

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07D 471/04
C07D 403/14
C07D 403/12

(11) 공개번호 10-2005-0032105
(43) 공개일자 2005년04월06일

(21) 출원번호	10-2005-7001908	(87) 국제공개번호	WO 2004/013140
(22) 출원일자	2005년02월02일		
번역문 제출일자	2005년02월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2003/023950	(87) 국제공개일자	2004년02월12일
국제출원출원일자	2003년07월31일		

(30) 우선권주장 60/400,967 2002년08월02일 미국(US)

(71) 출원인 버텍스 파마슈티칼스 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02139-4242 캠프리지 웨이벌리 스트리트 130
(72) 발명자 포스터 코넬리아 제이.
미국 뉴 햄프셔주 03076 펠햄 낸시 애브뉴 8
박 래리 씨.
미국 매사추세츠주 02451 월탐 스티언스 힐 로드 6206
웨너메커 메리온 더블류.
미국 매사추세츠주 01775 스토우 하버드 로드 375
야오 윈 메
미국 매사추세츠주 02468 뉴턴 풀러 스트리트 54

(74) 대리인 이병호
김영관
홍동오

심사청구 : 없음

(54) G S K-3의 억제제로서 유용한 피라졸 조성물

명세서

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 본원에 참고로 인용되어 있는 2002년 8월 2일자로 출원된 미국 가특허 출원 제60/400,967호를 우선권으로서 청구한다.

발명의 기술 분야

본 발명은 단백질 키나아제, 특히 세린/트레오닌 단백질 키나아제인 글리코젠 신타제 키나아제-3(GSK-3)의 억제제에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 억제제를 포함하는 조성물, 및 당뇨병, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환(Huntington's disease), 파킨슨 질환, 다발성 경화증(MS), 발작, 신경계 및 신경변성 질환, 및 정신 장애와 같은 여러 가지 질병의 치료에서의 이들 조성물의 사용방법도 제공한다.

발명의 배경

최근 수년간 새로운 치료제에 대한 연구는 표적 질환과 관련한 효소 및 기타의 생체 분자의 구조를 숙지함을 통해 큰 도움을 받고 있다. 광범위한 연구의 대상이 되고 있는 효소들 중에서 중요한 하나가 단백질 키나아제이다.

단백질 키나아제는 세포 내의 신호 전달을 매개한다. 이들은 뉴클레오시드 트리포스페이트로부터 신호 전달 경로에 포함된 단백질 수용체에 포스포릴 전이를 수행함으로써 신호 전달을 매개한다. 세포외 및 기타의 자극이 세포 내부에서 일어나는 여러 가지 세포 반응을 유발시킬 때 통하는 키나아제 및 경로는 다수가 존재한다. 이러한 자극의 예로는 환경적 및 화학적 스트레스 신호(예: 삼투 쇼크, 열 쇼크, 자외선 조사, 세균 내독소 및 H₂O₂), 사이토킨[예: 인터류킨-1(IL-1)] 및 중앙

피사 인자 α (TNF- α) 및 성장 인자[예: 과립구 대식세포-콜로니-자극 인자(GM-CSF) 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)]가 포함된다. 세포의 자극은 세포 성장, 이동 및 분화, 호르몬 분비, 전사 인자의 활성화, 근육 수축, 글루코오스 대사, 단백질 합성의 조절 및 세포 주기의 조절과 관련한 하나 이상의 세포 반응에 작용할 수 있다.

다수의 질환은 단백질 키나아제-매개된 현상에 의해 유발된 비정상적인 세포 반응과 관련이 있다. 이들 질환은 자가 면역 질환, 염증성 질환, 골 질환, 대사성 질환, 신경계 및 신경변성 장애, 암, 심장혈관 질환, 알레르기 및 천식, 알츠하이머 질환 및 호르몬 관련 질환을 포함한다. 따라서, 의학 화학 분야에서는 치료제로서 효과적인 단백질 키나아제 억제제를 개발하기 위한 상당한 노력이 이루어지고 있다.

글리코겐 신타제 키나아제-3(GSK-3)는 각각 별개의 유전자에 의해 코딩되는 α 및 β 이소포름으로 이루어진 세린/트레오닌 단백질 키나아제이다[참조: Coghlan et al., *Chemistry & Biology*, **7**, 793~803 (2000); Kim 및 Kimmel, *Curr. Opin. Genetics Dev.*, **10**, 508~514 (2000)]. GSK-3은 당뇨병, 알츠하이머 질환, CNS 질환(예: 조울증 및 신경변성 질환) 및 심근 비대증을 포함한 다수의 질환에 연루되어 있다[참조: WO 제99/65897호; WO 제00/38675; Kaytor 및 Orr, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 275~8 (2000); Haq et al., *J. Cell Biol.*, **151**, 117~30 (2000); Eldar-Finkelman, *Trends Mol. Med.*, **8**, 126~32 (2002)]. 이들 질환은 GSK-3이 작용하는 특정한 세포 신호 전달 경로의 비정상적인 작용과 관련이 있다.

GSK-3은 다수의 조절 단백질을 포스포릴화하고 이의 활성을 조정하는 것으로 밝혀졌다. 이들은 글리코겐 합성에 필요한 속도-제한적 효소인 글리코겐 신타제, 미소관-관련 단백질 타우(Tau), 유전자 전사 인자 β -카테닌, 번역 개시 인자 eIF-2B, 및 APT 시트레이트 리아제, 악신, 열 쇼크 인자-1, *c-Jun*, *c-myc*, *c-myc*, CREB 및 CEPBa를 포함한다. 다양한 이들 표적들은 세포 대사, 증식, 분화 및 성숙의 여러 가지 측면에서 GSK-3을 연루시킨다.

타입 II 당뇨병의 치료에 관련된 GSK-3 매개된 경로에서, 인슐린-유도된 신호 전달은 세포성 글루코오스 흡수 및 글리코겐 합성을 일으킨다. GSK-3은 이 경로에서 인슐린-유도된 신호의 음의 조절 인자이다. 보통, 인슐린의 존재는 GSK-3-매개되는 포스포릴화 및 글리코겐 신타제의 불활성화를 억제시킨다. GSK-3의 억제는 글리코겐 합성 및 글루코오스 흡수를 증가시킨다[참조: Klein et al., *PNAS*, **93**, 8455~9 (1996); Cross et al., *Biochem. J.*, **303**, 21~26 (1994); Cohen, *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 555~567 (1993); Massillon et al., *Biochem. J.*, **299**, 123~128 (1994); 및 Cohen 및 Frame, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 769~76 (2001)]. 그러나 당뇨병 환자에서 인슐린 반응이 손상되면 혈중 인슐린 농도가 비교적 높더라도 글리코겐 합성 및 글루코오스 흡수가 증가하지 못하게 된다. 이로 인해 혈중 글루코오스 농도가 급성 및 만성적 영향으로 비정상적으로 높아져 궁극적으로는 심장혈관 질환, 신부전증 및 실명을 일으킬 수 있다. 이러한 환자에서는 정상적인 인슐린-유도된 GSK-3의 억제가 일어나지 않는다. 타입 II 당뇨병 환자에서는 GSK-3이 과발현된다는 보고도 있다[WO 제00/38675호]. 따라서 GSK-3의 치료적 억제제는 인슐린에 대한 손상된 반응을 갖는 당뇨병 환자를 치료하는 데에 유용하다.

아포토시스(apoptosis)는 허혈성 뇌 손상의 병태 생리학에 연루되어 있다(참조: Li et al., 1997; Choi et al., 1996; Charriaut-Marlangue et al., 1998; Graham 및 Chen, 2001; Murphy et al., 1999; Nicotera et al., 1999). 최근의 문헌은 GSK-3 β 의 활성화가 아포토시스 기작에 포함되었을 수도 있다고 지적하였다(참조: Kaytor 및 Orr, 2002; Culbert et al., 2001). 중간 대뇌 동맥 폐쇄(MCAO)에 의해 유도된 허혈성 발작의 쥐 모델 연구는 허혈에 이어 GSK-3 β 발현이 증가됨을 보여준다(참조: Wang et al., *Brain Res*, 859, 381~5, 2000; Sasaki et al., *Neurol Res*, 23, 588~92, 2001). 섬유아세포 성장 인자(FGF)는 쥐의 영구적 중간 대뇌 동맥 폐쇄(MCO) 후의 허혈성 뇌 손상을 감소시킨다(Fisher et al., 1995; Song et al., 2002). 실제로, FGF의 신경 보호 효과는 GSK-3 β 의 PI-3 키나아제/AKT-의존적 불활성화에 의해 매개될 수 있다고 설명되었다(Hashimoto et al., 2002). 이처럼 대뇌의 허혈 현상 후의 GSK-3 β 의 억제는 허혈성 뇌 손상을 개선시킬 수 있다.

GSK-3은 심근 경색증에도 연루되어 있다[참조: Jonassen et al., *Circ Res*, 89:1191, 2001(재관류에서 인슐린 투여에 의한 심근 경색증의 감소는 Akt 의존성 신호 전달 경로를 통해 매개된다); Matsui et al., *Circulation*, 104:330, 2001(Akt 활성화는 심장 기능을 보호하고 생체내 일시적 심장 허혈 후의 심근 세포 손상을 방지한다); Miao et al., *J Mol Cell Cardiol*, 32:2397, 2000(심장에서 관상동맥내 아데노바이러스-매개된 Akt 유전자 전달은 생체내 허혈성 재관류 손상 후의 경색부 크기를 감소시켰다); 및 Fujio et al., *Circulation* et al., 101:660, 2000(Akt 신호 전달은 시험관내 심근 세포 아포토시스를 억제하고 생쥐 심장에서 허혈성 재관류 손상으로부터 보호한다)].

GSK-3 활성화는 두부 외상에서도 역할을 담당한다[참조: Noshita et al., *Neurobiol Dis*, 9:294, 2002(Akt/PI3-키나아제 경로의 조절 증가는 외상적 뇌 손상 후의 세포 생존에 중요할 수 있다) 및 Dietrich et al., *J Neurotrauma*, 13:309, 1996(외상 후 bFGF의 투여는 외상적 뇌 손상의 쥐 모델에서 손상된 피질 신경세포 및 전체 명 부피를 현저하게 감소시킨다)].

GSK-3은 정신병에서도 역할을 담당한다[참조: Elder-Finkelman, *Trends Mol Med*, 8:126, 2002; Li et al., *Bipolar Disord*, 4:137, 2002(LiCl 및 발프로산 항정신성 정서 안정제는 GSK3 활성을 감소시키고 베타-카테닌을 증가시킨다) 및 Lijam et al., *Cell*, 90:895, 1997(Dishevelled KO 생쥐는 비정상적인 사회적 행동 및 불완전한 지각 동조를 보인다. WNT 경로에 포함된 Dishevelled 세포형질 단백질은 GSK3 베타 활성을 억제한다)].

리튬 및 발프로산에 의한 GSK3 억제는 축삭 리모델링을 유도하고 시냅스 연결을 변화시킨다[참조: Kaytor & Orr, *Curr Opin Neurobiol*, 12:275, 2002(GSK3의 조절 감소는 미소관-관련 단백질 타우, MAP1 & 2에서의 변화를 유발한다) 및 Hall et al., *Mol Cell Neurosci*, 20:257, 2002(리튬 및 발프로산은 축삭을 따라 성장 원추형 구조의 형성을 유도한다)].

GSK-3 활성화는 알츠하이머 질환에도 관련되어 있다. 이 질환은 잘 알려져 있는 β -아밀로이드 펩티드의 존재 및 세포내 신경원섬유 농축체의 형성을 특징으로 한다. 신경원섬유 농축체는 과포스포릴화된 타우 단백질을 함유하며 여기서 타우는 비정상적 위치에서 포스포릴화되어 있다. GSK-3은 세포 및 동물 모델에서 이들 비정상적 위치를 포스포릴화하는 것으로 보인다. 추가로, GSK-3의 억제는 세포에서 타우의 과포스포릴화를 방지하는 것으로 보인다[참조: Lovestone et al., *Curr. Biol.*, **4**, 1077~86 (1994); 및 Brownless et al., *Neuroreport* **8**, 3251~55 (1997); Kaytor 및 Orr, *Curr. Opin.*

Neurobiol., **12**, 275~8 (2000)]. 유전자 이식 생쥐의 과발현 GSK3에서, 현저히 증가된 타우 과포스포릴화 및 비정상적 형태의 신경세포가 발견되었다[참조: Lucas et al., *EMBO J.* **20**:27~39 (2001)]. 활성화의 GSK3은 예비 농축된 (pretangled) 신경세포의 세포질 내에 축적되고, 이것은 알츠하이머 질환을 앓고 있는 환자의 뇌에서 신경원섬유 농축체의 형성을 초래할 수 있다[Pei et al., *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 1010~19 (1999)]. 따라서, GSK-3의 억제제는 신경원섬유 농축체의 형성을 완화 또는 정지시킴으로써 알츠하이머 질환을 치료 또는 경감시킨다.

알츠하이머 질환에서의 GSK-3의 역할이 시험관내에서 증명되었다[참조: Aplin et al. (1996), *J Neurochem* **67**:699; Sun et al. (2002), *Neurosci Lett* **321**:61 (GSK3b는 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 세포질 영역을 포스포릴화하고 GSK3b 억제는 APP-이식된 세포에서 Ab40 & Ab42 분비를 감소시킨다); Takashima et al. (1998), *PNAS* **95**:9637; Kirshenbaum et al. (2001), *J Biol Chem* **276**:7366 (GSK3b는 APP로부터 Aβ의 합성에서 감마-세크레타제 활성화와 관련된 프레세닐린-1과 착물을 형성하여 포스포릴화한다); Takashima et al. (1998), *Neurosci Res* **31**:317(Aβ(25-35)에 의한 GSK3b의 활성화는 해마 신경세포에서 타우의 포스포릴화를 증진시킨다. 이것은 알츠하이머 질환의 또다른 병리학 적 특징인 과포스포릴화된 타우를 구성하는 신경원섬유 농축체와 Aβ 사이의 연관성을 제공한다); Takashima et al. (1993), *PNAS* **90**:7789 (GSK3b 발현 또는 활성의 차단은 피질 및 해마의 주 배양물의 Ab-유도되는 신경 퇴행을 방지한다.); Sahara et al. (2003), *Neurobiol Aging*. **24**:437(세포내 Ab42는 Akt의 활성화/GSK-3b 신호 전달-의존적 기작을 방해함으로써 내피 세포에 유독하다); De Ferrari et al. (2003) *Mol Psychiatry* **8**:195(리튬은 Aβ 원섬유-유도되는 세포 독성으로부터 N2A 세포 및 주요 해마 신경세포를 보호하고, b-카테닌의 핵 전좌/불안정화를 감소시킨다); 및 Pigino et al., *J Neurosci*, **23**:4499, 2003 (알츠하이머의 프레세닐린 1에서의 변이는 GSK-3의 활성을 조절 철폐 및 증가시킴으로써 신경세포에서 축삭 이동을 손상시킨다. 신경세포에서의 축삭 이동의 결과적 감소는 궁극적으로 신경 퇴행을 유발할 수 있다)].

GSK-3이 알츠하이머 질환에 작용한다는 증거가 시험관 내에서 보여졌다[참조: Yamaguchi et al.(1996), *Acta Neuropathol* **92**:232; Pei et al. (1999), *J Neuropathol Exp Neurol* **58**:1010(GSK3b 면역 반응성은 AD 뇌의 민감한 영역에서 상승된다); Hernandez et al. (2002), *J Neurochem* **83**:1529(잠정적인 GSK3b 과발현을 갖는 유전자 도입된 생쥐는 AD의 유전자 도입된 APP 생쥐 모델에서와 유사한 기억 장애를 나타낸다); De Ferrari et al. (2003) *Mol Psychiatry* **8**:195 (만성적 리튬 치료는 Aβ 근원섬유의 해마내 주입에 의해 유발된 신경 퇴행 및 행동 결함(모리스 물 미로)을 구제한다.); McLaurin et al., *Nature Med.*, **8**:1263, 2002 (알츠하이머 질환의 유전자 도입 모델에서 Aβ에 의한 면역화는 AD와 같은 신경병리학 및 공간 기억 손상을 감소시킨다); 및 Phiel et al. (2003) *Nature* **423**:435(GSK3은 AD tg 생쥐에서 감마 세크레타제의 직접적인 억제를 통해 아밀로이드-베타 펩티드 생성을 조절한다)].

최근에 발표된 바와 같이 프레세닐린-1 및 키네신-1도 GSK-3을 위한 기질이며, 알츠하이머 질환에서의 GSK-3의 기능을 위한 다른 기작과 관련되어 있다(참조: Pigino, G., et al., *Journal of Neuroscience* **23**:4499, 2003). GSK3베타는 키네신-1 경사슬을 포스포릴화함으로써 막-결합된 소기관으로부터 키네신-1을 방출하여 신속한 진행성 축삭 이동의 감소를 유발하는 것으로 밝혀졌다(참조: Morfini et al., 2002). 저자는 PS1에서의 변이는 GSK-3 활성을 조절 철폐하고 증가시킴으로써 신경세포에서의 축삭 이동을 손상시킨다고 제안한다. 영향을 받은 신경세포에서의 축삭 이동의 결과적 감소는 궁극적으로 신경 퇴행을 일으키게 된다.

