



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2011-0022679  
 (43) 공개일자 2011년03월07일

(51) Int. Cl.  
**A61K 31/426** (2006.01) **C07D 277/24** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-7001228  
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월15일  
 심사청구일자 없음  
 (85) 번역문제출일자 2011년01월17일  
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2009/057324  
 (87) 국제공개번호 WO 2009/153226  
 국제공개일자 2009년12월23일  
 (30) 우선권주장  
 08380177.9 2008년06월16일  
 유럽특허청(EPO)(EP)  
 12/139,661 2008년06월16일 미국(US)

(71) 출원인  
**파에스 파마, 에스.에이.**  
 스페인, 48940 라미아코-레이오아 (비즈카야),  
 14, 막시모 아퀼레  
 (72) 발명자  
**루비오 로요 빅터**  
 스페인 이-48940 라미아코 (레이오아)-비즈카야  
 14 막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이  
**데 라 헤라 마르티네즈 안토니오**  
 스페인 이-48940 라미아코 (레이오아)-비즈카야  
 14 막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**박장원**

전체 청구항 수 : 총 17 항

**(54) 급성 및 만성 염증성 질환 치료용 5-(4-메탄설폰닐-페닐)-티아졸 유도체**

**(57) 요약**

본 발명은 TNF-알파 및 IFN-감마 중에서 선택된 적어도 1종의 전염증성 시토카인의 생산 억제, 또는 IL-8 및/또는 IL-10 조절성 시토카인의 면역조절에 의한, 급성 및 만성 염증성 질환 치료를 위한 의약을 제조하는데 있어서의 다음 화학식 (I)의 화합물 및 그의 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 화학식 (I')의 신규한 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화합물, 상기 화합물을 함유하는 의약 조성물에도 관한다.

(72) 발명자

**알바레즈 데 몬 소토 벨코르**

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

**무노즈 무노즈 아나**

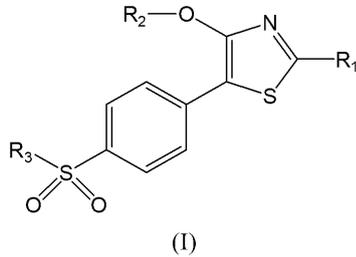
스페인 이-48940 라미아코 (레이오아)-비즈카야 14  
막시모 아퀼레 파에스 파마, 에스.에이

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

TNF-알파 및 IFN-감마 중에서 선택된 적어도 1종의 전염증성 시토카인의 생산 억제, 또는 IL-8 및/또는 IL-10 조절성 시토카인의 면역조절에 의한, 급성 및 만성 염증성 질환 치료를 위한 의약을 제조하는데 있어서의 다음 화학식 (I)의 화합물 및 그의 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화합물의 용도:



식 중:

R<sub>1</sub>은 수소, 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택되고;

R<sub>2</sub>는 수소, 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 및 N(R'R'') 중에서 선택되는데, 여기서 R' 및 R''은 독립적으로 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이며;

R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 래디칼이다.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 급성 및 만성 염증성 질환은 급성 및 만성적인 양성혈청반응 또는 음성혈청반응 올리고관절염 및 다관절염, 척추관절염, 사구체신염, 콜라겐병, 세노관사이질성 신장염, 대사성 증후군, 죽상동맥경화증, 골관절염, 천식, 만성 폐쇄폐병, 사이질성 폐질환, 다발경화증, 탈미엘린화 질환, 수막염, 뇌염, 뇌수막염, 염증성 신경근병 및 말초성 신경병, 염증성 장질환, 시로시스, 간염, 심장발작, 허혈성 질환, 신부전, 염증성 방광염, 양성 전립성 비대증, 전립선염, 심근염, 포도막염, 아토피성 피부염, 습진, 두드러기, 건선, 장미증, 알레르기성 비염, 패혈증, 패혈증성 쇼크, 멀티오가닉부전, 전신성 자가면역 질환, 예컨대 전신 홍반 루푸스, 혈관염, 피부근육염, 아밀로이드증 또는 사코이드증, 장기특이성 자가면역 질환, 예컨대 중증근육무력증, 갑상선염, 인슐린염, 장기이식, 감염 및 종양유발성 감염, TNF-알파 의존성 세포 퇴화, 괴사, 세포자멸사, 이식편 대 숙주 질환, 카켈시아 및 자가분비 및 측분비성 병리학적 세포 성장으로부터 선택되는 것인 용도.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 만성 염증성 질환은 양성혈청반응 또는 음성혈청반응 만성 다관절염인 것인 용도.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 만성 다관절염은 류마티스성 관절염인 것인 용도.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, R<sub>1</sub>은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬인 것인 용도.

**청구항 6**

제5항에 있어서, R<sub>1</sub>은 메틸인 것인 용도.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, R<sub>2</sub>는 치환 또는 비치환된 시클로알킬인 것인 용도.

청구항 8

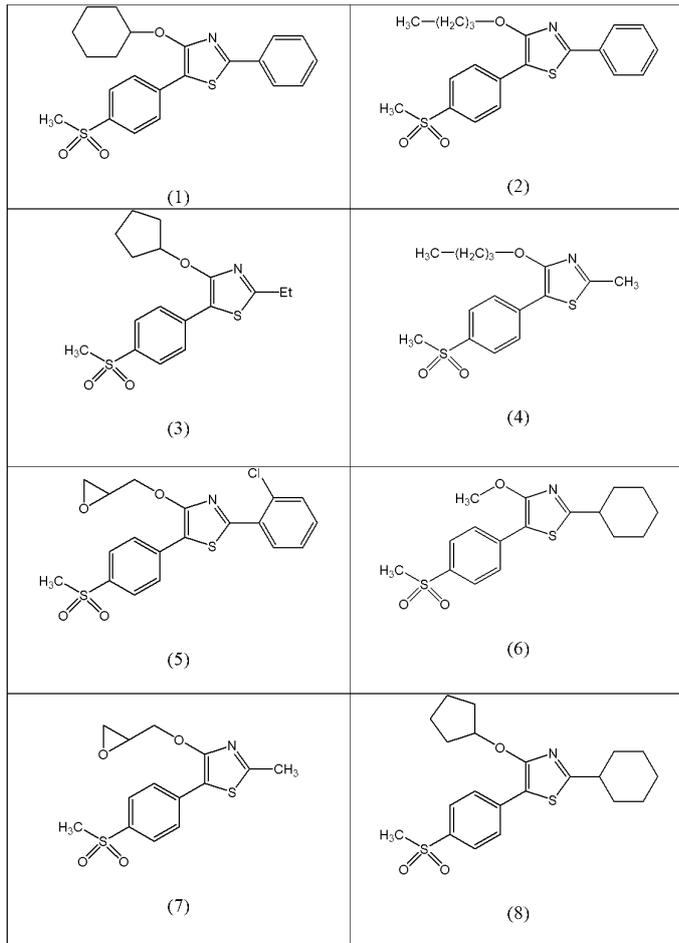
제7항에 있어서, R<sub>2</sub>는 시클로펜틸인 것인 용도.

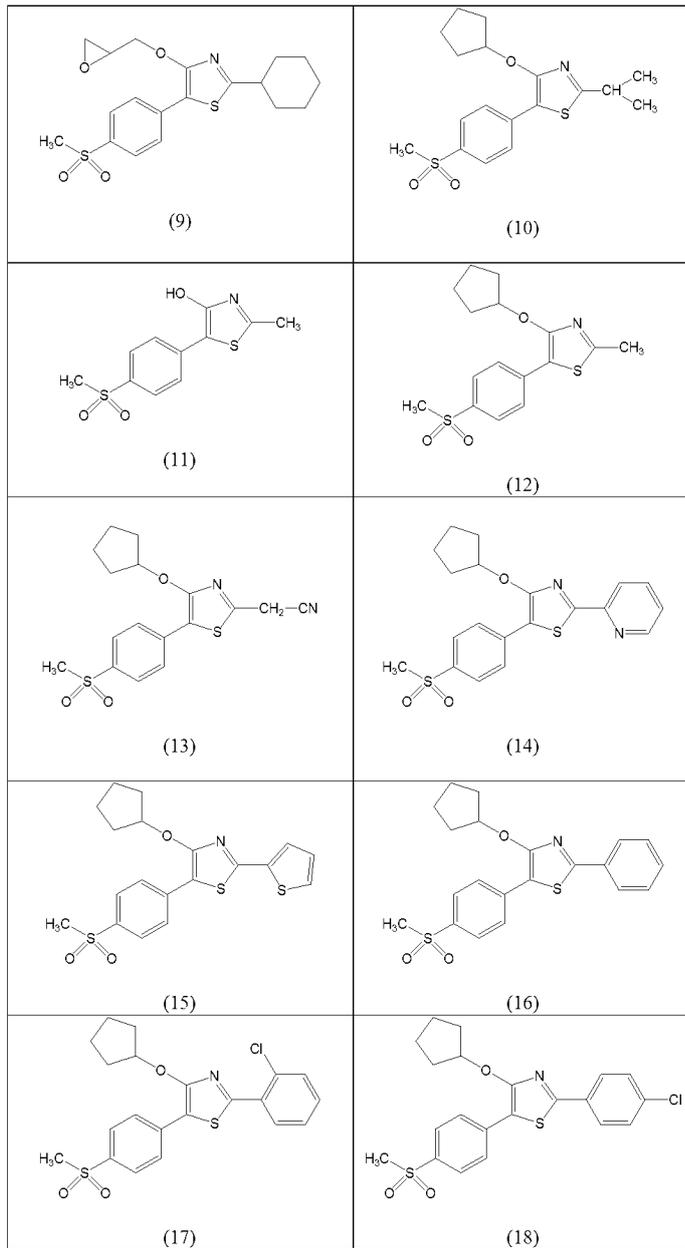
청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, R<sub>3</sub>는 메틸인 것인 용도.

청구항 10

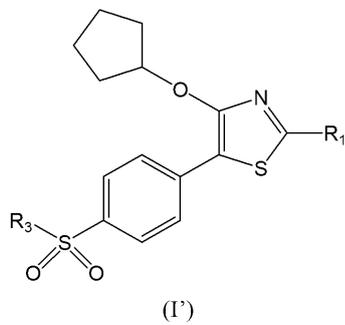
제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 다음 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화물들로부터 선택되는 것인 용도:





### 청구항 11

다음 화학식 (I')을 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화물:



식 중:

R<sub>1</sub>은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 및 치환 또는

비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택되고;

R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 래디칼이다.

**청구항 12**

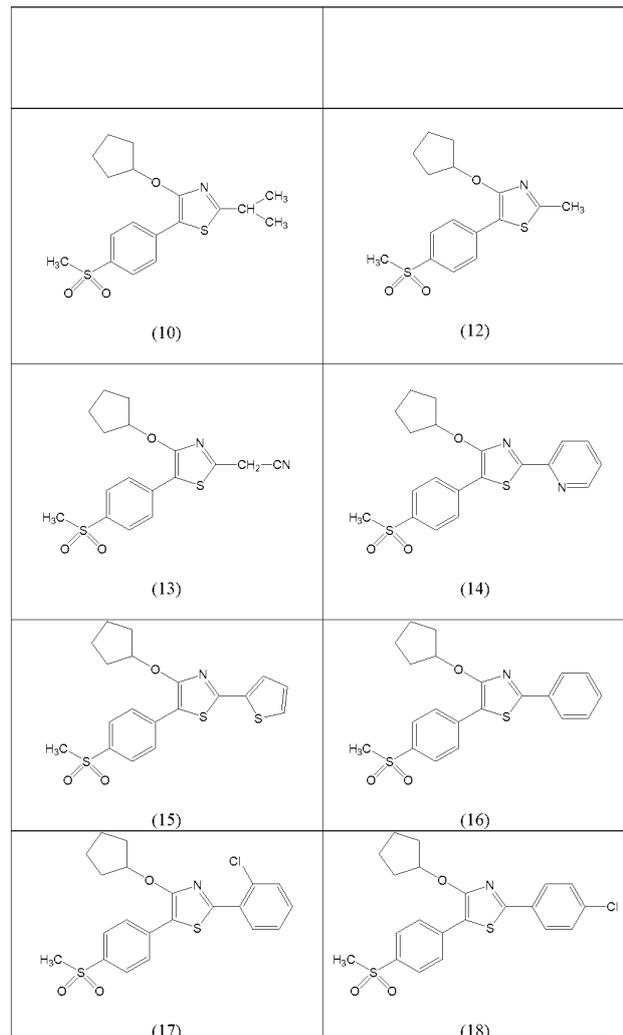
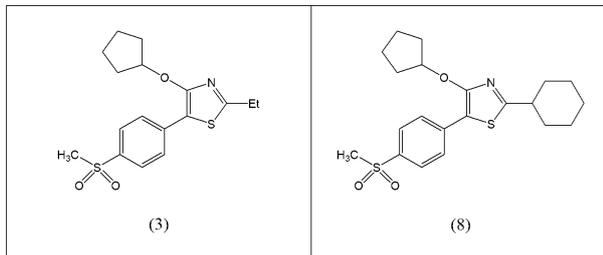
제11항에 있어서, R<sub>1</sub>은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬인 것인 화합물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, R<sub>1</sub>은 메틸인 것인 화합물.

**청구항 14**

제11항에 있어서, 다음 화합물들 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화물들로부터 선택되는 것인 화합물:



**청구항 15**

제11항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 정의된 화학식 (I')의 화합물, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 또는 용매화물과, 1종 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 아주반트 및/또는 비히클을 포함하여 이루어지는 약학적 조성물.

**청구항 16**

의약으로서 사용되는 제11항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 정의된 화학식 (I')의 화합물.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 면역학적 병변, 표적 세포 및 표적 분자를 찾는 데 있어서, 조영 기술 및 약학-조영 기술에 있어서의 제1항에 기재된 화학식 (I)의 화합물의 조영 바이오마커로서의 용도.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 류마티스성 관절염과 같은 급성 및 만성 염증성 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약 제품을 제조하는데 있어서의 5-(4-메탄설폰닐-페닐)-티아졸로부터 유도된 화합물의 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 면역학은 자타 간의 구별에 관한 과학적 연구이다. 자가 관용성의 파괴가 자가면역성 질환의 원인이 된다. 뿐만 아니라, 이식, 동맥경화, 패혈성 및 비패혈성 급만성 염증 병리학 및 다른 많은 질병, 이제까지 자가 면역질환으로 여겨지지 않았던 많은 다른 병태들이 면역 세포 매개형 병리학적 메커니즘을 나타내고 있다. 대부분의 연구자들은, 면역 감염 이펙터 응답의 활성화가 다음의 두 개의 시그널에 의한 것으로 여기고 있다:

[0003] - 시그널 1은 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 내재된 관련 항원을 인식하는, 클로날 항원 수용체 (TCR-CD3 T-세포 수용체 복합체)를 격발시키는 역할을 한다. B 세포에서, 세포의 가용성 항원 또는 막결합 항원은 면역글로불린 CD79 (Ig/CD79) 클로날 수용체 복합체와 교차 결합하여 시그널 1을 항체-분비 임과구 계통으로 전달한다.

[0004] - 두 번째 시그널은 항원-전달형 시그널 1에 더해, 아네르기 또는 클로날 결실에 의한 관용을 회피하는데 필요하다. 시그널 2는 인간의 단핵구 및 그의 분화 계통의 후손과 같은 전문적인 항원 제시 세포(APC)의 표면에 발현되는 CD86과 같은 보조 자극인자에 의해 전달된다.

[0005] 선천성 면역 염증성 응답에서는, 패턴 인식 수용체 (PRR)을 촉발하는 미토겐 또는 미생물 항원과 자가 수식형 항원에 의해 위험 신호가 촉진된다. TLR4 (그램 음성 세포벽 세균 리포다당류 또는 LPS에 대한 수용체)와 같은 PRR 시그널링 경로는 보조 자극인자 표면 분자 (즉, CD80 또는 CD86)를 높은 수준으로 발현시킨다. 이어서, 보조 자극인자 리간드 CD80 - CD86은 헬퍼 T 세포의 표면 상의 CD28과 교차 결합한다. 시그널 1 (즉, 항CD3 항체 교차 결합) 플러스 시그널 2 (즉, 특히 항체에 의한 CD28 교차 결합)의 조합은 효율적인 염증성 이펙터 면역 응답의 천연 조건을 실험적으로 모방한다. 주목할 만한 것은, 승인된 면역 억제제 약물들이 고농도의 보조 자극인자 조건 하에서 전염증성 시토카인 캐스케이드의 활성화를 억제하는데 문제가 있다는 것이다. 후자는 자가면역성 질환과 다른 많은 심각한 급성 및 만성 염증성 병태에서 일어난다.

