



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월16일
 (11) 등록번호 10-1696669
 (24) 등록일자 2017년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) *A61K 31/541* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *C07D 417/10* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7001940
 (22) 출원일자(국제) 2010년06월25일
 심사청구일자 2015년06월23일
 (85) 번역문제출일자 2012년01월25일
 (65) 공개번호 10-2012-0107919
 (43) 공개일자 2012년10월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/059064
 (87) 국제공개번호 WO 2010/149769
 국제공개일자 2010년12월29일
 (30) 우선권주장
 61/220,688 2009년06월26일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2009017954 A1*
 WO2009047514 A1
 WO2009155551 A1
 WO2010010190 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
갈라파고스 엔.브이.
 벨기에 메헬렌 비-2800, 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
 (72) 발명자
메네트 크리스텔 장 마리
 갈라파고스 엔.브이., 벨기에 메헬렌 비-2800, 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
스미츠 퀴 쿠틀트
 갈라파고스 엔.브이., 벨기에 메헬렌 비-2800, 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
 (74) 대리인
한라특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 2 항

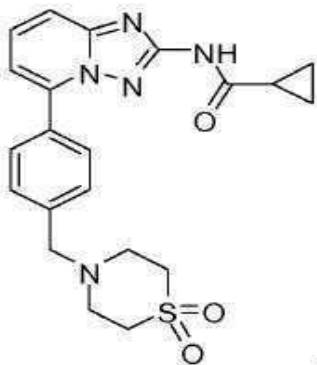
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **JAK 억제제로서 5-페닐-(1,2,4)트리아아졸로(1,5-A)피리딘-2-일 카복스아미드**

(57) 요약

JAK를 억제할 수 있는 신규의 화합물 I을 개시하며, 상기 화합물을 약학 조성물로서 제조할 수 있고, 인간을 포함한 포유동물에게서 다양한 병, 예를 들어 비 제한적으로 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및/또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병의 예방 및 치료에 사용할 수 있다:

[화학식 I]



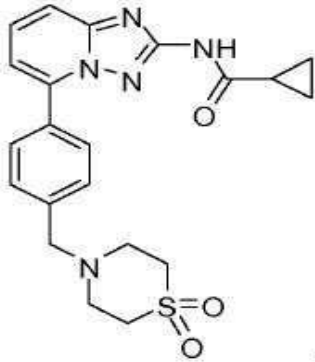
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 I]



청구항 2

제1항에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 약학 조성물이며,

상기 염증성 질병은 류머티스성 관절염, 골관절염, 알러지성 기도 질병, 및 염증성 장 질병으로 이루어지는 군으로부터 선택되고,

상기 증식성 질병은 암, 백혈병, 다발성 골수종 및 건선으로 이루어지는 군으로부터 선택되며,

상기 연골 전환의 장애를 수반하는 질병은 골관절염, 건선성 관절염, 청소년 류머티스성 관절염, 통풍성 관절염, 패혈성 또는 감염성 관절염, 반응성 관절염, 복합 부위 통증 증후군, 반사성 교감신경 위축증, 티지 증후군 또는 늑연골염, 섬유근육통, 골연골염, 신경성 또는 신경병성 관절염, 관절증, 변형성 골관절염 풍토병, 므셀리니병 및 한디고두병, 섬유근육통, 전신 홍반성 루프스, 경화증 및 강직성 척추염으로부터 발생하는 퇴행으로 이루어지는 군으로부터 선택되고,

상기 IL6의 과다분비와 관련된 질병은 캐슬만씨 병, 다발성 골수종, 건선, 카포시 육종, 및 사구체간질 증식성 사구체신염 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및/또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병에 관여하는 타이로신 키나제의 패밀리인 JAK의 억제제인 화합물에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 화합물은 JAK1 및 JAK2를 억제한다. 본 발명은 또한 본 발명 화합물의 제조 방법, 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물, 본 발명의 화합물을 투여함으로써 염증성 질병을 수반하는 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및/또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0002] 야누스 키나제(JAK)는 막 수용체로부터 STAT 전사 인자로의 사이토킨 신호전달을 도입하는 세포질 타이로신 키나제이다. 4 개의 JAK 과 구성원, JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2가 개시되어 있다. 상기 사이토킨이 그의 수용체에 결합 시, JAK 과 구성원들은 서로 자기- 및/또는 트랜스인산화한 다음, STAT의 인산화에 이어서 핵으로 이동하여 전사를 조절한다. JAK-STAT 세포 내 신호 전달은 인터페론, 대부분의 인터류킨 뿐만 아니라 다양한 사이토킨 및 내분비 인자들, 예를 들어 EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTF, GM-CSF, PRL을 조작한다(Vainchenker W. et al.(2008)).
- [0003] 유전자 모델 및 소 분자 JAK 억제제의 조합 연구는 여러 JAK의 치료 가능성을 밝혔다. JAK3는 면역-억제 표적으로서 마우스 및 인간 유전학에 의해 확인된다(O'Shea J. et al.(2004)). JAK3 억제제는 초기에 기관 이식편 거부에 대해서, 그러나 나중에는 또한 다른 면역-염증성 징후, 예를 들어 류머티스성 관절염(RA), 건선 및 크론병에 대해 성공적으로 임상 개발되었다(<http://clinicaltrials.gov/>).
- [0004] TYK2는 면역-염증성 질병에 대한 잠재적인 표적이며, 인간 유전학 및 마우스 녹-아웃 연구에 의해 확인된다(Levy D. and Loomis C.(2007)).
- [0005] JAK1은 면역-염증성 질병 분야에서 신규의 표적이다. JAK1은 다른 JAK와 이중이량체화하여 사이토킨-유발된 염증-전 신호전달을 도입한다. 따라서, JAK1 및/또는 다른 JAK의 억제는 일련의 염증성 질병뿐만 아니라 JAK-매개된 신호 전달에 의해 유발되는 다른 질병들에 대해 치료 이점을 갖는 것으로 예상된다.

배경 기술

- [0006] 연골의 퇴행은 다양한 질병들의 특징이며, 상기 질병 중에서도 류머티스성 관절염 및 골관절염이 가장 두드러진다. 류머티스성 관절염(RA)은 염증 및 관절 구조의 파괴를 특징으로 하는, 만성적인 관절 퇴행성 질병이다. 상기 질병이 억제되지 않으면, 관절 기능의 상실로 인해 실질적인 불구 및 통증 및 심지어 조기 사망에 이르게 된다. 따라서 RA 치료의 목적은 상기 질병을 늦추는 것이 아니라 관절 파괴를 멈추기 위해 질병을 소실시키는 것이다. 상기 질병 과정의 중증도 이외에, RA의 높은 유병률(세계적으로 성인의 약 0.8%가 앓고 있다)은 높은 사회-경제적 영향을 의미한다(RA에 대한 고찰에 대해서 하기 문헌들을 참조한다: Smolen and Steiner(2003); Lee and Weinblatt(2001); Choy and Panayi(2001); O'Dell(2004) and Firestein(2003)).
- [0007] 골관절염(또한 OA, 또는 마모 관절염으로도 지칭된다)은 가장 통상적인 형태의 관절염이며 관절 연골의 상실을 특징으로 하고, 종종 뼈의 비대 및 통증과 연관된다. 골관절염에 대한 광범위한 고찰에 대해서 문헌[Wieland et al., 2005]을 참조한다.
- [0008] 골관절염은 치료하기가 어렵다. 현재, 완치는 가능하지 않으며 치료는 통증의 완화 및 감염된 관절이 불구가 되는 것을 막는데 초점을 두고 있다. 통상적인 치료는 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID)의 사용을 포함한다.

콘드로이친 및 글루코사민과 같은 건강기능식품들이 골관절염의 치료에 안전하고 유효한 옵션으로서 주장되었지만, 최근의 임상 시험은 상기 둘 모두의 치료가 골관절염과 관련된 통증을 감소시키지 못함을 밝혔다(Clegg et al., 2006).

- [0009] 동화 과정의 자극, 이화 과정의 차단, 또는 이들 둘의 조합은 연골의 안정화, 및 추정 상 심지어 상기 손상의 역전을 생성시키고, 따라서 상기 질병의 추가적인 진행을 방지할 수도 있다. 골관절 질환 중에 나타나는 관절 연골 장애의 교정을 위한 치료 방법들이 개발되었으나, 지금까지 이들 중 어느 것도 원위치 및 생체 내에서 관절 연골의 재생을 매개할 수 없었다. 종합해보면, 질병 개질 골관절염 약물들을 입수할 수 없다.
- [0010] 반데그힌스테(Vandeghinste) 등(WO 2005/124342)은 억제제 OA를 포함한 여러 질병에 대해 치료학적 관련성을 가질 수도 있는 표적으로서 JAK1을 발견하였다. 마우스에서 JAK1 유전자의 녹아웃은 JAK1이 발생 중 필수적이고 필요한 역할을 한다는 것을 입증하였다, 즉 JAK1 -/- 마우스는 출생 후 24 시간 내에 죽고 림프구 발생이 심각하게 손상되었다. 더욱이, JAK1 -/- 세포는 II 부류 사이토킨 수용체, 신호전달을 위해 감마-c 서브유닛을 사용하는 사이토킨 수용체 및 신호전달을 위해 gp130 서브유닛을 사용하는 사이토킨 수용체 과를 사용하는 사이토킨들에 반응성이 아니거나 덜 반응성이었다(Rodig et al., 1998).
- [0011] 다양한 그룹들이 연골세포 생물학에서 JAK-STAT 신호에 연루되었다. 리(Lie) 등(2001)은 은코스타틴 M이 JAK/STAT 및 MAPK 신호전달 경로의 활성화에 의해 1차 연골세포에서 MMP 및 TIMP3 유전자 발현을 유도함을 보였다. 오사키(Osaki) 등(2003)은 연골세포에서 콜라겐 II의 인터페론-감마 매개된 억제가 JAK-STAT 신호 전달을 수반함을 보였다. IL1-베타는 기질 성분의 발현을 감소시키고 콜라게나제 및 유도 가능한 산화 질소 신타제(NOS2)(산화 질소(NO)의 생산을 매개한다)의 발현을 유도함으로써 연골 이화작용을 유도한다. 오테로(Otero) 등(2005)은 렙틴 및 IL1-베타가 연골세포에서 NO 생산 및 NOS2 mRNA의 발현을 상승적으로 유도하고 이는 JAK 억제제에 의해 차단됨을 보였다. 레젠드레(Legendre) 등(2003)은 IL6/IL6 수용체가 소 관절 연골세포에서 연골-특이적 기질 유전자 콜라겐 II, 아그레칸 코어 및 링크 단백질의 하향조절을 유도하고, 이는 JAK/STAT 신호 전달에 의해 매개됨을 보였다. 따라서, 이러한 관찰들은 연골 항상성에서 JAK 키나제 활성화에 대한 역할 및 JAK 키나제 억제제의 치료 기회를 암시한다.
- [0012] JAK 과 구성원들은 골수증식성 질환을 포함한 추가적인 병들에 연루되었으며(O'Sullivan et al, 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506), 여기에서 JAK2의 돌연변이가 확인되었다. 이는 JAK, 특히 JAK2의 억제제가 또한 골수증식성 질환의 치료에 사용될 수도 있음을 가리킨다. 또한, JAK 과, 특히 JAK1, JAK2 및 JAK3는 암, 특히 백혈병, 예를 들어 급성 골수성 백혈병(O'Sullivan et al, 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506; Xiang et al., 2008, "급성 골수성 백혈병 환자에서 체세포 JAK1 돌연변이의 확인" Blood First Edition Paper, prepublished online December 26, 2007; DIO 10.1182/blood-2007-05-090308) 및 급성 림프모구성 백혈병(Mullighan et al, 2009) 또는 고형 종양, 예를 들어 자궁 평활근육종(Constantinescu et al., 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3):122-131), 전립선 암(Tam et al., 2007, British Journal of Cancer, 97, 378-383)과 관련지어져 왔다. 이러한 결과들은 JAK, 특히 JAK1 및/또는 JAK2의 억제제가 또한 암(백혈병 및 고형 종양, 예를 들어 자궁 평활근육종, 전립선암)의 치료에 유용성을 가질 수도 있음을 가리킨다.
- [0013] 또한, 케슬만씨 병, 다발성 골수종, 사구체간질 증식성 사구체신염, 건선 및 카포시 육종은 사이토킨 IL-6의 과다분비로 인한 듯하며, 그의 생물학적 효과는 세포 내 JAK-STAT 신호에 의해 매개된다(Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadimitsu Kishimoto, Arthritis Res 2002, 4(suppl 3):S233-S242). 상기 결과는 JKA의 억제제가 또한 상기 질병의 치료에서도 유용성을 발견할 수 있음을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 현행 요법들은 만족스럽지 않으며 따라서 퇴행성 관절 질환, 예를 들어 골관절염, 류마티스성 관절염 및 골다공증, 특히 골관절염의 치료에 유용할 수 있는 추가의 화합물들을 동정할 필요가 여전히 존재한다.

과제의 해결 수단

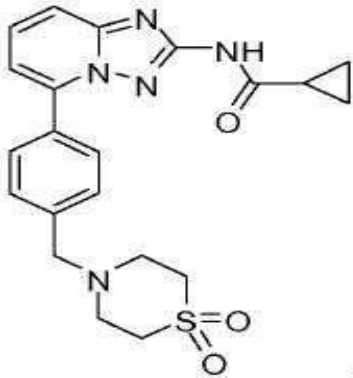
- [0015] 따라서 본 발명은 화합물, 그의 제조 방법 및 적합한 약학 담체와 함께 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 퇴행성 관절 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 발명 화합물의 용도를 제공한다. 구체적으로 본 발명은 대단히 개선된 생체 내 효능을 발휘하는 신규의 JAK 억제제를 제공한다.

[0016] 발명의 요약

[0017] 본 발명은 본 발명의 화합물이 JAK의 억제제로서 작용할 수 있으며 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및/또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병의 치료에 유용하다는 발견에 근거한다. 구체적인 실시태양에서 상기 화합물은 JAK1 및 JAK2의 억제제이다. 본 발명은 또한 상기 화합물의 제조 방법, 상기 화합물을 포함하는 약학 조성물, 및 본 발명의 화합물을 투여함으로써 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및/또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0018] 따라서, 본 발명의 첫 번째 태양에서, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물을 제공한다:

[0019] [화학식 I]



[0020]

[0021] 본 발명의 화합물은 구조적으로 유사한 화합물들에 비해 대단히 개선된 생체 내 효능을 발휘하는 것으로 보이는 신규의 JAK 억제제이다. 특정 실시태양에서 본 발명의 화합물은 JAK1 및 JAK2의 억제제이다. 특히 상기 화합물은 구조적으로 유사한 화합물들에 비해 보다 낮은 생체 내 노출 수준으로 상기 효능 증가를 발휘하는 것으로 보인다. 이러한 개선된 화합물의 사용은 보다 낮은 투여량 요구(및 따라서 개선된 투여 스케줄)를 생성시키는 것으로 기대된다.

[0022] 추가의 태양에서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 및 약학적 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 더욱이, 본 발명에 개시된 약학 조성물 및 치료 방법에 유용한, 본 발명의 화합물은 제조 및 사용 시 약학적으로 허용 가능하다. 본 발명의 상기 태양에서, 상기 약학 조성물은 본 발명의 화합물과 함께 사용하기에 적합한 추가의 유효 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 추가의 태양에서, 본 발명은 본 발명에 나열된 병들 중 하나, 및 특히 이상 JAK 활성화와 관련된 수도 있는 바와 같은 병, 예를 들어 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 발명에 개시된 바와 같은 본 발명의 약학 조성물 또는 화합물을 투여함을 포함한다. 구체적인 실시태양에서 상기 병은 이상 JAK1 및 JAK2 활성화와 관련된다.

[0024] 추가의 태양에서, 본 발명은 본 발명에 나열된 것들 중에서 선택된 병, 특히 이상 JAK 활성화와 관련된 수도 있는 바와 같은 병, 예를 들어 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.

[0025] 더욱 또 다른 치료 방법 태양에서, 본 발명은 본 발명에 개시된 바와 같은 이상 JAK 활성화와 인과 관계로 관련된 병에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공하며, 유효한 병-치료 또는 병-예방 량의 본 발명에 개시된 본 발명의 약학 조성물 또는 화합물을 투여함을 포함한다. 구체적인 태양에서 상기 병은 이상 JAK1 및 JAK2 활성화와 인과 관계로 관련된다.

[0026] 추가의 태양에서, 본 발명은 이상 JAK 활성화와 인과 관계로 관련된 병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.

[0027] 추가의 태양에서, 본 발명은 본 발명에서 나중에 개시되는 전형적인 합성 프로토콜 및 경로에 의해 본 발명의 화합물을 합성하는 방법을 제공한다.

- [0028] 따라서, 본 발명의 주목적은 JAK의 활성을 개질시키고 따라서 이에 대해 인과 관계로 관련될 수도 있는 임의의 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 신규의 화합물을 제공하는 것이다. 구체적인 태양에서 본 발명의 화합물은 JAK1 및 JAK2의 활성을 조절한다.
- [0029] 본 발명의 추가의 목적은 JAK, 특히 JAK1 및 JAK2의 활성과 인과 관계로 관련될 수도 있는 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병과 같은 질병 또는 이의 증상을 치료 또는 완화할 수 있는 화합물을 제공하는 것이다.
- [0030] 본 발명의 더욱 추가의 목적은 JAK 활성과 관련된 질병을 포함한 다양한 질병 상태, 예를 들어 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병의 치료 또는 예방에 사용될 수 있는 약학 조성물을 제공하는 것이다. 구체적인 실시태양에서 상기 질병은 JAK1 및 JAK2 활성과 관련이 있다.
- [0031] 다른 목적들 및 이점들은 계속되는 상세한 설명의 고려로부터 당해 분야의 숙련가들에게 자명해질 것이다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은 JAK 억제제인 화합물을 투여함으로써 염증성 질병을 수반하는 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및/또는 IL6의 과다분비와 관련된 질병을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하는데 유용한 효과가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 정의
- [0034] 하기의 용어들은 하기에 함께 제공된 의미들을 가짐을 의미하며 본 발명의 설명 및 의도하는 범위를 이해하는데 유용하다.
- [0035] 화합물, 상기와 같은 화합물을 함유하는 약학 조성물 및 상기와 같은 화합물 및 조성물을 사용하는 방법을 포함할 수 있는 본 발명을 개시할 때, 하기의 용어들(존재하는 경우)은 달리 나타내지 않는 한 하기의 의미들을 갖는다. 하기에 정의된 부분들 중 임의의 것은 본 발명에 개시될 때 다양한 치환체들로 치환될 수 있으며, 각각의 정의는 하기에 나타낸 바와 같은 그의 범위 내에 상기와 같은 치환된 부분들을 포함하고자 함은 또한 물론이다. 달리 나타내지 않는 한, '치환된'이란 용어는 하기에 나타낸 바와 같이 정의되어야 한다. 또한 '그룹' 및 '라디칼'이란 용어는 본 발명에 사용 시 호환적으로 간주할 수 있음은 물론이다.
- [0036] '하나의'란 관사는 본 발명에서 상기 관사의 문법적 목적어 중 하나 또는 하나보다 많음(즉 하나 이상)을 지칭하는데 사용될 수 있다. 예로서 "하나의 동족체"는 하나 또는 하나보다 많은 동족체를 의미한다.
- [0037] 본 발명에 사용된 바와 같이 'JAK'란 용어는 막 수용체로부터 STAT 전사 인자로의 사이토킨 신호전달을 도입하는 세포질 타이로신 키나제인 야누스 키나제(JAK) 과에 관한 것이다. 4 개의 JAK 과 구성원, JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2가 개시되어 있으며 상기 JAK란 용어는 모든 JAK 과 구성원들을 집합적으로 또는 내용상 가리키는 바와 같은 상기 JAK 과 구성원들 중 하나 이상을 지칭할 수도 있다.
- [0038] '약학적으로 허용가능한'은 연방 또는 주 정부의 규제 기관 또는 미국 이외 국가의 해당 기관에 의해 승인되거나 승인될 수 있음, 또는 동물, 및 보다 특히 인간용으로 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정된 약전에 나열됨을 의미한다.
- [0039] '약학적으로 허용 가능한 염'은 약학적으로 허용 가능하고 모 화합물의 목적하는 약물 활성을 갖는 본 발명 화합물의 염을 지칭한다. 특히, 상기와 같은 염은 무독성이며 무기 또는 유기 산 부가염 및 염기 부가염일 수 있다. 구체적으로, 상기와 같은 염은 (1) 무기산, 예를 들어 염산, 브롬화 수소산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산으로 형성되거나, 또는 유기산, 예를 들어 아세트산, 프로피온산, 핵산산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-다이설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트라이메틸아세트산, 3급 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 뮤콘산 등으로 형성된 산 부가염; 또는 (2) 모 화합물 중에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어 알칼리 금속 이온, 알칼리 토 이온, 또는 알루미늄

늄 이온에 의해 치환되거나, 또는 유기 염기, 예를 들어 에탄올아민, 디에탄올아민, 트라이에탄올아민, N-메틸글루카민 등과 배위하는 경우 형성되는 염을 포함한다. 염은 단지 예로서 나트륨 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 등; 및 상기 화합물이 염기성 작용기를 함유하는 경우, 무독성 유기 또는 무기산의 염, 예를 들어 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 아세테이트, 말리에이트, 옥살레이트 등을 추가로 포함한다. '약학적으로 허용 가능한 양이온'이란 용어는 산성 작용기의 허용 가능한 양이온성 대이온을 지칭한다. 상기와 같은 양이온은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 양이온 등으로 예시된다.