GSK-3은 근위축성 축삭 경화증(ALS)과도 관련이 있다[참조: Williamson 및 Cleveland, 1999(mSOD1 생쥐의 ALS의 매우 이른 상에서는 축삭 이동이 지연된다); Morfini et al., 2002(GSK3은 키네신 경사슬을 포스포릴화하고 진행성 축삭 이동을 억제한다); Warita et al., *Apoptosis*, **6**:345, 2001(척수의 운동 신경세포의 대다수는 ALS의 SOD1 tg 동물 모델에서 신경세포의 상당한 손실에 앞서서 이른 증상전 단계에서 PI-3D 및 Akt 둘 모두에 대해 면역 반응성을 손실한다); 및 Sanchez et al., 2001(PI-3K의 억제는 GSK3 활성화에 의해 매개되는 신경세포돌기 수축을 유발한다)].

GSK-3 활성화는 척수 및 말초 신경 손상에도 연관이 있다. 리튬 및 발프로산에 의한 GSK3 억제는 축삭 리모델링 유도하고 시냅스 연결을 변화시킨다[참조: Kaytor & Orr, *Curr Opin Neurobiol.*, **12**:275, 2002(GSK3의 조절 감소는 미소관-관련 단백질 타우, MAP1 & 2에서의 변화를 유발한다) 및 Hall et al., *Mol Cell Neurosci.*, **20**:257, 2002(리튬 및 발프로산은 축삭을 따라 성장 원추형 구조의 형성을 유도한다); Grothe et al., *Brain Res.*, **885**:172, 2000(FGF2는 Schwann 세포 증식을 자극하고 축삭 성장 중의 수초화를 억제한다); Grothe 및 Nikkhah, 2001(FGF-2는 신경 압박 후 5시간 이내에 중앙 및 말단의 신경 기부를 조절 증가시킨다); 및 Sanchez et al., 2001(PI-3K의 억제는 GSK3 활성화에 의해 매개되는 신경 세포돌기 수축을 유발한다)].

GSK-3의 또 다른 기질은 β-카테닌으로, 이것은 GSK-3에 의해 포스포릴화된 후에 변성된다. 감소된 수준의 β-카테닌은 정신분열증 환자에서 보고되었으며, 신경세포 치사의 증가와 관련된 다른 질병과 연루되어 있다[참조: Zhong et al., *Nature*, **395**, 698~702(1998); Takashima et al., *PNAS*, **90**, 7789~93(1993); Pei et al., *J. Neuropathol. Exp.*, **56**, 70~78 (1997); 및 Smith et al., *Bio-org. Med. Chem.*, **11**, 635~639 (2001)]. 또한, β-카테닌 및 Tcf-4는 혈관 리모델링에서 혈관의 평활근 세포 아포토시스를 억제하고 증식을 촉진시킴으로써 이중적 역할을 한다(Wang et al., *Circ Res.*, **90**:340, 2002). 따라서 GSK-3은 맥관형성 장애에 관련이 있다[참조: Liu et al., *FASEB J.*, **16**:950, 2002(GSK3의 활성화는 간세포 성장 인자를 감소시킴으로써 내피 세포 장벽 기능을 변화시키고 혈관 통합성을 감소시킨다) 및 Kim et al., *k J Biol Chem*, **277**:41888, 2002(Matrigel 플러그 분석을 사용한 바 GSK3베타 활성화는 생체내 맥관형성을 억제한다: GSK3베타 신호 전달의 억제는 모세관 형성을 향상시킨다)].

GSK-3과 헌팅턴 질환의 상관 관계가 밝혀졌다[참조: Carmichael et al., *J Biol Chem.*, **277**:33791, 2002(GSK3베타 억제는 β-카테닌의 증가 및 그와 관련된 전사 경로를 통하여 폴리-글루타민-유도되는 신경세포 및 비-신경세포 치사로부터 세포를 보호한다)]. GSK3의 과발현은 시험관내 HD 모델에서 폴리-(Q) 집합체 및 세포 치사를 모두 감소시키는 것으로 보이는 열 쇼크 전사 인자-1 및 열 쇼크 단백질 HSP70의 활성화를 감소시킨다(Bijur et al., *J Biol Chem*, **275**:7583, 2000; Wytttenbach et al., *Hum Mol Genet.*, **11**:1137, 2002).

GSK-3은 재 수초 형성하는 쥐의 뇌에서 뇌 집합체 배양물의 재 수초 형성 중에 FGF-2의 농도에 영향을 미쳐 이의 수용체가 증가한다(참조: Copelman et al., 2000, Messersmith et al., 2000; 및 Hinks 및 Franklin, 2000). 또한 FGF-2는 재

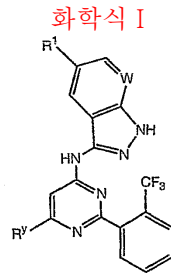
수초형성에서 FGF의 포함을 연루시키는 희돌기아교세포에 의해 성장 과정을 유도하고(Oh 및 Yong, 1996; Gogate et al., 1994), FGF-2 유전자 요법은 실험적 알레르기 뇌척수염(EAE) 생쥐의 회복을 개선시키는 것으로 보인다(Ruffini et al., 2001).

GSK-3은 Wnt/베타-카테닌 신호 전달이 모낭의 형태 발생 및 분화에서 주요한 역할을 담당하는 것으로 보이기 때문에 모발의 성장에도 관련이 있다(Kishimoto et al., Genes Dev, 14:1181, 2000; Millar, J Invest Dermatol, 118:216, 2002). 피부에서 Wnt 신호 전달의 억제제의 구조적인 과발현을 갖는 생쥐는 모낭이 성숙되지 않는다는 사실이 밝혀졌다. Wnt 신호는 모낭의 초기 성숙에 필요하며 GSK3은 베타-카테닌을 억제함으로써 Wnt 경로를 구조적으로 조절한다(Andl et al., Dev Cell 2:643, 2002). 일시적인 Wnt 신호는 상피 모낭 전구체에서 베타-카테닌 및 TCF-조절되는 유전자 전사를 활성화 시킴으로써 새로운 모발 성장 주기의 개시에 중요한 초기 자극을 제공한다(Van Mater et al., Genes Dev, 17:1219, 2003).

GSK-3 활성은 정자 운동성과 관련이 있기 때문에 GSK-3 억제제는 남성용 피임약으로서 유용하다. 소 및 원숭이의 부고환에서 정자 GSK3 활성의 쇠퇴는 정자 운동성 발달과 관련이 있는 것으로 보인다(Vijayaraghavan et al., Biol Reprod, 54:709, 1996; Smith et al., J Androl, 20:47, 1999). 또한, 황소에서 GSK3의 티로신 및 세린/트레오닌 포스포릴화는 운동성을 갖지 않는 정자에서보다 운동성을 갖는 정자에서 높다(Vijayaraghavan et al., Biol Reprod, 62:1647, 2000). 이 영향은 사람의 정자에서도 증명되었다(Loconi et al., Human Reprod, 16:1931, 2001).

GSK-3 단백질 키나아제와 관련된 대다수의 질환에 대해 현재 이용할 수 있는 치료 방법이 부족함을 고려하여, 이 단백질 표적을 억제하는 신규한 치료제가 여전히 강력히 요구되고 있다.

본 발명은 이러한 요구에 부응하여, 화학식 I의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염을 제공한다.



위의 화학식 I에서,

W, R¹ 및 R²는 아래에 정의된 바와 같다.

본 발명의 화합물은 GSK-3 활성을 억제할 수 있다. 본 발명에 따르면 이들 화합물은 GSK-3 활성을 억제하기 위한 조성물 및 방법, 및 GSK-3과 관련된 질병 및 질환을 치료 또는 경감시키는 방법에도 사용된다.

본 발명에 따라 치료될 수 있는 질병 또는 질환의 예로는 신경계 및 신경변성 질환, 당뇨병, 정신 장애, 다발성 경화증(MS), 심근 경색증, 재관류/허혈, 대머리 및 발작이 포함된다.

도면의 간단한 설명

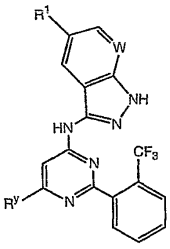
도 1은 중간 대뇌 동맥 폐쇄 모델(MCAO) 6시간 후 투여된 화학식 I의 화합물의 치료 효능을 부형제 대조군과 비교하여 총 경색 용적, 피질 경색 용적, 선조체 허혈 손상 및 부종 형성에서의 감소로서 나타낸 도면이다.

도 2는 실험 기간에 걸쳐 화학식 I의 화합물로 처리된 쥐의 신경계 기능을 부형제 대조군과 비교하여 나타낸 도면이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염을 제공한다.

화학식 I



위의 화학식 I에서,

W는 질소 또는 CH이고,

R¹은 수소 및 불소로부터 선택되며,

R^y는 N(R²)₂ 또는 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는 5원 또는 6원 포화 환으로 임의로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹(여기서, R²는 각각 독립적으로 수소 및, OH, N(R³)₂ 또는 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는 5원 또는 6원 포화 환으로 임의로 치환된 C₁₋₃ 지방족 그룹으로부터 선택되고, R³은 각각 독립적으로 수소 및 C₁₋₃ 지방족 그룹으로부터 선택된다)이고,

R¹이 수소이고 W가 CH인 경우, R^y는 메틸이 아니다.

"지방족" 또는 "지방족 그룹"이란 완전히 포화되거나 하나 이상의 불포화 단위를 함유한 직쇄 또는 분지쇄 C₁-C₄ 탄화수소 사슬, 또는 분자의 나머지 부분에 단일 결합점을 갖는, 완전히 포화되거나 하나 이상의 불포화 단위를 함유하지만 방향족이 아닌 모노사이클릭 C₃-C₄ 탄화수소(본 명세서에서 "카보사이클" 또는 "사이클로알킬"로도 일컫는다)를 의미한다. 예를 들어 적합한 지방족 그룹으로는 제한 없이 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 알케닐, 알키닐 그룹, 및 (사이클로알킬)알킬, (사이클로알케닐)알킬 또는 (사이클로알킬)알케닐과 같은 이들의 혼성체가 포함된다.

단독으로 사용되거나 보다 큰 잔기의 부분으로서 사용되는 "알킬", "알케닐" 및 "알키닐"이란 용어는 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유한 직쇄 및 분지쇄를 포함하며, 알케닐의 경우 적어도 2개의 탄소 원자와 1개의 이중 결합을, 알키닐의 경우 적어도 2개의 탄소 원자와 1개의 삼중 결합을 포함한다.

본 발명에 사용되는 화합물은 화학적으로 적합하며 안정한 화합물에 제한된다. 따라서, 상술된 화합물 내의 치환체 또는 변수의 조합은 이러한 조합이 안정하거나 화학적으로 적합한 화합물을 제공하는 경우에만 허용될 수 있다. 안정한 화합물 또는 화학적으로 적합한 화합물은 습기 또는 기타의 화학적 반응 조건의 부재 하에 40°C 이하의 온도에서 적어도 1주간 유지될 때 화학적 구조가 거의 변하지 않는 화합물이다.

당업자는 본 발명의 특정 화합물이 토오토머 형태로 존재할 수 있으며 이러한 모든 토오토머 형태의 화합물들은 본 발명의 범위에 속함을 명백히 알 것이다.

달리 언급이 없으면 본 명세서에 명시된 구조는 모든 입체화학적 형태의 구조, 즉 각각의 비대칭 중심에 대한 R 및 S 배위를 모두 포괄하는 것이다. 따라서, 본 발명의 단일 입체화학적 이성질체는 물론 에난티오머 및 디아스테레오머 혼합물도 본 발명의 범위에 속한다. 달리 언급이 없으면 본 명세서에 명시된 구조는 하나 이상의 동위원소적으로 풍부한 원자가 존재한다는 점만이 다른 화합물도 포함하는 것이다. 예를 들면, 본 발명의 구조에서 수소가 중수소 또는 3중수소로 치환되거나 탄소가 ¹³C- 또는 ¹⁴C- 풍부 탄소로 치환된 것을 제외하고는 동일한 구조의 화합물은 본 발명의 범위에 속한다.

본 발명의 화합물은 PCT 공개 WO 제02/22607호에 개시된 화합물의 부류에 속한다. 그러나, 본 출원인들은 본 발명의 화합물이 놀랍게도 허혈성 손상에 대한 신경세포의 보호 및 발작의 치료에서 예상 밖으로 높은 효능을 갖는다는 사실을 발견하였다.

본 발명의 한 가지 양태는 R^y가 치환되지 않은 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다. 화학식 I의 화합물의 바람직한 지방족 그룹은 알킬 그룹이다. 이러한 알킬 그룹은 바람직하게는 메틸, 에틸, 사이클로프로필, 3급-부틸 또는 이소프로필이다. 화학식 I의 화합물의 알킬 그룹은 더욱 바람직하게는 메틸, 사이클로프로필 및 3급-부틸이다.

한 양태에 따르면, 본 발명은 R^y가 질소, 산소 또는 황에서 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 갖는 6원의 포화된 고리로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다. 상기 6원의 포화된 고리는 모르폴리딘, 피페리딘 및 피페라지닐을 포함한다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 R^y가 N(R²)₂로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

특정 양태에서, 본 발명은 R²가 수소인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 R²가 치환되지 않은 C₁₋₃ 지방족 그룹인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

다른 양태는 R²가 OH 또는 N(R³)₂로 치환된 C₁₋₃ 지방족 그룹인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

또 다른 양태는 R²가 질소, 산소 또는 황에서 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 갖는 6원의 포화된 고리로 치환된 C₁₋₃ 지방족 그룹인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다. 상기 포화된 6원의 포화된 고리는 모르폴리닐, 피페리디닐 및 피페라지닐을 포함한다.

한 양태에 따르면, 본 발명은 W가 질소인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 W가 CH인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 R¹이 수소인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

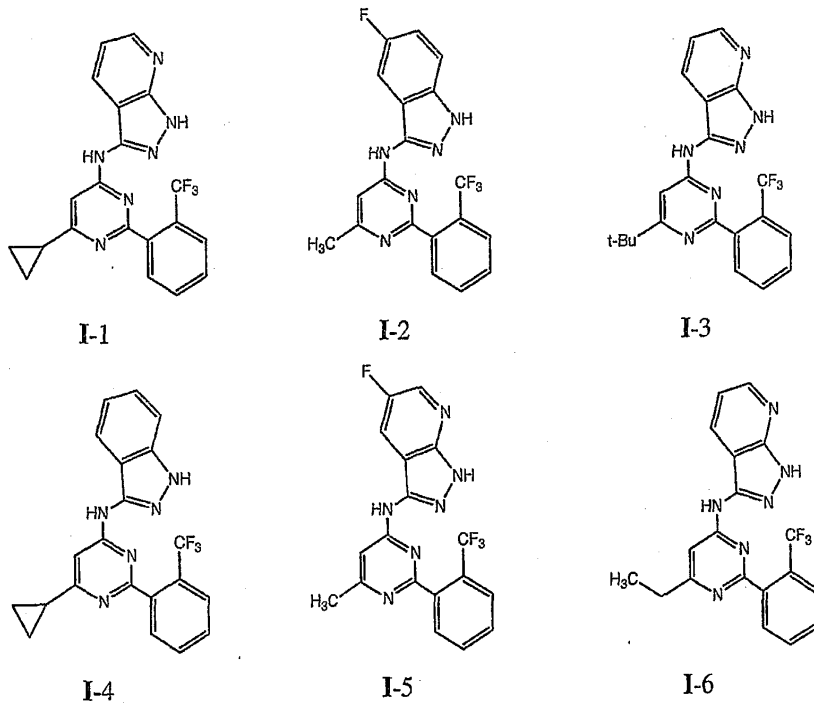
다른 양태에 따르면, 본 발명은 R¹이 불소인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

본 명세서에 설명된 양태들의 모든 조합 및 하위 조합들은 본 발명의 범위에 속하는 것으로 이해한다.

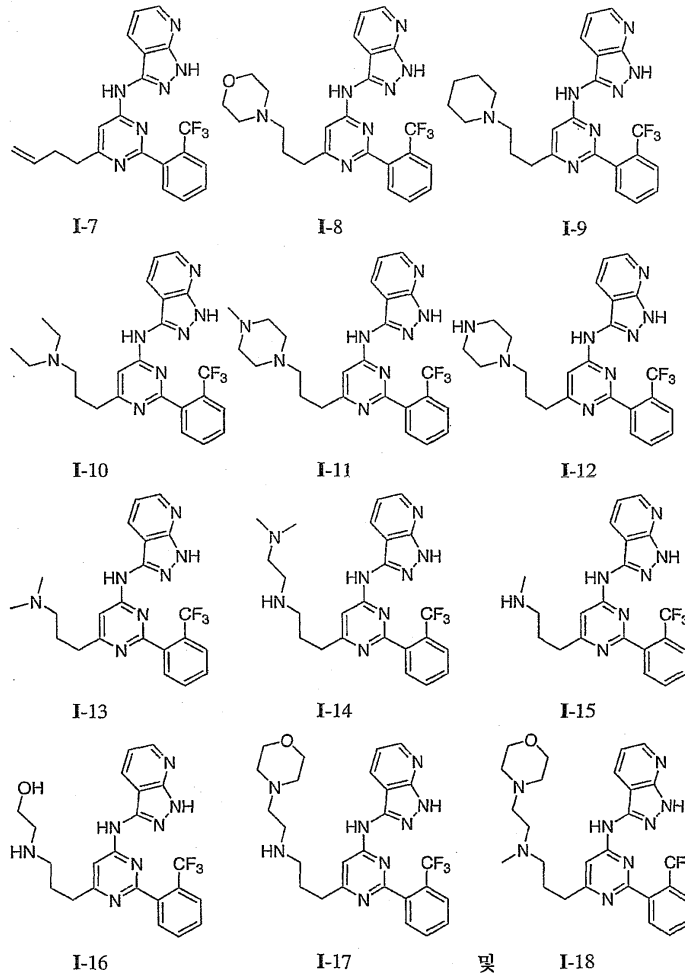
화학식 I의 화합물의 대표적인 예를 하기 표 1에 기재한다.

