



등록특허 10-2508288



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월09일
(11) 등록번호 10-2508288
(24) 등록일자 2023년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/44 (2006.01) *A61K 31/47* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/44 (2013.01)
A61K 31/47 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7034626
- (22) 출원일자(국제) 2017년06월02일
심사청구일자 2020년05월27일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월29일
- (65) 공개번호 10-2019-0015257
- (43) 공개일자 2019년02월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/IN2017/050224
- (87) 국제공개번호 WO 2017/208267
국제공개일자 2017년12월07일
- (30) 우선권주장
201621019087 2016년06월02일 인도(IN)
201621019185 2016년06월02일 인도(IN)

- (56) 선행기술조사문헌
KR1020140016889 A*
KR1020180011772 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 3 항

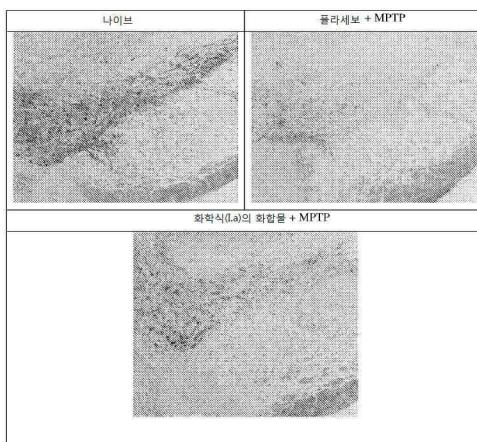
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **파킨슨병의 치료****(57) 요약**

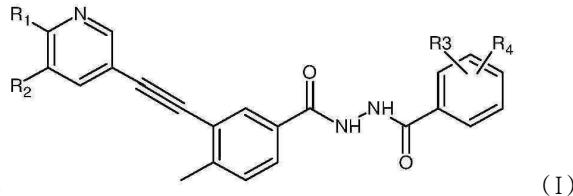
본 발명은 하기 화학식(I)갖는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

도 1. 디로신 하이드록실라이아제(TH)-양성 뉴런을 나타내는 코로날 섹션으로부터의 현미경 사진



는, 파킨슨병을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다:



상기 식에서,

R₁은 -NHC(O)C₃₋₆ 시클로알킬이고,

R₂는 수소이고;

또는 R₁ 및 R₂는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 여기서 방향족 고리는 수소, 할로겐 및 C₁₋₆ 알킬로부터 선택된 1 이상의 기로 치환되고;

R₃ 및 R₄는 수소, 할로겐, C₁₋₃ 알킬, OC₁₋₃ 알킬, NO₂, SC₁₋₃ 알킬, C₁₋₃ 할로알킬, OC₁₋₃ 할로알킬 및 SC₁₋₃ 할로알킬을 포함하는 군으로부터 독립적으로 선택된다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

(72) 발명자

우파드하, 만노지 아트마람지

인디아 바로다 390020 구자레트 탄달자 로드 니어
프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드 씬 파마 어드밴
스트 리서치 센터 씬 파마 어드밴스트 리서치 컴페
니 리미티드

메헤트례, 사미어 비시와나트

인디아 바로다 390020 구자레트 탄달자 로드 니어
프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드 씬 파마 어드밴
스트 리서치 센터 씬 파마 어드밴스트 리서치 컴페
니 리미티드

치드레와르, 가자난 우타마로오

인디아 바로다 390020 구자레트 탄달자 로드 니어
프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드 씬 파마 어드밴
스트 리서치 센터 씬 파마 어드밴스트 리서치 컴페
니 리미티드

센구프타, 프라발

인디아 바로다 390020 구자레트 탄달자 로드 니어
프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드 씬 파마 어드밴
스트 리서치 센터 씬 파마 어드밴스트 리서치 컴페
니 리미티드

치트튜리, 트리나드하 라오

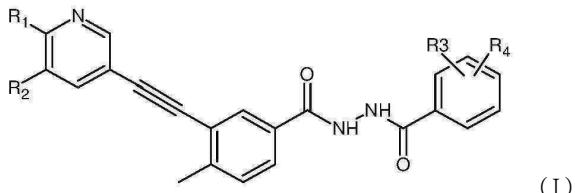
인디아 바로다 390020 구자레트 탄달자 로드 니어
프라탐 엔클레이브 니마 컴파운드 씬 파마 어드밴
스트 리서치 센터 씬 파마 어드밴스트 리서치 컴페
니 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식(I)의 화합물을 포함하는, 파킨슨병의 치료 또는 예방용 약학적 조성물로서:



식 중에서,

R₁은 -NHC(O) 시클로프로필이고,

R₂는 수소이거나;

또는 R₁ 및 R₂는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 여기서 방향족 고리는 비치환되고;

R₃이 클로로이고 R₄가 메틸이며 고리 내의 2 및 6 위치에서 치환체로서 존재하며,

상기 화학식(I)의 화합물은 시클로프로판카르복시산(5-{5-[N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)히드라진 카르보닐]-2-메틸-페닐에틴일}-피리딘-2-일)아미드 및 N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)-4-메틸-3-[2-(3-퀴놀일)에틴일]-벤조히드라지드로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화학식(I)의 화합물은 시클로프로판카르복시산(5-{5-[N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)히드라진 카르보닐]-2-메틸-페닐에틴일}-피리딘-2-일)아미드인 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 화학식(I)의 화합물은 N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)-4-메틸-3-[2-(3-퀴놀일)에틴일]-벤조히드라지드인 것인 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

발명의 설명

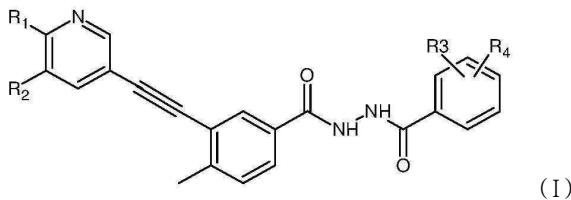
기술 분야

[0001]

본 출원은 2016년 6월 2일 출원된 인도 특허출원 제 IN 201621019087 호 및 2016년 6월 2일 출원된 인도 특허출원 제 IN 201621019185 호의 우선권을 주장하는 출원으로서 본원에서 참고로 인용된다.

[0002]

본 발명은 환자에게 하기 화학식(I)의 화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다:



[0003]

상기 식에서,

R₁은 -NHC(O)C₃₋₆ 시클로알킬이고,R₂는 수소이고;또는 R₁ 및 R₂는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 여기서 방향족 고리는 수소, 할로겐 및 C₁₋₆ 알킬로부터 선택된 1 이상의 기로 치환되고;R₃ 및 R₄는 수소, 할로겐, C₁₋₃ 알킬, OC₁₋₃ 알킬, NO₂, SC₁₋₃ 알킬, C₁₋₃ 할로알킬, OC₁₋₃ 할로알킬 및 SC₁₋₃ 할로알킬을 포함하는 군으로부터 독립적으로 선택된다.

