



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월22일

(11) 등록번호 10-1443056

(24) 등록일자 2014년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/4985 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7005040

(22) 출원일자(국제) 2007년09월11일

심사청구일자 2012년09월10일

(85) 번역문제출일자 2009년03월11일

(65) 공개번호 10-2009-0063214

(43) 공개일자 2009년06월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/078103

(87) 국제공개번호 WO 2008/033798

국제공개일자 2008년03월20일

(30) 우선권주장

60/825,168 2006년09월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US06770643 B2\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

사노피

프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54

(72) 발명자

길레스피 티모시 에이.

미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55

이노트 폴

미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 12 항

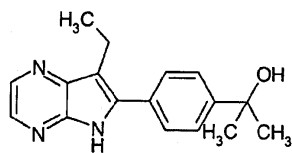
심사관 : 퇴-박형달

(54) 발명의 명칭 Syk-키나제 억제제로서의 피롤로피라진

### (57) 요약

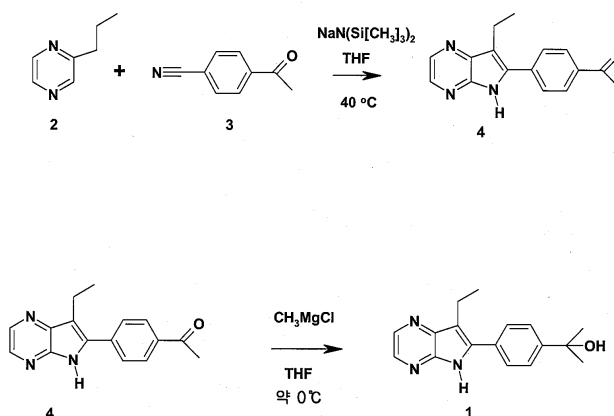
본 발명은 화학식 I의 화합물과 프로드럭, 및 이러한 화합물과 이들의 프로드럭의 약제학적으로 허용되는 염 및 용매화물에 관한 것이다.

화학식 I



이러한 화합물은 유용한 약제학적 특성, 특히 단백질 키나제를 억제하는 능력을 갖는다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**알렌 엘리자베스 엠.**

미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 코퍼레이트 드라  
이브 55

**유 킨 티.**

미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 코퍼레이트 드라  
이브 55

**질버스테인 어서**

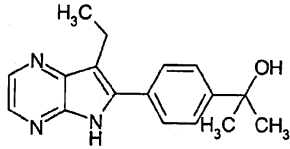
미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 코퍼레이트 드라  
이브 55

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

화학식 I의 화합물, 또는 이의 N-옥사이드; 또는 이러한 화합물의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물; 또는 상기 염 또는 용매화물의 N-옥사이드.

화학식 I



### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 관절 염증을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 4

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 류마티스성 관절염을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 5

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 메토티렉세이트와 병용되는 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 관절 염증을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 6

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 메토티렉세이트와 병용되는 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 류마티스성 관절염을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 7

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 급성 골수성 백혈병(AML), B세포 급성 림프아구성 백혈병(B-ALL), B세포 비호킨스성 림프종(B-NHL) 또는 다발성 골수종(MM)을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 8

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 외투세포(mantle cell) 림프종을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 9

하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 제1항에 따르는 화합물을 포함하는, 혈관형성을 억제하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 염이 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 설파메이트, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 타르트레이트, 말로네이트, 옥살레이트, 살리실레이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 푸마레이트, 말레에이트, 메틸렌-비스-b-하이드록시나프토에이트, 겐티세이트, 이

세티오네이트, 디-p-톨루오일타르트레이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 사이클로헥실설포네이트 및 퀴네이트로부터 선택되는 화합물.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 염이 하이드로클로라이드인 화합물.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 염이 아세테이트인 화합물.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 염이 시트레이트인 화합물.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 치환된 아자인돌, 이들의 제조방법, 이들 화합물을 함유하는 약제학적 조성물, 및 단백질 키나제의 억제에 의해서 조절될 수 있는 질병 상태를 치료하는데 있어서의 이들의 약제학적 용도에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 단백질 키나제는 세포외 매개물질 및 환경의 변화에 대한 반응으로 세포의 활성화, 성장 및 분화를 조절하는 시그널링 현상에 관여한다. 일반적으로, 이들 키나제는 몇 개의 그룹, 즉 세린 및/또는 트레오닌 잔기를 우선적으로 인산화시키는 것 및 티로신 잔기를 우선적으로 인산화시키는 것으로 분류된다 [S.K.Hanks and T.Hunter, FASEB. J., 1995, 9, pages 576-596]. 세린/트레오닌 키나제에는 예를 들어, 단백질 키나제 C 이소형태 (isoform) [A.C.Newton, J. Biol. Chem., 1995, 270, pages 28495-28498] 및 cdc2와 같은 사이클린-의존성 키나제의 그룹 [J.Pines, Trends in Biochemical Sciences, 1995, 18, pages 195-197]이 포함된다. 티로신 키나제에는 상피성장인자 수용체와 같은 막-스패닝(membrane-spanning) 성장인자 수용체 [S.Iwashita and M.Kobayashi, Cellular Signalling, 1992, 4, pages 123-132], 및 p56tck, p59fYn, ZAP-70 및 csk 키나제와 같은 세포질 비-수용체 키나제 [C. Chan et. al., Ann. Rev. Immunol., 1994, 12, pages 555-592]가 포함된다.

[0003] 부적절하게 높은 단백질 키나제 활성은 비정상적인 세포 기능으로 인한 다수의 질병에 관련되고 있다. 이것은 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어, 효소의 돌연변이, 과발현 또는 부적절한 활성화 등에 관련된 키나제에 대해 적절한 조절기전의 부전에 의해서; 또는 역시 키나제의 상류 또는 하류 시그날의 전달에 관여하는 사이토카인 또는 성장인자의 과- 또는 저-생산에 의해서 야기될 수 있다. 이들 모든 경우에, 키나제의 작용의 선택적 억제자가 유익한 효과를 가질 것으로 예상할 수 있다.

[0004] Syk는 다양한 조혈 세포에서 발견되며, 항원 수용체를 세포 반응에 커플링시키는 몇 개의 캐스케이드(cascade)에서 필수적인 요소인 72-kDa 세포질 단백질 티로신 키나제이다. 따라서, Syk는 비만세포에서 고친화성 IgE 수용체 FcεR1의 시그널링, 및 T 및 B 림프구에서 수용체 항원 시그널링에 중추적인 역할을 한다. 비만세포, T 세포 및 B 세포에 존재하는 시그날 전달경로는 공통적인 특징을 갖는다. 수용체의 리간드 결합 도메인은 내인성 티로신 키나제 활성이 결여되어 있다. 그러나, 이들은 면역수용체 티로신 기본 활성화 모티프(ITAM)를 함유하는 전달 서브유닛과 상호작용한다 [M.Reth, Nature, 1989, 338, pages 383-384]. 이들 모티프는 FcεR1의 β 및 γ 서브유닛 둘 다에, T 세포 수용체 (TCR)의 ζ-서브유닛, 및 B 세포 수용체(BCR)의 IgGα 및 IgGβ 서브유닛에 존재한다 [N.S.van Oers and A.Weiss, Seminars in Immunology, 1995, 7, pages 227-236]. 항원의 결합 및 다량체화(multimerization)시, ITAM 잔기는 Src 집단의 단백질 티로신 키나제에 의해서 인산화된다. Syk는 두 개의 탠덤(tandem) Src 상동성 2 (SH2) 도메인 및 C 말단 촉매 도메인을 갖는 티로신 키나제의 독특한 부류에 속한다. 이들 SH2 도메인은 ITAM에 대해 높은 친화성을 가지고 결합하며, 활성화된 수용체와 Syk의 이러한 SH2-매개된 결합은 Syk 키나제 활성을 증가시키고, Syk를 원형질막에 국재화시킨다.

[0005] Syk 결핍 마우스에서는 비만세포 탈과립화가 억제되며, 이는 이것이 비만세포 안정화제의 개발을 위한 중요한

표적임을 시사한다 [P.S.Costello, Oncogene, 1996, 13, pages 2595-2605]. 유사한 연구는 BCR 및 TCR 시그널링에 있어서의 Syk의 결정적인 역할을 입증하였다 [A.M.Cheng, Nature, 1995, 378, pages 303-306, (1995); 및 D.H.Chu et al., Immunological Reviews, 1998, 165, pages 167-180]. Syk는 또한, IL-5 및 GM-CSF에 대한 반응으로 호산구 생존에 관련되는 것으로 보인다 [S.Yousefi et al., J. Exp. Med., 1996, 183, pages 1407-1414]. 비만세포, BCR 및 T 세포 시그널링에서의 Syk의 중요한 역할에도 불구하고, Syk가 하류 효과기(downstream effector)를 전도하는 기전에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 두 개의 어댑터(adaptor) 단백질인 BLNK (B 세포 링커 단백질, SLP-65) 및 SLP-76은 각각 B 세포 및 비만세포에서 Syk의 기질인 것으로 밝혀졌으며, Syk를 하위 작용기와 연결시키는 것으로 가정되었다 [M.Ishiai et al., Immunity, 1999, 10, pages 117-125 및 L.R.Hendricks-Taylor et al., J.Biol. Chem, 1997, 272, pages 1363-1367]. 또한, Syk는 B 세포 증식에 중요한 역할을 하는 CD40 시그널링 경로에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다 [M.Faris et al., J.Exp. Med., 1994, 179, pages 1923-1931].

[0006] Syk는 또한, 저-친화성 IgG 수용체(Fc 감마-RIIA)를 통해서 자극되거나, 콜라겐에 의해서 자극된 혈소판의 활성화에 관련된다 [F.Yanaga et al., Biochem. J., 1995, 311, (Pt. 2) pages 471-478].

[0007] 초점 유착 키나제(focal adhesion kinase; FAK)는 인테그린-매개된 시그널 전달경로에 관련된 비-수용체 티로신 키나제이다. FAK는 국소 접촉부위에서 인테그린과 함께 공동-국재화하며, FAK 활성화 및 이의 티로신 인산화는 다수의 세포에서 이들의 세포외 리간드에 대한 인테그린 결합에 따라 좌우되는 것으로 나타났다. 몇 가지 연구로부터의 결과는 FAK 억제제가 암 치료에 유용할 수 있다는 가설을 뒷받침한다. 예를 들어, FAK-결핍 세포는 화학주성 시그널에 대한 반응으로 불충분하게 이동하며, FAK의 C-말단 영역의 과발현은 세포 확산뿐만 아니라 화학주성 이동을 차단하고[Sieg et al, J. Cell Science, 1999, 112, 2677-2691; Richardson A. and Parsons T., Cell, 1997, 97, 221-231]; 또한, FAK 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오타이드에 의해서 처리된 종양세포는 이들의 부착을 상실하고, 아포토시스(apoptosis)를 겪었다 [Xu et al, Cell Growth Differ. 1996, 4, 413-418]. FAK는 전립선암, 유방암, 갑상선암, 결장암 및 폐암에서 과발현되는 것으로 보고되었다. FAK의 발현 수준은 가장 공격적인 표현형을 나타내는 종양과 직접적인 상관관계가 있다.

