



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0007065
(43) 공개일자 2022년01월18일

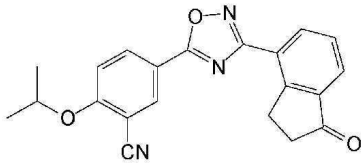
- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 271/06 (2006.01) A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07D 271/06 (2013.01)
A61K 31/4245 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7037136</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년03월27일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년11월12일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2020/025142</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/219207
국제공개일자 2020년10월29일</p> <p>(30) 우선권주장
62/839,495 2019년04월26일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
리셉토스 엘엘씨
미국 10016 뉴욕 뉴욕 이스트 29스트리트 430</p> <p>(72) 발명자
턴블 필립
미국, 뉴 저지 07901, 서밋, 86 모리스 애비뉴
마틴보로 에스더
미국, 뉴 저지 07901, 서밋, 86 모리스 애비뉴
마시니 모리스
미국, 뉴 저지 07901, 서밋, 86 모리스 애비뉴</p> <p>(74) 대리인
특허법인한얼</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 스펡고신 1 포스페이트 수용체 조절인자

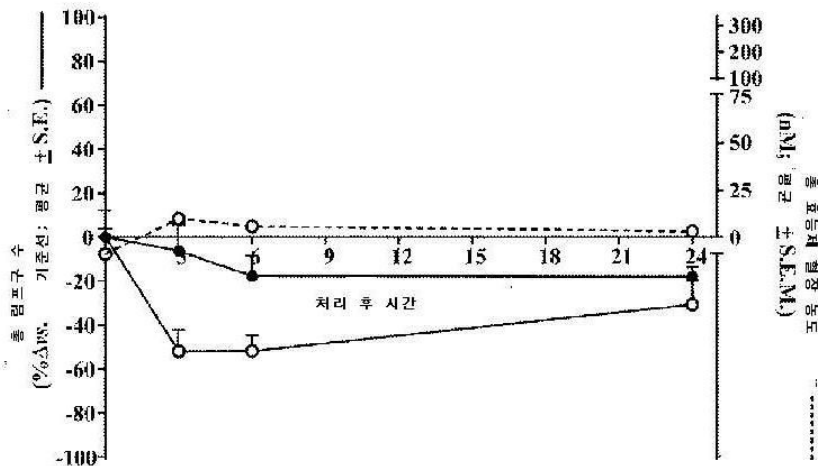
(57) 요약

하기 구조를 갖는 화합물인 화합물 (1):



또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체, 수화물 또는 용매화물이 제공된다. 또한, 화합물 (1) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체, 수화물 또는 용매화물을, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하여 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 37/04 (2018.01)

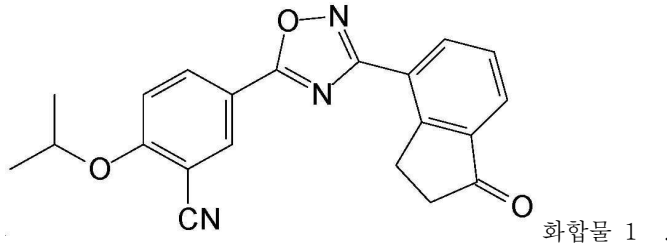
A61P 7/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조를 갖는 화합물 (화합물 1)의 단리된 또는 정제된 형태, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체 (homolog), 수화물 또는 용매화물:



청구항 2

제1항에 있어서, 화합물 1이 90% (w/w)를 초과하는 순도로 존재하는, 화합물의 단리된 또는 정제된 형태.

청구항 3

제1항에 있어서, 화합물 1이 95% (w/w)를 초과하는 순도로 존재하는, 화합물의 단리된 또는 정제된 형태.

청구항 4

제1항에 있어서, 화합물 1이 98% (w/w)를 초과하는 순도로 존재하는, 화합물의 단리된 또는 정제된 형태.

청구항 5

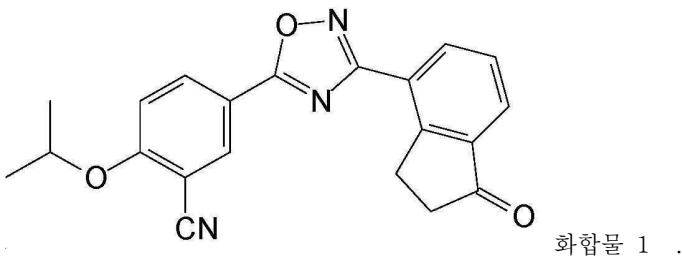
제1항에 있어서, 화합물 1이 98% (w/w)를 초과하는 순도로 존재하는, 화합물의 단리된 또는 정제된 형태.

청구항 6

제1항에 있어서, 화합물 1이 99% (w/w)를 초과하는 순도로 존재하는, 화합물의 단리된 또는 정제된 형태.

청구항 7

하기 구조를 갖는 화합물 (화합물 1), 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체, 수화물 또는 용매화물을, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하여 포함하는 약제학적 조성물:



청구항 8

제7항에 있어서, 경구 투여에 적합한 형태인 약제학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 정맥내 투여에 적합한 형태인 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 스펅고신(sphingosine)-1-포스페이트 수용체의 조절인자(modulator)는 이의 활성화가 의학적으로 지시되는 이상 상태(malcondition)의 치료를 위해 제공된다.

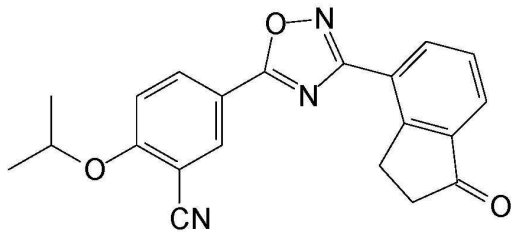
배경 기술

[0002] SIP₁/EDG₁ 수용체는 G-단백질 커플링된(coupled) 수용체 (GPCR)이며 내피 세포 분화 유전자 (EDG) 수용체 패밀 리(receptor family)의 구성원이다. EDG 수용체에 대한 내인성 리간드는 리소인지질(lysophospholipid), 예컨 대 스펅고신-1-포스페이트 (SIP)를 포함한다. 모든 GPCR과 마찬가지로, 수용체의 연결(ligation)은 G-단백질 (알파, 베타 및 감마)의 활성화를 통해 2차 메신저 신호를 전파한다. 소분자 SIP₁ 효능제 및 길항제의 개발은 SIP₁/SIP-수용체 신호전달 시스템의 일부 생리학적 역할에 대한 통찰력을 제공하였다. 이를 위해, SIP 수용체 는 다섯 가지의 아형 (즉, SIP₁, SIP₂, SIP₃, SIP₄ 및 SIP₅)으로 나뉘며, 이들 아형은 다종다양한 조직에서 발현 되고 상이한 세포 특이성을 나타낸다. SIP₁ 수용체의 효능작용은 림프구 이동(trafficking)을 교란시켜, 이들 을 림프절 및 기타 2차 림프양 조직(lymphoid tissue)에 격리시킨다. 이는 신속하고 가역적인 림프구감소증 (lymphopenia)을 야기하며, 아마도 림프 내피 세포와 림프구 자체의 수용체 연결로 인한 것이다 (Rosen et al, *Immunol. Rev.*, 195:160-177, 2003).

