(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월16일
(11) 등록번호 10-2340654
(24) 등록일자 2021년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 239/47 (2006.01) *A61K 31/44* (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01) *A61K 31/444* (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
C07C 311/08 (2006.01) *C07D 401/12* (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01) *C07D 405/12* (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 239/47 (2013.01)
A61K 31/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7023664(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년04월01일
심사청구일자 2021년07월26일
(85) 번역문제출일자 2021년07월26일
(65) 공개번호 10-2021-0096313
(43) 공개일자 2021년08월04일
(62) 원출원 특허 10-2015-7031292
원출원일자(국제) 2014년04월01일
심사청구일자 2019년03월29일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2014/051018
(87) 국제공개번호 WO 2014/162122
국제공개일자 2014년10월09일
(30) 우선권주장
1305945.6 2013년04월02일 영국(GB)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014027209 A1
WO2004014870 A1

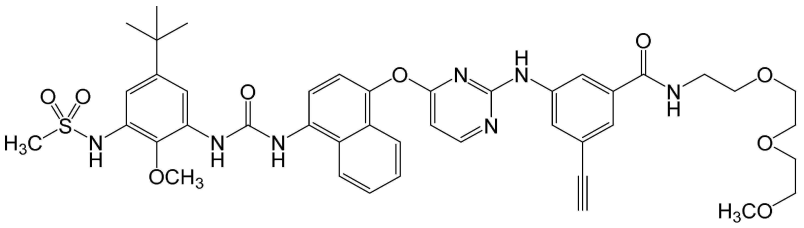
(73) 특허권자
옥슬러 앤퀴지션즈 리미티드
영국 옥스포드 오엑스4 4지에이 로버트 로빈슨 에비뉴 맥댈렌 센터
(72) 발명자
파이프, 매튜 콜린 토르
영국 에스더블유7 2비피 런던 프린스 콘소트 로드 베세머빌딩 (알에스엠) 인큐베이터 레벨 1 토피버트 리미티드 임페리얼 컬리지
(74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 신창훈

(54) 발명의 명칭 **키나제 저해제**

(57) 요 약

본 발명은, (예를 들어, p38 미토겐-활성화 단백질 키나제 효소류, Syk 키나제; 티로신 키나제의 Src류, 예를 들면 Src 및 Lck의 하나 또는 그 이상의 구성에 대한 저해를 통한) 항염증성 활성을 가지며, 약학적 조합, 특히 염증성 폐 질환, 염증성 안 질환, 염증성 장 질환을 포함하는 염증성 질환의 치료의 용도를 갖는 화학식 I의 화합물을 제공한다.



I

(52) CPC특허분류
A61K 31/4427 (2013.01)
A61K 31/444 (2013.01)
A61K 31/505 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)
C07C 311/08 (2013.01)
C07D 401/12 (2013.01)
C07D 403/12 (2013.01)
C07D 405/12 (2013.01)
C07D 413/12 (2013.01)

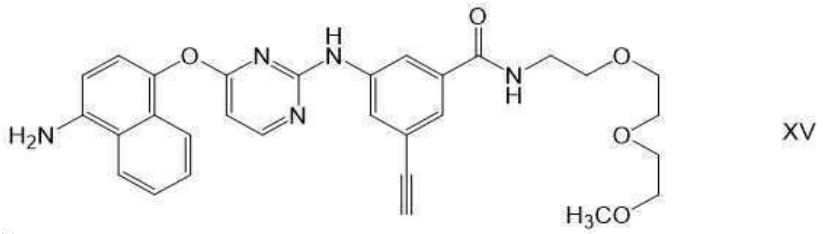
(30) 우선권주장
1322678.2 2013년12월20일 영국(GB)
1402647.0 2014년02월14일 영국(GB)

명 세 서

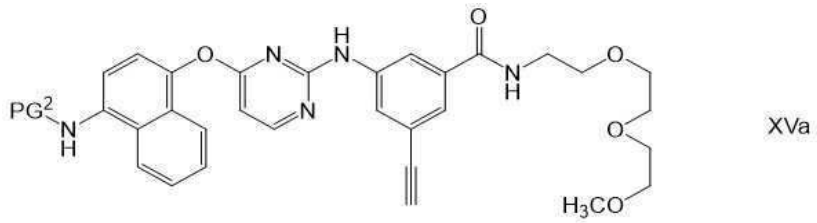
청구범위

청구항 1

화학식 XV 또는 XVa의 화합물:



XV

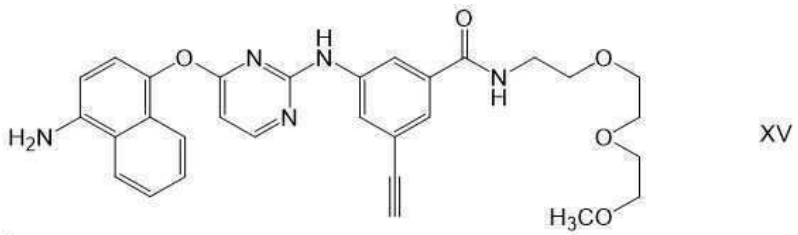


XVa

여기서, PG^2는 *tert*-부톡시카보닐이다.

청구항 2

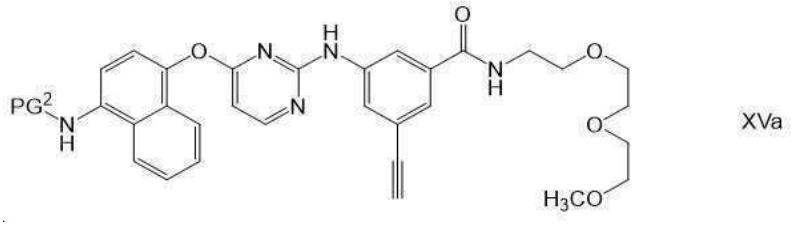
제1항에 있어서, 화학식 XV의 화합물인, 화합물:



XV

청구항 3

제1항에 있어서, 화학식 XVa의 화합물인, 화합물:



XVa

여기서, PG^2는 *tert*-부톡시카보닐이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 그 중에서도, (예를 들어, p38 미토겐-활성화 단백질 키나제 효소류의 하나 또는 그 이상의 구성에 대한 저해를 통한(본원에서는 p38 MAP 키나제 저해제라 칭함)) 예를 들어 이들의 알파 키나제 서브타입; Syk 키나제; 및 티로신 키나제의 Src류에 대한 항염증제인 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물의,

단일 또는 병용 용법을 포함하는 치료의 용도에 관한 것으로서, 특히 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)과 같은 염증성 폐 질환, 포도막염 및 건성각결막염(안구건조증)과 같은 염증성 안 질환과, 크론병 및 궤양성 대장염과 같은 염증성 위장관 질환과 같은 염증성 질환의 치료의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 명백히 본원 명세서에 앞서 공개된 문헌의 목록 또는 논의를 당 기술수준의 일부이거나, 또는 보편적인 일반 지식이라고 반드시 인정하는 것으로 간주하여서는 안된다.

[0003] 각각 상이한 조직 발현 패턴을 나타내는 4개의 p38 MAPK 이소폼(isoform)(각각 알파, 베타, 감마 및 델타)이 동정되었다. p38 MAPK 알파와 베타 이소폼은 신체 도처에서 발견되며 수많은 상이한 세포 타입에 존재하고, 전술한 분자량이 작은 화합물 다수에 의해 저해된다. 초기 분류의 저해제들은 화합물들의 다수의 표적 이탈(off-target) 효과를 유발하는 이러한 이소폼의 광범위한 조직 분포로 인하여 매우 유독하였다. 보다 최근에 동정된 저해제의 일부는, 보다 넓은 안전 여유를 갖는 p38 MAPK 알파 및 베타 이소폼에 대한 향상된 선택성을 보여준다.

[0004] p38 MAP 키나제는 중증 천식, COPD 및 염증성 장 질환 (IBD) 등의 인간 질병에서 만성적인 지속성 염증의 개시 및 유지에 연루되는 수많은 시그널링 경로에서 중추적 역할을 하는 것으로 생각된다. p38 MAP 키나제가 일정 범위의 염증전(pro-inflammatory) 사이토카인에 의해 활성화되고 그의 활성화로 인하여 추가 염증전 사이토카인의 보충 및 분비가 발생한다는 것을 입증하는 많은 문헌들이 있다. 실제로, 일부 임상 연구의 데이터는 p38 MAP 키나제 저해제로 치료하는 동안 환자의 질병 활성에서 유익한 변화를 입증하고 있다. 예를 들어, Smith는 인간 PBMC로부터 (IL-8이 아니라) TNFα 분비에 대한 p38 MAP 키나제 저해제의 저해 효과를 기술하고 있다(Smith, S. J., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149:393-404).

[0005] COPD 및 IBD의 치료에 p38 MAP 키나제의 저해제를 사용하는 것도 제안되었다. p38 MAPK α/β를 표적으로 하는 소분자 저해제는 일반적으로 코르티코스테로이드에 무감한 COPD 환자에서 얻어진 세포와 조직(Smith, S. J., Br. J. Pharmacol., 2006, 149:393-404); IBD 환자에서 얻어진 생검(Docena, G. et al., J. of Trans. Immunol., 2010, 162:108-115); 및 생체내 동물 모델(Underwood, D. C. et al., Am. J. Physiol., 2000, 279:L895-902; Nath, P. et al., Eur. J. Pharmacol., 2006, 544:160-167)에서 염증의 다양한 매개변수를 감소시키는데 효과적인 것으로 입증되었다.

[0006] Irusen과 그의 동료들은 또한 핵에서 글루코코르티코이드 수용체(GR)의 결합 친화성 감소에 의해 코르티코스테로이드 불감성에 대한 p38 MAPK α/β의 연관 가능성을 제안하였다(Irusen, E. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2002, 109:649-657). 일정 범위의 p38 MAP 키나제 저해제, 예를 들어 AMG548, BIRB 796, VX702, SCIO469 및 SCIO323에 대한 임상 실험이 기술되어 있다 (Lee, M.R. and Dominguez, C., Current Med. Chem., 2005, 12:2979-2994). 그러나, 인간의 만성 염증성 질환을 치료하는데 p38 MAP 키나제 저해제의 사용을 가로막는 주된 장애는 환자에서 관찰되는 독성이다. 이는 상기 특정적으로 언급된 모든 것을 비롯해 진행중인 많은 화합물의 임상 개발을 중단시키기에 충분히 심각하다.

[0007] COPD는 기저 염증이 흡입용 코르티코스테로이드의 항염증 효과에 실질적으로 내성이 있는 것으로 보고된 증상이다. 따라서, COPD를 치료하기 위한 고도의 전략은 고유의 항염증 효과와 흡입용 코르티코스테로이드에 대한 COPD 환자의 폐 조직의 민감성을 증가시킬 수 있는 능력을 갖는 중재안을 개발하는 것일 수 있다. Mercado 등의 최근 간행물(Mercado, N., et al., Mol. Pharmacol., 2011, 80(6):1128-1135)에서는 p38 MAPK γ의 사일런싱(silencing)이 코르티코스테로이드에 대한 민감성을 회복하는 잠재성이 있음을 입증하였다. 그러므로 COPD와 중증 천식 치료를 위해 p38 MAP 키나제 저해제를 사용하는 것은 환자에게 이중적 혜택이 될 수 있다.

[0008] 천식이나 COPD로 진단된 많은 환자들은 제어되지 않는 증상과 입원을 초래할 수 있는 이들의 의료 상태의 악화로 고통받고 있다. 이것은 흡입 코르티코스테로이드와 장시간 작용하는 β-작용제의 조합물을 포함하는, 가장 최신의 현재 시판중인 치료 요법제 사용에도 불구하고 일어난다. 지난 10년 동안 축적된 데이터는 폐 질환의 기저 염증 성분을 효과적으로 관리하지 못하는 것이 악화가 일어나는 가장 그럴듯한 이유임을 나타내고 있다. 천식 치료에서 항염증제로서 코르티코스테로이드, 특히 흡입 코르티코스테로이드의 확립된 효능을 고려할 때, 이러한 사실은 심도있는 조사를 촉발하였다. 연구에서는 일부 환경적 손상(insults)이 환자의 폐에서 코르티코스테로이드 무감성 염증 변화를 일으키는 것이 확인되었다. 일 예가 바이러스 매개 상기도관 감염(URTI)에서 발생하는 반응으로, 이것은 천식 및 COPD와 연관된 이병률 증가에서 특히 중요하다.

[0009] c-Src 및 Syk 키나제 둘다의 활성을 저해하는 화합물이 리노바이러스 복제에 대한 유효 약물이고(Charron, C.E.

et al., WO 2011/158042), p59-HCK를 저해하는 화합물이 인플루엔자 바이러스 복제에 대해 유효하다(Charron, C.E. et al., WO 2011/070369)는 것은 이전에 기술되었다. p38 MAPK의 저해와 함께, 이러한 것들은 만성 호흡기 질환을 갖는 환자를 치료하는 화합물에 있어서 유용한 성질이다.

[0010] 특정 p38 MAPK 저해제는 또한 호흡기 세포융합 바이러스 복제의 저해제로서 기술되었다(Cass, L. et al., WO 2011/ 158039).

[0011] IBD의 정확한 병인은 분명치 않으나, 상호작용하여 관강내 미생물상의 성분에 대항해 과다 및 잘 제어되지 않는 점막의 염증성 반응을 촉진하는 유전 및 환경적 인자에 의해 통제되는 것으로 여겨진다. 이러한 반응은 말초 유래 염증성 호중구, 수지상 세포 및 T-세포의 침윤을 통해 매개된다. 염증성 세포내 p38의 도처 발현으로 의해, p38은 IBD 모델에서의 연구를 위한 명백한 표적이 되고 있다. IBD의 동물 모델 및 IBD 환자 유래 인간 생검에서 p38 저해제의 효능을 조사한 연구에 따라서, p38이 IBD 치료를 위한 표적일 수 있음이 제시되었다(Hove, T. ten et al., Gut, 2002,50:507-512, Docena, G. et al., J. of Trans. Immunol,.2010, 162:108-115). 그러나, 이러한 발견은 p38 저해제로 효과를 보이지 않은 것으로 보고된 다른 그룹과 완전히 일치하지는 않는다(Malamut G. et al., Dig. Dis. Sci, 2006,51:1443-1453). p38 알파 저해제 BIRB796을 사용한 크론병 환자에서의 임상적 연구는 C-반응성 단백질 수준의 개선으로 임상적 혜택의 가능성을 입증하였다. 그러나 이러한 개선은 일시적인 것으로 8주차에 기준선으로 돌아왔다(Schreiber, S. et al.,Clin. Gastro. Hepatology, 2006, 4:325-334). 중증의 크론병을 가진 환자에서 CNI-1493, p38 및 Jnk 저해제의 효능을 조사한 소규모 임상 연구는 8주 이상 임상 점수에 상당한 개선을 나타내었다(Hommes, D. et al.Gastroenterology. 2002 122:7-14).

[0012] T 세포는 위장관의 염증 매개에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져다. 포우리(Powrie) 및 동료들에 의한 선구자적 연구로 나이브(naive) CD4+ 세포의 중도 장애 면역결핍(SCID) 동물로의 전달이 공생 박테리아의 존재에 따라 대장염으로 발달되는 것으로 판명되었다(Powrie F. et al. Int Immunol. 1993 5:1461-71). 또한, IBD 환자로부터의 점막을 조사하여 환자가 크론병인지 궤양성 대장염을 가졌는지에 따라 바이어스되는 Th1 (IFNγ/IL-2) 또는 Th2 (IL5/TGFβ) CD4+ 세포의 상향조절이 나타났다(Fuss IJ. et al. J Immunol. 1996 157:1261-70.). 유사하게, 베체트 환자의 혈청내 T 세포 관련 사이토카인(IL-17 및 IL-23)의 수준 증가를 보고한 다수의 연구로 T 세포는 염증성 안 장애에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Chi W. et al.Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 49:3058-64). 이의 지지로, 디레스케넬리(Direskeneli) 및 동료들은 베체트 환자가 그의 말초 혈액내에 Th17 세포가 증가하였고 Treg 세포가 감소하였음을 증명하였다(Direskeneli H. et al. J Allergy Clin Immunol. 2011 128:665-6).

[0013] T 세포 활성을 저해하기 위한 한가지 접근은 T 세포 수용체 시그널링 복합체의 활성화에 관여하는 키나제를 표적으로 하는 것이다. Syk 및 Src 패밀리 키나제는 이 경로에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며, 여기서는 Src 패밀리 키나제, Fyn 및 Lck가 T 세포 수용체의 활성화 하류가 되는 시그널링 분자이다(Barber EK. et al. PNAS 1989 86:3277-81). 이들은 Syk 패밀리 키나제, ZAP-70의 동원으로 이어지는 T 세포 수용체의 티로신 포스포릴화를 개시한다. 동물 연구는 ZAP-70 녹아웃이 SCID 표현형으로 이어짐을 보여주었다(Chan AC. et al. Science. 1994 10;264(5165):1599-601).

[0014] Syk 저해제 포스타마티닙에 의한 류마티스 관절염 환자의 임상 시험은 환자가 개선된 임상 결과 및 감소된 IL-6 및 MMP-3의 혈청 수준을 나타냄으로써, 항-염증성 표적으로서의 Syk 잠재성을 보여주었다(Weinblatt ME. et al. Arthritis Rheum. 2008 58:3309-18). Syk 키나제는 조혈계 세포, 가장 특히는 B 세포 및 성숙 T 세포에서 널리 발현된다. 이는 면역수용체 티로신계 활성(ITAM) 모티브와의 상호작용을 통해 염증 세포에서 면역-수용체 시그널링의 매개뿐만 아니라 T 세포 및 B 세포의 발현을 조절하는데 중요한 역할을 한다. Syk 활성화는 IL-6 및 MMP - IBD 및 류마티스 관절염을 포함한 염증성 장애에서 보통 발견되는 상향조절된 염증 담체의 방출로 이어진다(Wang YD. et al World J Gastroenterol 2007; 13: 5926-5932, Litinsky I et al. Cytokine. 2006 Jan 33:106-10).

[0015] 염증전 경로의 활성을 조절하는 세포 시그널링 이벤트에서 중추적인 역할을 하는 것 외에, 키나제 효소는, DNA 통합성의 유지(Shilo, Y. *Nature Reviews Cancer,* 2003, **3**: 155-168) 및 세포 분열의 복잡한 과정의 조직화를 포함하는 일정 범위의 세포 기능의 활성을 조절하는 것으로도 알려졌다. 사실, 소위 "올라하스키 키나제"인 특정 키나제 저해제는 생체외 소핵 형성의 빈도를 바꾸는 것으로 알려졌다(Olaharsky, A. J. *et al., PLoS Comput. Biol.,* 2009, **5**(7), e1000446; doi: 10.1371/journal.pcbi.1000446). 소핵 형성은 유사분열 과정의 중단에 연루되거나 연계되어 있어서, 바람직하지 않다. 글리코겐 신타제 키나제 3α(GSK3α)의 저해는 소핵 형성을 촉진하는 키나제 저해제의 가능성을 증가시키는 특히 중요 인자인 것으로 확인되었다. 또한, RNAi로의 키나

제 GSK3β의 저해가 또한 소핵 형성을 촉진하는 것으로 보고되었다(Tighe, A. et al., BMC Cell Biology, 2007, 8:34).

[0016] 용량의 최적화 및/또는 분자의 투여 경로를 변경함에 의해 GSK3α와 같은 올라하스키 키나제의 저해의 부작용을 약화시키는 것이 가능하다고 할지라도, GSK 3α와 같은 올라하스키 키나제의 저해가 낮거나 무시할 수 있고/있거나 (예를 들어 유사분열 분석법에 의해 측정된)유사분열의 중단이 낮거나 무시할 수 있는 정도인, 치료에 유용한 분자를 확인하는 것이 유리할 수 있다.

[0017] 요소 유도체를 포함하는 다양한 화합물들이 하나 또는 그 이상의 키나제를 저해하는 것으로 개시되었다. 그러한 화합물의 예는 WO 99/23091, WO 00/041698, WO 00/043384, WO 00/055139, WO 01/36403, WO 01/04115, WO 02/083628, WO 02/083642, WO 02/092576, WO 02/096876, WO 2003/005999, WO 2003/068223, WO 2003/068228, WO 2003/072569, WO 2004/014870, WO 2004/113352, WO 2005/005396, WO 2005/018624, WO 2005/023761, WO 2005/044825, WO 2006/015775, WO 2006/043090, WO 2007/004749 및 WO 2007/053394에서 찾을 수 있다. 또다른 예들은 다음에 간행물에서 찾을 수 있다:

[0018] - *Curr. Opin. Drug Devel.* (2004, *7(5)*, 600-616);

[0019] - *J. Med. Chem.* (2007, *50*, 4016-4026; 2009, *52*, 3881-3891; 및 2010, *53*, 5639-5655);

[0020] - *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2007, *17*, 354-357; 2008, *18*, 3251-3255; 2009, *19*, 2386-2391; 및 2010, *20*, 4819-4824);

[0021] - *Curr. Top. Med. Chem.* (2008, *8*, 1452-1467);

[0022] - *Bioorg. Med. Chem.* (2010, *18*, 5738-5748);

[0023] - *Eur. J. Pharmacol.* (2010, *632*, 93-102) 및

[0024] - *J. Chem. Inf. Model.* (2011, *51*, 115-129).

발명의 내용

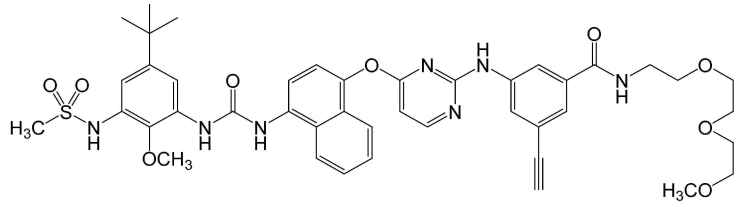
해결하려는 과제

[0025] 그럼에도 불구하고, 새로운 키나제 저해제, 특히 염증 치료에 적합한 p38 MAP 키나제 저해제를 대체할 수 있는 저해제를 발견하고 개발할 필요가 여전히 남아있다. 특히, 종래의 가능한 치료에 대해 향상된 치료 잠재성을 갖거나, 특히 월등한 치료 지수(적어도 동등하게 효과적이고, 하나 또는 그 이상의 면에서, 관계된 치료량에서 이전의 것에 비해 독성이 덜한)를 나타내는 그러한 저해제에 대한 요구가 존재한다.

과제의 해결 수단

[0026] 우리는 놀랍게도, 하나 또는 그 이상의 p38 MAP 키나제, Syk 및 Src 패밀리 키나제를 저해하고, 그에 따라 우수한 항염증 성질을 갖는 아닐린-치환노딘 디아릴우레아를 발견하였다.

[0027] 따라서, 본 발명의 제1측면에서, 화학식 I의 화합물, 또는 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 이들의 동위원소 유도체가 제공되고, 이러한 화합물은 본 명세서에서 "*본 발명의 화합물*"이라 칭한다.



I

[0028]

[0029] 언급된 약학적으로 허용가능한 염은 산부가염과 염기부가염을 포함한다. 그러한 염은 통상적인 방법, 예를 들어 화학식 I의 화합물의 유리산 또는 유리염기 형태와 적절한 산 또는 염기의 하나 또는 그 이상의 등가물과의 반응으로 형성되고, 선택적으로 용매나, 염이 불용성이고 상기 용매의 제거가 뒤따르는 배지 내에서나, 또는 상기 배지에서 통상적인 기술(예를 들어, 진공 속에서, 동결 건조 또는 여과에 의해)을 이용하여 형성된다. 염들은 또한, 예를 들어 적합한 이온 교환 수지를 이용하여, 염의 형태인 화학식 I의 화합물의 카운터 이온과 다른 카

운터 이온의 교환에 의해 제조될 수 있다.

[0030] 약학적으로 허용가능한 염들의 예로는 무기산 및 유기산으로부터 유도된 산부가염과, 금속으로부터 유도된 염을 포함한다.