[0008] 기존의 맥관구조로부터 자라는 새로운 혈관의 형성 또는 혈관형성(angiogenesis)은 배아 발생 및 기관형성에 중요한 중요성이 있다. 비정상적으로 증가된 신혈관 생성은 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증에서, 및 종양 발생 중에 관찰된다 [Folkman, Nat. Med., 1995, 1, 27-31]. 혈관형성은 내피세포의 활성화, 이동, 증식 및 생존을 포함하는 복잡한 다단계 과정이다. 지난 20년간 동안에 종양 혈관형성의 분야에서의 광범위한 연구로 키나제, 프로테아제 및 인테그린을 포함하는 다수의 치료학적 표적을 확인하여 KDR 억제제 (이들 중의 일부는 현재 임상적 평가 중에 있다)를 포함한 다수의 새로운 항혈관형성제를 발견하게 되었다 [Jekunen, et al Cancer Treatment Rev. 1997, 23, 263-286]. 혈관형성 억제제는 악성종양의 출현 또는 재성장에 대해 제1선에서 보조적으로 더구나 예방적인 셋팅에서 사용될 수 있다.

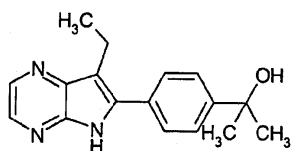
[0009] 염색체 분리 및 방추체 어셈블리에 관련된 몇 가지의 단백질은 효모 및 초파리에서 확인되었다. 이들 단백질의 붕괴는 염색체 오분리(missegregation) 및 단극성(monopolar) 또는 붕괴된 방추체를 초래한다. 이들 키나제 중에는 중심체 분리 및 염색체 분리에 필요한, 각각 에스.세레비시예(*S. cerevisiae*) 및 초파리로부터 유래하는 Ipl1 및 오로라 키나제(aurora kinase)가 있다. 효모 Ipl1의 한 가지 사람 동족체가 최근에 다양한 실험실에서 클로닝되고 특정화되었다. Aurora2, STK15 또는 BTA로 불리는 이 키나제는 세린/트레오닌 키나제 집단에 속한다. 비쇼프(Bischoff) 등은 Aurora2가 종양원성이며, 사람 결장직장암에서 증폭된다는 것을 밝혀내었다 [EMBO J, 1998, 17, 3052-3065]. 또한, 이것은 유방암과 같은 상피종양을 포함한 암에서도 예증되었다.

[0010] 본 발명자들은 본 발명에 이르러, 유용한 약제학적 특성, 특히 단백질 키나제를 억제하는 능력, 보다 특히 Syk 키나제를 선택적으로 억제하는 능력을 갖는 신규의 치환된 아자인들을 확인하였다. 이 아자인들 화합물은 미국 특허 제6,770,643호에 기술된 것과 관련이 있지만, 본 특허에 구체적으로 기술되지는 않았다.

# [0011] 발명의 요약

[0012] 본 발명은 화학식 I의 화합물, 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭(prodrug), 또는 이러한 화합물, 이의 염 또는 이의 프로드럭의 용매화물에 관한 것이다.

# 화학식 I



[0013]

[0014]

본 발명은 또한, 화학식 I의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 및 환자에서 Syk와 관련된 생리학적 상태를 치료 또는 예방하기 위하여 화학식 I의 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0015]

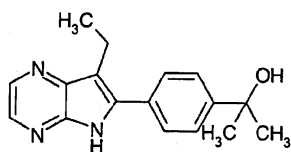
본 발명은 또한, 화학식 I의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체인 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0016]

또 다른 관점에서, 본 발명은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께, 화학식 I의 화합물; 및 상응하는 N-옥사이드 및 프로드럭; 이러한 화합물, N-옥사이드 및 프로드럭의 약제학적으로 허용되는 염 및 용매화물 (예를 들어, 수화물)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0017]

화학식 I



[0018]

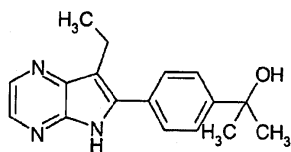
## 발명의 상세한 설명

[0029]

따라서, 한 가지 관점에서, 본 발명은 2-[4-(7-에틸-5H-피롤로[2,3-b]피라진-6-일)-페닐]-프로판-2-올로 또한 공지될 수 있는 화학식 I의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0030]

화학식 I



[0031]

[0032]

본 명세서에서, 용어 "본 발명의 화합물" 및 동등한 표현은 전술한 바와 같은 화학식 I의 화합물을 포함하는 것을 의미하며, 이 표현은 문맥이 그렇게 허용하는 경우에는 프로드럭, 약제학적으로 허용되는 염 및 용매화물, 예를 들어, 수화물을 포함한다. 마찬가지로, 중간체에 대한 언급은, 이들이 특허청구되든지 아니든지, 문맥이 그렇게 허용하는 경우에는, 이들의 염 및 용매화물을 포함하는 것을 의미한다. 명확히 하기 위하여, 문맥이 그렇게 허용하는 특정의 경우는 때때로 명세서에 나타내었지만, 이들 경우는 단지 설명을 위한 것이며, 문맥이 그렇게 허용하는 다른 경우를 배제하고자 하는 것은 아니다.

[0033]

본 명세서에서 사용된 약어:

[0034]

ATP 아데노신 트리포스페이트

[0035]

DTT 디티오프레이톨

[0036]

PBS 포스페이트 완충 식염수

[0037]

상기 및 본 발명의 설명 전체에 걸쳐서 사용된 것으로서, 다음의 용어들은 다른 식으로 나타내지 않는 한은 다음의 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다:

- [0038] "환자"는 사람 및 다른 포유동물 둘 다를 포함한다.
- [0039] "프로드럭"은 대사적 방법에 의해 (예를 들어, 가수분해에 의해) 생체내에서 화학식 I의 화합물(이의 N-옥사이드를 포함)로 전환될 수 있는 화합물을 의미한다. 예를 들어, 하이드록시 그룹을 함유하는 화학식 I의 화합물의 에스테르는 생체내에서 가수분해에 의해 모분자로 전환될 수 있다. 또는, 카복실 그룹을 함유하는 화학식 I의 화합물의 에스테르는 생체내에서 가수분해에 의해 모분자로 전환될 수 있다.
- [0040] 하이드록시 그룹을 함유하는 화학식 I의 화합물의 적합한 에스테르는 예를 들어, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 타르트레이트, 말로네이트, 옥살레이트, 살리실레이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 푸마레이트, 말레에이트, 메틸렌-비스- $\beta$ -하이드록시나프토에이트, 젠티세이트, 이세티오네이트, 디-p-톨루오일타르트레이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 사이클로헥실설포네이트 및 퀴네이트를 포함한다.
- [0041] 하이드록시 그룹을 함유하는 화학식 I의 화합물의 에스테르의 특히 유용한 부류는 문헌 [Bundgaard et. al., J. Med. Chem., 1989, 32, page 2503-2507]에 기술된 것들로부터 선택된 산 잔기로부터 형성될 수 있으며, 치환된 (아미노메틸)-벤조에이트, 예를 들어, 두 개의 알킬 그룹이 함께 결합될 수 있고/있거나 산소 원자에 의해서 또는 임의로 치환된 질소 원자, 예를 들어, 알킬화된 질소 원자에 의해서 차단될 수 있는 디알킬아미노-메틸벤조에이트, 보다 특히 (모르폴리노-메틸)벤조에이트, 예를 들어, 3- 또는 4-(모르폴리노메틸)-벤조에이트, 및 (4-알킬피페라진-1-일)벤조에이트, 예를 들어, 3- 또는 4-(4-알킬피페라진-1-일)벤조에이트를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 화합물 중의 일부는 염기성이며, 이러한 화합물은 유리 염기의 형태로, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 산부가염의 형태로 유용할 수 있다.
- [0043] 산부가염이 사용하기에 더욱 편리한 형태이며; 실제로, 염 형태의 사용은 본질적으로 유리 염기 형태의 사용에 상응한다. 산부가염을 제조하기 위해서 사용될 수 있는 산은 바람직하게는, 유리 염기와 결합하면 약제학적으로 허용되는 염을 생산하는, 즉 유리 염기 고유의 유익한 억제효과가 음이온에 기인하는 부작용에 의해서 손상되지 않도록 이의 음이온이 염의 약제학적 용량에서 환자에게 무독성인 염을 생산하는 것을 포함한다. 상기 염기성 화합물의 약제학적으로 허용되는 염이 바람직하지만, 특정한 염 그 자체가, 예를 들어, 염이 단지 정제 및 동정을 목적으로 형성되는 경우, 또는 이것이 이온 교환 절차에 의해서 약제학적으로 허용되는 염을 제조하는데 중간체로 사용되는 경우와 같이, 단지 중간체 생성물로서 바람직하다고 할지라도, 모든 산부가염은 유리 염기 형태의 공급원으로서 유용하다. 본 발명의 범위 내의 약제학적으로 허용되는 염에는 무기산 및 유기산으로부터 유도된 염이 포함되며, 하이드로할라이드, 예를 들어, 하이드로클로라이드 및 하이드로브로마이드, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 설파메이트, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 타르트레이트, 말로네이트, 옥살레이트, 살리실레이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 푸마레이트, 말레에이트, 메틸렌-비스-b-하이드록시나프토에이트, 젠티세이트, 이세티오네이트, 디-p-톨루오일타르트레이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 사이클로헥실설포네이트 및 퀴네이트가 포함된다.
- [0044] 본 발명의 화합물의 염은 그 자체로 활성 화합물로서 유용할 뿐만 아니라, 예를 들어, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려진 기술에 의해서 염과 모화합물, 부산물 및/또는 출발물질 사이의 용해도 차이를 이용함으로써 화합물을 정제할 목적으로 유용하다.
- [0045] 본 발명의 화합물은 유용한 약리학적 활성을 나타내며, 따라서 약제학적 조성물 내에 혼입되어 특정의 의학적 장애를 앓고 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은 추가의 관점에 있어서, 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 및 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 범위 내의 화합물은, 문헌에 기술되고 이하의 시험관내 방법에 기술된 시험에 따르면, 키나제 촉매 활성을 억제하거나 차단하며, 이 시험 결과는 사람 및 그 밖의 다른 포유동물에서의 약리학적 활성과 상관관계가 있는 것으로 생각된다. 따라서, 추가의 구체예에서, 본 발명은 단백질 키나제 억제제(예를 들어, Syk, FAK, KDR 또는 Aurora2)의 투여에 의해서 개선될 수 있는 상태를 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 환자를 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 화합물 및 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 염증성 질환, 예를 들어, 천식; 염증성 피부병 (예를 들어, 건선, 포진상 피부염, 습진, 괴사성 및 피부 맥관염, 수포성 질환); 알레르기성 비염 및 알레르기성 결막염; 관절염, 류마티스성 관절염, 및 류마티스성 척추염, 통풍성 관절염, 외상성 관절염, 풍진성 관절염, 건선성 관절염 및 골관절염과 같은 그 밖의 다른 관절염 상태를 포함하는 관절 염증의 치료에 유용하다. 화합물은 또한, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 급성 활액막염, 자가면역 당뇨병, 자가면역 뇌척수염, 대장염, 아테롬성 동맥경화증, 말초혈관 질환, 심혈관 질환,



다발성 경화증, 재협착증, 심근염, B 세포 림프종, 전신성 홍반성 루푸스, 이식편대 숙주 질환 및 그 밖의 다른 이식 관련된 거부현상, 암 및 종양 (예를 들어, 결장직장암, 전립선암, 유방암, 갑상선암, 결장암 및 폐암) 및 염증성 장질환의 치료에도 유용하다. 추가로, 화합물은 종양 항혈관형성제로서 유용하다. 또한, 추가로 본 발명의 화합물은 종양세포를 제어하기 위한 약제로도 유용하다.