발명의 내용

[0003] 간단히 말해서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체의 조절인자는 이의 활성화가 의학적으로 지시되는 이상상태의 치 료를 위해 제공된다.

[0004] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조 ("화합물 1" 또는 "Cpd 1"로도 지칭됨)를 갖는 단리된 또는 정제된 형태, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체(homolog), 수화물 또는 용매화물로 제공된다:



화합물 1.

[0005]

[0006] 또 다른 실시양태에서, 화합물 1 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체, 수화물 또는 용매화물을, 약제 학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하여 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 화합물 1의 림프구 수 (CD4⁺, CD8⁺ 및 B220⁺)에 비한 평균 혈장 농도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

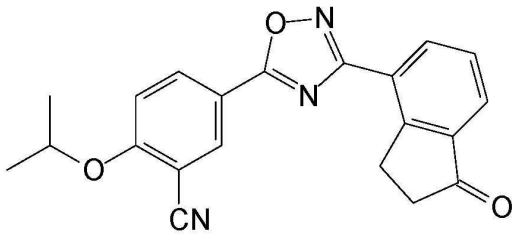
[0008] 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥에서 분명히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 추가로, 용어 "포함하는", "포함한" 및 "갖는"은 본원에 사용된 바와 같 이 개방형 용어이고, 추가 요소 또는 구성요소의 존재를 배제하지 않는다.

[0009] 본 발명은 SIP 수용체를 조정하는 화합물 및 조성물에 관한 것이다. SIP 수용체는 5개의 아형 (즉, SIP₁, SIP₂, SIP₃, SIP₄ 및 SIP₅)으로 나뉘며, 이 아형은 다종다양한 조직에서 발현되고 상이한 세포 특이성을 나타낸 다. 본원에 개시된 화합물은 이들 아형 중 하나 이상을 조정한다. 한 실시양태에서, 화합물은 그것이 스펅고 신-1-포스페이트 수용체의 아형(subtype) 1을 조정하기 때문에 "SIP1" 조절인자이다. 또 다른 실시양태에서, 화합물은 아형 1 및 또 다른 아형, 예컨대 아형 5를 조정한다. 본원에 사용된 바와 같이, "SIP1 조절인자"는

S1P₁ 아형 단독을 조정하거나, S1P₁ 아형뿐만 아니라 하나 이상의 다른 아형을 조정하는 화합물을 포괄하는 것으로 이해된다. 한 실시양태에서, S1P₁ 조절인자는 S1P₁ 아형 및 S1P₅ 아형 둘 다를 조정한다.

[0010] 본원에 사용된 바와 같이, S1P₁ 수용체의 "조절인자"는 대상체에게 투여될 때 수용체 자체에 직접 작용하는 화합물을 통해, 또는 수용체에 작용하는 화합물의 대사산물에 의해, 표적 수용체와 원하는 상호작용을 제공하는 화합물이다. 본 발명의 화합물은 대상체에게 투여시, 신호 전달을 위한 수용체를 활성화함으로써 S1P₁ 수용체를 조정한다. 이러한 화합물은 또한 본원에서 "효능제" 또는 "S1P₁ 효능제"로 지칭된다. 이러한 S1P₁ 효능제는 S1P₁에 대한 작용에 대해 선택적일 수 있다. 예를 들어, 화합물은 S1P 수용체 패밀리의 다른 아형보다 더 낮은 농도에서 S1P₁에 대한 작용에 대해 선택적일 수 있다.

[0011] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조 ("화합물 1")를 갖는 단리된 또는 정제된 형태, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체, 수화물 또는 용매화물로 제공된다:



화합물 1.

[0012] 보다 구체적 실시양태에서, 90% (w/w)를 초과하는 순도를 갖는, 95% (w/w)를 초과하는 순도를 갖는, 또는 98% (w/w)를 초과하는 순도를 갖는 화합물이 제공된다. 추가 실시양태에서, 99% (w/w)를 초과하는 순도를 갖는 화합물이 제공된다.

[0014] 관련 기술분야에 널리 공지된 "염"은 반대이온과 조합된, 이온 형태의 카르복실산, 술폰산, 또는 아민과 같은 유기 화합물을 포함한다. 예를 들어, 이의 음이온 형태의 산은 양이온 예컨대 금속 양이온, 예를 들어 나트륨, 칼륨 등과; 암모늄 염 예컨대 NH₄⁺ 또는 테트라알킬 암모늄 염 예컨대 테트라메틸암모늄 및 알킬 암모늄 염 예컨대 트로메타민 염을 포함한 다양한 아민의 양이온, 또는 기타 양이온 예컨대 트리메틸술포늄 등과 염을 형성할 수 있다. "약제학적으로 허용되는" 또는 "약리학적으로 허용되는" 염은 클로라이드 염 또는 나트륨 염과 같이 인간 소비에 대해 승인되고 일반적으로 무독성인 이온으로부터 형성된 염이다. "양쪽성 이온(zwitterion)"은 서로 균형을 이루는 역할을 하는, 하나는 음이온을 형성하고 다른 하나는 양이온을 형성하는 적어도 2개의 이온화 가능한 기를 갖는 분자에서 형성될 수 있는 바와 같은 내부 염이다. 예를 들어, 글리신과 같은 아미노산은 양쪽성 이온 형태로 존재할 수 있다. "양쪽성 이온"은 본원에서의 의미 내에 있는 염이다. 본 개시내용의 화합물은 염의 형태를 취할 수 있다. 용어 "염"은 본 개시내용의 화합물인 유리 산 또는 유리 염기의 부가 염을 포괄한다. 염은 "약제학적으로 허용되는 염"일 수 있다. 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 제약 적용에서 유용성을 제공하는 범위 내에서 독성 프로파일을 갖는 염을 지칭한다. 제약상 허용되지 않는 염은 그럼에도 불구하고 예를 들어 본 개시내용의 화합물의 합성, 정제 또는 제제화의 공정에서 유용성과 같은 본 개시내용의 실시에서 유용성을 갖는 높은 결정도와 같은 특성을 가질 수 있다.

[0015] 적합한 약제학적으로 허용되는 산 부가 염은 무기 산 또는 유기 산으로부터 제조될 수 있다. 무기 산의 예는 염산, 브로민화수소산, 아이오딘화수소산, 질산, 탄산, 황산, 및 인산을 포함한다. 적절한 유기 산은 유기 산의 지방족, 지환족, 방향족, 방향성지방족, 헤테로시클릭, 카르복실산 및 설폰산 부류로부터 선택될 수 있으며, 이의 예는 포름산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 글루쿠론산, 말레산, 푸마르산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤조산, 아트라닐산, 4 히드록시벤조산, 페닐아세트산, 만델산, 엠보산 (파모산), 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, 판토텐산, 트리플루오로메탄술폰산, 2 히드록시에탄술폰산, p 톨루엔술폰산, 술폰산, 시클로헥실아미노술폰산, 스테르산, 알긴산, β 히드록시부티르산, 살리실산, 갈락타르산 및 갈락투론산을 포함한다. 제약상 허용되지 않는 산 부가 염의 예는, 예를 들어, 퍼클로레이트 및 테트라플루오로보레이트를 포함한다.

