는 5 mg/kg의 CsA를 병용 처리하였다. 혈청 크레아티닌 수치 및 혈청 크레아티닌 소거능으로 신장 기능을 평가하였고, 그 결과는 도 11A과 11B에 각각 나타내었다. 지질 대사는 혈청 콜레스테롤(도 11C), 트리글리세라이드(도 11D), LDL-콜레스테롤(도 11E) 및 HDL-콜레스테롤(도 11F)로 평가하였다. NC1153 단독 또는 CsA 병용 처리시 신장 구조에 대한 영향을 확인하였다. 7일간 저염 식이한 랫에 14일간 10 mg/kg의 649641P(NC1153)를 정맥투여하거나, 0.16 mg/kg의 RAPA를 정맥투여하거나, 10 mg/kg의 CsA를 경구 위관 영양법으로 투여하거나, 10 mg/kg의 CsA 경구 위관 영양법 투여와 0.16 mg/kg의 RAPA 정맥 투여를 병용하거나, 또는 10 mg/kg의 CsA 경구 위관 영양법 투여와 10 mg/kg의 649641P(NC1153) 정맥 투

여를 병용 처리하였다. 14일째에, 랫을 희생시키고, 신장 조직은 표준 방법에 따라 H&E으로 염색하였다. 각 그룹당 5마리의 랫에서 유사한 결과가 관찰되었다. 도 6a-e에서, 649641P(NC1153) 또는 RAPA 단독 투여시 신장에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, CsA 단독 처리시 공포형성(vacuolization) 및 위축(atrophy)과 더불어 30%의 세관 손상이 관찰되었다. CsA/RAPA(SRL) 그룹에서는, 90%의 세관에서 대규모의 공포형성과 위축 및 농축핵이 관찰되었다. CsA/RAPA 그룹과 대비하여, CsA/NC1153 병용처리한 랫의 신장에서는 CsA만 단독으로 처리한 그룹에서 관찰되는 것과 유사한 변화가 관찰되었다.

649641P(NC1153)의 메조 입체이성체인, WP938(도 18B)를 아래 단계를 포함하는 공정으로 합성하였다: 400 mL의 아세토니트릴에 용해된 0.1 mmol 시클로알카논은 및 0.21M N,N,N',N'-테트라메틸디아미노메탄을 아세틸 클로라이드 16.5 g (0.21mol)에 40분간 점적하였다. 반응이 끝나면, 조 생성물을 침전시키고, 여과하고 에테르로 세척한 다음 건조하였다. 이후 결정화를 통하여 순수한 생성물을 수득하였다.

WP938 화합물을 단독으로 처리하거나 또는 CsA와 병용 처리하였을 때 동종이식 생존율과 독성에 대한 영향을 실험하였다. 그 결과는 도 12A,B - 13A-F에 나타나 있다. WP938 단독으로 7일간 20-160 mg/kg의 투여량으로 경구 위관 영양법으로 처리한 경우, LEW 신장으로 동종이식된 ACI 수용체의 생존율이 투여량 의존적으로 증가되었다(도 12A). 1.25 mg/kg CsA와 160 mg/kg WP938를 7일간 경구 위관 영양법으로 처리시 신장 동종이식 생존율에서 상승적인 작용이 CI 0.44로 형성되었다(도 12B). 도 13A-F에서, 14일간 160 mg/kg WP938를 경구 처리한 경우 화학적인 변화와 독성 결핍을 나타내는 혈액 요소 수치상 변화도 발생되지 않았다. 혈청 크레아티닌과 크레아티닌 소거능은 WP938에 의한 신독성 결핍과 CsA에 의한 신독성에 영향을 미치지 않음을 나타낸다(도 13A, 13B). 도 13C는 콜레스테롤 수치를 나타낸다. 도 13D는 트리글리세라이드를 나타낸다. 도 13E는 HDL 수치를 나타낸다. 도 13F는 LDL 수치를 나타낸다.

도 14B - 도 39B는, 프롤액틴 또는 IL2로 자극화된 T 세포에서 증식을 저해할 수 있는 것으로 검색된 다양한 매니치 염기 화합물과 그외(염 화합물)의 구조식을 나타낸다. 도 14B - 도 39B는 기재된 농도 범위에서 분석 결과를 나타낸 것이다. 검색 분석은 상기 일반적인 방법으로 실제 수행되었다. IL2(연한 원)으로 자극된 Jak3와 Stat5a/b를 저해하기에 충분한 농도에서, 프롤액틴(PRL)에 의해 자극된 Jak2와 Stat5a/b 활성화를 차단하지 않는 특성을 갖는 화합물은, 이후 실험을 위해 동정되었다. 바람직한 649641P(NC1153) 화합물과 그것의 선택적 저해활성은 실시예 1과 도 1A,B에 나타낸다. 추가적인 후보 약물로서, 도 14B-17B와 19B-39B에 나타난 화합물들은 특정 농도에서 PRL 또는 IL2로 자극받은 T세포에 대하여 얼마 이상의 선택적 저해 활성을 나타내며, 이들은 대표적인 화합물 649641P(NC1153)를 이용한 전술한 실시예들에서 언급된 바와 같은 방식의 실험 대상체들이다. 적용가능한 이러한 화합물은, 비대칭의 센터를 가지며, 라세미산, 라세믹 혼합물 및 개별적인 부분입체이성질체로서, 또는 포함되는 모든 이성체 형태와 광학이성질체로 발생될 수 있다. 예컨대, 화학식 1에서 C-2와 C-12의 배위는 (R) 또는 (S)일 수 있다. 모든 입체 이성체를 포함하며, 무독성인 것으로 확인되었으며, 649641P(NC1153)와 같이 동종이식 생존율을 연장시킬 수 있는 화합물은, 또한 면역억제 요법에서 있어서 인간에 대한 또는 수의학적 용도에 치료학적 가치가 있을 수 있다. 이들은 또한 림프계 기관 또는 골수 기관의 Jak3 발현 세포와 관련된 그의 질환 치료에 치료학적 가치가 있을 것을 예상된다. 649641P(NC1153) 및 WP938에서와 같이, 이러한 후보 물질 화합물은 또한 CsA 또는 Jak3 관련 경로 이외의 경로에 의해 면역억제 효과를 발휘하는 그의 면역억제성 약물과 병용하여 상승적 활성을 나타낼 것이다.

## 정의

관련적이고 일반적인 의미에 더하여, 하기 정의는 명세서와 청구범위에서 사용된 문맥에 적용된다.

"선택적 저해"는 하나의 단백질의 기능을 우선적으로 차단하는 화합물과 1종 이상의 공지 단백질을 더욱 적게하는 화합물을 의미한다.

"특이적 저해"는 다른 단백질에 영향을 미치지 않고 특정 단백질의 기능만 차단하는 화합물을 의미한다.

"면역억제 가능성"은 면역 반응을 감소 또는 제거하는 화합물을 의미한다(예, 이식된 기관 동종이식의 거부반응을 차단하는 약물).

"약학적 조성물"은 포유류에 약으로 투여되기 위한, 1종 이상의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염을 적합한 담체와 함께 함유한 혼합물이다.

"림프계 세포"는 면역 기원의 세포를 의미하며, 보다 구체적으로는 림프구 계열의 줄기 세포에서 유래된 세포를 의미하며, 크고 작은 림프구, 혈장 세포를 포함한다. 림프계 세포의 예로는, T 세포, B 세포 및 자연 살상(NK) 세포가 있다.

"골수 세포"는 골수 기원의 세포를 의미하며, 즉 골수 계열의 줄기세포에서 유래된 것으로서, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포를 포함한다.

"약물"은 의약적 용도로 적합한 화합물이다.

"콘제너"는 조성물에서 다른 것과 매우 가까우며(예, 구조 유사체), 유사한 또는 상반되는 효과를 발휘하는 화합물이다.

"치료학적 유효량"은 처리되는 질병의 1종 이상의 증상을 얼마 이상으로 경감시키는 투여되는 화합물의 함량이다. 예컨대, 질환의 증상의 예방, 완화 또는 개선하거나 또는 처리된 투여 대상자의 생존율을 연장시키는데 효과적인 화합물의 함량이다.

질환 또는 질병에서, "치료"는 질환 또는 질병의 발생 예방 또는 방지, 질환 또는 질병의 증상 또는 부작용을 정지, 퇴행 또는 완화시키거나, 및/또는 처리된 환자의 생존율을 증가시키는 것이다.

### 참고문헌

1. Kane LP, Lin J, Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol.* (2000) 12L2420249.
2. Denton, MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* (1999) 353:1083-1091.
3. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, et al. The side effects of Cyclosporin-A and Tacrolimus. (1998) *Clin. Nephrol* 49:356-363.
4. Kahan BD, Camardo JS. Rapamycin: clinical results and future opportunities. *Transplantation* (2001) 72:1181-1193.
5. Kirken RA, Stepkowski SM. New directions in T-cell signal transduction and transplantation tolerance. *Transplant* (2002) 7:18-25.
6. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* (1994) 76:263-274.
7. Irving BA, Chan AC, Weiss A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med.* (1993) 177:1093-1103.
8. Chan AC, Kadlecsek TA, Elder ME, et al. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science.* (1994) 264:1599-1601.
9. Appleby MW, Gross JA, Cooke MP, Levin SD, Qian X, Perlmutter RM. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell.* (1992) 70:751-763.
10. Kuo CT, Leiden JM. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol.* (1999) 17:149-187.
11. Leonard WJ, O'Shea JJ. JAKs and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* (1998);16:293-322.
12. Kondo M, Takeshita T, Ishii N, et al. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science.* (1993) 262:1874-1877.
13. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science.* (1993);262:1877-1880.

14. Russell SM, Keegan AD, Harada N, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science*. (1993) 262:1880-1883.
15. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science*. (1994) 266:1042-1045.
16. Kirken RA, Rui H, Malabarba MG, et al. Activation of JAK3, but not JAK1, is critical for IL-2-induced proliferation and STAT5 recruitment by a COOH-terminal region of the IL-2 receptor beta-chain. *Cytokine*. (1995) 7:689-700.
17. Malabarba MG, Rui H, Deutsch HH, et al. Interleukin-13 is a potent activator of JAK3 and STAT6 in cells expressing interleukin-2 receptor-gamma and interleukin-4 receptor-alpha. *Biochem J*. (1996) 319:865-872.
18. Szabo SJ, Glimcher LH, Ho IC. Genes that regulate interleukin-4 expression in T cells. *Curr Opin Immunol*. (1997) 9:776-781.
19. Kirken RA, Rui H, Malabarba MG et al. *J Biol Chem* (1994) 269:19136.
20. Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, et al. *Nature* (1994) 370:151.
21. Kirken RA. *Transplantation Proceedings* (2001) 33:3268-3270.
22. Thomis TC, Berg LJ. *Curr Opin Immunol* (1997) 9:541.
23. Kirken RA, Erwin RA, Taub D, et al. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated Jak3/Stat5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T-cells. *J Leukoc Biol* (1999) 65:891-899.
24. Behbod F, Erwin-Cohen RA, Wang M-E, et al. Concomitant inhibition of Janus kinase 3 and calcineurin-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts. *J Immunol* (2001) 166:3724-3732.
25. Stepkowski SM, Erwin-Cohen RA, Behbod F et al. Selective inhibitor of Janus tyrosine kinase 3, PNU156804, prolongs allograft survival and acts synergistically with cyclosporine but additively with rapamycin. *Blood* (2002) 99:680-689.
26. Yamashita H, Xu J, Erwin RA, Farrar WL, Kirken RA, Rui H. Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin-sensitive cells. *J Biol Chem*. (1998) 273:30218-30224.
27. Kirken RA, Rui H, Malabarba MG, et al. Activation of JAK3, but not JAK1, is critical for IL-2-induced proliferation and STAT5 recruitment by a COOH-terminal region of the IL-2 receptor beta-chain. *Cytokine*. (1995) 7:689-700.
28. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. (1969) 57:225-229.
29. Chou T-C. The median effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. In: Chou T-C, Rideout D, Eds. *Synergism and antagonism in chemotherapy*. San Diego, CA: Academic Press, Inc, 1991:61-102.
30. Chou J, Chou T-C. Dose-effect analysis with microcomputers: quantitation of ED50, LD50, synergism, antagonism, low-dose risk, receptor-ligand binding and enzyme kinetics. Biosoft, Cambridge, UK. 1987.