- [0047] 본 발명의 치료학적 방법의 특별한 구체에는 관절 염증을 치료하는 것이다.
- [0048] 본 발명의 치료학적 방법의 또 다른 특별한 구체에는 류마티스성 관절염을 치료하는 것이다.
- [0049] 본 발명의 치료학적 방법의 특별한 구체에는 암, 종양 및 그 밖의 다른 증식성 장애를 치료하는 것이다.
- [0050] 본 발명의 치료학적 방법의 또 다른 특별한 구체에는 액상 종양을 포함하는 암을 치료하는 것이다.
- [0051] 본 발명의 치료학적 방법의 또 다른 특별한 구체에는 외투세포(mantle cell) 림프종을 치료하는 것이다.
- [0052] 본 발명의 치료학적 방법의 또 다른 추가의 특별한 구체에는 혈관형성을 억제함으로써 장애를 치료하는 것이다.
- [0053] 본 발명의 추가의 특징에 따르면, 유효량의 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 단백질 키나제 억제제(예를 들어, Syk, FAK, KDR 또는 Aurora2)를 투여함으로써 개선될 수 있는 상태, 예를 들어, 전술한 바와 같은 상태를 앓고 있거나 이에 걸리기 쉬운 사람 또는 동물 환자를 치료하는 방법이 제공된다. "유효량"은 Syk, FAK, KDR 또는 Aurora2와 같은 단백질 키나제 촉매 활성을 억제함으로써 원하는 치료학적 효과를 제공하는데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 기술하고자 하는 것이다.
- [0054] 본 명세서에서 치료에 대한 언급은 예방적 치료뿐만 아니라 확립된 상태의 치료도 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0055] 본 발명은 또한, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 본 발명의 범위 내에 포함한다.
- [0056] 본 발명의 화합물은 어떤 적합한 수단에 의해서도 투여될 수 있다. 실제로, 본 발명의 화합물은 일반적으로 비경구적으로, 국소적으로, 직장으로, 경구적으로 또는 흡입에 의해서, 특히 경구적 경로에 의해 또는 흡입에 의해서 투여될 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따르는 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 보조제 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방법에 따라서 제조될 수 있다. 보조제에는 특히 희석제, 멸균 수성 매질 및 다양한 무독성 유기 용매가 포함된다. 조성물은 정제, 환제, 과립제, 산제, 수성 용액제 또는 현탁액제, 주사용 용액제, 엘릭서 또는 시럽제의 형태로 제공될 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 제제를 수득하기 위해서 감미제, 방향제, 착색제 또는 안정화제를 포함하는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 비히클의 선택 및 비히클 내의 활성물질의 함량은 일반적으로, 활성 화합물의 용해도 및 화학적 특성, 특정한 투여 방식, 및 약제학적 실시에서 관찰될 조건에 따라서 결정된다. 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 탈크와 같은 윤활제와 배합된, 락토즈, 나트륨 시트레이트, 칼슘 카보네이트, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 및 전분, 알긴산 및 특정의 복합 실리카이트와 같은 붕해제가 정제의 제조를 위해서 사용될 수 있다. 캡셀제를 제조하기 위해서는, 락토즈 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜을 사용하는 것이 유리하다. 수성 현탁액이 사용되는 경우에, 이들은 유화제 또는 현탁을 용이하게 하는 제제를 함유할 수 있다. 슈크로즈, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 글리세롤 및 클로로포름과 같은 희석제 또는 이들의 혼합물이 사용될 수도 있다.
- [0058] 비경구 투여의 경우에는, 식물유, 예를 들어, 호마유, 땅콩유 또는 올리브유, 또는 물 및 프로필렌 글리콜과 같은 수성-유기 용액, 에틸 올레에이트와 같은 주사용 유기 에스테르 중의 본 발명에 따르는 생성물의 에멀전, 현탁액 또는 용액뿐만 아니라 약제학적으로 허용되는 염의 멸균 수용액이 사용된다. 본 발명에 따르는 생성물의 염의 용액은 특히 근육내 또는 피하 주사에 의한 투여에 유용하다. 또한, 순수한 증류수 중의 염의 용액을 포함하는 수용액이 정맥내 주사를 위해서 사용될 수 있지만, 단 이들의 pH는 적합하게 조정되어야 하며, 이들은 신중하게 완충되어야 하고, 충분한 양의 글루코즈 또는 나트륨 클로라이드에 의해 등장성이 되도록 하여야 하며, 이들은 가열, 방사선 조사 또는 미세여과에 의해서 멸균되어야 한다.
- [0059] 국소 투여의 경우에는, 본 발명의 화합물을 함유하는 겔 (물 또는 알코올 기재), 크림 또는 연고제가 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한, 경피 장벽을 통한 화합물의 조절된 방출을 허용하는 패치로 적용하기 위하여 겔 또는 매트릭스 기재 내에 혼입될 수도 있다.
- [0060] 흡입에 의한 투여를 위해서는, 본 발명의 화합물을 분무기 또는 현탁액 또는 용액 에어로졸로 사용하기에 적합



한 담체에 용해 또는 현탁시킬 수 있거나, 건조 분말 흡입기에서 사용하기에 적합한 고체 담체 상에 흡수 또는 흡착시킬 수 있다.

- [0061] 직장 투여를 위한 고체 조성물은 공지된 방법에 따라 제형화되고, 본 발명의 하나 이상의 화합물을 함유하는 좌제를 포함한다.
- [0062] 본 발명의 조성물 내의 활성성분의 백분율은 변화될 수 있으나, 이것은 적합한 투여량이 얻어지도록 하는 비율을 구성하여야 하는 것이 필요하다. 명백하게, 몇 개의 단위 투여형을 거의 동시에 투여할 수 있다. 사용되는 용량은 의사에 의해서 결정될 수 있으며, 원하는 치료학적 효과, 투여 경로 및 치료 기간, 및 환자의 조건에 따라서 좌우된다. 성인에서, 용량은 일반적으로 흡입의 경우에는 1일에 약 0.001 내지 약 50, 바람직하게는 약 0.001 내지 약 5 mg/체중kg, 경구 투여의 경우에는 1일에 약 0.01 내지 약 100, 바람직하게는 0.1 내지 70, 보다 특히 0.5 내지 10 mg/체중kg, 정맥내 투여의 경우에는 1일에 약 0.001 내지 약 10, 바람직하게는 0.01 내지 1 mg/체중kg이다. 각각의 특정한 경우에, 연령, 체중, 일반적 건강상태, 및 의학적 생성물의 효능에 영향을 미칠 수 있는 그 밖의 다른 특징 등 치료할 대상에 대한 특유의 요인에 따라 용량이 결정될 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따르는 화합물은 원하는 치료학적 효과를 얻기 위해서 필요한 빈도로 투여될 수 있다. 일부의 환자는 더 높거나 더 낮은 용량에 대해서 빠르게 반응할 수 있으며, 훨씬 더 적은 유지용량이 적절한 것으로 확인될 수 있다. 다른 환자의 경우에는, 각각의 특정 환자의 생리학적 필요성에 따라서 1일에 1 내지 4회 투여의 비율로 장기간 치료하는 것이 필요할 수 있다. 일반적으로, 활성 생성물은 1일에 1 내지 4회 경구적으로 투여될 수 있다. 물론, 일부의 환자에 대해서는 1일에 1 또는 2회 투여 이하로 처방하는 것이 필요할 수도 있다.
- [0064] 본 발명의 화합물은 공지된 방법을 적용하거나 응용함으로써 제조될 수 있으며, 이 방법은 이전에 사용되거나 문헌에 기술된 방법, 예를 들어, 문헌 [R.C.Larock in Comprehensive Organic Transformations, VCH publishers, 1989]에 기술된 방법을 의미한다.
- [0065] 이하에 기술된 반응에서, 반응성 작용기, 예를 들어, 하이드록시, 아미노, 이미노, 티오 또는 카복시 그룹을 최종 생성물에서 원하는 경우에는, 이들이 반응에 원치 않게 관여하는 것을 피하기 위해서 이들을 보호하는 것이 필요할 수 있다. 통상적인 보호그룹이 표준 관례에 따라서 사용될 수 있다 [참조: 예를 들어, T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 1991].
- [0066] 본 발명의 화합물은 비대칭 중심을 함유할 수 있는 것으로 인식된다. 이들 비대칭 중심은 독립적으로 R 또는 S 배위로 존재할 수 있다. 본 발명의 특정한 화합물이 또한, 기하 이성질현상을 나타낼 수 있다는 것은 본 기술 분야에서 숙련된 전문가에게 명백할 것이다. 본 발명은 상술한 화학식 I의 화합물의 라세미 혼합물을 포함한 각각의 기하이성체 및 입체이성체 및 이들의 혼합물을 포함하는 것으로 이해된다. 이러한 이성체는 공지된 방법, 예를 들어, 크로마토그래피 기술 및 재결정화 기술을 적용하거나 응용함으로써 이들의 혼합물로부터 분리될 수 있거나, 이들은 이들의 중간체의 적절한 이성체로부터 개별적으로 제조된다.
- [0067] 본 발명의 추가의 특징에 따르면, 본 발명의 화합물의 산부가염은 공지된 방법을 적용하거나 응용하여 유리 염기를 적절한 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물의 산부가염은 유리 염기를 적절한 산을 함유하는 물 또는 수성 알코올 용액 또는 그 밖의 다른 적합한 용매에 용해시키고, 용액을 증발시켜 염을 분리시키거나, 유리 염기와 산을 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 (이 경우에, 염은 직접 분리시키거나 용액의 농축에 의해서 수득될 수 있다) 제조될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 화합물의 산부가염은 공지된 방법을 적용하거나 응용함으로써 이들의 염으로부터 재생될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 모화합물은 알칼리, 예를 들어, 탄산수소나트륨 수용액 또는 암모니아 수용액으로 처리함으로써 이들의 산부가염으로부터 재생될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 화합물은 공지된 방법을 적용하거나 응용함으로써 이들의 염기 부가염으로부터 재생될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 모화합물은 산, 예를 들어, 염산으로 처리함으로써 이들의 염기 부가염으로부터 재생될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 화합물은 용매화물(예를 들어, 수화물)로서 편리하게 제조될 수 있거나, 본 발명의 방법 동안에 형성될 수 있다. 본 발명의 화합물의 수화물은 디옥산, 테트라하이드로푸란 또는 메탄올과 같은 유기 용매를 사용하여 수성/유기 용매 혼합물로부터 재결정화시킴으로써 편리하게 제조될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 추가의 특징에 따르면, 본 발명의 화합물의 염기 부가염은 공지된 방법을 적용하거나 응용하여 유리 산을 적절한 염기와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물의 염기 부가염은 유리 산을

적절한 염기를 함유하는 물 또는 수성 알코올 용액 또는 그 밖의 다른 적합한 용매에 용해시키고 용액을 증발시켜 염을 분리시키거나, 유리 산과 염기를 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 (이 경우에, 염은 직접 분리시키거나 용액의 농축에 의해서 수득될 수 있다) 제조될 수 있다.

[0072] 출발물질 및 중간체는 공지된 방법, 예를 들어, 실시예에 기술된 바와 같은 방법 또는 이들의 명백한 화학적 등가방법을 적용하거나 응용함으로써 제조될 수 있다.