[0031] 의심의 여지를 없애기 위해, 화학식 I의 화합물은 언급된 원소들을 자연적인 또는 비자연적인 동위원소 형태로 함유할 수 있다. 이러한 관점에서, 본 발명의 구체예는 다음을 포함한다:

[0032] (a) 동위원소가 첨가되지 않거나 화합물의 다른 원소들에 대하여 표식되지 않은 화학식 I의 화합물; 및

[0033] (b) 동위원소가 첨가되거나 화합물의 다른 원소들에 대하여 표식된 화학식 I의 화합물.

[0034] 본 명세서의 "동위원소 유도체"는 이러한 두 구체예의 두번째에 관한 것이다. 본 발명의 특정 구체예에서, 화학식 I의 화합물은 동위원소가 첨가되거나 (화합물의 하나 또는 그 이상의 원소들에 대하여) 하나 또는 그 이상의 안정한 동위원소로 표식된다. 따라서, 본 발명의 화합물은, 예를 들어 동위원소가 첨가되거나, 듀테륨 등과 같은 하나 또는 그 이상의 원소로 표식되는 화학식 I의 화합물을 포함한다고 언급될 수 있다.

[0035] 화학식 I의 화합물은 호변이성을 나타낼 수 있다. 모든 호변이적 형태 및 이들의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0036] 화학식 I의 화합물의 명칭은 3-((4-((4-(3-(5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)우레이도)나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드이다. 그러나, 또한
3-[[4-[[4-[[5-tert-부틸-3-(메탄설폰아미도)-2-메톡시-페닐]카바모일아미노]-1-나프틸]옥시]-피리미딘-2-일]아미노]-5-에티닐-N-[2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]에틸]벤즈아미드로도 불려진다.

[0037] 따라서, 일 구체예에서, 본 발명은 3-((4-((4-(3-(5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)우레이도)나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드에 관한 것이다.

[0038] 화학식 I의 화합물의 염의 예로는, 제한 없이, HCl 및 HBr 염과 같은 강무기산의 산부가염 및 메탄설폰산과 같은 강유기산의 부가염과 같은, 약학적으로 허용가능한 염들을 모두 포함한다.

[0039] 본 명세서에서 본 발명의 화합물(화학식 I의 화합물)에 대한 언급은, 다른 것을 나타내는 것으로 명백하게 나타내지 않는 한, 상기 화합물과 모든 약학적으로 허용가능한 염들, 용매화물 및/또는 상기 화합물의 호변체에 대한 언급을 포함하는 것으로 의도되어야 한다. 이러한 관점에서, 언급된 용매화물은 수화물을 포함한다.

[0040] 본 발명의 화합물(화학식 I의 화합물)은 p38 MAP 키나제(특히 알파 서브타입), Syk 키나제 및 Src 패밀리 키나제, 즉 Src 및 Lck의 저해제이고, 따라서 의학, 특히 염증성 질환의 치료에 유용하다. 언급되는 본 발명의 또 다른 측면은 따라서 다음을 포함한다.

[0041] (a) 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합하여, 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 및 동위원소 유도체를 포함하는, 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학 제제

[0042] (b) 다음을 포함하는 조합 제품으로

[0043] (A) 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체, 및

[0044] (B) 또다른 치료제를 포함하고,

[0045] 각각의 성분 (A) 및 (B)는 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합되어 제조된다.

[0046] 본 발명의 이러한 측면에서, 조합 제품은 단일(조합) 약학 제제이거나 또는 요소들로 구성된 키트(kit-of-parts)일 수 있다.

[0047] 따라서 본 발명의 이러한 측면은, 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합되는, 본 명세서에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체, 및 다른 치료제를 포함하는 약학 제제를 포함한다(상기 제제는 본 명세서에서 "조합 제제"라 칭한다).

[0048] 또한, 이것은

[0049] (i) 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체를, 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합하여 포함하는 약학 제제; 및

[0050] (ii) 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합하여 다른 치료제를 포함하는 약학 제제를 포함하고,

[0051] 여기서 성분 (i) 및 (ii)는 각각 서로 합하여 투여에 적합한 형태로 제공되는, 요소들로 구성된 키트를 포함한다.

[0052] 따라서 요소들의 구성된 키트의 성분 (i)은 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합되는 상기 성분 (A)이다. 유사하게, 성분 (ii)는 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합되는 상기 성분 (B)이다.

[0053] (c) 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체를, 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 측면 (a)의 약학 제제를 제조하는 공정

[0054] 본 발명의 이러한 측면의 구체예는, 약학적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체가 국소적으로 허용가능한 어쥬번트, 희석제 또는 담체(및/또는 공정은 국소 약학 제제, 예를 들어 국소 투여용으로 수정된 약학 제제를 제조하기 위한 것이다)를 포함하는 것으로 언급될 수 있다.

[0055] (d) 의료용도의(또는 의약으로서 또는 제약으로서) 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체

[0056] (e) 염증성 질환의 치료 또는 예방하기 위한, 본 발명의 (a) 또는 (b) 측면과 관련되어 정의된, 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체, 또는 약학 제제 또는 조합 제품

[0057] (f) 염증성 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조를 위한

[0058] 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체, 또는

[0059] 본 발명의 (a) 또는 (b) 측면과 관련되어 정의된, 약학 제제 또는 조합 제품의 용도.

[0060] (g) 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체, 또는

[0061] 본 발명의 (a) 또는 (b) 측면과 관련되어 정의된, 약학 제제 또는 조합 제품

[0062] 의 효과적인 양을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

[0063] (h) 위에서 정의된 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체, 또는

[0064] 본 발명의 (a) 또는 (b) 측면과 관련되어 정의된, 약학 제제 또는 조합 제품

[0065] 의 효과적인 양을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상을 코르티코스테로이드의 항염증 효과에 대해 민감화하는 방법.

[0066] 본 발명의 이러한 측면의 구체예는 코르티코스테로이드의 항염증 효과에 대해 불응이 된 대상에 대한 것을 포함하는 것으로 언급된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 제제

[0068] 상기 (a) 및 (b) 측면과 관련하여, 언급되는 희석제 및 담체는 비경구, 경구, 국소, 점막 및 직장 투여에 적합한 것들을 포함할 수 있다.

[0069] 상기 (a) 및 (b) 측면의 약학 제제 및 조합 제품은, 예를 들어 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 초자체

내(intravitreous), 안구 주위, 안구 뒤쪽, 결막하, 서브테논(sub-Tenon), 국소 안구(topical ocular) 또는 관절 주위 투여를 위해, 특히 액체 용액, 에멀젼 또는 현택제의 형태; 경구 투여를 위해, 특히, 특히 직장선택형 약물 방출(Patel, M. M. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8* (10), 1247-1258)을 제공하는 것을 목표로 하는 기술을 포함하는, 정제 또는 캡슐의 형태; 국소, 예를 들어 폐 투여 또는 비강내 투여를 위해, 특히 파우더, 점비제 또는 에어로졸 및 경피 투여의 형태; 국소 안구 투여를 위해, 특히 용액, 에멀젼, 현탁제, 연고, 임플란트/인서트, 겔, 젤리 또는 리포솜 미소입자 제제(liposomal microparticle formulations)(Ghate, D.; Edelhauser, H. F. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, *3* (2), 275-287)의 형태; 안구 투여를 위해, 특히 생분해성 및 비-생분해성 임플란트, 리포솜 및 나노입자(Thrimawithana, T. R. et al. *Drug Discov. Today* **2011**, *16* (5/6), 270-277)의 형태; 예를 들어 볼(buccal), 혀밑(sublingual) 또는 질 점막에 대한 점막 투여, 및 직장 투여(rectal administration)를 위해, 예를 들어, 좌약 또는 관장의 형태로 제조될 수 있다.

[0070] 상기 (a) 및 (b) 측면의 약학 제제 및 조합 제품은 단위 투여 형태로 편리하게 투여될 수 있으며, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences(17판, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985))에 기술된 바와 같이, 약학 분야에서 잘 알려진 임의 방법으로 제조될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균수 또는 식염수, 프로필렌 글리콜과 같은 알킬렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜, 식물성 기원 오일, 수소화된 나프탈렌 등을 부형제로서 함유할 수 있다. 비강내 투여용 제제는 고체일 수 있으며, 부형제, 예를 들어 락토스 또는 덱스트란을 함유할 수 있거나, 점비제 또는 계량 스프레이(metered spray) 형태로 사용하기 위한 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 볼 투여의 경우, 전형적인 부형제는 당, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 전호화분 녹말(pregelatinated starch) 등을 포함한다.

[0071] 경구 투여에 적합한 조성물은 하나 이상의 생리적으로 적합한 담체 및/또는 부형제를 포함할 수 있으며 고체 또는 액체 형태일 수 있다. 정제 및 캡슐은, 결합제, 예를 들어 시럽, 아카시아, 젤라틴, 소르비톨, 트라가칸트, 또는 폴리-비닐피롤리돈; 락토스, 슈크로스, 옥수수 전분, 칼슘 포스페이트, 소르비톨, 또는 글리신 같은 충전제; 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 실리카 같은 윤활제; 및 소듐 라우릴 설페이트 같은 계면활성제와 함께 제조될 수 있다. 액체 조성물은 일반적인 첨가제, 예컨대 현탁화제, 예를 들어 소르비톨 시럽, 메틸 셀룰로스, 당 시럽, 젤라틴, 카복시메틸-셀룰로스, 또는 식용 지방; 유화제, 예컨대 레시틴, 또는 아카시아; 식물성 오일, 예컨대 아몬드 오일, 코코넛 오일, 대구 간유, 또는 땅콩유; 보존제, 예컨대 부틸레이트화 하이드록시아니솔(BHA) 및 부틸레이트화 하이드록시톨루엔(BHT)을 함유할 수 있다. 액체 조성물은, 예를 들어 젤라틴으로 캡슐화중에 단위 투여 형태를 제공할 수 있다.

[0072] 고체 경구 투여 형태는 정제, 투-피스 경질 캡슐(two-piece hard shell capsule) 및 연질 탄성 젤라틴(soft elastic gelatin; SEG) 캡슐을 포함한다. 투-피스 경질 캡슐은, 예를 들어 젤라틴 또는 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스(HPMC)로 제조될 수 있다.

[0073] 전형적으로, 건조 쉘 제제는 약 40% 내지 60% w/w 농도의 젤라틴, 약 20% 내지 30% 농도의 가소제(예컨대 글리세린, 소르비톨 또는 프로필렌 글리콜) 및 약 30% 내지 40% 농도의 물을 포함한다. 또한, 보존제, 염료, 유백제(opacifier) 및 향미제 같은 기타 물질도 존재할 수 있다. 액체 충전 물질은 (밀랍, 수소화된 피마자유 또는 폴리에틸렌 글리콜 4000과 같은 현탁화제와 함께) 용해, 가용화 또는 분산된 고체 약물, 또는 비히클 또는 미네랄 오일, 식물성 오일, 트리글리세리드, 글리콜, 폴리올 같은 비히클 및 표면활성제 조합 중의 액체 약물을 포함한다.

[0074] 본 발명의 화합물은 국소적으로(예를 들어 폐, 눈 또는 장에) 투여될 수 있다. 따라서, 상기 (a) 및 (b) 측면의 구체예는 국소 투여에 적합한 약학 제제 및 조합 제품을 포함한다. 그러한 제제는 국소적으로 허용가능한 (어떠한 어쥬번트, 희석제 및/또는 담체를 포함하는) 부형제를 포함한다.

[0075] 폐로의 국소 투여는 에어로졸 제제를 사용함으로써 가능해질 수 있다. 전형적으로, 에어로졸 제제는 클로로플루오로카본(CFC) 또는 하이드로플루오로카본(HFC)과 같은 적합한 에어로졸 분사제(propellant)에 현탁 또는 용해된 활성 성분을 포함한다. 적합한 CFC 분사제는 트리클로로모노플루오로메탄(분사제 11), 디클로로테트라플루오로메탄(분사제 114), 및 디클로로디플루오로메탄(분사제 12)을 포함한다. 적당한 HFC 분사제는 테트라플루오로에탄(HFC-134a) 및 헵타플루오로프로판(HFC-227)을 포함한다. 전형적으로, 분사제는 전체 흡입 조성물의 40 내지 99.5 중량%, 예를 들어 40 내지 90 중량%로 포함된다. 제제는 공용매(예를 들어, 에탄올) 및 계면활성제(예를 들어, 레시틴, 소르비탄 트리올리에이트 등)를 포함하는 부형제를 포함할 수 있다. 다른 가능한 부형제로는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 글리세린 등을 포함한다. 에어로졸 제제는 용기에 포장되거나 적정 투여량이 계량 밸브에 의해 전달된다(예를 들어, Bespack, Valois 또는 3M 또는 Aptar, Coster 또는 Vari에 의해

제공).

[0076] 또한, 폐로의 국소 투여는 수용액 또는 현탁제와 같이 무압 제제를 사용하여 이루어질 수 있다. 이는, 예를 들어 소형 및 휴대용인 것 또는 가정용 또는 병원용(비휴대용)인, 네뷸라이저(nebuliser)에 의해 투여될 수 있다. 제제는 물, 완충제, 긴장 조절제, pH 조절제, 계면활성제 및 공용매를 포함할 수 있다. 현탁제 용액 및 에어로졸 제제는 (가압되거나 또는 비가압된) 일반적으로 미세하게 나뉘어진 형태인 본 발명의 화합물을 포함하며, 예를 들어 0.5-10 ㎛의 D_{50}으로, 즉 약 1-5 ㎛을 포함한다. 입자 크기 분포는 D_{10}, D_{50} 및 D_{90} 값을 이용하여 나타낼 수 있다. 입자 크기 분포의 D_{50} 중간값은 분포를 절반으로 나누는 미크론 단위의 입자 크기로서 정의된다. 레이저 회절에서 유도된 측정은 부피 분포로서 보다 정확하게 기재되고, 따라서 이러한 절차를 이용하여 얻어진 D_{50} 값은 (부피 분포의 중간값인) Dv_{50} 값으로 보다 의미있게 칭해진다. 본 명세서의 Dv 값은 레이저 회절을 이용하여 측정된 입자 크기 분포를 지칭한다. 유사하게, 레이저 회절의 문맥에서 사용되는 D_{10} 및 D_{90} 값은 Dv_{10} 및 Dv_{90} 값을 평균내기 위해 취해지고, 분포의 10%인 D_{10} 값 아래에 있는 분포의 10%인 입자 크기 및, D_{90} 값 아래에 있는 분포의 90%인 입자 크기로 각각 불려진다.

[0077] 또한, 폐로의 국소 투여는 건조 분말 제제를 사용하여 이루어질 수도 있다. 건조 분말 제제는 본 발명의 화합물을, 전형적으로 1 내지 10 ㎛ 또는 0.5 내지 10㎛의 D_{50}, 예를 들어 약 1 내지 5 ㎛의 질량 평균 공기역학 직경(MMAD)을 갖는 미분 형태로 함유할 것이다. 미분 형태인 본 발명의 화합물의 분말은 미분화 공정 또는 유사 크기 감소 공정(similar size reduction process)에 의해 제조될 수 있다. 미분화는 Hosokawa Alpine에서 제조된 것과 같은 제트 밀을 이용하여 수행될 수 있다. 결과 입자 크기 분포는 레이저 회절(예를 들어, Malvern Mastersizer 2000S 장비로)을 이용하여 측정될 수 있다. 제제는 일반적으로, 예를 들어 50 ㎛ 이상, 예를 들어 100 ㎛ 이상의 MMAD 또는 40 내지 150 ㎛ 의 D_{50}인, 락토스, 글루코스 또는 만니톨 (바람직하게는 락토스)와 같은 국소적으로 허용가능한 희석제를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "락토스"는, α-락토스 모노하이드레이트, β-락토스 모노하이드레이트, α-락토스 무수(anhydrous), β-락토스 무수 및 비정질 락토스를 포함하는 락토스 함유 성분을 지칭한다. 락토스 성분은 미분화, 체거름(sieving), 밀링, 압축, 응집 또는 스프레이 건조에 의해 제조될 수 있다. 상업적으로 구입할 수 있는 다양한 형태의 락토스는 또한, 예를 들어 Lactohale® (흡입 등급 락토스; DFE Pharma), InhaLac®70 (건조 분말 흡입기용의 걸러진 락토스; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) 및 Respitose® (걸러진 흡입 등급 락토스; DFE Pharma)를 포함한다. 하나의 구체예에서, 락토스 성분은 α-락토스 모노하이드레이트, α-락토스 무수 및 비정질 락토스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이다. 바람직하게는 락토스는 α-락토스 모노하이드레이트이다.

[0078] 건조 분말 제제는 소듐 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 다른 부형제를 포함할 수 있다.

[0079] 건조 분말 제제는 일반적으로 건조 분말 흡입기(DPI) 장치를 이용하여 전달된다. 건조 분말 전달 시스템의 예는 SPIHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS 및 CLICKHALER를 포함한다. 건조 분말 시스템의 또다른 예는 ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, ORIEL 건조 분말 흡입기, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR 및 PROHALER를 포함한다.

[0080] 하나의 구체예에서, 본 발명의 화합물은, 예를 들어, AEROLISER와 같은 일회 투여 장치 또는 DISKUS와 같은 다회 투여 장치에 채워져, 선택적으로 마그네슘 스테아레이트와 함께 적합한 등급을 락토스를 더욱 포함하는, 미분화된 건조 분말 제제로 제공될 수 있다.

[0081] 본 발명의 화합물은 예를 들어 수성 또는 유성 용액뿐 아니라 현탁액 및 에멀젼을 포함하는 좌약 또는 관장제의 형태로 직장에 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 당업자들에게 주지인 표준 방법에 따라 제조된다. 예를 들어, 좌약은 활성 성분을 통상적인 좌약 베이스, 예컨대 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드, 예를 들어 Suppocire와 혼합하여 제조할 수 있다. 이 경우, 약물은 실온에서 고체이나 직장 온도에서는 액체이어서 직장내에서 녹아 약물을 방출하는 적합한 비자극성 부형제와 혼합된다. 이러한 물질은 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0082] 일반적으로, 점안제 또는 안연고 형태로 눈에 국소 투여되도록 의도된 조성물의 경우, 저해제의 총량은 약

0.0001 내지 4.0% (w/w) 미만일 것이다.

[0083] 바람직하게는, 국소 안 투여를 위해, 본 발명에 따라 투여되는 조성물은 용액, 현탁액, 에멀젼 및 다른 투약 형태로 제형화될 것이다. 제형화가 용이할 뿐만 아니라 환자가 감염된 눈에 용액 1 내지 2 방울을 주입함으로써 이러한 조성물을 용이하게 투여할 수 있다는 점에서 수성 용액이 일반적으로 바람직하다. 그러나, 조성물은 또한 현탁액, 점성 또는 반점성 겔, 또는 다른 형태의 고체 또는 반고체 조성물일 수도 있다. 수난용성 화합물에 대해 현탁액이 바람직할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따라 투여되는 조성물은 또한 등장화제, 완충제, 계면활성제, 안정화 폴리머, 보존제, 공용매 및 점도 구축제를 포함하나 이들에 제한되지 않는 다양한 기타 성분들을 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 약학 조성물은 등장화제 및 완충제와 함께 저해제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 임의로 계면활성제 및/또는 완화제 및/또는 안정화 폴리머를 더 포함할 수 있다.

[0085] 조성물의 장성을, 바람직하게는 안과 조성물에 대해 자연 눈물의 것으로 유지하기 위해 다양한 등장화제가 사용될 수 있다.

[0086] 예를 들어, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화마그네슘, 염화칼슘, 단당, 예컨대 덱스트로스, 프럭토스, 갈락토스, 및/또는 단순 폴리올, 예컨대 당 알콜 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 락티톨, 이소말티톨, 말티톨, 및 수소화 전분 가수분해물이 생리적 장성에 비슷하게 조성물에 첨가될 수 있다. 이러한 등장화제의 양은 첨가되는 특정 제제에 따라 달라질 것이다. 그러나, 조성물은 일반적으로, 등장화제를 최종 조성물이 안과적으로 허용가능한 오스몰농도(일반적으로 약 150-450 mOsm, 바람직하게는 250-350 mOsm 및 가장 바람직하게는 약 290 mOsm)를 가지게 하기에 충분한 양으로 함유할 것이다. 일반적으로, 본 발명의 등장화제는 2 내지 4% w/w의 범위로 존재할 것이다. 본 발명의 바람직한 등장화제는 단당 또는 당 알콜, 예컨대 D-만니톨을 포함한다.

[0087] 저장 조건하에서 pH가 변하는 것을 방지하기 위해 적절한 완충제 시스템(예를 들면, 인산나트륨, 아세트산나트륨, 시트르산나트륨, 붕산나트륨 또는 붕산)이 조성물에 첨가될 수 있다. 특정 농도는 사용되는 제제에 따라 달라질 것이다. 그러나, 완충제는 바람직하게는 표적 pH가 pH 5 내지 8, 및 더욱 바람직하게는 pH 5 내지 7의 표적 pH 범위내에서 유지되도록 선택될 것이다.

[0088] 고농도의 저해제를 전달하기 위해 계면활성제가 임의로 사용될 수 있다. 계면활성제는 저해제를 용해시키고 콜로이드 분산물, 예컨대 미셀 용액, 마이크로에멀젼, 에멀젼 및 현탁액을 안정화시키는 기능을 한다. 임의로 사용될 수 있는 계면활성제의 예로서는 폴리소르베이트, 폴록사머, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥실 피마자유, 티록사폴, 트리톤, 및 소르비탄 모노라우레이트를 들 수 있다.

[0089] 본 발명에서 사용되는 바람직한 계면활성제는 친수/친지/균형 "HLB"가 12.4 내지 13.2의 범위이며, 트리톤X114 및 티록사폴과 같이 안과 용도로 허용가능하다.

[0090] 본 발명의 안과 조성물에 첨가될 수 있는 추가 제제는 안정화 폴리머로서 기능하는 완화제이다. 안정화 폴리머는 우선적으로 국소 안과 용도의 이온성/전하성 실시예, 더욱 특히, 수중 분산물(즉, 수용성)을 만들 수 있고 물리적 안정성을 위해 그의 표면에 (-)10-50 mV의 제타-전위를 나타낼 수 있는 음전하를 가지는 폴리머여야 한다. 본 발명의 바람직한 안정화 폴리머는 0.1-0.5% w/w의 가교화 폴리아크릴레이트, 예컨대 카보머, 폴리카보필 및 페뮬렌(R), 특히 카보머 974p (폴리아크릴산) 류로부터 선택되는 폴리전해질, 또는 복수의 경우 폴리전해질들일 수 있다.

[0091] 담체의 점도를 증가시키기 위해 본 발명의 안과 조성물에 또한 다른 화합물이 첨가될 수 있다. 점도 증진제의 예로는 폴리사카라이드, 예컨대 히알루론산 및 그의 염, 콘드로이틴 설페이트 및 그의 염, 덱스트란, 셀룰로스계의 다양한 폴리머; 비닐 폴리머; 및 아크릴산 폴리머를 들 수 있으나 이들에 한정되지는 않는다.

[0092] 국소 안과 생성물은 전형적으로 다회 투여 형태로 포장된다. 따라서 사용중에 미생물의 오염을 방지하기 위해 보존제가 필요하다. 적합한 보존제는 벤잘코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 벤조도데시늄 브로마이드, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 페닐에틸 알콜, 에덴테이트 디소듐, 소르브산, 폴리쿼터늄-1, 또는 당업자들에게 공지된 다른 제제를 포함한다. 이러한 보존제는 전형적으로 0.001 내지 1.0% w/v의 수준으로 사용된다. 본 발명의 단위 투여 조성물은 멸균될 것이지만, 전형적으로 보존처리되지 않는다. 따라서 조성물은 일반적으로 보존제를 함유하지 않을 것이다.

[0093] 의사 또는 다른 숙련자들은 본 발명의 화합물에 적합한 용량을 결정할 수 있고, 따라서 임의의 특정 약학 제형(단위 투여 형태든, 그렇치 않던 간에 상관없이)에 포함되어야 하는 본 발명의 화합물의 양을 결정할 수 있을

것이다.

[0094] 상기 (b)에서 기재된 조합 제품과 관련된 본 발명의 구체예는

[0095] 본 발명의 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 염증성 질환(예를 들면,이하의 특정 질환)을 치료하는 데 적합하다고 알려진 하나 또는 그 이상의 다른 치료제를 포함할 수 있다.

