



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0121888
(43) 공개일자 2013년11월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 211/27 (2006.01) A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7016432
- (22) 출원일자(국제) 2011년11월22일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년06월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/070620
- (87) 국제공개번호 WO 2012/069442
국제공개일자 2012년05월31일
- (30) 우선권주장
10382314.2 2010년11월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

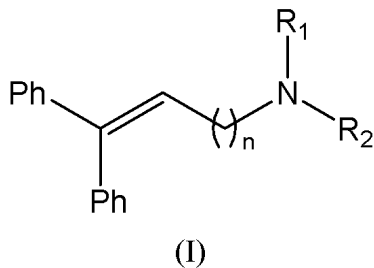
- (71) 출원인
파에스 파마, 에스.에이.
스페인, 48940 라미아코-레이오아 (비즈카야),
14, 막시모 아퀼레
- (72) 발명자
로데스 솔라네스 로사
스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.
가르시아 도밍구에즈 네프탈리
스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 15 항

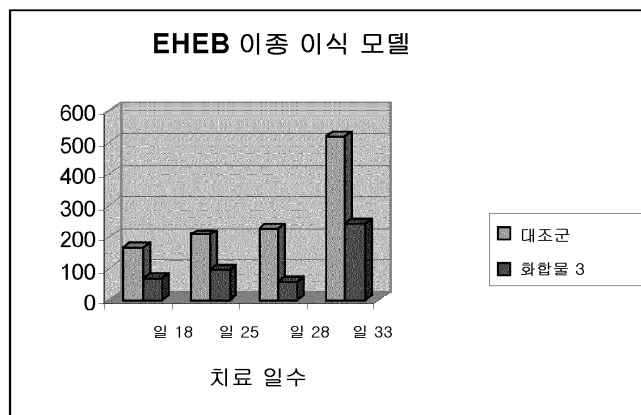
(54) 발명의 명칭 디페닐-아민 유도체: 용도, 합성 방법 및 약학 조성물

(57) 요약

식 (I)의 화합물, 그 염, 전구 약물 또는 용매화물, 상기 화합물의 합성 방법, 그들을 포함하는 약학적 조성물 및 염증성 질환 치료를 위한 의약으로서의 그들의 용도.



대표도 - 도1



(72) 발명자

로페즈 오르테가 베아트리스

스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.

알바레즈 데 몬 소토 멜초르

스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.

델 라 에라 마르티네즈 안토니오

스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.

문요즈 문요즈 아나

스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.

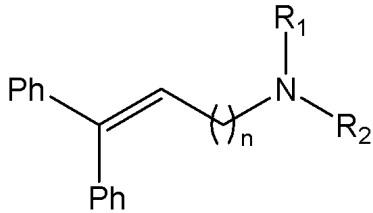
레도 고메즈 프란시스코

스페인 E-48940 라미아코 (레호나) - 비즈카야 14
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이.

특허청구의 범위

청구항 1

식 (I)의 화합물, 그 염, 전구 약물 또는 용매화물.



(I)

식에서,

Ph는 페닐;

n은 2, 3 또는 4;

R₁은 수소 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

R₂는 식 -[CH(R₃)]_m-R₄의 라디칼이고 여기서

m은 1;

R₃은 적절한 경우, 수소, 페닐 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되고;

R₄는 비치환 헤테로 아릴, 치환 헤테로 아릴 및 치환 아릴 라디칼로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 치환기는 C₁-C₆ 알킬, C₇-C₁₁ 아릴알킬, 페닐, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d 또는 -C(O)R_e로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a, R_b, R_c, R_d, 및 R_e는 수소, C₁-C₆ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸 중에서 독립적으로 선택되며;

또는

R₁ 및/또는 R₃가 수소가 아닐 경우, R₄는 또한 비치환 페닐일 수 있으며;

또는

R₁ 및 R₂는 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 치환 또는 비치환 헤테로아릴기를 형성하고, 여기서 치환기는 상기에서 정의된 바와 같고;

단,

2-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-페놀,

3-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-페놀,

5-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-2-메톡시-페놀,

4-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-2,6-디플루오로-페놀,

벤질-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-에틸-아민,

6-클로로-9-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-9H-퓨린,

9-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-9H-퓨린-6-일아민 및

5-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-이속사졸로[4,5-c]피리딘-3-올은 식 (I)에 포함되지 않는

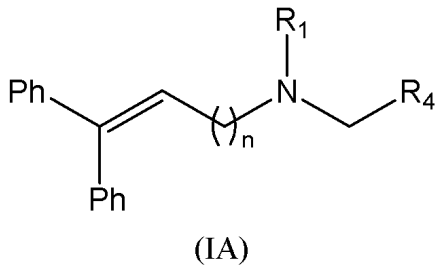
다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치환기의 각각은 C₁-C₆ 알킬, C₇-C₁₁ 아릴알킬, 페닐, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d 또는 -C(O)R_e로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a, R_b, R_d, 및 R_e는 수소, C₁-C₆ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸로부터 독립적으로 선택되며; R_c는 C₁-C₆ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸로 이루어지는 군에서 선택되고, 단 -N(R_a)(R_b)는 -NH₂가 아닌 것인 화합물.

청구항 3

선행하는 청구항들 중 어느 하나의 항에 있어서, 식 (IA)의 화합물 또는 그 염, 전구 약물 및/또는 용매화물인 것인 화합물.



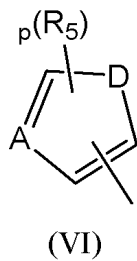
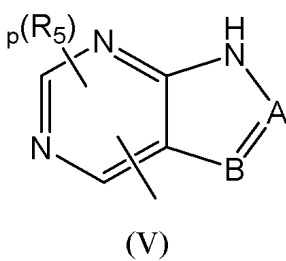
여기서, Ph, n, R₁ 및 R₄는 선행하는 청구항들에서 정의된 바와 같다.

청구항 4

선행하는 청구항들 중 어느 하나의 항에 있어서, R₄는 티에닐, 퓨릴, 피리딜, 1H-벤즈이미다졸, 9H-퓨린, 1H-이미다졸 및 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 미치환 헤테로아릴 또는 치환 헤테로아릴인 것인 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, R₄는 식 (V) 또는 (VI)의 기인 것인 화합물.



여기서,

A와 B는 -CH 및 -N-으로부터 독립적으로 선택되고;

D는 -O-, -S- 및 -NH-로 이루어지는 군에서 독립적으로 선택되고;

p는 0, 1, 2 또는 3으로 이루어지는 군에서 선택되는 정수이고;

각각의 R₅는 C₁-C₃ 알킬, 페닐, 페닐메틸, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, -N(R_a)(R_b), -SR_d 또는 -C(O)R_e로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a, R_b, R_d 및 R_e는 수소, C₁-C₃ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸로부터 독립적으로 선택되고, 단, 식 (V) -N(R_a)(R_b)의 화합물은 -NH₂는 아니고,

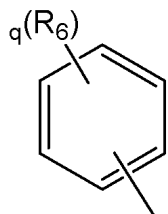
상기 식 (V) 또는 (VI)의 기는 자유 위치 중 어느 하나를 통해 분자의 나머지 부분에 결합된다.

청구항 6

제1항에 있어서, R₁ 및 R₂는 그들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 1*H*-벤즈이미다졸, 9*H*-퓨린, 1*H*-이미다졸 및 1*H*-피라졸로[3,4-*d*]피리미딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 라디칼을 형성하는 것인 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서, R₄는 식a (VII)의 기인 것인 화합물.



(VII)

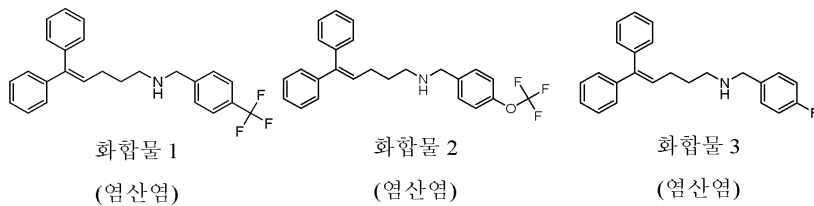
여기서, R₆는 -OCF₃, OC₁₋₃ 알킬, F, Cl, Br, I 및 -CN으로 이루어지는 군에서 선택되고; q는 1, 2 또는 3으로 이루어지는 군에서 선택되는 정수이고, 상기 식 (VII)의 기는 자유 위치 중 어느 하나를 통해 분자의 나머지 부분에 결합된다.

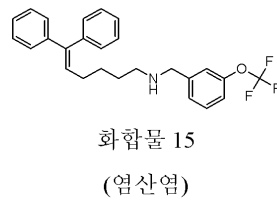
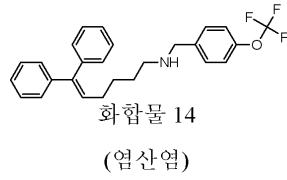
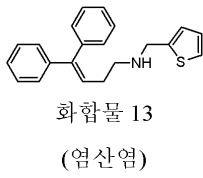
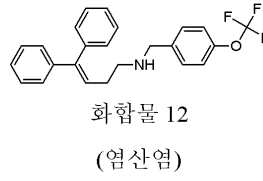
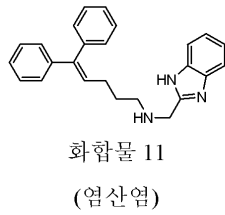
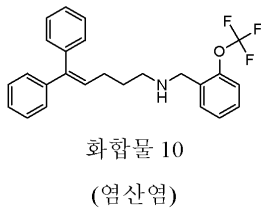
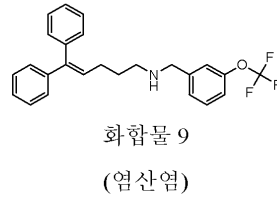
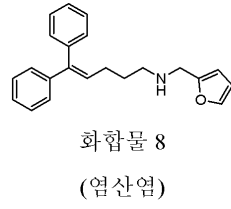
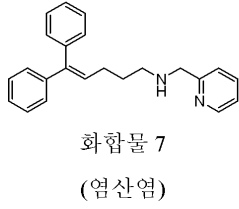
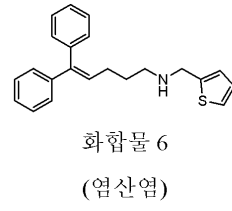
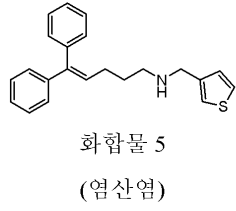
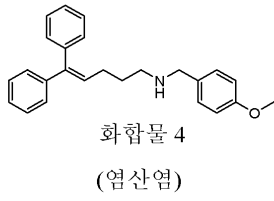
청구항 8

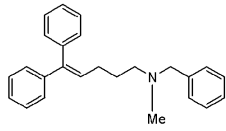
선행하는 어느 하나의 청구항들 중에서, R₁은 수소 또는 메틸인 것인 화합물.

청구항 9

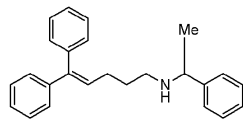
제1항에 있어서, 하기의 화합물, 그 염, 전구 약물 및/또는 용매화물로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 화합물.



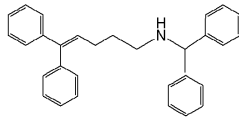




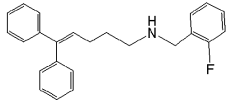
화합물 16
(염산염)



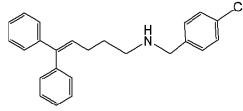
화합물 17
(염산염)



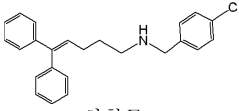
화합물 18
(염산염)



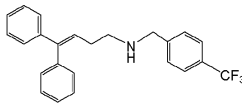
화합물 19
(염산염)



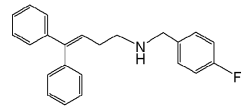
화합물 20
(염산염)



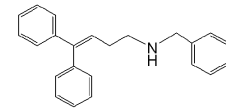
화합물 21
(염산염)



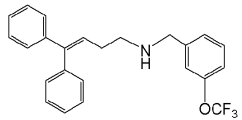
화합물 22
(염산염)



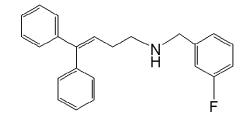
화합물 23
(염산염)



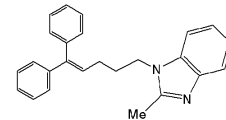
화합물 24
(염산염)



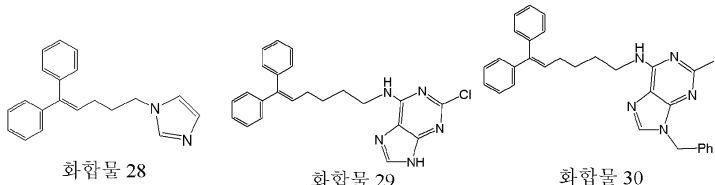
화합물 25
(염산염)



화합물 26
(염산염)



화합물 27

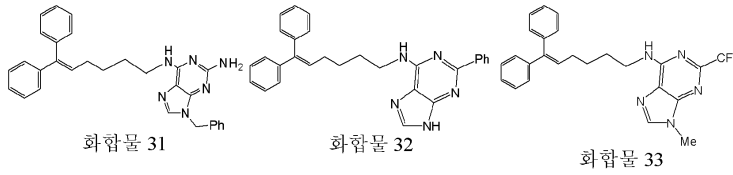


화합물 28

화합물 29

화합물 30

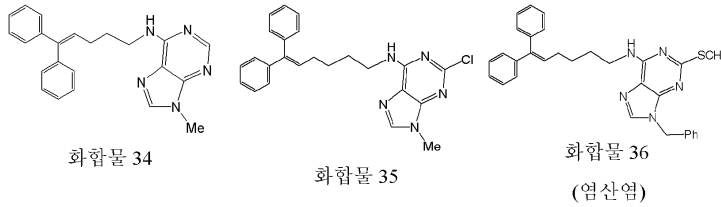
(염산염)



화합물 31

화합물 32

화합물 33

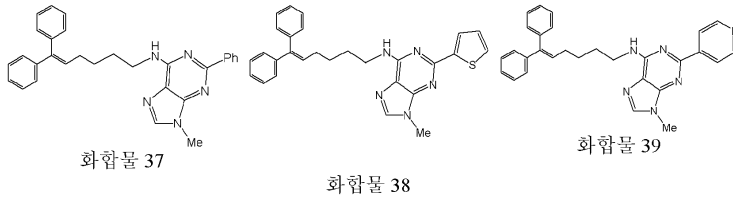


화합물 34

화합물 35

화합물 36

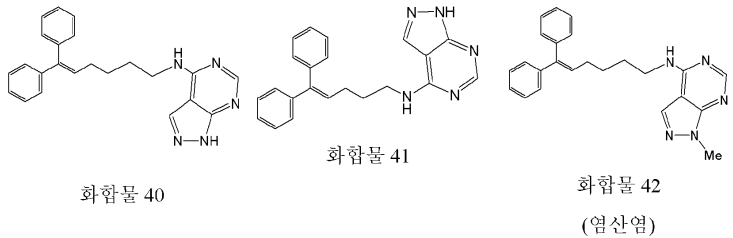
(염산염)



화합물 37

화합물 38

화합물 39

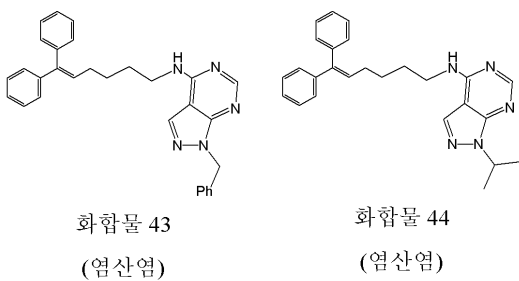


화합물 40

화합물 41

화합물 42

(염산염)



화합물 43

화합물 44

(염산염)

(염산염)

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에서 정의된 식 (I)의 화합물, 또는 그 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물 및 적어도 하나의 약학적으로 수용가능한 캐리어를 포함하는 것인 약학 조성물.

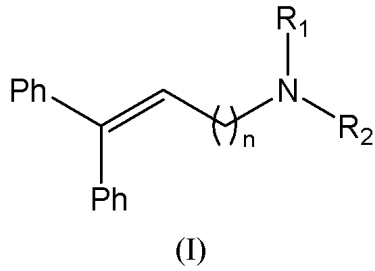
청구항 11

의약으로서 사용되기 위한 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 정의된 식 (I)의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물.

청구항 12

염증 질환 치료용 의약으로서 사용되기 위한 식 (I)의 화합물, 그 약학적으로 허용가능한 염, 전구 약물 또는

용매화물.



식에서,

Ph는 페닐;

n은 2, 3 또는 4;

R₁은 수소 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

R₂는 식 -[CH(R₃)]_m-R₄의 라디칼이고 여기서

m은 1, 0 또는 2로 이루어지는 군에서 선택되는 정수이고;

R₃은 적절한 경우, 수소, 페닐 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되고;

R₄는 비치환 헤테로 아릴, 치환 헤테로 아릴 및 치환 아릴 라디칼로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 치환기는 C₁-C₆ 알킬, C₇-C₁₁ 아릴알킬, 페닐, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d 또는 -C(O)R_e로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a, R_b, R_c, R_d, 및 R_e는 수소, C₁-C₆ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸 중에서 독립적으로 선택되며;

또는

R₁ 및 R₂는 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 치환 또는 비치환 헤테로아릴기를 형성하고, 여기서 치환기는 상기에서 정의된 바와 같다.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 염증성 질환은 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Disease, IBD), 류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA), 전립성 비대증, 바렛병, 천식, 골격근 및 건 손상, 궤양성 대장염, 리슈만편모충증 및 자가 면역 질환, 바람직하게는 크론병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 14

제12항에 있어서, 암 치료용으로 사용되는 것인 식 (I)의 화합물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 전이성 종양, 유방암, 식도암, 대장암, 대장 암종, 위암, 백혈병, 흑색종, 자궁 암종, 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 난소암, 난소 암종, 전립선암, 신세포암, 간암, 췌장 암종, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 골암, 피부암, 육종, 카포시 육종, 뇌종양, 근육종, 신경아세포종, 림프종 및 다발성 골수종으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 화합물.

명세서

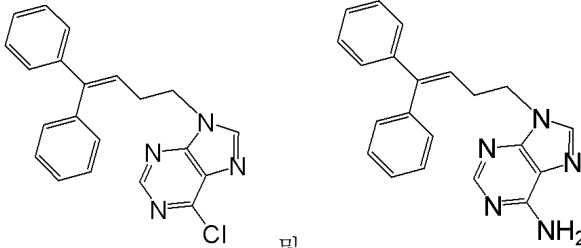
기술분야

[0001] 본 발명은 디페닐-유도체, 합성 방법, 그들을 포함하는 조성물 및 면역 조절 치료 (예를 들면, 면역 질환 또는 특정 종류의 암)를 위한 의약 제조에서의 용도에 관한 것이다.