[0006] APC는 면역 응답의 부류를 결정하기 위한 후천성 면역 시스템에 있어서만 중요한 것은 아닌데, 이는 이들이 쉐린지된 클론에 의해 매개되는 이펙터 (즉, T 세포 헬프, Th, 세포성 세포독성, Th, 항체 생산, B 세포) 응답이 존재하는지 또는 관용성 응답 (아네르기 또는 세포자멸사)이 존재하는지에 깊이 영향을 미치기 때문이다. APC는 또한 그들 자신에게 이펙터 즉시 면역 응답을 전달할 수도 있다. 암 환자들의 단핵구에 의한, 종양 괴사 인자 알파 (TNF-알파)의 대량 생산 및 방출은 잘 문서화되어 있다. 이 환자들에 있어서, TNF-알파는 혈관 내피의 반응과 활성화 개시를 촉진하며, 이는 인터류킨 8(IL-8) 및 다른 전염증성 시토카인의 분비 뿐만 아니라 전혈액응고 활동을 수반한다. 또한, TNF-알파는 암 괴사와 함께 혈전증과 허혈을 촉진하며, 이는 카렉틴 또는 TNF-알파로서 최초로 정의된다. 그러나, TNF-알파는 다른 많은 질환 병태와 관련된 다면발현성(pleiotropic) 시토카인이

다. 단핵구에서, LPS는 대량의 TNF-알파의 분비를 촉발시키고, 이는 패혈증 쇼크에 큰 원인이 된다는 증거가 오래 전부터 있어왔다. 최근, 부적합할 정도의 대량의 TNF-알파의 생산 및 분비는, 류마티스성 관절염, 척추관절염, 크론씨병, 포도막염 및 건선과 같은 자가면역성 염증성 질환에 있어서 치료 표적으로 여겨지고 있다. 따라서, 항TNF-알파의 사용은 현재, 생물활성적인 수준을 사용가능한 수준으로 감소시키는 것이 환자의 병태를 완화시키는 데 도움이 되는, 그러한 질병을 치료하는 최신 전략인 것으로 널리 여겨지고 있다.

- [0007] 이와 관련하여, TNF-알파 길항제를 이용한 치료가 효과가 있는 질병의 수는 급격히 증가하고 있는데, 이러한 질병은 특히, 죽상동맥경화증, 대사성 증후군, 뇌염, 바이러스성 간염, 사구체신염, 부적절한 염증성 반응부터 종양 및 패혈증 쇼크까지 다양하다.
- [0008] 체세포에 의해 생산되는 것에 더해, TNF-알파 생산의 주요한 소스는 두가지가 있는데 단핵구와 T 임파구가 그것이다. 후천성 면역 반응에서는, 전염증성 지시 시나리오 하에 위험 신호에 대한 APC의 엑스포지션이 IL-12 p70 (p35와 p40의 헤테로다이머)의 분비를 촉발하는데, 후자는 Th-1형에 대한 활성화된 Th-세포의 시토카인 분비 프로파일을 극대화시키는 보조 자극인자 분자이다. Th1-세포는 인터페론 감마 (IFN-감마) 분비가 진정한 쏫프린트인 특징적인 시토카인 프로파일을 나타낸다. 이 세포들은 TNF-알파 역시도 대량으로 분비한다.
- [0009] Th1에 의해 생산되는 IFN-감마는 염증성 질환을 이해하는데 연관이 있을 수 있는 많은 효과들을 촉진한다. 한편으로, 이것은 단핵구를 활성화시켜 주어진 자극에 의한 TNF-알파 분비 수준을 증가시킨다. 또 다른 한편으로는, 이것은 보다 TNF-알파 수용체 하류에서 보다 강력한 시그널링 경로를 촉진한다. 이와 함께, IFN-감마는 항바이러스 활성화와 같은 그 자신의 직접적인 효과에 더하여, MHC-II 발현을 증가시키고 그렇지 않아도 강한 TNF-알파의 효과를 증가시킴으로써 염증 및 병변에 기여한다.
- [0010] Th1-세포에서의 IFN-감마와 TNF-알파의 생산 또는 단핵구에서의 TNF-알파의 생산에 의해 개시되는 전염증성 캐스케이드는 IL-8과 같은 다른 전염증성 시토카인 경로를 통해 증폭되게 된다. IL-8은 그의 본래 명칭에도 불구하고, 상피세포와 같은 다른 세포종 및 대식세포에 의해 생산되는 케모카인으로서 설명되어 왔으며, 내피세포에 의해서도 합성되기 때문에, CXCL8이라고도 칭해진다. 호중구성 과립구가 IL-8의 주요 표적 세포이기는 하지만, 이 케모카인에 반응하는 세포들은 비교적 광범위하다 (내피세포, 대식세포, 비만 세포, 각질 세포). IL-8의 일차 기능은 표적 세포 (예컨대 호중구성 과립구)에서의 화학주성 유도이다. 호중구에서는 세포 이동에 요구되는 일련의 세포-물리학적 반응과 그의 표적 기능인 대식작용 역시도 세포내 Ca<sup>2+</sup>, 세포외배출 (예컨대 히스타민 방출), 호흡터짐의 증가처럼 유도된다. IL-8은 선천성 면역 반응과 연관된 TLR이 있는 세포에 의해 분비될 수 있다. IL-8의 1차 기능은 항원 패턴 TLR을 촉발하는 항원에 대한 대식작용을 하기 위해 호중구를 모으는 것이다. IL-8 표적 세포의 내피세포 및 기타 표적 조직으로의 전달에 의해, IL-8은 신체 방어 기작에서의 그의 역할에 더해, 많은 TNF-알파 병리학 역할의 증폭 및 실행과 연관되어 있다.
- [0011] 백혈구 이동 및 호밍(homing)은 케모카인과 그의 수용체에 의해 조절될 뿐만 아니라, 많은 부착 분자들에 의해서도 조절된다. 이들 중, 셀렉틴 CD62L은 백혈구가 임파절로 이동하는 것을 방지하기 위한 치료 표적으로서 인정되며, 따라서 비스테로이드성 소염제 (NSAIDs)의 시험관내 효과의 등급을 매기는데 있어서의 변수로서 평가되고 있다.
- [0012] 많은 면역 억제제와 항TNF-알파 분자가 정상적인 면역방어 메커니즘에 영향을 미치는데, 이는 이들이 면역 세포에 대한 세포독성 효과를 촉진하거나, 성공적인 이펙터 면역 반응에 선행하는 클로날 증폭의 기초가 되는 증식성 메커니즘을 억제하기 때문이다.
- [0013] 세포외 공간에 분비되는 TNF-알파 (세포질막-삽입 형태 또는 분비형 가용성 형태)의 중요성에 비추어, TNF-수용체 I 및/또는 TNF-수용체 II 두가지 모두와 TNF-알파와의 세포외 상호반응을 차단하는 치료제를 설계하기 위하여 많은 노력이 행해져왔다. 가장 그럴듯한 접근방식은 TNF-알파를 포획하는 가용성 데코이(decoy) TNF-수용체를 사용하는 것이었으며 장기간의 해리시간 덕분에 세포 수용체와 전염증성 리간드 간의 상호반응이 방지된다.
- [0014] 두 번째 전략은 인간화된 항인간 TNF-알파 항체를, 주어진 질병과 연관이 있는 다른 분자들 (즉, 류마티스성 관절염에 있어서 항VEFG/항TNF-알파) 역시도 표적화하는 이중 특이적 단백질 분자로서 통상적으로 또는 새롭게 만드는 것이었다. 진술한 분자들이 TNF-알파 길항제인 반면, 이들은 이들의 작용 메커니즘을 세포외 분비된 TNF-알파의 차단으로 국한한다.
- [0015] TNF-알파 생산 및 분비를 촉진하는 표적들의 포괄적인 (철저한 것이 아닌) 리스트에는: a) TNF-알파의 전사 발현을 촉진하는 분자; b) 핵으로부터 세포질로의 TNF-알파-RNA 이동 및 RNA 스플라이싱을 촉진하는 분자; c)

TNF-알파 번역을 지시하는 분자; d) TNF-알파-mRNA 안정성을 조절하는 분자; e) 전TNF-알파 표면 형태가 앵커링 되는 막에 골지체를 지향시키는 분자; f) TNF-알파의 분비 탈락과 연관이 있는 TNF-알파-전환 효소 (TACE)와 같은 분자 및 g) 전TNF-알파의 표면 형태의 내면화 및 그의 시그널링을 조절하는 분자가 포함된다. 이들 모두는 TNF-알파 생산 및 분비의 세포 표적으로 칭해진다.

[0016] TNF-알파의 생산을 차단하는 치료제를 설계하기 위한 접근방식이 다양함에도 불구하고, TNF-알파 생산만을 선택적으로 차단할 뿐만 아니라, IFN-감마와 같은 다른 중요한 전염증성 시토카인의 생산 역시도 선택적으로 차단하는 새로운 약물을 발견하는 것이 매우 바람직하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0017] 발명의 개요

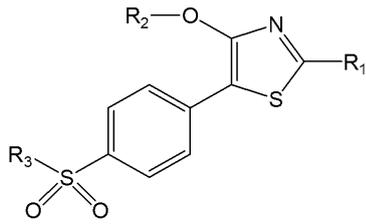
[0018] 본 발명자들은 놀랍게도 화학식 (I)의 화합물들이 급성 및 만성 염증성 질환의 병리학적 메카니즘을 제어하는데 잠재적으로 유용한, 매우 흥미로운 다양한 면역조절 효과를 나타낸다는 것과, 그에 따라, 잠재적인 임상 용도를 갖는다는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명에서 사용되는 화합물들은 류마티스성 관절염과 같은 만성 염증성 질환으로 고통받는 환자들로부터의 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)에 의한 TNF-알파 생산을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, T 세포 자극 후 다른 세포에 의해 분비되는 IFN-감마의 분비도 억제할 수 있다. 나아가, 화학식 (I)의 화합물들은 케모카인 (즉 IL-8) 및 조절성 시토카인(즉 IL-10)의 생물학적 반응 프로파일을 조절할 수 있으며 건강한 상태와 질병 상태에서 서로 다른 방식으로 조절한다. 화학식 (I)의 화합물의 이 모든 면역 조절 효과는 말초 혈액으로부터의 단핵구 세포 상에 어떠한 독특한 효과도 미치지 않았을 뿐만 아니라, 미토겐 자극 후의 활성화 및 증식 반응도 이들 화합물에 의해 전혀 변형되지 않았다.

[0019] TNF-알파 및 IFN-감마로서의 몇몇 전염증성 시토카인에 대한 억제 효과 및 IL-8 케모카인 및/또는 IL-10 조절성 시토카인의 조절 잠재성을 오직 하나의 작은 분자로서 조합시킬 수 있다는 것은, 이들 모두가 전신 및 장기-특이적인 자가면역 질환, 이식, 급만성 염증성 질환, 어떤 대사성 및 퇴행성 질환 및 죽상동맥경화증의 병리학에 있어서 매우 중요하기 때문에, 화학식 (I)의 화합물로 하여금, 전염증성/조절성 시토카인 및 케모카인의 캐스케이드를 임상적 및 치료적 타당성의 다양한 잠재적인 재프로그래밍 수준으로 표적화시키기 위한 새로운 분야의 면역 조절제에 속하도록 한다.

[0020] 면역 세포들은 현저히 착생적이며, 질병의 정도, 표적 장기 및 손상 정도에 따라 분포되는 병변에 집중하는 염증 병태에 침윤하는 체조직을 순찰하기 위해 장기 내로 유입된다. 본 발명에 사용되는 화합물들은 병생리학적 과정의 어떤 측면을 조절하는 것으로 기대되기 때문에, 수용체의 수, 결합 효율, 수용체 점유도 및 의약 프로브 농도를 특정화하는데 조영 연구를 이용할 수 있다. 백혈구의 호밍 특성이 알려지면, 치료 표적의 검출에 의해 표적 세포와 병변의 위치에 관한 정보를 알 수 있게 된다.

[0021] 따라서, 화학식 (I)의 화합물은 또한 약물 개발, 임상 연구 및 개체화 약물에 있어서 조영용 바이오마커로서 잠재적인 용도를 가지며, 이에 따라 약동학, 분포 및 투여량 뿐만 아니라, 전임상 및 임상 연구에 있어서 개별화된 반응 패턴에 미치는 관련 데이터에 대한 정보 역시도 제공해준다. 당업자에게 알려진 현저한 생물조영 기술에 최적화된 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 의약 조성물의 유효량을, 그러한 예진 및 개별화 평가를 필요로 하는 환자에게 투여하기 위한 임상적 엔드포인트의 검증된, 신뢰가능하고, 개별화된 대체 바이오마커의 정의가 후자에 의해 도출된다.

[0022] 첫번째 구체예에서, 본 발명은 TNF-알파 및 IFN-감마 중에서 선택된 적어도 1종의 전염증성 시토카인의 생산 억제, 또는 IL-8 및/또는 IL-10 조절성 시토카인의 면역조절에 의한, 급성 및 만성 염증성 질환 치료를 위한 의약을 제조하는데 있어서의 다음 화학식 (I)의 화합물 및 그의 약학적으로 허용가능한 염, 전구약물 및/또는 용매 화합물의 용도에 관한 것이다:



(I)

[0023]

[0024]

[0025]

[0026]

[0027]

[0028]

[0029]

[0030]

[0031]

[0032]

[0033]

[0034]

[0035]

식 중:

R<sub>1</sub>은 수소, 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴이고;

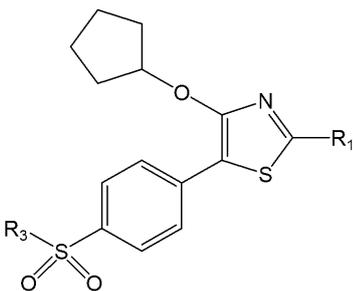
R<sub>2</sub>는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 및 N(R'R'')이고 여기서 R' 및 R''은 독립적으로 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이며;

R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 래디칼이다.

본 발명의 특정 구체예에서, 급성 및 만성 염증성 질환은 급성 및 만성적인 양성혈청반응 또는 음성혈청반응 올리고관절염 및 다관절염, 척추관절염, 사구체신염, 골라젠병, 세노관사이질성 신장염, 대사성 증후군, 죽상동맥 경화증, 골관절염, 천식, 만성 폐쇄폐병, 사이질성 폐질환, 다발경화증, 탈미엘린화 질환, 수막염, 뇌염, 뇌수막염, 염증성 신경근병 및 말초성 신경병, 염증성 장질환, 시로시스, 간염, 심장발작, 허혈성 질환, 신부전, 염증성 방광염, 양성 전립성 비대증, 전립선염, 심근염, 포도막염, 아토피성 피부염, 습진, 두드러기, 건선, 장미증, 알레르기성 비염, 폐혈증, 폐혈증성 쇼크, 멀티오가닉부전, 전신성 자가면역 질환, 예컨대 전신 홍반 루푸스, 혈관염, 피부근육염, 아밀로이드증 또는 사코이드증, 장기특이성 자가면역 질환, 예컨대 중증근육무력증, 갑상선염, 인슐린염, 장기이식, 감염 및 종양유발성 감염, TNF-알파 의존성 세포 퇴화, 괴사, 세포자멸사, 이식편 대 숙주 질환, 카켄시아 및 자가분비 및 측분비성 병리학적 세포 성장을 들 수 있다.

이들 치료적 용도는 적어도 1종의 비정상적 면역 반응, 면역-탈조절, 면역-분포, 면역-병리학 및 면역요법 또는 면역조절 생물학적 반응의 결과이다.

또 다른 구체예에서 본 발명은 화학식 (I')의 화합물, 그의 약학적으로 허용가능한 염, 전구약물 및/또는 용매 화물에 관한 것이다:



(I')

식 중:

R<sub>1</sub>은 수소, 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택되고;

R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 래디칼이다.

세번째 구체예에서, 본 발명은 전술한 화학식 (I')의 화합물, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화물 및 적어도 1종의 약학적으로 허용가능한 담체, 아쥘반트 및/또는 비히클을 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

- [0036] 본 발명의 또 다른 구체예는 전술한 바와 같은 화학식 (I')의 화합물, 의약으로서의 그의 용도에 관한 것이다.
- [0037] 마지막으로, 본 발명의 또 다른 구체예는 전술한 바와 같은 화학식 (I)의 화합물의 면역학적 병변, 표적 세포 및 표적 분자를 찾아내기 위한, 조영 및 약학-조영 기술에 있어서 조영용 바이오마커로서의 용도에 관한 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0038] 발명의 상세한 설명

[0039] 본 발명에서 다음의 용어들은 하기에 설명되는 의미로 사용된다:

[0040] "C<sub>1-6</sub> 알킬"이라는 용어는 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지며, 탄소 및 수소 원자만으로 이루어진, 불포화 결합이 없는, 직쇄 또는 분지쇄형의 탄화수소 사슬 래디칼로서, 단일 결합에 의해 그 분자의 나머지 부분에 결합되는 사슬로서 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, t-부틸, n-펜틸 등을 들 수 있다. C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼은 시클로알킬, 아릴, 헤테로시클릴, 할로, 히드록시, 알콕시, 시아노, 아미노, 니트로 또는 알킬티오와 같은 하나 이상의 치환기에 의해 임의로 치환될 수 있다.

[0041] "시클로알킬"이라는 용어는 포화 또는 부분적으로 포화된 안정한 3원 내지 8원 고리 래디칼을 칭하며, 시클로헥실 또는 시클로펜틸처럼 오직 탄소와 수소만으로 이루어진 것이다. 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한, "시클로알킬"이라는 용어는 수소, C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼, 할로, 히드록실, -N(R<sub>3</sub>)(R<sub>4</sub>) [여기서 R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 독립적으로 수소 및 직쇄 또는 분지쇄형 C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼 중에서 독립적으로 선택됨]로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1종 이상의 치환기에 의해 임의 치환된 시클로알킬 래디칼을 포함하는 것이다.

