 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0127307 (43) 공개일자 2014년11월03일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 31/501</i> (2006.01) <i>A61K 31/5377</i> (2006.01) <i>A61P 31/14</i> (2006.01) <i>A61P 43/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-7024991 (22) 출원일자(국제) 2013년02월04일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2014년09월04일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/052112 (87) 국제공개번호 WO 2013/117503 국제공개일자 2013년08월15일 (30) 우선권주장 61/595,293 2012년02월06일 미국(US) 61/702,854 2012년09월19일 미국(US)	(71) 출원인 글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 (넘버 2) 리미티드 영국 티더블유8 9지애스 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드 980 (72) 발명자 우스터, 리차드 프란시스 미국 19426-0989 펜실베이니아 칼리지빌 피오 박스 5089 사우스 칼리지빌 로드 1250 글락소스미스클라인 루키, 폴린 테레사 영국 에스퀴1 2엔와이 스티브니퀴 허트포드셔 건넬스 우드 로드 글락소스미스클라인 멜런스, 패트릭 존 톰슨 영국 티더블유8 9지애스 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드 980 글락소스미스클라인 (74) 대리인 특허법인 남앤드남
전체 청구항 수 : 총 6 항	
(54) 발명의 명칭 섬유성 질병을 치료하기 위한 PI3K 억제제	

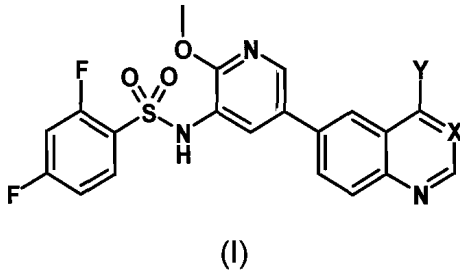
(57) 요약

본 발명은 특발성 폐섬유증(IPF)과 같은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

섬유성 질병(fibrotic disease)의 치료에 사용하기 위한 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



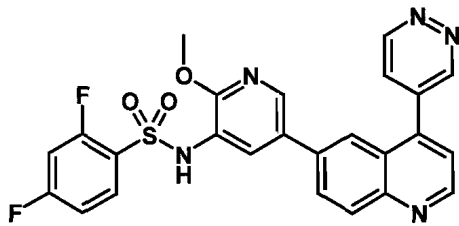
상기 식에서,

X는 -CH-이고, Y는 4-피리다지닐이거나;

X는 -N-이고, Y는 4-모르폴리닐이다.

청구항 2

섬유성 질병의 치료에 사용하기 위한 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



청구항 3

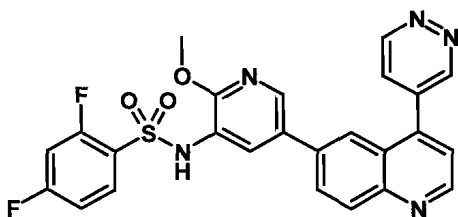
제 2항에 있어서, 화합물이 유리 염기로서 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드인 화합물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 섬유성 질병이 특발성 폐 섬유증(IPF)인 화합물.

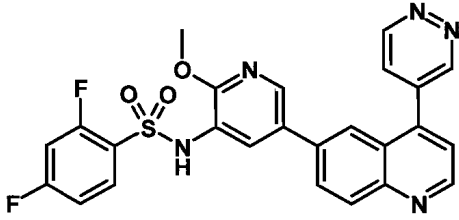
청구항 5

섬유성 질병의 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도:



청구항 6

안전하고 효과적인 양의 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설폰아미드의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법:



명세서

기술분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 섬유성 질병, 특히 특발성 폐 섬유증(이하, IPF)의 치료에 사용하기 위한, PI3K α , PI3K β , PI3K γ 및 PI3K δ 를 포함하는 포스포이노시티드 3'OH 키나제 패밀리(이하, PI3K), 및 PI3K 다운스트림 신호전달 표적인 라파마이신의 포유동물 표적(이하, mTOR)의 활성 또는 기능의 억제제인 화합물 및 이의 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 섬유성 질병은 회복 또는 반응 과정에서 기관 또는 조직 내의 과도한 섬유성 결합조직의 형성을 수반한다. 이러한 섬유성 질병은 IPF, 폐섬유증, 간질성 폐 질병, 비특이적 간질성 폐렴(NSIP), 통상성 간질성 폐렴 (UIP), 심내막 심근 섬유증, 종격 섬유증, 골수섬유증, 후복막 섬유증, 진행성 종괴성 섬유증(석탄 작업자 진폐증의 합병증), 신원성 전신 섬유증, 크론병, 진구성 심근경색증, 피부경화증/전신 경화증, 신경섬유증증, 헤르만스키-푸들라크 증후군, 당뇨병성 신장 섬유증, 신장 섬유증, 비대심근병증(HCM), 고혈압-관련 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 방사선-유도 섬유증, 자궁근종(fibroids), 알코올성 간질환, 간 지방증, 간 섬유증, 간경변증, C형 간염 바이러스(HCV) 감염, 만성 기관 이식 거부, 피부의 섬유성 질환, 켈로이드 반흔, 뒤뮈트랑 구축, 엘러스-단로스 증후군, 이영양성 표피 수포증, 구강 점막하 섬유증, 및 섬유-증식 장애를 포함한다.

[0005] IPF는 환자 예후가 불량하고, 5년 미만의 통상적인 생존 기간을 갖는 급성 및 만성 호흡기 장애의 이종성 그룹의 최종-단계이다. IPF의 기본 병변은 아포토시스에 대해 내성인 것으로 보이는 과증식 섬유모세포 및 근육섬유모세포의 밀집한 코어를 덮는 반응성 및 과다형성 상피 세포 및 공간 폐색(airspace obliteration) 및 호흡기 능부전을 발생시키는 폐 간질 내에 과도한 양의 세포의 기질 단백질 침착으로 구성되는 섬유성 병소이다.

[0006] 클래스 I PI3 키나제는 PtdIn(4,5)P2의 PtdIn(3,4,5)P3로의 전환을 촉매하여, 형질막으로의 다운스트림 신호전달 키나제(가장 특히 AKT)의 보충 및 인산화를 유도하고, 세포 증식, 대사, 성장, 및 생존을 포함하는 필수적인 세포 기능과 관련된 다수의 신호전달 캐스케이드의 활성화를 발생시킨다.

[0007] 클래스 I PI3 키나제 패밀리는 p110 촉매 서브유닛의 서열 및 구조에 의해 구별되는 4개의 별개의 이소형(isoform)(α , β , γ , δ)을 포함한다. 4개의 이소형 중, α 및 β 는 편재적으로 발현되는 반면, γ 및 δ 는 백혈구에 풍부하다. 키나제 사망 α 및 β 이소형을 상동성으로 발현하는 마우스에서 배아 사망이 관찰되는 한편, 이종성 키나제 사망 마우스는 대사 및 혈관 결함과 함께 부분적인 치사를 나타낸다. 발현 패턴과 일치하게, γ 및 δ 이소형의 제거는 면역학적 결함을 발생시킨다. PI3 키나제 활성은 SHIP 포스파타제에 의해 음성적으로 조절되고, 가장 특히 클래스 I PI3 키나제의 경우에는 PTEN에 의해 음성적으로 조절되며, 다양한 종양 환경에서의 암유발성은 p110 돌연변이(p110 α) 또는 과발현(p110 β , γ , δ)으로부터 발생하는 이상조절된 PI3K 신호전달 또는 대안적으로 조절 포스파티세스(regulatory phosphatases)의 감소된 기능성에 의해 증진되는 것이 잘 확립되어 있다.¹

- [0008] 섬유모세포 생존, 증식 및 기질 합성은 섬유증의 병리에서 중심적이며, 이상 PI3 키나제 신호전달이 질병 개시 및 진행 둘 모두에서 중요한 역할을 하여 상기 섬유모세포 기능 각각에 영향을 미칠 가능성이 있다. 이를 뒷받침하여, PI3 키나제는 폐 섬유모세포에서 콜라겐 생성 및 증식과 관련되어 있고², 더욱이 기능적 PTEN 결함으로부터 발생하는 이상조절되는 PI3-키나제 신호전달은 IPF 환자로부터 분리된 일차 폐 섬유모세포에서 과증식성 표현형과 관련되어 있다.^{3,4} 또한, PTEN에 결함이 있는 마우스는 블레오마이신 유도 폐 손상 후에 증가된 섬유증을 나타낸다.³ 피부 섬유증의 환경에서, 전신 경화증을 갖는 환자로부터 분리된 섬유모세포는 증강된 pAKT 신호전달과 관련된 감소된 PTEN 발현을 나타내는 한편, PTEN 조건 녹아웃(knockout) 마우스로부터 분리된 피부 섬유모세포는 콜라겐 1, α -SMA 및 또한 전섬유성 매개체 CTGF의 PI3K 의존성 과발현을 나타낸다.⁵ 간 섬유증의 래트 모델에서, PTEN 발현이 또한 하향 조절되어, 전섬유성 표현형을 부여한다.⁶ TGF β 의 PI3 키나제 신호전달 다운스트림은 일차 인간 폐 섬유모세포의 근육섬유모세포로의 분화와 관련이 있으며⁷, 아포토시스에 대한 내성을 전달하는 것으로 밝혀졌다.⁸ 더욱이, IPF 폐에서 감소되는 항섬유성 매개체 PGE2는 AKT 신호전달 경로의 억제에 의해 섬유모세포 아포토시스를 향상시킨다.⁹
- [0009] 잠재적 바이러스 감염이 유전적 불안정 및 기능장애 복구 메커니즘을 만성적으로 유도하거나, 바이러스 유도 악화를 급성적으로 촉발시킴으로써 폐섬유증의 발병기전에서 보조인자로 작용할 수 있는 것으로 가정되어 왔다.¹⁰ PI3K-Akt 신호전달의 활성화는 급성 및 지속 감염 둘 모두에서 바이러스 침투를 촉진하거나, 아포토시스를 늦추거나, 바이러스 복제를 연장시키기 위해 특정 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 및 인플루엔자 A)에 의해 사용되는 전략이다.¹¹
- [0010] IPF와 같은 섬유성 질병의 치료에서 유용할 수 있는 PI3K 및 mTOR의 활성 또는 기능의 억제제인 화합물을 제공할 필요성이 남아있다.