- [0040] '약학적으로 허용 가능한 비히클'은 본 발명의 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 담체를 지칭한다.
- [0041] '용매화물'은 대개 가용매 분해 반응에 의해, 용매와 회합되는 화합물의 형태를 지칭한다. 상기 물리적인 회합은 수소 결합을 포함한다. 통상적인 용매로는 물, 에탄올, 아세트산 등을 포함한다. 본 발명의 화합물을 예를 들어 결정성 형태로 제조할 수 있으며 용매화 또는 수화시킬 수 있다. 적합한 용매화물은 약학적으로 허용 가능함 용매화물, 예를 들어 수화물을 포함하며, 화학량론적 용매화물 및 비-화학량론적 용매화물 모두를 추가로 포함한다. 몇몇 경우에 상기 용매화물은, 예를 들어 하나 이상의 용매 분자가 결정성 고체의 결정 격자 중에 결합된 경우 단리가 가능할 것이다. '용매화물'은 용액상 및 단리 가능한 용매화물 모두를 포함한다. 전형적인 용매화물은 수화물, 에탄올레이트 및 메탄올레이트를 포함한다.
- [0042] '피실험자'는 인간을 포함한다. '인간', '환자' 및 '피실험자'란 용어는 본 발명에서 호환적으로 사용된다.
- [0043] '치료 유효량'은 질병의 치료를 위해 환자에게 투여 시 상기 질병에 대해 상기와 같은 치료를 수행하기에 충분한 본 발명 화합물의 양을 의미한다. '치료 유효량'은 상기 화합물, 질병 및 그의 중증도, 및 치료하려는 환자의 연령, 체중 등에 따라 변할 수 있다.
- [0044] '예방하다' 또는 '예방'은 질병 또는 질환이 초래되거나 발병할 위험의 감소(즉 질병 유발제에 노출되거나 질병의 발병에 앞서 상기 질병에 걸리기 쉬울 수 있는 환자에게서 상기 질병의 임상적 증상들 중 하나 이상이 발생하지 않게 함)를 지칭한다.
- [0045] '예방학'이란 용어는 '예방'과 관련이 있으며, 질병을 치료 또는 치유하는 것이기 보다는, 예방을 목적으로 하는 수단 또는 기술을 지칭한다. 예방학적 수단의 비 제한적인 예로 백신의 투여; 예를 들어 고정화로 인한 혈전증의 위험이 있는 환자에게 저 분자량 헤파린의 투여; 및 말라리아가 유행하는 지역 또는 말라리아 접촉 위험이 높은 지역을 방문하기에 앞서, 항말라리아제, 예를 들어 클로로퀸의 투여가 있을 수 있다.
- [0046] 임의의 질병 또는 질환을 '치료하는' 또는 '치료'는 하나의 실시태양에서 상기 질병 또는 질환의 개선(즉 상기 질병을 억제하거나 그의 임상적 증상들 중 하나 이상의 표시, 정도 또는 중증도를 감소시킴)을 지칭한다. 또 다른 실시태양에서 '치료하는' 또는 '치료'는 환자가 분간할 수 없을 수도 있는 하나 이상의 신체 매개변수의 개선을 지칭한다. 더욱 또 다른 실시태양에서, '치료하는' 또는 '치료'는 상기 질병 또는 질환을 신체적으로(예를 들어 분간할 수 있는 증상의 안정화), 생리학적으로(예를 들어 신체 매개변수의 안정화), 또는 이 둘 모두로 조절함을 지칭한다. 추가의 실시태양에서, '치료하는' 또는 '치료'는 상기 질병의 진행을 늦추는 것에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명에 사용된 바와 같이, '염증을 수반하는 병(들)'이란 용어는 류머티스성 관절염, 골관절염, 소아특발성 관절염, 건선, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식, 비염), 염증성 장 질병(예를 들어 크론병, 대장염), 내독소-유발된 질병 상태(예를 들어 우회술 후 합병증 또는 예를 들어 만성 심부전의 원인이 되는 만성 내독소 상태), 및 연골, 예를 들어 관절의 연골을 포함하는 관련된 질병을 포함한 병의 그룹을 지칭한다. 특히 상기 용어는 류머티스성 관절염, 골관절염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식) 및 염증성 장 질병을 지칭한다.
- [0048] 본 발명에 사용된 바와 같이 '자가면역 질병(들)'이란 용어는 폐쇄성 기도 질병을 포함하는 질병의 그룹, 예를 들어 COPD, 천식(예를 들어 내인성 천식, 외인성 천식, 먼지 천식, 유아 천식), 특히 만성 또는 고질 천식(예를 들어 말기 천식 및 기도 고반응성), 기관지염, 예를 들어 기관지 천식, 전신 홍반성 루프스(SLE), 다발성 경화증, I형 당뇨병 및 이와 관련된 합병증, 아토피성 습진(아토피성 피부염), 접촉 피부염 및 추가적인 습진 피부염, 염증성 장 질병(예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염), 동맥경화증 및 근위축성 측삭 경화증과 같은 병을 지칭한다. 특히 상기 용어는 COPD, 천식, 전신 홍반성 루프스, I형 당뇨병 및 염증성 장 질병을 지칭한다.
- [0049] 본 발명에 사용된 바와 같이 '증식성 질병(들)'이란 용어는 암(예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선 암), 골수증식성 질환(적혈구 증가증, 본태성 혈소판증가증, 및 골수섬유증), 백혈병(예를 들어 급성 골수성 백혈병 및

급성 림프모구성 백혈병), 다발성 골수종, 건선, 재협착증, 경화성피부염 또는 섬유증과 같은 병을 지칭한다. 특히 상기 용어는 암, 백혈병, 다발성 골수종 및 건선을 지칭한다.

- [0050] 본 발명에 사용된 바와 같이 '암'이란 용어는 피부 또는 신체 기관, 예를 들어 비 제한적으로 유방, 전립선, 폐, 신장, 췌장, 위 또는 장 세포의 악성 또는 양성 성장을 지칭한다. 암은 인접한 조직 내로 침투하고 원위 기관, 예를 들어 뼈, 간, 폐 또는 뇌로 확산(전이)하는 성향이 있다. 본 발명에 사용된 바와 같이 암이란 용어는 전이성 종양 세포 유형, 예를 들어 비 제한적으로 흑색종, 림프종, 백혈병, 섬유육종, 횡문근육종, 및 비만 세포종과, 조직 암종의 유형, 예를 들어 비 제한적으로 결장직장암, 전립선암, 소 세포 폐암 및 비 소 세포 폐암, 유방암, 췌장암, 방광암, 신장암, 위암, 교모세포종, 원발성 간암, 난소암, 전립선암 및 자궁 평활근육종을 모두 포함한다.
- [0051] 본 발명에 사용된 바와 같이 '백혈병'이란 용어는 혈액 및 혈액 형성 기관의 신생물형성 질병을 지칭한다. 상기 용어와 같은 질병은 골수 및 면역 체계 기능장애를 유발할 수 있으며, 이는 숙주를 감염 및 출혈에 민감하게 한다. 특히 백혈병이란 용어는 급성 골수성 백혈병(AML) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL)을 지칭한다.
- [0052] 본 발명에 사용된 바와 같이 '이식 거부'란 용어는 세포, 조직 또는 고형 기관, 예를 들어 이차성, 줄기 세포, 골수, 피부, 근육, 각막 조직, 신경 조직, 심장, 폐, 결합된 심장-폐, 신장, 간, 장, 췌장, 기관 또는 식도의 동종- 또는 이종이식편의 급성 또는 만성 거부, 또는 이식편 대 숙주병을 지칭한다.
- [0053] 본 발명에 사용된 바와 같이 '연골 전환의 장애를 수반하는 질병'이란 용어는 골관절염, 건선성 관절염, 청소년 류머티스성 관절염, 통풍성 관절염, 패혈성 또는 감염성 관절염, 반응성 관절염, 복합 부위 통증 증후군, 반사성 교감신경 위축증, 티지 증후군 또는 늑연골염, 섬유근육통, 골연골염, 신경성 또는 신경병성 관절염, 관절증, 변형성 골관절염 풍토병과 같은 풍토성 형태의 관절염, 므셀리니병 및 한디고두병; 섬유근육통, 전신 홍반성 루프스, 경화증 및 강직성 척추염으로부터 발생하는 퇴행과 같은 병을 포함한다.
- [0054] 본 발명에 사용된 바와 같이 '선천성 연골 기형(들)'이란 용어는 유전성 연골분해, 연골 형성 이상증 및 의사 연골 형성 이상증과 같은 병, 특히 비 제한적으로 소이증, 무이증, 골간단 연골 형성 이상증, 및 관련된 질환들을 포함한다.
- [0055] 본 발명에 사용된 바와 같이 'IL6의 과다분비와 관련된 질병(들)'이란 용어는 캐슬만씨 병, 다발성 골수종, 건선, 카포시 육종 및/또는 사구체간질 증식성 사구체신염과 같은 병을 포함한다.
- [0056] '본 발명의 화합물(들)' 및 동등한 표현은 본 발명에서 앞서 개시된 바와 같은 화학식(들)의 화합물을 포함함을 의미하며, 그 표현은 진구약물, 약학적으로 허용 가능한 염, 및 용매화물, 예를 들어 수화물, 및 상기 약학적으로 허용 가능한 염의 용매화물(내용상 그렇게 허용하는 경우)을 포함한다. 유사하게, 중간체에 대한 언급은, 그 자체가 청구되었는지의 여부와 관계없이, 그의 염 및 용매화물(내용상 그렇게 허용하는 경우)을 포함함을 의미한다.
- [0057] 본 발명 화합물의 다른 유도체들은 그들의 산 및 산 유도체 형태 모두에서 활성을 가질 수 있으나, 산 민감성 형태에서는 종종 용해도의 이점, 조직 적합성, 또는 포유동물 유기체에서 지연된 방출을 제공한다(문헌 [Bundgard, H., Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985]을 참조하십시오).
- [0058] 본 발명에 사용된 바와 같이, '동위원소 변체'란 용어는 화합물을 구성하는 원자들 중 하나 이상에 부자연한 비율의 동위원소를 함유하는 상기와 같은 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 화합물의 '동위원소 변체'는 하나 이상의 비-방사성 동위원소, 예를 들어 중수소(^2H 또는 D), 탄소-13(^{13}C), 질소-15(^{15}N) 등을 함유할 수 있다. 상기와 같은 동위원소 치환이 이루어진 화합물에서, 하기의 원자들(존재하는 경우)은, 예를 들어 임의의 수소가 $^2\text{H}/\text{D}$ 이거나, 임의의 탄소가 ^{13}C 이거나, 또는 임의의 질소가 ^{15}N 일 수 있고 상기와 같은 원자의 존재 및 치환이 당해 분야의 기술 내에서 측정될 수 있도록 다양할 수 있음을 이해할 것이다. 마찬가지로, 본 발명은 방사성 동위원소를 갖는 동위원소 변체의 제조를, 예를 들어 생성 화합물이 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 사용될 수 있는 경우, 포함할 수 있다. 상기 방사성 동위원소 삼중수소, 즉 ^3H 및 탄소-14, 즉 ^{14}C 는 그들의 결합 용이성 및 용이한 검출 수단에 비추어 상기 목적에 특히 유용하다. 더욱이, 양전자 방출 동위원소, 예를 들어 ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O 및 ^{13}N 으로 치환되고 기질 수용체 점유를 검사하기 위한 양전자 단층촬영(PET) 연구에 유용한 화합물들을 제조할 수 있다.

[0059] 본 발명에 제공된 본 발명 화합물의 모든 동위원소 변체들을, 방사성이든 아니든, 본 발명의 범위 내에 포함하고자 한다.

[0060] '토오토머'는 모 화합물 구조의 호환 가능한 형태이고 수소 원자 및 전자의 치환이 다양한 화합물을 지칭한다. 따라서, 2 개의 구조가 π 전자 및 원자(대개 H)를 통해 평형일 수 있다. 예를 들어, 에놀 및 케톤은 산이나 염기에 의한 처리에 의해 신속히 상호전환되므로 토오토머이다. 토오토머화의 또 다른 예는 페닐나이트로메탄의 액시- 및 나이트로-형태이며, 이는 마찬가지로 산 또는 염기에 의한 처리에 의해 형성된다.

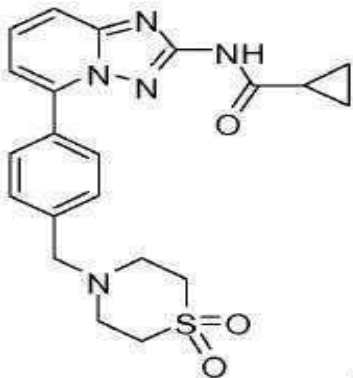
[0061] 토오토머 형태는 관심 화합물의 최적의 화학적 안정성 및 생물학적 안정성의 획득과 관련이 있을 수 있다.

[0062] **화합물**

[0063] 본 발명은 본 발명의 화합물이 JAK의 억제제이고 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병의 치료에 유용하다는 발견에 근거한다. 본 발명은 또한 본 발명 화합물의 제조 방법, 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물, 및 본 발명의 화합물을 투여함으로써 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서 본 발명의 화합물은 JAK1 및 JAK2의 억제제이다.

[0064] 따라서, 본 발명의 첫 번째 태양에서, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물을 개시한다:

[0065] [화학식 I]



[0066] 하나의 실시태양에서 본 발명의 화합물은 동위원소 변체가 아니다.

[0067]

[0068] 본 발명의 화합물은 JAK의 신규의 억제제이다. 특히 상기 화합물은 JAK1 및 JAK2의 효능 있는 억제제이나, TYK2 및 JAK3은 보다 낮은 효능으로 억제한다.

[0069] 본 발명의 화합물은 대단히 개선된 생체 내 효능을 발휘한다. 이러한 개선은 심지어 구조적으로 유사한 화합물들보다도 특별하고 놀라운 것으로 보인다. 이러한 개선을 갖는 화합물의 사용은 보다 낮은 투여량 요구(및 따라서 개선된 투여 스케줄)를 생성시킬 수 있다.

[0070] **약학 조성물**

[0071] 본 발명의 화합물은 약제로서 사용될 때, 전형적으로는 약학 조성물의 형태로 투여된다. 상기와 같은 조성물을 제약 분야에 널리 공지된 방식으로 제조할 수 있으며, 상기 조성물은 하나 이상의 활성 화합물을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 화합물을 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 실제로 투여되는 상기 화합물의 양을 전형적으로는 관련 환경, 예를 들어 치료하려는 병, 선택된 투여 경로, 투여되는 실제 화합물, 개인 환자의 연령, 체중 및 반응, 상기 환자 증상의 중증도 등에 비추어 의사가 결정할 것이다.

[0072] 본 발명의 약학 조성물을 다양한 경로, 예를 들어 경구, 직장, 피 내, 피 하, 관절 내, 정맥 내, 근육 내 및 비 내로 투여할 수 있다. 의도하는 전달 경로에 따라, 본 발명의 화합물을 바람직하게는 주사가능한 또는 경구 조성물로서 또는 연고로서, 로션으로서, 또는 경피 투여용 패치로서 제형화할 수 있다.

[0073] 경구 투여용 조성물은 벌크 액체 용액 또는 현탁액, 또는 벌크 분말의 형태를 취할 수 있다. 그러나 보다 통상적으로 상기 조성물은 정확한 투약을 용이하게 하기 위해 단위 투여형으로 제공된다. '단위 투여형'이란 용어는 인간 환자 및 다른 포유동물에게 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위들을 지칭하며, 각 단위

는 적합한 약학 부형제와 함께, 목적하는 치료 효과를 생성시키도록 계산된 소정량의 활성 물질을 함유한다. 전형적인 단위 투여형은 액체 조성물의 이미 충전된, 미리 측정된 앰플 또는 주사기, 또는 고체 조성물의 경우에 환제, 정제, 캡슐 등을 포함한다. 상기와 같은 조성물에서, 본 발명의 화합물은 대개 소량 성분(약 0.1 내지 약 50 중량% 또는 바람직하게는 약 1 내지 약 40 중량%)이며 나머지는 목적하는 투여형을 형성시키는데 도움이 되는 다양한 비히클 또는 담체 및 가공 보조제들이다.

[0074] 경구 투여에 적합한 액체 형태는 완충제, 현탁 및 분배제, 착색제, 풍미제 등과 함께 적합한 수성 또는 비수성 비히클을 포함할 수 있다. 고체 형태는 예를 들어 하기의 성분들, 또는 유사한 성질의 화합물들 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 결합제, 예를 들어 미정질 셀룰로스, 트라가칸트 또는 젤라틴 검; 부형제, 예를 들어 전분 또는 락토오스, 붕해제, 예를 들어 알긴산, 프리모젤, 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트; 윤활제, 예를 들어 콜로이드성 이산화 규소; 감미제, 예를 들어 슈크로스 또는 사카린; 또는 풍미제, 예를 들어 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 풍미제.

[0075] 주사 가능한 조성물은 전형적으로는 주사 가능한 멸균 염수 또는 포스페이트-완충 염수 또는 당해 분야에 공지된 다른 주사 가능한 담체를 기본으로 한다. 이전과 같이, 상기와 같은 조성물 중의 활성 화합물은 전형적으로는 소량 성분이며, 종종 약 0.05 내지 10 중량%이고 나머지는 상기 주사 가능한 담체 등이다.

[0076] 경피 조성물은 전형적으로는 활성 성분(들)을, 일반적으로 약 0.01 내지 약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 10 중량%, 및 보다 바람직하게는 약 0.5 내지 약 15 중량% 범위의 양으로 함유하는 국소 연고 또는 크림으로서 제형화된다. 연고로서 제형화 시, 상기 활성 성분들을 전형적으로는 파라핀 또는 수-혼화성 연고 베이스와 배합할 것이다. 한편으로, 상기 활성 성분을 예를 들어 수중 유적형 크림 베이스와 함께 크림으로 제형화할 수 있다. 상기와 같은 경피 제형은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며 일반적으로 상기 활성 성분 또는 제형의 피부 침투 안정성을 향상시키기 위한 추가의 성분들을 포함한다. 모든 상기와 같은 공지된 경피 제형 및 성분은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0077] 본 발명의 화합물을 또한 경피 장치에 의해 투여할 수 있다. 따라서, 경피 투여를 저장소나 다공성 멤브레인 유형, 또는 고체 기질 종류의 패치를 사용하여 수행할 수 있다.

[0078] 경구 투여가능하거나, 주사 가능하거나 또는 국소 투여 가능한 조성물에 대해 상술한 성분들은 단지 전형적인 것이다. 다른 물질들뿐만 아니라 가공 기법 등이 문헌[Part 8 of Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania](본 발명에 참고로 인용된다)에 나열되어 있다.

[0079] 본 발명의 화합물을 또한 서방성 형태로 또는 서방성 약물 전달 시스템으로부터 투여할 수 있다. 전형적인 서방성 물질에 대한 설명을 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]에서 찾을 수 있다.

[0080] 하기의 제형예들은 본 발명에 따라 제조될 수 있는 전형적인 약학 조성물을 예시한다. 그러나, 본 발명은 하기의 약학 조성물들로 제한되지 않는다.

[0081] **제형 1 - 정제**

[0082] 본 발명의 화합물을 무수 젤라틴 결합제와 적합한 1:2 중량비로 건조 분말로서 혼합할 수 있다. 소량의 마그네슘 스테아레이트를 윤활제로서 첨가한다. 상기 혼합물은 정제 프레스에서 240 내지 270 mg 정제(정제당 80 내지 90 mg의 활성 아미드 화합물)로 형성된다.

[0083] **제형 2 - 캡슐**

[0084] 본 발명의 화합물을 전분 희석제와 적합한 1:1 중량비로 건조 분말로서 혼합할 수 있다. 상기 혼합물을 250 mg 캡슐(캡슐당 125 mg의 활성 아미드 화합물)에 충전한다.

[0085] **제형 3 - 액체**

[0086] 본 발명의 화합물(125 mg)을 슈크로스(1.75 g) 및 잔탄 검(4 mg)과 함께 혼합하고 생성 혼합물을 블렌딩하고, 10 번 메쉬 U.S. 체에 통과시키고, 이어서 앞서 제조된 수중 미정질 셀룰로스 및 나트륨 카복시메틸 셀룰로스의 용액(11:89, 50 mg)과 혼합한다. 나트륨 벤조에이트(10 mg), 풍미제 및 착색제를 물로 희석하고 교반하면서 첨가한다. 이어서 충분한 물을 교반하면서 첨가할 수도 있다. 이어서 추가의 충분한 물을 가하여 5 ml의 전체 부피를 생성시킬 수 있다.

[0087] **제형 4 - 정제**

- [0088] 본 발명의 화합물을 무수 젤라틴 결합제와 적합한 1:2 중량비로 건조 분말로서 혼합할 수 있다. 소량의 마그네슘 스테아레이트를 윤활제로서 첨가한다. 상기 혼합물은 정제 프레스에서 450 내지 900 mg 정제(150 내지 300 mg의 활성 아미드 화합물)로 형성된다.
- [0089] **제형 5 - 주사**
- [0090] 본 발명의 화합물을 완충된 멸균 염수 주사 가능한 수성 매질에 대략 5 mg/ml의 농도로 용해하거나 현탁할 수 있다.
- [0091] **제형 6 - 국소**
- [0092] 스테아릴 알콜(250 g) 및 백색 바셀린(250 g)을 약 75 °C에서 용융시키고 이어서 물(약 370 g)에 용해된 본 발명의 화합물(50 g) 메틸파라벤(0.25 g), 프로필파라벤(0.15 g), 나트륨 라우릴 설페이트(10 g), 및 프로필렌 글리콜(120 g)의 혼합물을 가할 수 있으며 생성 혼합물을 응고시까지 교반할 수 있다.
- [0093] **치료 방법**
- [0094] 본 발명의 화합물을 JAK의 이상 활성화와 인과 관계로 관련되거나 이에 기인할 수 있는 포유동물의 병, 특히 JAK1 및/또는 JAK2의 이상 활성화와 관련된 병의 치료를 위한 치료제로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물 및 약학 조성물은 인간을 포함한 포유동물에게서 염증성 질병, 자가면역 질병, 증식성 질병, 이식 거부, 연골 전환의 장애를 수반하는 질병, 선천성 연골 기형 및 IL6의 과다분비와 관련된 질병을 예방 및/또는 치료하기 위한 치료제로서의 용도를 갖는다.
- [0095] 추가의 치료 방법 태양에서, 본 발명은 염증성 질병에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효한 병-치료 또는 병-예방 량의 본 발명에 개시된 약학 조성물 또는 화합물들 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 염증성 질병은 류마티스성 관절염, 골관절염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식) 및 염증성 장 질병 중에서 선택된다.
- [0096] 또 다른 태양에서, 본 발명은 염증성 질병의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다. 구체적인 태양에서, 상기 염증성 질병은 류마티스성 관절염, 골관절염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식) 및 염증성 장 질병 중에서 선택된다.
- [0097] 추가의 치료 방법의 태양에서, 본 발명은 자가면역 질병에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효한 병-치료 또는 병-예방 량의 본 발명에 개시된 약학 조성물 또는 화합물들 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 자가면역 질병은 COPD, 천식, 전신 홍반성 루푸스, I형 당뇨병 및 염증성 장 질병 중에서 선택된다.
- [0098] 또 다른 태양에서, 본 발명은 자가면역 질병의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다. 구체적인 태양에서, 상기 자가면역 질병은 COPD, 천식, 전신 홍반성 루푸스, I형 당뇨병 및 염증성 장 질병 중에서 선택된다.
- [0099] 추가의 치료 방법의 태양에서, 본 발명은 증식성 질병, 특히 암(예를 들어 고형 종양, 예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선 암), 백혈병(예를 들어 AML 또는 ALL), 다발성 골수종 및/또는 건선에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공한다.
- [0100] 또 다른 태양에서, 본 발명은 증식성 질병, 특히 암(예를 들어 고형 종양, 예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선 암), 백혈병(예를 들어 AML 또는 ALL), 다발성 골수종 및/또는 건선의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.
- [0101] 추가의 치료 방법의 태양에서, 본 발명은 이식 거부에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 본 발명은 기관 이식편 거부의 치료 방법을 제공한다.
- [0102] 또 다른 태양에서, 본 발명은 이식 거부의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 본 발명은 기관 이식편 거부의 치료 방법을 제공한다.
- [0103] 치료 방법의 태양에서, 본 발명은 연골 전환의 장애를 수반하는 질병에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료, 방지 또는 예방 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료 유효량의 본 발명의 화합물 및 본 발명에 개시된 약학 조성물 중 하나 이상을 투여함을 포함한다.
- [0104] 또 다른 태양에서, 본 발명은 연골 전환의 장애를 수반하는 질병의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본

발명의 화합물을 제공한다.