[0096] 예를 들어, (COPD 또는 천식과 같은)호흡기 장애의 치료를 위해, 다른 치료제는 다음을 포함하는 리스트로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 제제이다:

[0097] - 스테로이드(예를 들어, 부데소니드, 베클로메타손 디프로피오네이트, 플루티카손 프로피오네이트, 모메타손 푸로에이트, 플루티카손 푸로에이트; 다른 예는시클레소니드이다);

[0098] - 베타 작용제, 특히 베타2 작용제(예를 들어, 터부탈린, 살부타몰, 살메테롤, 포모테롤; 다른 예는 빌란테롤, 올로다테롤, 레프로테롤 및 페노테롤이다); 및

[0099] - 잔틴(예를 들어, 테오필린)

[0100] 예를 들어, (COPD 또는 천식과 같은)호흡기 장애의 치료를 위해, 다른 치료제는 다음을 포함하는 리스트로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 제제이다:

[0101] - 무스카린성 길항제 (예를 들어, 이들 중의 브로마이드염으로서, 예를 들어 티오트로피움, 유메클리디늄, 글리코피로니움, 아클리디니움 및 다라트로피움); 및

[0102] - 포스포디에스테라아제 저해제.

[0103] 또한, (크론병 또는 궤양성 대장염과 같은) 위장 질환의 치료를 위해, 다른 치료제는, 예를 들어, 다음을 포함하는 리스트로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 제제이다:

[0104] - 5-아미노살리실산, 또는 그의 프로드럭(예컨대 설파살라진, 올살라진 또는 비살라지드);

[0105] - 코르티코스테로이드(예를 들면, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 또는 부데소니드);

[0106] - 면역억제제(예를 들면, 사이클로스포린, 타클로리무스, 메톡트렉세이트, 아자티오프린 또는 6-머캅토퓨린);

[0107] - 항-TNFα 항체(예를 들면, 인플릭시맙, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골 또는 골리무맵);

[0108] - 항-IL12/IL23 항체(예를 들면, 우스테키누맵) 또는 소분자 IL12/IL23 저해제 (예를 들면, 아필리모드);

[0109] - 항-α4β7 항체(예를 들면, 베돌리주맵);

[0110] - MAdCAM-1 블록커(예를 들면, PF-00547659);

[0111] - 세포 부착 분자 α4-인테그린에 대한 항체(예를 들면, 나탈리주맵);

[0112] - IL2 수용체 α 서브유닛에 대한 항체(예를 들면, 다클리주맵 또는 바실릭시맵);

[0113] - JAK3 저해제(예를 들면, 토파시티닙 또는 R348);

[0114] - Syk 저해제 및 그의 프로드럭(예를 들면, 포스타마티닙 및 R-406);

[0115] - 포스포디에스테라제-4 저해제(예를 들면, 테토밀라스트);

[0116] - HMPL-004;

[0117] - 항생균(probiotics);

[0118] - 데르살라진;

[0119] - 세마피모드/CPSI-2364; 및

[0120] - 단백질 키나제 C 저해제(예를 들면, AEB-071).

[0121] 안 장애(예컨대 건성각결막염 또는 포도막염)의 치료를 위해, 예를 들어, 다른 치료제는 다음을 포함하는 목록 중에서 선택되는 하나 이상의 제제일 수 있다:

[0122] - 코르티코스테로이드(예를 들면, 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드, 디플루프레드네이트 또

는 플루오시놀론 아세토니드);

[0123] - 글루코코르티코이드 작용제 (예를 들면, 마프라코라트(mapracorat));

[0124] - 면역억제제(예를 들면, 사이클로스포린, 비클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸 또는 타크롤리무스);

[0125] - 항-TNFα 항체(예를 들면, 인플릭시맙, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골, ESBA-105 또는 골리무맵);

[0126] - 항-IL-17A 항체(예를 들면, 세쿠키누맵);

[0127] - mTOR 저해제(예를 들면, 시롤리무스);

[0128] - VGX-1027;

[0129] - 아데노신 A3 수용체 작용제 (예를 들면, CF-101);

[0130] - 리피테그라스트;

[0131] - JAK3 저해제(예를 들면, 토파시티닙 또는 R348); 및

[0132] - 단백질 키나제 C 저해제(예를 들면, AEB-071).

[0133] 특정 구체예에서, 안 장애(예컨대 건성각결막염 또는 포도막염)의 치료를 위해, 예를 들어, 다른 치료제는 다음을 포함하는 목록 중에서 선택되는 하나 이상의 제제일 수 있다:

[0134] - 코르티코스테로이드(예를 들면, 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드, 디플루프레드네이트 또는 플루오시놀론 아세토니드);

[0135] - 면역억제제(예를 들면, 사이클로스포린, 비클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸 또는 타크롤리무스);

[0136] - 항-TNFα 항체(예를 들면, 인플릭시맙, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골, ESBA-105 또는 골리무맵);

[0137] - 항-IL-17A 항체(예를 들면, 세쿠키누맵);

[0138] - mTOR 저해제(예를 들면, 시롤리무스);

[0139] - VGX-1027;

[0140] - JAK3 저해제(예를 들면, 토파시티닙 또는 R348); 및

[0141] - 단백질 키나제 C 저해제(예를 들면, AEB-071).

[0142] 의학적 용도

[0143] 본 발명의 화합물은 염증성 질환에 대한 단일 치료(monotherapy), 또는 그러한 질환들의 조합 치료(combination therapies)에서 사용될 수 있다.

[0144] 따라서, 상기 (e) 내지 (g) 측면의 구체예는 치료에서 사용되는 유일하게 약학적으로 활성 성분인 화학식 I의 화합물(또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체)을 포함한다.

[0145] 그러나, 상기 (e) 내지 (g) 측면의 다른 구체예에서, 화학식 I의 화합물(또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 동위원소 유도체)는 하나 이상의 다른 치료제(예를 들어 조합 제품과 관련된 위에서 정의된 하나 이상의 치료제)가 투여된 환자에게 투여된다.

[0146] 본 명세서에서, "*염증성 질환*"은 구체적으로 다음의 하나 이상을 포함한다:

[0147] (i) 낭포성 섬유증, 폐고혈압, 폐 유육종증, 특발성 폐섬유증 또는, 특히 COPD(만성 기관지염 및 폐기종 포함), 천식 또는 소아 천식과 같은 염증 성분을 갖는 폐 질환 또는 장애;

[0148] (ii) 아토피성 피부염, 알러지성 피부염, 접촉성 피부염 또는 건성과 같은 염증 성분을 갖는 피부 질환 또는 장애;

[0149] (iii) 알러지성 비염, 비염 및 부비강염과 같은 염증 성분을 갖는 비강내 질환 또는 장애;

[0150] (iv) 결막염, 알러지성 결막염, 녹내장, 당뇨병성 망막증, 황반부종(당뇨병성 황반부종 포함), 망막 중심 정맥

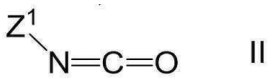
폐쇄(CRVO), 건성 및/또는 습성 연령관련황반변성(AMD), 수술후 백내장 염증, 또는 특히 건성각결막염(안구건조증), 포도막염(후방, 전방 및 범 포도막염 포함), 각막 이식편 및 윤부 세포 이식 거부와 같은 염증 성분을 갖는 안 질환 또는 장애;

[0151] (v) 글루텐 과민성 장질환(만성 소화 장애증), 호산구 식도염, 장 이식편대숙주 질환 또는, 특히, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 염증 성분을 갖는 위장 질환 또는 장애.

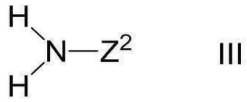
[0152] 본 명세서에서 염증 성분을 갖는 질환은, 다른 (비-염증성) 증상 또는 질병의 결과가 있던지 또는 없던지, 염증과 관련된 질환을 포함한다.

[0153] 본 발명의 다른 측면에 따르면 다음을 포함하는 화학식 I의 화합물의 제조 방법이 제공된다:

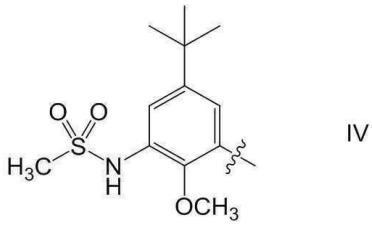
[0154] (a) 화학식 II의 화합물과

[0155] 

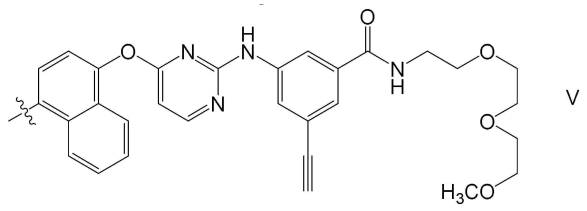
[0156] 화학식 III의 화합물과의 반응시키는 단계:

[0157] 

[0158] [상기 식에서 Z^1 및 Z^2 중 어느 하나는 화학식 IV의 구조 단편(structural fragment)이고,

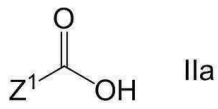
[0159] 

[0160] Z^1 및 Z^2 중 나머지는 화학식 V의 구조 단편이다]

[0161] 

[0162] 예를 들어 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건, 예를 들어 적합한 유기 용매(예를 들어 DMF, THF, 1,4-디옥산, 또는 이들의 혼합물과 같은 극성 비양자성 용매)의 존재 하에서 주변 온도(예를 들어 15 내지 30℃) 내지 약 110℃에서의 반응;

[0163] (b) 화학식 IIa의 화합물과 적합한 아지드 형성제(예를 들어, 디페닐 포스포라지데이트와 같은, 이탈기 및 활성화된 아지드 이온의 적합한 소스;예를 들어, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2151-2157 참고)를 반응시킨 후,

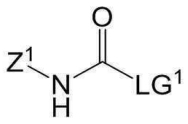
[0164] 

[0165] [상기 식에서 Z^1은 위에서 정의된 바와 같다]

[0166] 예를 들면 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서, 예를 들어 주위보다 낮은 온도(sub-ambient) 내지 주위 온도(예를 들어 약 -5 의 초기온도 내지 5℃의 반응 후 주위 온도)에서 아민 염기(예를 들어 트리에틸아민 또는 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민과 같은 입체장애 염기) 및 적합한 유기 용매(예를 들어, DMF, THF, 1,4-디옥산, 또는 이들의 혼합물과 같은 극성 비양자성 용매)의 존재하에서 수행되고, 상기 반응 이후에, 분리

없이, 예를 들어 (15 내지 30℃와 같은)주위 온도에서 (식 Z^1-C(O)-N_3의)중간체 아실 아지드의 열적 재배치(예를 들어 가열 하에서)가 수행되어 화학식 II의 화합물을, 인 시투(*in situ*)로 제공하고, 그 화합물은 위에서 정의된 화학식 III의 화합물과 반응하여 화학식 I의 화합물을 제공하는, 단계;

[0167] (c) 화학식 IIb의 화합물과 위에서 정의된 화학식 III의 화합물을 반응시키는 단계:

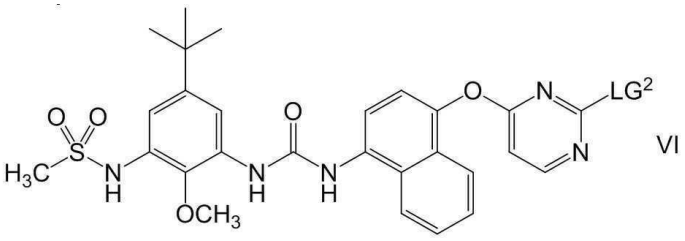


IIb

[0168]

[0169] 상기 식에서 LG^1은 적합한 이탈기(예를 들면, 이미다졸릴, 클로로 또는 페녹시와 같은 아릴옥시)를 나타내고, Z^1은 위에서 정의된 바와 같으며, 예를 들면 주위 온도(예를 들면 주위 온도 내지 80℃까지, 약 60℃에서)에서, 선택적으로 아민 염기(예를 들어 트리에틸아민 또는 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민과 같은 입체장애 염기) 및 적합한 유기 용매(예를 들면,디클로로메탄 또는 이소프로필 아세테이트와 같은 에스테르와 같은 비양자성 용매)의 존재 하에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행되는 반응;

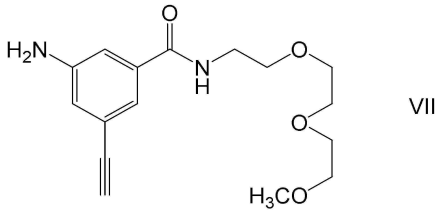
[0170] (d) 화학식 VI의 화합물과 화학식 VII의 화합물을 반응시키는 단계:



VI

[0171]

[0172] 상기 식에서 LG^2는 적합한 이탈기(예를 들면 클로로 또는 브로모와 같은 할로 그룹)를 나타내고,

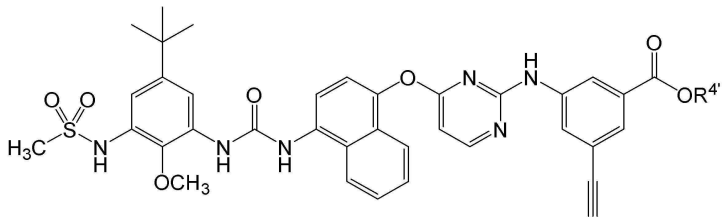


VII

[0173]

[0174] 예를 들면 상승된 온도(예를 들면 50 내지 110℃)에서 적합한 유기 용매(예를 들면, DMF, THF, 1,4-디옥산 또는 이들의 혼합물과 같은 극성 비양자성 용매)와, 선택적으로 산성 촉매(예를 들면, 파라-톨루엔설폰산과 같은 설폰산)의 존재 하에서 또는 팔라듐 촉매 및 BrettPhos와 같은 적절한 리간드와 관련된 Buchwald 커플링(Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27-50)을 통하는, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건(예를 들면 *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15686-15696에 기재된 것과 같은) 하에서 수행되는 반응; 또는

[0175] (e) 화학식 VIIa의 화합물과 화학식 VIIb의 화합물을 반응시키는 단계:



VIIa

[0176]

[0177] H_2N-[CH_2CH_2-O]$_2$-CH_2CH_2-OCH_3 VIIb

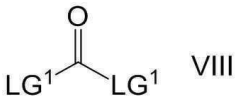
[0178] 상기 식에서 $R^{4'}$는 수소 또는 C_{1-3} 알킬 그룹(예를 들면, 메틸)이고,

[0179] (i) $R^{4'}$가 C_{1-3} 알킬 그룹을 나타낼 때 적합한 루이스 산성 촉매(예를 들면, 트리메틸알루미늄과 같은 트리알킬알

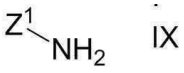
루미늄 시약) 및 비양자성 유기 용매(예를 들면 THF)의 존재 하에서 주위 온도에서의 반응, (ii) $R^{4'}$가 H를 나타낼 때, 3급 아민 염기(예를 들면, 트리에틸아민 또는 디이소프로필에틸아민과 같은 트리알킬아민 또는 N-메틸피롤리딘 또는 N-메틸모르폴린과 같은 사이클릭 아민), 아미드 (펩티드) 커플링 시약(예를 들면, T3P, HATU, CDI, BOP, PyBOP, HOAt, HOBt 또는 DCC 또는 디이소프로필카르보디이미드와 같은 카르보디이미드) 및 비양자성 유기 용매 (예를 들면, DCM과 같은 염소화 용매, 에틸 아세테이트와 같은 에스테르, DMF와 같은 디메틸아민의 아미드, 또는 이러한 용매의 혼합물)의 존재 하에서의 반응 또는 (iii) 화학식 VIIb의 화합물과의 반응에 앞서, 화학식 VIIa의 화합물에서 $OR^{4'}$가 할로(예를 들면, 클로로이고, 화합물은, 예를 들면 50 내지 70℃와 같은 상승된 온도에서, $R^{4'}$가 H를 나타내는 화학식 VIIa의 화합물이 티오닐 클로라이드와 같은 할로겐화 작용제와의 반응에 의해 제조될 수 있다)와 교체된 대응 화합물로의 전환이고, 이후 결과 산 할리이드와 화학식 VIIb의 화합물의 반응이 잇따르고, 상기 반응은, 예를 들면 비양자성 유기 용매(예를 들면 DCM과 같은 염소화 용매)의 존재하에서 수행되는, 전환.

[0180] 화학식 II의 화합물은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법, 예를 들면 위에서 정의된 화학식 IIa의 화합물과 아지드 형성제의 반응에 잇따른 중간체 아실 아지드(상기 (b)에서 기재됨; 예를 들면 *tetrahedron* **1974**, *30*, 2151-2157참고)의 재배열에 따라, 또는 유추에 의해 제조될 수 있다.

[0181] 화학식 IIb의 화합물은 화학식 VIII의 화합물과 화학식 IX의 화합물의 반응에 의해 제조될 수 있고,

[0182] 

[0183] 상기 식에서 LG^1은 위에서 정의된 바와 같고,

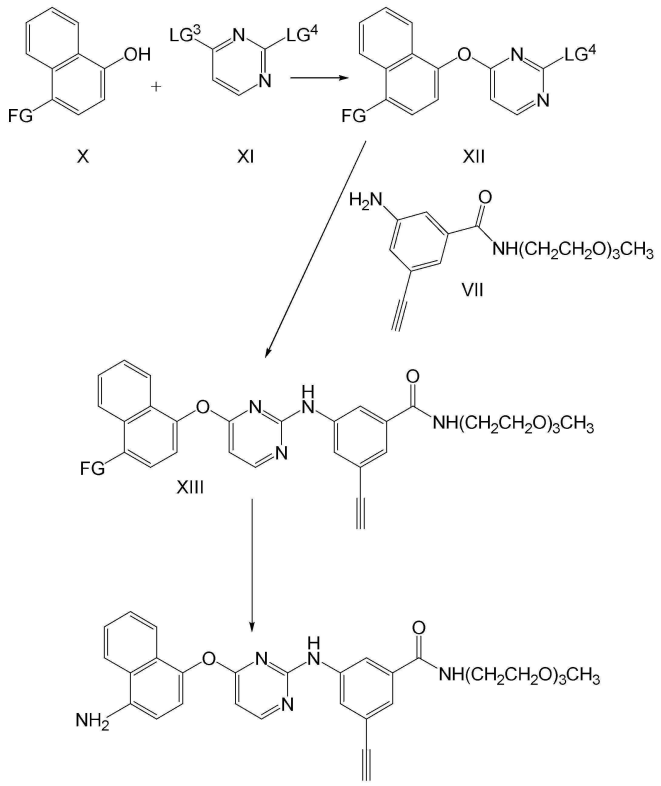
[0184] 

[0185] 상기 식에서 Z^1은 위에서 정의된 바와 같으며, 예를 들어 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0186] 화학식 IX의 아민은 상기 (b)에서 기재된 경로를 통해 화학식 IIa의 카복시산으로부터 제조되고, 중간체 이소시아네이트 II는 물로 가수분해되어 이산화탄소를 잃고 IX를 제공하는 카르밤산을 제공한다. 같은 이유로, 중간체 이소시아네이트 II는 *t*-부탄올과 같은 알콜과 반응하여 IX의 보호된 버전(protected version)을 생성한다.

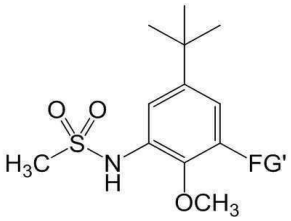
[0187] Z^2가 화학식 V의 구조 단편을 나타내는 화학식 III의 화합물, 또는 Z^1이 화학식 V의 구조 단편을 나타내는 화학식 IX의 화합물은 반응식 I(예를 들면: WO 2003/072569; 및 WO 2008/046216 참고)에서 보여주는 경로를 통해 합성될 수 있으며, LG^3 및 LG^4는 이탈기, 예를 들어 할로겐 또는 메탄설포닐을 나타내고, FG는 실제 또는 잠복 NH_2그룹, 즉 니트로 또는 보호된 변종 NH-PG^2와 같이 쉽게 NH_2 그룹으로 전환되는 그룹을 나타내며, 여기서 PG^2는 전형적인 보호기(예를 들면: Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley, 4th revised edition, 2006; ISBN-10: 0471697540 참고)이며, 예를 들면 카바메이트 에스테르 또는 카복스아미드이다. X가 염기로 처리되어 에테르 XII을 생성할 때 형성된 아록사이드(aroxide)에 의한 XI 내의 LG^3의 염기-매개된 S_NAr 이동(displacement)로 시퀀스가 시작한다. 에테르 XII의 잔여 할로겐 또는 메탄설포닐 치환기(LG^4)는 i) 제2 S_NAr 반응 내의 화학식 VII의 아민에 의해 또는 (ii) 원하는 화합물(FG가 NH_2일 때)을 제공하는 화학식 VII의 아민 또는 XIII(FG가 니트로 또는 NH-PG^2 일 때)의 Buchwald 커플링을 통해 대체된다. FG가 XIII 내에서 니트로일 때, NH_2 그룹은 환원반응에 의해 드러나고, 전형적으로 적합한 촉매, 예를 들면 탄소 담지 팔라듐(palladium on carbon)을 이용하거나 또는 빙초산 내의 철과 같은 금속 용해 조건을 이용한 수소첨가를 통해 수행된다. 다르게는 FG가 보호기일 때, NH_2 그룹은 탈보호 반응에 의해 드러난다. 시퀀스의 최종 단계에서 발생하는 것과 같이 묘사되더라도, FG로 나타나는 잠복 NH_2 그룹의 언마스킹(unmasking)은 반응식 1에서 보여지는 합성 루트의 어떠한 단계에서도 발생할 수 있다.

[0188] 반응식 1



[0189]

[0190] 유사한 방법으로, Z^1이 화학식 IV의 구조 단편을 나타내는 화학식 IX의 아민은 화학식 XIIIa의 화합물 내에서 잠복 NH_2 그룹의 실제로의 전환에 의해 합성될 수 있고,

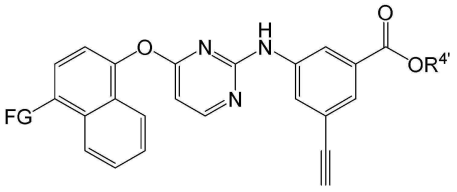


XIIIa

[0191]

[0192] 상기 식에서 FG'는 상기 FG에서 정의된 것과 같고, 그것이 NH_2를 나타내지 않는 것은 제외한다.

[0193] Z^2가 화학식 V의 구조 단편을 나타내는 화학식 III의 화합물, 또는 Z^1이 화학식 V의 구조 단편을 나타내는 화학식 IX의 화합물은, 본 명세서에 기재된 화학식 I의 화합물의 제조 방법(상기 (e) 참조) 및 화학식 III의 다른 화합물(예를 들어, 반응식 1 참조)의 제조 방법, 예를 들어 화학식 XIIIb의 화합물과 위에서 정의된 화학식 VIIb의 화합물의 반응의 유추에 의해 제조될 수 있고

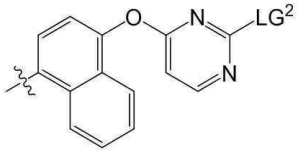


XIIIb

[0194]

[0195] 상기 식에서 FG 및 $R^{4'}$은 위에서 정의된 바와 같고, 본 기술분야의 통상의 기술자에 알려진 조건(예를 들면, 상기 공정 (e) 측면에서 기재된 펩티드 커플링 조건)으로 수행되며, 뒤이어 (만약 필요하다면) 예를 들어 반응식 1과 관계되어 기재된 바와 같은 FG에서 NH_2로의 전환이 일어날 수 있다.