배경 기술

c-Ab1은 세포의 생존, 성장 및 운동성의 조절을 포함하는 다양한 세포과정에 관여하는 비수용체 단백질 티로신 키나아제이다. 만성 골수성 백혈병의 치료에서 임상 사용을 위해 이마티닙(Gleevec[®]), 닐로티닙(Tasigna[®]), 다사티닙(Sprycel[®]) 및 포나티닙(Iclusig[®])과 같은 c-Ab1 키나아제 억제제가 개발 및 시판되고 있다.

최근의 연구에 따르면, c-Ab1은 산화적 스트레스에 의해 유발되는 신경 세포의 사멸에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(Wu et al., Cell Death Differ., 2016; 23:542-552). c-Ab1은 파킨슨병에 관여한다는 보고가 있다(Gonfloni et al., Int. J. Cell Biol., 2012, 2012:1-7). 또한, c-Ab1은 도파민성 스트레스 및 도파민성 신경 독에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다. 즉, 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로페리딘(MPTP, 생체내에서 효소적으로 활성형태인 MPP⁺으로 전환된 것)은 파킨(parkin)의 티로신 인산화를 야기하여 파킨의 E3 연결효소(ligase) 활성을 상실시킨다. 이것은 파킨의 다양한 기질의 축적과 궁극적으로는 도파민성 신경세포의 사멸을 가져온다(Ko et al., PNAS, 2010; 107:16691-16696).

파킨슨 병(PD)은 루이체(Lewy bodies)와 루이 신경염 (Lewy neuritis)으로 지정된 세포내 포함체(intracellular inclusions)에서의 단백질 축적과 도파민성 신경세포의 손실로 특징지어지는 일반적인 신경퇴행성 질환이다. 희귀한 가족 돌연변이가 α-시누클레인(synuclein) 및 LRRK2 돌연변이와 같은 만성 진행성 신경퇴행성 질환에 대한 통찰력을 제공하여 상염색체-우성 PD를 유발하는 반면, DJ-1, PINK1 및 파킨슨병의 돌연변이는 상염색체-열성 PD를 유발한다. 파킨(Parkin)은 E3 유비퀴틴 연결효소(ubiquitin ligase)이며, 가족 돌연변이는 파킨의 E3 연결효소 활성을 손상시키는 것으로 생각된다(Ko et al., PNAS, 2010; 107:16691-16696).

c-Ab1은 PD의 발병 기전에 관여하는 두 단백질, 즉 파킨 (Parkin) 및 α-시누클레인의 분해를 조절하는 것으로 나타났다(Mahul-Mellier et al., Hum. Mol. Genet., 2014; 23:2858-2879). c-Ab1은 티로신 143에서 파킨을 인산화시킨다. 이 인산화는 파킨의 E3 유비퀴틴 연결효소 활성을 억제하여 AIMP2 및 FBP1(파킨 기질)의 축적 및 세포 사멸을 초래하는 파킨의 세포보호 기능의 상실을 초래한다(Ko et al., PNAS, 2010; 107 : 16691-16696, Imam et al., J. Neurosci., 2011; 31:157-163). 또한, c-Ab1은 PD의 발병 기전에 강하게 연루된 시냅스 단백질인 α-시누클레인의 제거를 조절한다. α-시누클레인과 c-Ab1 사이의 생체 내 양방향 관계는 α-시누클레인 발현의 증가가 c-Ab1의 인산화 및 후속 활성화를 촉진시키는 것으로 기술되어 있다. 반대로, c-Ab1 발현 및 활성화의 증가는 α-시누클레인 축적 및 응집을 유도하여 c-Ab1의 억제가 도파민성 뉴런을 PD에서 축적된 α-시누클레인 독성으로부터 보호할 수 있는 실용적인 전략이 될 수 있음을 시사한다(Hebron et al., Hum. Mol. Genet., 2013; 22:3315-3328; Hebron et al., Autophagy, 2013; 9:1249-1250).

닐로티닙(nilotinib)과 같은 c-Ab1 억제제는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로페리딘(이하, 'MPTP' 포함)으로 유도된 PD의 마우스 모델에서 혈액-뇌 장벽을 통과하고 도파민성 신경을 보호하는 것으로 알려져 있다(Karuppagounder et al., Sci. Rep 2014; 4:4874). 닐로티닙은 자가포식(autophagy) 경로를 통해 α-시누클레인 제거를 증가시키고 PD의 마우스 모델에서 도파민성 뉴런의 α-시누클레인 축적-유도 손실을 방지한다(Hebron et

al., Hum. Mol. Genet., 2013; 22:3315-3328, Imam et al., J. Neurosci., 2011; 31:157-163). 또한, US 20150087653에서는 닐로티닙과 같은 티로신 키나아제 억제제를 투여하여 신경퇴행성 질환을 치료하는 방법에 대해 기재하고 있다. 그러나, 닐로티닙은 몇몇 중요한 약 관련 부작용을 갖고 있다. 미국 FDA는 그의 치료가 잠재적으로 심각한 심장 부작용 (QT 연장) 및 환자의 갑작스런 사망과 관련되어 있기 때문에 Tasigna® 캡슐에 대한 박스 경고를 하였다. 다사티닙(dasatinib)은 흉막심출과 출혈을 일으키는 것으로 알려져 있다. 포나티닙(ponatinib)은 또한 혈전 색전증 및 혈관 폐색과 같은 심각한 부작용과 관련이 있다. 이마티닙(imatinib)은 Ab1 키나아제의 강력한 억제제가 아니다. 더욱이, 이마티닙과 다사티닙은 모두 P-글리코프로테인(p-gp) 기질이므로 뇌 농도(brain concentration)가 낮다.

발명의 내용

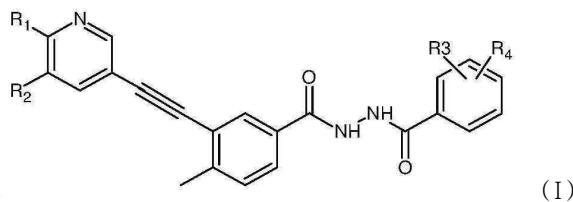
해결하려는 과제

[0014] 따라서, 혈액-뇌 장벽을 통과하고 심혈관 부작용을 유발하지 않는 강력한 Ab1 키나아제 억제제가 필요한 상황이다.