[0073] 본 발명은 이하의 설명적 실시예에 의해서 더 예시되나, 이에 의해 제한되지는 않는다.

[0074] 300 MHz  $^1\text{H}$  핵자기 공명 스펙트럼(NMR)은 배리안 머큐리(Varian Mercury) 장치 상에서 기록하였다. 핵자기 공명 스펙트럼(NMR)에서, 화학적 이동( $\delta$ )은 테트라메틸실란에 대비하여 ppm으로 표현한다. 약어는 다음의 의미를 갖는다: s = 단일선; d = 이중선; t = 삼중선; m = 다중선; q = 4중선; dd = 이중선의 이중선; ddd = 이중 이중선의 이중선.

[0075] 체류시간( $R_t$ ) 및 회합된 질량 이온을 측정하기 위한 고압 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS) 실험은 다음의 방법을 사용하여 수행한다. 질량 스펙트럼(MS)은 비행 질량 분광계(flight mass spectrometer)의 마이크로매스(Micromass) LCT 시간을 사용하여 기록한다. 당해 방법은 100부터 1000까지의 질량  $m/z$ 를 스캐닝하는 양성 전자스프레이 이온화(positive electrospray ionization)이다. 액체 크로마토그래피는 애질런트 1100 시리즈 바이나리 펌프 앤드 디게서(Agilent™ 1100 Series Binary Pump & Degasser) 상에서 수행된다; 정지상: 페노메넥스 시너지(Phenomenex Synergi™) 2  $\mu$  하이드로-RP 20 X 4.0mm 칼럼, 이동상: A = 물 중의 0.1% 포름산(FA), B = 아세트오니트릴 중의 0.1% FA; CTC 분석용 PAL 시스템에 의한 5  $\mu$ l의 주입 용적. 유속은 1 mL/분이다. 구배는 3분 동안은 5% B 내지 90% B이고, 2분 동안은 90% B 내지 100% B이다. 보조적 검출기는 다음과 같다: 애질런트 1100 시리즈 UV 검출기, 파장 = 220 nm, 및 세데레 세덱스(Sedere SEDEX™) 75 증발광산란(Evaporative Light Scattering; ELS) 검출기 온도 = 46°C, 질소 압력 = 4 바(bar).

[0076] 박층 크로마토그래피(TLC)  $R_f$  값은 머크(Merck™) 실리카 플레이트를 사용하여 측정하였다.

## 실시예

[0077] 실시예 1

[0078] 2-[4-(7-에틸-5H-피롤로[2,3-b]피라진-6-일)-페닐]-프로판-2-올

[0079] 총 6.0 g의 2-[4-(7-에틸-5H-피롤로[2,3-b]피라진-6-일)-페닐]프로판-2-올(화합물 1)은 *n*-프로필피라진(화합물 2) 및 4-아세틸벤조니트릴(화합물 3)로부터 2 단계로 제조되었다.

[0080] 화합물 1의 합성은 다음과 같이 수행되었다. *n*-프로필피라진(화합물 2)과 4-아세틸벤조니트릴(화합물 3)을 40°C에서 테트라하이드로푸란 중의 나트륨 비스(트리메틸실릴)아미드와 커플링시켜 중간체 화합물 4를 30% 수율로 수득하였다. 화합물 4를 0°C에서 테트라하이드로푸란 중의 메틸마그네슘 클로라이드와 반응시키고, 2-프로판올로부터 재결정화시킨 후에 목적하는 화합물인 화합물 1을 74% 수율로 수득하였다. 합성은 도 1에 나타내었다.

[0081] 실험

[0082] 2-[4-(7-에틸-5H-피롤로[2,3-b]피라진-6-일)-페닐]에타논(화합물 4).

[0083] 테트라하이드로푸란(5 mL) 중의 *n*-프로필피라진(화합물 2, 912 mg, 7.46 mmol)의 용액을 20°C에서 나트륨 비스(트리메틸실릴)아미드의 용액(THF 중의 2M 용액; 13 mL, 26 mmol, 3.5 당량)에 7분에 걸쳐서 적가하였다. 짙은 적자색 용액이 수득되었으며, 온도는 16.4°C로 떨어졌다. 테트라하이드로푸란(5 mL) 중의 4-아세틸벤조니트릴(화합물 3, 1.08 g, 7.4 mmol)의 용액을 13.3°C에서 18분에 걸쳐서 첨가하였다. 온도는 12.6°C로 떨어졌으며, 갈색 용액이 생성되었다. 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하고, 6 시간 동안 약 35°C로 가열한 다음에, 실온에서 약 60 시간 동안 교반하도록 하였다. 혼합물을 포화된 수성 탄산수소나트륨(200 mL)에 붓고, 에틸 아세테이트(2 x 150 mL)로 추출하였다. 에틸 아세테이트를 물(100 mL)로 세척하고, 40°C의 욕조 온도와 80 내지 10 토르에서 부치(Buchi) 상에서 농축시켜 짙은 황색 고체를 수득하였다. 고체를 디에틸 에테르

(25 mL)와 함께 분쇄하고, 여과하고, 에테르 (25 mL)로 세척하였다. 고체를 공기 건조시켜 황색 고체로서 600 mg (30.3%)의 화합물 4를 수득하였다:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 도 1)  $\delta$  8.5 (1H, d,  $J=2$  Hz), 8.15 (2H, d,  $J=8$  Hz), 8.1 (1H, d,  $J=3$  Hz), 7.9 (2H, d,  $J=8$  Hz), 3.1 (2H, q,  $J=9$  Hz), 2.7 (3H, s), 1.4 (3H, t,  $J=9$  Hz).

[0084] 1-[4-(7-에틸-5H-피롤로[2,3-*b*]피라진-6-일)페닐]프로판-2-올 (화합물 1).

[0085] 테트라하이드로푸란 (116 mL) 중의 메틸마그네슘 클로라이드 (THF 중의 3M; 81.3 mL, 244 mmol, 10 당량)의 냉각된 (약 5°C) 용액에 테트라하이드로푸란 (348 mL) 중의 화합물 4 (6.5 g, 24.4 mmol)의 용액을, 90 분에 걸쳐서, 첨가의 속도에 의해서 온도를 약 0°C로 유지시키면서 적가하였다. 담황색 용액이 첨가시에 관찰되었다. 1 시간 후에, TLC (에틸 아세테이트/*n*-헵탄 1/1)는 출발물질이 존재하지 않았고, 더 낮은  $R_f$ 로 이동한 새로운 스폿(spot)를 나타내었다. 배치(batch)를 탄산수소나트륨의 포화된 수용액 (약 660 mL)을 조심스럽게 첨가하여 켄칭(quenching)하였다. 농후한 덩어리가 생성되었으며, 혼합물에 에틸 아세테이트 (250 mL) 및 물 (250 mL)을 첨가하였다. 수성층을 분리하여 에틸 아세테이트 (2 x 250 mL)로 재추출하였다. 에틸 아세테이트 분획을 합하여 물 (2 x 200 mL)로 세척하고, 40°C의 욕조 온도 및 80 내지 10 토르에서 부치 상에서 농축시켜 얻은 베이지색 고체로서 7.5 g (109%)의 화합물 1을 수득하였다:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 도 2)  $\delta$  12.0 (1H, s), 8.35 (1H, d,  $J=3.5$  Hz), 8.2 (1H, d,  $J=3.5$  Hz), 7.6 (4H, s), 5.1 (1H, s), 2.9 (2H, q,  $J=8$  Hz), 1.5 (6H, s), 1.3 (3H, t,  $J=8$  Hz).

[0086] 이 물질을 이전의 실험으로부터 수득한 물질과 배합하였다. 배합된 물질 (8.5 g)을 2-프로판올 (150 mL)과 함께 재환류시켜 투명한 담갈색 용액을 수득하고, 이것을 진공 하에서 뜨거운 부흐너 (Buchner) 깔때기를 통해서 뜨거울 때 여과하였다. 필터 플라스크 내에 침전이 형성되었으며, 혼합물을 비등하도록 가열하여 투명한 용액을 수득하였다. 물질을 교반하면서 실온으로 냉각시켜 담황색의 고체를 수득하고, 이것을 여과하고, 냉 2-프로판올로 세척하고, 50°C의 진공 오븐에서 건조시켜 담황색 고체로서 6.0 g (71%)의 화합물 1을 수득하였다: LCMS:  $R_T$  = 2.55 분, MS: 282 (M+H);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 도 3)  $\delta$  12.0 (1H, s), 8.35 (1H, d,  $J=3$  Hz), 8.2 (1H, d,  $J=3$  Hz), 7.6 (4H, s), 5.1 (1H, s), 2.9 (2H, q,  $J=9$  Hz), 1.5 (6H, s), 1.3 (3H, t,  $J=9$  Hz).

[0087] 화합물 1의 원소분석은 표 1에 나타내었다.

표 1

[0088]	각 원소의 이론적 퍼센트	C 72.57%, H 6.81%, N 14.93%, O 5.69%
	실험 1	C 72.46%, H 7.05%, N 15.07%

# Syk에 대한 시험관내 시험방법

[0090] 시험 명칭: 비장 티로신 (Y) 키나제

[0091] 단축 명칭: Syk

[0092] 시험 형식: 기질 인산화

[0093] 검출 형식: 스트렙타비딘 플래쉬플레이트(Streptavidin FlashPlate)

[0094] 조절: 억제

[0095] 퍼킨엘머 라이프 사이언시즈(PerkinElmer Life Sciences™)로부터 제공된 스트렙타비딘 플래쉬 플레이트 플러스 (Plus) 마이크로플레이트는 플레이트내 방사성측정시험을 위해서 설계된 것이다. 각각의 웰의 내부는 폴리스티렌계 섬광물질의 박층으로 영구적으로 코팅된 후, 스트렙타비딘에 공유적으로 결합되어 있다. 이들 플레이트는 비오틴화된 포획 분자를 이용하는 광범한 종류의 시험에 적용하는데 적합하다. 폴리 (Glu,Tyr) 4:1 (PGT)은 티로신-특이적 단백질 키나제에 대한 기질로 작용할 수 있는 랜덤 공중합체이다. 이 시험방법은 Syk에 의한

PGT-비오틴 기질의 인산화를 측정한다. 효소는 [ $\gamma$   $^{33}$ P]-포스페이트를 [ $\gamma$   $^{33}$ P]-ATP로부터 중합체 기질로 이동시킨다. 이 시험은 비-결합 384-웰 플레이트 내의 용액 중에서 수행하였다. 인산을 사용하여 반응을 정지시킨 후에, 반응 혼합물을 384-웰 스트랩타비딘 플래쉬플레이트에 이동시켰다. 비오틴화된 기질은 플레이트 상에 포획되었으며, 뜨거운 ATP를 포함한 다른 시약은 세척하여 제거하였다. 그 후, 각각의 웰을 방사능에 대해서 계수하였다.

[0096] 효소반응은 384-웰 비-결합 플레이트 내에서 수행하였다. 최종 시약 농도/웰은 다음과 같았다: 7.77 nM Syk, 15.5 nM PGT-비오틴 기질, 0.1  $\mu$ Ci  $^{33}$ P-ATP, 50 mM 트리스(Tris), pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml  $\gamma$ -글로불린. 반응 용적은 22  $\mu$ l였다. 반응 시간은 120 분이였다. 온도는 실온이였다. 20  $\mu$ l의 9% 인산을 첨가함으로써 반응을 정지시키고, 30  $\mu$ l의 반응 혼합물을 384-웰 스트랩타비딘 플래쉬플레이트로 옮겼다. 실온에서 90 분 동안 항온처리한 후에, 플레이트를 50 mM 트리스 (pH 7.5) 중의 0.02%의 트윈 (Tween)-20으로 세척하였다. 방사능을 탑 카운트(Top Count™) 섬광계수기 상에서 계수하였다.

