



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월02일  
(11) 등록번호 10-2653821  
(24) 등록일자 2024년03월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07D 405/14 (2006.01) A61K 31/4196 (2006.01)  
A61K 31/496 (2024.01) A61K 45/06 (2006.01)  
A61P 31/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07D 405/14 (2013.01)  
A61K 31/4196 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7033395  
(22) 출원일자(국제) 2016년05월20일  
심사청구일자 2021년05월18일
- (85) 번역문제출일자 2017년11월17일  
(65) 공개번호 10-2018-0010189  
(43) 공개일자 2018년01월30일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2016/051467  
(87) 국제공개번호 WO 2016/185225  
국제공개일자 2016년11월24일
- (30) 우선권주장  
15168637.5 2015년05월21일  
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌  
W02013036866 A1
- (73) 특허권자  
폴모사이드 리미티드  
영국, 런던 더블유씨2알 1비에이치, 265  
스트랜드, 커빙턴 앤드 벌링 엘엘피 내
- (72) 발명자  
폴리 토마스 크리스토퍼  
영국, 런던 더블유씨2알 1비에이치, 265  
스트랜드, 커빙턴 앤드 벌링 엘엘피, 폴모사이드  
리미티드 내  
이토 카즈히로  
영국, 런던 더블유씨2알 1비에이치, 265  
스트랜드, 커빙턴 앤드 벌링 엘엘피, 폴모사이드  
리미티드 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 20 항

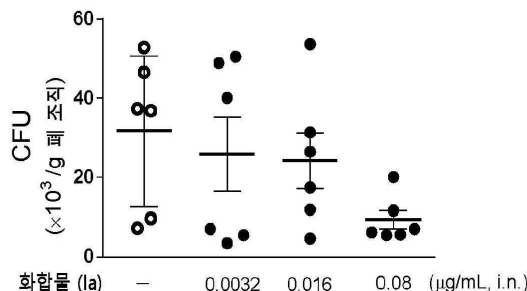
심사관 : 이기철

(54) 발명의 명칭 항진균성 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-N-(2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

(57) 요약

본 발명은 진균증 치료에 유용한 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물, 이를 함유하는 조성물 및 요법에서의 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 31/496** (2024.01)

**A61K 45/06** (2013.01)

**A61P 31/10** (2018.01)

**A61K 2300/00** (2023.05)

(72) 발명자

**스트롱 피터**

영국, 런던 더블유씨2알 1비에이치, 265 스트랜드,  
커빙턴 앤드 벌링 엘엘피, 폴모사이드 리미티드 내

**스노세 미히로**

영국, 노팅엄 노팅엄셔 엔지1 1지에프, 페니풋 스트리트,  
바이오시티 노팅엄, 시그네처 디스커버리 리미티드 내

**매콘빌 매튜**

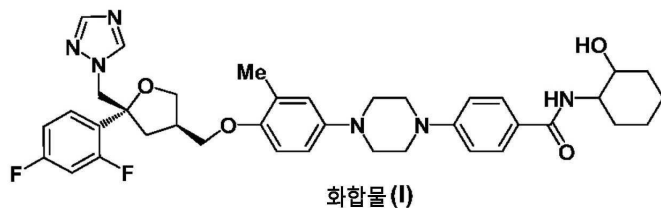
영국, 노팅엄 노팅엄셔 엔지1 1지에프, 페니풋 스트리트,  
바이오시티 노팅엄, 시그네처 디스커버리 리미티드 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

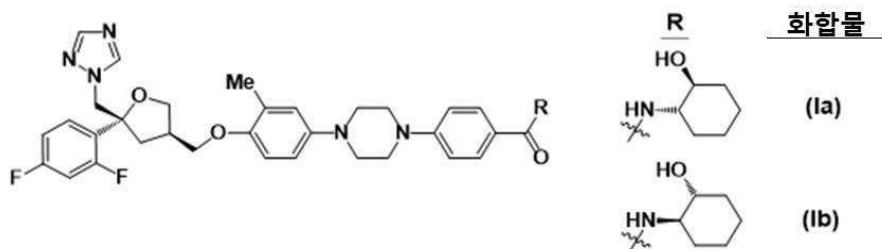
4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-*N*-(2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드인 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:



#### 청구항 2

제1항에 있어서,

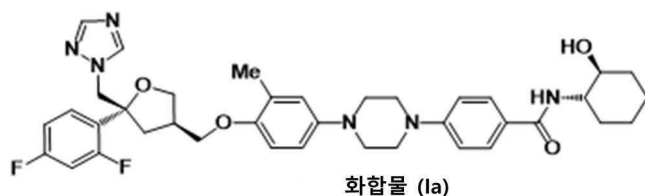
화합물 (Ia) 및 (Ib) 중에서 선택된 입체이성질체 또는 이들 중 어느 하나의 약학적으로 허용가능한 염 형태인, 화합물:



#### 청구항 3

제2항에 있어서,

4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-*N*-(2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드인 하기 화학식 (Ia)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인, 화합물:



#### 청구항 4

제1항에 있어서,

단일 입체이성질체로 제공되는 것인, 화합물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,  
제약으로 사용하기 위한 것인, 화합물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,  
진균증의 치료 또는 진균증과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것인, 화합물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,  
진균증이 아스페르길루스 종에 기인한 것인, 화합물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,  
아스페르길루스 종이, 아스페르길루스 푸미가투스 또는 아스페르길루스 플라부스인, 화합물.

#### 청구항 9

제6항에 있어서,  
진균증이 아우레오바시디움 폴루란스, 리조푸스 오리자에, 크립토코쿠스 네오포르만스, 차에토미움 글로보숨, 페니실리움 크리스제눔, 푸사리움 그라미네라룸, 클라도스포리움 헤르바룸, 트리코피톤 루브룸 또는 칸디다 종에 기인한 것인, 화합물.

#### 청구항 10

제6항에 있어서,  
진균증이 아졸 내성 진균증인, 화합물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,  
제2 또는 추가 활성 성분과 함께 제약으로 사용하기 위한 것인, 화합물.

#### 청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 임의로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체와 함께 포함하는, 진균증의 치료 또는 진균증과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,  
제2 또는 추가 활성 성분을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제11항에 있어서,  
제2 또는 추가 활성 성분이 항진균제, 암포테리신 B, 에키노칸딘 및 3-하이드록시-3-메틸-글루타릴-CoA 리덕타아제의 억제제 중에서 선택되는 것인, 화합물.

#### 청구항 15

제13항에 있어서,

제2 또는 추가 활성 성분이 항진균제, 암포테리신 B, 에키노칸딘 및 3-하이드록시-3-메틸-글루타릴-CoA 리덕타아제의 억제제 중에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 16

제11항에 있어서,

제2 또는 추가 활성 성분이 보리코나졸, 포사코나졸, 이트라코나졸 및 카스포푼진 중에서 선택되는 것인, 화합물.

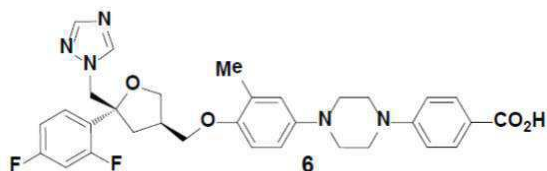
#### 청구항 17

제13항에 있어서,

제2 또는 추가 활성 성분이 보리코나졸, 포사코나졸, 이트라코나졸 및 카스포푼진 중에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

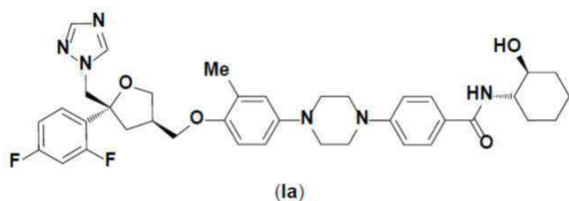
#### 청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조 방법으로서, 하기 화학식 (6)의 화합물 또는 이의 염을 2-아미노사이클로헥사놀 또는 이의 염과 반응시키는 것을 포함하는, 방법:

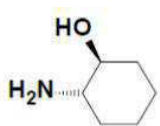


#### 청구항 19

제18항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물이 화학식 (Ia)의 화합물이고,

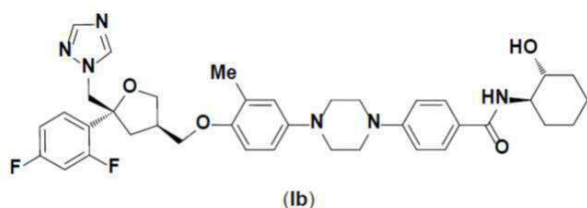


2-아미노사이클로헥사놀이 (1S,2S)-2-아미노사이클로헥사놀 또는 이의 염인, 방법:

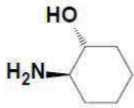


#### 청구항 20

제18항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물이 화학식 (Ib)의 화합물이고,



2-아미노사이클로헥사놀이 (1R,2R)-2-아미노사이클로헥사놀 또는 이의 염인, 방법:



## 청구항 21

삭제

## 청구항 22

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 진균증 (mycoses)의 치료에 유용한 화합물, 이를 함유하는 조성물 및 요법에서의 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 지난 20년간 진균 감염의 발생율은 실질적으로 증가되어 왔으며, 이의 침습적 형태는, 특히, 면역손상되거나 면역억제된 환자에서의 이환율 및 사망률의 주 원인이다. 파종성 칸디다증 (disseminated candidiasis), 폐 아스페르길루스증 (pulmonary aspergillosis), 및 신생 기회감염 곰팡이 (opportunistic fungi)는 심각한 진균증을 발생시키는 가장 흔한 감염원이다. 진균의 독특한 특징은, 서로 결합하여 이들의 시험관내 또는 생체내 기질에 부착하게 하는 세포외 기질 (ECM)을 생성할 수 있다는 것이다. 이러한 균막 (biofilm)은 숙주 면역계의 적대적 환경으로부터 이들을 보호하고 항균성 살해에 저항하도록 한다 [참조: **Kaur and Singh**, 2013].

[0003] 폐 아스페르길루스증은 비-침습성 질환을 앓는 환자 대 침습성 병증을 앓는 환자로 세분화될 수 있다. 이는, 아스페르길루스증에 대한 알리지 요인이 없는 환자와 비교하여 알리지 요인을 드러내는 환자 (ABPA로 알려짐: 알레르기성 기관지 폐 아스페르길루스증)를 규정하기 위하여 추가로 세분화된다. 폐 아스페르길루스증을 촉발하는 요인은, 예를 들어, 고용량의 면역-억제성 약물에 노출되거나 중환자실에서의 삽관 경험과 같이, 급성일 수 있다. 대안적으로, 이는 이전의 TB 감염 병력과 같이, 만성일 수 있다 [참조: **Denning et al.**, 2011a]. 아스페르길루스로 인한 만성 폐 감염은, 환자에서 경구 아졸 약물을 사용한 평생 치료를 필요로 하는 광범위하고 영구적인 폐 손상을 일으킬 수 있다 [참조: **Limper et al.**, 2011].

[0004] 아스페르길루스 감염이 임상 천식에 중요한 역할을 할 수 있다고 제시하는 연구 결과가 늘어나고 있다 [참조: **Chishimba et al.**, 2012; **Pasqualotto et al.**, 2009]. 또한, 최근 출판물에서는 아스페르길루스 감염과 저조한 임상 결과를 보이는 COPD 환자와의 연관성을 제기하였다 [참조: **Bafadhel et al.**, 2013]. 유사하게, 횡단적 단면연구에서 객담 내 아스페르길루스 종 (*Aspergillus* spp.) 및 칸디다 종 (*Candida* spp.)의 존재와 악화된 폐 기능 사이의 관련성을 밝혔다 [참조: **Chotirmall et al.**, 2010; **Agbetile et al.**, 2012].

[0005] 침습성 아스페르길루스 (IA)는 면역손상된 환자, 예를 들어, 동종이형 줄기세포 이식 또는 고형 장기 이식 (예: 폐 이식)을 겪은 환자에서 높은 사망률을 나타낸다. 1953년, 면역손상된 환자에서 IA의 첫 사례가 보고되었다. 이는 코르티코스테로이드 및 세포독성 화학요법을 치료 요법으로 도입함과 동시에 발생하였다 [참조: **Rankin**, 1953]. 침습성 아스페르길루스는 높은 발생률 및 관련 사망률을 갖는 백혈병 및 다른 혈액암 치료에서 주요 관심사이다. 경구 트리아졸 의약이 이용 가능함에도 불구하고, 사망률은 보통 50%를 초과하며 [참조: **Lin et al.**, 2001], 장기간 사망률은 동종이체 조혈모세포 이식 수용자의 90%에 도달할 수 있다 [참조: **Salmeron et al.**, 2012]. 고형 장기 이식 경험 (특히, 폐)이 있는 환자에서, 고용량의 스테로이드를 사용한 결과 환자가 감염에 취약해졌으며 [참조: **Thompson and Patterson**, 2008], 이는 심각한 문제를 일으킨다. 또한, 이러한 질환은 보다 덜 심각하게 면역손상된 환자 집단에서도 나타났다. 이는 COPD 또는 경화증을 앓았던 환자, 고용량의 스테로이드를 투여받았던 환자, 및 중심 정맥 카테터로 교정되거나 기계적 인공호흡 경험이 있는 환자를 포함한다 [참조: **Dimopoulos et al.**, 2012].

[0006] 항-진균성 약물은 주로 경구 또는 전신으로 투약된다. 이러한 일반적으로 이용되는 전달 경로는, 감염 부위에

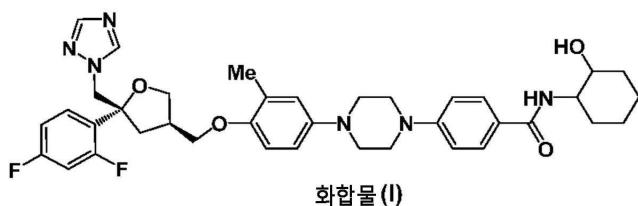
서의 약물 농도가 장기에서의 농도보다 더 낮은 경향이 있기 때문에, 기도 허파 감염을 치료하기에는 부적당하다. 이는, 간의 경우 특히 그렇다: 보리코나졸로 치료받은 환자의 최대 15%가 트랜스아미나아제 수준이 상승되었다 [참조: Levin *et al.*, 2007; Lat and Thompson, 2011]. 또한, 간의 노출은 간 P450 효소의 억제로 발생하는 중요한 약물 상호작용을 유도한다 [참조: Jeong, *et al.*, 2009; Wexler *et al.*, 2004].

