

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 5월 14일 (14.05.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/091238 A1

(51) 국제특허분류:

C07D 417/14 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)

협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/015359

(22) 국제출원일: 2020년 11월 5일 (05.11.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0140132 2019년 11월 5일 (05.11.2019) KR

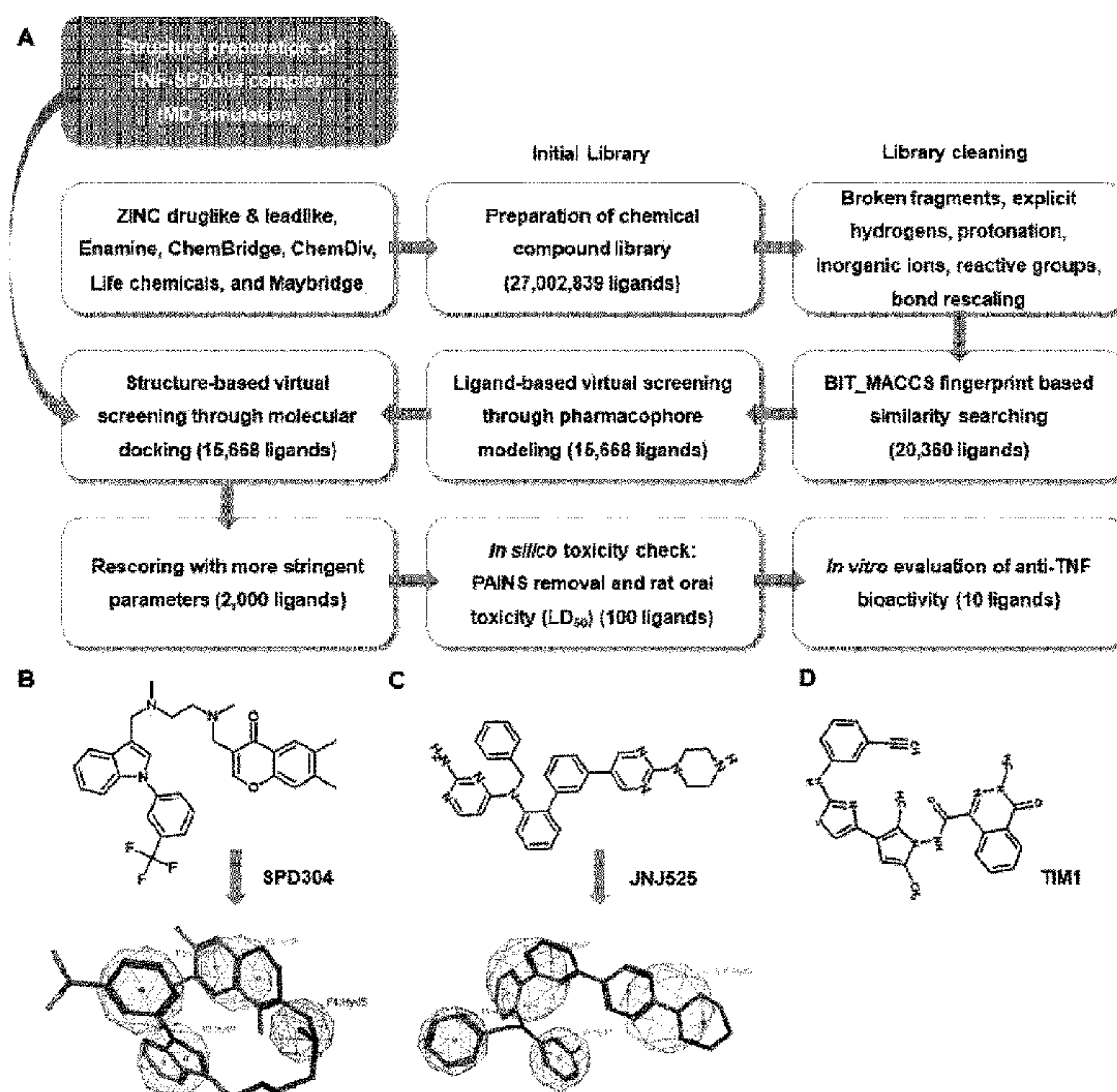
(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR). 경희대학교 산학

(72) 발명자: 최상돈 (CHOI, Sang Dun); 16493 경기도 수원시 팔달구 권광로 373 #103-3001, Gyeonggi-do (KR). 마헤시파트라 (MAHESH, Patra); 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 원천관 #104, Gyeonggi-do (KR). 나시르자배드 (NASIR, Javid); 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 원천관 #135, Gyeonggi-do (KR). 마리아바툴 (MARIA, Batool); 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 원천관 #104, Gyeonggi-do (KR). 함대현 (HAHM, Dae-Hyun); 02551 서울시 동대문구 답십리로23길 30 #102-904, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 언주로 430 16층, Seoul (KR).

(54) Title: TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF-ALPHA) SMALL MOLECULE INHIBITOR

(54) 발명의 명칭: 종양 괴사 인자 알파(TNF- α) 소분자 억제제



(57) Abstract: The present invention relates to a small molecule TNF- α inhibitor and, more specifically, to: a compound for inhibiting the formation of a TNF- α homotrimer by specifically binding to the binding cavity of a TNF- α homodimer; a composition for inhibiting TNF- α , containing the compound; and a composition for preventing or treating autoimmune diseases and/or inflammatory diseases, containing the composition for inhibiting TNF- α . Extracellular inactivation of TNF- α through protein-protein interface destruction is the most innovative and effective method for alleviating chronic systemic inflammatory states, and TIM series compounds, which have better efficacy and lower toxicity than those of existing TNF inhibitors and have oral bioavailability, can be effectively used as leading anti-inflammatory molecules.

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 소분자 TNF- α 억제제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 TNF- α 동종이합체(homodimer)의 결합 공동(binding cavity)에 특이적으로 결합하여 TNF- α 동종삼합체(homotrimer)의 형성을 억제하는 화합물과 이를 포함하는 TNF- α 억제용 조성물 및 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 단백질-단백질 계면의 파괴에 의한 TNF- α 의 세포 밖 불활성화는 만성 전신성 염증 상태를 완화시키는 가장 혁신적이고 효과적인 방법이며, 현존하는 TNF 억제제보다 효과적인 효능, 낮은 독성 및 경구 생물학적 이용가능성이 있는 TIM 시리즈 화합물들은 항-염증제 선도 분자로서 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 종양 괴사 인자 알파(TNF- α) 소분자 억제제 기술분야

- [1] 본 발명은 소분자 TNF- α 억제제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 TNF- α 동종이합체(homodimer)의 결합 공동(binding cavity)에 특이적으로 결합하여 TNF- α 동종삼합체(homotrimer)의 형성을 억제하는 화합물과 이를 포함하는 TNF- α 억제용 조성물 및 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 종양 괴사 인자(TNF) 슈퍼패밀리는 숙주 보호 및 종양 억제와 같은 몇 가지 중요한 생리적 과정에 필수적인 다면 발현성(pleiotropic)의 전염증성 사이토카인 그룹을 구성한다(Aggarwal BB, et al. (2012) *Blood* 119(3):651-665; Beutler B, et al. (1985) *Science* 229(4716):869-871)). 그러나, TNF 아형(특히 TNF- α)의 조절장애 신호전달은 류마티스 관절염, 건선(Victor FC & Gottlieb AB (2002) *J Drugs Dermatol* 1(3):264-275) 및 염증성 장 질환(Brynskov J, et al. (2002) *Gut* 51(1):37-43)을 비롯한 몇 가지 병리학적 상태와 연관되어 있다. TNF- α 의 만성적 생산은 또한 알츠하이머 병(Swardfager W, et al. (2010) *Biol Psychiatry* 68(10):930-941), 주요 우울증(Dowlati Y, et al. (2010) *Biol Psychiatry* 67(5):446-457) 및 암(Locksley RM, et al. (2001) *Cell* 104(4):487-501)과 관련이 있다. 따라서, 상이한 유형의 치료 조절자를 사용하여 TNF 신호전달 경로를 차단시키는데 상당한 노력이 집중되어왔다(Monaco C, et al. (2015) *Int Immunol* 27(1):55-62).
- [4] TNF- α 는 단백질분해(proteolytic) 절단(TNF- α -전환 효소에 의한) 후 17 kDa, 157 아미노산 가용성 단백질로 발현되는 26 kDa, 233 아미노산 transmembrane(TM) 단백질로 처음 합성된다. 가용성 TNF- α (sTNF- α)는 자발적으로 사이토카인의 생물학적 활성 형태인 안정한 동종삼합체(homotrimer)로 조립된다(Black RA, et al. (1997) *Nature* 385(6618):729-733). TNF- α 는 주로 대식세포, T 림프구 및 자연 살해 세포에 의해 생성되며, TNF 수용체 1(TNFR1)과 TNFR2의 구별되는 두 가지 수용체에 의해 인식되어 서로 다른 신호전달을 유발한다(Wajant H, et al. (2003) *Cell Death Differ* 10(1):45-65). TNFR1은 모든 세포 유형에 의해 널리 퍼져 발현되지만, TNFR2의 발현은 면역 세포에 국한된다. 따라서 TNF- α 와 각 수용체의 결합은 다양한 기능적 결과를 가져온다(Kontermann RE, et al. (2009) *Expert Opin Drug Discov* 4(3):279-292). TNFR1의 하류 신호전달 경로는 전형적으로 extracellular-signal-regulated kinase(ERK), p38 MAPK 및 c-Jun N-terminal kinase(JNK)를 포함하며 nuclear factor κ -light-chain-enhancer of

activated B cells(NF- κ B) 및 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)로 불리는 전사 인자를 활성화시킨다(Ting AT & Bertrand MJM (2016) *Trends Immunol* 37(8):535-545). NF- κ B와 MAPKs의 활성화는 강한 염증 반응을 나타내어 때때로 대부분의 세포 유형의 아포토시스(apoptosis) 또는 괴사(necrosis)를 유발하는 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) 및 면역조절자(immunoregulators)의 유도에 중요한 역할을 한다(Annibaldi A & Meier P (2018) *Trends Mol Med* 24(1):49-65).

- [5] 마우스 모델에서 TNF 생산의 조절장애는 만성 관절염과 연관되어 있으며, TNF 억제제의 적용이 상기 질병에 효과적이라는 것이 제시되었다(Keffer J, et al. (1991) *EMBO J* 10(13):4025-4031). 이 관찰 결과는 항-TNF 제조업체들 사이에 많은 관심을 불러 일으켰으며, 류마티스 관절염(Elliott MJ, et al. (1993) *Arthritis Rheum* 36(12):1681-1690)과 크론병, 건선, 건선성 관절염, 소아 특발성 관절염(juvenile idiopathic arthritis), spondyloarthritis 및 베체트 병(Behcet's disease)과 같은 만성 염증성 질환에서 최초로 성공한 임상 시험으로 이어진다(Sfikakis PP (2010) *Curr Dir Autoimmun* 11:180-210). 염증성 질환의 치료를 위해 현재 승인된 약물은 인플릭시맵(infliximab), 아달리무맵(adalimumab), 세톨리주맵(certolizumab) 및 골리무맵(golimumab)과 같은 합성 단일클론 항체 또는 에타너셉트(etanercept)와 같은 수용체 융합 단백질이 있으며, 이러한 모든 약물은 sTNF- α 에 결합하여 TNFR1 또는 TNFR2와의 연관을 방지한다(Lis K, et al. (2014) *Arch Med Sci* 10(6):1175-1185). 이들 생물학적 제제는 임상에서 성공했지만, 고가이고 경구 투여가 가능하지 않으며, 때때로 잠복해 있는 또는 재발하는 감염에 대한 숙주 면역력을 약화시킨다(Wendling D, et al. (2017) *Expert Opin Drug Saf* 16(1):1-3). 따라서 소분자(small-molecule) 기반 치료법은 생물학적 제제에 의한 TNF- α 억제의 잠재적 대안으로 인식되고 있다(Richmond V, et al. (2015) *Curr Med Chem* 22(25):2920-2942). TNF- α 의 첫 번째 길항제(antagonist)인 SPD304는 구조 기반 약물 설계를 통해 개발되었다(He MM, et al. (2005) *Science* 310(5750):1022-1025). 후속 연구는 리간드 JNJ525의 다중 카피에 결합된 TNF- α 의 구조를 밝혀냈으며, 이는 가능한 응집-매개 TNF 저해를 나타낸다(Blevitt JM, et al. (2017) *J Med Chem* 60(8):3511-3517). 최근 연구에서는 1~50 μ M 범위의 IC₅₀를 갖고 TNF- α 에 직접 결합하며, TNFR1- 또는 TNFR2-매개 하류 신호전달 경로를 차단하는 소분자를 제시했다(Chen CS, et al. (2010) *Bioorg Med Chem* 18(2):597-604). 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 연구 모두에서 TNF- α -매개 세포 효과를 조절하는 천연 생성물과 같은 화합물 또한 발견되었다(Hu Z, et al. (2012) *Biochem Pharmacol* 84(11):1482-1491). 항-TNF 생물학의 전임상 진보에도 불구하고, 이들 화학 제제의 낮은 효능 및 높은 독성은 최근 임상 시험에서의 테스트를 제한해왔다.

[6]

[7] 이에, 본 발명자들은 소분자 TNF- α 억제제를 개발하고자 예의 노력한 결과,

구조 기반 및 리간드 기반이 결합된 가상 스크리닝 접근법을 통해, TNF 억제 분자(TNF inhibitory molecules; TIM)로 지정된 신규 소분자 TNF- α 억제제 시리즈를 확인하였으며, *in vitro* 생물분석을 통해 선도물질 TIM1이 사이토카인의 TNF- α -매개 분비를 현저하게 저해하며 200 μ M 농도까지 세포독성을 나타내지 않고 마우스 및 인간 세포 유형 모두에서 TNF- α -유도 세포사멸을 감소시킨다는 것을 확인하였다. 또한, 교차 결합 실험 및 웨스턴 블랏팅과 컴퓨터 모델링을 통해 TIM1이 TNF- α 동종이합체(homodimer)에서 중앙의 소수성 공동(cavity)을 안정적으로 점유할 수 있고, 기능성 동종삼합체(homotrimer)의 형성에 필요한 제3단량체의 결합을 방지할 수 있다는 것을 확인하였다. 나아가, TIM1의 유도체 중 TIM1c가 콜라겐-유도 다발성관절염 마우스 모델에서 경구 생체 활성을 나타내며, 관절염 증상을 건강한 마우스 수준으로 억제하는 것을 확인하였다. 결과적으로, TIM 시리즈가 TNF-매개 자가면역질환 및/또는 염증질환을 완화시키는 저분자 화합물 치료제의 개발을 위한 유력한 선도 화합물이 될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

[9] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[10]

[11] **발명의 요약**

[12] 본 발명의 목적은 TNF- α -매개 사이토카인 분비 억제, TNF- α 유도 세포사멸 감소 효과를 나타내는 소분자 화합물 및 이를 포함하는 TNF- α 억제용 조성물 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 TNF- α 억제용 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 자가면역질환 및/또는 염증질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 TNF- α 억제용 조성물의 용도를 제공하는 데 있다.

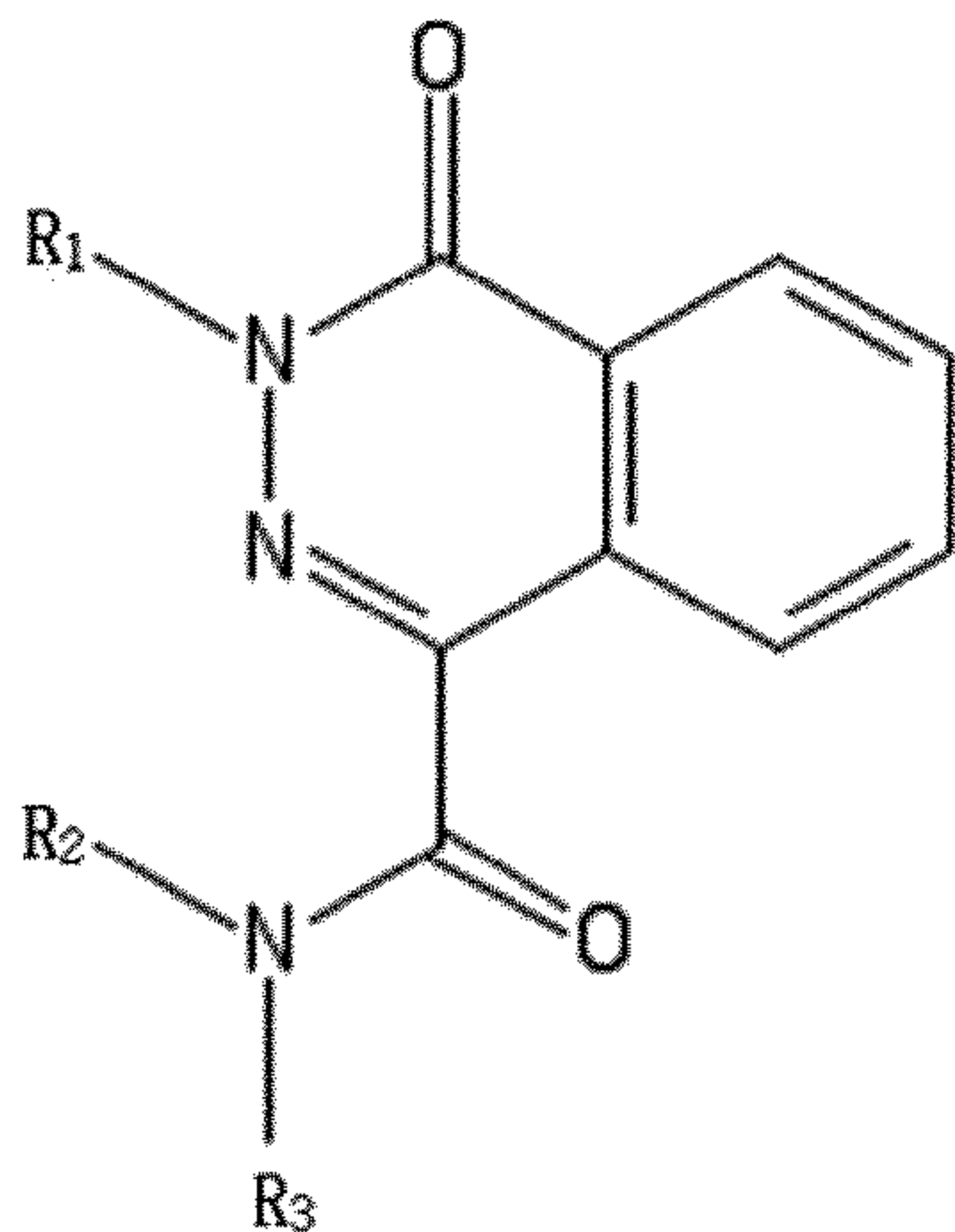
[16] 본 발명의 또 다른 목적은 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 TNF- α 억제용 조성물의 사용을 제공하는 데 있다.

[17]

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[19] [화학식 1]

[20]



- [21] 상기 화학식 1에서, R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 수소원자, 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 히드록시, 할로젠, 니트릴기, 니트로기, 사이클로알킬, 할로알킬, 알릴, 알콕시, 알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐, 아릴카보닐, 알킬아릴카보닐, 알콕시카보닐, 사이클로알콕시, 치환 또는 비치환된 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬, 아릴옥시, 알콕시헤테로아릴, 헤테로아릴옥시알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬에스테르, 알킬아미드 또는 아크릴이고, 여기서, 알킬, 알킬아미노 또는 알콕시는 C_{1-30} , 사이클로알킬은 C_{3-30} , 알릴은 C_{2-30} , 아릴은 C_{6-30} 이고, 헤테로아릴 및 헤테로사이클로알킬은 산소(O), 황(S) 및 질소(N) 중에서 선택된 헤테로원자를 함유한다.
- [22] 본 발명은 또한, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 TNF- α 억제용 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 자가면역질환 및/또는 염증질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 TNF- α 억제용 조성물의 용도를 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 TNF- α 억제용 조성물의 사용을 제공한다.
- [27]

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 본 발명에 따른 전체적인 가상 스크리닝 작업 흐름을 나타낸 것으로,
- [29] 도 1A는 화학-라이브러리 준비 및 가상 스크리닝의 다양한 단계의 도식적 표현으로, 각 단계의 산출 리간드 수는 괄호 안에 표시되어 있다. 도 1B는 활성 화합물 TIM1 및 두 개의 TNF 억제제 SPD304(PDB ID: 2AZ5) 및 JNJ525(PDB ID: 5MU8)의 2차원 구조를 나타낸 것이며, 도 1C는 리간드-기반 가상 스크리닝에

활용된 SPD304 및 JNJ525의 pharmacophore 모델을 나타낸 것이고, 도 1D는 TIM1의 2차원 구조를 나타낸 것이다.

[30] 도 2는 잠재적 종양 괴사 인자 α (TNF- α) 억제제의 스크리닝 및 동정을 나타낸 것으로,

[31] 도 2A는 인간 피부섬유아세포(human dermal fibroblasts; HDFs)에서 10개의 *in silico*-유래 히트 분자의 세포 생존율 분석(MTT 분석)을 나타낸 것으로, 각 리간드의 3가지 농도(1, 10 및 50 μ M)를 세포(10^4 /well)와 함께 24시간 동안 배양하였으며, TNF-억제제 C87 및 SPD304는 양성 대조군으로 사용하였다. 도 2B는 TIM1 및 SPD304에 의한 인간 인터루킨 8(hIL-8) 분비의 억제를 나타낸 것이며, 도 2C는 TIM1 및 SPD304에 의한 인간 인터루킨 6(hIL-6) 분비의 억제를 나타낸 것으로, 1시간 동안 재조합 인간 종양 괴사 인자 α (1ng/ml)로 사전배양한 4가지 농도(1, 10, 50 및 100 μ M)의 TIM1 및 SPD304를 HDF에 24시간 동안 적용시켰으며, hIL-8 및 hIL-6의 수준을 각각의 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA) 키트로 분석하고 대조군에 대한 표준화 후의 데이터를 나타냈다. 도 2D는 HDFs에서 hIL-8의 분비에 대한 TIM1의 IC₅₀ 곡선을 나타낸 것이며, 도 2E는 HDFs에서 hIL-6의 분비에 대한 TIM1의 IC₅₀ 곡선을 나타낸 것으로, IC₅₀ 값은 ELISA 실험에서 얻은 데이터를 이용하여 측정하였다. 도 2F는 TIM1 및 SPD304로 처리 후 MTT 분석에서 세포 생존율 분석을 나타낸 것으로, ELISA 실험을 독립적으로 4회 실시하였고, 실험의 평균 $\pm$ SEM을 two-tailed paired Student's *t* test(*P < 0.05)로 평가하였다.

[32] 도 3은 종양 괴사 인자 α (TNF- α)-유도 세포사멸의 감쇠를 나타낸 것으로,

[33] 도 3A는 인간 피부섬유아세포(HDF; 10^4 /well)에서 재조합 인간 종양 괴사 인자 α [rhTNF- α ; (10ng/ml)]와 함께 사전배양된 상이한 농도(1, 10, 50 및 100 μ M)의 TIM1 또는 SPD304에 의해 유발된 상대적 사멸율(%)을 나타낸 것이며, 도 3B는 재조합 마우스 종양 괴사 인자 α (rmTNF- α) 및 쥐 섬유육종 L929 세포와 함께 사전배양된 TIM1 또는 SPD304에 의한 사멸 감쇠율(%)을 나타낸 것으로, 처리 24시간 후, MTT 분석을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 도 3C는 TIM1 또는 SPD304로 처리한 후 HDF 세포 morphology를 나타낸 것이며, 도 3D는 TIM1 또는 SPD304로 처리한 후 L929 세포 morphology를 나타낸 것으로, 처리된 세포의 이미지를 10X magnification 역상 현미경으로 포착하였으며, 살아남은 세포는 흰색 화살표로 표시되었다. 도 3E는 HDF 세포에서 rhTNF- α 와 사전배양된 TIM1의 세포사멸 감쇠 잠재력을 보여주는 IC₅₀ 결정 곡선이며, 도 3F는 L929 세포에서 rmTNF- α 와 사전배양된 TIM1의 세포사멸 감쇠 잠재력을 나타내는 IC₅₀ 결정 곡선으로, IC₅₀ 값은 MTT 분석에서 얻어진 데이터로부터 계산되었다. 곡선 fitting 및 계산은 비선형 회귀 분석(nonlinear regression analysis)에 의해 GraphPad Prism 7(GraphPad Software, San Diego, CA)에서 수행되었다. 모든 실험을 독립적으로 4회 실시하였고 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM을 two-tailed paired Student's *t*-test(*P < 0.05)에 적용시켰다.

- [34] 도 4는 TIM1에 의한 다수의 종양 괴사 인자 α (TNF- α)-의존성 신호전달 경로의 억제를 나타낸 것으로,
- [35] 도 4A는 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B)의 p65(p-p65) subunit과 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)의 감소된 인산화를 보여주는 대표적인 western blots으로, TIM1 처리 후 extracellular-signal-regulated kinase(p-ERK), p38-MAPK(p-p38) 및 c-Jun N-terminal kinase(p-JNK)를 나타낸 것이다. L929 세포를 6cm dish에 분주하고, 재조합 마우스 TNF- α (rmTNF- α ; 1ng/ml) 단독 또는 TIM1(20 μ M)과 rmTNF- α (1ng/ml)의 5, 10, 15 또는 30분 동안 사전배양된 혼합물과 함께 처리하였다. 신호전달 성분의 총 단백질 추출 및 웨스턴 블랏팅은 각 단백질에 대한 1차 및 2차 항체를 사용하여 수행되었다. 도 4B는 TIM1에 의한 cleaved caspase 3(c-Cas3) 및 caspase 8(c-Cas8) 감소를 나타내는 대표적인 western blots으로, western blot은 ChemiDoc™ Touch Imaging System(Bio-Rad Laboratories)으로 시각화했으며, β -actin 단백질은 내인성(endogenous) 대조군으로 사용되었다.
- [36] 도 5는 TIM1에 의한 종양 괴사 인자 α (TNF- α) homotrimerization의 파괴를 나타낸 것으로,
- [37] TIM1 처리에 의한 재조합 인간 TNF- α homotrimerization assembly의 파괴(도 5A) 및 재조합 마우스 TNF- α homotrimerization assembly의 파괴(도 5B)를 나타낸 것이다. 인간 및 마우스 TNF- α 를 TIM1 또는 SPD304와 함께 배양하고, 화학적으로 교차 결합시킨 다음, 웨스턴 블랏팅 하였다. NC는 non-cross-linked control(no cross-linker, no inhibitor), CC는 cross-linked control(no inhibitor)를 의미한다. 블랏은 ChemiDoc™ Touch Imaging System(Bio-Rad Laboratories)으로 시각화했다.
- [38] 도 6은 TIM1-유도체들의 *in vitro* 활성 비교 및 콜라겐-유도 다발성관절염 마우스 모델에서 TIM1c의 항-관절염 활성의 행동 평가를 나타낸 것이다.
- [39] 도 6A는 TIM1-유도체의 인간 인터루킨-8(hIL-8) 억제 프로파일을 나타낸 것으로, 다양한 농도(1, 10, 50 μ M)의 화합물을 포함하는 재조합 인간 TNF- α 의 1시간 사전배양된 혼합물(1ng/ml)을 인간 피부섬유아세포에 적용시켰으며, 24시간 배양 후, 관련 ELISA 키트로 hIL-8의 수준을 분석하고 데이터를 대조군으로 표준화한 후에 나타냈다. 모든 ELISA 실험은 독립적으로 5회 수행되었으며; 각 실험은 반복 수행되었고; 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM을 two-tailed paired Student's t-test(* $P < 0.05$)에 사용하였다. 도 6B는 체중, 도 6C는 짹짹거리는 횟수(0의 값은 통증의 징후를 나타내지 않음), 도 6D는 발 부피 증가 및 도 6E는 관절염 지수 즉, 관절염 마우스 팔다리의 중증도를 나타내는 그래프이다. 관절염 팔다리의 수를 정량하고, 각 팔다리에 0-4의 중증도 점수를 할당했으며, 데이터는 관절염 마우스 당 관절염 팔다리의 수와 각 팔다리의 관절염의 평균 중증도 점수를 나타내고, 검은색 화살표는 약물 투여 시작일을 나타낸다. NOR, n = 4; CIA, n = 4; TIM1c_2 mg/ml, n = 4; TIM1c_20 mg/ml, n = 5.

Values are expressed as means $\pm$ SEM. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. NOR group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CIA group(two-way ANOVA followed by Bonferroni correction). 도 6F는 관절염 마우스의 앞다리 및 뒷다리의 각 그룹별 부기를 나타낸 것이다.

- [40] 도 7은 TNF- α 와 TIM1, TIM1c 또는 SPD304의 분자간 상호작용을 나타낸 것으로,
- [41] 도 7A는 SPD304와 TNF- α 의 중심 소수성 cavity의 상호작용을 나타낸 것이며, 도 7B는 TIM1과 TNF- α 의 리간드-결합 공동의 상호작용을 나타낸 것이고, 도 7C는 TIM1c와 TNF- α 의 리간드-결합 공동의 상호작용을 나타낸 것이다. 분자간 상호작용의 상세한 시각화를 위해 확대된 보기가 오른쪽에 제시되었으며, TNF- α 의 chain A와 chain B는 각각 파란색과 초록색이다. 결합된 리간드는 흰색으로 표시된 탄소 원자와 공동의 중앙에 막대 모델로 표시되며, 두 subunits의 주요 잔기 Y119/Y119*는 주황색 막대로 표시된다. 잔기 숫자의 '*'는 TNF- α 의 chain B를 의미한다.
- [42] 도 8은 증가하는 농도에서 신규 리간드인 TIM1의 세포 독성 분석을 나타낸 것으로,
- [43] 도 8A는 인간 피부섬유아세포의 생존력에 대한 TIM1 및 이의 용매 DMSO의 효과를 나타낸 그래프이다. 세포(10^4 /well)를 3가지 상이한 농도의 DMSO(0.5, 1 및 2%) 및 8가지 상이한 농도의 TIM1(1, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 $200\mu\text{M}$)으로 24시간 동안 처리하고, MTT 분석 방법으로 세포 생존율을 모니터링하였다. 도 8B는 도 8A와 동일한 조건에서 마우스 섬유육종 세포주[L929 (1.5×10^4 /well)]의 생존력에 대한 TIM1의 효과를 나타낸 그래프이다. 모든 실험은 4회 독립적으로 수행하였고, 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM을 two-tailed paired Student's t -test(* $P < 0.05$)에 사용하였다.
- [44] 도 9는 모든 활성 리간드의 SMILES strings, IUPAC 이름 및 분자량을 나타낸 것이다.
- [45] 도 10은 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델 개발 실험 일정을 나타낸 것이다.
- [46] 도 11은 100ns 분자 역학 시뮬레이션 시간의 함수로서 TNF- α -SPD304(검정색), TNF- α -TIM1(빨간색) 및 TNF- α -TIM1c(초록색)의 골격 원자간 거리의 제곱 평균 편차(RMSD)를 나타낸 것이다.
- [47]
- [48] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예
- [49] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [50]
- [51] 종양 괴사 인자 알파(Tumor necrosis factor alpha; TNF- α)는 TNF 수용체 1(TNF

receptor 1)-매개 사멸 신호전달 경로에 의해 유발되며 세포사멸의 한 형태인 괴사(네크로토시스; necroptosis)의 강력한 유도물질이다. 류마티스 관절염, 건선성 관절염 및 크론병(Crohn's disease)과 같은 전신성 염증질환의 치료를 위해 현재 승인된 항체와 같은 생물제제에 대한 대체 치료법으로 TNF- α 의 직접 저해 화합물이 오래 동안 고려되어왔다. 조절장애가 발생한 TNF- α -TNFR1 신호전달 축과 관련된 질병의 심각성 때문에 TNF- α -매개 염증 및 괴사 경로를 예방할 수 있는 강력한 분자를 개발할 필요성이 커지고 있다(Li P, Zheng Y, & Chen X (2017) *Front Pharmacol* 8:460).