[표 1a]

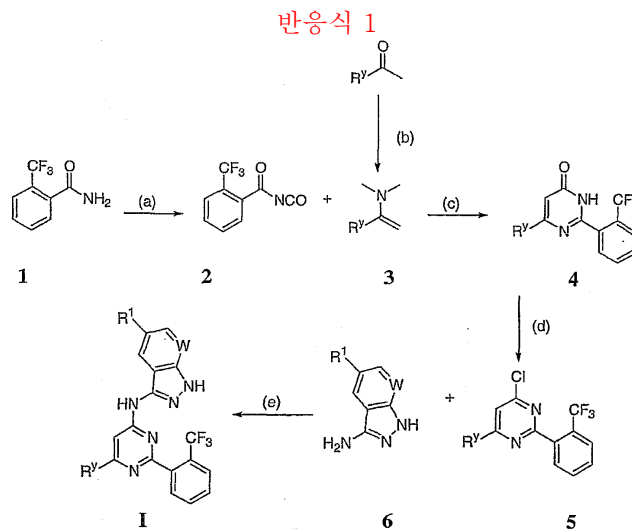
화학식 I의 화합물



[표 1b]

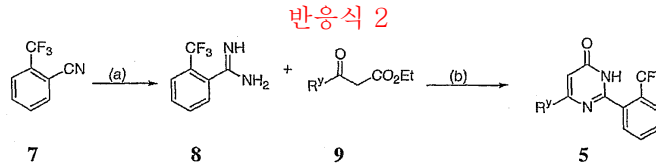


본 발명의 화합물은 반응식 1 및 2에 예시된 방법 및 당업자에게 공지된 일반적 방법으로 제조될 수 있다.



시약 및 조건: (a) 옥살릴 클로라이드, 디클로로에탄, 70°C; (b) 디메틸아민, 펜탄, TiCl₄; (c) NH₄OAc, HOAc, THF, 환류; (d) POCl₃, n-Pr₃N, 환류; (e) 160°C, 가공하지 않음.

상기 반응식 1은 본 발명의 화합물의 일반적 제조방법을 보여준다. 단계(a)에서 아릴 아미드(1)를 옥살릴 클로라이드로 처리하여 아실 이소시아네이트(2)를 형성한다. 단계(c)에서 보는 바와 같이 아실 이소시아네이트(2)를 엔아민(3)과 함께 농축하여 피리미디논(4)을 제공할 수 있다[참조: J. Org. Chem(1993), 58, 414~418; J. Med. Chem., (1992), 35, 1515~1520; J. Org. Chem., 91967, 32, 313~214]. 중간체(4)를 POCl₃로 처리하여 클로로 화합물(5)을 형성한 뒤에 아미노-인다졸 유도체(6)와 혼합하여 화학식 I의 화합물을 제공한다. 아미노-인다졸 유도체(6)의 제조방법은 당업계에 공지되어 있다. 상세하게, 이들 유도체의 합성은 국제 공개 WO 제02/22607호에 설명되어 있다.



시약 및 조건: (a) *i*LiN(TMS)₂, 에테르, THF, *ii* HCl; (b) NaOEt, EtOH, 환류.

상기 반응식 2는 반응식 1의 단계(e)에서와 같이 화학식 I의 화합물의 제조에 사용될 수 있는 피리미디논 중간체(5)의 다른 제조방법을 보여준다. 단계(a)에서 아릴 니트릴(7)을 벤즈아미딘 중간체(8)로 만든 후 베타-케토 에스테르(9)로 처리하여 상술한 바와 같이 사용할 수 있는 피리미디논 화합물(5)을 형성한다.

당업자는 시판 중이거나 용이하게 합성할 수 있는 시약을 사용하여 본 명세서에 설명된 대로 본 발명의 기타의 화합물들을 합성할 수 있다.

본 발명에 유용한 화합물의 GSK-3의 억제제로서의 활성을 시험관내, 생체내 또는 세포주에서 분석할 수 있다. 시험관내 분석은 활성화된 GSK-3의 포스포릴화 활성 또는 ATPase 활성의 억제를 측정하는 분석을 포함한다. 다른 시험관내 분석은 GSK-3에 결합하는 억제제의 능력을 평가한다. 억제제 결합은 억제제를 결합 전에 방사능 표지화하고, 억제제/GSK-3 착물을 단리하고, 결합된 방사능 표지의 양을 측정함으로써 측정할 수 있다. 다른 방법으로, 억제제 결합은 새로운 억제제를 공지된 방사선 리간드에 결합된 GSK-3과 함께 배양하는 경쟁 실험을 수행함으로써 측정할 수 있다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염 및 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 또는 부형제를 함유하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물 중의 화합물의 양은 생물학적 시료 또는 환자에서 단백질 키나아제, 특히 GSK-3을 검출 가능한 수준으로 억제하는데 효과적인 양이다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 이러한 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여되도록 제형화된다. 가장 바람직하게, 본 발명의 조성물은 환자에게 경구 투여되도록 제형화된다.

"환자"란 동물, 바람직하게는 포유 동물, 가장 바람직하게는 사람을 의미한다.

"약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 또는 부형제"란 함께 제형화되는 화합물의 약리적 활성을 파괴하지 않는 비독성의 담체, 보조제 또는 부형제를 의미한다. 본 발명의 조성물에 사용 가능한 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 또는 부형제는 제한됨 없이 이온 교환제, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예: 사람 혈청 알부민), 완충 물질, 예를 들면 포스페이트, 글리신, 소르브산, 포타슘 소르베이트, 포화된 식물성 지방산의 부분적 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들면 프로타민 설페이트, 디소듐 히드로젠 포스페이트, 포타슘 히드로젠 포스페이트, 소듐 클로라이드, 아연 염, 콜라이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스-기재 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양털 지방을 포함한다.

"검출 가능한 수준으로 억제한다"함은 상기 조성물 및 GSK-3 키나아제를 함유한 시료와, 상기 조성물은 함유하지 않고 GSK-3 키나아제를 함유한 대등한 시료 사이에서 GSK-3 활성의 측정 가능한 변화가 나타남을 의미한다.

"약제학적으로 허용되는 염"이란 수용자에 투여되었을 때 본 발명의 화합물 또는 억제적 활성의 대사 산물 또는 그 잔류물을 직접 또는 간접적으로 제공할 수 있는 본 발명의 화합물의 비독성 염, 에스테르, 에스테르의 염 또는 기타의 유도체를 의미한다.

"억제적 활성의 대사 산물 또는 그 잔류물"이란 본 발명의 화합물의 대사 산물 또는 그 잔류물도 역시 GSK-3 키나아제의 억제제임을 의미한다.

본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염은 약제학적으로 허용되는 무기 및 유기 산 및 염기로부터 유래된 염을 포함한다. 적합한 산 염의 예는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 비실페이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 글리콜레이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 2-히드록시에탄설포네이트, 락테이트, 말레이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 옥살레이트, 팔모에이트, 펙티네이트, 퍼실페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 살리실레이트

트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 토실레이트 및 운데카노에이트를 포함한다. 옥살산과 같은 다른 산도 그 자체는 약제학적으로 허용되지 않지만 본 발명의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 산 부가염을 수득함에 있어 중간체로서 유용한 염의 제조에 사용 가능하다.

적합한 염기로부터 유래된 염은 알칼리 금속(예: 나트륨 및 칼륨), 알칼리 토금속(예: 마그네슘), 암모늄 및 N+(Cl-4 알킬)4 염을 포함한다. 본 발명은 본 명세서에 기재된 화합물의 염기성 질소-함유 그룹의 4차화도 계획한다. 물 또는 오일 용해성 또는 분산성 생성물은 이러한 4차화에 의해 얻을 수 있다.

본 발명의 조성물은 경구, 비경구, 흡입 분무, 국소, 직장, 비강, 구강, 질 또는 이식된 저장소를 통해 투여될 수 있다. "비경구"란 피하, 정맥내, 근육내, 동맥내, 활막내, 흉골내, 포막내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 본 발명의 조성물의 무균 주사 형태는 수성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이들 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 무균 주사형 제제는 비경구적으로 허용되는 비독성의 희석제 또는 용매, 예를 들면 1,3-부탄디올 중의 무균 주사 용액 또는 현탁액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용 가능한 부형제 및 용매로는 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 추가로, 무균의 불휘발성 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다.

이 목적을 위하여, 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 포함하는 불휘발성 배합 오일을 사용할 수 있다. 올레산과 같은 지방산 및 이의 글리세리드 유도체는 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예: 올리브유 또는 피마자유)과 같이 특히 이의 폴리옥시에틸화된 형태에서 주사형 제제에 유용하다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 장쇄 알코올 희석제 또는 분산제, 예를 들면 유화액 및 현탁액을 포함한 약제학적으로 허용되는 투여 형태의 제형화에 통상적으로 사용되는 카복시메틸 셀룰로오스 또는 유사한 분산제를 함유할 수도 있다. Tween, Span과 같은 통상 사용되는 기타의 계면 활성제, 및 약제학적으로 허용되는 고체, 액체 또는 기타의 투여 형태의 제조에 통상 사용되는 기타의 유화제 또는 생체이용 가능한 증진제도 제형화 목적에 사용될 수 있다.

본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 제한됨 없이 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액을 포함하는 경구적으로 허용되는 투여 형태로 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 통상적으로 사용되는 담체는 락토오스 및 옥수수 전분을 포함한다. 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제도 전형적으로 첨가된다. 캡슐 형태로 경구 투여하기 위하여 유용한 희석제로는 락토오스 및 건조된 옥수수 전분이 포함된다. 경구 용도로 수성 현탁액이 필요한 경우에는 활성 성분을 유화제 및 현탁제와 혼합한다. 필요에 따라 특정 감미제, 풍미제 또는 착색제도 첨가할 수 있다.

달리, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 직장 투여를 위한 좌약 형태로 투여될 수 있다. 이들은 약제를, 실온에서는 고체이지만 직장 온도에서는 액체여서 직장 내에서 용융되어 약물을 방출시키는 적합한 비자극성 부형제와 혼합하여 제조할 수 있다. 이러한 재료는 코코아 버터, 밀납 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 특히 눈, 피부 또는 저위 장관의 질환과 같이 치료의 표적이 국소적 적용에 의해 쉽게 접근이 가능한 부위 또는 기관을 포함하는 경우에는 국소 투여될 수도 있다. 적합한 국소 제형은 이들 각각의 부위 또는 기관에 적합하도록 쉽게 제조된다.

저위 장관을 위한 국소 투여는 직장 좌약 제형(상기 참조) 또는 적합한 관장 제형으로 이루어질 수 있다. 국소적 경피 패치도 사용 가능하다.

국소 투여되기 위하여, 약제학적으로 허용되는 조성물은 1종 이상의 담체에 현탁 또는 용해된 활성 성분을 함유하는 적합한 연고로 제형화될 수 있다. 본 발명의 화합물의 국소 투여를 위한 담체로는 제한됨 없이 광물유, 액체 바세린, 백색 바세린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화제 왁스 및 물이 포함된다. 다른 방법으로, 약제학적으로 허용되는 조성물은 약제학적으로 허용되는 1종 이상의 담체에 현탁 또는 용해된 활성 성분을 함유하는 적합한 로션 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 적합한 담체로는 제한됨 없이 광물유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물이 포함된다.

안약 용도로서, 약제학적으로 허용되는 조성물은 벤질알코올 클로라이드와 같은 방부제를 함유하거나 함유하지 않는 pH 조정된 등장성 무균 염수 중의 미분된 현탁액, 또는 바람직하게는 pH 조정된 등장성 무균 염수 중의 용액으로서 제형화될 수 있다. 달리, 안약 용도로서 약제학적으로 허용되는 조성물은 바세린과 같은 연고로 제형화될 수 있다.

본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 비강 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수도 있다. 이러한 조성물은 잘 알려진 약제학적 제형화 기술에 따라 제조되며, 벤질 알코올 또는 기타의 적합한 방부제, 생체 이용률을 높이기 위한 흡수 증진제, 플루오로카본 및/또는 다른 통상의 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수 중의 용액으로서 제조될 수 있다.

가장 바람직하게, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 경구 투여용으로 제형화된다.

단일 투여 형태의 조성물을 제조하기 위해 담체 재료와 혼합될 수 있는 본 발명의 화합물의 양은 처리되는 숙주 및 특정한 투여 형태에 따라 달라질 것이다. 바람직하게, 조성물은 0.01 내지 100mg/kg(체중)/1일의 억제제가 환자에 투여될 수 있도록 제형화될 것이다.

특정한 환자를 위한 특정한 투여량 및 치료 요법은 사용되는 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적 건강, 성 관계, 다이어트, 투여 시간, 방출 속도, 약물 배합, 의사의 판단 및 치료되는 특정 질환의 정도를 포함한 여러 가지 인자에 따라 달라질 것이다. 조성물 중의 본 발명의 화합물의 양은 조성물 중의 특정 화합물에 따라 달라질 것이다.

치료 또는 예방하고자 하는 특정한 질환 또는 질병에 따라서, 그 질환을 치료 또는 예방하는 데에 보통 투여되는 추가의 치료제도 본 발명의 조성물 중에 존재할 수 있다.

예를 들면, 신경계 또는 신경변성 질환을 치료하기 위한 항신경성 인자 또는 기타의 약제를 본 발명의 화합물과 병용하여 신경계 및 신경변성 질환을 치료할 수 있다. 공지된 항신경성 인자의 예로는 아세틸콜린에스테라제 억제제, MAO 억제제, 인터페론, 항경련제, 이온 채널 차단제, 탈루졸 및 항파킨슨제가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

공지된 발작 치료제의 예로는 악티바제(Activase)^R, 재조합 또는 유전 공학적 조직 플라스미노겐 촉진제(rt-PA), 헤파린, 글루타메이트 길항제, 칼슘 길항제, 마약 길항제, GABA 작용제 및 항산화제가 포함된다.

본 발명의 화합물과 병용 가능한 다른 약제의 예로는 제한 없이 Zoloft^R, Prozac^R, Paxil^R 및 Buspar^R와 같은 항우울증제; 코르티코스테로이드, TNF 차단제, IL-1 RA, 아자티오프린, 사이클로포스파미드 및 설과살라진과 같은 항염증제; 사이클로스포린, 타크롤리무스, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 인터페론, 코르티코스테로이드, 사이클로포스파미드, 아자티오프린 및 설과살라진과 같은 면역조절제 및 면역억제제; 아세틸콜린에스테라제 억제제, MAO 억제제, 인터페론, 항경련제, 이온 채널 차단제, 탈루졸 및 항파킨슨제와 같은 항신경성 인자; 베타-차단제, ACE 억제제, 이노제, 니트레이트, 칼슘 채널 차단제 및 스타틴과 같은 심혈관 질환 치료제; 인슐린, 인슐린 동족체, 알파 글루코시다제 억제제, 비구아니드, 및 인슐린 감광제와 같은 당뇨병 치료제; 및 감마 글로불린과 같은 면역 결핍증 치료제가 포함된다.

본 발명의 구성물에 존재하는 추가의 치료제의 양은 그 치료제를 유일한 활성제로서 함유하는 구성물 중에 보통 존재하는 양보다 많지 않을 것이다. 바람직하게, 본 발명의 구성물 중의 추가의 치료제의 양은 그 치료제를 유일한 치료적 활성제로서 함유하는 구성물 중에 보통 존재하는 양의 약 50% 내지 100% 범위일 것이다.

다른 양태에 따르면, 본 발명의 구성물은 알츠하이머 질환(AD) 치료제, 파킨슨 질환 치료제, 다발성 경화증(MS) 치료제, 천식 치료제, 항염증제, 면역 조절제 또는 면역 억제제, 항신경성 인자, 발작 치료제, 심혈관 질환 치료제, 항우울증제, 항정신병제 또는 당뇨병 치료제로부터 선택되는, 치료하고자 하는 질환에 적합한 추가의 치료제를 상기 구성물과 함께 단일 투여 형태로서 또는 상기 구성물과 별도로 다중 투여 형태의 일부로서 환자에 투여하는 방법에 관한 것이다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 생물학적 샘플을 본 발명의 화합물 또는 이들 화합물을 함유한 구성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 GSK-3 키나아제 활성을 억제하는 방법에 관한 것이다.

"생물학적 샘플"이란 세포 배양물 또는 이의 추출물; 포유 동물에서 얻은 생검 물질 및 이의 추출물; 및 혈액, 타액, 뇨, 분, 정액, 땀 또는 기타의 체액 또는 이의 추출물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

생물학적 시료에서의 GSK-3 키나아제 활성의 억제는 당업자에게 공지된 여러 가지 목적에 유용하다. 이러한 목적의 예로는 수혈, 기관 이식, 생물학적 표본 보관 및 생물학적 분석이 포함되지만 이에 제한되는 것은 아니다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 이들 화합물을 함유한 구성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 GSK-3 키나아제 활성을 억제하는 방법에 관한 것이다.