[0097] 효소 회석액을 제조하여 사용하기 전에 얼음 상에서 유지시켰다. MnCl<sub>2</sub> 및 DTT를 사용하기 전에 시험 완충액에 새롭게 첨가하였다.

[0098] 시험을 위한 물질은 표 2에 나타내었다.

표 2

[0099]

물질	공급업자	카탈로그 번호	Mwt	기능
1 M 트리스, pH 7.5	Fisher	BP1757-500		완충제
1 M MgCl <sub>2</sub>	Sigma	M-1028	95.2	효소 보조인자
1 M MnCl <sub>2</sub>	Sigma	M-1787	125.8	효소 보조인자
DTT	Sigma	D-5545	154.2	항산화제
$\gamma$ -글로불린	Sigma	G-5009		단백질 안정화제
DMSO	Sigma-Aldrich	15,493-9		용매
스타우로스포린	Sigma	S-4400	466.5	표준 억제제
인산 (85%)	Sigma	P-6560	98.0	정지 용액
1 mCi [ $\gamma$ $^{33}$ P]-ATP	PerkinElmer	NEG6xx		기질
10 x PBS, pH 7.4	Fisher	BP399-1		세척 완충액
트윈 20	Fisher	BP337-500	1227.54	세제
384-웰 폴리프로필렌 플레이트	Corning	3657		화합물 플레이트
비-결합 384-웰 플레이트	Corning	3652		반응 플레이트
384-웰 스트랩타비딘 플래쉬플레이트	PerkinElmer	SMP-410 (A)		포획 플레이트
탑 실 (Top Seal) A 밀봉 필름	Packard	6005185		플레이트 밀봉재
Elx405 자동화 세척기	Bio-Tek			플레이트 세척기
탑 카운트	Packard			계수기
FX 스테이션 (Station)	Beckman			액체 취급기구
베크만 (Beckman) 2000	Beckman			액체 취급기구

[0100] 효소:

[0101] 플래그-태깅된(flag-tagged) Syk (0.184 mg/ml, MW = 35,531.81 Da)는 본 기술분야에서 공지된 방법에 의해서 생산하고 정제하였다.

[0102] 기질:

[0103] 비오틴 접합된 폴리 (Glu,Tyr) 4:1은 시스바이오 인터내셔널(Cisbio international™)로부터 구입하였다 (catalog # 61GT0BLB, lot # 16).

[0104] 사용된 시험 용액은 표 3에 나타내었다.

표 3

시약	화학물질	용매	농도
시험 완충액	트리스, pH 7.5	H <sub>2</sub> O	50 mM
MnCl <sub>2</sub> 및 DTT를 새롭게 첨가	MnCl <sub>2</sub>		3 mM
	MgCl <sub>2</sub>		10 mM
	DTT		1 mM
	γ-글로불린		0.1%
효소 및 기질 용액	Syk	시험 완충액	7.77 nM
비-결합 플레이트에서 유지	PGT-비오틴 기질		15.5 nM
ATP / <sup>33</sup> P-ATP 용액	ATP/ <sup>33</sup> P-ATP	시험 완충액	0.1 μCi/웰
정지 용액	인산	H <sub>2</sub> O	9%
세척 완충액	트윈-20	1 x PBS, pH 7.4	0.02%

[0106] 화합물 희석:

[0107] 1. 100% DMSO 중의 10 mM의 화합물을 H 열이 비어있는 96-웰 U-바닥 폴리프로필렌 플레이트 내에 10 μl/웰로 수용하였다. 100% DMSO를 90 μl/웰로 첨가하여 100 μl의 1 mM 화합물을 수득하고, 재밀봉하고, 플레이트를 암실에서 실온에서 저장하였다.

[0108] 2. 화합물 지정 플레이트(destination plate)의 제조: 384-웰 둥근-바닥 폴리프로필렌 플레이트 (코닝 (Corning) 저장 플레이트) 내에서, 칼럼 3 및 13에는 23 μl/웰의 H<sub>2</sub>O를, 칼럼 4 내지 12 및 칼럼 14 내지 22에는 20 μl/웰의 30% DMSO를 첨가하였다 (O 및 P 열은 비운 채로 두었다).

[0109] 3. 키나제 프로파일링(Kinase Profiling) 프로그램을 사용한 바이오메크 (Biomek) 2000™ 상에서의 화합물 희석액 (10개의 희석액, 300 μM, 100 μM, 30 μM, --- 등)의 제조: 8번째 열(H 열)은 배제하고 20 μl 팁 (tip)을 사용하여, 10 μl/웰의 1 mM 화합물을 기본 플레이트(source plate)의 칼럼 1로부터 지정 플레이트 내의 칼럼 3으로 이동시켜 제1의 300 μM 희석액을 제조하였다. 그 후에, 지정 플레이트 내에서 혼합시키고 10 ul/웰의 300 μM 희석액을 칼럼 3으로부터 칼럼 4로 이동시켜 100 μM 희석액을 제조하였다. 혼합시키고, 10 ul/웰의 100 μM 희석액을 칼럼 4로부터 칼럼 5로 이동시켜 30 μM 희석액 등을 제조하였다. 각각의 화합물에 대해서 이중 희석액을 제조하였으며, 예를 들어, 10 μl/웰의 화합물을 기본 플레이트 내의 A1으로부터 지정 플레이트 내의 A3 및 B3로 이동시켰다. 혼합 및 이동을 반복하였다. 그 후, 10 μl/웰의 1 mM 화합물을 기본 플레이트 내의 칼럼 2로부터 지정 플레이트 내의 칼럼 13으로 이동시켜 300 μM 희석액을 제조하였다. 그 후에, 지정 플레이트 내에서 혼합시키고 10 ul/웰의 300 μM 희석액을 칼럼 13으로부터 칼럼 14로 이동시켜 100 μM 희석액 등을 제조하였다. H 열이 비어있는 하나의 가득찬 96-웰 기본 플레이트로 6개까지의 화합물 지정 플레이트를 제조할 수 있다.

[0110] 4. 표준 화합물 모플레이트(parent plate)의 제조: 100% DMSO 중의 10 mM 로스코비틴(Roscovitine) 용액을 5 μl/웰로 96-웰 U-바닥 폴리프로필렌 플레이트 내의 H1 및 H2에 첨가한 다음에, 45 μl/웰의 100% DMSO에 의해서 1 mM 용액으로 희석하였다.

[0111] 5. 표준 화합물 지정 플레이트의 제조: 384-웰 둥근-바닥 폴리프로필렌 플레이트 (코닝 (Corning™) 저장 플레이트) 내에서, 칼럼 3 및 13에는 23 μl/웰의 H<sub>2</sub>O를, 칼럼 4 내지 12 및 칼럼 14 내지 22에는 20 μl/웰의 30% DMSO를 첨가하였다 (O 및 P 열에만 첨가).

[0112] 6. 프로파일링 표준(Profiling Standard) 프로그램을 사용한 바이오메크 2000™ 상에서의 표준 화합물 희석액 (10개의 희석액, 300 μM, 100 μM, 30 μM, --- 등)의 제조: 단일 20 μl 팁을 사용하여, 10 μl/웰의 1 mM 표준 화합물을 모플레이트 내의 H1으로부터 지정 플레이트 내의 O1에 이동시켜 제1의 300 μM 희석액을 만들었다. 그 후에, 지정 플레이트 내에서 혼합시키고 10 ul/웰의 300 μM 희석액을 O3으로부터 O4로 이동시켜 100 μM 희



석액을 제조하였다. 혼합시키고, 10  $\mu\text{l}$ /웰의 100  $\mu\text{M}$  희석액을 04로부터 05로 이동시켜 30  $\mu\text{M}$  희석액 등을 제조하였다. 각각의 표준 화합물에 대해서 이중 희석액을 제조하였으며, 예를 들어, 10  $\mu\text{l}$ /웰의 화합물을 모플레이트 내의 H1으로부터 지정 플레이트 내의 03 및 P3로 이동시켰다. 혼합 및 이동을 반복하였다. 그 후, 10  $\mu\text{l}$ /웰의 1 mM 화합물을 모플레이트 내의 H2로부터 지정 플레이트 내의 013으로 이동시켜 300  $\mu\text{M}$  희석액을 제조하였다. 그 후에, 지정 플레이트 내에서 혼합시키고 10  $\mu\text{l}$ /웰의 300  $\mu\text{M}$  희석액을 013으로부터 014로 이동시켜 100  $\mu\text{M}$  희석액 등을 제조하였다.

[0113] 7. 표준 화합물 지정 플레이트 내의 칼럼 23에서 A 내지 H에는 20  $\mu\text{l}$ /웰의 30% DMSO (고대조군)를, I 내지 J에는 20  $\mu\text{l}$ /웰의 45%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (저대조군)를 첨가하였다.

[0114] 시험방법:

[0115] 1. 시험 플레이트 (코닝 (Corning™) 비-결합 384-웰 플레이트)에 10  $\mu\text{l}$ 의 효소 및 기질 용액 및 2  $\mu\text{l}$ 의 시험 화합물을 첨가하고, 실온에서 30 분 동안 항온처리하였다 (효소/화합물 항온처리전 단계).

[0116] 2. 10  $\mu\text{l}$ 의 ATP/ $^{33}\text{P}$ -ATP 용액을 첨가함으로써 반응을 개시시켰다.

[0117] 3. 실온에서 120 분 동안 항온처리하였다.

[0118] 4. 20  $\mu\text{l}$ 의 정지 완충액을 첨가함으로써 반응을 정지시켰다.

[0119] 5. 30  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합물을 384-웰 스트랩타비딘 플래쉬플레이트에 이동시켰다.

[0120] 8. 실온에서 90 분 동안 항온처리하였다.

[0121] 9. 스트랩타비딘 플래쉬플레이트를 Elx405 자동화 세척기를 사용하여 100  $\mu\text{l}$ 웰의 세척 완충액으로 2회 세척하였다.

[0122] 10. 밀봉하고, 플레이트를 탑 카운트 섬광계수기 상에서 판독하였다 (40 초/웰).

[0123] \*단계 1부터 단계 5까지의 시험은 바이오메크 (Biomex™) FX 스테이션을 사용하여 수행하였다.

[0124]  $\text{IC}_{50}$  결정시에 곡선 적합을 위한 수학적:

[0125] 
$$Y = \text{최저} + (\text{최고} - \text{최저}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{경사 기울기}))}$$

[0126] X는 농도의 대수이다.

[0127] Y는 반응이다.

[0128] Y는 최저(Bottom)에서 시작하여 S자형으로 최고(Top)에 이른다.

[0129] 상기 식은 "4 파라미터 로지스틱 (four parameter logistic)" 방정식과 동일하다.

[0130] 화학식 I의 화합물은 이 시험에서 1.7 나노몰의  $\text{IC}_{50}$ 을 나타내었다.

