(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0072876
(43) 공개일자 2017년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 231/40 (2006.01) *A61K 51/04* (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01) *G01N 33/60* (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 231/40 (2013.01)
A61K 51/0453 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7008551
(22) 출원일자(국제) 2015년10월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년03월29일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/074557
(87) 국제공개번호 WO 2016/066534
국제공개일자 2016년05월06일
(30) 우선권주장
14190523.2 2014년10월27일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
유니베르시태트 취리히
스위스 체하-8006 취리히 라미슈트라쎄 71 프로렉토라트 엠엔더블유
아이드제노시쉐 테크니쉐 훽슐레 쥐리히
스위스 쥐리히 CH-8092 라미스트라세 101
(72) 발명자
아메타마이 시몬 엠
스위스 체하-8045 취리히 위틀리베르크스트라쎄 308
핑게를레 위르겐
독일 79400 칸데른 임 헬블링 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 31 항

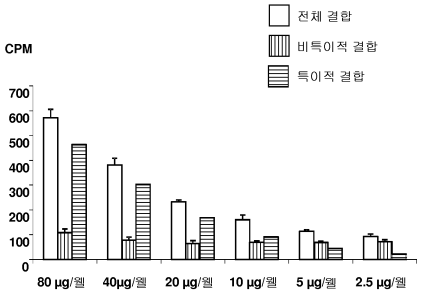
(54) 발명의 명칭 **방사성 표지된 카나비노이드 수용체 2 리간드**

(57) 요 약

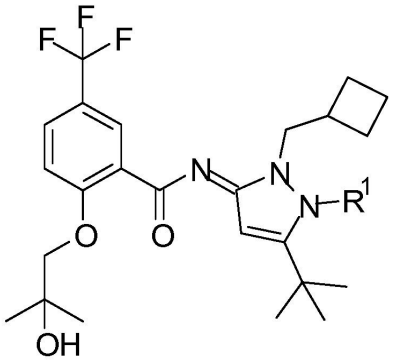
본 발명은 하기 화학식 I의 화합물에 관한 것이다:

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



[화학식 I]



상기 식에서,

R^1은 발명의 설명 및 청구범위에 정의된 바와 같다.

화학식 I의 화합물은 방사성 표지된 리간드로서 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
G01N 33/566 (2013.01)
G01N 33/60 (2013.01)
G01N 33/948 (2013.01)
G01N 2333/705 (2013.01)
G01N 2333/726 (2013.01)
G01N 2500/20 (2013.01)
G01N 2800/00 (2013.01)

(72) 발명자
고비 루카
스위스 체하-4463 부스 운테러 레마트베크 19
그레터 우베
독일 79588 에프링겐-키르헨 키르흐가쎄 4
하이더 아메트
스위스 체하-6300 주크 마이쎈베르크스트라쎄 2
하르퉁 토마스
독일 79541 뢰라흐 슐로쓰스트라쎄 15체
무 린징
스위스 체하-5600 렌츠부르크 조이크하우스스트라쎄 53
니콜스 레오
영국 리즈 엘에스18 5제이제이 홀스포스 웨스트 엔드 그로브 9
로저스-에반스 마크
스위스 체하-4103 보트민겐 로젠베크 6
울머 크리스토프
독일 79592 피쉉겐 노이마텐스트라쎄 6

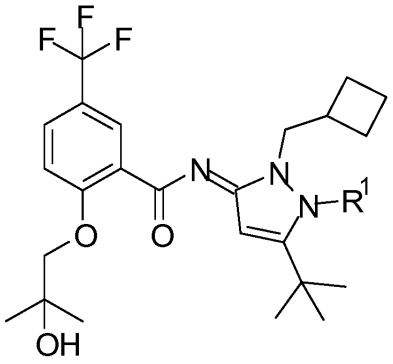
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물:

[화학식 I]



상기 식에서,

R^1은 메틸 기이고, 상기 메틸 기는 하나 이상의 방사성 핵종을 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서,

하나 이상의 방사성 핵종이 [^{3}H], [^{11}C] 및 [^{14}C]로부터 독립적으로 선택되는, 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

R^1이 C[^{3}H]$_3$, [^{11}C]H$_3$ 또는 [^{14}C]H$_3$인, 화합물.

청구항 4

CB2 수용체를 환자 또는 시료에서 국소화시키기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 5

CB2 수용체를 환자 또는 시료에서 이미징하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 6

다른 화합물이 CB2 수용체에 결합하는지 여부를 결정하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 7

제6항에 있어서,

CB2 수용체에 대한 다른 화합물의 결합 상수의 측정을 추가로 포함하는 용도.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

CB1 수용체 존재 하의 용도.

청구항 9

질병이 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는지 여부를 결정하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 10

제9항에 있어서,

질병이 통증, 아테롬성 동맥 경화증, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 녹내장, 진성 당뇨병, 염증, 염증성 장 질환, 허혈-재관류 손상, 급성 간 기능 부전, 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 전신 섬유증, 급성 동종 이식 거부, 만성 동종 이식 신장병, 당뇨병성 신장병, 사구체 신장병, 심근증, 심부전, 심근허혈, 심근경색, 전신 경화증, 온열 손상, 화상, 비후성 흉터, 켈로이드, 치은염 발열, 간경변증, 간 종양, 골량 조절, 신경 퇴화, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작 또는 포도막염인, 용도.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

환자 또는 질병의 조직의 진단에 사용하기 위한 화합물.

청구항 12

제11항에 있어서,

질병이, 건강한 피험자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현과 비교되는, 환자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는, 화합물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

진단이 환자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현을 건강한 피험자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현과 비교하는 단계를 포함하는, 화합물.

청구항 14

질병을 앓는 환자가 CB2 리간드의 투여를 포함하는 치료에 반응하는지 여부를 예측하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 15

제13항에 있어서,

환자에서의 CB2 수용체 발현을 건강한 피험자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현과 비교함을 포함하는 용도.

청구항 16

CB2 리간드를 필요로 하는 환자에게 투여하여야 하는 CB2 리간드의 투여량을 결정하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 17

(a) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물을, CB2 수용체 및 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 시료와 접촉시키는 단계; 및

(b) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 CB2 수용체의 결합에 영향을 주는지 여부를 모니터링하는 단계

를 포함하는, CB2 수용체에 결합하는 화합물을 동정하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물의 CB2 수용체에 대한 결합 강도를 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

(a) CB2 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 예상되는 화합물을 CB1 수용체, CB2 수용체 및 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 시료와 접촉시키는 단계; 및

(b) CB2 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 CB2 수용체의 결합에 영향을 주는지 여부를 모니터링하는 단계

를 포함하는, 화합물이 CB1 수용체와 비교하여 CB2 수용체에 선택적으로 결합하는지 여부를 결정하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

CB2 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 예상되는 화합물의 CB2 수용체에 대한 결합 상수를 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

(a) CB2 수용체를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 접촉시키는 단계;

(b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 결합이 발생하는지 여부를 모니터링하는 단계; 및

(c) 선택적으로, 시료와 다른 공지된 CB2 리간드를 추가로 접촉시키고, 상기 공지된 CB2 리간드가 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 결합 부위에서 치환하는지 여부를 모니터링하는 단계

를 포함하는, CB2 수용체인 세포 수용체를 동정하는 방법.

청구항 22

(a) 동물, 환자 또는 시료의 CB2 수용체의 100%를 점유하기에 충분한 양의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 동물 또는 환자에게 투여하거나, 하나 이상의 CB2 수용체를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계;

(b) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물의 투여량을 동물 또는 환자에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

(c) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물에 의한 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 치환을 모니터링하는 단계; 및

(d) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 점유한 하나 이상의 CB2 수용체의 백분율을 계산하는 단계

를 포함하는, 화합물의 투여량이 동물 또는 환자에게 투여되거나 시료와 접촉될 때, CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 점유한 CB2 수용체의 백분율을 동물, 환자 또는 시료에서 측정하는 방법.

