

(52) CPC특허분류

A61K 31/4436 (2013.01)

C07D 233/56 (2013.01)

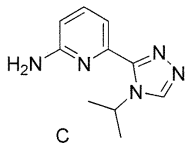
C07D 401/04 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 중간체 화합물 C 또는 그의 염.



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ASK1-매개 질환의 치료에 사용하기 위한 신규 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그의 제조를 위한 중간체 및 상기 신규 화합물을 함유하는 제약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 아폽토시스 신호-조절 키나제 1 (ASK1)은 c-Jun N-말단 단백질 키나제 ("JNK") 및 p38 MAP 키나제를 활성화하는 미토젠-활성화 단백질 키나제 키나제 ("MAP3K") 패밀리의 구성원이다 (문헌 [Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P. T., Saitoh, M., Moriguchi, T., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997) Science, 275, 90-94]). ASK1은 산화성 스트레스, 반응성 산소 종 (ROS), LPS, TNF- α , FasL, ER 스트레스, 및 증가된 세포내 칼슘 농도를 비롯한 다양한 자극에 의해 활성화된다 (문헌 [Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., and Ichijo, H. (2009) Cell Comm. Signal. 7:1-10; Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., and Ichijo, H. (2007) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48: 1-8.27; Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, I. (2007) J. Biochem. Mol. Biol. 40:1-6]).
- [0003] ASK1 단백질의 인산화는 세포 유형에 따라 아폽토시스 또는 다른 세포 반응으로 이어질 수 있다. ASK1 활성화 및 신호전달은 신경변성, 심혈관, 염증성, 자가면역 및 대사 장애를 비롯한 광범위한 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다. 또한, ASK1은 심장, 뇌 및 신장의 허혈 및 재관류 후의 기관 손상을 매개하는 것과 관련되어 있다 (문헌 [Watanabe et al. (2005) BBRC 333, 562-567; Zhang et al., (2003) Life Sci 74-37-43; Terada et al. (2007) BBRC 364: 1043-49]).
- [0004] ROS는 신장에서의 염증성 시토카인 생산, 섬유증, 아폽토시스 및 괴사의 증가와 연관된 것으로 보고된 바 있다 (문헌 [Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. Nat Rev Endocrinol 2011 Mar;7(3):176-184; Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001 Dec 13; 414(6865):813-820; Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. Nat Rev Nephrol 2010 Nov; 6(11):667-678]).
- [0005] 또한, 산화성 스트레스는 추가 신장 손상 및 ROS의 생산을 야기하는 최종 당화 산물 (AGE)의 형성을 용이하게 한다 (문헌 [Hung KY, et al. N-acetylcysteine-mediated antioxidation prevents hyperglycemia-induced apoptosis and collagen synthesis in rat mesangial cells. Am J Nephrol 2009;29(3):192-202]).
- [0006] 신장에서의 세관간질성 섬유증은 만성 신장 질환을 앓는 환자에서의 신부전으로의 진행에 대한 강력한 예측인자이다 (문헌 [Schainuck LI, et al. Structural-functional correlations in renal disease. Part II: The correlations. Hum Pathol 1970; 1: 631-641]). 래트에서의 일측성 요관 폐쇄 (UUO)는 세관간질성 섬유증의 광범위하게 사용되는 모델이다. UUO는 세관간질성 염증, 형질전환 성장 인자 베타 (TGF- β)의 증가된 발현, 및 매트릭스 단백질, 예컨대 콜라겐 및 피브로넥틴을 분비하는 근섬유모세포의 축적을 야기한다. UUO 모델은 신섬유증을 억제함으로써 만성 신장 질환을 치료하는 약물의 잠재력을 시험하는데 사용될 수 있다 (문헌 [Chevalier et al., Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy,

Kidney International (2009) 75, 1145-1152]).

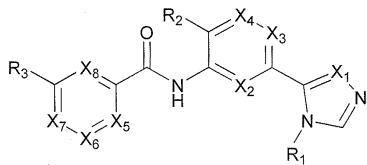
[0007] 따라서, ASK1 신호전달의 억제제로서 기능하는 치료제는 신경변성, 심혈관, 염증성, 자가면역 및 대사 장애와 같은 질환 또는 상태의 치료를 필요로 하는 환자의 삶의 치유 또는 개선에 대한 잠재력을 갖는다. 특히, ASK1 억제제는 심신성 질환, 예컨대 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 만성 신장 질환, 섬유화 질환 (폐 및 신장 섬유증 포함), 호흡기 질환 (만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD) 및 급성 폐 손상 포함), 급성 및 만성 간 질환의 치료에 대한 잠재력을 갖는다.

[0008] 미국 공개 번호 2007/0276050은 심혈관 질환을 예방하고/거나 치료하는데 유용한 ASK1 억제제를 확인하는 방법 및 동물에서 심혈관 질환을 예방하고/거나 치료하는 방법을 기재한다.

[0009] WO2009027283은 트리아졸로피리딘 화합물, 그의 제조 방법, 및 자가면역 장애, 염증성 질환, 심혈관 질환 및 신경변성 질환을 치료하는 방법을 개시한다.

[0010] 2011년 1월 13일에 공개된 미국 특허 공개 번호 2001/00095410A1은 ASK-1 억제제로서 유용한 화합물을 개시한다. 미국 특허 공개 번호 2001/00095410A1은 하기 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0011] <화학식 I>



[0012]

[0013] 상기 식에서,

[0014] R^1 은 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로시클릴이고, 이들 모두는 할로, 옥소, 알킬, 시클로알킬, 헤테로시클릴, 아릴, 아릴옥시, $-NO_2$, R^6 , $-C(O)-R^6$, $-OC(O)-R^6$, $-C(O)-O-R^6$, $-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-OC(O)-N(R^6)(R^7)$, $-S-R^6$, $-S(=O)-R^6$, $-S(=O)_2R^6$, $-S(=O)_2-N(R^6)(R^7)$, $-S(=O)_2-O-R^6$, $-N(R^6)(R^7)$, $-N(R^6)-C(O)-R^7$, $-N(R^6)-C(O)-O-R^7$, $-N(R^6)-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-N(R^6)-S(=O)_2-R^6$, $-CN$ 및 $-O-R^6$ 으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 치환기로 임의로 치환되고,

[0015] 여기서 알킬, 시클로알킬, 헤테로시클릴, 페닐 및 페녹시는 알킬, 시클로알킬, 알콕시, 히드록실 및 할로로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 치환기에 의해 임의로 치환되고;

[0016] R^6 및 R^7 은 독립적으로 수소, C_1-C_{15} 알킬, 시클로알킬, 헤테로시클릴, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이들 모두는 할로, 알킬, 모노- 또는 디알킬아미노, 알킬 또는 아릴 또는 헤테로아릴 아미드, $-CN$, 저급 알콕시, $-CF_3$, 아릴 및 헤테로아릴로부터 선택된 1-3개의 치환기로 임의로 치환되거나; 또는

[0017] R^6 및 R^7 은 이들이 부착되어 있는 질소와 함께 헤테로사이클을 형성하고;

[0018] R^2 는 수소, 할로, 시아노, 알콕시, 또는 할로에 의해 임의로 치환된 알킬이고;

[0019] R^3 은 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로시클릴이고, 이들 모두는 알킬, 알콕시, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 할로, 옥소, $-NO_2$, 할로알킬, 할로알콕시, $-CN$, $-O-R^6$, $-O-C(O)-R^6$, $-O-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-S-R^6$, $-N(R^6)(R^7)$, $-S(=O)-R^6$, $-S(=O)_2R^6$, $-S(=O)_2-N(R^6)(R^7)$, $-S(=O)_2-O-R^6$, $-N(R^6)-C(O)-R^7$, $-N(R^6)-C(O)-O-R^7$, $-N(R^6)-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-C(O)-R^6$, $-C(O)-O-R^6$, $-C(O)-N(R^6)(R^7)$ 및 $-N(R^6)-S(=O)_2-R^7$ 로부터 선택된 1개 이상의 치환기로 임의로 치환되고, 여기서 알킬, 알콕시, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로시클릴은 추가로 할로, 옥소, $-NO_2$, 알킬, 할로알킬, 할로알콕시, $-N(R^6)(R^7)$, $-C(O)-R^6$, $-C(O)-O-R^6$, $-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-CN$, $-O-R^6$, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴 및 헤테

로시클릴로부터 선택된 1개 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

[0020] 단, 헤테로아릴 또는 헤테로시클릴 모이어티는 적어도 1개의 고리 질소 원자를 포함하고;

[0021] X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 및 X^8 은 독립적으로 $C(R^4)$ 또는 N이고, 여기서 각각의 R^4 는 독립적으로 수소, 알킬, 알콕시, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클릴, 할로, $-NO_2$, 할로알킬, 할로알콕시, $-CN$, $-O-R^6$, $-S-R^6$, $-N(R^6)(R^7)$, $-S(=O)-R^6$, $-S(=O)_2R^6$, $-S(=O)_2-N(R^6)(R^7)$, $-S(=O)-O-R^6$, $-N(R^6)-C(O)-R^7$, $-N(R^6)-C(O)-O-R^7$, $-N(R^6)-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-C(O)-R^6$, $-C(O)-O-R^6$, $-C(O)-N(R^6)(R^7)$ 또는 $-N(R^6)-S(=O)_2-R^7$ 이고, 여기서 알킬, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴 및 헤테로시클릴은 추가로 할로, 옥소, $-NO_2$, $-CF_3$, $-O-CF_3$, $-N(R^6)(R^7)$, $-C(O)-R^6$, $-C(O)-O-R^7$, $-C(O)-N(R^6)(R^7)$, $-CN$, $-O-R^6$ 으로부터 선택된 1개 이상의 치환기로 임의로 치환되거나; 또는

[0022] X^5 및 X^6 또는 X^6 및 X^7 은 연결되어 임의로 치환된 융합된 아릴 또는 임의로 치환된 융합된 헤테로아릴을 제공하고;

[0023] 단, X^2 , X^3 및 X^4 중 적어도 1개는 $C(R^4)$ 이고;

[0024] X^5 , X^6 , X^7 및 X^8 중 적어도 2개는 $C(R^4)$ 이고;

[0025] X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 및 X^8 중 적어도 1개는 N이다.

[0026] 상기 개시내용에도 불구하고, 강력하고 ASK1 활성화와 관련된 질환의 치료를 위한 개선된 약동학적 및/또는 약역학적 프로파일을 나타내는 화합물에 대한 필요성이 존재한다.

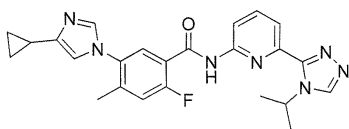
[0027] 놀랍게도, 본 출원인은 미국 특허 공보 US2011/0009410A의 범위 내에서 그 안에 개시된 화합물에 비해 전체적으로 우수한 효력, 개선된 약동학적 및/또는 약역학적 프로파일을 나타내는 신규 화합물을 발견하였다.