31. Schrader B, Steinhoff G. Models of inflammatory cascade reactions by adhesion molecules. In: Steinhoff G, Ed. Cell adhesion molecules in human organ transplants. Austin: R G Lands Company, 1993:71-86.
32. Winters GL, Marboe CC, Billingham ME. The international society for heart and lung transplantation grading system for heart transplant biopsy specimens: Clarification and commentary. J Heart Lung Transplant. 1998;17:754-760.
33. Thomis DC, Berg LJ. Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function. J Exp Med (1997) 185: 197-206.
34. Dimmock JR, Kumar P. Anticancer and Cytotoxic Properties of Mannich Bases. Current Medicinal Chemistry (1997) 4:1-22.
35. Dimmock JR, Chamankhah M, Seniuk A et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Some Mannich Bases of Alicyclic Ketones. Pharmazie (1995) 50:668-671.

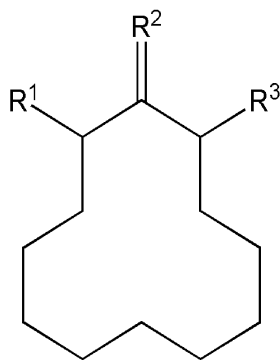
본 발명의 바람직한 양태들을 언급하나, 본 발명의 사상 및 기술로부터 이탈되지 않게 당업자에 의해 변경을 가할 수 있다. 본원에서 언급된 양태들은 예시적이고, 대표적인 것일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다. 많은 변형 및 변형이 가능하며, 이는 본 발명의 범위에 포함된다. 전술한 논의는 이식 편대 숙주질환을 유래하는 T 세포에 집중되어 있으나, 본원의 방법, 화합물 및 조성물은 다른 T 세포 의존적 질환 또는 질병에 적용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예컨대, 이들은 루푸스, 관절염, 복합성 경화증과 같은 자가면역 질환을 치료하거나, 알레르기, 천식, 건선, 궤양결장염, 림프종 및 백혈병의 치료에 유용할 수 있다. Jak3를 표적으로 하는 선택적 저해는 또한 많은 다른 면역-유래 병리학이나, 과활성 또는 의도하지 않은 수지상 세포로부터 유래된 과활성 면역 시스템 반응 증상, B 세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살상 세포에 유래된 증상을 포함한, Jak3 발현성 골수 세포에 의한 병리에 적용할 수 있을 것으로 예측된다. 따라서, 보호 범위는 전술한 바와 아래 청구범위에 한정되지 않으며, 청구범위의 청구 대상의 모든 등가물을 포함한다. 물질, 방법과 그것의 구체적인 예시를 제공하는, 본원에서 인용된 모든 특허, 특허 출원서 및 공개물은 참고자료로 인용된다. 상기 배경기술에서 논의된 참고문헌은 본 발명의 우선 기술로 인정되지 않는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그것의 염 화합물 1종 이상을 야누스 티로신 키나제 3(Janus tyrosien kinase 3)의 활성을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법:

(화학식 1)



상기 화학식 1에 있어서,

$R^1$ 은 H,  $=CH_2$ ,  $CH_2N(CH_3)_2$ ,  $CH_2SC(O)CH_3$ ,  $CH_2SC_6H_5$ ,  $CH_2SCH_2-(4-C_6H_4OCH_3)$ ,  $CH_2SC(O)C_6H_5$  또는  $CH_2N(CH_2CH_3)_2$ 이고;

$R^2$ 는 O이고;

$R^3$ 는  $CH_2N(CH_3)_2$ ,  $CH_2N(CH_2CH_3)_2$  또는  $CH_2-(N-모르필)$ 이다.

## 청구항 2.

제 1항에 있어서,  $R^1$ 은  $CH_2N(CH_3)_2$ 이고  $R^3$ 은  $CH_2N(CH_3)_2$ 인 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

## 청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 화합물은 메조(meso) 입체이성체인 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

## 청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 세포는 림프계 기관 또는 골수 기관의 세포인 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

## 청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 세포에서 신호 3 경로(signal 3 pathway)를 간접하여 세포 분열을 차단하는 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

## 청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 1종 이상의 화합물은, 상기 야누스 티로신 키나제 3을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도에서, 야누스 티로신 키나제 3의 활성 이외의 단백질 티로신 카나제 활성은 실질적으로 저해하지 않는 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

## 청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 세포는 T-세포이고,

상기 방법은 상기 T-세포에서 야누스 티로신 키나제 2(Jak2)에 비하여 3배 이상 높게 Jak3의 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

## 청구항 8.

제 1항에 있어서, IL2에 의해 활성화된 Jak3와 Stat5a/b를 저해하기에 충분한 농도에서 프롤액틴(PRL)에 의한 Jak2와 Stat5a/b 활성화 저해 정도가 낮은 1종 이상의 화합물을 선택하는 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법.

### 청구항 9.

- (a) 세포 배양 배지에서 무활성의 Jak3 의존적 T 림프구를 수득하는 단계;
  - (b) 선택적으로, 상기 무활성의 T 림프구가 증식되도록 자극하기 위하여, 사이토카인으로 T 림프구를 전처리하는 단계;
  - (c) 단계 (a) 및 (b)의 무활성의 림프구 또는 자극화된 림프구를 제1항에 기재된 화합물 또는 그것의 염 화합물로 처리하는 단계;
  - (d) 단계 (c)의 림프구를 세포 증식이 촉진되는 조건하에서 배양하는 단계;
  - (e) 단계 (d) 이후 세포 증식 정도를 평가하는 단계;
  - (f) 선택적으로, 상기 화합물의 Jak2 의존적 T 림프구의 증식에 대한 저해 효과를 평가하는 단계;
  - (g) 선택적으로, 상기 화합물의 세포독성을 평가하는 단계;
  - (h) 단계 (e), (f) 및 (g)의 평가로부터, 세포독성에 기인하지 않는, Jak3 의존적 림프구 증식의 현저한 저해가 존재하는 경우, 상기 화합물이 생체내 T 세포 매개성 면역억제제 또는 T 세포 증식 저해제로서 치료학적 용도를 갖는 후보 약물로서의 잠재성이 있음을 제시하는 것으로 결정하는 단계;
  - (i) 선택적으로, 단계 (e)와 (f)의 평가를 비교하여, 단계 (f)에서 평가된 저해 효과가 단계 (e)에서 평가된 저해 효과에 비하여 현저히 낮은 경우, 상기 비교 결과로부터 Jak2 활성화 저해와 비교하여 상기 화합물이 Jak3 활성을 저해하는데 있어 어느 정도 이상으로 선택적인지 결정하는 단계;
- 를 포함하는, 치료용 면역억제제로 유용한 물질을 동정하는 생체의 시험 방법.

### 청구항 10.

제 1항에 기재된 1종 이상의 화합물, 그것의 대사산물 또는 그것의 유도체를 세포에서 신호 3 경로를 간섭하는 유효량으로 세포에 접촉시켜 세포 기능을 저해하는 단계를 포함하며,

상기 접촉은 Jak3 의존적 세포 기능을 저해하기 위하여 제 1항에 기재된 1종 이상의 화합물, 그것의 약학적으로 허용가능한 염 화합물, 그것의 대사산물 또는 검사대상의 체내에서 상기 화합물로 전환시킬 수 있는 상기 화합물의 전구체와, 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학적 조성물을 치료학적으로 유효한 함량으로 투여대상에 투여하여 단계를 포함하는,

야누스 티로신 키나제 3 발현성 세포의 부적합한 기능 억제가 필요한 포유류 투여대상에서 야누스 티로신 키나제 3 발현성 세포의 부적합한 기능을 억제하는 생체내 방법.

### 청구항 11.

제 10항에 있어서, 상기 세포는 T 세포이고, 상기 약학적 조성물의 함량은 T 세포의 세포 분열을 차단하는데 효과적인 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현성 세포의 부적합한 기능을 억제하는 생체내 방법.

**청구항 12.**

제 10항에 있어서, 상기 약학적 조성물을 투여대상에 연속적으로 또는 주기적으로 투여하는 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현성 세포의 부적합한 기능을 억제하는 생체내 방법.

**청구항 13.**

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 부적합한 면역 반응을 억제하기 위하여 포유류의 투여대상을 치료학적으로 처리하는 방법으로서, 상기 투여대상은 부적합한 면역반응을 경험하였거나 또는 경험할 위험이 있으며, 상기 약학적 조성물의 치료학적으로 유효한 함량은 상기 부적합한 면역반응을 완화시키거나 또는 방지하는 것을 특징으로 하는, 부적합한 면역 반응을 억제하기 위하여 포유류의 투여대상을 치료학적으로 처리하는 방법.

**청구항 14.**

제 13항에 있어서, Jak3 저해제 이외의 다른 면역억제성 물질을 치료학적으로 유효한 함량으로 상기 투여대상에 더 투여하는 것을 특징으로 하는, 부적합한 면역 반응을 억제하기 위하여 포유류의 투여대상을 치료학적으로 처리하는 방법.

**청구항 15.**

제 14항에 있어서, 상기 다른 면역억제성 물질은 시클로스포린A 또는 FK506인 것을 특징으로 하는, 부적합한 면역 반응을 억제하기 위하여 포유류의 투여대상을 치료학적으로 처리하는 방법.

**청구항 16.**

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 포유류의 이식 수용체의 기관 이식 거부반응을 완화하는 방법으로서, 이식된 기관에 대한 T 세포 매개성 면역반응을 억제하여 상기 기관에 대한 거부반응을 완화 또는 저지하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17.**

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 포유류의 동종이식 수용체에서 급성 동종이식 거부반응을 완화하는 방법으로서, 동종 이식에 대한 T 세포 매개성 항-동종이식(anti-allograft) 면역반응을 억제하여 상기 동종이식에 대한 급성 거부반응을 완화 또는 방지하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18.**

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는, 포유류의 이식 내성을 유도하는 방법으로서, T 세포 매개성 이식 거부반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19.**

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 자가면역 질환의 포유류 투여대상자에서 자가면역 질환의 경감을 촉진하는 방법으로서, T 세포 매개성 자가면역 반응을 억제하여 내인성 Jak3 의존적 T 세포에 의해 매개되는 투여대상자의 자가 조직에 대한 자가면역 공격을 소거 또는 저지하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 20.

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 알레르기가 있는 포유류 투여대상자의 기도 과민성을 완화하는 방법으로서, T 세포 매개성 과민 반응을 억제하여 기도 조직의 과민성을 소거 또는 저지하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 21.

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 알레르기가 있는 포유류 투여대상자의 알레르기를 완화하는 방법으로서, T 세포 매개성 알레르기 반응을 억제하여 알레르기 반응을 소거 또는 저지하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 22.