[0011] 참고문헌

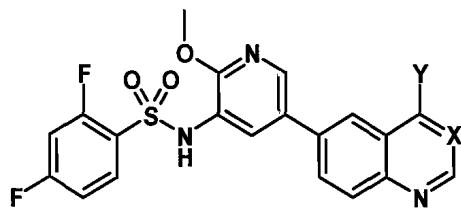
1. Vanhaesebroeck, B., J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, and B. Bilanges. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 11:329-341.
2. Lu, Y., N. Azad, L. Wang, A. K. Iyer, V. Castranova, B. H. Jiang, and Y. Rojanasakul. 2010. Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 42:432-441.
3. Xia, H., D. Diebold, R. Nho, D. Perlman, J. Kleidon, J. Kahm, S. Avdulov, M. Peterson, J. Nerva, P. Bitterman, et al. 2008. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J.Exp.Med.* 205:1659-1672.
4. Xia, H., W. Khalil, J. Kahm, J. Jessurun, J. Kleidon, and C. A. Henke. 2010. Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.J.Pathol.* 176:2626-2637.
5. Parapuram, S. K., X. Shi-Wen, C. Elliott, I. D. Welch, H. Jones, M. Baron, C. P. Denton, D. J. Abraham, and A. Leask. 2011. Loss of PTEN Expression by Dermal Fibroblasts Causes Skin Fibrosis. *J.Invest Dermatol.*
6. Hao, L. S., X. L. Zhang, J. Y. An, J. Karlin, X. P. Tian, Z. N. Dun, S. R. Xie, and S. Chen. 2009. PTEN expression is down-regulated in liver tissues of rats with hepatic fibrosis induced by biliary stenosis. *APMIS* 117:681-691.
7. Kulkarni, A. A., T. H. Thatcher, K. C. Olsen, S. B. Maggirwar, R. P. Phipps, and P. J. Sime. 2011. PPAR-gamma ligands repress TGFbeta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis. *PLoS.One.* 6:e15909.
8. Horowitz, J. C., D. Y. Lee, M. Waghay, V. G. Keshamouni, P. E. Thomas, H. Zhang, Z. Cui, and V. J. Thannickal. 2004. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J.Biol.Chem.* 279:1359-1367.
9. Maher, T. M., I. C. Evans, S. E. Bottoms, P. F. Mercer, A. J. Thorley, A. G. Nicholson, G. J. Laurent, T. D. Tetley, R. C. Chambers, and R. J. McNulty. 2010. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 182:73-82.
10. Naik PK, Moore BB. 2010. Viral infection and aging as cofactors for the development of pulmonary fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 4: 759-71.
11. Ji WT, Liu HJ. 2008. PI3K-Akt signaling and viral infection. *Recent Pat. Biotechnol.* 2: 218-26.

[0012]

발명의 내용

[0013] 발명의 개요

[0014] 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



(I)

[0015]

[0016]

상기 식에서,

[0017]

X는 -CH-이고, Y는 4-피리다지닐이거나;

[0018]

X는 -N-이고, Y는 4-모르폴리닐이다.

[0019]

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 24시간 동안 TGF β 로 프라이밍시키고, 이후에 TGF β 가 제거된 실험 요법의 개략도를 도시한다.

[0021]

도 2는 24시간 동안 TGF β 로 프라이밍시킨 후, 지속적인 TGF β 자극한 실험 요법의 개략도를 도시한다.

[0022]

도 3은 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 처리 후 Ser473에서 인산화된 AKT의 백분율을 도시한다. 비-IPF(A) 및 IPF(B) 섬유모세포주의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드에 대한 대표적 농도 반응. 데이터는 FBS 처리된 세포 단독의 AKT 인산화(100%)로 표준화시켰다. 데이터는 데이터 포인트 당 n=3 반복 웰의 평균 \pm SEM으로 제시되었다. 곡선을 4 파라미터 비-선형 회귀를 이용하여 적합화시켰다. 개별적 세포주 및 계대배양 수가 범례에 나열되어 있다.

[0023]

도 4는 FBS 처리 후 섬유모세포의 세포 증식에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과를 도시한다. 비-IPF(A) 및 IPF(B) 세포주의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드에 대한 대표적 용량 반응. 데이터는 최대 FBS 반응의 %로 표준화시켰다(% 상한점근치). 데이터는 데이터 포인트 당 n=5 또는 6 반복 웰의 평균 \pm SEM으로 제시되었다. 점선은 각각의 세포주에 대해 0.1% DMSO를 함유하는 혈청 비함유 배지 중의 세포에 대한 평균 신호이다. 곡선을 4 파라미터 비-선형 회귀를 이용하여 적합화시켰다. 개별적 세포주 및 계대배양 수가 범례에 나열되어 있다.

[0024]

도 5는 TGF β 분화된 근육섬유모세포의 상층액 내의 프로-콜라겐 축적에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과를 도시한다. 비-IPF 섬유모세포주에 의한 시험관 내에서의 TGF β -유도 프로콜라겐 합성에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과: 섬유모세포주 0110(A) 및 0610(B)를 24시간 동안 TGF β (1 ng/ml)와 함께 인큐베이션시켰다. TGF β 함유 배지를 이후 제거하고, 3nM 또는 30nM의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드를 함유하는 신선한 배지로 대체하였다. 세포를 추가 24 및 48시간 동안 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 데이터는 3회 반복에 대한 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며, 세포수로 표준화된다. 값 *p<0.05, **p<0.1 및 ***p<0.001은 TGF β 단독으로 처리된 세포에 비한 표시된 데이터의 통계적 유의성(TWO-WAY ANOVA, Bonferroni analysis)을 나타낸다.

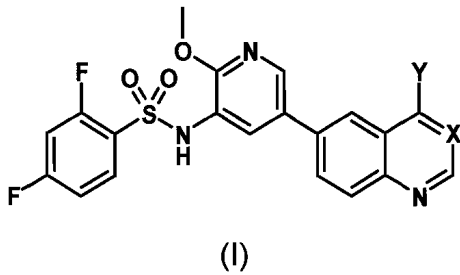
[0025]

도 6은 TGF β 의 재보충 후의 TGF β 분화된 근육섬유모세포의 상층액 내의 프로-콜라겐 축적에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과를 도시한다. 비-IPF 섬유모세포주에 의한 시험관 내에서의 TGF β -유도 프로콜라겐 합성에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과: 섬유모세포주 0110(A) 및 0610(B)를 24시간 동안 TGF β (1 ng/ml)와 함께 인큐베이션시켰다. TGF β 를 이후 제거하고, TGF β 및 3nM 또는 30nM의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드를 함유하는 신선한 배지로 대체하였다. 세포를 추가 24 및 48시간 동안 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 데이터는 3회 반복에 대한 평균 \pm S.E.M.으로 표현되며, 세포수로 표준화된다. 값 **p<0.01 및 ***p<0.001은 TGF β 단독으로 처리된 세포에 비한 표시된 데이터의 통계적 유의성(TWO-WAY ANOVA, Bonferroni analysis)을 나타낸다.

[0026]

발명의 상세한 설명

[0027] 한 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



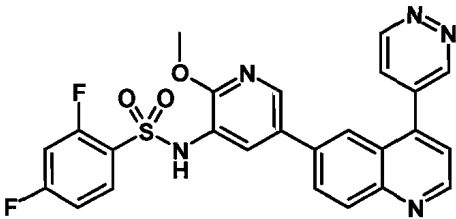
[0028]

[0029] 상기 식에서,

[0030] X는 -CH-이고, Y는 4-피리다지닐이거나;

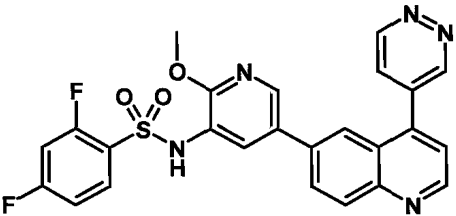
[0031] X는 -N-이고, Y는 4-모르폴리닐이다.

[0032] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



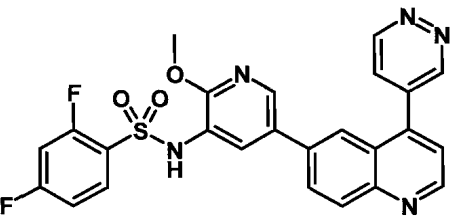
[0033]

[0034] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드인 화합물을 제공한다:



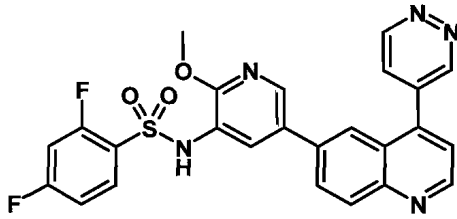
[0035]

[0036] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[0037]

[0038] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드인 화합물을 제공한다:



[0039]

[0040]

화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 모든 용매화물(수화물을 포함함), 복합체, 다형체, 프로드러그 및 방사선 표지된 유도체의 용도가 본 발명의 범위에 포함된다.

[0041]

화학식 (I)의 화합물은 약학적으로 허용되는 염으로 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 염"은 화합물의 요망되는 생물학적 활성을 보유하고, 최소의 요망되지 않는 독물학적 효과를 나타내는 염을 나타낸다. 화합물의 약학적으로 허용되는 염은 분자에 더 큰 안정성 또는 용해도를 부여함으로써 제형의 투여 형태로의 제형화를 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 이들 약학적으로 허용되는 염은 화합물의 최종 분리 및 정제 동안 제자리(in situ)에서 제조될 수 있거나, 정제된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되지 않는 염과 적합한 염기 또는 산을 개별적으로 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 적합한 염의 개관을 위해, 문헌[Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **1977**, 66, 1-19]을 참조하라. 한 구체예에서, 본 발명은 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드의 약학적으로 허용되는 염의 용도를 제공한다. 한 추가 구체예에서, 본 발명은 유리 염기로서의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드의 용도를 제공한다.