- [52] TNF- α 억제제인 SPD304와 복합체를 이루는 TNF- α 의 X-선 결정 구조는 컴퓨터를 약물 발견 원리를 사용하여 많은 다중형태(multiconformational) 라이브러리를 스크리닝 할 수 있게 했다. 본 발명자들은 세포 자체에 대해 독성이 없으며, 인간 및 마우스 세포주 모두에서 TNF- α -유도 독성을 억제하는 신규한 선도 화합물 TIM1을 확인했다. 알려진 억제제 SPD304와의 비교를 통해 TIM1이 TNF- α 신호전달에 대해 상대적으로 독성이 적고 억제 활성이 유의한 것을 확인하였다. 또한, 화합물 TIM1c는 모든 TIM1-유도체 중에서 가장 활성이 있는 TNF 억제제인 것으로 입증되었고, CIA 마우스 모델에서 경구 생물학적 이용가능성을 나타내며, 마우스의 다양한 관절염 증상을 억제하였다.
- [53] TNF 억제 분자 1(TNF inhibitory molecule 1; TIM1)로 정의된 상기 억제제는 각각 26.2 μ M(사람 세포주에서) 및 24.9 μ M(마우스 세포주에서)의 IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration, 반수최대억제농도)를 갖는, 공지된 억제제 SPD304와 비교하여 무시할 수 있는 정도의 세포독성을 보였고, TNF- α 유도 세포사멸에서 우수한 감쇠 효과를 나타냈다. 또한, 상기 화합물은 L929 세포에서 NF- κ B(nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells), MAPKs(mitogen-activated protein kinases) 및 카스파제 3와 8-의존성 세포사멸 경로(caspase 3 and 8-dependent proapoptotic pathways)를 차단함으로써 저해 효과를 나타냈다. 인간 피부섬유아세포(human dermal fibroblasts; HDFs)에서 TNF- α 매개 인터루킨 6 및 인터루킨 8 분비에 대한 TIM1의 IC₅₀는 각각 6.3 μ M 및 16.71 μ M로 계산되었다. 본 발명에서는 상기 화합물이 homotrimerization assembly를 파괴함으로써 TNF- α 의 기능을 불활성화시키고, TNF 수용체와의 결합을 방지함을 입증했다. TIM1 유도체 중 하나인 TIM1c는 가장 강력한 *in vitro* 활성을 나타냈고, 콜라겐-유도 다발성관절염의 마우스 모델에서 경구 생물학적 이용가능성을 나타냈으며, 상기 화합물은 발 부기, 체중 감소, 찌적거리는 횃수를 억제하고, 마우스의 모든 관절염 지수를 감소시켰다. 따라서, TIM 시리즈 화합물들은 항-TNF 생물학적 제제의 대체물 개발에 있어서 강력한 선도물질로서 작용할 수 있다.
- [54] 컴퓨터 모델링은 TIM1/TIM1c가 양쪽 monomers의 Y119 잔기 사이에 쌓인 thiazole ring을 갖는 TNF- α dimer의 중심 소수성 cavity에 대한 양호한 형상 상보성(shape complementarity)을 갖는다는 것을 시사한다. Y119가 monomer

assembly를 조정하고 TNF- α 의 결합 cavity에서 억제제를 수용하는 데 필수적이라는 것이 밝혀진 바 있다(He MM, et al. (2005) *Science* 310(5750):1022-1025). TNF- α -TIM1 또는 TNF- α -TIM1c 복합체는 분자간 수소 결합이나 salt bridges가 없는 소수성 접촉에 의해 대부분 안정화되었다. TNF- α dimer상의 리간드-결합 cavity는 tyrosine과 같은 방향족 고리 구조에 의해 주로 평평한 표면으로 되어 있기 때문에, 리간드는 소수성이어야 하고 확장된 형태로 cavity를 점유할 만큼 충분히 커야 한다(Jin L, Wang W, & Fang G (2014) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54:435-456). 화학적 교차결합(chemical crosslinking) 및 웨스턴 블랏팅 분석은 TIM1이 특이적이고, TNF- α homotrimerization의 강력한 파괴 물질이라는 것을 명확하게 보여 주었다. 이 결과를 토대로 TIM1 또는 이의 강력한 유도체들(예를 들어 TIM1c)의 작용 메커니즘에 대한 두 가지 가능한 시나리오를 제안할 수 있다. 첫째로, 상기 리간드는 assembly 과정 중에 제3단량체를 모방하여 안정한 homodimer의 형성을 촉진시킨다. 두 번째로, 상기 리간드는 제3단량체가 자발적으로 분리된 후에만 homodimer에 결합하고 기능적 trimer의 후속 reassembly를 방지한다. 제3의 작용 메커니즘은 다음과 같을 수 있다: 상기 리간드는 예비 형성된 homotrimer와 상호작용하여 trimeric assembly로부터 monomer들 중 하나를 치환한다. TNF- α monomer의 리간드-결합 잔기가 단백질-단백질 계면(interface)에 묻혀 있으므로 억제제는 예비 형성된 trimer를 분리하기 위해 상당한 energy barrier를 극복해야 한다(Arkin MR, Tang Y, & Wells JA (2014) *Chem Biol* 21(9):1102-1114).

- [55] 몇 가지 알려진 TNF- α 억제제에 대해, 그들의 억제 작용의 확실한 메커니즘이 밝혀져 있다. 리간드는 예를 들어 (i) TNF- α 의 수용체-결합 표면과 상호작용함으로써(Ma L, et al. (2014) *J Biol Chem* 289(18):12457-12466), (ii) 수용체의 TNF-결합 표면과 상호작용함으로써(Chen S, et al. (2017) *J Chem Inf Model* 57(5):1101-1111), (iii) TNF- α 의 trimerization interface를 파괴시킴으로써(Chan DS, et al. (2010) *Angew Chem Int Ed Engl* 49(16):2860-2864), 또는 (iv) TNF- α -전환 효소 또는 다른 하류 신호전달 분자를 차단함으로써(Esposito E & Cuzzocrea S (2009) *Curr Med Chem* 16(24):3152-3167), TNF- α 의 세포 효과를 차단할 수 있다. 이러한 모든 접근법이 TNF-매개 신호전달 경로를 하향 조절하는데 상대적으로 효과적이었지만, 단백질-단백질 interface의 파괴에 의한 TNF- α 의 세포 밖(extracellular)의 불활성화는 만성 전신성 염증 상태를 완화시키는 가장 혁신적이고 효과적인 방법인 것으로 보인다. 이 접근법은 TNF- α 에 비가역적으로 결합하고 최대한의 특이성을 가지고 수용체와의 상호작용을 중화시키는 항체 또는 수용체 융합 단백질이 따르는 접근법과 유사하다.

- [56] 본 발명자들은 두 가지 TNF 억제제, SPD304 및 C87을 양성 대조군으로 평가하여 세포 생존율 분석에서 TIM1의 저해 활성을 동시에 확인하고 비교하였다. SPD304와는 달리 C87은 homotrimerization interface의 파괴를

포함하지 않는 알려지지 않은 메커니즘에 의해 TNF- α 신호를 억제한다고 보고되었다(Ma L, et al. (2014) *J Biol Chem* 289(18):12457-12466). 따라서, C87은 TIM1의 활성과의 추가적인 비교에서 제외되었는데, 그 이유는 두 가지가 서로 다른 작용 기전을 가지고 있기 때문이다. TIM1은 TNF- α -유도 사이토카인 분비 및 염증 세포의 세포사멸을 억제하는 효능이 높았으며, 높은 농도(100 μ M 이하)에서도 세포독성을 나타내지 않았다. 주어진 리간드의 독성은 대개 대사 저하 이후에 다양한 숙주 경로를 방해할 수 있는 내재하는 화학적 scaffolds에 기인한다(Stepan AF, et al. (2011) *Chem Res Toxicol* 24(9):1345-1410). 화학 데이터베이스(예를 들어, PubChem)에서의 유사성 검색으로 TIM1/TIM1c가 필수 숙주 분자와 상호작용하는 것으로 이전에 알려진 어떠한 단편도 함유하고 있지 않은 것을 확인하였으며, 이는 우수한 흡수(absorption), 분포(distribution), 대사(metabolism) 및 배출(excretion) (ADME) 특성을 의미한다. 이와 관련하여, SPD304가 서로 다른 농도에서 사이토카인 분비에 일관성 없는 효과가 있음을 관찰했다. 예를 들어, 사이토카인 분비의 억제는 10 μ M에서 약하지만 1 μ M에서 더 강했으며, 한편 10, 50 또는 100 μ M 농도에서 유의한 세포독성 효과를 나타냈다. 이러한 SPD304의 일관되지 않은 활성은 세포의 중요한 생리적 과정을 방해할 수 있는 특정한 화학적 특성에 기인한 것일 수 있다. 리간드의 3-alkylindole moiety는 cytochrome P450에 의해 대사되어 주요 intracellular 단백질 및 DNA와 반응할 수 있는 반응성 친전자성 이미늄(iminium) 이온을 생성한다(Sun H & Yost GS (2008) *Chem Res Toxicol* 21(2):374-385). 또한, C87은 HDFs에 대해 가벼운 독성을 나타내었다. 대조적으로 TIM1은 시험한 농도에서 어떠한 세포독성의 징후를 나타내지 않았다. 저농도(즉, ~1 μ M)에서 TIM1은 SPD304보다 다소 덜 효과적이지만, 그의 안전 프로파일은 치료 관점에서 훨씬 더 우수하다(도 8).

- [57] 본 발명자들은, TIM1-유도체 중 하나인 TIM1c가 경구 활성을 가지며, CIA 마우스 모델에서 전신성 염증을 억제할 수 있음을 확인하였다. 현재 RA, 건선성 관절염 및 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)과 같은 질병의 치료를 위해 항-TNF 항체 또는 디코이(decoy) 수용체만이 치료적으로 투여되도록 승인되었다(Patra MC, Shah M, & Choi S (2019) *Semin Cancer Biol*). 이전에, 몇몇 peptide/peptidomimetic-기반 TNF- α 저해제가 파지 디스플레이 또는 추론 디자인 접근법에 의해 확인되었다(Sun H & Yost GS (2008) *Chem Res Toxicol* 21(2):374-385; Alizadeh AA, et al. (2017) *Eur J Pharm Sci* 96:490-498). 그럼에도 불구하고 소분자 제제는 그들의 바람직한 약동학적 종점 때문에 펩타이드나 단백질보다 바람직하며, 생물학적 이용가능성과 물질대사 안정성이 향상된 약물을 제공한다(Mocsai A, Kovacs L, & Gergely P (2014) *BMC Med* 12:43). 소수의 TNF-차단 소분자들이 동물의 경구 경로를 통해 효과적인 것으로 입증되었다(Coste E, et al. (2015) *Ann Rheum Dis* 74(1):220-226). CIA 마우스에 대한 TIM1c의 효능은 TIM 시리즈 화합물들이 저분자량 약물의 사용을 통해

TNF-매개 염증성 질환의 치료 또는 예방에 대한 기존의 연구에 유용한 기여를 할 수 있음을 시사한다.

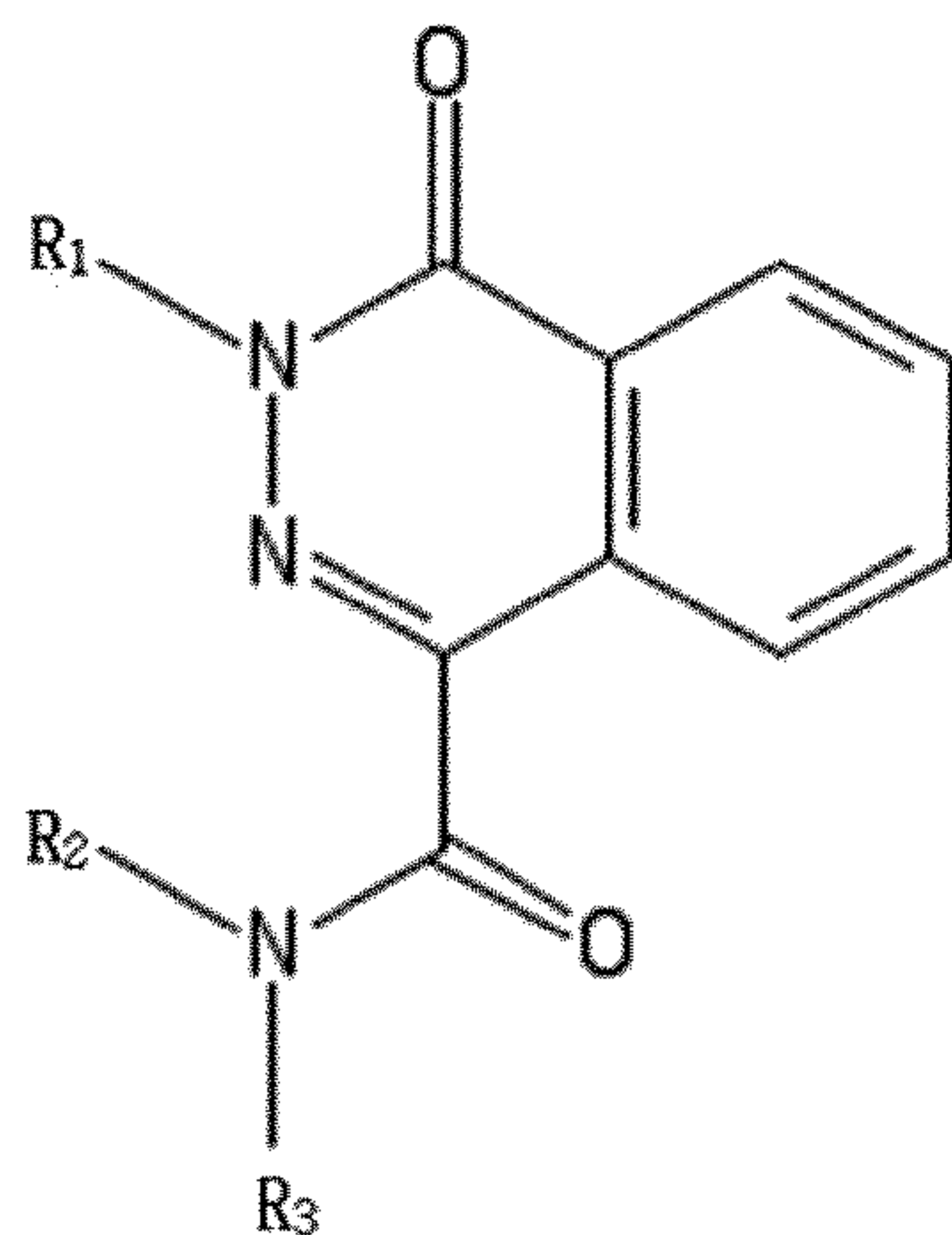
- [58] 요약하면, 본 발명에 따른 가상 스크리닝 작업 흐름을 통해 homotrimerization assembly를 방해함으로써 TNF- α 기능을 억제하는 능력을 지닌 새로운 소분자 리간드를 확인할 수 있었다. 기존의 TNF 억제제와 비교하여, 마우스에서 경구 효능을 나타내고, 낮은 독성 프로파일을 갖는 TIM 시리즈 화합물들은 가치 있는 항-염증 선도 분자로서 향후 개발 및 특성화될 수 있다.

[59]

- [60] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

[61] [화학식 1]

[62]



- [63] 상기 화학식 1에서,

- [64] R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 수소원자, 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 히드록시, 할로젠, 니트릴기, 니트로기, 사이클로알킬, 할로알킬, 알릴, 알콕시, 알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐, 아릴카보닐, 알킬아릴카보닐, 알콕시카보닐, 사이클로알콕시, 치환 또는 비치환된 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬, 아릴옥시, 알콕시헤테로아릴, 헤테로아릴옥시알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬에스테르, 알킬아미드 또는 아크릴이고,

- [65] 여기서, 알킬, 알킬아미노 또는 알콕시는 C_{1-30} , 사이클로알킬은 C_{3-30} , 알릴은 C_{2-30} , 아릴은 C_{6-30} 이고, 헤테로아릴 및 헤테로사이클로알킬은 산소(O), 황(S) 및 질소(N) 중에서 선택된 헤테로원자를 함유한다.

- [66] 본 발명에 있어서, 상기 알킬, 알킬아미노 또는 알콕시는 바람직하게는 C_{1-20} , 더욱 바람직하게는 C_{1-12} , 가장 바람직하게는 C_{1-6} 인 것을 특징으로 할 수 있다.

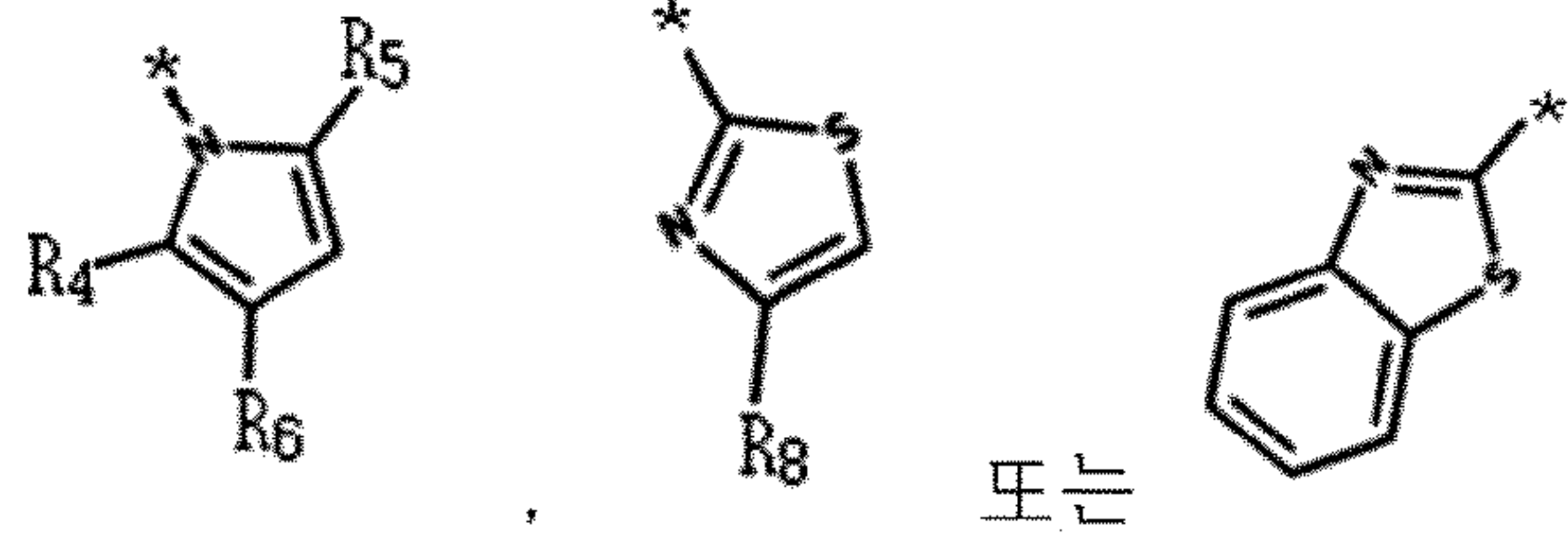
- [67] 본 명세서에서 용어 “ C_{1-30} 알킬”은 1 내지 30개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 1가 선형 또는 분지형 포화된 탄화수소 잔기를 의미한다. 이러한 알킬 기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- “분지형 알킬”의 예는 아이소프로필, 아이소부틸, 3급-부틸 등이 있다.
- [68] 용어 “ C_{1-30} 알콕시”는 화학식 $-O-C_{1-30}$ 알킬을 의미하며, 예를 들어 메톡시, 에톡시, 아이소프로폭시, 3급-부톡시 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [69] 용어 “할로젠(또는 할로(halo))”의 구체적인 예로는 플루오르(F), 클로린(Cl), 브롬(Br) 및 요오드(I)를 들 수 있다.
- [70] 용어 “ C_{6-30} 아릴(aryl)”은 공유 파이 전자계를 가지는 적어도 하나의 환을 포함하며, 예를 들어 모노사이클릭 또는 융합환 폴리사이클릭(즉, 탄소 원자들의 인접한 쌍들을 나뉘가지는 링들)그룹을 포함한다. 즉, 본 명세서에서 아릴은 달리 정의하지 않는 한 페닐, 나프틸 등과 바이아릴을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 아릴은 탄소수 6 내지 30의 방향족 고리를 지칭한다.
- [71] 용어 “ C_{3-30} 사이클릭알킬(Cyclic alkyl)”은 5 내지 6개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 고리형의 포화된 탄화수소 잔기를 의미한다. 이러한 사이클릭알킬 기의 예로는 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [72] 용어 “헤테로아릴”은 달리 정의하지 않는 한 N, O 및 S로 이루어진 그룹에서 선택된 1 내지 4개의 헤테로 원자를 포함하는 고리원자수 5 또는 6의 방향족 고리이거나, 또는 상기 헤테로아릴 고리가 벤젠 고리 또는 다른 헤테로아릴 고리에 융합된 2환식 고리를 지칭한다. 모노사이클릭 헤테로아릴의 예로는 티아졸릴, 옥사졸릴, 티오펜릴, 퓨라닐, 피롤릴, 이미다졸릴, 이소옥사졸릴, 이소티아졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 트리아지닐, 티아디아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐 및 이와 유사한 그룹을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비사이클릭 헤테로아릴의 예로는 인돌릴, 아자인돌릴, 인돌리닐, 벤조티오펜릴, 벤조퓨라닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조옥사졸릴, 벤즈이속사졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤즈티아디아졸릴, 벤즈트리아졸릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퓨리닐, 퓨로피리디닐 및 이와 유사한 그룹을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 용어 “헤테로사이클로알킬”은 탄소 원자 이외에 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 포함하는 고리원자수 5 내지 9의 포화되거나 부분적으로 불포화된 카보사이클릭 고리를 나타낸다. 예를 들어, 헤테로사이클릴은 아제티디닐, 피롤리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로-티에닐, 피라졸리디닐, 이미다졸리디닐, 옥사졸리디닐, 아이소옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 피페리디닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 피페라지닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 1,1-다이옥소-티오모르폴린-4-일, 아제파닐, 다이아제파닐, 호모피페라지닐, 옥사제파닐, 디하이드로인돌릴, 디하이드로푸릴, 디하이드로이미다졸리닐, 디하이드로옥사졸릴, 테트라하이드로피리디닐, 디하이드로피라닐, 디하이드로벤조퓨라닐, 벤조디옥솔릴, 또는 벤조디옥사닐이다.
- [74] 본 발명에 있어서, 상기 R_1 , R_2 및 R_3 는 하기로 구성된 군에서 선택되는

치환기인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] R_1 : C_{1-6} 알킬; 및

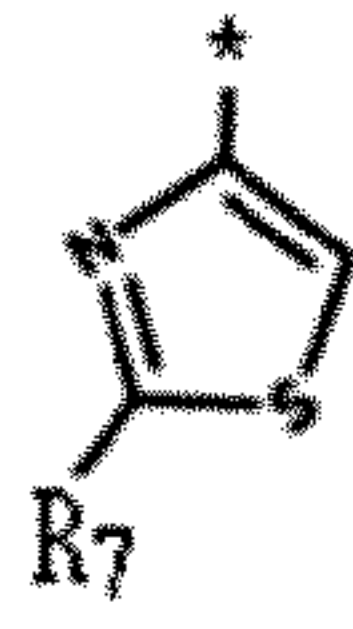
[76]



R_2 및 R_3 : 수소원자, 아릴,

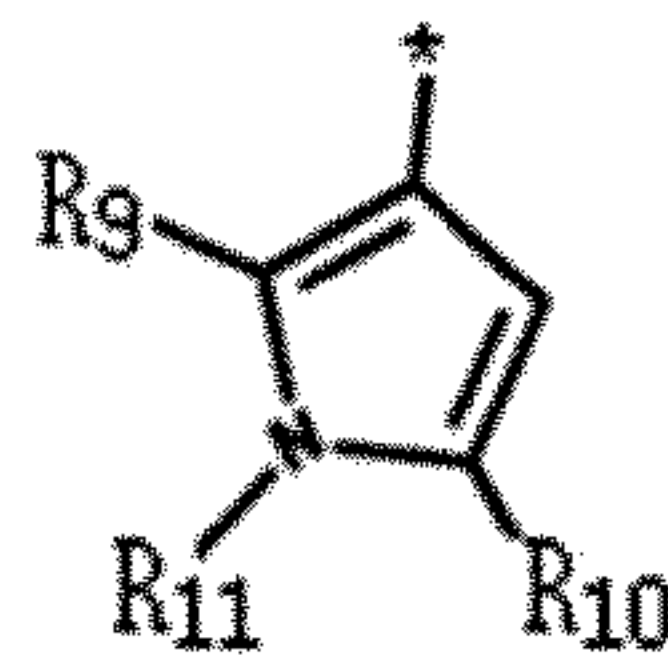
(여기서, R_2 및 R_3 는 서로 동일하거나 상이하며,

상기 R_4 및 R_5 는 서로 동일하거나 상이한 C_{1-6} 알킬;



상기 R_6 는 ;

상기 R_7 은 C_{1-6} 알킬아미노, 치환 또는 비치환된 아릴아미노;



상기 R_8 은 C_{1-6} 알킬 또는 ; 및

상기 R_9 내지 R_{11} 은 C_{1-6} 알킬 또는 아릴알킬인 것을 특징으로 함).

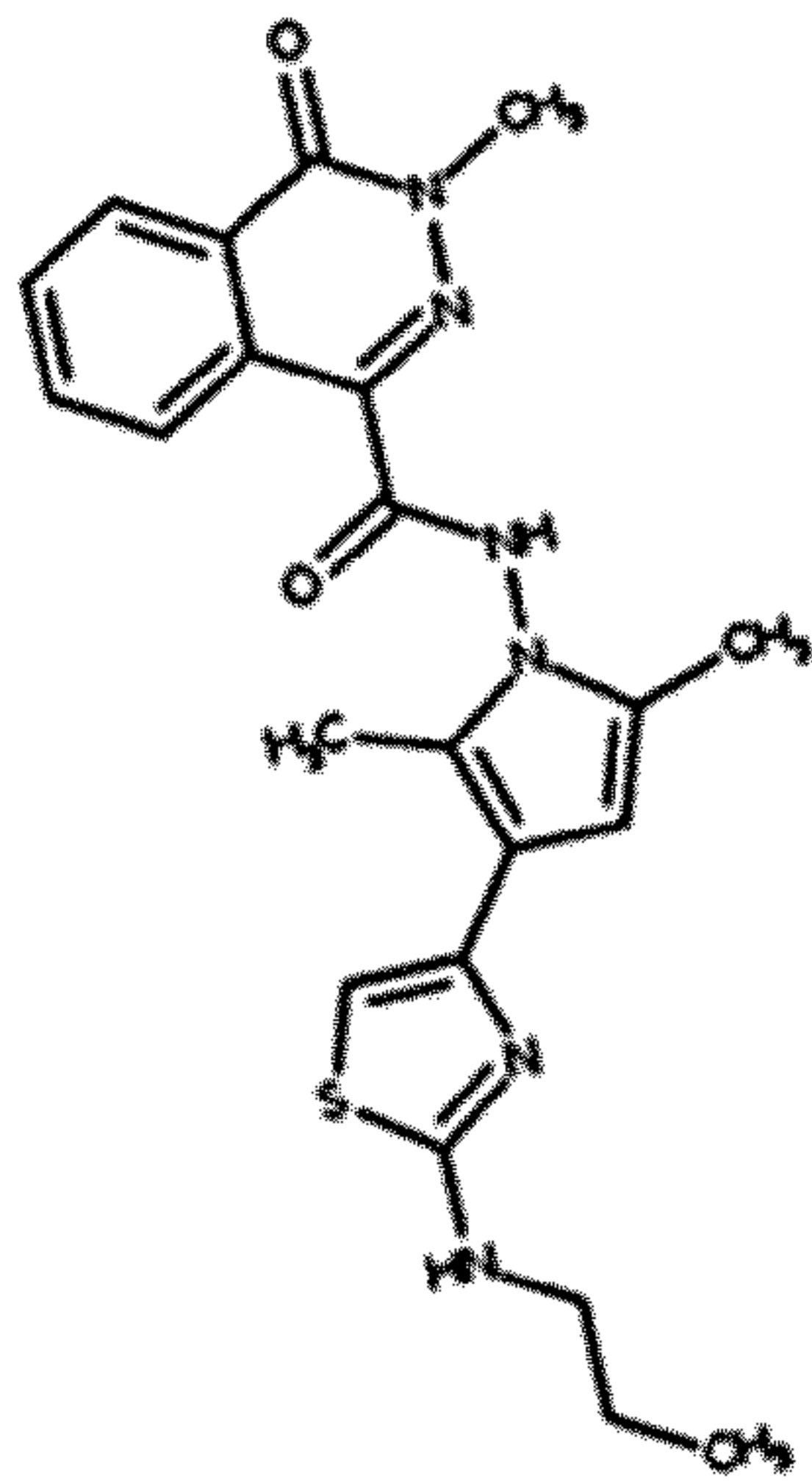
상기 치환기들에서, *은 화학식 1의 백본과 결합된 위치를 의미한다.

[77] 바람직하게는, 상기 R_1 , R_2 및 R_3 는 하기로 구성된 군에서 선택되는 치환기인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[78] R_1 : C_{1-6} 알킬; 및

[84] [화학식 1-2]

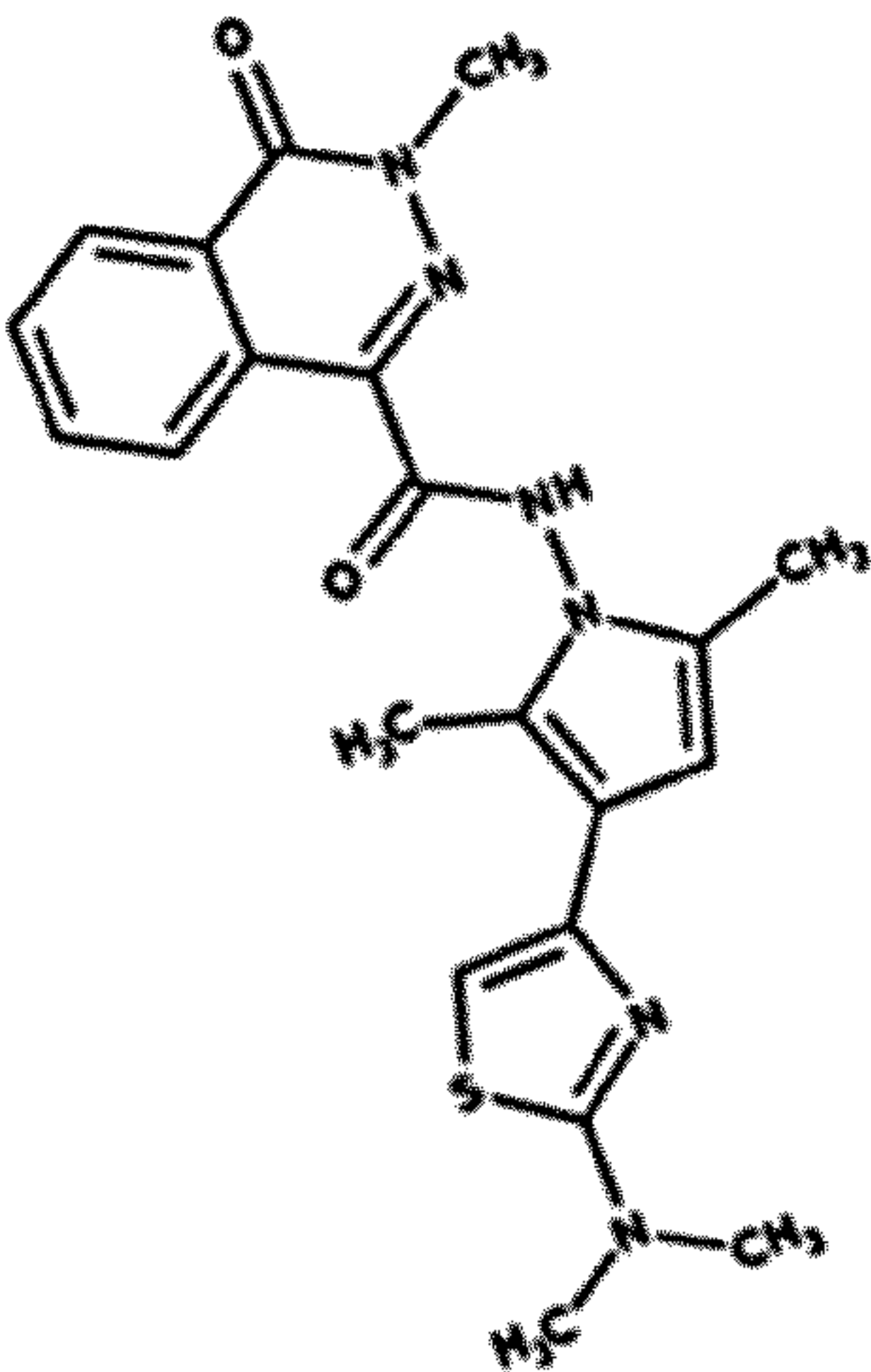
[85]



;

[86] [화학식 1-3]

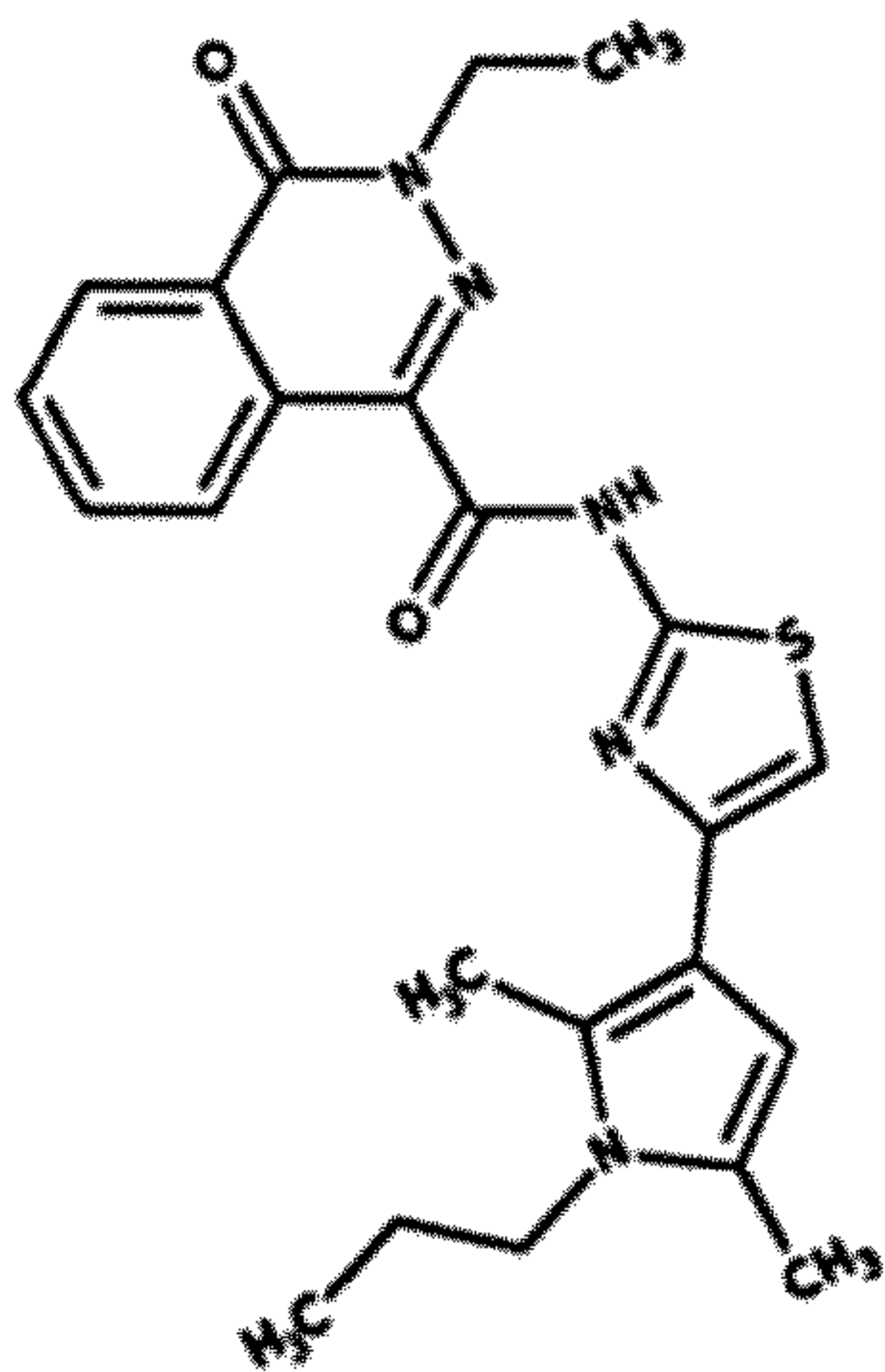
[87]