제 10항의 방법을 수행하는 것을 포함하는 Jak3 의존적 백혈병 또는 림프종의 증식을 저해하는 방법으로서,

상기 투여 대상자는 백혈병 또는 림프종 환자이고,

상기 화합물 또는 대사산물은 다른 키나제 활성화에 비하여 Jak3 활성을 선택적으로 억제할 수 있어, 백혈병 또는 림프종 세포의 증식을 저해 또는 차단하는 것을 특징으로 하는, Jak3 의존적 백혈병 또는 림프종의 증식을 저해하는 방법

### 청구항 23.

제 10항에 있어서, 상기 화합물의 신독성(nephrotoxicity)은 시클로스포린A의 신독성 보다 낮은 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현성 세포의 부적합한 기능을 억제하는 생체내 방법.

### 청구항 24.

제 10항에 있어서, 다른 면역억제성 물질을 더 투여하는 것을 특징으로 하는, 야누스 티로신 키나제 3 발현성 세포의 부적합한 기능을 억제하는 생체내 방법.

### 청구항 25.

Jak3을 포함하는 T 세포에 다양한 농도 범위의 검사대상 화합물을 접촉시켜 상기 화합물이 상기 범위내 한가지 이상의 농도에서 Jak3 활성을 저해하는지 여부를 결정함으로써, T 세포 기능 파괴에 대한 활성을 시험하는 단계;

상기 검사대상 화합물의 Jak3 저해활성을 Jak3 저해 활성이 입증된 제 2항에 기재된 화합물과 비교하는 단계; 및

상기 실험 결과 및 비교 결과를 활용하여 상기 검사대상 화합물이 치료용 면역억제성 물질로서 생체외에서 이용가능한 후보 약물인지 결정하는 단계;

를 포함하는 신규한 면역억제성 약물 동정하는 생체외 방법.

**청구항 26.**

제 25항에 있어서,

검사대상 화합물을 Jak2 저해 활성화에 대하여 실험하는 단계;

상기 검사대상 화합물의 Jak3 저해 활성을 그것의 Jak2 저해활성과 비교하는 단계; 및

상기 비교 결과를 이용하여 상기 검사대상 화합물을 선택적 Jak3 저해제로서 동정하는 단계;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 신규한 면역억제성 약물을 동정하는 생체의 방법.

**청구항 27.**

(a) 적합한 공여체 동물로부터 적출한 동종이식물을 적합한 수용체 동물로 이식하는 단계;

(b) 동물에 대한 기본적인 영양과 건강한 상태를 유지시키는 단계;

(c) 하나 이상의 동물 각각에 후보 약물을 투여하여 처리된 수용체 또는 그룹을 제공하는 단계;

(d) 하나 이상의 동물에 제1항에 기재된 화합물로서 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>은 각각 CN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이고 R<sup>2</sup>는 O인 화합물을 투여하여 양성 대조군으로 제공하는 단계;

(e) 선택적으로, 미처리된 수용체 동물 중 하나 이상을 미처리 상태로 남겨 이를 미처리된 대조군 수용체 또는 대조군으로 제공하는 단계;

(f) 각 수용체에서 각각의 동종이식에 대한 동종이식 생존 시간을 측정하는 단계;

(g) 각 동종이식에 대한 조직학적 실험을 수행하여 각 동종이식에서 후보 약물 관련 구조적 손상을 조사하는 단계;

(h) 각 동종이식에서 동종이식 생존 시간과 조직학적 구조 변화를 유도하는 후보 약물을 비교하는 단계; 및

(i) 단계 (h)의 비교 결과를 이용하여, 이식체의 생존 시간 증강과 미처리 대조 수용체(들)의 동종이식체(들) 또는 양성 대조 수용체(들)의 동종이식체(들)에 비해 약물 처리된 동종이식체에서의 약물 유도성 구조적 손상이 없는 경우, 상기 후보 약물이 면역억제성 물질로서 치료학적으로 생체외에서 사용되는 것이 효과적임을 나타내는 것으로 판단하는 단계;

를 포함하는 동종이식 생존에 대한 후보 면역억제성 약물의 효용을 생체내로 실험하는 방법.

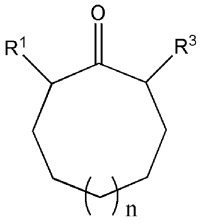
**청구항 28.**

제 27항에 있어서, 상기 후보 약물이 생체외에서 Jak3 의존적 T 세포 증식을 선택적으로 저해할 수 있는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 동종이식 생존에 대한 면역억제성 후보 약물의 효용을 생체내로 실험하는 방법.

**청구항 29.**

화학식 2로 표시되는 화합물 또는 그것의 염 화합물 1종 이상을 Jak3의 활성을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는, Jak3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법:

(화학식 2)



화학식 2에서,

n은 1, 2, 3, 4 또는 6이고;

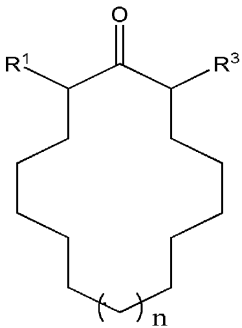
R<sup>1</sup>은 H, CH<sub>2</sub>, 또는 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이고;

R<sup>3</sup>은 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이다.

### 청구항 30.

화학식 3으로 표시되는 화합물 또는 그것의 염 화합물 1종 이상을 Jak3의 활성을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는, Jak3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법:

(화학식 3)



화학식 3에서,

n은 1 또는 2이고;

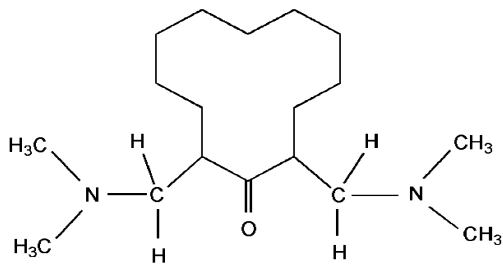
R<sup>1</sup>은 H 또는 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이고;

R<sup>3</sup>은 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이다.

### 청구항 31.

아래 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그것의 염 화합물 1종 이상을 Jak3의 활성을 선택적으로 저해하기에 유효한 농도로 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는, Jak3 발현 세포의 기능 및/또는 증식을 저해하는 방법:

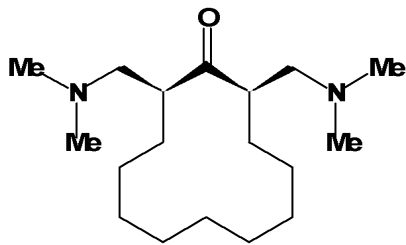
(화학식)



청구항 32.

아래 화학식으로 표시되는 분리 또는 정제된 화합물 또는 그것의 염 화합물:

(화학식)

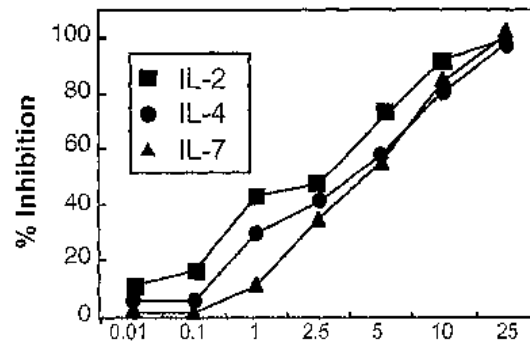


청구항 33.

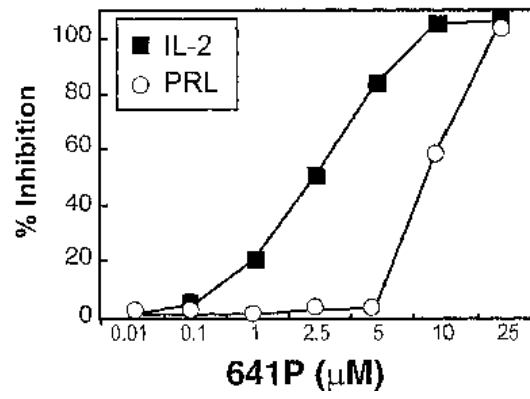
담체와, 제 32항에 기재된 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그것의 염 화합물을 포함하는 약학적 조성물.