[0042]

화합물 제조

[0043]

본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 표준 화학을 포함하는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드는 WO 2008/144463호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있고, 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-모르폴리닐)-6-퀴나졸리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드는 WO 2008/157191호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0044]

사용 방법

[0045]

본 발명의 치료 방법은 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이룰 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함한다.

[0046]

장애와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "치료하다"는 (1) 장애 또는 장애의 생물학적 소견 중 하나 이상을 개선시키거나, (2) (a) 장애를 초래하거나 장애의 원인이 되는 생물학적 캐스케이드 내의 하나 이상의 지점 또는 (b) 장애의 생물학적 소견 중 하나 이상을 방해하거나, (3) 장애와 관련된 증상 또는 결과 중 하나 이상을 경감시키거나, (4) 장애 또는 장애의 생물학적 소견 중 하나 이상의 진행을 늦추는 것을 의미한다.

[0047]

화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 다른 약학적 활성제와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "안전하고 효과적인 양"은 환자의 질환을 치료하기에 충분하나, 철저한 의학적 판단의 범위 내에서 심각한 부작용을 회피하기에 충분히 낮은(합리적인 이익/위험 비) 화합물의 양을 의미한다. 화합물의 안전하고 효과적인 양은 선택된 특정 화합물(예를 들어, 화합물의 역가, 효능, 및 반감기를 고려함); 선택된 투여 경로; 치료되는 장애; 치료되는 장애의 중증도; 치료되는 환자의 연령, 크기, 체중, 및 신체적 상태; 치료되는 환자의 병력; 치료 기간; 동시 요법의 특성; 요망되는 치료 효과; 및 기타 요인에 따라 다양할 것이나, 그럼에도 불구하고 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다.

[0048]

본원에서 사용되는 용어 "환자"는 인간(성인 및 아동을 포함함) 또는 다른 동물을 나타낸다. 한 구체예에서, "환자"는 인간을 나타낸다.

[0049]

화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 임의의 적합한 투여 경로, 특히 경구 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0050]

화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 제공된 기간 동안 다양한 시간 간격으로 다수의 용량이 투여되는 투여 요법에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 용량은 하루에 1회, 2회, 3회, 또는 4회로 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 용량은 하루에 2회(BID) 투여된다.

[0051]

용량은 요망되는 치료 효과가 달성될 때까지 투여될 수 있거나, 요망되는 치료 효과를 유지시키기 위해 무기한적으로 투여될 수 있다. 상기 요법이 제공되는 기간을 포함하는 적합한 투여 요법은 치료되는 장애의 중증도,

치료되는 환자의 연령 및 신체적 상태, 치료되는 환자의 병력, 동시 요법의 특성, 요망되는 치료 효과, 및 당업자의 지식 및 전문적 의견 내의 기타 요인에 좌우될 수 있다. 적합한 투여 요법은 투여 요법에 대한 개별적 환자의 반응이 주어지거나, 개별적 환자가 변화를 필요로 함에 따라 시간 경과에 따라 조정을 필요로 할 수 있음이 당업자에 의해 추가로 이해될 것이다.

[0052] 경구 투여를 위한 통상적인 일일 투여량은 약 0.1 mg 내지 약 20mg, 예를 들어, 약 0.1 mg 내지 약 10 mg, 예를 들어, 약 0.4 mg 내지 약 7 mg의 범위일 수 있다. 예를 들어, 약 0.1 mg 내지 약 5 mg, 예를 들어, 약 0.2mg 내지 약 3.5 mg, 예를 들어, 약 0.25 mg 내지 약 3 mg의 용량이 환자에 대해 BID로 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 약 0.25 mg 내지 약 2.5 mg의 용량이 환자에 대해 BID로 투여될 수 있다.

[0053] 한 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

[0054] 상기 섬유성 질병은 IPF, 폐섬유증, 간질성 폐 질병, 비특이적 간질성 폐렴(NSIP), 통상성 간질성 폐렴(UIP), 심내막 심근 섬유증, 종격 섬유증, 골수섬유증, 후복막 섬유증, 진행성 종괴성 섬유증(석탄 작업자 진폐증의 합병증), 신원성 전신 섬유증, 크론병, 진구성 심근경색증, 피부경화증/전신 경화증, 신경섬유종증, 헤르만스키-푸들라크 증후군, 당뇨병신장병증, 신장 섬유증, 비대심근병증(HCM), 고혈압-관련 신장병증, 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 방사선-유도 섬유증, 자궁근종(fibroids), 알코올성 간질환, 간 지방증, 간 섬유증, 간경변증, C형 간염 바이러스(HCV) 감염, 만성 기관 이식 거부, 피부의 섬유성 질환, 켈로이드 반흔, 뒤쥐트랑 구축, 엘러스-단로스 증후군, 이영양성 표피 수포증, 구강 점막하 섬유증, 및 섬유-증식 장애를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 섬유성 질병은 IPF, 폐섬유증, 간질성 폐 질병, 비특이적 간질성 폐렴(NSIP), 통상성 간질성 폐렴(UIP), 심내막 심근 섬유증, 종격 섬유증, 골수섬유증, 후복막 섬유증, 진행성 종괴성 섬유증(석탄 작업자 진폐증의 합병증), 신원성 전신 섬유증, 크론병, 진구성 심근경색증, 피부경화증/전신 경화증, 신경섬유종증, 헤르만스키-푸들라크 증후군, 당뇨병신장병증, 비대심근병증(HCM), 고혈압-관련 신장병증, 방사선-유도 섬유증, 자궁근종(유섬유), 알코올성 간질환, 간 지방증, 간 섬유증, 간경변증, C형 간염 바이러스(HCV) 감염, 만성 기관 이식 거부, 피부의 섬유성 질환, 켈로이드 반흔, 뒤쥐트랑 구축, 엘러스-단로스 증후군, 이영양성 표피 수포증, 구강 점막하 섬유증, 또는 섬유-증식 장애를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 섬유성 질병은 IPF이다.

[0055] 한 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도를 제공한다.

[0056] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

[0058] 한 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에서의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도를 제공한다.

[0059] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물을 제공한다.

[0061] 한 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물의 용도를 제공한다.

[0062] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0063] 한 추가 양태에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

- [0064] 한 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0065] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 IPF를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0066] 또 다른 양태에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.
- [0067] 한 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0068] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 IPF를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0069] 한 추가 양태에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물을 제공한다.
- [0070] 한 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드인 화합물의 용도를 제공한다.
- [0071] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여 IPF를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0072] **조성물**
- [0073] 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 환자로의 투여 전에 약학적 조성물로 제형화될 수 있다.
- [0074] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0075] 한 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0076] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0077] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0078] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0079] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0080] 또 다른 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 0.1 mg 내지 약 5 mg의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 약 0.1g 내지 약 2g의 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0081] 한 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 0.1 mg 내지 약 5 mg의 화학식 (I)의 화합물 또는 이

의 약학적으로 허용되는 염 및 약 0.1g 내지 약 2g의 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

- [0082] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 0.1 mg 내지 약 5 mg의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 약 0.1g 내지 약 2g의 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0083] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 0.1 mg 내지 약 5 mg의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 약 0.1g 내지 약 2g의 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0084] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 0.1 mg 내지 약 5 mg의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 약 0.1g 내지 약 2g의 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0085] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 0.1 mg 내지 약 5 mg의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 및 약 0.1g 내지 약 2g의 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0086] 한 추가 양태에서, 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 섬유성 질병의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0087] 한 구체예에서, 본 발명은 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 섬유성 질병의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0088] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드를 포함하는 섬유성 질병의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0089] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 IPF의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0090] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 IPF의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0091] 추가 구체예에서, 본 발명은 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드를 포함하는 IPF의 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0092] 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 벌크 형태로 제조되고 패키징될 수 있으며, 여기서 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 추출된 후, 분말 또는 시럽과 같은 형태로 환자에게 제공될 수 있다. 대안적으로, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 단위 투여 형태로 제조되고 패키징될 수 있으며, 여기서 각각의 물리적으로 분리된 단위는 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 함유한다. 단위 투여 형태로 제조되는 경우, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 통상적으로, 예를 들어, 약 0.1 mg 내지 약 5 mg, 예를 들어, 약 0.2mg 내지 약 3.5 mg, 예를 들어, 약 0.25mg 내지 약 3 mg의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 함유할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 통상적으로 약 0.25 mg의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 함유한다. 한 추가 구체예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 통상적으로 약 0.5 mg의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 함유한다.
- [0093] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 부형제"는 약학적 조성물에 대해 제공된 형태 또는 일관성과 관련된 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각각의 부형제는 환자에게 투여되는 경우 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 효능을 실질적으로 감소시키는 상호작용 및 약학적으로 허용되지 않는 약학적 조성물을 발생시키는 상호작용이 회피되도록 혼합되는 경우 약학적 조성물의 다른 성분과 양립되어야 한다. 또한, 각각의 부형제는 물론, 예를 들어, 충분히 높은 순도와 같이 약학적으로 허용되어야

한다.

