



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0064528
(43) 공개일자 2018년06월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) *A61K 31/437* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

- (52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2013.01)
A61K 31/437 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7013738

(22) 출원일자(국제) 2016년10월14일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년05월15일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/074662

(87) 국제공개번호 WO 2017/067848

국제공개일자 2017년04월27일

(30) 우선권주장

1518456.7 2015년10월19일 영국(GB)

- (71) 출원인
갈라파고스 엔.브이.
벨기에 메헬렌 비-2800, 제너럴 드 위텔란 엘11/
에이3
- (72) 발명자
브리스, 레지날도, 크리스토프, 자비에르
벨기에 메헬렌 2800 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
갈라파고스 엔브이
제니, 라파엘, 장, 조엘
프랑스 로맹빌 93230 가스통 루셀 애비뉴 102
갈라파고스 에스에이에스유
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
한라특허법인(유한)

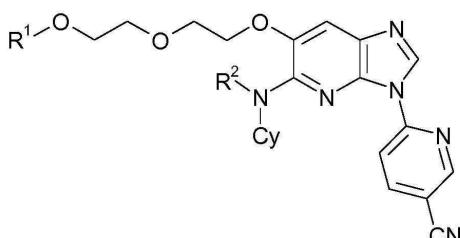
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 6-[5-아미노-6-(2-에톡시에톡시)-이미다조[4,5-비]피리딘-3-일]-니코티노니트릴 유도체 및 아이알에이케이 억제제로서 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 I에 따른 화합물을 개시한다:

화학식 I



상기 식에서 R¹, R² 및 Cy는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

본 발명은 IRAK 과 키나제를 억제하는 화합물, 그의 제조 방법, 상기 화합물을 포함하는 약학 조성물, 및 본 발명의 화합물의 투여에 의해 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병을 예방 및/또는 치료하기 위한, 상기 화합물을 사용하는 치료 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

(72) 발명자

종쿠르, 아그네스, 마리

프랑스 로맹빌 93230 가스통 루셀 애비뉴 102 갈라
파고스 에스에이에스유

도운, 줄리엔, 조지, 피에르-올리비에

벨기에 빌어스 2340 비카케르스트라트 68

라베게르, 프레데릭, 길버트

프랑스 로맹빌 93230 가스통 루셀 애비뉴 102 갈라
파고스 에스에이에스유

르프랑코, 장-미셸

프랑스 로맹빌 93230 가스통 루셀 애비뉴 102 갈라
파고스 에스에이에스유

만모리티, 오스카

벨기에 메헬렌 2800 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
갈라파고스 엔브이

슈미트, 브누아, 앙투안

벨기에 메헬렌 2800 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
갈라파고스 엔브이

반 테르 폴라스, 스티븐, 에밀

벨기에 메헬렌 2800 제너럴 드 위텔란 엘11/에이3
갈라파고스 엔브이

모네, 크리스탈, 잔느, 마리

벨기에 브뤼셀 1050 이7.6 빌딩 이, 7층 콘포 세러
퓨텍스 플레이란 2

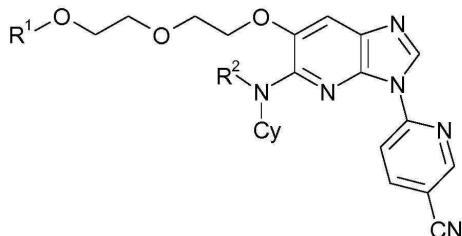
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물 또는 용매화물의 염:

화학식 I



상기 식에서,

Cy는

- 하나 이상의 독립적으로 선택된 R³로 임의로 치환된 모노사이클릭 C₃₋₇ 사이클로알킬, 또는
- N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 혼테로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 R³로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 혼테로사이클로알킬이고;

R¹은

- H,
- -SO₃H,
- -P(=O)(OH)₂,
- C₁₋₄ 알킬,

- -C(=O)-(N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 혼테로원자를 포함하는 4 내지 7원 모노사이클릭 혼테로사이클로알킬), 또는

- -C(=O)C₁₋₆ 알킬(상기 C₁₋₆ 알킬은 하나 이상의 독립적으로 선택된 R⁴ 기로 임의로 치환된다)이고;

R²는 H 또는 C₁₋₄ 알킬이고;

각각의 R³는

- OH,
- =O,
- 할로, 및
- C₁₋₄ 알킬

중에서 독립적으로 선택되고;

각각의 R⁴는

- $-\text{NR}^{\text{5a}}\text{R}^{\text{5b}}$,

- $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$,

- N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 C_{1-4} 알킬로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬, 및

- $-\text{NHC}(=\text{O})-\text{C}_{1-4}$ 알킬-NH₂

중에서 독립적으로 선택되고;

R^{5a} 및 R^{5b} 는 독립적으로 H 또는 C_{1-4} 알킬이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

Cy가 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R^3 로 치환된 모노사이클릭 C_{3-7} 사이클로알킬인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

Cy가 테트라하이드로파라닐 또는 테트라하이드로티오파라닐이고, 이들이 각각 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R^3 로 임의로 치환되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

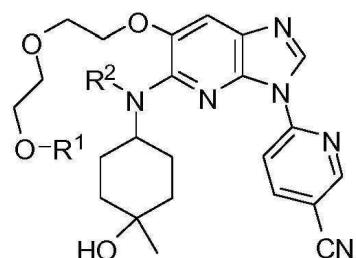
R^3 가 OH, =O, F 및 -CH₃ 중에서 선택되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 5

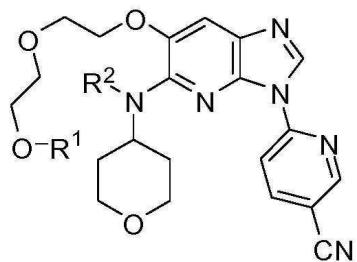
제 1 항에 있어서,

하기 화학식 IIa, IIb, IIc, IId, IIe 또는 IIIf에 상응하는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염:

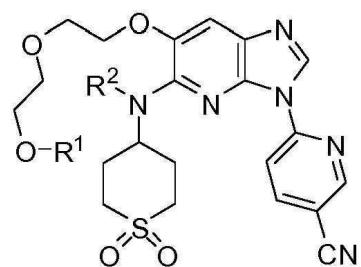
화학식 IIa



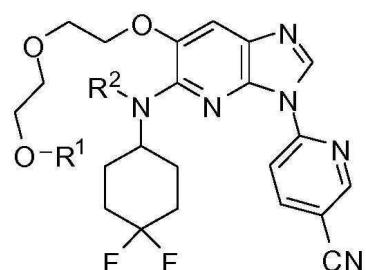
화학식 IIb



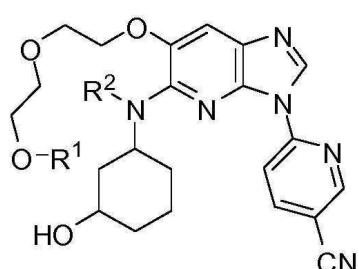
화학식 IIc



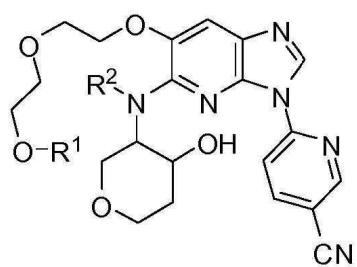
화학식 IId



화학식 IIe



화학식 IIIf



청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^1 이 H, $-CH_3$, $-SO_3H$ 또는 $-P(=O)(OH)_2$ 인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^1 이 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬이 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R^4 로 치환되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 8

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^1 이 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬이 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 $-C(=O)OH$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, 또는 $-N(CH_3)_2$ 로 치환되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^2 가 H 또는 $-CH_3$ 인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

6-[6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-(테트라하이드로-피란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일]-니코티노니트릴, 및

(S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-페리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-피란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터

중에서 선택되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 11

약학적으로 허용 가능한 담체 및 약학적으로 유효한 양의 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

추가의 치료제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

추가의 치료제가 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료를 위한 작용제인 약학 조성물.

청구항 14

약물에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제 11 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물.

청구항 15

염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제 11 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료에 유용한 화합물에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 화합물은 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병에 관련된 키나제의 한 과인 인터류킨-1 수용체 관련 키나제(IRAk), 및 보다 특히 IRAK-4를 억제할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 제조 방법, 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물, 본 발명의 화합물의 투여에 의한 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002]

키나제는 세포 생리학, 예를 들어 단백질 인산화의 다수의 필수적인 과정들에 관련된다. 특히, 단백질 및 지질 키나제는 세포의 활성화, 성장, 분화 및 생존에 관련된다. 단백질 키나제는 티로신 잔기를 우선적으로 인산화하는 것과 세린 및/또는 쓰레오닌 잔기를 우선적으로 인산화하는 것으로 나눌 수 있다.

[0003]

수년에 걸쳐, 키나제는 소염 약물의 개발에 매우 중요한 표적으로 성장되어 왔다(Cohen 2009). 특히, IRAK 키나제, 및 보다 특히 IRAK-4는 염증 및 자가면역 질병에 한 역할을 하는 것으로 확인되었다(Ringwood & Li 2008; Wang et al. 2009).

[0004]

IRAK는 다수의 세포 유형들에서 발현되며 인터류킨-1(IL-1) 및 틀형 수용체(TLR)를 포함한 다양한 세포 수용체로부터의 신호를 매개한다. 상기 IRAK 과에서, 4개의 구성원, 즉 IRAK 1-4(Wang et al. 1009)가 확인되었으며, 상기 과의 가장 최근의 구성원인 IRAK-4는 매력적인 치료 표적을 나타낸다(Li et al. 2002). 실제로, IRAK-4는 초기에 상기 IL-1 수용체 및 TLR(TLR3 제외)의 하류에서 활성화되어, IRAK-1 및 IRAK-2의 빠른 활성화를 통한 신호전달을 개시시켜 내재적인 면역 반응을 도출하는 핵심 단백질 키나제인 것으로 여겨진다. 또한, 다른 인터류킨, 예를 들어 IL-18 및 IL-33이 신호전달을 위해서 IRAK-4에 의존한다. 이와 같이, 이들 사이토카인이 병적인 과정(예를 들어 섬유증(Li et al. 2014; McHedlidze et al. 2013; Rankin et al. 2010) 및 아토피성 피부염(Salimi et al. 2013))에 관련되는 질병들은 IRAK-4 억제제에 의한 치료에 잠재적인 표적 질병들이다.

[0005]

야생형 대신에 불활성 IRAK-4 돌연변이체를 발현하는 마우스에서, 다수의 TLR 작용물질에 의해 촉발되는 패혈성 쇼크에 대한 완전한 내성뿐만 아니라 IL-1에 대한 순상된 반응이 관찰된다. 더욱 또한, 야생형 대신에 불활성 IRAK-4 돌연변이체를 발현하는 마우스는 류머티스성 관절염(Koziczkak-Holbro et al. 2009) 및 다발성 경화증(Staschke et al. 2009)과 같은 자가면역 질병의 다수의 모델들에서 부분적으로 보호된다. 흥미롭게, 류머티스 성 관절염 및 전신 홍반성 루푸스 환자의 혈청은 IRAK-4 의존적인 방식으로 형질세포양 수지상세포를 활성화시키는 것으로 나타났다(Chiang et al. 2011). 최종적으로, 재발성 화농성 세균감염이, IRAK-4 불활성화에 이르는 유전자 결함을 앓고 있는 아동에서 관찰되었다. 이들 화농성 감염은 불활성화 IRAK-4 돌연변이를 갖는 성인에서는 관찰되지 않으므로, 상기 IRAK-4 신호전달 시스템은 성인의 선천성 면역의 일부 태양에 대해 매우 풍부한 것으로 보인다.