도면

도면1

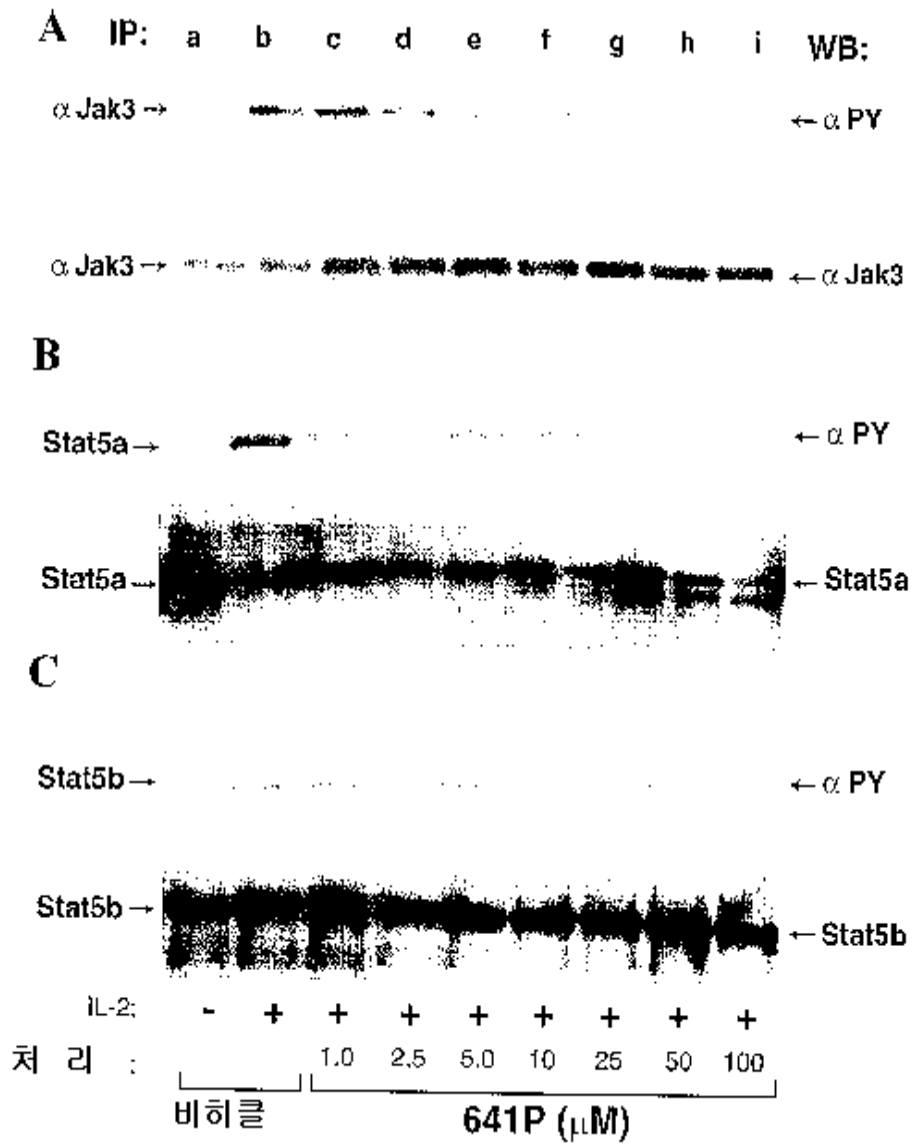


A

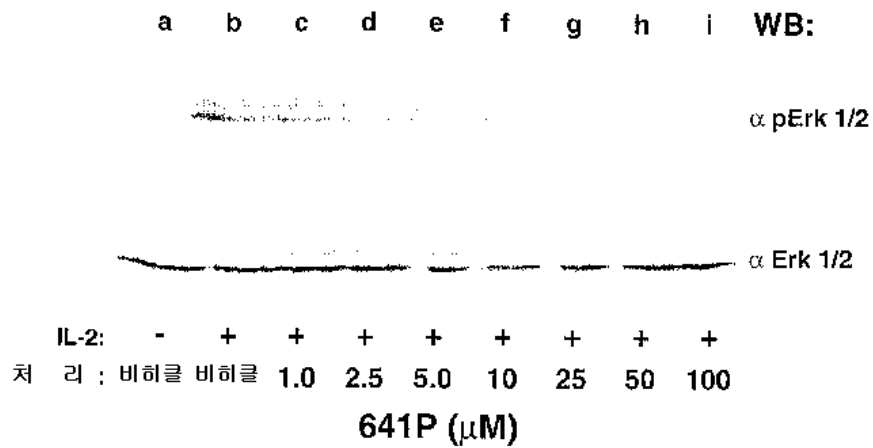


B

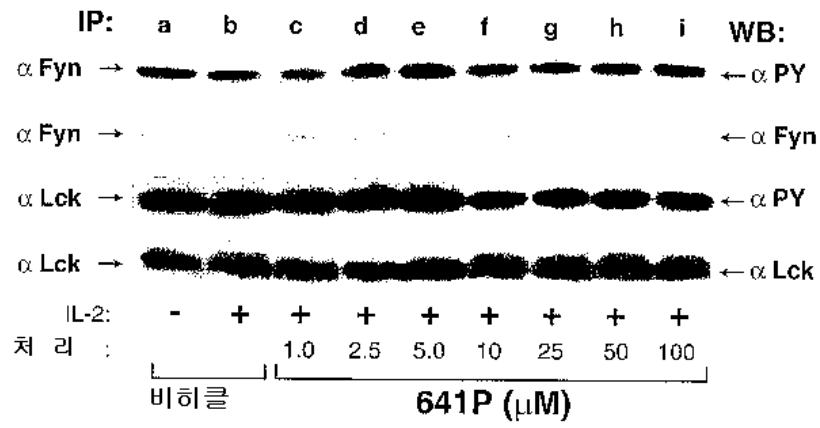
도면2



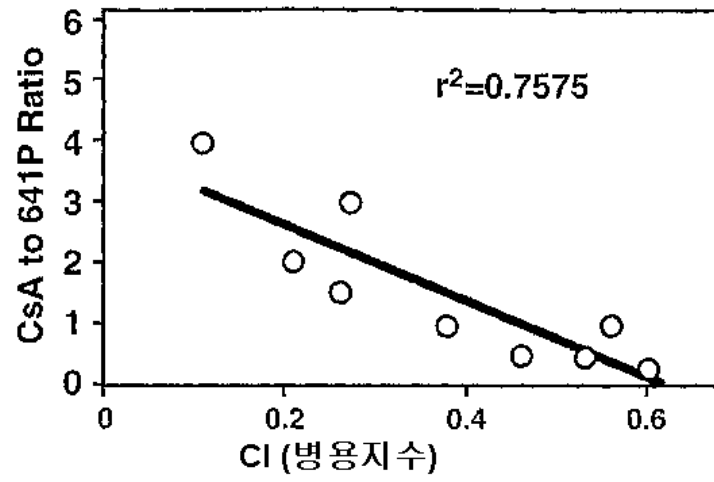
도면3



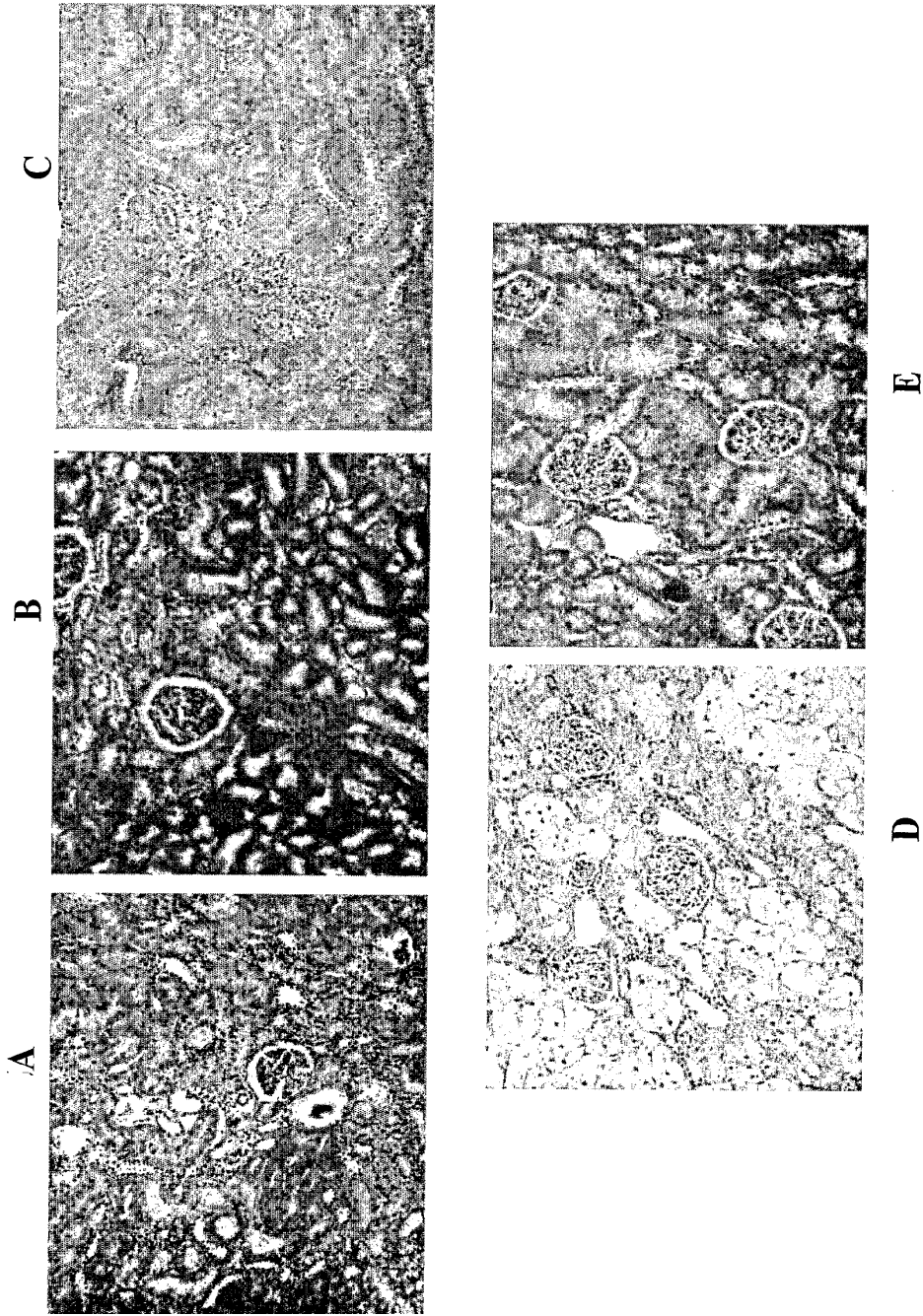
도면4



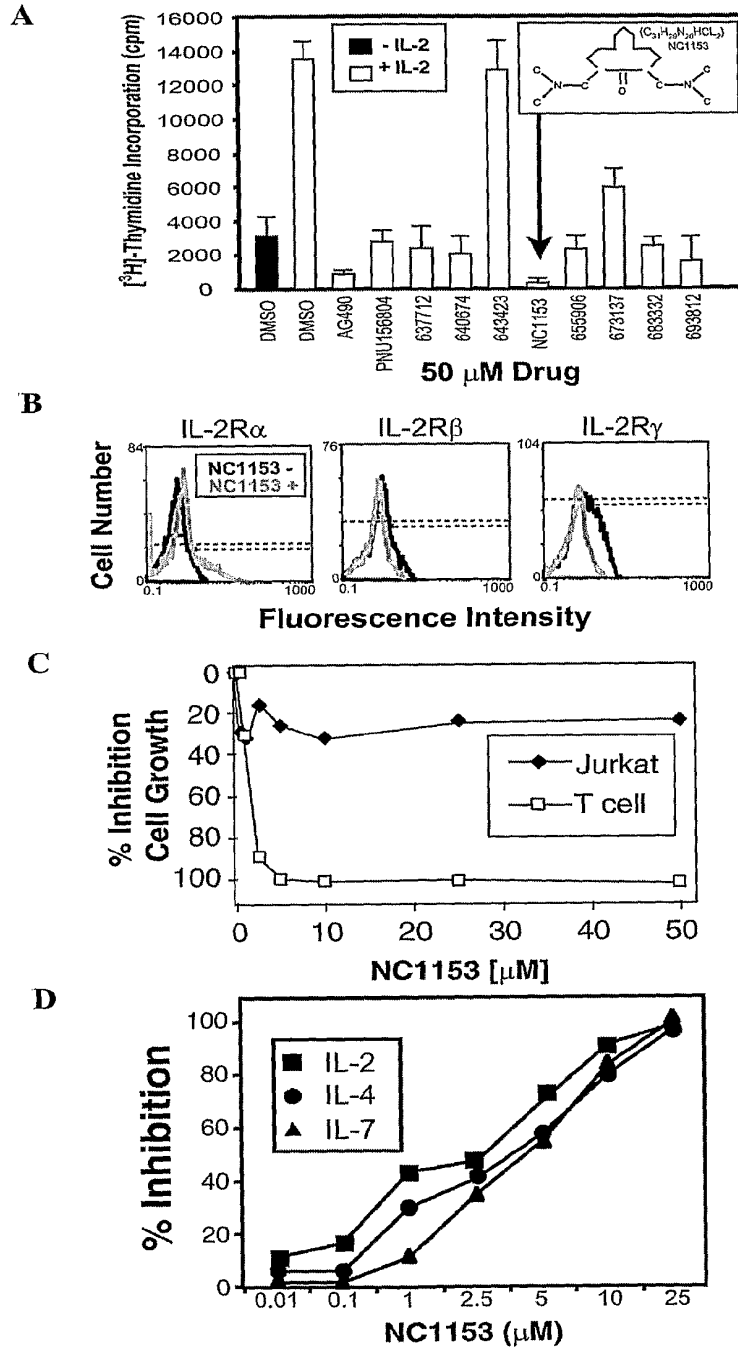
도면5



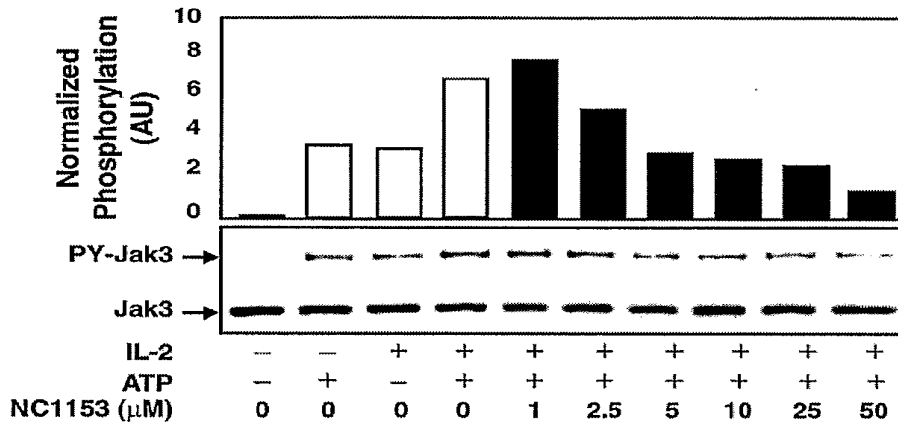
도면6



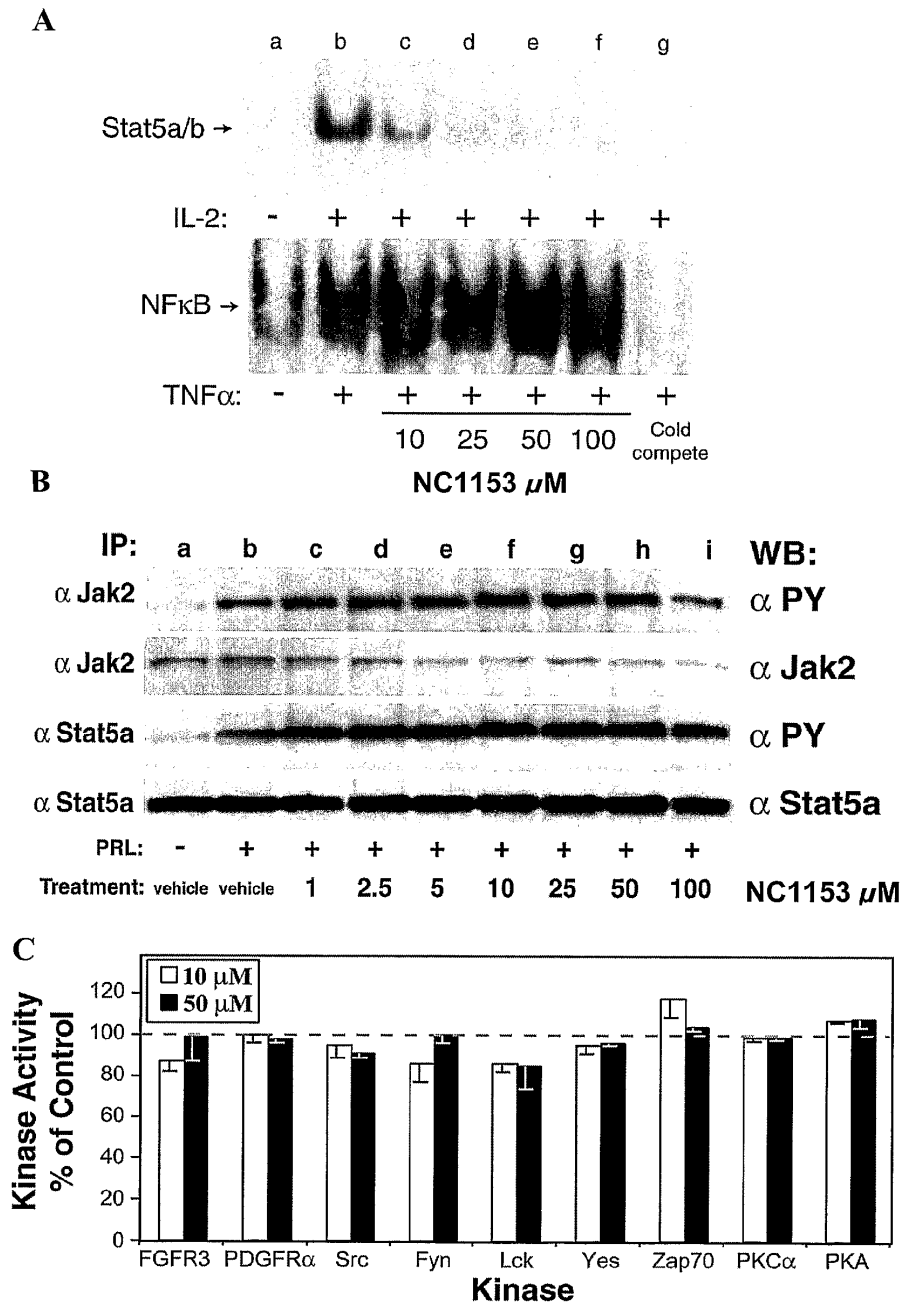
도면7



도면8

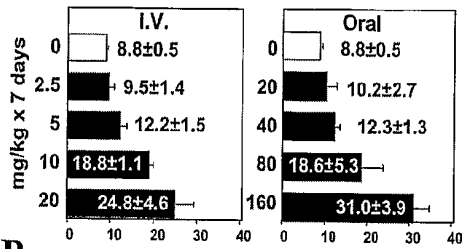