[0016] 본 개시내용의 화합물의 적합한 약제학적으로 허용되는 염기 부가 염은, 예를 들어, 알칼리 금속, 알칼리 토금속 및 전이 금속 염 예컨대, 예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연 염을 포함한 금속 염을 포함한다.

다. 약제학적으로 허용되는 염기 부가 염은 또한, 예를 들어, N,N' 디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민 (N-메틸글루카민) 및 프로카인과 같은 염기성 아민으로부터 제조된 유기 염을 포함한다. 제약상 허용되지 않는 염기 부가 염의 예는 리튬 염 및 시아네이트 염을 포함한다. 비록 제약상 허용되지 않는 염은 일반적으로 의약으로서 유용하지 않긴 하지만, 이러한 염은, 예를 들어 화합물 합성, 예를 들어 재결정화에 의한 이의 정제에서 중간체로서 유용할 수 있다. 이들 염 모두는, 예를 들어, 적절한 산 또는 염기를 화합물과 반응시킴으로써 상응하는 화합물로부터 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 무독성 무기 또는 유기 산 및/또는 염기 부가염을 지칭하며, 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 문헌 [Gould *et al.*, Salt Selection for Basic Drugs (1986), *Int J. Pharm.*, 33, 201-217]을 참조한다.

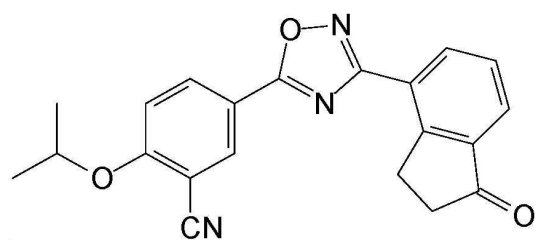
[0017] 본 개시내용의 잠재적 염의 비제한적 예는 히드로클로라이드, 시트레이트, 글리콜레이트, 푸마레이트, 말레이트, 타르트레이트, 메실레이트, 에실레이트, 신나메이트, 이세티오네이트, 술페이트, 포스페이트, 디포스페이트, 니트레이트, 히드로브로마이드, 히드로아이오다이드, 숙시네이트, 폼메이트, 아세테이트, 디클로로아세테이트, 락테이트, p-톨루엔술포네이트, 과미데이트, 피돌레이트, 과모에이트, 살리실레이트, 4-아미노살리실레이트, 벤조에이트, 4-아세트아미도 벤조에이트, 글루타메이트, 아스파르테이트, 글리콜레이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 베실레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 캄실레이트, 카프레이트, 카프로에이트, 시클라메이트, 라우릴술페이트, 에디실레이트, 겐티세이트, 갈락타레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 옥소글루타레이트, 히푸레이트, 락토비오네이트, 말로네이트, 말레에이트, 만달레이트, 냅실레이트, 나파디실레이트, 옥살레이트, 올레이트, 세바케이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 티오시아네이트, 운테실레이트, 및 크시나포에이트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0018] 본 개시내용의 화합물의 "동족체"는 이러한 원자의 동위원소에 의해 대체된 화합물의 하나 이상의 원자를 갖는 화합물이다. 예를 들어, 동족체는 화합물의 하나 이상의 수소 원자 대신에 중수소를 가진 화합물 예컨대 화학식 I-R 및 I-S의 이소프로폭시 모이어티의 메틸기가 완전히 또는 부분적으로 중수소화된 (예를 들어, (D₃C)₂CHO-) 본 개시내용의 화합물을 포함한다. 본 개시내용의 동족체의 형성에서 이루어질 수 있는 동위원소 치환은 중수소 및 탄소 13과 같은 비방사성 (안정한) 원자, 뿐만 아니라 삼중수소, 탄소 14, 아이오딘 123, 아이오딘 125 등과 같은 방사성 (불안정한) 원자를 포함한다.

[0019] "수화물"은 물 분자와 함께 조성물에 존재하는 화합물이다. 조성물은 일수화물 또는 이수화물과 같은 화학량론적 양의 물을 포함할 수 있거나, 무작위의 양의 물을 포함할 수 있다. 용어가 본원에 사용된 바와 같이 "수화물"은 고체 형태, 즉 수용액 중의 화합물을 지칭할 수 있으며, 한편 이는 수화될 수 있으며, 용어가 본원에 사용된 바와 같이 수화물은 아니다.

[0020] "용매화물"은 물이 아닌 용매가 물을 대체한다는 것을 제외하고는 유사한 조성이다. 예를 들어, 메탄올 또는 에탄올은 "알콜레이트"를 형성할 수 있으며, 이는 다시 화학량론적 또는 비화학량론적일 수 있다. 용어가 본원에 사용되는 바와 같이, "용매화물"은 고체 형태, 즉 용매에 용해된 화합물을 지칭하며, 한편 이는 용매화될 수 있으며, 용어가 본원에 사용된 바와 같이 용매화물은 아니다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 하기 구조를 갖는 화합물 (화합물 1):



화합물 1.

[0022] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 동족체, 수화물 또는 용매화물을, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하여 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 이 실시양태에서, 용어 "약제학적으로 허용되는", "염", "동족체", "수화물" 및 "용매화물"은 상기에 정의된 바와 같다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 관련하여, 약제학적 조성물은 경구 또는 정맥내 투여에 적합한 형태를 포함한 (그러나 이에 제한되지는 않는) 여러 가지의 상이한 형태를 취할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제는 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Allen, Lloyd V., Jr. Ed. (2012)] (본원에 참조로 포함

됨)에 개시된 것들과 같이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0024] 화합물 1은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 기술에 의해서 뿐만 아니라 하기 실시예에 개시된 절차에 의해서도 제조될 수 있다.