[0006]

상기 선천성 면역계의 신호전달 성분의 조절장애가 또한 암 개시 및 진행에 중요한 인자로서 점점 더 인식되고 있다(Rhyasen & Starczynowski 2015). 실제로, IL-1은 종양 세포 성장, 혈관형성, 침입, 약물 내성 및 전이에 직접적인 역할을 한다는 증거가 존재한다(Carmi et al. 2013; Vidal-Vanaclocha et al. 2000). 추가로, TLR은 종양 세포 환경에 따라 다수의 프로튜머(protumor) 반응에 관련된다. IL-1 수용체 및 TLR 신호전달의 필수 매개체로서, IRAK 과 키나제는 유망한 암 약물 표적을 나타낸다. 또한, 다수의 암 유형들이, IRAK-4를 활성화하는 상기 TLR 및 IL-1R의 하류 어댑터 분자인 MYD88의 활성화된 형태에 의존하는 것으로 나타났다. MYD88 돌연변이 활성화가 예를 들어 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)(Ngo et al. 2011), 및 밸렌스트롬 고글로불린혈증(Treon et al. 2012)에서 확인되었다. 또 다른 보고서가 종양학 분야에서, 특히 T-세포 급성 림프모구성 백혈병(T-ALL)에서 IRAK-4의 역할을 지지한다(Li et al. 2015). IRAK-4의 약물학적 억제는 화학요법제에 대한 T-

ALL의 감수성을 증대시키는 것으로 나타났다.

[0007] IL-33은 섭유증 및 알러지성 질병, 특히 천식 및 아토피성 피부염의 발생에 한 역할을 하는 것으로 나타났다(Nabe 2014). 상기 사이토킨은 IRAK-4 의존적인 경로를 통해 신호를 전달하므로(Kroeger et al. 2009), 이들 질병이 또한 IRAK-4 억제제에 대한 표적을 나타낼 수도 있다.

[0008] 최종적으로, 다수의 자가-염증 질병이 IL-1 활성에 의존적인 것으로 나타났으며, 결과적으로, IL-1 차단 생물학적 약제가 이들 환자에게 일부 이점을 보인다. 통풍, 소아 특발성 관절염, 머클-웰스 질병, 가족성 지중해열, 베체트병, 성인 발병성 스텔병이 상기와 같은 자가-염증 질병의 예이다(Dinarello et al. 2012).

[0009] 소분자에 의한 사이토킨 신호전달의 억제는 면역-염증 질병에서 질병 결과를 감소시키는데 일조할 수 있다(Sundberg et al. 2014). 특히, 사이토킨은 병원체 및 감염에 대한 유기체의 방어에서 한 역할을 할 수 있다. 그러나, 면역-염증 질병에 대한 신규 치료법의 개발시, 한편으로는 적응 및/또는 선천 면역반응을 훼손시키지 않으면서 억제될 수 있는 경로에 관련된 표적을 선택하는 것이 중요한데, 그 이유는 다수의 사이토킨 반응 경로의 동시적인 억제가 상기 면역계를 과도하게 약화시킬 수도 있기 때문이다. 그러나, 키나제에 대한 약물 선택성을 성취하는 것은 어렵지만(Bain et al. 2003; Fabian et al. 2005), 특히 만성 치료와 관련하여 표적-외(off-target) 관련 부작용을 피하기 위해서는 상기가 매우 바람직하다(Broekman et al. 2011; Dy & Adjei 2013; Force & Kolaja 2011).

[0010] 특히, 최근에 IL-1 차단제(아나킨라(Anakinra)) 및 TNF α 차단제(에타너셉트(Etanercept))의 동반 사용이 백혈구감소증 및 감염의 위험을 증가시키는 것으로 나타났다(Genovese et al., 2003, EMEA public statement EMEA/31631/02, 05 Feb 2003). 상기 발견은, 새로운 약물 개발시 선택성이 중요한 요소이며, 따라서 다른 것들에 영향을 미치지 않으면서 신호전달 경로를 선택적으로 조절할 수 있는 화합물, 특히 TNF α 신호전달 경로에 영향을 미치지 않으면서 IL-1 반응을 선택적으로 조절할 수 있는 화합물을 개발하는 것이 바람직할 것임을 강조한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 현행 치료법들은 만족스럽지 못하며, 따라서 표적-외 관련 부작용이 감소된, 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 중식성 질병의 예방 및/또는 치료에 유용할 수 있는 추가의 화합물을 발견할 필요가 여전히 남아있다.

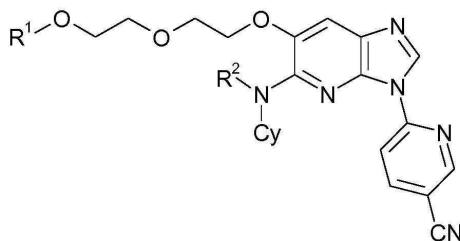
과제의 해결 수단

발명의 요약

[0013] 본 발명은 신규 화합물의 확인, 및 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 중식성 질병의 예방 및/또는 치료에서의 그의 용도를 기본으로 한다. 특히, 본 발명의 화합물은 IRAK 억제제, 및 보다 특히 IRAK-4 억제제일 수 있다. 본 발명은 또한 이들 화합물의 제조 방법, 이를 화합물을 포함하는 약학 조성물 및 본 발명의 화합물의 투여에 의한 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 중식성 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0014] 상응하게, 본 발명의 첫 번째 태양에서, 하기 화학식 I을 갖는 본 발명의 화합물을 제공한다:

[화학식 I]



[0016]

[0017] 상기 식에서,

[0018] Cy는

- [0019] - 하나 이상의 독립적으로 선택된 R³로 임의로 치환된 모노사이클릭 C₃₋₇ 사이클로알킬, 또는
- [0020] - N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 R³로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬이고;
- [0021] R¹은
- [0022] - H,
- [0023] - -SO₃H,
- [0024] - -P(=O)(OH)₂,
- [0025] - C₁₋₄ 알킬,
- [0026] - -C(=O)-(N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤�테로원자를 포함하는 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬), 또는
- [0027] - -C(=O)C₁₋₆ 알킬(상기 C₁₋₆ 알킬은 하나 이상의 독립적으로 선택된 R⁴ 기로 임의로 치환된다)이고;
- [0028] R²는 H 또는 C₁₋₄ 알킬이고;
- [0029] 각각의 R³는
- [0030] - OH,
- [0031] - =O,
- [0032] - 할로, 및
- [0033] - C₁₋₄ 알킬
- [0034] 중에서 독립적으로 선택되고;
- [0035] 각각의 R⁴는
- [0036] - -NR^{5a}R^{5b},
- [0037] - -C(=O)OH,
- [0038] - N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤�테로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 C₁₋₄ 알킬로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 헤�테로사이클로알킬, 및
- [0039] - -NHC(=O)-C₁₋₄ 알킬-NH₂
- [0040] 중에서 독립적으로 선택되고;
- [0041] R^{5a} 및 R^{5b}는 독립적으로 H 또는 C₁₋₄ 알킬이다.
- [0042] 하나의 태양에서, 본 발명의 화합물을 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위해 제공한다. 특정한 태양에서, 본 발명의 화합물은 IRAK 키나제 과 구성원, 및 보다 특히 IRAK-4를 억제할 수 있다. 또 다른 특정한 태양에서, 본 발명의 화합물은 밀접하게 관련된 유사체에 비해, IRAK 과 키나제, 및 보다 특히 IRAK-4에 대해 개선된 선택성을 보이며, 따라서 감소된 표적-와 관련 독성을 생성시킬 수 있다. 추가의 태양에서, 본 발명의 화합물은 양호한 대사 안정성을 나타낼 수 있으며, 이는 개선된 경구 생물학적 이용효능을 생성시킬 수 있다.
- [0043] 더욱 추가의 태양에서, 본 발명의 화합물은 IRAK-4에 대한 선택성을 나타낼 수 있으며, 이는 개선된 안전성을 생성시키고 표적-와 관련 부작용을 낮출 수 있다. 특정한 태양에서, 본 발명의 화합물은 IL-1의 선택성 억제제

일 수 있다.

- [0044] 추가의 태양에서, 본 발명은 본 발명의 화합물 및 약학적 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 태양에서, 상기 약학 조성물은 본 발명의 화합물과 함께 사용하기에 적합한 추가의 치료학적으로 활성인 성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 특정한 태양에서, 상기 추가의 치료학적으로 활성인 성분은 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료를 위한 작용제이다.
- [0045] 더욱이, 본 명세서에 개시된 약학 조성물 및 치료 방법에 유용한 본 발명의 화합물은 제조 및 사용시 약학적으로 허용 가능하다.
- [0046] 본 발명의 추가의 태양에서, 본 발명은 본 명세서에 나열된 것들 중에서 선택된 상태, 및 특히 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 증식성 질병에 걸린 포유동물, 특히 인간의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 약학 조성물 또는 화합물을 투여함을 포함한다.
- [0047] 본 발명은 또한 약물에 사용하기 위한 본 발명의 화합물, 및 적합한 약학적 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 태양에서, 상기 약학 조성물은 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0048] 추가의 태양에서, 본 발명은 나중에 본 명세서에 개시되는 전형적인 합성 프로토콜 및 경로에 의해 본 발명의 화합물을 합성하는 방법을 제공한다.
- [0049] 다른 목적 및 이점들은 이어지는 상세한 설명을 고려하여 당해 분야의 숙련가들에게 자명할 것이다.
- [0050] 본 발명의 화합물은 대사되어 생물학적으로 활성인 대사산물을 생성시킬 수 있음을 알 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 정의
- [0052] 하기의 용어들은 하기에 함께 제공된 의미를 갖고자 하며 본 발명의 개시 및 의도된 범위를 이해하는데 유용하다.
- [0053] 화합물, 상기와 같은 화합물을 함유하는 약학 조성물 및 상기와 같은 화합물 및 조성물의 사용 방법을 포함할 수 있는 본 발명을 개시할 때, 하기의 용어들(존재하는 경우)은 달리 나타내지 않는 한 하기의 의미를 갖는다. 본 발명에 개시될 때 이후 하기에 정의되는 부분들 중 임의의 부분은 다양한 치환체들로 치환될 수 있으며, 각각의 정의가 하기에 설명되는 바와 같은 그의 범위내에 상기와 같은 치환된 부분들을 포함하고자 함은 또한 물론이다. 달리 서술되지 않는 한, '치환된'이란 용어는 하기에 설명되는 바와 같이 정의되어야 한다. '기' 및 '라디칼'이란 용어들은 본 발명에서 사용시 호환 가능한 것으로 간주될 수 있음도 또한 물론이다.
- [0054] '하나의'란 관사는 본 발명에서 상기 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나보다 많은(즉 적어도 하나)을 지칭하는데 사용될 수 있다. 예로서 '하나의 유사체'는 하나의 유사체 또는 하나보다 많은 유사체를 의미한다.
- [0055] '알킬'은 명시된 탄소수를 갖는 직쇄 또는 분지된 지방족 탄화수소를 의미한다. 특정한 알킬기는 탄소수 1 내지 6 또는 1 내지 4를 갖는다. 분지된은 하나 이상의 알킬기, 예를 들어 메틸, 에틸 또는 프로필이 선형 알킬쇄에 부착됨을 의미한다. 특정한 알킬기는 메틸($-CH_3$), 에틸($-CH_2-CH_3$), n-프로필($-CH_2-CH_2-CH_3$), 아이소프로필($-CH(CH_3)_2$), n-부틸($-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 3급-부틸($-CH_2-C(CH_3)_3$), 2급-부틸($-CH_2-CH(CH_3)_2$), n-펜틸($-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), n-헥실($-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 및 1,2-다이메틸부틸($-CHCH_3)-C(CH_3)H_2-CH_2-CH_3$)이다. 특정한 알킬기는 탄소수 1 내지 4를 갖는다.
- [0056] '알콕시'는 0-알킬기를 지칭하며, 이때 상기 알킬기는 명시된 수의 탄소 원자를 갖다. 특히 상기 용어는 $-O-C_{1-6}$ 알킬기를 지칭한다. 특정한 알콕시기는 메톡시, 에톡시, n-프로포시, 아이소프로포시, n-부톡시, 3급-부톡시, 2급-부톡시, n-펜톡시, n-헥속시, 및 1,2-다이메틸부톡시이다. 특정한 알콕시기는 저급 알콕시, 즉 탄소수 1 내지 6을 갖는 알콕시다. 추가의 특정한 알콕시기는 탄소수 1 내지 4를 갖는다.
- [0057] '알케닐'은 명시된 탄소 원자의 수를 갖는 1가 올레핀형 (불포화) 탄화수소기를 지칭한다. 특정한 알케닐은 직쇄 또는 분지될 수 있는 탄소수 2 내지 8, 및 보다 특히 탄소수 2 내지 6을 가지며 하나 이상 및 특히 1 내지 2 개의 올레핀 불포화 부위를 갖는다. 특정한 알케닐기는 에테닐($-CH=CH_2$), n-프로페닐($-CH_2CH=CH_2$), 아이소프로