또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 이들 화합물을 함유한 구성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 GSK-3-매개된 질환 또는 질병을 치료 또는 경감시키는 방법을 제공한다.

"GSK-3-매개된 질환"이란 GSK-3이 작용하는 것으로 알려진 질환 또는 기타의 유독한 상태 또는 질병을 의미한다. 이러한 질환 또는 질병으로는 자가 면역 질환, 염증성 질환, 대사성 질환, 정신 질환, 당뇨병, 맥관형성 질환, 타우오포시(tauopathy), 신경계 및 신경변성 장애, 척수 손상, 녹내장, 대머리 또는 심혈관 질환을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

다른 양태에 따르면, 본 발명은 자가면역 질환, 염증 질환, 대사 질환, 정신 질환, 당뇨병, 맥관형성 질환, 타우오포시, 신경계 및 신경변성 장애, 척수 손상, 녹내장, 대머리 또는 심혈관 질환의 치료 또는 경감을 필요로 하는 환자에게 본 발명의 화합물 또는 이의 구성물을 투여함을 포함하는, 상기 질환을 치료 또는 경감하는 방법에 관한 것이다.

또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 알러지, 천식, 당뇨병, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환, 파킨슨 질환, AIDS-관련 치매, 근위축성 경화증(ALS, 루게릭병), 다발성 경화증(MS), 두부 외상으로 인한 손상, 정신분열증, 불안증, 양극성 장애, 타우오포시, 척수 또는 말초 신경 손상, 심근 경색증, 심근 비대증, 녹내장, 주의력 결핍 장애(ADD), 우울증, 수면 장애, 재관류/허혈, 발작, 맥관형성 질환 또는 대머리로부터 선택되는 질환 또는 질병의 치료 또는 경감을 필요로 하는 환자에게 본 발명의 화합물 또는 이의 구성물을 투여함을 포함하는, 상기 질환을 치료 또는 경감시키는 방법에 관한 것이다.

바람직한 양태에 따르면, 본 발명의 방법은 발작을 치료 또는 경감시키는 방법에 관한 것이다.

다른 바람직한 양태에 따르면, 본 발명의 방법은 신경변성 또는 신경계 질환을 치료 또는 경감시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 양태는 남성 환자에게 본 발명의 화합물 또는 구성물을 투여함을 포함하는, 남성 환자의 정자 운동성을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

다른 양태에서, 추가의 치료제를 함유하지 않는 구성물을 사용하는 본 발명의 방법은 상기 환자에게 추가의 치료제를 별도로 투여하는 단계를 포함한다. 이들 추가의 치료제를 따로 투여하는 경우에는 본 발명의 구성물을 투여하기 전에, 혹은 본 발명의 구성물과 함께 연속적으로, 혹은 본 발명의 구성물을 투여한 후에 투여한다.

본 명세서에 설명된 본 발명은 더욱 충분히 이해하기 위하여 하기 실시예를 설명하겠다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이며 어떤 식으로든 본 발명을 제한하지 않음을 이해해야 한다.

실시예

본원에서 사용되는 바와 같이, "방법 A"로서 명시된 HPLC법은 다음과 같다:

컬럼 : C18, 3um, 2.1 × 50mm, 존슨 크로마토그래피에 의한 "조명"

구배 : 4.0분에 걸쳐 100% 물(1% 아세트니트릴, 0.1% TFA 함유) 내지 100% 아세트니트릴(0.1% TFA 함유), 100% 아세트니트릴에서 1.4분 동안 유지시킨 다음 초기 상태로 되돌림

총 수행 시간 : 7.0분

유량 : 0.8ml/분

본원에서 사용되는 "R_t"라는 용어는 명시한 HPLC 법을 사용하여 화합물에 대해 입수한 체류시간(분)을 나타낸다. 하기 실시예에 기재된 화합물 번호는 표 1에 기재된 화합물 번호에 상응한다.

실시예 1

6-메틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온 : 에탄올(20ml) 중의 2-트리플루오로메틸-벤즈아미딘(2.13g, 4mmol)과 나트륨 에톡사이드(0.83g, 12mmol)와의 혼합물을 메틸 아세트아세테이트(0.44ml, 4mmol)로 처리하여 24시간 동안 가열한다. 반응물을 냉각시키고 농축시켜 물로 희석시키고 2N 염산으로 산성화시킨다. 생성된 용액을 에틸 아세테이트로 추출하고 황산나트륨으로 건조시켜 농축시킨다. 섬광 크로마토그래피[SiO₂, 메탄올:디클로로메탄(3:97)]로 정제하여 표제 화합물(0.51g, 수율 50%)을 황색 고체로서 수득한다; ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 12.7 (br s, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.8 (m, 2H), 7.7 (m, 1H), 6.3 (s, 1H), 2.21 (s, 3H) ppm; MS (FIA) 255.0 (M+H) ; R_t (방법 A) 2.578분.

실시예 2

4-클로로-6-메틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘 : 옥시염화인(39ml, 419mmol) 중의 6-메틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온(10.7g, 41.9mmol)의 용액을 트리-n-프로필아민(16ml, 83.9mmol)으로 처리하여 110 내지 120°C에서 1시간 동안 환류시킨다. 용매를 증발시키고 톨루엔으로 2회 공비화시킨 다음 진공에서 건조시킨다. 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고, 1N 수산화나트륨, 물 및 염수로 차례로 세척한 다음 황산나트륨으로 건조시키고 농축시킨다. 섬광 크로마토그래피[SiO₂, 에틸 아세테이트:헥산(1:9)]로 정제하여 표제 화합물(9.61g, 수율 84%)을 오렌지색 오일로서 수득한다. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 2.63 (3H, s), 7.26 (s, 1H), 7.61 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.67 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.76 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.82 (d, J=7.8Hz, 1H) ppm; MS (FIA) 273.0 (M+H); R_t (방법 A) 3.499분.

실시예 3

(5-플루오로-1H-인다졸-3일)[6-메틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]아민(I-2) : 4-클로로-6-메틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘(0.10g, 0.37mmol)과 5-플루오로-1H-인다졸E-3-일아민(0.072g, 0.48mmol)의 혼합물을 대략 160 내지 170°C에서 8시간 동안 가열한다. 생성된 잔류물을 주위 온도로 냉각시킨 다음 N-메틸-피롤리디논(2ml)에 용해시킨다. 이들 혼합물을 물(20ml)에 붓고 중탄산나트륨(5ml)을 가하여 생성된 혼합물을 여과하고 물로 세척한다. 예비 HPLC로 정제하여 표제 화합물(0.081g, 수율 43%)을 갈색 고체로서 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 12.8 (br s, 1H), 10.6 (br s, 1H), 7.86 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.77 (m, 4H), 7.62 (br s, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 2.44 (s, 3H) ppm; LC-MS 388.05 (M+H) ; R_t (방법 A) 2.900분.

실시예 4

6-3급 부틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온 : 에탄올(50ml) 중의 2-트리플루오로메틸벤즈아미딘(1.12g, 5mmol), 나트륨 에톡사이드(1.02g, 15mmol) 및 4,4-디메틸-3-옥소-펜탄산 메틸 에스테르(0.80ml, 5mmol)의 혼합물을 16시간 동안 환류하여 가열한다. 반응물을 냉각시키고 농축하여 희석시킨 다음 2N 염산으로 산성화시킨다. 이들 용액을 에틸 아세테이트로 추출하고 황산나트륨으로 건조시켜 농축시킨다. 섬광 크로마토그래피[SiO₂, 메탄올:디클로로메탄(2:98)]로 정제하여 표제 화합물(0.48g, 수율 32%)을 황색 고체로서 수득한다 ; ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 12.8 (br s, 1H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.71 (d, J=7.4Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 1.20 (s, 9H) ppm; LC-MS 297.03 (M+H) ; R_t (방법 A) 3.30분.

실시예 5

6-3급 부틸-6-클로로-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘 : 옥시염화인(1.65ml, 15.9mmol) 중의 6-3급 부틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온(0.47g, 1.59mmol)의 용액을 트리-n-프로필아민(0.61ml, 3.17mmol)으로 처리하여 110 내지 120°C에서 1시간 동안 가열한다. 증발에 의해 용매를 제거한 다음 톨루엔으로 3회 공비화시킨다. 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고 1N 수산화나트륨, 물 및 염수로 차례로 세척한 다음 황산나트륨으로 건조시키고 농축시킨다. 섬광 크로마토그래피 [SiO₂, 에틸 아세테이트:헥산(1:9)]로 정제하여 표제 화합물(0.33g, 수율 66%)을 황색 오일로서 수득한다. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 1.31 (9H, s), 7.25 (s, 1H), 7.51 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.58 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.74 (t, J=8.5HZ, 2H) ppm; MS (FIA) 314.9 (M+ H); R_f (방법 A) 4.156분.

실시예 6

[6-3급 부틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-3) : 4-클로로-6-3급 부틸-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘(0.10g, 0.32mmol)과 1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일아민(0.064g, 0.48mmol)의 혼합물을 대략 160 내지 170°C에서 16시간 동안 가열한다. 생성된 잔류물을 냉각시키고 N-메틸-피롤리디논(2ml)에 용해시킨 다음 물(20ml)과 중탄산나트륨(5ml)에 부어 에틸 아세테이트로 2회 추출한다. 합한 유기층을 물로 4회 세척하고 염수로 1회 세척한 다음 황산나트륨으로 건조시키고 농축시킨다. 조 생성물을 예비 HPLC로 정제하여 표제 화합물(0.007g, 수율 4%)을 황색 고체로서 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (br s, 1H), 10.6 (br s, 1H), 8.49 (m, 2H), 7.84 (d, J=7.8HZ, 2H), 7.76 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 1.32 (s, 9H) ppm; LC-MS 413.08 (M+ H) ; R_f (방법 A) 3.112분.

실시예 7

6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온:

·(1-사이클로프로필-비닐)-디메틸아민:

질소하에 0°C에서 펜탄(600ml) 중의 사이클로프로필 메틸케톤(19.8ml, 200mmol)의 용액에 디메틸아민/테트라하이드로푸란(2M, 500ml, 1000mmol)을 가한 다음 펜탄(600ml) 중의 염화티탄(IV)(12.1ml, 110mmol)의 용액을 적가한다. 반응물을 0°C에서 0.5시간 동안 교반한 다음 실온에서 5시간 동안 교반한다. 반응물을 셀라이트를 통해 여과하고 펜탄과 에테르로 세척하여 15 내지 20°C의 수욕 온도에서 진공하에 농축시킨 다음 밤새 -4°C에서 오렌지색 오일로서 저장한다.

·2-트리플루오로메틸벤조일 이소시아네이트:

질소하에 실온에서 1,2-디클로로에탄(600ml) 중의 2-트리플루오로메틸벤즈아미드(34.9g, 185mmol)의 용액을 신속하게 적하하면서 옥살릴 클로라이드(20.2ml, 230mmol)로 처리하여 반응물을 70 내지 80°C에서 밤새 교반한다. 용매를 증발시켜 제거하고, 잔류물을 톨루엔으로 2회 공비화시킨다.

·6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘4-온:

질소하에 0°C에서 테트라하이드로푸란(400ml) 중의 (1-사이클로프로필-비닐)-디메틸아민의 용액에 테트라하이드로푸란(50ml) 중의 2-트리플루오로메틸벤조일 이소시아네이트의 용액을 적가한다. 반응물을 0.5시간 동안 교반한 다음 암모늄 아세테이트(78g, 1000mmol)와 아세트산(400ml)을 가한다. 반응 혼합물을 3시간 동안 환류하에 가열하면서 테트라하이드로푸란을 연속 제거한 다음 냉각시켜 물(1.2l)에 붓는다. 생성된 침전물을 여과하여 수집하고, 물과 에테르로 세척하여, 표제 화합물과 (2-트리플루오로메틸-벤조일)-우레아(HPLC에 의해 91:9)의 혼합물인 6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온(28.79g, 수율 56%)을 백색 고체로서 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 12.7 (br s, 1H), 7.87 (d, J=7.6HZ, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.73 (d, J=7.5Hz, 1H), 6.32 (s, 1H), 1.93 (m, 1H), 0.90 (m, 4H), [우레아 : 10.8 (br s, 1H), 7.45 (br s, 1H)] ppm; LC-MS 280.96 (M+ H); R_f (방법 A) 2.961분(표제 화합물), 2.313분(우레아 불순물).

실시예 8

4-클로로-6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘: 옥시염화인 (40ml, 428mmol) 중의 6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온(12.0g, 42.8mmol)을 75 내지 80°C에서 1시간 동안 가열한다. 용매를 증발시켜 제거하고 톨루엔으로 3회 공비화시킨다. 잔류물을 0°C로 냉각시키고 에틸 아세테이트에 용해시켜 얼음 조각과 물로 처리한다. 이어서, 혼합물을 중탄산나트륨, 물 및 염수로 차례로 세척하여 황산나트륨으로 건조시키고 농축시킨다. 섬광 크로마토그래피 [SiO₂, 5:95 에틸 아세테이트:헥산(5:95)]로 정제하여 표제 화합물(9.71g, 수율 76%)을 무색 오일로서 수득한다. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 1.12 (m, 2H), 1.30 (m, 2H), 2.02 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.56 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.64 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.79 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 299.1/300.9 (M+ H); R_f (방법 A) 3.882분.

실시예 9

[6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-(1H-인다졸-3-일)-아민(1-4): 4-클로로-6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘(0.08g, 0.27mmol)과 1H-인다졸-3-일아민(0.036g, 0.41mmol)의 혼합물을 대략 160 내지 170°C에서 6시간 동안 가열한다. 잔류물을 냉각시키고 N-메틸-피롤리디논(2ml)에 용해시켜 물(30ml)과 중탄산나트륨(5ml)에 부은 다음 여과시켜 물과 에테르로 세척한다. 수집한 침전물과 에테르 세척

물을 합하여 농축시킨다. 섬광 크로마토그래피 [SiO₂, 메탄올:디클로로메탄(2:98)]로 정제하여 표제 화합물(0.017g, 수율 15%)을 담황색 고체로서 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 12.6 (br s, 1H), 10.2 (br s, 1H), 8.00 (d, J=8.1HZ, 2H), 7.81 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.71 (m, 3H), 7.65 (t, J=7.3HZ, 1H), 7.45 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.36 (t, J=7.5HZ, 1H), 7.06 (t, J=7.5Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.01 (m, 2H), 0.96 (m, 2H) ppm; LC-MS 396.10 (M+H); R_t (방법 A) 3.122분.

실시에 10

[6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-1) : N-메틸피롤리딘(50ml) 중의 4-클로로-6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘(7.00g, 23.4mmol, 실시예 8에 기재된 바와 같이 제조함)과 1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일아민(9.43g, 70.3mmol)의 혼합물을 130°C에서 12시간 동안 가열한다. 잔류물을 냉각시켜 N-메틸-피롤리딘(2ml)에 용해시켜 물(500ml)과 중탄산나트륨(15ml)에 부은 다음 여과하여 물로 세척한다. 섬광 크로마토그래피 [SiO₂, 에틸 아세테이트:헥산(35:65)]로 정제하여 표제 화합물(5.25g, 수율 57%)을 백색 고체로서 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.1 (br s, 1H), 10.5 (br s, 1H), 8.50 (m, 2H), 7.82 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.73 (m, 3H), 7.66 (t, J=7.7Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.02 (m, 2H), 0.97 (m, 2H) ppm; LC-MS 397.22 (M+H); R_t (방법 A) 3.412분.

실시에 11

[6-사이클로프로필-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민, 하이드로클로라이드 염:

화합물 I-1(8.42g, 21.4mmol)을 6N 염산에 용해시키고 동결건조시켜 표제 화합물(9.242g, 99%)을 황색 고체로서 수득함으로써 HCL염을 제조한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.3 (br s, 1H), 10.9 (br s, 1H), 8.53 (dd, J=4.4, 1.4Hz, 1H), 8.48 (br d, J=7.4Hz, 1H), 7.87 (d, J=7.8HZ, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.72 (t, J=6.8Hz, 2H), 7.15 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.07 (m, 4H) ppm; MS (FIA) 397.3 (M+H), 395.2 (M-H), 431.2 (M-H+HC1); R_t (방법 A) 2.798분.

실시에 12

6-부트-3-에닐-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온: 3-옥소-헵트-6-엔산 에틸 에스테르를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 바와 같이 6-부트-3-에닐-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘4-온을 제조한다. 반응으로 표제 화합물(2.545g, 수율 49%)이 크림색 고체로서 수득된다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 12.8 (s, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.79 (t, 1H), 7.75 (t, 1H), 7.68 (d, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.03 (dd, 1H), 4.98 (dd, 1H), 2.56 (t, 2H), 2.36 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 295.1 (M+H); R_t (방법 A) 3.160분.

실시에 13

4-부트-3-에닐-6-클로로-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘: 6-부트-3-에닐-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-3H-피리미딘-4-온을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 2에 기재된 바와 같이 표제 화합물을 제조하여 황색 오일(0.49g, 수율 99%)을 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 7.72 (d, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.51 (t, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.77 (m, 1H), 4.98 (m, 2H), 2.84 (t, 2H), 2.49 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 313.0 (M+H); R_t (방법 A) 4.220분.