- [0105] 본 발명은 또한 선천성 연골 기형의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료 유효량의 본 발명에 개시된 본 발명의 화합물 및 약학 조성물 중 하나 이상을 투여함을 포함한다.
- [0106] 또 다른 태양에서, 본 발명은 선천성 연골 기형의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.
- [0107] 추가의 치료 방법의 태양에서, 본 발명은 IL6의 과다분비와 관련된 질병, 특히 캐슬만씨 병 또는 사구체간질 증식성 사구체신염에 걸리기 쉽거나 또는 이에 걸린 포유동물의 치료 방법을 제공한다.
- [0108] 또 다른 태양에서 본 발명은 IL6의 과다분비와 관련된 질병, 특히 캐슬만씨 병 또는 사구체간질 증식성 사구체신염의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다.
- [0109] 본 발명의 추가의 태양으로서 특히 상기 언급한 병 및 질병들의 치료 또는 예방에서 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물을 제공한다. 또한 상기 언급한 병 및 질병들 중 하나의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서 본 발명 화합물의 용도를 제공한다.
- [0110] 본 발명 방법의 특정 섭생은 염증을 수반하는 질병을 앓고 있는 환자에게 상기 환자에게서 염증 수준을 감소시키고, 바람직하게는 상기 염증의 원인이 되는 과정을 종결시키기에 충분한 기간 동안 유효량의 본 발명의 화합물을 투여함을 포함한다. 상기 방법의 특정 실시태양은 류마티스성 관절염을 앓고 있거나 또는 상기 질병이 발병되기 쉬운 환자에게 상기 환자의 관절 중의 염증을 각각 감소 또는 예방하고, 바람직하게는 상기 염증의 원인이 되는 과정을 종결시키기에 충분한 기간 동안 유효량의 본 발명의 화합물을 투여함을 포함한다.
- [0111] 본 발명 방법의 추가의 특정 섭생은 연골 또는 관절 퇴화를 특징으로 하는 질병 상태(예를 들어 류마티스성 관절염 및/또는 골관절염)을 앓고 있는 환자에게 상기 퇴화의 원인이 되는 저절로-계속되는 과정을 감소시키고 바람직하게는 종결시키기에 충분한 기간 동안 유효량의 본 발명의 화합물을 투여함을 포함한다. 상기 방법의 특정 실시태양은 골관절염을 앓고 있거나 또는 상기 질병이 발병되기 쉬운 환자에게 상기 환자의 관절 중의 연골 퇴화를 각각 감소 또는 예방하고, 바람직하게는 상기 퇴화의 원인이 되는 과정을 종결시키기에 충분한 기간 동안 유효량의 본 발명의 화합물을 투여함을 포함한다. 특정 실시태양에서 상기 화합물은 연골 동화작용 및/또는 항-이화작용 성질을 나타낸다.
- [0112] 주사 용량 수준은 전부 약 1 내지 약 120 시간 및 특히 24 내지 96 시간 동안 약 0.1 내지 10 mg/kg/시간 이상의 범위이다. 적합한 정상 상태 수준을 성취하기 위해서 또한 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 이상의 프리로딩(preloading) 일시주사를 투여할 수 있다. 상기 최대 전체 용량은 40 내지 80 kg 인간 환자의 경우 약 2 g/일을 초과하지 않을 것으로 예상된다.
- [0113] 장기적인 병, 예를 들어 퇴행성 병의 예방 및/또는 치료를 위해서, 상기 치료 섭생을 대개는 수 개월 또는 수년 이상 연장하며, 따라서 경구 투여가 환자의 편리성 및 허용성을 위해 바람직하다. 경구 투여의 경우, 하루에 1 내지 5 회 및 특히 2 내지 4 회 및 전형적으로 3 회 경구 용량이 전형적인 섭생이다. 상기 투여 패턴을 사용하는 경우, 각 용량은 약 0.01 내지 약 20 mg/kg의 본 발명의 화합물을 제공하며, 특정 용량은 각각 약 0.1 내지 약 10 mg/kg 및 특히 약 1 내지 약 5 mg/kg을 제공한다.
- [0114] 주사 용량을 사용하여 성취되는 경우와 유사하거나 이보다 낮은 혈액 수준을 제공하기 위해 일반적으로 경피 용량이 선택된다.
- [0115] 염증성 병의 발병을 예방하기 위해 사용되는 경우, 본 발명의 화합물을 상기 병의 발병 위험이 있는 환자에게, 전형적으로는 의사의 조언 및 관리 하에, 상술한 투여량 수준으로 투여할 것이다. 특정 병의 발병 위험이 있는 환자는 상기 병의 가족력이 있는 환자, 또는 유전자 시험 또는 선별에 의해 상기 병이 발병하기 특히 쉬운 것으로 확인된 환자를 포함한다.
- [0116] 본 발명의 화합물을 유일한 활성제로서 투여하거나 또는 다른 치료제들, 예를 들어 동일하거나 유사한 치료 활성을 나타내고 병행 투여에 대해 안전하고 효능 있는 것으로 결정된 다른 화합물들과 함께 투여할 수 있다. 특정 실시태양에서, 2 개(또는 그 이상) 작용제의 동시 투여는 각각을 현저하게 더 낮은 용량으로 사용할 수 있게 하며, 따라서 나타나는 부작용들이 감소된다.
- [0117] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 염증을 수반하는 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며; 특정 작용제는 비 제한적으로 면역조절제, 예를 들어 아자티오프린, 코르티코스테로이드(예를

들어 프레드니솔론 또는 텍사메타손), 사이클로포스파미드, 사이클로스포린 A, 타크로리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 뮤로모납-CD3(OKT-3, 예를 들어 오소콜론(등록상표)), ATG, 아스피린, 아세트아미노펜, 이부프로펜, 나프록센 및 피록시카를 포함한다.

[0118] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 관절염(예를 들어 류머티스성 관절염)의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며; 특정 작용제는 비 제한적으로 진통제, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 스테로이드, 합성 DMARDS(예를 들어 비 제한적으로 메토티렉세이트, 레플루노미드, 셀파살라진, 아우라노핀, 나트륨 아우로티오말레이트, 페니실라민, 클로로퀸, 하이드록시클로로퀸, 아자티오프린, 및 시클로스포린) 및 생물학적 DMARDS(예를 들어 비 제한적으로 인플릭시맵, 에타너셉트, 아달리우맵, 리툽시맵 및 아바타셉트)를 포함한다.

[0119] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 증식성 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 또 다른 치료제와 함께 투여하며; 특정 작용제로는 비 제한적으로 메토티렉세이트, 류코보린, 아드리아마이신, 프레니손, 블레오마이신, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 패클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 독소루비신, 타목시펜, 토레미펜, 메제스트롤 아세테이트, 아나스트로졸, 고세렐린, 항-HER2 단클론 항체(예를 들어 허셉틴™), 카페시타빈, 탈록시펜 하이드로클로라이드, EGFR 억제제(예를 들어 이레사(등록상표), 타세마™, 에르비투스™), VEGF 억제제(예를 들어 아바스틴™), 프로테아솜 억제제(예를 들어 벨케이드™), 글리벡(등록상표) 또는 hsp90 억제제(예를 들어 17-AAG)가 있다. 또한, 본 발명의 화합물을 다른 요법들, 예를 들어 비 제한적으로 방사선요법 또는 수술과 함께 투여할 수도 있다. 특정 실시태양에서 상기 증식성 질환은 암, 골수증식성 질병 및 백혈병 중에서 선택된다.

[0120] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 자가면역 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정 작용제로는 비 제한적으로 글루코코르티코이드, 세포증식억제제(예를 들어 푸린 동족체), 알킬 화제(예를 들어 질소 머스타드(사이클로포스파미드), 나이트로소유레아, 백금 화합물 및 다른 것들), 대사길항 물질(예를 들어 메토티렉세이트, 아자티오프린 및 머캅토프린), 세포독성 항생제(예를 들어 닥티노마이신 안트라사이클린, 마이토타마이신 C, 블레오마이신 및 미트라마이신), 항체(예를 들어 항-CD20, 항-CD25 또는 항-CD3(OTK3) 단클론 항체, 아트감(등록상표) 및 타이모글로블린(등록상표)), 사이클로스포린, 타크로리무스, 라파마이신(시로리무스), 인터페론(예를 들어 IFN-β), TNF 결합 단백질(예를 들어 인플릭시맵(레미케이드), 에타너셉트(엔브렐), 또는 아달리우맵(휴미라)), 마이코페놀레이트, 핑고리모드, 마이리오신이 있다.

[0121] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 이식 거부의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정 작용제로는 비 제한적으로 칼시뉴린 억제제(예를 들어 사이클로스포린 또는 타크로리무스(FK506)), mTOR 억제제(예를 들어 시로리무스, 에베로리무스), 증식 억제제(예를 들어 아자티오프린, 마이코페놀산), 코르티코스테로이드(예를 들어 프레드니솔론, 하이드로코르티손), 항체(예를 들어 단클론 항-IL-2Rα 수용체 항체, 바실릭시맵, 다클리주맵), 다클론 항-T-세포 항체(예를 들어 항-흉선세포 글로블린(ATG), 항-립프구 글로블린(ALG))가 있다.

[0122] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 천식 및/또는 비염 및/또는 COPD의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정 작용제로는 비 제한적으로 베타₂-아드레날린수용체 작용물질(예를 들어 살부타몰, 레발부테롤, 터부탈린 및 비틀테롤), 에피네프린(흡입 또는 정제), 항콜린제(예를 들어 이프라트로피움 브로마이드), 글루코코르티코이드(경구 또는 흡입), 장시간-작용 베타₂-작용물질(예를 들어 살메테롤, 포모테롤, 밤부테롤, 및 서방성 경구 알부테롤), 흡입 스테로이드와 장시간-작용 기관지확장제의 조합(예를 들어 플루티카손/살메테롤, 부테소니드/포모테롤), 류코트리엔 길항물질 및 합성 억제제(예를 들어 몬테류카스트, 자피르류카스트 및 질류톤), 매개체 방출 억제제(예를 들어 크로모글리케이트 및 케토티펜), IgE 반응의 생물학적 조절제(예를 들어 오말리주맵), 항히스타민제(예를 들어 세테리진, 신나리진, 펙소페나딘), 혈관수축제(예를 들어 옥시메타졸린, 자일로메타졸린, 나파졸린 및 트라마졸린)가 있다.

[0123] 또한, 본 발명의 화합물을 천식 및/또는 COPD를 위한 응급 치료와 함께 투여할 수 있으며, 상기와 같은 요법으로는 산소 또는 헬리옥스 투여, 분무된 살부타몰 또는 터부탈린(항콜린제(예를 들어 이프라트로피움), 전신 스테로이드(경구 또는 정맥 내, 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 텍사메타손, 또는 하이드로코르티손), 정맥 내 살부타몰, 비특이성 베타-작용물질, 주입 또는 흡입된(예를 들어 에피네프린, 아이소에타린, 아이소프로테레놀, 메타프로테레놀), 항콜린제(IV 또는 분무된, 예를 들어 글리코피롤레이트, 아트로핀, 이프라트로피움), 메틸잔틴(테오필린, 아미노필린, 바미필린), 기관지확장 효과를 갖는 흡입 마취제(예를 들어

아이소플루란, 할로탄, 엔플루란), 케타민, 정맥 내 황산 마그네슘과 임의로 배합된)이 있다.

[0124] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 IBD의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정 작용제로는 비 제한적으로 글루코코르티코이드(예를 들어 프레드니손, 부데소니드) 합성 질병 개질성, 면역조절제(예를 들어 메토티렉세이트, 레플루노미드, 설파살라진, 메살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린 및 사이클로스포린) 및 생물학적 질병 개질성, 면역조절제(인플릭시맵, 아달리뮤맵, 리투시맵 및 아바타셉트)가 있다.

[0125] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 SLE의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정 작용제로는 비 제한적으로 질병-개질성 항류머티스성 약물(DMARD), 예를 들어 항말라리아제(예를 들어 플라퀼, 하이드록시클로로퀸), 면역억제제(예를 들어 메토티렉세이트 및 아자티오프린), 사이클로포스파미드 및 마이코페놀산; 면역억제성 약물 및 진통제, 예를 들어 비스테로이드성 소염 약물, 아편제(예를 들어 텍스트로프로록시펜 및 코-코다몰), 아편양제제(예를 들어 하이드로코돈, 옥시코돈, MS 콘틴, 또는 메타돈) 및 펜타닐 듀라제식 경피 패치가 있다.

[0126] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 건선의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정 작용제로는 비 제한적으로 국소 치료제, 예를 들어 콜타르, 다이트라놀(안트라린), 코르티코스테로이드형 테속시메타손(토피코트), 플루코시노니드, 비타민 D₃ 동족체(예를 들어 칼시포트리올), 아르간 오일 및 레티노이드(에트레티네이트, 아시트레틴, 타자로텐), 전신 치료제, 예를 들어 메토티렉세이트, 사이클로스포린, 레티노이드, 티오구아닌, 하이드록시유레아, 설파살라진, 마이코페놀레이트 모페틸, 아자티오프린, 타크로리무스, 푸마르산 에스터 또는 생물학적 약제, 예를 들어 아메비브, 엔브렐, 휴미라, 레미케이드, 랩티바 및 유스테기뮤맵(IL-12 및 IL-23 차단제)을 함유하는 입욕 용액, 보습제, 약물첨가 크림 및 연고가 있다. 또한, 본 발명의 화합물을 다른 요법들, 예를 들어 비 제한적으로 광선치료, 또는 광화학요법(예를 들어 프소랄렌 및 자외선 A 광선치료(PUVA))과 함께 투여할 수 있다.

[0127] 동시 투여는 숙련가에게 자명한 바와 같이, 2 개 이상의 치료제를 동일한 치료 섭생의 부분으로서 환자에게 전달하는 임의의 수단을 포함한다. 2 개 이상의 작용제들을 단일 제형으로 동시에 투여할 수도 있지만, 이는 필수적인 것은 아니다. 상기 작용제들을 상이한 제형 및 상이한 시간으로 투여할 수 있다.

[0128] **일반적인 합성 과정**

[0129] **일반적인 사항**

[0130] 본 발명의 화합물들을 하기의 일반적인 방법 및 과정을 사용하여 쉽게 입수할 수 있는 출발 물질로부터 제조할 수 있다. 전형적이거나 바람직한 공정 조건들(즉 반응 온도, 시간, 반응물들의 몰 비, 용매, 압력 등)이 주어지는 경우, 달리 나타내지 않는 한 다른 공정 조건들도 또한 사용할 수 있음을 알 것이다. 최적 반응 조건은 사용되는 특정 반응물 또는 용매에 따라 변할 수 있지만, 상기와 같은 조건들은 통상적인 최적화 과정에 의해 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다.

[0131] 또한, 당해 분야의 숙련가들에게 자명한 바와 같이, 몇몇 작용기들이 바람직하지 못한 반응을 겪지 않기 위해서 통상적인 보호 그룹들이 필요할 수 있다. 적합한 보호 및 탈보호 조건들뿐만 아니라 특정 작용기들에 적합한 보호 그룹의 선택은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 다수의 보호 그룹들, 및 이들의 도입 및 제거가 문헌[T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, Second Edition, Wiley, New York, 1991] 및 이 중에 인용된 참고문헌들에 개시되어 있다.

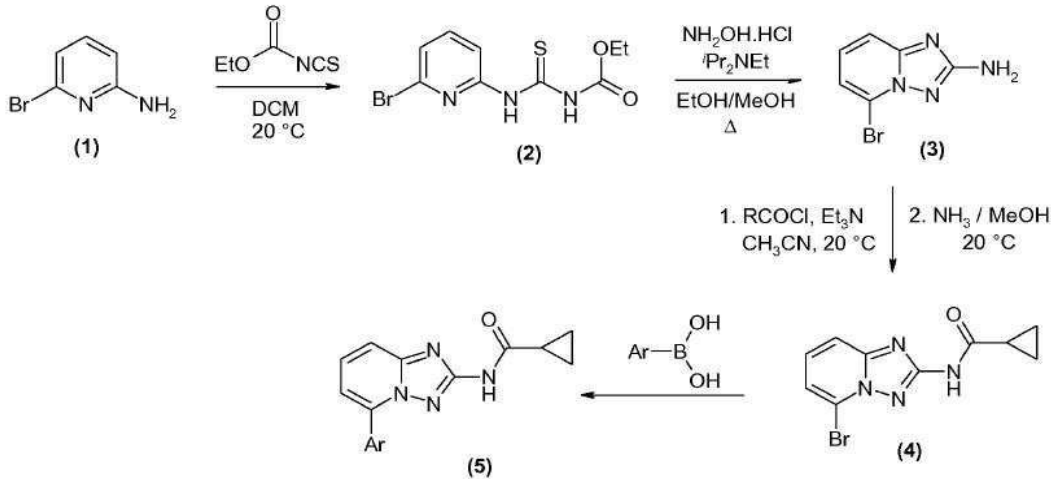
[0132] 하기의 방법들을 상기 본 발명에서 정의한 바와 같은 본 발명의 화합물 및 비교 실시예의 제조에 대한 상세한 설명과 함께 제공한다. 본 발명의 화합물 및 비교 실시예를 유기 합성 분야의 숙련가에 의해, 공지되거나 상업적으로 입수할 수 있는 출발 물질 및 시약들로부터 제조할 수 있다.

[0133] 모든 시약들은 상업적인 등급이며 달리 나타내지 않는 한 추가의 정제 없이 제공받은 대로 사용되었다. 상업적으로 입수할 수 있는 무수 용매들을 불활성 분위기 하에서 수행된 반응들에 대해 사용하였다. 시약 등급 용매를, 달리 나타내지 않는 한, 모든 다른 경우들에 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피를 실리카젤 60(35-70 μm) 상에서 수행하였다. 박층 크로마토그래피를 예비 코팅된 실리카젤 F-254 플레이트(두께 0.25 mm)를 사용하여 수행하였다. ¹H NMR 스펙트럼을 브루커 DPX 400 NMR 광도계(400 MHz) 상에 기록하였다. ¹H NMR 스펙트럼에 대한 화학 이동(δ)은 내부 기준으로서 테트라메틸실란(δ 0.00) 또는 적합한 잔류 용매 피크, 즉 CHCl₃(δ 7.27)에 대한 ppm으로 기록한다. 중복성을 단일선(s), 이중선(d), 삼중선(t), 사중선(q), 다중선(m) 및 브로드

(br)로서 제공한다. 커플링 상수(J)를 Hz로 제공한다. 전기분무 MS 스펙트럼을 마이크로매스 플랫폼 LC/MS 광도계 상에서 획득하였다. 모든 LCMS 분석에 대해 사용된 컬럼: 워터스 액퀴티(Waters Acquity) UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 mm ID x 50 mm L(파트 No. 186002350). 예비 HPLC: 워터스 XBridge Prep C18 5 μ m ODB 19 mm ID x 100 mm L(파트 No. 186002978). 상기 방법들은 모두 MeCN/H₂O 구배를 사용한다. H₂O는 0.1% TFA 또는 0.1% NH₃를 함유한다.

- [0134] 실험 부분에 사용된 약어들의 목록
- [0135] DCM: 다이클로로메탄
- [0136] DiPEA: N,N-다이아이소프로필에틸아민
- [0137] MeCN 아세토나이트릴
- [0138] BOC 3급-부틸옥시-카보닐
- [0139] DMF N,N-다이메틸폼아미드
- [0140] TFA 트라이플루오로아세트산
- [0141] THF 테트라하이드로퓨란
- [0142] NMR 핵 자기 공명
- [0143] DMSO 다이메틸설폭사이드
- [0144] DPPA 다이페닐포스포릴아지드
- [0145] LC-MS 액체 크로마토그래피-질량 분광측정
- [0146] Ppm 백만 당 부
- [0147] EtOAc 에틸 아세테이트
- [0148] APCI 대기압 화학 이온화
- [0149] Rt 체류 시간
- [0150] s 단일선
- [0151] br s 브로드 단일선
- [0152] m 다중선
- [0153] d 이중선
- [0154] PdCl₂dppf [1,1'-비스(다이페닐포스피노)페로센]다이클로로팔라듐(II)
- [0155] TEA 트라이에틸아민
- [0156] **본 발명의 화합물 및 비교 실시예의 합성적 제조**
- [0157] 본 발명의 화합물 및 비교 실시예들을 하기 반응식에 따라 제조할 수 있다.
- [0158] **일반적인 합성 방법**

[0159] [반응식 1]



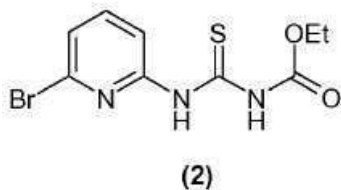
[0160]

[0161] 상기에서,

[0162] Ar은 페닐-L1-헤테로사이클로알킬을 나타내고, 이때 L1은 단일 결합, -CH₂- 또는 -CO-이고, 상기 헤테로사이클로알킬 그룹은 임의로 치환된다.

[0163] 일반적인 내용

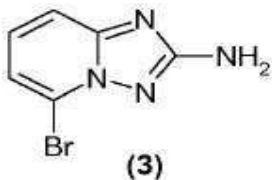
[0164] 1.1.1 1-(6-브로모-피리딘-2-일)-3-카보에톡시-티오우레아(2)



[0165]

[0166] 5 °C로 냉각된 DCM(2.5 L) 중의 2-아미노-6-브로모피리딘(1)(253.8 g, 1.467 몰)의 용액에 15 분에 걸쳐 에톡시카보닐 아이소티오시아네이트(173.0 ml, 1.467 몰)를 적가하였다. 이어서 상기 반응 혼합물을 실온(20 °C)으로 가온되게 하고 16 시간 동안 교반하였다. 진공 하에서 증발시켜 고체를 제공하고 이를 여과에 의해 수거하고, 가솔린(3 x 600 ml)으로 철저히 세척하고 공기 건조시켜 (2)를 제공하였다. 상기 티오우레아를 임의의 정제 없이 다음 단계에 그대로 사용하였다. ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12.03 (1H, br s, NH), 8.81 (1H, d, J 7.8 Hz, H-3), 8.15 (1H, br s, NH), 7.60 (1H, t, J 8.0 Hz, H-4), 7.32 (1H, dd, J 7.7 및 0.6 Hz, H-5), 4.31 (2H, q, J 7.1 Hz, CH₂), 1.35 (3H, t, J 7.1 Hz, CH₃).

[0167] 1.1.2 5-브로모-[1,2,4]트리아아졸로[1,5-a]피리딘-2-일아민(3)

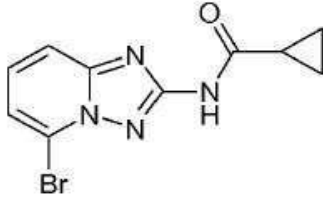


[0168]

[0169] EtOH/MeOH(1:1, 900 ml) 중의 하이드록실아민 하이드로클로라이드(101.8 g, 1.465 mol)의 현탁액에 N,N-다이이소프로필에틸아민(145.3 ml, 0.879 몰)을 가하고 상기 혼합물을 실온(20 °C)에서 1 시간 동안 교반하였다. 이어서 1-(6-브로모-피리딘-2-일)-3-카보에톡시-티오우레아(2)(89.0 g, 0.293 몰)를 가하고 상기 혼합물을 서서히 가열 환류시켰다(주: 방출되는 H₂S를 소멸시키기 위해서 표백 세척기가 필요하다). 환류 하에서 3 시간 후에, 상기 혼합물을 냉각되게 하고 여과하여 침전된 고체를 수거하였다. 추가의 생성물을 상기 여액의 진공 증발, H₂O(250 ml)의 첨가 및 여과에 의해 수거하였다. 합한 고체를 H₂O(250 ml), EtOH/MeOH(1:1, 250 ml) 및

Et₂O(250 ml)로 연속적으로 세척하고, 이어서 진공 하에서 건조시켜 고체로서 트리아졸로피리딘 유도체(3)를 제공하였다. 상기 화합물을 임의의 정제 없이 다음 단계에 그대로 사용하였다. ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.43-7.34 (2H, m, 방향족-H), 7.24 (1H, dd, J 6.8 및 1.8 Hz, 방향족-H), 6.30 (2H, br, NH₂); m/z 213/215 (1:1, M+H⁺, 100%).

[0170] 1.1.3 중간체(4)를 제공하기 위한 모노 아실화에 대한 일반적인 과정:



[0171]

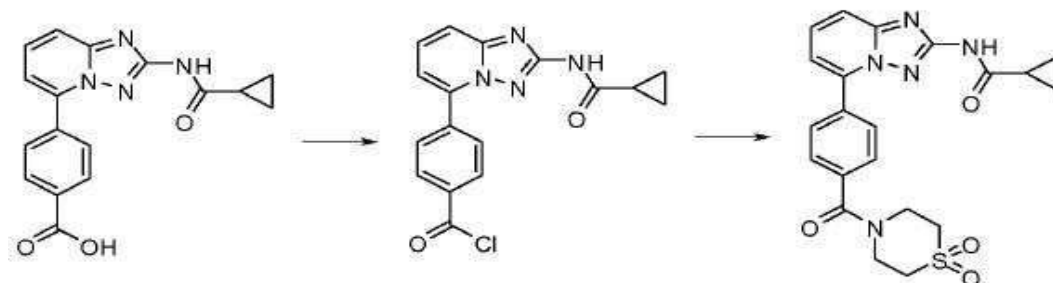
[0172] 5 °C에서 무수 CH₃CN(150 ml) 중의 2-아미노-트리아졸로피리딘(3)(7.10 g, 33.3 mmol)의 용액에 Et₃N(11.6 ml, 83.3 mmol)을 가한 다음 사이클로프로판카보닐 클로라이드(83.3 mmol)를 가한다. 이어서 반응 혼합물을 주변 온도로 가온되게 하고 모든 출발 물질(3)이 소모될 때까지 교반한다. 필요한 경우, 추가의 Et₃N(4.64 ml, 33.3 mmol) 및 사이클로프로판카보닐 클로라이드(33.3 mmol)를 가하여 반응이 완료되게 한다. 진공 하에서 용매를 증발시킨 다음 생성 잔사를 7N 메탄올 암모니아 용액(50 ml)으로 처리하고 주변 온도에서 교반하여(1 내지 16 시간 동안) 임의의 비스-아실화된 생성물을 가수분해시킨다. 진공 하에서 휘발성 물질을 제거한 다음 Et₂O(50 ml)로 연마시켜 생성물을 단리한다. 고체를 여과에 의해 수거하고, H₂O(2 x 50 ml), 아세톤(50 ml) 및 Et₂O(50 ml)로 세척하고, 이어서 진공 하에서 건조시켜 목적하는 브로모 중간체(4)를 제공한다.