# [0131] MTS 시약을 사용한 혈액학적 악성 세포주의 생존도 시험

[0132] 1. 목적

[0133] 이 방법은 시험 화합물에 의한 처리에 따른 액상 종양세포주의 생존도를 측정하는 것이다. 종양세포는 현탁액 중에서 대수가 성장으로 유지시킨다. 사용하는 날에 세포를 0.05 내지  $0.1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 밀도로 재현탁시키고, 시험 화합물과 함께 96 웰 플레이트에서 96 시간 동안 항온배양한다. 세포의 생존도는 세포를 프로메가 (Promega)의 MTS 시약과 함께 항온배양함으로써 측정하였다. 세포의 생존도는 490 nm에서의 흡광도의 변화에 비례한다. 대조군과 화합물-처리된 세포 사이의 흡광도를 비교함으로써, 세포 생존도에 미치는 시험 화합물의 영향을 대조세포 생존도의 백분율로서 측정한다.



- [0134] 2. 절차
- [0135] A. 재료
- [0136] 1. 세포:
- [0137] 액상 종양 세포주는 아메리칸 티슈 컬처 콜렉션 (American Tissue Culture Collection)으로부터 또는 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)로부터 입수한다.
- [0138] 2. 배양 배지:
- [0139] 완전 RPMI: 25 mM HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산) 및 L-글루타민 (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 22400-089) + 10% 열-불활성화된 태아소혈청 (FBS) (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 16140-071) + 1x 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco/Invitrogen, Cat. # 15070-063) + 50ug/ml 플라즈모신 (Invivogen™, Cat. # ant-mpt)을 함유하는 RPMI-1640 배지.
- [0140] 무-페놀레드 cRPMI: L-글루타민 (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 11835-030) + 10% 열-불활성화된 태아소혈청 (FBS) (Gibco/Invitrogen, Cat. # 16140-071) + 1x 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 15070-063)을 함유하는 무-페놀레드 RPMI-1640 배지.
- [0141] 3. 그 밖의 다른 액체 시약:
- [0142] 프로메가 (Promega™) MTS 시약 (Cell Titer 96 Aqueous Cat. # G358B)
- [0143] 디메틸설폭사이드 (DMSO) (Sigma™, Cat. # D2650)
- [0144] 4. 소모품:
- [0145] 뚜껑이 있는 멸균 96-웰 폴리스티렌 조직 배양-처리된 투명한 플레이트 (Falcon™, Cat. # 3072)
- [0146] 5. 장치:
- [0147] 플레이트판독기, 96-웰 (SpectraMAX GeminiEM™, Molecular Devices, USA)
- [0148] B. 방법
- [0149] 제1일: 시험 화합물의 제조
- [0150] 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고 1000x 농도로 연속-희석한다.
- [0151] 시험 화합물을 멸균 96-웰 폴리스티렌 조직 배양 플레이트 내의 무-페놀레드 cRPMI 중에 1:100으로 희석한다.
- [0152] 12-채널 피펫터(pipetor)를 사용하여 10 ul의 희석된 화합물 용액을 세포 배양에 사용될 비어 있는 96 웰 플레이트에 이동시킨다.
- [0153] 100 ul의 세포 배양액을 첨가한 후, 시험 화합물의 최종 농도는 1x가 될 수 있다.
- [0154] 제1일: 화합물 처리를 위한 액상 종양세포의 제조
- [0155] 완전 RPMI 중의 세포를 대수기 배양물로부터 약 0.3 내지  $0.7 \times 10^6$ /ml의 밀도로 수거한다. 세포를 계수하고, 무-페놀레드 cRPMI 중에서  $0.1 \times 10^6$ /ml로 조정한다 (24시간 이하의 배가시간을 갖는 빠르게 성장하는 세포, 예를 들어, K562의 경우에는, 과성장을 피하기 위해서  $0.05 \times 10^6$ /ml를 대신 사용한다).
- [0156] 3중의 100  $\mu$ l의 세포를 투명한 96-웰 플레이트의 웰에 총 10000개 세포/웰이 되도록 이동시켰다. 각각의 웰이 이미 10  $\mu$ l의 상기한 바와 같이 제조된 10x 농축된 시험 화합물을 함유한다는 점을 유의하여야 한다.
- [0157] 세포 배양:
- [0158] 세포는 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 조직 배양기 내에서 37℃로 72 내지 96시간 동안 항온배양한다.

- [0159] C. 측정: 세포 생존도의 측정
- [0160] 1. 프로메가의 MTS 시약을 해동시키고, 반복 피펫터에 의해 각각의 웰에 20  $\mu$ l를 첨가한다.
- [0161] 2. 플레이트를 흔들어서 웰 내의 시약을 혼합시키고, 플레이트를 37°C의 CO<sub>2</sub> 조직 배양기에 배치한다.
- [0162] 3. 100 $\mu$ l의 무-페놀레드 cRPMI 만을 함유하는 웰의 열에 MTS 시약을 첨가함으로써 "무-세포" 블랭크 대조군을 제조한다.
- [0163] 4. 대조군 세포에 대한 490 nm에서의 흡광도가 >1.5가 될 때까지 37°C에서 항온배양한다.
- [0164] 5. 세포 배양물을 흔들어서 혼합시켜 웰 내에서 색상이 균일하도록 보장하여, 기포가 없는 것을 확인한다. 기포가 존재하는 경우에는, 플레이트를 벤치 탑 (bench top) 원심분리기 상에서 1000xg으로 원심분리하여 기포를 제거한다.
- [0165] 6. 몰레큘라 디바이시스 (Molecular Devices) 96-웰 플레이트 판독기에서 흡광도를 판독한다.

[0166] D. 결과의 분석:

- [0167] 1. 텍스트 데이터를 복사하여 엑셀 스프레드시트 (spreadsheet) 상에 붙인다.
- [0168] 2. "무-세포" 블랭크 데이터를 평균하고, 이 값을 세포를 함유하는 각각의 웰로부터의 흡광도에서 감산하였다.
- [0169] 3. 블랭크-보정된 삼중 웰 데이터를 평균하고, 반복 변동(replicate variation)에 대한 표준 편차를 계산한다.
- [0170] 4. 대조군 세포 데이터의 평균:
- [0171] 5. 평균을 낸 화합물 처리된 세포 데이터를 다음의 수학적식에서와 같이 평균을 낸 대조군 세포 데이터의 퍼센트로 계산한다:

[0172] 
$$(\text{화합물 처리된 값}/\text{대조군 값}) * 100 = \text{대조군 값의 \%}$$

[0173] 결과:

[0174] 본 발명자들은 화학식 I의 화합물의 항-증식 활성을 측정하였다. 표 4에 나타낸 바와 같이, 화학식 I의 화합물은 Jeko-1 및 Granta-519의 두 개의 MCL 세포주에서 일관되게 활성이 있다. 또한, 화학식 I의 화합물은 비교적 광범위한 스펙트럼의 혈액학적 악성 세포주에 대해서 억제적인 것으로 보인다 (15 개 중의 6 개).

**표 4**

[0175] 액상 종양 세포주의 생존도에 미치는 Syk 화합물의 효과 (MTS 시험)

질병	세포주	IC50 ( $\mu$ M)	최고 농도 (10 $\mu$ M)에서의 억제율 %
		A003397769	A003397769
		N=4	N=4
AML	HL-60	3.7, 8.1, >10, >10	35
AML	KG-1	1.9	91
AML	ML-2	>10	28
B-ALL	Nalm-6	5.5	84
B-CLL	JVM-2	3.5, 3.6, 7.7, >10	60
B-CLL	JVM-2	6.8, 7.0, 8.4, >10	59
B-NHL	DLCL-2	1.4, >10, >10, >10	0
B-NHL	DOHH-2	4.5	75
CML	Jur1-MK1	1.2, >10, >10, >10	28
CML	K562	3.9, >10, >10, >10	21
MCL	Jeko-1	3.1	97
MCL	그란타 (Granta)-519	3.4	67
MM	L-363	5.5	61
MM	RPMI8226	>10	36

T-ALL	저켓 (Jurkat)	6.8, >10, >10, >10	43
-------	----------------	--------------------	----

[0176] **랫트 콜라겐 유도된 관절염의 억제**

[0177] 서론:

[0178] 콜라겐-유도된 관절염(CIA)은 보조제 중의 II형 콜라겐(cII)으로 면역화시킴으로써 유전적으로 민감한 설치류에서 유도될 수 있는 사람 류마티스성 관절염(RA)의 잘 특성화된 모델이다. CIA 및 RA 둘 다는 관절의 부종/염증, 활막 과다증식 및 연골 및 골 침식을 나타낸다. cII로 면역화시켜서 유도된 이러한 만성 염증성 관절염은, T 세포-결핍 마우스에서 약화된 CIA에 의해 입증되는 바와 같이, T 세포 성분, 및 B 세포 성분 둘 다로 이루어진다. B 세포-결핍 마우스, xid 마우스, 또는 CXCR5에 무효 돌연변이(null mutation)를 갖는 마우스에서는 CIA가 발생하지 않는다.

[0179] 방법:

[0180] 면역화 및 시험감염: 암컷 루이스 랫트를 제0일에 면역화시키고, 제7일에는 불완전 프로인트 보조제와 혼합된 소의 코로부터 유래한 cII로 1.0 mg/ml의 최종 콜라겐 농도로 시험감염시켰다. 동물의 꼬리 기부(base)에 400  $\mu$ g의 cII를 주사하였다.

[0181] 예방적 투여 방법: 화학식 I의 화합물 (3.0, 10 및 30 mg/kg)을 제6일에 시작하여 1일 2회 (b.i.d.) 경구적으로 투여 (p.o.)하고, 제21일까지 계속하였다.

[0182] 병용 투여 방법: 랫트에게 제6일에 시작하여 제21일까지 화학식 I의 화합물 (3.0 및 10 mg/kg, p.o., bi.d.) 또는 메토타렉세이트 (MTX, 0.1 및 0.2 mg/kg, p.o., q.d.)를 단일요법으로서, 또는 화학식 I의 화합물의 각각의 용량과 MTX의 각각의 용량으로 이루어진 병용물로 투여하였다.

[0183] 치료학적 투여 방법: 화학식 I의 화합물 (10 및 30 mg/kg, p.o., b.i.d.)을 제12일에 시작하여 경구적으로 투여하고, 제21일까지 계속하였다.

[0184] 관절 병리학: 발목관절 부종은 전자 디지털 캘리퍼를 사용하여 최근접 0.01 mm까지 측정하였다. 측정은 제6일에 시작하여 제21일에 끝나는 시험 전체에 걸쳐서 7회 기록하였다. 체중은 같은 날에 기록하였다. 제21일에, 뒷발을 발목 바로 위의 헤어라인(hairline)에서 절제하고, 10% 중성 완충 포르말린 중에서 고정시켰다.

[0185] 마이크로CT 분석: 발목관절은 콘-빔 (cone-beam)  $\mu$ CT 스캐너를 사용하여 검사하였다. 검체의 검사 용적을 선택하기 위해서 우선 스카우트 뷰 스캔 (scout view scan)을 얻고, 이어서 위치 확인, 측정 및 컴퓨터 재구성을 하였다. 발목관절에서, 특정 용적에서의 골 표면의 복잡성을 나타내는 골 표면적 대 골 용적의 비를 분석하였다.

[0186] 통계학적 분석: 관절 부종/염증에 대해서는, 에버스타트 (Everstat) v.5 소프트웨어 및 2원 반복 측정 ANOVA 및 던넛 사후 검정(Dunnett's post test)을 사용하여 데이터를 분석하였다. 마이크로CT 데이터는 1원 ANOVA 및 뉴만-쿨스 (Newman-Keuls) 다중비교 검정을 사용하여 에버스타트 (Everstat)에 의해서 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시하며, <0.05의 p 값은 유의적인 것으로 간주된다.