과제의 해결 수단

발명의 개요

[0016] 본 발명은 환자에게 하기 화학식(I)을 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 그 염의 치료유효량을 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다:



[0017]

[0018] 상기 식에서,

[0019]

R₁은 -NHC(O)C₃₋₆ 시클로알킬이고,

[0020]

R₂는 수소이고;

[0021]

또는 R₁ 및 R₂는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 여기서 방향족 고리는 수소, 할로겐 및 C₁₋₆ 알킬로부터 선택된 1 이상의 기로 치환되고;

[0022]

R₃ 및 R₄는 수소, 할로겐, C₁₋₃ 알킬, OC₁₋₃ 알킬, NO₂, SC₁₋₃ 알킬, C₁₋₃ 할로알킬, OC₁₋₃ 할로알킬 및 SC₁₋₃ 할로알킬을 포함하는 군으로부터 독립적으로 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 화학식(I.a)의 화합물에 의한 신경퇴행의 예방을 나타내는, 티로신 하이드록실라아제(TH)-양성 뉴런을 나타내는 코로날 섹션으로부터의 현미경 사진이다.

도 2는 화학식(I.a)의 화합물의 투여에 대한 TH-양성 뉴런의 백분율 면적을 나타내는 도면이다.

도 3은 화학식(I.a)의 화합물의 투여에 대한 TH-면역 반응성의 통합 밀도를 나타낸 도면이다.

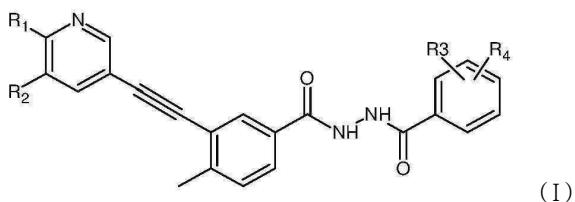
도 4는 화학식(I.b)의 화합물에 의한 신경퇴행의 예방을 나타내는 것으로서, 티로신 하이드록실라아제(TH)-양성 뉴런을 나타내는 코로날 섹션으로부터의 현미경 사진이다.

도 5는 화학식(I.b)의 화합물의 투여에 대한 TH-양성 뉴런의 백분율 면적을 나타낸 도면이다.

도 6은 화학식(I.b.)의 화합물의 투여에 대한 TH-면역 반응성의 통합 밀도를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명의 일 요지는 환자에게 하기 화학식(I)을 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그 염의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병의 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이다:



[0025]

상기 식에서,

[0026]

R_1 은 $-NHC(O)C_{3-6}$ 시클로알킬이고,

[0027]

R_2 는 수소이고;

[0028]

또는 R_1 및 R_2 는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 여기서 방향족 고리는 수소, 할로겐 및 C_{1-6} 알킬로부터 선택된 1 이상의 기로 치환되고;

[0029]

R_3 및 R_4 는 수소, 할로겐, C_{1-3} 알킬, OC_{1-3} 알킬, NO_2 , SC_{1-3} 알킬, C_{1-3} 할로알킬, OC_{1-3} 할로알킬 및 SC_{1-3} 할로알킬을 포함하는 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0030]

본 발명의 또 다른 요지는 파킨슨병을 앓고 있거나 파킨슨병을 발병할 위험이 있는 환자를 선택하고 환자에게 치료유효량의 화학식(I)의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는 것이다.

[0031]

본 발명에서 "화학식(I)의 화합물의 치료유효량"은 투여되었을 때 치료 효과를 나타내는 화학식(I)의 화합물의 양을 의미한다.

[0032]

본 발명에서 "알킬"은 선형 또는 분지형의 주체에 탄소 및 수소 원자를 단독으로 포함하고 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 결합된 포화 탄화수소 사슬 라디칼을 의미하며, 예를 들면 메틸, 에틸, n-프로필, 1-메틸에틸(이 소프로필), n-부틸 및 n-펜틸이 있다.

[0033]

" C_{3-6} 시클로알킬"은 3 내지 6 탄소 원자의 비방향족 단일 시클릭 고리형을 나타낸다. 모노시클릭 고리는 시클로

프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 포함한다.

[0034]

" C_{1-6} 알킬"에서의 수치는 알킬 사슬에 1 내지 6개의 탄소 원자가 있음을 나타낸다.

[0035]

" C_{3-6} 시클로알킬"은 3 내지 6 탄소 원자의 비방향족 단일 시클릭 고리형을 나타낸다. 모노시클릭 고리는 시클로

프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 포함한다.

[0036]

"할로알킬"은 염화물, 브롬화물, 요오드화물 및 불화물로부터 선택된 1 이상의 할로겐 라디칼로 치환된 알킬 사슬을 의미한다.

[0037]

본 발명의 일 실시형태는, R_1 이 $-NHC(O)$ 시클로프로필이고 R_2 가 수소인 화학식(I)의 화합물을 치료유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0038]

본 발명의 다른 실시형태는, R_1 및 R_2 가 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 방향족 고리가 수소, 할로겐 및 C_{1-6} 알킬로부터 선택된 1 이상의 기로 치환되는 화학식(I)의 화합물을 치료유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 바람직하게는, 방향족 고리는 수소로 치환되는 것으로, 즉 비치환된다.

[0039]

본 발명의 또 다른 실시형태는, R_1 및 R_2 가 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 6-원 방향족 고리를 형성하고, 방향족 고리가 수소 치환, 즉 비치환되고, R_3 이 클로로이고, R_4 가 메틸이며 고리 내의 2 및 6 위치에서 치환체로서 존재하는 화학식(I)의 화합물을 치료유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0040]

본 발명의 또 다른 실시형태는, R_3 및 R_4 가 할로겐 및 C_{1-6} 알킬로부터 선택되는 화학식(I)의 화합물을 치료유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 파킨슨병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, R_3 및 R_4

는 할로겐 및 메틸이고, 고리 내의 2 및 6 위치에서 치환기로서 존재한다.

[0041] 화학식(I)의 바람직한 화합물은 하기 표 1에 나타냈다.