페닐(-C(CH₃)=CH₂) 등을 포함한다.

[0058] '아미노'는 라디칼 -NH₂를 지칭한다.

[0059] '아릴'은 모 방향족 고리 시스템의 단일 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자의 제거에 의해 유도된 1가 방향족 탄화수소기를 지칭한다. 특히 아릴은 명시된 고리 원자의 수를 갖는, 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 방향족 고리 구조를 지칭한다. 구체적으로, 상기 용어는 6 내지 10개의 고리 구성원을 포함하는 기를 포함한다. 상기 아릴기가 모노사이클릭 고리 시스템인 경우 상기는 우선적으로는 탄소수 6을 함유한다. 특히 아릴기는 페닐 및 나프탈을 포함한다.

[0060] '사이클로알킬'은 명시된 고리 원자의 수를 갖는, 모노사이클릭, 축합된 폴리사이클릭, 가교된 폴리사이클릭, 또는 스피로사이클릭 비-방향족 하이드로카빌 고리 구조를 지칭한다. 사이클로알킬은 탄소수 3 내지 12, 특히 3 내지 10, 및 보다 특히 탄소수 3 내지 7을 가질 수 있다. 상기와 같은 사이클로알킬기는 예로서 단일 고리 구조, 예를 들어 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 및 사이클로헵틸을 포함한다.

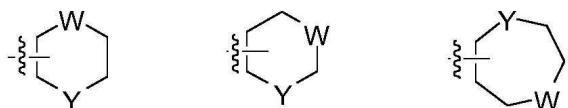
[0061] '시아노'는 라디칼 -CN을 지칭한다.

[0062] '할로' 또는 '할로겐'은 플루오로(F), 클로로(Cl), 브로모(Br) 및 요오도(I)를 지칭한다. 특정한 할로기는 플루오로 또는 클로로이다.

[0063] '헤테로'는 화합물 또는 화합물상에 존재하는 기를 개시하는데 사용될 때 상기 화합물 또는 기 중의 하나 이상의 탄소 원자가 질소, 산소 또는 황 헤테로원자에 의해 치환되었음을 의미한다. 헤테로를 상술한 하이드로카빌기 중 어느 하나, 예를 들어 1 내지 4, 및 특히 1 내지 3개의 헤테로원자, 보다 전형적으로는 1 또는 2개의 헤테로원자, 예를 들어 단일 헤테로원자를 갖는 알킬, 예를 들어 헤테로알킬, 사이클로알킬, 예를 들어 헤테로사이클로알킬, 아릴, 예를 들어 헤테로아릴 등에 적용할 수 있다.

[0064] '헤테로사이클로알킬'은 O, N 및 S 중에서 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자 및 명시된 고리 원자의 수를 포함하는, 모노사이클릭, 축합된 폴리사이클릭, 스피로사이클릭 또는 가교된 폴리사이클릭의 완전히 포화된 비-방향족 고리 구조를 의미한다. 상기 헤테로사이클로알킬 고리 구조는 4 내지 12개의 고리 구성원, 특히 4 내지 10개의 고리 구성원, 및 보다 특히 4 내지 7개의 고리 구성원을 가질 수 있다. 각각의 고리는 전형적으로 질소, 황 및 산소 중에서 선택된 4개 이하의 헤테로원자를 함유할 수 있다. 전형적으로 헤테로사이클로알킬 고리는 4개 이하의 헤테로원자, 보다 전형적으로는 3개 이하의 헤테로원자, 보다 대개는 2개 이상, 예를 들어 단일의 헤테로원자를 함유할 것이다. 헤테로사이클 고리의 예는 비제한적으로 아제티디닐, 옥세타닐, 티에타닐, 피롤리디닐(예를 들어 1-피롤리디닐, 2-피롤리디닐 및 3-피롤리디닐), 테트라하이드로퓨라닐(예를 들어 1-테트라하이드로퓨라닐, 2-테트라하이드로퓨라닐 및 3-테트라하이드로퓨라닐), 테트라하이드로티오페닐(예를 들어 1-테트라하이드로티오페닐, 2-테트라하이드로티오페닐 및 3-테트라하이드로티오페닐), 피페리디닐(예를 들어 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐 및 4-피페리디닐), 테트라하이드로피라닐(예를 들어 4-테트라하이드로피라닐), 테트라하이드로티오피라닐(예를 들어 4-테트라하이드로티오피라닐), 모폴리닐, 티오모폴리닐, 다이옥사닐, 또는 피페라지닐을 포함한다.

[0065] 모노사이클릭 고리의 특정한 예는 하기의 예시적인 예들로 나타낸다:

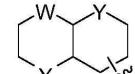
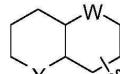
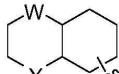
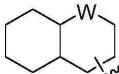
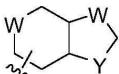
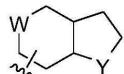
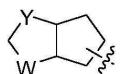
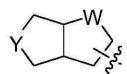
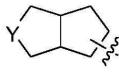


[0066]

[0067] 상기에서, 각각의 W 및 Y는 독립적으로 -CH₂-، -NH-， -O- 및 -S- 중에서 선택된다.

[0068]

축합된 바이사이클릭 고리의 특정한 예는 하기의 예시적인 예들로 나타낸다:

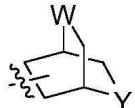
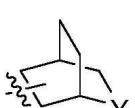
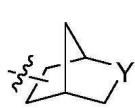


[0069]

상기에서, 각각의 W 및 Y는 독립적으로 $-\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$ 및 $-\text{S}-$ 중에서 선택된다.

[0070]

가교된 바이사이클릭 고리의 특정한 예는 하기의 예시적인 예들로 나타낸다:

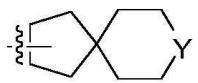
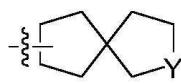
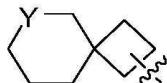


[0071]

상기에서, 각각의 W 및 Y는 독립적으로 $-\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$ 및 $-\text{S}-$ 중에서 선택된다.

[0072]

스페로사이클릭 고리의 특정한 예는 하기의 예시적인 예들로 나타낸다:



[0073]

상기에서, 각각의 W 및 Y는 독립적으로 $-\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$ 및 $-\text{S}-$ 중에서 선택된다.

[0074]

'하이드록실'은 라디칼 $-\text{OH}$ 를 지칭한다.

'옥소'는 라디칼 $=\text{O}$ 를 지칭한다.

'치환된'은 하나 이상의 수소 원자가 동일하거나 상이한 치환체(들)로 각각 독립적으로 치환된 기를 지칭한다.

'설포' 또는 '설플론'은 $-\text{SO}_3\text{H}$ 와 같은 라디칼을 지칭한다.

[0075]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, '하나 이상으로 치환된'이란 용어는 1 내지 4개의 치환체를 지칭한다. 하나의 실시태양에서 상기는 1 내지 3개의 치환체를 지칭한다. 추가의 실시태양에서 상기는 1 또는 2개의 치환체를 지칭한다. 더욱 추가의 실시태양에서 상기는 하나의 치환체를 지칭한다.

[0076]

유기 합성 분야의 통상적인 숙련가는 안정한, 화학적으로 가능한 헤테로사이클릭 고리 중의 헤테로원자의 최대 수는, 상기가 방향족이든 비방향족이든 간에, 상기 고리의 크기, 불포화도 및 헤테로원자의 원자가에 의해 결정됨을 알 것이다. 일반적으로, 헤테로사이클릭 고리는 상기 헤테로방향족 고리가 화학적으로 가능하고 안정한 1 내지 4개의 헤테로원자를 가질 수 있다.

[0077]

'약학적으로 허용 가능한'은 연방 정부 또는 주 정부의 규제 기관 또는 미국 이외 국가의 해당 당국에 의해 승인되거나 승인 가능함, 또는 동물, 및 보다 특히 인간에의 사용에 대해 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정된 약전에 나열됨을 의미한다.

[0078]

'약학적으로 허용 가능한 염'은 약학적으로 허용 가능하고 모 화합물의 목적하는 약물학적 활성을 갖는 화합물의 염을 지칭한다. 특히, 상기와 같은 염은 무독성이며 무기 또는 유기 산 부가염 및 염기 부가염일 수 있다. 구체적으로, 상기와 같은 염은 (1) 무기산, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등과 형성된 산 부가염; 또는 유기산, 예를 들어 아세트산, 프로피온산, 헥산산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 퓨마르산, 타타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일) 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-1-아세트산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카복실산, 글루코헵تون산, 3-페닐프로피온산, 트라이메틸아세트산, 3급 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글

루탐산, 하이드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 뮤콘산 등과 형성된 산 부가염; 또는 (2) 모 화합물 중에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어 알칼리 금속 이온, 알칼리 토 이온, 또는 알루미늄 이온에 의해 치환되거나; 또는 유기 염기, 예를 들어 에탄올아민, 다이에탄올아민, 트라이에탄올아민, N-메틸글루카민 등과 배위하는 경우 형성된 염을 포함한다. 염은 단지 예로서, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 등; 및 상기 화합물이 염기성 작용기를 함유하는 경우, 무독성 유기 또는 무기산의 염, 예를 들어 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 아세테이트, 말리에이트, 옥살레이트 등을 추가로 포함한다. '약학적으로 허용 가능한 양이온'이란 용어는 산성 작용기의 허용 가능한 양이온성 대이온을 지칭한다. 상기와 같은 양이온은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 양이온 등에 의해 예시된다.