청구항 23

(a) (a1) 동물 또는 시료의 CB2 수용체의 100%를 점유하기에 충분한 양의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 동물에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

(a2) 동물 또는 시료에서 약리학적 반응을 제공하는 것으로 공지된 투여량을 동물에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

(a3) CB2 리간드에 의한 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 치환을 모니터링하는 단계; 및

(a4) CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 백분율을 계산하는 단계

를 포함하는, 동물 또는 시료에서 약리학적 반응을 제공하는 것으로 공지된 CB2 리간드의 투여량을 동물에게 투여하거나 시료와 접촉시킨 후에, CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 백분율을 동물 또는 시료에서 결정하는 단계; 및

(b) (b1) 인간 피험자의 CB2 수용체의 100%를 점유하기에 충분한 양의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 인간 피험자에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

(b2) CB2 리간드의 투여량을 인간 피험자에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

(b3) CB2 리간드에 의한 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 치환을 모니터링하는 단계;

(b4) CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 백분율을 계산하는 단계;

(b5) 단계 (a4)에서 계산된 CB2 수용체의 백분율이 단계 (b4)에서 또한 수득될 때까지 단계 (b2) 내지 (b4)를 반복하는 단계; 및

(b6) 단계 (b2)에서 투여된 투여량의 첨가를 계산하여 환자에게 투여하여야 하는 CB2 리간드의 투여량을 수득하는 단계

를 포함하는, 인간 피험자 또는 시료에서 CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 동일한 백분율을 제공하는 CB2 리간드의 투여량을 결정하는 단계

를 포함하는, CB2 리간드를 필요로 하는 환자에게 투여하여야 하는 CB2 리간드의 투여량을 결정하는 방법.

청구항 24

(a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 질병을 앓는 시료와 접촉시키거나 상기 질병을 앓는 피험자에게 투여하고, 건강한 시료와 접촉시키거나 또는 건강한 피험자에게 투여하는 단계;

(b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 결합이 발생하는지 여부를 2개의 시료 모두에서 모니터링하는 단계; 및

(c) CB2 수용체에 결합하는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 양을 2개의 시료 모두에서 비교하는 단계

를 포함하는, 질병이 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는지 여부를 결정하는 방법.

청구항 25

제17항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

모니터링하는 동안 자가 조직 방사선 촬영 또는 양전자 방출 단층 촬영을 사용하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 약학 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

진단제로 사용하기 위한 화합물.

청구항 28

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

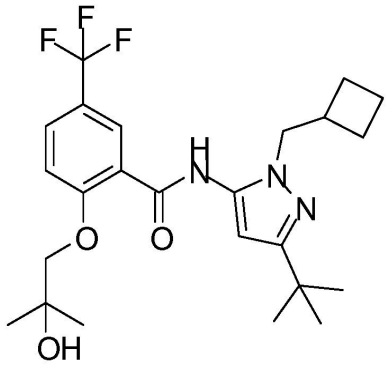
통증, 아테롬성 동맥 경화증, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 녹내장, 진성 당뇨병, 염증, 염증성 장 질환, 허혈-재관류 손상, 급성 간 기능 부전, 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 전신 섬유증, 급성 동종 이식 거부, 만성 동종 이식 신장병, 당뇨병성 신장병, 사구체 신장병, 심근증, 심부전, 심근허혈, 심근경색, 전신

경화증, 온열 손상, 화상, 비후성 흉터, 켈로이드, 치은염 발열, 간경변증, 간 종양, 골량 조절, 신경 퇴화, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작 또는 포도막염의 진단에 사용하기 위한 화합물.

청구항 29

하기 화학식 A의 화합물을 [^{3}H]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트, [^{3}H]-메틸 요오다이드, [^{11}C]-메틸 트라이플레이트, [^{11}C]-메틸 요오다이드, [^{11}C]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트, [^{14}C]-메틸 트라이플레이트, [^{14}C]-메틸 요오다이드 또는 [^{14}C]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트의 존재 하에 반응시키는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 제조 방법:

[화학식 A]



.

청구항 30

제29항에 따른 제조 방법에 따라 제조되는 화합물.

청구항 31

본원에 기술된 발명.

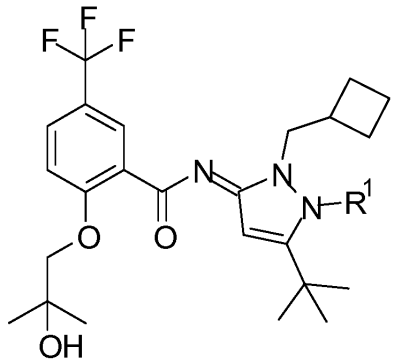
발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 방사성 표지된 카나비노이드 수용체 2 리간드에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 특히 하기 화학식 I의 화합물에 관한 것이다:

[0003] [화학식 I]



[0004]

[0005] 상기 식에서,

[0006] R^{1}은 메틸 기이고, 상기 메틸 기는 하나 이상의 방사성 핵종을 포함한다.

배 경 기 술

[0007] 카나비노이드 수용체는 G 단백질-커플링된 수용체 상과에 속하는 세포막 수용체의 한 부류이다. 현재 2개의 아형이 있으며, 카나비노이드 수용체 1(CB1) 및 카나비노이드 수용체 2(CB2)로 명명된다. CB1 수용체는 넓은 범위의 발현을 갖는다. 이는 주로 중추 신경계(예컨대, 편도체, 소뇌, 해마)에서 발현되고 말초 신경계에서는 더 적게 발현된다. CB2는 CNR2 유전자에 의해 암호화되고 면역계의 세포, 예컨대 대식세포, B- 및 T-세포(문헌[Ashton, J. C. et al. Curr Neuropharmacol 2007, 5(2), 73-80], 문헌[Miller, A. M. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2), 299-308] 및 문헌[Centonze, D., et al. Curr Pharm Des 2008, 14(23), 2370-42]) 상에서 및 위장계(문헌[Wright, K. L. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2), 263-70])에서 주로 말초적으로 발현된다. CB2 수용체는 뇌의 소교 세포에서 주로 발견되고 뉴런에서는 발견되지 않는다(문헌[Cabral, G. A. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2): 240-51]).

[0008] CB2 수용체 작용제에 대한 관심은 지난 10년간 꾸준히 증가해 왔는데(현재 30 내지 40개의 특허출원/년), 이는 초기 화합물의 일부가 만성 통증(문헌[Beltramo, M. Mini Rev Med Chem 2009, 9(1), 11-25]), 아테롬성 동맥경화증(문헌[Mach, F. et al. J Neuroendocrinol 2008, 20 Suppl 1, 53-7]), 골량 조절(문헌[Bab, I. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2), 182-8]), 신경 염증(문헌[Cabral, G. A. et al. J Leukoc Biol 2005, 78(6), 1192-7]), 허혈/재관류 손상(문헌[Pacher, P. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2), 252-62), 전신 섬유증(문헌[Akhmetshina, A. et al. Arthritis Rheum 2009, 60(4), 1129-36] 및 문헌[Garcia-Gonzalez, E. et al. Rheumatology (Oxford) 2009, 48(9), 1050-6]), 간 섬유증(문헌[Julien, B. et al. Gastroenterology 2005, 128(3), 742-55] 및 문헌[Munoz-Luque, J. et al. J Pharmacol Exp Ther 2008, 324(2), 475-83])을 포함한 다수의 인간 질병에 관한 전임상 모델에서 이로운 효과를 보였기 때문이다.

[0009] 허혈/재관류(I/R) 손상은, 다양한 병인의 순환계 쇼크의 경과를 악화시키는 종말 기관 손상의 기작은 물론, 뇌졸중, 심근 경색, 심폐 우회술과 기타 혈관 수술, 및 장기 이식과 같은 조건하에서 일어나는 조직 손상의 주 요인이다. 이 모든 조건은 조직의 불충분한 산소화를 야기하는, 정상적인 혈액 공급의 붕괴로 특징지어진다. 재산소화 예컨대, 재관류는 정상적인 조직 산소화를 회복하기 위한 궁극적인 처리이다. 그러나, 혈액으로부터 산소 및 영양소의 결핍은 순환의 회복이 추가적인 조직 손상을 야기하는 조건을 만든다. 재관류 손상의 피해는 손상된 조직의 염증 반응에 부분적으로 기인한다. 새롭게 돌아가는 혈액에 의해 조직 영역으로 운반되는 백혈구는 조직 손상에 반응하여 자유 라디칼은 물론, 다수의 염증 인자, 예컨대, 인터루킨을 방출한다. 회복된 혈류는 세포 단백질, DNA 및 원형질 막을 손상시키는 산소를 재도입한다.