발명의 내용

[0028] 발명의 개요

[0029] 본 발명은 하기 화학식의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염에 관한 것이다.

[0030] <화학식 I>



[0031]

[0032] 한 실시양태에서, 본 발명은 ASK1 억제제로의 치료를 필요로 하는 환자에서의 질환의 치료에서의 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0033] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0034] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 당뇨병성 신병증 또는 당뇨병의 합병증의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병성 신병증 또는 당뇨병의 합병증의 치료 방법이다.

[0035] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 신장 질환 또는 당뇨병성 신장 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 신장 질환 또는 당뇨병성 신장 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0036] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 신장 섬유증, 폐 섬유증 또는 특발성 폐 섬유증 (IPF)의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 신장 섬유증, 폐 섬유증 또는 특발성 폐 섬유증 (IPF)의 치료 방법에 관한 것이다.

- [0037] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 염을 당뇨병성 신장 질환, 당뇨병성 신병증, 신장 섬유증, 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병성 신장 질환, 당뇨병성 신병증, 신장 섬유증, 간 섬유증 또는 폐 섬유증의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0038] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물의 합성에 유용한 중간체에 관한 것이다.
- [0039] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 만성 신장 질환의 치료를 위한 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도에 관한 것이다.
- [0040] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 당뇨병성 신장 질환의 치료를 위한 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도에 관한 것이다.
- [0041] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 만성 신장 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도에 관한 것이다.
- [0042] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 요법에 사용하기 위한 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 7일의 일측성 요관 폐쇄를 적용하고, 비히클 또는 1일당 1, 3, 10 또는 30 mg/kg b.i.d.의 화학식 I의 화합물로 처리한 래트의 신장 피질에서의 콜라겐 IV의 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 2는 7일의 일측성 요관 폐쇄를 적용하고, 비히클 또는 1일당 1, 3, 10 또는 30 mg/kg b.i.d.의 화학식 I의 화합물로 처리한 래트로부터의 알파-평활근 액틴 (활성화 근섬유모세포의 마커) 염색한 신장 피질 절편의 대표적 이미지를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 정의 및 일반적 파라미터
- [0045] 본원에 사용된 바와 같은 하기 단어 및 어구는, 이들이 사용된 문맥에서 달리 나타난 경우를 제외하고는 하기에 제시된 의미를 갖는 것으로 의도된다. 지시 또는 정의가 주어지지 않은 경우에는, 관련 사전 또는 당업자에게 공지된 통상의 용법에서 발견되는 바와 같은 단어 또는 어구의 통상의 의미를 나타낸다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "만성 신장 질환"은 전형적으로 수개월 또는 심지어 수년의 시간에 걸친 신장 기능의 진행성 상실을 지칭한다. 만성 신장 질환 (CKD)은 당업자에게 공지된 적절한 정보, 시험 또는 마커를 사용하여 유능한 의료진에 의해 진단된다. 만성 신장 질환은 함축적으로 신장 질환을 포함한다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당뇨병성 신장 질환"은 당뇨병에 의해 야기되거나, 당뇨병에 의해 악화되거나, 또는 당뇨병과 공동으로 나타나는 신장 질환을 지칭한다. 이는 당뇨병을 앓는 환자의 대략 30%에서 발생하는 만성 신장 질환의 형태이다. 이는 알부민뇨 및/또는 신기능 장애 (즉, 감소된 사구체 여과율)를 동반하는 당뇨병으로 정의된다 (문헌 [de B, I, et al. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. JAMA 2011 Jun 22; 305(24):2532-2539] 참조).
- [0048] 용어 "제약상 허용되는 염"은 기초 화합물의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하고 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 제약 화합물, 예를 들어 화학식 I의 화합물의 염을 지칭한다. 산 부가염 및 염기 부가염이 존재한다. 제약상 허용되는 산 부가염은 무기 및 유기 산으로부터 제조될 수 있다.
- [0049] 제약상 허용되는 염 (각각 산 부가염 또는 염기 부가염)을 형성하기 위한 기초 화합물과의 반응에 유용한 산 및 염기는 당업자에게 공지되어 있다. 유사하게, 기초 화합물 (개시내용 상)로부터 제약상 허용되는 염을 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Berge, et al. Journal of Pharmaceutical Science, Jan. 1977 vol. 66, No.1] 및 다른 출처에 개시되어 있다. 무기 산으로부터 유도된 염은 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 유기 산으로부터 유도된 염은 말레인산, 푸마르산, 타르타르산, p-톨루엔-술폰산 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 염기 부가염을 형성하는데 유용한 염기는 당업자에게 공지되어 있다. 화학식 I의 화합물의 제약상 허용되는 염의 예는 화학식 I의 화합물의 히드로클로라이드 염이다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같은 "제약상 허용되는 담체"는 본 발명의 화합물 또는 그의 용도에 유해하지 않은 부형제 또는 작용제, 예컨대 용매, 희석제, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등

을 포함한다. 제약 활성 물질의 조성물을 제조하기 위한 이러한 담체 및 작용제의 사용은 당업계에 익히 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Co., Philadelphia, PA 17th Ed. (1985); 및 Modern Pharmaceutics, Marcel Dekker, Inc. 3rd Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.)] 참조)

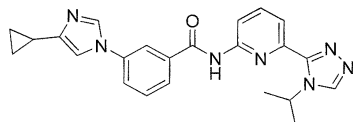
- [0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "심신성 질환"은, 예를 들어 높은 혈압 또는 고혈압과 같은 심혈관 문제에 의해 야기되거나 또는 악화되는 신장의 기능과 관련된 질환을 지칭한다. 고혈압은 신장 질환에 대한 주요 기여인자인 것으로 여겨진다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "호흡기 질환"은 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD) 및 특발성 폐 섬유증 (IPF)을 포함하는 질환을 지칭한다.
- [0053] 용어 "치료 유효량"은 하기 정의된 바와 같은 치료를 필요로 하는 환자 (특히, 인간)에게 하나 이상의 용량으로 투여되는 경우에, 이러한 치료를 달성하기에 충분한 화학식 I의 화합물의 양을 지칭한다. 치료 유효량은 검증된 처방자 또는 의료진에 의해 결정되는 바와 같이, 환자, 치료할 질환, 환자의 체중 및/또는 연령, 질환의 중증도, 또는 투여의 방식에 따라 달라질 것이다.
- [0054] 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 화학식 I의 화합물 또는 제약상 허용되는 염을
- [0055] (i) 질환의 발병을 지연시키는 것, 즉 질환의 임상적 증상이 발생하지 않게 하거나 또는 그의 발생을 지연시키는 것;
- [0056] (ii) 질환을 억제시키는 것, 즉 임상적 증상의 발생을 정지시키는 것; 및/또는
- [0057] (iii) 질환을 완화시키는 것, 즉 임상적 증상 또는 그의 중증도를 퇴행시키는 것
- [0058] 의 목적을 위해 투여하는 것을 의미한다.
- [0059] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량을 만성 신장 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 만성 신장 질환의 치료에서의 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0060] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량을 당뇨병성 신장 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병성 신장 질환의 치료에서의 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0061] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량을 폐 또는 신장 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 폐 또는 신장 섬유증의 치료에서의 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0062] 치료제의 반수 최대 억제 농도 (IC_{50})는 표적 효소에 대해 최대 억제의 50%를 생성하는데 필요한 치료제의 농도이다. 아토포시스 신호-조절 키나제 (ASK1)를 낮은 IC_{50} 으로 억제하는 치료제, 예를 들어 화합물을 발견하는 것이 바람직한 목표이다. 이 방식에서, 바람직하지 않은 부작용은 ASK1 효소를 억제하기 위한 치료제의 보다 낮은 용량을 사용하는 능력에 의해 최소화된다.
- [0063] 유사하게, 낮은 해리 상수 (K_d)를 갖는 치료제를 발견하는 것이 바람직한 목표이다. K_d 는 리간드 (예컨대, 치료제)와 상응하는 키나제 또는 수용체 사이의 친화도; 즉, 얼마나 단단하게 치료제가 특정한 키나제, 예를 들어 아토포시스 신호-조절 키나제 ASK1에 결합하는지의 측정값을 기재하는데 사용된다. 따라서, 보다 낮은 K_d 가 일반적으로 약물 개발에서 바람직하다.
- [0064] 유사하게, 낮은 EC_{50} 을 갖는 화합물을 발견하는 것이 바람직한 목표이다. EC_{50} 은 세포에서 최대 효능의 50%를 달성하는 약물의 농도이다. EC_{50} 값은 최대 효능의 50%를 달성하는데 필요한 검정 매질에서의 화합물의 농도로 해석된다. 따라서, 보다 낮은 EC_{50} 이 일반적으로 약물 개발에 바람직하다.
- [0065] EC_{50} 과 연관된 측정값의 유용한 단위는 단백질 결합 조정된 EC_{50} (본원에 사용된 바와 같은 $PB_{adj} \cdot EC_{50}$)이다. 이 값은 최대 효능의 50%를 제공하는 단백질에 미결합된 약물의 분율과 상관관계가 있는 약물, 예를 들어 화학식 I의 화합물의 양을 측정한다. 이 값은 표적 작용 부위에서 이용가능한 약물의 양에 대해 수정되거나 또는 이와 상관관계가 있는 약물의 효능을 측정한다.
- [0066] 또 다른 바람직한 특성은 CACO 세포 투과성 연구에 의해 결정되는 바와 같은 낮은 세포 막 유출 비를 갖는 화합물을 갖는 것이다. 3.0 미만의 유출 비 ($(B/A)/(A/B)$)가 바람직하다. 3 초과의 비를 갖는 화합물은 세포로부

터의 활발한 급속 유출을 겪을 것으로 예상되고, 최대 효능을 달성하기에 충분한 세포 내 지속시간을 갖지 못할 수 있다.

[0067] 또 다른 바람직한 목표는 최소 오프-타겟(off-target) 억제제를 나타내는 약물을 발견하는 것이다. 이는 Cyp450 (시토크롬 p450) 효소를 최소한으로 억제하는 약물이다. 보다 특히, P450 효소 중 가장 중요한 cyp3A4의 약한 억제제인 약물이 바람직하다. 약한 억제제는 혈장 AUC 값에서 최소 1.25배이고 2배 미만인 증가, 또는 클리어런스에서 20-50% 감소를 야기하는 화합물이다 (wikipedia.org/wiki/cyp3A4, 11/12/11 방문). 일반적으로, 10 uM 초과 Cyp3A4 IC₅₀을 나타내는 화합물이 약한 억제제로 간주된다.