;

[88] [화학식 1-4]

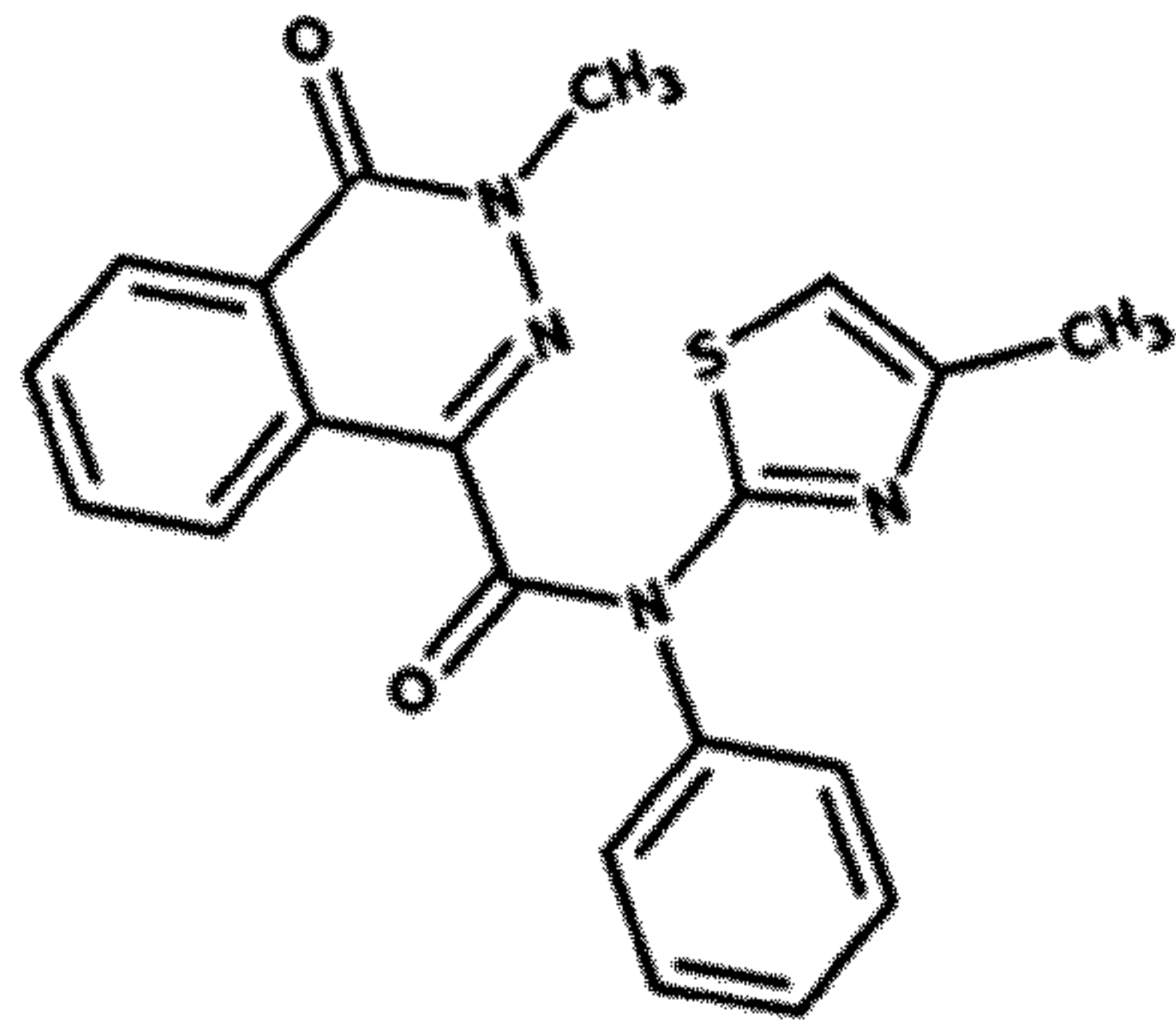
[89]



;

[90] [화학식 1-5]

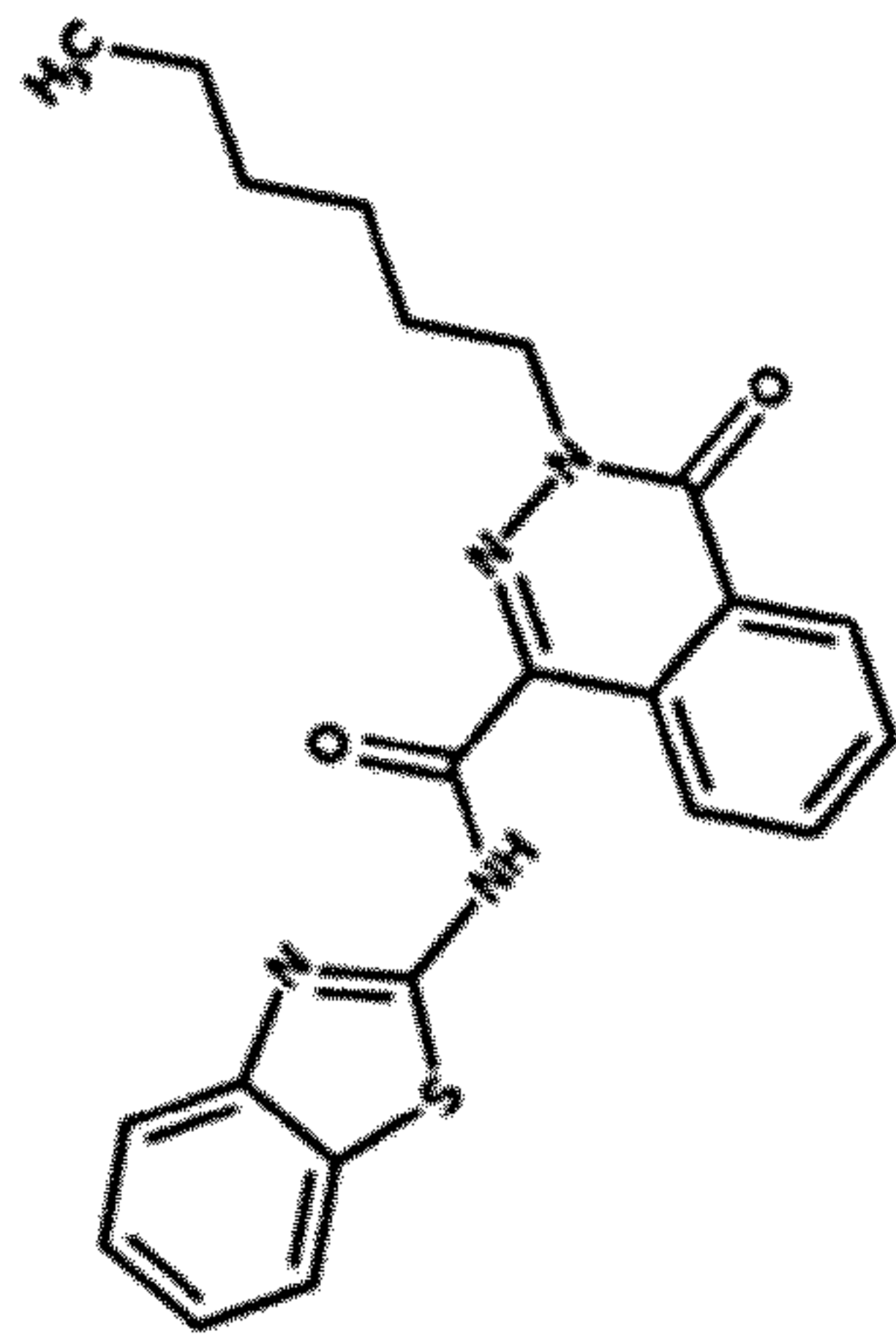
[91]



;

[92] [화학식 1-6]

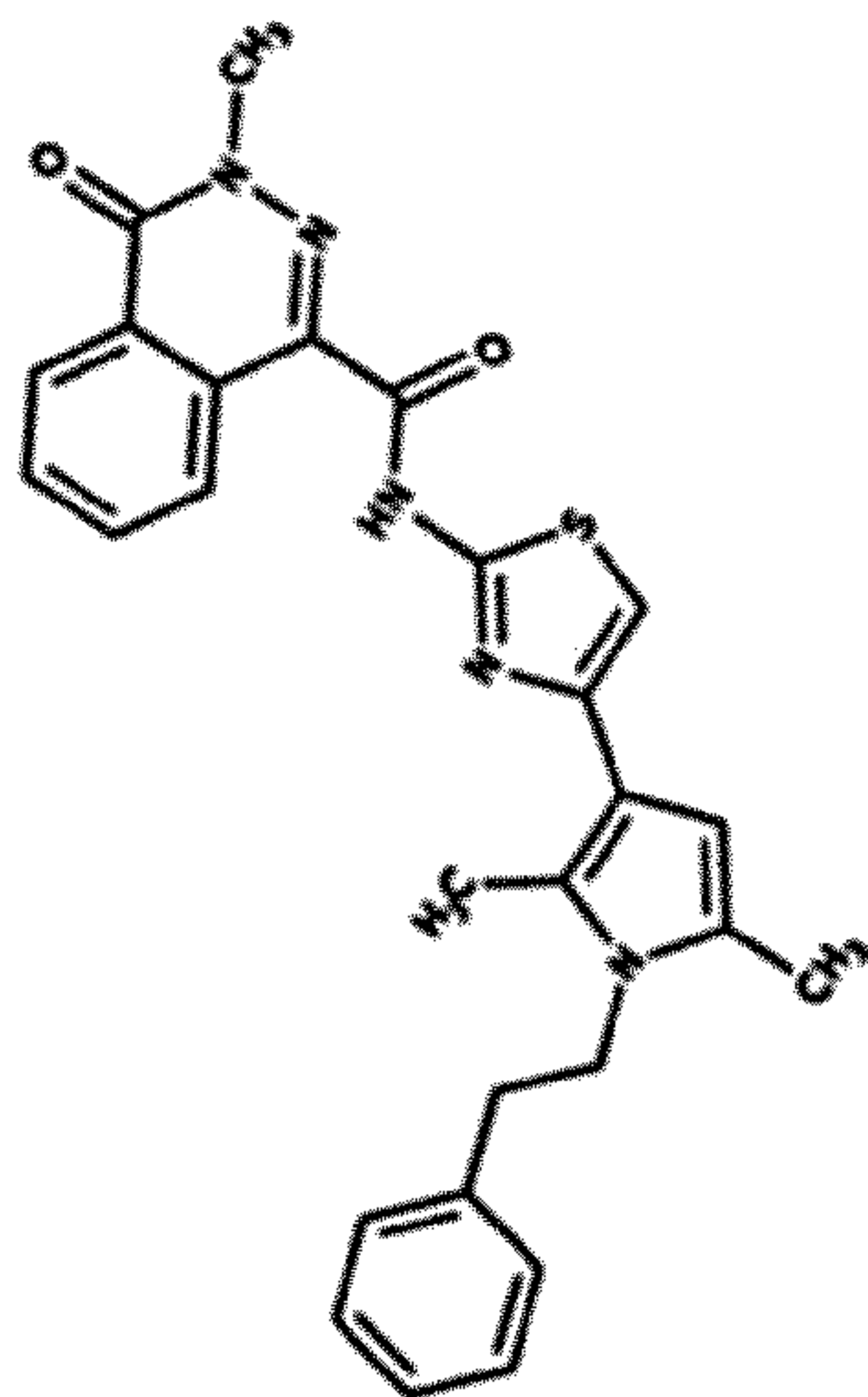
[93]



;

[94] [화학식 1-7]

[95]



.

[96] 본 명세서에서, 상기 화학식 1-1의 화합물은 TIM1로 명명되었으며, 화학식 1-2의 화합물은 TIM1c, 화학식 1-3의 화합물은 TIM1d, 화학식 1-4의 화합물은 TIM1-7, 화학식 1-5의 화합물은 TIM1-10, 화학식 1-6의 화합물은 TIM1-11,

화학식 1-7의 화합물은 TIM1-14로 명명되었다(표 1).

[97]

[98] [표 1]

활성 리간드의 SMILES strings, IUPAC 명칭 및 분자량

Name	SMILES	IUPAC Name	MW(g/mol)
TIM1	<chem>Cc1cc(-c2csc(Nc3cccc(c3)C#C)n2)c(C)n1NC(=O)c1nn(C)c(=O)c2ccccc12</chem>	N-(3-{2-[(3-ethynylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl}-2,5-dimethylpyrrol-1-yl)-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	494.57
TIM1c	<chem>C1.CCCNc1nc(cs1)-c1cc(C)n(NC(=O)c2nn(C)c(=O)c3ccccc23)c1C</chem>	N-{2,5-dimethyl-3-[2-(propylamino)-1,3-thiazol-4-yl]pyrrol-1-yl}-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide hydrochloride	472.99

[99]

TIM1d	<chem>CN(C)c1nc(cs1)-c1cc(C)n(NC(=O)c2nn(C)c(=O)c3cccc23)c1C</chem>	N-{3-[2-(dimethylamino)-1,3-thiazol-4-yl]-2,5-dimethylpyrrol-1-yl}-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	422.51
TIM1-7	<chem>CCc1c(C)cc(-c2csc(NC(=O)c3nn(CC)c(=O)c4cccc34)n2)c1C</chem>	N-[4-(2,5-dimethyl-1-propylpyrrol-3-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-3-ethyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	435.55
TIM1-10	<chem>Cc1csc(n1)N(C(=O)c1nn(C)c(=O)c2cccc12)c1ccc(C)cc1</chem>	3-methyl-N-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)-4-oxo-N-phenylphthalazine-1-carboxamide	376.43
TIM1-11	<chem>CCCCCn1nc(C(=O)Nc2nc3cccc3s2)c2cccc2c1=O</chem>	N-(1,3-benzothiazol-2-yl)-3-hexyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	406.5
TIM1-14	<chem>Cc1cc(-c2csc(NC(=O)c3nn(C)c(=O)c4cccc34)n2)c(C)n1Cc1cccc1</chem>	N-{4-[2,5-dimethyl-1-(2-phenylethyl)pyrrol-3-yl]-1,3-thiazol-2-yl}-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	483.59

[100]

[101] 본 발명에 있어서, TNF- α 억제 효과를 나타내는 상기 화합물은 바람직하게는 화학식 1-1 또는 화학식 1-2로 표시되는 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[102]

[103] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 TNF- α 억제용 조성물에 관한 것이다.

[104] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 TNF- α 동종이합체(homodimer)의 결합 공동(binding cavity)에 특이적으로 결합하여, TNF- α 동종삼합체(homotrimer)의 형성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[105] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 화합물이 TNF- α homotrimerization assembly를 파괴함으로써 TNF- α 의 기능을 불활성화시키고, TNF 수용체와의 결합을 방지함을 확인하였다.

[106] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 화합물은 낮은 세포독성을 나타내며, TNF- α 유도 세포사멸에서 높은 감쇠 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 상기 화합물에 의한 NF- κ B 및 MAPKs 활성 억제; 카스파제 3와 8-의존성 세포사멸

경로 억제; 및 IL-6(인터루킨 6)와 IL-8 분비 억제를 확인하였다.

[107]

[108] 본 발명에서, “종양 괴사 인자 알파(Tumor necrosis factor alpha; TNF- α)”는 전신성 염증반응(systemic inflammation)에 관여하는 세포 신호전달 단백질(사이토카인)로서, 급성기반응(acute phase reaction)을 형성하는 사이토카인 중 하나이다. TNF- α 는 CD4+ 림프구, NK 세포, 호중구, 비만 세포, 호산구 및 뉴런과 같은 많은 세포 유형들에 의해 생성될 수 있으며, 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성된다. TNF- α 는 상동성 TNF 도메인을 가진 다양한 막형단 단백질로 구성된 TNF superfamily에 속한다. TNF는 TNFR1(TNF 수용체 1; CD120a; p55/60)과 TNFR2(TNF 수용체 2; CD120b; p75/80)의 두 수용체에 결합할 수 있다. TNFR1은 대부분의 조직에서 발현되며 TNF의 막-결합 및 가용성 삼합체 형태에 의해 완전히 활성화될 수 있는 반면, TNFR2는 전형적으로 면역계 세포에서 발견되고 막-결합 형태의 TNF homotrimer에 반응한다. TNF는 NF- κ B와 MAPKs를 활성화시키며, 사멸 신호전달을 유도하고, 염증반응을 촉진시킨다.

[109] 본 발명에서 용어, “억제”(또는 “저해”)는 결핍, 부조화, 그 밖의 많은 원인에 의하여 생물 활동이나 활성이 저하되는 현상을 말하며, TNF- α 의 활성을 부분적으로 또는 완전히 블로킹하거나, 감소시키거나, 예방하거나, 활성화를 지연시키거나, 불활성화시키거나 또는 하향 조절하는 것일 수 있다.

[110] 본 발명에서 용어, “억제제”는 임의의 메커니즘에 의하여, 수용체 또는 세포 내 매개체와 같은 다른 분자의 영향을 부분적으로 또는 완전히 저해하는 분자를 의미한다.

[111] 본 발명에서 용어, “TNF- α 억제제” 또는 TNF- α 억제용 조성물은 TNF- α 의 생물학적 활성을 직간접적으로, 또는 실질적으로 방해, 감소 또는 저해할 수 있는 물질을 의미한다.

[112] 본 발명에 따른 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[113] 본 발명에 따른 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.

[114] 또한, 본 발명에 따른 상기 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 1의 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

[115]

- [116] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [117] 본 발명에 있어서, 상기 자가면역질환 및/또는 염증질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 크론병(Crohn's disease), 소아 특발성 관절염(juvenile idiopathic arthritis), 척추관절염(spondyloarthritis), 베체트 병(Behcet's disease), 포도막염, 판상 건선, 축성 척추관절염, 궤양성 대장염, 화농성 한선염, 인슐린-의존성 당뇨병, 습진, 알러지, 아토피성 피부염, 여드름, 아토피성 비염, 폐염증, 알레르기성 피부염, 만성 부비동염, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 위염, 통풍, 통풍 관절염, 궤양, 만성 기관지염, 궤양성 대장염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 패혈증, 맥관염, 활액낭염, 측두 동맥염, 고형암, 알츠하이머병, 동맥경화증, 비만 및 바이러스 감염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [118] 본 발명에서 용어, “자가면역질환”은 인체 내부의 면역계가 외부 항원이 아닌 내부의 정상세포를 공격하여 생기는 질병을 의미한다. 자가면역질환에는 류마티스 관절염뿐만 아니라 1형 당뇨병(인슐린 의존성), 전신성 루푸스, 크론병, 건선 등이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [119] 본 발명에서 용어, “염증질환”은 염증유발인자 또는 방사선조사 등 유해한 자극으로 인해 면역체계를 과도하게 항진시켜 대식세포와 같은 면역세포에서 분비되는 TNF- α , IL-1, IL-6, 프로스타글란딘(prostaglandin), 루코트리엔(leukotriene) 또는 NO와 같은 염증 유발물질(염증성 사이토카인)에 의해 유발되는 질환을 의미한다.
- [120] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은, 상기 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 자가면역질환 및/또는 염증질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 자가면역질환 및/또는 염증질환 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [121] 본 발명에 따른 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 자가면역질환 및/또는 염증질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [122] 상기 “약학적으로 허용되는”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트,

셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[123] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과 함께 자가면역질환 및/또는 염증질환 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 포함할 수 있다.

[124] 본 발명의 약학 조성물은 인간을 제외한 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[125] 본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물은 염증질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[126]

[127] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[128] 본 발명은 또 다른 관점에서, 자가면역질환 및/또는 염증질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 TNF- α 억제용 조성물의 용도에 관한 것이다.

[129] 본 발명은 또 다른 관점에서, 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 TNF- α 억제용 조성물의 사용에 관한 것이다.

[130] 본 발명의 예방 또는 치료방법, 용도 및 사용은 상술한 “상기 TNF- α 억제용 조성물”을 이용하기 때문에, 중복된 내용은 그 기재를 생략한다.

[131]

[132] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[133]

[134] 실시예 1: 재료 및 방법

[135] 실시예 1-1: 세포주 및 시약의 준비

[136] HDF(ATCC, Manassas, VA, USA) 및 L929 세포주(ATCC)는 0.2% 노모신 용액(InvivoGen, San Diego, CA, USA), 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액 및 10% 소 태아 혈청(FBS)을 함유하는 저당 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)에서

유지되었다. 두 세포주 모두 5% CO₂, 37°C의 습한 조건의 배양 시스템(Thermo Fisher Scientific, Inc.)에서 배양하였다. SPD304(MolPort ID: MolPort-042-665-817; ChemDiv catalog # 4031-0592), C87(Tocris Cookson, Bristol, UK), rmTNF- α (Miltenyi Biotec, Auburn, California, USA), rhTNF- α (Miltenyi Biotec), act-D(Thermo Fisher Scientific, Inc.) 및 BS3(Thermo Fisher Scientific, Inc.)는 상기 각각 괄호에 기재된 회사로부터 구입하였다. 모든 hit 리간드들은 순수 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해되었다.

[137]

[138] 실시예 1-2: 동물

[139] 수컷 DBA/1J 마우스(20-23g)는 Central Lab. Animal Inc.(Seoul, Korea)에서 구입했다. 폴리카보네이트 케이지당 최대 4마리의 동물이 있는 접근이 제한된 설치류 시설에 동물을 수용하고, pelleted 먹이 및 물에 자유롭게 접근할 수 있게 하였다. 온도는 22-24°C로 유지되었고, 12/12시간 명/암 주기로 하였다. 실험을 시작하기 전에 동물을 적어도 1주일 동안 적응시켰다. 실험 또는 테스트 당 사용된 동물의 수와 잠재적인 고통을 최소화하고자 하였다. 모든 방법은 경희대학교 동물 관리 및 사용 위원회(Animal Care and Use Committee of Kyung-Hee University)의 승인을 받았다. 모든 절차는 한국 보건 연구원의 실험 동물 관리 및 사용 가이드(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Korea National Institute of Health)에 따라 수행되었다.

[140]

[141] 실시예 1-3: 콜라겐-유도 마우스 다발성관절염 및 실험군

[142] 수컷 DBA/1J 마우스(6주령)는 25 μ l 아세트산 및 25 μ l complete Freund's adjuvant(Sigma-Aldrich Co.)에 용해된 100 μ g chicken collagen type II(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 이루어진 50 μ l 에멀전의 피하 주사에 의해 꼬리의 기저부에서 처음 면역되었고, 이를 day 0으로 지정하였다. Day 14에 incomplete Freund's adjuvant를 사용하는 것을 제외하고는 마우스에 첫 번째와 동일한 조성으로 50 μ l 에멀전의 부스터를 주사하였다. 콜라겐-유도 관절염(CIA) 마우스 모델을 개발하기 위한 실험 스케줄은 도 10에 도시되었다. 모든 마우스를 무작위로 4개의 실험군으로 나누었다: 비-처리 정상군(NOR, n = 4), 콜라겐-주사 및 비히클-처리 관절염 대조군(CIA, n = 4), 2mg/kg TIM1c-처리 관절염 그룹(TIM1c_2mg/ml, n = 4) 및 20mg/kg TIM1c-처리 관절염 그룹(TIM1c_20mg/ml, n = 5). 처리군들은 제1 면역화 후 day 15부터 day 60까지 2일마다 2 및 20mg/kg TIM1c를 경구로 공급받았다.

[143]

[144] 실시예 1-4: 관절염 증상의 행동 평가

[145] CIA 마우스에서 관절염의 진행을 평가하기 위해, 콜라겐 및 complete Freund's adjuvant로의 제1 면역화 후 4가지 파라미터(체중, 발 부피 증가, 짹짹거리는 점수(squeaking score) 및 관절염 점수(arthritic score))를 측정하였다. 마우스의

체중은 digital balance(Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA)를 사용하여 측정하였다. 통각(nociception)과 통각과민(hyperalgesia)을 평가하기 위해, 찌찌거리는 소리를 측정 척도로 발목 통증을 평가했다. 찌찌거리는 소리에는 발목 굴곡(flexion)과 신장(extension)으로 유발되는 발성이 포함되었다. 굴곡 및 신장 절차를 5초마다 10회 반복하고, 마우스의 각 뒷다리에 대해 0(발성 없음) 또는 1(발성 있음)의 등급을 매겼다. 관찰자에 의해 탐지된 찌찌거리는 발성 총 횟수는 찌찌거리는 횟수(squeaking number)로 계산되었다. 발 팽창은 이전에 기술된 바와 같이, water-displacement plethysmometer(Ugo-Basil Biological Research Apparatus Co., Comerio-Varese, Italy)를 사용하여 전해질 용액의 부피 변위에 의해 측정되었다(Bang JS, et al. (2009) *Arthritis Res Ther* 11(2):R49). 뒷다리는 털이 많은 피부 라인에 침지되었고, 부피는 디지털 디스플레이에서 판독되었다. 발 부피 증가는 0으로 정의된 day 0과 비교하여 표현되었다. 관절염 지수는 팔다리마다 4점 척도를 사용하여 각 팔다리의 모든 관절에서 명백한 관절염 중증도를 평가함으로써 평가되었다; 각 마우스에 대해 최대 점수 16, 0 = 하나의 팔다리에서 관절의 홍반 또는 부종 없음, 1 = 팔다리 당 적어도 하나의 관절의 홍반 또는 부종, 2 = 팔다리 당 3개 미만의 관절의 홍반 또는 부종, 3 = 한 팔다리에서 모든 관절의 홍반 또는 부종, 4 = 한 팔다리에서 모든 관절의 발병 및 변형.

[146]

[147] 실시예 1-5: 세포 생존율(cell viability) 분석

[148] 세포 생존율을 측정하기 위해 colorimetric

1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan(MTT) assay(Sigma-Aldrich Co.)를 수행하였다. HDF를 96-well plates(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 10^4 /well의 밀도로 분주하고 밤새 성장시킨 다음, 24시간 동안 다양한 농도의 테스트 화합물로 처리하였다. 다음날, 배지를 10% MTT 용액이 포함된 배지(100 μ l/well)로 대체하고, 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 이 용액을 DMSO(100 μ l/well)로 대체하고 plates를 실온에서 30분 동안 배양하였다. 그 후, plates를 microplate spectrophotometer system(Molecular Devices, Silicon Valley, California)을 사용하여 540nm 파장에서 판독하였다.

[149]

[150] 실시예 1-6: IL-8 및 IL-6 사이토카인 검출 분석

[151] HDF를 96-well plate(BD Biosciences)에 10^4 /well의 밀도로 분주하고 밤새 성장시켰다. rhTNF- α 와 테스트 화합물의 1시간 사전배양된 혼합물로 세포를 24시간 동안 처리하였다. IL-8 분비는 human IL-8 uncoated ELISA kit(eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA)에 의해 평가되었고, IL-6 분비 수준은 human IL-6 ELISA MAXTM Deluxe kit(BioLegend, San Diego, CA, USA)에 의해 측정되었다. 그 다음, microtiter plates를 적절한 파장에서 microplate spectrophotometer system(Molecular Devices, Silicon Valley, California)으로 분석했다.

[152]

[153] 실시예 1-7: 세포사멸 감쇠 분석

[154] HDF(10^4 /well) 및 L929 세포주(1.5×10^4 /well)를 96-well plate에 분주하고 적당한 조건하에 밤새 성장시켰다. 다음날 HDFs와 L929 세포를 각각 $1\mu\text{g/ml}$ 및 $0.1\mu\text{g/ml}$ act-D로 전처리하고 30분간 배양하였다. 그 후, 10ng/ml rhTNF α 와 테스트 화합물의 1시간 사전배양된 혼합물 또는 1ng/ml rmTNF α 와 테스트 화합물의 1시간 사전배양된 혼합물을 HDF 및 L929 세포에 각각 적용시켰다. 처리 후 24시간 동안 세포를 배양하고, MTT assay에 의해 생존을 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 대조군을 참조하여 계산하였다. 얻은 값을 act-D 처리 그룹에 대해 표준화한 다음, 하기 식을 통해 사멸 쇠퇴(%)를 계산하는데 사용하였다:

[155]

$$\text{Death attenuation (\%)} = 100 - \left(\frac{100 - \text{sample value}}{100 - \text{ActD\&TNF}\alpha \text{ cotreatment value}} * 100 \right)$$

[156] 처리된 wells의 이미지는 역상 현미경(Olympus IX53; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 포착하였다.

[157]

[158] 실시예 1-8: 웨스턴 블랏(western blot) 분석

[159] M-PER mammalian protein extraction reagent(Thermo Fisher Scientific, Inc.)를 사용하여 처리된 세포로부터 총 단백질을 추출하였다. 세포 펠릿을 M-PER, protease 및 phosphatase inhibitor cocktail(Thermo Fisher Scientific, Inc.)의 혼합물에 4°C 에서 1분 동안 용해시키고, 수득된 용해물을 $16,000\times g$, 4°C 에서 10분 동안 원심분리하였다. 단백질을 함유하는 상등액을 별도의 Eppendorf 튜브에 수집하고, 단백질 정량을 위해 BCA assay(Sigma-Aldrich)를 수행하였다. $20\mu\text{g}$ 단백질 샘플을 10-12% polyacrylamide gel(SDS 포함)에 넣고, 분리된 단백질을 mini-PROTEAN tetra cell 및 mini trans-blot electrophoretic transfer cell system(Bio-Rad Laboratories)의 nitrocellulose membrane(Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, New Jersey)으로 옮겼다. 막 블로킹은 5% nonfat dried milk로 1시간 동안 수행하였다. 막은 특정 1차 항체, 즉 (phospho-) p-p65, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, cleaved caspase 3(Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), p-p38, caspase 8 및 β -actin(Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA)에 대한 항체로 4°C 의 온도에서 하룻밤 동안 가볍게 웨이킹하여 면역블랏팅하였다. 다음날, PBST로 철저히 세척한 후, 막을 peroxidase-결합 항-마우스 또는 항-토끼 IgG 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. SuperSignal West Pico ECL solution(Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 사용하여 단백질을 검출하고, ChemiDoc™ Touch Imaging System(Bio-Rad Laboratories)으로 시각화했다.

[160]

[161] 실시예 1-9: TNF- α trimerization assembly의 분리

[162] 억제제들을 100ng의 재조합 TNF- α 와 함께 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음, 상온에서 30분 동안 4.8mM BS3(Thermo Fisher Scientific, Inc.)로 교차 결합(cross-linking)시켰다. 그 다음, 1/10 부피의 1M Tris-HCl(pH 7.5)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 후, 샘플을 SDS-PAGE로 분리하고 항-TNF- α 항체(Cell Signaling Technology Inc.)로 웨스턴 블랏팅하였다.

[163]

[164] 실시예 1-10: 리간드 라이브러리의 준비

[165] 스크리닝 라이브러리는 ZINC(druglike and leadlike)와 다른 공급 업체가 제공하는 화학 구조를 사용하여 구성되었다(도 1 및 표 2). 화학 구조는 molecular operating environment(MOE)의 *sdwash* tool을 이용하여 준비되었다(Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017). 리간드 구조는 연결되지 않은 염 원자 및 무기 금속 이온뿐만 아니라 반응성 그룹을 갖는 리간드를 제거함으로써 정돈되었다. 부서진 단편을 가진 리간드의 경우 가장 큰 단편만 보관했다. 명시적인 수소 원자가 추가되었고, 강염기를 양성자화하면서 강산을 탈양성자화하여 양성자화 상태를 조정했다. 각각의 리간드에 대해 최대 10개의 tautomeric 상태가 열거되었고, 분자 내 결합이 합리적인 길이로 스케일링되었다. 정돈된 구조들은 0.1의 root mean square gradient에 도달할 MMFF94x force field를 사용하여 에너지를 최소화시켰다. MMFF94x force field로 에너지 최소화 전에 리간드 원자에 대해 부분 전하를 계산하였다.

[166]

[167] 실시예 1-11: Molecular-fingerprint(분자-지문)-기반 리간드 유사성의 계산

[168] 분자 속성을 강조하기 위해 bit-packed MACCS Structural Keys(FP:BIT_MACCS) scheme에 따라 데이터베이스의 각 리간드에 대해 분자 지문을 계산하였다. 문헌에서 보고된 알려진 TNF- α 억제제 세트에서 선택된 것과 적어도 60-80% 유사한 리간드를 확인하기 위해, in-house support vector language(SVL) script를 적용했다. 검색은 $\#AB / (\#A + \#B - \#AB)$ 의 식을 통해 두 가지 지문 사이의 유사성을 측정하는 Tanimoto similarity metric, Tanimoto Coefficient를 사용하여 수행되었다. 여기서 A와 B는 두 개의 지문이며, #은 각 feature의 수를 나타낸다. 그 결과로 생성된 리간드는 후속 스크리닝을 위해 별도의 라이브러리에 보관하였다.

[169]

[170] 실시예 1-12: Pharmacophore 모델 생성

[171] 2개의 억제제, JNJ525 및 SPD304를 기반으로 pharmacophore 모델을 설정하고, 리간드의 리간드-기반 스크리닝을 수행했다. Planar-Polar-Charged-Hydrophobic scheme을 사용하여 필수 리간드 그룹 주위에 pharmacophore features를 생성시켰다. 관찰된 TNF- α 잔기와의 상호작용에 기초하여 각 리간드에 4가지

pharmacophore features가 생성되었다. 그 결과 생성된 hit는 구조-기반 가상 스크리닝을 위한 다른 라이브러리에 보관되었다.

[172]

[173] 실시예 1-13: 가상 스크리닝(virtual screening)

[174] 하나는 TNF- α /SPD304 복합체(PDB ID: 2AZ5)를 사용하여, 다른 하나는 TNF- α /JNJ525 복합체(PDB ID: 5MU8)를 사용하여 두 개의 독립된 가상 스크리닝을 수행했다. TNF- α 원자는 단단하게 유지되었지만 리간드 원자는 유연했다. 도킹(docking)은 triangle-matcher placement 방법과 London dG scoring function으로 수행되어, 각 리간드의 최대 30개의 docked poses를 유지했다. 각 리간드의 top-scoring poses는 MMFF94x force field refinement 및 Affinity dG scoring function을 갖는 또 다른 도킹 실행 라운드에 적용되어 각 리간드의 30개의 도킹된 형태를 유지하였다. 최종 단계에서, TNF- α cavity에서 본래 리간드의 전자 밀도에 기초하여 생성된 리간드를 스크리닝하였다.