실시에 14

[6-부트-3-에닐-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-7): 4-부트-3-에닐-6-클로로-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 6에 기재된 바와 같이 표제 화합물을 제조하여 크림색 고체(2.712g, 수율 62%)를 수득한다. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.1 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.84 (d, 1H), 7.76 (t, 1H), 7.69 (m, 3H), 7.13 (m, 1H), 5.86 (m, 1H), 5.06 (dd, 1H), 4.98 (dd, 1H), 2.76 (t, 2H), 2.46 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 411.2 (M+H); R_t (방법 A) 3.019분.

실시에 15

[6-(3-모르폴린-4-일-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(1-8): -78°C에서 메탄올(5ml)과 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 [6-부트-3-에닐-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(0.10g, 0.25mmol)의 용액을 오존을 통해 5분 동안 버블링시킨다. 이들 혼합물에 모르폴린(0.05ml, 0.56mmol)과 수소화트리아세톡시붕소나트륨(0.39g, 1.85mmol)을 가한다. 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반한 다음 추가의 모르폴린(0.10ml, 1.28mmol)과 수소화트리아세톡시붕소나트륨(0.39g, 1.85mmol)을 가하여 2시간 동안 계속 교반한다. 중탄산나트륨으로 반응을 급냉시켜 증발시킨다. 섬광 크로마토그래피 (SiO₂, 1:9 메탄올:디클로로메탄으로 용출시킴)한 다음 예비 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 담황색 동결건조물(0.068g, 수율 38%)로서 수득한다. 484.3 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.60 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.86 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.97 (br m, 2H), 3.61 (br m, 2H), 3.44 (br m, 2H), 3.18 (br m, 2H), 3.05 (br m, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.08 (m, 2H) ppm.

실시예 16

다음의 화합물은 실시예 1 내지 15에 기재된 바와 실질적으로 유사한 방법, 일반적인 반응식 및 당해 기술분야의 통상의 숙련자들에게 공지되어 있는 방법으로 제조한다.

[6-(3-피페리딘-1-일-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-9): 482.2 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.04 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.10 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.09 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.61 (m, 3H), 1.35 (M, 1H) ppm.

[6-(3-디에틸아미노-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-10): 470 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.11 (m, 6H), 2.80 (t, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.15 (t, 6H) ppm.

[6-(3-(4-메틸-피페라진-1-일)-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-11): 497.2 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (m, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.72 (m, 3H), 7.14 (m, 1H), 3.0-3.7 (br, 10H), 2.83 (s, 3H), 2.77 (t, 2H), 2.05 (m, 2H) ppm.

[6-(3-피페라진-1-일-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-12): 483.3 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.06 (br s, 2H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (M, 1H), 3.34 (br m, 8H), 3.15 (br m, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.06 (m, 2H) ppm.

[6-(3-디메틸아미노-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-13): 442.1(M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.40 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.77 (m, 8H), 2.06 (m, 2H) ppm.

N,N-디메틸-N'-{3-[6-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일-아미노)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-4-일]-프로필}-에탄-1,2-디아민(I-14): 485.3 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.7 (br, 1H), 8.8 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.71 (m, 2H) 7.14 (m, 1H), 3.32 (s, 4H), 3.07 (br m, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.80 (m, 2H), 2.04 (m, 2H) ppm.

[6-(3-메틸아미노-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H- 피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-15): 428.1 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.51 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 8.37 (br s, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.55 (m, 3H), 2.01 (m, 2H) ppm.

2-{3-[6-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일아미노)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)-피리미딘-일] 프로필아미노}-에탄올(I-16): 458.2 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (m, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.62 (t, 2H), 2.99 (m, 4H), 2.78 (t, 2H), 2.04 (m, 2H) ppm.

[6-(3-(2-모르폴린-4-일-에틸아미노)-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-17): 527.2 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.76 (br s, 2H), 8.52 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.81 (br S, 4H), 3.1-3.3 (br m, 8H), 3.06 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 2.05 (t, 2H) ppm.

[6-(3-[메틸-(2-모르폴린-4-일-에틸)-아미노]-프로필)-2-(2-트리플루오로메틸-페닐)피리미딘-4-일]-(1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-3-일)-아민(I-18): 541.2 (M+H). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.73 (br s, 4H), 3.39 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 2.8-3.3 (br m, 6H) 2.81 (s, 3H), 2.78 (t, 2H), 2.09 (m, 2H) ppm.

실시예 17

GSK-3의 억제에 대한 K_i 측정

화합물에 대해, 표준 커플링된 효소 시스템을 사용하여 GSK-3β(AA 1-420) 활성을 억제하는 능력을 선별하였다(문헌 참조; Fox et al. (1998) Protein Sci. 7, 2249). 반응은 100mM HEPES(pH 7.5), 10mM MgCl₂, 25mM NaCl, 300μM NADH, 1mM DTT 및 1.5% DMSO를 함유하는 용액 속에서 수행하였다. 분석시 최종 기질 농도는 ATP(제조원; Sigma

Chemicals, St Louis, MO) 20 μ M 및 펩타이드(HSSPHQS (P₀₃H₂)EDEEE, 제조원; American Peptide, Sunnyvale, CA) 300 μ M이었다. 반응을 30°C 및 20nM GSK-3 β 에서 수행하였다. 커플링된 효소 시스템의 성분의 최종 농도는 포스포엔올 피루베이트 2.5mM, NADH 300 μ M, 피루베이트 키나아제 30 μ g/ml 및 락테이트 데하이드로게나아제 10 μ g/ml였다.

ATP 및 해당 시험 화합물을 제외하고는 앞서 열거한 시약을 모두 함유하는 분석 스톱 완충 용액을 제조하였다. 분석 스톱 완충 용액(175 μ l)을 30°C에서 10분 동안 0.01 μ M 내지 30 μ M에 이르는 최종 농도에서 해당 시험 화합물 5 μ l가 담긴 96웰 플레이트에서 항온처리하였다. 전형적으로, 도터 플레이트에서 시험 화합물을 DMSO로 일련 희석물(10mM 화합물 스톱 으로부터)을 제조하여 12-포인트 적정을 수행하였다. ATP(최종 농도 20 μ M) 20 μ l를 가하여 반응을 개시하였다. 30°C에서 10분에 걸쳐 모레클러 디바이스 스펙트라맥스 플레이트 판독기(Molecular Devices Spectramax plate reader (Sunnyvale, CA))를 사용하여 반응 속도를 입수하였다. K_i 값은 억제제 농도의 함수로서 속도 데이터로부터 결정하였다.

상기한 분석을 사용하여, 본 발명의 화합물의 K_i 값이 100nM 미만인 것으로 밝혀졌다.

실시에 18

신경 보호율의 측정

본원에서 사용되는 "보호율"이라는 용어는 허혈 손상(OGD)으로부터 보호된 신경원 세포의 비율(%)을 나타내며, 다음과 같이 계산한다:

$$\text{보호율(\%)} = (\text{시험} - \text{OGD}) / (\text{정상} - \text{OGD}) * 100$$

이러한 프로토콜은 배양된 해마 신경원 세포에서의 무산소증-재산소화에 의해 실험적 허혈을 유도하는 데 사용되는 과정을 설명한다. 시험 화합물의 신경보호 효과를 허혈-유도된 신경원 세포 손상 및 세포사로부터 평가한다.

분석일 이전에 다음의 단계를 수행하였다:

LoG-Neurobasal[LoG-Neurobasal은 NoG-Neurobasal 배지(제조원; Invitrogen Corp, customized order)와 0.5mM 글루코즈, 0.5mM L-글루타민 및 0.25x 페니실린/스트렙토마이신을 함유한다]을 밤새 저산소 챔버에서 예비평형화시켰다.

LoG-Neurobasal을 통상의 배양기(5% CO₂)에서 밤새 예비평형화시켰다.

통상의 배양기(5% CO₂)에서, Neurobasal/B27AO[Neurobasal/B27AO는 Neurobasal 배지(제조원; Invitrogen Corp Cat # 21103-049)과 2x B27 - AO 보충물(제조원; Invitrogen Corp Cat #10889-038), 0.5mM L-글루타민 및 0.25x 페니실린/스트렙토마이신을 함유한다]를 밤새 예비평형화시켰다.

다음의 단계를 분석일에 수행하였다:

LoG-Neurobasal 배지를 저산소 챔버로부터 제거하고, 배지를 100% N₂로 30분 동안 약간 버블링시켜 완전히 탈산소화시켰다.

Neurobasal/B27m 배양 배지[Neurobasal/B27m은 Neurobasal 배지와 2x B27 보충물(제조원; Invitrogen Corp Cat #17504-044) 및 0.5mM L-글루타민을 함유한다]를 살균 유리 파스페르 피펫이 부착된 진공 펌프를 사용하여 각 12웰 플레이트에서 세포로부터 흡인시켰다.

플레이트를 143.6mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgSO₄, 1mM NAH₂PO₄, 26.2mM NAHCO₃, 10mg/l 페놀 레드 및 0.25x P/S로부터 제조된 글루코즈 비함유-BSS₀(pH 7.4) 2ml로 1회 세척하였다.

뉴런(초기 배양물로부터 10-11일)에 탈산소화된 LoG-Neurobasal(12웰 플레이트의 각 웰에 대해 1ml/웰)을 보충하였다. 이들 신경원 세포는 문헌[참조; Park LC, Calingasan NY, Uchida K, Zhang H, Gibson GE. (2000) "Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture." J Neurochem 74(1) : 114-124]에 따라 제조하였다.

시험 화합물을 각 웰에 직접 가하였다(세 가지 농도의 화합물 + 양성 대조군, 각각 트리플레이트). 화합물을 100% DMSO에 용해시키고(여기서, DMSO의 농도는 0.5%를 초과해선 안된다), 이어서 플레이트를 저산소 챔버내에 5시간 동안 두면서 플레이트를 뚜껑은 열어두었다.

정상 산소 분압 상태의 대조군의 경우, 예비-평형화된 정상 산소 분압 상태의 LoG-Neurobasal 배지를 각 웰에 가하여 플레이트를 정상 배양 항온기에서 4시간 동안 다시 두었다.

저산소 상태에서 4시간 후, 잔존하는 배지를 조심스럽게 흡인 제거시키고, 새롭게 산소화된(예비평형화된) Neurobasal/B27AO 2ml를 각 웰에 가하였다. 재산소화된 배지는, 배지를 사용 전에 배양 항온기(5% CO₂/95% O₂)에 밤새 방치함으로써 달성하였다.

동일 농도의 동일 시험 화합물을 다시 상응하는 웰에 가하고, 플레이트를 세포 배양 항온기(5% CO₂/95% O₂)에 넣고 20 내지 24시간 동안 재산화시켰다. 20 내지 24시간 동안 재산화시킨 후, 후술하는 세포 트래커 그린 형광법(cell tracker green fluorescence method)을 사용하여 살아있는 뉴런의 수를 계수한다.

잔존하는 배양 배지를 12웰 플레이트의 각 웰로부터 흡인시켜 뉴런을 30 내지 37°C로 예비가온시킨 HBSS(pH 7.4, 제조원; Invitrogen Corp, Cat #14170-112)로 1회 세정하였다.

플레이트의 각 웰에 HBSS에 용해시킨 5μM 웨스트 33342 형광 염료 및 2.5μM 세포 트래커 그린(제조원; Molecular Probes Cat # 2925) 1ml를 가하였다. 이어서, 플레이트를 실온에서 15분 동안 암흑하에 둔 다음 뉴런을 HBSS 2ml로 1회 세척하였다. HBSS 1ml를 각 웰에 가하고, 셀로믹스(Cellomics)^R 자동 이미징 시스템을 사용하여 살아있는 형광 세포와 죽은 형광 세포의 수를 계수하였다.

본 발명의 화합물의 보호율은 ≥30%인 것으로 밝혀졌다.

실시에 19

중간 대뇌 동맥 폐쇄 모델(MCAO)

당해 연구에 사용된 동물은 체중이 270 내지 333g인 스프래규-돌리 랫트(구입처; Charles River, NC)였다. 랫트를 12시간 낮/밤 주행성 사이클로 적어도 1주일 동안 동물 시설에 순응시켰다. 이들이 음식과 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

중간 대뇌 동맥(MCA)의 기시점을 차단시키는 데 사용되는 관내 동맥 폐쇄 기구를 25mm 길이의 세그먼트로 절단한 4-0 나일론 모노필라멘트 봉합사로부터 제조하였다. 봉합사의 끝을 열에 노출시켜 둥글게 하였다. 동맥의 관내강을 차단하는 폐쇄 기구의 효능을 증가시키기 위해, 이들을 1% 폴리-L-리신 현탁액으로 피복시키고, 60°C로 설정한 오븐 속에서 1시간 동안 건조시켰다. 봉합사는 뉴저지주 소머빌에 소재하는 에텔론(Ethelon)으로부터 구입하였다. 다음과 같은 화학적 시약이 사용되었다:

- 1, 2, 3, 5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드, 즉 TTC, Cat #T8877, Lot #50K1435, 및 PEG400, Cat # P-3265는 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미칼 캠퍼니(Sigma Chemical Co.)로부터 구입하였다.
- 포스페이트 완충액 포르말린, Cat # 245-685는 버지니아주 미들타운에 소재하는 피셔 사이언티픽 캠퍼니(Fisher Scientific Co.)로부터 구입하였다.
- 증류수는 사내에서 제조하였다.
- 에탄올, Cat # E702-3은 위스콘신주 밀워키에 소재하는 알드리지(Aldridge)로부터 구입하였다.

국소 대뇌 허혈의 관내 봉합 모델은 실질적으로 문헌(참조; Longa, et al., Stroke, 20:84-91 (1989))에 기재된 바와 같이 사용하였다. 부형제 또는 화합물 투여를 위해, 좌측 외부 목적에 캐놀라를 삽입하였다.

연구 동안 랫트가 수화 상태로 유지되도록 돕기 위해, 물 중의 5% 텍스트로즈 및 락테이트화 링거액(각 5ml)을 MCAO한 지 10, 24 및 48시간 후에 각 플랭크에서 피하 주사하였다.

초기 산입 기준(신경학적 스코어 2, 신체 온도 > 38.5°C)을 만족시킨 랫트를 랜덤하게 부형제 또는 화합물 처리군으로 순차적으로 분류하였다. 특정 그룹으로의 랫트의 초기 일일 분류를 각 날마다 교대하였다.

화합물 또는 부형제로의 처리는 MCAO한 지 6시간 후 정맥내 농축과 주사에 의해 개시하며 인푸 디스크 펌프(Infu Disk pump)를 사용하여 고정 주입에 의해 18시간 동안 계속하였다. 랫트를 단순 마취시키고, 등쪽 목 절개를 통해 목정맥 카테터를 노출시켰다. 화합물 또는 부형제의 농축과 용량을 투여하고, 5분 후 주입 펌프를 활성화시켰다. 주입 펌프를 재킷에 의해 랫트의 등에 부착시켰다.

5:4:1 용적의 물:PEG400:에탄올의 부형제를 사용하여 화합물 용액을 매일 신선하게 제조하였다. 그룹 및 당해 모델에 사용된 투여량이 하기 표 2에 제시되어 있다.

[표 2]

t-MCAO 모델에 대한 화합물 투여량

그룹	n	처리	농축과 투여량* (mg/kg)	주입 투여량 (mg/kg/hr)	농축과 화합물 (mg/ml)	주입** 화합물 (mg/ml)
1	12	부형제	-	-	-	-
2	10	화합물	35	14	21.4	21.4

* 0.49ml의 농축피 투여 용적

** 0.21ml/hr의 주입 속도 및 18시간의 주입 지속 시간

경색증 용적을, 베더슨 등(Bederson et al.)(1986)에 의해 기재된 과정을 변형시킨 방법을 사용하여 7개의 연속적인 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드(TCC) 염색된 절편의 이미지 분석에 의해 측정하였다. MCAO한지 3일 후에, 랫트를 CO₂ 질식에 의해 희생시켜 단두시켰다. 두개관으로부터 뇌를 재빨리 제거하여 방욕에서 30분 동안 PBS를 함유하는 개별 비이커에 두었다. 뇌 기질 슬라이서를 사용하여 2mm 두께의 관상 뇌 절편을 입수하였다. 뇌 절편을 37°C에서 20분 동안 PBS 중에 2% TTC를 함유하는 표지된 페트리 디쉬에 두었다. TTC는 살아있는 뇌 조직을 적색으로 염색시키며, 허혈 부위는 백색으로 남게 된다. 이어서, 뇌 절편을 4°C에서 적어도 24시간 동안 10% 중성 완충된 포르말린에 침지시켰다. 모든 절편은 희생시킨지 3일 내에 이미징시킨다.

포르말린 고정된 TTC 염색된 뇌 절편(7개의 연속 절편)을 아도브 포토샵 소프트웨어와 디지털 카메라를 사용하여 디지털 캡처시켰다. 이미지를 IPLab 이미지 분석 프로그램에 이입시켰다. 피질 경색의 면적(백색 면적)을 부각시켜 측정하였다. 경색 용적은 다음의 수학적식에 따라 계산하였다.

경색 용적 = ∑경색 면적 × 2 (각 절편 사이의 거리)

동측성 및 대측성 반구 총 면적도 유사하게 측정하였다. 부종의 용적은 동측성 반구 용적으로부터 대측성 반구 용적을 감산하여 계산하였다. 처리한 랫트가 어느 것인지 모르는 과학자들이 분석을 수행하였다.