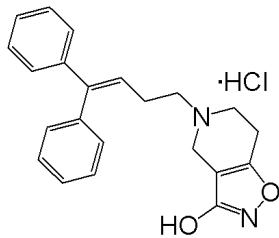
배경 기술

- [0002] 염증은, 백혈구의 축적 및 활성화로 이루어지고, 또한 독소 또는 세포 손상에 노출된 감염 위치에서의 혈장 단 백질로 이루어진 혈관성 조직의 선천적인 복잡한 면역계 반응이다.
- [0003] 염증은 백혈구 보충을 촉진하는 혈관 내의 변화로부터 시작된다.
- [0004] 국부적인 적응 면역 응답은 염증을 자극할 수 있다. 이것은 염증을 제어하고 조직 회복을 향상시키는 긍정적인 영향을 갖기는 하지만, 또한 조직 손상과 질병을 초래할 수도 있다.
- [0005] 소위 면역 염증은 항원에 대한 적응 면역 응답의 결과이다. 감염 위치에서의 세포 침투는 T 세포에 의해 생성된 사이토카인의 작용 결과 보충되는, 호중구와 대식 세포와 같은 선천적인 면역 시스템의 세포를 함유할 수 있다.
- [0006] 사이토카인은 다수의 선천적인 면역 및 적응 면역 반응을 조정하는 단백질 군이다. 동일한 사이토카인이 다수 종류의 세포에 의해 생성될 수 있으며, 동일한 사이토카인은 종종 서로 다른 종류의 세포에서 작용한다.
- [0007] 사이토카인은 감염 또는 항원 자극에 대한 반응으로서 합성되고, 그들은 통상 타겟 세포에 존재하는 높은 친화력 수용체에 결합되어 자가 분비 또는 측분비 방식으로 국부적으로 작용한다. 사이토카인은 또한 다수 종류의 세포에서 생장 인자로서 작용한다.
- [0008] 사이토카인은 제한된 수의 구조군에 속하는 수용체에 대한 고친화력 결합을 통해 그들의 작용을 조정한다. 다른 종류의 사이토카인은 JAK/STAT 경로와 같은 특정화된 신호화 경로를 이용한다.
- [0009] 사이토카인에 의해 조정되는 선천적 면역은 주로 활성화된 대식 세포에 의해 생성되고, 미생물에 대한 급성 염증 반응 조정체로서 TNF 및 IL-1; 감염 위치에서 백혈구 보충체로서의 케모카인; 대식세포-활성화 사이토카인 (IFN-감마) 생산 자극체로서 IL-12; 항바이러스 사이토카인으로서 I형 인터페론 및 대식 세포 저해제로서 IL-10 을 포함한다.
- [0010] 적응성 면역의 사이토카인 조절 및 제어, 활성화와 이펙터 상은 주로 항원 자극된 T 세포에 의해 생성되고, 주된 T 세포 생장 인자로서 IL-2; IgE 합성 및 통합 처녀 T 세포 (collaborating virgin T-cell)로부터의 Th2 세포의 발달 자극체로서의 IL-4; 호산구 활성화제로서 IL-5; 대식 세포 활성화제로서 IFN-감마 및 T-세포 증식 및 백혈구 활성화 저해제로서의 TGF-베타를 포함한다.
- [0011] CD4+ 통합 T-세포는 식세포-매개 면역에 유리한 IFN-감마를 분비하는 특정화된 Th1 이펙터 세포로 분화되거나 또는 IgE-, 호산구 및 비만 세포에 유리한, IL-4 및 IL-5를 분비하는 Th2 세포로 분화될 수 있다.
- [0012] 요약하면, 사이토카인은 병원균으로부터 숙주를 방어하는데 결정적인 다수의 역할을 하며, 또한 선천적 면역과 적응성 면역 간의 통합을 제공한다. 사이토카인은 또한 백혈구 생장 및 분화에 영향을 미치는 면역 반응의 정도와 특성을 제어한다. 마지막으로, 사이토카인은 하나의 항원에 특정한 소수의 백혈구가 항원을 제거하기 위한 다양한 이펙터 메커니즘을 활성화할 수 있도록 하는 중요한 확장 메커니즘을 제공한다. 사이토카인의 과량 생산 또는 작용은 병리적 결과를 낼 수도 있다.
- [0013] 사이토카인, 사이토카인의 가용성 수용체 또는 저해제의 투여는 현재로서는 급성 및 만성 면역 및 염증 질환과 관련된 생물합성 반응의 변형을 위한, 또한 다수 종류의 암 치료를 위한 신규하고 효과적인 접근 방법이다. 면역 전략에 의한 암 환자의 치료 가능성은 암 면역학자들과 생물학자들에게 희망을 부여한다. 이와 같은 관심의 주요 이유는 현재의 암 치료가 분할 세포를 파괴하거나 또는 세포 분할을 차단하는 약물에 의존하고 있으며, 이들 치료는 암 환자의 정상적인 세포 증식에 심각한 영향을 미친다는 사실에 근거한 것이다. 그러므로 암 치료는 상당한 이환율과 사망율을 초래한다. 이 치료방법과는 달리 면역 조절 치료는 생각할 수 있는 가장 높은 특이성과 가장 낮은 독성을 가진 치료법이 될 수 있다.
- [0014] 그러나, 사실상 거의 모든 이들 새로운 치료 도구들은 생물학적 기원을 가지며, 또한 단일 사이토카인에 매우 특화되어 있다. 이것은 일련의 내성 위험성 및 복잡한 면역 시스템에서 상당한 불균형을 생기게 하는 면역 반응 생성 및 유도 반응을 일으킬 위험을 포함한다.
- [0015] 소분자 및 비생물학적 화합물 외에 본 발명에 의한 일련의 화합물은 하나 이상의 관련 사이토카인에 분명하게 작용하지만 다른 사이토카인에 대해서는 작용하지 않고, 세포 생존가능성과 통상의 세포 생리 작용을 변형하지 않고, 급성 또는 만성 염증성 질환 또는 심지어 일부 종류의 암을 앓고 있는 숙주의 실제 면역 메커니즘을 통상의 것으로 되돌릴 수 있는 능력에 의해 엄격한 저해제 이상으로 조절체로서 잠재적으로 작용한다.

[0016] Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 2404는 뮤린 GABA 전달제 저해제로서 벤질-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-아민, 2-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-페놀, 3-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-페놀, 5-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-2-메톡시-페놀 및 4-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-2,6-디플루오로-페놀을 개시한다. Eur. J. Med. Chem. 1993, 28, 555, 727 및 783에서는 벤질-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-아민 및 상기 화합물의 추정 상의 치료적 용도로서 혈관 확장에 대해 개시하고 있다. Org. Lett. 1999, 1, 849 는 벤질-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-에닐-아민에 대해 개시하고 있지만, 상기 화합물의 생물학적 활성에 대해서는 보고하고 있지 않다. US 5,795,756호는 아데닐 시클라아제 저해제로서 6-클로로-9-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-9H-퓨린과 9-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-9H-퓨린-6-일아민, 즉



[0017] 을 개시하고 있다. 또한 Falch, E. et al는 Drug Dev. Res., 1990, 21, 169-188에서 GABA 흡수 저해제로서 5-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-아속사졸로[4,5-c]피리딘-3-올



[0018] 을 개시하고 있다.

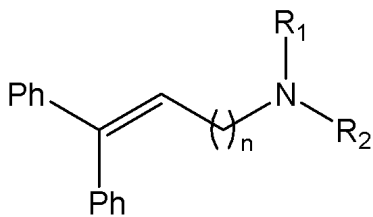
발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 하기 식 (I)의 화합물이 면역 조절 치료에 대해 흥미로운 활성을 나타낸다는 것을 발견하였다.

과제의 해결 수단

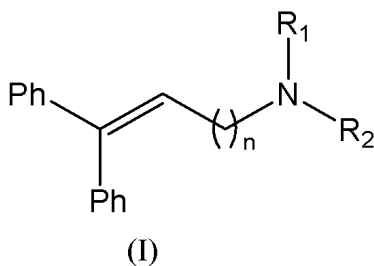
[0021] 따라서 본 발명의 제1 측면에 의하면, 본 발명은 화학식 (I)의 화합물, 그 염, 전구 약물 또는 용매화물에 관한 것이다.



(I)

[0022] 식에서,
 [0023] Ph는 페닐;
 [0024] n은 2, 3 또는 4;

- [0026] R₁은 수소 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0027] R₂는 식 -[CH(R₃)]_m-R₄의 라디칼이고 여기서
- [0028] m은 1;
- [0029] R₃은 적절한 경우, 수소, 페닐 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되고;
- [0030] R₄는 비치환 헤테로 아릴, 치환 헤테로 아릴 및 치환 아릴 라디칼로 이루어진 군에서 선택되고,
- [0031] 상기 치환기는 C₁-C₆ 알킬, C₇-C₁₁ 아릴알킬, 페닐, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d 또는 -C(O)R_e로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a, R_b, R_c, R_d, 및 R_e는 수소, C₁-C₆ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸 중에서 독립적으로 선택되며;
- [0032] R₁ 및/또는 R₃가 수소가 아닐 경우, R₄는 또한 비치환 페닐일 수 있으며;
- [0033] 또는
- [0034] R₁ 및 R₂는 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 치환 또는 비치환 헤테로아릴기를 형성하고, 여기서 치환기는 상기에서 정의된 바와 같고;
- [0035] 단,
- [0036] 2-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-페놀,
- [0037] 3-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-페놀,
- [0038] 5-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-2-메톡시-페놀,
- [0039] 4-[(4,4-디페닐-부트-3-에닐아미노)-메틸]-2,6-디플루오로-페놀,
- [0040] 벤질-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-에틸-아민,
- [0041] 6-클로로-9-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-9H-퓨린,
- [0042] 9-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-9H-퓨린-6-일아민 및
- [0043] 5-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-이속사졸로[4,5-c]피리딘-3-올은 식 (I)에 포함되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 다른 측면에 의하면 본 발명은 상기 정의된 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물과, 적어도 하나의 약학적으로 수용가능한 캐리어를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명의 또한 측면은 의약품의 상기 정의된 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 다른 측면은 염증성 질환 치료용 의약품의 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물에 관한 것이다.



- [0047] .
- [0048] 식에서,

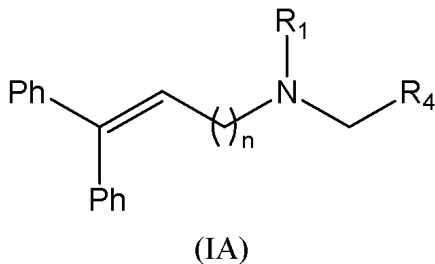
- [0049] Ph는 페닐;
- [0050] n은 2, 3 또는 4;
- [0051] R₁은 수소 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0052] R₂는 식 $-[\text{CH}(\text{R}_3)]_m-\text{R}_4$ 의 라디칼이고 여기서
- [0053] m은 1, 0, 또는 2로 이루어지는 군에서 선택되는 정수이고;
- [0054] R₃은 적절한 경우 수소, 페닐 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되고;
- [0055] R₄는 비치환 헥테로 아릴, 치환 헥테로 아릴 및 치환 아릴 라디칼로 이루어진 군에서 선택되고,
- [0056] 상기 치환기는 C₁-C₆ 알킬, C₇-C₁₁ 아릴알킬, 페닐, 5- 또는 6-원 헥테로아릴, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, $-\text{N}(\text{R}_a)(\text{R}_b)$, $-\text{OR}_c$, $-\text{SR}_d$ 또는 $-\text{C}(\text{O})\text{R}_e$ 로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a, R_b, R_c, R_d, 및 R_e는 수소, C₁-C₆ 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸 중에서 독립적으로 선택되며;
- [0057] 또는
- [0058] R₁ 및 R₂는 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 치환 또는 비치환 헥테로아릴기를 형성하고, 여기서 치환기는 상기에서 정의된 바와 같다.
- [0059] 또 다른 측면에 의하면 본 발명은 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매 화물의 염증성 질환의 치료용 의약의 제조에서의 용도에 관한 것이다.
- [0060] 또 다른 측면에서, 본 발명은 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 적어도 하나의 상기 기재한 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물의 치료적 유효량을 그와 같은 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0061] 다른 측면에 의하면, 본 발명은 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물의 합성 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1: 비히클로 치료된 대조군과 비교해서 이중 이식 동물 모델에서 화합물 3의 만성 림프구성 백혈병 (CLL)의 저해
- 도 2: 비히클로 치료된 대조군과 비교해서 이중 이식 동물 모델에서 다발성 골수종 (MM)의 저해
- 도 3: 만성 림프구성 백혈병을 가진 환자로부터의 세포의 생존 능력
- 도 4: 동소 동물 모델 (orthotopic animal model)에서 화합물 3의 결장암 저해. A: 도면은 비히클로 치료된 대조군과 비교해서 화합물 3, 5-F 우라실 (5-FU; 시험된 실험 조건에서 활성화되지 않음) 및 옥살리플라티늄 (OXA)의 종양 크기 감소 효과를 나타낸다. B: 그래프는 화합물 3 (NF), 옥살리플라티늄 (OXA), 5-F 우라실 (5-FU) 및 그들의 조합으로 치료된 마우스로부터의 인간 대장암 종양 무게를 나타낸다.
- 도 5: 비히클로 치료된 대조군과 비교해서 동소 동물 모델에서 화합물 3의 흑색종 저해. A: 흑색종 종양 루시페라아제 인 비보 활성의 PET 도면. B: 치료 종료 시 동물로부터의 흑색종 종양의 엑스 비보. C: 대조군 또는 화합물 3에 의한 치료 (n=4) 후의 흑색종 종양 무게. D: 대조군 또는 화합물 3에 의한 치료 (n=9) 후의 골수종 종양 무게
- 도 6: 비히클로 치료된 대조군과 비교해서 동소 동물 모델에서 화합물 3의 난소암 저해. A: 인 비보 종양 루시페라아제 활성의 PET 도면. B: 대조군과 화합물 3으로 치료된 동물로부터의 루시페라아제 신호의 정량화.
- 도 7: 화합물 3 (10 μM)로 치료된 EHEB (B-세포 만성 림프구성 백혈병). A: 히스토그램은 화합물 3에 의해 EHEB 세포에 유발된 세포 사멸을 나타낸다. B: 화합물 3-치료된 EHEB 세포에서 서로 다른 단백질 발현.
- 도 8: 화합물 3 (10 μM)로 치료된 HCT-116 세포 (결장 암종). A: 히스토그램은 화합물 3에 의해 인간 결장 암 HCT-116 세포주에서 유발된 세포 사멸을 나타낸다. B: 화합물 3-치료된 EHEB 세포에서 서로 다른 단백질 발현.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

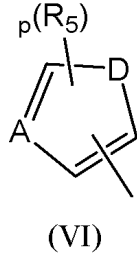
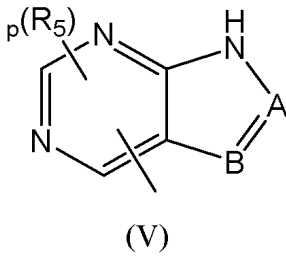
- [0063] 본 발명의 맥락에서 다음의 용어들은 하기에 설명된 의미를 가진다.
- [0064] 용어 " C_1-C_6 알킬"은 불포화를 함유하지 않는, 탄소와 수소 원자들로 이루어진 직쇄 또는 분지 탄화수소쇄 라디칼을 나타내며, 1 내지 6개, 바람직하게는 1 내지 3개 (" C_1-C_3 알킬")의 탄소 원자와 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 부착된 원자를 가지며, 비제한적으로 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, t-부틸, n-펜틸 등을 포함한다.
- [0065] 용어 "아릴"은 달리 지시되지 않으면 6 내지 18개, 바람직하게는 6 내지 10개, 더욱 바람직하게는 6개 또는 10개의 탄소 원자를 가지고, 탄소-탄소 결합에 의해 결합되거나 축합된 1, 2 또는 3개의 방향족을 포함하는 방향기를 나타내며, 비제한적으로, 또한 예시적으로 페닐, 나프틸, 디페닐, 인데닐, 페난트릴 등을 포함한다. 바람직하게는 "아릴"은 페닐을 나타낸다.
- [0066] "헤테로아릴"은 탄소 원자와, 질소, 산소 및 황으로 이루어지는 군에서 선택되는 1 내지 5개의 헤테로 원자로 이루어지는, 안정된 3- 내지 10-원 방향 고리 라디칼, 바람직하게는 5- 내지 6-원 방향 고리 라디칼을 나타낸다. 본 발명의 목적을 위해, 헤테로아릴은 모노시클릭, 바이시클릭 또는 트리시클릭 고리 시스템일 수 있으며, 또한 축합 고리 시스템을 포함할 수 있고, 그들 각각은 탄소 원자와, 질소, 산소 및 황으로 이루어지는 군에서 선택되는 1 내지 5개의 헤테로원자로 이루어지는 안정한 3- 내지 10-원 방향 고리 라디칼, 바람직하게는 5- 또는 6-원 방향족 고리 라디칼이다. 헤테로아릴 라디칼에서 질소, 탄소 또는 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있으며; 질소 원자는 선택적으로 4급화될 수 있다. 이와 같은 헤테로아릴의 예에는 비제한적으로 벤즈이미다졸, 벤조티아졸, 퓨란, 피롤, 티오펜, 피리딘, 피리미딘, 이소티아졸, 이미다졸, 인돌, 퓨린, 퀴놀린, 티아디아졸이 포함된다. 바람직하게는 "헤테로아릴"은 퓨란, 티오펜, 피리딘 및 벤즈이미다졸을 나타낸다.
- [0067] "아라킬"은 벤질 및 페네틸과 같은 알킬기에 의해 분자의 나머지 부분에 연결된 아릴기를 나타낸다.
- [0068] 용어 "할로젠"은 브로모, 클로로, 요오도 또는 플루오로를 나타낸다.
- [0069] **화학식 (I)의 화합물**
- [0070] 바람직한 실시 형태에 의하면 "치환된"이란 C_1-C_6 알킬, C_7-C_{11} 아릴알킬, 페닐, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, $-N(R_a)(R_b)$, $-OR_c$, $-SR_d$ 또는 $-C(O)R_e$ 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 라디칼을 나타낸다. 여기서, R_a , R_b , R_d , 및 R_e 는 수소, C_1-C_6 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸로부터 독립적으로 선택되고, R_c 는 C_1-C_6 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸로 이루어지는 군에서 선택되며, 단 $-N(R_a)(R_b)$ 는 $-NH_2$ 가 아니다. 치환 라디칼, 예를 들면, 아릴 또는 치헤테로아릴은 그 자유 위치 중 하나에 치환될 수 있다. 본 발명의 실시 형태에서, 치환된 라디칼은 그들의 1, 2, 3 또는 4 위치, 바람직하게는 1 또는 2 위치에서 치환되었다.
- [0071] 본 발명의 실시 형태에 의하면, 치환기는 메틸, 이소프로필, 페닐메틸, 페닐, 티오펜, 피리딘, F, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, 아미노, 메톡시, 트리플루오로메톡시 및 티오메톡시로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0072] 본 발명의 실시 형태는 화학식 (IA), 또는 그 염, 전구 약물 또는 용매화물에 관한 것이다.



- [0073]
- [0074] 식에서, Ph, Ph, n, R_1 및 R_4 는 상기에서 정의한 바와 같다.
- [0075] 본 발명의 실시 형태에 의하면, R_4 는 티에닐, 퓨릴, 피리딜, 1H-벤즈이미다졸, 9H-퓨린, 1H-이미다졸 및 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘으로 이루어진 군에서 선택되는 헤테로아릴이고, 여기서 각각의 기는 상기에서 정의된 바

와 같이 치환될 수 있다.

[0076] 본 발명의 다른 실시 형태는 화학식 (I) 또는 (IA), 또는 그 염, 전구 약물 또는 용매화물이며, 식에서 R_4 는 식 (V) 또는 (VI)의 기이다.



[0077]

[0078] 식에서,

[0079] A와 B는 -CH 및 -N-으로부터 독립적으로 선택되고;

[0080] D는 -O-, -S- 및 -NH-로 이루어지는 군에서 독립적으로 선택되고;

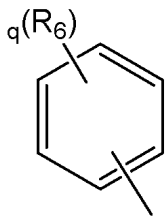
[0081] p는 0, 1, 2 또는 3으로 이루어지는 군에서 선택되는 정수이고;

[0082] 각각의 R_5 는 C_1-C_3 알킬, 페닐, 페닐메틸, 5- 또는 6-원 헤테로아릴, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, $-N(R_a)(R_b)$, $-SR_d$ 또는 $-C(O)R_e$ 로 이루어지는 군에서 선택되며, 여기서 R_a , R_b , R_d 및 R_e 는 수소, C_1-C_3 알킬, 페닐 및 트리플루오로메틸로부터 독립적으로 선택되고, 단, 식 (V) $-N(R_a)(R_b)$ 의 화합물은 $-NH_2$ 는 아니고;

[0083] 상기 식 (V) 또는 (VI)의 기는 자유 위치 중 어느 하나를 통해 분자의 나머지 부분에 부착된다.