[0173] **방법 A**

[0174] 스즈키 커플링을 통한 본 발명 화합물(5)의 제조:

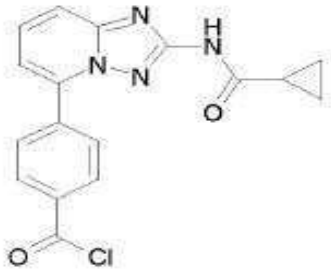
[0175] 적합한 보론산(2 당량)을 1,4-다이옥산/물(5:1)의 브로모 중간체(4) 용액에 가한다. K₂CO₃(2 당량) 및 PdCl₂dppf(5%)를 상기 용액에 가한다. 이어서 생성 혼합물을 마이크로오븐 140 °C에서 30 분간 가열한다(상기 반응을 또한 N₂ 하에 90 °C에서 오일 욕에서 16 시간 동안의 전통적인 가열에 의해 수행할 수 있다). 물을 가하고 상기 용액을 에틸 아세테이트로 추출한다. 유기층들을 MgSO₄ 상에서 건조시키고 진공 하에서 증발시킨다. 플래시 크로마토그래피 또는 예비 HPLC에 의해 정제 후 최종 화합물을 수득한다. HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm L(Part No. 186002978). 상기 모든 방법들은 MeCN/H₂O 구배를 사용한다. H₂O는 0.1% TFA 또는 0.1% NH₃를 함유한다.

[0176] **방법 B**



[0177]

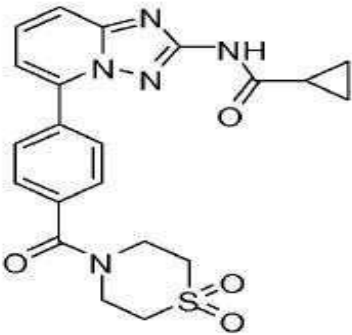
[0178] B1. 4,4-[2-(사이클로프로판카보닐-아미노)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-5-일]-벤조일 클로라이드



[0179]

[0180] 2 방울의 DMF를 N₂ 분위기 하에서 DCM 중의 4-카복시페닐보론산을 사용하여 방법 A에 의해 취득된 4-[2-(사이클로프로판카보닐-아미노)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-5-일]-벤조산(1 당량)의 용액에 가한다. 이어서 염화 옥살릴(2 당량)을 상기 생성 용액에 적가한다(기체 방출). 상기 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반한다. LCMS에 의해 반응의 완료 후, 용매를 제거한다. 조 산 클로라이드를 추가의 정제 없이 다음 단계에 사용한다.

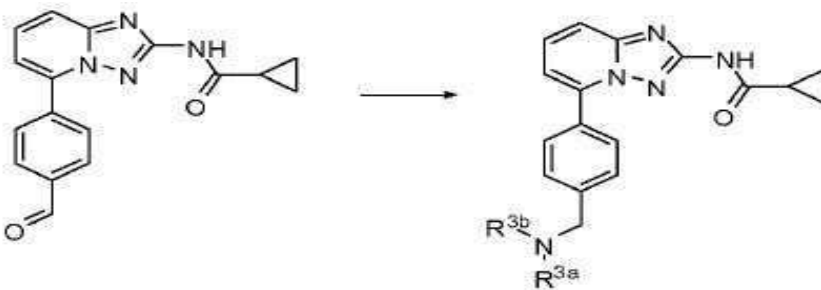
[0181] B2. 아미드 형성(일반적인 방법)



[0182]

[0183] 적합한 아민(1.1 당량) 및 Et₃N(5 당량)을 N₂ 분위기 하에서 DCM 중에 용해시키고 0 °C로 냉각시킨다. DCM 중에 용해된 산 클로라이드(B1, 1 당량)를 상기 용액에 적가한다. 상기 반응물을 실온에서 16 시간 동안 교반한다. 상기 시간 후에, 반응이 완료된다. 상기 화합물을 EtOAc 및 물로 추출하고, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시킨다. 유기층들을 여과하고 증발시킨다. 최종 화합물을 예비 HPLC에 의해 분리한다. 예비 HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm L(Part No. 186002978). 상기 모든 방법들은 MeCN/H₂O 구배를 사용한다. H₂O는 0.1% TFA 또는 0.1% NH₃를 함유한다.

[0184] 방법 C



[0185]

[0186] 상기에서,

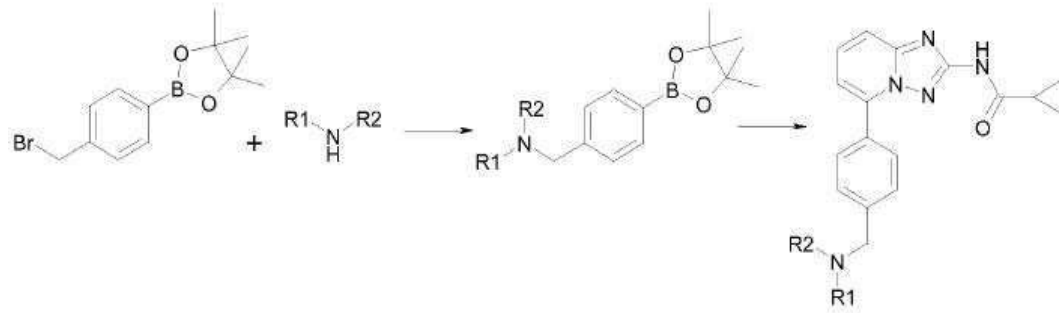
[0187] R^{3a} 또는 R^{3b}는 이들이 결합된 질소 원자와 함께 헤테로사이클로알킬을 형성할 수도 있다.

[0188] 환원적 알킬화(일반적인 방법)

[0189] 적합한 알데하이드(2 당량), 방법 A에 의해 제조된 사이클로프로판카복실산(예를 들어 사이클로프로판카복실산 [5-(4-폼일-페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일]-아미드)(1 당량) 및 Ti(OPr)₄을 혼합하고 실온에서

3 시간 동안 교반한다. 상기 혼합물을 에탄올 중에서 희석하고 Na(CN)BH₃(1 당량)를 가한다. 생성 용액을 실온에서 16 시간 동안 교반한다. 상기 혼합물을 물에 희석하고 여과한다. 상기 여액을 에탄올로 세척한다. 합한 용매 상들을 진공 하에서 증발시킨다. 최종 화합물을 예비 HPLC에 의해 분리한다.

[0190] **방법 D**

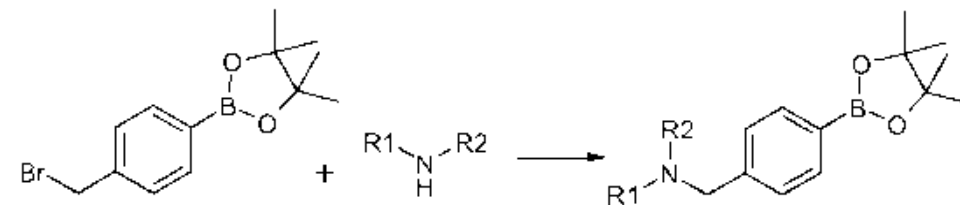


[0191]

[0192] 상기에서,

[0193] R¹ 또는 R²는 이들이 결합된 질소 원자와 함께 헤테로사이클로알킬을 형성할 수도 있다.

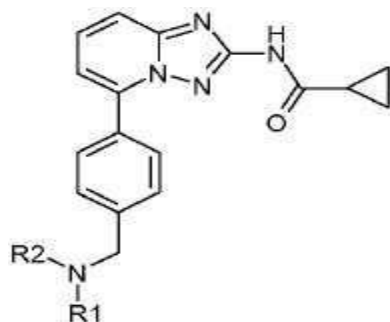
[0194] 알킬화의 반응



[0195]

[0196] 2-(4-브로모메틸-페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]다이옥사보로란(1 당량) 및 Et₃N(2 당량)(또는 AgCO₃)를 N₂ 하에서 DCM/MeOH(4:1 v:v)에 용해시키고 아민(2 당량)을 적가한다. 생성 용액을 실온에서 16 시간 동안 교반한다. 상기 시간 후에, 반응이 완료된다. 용매를 증발시킨다. 상기 화합물을 EtOAc 및 물로 추출하고, 염수로 세척하고, 무수 MgSO₄ 상에서 건조시킨다. 유기층들을 여과하고 증발시킨다. 최종 화합물을 플래시 크로마토그래피에 의해 분리한다.

[0197] 스즈키 커플링



[0198]

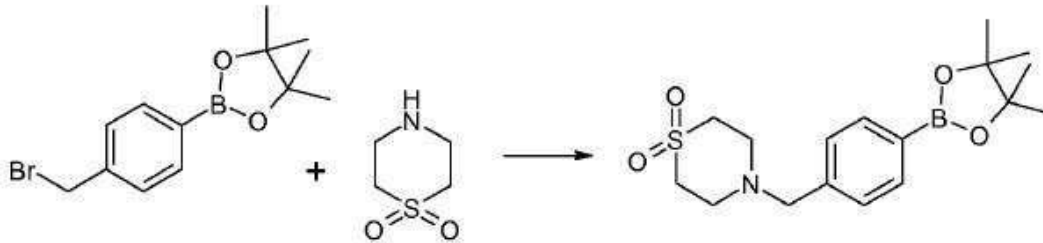
[0199] 상기 수득된 보르산(2 당량)을 1,4-다이옥산/물(5:1) 중의 사이클로프로판카복실산(5-브로모-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)-아미드(4)의 용액에 가한다. K₂CO₃(2 당량) 및 PdCl₂dppf(5%)를 상기 용액에 가한다. 이어서 생성 혼합물을 마이크로오븐 140 °C에서 30 분간 가열한다(상기 반응을 또한 N₂ 하에 90 °C에서 오일 욕에서 16 시간 동안의 전통적인 가열에 의해 수행할 수 있다). 물을 가하고 상기 용액을 에틸 아세테이트로 추출한다. 유기층들을 무수 MgSO₄ 상에서 건조시키고 진공 하에서 증발시킨다. 플래시 크로마토그래피 또는 예비 HPLC에 의해 정제 후 최종 화합물을 수득한다. HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm L(Part No. 186002978). 상기 모든 방법들은 MeCN/H₂O 구배를 사용한다. H₂O는 0.1% TFA 또는 0.1% NH₃를 함

유한다.

[0200] 본 발명의 화합물 및 비교 실시예의 합성

[0201] 화합물 1(본 발명의 화합물)

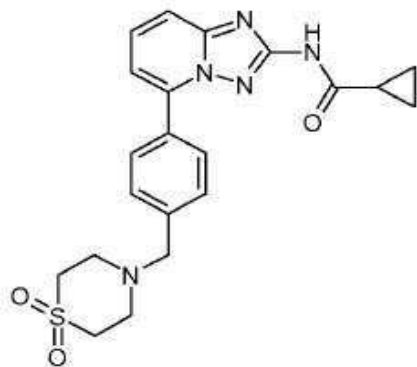
[0202] 단계 1:



[0203]

[0204] 2-(4-브로모메틸-페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]다이옥사보로란(1 당량) 및 DIPEA(2 당량)를 N₂ 하에서 DCM/MeOH(5:1 v:v)에 용해시키고 티오모폴린 1,1-다이옥사이드(2 당량)를 나누어 가하였다. 생성 용액을 실온에서 16 시간 동안 교반하였다. 상기 시간 후에, 반응이 완료되었다. 용매를 증발시켰다. 상기 화합물을 EtOAc 및 물로 추출하고, 염수로 세척하고 MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 유기 층들을 여과하고 증발시켰다. 최종 화합물을 추가의 정제 없이 단리하였다.

[0205] 단계 2: 스즈키 커플링



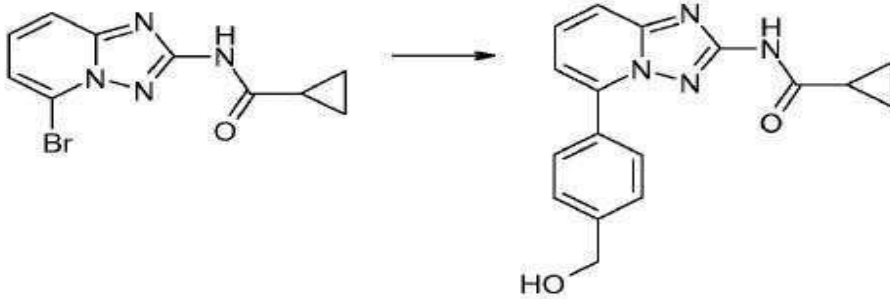
[0206]

[0207] 4-[4-(4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]다이옥사보로란-2-일)-벤질]-티오모폴린-1,1-다이옥사이드(1.1 당량)를 1,4-다이옥산/물(4:1) 중의 사이클로프로판카복실산(5-브로모-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)-아미드의 용액에 가하였다. K₂CO₃(2 당량) 및 PdCl₂dppf(0.03 당량)를 상기 용액에 가하였다. 이어서 생성 혼합물을 오일 욕에서 90 °C에서 N₂ 하에 16 시간 동안 가열하였다. 물을 가하고 상기 용액을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고 진공하에서 증발시켰다. 최종 화합물을 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시킨 후에 수득하였다.

[0208] 한편으로, 상기 반응의 완료 후에, 팔라듐 제거제, 예를 들어 1,2-비스(다이페닐포스피노)에탄을 가하고, 상기 반응 혼합물을 냉각시키고 여과를 수행한다. 필터 케이크를 적합한 용매(예를 들어 아세톤) 중에 재슬러리화하고, 고체를 여과에 의해 분리하고, 추가의 아세톤으로 세척하고, 건조시킨다. 생성 고체를 물에 재현탁하고, 수성 HCl을 가하고, RT에서 교반 후에, 생성 용액을 셀라이트(Celpure P300) 상에서 여과한다. 이어서 수성 NaOH를 상기 여액에 가하고, 생성 현탁액을 RT에서 교반하고, 상기 고체를 여과에 의해 분리하고 물로 세척하고 흡입에 의해 건조시킨다. 최종적으로 상기 케이크를 THF/H₂O의 혼합물 중에 재용해시키고, 50 °C에서 팔라듐 제거제(예를 들어 SMOPEX 234)로 처리하고, 상기 현탁액을 여과하고, 유기 용매를 증발에 의해 제거하고, 생성 슬러리를 물 및 메탄올로 세척하고, 건조시키고 체질하여 유리 염기로서 표제 화합물을 수득한다.

[0209] 화합물 1(본 발명의 화합물)에 대한 또 다른 경로:

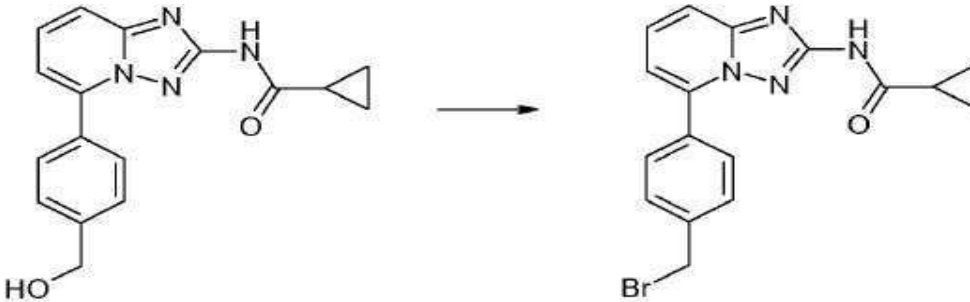
[0210] 단계 1:



[0211]

[0212] 4-(하이드록시메틸)페닐보론산(1.1 당량)을 1,4-다이옥산/물(4:1) 중의 사이클로프로판카복실산(5-브로모-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)-아미드의 용액에 가하였다. K_2CO_3 (2 당량) 및 $PdCl_2dppf$ (0.03 당량)를 상기 용액에 가하였다. 이어서 생성 혼합물을 오일 욕에서 90 °C에서 N_2 하에 16 시간 동안 가열하였다. 물을 가하고 상기 용액을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고 진공하에서 증발시켰다. 최종 화합물을 추가의 정제 없이 사용하였다.

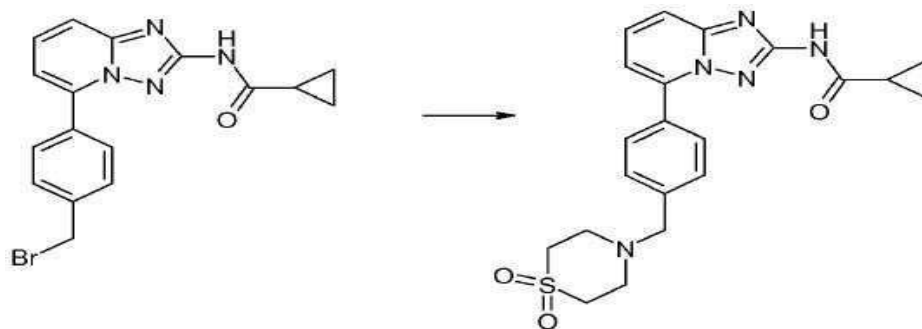
[0213] 단계 2:



[0214]

[0215] 클로로폼 중의 사이클로프로판카복실산 [5-(4-하이드록시메틸-페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일]-아미드(1.0 당량)의 용액에 인 트리브로마이드(1.0 당량)를 서서히 가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 20 시간 동안 교반하고, 얼음 및 물(20 ml)로 급냉시키고 다이클로로메탄으로 추출하였다. 유기층을 무수 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축 건조시켰다. 생성되는 백색 잔사를 다이클로로메탄/다이에틸 에테르 2:1에서 연마하여 백색 고체로서 예상된 생성물을 제공하였다.

[0216] 단계 3:



[0217]

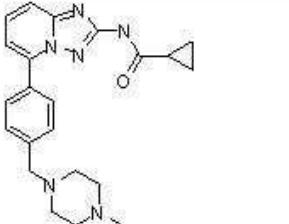
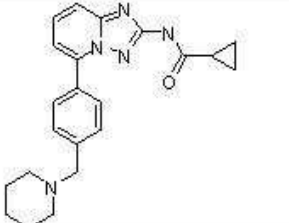
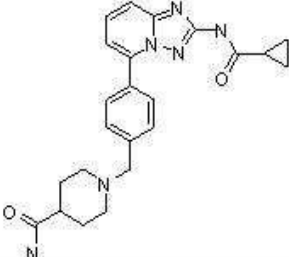
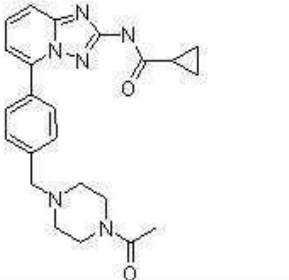
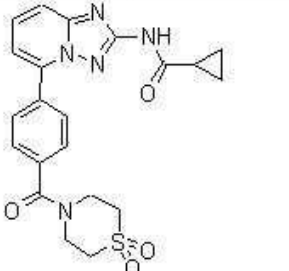
[0218] 사이클로프로판카복실산 [5-(4-브로모메틸-페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일]-아미드(1 당량) 및 DIPEA(2 당량)를 N_2 하에서 DCM/MeOH(5:1 v:v)에 용해시키고 티오모폴린 1,1-다이옥사이드(1.1 당량)를 적가하였다. 생성 용액을 실온에서 16 시간 동안 교반하였다. 상기 시간 후에, 상기 반응이 완료되었다. 용매를 증발시켰다. 상기 화합물을 DCM에 용해시키고, 물로 세척하고 $MgSO_4$ 상에서 건조시켰다. 유기층들을 여과하고 증발시켰다. 최종 화합물을 EtOAc를 사용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 목적하는 생성물을 제공하였다.

- [0219] **비교 화합물:**
- [0220] **화합물 2**
- [0221] 본 화합물을 일반적인 방법 A 및 4-[4-(4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]다이옥사보로란-2-일)-벤질]-모폴린을 사용하여 제조하였다.
- [0222] **화합물 3**
- [0223] 본 화합물을 일반적인 방법 A 및 3-(4-모폴리노메틸)-페닐보론산 피나콜 에스터 하이드로클로라이드를 사용하여 제조하였다.
- [0224] **화합물 4**
- [0225] 본 화합물을 일반적인 방법 A 및 2-(4-모폴리노)피리딘-5-보론산 피나콜 에스터를 사용하여 제조하였다.
- [0226] **화합물 5**
- [0227] 본 화합물을 일반적인 방법 A 및 4-[4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-다이옥사보로란-2-일)페닐]-모폴린을 사용하여 제조하였다.
- [0228] **화합물 6**
- [0229] 본 화합물을 일반적인 방법 C 및 N-메틸-피페라진을 사용하여 제조하였다.
- [0230] **화합물 7**
- [0231] 본 화합물을 일반적인 방법 C 및 피페리딘을 사용하여 제조하였다.
- [0232] **화합물 8**
- [0233] 본 화합물을 일반적인 방법 C 및 피페리딘-4-카복실산 아미드를 사용하여 제조하였다.
- [0234] **화합물 9**
- [0235] 본 화합물을 일반적인 방법 C 및 1-피페라진-1-일-에탄올을 사용하여 제조하였다.
- [0236] **화합물 10**
- [0237] 본 화합물을 일반적인 방법 B 및 티오모폴린 1,1-다이옥사이드를 사용하여 제조하였다.
- [0238] **화합물 11**
- [0239] 본 화합물을 일반적인 방법 D 및 4,4-다이플루오로피페리딘을 사용하여 제조하였다.
- [0240] 본 발명에 개시된 합성 방법에 따라 제조되었거나 제조될 수 있는 예시적인 화합물들을 하기 표 1에 나타낸다. 본 발명의 일부 전형적인 화합물들의 NMR 스펙트럼 데이터를 표2에 제공한다.