표 1:

화합물 번호	화합물 명칭
I.a	N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)-4-메틸-3-[2-(3-퀴놀일)에틴일]-벤조히드라지드
I.b	시클로프로판카르복시산(5-(5-[N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)히드라진 카르보닐]-2-메틸-페닐에틴일)-페리딘-2-일)아미드
I.c	시클로헥산카르복시산(5-(5-[N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)히드라진 카르보닐]-2-메틸-페닐에틴일)-페리딘-2-일)아미드
I.d	시클로부탄카르복시산(5-(5-[N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)히드라진 카르보닐]-2-메틸-페닐에틴일)-페리딘-2-일)아미드
I.e	N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)-4-메틸-3-[2-(6-클로로-3-퀴놀일)에틴일]-벤조히드라지드
I.f	N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)-4-메틸-3-[2-(6-메틸-3-퀴놀일)에틴일]-벤조히드라지드
I.g	N'-(2-클로로-6-메틸벤조일)-4-메틸-3-[2-(6-플루오로-3-퀴놀일)에틴일]-벤조히드라지드

[0042]

[0043] 본 발명에 따른 화합물의 적합한 제약상 허용되는 염은 염산, 브롬화수소산, 인산 등과 같은 무기산염; 또는 아세트산, 벤젠су阜산, 메탄су阜산, 벤조산, 시트르산, 글리콜산, 젖산, 푸마르산, 숙신산, 아디프산, 피렐산, 수베르산, 아젤라산, 말산, 타르타르산, 또는 글루탐산 또는 아스파라긴산과 같은 아미노산의 유기산염이 있다. 화학식(I)의 화합물 중 1 이상의 수소 원자는 중수소화, 즉 중수소 원자로 치환될 수 있다.

[0044]

WIPO 공개 WO 2012098416 ('416 공개)은 c-Ab1 키나아제 억제제로서 활성인 화합물의 마커시(markush) 그룹 및 만성 골수성 백혈병 (CML)과 같은 암의 치료에 대한 그의 유용성에 대해 기재하고 있다. 본 발명에 따른 화학식(I)의 화합물은 본발명에서 참고로 하는 WO 2012098416 및 WO 2016185490에 기재된 방법에 의해 제조 될 수 있다.

[0045]

본 발명자들은 본 발명에 따른 화학식(I)의 화합물이 강력한 Ab1 키나아제 억제제이며, 혈액-뇌 장벽을 효과적으로 통과하여 화학식(I)의 화합물에 대한 뇌 대 혈장농도의 높은 비율 및 높은 치료지수를 가져온다는 것을 알아냈다.

[0046]

특히, 본 발명자들은, 의식있는 비글 개(beagle dog)와 기니 피그에게 시험하였을 때, 화학식(I)의 화합물이 치료유효량으로 투여될 경우, hERG 채널에 대한 생체내 효과 및 QT 간격, QT_c 간격, QT_{cf} 간격 및 심박수와 같은 ECG 파라미터에 대한 생체내 효과에 있어서 심혈관 부작용이 없다는 것을 알아냈다. 화학식(I)의 화합물을 본 발명의 실시예에서 기술된 바와 같이 ECG 파라미터 및 심박수에 대해 과도한 효과를 나타내지 않아 안전하다는 것이 판명되었다.

[0047]

화학식(I)의 화합물은 적합한 투여형태로 경구투여될 수 있다. 적합한 투여 형태는 정제, 펠릿, 캡슐, 봉지제(sachet), 봉지내의 펠렛, 캡슐내의 펠릿, 분말, 과립제 등을 포함할 수 있다. 화학식(I)의 화합물은 당업자에게 통상적인 지식으로서 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있는 경구투여 형태로 제제화될 수 있다. "Remington's Pharmaceutical Sciences", 제16판, E. W. Martin"(Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)은 적합한 투여형태의 제조에 사용될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체에 대해 기재하고 있다.

[0048]

하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하지 않으면서 예시하는 것이다.

실시예 1

AbI 키나아제 억제

[0051]

25 μL의 최종 반응 부피에서, Ab1(인간) (5-10 mU)을 8 mM MOPS pH 7.0, 0.2 mM EDTA, 50 μM EAIYAAPFAKKK, 10 mM Mg (OAc)₂ 및 [γ -³³P-ATP] [비활동도 약 500 cpm/pmol, 필요에 따른 농도]와 함께 배양하였다. 반응은 MgATP 혼합물의 첨가에 의해 개시되었다. 실온에서 40분 동안 유지한 후, 3% 인산 용액 5 μL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 10 μL를 P30 필터매트 상에 스포팅하고, 75 mM 인산 중에서 5분 동안 3회 세척하고, 건조 및 신틸레이션(scintillation) 카운팅하기 전에 메탄올로 1회 세척하였다.

[0052] 화학식(I)의 대표적인 화합물에 대한 결과를 표 2에 나타냈다.

표 2: c-Abl에서 티로신 키나아제 억제제의 비교 효능

IC ₅₀ (nM)					
I.a	I.b	닐로티닙	포나티닙	다사티닙	이마티닙
0.9	0.6	18	0.4	0.27	190

[0053]

[0054] 실시예 2

[0055] 뇌/혈장 약물동태 시험

[0056] 화학식(I.a)의 화합물이 혈액-뇌 장벽을 통과하는지의 여부를 측정하기 위해서, C57BL6 마우스에게 화학식(I.a)의 화합물 30 mg/kg, 닐로티닙 100 mg/kg 또는 다사티닙 30 mg/kg을 경구투여하였다. 처리한 후 1, 4 및 8 시간 시점에서, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 0.4 mL의 혈액을 안구 뒤쪽 망상조직(retro-orbital plexus)에서 채취한 후, 항응고제(100 IU/ml)로서 8 μL 나트륨 해파린을 함유한 에펜도르프 튜브에 넣은 다음, 얼음 용기로 옮겼다. 혈액 샘플을 8,500 rpm, 4°C에서 7분 동안 즉시 원심분리하였다. 혈장을 미리 라벨링된 에펜도르프 튜브에서 분리하고 추후 분석전까지 -70 °C에서 보관하였다. 그 직후, 마우스를 희생시켜 전체 뇌를 제거한 후, 얼음 냉각된 인산 완충 식염수(PBS)로 씻어낸 다음, 외래 혈액을 제거하고 얼룩을 건조하였다. 뇌조직 샘플을 칭량하고 조직 호모지나이저를 사용하여 PBS 1:2 부피로 균질화한 후, 추가 분석전까지 -70°C에서 라벨 표시된 바이알에 보관하였다. 뇌 및 혈장 중 화학식(I.a)의 화합물의 농도는 LC-MS 기술을 이용하여 측정하였다.

[0057] 혈장에 대한 뇌의 비율은 닐로티닙 또는 다사니닙에 비해서 화학식(I.a)의 화합물에서 매우 높은 것으로 나타났다(표 3 참조).