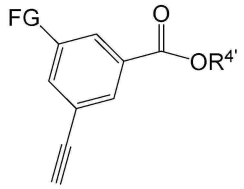
[0196] 화학식 VI의 화합물은 화학식 I의 화합물(예를 들면 상기 (a) 내지 (c)의 대체 공정)로 유추에 의해 합성될 수 있다. 예를 들면, 화학식 VI의 화합물은 화학식 IIx의 화합물과 화학식 IIIx의 화합물의 반응에 의해 제조될 수 있고, 화학식 IIx 및 IIIx의 화합물은 화학식 II 및 III의 화합물로서 같은 정의를 취하며, Z^1 및 Z^2 중 하나는 위에서 정의된 화학식 IV의 구조 단편을 나타내고, Z^1 및 Z^2 중 나머지는 화학식 Va의 구조 단편을 나타내며,



Va

[0197]

[0198] 화학식 VII의 화합물은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 방법에 따라 또는 유추에 의해 제조될 수 있고, 예를 들어 화학식 XIV의 화합물과 위에서 정의된 화학식 VIIb의 화합물의 반응에 의할 수 있으며,



XIV

[0199]

[0200] 상기 식에서 FG는 위에서 정의된 바와 같고, 본 기술분야의 통상의 기술작에게 알려진 조건(예를 들면, 상기 (e) 공정의 측면에서 기재된 펩티드 커플링 조건)하에서 수행될 수 있고, 뒤이어

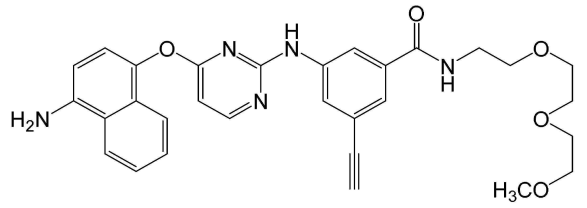
[0201] FG가 NH-PG^2를 나타낼 때, PG^2 보호기의 제거가, 또는

[0202] FG가 NO_2를 나타낼 때, NO_2의 NH_2 로의 환원이 일어난다.

[0203] 화학식 II, IIx 및 IIb에 의해 표현되는 화합물은 일반적으로 반응성 중간체라는 것은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 이해될 것이다. 이러한 중간체들은 인 시투로 형성될 수 있고, 분리 없이, 직접적으로 화학식 III의 화합물과 반응하여 화학식 I의 화합물을 제공할 수 있다. 또한, 예를 들어 히드록시 그룹 또는 아미노 작용기와 같은 화학적-민감성 작용기를 갖는 Z^1 및 Z^2에 어떠한 것에 대해 기재된 공정 중에 적절한 보호기의 사용이 요구된다는 것은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 이해될 것이다.

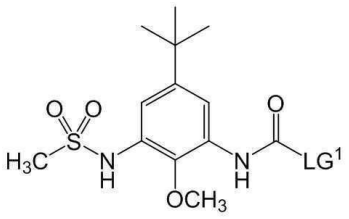
[0204] 반응식에서 묘사된 많은 화합물은 상업적으로 구입할 수 있거나 또는 언급된 절차를 이용하여 얻어질 수 있거나, 또는 본 기술분야의 통상의 기술자에 의한 통상적인 방법에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 예를 들면, Regan, J. et al.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4676-4686, WO 2000/043384, WO 2007/053346, WO 2007/087448, WO 2007/089512, WO 2009/117080 및 WO 2014/027209를 참고하라.

[0205] 본 발명의 특정 구체예는 화학식 I의 화합물의 제조 방법에 대한 것으로, 화학식 XV의 화합물과 화학식 XVI의 화합물의 반응을 포함하고,



XV

[0206]



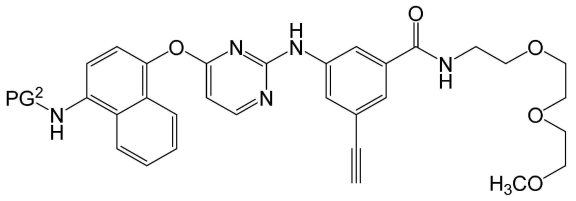
XVI

[0207]

[0208] 상기 식에서 LG^1은 위에서 정의된 바와 같고(예를 들면 페녹시), 예를 들면 상승된 온도(예를 들면 40 내지 80

℃, 약 60℃)에서 아민 염기(예를 들면 트리에틸아민) 및 비양자성 유기 용매(예를 들면 이소프로필 아세테이트와 같은 에스테르)의 존재 하에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0209] 화학식 XV의 화합물은 화학식 XVa의 대응 화합물의 탈보호에 의해 제조될 수 있고,



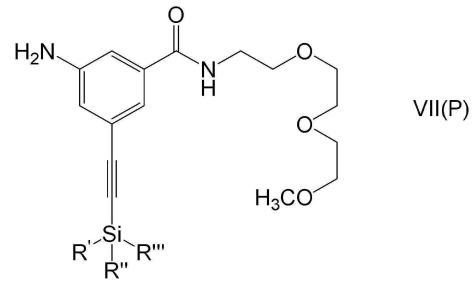
XVa

[0210]

[0211] 상기 식에서 PG^2는 위에서 정의된 바와 같고(예를 들면 PG^2는 *tert*-부톡시카보닐), 예를 들면 PG^2가 *tert*-부톡시카보닐을 나타낼 때 비양자성 유기 용매(예를 들면 DCM과 같은 염소화 용매)의 존재 하에서 강산(예를 들면, 알킬 또는 아릴설폰산(예를 들면, *p*-톨루엔설폰산 및/또는, 특히, 트리플루오로아세트산))과의 반응과 같은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0212] 화학식 XVa의 화합물은, 위에서 정의된 화학식 VII의 화합물과, 위에서 정의되었으나 FG가 $NH\text{-}PG^2$ (예를 들면, $NH\text{-}C(O)O\text{-}C(CH_3)_3$)인 화학식 XII의 화합물(예를 들면, LG^4가 클로로를 나타낼 때의 화학식 XII의 화합물)의 반응에 의해 제조될 수 있고, 예를 들면 상승된 온도(예를 들면 40 내지 80℃, 예컨대 60 및 70℃ 사이)에서 비양자성 용매(예를 들면, THF)와, 선택적으로 산성 촉매(예를 들면, *para*-톨루엔설폰산과 같은 설폰산)의 존재하에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0213] 화학식 VII의 화합물은 위에서 기재된 것과 같은 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 화학식 VII의 화합물은 화학식 VII(P)의 화합물의 탈보호에 의해 제조될 수 있고,

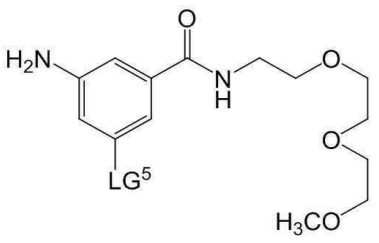


VII(P)

[0214]

[0215] 상기 식에서 R', R'' 및 R'''은 독립적으로 $C_{1\text{-}4}$ 알킬(예를 들면, R', R'' 및 R''' 은 모두 이소프로필을 나타냄)을 나타내고, 예를 들면 BAF 또는 세슘 플루오라이드와 같은 플루오라이드 이온 소스와 함께 극성, 비양자성 용매(예를 들면, 아세토니트릴) 내에서 주위 온도에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

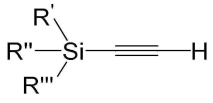
[0216] 화학식 VII(P)의 화합물은 화학식 XVII의 화합물과 화학식 XVIII의 화합물의 커플링(예를 들면, Sonogashira 커플링; see *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5084-5121)에 의해 제조될 수 있고,



XVII

[0217]

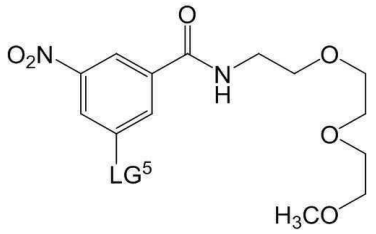
[0218] 상기 식에서 LG^5 는 브로모와 같은 할로를 나타내고,

[0219] 

XVIII

[0220] 상기 식에서 R', R'' 및 R'''은 위에서 정의된 바와 같고, 예를 들면 CuI 및 Pd(0) 촉매(예를 들면, $Pd(PPh_3)_4$) 및 THF와 같은 반응-비활성 유기용매의 존재 하에 상승된 온도(예를 들면 50 내지 80℃, 특히 60 내지 70℃)에서의 반응과 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

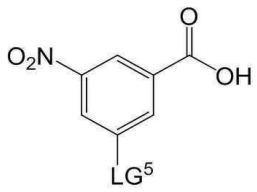
[0221] 화학식 XVII의 화합물은 화학식 XIX의 화합물의 환원에 의해 제조될 수 있고,

[0222] 

XIX

[0223] 상기 식에서 LG^5은 위에서 정의된 바와 같고, 예를 들면, 적합한 촉매(예를 들면, Pt/C), 반응-비활성 용매(예를 들면, THF) 및 산(예를 들면, 아세트산) 또는 대체적으로 물 및 에탄올 내의 산성 매개(acidic media)(예를 들면, 염산) 내의 철의 존재 하에서 수소 분위기(예를 들면, 약 3 MPa의 압력의 H_2 하에서) 하의 상승된 온도(예를 들면, 약 50 내지 70℃)에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

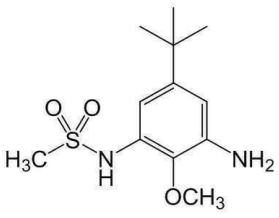
[0224] 화학식 XIX의 화합물은 화학식 XX의 화합물과 할로겐화 작용제(예를 들면, 티오닐 클로라이드, 예를 들면 60 내지 70℃)의 반응에 의해 제조될 수 있고,

[0225] 

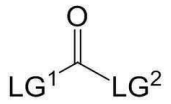
XX

[0226] 상기 식에서 LG^5 는 위에서 정의된 바와 같고, 뒤이어 중간체 산 할라이드와 위에서 정의된 화학식 VIIb의 화합물과의 반응이 일어나며, 예를 들면, 비양자성 유기 용매(예를 들면, DCM) 및 염기, 예를 들면 트리에틸아민, DIPEA 또는 $NaHCO_3$의 존재 하에서 25℃ 이하에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다. 다르게는 이러한 전환은, 3급 아민 염기(예를 들면, 트리에틸아민 또는 DIPEA과 같은 트리알킬아민, 또는 N-메틸피롤리딘 또는 N-메틸모르폴린과 같은 사이클릭 아민), 아미드 (펩티드) 커플링 시약 (예를 들면, T3P, HATU, CDI, BOP, PyBOP, HOAt, HOBt 또는 DCC 또는 디이소프로필카르보디이미드와 같은 카르보디이미드) 및 비양자성 유기 용매 (예를 들면, DCM과 같은 염소화 용매, 에틸 아세테이트와 같은 에스테르, DMF 또는 그러한 용매의 혼합물과 같은 디메틸아민의 아미드)의 존재 하에서의 응축에 의해 영향받을 수 있다.

[0227] 화학식 XVI의 화합물은 화학식 XXI의 화합물(US2003/0065034)과 화학식 XXII의 화합물의 반응에 의해 제조될 수 있고,

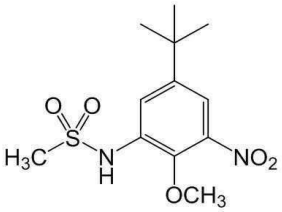
[0228] 

XXI

[0229]  XXII

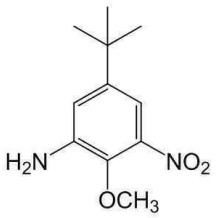
[0230] 상기 식에서 LG^1 및 LG^2 는 이탈기(예를 들면, LG^1은 페녹시를 나타내고, LG^2는 클로로와 같은 할로를 나타냄)를 나타내고, 예를 들면 염기(예를 들면, $NaHCO_3$) 및 반응-비활성 유기 용매(예를 들면, THF, DCM 또는, 특히, 이들의 혼합물)의 존재 하에서 약 20℃ 미만과 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0231] 화학식 XXI의 화합물은 화학식 XXIII의 화합물의 환원에 의해 제조될 수 있고,

[0232]  XXIII

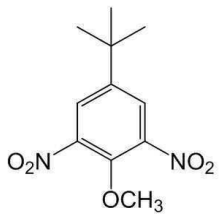
[0233] 예를 들면, 적합한 촉매(예를 들면, Pd/C) 및 용매(예를 들면, 메탄올)의 존재 하에서 수소 분위기(예를 들면, 약 0.3 내지 0.4 MPa의 압력의 H_2 하에서) 하에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0234] 화학식 XXI의 화합물은 화학식 XXIV의 화합물의 메탄설포닐 클로라이드를 이용한 환원에 의해 제조될 수 있고,

[0235]  XXIV

[0236] 예를 들면, 염기(예를 들면, 피리딘) 및 반응-비활성 유기 용매(예를 들면, 톨루엔)의 존재 하에서 25 및 40℃ 사이에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0237] 화학식 XXIV의 화합물은 화학식 XXV의 화합물의 부분적 환원에 의해 제조될 수 있고,

[0238]  XXV

[0239] 예를 들면, 수소 소스(예를 들면, 4-메틸-1-사이클로헥센), 적합한 촉매(예를 들면, Pd/C) 및 용매(예를 들면, 메탄올, 에탄올 또는 공업적 변성 알콜과 같은 이들의 혼합물과 같은 알콜)의 존재 하에서 상승된 온도(예를 들면, 70 내지 80℃)에서와 같은, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 조건 하에서 수행된다.

[0240] 특정 구체예에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물의 제조방법에 관한 것이고, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0241] (a) 본 명세서에 기재된 화학식 XV의 화합물의 제조방법; 및/또는

[0242] (b) 본 명세서에 기재된 화학식 XVI의 화합물의 제조방법.

[0243] 본 발명의 이러한 구체예들과 관련하여, 화학식 I의 화합물의 제조방법은 본 명세서에 기재된 화학식 XVa, VII(P), VII, XVII, XIX, XXI, XXIII 및 XXIV의 화합물들의 하나 이상을 제조하는 방법을 포함할 수 있다.

[0244] 본 명세서에 기재된 신규 중간체는 본 발명의 일 측면을 형성한다. 이러한 측면에서, 본 발명의 또다른 측면은

위에서 정의된 호학식 XVI의 화합물(예를 들면, LG^1이 페녹시를 나타낼 때의 화학식 XVI의 화합물)에 관한 것이다.

[0245] 본 명세서에 기재된 본 발명의 측면(예를 들면, 위에서 언급된 화합물, 조합, 방법 및 용도)은, 그러한 상태 또는 그 외의 것에 대한 치료용의 선행 기술에서 알려진 유사한 화합물, 조합, 방법(치료) 또는 용도에 비해, 의사 및/또는 환자에게 보다 편리하고, 보다 효과적이며, 독성이 덜하고, 선택성이 보다 우수하고, 보다 넓은 활성을 가지며, 보다 잠재성이 있고, 부작용이 덜 발생하고, 보다 나은 약동학(pharmacokinetic) 및/또는 약물학적(pharmacodynamic) 프로파일을 가지며, 보다 적합한 고체 상태 모폴로지(morphology)를 가지고, 보다 나은 장기간 안정성을 가지며, 다른 유용한 약학적 성질을 가진다는 점에서 유리할 수 있다.

[0246] 본 발명의 화합물은 추가적으로(또는 대체적으로):

[0247] - (예를 들면, **BIRB796**과 같은, 이전에 개시된 p38 MAP 키나제 저해제와 비교하여)장기간의 작용 및/또는 작용의 지속성을 나타내고;

[0248] - GSK3a를 강하게 저해하지는 않고;

[0249] - lowered KinomeScan Selectivity Scores에 묘사된 바와 같이, 예를 들면 개선된 선택성을 가지면서, 작은 비율의 키노메(kinome)를 목적으로 하고;

[0250] - 복용량 사이(예를 들면, **BIRB796**과 같은, 이전에 개시된 p38 MAP 키나제 저해제에 대한 높은 로컬 농도)에서의 상대적으로 높은 로컬 약물 농도를 유지하고;

[0251] - 특히 국소/로컬 투여(예를 들면, 다음의 국소/로컬 투여에서, 화학식 (I)의 화합물의 높은 표적 조직 농도와 낮은 혈장 농도의 생성 및/또는 혈장 유래의 화학식 (I)의 화합물의 신속한 제거, 예를 들면 높은 신장 또는 간 추출의 결과로서)에 적합한 성질을 나타내고;

[0252] - β-카테닌 유도 및/또는 세포 내의 유사분열의 저해가 거의 없거나 완전히 없음을 나타내고;

[0253] - 인간 림프구 생체외 소핵 테스트에서 소핵을 함유하는 이핵세포 내에서 증가가 발생하지 않고;

[0254] - 사이토크롬 P450 상과(superfamily)의 구성요소의 시간의존적 저해가 거의 없거나 완전히 없는 것을 나타내고;

[0255] - 예를 들면, **BIRB796**과 같은, 이전에 개시된 p38 MAP 키나제 저해제와 비교하여 물 내에서 향상된 화학적 안정성(예를 들면, 상승된 온도에서 수용성 혼합물 내에서 가수분해하는 안정성)을 나타내고;

[0256] - 환자에게 투여하여, 안전(예를 들면)과 관련된 대사 물질이 거의 발생하지 않거나 완전히 발생하지 않으며;

[0257] - 우수한 용해도 및/또는 세포 투과도를 나타내고;

[0258] - 높은 결정화도를 가지며; 및/또는

[0259] - 고체 상태에서 흡습성이 거의 없거나 완전히 없다.

[0260] **실험 방법**

[0261] **일반적인 절차**

[0262] 모든 시작 물질 및 용매를 상업적 소스를 상업적 소스로부터 얻거나, 인용된 문헌에 따른 방법으로 제조하여 얻었다. 다르게 언급되지 않는 한, 모든 반응을 교반하였다. 유기 용액을 무수 마그네슘 설페이트 상에서 일정하게 건조시켰다. 마이크로파 반응을 CEM Discover 및 Smithcreator 마이크로파 반응기에서 수행하고, 다양한 전력의 마이크로파 조사를 이용하여 일정한 온도로 가열하였다.

[0263] 정상 컬럼 크로마토그래피를 프리팩 실리카(230-400 메쉬, 40-63 ㎛) 카트리지를 이용하는 CombiFlash Companion 또는 CombiFlash RF 시스템과 같은 자동화된 플래쉬 크로마토그래피 시스템 상에서 일상적으로 수행하였다. SCX는 Supelco 에서 구입하였고 사용에 앞서 1M 염산으로 처리하였다. 다르게 언급되지 않는한, 정제되는 반응 혼합물은 먼저 MeOH로 희석되고 AcOH 몇 방울로 산성화된다. 이 용액을 SCX에 직접 로드하고 MeOH로 세척하였다. MeOH 내의 1% NH_3로 세척하여 원하는 물질을 녹여서 분리하였다

[0264] **분석 방법**

[0265] 0.1% 포름산 수용액 내의 MeCN 내의 0.1% 포름산의 그라디언트로 용출한 2.5 ㎛, 4.6x30 컬럼의 Waters Xselect CSH C18 또는 10 mM 암모늄 바이카보네이트 수용액 내의 MeCN의 그라디언트로 용출한 2.5 ㎛, 4.6x30 컬럼의 Waters Xbridge BEH C18을 이용하여 분석 HPLC를 수행하였다. 용출된 피크의 UV 스펙트럼을 다이오드 분석을 이용하거나, Agilent 1100 시스템 상의 다양한 파장 탐지기를 이용하여 측정하였다.

[0266] 0.1% 포름산 수용액 내의 MeCN 내의 0.1% 포름산의 그라디언트로 용출한 2.5 ㎛, 4.6x30 컬럼의 Waters Xselect CSH C18 또는 10 mM 암모늄 바이카보네이트 수용액 내의 MeCN의 그라디언트로 용출한 2.5 ㎛, 4.6x30 컬럼의 Waters Xbridge BEH C18을 이용하여 분석 LCMS를 수행하였다. 양이온 및 음이온 전기분무(electrospray)와 함께 6120 단일 사중극자 질량 스펙트로미터를 구비한 Agilent Infinity 1260 LCMS 또는 Agilent 1200 중 어느 하나에서 다양한 파장 탐지기를 이용하여 용출된 피크의 UV 및 질량 스펙트럼을 측정하였다.

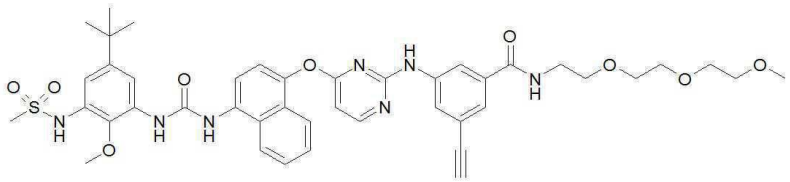
[0267] 0.1% 포름산 수용액 내의 MeCN 내의 0.1% 포름산의 그라디언트 또는 10 mM 암모늄 바이카보네이트 수용액 내의 MeCN의 그라디언트로 용출한 5 ㎛, 19x50 컬럼의 Waters Xselect CSH C18 또는 10 mM 암모늄 바이카보네이트 수용액 내의 MeCN의 그라디언트로 용출한 5 ㎛, 19x50 컬럼의 Waters Xbridge BEH C18을 이용하여 예비 HPCL(Preparative HPLC)를 수행하였다. 음이온 및 양이온 전기분무와 Waters FractionLynx LCMS의 듀얼 파장 탐자기를 구비한 ZQ 단일 사중극자 질량 스펙트로미터로 측정한 단일 파장에서의 질량 및 UV에 의한 또는 Gilson 215 예비 HPLC 또는 Varian PrepStar 예비 HPLC의 다양한 파장 탐지기에 의해 측정된 단일 파장에서의 UV에 의한 탐지에 의해 일부를 수집하였다.

[0268] *^1H NMR 스펙트로스코피*: 400 MHz에서 Bruker Avance III 스펙트로미터 상에서 ^1H NMR 스펙트럼 데이터를 얻었다. 클로로포름-*d*, 디메틸설폭사이드-d_6 또는 테트라메틸실란의 내부표준의 중앙 피크 중 어느 하나를 레퍼런스로 사용하였다.

[0269] **실시예**

[0270] 실시예 1

[0271] 3-((4-((4-(3-(5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)우레이도)나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드 (화합물 I)

[0272] 

[0273] (i) 3-브로모-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)-5-니트로벤즈아미드

[0274] EtOAc(25 mL, 42.0 mmol) 내의 T3P, 50 wt%를 3-브로모-5-니트로벤조산 (7.05 g, 28.7 mmol), 2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에탄아민 (4 g, 24.25 mmol) 및 EtOAc (50 mL) 내의 Et_3N (12 mL, 86 mmol) 용액에 천천히 첨가하고, 아이스배스에 침지하였다. 첨가를 완료한 후, 아이스 배스를 제거하고 2시간 동안 상온에서 교반하면서 반응을 하였다. 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액(100 mL) 및 EtOAc (100 mL) 사이에서 분할하였다. 유기층을 K_2CO_3 수용액(100 mL 내에 100g) 및 브라인(100 mL)으로 세척한 후, 건조하고($MgSO_4$), 진공에서 여과 및 농축하여 갈색 오일로서의 제목의 화합물(8.23 g)을 얻었다.

[0275] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.02 (t, 1H), 8.65-8.64 (m, 1H), 8.53 (t, 1H), 8.46 (t, 1H), 3.57-3.43 (m, 10H), 3.41-3.38 (m, 2H), 3.21 (s, 3H).

[0276] LCMS m/z 391/393 $(M+H)^+$ (ES^+); 389/391 $(M-H)^-$ (ES^-)

[0277] (ii) 3-아미노-5-브로모-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0278] 상기 단계 (i)의 생성물(8.24 g, 20.43 mmol) 및 EtOH (65 mL) 내의 농축된 HCl (2 mL, 23.40 mmol) 및 물(15 mL)의 용액에 철 분말(5.90 g, 106 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 1시간 동안 75℃(블록 온도)에서 가열하였다. 그 후, 반응을 상온까지 냉각하고, 물(30 mL)로 희석한 후, 진공에서 여과 및 농축하였다. 잔여물을 염기성화

($NaHCO_3$)하고, 그 후 EtOAc(350 mL) 및 물(275 mL) 사이에서 분할하였다. 유기층을 건조시키고($MgSO_4$), 진공에서 여과 및 농축시켜 실리카 겔(220 g 컬럼, DCM 내의 0-5% MeOH) 상에서의 크로마토그래피에 의해 정제된 오렌지색 오일을 얻어, 오렌지색 오일로서 제목의 화합물(5.25 g)을 얻었다.

[0279] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 8.36 (t, 1H), 7.07 (t, 1H), 7.00-6.99 (m, 1H), 6.84 (t, 1H), 5.57 (s, 2H), 3.52-3.48 (m, 8H), 3.42-3.39 (m, 2H), 3.35 (q, 2H), 3.22 (s, 3H).