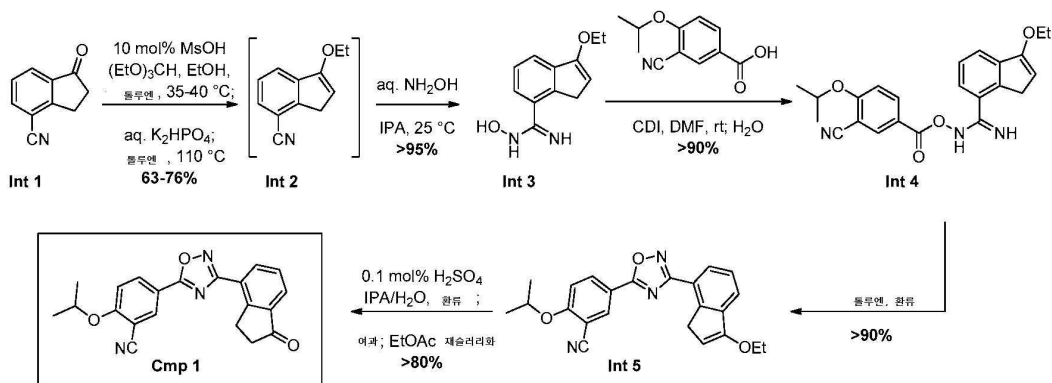
[0025] 실시예

[0026] 일반 합성 방법

[0027] ¹H NMR (400 MHz) 및 ¹³C NMR (100 MHz)을 듀테리오클로로포름 (CDCl₃), 듀테리오메탄올 (CD₃OD) 또는 디메틸 설펝시드- D₆ (DMSO)의 용액 중에서 취득하였다. NMR 스펙트럼을 메스트렉(Mestrec) 5.3.0 및 6.0.1을 사용하여 처리하였다. 브래킷된 ¹³C NMR 피크는 동일한 탄소의 두 회전체이다. 질량 스펙트럼 (LCMS)은 이동상 A로서 0.1% 포름산을 가진 물을 사용하고 이동상 B로서 0.1% 포름산을 가진 아세트니트릴을 사용하여 톰슨(Thompson) ODS-A, 100A, 5 μ (50 X 4.6 mm) 컬럼이 장착된 애질런트(Agilent) 1100/6110 HPLC 시스템을 사용하여 취득하였다. 구배(gradient)는 이동상 B를 사용하여 2.5분에 걸쳐 20-100%였고, 이어서 100%에서 2.5분 동안 유지하였다. 유량은 1 mL/분이었다. 더 많은 소수성 화합물의 경우, *방법 1*로 표시된, 하기 구배를 사용하였다: 0.5분에 걸쳐 40-95%, 8.5분 동안 95%에서 유지한 다음에, 1 mL/분의 유량으로 2분에 걸쳐 40%로 복귀하였다. *방법 2*를 사용하여 최종 화합물의 순도를 점검하였다: 1분 동안 5%, 9분에 걸쳐 5-95%, 이어서 1 mL/분의 유량으로 95%에서 5분 동안 유지하였다. 거울상이성질체 과잉물은 키랄팩(Chiralpak) AD-H, 250 x 4.6 mm 컬럼, 5 μm 입자 크기 상에서 분리된 피크의 통합에 의해 결정하였다. 1 mL/분의 유량 및 등용매 이동상. 달리 명시되지 않는 한, 제공된 키랄 데이터는 이 방법을 사용한다. 대안적으로, *키랄 방법 1*로 표시된, 하기 조건 하에 키랄 분리를 수행하였다: 키랄팩 AY-H, 250 x 4.6 mm 컬럼, 5 μm 입자 크기. 1 mL/분의 유량 및 등용매 이동상. *키랄 방법 2*: 키랄셀(Chiralcel) OZ-3, 250 x 4.6, 0.75 mL/분의 유량에서 3 μm 입자 크기. 절차에 사용된 피리딘, 디클로로메탄 (DCM), 테트라히드로푸란 (THF), 및 톨루엔은 질소 (N₂) 하에 유지된 알드리치 슈어-씨일 (Aldrich Sure-Seal) 병으로부터의 것이었다. 모든 반응은 자기적으로 교반되었고 온도는 외부 반응 온도이다. 크로마토그래피는 레디셉(Redisep) (텔레딘 이스코(Teledyne Isco)) 실리카겔 (SiO₂) 컬럼이 장착된 콤비플래시 (Combiflash) Rf 플래시 정제 시스템 (텔레딘 이스코)을 사용하여 수행하였다. 분취용 HPLC 정제는 이동상 A로서 0.05% 트리플루오로아세트산을 함유하는 물을 사용하고 이동상 B로서 0.05% 트리플루오로아세트산을 가진 아세트니트릴을 사용하여 배리언(Varian) 프로스타(ProStar)/프렙스타(PrepStar) 시스템 상에서 행하였다. 구배는 12분에 걸쳐 이동상 B로 10-80%, 2분 동안 80%에서 유지한 다음에, 22 mL/분의 유량으로 2분에 걸쳐 10%로 복귀하였다. 이와 유사한 다른 방법이 이용되었을 수 있다. 배리언 프로스타 분획 수집기를 사용하여 분획을 수집하고 사반트(Savant) 스피드백 플러스(SpeedVac Plus) 진공 펌프를 사용하여 증발시켰다. 마이크로파 가열은 바이오타지(Biotage) 마이크로파 용기가 장착된 바이오타지 이니시에이터(Biotage Initiator) 마이크로파 반응기를 사용하여 수행하였다. 하기 약어가 사용된다: 에탄올 (EtOH), 카르보닐디이미다졸 (CDI), 이소프로판올 (IPA), 및 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP).

[0028] 실시예 1

[0029] 화합물 번호 1의 합성



[0030]

[0031] 단계 1 - 3-에톡시-1H-인덴-7-카르보니트릴 (Int 2)의 합성:

[0032] 톨루엔 (80 mL) 중 무수 EtOH (20 mL), 트리에틸오르토포르메이트 (80 mL, 481 mmol) 및 메탄술폰산 (0.88 mL, 12.5 mmol) 중 1-옥소-2,3-디히드로-1H-인덴-4-카르보니트릴 (**Int 1**) (20.0 g, 98 wt%, 18.6 검정 g, 124.8 mmol)의 교반 혼합물을 43-47°C에서 가열하였다. 1시간 후, GC 분석은 오르토포르메이트가 소모되었고 12.8 면적%의 **Int 1**이 남은 것으로 나타났다. 트리에틸오르토포르메이트 (20 mL, 120.2 mmol)를 추가로 충전하였으며 45분 후 GC 분석은 1.5 면적% **Int 1**을 나타냈다. 배치를 주위 온도로 냉각한 다음에 < 15°C의 켄칭 온도를 유지하면서 격렬하게 교반하면서 1 M 수성 K₂HPO₄ (200 mL)에 부었다. 2상 혼합물을 10분 동안 격렬하게 교반하였다. 상을 분리하고 수성 상 (pH 11)을 톨루엔 (100 mL)으로 역추출하였다. 유기 상을 합하고 대기압에서 증류시켜 340 mL 증류물을 제거하였다. 톨루엔 (500 mL)을 첨가하고 대기압에서 증류시켜 500 mL 증류물을 제거하였다. 총 증류 시간 3시간, 온도 범위 80-120°C. 이 시점에서 배치를 < 5°C에서 밤새 보관하였다. 과량의 오르토포르메이트를 증류가 멈출 때까지 에틸 아세테이트 (100 mL)로 감압 하에 체이싱함으로써 제거하였다. 또 다른 부피의 에틸 아세테이트 (100 mL)를 첨가한 다음에, 증류가 멈출 때까지 감압 하에 농축시켰다. 세 번째 부피의 에틸 아세테이트 (100 mL)를 첨가한 다음에 증류가 멈출 때까지 감압 하에 농축하고, 그 후 GC 분석은 어떤 오르토포르메이트도 남아 있지 않음을 확인하였다. 이어서 조 물질을 110°C에서 1시간 동안 교반하여, 중간체 케탈을 3-에톡시-1H-인덴-7-카르보니트릴 (**Int 2**)로 전환시켰다. 냉각시, 내부 표준으로서 메틸렌을 이용하는 ¹H NMR에 의해 조 물질 (이동성 오일, 21.34 g)을 **Int 2**에 대해 검정하였다. 오일은 78.1 wt% 생성물 = 16.73 어세이 g, 90.0 mmol = 72.1% 검정 수율로 검정되었다. 이어서, 조 오일을 15% EtOAc/헥산으로 용리하는 실리카겔 플러그를 통한 여과에 의해 정제하였다. 순수한 분획을 합하고 다음 단계에 활용하였다. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 7.78 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.49 (m, 1H), 5.60 (m, 1H), 1.38 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H); LRMS: C₁₂H₁₂N⁺에 대한 계산치 [M + H]: 186.2; 실측치: 186.2.