[0010] 원격 허혈성 전 조건화(RIPC)는 허혈 및 재관류에 의해 발생한 손상에 반하여 신체의 내생성 방어 능력을 이용하기 위한 전략을 나타낸다. 이는 하나의 기관 또는 조직의 일시적인 비치명적인 허혈 및 재관류가 원격 기관 또는 조직의 "치명적인" 허혈 재관류 손상의 후속 에피소드에 대한 저항성을 부여하는 흥미로운 현상을 설명한다. 기관 또는 조직의 일시적인 허혈 및 재관류가 보호를 부여하는 실질적인 기작은, 일부 가설이 제안되었음에도, 현재로선 공지되지 않았다.

[0011] 체액 가설은 원격 기관 또는 조직에서 생성된 내생성 물질(예컨대, 아데노신, 브래디키닌, 오피오이드, 칼시토닌 유전자 연관 펩타이드(CGRP(Calcitonin Gene-Related Peptide)), 엔도카나비노이드, 안지오텐신 I(Angiotensin I) 또는 아직 미확인된 일부의 다른 체액성 인자)이 혈류에 진입하고 표적 조직에서 각각의 수용체를 활성화시킴으로써 허혈의 프리컨디셔닝(preconditioning)에 관련된, 심장보호의 다양한 세포내 반응 경로를 구성한다.

[0012] 최근의 데이터는 엔도카나비노이드 및 이의 수용체가, 특히 CB2에서 염증 반응의 하향조절(downregulation)을 통해 프리컨디셔닝에 관여하고 재관류 손상의 예방에 기여할 수 있다는 것을 나타낸다(문헌[Pacher, P. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2), 252-62]). 구체적으로, CB2 수단 작용제를 사용한 최근의 연구는 심장(문헌[Defer, N. et al. Faseb J 2009, 23(7), 2120-30], 뇌(문헌[Zhang, M. et al. J Cereb Blood Flow Metab 2007, 27(7), 1387-96]), 간(문헌[Batkai, S. et al. Faseb J 2007, 21(8), 1788-800]) 및 신장(문헌[Feizi, A. et al. Exp Toxicol Pathol 2008, 60(4-5), 405-10])에서의 I/R 손상을 감소시키는 상기 개념의 효능을 입증하였다.

[0013] 추가적으로, 지난 몇년에 걸쳐, 진전되는 연구는 CB2가 아만성 및 만성의 경우에서도 흥미로울 수 있음을 나타낸다. CB1 및 CB2의 특정 상향조절(upregulation)이 섬유증과 관련된 만성 질병의 동물 모델(문헌[Garcia-Gonzalez, E. et al. Rheumatology (Oxford) 2009, 48(9), 1050-6] 및 문헌[Yang, Y. Y. et al. Liver Int

2009, 29(5), 678-85])에서, 섬유증 진행의 원인이 되는 세포인 근섬유아세포에서의 CB2의 유의미한 발현과 관련있는 것으로 나타났다.

[0014] 선택적인 CB2 작용제에 의한 CB2 수용체의 활성화가 광범위 전신 경화증에 항섬유 효과를 주는 것으로 실제로 나타났고(문헌[Garcia-Gonzalez, E. et al. Rheumatology (Oxford) 2009, 48(9), 1050-6]), CB2 수용체는 실험적 피부 섬유증(문헌[Akhmetshina, A. et al. Arthritis Rheum 2009, 60(4), 1129-36]) 및 만성 간 질병과 관련된 섬유 조직의 성장(문헌[Lotersztajn, S. et al. Gastroenterol Clin Biol 2007, 31(3), 255-8], 문헌[Mallat, A. et al. Expert Opin Ther Targets 2007, 11(3), 403-9] 및 문헌[Lotersztajn, S. et al. Br J Pharmacol 2008, 153(2), 286-9])을 포함하는 간의 병태생리학에 있어서 매우 중요한 표적으로 떠올랐다.

[0015] 상기 수용체에 대한 관심이 증대됨에 따라, 조직에서 명백히 CB2를 검출할 필요성이 있다. 환자 또는 시료에서의 CB2 발현 및 수용체 점유에 대한 적절한 도구에 의한 평가는 발현의 표적 세포를 확인하거나, 인간 연구에서 임의의 CB2 리간드의 투여량 탐색을 허용하거나, 진단 목적에 사용될 수 있다.

[0016] 지금까지는 CB2 수용체의 낮은 발현 수준의 결과로서, 조직에서 CB2 수용체 단백질의 검출을 위한 효과적인 수단이 부족했다. CB2의 검출 수단인 특정한 항체의 결여의 또 다른 원인은 CB2를 면역원으로 사용하기가 명백히 어렵다는 점에 기인할 수 있다.

[0017] 상기 문제에 접근하기 위해서, CB2에 선택적으로 결합하는 방사성 표지된 리간드 사용의 가능성을 탐색하였다. 우리에게 알려진 바, 오직 하나의 방사성 표지된 CB2 리간드, 즉 [^{3}H]-CP55940만이 사용가능하다(문헌[Priller, J. et al Molecular Pharmacology 1995, 48, 288-292]). 그러나, 몇몇의 시험된 포유류 종에서, [^{3}H]-CP55940은 CB1 및 CB2 수용체에 대한 비선택적인 작용제이고, 2개의 수용체를 구별하지 못한다. 따라서, CB1 또한 발현하는 조직에서 CB2를 검출하기 위해선, 경쟁 분석(competition assay)을 위한 공통의 동위원소 ^{3}H, 자가 조직 방사선 촬영을 위한 동위원소 ^{14}C 또는 PET 추적 기술을 위한 동위원소 ^{11}C로 방사성 표지된, 선택적인 CB2 리간드가 필요하다.

[0018] 첫번째 전략은 CB1 대비 CB2에 대한 높은 선택성 및 자연적으로 발생하는 카나비노이드에 대한 구조적 상동성으로 리간드를 동정하는 것이었다. 높은 선택성, 및 식물에서 발견되는 카나비노이드 유형 화합물과 구조적으로 관련되는 성질에 의거하여 CB2 작용제 HU-910(국제출원공개 제2011/061744호에 기술됨)을 선택하였다. HU-910이 선택적으로 및 경쟁적으로 [^{3}H]-CP55940으로 표지된 CB2 수용체에 결합함에도 불구하고, [^{3}H]-HU-910은 높은 비-특이적 결합을 나타냄으로써, 전체 결합 부위의 일부 분획을 나타낼 것으로 기대되는 CB2 수용체에 대한 결합 부위를 덮었다. 이론에 얽매이려는 것은 아니지만, 본 발명자들은 이 현상이, 세포막을 고도로 분할시켜 표지되지 않은 과량의 HU-910과 경쟁할 수 없는 높은 비-특이적 결합을 유발하는, [^{3}H]-HU-910의 높은 친유성으로부터 기인한다고 본다.

[0019] 따라서, 화학 합성의 최종 단계에 방사성 표지도 도입하는 옵션과 함께, 효능 및 선택성과 더불어 높은 친수성을 갖는 CB2 리간드를 찾는 것이 요구되었다.

[0020] 상기 정의된 화학식 I의 화합물은 놀랍게도 바람직한 특성을 갖는 것으로 확인되었고, 매우 감소된 비-특이적 결합을 하게 되었다.