[0084] 본 발명의 실시 형태에 의하면, 각 R_5 는, 존재할 경우, 메틸, 이소프로필, 페닐메틸, 페닐, 티오펜, 피리딘, F, Cl, Br, I, 트리플루오로메틸, 시아노, 아미노, 메톡시, 트리플루오로메톡시 및 티오메톡시로 이루어지는 군에서 독립적으로 선택된다. 추가 실시 형태에 의하면, p는 1 또는 2이다.

[0085] 본 발명의 실시 형태에 의하면, R_4 는 식 (VII)의 기이다.



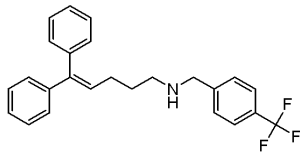
[0086]

[0087] 식에서, R_6 는 $-OCF_3$, OC_1-C_3 알킬, F, Cl, Br, I 및 $-CN$ 으로 이루어진 군에서 선택되고; q는 0, 1, 2, 또는 3으로 이루어진 군에서 선택되는 정수이며, 상기 식 (VII)의 기는 자유 위치 중 어느 하나를 통해 분자의 나머지 부분에 부착된다.

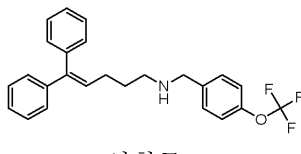
[0088] 본 발명의 실시 형태에 의하면, R_1 및 R_2 는 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 1H-벤즈이미다졸, 9H-퓨린, 1H-이미다졸 및 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 라디칼을 형성한다.

[0089] 본 발명의 실시 형태에 의하면, R_1 은 수소 또는 메틸이다.

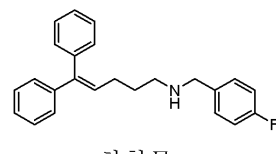
[0090] 본 발명의 실시 형태에서, 식 (I)의 화합물은 다음으로 이루어지는 군, 또는 그 염, 전구 약물 및/또는 용매화물에서 선택된다.



화합물 1
(염산염)

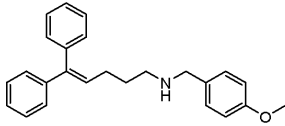


화합물 2
(염산염)

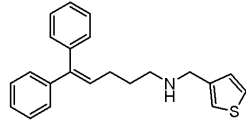


화합물 3
(염산염)

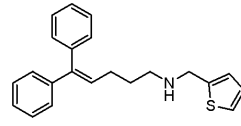
[0091]



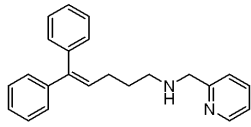
화합물 4
(염산염)



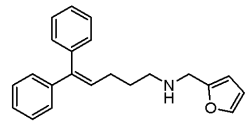
화합물 5
(염산염)



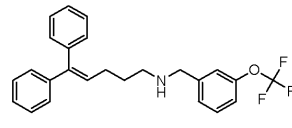
화합물 6
(염산염)



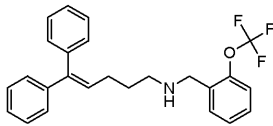
화합물 7
(염산염)



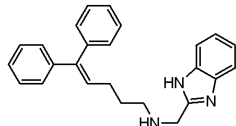
화합물 8
(염산염)



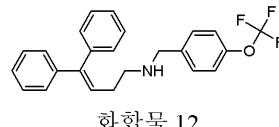
화합물 9
(염산염)



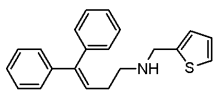
화합물 10
(염산염)



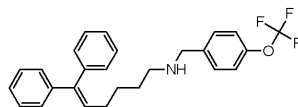
화합물 11
(염산염)



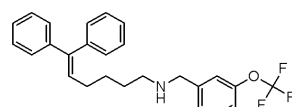
화합물 12
(염산염)



화합물 13
(염산염)

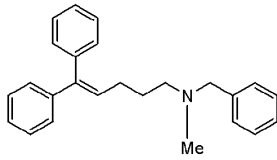


화합물 14
(염산염)

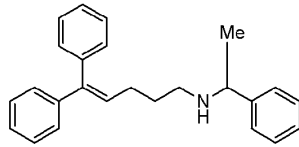


화합물 15
(염산염)

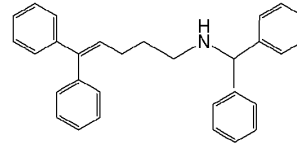
[0092]



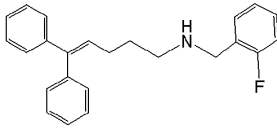
화합물 16
(염산염)



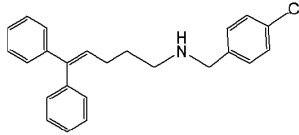
화합물 17
(염산염)



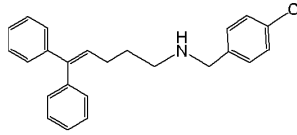
화합물 18
(염산염)



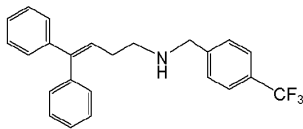
화합물 19
(염산염)



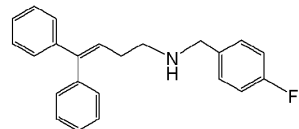
화합물 20
(염산염)



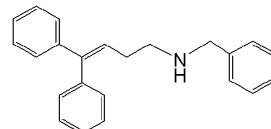
화합물 21
(염산염)



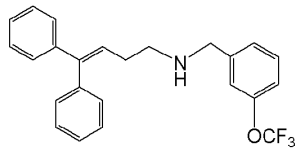
화합물 22
(염산염)



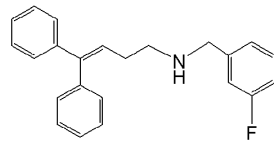
화합물 23
(염산염)



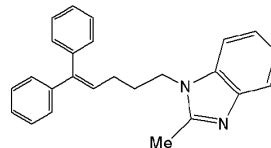
화합물 24
(염산염)



화합물 25
(염산염)

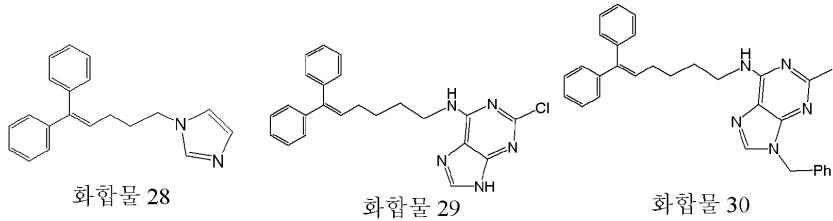


화합물 26
(염산염)

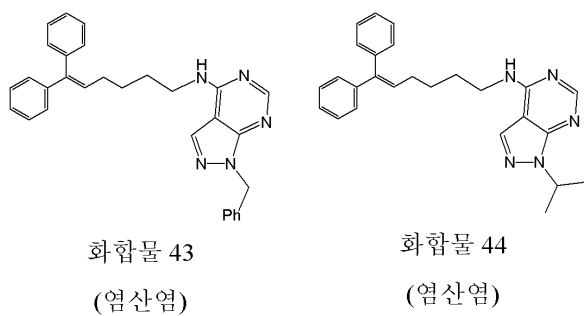
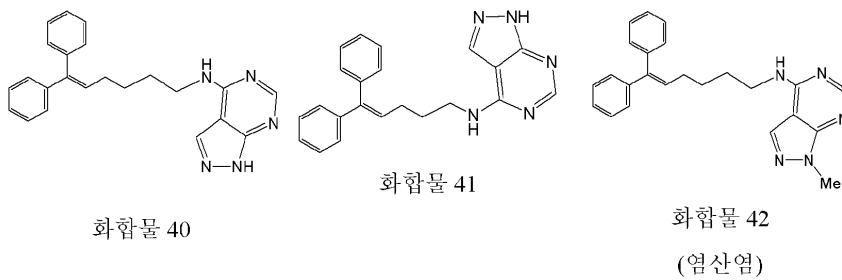
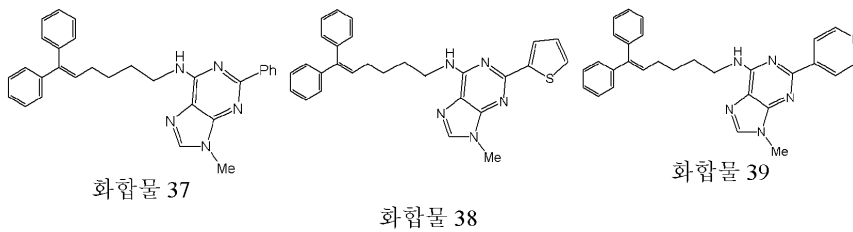
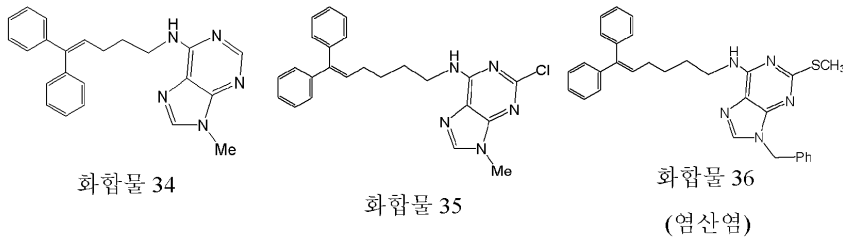
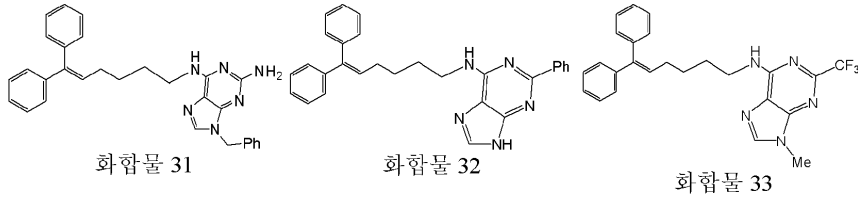


화합물 27

[0093]



(염산염)



[0094]

[0095]

[0096]

화학식 (I)의 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 수용가능한 염의 형태, 용매화물 또는 전구 약물의 형태 일 수 있다. 약학적으로 수용가능한 그 염, 용매화물 또는 전구 약물은 환자에게 투여되었을 때 여기서 설명한 바와 같은 화합물을 제공 (직접 또는 간접적으로)할 수 있는 염, 용매화물 또는 전구 약물에 관한 것이다. 그럼에도, 약학적으로 허용 불가능한 염 역시, 이들이 약학적으로 허용 가능한 염의 제조에 유용할 수 있기 때문에

본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 염, 전구 약물 및 유도체는 이 기술 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. "약학적으로 수용가능한"이란 바람직하게는 생리적으로 용인될 수 있고, 인간 또는 동물에게 투여되었을 때 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 그와 유사한 불쾌한 반응을 전형적으로 초래하지 않는 분자 및 조성물에 관한 것이다. "약학적으로 허용가능한"이란 용어는 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 또는 미국 약전 또는 동물, 더욱 특별하게는 인간용으로 일반적으로 인정되는 약전에 포함되는 것이다.

[0097] 본 발명에 의한 용어 "용매화물"은 비공유 결합을 통해 그에 결합된 다른 분자 (아마도 극성 용매)를 가진 본 발명에 의한 유효 화합물의 어떤 형태를 의미하는 것으로 이해된다. 용매화물의 예에는 수화물 및 알코올레이트, 예를 들면 메탄올레이트가 포함된다. 바람직하게는 용매화물은 약학적으로 수용가능한 용매화물이다.

[0098] 염과 용매화물의 제조는 이 기술 분야에서 공지된 방법에 의해 수행된다. 예를 들면, 여기서 제공되는 화합물의 약학적으로 수용가능한 염은 통상의 화학적인 방법에 의해 하나 이상의 기본 성분을 함유하는 모 화합물로부터 합성된다. 일반적으로 그와 같은 염은 예를 들면, 물, 또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 내에서 이들 화합물의 자유 염기 형태를 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조된다. 일반적으로, 에테르, 에틸, 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수용성 매체가 바람직하다. 산부가염의 예에는 무기산 부가염, 예를 들면 염산염, 브롬화수소산염, 요오드화수소산염, 황산염, 질산염, 인산염 및 유기산 부가염, 예를 들면 아세테이트, 말레에이트, 푸마레이트, 시트레이트, 옥살레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 말레이트, 만델레이트, 메탄설폰네이트 및 p-톨루엔설폰네이트가 포함된다. 바람직한 실시 형태에서, 상기 염은 염산염 또는 푸마레이트 염이다.

[0099] 하나의 바람직한 약학적으로 수용가능한 형태는 약학적 조성물에서 그와 같은 형태를 포함하는 결정형이다. 염과 용매화물의 경우, 부가 이온 성분과 용매 성분은 반드시 비독성이어야 한다. 본 발명의 화합물은 다른 다형 형태로 존재할 수 있으며, 본 발명은 그와 같은 모든 형태를 포함하도록 의도한다.

[0100] 식 (I)의 전구 약물인 모든 화합물은 본 발명의 범위 내에 포함된다. "전구 약물"이라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 인 비보에서 본 발명의 화합물로 전환되는 그 유도체를 포괄한다. 주어진 활성 화합물의 전구 약물을 제조하는 잘 알려진 방법의 예들이 이 기술 분야의 통상의 기술자들에게 알려져 있으며, 예컨대 Krogsgaard-Larsen et al.,의 Textbook of Drug design and Discovery, Taylor & Francis (April 2002)에서 찾아볼 수 있다. 이 기술 분야의 통상의 기술자들은 이와 같은 유도체들을 용이하게 도출할 수 있으며, 분자 내에 존재하는 관능기에 따라, 비제한적으로 에스테르, 아미노산 에스테르, 포스페이트 에스테르, 금속염 설폰네이트 에스테르, 카바메이트 및 아마이드를 포함한다.

[0101] 본 발명의 화합물은 또한 하나 이상의 동위적으로 풍부한 원소가 존재한다는 점에서만 다른 화합물을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들면 중수소 또는 삼중수소에 의해 수소가 치환되거나, ¹³C- 또는 ¹⁴C-풍부화된 탄소에 의해 탄소가 치환되거나 또는 ¹⁵N-풍부화된 질소에 의해 질소가 치환된 것을 제외하고는 동일 구조를 가지는 화합물 역시 본 발명의 범위 내에 포함되도록 의도된다.

[0102] 상술한 식 (I)에 의해 표시되는 본 발명의 화합물은 키랄 중심에 따른 거울상 이성질체, 또는 다중 결합의 존재에 따른 이성질체 (예를 들면 Z, E)를 포함할 수 있다. 단일 이성질체, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체 및 이들의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0103] **식 (I)의 화합물의 용도**

[0104] 바람직한 실시 형태에 의하면, 염증성 질환은 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Disease, IBD), 류마티스 관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA), 전립선 비대증, 바렛병, 천식, 골격근 및 건 손상, 궤양성 대장염, 리슈만편 모충증 및 자가 면역 질환, 바람직하게는 크론병으로부터 선택된다. 추가 실시 형태에 의하면 상기 질환은 예를 들면 전이성 종양, 유방암, 식도암, 대장암, 대장 암종, 위암, 백혈병, 골수종, 자궁 암종, 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 난소암, 난소 암종, 전립선암, 신세포암, 간암, 췌장 암종, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 골암, 피부암, 육종, 카포시 육종, 뇌종양, 근육종, 신경아세포종, 림프종 및 다발성 골수종으로 이루어진 군에서 선택되는 암이다.

[0105] 본 명세서의 맥락에서 "치료", "치료하다", 또는 "치료하는"이라는 용어는 상기 질병, 또는 상기 질병과 관련된 하나 이상의 징후를 예방, 개선 또는 제거하기 위해 본 발명에 의한 화합물 또는 제제를 투여하는 것을 의미한다.

다. "치료"는 또한 상기 질병의 생리학적 후유증의 예방, 개선 또는 제거를 포함한다.

[0106] 본 발명의 맥락에서 "개선하다"라는 용어는 치료된 환자의 상황에 대한 주관적 (환자의, 또는 환자에 대한 느낌) 또는 객관적 (측정된 파라미터) 개선을 의미하는 것으로 이해된다.

[0107] **약학적 조성물**

[0108] 본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명은 상기에서 정의된 식 (I)의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물 및 적어도 하나의 약학적으로 수용가능한 캐리어를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0109] "캐리어"라는 용어는 희석제, 보조제, 부형제 또는 그에 의해 유효 성분이 투여되는 비히클을 말한다. 그와 같은 약학적 캐리어는 멸균 액체, 예를 들면 물과, 석유, 동물유, 식물유 또는 합성 기원의 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 미네랄유, 참깨유 등을 포함하는 것이다. 물 또는 식염수 수용액, 및 수용성 텍스트로스 및 글리세롤 수용액이 바람직한 캐리어로서, 특히 주사가능한 용액으로서 사용된다. 적절한 약학적 캐리어는 E.W.Martin 에 의한 "Remington's Pharmaceutical Sciences", 21st Edition, 2005; 또는 Rowe C. R.; Paul J. S.; Marian E. Q.,에 의한 "Handbook of Pharmaceutical Excipients" sixth Edition에 기재되어 있다. 바람직하게는 연방 또는 주정부의 관리 기관에 의해 승인된 것 또는 미국 약전 또는 동물, 특히 인간에 대해 사용되기 위해 일반적으로 승인된 약전에 기재된 것이다.

[0110] 본 발명의 약학 조성물을 투여하기 위한 바람직한 약학적 형태를 제조하기 위해 필요한 캐리어 및 보조 성분은 다른 요인들 중 선택된 약학적 투여 형태에 따라 결정될 것이다. 상기 약학적 조성물의 약학적 투여 형태는 이 기술 분야의 당업자에게 공지된 통상의 방법에 따라 제조된다. 서로 다른 유효 성분의 투여 방법, 그들의 제조에 사용되는 부형제 및 방법에 대한 리뷰는 E.W.Martin에 의한 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 21st Edition, 2005; 또는 Rowe C. R.; Paul J. S.; Marian E. Q.,에 의한 "Handbook of Pharmaceutical Excipients" sixth Edition에서 찾을 수 있다.

[0111] 약학적 조성물의 예에는 경구, 국부 또는 비경구 투여를 위한 고체 (정제, 알약, 캡슐, 과립 등) 또는 액체 (용액, 서스펜션 또는 에멀전) 조성물이 포함된다.

[0112] 바람직한 실시 형태에서, 약학적 조성물은 경구 형태이다. 경구 투여를 위한 적절한 복용형은 정제와 캡슐일 수 있고, 예를 들면 시럽, 아카시아, 젤라틴, 솔비톨, 트래거캔스 또는 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제; 예를 들면 락토스, 슈가, 옥수수 전분, 칼슘 포스페이트, 솔비톨 또는 글리신과 같은 충전제; 예를 들면 마그네슘 스테아레이트와 같은 정제 윤활제; 전분, 폴리비닐피롤리돈, 소듐 전분 글리콜레이트, 또는 미정질 셀룰로오스와 같은 붕괴제; 또는 소듐 라우릴 설페이트와 같은 약학적으로 수용가능한 습윤제와 같은 이 기술 분야에서 공지된 종래의 부형제를 함유할 수 있다.

[0113] 고형 경구 조성물은 혼합, 충전 또는 정제화의 종래의 방법에 의해 제조될 수 있다. 다량의 충전제를 사용하는 이들 조성물 전체에 걸쳐 유효 성분을 분포시키기 위해 반복된 혼합 조작이 사용될 수 있다. 그와 같은 조작은 이 기술 분야에서 통상적인 것이다. 정제는 예를 들면 습윤 과립화 또는 건조 과립화에 의해 만들어질 수 있고, 선택적으로 통상의 제약 실무에서 잘 알려진 방법에 따라 코팅, 특히 장용성 코팅될 수 있다.

[0114] 약학적 조성물은 또한 적절한 단위 투여형으로 멸균 용액, 서스펜션 또는 동결 건조 제품과 경구 투여형으로 적용될 수 있다. 적절한 부형제, 예를 들면 벌킹제, 버퍼링제 또는 계면활성제가 사용될 수 있다.