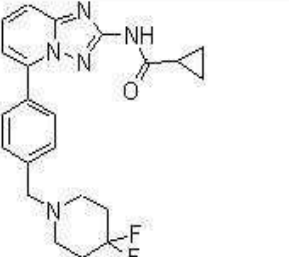
[0241] [표 1]

화합물 #	구조	명칭	MW	측정된 MS
1		사이클로프로판카복실산 {5-[4-(1,1-다이옥소-1-티오폐놀린-4-일메틸)-페닐]-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일}-아미드	425.51	426
2		N-(5-(4-(모폴리노메틸)페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사아미드	377.45	378.20
3		N-(5-(3-(모폴리노메틸)페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사아미드	377.45	378.20
4		N-(5-(6-모폴리노피리딘-3-일)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사아미드	364.41	365.10
5		N-(5-(4-모폴리노페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사아미드	363.42	364.0

[0242]

6		<p>N-(5-(4-((4-메틸피페라진-1-일)메틸)페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사미드</p>	390.49	391.1
7		<p>N-(5-(4-(피페리딘-1-일메틸)페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사미드</p>	375.48	376.1
8		<p>1-(사이클로프로판카복사미도)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-5-일)벤질)피페리딘-4-카복사미드</p>	418.5	419.1
9		<p>N-(5-(4-((4-아세 토일피페라진-1-일)메틸)페닐)-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일)사이클로프로판카복사미드</p>	418.5	419.1
10		<p>사이클로프로판카복실산 {5-[4-(1,1-다이옥소-1-티오모폴린-4-카보닐)-페닐]-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일}-아미드</p>	439.49	440.0

[0243]

11		<p>사이클로프로판카복실산 {5-[4-(4,4-다이플루오로-피페리딘-1-일메틸)-페닐]-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-2-일}-아미드</p>	411.46	412.1
----	---	--	--------	-------

[0244]

[0245] [표 2]

본 발명의 전형적인 화합물들의 NMR 데이터	
화합물 #	(d) NMR 데이터
1	¹ H, DMSO- <i>d</i> ₆) 11.00 (1H, b, NH) 7.99 (2H, d, 2xArH) 7.70 (2H, m, 2xArH) 7.53 (2H, d, 2xArH) 7.30 (1H, dd, ArH) 3.78 (2H, s, CH ₂) 3.14 (4H, b, 4xCH) 2.93 (4H, b, 4xCH) 2.03 (1H, b, CH) 0.82 (4H, m, 2xCH ₂)
2	¹ H, CDCl ₃) 10.20 (1H, b, NH), 8.06 (2H, d, ArH), 7.72 (2H, m, ArH), 7.63 (2H, d, ArH), 7.23 (1H, d, ArH), 4.27 (2H, s, CH ₂), 3.99 (4H, m, 2xCH ₂), 3.50 (2H, br, CH ₂), 2.95 (2H, br, CH ₂), 1.97 (1H, br, CH), 1.17 (2H, m, CH ₂), 0.95 (2H, m, CH ₂)
3	¹ H, CDCl ₃) 8.32 (1H, s, ArH), 7.96 (1H, m, ArH), 7.79 (1H, m, ArH), 7.66 (3H, m, ArH), 7.32 (1H, d, ArH), 4.31 (2H, s, CH ₂), 4.05 (4H, b, 2xCH ₂), 3.6 (2H, br, CH ₂), 3.06 (2H, br, CH ₂), 1.85 (1H, br, CH), 1.12 (2H, m, CH ₂), 0.98 (2H, m, CH ₂)
4	¹ H, CDCl ₃) 8.71 (1H, s, NH), 8.35 (1H, m, ArH), 8.27 (1H, br, ArH), 7.57 (2H, d, ArH), 7.07 (1H, m, ArH), 6.78 (1H, d, ArH), 3.86 (4H, m, 2xCH ₂), 3.66 (4H, m, 2xCH ₂), 1.6 (1H, br, CH), 1.22 (2H, m, CH ₂), 0.95 (2H, m, CH ₂)
5	¹ H, DMSO- <i>d</i> ₆) 11.06 (1H, br, NH), 7.98 (2H, d, ArH), 7.67 (1H, m, ArH), 7.59 (1H, d, ArH), 7.25 (1H, m, ArH), 7.08 (2H, m, ArH), 3.67 (4H, m, 2xCH ₂), 3.25 (4H, m, 2xCH ₂), 2.02 (1H, br, CH), 0.82 (4H, m, 2xCH ₂)
10	¹ H, DMSO- <i>d</i> ₆) 11.03 (1H, b, NH), 8.11 (2H, d, ArH), 7.73 (1H, d, ArH), 7.72 (1H, s, ArH), 7.68 (2H, d, ArH), 7.36 (1H, dd, ArH), 4.01 (2H, b, CH ₂), 3.81 (2H, b, CH ₂), 3.31 (4H, b under water peak, 2xCH ₂), 2.03 (1H, b, CH), 0.81 (4H, m, CH ₂)
11	¹ H, DMSO- <i>d</i> ₆) 10.99 (1H, b, NH), 7.98 (2H, d, 2xArH), 7.70 (2H, m, 2xArH), 7.50 (2H, d, 2xArH), 7.29 (1H, dd, ArH), 3.65 (2H, s, CH ₂), 2.54 (4H, b, 4xCH), 1.98 (5H, b, 5xCH), 0.81 (4H, m, 2xCH ₂)

[0246]

[0247] 생물학적 실시예

[0248] 실시예 1 - 시험관 내 분석

[0249] 1.1 JAK1 억제 분석

[0250] 재조합 인간 JAK1 촉매 도메인(아미노산 850-1154; 카탈로그 번호 08-144)을 카르나 바이오사이언스(Carna Bioscience)로부터 구입하였다. 10 ng의 JAK1을 폴리프로필렌 96-웰 플레이트(Greiner, V-바닥) 중에서, 총 25 μ l의 부피로, 5 μ l 시험 화합물 또는 비히클(DMSO, 1% 최종 농도)의 존재 또는 부재 하에 키나제 반응 완충액(15 mM 트리스-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 0.01% 트윈-20, 10 mM MgCl₂, 2 μ M 비-방사성 ATP, 0.25 μ Ci 33P-감마-ATP(GE Healthcare, 카탈로그 번호 AH9968) 최종 농도) 중의 12.5 μ g의 폴리GT 기질(Sigma 카탈로그 번호 P0275)과 함께 배양하였다. 30 °C에서 45 분 후에, 150 mM 인산 25 μ l/웰을 가하여 반응을 중지시켰다. 종결된 키나제 반응물을 모두 세포 수확기(Perkin Elmer)를 사용하여, 미리 세척한(75 mM 인산) 96 웰 필터 플레이트(Perkin Elmer 카탈로그 번호 6005177)로 옮겼다. 플레이트를 웰당 300 μ l의 75 mM 인산 용액으로 6 회 세척하고 상기 플레이트의 바닥을 밀봉시켰다. 40 μ l/웰의 마이크로신티(Microscint)-20을 가하고, 상기 플레이트의 상부를 밀봉하고 탐카운트(Topcount)(Perkin Elmer)를 사용하여 관독을 수행하였다. 비히클의 존재 하에서 수득한 분당 카운트(cpm)로부터 양성 대조군 억제제(10 μ M 스타우로스포린)의 존재 하에서 수득한 cpm을 감하여 키나제 활성을 계산하였다. 상기 활성을 억제하는 시험 화합물의 능력을 하기와 같이 측정하였다:

[0251] 억제 퍼센트 = ((시험 화합물이 존재하는 샘플에 대해 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)/(비히클 존재 하에서 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)) x 100.

[0252] 상기 JAK1 분석에서 용량-반응 효과의 시험 및 각 화합물에 대한 IC₅₀의 계산이 가능하도록 상기 화합물들에 대한 일련의 용량 희석물을 제조하였다. 각각의 화합물을 20 μ M의 농도에 이어서 1/3의 일련의 희석, 8 개의 점 (20 μ M - 6.67 μ M - 2.22 μ M - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM)에서 1% DMSO의 최종 농도로 통상

적으로 시험하였다. 상기 일련의 화합물의 효능이 증가했을 때, 더 희석하고/하거나 최고 농도를 낮추었다(예를 들어 5 μ M, 1 μ M).

[0253] 하기의 화합물들을 본 발명에 개시된 분석들을 사용하여 측정된 바와 같이, JAK1 및 IC₅₀ 값에 대한 그들의 활성에 대해 시험하였으며 하기 표 3a에 나타낸다.

[0254] [표 3a]

화합물들의 JAK1 값	
화합물 #	JAK1 IC ₅₀ (nM)
1	47.07, 55.66, 50.1, 48.29
2	50.91, 52.11
3	291
4	1032
5	1450
6	3448
7	504.1
8	435
9	334.3
10	18.16
11	7.69

[0255]

[0256] **1.2 JAK1 Ki 측정 분석**

[0257] Ki의 측정을 위해서, 상이한 양들의 화합물을 상기 효소와 혼합하고 효소 반응을 ATP 농도의 함수로서 추적하였다. 상기 Ki를, 화합물 농도에 대한 Km의 이중 역수 플롯에 의해 측정하였다(Lineweaver-Burk 플롯). 1 ng의 JAK1(Invitrogen, PV4774)을 상기 분석에 사용하였다. 기질은 50 nM 유라이트(Ulight)-JAK-1(Tyr1023) 펩타이드(Perkin Elmer, TRF0121)이었다. 상기 반응을 다양한 농도의 ATP 및 화합물과 함께 25 mM MOPS pH 6.8, 0.01%, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂ 브리즈(Brij)-35 중에서 수행하였다. 인산화된 기질을 Eu-표지된 항-포스포타이로신 항체 PT66(Perkin Elmer, AD0068)을 사용하여 측정하였다. 판독을 320 nm 여기 및 615 nm 및 665 nm 방출의 엔비전(Perkin Elmer) 상에서 수행하였다.

[0258] 예를 들어, 화합물 1을 상기 분석에서 시험했을 때, 39 nM의 Ki 값이 측정되었다.

[0259] **1.3 JAK2 억제 분석**

[0260] 재조합 인간 JAK2 촉매 도메인(아미노산 808-1132; 카탈로그 번호 PV4210)을 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 구입하였다. 0.025 mU의 JAK2를 폴리프로필렌 96-웰 플레이트(Greiner, V-바닥) 중에서, 총 25 μ l의 부피로, 5 μ l 시험 화합물 또는 비히클(DMSO, 1% 최종 농도)의 존재 또는 부재 하에 키나제 반응 완충액(15 mM MOPS pH 7.5, 9 mM MgAc, 0.0 mM EDTA, 0.06% Brij 및 0.6 mM DTT, 1 μ M 비-방사성 ATP, 0.25 μ Ci 33P-감마-ATP(GE Healthcare, 카탈로그 번호 AH9968) 최종 농도) 중의 2.5 μ g의 폴리GT 기질(Sigma 카탈로그 번호 P0275)과 함께 배양하였다. 30 °C에서 90 분 후에, 150 mM 인산 25 μ l/웰을 가하여 반응을 중지시켰다. 종결된 키나제 반응물을 모두 세포 수확기(Perkin Elmer)를 사용하여, 미리 세척한(75 mM 인산) 96 웰 필터 플레이트(Perkin Elmer 카탈로그 번호 6005177)로 옮겼다. 플레이트를 웰당 300 μ l의 75 mM 인산 용액으로 6 회 세척하고 상기 플레이트의 바닥을 밀봉시켰다. 40 μ l/웰의 마이크로싯트-20을 가하고, 상기 플레이트의 상부를 밀봉하고 탑카운트(Perkin Elmer)를 사용하여 판독을 수행하였다. 비히클의 존재 하에서 수득한 분당 카운트(cpm)로부터 양성 대조군 억제제(10 μ M 스타우로스포린)의 존재 하에서 수득한 cpm을 감하여 키나제 활성을 계산하였다. 상기 활성을 억제하는 시험 화합물의 능력을 하기와 같이 측정하였다:

[0261] 억제 퍼센트 = ((시험 화합물이 존재하는 샘플에 대해 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)/(비히클 존재 하에서 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)) x 100.

[0262] 상기 JAK2 분석에서 용량-반응 효과의 시험 및 각 화합물에 대한 IC₅₀의 계산이 가능하도록 상기 화합물들에 대한 일련의 용량 희석물을 제조하였다. 각각의 화합물을 20 μ M의 농도에 이어서 1/3의 일련의 희석, 8 개의 점(20 μ M - 6.67 μ M - 2.22 μ M - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM)에서 1% DMSO의 최종 농도로 통상적으로 시험하였다. 상기 일련의 화합물의 효능이 증가했을 때, 더 희석하고/하거나 최고 농도를 낮추었다(예를 들어 5 μ M, 1 μ M).

[0263] 하기의 화합물들을 본 발명에 개시된 분석들을 사용하여 측정된 바와 같이, JAK2 및 IC₅₀ 값에 대한 그들의 활성에 대해 시험하였으며 하기 표 3b에 나타낸다.

[0264] [표 3b]

화합물들의 JAK2 IC ₅₀ 값	
Cpd #	JAK2 IC ₅₀ (nM)
1	31.37, 41.16, 55.49, 167.34
2	38.73, 152.3, 184.7
3	N/A
4	N/A
5	1760
6	5070
7	6449
8	7731, 1355
9	848.7
10	65.42
11	15.51

[0265]

[0266] **1.4 JAK2 Kd 측정 분석**

[0267] JAK2(Invitrogen, PV4210)를 5 nM의 최종 농도로 사용하였다. 상기 결합 시험을 화합물 농도를 변화시키면서 25 nM 키나제 추적자 236(Invitrogen, PV5592) 및 2 nM Eu-항-GST(Invitrogen, PV5594)를 사용하여 50 mM Hepes pH 7.5, 0.01% 브리즈-35, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA 중에서 수행하였다. 추적자의 검출을 제조 과정에 따라 수행하였다.

[0268] 예를 들어, 화합물 1을 상기 분석에서 시험했을 때, 205 nM의 Kd 값이 측정되었다.

[0269] **1.5 JAK3 억제 분석**

[0270] 제조합 인간 JAK3 촉매 도메인(아미노산 781-1124; 카탈로그 번호 PV3855)을 인비트로젠으로부터 구입하였다. 0.025 mU의 JAK3를 폴리프로필렌 96-웰 플레이트(Greiner, V-바닥) 중에서, 총 25 µl의 부피로, 5 µl 시험 화합물 또는 비히클(DMSO, 1% 최종 농도)의 존재 또는 부재 하에 키나제 반응 완충액(25 mM 트리스 pH 7.5, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM Na₃VO₄, 5 mM b-글리세로포스페이트, 0.01% 트리톤 X-100, 1 µM 비-방사성 ATP, 0.25 µCi 33P-감마-ATP(GE Healthcare, 카탈로그 번호 AH9968) 최종 농도) 중의 2.5 µg의 폴리GT 기질(Sigma 카탈로그 번호 P0275)과 함께 배양하였다. 30 °C에서 105 분 후에, 150 mM 인산 25 µl/웰을 가하여 반응을 중지시켰다. 종결된 키나제 반응물을 모두 세포 수확기(Perkin Elmer)를 사용하여, 미리 세척한(75 mM 인산) 96 웰 필터 플레이트(Perkin Elmer 카탈로그 번호 6005177)로 옮겼다. 플레이트를 웰당 300 µl의 75 mM 인산 용액으로 6 회 세척하고 상기 플레이트의 바닥을 밀봉시켰다. 40 µl/웰의 마이크로신티-20을 가하고, 상기 플레이트의 상부를 밀봉하고 탐카운트(Perkin Elmer)를 사용하여 판독을 수행하였다. 비히클의 존재 하에서 수득한 분당 카운트(cpm)로부터 양성 대조군 억제제(10 µM 스타우로스포린)의 존재 하에서 수득한 cpm을 감하여 키나제 활성을 계산하였다. 상기 활성을 억제하는 시험 화합물의 능력을 하기와 같이 측정하였다:

[0271] 억제 퍼센트 = ((시험 화합물이 존재하는 샘플에 대해 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)/(비히클 존재 하에서 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)) x 100.

[0272] 상기 JAK3 분석에서 용량-반응 효과의 시험 및 각 화합물에 대한 IC₅₀의 계산이 가능하도록 상기 화합물들에 대한 일련의 용량 희석물을 제조하였다. 각각의 화합물을 20 µM의 농도에 이어서 1/3의 일련의 희석, 8 개의 점 (20 µM - 6.67 µM - 2.22 µM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM)에서 1% DMSO의 최종 농도로 통상적으로 시험하였다. 상기 일련의 화합물의 효능이 증가했을 때, 더 희석하고/하거나 최고 농도를 낮추었다(예를 들어 5 µM, 1 µM).

[0273] 하기의 화합물들을 본 발명에 개시된 분석들을 사용하여 측정된 바와 같이, JAK3 및 IC₅₀ 값에 대한 그들의 활성에 대해 시험하였으며 하기 표 3c에 나타낸다.

[0274] [표 3c]

화합물들의 JAK3 IC ₅₀ 값	
Cpd #	JAK3 IC ₅₀ (nM)
1	149.35, 187.3, 189.3, 194.7
2	2843
11	194.6

[0275]

[0276] 1.6 JAK3 Ki 측정 분석

[0277]

Ki의 측정을 위해서, 상이한 양들의 화합물을 상기 효소와 혼합하고 효소 반응을 ATP 농도의 함수로서 추적하였다. 상기 Ki를, 화합물 농도에 대한 Km의 이중 역수 플롯에 의해 측정하였다(Lineweaver-Burk 플롯). JAK3(Carna Biosciences, 09CBS-0625B)을 10 ng/ml의 최종 농도로 사용하였다. 기질은 폴리(Glu,Tyr)나트륨염(4:1), MW 20 000 - 50 000(Sigma, P0275)이었다. 상기 반응을 다양한 농도의 ATP 및 화합물과 함께 25 mM 트리스 pH 7.5, 0.01% 트리톤 X-100, 0.5 mM EGTA, 2.5 mM DTT, 5 mM Na₃VO₄, 5 mM b-글리세롤포스페이트, 10 mM MgCl₂ 중에서 수행하고 150 mM 인산의 첨가에 의해 중지시켰다. 상기 기질 폴리GT에 통합된 포스페이트의 측정을, 상기 샘플을 필터 플레이트 상에 로딩하고(수확기 사용, Perkin Elmer) 후속 세척함으로써 수행하였다. 폴리GT 중에 통합된 ³³P를, 상기 필터 플레이트(Perkin Elmer)에 섬광 액체를 첨가한 후에 탐카운트(Topcount) 섬광 계수기에서 측정한다.

[0278]

예를 들어, 화합물 1을 상기 분석에서 시험했을 때, 353 nM의 Ki 값이 측정되었다.

[0279]

1.7 TYK2 억제 분석

[0280]

제조업 인간 TYK2 촉매 도메인(아미노산 871-1187; 카탈로그 번호 08-147)을 카르나 바이오사이언스로부터 구입하였다. 5 ng의 TYK2를 폴리프로필렌 96-웰 플레이트(Greiner, V-바닥) 중에서, 총 25 μl의 부피로, 5 μl 시험 화합물 또는 비히클(DMSO, 1% 최종 농도)의 존재 또는 부재 하에 키나제 반응 완충액(25 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.1% NP-40, 0.1 μM 비-방사성 ATP, 0.125 μCi ³³P-감마-ATP(GE Healthcare, 카탈로그 번호 AH9968) 최종 농도) 중의 12.5 μg의 폴리GT 기질(Sigma 카탈로그 번호 P0275)과 함께 배양하였다. 30 °C에서 90 분 후에, 150 mM 인산 25 μl/웰을 가하여 반응을 중지시켰다. 종결된 키나제 반응물을 모두 세포 수확기(Perkin Elmer)를 사용하여, 미리 세척한(75 mM 인산) 96 웰 필터 플레이트(Perkin Elmer 카탈로그 번호 6005177)로 옮겼다. 플레이트를 웰당 300 μl의 75 mM 인산 용액으로 6 회 세척하고 상기 플레이트의 바닥을 밀봉시켰다. 40 μl/웰의 마이크로신티-20을 가하고, 상기 플레이트의 상부를 밀봉하고 탐카운트(Perkin Elmer)를 사용하여 판독을 수행하였다. 비히클의 존재 하에서 수득한 분당 카운트(cpm)로부터 양성 대조군 억제제(10 μM 스타우로스포린)의 존재 하에서 수득한 cpm을 감하여 키나제 활성을 계산하였다. 상기 활성을 억제하는 시험 화합물의 능력을 하기와 같이 측정하였다:

[0281]

억제 퍼센트 = ((시험 화합물이 존재하는 샘플에 대해 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)/(비히클 존재 하에서 측정된 cpm - 양성 대조군 억제제를 갖는 샘플에 대해 측정된 cpm)) x 100.

[0282]

상기 TYK2 분석에서 용량-반응 효과의 시험 및 각 화합물에 대한 IC₅₀의 계산이 가능하도록 상기 화합물들에 대한 일련의 용량 희석물을 제조하였다. 각각의 화합물을 20 μM의 농도에 이어서 1/3의 일련의 희석, 8 개의 점 (20 μM - 6.67 μM - 2.22 μM - 740 nM - 247 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM)에서 1% DMSO의 최종 농도로 통상적으로 시험하였다. 상기 일련의 화합물의 효능이 증가했을 때, 더 희석하고/하거나 최고 농도를 낮추었다(예를 들어 5 μM, 1 μM).

[0283]

하기의 화합물들을 본 발명에 개시된 분석들을 사용하여 측정된 바와 같이, TYK2 및 IC₅₀ 값에 대한 그들의 활성에 대해 시험하였으며 하기 표 3d에 나타낸다.

[0284] [표 3d]

화합물들의 TYK2 IC ₅₀ 값	
화합물 #	TYK2 IC ₅₀ (nM)
1	72.7, 73.75, 79.07, 86.77
2	2096
11	125.8

[0285]

[0286] 1.8 TYK2 Kd 측정 분석

[0287] TYK2(Carna Biosciences, 09CBS-0983D)를 5 nM의 최종 농도로 사용하였다. 상기 결합 시험을 화합물 농도를 변화시키면서 50 nM 키나제 추적자 236(Invitrogen, PV5592) 및 2 nM Eu-항-GST(Invitrogen, PV5594)를 사용하여 50 mM Hepes pH 7.5, 0.01% 브리즈-35, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA 중에서 수행하였다. 추적자의 검출을 제조 과정에 따라 수행하였다.

[0288] 예를 들어, 화합물 1을 상기 분석에서 시험했을 때, 376 nM의 Kd 값이 측정되었다.

[0289] 실시예 2. 세포 분석:

[0290] 2.1 JAK-STAT 신호전달 분석:

[0291] HeLa 세포를 10% 열 불활성화된 송아지 태아 혈청, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 돌베코의 변형된 이글 배지(DMEM)에서 유지시켰다. HeLa 세포를 70% 감염 용합물로 사용하였다. 87 µl 세포 배양 배지 중의 20,000 세포를, 96-웰 플레이트 포맷으로 웰당 형질감염 시약으로서 0.32 µl 제트-PEI(Polyplus)를 사용하여 40 ng pSTAT1(2)-루시페라제 리포터(Panomics), 내부 대조용 리포터로서 8 ng의 LacZ 리포터 및 52 ng의 pBSK로 일시 형질감염시켰다. 37 °C, 10% CO₂에서 밤새 배양 후에, 형질감염 배지를 제거하였다. 75 µl의 DMEM + 1.5% 열 불활성화된 송아지 태아 혈청을 가하였다. 15 µl의 화합물을 6.7 배 농도로 60 분간 가하고 이어서 10 µl의 인간 OSM(Peprotech)을 33 ng/ml의 최종 농도로 가하였다.

[0292] 모든 화합물을 20 µM의 농도부터 출발하고 이어서 1/3의 일련의 희석, 총 8 개 용량(20 µM - 6.6 µM - 2.22 µM - 740 nM - 250 nM - 82 nM - 27 nM - 9 nM)에서 0.2% DMSO의 최종 농도로 중복 시험하였다.

[0293] 37 °C, 10% CO₂에서 밤새 배양 후, 세포를 100 µl 용해 완충액/웰(PBS, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 5% 트레할로스, 0.025% 터지틀 NP9, 0.15% BSA)에 용해시켰다.

[0294] 세포 용해물 40 µl를 사용하여, 20 분간 βGal 용액 180 µl(30 µl ONPG 4 mg/ml + 150 µl β-갈락토시다제 완충액(0.06 M Na₂HPO₄, 0.04 M NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂))을 가하여 β-갈락토시다제 활성을 판독하였다. 1M Na₂CO₃ 50 µl를 가하여 상기 반응을 중지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0295] 엔비전(Envision)(Perkin Elmer) 상에서, 제조사(Perkin Elmer)에 의해 개시된 바와 같이 40 µl 세포 용해물 + 40 µl의 스테디라이트(SteadyLite)(등록상표)를 사용하여 루시페라제 활성을 측정하였다.

[0296] 10 µM의 범-JAK 억제제를 양성 대조군(100% 억제)으로서 사용하였다. 음성 대조군으로서 0.5% DMSO(0% 억제)를 사용하였다. 상기 양성 및 음성 대조군을 사용하여 'z' 및 '억제 퍼센트'(PIN) 값을 계산하였다.

[0297] 억제 퍼센트 = ((비히클 존재 하에서 측정된 형광 - 시험 화합물이 존재하는 샘플에 대해 측정된 형광)/(비히클 존재 하에서 측정된 형광 - 촉발제 부재 샘플에 대해 측정된 형광)) x 100.

[0298] PIN 값을 용량-반응에서 시험된 화합물에 대해 플롯팅하고 EC₅₀ 값을 이끌어 냈다.