- [0094] 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 부형제들은 통상적으로 요망되는 투여 경로에 의한 환자로의 투여에 적합화된 투여 형태로 제형화될 것이다. 예를 들어, 투여 형태는 경구 투여에 적합화된 투여 형태, 예를 들어, 정제, 캡슐, 캐플릿(caplet), 환약, 트로키(troche), 분말, 시럽, 엘릭서(elixer), 현탁액, 용액, 에밀전, 샷세(sachet), 및 카세제(cachet)를 포함한다.
- [0095] 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는 선택된 특정 투여 형태에 따라 다양할 것이다. 또한, 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는 이들이 조성물에서 작용할 수 있는 특정 기능에 대해 선택될 수 있다. 예를 들어, 특정한 약학적으로 허용되는 부형제는 균일한 투여 형태의 생성을 촉진하는 이들의 능력에 대해 선택될 수 있다. 특정한 약학적으로 허용되는 부형제는 안정적인 투여 형태의 생성을 촉진하는 이들의 능력에 대해 선택될 수 있다. 특정한 약학적으로 허용되는 부형제는 환자에게 투여된 후 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 한 기관 또는 신체의 일부로부터 또 다른 기관 또는 신체의 일부로 운반하거나 수송하는 것을 촉진하는 이들의 능력에 대해 선택될 수 있다. 특정한 약학적으로 허용되는 부형제는 환자 순응도를 향상시키는 이들의 능력에 대해 선택될 수 있다.
- [0096] 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는 다음과 같은 유형의 부형제를 포함한다: 희석제, 충전제, 결합제, 붕해제, 윤활제, 활택제, 과립화제, 코팅제, 습윤제, 용매, 공용매, 현탁제, 유화제, 감미제, 착향제, 향차폐제, 착색제, 케이크방지제(anticaking agent), 보습제, 킬레이트화제, 가소제, 점도증가제, 항산화제, 보존제, 안정화제, 계면활성제, 및 완충제. 당업자는 특정한 약학적으로 허용되는 부형제가 하나 이상의 기능을 제공할 수 있고, 얼마나 많은 부형제가 제형에 존재하고, 어떠한 다른 부형제가 제형에 존재하는지에 따라 대안적 기능을 제공할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0097] 당업자는 본 발명에서 사용하기에 적절한 양으로 적합한 약학적으로 허용되는 부형제를 선택하는 것을 가능케 하는 당 분야의 지식 및 기술을 보유한다. 또한, 약학적으로 허용되는 부형제를 기재하는 당업자가 이용가능하고, 적합한 약학적으로 허용되는 부형제를 선택하는데 유용할 수 있는 다수의 자원이 존재한다. 예로는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), 및 The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press)]을 포함한다.
- [0098] 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 기술 및 방법을 이용하여 제조된다. 당 분야에서 일반적으로 사용되는 방법 중 일부는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company)]에 기재되어 있다.
- [0099] 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물은, 예를 들어, 주위 온도 및 대기압에서의 혼합에 의해 제조될 수 있다.
- [0100] 한 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 경구 투여용으로 제형화될 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용하기 위한 조성물은 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 희석제 또는 충전제를 포함하는 고체 경구 투여 형태, 예를 들어, 정제 또는 캡슐일 수 있다. 적합한 희석제 및 충전제는 락토스, 수크로스, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨, 전분(예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 및 호화 전분), 셀룰로스 및 이의 유도체(예를 들어, 미정질 셀룰로스), 칼슘 셀페이트, 및 이염기 칼슘 포스페이트를 포함한다. 경구 고체 투여 형태는 결합제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 결합제는 전분(예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 및 호화 전분), 젤라틴, 아카시아, 소듐 알기네이트, 알긴산, 트래거칸스(tragacanth), 구아 검(guar gum), 포비돈, 및 셀룰로스 및 이의 유도체(예를 들어, 미정질 셀룰로스)를 포함한다. 경구 고체 투여 형태는 붕해제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 붕해제는 크로스포비돈, 소듐 전분 글리콜레이트, 크로스카르멜로스, 알긴산, 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 경구 고체 투여 형태는 윤활제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 윤활제는 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 및 탤크를 포함한다.
- [0101] 적절한 경우, 경구 투여를 위한 투여 단위 제형은 미세캡슐화될 수 있다. 조성물은 또한, 예를 들어, 중합체, 왁스 등 내에 미립자 물질을 코팅하거나 포매시킴으로써 방출을 연장시키거나 지속시키도록 제조될 수 있다.
- [0102] 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 또한 표적화가능한 약물 담체로서 가용성 중합체와 커플링될 수 있다. 이러한 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 피란 공중합체, 폴리하이드록시프로필메타크릴아미드-페놀, 폴리하이드록시에틸아스파르트아미드페놀, 또는 팔미토일 잔기로 치환된 폴리에틸렌옥시드폴리리신을 포

합할 수 있다. 더욱이, 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 약물의 조절 방출을 달성하는데 유용한 생물분해성 중합체의 부류, 예를 들어, 폴리락트산, 폴엠피실론 카프롤락톤(polepsilon caprolactone), 폴리하이드록시 부티르산, 폴리오르토에스테르, 폴리아세탈, 폴리디하이드로피란, 폴리시아노아크릴레이트 및 하이드로겔의 가교되거나 양친매성인 블록 공중합체에 커플링될 수 있다.

[0103] 또 다른 양태에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 조성물은 액체 경구 투여 형태이다. 경구 액체, 예를 들어, 용액, 시럽 및 엘릭서는 제공된 양이 소정량의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 투여 단위 형태로 제조될 수 있다. 시럽은 적합하게 착향된 수용액에 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 용해시킴으로써 제조될 수 있는 한편, 엘릭서는 비독성의 알코올성 비히클의 사용을 통해 제조된다. 현탁액은 비독성의 비히클에 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 분산시킴으로써 제형화될 수 있다. 용해화제 및 유화제, 예를 들어, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올 및 폴리옥시 에틸렌 소르비톨 에테르, 보존제, 착향 첨가물, 예를 들어, 페퍼민트 오일 또는 자연 감미제 또는 사카린 또는 다른 인공 감미제 등이 또한 첨가될 수 있다.

[0104] 본 발명에 따르면, 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 섬유성 질병의 치료에서 하나 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0105] 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염과 조합하여 사용하기에 적합한 치료제는 항염증제(예를 들어, 코르티코스테로이드, 예를 들어, 프레드니손), 면역억제제(예를 들어, 아자티오프린 또는 사이클로포스파미드), 항증식제, 피르페니돈(pirfenidone), N-아세틸시스테인, p38 MAK 키나제 억제제(예를 들어, 로스마피모드(losmapimod), (6-[5-(사이클로프로필카르바모일)-3-플루오로-2-메틸페닐]-N-(2,2-디메틸프로필)피리딘-3-카르복사미드) 및 MEK 또는 이중 MEK1/MEK2 억제제(예를 들어, 셀루메티니브(selumetinib), 5-(4-브로모-2-클로로페닐아미노)-4-플루오로-N-(2-하이드록시에톡시)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-6-카르복사미드)를 포함한다.

[0106] 따라서, 본 발명은, 한 양태에서, 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 다른 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.

[0107] 한 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0108] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.

[0109] 또 다른 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 다른 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.

[0110] 한 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0111] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.

[0112] 또 다른 양태에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 및 하나 이상의 다른 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.

[0113] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 투여하는 것을 포함하여 섬유성 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0114] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.

- [0115] 또 다른 양태에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 다른 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0116] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 투여하는 것을 포함하여 IPF를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0117] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0118] 또 다른 양태에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 다른 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0119] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 투여하는 것을 포함하여 IPF를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0120] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0121] 한 추가 양태에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 및 하나 이상의 다른 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0122] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 투여하는 것을 포함하여 IPF를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0123] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 및 하나 이상의 치료적 활성제를 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0124] 본 발명의 한 구체예는 1 또는 2개의 다른 치료제를 포함하는 조합물의 용도를 제공한다.
- [0125] 적절한 경우, 다른 치료적 성분(들)이 치료적 성분의 활성 및/또는 안정성 및/또는 물리적 특성, 예를 들어, 용해도를 최적화시키기 위해 염, 예를 들어, 알칼리 금속 또는 아민 염 또는 산 부가염, 또는 프로드러그, 또는 에스테르, 예를 들어, 저급 알킬 에스테르, 또는 용매화물, 예를 들어, 수화물의 형태로 사용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 적절한 경우, 치료적 성분이 광학적으로 순수한 형태로 사용될 수 있음이 또한 명백할 것이다.
- [0126] 상기 조합물의 개별적 화합물은 별개의 또는 조합된 약학적 제형으로 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 개별적 화합물은 조합된 약학적 제형으로 동시에 투여될 것이다. 공지된 치료제의 적절한 용량은 당업자에 의해 용이하게 인지될 것이다.
- [0127] 따라서, 본 발명은, 한 추가 양태에서, 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 또 다른 치료적 활성제의 조합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0128] 한 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 또 다른 치료적 활성제의 조합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0129] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 섬유성 질병의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 및 또 다른 치료적 활성제의 조합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0130] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 또 다른 치료적 활성제의 조합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0131] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 또 다른 치료적 활성제의 조합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0132] 한 추가 구체예에서, 본 발명은 IPF의 치료에서 사용하기 위한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드 및 또 다른 치료적 활성제의 조합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0133] 생물학적 데이터

[0134] 실시예 1

[0135] AKT의 인산화는 PI3-키나제 활성의 지표로 널리 인정되어 있으며, IPF 환자로부터 분리된 일차 인간 폐 섬유모세포 뿐만 아니라 IPF 기관지폐포 세척(BALF)으로부터 분리된 대식세포에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과에 대한 IC₅₀을 획득하기 위해 본원에서 사용된다.