[0280] LCMS m/z 361/363 $(M+H)^+$ (ES^+)

[0281] (iii) 3-아미노-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)-5-((트리이소프로필실릴)에티닐)벤즈아미드

[0282] 상기 단계 (ii)의 생성물(5.06 g, 13.31 mmol)로부터 가스를 제거하기 위해, 에티닐트리이소프로필실란 (4.5 mL, 20.06 mmol), Cu(I)I (130 mg, 0.683 mmol) 및 DMF (45 mL) 내의 Et_3N (8 mL, 57.4 mmol)을 $Pd(PPh_3)_4$ (770 mg, 0.666 mmol)에 첨가하였다. 반응을 3시간 동안 85℃로 가열하고, 상온까지 냉각시킨 후 EtOAc(250 mL) 및 브라인(250 mL) 사이에서 분할하였다. EtOAc (250 mL)로 수상(aqueous phase)을 더욱 추출하고, 결합된 유기 추출물을 물(3 x 200 mL) 및 브라인(200 mL)으로 세척한 후, 건조시키고($MgSO_4$) 진공에서 여과 및 농축하여 짙은 갈색 오일을 얻었다. 조생성물(crude product)을 실리카 겔 (220 g 컬럼, DCM 내의 0-3% MeOH) 상의 크로마토그래피에 의해 정제하여 오렌지색 오일로서 제목의 화합물(5.4 g)을 얻었다.

[0283] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 8.39 (t, 1H), 7.06-7.03 (m, 2H), 6.79-6.78 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 3.54-3.49 (m, 8H), 3.41-3.33 (m, 4H), 3.21 (s, 3H), 1.10 (s, 21H).

[0284] LCMS m/z 463 $(M+H)^+$ (ES^+)

[0285] (iv) 3-아미노-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0286] EtOAc(75 mL) 내의 상기 단계 (iii)의 생성물(5.33 g, 11.40 mmol)의 용액을 교반하기 위해 THF (11.40 mL, 11.40 mmol) 내의 1M TBAF을 첨가하였다. 반응을 1시간 동안 상온에서 교반하고, 물(300 mL) 및 EtOAc(400 mL) 사이에서 분할하고, EtOAc(300 mL)로 수상을 더욱 추출하였다. 결합된 유기 추출물을 브라인(400 mL)으로 세척하고, 건조시킨 후($MgSO_4$), 여과 및 농축하여 오렌지색 오일을 얻었다. 조생성물을 최소량의 MeOH에 용해시키고 SCX에 로드하였다. 컬럼을 MeOH(3 컬럼 부피)로 용출하고, MeOH(3 컬럼 부피) 내의 1% NH_3로 용출하였다. 부분을 함유하는 생성물을 진공에서 농축하여 갈색 오일로서 제목의 화합물(3.27 g)을 얻었다.

[0287] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 8.38 (t, 1H), 7.06-7.04 (m, 2H), 6.75-6.74 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.09 (s, 1H), 3.53-3.48 (m, 8H), 3.41-3.39 (m, 2H), 3.37-3.33 (m, 2H), 3.21 (s, 3H).

[0288] LCMS m/z 307 $(M+H)^+$ (ES^+)

[0289] (v) tert-부틸 (4-((2-((3-에티닐-5-((2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)카바모일)페닐)-아미노)피리미딘-4-일)옥시)나프탈렌-1-일)카바메이트

[0290] 상기 단계(iv)의 생성물 및 DMF(60 mL) 내의 tert-부틸(4-((2-클로로피리미딘-4-일)옥시)나프탈렌-1-일)카바메이트(예를 들면, Ito, K. *et al.*, **WO 2010/067130**, 17 Jun 2010; 777 mg, 2.090 mmol 참조)의 용액을 교반하기 위해 pTSA 모노하이드레이트(200 mg, 1.051 mmol)를 첨가하였다. 결과 용액을 72시간 동안 60℃에서 교반하였다. 반응을 상온까지 냉각시키고, EtOAc (150 mL) 및 퍼화 $NaHCO_3$ 수용액(100 mL) 사이에서 분할하였다. EtOAc (2 x 150 mL)로 수용액 층을 더욱 추출하고, 그 후 결합된 유기 추출물을 water(3 x 200 mL) 및 브라인(200 mL)으로 세척하고, 건조시킨 후($MgSO_4$), 여과 및 농축하여 오렌지색 오일(1.17 g)을 얻었다. 실리카 겔(80 g 컬럼, EtOAc 내의 0-5% MeOH) 상에서의 크로마토그래피에 의해 조생성물을 정제하여 밝은 갈색 폼으로서의 제목의 화합물(552 mg)을 얻었다.

[0291] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 9.73 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.11-8.09 (m, 2H), 7.92-7.88 (br m, 1H), 7.83-7.80 (m, 1H), 7.62-7.53 (m, 3H), 7.56-7.55 (m, 1H), 7.42 (d, 1H), 6.57 (d, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.54-3.48 (m, 8H), 3.40-3.35 (m, 4H), 3.20 (s, 3H), 1.52 (s, 9H).

[0292] LCMS m/z 642 $(M+H)^+$ (ES^+)

[0293] (vi) 3-((4-((4-아미노나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시-에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0294] DCM (8 mL) 내의 상기 단계 (v)의 생성물(540 mg, 0.825 mmol)의 용액을 교반하기 위해 TFA (3.2 mL, 41.5 mmol)를 첨가하였다. 반응을 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 용액을 진공에서 농축하고, 최소의 MeOH 내에 용해된 결과 오일을 SCX에 로드하였다. 컬럼을 MeOH(3 컬럼 부피)로 용출하고, 그 후 MeOH(3 컬럼 부피) 내의 1% NH_3 로 용출하였다. 생성물 함유 부분을 진공에서 농축하여 밝은 갈색 폼으로서의 제목의 화합물(405 mg)을 얻었다.

[0295] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 9.73 (s, 1H), 8.45 (t, 1H), 8.36 (d, 1H), 8.14-8.10 (m, 1H), 8.07-8.05 (br m, 1H), 7.94-7.92 (br m, 1H), 7.65-7.61 (m, 1H), 7.47-7.40 (m, 3H), 7.15 (d, 1H), 6.72 (d, 1H), 6.37 (d, 1H), 5.87 (br s, 2H), 4.17 (s, 1H), 3.54-3.48 (m, 8H), 3.40-3.36 (m, 4H), 3.20 (s, 3H).

[0296] LCMS m/z 542 $(M+H)^+$ (ES^+)

[0297] (vii) 페닐 (5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)카바메이트

[0298] N-(3-아미노-5-(tert-부틸)-2-메톡시페닐)메탄설폰아미드(예를 들면, Cirillo, P. F. *et al.*, WO 2002/083628, 24 October 2002; 1 g, 3.67 mmol 참조) 및 THF(10 mL) 내의 $NaHCO_3$(620 mg, 7.38 mmol) 및 DCM(10 mL)의 교반된 용액에 페닐 클로로포르메이트(0.5 mL, 3.99 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 2시간 동안 교반하고, 물(20 mL)을 첨가하였다. 유기층을 분리하고, 건조시킨 후($MgSO_4$), 여과 및 증발시켜서 갈색 폼을 얻었으며, 이는 사이클로헥산(20 mL)에서 교반되어 무색 고체로서의 제목의 화합물(1.4 g)을 얻었다.

[0299] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.50-7.37 (m, 2H), 7.31-7.13 (m, 4H), 3.77 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 1.25 (s, 9H)

[0300] LCMS m/z 393 $(M+H)^+$ (ES^+); 391 $(M-H)^-$ (ES^-)

[0301] (viii) 3-((4-((4-(3-(5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)우레이도)-나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0302] 페닐 (5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)-카바메이트(상기 단계 (vii) 참조; 95 mg, 0.239 mmol), 상기 단계 (vi)의 생성물(120 mg, 0.217 mmol) 및 i-PrOAc (3 mL) 내의 Et_3N(6 L, 0.043 mmol)의 교반된 혼합물을 밤새 70℃로 가열하였다. 반응을 상온으로 냉각시키고 진공에서 농축시켰다. 잔여물을 실리카 겔(40 g 컬럼, EtOAc 내의 0-5% MeOH) 상에서의 크로마토그래피에 의해 정제하여 오일을 얻었고, 디에틸 에테르와 함께 분말로 만들어 밝은 베이지색 고체를 얻었다. 예비 HPLC(Varian, Basic (10 mM 암모늄 바이카보네이트), Waters X-Bridge Prep-C18, 5 ㎛, 19x50 mm 컬럼, 물 내의 35-70% MeCN) 에 의해 조생성물을 정제하여 황백색(off-white) 고체로서 제목의 화합물(69 mg)을 얻었다.

[0303] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ: 9.74 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.46-8.43 (m, 2H), 8.26 (d, 1H), 8.17 (d, 1H), 8.09-8.07 (m, 2H), 7.87-7.83 (m, 2H), 7.69-7.65 (m, 1H), 7.61-7.57 (m, 1H), 7.45-7.43 (m, 2H), 7.02 (d, 1H), 6.55 (d, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.53-3.47 (m, 8H), 3.40-3.35 (m, 4H), 3.20 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 1.26 (s, 9H).

[0304] LCMS m/z 840 $(M+H)^+$ (ES^+); 838 $(M-H)^-$ (ES^-)

[0305] 실시예 2

[0306] 3-((4-((4-(3-(5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)우레이도)나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드 (화합물 I)

[0307] (i) 3-브로모-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)-5-니트로벤즈아미드

[0308] 질소 분위기 하에서 스크러버를 구비한 10L 플라스크에, 3-브로모-5-니트로벤조산 (2686 g, 10.91 mol) 및 티오

닐 클로라이드(5.37 L, 75.8 mol)을 첨가하였다. 반응을 68℃로 가열하고[GAS EVOLUTION] 완료된 반응임을 나타내는 LC 분석 이후에, 밤새 60℃로 교반하였다. 반응을 상온으로 냉각시키고 진공에서 농축하여 3.2 kg의 물질을 얻었는데, 그 양은 티오닐 클로라이드 (100% 수득 = 2.88 kg)의 존재를 나타낸다. 혼합물을 톨루엔(2 x 3 L)으로부터 농축하여 티오닐 클로라이드의 모든 트레이스(trace)를 제거하였다. 초과 수득을 설명하는 톨루엔과 함께, 총 3370g의 산 클로라이드를 얻었다.

[0309] 질소 하에서 20L 플라스크에 2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에탄아민(890 g, 5.45 mol) 및 DCM(3.5 L)를 첨가하였다. 이후에 8% $NaHCO_3$ 수용액(9 L)을 첨가하였다. 산 클로라이드(1373 g 활성, 4.89 mol)를 혼합물에 첨가하고 온도를 25℃ 미만으로 유지하였다[EXOTHERM 및 GAS EVOLUTION]. 완료된 반응을 나타내는 LC 이후에 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 유기물을 분리하고 1 M HCl(4.5 L) 및 8% $NaHCO_3$ 수용액(4.5 L)으로 세척한 후, 건조하고, 진공에서 여과 및 농축하여 총 1956g의 제목의 화합물(95% 수득)을 얻었다. ^{1}H NMR에 의한 분석은 생성물 순도가 >95%임을 나타내었다.

[0310] (ii) 3-아미노-5-브로모-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0311] 상기 단계 (i)의 생성물(1 kg, 2.56mol)을 THF(3.5 L) 및 AcOH(500 mL)에 용해시키고, 5% Pt/C(30 g의 JM 타입 18 MA, 55% 물)과 함께 60℃까지의 온도에서 3 MPa(30 bar) H_2에서 수소화시켰다. 5시간 이후의 분석을 1:1 비율의 ArNHOH 및 $ArNH_2$를 나타내었다. 밤새 방치한 후 반응을 완료하였고, ^{1}H NMR 분석은 3% des-브로모 부산물을 나타내었다. 촉매를 여과하여 제거한 후, 잔여물을 에틸 아세테이트(3 L)로 희석하고, 20% 탄산칼륨 용액(3.5 L)으로 세척하였다. 그 후 유기물을 건조시키고, 진공에서 여과 및 농축하여 잔여물을 얻고, 그 후 5배 부피의 디에틸 에테르에서 밤새 슬러리화하여 des-브로모 종(species)의 레벨을 감소시켰다(슬러리 후 <2%). LC에 의한 86%의 순도인 90% 수득율의 제목의 화합물을 얻었다.

[0312] (iii) 3-아미노-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)-5-((트리이소프로필실릴)에티닐)벤즈아미드

[0313] 질소 하에서 10L 플라스크에 상기 단계 (ii)의 생성물(700 g, 1.93 mol) 및 THF(5.59 L)을 첨가하였다. 그 후, CuI(19.2 g, 0.1 mol), 트리에틸아민(1.29 L, 9.27 mol) 및 에티닐트리이소프로필실란(389 g, 2.13 mol)을 첨가하였다. 반응에서 질소로 3번 가스를 제거하고 퍼지(purge)하였다. $Pd(PPh_3)_4$(125.5 g, 0.198 mol)을 첨가하고, 질소로 가스를 제거하고 퍼지하였다. LC가 91% 생성물 및 <1% 시작 물질을 나타낸 후, 65℃에서 밤새 반응을 가열하였다. 진공에서 반응 혼합물을 농축하고, 잔여물을 에틸 아세테이트(2 L) 내로 취하고, 실리카 플러그(2 kg)를 통과시키고 추가적인 에틸 아세테이트(30 L)로 용출하였다. 생성물 함유 부분을 진공에서 농축하고, 조 생성물을 TBME (5 L)에 용해시킨 후, 6 N HCl(5 L)로 추출하였다. 6 N NaOH를 이용하여 pH 9-10로 염기화한 후, 수성 HCl 상을 TBME (2 x 5 L)으로 세척하였다. 그 후 생성물을 TBME(2 x 5 L)로 추출하고, 유기물을 건조시킨 후, 진공에서 여과 및 농축하여 ^{1}H NMR (용매 배제)에 의할 때 순도 >95%인 635g의 제목의 화합물을 얻었다.

[0314] (iv) 3-아미노-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0315] MeCN(8.8 L) 내의 상기 단계 (iii)의 생성물(1200 g, 2.59 mol)에 CsF(433.6 g, 2.85 mol)을 첨가하였다. HPLC 분석이 1.7% 생성물, 97.4% 시작 물질을 나타낸 후, 반응을 상온에서 밤새 교반하였다. 추가적인 CsF(420 g, 2.76 mol)을 투입하고, HPLC 분석이 91.0% 생성물, 4.4% 시작물질을 나타낼 때 반응을 상온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 여과하고 진공에서 농축하여 HPLC에 의할 때 92.5% 생성물, 0.7% 시작물질인 물질을 얻었다. 잔여물을 DCM(3 L) 및 EtOAc(3 L)에 용해시킨 후, 2개의 동일한 부분으로 나누었다. 각각의 부분을 실리카 패드(1.6 kg)에 통과시키고, EtOAc(50 L)로 용출하였다. 여과액을 결합하고 진공에서 농축시켰다. 조물질(crude material)을 헵탄(2 x 4 L)으로 세척하여 실릴 불순물을 제거하였다. 총 719g의 제목의 화합물을 분리하였다(^{1}H NMR에 의한 83% 분석, 75% 활성 수득, 597g 활성).

[0316] (v) tert-부틸 (4-((2-((3-에티닐-5-((2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)카바모일)페닐)-아미노)피리미딘-4-일)옥시)나프탈렌-1-일)카바메이트

[0317] N_2 하에서 상기 단계 (iv)의 생성물(301.2 g, 250.0 g 활성, 0.816 mol), tert-부틸 (4-((2-클로로피리미딘-4-일)옥시)나프탈렌-1-일)카바메이트(예를 들면, Ito, K. *et al.*, WO 2010/067130, 17 Jun 2010 참조; 252.8 g,

0.680 mol), *p*TSA.H_2O(24.7 g, 0.130 mol) 및 THF(7600 mL)을 투입하였다. HPLC 분석이 0.25% 단계 (iv)의 생성물, 22.24% 단계 (vi)의 생성물, 8.98% 클로로피리미딘 시작 물질 및 64.08% 단계 (v)의 생성물을 나타낸 후, 짙은 붉은색 용액을 환류를 위해 6시간 동안 가열하고, 상온까지 냉각하였다. 단계 (iv)의 또 다른 생성물(27.1 g, 22.5 g 활성, 73.4 mmol)을 투입하고, HPLC 분석이 이후 0.20% 단계 (iv)의 생성물, 30.23% 단계 (vi)의 생성물, 4.50% 시작 클로로피리미딘 및 58.61% 단계 (v)의 생성물을 나타냄과 함께, 환류를 위해 가열하고 밤새 교반하였다.

[0318] 반응을 상온까지 냉각하고 20% K_2CO_3(735 mL)으로 퀀칭한 후, 유기 층을 포화 브라인 (880 mL)으로 세척하여 층들을 분리하였다. 유기층을 $MgSO_4$상에서 건조하고, 여과 및 농축하여 갈색의 끈끈한 고체를 분리하였다. 수득 = 491.2g (93.8%). HPLC는 30.59% 단계 (vi)의 생성물 및 59.50% 단계 (v)의 생성물을 나타내었고, ^{1}H NMR으로 구조를 확정하였다.

[0319] (vi) 3-((4-((4-아미노나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시-에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0320] N_2 하에서 단계 (v)의 조생성물 혼합물(491.2 g) 및 DCM (3700 mL)을 투입하였다. TFA(695 mL, 12.3 당량)을 적가하였고, 20℃ 미만의 온도를 유지하였다. 짙은 갈색 용액을 상온에서 밤새 교반하고, HPLC 분석은 86.90% 단계 (vi)의 생성물 및 0.94% 단계 (v)의 생성물을 나타내었다. 혼합물을 농축하고, 잔여물을 EtOAc(3700 mL) 내에 취한 후, pH 7-8 이 얻어질 때까지 포화 $NaHCO_3$ 수용액(2 x 2000 mL)으로 세척하였다. 유기층을 $MgSO_4$상에서 건조시키고, 여과 및 농축시켜 보라색 고체를 분리하였다. 수득 = 360.8g. HPLC 순도 78.58%.

[0321] (vii) 5-tert-부틸-2-메톡시-3-니트로아닐린

[0322] N_2 하에서 4-*tert*-부틸-2,6-디니트로아니솔(620 g, 2.439 mol), IMS(4774 mL) 및 10% Pd/C(31.8g)을 투입하였다. 반응 혼합물을 가열하여 환류하고(78℃) 4.5시간 이상으로 4-메틸-1-사이클로헥센(500 mL, 4.159 mol)을 적가하였다. 환류에서 반응을 밤새 교반하였고, HPLC 분석은 72.13% 생성물 및 27.17% 시작 물질을 나타내었다. 또한, 4-메틸-1-사이클로헥센(160 mL, 1.331 mol)을 3시간 이상 적가하고 반응을 환류에서 72시간 동안 교반하였다. HPLC 분석은 92.72% 생성물 및 0% 시작 물질을 나타내었다. 반응을 상온까지 냉각하고 진공 여과를 통해 촉매를 제거하고, IMS(500 mL)로 세척하였다. 용매를 ca. 1200 mL로 농축하여 1 : 4.45 비율의 생성물 : 에탄올(목표 1 : 5)을 얻었다. 2 M HCl(124 mL)을 잔여물에 적가하고 23℃ 아래의 온도를 유지하였다. 물(3100 mL)을 투입하고 결과 현탁제를 1.5시간 동안 상온에서 교반하였다. 고체를 진공 여과를 통해 수집하고, 물(2 x 1000 mL)로 세척하였다. 결과 오렌지색의 니들(needles)을, 진공 하에서 40℃로 밤새 건조시켰다. 수득 = 475.2 g (86.9%). ^{1}H NMR에 의할 때 순도>97%. HPLC 순도 98.8%. KF 0.36%.

[0323] (viii) N-(5-tert-부틸-2-메톡시-3-니트로페닐)메탄설폰아미드

[0324] N_2 하에서 단계 (vii)의 생성물(471 g, 2.099 mol), 톨루엔(1880 mL) 및 피리딘(471 mL)을 투입하였고, 그 후 메탄설포닐 클로라이드(179 mL)를 1시간 이상 적가하고 35℃ 아래의 온도를 유지하였다. 반응을 30-35℃로 밤새 교반하고, 그 후 20℃ 미만으로 냉각시켰고, 그 후 물(1880 mL) 및 2 M HCl(1880 mL)을 투입하였다(pH 3을 달성함). 층들을 분리하였고, 유기상을 2.5% 브라인(1880 mL)으로 세척하였다. 그 후 헵탄(3760 mL)을 유기층으로 0.5시간 이상 투입하여 침전물을 분리하였다. 혼합물을 0℃까지 냉각시키고 1시간 동안 교반하였다. 진공 여과를 통해 고체를 수집하고, 헵탄(1880 mL)으로 세척한 후, 진공 하에서 40℃로 밤새 건조시켰다. 수득 = 551 g (87%). HPLC 순도 98.5%. ^{1}H NMR에 의한 순도 >97%.

[0325] (ix) N-(3-아미노-5-tert-부틸-2-메톡시페닐)메탄설폰아미드

[0326] 5L 수소첨가기(hydrogenator)에 상기 단계 (viii)의 생성물(209.4 g, 0.693 mol), 메탄올 (1675 mL, 8 부피) 및 10% Pd/C (10.2 g)를 첨가하였다. 3 x N_2 및 3 x H_2 로 베셀을 퍼지하고, 그 후 다른 열방출(exotherm)이 관측되지 않을 때까지 0.3447 MPa (50 psi) H_2하에서 교반하였다. THF(314 mL)로 반응을 희석하고, 진공 여과(Cuno 필터)를 통해 촉매를 제거하고, 그 후 THF(1000 mL)로 세척하였다. 용매를 농축하여 밝은 갈색의 고체를 분리하였고, 이를 진공에서 40℃로 밤새 건조시켰다. 수득 = 167.0 g (88.5%). HPLC 순도 96.7%. ^{1}H NMR에 의한 순도 >95%.

[0327] (x) 페닐 N-[5-tert-부틸-3-(메탄설폰아미도)-2-메톡시페닐]카바메이트

[0328] N_2 하에서 상기 단계 (ix)의 생성물(167.0 g, 613 mmol), $NaHCO_3$(77.3 g, 920 mmol), THF(870 mL) 및 DCM(1440 mL)을 투입하였다. 페닐 클로로포르메이트(82.6 mL, 659 mmol)를 적가하고, 20℃ 미만의 온도를 유지하였고, 반응을 4시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응 혼합물의 HPLC 분석은 98.6% 생성물 및 0.03% 시작 물질을 나타내었다. 반응 혼합물을 여과하고, 케이크(cake)를 THF(~50 mL)로 세척하였다. 여과액을 ~900 mL까지 농축하고, 사이클로헥산(2400 mL)을 첨가한 후, 혼합물을 밤새 교반하였다. 결과 고체를 진공 여과를 통해 수집하고, 사이클로헥산(500 mL)으로 세척하였다. 생성된 엷은 분홍색 고체를 진공에서 40℃로 4시간 동안 건조시켰다. 수득 = 232.6g (96.7%). HPLC 순도 94.5%. ^{1}H NMR 순도 >95%.

[0329] (xi) 3-((4-((4-(3-(5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐)우레이도)나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-5-에티닐-N-(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)벤즈아미드

[0330] N_2 하에서 상기 단계 (vi)의 생성물(175.5g, 0.324mol), 상기 단계 (x)의 생성물(145.0 g, 0.369 mmol) 및 *i*PrOAc(8800 mL)을 투입하였다. 결과 용액을 60℃까지 가열하고, NEt_3 (9.3 mL)을 한 부분으로 투입하고, 그 후 혼합물을 60℃로 밤새 교반하여 방치하였으며, HPLC 분석은 25.77% 단계 (vi)의 생성물, 3.60% 단계 (x)의 생성물 및 57.85% 단계 (xi)의 생성물을 나타내었다. 단계 (x)의 다른 생성물(36.0 g, 0.092 mol)을 투입하고, 그 후 반응을 60℃에서 밤새 교반하여 방치하였고, HPLC 분석은 5.47% 단계 (vi)의 생성물, 3.72% 단계 (x)의 생성물 및 73.33% 단계 (xi)의 생성물을 나타내었다. 반응 혼합물을 상온까지 냉각하고, 농축하여 짙은 보라색 고체(522.9 g)를 분리하였다. 이 고체를 아세토니트릴(2615 mL, 5 부피)로부터 재결정하고, 그 후 진공 여과를 통해 수집하고 *i*PrOAc(2 x 500 mL)으로 세척하였다. 얻어진 분홍색 고체를 진공에서 40℃로 밤새 건조시키고, HPLC 순도가 99.27%인 본 제목의 화합물 181.1 g (66.5%)을 수득하였다. ^{1}H NMR은 구조를 확정하였다.