[0007] 또한, 임상 및 축산에서의 트리아졸의 광범위한 사용은 일부 지역에서 내성 진균증의 증가하는 문제적 출현을 야기하였다 [참조: Denning *et al.*, 2011b; Bowyer and Denning, 2014].

[0008] 개선된 효능 및 양호한 전신 내성 프로파일을 전달하는 신규 항-진균성 약물에 대한 긴급한 의학적 필요성이 존재한다는 것이 자명하다.

## 발명의 내용

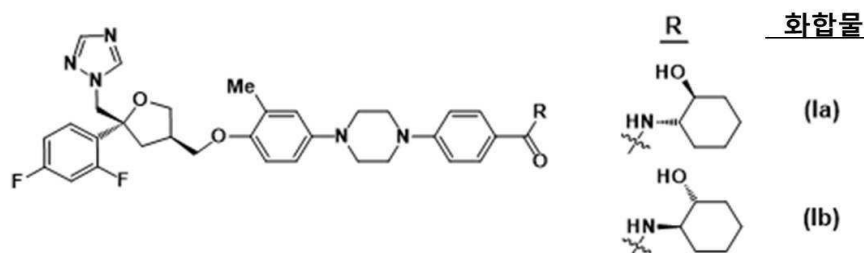
[0009] 제1 양태에서, 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 ("본 발명의 화합물"의) 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



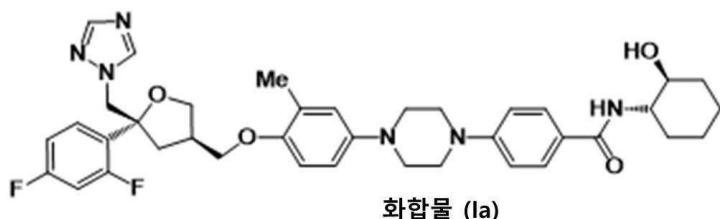
[0010] 상기 화합물은 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-N-(2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드이다.

[0012] 화합물 (I)은 2-아미노사이클로헥사놀 라디칼 내 2개 입체발생 중심 (stereogenic centre)을 가지며, 단일 입체 이성질체 또는 임의의 비율의 입체이성질체의 혼합물 (라세미 혼합물 포함)로서 이들의 4개 가능한 입체이성질체 중 임의의 형태로 제공된다.

[0013] 바람직한 양태에서, 본 발명은, 트랜스-2-아미노사이클로헥사놀의 거울상 이성질체로부터 유래된 2개 입체이성질체인, 하기 예시된 화합물 (Ia) 및 (Ib) 중에서 선택된 입체이성질체 형태의 화합물 (I), 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



[0014] 보다 바람직한 양태에서, 본 발명은 하기 도시된 화합물 (Ia), 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



[0016] 상기 화합물은 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-N-((1S,2S)-2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드이다.

[0018] 적합하게는, 화합물 (I), 예컨대, 화합물 (Ia)는 단일 입체이성질체로서 제공된다.

[0019] 본원에 기재된 생물학적 데이터는 화합물 (I), 특히 화합물 (Ia)의 입체이성질체가 시험관내 분석에서 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*) 성장의 강력한 억제제임을 나타낸다. 면역억제된 마우스에서, 화합물 (Ia)는 아스페르길루스 푸미가투스 감염의 강력한 억제 효과를 입증하였다.

### 도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역-손상된 호중구감소성 (neutropenic) 마우스의 폐 내 CFU에 대한 화합물 (Ia)로의 치료적 처리 효과를 나타낸다.

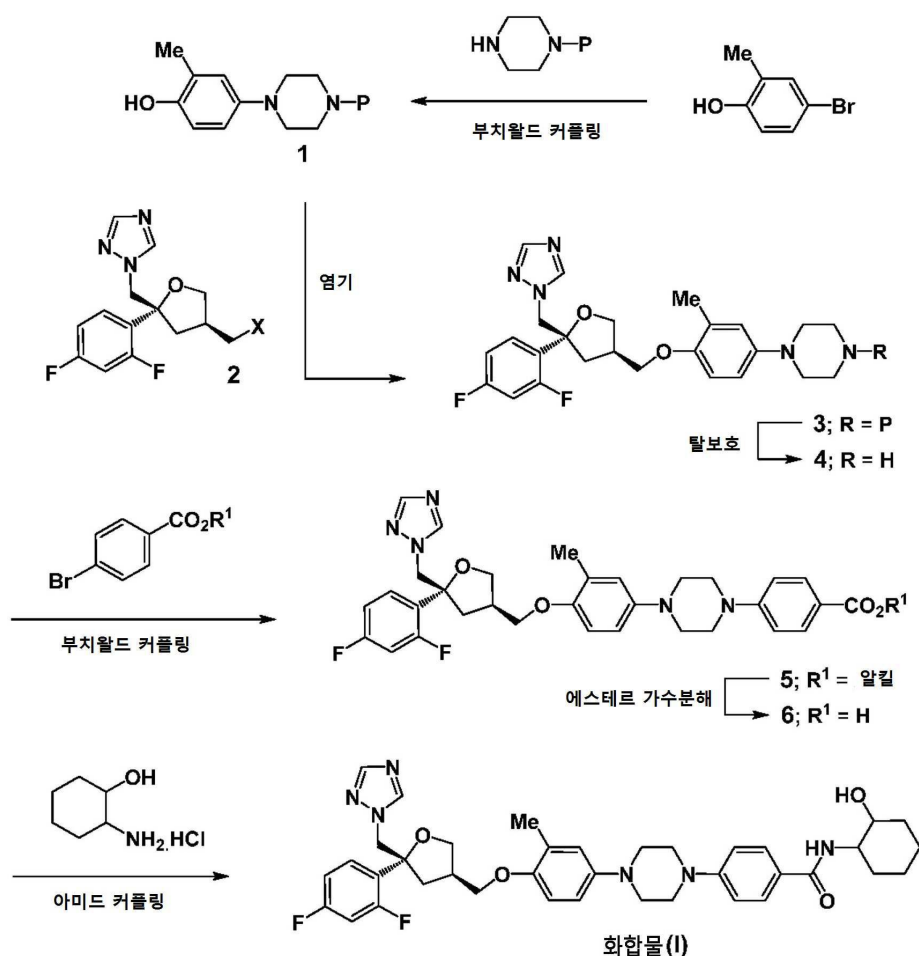
도 2는 아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역-손상된 호중구감소성 마우스의 혈청 갈락토만난 농도에 대한 화합물 (Ia)로의 치료적 처리 효과를 나타낸다.

도 3은 아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역-손상된 호중구감소성 마우스의 폐 내 아스페르길루스 푸미가투스 DNA 함량에 대한 화합물 (Ia)로의 치료적 처리 효과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 화합물은 하기 (반응식 1)에 도시된 합성 절차를 이용하여, 시판되는 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 이러한 반응을 위하여 전형적으로 이용되는 조건 하에서 적절히 보호된 피페라진 유도체와 4-브로모-2-메틸페놀을 부치왈드 커플링 (Buchwald coupling)시켜 N-아릴화된 (N-arylated) 생성물 1을 생성한다. 이러한 전환에 적합한 아민 보호기 (P)는 우레탄기, 예컨대, Boc기 ( $P = CO_2^tBu$ )이다. 당업자는 이러한 종류의 전환에 영향을 끼치는 다양한 종류의 조건을 알 것이다. 특히, 팔라듐 촉매 및 포스핀 리간드, 예컨대, RuPhosG3 및 RuPhos는 일반적으로 염기, 예를 들어, 탄산 세슘 또는 리튬 헥사메틸디실아자이드의 존재하에서 사용된다.

[0022] 반응식 1



[0023]



- [0024] 생성된 페놀 1을 염기 조건하에서 ((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메탄올 (2, **X** = **OH**)의 적절한 친전자성 유도체와 반응시켜 에테르 3을 생성한다. 이러한 화합물의 예로는 높은 거울상 이성질체 순도를 갖는 이미 시판되는 상응하는 토실레이트 (2, **X** = **OTs**)가 있다. 토실레이트가 전형적인 반면, **X**는 또한 대안적 이탈기, 예컨대, 할로젠, 전형적으로 염소일 수 있다. 아민 보호기의 선택적 제거로 단일-치환된 피페라진 (4)가 생성된다. Boc 유도체 (**R** = CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu)의 경우, 탈보호 단계는 전형적으로 용매, 예컨대, DCM 부근 또는 이의 존재하의 강 무기산 또는 강 유기산, 예컨대, TFA에 대한 카르바메이트의 노출로써 개시된다.
- [0025] 염기 조건하에서 아민 (4)와 알킬 4-브로모벤조에이트 및 촉매제와의 제2 부치왈드 커플링은 **R**이 저급 알킬, 예를 들어, C<sub>1-5</sub> 알킬, 예컨대, 메틸 또는 에틸인, *N,N'*-비스아릴화된 생성물 (5)를 생성시킨다. 물 및 적절한 수성 혼화성 용매의 혼합물 중의 염기, 예컨대, 알칼리 금속 수산화물을 이용하여 처리함으로써 에스테르 5의 비누화가 용이하게 개시된다. 당업계에서 널리 이용가능한 표준 아미드 커플링 조건하에서의 산 생성물 (6)과 2-아미노사이클로헥사놀과의 반응은 화합물 (I)을 생성한다. 2-아미노사이클로헥사놀의 상응하는 단일 입체이성질체를 사용함으로써 화합물 (I)의 각각의 4개 개별 입체이성질체가 생성될 수 있다. 2-아미노사이클로헥사놀의 상응하는 입체이성질체는 각각 고 입체이성질체 순도로 시판된다.
- [0026] 이의 제거를 위한 보호기 및 수단이 문헌 [참조 "Protective Groups in Organic Synthesis", by Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, published by John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540]에 기재된다. 다음 문헌에서 아미드의 제조 방법론에 대한 검토가 이루어진다 [참조: 'Amide bond formation and peptide coupling' Montalbetti, C.A.G.N. and Falque, V. *Tetrahedron*, 2005, **61**, 10827-10852].
- [0027] 화학식 (I)의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은 특히 상기 화합물의 약학적으로 허용가능한 산 부가 염을 포함한다. 화학식 (I)의 화합물의 약학적으로 허용가능한 산 부가 염은 화학식 (I)의 화합물이 형성될 수 있는 치료학적 활성 비-독성 산 부가 염을 포함하는 것을 의미한다. 이러한 약학적으로 허용가능한 산 부가 염은, 유리 염기 형태를 적절한 용매 또는 용매의 혼합물 중에서 적절한 산과 함께 처리함으로써 용이하게 수득될 수 있다. 적절한 산으로는, 예를 들어, 무기산, 예를 들어, 할로젠화수소산, 예컨대, 염산 또는 브롬화수소산, 황산, 질산 및 인산 등; 또는 유기산, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 수산화초산, 락트산, 피루브산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 시클라민산, 살리실산, p-아미노살리실산 및 판산 등을 포함한다.
- [0028] 반대로, 상기 염은 적절한 염기를 유리 염기 형태로 처리함으로써 전환될 수 있다.
- [0029] 화합물 (I)의 정의는 상기 화합물의 모든 호변체를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0030] 본원에 사용되는 바와 같이, 화합물 (I)의 "단일 입체이성질체"는 높은 부분입체이성질체 및 높은 거울상이성질체 순도의 형태로, 즉, 2-아미노사이클로헥사놀 라디칼이 그 안에 존재함으로써 인해 발생하는 화합물 (I)의 다른 3개 입체이성질체가 실질적으로 없는 형태로 제공되는, 입체이성질체를 의미한다. 전형적으로, 단일 입체이성질체는 화합물 (I) 함량의 적어도 98%, 99%, 99.5%, 또는 99.9% w/w로 구성된다 (즉, 다른 입체이성질체는 화합물 (I) 함량의 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.1% w/w 미만으로 구성됨).
- [0031] 화합물 (I)의 정의는 달리 구체적으로 지시되지 않는 한, 상기 화합물의 모든 용매화물 (상기 화합물의 염의 용매화물을 비롯)을 포함하는 것으로 의도된다. 용매화물의 예로는 수화물을 포함한다.
- [0032] 본 개시의 화합물은 명시된 하나 이상의 원자가 자연 발생 또는 비-자연 발생 동위원소인 실시형태를 포함한다. 일 실시형태에서, 동위원소는 안정한 동위원소이다. 따라서, 본 개시의 화합물은, 예를 들어, 화합물 등을 함유하는 중수소를 포함한다.
- [0033] 또한, 본 개시는 본원에 정의된 화합물의 모든 다형태를 포괄한다.
- [0034] 본원에 기재된 신규 중간체, 예를 들어, 화학식 (3), (4), (5) 및 (6)의 화합물 및 이의 염은 본 발명의 추가 양태를 형성한다. 염은 약학적으로 허용가능한 염 (예를 들어, 상기 언급된 것) 및 비-약학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 산의 염 (예: 카르복실산)은 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘 염을 비롯한 제1 및 제2족 금속 염을 포함한다.
- [0035] 일 실시형태에서, 본 발명의 화합물과 함께 임의로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포

합하는 약학적 조성물이 제공된다.