도면9

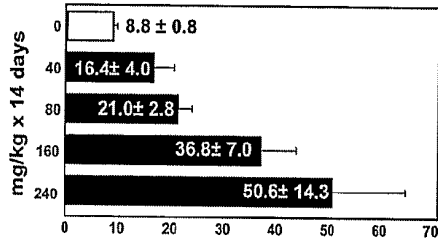


도면10

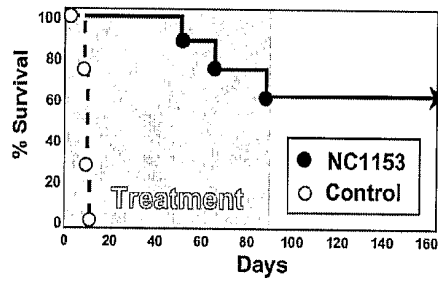
A



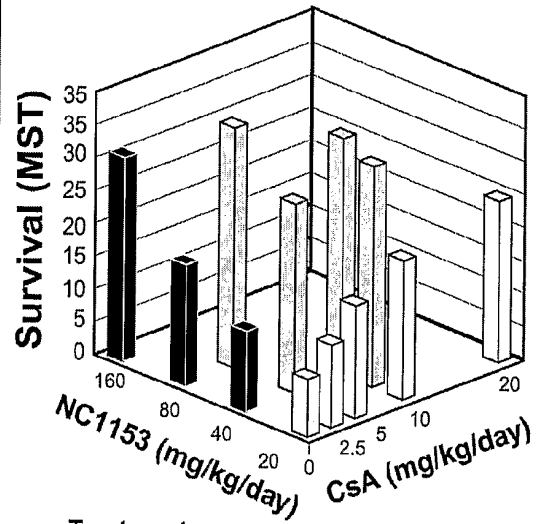
B



C

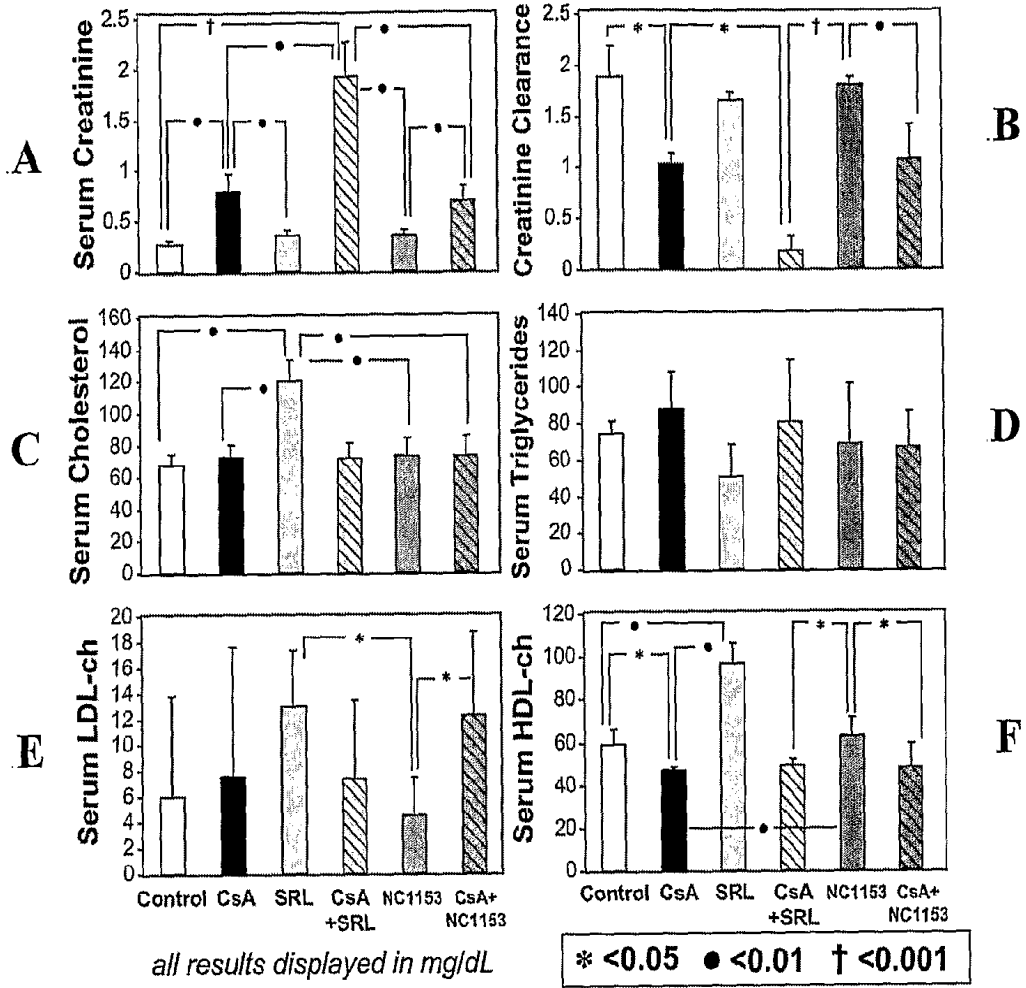


D

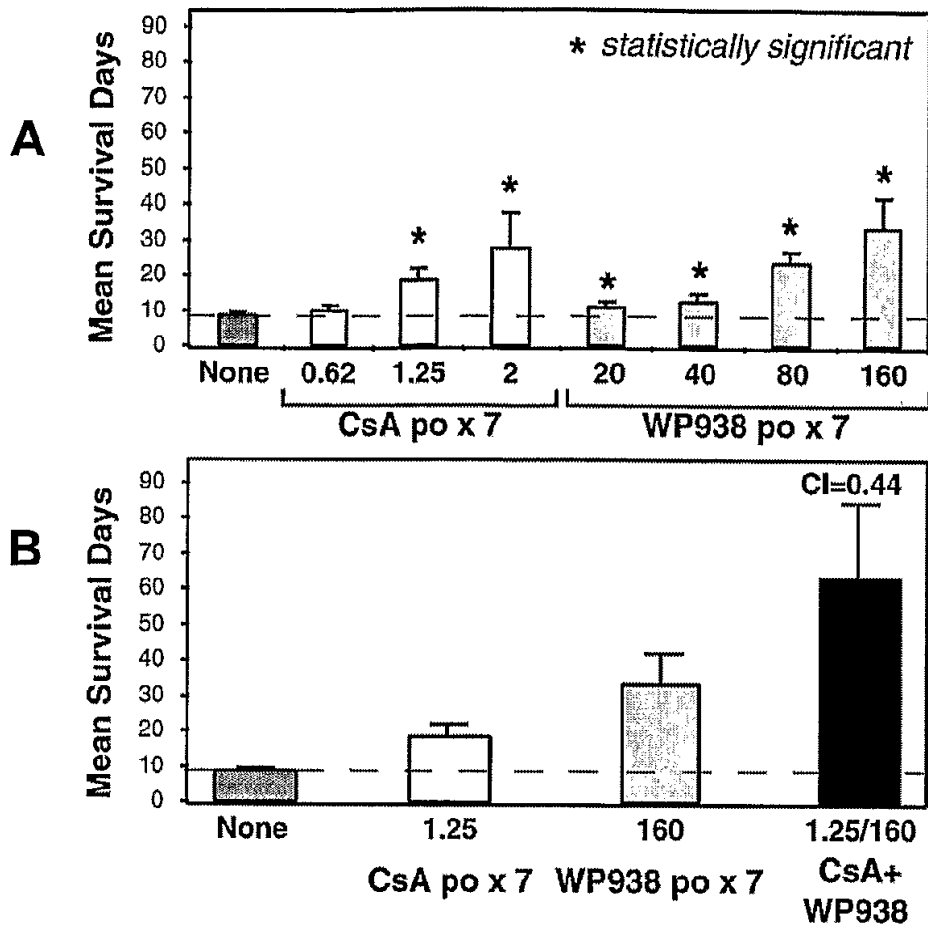


Treatment mg/kg/d		Ratio	MST ± SD	CI
NC1153	CsA			
20	10	2:1	33.6 ± 10.04	0.30
40	5	8:1	28.8 ± 9.87	0.49
40	10	4:1	36.0 ± 10.05	0.36
80	5	16:1	36.6 ± 4.72	0.51