[0021] 화학식 I의 화합물은 특이적으로 및 선택적으로, CB2 수용체를 재조합적으로 발현하는 세포로부터 준비된 막에 결합하는 것이 증명되었다. 추가적으로, 화학식 I의 화합물은 CB1 및 CB2 수용체 둘다의 높은 발현을 보이는 기관인 비장 조직에서 CB2 수용체를 특이적으로 표지한다는 것이 밝혀졌다. 더욱이, CB2 수용체 결핍 마우스로부터 단리된 비장 조직에서, 화학식 I의 화합물에 의한 결합은 결여되어 있었다. 이러한 특정 경우에서, 전체 결합 신호는 표지되지 않은(R^{1}= CH_3) 과량의 화학식 I의 화합물에 의해 감소되지 않을 수 있었다.

[0022] 따라서, 화학식 I의 화합물은, 예를 들어 인간 연구에서 임의의 CB2 리간드에 대한 투여량 탐색 또는 진단의 목적을 위해 자가 조직 방사선 촬영 및 PET 이미징(예컨대, 수용체 발현 및 수용체 점유를 평가하기 위한 촬영 및 이미징)에 사용될 수 있다.

[0023] 본원에서, 용어 "방사성 핵종"은 불안정한 핵을 갖고 방사능 붕괴를 겪는 원자의 동위원소를 정의한다. 본 발명의 특정 방사성 핵종은 [^{3}H], [^{11}C] 및 [^{14}C]이다.

[0024] 용어 "결합 상수"는 리간드의 수용체에 대한 결합 반응과 관련된 평형 상수를 나타낸다.

[0025] 용어 "선택적인 결합"은 매우 제한된 유형의 수용체에 대한 리간드의 결합을 특징짓는다.

발명의 내용

[0026] 그러므로, 본원은 하기에 관한 것이다:

[0027] 하나 이상의 방사성 핵종이 [^{3}H], [^{11}C] 및 [^{14}C]로부터 독립적으로 선택되는 화학식 I의 화합물;

[0028] R^{1}이 C[^{3}H]$_3$, [^{11}C]H_3 또는 [^{14}C]H_3인 화학식 I의 화합물;

[0029] (NE)-N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-(트라이트라이티오메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드, (NE)-N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-([^{14}C]메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드 및 (NE)-N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-([^{11}C]메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드로부터 선택되는 화학식 I의 화합물;

[0030] CB2 수용체를 환자 또는 시료에서 국소화시키기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도;

[0031] CB2 수용체를 환자 또는 시료에서 이미징하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도;

[0032] 다른 화합물이 CB2 수용체에 결합하는지 여부를 결정하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도;

[0033] 다른 화합물이 CB2 수용체에 결합하는지 여부를 결정하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도로서, 상기 다른 화합물의 CB2 수용체에 대한 결합 상수의 측정을 추가로 포함하는 용도;

[0034] CB1 수용체의 존재 하의 상기 정의된 용도;

[0035] 질병이 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는지 여부를 결정하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도;

[0036] 질병이 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는지 여부를 판단하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도로서, 상기 질병이 통증, 아테롬성 동맥 경화증, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 녹내장, 진성 당뇨병, 염증, 염증성 장 질환, 허혈-재관류 손상, 급성 간 기능 부전, 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 전신 섬유증, 급성 동종 이식 거부, 만성 동종 이식 신장병, 당뇨병성 신장병, 사구체 신장병, 심근증, 심부전, 심근허혈, 심근경색, 전신 경화증, 온열 손상, 화상, 비후성 흉터, 켈로이드, 치은염 발열, 간경변증, 간 종양, 골량 조절, 신경 퇴화, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작 또는 포도막염인, 용도;

[0037] 환자 또는 질병의 조직의 진단에 사용하기 위한, 화학식 I의 화합물;

[0038] 상기 정의된 환자 또는 질병의 조직의 진단에 사용하기 위한, 화학식 I의 화합물로서, 상기 질병이, 건강한 피험자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현의 변화와 비교되는, 상기 환자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는, 화학식 I의 화합물;

[0039] 진단이 환자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현을 건강한 피험자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현과 비교하는 단계를 포함하는, 상기 정의된 용도를 위한 화합물;

[0040] 질병을 앓는 환자가 CB2 리간드의 투여를 포함하는 치료에 반응하는지 여부를 예측하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도;

[0041] 질병을 앓는 환자가 CB2 리간드의 투여를 포함하는 치료에 반응하는지 여부를 예측하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도로서, 환자에서의 CB2 수용체 발현을 건강한 피험자 또는 조직에서의 CB2 수용체 발현과 비교하는 단계를 포함하는 용도; 및

[0042] CB2 리간드의 투여가 필요한 환자에게 투여하여야 하는 CB2 리간드의 투여량을 결정하기 위한, 화학식 I의 화합물의 용도.

[0043] 본 발명은 추가적으로,

[0044] (a) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물을, CB2 수용체 및 화학식 I의 화합물을 포함하는 시료와 접

촉시키는 단계; 및

[0045] (b) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 화학식 I의 화합물과 CB2 수용체의 결합에 영향을 주는지 여부를 모니터링하는 단계

[0046] 를 포함하는, CB2 수용체에 결합하는 화합물을 동정하는 방법에 관한 것이다.

[0047] 본 발명은 또한 CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물의 CB2 수용체에 대한 결합 강도를 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 상기 정의된 방법에 관한 것이다.

[0048] 본 발명은 또한,

[0049] (a) CB2 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 예상되는 화합물을, CB1 수용체, CB2 수용체 및 화학식 I의 화합물을 포함하는 시료와 접촉시키는 단계; 및

[0050] (b) CB2 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 화학식 I의 화합물과 CB2 수용체의 결합에 영향을 주는지 여부를 모니터링하는 단계

[0051] 를 포함하는, 화합물이 CB1 수용체와 비교하여 CB2 수용체에 선택적으로 결합하는지 여부를 결정하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 본 발명은 추가적으로 화합물이 CB1 수용체와 비교하여 CB2 수용체에 선택적으로 결합하는지 여부를 결정하는 상기 정의된 방법으로서, CB2 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 예상되는 화합물의 CB2 수용체에 대한 결합 상수를 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명은 또한,

[0054] (a) CB2 수용체를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 화학식 I의 화합물과 접촉시키는 단계;

[0055] (b) 화학식 I의 화합물의 결합이 발생하는지 여부를 모니터링하는 단계; 및

[0056] (c) 선택적으로, 시료를 다른 공지된 CB2 리간드와 추가로 접촉시기고, 상기 공지된 CB2 리간드가 화학식 I의 화합물을 결합 부위에서 치환하는지 여부를 모니터링하는 단계

[0057] 를 포함하는, CB2 수용체인 세포 수용체를 동정하는 방법에 관한 것이다.

[0058] 본 발명은 또한,

[0059] (a) 동물, 환자 또는 시료의 CB2 수용체를 100% 점유하기에 충분한 양의 화학식 I의 화합물을 동물 또는 환자에게 투여하거나, 하나 이상의 CB2 수용체를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계;

[0060] (b) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 상기 화합물의 투여량을 동물 또는 환자에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

[0061] (c) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물에 의한 화학식 I의 화합물의 치환을 모니터링하는 단계; 및

[0062] (d) CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 점유한 하나 이상의 CB2 수용체의 백분율을 계산하는 단계

[0063] 를 포함하는, 화합물의 투여량이 동물 또는 환자에게 투여되거나 시료와 접촉될 때, CB2 수용체에 결합하는 것으로 예상되는 화합물이 점유한 CB2 수용체의 백분율을 상기 동물, 환자 또는 시료에서 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0064] 본 발명은 또한,

[0065] (a) (a1) 동물 또는 시료의 CB2 수용체의 100%를 점유하기에 충분한 양의 화학식 I의 화합물을 동물에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

[0066] (a2) 동물 또는 시료에서 약리학적 반응을 제공하는 것으로 공지된 투여량을 동물에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

[0067] (a3) CB2 리간드에 의한 화학식 I의 화합물의 치환을 모니터링하는 단계; 및

[0068] (a4) CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 백분율을 계산하는 단계

[0069] 를 포함하는, 동물 또는 시료에서 약리학적 반응을 제공하는 것으로 공지된 CB2 리간드의 투여량을 동물에게 투여하거나 시료와 접촉시킨 후에, CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 백분율을 상기 동물 또는 시료에서 결정하는 단계; 및