[0187] 결과:

[0188] 예방적 투여:

[0189] 관절 부종/염증의 디지털 캘리퍼 측정 (도 2).

[0190] - 화학식 I의 화합물 (3.0 mg/kg)은 단지 제12일에 비히클 처리된 랫트에 비해서 발목 부종/염증을 유의적으로 감소시켰다.

[0191] - 화학식 I의 화합물 (10 mg/kg)은 제12일부터 제19일까지 비히클 처리된 랫트에 비해서 발목 부종/염증을 유의적으로 감소시켰다.

- [0192] - 화학식 I의 화합물 (30 mg/kg)은 제12일부터 제21일까지 비히클 처리된 랫트에 비해서 발목 부종/염증을 유의적으로 감소시켰다.
- [0193] 마이크로CT 분석 (도 3).
- [0194] - 화학식 I의 화합물 (3, 10 또는 30mg/kg, b.i.d.)은 비히클-처리된 랫트와 비교하는 경우에 골 침식의 유의적인 감소를 나타내었다 (골 표면적 대 골 용적의 비로 측정됨).
- [0195] 병용 투여:
- [0196] 관절 부종/염증의 디지털 캘리퍼 측정 (도 4, 5).
- [0197] - 화학식 I의 화합물 (10 mg/kg)은 제15일부터 제21일까지 비히클 처리된 랫트에 비해서 발목 부종/염증을 유의적으로 감소시켰다.
- [0198] - 화학식 I의 화합물 (10 mg/kg)과 MTX (0.2 또는 0.1 mg/kg)의 병용요법은 화학식 I의 화합물 (10 mg/kg) 또는 MTX (0.2 또는 0.1 mg/kg)를 단일요법으로 투여한 랫트에서 관찰된 것에 비해, 제15일부터 제21일까지 발목 부종/염증의 유의적인 감소를 나타내었다.
- [0199] - 단일요법으로 또는 MTX (0.1 mg/kg)와의 병용요법으로서 화학식 I의 화합물 (3.0 mg/kg)은 관절 부종/염증에 의해서 측정되는 바와 같이 질병 중증도에 대해 유의적인 영향을 미치지 못하였다.
- [0200] - MTX (0.2 mg/kg)와의 병용요법으로서 화학식 I의 화합물 (3.0 mg/kg)은 제18일 내지 제21일에 수행된 측정시에, 둘 중 하나의 약물만을 단독으로 투여한 경우에 관찰된 것 이상으로 관절 부종/염증의 유의적인 감소를 나타내었다.
- [0201] 마이크로CT 분석 (도 6):
- [0202] - 3차원 영상은 비히클-처리된 랫트의 관절에서 유의적인 골 침식/파괴를 나타내었다.
- [0203] - 랫트에 대한 화학식 I의 화합물 (10 mg/kg, po, bid)의 투여는 비히클-처리된 랫트에 비해서 골 침식의 유의적인 감소를 제공하였다. 유의적인 감소는 화학식 I의 화합물을 3 mg/kg으로 투여한 랫트에서는 관찰되지 않았다.
- [0204] - MTX (0.2 mg/kg, po, qd)에 의한 단일요법은 골 침식의 유의적인 감소를 제공하였다. 이 효과는 0.1 mg/kg MTX를 투여한 랫트에서는 나타나지 않았다.
- [0205] - 화학식 I의 화합물과 MTX의 병용물로 처리한 경우에, 모든 그룹은 비히클-처리된 랫트에 비해서 골 표면적 대 골 용적의 비에 있어서의 유의적인 감소를 나타내었다.
- [0206] - MTX (0.2 mg/kg, qd)와 화학식 I의 화합물 (10mg/kg, bid, po)의 병용요법은 화학식 I의 화합물 또는 MTX를 단일요법으로 제공받은 랫트에서 관찰된 것에 비해서 골 침식에 대한 상가적 보호작용을 제공하였다.
- [0207] 치료학적 투여
- [0208] 관절 부종/염증의 디지털 캘리퍼 측정 (도 7).
- [0209] - 관절염이 시각적으로 명확하게 될 때까지 투여를 지연시키는 치료학적 방법으로 투여하는 경우에도, 화학식 I의 화합물 (10 및 30 mg/kg, p.o., b.i.d.)은 제15일부터 제21일까지 발목 부종/염증을 유의적으로 감소시켰다.
- [0210] 마이크로CT 분석 (도 8):
- [0211] - 비히클-처리된 경우에 비해서, 화학식 I의 화합물 (10mg/kg 또는 30mg/kg)을 치료학적으로 투여한 CIA 랫트는 골 표면적 대 골 용적의 비에 의해 측정되는 바와 같이 골 침식의 유의적인 감소를 나타내었다.

[0212] 요약:

[0213] 이들 연구는, 화학식 I의 화합물에 의한 syk 키나제의 억제에 관절 부종/염증 및 골 침식의 감소에 의해 측정되는 바와 같이 랫트 CIA의 발병 및 진행 둘 다를 유의적으로 지연시킬 수 있음을 확증한다. 중요하게, 질병 진행 및 중증도의 유의적인 억제가 관절염의 시각적인 징후가 명백할 때까지 투여를 지연시킨 랫트에서 관찰되었다. RA에 대한 새로운 임상 요법은 통상적으로 MTX와의 병용 요법으로 제공된다. 관절염의 설치류 모델에서의 본 데이터는 화학식 I의 화합물을 MTX와 병용 투여한 경우의 상가적 효과를 나타내며, 이것은 화학식 I의 화합물과 MTX의 병용요법이 RA 환자에서 상승적인 임상적 효과를 제공할 수 있음을 시사한다.

# [0214] 혈관형성 시험

[0215] 암컷 루이스 랫트 (5 주령, 150-175 g)를 자일라진 (xylazine) (4 mg/kg) 및 케타민 (80 mg/kg)을 사용하여 마취시켰다. 그 후, 50  $\mu$ l의 FGF-2 (섬유아세포 성장인자 2) 용액 (400 ng의 FGF-2를 함유) 또는 비히클 (생리학적 염 용액, 소혈청 알부민 0.08 %)을 함유하는 셀룰로즈 스폰지 (직경 10 mm, Vivoxid Ltd.<sup>TM</sup> Turku, Finland)를 동물의 등에 피하 이식하였다. 다음의 2일 동안, 피부를 통해 스폰지 속으로 50  $\mu$ l의 FGF-2 용액 또는 비히클 (기본 조건)을 매일 주사함으로써 추가의 혈관형성을 유도시켰다. 스폰지를 이식시킨지 1주일 후에, 과용량의 펜토바르비탈을 사용하여 동물을 안락사시키고, 스폰지를 절제하였다. 그 후, 스폰지를 잘게 썰고, 패스트프레프 (Fastprep) 균질화기 (Qbiogene<sup>TM</sup>, Illkirch, France) 내에서 라이싱 매트릭스 D 튜브 (Lysing Matrix D tubes; MP Biomedicals<sup>TM</sup>, Illkirch, France)를 사용하여 용해 완충액 [NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 트리톤 X100 1%, 나트륨 테옥시콜레이트 0.5%, NaF 10 mM, 트리스/HCl 30 mM pH 7.8, 프로테아제 억제제 콕테일 (P8340, Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>, St Louis, USA)을 함유] 중에 균질화시켰다. 혈관 용적의 지표인 헤모글로빈 농도는 드라브킨 시험 (Drabkin assay; Pierce Biotechnology<sup>TM</sup>, Rockford, Illinois, USA)을 사용하여 측정하였다. 화합물은 수성 메틸셀룰로즈 0.6%, 트윈 80 0.5% 용액 중의 현탁액으로 경구 위관영양법에 의해 투여하였다.

[0216] 랫트 체중에 미치는 화학식 I의 화합물의 효과는 도 9에 나타내었다. 헤모글로빈 농도 (mg/ml)에 미치는 화학식 I의 화합물의 효과는 도 10에 나타내었다.

## 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 화학식 I의 화합물을 제조하기 위한 반응식이다.

[0020] 도 2는 불완전 프로인트 보조제(Freund's adjuvant) 중의 소의 코로부터 유래한 II형 콜라겐을 주사하고, 제6일부터 제21일까지에 걸쳐서 화학식 I의 화합물인 A003397769 (3.0, 10 또는 30 mg/kg, b.i.d.)로 치료한 랫트의 평균 발목관절 직경을 나타낸 것이다. 제0일 및 제7일에 불완전 프로인트 보조제 중의 콜라겐 (400ug/400ul/랫트)으로 피내 주사에 의해 감작시킨 암컷 LEW 랫트의 평균 발목관절 직경을 나타낸다. 동물에게 제6일부터 제21일까지 투여하였다.

[0021] 도 3은 A003397769 (3.0, 10 또는 30 mg/kg)로 치료한 CIA 랫트의 종골(calcanus)에서의 골 침식의 분석 (골 표면적 대 골 용적의 비)을 나타낸 것이다.

[0022] 도 4는 불완전 프로인트 보조제 중의 소의 코로부터 유래한 II형 콜라겐을 주사하고, 제6일부터 제20일 또는 제21일까지에 걸쳐서 A003397769(3.0 mg/kg) 단독으로 또는 메토티렉세이트(0.1 또는 0.2 mg/kg)와 병용하여 치료한 랫트의 평균 발목관절 직경을 비히클 투여 동물과 비교하여 나타낸 것이다. 랫트 CIA에 대한 단일요법으로서 또는 메토티렉세이트와 병용한 Syk 억제제 A003397769(3.0 mg/kg b.i.d.)의 효과를 나타낸다.

[0023] 도 5는 불완전 프로인트 보조제 중의 소의 코로부터 유래한 II형 콜라겐을 주사하고, 제6일부터 제20일 또는 제21일까지에 걸쳐서 A003397769(10 mg/kg) 단독으로 또는 메토티렉세이트(0.1 또는 0.2 mg/kg)와 병용하여 치료한 랫트의 평균 발목관절 직경을 비히클 투여 동물과 비교하여 나타낸 것이다. 랫트 CIA에 대한 단일요법으로서 또는 메토티렉세이트와 병용한 Syk 억제제 A003397769(10 mg/kg b.i.d.)의 효과를 나타낸다.

[0024] 도 6은 A003397769(3.0 또는 10 mg/kg) 단독으로 또는 메토티렉세이트(0.1 또는 0.2 mg/kg)와 병용하여 치료한 CIA 랫트의 종골에서의 골 침식의 분석 (골 표면적 대 골 용적의 비)을 나타낸 것이다.

[0025] 도 7은 불완전 프로인트 보조제 중의 소의 코로부터 유래한 II형 콜라겐을 주사하고, 제12일부터 제21일까지에 걸쳐서 A003397769A (10 및 30 mg/kg b.i.d)로 치료학적으로 치료한 랫트의 평균 발목관절 직경을 나타낸 것이다. 제0일 및 제7일에 불완전 프로인트 보조제 중의 콜라겐 (400ug/400ul/랫트)의 피내 주사에 의해서 감작시킨 암컷 루이스(Lewis) 랫트의 평균 발목관절 직경을 나타낸다. 양쪽 발의 평균을 나타낸 것이다.