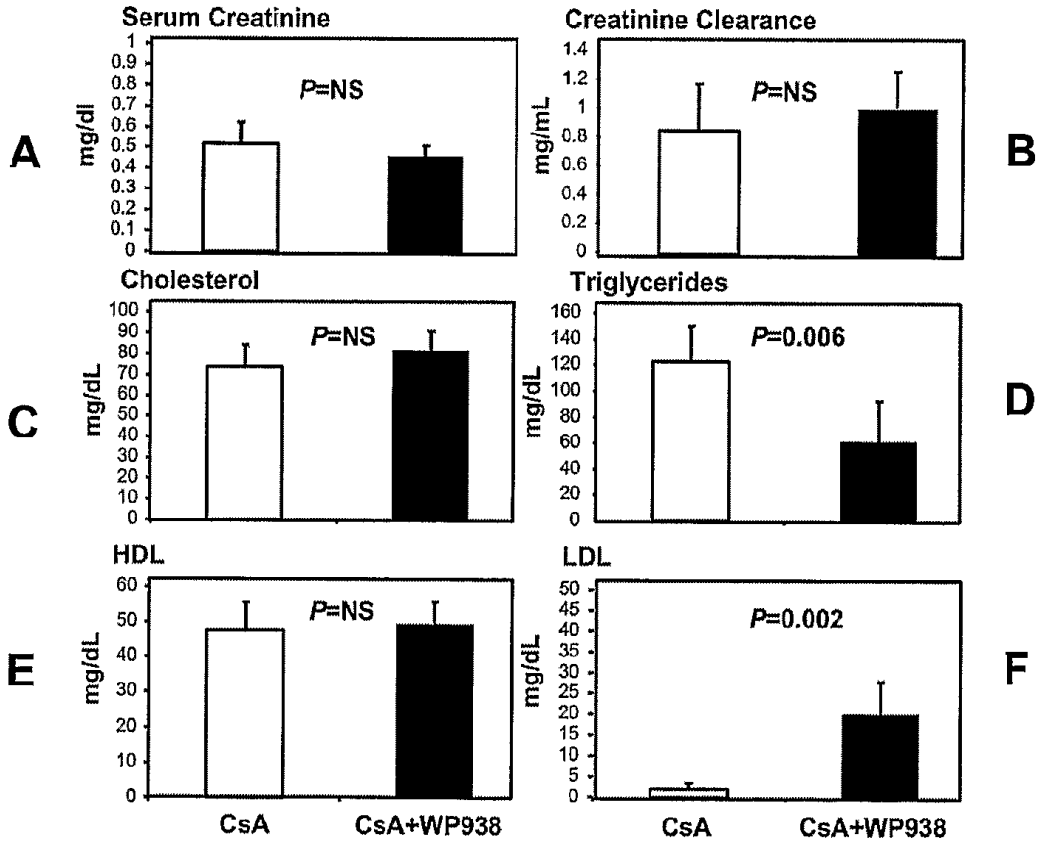
도면11



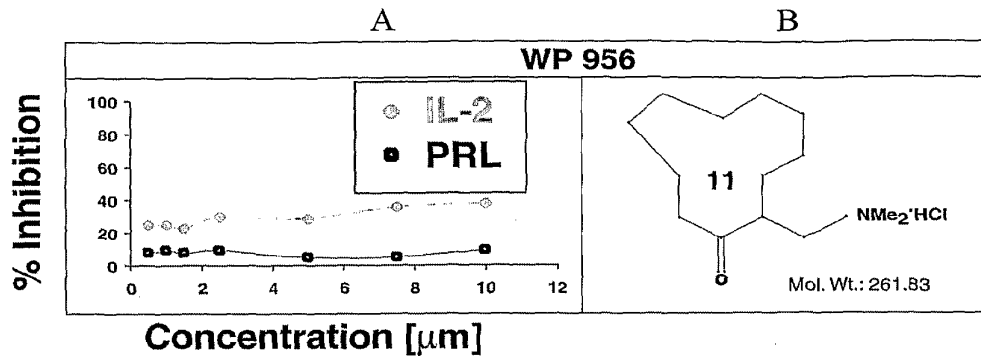
도면12



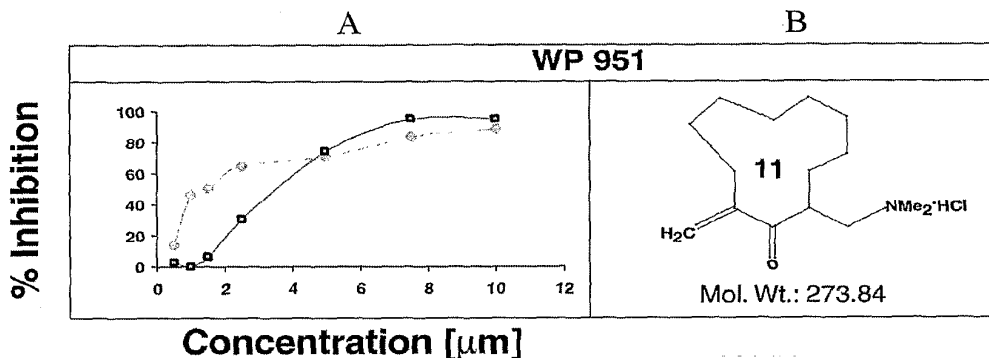
도면13



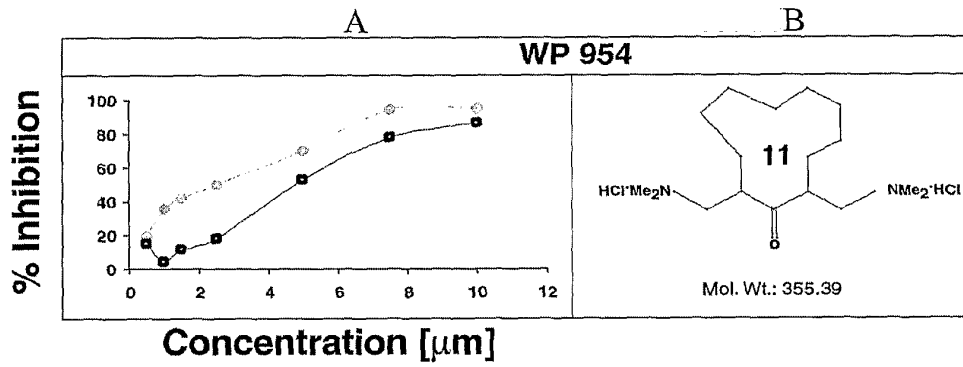
도면14



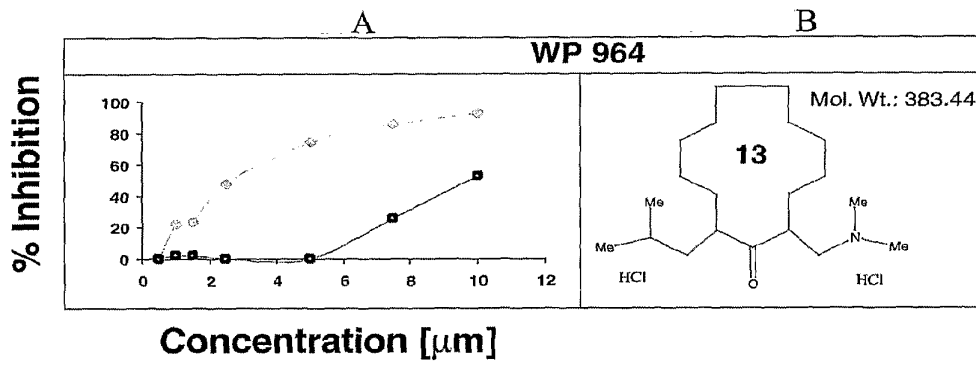
도면15



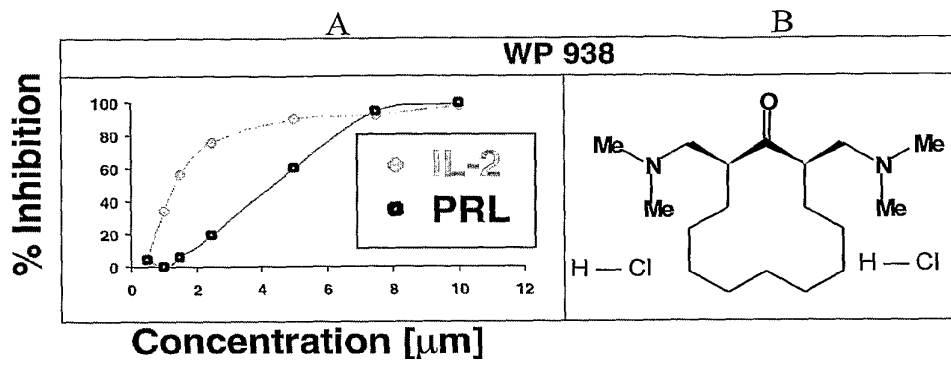
도면16



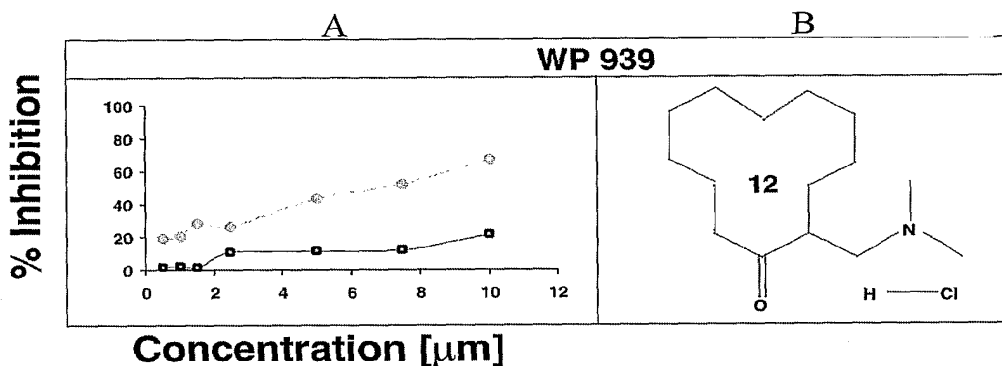
도면17



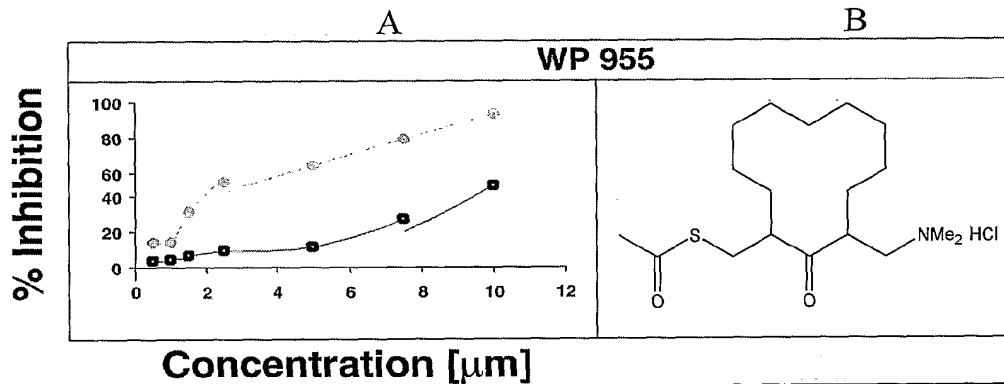
도면18



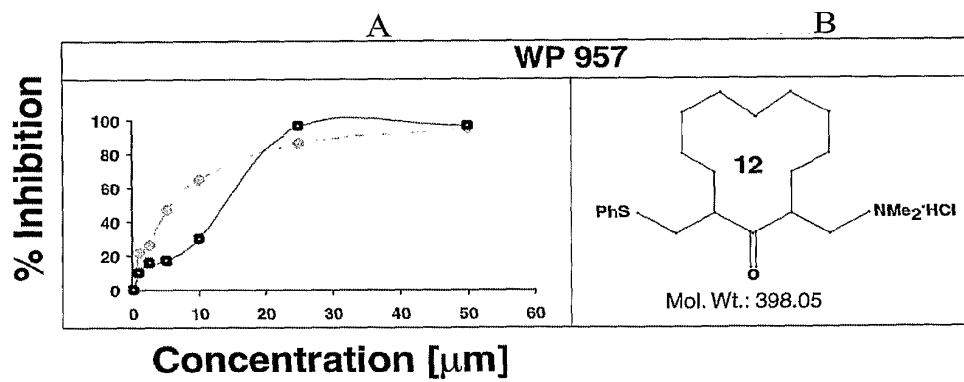