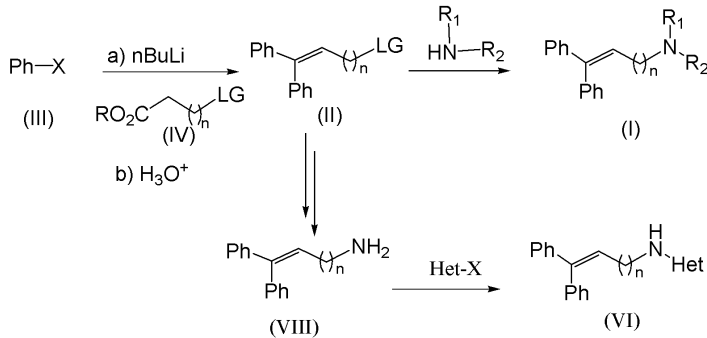
[0115] 언급된 제제는 스페인 및 미국 약전과 유사한 참조 문헌에 설명되거나 언급된 것과 같은 표준 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0116] 일반적으로 본 발명의 화합물의 유효 투여량은 선택된 화합물의 상대적 효율성, 치료할 질환의 정도 및 환자의 체중에 따라 달라진다. 그러나 유효 화합물은 예를 들면 전형적인 일일 투여량인 0.01 내지 1000 mg/kg/일의 범위로 하루에 한 번 이상, 예를 들면 하루에 1, 2, 3 또는 4회 투여될 수 있다.

[0117] 본 발명의 이들 약학적 조성물은 다른 유효 성분, 예를 들면 염증성 질환의 치료를 위한 다른 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 조성물은 동시에, 개별적으로 또는 연속적인 방식의 투여를 위해 각각의 성분 (식 (I)의 화합물 또는 그 약학적으로 수용가능한 염, 전구 약물 또는 용매화물 및 추가적 유효 성분)의 제조에서 사용될 수 있다.

[0118] 식 (I)의 화합물의 합성

[0119] 본 발명의 화합물은 이용가능한 합성 방법에 의해 다단계 시퀀스로 합성될 수 있다. 예를 들면 화합물들은 하기의 일반 스킴 1에서 요약한 방법에 의해 제조될 수 있다.



[0120]

[0121]

스킴 1

[0122] 특정 실시 형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 염기와 유기 용매의 존재 하에서 유도체 (II)와, R₁ 및 R₂를 가지는 아민과의 치환 반응으로 제조될 수 있다. 바람직한 실시 형태에 의하면, 디이소프로필 에틸 아민 또는 포타슘 카보네이트가 염기로서 사용된다. 다른 바람직한 실시 형태에 의하면, 유기 용매는 아세토니트릴 또는 에탄올이다. 화합물 (II)에 존재하는 이탈기 (LG)는 바람직하게는 할라이드와 설포네이트로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는 브로마이드이다.

[0123] 또한, 아민이 일차 아민인 경우 (R₁ = H), 얻어지는 화합물 (I)은 염기의 존재 하에서 알킬 할라이드 (R₁-X; 여기서 R₁은 C₁-C₆ 알킬 또는 C₇-C₁₅ 아릴킬)로 처리하여 추가 알킬화될 수 있다.

[0124] 특정 실시 형태에서, 식 (II)의 화합물은 식 (IV)의 에스테르에 페닐-리튬 할라이드를 부가하고, 또한 탈수화 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 바람직한 실시 형태에 의하면, 오르가노리튬 화합물은 페닐 할라이드에 n-부틸리튬을 부가함으로써 제조된다. 다른 바람직한 실시 형태에 의하면, 탈수 단계는 산의 존재 하에서 수행된다. 바람직한 실시 형태에서, 산은 H₂SO₄이다. 바람직하게는 화합물 (II)의 합성은 에테르 용매의 존재 하에서 수행된다. 더욱 바람직하게는 상기 용매는 디에틸 에테르 및 테트라하이드로퓨란으로부터 선택된다.

[0125] 특정 실시 형태에서, 식 (VI)의 화합물, 즉 식 (I)의 화합물에서 R₁이 수소, R₂는 -[CH(R₃)]_m-R₄-, m은 0, R₄는 여기서 정의된 바와 같은 치환 또는 비치환 헤테로 아릴인 경우의 화합물은 염기와 유기 용매의 존재 하에서 식 (VIII)의 아민과, 대응하는 치환 또는 비치환 할로젠화 헤테로아릴 유도체 (Het-X; X는 F, Br, Cl 또는 I)의 반응에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 실시 형태에 의하면, 디이소프로필 에틸 아민 또는 포타슘 카보네이트가 염기로서 사용된다. 다른 바람직한 실시 형태에 의하면, 유기 용매는 에탄올이다. 아민의 알킬화를 위한 추가 조건은 당업자에게 알려져 있다.

[0126] 특정 실시 형태에서, 식 (VIII)의 화합물은 DMF에서 화합물 (III)과 소듐 아자이드와의 반응 및 이들 아자이드의 THF 내에서 트리페닐포스핀과의 이어지는 환원에 의해 제조될 수 있다.

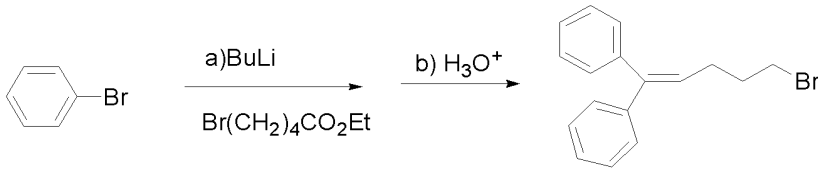
[0127] 본 발명은 또한 하기의 실시예에 의해 설명된다. 이에 대한 설명은 청구범위에서 정의된 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0128] 실시예

[0129] 본 발명에 의한 식 (I)의 화합물은 하기에서 상세하게 제시되는 일반적인 제조 전략에 따라 제조된다. 상기 화합물 중 일부의 상세한 제조에 대해 이하에서 설명한다. 사용된 모든 반응물은 상업적으로 이용가능하다.

[0130] 실시예 1: (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-플루오로-벤질)-아민 하이드로클로라이드의 합성 (화합물 3)

[0131] 단계 1: 5-브로모-1,1-비스페닐펜텐의 합성

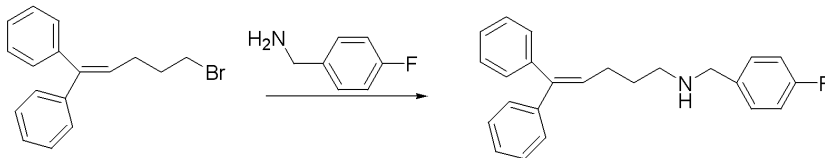


[0132]

[0133] 무수 Et₂O (60 mL) 중에서 브로모벤젠 (20.86 mL, 0.225 mol) 용액을 아르곤 분위기 하에서 온도를 5-10°C로 유지하면서 무수 Et₂O (100 mL) 중의 2.5M *n*-부틸리튬 (100 mL, 0.250 mol) 혼합물에 부가하였다. 혼합물이 -70°C 까지 냉각되기 전까지 15분간 10°C에서 계속 교반하였다. 무수 Et₂O (60 mL) 중에서 에틸 5-브로모발레레이트 (14.54 mL, 0.090 mol)를 온도를 -65°C로 유지하면서 부가하였다. 부가 완료 시, 혼합물을 -70°C에서 2.5 시간 동안 교반하였다. 냉수 (75 mL)와 차가운 수용성 1 N HCl (35 mL)을 온도를 0°C 미만으로 유지하면서 연속적으로 부가하였다. 반응 혼합물을 온도가 > 0°C로 상승하도록 15분 동안 교반하고, 상을 분리하였다. 수용성 상을 Et₂O (75 mL)로 추출하고, 결합된 유기상을 물 (60 mL)과 염수 (60 mL)로 세정하였다. 상기 용액을 무수 소듐 설페이트 상에서 건조하고, 상기 용매를 진공 증류하여 46.5 g의 고체를 얻었고, 이것을 2-프로판올 (225 mL)에 용해시켰다. 20% 수용성 H₂SO₄ 용액 (25 mL)을 부가하고, 혼합물을 환류 하에 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 증류하여 CH₂Cl₂ (400 mL)과 포화 용액 (75 mL)로 분획되는 잔사를 얻었다. 상을 분리하고, 수용성 상을 CH₂Cl₂(75 mL)로 추가 추출하였다. 결합된 유기상은 물 (75 mL), 염수 (75 mL)로 세정하고, 무수 소듐 설페이트 상에서 건조하였다. 용매를 감압 증류하여 황색 오일로서 5-브로모-1-1-비스페닐펜텐 (20.0 g, 73.7%)을 얻었다. ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.2-7.4 (m, 10 H); 6.2 (t, 1H); 3.3 (t, 2H); 2.3 (q, 2H); 1.9 (q, 2H).

[0134] 추가 화합물:

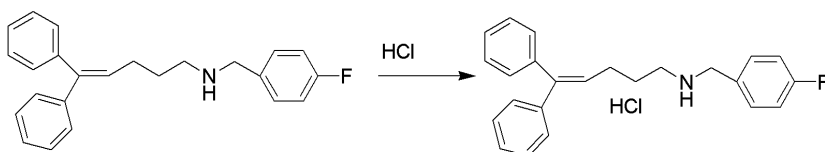
[0135] 단계 2. (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-플루오로-벤질)-아민의 합성



[0136]

[0137] 4-플루오로-벤질아민 (0.62 g, 5 mmol)과 K₂CO₃ (0.7 g, 5 mmol)을 25mL 아세토니트릴 중의 5-브로모-1-1-비스페닐펜텐 (0.75 g, 2.5 mmol) 용액에 가하였다. 반응을 16시간 동안 교반하면서 환류 가열하였다. 용매를 감압 하에 제거하고, 물을 가한 다음 혼합물을 CH₂Cl₂ (3 x 50 mL)로 추출하였다. 유기층을 무수 소듐 설페이트 상에서 건조하고, 용매를 감압 하에 증류하여 얻어진 오일을 플래쉬 크래마토그래피 (AcOEt/헵탄/TEA 45:55:1)로 정제하여 황색 오일로서 (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-플루오로-벤질)-아민 0.58 g (수율 67.1%)로 얻었다. ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.2-7.5 (m, 12H); 7.0-7.1 (m, 2H); 6.2 (t, 1H); 3.8 (s, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.3 (c, 2H); 1.7 (q, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃), δ (ppm): 163.2; 143.4; 141.9; 139.5; 132.5; 132.3; 129.6; 128.3; 128.1; 127.1; 126.6; 125.7; 116.3; 115.9; 49.6; 45.3; 26.7; 25.8.

[0138] 단계 3. (5,5-페닐-펜트-4-에닐)-(4-플루오로-벤질)-아민 하이드로클로라이드 (화합물 3)의 합성



[0139]

[0140] 무수 Et₂O (3 mL, 3 mmol) 중에서 HCl 1M 용액을 100 mL의 무수 Et₂O 중에서 (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-플루오로-벤질)-아민 (1 g, 3 mmol) 용액에 10분 이내에 부가하였다. 반응을 30분간 교반하였다. 고체를 여과하고,

결정화 접시로 옮기고, 진공 오븐으로 50℃에서 건조하였다 (0.9 g, 수율 84.7%). MP= 128.0-130.1 °C. ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 9.9 (bs, 2H); 7.6-7.5 (m, 2H); 7.3-7.0 (m, 12H); 5.9 (t, 1H); 4.0 (bs, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.2-1.9 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃), δ (ppm): 163.2; 143.4; 141.9; 139.5; 132.5; 132.3; 129.6; 128.3; 128.1; 127.1; 126.6; 125.7; 116.3; 115.9; 49.6; 45.3; 26.7; 25.8.

- [0141] 화학식 (I)에 대해 상기 설명한 일반적인 합성 방법, 특히 5-브로모-1,1-비스페닐헨텐과 대응하는 아틸벤질아민의 반응에 의해 다음 화합물을 얻었다.
- [0142] **실시예 2:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-트리플루오로메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 2) ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.2 (m, 14H); 6.1 (t, 1H); 3.8 (s, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.7 (m, 2H).
- [0143] **실시예 3:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-트리플루오로메틸벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 1) m.p.: 121.4-122.7 °C.
- [0144] ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.1 (s, 2H); 7.7-7.6 (m, 4H); 7.0-6.8 (m, 10H); 5.9 (t, 2H); 4.0 (s, 2H); 2.6 (bs 2H); 2.1-1.9 (m, 4H).
- [0145] **실시예 4:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(4-메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물) m.p.: 69.2-73.8 °C.
- [0146] ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 9.7 (bs, 2H); 7.4 (d, 2H); 7.3-7.0 (m, 10H); 6.8 (d, 2H); 5.9 (t, 1H); 3.9 (bs 2H); 3.7 (s, 3H); 2.6 (bs, 2H); 2.1-1.9 (m, 4H).
- [0147] **실시예 5:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-티오펜-3-일메틸아민 하이드로클로라이드 (화합물 5). m.p.: 108.0-109.7 °C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 9.8 (bs, 2H); 7.5-7.4 (m, 1H); 7.3-7.0 (m, 12H); 5.9 (t, 1H); 4.0 (bs, 2H); 2.7 (bs, 2H); 2.1-1.9 (m, 4H).
- [0148] **실시예 6:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-티오펜-2-일메틸아민 하이드로클로라이드 (화합물 6). m.p.: 161.0-161.6 °C. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.4-7.1 (m, 11H); 6.9 (m, 2H); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.6 (m, 2H).
- [0149] **실시예 7:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)피리딘-2-일메틸아민 하이드로클로라이드 (화합물 7). m.p.: 125.0-126.9 °C. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8.5 (m, 1H); 7.8 (m, 2H); 7.4-7.0 (m, 11H); 5.9 (t, 1H); 4.4 (s, 2H); 2.9 (t, 2H); 2.2-2.0 (m, 4H).
- [0150] **실시예 8:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)퓨란-2-일메틸아민 하이드로클로라이드 (화합물 8). m.p.: 139.0-141.3 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 9.5 (bs, 2H); 7.7 (m, 1H); 7.5-7.0 (m, 10H); 6.6(m, 1H); 6.5 (m, 1H); 6.0 (t, 1H); 4.1 (bs, 2H); 2.8 (bs, 2H); 2.1-2.0 (m, 2H); 1.8-1.7 (m, 2H).
- [0151] **실시예 9:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(3-트리플루오로메톡시-벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 9). m.p.: 102.4-104.0 °C. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.0 (bs 2H); 7.6-7.0 (m, 14H); 5.9 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.7 (bs, 2H); 2.1-1.9 (m, 4H).
- [0152] **실시예 10:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(2-트리플루오로메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 10). m.p.: 109.0-110.7 °C. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.0 (bs, 2H), 8.0 (m, 1H); 7.4-7.0 (m, 13H); 5.9 (t, 1H); 4.2 (s, 2H); 2.7 (bs, 2H); 2.1-2.0 (m, 4H).
- [0153] **실시예 11:** (1H-벤조이미다졸-2-일메틸)-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)아민 하이드로클로라이드 (화합물 11). m.p.: 251.0-253.8 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 10.1 (bs, 2H); 7.8-7.1 (m, 14H); 6.2 (bs 2H); 6.1 (t, 1H); 4.6 (s, 2H); 3.0 (bs, 2H); 2.1-2.0 (m, 2H); 1.8-1.0 (m, 2H).
- [0154] **실시예 12:** (4,4-디페닐-부트-3-에닐)-(4-트리플루오로메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 12). m.p.:

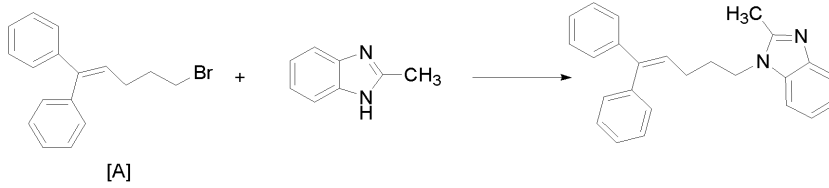
126-128. °C. ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 10.1 (s, 1H); 6.1 (t, 1H); 7.5 (d, 2H); 7.3-7.0 (m, 12H); 3.9 (s, 2H); 2.8 (m, 2H); 2.6 (m, 2H).

- [0155] **실시예 13:** (4,4-디페닐-부트-3-에닐)-티오펜-2-일메틸-아민 하이드로클로라이드 (화합물 13). m.p.: 163-165.5 °C. ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 2.3 (q, 2H); 2.8 (t, 2H); 4.0 (s, 2H); 6.1 (t, 1H); 6.9 (m, 2H); 7.0 (m, 8H); 7.4 (m, 3H).
- [0156] **실시예 14:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(4-트리플루오로메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 14). m.p.: 109-110.5 °C. ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 10.0 (m, 2H); 7.6 (d, 2H); 7.4-7.0 (m, 14H); 6.0 (t, 1H); 3.9 (s, 2H); 2.7 (s, 2H); 2.1 (q, 2H); 1.8 (m, 2H); 1.5 (m, 2H).
- [0157] **실시예 15:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(3-트리플루오로메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 15). m.p.: 96.6-98.5 °C. ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 7.4-7.0 (m, 13H); 6.1 (t, 1H); 3.8 (s, 2H); 2.6 (t, 2H), 2.2 (q, 2H); 1.6 (m, 4H).
- [0158] **실시예 16:** 벤질-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-메틸-아민 하이드로클로라이드 (화합물 16) ¹H-NMR (CDC1₃), δ (ppm): 12.5 (s, 1H); 7.0-7.6 (m, 15H); 5.9 (t, 1H); 4.1 (s, 2H); 2.9-2.6 (m, 2H); 2.6 (s, 3H); 2.2-1.8 (m, 4H).
- [0159] **실시예 17:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(1-페닐-에틸)-아민 하이드로클로라이드 (화합물 17). ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 10.1 (bs 1H); 9.8 (bs, 1H); 7.6-7.0 (m, 15 H); 5.9 (t, 1H); 4.16 (t, 1H); 2.6 (bs, 2H); 2.0 (m, 4H); 1.9 (d, 3H).
- [0160] **실시예 18:** 벤즈히드릴-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-아민 하이드로클로라이드 (화합물 18). ¹H-NMR (CDC1₃), δ (ppm): 10.3 (bs, 2H); 7.6-7.0 (m, 20H); 5.8 (t, 1H); 5.1 (bs, 1H); 2.5 (bs 2H); 1.9-1.7 (m, 4H).
- [0161] **실시예 19:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(2-플루오로벤질)아민 하이드로클로라이드 (화합물 19). ¹H-NMR (CDC1₃) δ(ppm): 10.0 (s, 2H); 7.4-6.9 (m, 15H); 6.0 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.7 (m, 2H); 2.2-2.0 (m, 4H).
- [0162] **실시예 20:** (4-클로로벤질)-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)아민 하이드로클로라이드 (화합물 20). ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 1.7 (m, 2H); 2.2 (m, 2H); 2.7 (m, 2H); 4.0 (s, 2H); 6.1 (t, 1H); 7.5-7.0 (m, 14H); 10.0 (bs, 2H).
- [0163] **실시예 21:** 4-[(5,5-디페닐-펜트-4-에닐아미노)-메틸]벤조니트릴 하이드로클로라이드 ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 10.2 (s, 2H); 7.8-7.6 (m, 4H); 7.4-7.0 (m, 10H); 5.9 (t, 1H); 4.1 (s, 2H); 2.7 (m, 2H); 2.2 (m, 2H); 2.0 (m, 2H).
- [0164] **실시예 22:** (4,4-디페닐-부트-3-에닐)-(4-트리플루오로메틸벤질)아민 하이드로클로라이드 ¹H-NMR (CDC1₃) δ (ppm): 11.0 (bs, 2H); 7.6 (m, 4H); 7.4-7.2 (m, 8H); 7.1(m, 2H); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.9 (t, 2H); 2.6 (m, 2H).
- [0165] **실시예 23:** (4,4-디페닐-부트-3-에닐)-(4-플루오로-벤질-아민 하이드로클로라이드. ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 10.0 (s, 2H); 7.6-7.4 (m, 10H); 7.0-6.8 (m, 4H); 6.1 (t, 1H); 3.9 (m, 2H); 2.8 (m, 2H); 2.5 (m, 2H).
- [0166] **실시예 24:** 벤질-(4,4-디페닐-부트-3-에닐)아민 하이드로클로라이드. ¹H-NMR (CDC1₃), δ(ppm): 10.0 (bs, 2H); 7.5-7.2 (m, 13H); 7.0 (m, 2H); 6.1 (t, 1H); 3.9 (s 2H); 2.9 (m, 2H); 2.6 (m, 2H).
- [0167] **실시예 25:** (4,4-디페닐-부트-3-에닐)-(3-트리플루오로메톡시벤질)아민 하이드로클로라이드. ¹H-NMR (CDC1₃, δ (ppm): 10.2 (bs, 2H); 7.8 (d, 1H); 7.6 (m, 2H); 7.5 (m, 1H); 7.7-7.4 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s,

2H); 2.9 (m, 2H); 2.6 (m, 2H).