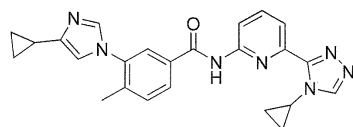
[0068] 약물 후보 중에서 cyp3A4 억제를 비교하기에 유용한 측정값은 Cyp3A4 억제와 단백질 결합 조정된 EC₅₀의 비이다. 이 값은 각 약물에 대해 특이적인 단백질 결합 조정된 EC₅₀에 대해 수정된 cyp 억제에 대한 상대적 잠재력을 나타낸다. 이 측정값에서의 보다 높은 비는 cyp3A4 억제에 대한 보다 낮은 잠재력을 나타내는 것으로서 바람직하다.

[0069] 예상치 못하게 유리하게도, 본 출원인은 미국 특허 공개 번호 2001/00095410A1의 일반적 범위 내에서, 미국 특허 공개 번호 2001/00095410A1에 개시된 구조적으로 근접한 화합물 (본원에서 하기 화합물 A 및 B로서 지정된 것)에 비해 이점을 제공하는 (본원의 화학식 I의) 화합물을 발견하였다.



화합물 A

[0070]



화합물 B

[0071]

[0072] 따라서, 본 발명의 목적은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 신장 질환, 만성 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 당뇨병성 신병증, 신장 섬유증 또는 폐 섬유증의 치료를 위해 화학식 I의 화합물을 사용하는 방법의 제공을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0073] 조합 요법

[0074] 심신성 질환, 예컨대 만성 신장 질환에 대해 치료되는 환자는 조합 약물 치료로부터 이익을 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제, 예컨대 에날라프릴, 캅토프릴, 라미프릴, 리시노프릴 및 퀴나프릴; 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제 (ARB), 예컨대 로사르탄, 올메사르탄 및 이르베사르탄; 또는 항고혈압제, 예컨대 아로디핀, 니페디핀 및 펠로디핀 중 하나 이상과 조합될 수 있다. 조합의 이익은 성분(들)에 대한 증가된 효능 및/또는 감소된 부작용일 수 있는데, 이는 그 성분(들)의 용량이 화학식 I의 화합물 및/또는 다른 활성 성분(들)의 효능에 의해 증진되는 그의 효능으로부터 이익을 얻으면서 그의 부작용을 감소시키기 위해 하향 조정될 수 있기 때문이다.

[0075] ASKI 억제제, 예컨대 화학식 I의 화합물로 치료가능한 만성 신장 질환을 앓는 것으로 나타난 환자는 치료제, 또는 항생제, 진통제, 항우울제 및/또는 항불안제인 작용제를 화학식 I의 화합물과 조합하여 공-투여하는 것 (검증된 의료진에 의해 지시된 바와 같음)으로부터 이익을 얻는 상태를 또한 나타낼 수 있다. 조합 치료는 검증된 의료진에 의해 지시된 바와 같이 동시에 또는 간격을 두고 차례로 또는 2종 이상의 활성제의 고정 용량 (모든 활성 성분이 단일 투여 형태 내에 조합되어 있는 것, 예를 들어 정제) 제공을 통해 투여될 수 있다.

[0076] 제약 조성물 및 투여

[0077] 본 발명의 화합물은 제약 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 활성 성분으로서의 화학식 I의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제 및/또는 담체, 예컨대 불활성 고체 희석제 및 충전제, 희석제, 예컨대 멸균 수용액 및 다양한 유기 용매, 투과 증진제, 가용화제 및 아주반트를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다.

조성물은 고체 정제, 캡슐, 캐플릿, 연고, 피부 패치, 지속 방출, 고속 봉해 정제, 흡입 제제 등으로서 전달하기 위해 제조될 수 있다. 전형적 제약 조성물은 제약 업계에 익히 공지되어 있는 방법 및/또는 과정을 사용하여 제조되고/거나 부여된다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Co., Philadelphia, PA 17th Ed. (1985); 및 Modern Pharmaceutics, Marcel Dekker, Inc. 3rd Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.) 참조].

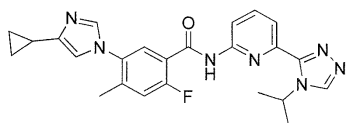
[0078] 화학식 I의 화합물을 포함하는 조합 치료를 위한 제제는 당업자에게 공지된 절차를 사용하여 고정 용량 제제, 예를 들어 정제, 엘릭시르, 액체, 연고, 흡입제, 젤 등으로서 제공될 수 있다.

[0079] 화학식 I의 화합물의 제약 조성물은, 예를 들어 직장, 협측, 비강내 및 경피 경로를 포함하는 경로에 의해; 동맥내 주사에 의해, 정맥내로, 복강내로, 비경구로, 근육내로, 피하로, 경구로, 국소로, 흡입제로서, 또는 함침되거나 또는 코팅된 장치, 예컨대 스텐트, 예를 들어 동맥-삽입된 원통형 중합체를 통해, 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 가장 바람직한 투여 경로는 경구, 비경구 및 정맥내 투여를 포함한다.

[0080] 화학식 I의 화합물은 제약 유효량으로 투여될 수 있다. 경구 투여를 위해, 각 투여 단위는 바람직하게는 화학식 I의 화합물 1 mg 내지 500 mg을 함유한다. 보다 바람직한 용량은 화학식 I의 화합물 1 mg 내지 250 mg이다. 1일 2회 약 20 mg 내지 1일 2회 약 50 mg 범위의 화학식 I의 화합물의 용량이 특히 바람직하다. 그러나, 실제로 투여되는 화합물의 양은 통상적으로 치료할 상태, 선택된 투여 경로, 적용가능한 경우 공-투여 화합물, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 환자 증상의 중증도 등을 비롯한 관련 상황에 따라 의사에 의해 결정될 것임이 이해될 것이다.

[0081] 명명법

[0082] 켐바이오드로우 울트라(ChemBioDraw Ultra) 11을 사용하여 생성된 바와 같은 하기 본 발명의 화합물의 명칭은 5-((4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-N-(6-(4-이소프로필-4H-1,2,4-트리아졸-3-일)피리딘-2-일)-4-메틸벤즈아미드)로도 공지된 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-N-(6-(4-이소프로필-4H-1,2,4-트리아졸-3-일)피리딘-2-일)-2-플루오로-4-메틸벤즈아미드이다.



[0083]

[0084] 화학식 I의 화합물의 합성

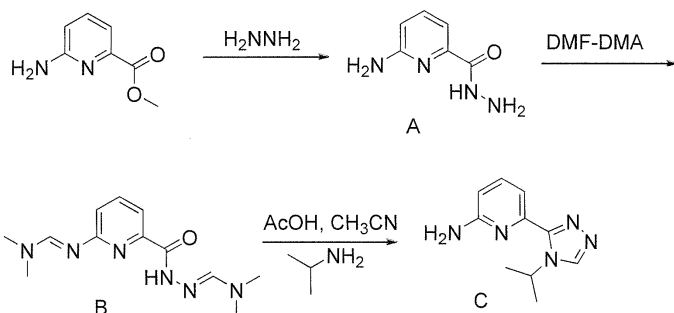
[0085] 본 발명의 화합물은 본원에 개시된 방법 또는 본원의 개시내용을 고려할 때 명백한 그의 변형을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 화합물의 합성은 하기 실시예에 기재된 바와 같이 달성될 수 있다. 이용가능한 경우에, 시약은 상업적으로, 예를 들어 시그마 알드리치(Sigma Aldrich) 또는 다른 화학물질 공급업체로부터 구입할 수 있다. 대안적으로, 시약은 당업자에게 공지된 반응식 및 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0086] 합성 반응 파라미터

[0087] 용어 "용매", "불활성 유기 용매" 또는 "불활성 용매"는 이와 함께 기재된 반응의 조건 하에서 불활성인 용매를 지칭한다 (예를 들어, 벤젠, 톨루엔, 아세토니트릴, 테트라히드로푸란 (THF), 디메틸포름아미드 (DMF), 클로로포름, 메틸렌 클로라이드 (또는 디클로로메탄), 디에틸 에테르, 석유 에테르 (PE), 메탄올, 피리딘, 에틸 아세테이트 (EA) 등 포함). 반대로 명시되지 않는 한, 본 발명의 반응에 사용된 용매는 불활성 유기 용매이고, 반응은 불활성 기체, 바람직하게는 질소 하에 수행된다.

[0088] 화학식 I의 화합물을 제조하는 하나의 방법을 하기 반응식 1 및 2에 나타낸다.

[0089] 반응식 1



[0090]

[0091] 화합물 A의 제조

[0092] MeOH (5 L) 중 메틸 6-아미노피콜리네이트 (432 g, 2.84 mol)의 용액에 $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (284 g, 5.68 mol, 2.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 환류 하에 3시간 동안 가열한 다음, 실온으로 냉각시켰다. 혼합물 중에 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, EA (2 L x2)로 세척한 다음, 진공 하에 건조시켜 화합물 A (405 g, 94% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0093] 화합물 B의 제조

[0094] 디메틸포름아미드-디메틸아세탈 (DMF-DMA) (3.54 L) 중 화합물 A (405 g, 2.66 mol)의 혼합물을 환류 하에 18 시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각시킨 다음, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 EA (700 mL) 중에 녹이고, 50 °C에서 20분 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 고체를 여과에 의해 수집하고, 진공 하에 건조시켜 화합물 B (572 g, 82% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0095] C의 제조

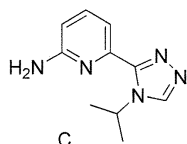
[0096] CH_3CN -AcOH의 혼합물 (3.6 L, 4:1) 중 화합물 B (572 g, 2.18 mol)의 용액에 프로판-2-아민 (646 g, 5.0 당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 환류 하에 24시간 동안 가열한 다음, 실온으로 냉각시키고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 물 (2.8 L) 중에 용해시키고, 1 N 수성 NaOH를 8.0 H의 pH까지 첨가하였다. 침전물을 여과에 의해 수집하고, 여과물을 EA (500 mL x3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시킨 다음, 150 mL 부피로 농축시켰다. 0 °C에서 이 혼합물에 PE (400 mL)를 천천히 첨가하고, 생성된 현탁액을 여과하였다. 합한 고체를 EA-PE로부터 재결정화하여 화합물 C (253 g, 57% 수율)를 희백색 고체로서 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (s, 1 H), 7.52 (m, 2 H), 6.51 (dd, $J = 1.6, 7.2$ Hz,

1 H), 5.55 (m, 1 H), 4.46 (bs, 2 H), 1.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H). MS (ESI+) m/z : 204 ($\text{M}+1$)⁺.

[0097]

[0098] 화합물 C는 화학식 I의 화합물의 합성을 위한 주요 중간체이다. 따라서, 본 발명의 목적은 또한 화학식 I의 화합물의 제조를 위한 하기 중간체 화합물 C, 또는 그것의 염 또는 그의 보호된 형태를 제공하는 것이다.