[0070] (b) (b1) 인간 피험자의 CB2 수용체의 100%를 점유하기에 충분한 양의 화학식 I의 화합물을 인간 피험자에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

[0071] (b2) CB2 리간드의 투여량을 인간 피험자에게 투여하거나 시료와 접촉시키는 단계;

[0072] (b3) CB2 리간드에 의한 화학식 I의 화합물의 치환을 모니터링하는 단계;

[0073] (b4) CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 백분율을 계산하는 단계;

[0074] (b5) 단계 (a4)에서 계산된 CB2 수용체의 백분율이 단계 (b4)에서 또한 수득될 때까지 단계 (b2) 내지 (b4)를 반복하는 단계; 및

[0075] (b6) 단계 (b2)에서 투여된 투여량의 첨가를 계산하여 환자에게 투여하여야 하는 CB2 리간드의 투여량을 수득하는 단계

[0076] 를 포함하는, 인간 피험자 또는 시료에서 CB2 리간드가 점유한 CB2 수용체의 동일한 백분율을 제공하는 CB2 리간드의 투여량을 결정하는 단계

[0077] 를 포함하는, CB2 리간드를 필요로 하는 환자에게 투여하여야 하는 CB2 리간드의 투여량을 결정하는 방법에 관한 것이다.

[0078] 본 발명은 또한

[0079] (a) 화학식 I의 화합물을 시료와 접촉시키거나 질병을 앓는 피험자에게 투여하고, 건강한 시료와 접촉시키거나 건강한 피험자에게 투여하는 단계;

[0080] (b) 화학식 I의 화합물의 결합이 발생하는지 여부를 2개의 시료 모두에서 모니터링하는 단계; 및

[0081] (c) CB2 수용체에 결합하는 화학식 I의 화합물의 양을 2개의 시료 모두에서 비교하는 단계

[0082] 를 포함하는, 질병이 CB2 수용체 발현의 변화에 의해 특징지어지는지 여부를 결정하는 방법에 관한 것이다.

[0083] 본 발명은 또한 모니터링하는 동안 자가 조직 방사선 촬영 또는 양전자 방출 단층 촬영을 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0084] 본 발명은 추가적으로 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0085] 본 발명은 또한 진단제로서 사용하기 위한(예컨대, 질병의 진단에 사용하기 위한) 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0086] 본 발명은 또한 통증, 아테롬성 동맥 경화증, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 녹내장, 진성 당뇨병, 염증, 염증성 장 질환, 허혈-재관류 손상, 급성 간 기능 부전, 간 섬유증, 폐 섬유증, 신장 섬유증, 전신 섬유증, 급성 동종 이식 거부, 만성 동종 이식 신장병, 당뇨병성 신장병, 사구체 신장병, 심근증, 심부전, 심근허혈, 심근경색, 전신 경화증, 온열 손상, 화상, 비후성 흉터, 켈로이드, 치은염 발열, 간경변증, 간 종양, 골량 조절, 신경 퇴화, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작 또는 포도막염의 진단에 사용하기 위한 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 마우스의 비장 조직 WT를 이용한 방사성 리간드 결합(1.5 nM의 [^{3}H]-화학식 I의 화합물)을 도시한다.

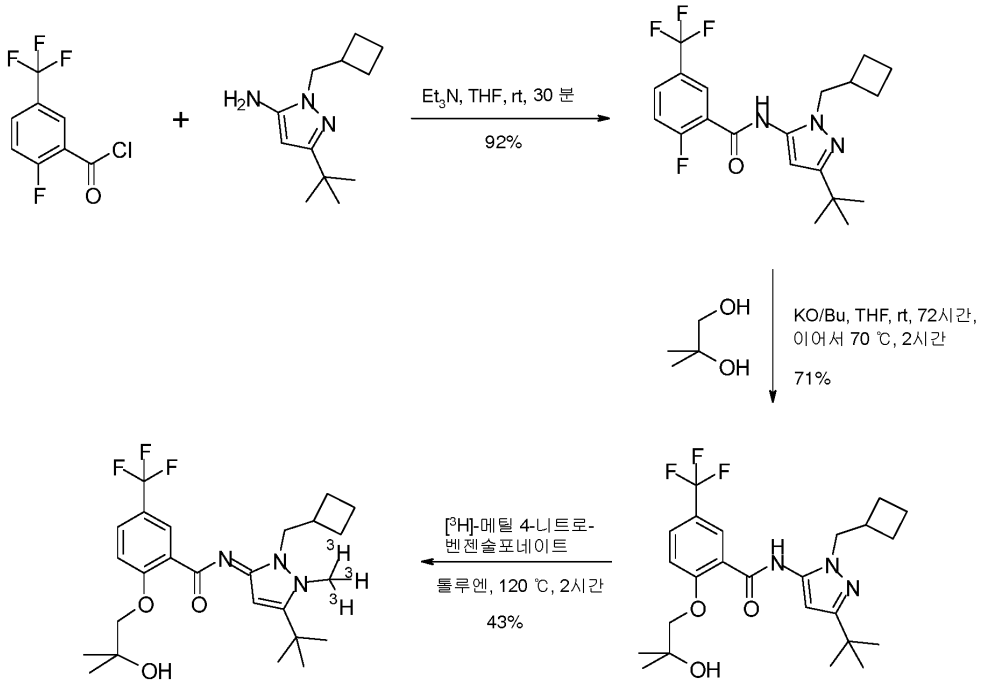
도 2는 마우스의 비장 조직 WT를 이용한 방사성 리간드의 포화 결합([^{3}H]-화학식 I의 화합물)을 도시한다.

도 3은 마우스의 비장 넉아웃(KO)(NIH)을 이용한 방사성 리간드 결합(^{3}[H]-화학식 I의 화합물)을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 예를 들어, 화학식 I의 화합물의 합성은 하기 반응식 1에 따라 수행될 수 있다.

[0089] [반응식 1]



[0090]

[0091] 표적 화합물은 [^{3}H]-메틸 술포네이트(예컨대, [^{3}H]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트) 또는 [^{3}H]-메틸 요오다이드와 같은 널리 인정받는 트라이티오-메틸화제를 사용하여, 데스메틸 전구체 N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드의 단일-단계 트라이티오-메틸화 반응을 통해 쉽게 입수될 수 있다. 상기 합성 개념의 주요 이점은 방사성 핵종의 혼입이 합성 경로의 마지막 단계에서 수행될 수 있다는 것이고, 이는 ALARA(as low as reasonably achiveable)로서 공지된 방사선 보호의 본질적 원칙을 충족하는 통상적으로 가장 실현가능한 방법이다.

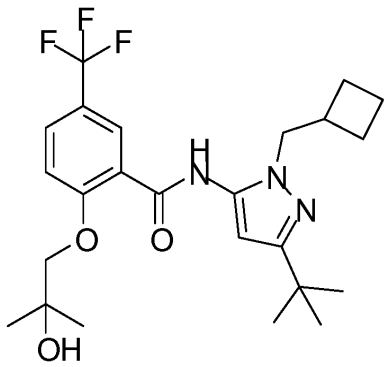
[0092] 추가적으로 방사능 물질의 사용을 최소화하기 위해서, 데스메틸-전구체는 전형적으로 방사성-메틸화제(radio-methylation agent)를 기준으로 2 내지 3배 과량으로 사용된다.

[0093] 동일한 합성 개념을 적용하고, [^{14}C/^{11}C]MeI 또는 [^{14}C/^{11}C]메틸술포네이트(예컨대, [^{14}C/^{11}C]메틸 트라이플레이트, [^{14}C/^{11}C]메틸 4-니트로벤젠술포네이트)와 같은 공지된 [^{14}C/^{11}C]-표지된 메틸 전달 시약을 사용함으로써, 상응하는 [^{14}C]- 및 [^{11}C]-표지된 유도체가 동일한 전구체 분자로부터 출발하여 제조될 수 있다.