[0168] **실시예 26:** (4,4-디페닐-부트-3-에닐)-(3-플루오로벤질)아민 하이드로클로라이드. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 10.0 (bs, 2H); 7.4-7.7 (m, 14H); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.9 (m, 2H); 2.6 (m, 2H).

[0169] **실시예 27:** (1-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-2-메틸-1H-벤조이미다졸 (화합물 27)의 합성.



[0170]

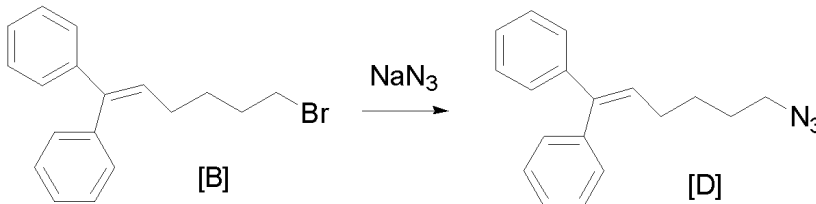
[0171] 수산화나트륨 (0.24 g, 오일 분산 중에서 60%, 6.0 mmol)을 20mL의 무수 DMF 중의 2-메틸-벤조이미다졸 (0.66 g, 5.0 mmol)의 사전 냉각 용액 (얼음/물 냉각조) 위로 천천히 나누어서 부가하였다. 2시간 후, 5-브로모-1,1-비스페닐펜텐 (1.5 g, 5.0 mmol)을 나누어서 부가하고, 얻어진 혼합물을 20h 동안 교반하였다. 가스 생성이 중단될 때까지 메탄올 (3ml)을 부가하여 반응을 종료시켰다. 물 (120mL)로 희석하고 에틸 아세테이트 (3 x 25 mL)로 추출하였다. 유기층을 염수 (1 x 20 mL)로 세정하고, 무수 소듐 설페이트 상에서 건조한 다음 용매를 감압 하에 제거하여 잔사 (1.9 g)을 얻었고, 이것을 플래쉬 크로마토그래피 (DCM/MeOH 98:2)로 정제하여 황색 고체 1.5 g (4.2 mmol, 수율 60%)을 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.7 (m, 1H); 7.4-7.0 (m, 13H); 6.0 (t, 1H); 4.0 (t, 2H); 2.5 (s, 3H); 2.3 (q, 2H); 1.9 (m, 2H).

[0172] 다음 화합물들 역시 유사한 방법으로 제조하였다:

[0173] **실시예 28:** 1-(5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-1H-이미다졸 (화합물 28). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.5-7.2 (m, 11H); 7.0 (s, 1H); 6.8 (s, 1H); 6.1(t, 1H); 3.9 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.9 (m, 2H).

[0174] **실시예 29:** (2-클로로-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-아민 (화합물 29)의 합성

[0175] 단계 1 . 6-아자이드-1,1-디페닐-1-헥센 중간체 [D]의 합성



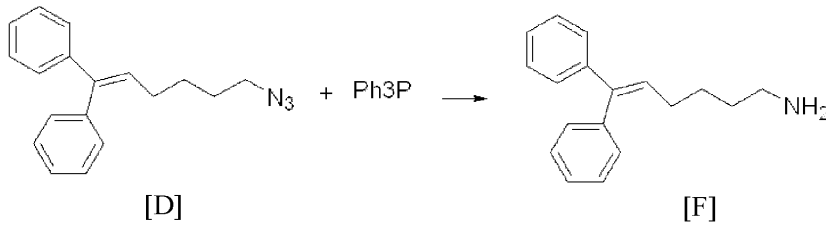
[0176]

[0177] 6-브로모-1,1-디페닐-1-헥센 (50.0 g, 158 mmol)과 DMS (250 mL) 중의 소듐 아자이드 (31.0 g, 476 mmol)의 혼합물을 주변 온도에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (400 mL)로 희석하고, NH_4Cl (3 x 100 mL) 포화 수용액으로 세정하였다. 유기 추출물을 염수 (1x 60 mL)로 세정하고, 무수 소듐 설페이트 상에서 건조하고, 용매를 감압 하에 제거하여 무색 오일 41g (148 mmol, 96.68%)을 얻었으며, 6-아자이드-1,1-디페닐-1-헥센임을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.4-7.1 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 3.2 (t, 2H); 2.1 (m, 2H); 1.5 (m, 4H).

[0178] 다음 중간체 화합물들 중간체 [A] (실시예 27 참조)와 소듐 아자이드의 합성 반응에 의해 유사한 방법으로 제조 하였다:

[0179] 중간체 [E] 5-아자이드-1,1-디페닐-1-펜텐 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 3.3 (t, 2H); 2.1 (m, 2H); 1.6 (m, 2H).

[0180] 단계 2 . 6,6-디페닐-헥스-5-에닐아민의 합성. 중간체 [F]



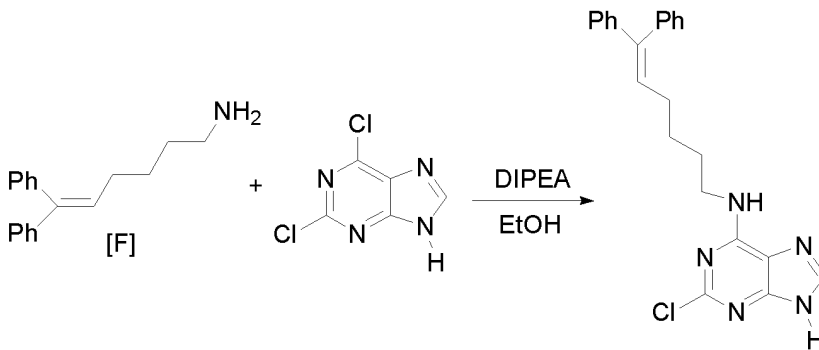
[0181]

[0182] 6-아자이드-1,1-디페닐-1-헥센 (2.7 g, 9.7 mmol)과 THF (50 mL)과 물 (2.5 mL) 중에서의 트리페닐포스핀 (3.1 g, 12 mmol)의 혼합물을 주변 온도에서 20시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하여 오일을 얻었고, 이를 플래쉬 크로마토그래피 (DCM/MeOH/Et₃N 95:5:5)로 정제하여 황색 오일로서 6,6-디페닐-헥스-5-에닐아민 (2.4 g, 98% 수율)을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 1.4 (m, 4H); 7.3 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 2.6 (m, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.6 (s, 2H).

[0183] 다음 중간체 화합물을 유사한 방법으로 제조하였다:

[0184] 중간체[G] 5,5-디페닐-헵트-4-에닐아민 ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.4-7.2 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 2.7 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.9 (s, 2H); 1.6 (m, 2H).

[0185] 단계 3. (2-클로로-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-아민



[0186]

[0187] 에탄올 (500mL) 중의 6,6-디페닐-헥스-5-에닐아민 (25.6 g, 103 mmol) 용액에, 퓨린 (17.0 g, 90 mmol)과 DIPEA (15.7 mL, 90 mmol)를 가하였다. 얻어진 혼합물을 3시간 동안 환류 가열하였다. 일단 이 시간이 경과하고 나면, 용매를 감압 하에 제거하고, 물 (150 mL)을 부가하고 침전물을 여과한 다음 메탄올로 세정하여 백색 고체로서 (2-클로로-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-아민 (31.76g, 78.6 mmol, 87.3% 수율)을 얻었다. (m.p.: 205.7-207.0°C ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8.1 (s, 2H); 7.5-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 2.5 (m, 2H); 2.1 (m, 2H); 1.7-1.4 (m, 4H).

[0188] 다음 화합물을 6,6-디페닐-헥스-5-에닐아민과 대응하는 시판 6-클로로퓨린 유도체 또는 4-클로로-1H-피라졸로 [3,4-d]피리미딘 유도체와의 반응에 의해 유사한 방법으로 제조하였다. 시판되지 않는 화합물은 US6936713; Eur. J. Med. Chem, 2003, 38, 199-214; WO2005/009348; Synthesis, 1994, 1401; J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 784-790; J. Med. Chem. 2005, 6887; J. Med. Chem. 2006, 1549; 및/또는 Eur. J. Med. Chem, 2004, 939 에 기재된 방법 등의 공지된 문헌의 방법에 의해 제조하였다.

[0189] 실시예 30: (9-벤질-2-요오도-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 하이드로클로라이드 염 (화합물 30). 6-클로로-2-요오도-9H-퓨린과의 반응으로 표제 화합물을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.5 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 15H); 6.1 (t, 1H); 5.7 (s, 1H); 5.3 (s, 2H); 3.6 (s, 2H); 2.1 (q, 2H); 1.6 (m, 5H).

[0190] 실시예 31: 9-벤질-N-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-9H-퓨린-2,6-디아민 (화합물 31) 9-벤질-6-클로로-9H-퓨린-2-일아민과의 반응으로 표제 화합물을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.4-7.1 (m, 15H), 6.1 (t, 1H), 5.5

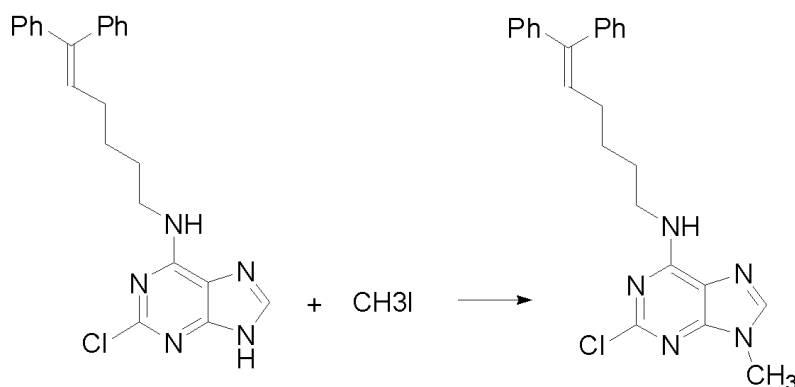
(m, 1H, NH); 5.2 (s, 2H); 4.7 (s, 2H, NH₂); 3.5 (m, 2H); 2.2 (m, 2H); 1.6 (m, 4H).

[0191] **실시예 32:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(2-페닐-9H-퓨린-6-일)아민 (화합물 32) 6-클로로-2-페닐-9H-퓨린과의 반응으로 표제 화합물을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃+ DMSO-d₆), δ (ppm): 8.2 (m, 2H); 7.7 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 14H); 6.9 (bs, 1H); 6.0 (t, 1H); 3.6 (m, 2H); 2.1 (q, 2H); 1.8- 1.4 (m, 4H).

[0192] **실시예 33:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(9-메틸-2-트리플루오로메틸-9H-퓨린-6-일)아민 (화합물 33) 6-클로로-9-메틸-2-트리플루오로메틸-9H-퓨린과의 반응으로 표제 화합물을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.8 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.8 (bs, 1H); 3.9 (s, 3H); 3.6 (bs, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.8-1.5 (m, 4H).

[0193] **실시예 34:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(9-메틸-9H-퓨린-6-일)아민 (화합물 34) 6-클로로-9-메틸-9H-퓨린과의 반응으로 표제 화합물을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8.4 (s, 1H); 7.7 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.7 (s, 1H, NH); 3.9 (s, 3H); 3.6 (m, 2H); 2.3 (q, 2H); 1.9 (m, 2H).

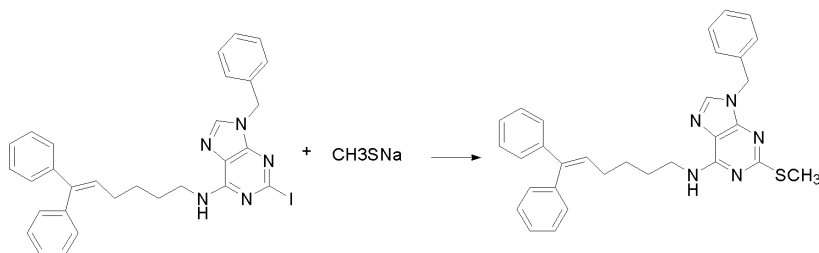
[0194] **실시예 35 :** (2-클로로-9-메틸-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 (화합물 35)의 합성



[0195]

[0196] DMF (50mL) 내의 (2-클로로-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-아민 (2.0 g, 5.0 mmol) 용액에 포타슘 카보네이트 (1.4 g, 10 mmol)를 부가하고, 얻어진 서스펜션을 메틸 아이오다이드 (0.5 mL, 7.92 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 주변 온도에서 72시간 동안 교반하였다. 물 (250 mL)을 가하고 얻어진 혼합물을 에틸 아세테이트 (3 x 50 mL)로 추출하였다. 유기 추출물을 염수 (1 x 25 mL)로 세정하고, 무수 소듐 설페이트 상에서 건조하고, 용매를 감압 하에 제거하여 고체 잔사 (2.30 g)을 얻었고, 플래쉬 크로마토그래피 (EtOAc/헥탄 60:30)로 정제하여 백색 고체로서 (2-클로로-9-메틸-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 (1.45 g, 70 % 수율)을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.7 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.9 (bs, 1H); 3.8 (s, 3H); 3.6 (bs, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.7-1.5 (2q, 4H).

[0197] **실시예 36 :** (9-벤질-2-메틸술파닐-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 (화합물 36)의 합성

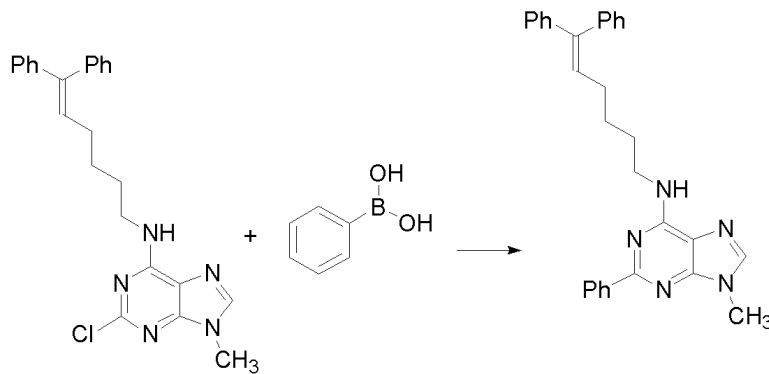


[0198]

[0199] 250 mL 고압 반응기에서, 에탄올 (30mL)과 물 (30mL)의 혼합물 중 (9-벤질-2-요오도-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-아민 (화합물 30) (2.4 g, 4.1 mmol)의 용액을 소듐 티오메톡사이드 (1.4 g, 20.5 mmol)로 처리하였다. 반응 용기를 닫고 혼합물을 6시간 동안 130°C로 가열하였다 (최대 내부 압력: 2 bar). 이 시간이 경과하고 나서, 용매를 낮은 압력에서 제거하고 물 (120 mL)을 가하고 얻어진 혼합물을 에틸 아세테이트 (3 x 50 mL)로 추출하였다. 유기층을 무수 소듐 설페이트 상에서 건조하고 용매를 진공 하에 증발시켜 잔사를 얻고, 이

것을 플래쉬 크로마토그래피 (EtOAc/헵탄 1:1)로 정제하여 황색 고체로서 (9-벤질-2-메틸설파닐-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 (1.68 g, 3.3 mmol, 81%)을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.55 (s, 1H); 7.45-7.12 (m, 15H); 6.07 (1H, t); 5.65 (bs, 1H); 5.29 (s, 2H); 3.58 (bs, 2H); 2.55 (s, 3H); 2.16 (q, 2H); 1.79-1.51 (m, 4H).

[0200] **실시예 37:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(9-메틸-2-페닐-9H-퓨린-6-일)아민 (화합물 37)



[0201]

[0202] DMF (50mL) 내의 (2-클로로-9-메틸-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 (3.0 g, 7.0 mmol), 소듐 카보네이트 (1.3 g, 12.28 mmol), 페닐 보론산 (1.05 g, 8.6 mmol) 및 테트라키스 (트리페닐포스핀 팔라듐(0)) (1.21 g, 1.05 mmol, 15 mol %)의 서스펜션을 Ar 하에서 40시간 동안 100℃에서 교반하였다. 이 시간이 경과하고 나서, 용매를 낮은 압력에서 제거하고 물 (34 mL)을 가하였다. 얻어진 혼합물을 10분 동안 교반하고, 침전물을 여과하고 물 (2 x 20 mL)과 에테르 (2 x 20 mL)로 세정하였다. 얻어진 물질을 진공 하에 건조하여 황색 고체로서 (2-클로로-9-메틸-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 (2.6 g, 5.7 mmol, 81 % 수율)을 얻었다. ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8.5 (d, 2H); 7.7 (s, 1H); 7.5-7.1 (m, 13H); 6.1 (t, 1H); 5.7 (m, 1H, NH); 3.9 (s, 3H); 3.7 (m, 2H); 2.3 (q, 2H); 1.8 (m, 2H); 1.6 (q, 2H).

[0203] 다음 화합물들을 (2-클로로-9-메틸-9H-퓨린-6-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민과 대응하는 헤테로아릴 보론산 유도체와의 반응에 의해 유사한 방법으로 제조하였다:

[0204] **실시예 38:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(9-메틸-2-티오펜-2-일-9H-퓨린-6-일)아민 (화합물 38) ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.7-7.5 (m, 2H); 7.5-7.0 (m, 11H); 6.1 (t, 1H); 5.4 (bs, 1H); 3.7 (s, 3H); 3.6 (bs, 2H); 2.1(q, 2H); 1.8-1.5 (2q, 4H).

[0205] **실시예 39:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(9-메틸-2-피리딘-4-일-9H-퓨린-6-일)아민 (화합물 39) ¹H-NMR (CDCl₃, δ (ppm): 8.7 (d, 2H); 8.3 (d, 2H); 7.7 (s, 1H); 7.3-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.5 (bs, 1H); 3.9 (s, 3H); 3.7 (bs, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.8-1.5 (2q, 4H).

[0206] **실시예 40:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일)아민. (화합물 40) ¹H-NMR (CDCl₃, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 12.81 (bs, 1H); 8.22 (s, 1H); 7.92 (s, 1H); 7.02-7.26 (m, 10H); 6.80 (bs, 1H); 5.95 (t, 1H); 3.41-3.45 (m, 2H); 2.45-2.58 (m, 2H); 2.03-2.10 (m, 2H); 1.42-1.62 (m, 4H).

[0207] **실시예 41:** (5,5-디페닐-펜트-4-에닐)-(1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일)아민 (화합물 41). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆), δ (ppm): 13.35 (bs, 1H); 8.11 (bs, 1H); 8.04 (s, 1H); 7.05-7.33 (m, 10H); 6.16 (t, 1H); 3.42-3.49 (m, 2H); 2.08-2.15 (m, 2H); 1.72-1.77 (m, 2H);

[0208] 다음 화합물들을 화합물 41과, 대응하는 알킬 벤질 할라이드 유도체와 반응시켜 화합물 35와 유사한 방법으로 제조하였다.

[0209] **실시예 42:** (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(1-메틸-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일)아민 하이드로클로라이드 염.