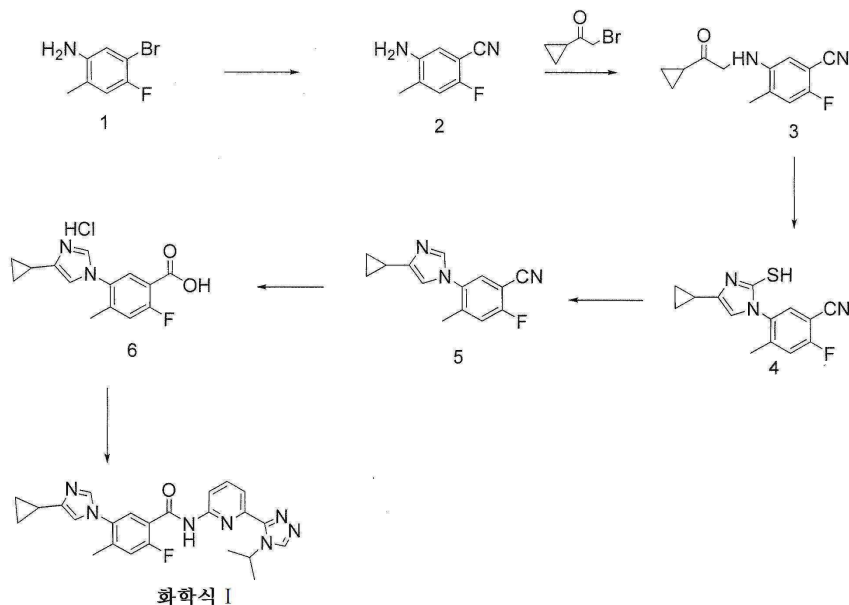


[0099]

[0100] 화합물 C의 염의 예는 HCl 부가염이다. 화합물 C의 보호된 형태의 예는 카르바메이트 화합물, 예컨대 Cbz-Cl에 의해 수득한 것이다. 보호기, 그의 제조법 및 용도는 문헌 [Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, Protective Groups in Organic Chemistry, 2nd edition, 1991, Wiley and Sons, Publishers]에 교시되어 있다.

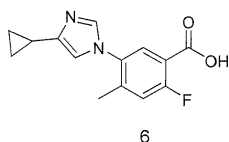
[0101] 반응식 2

[0102] 화학식 I의 화합물의 제조를 계속하였다:



[0103]

[0104] 화합물 6은 화학식 I의 화합물의 합성을 위한 주요 중간체이다. 따라서, 본 발명의 목적은 또한 화학식 I의 화합물의 제조를 위한 하기 중간체 화합물 6, 또는 그의 염 또는 보호된 형태를 제공하는 것이다.



[0105]

[0106] 화합물 6의 염의 예는 HCl 부가염이다. 화합물 6의 보호된 형태의 예는 에스테르 (예를 들어, 메틸, 에틸 또는 벤질 에스테르) 또는 카르바메이트 화합물, 예컨대 Cbz-Cl에 의해 수득한 것이다. 보호기, 그의 제조법 및 용도는 문헌 [Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, Protective Groups in Organic Chemistry, 2nd edition, 1991, Wiley and Sons, Publishers]에 교시되어 있다.

[0107] 단계 1 - 5-아미노-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 - 화합물 (2)의 제조

[0108] 출발 5-브로모-4-플루오로-2-메틸아닐린 (1) (20 g, 98 mmol)을 무수 1-메틸피롤리딘 (100 mL) 중에 용해시키고, 시안화구리 (I) (17.6 g, 196 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 180℃로 3시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각시키고, 물 (300 mL) 및 진한 수산화암모늄 (300 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 교반하고, EA (3 x 200 mL)로 추출하였다. 합한 추출물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 유성 잔류물을 헥산 (2 x 100 mL)으로 세척하고, 고체를 디클로로메탄 중에 용해시키고, 실리카 겔 칼럼 상에 로딩하였다. 헥산 중 0에서 25% EA 구배로 용리시켜 5-아미노-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (10.06 g, 67.1 mmol)을 수득하였다.

[0109] LC/MS (m/z: 151 M⁺).

[0110] 단계 2 - 5-(2-시클로프로필-2-옥소에틸아미노)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 - 화합물 (3)의 제조

[0111] 5-아미노-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (12 g, 80 mmol)을 무수 N,N-디메틸포름아미드 (160 mL) 중에 질소 하에 용해시키고, 탄산칼륨 (13.27 g, 96 mmol) 및 아이오딘화칼륨 (14.61 g, 88 mmol)을 고체로서 교반하면서 첨가하였다. 반응물을 실온에서 5분 동안 교반한 다음, 브로모메틸 시클로프로필케톤 (20.24 mL, 180 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 60℃로 3시간 동안 가열한 다음, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 EA (400 mL) 중에 용해시키고, 물 400 mL로 세척하였다. 유기 층을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 최소량의 EA 중에 재용해시키고, 헥산을 첨가하여 용액을 부피 기준 3:1 헥산:EA로 만들었다. 용액으로부터 침전된 생성물을 여과에 의해 수집하여 5-(2-시클로프로필-2-옥소에틸아미노)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (14.19 g, 61.2 mmol)을 수득하였다.

- [0112] LC/MS (m/z : 233, M⁺)
- [0113] 단계 3 - 5-(4-시클로프로필-2-메르캅토-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 - 화합물 (4)의 제조
- [0114] 5-(2-시클로프로필-2-옥소에틸아미노)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (14.19 g, 61.2 mmol)을 빙초산 (300 mL) 중에 용해시켰다. 티오시안산칼륨 (11.9 g, 122.4 mmol)을 고체로서 교반하면서 첨가하였다. 반응 혼합물을 110℃로 4시간 동안 가열하고, 이때 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄 (200 mL) 중에 녹이고, 200 mL 물로 세척하였다. 수성 추출물을 (2 x 200 mL) 추가의 디클로로메탄으로 추출하고, 유기 추출물을 합하고, 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 용매를 감압 하에 제거하고, 유성 잔류물을 EA (50 mL) 중에 재용해시키고, 150 mL 헥산을 첨가하였다. 압색 층이 형성되었고, 교반용 막대를 플라스크에 부가하였다. 격렬히 교반하여 생성물이 복숭아색 고체로서 침전되도록 하였다. 생성물을 여과에 의해 수집하여 5-(4-시클로프로필-2-메르캅토-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (14.26 g, 52.23 mmol)을 수득하였다.
- [0115] 분석용 LC/MS (m/z : 274, M⁺)
- [0116] 단계 4 - 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 - 화합물 (5)의 제조
- [0117] 500 mL 3구 둥근 바닥 플라스크에 아세트산 (96 mL), 물 (19 mL) 및 과산화수소 (30%, 7.47 mL, 65.88 mmol)를 넣었다. 내부 온도를 모니터링하면서 혼합물을 교반하면서 질소 하에 45℃로 가열하였다. 이어서, 내부 온도를 55℃ 미만으로 유지하면서 5-(4-시클로프로필-2-메르캅토-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (6.00 g, 21.96 mmol)을 고체로서 30분에 걸쳐 소량씩 첨가하였다. 티오이미다졸의 첨가가 완료되었을 때, 반응물을 45℃의 온도에서 30분 동안 교반한 다음, 실온으로 냉각시키고, 물 (6 mL) 중 20% wt/wt 아황산나트륨의 용액을 천천히 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 교반하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 물 250 mL 중에 현탁시키고, 4N 수성 수산화암모늄을 첨가하여 pH를 ~10으로 만들었다. 혼합물을 디클로로메탄 (3 x 200ml)으로 추출하고, 유기부를 합하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 20 mL EA 중에 용해시키고, 헥산 80 mL를 교반하면서 첨가하였다. 용매를 가만히 따르고, 유성 잔류물을 남겼다. 이 과정을 반복하고, 생성물인 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴을 점성 오일 (5.14 g, 21.33 mmol)로서 수득하였다.
- [0118] 분석용 LC/MS (m/z: 242, M⁺)
- [0119] 단계 5 - 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조산 히드로클로라이드 (6)의 제조
- [0120] 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조니트릴 (11.21 g, 46.50 mmol)을 환류 응축기가 구비된 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 38% 염산 (200 mL) 중에 현탁시켰다. 혼합물을 100℃로 4.5시간 동안 가열한 다음, 실온으로 냉각시켰다. 용매를 감압 하에 제거하여 분홍색 고체를 수득하였으며, 여기에 EA 100 mL를 첨가하였다. 고체 생성물을 여과에 의해 수집하고, 3 x 100 mL EA로 세척하였다. 고체 생성물에 디클로로메탄 중 10% 메탄올 100 mL를 첨가하고, 혼합물을 교반하고, 여과물을 수집하였다. 디클로로메탄 중 10% 메탄올 100 mL를 2부분 더 사용하여 이를 반복하였다. 여과물을 합하고, 용매를 감압 하에 제거하여 조 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조산 히드로클로라이드를 수득하였다. 추가 정제는 수행하지 않았다 (11.13 g, 37.54 mmol).
- [0121] 분석용 LC/MS (m/z: 261, M⁺)
- [0122] 단계 6 - 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-N-(6-(4-이소프로필-4H-1,2,4-트리아졸-3-일)피리딘-2-일)-4-메틸벤즈아미드 - 화학식 I의 제조
- [0123] 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-4-메틸벤조산 히드로클로라이드 (1.5 g, 5.07 mmol)를 무수 1,2-디클로로메탄 (25 mL) 중에 실온에서 현탁시켰다. 옥살릴 클로라이드 (0.575 mL, 6.59 mmol)를 교반하면서 질소 하에 첨가하고, 이어서 N,N-디메틸포름아미드 (0.044 mL, 0.507 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반한 다음, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 25 mL 무수 디클로로메탄 중에 용해시켰다. 6-(4-이소프로필-4H-1,2,4-트리아졸-3-일)피리딘-2-아민 (1.13 g, 5.58 mmol) (화합물 C) 및 4-디메틸아미노피리딘 (0.62 g, 5.07 mmol)을 교반하면서 질소 하에 급속하게 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 수성 포화 NaHCO₃ (15 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 교반하고, 층을 분리하고, 수성 층을 1 x 20 mL 디클로로메탄으로 세척하였다. 합한 유기부를 건조시키고 (MgSO₄), 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 최

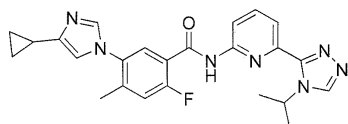
소량의 CH₃CN 중에 용해시키고, 고체가 혼합물로부터 침전될 때까지 물을 천천히 첨가하였다. 고체를 여과에 의해 수집하고, 건조시켜 5-(4-시클로프로필-1H-이미다졸-1-일)-2-플루오로-N-(6-(4-이소프로필-4H-1,2,4-트리아졸-3-일)피리딘-2-일)-4-메틸벤즈아미드를 ~96% 순도 (1.28 g, 2.88 mmol)로 수득하였다.

[0124]

분석용 LC/MS (m/z: 446, M⁺).