[0033] 단계 2 - **Int 3**의 합성:

[0034] 3-에톡시-1H-인덴-7-카르보니트릴 (**Int 2**)의 EtOAc/헥산 용액 (650 mL)을 감압 하에 ~17 mL로 농축하고 이소프로필 알콜 (IPA, 40 mL)을 첨가하였다. 용액을 ~ 17 mL로 농축하고, 제2 부피의 IPA (34 mL)를 첨가하였다. 교반된 용액에 수성 히드록실아민 (50%, 30 mL, 455 mmol)을 첨가하였다. 이어서 배치를 35-40°C에서 5시간 동안 가온한 다음에, 주위 온도에서 밤새 교반하였다. 배치를 0°C로 냉각하고, 시딩하고 (50 mg), 시드 베드가 발생하도록 30분 동안 교반하였다. 이어서 물 (250 mL)을 ~ 1.5시간에 걸쳐 적가하였다. 배치를 0 내지 20°C에서 1시간 동안 교반하였다. 생성물을 여과에 의해 단리하고, 물 (100 mL)로 케이크-세척하고, 진공 및 질소 분위기 하에 필터 상에서 건조시켜 3-에톡시-N-히드록시-1H-인덴-7-카르복시이미다미드 (**Int 3**) (20.8 g, 90% 수율)를 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9.61 (s, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 5.77 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.08 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 1.39 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); LRMS: C₁₂H₁₅N₂O₂⁺에 대한 계산치 [M + H]: 219.2; 실측치: 219.1.

[0035] 단계 3 - N-((3-시아노-4-이소프로필벤조일)옥시)-3-에톡시-1H-인덴-7-카르복시이미다미드 (**Int 4**)의 합성:

[0036] DMF (83 mL) 중 CDI (16.64 g, 102.6 mmol)와 3-시아노-4-이소프로필벤조산 (21.06 g 102.6 mmol)의 혼합물을 20°C에서 1시간 동안 교반하였다. DMF (40 mL) 중 3-에톡시-N-히드록시-1H-인덴-7-카르복시이미다미드 (**Int 3**) (20.8 g, 93.3 mmol)의 용액을 첨가 갈때기를 통해 ~ 5분에 걸쳐 첨가하였다. ~ 30분 후 배치가 점성이 되고 교반을 돕기 위해 추가 부피의 DMF (40 mL)를 첨가하였다. 이 시점에서 HPLC 검정은 반응이 완료된 것으로 나타났다. 생성된 슬러리를 물 (1.5 L)로 희석하고, 0°C로 냉각하고, 여과에 의해 단리하였다. 필터 케이크를 물 (1.5 L)로 세척하고, 생성물을 질소류 하에 필터 상에서 건조시켜 N-((3-시아노-4-이소프로필벤조일)옥시)-3-에톡시-1H-인덴-7-카르복시이미다미드 (**Int 4**)를 회백색 고체 (34.8 g, 90% 수율)로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8.70 (s, 1H), 8.33 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.10 (m, 2H), 5.49 (s, 1H), 4.94 (m, 1H), 4.10 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 1.38 (m, 9H); LRMS: C₂₃H₂₄N₃O₄⁺에 대한 계산치 [M + H]: 406.4; 실측치: 406.2.

[0037] 단계 4 - 5-(3-(3-에톡시-1H-인덴-7-일)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)-2-이소프로필벤조니트릴 (**Int 5**)의 합성

[0038] N-((3-시아노-4-이소프로필벤조일)옥시)-3-에톡시-1H-인덴-7-카르복시이미다미드 (**Int 4**) (34.8 g, 83.97 mmol)를 톨루엔 (590 mL)에 현탁시키고, 18시간 동안 딘-스타크(Dean-Stark) 장치로 환류 가열하였다. ~ 2 mL

를 수집하였다 (이론치 1.5 mL). 배치를 주위 온도로 냉각하고, 셀라이트(Celite)를 통해 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 조 고체 5-(3-(3-에톡시-1H-인덴-7-일)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)-2-이소프로폭시벤조니트릴 (**Int 5**) (30 g, 90% 수율)을 그대로 다음 단계로 취하였다. LRMS: $C_{23}H_{22}N_3O_3^+$ 에 대한 계산치 [M + H]: 388.4; 실측치: 388.3.

[0039] 단계 5 - 2-이소프로폭시-5-(3-(1-옥소-2,3-디히드로-1H-인덴-4-일)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)벤조니트릴 (Cpd. 번호 1)의 합성:

[0040] **Int 5** (30 g, 75.57 mmol)를 4:1 IPA/H₂O (300 mL)에 현탁시켰다. 촉매 H₂SO₄ (0.1 mL, 0.19 mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 12시간 동안 환류 가열하였다. 슬러리는 주위 온도로 냉각하고 1시간 동안 교반하였다. 생성물을 여과에 의해 단리하고 4:1 IPA/H₂O (100 mL)로 세척하였다. 진공 하에 1시간 동안 필터 상에서 건조시킨 후, 습윤 케이크를 반응기에 다시 충전하고 EtOAc (300 mL)에 현탁시켰다. 혼합물을 3시간 동안 환류 가열한 다음에, 주위 온도로 냉각하고 1시간 동안 교반하였다. 슬러리를 여과하고, EtOAc (100 mL)로 세척하고, 질소 하에 필터 상에서 건조시켜 2-이소프로폭시-5-(3-(1-옥소-2,3-디히드로-1H-인덴-4-일)-1,2,4-옥사디아졸-5-일)벤조니트릴 (**Cpd. 번호 1**) (22 g, 80% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8.55 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.44 (m, 2H), 7.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.99 (h, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J*₁ = 5.6, *J*₂ = 11.2 Hz, 2H), 2.76 (dd, *J*₁ = 5.6, *J*₂ = 11.2 Hz, 2H), 1.45 (d, *J* = 12.4 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 205.9, 173.4, 167.4, 162.6, 154.2, 138.1, 134.7, 134.2, 133.9, 128.2, 125.9, 124.5, 115.8, 115.3, 114.9, 102.5, 72.6, 35.9, 27.3, 21.5; LRMS: $C_{21}H_{18}N_3O_3^+$ 에 대한 계산치 [M + H]: 360.1; 실측치: 360.2; C,H,N 분석: 실측치: %C: 70.25, %H: 4.69; %N: 11.71; 이론치: %C: 70.18; %H: 4.77; %N: 11.69.