(화합물 42) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 8.35 (bs, 1H); 7.83 (s, 1H); 7.14-7.39 (m, 10H); 6.07 (t, 1H); 4.04 (s, 3H); 3.5-3.6 (m, 2H); 2.19 (q, 2H); 1.67-1.75 (m, 2H); 1.56-1.63 (m, 2H).

[0210] 실시예 43: (1-벤질-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일)-(6,6-디페닐-헥스-5-에닐)아민 하이드로클로라이드 염
(화합물 43) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 8.4 (bs, 1H); 7.9 (s, 1H); 7.4-7.2 (m, 16H); 6.1 (t, 1H); 5.6 (s, 2H); 3.6-3.5 (m, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.9-1.8 (m, 2H); 1.6-1.5 (m, 2H).

[0211] 실시예 44: (6,6-디페닐-헥스-5-에닐)-(1-이소프로필-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-일)아민 하이드로클로라이드 염. (화합물 44) $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 11.0 (bs, 1H); 8.8 (s, 1H); 8.4 (s, 1H); 7.3-7.1 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.0 (hept, 1H); 3.7-3.4 (m, 2H); 2.1-1.9 (m, 2H); 1.7-1.6 (m, 2H); 1.6-1.40 (m, 2H); 1.39 (d, 6H).

[0212] **생물학적 분석**

[0213] **형질전환체 (transfectant) 생성**

[0214] 모든 형질전환체들은 연구 중인 루트의 주요 수용체를 결핍한 공통적인 세포 베이스를 가진다. 분비된 포스파타제 sPase는 니트로페놀 포스페이트와 화학적으로 유사한 기질의 가수 분해에서 기초 배양으로부터 발광 또는 유색 기질을 처리하는 능력에 대한 리포터로서 사용된다. 다섯 가지 형질전환체가 생성되었고 이하에 설명된다:

[0215] 1. IL-4R. 비조혈 세포 내에서 흔하게 발견되는 Type II IL-4r의 사슬과, IL-4r에 의한 핵 신호화 루트에서 주요 분자인 STAT6을 형질전환시키고, 최종적으로 STAT6에 대한 응답을 측정하기 위해 리포터 유전자를 도입하였다. 내생적으로 세포는 이전에 p62/aPKC를 통해 STAT6과 관련된 것으로 알려진 야누스 연관 키나제 (Janus Associated Kinase) 1(JAK1)을 가진다.

[0216] 2. IL-6R. IL-6R의 사슬을 형질전환시키고, STAT3에 대한 응답을 측정할 수 있는 리포터 유전자를 도입하였다. 알려진 바와 같이, STAT3는 형질도입 분자 (transductional molecule)이고, 표준 응답 IL-6/IL-6R에서 생리학적 생성된 핵 인자이다.

[0217] 3. TNF-R. 이 경우에는 형질 도입 분자이고, TNF-알파에 대한 응답에서 생리학적으로 생성된 핵인자이기 때문에 TNF-kB에 대한 응답을 측정할 수 있는 리포터 유전자가 도입되었다. TNF-알파 형질전환체는 LPS로서 NFkB의 잠재적 활성화제에 응답하지 않는다.

[0218] 4. TLR4/MD2/CD14로 표시되는 PS-수용체 복합체. 이전 경우에서와 같이 NFkB에 대한 응답 요소를 가진 리포터 유전자가 이용되었지만, 선택성은 LPS-R 복합체 성분의 공동-형질전환에 의해 얻어졌다. LPS는 LPS를 맴브레인 단백질 CD13로 이동시키는 LBP로 알려진 하나의 플라즈마 단백질에 대한 연결을 통해 혈청으로부터 포획된다. LBP의 포함으로 매체 또는 LBP-프리 배양액에 대한 민감도가 100배 증가된 것을 설명할 수 있다. 분자 CD14는 LPS-수용체가 아니지만, LBP를 포획하여 세포 표면에서 MD2로의 이동을 가능하게 하는 수용체 복합체의 모듈이다. CD14는 세포질 꼬리 (cytoplasmic tail)를 갖지 않고, 신호 트랜스듀서가 될 수는 없지만, 실질적으로 시스템의 민감도를 증가시킨다. 같은 방식으로 MD2는 신호 트랜스듀서는 아니지만 CD14와 MD2의 조합은 민감도를 1000배 증가시킨다.

[0219] 5. IL-1R. 이전 경우에서와 같이 NFkB에 대한 응답 요소를 가진 리포터 유전자가 사용되지만, 선택성은 수용체 복합체 IR-1R에 속하는 요소의 발현에 의해 얻어진다. IL-1R은 TIR 형질도입 영역을 사용하는 수용체 슈퍼 패밀리 (super family) 상과에 속한다 (톨 유사 IL-1R). IL-1R 경로가 차례로 AP-1로서 전사적으로 활성화된 핵 인자를 생성하는 JNK 형의 미토겐-활성화된 단백질 키나제 (MAPK)를 활성화시킨다는 것이 알려져 있다. 수용체 유전자는 생리적 상황을 자극하기 위해 연결된 NFkB 및 AP-1 사이트를 포함한다.

화합물	결과
화합물 28	TNFr 저해 25% IL6r 저해 다운-로우(*) IL4r 저해 75%
화합물 27	TNFr 저해 전체 IL6r 저해 로우-75% IL4r 저해 전체
화합물 13	TNFr 저해 전체 IL6r 저해 전체 IL4r 저해 전체
화합물 11	TNFr 저해 전체 IL6r 저해 전체 IL4r 저해 전체
화합물 10	TNFr 저해 30% 상승 IL6r 5% 저하 IL4r 전체
화합물 8	TNFr 저해 total IL6r 저해 total IL4r 저해 total
화합물 6	TNFr 저해 total IL6r 저해 total IL4r 저해 total

[0220]

[0221]

뮤린 내독소혈증: TNF- α 의 혈청 수준에 대한 화합물 11과 화합물 8의 활성

[0222]

재료 및 방법: 무게 30 내지 35g, 제어된 표준 조건 하에 수용된 수컷 CD1 마우스를 이용하였다. 이 동물들에게 (14-16시간 동안; 그룹 마다 12 마리; 케이지 당 6 마리 \approx 500cm²), 사카로즈 (8%)와 NaCl (0.2%)로 만들어진 영양 용액을 임의로 공급하였다. 경구 시험 치료는 서스펜션 (비히클: 트윈 80 0.1%-NaCl 0.9%) 10ml/kg 부피비로 주어진다. 한 시간 후, *Escherichia coli* 혈청형 055:B5 (Sigma L-2880)로부터의 지질다당체 (Lipopolysaccharides)를 1 mg/kg 복용량으로, 10 ml/kg 부피비로 멸균 생리 식염수에 용해시킨 것을 복강 내 주사하여 뮤린 내독소혈증을 유발시켰다. 90분 후 LPS 주사 (i.p.) 후, 이소퓨란 마취 하에서, 심장 평선 (punction)에 의해 0.5-0.8 ml의 혈액을 추출하였다; 혈액 샘플을 원심분리하고 (6000 rpm; 10 분; 4°C) 2개의 혈청 샘플을 취하여 혈청 TNF- α 농도를 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 상태로 유지하였다 (EIA: R&D 시스템스의 마우스 TNF/TNFSF1A Quantikine).

[0223]

100 mg/kg/10ml 복용량으로 경구 투여된 화합물 11과 화합물 8은 *E.coli* 유발된 뮤린 내독소혈증의 LPS (i.p.) 실험 모델에서 활성을 나타낸다; 이들은 각각 비히클 군에 비해 TNF- α 의 혈청 수준을 통계적으로 유의한 방식으로 각각 35.42% 및 37.7% 감소시켰다.

[0224]

파라티로이드 호르몬으로 처리된 마우스에서의 IL6의 혈청 수준. 화합물 15의 활성.

[0225]

재료 및 방법:

[0226]

5 내지 7주령의, 제어된 표준 조건 하에 수용된 수컷 CD1 마우스를 이용하였다. 이 동물들에게 (14-16시간 동안; 그룹 마다 12 마리; 케이지 당 6 마리 \approx 1100cm²), 고체 및 액체 사료를 임의로 공급하였다. 5일 동안, 동물들을 8 i.p. pTH-rp (1-34, 인간) 15 마이크로그램/0.1ml/주사를 투여하여 치료하였다. 경구 시험 치료는 pTH 주사 한 시간 후, 서스펜션 (비히클: 트윈 80 0.1%-NaCl 0.9%) 10ml/kg 부피비로 주어진다.

- [0227] 마지막 pTH 투여 후 2시간이 경과하면, 이소푸란 마취 하에서 심장 평선 (punction)에 의해 0.5-0.8 ml의 혈액을 추출하고; 혈액 샘플을 원심 분리하고 (6000 rpm; 10분; 4°C), 2개의 혈액 샘플을 취하여 혈청 IL6 농도를 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 유지한다 (EIA: 참조 번호 555240, BD Bioscience).
- [0228] 25 mg/kg/10ml의 복용량으로 경구 투여된 화합물 15는 이 실험 모델에서 활성을 나타냈으며; 비히클 군에 비해 IL6의 혈청 수준을 통계적으로 유의한 방식으로 64.58% 감소시켰다.
- [0229] **항종양 활성**
- [0230] 세포주 NCI 패널 (1차 스크리닝)
- [0231] 이 연구에 사용되는 뚜렷한 인간 세포주는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션으로부터 입수하였으며, 10% (v/v) 열-불활성화된 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 37°C, 가습된 95% 공기, 5% CO₂ 에서 배양하였다.
- [0232] 지수 성장 인간 세포주의 뚜렷한 양을 최종 부피 100µl로 96-웰 평평한 바닥 마이크로타이터 플레이트에 접종하고, 24시간 동안 가습된 5% CO₂/95% 공기 분위기, 37°C에서 배양하여 세포가 플레이트에 부착되도록 하였다. 그리고 나서, 세포를 72시간 동안 5% CO₂/95% 공기 분위기 하 37°C에서 시험 화합물의 서로 다른 농도로 배양하였다. XTT (3'-[1-(페닐아미노)카보닐]-3,4-테트라졸륨-비스(4-메톡시-6-니트로)벤젠 술폰산 소듐염 수화물) 세포 증식 키트 (Roche Molecular Biochemicals, 독일, 만하임)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 세포 증식을 정량화하였다. 간략하게는, XTT 라벨링 시약의 방금 제조된 혼합물 용액 (50µl)과 PMS (N-메틸디벤조피라진 메틸 설페이트) 전자 커플링시약을 각 웰에 가하였다. 얻어진 혼합물을 가습된 분위기 (37°C, 5% CO₂)에서 4시간 동안 추가 배양하고, 생성된 포르마잔 산물의 흡광도를 490nm 시험 파장과 655nm 기준 파장에서 마이크로타이터 플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 그리고 나서 세포 증식의 50% 저해를 초래하는 약물 농도로서 IC₅₀ (50% 저해 농도)를 계산하였다. 데이터는 각각 삼중 실시된 3개의 실험의 평균값 (S.D.)을 나타낸다. 표 1은 3 및 60 세포주 패널에서 스크리닝 후 시험된 화합물에 대한 일부 IC₅₀ 농도를 나타낸다.

표 1. 세포주 스크리닝에서 IC50 (마이크로몰)

세포주	조직	IC50 (몰)	
		화합물 3	화합물 6
BT-549	유방	1.6 ± 0.01 E-05	2.1 ± 0.16 E-05
HS 578T	유방	1.1 ± 0.08 E-05	1.5 ± 0.12 E-05
MCF-7	유방	1.3 ± 0.08 E-05	2.1 ± 0.58 E-05
MDA-MB-231	유방	1.3 ± 0.11 E-05	2.1 ± 0.09 E-05
MDA-MB-435	유방	1.5 ± 0.41 E-05	5.8 ± 0.63 E-06
MDA-MB-468	유방	8.7 ± 0.01 E-06	1.4 ± 0.04 E-05
NCI/ADR-RES	유방	1.4 ± 0.08 E-05	1.9 ± 0.05 E-05
SK-BR-3	유방	1.2 ± 0.25 E-05	1.3 ± 0.11 E-05
T-47D	유방	1.1 ± 0.29 E-05	1.4 ± 0.08 E-05
SF-268	CNS	8.9 ± 0.42 E-06	2.9 ± 0.27 E-05
SF-295	CNS	8.1 ± 0.15 E-06	1.5 ± 0.25 E-05
SF-539	CNS	6.6 ± 0.32 E-06	1.3 ± 0.18 E-05
SNB-19	CNS	1.5 ± 0.05 E-05	1.5 ± 0.01 E-05
SNB-75	CNS	1.5 ± 0.08 E-05	1.5 ± 0.05 E-05
U251	CNS	1.6 ± 0.01 E-05	1.6 ± 0.01 E-05
COLO-205	결장	1.3 ± 0.11 E-05	1.4 ± 0.05 E-05
HCT-15	결장	4.8 ± 2.10 E-06	1.3 ± 0.11 E-05
HCT-116	결장	6.0 ± 1.10 E-06	8.1 ± 1.60 E-06
HT-29	결장	1.5 ± 0.12 E-05	2.7 ± 0.52 E-05
KM12	결장	1.6 ± 0.05 E-05	1.5 ± 0.04 E-05
SW-620	결장	8.8 ± 0.74 E-06	1.3 ± 0.21 E-05
CCRF-CEM	백혈병	6.1 ± 0.04 E-06	1.8 ± 1.1 E-05
HL-60	백혈병	1.2 ± 0.05 E-05	1.4 ± 0.28 E-05
K-562	백혈병	4.6 ± 1.60 E-06	1.4 ± 0.24 E-05
MOLT-4	백혈병	1.5 ± 0.07 E-05	1.7 ± 0.34 E-05
LOX IMVI	흑색종	1.1 ± 0.04 E-05	8.7 ± 0.33 E-06
M14	흑색종	7.5 ± 0.30 E-06	7.0 ± 0.18 E-06
MALME-3M	흑색종	8.7 ± 0.33 E-06	1.3 ± 0.20 E-05
SK-MEL-2	흑색종	1.4 ± 0.04 E-05	1.6 ± 0.01 E-05

[0233]

SK-MEL-5	흑색종	1.4 ± 0.20 E-05	1.6 ± 0.05 E-05
SK-MEL-28	흑색종	1.2 ± 0.11 E-05	1.5 ± 0.08 E-05
UACC-62	흑색종	1.6 ± 0.05 E-05	1.6 ± 0.04 E-05
UACC-257	흑색종	3.7 ± 0.07 E-06	6.1 ± 0.14 E-06
RPMI-8226	MM	5.9 ± 0.67 E-06	2.9 ± 0.19 E-06
A549	비소세포 폐	1.3 ± 0.18 E-05	2.0 ± 0.41 E-05
EKVX	비소세포 폐	1.6 ± 0.04 E-05	1.7 ± 0.08 E-05
HOP-62	비소세포 폐	1.3 ± 0.11 E-05	1.6 ± 0.05 E-05
HOP-92	비소세포 폐	6.2 ± 0.55 E-06	1.5 ± 0.04 E-05
NCI-H23	비소세포 폐	8.8 ± 0.56 E-06	1.4 ± 0.07 E-05
NCI-H322M	비소세포 폐	1.1 ± 0.04 E-05	2.9 ± 0.18 E-05
NCI-H226	비소세포 폐	8.7 ± 0.27 E-06	1.7 ± 0.05 E-05
NCI-H460	비소세포 폐	1.3 ± 0.15 E-05	1.7 ± 0.32 E-05
NCI-H522	비소세포 폐	1.1 ± 0.08 E-05	1.5 ± 0.17 E-05
IGR-OV1	난소	6.2 ± 0.19 E-06	1.1 ± 0.04 E-05
OVCAR-3	난소	1.2 ± 0.17 E-05	1.8 ± 0.21 E-05
OVCAR-5	난소	6.5 ± 0.27 E-06	8.2 ± 0.20 E-06
OVCAR-8	난소	1.5 ± 0.08 E-05	1.6 ± 0.18 E-05
SK-OV-3	난소	1.2 ± 0.12 E-05	1.8 ± 0.16 E-05
DU-145	전립선	1.3 ± 0.16 E-05	2.9 ± 0.11 E-05
PC-3	전립선	1.4 ± 0.08 E-05	1.6 ± 0.05 E-05
786-0	신장	2.6 ± 0.22 E-05	1.7 ± 0.12 E-05
A498	신장	3.3 ± 0.11 E-05	3.1 ± 0.18 E-05
ACHN	신장	1.5 ± 0.01 E-05	3.5 ± 0.0 E-05
CAKI-1	신장	1.2 ± 0.12 E-05	3.3 ± 0.19 E-05
SN12C	신장	6.7 ± 0.17 E-06	1.1 ± 0.08 E-05
TK-10	신장	1.5 ± 0.04 E-05	1.4 ± 0.07 E-05
UO-31	신장	1.3 ± 0.15 E-05	1.6 ± 0.05 E-05
DMS 114	소세포 폐	1.5 ± 0.13 E-05	8.8 ± 0.49 E-06
SHP-77	소세포 폐	8.1 ± 0.88 E-06	1.3 ± 0.19 E-05

[0234]

[0235] 흑색종 (B16-F1, MALM-3M), 결장암 (HCT-116, SW260), 간암 (HepG2), 교모세포종 (SF268) 및 폐 (NCI-H460) 압 세포주에서 화합물 6, 8, 40, 41 및 44의 인 비트로 세포 독성

[0236]

SRB 방법에 따랐다 (Wieland, V., et al. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. Chemosensitivity, volume 1, In Vitro Assays. Methods in Molecular Medicine. Edited by Rosalyn D. Blumenthal. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005).

[0237]

세포를 96웰 마이크로플레이트에 파종하였다. 각 웰에서, 세포 타입에 따라 특정 수의 세포를 200 μl로 파종하였다. 이 조건에서, 세포를 제품의 세포 독성 시험을 위해 그들의 지수 상태에 도달하도록 하기 위해 3일 간 배양하였다. 제품 농도는 스톱 용액 (10mM) 해동 후 처리 당일 준비하였다. 3일 간 파종된 세포로 마이크로플레이트를 수확한 후, 배양 배지를 따라내고, 각 웰에서 신선한 배지 150μl로 교체하였다. 그 다음 50μl의 대응 제품 희석액을 부가하여 각 웰에서 200 마이크로리터의 최종 부피에서 계획된 최종 농도가 되도록 하였다. 시험 농도에서 제품은 72시간 동안 세포 성장 단일 층과 접촉하고, 37°C, 5% CO₂에서 배양된다. 최종적으로 세포는 차가운 TCA (트리클로로아세트산) 50% 50μl를 부가하여 성장 중단되었다 (웰에서 최종 농도 10%). 그리고 나서

마이크로플레이트를 60분 간 4°C에서 유지하여 세척 및 SRB에 의한 염색이 시작될 때까지 세포 단백질을 고정하였다.

[0238] 세포 생존율 (%) = (처리된 웰의 세포군/ 표준 곡선의 최대 세포군) x 100

[0239] 각 농도에 대한 평균 생존값을 농도가 시험된 각 웰에서 얻어진 값으로부터 계산하였다.

[0240] 7개의 다른 세포 타입에서 시험된 화합물에 대한 IC50 농도를 표 2에 나타낸다.

표 2. 세포주 스크리닝에서 IC50 (마이크로미터)

세포주	화합물 8	화합물 6	화합물 40	화합물 44	화합물 41
B16-F1	IC ₅₀ =14 μM	IC ₅₀ =16 μM	IC ₅₀ =9 μM	IC ₅₀ =8 μM	IC ₅₀ =6 μM
HepG2	50μM>IC ₅₀ >5μM	50μM>IC ₅₀ >5 M	50μM>IC ₅₀ >5μM	50μM>IC ₅₀ >5μM	50μM>IC ₅₀ >5μM
Malm-3M	IC ₅₀ =16 μM	IC ₅₀ =13 μM	IC ₅₀ =30 μM	IC ₅₀ =40 μM	IC ₅₀ =44 μM
SF268	50μM>IC ₅₀ >5μM	IC ₅₀ =29 μM	IC ₅₀ =33 μM	IC ₅₀ =31 μM	IC ₅₀ =17 μM
SW260	50μM>IC ₅₀ >5μM	IC ₅₀ =13 μM	IC ₅₀ >50 μM	IC ₅₀ >50 μM	50μM>IC ₅₀ >5μM
HCT116	50μM>IC ₅₀ >5μM	IC ₅₀ =8.1 μM	50μM>IC ₅₀ >5μM	50μM>IC ₅₀ >5μM	50μM>IC ₅₀ >5μM
NCI-H460	50μM>IC ₅₀ >5μM	IC ₅₀ =17 μM	IC ₅₀ =8,1 μM	IC ₅₀ =9,4 μM	IC ₅₀ =2 μM

[0241]

[0242] 인간 비종양 세포 (2차 스크리닝)

[0243] 인간 비종양 세포에 대한 화합물의 세포 독성을 섬유아세포, HUVEC 세포 및 휴지기 PBL (말초 혈액 림프구)에서 연구하였다.