[0125]

물질을 RP-HPLC (역상 HPLC)에 의해 추가로 정제하여 분석적으로 순수한 샘플을 HCl 염으로서 수득하였다.



[0126]

C₂₄H₂₄FN₇O·HCl. 446.2 (M+1). ¹H-NMR (DMSO): δ 11.12 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.07 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.59 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.72 (sept, J = 6.8 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.00-2.05 (m, 1H), 1.44 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 1.01-1.06 (m, 2H), 0.85-0.89 (m, 2H).

[0127]

[0128]

생물학적 검증

[0129]

ASK1 (아픔토시스 신호-조절 키나제 1) TR-FRET 키나제 검증 (생화학적 IC₅₀)

[0130]

ASK1 키나제 활성을 억제하는 화합물의 능력을, 단백질 기질로서 비오티닐화 미엘린 염기성 단백질 [비오티닌-MBP]을 이용하는 시간 분해 형광 공명 에너지 전달 [TR-FRET] 검정을 사용하여 결정하였다. 벙크만 바이오맥 (Beckman Biomek) FX 액체 취급 로봇을 이용하여 2.44% 수성 DMSO 중 화합물 2 μL/웰을 저 부피 384-웰 폴리프로필렌 플레이트 [뉴크, #267460] 내에 스폿팅하여 키나제 검증에서 100 μM 내지 0.5 nM 화합물의 최종 농도를 제공하였다. 디랙 플루이딕스 이퀘이터(Deerac Fluidics Equator)를 사용하여 완충제 (85 mM MOPS, pH 7.0, 8.5 mM Mg-아세테이트, 5% 글리세롤, 0.085% NP-40, 1.7 mM DTT 및 1.7 mg/mL BSA) 중 0.667 ng/μL [업스테이트 바이오테크놀로지스(Upstate Biotechnologies), #14-606, 또는 자체적으로 제조한 동등한 단백질] 및 0.1665 ng/mL 비오티닌-MBP [업스테이트 바이오테크놀로지스, #13-111]의 3 μL/웰을 스폿팅된 화합물을 함유하는 플레이트 내에 분배하였다.

[0131]

효소를 20분 동안 화합물과 함께 예비인큐베이션되도록 한 후에, 디랙 플루이딕스 이퀘이터를 사용한 완충제 (50 mM MOPS, pH 7.0, 5 mM Mg-아세테이트, 1 mM DTT, 5% DMSO) 중 300 μM ATP 5 μL/웰의 첨가로 키나제 반응을 개시하였다. 키나제 반응을 주위 온도에서 20분 동안 진행되도록 하고, 후속적으로 디랙 플루이딕스 이퀘이터를 사용한 25 mM EDTA 5 μL/웰의 첨가로 정지시켰다. 이어서, 바이오맥 FX를 사용하여 각각의 완료된 키나제 반응물 1 μL/웰을 5 μL/웰 검출 시약 (1x 랜스(LANCE) 검출 완충제 [퍼킨엘머(PerkinElmer), #CR97-100] 중 1.11 nM Eu-W1024 표지된 항-포스포트레오닌 항체 [퍼킨엘머, #AD0094] 및 55.56 nM 스트렙타비딘 알로피코시아닌 [퍼킨엘머 #CR130-100])을 함유하는 옵티플레이트(OptiPlate)-1536 백색 폴리스티렌 플레이트 [퍼킨엘머, #6004299]의 웰로 옮겼다. 이어서, 플레이트를 2시간 동안 주위 온도에서 인큐베이션한 후에, TR-FRET 신호를 퍼킨 엘머 엔비전(Perkin Elmer Envision) 플레이트 판독기 상에서 판독하였다.

[0132]

100% 억제 양성 대조군 웰을 상기 기재된 EDTA 및 ATP 용액의 첨가 순서를 바꿈으로써 생성하였다. 이들 웰 및 검증 초기에서의 2.44% DMSO의 스폿을 함유하는 0% 억제 웰을 시험 화합물에 대한 억제 %를 계산하는데 사용하였다.

[0133]

결과

[0134]

화학식 I의 화합물은 3.0 nM의 IC₅₀으로 ASK1을 억제하였다. 이 데이터는 화학식 I의 화합물이 경쟁적 리간드 ATP의 존재 하에 ASK1의 강력한 억제제임을 시사한다.

[0135]

상기 검증의 업데이트된 버전에서, ASK1에 대한 본 발명의 화합물의 억제 활성을, ATP로부터 펩티드 기질로 전달되는 포스포이트의 양을 결정하는 TR-FRET ASK1 검정을 사용하여 검사하였다.

[0136]

물질 및 방법

[0137]

시약

- [0138] 탈인산화 재조합 인간 ASK1 키나제는 길리아드 사이언시스(Gilead Sciences)로부터의 것이었다. 소분자 키나제 억제제 스타우로스포린 (카탈로그 # S6942) 및 디티오프레이톨 (DTT, 카탈로그 # 43815-5G)은 시그마 케미칼스 (Sigma Chemicals) (미주리주 세인트 루이스)로부터 입수하였다. ATP (카탈로그 # 7724)는 아피메트릭스 (Affymetrix) (캘리포니아주 산타 클라라)로부터의 것이고, 화학식 I의 화합물은 길리아드 사이언시스로부터의 것이었다. HTRF KinEASE™-STK S3 키트는 시스바이오(Cisbio) (매사추세츠주 베드포드)로부터 입수하였다. 다른 모든 시약은 상업적으로 입수가능한 최고 등급의 것이었다.
- [0139] 검정
- [0140] 검정은 HTRF 검출을 사용하여 ASK1 키나제에 의한 비오티닐화 펩티드 기질의 인산화 수준을 측정한다 (6.1). 이는 시스바이오로부터의 HTRF® KinEASE™-STK 매뉴얼에 기반한, 경쟁적 시간-분해 형광 공명 에너지 전달 (TR-FRET) 면역검정이다 (6.1). 시험 화합물, 1 μM STK3 펩티드 기질, ASK1 키나제 4 nM을 10 mM Mg-아세트이트, 0.025 % NP-40, 1 mM DTT, 0.05% BSA 및 1.5% 글리세롤을 함유하는 10 mM MOP 완충제, pH.7.0과 30분 동안 인큐베이션하고, 이어서 100 μM ATP를 첨가하여 키나제 반응을 시작하고, 3시간 동안 인큐베이션하였다. 10 mM EDTA 및 125 nM 스트렙타비딘 XL665를 함유하는 1X Eu3+ 크립테이트 완충제로 표지된 펩티드 항체를 첨가하여 반응을 정지시키고, 퍼킨엘머로부터의 엔비전 2103 멀티라벨드(Envision 2103 Multilabeled) 검출기를 사용하여 인산화 펩티드 기질을 검출하였다. 형광을 615 nm (크립테이트) 및 665 nm (XL665)에서 측정하고, 665 nm/615 nm의 비를 각 웰에 대해 계산하였다. 생성된 TR-FRET 수준 (665 nm/615 nm의 비)은 인산화 수준에 비례한다. 이들 검정 조건 하에, 펩티드 기질의 인산화 정도는 시간 및 효소에 대한 농도와 선형이었다. 검정 시스템은 효소에 대한 K_m 및 특정한 활성에 관한 일관된 결과를 만들어냈다. 억제 실험 (IC_{50} 값)에 대해, 활성을 일정한 농도의 ATP, 펩티드 및 몇몇 고정 농도의 억제제로 수행하였다. 비선택적 키나제 억제제인 스타우로스포린을 양성 대조군으로서 사용하였다. 모든 효소 활성 데이터는 4별 결정의 평균으로서 보고하였다.
- [0141] 데이터 분석
- [0142] IC_{50} 값을 하기 방정식에 따라 계산하였다.
- [0143]
$$y = \text{범위} / \{1 + (x / IC_{50})^s\} + \text{배경값}$$
- [0144] 여기서, x 및 y는 각각 억제제의 농도 및 효소 활성을 나타낸다. 효소 활성은 ATP로부터 기질 펩티드 내로 혼입되는 포스페이트의 양으로서 표현된다. 범위는 최대 y 범위 (억제제 없음, DMSO 대조군)이고, s는 기울기 인자이다 (6.2).
- [0145] 결과
- [0146] 화학식 I의 화합물은 이 시험 조건 하에 3.2 nM의 IC_{50} 을 나타냈다.
- [0147] 데이터는 화학식 I의 화합물이 ASK-1 1 수용체의 강력한 억제제임을 입증한다.
- [0148] ASK1 (아포토시스 신호-조절 키나제 1) 293 세포-기반 검정 (세포 EC_{50})
- [0149] 화합물의 세포 효력을, AP-1:루시페라제 리포터 구축물을 안정하게 발현하는 세포 (293/AP1-Luc 세포 - 파노믹스 인크.(Panomics Inc.), 캘리포니아주 프레몬트 덤바턴 서클 6519)에서 검정하였다. AP-1 전사 인자를 활성화시키고, 루시페라제의 발현을 증가시키는 키나제 활성 ASK1 (래트 ASK1 cDNA의 631-1381)을 발현하는 아데노바이러스로 세포를 감염시켰다. ASK1의 억제제는 ASK1의 효소 활성을 감소시킴으로써 AP-1 전사 인자의 활성 및 루시페라제의 발현을 감소시킬 것이다.

[0150] 1. 이 프로토콜에 요구되는 물질

배지 및 시약	공급 회사	카탈로그 번호
AP-1 리포터 293 안정한 세포주	파노믹스	알려져 있지 않음
DMEM (고 글루코스 포함, L-글루타민 불포함, 피루베이트 포함, HEPES 포함)	미디어테크(MediaTech)	15-018-CM
DMEM (고 글루코스 포함, L-글루타민 불포함, 피루베이트 불포함, HEPES 불포함, 페놀 레드 불포함)	인비트로젠(Invitrogen)	31053-028
HEPES, 1M	인비트로젠	15630-080
피루브산나트륨, 100 mM	인비트로젠	11360-070
태아 소 혈청, "FBS"	하이클론(Hyclone)	SH30088.03
Pen-Strep-Glut., "PSG"	인비트로젠	10378-016
히그로마이신 B	칼바이오켄(Calbiochem)	400052
둘베코 PBS (멸균)	미디어테크	21-030-CM
트립신-EDTA (0.25%)	인비트로젠	25200-056
스테디-글로(Steady-Glo) 루시페라제 검정 시스템	프로메가(Promega)	E2550
랩웨어	공급원	카탈로그 번호
플라스크 (폴리-D-리신 코팅됨, 150 cm ² , 배기 캡)	BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)	356538
플레이트 (폴리-D-리신 코팅됨, 384-웰, 백색/투명, 멸균 TCT)	그라이너(Greiner) (VWR 사이언티픽(VWR Scientific)을 통합)	781944 (82051-354)
백색 백킹 테이프	퍼킨엘머	6005199
세포 여과기 (40 um 나일론, 청색 고리, 50 mL 원추형 바이알에 맞춤)	VWR 사이언티픽	21008-949

[0151]

[0152] 2. 참조 물질

[0153] 파노믹스 293/AP1-Luc 안정한 세포주 생성물 삽입물.