[0136] 섬유모세포는 웰 당 10,000개의 세포의 밀도로 96웰 플레이트에 시딩된다. 혈청 고갈(serum starvation) 24시간 후, 섬유모세포는 다양한 농도의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드를 함유하는 혈청 비함유 완충액(혈청 비함유 DMEM 중 $[3 \times 10^{-12} \text{ M}]$ 내지 $[3 \times 10^{-7} \text{ M}]$ 범위의 억제제의 1:10 희석액을 포함하는, 웰 당 50 μl 부피) 중에서 15분 동안 예비-인큐베이션된다. 섬유모세포는 10%의 최종 부피로의 소 태아 혈청(FCS)의 첨가에 의해 자극된다. 자극 30분 후, 상층액이 신속히 딴 그릇으로 옮겨지고, 세포 플레이트가 얼음 상에 배치된다. 35 μl 의 1X 완전 용해 완충액(Complete Lysis buffer)이 각각의 웰에 첨가되고, 4°C에서 10분 동안 인큐베이션되고, 추가 분석 전에 -80°C에서 저장된다. 얼음 상에서의 해동 후, 세포 용해질은 전체 및 phospho-AKT(Ser 473)에 특이적인 포획 항체로 미리 코팅된 전극을 함유하는 Meso Scale Discovery(MSD) 포획 플레이트로 옮겨진다. 검정 프로토콜은 제조업체의 설명서에 따라 완료되고, 플레이트가 MSD SECTOR Imager 상에서 분석된다. 데이터는 위치 Ser473에서 인산화된 전체 AKT의 %로 판독된다. 상기 또는 유사한 조건을 이용하여, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드는 2.58nM(95% CI 0.83-8nM)(기하 평균으로 표현되며, n=4 IPF 폐로부터 분리된 섬유모세포에 대해 95% CI, 세포주 당 n=2 실험)의 FSC 유도 AKT 인산화의 억제에 대한 IC₅₀을 나타낸다.

[0137] 유사한 실험에서, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드에 의한 AKT 인산화의 억제가 IPF BALF로부터 분리된 세포에서 평가된다. 간단히, BAL 세포는 0.1% BSA RPMI 배지에 재현탁되어, 세포는 웰 당 5.7×10^4 - 8.3×10^4 개의 세포의 세포수를 제공한다. BAL 세포가 96웰 플레이트에 첨가되고, 다양한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드(검정에서 0.1% DMSO 및 0.1% BSA 최종 농도)와 함께 인큐베이션된다. 37°C, 5% CO₂에서의 25분의 인큐베이션 후, 플레이트는 1600rpm에서 5분 동안 회전된다. 상층액이 딴 그릇으로 옮겨지고, 프로테아제 억제제를 함유하는 40 μl 의 포스포세이프 용해 완충액(phosphosafe lysis buffer)이 각각의 웰에 첨가된다. 이후, 플레이트는 액체 질소에서 급속 동결되고, 추가 분석 전에 -80°C에서 저장된다. 얼음 상에서의 해동 후, 세포 용해질이 phospho Akt, 전체 Akt Meso Scale Discovery(MSD) 포획 플레이트로 옮겨지고, 상기 기재된 바와 같이 처리된다. 상기 또는 유사한 조건을 이용하여, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드는 0.54nM (95% CI 0.28-1.08nM)(기하 평균으로 표현되며, n=3 IPF BALF로부터 분리된 대식세포에 대해 95% CI)의 AKT 인산화의 억제에 대한 IC₅₀을 나타낸다.

[0138] 실시예 2

[0139] 실험 준비 및 프로토콜

[0140] (a) 일차 인간 세포 분리

[0141] 일차 인간 섬유모세포를 갑작스러운 외상후 사후 획득된 비-IPF 폐 조직, 및 이식 또는 생검을 위해 분리된 IPF 환자의 폐로부터 획득된 IPF 폐 조직으로부터의 체외이식편 배양에 의해 분리시켰다. 체외이식편을 37°C, 100% 습도, 및 10% CO₂에서 고 글루코스 및 소듐 피루베이트(PAA laboratories, catalogue #E15-011)과 함께 페니실

린/스트렙토마이신(Sigma #P4333), 암포테리신 B(Sigma #A2942), L-글루타민(Gibco #25030) 및 20% FBS(소 태아 혈청, Lonza, catalogue #14-801 F, Lot #1SB003)를 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 세포를 의학적 진단을 기초로 하여 비-IPF(UCL 표기 0110 및 0610) 및 IPF(UCL 표기 0207, 0208, 0308, 0507 및 0508)로 지정하였다.

[0142] (b) 일차 인간 세포 배양

[0143] 인간 폐 일차 섬유모세포 세포주를 37℃, 100% 습도, 및 10% CO₂에서 L-글루타민, 페니실린/스트렙토마이신 및 10% FBS가 보충된 고 글루코스 및 소듐 피루베이트를 함유하는 DMEM(완전 DMEM)에서 배양하였다. 세포를 검정을 위한 수거시에 약 70-80% 컨플루언스(confluence)를 생성시키는 농도로 검정 설정 2 내지 3일 전에 T175 플라스크(NUNC #159910)로 나누었다. 세포를 0.25% 트립신-EDTA(Gibco #25300)을 이용하여 수거하고, 세척하고, 완전 DMEM에 재현탁시켰다. 세포 계수를 60 μm 센서(Millipore #PHCC60050)를 갖는 핸드헬드 자동화 세포 계수기(Handheld Automated Cell Counter)(Millipore #PHCC00000)를 이용하여 세포 현탁액에 대해 수행하였다.

[0144] (c) pAKT의 측정

[0145] 세포 배양

[0146] 일차 섬유모세포를 100 μL의 완전 DMEM 중에 웰 당 10,000개의 세포로 96웰 편평 바닥 플레이트(Nunc, #167008)로 시딩하였다. 세포를 외부 벽에는 시딩하지 않았고, 이를 200 μL의 완전 DMEM 단독으로 충전하였다. 세포를 약 16-20시간 동안 100% 습도, 및 10% CO₂에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 세포 상의 배지를 FBS가 없는 DMEM으로 교환하고, 약 24시간 동안 37℃ 및 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0147] 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설포나미드를 0.3mM의 시작 농도(스톡 농도 30mM를 시작 농도를 만들기 위해 DMSO 중에서 2회 1:10 희석시킴)로부터 DMSO(Sigma #D2650) 중에서 10배만큼 연속 6회 희석시켰다. 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설포나미드를 이후 DMEM으로 추가로 1:1000 희석시켰다. 배지를 세포로부터 제거하고, 100 μL의 희석된 화합물을 각각의 웰에 첨가하였다(6웰의 반복, 배지 + 0.1% DMSO를 대조군 웰의 둘 모두의 세트에 첨가하였다). 플레이트를 15분 동안 37℃ 및 10% CO₂에서 인큐베이션하였다. 배지를 제거하고, DMEM + 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설포나미드의 동일 희석 시리즈를 함유하는 20% FBS로 대체하였다. 6개의 대조군 웰을 DMEM + 0.1% DMSO(음성 대조군)로 대체하였고, 6개의 대조군 웰을 DMEM, 0.1% DMSO + 20% FBS(양성 대조군)로 대체하였다. 플레이트를 30분 동안 37℃, 100% 습도, 및 10% CO₂에서 인큐베이션하였다. 배지를 제거하고, 플레이트를 얼음 상에 두고, 35 μL의 얼음 저온 Meso-Scale Discovery(MSD) 용해 완충액(+ MSD 표준 프로토콜에 따른 억제제)을 각각의 웰에 첨가하였다. 이후, 플레이트를 -80℃에서 즉시 동결시켰다.

[0148] MSD 검정

[0149] 150 μL의 3% 블로커(Blocker) A 용액을 첨가함으로써 Meso-Scale Discovery(MSD) Phosho(Ser473)/Total Akt Whole Cell Lysate 키트(MSD #K15100D-2)를 1시간 동안 예비 블로킹시켰다. 플레이트를 300 μL 1x MSD 세척 완충액(50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.02% Tween-20)으로 4회 세척하였다. 세포 용해질을 함유하는 플레이트를 얼음 상에서 녹이고, 25 μL의 용해질을 미리 세척된 AKT 듀플렉스 플레이트로 옮겼다. 플레이트를 밀봉하고, 200rpm으로 진탕하면서 90분 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0150] AKT 듀플렉스 플레이트를 흡인하고, 300 μL 1x MSD 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 최종 세척액을 흡인한 후, 25 μL의 검출 완충액(1x 검출 항체를 가짐)을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 상기와 같이 실온에서 진탕하면서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0151] 이후, AKT 듀플렉스 플레이트를 흡인하고, 300 μL의 1x MSD 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 최종 세척액을 흡인한 후, 150 μL의 1x 판독 완충액(이중 증류된 H₂O에 희석된 4x 판독 완충액)을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 MSD Workbench 소프트웨어를 이용하여 SECTOR™ Imager 6000 상에서 판독하였다.

[0152] (d) 집단 세포 성장의 측정

[0153] 세포 배양

[0154] 일차 섬유모세포를 100 μL의 완전 DMEM 중에 웰 당 2,500개의 세포로 96웰 편평 바닥 플레이트에 시딩하였다. 세포를 외부 벽에는 시딩하지 않았고, 이를 200 μL의 완전 DMEM 단독으로 충전하였다. 세포를 약 16-20시간 동

안 37℃, 100% 습도, 및 10% CO₂에서 인큐베이션하였다. 세포 상의 배지를 FBS가 없는 DMEM으로 교환하고, 약 24시간 동안 37℃, 100% 습도, 10% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0155] 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드를 30mM의 시작 농도로부터 DMSO 중에서 10배만큼 연속 8회 희석시켰다. 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드를 이후 DMEM + 10% FBS에서 추가로 1:1000 희석시켰다. 배지를 세포로부터 제거하고, 100 μL의 화합물을 희석 당 6개의 웰에 첨가하였다. 추가 6개의 웰에는 배지 + 10% FBS 및 0.1% DMSO를 제공하였고, 6개의 웰에는 배지 + 0.1% DMSO를 제공하였다. 웰 A2-6은 첨가된 배지 + 0.1% DMSO를 가졌고, A7-11은 배지 + 10% FBS 및 0.1% DMSO(세포가 없는 대조군)를 가졌다. 플레이트를 72시간 동안 37℃, 100% 습도, 10% CO₂에서 인큐베이션하였다. T0(시간 0) 대조군 플레이트는 FBS가 없는 배지를 갖는 6개의 웰 및 배지 + 10% FBS를 갖는 6개의 웰 뿐만 아니라 상기 언급된 바와 동일한 세포가 없는 대조군을 가졌다.