[0085] '약학적으로 허용 가능한 비히클'은 본 발명의 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 담체를 지칭한다.

[0086] '전구약물'은, 절단 가능한 기를 가지며 가용매분해에 의해서 또는 생리학적 조건 하에서 생체 내에서 약학적으로 활성인 본 발명의 화합물로 되는, 본 발명 화합물의 유도체를 포함한 화합물을 지칭한다. 상기와 같은 예는 비제한적으로 콜린 에스터 유도체 등, N-알킬모폴린 에스터 등을 포함한다.

[0087] '용매화물'은 용매와, 대개는 가용매분해 반응에 의해 회합되는 화합물의 형태를 지칭한다. 이러한 물리적 회합은 수소 결합을 포함한다. 통상적인 용매는 물, 에탄올, 아세트산 등을 포함한다. 본 발명의 화합물을 예를 들어 결정성 형태로 제조할 수 있으며 용매화 또는 수화시킬 수 있다. 적합한 용매화물은 약학적으로 허용 가능한 용매화물, 예를 들어 수화물을 포함하며, 화학량론적 용매화물 및 비-화학량론적 용매화물을 모두 추가로 포함한다. 몇몇 예에서, 상기 용매화물은, 예를 들어 하나 이상의 용매 분자가 상기 결정성 고체의 결정 격자 중에 통합된 경우 단리될 수 있을 것이다. '용매화물'은 용액-상 및 단리 가능한 용매화물 모두를 포함한다. 전형적인 용매화물은 수화물, 에탄올레이트 및 메탄올레이트를 포함한다.

[0088] '피실험자'는 인간을 포함한다. '인간', '환자' 및 '피실험자'란 용어들은 본 발명에서 호환적으로 사용된다.

[0089] '유효량'은 질병의 치료를 위해 환자에게 투여 시, 상기 질병에 대해 상기와 같은 치료를 수행하기에 충분한 본 발명 화합물의 양을 의미한다. '유효량'은 상기 화합물, 상기 질병 및 그의 중증도, 및 치료하려는 환자의 연령, 체중 등에 따라 변할 수 있다.

[0090] '예방하는' 또는 '예방'은 질병 또는 질환을 얻거나 상기가 발병할 위험을 감소시킴(즉 질병 유발제에 노출되거나 또는 질병 개시에 앞서 상기 질병의 소인이 있을 수 있는 환자에게서 상기 질병의 임상적인 증상을 중 하나 이상이 발생하지 않게 함)을 지칭한다.

[0091] '예방학'이란 용어는 '예방'과 관련되며, 질병의 치료 또는 치유보다는 예방을 목적으로 하는 조치 또는 시술을 지칭한다. 예방학적 조치의 비제한적인 예는 백신의 투여; 예를 들어 고정화에 기인하여 혈전증의 위험이 있는 입원 환자에 대한 저 분자량 혜파린의 투여; 및 말라리아가 풍토병이거나 또는 말라리아와 접촉할 위험성이 높은 지리학적 지역의 방문에 앞서 항-말라리아제, 예를 들어 클로로퀸의 투여를 포함할 수 있다.

[0092] 하나의 실시태양에서, 임의의 질병 또는 질환을 '치료하는' 또는 '치료'는 상기 질병 또는 질환을 개선시킴(즉 상기 질병을 억제하거나 상기 질병의 임상적 증상을 중 하나 이상의 정후, 정도 또는 중증도를 감소시킴)을 지칭한다. 또 다른 실시태양에서 '치료하는' 또는 '치료'는 환자가 알아차릴 수 없는 하나 이상의 물리적 매개변수의 개선을 지칭한다. 더욱 또 다른 실시태양에서, '치료하는' 또는 '치료'는 상기 질병 또는 질환을 물리적으로(예를 들어 알아차릴 수 있는 증상의 안정화), 생리적으로(예를 들어 물리적 매개변수의 안정화), 또는 이를 둘 다에 의해 완화시킴을 지칭한다. 추가의 실시태양에서, "치료하는" 또는 "치료"는 상기 질병의 진행을 늦춤에 관한 것이다.

[0093] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, '알러지성 질병(들)'이란 용어는 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식, 비염), 아토피성 피부염, 부비동염, 습진 및 두드러기를 포함한 면역계의 과민성 질환뿐만 아니라 식품 알러지 또는 곤충 독에 대한 알러지를 특징으로 하는 상태의 그룹을 지칭한다.

[0094] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 '천식'이란 용어는 원인이 무엇이든(내인성, 외인성, 또는 둘 다; 알러지성 또는 비-알러지성) 기도 수축과 관련된 폐 기류의 변화를 특징으로 하는 폐의 임의의 질환을 지칭한다. 상기 천식이란 용어는 원인을 가리키는 하나 이상의 형용사와 함께 사용될 수 있다.

[0095] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 '염증성 질병(들)'이란 용어는 류마티스성 관절염, 골관절염, 소아 특발성 관

절염, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식, 비염), 만성 폐쇄성 폐 질병(COPD), 염증성 장 질환(IBD, 예를 들어 크론병, 궤양성 대장염), 과민성 장 증후군, 내독소-구동된 질병 상태(예를 들어 우회술 후 합병증 또는 예를 들어 만성 심부전에 기여하는 만성 내독소 상태), 성인-발병성 스틸병, 머클-웰스 증후군, 가족성 한랭 자가염증 증후군(FCAS), 베체트병, 가족성 지중해열, 통풍, 신생아 발병성 다발계 염증 질병(NOMID), 슈니츨러 증후군, 및 연골 관련된 질병, 예를 들어 관절 질병을 포함하는 상태들의 그룹을 지칭한다. 특히 상기 용어는 류마티스성 관절염, 소아 특발성 관절염, 건선, 골관절염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식), 만성 폐쇄성 폐 질병(COPD) 및 염증성 장 질병을 지칭한다. 보다 특히 상기 용어는 류마티스성 관절염, 소아 특발성 관절염, 건선, 만성 폐쇄성 폐 질병(COPD) 및 염증성 장 질병을 지칭한다.

[0096] 본 발명에 사용된 바와 같이 '자가면역 질병(들)'은 COPD와 같은 상태를 포함한 폐쇄성 기도 질병, 천식(예를 들어 내인성 천식, 외인성 천식, 먼지 천식, 소아 천식), 특히 만성 또는 고질성 천식(예를 들어 말기 천식 및 기도 과민반응), 기관지 천식을 포함한 기관지염, 전신 홍반성 루프스(SLE), 피부 홍반 루푸스, 루푸스 신염, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 건선, 안구건조증, I형 당뇨병 및 이와 관련된 합병증, 아토피성 습진(아토피성 피부염), 갑상선염(하시모토 및 자가면역 갑상선염), 접촉 피부염 및 추가의 습진성 피부염, 염증성 장 질병(예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염), 죽상동맥경화증 및 근위축성 측삭 경화증을 포함한 질병의 그룹을 지칭한다. 특히 상기 용어는 COPD, 천식, 전신 홍반성 루프스, I형 당뇨병 및 염증성 장 질병을 지칭한다.

[0097] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, '섬유증'이란 용어는 전신 경화증, 특발성 폐 섬유증 및 다른 형태의 폐 섬유증 및 간질성 폐 질병, 알콜성 지방간염, 비-알콜성 지방간염, 신섬유증, 및 염증성 장 질병의 결과로서 결장의 섬유증을 지칭한다.

[0098] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, '증식성 질병(들)'이란 용어는 암(예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선 암), 골수증식성 질환(예를 들어 진성적혈구증가증, 본태성 혈소판증가증 및 골수섬유증), 백혈병(예를 들어 급성 골수성 백혈병, 급성 및 만성 림프모구성 백혈병), 다발성 골수종, 건선, 재협착증, 피부경화증 또는 섬유증과 같은 상태를 지칭한다. 특히 상기 용어는 암, 백혈병, 다발성 골수종 및 건선을 지칭한다.

[0099] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, '암'이란 용어는 피부 또는 신체 기관, 예를 들어 비제한적으로 유방, 전립선, 폐, 신장, 췌장, 위 또는 장 중 세포의 악성 또는 양성 종식을 지칭한다. 암은 인접 조직내로 침윤하여 면 기관, 예를 들어 뼈, 간, 폐 또는 뇌로 확산(전이)하는 경향이 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 상기 암이란 용어는 전이성 종양 세포 유형(예를 들어 비제한적으로 흑색종, 림프종, 백혈병, 섬유육종, 횡문근육종, 및 비만세포종) 및 조직 암종의 유형(예를 들어 비제한적으로 결장직장암, 전립선암, 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암, 유방암, 췌장암, 방광암, 신장암, 위암, 교모세포종, 원발성 간암, 난소암, 전립선암 및 자궁 평활근육종)을 모두 포함한다. 특히, 상기 '암'이란 용어는 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, 항문암, 맹장암, 성상세포종, 비정형 유기형/간상 종양, 기저세포 암종, 담즙관암, 방광암, 골암(골육종 및 악성 섬유성 조직구증), 뇌간 신경교종, 뇌 종양, 뇌 및 척수 종양, 유방암, 기관지 종양, 버킷 림프종, 경부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결장암, 결장직장암, 두개암종, 피부 T-세포 림프종, 배아성 종양, 자궁내막암, 뇌실막모세포종, 상의세포종, 식도암, 유잉 육종 계열 종양, 눈암, 망막모세포종, 담낭암, 위장(위)암, 위장관 유암종, 위장간질종양(GIST), 위장기질세포 종양, 생식세포 종양, 신경교종, 텔세포 백혈병, 두경부암, 간세포(간)암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안내 흑색종, 섬세포 종양(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암, 랑게르란스 세포 조직구증, 후두암, 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수생성 백혈병, 텔세포 백혈병, 간암, 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 버킷 림프종, 피부 T-세포림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 림프종, 발덴스트롬 고글로불린혈증, 수모세포종, 수질상피종, 흑색종, 중피종, 구강암, 만성 골수생성 백혈병, 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 비인두암, 신경모세포종, 비-소세포 폐암, 구부암, 구강인두암, 골육종, 뼈의 악성 섬유성 조직구증, 난소암, 난소상피암, 난소생식세포 종양, 난소 저 악성 잠재성 종양, 췌장암, 유두종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 중간 분화의 송과체 실질 종양, 송과체모세포종 및 천막상 원시신경외배엽성 종양, 뇌하수체 종양, 혈장세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신장 세포(신장)암, 망막모세포종, 횡문근육종, 침샘암, 육종, 유잉 육종 계열 종양, 카포시 육종, 세자리 증후군, 피부암, 소세포 폐암, 소장암, 연조직 육종, 편평세포 암종, 위(위장)암, 천막상 원시신경세포외배엽 종양, T-세포 림프종, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 자궁육종, 질암, 음문암, 발덴스트롬 고글로불린혈증, 및 빌름 종양을 지칭한다.

[0100] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 '백혈병'이란 용어는 혈액 및 혈액 형성 기관의 신생물 질병을 지칭한다. 상

기와 같은 질병은 골수 및 면역계 기능장애를 야기할 수 있으며, 이는 숙주를 감염 및 출혈에 매우 민감하게 한다. 특히 백혈병이란 용어는 급성 골수성 백혈병(AML) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 및 만성 림프모구성 백혈병(CLL)을 지칭한다.