[0154] 프로메가 스테디-글로 루시페라제 검정 시스템 생성물 삽입물.

[0155] 3. 요구되는 배지

[0156] 완전 성장 배지 "CGM"

[0157] DMEM (미디어테크)

[0158] 10% FBS

[0159] 1% PSG

[0160] 100 ug/ml 히그로마이신B

[0161] 검정 배지 "AM"

[0162] DMEM (인비트로젠)

[0163] 25 mM HEPES

- [0164] 1 mM 피루브산나트륨
- [0165] 1% PSG
- [0166] 4. 방법
- [0167] 유지:
- [0168] 판매자의 지침에 따라 293/AP1-Luc를 293/A세포로 유지하고; 하기와 같이 T150 플라스크 내 ~80% 전면생장률에서 세포를 수확하였다:
- [0169] 배지를 흡인하고, ~12 mL 멸균 D-PBS로 부드럽게 세척하고, 흡인하였다.
- [0170] 5 mL 트립신-EDTA를 첨가하고, 부드럽게 기울여서 플라스크를 코팅하고, 37℃에서 ~5분 인큐베이션하였다.
- [0171] 플라스크를 두드리지 않고; 5 mL CGM을 첨가하고, 세포 현탁액으로 플라스크를 4X 세척하고, 50 mL 원추형 바이알에 옮기고, 5분 동안 1200 rpm으로 원심분리하였다.
- [0172] 세포 펠릿으로부터 배지를 흡인하고, 20 내지 30 mL CGM을 첨가하고, 6X 피펫팅에 의해 펠릿을 재현탁시키고, 세포 여과기에 통과시켜 클럼프를 분산시키고 (필요한 경우), 혈구계로 세포를 계수하였다.
- [0173] 검정 제1일:
- [0174] 세포 펠릿을 재현탁시키는 것을 제외하고는, 상기와 같이 세포를 수확하였다.
- [0175] 세포를 계수하고, mL당 1.5×10^5 개 세포로 희석하고; 세포당 5개의 감염성 형성 단위가 존재하도록 아데노바이러스를 첨가하였다.
- [0176] 세포를 준비하고 (20 내지 30 mL) 바이오텍 유필(BioTek uFill)을 사용하여 웰당 1.2×10^4 개 세포로 그라이너 폴리-D-리신 코팅된 384-웰 플레이트에 플레이팅하였다 (웰당 80 μ L).
- [0177] (100% DMSO 중) 화합물 용량 시리즈 0.4 μ L를 플레이트에 즉시 투여하고, 가습 인큐베이터 (37℃, 5% CO₂)에서 24시간 인큐베이션하였다.
- [0178] 검정 제2일:
- [0179] 하기와 같이 플레이트를 (각 제조업체의 지침에 따라) 처리하였다:
- [0180] 층류 후드에 플레이트를 세팅하고, 실온에서 30분 동안 덮개를 벗겨 냉각시켰다.
- [0181] AM 60 μ L를 검정 웰로부터 제거하였다.
- [0182] 스테디-글로 반딧불이 기질을 웰당 20 μ L 첨가하고, 실온에서 10-20분 동안 정치시켰다.
- [0183] 검정 플레이트의 바닥을 백색 백킹 테이프로 덮었다.
- [0184] 형광 플레이트 판독기 상에서 데이터를 얻었다.
- [0185] 잔기 709에서 리신의 아르긴으로의 돌연변이를 갖는 촉매 불활성 ASK1 돌연변이체를 발현하는 아데노바이러스로 세포를 감염시킴으로써 100% 억제 양성 대조군 웰을 생성하였다.
- [0186] 결과
- [0187] 화학식 I의 화합물은 2.0 nM의 EC₅₀을 나타냈다.
- [0188] Kd의 결정
- [0189] 키나제 검정
- [0190] 키나제-태그부착된 T7 파지 균주를 BL21 균주로부터 유도된 이. 콜라이 숙주에서 제조하였다. 이. 콜라이를 대수기까지 성장시키고, T7 파지로 감염시키고, 용해될 때까지 32℃에서 진탕하면서 인큐베이션하였다. 용해물을 원심분리하고, 여과하여 세포 파편을 제거하였다. 나머지 키나제를 HEK-293 세포에서 생산하고, 후속적으로 qPCR 검출을 위해 DNA로 태그부착시켰다. 스트렙타비딘-코팅된 자기 비드를 실온에서 30분 동안 비오틴닐화 소분자 리간드로 처리하여 키나제 검정을 위한 친화성 수지를 생성하였다.

- [0191] 리간드 비드를 과량의 비오틴으로 차단하고, 차단 완충제 (시블록(SeaBlock) (피어스(Pierce)), 1% (소 혈청 알부민), 0.05% 트윈(Tween) 20, 1 mM DTT (디티오프로판올))로 세척하여 미결합 리간드를 제거하고, 비-특이적 결합을 감소시켰다. 1x 결합 완충제 (20% 시블록, 0.17x PBS, 0.05% 트윈 20, 6 mM DTT) 중에서 키나제, 리간드 친화성 비드, 및 시험 화합물을 결합시킴으로써 결합 반응을 조립하였다. 모든 반응은 폴리스티렌 96-웰 플레이트에서 0.135 mL 최종 부피로 수행하였다. 검정 플레이트를 1시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하고, 친화성 비드를 세척 완충제 (1x PBS, 0.05% 트윈 20)로 세척하였다. 이어서, 비드를 용리 완충제 (1x PBS, 0.05% 트윈 20, 0.5 μ M 비-비오틴화 친화성 리간드) 중에 재현탁시키고, 진탕하면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 용출액에서의 키나제 농도를 qPCR에 의해 측정하였다.
- [0192] 힐(Hill) 방정식을 사용하여 표준 용량-반응 곡선으로 결합 상수 (K_d)를 계산하였다.
- [0193] 결과
- [0194] 화학식 I의 화합물은 0.24 nM의 K_d 를 나타냈다. 이 데이터는 화학식 I의 화합물이 ATP의 부재 하에 ASK1 수용체에 강력하게 결합한다는 것을 시사한다.
- [0195] 혈장에 결합된 화합물의 퍼센트 결정
- [0196] 실험 설계:
- [0197] 하버드 어패러투스(Harvard Apparatus) (미국 매사추세츠주 홀리스톤)로부터의 1mL 테플론(Teflon) 투석 셀을 이들 실험에 사용하였다. 연구에 앞서, 투석 막을 대략 1시간 동안 0.133 M 포스페이트 완충제 pH 7.4 중에 침지시켰다. 공칭 농도 2 μ M의 화합물을 혈장 1 mL 또는 세포 배양 배지 1 mL 내에 스파이킹하였다. 셀의 각각의 면 상 액체의 전체 부피는 1 mL였다. 37°C 수조에서 3시간 평형화시킨 후에, 셀의 각각의 면으로부터의 샘플을 인간 혈장 (세포 배양 배지) 1 mL 또는 완충제를 함유하는 적절한 바이알 내에 분취하였다. 샘플 바이알을 칭량하고 기록하였다. 100 μ L 분취액을 제거하여 400 μ L 켄칭 용액 (50% 메탄올, 25% 아세트오니트릴, 25% 물 및 내부 표준물)에 첨가하였다. 샘플을 와동시키고, 12000 G로 15분 동안 원심분리하였다. 상청액 200 μ L를 제거하여 새로운 96 웰 플레이트 내에 넣었다. 추가의 1:1 ACN:물 200 μ L를 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 와동시키고, LC-MS 분석에 적용하였다.
- [0198] 혈장에서의 분석물에 대한 미결합 퍼센트를 하기 방정식을 사용하여 계산하였다.
- [0199]
$$\text{미결합 \%} = 100(C_f / C_i)$$
- [0200] 여기서, C_f 및 C_i 는 각각 투석-후 완충제 및 혈장 농도이다.
- [0201] 결과
- [0202] 인간 혈장에서 측정된 화학식 I의 화합물에 대한 미결합 퍼센트는 11.94%였다.
- [0203] CACO-2 유출 비의 결정
- [0204] 실험:
- [0205] Caco-2 세포를 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) 중에서 1% Pen/Strep, 1% NEAA 및 10% 태아 소 혈청으로 보충된 글루타맥스(Glutamax), 피루브산나트륨과 함께 37°C, 90% 습도 및 5% CO₂로 설정된 인큐베이터에서 유지하였다. 계대 62 내지 72의 Caco-2 세포를 2100개 세포/웰로 시딩하고, 적어도 21일에 걸쳐 24 웰 PET (폴리에틸렌-테레프탈레이트) 플레이트 (BD 바이오사이언시스) 상에서 전면성장물로 성장시켰다. 수용자 웰은 pH가 pH 7.4로 조정된 1% BSA로 보충된 HBSS 완충제 (10 mM HEPES, 15 mM 글루코스, pH는 pH 6.5로 조정됨)를 함유하였다. 수송 완충제로 초기 평형화시킨 후에, TEER 값을 판독하여 막 완전성을 시험하였다. 시험 화합물을 함유하는 완충제를 첨가하고, 용액 100 μ L를 수용자 구획으로부터 1 및 2시간째에 취하였다. 제거된 완충제를 신선한 완충제로 대체하고, 제거된 물질에 대한 수정을 모든 계산에 적용하였다. 실험을 반복하여 수행하였다. 모든 샘플을 즉시 400 μ L 100% 아세트오니트릴산 내에 수집하여 단백질을 침전시키고, 시험 화합물을 안정화시켰다. 세포를 정단 또는 기저측 면 상에 투여하여 정 투과성 ($A \rightarrow B$) 및 역 투과성 ($B \rightarrow A$)을 결정하였다. 또한, 세포 무함유 트랜스-웰(trans-well)을 통한 투과성을 막을 통한 세포 투과성 및 비-특이적 결합의 측정값으로서 결정하였다. 비-특이적 결합 및 화합물 불안정성을 시험하기 위해 회수 퍼센트를 결정하였다. 샘플을 LC/MS/MS에 의해 분석하였다.

[0206] 겉보기 투과성 P_{app} 및 회수 %를 하기와 같이 계산하였다:

$$P_{app} = (dR/dt) \times V_r / (A \times D_0)$$

[0207] 회수 % = $100 \times ((V_r \times R_{120}) + (V_d \times D_{120})) / (V_d \times D_0)$

[0208] 여기서,

[0209] dR/dt 는 60 및 120분에 측정된 수용자 농도를 기준으로 한, $\mu M/s$ 단위의 시간에 대한 수용자 구획에서의 누적 농도의 기울기이다.