[0042] "아릴"이라는 용어는 안정한 5원 내지 8원 방향족 고리 래디칼을 가리키며, 페닐 또는 시클로옥타테트라엔과 같이 오직 탄소와 수소 원자만으로 이루어진 것이다. 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한, "아릴"이라는 용어는 수소, C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼, 할로, 히드록실, -N(R<sub>3</sub>)(R<sub>4</sub>) [여기서 R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 독립적으로 수소 및 직쇄 또는 분지쇄형 C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼 중에서 독립적으로 선택됨]로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1종 이상의 치환기에 의해 임의 치환된 아릴 래디칼을 포함하는 것이다.

[0043] "헤테로시클릴"이라는 용어는 탄소 원자와 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 5개의 이종원자로 이루어진 안정한 3원 내지 8원 고리 래디칼을 가리킨다. 본 발명의 목적 상, 헤테로사이클은 부분적으로 또는 전적으로 포화되거나 방향족일 수 있다. 이러한 헤테로사이클의 예로는 피롤리딘, 피리딘, 티오펜, 퓨란 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한, "헤테로시클릴"이라 함은 수소, C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼, 할로, 히드록실, -N(R<sub>3</sub>)(R<sub>4</sub>) [식 중 R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 독립적으로 수소 및 직쇄상 또는 분지상 C<sub>1-6</sub> 알킬 래디칼임]로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 치환기에 의해 임의 치환된다.

[0044] "할로"라는 용어는 브로모, 클로로, 요오도 또는 플루오로를 의미한다.

[0045] "급성 및 만성 혈청양성 또는 음성혈청반응 올리고관절염 및 다관절염"이라는 용어는 류마티스성 관절염과 1차 및 2차 췌그렌 증후군을 모두 포함하는 양성 또는 음성 류마티스성 팩터와 함께, 1개 이상의 가동관절에서의 윤활막염 질환을 가리킨다.

[0046] "척추관절염"이라 함은 사르코-일리얼 관절 및/또는 척추 및/또는 말초 관절과 연관된 면역병인학적 HLAHLA-B27-관련 염증성 질환을 가리키는 것으로서 포도막염도 여기에 포함된다.

[0047] "사구체신염"이라는 용어는 신장 사구체와 관련된 염증 병변을 칭한다.

[0048] "세뇨관 사이질 신염"이라는 용어는 세뇨관과 신장 사이질과 연관된 염증성 질환을 가리킨다.

[0049] "콜라겐질환"이라는 용어는 전신 홍반 루푸스(SLE), 피부근염 및 경피증을 비롯한 면역질환 메카니즘을 갖는 전신 염증성 질환을 가리킨다.

[0050] "염증성 장질환"이라 함은 크론씨 병 및 궤양성 대장염을 비롯한, 전신적 특성이 있거나 없는, 면역질환 메카니즘을 갖는 위장관의 염증성 질환을 의미한다.

[0051] "폐쇄 폐병"이라는 용어는 날숨 유량 (FEV)의 가역적 또는 비가역적 감소를 수반하는 기관지 질환으로 천식, 만

성 폐쇄 폐병이 이에 속한다.

- [0052] "사이질성 폐질환"이라는 용어는 폐의 사이질과 연관된 염증성 질환을 가리킨다.
- [0053] "탈수초 질환"이라는 용어는 미엘린 용해르 유발하는 면역질환 메커니즘을 수반하는 중추신경계의 염증성 질환을 의미하는 것으로서, 다발성 경화증과 시신경염이 여기에 속한다.
- [0054] "수막염, 뇌염 및 뇌수막염"이라는 용어는 중추신경계의 수막 및/또는 기타 구조의 염증성 질환을 의미한다.
- [0055] "염증성 신경근병"이라 함은 방광의 염증성 질환을 가리킨다.
- [0056] "양성 전립성 비대증"이라는 용어는 전립선의 비악성 하이퍼트로피 및/또는 비대증을 가리킨다.
- [0057] "아토피성 피부염, 습진 및 두드러기"라는 용어는 IgE와 연관되거나 연관되지 않은 면역질환 메커니즘을 갖는 알레르기성 피부 질환을 의미한다.
- [0058] "건선"이라는 용어는 면역계 질환 메커니즘을 갖는 과다각화증 및 홍반성 피부 반응을 가리킨다.
- [0059] "장미증"이라 함은 얼굴 중심과 뺨, 코 또는 이마에 걸친 (때로는 목과 가슴까지도) 홍반 (홍조 및 발적)으로 특징지어지는 피부의 염증성 병태를 가리킨다.
- [0060] "알레르기성 비염"이라는 용어는 과민성 면역 질환 메커니즘을 갖는 간헐적 (또는 계절성이라고도 함) 또는 지속적 (또는 만성성이라고도 함)인 코점막의 염증성 질환을 의미한다.
- [0061] "패혈증, 패혈증 쇼크 및 다장기 부전"이라는 용어는 미생물 제제 및 기타 병인에 대한 비정상적 면역 반응에 의해 매개되는 전신성 염증 질환을 가리키는 것이다.
- [0062] "사르코이드증 및 아밀로이드증"이라는 용어는 장기 및/또는 전신의 특발성 면역학적 질환을 가리키는 것으로, 비정상적 면역 반응이 관찰될 수 있는 잘 정의되지 않는 병인 역시도 이에 포함된다.
- [0063] "장기 특이적 자가면역 질환"이라는 용어는 중증 근무력증, 갑상선염, 뇌하수체염, 부신염 등을 비롯한 잘 정의되지 않는 병인을 갖는 장기의 면역계 병변을 가리킨다.
- [0064] "장기 이식"이라는 용어는 이식된 세포, 조직 및 장기의 거부반응의 치료 및 예방을 가리킨다.
- [0065] "감염 및 종양 유도형 염증"이라는 용어는 미생물 제제 또는 암에 의한 자극에 2차적인 비정상적인 면역 반응을 가리킨다.
- [0066] "TNF-알파 의존성 세포 퇴화, 세포자멸사 또는 괴사"라는 용어는 TNF-알파에 의해 유발되는 조직의 퇴화 또는 사멸을 가리킨다.
- [0067] "이식편 대 숙주 질병"이라는 용어는 이식 세포에 의해 유발되는 염증성 면역 반응을 가리킨다.
- [0068] "카캐시아"라는 용어는 염증성 또는 종양성 질병에 의해 유발되는 전신적인 식욕부진 또는 영양실조 및 체중 손실을 가리킨다.
- [0069] "죽상동맥경화증"이라는 용어는 동맥벽에 지질을 함유하는 세포 잔해 및 염증성 세포 (대개 대식세포)가 축적되는 현상 또는 죽종에 이차적인 동맥 경화를 가리킨다.
- [0070] "허혈성 질환"이라는 용어는 심장 및 뇌혈관 허혈을 비롯한 감소된 조직 산소화 및/또는 혈류량에 이차적인 장기의 병변을 가리킨다.
- [0071] "자가분비 및 촉분비성 병리적 세포 성장"이라는 용어는 세포에 대해 시토카인 조절 활성화 및 증식 인자로서의 TNF-알파의 세포 사용을 수반하는 악성 또는 양성 질환을 가리킨다.
- [0072] 달리 언급하지 않는 한, 본 발명에 사용되는 화합물들은 1종 이상의 이성질체가 풍부한 원자들의 존재 하에서만 차이가 있는 화합물들을 포괄한다. 현재 구조를 갖는 화합물들 (예컨대 수소가 중수소 또는 삼중수소로 치환된 것을 제외하거나, 탄소가 <sup>13</sup>C- 또는 <sup>14</sup>C- 강화 탄소 또는 <sup>15</sup>N-강화 질소로 치환된 것을 제외한다)이 본 발명에 포함된다.
- [0073] "약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화물 또는 전구약물"이라는 용어는 수용자에게 투여시, 본 명세서에 설명된 화합물을 (직접 또는 간접적으로) 제공하는 염, 용매화물 또는 전구약물과 관련된다. 그럼에도 불구하고, 약학적으로 허용불가능한 염 역시도 본 발명의 범위에 포함되는데, 이는 이들 역시도 약학적으로 허용가능한 염을

제조하는데 유용할 수 있기 때문이다. 염, 전구약물 및 유도체는 본 발명이 속한 기술 분야에 잘 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. "약학적으로 허용가능한"이라는 용어는, 인간이나 동물에게 투여시, 바람직하게는 생리적으로 관용될 수 있고, 일반적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 바람직하지 못한 반응, 예컨대 위장질환, 현기증 등을 유발하지 않는 분자체 및 조성물을 가리킨다. "약학적으로 허용가능한"이라는 용어는 동물 및 특히 인간에게 사용될 경우 미국 약전 또는 기타 일반적으로 승인된 약전에 포함되거나 미연방 관련 당국에 의해 승인되었다는 것을 의미한다.

[0074] 예컨대, 본 명세서에서 앞서 설명된 화합물들의 약학적으로 허용가능한 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 유닛을 함유하는 앞서 설명된 화합물로부터 합성된다. 이러한 염은 일반적으로 예컨대, 이들 화합물의 유리산 또는 유리 염기 형태를 물이나 유기 용매 또는 이들 두가지의 혼합물 정에서 적절한 염기 또는 산의 화학량론적 양과 반응시킴으로써 제조한다. 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세트니트릴과 같은 비수성 용매가 일반적으로 바람직하다. 산부가염의 예로는 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 황산염, 질산염, 인산염과 같은 무기산 부가염, 아세트산염, 말레산염, 푸마르산염, 시트르산염, 옥살산염, 숙신산염, 주석산염, 말산염, 만델산염, 메탄설폰산염 및 p-톨루엔설폰산염과 같은 유기산 부가염을 들 수 있다. 알칼리성 부가염의 예로는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 마그네슘, 알루미늄 및 리튬과 같은 무기염, 에틸렌디아민, 에탄올아민, N,N-디알킬렌에탄올아민, 글루카민 및 염기성 아미노산염의 유기 알칼리염을 들 수 있다.

[0075] "전구약물"이라는 용어는 환자에게 투약 후 그 자체로 활성 화합물을 제공하는 활성 화합물로부터 유도된 예컨대 에스테르 또는 에테르와 같이, 용해도 또는 생체이용성과 같은 이화학적 특성의 일부를 변화시키기 위해 (약학적 용도를 위해) 부가적인 화학 그룹을 치환 또는 부가하는 것과 같은 화학적 유도화가 수행된 화학적 화합물로 정의된다. 주어진 활성 화합물로부터 전구약물을 생산하기 위한 잘 알려진 방법의 예는 당업자에게 잘 알려져 있으며 예컨대 크록스가드-라센 등의 문헌 [Krogsgaard-Larsen 등, Textbook of Drug Design and Discovery, Taylor & Francis (April 2002)]에 설명되어 있다. 본 발명에서, "용매화물"이라는 용어는 비공유 결합을 통해 결합된 다른 분자 (대개 극성 용매)를 갖는 본 발명의 화합물의 모든 형태를 의미한다. 용매화물의 예로는 수화물과 알코올화물, 예컨대 메탄올레이트를 들 수 있다.

[0076] 특히 바람직한 전구약물은 그러한 화합물을 환자에게 투여할 경우 본 발명의 화합물의 생체이용성을 증가시키거나 (예컨대 경구 투여된 화합물을 혈액 내로 보다 신속하게 흡수시키는 등) 본래 중에 비해서 생물학적 부분 (예컨대 뇌 또는 임파계)에 본래 화합물의 분포를 증대시키는 화합물들을 가리킨다.

[0077] 본 발명에 사용된 화합물은 결정 형태일 수 있으며, 예컨대 유리 화합물 또는 용매화물 (예컨대 수화물) 등의 다형일 수 있고, 이들 두가지 형태는 모두 본 발명의 범위에 포괄된다. 용매화 방법은 기술 분야에 잘 알려져 있다. 적절한 용매화물은 약학적으로 허용가능한 용매화물이다. 특정 실시 상태에서, 용매화물은 수화물이다.

[0078] 염, 용매화물 및 전구약물은 기술 분야에 알려진 방법에 의해 제조할 수 있다. 약학적으로 허용불가능한 염, 용매화물 또는 전구약물 역시 본 발명의 범위에 포괄되는데 이는 이들이 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 전구약물을 제조하는데 유용할 수 있기 때문이다.

[0079] 화학식 (I)의 화합물 또는 이들의 염이나 용매화물인 특히 바람직한 약학적으로 허용가능한 형태 또는 실질적으로 순수한 형태이다. 약학적으로 허용가능한 형태는 그 중에서도 약학적으로 허용가능한 순도 수준을 갖는 것으로, 희석제나 부형제와 같은 일반적인 약제학적 첨가제는 배제되며, 정상 투여량 범위에서 유독한 것으로 여겨지는 물질들은 배제된다. 약물의 순도 수준은 바람직하게는 50% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상인 것이 좋다. 바람직한 실시 상태에서, 화학식 (I)의 화합물, 또는 그의 염, 용매화물 또는 전구약물은 95% 이상의 순도를 갖는다.

[0080] 전술한 화학식 (I)로 표시되는 본 발명에 사용되는 화합물들에는 키랄 중심의 존재 여부에 따라 에난티오머 또는 다중 결합의 존재 여부에 따라 이성질체 (예컨대 Z, E)가 포함될 수 있다. 개별적인 이성질체, 에난티오머, 부분입체이성질체 및 이들의 혼합물들이 모두 본 발명에 포함된다.

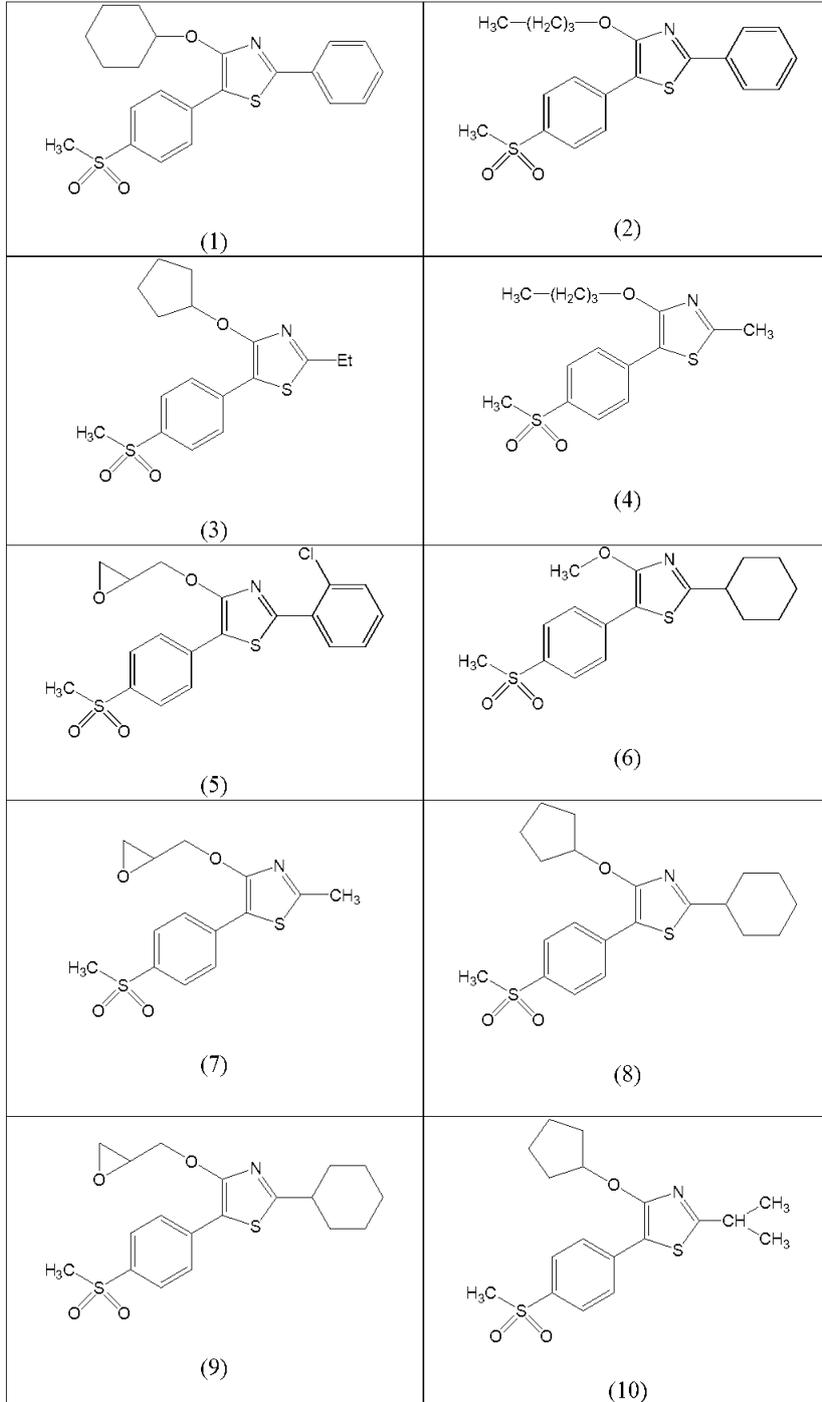
[0081] 특정 실시 상태에서, 조영 및 약학-조영 기술 또는 약물 개발, 임상 시도 및 개체에 맞는 의약 연구에서 바이오마커로서의 이들의 사용을 위해, 화학식 (I)의 화합물은 형광 또는 발광 태그 또는 플레그로 표시되어, 당업자에게 알려진 방법에 의해 이러한 마커를 도입할 수 있다.