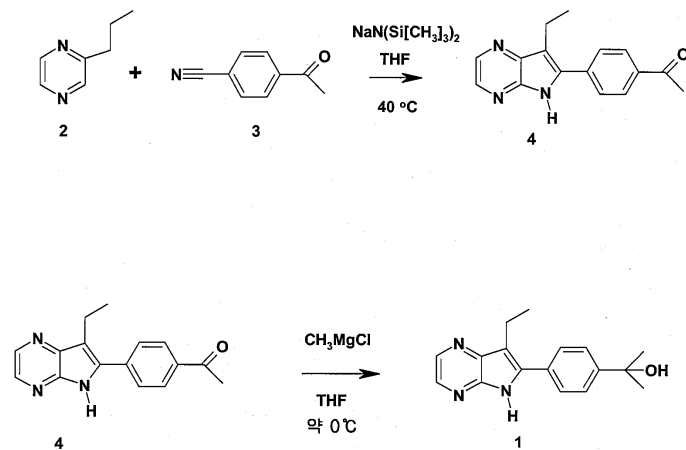
[0026] 도 8은 A003397769A (10 또는 30 mg/kg b.i.d)로 치료학적으로 치료한 CIA 랫트의 종골에서의 골 침식의 분석 (골 표면적 대 골 용적의 비)을 나타낸 것이다.

[0027] 도 9는 랫트 체중에 대한 화학식 I의 화합물의 효과를 나타낸 것이다.

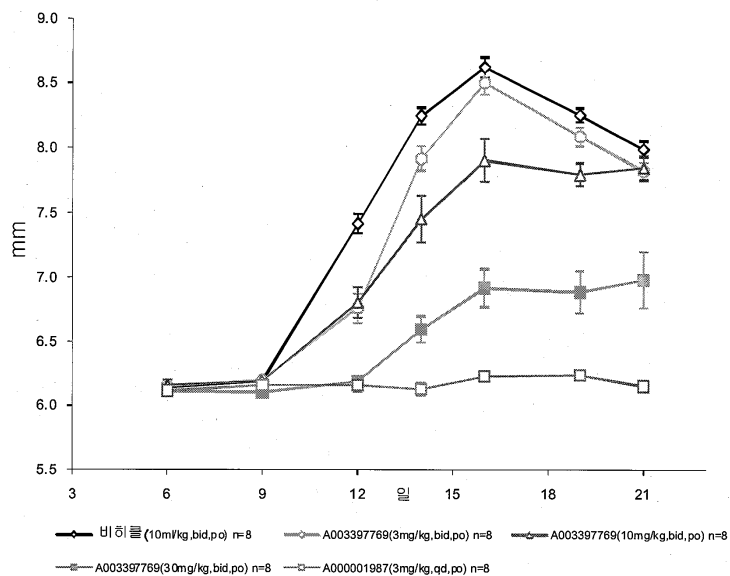
[0028] 도 10은 헤모글로빈 농도에 대한 화학식 I의 화합물의 효과를 나타낸 것이다.

## 도면

### 도면1

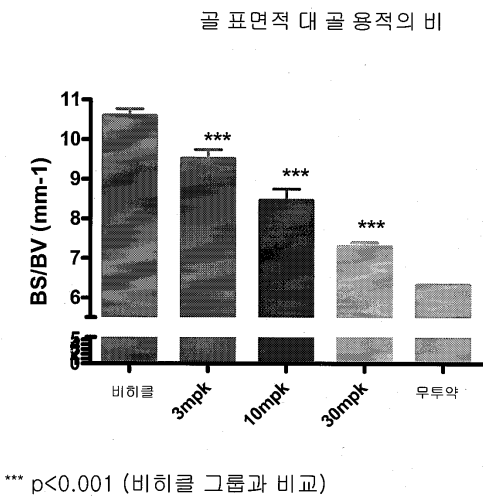


### 도면2

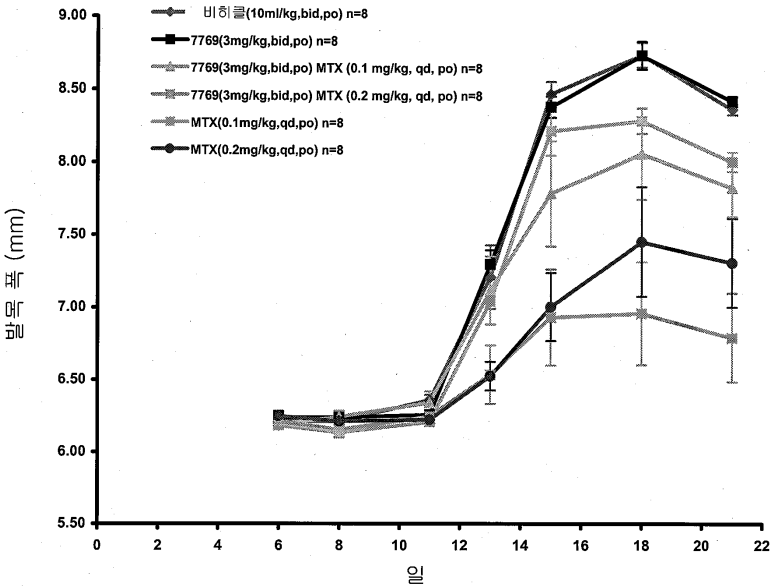




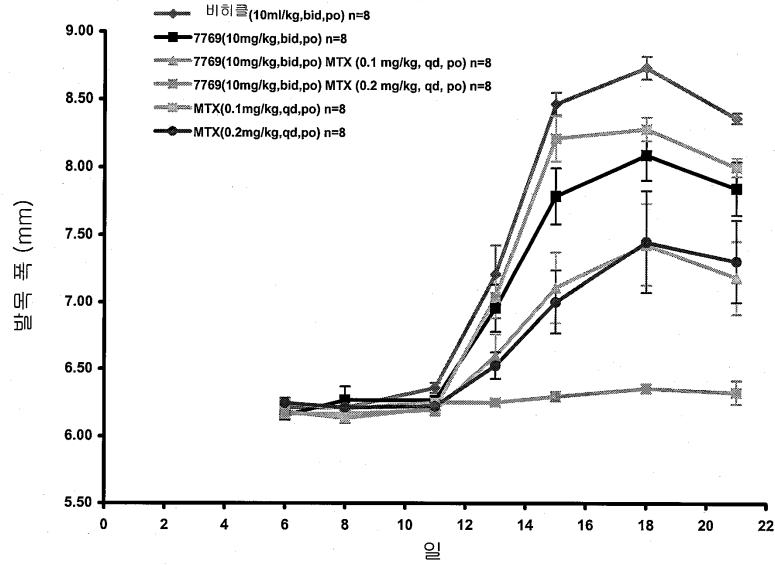
도면3



도면4

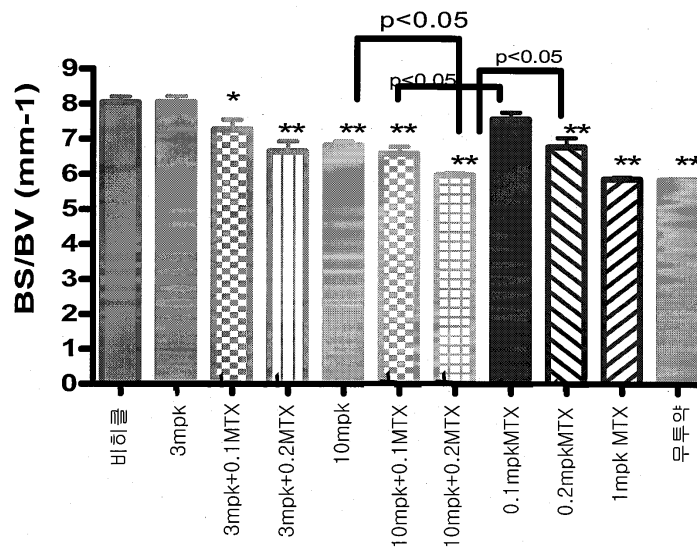


도면5



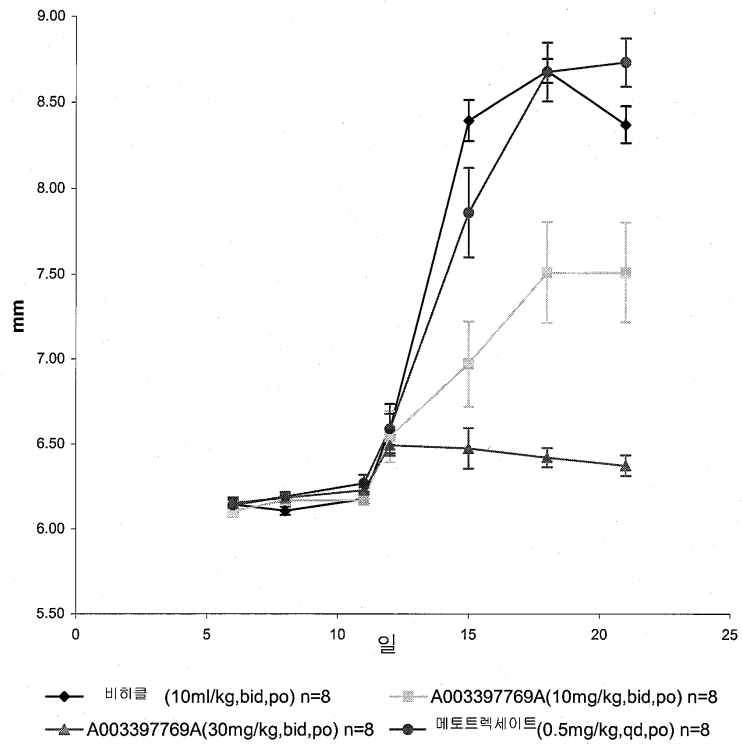
도면6

A003397769 처리된 CIA 랫트 발목에서의  
골 표면적 대 골 용적의 비

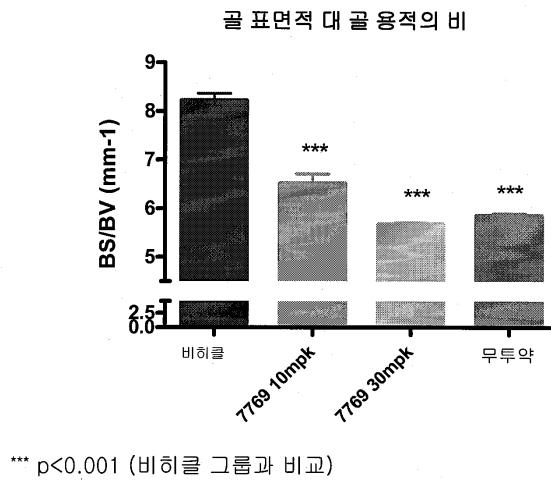


\* P<0.05, \*\* P<0.001 (비히클 그룹과 비교)

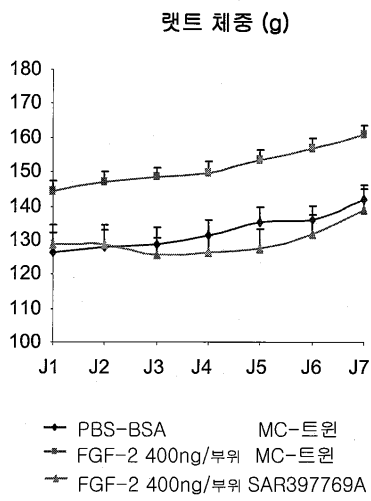
도면7



도면8



도면9



도면10