[0210] V_r 및 V_d 는 각각 cm^3 단위의 수용자 및 공여자 구획에서의 부피이다.

[0211] A 는 세포 단층의 면적 ($0.33 cm^2$)이다.

[0212] D_0 및 D_{120} 은 각각 실험의 시작 및 끝에 측정된 공여자 농도이다.

[0213] R_{120} 은 실험의 끝 (120분)의 수용자 농도이다.

[0214] 흡수 및 유출 분류:

$P_{app} (A \rightarrow B) \geq 1.0 \times 10^{-6} cm/s$	높음
$1.0 \times 10^{-6} cm/s > P_{app} (A \rightarrow B) \geq 0.5 \times 10^{-6} cm/s$	중간
$P_{app} (A \rightarrow B) < 0.5 \times 10^{-6} cm/s$	낮음
$P_{app} (B \rightarrow A) / P_{app} (A \rightarrow B) \geq 3$	유의한 유출
회수 % < 20%	측정된 투과도에 영향을 미칠 수 있음
세포 무함유 $P_{app} < 15$	측정된 투과도에 영향을 미칠 수 있음

[0215]

[0216] 결과

[0217] 화학식 I의 화합물은 27의 CACO A→B 값; 및 35의 CACO B→A 값을 가짐으로써 1.3의 유출 비 (B→A)/(A→B)를 생성하는 것으로 관찰되었다.

[0218] 간 마이크로솜 분획에서의 대사 안정성 결정:

[0219] 실험:

[0220] 대사 안정성을 산화적 대사 (NADPH) 및 접합 (UDP 글루쿠론산 (UDPGA)) 둘 다에 대한 보조인자를 사용하여 평가하였다. 2벌의 분취액의 화학식 I의 화합물 (0.5 mM DMSO 원액 3 μL) 또는 대사 안정성 표준물 (부스피론 (Buspirone))을, 1.0 mg/mL의 단백질 농도를 얻기 위해 인산칼륨 완충제 pH 7.4로 희석하고 투과제로서 알라메티신을 함유하는 마이크로솜 원액에 첨가하였다. NADPH 재생 시스템 및 UDPGA 보조인자의 첨가에 의해 대사 반응을 개시하였다. 각 반응 혼합물의 최종 조성은 50 mM 인산칼륨 완충제 pH 7.4 중 3 μM 시험 화합물, 1 mg 마이크로솜 단백질/mL, 5 mM UDPGA, 23.4 $\mu g/mL$ 알라메티신, 1.25 mM NADP, 3.3 mM 글루코스-6-포스페이트, 0.4 U/mL 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제 및 3.3 mM $MgCl_2$ 였다. 0, 2, 5, 10, 15, 30, 45 및 60분째에, 반응 혼합물의 25 μL 분취액을 IS/Q (내부 표준물을 함유하는 쉐킹 용액) 250 μL 를 함유하는 플레이트로 옮겼다. 쉐킹시킨 후에, 플레이트를 3000 $\times g$ 로 30분 동안 원심분리하고, LC/MS를 사용하여 상청액의 10 μL 분취액을 분석하여 분석물/내부 표준물 피크 면적 비를 얻었다.

[0221] 마이크로솜 분획에서의 대사 안정성을 화학식 I의 화합물의 소멸 속도를 측정함으로써 결정하였다. 데이터 (남아있는 모 화합물의 %)를 세미 로그 눈금 상에 플롯팅하고, 지수 피트를 사용하여 피팅하였다.

[0222] $C_t = C_0 \cdot e^{-K \cdot t}$ 및 $T_{1/2} = \ln 2 / K$, 여기서

[0223] C_t 시간 = t에서 남아있는 모 화합물의 %

[0224] C_0 시간 = 0에서 남아있는 모 화합물의 %

[0225] t 시간 (hr)

[0226] K 1차 제거 속도 상수 (hr^{-1})

[0227] $T_{1/2}$ 시험관내 반감기 (hr)

[0228] 예측 간 클리어런스를 하기와 같이 계산하였다 {참조 1}:

[0229]
$$CL_{int} = \frac{K \cdot V \cdot Y_p}{P} \quad \text{또는} \quad CL_{int} = \frac{K \cdot V \cdot Y_H}{H}$$

[0230]
$$CL_h = (CL_{int} \cdot Q_h) / (CL_{int} + Q_h), \quad \text{여기서}$$

[0231] CL_h 예측 간 클리어런스 (L/hr/체중 kg)

[0232] CL_{int} 고유 간 클리어런스 (L/hr/체중 kg)

[0233] V 인큐베이션 부피 (L)

[0234] Y_p 마이크로솜 단백질 수율 (단백질 mg/체중 kg)

[0235] Y_H 간세포 수율 (세포 백만개/체중 kg)

[0236] P 인큐베이션에서의 단백질의 질량 (mg)

[0237] H 인큐베이션에서의 간세포의 수 (백만개)

[0238] Q_h 간 혈류 (L/hr/체중 kg)

[0239] 이어서, 예측 간 추출을 간 혈류에 대한 예측 간 클리어런스의 비교에 의해 계산하였다. 화합물은 인큐베이션 과정에 걸쳐 기질 농도의 감소가 < 10% (마이크로솜 분획에서 > 395분 및 간세포에서 > 39.5시간인 외삽된 반감기에 상응함)인 경우에 안정한 것으로 간주되었다.

[0240] 예측 간 클리어런스의 계산에 사용된 값을 하기 표에 나타냈다.

[0241] 표 1. 마이크로솜 안정성으로부터의 예측 간 클리어런스의 계산에 사용된 값

종	간 마이크로솜			Q_h (L/kg)
	V (L)	P (mg)	Y (mg/kg)	
랫	0.001	1.0	1520	4.2
시노몰구스 원숭이	0.001	1.0	684	1.6
레스스 원숭이	0.001	1.0	1170	2.3
개	0.001	1.0	1216	1.8
인간	0.001	1.0	977	1.3

[0242]

[0243] 결과:

[0244] 마이크로솜 분획에서 시험관내 실험으로부터 결정된 바와 같은 인간에서의 예측 간 클리어런스는 0.1 L/h/kg이었다.

[0245] 시험 화합물에 대한 랫 CL 및 V_{ss} 의 결정

[0246] 랫에서의 1 mg/kg IV 주입 및 5.0 mg/kg PO 투여 후의 시험 화합물의 약동학

- [0247] 시험 물품 및 제제
- [0248] IV 투여를 위해, 시험 화합물을 0.5 mg/mL의 1 당량 HCl을 포함하는 60:40 PEG 400:물로 제제화하였다. 제제는 용액이었다.
- [0249] PO (경구) 투여를 위해, 시험 화합물을 2.5 mg/mL의 5/75/10/10 에탄올/PG/솔루톨/물로 제제화하였다. 제제는 용액이었다.
- [0250] 사용된 동물
- [0251] IV 및 PO 투여 군은 각각 3마리의 수컷 SD 래트로 이루어졌다. 투여 시, 동물은 일반적으로 0.317 내지 0.355 kg이었다. 동물은 용량 투여 전 밤새 및 투여 후 4시간까지 공복상태였다.
- [0252] 투여
- [0253] IV 주입 군의 경우, 시험 화합물을 30분에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여하였다. 주입의 속도를 각 동물의 체중에 따라 조정하여 2 mL/kg으로 1 mg/kg의 용량을 전달하였다. 경구 투여 군의 경우, 시험 물품을 5.0 mg/kg의 용량에 대해 2 mL/kg으로 경구 위관영양에 의해 투여하였다.
- [0254] 샘플 수집
- [0255] 투여 후 명시된 시점에 각 동물로부터 연속 정맥 혈액 샘플 (각각 대략 0.4 mL)을 취하였다. 혈액 샘플을 응고제로서 EDTA를 함유하는 바큐테이너(Vacutainer)TM 튜브 (백톤-디킨슨 코포레이션(Becton-Discinson Corp), 미국 뉴저지주) 내에 수집하고, 혈장을 위해 습윤 얼음 부착 원심분리기 상에 즉시 넣었다.
- [0256] 혈장에서의 화학식 I의 화합물의 농도 결정
- [0257] LC/MS/MS 방법을 사용하여 혈장에서의 시험 화합물의 농도를 측정하였다.
- [0258] 계산
- [0259] 비-구획 약동학 분석을 혈장 농도-시간 데이터 상에서 수행하였다.
- [0260] 결과
- [0261] 화학식 I의 화합물은 래트에서 0.09 L/hr/kg의 CL; 75%의 경구 생체이용률; 5.07시간의 $t_{1/2}$ 및 0.55 L/kg의 V_{ss} 를 나타냈다.
- [0262] Cyp 억제 검정
- [0263] 목적
- [0264] 주요 시토크롬 P450 이소형인 CYP1A, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP3A4를 억제하는 시험 화합물의 잠재력을 평가하기 위한 것이다 (2개의 기질).
- [0265] 시토크롬 P450 억제 IC₅₀ 결정 (8개의 이소형, 9개의 기질)
- [0266] 프로토콜 개요
- [0267] 시험 화합물 (0.1 μ M - 25 μ M)을 시토크롬 P450 이소형-특이적 프로브 기질의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 및 NADPH와 함께 인큐베이션하였다. CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP3A4 특이적 반응에 대해, 대사물을 질량 분광측정법에 의해 모니터링하였다. CYP1A 활성을 형광 대사물의 형성을 측정함으로써 모니터링하였다. 대사물의 형성에서의 비히클 대조군에 비한 감소값을 사용하여 IC₅₀ 값 (50% 억제를 생성하는 시험 화합물 농도)을 계산하였다.
- [0268] 검정 요구사항
- [0269] DMSO 중 10 mM 시험 화합물 용액 500 μ L.
- [0270] 실험 절차
- [0271] CYP1A 억제
- [0272] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.3%)을 37°C에서 5분 동안 프로브 기질 에톡시리소루핀 (0.5 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.25 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함

게 인큐베이션하였다. 선택적 CYP1A 억제제인 알파-나프토플라본을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.