[0331] **생물학적 시험: 실험 방법**

[0332] ***효소 결합 분석 (키노메스칸)***

[0333] 본원에 기술된 화합물의 키나제 효소 결합 활성을 고정화 리간드에 대한 활성 부위-특이적 경쟁 결합을 측정하는 독점 어세이를 사용하여 측정하였다(Fabian, M.A. *et al., Nature Biotechnol.*, 2005, 23:329-336). 이 어세이는 DiscoverX(이전 명칭 Ambit; San Diego, CA)로 수행되었다. 시험 화합물과의 인큐베이션으로 생성된 저해 백분율이 비-저해 대조군에 대해 계산되었다.

[0334] ***효소 저해 어세이***

[0335] 본원에 기술된 화합물의 효소 저해 활성을 공여체와 수용체 형광단(플루오로phore)(Z-LYTE, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) 둘다로 표지된 합성 펩티드를 사용하여 FRET에 의해 측정하였다.

[0336] *p38 MAPKα 효소 저해*

[0337] 하기 두 어세이 변법을 사용하여 p38 MAPKα 저해를 결정하였다.

[0338] 방법 1

[0339] p38 MAPKα 이소폼(MAPK14: Invitrogen)에 대한 시험 화합물의 저해 활성을 하류 분자, MAPKAP-K2의 활성화/인산화 수준을 측정하여 간접적으로 평가하였다. p38 MAPKα 단백질(80 ng/mL, 2.5 μL)을 시험 화합물(4 μg/mL, 0.4 μg/mL, 0.04 μg/mL 또는 0.004 μg/mL 농도, 2.5 μL)과 2 시간 동안 RT에서 혼합하였다. p38α 불활성 표적 MAPKAP-K2(Invitrogen, 600 ng/mL)와 FRET 펩티드(8 μM; MAPKAP-K2의 인산화 표적)의 혼합 용액(2.5 μL)을 첨가하고, ATP(40 μM, 2.5μL)를 첨가하여 키나제 반응을 개시하였다. 혼합물을 1 시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 형광 마이크로플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific)에서 검출하기 전에 전개 시약(프로테아제, 5μL)을 1 시간 동안 첨가하였다.

[0340] 방법 2

[0341] 이 방법은 시험 화합물(1 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL 또는 0.001 μg/mL 중 어느 하나에서 시험됨)과의 혼합을 위해 더 높은 농도의 p38 MAPKα 단백질(80 ng/mL 단백질 2.5 μL 대신 200 ng/mL 단백질 2.5 μL)을 사용하는 것만을 제외하고 상기 방법 1과 동일한 단계를 따랐다.

[0342] *p38 MAPKγ 효소 저해*

[0343] p38MAPKγ(MAPK12: Invitrogen)에 대한 본 발명 화합물의 저해 활성을 상기한 것과 유사한 방법으로 평가하였다. 효소(800 ng/mL, 2.5 μL)를 시험 화합물(4 μg/mL, 0.4 μg/mL, 0.04 μg/mL 또는 0.004 μg/mL 농도, 2.5 μL)과 2 시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. FRET 펩티드(8 μM, 2.5 μL), 및 적절한 ATP 용액(2.5 μL, 400 μM)을 효소/화합물 혼합물에 첨가하고 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 마이크로플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific)에서 검출하기 전에 전개 시약(프로테아제, 5 μL)을 1 시간 동안 첨가하였다.

[0344] *c-Src 및 Syk 효소 저해*

[0345] c-Src 및 Syk 효소(Invitrogen)에 대한 본 발명 화합물의 저해 활성을 상기한 것과 유사한 방법으로 평가하였다. 관련 효소(각각 3000 ng/mL 또는 2000 ng/mL 농도, 2.5 μL)를 시험 화합물(1 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL, 또는 0.001 μg/mL, 각각 2.5 μL)과 2시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. FRET 펩티드(8 μM, 2.5 μL), 및 적절한 ATP 용액(2.5μL, c-Src에 대해 800 μM, 및 Syk에 대해 60 μM ATP)을 효소/화합물 혼합물에 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 마이크로플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific)에서 검출하기 전에 전개 시약(프로테아제, 5μL)을 1 시간 동안 첨가하였다.

[0346] *GSK 3α 효소 저해*

[0347] 하기 두 어세이 변법을 사용하여 GSK 3α 저해를 결정하였다.

[0348] 방법 1

[0349] GSK 3α 효소 이소폼(Invitrogen)에 대한 시험 화합물의 저해 활성을, 표적 펩티드의 활성화/인산화 수준을 측정하여 평가하였다. GSK3-α 단백질(500 ng/mL, 2.5 μL)을 시험 화합물(4 μg/mL, 0.4 μg/mL, 0.04 μg/mL, 또는 0.004 μg/mL 농도, 2.5 μL)과 2 시간 동안 RT에서 혼합하였다. GSK3α의 인산화 표적인 FRET 펩티드(8 μM, 2.5 μL)와 ATP(40 μM, 2.5 μL)를 효소/화합물 혼합물에 첨가하고 얻은 혼합물을 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 마이크로플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific)에서 검출하기 전에 전개 시약(프로테아제, 5 μL)을 1 시간 동안 첨가하였다.

[0350] 모든 경우에, 부위-특이적 프로테아제가 인산화되지 않은 펩티드만을 절단하여 FRET 시그널을 제거하였다. 각 반응의 인산화 수준을 플루오레신 방출(수용체)에 대한 쿠마린 방출(공여체)의 비율로 계산하였으며, 여기서 높은 비율은 높은 인산화 수준을 나타내고, 낮은 비율은 낮은 인산화 수준을 나타낸다. 각 반응의 저해 백분율을 비저해 대조군에 대해 계산하고, 이어서 50% 저해 농도(IC_{50} 값)를 농도-반응 곡선으로부터 계산하였다.

[0351] 방법 2

[0352] 이 방법은 시험 화합물과 GSK3-α 단백질의 혼합 시간을 단축(2 시간 대신 105 분)시킨 것을 제외하고 상기 방법 1과 동일한 단계를 따랐다. 또한, 사용된 시험 화합물의 농도는 10 μg/mL, 1 μg/mL, 0.1 μg/mL 또는 0.01 μg/mL였다.

[0353] **세포 어세이**

[0354] 본 발명의 화합물을 다음 어세이들 중 하나 이상을 사용하여 시험하였다.

[0355] (a) Jurkat 세포에서 p38 MAPKα와 Lck의 저해

[0356] Jurkat T 세포를 스타브(starve) 배지(RPMI 1640 + 5% FBS)에서 실험 전에 24 h 동안 배양하였다. 세포를 수확하여 $10x10^6$ 세포/mL 스타브 배지로 재현탁한 다음, 둥근바닥 96 웰 플레이트에 웰 당 $1x10^6$ 세포로 도포하였다. 시험 화합물의 연속 희석물을 자극 전에 2 h 동안 첨가하였다(1% 최종 DMSO 농도). 화합물과 사전 인큐베이션한 후, 세포를 H_2O_2(최종 0.05%)로 5분 동안 자극하였다. 반응을 2000 rpm (3 min, 4℃)으로 원심분리하여 중지한 다음, 상청액을 제거하고 100 μL의 냉 fix/perm 용액(BD Fix/Perm kit #554714)을 첨가하였다. 플레이트를 20분 동안 4℃에서 인큐베이션한 후, 원심분리하고 공급된 1x 세척 배지(BD Fix/Perm 키트 #554714)로 세척하였다. 세포를 Cell Signalling Technology (9211s)에 의해 제공된 포스포-p38α (T180/182), 또는 R&D (MAB7500)에 의해 제공된 포스포-Lck (Y394)로 염색하였다. 항체를 세척 배지로 5 μg/mL (R&D) 또는 1:200 (Cell Signalling Technology)으로 희석하여 4℃에서 1h 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 빙냉한 세척 완충액으로 3회 반복 세척한 후, 2차 항체(항-래빗-FITC #F1362 또는 항-마우스-FITC #F2883, 둘다 시그마 제품)를 1:1000의 희석비로 첨가하고 1h 동안 4℃, 암실에서 인큐베이션하였다. 세포를 차가운 세척 완충액으로 3회 세

척하고, 냉 PBS로 최종 세척한 후, 150 μL 냉 PBS에 재현탁하였다. 세포를 BD Accuri C6를 사용한 유세포분석법으로 분석하였다.

[0357] (aa) *d-U937 세포에서 LPS로 유도된 TNFα / IL-8의 분비*

[0358] 인간 단핵구 세포주인 U937 세포를 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA;100 ng/mL)와 48 내지 72 시간 동안 인큐베이션하여 대식세포 종류 세포로 분화시켰다. 세포를 최종 농도의 시험 화합물과 2 시간 동안 사전 인큐베이션한 다음, LPS(0.1 μg/mL; *E. Coli*에서 유래: 0111:B4, Sigma)로 4 시간 동안 자극하였다. 상청액을 샌드위치 ELISA(Duo-set, R&D systems)로 TNFα 및 IL-8 농도 측정을 위해 수집하였다. TNFα 생산의 저해를 각 농도의 시험 화합물에서 10 μg/mL의 BIRB796에 의해 비히클 대조군에 대한 비교로 얻어진 것의 백분율로서 계산하였다. 상대적 50% 유효 농도(REC_{50})를 얻어진 농도-반응 곡선으로부터 결정하였다. IL-8 생산의 저해를 각 농도의 시험 화합물에서 비히클 대조군과 비교하여 계산하였다. 50% 저해 농도(IC_{50})를 얻어진 농도-반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0359] (b) *PBMC 세포에서* LPS로 유도된 *TNFα / IL-8의 분비*

[0360] 건강한 대상체로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 밀도 구배(Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare)를 사용하여 전혈에서 분리하였다. PBMC를 96 웰 플레이트에 시딩하고 목적 농도의 화합물로 2 시간 처리한 후, 1 ng/ml LPS (*Escherichi Coli* 0111:B4, Sigma Aldrich 제품)를 정상 조직 배양 조건 (37℃, 5% CO_2) 하에서 24 시간 동안 첨가하였다. 상청액을 샌드위치 ELISA(Duo-set, R&D systems)로 IL-8 및 TNFα 농도 측정을 위해 수집하고, 형광 마이크로플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific)에서 판독하였다. IL-8 및 TNFα 생산의 50% 저해 농도(IC_{50})를 용량 반응 곡선으로부터 계산하였다.

[0361] (c) *CD3/CD28 자극 PBMC 세포에서 IL-2 및 IFN 감마 분비*

[0362] 건강한 대상체로부터의 PBMC를 밀도 구배(Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare)를 사용하여 전혈에서 분리하였다. 세포를 CD3/CD38 단클론 항체(각각 0.3ug/ml eBioscience 및 3ug/ml BD Pharmingen)의 혼합물로 사전 코팅한 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 이어 목적 농도의 화합물을 웰에 첨가하고, 플레이트를 3 일동안 정상 조직 배양 조건하에 두었다. 상청액을 수집하고, IL-2 및 IFN 감마 방출을 샌드위치 ELISA(Duo-set, R&D System)로 측정하였다. IC_{50}을 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0363] (d) *HT29 세포에서 IL-1β로 유도된 IL-8의 분비*

[0364] HT29 세포의 인간 결장 선암 세포주를 96 웰 플레이트에 플레이팅하고(24 시간), 목적 농도의 화합물로 2 시간 동안 사전 처리한 뒤, 5ng/ml의 IL-1β(Abcam)를 24 시간에 걸쳐 첨가하였다. 상청액을 수집하고, IL-8을 샌드위치 ELISA(Duo-set, R&D System)로 정량하였다. IC_{50}을 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0365] (e) *초기 대식세포에서 LPS로 유도된 IL-8 및 TNFα의 분비*

[0366] 건강한 대상체로부터의 PBMC를 밀도 그래디언트 (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare)를 사용하여 전혈에서 분리하였다. 세포를 2 시간 동안 인큐베이션하고, 세척에 의해 비부착 세포를 제거하였다. 세포를 대식세포와 구별하기 위해, 세포를 5ng/ml의 GM-CSF(Peprotech)와 7 일동안 정상 조직 배양 조건하에 인큐베이션하였다. 그 후, 10 ng/ml LPS로 24 시간 동안 자극하기 이전에, 2 시간의 전처리 동안 화합물을 목적 농도로 세포에 첨가하였다. 상청액을 거둬들이고, IL-8 및 TNFα의 분비를 샌드위치(Sandwich) ELISA(Duo-set, R&D System)로 결정하였다. IC_{50}을 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0367] (f) *BEAS2B 세포에서 폴리 I:C로 유도된 ICAM-1의 발현*

[0368] 폴리 I:C가 본 연구에서 간단한, RNA 바이러스 모사체(mimic)로 사용되었다. 폴리 I:C-올리고펙타민 혼합물 (각각, 1 μg/mL 폴리 I:C, ±2% 올리고펙타민, 25 μL; Invivogen Ltd., San Diego, CA, 및 Invitrogen, Carlsbad, CA)을 BEAS2B 세포 (인간 기관지 상피세포, ATCC)로 감염시켰다. 세포를 최종 농도의 시험 화합물로 2 시간 동안 사전 인큐베이션(pre-incubate)하고, 세포 표면에서의 ICAM1의 발현 수준을 세포-기반 ELISA를 통해 측정하였다. 폴리 I:C 감염 후 18 시간이 된 시점에서, 세포를 PBS 내의 4% 포름알데히드로 고정한 후, 0.1% 아지드화 나트륨 및 1% 과산화수소를 포함하는 세척 완충제(100 μL, PBS 내 0.05% Tween: PBS-Tween)을 첨가하여 내인성 퍼옥시다제(endogenous peroxidase)를 퀀칭하였다. 세포를 세척 완충제(3 x 200 μL)로 세척하고, PBS-Tween(100 μL) 내의 5% 우유로 1 시간 동안 웰(well)을 블록킹한 후, 세포를 1% BSA PBS 내의 항-인간

ICAM-1 항체(50 μL; Cell Signalling Technology, Danvers, MA)와 밤새 4 ℃에서 인큐베이션하였다.

[0369] 세포를 PBS-Tween(3 x 200 μL)으로 세척한 후, 제2차 항체(100 μL; HRP가 콘쥬게이션된 항-토끼 IgG, Dako Ltd., Glostrup, Denmark)와 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 기질(50 μL)과 2-20 분동안 인큐베이션하고, 뒤이어 정지액(50 μL, 1N H_2SO_4)을 첨가하였다. 분광 광도계를 사용하여 기준 파장 655 nm에 대한 450 nm의 흡광도를 확인하여 ICAM-1 신호를 측정하였다. 세포를 PBS-Tween(3 x 200 μL)으로 세척하고, 크리스탈 바이올렛 염색(PBS 내의 2% 용액 50 μL) 및 증류수 내의 1% SDS 용액(100 μL)으로 용리(elution)시킨 후 595 nm에서의 흡광도를 확인하여 각각의 웰 내의 총 세포 수를 측정하였다. 측정된 OD 450-655 값을 각각의 웰 내의 OD595 값으로 나누어 세포 수에 대해 보정하였다. 비히클 대조군(vehicle control)과 비교하여 시험 화합물의 각각의 농도에서의 ICAM-1 발현 저해를 계산하였다. 50% 저해 농도(IC_{50})를 생성된 농도-반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0370] (g) *세포 유사분열 어세이*

[0371] 건강한 대상로부터의 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 밀도 그래디언트(Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Poole, UK)를 사용하여 전혈(Quintiles, London, UK)로부터 분리하였다. 이어서, PBMC(샘플당 3백만개의 세포)를 2% PHA(Sigma-Aldrich, Poole, UK)로 48 시간 동안 처리한 후, 뒤이어 시험 화합물의 농도를 변화시켜 20 시간 동안 노출시켰다. 수집하기 2시간 전에, PBMC를 데메콜친(0.1 μg/mL; Invitrogen, Paisley, UK)으로 처리하여 중기(metaphase)의 세포를 억제하였다. 유사분열 세포를 관찰하기 위해, 이전에 기술된 바와 같이(Muehlbauer P.A. and Schuler M.J., Mutation Research, 2003, **537**:117-130), 인트라프렙(Intraprep)(50 μL; Beckman Coulter, France)을 첨가하여 PBMC를 투과 및 고정시키고, 항-포스포-히스톤 3(0.26 ng/L; #9701; Cell Signalling, Danvers, MA) 및 프로피듐 요오드화물(1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Poole, UK)로 염색하였다. 림프구에 대한 통로인, ATTUNE 유세포 분석기(Invitrogen, Paisley, UK)를 사용하여 형광을 관찰하였다. 각 처리에 대한 유사분열의 저해 백분율을 비히클(0.5% DMSO) 처리에 대해 계산하였다.

[0372] (h) *라이노바이러스로 유도된 IL-8 분비 및 ICAM-1 발현*

[0373] 인간 라이노바이러스 RV16는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 입수하였다. 바이러스 스탁은 80%의 세포가 세포병변될 때까지 HeLa 세포를 HRV로 감염하여 생성하였다.

[0374] BEAS2B 세포를 HRV에 의해 MOI 5로 감염시키고 2 hr 동안 33℃에서 흡수를 촉진하기 위해 서서히 진탕하면서 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 PBS로 세척하고 새로운 배지를 첨가하여 세포를 다시 72hr 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 Duoset ELISA 전개 키트(R&D systems, Minneapolis, MN)를 사용하는 IL-8 농도 어세이를 위해 수집하였다.

[0375] ICAM-1 발현 세포 표면의 농도를 세포 기반 ELISA에 의해 측정하였다. 72hr의 감염 후, 세포를 PBS 중의 4% 포름알데히드로 고정하였다. 0.1% 소듐 아자이드와 1% 과산화수소를 첨가하여 내인성 퍼옥시다제를 퀀칭한 후, 웰을 세척 완충액(0.05% Tween/PBS: PBS-Tween)으로 세척하였다. 웰을 PBS-Tween 중의 5% 밀크로 1hr 동안 블로킹한 후에, 세포를 항-인간 ICAM-1 항체의 5% BSA PBS-Tween (1:500)과 밤새 인큐베이션하였다. 웰을 PBS-Tween으로 세척한 후, 제2차 항체(HRP가 콘쥬게이션된 항-래빗 IgG, Dako Ltd.)와 인큐베이션하였다. ICAM-1 시그널을 기질을 첨가하고 분광광도계를 사용하여 655 nm의 기준파장으로 450 nm에서 판독하여 검정하였다. 웰을 PBS-Tween으로 세척하고, 크리스탈 바이올렛 염색 및 1% SDS 용액으로 용출한 후 595 nm에서의 흡광도를 판독하여 각각의 웰 내의 총 세포 수를 측정하였다. 측정된 $OD_{450-655}$ 판독값을 각 웰 내의 OD_{595} 판독값으로 나누어 세포 수에 대해 보정하였다. 화합물을 HRV 감염 2hr 전과 비감염 HRV가 세척된 감염 2hr 후에 첨가하였다.

[0376] (i) *MRC5 세포에서 HRV16으로 유도된 세포병변 효과(CPE)의 평가*

[0377] MRC5 세포를 HRV16에 의해 MOI 1으로 5% FCS와 1.5 mM $MgCl_2$를 함유하는 DMEM에서 감염시킨 후, 흡수를 촉진하기 위해 1 hr 동안 33℃에서 인큐베이션하였다. 상청액을 흡입한 다음, 새로운 배지를 첨가하고 4일 동안 인큐베이션하였다. 필요에 따라, 세포를 화합물 또는 DMSO와 2 hr 동안 사전 인큐베이션하고, 첨가된 화합물과 DMSO를 바이러스를 세척한 후에 다시 첨가하였다.

[0378] 상청액을 흡입시키고, 메틸렌블루 용액(100 μL, 2% 포름알데히드, 10% 메탄올 및 0.175 % 메틸렌블루)과 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 증류수(100 μL) 내의 1% SDS를 각각의 웰에 첨가하고, 660 nm에서의 흡광도를 확인하기에 앞서 플레이트를 1-2 시간 동안 가볍게 흔들었다. 각각의 웰에 대한 저해 백분율을 계산하였다. 시험 화합물의 연속 희석(serial dilution)에 의해 생성된 농도-반응 곡선으로부터 IC_{50} 값을 계산

하였다.

[0379] (j) *초기 기관지 상피세포에서 시험관내 RSV 바이러스 부하*

[0380] 96 웰 플레이트에서 증식된 정상 인간 기관지 상피세포(NHBEC)를 15 mM 염화마그네슘을 포함하는 LHC8 배지:RPMI-1640 (50:50) 중에 0.001 MOI로 RSV A2(Strain A2, HPA, Salisbury, UK)에 감염시키고, 흡착을 위해 37 ℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS(3 x 200 μL)로 세척하고, 새로운 배지(200 μL)를 첨가한 후, 4 일동안 계속 인큐베이션하였다. 필요에 따라, 세포를 화합물 또는 DMSO와 2 시간 동안 사전 인큐베이션하고, 바이러스를 세척한 후 다시 첨가하였다.

[0381] 세포를 PBS 용액(50 μL) 내 4% 포름알데히드로 20 분동안 고정시키고, WB(3 x 200 μL) (세척 완충액, 0.5% BSA 및 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS)로 세척한 후, 블로킹 용액(PBS 내의 5% 연유)과 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 WB(3 x 200 μL)로 세척하고, PBS-tween 중의 5% BSA 내 항-RSV(2F7) F-융합 단백질 항체(40 μL; 마우스 모노클로날, lot 798760, Cat. No.ab43812, Abcam)와 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세척 후에, PBS-Tween(lot 00053170, Cat.No. P0447, Dako) 내의 5% BSA에서 HRP가 콘쥬게이션된 제2 항체 용액(50 μL)과 세포를 인큐베이션하고, 그 후 TMB 기질을 첨가하였다(50 μL; 기질 시약 팩, lot 269472, Cat. No. DY999, R&D Systems, Inc.). 2N H_2SO_4 (50 μL)을 첨가하여 반응을 중지시키고, 생성된 신호를 비색법을 사용하여(OD: 655 nm의 기준 파장에서 450 nm) 마이크로플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific)에서 측정하였다.

[0382] 세포를 세척하고, 2.5% 크리스탈 바이올렛 용액(50 μL; lot 8656, Cat. No. PL7000, Pro-Lab Diagnostics)을 30 분동안 적용하였다. WB로 세척한 후, 증류수(100 μL) 내의 1% SDS를 각각의 웰에 첨가하고, 595 nm에서의 흡광도를 확인하기에 앞서 플레이트를 1 시간 동안 진탕기에서 가볍게 흔들었다. $OD_{450-655}$ 판독값을 OD_{595} 판독값으로 나누어 측정된 $OD_{450-655}$ 판독값을 세포 수에 대해 보정하였다. 각각의 웰에 대한 저해 백분율을 계산하고, 화합물의 연속 희석으로부터 생성된 농도-반응 곡선으로부터 IC_{50} 값을 계산하였다.

[0383] (k) *세포 생존도 어세이: MTT 어세이*

[0384] 구별된 U937 세포를 각각의 시험 화합물(아래에 표시된 200 μL 배지 내의 최종 농도 1 μg/mL 또는 10 μg/mL)과 2개의 프로토콜 하에서 사전 인큐베이션하였다: 첫번째는 5% FCS RPMI1640 배지에서 4 시간 동안이고, 두번째는 10% FCS RPMI1640 배지에서 24 시간 동안이다. 상청액을 새로운 배지(200 μL)로 교체하고, MTT 저장용액(10 μL, 5 mg/mL)을 각각의 웰에 첨가하였다. 1 시간 동안 인큐베이션한 후 배지를 제거하고, DMSO(200 μL)을 각각의 웰에 첨가한 후, 550 nm에서의 흡광도를 확인하기에 앞서 플레이트를 1 시간 동안 가볍게 흔들었다. 비히클(0.5% DMSO) 처리와 비교하여 각각의 웰에 대한 세포 생존도의 손실 백분율을 계산하였다. 그 결과 비히클에 대하여 약물 처리를 한 세포 생존도의 명백한 증가가 음수의 백분율로서 도표화되었다.