표 3: 뇌와 혈장 중 화합물의 농도

화합물	처리* (mg/kg)	시점 (시간)	혈장농도 (혈장의 mL당 화합물의 ng)	뇌농도 (뇌조직의 g당 화합물의 ng)	뇌/혈장 농도의 비
화학식(I.a)의 화합물	30	1	4798 ± 858	1901 ± 959	0.40
		4	3167 ± 50	510 ± 367	0.16
		8	2715 ± 379	435 ± 157	0.16
닐로티닙	100	1	31683 ± 7958	380 ± 70	0.01
		4	38813 ± 11635	487 ± 126	0.01
		8	16988 ± 2133	180 ± 46	0.01
다사티닙	30	1	553 ± 550	23.4 ± 0	0.04
		4	222 ± 122	25 ± 5	0.11
		8	BQL	24 ± 4	-

BQL-정량한계 이하

[0058]

[0059] 실시예 3

[0060] 화학식(I.a)의 화합물에 대한 파킨슨병의 동물 모델에서의 효능

[0061] C57BL/6 마우스(6-8 주령, 체중 25-30g)에게 화학식(I.a)의 화합물(1일 1회, 10 또는 30 mg/kg)을 비히클로 7 일 동안 경구투여 하였다. 7 일째, 이를 동물에게 식염수에 용해한 신경독소인 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(MPTP-HCl; 17 mg/kg 유리 염기; Sigma)을 2시간 간격으로 4회 복강내 주입하였다. MPTP를 마지막으로 주입한 후 화합물을 계속하여 7일 동안 매일 추가적으로 투여하였다. 요약하면, 화합물은 MPTP 투여 6일 전, MPTP 투여 당일 및 MPTP 투여 7일 후에 투여되었다. MPTP 투여 7일 후에 모든 동물을 희생시키고 뇌 조직을 면역조직 화학적 평가를 위해 처리하였다. 표준 아비딘-비오딘 방법(Benno et al, Brain Res., 1982; 246:225-236)을 이용하여 티로신 히드록실라제(TH)의 면역조직 화학적 검출을 하였다. 초기에, 냉동미세절단기를 사용하여 섭스텐티아 니그라 파스 컴팩타(substantia nigra pars compacta, SNpc) 수준으로 뇌를 절단하여 유리 슬라이드 상에 놓았다. 상기 절단된 뇌가 놓인 슬라이드를 0.1M PBS에서 3 x 5분 린스하였다. 0.3M Triton X-100을 함유한 0.1M PBS 중에서 정상차단 혈청과 함께 절단된 뇌를 실온에서 30분간 먼저 유지(incubation)한

후, 0.1M PBS 중에서 토키 폴리클론 항체와 마우스 티로신 헤드록실라제(Invitrogen)가 1 : 1,000의 비율로 희석된 정상차단 혈청과 함께 2시간 동안 더 유지하였다. 절단된 뇌가 놓인 슬라이드를 0.1M PBS에서 3 x 5분간 더 린스한 후, 실온에서 1 시간 동안 비오티닐화 항-토키 항체(Vectastain® ABC 키트)와 함께 유지하였다. 절단된 뇌를 0.1M PBS로 3 x 5분 린스한 후, 0.1M PBS 중에 1:50으로 희석된 A 및 B 용액 (Vectastain® ABC 키트)과 함께 실온에서 1 시간 동안 유지하였다. 1 시간 후 절단된 뇌를 0.1M PBS 중에서 3 x 5분간 린스한 후, 약 5 내지 8 분 동안 3,3'-디아미노벤자린(DAB)/H₂O₂ 용액(시그마)에서 유지하였다 (최적의 신호-잡음비에 대해 진행 과정을 현미경으로 체크하였다). 절단된 뇌를 먼저 0.1M PBS로 2 x 5분간 린스한 다음 Milli-Q 물로 3 x 5분간 린스하였다. 슬라이드를 글리세롤-젤라틴 용액으로 도포한 후 실온에서 철야 유지하여 건조한 다음, 염색된 뇌 절편의 이미지를 현미경에 부착된 카메라로 촬영하고 NIH ImageJ® 소프트웨어 (NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 분석하였다. 이미지는 8 비트 해상도와 최적의 명도/콘트라스트로 변환하여 분석되었다. 개별 이미지의 배경 및 의사신호를 제거하고 세포체와 섬유로 덮인 면적을 측정하였다. 총 이미지 면적 및 통합된 밀도와 비교된 백분율 면적을 계산하였다. 얻어진 결과를, GraphPad Prism® 6.0을 사용하여 그룹 간 또는 그룹 내 변이 및 통계적 유의성에 대해 비교하였다. 화학식(I.a)의 화합물을 투여한 결과, TH-양성 뉴런(도 1), TH-양성 뉴런의 백분율 면적 측정(도 2) 및 TH-면역반응의 통합밀도(도 3)를 나타내는 코로날 섹션의 현미경 사진으로부터 알 수 있는 바와 같이, MPTP에 의해 유도된 신경퇴행을 현저히 방지하였다.

[0062] 실시예 4

[0063] 화학식(I.b)의 화합물에 대한 파킨슨병의 동물 모델에서의 효능

파킨슨병을 치료하기 위한 화학식(I.b)의 화합물의 효능을 상기 실시예 3의 화학식(I.a)의 화합물에 대해 기재된 바와 동일한 방법으로 시험하였다.

[0065] 얻어진 결과를, GraphPad Prism® 6.0을 사용하여 그룹 간 또는 그룹 내 변이 및 통계적 유의성에 대해 비교하였다. 화학식(I.b)의 화합물을 투여한 결과, TH-양성 뉴런(도 4), TH-양성 뉴런의 백분율 면적 측정(도 5) 및 TH-면역반응의 통합밀도(도 4)를 나타내는 코로날 섹션의 현미경 사진으로부터 알 수 있는 바와 같이, MPTP에 의해 유도된 신경퇴행을 현저히 방지하였다.

[0066] 실시예 5

[0067] 전기생리학적 절차-hERG K⁺채널에 미치는 영향

화학식(I.a) 및 화학식(I.b)의 화합물에 있어서, hERG K⁺ 채널의 억제를 측정하기 위하여 시험관 시험에서 심혈관 안전성에 대해 시험하였다. 화학식(I.a) 및 화학식(I.b)의 화합물은 시험된 농도에서 현저한 hERG 전류 억제를 나타내지 않았다.

[0069] 인간 에테르-이동-관련(ether-a-go-go-related) 유전자(hERG)를 안정하게 발현하는 전암-고정된 인간 배아 신장 세포 (HEK293)에서 화학식(I.a) 및 화학식(I.b)의 화합물의 이온 전류에 미치는 시험관내 효과를 시험하였다. 화학식(I.a) 및 화학식(I.b)의 화합물의 2농도(1 μM 및 10 μM)를 생리적 온도 부근에서 시험하였다.