[0082] 본 발명의 특정 실시 상태에서, R<sub>1</sub>은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이다. 바람직하게는 R<sub>1</sub>은 메틸인 것이 좋다.

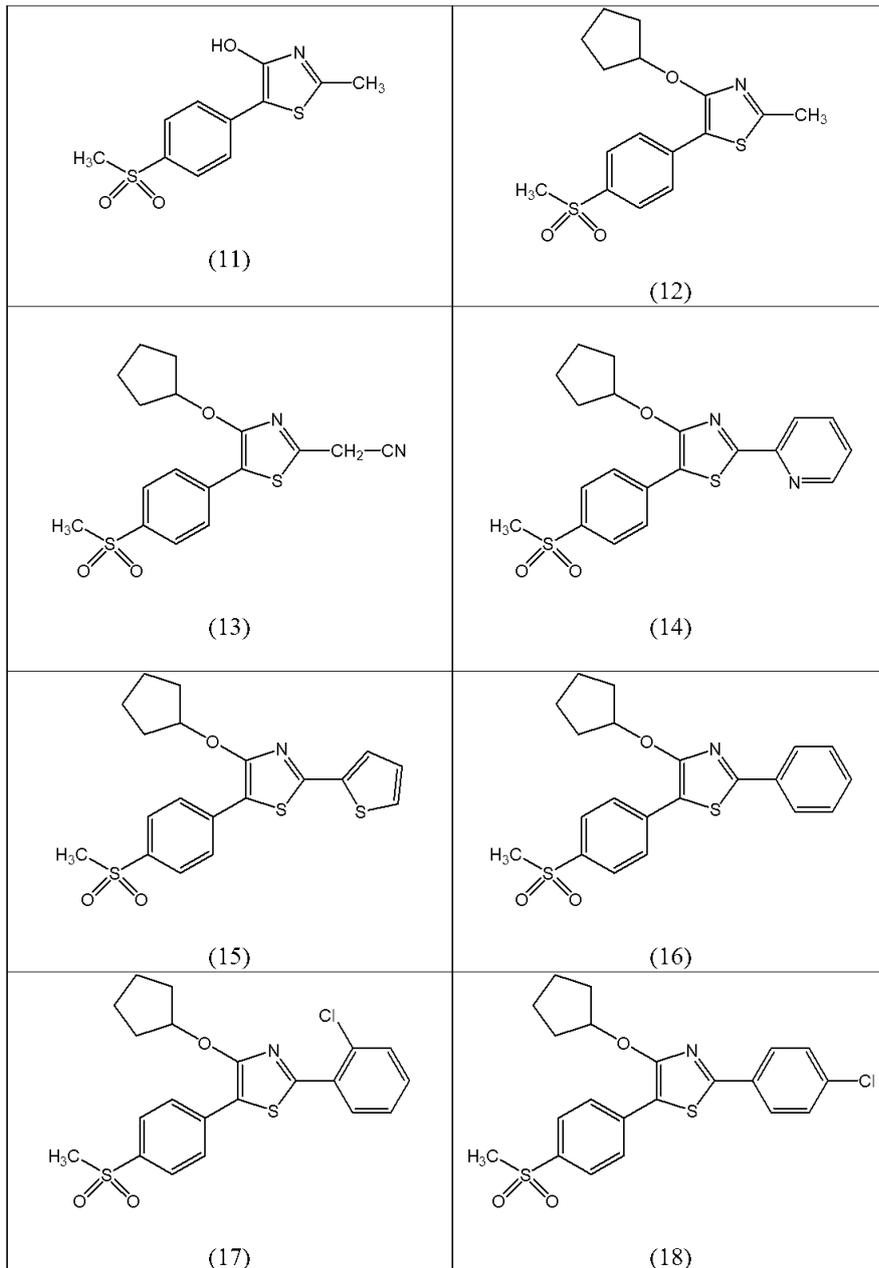
[0083] 또 다른 특정 실시 상태에서, R<sub>2</sub>는 수소, 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬이다. 바람직하게는, R<sub>2</sub>는 치환 또는 비치환된 시클로알킬이다. 더욱 바람직하게는, R<sub>2</sub>는 시클로펜틸이다.

[0084] 더욱 바람직한 특정 실시 상태에서, R<sub>3</sub>는 메틸이다.

[0085] 또 다른 특정 실시 상태에서 본 발명의 화학식(I)의 화합물은 다음 화합물들:



[0086]



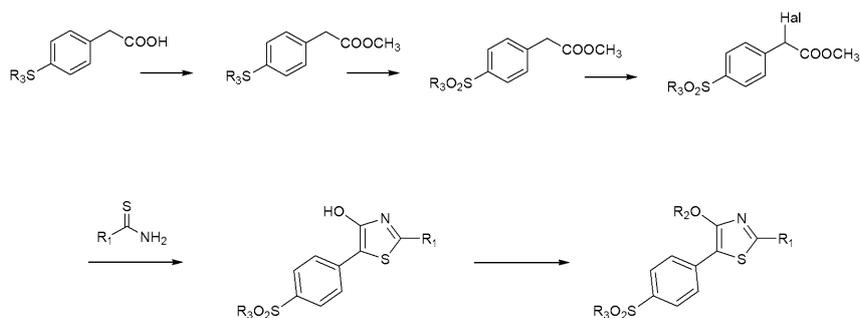
[0087]

[0088]

[0089]

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 전구약물 및/또는 용매화물로부터 선택된다.

본 발명에 사용되는 화학식 (I)의 화합물은 이용가능한 합성 공정에 의해 수득가능하다. 예컨대, 이들은 다음 반응식으로 요약되는 공정에 의해 제조할 수 있다.



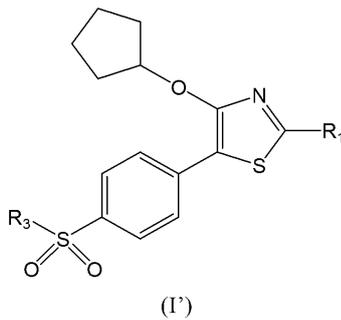
[0090]

[0091]

이 반응 과정은 우선 화합물 4-R<sub>3</sub>-티오펜아세트산을 에스테르화시켜 메틸 에스테르 유도체를 만드는 것을 포함한다. 상기 반응은 NaHCO<sub>3</sub>와 같은 염의 존재 하에 MeIdhk 같은 메틸화제를 사용하거나 또는 산성 용매 존재 하

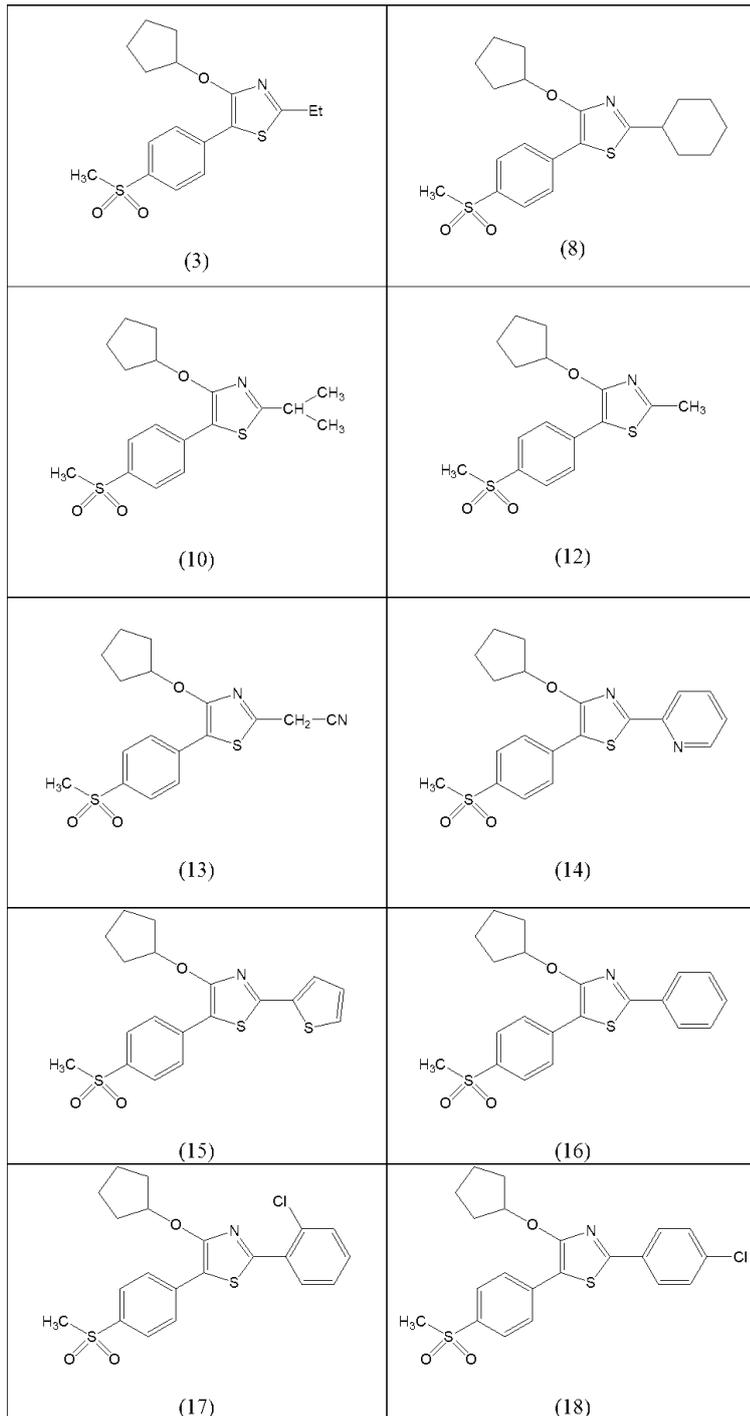
에 메틸화제로서 MeOH를 사용하여 실시할 수 있다.

- [0092] 후속 단계에서, 메틸 에스테르 유도체를 정제하거나 정제하지 않은 채로 산화제, 예컨대 옥손을 이용하여 항 원자를 산화시켜, 티오에테르기로부터 설폰 화합물을 수득한다.
- [0093] NBS와 같은 제제를 이용한 이어지는 할로겐화에 의해 에스테르기의 알파-위치에서 할라이드를 형성시킬 수 있다. 가열 하에 이 화합물 여러가지 티오아미드로 고리부가하여 R<sub>1</sub>-치환된 5-(4-R<sub>3</sub>-설폰닐-페닐)-티아졸-4-올을 고순도로 얻는다.
- [0094] 고리부가에 사용되는 티오아미드는 [J. Med. Chem (34) 2158-2165, 1991 및 J. Org. Chem. (65), 13, 3973, 2000]에 설명된 바와 같은 로손 시약에 상응하는 아미드로부터 얻는다. 상기 티오아미드로는 R<sub>1</sub>이 수소, 상기 정의한 바와 같은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택되는 것인 화합물을 들 수 있다.
- [0095] 히드록시기르 통한 R<sub>2</sub> 래디칼의 도입은 본 발명에 사용되는 화학식 (I)의 화합물을 제공하기위해 당업자에게 알려진 방법에 따라 수행할 수 있다. 특정 실시 상태에서, 히드록실기를 화학식 R<sub>2</sub>-Hal, 바람직하게는 R<sub>2</sub>-Br의 할라이드와 반응시켜, 화학식 (I)의 화합물을 얻는다.
- [0096] 전술한 반응에 사용되는 모든 시약들은 시판되는 것들이다.
- [0097] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 다음 화학식 (I')의 하합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및 /또는 용매화합물을 제공한다:



- [0098]
- [0099] 식 중:
- [0100] R<sub>1</sub>은 수소, 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 치환 또는 비치환된 시클로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴 중에서 선택되고;
- [0101] R<sub>3</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 래디칼이다.
- [0102] 특정 실시 상태에서, R<sub>1</sub>은 치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이다. 좋기로는, R<sub>1</sub>은 메틸인 것이 좋다.
- [0103] 또 다른 실시 상태에서, R<sub>3</sub>는 메틸이다.

[0104] 또 다른 특정 실시 상태에서, 본 발명의 화학식 (I')의 화합물은 다음 구조의 화합물:



[0105]

[0106] 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화물 중에서 선택된다.

[0107]

본 발명은 또한 본 발명의 화학식 (I')의 신규 화합물, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화물 또는 전구약물과 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 아췌반트 및/또는 비히클을 함유하는, 환자에게 투여하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

[0108]

본 발명의 특정 실시 상태에서, 화학식 (I)의 화합물, 약학적으로 허용가능한 그의 염, 전구약물 및/또는 용매화물을 급만성 염증 질환 치료를 위해 투여하기 위해 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 아췌반트 및/또는 비히클과 함께 치료적 유효량으로서 적절한 의약 조성물로 조성한다.

[0109]

"담체, 아췌반트 및/또는 비히클"이라는 용어는 활성 성분과 함께 투여되는 분자 구조 또는 물질을 가리킨다. 이러한 약학적 담체, 아췌반트 또는 비히클로는 물이나 예컨대 페트롤류, 또는 동식물 또는 합성 기원의 오일,

예컨대 낙화생 오일, 대두유, 광물유, 참기름 등의 오일과 같은 멸균 액체, 부형제, 붕괴제, 습윤제 또는 희석제를 들 수 있다. 적절한 약학적 담체들이 "Remington's Pharmaceutical Science", E.W. Martin에 설명되어 있다.

- [0110] 의약 조성물은 예컨대 경구, 비경구 (예컨대 피하, 복강내, 정맥내, 근육내 등), 직장 투여 등과 같은 적절한 투여 방법에 의해 투여될 수 있으며, 일반적으로는 치료하고자 하는 질병의 만성 특성으로 인해 경구적으로 투여된다.
- [0111] 특정 실시 상태에서, 상기 의약 조성물은 고체 또는 액체 형태의 약학적 형태로서 경구투여될 수 있다. 경구 투여용 약학적 형태의 예로는 정제, 캡슐, 과립, 용액, 현탁액 등을 들 수 있으며 결합제, 희석제, 붕괴제, 윤활제, 습윤제와 같은 통상적인 부형제가 함유되며, 상법에 따라 제조될 수 있다. 의약 조성물은 또한 예컨대 적절한 투약 용기 중에 멸균, 동결건조된 제품, 현탁액 또는 용액으로서 제공될 수도 있으며; 이 경우, 상기 의약 조성물은 완충액, 계면활성제 등과 같은 적절한 부형제를 포함한다. 어떤 경우에도, 이들 부형제는 선택된 투여 약학 제형에 알맞게 선택된다. 약물 및 이들의 제제를 투여하기 위한 여러가지 제약 형태에 관한 설명을 문헌 [Tratado de Farmacia Galenica" C. Fauli i Trillo, 10th Edition, 1993, Luzan 5, S.A. de Ediciones]에서 찾아볼 수 있다.
- [0112] 치료에 사용하기 위해, 화학식 (I)의 화합물은 바람직하게는 약학적으로 허용가능하거나 실질적으로 순수한 약학적 형태인 것이 바람직하다. 즉, 화학식 (I)의 화합물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 제외한, 약학적으로 순수한 농도를 가지며, 정상 투약량 범위에서 유독하다고 생각되는 물질들은 포함하지 않는다. 화학식 (I)의 화합물의 순도 수준은 50% 이상인 것이 좋고, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상인 것이 좋다. 바람직한 실시 상태에서, 95% 이상이다.
- [0113] 투여될 화학식 (I)의 화합물의 치료적 유효량은 일반적으로, 특히, 치료될 개체, 상기 개체가 앓고 있는 질병의 위중도, 채택된 투여 방법, 등에 의하여 좌우된다. 이로 인하여, 본 발명에 언급된 투약량은 당업자에게 참조로서 제시된 것일 뿐이며, 당업자들은 전술한 변수에 따라 투약량을 적절히 조정해야만 함을 이해하여야 한다. 그럼에도 불구하고, 화학식 (I)의 화합물은 하루 한번 이상, 예컨대, 하루에 1, 2, 3 또는 4번 투여될 수 있고, 전형적인 1일 총 투여량은 0.1 내지 1000 mg/kg 체중/1일, 바람직하게는 10 mg/kg 체중/1일의 양이다.
- [0114] 화학식 (I)의 화합물, 그의 약학적으로 허용가능한 염, 전구약물 및/또는 용매화물 뿐만 아니라 이들을 함유하는 의약 조성물은 급성 및 만성 염증성 질환을 치료하는데 유용한 다른 부가적인 약물들과 함께 사용될 수 있다. 상기 부가적인 약물들은 동일 의약 조성물의 일부를 구성할 수도 있고, 또는 화학식 (I)의 화합물, 그의 약학적으로 허용가능한 염, 전구약물 및/또는 용매화물을 함유하는 의약 조성물과 동시에 또는 시차를 두어 투여되는 별도 조성물 형태로서 제공될 수도 있다.
- [0115] 본 발명의 범위 내에서, "급성 및 만성 염증성 질환"이라는 표현은 비정상적인 자극이 곧 병인성 메카니즘인 병태 하에서 염증성/면역 세포 및 염증성 시토카인 캐스케이드의 활성화 및 병리학적 연관성을 야기하는 모든 질병, 장애 또는 병태와 관련된 것이다. 이와 관련된 주요 세포들로는 상기 질병의 치료와 관련된 염증/면역 세포 예컨대 단핵세포, 대식세포, APC, T, B 및 내츄럴 킬러 (NK) 세포, 혈장 세포, 과립구 및 비만세포, 또는 이들 세포 아집단의 조합을 들 수 있다.
- [0116] "시토카인"이라는 용어는 다른 세포의 기능에 영향을 미치는 분비된 단백질을 가리키는 것으로서, 특히 염증 반응과 관련된 면역계 세포 또는 면역 세포들 간의 상호반응을 조절하는 것과 관련된 단백질이다. 상기 시토카인은 TNF-알파 (9종양괴사 인자-알파), IFN-감마 (인터페론-감마), IL-8 (인터류킨-8) 케모카인 및 조절성 시토카인 IL-10 (인터류킨-10)이다. IL-10의 생산은 높은 TNF-알파 수준에 의해 유발되며 전염증성 시토카인 전사의 차단에 따른 TNF-알파 생산의 네거티브 피드백을 촉진한다.
- [0117] 본 발명의 특정 실시 상태에서, 급성 또는 만성 염증성 질환은 음성혈청반응 올리고관절염 및 다관절염, 척추관절염, 사구체신염, 콜라겐병, 세노관사이질성 신장염, 대사성 증후군, 죽상동맥경화증, 골관절염, 천식, 만성 폐쇄폐병, 사이질성 폐질환, 다발경화증, 탈미엘린화 질환, 수막염, 뇌염, 뇌수막염, 염증성 신경근병 및 말초성 신경병, 염증성 장질환, 시로시스, 간염, 심장발작, 허혈성 질환, 신부전, 염증성 방광염, 양성 전립성 비대증, 전립선염, 심근염, 포도막염, 아토피성 피부염, 습진, 두드러기, 건선, 장미증, 알레르기성 비염, 패혈증, 패혈증성 쇼크, 멀티오가닉부전, 전신성 자가면역 질환, 예컨대 전신 홍반 루푸스, 혈관염, 피부근육염, 아밀로이드증 또는 사코이드증, 장기특이성 자가면역 질환, 예컨대 중증근육무력증, 갑상선염, 인슐린염, 장기이식, 감염 및 종양유발성 감염, TNF-알파 의존성 세포 퇴화, 괴사, 세포자멸사, 이식편 대 숙주 질환, 카렉시아 및

자가분비 및 측분비성 병리학적 세포 성장을 들 수 있다.