- [0036] 적절하게는, 본 발명의 화합물은 폐 또는 코, 특히, 폐로 국소적으로 투여된다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 화합물과 함께 임의로 하나 이상의 국소적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.
- [0037] 폐 또는 비강내 투여에 적합한 조성물로는 분말, 액체 용액, 액체 현탁액, 용액 또는 현탁액을 포함하는 점비액 또는 가압된 또는 비-가압된 에어로졸을 포함한다.
- [0038] 조성물은 단위 투여 형태로 용이하게 투여될 수 있으며, 제약 분야에 잘 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 문헌 [참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985)]에 기재된 바와 같은 방법으로 제조될 수 있다. 또한, 조성물은 다중 단위 투여 형태로 용이하게 투여될 수 있다.
- [0039] 코 또는 폐로의 국소 투여는 수성 용액 또는 현탁액과 같은 비-가압된 제형을 사용함으로써 이뤄질 수 있다. 이러한 제형은 분무기, 예컨대, 손바닥 크기의 휴대 가능한 또는 가정용 또는 의료용 (예: 비-휴대용)의 분무기를 사용하여 투여될 수 있다. 예시적인 장치로는 RESPIMAT 흡입기가 있다. 제형은 물, 완충액, 긴장성 조절제 (tonicity adjusting agent), pH 조절제, 점도 조절제, 계면활성제 및 공용매 (예: 에탄올)와 같은 부형제를 포함할 수 있다. (가압되거나 비가압된) 현탁 액체 및 에어로졸 제형은 전형적으로 미세하게 나뉜 형태, 예를 들어, 0.5-10  $\mu\text{m}$ , 예컨대, 약 1-5  $\mu\text{m}$ 의  $D_{50}$ 의 본 발명의 화합물을 함유할 것이다. 입자 크기 분포는  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  및  $D_{90}$  값을 사용하여 표현될 수 있다. 입자 크기 분포의  $D_{50}$  중간값은 분포도를 절반으로 나누는 마이크로 단위의 입자 크기로 정의된다. 레이저 회절법을 사용한 측정은 용적 분포로 보다 정확하게 기재되며, 결과적으로는 이러한 절차를 사용하여 수득된  $D_{50}$  값은  $Dv_{50}$  값 (용적 분포에 대한 중앙값)으로서 보다 의미 있게 언급된다. 본원에 사용된 바와 같이,  $Dv$  값은 레이저 회절법을 사용하여 측정된 입자 크기 분포를 지칭한다. 유사하게는, 레이저 회절법과 관련하여 사용된  $D_{10}$  및  $D_{90}$  값은  $Dv_{10}$  및  $Dv_{90}$  값을 의미하기 위하여 취해지며, 각각  $D_{10}$  값 이하의 10% 분포, 및  $D_{90}$  값 이하의 90% 분포에 인한 입자 크기를 지칭한다.
- [0040] 본 발명의 일 구체적 양태에 따라, 수성 매질 내 현탁된 입자 형태의 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 수성 매질은 전형적으로 물, 및 완충제, 긴장성 조절제, pH 조절제, 점도 조절제 및 계면활성제 중에서 선택된 하나 이상의 부형제를 포함한다.
- [0041] 또한, 코 또는 폐로의 국소 투여는 에어로졸 제형을 사용함으로써 이뤄질 수 있다. 에어로졸 제형은 전형적으로 적절한 에어로졸 분사제, 예컨대, 프레온가스 (CFC) 또는 수소화불화탄소 (HFC) 중에 현탁되거나 용해된 활성 성분을 포함한다. 적절한 CFC 추진제는 트리클로로모노플루오로메탄 (추진제 11), 디클로로테트라플루오로메탄 (추진제 114), 및 디클로로디플루오로메탄 (추진제 12)을 포함한다. 적절한 HFC 추진제는 테트라플루오로에탄 (HFC-134a) 및 헵타플루오로프로판 (HFC-227)을 포함한다. 추진제는 전형적으로 총 흡입 조성물의 40%-99.5%, 예를 들어, 40%-90% 중량부를 포함한다. 제형은 공-용매 (예: 에탄올) 및 계면활성제 (예: 레시틴 및 소르비탄 트리올리에이트 등)을 포함할 수 있다. 다른 가능한 부형제는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈 및 글리세린 등을 포함한다. 에어로졸 제형은 소형 통에 포장되며, 계량 밸브를 통해 적정 용량이 전달된다 (예를 들어, Bepak, Valois 또는 3M에 의해 제공되거나 대안적으로 Aptar, Coster 또는 Vari에 의해 공급됨).
- [0042] 또한, 폐로의 국소 투여는 건조-분말 제형을 사용함으로써 달성될 수 있다. 건조 분말 제형은 미세하게 분해된 형태, 전형적으로 1-10  $\mu\text{m}$ 의 MMD 또는 0.5-10  $\mu\text{m}$ , 예컨대, 약 1-5  $\mu\text{m}$ 의  $D_{50}$ 의 본원의 화합물을 함유할 것이다. 미세하게 분해된 형태의 본 발명의 화합물의 분말은 미분화 공정 또는 유사 크기 감소 공정으로 제조될 수 있다. 미분화는, 예를 들어, Hosokawa Alpine에 의해 제작된 제트 밀을 사용하여 수행될 수 있다. 생성된 입자 크기 분포는 레이저 회절법을 사용하여 측정될 수 있다 (예: Malvern Mastersizer 2000S 기기 사용). 제형은 전형적으로는 통상 허용가능한 희석제, 예를 들어, 락토오스, 글루코스 또는 만니톨 (바람직하게는, 락토오스)을, 보통 비교적 큰 입자 크기, 예를 들어, 50  $\mu\text{m}$  이상, 예컨대, 100  $\mu\text{m}$ 의 MMD, 또는 40-150  $\mu\text{m}$ 의  $D_{50}$ 를 갖는 크기로 함유할 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "락토오스"는  $\alpha$ -락토오스 일수화물,  $\beta$ -락토오스 일수화물,  $\alpha$ -락토오스 무수물,  $\beta$ -락토오스 무수 및 무정형 락토오스를 비롯한 락토오스-함유 성분을 지칭한다. 락토오스 성분은 미분화, 체질 (sieving), 밀링 (milling), 압축, 밀집화 또는 분무 건조로 제조될 수 있다. 통상 허용가능한 형태의 다양한 락토오스가 또한 포함되며, 예를 들어, Lactohale<sup>®</sup> (흡입 등급 락토

오스; DFE Pharma), InhaLac<sup>®</sup> 70 (건조 분말 흡입기용으로 체질된 락토오스; Meggle), Pharmatose<sup>®</sup> (DFE Pharma) 및 Respitose<sup>®</sup> (체질된 흡입 등급 락토오스; DFE Pharma) 제품을 포함한다. 일 실시형태에서, 락토오스 성분은  $\alpha$ -락토오스 일수화물,  $\alpha$ -락토오스 무수물 및 무정형 락토오스로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 바람직하게는, 락토오스는  $\alpha$ -락토오스 일수화물이다.

- [0043] 건조 분말 제형은 또한 다른 부형제, 예컨대, 나트륨 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트 또는 마그네슘 스테아레이트를 함유할 수 있다.
- [0044] 건조 분말 제형은 전형적으로는 건조 분말 흡입기 (DPI) 장치를 이용하여 전달된다. 건조 분말 전달 시스템의 예로는 SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYHALER, ACCUHALER 및 CLICKHALER을 포함한다. 건조 분말 전달 시스템의 추가 예로는 ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, ORIEL 건조 분말 흡입기, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR 및 PROHALER을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 화합물은 진균증의 치료 및 진균증과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용하다.
- [0046] 본 발명의 일 양태에서, 진균증의 치료 및 진균증과 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물 제조에서의 본 발명의 화합물의 용도가 제공된다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태에서, 진균증을 앓는 대상체에게 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체의 치료 방법이 제공된다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태에서, 대상체에서 진균증과 관련된 질환의 예방 또는 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0049] 진균증은, 특히, 아스페르길루스 종, 예컨대, 아스페르길루스 푸미가투스에 기인한 것일 수 있다.
- [0050] 진균증과 관련된 질환은, 예를 들어, 폐 아스페르길루스증이다.
- [0051] 본 발명의 화합물은 진균증 발병 이전에 상기 화합물을 투여함으로써 예방적으로 설정하는데 사용될 수 있다.
- [0052] 대상체는 인간 및 동물 대상체, 특히 인간 대상체를 포함한다.
- [0053] 본 발명의 화합물은 특히 아스페르길루스 푸미가투스와 같은 진균증 감염의 치료 및 감염 가능성이 있는 대상체에서의 아스페르길루스 푸미가투스와 같은 진균증 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용하다. 감염 가능성이 있는 대상체는 미숙아, 폐 또는 심장의 선천성 결함이 있는 아동, 면역손상된 대상체 (예: HIV 감염을 앓는 대상체), 천식 환자, 낭포성 섬유증을 앓는 대상체, 노인 대상체 및 심장 또는 폐에 영향을 미치는 만성적 건강 병증 (예: 울혈성 심부전 또는 만성 폐쇄성 폐 질환)을 앓는 대상체를 포함한다.
- [0054] 또한, 본 발명의 화합물은, 아우레오바시디움 풀루란스 (*Aureobasidium pullulans*), 리조푸스 오리자에 (*Rhizopus oryzae*), 크립토크쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 차에토미움 글로보숨 (*Chaetomium globosum*), 페니실리움 크리스소제눔 (*Penicillium chrysogenum*), 푸사리움 그라미네라룸 (*Fusarium graminearum*), 클라도스포리움 헤르바룸 (*Cladosporium herbarum*), 트리코피톤 루브룸 (*Trichophyton rubrum*), 칸디다 종, 예컨대, 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 칸디다 글라브라타 (*Candida glabrata*) 및 칸디다 크루세이 (*Candida krusei*) 및 다른 아스페르길루스 종, 예컨대, 아스페르길루스 플라부스 (*Aspergillus flavus*)를 비롯한, 다른 진균증의 치료 (및 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료)에 유용하다.
- [0055] 또한, 본 발명의 화합물은 아졸 내성 진균증, 예를 들어, 아졸 내성 아스페르길루스 종, 예컨대, 아스페르길루스 푸미가투스에 기인한 진균증의 치료 (및 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료)에 유용할 것으로 예상된다.
- [0056] 본 발명의 화합물은 제2 또는 추가 활성 성분과 함께 투여될 수 있다. 제2 또는 추가 활성 성분은, 예를 들어, 아졸 항-진균성 제제 (예: 보리코나졸, 또는 포사코나졸), 암포테리신 B, 에키노칸딘 (예: 카스포푼진 (caspofungin)) 및 3-하이드록시-3-메틸-글루타릴-CoA 리덕타아제의 억제제 (예: 로바스타틴, 프라바스타틴 또는 플루바스타틴)를 비롯한 다른 항-진균성 제제 중에서 선택될 수 있다. 적절한 아졸 항-진균성 제제의 다른 예로는 이트라코나졸 및 이사부코나졸 (isavuconazole)을 포함한다.
- [0057] 제2 또는 추가 활성 성분은, 예를 들어, 보리코나졸, 포사코나졸, 이트라코나졸 및 카스포푼진 중에서 선택될

수 있다.

- [0058] 제2 또는 추가 활성 성분은 아스페르길루스 푸미가투스과 같은 진균증 감염 또는 아스페르길루스 푸미가투스과 같은 진균증 감염과 관련된 질환 또는 아스페르길루스 푸미가투스과 같은 진균증 감염을 동반한 병증의 치료 또는 예방에 적합한 활성 성분을 포함한다.
- [0059] 본 발명의 화합물은 제2 또는 활성 성분과 동시-제형화되거나, 제2 또는 추가 활성 성분은 동일하거나 상이한 경로로 분리되어 투여되도록 제형화될 수 있다.
- [0060] 예를 들어, 본 발명의 화합물은 항-진균증, 예컨대, 보리코나졸 또는 포사코나졸 또는 대안적으로 이트라코나졸 또는 이사부코나졸을 이용하여 이전에 전신적으로 치료되었던 환자에게 투여될 수 있다.
- [0061] 예를 들어, 본 발명의 화합물은 암포테리신 B, 에키노칸딘, 예컨대, 카스포푼진, 및 3-하이드록시-3-메틸-글루타릴-CoA 리덕타아제의 억제제, 예컨대, 로바스타틴, 프라바스타틴 또는 플루바스타틴 중에서 선택된 하나 이상의 제제와 함께 동시-제형화될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 양태에 따라, 다음 부분을 포함하는 키트가 제공된다: (a) 본 발명의 화합물과 함께 임의로 하나 이상의 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물; (b) 제2 활성 성분과 함께 임의로 하나 이상의 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물; (c) 임의적으로, 제3 또는 추가 활성 성분과 함께 임의로 하나 이상의 희석제 또는 담체를 포함하는 하나 이상의 추가 약학적 조성물; 및 (d) 이를 필요로 하는 대상체에게 약학적 조성물을 투여하기 위한 지침. 이를 필요로 하는 대상체는 진균증, 예컨대, 아스페르길루스 푸미가투스 감염을 앓거나 이에 취약할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 화합물은 적절한 시간 간격, 예를 들어, 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 4회로 투여될 수 있다.
- [0064] 인간 평균 중량 (50-70 kg)에 적절한 투여량은 약 50  $\mu$ g 내지 10 mg/일, 예를 들어, 500  $\mu$ g 내지 5 mg/일로 예상되나, 투여될 정확한 투여량은 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 하기의 유리한 속성을 갖는 것으로 예상된다:
- [0066] 특히, 폐 또는 코로의 국소 투여 후의, 특히 아스페르길루스 종, 예컨대, 아스페르길루스 푸미가투스에 대한 강력한 항진균 활성;
- [0067] 바람직하게는, 1일 투여량에 따른 폐 내에서의 장기간 작용;
- [0068] 폐 또는 코로의 국소 투여에 따른 저수준 전신 노출; 및
- [0069] 특히, 폐 또는 코로의 국소 투여 후의 허용 가능한 안전 프로파일.
- [0070] **실험 부분**
- [0071] 본원에 사용된 약어는 하기에서 정의된다 (표 1). 정의되지 않은 임의의 약어는 일반적으로 허용되는 의미를 나타내는 것으로 의도된다.