랫트의 신경계 기능은 베더슨 등(Bederson et al.)(1986)에 의해 기재된 스코어링 시스템을 사용하여 MCAO한지 2시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후에 평가하였다. 스코어는 0 내지 3이며, 0은 정상상을 나타내고 3은 심각한 결핍을 나타낸다.

허혈의 2시간째 신경학적 스코어를 산입 기준으로서 연구에 사용하였다. 랫트가 2 이상의 신경학적 스코어를 갖지 않거나 스코어가 3인 경우, 랫트를 연구에서 제외시켰다. 처리한 랫트가 어느 것인지 모르는 연구자가 신경학적 평가를 수행하였다.

농축피를 주사한지 5분, 4시간, 22시간, 46시간 및 70시간째에 약력학적 분석을 위해 랫트로부터 혈액 샘플(~0.5ml)을 입수하였다. 랫트를 이소플루잔으로 약간 마취시켰다. 23게이지 버터플라이 주입 세트(butterfly infusion set)를 사용하여 측면 꼬리 정맥으로부터 헤파린-처리된 혈액 수집 튜브(0.6ml 용량)에 혈액을 수집하였다. 혈액 샘플을 마이크로퓨지(microfuge) 속에서 4분(10으로 세팅) 동안 회전시켰다. 혈장을 덜어내어 표지된 바이알에 넣고 냉동기 속에 -20°C에서 저장하였다.

MCAO한지 72시간 후에, 랫트를 CO₂ 흡입에 의해 깊이 마취시켜 가능한 한 많은 혈액을 심장 천자에 의해 입수하였다. 혈액을 헤파린-처리된 혈액 수집 튜브(6ml)에 넣었다. 4000rpm에서 5분 동안 원심분리[알레그라(Allegra) R6]하여 혈액으로부터 혈장을 분리하였다. 혈장을 수집하여 표지된 플라스틱 튜브에 넣고 냉동기 속에 -20°C에서 저장하였다.

부형제 그룹과 처리 그룹 간의 경색 크기, 혈장 글루코즈, 체온 및 체중에 대한 통계학적 분석은 양방향 스튜던츠 t-테스트(two-tailed Student's t-test)에 의해 수행하였다. 신경학적 스코어의 통계학적 분석은 비-파라미터 분석에 의해 수행하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타낸다.

MCAO한지 6시간 후에 화학식 I의 화합물을 투여하여 처리하는 것이 일시적인 국소 발작 모델의 경색 용적을 감소시키는 데 매우 효과적이었다(도 1 참조). 화합물로 처리한 그룹(88 ± 31mm³)의 랫트는 부형제 대조군(418 ± 20mm³, p<0.0001)에 비해 총 경색 용적이 매우 유의적으로 79% 감소하였다. 또한, 화합물로 처리한 그룹(32 ± 20mm³)에서의 피질 허혈 손상도 부형제 대조군(272 ± 22mm³, p<0.0001)에 비해 88%까지 유의적으로 감소하였다. 화학식 I의 화합물로 처리하면(55 ± 12mm³), 부형제 대조군(146 ± 13mm³, p<0.0001)에 비해 선조체 허혈 손상을 유의적으로 감소시킬 수 있었다. 최종적으로, 화학식 I의 화합물(21 ± 10mm³)로 처리시, 부형제 대조군(97 ± 10mm³, p<0.0001)에 비해 부종 형성량을 79%까지 감소시켰다.

화학식 I의 화합물로 처리한 랫트는 실험 시간이 경과함에 따라 신경계 기능이 현저하게 개선되는 것이 입증되었다(도 2 참조). 투여를 개시한지 18시간 정도로 빠른 경우, 부형제 대조군에 비해 화합물 처리군에서 신경계 기능이 유의적으로 개선되는 것으로 관찰되었다(각각 1.3 ± 0.3 대 2 ± 0 단위, p<0.01). 화합물로 처리한 랫트의 신경학적 스코어는 계속 향상되어, MCAO한지 72시간까지 랫트는 주목할 만한 결핍을 거의 나타내지 않거나 전혀 나타내지 않으면서 작용할 수 있었다. 반대로, 부형제로 처리한 랫트는 실험 시간 전반에 걸쳐 신경계 기능의 개선을 나타내지 않았다.

실시에 20

항우울제에 대한 동물 모델

본 발명의 화합물에 대해, 문헌(참조; Porsolt, R. D., et al., 1977; 229: 327-336; Bourin M. Fundam Clin Phannacol 1990; 4: 49-64)에 기재되어 있는 바와 실질적으로 유사한 방법으로 랫트에서의 항우울 활성을 평가하였다.

랫트를 대상으로 한 수영 시험(우울증 시험)

물로 채워진 투명 실린더에 랫트를 넣는다. 랫트가 머리를 물 위에 유지시키기 위해 최소한으로 몸을 움직이는 시간으로서 정의된 운동 지속 시간을 수동으로 기록한다. 2차 시험에서, 4일째에 랫트를 실린더에 다시 넣으며, 이때의 시간은 5분이다. 운동-시간을 전 실험 기간에 걸쳐 수동으로 기록한다.

실험 I(초기 실험) :

1일째에, 수컷 위스터 랫트(RA239 종, 160 내지 180g)를 15분 동안 실린더에 넣는다. 랫트가 머리를 물 위에 유지시키기 위해 최소한으로 몸을 움직이는 시간으로서 정의된 운동 지속 시간을 수동으로 기록한다. 당일내에 합당한 숫자의 동물을 시험하기 위해, 기록치를 15분내에서 다음의 3가지 하위시간으로 제한한다: 0 내지 2.5분(즉, 시험 시작시), 6.25 내지 8.75분(정확히 실험 중간) 및 12.5 내지 15분(실험의 맨끝). 이러한 과정은 실험 절반에 걸쳐 나타내어지는 바와 같은 동물의 "성과"를 나타내기 위한 것이라는 것이 이전에 밝혀졌다.

실험 II(2차 실험)

4일째에, 랫트를 다시 실린더에 넣으며, 이때 시간은 5분이다. 운동-시간을 실험 전반에 걸쳐 수동으로 기록한다.

처리 화합물을 0.5% 메틸셀룰로즈(메토셀)에 현탁시켜 경구(5ml/kg) 제공하였다. 약물은 1일째 저녁(약 16:00), 2일째와 3일째 아침(약 08:00) 및 저녁(약 16:00) 및 시험 II하기 정확히 1시간 전(4일째)에 투여한다. 두 마리 랫트의 처리는, 실험 1에서의 성과에 대한 랜덤화에 따라, 동일하거나 상이하였다. 메토셀 또는 15mg/kg 복강내 데스피라민(DMI)으로 처리한 랫트 그룹은 각각 대조군 및 양성 표준으로서 역할을 한다.

본 발명의 화합물은 상기 모델에서 항-우울 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

실시예 21

정신분열증의 동물 모델: 놀람 반응의 프리-펄스 억제(PPI; Pre-pulse Inhibition)

주의력 및 인지력의 파괴와 관련된 감각 운동 관문의 손상은 정신분열증 환자에서 일반적이다. 정신분열증 환자에서는 놀람 반응의 PPI가 손상된다. PPI는 큰 청각 자극 전의 약한 음파가 놀람 반사를 억제하는 경우에 일어난다. PPI는 정신분열증에 대한 우수한 예언적이고 타당한 시험으로 간주된다.

양성 대조물인 클로자핀은 시판되는 비정형 항정신병제[클로자릴(Clozaril)^R]이다. 클로자핀은 D4 도파민 & 5-HT2 수용체에 대한 친화력이 높고 동물 모델에서 PPI 반응을 효과적으로 증진시킨다.

PPI 분석은 문헌[참조: Spooen et al., anxiolytic-like effects of the prototypical metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine in rodents. J Pharmacol Exp Ther. 295:1267-1275 (2000)]에 기재된 바와 실질적으로 유사한 방법으로 아래의 방식에 따라 수행하였다.

수컷 C57BL/6(20 내지 30g)을 실험하기 전 적어도 3일 동안 4마리를 한 그룹으로 하여 마클로론 케이지(42 × 26 × 15cm)에 수용하였다. 수용 시설은 온도 및 습도가 제어되며 인공 조명(6:00 AM 내지 6:00 PM, 조명을 켜둠)이 장착되어 있다. 동물이 물과 음식을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물은 실험을 받은 적이 없다.

동물을 시험 화합물(30, 60, 100mg/kg, 클로자핀(30mg/kg), 양성 대조물 또는 부형제(0.5% 메틸셀룰로즈)로 예비처리 하였다. 45분 후, 마우스를 개별적으로 백그라운드 화이트 노이즈가 70dB인 놀람 반응 챔버에 넣고 10분 동안 방해하지 않은 채로 두었다. 그후, 56회 시험으로 이루어진 15분간의 세션을 수행하였다. 놀람 반응 자극은 40ms-120dB-화이트 노이즈 사운드이고, 프리-펄스는 100ms까지 놀람을 선행하는 72, 74 및 78dB의 20ms-화이트 노이즈 사운드이다.

8가지 유형의 시험이 제공되었다: 프리펄스+놀람(프리펄스 강도당 7회 시험), 프리펄스 단독(프리펄스 강도당 7회 시험), 놀람 단독(7회 시험) 및 무자극(7회 시험). 가변적인 시험간의 간격은 평균 15초(10 내지 20초 사이)이다. 무자극 시험에서, 베이스라인을 측정하였다. 놀람 단독 시험에서, 기본 청각 놀람 크기(g)를 측정하였고, 프리펄스+놀람 시험에서, 정상적인 놀람의 억제량을 측정하여 기본 놀람의 비율(%)로서 표현하였다. 프리펄스 단독 시험에서, 약한 노이즈에 대한 정상적인 반응을 대조치로서 측정하였다. 프리펄스 억제를 수학적 %PPI = 100 - 100 × [PAs PPP]/PA2에 따라 산출하였다. 본 발명의 화합물은 마우스에서 청각의 놀람 반사의 PPI를 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

실시예 22

항불안제에 대한 동물 모델

항불안 분석은 문헌[참조: Spooen et al., Anxiolytic-like effects of the prototypical metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine in rodents. J Pharmacol Exp Ther. 295:1267-1275 (2000) and Lecci A, Borsini F, Voltera G and Meli A, Pharmacological validation of a novel animal model of anticipatory anxiety in mice. Psychopharmacology 101 : 255-261 (1990)]에 기재된 바와 실질적으로 유사한 방법에 의해 다음의 방식으로 수행하였다.

I. 스트레스-유도된 고온 현상

스트레스-유도된 고온 현상(SIH)의 시험 과정은 레씨(Lecci) 등(1990)에 의한 본래의 방법을 약간 변형시켜 사용하였다. 마우스가 꼬리의 출발부 근처를 손으로 잡고 있도록 하여, 직장으로 20mm 삽입된 윤활화된 서미스터 프로브(직경 2mm)를 통해 온도계(제조원; ELLAB instruments, Copenhagen, Denmark)로 직장 온도를 0.1°C까지 측정하였다. 일정한 판독치가 수득될 때까지(15초 이내), 프로브를 그대로 두었다.

마크롤론 케이지(42×26×15cm)당 1마리의 동물을 수용하였다. 실험하기 적어도 24시간 전에, 추후 확인을 위해 케이지 내의 동물의 털에 색상으로 표시해 두었다. 직장 온도를 측정하기 60분 전에, 주어진 케이지내의 모든 개체를 시험 화합물(투여량: 1.3, 10 또는 30mg/kg 복강내; 주사 용적: 10mg/kg), 클로르디아제폭사이드-HCl(10mg/kg 복강내; 제조원; Research Biochemicals International), 즉 양성 대조물 또는 부형제(0.5% 메틸셀룰로즈, 제조원; Animed)로 1분 간격으로 연속적으로 처리하였다. 정확하게 30분 후, 마우스를 (다시 1분 간격으로) 케이지로부터 꺼내어 직장 온도를 측정하고 메모해 두었다. 일단 온도를 기록하면, 동물을 다른 (인접) 케이지에 넣는다. 의존적인 변수, 즉 스트레스-유도된 고온 현상은 초기에 꺼낸 6마리의 마우스에서의 직장 온도 중간값과 케이지로부터 마지막에 꺼낸 6마리 마우스에서의 직장 온도 중간값의 델타로서 정의된다. 이러한 델타는 특정 처리군에 따라 6 내지 8 케이지에 대해 계산하였으며, 반면에 최종 표 현시에는 이러한 6개 내지 8개의 값의 평균을 사용하였다. 또한, 기초 체온에 미치는 화합물의 잠재적인 효과를 평가하기 위해, 맨 처음 동물의 직장 온도를 사용하였다.

II. 랫트에서의 사회성 진단 시험

성체 수컷 스프래규-돌리 랫트(= "거주자" 랫트; 350 내지 400g)와 어린 리스터 후디드 랫트(= "침입자" 랫트; 100 내지 120g)를 사용하였다. 시험하기 전 2주 동안 마크롤론 케이지(42×26×15cm)에 침입자 랫트는 쌍으로 수용하였고 거주자 랫트는 개별적으로 수용하였다. 모든 동물은 동일한 방에 수용하였다. 수용 시설은 온도 및 습도가 제어되며 인공 조명(6:00 AM 내지 6:00 PM, 조명을 켜둠)이 장착되어 있다. 동물이 물과 음식을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물은 실험을 받은 적이 없다.

동물에게 시험 화합물(투여량: 0.3, 3, 10 또는 30mg/kg), 클로르디아제폭사이드-HCl(530mg/kg 복강내; CDZ, 제조원; Research Biochemicals International, Natick, MA), 기준/양성 화합물로서의 LiCl(10, 30mg/kg) 또는 부형제(0.5% 메틸셀룰로즈)를 제공하였다. 주사 용적은 20ml/kg이었다. 침입자 랫트에게만 경구 처리하였고, 시험은 화합물을 투여한지 1시간 후에 수행하였다. 모든 관찰 사항은 거주자 랫트의 홈 케이지에서 주간 시기(8:00 AM 내지 1:00 PM) 동안 이루어 졌다(상기 참조). 케이지의 바닥은 톱밥으로 덮여 두었다. 한 마리의 침입자 랫트와 한 마리의 거주자 랫트로 구성된 쌍을 무작위로 실험 그룹 또는 대조 그룹 중의 하나로 분류하였다. 거주자에 대한 침입자 랫트의 활동적인 접근 거동의 지속 시간(=사회적 활동으로 소비한 시간)을 수동으로 스코어링하여 5분에 걸쳐 누적적으로 기록하였다.

III. 엘리베이트드 플러스 미로(elevated plus maze) 시험:

실험하기전 적어도 3일 동안 수컷 성체 스프래규-돌리 랫트(180 내지 220g)를 4마리를 한 그룹으로 하여 마크롤론 케이지(42×26×15cm)에 수용하였다. 수용 시설은 온도 및 습도가 제어되며 인공 조명(6:00 AM 내지 6:00 PM, 조명을 켜둠)이 장착되어 있다. 동물이 물과 음식을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물은 실험을 받은 적이 없다.

엘리베이트드 플러스 미로는 2개의 개방된 팔(arm)(40×12cm)과 2개의 밀폐된 팔(40×12×20cm)로 구성되며, 이들은 모두 통상의 중심 플랫폼(12×12cm)으로부터 뻗어있다. 외형은 유사한 팔들이 서로 반대로 배치되어 있는 플러스 부호의 형상을 형성하며, 장치는 중심 축대의 바닥으로부터 60cm 위로 들어올려져 있다. 미로는 그레이 플렉시글라스(gray Plexiglas)로부터 제조된다. 개방된 팔의 그림은 이들 주변에 작은 돌아진 엣지(0.25cm)의 삽입에 의해 촉진된다.

방법은 문헌[참조; Handley, S. L. and Mithani, S Effects of alpha- adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear"-motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 327:1-5 (1984)]에 기재된 바와 실질적으로 유사한 방법에 의해 다음의 방식으로 수행하였다. 랫트를 다양한 처리 중의 하나에 무작위로 할당하였다. 실험하기 적어도 1시간 전에 동물을 수용 룸에서 실험실로 이동시켰다. 화합물을 경구 투여한 후, 랫트를 마크롤론 케이지(22×16×14cm)에 개별적으로 수용하고, 60분 후에 밀폐된 팔과 마주보는 중심 플랫폼에 두었다. 8분간의 시험을 수행하고, 피검체간에 미로를 완전히 청소하였다. 미로 가까이에 앉아있는 관찰자가 직접 기록하도록 하였으며, 다음의 통상적인 파라미터를 사용하였다: 개방된 팔 및 밀폐된 팔에 입장한 횟수(팔 입구는 4개의 발이 모두 팔에 들어오는 것으로 정의함)와 개방된 팔에서 소비한 시간(중심 플랫폼은 배제함). 또한, 상이한 처리 그룹으로부터의 동물을 시험하였으며, 시험은 8:30 AM 내지 12:30 PM, 즉 주간 시기의 처음 1/2 사이에 수행하였다. 다음의 불안을 반영하는 파라미터를 기록하였다: 개방된 팔에서 소비한 시간의 비(open/total), 제1 팔을 머문 잠복기 및 팔에 입장한 총 횟수.

본 발명의 화합물은 상기한 동물 모델에서 항불안-유사 효과를 나타낸다.