[0385] (l) *인간 생검 어세이*

[0386] 장점막 생검을 IBD 환자 결장의 염증이 생긴 부위로부터 획득하였다. 생검 물질을 작은 조각(2-3 mm)으로 절단하고, 5% CO_2/95% O_2 분위기의 무혈청 배지에서 37 ℃의 기관 배양 챔버의 강철 격자 상에 두었다. DMSO 대조군 또는 목적 농도에서의 시험 화합물을 조직에 첨가하고, 기관 배양 챔버에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. R&D ELISA에 의한 IL-6, IL-8, IL-1β 및 TNFα의 수준 측정을 위해 상청액을 수확하였다. 시험 화합물에 의한 사이토카인 분비의 저해 백분율을 DMSO 대조군(100%)에 대해 측정한 사이토카인 분비에 대해 계산하였다.

[0387] (m) *d-U937 세포내 β 카테닌의 축적*

[0388] U937 세포, 인간 단핵구성 세포주를 PMA; (100 ng/mL)와 48 내지 72 시간 동안 인큐베이션하여 대식세포-타입 세포로 분화시켰다. 그 후 세포를 최종 농도의 시험 화합물 또는 비히클 중 어느 하나와 18 시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 4% 포름알데히드 용액으로 교체함으로써 시험 화합물에 의한 β-카테닌의 유도를 중단시켰다. 퀀칭 완충제 (100 μL, 0.1% 아지드화 나트륨, 0.05% Tween-20를 포함하는 PBS 내의 1% H_2O_2)와 20 분동안 인큐베이션하여 내인성 과산화물의 활성도를 상쇄시켰다. 세포를 세척 완충제(200 μL; 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS)로 세척하고, 블록킹 용액(200 μL; PBS 내의 5% 우유)과 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 세척 완충제(200 μL)로 재세척하고, 그 후 1% BSA/PBS(BD, Oxford, UK) 내의 항-β-카테닌 항체 용액(50 μL)과 밤새 인큐베이션하였다.

[0389] 세척 완충제(3 x 200 μL; 0.05% Tween-20를 포함하는 PBS)로 세척한 후, 세포를 1% BSA/PBS(Dako, Cambridge,

UK) 내의 HRP가 콘쥬게이션된 제2 항체 용액(100 μL)과 인큐베이션하고, 생성된 신호를 비색법으로 (OD: 655 nm의 기준 파장에서 450 nm) TMB 기질(50 μL; R&D Systems, Abingdon, UK)을 이용하여 측정하였다. 1N H_2SO_4 용액 (50 μL)을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 그 후 세포를 세척 완충제로 세척하고, 2% 크리스탈 바이올렛 용액(50 μL)을 30 분동안 적용하였다. 세척 완충제(3 x 200 μL)로 세척한 후, 1% SDS(100 μL)을 각각의 웰에 첨가하고, 595 nm에서의 흡광도를 측정하기 전에(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific) 플레이트를 1 시간 동안 가볍게 흔들었다.

[0390] $OD_{450-655}$ 판독값을 OD_{595} 판독값으로 나누어 측정된 $OD_{450-655}$ 판독값을 세포 수에 대해 보정하였다. 각 웰에 대한 백분율 유도를 비히클에 대하여 계산하였고, 유도 비율을 단일체(unity)로 정의되는 **참조 화합물** (*N*-(4-(4-(3-(3-*tert*-부틸-1-*p*-톨릴-1*H*-피라졸-5-일)우레이도)나프탈렌-1-일옥시)피리딘-2-일)-2-메톡시아세트아미드)(1 ㎍/mL)을 포함하는 표준 대조군에 의해 생성된 유도와 비교하여 정상화하였다.

[0391] (n) *T 세포 증식*

[0392] 건강한 대상체로부터의 PBMC를 밀도 그래디언트(Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare)를 이용하여 전혈에서 분리하였다. 제조자의 지시(Miltenyi Biotec 130-091-155)에 따라 음성 자기 세포 분류(negative magnetic cell sorting)에 의하여 림프구 분율을 먼저 CD4+ T 세포에 대해 가장 풍부하게 하였다. 그 후, 제조자의 지시(130-045-901)에 따라 마이크로비드를 이용한 CD45RA+ 세포의 양성 자기 선택(positive magnetic selection)을 이용하여 미접촉(Naive) CD4+ T 세포를 분리하였다. 96 웰 평평한 바닥 플레이트(Corning Costar) 상의 100 μL RPMI/10%FBS에 각 웰 당 $2x10^5$ 개의 세포를 플레이팅하였다. 25 μL의 시험 화합물을 정상 배지에서 적절한 농도(8x 최종 농도)로 희석하고, 플레이트 상의 듀플리케이트 웰(duplicate well)에 첨가하여 0.03 ng/mL-250 ng/mL 범위의 용량 반응을 달성하였다. DMSO를 음성 대조군으로서 첨가하였다. 플레이트를 1 ㎍/mL의 항-CD3(OKT3; eBioscience)로 자극하기 전에 2 시간 동안 사전 인큐베이션 하였다. 72 시간 후, 각각의 웰 내의 배지를 10 μM BrdU (Roche)를 포함하는 새로운 배지 150 μL로 교체하였다. 16 시간 후, 상등액을 제거하고, 플레이트를 건조시킨 후, 제조자의 지시(Roche)에 따라 각각의 웰에 100 μL의 고정/변성 용액을 첨가하여 세포를 고정시켰다. 항-BrdU 검출 항체의 첨가 및 실온에서 90 분동안 인큐베이션하기 전에 플레이트를 PBS로 한번 세척하였다. 그 후, 100 μL 기질 용액의 첨가에 의해 공급 및 전개된 세척 완충제로 플레이트를 부드럽게 3번 세척하였다. 50 μL의 1M H_2SO_4를 첨가하여 반응을 중지시키고, 플레이트 판독기(Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific) 상의 450 nm에서의 흡광도를 확인하였다. IC_{50}을 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다.

[0393] (o) *IBD 환자로부터 유래된 CD3/CD28 자극 LPMC 세포에서 IL-2 및 IFNγ의 분비*

[0394] 다음과 같이 수술 적출물의 염증이 생긴 IBD 점막 또는 수술 적출물의 정상 점막으로부터 프로프리아층 단핵 세포(LPMC)를 분리한 후 정제하였다:

[0395] 수술용 메스를 이용하여 수술 적출물의 심층으로부터 점막을 제거하고, 그 점막을 3-4 mm 크기의 단편으로 절단하였다. 자석 교반기를 사용한 교반으로 조직의 단편을 HBSS(Sigma-Aldrich) 내의 1 mM EDTA(Sigma-Aldrich, Poole, UK)로 3번 세척하고, 각각의 세척 후 상청액을 버려서 상피를 제거하였다. 뒤이어 샘플을 타입 1A 콜라게나아제(1 mg/mL; Sigma-Aldrich)로 37 ℃에서 1 시간 동안 교반하면서 처리하였다. 이후 얻어진 세포 현탁액을 100 ㎛ 세포 스트레이너를 이용하여 여과하고, 2번 세척하고, 10% 소태아 혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 ㎍/mL 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI-1640 배지(Sigma-Aldrich)에 재현탁시킨 후, 이를 세포 배양을 위해 사용하였다.

[0396] DMSO 대조군 또는 적절한 농도의 화합물 중 어느 하나의 존재하에, 새롭게 분리된 LPMC($2x10^5$ 세포/웰)를 1 ㎍/mL α-CD3/α-CD28로 48 시간동안 자극하였다. 48 시간 후, 상등액을 제거하고, R&D ELISA로 TNFα 및 IFNγ의 존재를 분석하였다. DMSO 대조군(100%)에 대해 측정된 사이토카인 분비와 비교하여 시험 화합물에 의한 사이토카인 분비의 저해 백분율을 계산하였다.

[0397] (p) *IBD 환자에서 분리된 근섬유모세포로부터 사이토카인 분비의 저해*

[0398] 염증이 생긴 IBD 점막에서 유래된 근섬유모세포를 다음과 같이 분리하였다:

[0399] 점막을 절개하여 불필요한 부분을 폐기하고, 37 ℃의 가습 CO_2 인큐베이터에서 1 mm 사이즈의 점막 샘플을 20% FBS, 1% 비필수 아미노산 (Invitrogen, Paisley, UK), 100 U/mL 페니실린, 100 ㎍/mL 스트렙토마이신, 50 ㎍

/mL 겐타마이신 및 1 ㎍/mL 암포테리신(Sigma-Aldrich)이 보충된 둘베코(Dulbecco) 변형 이글Eagle) 배지(DMEM, Sigma-Aldrich)에서 배양하였다. 생성된 근섬유모세포의 콜로니들을 25-cm^2 배양 플라스크에 넣고, 자극 실험에 사용되기에 충분한 양을 제공하기 위해 20% FBS 및 적어도 4계대에 대한 항생제로 보충된 DMEM에서 배양하였다.

[0400] 근섬유모세포의 부융합성(Subconfluent) 단일막을 12-웰 플레이트에 웰 당 $3x10^5$ 세포씩 넣고, DMSO 대조군 또는 적절한 농도의 화합물 중 어느 하나의 존재하에서 24 시간동안 배양되기 전에, 무혈청 배지에서 37℃로 24시간 동안 5% CO_2 분위기에서 영양분을 공급하지 않았다. 24시간 경과 후 상등액을 제거하고 R&D ELISA로 IL-8 및 IL-6의 존재를 분석하였다. DMSO 대조군(100%)에 대해 측정된 사이토카인의 분비와 비교하여 시험 화합물에 의한 사이토카인 분비의 저해 백분율을 계산하였다.

[0401] (q) *인간 호중구 탈과립*

[0402] 인간 말초 혈액으로부터 호중구를 다음과 같이 분리하였다:

[0403] 정맥 천자(venepuncture)로 혈액을 수집하고, 1:1 EDTA: 살균한 인산완충식염수(PBS, 무 Ca+/Mg+)를 첨가하여 항응고 처리하였다. 덱스트란(3% w/v)을 첨가하고(혈액 4에 대해 덱스트란 용액 1), 혈액을 실온에서 약 20 분간 방치하였다. 상등액을 밀도 경사(Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare) 상에 조심스럽게 놓고 원심분리(15분, 2000 rpm, 브레이크 없음)하였다. 상등액을 흡입하고, (오염시키고 있는 적혈구를 용해시키기 위해) 세포 펠렛을 식염수(0.2%)에 60 초 이내로 재현탁시켰다. 그 후, 10배 부피의 PBS를 첨가하고 세포를 원심분리하였다(5 분, 1200 rpm). 세포를 HBSS+(시토칼라신 B (5 ㎍/mL) 및 1 mM $CaCl_2$를 포함하는 Hanks 완충 염 용액(페놀 레드 없음)에 재현탁시켜 5 x 10^6 세포/mL를 얻었다.

[0404] 5 x 10^4 세포를 V-바닥 96 웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 적절한 농도의 시험 화합물(0.3-1000 ng/mL) 또는 비히클(DMSO, 0.5% 최종 농도)과 인큐베이션하였다(30 분, 37 ℃). fMLP (최종 농도 1 μM)을 첨가하여 탈과립을 자극하고, 추가적인 인큐베이션(30 분, 37 ℃) 후에 원심분리하여 세포를 제거하고(5 분, 1500 rpm), 상등액을 평평한 바닥 96 웰 플레이트로 옮겼다. 동일한 부피의 테트라메틸벤지딘(TMB)을 첨가하고, 10분 후 동일 부피의 황산(0.5 M)을 첨가하여 반응을 중단시키고, 450 nm에서 흡광도를 확인하였다(655 nm에서의 백그라운드를 제함). 생성된 농도-반응 곡선으로부터 50% 저해 농도(IC_{50})를 측정하였다.

[0405] (r) *세포독성 분석*

[0406] 5 x 10^4 TK6 세포 (림프구성 T 세포주)를 195 μL의 배지(10% 소태아 혈청으로 보충된 RPMI)가 있는 96 웰 플레이트의 적절한 수의 웰에 첨가하였다. 5 μL의 DMSO 대조군(최종 농도 0.5% v/v) 또는 시험 화합물(최종 농도 5 또는 1 ㎍/mL 중 어느 하나)을 웰에 첨가하고, 37 ℃, 5% CO_2 하에서 인큐베이션하였다. 24 시간 경과 후, 플레이트를 1300 rpm으로 3 분동안 원심분리하고, 상등액을 버렸다. 세포를 PBS 내의 7.5 ㎍/mL 프로피듐 요오드화물(PI)에 재현탁시켰다. 15 분후, 유세포 분석기(BD accuri)로 세포를 분석하였다. DMSO 대조군에 대해 정상화된 시험 웰에서 PI 음성인 세포의 %에 따라 % 생존율을 계산하였다.

[0407] ***생체내 스크리닝(In Vivo Screening): 약력학 및 항-염증 활성***

[0408] (i) *마우스에서 LPS로 유도된 호중구의 축적*

[0409] LPS 도전(challenge)의 적용에 의한 염증성 반응의 자극 이전에, 단식시키지 않은 Balb/c 마우스에 기관내 경로를 통해 비히클 또는 시험 물질을 지시된 시간에(2-8 시간 범위 내에서) 투여하였다. T=0일 때, 마우스를 노출 챔버에 두고 30 분동안 LPS(7.0 mL, PBS 내 0.5 mg/mL 용액)에 노출시켰다. 추가적인 8 시간 이후 동물들을 마취시키고, 기도에 캐뉼러를 꽂고, 주입에 의해 폐포세척액(BALF)을 추출하고, 그 후 기관 카테터를 경유하여 폐로부터 1.0 mL의 PBS를 빼내었다. Neubaur 혈구계를 이용하여 BALF 샘플내의 총 백혈구 수 및 분화된 백혈구 수를 측정하였다. 200 rpm으로 5 분간 실온에서 원심분리하여 BALF 샘플의 사이토스핀 스미어(Cytospin smear)를 제조하고, DiffQuik 스테인 시스템(stain system)(Dade Behring)을 이용하여 염색하였다. 유침 현미경(oil immersion microscopy)을 이용하여 세포의 수를 세었다. BAL 내의 호중구 수에 대한 데이터는 평균±S.E.M. (평균 표준오차)로 나타내었다. 비히클 처리와 비교하여 각각의 처리에 대해 호중구 축적의 저해 백분율을 계산하였다.

[0410] (ii) *흡연 모델*

[0411] 작은 동물에 대한 Tobacco Smoke Inhalation Experiment System(Model SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan)을 이용하여 11일간 30분/일 동안 A/J 마이스(수컷, 생후 5주)를 담배 연기(4% 담배 연기, 압축 공기로 희석)에 노출시켰다. 담배 연기에 마지막으로 노출한 후, 하루 2번 3일간 테스트 물질(50% DMSO/PBS 중 35μL의 용액)을 콧속으로 치료상 주입하였다. 최종 투여 12시간 후, 동물들을 마취시키고, 기관에 케뉼러를 삽입하여 기관지 폐포성 유출액(BALF)을 수집하였다. 항-마우스 MOMA2 항체 (대식세포) 또는 항-마우스 7/4 항체 (호중구)를 사용하여 허파꽈리 대식세포 및 호중구의 수를 FACS 분석(EPICS® ALTRAⅡ, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)에 의해 판정하였다.

[0412] (iii) *마우스에서 DSS로 유도된 대장염*

[0413] 덱스트란 소듐 설페이트(DSS)로 처리함에 따른 염증성 반응의 자극 하루 전에(Day -1), 단식하지 않은, 10-12주령의 수컷 BDF1 마우스에 하루에 두번씩 경구 위관 영양을 통해 비히클, 참조 물질 (5-ASA) 또는 시험 화합물을 투여하였다. 연구 0 일째 (Day 0)에 DSS(5% w/v)를 음료수와 함께 투여하고, 뒤이어 비히클(5 mL/kg), 참조 화합물 (100 mg/kg) 또는 시험 화합물 (5 mg/kg)의 1일 2회 투여를 7 일동안 수행하였다. DSS와 함께 음료수를 3일마다 보충하였다. 연구 동안에 매일 동물의 체중을 재었고 대변 관찰이 이루어졌고, 대변의 일관성에 기반을 두어 점수로 기록되었다. 6 일째(Day +6)에 수술로 대장을 제거하고 길이와 무게를 기록하였다. 결장의 부위들은 호중구 침윤을 측정하기 위한 MPO 분석을 위해 또는 발병도 측정을 위한 조직병리학 기록을 위해 취하였다.

[0414] (iv) *마우스에서 TNBS로 유도된 대장염*

[0415] 2,4,6-트리니트로벤젠설폰산(TNBS)(50% 에탄올중 15 mg/mL/ 50% 식염수)으로 처리함에 따른 염증성 반응의 자극 하루 전에(Day -1), 단식하지 않고, 10-12주령의 수컷 BDF1 마우스에 하루에 두번씩 경구 위관 영양을 통해 비히클(5 mL/kg), 참조 물질(부데소니드 2.5 mg/kg) 또는 시험 화합물(1, 5 또는 50 mg/kg)을 하루에 두번씩 투여하였다. 연구의 0일째 (Day 0)에 TNBS (200 μL)를 플라스틱 카테터를 경유하여 결장 내부로 투여하고, 뒤이어 비히클, 참조 또는 시험 화합물의 1일 2회 투여를 2일 또는 4일 동안 수행하였다. 연구 동안에 매일 동물의 체중을 재었고 대변 관찰이 이루어졌고, 대변의 일관성에 기반을 두어 점수로 기록되었다. 2 일째(또는 4 일째)에 수술로 대장을 제거하고 길이와 무게를 기록하였다. 결장 부위들을 발병도 측정을 위한 조직병리학 기록을 위해 취하였다.

[0416] (v) *마우스에서 입양 전달(Adoptive transfer)*

[0417] 연구 0일째에, 암컷 Balb/C 마우스를 사멸시키고, $CD45RB^{high}$ 세포 분리(SCID IBD 세포 분리 프로토콜을 이용)를 위한 비장을 얻었다. 대략 $4x10^5$ 세포/mL의 $CD45RB^{high}$ 세포를 암컷 SCID 동물에 IP(100 μL/마우스)로 주입하였다. 연구 14일째에, 마우스의 무게를 재고, 몸무게에 따라 처리 그룹으로 무작위로 분류하였다. 14일째에, 화합물을, 경구 위관 영양을 통해, 하기 표 6a와 6b에 요약한 투여 수준 및 5 mL/kg의 투여 부피의 옥수수 오일(32.5%), 트랜스큐톨(transcutol) (20%), 마이사인(maisine) (12.5%) 및 크레모포어 ELP (35%)의 정의된 혼합물을 포함하는 비히클에서 1일 2회씩 투여하였다. 연구 42일째까지 처리를 계속하였고, 아침 투여 후 4시간에 동물을 부검하였다. 결장의 길이 및 무게를 기록하고, 이를 결장 부종의 측정시 연구에서의 제2 종점(endpoint)으로 사용하였다. 그 후 결장을 6 등분으로 나누고, 그 중 넷을 조직병리학 기록(제1 종점)으로 사용하고, 둘을 사이토카인 분석을 위해 균질화하였다. 제시된 데이터는 미접촉 동물과 비히클 동물(vehicle animal) 간 유도 창(window)의 % 저해인데, 더 높은 저해는 질병에 걸리지 않고, 미접촉 표현형에 대해 더 근접한 것을 암시한다.

[0418] (vi) *래트에서 내독소로 유도된 포도막염*

[0419] 수컷 Lewis 래트(6-8주령, Charles River UK Limited)를 3개 케이지에서 19-21℃로 12 h 명/암 주기(07:00/19:00)로 사육하고 설치류 사료의 표준 식이와 임의량의 물을 공급하였다. 단식하지 않은 래트의 무게를 재고, 개별적으로 꼬리에 영구 마커로 표시하여 32 게이지의 니들로 동물 당 100 ng의 LPS (PBS로 제조된 Escherichia coli 0111:B4, Sigma Aldrich, UK)를 우측 유리액 내로 단일 유리체강내 투여하였다(5 μL 투여 부피). 미처리 래트에게는 PBS를 주사하였다. 시험 화합물, 덱사메타손(Dex) 또는 비히클(20% 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 0.1% HPMC, 0.01% 벤즈알코늄 클로라이드, 0.05% EDTA, 탈이온화된 물 중의 0.7% NaCl)을 동물의 오른쪽 눈에 국소 경로에 의해 LPS 투여 30분 전, LPS 투여 시, 그리고 LPS 투여 1, 2 및 4시간 후에 투여하였다(10 μL). 투여 전에, 투여될 용액 또는 현탁액을 5분 동안 진탕하여 균일한 현탁액을 만들었다.

LPS를 투여한 6시간 후에 동물을 과량의 펜토바비톤(i.v.)으로 안락사시켰다. 안락사 후에 각 동물의 오른쪽 눈을 적출하여 렌즈 주위에서 전측(전방)과 후측(후방)으로 해부하였다. 각 부위의 무게를 측정하고 500 μL의 멸균 인산염 완충 살린에 균질화한 다음, 20분 동안 12000 rpm으로 4℃에서 원심분리하였다. 얻어진 상청액을 3개의 분액으로 나누어 -80℃에서 R&D DuoSet ELISA에 의한 후속 사이토카인 분석까지 저장하였다.

[0420] ***시험관내 및 생체내 스크리닝 결과의 요약***

시험 대상	해리상수 (nM)		
	Lck	p38 MAPKα	Syk
화합물 I	4.1	9	21

표 1a: KINOMEscan™ 기술을 이용하는 LeadHunter Discover Services (DiscoveRx Corporation, Fremont, CA)에 의해 측정된 선택된 키나제에 대한 해리상수

[0421]

[0422] KINOMEscan™ 기술을 사용하는 LeadHunter Discover Services (DiscoveRx Corporation, Fremont, CA)에 의해 수행된 본 연구에서는 실시예의 화합물이 키나제 B-Raf 및 B-Raf(V600E)와 그들의 표준 리간드의 결합에 대해 어떤 심각한 영향도 미치지 않았음을 측정하였다. 또한, 이 화합물은 낮은 선택성 점수(표 1b)로 입증된 **참조 화합물** *N*-(4-(4-(3-(3-*tert*-부틸-1-*p*-톨릴-1*H*-피라졸-5-일)우레이도)나프탈렌-1-일옥시)피리딘-2-일)-2-메톡시아세트아미드(WO 2010/ 112936)와 비교하여 실질적으로 향상된 선택성을 나타내었다.

화합물	KinomeScan 선택도 스코어 / 개별 키나제 히트의 수					
	50 nM			500 nM		
	S(35)	S(10)	S(1)	S(35)	S(10)	S(1)
참조 화합물	0.174 / 67	0.083 / 32	0.018 / 7	0.370 / 143	0.272 / 105	0.117 / 45
화합물 I	0.068 / 27	0.023 / 9	0.000 / 0	0.197 / 78	0.129 / 51	0.038 / 15

표 1b: 50 및 500 nM 에서 KinomeScan 선택도 스코어 데이터 = (%Ctrl <35 인 비돌연변이 키나제의 수)/(시험된 비돌연변이 키나제의 수); S(10) = (%Ctrl <10 인 비돌연변이 키나제의 수)/(시험된 비돌연변이 키나제의 수); S(1) = (%Ctrl <1 인 비돌연변이 키나제의 수)/(시험된 비돌연변이 키나제의 수)

[0423]

시험 화합물	효소 저해에 대한 IC_{50} 값 (nM)			
	p38 MAPKα	c-Src	Syk	GSK3α
화합물 I	224	24	591	411

표 1c. 생체외 p38 MAPKα (방법 2), c-Src, Syk 및 GSK3α (방법 2) 저해 분석의 결과

[0424]

시험 대상	IC_{50} 값(ng/mL)	
	포스포-p38 MAPKα	포스포-Lck
화합물 I	20	6

표 1d. 세포의 p38 MAPKα 및 Lck 저해를 평가하는 포스포플로우 어세이의 데이터

[0425]

시험 대상	사이토카인 분비의 저해에 대한 IC_{50} 값 (nM)						
	dU937 세포		PBMCs				HT29 세포
	IL-8	TNFα	IL-8	TNFα	IL-2	IFNγ	IL-8
화합물 I	–	–	1.5	–	74.0	7.3	8.0

표 2. 자극된 세포에서 사이토카인 분비의 저해 (상기 어세이 (b), (c) 및 (d)).