[0094] 특히, [^{11}C]-표지 전략에 있어서, 짧고 빠르면서 효율적인 합성의 정립에 가장 중요하며, 이는 양전자 방출 카본-11의 20분의 반감기 때문이다.

[0095] 따라서, 본 발명은 또한 [^{3}H]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트, [^{3}H]-메틸 요오다이드, [^{11}C]-메틸 트라이플레이트, [^{11}C]-메틸 요오다이드, [^{11}C]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트, [^{14}C]-메틸 트라이플레이트, [^{14}C]-메틸 요오다이드 또는 [^{14}C]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트의 존재 하에 하기 화학식 A의 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는, 화학식 I의 화합물의 제조 방법에 관한 것이다:

[0096] [화학식 A]



[0097]

[0098] 본 발명의 제조 방법에서, 화학식 A의 화합물은 유리하게는 [^{3}H]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트, [^{11}C]-메틸 트라이플레이트 또는 [^{14}C]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트의 존재 하에 반응한다.

[0099] 본 발명의 제조 방법은 유리하게는 톨루엔에서 수행된다.

[0100] 본 발명의 제조 방법은 유리하게는 약 100 내지 150℃, 특히 약 120℃의 온도에서 수행된다.

[0101] 본 발명은 추가적으로 본 발명의 제조 방법에 따라 제조되는 화합물에 관한 것이다.

[0102] 이하, 본 발명은 비제한적으로 하기 실시예에 의해 제시된다.

[0103] **실시예**

[0104] 약어

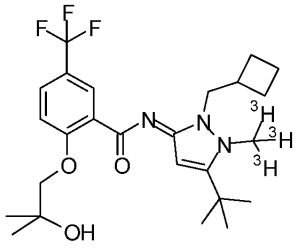
[0105] CAN = CAS 등록 번호; LC = 액체 크로마토그래피; MS = 질량 분석; NMR = 핵자기 공명; SEM = 평균의 표준 오차; THF = 테트라하이드로퓨란; WT = 야생형.

[0106] 실험

[0107] 모든 반응은 아르곤 대기 하에 화염 건조된 유리 용기에서 시행되었다. 반응에 분석용 등급 용매를 사용하였고, 필요한 경우, 건조 용매를 추가적인 정제 없이 사용하였다. 시약은 평판이 좋은 상업 공급자로부터 구입하였고, 별도의 언급이 없는 한 추가적인 정제 없이 사용하였다. 모든 ^{1}H NMR 스펙트럼을 브루커 어드벤스 울트라 실드(Bruker Advance Ultra Shield) 300 MHz 분광계 상에서 기록하였다. 화학적 이동이 소정의 수소 원자가 중수소로 치환된 용매에 대하여 보고되었다. 질량 스펙트럼을 피이 사익스 에이피아이 150이엑스 LS/MS 터보 스프레이 시스템(PE Sciex API 150EX LC/MS Turbo Spray System) 상에 기록하였다. 플래시 크로마토그래피를 이스코 콤비 플래시 컴패니언(Isco Combi Flash companion)을 사용하고, 다양한 상업 공급자로부터 다양한 크기의 전포장된(prepacked) 실리카 칼럼(230 내지 400메시, 40 내지 63 ㎛)을 사용하여 실시하였다. 박막 크로마토래피를 메르크 카게아아(Merck KgaA)로부터 구입한 전코팅된(pre-coated) 판 상에서 수행하였고, 254 nm 카맥 자외선 램프(CAMAG UV lamp) 또는 기본 칼륨 퍼망간에이트 용액을 이용하여 시각화하였다. 모든 반응은 박막 크로마토그래피, LCMS 및 ^{1}H NMR의 조합을 사용하여 모니터링되었다.

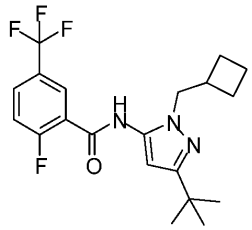
[0108] **실시예 1**

[0109] **(NE)-N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-(트라이트라이티오메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드**



[0110]

[0111] a) N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-플루오로-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드



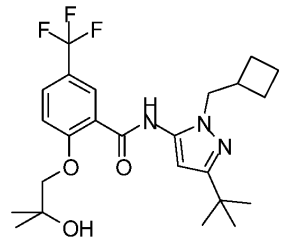
[0112]

[0113] 무수 THF(9 mℓ)에서의 3-tert-뷰틸-1-(사이클로뷰틸메틸)-1H-피라졸-5-아민(458 mg, 2.21 mmol, CAN 1018679-74-7) 및 트라이에틸아민(670 mg, 923 ㎕, 6.62 mmol)의 용액에 무수 THF(9 mℓ)에서의 2-플루오로-5-(트라이플루오로메틸)벤조일 클로라이드(500 mg, 333 ㎕, 2.21 mmol, CAN 207981-46-2)의 용액을 적가하였다. 분홍색 현탁액을 상온에서 30분 동안 교반하고, 1 M의 나트륨 수소 카보네이트 수용액(70 mℓ)으로 추출하였다. 수성층을 에틸 아세테이트(3 x 70 mℓ)로 추출하였다. 진공에서 농축하기 전에, 유기층을 합하고, 나트륨 설페이트를 사용하여 건조시켰다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(헵탄에서의 10% → 20%의 에틸아세테이트)로 정제하여 794.4 mg(2.0 mmol, 91% 수율)의 표제 화합물을 주황색 분말로서 수득하였다.

[0114] ^{1}H NMR(300 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 1.32(s, 9 H), 1.72-2.20(m, 6 H), 2.81(dt, J=14.73, 7.37 Hz, 1 H), 4.04(d, J=7.06 Hz, 2 H), 6.37(s, 1 H), 7.38(dd, J=11.61, 8.58 Hz, 1 H), 7.80-7.91(m, 1 H), 8.27(d, J=15.95 Hz, 1 H), 8.53(dd, J=6.96, 2.32 Hz, 1 H).

[0115] MS m/z 398.2$[M+H]^+$.

[0116] b) N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드



[0117]

[0118] 칼륨 tert-뷰톡사이드(203 mg, 1.81 mmol)를 무수 THF(7 mℓ)에서의 2-메틸프로판-1,2-다이올(136 mg, 138 ㎕, 1.51 mmol, CAN 558-43-0)의 빙랭 용액에 첨가하였다. 무색 현탁액을 0℃에서 5분 동안 교반하고, 실온까지 가온하고, 1시간 동안 교반하였다. 0℃에서 N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-플루오로-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드(400 mg, 1.01 mmol)를 첨가하였다. 생성된 황색 현탁액을 실온에서 72시간 동안 교반하였다. 칼륨-tert-뷰톡사이드(203 mg, 1.81 mmol)를 첨가하고, 70℃에서 2시간 동안 계속 교반하였다. 1 M의 나트륨 수소 카보네이트 수용액(50 mℓ) 및 에틸 아세테이트(50 mℓ)를 첨가하고, 층을 분리하였다. 수성상을 에틸 아세테이트(2 x 50 mℓ)로 추출하였다. 진공에서 농축하기 전에, 유기층을 합하고, 나트륨 설페이트를 사용하여 건조시켰다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(헵탄에서의 30% → 50% 에틸 아세테이트)로 정제하여 334 mg(0.714 mmol, 71% 수율)의 표제 화합물을 백색 분말로서 수득하였다.

[0119] ^{1}H NMR(300 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 1.30(s, 9 H), 1.43(s, 6 H), 1.69-2.05(m, 6 H), 2.77(dt, J=14.63,

7.22 Hz, 1 H), 4.02-4.19(m, 4 H), 6.19(s, 1 H), 7.13(d, J=8.88 Hz, 1 H), 7.75(dd, J=8.68, 2.42 Hz, 1 H), 8.55(d, J=2.22 Hz, 1 H), 9.69 (s, 1 H).

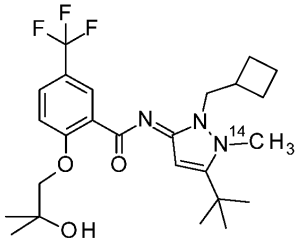
[0120] MS m/z 468.3$[M+H]^+$.