[0299] [표 4]

화합물 #	EC ₅₀ (nM)
1	922.5, 625.6, 987.7, 1767
2	>10000, 3322, 2492
11	740.4

[0300]

[0301] **실시예 2.2 OSM/IL-1 β 신호전달 분석**

[0302] OSM 및 IL-1 β 는 인간 연골육종 세포 주 SW1353에서 MMP13 수준을 상승적으로 상향조절하는 것으로 나타났다. 상기 세포를 96 웰 플레이트에 37 °C, 5% CO₂에서 배양한 10%(v/v) FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Invitrogen)을 함유하는 120 μ l 부피의 DMEM(Invitrogen)에서 15,000 세포/웰로 시딩하였다. 세포를 2% DMSO가 있는 M199 배지 중의 화합물 15 μ l로 예비배양한 후 1 시간째에 15 μ l OSM 및 IL-1 β 로 촉발시켜 25 ng/ml OSM 및 1 ng/ml IL-1 β 에 도달하고, MMP13 수준을 촉발 후 48 시간째에 처리된 배지에서 측정하였다. MMP13 활성을 항체 포획 활성 분석을 사용하여 측정하였다. 이를 위해서, 384 웰 플레이트(NUNC, 460518, MaxiSorb black)를 4 °C에서 24 시간 동안 1.5 μ g/ml 항-인간 MMP13 항체(R&D Systems, MAB511) 35 μ l로 코팅하였다. 상기 웰을 PBS + 0.05% 트윈으로 2 회 세척한 후에, 나머지 결합 부위를 4 °C에서 24 시간 동안 PBS 중의 5% 무지방 분유(Santa Cruz, sc-2325, Blotto) 100 μ l로 차단하였다. 이어서, 상기 웰을 PBS + 0.05% 트윈으로 2 회 세척하고 100 배 희석된 차단 완충액 중에 MMP13을 함유하는 배양 상등액의 1/10 희석액 35 μ l를 가하고 실온에서 4 시간 동안 배양하였다. 이어서 상기 웰을 PBS + 0.05% 트윈으로 2 회 세척한 다음 1.5 mM 4-아미노페닐머큐릭 아세테이트(APMA)(Sigma, A9563) 용액 35 μ l를 첨가하고 37 °C에서 1 시간 동안 배양하여 MMP13을 활성화시켰다. 상기 웰을 다시 PBS + 0.05% 트윈으로 세척하고 MMP13 기질(Biomol, P-126, OmniMMP 형광 기질) 35 μ l를 가하였다. 37 °C에서 24 시간 배양 후 상기 전환된 기질의 형광을 퍼킨 엘머 왈락 엔비전(Perkin Elmer Wallac EnVision) 2102 다중표지 판독기(과장 여기: 320 nm, 과장 방출: 405 nm)에서 측정하였다.

[0303] 억제 퍼센트 = ((비히클 존재 하에서 측정된 형광 - 시험 화합물이 존재하는 샘플에 대해 측정된 형광)/(비히클 존재 하에서 측정된 형광 - 촉발제 부재 샘플에 대해 측정된 형광)) x 100.

[0304] 예를 들어, 화합물 1을 상기 분석에서 시험했을 때, 2242.5(±1098.5) nM의 EC₅₀ 값이 측정되었다.

[0305] **실시예 2.3 PBL 증식 분석**

[0306] 인간 말초 혈액 림프구(PBL)를 IL-2로 자극하고 증식을 BrdU 결합 분석을 사용하여 측정하였다. 상기 PBL을 먼저 72 시간 동안 PHA로 자극하여 IL-2 수용체를 유도하고, 24 시간 동안 굵겨 세포증식을 중단시킨 다음 추가로 72 시간(24 시간 BrdU 표지화 포함) 동안 IL-2 자극하였다. 세포를 시험 화합물과 함께 1 시간 예비배양한 후에 IL-2를 첨가하였다. 세포를 10%(v/v) FBS를 함유하는 RPMI 1640 중에서 배양하였다.

[0307] **실시예 2.4 전혈 분석(WBA)**

[0308] 2.4.1 IFN α 자극 프로토콜

[0309] 생체 내에서 JAK1 또는 JAK2-의존성 신호전달 경로를 억제하는 시험 화합물의 효능을 예측하기 위해서, 생리학적으로 관련된 시험관 내 분석을 인간 전혈을 사용하여 개발하였다. 상기 WBA 분석에서, 사전동의를 구한 인간 지원자로부터 채혈한 혈액을 생체 외에서 화합물(1 시간)로 처리하고 후속적으로 인터페론 α (IFN α , JAK1 의존성 경로)로 30 분간 또는 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF, JAK2 의존성 경로)로 2 시간 동안 자극하였다.

[0310] 2.4.1.1 포스포-STAT1 분석

[0311] IFN α 자극을 위해서, 백혈구 추출물 중의 IFN α 에 의한 전사 1의 신호 전달자 및 활성화제(pSTAT1)의 인산화의 증가를 pSTAT1 ELISA 분석을 사용하여 측정하였다. 인터페론 알파(IFN α) 촉발 후 전사 1의 신호 전달자 및 활성화제(STAT1)의 인산화는 JAK1-매개된 사건이다. JAK1-의존성 신호전달 경로를 억제하는 화합물의 능력을 평가하기 위해, 세포 추출물 중의 포스포-STAT1 수준을 측정하는데 사용된 포스포-STAT1 분석을 개발하였다.

[0312] 사전동의를 구한 인간 지원자로부터 채혈한 인간 전혈을 생체 외에서 화합물(1 시간)로 처리하고 IFN α 로 30 분간 후속 자극하였다. 백혈구 추출물 중의 IFN α 에 의한 STAT1의 인산화의 증가를 포스포-STAT1 ELISA를 사용하여 측정하였다.

[0313] ACK 용해 완충제는 0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA로 이루어졌다. 상기 완충제의 pH는 7.3이었다.

[0314] 10x 세포 용해 완충제 농축물(the PathScan Phospho-STAT1(Tyr701) 샌드위치 ELISA 키트의 일부, Cell Signaling으로부터)을 H₂O에서 10 배 희석하였다. 프로테아제 억제제를 사용 전에 상기 완충제에 가하였다.

[0315] 20 μ g의 IFN α 를 40 μ l의 H₂O에 용해시켜 500 μ g/ml의 모액을 수득한다. 상기 모액을 -20 °C에서 보관하였다.

- [0316] 상기 화합물의 일련의 3 배 희석물을 DMSO 중에서 제조하였다(최고 농도: 10 mM). 후속적으로, 상기 화합물을 배지에서 추가로 희석하였다(목적하는 최종 화합물 농도에 따른 희석 인자).
- [0317] 2.4.1.1.1 혈액과 화합물과의 배양 및 IFN α 에 의한 자극
- [0318] 인간 혈액을 헤파린 처리된 튜브에 수집하였다. 상기 혈액을 392 μ l의 분액들로 분할하였다. 그 후에, 4 μ l의 화합물 희석물을 각 분액에 가하고 상기 혈액 샘플을 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 IFN α 모액을 RPMI 배지에서 1000 배 희석하여 500 ng/ml 실험 용액을 수득하였다. 상기 500 ng/ml 실험 용액 중 4 μ l를 상기 혈액 샘플에 가하였다(최종 농도 IFN α : 5 ng/ml). 상기 샘플을 37 °C에서 30 분간 배양하였다.
- [0319] 2.4.1.1.2 세포 추출물의 제조
- [0320] 상기 자극 기간의 끝에서, 7.6 ml의 ACK 완충제를 상기 혈액 샘플에 가하여 적혈구를 용해시켰다. 상기 튜브를 5 회 뒤집어 상기 샘플을 혼합하고 상기 반응물을 얼음 상에서 5 분간 배양하였다. 상기 RBC의 용해는 상기 배양 중 확실해야 한다. 상기 세포를 300 g, 4 °C에서 7 분간 원심분리에 의해 펠릿화하고 상등액을 제거하였다. 10 ml의 1 x PBS를 각 튜브에 가하고 상기 세포 펠릿을 재현탁시켰다. 상기 샘플을 다시 300 g, 4 °C에서 7 분간 원심분리시켰다. 상등액을 제거하고 펠릿을 500 μ l의 1 x PBS에 재현탁시켰다. 이어서, 상기 세포 현탁액을 깨끗한 1.5 ml 미세원심분리 튜브로 옮겼다. 상기 세포를 700 g, 4 °C에서 5 분간 원심분리에 의해 펠릿화하였다. 상기 상등액을 제거하고 펠릿을 150 μ l의 세포 용해 완충제에 용해시켰다. 상기 샘플을 얼음 상에서 15 분간 배양하였다. 그 후에, 상기 샘플을 추가로 가공할 때까지 -80 °C에서 보관하였다.
- [0321] 2.4.1.1.3 ELISA에 의한 STAT1 인산화의 측정
- [0322] 상기 패스스캔 포스포(Pathscan Phospho)-STAT1(Tyr701) 샌드위치 ELISA 키트(Cell Signaling)(Cat.n° :#723 4)를 사용하여 포스포-STAT1 수준을 측정하였다.
- [0323] 상기 세포 추출물을 얼음 상에서 해동시켰다. 상기 튜브를 16,000 g, 4 °C에서 5 분간 원심분리하고 등명해진 용해물을 수확하였다. 이러한 동안, 상기 키트로부터의 미세웰 스트립을 실온으로 평형화하고, 20 x 세척 완충제를 H₂O 중에서 희석하여 세척 완충제를 제조하였다. 샘플을 샘플 희석제 중에서 2 배 희석하고 100 μ l를 상기 미세웰 스트립에 가하였다. 상기 스트립을 4 °C에서 밤새 배양하였다.
- [0324] 다음날, 상기 웰을 세척 완충제로 3 회 세척하였다. 100 μ l의 검출 항체를 상기 웰에 가하였다. 상기 스트립을 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 이어서, 상기 웰을 세척 완충제로 다시 3 회 세척하였다. 100 μ l의 HRP-결합된 2차 항체를 각 웰에 가하고 상기 샘플을 37 °C에서 배양하였다. 30 분 후에, 상기 웰을 다시 3 회 세척하고 100 μ l의 TMB 기질을 모든 웰에 가하였다. 샘플이 청색으로 변하면, 100 μ l의 정지 용액을 가하여 상기 반응을 정지시켰다. 흡광도를 450 nm에서 측정하였다.
- [0325] 2.4.1.2 데이터 분석
- [0326] 세포 추출물에서 IFN α 에 의한 포스포STAT1 유도의 억제를 상기 화합물 농도에 대해 플롯팅하고 IC₅₀ 값을 그래프패드(Graphpad) 소프트웨어를 사용하여 유도하였다. R²가 0.8보다 크고 언덕 기울기가 3보다 작은 경우 데이터를 유지하였다.
- [0327] 2.4.1.2 IL-8 ELISA
- [0328] GM-CSF 자극을 위해서, 혈장 중 인터류킨-8(IL-8) 수준의 증가를 IL-8 ELISA 분석을 사용하여 측정한다. 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF) - 유도된 인터류킨 8(IL-8) 발현은 JAK2-매개된 사건이다. IL-8 ELISA(혈장 샘플 중 IL-8 수준의 측정에 사용할 수 있다)를 JAK2-의존성 신호전달 경로를 억제하는 화합물의 능력을 평가하기 위해 개발하였다.
- [0329] 사전동의를 구한 인간 지원자로부터 채혈한 인간 전혈을 생체 외에서 화합물(1 시간)로 처리하고 GM-CSF로 2 시간 동안 후속 자극하였다. 혈장 중의 IL-8 수준의 증가를 IL-8 ELISA를 사용하여 측정한다.
- [0330] 10 μ g의 GM-CSF를 100 μ l의 H₂O에 용해시켜 100 μ g/ml의 모액을 수득한다. 상기 모액을 -20 °C에서 보관한다.
- [0331] 상기 시험 화합물의 일련의 3 배 희석물을 DMSO 중에서 제조한다(최고 농도: 10 mM). 후속적으로, 상기 화합물을 배지에서 추가로 희석한다(목적하는 최종 화합물 농도에 따른 희석 인자).

- [0332] 2.4.1.2.1 혈액과 화합물과의 배양 및 GM-CSF에 의한 자극
- [0333] 인간 혈액을 헤파린 처리된 튜브에 수집한다. 상기 혈액을 245 μ l의 분액들로 분할한다. 그 후에, 2.5 μ l의 시험 화합물 희석물을 각 분액에 가하고 상기 혈액 샘플을 37 °C에서 1 시간 동안 배양한다. 상기 GM-CSF 모액을 RPMI 배지에서 100 배 희석하여 1 μ g/ml 실험 용액을 수득한다. 상기 1 μ g/ml 실험 용액 중 2.5 μ l를 상기 혈액 샘플에 가한다(최종 농도 GM-CSF: 10 ng/ml). 상기 샘플을 37 °C에서 2 시간 동안 배양한다.
- [0334] 2.4.1.2.2 혈장 샘플의 제조
- [0335] 상기 샘플을 1,000 g, 4 °C에서 15 분간 원심분리시킨다. 상기 혈장 100 μ l를 수확하고 추가 사용시까지 -80 °C에서 보관한다.
- [0336] 2.4.1.2.3 ELISA에 의한 IL-8 수준의 측정
- [0337] 인간 IL-8 화학발광 면역분석 키트(R&D Systems(Cat.n° :Q8000B))를 사용하여 IL-8 수준을 측정한다.
- [0338] 10x 세척 완충제를 H₂O에서 희석하여 세척 완충제를 제조한다. 실험용 글로(glo) 시약을, 사용 전 15 분 내지 4 시간째에 1 부의 글로 시약 1을 2 부의 글로 시약 B에 첨가함으로써 제조한다. 100 μ l의 분석 희석제 RD1-86을 각 웰에 가한다. 그 후에, 50 μ l의 샘플(혈장)을 가한다. 상기 ELISA 플레이트를 실온, 500 rpm에서 2 시간 동안 배양한다. 모든 웰을 세척 완충제로 4 회 세척하고 200 μ l의 IL-8 접합체를 각 웰에 가한다. 실온에서 3 시간 동안 배양 후에, 상기 웰들을 세척 완충제로 4 회 세척하고 100 μ l의 실험 글로 시약을 각 웰에 가한다. 상기 ELISA 플레이트를 실온에서 5 분간 배양한다(빛으로부터 보호함). 발광을 측정한다(0.5 s/웰 판독 시간).
- [0339] 2.4.1.3 결과
- [0340] 예를 들어 상기 프로토콜에 따를 때, pSTAT1 수준의 INF α 유도된 증가를 억제하기 위한 화합물 1의 pIC₅₀은 6.23 \pm 0.15(SEM)이었다. 이는 화합물 1이 생리학적 설정 하에서 상기 JAK1 경로를 효능 있게 억제함을 입증한다.
- [0341] 2.4.2 IL6-자극 프로토콜
- [0342] 또한, 인간 전혈을 사용하여 유식 세포측정 분석을 수행하여 생체 외에서 JAK2 화합물 선택성에 대해 JAK1을 확립시켰다. 따라서, 서면동의를 구한 인간 지원자로부터 혈액을 채혈하였다. 이어서 혈액을 서서히 흔들면서 37 °C에서 30 분간 평형화하고, 이어서 에펜도르프 튜브에 분액화하였다. 화합물을 상이한 농도로 가하고 서서히 흔들면서 37 °C에서 30 분간 배양하고, 후속적으로 JAK1-의존성 경로 자극의 경우 인터류킨(IL-6)으로 또는 JAK2-의존성 경로 자극의 경우 GM-CSF로, 서서히 흔들면서 37 °C에서 20 분간 자극하였다. 이어서 포스포-STAT1 및 포스포-STAT5를 FACS 분석을 사용하여 평가하였다.
- [0343] 2.4.2.1 포스포-STAT1 분석
- [0344] 백혈구 중의 전사 1의 신호 전달자 및 활성화제(pSTAT1) 인산화의 IL-6-자극된 증가를 위해서, 서면동의를 구한 인간 지원자로부터 채혈된 인간 전혈을 생체 외에서 상기 화합물로 30 분간 처리하고 후속적으로 IL-6으로 20 분간 자극하였다. 림프구 중에서 IL-6에 의한 STAT1의 인산화의 증가를, FACS에 의해 항 포스포-STAT1 항체를 사용하여 측정하였다.
- [0345] 5X 라이스/픽스(Lyse/Fix) 완충제(BD PhosFlow, Cat.N° 558049)를 증류수로 5 배 희석하고 37 °C에서 예온하였다. 나머지 희석된 라이스/픽스 완충제는 버렸다.
- [0346] 10 μ g의 rhIL-6(R&D Systems, Cat N° 206-IL)을 1 ml의 PBS 0.1% BSA에 용해시켜 10 μ g/ml의 모액을 수득하였다. 상기 모액을 분액화하고 -80 °C에서 보관하였다.
- [0347] 상기 화합물의 일련의 3배 희석물을 DMSO(10 mM 모액) 중에서 제조하였다. 대조군 처리된 샘플은 화합물 대신에 DMSO를 수용하였다. 모든 샘플들을 1% 최종 DMSO 농도로 배양하였다.
- [0348] 2.4.2.1.1 혈액과 화합물과의 배양 및 IL-6에 의한 자극
- [0349] 인간 혈액을 헤파린 처리된 튜브에 수집하였다. 상기 혈액을 148.5 μ l의 분액들로 분할하였다. 이어서, 1.5 μ l의 시험 화합물 희석물을 각 혈액 분액에 가하고 상기 혈액 샘플을 서서히 흔들면서 37 °C에서 30 분간 배양하였다. IL-6 모액(1.5 μ l)을 상기 혈액 샘플(최종 농도 10 ng/ml)에 가하고 샘플들을 서서히 흔들면서 37 °C

에서 20 분간 배양하였다.

- [0350] 2.4.2.1.2 백혈구 제조 및 CD4 표지화
- [0351] 상기 자극 기간의 끝에서, 3 ml의 1X 예온된 라이스/픽스 완충제를 상기 혈액 샘플에 바로 가하고, 적혈구를 용해시키고 백혈구를 고정시키기 위해서 간단히 와동시키고 수욕에서 37 °C에서 15 분간 배양하였으며, 이어서 추가로 사용할 때까지 -80 °C에서 동결시켰다.
- [0352] 다음 단계를 위해, 튜브를 대략 20 분간 37 °C에서 해동시키고 4 °C, 400xg에서 5 분간 원심분리시켰다. 세포 펠릿을 3 ml의 저온 1X PBS로 세척하고, 원심분리 후에 상기 세포 펠릿을 3% BSA를 함유하는 PBS 100 μl에 재현탁시켰다. FITC-접합된 항-CD4 항체 또는 대조용 FITC-접합된 아이소타입 항체를 가하고 암실에서 실온에서 20 분간 배양하였다.
- [0353] 2.4.2.1.3 세포 투과화(permeabilization) 및 항 포스포-STAT1 항체에 의한 표지화
- [0354] 세포를 1X PBS로 세척한 후에, 세포 펠릿을 100 μl의 빙냉 1XPBS에 재현탁시키고 900 μl의 빙냉 100% 메탄올을 가하였다. 이어서 세포를 4 °C에서 30 분간 투과화를 위해 배양하였다.
- [0355] 이어서 투과화된 세포를 3% BSA를 함유하는 1XPBS로 세척하고 최종적으로 3% BSA를 함유하는 1X PBX 80 μl에 재현탁시켰다.
- [0356] 20 μl의 PE 마우스 항-STAT1(pY701) 또는 PE 마우스 IgG2a κ 아이소타입 대조용 항체(BD Bioscience, 각각 Cat. N° 612564 및 559319)를 가하고 혼합하고, 이어서 암실에서 4 °C에서 30 분간 배양하였다.
- [0357] 이어서 세포를 1X PBS로 1 회 세척하고 FACSCanto II 유식 세포계(BD Biosciences) 상에서 분석하였다.
- [0358] 2.4.2.1.4 FACSanto II 상에서 형광 분석
- [0359] 50,000 회의 전체 사건을 카운트하고 포스포-STAT1 양성 세포를, 림프구 게이트에서 CD4+ 세포 상에서 게이트 조절 후에 측정하였다. 데이터를 FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 분석하고 IL-6 자극의 억제 백분율을 CD4+ 세포 상의 포스포-STAT1에 대한 양성 세포의 백분율에 대해 계산하였다.
- [0360] 2.4.2.2 포스포-STAT5 분석
- [0361] 백혈구 중의 전사 5의 신호 전달자 및 활성화제(pSTAT5) 인산화의 GM-CSF-자극된 증가를 위해서, 서면동의를 구한 인간 지원자로부터 채혈된 인간 전혈을 생체 외에서 상기 화합물로 30 분간 처리하고 후속적으로 GM-CSF로 20 분간 자극한다. 단핵구 중에서 GM-CSF에 의한 STAT5의 인산화의 증가를, FACS에 의해 항 포스포-STAT5 항체를 사용하여 측정한다.
- [0362] 5X 라이스/픽스 완충제(BD PhosFlow, Cat.N° 558049)를 증류수로 5 배 희석하고 37 °C에서 예온한다. 나머지 희석된 라이스/픽스 완충제는 버린다.
- [0363] 10 μg의 rhGM-CSF(AbCys S.A., Cat N° P300-03)를 100 μl의 PBS 0.1% BSA에 용해시켜 100 μg/ml의 모액을 수득한다. 상기 모액을 분액화하고 -80 °C에서 보관한다.
- [0364] 상기 화합물의 일련의 3배 희석물을 DMSO(10 mM 모액) 중에서 제조한다. 대조군 처리된 샘플은 화합물 대신에 DMSO를 수용한다. 모든 샘플들을 1% 최종 DMSO 농도로 배양한다.
- [0365] 2.4.2.2.1 혈액과 화합물과의 배양 및 GM-CSF에 의한 자극
- [0366] 인간 혈액을 헤파린 처리된 튜브에 수집한다. 상기 혈액을 148.5 μl의 분액들로 분할한다. 이어서, 1.5 μl의 화합물 희석물을 각 분액에 가하고 상기 혈액 샘플을 서서히 흔들면서 37 °C에서 30 분간 배양한다. GM-CSF 모액(1.5 μl)을 상기 혈액 샘플(최종 농도 20 pg/ml)에 가하고 샘플들을 서서히 흔들면서 37 °C에서 20 분간 배양한다.
- [0367] 2.4.2.2.2 백혈구 제조 및 CD4 표지화
- [0368] 상기 자극 기간의 끝에서, 3 ml의 1X 예온된 라이스/픽스 완충제를 상기 혈액 샘플에 바로 가하고, 적혈구를 용해시키고 백혈구를 고정시키기 위해서 간단히 와동시키고 수욕에서 37 °C에서 15 분간 배양하고, 이어서 추가로 사용할 때까지 -80 °C에서 동결시킨다.
- [0369] 다음 단계를 위해, 튜브를 대략 20 분간 37 °C에서 해동시키고 4 °C, 400xg에서 5 분간 원심분리시킨다. 세포

펠릿을 3 ml의 저온 1X PBS로 세척하고, 원심분리 후에 상기 세포 펠릿을 3% BSA를 함유하는 PBS 100 μ l에 재현탁시킨다. FITC 마우스 항-CD14 항체(BD Biosciences, Cat.N° 345784) 또는 대조용 FITC 마우스 IgG2b κ 아이소타입 항체(BD Biosciences, Cat.N° 555057)를 가하고 암실에서 실온에서 20 분간 배양한다.