[175]

[176] 실시예 1-14: *In silico*(가상실험에서의 컴퓨터 프로그래밍) 독성 예측

[177] 가상 스크리닝 히트 라이브러리에서 가장 높은 점수를 얻은 상위 100개의 리간드는 오픈 소스 도구인 ProTox(Banerjee P, et al. (2018) *Nucleic Acids Res* 46(W1):W257-W263), TEST(U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC), Datawarrior(Sander T, et al. (2015) *J Chem Inf Model* 55(2):460-473) 및 PAINS-Remover(Baell JB & Holloway GA (2010) *J Med Chem* 53(7):2719-2740)를 사용하여 *in silico* 독성 예측을 수행하였다. 독성 단편이 없는 상위 10개 리간드를 그들의 항-TNF 활성의 실험적 검증을 위해 획득하였다.

[178]

[179] 실시예 1-15: TNF- α -SPD304 또는 TNF- α -JNJ525 복합체의 MD 시뮬레이션

[180] SPD304 및 JNJ525와 복합체를 형성한 TNF- α 의 결정 구조는 PDB로부터 얻어졌다. 리간드의 topology는 automated topology builder(ATB 3.0) 서버(Stroet M, et al. (2018) *J Chem Theory Comput* 14(11):5834-5845)에서 구했다. GROMACS 5.1.5 소프트웨어에서 the gromos96-54a6 force field를 사용하여(Abraham MJ, et al. (2015) *SoftwareX* 1-2:19-25) 에너지 최소화 및 MD 시뮬레이션을 수행했다. 단백질-리간드 복합체는 그들의 표면과 박스 경계 사이에 20Å의 거리를 갖는 큐빅 박스 내에 파묻혔다. 시뮬레이션 박스에 추가된 simple point charge(SPC216) 물 분자와 적절한 양의 반대이온이 시뮬레이션 시스템의 총 전하를 중화하기 위해 추가되었다. 에너지 최소화는 maximum force 1000kJmol⁻¹nm⁻¹에 도달할 때까지 steepest-descent algorithm에 의해 수행되었다. 시뮬레이션 시스템의 온도는 Berendsen temperature-coupling scheme의 수정 버전인 V-rescale scheme에 따라 평형을 이루었다. 압력 평형은 1bar에서 Parinello-Rahman algorithm을 사용하여 이루어졌다. 온도 및 압력 평형 과정 동안, 단백질의 backbone heavy atom은 100ps 동안 고조파로(harmonically) 억제되었다. 생산 실행은 백분

원자에서 위치 제한 없이 100ns 동안 수행되었다. 주기-경계 조건은 시뮬레이션 시스템에 적용되었으며 수소 원자를 포함한 모든 결합은 linear constraint solver algorithm으로 제한되었다. 0.002ps의 타임 스탬프가 사용되었고, 궤도 스냅샷(trajecory snapshots)은 10ps마다 저장되었다. 데이터 분석은 VMD(Humphrey W, Dalke A, & Schulten K (1996) *J Mol Graph* 14(1):33-38, 27-38), PyMOL(Schrodinger, LLC, New York, NY, USA), discovery studio 4.0(Dassault Systemes, San Diego, CA, USA), MOE software 및 built-in tools of the GROMACS program으로 수행되었다.

[181]

[182] 실시예 1-16: TIM1의 구조적 유도체 동정(identification)

[183] TIM1의 활성을 향상시키기 위해, TIM1 구조를 사용하고, Tanimoto metrics cutoff를 0.8(즉, 80% similarity cutoff)로 지정하여, MolPort 데이터베이스(URL: <https://www.molport.com/shop/index>)에서 유사성 검색을 수행했다. MOE에서 *in silico* 도킹에 대한 SDF 파일로서 총 100개의 유사체들을 선택하였다. MOE의 *sdwash* 프로토콜을 사용하여 리간드를 세척하고 에너지를 최소화하였다. 분자 도킹은 TNF- α 의 SPD304 결합 부위(PDB ID: 2AZ5)에서 수행되었고, docked poses는 결합 친화도 점수(S score)에 기초하여 순위가 매겨졌다. MMFF94x force field refinement 및 Affinity dG scoring function으로 rescoring한 후, TIM1보다 더 큰 친화도를 나타내는 리간드를 실험적 검증을 위해 선택하였다.

[184]

[185] 실시예 1-17: TNF- α -TIM1 또는 TNF- α -TIM1c 복합체의 MD 시뮬레이션

[186] 동적 조건에서 분자간 상호작용을 분석하기 위해, TNF- α 와 TIM1 또는 이의 강력한 유도체 사이의 복합체에 대해 100ns MD 시뮬레이션의 라운드를 수행하였다. 리간드 topology는 ATB 3.0 서버에서 얻었고, MD 시뮬레이션은 상기에 기술된 바와 같이 동일한 파라미터를 사용하여 수행되었다.

[187]

[188] 실시예 1-18: 자유 에너지계(free energy landscape, FEL)의 구축

[189] FEL은 가상 스크리닝에 사용되는 리간드-결합 TNF- α 의 최저 에너지 형태(conformation)를 추출하기 위해 제작되었다. 각 MD 궤적에 대해 cluster 분석을 수행하였고, 가장 큰 cluster로부터의 모든 형태에 대한 FEL을 계산하였다. GROMACS의 *gmx sham* 툴을 사용하여 FEL의 값을 계산하였고, Mathematica 소프트웨어의 데모 버전(version 11.2; Wolfram Research, Inc., Champaign, IL, USA)을 사용하여 플롯을 생성시켰다. 도킹 또는 시각적 표현을 위해 FEL에서 대표적인 저에너지 형태를 추출했다.

[190]

[191] 실시예 1-19: 결합 자유 에너지의 계산

[192] TNF- α -리간드 복합체의 결합 친화도는 분자 역학 Poisson-Boltzmann 표면적 계산법에 의해 계산되었다. 계산은 하기 계산식 1로 *g_mmpbsa* software(Kumari

R, Kumar R, Open Source Drug Discovery C, & Lynn A (2014) g_mmpbsa--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J Chem Inf Model* 54(7):1951-1962)에서 90 및 100ns MD 궤적 사이의 모든 형태에 대해 수행되었다:

[193]
$$\Delta G_{bind} = \langle G_{complex} \rangle - \langle G_{protein} \rangle - \langle G_{ligand} \rangle$$
 (계산식 1)

[194] 여기서, G_{bind} 는 총 결합 자유 에너지이고, $G_{complex}$, $G_{protein}$ 및 G_{ligand} 는 각각 복합체, 단백질 및 리간드의 평균 자유 에너지이다.

[195] 각 구성요소의 자유 에너지는 하기 계산식 2를 이용하여 계산되었다:

[196]
$$G = G_{bond} + G_{ele} + G_{vdW} + G_{pol} + G_{npol} - TS$$
 (계산식 2)

[197] 여기서, G_{bond} 는 결합, 각(angle) 및 2면각(dihedral) 에너지의 합이며, G_{ele} 및 G_{vdW} 는 각각 분자 역학 에너지의 계산으로부터 유도된 정전기 에너지 및 vdW 에너지이다. G_{pol} 및 G_{npol} 은 각각 용매화 에너지에 대한 극성 및 비극성 기여도를 나타내며, G_{pol} 은 Poisson-Boltzmann 방정식을 풀어서 얻었고, G_{npol} 은 용매-접근 가능 표면적과의 선형 관계로부터 추정하였다. 구성 엔트로피(configurational entropy, TS)는 계산 비용이 증가하고 결합 자유 에너지 값이 과대 평가되기 때문에 일반적으로 무시된다.

[198]

[199] 실시예 1-20: 통계 분석

[200] 모든 *in vitro* 데이터 분석은 Microsoft Excel 2016 또는 GraphPad Prism 7 software에서 two-tailed paired Student's *t*-test를 사용하여 수행되었다. 모든 데이터는 평균±SEM으로 표시되었다. 동물 그룹들 사이의 통계적 차이는 two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test correction(체중, 짝짓거리는 점수, 발 부피 증가 및 관절염 지수의 다중 비교를 위해)을 이용하여 확인하였다. *P* values < 0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다.

[201]

[202] 실시예 2: 잠재적인 TNF- α 억제제로서 TIM1의 동정(identification)

[203] 새로운 TNF- α 억제제인 TIM1의 동정은 TNF- α -SPD304 복합체(Protein Data Bank [PDB] ID: 2AZ5)의 결정 구조와 다양한 출처로부터 수득된 다중형태(multiconformational) 화학 물질 라이브러리(표 2)를 사용하여 *in silico* 접근법을 통해 수행되었다.

[204]

[205] [표2]

TNF- α 억제제의 발견에 사용된 화학적 화합물 라이브러리

Compound library	No. of compounds
ZINC druglike	14,480,911
ZINC leadlike	5,449,805
Enamine	3,005,135
ChemBridge	1,586,299
ChemDiv	1,912,842
Life Chemicals	497,067
Maybridge	70,780
합계	27,002,839

공급 업체의 리간드는 ZINC 인터페이스 (<https://zinc.docking.org/>)에서 무료로 얻을 수 있다.

[206]

[207] 약물 유사 물리화학적 특성을 갖는 화합물은 query molecules로 선택된 TNF- α 억제제를 사용하여 fingerprint-based Tanimoto coefficient similarity metric에 의해 분리되었다(표 3 및 도 1A).

[208]

[209] [표3]

분자 지문을 통해 화합물 라이브러리에서 약물유사 특성을 찾는 데
사용된 리간드

Inhibitor name	Target	Activity	Reference
SPD304	TNF- α	IC ₅₀ = 22 μ M	He MM, et al. (2005) Small-molecule inhibition of TNF-alpha. <i>Science</i> 310(5750):1022-1025
Physcion-8-O- β -D-monoglucoside	TNFR1	K _D = 376 nM	Cao Y, et al. (2016) Identification of a ligand for tumor necrosis factor receptor from Chinese herbs by combination of surface plasmon resonance biosensor and UPLC-MS. <i>Anal Bioanal Chem</i> 408(19):5359-5367
AP-906/41640035	TNF- α	IC ₅₀ = 14 μ M	Shen Q, et al. (2014) Discovery of highly potent TNFalpha inhibitors using virtual screen. <i>Eur J Med Chem</i> 85:119-126
Quinuclidine 1	TNF- α /TNFR1 interface	IC ₅₀ $\approx$ 51 μ M	Chan DS, et al. (2010) Structure-based discovery of natural-product-like TNF-alpha inhibitors. <i>Angew Chem Int Ed Engl</i> 49(16):2860-2864
Indoloquinolizidine 2	TNF- α /TNFR1 interface	IC ₅₀ $\approx$ 101 μ M	
Japonicone A	TNF- α /TNFR1 interface	IC ₅₀ $\approx$ 101 μ M	Hu Z, et al. (2012) Japonicone A antagonizes the activity of TNF-alpha by directly targeting this cytokine and selectively disrupting its interaction with TNF receptor-1. <i>Biochem Pharmacol</i> 84(11):1482-1491

[210]

Inhibitor 1	TNF- α	IC ₅₀ = 10 μ M	Choi H, et al. (2010) Discovery of the inhibitors of tumor necrosis factor alpha with structure-based virtual screening. <i>Bioorg Med Chem Lett</i> 20(21):6195-6198
C87	TNF- α	IC ₅₀ = 8.73 μ M	Ma L, et al. (2014) A novel small-molecule tumor necrosis factor alpha inhibitor attenuates inflammation in a hepatitis mouse model. <i>J Biol Chem</i> 289(18):12457-12466
Erythrosine B	TNF- α /TNFR1 interface	IC ₅₀ = 5 μ M	Ganesan L, et al. (2011) The food colorant erythrosine is a promiscuous protein-protein interaction inhibitor. <i>Biochem Pharmacol</i> 81(6):810-818

TNF- α 는 tumor necrosis factor α , TNFR1는 tumor necrosis factor receptor 1, TNF- α /TNFR1 interface는 TNFR1와 상호작용하는 TNF- α 표면을 나타낸다.

[211]

[212] 리간드 라이브러리는 TNF- α 와 잘 정의된 분자간 상호작용을 갖는(Blevitt JM, et al. (2017) *J Med Chem* 60(8):3511-3517) 리간드 SPD304 및 JNJ525의 pharmacophore 모델 방법으로 스크리닝되었다(도 1B 및 도 1C). 이어서 15,668개의 리간드 세트를 TNF- α 동종이량체의 중심 소수성 cavity에서 구조 기반 가상 스크리닝을 수행하였다. 도킹된 리간드 포즈(poses)는 MMFF94x force field-based binding free energy(GBVI/WSA dG) 점수에 의해 등급이 매겨졌다. *In silico* 독성 분석은 pan-assay interference(PAINS) 화합물의 제거를 포함하여 온라인 및 오프라인 계산 도구를 통해 최고 득점의 100개 리간드에서 수행되었다. 화학 구조에 어떠한 독성 단편이 없는 상위 10개 리간드를 그들의 생체활성의 *in vitro* 확인을 위해 수득하였다.

[213] 획득한 10가지 화학 물질은 처음에는 1~50 μ M 농도에서 그들의 인간 피부섬유아세포(human dermal fibroblasts, HDFs)에 대한 독성이 테스트되었다. 화합물 처리 24시간 후 colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay에서 세포 생존율을 모니터링 하였다. 테스트한 분자 중 TIM1(도 1D)은 50 μ M 농도까지 세포독성을 나타내지 않은 반면, 다른 화합물들은 세포에 가벼운 독성을

나타냈다. 양성대조군인 알려진 TNF- α 억제제 SPD304와 C87이 본 실험에서 세포독성을 나타냄은 주목할 만하다(도 2A). TIM1은 최대 200 μ M까지 HDF 또는 쥐 섬유육종(murine fibrosarcoma) 세포주 L929에서 치사율을 전혀 나타내지 않았다(도 8). 관찰된 화합물들의 세포독성에 기초하여, TNF- α -매개 사이토카인 분비의 억제 효과를 시험하기 위한 추가 실험을 위해 TIM1을 선택하였다. 재조합 인간 TNF- α (recombinant human TNF- α , rhTNF- α)와 TIM1 또는 SPD304의 사전배양된 혼합물을 HDF와 함께 배양하고, 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA)에 의한 사이토카인 분비 프로파일의 평가를 위해 배양 상등액을 24시간 후에 수집하였다. 그 결과, TIM1이 인간 인터루킨 8(hIL-8; 도 2B) 및 인간 인터루킨 6(hIL-6; 도 2C)의 TNF- α -매개 분비를 농도-의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. hIL-8 및 IL-6의 분비에 대한 TIM1의 IC₅₀을 계산한 결과, 각각 16.71 및 6.3 μ M 이었다(도 2D 및 도 2E). 알려진 항-TNF 리간드 SPD304가 50 μ M에서 hIL-8 또는 hIL-6의 분비를 완전히 억제했지만, 이 현저한 저해는 고농도에서의 심각한 세포독성 때문이었다(도 2F). 보다 낮은 농도(즉, 10 μ M)에서, SPD304는 사이토카인의 분비를 상승시키는 것으로 밝혀졌다. 이는 리간드-유도 괴사 이전에 세포가 겪었던 생리적인 스트레스 때문이었을 것이다(도 2B 및 도 2C) (Grootjans S, et al. (2017) *Cell Death Differ* 24(7):1184-1195).

[214]

[215] 실시예 3: TIM1의 인간 및 마우스 세포에서 TNF- α -유도 사멸 방지 효과 확인

[216] TNF- α 는 TNFR1-관련 사멸 신호전달 경로의 활성화를 통해 염증 세포의 사멸을 유도하는 강력한 유도 물질이다(Elinav E, et al. (2013) *Nat Rev Cancer* 13(11):759-771). TNF- α -매개 아포토시스에서 TIM1의 예방 효과를 평가하기 위해, 다른 농도의 TIM1 또는 SPD304(rhTNF- α 와 사전배양)를 actinomycin D(act-D)-sensitized HDFs와 함께 적용시켰다. TIM1 처리시 TNF- α -유도 아포토시스의 현저한 감쇠가 관찰되었고(도 3A 및 도 3B), IC₅₀ 값은 26.2 μ M였다(도 3C). 반면, 1 μ M 보다 높은 농도에서 공지된 항-TNF 화합물 SPD304에 의한 유사한 효과는 발휘되지 않았다. 다음으로, TIM1이 마우스 세포에서 그의 보호 효과를 재현할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, TIM1 또는 SPD304와 재조합 마우스 TNF- α (rmTNF- α)의 사전배양된 혼합물을 act-D-sensitized L929 세포주에 적용시켰다. 예상한 바와 같이, TIM1은 L929 세포에서 rmTNF- α -매개 proapoptotic 경로를 농도-의존적으로 억제하였으며(도 3D 및 도 3E), IC₅₀가 24.9 μ M였다(도 3F). 반면에, SPD304는 1 μ M 이외 농도에서 이들 세포의 사멸을 감소시키지 못했다(도 3D 및 도 3E).

[217]

[218] 실시예 4: TIM1의 TNF- α -의존성 신호전달 경로 억제 효과 확인TNF- α 에 의한 TNFR1의 활성화는 NF- κ B, MAPK 및 카스파제 경로를 포함한 몇몇 별개의 신호전달 경로를 유발한다(Brenner D, Blaser H, & Mak TW (2015) *Nat Rev Immunol* 15(6):362-374). 본 발명자들은 먼저 western blotting으로 L929 세포에서

NF- κ B 활성화의 필수 지표인 p65 subunit의 인산화에 대한 TIM1의 효과를 평가했다(도 4A). 도 4A에 제시된 바와 같이, 인산화된 p65의 양이 시간이 경과함에 따라 증가하는 미처리 세포와 비교하여, p65 subunit의 TNF- α -매개 인산화는 TIM1에 의해 감소되었다. 다음으로, p38 MAPK, JNK 및 ERK와 같은 MAPKs의 인산화 또한 TIM1을 처리함으로써 억제되는 것으로 나타났다. 또한, TIM1은 계획된/염증 세포사멸의 특징인 카스파제 신호전달 경로의 활성화를 억제했다(도 4B). 구체적으로, TIM1은 TNF- α 자극에 의해 유도되는 절단된 활성화 형태의 카스파제 3 및 8의 형성을 차단하였다.

[219]

[220] 실시예 5: TIM1의 TNF- α homotrimerization assembly 방지 효과 확인

[221] TNF- α 신호전달 경로에 대한 TIM1의 억제 효과를 확인한 후, 교차결합 단백질 상호작용 분석에 이어서 웨스턴 블랏 분석으로 작용 메커니즘을 검증하고자 하였다. TNF- α 는 용액에서 안정한 homotrimer로서 생물학적으로 활성이며, trimeric assembly를 방해하는 리간드는 사이토카인 기능을 불활성화시키는 것으로 알려져 있다(Melagraki G, et al. (2017) *PLoS Comput Biol* 13(4):e1005372). 리간드의 초기 스크리닝은 TNF- α 입체 구조의 소분자 결합 부위를 고려함으로써 수행되었기 때문에, TIM1은 기능적 trimer의 형성을 억제함으로써 TNF- α 활성을 차단해야 한다고 예상되었다. 이를 위해 rhTNF- α 를 TIM1 또는 SPD304와 사전배양하고 화학적으로 교차결합시킨 다음, western blotting으로 분석하였다. 예상한 바와 같이, TIM1은 rhTNF- α 및 rmTNF- α 모두에서 농도-의존적으로 기능적 homotrimers의 형성을 억제하였다(도 5). 이는 TIM1이 예비 형성된 TNF- α homodimer의 중심 소수성 cavity에 대해 매우 특이적으로 결합하며, 이에 따라 생리학적 조건 하에서 제3단량체의 공간적 결합을 방지한다는 것을 나타낸다.

[222]

[223] 실시예 6: TIM1 유도체들의 TNF- α 신호전달에 대해 개선된 생체활성 확인

[224] TIM1의 TNF-억제 활성을 개선하기 위해, 상업적으로 입수 가능한(80% 유사) 유도체들의 서브 세트를 이용하여 추가 실험을 수행하고, 그들의 활성을 TIM1 또는 SPD304와 비교하였다. rhTNF- α 와 TIM1, TIM1-유도체 또는 SPD304의 사전배양된 혼합물을 HDF와 함께 배양하고, ELISA를 통해 배양 상청액을 hIL-8의 분비 수준에 대해 평가하였다. 시험된 분자들 중에서, TIM1c, TIM1d, TIM1-7, TIM1-10, TIM1-11 및 TIM1-14(도 9)는 무시할 수 있는 세포독성을 나타냈고, 농도-의존적 방식으로 TIM1에 비해 TNF-유도 hIL-8의 더 큰 억제를 나타냈다(도 6A). 특히, TIM1c는 다른 것에 비해 TNF-유도 hIL-8를 최대로 억제하였으며, 가장 강력한 유도체로 간주되었다. 여기서 주목할 점은 SPD304는 50 μ M에서 사이토카인 생성을 완전히 억제하지만, 1 μ M 농도 초과시 강한 세포독성을 나타내어 관찰된 사이토카인 억제를 무의미하게 만든다.

[225]

- [226] 실시예 7: TIM1c의 마우스에서 경구 생물학적 이용가능성 및 억제된 관절염 증상 확인
- [227] TIM1c가 *in vitro*에서 TNF- α 신호전달을 강력하게 억제함에 따라, 본 발명자들은 동물에서 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis; RA) 증상을 개선시킬 수 있을 것으로 예상하였다. 콜라겐-유도 다발성관절염(collagen-induced polyarthritis; CIA) 마우스 모델에서 동물에게 2일마다 2 또는 20mg/kg의 화합물을 공급하고(도 10) 관절염 증상을 평가함으로써 TIM1c의 효능을 분석하였다. 체중 증가(도 6B), 발 부피 감소(도 6C) 및 1일 당 짹짹거리는 횟수(도 6D)에 의해 확인된 바와 같이, CIA 마우스와 비교할 때 TIM1c의 경구 투여로 처리된 그룹의 RA에서 용량-의존적 개선을 나타냈다. 결과적으로, 처리군의 관절염 지수(임상 스코어)는 CIA와 비교하여 유의미한 감소를 나타냈다(도 6E). 약물 처리가 시작될 때(15일), 무릎, 발목 및 발이 부어 올랐으므로, RA의 발달이 앞다리와 뒷다리 모두에서 명백했다(도 6F). 2mg/kg/2days의 저용량에서 TIM1c는 질병 중증도를 약간 개선시킬 수 있었다. 그러나, 20mg/kg/2days의 용량에서는, 동물의 팔다리가 정상 그룹의 팔다리와 거의 비슷할 정도로 RA의 유도를 상당히 악화시켰다. 이는 TIM1c 경구 투여시 동물에서 항-염증 효능 및 효과를 나타냄을 시사한다.
- [228]
- [229] 실시예 8: 비극성 상호작용을 통해 TNF- α 동종이합체(homodimer)를 안정적으로 점유하는 TIM1 및 TIM1c
- [230] 본 발명자들은 동적 조건에서 리간드 결합 패턴을 비교하기 위해 각각 100ns 동안 TNF- α -SPD304, TNF- α -TIM1 및 TNF- α -TIM1c 복합체의 분자 동역학(molecular dynamics; MD) 시뮬레이션을 수행했다(도 11). 초기 선도물질 TIM1은 SPD304보다 비교적 확장된 형태로 TNF- α dimer에 결합하였고(도 7A), thiazole ring은 Y119/Y119*(*는 chain B를 의미함)과 주로 Q61 및 Y151과 상호작용하는 carboxamide-linked pyrrole group에 대해 패킹되었다(도 7B). Phthalazine group은 Y151 및 H15와의 소수성 접촉뿐만 아니라 Y59와의 부분적인 π -스태킹 상호작용에 의해 안정화되었다. Ethynylphenyl group은 V123, L57 및 I155와 상호작용하며, Y151*, Y59* 및 I155*와 상호작용하였다. TIM1의 아마이드-질소와 Y151 측쇄의 하이드록실기 사이의 단독 정전기적 상호작용을 제외하고, TIM1은 TNF- α 와 어떠한 salt bridge 또는 수소결합도 형성하지 않았다. SPD304의 전기적 음성 원자(예를 들면, 3-trifluoromethyl moiety)가 코어와 상호작용하는 반면, 리간드의 산소 용매를 향하여 노출되었다.
- [231] 반면, TIM1c는 TNF 동종이합체에 완전히 펼쳐진 방향이지만 부분적으로는 평면 방향으로 결합하였다(도 7C). TIM1c에서 ethynylphenyl group은 propylamino group으로 치환되며, 이는 A96*, P117*, I118* 및 L120*에 의해 형성된 소수성 pocket을 향해 신장된다. TIM1과 달리, TIM1c의 thiazole ring 및 carboxamide-linked pyrrole group은 Y119/Y119*에 대해서만 패킹되었고, 이는

다른 두 복합체에 비해 뚜렷한 배향을 나타냈다. Phthalazine group은 Y59*, L57*, L115* 및 H15와의 소수성 접촉뿐만 아니라 Y119 및 Y59와의 부분적인 π -스태킹 상호작용에 의해 안정화되었다. SPD304에서와 같이, TIM1c의 소수성 고리 시스템은 양 TNF- α 서브유닛의 β -가닥(L120-G121-G122)과 밀접하게 접촉하였다.

[232] MM/PBSA 결합 친화도 계산에 따르면 TIM1 및 TIM1c의 총 결합 자유 에너지는 SPD304보다 적지만, van der Waals(vdW) 상호작용 에너지는 상대적으로 더 컸다(표 4).

[233]

[234] [표4]

TNF- α -리간드 복합체 분해의 결합 자유 에너지(kJ mol⁻¹)

System	¹ Δ_{vdW}	² Δ_{elec}	³ Δ_{ps}	⁴ Δ_{SASA}	⁵ ΔG_{Total}
TNF- α /SPD304	-152.82 $\pm$ 5.85	-107.36 $\pm$ 6.32	98.6 $\pm$ 5.45	-14.78 $\pm$ 5.0	-176.37 $\pm$ 7.56
TNF- α -TIM1c	-164.18 $\pm$ 4.8	-22.64 $\pm$ 5.01	45.46 $\pm$ 9.12	-14.36 $\pm$ 3.98	-155.72 $\pm$ 3.65
TNF- α /TIM1	-203.39 $\pm$ 7.26	-25.19 $\pm$ 5.74	92.72 $\pm$ 5.42	-17.93 $\pm$ 1.2	-153.78 $\pm$ 4.48
TNF- α /JNJ525	-178.29 $\pm$ 6.16	-32.29 $\pm$ 5.54	89.62 $\pm$ 4.49	-15.83 $\pm$ 2.2	-136.79 $\pm$ 4.48

¹Van der Waals energy(반 데르 발스 에너지), ²Electrostatic energy(정전기 에너지), ³Polar solvation energy(극성 용매 에너지), ⁴Solvent-accessible surface area energy(용매-접근 가능 표면적 에너지), ⁵Total binding free energy(총 결합 에너지)이다.

[235] TNF- α 와 SPD304 사이의 보다 큰 결합 친화도는 보다 높은 정전기적 상호작용 에너지에 기인한 것으로, 이는 리간드의 3-trifluoromethyl group에 기인한 것일 수 있다. TIM1c는 TNF- α 에 대한 결합 친화도가 약간 더 높았으며, 이는 아마도 극성 용매화 및 복합체의 용매-접근 가능한 표면적 에너지에 대한 기여도가 낮기 때문일 것이다. TNF- α 에서 리간드-결합 부위가 주로 비극성인 것을 고려하면, 보다 큰 분자간 비극성 또는 vdW 상호작용 에너지를 갖는 리간드-수용체 복합체가 강한 결합을 할 가능성이 있다.

[236]

산업상 이용가능성

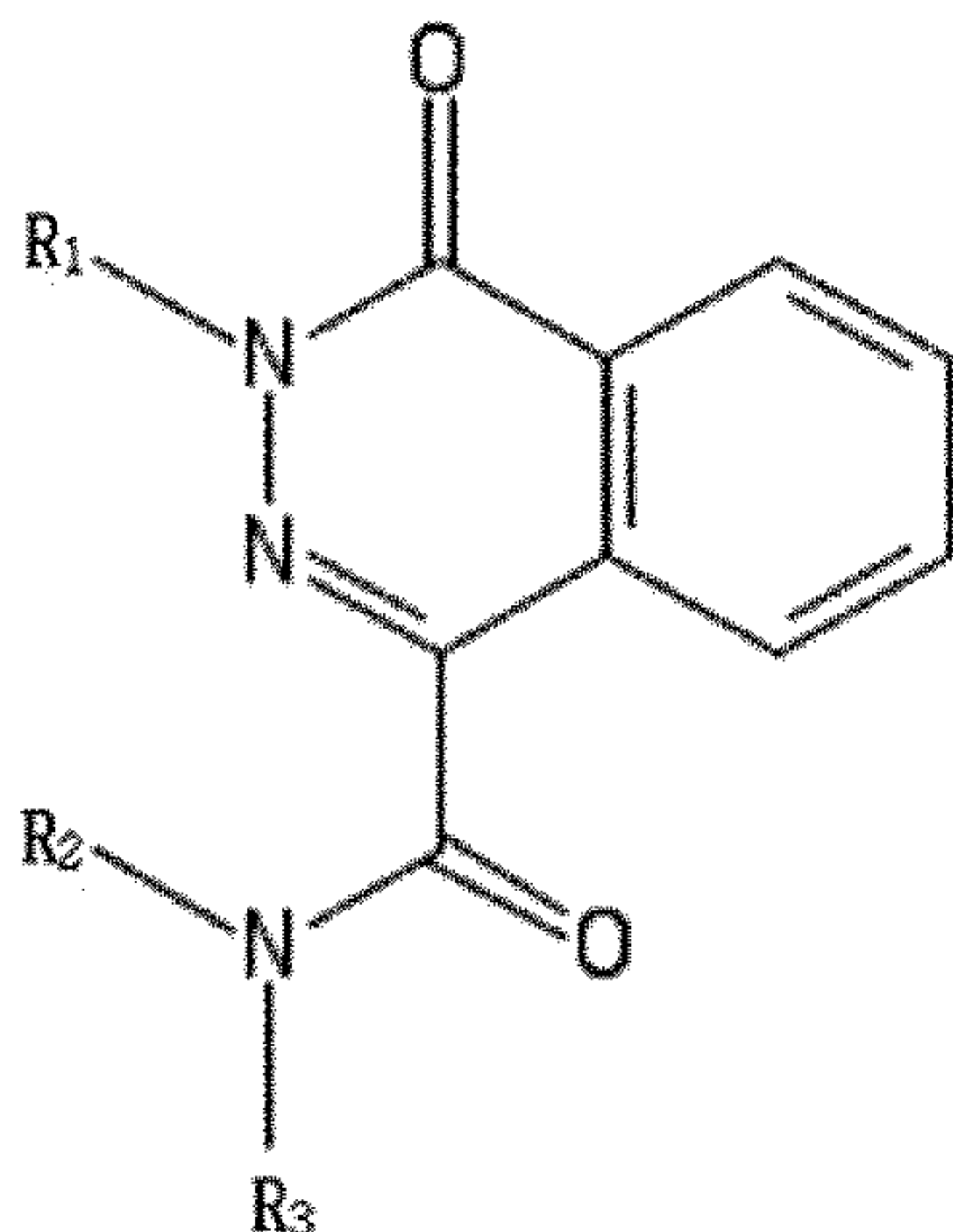
[237] 본 발명에서는 컴퓨터를 이용한 가상 스크리닝을 사용하여 TNF- α 의 새로운 소분자 억제제를 발굴하고 상기 억제제를 세포기반 생체 검사 및 콜라겐-유도 관절염 마우스 모델에서 실험적으로 검증하였다. 단백질-단백질 계면의 파괴에 의한 TNF- α 의 세포 밖 불활성화는 만성 전신성 염증 상태를 완화시키는 가장 혁신적이고 효과적인 방법이며, 현존하는 TNF 억제제보다 효과적인 효능, 낮은 독성 및 경구 생물학적 이용가능성이 있는 TIM 시리즈 화합물들은 항-염증제 선도 분자로서 유용하게 이용될 수 있다.