[0121] c) (NE)-N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-(트라이트라이티오메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드

[0122] 1-mℓ 스크류 캡 바이알에서, N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드(1.0 mg, 2.14 μmol)를 무수 톨루엔(50 ㎕)에서의 [^{3}H]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트 (50 mCi, 0.16 mg, 0.71 μmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 바이알을 닫고, 반응 혼합물을 120℃에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후에, 조 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카, 다이클로로메탄/메탄올 95:5)로 정제하여 21.4 mCi(43%)의 표제 화합물을 99% 초과의 방사 화학적 순도(HPLC: 엑스-브릿지(X-Bridge) C18, 아세토니트릴/포름에이트 완충액 pH 3.0) 및 85 Ci/mmol의 비방사능으로 수득하였다.

[0123] **실시예 2**

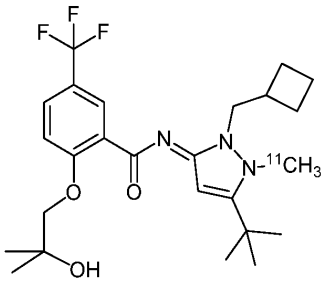
[0124] **(NE)-N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-([^{14}C]메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드**

[0125] 

[0126] 2-mℓ 스크류 캡 바이알에서, N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드(209 mg, 0.45 mmol)를 무수 톨루엔(1.5 mℓ)에서의 [^{14}C]-메틸 4-니트로벤젠술포네이트(25 mCi, 98 mg, 0.45 mmol)에 첨가하였다. 상기 바이알을 닫고, 반응 혼합물을 120℃에서 20시간 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후에, 조 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카, 다이클로로메탄/메탄올/트라이에틸아민 97:3:0.5)로 정제하여 8.7 mCi(35%)의 표제 화합물을 99% 초과의 방사 화학적 순도(HPLC: 엑스-브릿지 C18, 0.05%의 트라이에틸 아민을 함유하는 물/아세토니트릴) 및 56 mCi/mmol의 비방사능으로 수득하였다.

[0127] **실시예 3**

[0128] **(NE)-N-(5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)-1-([^{11}C]메틸)피라졸-3-일리덴]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드**

[0129] 

[0130] 카본-11을, 사이클론(Cyclone) 18/9 사이클로트론(18-MeV, 아이비에이(IBA), 벨기에)에서 ^{14}N(p,α)^{11}C 핵 반응을 통하여, [^{11}C]CO_2의 형태로 제조하였다. [^{11}C]메틸 요오다이드([^{11}C]MeI)를, 니켈 촉매 상에서 [^{11}C]CO_2의 [^{11}C]메탄으로의 환원 및 후속 기체상 요오드화를 포함하는 2-단계 반응 시퀀스로 제조하였다. 190℃에서

AgOTf/C 칼럼을 통과한 후에, 더 큰 반응성의 [^{11}C]메틸 트라이플레이트(약 30 GBq)가 형성되었고, 이를 N-[5-tert-뷰틸-2-(사이클로뷰틸메틸)피라졸-3-일]-2-(2-하이드록시-2-메틸-프로폭시)-5-(트라이플루오로메틸)벤즈아미드(3 mg, 6.46 μmol) 및 무수 톨루엔(0.25 ㎖)을 함유하는 3-㎖ 반응 바이알을 통해 발포시켰다. 혼합물을 150℃까지 5분 동안 가열하였다. 물(1.5 ㎖)에서의 30% 아세토니트릴로 희석시킨 후에, 조 생성물을 반-분취용(semi-preparative) HPLC(칼럼: 선파이어(Sunfire) C18 5 ㎛; 10 x 150 mm; 약 10분에서 생성물 피크)를 사용하여 정제하였다. 수집한 생성물을 물(10 ㎖)로 희석하고, C18 카트리지(워터스(Waters), 5 ㎖의 EtOH 및 10 ㎖의 물로 프리컨디셔닝됨) 상에 모아서, 물(5 ㎖)로 세척하고, EtOH(0.5 ㎖)로 용리하였다. 최종 생성물의 제형화를 위해, 주입용 물(0.5 ㎖)을 첨가하여 5%의 에탄올 농도를 수득하였다. 품질 제어를 위해서, 제형화된 용액의 분취액을 분석용 HPCL 시스템(칼럼: 에이스 칼럼(ACE column), C18, 3 ㎛)에 주입하였다. ^{11}C-표지된 생성물의 종류를 이의 비방사성 참조 화합물과의 체류 시간 비교 및 공-주입(co-injection)에 의해 확인하였다. 생성물의 비방사능을 저온 참조 화합물의 검정선과의 자외선 피크 강도 비교에 의해 계산하였다. 전형적인 실험에서, 비방사능은 500 GBq/μmol 이상이고, 합성 종료시의 총 비방사능은 2 ± 1.00 GBq이었다. 총 합성 시간은 반응물 투입(bombardment) 종료시로부터 약 40분이었다.

[0131] **실시예 4**

[0132] **마우스에서의 방사성 리간드 결합**

[0133] 세포 배양

[0134] 인간 CB1 및 인간 CB2를 발현하는 CHO-K1 베타-아레스틴 세포(디스커버엑스 인코포레이티드(DiscoveRx Inc.), 미국 캘리포니아주 프레몬트 소재)를 10% FBS, 300 ㎍ ml-1 하이그로마이신 및 800 ㎍ ml-1 게네티신(G418)이 보충된 F-12 뉴트리언트 믹스처(F-12 Nutrient Mixture, HAM)에서 배양하였다. 세포를 5% CO_2를 함유한 37℃의 습한 대기에서 항온처리하였다.

[0135] 방사성 리간드 결합 분석

[0136] 안정적으로 형질감염된 세포 또는 비장 조직을 15 mmol L-1 헤페스(Hepes), 0.3 mmol L-1 EDTA, 1 mmol L-1 EGTA, 2 mmol L-1 $MgCl_2$, 완전한 EDTA-부재 단백질 분해효소 저해제(로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science), 스위스 로트크로이츠 소재), pH 7.4에서, 유리 포터 및 4℃에서 47,800 g로 30분 동안의 원심분리를 사용하여 균질화하였다. 이어서, 펠릿을 동일한 완충액에서 2회 재균질화하고, 원심분리(47,800g, 4℃, 30분)하였다. 이어서, 최종 펠릿을 75 mmol L-1 트리스, 0.3 mmol L-1 EDTA, 1 mmol L-1 EGTA, 12.5 mmol L-1 $MgCl_2$, 250 mmol L-1 수크로스, pH 7.4에서 1 내지 3 mg mL-1의 단백질 농도로 재현탁시키고, 분취하고, 드라이아이스 상에서 냉동시키고, -80℃에서 저장하였다.

[0137] 포화 결합

[0138] 포화 결합을 0.05 내지 2.4 nM의 화학식I의 화합물 및 40 ㎍의 막 단백질로 실행하였다. CP55940(10 μM)을 이용하여 비특이적 결합을 정의하였다. 분석 완충액은 50 mmol L-1 트리스-HCl, 5 mmol L-1 $MgCl_2$, 2.5 mmol L-1 EGTA 및 0.1%의 지방산-부재 BSA, pH 7.4로 이루어졌다. 분석을 250 ㎕/웰의 최종 부피의 막의 첨가에 의해 개시하였다. 분석물을 2시간 동안 실온에서 항온처리한 후에 진공으로 여과하고, 필터메이트(Filtermate) 세포 수확기 상에서 미리 0.3% 폴리에틸렌이민에 담근 패커드(Packard) GF/B 필터를 통과하게 하여 세척 완충액(50 mmol L-1 트리스-HCl, 5 mmol L-1 $MgCl_2$, 2.5 mmol L-1 EGTA 및 0.5% 지방산-부재 BSA, pH 7.4)으로 행구었다.