[0070] 세포를 기록챔버로 옮기고 비하를 대조군 용액 (HEPES-완충 생리식염수 + 1% 디메틸су포시드 + 1% 소 혈청 알부민)으로 과주입(superfused)시켰다. 전체 세포 패치 클램프 기록을 위한 마이크로 피펫 용액은 다음과 같이 구성되었다: 칼륨 아스파르테이트, 130mM; MgCl₂, 5mM; EGTA, 5mM; ATP, 4mM; HEPES, 10mM; 10N KOH로 조정된 pH 7.2. 마이크로피펫 용액은 1회분으로 준비하고, 분액 및 냉동 보관하고, 매일 새로운 분액을 해동하였다. 기록은 인-라인(in-line) 용액 예열기, 챔버 히터 및 피드백 온도 제어기를 함께 사용하여 33~35 °C의 온도에서 실시되었다. 온도는 기록챔버에서 서미스터 탐침을 사용하여 측정되었다. 패치 클램프 기록용 마이크로 피펫은 P-97 마이크로 피펫 풀러(Sutter Instruments, Novato, CA)를 사용하여 유리 모세관 튜빙으로 제조되었다. 상업용 패치 클램프 증폭기가 전체 세포기록에 사용되었다. 디지털화되기 전에 전류 기록은 샘플링 주파수의 1/5로 저역 통과 필터링되었다.

[0071] hERG를 안정적으로 발현하는 세포는 -80 mV에서 유지되었다. 시험 화합물(화학식 1a 및 1b)에 기인한 hERG 칼륨 전류의 개시 및 정상 상태 억제는 고정된 진폭을 갖는 펄스 패턴을 이용하여 측정되었다(1초 동안 컨디셔닝 예비펄스 + 20 mV; 5초 간격으로 반복되는 -80 mV(-0.5 V/s)로의 재분극 시험 램프). 각 기록은 내인성 전류의 기여도를 평가하기 위해 대조용 물질(E-4031, 500 nM)의 최고 최대농도의 최종 적용으로 종료되었다. 나머지 억제

되지 않은 전류는 hERG 억제에 대한 시험 화합물의 효능을 측정하기 위해 데이터로부터 디지털 방식으로 오프라인으로 뺐다.

[0072] 화학식(Ia)의 화합물은 비히클 대조군에서 $1.0 \pm 0.6\%$ ($n = 3$)와 비교하여 $1 \mu M$ ($n=3$)에서 (평균 \pm SEM) $2.1 \pm 0.4\%$, 그리고 $10 \mu M$ ($n=3$)에서 $9.7 \pm 0.4\%$ 까지 hERG 전류를 억제하였다(표 4 참조). $10 \mu M$ 보다 높은 화학식(I.a)의 화합물의 농도는 비히클 대조군에서의 화합물의 용해도 한계로 인해 시험하지 않았다.

[0073] 유사한 조건 하에서, 양성 대조군(테르페나딘, $60nM$)은 hERG 칼륨 전류를 (평균 \pm 표준 편차; $n=2$) $82.8 \pm 1.2\%$ 까지 억제하여, hERG K⁺ 채널에서의 매우 높은 농도를 갖는 화학식(I.a)의 화합물에 대해 약간의 효과를 확인하였다. 이와는 달리, 널로티닙은 $1 \mu M$ 농도에서 거의 90%의 억제율을 나타낸다(표 5).

표 4: 화학식(I.a) 및 (I.b)의 화합물의 각 농도에서의 hERG 전류의 평균 억제율(%)

제율(%)

화합물	농도 (μM)	평균	SD	SEM	N
화합물(I.a)	0	1.0 %	1.0 %	0.6 %	3
	1	2.1 %	0.7 %	0.4 %	3
	10	9.7 %	0.7 %	0.4 %	3
화합물(I.b)	0	1.6 %	0.3 %	0.2 %	3
	0.3	5.6 %	1.3 %	0.8 %	3
	1	12.9 %	4.1 %	2.4 %	3
	3	25.0 %	6.0 %	3.4 %	3

* 값은 비히클만의 경우와는 통계적으로 다름.

[0074]

표 5: 널로티닙#에 의한 hERG 전류의 억제율(%)

농도 (μM)	0.03	0.1	0.3	1
억제율(%)	14.9 ± 2	43.9 ± 0.7	70.4 ± 2.5	89.7 ± 1.6

NDA No. 22-068 (Tasigna® 캡슐) pg No. 31에 대한 CDER 약리학적 검토로

부터 얻은 데이터

[0075]

실시예 6

[0077] 의식있는 비글 개에서 QT, QT_c 간격 및 심박수에 대한 화학식(I.a)의 화합물의 효과

[0078] 화학식(I.a)의 화합물을 생체내 시험에 적용하여 의식있는 비글 개에서 QT, QT_{cb} 및 QT_{cf} 간격 및 심박수에 미치는 영향을 측정하였다.

[0079] 화학식(I.a)의 화합물을 의식있는 원격 측정된 암컷 및 수컷 비글 개에게 5, 15, 및 30 mg/kg 의 3 가지 투여량으로 경구(p.o.) 경로를 통해 투여하였다. 투여 후 14분에 화학식(I.a)의 화합물 30 mg/kg 투여량으로 처리된 2마리의 개 (수컷 1 및 암컷 1)에서 구토가 발생하였다. 따라서, 30 mg/kg 투여량으로 처리된 그룹은 데이터 분석에 고려되지 않았다. 5 및 15 mg/kg 투여량으로 처리된 그룹에서는 구토가 관찰되지 않았다.

[0080]

ECG 파라미터 (QT 간격, QT_{cb} 간격, QT_{cf} 간격) 및 심장 박동수를 측정하고, 약물 투여(기준선) 2 시간 전과 투여 후 24 시간까지 지속적으로 기록하였다. 각 동물에게 비히클(플라세보)과 화학식(I.a)의 화합물의 3 가지 상이한 투여량을 상이한 날에 라틴 스퀘어 디자인(Latin square design)으로 최소한 96 시간 세척과 함께 투여하였다. 별도의 날에, 상이한 시점에서 화학식(I.a)의 화합물의 혈장농도를 평가하기 위하여 화학식(I.a)의 화합물을 추가적으로 경구투여를 실시하여 약물동태(PK) 파라미터를 유도하였다.