- [0118] 바람직한 실시 상태에서, 급성 또는 만성 염증성 질환은 혈청양성 또는 음성혈청반응 만성 다관절염, 더욱 바람직하게는 류마티스성 관절염이다.
- [0119] 본 발명의 또 다른 구체예는 상기 정의한 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 의약 조성물의 치료적 유효량을, 치료를 요하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 급성 또는 만성 염증성 질환의 치료 방법이다.
- [0120] 본 명세서에서 "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 본 발명에 따른 화합물을 함유하는 포물레이션을 상기 질환과 연관된 1 이상의 증상을 예방, 경감 또는 제거하기 위해 투여하는 것을 의미한다. "치료"는 또한 이러한 질환의 생리학적 후유증을 예방, 경감 또는 제거하는 것도 포함한다.
- [0121] 본 발명에서 "경감하다"라는 용어는 치료된 환자 - 주관적 (환자의 느낌 등) 및 객관적 (측정된 변수)의 두가지 측면 모두에서 치료된 환자의 상황의 개선을 의미하는 것이다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 구체예는 면역학적 병변, 표적 세포 및 표적 분자를 찾아내기 위한, 조영 및 약학-조영 기술에서 조영용 바이오마커로서 전술한 화학식 (I)의 화합물을 사용하는 것과 연관이 있다.
- [0123] 약학-조영 기술은 생체내 조영 기술에 있어서 적합한 전임상 (동물의 분자, 세포, 장기 및 진신 추적 및 개념과 메카니즘, 효능 평가 등의 증거에 관한 연구), 및 임상 (인간 의료)의 급격한 조합 성장에 의해 수득되는 바이오마커 범위를 본 명세서에 설명된 화합물에 의해 생성되는 가치있는 정보 데이터로 확장시켜 의약으로서 이용케 해준다.
- [0124] 다음에 구체적인 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 이 설명은 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니라 어디까지나 청구범위로서 정의되는 것으로 이해되어야 한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0125] 도 1: 세포계수 비드 분석 (CBA: Cytometric Bead Array)의 개발을 위한, 선택된 마이크로입자의 여러가지 형광 특성.
- 도 2: 건강한 지원자 (n=10)로부터의 LPS-자극 PBMC에 있어서의 TNF-알파 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.
- 도 3: 건강한 지원자 (n=14)으로부터의 LPS- 또는 TCR/CD3+CD28-자극된 PBMC에서의 TNF-알파 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.
- 도 4: 류마티스성 관절염 환자 (n=7)로부터의 PBMC에 있어서의 TNF-알파 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.
- 도 5: 건강한 지원자 (n=13)으로부터의 PBMC에서의 IFN-감마 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.
- 도 6: 류마티스성 관절염 환자 (n=8)로부터의 PBMC에 있어서의 IFN-감마 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.
- 도 7: 건강한 지원자 (n=13)으로부터의 PBMC에서의 IL-8 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.
- 도 8: 류마티스성 관절염 환자 (n=8)로부터의 PBMC에 있어서의 IL-8 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 별표는 각 실험 조건에 있어서 비히클에 따른 대응 데이터의 통계적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 나타낸다.

도 9: 건강한 지원자 (n=13)으로부터의 PBMC에서의 IL-10 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 통계적 차이는 발견되지 않았다.

도 10: 류마티스성 관절염 환자 (n=8)로부터의 PBMC에 있어서의 IL-10 생산에 미치는 화합물 12의 영향. 컬럼들은 여러가지 실험 조건하에서 각 샘플에 대해 행하여진 이중 배양의 평균 오차 및 표준 오차를 나타낸다. 통계적 차이는 발견되지 않았다.

도 11: PHA, PHA 플러스 IL-2, 또는 모노클로날 항체 항CD3 (T3)와 항CD28와의 조합에 의한 자극의 존재 또는 부재 하에서의 건강한 지원자 (n=8)으로부터의 PBMC에서의 증식 반응에 미치는 화합물 12 (a)와 비히클 (b)의 효과.

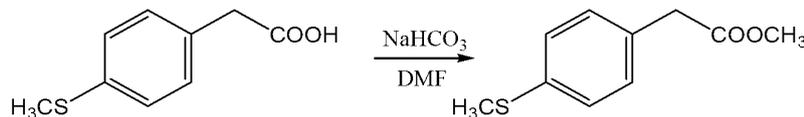
도 12: 건강한 자원자로부터의 PBMC의 임파구 (a) 및 단핵세포 (b)에 있어서의 CD62L의 shedding(shedding)에 미치는 화합물 12의 효과.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**실시예**

**합성예**

실시예 1. (4-메틸티오페닐)-아세트산 메틸 에스테르의 합성

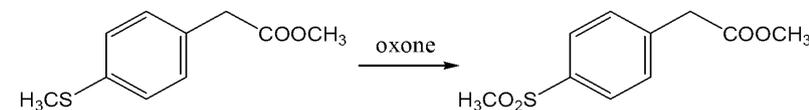


1.82 g (10 mmol)의 4-메틸티오페닐아세트산을 30 mL의 DMF에 용해시키고 이어서 1.34 g (16 mmol)의 NaHCO<sub>3</sub>를 첨가하였다; 교반 혼합물을 약 15 분간 교반하였다. 이어서, 1.9 mL의 ICH<sub>3</sub>를 첨가하면서 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 이 시간이 일단 경과한 후 혼합물을 물/얼음 상에 부었다. 침전이 발생하지 않으면 에테르를 첨가하여 추출시켰다. 유기상을 물로 세척하고 무수황산나트륨 상에서 건조시킨 다음 유기상을 회전 증발기 상에서 농축시켜 1.92 g (9.7 mmol, 97% 수율)의 무색 오일을 얻고 이를 현미경 관찰하여 예상 구조를 확인하였다. 이 생성물은 TLC (디클로로메탄/메탄올 9/1 용리)에서 단일 스테인을 제공하므로, 다음 합성과정 단계에서 정제하지 않고 사용한다.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 7.2 (s, 4H) 3.7 (s, 3H) 3.5 (s, 2H) 2.4 (s, 3H CH<sub>3</sub>S)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 171.5 136.9 130.4 129.4 126.4 51.6 40.2 15.5

실시예 2. (4-메틸설포닐-페닐)-아세트산 메틸 에스테르의 합성

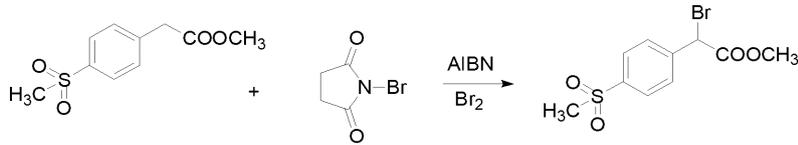


80 mL의 물 중 옥손 30.7 g (50 mmol) 용액을 100 mL의 메탄올 중 실시예 1의 화합물 3.4 g (17.3 mmol)의 용액에 적가하면서 반응을 빙수 베스에서 유지시켰다. 일단 첨가후, 5 시간 동안 계속 교반하면서 온도를 실온 수준으로 유지시켰다. 이어서, 용매 일부를 감압 농축시키고 침전된 고체를 물로 반복 수세하여 여과하였다. 건조 후, 이 고체의 무게는 3 g이었다. 여과하여 얻은 물을 디클로로메탄으로 추출하고, 유기상을 물로 세척한 다음 무수황산나트륨 상에서 건조 및 회전 증발기로 농축시켜 예상된 것보다 1g 더 많은 양인 4g의 생성물을 얻었다 (17 mmol, 100% 수율). 이 고체는 57°C에서 용해되며 그 순도는 HPLC 측정시 99%였다. 분광광도학 데이터에 의해 예상된 구조가 그대로 확인되었다.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 7.9 (d, 2H), 7.5 (d, 2H), 3.7 (s,s 3+2H), 3.1 (s, 3H)

[0137] RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 170.80 140.13 139 130.33 127.63 52.31 44.49 40.82

[0138] 실시예 3. 브로모-(4-메틸설포닐-페닐)-아세트산 메틸 에스테르의 합성



[0139]

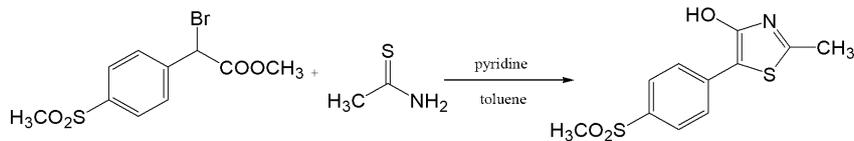
[0140] 실시예 3에서 얻은 20 g (87.62 mmol)의 에스테르를 300 mL의 사염화탄소에 용해시키고; 19 g (105 mmol)의 N-브로모숙신이미드, 2 g (12.18 mmol)의 아자비스이소부티로니트릴 및 0.1 mL의 브롬을 여러 차례로 나누어 첨가하였다. 반응 혼합물을 80°C에서 3 시간 동안 가열한 다음 냉각, 여과하여 디클로로메탄을 세척하였다. 여액을 물로 세척한 다음 염수로 세척하였다. 용액을 무수황산나트륨으로 건조하고 진공 농축시켜 28 g의 오일을 얻고, 이를 용리액으로서 헵탄/에틸 아세테이트 (1/1)를 이용하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 보다 순수한 분획을 농축시켜 19.63 g (72.94% 수율)의 브로모 유도체 화합물을 얻었다.

[0141] mp: 81.8 - 83.3°C

[0142] NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), δ : 7.9 (d, 2 H), 7.75 (d, 2H), 5.4 (s, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.1 (s, 3H).

[0143] NMR <sup>13</sup>C(CDCl<sub>3</sub>), δ, : 168.0 ( C); 141.6 ( C); 141.1 ( C); 129.8 (CH); 127.8 (CH); 53.7 (CH); 44.7 (CH<sub>3</sub>) 및 44.2 (CH<sub>3</sub>) ppm.

[0144] 실시예 4. 2-메틸-5-(4-메틸설포닐-페닐)-티아졸-4-올의 합성



[0145]

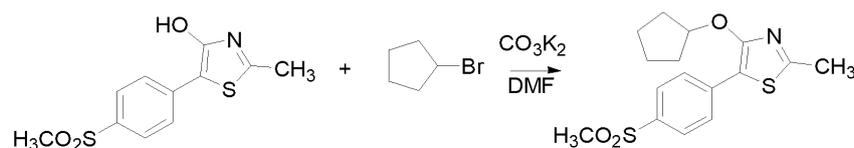
[0146] 실시예 3에서 얻은 16.7 g (54.3 mmol)의 에스테르를 400 mL의 톨루엔에 용해시킨 다음, 19 mL의 피리딘과 4.08 g (54.34 mmol)의 티오아미드를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 2 시간 동안 교반하면서 80°C (배쓰 온도)로 가열한다. 이어서, 이 혼합물을 냉각 방지하여 침전된 고체를 여과하고, 물(2 x 50 mL)로 세척한 다음 에테르 (2 x 30 mL)로 세척하였다. 생성물을 진공 건조시켜 7 g (26 mmol, 47.86% 수율)의 크림상 고체를 얻었으며 이것의 용점은 216-226°C였다.

[0147] 예상된 생성물의 구조를 분광광도학 데이터로부터 확인하였다.

[0148] RMN <sup>1</sup>H (d<sup>6</sup>DMSO) δ : 11.8 (s, 1H) 7.8 (m, 4H) 3.1 (s, 3H) 2.6 (s, 3H) ppm

[0149] RMN <sup>13</sup>C (d<sup>6</sup>DMSO): 162.9 (C); 159.4 (C); 146.2 (C); 143.0 (C); 128.0 (CH); 126.1 (CH); 104.4 (C); 44.2 (CH<sub>3</sub>); 19.9 (CH<sub>3</sub>) ppm.

[0150] 실시예 5. 4-시클로펜틸옥시-5-(4-메틸설포닐-페닐)-2-메틸-티아졸의 합성.



[0151]

[0152] 실시예 4에서 얻은 7.0 g (26 mmol)의 히드록시티아졸과 8.8 g (63.67 mmol)의 탄산칼륨을 200 mL의 DMF에 용해시켰다. 이어서, 시클로펜틸 브로마이드, 14 mL (130 mmol)를 적가하였다. 반응 혼합물을 80°C에서 3 시간 가열한 다음 냉각시키고, 이 혼합물을 얼음/물 혼합물에 부어서 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기상을 물(3 X 100 mL)로 추출하고, 무수 황산나트륨으로 건조시킨 다음 농축시켜 12 g의 조질의 물질을 얻었으며 이를 헵탄/

에테르 (1/1)로부터 결정화시켰다. 용리액으로서 헵탄/에틸 아세테이트 (2/1)을 이용하여 플래쉬 크로마토그래피에 의한 생성물의 정제에 의해 6.7 g (19.85 mmol, 76.39% 수율)의 화합물 12를 얻었다.

[0153] mp: 124.6 - 125.2°C

[0154] NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>), δ: 7.9 (dd, 4H), 5.4, (m, 1H), 3.0, (s, 3H), 2.6, (s, 3H), 1.7-2.0 (m, 8H) ppm

[0155] NMR <sup>13</sup>C(CDC1<sub>3</sub>), δ: 162.6 (C); 159.5 (C); 138.3 (C); 137.1 (C); 128.1 (CH); 126.8 (CH); 109.1 (C); 83.7 (CH); 45.0 (CH<sub>3</sub>); 33.5 (CH<sub>2</sub>); 24.1 (CH<sub>2</sub>); 20.4 (CH<sub>3</sub>) ppm

[0156] **생물학적 분석**

[0157] 재료 및 방법

[0158] 1. 대상

[0159] 이 연구는 경간한 지원자와 류마티스성 관절염이 있는 환자들을 정맥 천자하여 얻은 헤파린화된 말초 혈액에 대하여 수행하였다.

[0160] 건강한 지원자들은 병원 실무에 따라 통상적으로 컨트롤된 혈액 공여자였다.

[0161] 이 연구에 포함된 류마티스성 관절염 환자들은 미국 류마티스학회 진단 기준에 부합하는 환자들로서 6개월 이상 20mg/1주일 경구 메토티렉세이트로 치료받고 있는, 이 부류에 방문 포함 당시 임상적으로 활성적인 질병 상태의 환자들이었다. 질병 활성 정도는 다음과 같이 정의하였다: a) DAS28 ≥ 3,2 및/또는 b) 6 이상의 팽창 관절(articulation) 및 6 이상의 통증 있는 관절. 배제 기준은 다음과 같았다: a) 포함 방문시 활성 감염 질환을 앓고 있거나; b) 포함 전에 종양관련 질환을 앓고 있거나; 3) 포함 방문 전 적어도 1년 동안 완전한 재발 단계에 들어가지 않은 다른 전신성 또는 장기 특이적인 자가면역 질환을 앓고 있거나; d) 주요 질환으로서의 류마티스성 관절염에 의해 유도되는 수준에서의 변화와 관련이 없는 위중한 신장, 심장 또는 간 질환을 앓거나; f) 코르티코스테로이드, 면역억제제, 사이토스테틱 또는 면역계에 활성을 미치는 것으로 알려진 기타 약물로 포함 방문 전 1년 동안 치료된 경우 (메토티렉세이트의 지도 복용은 제외함); 7) 포함 방문시 임신 또는 산후 조리 중에 있는 경우.