[238]

[239] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:
[화학식 1]

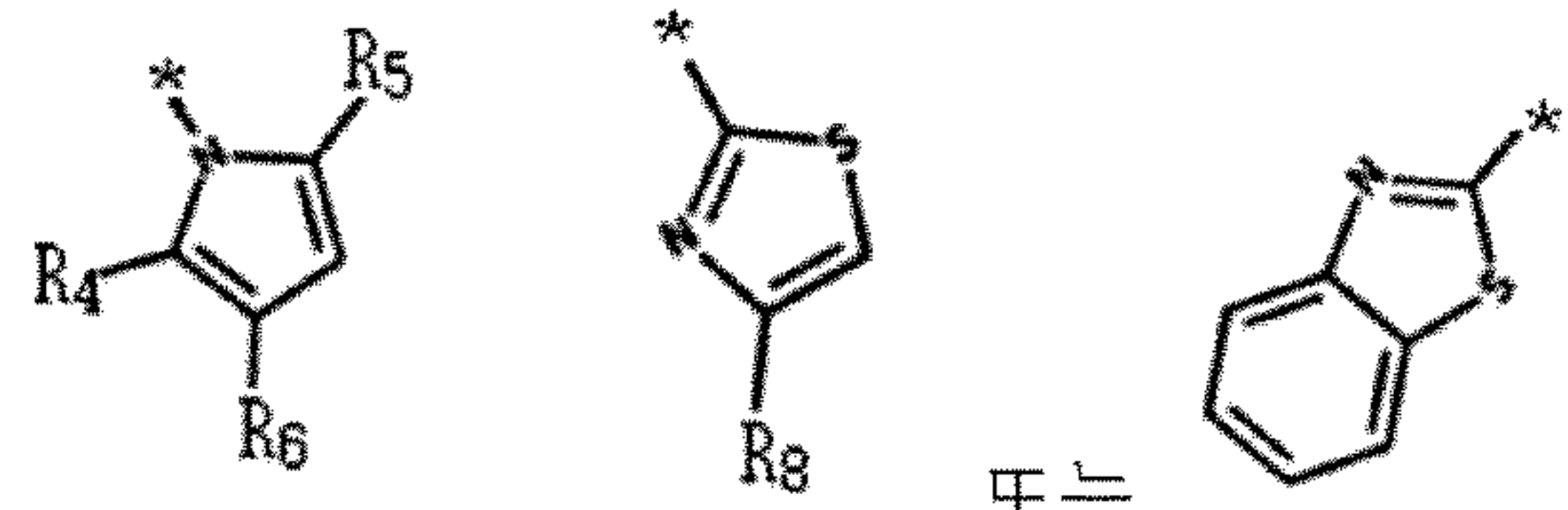


상기 화학식 1에서,

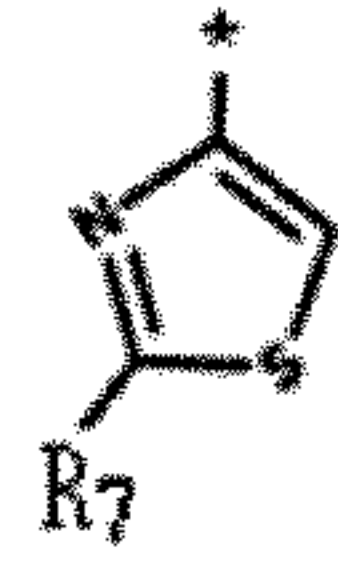
R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 수소원자, 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 히드록시, 할로젠, 니트릴기, 니트로기, 사이클로알킬, 할로알킬, 알릴, 알콕시, 알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐, 아릴카보닐, 알킬아릴카보닐, 알콕시카보닐, 사이클로알콕시, 치환 또는 비치환된 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬, 아릴옥시, 알콕시헤테로아릴, 헤테로아릴옥시알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬에스테르, 알킬아미드 또는 아크릴이고, 여기서, 알킬, 알킬아미노 또는 알콕시는 C_{1-30} , 사이클로알킬은 C_{3-30} , 알릴은 C_{2-30} , 아릴은 C_{6-30} 이고, 헤테로아릴 및 헤테로사이클로알킬은 산소(O), 황(S) 및 질소(N) 중에서 선택된 헤테로원자를 함유한다.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 R_1 , R_2 및 R_3 는 하기로 구성된 군에서 선택되는 치환기인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

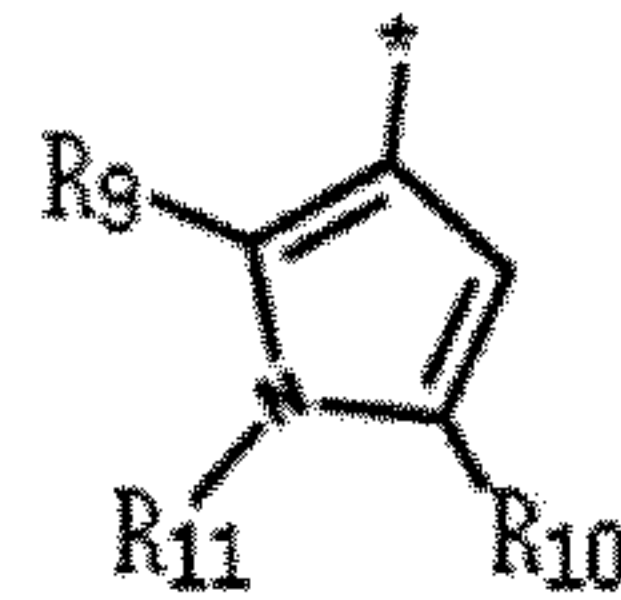
R_1 : C_{1-6} 알킬; 및



R_2 및 R_3 : 수소원자, 아릴,
(여기서, R_2 및 R_3 는 서로 동일하거나 상이하며,
상기 R_4 및 R_5 는 서로 동일하거나 상이한 C_{1-6} 알킬;



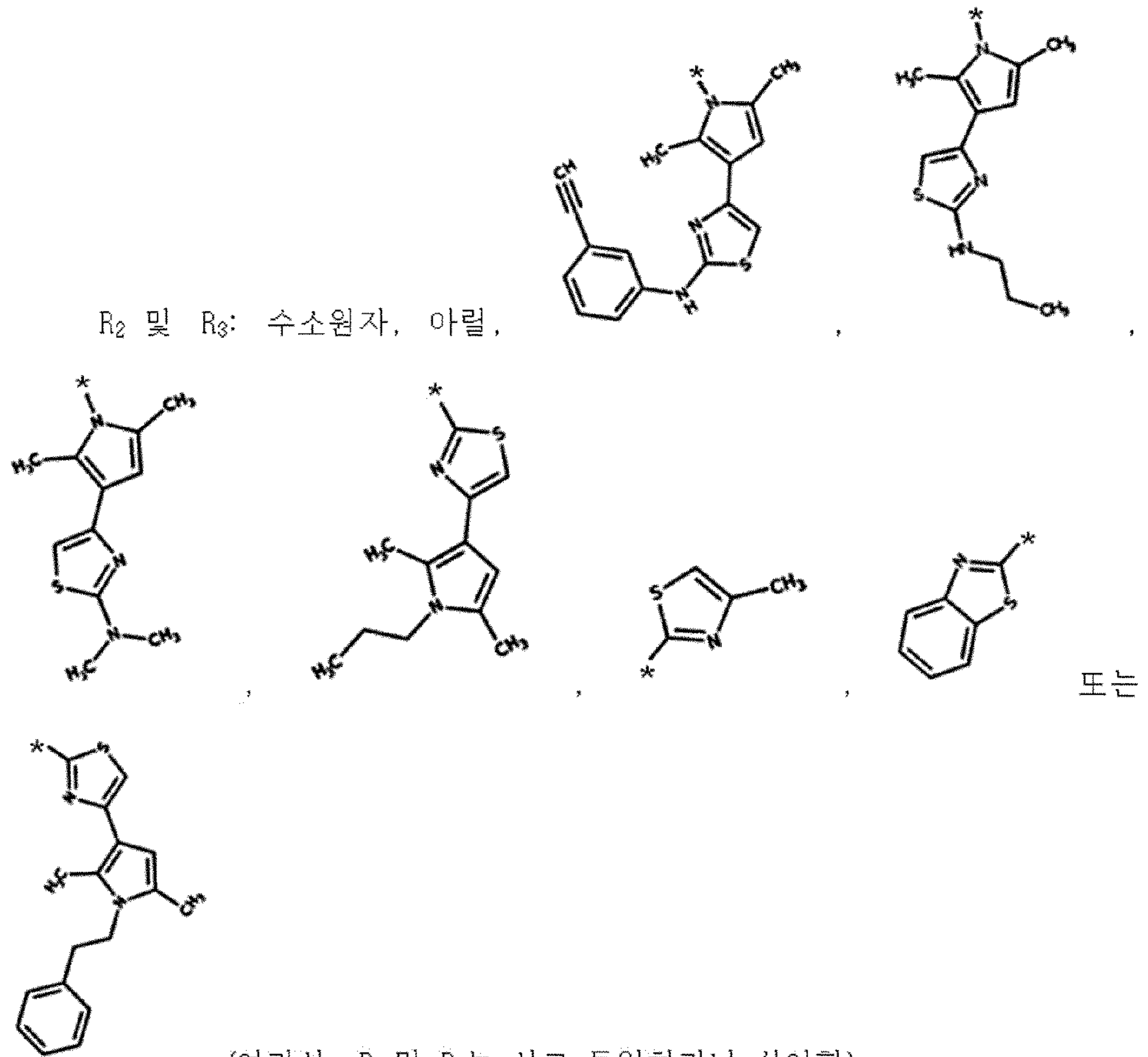
상기 R_6 는 ;
상기 R_7 은 C_{1-6} 알킬아미노, 치환 또는 비치환된 아릴아미노;



상기 R_8 은 C_{1-6} 알킬 또는 ; 및
상기 R_9 내지 R_{11} 은 C_{1-6} 알킬 또는 아릴알킬인 것을 특징으로 함).

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 R_1 , R_2 및 R_3 는 하기로 구성된 군에서 선택되는 치환기인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

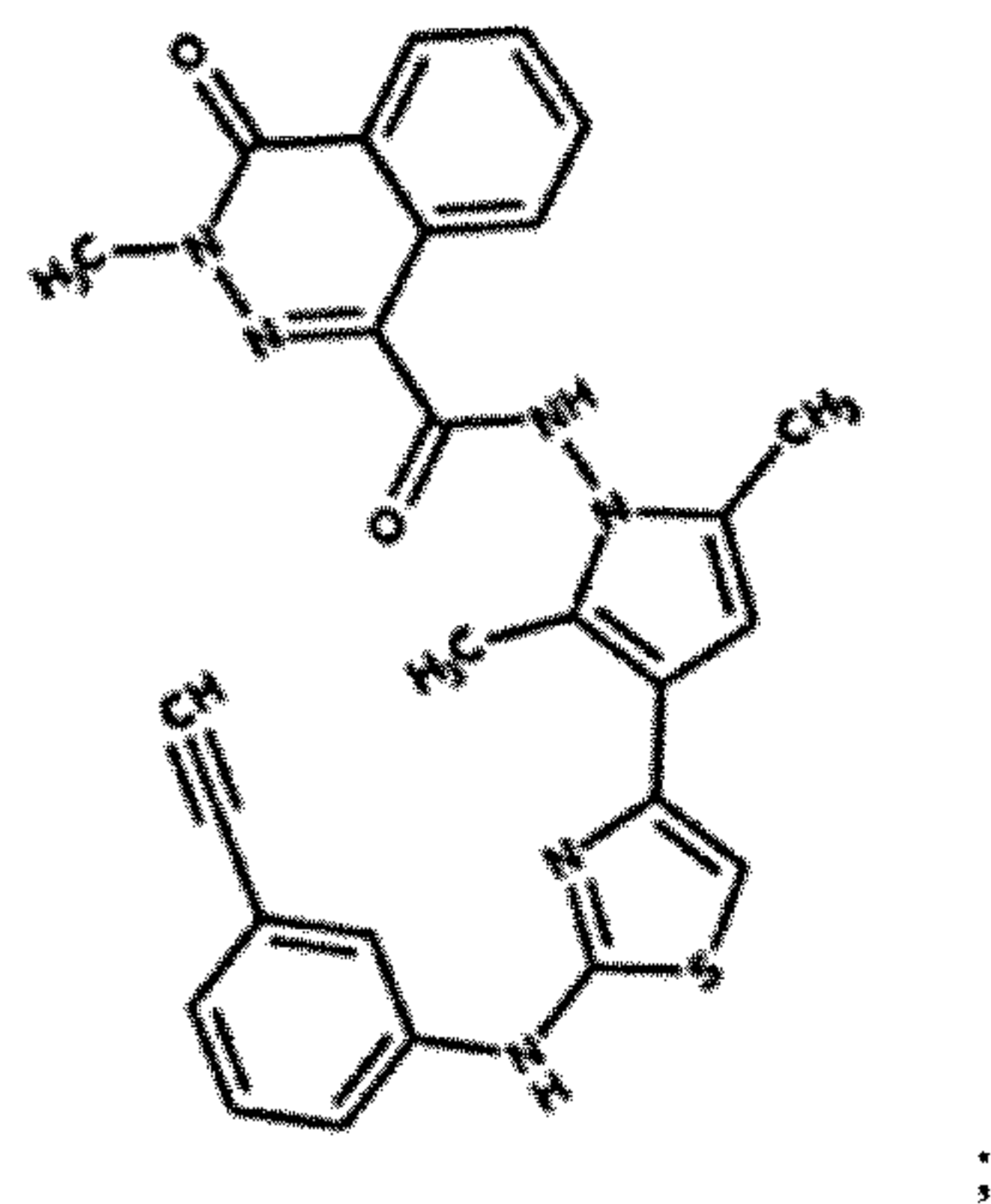
R_1 : C_{1-6} 알킬; 및



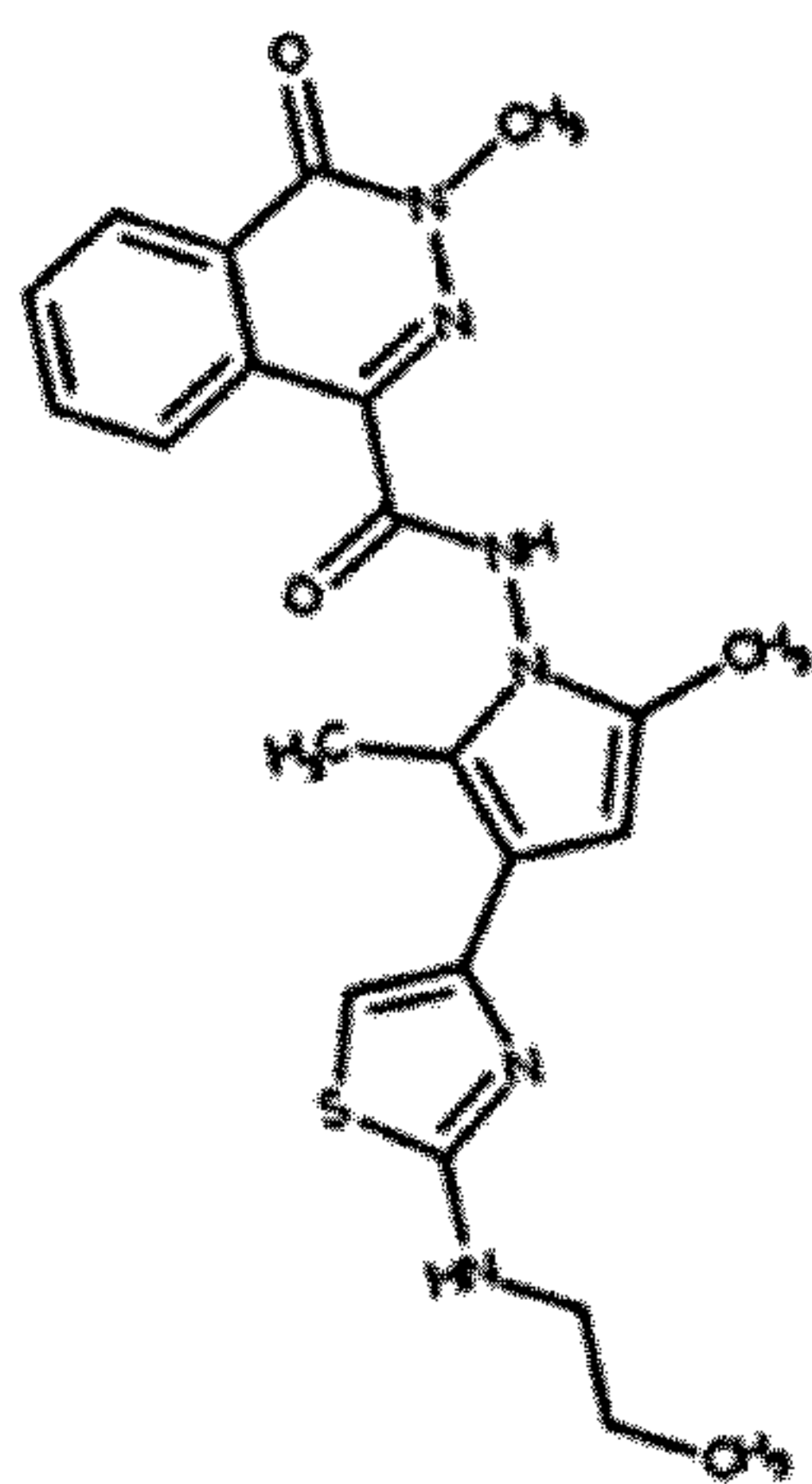
(여기서, R_2 및 R_3 는 서로 동일하거나 상이함).

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 1-1 내지 화학식 1-7로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1-1]

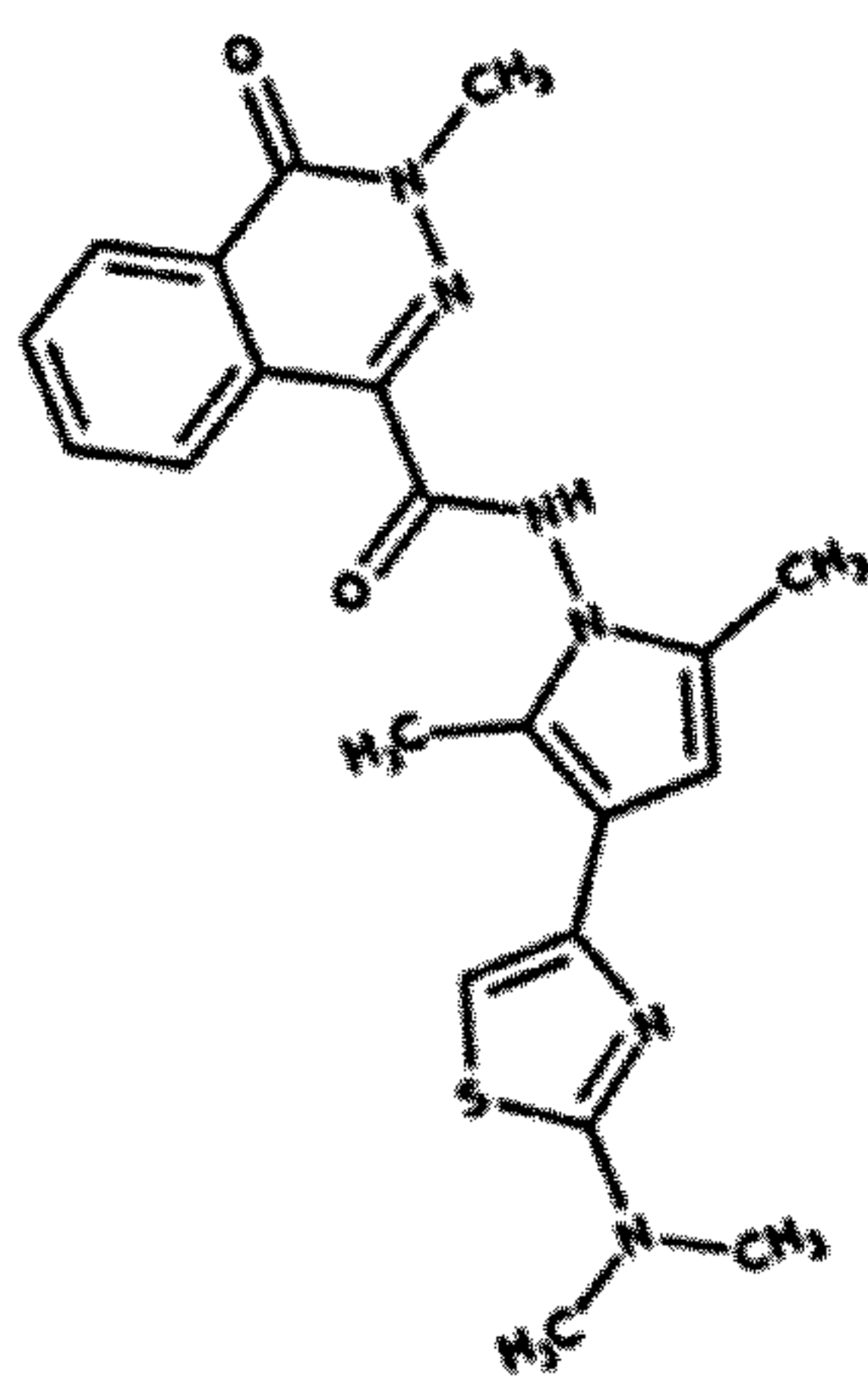


[화학식 1-2]



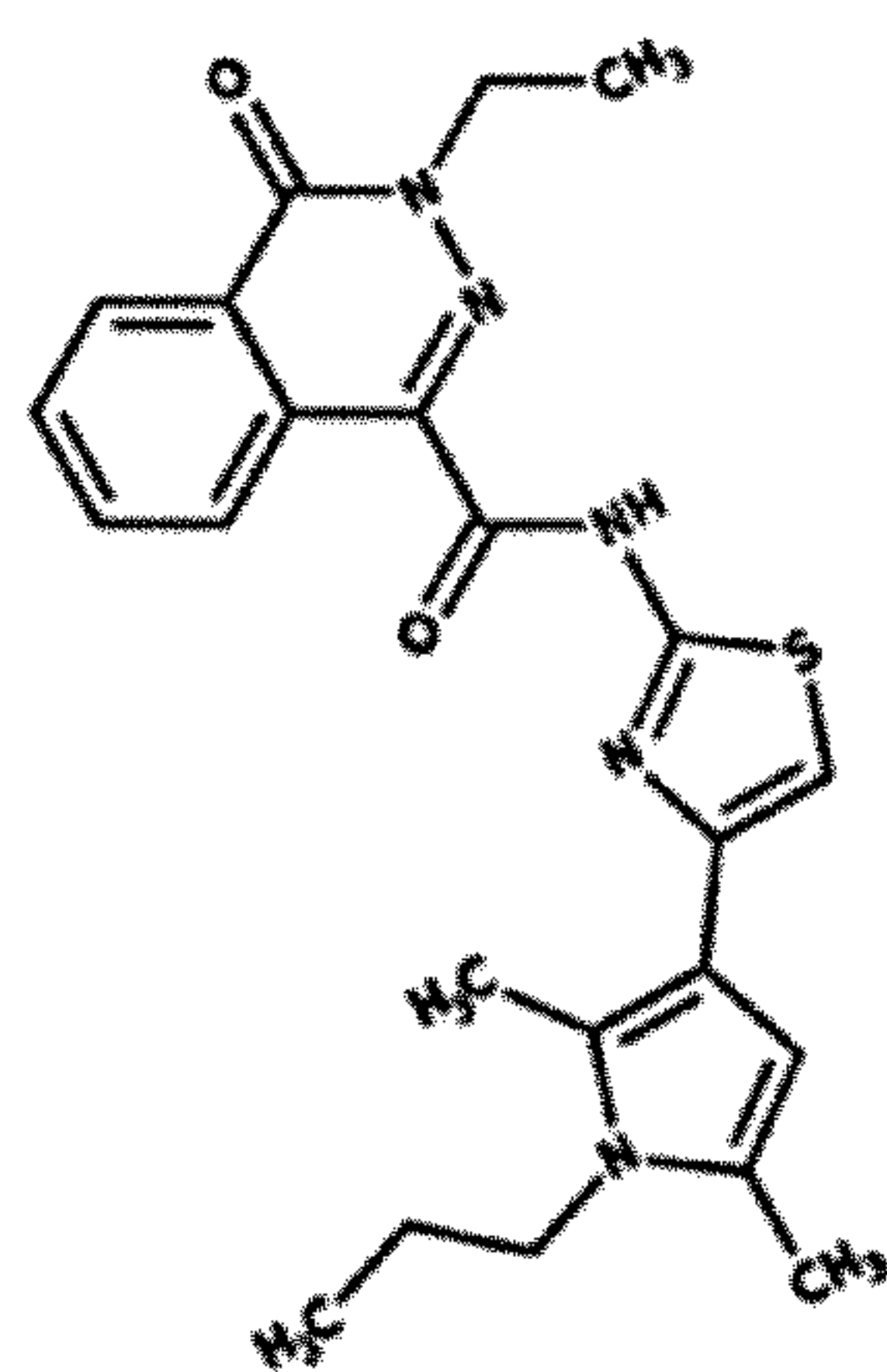
;

[화학식 1-3]



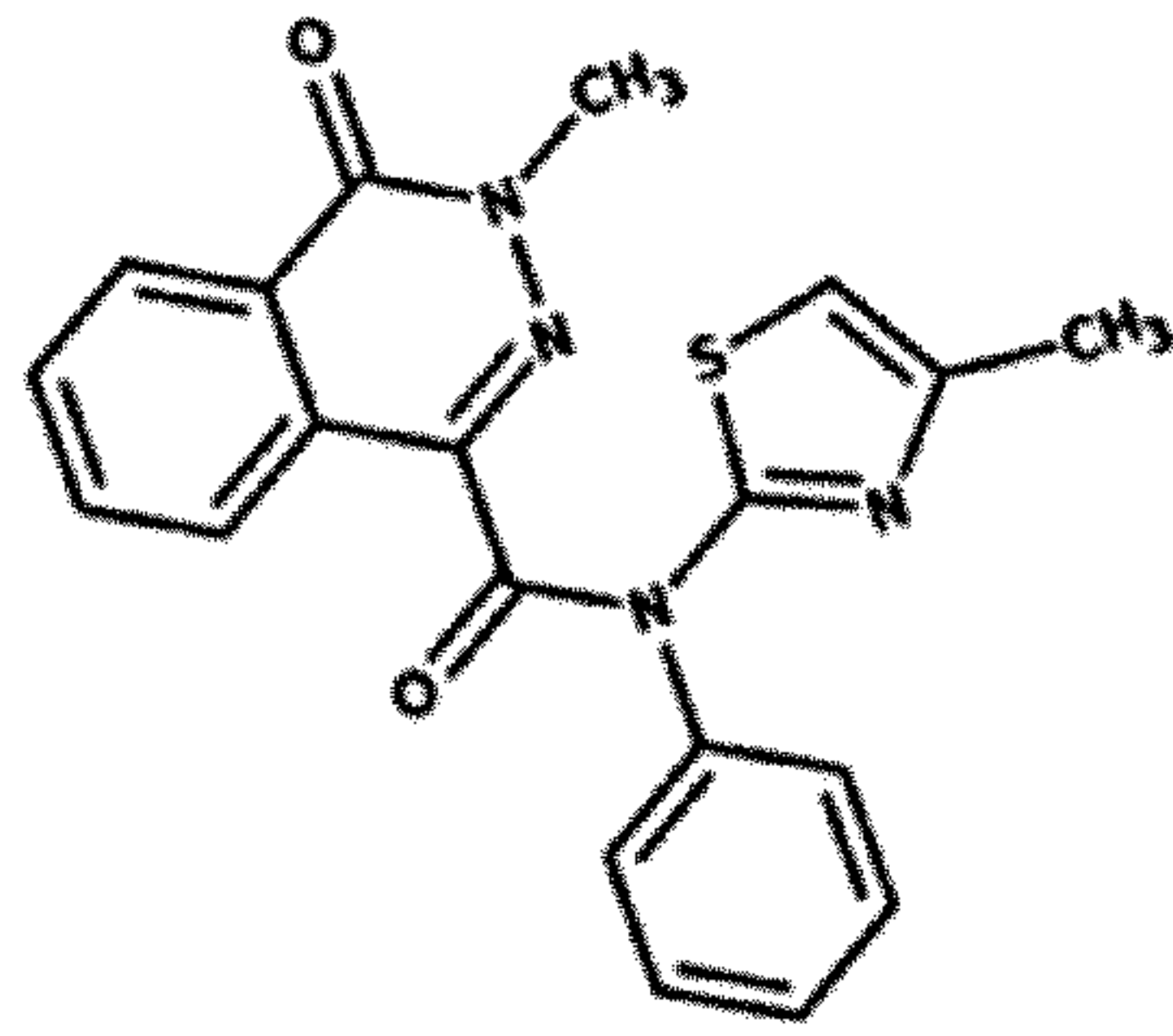
;

[화학식 1-4]



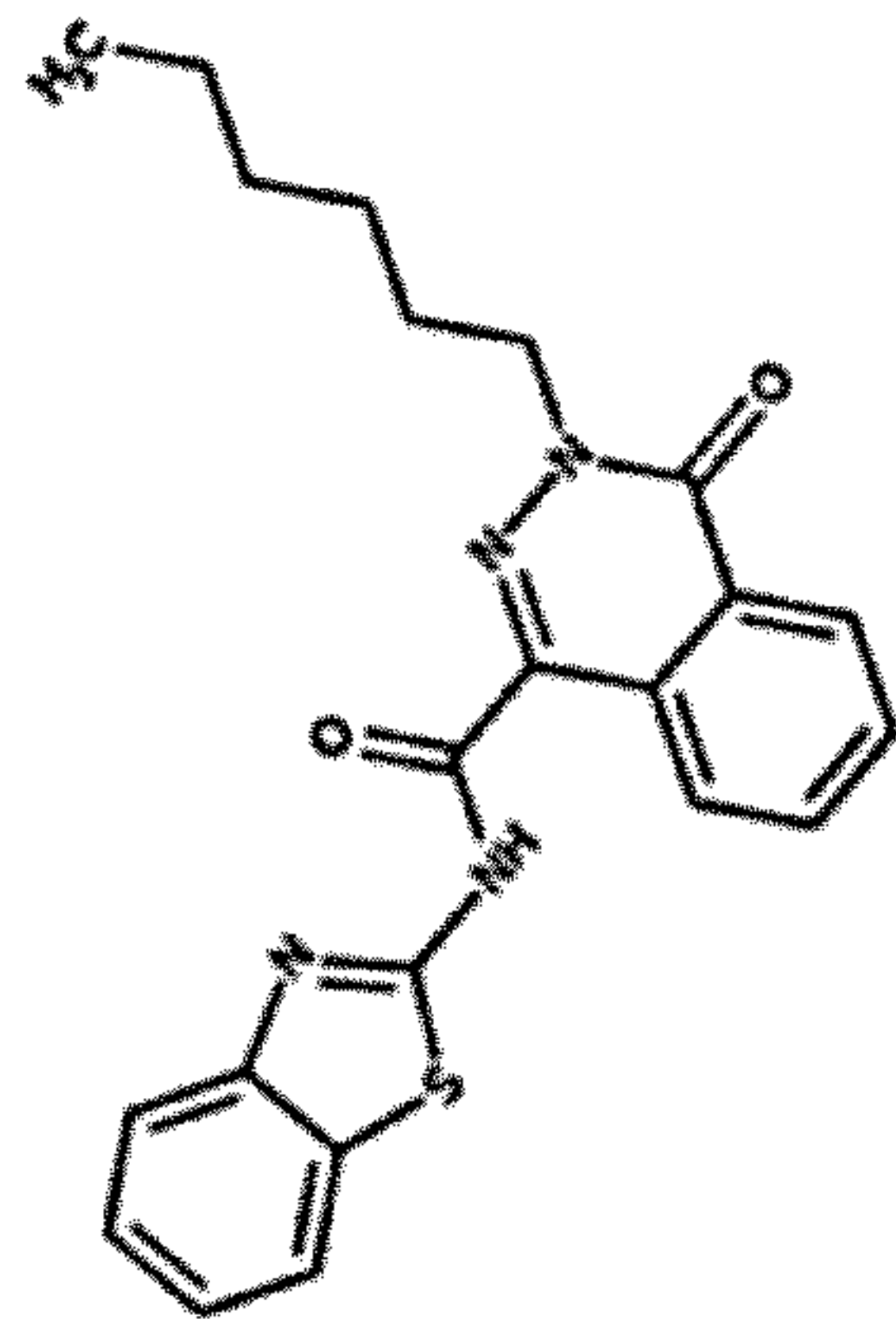
;

[화학식 1-5]



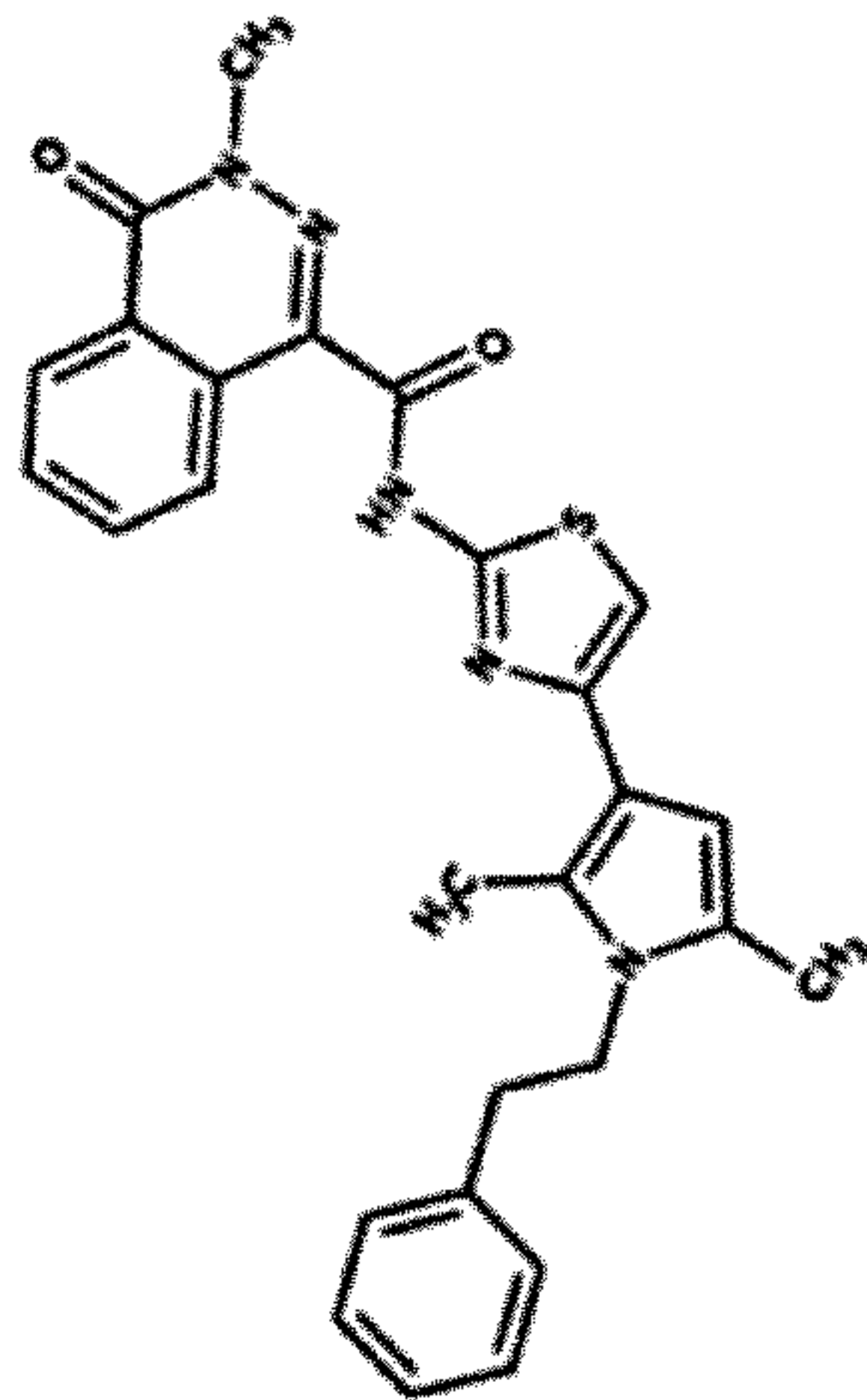
;

[화학식 1-6]



;

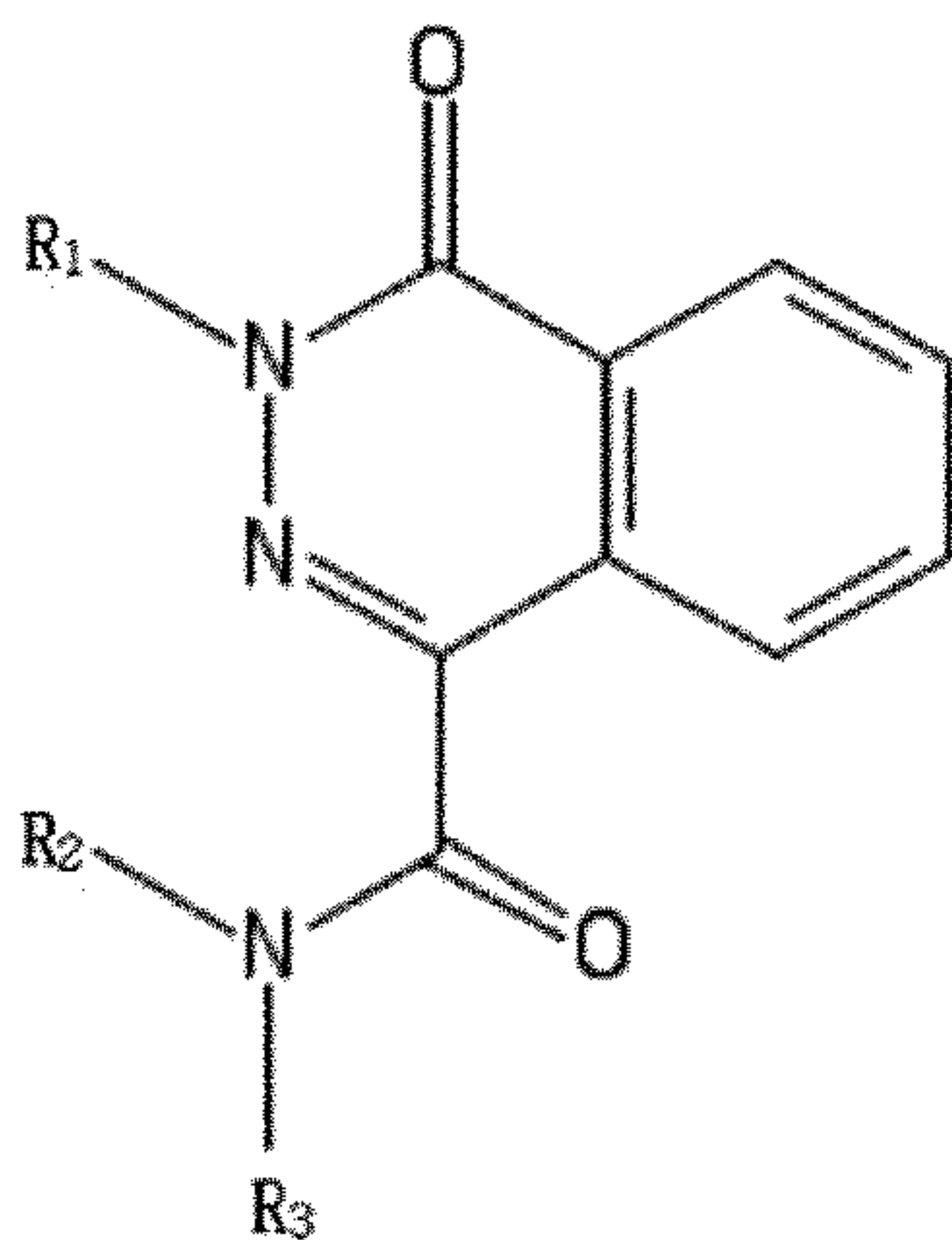
[화학식 1-7]



.