[0156] MTS 검정

[0157] 관독을 위해, 20 μL의 CellTiter 96™ Aqueous 비-방사능 세포 성장 검정(MTS) 시약(Promega #G5430)을 모든 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 100% 습도, 10% CO₂에서 추가 2시간 동안 인큐베이션한 후, Softmax Pro v5 소프트웨어를 이용하여 Versa_{max} 마이크로플레이트 관독기에서 490nm에서 관독하였다. 배지 대조군(세포 없음) 웰로부터의 값의 공제에 의해 제조업체의 설명서에 따라 FBS 변색에 대해 관독을 보정하였다.

[0158] (e) 프로-콜라겐 축적의 측정

[0159] 세포 배양 조건

[0160] 배양된 비-IPF 세포주(섹션 3.1.2에 기재된 바와 같음)를 TGFβ 유도 근육섬유모세포 분화 후의 세포 배양 상층액에서의 프로-콜라겐 축적을 연구하기 위해 사용하였다.

[0161] 세포를 1 mL 완전 DMEM 중에 12-웰 플레이트(NUNC #150628)에서 웰 당 100,000개의 세포로 시딩하고, 이들이 100% 컨플루언스에 도달할 때까지(4-5일) 인큐베이션하였다. 배지를 컨플루언스 세포로부터 제거하고, 1 mL의 예비-인큐베이션 배지(4mM 글루타민, 50 μg/mL 아스코르브산, 0.2mM 프롤린 및 0.4% FBS를 함유하는 DMEM)로 대체하고, 추가 24시간 동안 인큐베이션하였다. 신선한 예비-인큐베이션 배지를 3개의 웰에 첨가하고, 인큐베이션 기간 시작시에 배양 배지에 존재하는 하이드록시프롤린의 백그라운드 수준(T0)을 결정하기 위한 분석을 위해 즉시 수거하였다.

[0162] TGFβ는 TGFβ 첨가 24시간 후에 피크인 pAKT의 느린 활성화를 유도한다(데이터는 제시하지 않음). 이는 AKT 활성화가 TGFβ 유도 근육섬유모세포 분화(보통 18-24시간에서 발생함; 데이터는 제시하지 않음) 후에 최대임을 암시한다. 분화된 근육섬유모세포에서 PI3K 활성화에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드의 효과를 연구하기 위해, 섬유모세포를 먼저 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드의 첨가 전 24시간 동안 TGFβ로 분화시켰다. 프로-콜라겐 생성에 대한 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드의 효과를 추가 24 또는 48시간 동안 부재하에서 평가하였다.

[0163] 24시간의 혈청 고갈 후, 섬유모세포를 TGFβ 1(1ng/mL, 24시간)(R&D #101-B1)으로 자극하여 근육섬유모세포 분화를 유도하였다. 이후, TGFβ 1을 제거하거나 재보충(완전 혈청 비함유 배지 변화 ± TGFβ에 의한, 1ng/ml)하고, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드(0.1% DMSO 중 최종 농도 3nM 또는 30nM)를 첨가하였다. 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3 피리디닐}벤젠설폰아미드의 희석액을 0.1% DMSO 중에서의 연속 10배 희석 및 추가 1000배 희석에 의해 0.03M의 스톡으로부터 제조하였다. 분화된 근육섬유모세포 배양액을 37℃, 100% 습도, 10% CO₂에서 추가 24 및 48시간 동안 인큐베이션하였다. 실험 방법의 개략도에 대해 도 1 및 도 2를 참조하라.

[0164] 세포 수거

[0165] 각각의 인큐베이션 시점 종료시, 세포 상층액을 수거하고, -80℃에서 동결시켰다. 5분 동안 250 μL의 0.25% 트립신-EDTA와의 인큐베이션에 의해 세포층을 분리시키고, DMEM 중에서 1mL 현탁액을 제조하였다. Sceptre 60 μM 센서를 이용하여 세포 현탁액에 대해 세포 계수를 수행하였다.

- [0166] 세포 상층액을 실온에서 해동시키고, 단백질을 4℃에서 67%(v/v) 에탄올 중에서 밤새 침전시켰다.
- [0167] **에탄올 불용성 분획에서의 회수**
- [0168] 침전된 단백질을 Durapore 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막 필터(포어 크기 0.45 μm)(타입 HV, Millipore Ltd., UK; # HVLP02500)로의 진공 여과에 의해 회수하고, 부착 단백질을 1.5mL 에탄올(67% v/v)로 2회 세척하였다. 부착 단백질을 갖는 필터를 2mL의 6M HCl을 함유하는 Pyrex 가수분해 튜브로 옮겼다. 이후, 에탄올-불용성 분획을 16시간 동안 110℃에서 가수분해시키고, 샘플을 약 70 mg의 차콜과 혼합하여 탈색시키고, Durapore 막 필터(포어 크기 0.65 μm)(타입 DA, Millipore Ltd., UK; DVPP02500)로 여과시켰다. 탈색된 가수분해물의 분취액(100 μl)을 1.5mL 원심분리 튜브로 옮기고, 고속 진공 농축기(Savant SPD 131DDA, Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK)를 이용하여 건조 증발시켰다.
- [0169] **샘플 유도체화**
- [0170] 세포 배양 상층액 내에서의 하이드록시프롤린 축적이 프로-콜라겐 생성의 척도로 이용된다. 하이드록시프롤린은 프로-콜라겐의 일차 서열의 약 12%로 존재하며, 콜라겐 삼중 나선의 형성에 필수적이다. 하이드록시프롤린은 임의의 다른 단백질에는 유의한 수준으로 존재하지 않는다. 세포 배양 가수분해물 내의 하이드록시프롤린의 수준을 7-클로로-4-니트로벤조-옥사-1; 3-디아졸(NBD-Cl)(Sigma; #17239-0050)을 이용한 유도체화 후에 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 정량하였다.
- [0171] 하이드록시프롤린 표준: 트랜스-4-하이드록시-L-프롤린(PHPRO)의 표준 샘플(Sigma; #H5534)을 10 μL(250 μM) 분취액으로 -20℃에서 동결 저장하였다. 10 μL 분취액을 990 μL Milli-Q 물(Milli-Q Plus; Millipore Ltd., UK)에 희석시키고, 표준으로 사용하였다. 컬럼에 로딩된 하이드록시프롤린(Hyp) 표준의 최종량은 50pmole이었다.
- [0172] 샘플: Milli-Q 물(100 μL)을 가수분해물의 건조된 분취액에 첨가하고, 밤새 4℃에서 재수화시켰다. 100 μL의 각각의 표준 및 샘플에 100 μL의 0.4M 포타슘 테트라 보레이트 완충액(HCl을 이용하여 pH9.5로 조정됨) 및 100 μL의 NBD-Cl(메탄올 중 36mM)을 첨가하였다. 이들을 충분히 볼텍스(Vortex) 혼합시키고, 20분 동안 37℃(어두운 곳)에서 인큐베이션하였다. 50 μL의 1.5M HCl 및 150 μL의 HPLC 런닝(running) 완충액 A(150mL Milli-Q 물 및 65mL 아세트니트릴에 용해된 5.68g 소듐 아세테이트, 오르토포스포르산으로 pH6.4로 조정되고, 250mL 이하로 제조됨)의 농축된 용액(3.33X)을 충분한 볼텍스 혼합에 의해 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응 혼합물을 1 ml 주사기로 끌어올리고, HPLC 저 사장 용적(dead volume) 필터(포어 크기 0.22 μm, 타입 GV; # 611-0716 Millipore Ltd, UK)를 통해 플라스틱 삽입부로 여과시켰다. 삽입부를 갈색 유리 튜브(Laboratory Sales Ltd., Rochdale, UK)에 두고, 캡으로 덮고, 병을 가볍게 튕겨 공기 기포를 방출시켰다. 이후, 이들 바이얼을 HPLC 장치(Beckman Coulter, UK) 내의 자동화 샘플러에 두고, 샘플을 HPLC 컬럼에 순차적으로 주입하고, 표 1에 기재된 바와 같이 아세트니트릴 구배를 이용하여 용리시켰다.

[0173] 표 1 - 역상 HPLC에 의한 하이드록시프롤린의 분리를 위한 조건 및 완충액

컬럼	LiChrospher, 100 RP-18, 250 x 4mm, 5µm	
이동상	<p>완충액 A - 수성 아세토니트릴 (8% v/v)</p> <p>50mM 소듐 아세테이트, pH 6.4</p> <p>완충액 B - 수성 아세토니트릴 (75% v/v)</p>	
컬럼 유량	1.0 ml/분	
컬럼 온도	40°C	
검출 파장	495nm	
응리 구배	시간 (분)	% 완충액 B
	0	0
	5	5
	6	80
	12	80
	12.5	0
	25	0

[0174]

[0175] 데이터 분석

[0176] (a) 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포아미드에 대한 농도 반응 곡선: pAKT 반응

[0177] pAKT 반응의 분석을 위해, 섹터 이미저(sector imager)로부터의 미가공 데이터를 계산하여, 인산화된 전체 AKT의 비를 생성시켰다. 증가하는 log 물 농도의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포아미드의 존재하에서의 비 값을 획득하였다. 삼중 웰의 평균 및 SEM을 각 실험에서 각각의 화합물 농도(또는 화합물이 없는 대조군)에 대해 획득하였다. 데이터를 화합물이 없는 20% FCS(% FCS 대조군)의 존재하에서 획득된 최대 값의 %로 표현하였다. 비-선형 회귀 곡선을 각 실험에 대한 IC₅₀을 계산하기 위해 사용된 4 파라미터 곡선 적합도(Prism)를 이용하여 적합화시켰다.