[0162] 이 연구는 스페인 마드리드에 소재하는 알칼라 대학의 조사위원회의 승인을 받았다.

[0163] 2. 재료

[0164] - 조직 배양 플레이트, 저증발 리드가 구비된 96 웰 짜리 평평한 바닥 플레이트, 353073 Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, 07417-1886, NJ, USA).

[0165] - 비멸균 플레이트, 96 웰 짜리 V형 바닥의 플레이트(Greiner, Soria Greiner, Madrid, Espana).

[0166] - 1회용 피펫 파스토프(Brand, Alemania).

[0167] - 조정가능한 용량의 피펫 피펫맨 P de 20, 200, 1000 및 5000 μl (Gilson, Francia).

[0168] - 에펜도르프 멀티피펫 4780 (Hamburg, Germany).

[0169] - 멸균 팁 에펜도르프(Hamburg, Germany).

[0170] - 버진 프로필렌 멸균 팁 (Daslab, Madrid, Spain).

[0171] - 멸균 플라스틱 튜브 5 및 10 ml (Daslab, Madrid, Spain).

[0172] - 세포계수기 폴리스티렌 튜브 15 및 50 ml (BD Falcon, Franklin Lakes, USA).

[0173] - 헤파린 10 ml가 함유된 혈액 추출 튜브 (Venojet, Terumo Europe, Belgium)

[0174] - 혈장 추출 튜브 10 ml (BD Vacutainer, Plymouth, UK)

[0175] - 피펫 충전기, 피펫보이 플러스 (Flow Lab., Germany).

[0176] - 멸균 필터 22 μl Millex-GS (Millipore, Molshein, France).

- [0177] - 크리스털 슬라이드 커버 (Hirschman, Germany).
- [0178] - 계수 챔버 Neubauer(Saaringia, Germany).
- [0179] - 수직 라미나 플럭스 챔버 Herasafe HS12 (Heraeus, Germany).
- [0180] - CO<sub>2</sub> 조절 장치가 구비된 세포 배양 스토브 Heracell 150 (Heraeus, Germany).
- [0181] - 냉장형 원심분리기 Beckman. Multifuge 3SR (Heraeus, Germany).
- [0182] - 냉동고 -70°C (Selecta, Tarrasa, Spain).
- [0183] - 현미경 Olympus CHS-2 (Olympus, Tokyo, Japan).
- [0184] - 세포유량계 FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View USA) - 소프트웨어 및 분석기 BD cellquest Pro v. 5.5.1가 구비됨.
- [0185] - BD FACS Array Bioanalyser.
- [0186] - 효소-면역분석 판독기 (Titertek Multiscan Plus, Flow laboratories).
- [0187] - 방사능 베타 계수기 Beckman
  
- [0188] 3. 세포 서브세트의 분리 및 동정에 사용된 시약
- [0189] - 심플 클로라이드 염수 (SSF) Apiroserum (Ibys, Madrid, Spain).
- [0190] - 림포프랩 (Ficoll-Hypaque, Nyegaard Co, Oslo, Norway).
- [0191] - 블루 트리판 (Flucke AG., Buchs SG., Germany).
- [0192] - PBS FACS FLOW (Becton Dickinson).
- [0193] - HEPES 완충액 (Reactivos de Sigma y Panreac)
- [0194] - 메틸-<sup>3</sup>H 티미딘 (<sup>3</sup>[H]-T). 비활성 60 Ci/mmol (American Radiochemicals, ITISA, Madrid, Spain).
- [0195] - 면역형광 및 세포 유량 연구에 사용된 모노클로날 항체:

**표 1**

표 1. 이 연구에 사용된 모노클로날 항체:

CD*	Ac Mo	세포 서브세트	서브클래스	플루오로크롬
62L	SK11	백혈구. L-Selectin	IgG2a	피코에리쓰린 (PE)

\* "인간 백혈구 분화항원에 관한 7차 워크샵"에서 규정됨.

- [0196]
  
- [0197] 4. 세포 배양에 사용된 시약
- [0198] - 1 % L-글루타민 200 mM y 25 mM Hepes (Flow Lab., Irvine, California, USA)가 보강된 RPMI-1640으로 만든 완전 배지 (Cambrex BioSciences B4800 Verviers, Belgium).
- [0199] - 소 태아 혈청(FCS) (Gibco, Grand Island, NY, USA).
- [0200] - 배양 배지: 10 % FCS를 첨가함으로써 완전 배지를 사용하였다. 45분 간 57°C로 가열함으로써 보체를 모든 혈청으로부터 제거하였다.
- [0201] - 피토헤마글루티닌M (PHA) (Sigma Ref δL-8902, Lot δ 115K4132, Sigma, Madrid, Spain).

- [0202] - LPS (E. coli 0111: B4 균주, InvivoGene, San Diego CA92121, USA).
- [0203] - 항생제 혼합물. 소듐 암피실린 10 mg/ml (Britapen, Beecham A., Toledo, Spain), 겐타마이신 황산염 1.6 mg/ml (Tamadit Lab., Dr. Esteve SA., Madrid, Spain) 및 암포테리신 B 0.5 µg/ml (Fungizona, Squibb, Esplugues, Barcelona, Spain)의 혼합물을 배양 배지에 첨가하였다.
- [0204] - 항CD3 모노클로날 항체 (Orthoclone OKT3, Orthopharmaceutical Corporation, Raritan, NJ, USA).
- [0205] - 항CD28 모노클로날 항체 (Clon 15E8, Menarini, Madrid, Spain).

[0206] 5. 생물학적 시료의 채취

- [0207] a) 정맥혈: 전주 정맥 천자에 의해 수집된 정맥혈로부터 단핵세포를 획득하였다. 50 ml의 혈액을 추출하고 리 튜브 헤파린 튜브 (Venojet)에서 보관하였으며, 멸균 조건 하에서 염수 1/1 (vol/vol)로 추가 희석하였다.
- [0208] b) 인간 세포 서브세트 수확. PBMC 분리를 위해, 나머지 혈액 성분들을 Ficoll 상에서 밀도 구배에 의해 분리 하였다. 이 방법은 혈액 세포의 밀도 차에 기초한 것이다. 희석되어 헤파린화된 혈액을 함유하는 50 ml 원심분 리용 튜브에, 15 ml Ficoll-Hipaque (밀도 1.077 g/ml)를 조심스럽게 넣는다. 45분간 원심분리 (400xg) 하여 3 개의 층(strati: 적혈구, Ficoll 및 혈장)이 얻어졌으며 이를 두개의 인터페이스로 분리하였다: PBMC는 희석된 혈장과 Ficoll 사이에 위치한 것에 함유된다. 파스퇴르 피펫으로 흡입하여 수집할 수 있다. 이렇게 얻어진 세포 들을 SSF에 재현탁하여 원심분리시키고 (300 xg 10분간); 상등액을 제거하고 (세척 단계), 세포 펠릿을 10 %의 PBS와 함께 RPMI 1640 배지에 재현탁시켰다.

[0209] 6. 계수 및 생존력(viability) 연구

- [0210] 모든 세포 현탁액 중 세포 농도와 생존력을 블루 트리판 0.1 % 희석액 및 Neubauer 챔버 현미경 계수에 의해 측 정하였다. 살아있는 세포의 백분율을 염색 배제 능력에 의해 수립하였다. 세포 생존력이 95%를 상회할 때만 실험을 계속하였다.

[0211] 7. ELISA에 의한 혈청 시토카인의 정량

- [0212] 혈청 시토카인 농도를 증량하기 위해, 추출된 혈액을 항응고제 존재 및 부재 하에 튜브에 보관하였다 (각각 전주 정맥천자 및 동맥 카테테르에 의해 수집함) . 혈액을 실온의 실험실에서 응고시킨 다음, 원심분리(20분간 600xg)에 의해 혈청을 분리하였다. 상등액을 수집, 여과 및 분주하여 -70°C에서 보관하였다. 다음 표 2에 설명 된 시판되는 키트를 이용하여 여러가지 시토카인의 농도 분석을 실시하였다.

**표 2**

표 2.- 이 연구에 사용된 시판되는 ELISA 키트

	시토카인	상등액 중에서의 정량	PM (KDa)	회사
		감도 (pg/ml)		
[0213]	TNF-알파	3.83 pg/ml	17	Bender

- [0214] 상등액을 실온으로 해동시키고 플레이트 바닥에 이를 고정시킴으로써 각각의 항시토카인과 대면시키고 여러가지 기간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세척을 행하고 대응하는 회사에 의해 추천된 물질들을 첨가하여 상등액 중에 존재하는 시토카인의 양에 비례하는 방식으로 비색 반응시켰다. 효소-면역분석 판독기Multititer Plus (Tiertek Multiscan Plus, Flow Laboratories)를 이용하여 결과르 큰평가하였다. 이 결과들을 각 회사들이 제공하는 각각의 시토카인의 공지 농도로부터 얻어진 표준 곡선과 비교하였다.

[0215] 표준 곡선 및 후속적인 외삽 분석을 애플 매킨토시 컴퓨터를 이용하여 소프트웨어 Delta Soft II (버전 4.1) (Biometallics, Inc.)에 의해 수행하였다. 각각의 경우의 가용성 분자의 수를 산출하기 위해 시토카인 농도를 몰(molar)로 변환하였다.

[0216] 8. 면역-표현형 분석

[0217] 모노클로날 항체 피코에리쓰린-표지(PE)를 이용하는 단색의 직접 면역 형광 기술을 이용하였다. PE는 488 nm 레이저에서 여기가능한 형광 물질로서, 570 nm에서 발광하므로, 세포 유량계에 의해 용이하게 검출 및 식별가능하다. 표 1에 설명된 항체를 이용함으로써, 직접 표지를 수행하였다:

[0218] PBMC 라벨링: 이 공정은 96 웰의 V형 바닥 플레이트를 이용하는 라벨링으로 이루어진다. 각각의 웰에,  $5 \times 10^4$  세포를 넣고, 5분간 400 xg로 원심분리하였다. 세척 후, 세포들을 재현탁하고 5  $\mu$ l의 대응하는 모노클로날 항체를 첨가하였다. 세포들을 다시 재현탁하고 플레이트를 암실에서 20분간 4°C에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 150  $\mu$ l의 PBS를 첨가하고 2 차례 세척하였다. 마지막으로, 이를 150  $\mu$ l의 PBS에 재현탁시키고 세포계수기 튜브에 넣은 다음 최종 용량 0.3 ml가 되도록 PBS를 첨가하였다.

[0219] 계수는, 피코에리쓰린 형광 유발을 위해, 488 nm로 튜닝된 아르곤 레이저가 구비된 FACSCalibur 세포 유량계를 사용하였다. 형광 채널과 별도로 이 장비에는 사이즈 (FSC) 및 세포 복합성(SSC)과 관련한 정보도 제공되었다.

[0220] 음성 대조군으로서, 표지되지 않은 연구 세포 및 이 연구에 사용된 것 이외의 균등 이소타입의 모노클로날 항체로 표지된 다른 무관한 연구 세포를 사용하였다. (IgG1-FITC, PE y TC, IgG2a FITC, PE, TC).

[0221] 9. 세포 배양 및 기능 연구

[0222] 일반적인 배양 조건: 모든 세포 배양은 멸균된 1회용 재료를 이용하거나, 또는 에틸렌 옥사이드로 멸균된 재료 또는 멸균 장치로 멸균된 재료를 이용하여, 수직 라미나 플릭스 챔버 내에서 멸균 조건 하에 실시되었다. 배양 물을 37°C 스토브 중, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 상대 습도에서 배양하였다.

[0223]

[0224] 10. <sup>3</sup>[H]-티미딘을 이용한 증식 연구

[0225] 미토겐 자극에 직면하면, 임파구들은 배발생 및 세포분화 과정을 겪게 된다. 세포 증식을 정량하는데 사용된 방법은 <sup>3</sup>[H]-티미딘을 드 노보 합성된 DNA 내로 혼입시켜, 세포배양이 종결 및 수확되기 전에, 세포 배양 건조 추출물(여기에 삼중수소 염기가 첨가됨)로부터의 베타-방사량을 측정하는 분석법이었다. 증식 연구를 위해 실시된 다른 실험에서는, 여러 농도의 미토겐 존재 하에 정제된 세포 준비물을  $5 \times 10^4$  세포/웰 (200  $\mu$ l 최종 용량)의 농도의 96 웰 마이크로웰 평저 플레이트에서 인큐베이션시켰는데 이를 4일의 배양 기간 동안 3회 반복하였다.

[0226] 특정 자극에 대한 반응 여부는 연구된 세포 종류와 밀도 뿐만 아니라, 배양 시간과 미토겐 제제 농도에 의하여도 좌우되었다.

[0227] 세포 배양 종결 20 내지 24 시간 전에, 1 microCi <sup>3</sup>[H]-티미딘을 각각의 웰에 첨가하고; 특정 배양 하베스터를 이용하여 유리 필터를 통해 흡입함으로써 배양물을 수확하였다.

[0228] DNA 합성은 분당 카운트 (counts per minute :c.p.m.)로서 표현하였다. 각각의 분석은 3회 실시하였으며, 3회 실험 평균값이 10% 높은 가변성 있는 데이터는 폐기하였는데 이는, 이러한 데이터는 기술적 오차 또는 배양물의 오염을 가리키는 것일 수 있기 때문이다. 웰 당 일정량의 세포 및 200  $\mu$ l의 일정 용량으로 배양을 수행하였다. 모든 미토겐과 시토카인은 투여량 반응 곡선 및 시간-반응을 수행함으로써 먼저 테스트하였다.

[0229] 11. 정량적 다변수적 세포 유량계 (BD™ Cytometric Bead Array o CBA)에 의한 분석 측정 평가

[0230] 제조업자 지침에 따라 CBA 프로토콜을 실시하였다. 도 1에 요약된 바에 따라, 마이크로입자의 선별을 수행

하였다. 약간의 스펙트럼 중복을 나타내는 것들을 최종적으로 선택하였다.

[0231] 이 실험 개발에 이용된 각각의 시약의 카탈로그 번호와 배치 번호를 표 3과 표 4에 나타내었다. BD FACS Array Bioanalyser System (FACSArray, Becton Dickinson, San Jose CA, USA)를 이용하여 시료 상의 획득을 실시하고, PC 컴퓨터에서 소프트웨어 FCAP Array (Becton Dickinson)를 이용함으로써 결과 분석을 완료하였다.

[0232] 간단히 설명하면, 실험 프로토콜은 플레이트를 Wash Buffer로 예비세척하는 것으로 이루어졌다. 디캔팅 후, 포획 마이크로플레이트 혼합물을 보텍스에서 재현탁시켰다. 표품과 시료들을 적절한 희석 비율로 첨가하였다. 1 시간 동안 영구 교반 인큐베이션시킨 다음, PE 검출 시약을 첨가하고 실온에서 다시 2 시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후, 세포 유량계에서 획득(acquisition)을 실시하였다.

**표 3**

표 3. -키트 CBA 인간 가용성 단백질 Multiplex Flex Set System.

시약	N° 카탈로그	배치	
<u>마스터 버퍼 키트 500 테스트</u>	558265	95098	
분석용 희석제	51-90003992	86192	
포획용 비드 희석제	51-90003804	90262	
검출 시약 희석제	51-90003993	95811	
세척 완충액	51-90003798	85964	
Instrument Setup Bead A1	51-90003855	87987	
Instrument Setup Bead A9	51-90003858	95933	
Instrument Setup Bead F1	51-90003851	89231	
Instrument Setup Bead F9	51-90003854	94229	
PE Instrument Setup Bead F1	51-9005038	94498	
PE 양성 대조군 검출기	51-9005065	92154	
<u>CBA Flex Set Kits</u>			감도
IL-8 (A9)	558277	85109	1.2 pg/ml
IL-10 (B7)	558274	97196	0.13 pg/ml
TNF- $\alpha$ (D9)	558273	85106	0.7 pg/ml
IFN- $\gamma$ (E7)	558269	81562	1.8 pg/ml

[0233]

**표 4**

표 4. - Kit CBA Flex Set 디자인에 포함되는 시약 배치.

시약	표품	포획 마이크로입자	형광 시약 (PE)
IL-8 (A9)	84854	87670	77948
IL-10 (B7)	70333	96280	95934
TNF- $\alpha$ (D9)	65908	87667	77294
IFN- $\gamma$ (E7)	80390	87664	77136

[0234]

[0235]

통계 분석

[0236]

실험 테스트 결과를 평균 및 표준값으로서 제시하고 분포 유형에 따라 평균 오차를 평가하였다. 통계 분석을 위해, 분포 특성을 먼저, Shapiro-Whilk의 정규성 대조를 이용함으로써 분석하였다. 비교를 위해 Mann-Whitney U를 이용하여 비변수 대조를 실시하였다. 모든 경우에 있어서, 5 % 미만의 유의도 수준이 평가되었다( $p < 0.05$ ).

[0237]

통계 분석을 소프트웨어 SPSS 11.0 (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor. Chicago, Illinois 60606)를 이용하여 실시하였다.

[0238]

**Results 화합물 12의 면역 조절 효과에 미치는 연구 결과**

[0239]

건강한 지원자와 류마티스성 관절염을 앓고 있는 환자들의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 이용하여 수행한 TNF-알파, IFN-감마 및 기타 시토카인들의 생산에 미치는 화합물 12의 면역 조절 효과.