- [0101] '본 발명의 화합물(들)' 및 동등한 표현들은 본 명세서에 개시된 바와 같은 화학식(들)의 화합물을 포함함을 의미하며, 상기 표현은 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물, 예를 들어 수화물, 및 상기 약학적으로 허용 가능한 염의 용매화물(문맥상 그렇게 허용되는 경우)을 포함한다. 유사하게, 중간체에 대한 언급은, 상기 중간체 자체의 청구 여부에 관계 없이, 상기 중간체의 염, 용매화물(문맥상 그렇게 허용되는 경우)을 포함함을 의미한다.
- [0102] 본 명세서에서 범위를 언급하는 경우, 예를 들어 비제한적으로 C₁₋₈ 알킬의 경우, 범위의 인용은 상기 범위의 각 구성원들을 나타내는 것으로 간주해야 한다.
- [0103] 본 발명 화합물의 다른 유도체는 그의 산 및 산 유도체 형태 모두의 활성을 갖지만, 산 민감성 형태로 종종, 포유동물 유기체에 대한 용해도, 조직 적합성 또는 지연된 방출의 이점을 제공한다(Bundgaard, 1985). 전구약물은 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지된 산 유도체, 예를 들어 모 산과 적합한 알콜과의 반응에 의해 제조된 에스터, 또는 모 산 화합물과 치환되거나 비치환된 아민과의 반응에 의해 제조된 아미드, 또는 산 무수물 또는 혼합된 무수물을 포함한다. 본 발명의 화합물 상에 매달린 산성 그룹으로부터 유도된 간단한 지방족 또는 방향족 에스터, 아미드 및 무수물이 특히 유용한 전구약물이다. 일부의 경우에 이중 에스터 유형의 전구약물, 예를 들어 (아실옥시)알킬 에스터 또는 ((알콕시카보닐)옥시)알킬에스터를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 상기와 같은 전구약물은 본 발명 화합물의 C₁₋₈ 알킬, C₂₋₈ 알케닐, C₆₋₁₀ 임의로 치환된 아릴, 및 (C₆₋₁₀ 아릴)-(C₁₋₄ 알킬) 에스터이다.
- [0104] 본 발명에 사용된 바와 같이, '동위원소 변체'란 용어는 화합물을 구성하는 원자들 중 하나 이상에서 비천연 비율의 동위원소를 함유하는 상기와 같은 화합물을 지칭한다. 예를 들어 화합물의 '동위원소 변체'는 하나 이상의 비-방사성 동위원소, 예를 들어 중소수(²H 또는 D), 탄소-13(¹³C), 질소-15(¹⁵N) 등을 함유할 수 있다. 상기와 같은 동위원소 치환이 이루어지는 화합물에서, 하기의 원자들(존재하는 경우)은 다양할 수 있으며, 따라서 예를 들어 임의의 수소는 ²H/D일 수 있거나, 임의의 탄소는 ¹³C일 수 있거나, 또는 임의의 질소는 ¹⁵N일 수 있고, 상기와 같은 원자의 존재 및 위치는 당해 분야의 기술 내에서 측정될 수 있음을 알 것이다. 마찬가지로, 본 발명은, 예를 들어 생성되는 화합물을 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 사용할 수 있는 경우, 방사성동위원소를 갖는 동위원소 변체의 제조를 포함할 수 있다. 방사성 동위원소인 삼중소수, 즉 ³H 및 탄소-14, 즉 ¹⁴C가 그들의 통합 용이성 및 편리한 검출 수단에 비추어 상기 목적에 특히 유용하다. 더욱이, 양전자 방출 동위원소, 예를 들어 ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O 및 ¹³N으로 치환된 화합물을 제조할 수 있으며, 이는 기질 수용체 점유를 조사하기 위한 양전자 방출 단층촬영(PET) 연구에 유용할 것이다.
- [0105] 동일한 문자식을 갖지만 원자들의 결합 성질 또는 순서 또는 상기 원자들의 공간 배열이 상이한 화합물을 '이성질체'라 칭함을 또한 알아야 한다. 원자들의 공간 배열이 상이한 이성질체를 '입체이성질체'라 칭한다.
- [0106] 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 '부분입체이성질체'라 칭하며 서로 겹쳐지지 않는 거울상인 이성질체를 '거울상 이성질체'라 칭한다. 화합물이 비대칭 중심을 갖는 경우, 예를 들어 4 개의 상이한 그룹에 결합되는 경우, 한 쌍의 거울상 이성질체가 가능하다. 거울상 이성질체는 그의 비대칭 중심의 절대 배열을 특징으로 할 수 있으며, 이는 칸과 프레로그(Cahn and Prelog)의 R- 및 S-서열화 법칙에 의해서 또는 분자가 편광면을 회전하는 방식에 의해 개시되고 우회전성 또는 좌회전성(즉 각각 (+) 또는 (-)-이성질체)으로 표시된다. 키랄 화합물은 개별적인 거울상 이성질체로서 또는 이들의 혼합물로서 존재할 수 있다. 같은 비율의 거울상 이성질체를 함유하는 혼합물을 '라세미 혼합물'이라 칭한다.
- [0107] '토오토머'는 특정한 화합물 구조의 상호전환 가능한 형태이고 수소 원자 및 전자의 치환이 다양한 화합물을 지칭한다. 따라서, 2 개의 구조는 π 전자 및 원자(대개는 H)의 이동을 통해 평형으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 에놀과 케톤은 산 또는 염기에 의한 처리에 의해 신속하게 상호전환되기 때문에 토오토머이다. 토오토머화의 또 다른 예는 산 또는 염기에 의한 처리에 의해 마찬가지로 형성되는 페닐니트로메탄의 산- 및 질소-형태이다.
- [0108] 토오토머 형태는 관심 화합물의 최적의 화학 반응성 및 생물 활성의 획득에 적합할 수 있다.

[0109] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 가질 수 있으며; 따라서 상기와 같은 화합물은 개별적인 (R)- 또는 (S)-임체이성질체로서 또는 이들의 혼합물로서 생성될 수 있다.

[0110] 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서 및 청구의 범위에서 특정 화합물의 기술 또는 명칭은 개별적인 거울상 이성질체 및 이들의 라세미 또는 다른 혼합물 모두를 포함함을 의미한다. 임체이성질체의 임체화학의 결정 및 분리를 위한 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0111] 본 발명의 화합물이 대사되어 생물학적으로 활성인 대사산물을 제공할 수 있음을 알 것이다.

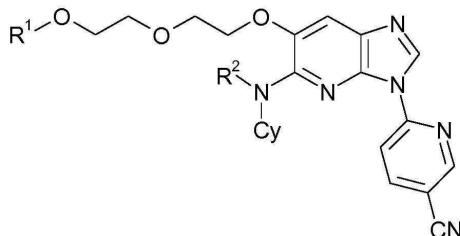
본 발명

[0113] 본 발명은 신규 화합물의 확인, 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 중식성 질병의 예방 및/또는 치료에서의 그의 용도를 기본으로 한다. 특히, 본 발명의 화합물은 IRAK 억제제, 및 보다 특히 IRAK-4 억제제일 수 있다.

[0114] 본 발명은 또한 이들 화합물의 제조 방법, 이들 화합물을 포함하는 약학 조성물 및 본 발명의 화합물의 투여에 의한 염증 질병, 자가면역 질병 및/또는 중식성 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0115] 상응하게, 본 발명의 첫 번째 태양에서, 하기 화학식 I을 갖는 본 발명의 화합물을 제공한다:

[0116] 화학식 I



[0117]

[0118] 상기 식에서,

[0119] Cy는

[0120] - 하나 이상의 독립적으로 선택된 R³로 임의로 치환된 모노사이클릭 C₃₋₇ 사이클로알킬, 또는

[0121] - N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 R³로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬이고;

[0122] R¹은

[0123] - H,

[0124] - -SO₃H,

[0125] - -P(=O)(OH)₂,

[0126] - C₁₋₄ 알킬,

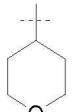
[0127] - -C(=O)-(N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤�테로원자를 포함하는 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬), 또는

[0128] - -C(=O)C₁₋₆ 알킬(상기 C₁₋₆ 알킬은 하나 이상의 독립적으로 선택된 R⁴ 기로 임의로 치환된다)이고;

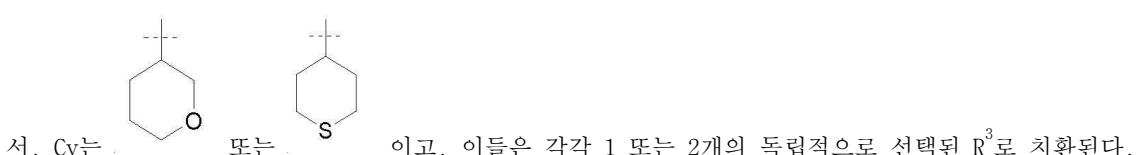
[0129] R²는 H 또는 C₁₋₄ 알킬이고;

[0130] 각각의 R³는

[0131] - OH,

- [0132] - =0,
- [0133] - 할로, 및
- [0134] - C₁₋₄ 알킬
- [0135] 중에서 독립적으로 선택되고;
- [0136] 각각의 R⁴는
- [0137] - -NR^{5a}R^{5b},
- [0138] - -C(=O)OH,
- [0139] - N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤テ로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 C₁₋₄ 알킬로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬, 및
- [0140] - -NHC(=O)-C₁₋₄ 알킬-NH₂
- [0141] 중에서 독립적으로 선택되고;
- [0142] R^{5a} 및 R^{5b}는 독립적으로 H 또는 C₁₋₄ 알킬이다.
- [0143] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 Cy가 모노사이클릭 C₃₋₇ 사이클로알킬인 화학식 I에 상응한다. 특정한 실시태양에서, Cy는 사이클로헥실이다.
- [0144] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 Cy가 1, 2 또는 3개의 독립적으로 선택된 R³로 치환된 모노사이클릭 C₃₋₇ 사이클로알킬인 화학식 I에 상응한다. 특정한 실시태양에서, Cy는 1, 2 또는 3개의 독립적으로 선택된 R³로 치환된 사이클로헥실이다. 또 다른 특정한 실시태양에서, Cy는 1 또는 2개의 R³로 치환된 모노사이클릭 C₃₋₇ 사이클로알킬이다. 보다 특정한 실시태양에서, Cy는 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R³로 치환된 사이클로헥실이다.
- [0145] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 Cy가 N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬인 화학식 I에 상응한다. 특정한 실시태양에서, Cy는 테트라하이드로피라닐, 또는 테트라하이드로티오피라닐이다. 보다 특정한 실시태양에서, Cy는 테트라하이드로피라닐, 또는 테트라하이드로티오피라닐이다.
- [0146] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 Cy가 1, 2 또는 3개의 독립적으로 선택된 R³로 치환된, N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 모노사이클릭 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬인 화학식 I에 상응한다. 또 다른 실시태양에서, Cy는 테트라하이드로피라닐 또는 테트라하이드로티오피라닐이고, 이들은 각각 1, 2 또는 3개의 독립적으로 선택된 R³로 치환된다. 특정한 실시태양에서, Cy는 1 또는 2개의 R³로 치환된, N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 4 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클로알킬이다. 또 다른 특정한 실시태양에서, Cy는 테트라하이드로피라닐 또는 테트라하이드로티오피라닐이고, 이들은 각각 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R³로 치환된다. 보다 특정한 실시태양에
- 

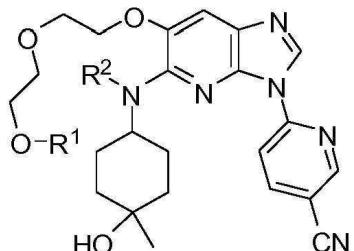
 테트라하이드로피라닐, 또는 테트라하이드로티오피라닐이다. 보다 특정한 실시태양에서, Cy는 테트라하이드로피라닐, 또는 테트라하이드로티오피라닐이다.
- [0147] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 각각의 R³가 OH, =O, 할로 및 C₁₋₄ 알킬 중에서 선택되는 화학식 I에



상응한다. 특정한 실시태양에서, 각각의 R³는 OH, =O, F 및 -CH₃ 중에서 선택된다. 보다 특정한 실시태양에서, 각각의 R³는 OH, 및 -CH₃ 중에서 선택된다. 또 다른 보다 특정한 실시태양에서, 각각의 R³는 F이다. 더욱 또 다른 보다 특정한 실시태양에서, 각각의 R³는 =O이다.