표 1

약어

ABPA	알레르기성 기관지 폐 아스길루스증
aq	수성
ATCC	아메리칸 타입 컬처 컬렉션
BALF	기관지 폐포 세척액
BEAS2B	기관지 상피 + 아데노바이러스 12-SV40 하이브리드, 세포주 2B
Boc	<i>tert</i> -부틸옥시카르보닐
br	광범위 (broad)
BSA	소 혈청 알부민
CC <sub>50</sub>	50% 세포 독성 농도
CFU	콜로니 형성 단위
CLSI	임상 및 실험실 표준 기관
COI	컷 오프 지표 (cut off index)
conc	농도
d	이중
DCM	디클로로메탄
DMAP	4-디메틸아미노피리딘
DMEM	둘베코 변형 이글 배지
DMF	<i>N,N</i> -디메틸포름아미드
DMSO	디메틸설폭사이드
DNA	데옥시리보핵산
DSS	덱스트린 황산 나트륨염
EBM	내피 세포 기본 배지
ECM	세포외 기질
EDCI	1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드
ee	거울상이성질체 과잉율
EGM	내피세포 성장 배지
EUCAST	항생제 민감성 시험에 관한 유럽 위원회 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
(ES <sup>+</sup> )	전자분무 이온화, 양성 모드
EtOAc	에틸 아세테이트
FAM	6-플루오레세인 아미다이트

[0072]

FBS	소 혈청 알부민
GM	갈락토만난
hr	시간
HPAEC	일차 인간 폐 동맥 내피세포
IA	침습성 아스페르길루스
i.n.	비강내
i.t.	기관-내
LC-MS/MS	액체 크로마토그래피-질량 분광분석
Li Hep	리튬 헤파린
LiHMDS	리튬 비스(트리메틸실릴)아미드
(M+H) <sup>+</sup>	양성자화된 분자 이온
MDA	말론디알데히드
Me	메틸
MeCN	아세토니트릴
MeOH	메탄올
MHz	메가헤르츠
MIC <sub>50</sub>	최소 억제 농도의 50%
MIC <sub>75</sub>	최소 억제 농도의 75%
MIC <sub>90</sub>	최소 억제 농도의 90%
min	분
MMD	질량 중앙 직경
MOI	감염 다중도
MOPS	3-(N-모르폴리노)프로판설폰산
m/z:	질량 대 전하 비
NCPF	병원균의 내셔널 컬렉션 (National Collection of Pathogenic Fungi)
NMR	핵자기 공명법 (분광분석)
NT	시험되지 않음
OD	광학 농도
PBS	인산 완충된 염수
PCR	중합효소 연쇄반응
P	보호기
q	사중선
RT	실온

[0073]



RP HPLC	역상 고성능 액체 크로마토그래피
RPMI	로즈웰 파크 기념 연구소 배지 (Roswell Park Memorial Institute medium)
RuPhos	2-디사이클로헥실포스피노-2',6'-디이소프로폭시비페닐
RuPhosG3	(2-디사이클로헥실포스피노-2',6'-디이소프로폭시비페닐)[2-(2'-아미노-1,1'-비페닐)]팔라듐 (II)메탄설퍼네이트
s	단일선
sat	포화된
sc	피하
SDS	나트륨 도데실 설페이트
t	삼중선
TAMRA	테트라메틸-6-카르복시로다민
TE	트리스-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산)
TFA	트리플루오로아세트산
THF	테트라하이드로푸란
TR34/L98H	코돈 98 에서 류신 내지 히스티딘 치환 및 34-bp 탠덤 반복을 함유하는 A. 푸미가투스 균주
TR46/Y121F/T289A	코돈 121 에서 티로신 내지 페닐알라닌 치환, 코돈 289 에서 트레오닌 내지 알라닌 치환 및 46-bp 탠덤 반복을 함유하는 A. 푸미가투스 균주
vol	부피

[0074]

[0075]

#### 일반 절차

[0076]

모든 시약 및 용매는 시판되는 것을 구매하였거나 인용 문헌에 따라 제조하였다. 달리 지시되지 않는 한, 모든 반응물을 교반하였다. 유기 용액은 일반적으로 무수 황산 마그네슘 상에서 건조시켰다.

[0077]

#### 분석 방법

[0078]

역상 HPLC 방법:

[0079]

Waters Xselect CSH C18 XP 컬럼, 40 °C에서 2.5  $\mu\text{m}$  (4.6 x 30 mm); 유속 2.5-4.5 mL min<sup>-1</sup>, 254 nm에서 UV 검출을 사용하여 4분 동안 물 중 0.1% v/v 포름산 (방법 1a) 또는 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (방법 1b)를 함유하는 H<sub>2</sub>O-MeCN 구배로 용출. 구배 정보: 0-3.00분, 기율기 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN 내지 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 3.00-3.01분, 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN으로 유지, 4.5 mL min<sup>-1</sup>로 유속 증가; 3.01-3.50분, 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN으로 유지; 3.50-3.60분, 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN로 복귀, 3.50 mL min<sup>-1</sup>로 유속 감소; 3.60-3.90분, 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN으로 유지; 3.90-4.00분, 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN으로 유지, 2.5 mL min<sup>-1</sup>로 유속 감소.

[0080]

<sup>1</sup>H NMR 분광분석:

[0081]

참조물로 잔사 비중수소화된 용매를 사용하여 400 MHz로 Bruker Advance III 분광분석기 상에서 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼을 획득하였고, 달리 지시되지 않는 한 DMSO-d<sub>6</sub> 중에서 수행하였다.

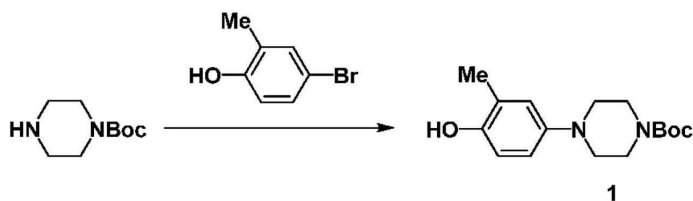
[0082]

#### 화합물 (Ia-d)의 제조: 화합물 (I)의 입체이성질체

[0083]

광학적으로 순수한 시스 및 트랜스 2-아미노 헥사놀의 합성은 이전에 문헌 [Jacobsen *et al.*, 1997 참조]에 기록되었다. 이러한 물질은 상업적 공급원으로부터 높은 거울상이성질체 순도로 이용가능하며, 이를 공급된 대로 사용하였다.

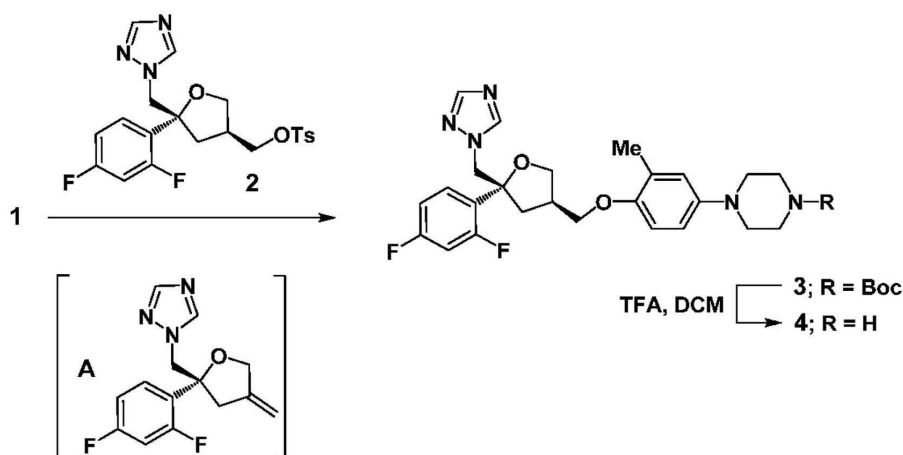
[0084] *tert*-부틸-4-(4-하이드록시-3-메틸페닐)피페라진-1-카르복실레이트.



[0085]

[0086] *tert*-부틸피페라진-1-카르복실레이트 (19.1 g, 103 mmol), 4-브로모-2-메틸 페놀 (16.0 g, 86.0 mmol), RuPhos (798 mg, 1.71 mmol) 및 RuPhos G3 (1.43 g, 1.71 mmol)로 충전된 플라스크를 진공배기시키고 (evacuate), 질소로 3회 채웠다. 캐놀라를 통해 LiHMDS의 용액 (THF 중 1M, 257 mL, 257 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 70 °C에서 3시간 동안 가열하였다. RT로 냉각시킨 후, 0 °C에서 1M aq 염산 (400 mL)을 첨가함으로써 혼합물을 퀀칭시키고, 이어서 포화 aq NaHCO<sub>3</sub> (400 mL)로 중화하였다. 수성 층을 EtOAc (1 x 400 mL, 이어서 2 x 200 mL)로 추출하고, 배합된 유기 추출물을 염수 (500 mL)로 세척하고 건조시켰다. 휘발성물질을 진공하에 제거하여 조 생성물을 생성하고, 이를 디에틸 에테르:헥산 (2:1) (750mL) 중에서 분쇄하고, 여과로 수집하여 분홍색 고체로 표제 화합물인 **중간체 1**을 생성하였다 (20.7 g, 76%); R<sup>t</sup> 2.07분 (방법 1b); m/z 293 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR δ: 1.41 (9H, s), 2.07 (3H, s), 2.86-2.88 (4H, m), 3.41-3.43 (4H, m), 6.58-6.66 (2H, m), 6.71 (1H, d) 및 8.73 (1H, s).

[0087] 1-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진.



[0088]

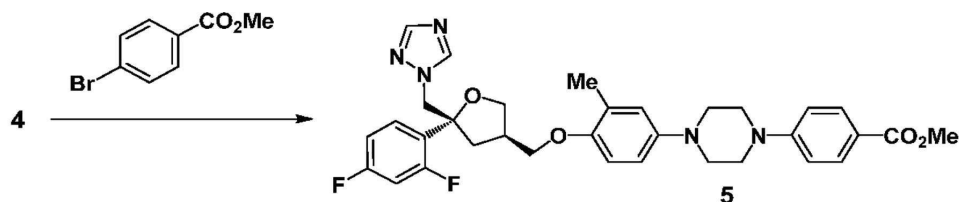
[0089] DMSO (408 mL) 중 중간체 1 (21.5 g, 66.1 mmol)의 용액에 aq 수산화나트륨 (28.3 mL, 3.5 M, 99.0 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 RT에서 30분 동안 교반하고, 이어서 ((3*S*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐) 테트라하이드로푸란-3-일)메틸-4-메틸벤젠설포네이트 2 (예: APIChem, 카탈로그 번호: AC-8330, 32.7 g, 72.7 mmol)를 부분 첨가하여 처리하였다. 반응 혼합물을 30 °C에서, 18시간 동안 교반하고, RT로 냉각시키고 물 (600 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 500 mL)로 추출하고, 배합된 유기 추출물을 포화 aq NaHCO<sub>3</sub> (2 x 500 mL) 및 염수 (500 mL)로 세척하고, 이어서 건조시키고 진공하에 증발시켜 갈색 오일을 수득하였다 (약 41g). 조 *N*-Boc-보호된 생성물 3을 <sup>1</sup>H NMR로 분석한 결과, 일부 비반응된 출발 물질과 함께 약 10 mole %의 알켄 배출 생성물 ((*R*)-1-((2-(2,4-디플루오로페닐)-4-메틸렌테트라하이드로푸란-2-일)메틸)-1*H*-1,2,4-트리아졸 [A])을 함유하는 것으로 나타났다. 이러한 조 생성물을 정제없이 다음 단계에 사용하였다.

[0090] 조 우레탄 3을 취하여 DCM (260 mL) 중에 넣고, 이를 TFA (76.0 mL, 991 mmol)로 처리하였다. RT에서 2시간 후, 반응 혼합물을 진공하에 농축시켜 휘발성 물질 대부분을 제거하고, 이어서 이를 DCM (200 mL)으로 희석하고, 조심스럽게 포화 aq NaHCO<sub>3</sub> (500 mL)를 이용하여 pH7로 중화시켜 에멀전 형태를 생성하였다. 1M 염산 (250 mL)을 첨가하여 혼합물을 pH 1로 산성화시키고, DCM (350 mL)를 첨가하여 2상의 혼합물을 형성하였다



(2개 층). 수성 상을 분리하여 보관하고, 유기 상을 1M 염산 (800 mL)으로 추출하였다. 2M aq 수산화나트륨 (500 mL)을 첨가하여 배합된 aq 층을 pH 14로 염기화시키고, 이어서 이를 EtOAc (3 x 500 mL)로 추출하였다. 배합된 유기 추출물을 염수 (2000 mL)로 세척하고, 이어서 건조시키고 진공하에 증발시켜 점성의 갈색 오일로 표제 화합물 **4**를 생성하였다 (24.6 g, 78%);  $R^t$  1.46분 (방법 1a);  $m/z$  470 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR  $\delta$ : 2.07 (3H, s), 2.15 (1H, dd), 2.36-2.42 (1H, m), 2.52-2.56 (1H, m), 2.79-2.81 (4H, m), 2.87-2.90 (4H, m), 3.66 (1H, dd), 3.73-3.77 (2H, m), 4.04 (1H, t), 4.57 (2H, dd), 6.64 (1H, dd), 6.70-6.75 (2H, m), 6.99 (1H, td), 7.25-7.33 (2H, m), 7.76 (1H, s) 및 8.34 (1H, s).

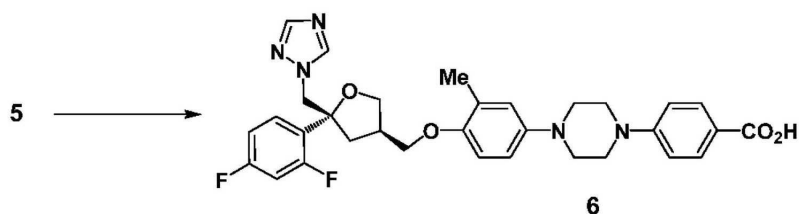
[0091] 메틸 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)벤조에이트.



[0092]

[0093] 중간체 **4** (19.1 g, 40.7 mmol), 메틸-4-브로모벤조에이트 (10.5 g, 48.8 mmol), RuPhos (0.38 g, 0.81 mmol, 2 mol%), RuPhosG3 (0.68 g, 0.81 mmol, 2 mol%) 및 탄산 세슘 (21.2 g, 65.1 mmol)으로 충전된 플라스크를 진공 배기시키고, 질소로 3회 채운 후 DMF (500 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 90 °C에서 18시간 동안 가열하고, RT로 냉각시키고, 이를 물 (300 mL)에 부었다. 생성된 고체를 여과로 수집하고, 물 (3 x 100 mL) 및 디에틸 에테르 (3 x 75 mL)로 세척하고, 이어서 50 °C에서 진공하에 건조시켜 황갈색 고체로 표제 화합물 **5**를 생성하였다 (22.8 g, 89%);  $R^t$  2.56분 (방법 1a);  $m/z$  604 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR  $\delta$ : 2.09 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.36-2.42 (1H, m), 2.53-2.57 (1H, m), 3.11-3.13 (4H, m), 3.43-3.46 (4H, m), 3.67 (1H, dd), 3.74-3.79 (5H, m 초과 중복 s), 4.04 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br d), 7.00 (1H, td), 7.04 (2H, d), 7.27-7.34 (2H, m), 7.77 (1H, s), 7.81 (2H, d) 및 8.35 (1H, s).