[0139] 경쟁 결합

[0140] 경쟁 결합을 위해서, 막 제재를 표지되지 않은(R^1= CH_3) 화학식 I의 화합물의 증가하는 농도의 존재 또는 부재하에서 0.3 nM의 [^{3}H]-CP55940, 또는 1.5 nM의 화학식 I의 화합물 및 CP55940(10 μM)의 존재 또는 비존재 하에서 증가하는 양(2.5 내지 80 ㎍)의 막으로 60분 동안 30℃에서 50 mmol L-1 트리스-HCl, 5 mmol L-1 $MgCl_2$, 2.5 mmol L-1 EGTA, 0.1% 지방산-부재 BSA 및 1% DMSO의 최종 부피 0.2 ㎖ 인 완충액 pH 7.4에서 서서히 진탕하면서 항온처리하였다. 모든 결합 반응을, 0.5% 폴리에틸렌이민에 미리 담근 GF/B 필터 판(패커드) 상으로의 진공 여과에 의해 종결시키고, 이어서 0.5% 지방산-부재 BSA를 함유하는 2 ㎖의 빙랭 결합 완충액으로 7회 간단히 세척하였다. 판을 50℃에서 1시간 동안 건조시키고, 액체 섬광 계수를 사용하여 결합된 방사성 표지를 측정

하였다. IC50 값 및 힐 경사(Hill slope)를 액티비티베이스(ActivityBase, 아이디 비지니스 솔루션 리미티드(ID Business Solution, Ltd.))를 이용한 4-모수 로지스틱 모델에 의해 결정하였다.

[0141] 결과는 하기의 표 1 및 도 1 내지 3에 제시된다.

표 1

[0142] 인간 CB2 수용체를 발현하는 CHO-K1 세포를 이용한 [^{3}H]-CP55940 방사성 리간드 경쟁 결합

	인간 CB1	인간 CB2
pKi	5.41	8.97
SEM	±0.018	±0.027
n	6	13

[0143] 표 1은 수용체를 재조합적으로 발현하는 세포에서 비선택적인 CB1/CB2 방사성 리간드 [^{3}H]-CP55940을 사용하여, 표지되지 않은(R^1= CH_3) 화학식 I의 화합물이 인간 CB1 수용체(pKi 5.41)에 비해서 인간 CB2 수용체에 대해 높은 결합 선택성(pKi 8.97)을 가짐을 입증한다.

[0144] 도 1은 마우스의 비장 조직 WT를 이용한 방사성 리간드 결합(1.5 nM의 [^{3}H]-화학식 I의 화합물)을 도시한다.

[0145] 도 1은 마우스의 비장 조직에서 화학식 I의 화합물의 높은 특이적 결합을 도시한다. 증가하는 양의 막을 사용하여, 비특이적 결합은 일정하지만 특이적 결합은 증가한다.

[0146] 도 2는 마우스의 비장 조직 WT를 이용한 방사성 리간드의 포화 결합([^{3}H]-화학식 I의 화합물)을 도시한다.

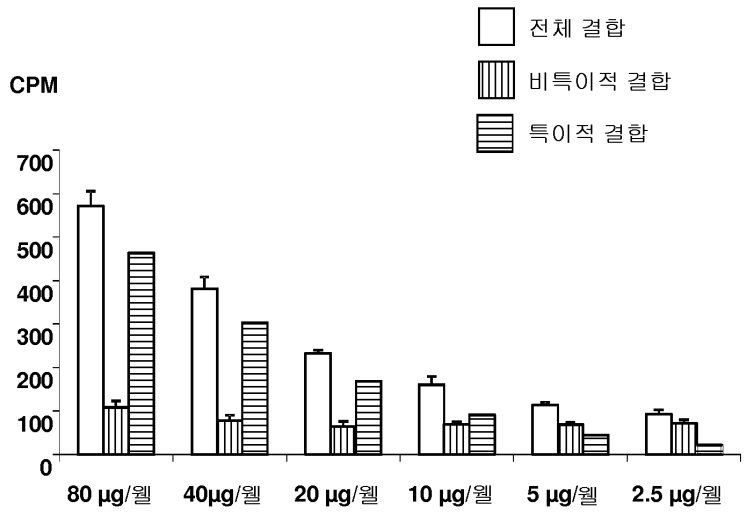
[0147] 도 2는 마우스의 비장 조직에서 화학식 1의 특이적 결합이 포화가능함을 도시한다. 계산된 최대 친화도의 절반값(Kd)은 마우스의 CB2 수용체에 대해서 0.58 nM이고, 마우스의 비장 조직에서 CB2 수용체의 발현 수준(Bmax)은 430 fmol/mg이다.

[0148] 도 3은 마우스의 비장 넉아웃(KO)(NIH)을 이용한 방사성 리간드 결합(^{3}[H]-화학식 I의 화합물)을 도시한다.

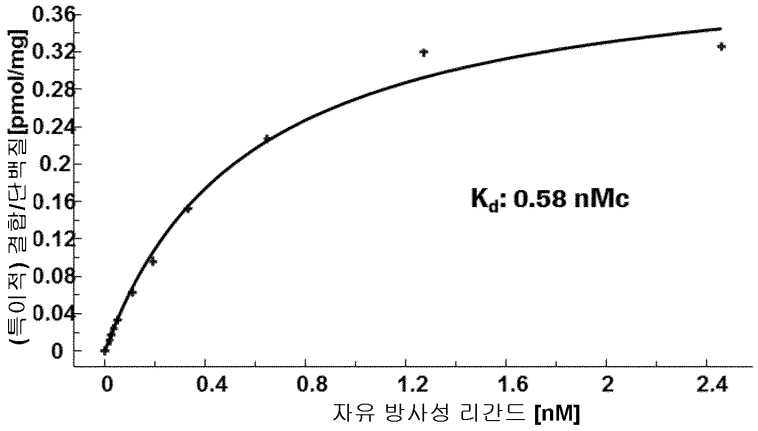
[0149] 도 3은 도 1과는 대조적으로 CB2 결핍 마우스로부터 얻은 마우스의 비장 조직에서, 화학식 I의 화합물의 특이적 결합의 부재를 도시한다. 증가하는 양의 막을 사용하여, 특이적 결합이 부재하는데, 이는 야생형의 한배 자식으로부터 얻은 마우스의 비장 조직에서 측정된 CB2 수용체에 대한 높은 특이적 결합을 나타낸다.

도면

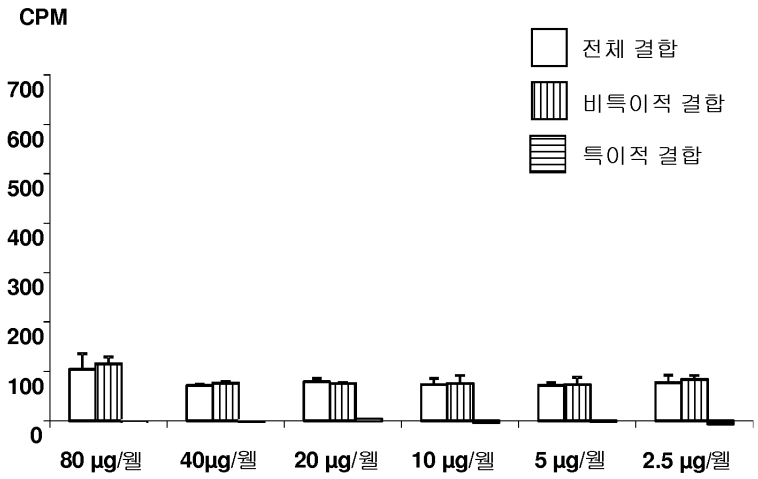
도면1



도면2


0.36
0.32
0.28
0.24
0.2
0.16
0.12
0.08
0.04
0
(특이적) 결합/단백질[pmol/mg]
K_d: 0.58 nMc
0
0.4
0.8
1.2
1.6
2
2.4
자유 방사성 리간드 [nM]

도면3


CPM
전체 결합
비특이적 결합
특이적 결합
700
600
500
400
300
200
100
0
80 μg/웰
40μg/웰
20 μg/웰
10 μg/웰
5 μg/웰
2.5 μg/웰