도면19



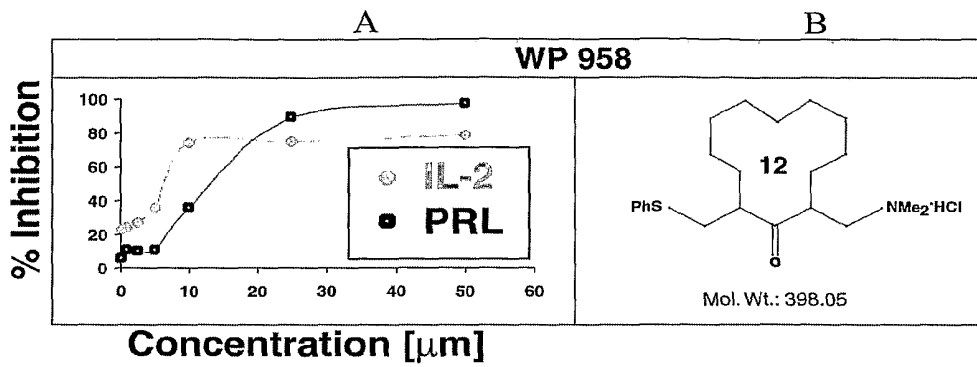
도면20



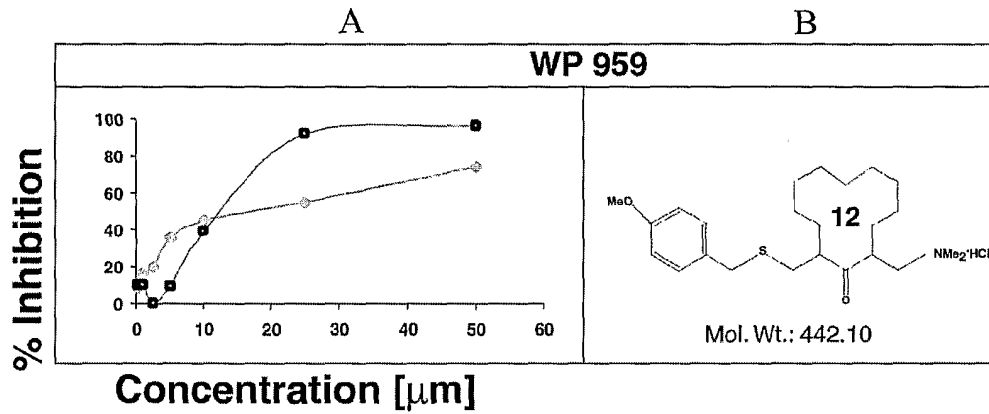
도면21



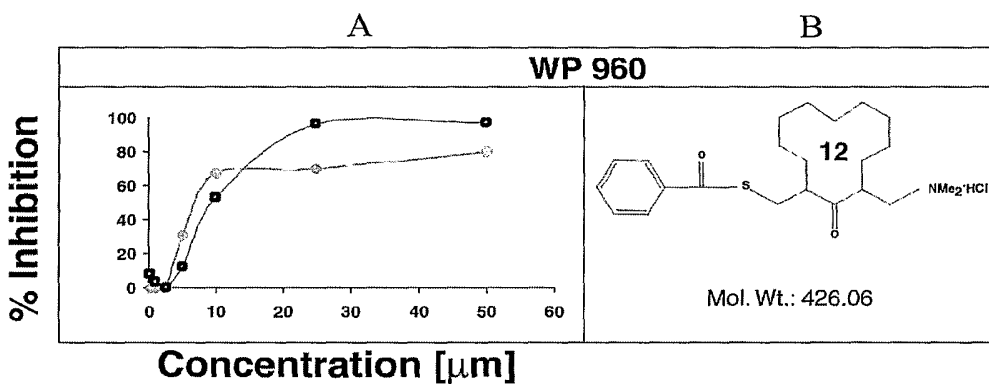
도면22



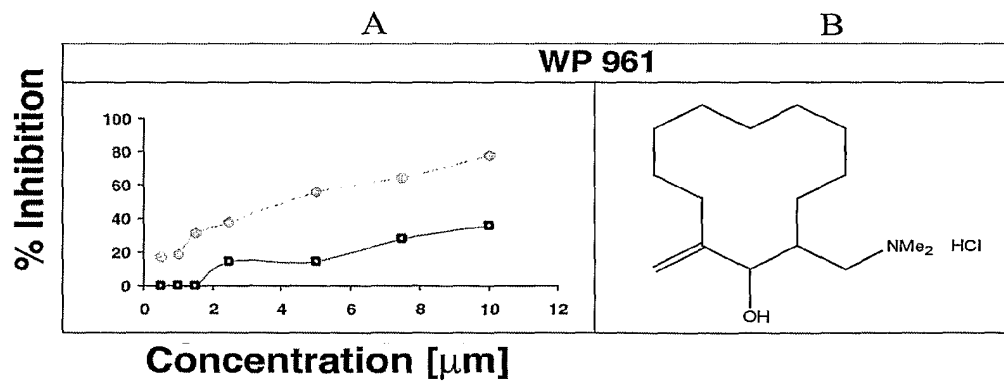
도면23



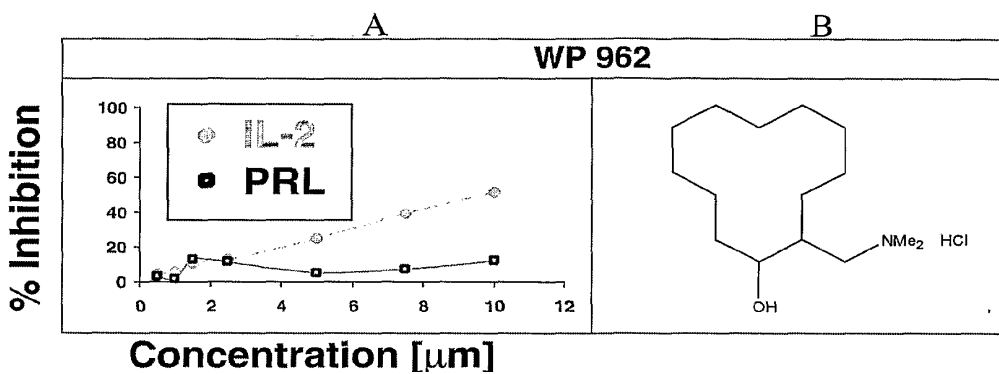
도면24



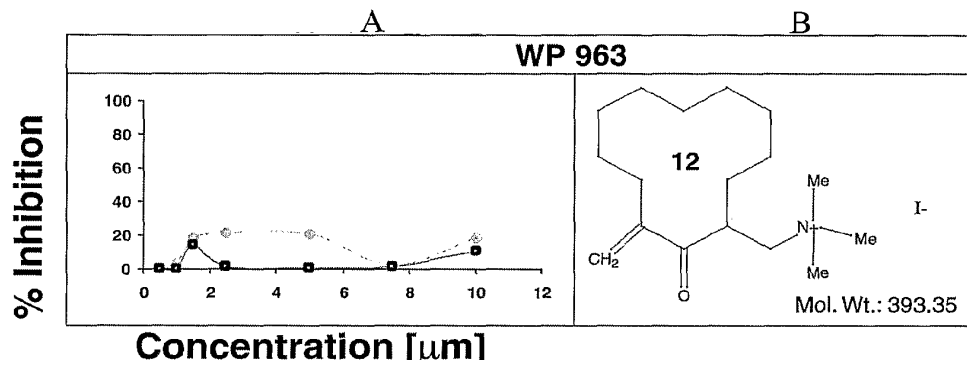
도면25



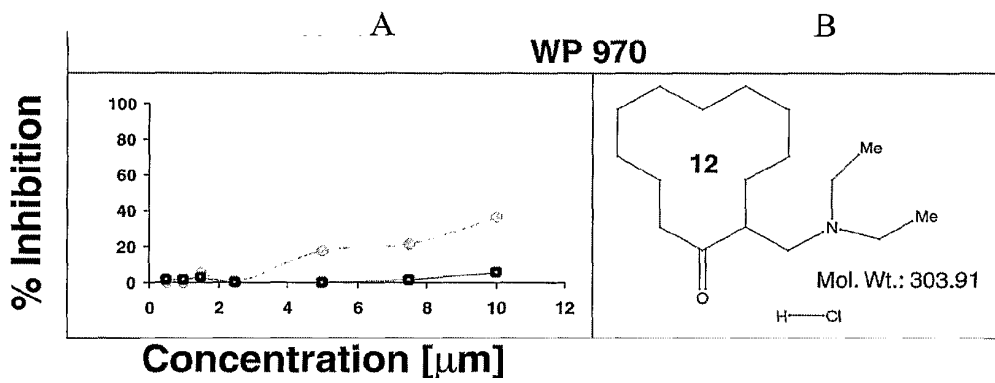
도면26



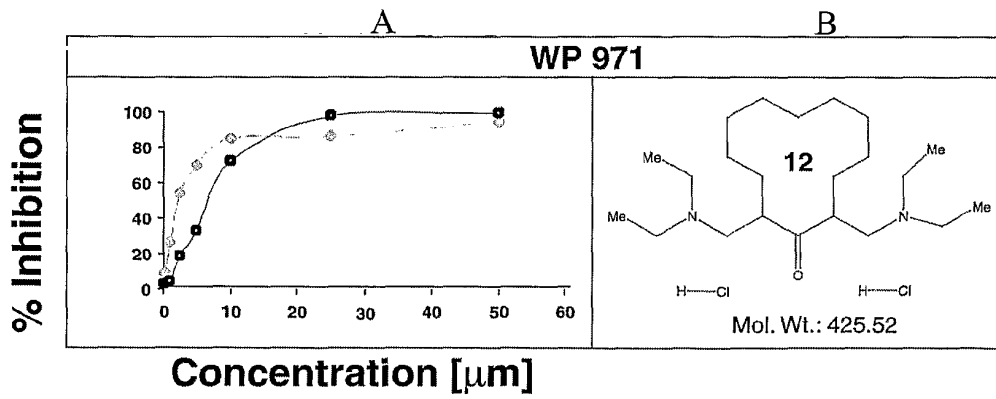
도면27



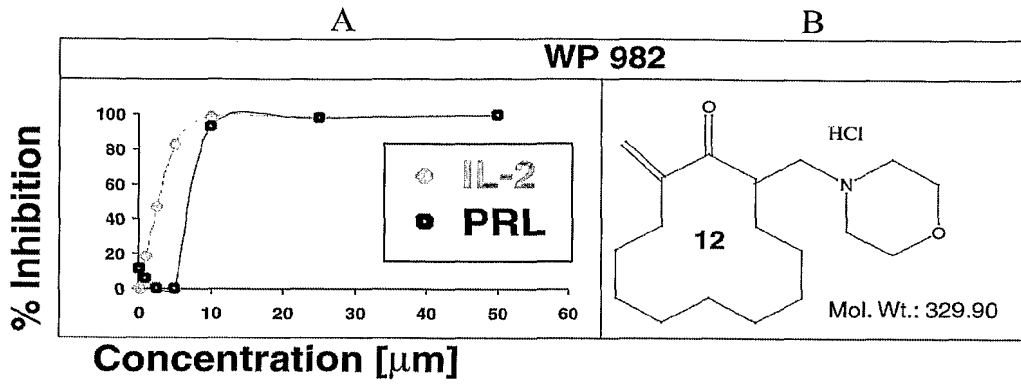