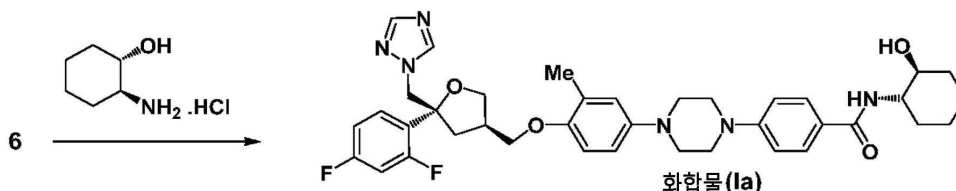
[0094] 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)벤조산.



[0095]

[0096] DMSO (1000 mL) 중 중간체 **5** (22.8 g, 37.8 mmol)의 현탁액에 물 (100 mL) 중 수산화리튬 (4.52 g, 188 mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 70 °C에서 22시간 동안 가열하고, 이어서 RT로 냉각시키고, 이를 물 (1000 mL) 중으로 붓고, 1M 염산 (300 mL)을 첨가하여 pH 2로 산성화하였다. 혼합물을 얼음욕 중에서 2시간 동안 냉각시키고, 생성된 침전물을 여과로 수집하였다. 여과 케이크 (filter cake)를 물 (2 x 200 mL) 및 디에틸 에테르 (4 x 200 mL)로 세척하였다. 조 생성물을 THF (150 mL)을 이용하여 분쇄하고, 여과로 수집하고, 이어서 디에틸 에테르 (3 x 100 mL)로 세척하고 50 °C 진공하에 건조시켜 회백색 고체로 표제 화합물 **6**를 생성하였다 (19.7 g, 88%);  $R^t$  2.28분 (방법 1a);  $m/z$  590 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR  $\delta$ : 2.09 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.36-2.42 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.11-3.14 (4H, m), 3.41-3.44 (4H, m), 3.67 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.04 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br d), 6.97-7.03 (3H, m), 7.26-7.34 (2H, m), 7.77-7.80 (3H, m), 8.34 (1H, s) 및 12.32 (1H, s).

[0097] 화합물 (Ia): 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-*N*-((1*S*,2*S*)-2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드.



[0098]

[0099]

피리딘 (1.0 mL) 중 중간체 6 (100 mg, 0.17 mmol), EDCI (65 mg, 0.34 mmol) 및 DMAP (2.07 mg, 0.017 mmol)의 혼합물에 (1*S*,2*S*)-2-아미노사이클로헥사놀 하이드로클로라이드 (51.4 mg, 0.34 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 16시간 동안 교반하고, 이를 DCM (8.0 mL)으로 희석하고, 1M 염산 (2.0 mL)으로 세척하였다. 혼합물을 상 분리기에 통과시키고, 유기물을 진공하에 증발시켰다. 조 생성물을 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (SiO<sub>2</sub>, 12 g, EtOAc 중 0-5% MeOH, 구배 용출)로 정제하여 백색 고체로 표제 화합물 (Ia)를 생성하였다 (75 mg, 64%).

[0100]

#### 화합물 (Ib-Id)의 제조

[0101]

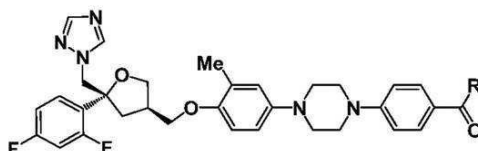
벤조산 중간체 6과 적절한 단일 입체이성질체의 2-아미노사이클로헥사놀과의 커플링과 유사한 방식으로 본 발명의 실시예의 나머지 화합물을 제조하였다. 이러한 화합물은 상업적 공급원으로부터 용이하게 이용가능하다. Sigma Aldrich로부터 수득된 물질은 하기 기재된 거울상체 순도에 대한 염화수소산염으로 제공되었다: (1*S*,2*S*) 트랜스 이성질체, >98% ee; (1*R*, 2*R*) 트랜스 이성질체, >98% ee; (1*R*, 2*S*) 시스 이성질체 >97% ee; (1*S*, 2*R*) 시스 이성질체, >97% ee.

[0102]

실시예 화합물 (Ia-Id)에 대한 LCMS 및 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 데이터를 하기 (표 2)에 나타낸다.

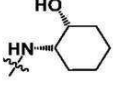
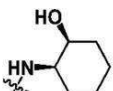
### 표 2

#### 본 발명의 화합물에 대한 분석 및 스펙트럼 데이터



R	실시예 번호, 명칭, LCMS 및 NMR 데이터
	<p><b>Ia:</b> 4-(4-(4-(((3<i>R</i>,5<i>R</i>)-5-((1<i>H</i>-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-<i>N</i>-((1<i>S</i>,2<i>S</i>)-2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드</p> <p>R<sub>t</sub> 2.15 min (방법 1a); m/z 687 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>);</p> <p><sup>1</sup>H NMR δ: 1.15-1.28 (4H, m), 1.61-1.65 (2H, m), 1.82-1.92 (2H, m), 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.15 (4H, m), 3.36-3.43 (5H, m), 3.55-3.62 (1H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.53-4.62 (3H, m), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br s), 6.97-7.02 (3H, m), 7.25-7.34 (2H, m), 7.76-7.82 (4H, m), 8.34 (1H, s).</p>
	<p><b>Ib:</b> 4-(4-(4-(((3<i>R</i>,5<i>R</i>)-5-((1<i>H</i>-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-<i>N</i>-((1<i>R</i>,2<i>R</i>)-2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드</p> <p>R<sub>t</sub> 2.14 min (방법 1a); m/z 687 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>);</p> <p><sup>1</sup>H NMR δ: 1.15-1.28 (4H, m), 1.61-1.65 (2H, m), 1.82-1.92 (2H, m), 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.15 (4H, m), 3.36-3.43 (5H, m), 3.55-3.62 (1H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.53-4.62 (3H, m), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br s), 6.97-7.02 (3H, m), 7.25-7.34 (2H, m), 7.76-7.82 (4H, m), 8.34 (1H, s).</p>

[0103]

	<p><b>1c:</b> 4-(4-(4-(((3<i>R</i>,5<i>R</i>)-5-((1<i>H</i>-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-<i>N</i>-((1<i>S</i>,2<i>R</i>)-2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드</p> <p><math>R^t</math> 2.46 min (방법 1b); <math>m/z</math> 687 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>);</p> <p><sup>1</sup>H NMR <math>\delta</math>: 1.23-1.34 (2H, m), 1.41-1.74 (6H, m), 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.42 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.14 (4H, m), 3.36-3.38 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.82 (4H, m), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 4.68 (1H, d), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br s), 6.98-7.02 (3H, m), 7.26-7.34 (2H, m), 7.51 (1H, d), 7.75-7.77 (3H, m), 8.34 (1H, s).</p>
	<p><b>1d:</b> 4-(4-(4-(((3<i>R</i>,5<i>R</i>)-5-((1<i>H</i>-1,2,4-트리아졸-1-일)메틸)-5-(2,4-디플루오로페닐)테트라하이드로푸란-3-일)메톡시)-3-메틸페닐)피페라진-1-일)-<i>N</i>-((1<i>R</i>,2<i>S</i>)-2-하이드록시사이클로헥실)벤즈아미드</p> <p><math>R^t</math> 2.46 min (방법 1b); <math>m/z</math> 687 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>);</p> <p><sup>1</sup>H NMR <math>\delta</math>: 1.23-1.34 (2H, m), 1.41-1.74 (6H, m), 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.42 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.14 (4H, m), 3.36-3.38 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.82 (4H, m), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 4.68 (1H, d), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br s), 6.97-7.02 (3H, m), 7.25-7.34 (2H, m), 7.50 (1H, d), 7.75-7.77 (3H, m), 8.34 (1H, s).</p>

[0104]

[0105]

# 생물학적 시험: 실험 방법

[0106]

플랑크톤 진균 (*planktonic fungus*) 성장 분석: 브로쓰 미량희석 (*microdilution*) 분석

[0107]

문헌 [참조: EUCAST ([Rodriguez-Tudela, et al., 2008](#))]에 공개된 변형된 방법을 사용하여 이러한 분석을 수행하였다. Public Health England (Wiltshire)로부터의 아스페르길루스 푸미가투스 (NCPF2010, NCPF7010 [메티오닌 220 돌연변이], NCPF7099 [글리신 G54 돌연변이]); St Louis Hospital (Paris, France)로부터의 TR34/L98H 돌연변이; University of Delhi (Delhi, India)로부터의 TR46/Y121F/T289A 돌연변이의 포자를 사부로트 텍스트로스 (Sabouraud dextrose) 아가 중에서 3일 동안 배양하였다. PBS-Tween (10 mL; 0.05% Tween-20, 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신을 함유하는 인산 완충된 염수)을 사용하여 세척함으로써 사부로트 텍스트로스 아가 배양물로부터 원액 포자 현탁액을 제조하였다. Neubauer 혈구계를 이용하여 포자를 계수하고, 이어서 PBS를 사용하여  $10^6$  포자/mL로 조정하였다. 포자의 위킹 현탁액 ( $2 \times 10^5$  포자/mL)을 여과 멸균된 BSA MOPS RPMI-1640 (50 mL; 2 mM L-글루타민, 0.5% BSA, 2% 글루코스, 0.165 M MOPS를 함유하는 RPMI-1640, NaOH로 pH 7로 완충됨) 중에서 제조하였다.

[0108]

분석을 위하여, 384-웰 플레이트 (카탈로그 번호 353962, BD Falcon, Oxford, UK)를 통해 BSA MOPS RPMI-1640 (50  $\mu$ L/웰)을 먼저 첨가하였다. 이어서, 시험 화합물 (0.5  $\mu$ L DMSO 용액)을 Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland)를 사용하여 4배량 첨가하고, 플레이트 믹서를 사용하여 잘 혼합하였다. 이어서, 상기 제조된 50  $\mu$ L의 위킹 현탁액을 비-포자 대조군 웰을 제외한 웰에 첨가하였다. 포자-비함유 대조군 웰에 대해서, 대신 BSA MOPS-RPMI 용액 (50  $\mu$ L/웰)을 첨가하였다. 플레이트를 플라스틱 뚜껑으로 덮고, 48h 동안 항온처리하였다 (35  $^{\circ}$ C, 주변 대기하). 530 nm에서 각 웰의 OD를 멀티-스캐너 (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 측정하였다. 각 웰의 억제율을 계산하고, 각 시험 화합물에 대해 생성된 농도-반응 곡선으로부터 MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>75</sub> 및 MIC<sub>90</sub> 값을 계산하였다.

[0109]

Eurofins Panlabs Inc.로 진균류 패널 스크리닝을 수행하였다. CLSI 가이드 라인에 따라 시험 물질의 MIC 및 MIC<sub>50</sub> 값을 측정하였다: 효모용 (CLSI M27-A2), (CLSI, 2002) 및 사상 진균류용 (CLSI M38-A), (CLSI, 2008) 브로쓰 미량희석 방법.

[0110]

기관지 상피세포의 아스페르길루스 푸미가투스 감염

[0111]

BEAS2B 세포를 10% FBS RPMI-1640의 96-웰 플레이트 (100  $\mu$ L;  $3 \times 10^4$  세포/웰; 카탈로그 번호 3596, Sigma Aldrich, Dorset, UK) 중에 시딩하고, 이어서 실험 전 하루 동안 항온처리 하였다 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>). 시험 화합물 (0.5  $\mu$ L DMSO 용액) 또는 비히클 (DMSO)을 각 웰에 첨가하여 0.5%의 최종 DMSO 농도에 도달하였다.

BEAS2B 세포를 시험 화합물과 함께 1hr 동안 항온처리하고 (35 °C, 5% CO<sub>2</sub>), 그 후 아스페르길루스 푸미가투스 (20  $\mu$ L; Public Health England) 분생자 (conidia) 현탁액 (10% FBS RPMI-1640 중 0.5 x 10<sup>5</sup> /mL)으로 감염시켰다. 플레이트를 24시간 동안 항온처리하였다 (35 °C, 5% CO<sub>2</sub>). 현탁액 (50  $\mu$ L)을 수집하여 PCR 플레이트 (카탈로그 번호 L1402-9700, Starlab, Milton Keynes, UK)로 옮기고, 이를 사용시까지 냉동시켰다 (-20 °C). 해동 후, 상청액 (5  $\mu$ L)을 R7-PBS 용액 (95  $\mu$ L; 1:4 R7 내지 PBS; Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA)을 첨가함으로써 1:20으로 희석하였다. Platelia GM-EIA 키트 (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA)를 사용하여 상기 샘플 (50  $\mu$ L) 중 갈락토만난 수준을 측정하였다. 각 웰에 대한 억제율을 계산하고, 각 시험 화합물에 대해 생성된 농도-반응 곡선으로부터 IC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

[0112] 인간 폐포 이중층의 아스페르길루스 푸미가투스 감염

[0113] 인간 폐포 상피 세포 및 내피 세포의 이중층으로 이루어진 인간 폐포의 시험관내 모델을 문헌 [참조: Hope *et al.*, 2007]에 기재된 바와 같이 제조하였다. 이러한 시스템은 시험 화합물이 상부 ("공기" 공간) 및/또는 하부 ("조직" 공간) 구획으로 투여되게끔 한다. 이러한 유연성을 이용하여, 화합물 (I)을 상부 챔버로 투약하고 포 사코나졸 또는 다른 항-진균성 제제를 하부 챔버에 투약함으로써 조합 치료의 효과를 탐색하였다. 일차 인간 폐 동맥 내피세포 (HPAEC)를 수확하고, EGM-2 배지 (Lonza, Basel, Switzerland) 중에 10<sup>6</sup> 세포/mL로 희석하였다. 트랜스웰을 뒤집고, 세포 현탁액 (100  $\mu$ L/웰)을 각 트랜스웰의 바닥에 적용하였다. 뒤집힌 트랜스웰을 RT에서 2시간 동안 유동 후드 (flow hood) 내에서 항온처리하고, 그 후 이들을 다시 똑바로 돌려놓았다. EGM-2 배지를 하부 (700  $\mu$ L/웰) 및 상부 (100  $\mu$ L/웰) 구획에 첨가하고, 트랜스웰을 48시간 동안 항온처리하였다 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). 이어서, 하부 구획 내 EGM-2 배지를 새로운 EGM-2 배지로 대체하였다. A549 세포를 수확하고, 10% EBM에서 5x10<sup>5</sup> 세포/mL로 희석하고, 이어서, 이를 모든 트랜스웰의 상부 구획 (100  $\mu$ L/웰)에 첨가하고, 플레이트를 72시간 동안 항온처리하였다 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). 이트라코나졸 민감성 아스페르길루스 푸미가투스 (NCPF2010) 및 이트라코나졸 내성 (TR34-L98H) 균주의 분생자를 3일 동안 사부로드 텍스트로스 아가 중에 별도로 배양하였다. PBS-tween (10 mL; 0.05% Tween-20, 100 U/mL 페니실린 및 100 U/mL 스트렙토마이신 함유 PBS)을 사용하여 세척함으로써, 사부로드 텍스트로스 아가 배양물로부터 이들 균주의 원액 분생자 현탁액을 제조하였다. Neubauer 혈구계를 사용하여 분생자 계수를 측정하고, PBS로써 10<sup>6</sup> 분생자/mL로 조정하였다. 분생자의 워킹 원액을 사용 직전에 EBM (10<sup>5</sup> 분생자/mL) 중에서 제조하였다.