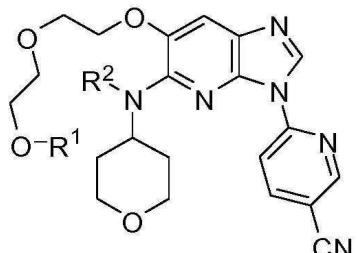
[0148] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 하기 화학식 IIa, IIb, IIc, IId, IIe 또는 IIIf에 상응한다:

[0149] [화학식 IIa]



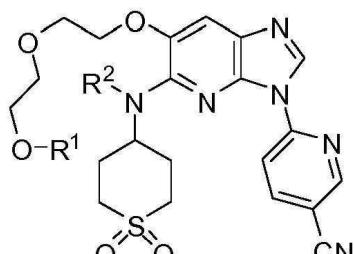
[0150]

[0151] [화학식 IIb]



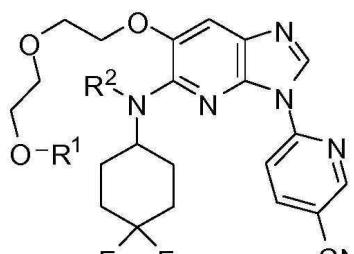
[0152]

[0153] [화학식 IIc]



[0154]

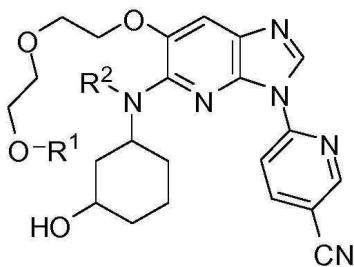
[0155] [화학식 IId]



[0156]

[0157]

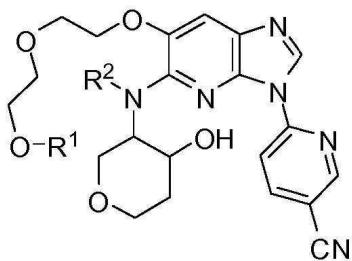
[화학식 IIe]



[0158]

[0159]

[화학식 IIIf]



[0160]

[0161]

상기 식들에서 R^1 및 R^2 는 상술한 바와 같다.

[0162]

하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^1 이 H, $-SO_3H$ 또는 $-P(=O)(OH)_2$ 인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다.

[0163]

하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^1 이 C_{1-4} 알킬인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ 또는 $-CH(CH_3)_2$ 이다. 보다 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-CH_3$ 이다.

[0164]

하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^1 이 $-C(=O)-(N, S$ 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 4 내지 7원 모노사이클릭 혼테로사이클로알킬)인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-C(=O)-\text{페롤리디닐}$ 이다.

[0165]

하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^1 이 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬은 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, 또는 $-CH(CH_3)_2$ 중에서 선택된다.

[0166]

하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^1 이 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬이 하나 이상의 독립적으로 선택된 R^4 로 치환되는 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬은 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, 또는 $-CH_2(CH(CH_3)_2)$ 중에서 선택되고, 이들은 각각 하나 이상의 독립적으로 선택된 R^4 로 치환된다. 또 다른 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬은 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R^4 로 치환된다. 보다 특정한 실시태양에서, R^1 은 $-C(=O)C_{1-6}$ 알킬이고, 상기 C_{1-6} 알킬은 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, 또는 $-CH_2(CH(CH_3)_2)$ 중에서 선택되고, 이들은 각각 1 또는 2개의 독립적으로 선택된 R^4 로 치환된다.

[0167]

하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^4 가 $-NR^{5a}R^{5b}$ 이고, 여기에서 각각의 R^{5a} 및 R^{5b} 가 독립적으로 H 또는

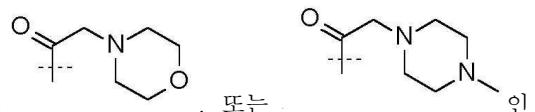
C_{1-4} 알킬인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, 각각의 R^{5a} 및 R^{5b} 는 독립적으로 H, -CH₃, 또는 -CH₂CH₃이다. 보다 특정한 실시태양에서, R^4 는 H이고, R^{5b} 는 H, -CH₃, 또는 -CH₂CH₃이다. 가장 특정한 실시태양에서, R^4 는 -NH₂, -NHCH₃, 또는 -N(CH₃)₂이다.

[0168] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^4 가 -C(=O)OH인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다.

[0169] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^4 가 N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 혼다로원자를 포함하고, 하나 이상의 독립적으로 선택된 C_{1-4} 알킬로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 혼다로사이클로알킬인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^4 는 모폴리닐, 피페리디닐, 또는 피페라지닐이고, 이들은 각각 하나 이상의 독립적으로 선택된 C_{1-4} 알킬로 임의로 치환된다. 또 다른 특정한 실시태양에서, R^4 는 N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 혼다로원자를 포함하고, 하나의 C_{1-4} 알킬로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 혼다로사이클로알킬이다. 보다 특정한 실시태양에서, R^4 는 N, S 및 O 중에서 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 혼다로원자를 포함하고, 하나의 -CH₃로 임의로 치환된 4 내지 7원 모노사이클릭 혼다로사이클로알킬이다. 또 다른 보다 특정한 실시태양에서, R^4 는 모폴리닐, 피페리디닐, 또는 피페라지닐이고, 이들은 각각 하나 이상의 -CH₃로 임의로 치환된다. 가장 특정한 실시태양에서, R^4 는 모폴리닐, 피페리디닐, 또는 피페라지닐이고, 이들은 각각 하나의 -CH₃로 임의로 치환된다.

[0170] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^4 가 -NHC(=O)-C₁₋₄ 알킬-NH₂인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^4 는 -NHC(=O)-CH₂-NH₂이다.

[0171] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^1 이 -C(=O)CH₂NH₂, -C(=O)CH₂NHCH₃, -C(=O)CH₂N(CH₃)₂, -C(=O)CH₂CH₂N(CH₃)₂, -C(=O)CH(NH₂)CH(CH₃)₂, -C(=O)CH₂CH₂C(=O)OH, -C(=O)CH(NH₂)CH₂C(=O)OH, -C(=O)CH(NH₂)CH₂CH₂C(=O)OH, -C(=O)CH(CH(CH₃)₂)NHC(=O)CH₂NH₂,


인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다.

[0172] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^2 가 H인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다.

[0173] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 R^2 가 C₁₋₄ 알킬인 화학식 I 내지 IIIf 중 어느 하나에 상응한다. 특정한 실시태양에서, R^2 는 -CH₃이다.

[0174] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 화학식 I에 상응하며, 여기에서 상기 화합물은 하기 중에서 선택된다:

[0175] 6-[6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일]-니코티노니트릴,

[0176] 6-{5-(1,1-다이옥소-테트라하이드로-2H-티오페란-4-일아미노)-6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일}-니코티노니트릴,

[0177] 6-{6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-[(시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실]-메틸-아미노]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일}-니코티노니트릴,

[0178] 6-{6-[2-(2-메톡시-에톡시)-에톡시]-5-[메틸-(테트라하이드로-페란-4-일)-아미노]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일}-니코티노니트릴,

- [0179] 6-[6-[2-(2-메톡시)-에톡시]-에톡시]-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일]-니코티노니트릴,
- [0180] 6-{5-(3-하이드록시-사이클로헥실아미노)-6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일}-니코티노니트릴,
- [0181] 6-{5-(4,4-다이플루오로-사이클로헥실아미노)-6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-일}-니코티노니트릴,
- [0182] 황산 모노-(2-{2-[3-(5-시아노-페리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸) 에스터,
- [0183] (S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-페리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터,
- [0184] (S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-페리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 옥살산염,
- [0185] 6-[6-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-5-[(시스-3,4)-4-하이드록시테트라하이드로페란-3-일]아미노]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-카보니트릴,
- [0186] 6-[6-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸사이클로헥실)아미노]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-카보니트릴,
- [0187] 6-[5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸사이클로헥실)-메틸-아미노]-6-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-카보니트릴,
- [0188] 6-[5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸사이클로헥실)아미노]-6-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-이미다조[4,5-b]페리딘-3-카보니트릴,
- [0189] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-(다이메틸아미노)아세테이트,
- [0190] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-아미노아세테이트,
- [0191] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-(메틸아미노)아세테이트,
- [0192] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 (2S)-피롤리딘-2-카복실레이트,
- [0193] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 (2S)-2-(2-아미노아세틸)아미노]-3-메틸-부타노에이트,
- [0194] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-모롤리노아세테이트,
- [0195] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-(4-메틸페페라진-1-일)아세테이트,
- [0196] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 3-(다이메틸아미노)프로파노에이트,
- [0197] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-(다이메틸아미노)아세테이트 옥살산염,
- [0198] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-아미노아세테이트 옥살산염,
- [0199] 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-(메틸아미노)아세테이트 옥살산염,

- [0200] 2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸(2S)-피롤리딘-2-카복실레이트 옥살산염,
- [0201] (3S)-3-아미노-4-[2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에톡시]-4-옥소-부탄산 염산염,
- [0202] (4S)-4-아미노-5-[2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에톡시]-5-옥소-펜탄산 염산염,
- [0203] 2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸(2S)-2-(2-아미노아세틸)아미노]-3-메틸-부타노에이트 옥살산염,
- [0204] 2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸2-모폴리노아세테이트 옥살산염,
- [0205] 2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸2-(4-메틸피페라진-1-일)아세테이트 옥살산염,
- [0206] 2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸3-(다이메틸아미노)프로파노에이트 옥살산염, 및
- [0207] 4-[2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]-4-옥소-부탄산.
- [0208] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 화학식 I에 상응하며, 여기에서 상기 화합물은 6-[6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]-니코티노니트릴이다.
- [0209] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 화학식 I에 상응하며, 여기에서 상기 화합물은 6-[6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]-니코티노니트릴이 아니다.
- [0210] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 화학식 I에 상응하며, 여기에서 상기 화합물은 (S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-피리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터이다.
- [0211] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 화학식 I에 상응하며, 여기에서 상기 화합물은 (S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-피리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터가 아니다.
- [0212] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 동위원소 변체가 아니다.
- [0213] 하나의 태양에서 본 명세서에 개시된 실시태양들 중 어느 하나에 따른 본 발명의 화합물은 유리 염기로서 존재한다.
- [0214] 하나의 태양에서 본 명세서에 개시된 실시태양들 중 어느 하나에 따른 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염이다.
- [0215] 하나의 태양에서 본 명세서에 개시된 실시태양들 중 어느 하나에 따른 본 발명의 화합물은 상기 화합물의 용매화물이다.
- [0216] 하나의 태양에서 본 명세서에 개시된 실시태양들 중 어느 하나에 따른 본 발명의 화합물은 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염의 용매화물이다.
- [0217] 각 실시태양의 명시된 그룹들을 별도로 상기에 일반적으로 나열하였지만, 본 발명의 화합물은 상기 화학식뿐만 아니라 본 발명에 제공된 다른 화학식들의 다수의 또는 각각의 실시태양이 각각의 변수에 대해서 각각 나타낸 특정한 구성원 또는 그룹들 중 하나 이상으로부터 선택된 것이다. 따라서, 본 발명은 그의 범위내에 상기와 같은 실시태양들의 모든 조합을 포함하고자 한다.
- [0218] 각 실시태양에 대해 명시된 그룹들을 상기에 별도로 일반적으로 나열하였지만, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 변수(예를 들어 R 기)가 상기 나열된 화학식(들) 중 어느 하나에 따른 하나 이상의 실시태양들 중에서 선택된 것일 수 있다. 따라서, 본 발명은 그의 범위내에 개시된 실시태양들 중 어느 하나로부터의 변수들의 모든 조합

을 포함하고자 한다.