- [0273] CYP2B6 억제
- [0274] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.3%)을 37°C에서 5분 동안 프로브 기질 부프로피온 (110 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.1 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP2B6 억제제인 티클로피딘을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0275] CYP2C8 억제
- [0276] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.3%)을 37°C에서 30분 동안 프로브 기질 파클리탁셀 (7.5 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.25 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP2C8 억제제인 몬테루카스트를 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0277] CYP2C9 억제
- [0278] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.25%)을 37°C에서 60분 동안 프로브 기질 톨부타미드 (120 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (1 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP2C9 억제제인 술파페나졸을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0279] CYP2C19 억제
- [0280] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.25%)을 37°C에서 60분 동안 프로브 기질 메페니도인 (25 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.5 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP2C19 억제제인 트라닐시프로민을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0281] CYP2D6 억제
- [0282] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.25%)을 37°C에서 5분 동안 프로브 기질 텍스트로메토르판 (5 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.5 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP2D6 억제제인 퀴니딘을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0283] CYP3A4 억제 (미다졸람)
- [0284] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.26%)을 37°C에서 5분 동안 프로브 기질 미다졸람 (2.5 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.1 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP3A4 억제제인 케토코나졸을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0285] CYP3A4 억제 (테스토스테론)
- [0286] 6개 농도의 시험 화합물 (DMSO 중 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25 μ M; 최종 DMSO 농도 = 0.275%)을 37°C에서 5분 동안 프로브 기질 테스토스테론 (50 μ M)의 존재 하에 인간 간 마이크로솜 (0.5 mg/mL) 및 NADPH (1 mM)와 함께 인큐베이션하였다. 선택적 CYP3A4 억제제인 케토코나졸을 양성 대조군으로서 시험 화합물과 함께 스크리닝하였다.
- [0287] CYP1A 인큐베이션의 경우에는, 반응을 메탄올에 의해 종결시키고, 대사물인 레조루핀의 형성을 형광 (여기 파장 = 535 nm, 방출 파장 = 595 nm)에 의해 모니터링하였다. CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP3A4 인큐베이션의 경우에는, 반응을 메탄올에 의해 종결시켰다. 이어서, LC-MS/MS에 의한 4-히드록시톨부타미드, 4-히드록시메페니도인, 텍스트로르판 및 1-히드록시미다졸람의 동시 분석을 위해 샘플을 원심분리하고, 상청액을 합하였다. 히드록시부프로피온, 6 α -히드록시파클리탁셀 및 6 β -히드록시테스토스테론을 LC-MS/MS에 의해 개별적으로 분석하였다. 내부 표준물을 함유하는 탈이온수 중 포름산 (최종 농도 = 0.1%)을 최종 샘플에 첨가한 후 분석하였다. 대사물의 형성에서의 비히클 대조군에 비한 감소값을 사용하여 IC₅₀ 값 (50% 억제를 생성하는 시험

화합물 농도)을 계산하였다.

결과

CYP450 이소형	기질	대사물	계산된 IC ₅₀ (μM)
1A	에톡시레조루핀	레조루핀	> 25 μM
1A2	페나세틴	아세트아미노펜	> 25 μM
2B6	부프로피온	히드록시부프로피온	19.2 μM
2C8	파클리탁셀	6α-히드록시파클리탁셀	21.6 μM
2C9	톨부타미드	4-히드록시톨부타미드	>25 μM
2C19	S-메페니토인	4-히드록시메페니토인	> 25 μM
2D6	텍스트로메트르판	텍스트로판	17.7 μM
3A4	미다졸람	히드록시미다졸람	2.7 μM
3A4	테스토스테론	6β 히드록시테스토스테론	10.5 μM

신장 섬유증의 래트 일측성 요관 폐쇄 (UUO) 모델에 대한 일반적 연구 설계.

수컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트에 일반적 사료를 공급하고, 표준 조건 하에 수용하고, 수술 전 적어도 7일 동안 순응되도록 하였다. 연구의 시작 시에, 래트를 중량-일치된 군에 넣고, 경구 위관영양 비히클을 통해 화합물의 4개 용량 수준 (1, 3, 10 또는 30 mg/kg) 중 하나를 투여하였다 (2 ml/kg p.o. bid). 래트를 노즈콘 상에서 이소플루란 마취로 마취시키고, 개복을 수행하였다. 래트는 가열 멸균된 기기 및 무균 수술 기술을 사용한 오른쪽 요관의 완전 폐쇄 (UUO)를 겪었다. 래트에 50 μl 페니실린 G (i.m.)를 수술 후 즉시 투여하였다. 래트를 정상 사육장 조건으로 복귀시키기 전에 깨끗하고 가열된 케이지에서 회복되도록 하였다. 래트에 후속 7일 동안 매일 2회 (12시간 간격) 상기 기재된 용량으로 화합물을 투여하였다. 수술 후 제7일에, 래트를 이소플루란으로 마취시키고, 혈청, 혈장 및 소변을 수집하였다. 이어서, 형태학적, 조직학적 및 생화학적 분석을 위해 동물을 안락사시키고, 신장을 수확하고, 신장 피질 생검을 수집하였다. 생화학적 분석을 위한 모든 조직은 액체 질소 중에서 급속-동결시키고, -80℃에서 저장하고, 조직학적 분석을 위한 조직은 10% 중성 완충 포르말린 중에 고정시켰다.

신섬유증을, ELISA 방법에 의해 신장에서의 콜라겐 IV의 양을 측정함으로써 및 면역조직화학에 의해 신장에서의 알파-평활근 액틴 양성 근섬유모세포의 축적을 검사함으로써 평가하였다. 전자의 경우에, 동결된 신장 피질의 작은 조각을 RIPA 완충제 중에 전달하여 균질화시킨 다음, 4℃에서 10분 동안 14000 x g로 원심분리하였다. 상청액을 예비-냉각된 튜브 내에 수집하고, 단백질 농도를 결정하였다. 전체 단백질의 등량을 제조업체 지침에 따라 Col IV ELISA 검정 (엑소셀(Exocel))에 적용하였다.

고정된 포르말린 및 파라핀 포매 신장 조직을 이전에 기재된 바와 같이 알파-평활근 액틴 염색하였다 (문헌 [Stambe et al., The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Renal Fibrosis J Am Soc Nephrol 15: 370-379, 2004])).

결과:

화학식 I의 화합물은 3 내지 30 mg/kg의 용량에서 신장 콜라겐 IV 유도 (도 1) 및 알파-평활근 양성 근섬유모세포의 축적 (도 2)을 유의하게 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

화학식 I의 화합물 및 참조 화합물에 대한 비교 데이터

하기 표는 화학식 I의 화합물 및 2011년 1월 13일 공개된 미국 특허 공개 번호 2001/00095410A1에 개시되어 있는 참조 화합물 A 및 B에 대한 비교 결과를 제공한다. 본 출원인은 하기 비교되어 있는 결과에 대한 실험이 유

사한 조건 하에 수행되었지만 반드시 동시일 필요는 없다는 점을 언급한다.

표

	화학식 I의 화합물	화합물 A	화합물 B
IC ₅₀ (nM)	3	5	6.5
EC ₅₀ (nM)	2	3.4	18 (9X)
PBadj EC ₅₀ (nM)	17	71 (4X)	563 (33X)
CACO (A/B, B/A)	27/ 35	3.1 /18.5	0.26 / 4
유출 비 (B/A)/(A/B)	1.3	6.0	15.4
fu	12	4.8	3.2
Cyp3A4 IC ₅₀ 테스토스테론 (TST)) (uM)	11	1.1 (10X)	4 (2.8X)
Cyp3A4 IC ₅₀ /PBadj.EC ₅₀	647	15 (43X)	7 (92X)
랫에서의 V _{ss} (L/Kg)	0.55	0.17 (3.2X)	0.54
랫에서의 CL (L/hr/kg)	0.11	0.30 (2.7X)	0.39 (3.6X)
랫에서의 %F	75	11 (6.8X)	50 (1.5X)
랫에서의 t _{1/2}	5.07	0.59 (8.6X)	1.3 (3.9X)

() 괄호 안의 값은 화학식 I의 화합물이 표시된 파라미터에 대해 표시된 화합물보다 개선을 나타내는 배수를 가리킨다.

상기 비교 데이터로부터 하기를 추론할 수 있다:

화학식 I의 화합물은 화합물 A의 것과 비슷한 EC₅₀을 갖는다.

화학식 I의 화합물은 화합물 A 및 B에 대한 IC₅₀과 비슷한 기능적 IC₅₀을 갖는다.

화학식 I의 화합물은 화합물 A의 것보다 4배 낮고 화합물 B의 것보다 33배 낮은 단백질 결합 조정된 EC₅₀을 갖는다.

화학식 I의 화합물은 화합물 A 및 B에 비해 더 약한 Cyp3A4 억제제이다.

화학식 I의 화합물은 화학식 A의 화합물에 대한 것보다 43배 높고 화학식 B의 화합물에 대한 것보다 92배 높은 CYP3A4 IC₅₀/ PBadj.EC₅₀ 값을 갖는다.

화학식 I의 화합물은 화학식 A의 화합물에 대한 것보다 2.7배 낮고 화학식 B의 화합물에 대한 것보다 3.6배 낮은 랫 CL 값을 갖는다.

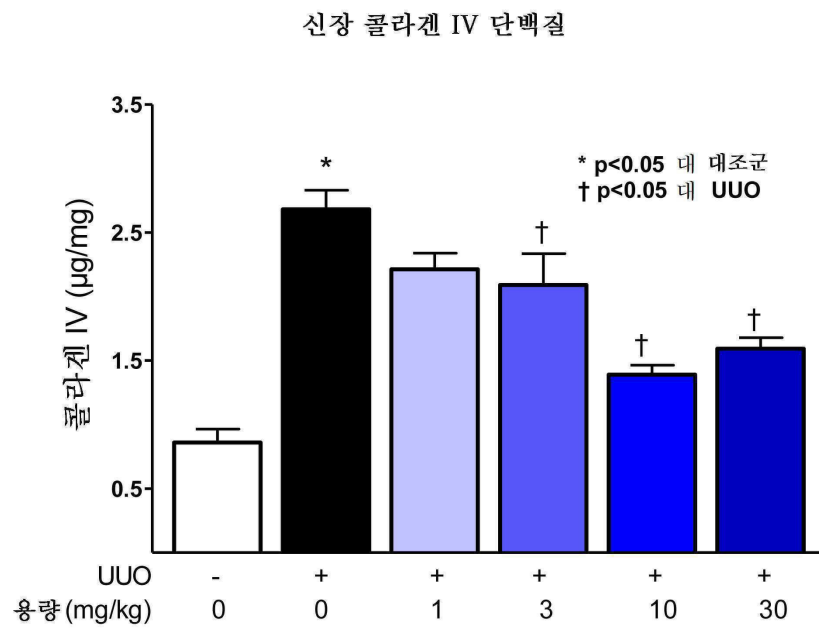
화학식 I의 화합물은 화합물 A보다 6.8배 높고 화합물 B보다 1.5배 높은 랫에서의 생체이용률 퍼센트를 갖는다.

화학식 I의 화합물은 화합물 A의 것보다 8.6배 길고 화합물 B의 것보다 3.9배 긴 랫에서의 반감기를 갖는다.

상기 데이터는 화학식 I의 화합물이 화학식 A 및 B의 화합물에 비해 예상치 못하고 유리한 특성을 갖고; 화학식 I의 화합물이 만성 신장 질환, 폐 및/또는 신장 섬유증, 및/또는 심신성 질환의 치료를 위한 추가 개발에 대한 보다 우수한 후보일 가능성이 있음을 강하게 시사한다.

도면

도면1



도면2