[0114] 0.5%의 최종 DMSO 농도를 제공하기 위하여, 시험 및 기준 화합물 (또는 비히클로서 니트(neat) DMSO)을, 하부 구획 처리를 위해서는 24-웰 플레이트 (3  $\mu$ L/웰, 600  $\mu$ L의 2% FBS EBM 함유) 및 상부 구획 처리를 위해서는 96-웰 플레이트 (1  $\mu$ L/웰, 200  $\mu$ L의 2% FBS EBM 함유)의 적절한 웰에 첨가하였다. 상부 구획 내 배지를 흡인하고, 적절한 시험 및 기준 화합물, 또는 비히클을 함유하는 배지를 첨가하였다 (100  $\mu$ L/웰). 이어서, 트랜스웰을 시험 및 기준 화합물 또는 DMSO 비히클을 함유하는 24-웰 플레이트로 옮겼다. 항온처리 1시간 후 (35 °C, 5% CO<sub>2</sub>), 분생자 현탁액 (10  $\mu$ L/웰)을 각 트랜스웰의 상부 구획에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 24시간 동안 항온처리하였다 (35 °C, 5% CO<sub>2</sub>). 각 구획 (5  $\mu$ L/구획)으로부터의 상청액을 수집하고 저장하였다 (-20 °C). 상청액 수집 후 배지를 매일 교체하고, 상기 기재된 바와 같이 3일 동안 모든 웰을 시험 및 기준 화합물 또는 DMSO로 처리하였다. 모든 트랜스웰 중에서 진균 성장이 눈으로 관찰될 때까지 샘플 수집을 지속하였다. 이어서, 아스페르길루스 푸미가투스 침투의 지표로서 하부 구획 내 상청액 중 GM의 수준을 ELISA로 측정하였다 (BioRad, CA, USA).

[0115] 세포 생존력: 레자주린 (Resazurin) 분석

[0116] 실험 하루 전, RPMI-LHC8 (동일 비율로 배합된 RPMI-1640 및 LHC8 배지) 중 384-웰 플레이트 (100  $\mu$ L; 3000 / 웰 /; BD Falcon, 카탈로그 번호 353962) 내에 BEAS2B 세포를 시딩하였다. 세포-비함유 대조군 웰에 대해서, RPMI-LHC8 (100  $\mu$ L)을 첨가하였다. Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland)를 사용하여 0.5%의 최종 DMSO 농도가 되도록 시험 화합물 (0.5  $\mu$ L의 DMSO 용액)을 첨가하였다. BEAS2B 세포를 1일 동안 각 시험 화합물로 항온처리하였다 (37 °C / RPMI-LHC8 중 5% CO<sub>2</sub>). 레자주린 원액 (5  $\mu$ L, 0.04%)을 첨가한 후, 플레이트를 추가 4시간 동안 항온처리하였다 (37 °C / 5% CO<sub>2</sub>). 545 nm (여기) 및 590 nm (방출)에서의 각 웰의 형광을 멀티-스캐너 (Clariostar: BMG Labtech)를 사용하여 측정하였다. 비히클 (0.5% DMSO) 처리와 비교하여 각



웰에 대해 세포 생육력 손실률을 계산하였다. 적절한 경우, 각 시험 화합물에 대한 농도-반응 곡선으로부터 생성된 농도-반응 곡선으로  $CC_{50}$  값을 계산하였다.

[0117] 생체내 항-진균 활성

[0118] 아스페르길루스 푸미가투스 (ATCC 13073 [균주: NIH 5233], American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 RT ( $24 \pm 1$  °C)에서 6-7일 동안 맥아 아가 (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 플레이트 상에 성장시켰다. 아가 플레이트로부터 무균상태로 포자를 제거하고, 0.05% Tween 80 및 0.1% 아가를 사용하여 이를 멸균 증류수 중에 현탁시켰다. 감염 당일, 혈구계로 포자를 계수하고, 접종물을 조정하여  $1.67 \times 10^8$  포자  $ml^{-1}$  농도의 생리 식염수를 수득하였다. 면역억제 및 호중구감소증을 유도하기 위하여, A/J 마우스 (수컷, 5 주령)에게 감염 3, 2 및 1일 전 히드로코르티손 (Sigma H4881; 125 mg/kg, sc,)을 투약하고, 감염 2일 전 사이클로포스파미드 (Sigma C0768; 250 mg/kg, i.p.)를 투약하였다. 0일에, 동물을 포자 현탁액 (30  $\mu$ L 비강내)으로 감염시켰다.

[0119] 시험 물질을 1, 2 및 3일에만 1일 1회 비강내 (생리 식염수 중 0.0032-10.0 mg/mL의 약물의 현탁액 35  $\mu$ L) 투여하였다 (이로써 치료적 처리 요법을 나타냄). 장기간의 예방적 처리를 위하여, 시험 화합물 (생리 식염수 중 0.0032 또는 0.016 mg/mL의 현탁액 35  $\mu$ L)을 7일 동안 1일 1회 비강내 투여하였다. 제1 그룹에는 감염 30분 전 0일에 투약하였나 이후에는 투약하지 않았으며, 제2 그룹에는 감염 후 1, 2 및 3일에 추가로 투약하였다. 이러한 처리 패러다임의 효과를, 다른 그룹에서 처리가 1일 또는 접종 전 30분에, 이어서 양 그룹 모두에서 감염 후 1, 2 및 3일로 제한된 경우에 수득된 효과와 비교하였다. 최종 그룹에서, 투약은 단지 1일 및 감염 전 30분에 2회 투약된 동물로 추가로 제한되었다.

[0120] 동물 체중을 매일 모니터링하고, 3일에 마지막 용량의 약물을 투여한지 6 시간 후, 동물을 마취시키고, 기관을 사판하고, BALF 혈액 및 폐 조직을 수집하였다. Quantikine<sup>®</sup> 마우스 IL-6 또는 TNF- $\alpha$  ELISA 키트 (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 각각 사용하여 혈청 내 IL-6 및 TNF $\alpha$ 의 수준을 측정하였다. Platelia GM-EIA 키트 (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA)를 사용하여 혈청 내 아스페르길루스 GM을 측정하였다. 다음의 식을 사용하여 컷-오프 지수 (COI)를 계산하였다: 컷-오프 지수 = 샘플 내 OD / 키트에 제공된 컷-오프 대조군 내 OD. 조직 진균 부하 분석을 위하여, 100 mg의 폐 조직을 무균 상태로 제거하고, 멸균 증류수 중 0.2 mL의 0.1% 아가 내에 이를 균질화하였다. 연속 희석된 폐 균질액을 맥아 아가 플레이트 (50  $\mu$ L/플레이트) 상에 플레이트링하고,  $24 \pm 1$  °C에서 72 내지 96 시간 동안 항온처리하였다. 각 플레이트 상의 A. 푸미가투스의 콜로니를 계수하고, 진균 역가를 폐 조직 g 당 CFU로 본원에 나타냈다.

[0121] 아스페르길루스 푸미가투스 DNA 함량의 측정을 위하여, 제조사의 지침에 따라 Isoplant (Nippon Gene)를 사용하여 감염된 폐 또는 아스페르길루스 푸미가투스로부터 DNA를 추출하였다. <3 mm의 임의의 길이로 조직을 자르고, 이를 용액 I (추출 완충액: 300  $\mu$ L)과 함께 혼합하였다. 이어서, 용액 II (용해 완충액; 벤질 클로라이드: 150  $\mu$ L)를 혼합물에 첨가하고, 후에 이를 5초 동안 볼텍스를 사용하여 혼합하였다. 50 °C에서 15분 동안 항온처리 한 후, 용액 III (나트륨 아세테이트, pH 5.2: 150  $\mu$ L)를 혼합물에 첨가하여 1-3초 동안 격렬하게 휘젓고, 이어서 15분 동안 얼음위에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 혼합물을 12,000 g로 4 °C에서 15분 동안 원심분리하였다. 상청액의 상부 수성 층 내 DNA를 100% 에탄올 (x 2.5 vol)로 침전시키고, 70% 에탄올로 세척하고, 5-10  $\mu$ L의 TE 완충액 중에 용해시켰다.

[0122] 96-웰 광학 반응 플레이트에서 Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Takara Bio)를 사용하여 DNA 증폭을 수행하였다. 프라이머 쌍을 이용하여 아스페르길루스 푸미가투스 18S rRNA 유전자 단편을 증폭시켰다: 5'-GGCCCTTAA ATAGCCCGGT-3' (서열 번호 1) 및 5'-TGAGCCGATAGTCCCCTAA-3' (서열 번호 2), 및 혼성화 프로브; 5'-FAM-AGCCAGCGGCCGCAAATG-TAMRA-3' (서열 번호 3). 다음의 조건하 (200 nM의 프로브와 함께 50ng의 마우스 DNA가 함유된 25  $\mu$ L)에서 실시간 PCR을 수행하였다: 50 °C에서 2분 간 초기 항온처리, 95 °C에서 10분 간 초기 변성, 이어서 95 °C에서 15초 및 65 °C에서 1분으로 55회 사이클. 아스페르길루스 푸미가투스로부터의 0.05-50,000 pg의 DNA에 대한 표준 곡선으로부터 50 ng의 마우스 폐 DNA 내 아스페르길루스 푸미가투스 DNA의 양을 평가하였다.

[0123] 스크리닝 결과 요약

[0124] 화합물 (I)은 브로쓰 미량희석 분석에서 평가된 바와 같이 플랑크톤 진균 성장에 대해 강력한 억제 활성을 나타낸다 (표 3).

표 3

아스페르길루스 푸미가투스 단리물의 플랑크톤 진균 성장에 대한 보리코나졸, 포사코나졸, 암포테리신 B 및 화합물 (Ia-d)로의 처리 효과

처리 (시험 화합물)	지시된 아스페르길루스 푸미가투스 단리물에 대한 MIC <sub>75</sub> 값 (nM) <sup>1</sup>				
	NCPF2010	L98H	TR46	NCPF7099	NCPF7100
보리코나졸	511	2585	>2860	113	543
포사코나졸	10.9	98.3	414	167	59.7
암포테리신 B	407	195	187	248	523
화합물 (Ia)	2.81	12.7	93	10.0	12.7
화합물 (Ib)	8.02	303	334	86.2	87.3
화합물 (Ic)	2.27	54.9	164	11.5	10.9
화합물 (Id)	8.51	70.0	316	11.7	25.2

표 각주: 1. 브로쓰 미량희석 분석, n = 2-3.

[0125]

[0126]

이러한 분석에서, 특히 화합물 (Ia)는, 포사코나졸, 보리코나졸 및 암포테리신 B에서 보다는, 포사코나졸-내성 균주 (NCPF7099, NCPF7100, TR34/L98H 및 TR46/Y121F/T289A), 및 포사코나졸-민감성 균주 (NCPF2010)에 대해 현저히 뛰어난 효능을 나타냈다.

[0127]

화합물 (Ia 및 Ic)는 또한 기관지 상피 세포의 진균 감염에 대해 강력한 억제 활성을 입증한다 (표 4). 이러한 분석 시스템에서, 화합물 (Ia 및 Ic)는 보리코나졸보다 현저히 뛰어난 효능을 나타내고, 포사코나졸보다 더욱 뛰어난 효능을 나타냈다. 화합물 (Ia, Ib, Ic 및 Id)과의 항온처리는 하기 지시된 농도에서 BEAS2B 기관지 상피 세포의 생육력에 대해서 효과가 없거나 미미하였다.

표 4

아스페르길루스 푸미가투스 (NCPF2010) 플랑크톤 진균 성장, BEAS2B 기관지 상피 세포의 진균 감염 및 BEAS2B 세포 생육력에 대한 보리코나졸, 포사코나졸, 암포테리신 B 및 화합물 (Ia-d)로의 처리 효과

처리 (시험 화합물)		지시된 처리에 대한 MIC <sub>50</sub> / CC <sub>50</sub> 값 (nM)	
		BEAS2B 세포의 감염 <sup>1</sup>	BEAS2B 세포 생육력 <sup>2</sup>
		MIC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>
보리코나졸		154	>28600
포사코나졸		11.6	>14300
암포테리신 B		nt	2343
화합물 (Ia)		6.35	>14600
화합물 (Ib)		nt	>14600
화합물 (Ic)		1.86	>14600
화합물 (Id)		nt	>14600

표 각주: 1. 기관지 상피 세포; n = 1-3; 2. n = 3; nt: 시험되지 않음.