[0081]

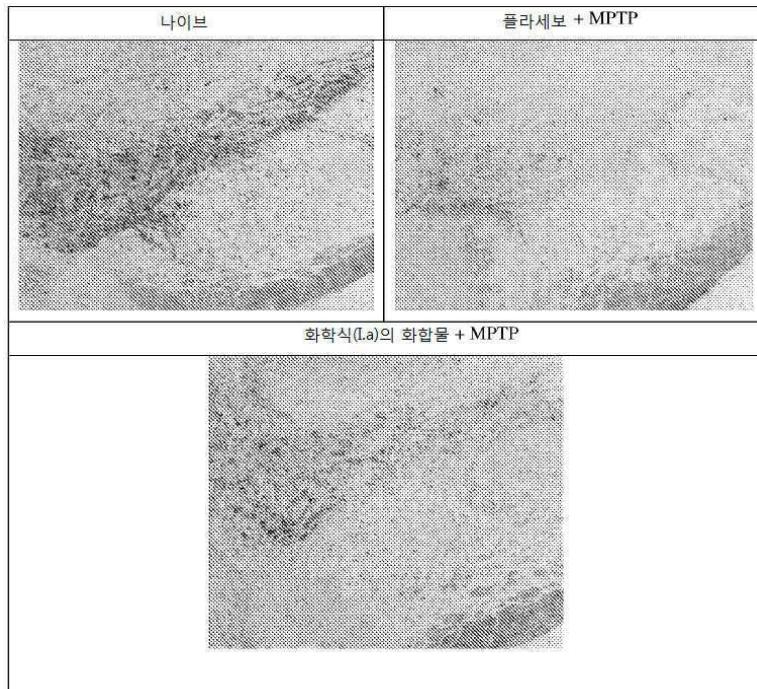
ECG 파라미터 (QT 간격, QT_{cb} 간격, QT_{cf} 간격) 및 심장 박동수의 데이터를 다음과 같이 통계적으로 비교하였다: 플라세보 그룹의 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 시간 시점에서의 데이터를 동일한 그룹의 기준 데이터와 비교하였다. 화학식(I.a)의 화합물로 처리된 상이한 그룹의 데이터를 플라세보 그룹의 상응하는 데이터와 비교하였다.

- [0082] 수컷과 암컷 개로부터 수집된 데이터를 기반으로 한 심전도 분석 결과, 기준선과 비교했을 때 플라세보 처리는 ECG 파라미터(QT 간격, QT_{cb} 간격, QT_{cf} 간격) 및 심장 박동수에 통계적으로 큰 영향을 미치지 않았다. 화학식(I.a)의 화합물은 5 및 15 mg/kg 투여량에서 플라세보와 비교하여 QT, QT_{cb}, QT_{cf} 기간에 영향을 미치지 않았다. 또한, 심장 박동수와 같은 기타 파라미터는 변하지 않았다.
- [0083] PK 분석 결과, 화학식(I.a)의 화합물을 상이한 투여량으로 투여된 동물에게 화학식(I.a)의 화합물의 투여량-의존적인 전신 노출(systemic exposure)을 나타냈다. AUC_{0-inf}는 화학식(I.a)의 화합물 5, 15 및 30 mg/kg 투여량에서 1,925 내지 4,824, 6,776 내지 12,756 및 25,927 내지 46,749 hr × ng/mL의 범위에 있었다. C_{max}는 화학식(I.a)의 화합물 5, 15 및 30 mg/kg 투여량에서 각각 1218 내지 2033, 2723 내지 5323 및 9825 내지 9967 ng/mL 범위에 있었다.
- [0084] 이 연구 결과, 화학식(I.a)의 화합물을 15 mg/kg 투여량까지 1회 경구투여만으로 의식이 있는 비글 개에서 심장 혈관 기능에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여 주었다. 화학식(I.a)을 갖는 화합물의 임의의 투여량 수준에서 ECG 형태학에서 어떠한 변화도 없었다. ECG 파라미터 및 심박수에 미치는 치료 효과에는 성별 차이가 없었다.
- [0085] 실시예 7
- [0086] 마취된 기니 피그에서 QT, QT_c 간격 및 심박수에 대한 화학식(I.b)의 화합물의 효과
- [0087] QT, QT_c 간격 및 심박수에 미치는 화학식(I.b)의 화합물의 효과를 마취된 기니 피그에서 연구하였다.
- [0088] 체중 범위 300~400g의 숫컷 Dunkin-Hartley 기니 피그에게 우레탄(1.5 g/kg)을 복강내 주사하여 마취시켰다. 기관 절제술을 시행하고 실험을 통해 동물이 자발적으로 숨을 쉬게 하였다. 약물 투여를 위하여 왼쪽 경정맥을 혜파린 첨가 식염수 용액(100 IU/mL)으로 채워진 폴리에틸렌 카테터를 사용하여 카테터 삽입하였다. 전극을 납 II 위치에 놓고 기준선 ECG를 기록하였다.
- [0089] 상이한 동물에 있어서, 체중에 따라, 화학식(I.b)의 화합물의 투여량을 청량하여 DMSO 0.5 mL 중에 첨가하여 제조하고, 10 분에 걸쳐 투여된 느린 정맥내 주입을 통해 투여하였다. ECG는 0.5 시간까지 주입 과정 및 주입 완료 후에 기록되었다. PowerLab 4SP[®] 소프트웨어를 사용하여 QT 및 RR 간격을 측정하였다. 데이터는 주입 동안 1, 5, 10분, 주입 후 5, 10, 15, 30 분에 평균 9박동으로 분석되었다.
- [0090] 화학식(I.b)의 화합물을 1 mg/kg의 투여량으로 정맥내 투여하였을 때 QT 간격의 변화는 없었다.