[청구항 5] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 TNF- α 억제용 조성물:

[화학식 1]



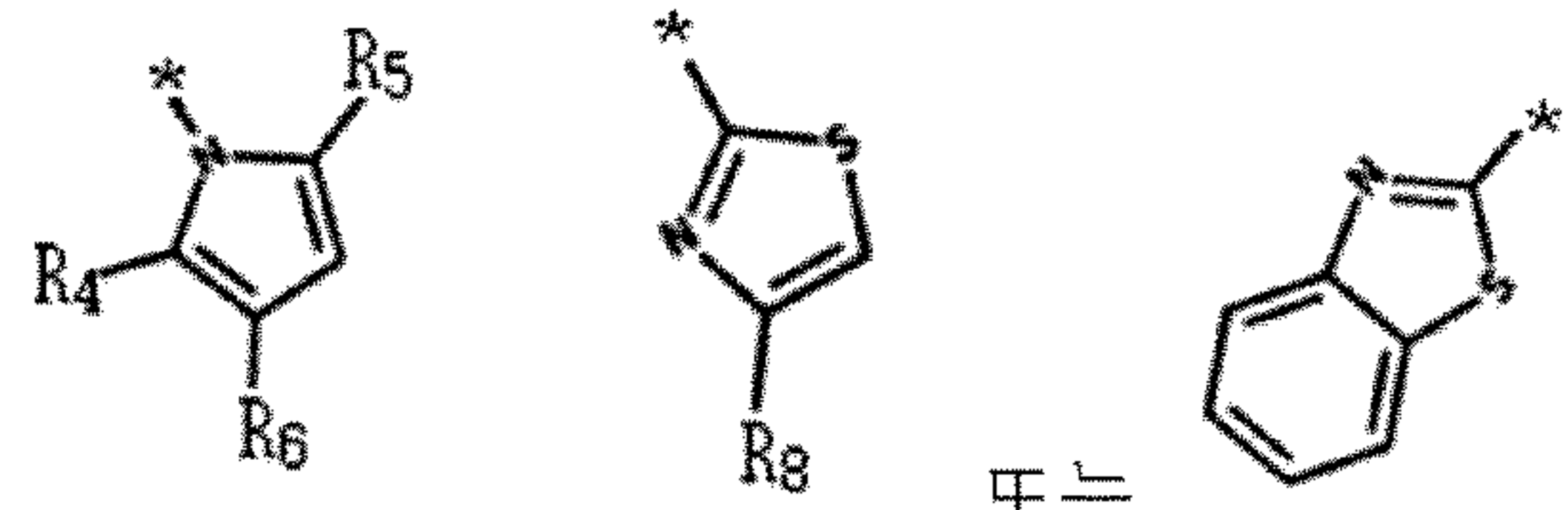
상기 화학식 1에서,

R_1 내지 R_3 는 각각 독립적으로 수소원자, 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 히드록시, 할로젠, 니트릴기, 니트로기, 사이클로알킬, 할로알킬, 알릴, 알콕시, 알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐, 아릴카보닐, 알킬아릴카보닐, 알콕시카보닐, 사이클로알콕시, 치환 또는 비치환된 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬, 아릴옥시, 알콕시헤테로아릴, 헤테로아릴옥시알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬아릴, 아릴알킬, 알킬헤테로아릴, 알킬에스테르, 알킬아미드 또는 아크릴이고, 여기서, 알킬, 알킬아미노 또는 알콕시는 C_{1-30} , 사이클로알킬은 C_{3-30} , 알릴은 C_{2-30} , 아릴은 C_{6-30} 이고, 헤테로아릴 및 헤테로사이클로알킬은 산소(O), 황(S) 및 질소(N) 중에서 선택된 헤테로원자를 함유한다.

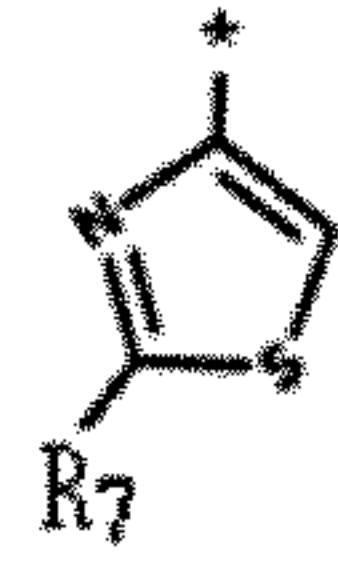
[청구항 6]

제5항에 있어서, 상기 R_1 , R_2 및 R_3 는 하기로 구성된 군에서 선택되는 치환기인 것을 특징으로 하는 TNF- α 억제용 조성물:

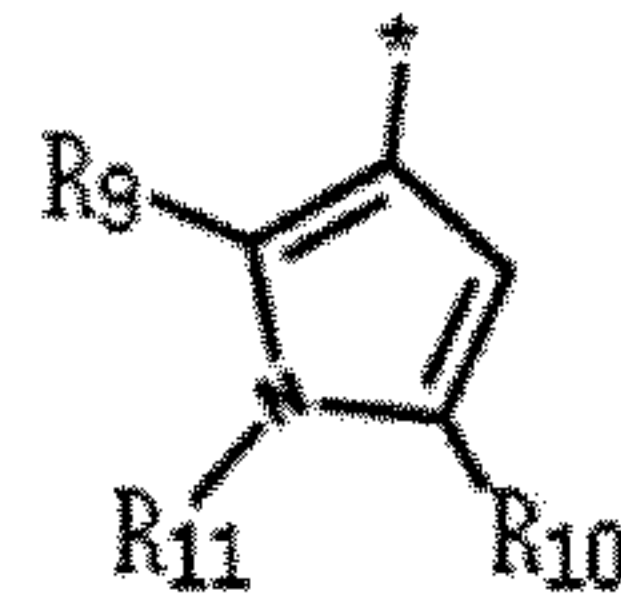
R_1 : C_{1-6} 알킬; 및



R_2 및 R_3 : 수소원자, 아릴,
(여기서, R_2 및 R_3 는 서로 동일하거나 상이하며,
상기 R_4 및 R_5 는 서로 동일하거나 상이한 C_{1-6} 알킬;

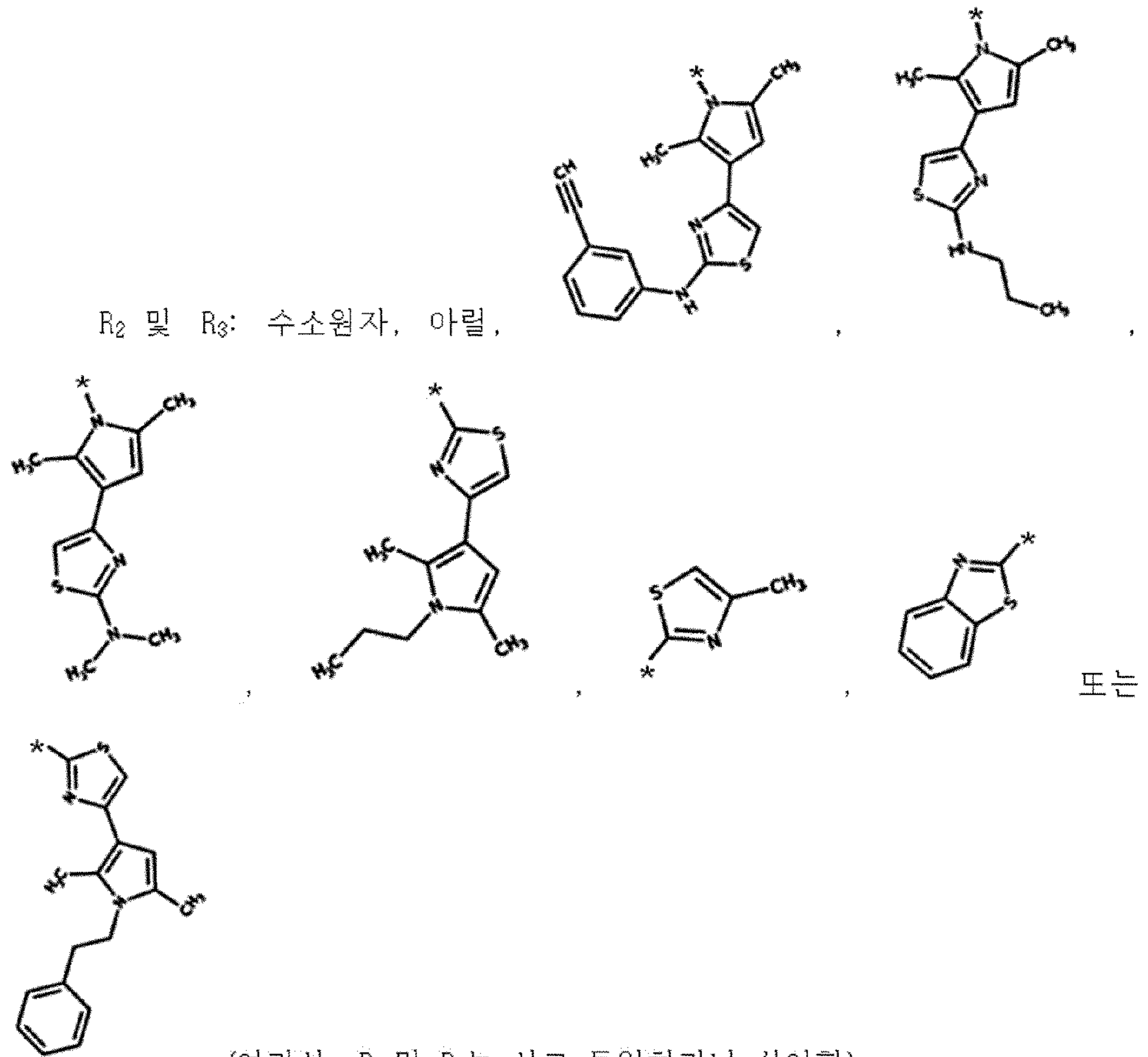


상기 R_6 는 ;
상기 R_7 은 C_{1-6} 알킬아미노, 치환 또는 비치환된 아릴아미노;



상기 R_8 은 C_{1-6} 알킬 또는 ; 및
상기 R_9 내지 R_{11} 은 C_{1-6} 알킬 또는 아릴알킬인 것을 특징으로 함).

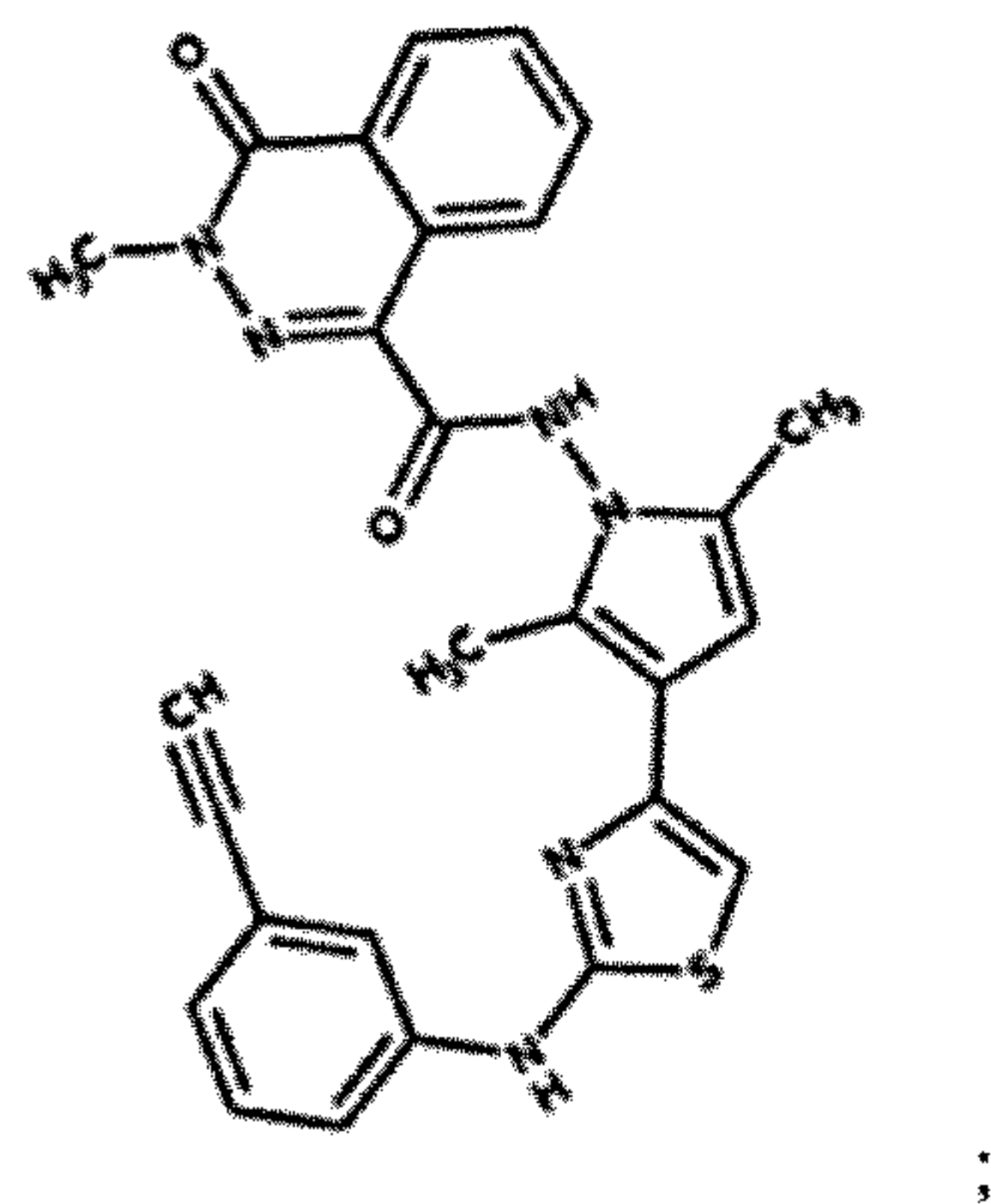
[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 R_1 , R_2 및 R_3 는 하기로 구성된 군에서 선택되는
치환기인 것을 특징으로 하는 TNF- α 억제용 조성물:
 R_1 : C_{1-6} 알킬; 및



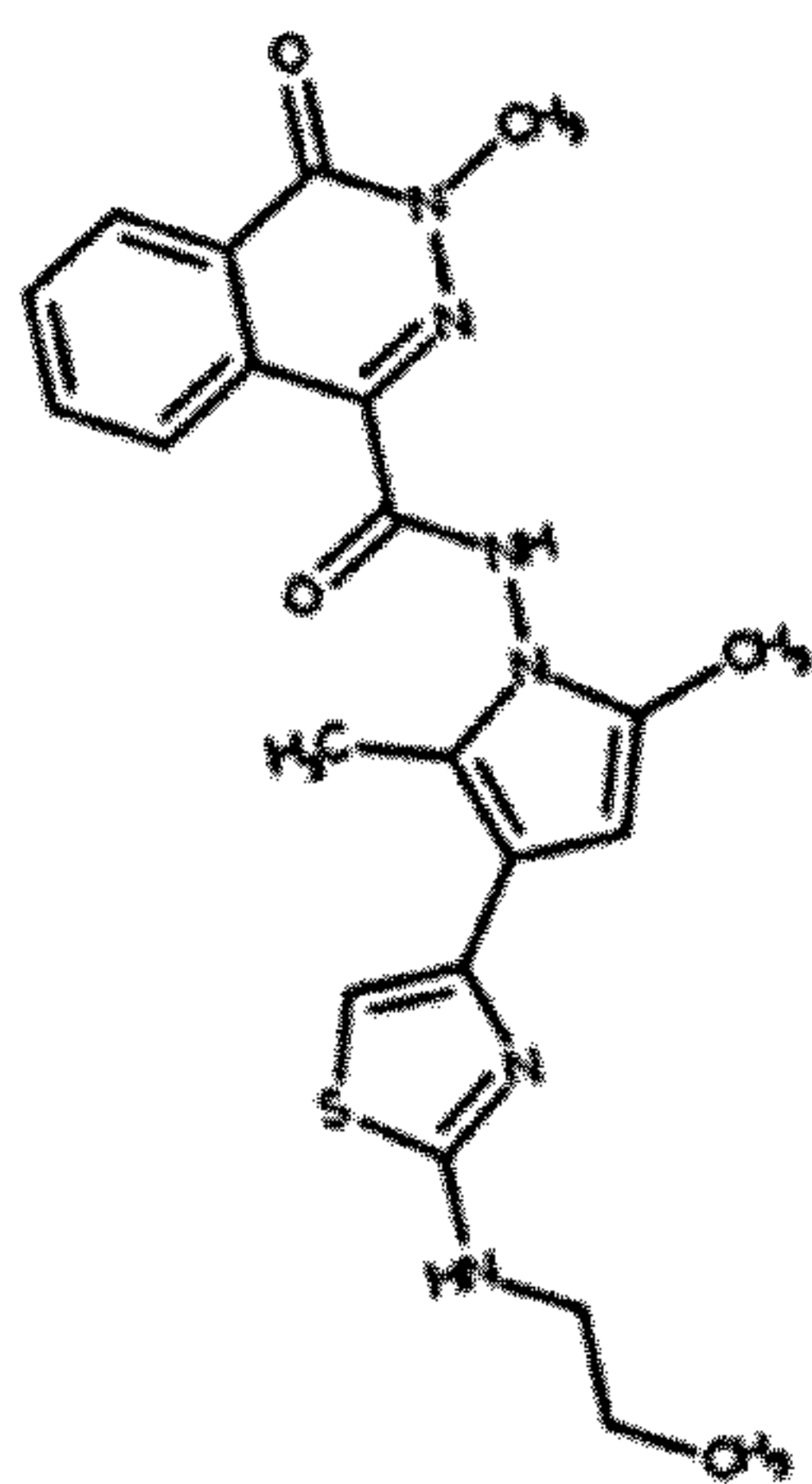
(여기서, R_2 및 R_3 는 서로 동일하거나 상이함).

[청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 1-1 내지 화학식 1-7로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 화합물인 것을 특징으로 하는 TNF- α 억제용 조성물:

[화학식 1-1]

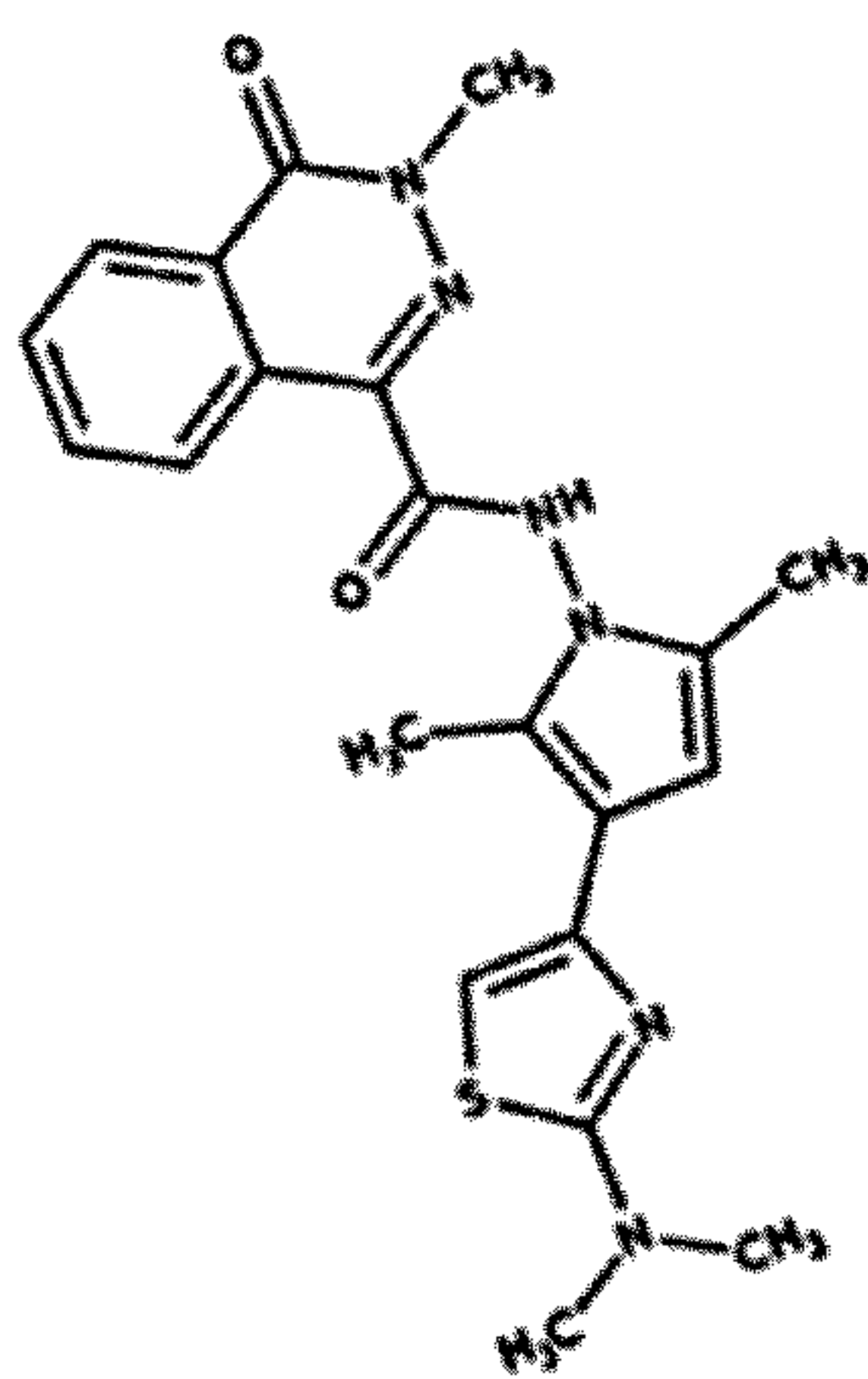


[화학식 1-2]



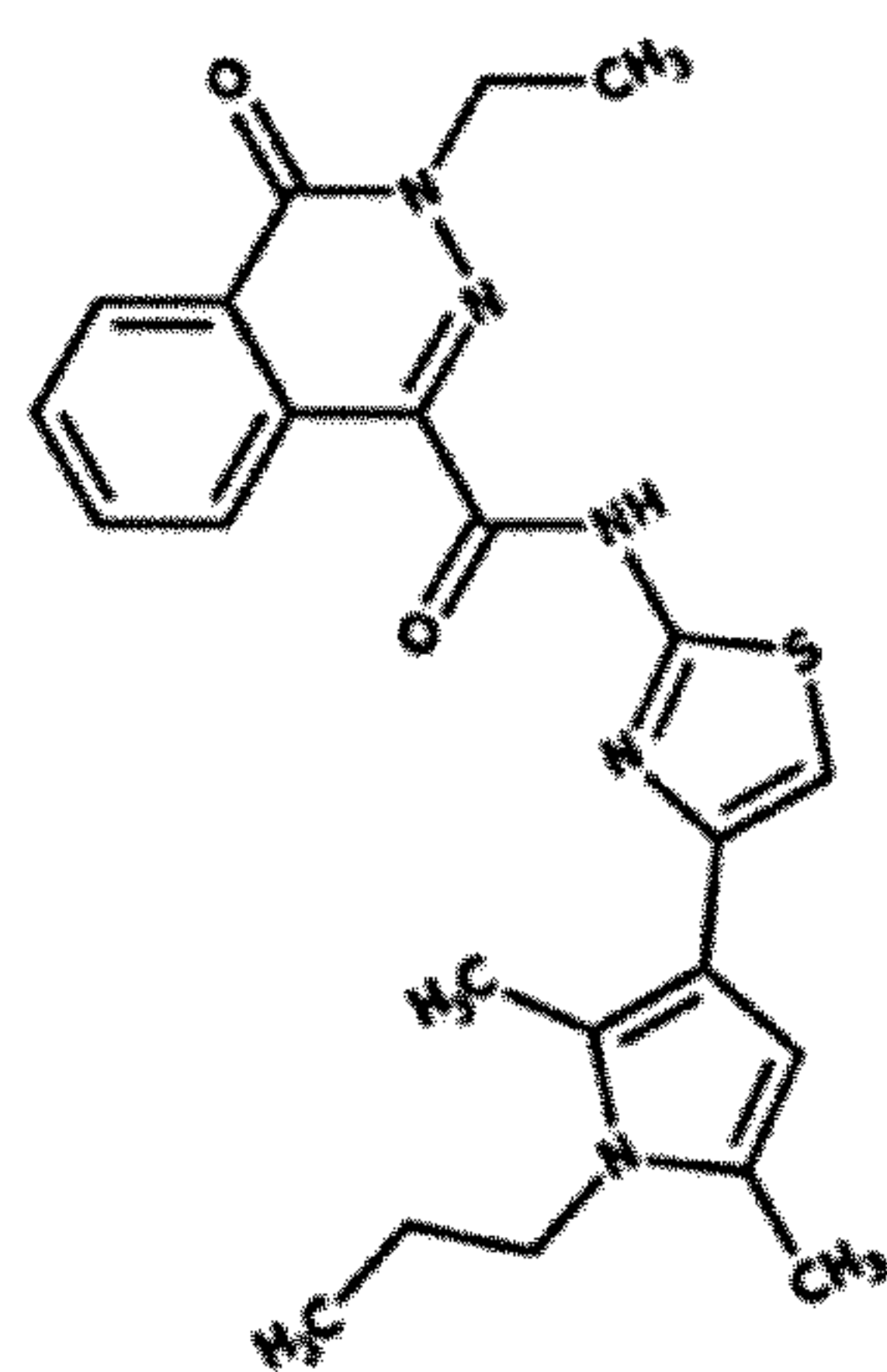
;

[화학식 1-3]



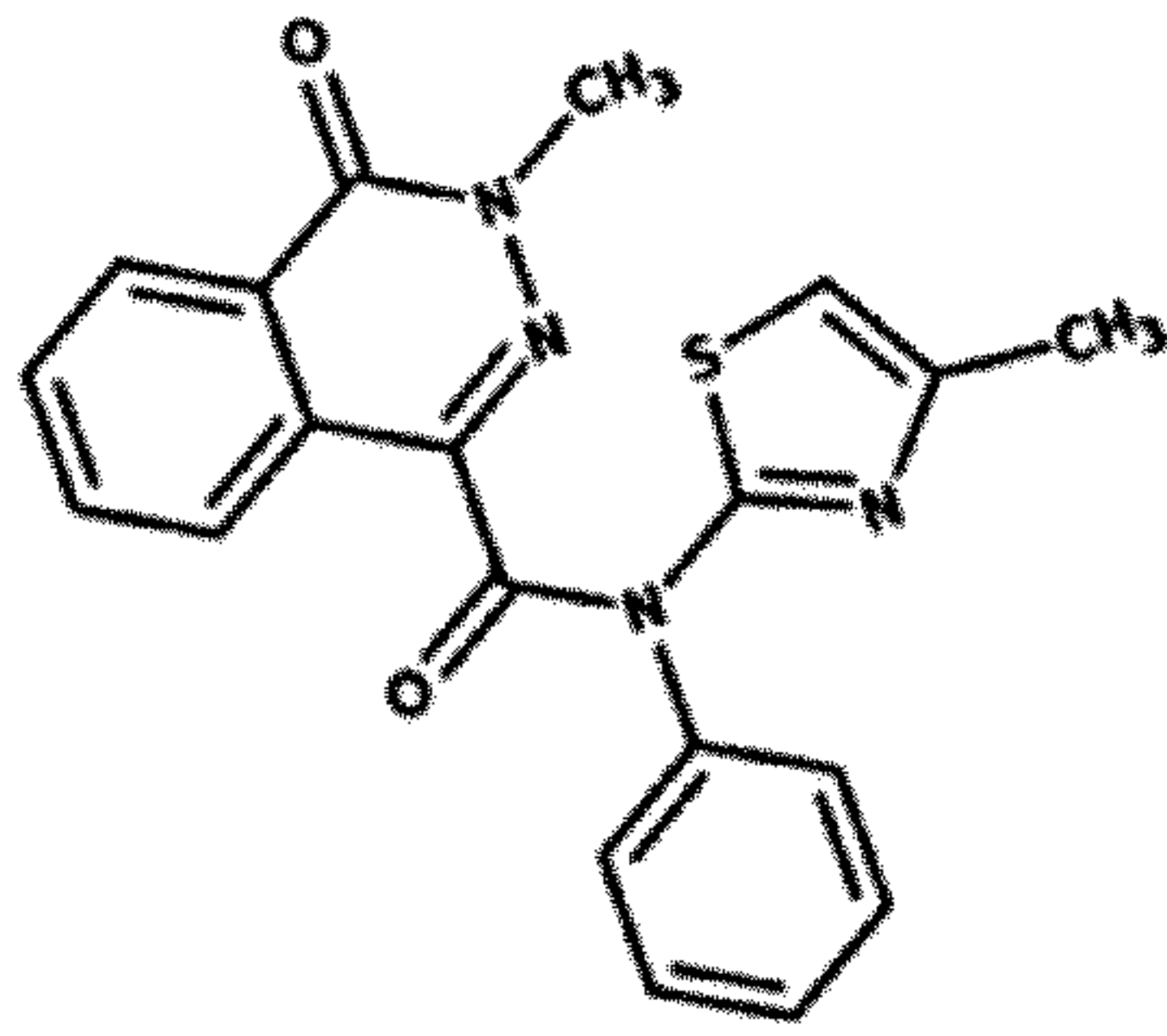
;

[화학식 1-4]