실시예 23

알츠하이머 질환에 대한 세포 분석 - 신경세포의 생존

하기 분석은 문헌 [Kienlen-Campard et al., *J Biol Chem* 277:15666 (2002)]에 기재된 방법과 거의 유사한 방법에 의해 수행한다. 해마 신경세포의 주 배양물을 E18 쥐 태아로부터 제조한다(Park et al., *J Neurochem*, 74:114, 2000 참조). 세포를 폴리(D-리신)으로 예비 처리한 6- 또는 96-웰 배양 접시(4×105셀/cm²) 또는 유리 커버슬립(1.25×105셀/cm²) 안에 놓고, 재조합 아데노신바이러스로 감염시키기 전에 2% B-27 및 0.5mM L-글루타민으로 보강된 NEUROBASALTM 매질 내에서 6일간 시험관내 배양한다. 이러한 조건하에서 신경세포 배양물(98% 이하의 신경세포)은 높은 분화율 및 생존율을 나타낸다.

재조합 아테노바이러스 및 신경세포 감염 -- 아테노바이러스-코딩 변이 형태의 APP695를 생성, 증식 및 정제한다. 시험관 내에서 6일 후, 신경세포 배양물을 최소 부피의 배양 매질 중에서 감염 중독도 100으로 4시간 동안 감염시킨다. 그런 다음 감염 매질을 3 내지 5일간 새로운 배양 매질로 대체한다. 이러한 조건하에서 적어도 75%의 신경세포가 재조합 아테노바이러스에 의해 코딩된 단백질을 발현한다.

세포 생존 -- 신경세포 생존을 세포체학 자동화 이미지 시스템을 사용하여 비색 MTT 분석법 또는 세포 추적자 형광 세포 생존률 분석법에 의해 측정한다. 핵 염색을 위하여 세포를 고정시키고(포스페이트 완충 염수 중의 0.37% 포르말데히드/0.2% 글루타르알데히드) Hoechst 33342 염료(1 μ g/ml) 중에서 30분간 배양한다.

A β 생성의 정량 -- 배양 매질을 모으고, 프로테아제 억제제(1 μ g/ml 웨스타틴, 10 μ g/ml 류펩틴, 1mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드)로 처리하고, 원심 분리(16,000 \times g, 5분, 4 $^{\circ}$ C)에 의해 정제한다. 상청액 100 μ l를 후술하는 ELISA 방법에 의한 베타 아밀로이드 정량에 사용한다.

실시에 24

베타 아밀로이드(1-40) 생성의 억제

알츠하이머 질환은 뇌에 세포외 플라그 및 세포내 신경원섬유 농축체가 존재하는 것이 특징이다. 이들 플라그의 주된 단백질 성분은 아밀로이드 전구체 단백질("APP")로부터 절단된 베타 아밀로이드("A β ") 펩티드이다.

세포주 및 화합물 처리

Swedish 변이(K595N, M596L)를 함유한 APP695와 선택 마커인 YFP를 모두 발현하는 레트로바이러스 벡터로 유전자 도입함으로써, A β 를 분비할 수 있는 안정한 세포주를 사람 H4 신경교종 세포 내에 구성한다. APP695를 발현하는 안정한 유전자 도입균은 높은 수준의 YFP를 발현하는 세포들을 가려냄으로써 선택한다.

세포를 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보강된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Invitrogen, 카탈로그 번호 11965-092) 중에서 96웰 플레이트에 80,000세포/웰로 평판 배양한다. 24시간 후, 매질을 시험 화합물을 함유하는 새로운 매질로 대체한다(20 μ M 내지 10nM 범위의 화합물 농도를 7점의 적정으로 증폭 시험한다). 37 $^{\circ}$ C에서 18 내지 24시간 동안 시험 화합물로 배양한 후, 상청액 중의 hA β (1-40) 농도를 hA β 40·ELISA를 사용하여 측정한다.

분비된 A β 에 대한 ELISA 분석

배양물 상청액 시료 중의 hA β 40의 시험관내 정량적 측정을 위하여 Biosource International, Inc., Signal SelectTM Human β Amyloid(hA β 40) ELISA(카탈로그 번호 KHB3482)를 사용한다. hA β 의 NH₂ 말단에 특이적인 모노클론 항체를 마이크로티터 플레이트의 웰 위에 도포한다. 공지된 표준 hA β 함량을 함유한 시료를 이들 웰에 피펫팅한 후 hA β 의 1-40 서열에 대해 특이적인 토끼 항체를 첨가한다. 그런 다음 결합된 토끼 항체를 홀스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제-표지된 항-토끼 항체를 사용하여 검출한다. 과량의 항-토끼 항체를 제거한 후, 기질 용액을 첨가한다(결합된 효소에 의해 절단되어 색이 생성된다). 이렇게 생성된 색의 강도는 시료 중에 존재하는 hA β (1-40)의 농도에 직접 비례한다.

ELISA 분석을 다음과 같이 수행한다:

공지 농도의 hA β (1-40) 펩티드를 함유한 표준물 및 시료를 표준/시료 희석액(Biosource Reagent) 중에 희석시킨다. 프로테아제 억제제 AEBSEF, 아프로티닌, 베스타틴, E-64, 류펩틴 및 웨스타틴 A(Calbiochem, Protease Inhibitor Cocktail Set III, 카탈로그 번호 539134)를 모든 시료에 첨가하여 A β 펩티드의 단백질 분해를 방지한다. 시료 및 표준물 100 μ l를 96-웰 ELISA 플레이트에 첨가하고 실온에서 2시간 또는 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한다. 웰을 100 μ l의 세척용 완충액(Biosource Reagent)으로 4회 세척한 후 100 μ l의 검출 항체를 첨가하고 플레이트를 실온에서 2시간 동안 배양한다. 검출 항체는 hA β (1-40) 서열을 인식한다.

웰을 세척용 완충액 100 μ l로 4회 세척한 다음, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-표지된 항-토끼 2차 항체 100 μ l를 첨가한다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 배양한다. 그런 다음 웰을 세척용 완충액 100 μ l로 5회 세척하고, 100 μ l의 안정화된 크로모젠을 첨가한다. 플레이트를 실온의 암실에서 30분간 배양한다. 안정화된 크로모젠은 결합된 HRP에 의해 절단될 때 청색으로 변하는 기질 용액이기 때문에 표준 마이크로티터 플레이트 판독기에서 관찰이 가능하다. 그런 다음 100 μ l의 멈춤 용액(stop solution)을 첨가하고, Molecular Devices SpectraMAX 340 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 웰 내의 색의 강도를 측정한다. 전형적으로 화합물은 20 μ M 내지 10nM 범위의 화합물 농도로 7-점의 일회 반응을 증폭 수행하여 분석한다. 공지 농도의 A β 펩티드를 함유한 표준물로부터 얻은 표준 곡선으로부터 시료 중의 A β (1-40)의 농도를 산출한다.

본 발명의 화합물을 3일에 걸쳐 시험한다. 각각의 일자에 Calbiochem 감마 세크레타제 "억제제 X"를 대조물로서 포함시킨다. 이것은 50nM의 보고된 IC50을 갖는 세포-투과성의 히드록시에틸렌 디펩티드 아이소스티어(isostere)이다(카탈로그 번호 565771).

실시에 25

알츠하이머 질환(AD)에 대한 유전자 도입 동물 분석

I. AD 유전자 도입 동물

Lys670 -> Asn 및 Met671 -> Leu의 변이를 갖는 사람 알츠하이머 베타-아밀로이드(A베타) 전구체 단백질의 695-아미노산 이소포름을 과발현하는 유전자 도입 생쥐(Tg2576 생쥐는 Taconic, N.Y.으로부터 시판 중이다)는 3개월의 월령에서는 공간 기준 및 변경 과제에 있어서 정상적인 학습 및 기억을 가졌지만 9 내지 10개월의 월령에서는 약화를 보인다. 이들 행동적 결함은 A베타(1-40)의 5배의 증가와 A베타(1-42/43)의 14배의 증가를 수반한다. Congo 적색 염료로 염색된 다수의 A베타 플라그는 증가된 양의 A베타를 갖는 쥐의 피질 및 변연 구조에 존재한다. 이들 유전자 도입된 생쥐에서 알츠하이머 질환을 암시하는 행동적, 생화학적 및 병리학적인 이상의 유사한 출현은 이 질환의 병리 생리학 및 신경 생물학을 탐구할 새로운 기회를 제시한다[참조: Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996 Oct 4;274(5284): 99~102].

본 명세서에 설명된 모델에서는 Tg2576 생쥐를 명기하였으나 시판되거나 개인적으로 구입할 수 있는 기타의 유전자 도입 생쥐도 상기 모델에 사용될 수 있음을 이해한다.

II. 베타-아밀로이드 ELISA 프로토콜

알츠하이머 질환의 Tg2576 생쥐 모델에서 Aβ와 기억과의 상관 관계가 문헌에 있다[참조: *The Journal of Neuroscience*, 2002년 3월 1일, 22(5):1858~1867].

냉동된 편뇌를 2단계 추출로 순차적으로 추출한다[(1) 2% SDS 및 (2) 70% 포름산(FA)에서 초음파 분해]. 최종 분획물은 지정된 Absol이다. 초음파 분해 후 시료를 24°C에서 1시간 동안 100,000×g으로 원심 분리하고, 상청액을 회수한 후 다음 용액을 사용하여 펠릿을 초음파 분해한다. 뇌 추출물을 전술한 샌드위치 ELISA에 의해 측정한다(Suzuki et al., 1994; Gravina et al., 1995). 하기 시스템을 사용한다:(1) BAN-50 포획 및 BA-27 또는 BC-05 검측 또는 (2) 3160 포획 및 BA-27 또는 BC-05 검측(각각 Aβ1-40 및 Aβ1-42를 검측한다). 모든 월령의 생쥐로부터 다수의 Tg2576 뇌를 직접 비교한 바 3160 포획 ELISA로 검측된 Aβ40 및 Aβ42의 양은 포획에 BAN-50이 사용된 경우 본질적으로 동일한 것으로 나타난다. 2% SDS 추출물을 적어도 1:40으로 희석하여 0.05% SDS에서 분석이 이루어질 수 있도록 한다. 보다 많은 희석을 SDS에 대해 보정하여 이들도 0.05% SDS에서 분석되도록 한다. FA 추출물을 1M Tris 포스페이트 완충액(pH 8.0) 중에 1:20으로 희석함으로써 중화시킨다. Softmax 프로그램을 사용하여 시료의 흡광도를 시료와 동일한 용액 중의 공지된 농도의 합성 Aβ1-40 및 Aβ1-42의 흡광도에 비교함으로써 펩토몰/밀리리터 단위로 산출하고, 이들 값을 최초의 균질화액의 습윤 중량으로 보정하여 최종적으로 피코몰/g(습윤 중량)으로 표시한다. 모든 경우에 유전자 도입되지 않은 조직을 유전자 도입 조직과 병행하여 동일하게 처리한다.

III. 유전자 도입 생쥐의 행동 시험: 모리스 물 미로(Morris Water Maze)

모든 단계의 기억 손실을 검측 및 구별할 수 있도록 하는 방식으로 B6/SJL 스트레인 백그라운드(strain background)에서 Tg2576 생쥐에게 물 미로를 만들어준다. 이 프로토콜은 수명 초기의 미세한 변화 및 수명 말기의 총 변화를 측정하는데 필요한 감각, 특이성 및 동작 범위를 제공한다. 수행 결함에 대한 제의 기준의 채용은 특이성을 제공한다. 훈련은 동작 범위를 광범위하게 제공한다. 생쥐가 3회의 탐구 시도 동안에 표적 4분면에서 보낸 평균 시간 백분율인 MPS(mean probe score)의 할당은 분자 마커를 사용한 보정을 위하여 개별 생쥐의 인식 능력의 정량을 개선시키고 광범위한 동작 범위를 갖는 단일 측정값을 제공한다. 다른 스트레인 백그라운드에서 Tg2576 생쥐를 위한 프로토콜은 학습 및 수행 결함의 쥐에서 스트레인-특이적 차이를 위해 조정될 필요가 있을 수 있다[참조: The Relationship between Aβ and Memory in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 2002년 3월 1일, 22(5): 1858~1867].

물 미로는 비독성의 백색 페인트를 넣어서 불투명하게 만든 25 내지 27°C의 물이 채워진 1 또는 1.2m의 원형 수영장이다. 수영장은 독특한 물체를 함유한 대담하게 패턴화된 칸막이와 선반으로 이루어진 고정된 공간적 큐(cues)의 한복판에 놓인다. 생쥐를 비이커에 넣고 수영장의 벽에 맞닿은 물 속으로 살짝 끌어내린다. 생쥐를 연속 3일 동안 흑색 및 백색의 줄무늬 막대로 표시된 솟아 오른 플랫폼(12×12cm²의 사각 표면)까지 수영하는 가시적 플랫폼 훈련을 실시한다(매일 8회의 시도). 가시적 플랫폼 훈련 일자는 통계적 분석을 위하여 4회 시도의 두 훈련 구획으로 나눈다. 가시적 플랫폼 훈련 중에는 플랫폼의 위치(N, NE, E, SE, S, SW, W 또는 NW)와 출발 위치(N, NE, E, SE, S, SW, W 또는 NW, 플랫폼에 바로 인접한 위치는 제외)를 각각의 시도에서 의사 무작위적으로 바꾼다. 의사 무작위적 변화는 주어진 위치를 반복하기 전에 모든 위치가 샘플링되었음을 보장한다. 생쥐가 수면에서 1.5cm 밑에 잠긴 플랫폼을 찾아가도록 하는 숨겨진 플랫폼 훈련을 연속 9일 동안 수행한다(매일 4회의 시도). 60초 안에 플랫폼을 찾아가지 못한 생쥐는 금속 탈출 스크프가 달린 플랫폼으로 인도한다. 숨겨진 플랫폼 시도 중에 플랫폼의 위치는 일정하게 하고(N, SE, SW 또는 NW) 생쥐는 의사 무작위적으로 선택된 7군데의 위치(N, NE, E, SE, S, SW, W 또는 NW, 플랫폼에 바로 인접한 위치는 제외) 중 하나에서 수영장에 투입된다. 각각의 숨겨진 플랫폼 시도 후에, 생쥐를 플랫폼 위에 30초 동안 남겨둔 후 플랫폼에서 떼어내 탈출 스크프가 달린 그들의 우리에 다시 넣는다. 생쥐는 수영장으로부터의 탈출과 스크프를 연관성을 빠르게 학습하고 스크프가 나타나면 스크프를 향해 일정하게 방향을 맞추어 따라간다. 생쥐가 탈출 스크프를 향해 따라가는 능력은 시력 및 주의력의 독립적인 측정값을 나타낸다. 4일, 7일 및 10일째의 숨겨진 플랫폼 훈련의 개시에서는 수영장에서 플랫폼을 제거하고 생쥐가 60초 동안 플랫폼을 찾도록 하는 탐구 시도를 수행한다. 모든 시도는 수영장 바로 위에 장착된 카메라를 통해 관찰하고 컴퓨터화된 트래킹 시스템을 사용하여 기록 및 분석한다.

각각의 생쥐에서 MPS를 산출하고 이를 사용하여 모리스 물 미로에서의 공간적 정보의 기억력을 분석한다. 사이에 놓여진 탐구로부터 정보를 통합함으로써 MPS는 앞서서 설명되었던 학습 지수(Gallagher et al., 1993)에 개념적으로 유사한 학습 측정치를 나타낸다. MPS, 학습 지수 및 학습 점수(탐구 시도 동안에 표적 4분면에서 보낸 시간 백분율의 총 합계)를 갖는 유사한 통계적 결과들이 발견되며, 본 발명자들은 표시의 용이함 때문에 MPS를 사용하는 본 발명자들의 데이터를 표시하기로 선택했다.

시험 후에, 각 군의 생쥐의 하위 집합을 안락사시키고, Aβ 측정을 위하여 오른쪽 편뇌를 액체 질소 중에서 냉동시킨다. 모든 뇌는 암호화된 방식으로 분석한다.

IV. 유전자 도입 생쥐의 행동 시험: 탐구적 행동, 공포, 및 협응 운동

[Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res* 2003 Jul 4;977(1): 38~45 참조].

백색 아크릴로 만들어진 T-미로 안에서 자발적 변화를 시험한다. 미로는 2개의 가로대(길이: 30cm)에 의해 각각의 측면에 위치하는 중앙의 후미부(길이: 30cm)로 구성된다. 미로의 폭은 9cm이고 각각의 벽은 길이가 20cm이다. 최초의 시도에서 생쥐를 플라스틱 장벽으로 차단된 우측 가로대를 갖는 T-미로의 후미부에 위치시킨다(강제 선택). 이용 가능한 가로대를 들어 넣은 후, 생쥐 뒤로 장벽을 닫아 생쥐를 60초간 미로 안에 놓아둔다. 그런 다음 생쥐를 다시 꺼내고 장벽을 제거한 직후 생쥐를 반대쪽 가로대 또는 같은 가로대를 탐구할 수 있도록 하는 자유 선택 시도를 위하여 후미부에 다시 놓는다(네발 기준). 계속 되는 9일 동안에서, 제1 시도에서 차단된 가로대를 홀수 날에 오른쪽으로부터 짝수 날에 왼쪽으로 돌리는 것을 제외하고는 동일한 2회의 시도 과정을 반복한다. 선택 시도 중의 변화의 수 및 반응 전 잠복 수를 1회의 시도 당 1분의 차단 시간으로 측정한다. 생쥐가 1분 안에 반응하지 않고 선택점으로부터 멀어지는 경우에는 일반적으로 1회 이하로 뒤에서 잠시 동안 자극하여 매 시도에서 반응을 기록할 수 있도록 한다.