[0244] 시험 화합물들은 10⁻⁵ M의 범위에서 HUVEC와 섬유아세포에 대해 어느 정도의 세포 독성을 나타내었다. 기타 PBL의 경우, 화합물들은 심지어 10⁻⁴ M에서도 PBL에 거의 영향을 미치지 않았다. 화합물들이 10⁻⁵-10⁻⁶ M 농도 범위에서 혈액암 세포주의 세포 사멸을 유발하기 때문에 이들 데이터는 통상의 혈액 세포와 비교해서 혈액암에 대한 치료 영역을 나타낸다.

[0245] 37°C에서 20분간 행크 배지에서 배양된 0.1% 콜라게나제 타입 I로 인간 삭상 조직 (human cord)를 치료함으로써 HUVEC 세포가 얻어진다. 세포를 수집하고 20 % FBS, 1 % P/S 및 25 mg/500 ml의 배지 ECGF를 보충한 M199 배지에서 배양하였다. 세포는 0.2% 젤라틴 매트릭스 상에서 성장하였다,

[0246] 지수적 성장 세포의 분명한 양을 최종 부피가 100μl가 되도록 96-웰 평평한 바닥 마이크로플레이트에 파종하고, 가습된 5% CO₂/95% 공기 분위기에서 37°C에서 배양하여 세포가 플레이트에 부착되도록 하였다. 그리고 나서 세포를 37°C, 5% CO₂/95% 공기 분위기 하에서 72시간 동안 시험된 화합물의 서로 다른 농도로 배양하였다. 세포 증식을 제조사의 지시에 따라 XTT 세포 증식 키트 (Roche Molecular Biochemicals, 독일, 만하임)를 사용하여 정량화하였다. 간단하게는 XTT 라벨링 시약의 방금 제조된 혼합물 용액 (50 μl)과 PMS (N-메틸디벤조피라진 메틸 설페이트) 전자 커플링 시약을 각 웰에 가하였다. 얻어진 혼합물을 4시간 동안 가습된 분위기 (37°C, 5% CO₂)에서 추가 배양하여 490nm의 시험 파장과 655nm의 기준 파장에서 마이크로타이터 플레이트 판독기로 포르마잔 산물의 흡광도를 측정하였다. 그리고 나서 IC₅₀ (50% 저해 농도)를 세포 증식의 50% 저해를 초래하는 약물 농도로서 계산하였다. 데이터는 삼중 시험된 4개의 각각의 실험의 평균값을 나타낸다. 결과는 표 3에 나타낸다.

표 3. 인간 비종양세포에 대한 IC50s

화합물	IC ₅₀ (M)	
	HUVEC	섬유아세포
화합물 3	1.6 ± 0.1 × 10 ⁻⁵	1.9 ± 0.3 × 10 ⁻⁵
화합물 40	3.6 ± 0.3 × 10 ⁻⁵	---
화합물 44	55 ± 0.4 × 10 ⁻⁵	---
화합물 41	52 ± 0.1 × 10 ⁻⁵	---
화합물 6	2.7 ± 0.1 × 10 ⁻⁵	2.4 ± 0.3 × 10 ⁻⁵
독소루비신	2.3 ± 0.1 × 10 ⁻⁷	---
탁솔	4.7 ± 0.7 × 10 ⁻¹⁰	7.5 ± 0.5 × 10 ⁻¹⁰

[0247]

[0248]

통상의 말초 혈액 림프구 (PBL)를 동정하기 위해, (Cabaner *et al. Br. J. Pharmacol* 127:813-825.1999)에 기재된 바와 같이 건강한 지원자로부터의 신선한 인간 말초 혈액을 피콜-하이페크 밀도 구배로 원심 분리하고, 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 세척하고, 10% (v/v) 열-불활성화된, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 재현탁시켜 단핵세포를 얻었다. 밤새 배양 후, 배양 접시 부착에 의해 단핵구를 결집시킨다. 비부착 세포 (림프구)를 PBS로 세척하고 수집하였다. PBL 제제는 전형적으로 70-75% CD3⁺, 24-29% CD19⁺, 및 0.4% CD14⁺ 미만이다.

표 4. 휴지기 인간 PBL에 대한 화합물 3과 6의 효과

화합물	% 아포토시스 PBL	
	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
화합물 3	7.5	1.3
화합물 6	7.2	4.1
독소루비신	21.7	13.2

[0249]

[0250]

화합물 3과 6은 10⁻⁴ M 에서도 PBL에 거의 영향을 미치지 않아 독소루비신보다 더 낮은 세포 독성을 보였다. 이들 화합물이 10⁻⁶ M 농도 범위에서 혈액암 세포주의 세포 사멸을 유발하기 때문에 이들 데이터는 통상의 혈액 세포와 비교해서 혈액암에 대한 치료 범위를 나타낸다.

[0251]

만성 림프구성 백혈병 이중이식 동물 모델에서 화합물 3의 인 비보 항종양 활성

[0252]

만성 림프구성 백혈병 (CLL) EHEB 세포주를 10% (v/v) 열-불활성화된 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 가습된 95% 공기 및 5% CO₂, 37°C 에서 배양하였다. 세포를 주기적으로 *마이코플라즈마* 감염에 대해 테스트하였고, 음성임을 확인하였다. CB17-중증 복합 면역 결핍 (SCID) 마우스 (Charles River laboratories, Lyon, France)를 스페인 법률에 따른 기관 가이드라인에 따라, 22°C에서, 12/12시간 명/암 주기로, 임의로 표준 규정식과 산화수를 제공하여 유지, 조작하였다. CB17-SCID 마우스의 하복부에 100ml PBS 및 100ml의 매트리지엘 기재 멤브레인 매트릭스 [Matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson)] 내의 1.5 × 10⁷ EHEB 세포를 피하 접종하였다. 종양이 촉진가능하게 되면, 마우스를 각각 10마리의 코호트로 임의로 할당하여, 꼬리에 화합물을 정맥 내 투여 (3회/주)한다. 각 정맥 내 투여에서 사용된 용량은 200µl이며, 최종 약물 농도가 2.5 mg/kg (체중)이 되도록 한다. 비히클의 동일 용량의 정맥 내 투여가 동시에 수행된다. 종양의 가장 짧은 지름과 가장 긴 지름을 캘리퍼로 측정하였고, 종양 부피 (10⁻³ cm³)를 다음의 표준 식을 이용하여 계산하였다: (가장 짧은 지름)² × (가장 긴 지름) × 0.5. 종양 지름이 3cm에 이르거나 또는 유의한 독성이 관찰되었을 때 기관 가이드 라인에 따라 동물들을 희생시켰다. 동물의 체중과 이환율을 모니터링하였다. 약물 치료는 41일 동안 지속되었다. 그리고 종양 이중이식편을 동정하고, 측정 및 측정하였으며, 종양과 구별가능한 조직을 포함하는 검시 분석이 수행되었다. 모든 값은 평균 ± SD로 표시된다. 군들 간의 통계적 차이를 만-윌트니 테스트 또는 스튜던트의 t-테스트를 이용하여 평가하였다. 0.05 미만의 p값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 결과는 도 1에 나타내었다. 화합물 3은 대조군 (비히클로 치료된)과 비교해서 유의하게 (**, p < 0.01) CLL 종양 성장을 저해하였다.

[0253]

인 비보 평가 종료 후, 대조군과 화합물 3-치료된 마우스를 희생시키고 종양 이중 이식편을 동정하고 종양 무게

와 부피를 측정하였으며, 대조군의 미치료 마우스와 비교해서 화합물 3 치료된 마우스에서 종양 크기와 무게에서 현저하고 유의한 ($p < 0.01$) 감소가 나타났다.

	CLL 마우스 이종이식		
	대조군	화합물 3	저해 (%)
종양 부피(cm ³)	1.939	0.487	74.88**
종양 무게 (g)	1.89	0.932	50.69**

** $p < 0.01$ (스튜던트의 테스트)

[0254]

[0255]

마우스를 희생시킨 다음, 종양과 뚜렷한 조직에 대한 검시 분석을 수행하였다. 검시 분석 후 분석된 뚜렷한 조직에서 유의한 사건이나 변화는 검출되지 않았다. 마우스의 무게는 비치료 대조군과 치료 마우스에서 모두 동일했다. 이들 데이터는 화합물 3에 의한 마우스의 치료에서 유의한 부작용은 없음을 제시한다. 화합물 3으로 치료된 마우스에서 동정된 종양은 약물이 없는 종양 함유 대조군 마우스와 비교해서 매우 작은 혈관 신생을 나타내었고, 이는 화합물 3이 항종양 세포 독성 활성을 가능하게 할 수 있는 항 혈관 생성 활성을 가질 수 있음을 나타낸다. 이들 결과는 화합물 3이 CLL 이종이식 마우스 모델에서 유의하고 강력한 인 비보 항종양 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. 또한, 검시 연구에서 두 가지 약물에 의한 치료는 잘 용인되었고 뚜렷한 독성이 없음을 나타내었다.

[0256]

모든 측정일 동안, 대조군에 대한 화합물 3의 차이는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$).

[0257]

다발성 골수종 이종이식 동물 모델에서의 화합물 3의 인 비보 항종양

[0258]

다발성 골수종 (MM) MM1S 세포주를 10% (v/v) 열-불활성화된 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지에서, 37°C, 가습된 95% 공기 및 5% CO₂에서 배양하였다. 세포에 대해 주기적으로 *마이코플라스마* 감염에 대해 검사하였으며, 음성인 것으로 확인되었다.

[0259]

CB17-중증 복합 면역 결핍 (SCID) 마우스 (Charles River laboratories, Lyon, France)를 스페인 법률에 따른 기관 가이드라인에 따라, 22°C에서, 12/12시간 명/암 주기로, 임의로 표준 규정식과 산화수를 제공하여 유지, 조작하였다. CB17-SCID 마우스의 하복부에 100µl PBS 및 100µl트리젤 기재 멤브레인 매트릭스 중 (Becton Dickinson)에서의 3 x 10⁷ MM1S 세포를 피하 접종하였다. 종양이 촉진가능하게 되면 마우스들을 임의로 각 10 마리의 코호트로 할당하고, 꼬리에 화합물을 정맥 내 투여 (3회/주)한다. 각각의 정맥 내 투여에 사용된 용량은 200 µl 최종 약물 농도가 2.5 mg/kg (체중)이 되도록 한다. 마우스에 대한 동량의 비히클의 정맥 내 투여가 동시에 수행된다. 종양의 가장 짧은 지름과 가장 긴 지름을 캘리퍼로 측정하고, 종양 부피 (10⁻³ cm³)를 다음 표준식을 이용하여 계산하였다: (가장 짧은 지름)² × (가장 긴 지름) × 0.5. 종양 지름이 3cm가 되거나 또는 유의한 독성이 관측되면 기관 가이드 라인에 따라 동물을 희생시킨다. 동물 체중과 이환율의 징표를 모니터하였다. 약물 치료는 1달간 계속되었다. 그 다음, 종양을 동정하고, 측정하고 칭량한 다음 종양과 뚜렷한 조직에 대한 부검 분석을 수행하였다.

[0260]

모든 측정 일 동안, 대조군 3의 대조군에 대한 차이는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 결과는 표 2에 나타내었다. 다음 표는 치료 종료 시 엑스 비보 종양을 나타낸다.

	MM1S 마우스 이종이식편		
	대조군	화합물 3	저해 (%)
종양 부피 (cm ³)	3.722	0.288	92.26**
종양 무게 (g)	4.569	0.647	85.84*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (스튜던트의 테스트)

[0261]

[0262]

환자로부터의 만성 림프구성 백혈병 세포에 대한 화합물 3의 항종양 활성

[0263] ZAP70 발현의 서로 다른 패턴을 보여줄 수 있는 인간 환자 6명으로부터의 만성 림프구성 백혈병 세포 패널을 선택하였다 (표 5에 나타낸 세포유전자 변화를 참조). 세포를 화합물 3의 존재 하에서 인큐베이션하였다. 생존 가능성을 나타내는 이 연구 결과를 표 3에 나타내었다.

표 5

환자 코드	진단 연령	성별	Estadio	%CD19/ CD5	%ZAP70	세포유전학적 변경 (FISH)
CLL 07/86	69	M	B/C	95	70	정상
CLL 07/133	46	F	B/C	94	> 20	13q 결핍
CLL 07/151	54	M	A	95	19	정상

- [0264]
- [0265] 생존가능성의 감소가 복용량 의존적 방식으로 ZAP 70의 저발현 세포에서 더 유의하게 나타났다.
- [0266] 돌연변이 K-RAS 결장암 동소 동물 모델에서의 화합물 3의 인 비보 항 종양 활성
- [0267] 마우스의 결장 영역에 이식된 (Yao, M. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. Br. J. Cancer, 2004 Feb 9;90(3):712-9) Kras 돌연변이를 갖는 환자로부터의 결장암 세포에 의한 동물 모델을 이용하여 화합물 3의 효과를 시험하였다.
- [0268] 도 4A는 인간 결장암의 종양 부피의 분명한 감소 효과를 보여준다. 화합물 3과 결장암에 대해 널리 사용되는 2개의 서로 다른 항종양 약물인 5-FU 및 옥살리플라티늄 (OXA) 간의 분명한 비교 효과가 나타난다.
- [0269] 화합물 3 (NF), 옥살리플라티늄 (OXA), 5-F 우라실 (5-FU) 및 그 조합으로 치료된 마우스로부터의 인간 결장 종양 무게를 도 4B에 나타내었다.
- [0270] 흑색종 동소 (ORTHOPOPIC) 동물 모델에서 화합물 3의 인 비보 항종양 활성
- [0271] B16 흑색종 마우스 세포 (Szende, B., et al, Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma. British Journal of Cancer (2003) 88, 132-136)에 의한 동물 모델을 이용하여 화합물 3은 흑색종 동소 마우스 모델에서 강력한 인비보 항종양 활성을 나타내었다. 화합물 3의 복용량은 이들 모든 실험에서 복강 내에 30 mg/kg이었다. 결과는 도 5에 나타낸다.
- [0272] 도 5A는 흑색종 종양 루시페라아제의 인 비보 활성의 PET 도면을 나타낸다. 신호의 강도는 더 증식성이 큰 세포를 가진 종양에 대해 더 높다. 도 5B는 치료 종료 시점에서 동물로부터의 엑스 비보 흑색종 종양을 나타낸다. 도 5C는 대조군 또는 화합물 3의 치료 후 흑색종 종양 무게를 나타내는 그래프이다. 군 당 n=4 동물에 대해 서로 다른, 독립적인 실험이 수행되었다. 도 5D는 군 당 n=9 동물에 대해 인비보 모델에서 흑색종 B16에 대한 개별 실험을 나타내는 그래프이다.
- [0273] 난소 종양 동위 동물 모델에서 화합물 3의 인 비보 항종양 활성
- [0274] 화합물 3은 종양 면적을 감소시키는 강력한 인 비보 항종양 활성을 나타내었다. 실험은 복제된 루시페라아제 리포터를 가진 MOSEC ID8 세포 (마우스 난소 표면 상피 세포)를 이용하여 수행되었으며, 세포는 마우스의 난소 영역에 이식되었다 (Yu-Hung Huang et al, Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. 3426-3430 PNAS 2009. vol. 106, no. 9). 결과는 도 6에 제시된다. 도 6A는 인 비보 종양에서 루시페라아제의 활성의 PET를 나타낸다 (화합물 3 치료된 마우스: 30 mg/Kg i.p. 2주간, 주 당 5일). 도 6B는 대조군과 화합물 3으로 치료된 동물로부터의 루시페라아제 신호의 정량화를 나타낸다.
- [0275] 작용 기전
- [0276] 혈액암 세포주
- [0277] CLL, MM, 급성 T-세포 및 급성 골수성 백혈병 세포주를 포함하는 서로 다른 인간 혈액암 세포주에 의한 화합물 3의 인큐베이션은 세포 사멸을 유발하며, 이는 초기 세포 사멸 (sub-G1 피크; 6-8 시간 치료 후)의 특징인 G1 미만의 DNA 함량을 가진 세포의 출현에 의해 평가된다. 20% 이상의 세포 사멸이 주르카트 (Jurkat) (급성 T-세

포 백혈병) 및 HL-60 (급성 골수성 백혈병) 세포를 가진 화합물 3의 10 μM에 의한 24시간 치료 후 유발되었다. 세포 사멸 세포사의 유발은 신속한 PARP 분할, 카스파아제-3 기질, 카스파아제-3 활성화에 의해 추가로 지지된다. EHEB 세포를 화합물 3으로 치료할 경우, 카스파아제-9 역시 활성화되며, 이는 약물 기전에서 내인성 미토콘드리아-조정되는 신호 전달이 있음을 나타낸다. 결과적으로 활성화된 카스파아제-4는 세포내 소포체 스트레스에 대한 추정 상의 개입을 나타낸다. 흥미롭게도, 빠르고 강력한 자가 포식의 유발이 화합물 3의 치료 후에 관측되었으며, 이는 인큐베이션 시간 동안 지질화된 미세소관-관련 단백질 1 경쇄 3 (LC3-II)의 강한 형성에 의해 평가가능하다.

[0278] 화합물 3에 의한 EHEB 세포에서의 서로 다른 단백질의 발현 (도 7A): EHEB 세포를 지시된 시간 동안 10 μM의 화합물 3과 함께 인큐베이션하였다. 세포 사멸은 유세포 분석기에 의한 세포사이클 분석에서 서브-G₁ 영역에서의 세포 비율에 의해 정량화된다. 세포 사멸 세포와 통합된 서브-G₁ 피크 [저배수체(hypodiploidy)]와 G₀/G₁ 및 G₂/M 피크가 화살표로 표시된다. 치료되지 않은 대조군에 대해서도 동시에 진행하였다. G₁ (서브-G₁) 미만의 DNA함량을 가진 세포의 비율이 각 히스토그램에서 표시된다. 제시된 실험은 3회의 실험을 대표하여 나타낸 것이다. 간략하게는, 세포 (5 x 10⁵)를 원심분리하고 4°C에서 밤새 70% 에탄올로 고정하였다. 세포를 PBS로 3회 세정하고, 1시간 동안 실온에서 1 mg/ml RNaseA 및 20 μg/ml 프로피디움 아이오다이드로 인큐베이션 하고, Becton Dickinson FACS Calibur 유세포 분석기 (San Jose, CA)에 의해 세포 주기에 대해 분석하였다. 세포 사멸 세포의 정량을 세포 주기 분석에서 서브-G₁ 영역 (저배수체)에서의 세포 비율로서 계산하였다.

[0279] 화합물 3으로 치료된 EHEP 세포에서의 서로 다른 단백질의 발현 (도 7 B)

[0280] 지시된 시간 동안 세포를 화합물 3의 10 μM로 치료하고 지시된 단백질에 대한 특정 항체로 면역블러팅에 의해 분석하였다. 서로 다른 단백질의 이동 위치가 표시되었다. β-액틴이 부하 대조군으로서 사용되었다. 데이터는 수행된 3회의 실험을 대표하여 나타낸 것이다.