[0426]

[0427] 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, 화합물 I은 또한 세포 어세이 (1), 즉 상기한 바와 같은 생체외 인간 생검 모델에서 선별되었고, 여기서 이 화합물들은 궤양성 대장염(UC) 환자의 생검에서 상당한 항염증 효과를 나타내었다. 건강한 지원자들과 달리, UC 환자들의 장 점막 생검은 시험관 내에서 염증전 사이토카인의 자발적인 분비를 나타냈다(Onken,J.E. *et al., J Clin Immunol,* 2008, **126**(3): 345-352). 따라서, 화합물 I은 궤양성 대장염 환자의 생검과 24시간 동안 1 μg/mL으로 인큐베이션하는 경우, DMSO 대조군과 비교하여 사이토카인(IL-1β, IL-6 및 IL-8) 분비를 상당히 저해하였다.

처리 그룹	UC 환자의 생검에서 유래된 사이토카인 분비					
	n	IL-1β 분비	n	IL-6 분비	n	IL-8 분비
DMSO 대조군		100%		100%		100%
화합물 I (1 μg/mL)	4	5 ± 8	4	17 ± 23	2	9 ± 15

표 3: 궤양성 대장염(IBD 의 형태)을 겪는 다양환 환자의 결장의 염증 부위에서 유래된 장점막 생검을 이용한 어세이의 결과 요약

[0428]

[0429] 하기 표 4a에 나타낸 바와 같이, 화합물 I은 대부분 PBMC에서 세포분열(유사분열)에 대한 영향을 측정하는 상기한 어세이 (g)에서 **참조 화합물**(*N*-(4-(4-(3-(3-*tert*-부틸-1-*p*-톨릴-1*H*-피라졸-5-일)우레이도)나프탈렌-1-일옥시)피리딘-2-일)-2-메톡시아세트아미드; WO 2010/112936)보다 현저하게 덜 활성적이었다.

시험 화합물	5 μg/mL 에서 유사분열의 저해%
참조 화합물	87.8[a]
화합물 I	20.5

표 4a: 참조 화합물과 비교하여 PBMC 내의 세포 분열에 대한 화합물 I 의 효과

[a] 예를 들면, WO 2013/050757 에서 보고된 값을 참조.

[0430]

[0431] 하기 표 4b에 나타낸 바와 같이, 화합물 I은 상기한 어세이 (m)에서 시험했을 때 실질적 β-카테닌 유도를 유발하지 않았다. 따라서, β-카테닌의 세포내 농도를 증가하기 위해 시험된 이 화합물들의 능력은 다양한 시험 농도에서 그의 유도효과가 1 μg/mL의 참조 화합물이 나타내는 효과보다 실질적으로 더 낮다는 점에서 음성인 것으로 확인되었다.

시험 화합물	% β-카테닌 유도		
	시험 화합물의 농도		
	1 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL
참조 화합물	100	NT	NT
화합물 I	21	14	26

표 4b: β-카테닌 유도에 있어서 참조 화합물과 비교되는 화합물 I 의 효과 (NT = 시험되지 않음)

[0432]

[0433] 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, 화합물 I은 또한, 2일에 걸쳐 수행되고 옥수수 오일(32.5%), 트랜스쿠톨(transcutol) (20%), 메이진(maisine)(12.5%) 및 크레모포르(cremophor) ELP(35%)의 규정된 혼합물을 포함하는 비히클을 사용한 상기한 생체내 어세이 (iv)에서 선별되었다. 조직병리학 분석에서는 화합물 I이 콜론성 염증의 생체내 모델에서 실질적 활성을 보이는 것으로 나타났다. 구체적으로, 이러한 화합물 I을 5 mg/kg으로 경구 투여했을 때 비히클 대조군과 비교하여 궤양 등급과 상피 복구에서 현저한 개선을 나타냈다. 또한, 이 화합들은 렉티큘라와 프로프리아층 영역에서 염증 세포 침투의 현저한 감소를 나타냈다.

처리 그룹	TNBS		
	n	궤양 등급	LP 염증
질병에 걸리지 않은 그룹	6	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
TNBS + 비히클	24	4.4 ± 0.4	4.8 ± 0.4
TNBS + 화합물 I	12	3.6 ± 0.5	3.8 ± 0.4

표 5: 마우스 내의 TNBS-유도된 대장염에 대한 화합물 I 의 효과

[0434]

[0435] 하기 표 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이, 화합물 I을 또한 상기한 생체내(입양 전달) 어세이 (v)에서 선별하였다. 시험의 종료 시에 미접촉, 대조 및 처리된 동물에서 결장 무게:길이의 상대적 비율의 분석 결과, 화합물 I이 결장 염증의 T 세포 유도성 생체내 모델에서 상당한 활성을 보이는 것으로 나타났다.

처리 그룹	용량	결장 무게:길이	% 저해
미접촉	N/A	0.022 ± 0.001	100
사이클로스포린 A	75 mg/kg	0.029 ± 0.001	64
비히클 대조군	N/A	0.042 ± 0.005	0
화합물 I	3 mg/kg	0.024 ± 0.003	90

[0436] 표 6a: 입양전달 마우스 모델에서 유래된 결과의 요약.

처리 그룹	n	결장 무게:길이
질병에 걸리지 않은 그룹	4	0.021 ± 0.001
비히클 대조군	12	0.047 ± 0.004
화합물 I (3 mg/kg)	12	0.034 ± 0.003
화합물 I (0.3 mg/kg)	12	0.041 ± 0.005
화합물 I (0.03 mg/kg)	12	0.033 ± 0.002

[0437] 표 6b: 입양전달 마우스 모델에서 추가적인 연구에서 유래된 결과의 요약.

[0438] 하기 표 6c에 나타낸 바와 같이, 화합물 I은 또한 입양 전달 모델에서 마우스의 결장 조직 샘플 내에서 염증전 사이토카인의 농도를 상당히 저하하였다.

처리 그룹	n	IFNγ(pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
질병에 걸리지 않은 그룹	4	1.3 ± 0.6	7.9 ± 0.9
비히클 대조군	12	117.7 ± 36.6	1064.9 ± 239.6
화합물 I (3 mg/kg)	12	10.8 ± 3.3	70.8 ± 22.8

[0439] 표 6c: 입양전달 마우스 모델의 사이토카인 레벨 측정의 요약.

[0440] ***추가 시험의 요약***

[0441] *약동학적 파라미터의 측정*

[0442] 화합물 I의 혈장 약동학 및 총 결장 조직 분포를 조사하기 위해 Sai Life Sciences (Hinjewadi, Pune, India)에 의해 시험을 수행하였다. 구체적으로, 약동학 시험은 다음으로 수행하였다:

[0443] - 단일 경구 투여한 후, 수컷 C57BL/6 마우스; 및

[0444] - 단일 정맥내 또는 경구 투여한 후, 수컷 Wistar 래트.

[0445] 데이터는 화합물 I이 실질적 결장 농도를 얻는 반면, 혈장 노출은 매우 낮거나 무시할 정도임을 나타내었다.

		시간(h)						
시험 대상	비히클	1	2	4	6	8	12	24
화합물 I	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0446] 표 8a: 마우스에 5 mg/kg 의 화합물을 경구투여하여 얻어진 평균혈장농도(ng/mL).

[0447] Key

[0448] 비히클 B = 옥수수 오일 - 트랜스쿠톨 - 메이진 - 크레모포르 ELP (32.5 : 20 : 12.5 : 35), 자가미세유화 약물전달시스템(SMEDDS).

		시간(h)						
시험 대상	비히클	1	2	4	6	8	12	24
화합물 I	B	0.0	10.4	420	3080	1951	126	23

[0449] 표 8b: 마우스에 5 mg/kg 의 화합물 I 을 경구투여하여 얻어진 평균 총 결장 농도(ng/g) (비히클 B 는 표 8a 에 대한 것임).

시험 대상	C_0 (ng/mL)	AUC_{last} (h*ng/mL)	AUC_{INF} (h*ng/mL)	$T_{1/2}$ (h)	Cl (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)
화합물 I	6536	869	871	0.1	4.8	0.03

[0450] 표 9a: 5% DMSO–7.5% 솔루톨 HS15–87.5% 생리 식염수 내의 0.25 mg/kg 의 화합물 I 을 랫에 정맥투여하여 얻어진 약동학 데이터.

시험 대상	비히클	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (h*ng/mL)	AUC_{INF} (h*ng/mL)	F_{po} (%)
화합물 I	B	NC[‡]	NC[‡]	NC[‡]	NC[‡]	0.0

[0451] 표 9b: 5 mg/kg 의 화합물 I 을 랫에 경구 투여하여 얻어진 약동한 데이터.

[0452] Key

[0453] 비히클 B = 표 8a에 대한 것임.

[0454] [‡] 혈장 내에 화합물이 탐지되지 않아 계산되지 않음

		시간(h)								
시험 대상	비히클	0.25	0.5	1	2	4	6	8	12	24
화합물 I	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0455] 표 9c: 5 mg/kg 의 화합물 I 을 랫에 경구 투여하여 얻어진 평균 혈장 농도(ng/mL).

[0456] Key

[0457] 비히클 B는 표 8a에 대한 것임.

[0458] *ADME 파라미터의 측정*

[0459] 화합물 I에 대한 특정 시험관내 ADME(흡수, 분포, 대사 및 배출) 파라미터의 평가를 BioFocus (Saffron Walden, UK)에 의해 수행하였다. 그 결과, 일반적으로 화합물 I이 인간 간세포에 의해 신속하게 소거되고 시간 의존적 사이토크롬 P450 저해에 대한 장애(liability)를 감소하는 것으로 나타났다.

시험 대상	$T_{1/2}$ (min)	평균 고유 소거 (μL/분/100 만 세포)	평균 간 추출 비
화합물 I	34	41	0.85

[0460] 표 10: 화합물 I 에 대한 인간 간세포 안정성 데이터.

	0 분 사전배양		30 분 사전배양	
시험 대상	IC_{50} (μM)	15 μM %Inh	IC_{50} (μM)	15 μM %Inh
Ref Cpd A	>15	41	0.4	92
화합물 I	>15	31	7.8	54

[0461] 표 11a: 화합물 I 에 대한 CYP3A4 저해 연구의 요약(결과는 두 실험의 산술평균으로 보고됨).

[0462] Key

[0463] Ref Cpd A: 1-(4-((2-((7-메틸-1H-인다졸-5-일)아미노)피리미딘-4-일)옥시)-나프탈렌-1-일)-3-(3-(2-메틸부트-3-인-2-일)-1-(p-톨릴)-1H-피라졸-5-일)우레아 (Fyfe, M. C. T., et al. WO 2014/033447).

	0 분 사전배양		30 분 사전배양	
시험 대상	IC_{50} (μM)	15 μM %Inh	IC_{50} (μM)	15 μM %Inh
Ref Cpd A	>5	31[†]	1.4	66[†]
화합물 I	>15	21	>15	37

[0464] 표 11b: 화합물 I 에 대한 CYP2C9 저해 연구의 요약(결과는 두 실험의 산술평균으로 보고됨).

[0465] Key

[0466] Ref Cpd A: 표 11a에 대한 것임.

[0467] [†] 15 μM에서 침전이 관찰되었으므로, 대신 5 μM에서의 저해가 보고됨.

[0468] *hERG 저해 시험*

[0469] 화합물 I을 인간 에테르 a go-go (hERG) 채널의 저해에 대해 Essen Bioscience (Welwyn Garden City, England)의 IonWorks™ 패치 클램프 전기생리학을 사용하여 시험하였다.

[0470]

시험 대상	IC_{50} (μM)	3 μM 에서 저해%
화합물 I	>3.0	−12 ± 4

표 12: 화합물 I 에 대한 hERG 저해 데이터

[0471] *대사물질의 분석*

[0472] 화합물 I의 대사경로를 결정하기 위해 래트, 사이노몰거스 마카쿠(Cynomolgus macaque) 또는 인간 간세포와 인큐베이션한 후 BioFocus (Saffron Walden, UK)에 의해 시험을 수행하였다.

[0473] 화합물 I(10 μM 초기 농도) 또는 DMSO 대조군의 별도 인큐베이션 (n=3)을 각 종의 냉동보존된 간세포(50만 세포/mL)로 37℃에서 반응 종료 전 0, 60 및 90분 동안 수행하고 아세토니트릴로 화합물을 추출하였다. 샘플 복제물을 분석 전에 모았다.

[0474] 잠재적 대사물질을 비행시간형(TOF) 및 트리플 쿼드러플(TQ) 질량 분광기를 사용하여 확인하였다.

[0475] 그 결과, 화합물 I은 간세포에서 9개의 대사물질을 형성하였고, 그 중 8개는 아미드 잔기의 폴리에틸렌 글리콜 사슬의 산화로부터 발생하는 것으로 나타났다. 주로 사이노몰거스 마카쿠 간세포에서 보이는 다른 대사물질은 5-(tert-부틸)-2-메톡시-3-(메틸설폰아미도)페닐 단편에서 산화에 의해 발생하였다. 따라서, 어떤 생성물도 p38 α 저해제 BIRB796와 관련된 간독성을 유발하는 현상(Iwano, S., et al., J. Appl. Toxicol. 2011, 31, 671-677)인 나프탈렌 잔기에서의 대사와 연결될 수 있는 것으로 나타나지 않았다. 인간 간세포 인큐베이션에서 확인된 모든 대사물질은 또한 래트 또는 사이노몰거스 마카쿠 간세포 인큐베이션에서 검출되었다.

[0476] *변이원성(Mutagenicity) 평가 (박테리아 역돌연변이 선별)*

[0477] 시험관 내에서 살모넬라 타이피뮤리움(Salmonella typhimurium), 균주 TA98 및 TA100의 두 히스티딘 의존 영양요구성 돌연변이체의 돌연변이를 유도하는 능력에 대해 화합물 I을 평가하기 위해 Sequani (Ledbury, Herefordshire, UK)로 시험을 수행하였다.

[0478] 돌연변이 선별은 플레이트 결합(incorporation) 방법을 사용하여 수행하였고 S-9 믹스(Aroclor 1254 처리 래트의 간에서 유래된 간 포스트-미토콘드리아 분획)의 존재 및 부재 하에 수행하였다. 박테리아를 디메틸설폭사이드에 용해된 시험 화합물에 노출하였고, 이 용매는 또한 음성 대조군으로 사용하였다. 사용된 투여 농도는 플레이트 당 0.32, 1.6, 8, 40, 200, 1000 또는 5000 μg이었다.

[0479] 시험 화합물의 분석가능한 처리 농도는 불용성에 의해 플레이트 당 1000 μg으로 제한되었으며, 왜냐하면 플레이트 당 5000 μg에서 관찰된 심각한 침전이 콜로니 스코어링에 영향을 미치기 때문이다. 침전은 또한 S-9 mix의 존재 및 부재 하에서 플레이트 당 1000 μg에서 두 균주 모두에서 나타났다.

[0480] 화합물 I은 S-9 믹스의 존재 또는 부재 하에서 살모넬라 타이피뮤리움 균주의 복귀 콜로니에서 용량 관련 또는 통계적으로 유의한 증가를 생성하지 않았다.

[0481] *가수분해 안정성 시험*

[0482] 화합물 I의 화학적 안정성을 1 mg/mL의 시험 화합물 농도에서 DMSO와 물(3:1)의 혼합물로 평가하였다.

[0483] 일반적인 HPLC 방법

[0484] Agilent, Waters X-Select C18, 2.5 μm, 4.6x30 mm 컬럼, 4 min 방법, 5-95% MeCN/물 (0.1% 포름산).

[0485] 유속 2.5 ml/min.

[0486] 컬럼 오븐 온도 40℃.

[0487] 검출파장 254 nm.

[0488] 샘플 제조

[0489] 시험 화합물의 1.0 mg 샘플을 750 μL의 DMSO에 용해하였다. 침전이 발생하지 않도록 물(250 μL)을 서서히 첨가하였다.

[0490] 안정성 기록

[0491] 시험 용액의 50 μL 분액을 5 μL HPLC 주입에 의해 듀플리케이트로 분석하였다. 시험 화합물에 대한 피크 면적을 상응하는 UV 트레이스의 메뉴얼 적분 후에 기록하였다.

[0492] 시험 용액을 교반하면서 60℃로 가열하였고, 50 μL의 분액을 HPLC 분석을 위해 5 및 24 h 시점에 덜어냈다. 모든 경우에서, 5 μL 주입을 사용하였고 샘플은 듀플리케이트로 분석하였다.

[0493] 시험 화합물의 피크 면적을 2개의 그 다음 시점에 기록하였고 분해율(%)을 시간에 따른 피크의 변화율(%)로부터 계산하였다.

[0494] 참조 화합물 B (3-에티닐-5-((4-((4-(3-(3-이소프로필-1-(*p*-톨릴)-1*H*-피라졸-5-일)우레이도)나프탈렌-1-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-*N*-(2-모폴리노에틸)벤즈아미드; Cariou, C. A. M., et al, WO 2014/027209)를 시험을 인증하기 위한 대조용으로 각 안정성 시험에 포함시켰다. 완벽하게 안정한 본 발명의 화합물과 달리, 참조 화합물은 실험 조건 하에서 실질적 분해를 일으켰다.

[0495] 시험 결과를 이하의 표에 기재하였다.

시험 화합물	시간 (분)	% 잔여 모체
참조 화합물 B	0	100
	300	82
	1440	36
화합물 I	0	100
	300	100
	1440	100

[0496]

[0497] **약어**

[0498] AcOH 빙초산

[0499] aq 수성

[0500] 5-ASA 5-아미노살리실산

[0501] ATP 아데노신-5'-트리포스페이트

[0502] BALF 기관지 폐포성 유출액(bronchoalveolae lavage fluid)

[0503] BID 1일 2회(bis in die)

[0504] BINAP 2,2'-비스(디페닐포스피노)-1,1'-비나프틸

[0505] BOP (벤조트리아졸-1-일옥시)트리스(디메틸아미노)포스포늄

[0506] 헥사플루오로포스페이트

[0507] br 광폭(broad)

[0508] BrdU 5-브로모-2'-데옥시우리딘

[0509] BSA 소 혈청 알부민

[0510] CatCart® 촉매성 카트리지

[0511] CDI 1,1-카보닐-디이미다졸

[0512] COPD 만성 폐쇄성 폐 질환

[0513] d 이중선

[0514] dba 디벤질리덴아세톤

[0515] DBU 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔

[0516] DCC 디사이클로헥실카보디이미드

[0517] DCM 디클로로메탄

[0518] DIAD 디이소프로필 아조디카복실레이트

[0519] DIPEA 디이소프로필에틸아민

[0520] DMAP 4-디메틸아미노피리딘

[0521] DMEM 둘베코 변성 이글 배지

[0522] DMF N,N-디메틸포름아미드

[0523] DMSO 디메틸 설폭사이드

[0524] DPPA 디페닐포스포릴 아자이드

[0525] d-U937 세포 PMA 분화 U-937 세포

[0526] EDTA 에틸렌디아민테트라아세트산

[0527] ELISA 효소 결합 면역흡착 어세이

[0528] (ES^-) 전기분무 이온화, 음성 모드

[0529] (ES^+) 전기분무 이온화, 양성 모드

[0530] Et 에틸

[0531] Et_3N 트리에틸아민

[0532] EtOAc 에틸 아세테이트

[0533] EtOH 에탄올

[0534] FACS 형광 활성화 세포 분류

[0535] FBS 소태아혈청

[0536] FCS 송아지태아혈청

[0537] fMLP 포밀-메티오닐-루실-페닐알라닌

[0538] FRET 형광 공명 에너지 전달

[0539] GR 글루코코르티코이드 수용체

[0540] GSK3α 글리코겐 신타제 키나제 3α

[0541] HBEC 일차 인간 기관지 상피 세포

[0542] HBSS 행크(Hank) 밸런스화 염 용액

[0543] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

[0544] HPMC 하이드록시프로필메틸셀룰로스

[0545] h 또는 hr 시간

[0546] HATU 2-(1H-7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸

[0547]		유로늄
[0548]	HOAt	1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸
[0549]	HOBt	하이드록시벤조트리아졸
[0550]	HRP	호스래디쉬 퍼옥시다제
[0551]	HRV	인간 라이노바이러스
[0552]	ICAM-1	세포간 부착 분자 1
[0553]	IFNγ	인터페론-γ
[0554]	IL	인터루킨
[0555]	IMS	공업적 변성 알콜
[0556]	iPrOAc	이소프로필 아세테이트
[0557]	JNK	c-Jun N-말단 키나제
[0558]	LC	액체 크로마토그래피
[0559]	Lck	림프구 특이성 단백질 티로신 키나제
[0560]	LPS	리포폴리사카라이드
[0561]	m	다중선
[0562]	$(M+H)^+$	프로톤화된 분자 이온
[0563]	MAPK	미토겐 활성화 단백질 키나제
[0564]	MAPKAP-K2	미토겐 활성화 단백질 키나제-활성화 단백질 키나제-2
[0565]	mCPBA	메타-클로로퍼벤조산
[0566]	Me	메틸
[0567]	MeCN	아세토니트릴
[0568]	MeOH	메탄올
[0569]	MHz	메가헤르츠
[0570]	min 또는 mins	분
[0571]	MMAD	질량 중간 공기 역학적 직경
[0572]	MOI	감염다중도
[0573]	MPO	미엘로퍼옥시다제
[0574]	MTT	3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨
[0575]		브로마이드
[0576]	MS	질량 분광학
[0577]	m/z:	질량 대 전하 비
[0578]	NMP	N-메틸 피롤로디논
[0579]	NMR	핵자기공명(분광학)
[0580]	OD	광학밀도
[0581]	PBMC	말초혈액 단핵세포

[0582]	PBS	인산염 완충 살린
[0583]	Ph	페닐
[0584]	PHA	파이토헤마글루티닌(phytohaemagglutinin)
[0585]	PMA	포볼(phorbol) 미리스테이트 아세테이트
[0586]	pTSA	4-메틸벤젠설폰산(파라-톨루엔설폰산)
[0587]	PyBOP	(벤조트리아졸-1-일옥시)트리피롤리디노포스포늄
[0588]		헥사플루오로포스페이트
[0589]	q	사중선(quartet)
[0590]	rt 또는 RT	실온
[0591]	RP HPLC	역상 고성능 액체 크로마토그래피
[0592]	rpm	분 당 회전
[0593]	RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
[0594]	RSV	호흡기 세포융합 바이러스
[0595]	s	단일선
[0596]	sat 또는 satd	포화
[0597]	SCID	중증 합병성 면역결핍
[0598]	SCX	고체 지지 양이온 교환(수지)
[0599]	SDS	소듐 도데실 설페이트
[0600]	S_NAr	친핵성 방향족 치환
[0601]	Syk	비장 티로신 키나제
[0602]	t	삼중선
[0603]	T3P	1-프로판포스폰산 사이클릭 무수물
[0604]	TBAF	테트라부틸암모늄 플루오라이드
[0605]	TBDMS	*tert*-부틸디메틸실릴
[0606]	TBME	*tert*-부틸메틸에테르
[0607]	$TCID_{50}$	50% 조직 배양 감염 용량
[0608]	TEA	트리에틸아민
[0609]	THF	테트라하이드로퓨란
[0610]	TFA	트리플루오로아세트산
[0611]	TGFβ	변형성 성장인자 베타
[0612]	TIPS	트리이소프로필실릴
[0613]	TMB	3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘
[0614]	TMS-Cl	트리메틸실릴 클로라이드
[0615]	TNFα	종양괴사인자 알파

[0616] 접두사 *n*-, *s*-, *i*-, *t*- 및 *tert*-는 그의 일반적 의미: 노멀, 2차, 이소 및 3차를 지칭한다.