도면28



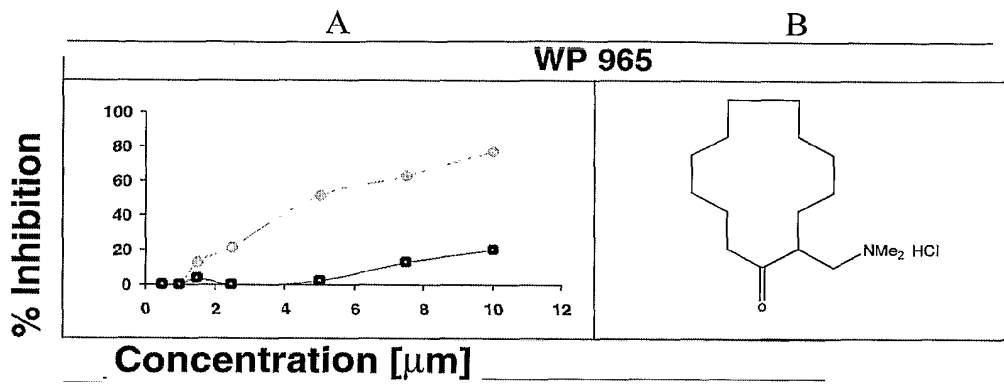
도면29



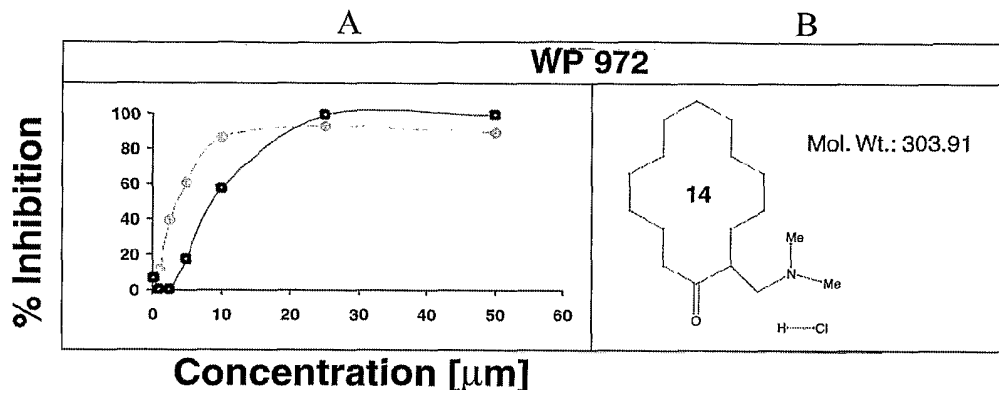
도면30



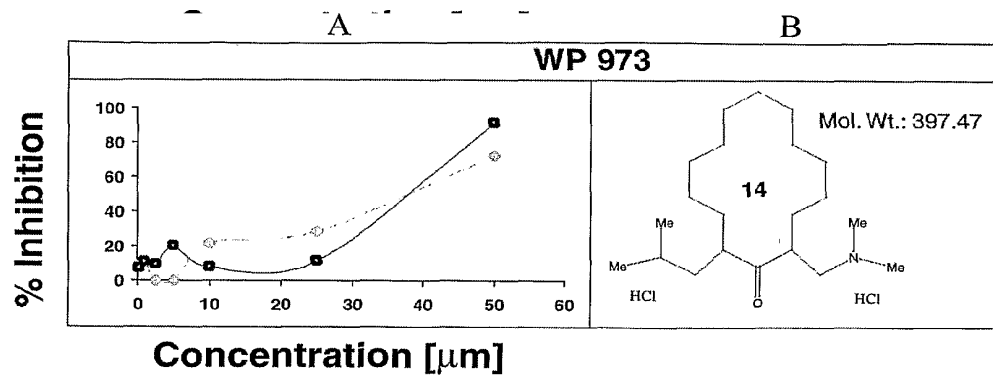
도면31



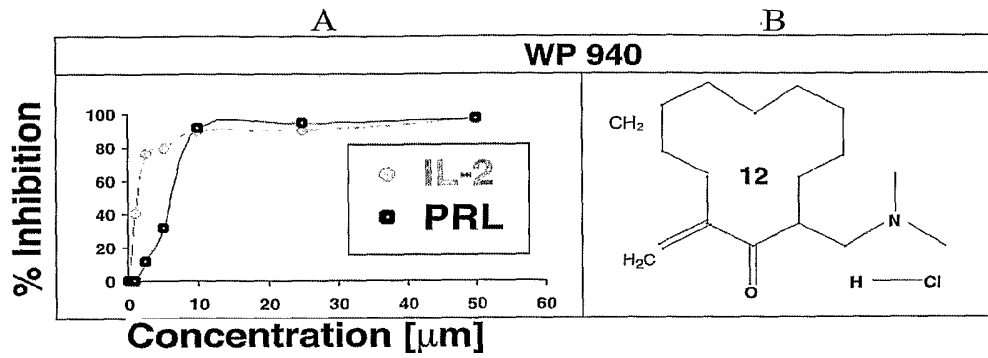
도면32



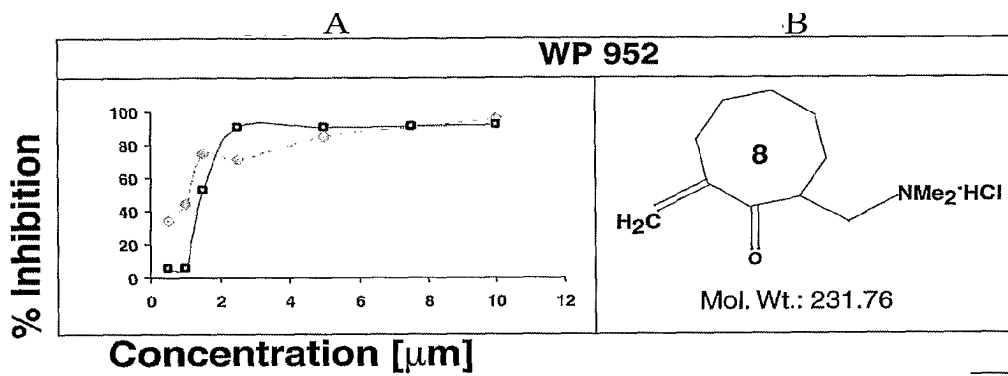
도면33



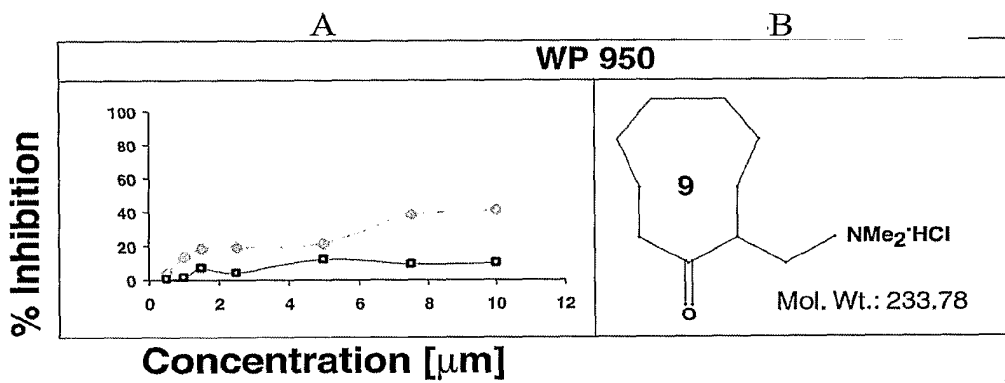
도면34



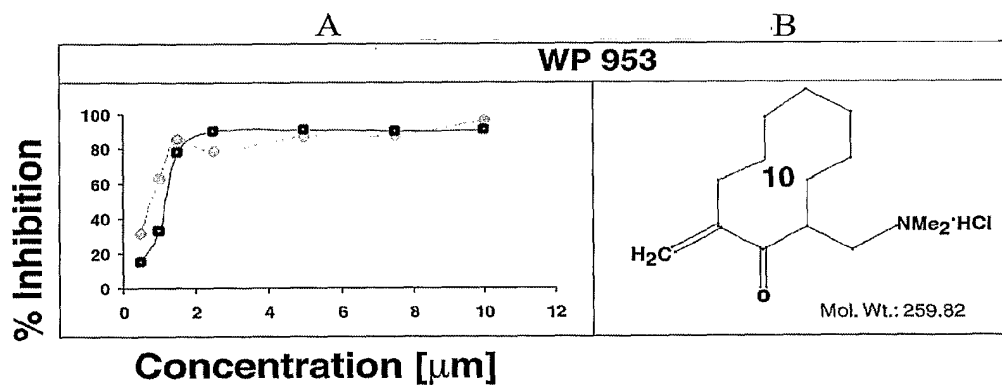
도면35



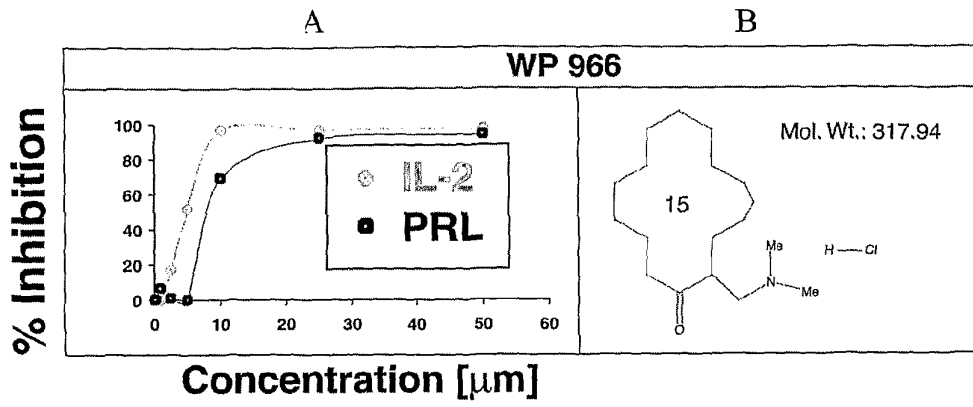
도면36



도면37



도면38



도면39