[0281] 결장암종 세포 (Colon carcinoma cells)

[0282] 얻어진 결과는 화합물 3이 인간 결장암종 세포주 (SW620, HCT-116)에서 세포 사멸을 유발한다는 것을 나타내며, 이는 세포 사이클 분석에서 서브-G₁ 피크의 출현 (저배수체)과 카스파아제 활성화에 의해 평가될 수 있다. 화합물 3이 유발한 세포 사멸에서 미토콘드리아 조정 내인성 세포 사멸 신호전달의 잠정적 개입이 카스파아제-9의 유도에 의해 제시된다. 더욱이 화합물 3은 세포 사멸의 촉진자인 Mc1-1S (short)로 명명된 골수성 세포 백혈병-1 (Mc1-1)의 슬라이스된 더 짧은 유전자 산물의 발현을 유발한다. p53의 단백질 레벨 역시 화합물 3에 의해 치료에서 증가한다. 요약하면, 이 데이터는 화합물 3이 Mc1-1S 및 p53의 상향 조절을 촉진하며 이는 결장암종 세포 살해에 관여할 수 있음을 나타낸다.

[0283] 화합물 3에 의한 인간 결장암 세포 HCT-116 세포주에서의 세포 사멸의 유발 (도 8A)

[0284] 세포 사멸의 유발은 세포주기 분석에서 서브-G₁ 영역 (저배수체)에서의 세포의 비율에 의해 정량화된다. 요약하면, 세포 (5 x 10⁵)를 원심분리하고, 4°C, 70% 에탄올에서 밤새 고정하였다. 세포를 PBS로 3회 세정하고, 1 mg/ml RNaseA 및 20 μg/ml 프로피디움 아이오다이드로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, Becton Dickinson FACSCalibur 유세포 분석기 (San Jose, CA)을 이용하여 세포 사이클에 대해 분석하였다. HCT-116 세포를 지시된 시간 동안 화합물 3의 10 μM로 치료하고, 유세포 분석기에 의해 세포 사이클 분석에서 서브-G₁ 영역에서의 세포 비율로서 세포 사멸을 정량화하였다. 세포 사멸 세포와 통합된 서브-G₁ 피크 (저배수체)와, G₀/G₁ 및 G₂/M 피크를 화살표로 나타내었다. 미치료 대조군에 대해서 역시 동시에 수행하였다. G₁ (서브-G₁) 미만의 DNA 함량을 가지는 세포의 비율이 각 히스토그램에서 표시되었다. 도시된 실험은 3회 수행된 결과를 대표하여 나타낸 것이다.

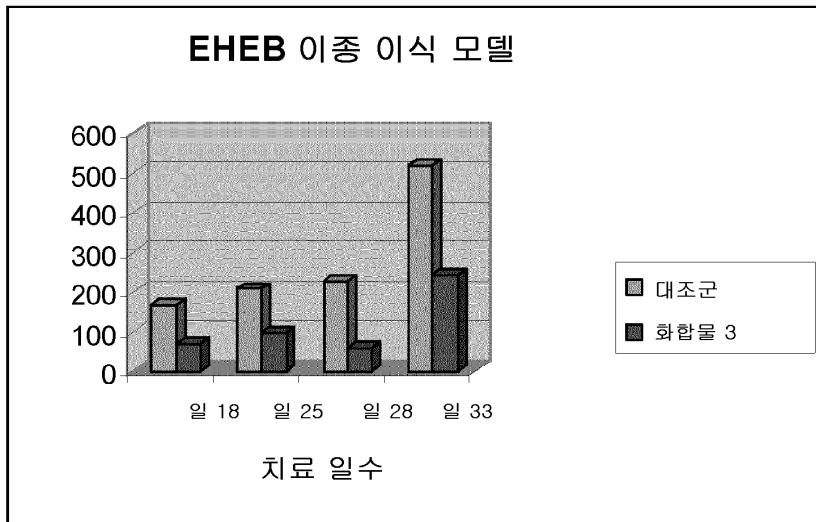
[0285] 화합물 3의 치료 중 서로 다른 세포 사멸-관련 단백질의 발현 (도 8B)

[0286] HCT-116 및 SW620 세포를 지시된 시간 동안 10 μM의 화합물 3으로 치료하고 지시된 단백질에 대한 특정 항체에 의해 면역블러팅에 의해 분석하였다. 서로 다른 단백질의 이동 위치가 표시되었다. β-액틴이 부하 대조군으로서 사용되었다. 표시된 데이터는 3회 수행된 실험을 대표하여 나타낸다. 약 10⁷ 세포를 원심분리에 의해 펠릿화하고 PBS로 세정한 다음 용해시켰다. 단백질 (20 μg)을 소듐 도데실 설페이트 (SDS)-폴리아크릴아미드 겔 상에서 진행시키고, 니트로셀룰로오스 필터로 이동시킨 다음 실온에서 90분 동안 TBST (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 및 0.1% Tween 20) 중에서의 탈지 분유 5% (v/v)로 블럭화하고, 특정 항체: 항-폴리(ADP-리보스) 폴리머라제 (PARP) (1:1000 희석) 마우스 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 항Bcl-X_L (1:500 희

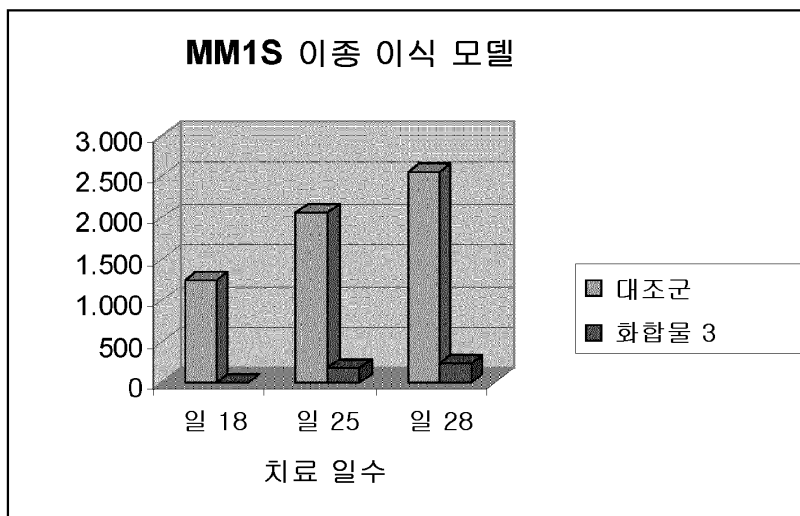
석) 래빗 폴리클로날 항체 BD Biosciences Pharmingen); 항-Bcl-2 (1:250 희석) 마우스 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 항-카스파아제-3 (1:500 희석) 래빗 폴리클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 항-카스파아제-9 (1:1000 희석) 래빗 폴리클로날 항체 (Oncogene); 항-Mcl-1 (1:1000 희석) 래빗 폴리클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 항-p53 (1:500 희석) 마우스 모노클로날 항체 (Santa Cruz Biotechnology); 항-β 액틴 (1:5000 희석) 마우스 모노클로날 항체 (Sigma)로, 실온에서 1시간 또는 4℃에서 철야 인큐베이션하였다. 마우스, 래빗 (GE Healthcare) 및 고트 (Santa Cruz Biotechnology) 2차 HRP-항체를 TBST 중에서 5% (v/v) 탈지 분유에서 1:5000 희석하여 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 신호를 증강 화학 발광 검색 키트 (Amersham)를 이용하여 처리하였다.

도면

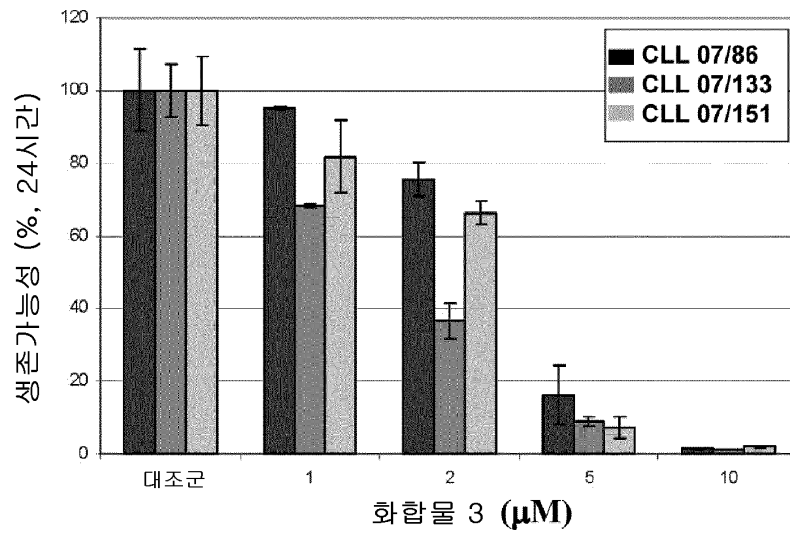
도면1



도면2

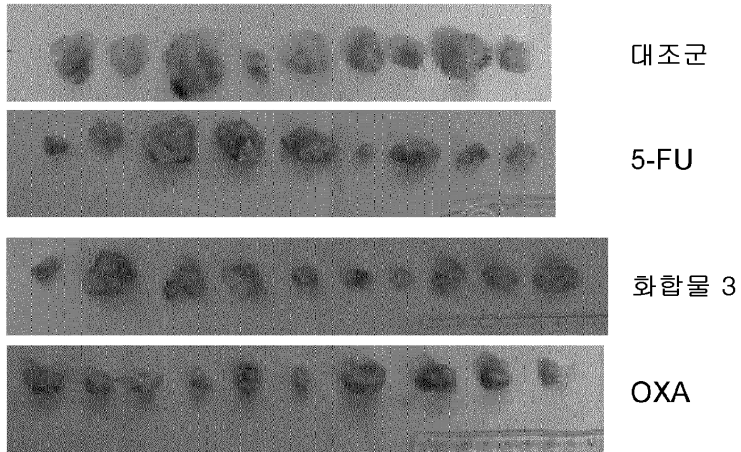


도면3

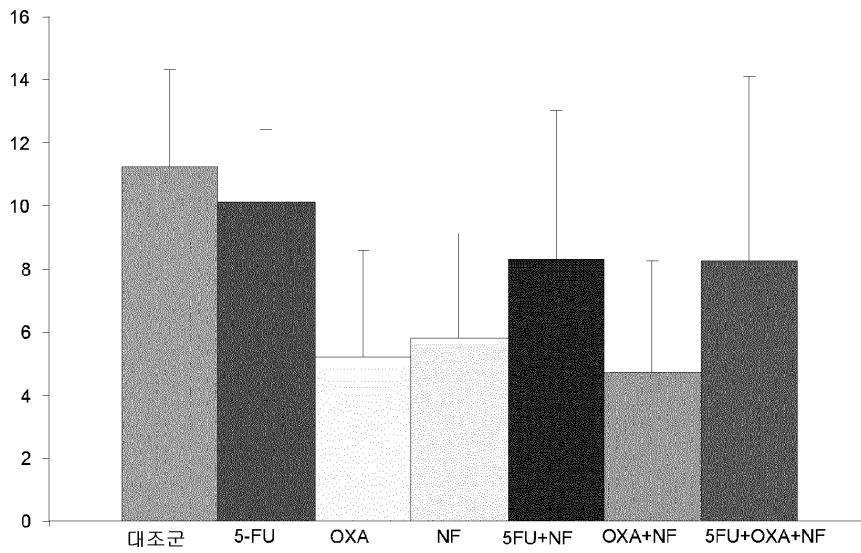


도면4

A

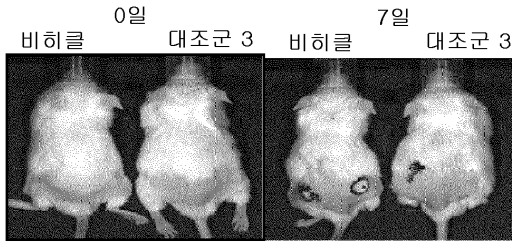


B

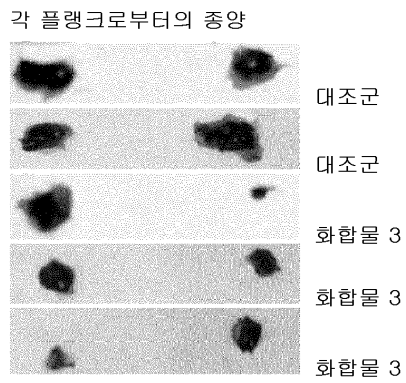


도면5a

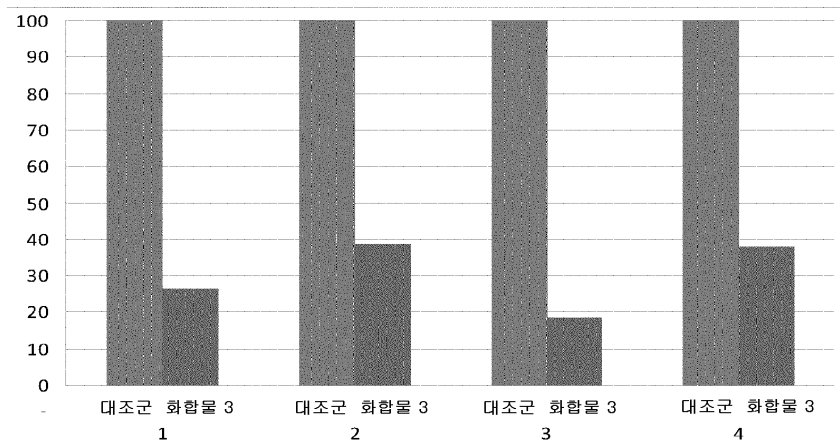
A



B

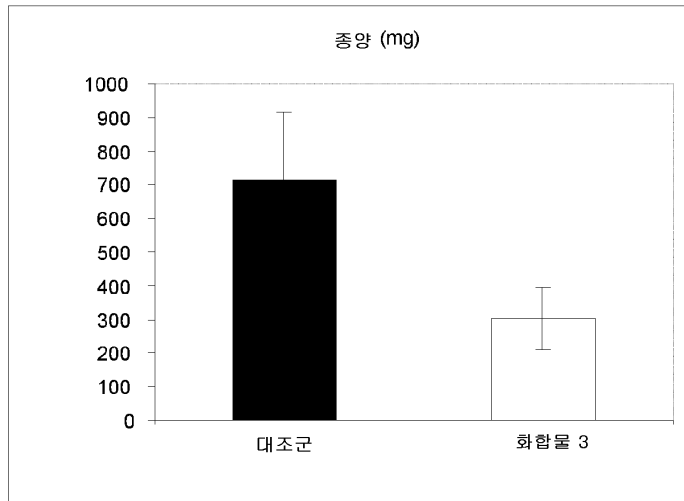


C



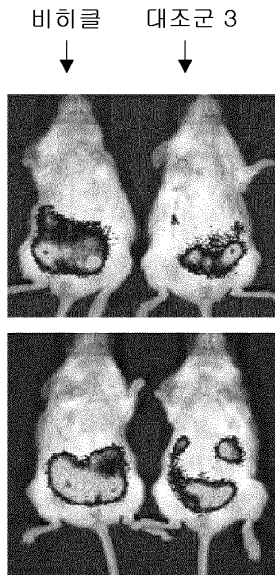
도면5b

D

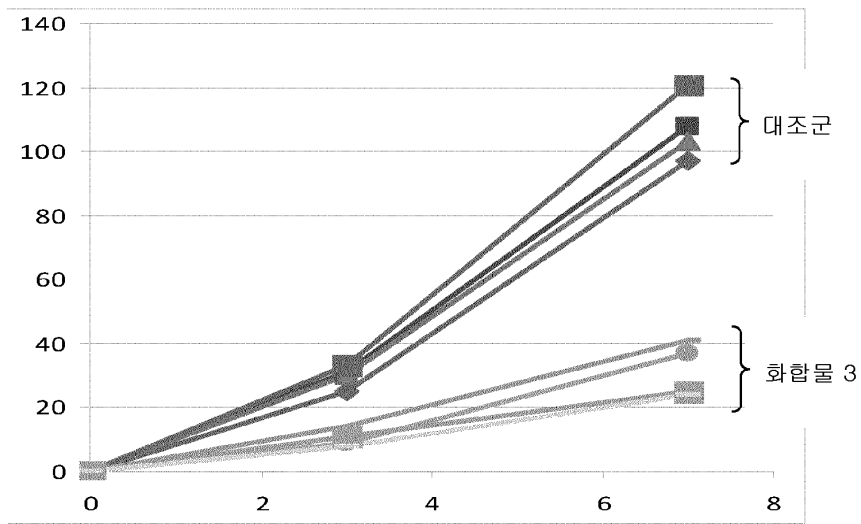


도면6

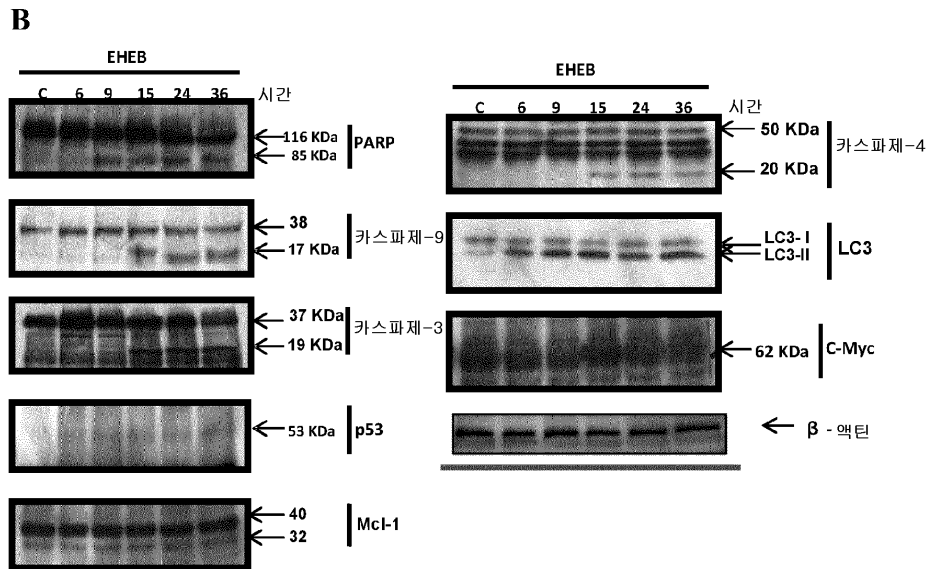
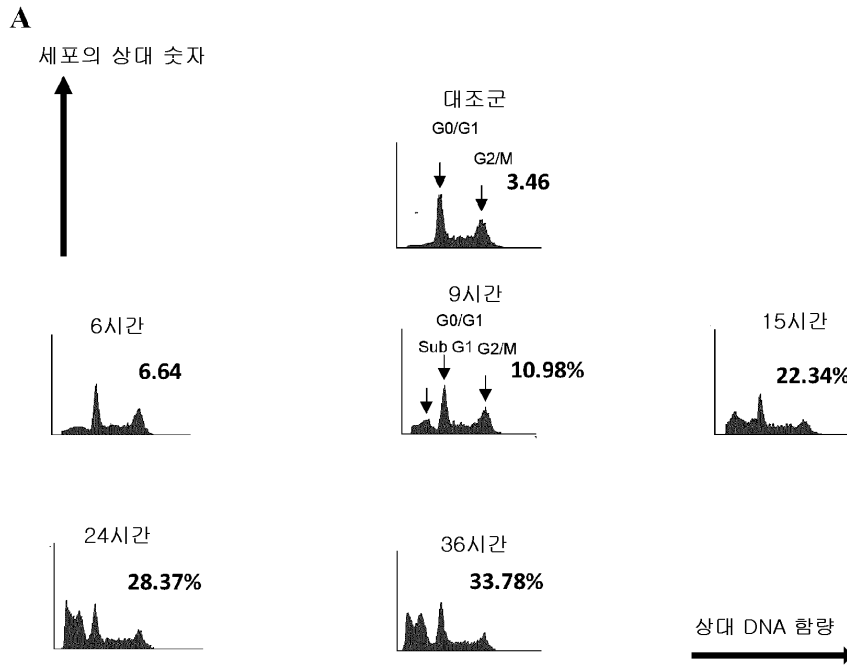
A



B



도면7



도면8