[0219] 한편으로, 그룹 또는 실시태양으로부터의 명시된 변수들 중 하나 이상, 또는 이들의 조합의 제외도 또한 본 발명에 의해 고려된다.

[0220] 몇몇 태양에서, 본 발명은 상기 화학식들에 따른 화합물들의 전구약물 및 유도체를 제공한다. 전구약물은 대사적으로 절단가능한 그룹을 가지며 용매분해에 의해서 또는 생리학적 조건하에서 본 발명의 화합물로 되는, 생체내에서 약학적으로 활성인 본 발명 화합물의 유도체이다. 상기와 같은 예는 비제한적으로 콜린 에스터 유도체 등, N-알킬모폴린 에스터 등을 포함한다.

[0221] 본 발명 화합물의 다른 유도체는 상기 화합물의 산 및 산 유도체 형태 모두에서 활성을 갖지만, 종종 산 민감성 형태가 용해도, 조직 적합성, 또는 포유동물 유기체에서 지연된 방출의 이점을 제공한다(Bundgaard H, 1985). 전구약물은 당해 분야의 전문가들에게 널리 공지된 산 유도체, 예를 들어 모산과 적합한 알콜과의 반응에 의해 제조된 에스터, 또는 모산 화합물과 치환되거나 비치환된 아민과의 반응에 의해 제조된 아미드, 또는 산 무수물, 또는 혼합된 무수물을 포함한다. 본 발명의 화합물에 대해 펜던트인 산성 기로부터 유도된 간단한 지방족 또는 방향족 에스터, 아미드 및 무수물이 바람직한 전구약물이다. 일부의 경우에 이중 에스터 유형의 전구약물, 예를 들어 (아실옥시)알킬 에스터 또는 ((알콕시카보닐)옥시)알킬에스터를 제조하는 것이 바람직하다. 본 발명의 화합물의 C₁ 내지 C₈ 알킬, C₂-C₈ 알케닐, 아릴, C₇-C₁₂ 치환된 아릴, 및 C₇-C₁₂ 아릴알킬 에스터가 특히 유용하다.

약학 조성물

[0223] 본 발명의 화합물은 약제로서 사용될 때, 전형적으로는 약학 조성물의 형태로 투여된다. 상기와 같은 조성물은 제약 분야에 널리 공지된 방식으로 제조될 수 있으며 하나 이상의 화학식 I에 따른 본 발명의 활성 화합물을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 화합물을 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 실제 투여되는 화합물의 양은 전형적으로는 의사에 의해, 관련된 상황, 예를 들어 치료하려는 질환, 선택된 투여 경로, 실제 투여되는 화합물, 개인 환자의 연령, 체중 및 반응, 환자의 증상의 중증도 등에 비추어 결정될 것이다.

[0224] 본 발명의 약학 조성물을 경구, 직장, 경피, 피하, 관절-내, 정맥 내, 근육 내 및 비 내를 포함한 다양한 경로에 의해 투여할 수 있다. 의도하는 전달 경로에 따라, 본 발명의 화합물을 바람직하게는 주사성 또는 경구 조성물로서 또는 연고로서, 로션으로서 또는 모든 경피 투여의 경우 패치로서 제형화한다.

[0225] 경구 투여용 조성물은 별크 액체 용액 또는 혼탁액, 또는 별크 분말의 형태를 취할 수 있다. 그러나, 보다 통상적으로, 상기 조성물을 단위 투여형으로 제공하여 정확한 투여를 용이하게 한다. '단위 투여형'이란 용어는 인간 환자 및 다른 포유동물에 대해 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 목적하는 치료 효과를 생성시키도록 계산된 소정량의 활성 물질을, 적합한 약학 부형제, 비히클 또는 담체와 함께 함유한다. 전형적인 단위 투여형은 액체 조성물의 미리 충전되거나, 미리 측정된 앰플 또는 주사기 또는 고체 조성물의 경우에 환제, 정제, 캡슐 등을 포함한다. 상기와 같은 조성물에서, 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물은 대개 소량 성분(약 0.1 내지 약 50 중량% 또는 바람직하게는 약 1 내지 약 40 중량%)이며, 나머지는 다양한 비히클 또는 담체 및 목적하는 투여형의 형성에 도움이 되는 가공 보조제이다.

[0226] 경구 투여용으로 적합한 액체 형태는 완충제, 혼탁 및 분배제, 착색제, 풍미제 등과 함께 적합한 수성 또는 비수성 비히클을 포함할 수 있다. 고체 형태는 예를 들어 하기의 성분들 중 임의의 것 또는 유사한 성질의 화합물을 포함할 수 있다: 결합제, 예를 들어 미정질 셀룰로스, 겹 트라가칸트 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어 전분 또는 락토오스, 봉해제, 예를 들어 알긴산, 프리모젤(Primoje1)(등록상표), 또는 옥수수 전분; 유후제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트; 활주제, 예를 들어 콜로이드성 이산화 규소; 감미제, 예를 들어 슈크로스 또는 사카린; 또는 풍미제, 예를 들어 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지향.

[0227] 주사성 조성물은 전형적으로는 주사성 멸균 염수 또는 포스페이트-완충된 염수 또는 당해 분야에 공지된 다른 주사성 담체를 기본으로 한다. 이전과 같이, 상기와 같은 조성물 중의 화학식 I에 따른 본 발명의 활성 화합물은 전형적으로는 소량 성분(종종 약 0.05 내지 10 중량%)이며, 나머지는 주사성 담체 등이다.

[0228] 경피 조성물을 전형적으로는 상기 활성 성분(들)을 일반적으로 약 0.01 내지 약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 20 중량%, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 10 중량%, 및 보다 바람직하게는 약 0.5 내지 약 15 중량% 범위의 양으로 함유하는 국소 연고 또는 크림으로서 제형화한다. 연고로서 제형화 시, 상기 활성 성분을 전형적으로는 파라핀성 또는 수-흔화성 연고 베이스와 배합할 것이다. 한편으로, 상기 활성 성분을 예를 들어 수중

유적형 크림 베이스와 함께 크림으로 제형화할 수도 있다. 상기와 같은 경피 제형은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며 일반적으로는 상기 활성 성분 또는 상기 제형의 피부 침투 안정성을 증대시키기 위해서 추가적인 성분들을 포함한다. 모든 상기와 같은 공지된 경피 제형 및 성분들은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0229] 본 발명의 화합물을 또한 경피 장치에 의해 투여할 수 있다. 따라서, 경피 투여를 수용조 또는 다공성 막 유형, 또는 고체 기질 잡동사니의 패치를 사용하여 수행할 수 있다.

[0230] 경구 투여성, 주사성 또는 국소 투여성 조성물에 대한 상술한 성분들은 단지 예시적인 것이다. 다른 물질들뿐만 아니라 가공 기법 등이 본 발명에 참고로 인용된 문헌[Part 8 of Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania]에 나열되어 있다.

[0231] 본 발명의 화합물을 또한 서방성 형태로 또는 서방성 약물 전달 시스템으로부터 투여할 수 있다. 전형적인 서방성 물질에 대한 명세를 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]에서 찾을 수 있다.

[0232] 하기의 제형예들은 본 발명에 따라 제조될 수 있는 전형적인 약학 조성물들을 예시한다. 그러나, 본 발명을 하기의 약학 조성물들로 제한하지 않는다.

제형 1 - 정제

[0234] 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물을 대략 1:2 중량비로 건조 젤라틴 결합제와 함께 건조 분말로서 혼합할 수 있다. 소량의 마그네슘 스테아레이트를 윤활제로서 첨가할 수도 있다. 상기 혼합물을 정제 프레스에서 240 내지 270 mg 정제(정제당 80 내지 90 mg의 화학식 I에 따른 본 발명의 활성 화합물)로 형성시킬 수 있다.

제형 2 - 캡슐

[0236] 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물을 대략 1:1 중량비로 전분 희석제와 함께 건조 분말로서 혼합할 수 있다. 상기 혼합물을 250 mg 캡슐에 충전할 수 있다(캡슐당 125 mg의 화학식 I에 따른 본 발명의 활성 화합물).

제형 3 - 액체

[0238] 본 발명의 화합물(125 mg)을 슈크로스(1.75 g) 및 잔탄 검(4 mg)과 혼합하고, 생성된 혼합물을 블렌딩하고, 10 번 메쉬 U.S. 체에 통과시키고, 이어서 앞서 제조된 미정질 셀룰로스와 나트륨 카복시메틸 셀룰로스(11:89, 50 mg)의 수중 용액과 혼합할 수 있다. 나트륨 벤조에이트(10 mg), 풍미제 및 착색제를 물로 희석하고, 교반하면서 첨가할 수도 있다. 이어서 충분한 물을 교반하면서 가할 수 있다. 이어서 충분한 물을 가하여 총 5 ml의 부피를 생성시킬 수 있다.

제형 4 - 정제

[0240] 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물을 대략 1:2 중량비로 건조 젤라틴 결합제와 함께 건조 분말로서 혼합할 수 있다. 소량의 마그네슘 스테아레이트를 윤활제로서 첨가할 수 있다. 상기 혼합물을 정제 프레스에서 450 내지 900 mg 정제(150 내지 300 mg의 화학식 I에 따른 본 발명의 활성 화합물)로 형성시킨다.

제형 5 - 주사액

[0242] 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물을 대략 5 mg/ml의 농도로 완충된 멸균 염수 주사성 수성 매질에 용해시키거나 혼탁시킬 수 있다.

제형 6 - 국소용

[0244] 스테아릴 알콜(250 g) 및 백색 바셀린(250 g)을 약 75 °C에서 용융시키고 이어서 수(약 370 g) 중에 용해된 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물(50 g), 메틸파라벤(0.25 g), 프로필파라벤(0.15 g), 나트륨 라우릴 설레이트(10 g), 및 프로필렌 글리콜(120 g)의 혼합물을 가하고, 생성되는 혼합물을 응결시까지 교반할 수 있다.

치료 방법

[0246] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 약물에 사용하기 위한 본 발명의 화합물, 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 본 발명은 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 종식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0247] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 종식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 화합물, 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을

제공한다.