- [0370] 2.4.2.2.3 세포 투과화 및 항 포스포-STAT1 항체에 의한 표지화
- [0371] 세포를 1X PBS로 세척한 후에, 세포 펠릿을 100 μ l의 빙냉 1X PBS에 재현탁시키고 900 μ l의 빙냉 100% 메탄올을 가한다. 이어서 세포를 4 °C에서 30 분간 투과화를 위해 배양한다.
- [0372] 이어서 투과화된 세포를 3% BSA를 함유하는 1XPBS로 세척하고 최종적으로 3% BSA를 함유하는 1X PBX 80 μ l에 재현탁시킨다.
- [0373] 20 μ l의 PE 마우스 항-STAT5(pY694) 또는 PE 마우스 IgG1 κ 아이소타입 대조용 항체(BD Bioscience, 각각 Cat. N° 612567 및 554680)를 가하고 혼합하고, 이어서 암실에서 4 °C에서 30 분간 배양한다.
- [0374] 이어서 세포를 1X PBS로 1 회 세척하고 FACSCanto II 유식 세포계(BD Biosciences) 상에서 분석한다.
- [0375] 2.4.2.2.4 FACSanto II 상에서 형광 분석
- [0376] 50,000 회의 전체 사건을 카운트하고 포스포-STAT5 양성 세포를 CD14+ 세포 상에서 게이트 조절 후에 측정한다. 데이터를 FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 분석하며 이는 CD14+ 세포 상의 포스포-STAT5에 대한 양성 세포의 백분율에 대해 계산된 GM-CSF 자극의 억제 백분율에 상응한다.
- [0377] 2.4.2.2 결과
- [0378] 상기 프로토콜에 따를 때, 3 명의 건강한 지원자들의 평균으로부터 획득한 억제 백분율(PIN)을 각각의 시험 화합물에 대해 측정한다. 예를 들어, 화합물 1을 시험하였으며 이는 STAT1 인산화의 억제에서 $pIC_{50} = 6.08$ 로 복귀되었다.
- [0379] **실시예 3. 생체 내 모델**
- [0380] **실시예 3.1 CIA 모델**
- [0381] 3.1.1 물질
- [0382] 완전 프로인트 항원보강제(CFA) 및 불완전 프로인트 항원보강제(IFA)를 디프코(Difco)로부터 구입하였다. 소콜라겐 유형 II(CII), 리포폴리사카라이드(LPS), 및 엔브렐(Enbrel)을 각각 콘드렉스(Chondrex)(Isle d'Abeau, France); 시그마(Sigma)(P4252, L'Isle d'Abeau, France), 와이에트(Whyett)(25 mg 주사가능한 주사기, France), 아크로스 오가닉스(Acros Organics)(Palo Alto, CA)로부터 획득하였다. 사용된 다른 모든 시약들은 시약 등급이며 모든 용매는 분석 등급을 가졌다.
- [0383] 3.1.2 동물
- [0384] 다크 아구티 래트(수컷, 7 내지 8 주된 것)를 할란 레보라토리즈(Harlan Laboratories)(Maison-Alfort, France)로부터 획득하였다. 래트를 12 시간 명/암 주기(0700-1900)로 유지시켰다. 온도를 22 °C에서 유지시키고, 음식과 물을 임의로 제공하였다.
- [0385] 3.1.3 콜라겐 유발시킨 관절염(CIA)
- [0386] 실험 하루 전에, CII 용액(2 mg/ml)을 0.05M 아세트산으로 제조하고 4 °C에서 보관하였다. 면역화 직전에, 동분량의 항원보강제(IFA) 및 CII를 빙수 욕에서 예냉된 유리병 중에서 균질화에 의해 혼합하였다. 유화액이 형성되지 않는 경우 여분의 항원보강제 및 연장된 균질화가 필요할 수도 있다. 0.2 ml의 상기 유화액을 1일째에 각 래트의 꼬리 맨 아랫부분에 피 내 주사하고, 2차 추가접종 피 내 주사(CFA 0.1 ml 염수 중의 CII 용액 2 mg/ml)를 9일째에 수행하였다. 상기 면역화 방법을 공개된 방법들로부터 변형시켰다(Sims NA et al., (2004); Jou et al., 2005).
- [0387] 3.1.4 연구 디자인
- [0388] 시험 화합물의 치료 효과를 래트 CIA 모델에서 시험하였다. 래트를 동등한 그룹으로 랜덤하게 나누고 각 그룹에 10 마리의 래트를 포함시켰다. 모든 래트를 1일째에 면역화하고 9일째에 추가접종하였다. 치료 투여를 16일부터 30일까지 지속시켰다. 음성 대조군을 비히클(MC 0.5%)로 처리하고 양성 대조군은 엔브렐(10 mg/kg, 3x 주, s.c.)로 처리하였다. 관심 화합물들을 전형적으로 3 회 용량, 예를 들어 3, 10, 30 mg/kg, p.o로 시험하였

다.

- [0389] 3.1.5 관절염의 임상 평가
- [0390] 관절염을 문헌[Khachigian 2006, Lin et al 2007] 및 [Nishida et al. 2004]의 방법에 따라 기록하였다. 4 개의 각 앞발의 종창을 하기와 같은 관절염 점수로 순위를 매겼다: 0 - 증상 없음; 1 - 관절, 예를 들어 발목 또는 손목의 한 가지 유형의 순하지만, 뚜렷한 발적 및 종창, 또는 감염된 손 발가락의 수와 상관없이, 개별적인 손 발가락으로 제한된 명백한 발적 및 종창; 2 - 관절의 2 가지 이상 유형의 보통의 발적 및 종창; 3 - 손 발가락을 포함한 전체 발의 심한 발적 및 종창; 4 - 다수의 관절을 포함한 최대로 염증을 일으킨 사지(동물당 최대의 누적 임상 관절염 점수 16)(Nishida et al., 2004).
- [0391] 수회 연구의 메타-분석을 허용하기 위해서, 상기 임상 점수 값들을 하기와 같이 표준화하였다:
- [0392] 임상 점수의 AUC(AUC 점수): 제1일부터 제14일까지 상기 곡선 아래 면적(AUC)을 각각의 개별적인 래트로부터 계산하였다. 각 동물의 AUC를, 상기 동물에 대한 데이터가 획득된 연구에서 비히클에 대해 획득된 평균 AUC로 나누고 100을 곱하였다(즉 상기 AUC를 연구에 따른 평균 비히클 AUC의 백분율로서 나타내었다).
- [0393] 제1일부터 제14일(중점 점수)까지의 임상 점수 증가: 각 동물에 대한 임상 점수 차이를, 상기 동물에 대한 데이터가 획득된 연구에서 비히클에 대해 획득된 평균 임상 점수 차이로 나누고 100을 곱하였다(즉 상기 차이를 연구에 따른 상기 비히클에 대한 평균 임상 점수 차이의 백분율로서 나타내었다).
- [0394] 3.1.6 관절염 발병 후 체중 변화(%)
- [0395] 임상적으로, 체중 손실은 관절염과 관련이 있다(Shelton et al., 2005; Argiles et al., 1998; Rall, 2004; Walsmith et al., 2004). 따라서, 관절염 발병 후 체중 변화를 상기 래트 모델에서 치료 효과를 평가하기 위한 불특정 중점으로서 사용할 수 있다. 상기 관절염 발병 후 체중 변화(%)를 하기와 같이 계산하였다:
- [0396] 마우스: $(\text{체중}_{(6주)} - \text{체중}_{(5주)}) / \text{체중}_{(5주)} \times 100\%$
- [0397] 래트: $(\text{체중}_{(4주)} - \text{체중}_{(3주)}) / \text{체중}_{(3주)} \times 100\%$
- [0398] 3.1.7 방사선학
- [0399] X-선 사진을 각각의 개별적인 동물의 뒷발로부터 촬영하였다. 랜덤한 블라인드 확인 번호를 각 사진에 할당하고, 골 미란의 중증도를 하기와 같이 방사선학적 라르센 득점 시스템을 사용한 2 개의 독립적인 점수에 의해 등급을 매겼다: 0 - 완전한 골 윤곽과 정상적인 관절 공간을 갖는 정상적인 상태; 1 - 임의의 하나 또는 2 개의 가벼운 골 미란을 나타내는 외부 척골을 갖는 약간 비정상적인 상태; 2 - 임의의 3 내지 5 개의 골 미란을 나타내는 외부 척골을 갖는 뚜렷한 초기 비정상적인 상태; 3 - 임의의 하나 또는 2 개의 뚜렷한 골 미란을 나타내는 외부 척골뿐만 아니라 모든 외부 척골을 갖는 중간 파괴적인 비정상 상태; 4 - 뚜렷한 골 미란을 나타내는 모든 척골 및 하나 이상의 완전히 미란되어 부분적으로 보존된 일부 골 관절 윤곽을 남기는 내부 척골 관절을 갖는 중증의 파괴적인 비정상 상태; 5 - 골 윤곽이 없는 절단 비정상 상태. 상기 득점 시스템은 문헌[Salvemini et al., 2001; Bush et al., 2002; Sims et al., 2004; Jou et al., 2005]의 변형이다.
- [0400] 3.1.8 조직학
- [0401] 방사선학 분석 후, 마우스의 뒷발을 10% 포스페이트-완충된 포르말린(pH 7.4)에 고정시키고, 미세 조직학을 위해 빠른 골 칼슘제거제(Laboratories Eurobio)로 칼슘을 제거하고 파라핀에 묻었다. 상기 관절염 관절의 광범위한 평가를 확실히 하기 위해서, 4 개 이상의 일련의 구획(5 μm 두께)을 절단하고 일련의 각 구획들의 사이를 100 μm 로 하였다. 상기 구획들을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 활액 염증 및 뼈 및 연골 손상에 대한 조직학적 검사를 이중 맹검법으로 수행하였다. 각각의 발에서, 4 개의 매개변수를 4-점 등급으로 평가하였다. 상기 매개변수들은 세포 침윤, 판누스 중증도, 연골 미란 및 골 미란이었다. 득점을 하기와 같이 수행하였다: 1 - 정상, 2 - 순함, 3 - 보통, 4 - 현저함. 이들 4 개의 점수를 합산하고 추가적인 점수, 즉 'RA 총점'으로 나타내었다.
- [0402] 3.1.9 종골(발꿈치 뼈)의 미세 컴퓨터 단층촬영(μCT) 분석
- [0403] RA에서 관찰된 골 퇴화는 특히 걸질 뼈에서 발생하며 μCT 분석에 의해 밝힐 수 있다(Sims NA et al., Arthritis Rheum. 50(2004) 2338-2346: 졸레드론산에 의한 파골세포의 표적화는 콜라겐-유발된 관절염에서 골 파괴를 방지한다; Oste L et al., ECTC Montreal 2007: 미세-CT 형태측정에 의한 쥐 CIA 모델에서 골 구조 장

에의 측정을 위한 고도의 자료처리 방법). 상기 종골의 스캐닝 및 3D 재건 후에, 골 퇴화를 상기 뼈의 종 방향 축에 수직으로 인실리코 단리한, 슬라이드당 존재하는 구별되는 물체의 수로서 측정하였다. 퇴화된 뼈가 많을 수록, 측정되는 구별되는 물체가 많다. 상기 종골을 따라 고르게 분포된(약 10.8 μm로 이격됨) 1000 개의 슬라이스를 분석한다.

[0404] 3.1.10 정상 상태 PK

[0405] 제7일 또는 제11일에, 혈액 샘플을 하기의 시점들에서 항응고제로서 리튬 헤파린을 사용하여 후-안구 동에서 채혈하였다: 투여 전, 1, 3 및 6 시간. 전혈 샘플을 원심분리하고 생성되는 혈장 샘플을 분석시까지 -20 °C에서 보관하였다. 각 시험 화합물의 혈장 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하였으며, 상기 방법에서 질량 분광계를 양의 전기분무 방식으로 작동시켰다. 약동학 매개변수를 윈놀린(Winonlin)(등록상표)(Pharsight(등록상표), United States)을 사용하여 계산하였으며 이는 투여 전 혈장 수준이 상기 24 시간 혈장 수준과 동일한 것으로 추정되었다.

[0406] 하기 표 5는 본 발명의 화합물 및 비교 실시예에 대해서, 여러 PK 매개변수들에 대해 획득한 결과를 요약하며, 이는 본 발명 화합물의 개선된 PK 성질들(예를 들어 C_{max}, T_{1/2})을 예시한다.

[0407] [표 5]

		화합물 1						화합물 2	
		PO (mg/kg/day)						PO (mg/kg/day)	
		0.1	0.3	1	3	10	30	10	30
C _{max}	(ng/mL)	5.18	19.3	102	363	1,167	3,805	867	2630
T _{max}	(h)	3	1	1	1	1	1	1	1
AUC(0-24h)	(ng h/mL)	30	163	931	1,932	7,172	27,767	2019	7809
T _{1/2}	(h)	NC	NC	3.6	5.6	4.5	3.9	1.17	3.36

[0408]

[0409] 3.1.11 결과

[0410] 하기의 표 6는 래트 CIA 모델에서 화합물 1 및 2에 대해 획득된 결과들을 요약하며, "*"는 점수에 있어서 통계학적으로 의미 있는 개선이 있었음을 가리킨다, p 0.05 대 처리되지 않은 대조군.

[0411] [표 6]

화합물	용량 (mg/kg/day)	임상 평가 [§]		앞발 팽창	라슨 점수
		중점 점수	AUC 점수		
화합물 1	0.1	*	*		
	0.3	*	*	*	
	1	*	*	*	
	3	*	*	*	*
화합물 2	10	*			
	30	*		*	*

[0412]

[0413] § - "임상 점수"는 화합물 1에 대해 획득된 표준화된 AUC 점수/표준화된 중점 점수, 및 화합물 2의 경우는 AUC 점수/중점을 지칭한다)

[0414] 화합물 1은 0.1 mg/kg의 용량에서 표준화된 임상 점수 값(AUC로서 또는 제1일부터 제4일까지의 차이로서 계산됨)에 있어서 통계학적으로 의미 있는 개선을 나타내었다. 또한, 상기 앞발 팽창 관독 및 라슨 점수에 있어서 통계학적으로 의미 있는 증가가 각각 0.3 mg/kg 및 3 mg/kg의 용량에서 나타났다. 대조적으로, 화합물 2는 10 mg/kg의 용량에서 단지 표준화된 임상 점수 값(제14일에)만 통계학적으로 의미 있는 개선을 나타내었다. 또한, 상기 앞발 팽창 관독 및 라슨 점수의 통계학적으로 의미 있는 증가는 30 mg/kg의 용량에서 나타났다. 따라서, 화합물 1은 경구 용량으로 비교할 때 화합물 2에 비해 100 배의 효능 개선을 보인다. 특히 화합물 1의 경우 3 mg/kg의 용량에서, 모든 측정에 있어서 통계학적으로 의미 있는 개선을 나타냈지만, 보다 높은 용량의 화합물 2는 단지 임상 점수에 있어서만 통계학적으로 의미 있는 개선을 생성시켰다. 이러한 생체 내 효능 개선은 상기 AUC(0 내지 2 시간)가, 10 mg/kg/일에서의 화합물 2에 비해 0.1, 0.3 및 1 mg/kg/일에서의 화합물 1의 경우 더 낮음을 알 수 있는 바와 같이 상기 화합물의 증가된 노출 시간에 기인할 수는 없다.

[0415] **실시예 3.2 패혈증 쇼크 모델**

[0416] 리포폴리사카라이드(LPS)의 주사는 용해성 종양 괴사 인자(TNF- α)의 말초 혈관 내로의 빠른 방출을 유도한다. 상기 모델을 사용하여 생체 내 TNF 방출의 가망 있는 차단제들을 분석한다.

[0417] 그룹당 6 마리의 BALB/cJ 암컷 마우스(20 g)를 1 회 목적하는 용량으로 처리한다. po. 30 분 후에, LPS(15 μ g/kg; 이 콜라이 혈청형 0111:B4)를 ip 주사한다. 90 분 후에, 마우스를 안락사시키고 채혈한다. 순환하는 TNF 알파 수준을 상업적으로 입수할 수 있는 ELISA 키트를 사용하여 측정한다. 텍사메타손(5 μ g/kg)을 표준 소염 화합물로서 사용한다. 선택된 화합물들을 1 회 또는 수 회 용량, 예를 들어 3 및/또는 10 및/또는 30 mg/kg, po에서 시험한다.

[0418] 화합물 1, 2 및 10은 30 mg/kg, po의 용량에서 활성이었다.

[0419] **실시예 3.3 MAB 모델**

[0420] 상기 MAB 모델은 치료제에 의한 RA-형 염증 반응의 변화에 대한 빠른 평가를 허용한다(Kachigian LM. Nature Protocols(2006) 2512-2516: 콜라겐 항체-유발된 관절염). DBA/J 마우스에게 콜라겐 II에 대한 mAb의 각테일을 iv 주사하였다. 1일 후에, 화합물 처리를 개시하였다(비히클: 10% (v/v) HP β CD). 3일 후에, 마우스에게 LPS(50 μ g/마우스)를 ip 주사하여, 염증을 빨리 발병시켰다. 상기 mAb 주사 후 10일까지 화합물 처리를 계속하였다. 앞발 종창을 측정하고 각 발의 임상 점수를 기록하여 염증을 판독하였다. 사지의 누적된 임상 관절염 점수로 염증의 중증도를 나타내었다. 득점 시스템을 0 내지 4의 등급으로 각 수족에 적용하며, 이때 4는 가장 심한 염증이다.

[0421] 0 증상 없음

[0422] 1 관절, 예를 들어 발목 또는 손목의 한 가지 유형의 순하지만, 뚜렷한 발적 및 종창, 또는 감염된 손 발가락의 수와 상관없이, 개별적인 손 발가락으로 제한된 명백한 발적 및 종창

[0423] 2 관절의 2 가지 이상 유형의 보통의 발적 및 종창

[0424] 3 손 발가락을 포함한 전체 발의 심한 발적 및 종창

[0425] 4 다수의 관절을 포함한 최대로 염증을 일으킨 사지.

[0426] **실시예 3.4 종양학 모델**

[0427] JAK2-유발된 골수증식성 질병에 대한 소 분자들의 효능을 확인하기 위한 시험관 내 및 생체 내 모델이 문헌 [Wernig et al. Cancer Cell 13, 311, 2008] 및 [Geron et al. Cancer Cell 13, 321, 2008]에 개시되어 있다.

[0428] **실시예 3.5 마우스 IBD 모델**

[0429] IBD에 대한 소 분자들의 효능을 확인하기 위한 시험관 내 및 생체 내 모델이 문헌[Wirtz et al. 2007]에 개시되어 있다.

[0430] **실시예 3.6 마우스 천식 모델**

[0431] 천식에 대한 소 분자들의 효능을 확인하기 위한 시험관 내 및 생체 내 모델이 문헌[Nials et al., 2008; Ip et al. 2006; Pernis et al., 2002; Kudlacz et al., 2008]에 개시되어 있다.

[0432] **실시예 4: 약동학, DMPK 및 독성 분석**

[0433] **실시예 4.1 열역학적 용해도**

[0434] 시험 화합물 1 mg/ml의 용액을 유리 바이알 중에서 실온에서 0.2M 포스페이트 완충액 pH 7.4 또는 0.1M 시트레이트 완충액 pH 3.0 중에서 제조한다.

[0435] 상기 샘플을 실온에서 24 시간 동안 3.0의 속도로 로테이터(Rotator) 구동 STR 4(Stuart Scientific, Bibby)에서 회전시킨다.

[0436] 24 시간 후에, 상기 샘플 800 μ l를 에펜도르프 튜브로 옮기고 14000 rpm에서 5 분간 원심분리한다. 이어서 상기 샘플의 상등액 200 μ l를 멀티스크린R 용해도 플레이트(Millipore, MSSLBPC50)로 옮기고 상기 상등액을 진공 다기관의 도움으로 깨끗한 그레이너(Greiner) 폴리프로필렌 V-바닥 96 웰 플레이트(Cat no. 651201) 내로 여과한다(10 내지 12" Hg). 상기 여액 5 μ l를 상기 사용된 것과 동일한 완충액 95 μ l(F20)로 희석하여 표준 곡선을

포함하는 플레이트에서 배양한다(Greiner, Cat no. 651201).

[0437] 상기 화합물에 대한 표준 곡선을 DMSO(500 μM) 중의 10 mM DMSO 모액 희석된 인자 2로부터 출발하고 이어서 DMSO 중에서 19.5 μM까지 추가로 희석하여 DMSO 중에서 새로 작성한다. 이어서 5000 μM로부터의 일련의 희석액 3 μl를 97 μl의 아세트나이트릴-완충액 혼합물(50/50)로 옮긴다. 최종 농도 범위는 2.5 내지 150 μM이었다.

[0438] 상기 플레이트를 밀봉 매트(MA96RD-04S, www.kinesis.co.kr)로 밀봉하고 샘플들을 콰옵티마이즈(Quanoptimize)를 사용하여 최적화된 조건 하에 LCMS(Waters로부터 ZQ 1525) 상에서 실온에서 측정하여 상기 분자의 적합한 질량을 측정한다.

[0439] 상기 샘플들을 1 ml/분의 유속으로 LCMS 상에서 분석한다. 용매 A는 15 mM 암모니아이고 용매 B는 아세트나이트릴이다. 상기 샘플을 XBridge C18 3.5 μM(2.1 x 30 mm) 컬럼(Waters로부터) 상에서 양 이온 분무 하에 실행한다. 용매 구배는 2 분의 총 실행 시간을 가지며 5% B에서부터 95% B의 범위이다.

[0440] 피크 면적을 Masslynx 소프트웨어 패키지의 도움으로 분석하고 상기 샘플들의 피크 면적을 상기 표준 곡선에 대해 플롯팅하여 상기 화합물의 용해도를 획득한다.

[0441] 용해도 값을 μM 또는 μg/ml로 기록한다.

[0442] **실시예 4.2 수용해도**

[0443] DMSO 중에서 10 mM 모액으로부터 출발하여, 상기 화합물의 일련의 희석액을 DMSO 중에서 제조한다. 상기 일련의 희석액을 96 NUNC Maxisorb 플레이트 F-바닥(Cat no. 442404)으로 옮기고 실온에서 0.2M 포스페이트 완충액 pH 7.4 또는 0.1M 시트레이트 완충액 pH 3.0을 가한다.

[0444] 최종 농도는 5 회의 동등한 희석 단계로 200 μM에서부터 2.5 μM까지의 범위이다. 최종 DMSO 농도는 2%를 초과하지 않는다. 200 μM 파이렌을 상기 각각의 96 웰 플레이트의 모서리 점들에 가하며 이는 현미경 상에서 Z-축의 눈금화를 위한 기준점으로서 작용한다.

[0445] 상기 분석 플레이트를 밀봉하고 230 rpm에서 진탕하면서 37 °C에서 1 시간 동안 배양한다. 이어서 상기 플레이트를 백색광 현미경 하에서 스캐닝하여, 농도당 침전물의 개별적인 그림을 제공한다. 상기 침전물을 분석하고 이를 그래프 상에 플롯팅된 숫자로 전환하였다. 상기 화합물이 완전히 용해된 것으로 보이는 첫 번째 농도를 기록하나, 진정한 농도는 상기 농도와 더 높은 하나의 희석 단계 사이의 어딘 가에 놓인다.

[0446] 용해도 값을 μg/ml로 기록한다.

[0447] [표 7]

화합물 #	pH3.0 (μg/mL)	pH7.4 (μg/mL)
1	>85	>85
2	>38	>38
10	>87.9	>87.9

[0448]

[0449] **실시예 4.3 혈장 단백질 결합(평형 투석)**

[0450] DMSO 중의 10 mM 화합물 모액을 DMSO 중에서 인자 5로 희석한다. 상기 용액을 새로 해동된 인간, 래트, 마우스 또는 개 혈장(BioReclamation INC) 중에서 10 μM의 최종 농도 및 0.5%의 최종 DMSO 농도(PP-Masterblock 95 웰(Greiner, Cat no. 780285) 중의 1094.5 μl 혈장 중 5.5 μl)로 추가 희석한다.

[0451] 삼입물을 갖는 피어스 레드 디바이스(Pierce Red Device) 플레이트(ThermoScientific, Cat no. 89809)를 제조하고 완충액 챔버 중의 PBS 750 μl 및 혈장 챔버 중의 상기 첨가된(spiked) 혈장 500 μl로 채운다. 상기 플레이트를 230 rpm에서 진탕하면서 37 °C에서 4 시간 동안 배양한다. 배양 후, 상기 두 챔버 모두의 120 μl를 96-웰 환저, PP 깊은-웰 플레이트(Nunc, Cat no. 278743) 중의 360 μl 아세트나이트릴로 옮기고 알루미늄 호일 뚜껑으로 밀봉한다. 상기 샘플들을 혼합하고 30 분간 얼음 상에 둔다. 이어서 상기 플레이트를 4 °C에서 1200 rcf에서 30 분 원심분리하고 상등액을 LCMS 상에서 분석을 위해 96 v-바닥 PP 플레이트(Greiner, 651201)로 옮긴다.