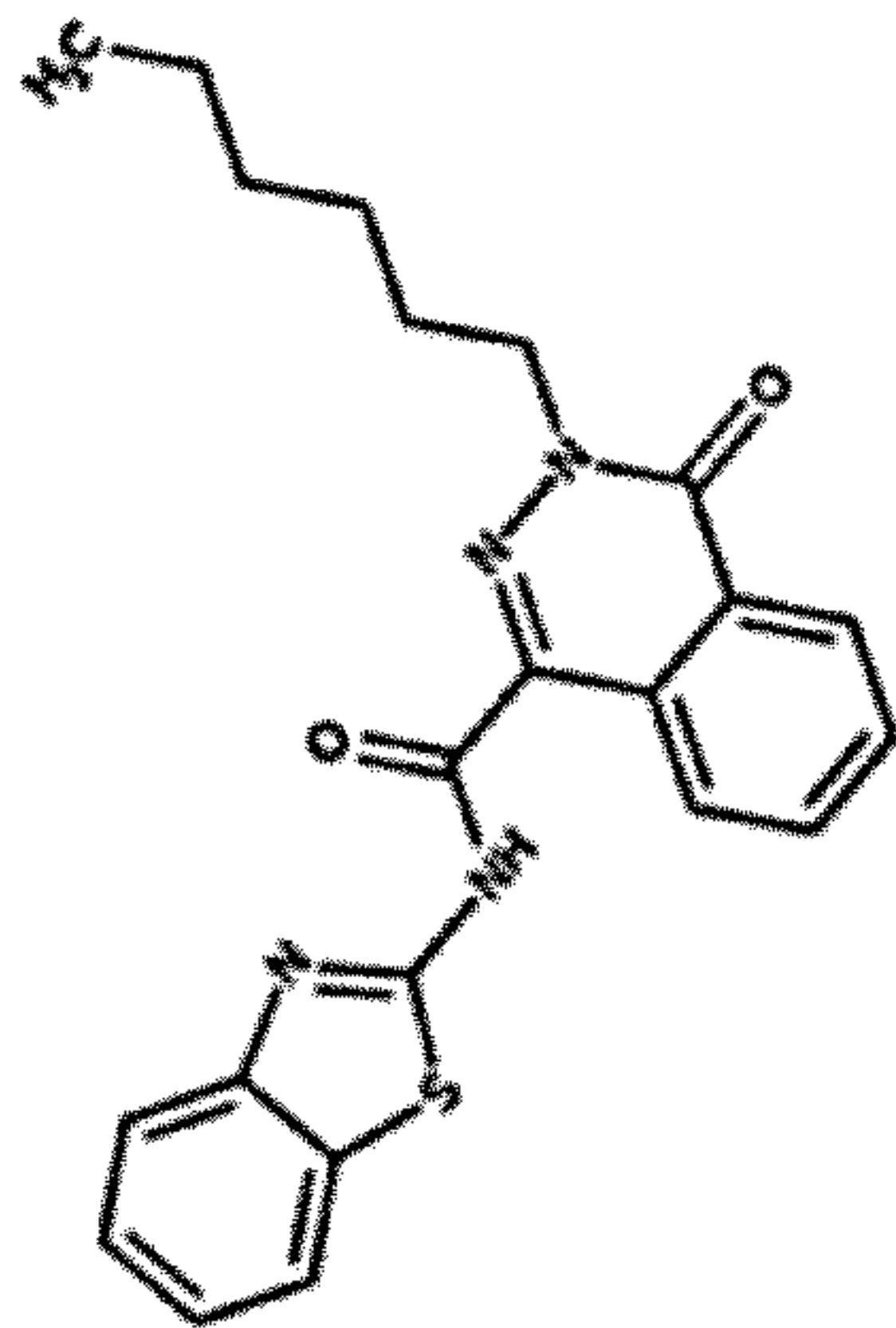
;

[화학식 1-5]



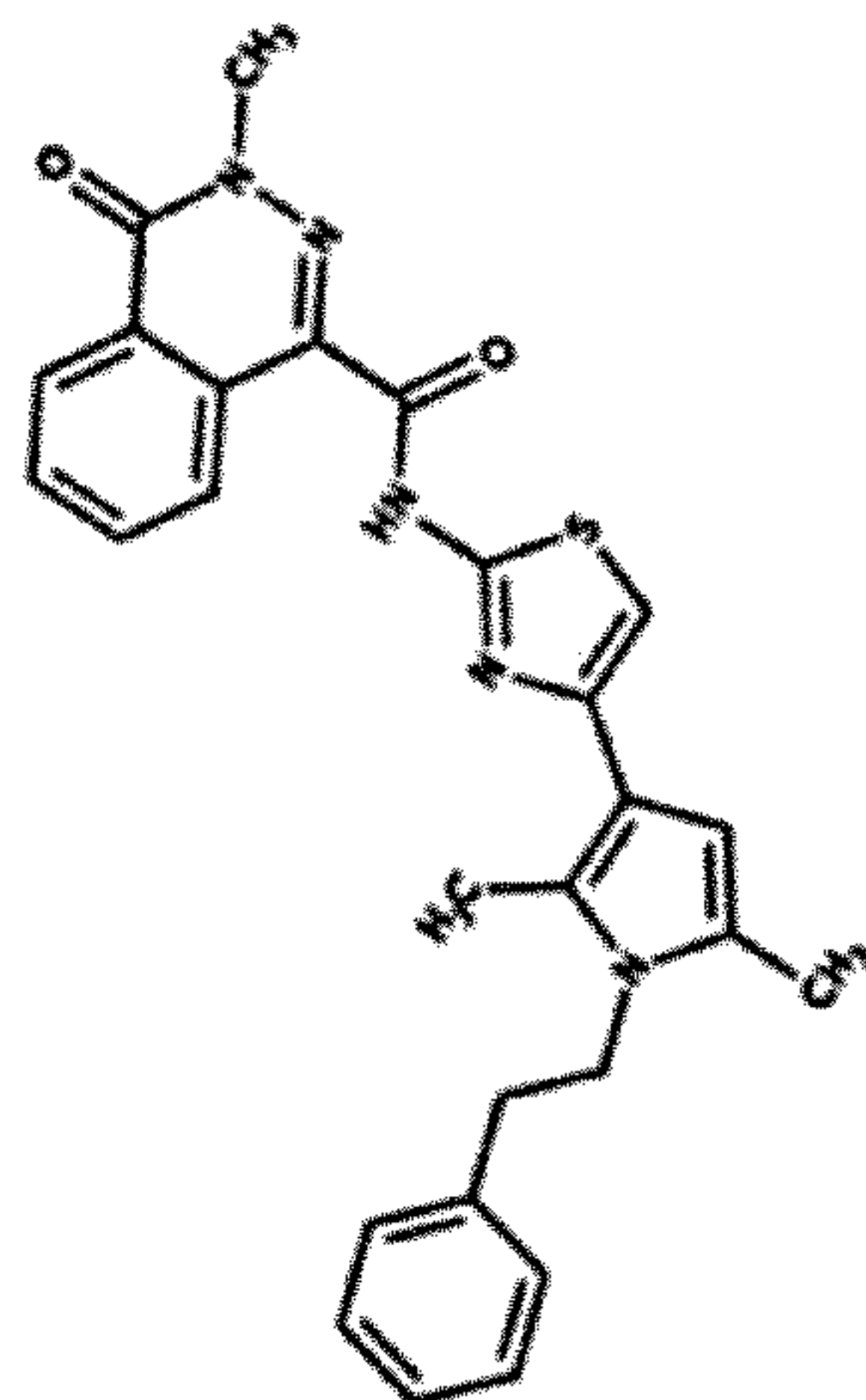
;

[화학식 1-6]



;

[화학식 1-7]

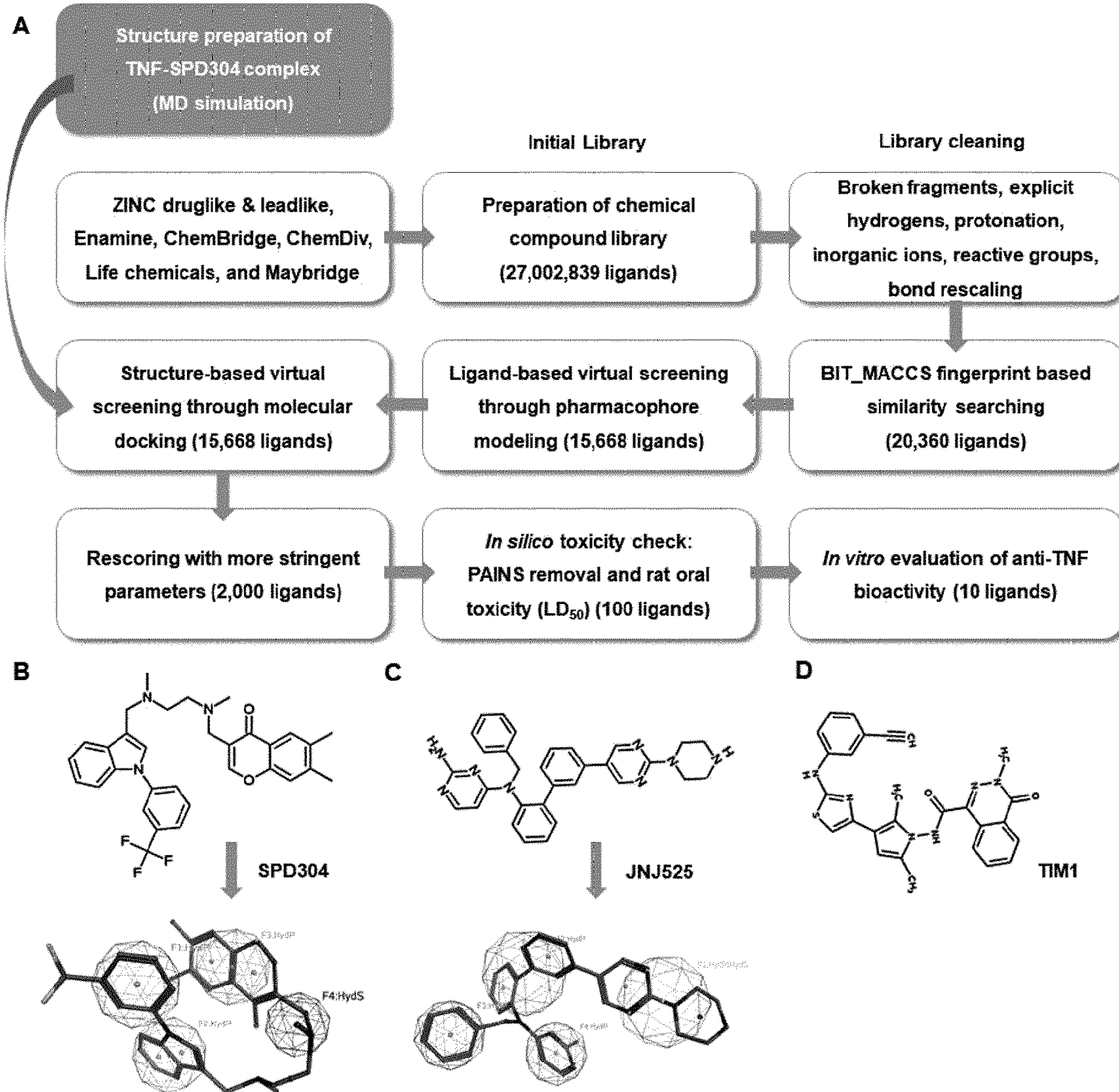


.

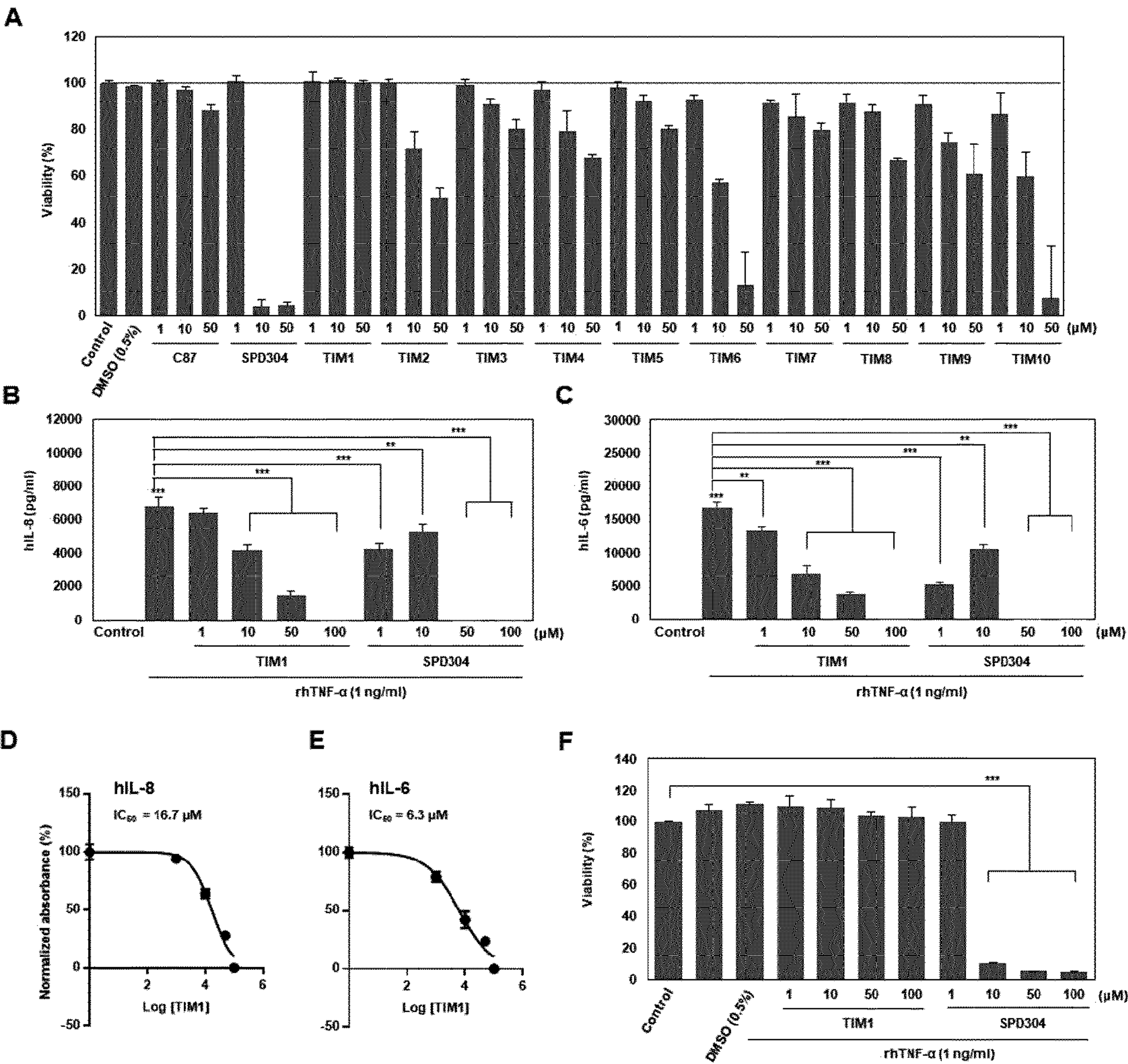
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 화합물은 TNF- α 동종이합체(homodimer)의 결합 공동(binding cavity)에 특이적으로 결합하여, TNF- α 동종삼합체(homotrimer)의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 TNF- α 억제용 조성물.
- [청구항 10] 제5항의 TNF- α 억제용 조성물을 포함하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물.

- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 자가면역질환 및/또는 염증질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 크론병(Crohn's disease), 소아 특발성 관절염(juvenile idiopathic arthritis), 척추관절염(spondyloarthritis), 베체트 병(Behcet's disease), 포도막염, 판상 건선, 축성 척추관절염, 궤양성 대장염, 화농성 한선염, 인슐린-의존성 당뇨병, 습진, 알러지, 아토피성 피부염, 여드름, 아토피성 비염, 폐염증, 알레르기성 피부염, 만성 부비동염, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 위염, 통풍, 통풍 관절염, 궤양, 만성 기관지염, 궤양성 대장염, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 패혈증, 맥관염, 활액낭염, 측두 동맥염, 고형암, 알츠하이머병, 동맥경화증, 비만 및 바이러스 감염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 및/또는 염증질환 예방 또는 치료용 조성물.

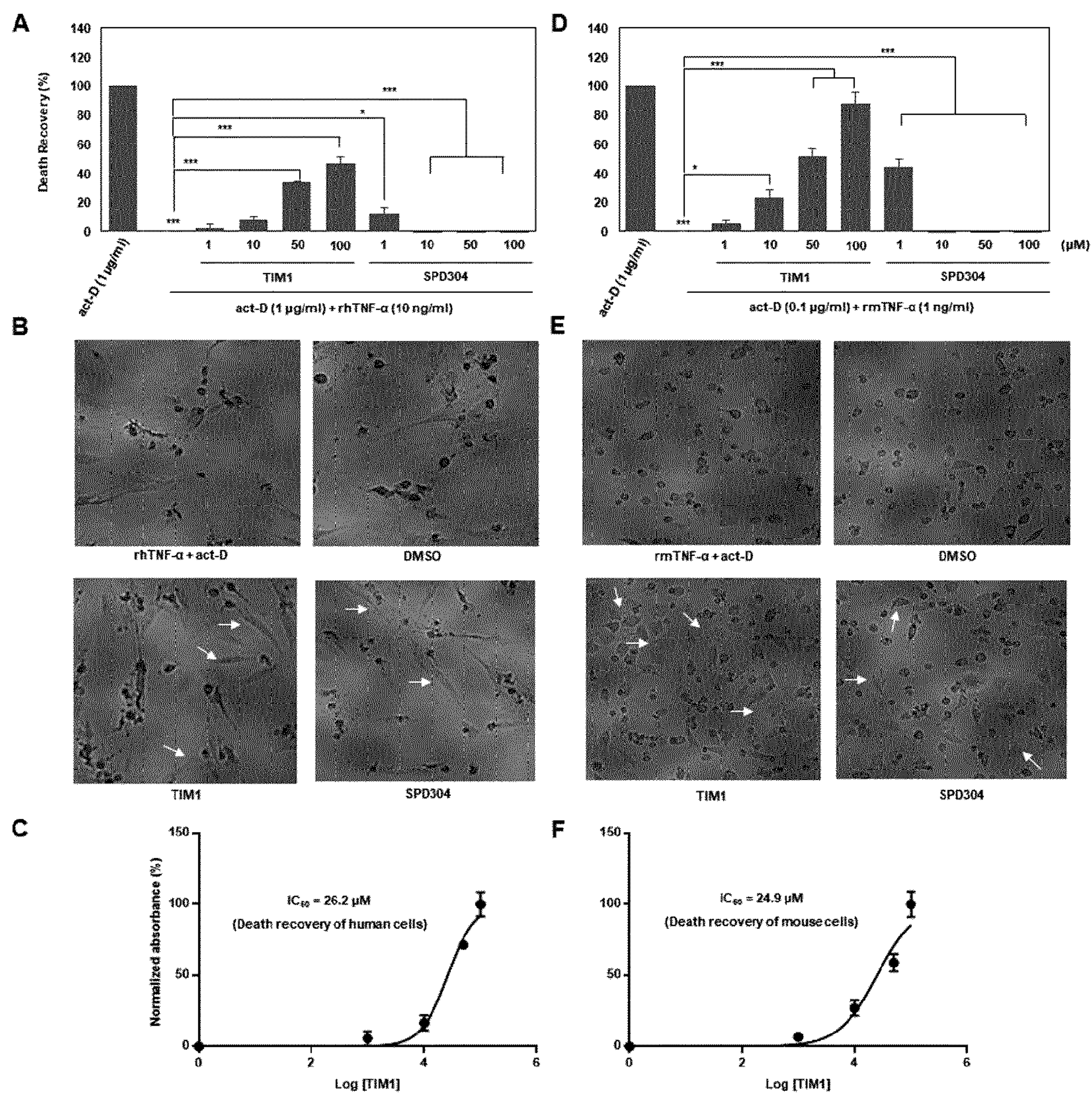
[도 1]



[도2]

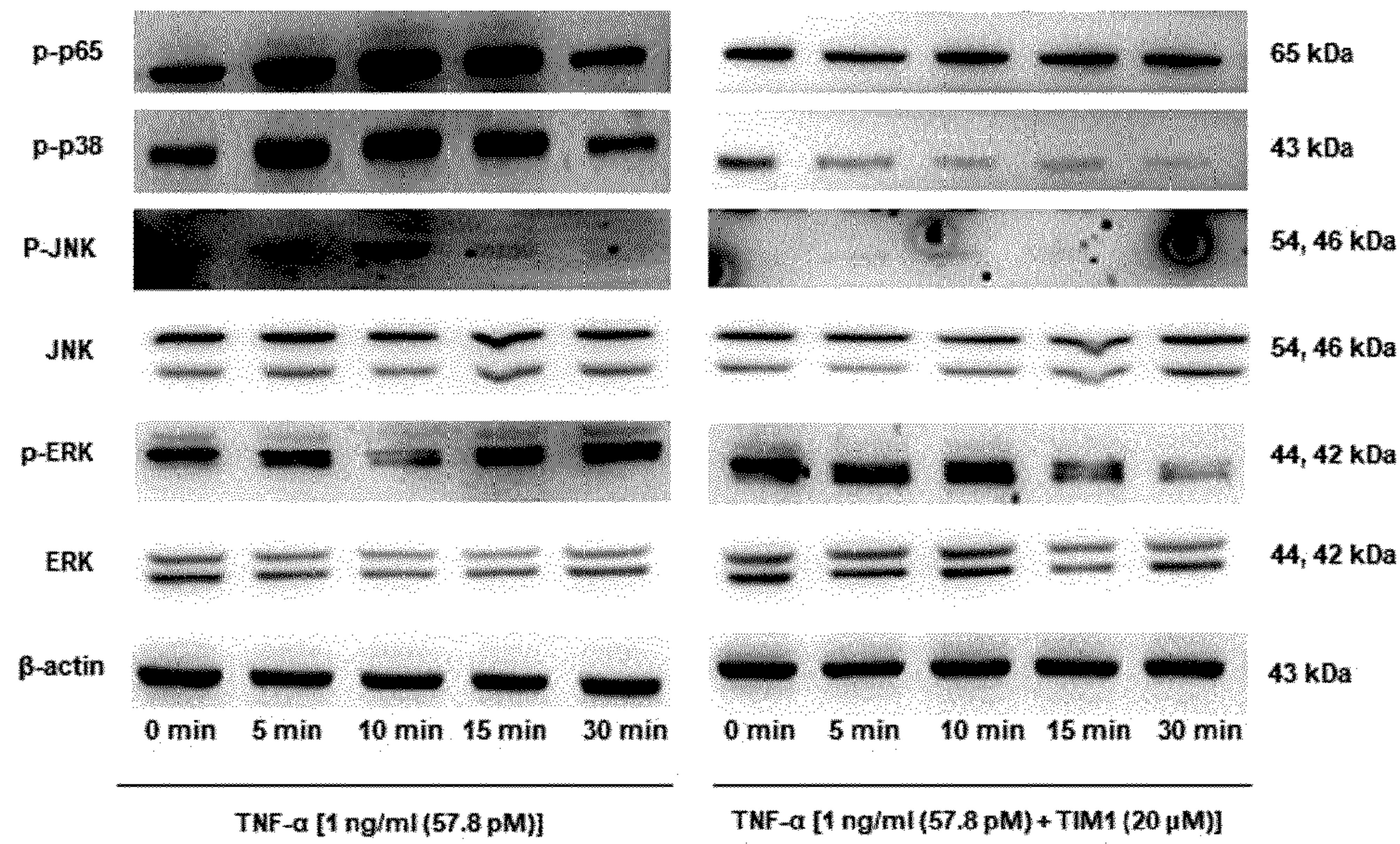


[도3]

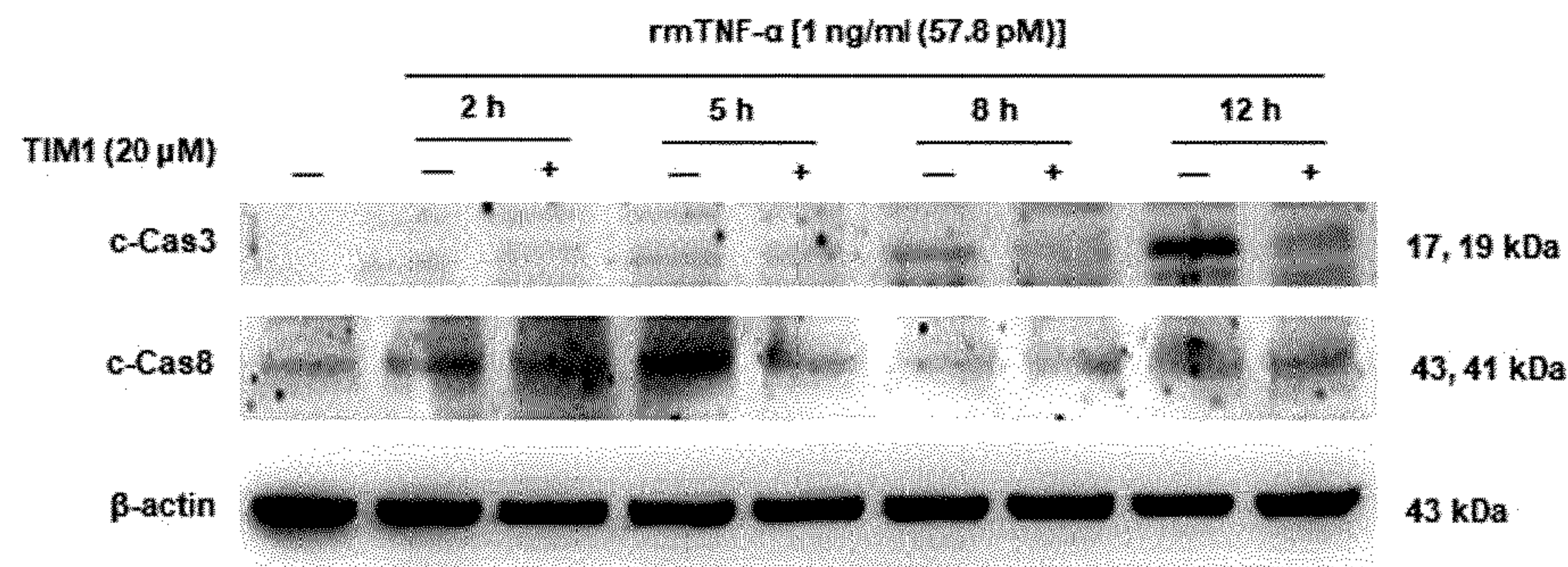


[도4]

A

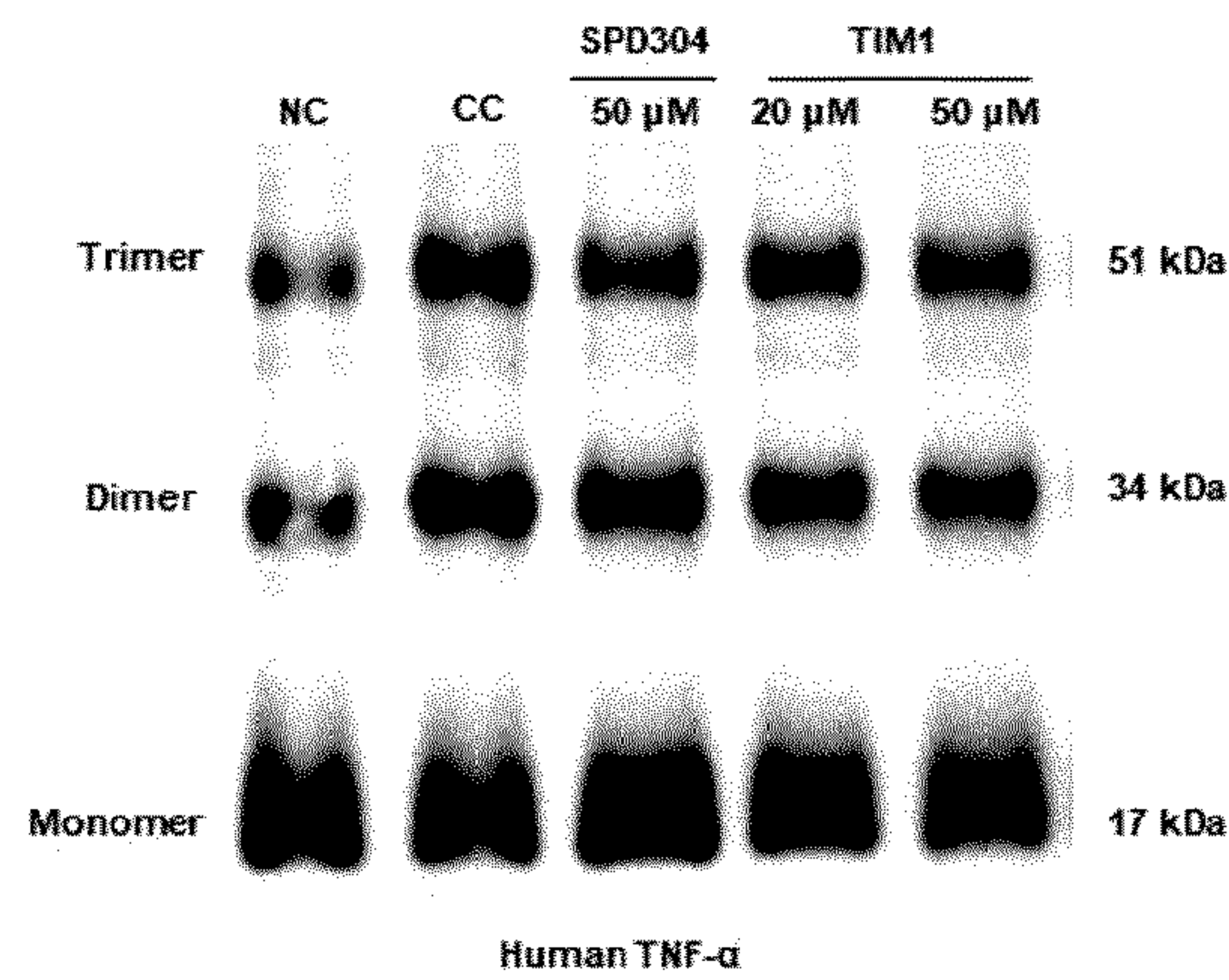


B

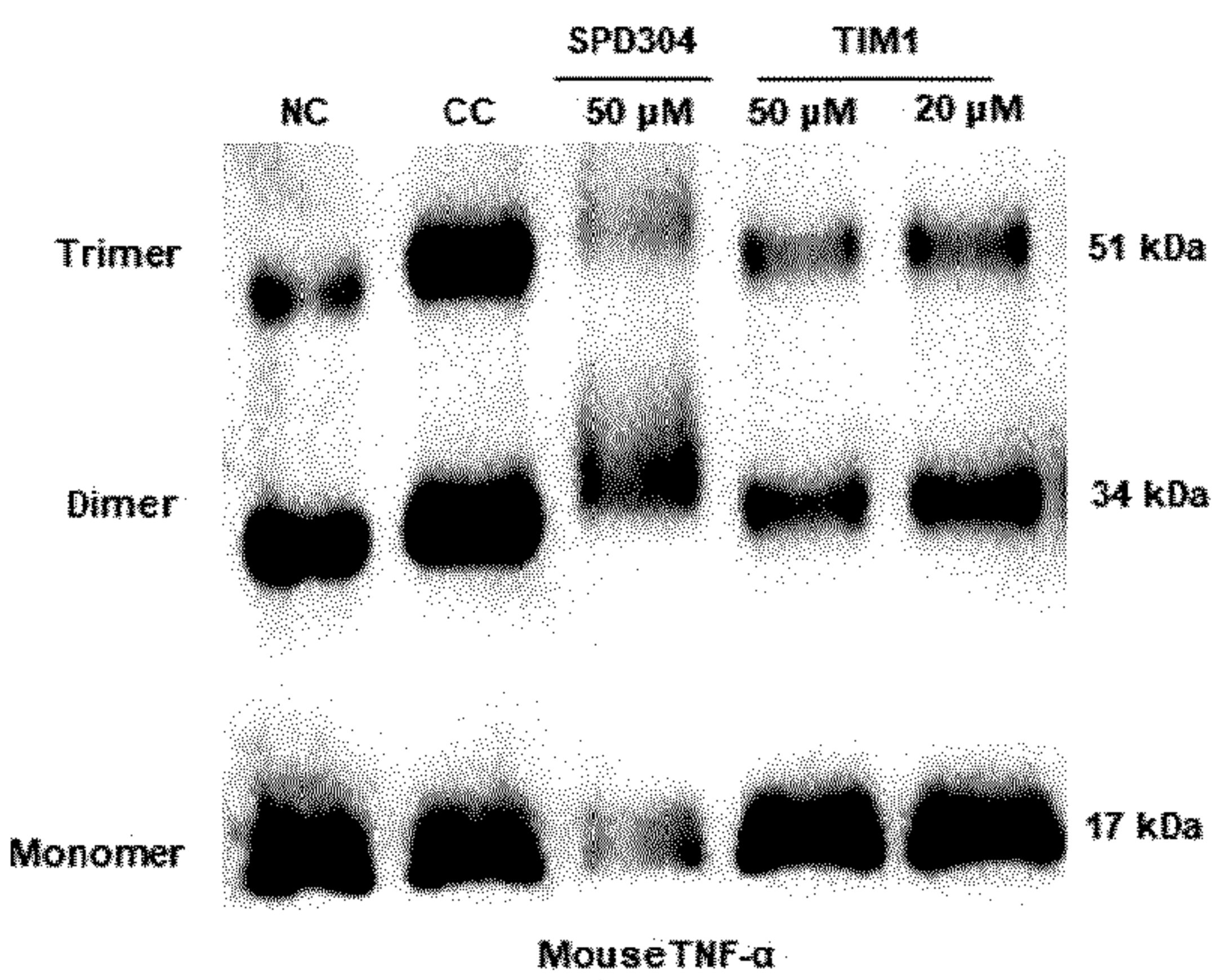


[도5]