[0041] 실시예 2

[0042] 화합물 1의 생물학적 활성

[0043] S1P_{1R}은 억제성 G 단백질 (G_{αi})에 독점적으로 커플링하여, 세포에서 아데닐레이트 시클라제 활성을 감소시키고 시클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP 수준)를 저하시키는 GPCR이다. 화합물 1의 효능은 S1P 수용체 (S1P_{1R}) 및 관련 패밀리 구성원에 대해 시험하였다. 효능 및 S1P 수용체 선택도는 두 가지 독립적인 시험관내 검정, [³⁵S]구아노신-5'-0-(3-티오)트리포스페이트 ([³⁵S]GTP_γS) 및 β-락타마제 유전자 발현 및 활성을 사용하여 측정하였다. 제조합 인간 S1P 수용체 1-5 (S1P_{1R}-S1P_{5R})를 발현하는 안정한 포유동물 세포주로부터 제조된 막에 대한 GTP_γS 결합을 사용하여 S1P 수용체 패밀리 구성원과의 리간드 상호작용을 약리학적으로 특성화하였다. 막을 시험 화합물 (각각의 화합물의 효능에 따라 300 nM-10 μM의 최고 농도로 10점 연속 절반-로그 용량 범위) 및 플레이트 진탕기 상에 밀 배아 응집소-코팅된 섬광 근접 검정 비드와 함께 [³⁵S]GTP_γS를 첨가하기 전에 30분 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하고 실온에서 추가로 40분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 결합된 방사능을 마이크로베타(MicroBeta)^{2®} 마이크로플레이트 섬광 계수기로 정량화하기 전에 막-비드 복합체를 원심분리에 의해 펠릿화하였다. DMSO 비히클에 의한 방사능 수를 계산하고 비선형 회귀를 사용하여 최대 유효 농도의 절반 (EC₅₀)을 결정하였다.

[0044] β-락타마제 유전자 발현 및 활성의 상황-조절을 S1P 수용체 활성화의 전체-세포 기능 관독으로서 사용하였다. β-락타마제의 유전자 발현에 커플링하도록 설계된 제조합 인간 S1P_{1R}-S1P_{5R}을 발현하는 안정한 포유동물 세포주를 조직 배양 인큐베이터에서 37°C에서 4-5시간 동안 시험 화합물 (화합물의 효능에 따라 100 nM-10 μM의 최고 농도로 10점 연속 1:4 용량 범위)과 함께 인큐베이션하기 전에 384 웰 마이크로플레이트(well microplate)에 미리 시딩하였다. 이어서 각각의 β-락타마제 활성을 형광 공명 에너지 전달 (FRET)-기반 β-락타마제 형광 기질 (라이브블레이저(LiveBLazer)TM-FRET B/G 로딩 키트 CCF4-AM)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 결정하고, 실온에서 2시간 동안 세포와 인큐베이션하였다. 스펙트라맥스(SpectraMax) M5 다중-모드 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 판독하고 비선형 회귀를 사용하여 EC₅₀ 결정을 위해 계산된 DMSO 비히클에 대한 상대 응답을 계산하였다.

[0045] 화합물 1은 β -락타마제 활성 및 GTP γ S 결합 검정 둘 다에서 강력하고 선택적인 S1P_{1R} 및 S1P_{5R} 효능제이며, GTP γ S 결합의 경우 2.1 nM의 EC₅₀ 그리고 β -락타마제 활성의 경우 0.04 nM의 EC₅₀을 갖는다. 화합물 1은 또한 S1P_{R5}에서 활성이며 GTP γ S 결합 및 β -락타마제 활성의 경우 각각 17.9 및 6.9 nM의 EC₅₀ 값을 가진다. 화합물 1은 S1P₂₋₄ 수용체에 대해 최소 활성을 가지며, 이는 [³⁵S]GTP γ S 결합 활성 판독을 사용하여 S1P_{2R}, S1P_{3R} 및 S1P_{4R}에 비해 S1P_{1R}의 경우 1000배 초과 선택도, 및 검정 둘 다의 판독을 사용하여 S1P_{2R}, S1P_{3R} 및 S1P_{4R}에 비해 S1P_{5R}의 경우 200배 초과 선택도를 나타낸다 (표 1 참조).

[0046] [표 1]

[0047] GTP γ S 및 β -락타마제 검정을 사용한 스펅고신-1-포스페이트 수용체에 대한 결합 친화도

분석물	EC ₅₀ (nM)									
	S1P _{1R}		S1P _{2R}		S1P _{3R}		S1P _{4R}		S1P _{5R}	
	GTP γ S	β -락타마제	GTP γ S	β -락타마제	GTP γ S	β -락타마제	GTP γ S	β -락타마제	GTP γ S	β -락타마제
화합물 1	2.1	0.04	>10000	Not tested	>5000	>10000	>10000	>10000	17.9	6.9

[0048]

[0049] 혈장 샘플 분석

[0050] 혈장 샘플 (50 μ L)을 96 웰 폴리프로필렌 플레이트 (2 mL/웰)에 분취하고 5 μ L의 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 첨가하였다. 정량화의 상한선 (ULOQ) 초과가 될 것으로 예상되는 샘플을 혈장으로 희석하였다. 표준 곡선은 96 웰 폴리프로필렌 플레이트에서 50 μ L의 혈장에 첨가된 농도의 10배로 DMSO에서 5 μ L의 시험 화합물을 혼합하여 작성하였다. 예를 들어, 0.3 μ M 표준의 경우, 10 X 시험 화합물의 DMSO 농도는 3 μ M이었다. 표준 곡선은 화합물 1의 분석 표준을 사용하여 작성하였다. 150 μ L의 아세트니트릴을 첨가하여 연구 샘플 및 표준으로부터 단백질을 침전시켰다. 플레이트를 볼텍싱하여 단백질의 완전한 침전을 보장하였다. 침전된 단백질은 20°C에서 10분 동안 4,000 rpm으로 원심분리하여 펠릿화하고 투명한 상청액을 깨끗한 96-웰 플레이트로 옮기고 동일한 조건 하에 다시 원심분리하여 임의의 이전된 고체 물질을 펠릿화하였다.

[0051] 크로마토그래피

[0052] 샘플 (7 μ L)을 SIL-30ACMP 오토샘플러(autosampler) (시마즈(Shimadzu))를 갖춘 시마즈 HPLC (LC-20ADXR)에 도입하였다. 이동상은 물 중 0.1% 포름산 및 아세트니트릴 중 0.1% 포름산을 사용하는 구배였다. 사용된 컬럼은 페노메넥스(Phenomenex) 키네틱(Kinetic) C18 100A 2.6 μ 30 \times 3 mm (PN 946975-906)이었다. CTO-20AC 컬럼 오븐 (시마즈)은 40°C로 설정하였다. 준비된 샘플을 통상적으로 표준에 대한 최저 농도에서 최고 농도의 순서로 그리고 연구 샘플에 대한 시점의 역순으로 분석하였다. 연구 샘플은 전체 표준 곡선에 의해 브래킷되었다. 전형적으로 +/- 20%의 퍼센트 정확도가 허용된 더 낮은 수준의 정량화 (LLOQ)를 제외한 모든 표준에 대해 +/- 15%의 퍼센트 정확도로 정량화에 적어도 6개의 표준을 사용하였다.