[0178] (b) 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포아미드에 대한 농도 반응 곡선: MTS 검정

[0179] 각각의 실험에 대해 최대 적합화된(상한점근치) 값을 100% 참조 반응으로 이용하였다. 증가하는 log 물 농도의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포아미드의 존재하에서 MTS 신호(공제된 배지 백그라운드 값을 가짐)를 최대 점근치의 %로 표현하였다. 화합물이 없는 대조군/FBS 대조군 값을 또한 작도하였다. 5 또는 6회 반복의 평균 및 SEM을 각 실험에서 각각의 화합물 농도(또는 화합물이 없는 대조군)에 대해 획득하였다. 비-선형 회귀 곡선을 4 파라미터 곡선 적합도(Prism)를 이용하여 적합화시키고, 각 세포주에 대한 IC₅₀을 계산하기 위해 사용하였다.

[0180] 실험의 서브셋에서, 카스파제 3/7의 활성화와 병행하여 세포 성장을 측정하는 경우, 혈청 비함유 배지를 10% FBS로 변경하고, 화합물을 첨가하는 경우에 T0 관독을 수행하였다. 화합물과의 72시간의 인큐베이션 후에 T0 아래로 하락된 MTS 값이 세포 사멸을 나타내는 것으로 추정하였다. 상기 실험 시리즈를 위해, 값을 IC₅₀ 곡선의 생성에 대해 100%로서 T0으로 표준화시켰다.

[0181] (c) 근육섬유모세포 상충액 내의 프로-콜라겐 축적에 대한
2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포아미드의 효과

[0182] 컬럼에 주입된 각각의 100 µl의 샘플 내의 하이드록시프롤린(Hyp) 함량의 정량을 각각의 실험 시작 및 종료에서 각각의 샘플에 대해 획득된 크로마토그램의 피크 영역을 동일한 조건하에서 유도체화되고 분리된 표준 용액

으로부터 생성된 크로마토그램의 피크 영역과 비교함으로써 결정하였다. 유도체화된 Hyp 표준 용액은 50pmol/L Hyp와 동등하였고, 교정에 사용하였다. 전체 콜라겐을 세포수/mL로 표준화시키고, pg/세포로 표현하고, 하기 식으로부터 유도하였다:

[0183] 전체 콜라겐 = (샘플 피크 영역/표준 피크 x 50)^{*} x 20^{**} x 8.1967^{***} x 131.135^{****} /표준화된 세포수.

[0184] 유도된 보정 인자:

[0185] ^{*} = 컬럼 상의 하이드록시프롤린의 pmol에 대한 교정(50pmol 표준에 대해 표준화됨)

[0186] ^{**} = 웰 당 pmol 하이드록시프롤린에 대한 교정(전체 웰 하이드록시프롤린의 1/20th v/v가 컬럼에 주입되었다)

[0187] ^{***} 하이드록시프롤린에 의해 밝혀진 콜라겐의 비율에 대한 보정 인자.

[0188] ^{****} 하이드록시프롤린의 분자량.

[0189] 데이터는 처리 당 3개의 웰의 그룹에서 수득된 값의 평균 ± SEM이다. 통계적 평가는 그룹 비교를 위해 2-Way ANOVA를 이용하여 수행하였다. 0.05 미만의 p 값이 유의한 것으로 간주되었다.

[0190] T0 값은 인큐베이션 기간의 시작시에 배양 배지에 존재하는 하이드록시프롤린을 나타낸다.

[0191] 결과

[0192] (i) AKT 인산화에 대한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효과

[0193] PI3K 활성의 세포내 억제제를 위치 Ser473에서의 AKT 인산화(pAKT)의 억제를 측정함으로써 결정하였다. AKT 인산화의 정도는 PI3K 활성의 간접적인 척도이다. PI3K 활성화의 생성물인 PIP₃는 AKT의 형질막으로의 국소화에 필요하며, 여기서 이는 TORC2(라파마이신 복합체 2의 표적)에 의해 위치 T308 및 위치 S473에서 3-포스포노시티드-의존성 키나제-1(PDK1)에 의해 인산화된다.

[0194] Meso Scale Discovery(MSD) 96 웰 플레이트 검정을 이용하여, AKT(S473)의 인산화를 20% FBS에 의한 30분의 자극 후 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 존재하에서 측정하였다. 20% FBS의 첨가는 시험된 모든 세포주에서 AKT 인산화의 증가를 야기시켰다. 도 3은 AKT 인산화가 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드와의 인큐베이션 후에 농도 의존 방식으로 감소된 것을 나타낸다. 계산된 평균 pIC₅₀은 일차 인간 비-IPF(도 3(A))에서 9.1(범위 8.8-9.4, n=2 섬유모세포주, n=1 세포주 당 반복 계대배양)이었고, IPF 섬유모세포(도 3(B))에서 8.8(+/- 0.1 SEM, n=5 세포주, n=4 이하 세포주 당 복제 계대배양)이었다.

[0195] (ii) 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 세포 집단 성장에 대한 효과(MTS 검정)

[0196] 세포 성장의 억제를 위한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 효능을 세포수의 대용으로서 미토콘드리아 활성을 정량하는 CellTiter 96TM Aqueous 비-방사성 세포 성장 검정을 이용한 표준화된 72시간의 검정에 의해 결정하였다.

[0197] 10% FBS에 대한 섬유모세포의 노출은 72시간에 걸쳐 세포 성장을 증가시켰다. 도 4(A & B)에 제시된 데이터는 일차 인간 폐 섬유모세포의 성장이 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드와의 인큐베이션 후에 농도 의존 방식으로 감소된 것을 나타낸다.

[0198] 계산된 평균 pIC₅₀은 일차 인간 비-IPF(도 4(A))에서 7.7(±0.2 SEM n= 2 섬유모세포주, n=5 세포주 당 반복 계대배양)이었고, IPF 섬유모세포에서 7.5(+/- 0.1 SEM, n=5 세포주, n=5 이하 세포주 당 반복 계대배양)였다. 30nM 초과 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드의 농도에서, 10% FBS의 존재하에서의 섬유모세포에 대한 MTS 신호는 FBS가 없는 대조군보다 낮게 나타났다. 이는 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포나미드가 더 높은 농도에서 세포수의 감소를 유도한 것을 암시하며, 이는 잠재적으로 세포 사멸을 나타낸다.

[0199] (iii) 프로-콜라겐 합성에 대한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디

닐}벤젠설포아미드의 효과

[0200] TGFβ 유도 분화 후에 배양 상층액 내의 하이드록시프로린의 축적을 측정함으로써 근육섬유모세포로 분화된 일차 인간 폐 섬유모세포에서 프로-콜라겐 생성을 평가하였다.

[0201] 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드는 근육섬유모세포로의 TGFβ (1ng/ml) 유도 분화 후에 일차 인간 폐 섬유모세포에 의해 생성되는 프로-콜라겐의 수준을 유의하게 감소시켰다(도 5 & 도 6). 억제 효과는 TGFβ가 근육섬유모세포 분화 후에 배양 배지로부터 분리되는 경우에 가장 현저하였다(도 5(A & B)). 이들 실험에서, 프로-콜라겐 축적은 TGFβ의 제거에도 불구하고 48시간 이하 동안 지속된다. 프로-콜라겐의 축적은 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드(3nM 및 30nM, 24 및 48시간, n=2 섬유모세포주)와의 인큐베이션에 민감하였다. 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드에 의한 프로-콜라겐 축적의 평균 억제 백분율은 표 2(A & B)에서 2개의 섬유모세포주에 대해 요약되어 있다.

[0202] 표 2 - 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드에 의한 TGFβ 유도 프로-콜라겐 생성의 평균 억제 퍼센트에 대한 값의 요약이 세포주 0110(A) 및 0610(B)에 대해 제시된다.

(A)

	[화합물] (nM)	
	3nM	30nM
24 시간	31.61%	60.80%
48 시간	48.06%	63.95%

(B)

	[화합물] (nM)	
	3nM	30nM
24 시간	26.25%	56.82%
48 시간	35.63%	59.61%

백분율은 n=3 웰에 대해 화합물 처리된 값과 화합물을 갖지 않는 대조군을 비교하여 계산됨.

[0203]

[0204] TGFβ가 화합물과 동시에 인큐베이션 배지로 재보충된 실험에서, 프로-콜라겐 생성의 억제는 덜 현저하였다(도 6(A & B)). 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드에 의한 프로-콜라겐 축적의 평균 억제 백분율은 표 3(A & B)에서 2개의 섬유모세포주에 대해 요약되어 있다.

[0205] 표 3 - 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드에 의한 TGFβ 유도 프로-콜라겐 생성의 평균 억제 퍼센트에 대한 값의 요약이 TGFβ의 재보충 후 세포주 0110(A) 및 0610(B)에 대해 제시된다.

(A)

	[화합물] (nM)	
	3nM	30nM
24 시간	억제 없음	억제 없음
48 시간	6.3%	35.22%

(B)

	[화합물] (nM)	
	3nM	30nM
24 시간	29.15%	45.40%
48 시간	억제 없음	37.68%

백분율은 n=3 웰에 대해 화합물 처리된 값과 화합물을 갖지 않는 대조군을 비교하여 계산됨.