[0128]

[0129]

다양한 진균 병원체의 성장에 관한 화합물 (I)의 효과를 CLSI 브로쓰 미량희석 분석을 사용하여 평가하였다. 화합물 (Ia)은 아우레오바시디움 플루란스, 리조푸스 오리자에, 크립토크쿠스 네오포르만스, 차에토미움 글로보숨, 페니실리움 크리소제눔, 푸사리움 그라미네라룸, 클라도스포리움 헤르바룸 및 트리코피톤 루브룸 뿐만 아니라, 칸디다 종 (특히 칸디다 알비칸스, 칸디다 글라브라타 및 칸디다 크루세이) 및 일부 아스페르길루스 종 (특히 아스페르길루스 플라부스)의 성장의 강력한 억제제로 밝혀졌다 (표 5).

표 5

다양한 진균 종 성장에 대한 화합물 (Ia)의 억제 효과

진균류	균주	화합물 (Ia)		보리코나졸		포사코나졸	
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>100</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>100</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>100</sub>
		(μg/mL)		(μg/mL)		(μg/mL)	
아스페르길루스 플라부스	ATCC204304	0.13	0.13	1.0	2.0	0.063	0.13
아우레오바시디움 플루란스	ATCC9348	0.25	1.0	>8.0	>8.0	0.25	1.0
칸디다 알비칸스	20240.047	0.016	>2.0	0.031	>8.0	0.031	>8.0
	ATCC10231	0.25	>2.0	0.25	>8.0	0.13	>8.0
	20183.073	0.125	>2.0	4.0	>8.0	0.25	>8.0
칸디다 글라브라타	ATCC36583	0.25	>2.0	0.25	>8.0	0.5	>8.0
	20197.1	0.0078	>2.0	0.031	>8.0	0.031	>8.0
칸디다 크루세이	ATCC6258	0.25	0.25	0.25	1.0	0.13	0.25
리조푸스 오리자에	ATCC11145	0.25	0.5	8.0	>8.0	0.13	>8.0
크립토코쿠스 네오포르만스	ATCC24067	0.016	0.063	0.016	1.0	0.016	0.25
차에토미움 글로보숨	ATCC44699	0.031	0.13	0.5	1.0	0.13	0.25
푸사리움 그라미네라룸	ATCC16106	0.13	0.5	>8.0	>8.0	>8.0	>8.0
페니실리움 크리소제눔	ATCC9480	0.063	0.13	1.0	2.0	0.063	0.13
클라도스포리움 헤르바룸	NCPF2564	0.016	0.016	ND	ND	ND	ND
트리코피톤 루브룸	ATCC10218	ND	0.031	<0.008	0.063	<0.008	0.031

표 각주: MIC<sub>50</sub> / MIC<sub>100</sub> = 육안 검사에 의한 진균 성장의 50% 및 100% 억제에 필요한 농도 (CLSI). ND: 측정되지 않음.

[0130]

[0131]

감염 후 1일에 인간 폐포 이중층의 하부 챔버 내 갈락토만난 (GM)을 측정함으로써, 아스페르길루스 푸미가투스 (아졸 민감성 균주: NCPF2010; 및 아졸 내성 균주 TR34/L98H)의 폐포 침투에 대한 억제 활성을 측정하였다. 화합물 (Ia)의 정점 챔버 (apical chamber)로의 투여는 두 균주에 대한 90% 초과와 최대 효과와 함께, 하부 챔버 내 GM 수준의 농도-의존적 억제를 야기하였다 (표 6 및 7).



표 6

아스페르길루스 푸미가투스 (아졸 민감성 균주: NCPF2010)의 인간 폐포 이중층 (트랜스웰) 내 하부 챔버로의 침투에 대한 화합물 (Ia) 및 포사코나졸의 효과

처리 (시험 화합물)	지시된 처리에 대한 MIC 값 (nM)			
		MIC <sub>50</sub>		MIC <sub>90</sub>
포사코나졸		155		212
화합물 (Ia)		154		185

표 각주: n = 3.

[0132]

표 7

아스페르길루스 푸미가투스 (아졸 내성 균주: TR34/L98H)의 인간 폐포 이중층 (트랜스웰) 내 하부 챔버로의 침투에 대한 화합물(Ia) 및 포사코나졸의 효과

처리	지시된 처리에 대한 MIC 값 (nM)			
		MIC <sub>50</sub>		MIC <sub>90</sub>
시험 화합물				
포사코나졸		315		793
화합물 (Ia)		261		417

표 각주: n = 1

[0133]

[0134]

감염 후 수일 동안 억제 활성을 모니터링한 경우, 화합물 (Ia) (상부 챔버에서 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) 또는 포사코나졸 (하부 챔버에서 0.01  $\mu\text{g/mL}$ )을 사용한 단일 요법의 초기 억제 효과는 급속하게 사라지는 것으로 밝혀졌다 (표 8). 반대로, 상부 챔버에서 화합물 (Ia) 및 하부 챔버에서 포사코나졸 (상기와 같이)을 사용한 조합 처리는 침투 후 감염에 대한 지속적인 억제로 이어졌다. 결과적으로, 조합 처리에 대한 DFB<sub>50</sub>은 3.63 일이었고, 이는 화합물 단독으로 사용한 경우의 값보다 훨씬 더 긴 것이었다 (표 8). 또한, 화합물 (Ia)를 이트라코나졸, 보리코나졸 또는 카스포푼진과 조합하여 처리 한 경우, 조합 요법의 이러한 상승적 또는 적어도 부가적 효과가 생성되었다 (결과 도시되지 않음).

표 8

인간 폐포 이중층 (트랜스웰) 내 하부 챔버로의 아스페르길루스 푸미가투스 (NCPF2010) 침투에 대한 화합물 (Ia), 포사코나졸 및 조합 처리의 효과

OD값으로 나타난 처리에 대한 하부 챔버 내 GM 수준 (% 억제 vs. 대조군)					
처리 일수	비히클	화합물 (Ia) <sup>1</sup> 상부 챔버	포사코나졸 <sup>2</sup> 하부 챔버	조합 처리	
0	0	0	0	0	
1	0.73	0.24 (66)	0.074 (89)	0.019 (97)	
2	1.73	1.71 (1.5)	1.71 (1.5)	0.11 (94)	
3	1.82	1.67 (8.6)	1.70 (7.1)	0.18 (90)	
4	1.65	1.68 (-1.6)	1.70 (-3.0)	1.34 (19)	
5	1.64	1.63 (0.2)	1.69 (-3.6)	1.72 (-5.3)	
6	1.55	1.57 (-1.8)	1.59 (-3.0)	1.62 (-4.6)	
7	1.66	1.54 (7.1)	1.62 (2.5)	1.59 (4.4)	
처리에 대한 DFB <sub>50</sub> 값		1.04	1.16	3.63	

표 각주: 1. 0.1 µg/mL 로 투여; 2. 0.01 µg/mL 로 투여; DFB<sub>50</sub>: 대조군의 50% 진균 부하에 도달한 일수

[0135]

[0136]

또한, 아스페르길루스 푸미가투스의 아졸 내성 균주로 감염된 이중층에서 이러한 조합 처리를 시험하였다: 상부 챔버에서 화합물 (Ia) (0.3 µg/mL) 또는 하부 챔버에서 포사코나졸 (0.1 µg/mL)을 사용한 단일 요법은 제한된 이점을 나타내었다. 반대로, 화합물 (Ia) 및 포사코나졸의 조합은 하부 챔버로의 진균 침투에 대한 현저한 억제 효과를 나타내었다.

표 9

폐포 이중층 세포 시스템 (트랜스웰) 내 하부 챔버로의 아스페르길루스 푸미가투스 (아졸 내성 균주: TR34-L98H) 침투에 대한 화합물 (Ia), 포사코나졸 및 조합 처리의 효과

OD 값으로 나타난 처리에 대한 하부 챔버 내 GM 수준 (% 억제 vs. 대조군)					
처리 일수	비히클	화합물 (Ia) <sup>1</sup> 상부 챔버	포사코나졸 <sup>2</sup> 하부 챔버	조합 처리	
0	0	0	0	0	
1	0.63	0.016 (98)	0.016 (98)	0.014 (98)	
2	1.11	0.84 (24)	0.73 (35)	0.015 (99)	
3	1.06	1.01 (4.6)	1.16 (-10)	0.020 (98)	
처리에 대한 DFB <sub>50</sub> 값		1.53	1.94	> 3	

표 각주: 1. 0.3 µg/mL 로 투여; 2. 0.1 µg/mL 로 투여; DFB<sub>50</sub>: 대조군의 50% 진균 부하에 도달한 일수

[0137]

[0138]

접종 후 1, 2 및 3일에 화합물 (Ia)가 면역손상된 호중구감소성 마우스에 비강내 투여된 경우 (치료적 처리), 화합물 (Ia)은 포사코나졸보다 더 적은 용량으로 아스페르길루스 푸미가투스로의 감염으로 인한 체중 감소 (3일간 측정)에 대해 어느 정도의 보호를 나타냈다.

표 10

A.푸미가투스 감염으로 인한 면역손상된 호중구감소성 마우스의 체중 감소에 대한 화합물 (Ia) 또는 포사코나졸로의 처리 효과

처리 요법 <sup>2</sup>	약물 농도 (mg/mL)	체중 감소 <sup>1,2</sup> (체중 감소 억제율 %)	
		2 일	3 일
비히클+포자	-	5.5 ± 1.5	10.7 ± 1.8
화합물 (Ia)	0.0032	4.2 ± 1.2 (24)	9.7 ± 2.1 (9)
	0.016	3.6 ± 1.2 (35)	9.7 ± 3.2 (9)
	0.08	2.8 ± 2.4 (49)	8.3 ± 6.7 (22)
비히클+포자	-	4.7 ± 2.1	9.3 ± 2.7
포사코나졸	0.4	5.4 ± 0.4 (-15)	9.2 ± 4.0 (1)
	2	3.9 ± 1.3 (17)	7.1 ± 1.9 (24)
	10	3.9 ± 1.3 (17)	4.3 ± 1.8 (54)

표 각주: 1. 처리 시작 1 일의 동물 체중과 비교하여 A.푸미가투스 감염으로 인한 체중 감소율 (%); 2. 2 가지 독립 연구가 수행됨.

[0139]

[0140]

더욱이, 화합물 (Ia)로의 치료적 처리는 폐 내 진균 부하, 혈청 내 갈락토만난 농도 및 폐 내 아스페르길루스

푸미가투스 DNA 함량에 대해서 포사코나졸 보다 우수한 효과를 나타냈다. 화합물 (Ia)의 이러한 데이터를 표 11 및 도 1, 2 및 3에 나타낸다.

표 11

아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스의 폐 내 CFU, 혈청 내 갈락토만난 농도 및 폐 내 아스페르길루스 DNA 에 대한 화합물 (Ia)로의 예방 및 치료적 처리 효과

처리 요법	약물 농도 (μg/mL)	반응 억제 (%)		
		CFU (폐의 /mg)	혈청 내 GM (COI)	폐 내 DNA (pg/50ng 마우스 DNA)
비히클+포자	-	31.7 ± 17.4	3.38 ± 2.02	70.7 ± 41.3
화합물 (Ia)	3.2	25.8 ± 20.8 (19)	2.85 ± 2.76 (16)	41.7 ± 29.0 (41)
	16	24.2 ± 15.8 (24)	3.01 ± 2.14 (11)	56.1 ± 53.4 (21)
	80	9.30 ± 5.20 (71)	0.53 ± 0.38 (84)	4.10 ± 4.60 (94)

표 각주: 진균 부하 데이터를 평균 ± 평균의 표준오차로 나타냄 (SEM; n = 6).

또한, 독립 실험에서 치료학적으로 투여된 포사코나졸 및 화합물 (Ia)에 대한 ID<sub>50</sub> 값을 하기에 나타낸다 (표 12).

표 12

아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스의 폐 내 진균 부하, 혈청 내 갈락토만난 농도 및 폐 조직 내 아스페르길루스 푸미가투스 DNA 함량에 대한 포사코나졸 및 화합물 (Ia)로의 치료적 처리에 대한 ID<sub>50</sub> 값

약물 (치료 요법)	지시된 반응에 대한 ID <sub>50</sub> 값 (mg/mL)		
	폐 내 균 부하	혈청 내 GM	폐 내 A.푸미가투스 DNA
화합물 (Ia)	0.051	0.047	0.050
포사코나졸	0.39	0.59	Nt

표 각주: nt: 시험되지 않음

또한, 화합물 (Ia)로의 치료적 처리는 아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스에서 혈청 시토카인 농도를 억제하는 것으로 밝혀졌다 (표 13 및 14; 도 1, 2 및 3). 혈청 시토카인 수준의 억제에 대해 계산된 ID<sub>50</sub> 값 (표 14)은 (상기) 폐 진균 부하, 혈청 갈락토만난 농도 및 폐 아스페르길루스 푸미가투스 DNA 함량에 대한 값과 매우 유사하다.

표 13

아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스의 혈청 내 IL-6 및 TNFα 수준에 대한 화합물 (Ia)로의 치료적 처리 효과

처리 요법	약물 농도 (μg/mL)	바이오 마커 농도 (pg/mL) (억제 %)	
		IL-6	TNFα
비히클+포자	-	298 ± 142	35.3 ± 10.1
화합물 (Ia)	3.2	247 ± 185 (17)	28.1 ± 13.8 (20)
	16	262 ± 185 (12)	21.8 ± 14.6 (38)
	80	66.5 ± 32.9 (78)	4.7 ± 1.0 (87)

표 각주: 바이오마커 농도 데이터를 평균 ± 평균의 표준 오차로 나타냄 (SEM), N = 6.

[0145]

표 14

아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스의 혈청 내 IL-6 및 TNFα 수준에 대한 화합물 (Ia)로의 치료적 처리에 대한 ID<sub>50</sub> 값

약물 (예방 요법)	지시된 바이오마커에 대한 ID <sub>50</sub> 값 (mg/mL)	
	IL-6	TNFα
화합물 (Ia)	0.050	0.027

[0146]

[0147]

또한, 아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스에서 화합물 (Ia)을 이용한 장기간의 예방적 투여 효과를 관찰하였다. 화합물 (Ia)를 이용한 장기간 예방적 투여는, 이전 연구에 사용된 것보다 25 배 낮은 용량으로 폐 내 진균 부하, 및 BALF 및 혈청 내 GM 농도를 억제하는 것으로 밝혀졌다 (표 15). 또한, 데이터는, 7일의 예방이 1일의 예방적 처리보다 더 뛰어난 항-진균 효과를 나타내었으므로, 반복 투여시 폐에서 항-진균 효과가 축적된다는 것을 시사한다. 폐 내 화합물의 지속적 작용은, -7 내지 0일의 처리가 -1 및 0일에서의 처리에서 비롯된 것보다 3일에 더 우수한 항-진균 효과를 생성한다는 것을 시사한다.