협응 운동은 50×50cm 표면적 및 벽 높이 38cm의 백색 아크릴로 된 개방된 필드에서 측정한다. 중앙 및 주변 영역에서의 운동을 오버헤드 비디오 카메라로 기록하여 분석한다. 중앙 영역은 사각형이고 각각의 벽으로부터 25cm의 거리에서 시작된다. 생쥐를 3일간 5분의 시간 동안 개방 필드의 구석에 위치시킨다. 각각의 영역에서 이동한 거리, 및 휴식 시간(< 2cm/s), 느린 이동 시간(2 내지 5cm/s) 또는 빠른 이동 시간(> 5cm/s)은 물론 장치의 주변 및 중앙에서 보낸 시간을 측정한다.

높여진 플러스(plus)-미로는 십자가 형태를 갖는 4개의 가로대(길이: 70cm, 폭: 10cm, 바닥으로부터의 높이: 40cm)와 중앙 영역(10cm)으로 이루어진다. 2개의 가로대는 벽(높이: 10cm)에 의해 3면이 닫혀 있으며 다른 2개의 가로대는 추락을 최소화하기 위해 사용된 최소 가장자리(높이: 0.5cm)를 제외하고는 열려 있다. 2개의 닫혀진 가로대와 열린 가로대는 서로 마주보고 있다. 생쥐를 중앙 영역에 놓고, 앞의 시험에서 사용된 것과 동일한 비디오-트랙 장치를 사용하여 2일 동안 매일 5분간 폐쇄 및 개방된 가로대 내에 진입한 회수 및 지속 시간을 측정한다. 그런 다음 개방/전체의 가로대 진입 회수 및 지속 시간의 비율을 산출한다. 생쥐가 개방된 가로대로부터 추락한 보기 드문 경우에는 기록된 시간을 멈추고 생쥐가 떨어진 정확한 위치에 다시 놓는다. 자발적 변화, 개방-필드 및 플러스-미로 시험의 각각의 시험 시간 후에, 장치를 냄새가 날 가능성을 줄이기 위하여 다음 시험을 개시하기 전에 젖은 헝겊으로 깨끗이 닦고 건조시킨다.

정지상 비임(beam)은 직경 2.5cm 및 길이 110cm의 플라스틱으로 구성된다. 비임은 단단하게 움켜쥐도록 백색의 마스크 테이프의 층으로 덮여 있고 선 문자에 의해 11개의 구획으로 나뉘어져 있다. 비임을 매트(쿠션 역할을 하여 생쥐가 상처 입는 것을 막아준다)로 덮인 바닥으로부터 45cm 높이에 놓는다. 비임의 말단부에 마분지 벽을 삽입하여 생쥐가 탈출하지 못하도록 한다. 생쥐를 중간 구획에 올려놓음으로써 시도를 개시한다. 단일의 4회 시도 시간에서, 가로지른 구획의 수(네발 기준), 추락 전의 잠재기, 및 추락 회수를 측정한다. 차단 시간은 1회의 시도 당 1분이고 시도 사이의 간격은 15분이다.

가속화 로토로드(rotorod)(Model 7650, Stoelting, Wood Dale, IL, USA)는 리브(ribbed) 플라스틱(직경:3cm)으로 구성된다. 비임은 바닥으로부터 13.5cm의 높이에 놓여 있고 플라스틱 장벽에 의해 5개의 구획(폭: 5.5cm)으로 분리된다. 실험자의 시야로부터 멀리 향하게 하고 생쥐를 이의 운동 방향과 반대 방향으로 미리 선회시킨 로드(4rpm) 위에 올려놓아 전진 운동에 의해 추락을 막을 수 있도록 한다. 로토로드는 각각의 5분간의 시도 동안에 4rpm에서 40rpm으로 점진적으로 서서히 가속화된다. 15분의 간격을 두고 3일간 매일 4회의 시도로 추락 전의 잠재기를 측정한다. 생쥐가 2회의 완전한 회전 동안 움직임 없이 로드 위에 매달려 있을 때마다(수동적 회전) 그것은 추락한 것으로 간주한다. 고의로 점프하는 생쥐는 없는 것으로 보이기 때문에 협응 기술의 유효 측정을 수득할 수 있다. 훈련 후 다양한 정상적 및 병리학적 반사 작용을 평가한다.

V. 면역 조직 화학에 의한 뇌의 베타-아밀로이드 축적 측정

[Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and upregulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J Biol Chem*. 2002 Jun 21; 277(25):22768~80 참조]

생쥐를 포스페이트 완충된 염수(10mM NaHPO₄, 150mM NaCl, pH 7.1)로 심장 관류시키고 4% 파라포름알데히드로 고정시킨다. 냉동된 뇌 부분을 ProbeOn Plus 마이크로스코프 슬라이드(Fisher Scientific) 위에 탑재된 초저온 냉각조를 사용하여 12µm 두께로 관상으로 구획하고 공기 건조시킨다. 염색 직전에 뇌 구획을 아세톤으로 고정시킨다. 조직 구획을 0.3% H₂O₂ 및 0.3% 정상적 염소 혈청 중에서 30분간 배양하고, 포스페이트 완충된 염수로 세척하고, 포스페이트 완충된 염수 중에서 1.5% 정상적 염소 혈청과 함께 30분간 배양한다. 그런 후 뇌 구획을 비오틴화 항-생쥐 IgG(1:200, Vector Laboratories)로 염색된 항-Aβ 항체 6E10(1:1000, Senetik)과 함께 배양하고, Vectastain ABC Reagent(1:100, Vector Laboratories)로 면역 검출한다. 구획을 헤마톡실린을 사용하여 반대로 염색시킨다.

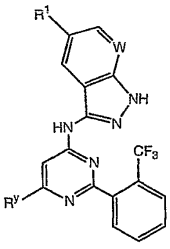
위에서 본 발명의 다수의 양태를 설명하였으나 이러한 기본적인 실시예들은 본 발명의 화합물 및 방법을 사용한 기타의 양태로 변형될 수 있음이 분명하다. 따라서 본 발명의 범위는 실시예에 의해 설명된 특정 양태에 의해 제한되는 것이 아니라 첨부된 청구의 범위에 의해 한정되는 것으로 이해한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

화학식 I의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염.

화학식 I



위의 화학식 I에서,

W는 질소 또는 CH이고,

R¹은 수소 및 불소로부터 선택되며,

R^y는 N(R²)₂ 또는 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는 5원 또는 6원 포화 환으로 임의로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹(여기서, R²는 각각 독립적으로 수소 및, OH, N(R³)₂ 또는 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는 5원 또는 6원 포화 환으로 임의로 치환된 C₁₋₃ 지방족 그룹으로부터 선택되고, R³은 각각 독립적으로 수소 및 C₁₋₃ 지방족 그룹으로부터 선택된다)이고,

R¹이 수소이고 W가 CH인 경우, R^y는 메틸이 아니다.

청구항 2.

제1항에 있어서, R^y가 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화합물.

청구항 3.

제2항에 있어서, R^y가 메틸, 에틸, 사이클로프로필, 3급 부틸 및 이소프로필로부터 선택되는 화합물.

청구항 4.

제3항에 있어서, R^y가 메틸, 사이클로프로필 및 3급 부틸로부터 선택되는 화합물.

청구항 5.

제1항에 있어서, W가 질소인 화합물.

청구항 6.

제1항에 있어서, W가 CH인 화합물.

청구항 7.

제1항에 있어서, R¹이 수소인 화합물.

청구항 8.

제1항에 있어서, R¹이 불소인 화합물.

청구항 9.

제1항에 있어서, R^y가 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는 6원 포화 환으로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화합물.

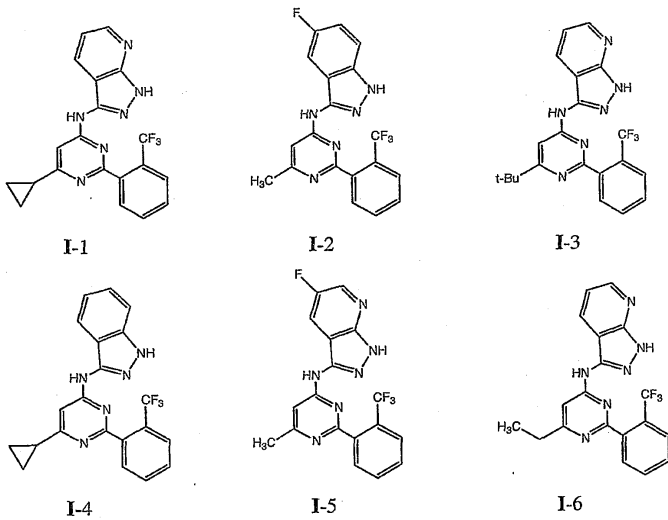
청구항 10.

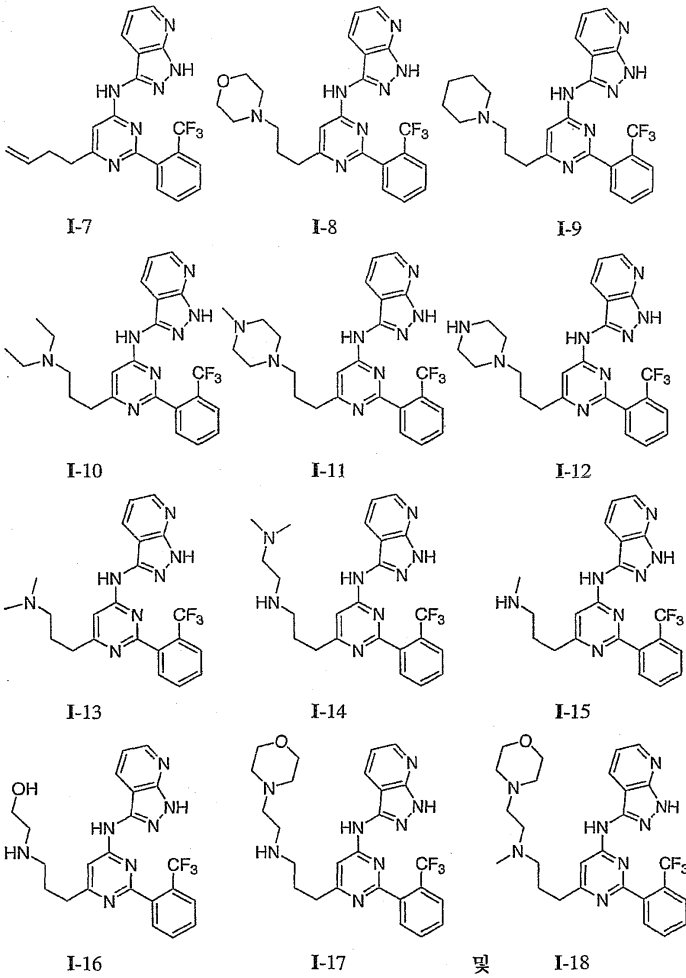
제9항에 있어서, R^y가 모르폴리닐, 피페리디닐 또는 피페라지닐 환으로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화합물.

청구항 11.

제1항에 있어서, R^y가 N(R²)₂로 치환된 C₁₋₄ 지방족 그룹인 화합물.

청구항 12.





로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물.

청구항 13.

제1항에 따르는 화합물과 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 또는 부형제를 포함하는, 약제학적으로 허용되는 조성물.

청구항 14.

제13항에 있어서, 알츠하이머 질환(AD) 치료제, 파킨슨 질환 치료제, 다발성 경화증(MS) 치료제, 천식 치료제, 항염증제, 면역조절제, 면역억제제, 항신경 인자, 발작 치료제, 심혈관 질환 치료제, 항우울제, 항정신병제 및 당뇨병 치료제로부터 선택된 추가의 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 15.

생물학적 샘플을 제13항에 따르는 조성물(a) 또는 제1항에 따르는 화합물(b)과 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 샘플에서 GSK3 키나아제 활성을 억제하는 방법.

청구항 16.

제13항에 따르는 조성물(a) 또는 제1항에 따르는 화합물(b)을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 환자에서 GSK3 키나아제 활성을 억제하는 방법.

청구항 17.

제13항에 따르는 조성물을 자가면역 질환, 염증 질환, 대사 장애, 정신 장애, 당뇨병, 맥관형성 장애, 타우오포시 (tauopathy), 신경계 또는 신경변성 장애, 척수 손상, 녹내장, 대머리 또는 심혈관 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여, 환자에서 자가면역 질환, 염증 질환, 대사 장애, 정신 장애, 당뇨병, 맥관형성 장애, 타우오포시 (tauopathy), 신경계 또는 신경변성 장애, 척수 손상, 녹내장, 대머리 또는 심혈관 질환을 치료하는 방법.

청구항 18.

제17항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 알러지, 천식, 당뇨병, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환, 파킨슨 질환, AIDS-관련 치매, 근위축성 측삭 경화증(ALS, 루게릭 질환), 다발성 경화증(MS), 두부 외상으로 인한 손상, 정신분열증, 불안증, 양극성 장애, 타우오포시, 척수 또는 말초 신경 손상, 심근경색증, 심근세포 비대증, 녹내장, 주의력 결핍 장애(ADD), 우울증, 수면 장애, 재관류/허혈, 발작, 맥관형성 장애 및 대머리로부터 선택되는 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 발작인 방법.

청구항 20.

제18항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 알츠하이머 질환인 방법.

청구항 21.

제17항에 있어서, 장애가 신경계 또는 신경변성 장애인 방법.

청구항 22.

제13항에 따르는 조성물을 남성 환자에게 투여함을 포함하여, 남성 환자에서 정자 운동성을 감소시키는 방법.

청구항 23.

제17항에 있어서, 알츠하이머 질환(AD) 치료제, 파킨슨 질환 치료제, 다발성 경화증(MS) 치료제, 천식 치료제, 항염증제, 면역조절제, 면역억제제, 항신경 인자, 발작 치료제, 심혈관 질환 치료제, 항우울제, 항정신병제 및 당뇨병 치료제로부터 선택된 추가의 치료제를 환자에게 투여하는 추가의 단계를 포함하고,

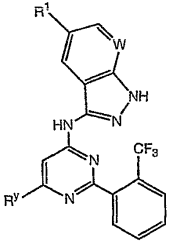
추가 치료제가 치료하고자 하는 질환에 대해 적합하며,

추가 치료제가 단일 용량 형태로서 당해 조성물과 함께 투여되거나 다중 용량 형태의 일부로서 당해 조성물과는 별도로 투여되는 방법.

요약

본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 유도체를 제공한다. 당해 화합물은 단백질 키나아제의 억제제, 특히 GSK3 포유동물 단백질 키나아제의 억제제이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물 및 각종 단백질 키나아제 매개된 장애를 치료하는 데 당해 화합물 및 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

화학식 I



위의 화학식 I에서,

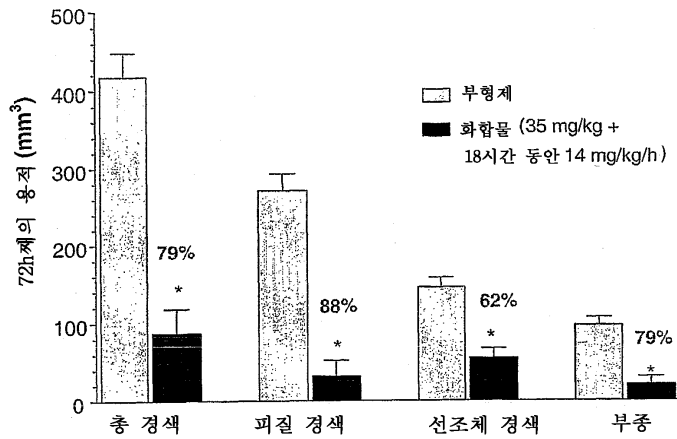
W, R¹ 및 R^y는 본원에서 정의한 바와 같다.

색인어

단백질 키나아제 억제제, GSK3 포유동물 단백질 키나아제 억제제,

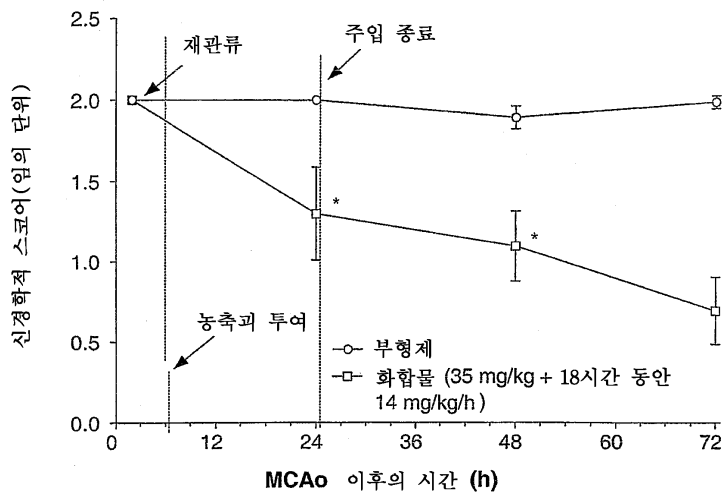
도면

도면1



*부형제 대조군에 비해 p<0.0001(양방향 스튜던츠 t-테스트)
(n=12 부형제, 10)

도면2



* 부형제 대조군에 비해 p<0.05(양방향 스튜던츠 t-테스트)