[0206]

[0207] 논의

[0208] 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설포아미드는 농도 의존 방

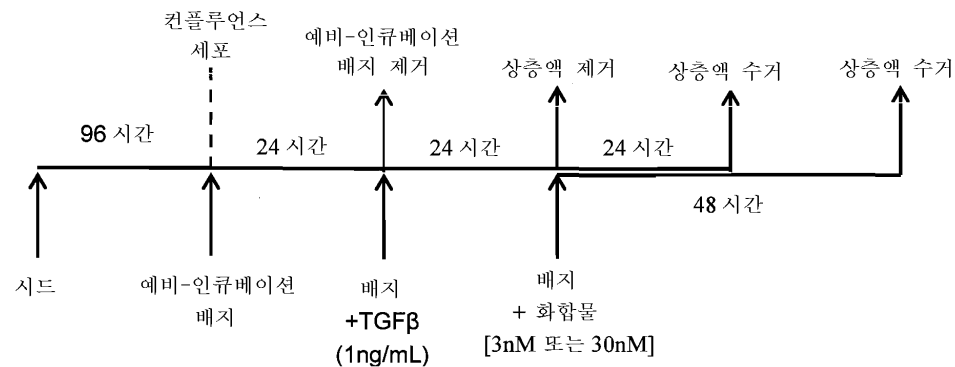
식으로 PIP3의 다운스트림 표적인 phospho-AKT의 수준을 감소시켰다. 섬유모세포의 증식은 또한 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드의 수준을 증가시킴으로써 감소되었다. 상기 둘 모두의 결과는 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드가 300nM 초과 농도에서 섬유모세포 증식을 감소시키고 섬유모세포 아포토시스를 증가시키는 잠재성을 갖는 것을 암시한다. 콜라겐 수준의 분석은 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드가 TGFβ 자극에 의해 근육섬유모세포로 분화하도록 유도되는 세포에서 TGF-β 유도 콜라겐 생성을 방지하는 것을 암시한다.

[0209]

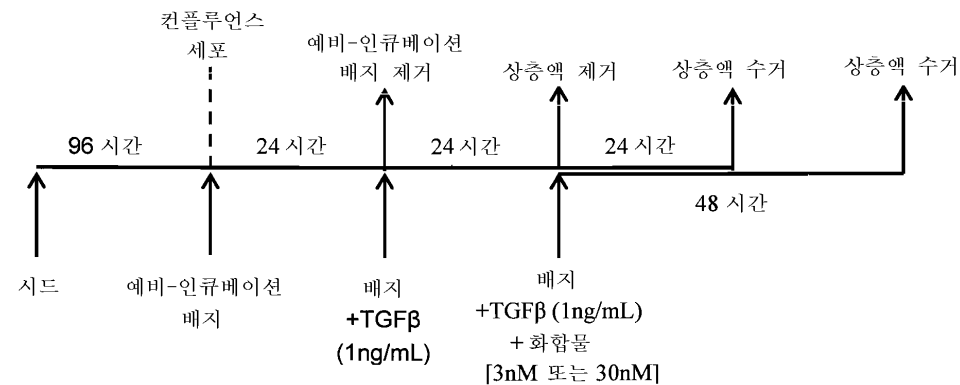
종합적으로, 상기 데이터는 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠설폰아미드가 IPF의 진행, 즉, 섬유모세포 증식 및 콜라겐 생성에서 중요한 메커니즘을 유력하게 억제하는 것을 나타낸다.

도면

도면1

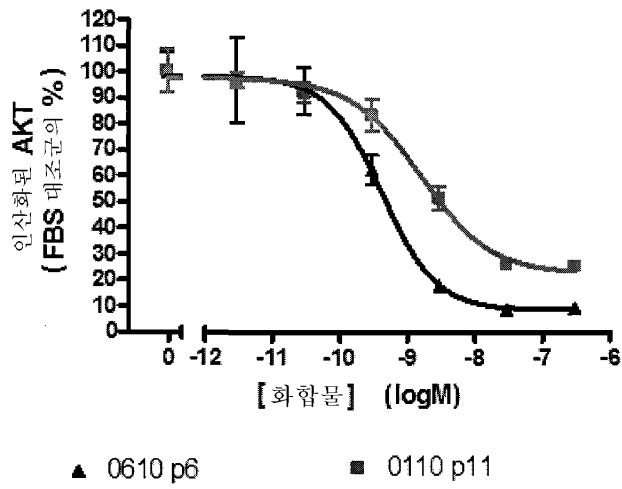


도면2

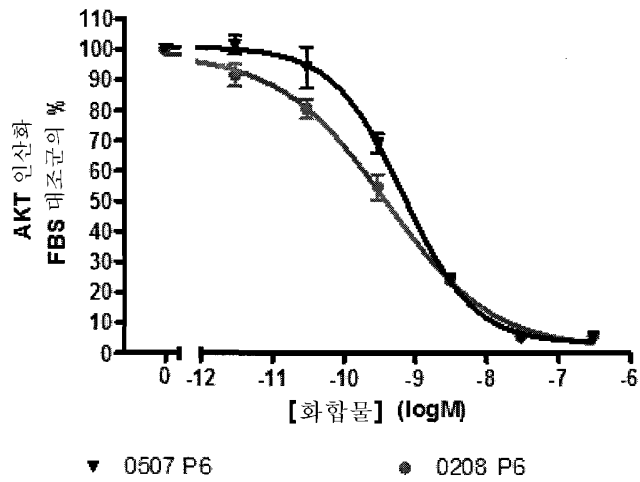


도면3

(A)

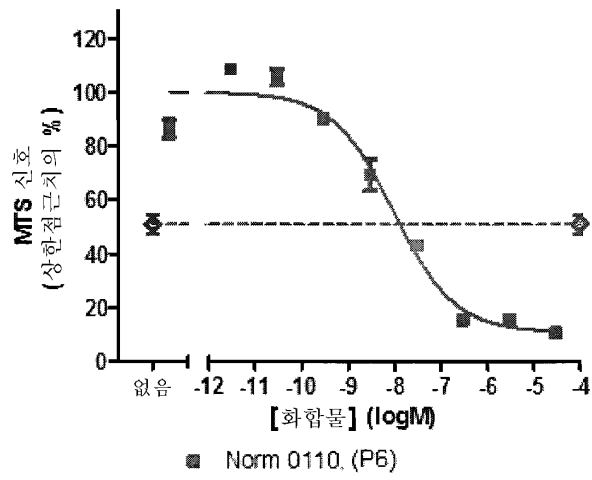


(B)

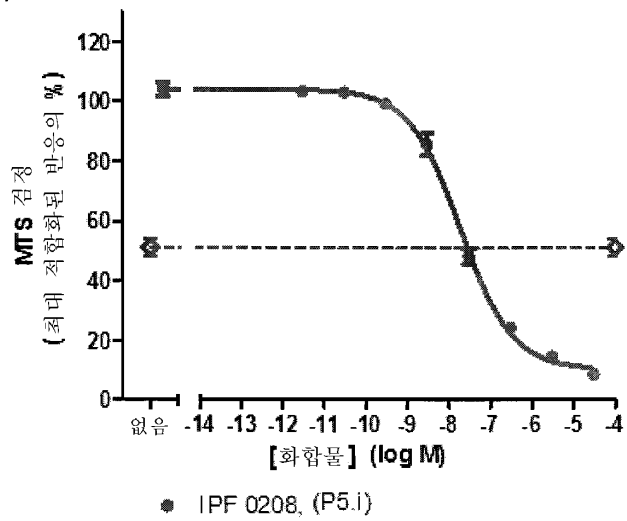


도면4

(A)

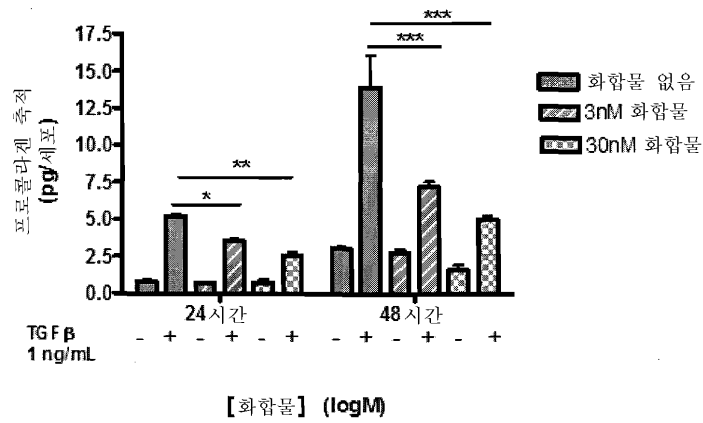


(B)

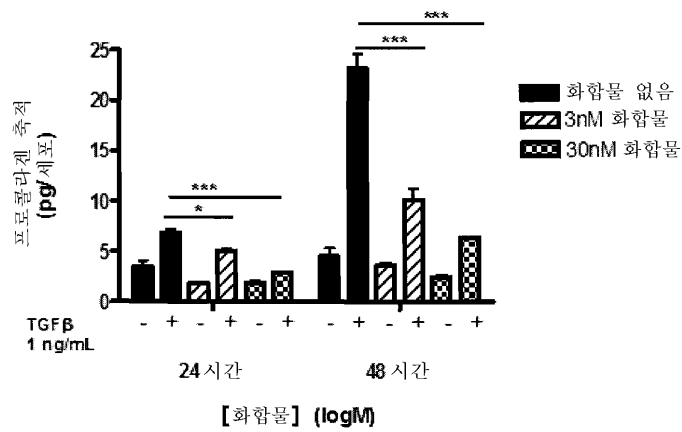


도면5

(A)

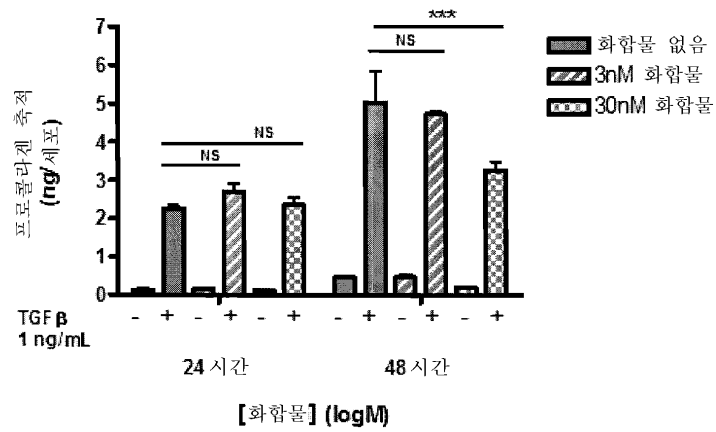


(B)



도면6

(A)



(B)