도면

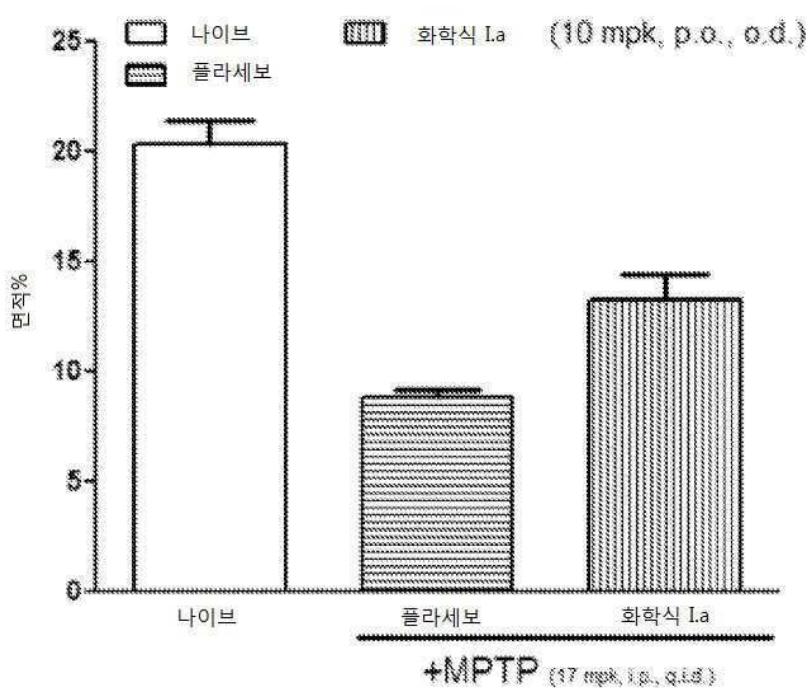
도면1

도 1. 티로신 하이드록실라아제(TH)-양성 뉴런을 나타내는 코로날 섹션으로 부터의 현미경 사진



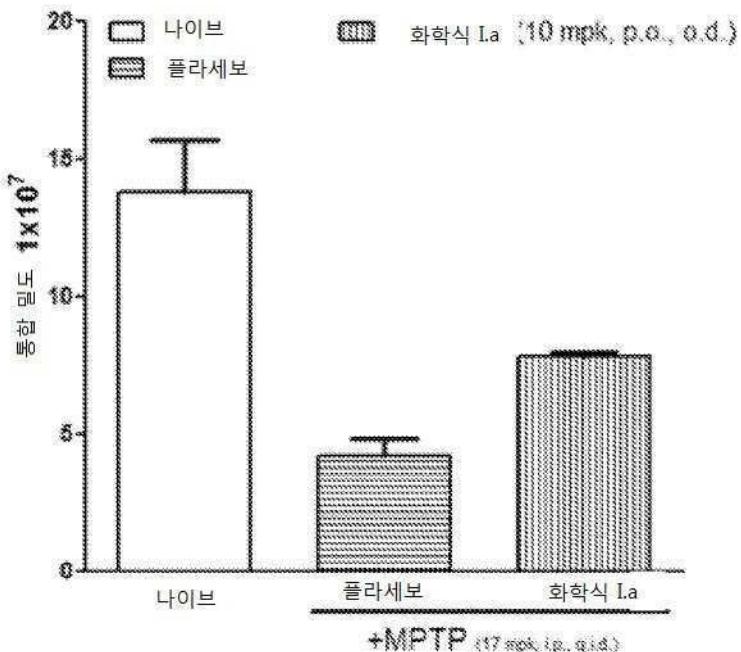
도면2

도 2. 화학식(I.a)의 화합물의 투여에 대한 TH-양성 뉴런의 백분율 면적



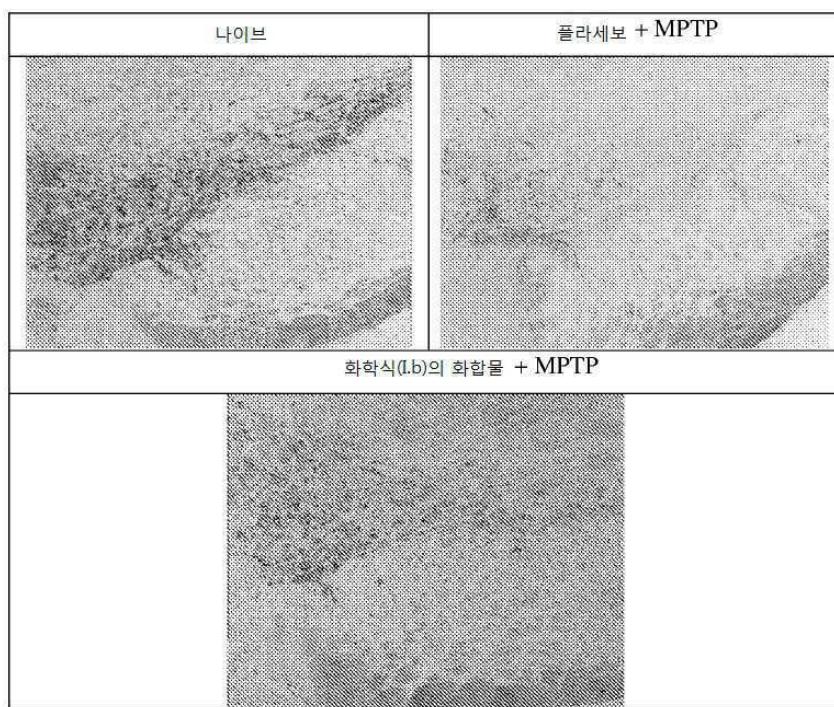
도면3

도 3. 화학식(Ia)의 화합물 및 닐로티닙의 투여에 대한 TH-면역 반응성의 통합 밀도

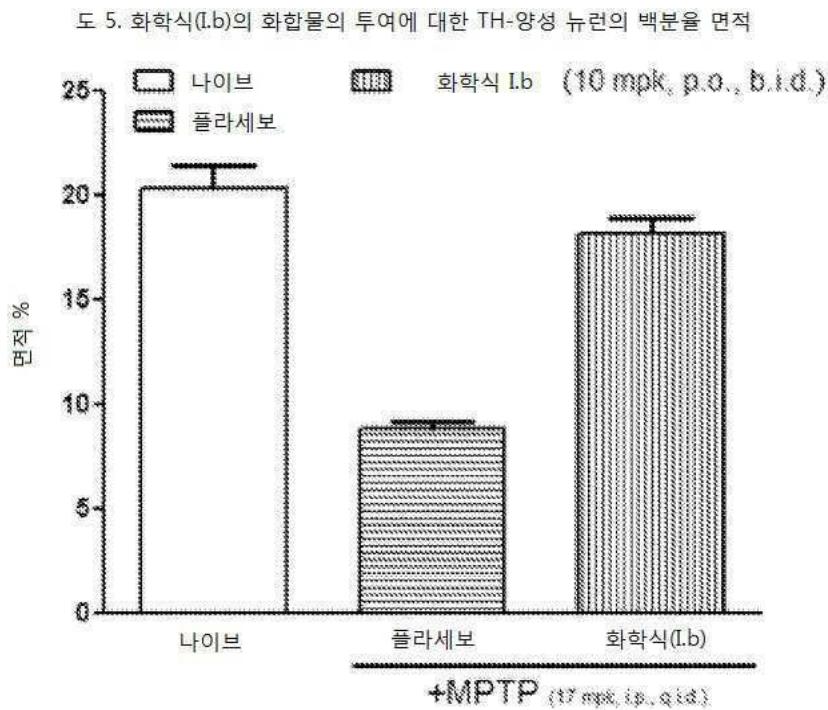


도면4

도 4. 티로신 하이드록실라아제(TH)-양성 뉴런을 나타내는 코로날 섹션으로 부터의 현미경 사진



도면5



도면6