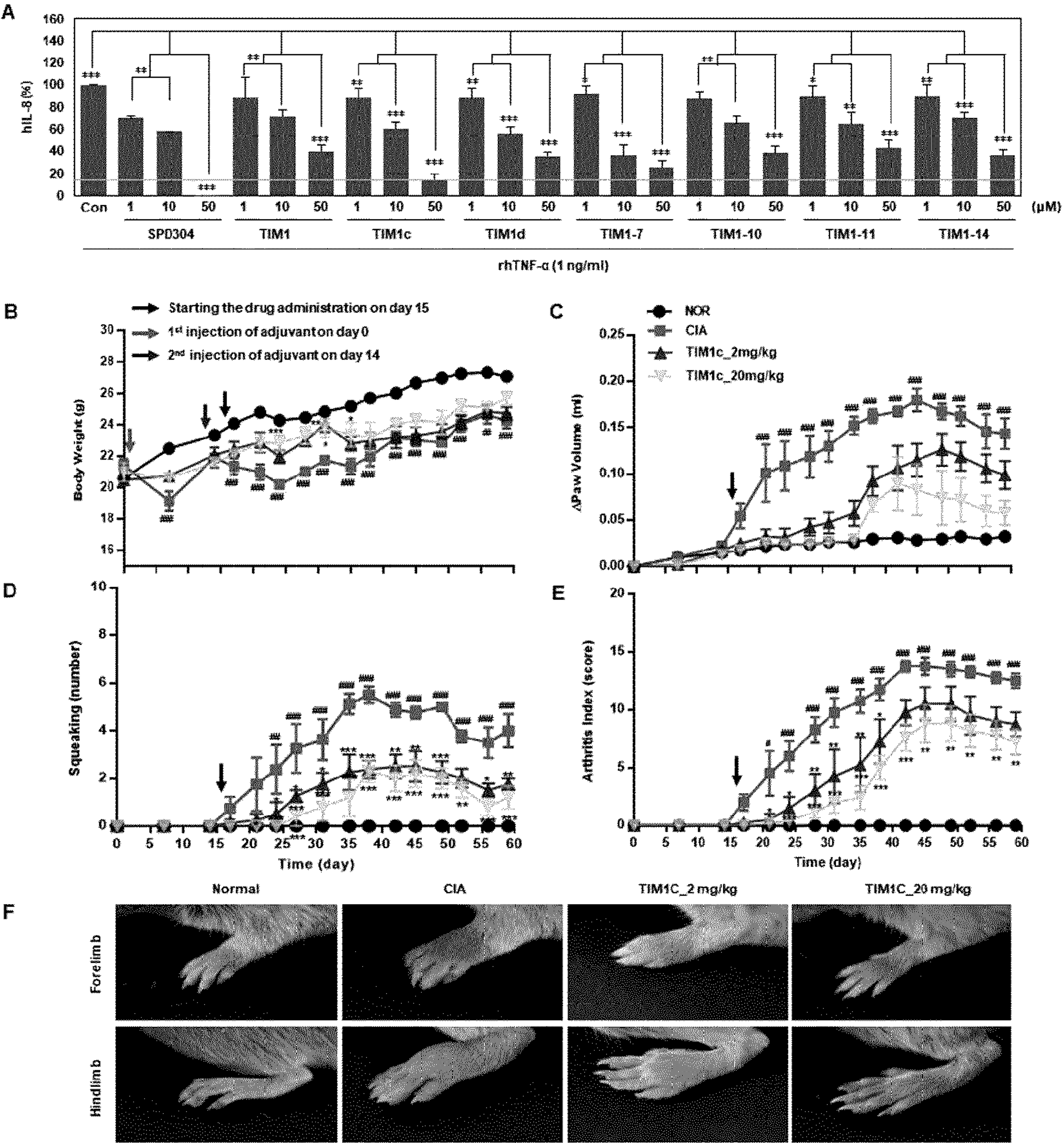
A



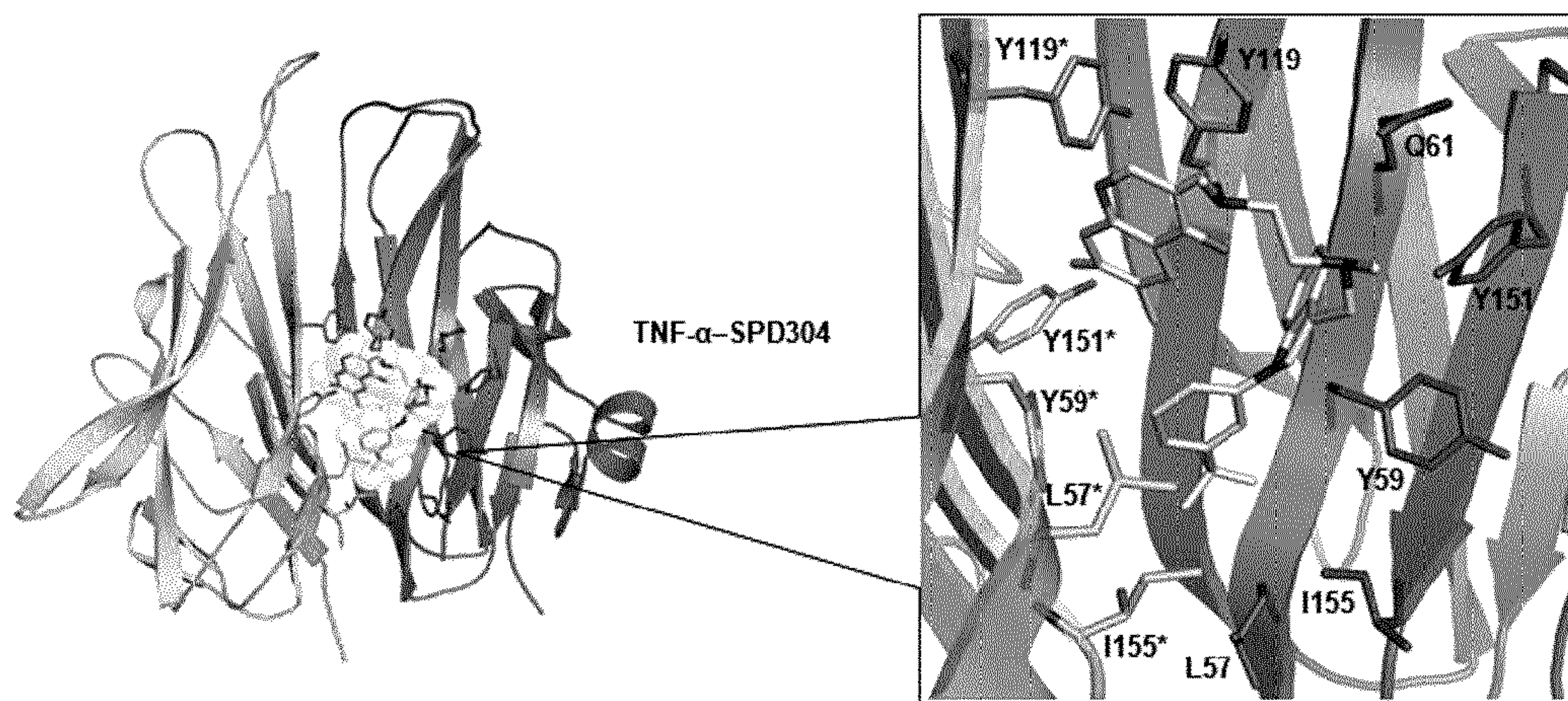
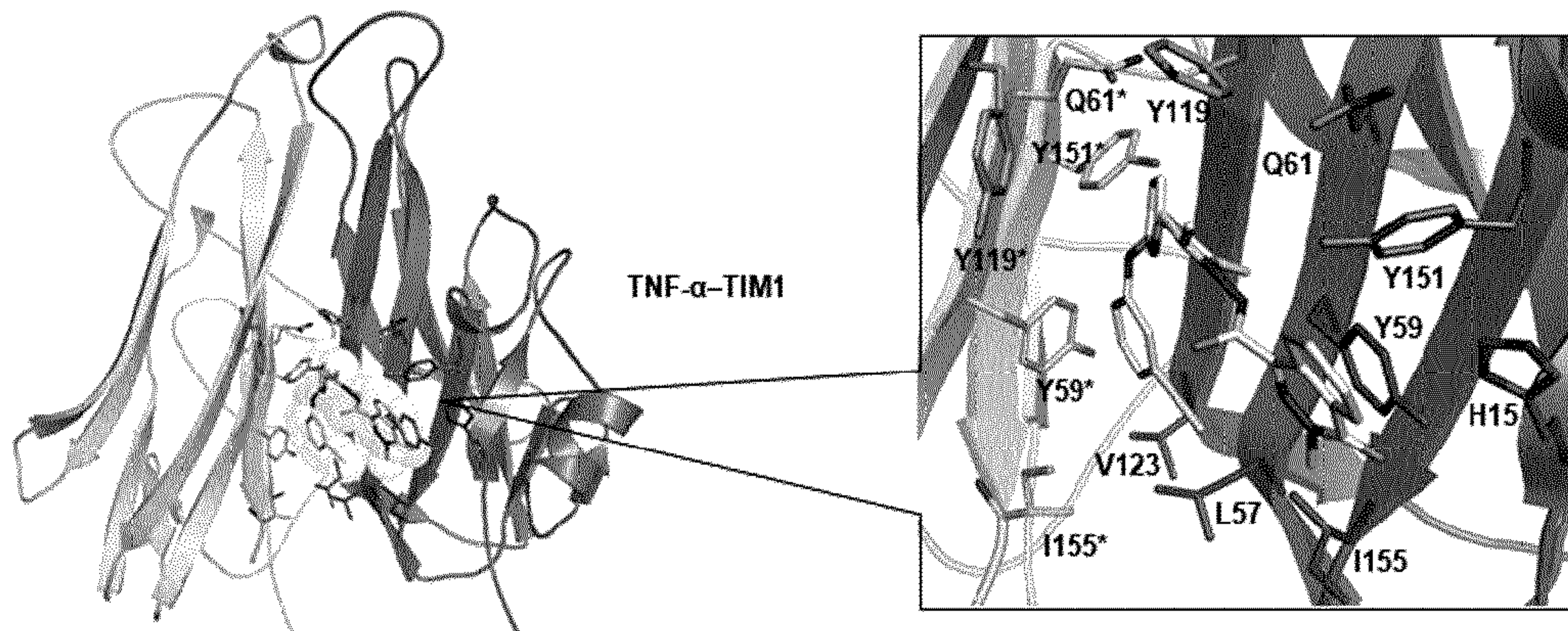
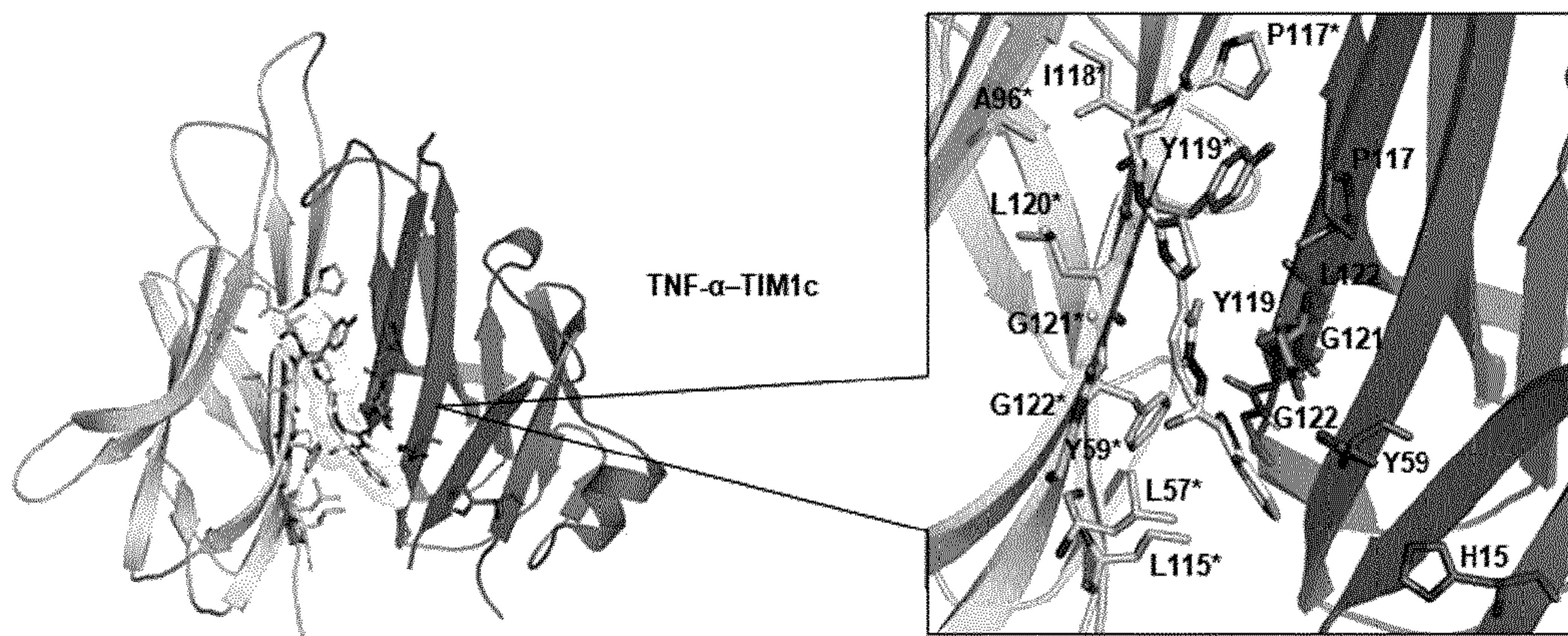
B



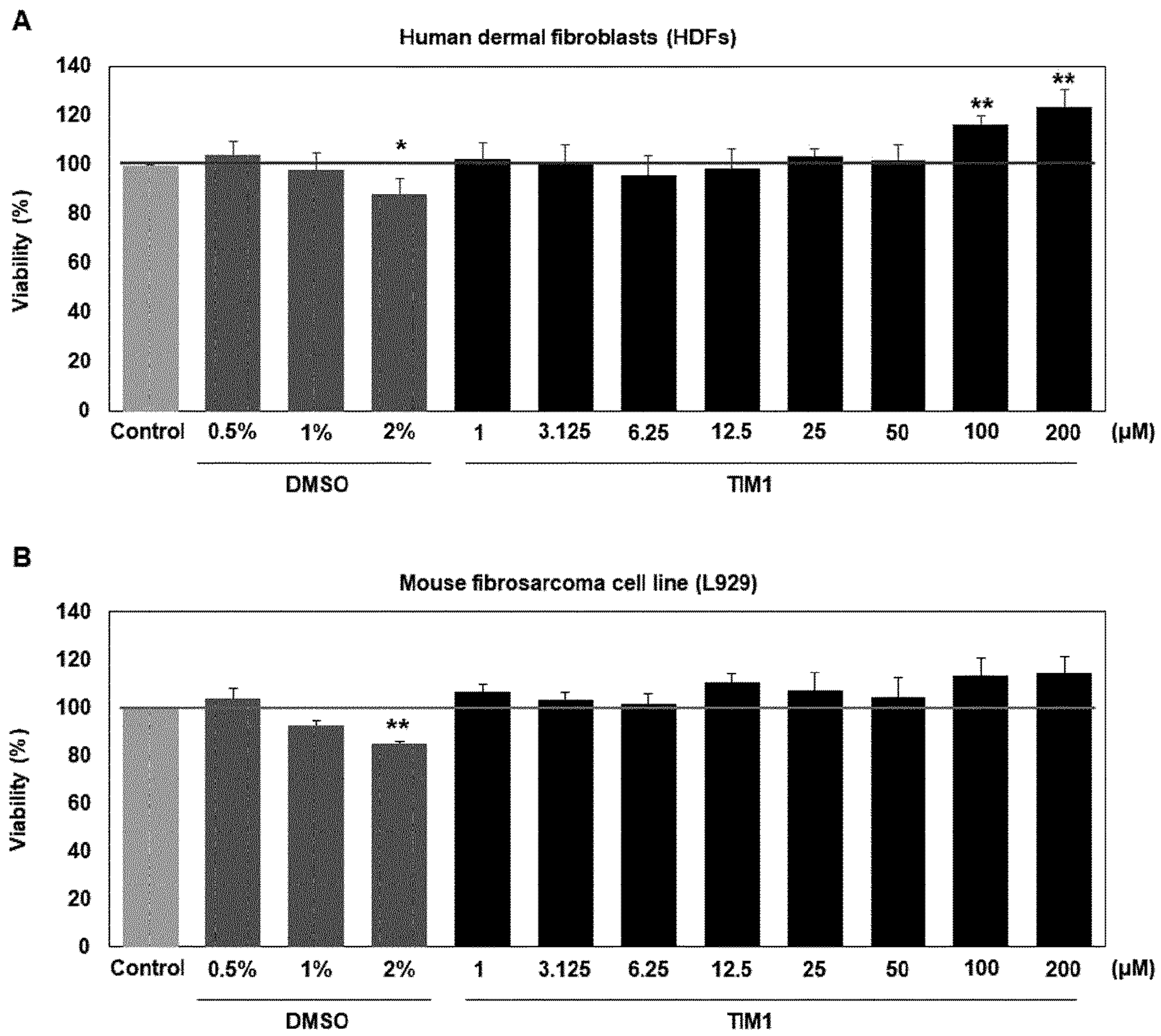
[도6]



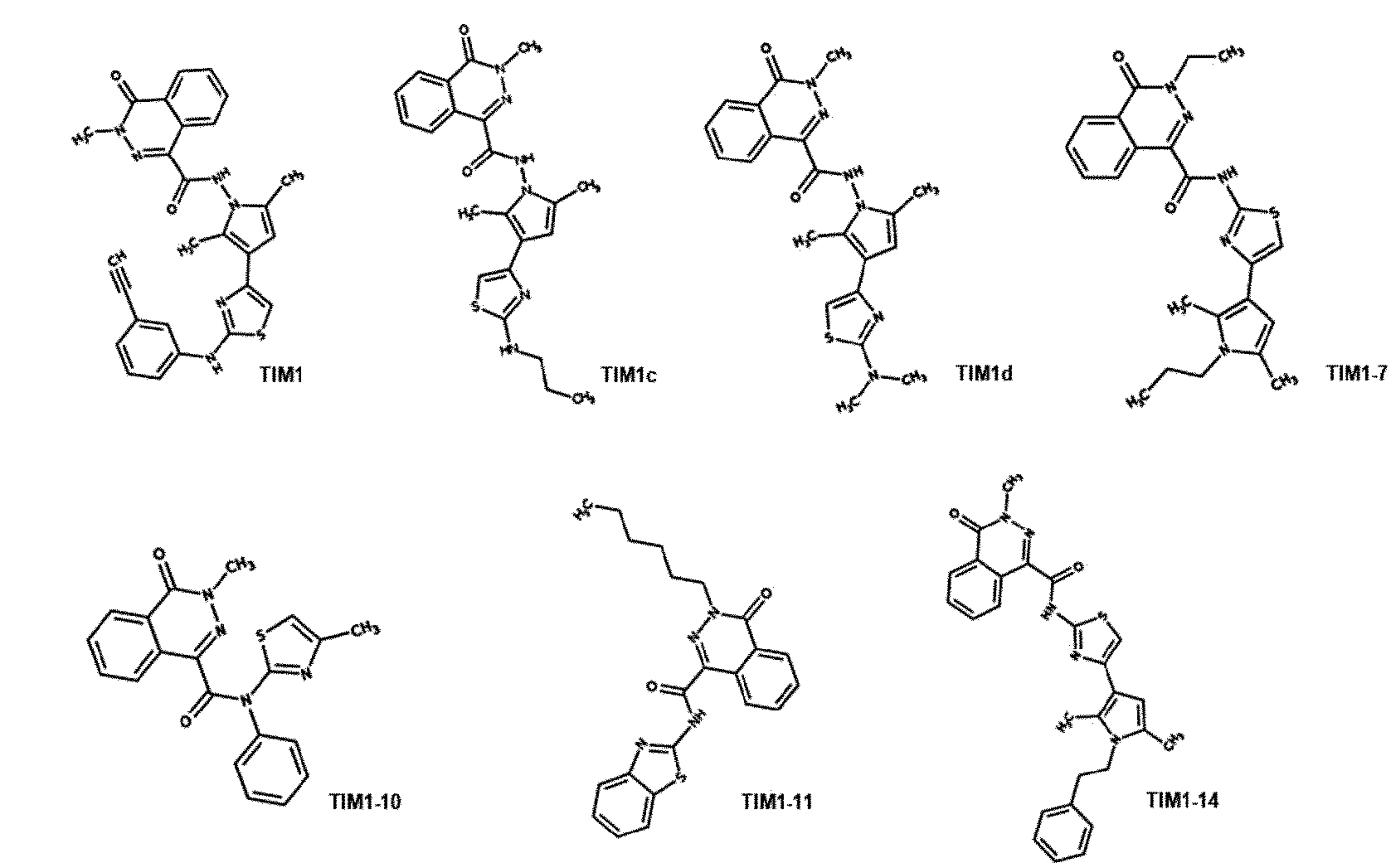
[도7]

A**B****C**

[도8]

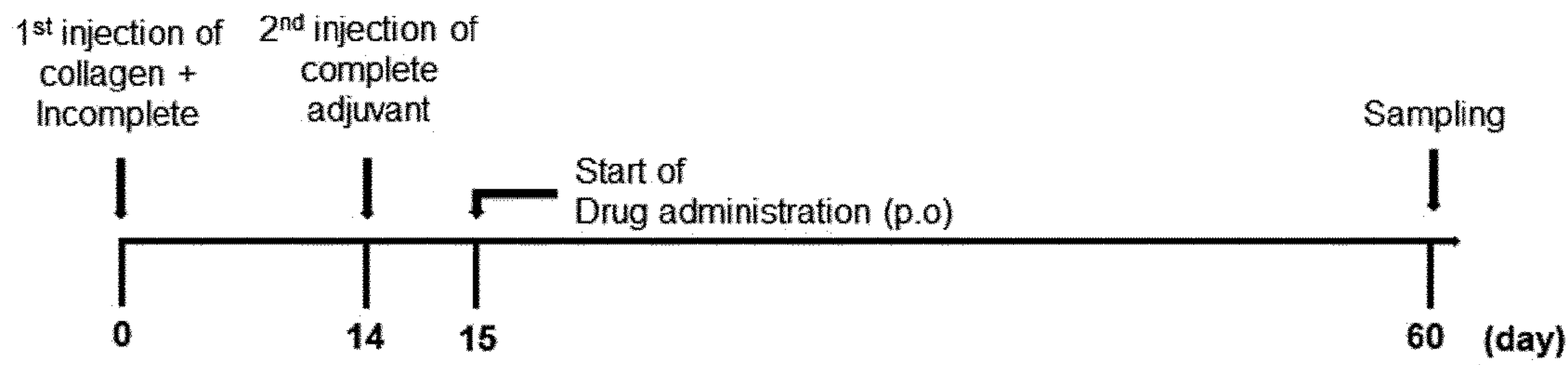


[도9]

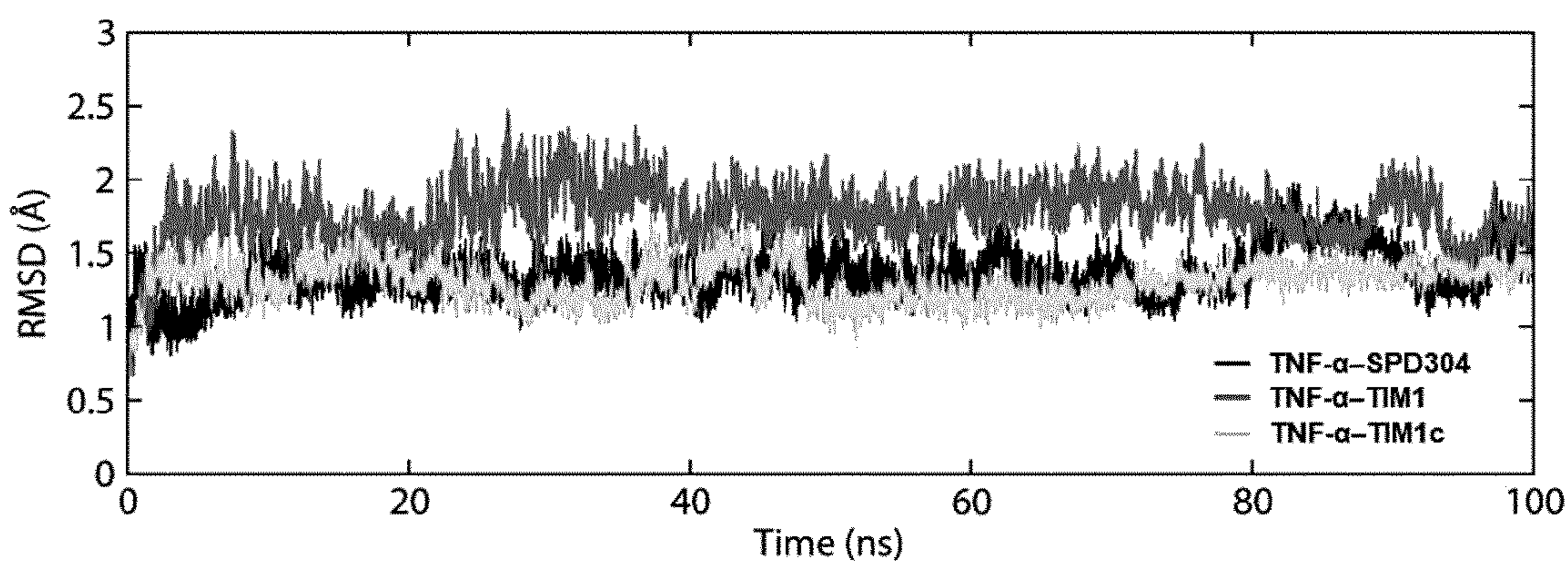


Name	SMILES	IUPAC Name	MW (g/mol)
TIM1	<chem>Cc1cc(-c2csc(Nc3cccc(c3)C#C)n2)c(C)n1NC(=O)c1nn(C)c(=O)c2cccc12</chem>	N-(3-{2-[(3-ethynylphenyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl}-2,5-dimethylpyrrol-1-yl)-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	494.57
TIM1c	<chem>Cl.CCCNc1nc(cs1)-c1cc(C)n(NC(=O)c2nn(C)c(=O)c3ccccc23)c1C</chem>	N-{2,5-dimethyl-3-[2-(propylamino)-1,3-thiazol-4-yl]pyrrol-1-yl}-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide hydrochloride	472.99
TIM1d	<chem>CN(C)c1nc(cs1)-c1cc(C)n(NC(=O)c2nn(C)c(=O)c3ccccc23)c1C</chem>	N-{3-[2-(dimethylamino)-1,3-thiazol-4-yl]-2,5-dimethylpyrrol-1-yl}-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	422.51
TIM1-7	<chem>CCCn1c(C)cc(-c2csc(NC(=O)c3nn(CC)c(=O)c4ccccc34)n2)c1C</chem>	N-[4-(2,5-dimethyl-1-propylpyrrol-3-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-3-ethyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	435.55
TIM1-10	<chem>Cc1csc(n1)N(C(=O)c1nn(C)c(=O)c2ccccc12)c1ccccc1</chem>	3-methyl-N-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)-4-oxo-N-phenylphthalazine-1-carboxamide	376.43
TIM1-11	<chem>CCCCCCn1nc(C(=O)Nc2nc3ccccc3s2)c2ccccc2c1=O</chem>	N-(1,3-benzothiazol-2-yl)-3-hexyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	406.5
TIM1-14	<chem>Cc1cc(-c2csc(NC(=O)c3nn(C)c(=O)c4ccccc34)n2)c(C)n1CCc1ccccc1</chem>	N-{4-[2,5-dimethyl-1-(2-phenylethyl)pyrrol-3-yl]-1,3-thiazol-2-yl}-3-methyl-4-oxophthalazine-1-carboxamide	483.59

[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/015359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 417/14(2006.01)i; C07D 417/12(2006.01)i; A61K 31/502(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 417/14(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 31/075(2006.01); A61K 31/4196(2006.01); A61K 31/519(2006.01); A61K 31/70(2006.01); A61K 31/7052(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & keywords: 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor-α, TNF-α), 동종이합체(homodimer), 동종삼합체(homotrimer), 자가 면역 질환(autoimmune disease), 염증 질환(inflammatory disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010-108187 A2 (BRANDEIS UNIVERSITY et al.) 23 September 2010 (2010-09-23) See claims 3 and 27-34; page 85; and figure 42.	1-11
A	WO 2007-119108 A2 (WARATAH PHARMACEUTICALS INC.) 25 October 2007 (2007-10-25) See claims 27-40; and page 99.	1-11
A	KR 10-2017-0092634 A (AN2H DISCOVERY LIMITED) 11 August 2017 (2017-08-11) See page 38; and paragraphs [0021]-[0023].	1-11
A	WO 2010-151799 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 29 December 2010 (2010-12-29) See figure 1; and page 18, lines 8-16.	1-11
A	US 5563143 A (COHAN, V. L. et al.) 08 October 1996 (1996-10-08) See entire document.	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 February 2021

Date of mailing of the international search report

09 February 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/015359

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SADDALA, M. S. et al. Identification of novel inhibitors for TNF α , TNFR1 and TNF α -TNFR1 complex using pharmacophore-based approaches. Journal of translational medicine. 02 July 2019, vol. 17, no. 215, pp. 1-16. See page 1; and page 12, right column, third paragraph.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/015359

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2010-108187	A2	23 September 2010	EP	2408753	A2	25 January 2012
				EP	2408753	A4	07 November 2012
				US	10125116	B2	13 November 2018
				US	2012-0101096	A1	26 April 2012
				US	2015-0099781	A1	09 April 2015
				US	8969342	B2	03 March 2015
				WO	2010-108187	A3	31 March 2011
WO	2007-119108	A2	25 October 2007	CA	2626005	A1	25 October 2007
				EP	1940373	A2	09 July 2008
				EP	1940373	A4	27 May 2009
				EP	1940373	B1	06 May 2015
				EP	1940373	B8	24 June 2015
				JP	2009-511568	A	19 March 2009
				JP	2013-018791	A	31 January 2013
				US	2007-0111970	A1	17 May 2007
				US	2009-0170957	A1	02 July 2009
				US	2010-0105631	A1	29 April 2010
				US	2014-0155480	A1	05 June 2014
				WO	2007-041855	A1	19 April 2007
				WO	2007-119108	A3	13 March 2008
KR	10-2017-0092634	A	11 August 2017	AU	2015-357487	A1	08 June 2017
				BR	112017011644	A2	14 February 2018
				CA	2968094	A1	09 June 2016
				CN	107249580	A	13 October 2017
				EP	3227437	A2	11 October 2017
				IL	252425	A	31 July 2017
				JP	2017-538699	A	28 December 2017
				MX	2017007095	A	17 November 2017
				US	10155936	B2	18 December 2018
				US	2016-0160205	A1	09 June 2016
				US	2020-0087648	A1	19 March 2020
				WO	2016-090371	A2	09 June 2016
				WO	2016-090371	A3	28 July 2016
WO	2010-151799	A2	29 December 2010	US	2011-0077250	A1	31 March 2011
				WO	2010-151799	A3	19 May 2011
				WO	2010-151799	A9	22 September 2011
US	5563143	A	08 October 1996	AU	3177295	A	04 April 1996
				CA	2158632	A1	22 March 1996
				CA	2158632	C	02 June 1998
				CN	100129102	A	21 August 1996
				EP	0706795	A2	17 April 1996
				EP	0706795	A3	17 December 1997
				IL	115311	A	29 February 2000
				JP	08-134073	A	28 May 1996
				KR	10-1996-0010000	A	20 April 1996
				MX	9504020	A	31 May 1997
				MY	115983	A	31 October 2003
				TW	492862	B	01 July 2002
				ZA	9507925	B	20 March 1997

A.발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 417/14(2006.01)i; C07D 417/12(2006.01)i; A61K 31/502(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

B.조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 417/14(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 31/075(2006.01); A61K 31/4196(2006.01); A61K 31/519(2006.01); A61K 31/70(2006.01); A61K 31/7052(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, Caplus), 구글 & 키워드: 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor- α ,TNF- α), 동종이합체(homodimer), 동종삼합체(homotrimer), 자가 면역 질환(autoimmune disease), 염증 질환(inflammatory disease)

C.관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2010-108187 A2 (BRANDEIS UNIVERSITY 등) 2010.09.23 청구항 3, 27-34; 페이지 85; 도면 42	1-11
A	WO 2007-119108 A2 (WARATAH PHARMACEUTICALS INC.) 2007.10.25 청구항 27-40; 페이지 99	1-11
A	KR 10-2017-0092634 A (에이엔2에이치 디스커버리 리미티드) 2017.08.11 페이지 38; 단락 [0021]-[0023]	1-11
A	WO 2010-151799 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 2010.12.29 도면 1; 페이지 18, 라인 8-16	1-11
A	US 5563143 A (COHAN, V. L. 등) 1996.10.08 전체 문헌	1-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2021년02월09일(09.02.2021)

국제조사보고서 발송일

2021년02월09일(09.02.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SADDALA, M. S. 등, "Identification of novel inhibitors for TNF α , TNFR1 and TNF α -TNFR1 complex using pharmacophore-based approaches", Journal of translational medicine, 2019.07.02, 제17권, 제215호, pp.1-16 페이지 1; 페이지 12 우측 컬럼, 세번째 문단	1-11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2010-108187 A2	2010/09/23	EP 2408753 A2	2012/01/25
		EP 2408753 A4	2012/11/07
		US 10125116 B2	2018/11/13
		US 2012-0101096 A1	2012/04/26
		US 2015-0099781 A1	2015/04/09
		US 8969342 B2	2015/03/03
		WO 2010-108187 A3	2011/03/31
WO 2007-119108 A2	2007/10/25	CA 2626005 A1	2007/10/25
		EP 1940373 A2	2008/07/09
		EP 1940373 A4	2009/05/27
		EP 1940373 B1	2015/05/06
		EP 1940373 B8	2015/06/24
		JP 2009-511568 A	2009/03/19
		JP 2013-018791 A	2013/01/31
		US 2007-0111970 A1	2007/05/17
		US 2009-0170957 A1	2009/07/02
		US 2010-0105631 A1	2010/04/29
		US 2014-0155480 A1	2014/06/05
		WO 2007-041855 A1	2007/04/19
		WO 2007-119108 A3	2008/03/13
KR 10-2017-0092634 A	2017/08/11	AU 2015-357487 A1	2017/06/08
		BR 112017011644 A2	2018/02/14
		CA 2968094 A1	2016/06/09
		CN 107249580 A	2017/10/13
		EP 3227437 A2	2017/10/11
		IL 252425 A	2017/07/31
		JP 2017-538699 A	2017/12/28
		MX 2017007095 A	2017/11/17
		US 10155936 B2	2018/12/18
		US 2016-0160205 A1	2016/06/09
		US 2020-0087648 A1	2020/03/19
		WO 2016-090371 A2	2016/06/09
		WO 2016-090371 A3	2016/07/28
WO 2010-151799 A2	2010/12/29	US 2011-0077250 A1	2011/03/31
		WO 2010-151799 A3	2011/05/19
		WO 2010-151799 A9	2011/09/22
US 5563143 A	1996/10/08	AU 3177295 A	1996/04/04
		CA 2158632 A1	1996/03/22
		CA 2158632 C	1998/06/02
		CN 100129102 A	1996/08/21
		EP 0706795 A2	1996/04/17
		EP 0706795 A3	1997/12/17
		IL 115311 A	2000/02/29
		JP 08-134073 A	1996/05/28
		KR 10-1996-0010000 A	1996/04/20
		MX 9504020 A	1997/05/31
		MY 115983 A	2003/10/31
		TW 492862 B	2002/07/01
		ZA 9507925 B	1997/03/20