[0452] 상기 플레이트를 www.kinesis.co.uk의 밀봉 매트(MA96RD-04S)로 밀봉하고 샘플들을 콰옵티마이즈를 사용하여 최

적화된 조건 하에 LCMS(Waters로부터 ZQ 1525) 상에서 실온에서 측정하여 상기 분자의 적합한 질량을 측정한다.

[0453] 상기 샘플들을 1 ml/분의 유속으로 LCMS 상에서 분석한다. 용매 A는 15 mM 암모니아이고 용매 B는 아세트나이트릴이다. 상기 샘플을 XBridge C18 3.5 μM(2.1 x 30 mm) 컬럼(Waters로부터) 상에서 양 이온 분무 하에 실행한다. 용매 구배는 2 분의 총 실행 시간을 가지며 5% B에서부터 95% B의 범위이다.

[0454] 상기 완충액 챔버 및 혈장 챔버 중의 상기 화합물로부터의 피크 면적은 100% 화합물인 것으로 간주한다. 혈장에 결합된 퍼센트를 상기 결과로부터 획득하고 이를 혈장에 결합된 퍼센트로서 LIMS에 보고한다.

[0455] PBS에 대한 최종 시험 농도의 화합물의 용해도를 현미경으로 검사하며 이는 침전의 관측 유무를 나타낸다.

[0456] [표 8]

화합물 #	인간 (%)	랫트 (%)
1	76.4	65.7
2	70.5	64.5
10	n/a	51
11	91.25	76.5

[0457]

[0458] **실시예 4.4 마이크로솜 안정성**

[0459] DMSO 중의 10 mM 화합물 모액을 96 깊은 웰 플레이트(Greiner, Cat no. 780285) 중의 182 mM 포스페이트 완충액 pH 7.4로 1000 배 희석하고 37 °C에서 예비 배양하였다.

[0460] 40 μl의 탈이온수를 폴리프로필렌 매트릭스 2D 바코드 표지된 보관 튜브(Thermo Scientific)의 웰에 가하고 37 °C에서 예비배양하였다.

[0461] 글루코스-6-포스페이트-데하이드로게나제(G6PDH) 실행 모액을 182 mM 포스페이트 완충액 pH 7.4 중에서 제조하고 사용 전에 얼음 상에 두었다. MgCl₂, 글루코스-6-포스페이트 및 NADP+를 함유하는 보조-인자를 탈이온수 중에서 제조하고 사용 전에 얼음 상에 두었다.

[0462] 관심 종(인간, 마우스, 랫트, 개)의 간 마이크로솜(Xenotech)을 함유하는 최종 실행 용액, 앞서 개시된 G6PDH 및 보조-인자를 제조하고 상기 혼합물을 실온에서 20 분 이하로 배양하였다.

[0463] 30 μl의 상기 예비-배양된 화합물 희석액을 상기 매트릭스 튜브 중의 예열된 물 40 μl에 가하고 30 μl의 상기 마이크로솜 혼합물을 가하였다. 최종 반응 농도는 3 μM 화합물, 1 mg 마이크로솜, 0.4 U/ml GDPDH, 3.3 mM MgCl₂, 3.3 mM 글루코스-6-포스페이트 및 1.3 mM NADP+이었다.

[0464] 0 시간째에 남아있는 화합물의 퍼센트를 측정하기 위해서 상기 마이크로솜 혼합물 첨가 전에 MeOH 또는 ACN을 상기 웰에 가하였다(1:1). 상기 플레이트를 매트릭스 세프라 실즈(Matrix Septra seals)TM(Matrix, Cat. No. 4464)으로 밀봉하고 수 초간 진탕시켜 모든 화합물들이 완전히 혼합되게 한다.

[0465] 중지되지 않은 샘플들을 37 °C, 300 rpm에서 배양하고 1 시간 배양 후에 상기 반응을 MeOH 또는 ACN(1:1)으로 중지시켰다.

[0466] 상기 반응을 중지시킨 후에 상기 샘플들을 혼합하고 30 분간 얼음 상에 두어 단백질을 침전시켰다. 이어서 상기 플레이트를 4 °C, 1200 rcf에서 30 분 원심분리하고 상등액을 LCMS 상에서 분석을 위해 96 v-바닥 PP 플레이트(Greiner, 651201)로 옮겼다.

[0467] 상기 플레이트를 www.kinesis.co.uk의 밀봉 매트(MA96RD-04S)로 밀봉하고 샘플들을 콤팩티마이저를 사용하여 최적화된 조건 하에 LCMS(Waters로부터 ZQ 1525) 상에서 실온에서 측정하여 상기 모 분자의 적합한 질량을 측정하였다.

[0468] 상기 샘플들을 1 ml/분의 유속으로 LCMS 상에서 분석하였다. 용매 A는 15 mM 암모니아이고 용매 B는 사용된 중지 용액에 따라 메탄올 또는 아세트나이트릴이었다. 상기 샘플을 XBridge C18 3.5 μM(2.1 x 30 mm) 컬럼(Waters로부터) 상에서 양 이온 분무 하에 실행하였다. 용매 구배는 2 분의 총 실행 시간을 가지며 5% B에서부터 95% B의 범위이다.

[0469] 0 시간째에 상기 모 화합물로부터의 피크 면적은 100% 화합물인 것으로 간주하였다. 1 시간 배양 후에 남아있는 퍼센트를 0 시간째로부터 계산하고 남아있는 퍼센트로서 계산하였다. 완충액에 대한 최종 시험 농도의 화합

물의 용해도를 현미경으로 검사하고 결과를 기록한다.

[0470] 마이크로솜 안정성에 대한 데이터를 60 분 후에 남아있는 화합물의 총량의 퍼센트로서 나타낸다.

[0471] [표 9]

화합물 #	인간 (%)	랫트 (%)
1	87.2	65.6
2	73	38
10	102	89
11	51	26

[0472]

[0473] **실시예 4.5 Caco2 침투성**

[0474] 양방향 Caco-2 분석을 하기 개시하는 바와 같이 수행하였다. Caco-2 세포를 유러피안 콜렉션 오브 셀 컬처 (ECACC, cat 86010202)로부터 수득하고 24-웰 트랜스웰 플레이트(Fisher TKT-545-020B)에서 21일 세포 배양 후 사용하였다.

[0475] 2×10^5 세포/웰을 DMEM + GlutaMAX1 + 1% NEAA + 10% FBS(FetalClone II) + 1% Pen/Strep으로 이루어진 도말 배지에 시딩하였다. 상기 배지를 매 2 내지 3일마다 교환하였다.

[0476] 시험 및 비교 화합물(프로프라놀롤 및 로다민123 또는 빈블라스틴, 모두 Sigma로부터 구입하였다)을 25 mM HEPES(pH 7.4)를 함유하는 헵크의 균형 염 용액 중에서 제조하고 상기 트랜스웰 플레이트 조립체의 정점(125 μ l) 또는 기저측면(600 μ l) 챔버에 0.25%의 최종 DMSO 농도로 10 μ M의 농도로 가하였다.

[0477] 50 μ M 루시퍼 엘로우(Sigma)를 모든 웰 중의 공여 완충액에 가하여 루시퍼 엘로우 침투를 모니터링함으로써 상기 세포층의 보전을 평가하였다. 루시퍼 엘로우(LY)는 친지성 장벽을 자유롭게 침투할 수 없기 때문에, 높은 정도의 LY 수송은 상기 세포층의 불량한 보전을 가리킨다.

[0478] 150 rpm에서 케도 진탕기에서 진탕시키면서 37 °C에서 1 시간 배양 후에, 70 μ l 분액을 상기 정점(A) 및 기저 (B) 챔버 모두로부터 취하고 96 웰 플레이트 중의 분석학적 내부 표준(0.5 μ M 카바마제핀)을 함유하는 50:50 아세트나이트릴:수 용액 100 μ l에 가하였다.

[0479] 루시퍼 엘로우를, 기저측면 및 정점 면으로부터의 150 μ l의 액체를 함유하는 깨끗한 96 웰 플레이트 중의 스펙 트라맥스 제미니(Spectramax Gemini) XS(Ex 426 nm 및 Em 538 nm)로 측정하였다.

[0480] 상기 샘플 중의 화합물 농도를 고성능 액체-크로마토그래피/질량 분광학(LC-MS/MS)에 의해 측정하였다.

[0481] 겉보기 침투성(P_{app}) 값을 하기의 관계로부터 계산하였다:

[0482]
$$P_{app} = [\text{화합물}]_{\text{최종 수용체}} \times V_{\text{수용체}} / ([\text{화합물}]_{\text{초기 공여체}} \times V_{\text{공여체}}) / T_{inc} \times V_{\text{공여체}} / \text{표면적} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

[0483] V = 챔버 부피

[0484] T_{inc} = 배양 시간

[0485] 표면적 = 0.33 cm^2

[0486] 상기 정점 세포 표면으로부터 능동 배출의 표시로서, 배출 비를 $P_{appB} > A / P_{appA} > B$ 의 비를 사용하여 계산하였다.

[0487] 하기의 분석 허용 기준을 사용하였다:

[0488] 프로프라놀롤: $P_{app}(A > B)$ 값 $\geq 20 (x 10^{-6} \text{ cm/s})$

[0489] 로다민 123 또는 빈블라스틴: $P_{app}(A > B)$ 값 $< 5 (x 10^{-6} \text{ cm/s})$ (이때 배출 비 ≥ 5).

[0490] 루시퍼 엘로우 침투성: $\leq 100 \text{ nm/s}$

[0491] [표 10]

화합물 #	$P_{app}^{A \rightarrow B}$ ($\times 10^{-6}$ cm/sec)	배출비
1	3.33	15.7
2	25	0.95
10	0.05	97.6
11	36.5	0.9

[0492]

[0493] 실시예 4.6 설치류에서 약동학 연구

[0494] 4.6.1 동물

[0495] 스프래그 다우리 래트(수컷, 5 내지 6 주된 것)를 장비에(Janvier)(France)로부터 얻었다. 래트를 치료 전에 7 일 이상 순응시키고 12 시간 명/암 주기(0700-1900)로 유지시켰다. 온도를 대략 22 °C에서 유지시키고, 먹이 및 물을 자유롭게 제공하였다. 화합물 1 및 2의 투여 2일 전에, 래트를 아이소플루란 마취 하에 수술하여 카테터를 경정맥에 넣었다. 상기 수술 후에, 래트를 개별적으로 수용하였다. 래트에게서 경구 투여 전 16 시간 이상 및 투여 후 6 시간 동안 먹이를 빼앗았다. 물은 자유롭게 제공하였다.

[0496] 4.6.2 약동학 연구

[0497] 화합물을 정맥 내 경로의 경우 PEG200/생리식염수(60/40) 혼합물 중에서, 경구 경로의 경우 0.5% 메틸셀룰로스(화합물 1 및 2) 및 10% 하이드록실프로필-β-사이클로덱스트린 pH 3(화합물 11) 중에서 제형화하였다. 시험 화합물을 5 ml/kg의 투여 부피 하에서 단일의 식도 위관영양으로서 5 mg/kg으로 경구 투여하고 5 ml/kg의 투여 부피 하에서 미정맥을 통한 일시주사로서 1 mg/kg으로 정맥 내 투여하였다. 각 그룹은 3 마리의 래트로 이루어졌다. 화합물 1 및 2의 경우 혈액 샘플을 경정맥을 통해서 항응고제로서 리튬 헤파린을 사용하여 하기의 시점에서 채혈하였다: 0.05, 0.25, 0.5, 1, 3, 5 및 8 시간(정맥 내 경로), 및 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 8 및 24 시간(경구 경로). 화합물 11의 경우, 혈액 샘플을 후-안구 동에서 항응고제로서 리튬 헤파린을 사용하여 하기의 시점에서 채혈하였다: 0.25, 1, 3 및 6 시간(경구 경로). 전혈 샘플을 5000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 생성되는 혈장 샘플을 분석시까지 -20 °C에서 보관하였다.

[0498] 4.6.3 혈장 중의 화합물 수준의 정량화

[0499] 각 시험 화합물의 혈장 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하며 여기에서 질량 분광계를 양의 전기분무 방식으로 작동시켰다.

[0500] 4.6.4 약동학적 매개변수의 측정

[0501] 약동학적 매개변수를 윈논린(등록상표)(Pharsight(등록상표), United States)을 사용하여 계산하였다.

[0502] [표 11]

	화합물 1		화합물 2		화합물 11
	IV 1 mg/kg (n=3)	PO 5mg/kg (n=3)	IV 1 mg/kg (n=3)	PO 5mg/kg (n=3)	PO 5 mg/kg (n=3)
CD or Cmax (ng/mL)	1407 (28)	310 (33)	863(4)	1320 (42)	547 (8)
Tmax (h)		2.2 [0.5-5]		0.33 [0.25-0.5]	0.25 [0.25-0.25]
AUC(0-z) (ng.h/mL)	722 (2)	1429 (24)	470 (5)	1437 (33)	690 (23)
AUC (0-24h) (ng.h/mL)	739 (2)	1681 (8)	474 (5)	1465 (30)	
Cl	1.35 (2)		2.12 (5)		
Vss	1.76 (3)		1.46 (4)		
TL/2	1.6 (3)		0.74 (8)	0.92 (57)	0.92 (7)
F (%)	45		62		

[0503]

[0504] **실시예 4.7 7-일 래트 독성 연구**

[0505] 시험 화합물을 사용한 7-일 경구 독성 연구를 스프래그-다우리 수컷 래트에서, 100, 300 및 500 mg/kg/일의 1일 용량으로, 위관영양에 의해, 5 ml/kg/일의 일정한 투여량-부피로 상기 래트의 독성 가능성 및 독성동태학을 평가한다.

[0506] 상기 시험 화합물을 정제 수 중의 30%(v/v) HPβCD 중에서 제형화한다. 각각의 그룹은 5 마리의 주 수컷 래트 뿐만 아니라 독성동태학을 위한 3 마리의 보조 동물을 포함하였다. 네 번째 그룹에게 오직 수 중의 30%(v/v) HPβCD를, 동일한 회수, 투여량 부피로, 동일한 투여 경로에 의해 제공하며, 이는 비히클 대조군으로서 작용한다.

[0507] 상기 연구의 목적은 부작용이 확인되지 않는 최저 용량을 측정하는 것이다(관찰할 수 있는 부작용 수준이 없음 - NOAEL).

[0508] **실시예 4.8 간세포 안정성**

[0509] 간세포에서 대사 제거를 평가하기 위한 모델이 문헌[McGinnity et al. Drug Metabolism and Disposition 2008, 32, 11, 1247]에 개시되어 있다.

[0510] **실시예 4.9 QT 연장을 위한 의무**

[0511] QT 연장에 대한 가능성을 hERG 패치 클램프 분석에서 평가하였다.

[0512] 통상적인 전-세포 패치-클램프

[0513] 전-세포 패치-클램프 기록을 펄스(Pulse) v8.77 소프트웨어(HEKA)에 의해 조절되는 EPC10 증폭기를 사용하여 수행하였다. 일련의 저항은 전형적으로는 10 MΩ 미만이고 60% 초과까지 보정되며, 기록들을 누락하지 않았다. 전극은 GC150TF 피펫 유리(Harvard)로부터 제작되었다.

[0514] 외부 욕 용액은 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM 글루코스, 10 mM HEPES, pH 7.4를 함유하였다.

[0515] 내부 패치 피펫 용액은 100 mM K 글루코네이트, 20 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM Na₂ATP, 2 mM 글루타치온, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.2를 함유하였다.

[0516] 약물들을 바이오로직 MEV-9/EVH-9 고속 관류 시스템을 사용하여 관류시켰다.

[0517] 모든 기록을 hERG 채널을 안정하게 발현하는 HEK293 세포 상에서 수행하였다. 세포를 2 개의 백금 막대(Goodfellow)를 사용하여 기록 챔버 중에 고정시킨 12 mm 둥근 커버슬립(German glass, Bellco) 상에서 배양하였다. hERG 전류를 1000 분 동안 +40 mV로의 활성화 펄스에 이어서 2000 분간 -50 mV로의 꼬리 전류 펄스를 사

용하여 발생시키며, 유지 포텐셜은 -80 mV이었다. 펄스를 매 20 초마다 적용하고 모든 실험을 실온에서 수행하였다.

[0518]

결과

[0519]

예를 들어, 상기 분석이 가해졌을 때, 상기 측정된 화합물 1의 IC₅₀은 150 μM 초과였다.

[0520]

일반적인 결론

[0521]

본 출원에 제공된 데이터는 화합물 1(본 발명의 화합물)이 구조적으로 유사한 화합물에 비해 현저하게 개선된 생체 내 효능을 발휘함을 입증한다. 이러한 개선은, 특히 이들 구조적으로 유사한 화합물들 중 다수가 JAK1 및 JAK2에 대해 매우 유사한 시험관 내 효능을 발휘하므로, 뜻밖이며 당해 분야의 숙련가에 의해 예측될 수 없었다.

[0522]

당해 분야의 숙련가들은 상기 설명이 사실상 예시적이고 설명적이며, 본 발명 및 그의 바람직한 실시태양들을 예시하고자 하는 것임을 알 것이다. 통상적인 실험을 통해, 숙련가는 본 발명의 진의로부터 이탈됨 없이 수행될 수 있는 자명한 변경 및 변화들을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명을 상기 설명에 의해서가 아니라, 하기 청구의 범위 및 이의 등가물에 의해서 한정하고자 한다.

[0523]

참고문헌

[0524]

Choy EH, Panayi GS. (2001). N Engl J Med. 344: 907-16.

[0525]

Chubinskaya Sand Kuettner KE (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. The international journal of biochemistry & cell biology 35(9)1323-1340.

[0526]

Clegg DO et al. (2006) N Engl J Med. 2006 354:795-808. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis.

[0527]

Firestein GS. (2003). Nature. 423:356-61.

[0528]

Lee DM, Weinblatt ME (2001). Lancet. 358: 903-11.

[0529]

Legendre F, Dudhia J, Pujol J-P, Bogdanowicz P. (2003) JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. J Biol Chem. 278(5)2903-2912.

[0530]

Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. (2001) Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires janus kinase/STAT signaling pathway. (2001) J Immuno 166:3491-3498.

[0531]

O'Dell JR. (2004) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 350(25):2591-602.

[0532]

Osaki M, Tan L, Choy BK, Yoshida Y, Cheah KSE, Auron PE, Goldring MB. (2003) The TATAcontaining core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-γ mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1α, JAK1 and JAK2. Biochem J 369:103-115.

[0533]

Otero M, Lago R, Lago F, Gomez Reino JJ, Gualillo O. (2005) Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. Arthritis Research & Therapy 7:R581-R591.

[0534]

Sims NA et al., (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collageninduced arthritis, Arthritis Rheum. 50:2338-2346:

[0535]

Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L,

[0536]

Pennica D, Johnson EM, Schreiber RD. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine-induced biologic responses Cell 93: 373-383.

[0537]

Smolen JS, Steiner G. (2003). Nat Rev Drug Discov. 2: 473-88.

[0538]

Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. (2005). Nat Rev Drug Discov. 4:331-44.

Osteoarthritis - an untreatable disease?

- [0539] Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383
- [0540] Constantinescu et al., 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3): 122-131
- [0541] Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadimitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (suppI3):S233-S242
- [0542] O'Shea J. *et al.* *Nature Review Drug Discovery* 3 (2004) 555-564: A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway
- [0543] Vainchenker W. et al. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (2008) 385-393: JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immune deficiencies
- [0544] Levy D. and Loomis C. *New England Journal of Medicine* 357 (2007) 1655-1658: STAT3 signaling and the Hyper-IgE-syndrome
- [0545] Wernig *et al.* (2008) Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera, *Cancer Cell* 13(4), 311-320
- [0546] Geron *et al.* (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors *Cancer Cell* 13 (4), 321-30
- [0547] Wirtz *et al.* (2007) *Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073-1083:
- [0548] Nials *et al.* (2008) *Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge*, *Disease Models & Mechanisms*, 213-220.
- [0549] Ip *et al.* (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways, *Clin. Exp. Immun.*, 162-172.
- [0550] Pernis *et al.* (2002) JAK-STAT signaling in asthma *J. Clin. Invest.* 1279.
- [0551] Kudlacz *et al.* (2008) The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia, *Eur J Pharmacol* 154-161.
- [0552] Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen I-M, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP, Willmann CL; (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *PNAS* May 22. [Epub ahead of print]
- [0553] Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. (1998) Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1:245-51.
- [0554] Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. (2002) Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 46: 802-5.
- [0555] Jou IM, Shiau AL, Chen SY, Wang CR, Shieh DB, Tsai CS, Wu CL. (2005) Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52:339-44.
- [0556] Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, Yoshida A, Yamana J, Yamamura M, Ninomiya Y, Inoue H, Asahara H. (2004) Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 10: 3365-76.
- [0557] Rall LC, Roubenoff R. (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology*; 10:1219-23.

- [0558] Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. (2001) Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 44:2909-21.
- [0559] Shelton DL, Zeller J, Ho WH, Pons J, Rosenthal A. (2005) Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain.* 116:8-16.
- [0560] Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlict S, Martin TJ, Gillespie MT, Romas E. (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 50: 2338-46.
- [0561] Walsmith J, Abad L, Kehayias J, Roubenoff R. (2004) Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*; 31:23-9.
- [0562] Khachigian, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. (2006) *Nature Protocols* 1,2512-6.s
- [0563] Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clement-Lacroix P. (2007) Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* Apr; 150 (7):829-31.
- [0564] McGinnity *et al.* *Drug Metabolism and Disposition* **2008,32,11**, 1247.
- [0565] 비 제한적으로 본 명세서에 인용된 특허 및 특허 출원들을 포함하여 모든 공보들은, 각각의 개별적인 공보가 충분히 나열된 바와 같이 본 발명에 인용됨을 구체적이고 개별적으로 가리키는 것처럼 본 발명에 참고로 인용된다.
- [0566] 상기 설명으로부터, 본 발명의 조성물 및 방법의 다양한 변경 및 변화가 당해 분야의 숙련가들에게 떠오를 것이다. 첨부된 청구의 범위 내에 있는 모든 상기와 같은 변경들을 상기 중에 포함시키고자 한다.
- [0567] 다양한 화합물들의 차별적인 세포 침투 능력과 같은 인자들이 시험관 내 생화학 및 세포 분석에서 상기 화합물들의 활성 간의 불일치에 원인이 될 수 있음은 물론이다.
- [0568] 본 출원에 제공되고 나열된 바와 같은 본 발명 화합물들의 화학 명칭 중 적어도 일부는 상업적으로 입수할 수 있는 화학 명명 소프트웨어 프로그램의 사용에 의해 자동적으로 생성될 수도 있다. 상기 기능을 수행하는 전형적인 프로그램은 오픈 아이 소프트웨어 인코포레이티드(Open Eye Software, Inc.)에 의해 판매되는 렉시켄(Lexichem) 명명 도구 및 MDL 인코포레이티드에 의해 판매되는 오토놈(Autonom) 소프트웨어 도구를 포함한다. 상기 나타난 화학명 및 도시된 구조가 상이한 경우, 상기 도시된 구조는 조절될 것이다.
- [0569] 본 발명에 나타난 화학 구조는 ChemDraw(등록상표) 또는 ISIS(등록상표)/DRAW를 사용하여 제조되었다. 본 발명의 화학식들에 나타난 탄소, 산소 또는 질소 원자 상에 존재하는 임의의 개방 원자가는 수소 원자의 존재를 가리킨다. 화학식 중에 키랄 중심이 존재하지만 상기 키랄 중심에 대해 구체적인 입체화학을 나타내지 않은 경우, 상기 키랄 구조와 관련된 2 개의 거울상이성체가 모두 상기 구조에 포함된다.