[0053] 질량 분석법

[0054] 에이비시엑스 기기(ABSciex Instruments) 삼중 사중극자(Triple Quad) 5500 질량 분석기 (애널리스트(Analyst) 1.6.3)를 MRM 모드에서 검출에 사용하였다. 이온화는 600°C의 소스 온도에서 포지티브 또는 네거티브 전기분무에 의해 달성되었다. 네거티브 및 포지티브 모드 분석은 동일한 주입에서 수행되었다. 표준 샘플은 통상적으로 최저 농도에서 최고 농도의 순서로 분석하였다. 전형적으로 +/- 20%의 퍼센트 정확도가 허용된 LLOQ를 제외한 모든 표준에 대해 +/- 15%의 퍼센트 정확도로 정량화에 적어도 6개의 표준을 사용하였다. 연구 샘플은 브래킷 표준 곡선으로 브래킷된 역 연대순으로 분석하였다.

[0055] 랫(Rat)에서 절대 경구 생체이용률의 결정

[0056] 약물동태학 연구는 금식하지 않은 수컷 스프라그-다우리(Sprague-Dawely) 랫트 (시몬센 레보라토리즈(Simonsen Laboratories) 또는 할란 레보라토리즈(Harlan Laboratories))에서 수행하였다. 랫트를 ALAAC 인증 시설에 사용하였으며 연구는 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) (IACUC) 시설에 의해 승인되었다. 동물은 실험 시작 전 적어도 48시간 동안 실험실에 순응되었다.

[0057] 화합물 1을 5%DMSO/5%트윈(Tween)20 및 90% 정제수 (정맥내 주입) 또는 5%DMSO/5%트윈20 및 90% 0.1N HCL (경구 위관영양법)에서 제제화하였다. 투여 용액의 농도는 HPLC-UV에 의해 검증되었다. 정맥내 투여의 경우, 화합물을 수동으로 구속된 동물 (n=4 래트/화합물)에 1분에 걸쳐 정맥으로 주입 펌프에 의해 투여하였다. 경구 투여는 표준 스테인리스 스틸 위관영양법 바늘 (n=2-4 래트/화합물)을 사용하여 위관영양법에 의한 것이었다. 투여의 두 경로 모두의 경우, 투여 후 8개의 시점에서 혈액을 수집하고 복용 후 24시간에 최종 샘플을 채취하였다. 혈액 샘플의 분취액을 폴리프로필렌 96-웰 플레이트로 옮기고 분석 때까지 -20℃에서 동결시켰다.

[0058] 혈액 샘플을 실온에서 해동한 후, 5 µL의 DMSO를 각각의 웰에 첨가하였다. 200 nM 내부 표준 (4-히드록시-3-(알파-이미노벤질)-1-메틸-6-페닐피리딘-2-(1H)-온) 및 0.1% 포름산을 함유하는 150 µL의 아세토니트릴을 첨가함으로써 단백질을 침전시켰다. 플레이트를 플레이트 셰이커 상에서 1분 동안 혼합하여 단백질을 침전을 용이하게 한 다음에 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 단백질을 펠릿화하였다. 상청액을 깨끗한 플레이트로 옮기고 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 LC/MS/MS 분석 전에 임의의 남아 있는 고체 물질을 펠릿화하였다. 검량 곡선 표준은 DMSO 중 5 µL 화합물 스톱을 새로 수집된 EDTA 래트 혈액에 스파이킹하여 작성하였다. 5 nM 내지 10,000 nM의 범위에 걸친 8점 표준 곡선이 각각의 생체-분석 시행 내에 포함되었다. 표준은 래트 약물동태학 샘플과 동일하게 처리하였다.

[0059] 래트 약물동태학 샘플의 농도를 8점 표준 곡선에 비해 표준화된 HPLC-LC/MS/MS 방법을 사용하여 결정하였다. 시스템은 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 3200 큐트랩(QTrap)과 커플링된 바이너리 펌프(binary pump)를 가진 리이프(Leap) CTC 팔(Pal) 주입기, 애질런트 1200 HPLC로 이루어진다. 화합물은 보안가드(Security Guard)를 가진 페노메넥스 시너지(Synergi) 퓨전(Fusion) RP 20x2mm 2 µm 수은 카트리지가 상에서 크로마토그래피하였다. 구배 방법은 0.7 내지 0.8 mL/분으로 달라지는 유량에서 물 중 0.1% 포름산으로 이루어진 이동상 A 및 아세토니트릴 중 0.1% 포름산으로 이루어진 이동상 B로 사용하였다. 이온은 전자분무 이온화(ESI) 인터페이스를 사용하여 양이온화 모드에서 생성되었다. 다중 반응 모니터링(MRM) 방법은 각각의 화합물에 특이적으로 개발되었다. 가열된 분무기는 4.8 µA의 분무기 전류로 325℃로 설정하였다. 충돌 에너지를 사용하여 29 내지 39 V 범위의 딸 이온을 생성하였다. 피크 면적 비는 정량화에 사용된 각각의 화합물에 특이적인 질량 전이의 MRM으로부터 획득하였다. 방법의 정량화 한계는 전형적으로 5 nM이었다. 애널리스트 소프트웨어 버전 1.4.2를 사용하여 데이터를 수집하고 분석하였다.

[0060] 혈액 농도 대 시간 데이터는 비구획 방법(non-compartmental method) (윈놀린(WinNonlin) 버전 5.2; 경구 투여 용 모델 200 및 정맥내 주입용 모델 202)을 사용하여 분석하였다. 절대 경구 생체이용률 (%)은 하기 식을 사용하여 계산하였다: (경구 AUC × IV 용량)/(IV AUC × 경구 용량) × 100.

[0061] 래트에서 화합물 1 단일 용량 약물동태학

[0062] 화합물 1은 IV 투여 (10 mL/kg)에 의해 10% 부피/부피 (v/v) DMSO 및 5% v/v 트윈 20 또는 경구 위관영양법 (10 mL/kg)에 의해 물 중 0.5% 중량/부피 (w/v) CMC의 제제로 투여하였다. 동물은 단일 투여로서 IV 용량으로 0.2 mg/kg을 또는 2 mg/kg/일을 경구로 받았다. 혈액 샘플을 IV 투여 후 1, 5 및 30분, 2, 4, 8, 10, 24, 24, 48, 및 72 시간 및 경구 투여 후 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 및 72 시간에 수집하였다. 혈액을 항응고제 K₂EDTA를 함유한 튜브에 수집하고 혈장으로 처리하였다. 각각의 분석물의 혈장 농도는 적격 LC-MS/MS 방법을 사용하여 결정하였다. PK 파라미터는 하기 표 2에 요약되어 있다.

[0063] [표 2]

[0064] 화합물 1의 단일 투여 후 평균 약물동태학 파라미터

용량 (mg/kg); 경로	분석물	t _{max} (hr)	C _{max} (nmol/L)	AUC ₀₋₂₄ (hr*nmol/L)	t _{1/2} (hr)	Vd/F (L/kg)	%F
0.2 IV	화합물 1	0.02	743	386	1.62	DNS	NA
2.0 경구	화합물 1	3.00	14.8	95.4	3.73	292	2.5

[0065] .