[0240]

실시예 6. TNF-알파 생산에 미치는 화합물 12의 효과

[0241]

LPS 존재 또는 부재 하에서 건강한 지원자들의 PBMC에 의한 TNF-알파 생산에 미치는 화합물 12의 효과를 먼저 조사하였다. 10명의 건강한 지원자로부터의 PBMC ( $5 \times 10^4$  세포/웰,  $200 \mu\text{l}$ )를, 24 시간 동안 LPS (10microg/ml; E. coli LPS 0111:B4 strain InvivoGene, San Diego CA92121 USA)의 존재 및 부재 하에, 소 태아 혈청 (origin USA, Gibco ref. 26140-079)이 강화되고 용매 농도  $10^{-6}$  M 단독 또는  $10^{-6}$  M 또는  $10^{-7}$  M의 화합물 12가 보강된 완전 배지 (글루타민 Cat BE-12-70F이 함유된 RPMI-1640, Cambrex Biosciences, B4880 Verviers, Belgium)에서, 조직 배양 플레이트, 96 웰, 저증발 리드가 구비된 평저 플레이트 (353072 Falcon, Becton Dickinson labware, Franklin Lakes, USA, 07417-1886 NJ)에서 배양하였다. 배양물 상등액을  $-20^\circ\text{C}$ 로 냉동하고 TNF-알파의 농도를 ELISA 중-중 (중양 피사 인자-알파의 정량적 검출을 위한 효소 결합 면역흡착분석법: 인간 TNF-알파 ELISA BM S223/4TEUCE, Bender Med System Inc, Burlinghane CA 94010)을 이용하여 정량화시켰다.

[0242]

도 2는 화합물 12가 배양물 중에  $10^{-6}$  M 및  $10^{-7}$  M의 농도로 존재하자, LPS-자극된 PBMC ( $p < 0.05$ )의 배양 상등액에서 정량된 바와 같이, 통계적으로 유의적인 방식으로 TNF-알파의 농도가 감소되었음을 보여준다. 뿐만 아니라, 화합물 12는,  $10^{-6}$  M에서도 PBMC에 의하여 자연적인 TNF-알파 생산량도 저감시켰다.

**표 5**

표 5. - 건강한 지원자에 의한 TNF-알파 생산. 결과는 분비된 시토카인의 중간값 (median) ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=10	건강한 지원자로부터의 PBMC 중의 TNF-알파 생산량 (pg/mL)		
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
배지	1118.00±800.00	<b>551.60±324.17</b> (0.009)	1121.00±100.48 (0.114)
LPS (10µg/ml)	3084.63±450.00	<b>1064.91±52.82</b> (0.005)	<b>1938.00±487.74</b> (0.028)

[0243]

[0244]

모노클로날 항체 항CD3 및 항CD2의 조합을 이용한 임파구 활성화 또는 LPS를 LPS를 after monocyte stimulation with either LPS 또는 lymphocyte activation 이용한 단핵세포 자극 후에, PBMC에 의한 시토카인 패널의 생성에 미치는 화합물 12의 면역 조절 효과를 추가로 특징화하였다. 이 연구는 건강한 지원자 및 류마티스성 관절염 환자로부터 수득된 PBMC 배양체 중 화합물 12의 적정 투여량의 존재 또는 부재 하에 실시되었다.

[0245]

13 명의 건강한 지원자로부터 수득한 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도(10<sup>-6</sup> M), 또는 10<sup>-6</sup> M 및 10<sup>-7</sup> M 화합물 12이 보강된 200 µl의 완전 배지 중에서 LPS (10 µg/ml) 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을 -20°C로 냉동하고 표시된 시토카인 농도의 동시 분석을 위한 특이 시약을 이용함으로써 (CBA Flex Multiplex Set (BD Cytometric Bead Array, CBA: IL-8, IL-10, TNF-알파 및 IFN-감마 Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego CA 92121) BD FACS Array Bioanalyzer (BD Biosciences Cat No. 340128, San Diego CA 92121)에 의한 정량화를 실시하였다.

[0246]

배양물 중 화합물 12가 10<sup>-6</sup> M 및 10<sup>-7</sup> M의 농도로 존재하자 LPS로 자극된 건강한 지원자의 PBMC에 의한 TNF-알파 생산량이 통계적으로 유의적인 방식 (p<0.05)으로 감소하였다 (도 3). 이와 반대로, 모노클로날 항체 항CD3 및 항CD28에 의해 자극된 PBMC에 의한 TNF-알파 분비량과 자연발생적인 것 (외래 자극 부재시 관찰되는 값)은 어느 것도 화합물 12에 의해 변경되지 않았다.

**표 6**

표 6. - 건강한 지원자에 의한 TNF-알파 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=13	건강한 지원자로부터의 PBMC 중의 TNF-알파 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	163.84±30.00	148.31±50.00 (0.422)	197.81±40.00 (0.249)	168.49±16.00 (0.65)
LPS (10µg/ml)	923.93±160.00	<b>602.12±100.00</b> (0.002)	<b>746.84±125.00</b> (0.046)	<b>738.81±100.00</b> (0.055)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	435.81±60.00	334.21±63.00 (0.116)	404.11±97.00 (0.753)	355.62±65.00 (0.422)

[0247]

[0248]

또 다른 실험에서, 류마티스성 관절염을 앓는 7명의 환자로부터의 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최

고 용매 농도( $10^{-6}$  M), 및  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M 및  $10^{-8}$  M 화합물 12가 보강된 200  $\mu$ l의 완전 배지 중에서 LPS (10  $\mu$ g/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml) (Orthoclone OKT3, Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan NJ, USA) + 항CD28 ( $1/3 \times 10^5$ ) (Clon 15E8, Menarini, Madrid, Spain)의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉동하고, 제조업자 지침에 따라, 상기 시토카인 농도를 측정하는데 특이적인 CBA Flex Set (Becton Dickinson)를 이용하여, BD FACS Array Bioanalyser에 의해 TNF-알파의 농도를 정량하였다.

[0249] 류마티스성 관절염 환자의 LPS-자극된 PBMC에서는, TNF-알파의 생산이  $10^{-6}$  M 농도의 화합물 12에 의해 유의적으로 억제되었다 ( $p < 0.05$ ) (도 4). 배양물 중에 화합물 12가 존재하여도, 자연발생적인 TNF-알파 생산과, 류마티스성 관절염 환자의 PBMC에서 항CD3 및 항CD28 모노클로날 항체로 자극 후 얻어진 TNF-알파의 생산은 억제되지 않았다.

**표 7**

표 7. - 류마티스성 관절염 환자에 의한 TNF-알파 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값  $\pm$  표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=7	류마티스성 관절염 환자의 PBMC 에서의 TNF-알파의 생산 (pg/ml)			
	비히클	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M
배지	100.64 $\pm$ 40.00	177.32 $\pm$ 95.00 (0.735)	191.33 $\pm$ 80.00 (0.735)	131.95 $\pm$ 85.00 (0.735)
LPS (10 $\mu$ g/ml)	700.39 $\pm$ 180.00	<b>383.75<math>\pm</math>75.00</b> (0.05)	626.57 $\pm$ 150.00 (0.237)	683.40 $\pm$ 120.00 (0.499)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 ( $1/3 \times 10^5$ )	648.72 $\pm$ 90.00	532.07 $\pm$ 80.00 (0.31)	568.47 $\pm$ 97.00 (0.612)	695.81 $\pm$ 79.00 (0.398)

[0250]

[0251] 실시예 7. IFN-감마의 생산에 미치는 화합물 12의 효과

[0252] 13명의 건강한 지원자로부터의 PBMC ( $5 \times 10^4$  세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도( $10^{-6}$  M), 및  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M 및  $10^{-8}$  M의 화합물 12가 보강된 200  $\mu$ l의 완전 배지 중에서 LPS (10  $\mu$ g/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml) + 항CD28 ( $1/3 \times 10^5$ )의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉동하고, 제조업자 지침에 따라, IFN-감마의 농도를 측정하는데 특이적인 CBA Flex Set (Becton Dickinson)를 이용하여, BD FACS Array Bioanalyser에 의해 IFN-감마의 농도를 정량하였다.

[0253] 화합물 12는  $10^{-6}$  M 농도에서 모노클로날 항체 항CD3과 항CD28로 자극되거나 LPS-로 자극된 건강한 지원자로부터의 PBMC에 의한 TNF-알파의 생산을 유의적으로 억제하였다 ( $p < 0.05$ ) (도 5).

**표 8**

5 표 8. - 류마티스성 관절염 환자에 의한 IFN-감마 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=13	건강한 지원자로부터의 PBMC 중의 IFN-감마의 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	283.78±90.00	189.72±40.00 (0.279)	296.28±90.00 (0.807)	279.16±60.00 (0.807)
LPS (10µg/ml)	860.42±105.00	<b>649.61±120.00</b> <b>(0.011)</b>	919.53±130.00 (0.552)	1049.85±230.00 (0.382)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	11802.22±1300.00	<b>7927.17±1003.00</b> <b>(0.019)</b>	11552.08±1600.00 (0.917)	10254.66±1500.00 (0.196)

[0254]

[0255] 건강한 지원자로부터의 PBMC에 의한 IFN-감마의 자연발생적 분비는 화합물 12에 의해 변형되지 않았다.

[0256] 류마티스성 관절염을 앓는 8명의 환자로부터의 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도(10<sup>-6</sup> M), 및 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup> M의 화합물 12가 보강된 200 µl의 완전 배지 중에서 LPS (10 µg/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml)+ 항CD28 (1/3x10<sup>5</sup>)의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을 -20℃로 냉동하고, 제조업자 지침에 따라, IFN-감마의 농도를 측정하는데 특이적인 CBA Flex Set (Becton Dickinson)를 이용하여, BD FACS Array Bioanalyser에 의해 IFN-감마의 농도를 정량하였다.

[0257] 화합물 12의 존재는 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup> M의 농도에서 모노클로날 항체 항CD3과 항CD28로 자극된 건강한 류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC에 의한 IFN-감마의 생산을 유의적으로 감소시켰다 (p<0.05) (도 6). 화합물 12는 그러나 건강한 지원자로부터의 PBMC에 의하여 유도된 LPC 또는 자연발생적인 IFN-감마 분비는 변형시키지 못하였다.

**표 9**

표 9. - 류마티스성 관절염 환자에 의한 TNF-알파 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=8	류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC 에서의 IFN-감마의 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	145.49±28.00	193.68±45.00 (0.779)	203.72±50.00 (0.208)	235.10±60.00 (0.674)
LPS (10µg/ml)	461.14±85.00	205.26±46.00 (0.484)	146.50±33.00 (0.208)	248.73±35.00 (0.889)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	8406.18±1000.00	<b>5115.27±600.00</b> <b>(0.05)</b>	<b>6411.71±700.00</b> <b>(0.05)</b>	<b>7122.07±950</b> <b>(0.017)</b>

[0258]

[0259] 실시예 8. 인터류킨 8 (IL-8) 생산에 미치는 화합물 12의 효과.

[0260] 건강한 지원자로부터의 PBMC에 의한 IL-8의 생산에 미치는 화합물 12의 효과를 LPS 자극 및, 모노클로날 항체 항CD3 및 항CD28 존재 및 부재 하에 추가 조사하였다. 13명의 건강한 지원자로부터의 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도(10<sup>-6</sup> M), 및 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup> M의 화합물 12가 보강된 200 µl의 완전 배지

중에서 LPS (10 µg/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml)+ 항CD28 (1/3x10<sup>5</sup>)의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을 -20℃로 냉동하고, 제조업자 지침에 따라, IL-8의 농도를 측정하는데 특이적인 CBA Flex Set를 이용하여, BD FACS Array Bioanalyser에 의해 IL-8의 농도를 정량하였다.

[0261] 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup>의 농도에서, 화합물 12는 IL-8의 자연발생적 생산을 유의적으로 억제하였다 (p< 0.05) (도 7). 10<sup>-7</sup> 및 10<sup>-8</sup> M 농도의 화합물 12는 모노클로날 항체 항CD3 및 항CD28에 의해 유도된 IL-8 생산을 유의적으로 억제하였다. 그럼에도 불구하고, PBMC의 LPS 자극 하에서는 IL-8 생산에 아무런 영향도 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

**표 10**

표 10. - 건강한 지원자에 의한 IL-8 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

10

n=13	건강한 지원자로부터의 PBMC 에 의한 IL-8 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	72814.17±10647.16	<b>45634.31±6311.13</b> (0.016)	<b>53732.66±7952.75</b> (0.006)	57773.60±6667.57 (0.087)
LPS (10µg/ml)	173877.36±8474.49	168467.15±9656.96 (0.807)	162075.59±10258.41 (0.249)	169609.11±9060.90 (0.861)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	107008.56±8351.21	99779.72±20000 (0.311)	<b>97968.61±10220.21</b> (0.055)	<b>92989.29±8463.47</b> (0.028)

[0262]

[0263] 류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC에 의한 IL-8 생산에 미치는 효과도 연구하였다. 8명의 류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도(10<sup>-6</sup> M), 및 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup> M의 화합물 12가 보강된 200 µl의 완전 배지 중에서 LPS (10 µg/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml)+ 항CD28 (1/3x10<sup>5</sup>)의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을 -20℃로 냉동하고, 제조업자 지침에 따라, IL-8의 농도를 측정하는데 특이적인 CBA Flex Set를 이용하여, BD FACS Array Bioanalyser에 의해 IL-8의 농도를 정량하였다.

[0264] 10<sup>-6</sup> M 및 10<sup>-8</sup>의 농도로, 화합물 12이 존재할 경우, 류마티스성 관절염 환자의 PBMC중의 IL-8의 LPS-유도형 생산량은 현저히 변형된 반면, 자연발생적인 IL-8 생산량과 모노클로날 항체 항CD3 및 항CD28의 조합에 의해 유도된 생산량은 전혀 변형되지 않았다 (도 8). 이들 결과들 모두는 화합물 12에 의한 IL-8 조절 또는 변형이 흥미롭게도, 건강한 사람과 정의된 질병을 갖는 환자의 구별되는 조건 하에서 구별되는 변형 패턴을 나타내는 것일 수 있음을 보여주는 것이다.

**표 11**

표 11. - 류마티스성 관절염 환자에 의한 IL-8 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

10

n=8	류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC 에서의 IL-8 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	57877.64±11143.52	98012.08±8395.97 (0.208)	96498.50±10784.62 (0.161)	93977.67±9247.38 (0.123)
LPS (10µg/ml)	150759.65±22966.06	<b>185536.78±22000.00</b> (0.012)	174156.23±13385.66 (0.208)	<b>184541.37±21500.00</b> (0.012)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	118017.97±21116.00	124576.09±14605.02 (0.263)	109607.00±18310.15 (0.889)	121587.88±16117.25 (0.575)

[0265]

- [0266] 실시예 9. 인터류킨 10(IL-10) 생산에 미치는 화합물 12의 효과.
- [0267] 건강한 지원자 및 류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC에 의한 IL-10 생산에 미치는 화합물 12의 효과를 LPS 자극 및 모노클로날 항체 항CD3 및 항CD28의 조합의 존재 또는 부재 하에 조사하였다. 13 명의 건강한 지원자로부터의 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도(10<sup>-6</sup> M), 및 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup> M의 화합물 12가 보강된 200 μl의 완전 배지 중에서 LPS (10 μg/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml)+ 항CD28 (1/3x10<sup>5</sup>)의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다.
- [0268] 한편으로, 류마티스성 관절염 환자 8명으로부터의 PBMC (5 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)를 24 시간 동안, 최고 용매 농도(10<sup>-6</sup> M), 및 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M 및 10<sup>-8</sup> M의 화합물 12가 보강된 200 μl의 완전 배지 중에서 LPS (10 μg/ml) 또는 항CD3 (12.5ng/ml)+ 항CD28 (1/3x10<sup>5</sup>)의 존재 또는 부재 하에 2회 배양하였다. 배양 상등액을 -20℃로 냉동하고, 제조업자 지침에 따라, IL-10의 농도를 측정하는데 특이적인 CBA Flex Set를 이용하여, BD FACS Array Bioanalyser에 의해 IL-10의 농도를 정량하였다.
- [0269] 화합물 12는 두가지 모두의 연구된 자극의 존재 및 부재 하에서 건강한 지지지원자로부터의 PBMC에 의한 IL-10 생산에 아무런 영향을 미치지 않았다 (도 9). 그러나, 화합물 12가 배양물 중에 10<sup>-8</sup>의 농도로 존재할 경우, 류마티스 관절염 환자로부터의 PBMC의 LPS에 의한 자극 후, IL-10 생산량이 유의적으로 상향조절되었다 (p < 0.05). 화합물 12는 IL-10의 자연발생적 생산이나, 류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC에 의한 모노클로날 항체 항CD3 및 항CD28를 이용한 자극 후에는 아무런 유의적인 영향을 미치지 않았다(도 10).