표 15

아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스의 폐 내 진균 부하 (CFU) 및 BALF 및 혈청 내 GM 농도에 대한 화합물 (Ia)로의 장기간 치료 투여 효과

처리 요법 <sup>1</sup> (투여된 일수)	화합물 (Ia) 용량 (μg/mL)	BALF 및 혈청 내 GM에 대한 CFU 값, COI 값 및 반응 억제 % <sup>2</sup>		
		CFU (폐의 /mg)	BALF 내 GM (COI)	혈청 내 GM (COI)
비히클+포자	None	9.2±4.9	4.1±0.7	3.9 ±0.7
-7 내지 +3	0.64	2.0±3.6 (78)	3.1±0.85 (24)	2.6±0.82 (33)
-1 내지 +3	0.64	4.0±5.2 (57)	3.9±0.59 (5)	3.6±0.52 (8)
-7 내지 +3	3.2	0.04±0.08 (99.6)	1.5±0.59 (63)	1.5±0.85 (62)
-1 내지 +3	3.2	1.0±1.4 (89)	3.4±0.46 (17)	2.8±0.24 (28)
-7 내지 0	3.2	0.9±1.1 (90)	2.9±0.97 (29)	2.6±0.48 (33)
-1, 0	3.2	20.4±15.7 (-222)	4.5±0.63 (-10)	4.7±0.65 (-21)

표 각주: 1. N 값은 모든 비히클 및 약물 처리된 그룹에 대해 5 이다; 2. 진균 부하 및 GM 수준에 대한 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차 및 비히클에 대한 억제율로 나타냄.

[0148]

[0149] 생체내 약물동력학

[0150] 이는, 투여된 화합물로 발생한 전신 노출을 특성화하기 위하여 투여 후 다양한 시점에서 수집된 동물 (예: 마우스)의 폐, 및 혈장으로 투여되는 폐 치료제에 대해 일반적으로 사용되는 절차이다.

[0151] 본 발명의 화합물은 상기 언급된 생체내 시스템 내에서 시험될 것이다.

[0152] 화합물 (I)의 생물학적 프로파일 요약

[0153] 모든 4개 입체이성질체 형태의 화합물 (I)은 아스페르길루스 푸미가투스 플랑크톤 진균 성장 및 기관지 상피세포 감염의 강력한 억제제로 밝혀졌다. 화합물 (Ia)는 포사코나졸-내성 및 보리코나졸-내성 아스페르길루스 푸미가투스 단리물의 성장을 억제하였으며, 이는 이러한 균주에 대해서 포사코나졸, 보리코나졸 및 암포테리신 B 보다 뛰어난 효능을 갖는다는 것을 입증하는 것이다. 또한, 다양한 다른 병원성 진균이 화합물 (Ia)에 대해 민감한 것으로 밝혀졌다. 화합물 (Ia) 및 포사코나졸, 이트라코나졸, 보리코나졸 및 카스포푼진에 대한 상승적 또는 적어도 부가적 효과가 나타났다. 아스페르길루스 푸미가투스 감염된 면역손상된 호중구감소성 마우스의 생체내에서, 화합물 (Ia)는 치료학적으로 또는 예방적으로 투여되는 경우 아스페르길루스 푸미가투스 감염 뿐만 아니라, 관련된 폐 면역 반응의 강력한 억제제를 나타낸다는 것이 입증되었다. 또한, 화합물 (Ia)는 감염-의존적 체중 감소를 저하시키는데 효과가 있었다. 이러한 억제 효과는 포사코나졸의 효능보다 우수한 것이었다. 화합물 (I)의 이로온 항-진균 효과가 치료적 설정에서 관찰된다는 것은 임상적으로 중요한 것이다.

[0154] 참고 문헌

[0155] Agbetile, J., Fairs, A., Desai, D., Hargadon, B., Bourne, M., Mutalithas, K., Edwards, R., Morley, J.P., Monteiro, W.R., Kulkarni, N.S., Green, R.H., Pavord, I.D., Bradding, P., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J. and Pashley, C.H. Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV1. *Clin. Exp. Allergy*, 2012, **42**, 782-91.

[0156] Bafadhel M., McKenna S., Agbetile J., Fairs A., Desai D., Mistry V., Morley J.P., Pancholi M., Pavord

I.D., Wardlaw A.J., Pashley C.H. and Brightling C.E. *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. *Eur. Respir. J.*, 2014, **43**, 64-71.

- [0157] Bowyer P. and Denning D.W. Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. *Pest Management Science*, 2014, **70**, 173-178.
- [0158] Chishimba L., Niven R.M., Fom M., Cooley J. and Denning D.W. Voriconazole and Posaconazole Improve Asthma Severity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Severe Asthma with Fungal Sensitization. *Pharmacotherapy*, 2012, **49**, 423-433.
- [0159] Chotirmall S.H., O'Donoghue E., Bennett K., Gunaratnam C., O'Neill S.J. and McElvaney N.G. Sputum *Candida albicans* presages FEV1 decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest*, 2010, **138**, 1186-95.
- [0160] CLSI M27-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, 2nd ed., NCCLS document M27-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A., 2002.
- [0161] CLSI M38-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed., CLSI document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A., 2008.
- [0162] Denning D.W., Pleuvry A. and Cole D.C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 2011a, **89**, 864-872.
- [0163] Denning D.W., Park S., Lass-Flori C., Fraczek M.G., Kirwan M., Gore R., Smith J., Bueid A., Moore C.B., Bowyer P. and Perlin D.S. High frequency triazole resistance found in nonculturable *aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2011b, **52**, 1123-1129.
- [0164] Dimopoulos G., Frantzeskaki F., Poulakou G. and Armaganidis A. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2012, **1272**, 31-39.
- [0165] Geist M.J.P., Egerer G., Burhenne J., Riedel K-D. and Mikus G. Induction of voriconazole metabolism by rifampin in a patient with acute myeloid leukemia: importance of interdisciplinary communication to prevent treatment errors with complex medications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, **51**, 3455-3456.
- [0166] Hope W.W., Kruhlak M.J., Lyman C.A., Petraitiene R., Petraitis V., Francesconi A., Kasai M., Mickiene D., Sein T., Peter J., Kelaher A.M., Hughes J.E., Cotton M.P., Cotten C.J., Bacher J., Tripathi S., Bermudez L., Mangel T.K., Zervas P.M., Wingard J.R., Drusano G.L. and Walsh T.J. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J. Infect. Dis.*, 2007, **195**(3), 455-466.
- [0167] Jeong S., Nguyen P.D. and Desta Z. Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effect on CYPs 2B6, 2C9, 2C19, and 3A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 541-551.
- [0168] Kaur S. and Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.*, 2014, **52**, 2-9.
- [0169] Kimura G., Ueda K., Eto S., Watanabe Y., Masuko T., Kusama T., Barnes P.J., Ito K. and Kizawa Y. Toll-like receptor 3 stimulation causes corticosteroid-refractory airway neutrophilia and hyper-responsiveness in mice. *Chest*. 2013, **144**, 99-105.
- [0170] Lat A. and Thompson G.R. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. *Infect. Drug Resist.*, 2011, **4**, 43-53.
- [0171] Limper A.H., Knox K.S., Sarosi G.A., Ampel N.M., Bennett J.E., Catanzaro A., Davies S.F., Dismukes W.E., Hage C.A., Marr K.A., Mody C.H., Perfect J.R. and Stevens D.A. An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. *Am.*

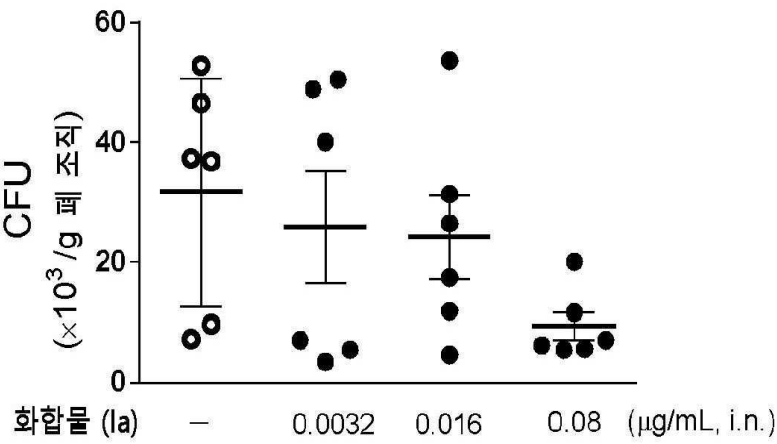
*J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, **183**, 96-128.

- [0172] Levin M-D., den Hollander J.G., van der Holt B., Rijnders B.J., van Vliet M., Sonneveld P. and van Schaik R.H. Hepatotoxicity of oral and intravenous voriconazole in relation to cytochrome P450 polymorphisms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, **60**, 1104-1107.
- [0173] Lin S-J, Scranz J and Teutsch S.M. Aspergillus case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, **32**, 358-366.
- [0174] Monteiro M.C., de la Cruz M, Cantizani J., Moreno C., Tormo J.R., Mellado E, De Lucas J.R., Asensio F., Valiente V., Brakhage A.A., Latgé JP, Genilloud O., Vicente F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J. Biomol. Screen.* 2012, **17**, 542-549.
- [0175] Pasqualotto A.C., Powell G., Niven R. and Denning D.W. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respirology*, 2009, **14**, 1121-127.
- [0176] Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 1494-500.
- [0177] Rankin, N. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with granulocytosis and antibiotic therapy. *Br. Med. J.*, 1953, **183**, 918-9.
- [0178] Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Arikan S., Barchiesi F., Bille J., Chyssanthou E., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Denning D.W., Donnelly J.P., Fegeler W., Lass-Floerl C., Moore C., Richardson M., Gaustad P., Schmalreck A., Velegraki A. and Verweij P. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. E.DEF 9.1 2008, 1-13.
- [0179] Salmeron G., Porcher R., Bergeron A., Robin M., Peffault de Latour R., Ferry C., Rocha V., Petropoulou A., Xhaard A., Lacroix C., Sulahian A., Soci G., and Ribaud P. Persistent poor long-term prognosis of allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients surviving invasive aspergillosis. *Haematologica*, 2012, **97**, 1357-1363.
- [0180] Shaus S.E., Larrow J.F. and Jacobsen E.N. Practical Synthesis of Enantiopure Cyclic 1,2-Amino Alcohols via Catalytic Asymmetric Ring Opening of Meso Epoxides. *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4197-4199.
- [0181] Thompson G.R. and Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, **29**, 103-110.
- [0182] Wexler D., Courtney R., Richards W., Banfield C., Lim J. and Laughlin M. Effect of posaconazole on cytochrome P450 enzymes: a randomized, open-label two-way crossover study. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, **21**, 65-653.

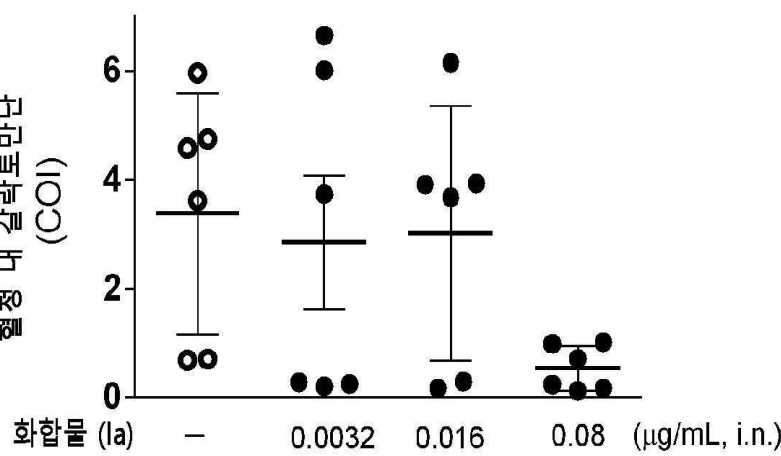


도면

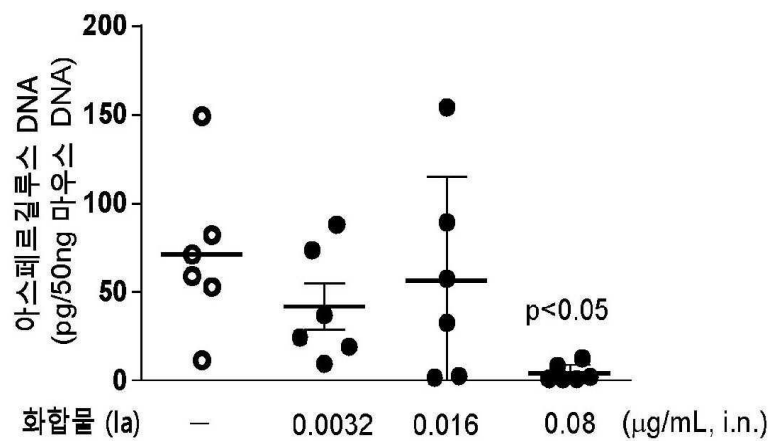
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pulmocide Limited

<120> ANTIFUNGAL 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-TRIAZOL-1-YL)METHYL)-5-(2,4-DIFLUOROPHENYL)TETRAHYDROFURAN-3-YL)METHOXY)-3-METHYLPHENYL)PIPERAZIN-1-YL)-N-(2-HYDROXYCYCLOHEXYL)BENZAMIDE, OR A PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF.

<130> IPA171057-GB

<150> EP15168637.5

<151> 2015-05-21

<160> 3

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First primer

<400> 1

ggcccttaaa tagcccggt

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second primer

<400> 2

tgagccgata gtccccctaa

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hybridisation probe DNA region

<400> 3

agccagcggc ccgcaaatg

19