- [0066] 약어: DNS = 데이터가 충분하지 않음, NA = 해당 없음.
- [0067] 순환 림프구 수의 평가
- [0068] 전혈 샘플을 복용 전 및 비히클 또는 시험 화합물의 단일 경구 용량 투여 후 3, 6 및 24 시간에 경피적 경정맥 천자(percutaneous jugular vein puncture)를 사용하여 섭식 상태(fed state)의 순응된, 의식이 있는 수컷 스프라그 다우리 래트로부터 수집하였다. 혈액 샘플을 K₂EDTA 튜브에 수집하고, 완전히 혼합하고 분석할 때까지 습윤 얼음에 보관하였다. 순환 림프구 수는 동일한 샘플의 개별 분취액으로부터의 두 가지 방법에 의해 평가하였다. 총 림프구 수는 CD4⁺, CD8⁺ 및 B220⁺ 림프구의 수를 결정하기 위해 형광 활성화-세포 분류 (FACS) 분석을 사용하여 검량된 분석기 (시험 #416; 호리바 메디칼(Horiba Medical) ABX 펜트라(Pentra) XL 80) 상의 표준 혈액학 패널 및 사내 유세포 분석 (써모피셔(ThermoFisher) 어튠(Attune) NxT 유세포 분석기)에 의해 결정하였다. 데이터는 절대 림프구 수 (혈액학 분석기), 개별 림프구 아형 (CD4⁺, CD8⁺ 및 B220⁺) 및 개별 림프구 아형의 합계 (유세포 분석기)에 대해 다음과 같이 표현하였다.
- [0069] · μ L 전혈당 림프구의 수.
 - [0070] · 각각의 시점에서 각각의 군의 복용 전 기준선에 비한 백분을 변화
- [0071] 유세포 분석 절차(Flow Cytometry Procedure)
- [0072] 전혈 샘플 (K₂EDTA)을 하기에 상세히 설명된 바와 같이, 래트 항체를 사용하여 유세포 분석기 (써모피셔 어튠 NxT) 상에서 분석하였다. 기준선 및 복용 후 3시간 샘플은 수집과 동일한 날에 분석하였다. 복용 후 6시간 샘플을 4°C에서 (2 - 8°C 냉장고에서의 습윤 얼음 상에서) 밤새 보관한 후 분석하고 동일한 날에 복용 후 24시간 샘플을 수집하여 분석하였다.
- [0073] 약력학적 효과
- [0074] 동물에게 투여된 화합물 1의 2 mg/kg 경구 용량 수준은 순환 림프구의 수의 유의한 감소 (~ \geq 60%)를 유도하기 위한 것이었다. 순응 후, 혈액 샘플을 투여 전 및 투여 후 3시간, 6 및 24시간에 의식 있는 스프라그 다우리 래트의 경정맥으로부터 연속적으로 수집하였다. 순환 림프구의 절대 수는 혈액학 분석기를 사용하여 전혈 샘플에서 정량화하였고 CD4⁺, CD8⁺ 및 B220⁺ 림프구 아형은 유세포 분석기를 사용하여 정량화하였다. 각각의 화합물 1에 대한 혈장 농도는 액체 크로마토그래피, 텐덤 질량 분석법으로 정량화하였다.
- [0075] 화합물 1의 경구 투여는 총 순환 림프구 수 (CD4⁺, CD8⁺ 및 B220⁺의 총 수)를 복용 전 값에 비해 52%까지 유의하게 감소시켰다 (도면 참조). 개별 림프구 아형에 대한 효과는 각각 68%, 62% 및 35% 감소된 CD4⁺, CD8⁺ 및 B220⁺ 림프구 모집단과 유사하였다. 더욱이, 혈액학 분석기에서의 측정이 또한 유사한 결과를 제공하였다 (복용 전 값에 비해 림프구가 44% 더 적다). 일반적으로, 최대 효과는 투여 후 6시간까지 관찰되었다. 화합물 1은 24시간 시점에서 유의한 효과가 없었다. 림프구 수는 투여 후 화합물 1의 혈장 농도를 반영하여, 분명한 약물 동태학/약력학 (PK/PD) 관계를 입증하였다.
- [0076] 화합물 1의 임상 PK
- [0077] 화합물 1 약물동태학 (PK) 파라미터는 재발 완화성 다발성 경화증 (RMS)을 가진 대략 24명의 적격 대상체가 오자니모드 HCl의 초기 7-일 용량 증량 (1일 내지 4일차에 0.25 mg PO QD 및 5일 내지 7일차에 0.5 mg PO QD)에 이어서 대략 85일 \pm 5일차까지 0.5 mg PO QD (군 1, n=12) 또는 1 mg PO QD (군 2, n=12)를 받은 1상 연구로부터 유래되었다. 연속 혈액 PK 샘플을 투여 1일차 및 마지막 날에 수집하였다. 표 3에 요약된 바와 같이, 화합물 1을 포함한 오자니모드 및 이의 대사산물에 대한 PK 파라미터를 비구획 분석 및 실제 PK 수집 시간을 사용하여 평가하였다.
- [0078] [표 3]

[0079] 오자니모드 및 활성 대사산물의 임상 PK 특성의 요약

	오자니모드	화합물 1
중앙값 Tmax	6-8 시간	6-10 시간
평균 t1/2 (정상 상태에서)	15-23 시간	약 10-13 일
최고점-대-최저점 비 (정상 상태에서)	2-배	1.3- 내지 1.6-배
정상 상태에서 총 효능제 노출*의 %	오자니모드: 3% 내지 6% 기타 대사산물 5% 내지 9%	85% 내지 93%

[0080]

[0081] *총 효능제 = 오자니모드와 활성 대사산물의 합계

[0082] SIP₁-SIP₅에 관해서 오자니모드 및 화합물 1에 대한 비교 선택도를 nM으로 보고된 효능제 값 (EC₅₀)과 함께, 표 4에 나타냈다.

[0083] [표 4]

[0084] 비교 선택도

분포		SIP ₁	SIP ₂	SIP ₃	SIP ₄	SIP ₅
EC ₅₀	오자니모드	1.2	>10,000	>5,000	2038	5.1
	화합물 1	2.1	>10,000	>5,000	>10,000	17.9

[0085]

[0086] 상기에 기재된 다양한 실시양태는 추가 실시양태를 제공하기 위해 조합될 수 있다. 본 명세서에서 언급되고/되거나 출원 데이터 시트(Application Data Sheet)에 열거된 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비특허 간행물은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 필요한 경우, 실시양태의 측면이 또 다른 실시양태를 제공하기 위해 다양한 특허, 출원 및 간행물의 개념을 이용하기 위해 변형될 수 있다. 이들 및 기타 변경은 상기-상세한 설명에 비추어 실시양태에 대해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 하기 청구범위에서, 사용된 용어는 본 명세서 및 청구범위에 개시된 구체적 실시양태로 청구범위를 제한하는 것으로 해석되어야 하는 것이 아니라, 이러한 청구범위에 대한 권리가 있는 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 실시양태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 2019년 4월 26일에 출원된 미국 가출원 62/839,495는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

도면1