**표 12**

표 12. - 건강한 지원자에 의한 IL-10 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=13	건강한 지원자로부터의 PBMC 에 의한 IL-10 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	490.46±87.16	559.06±112.20 (0.753)	609.10±108.74 (0.701)	578.66±106.20 (0.861)
LPS (10μg/ml)	2342.20±384.02	2420.68±455.50 (0.507)	2392.99±427.86 (0.507)	2389.63±366.01 (0.701)
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	1042.64±162.36	1239.47±251.24 (0.507)	1132.69±213.32 (0.382)	1122.51±211.03 (0.507)

[0270]

**표 13**

표 13. - 류마티스성 관절염 환자에 의한 IL-10 생산. 결과는 분비된 시토카인의 평균값 ± 표준오차 값으로서 표시한다. 통계적으로 유의적인 결과는 굵은 문자로 나타내었으며, 이들의 대응하는 p 값 (각 실험 조건에 있어서 비히클과 관련된 데이터)은 괄호 안에 나타내었다.

n=8	류마티스성 관절염 환자로부터의 PBMC 에서의 IL-10 생산량 (pg/mL)			
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
배지	452.69±107.47	682.50±113.65 (0.674)	798.92±144.46 (0.401)	468.14±65.80 (0.263)
LPS (10μg/ml)	2388.64±300.00	2787.12±416.91 (0.069)	2597.85±513.19 (0.327)	<b>3000.00±400.00</b> <b>(0.025)</b>
항 CD3 (12.5 ng/ml) + 항 CD28 (1/3x10 <sup>5</sup> )	836.39±189.09	976.96±187.99 (0.484)	805.41±141.23 (1.000)	872.06±150.87 (0.674)

[0271]

- [0272] 면역계 세포에 미치는 화합물 12의 기타 효과
- [0273] 실시예 10. PBMC의 증식성 반응에 미치는 화합물 12의 효과.
- [0274] 건강한 지원자 (n=8)로부터의 PBMC의 증식성 반응에 미치는 화합물 12의 효과를 피토헤마글루티닌 (PHA) 10 μg/ml; PHA 2 μg/ml 플러스 외인성 IL-2 보강(25 IU/ml), 및 모노클로날 항체 항CD3 (12.5 ng/ml) 및 항CD28 (1:320.000)의 조합을 이용한 자극의 존재 또는 부재 하에 조사하였다.
- [0275] PBMC를 완전 배양 배지 중, 37°C, 및 5% CO<sub>2</sub> 분위기 (세포 인큐베이터 HERA 세포 150, ThermoScientific, Thermoelectron, 63505 Lagenselbold, GE)에서 4일간 배양하였다. 배양 자극 조건은 피토헤마글루티닌 (PHA Sigma Ref δL-8902, Madrid, Spain), 10 μg/ml; PHA 2 μg/ml with 외인성 IL-2 보강 (25 IU/ml, 인간 재조합 IL-2, Macrolin, Chiron Iberca, 배치 δSA753228/4, Madrid, Spain) 및 모노클로날 항체 항CD3 (12.5 ng/ml) + 항CD28 (1:320.000)의 존재 또는 부재였다. 메틸-<sup>3</sup>H-티미딘을 배양 마지막 8 시간 동안 첨가하였다 (American Radiochemical 60 Ci/mmol 메틸-<sup>3</sup>H-티미딘, ITISA, Madrid, Spain). 세포들을 유리 섬유막에서 수확하여 섬광 배지 (1450-441 Meltilex A, de Wallac Oy, Ref δ 1450-441)로 옮겼다. DNA-혼입 방사능량을 베타 입자 계수기 Wallac Oy를 이용하여 측정하였다. PBMC에 미치는 연구 분자의 가능한 미토겐 직접 작용을 검출 및 정량하기 위해, 아무런 시그널 없이, 배지 존재 하에, 세포 배양체의 밀도와 형태학과 관련하여, 배지의 세포 생존력의 대조군으로서, 이들을 현미경 (Zeiss Axiovert 40CFL, Karl Zeiss Microimagen GmbH, Goettingen, Germany) 관찰하고, 인큐베이션 후 세포 생존력을 평가하였다.
- [0276] 배양물 중 화합물 12가 존재하여도 여러가지 연구된 미토겐성 자극의 존재 및 부재하에서 건강한 지원자들로부터의 PBMC의 증식성 반응이 유의적으로 변형되지는 않았다 (도 11a 및 11b).
- [0277] 실시예 11. PBMC에 의한 CD62L의 웨딩에 미치는 화합물 12의 효과
- [0278] 건강한 지원자로부터의 PBMC의 임파구 및 단핵세포에서의 CD62L의 웨딩에 미치는 화합물 12의 효과를 조사하였다.
- [0279] 10<sup>-6</sup> M 농도의 화합물 12의 존재 하에, CD62L 웨딩 (CD62L - 피코에리스린 (PE), 클론 BD SK11 Cat No. 341012, BD Biosciences)은 유의적으로 증가한다 (p< 0.05). 이것은 임파구에서 선택적으로 일어나는 CD62L의 웨딩 후 검출된 CD62L-PE 라벨링의 기하학적 평균 형광 강도 (MFI)는 감소시켰으나, 단핵 세포에서는 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (도 12a 및 12b).

**표 14**

표 14. - 임파구에서의 표면 CD62L 발현의 평균 형광 강도. p 값은 각 실험 조건과 관련된 비히클에 대한 데이터에 상응한다.

n=10	임파구 (평균값 + 표준오차)/통계학적 유의성		
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
MFI (p)	112.68±13.57	90.01±8.93 (0.47)	116.90±11.02 (0.333)

[0280]

표 15

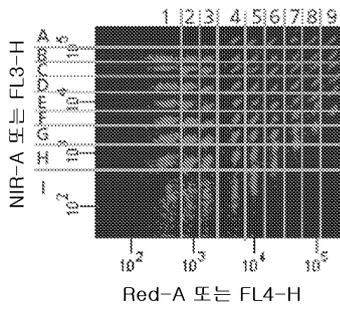
표 15. - 임파구에서의 표면 CD62L 발현의 평균 형광 강도. p 값은 각 실험 조건과 관련된 비히클에 대한 데이터에 상응한다.

n=10	단핵세포 (평균값 + 표준오차)/통계학적 유의성		
	비히클	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
MFI (p)	65.34±8.06	63.90±8.52 (0.721)	72.30±10.21 (0.878)

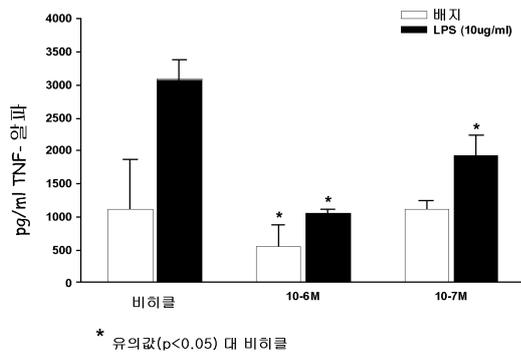
[0281]

도면

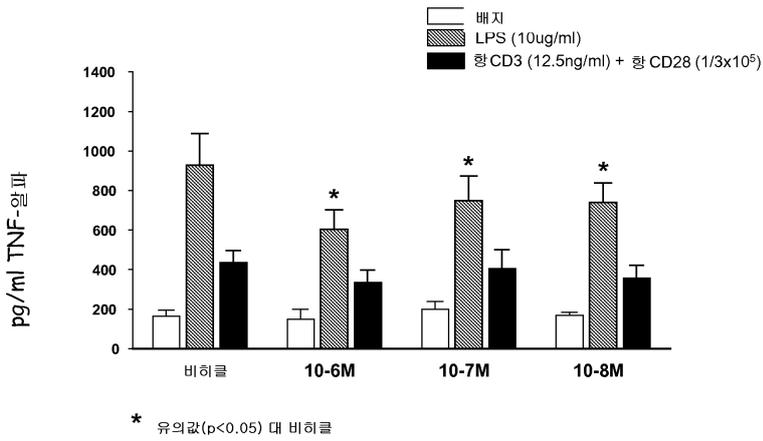
도면1



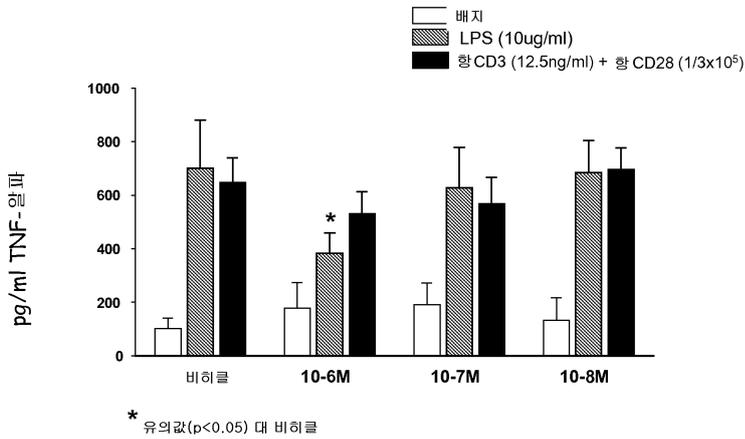
도면2



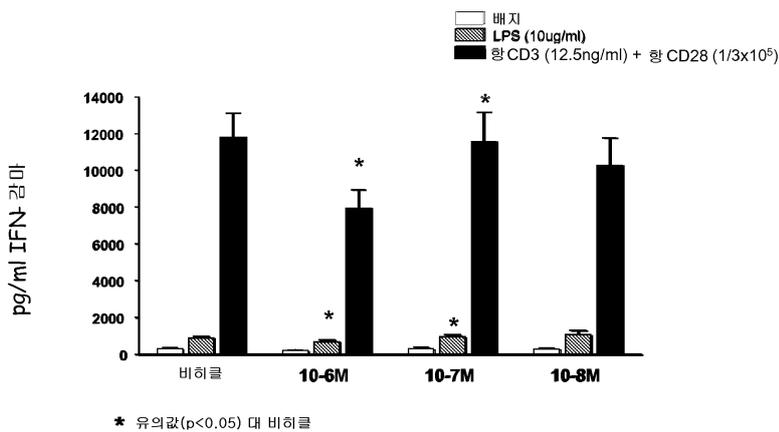
도면3



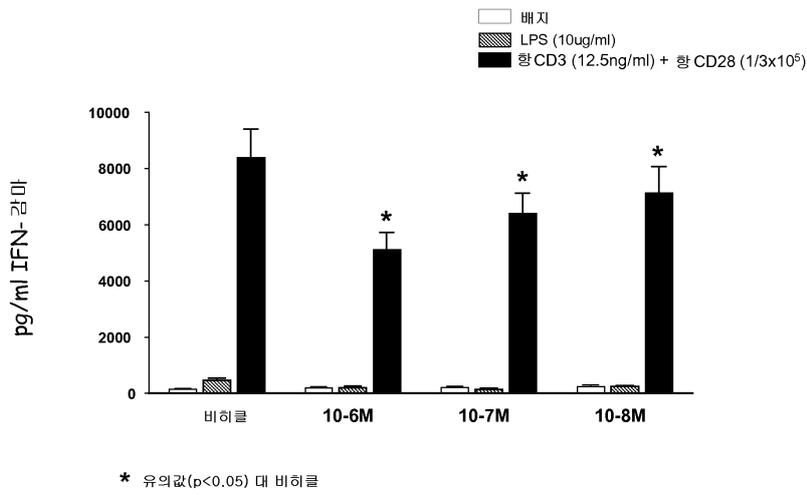
도면4



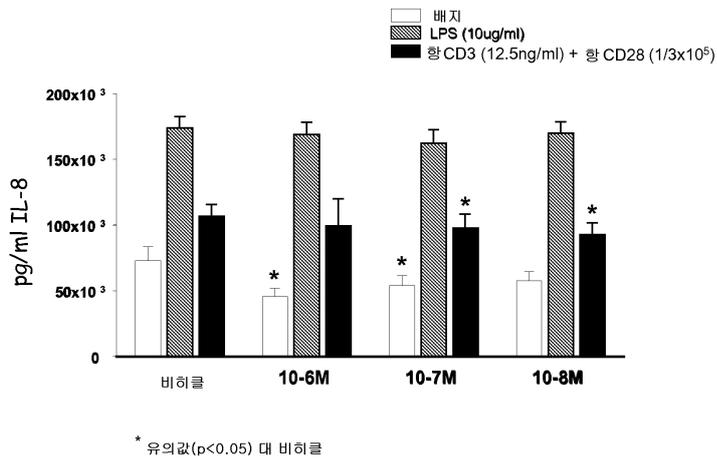
도면5



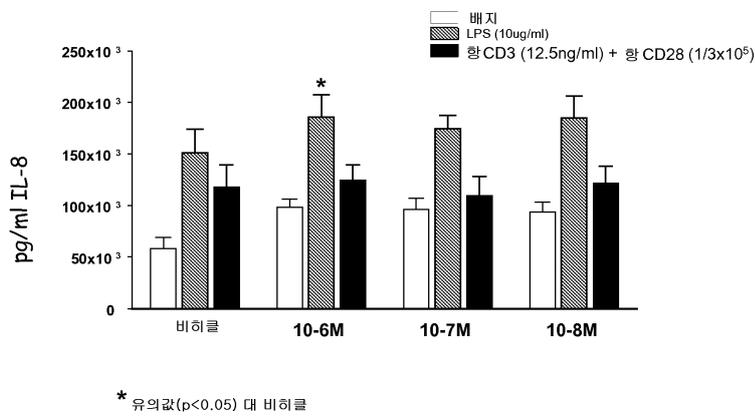
도면6



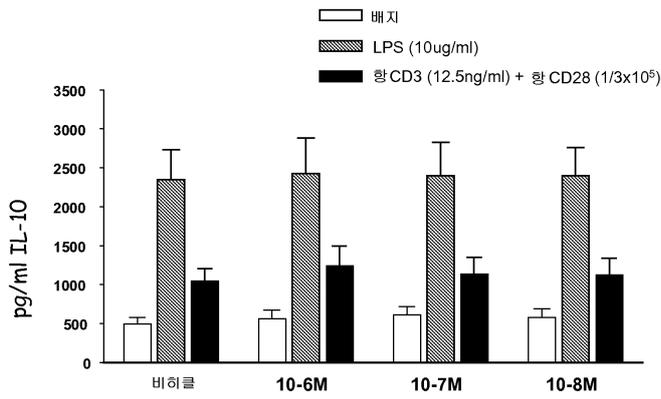
도면7



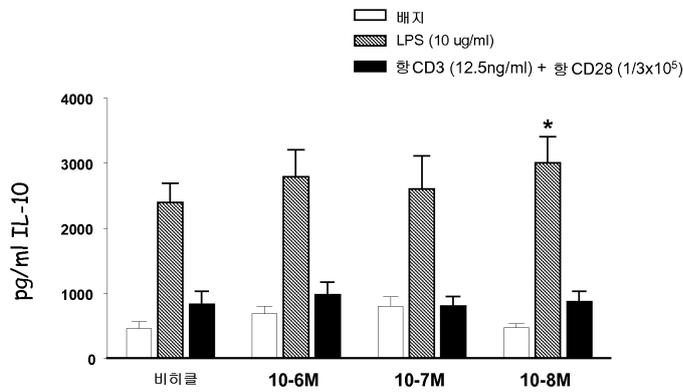
도면8



도면9

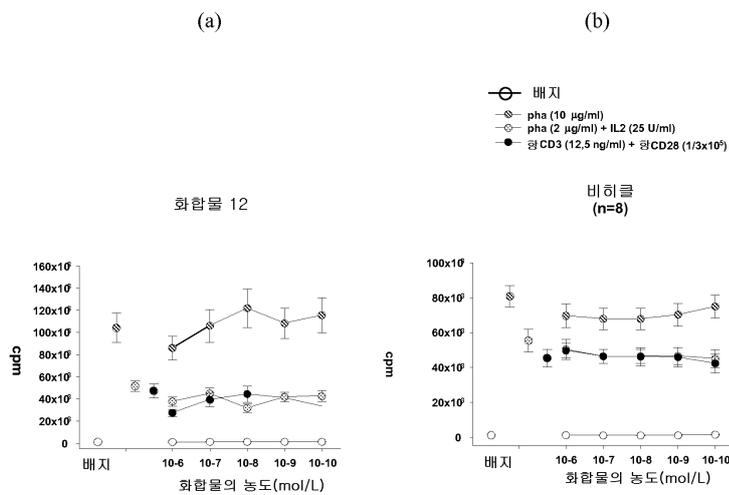


도면10

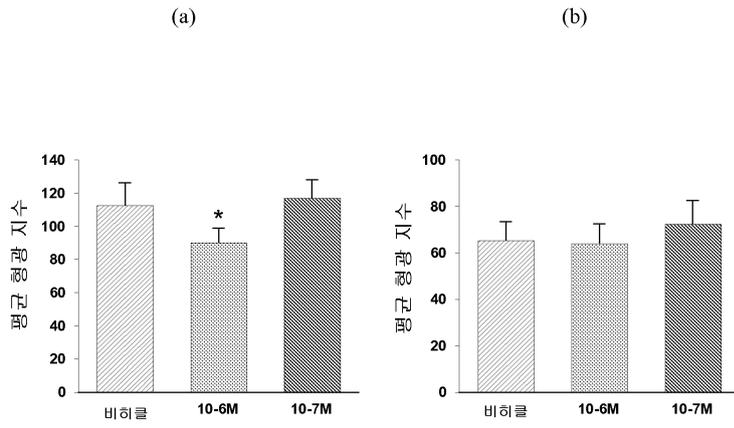


\* 유의값(p<0.05) 대 비히클

도면11



도면12



\* 유의값( $p < 0.05$ ) 대 비히클