[0248] 추가의 치료 방법 태양에서, 본 발명은 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병에 걸린 포유동물의 예방 및/또는 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 화합물 또는 상기 상태의 치료 또는 예방을 위해 본 명세서에 기재된 약학 조성물 중 하나 이상을 투여함을 포함한다.

[0249] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 및 또 다른 치료제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 다른 치료제는 염증 질병, 자가면역 질병, 및/또는 증식성 질병의 예방 및/또는 치료를 위한 작용제이다.

[0250] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 염증 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 염증 질병은 류마티스성 관절염, 골관절염, 소아 특발성 관절염, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식, 비염), 만성 폐쇄성 폐 질병(COPD), 염증성 장 질환(IBD, 예를 들어 크론병, 궤양성 대장염), 내독소-구동된 질병 상태(예를 들어 우회술 후 합병증 또는 예를 들어 만성 심부전에 기여하는 만성 내독소 상태), 및 연골, 예를 들어 관절의 연골을 수반하는 관련 질병 중에서 선택된다. 보다 특히, 상기 염증성 질병은 건선 또는 소아 특발성 관절염이다.

[0251] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 염증 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 염증 질병은 류마티스성 관절염, 골관절염, 소아 특발성 관절염, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식, 비염), 만성 폐쇄성 폐 질병(COPD), 염증성 장 질환(예를 들어 크론병, 궤양성 대장염), 내독소-구동된 질병 상태(예를 들어 우회술 후 합병증 또는 예를 들어 만성 심부전에 기여하는 만성 내독소 상태), 및 연골, 예를 들어 관절의 연골을 수반하는 관련 질병 중에서 선택된다. 보다 특히, 상기 염증성 질병은 건선 또는 소아 특발성 관절염이다.

[0252] 추가의 치료 방법 태양에서, 본 발명은 염증 질병에 걸린 포유동물의 예방 및/또는 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 화합물 또는 상기 상태의 치료 또는 예방을 위해 본 명세서에 기재된 약학 조성물 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 특정한 실시태양에서, 상기 염증 질병은 류마티스성 관절염, 골관절염, 소아 특발성 관절염, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 알러지성 기도 질병(예를 들어 천식, 비염), 만성 폐쇄성 폐 질병(COPD), 염증성 장 질환(예를 들어 크론병, 궤양성 대장염), 내독소-구동된 질병 상태(예를 들어 우회술 후 합병증 또는 예를 들어 만성 심부전에 기여하는 만성 내독소 상태), 및 연골, 예를 들어 관절의 연골을 수반하는 관련 질병 중에서 선택된다. 보다 특히, 상기 염증성 질병은 건선 또는 소아 특발성 관절염이다.

[0253] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 자가면역 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 자가면역 질병은 COPD와 같은 상태를 포함한 폐쇄성 기도 질병, 천식(예를 들어 내인성 천식, 외인성 천식, 먼지 천식, 소아 천식), 특히 만성 또는 고질성 천식(예를 들어 말기 천식 및 기도 과민반응), 기관지 천식을 포함한 기관지염, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 피부 홍반 루푸스, 루푸스 신염, 피부근염, 쇼그伦 증후군, 다발성 경화증, 건선, 안구건조증, I형 당뇨병 및 이와 관련된 합병증, 아토피성 습진(아토피성 피부염), 갑상선염(하시모토 및 자가면역 갑상선염), 접촉 피부염 및 추가의 습진성 피부염, 염증성 장 질병(예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염), 죽상동맥경화증 및 근위축성 축삭 경화증 중에서 선택된다. 보다 특히, 상기 자가면역 질병은 전신 홍반성 루푸스이다.

[0254] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 자가면역 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 자가면역 질병은 COPD와 같은 상태를 포함한 폐쇄성 기도 질병, 천식(예를 들어 내인성 천식, 외인성 천식, 먼지 천식, 소아 천식), 특히 만성 또는 고질성 천식(예를 들어 말기 천식 및 기도 과민반응), 기관지 천식을 포함한 기관지염, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 피부 홍반 루푸스, 루푸스 신염, 피부근염, 쇼그伦 증후군, 다발성 경화증, 건선, 안구건조증, I형 당뇨병 및 이와 관련된 합병증, 아토피성 습진(아토피성 피부염), 갑상선염(하시모토 및 자가면역 갑상선염), 접촉 피부염 및 추가의 습진성 피부염, 염증성 장 질병(예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염), 죽상동맥경화증 및 근위축성 축삭 경화증 중에서 선택된다. 보다 특히, 상기 자가면역 질병은 전신 홍반성 루푸스이다.

[0255] 추가의 치료 방법 태양에서, 본 발명은 자가면역 질병에 걸린 포유동물의 예방 및/또는 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 화합물 또는 상기 상태의 치료 또는 예방을 위해 본 명세서에 기재된 약학 조

성물 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 특정한 실시태양에서, 상기 자가면역 질병은 COPD와 같은 상태를 포함한 폐쇄성 기도 질병, 천식(예를 들어 내인성 천식, 외인성 천식, 먼지 천식, 소아 천식), 특히 만성 또는 고질성 천식(예를 들어 말기 천식 및 기도 과민반응), 기관지 천식을 포함한 기관지염, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 피부 홍반 루푸스, 루푸스 신염, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 건선, 안구건조증, I형 당뇨병 및 이와 관련된 합병증, 아토피성 습진(아토피성 피부염), 갑상선염(하시모토 및 자가면역 갑상선염), 접촉 피부염 및 추가의 습진성 피부염, 염증성 장 질병(예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염), 죽상동맥경화증 및 근위축성 측삭 경화증 중에서 선택된다. 보다 특히, 상기 자가면역 질병은 전신 홍반성 루푸스이다.

[0256] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 증식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 증식성 질병은 암(예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선암), 골수증식성 질환(예를 들어 진성적혈구증가증, 본태성 혈소판증가증 및 골수 섬유증), 백혈병(예를 들어 급성 골수성 백혈병, 급성 및 만성 림프모구성 백혈병), 다발성 골수종, 건선, 재협착증, 피부경화증 또는 섬유증 중에서 선택된다.

[0257] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 증식성 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정한 실시태양에서, 상기 증식성 질병은 암(예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선암), 골수증식성 질환(예를 들어 진성적혈구증가증, 본태성 혈소판증가증 및 골수 섬유증), 백혈병(예를 들어 급성 골수성 백혈병, 급성 및 만성 림프모구성 백혈병), 다발성 골수종, 건선, 재협착증, 피부경화증 또는 섬유증 중에서 선택된다.

[0258] 추가의 치료 방법 태양에서, 본 발명은 증식성 질병에 걸린 포유동물의 예방 및/또는 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 화합물 또는 상기 상태의 치료 또는 예방을 위해 본 명세서에 기재된 약학 조성물 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 특정한 실시태양에서, 상기 증식성 질병은 암(예를 들어 자궁 평활근육종 또는 전립선암), 골수증식성 질환(예를 들어 진성적혈구증가증, 본태성 혈소판증가증 및 골수 섬유증), 백혈병(예를 들어 급성 골수성 백혈병, 급성 및 만성 림프모구성 백혈병), 다발성 골수종, 건선, 재협착증, 피부경화증 또는 섬유증 중에서 선택된다.

[0259] 주사 용량 수준은 모두 약 1 내지 약 120 시간 및 특히 24 내지 96 시간 동안 약 0.1 mg/kg/h 내지 적어도 10 mg/kg/h의 범위이다. 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 이상의 프리로딩 일시주사를 또한 투여하여 적합한 정상 상태 수준을 성취할 수 있다. 최대 총 용량은 40 내지 80 kg 인간 환자의 경우 약 1 g/일을 초과하지 않을 것으로 예상된다.

[0260] 장기적인 상태, 예를 들어 퇴행 상태의 예방 및/또는 치료를 위해서, 상기 치료 섭생을 대개는 수개월 또는 수년에 걸쳐 늘릴 수 있으며 따라서 경구 투여가 환자의 편의성 및 허용성을 위해 바람직하다. 경구 투여의 경우, 매일 1 내지 4 회의 정규 용량, 특히 매일 1 내지 3회의 정규 용량, 전형적으로는 매일 1 내지 2회의 정규 용량, 및 가장 전형적으로는 매일 1회의 정규 용량이 전형적인 섭생이다. 한편으로, 장기간 지속 효과의 약물의 경우, 경구 투여에 의해, 2주마다 1회, 매주 1회, 및 하루에 1회가 전형적인 섭생이다. 특히, 투여량 섭생은 1 내지 14일마다, 보다 특히 1 내지 10일마다, 월씬 더 특히 1 내지 7일마다, 및 가장 특히는 1 내지 3일마다일 수 있다.

[0261] 이러한 투여 패턴을 사용하는 경우, 각각의 용량은 약 1 내지 약 1000 mg의 본 발명의 화합물을 제공하며, 특히 각각의 용량은 약 10 내지 약 500 mg 및 특히 약 30 내지 약 250 mg를 제공한다.

[0262] 경피 용량은 일반적으로 주사 용량을 사용하여 성취되는 것과 유사하거나 더 낮은 혈중 수준을 제공하도록 선택된다.

[0263] 질환의 발병을 예방하기 위해 사용될 때, 본 발명의 화합물을 상기 질환이 발병할 위험이 있는 환자에게, 전형적으로는 의사의 충고 및 감독 하에서, 상술한 투여량 수준으로 투여할 것이다. 특정 질환이 발병할 위험이 있는 환자는 일반적으로 상기 질환의 가족력이 있는 환자 또는 상기 질환의 발병에 특히 민감한 것으로 유전자 시험 또는 선별에 의해 확인된 환자를 포함한다.

[0264] 본 발명의 화합물을 단독 활성제로서 투여하거나 또는 다른 치료제, 예를 들어 동일하거나 유사한 치료 활성을 나타내고 병행 투여에 대해 안전하고 효능 있는 것으로 결정된 본 발명의 다른 화합물과 함께 투여할 수 있다. 특정한 실시태양에서, 2 개(이상)의 작용제의 동시 투여는 각각 현저하게 더 낮은 용량의 사용을 허용하며, 이에 의해 나타나는 부작용이 감소된다.

[0265] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 약제로서 투여한다.

특정 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 추가의 활성 성분을 추가로 포함한다.

[0266] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 염증을 동반하는 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 면역조절제, 예를 들어 아자티오프린, 코르티코스테로이드(예를 들어 프레드니솔론 또는 덱사메타손), 사이클로포스파미드, 사이클로스포린 A, 타크로리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 뮤로모냅-CD3(OKT3, 예를 들어 오르초클론(Orthoclone)(등록상표)), ATG, 아스피린, 아세트아미노펜, 이부프로펜, 나프록센 및 피록시캄을 포함한다.

[0267] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 관절염(예를 들어 류마티스성 관절염)의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 진통제, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAIDS), 스테로이드, 합성 DMARDs(예를 들어 비제한적으로 메토트렉세이트, 레플루노미드, 살파살라진, 아우라노핀, 나트륨 아우로티오말레이트, 페니실라민, 클로로퀸, 하이드록시클로로퀸, 아자티오프린, 토파시티니브, 바리시티니브, 포스타마티니브, 및 사이클로스포린), 및 생물학적 DMARDs(예를 들어 비제한적으로 인플릭시맙, 에타너셉트, 아달리뮤맙, 리툭시맙, 및 아바타셉트)를 포함한다.

[0268] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 증식성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 닌테다니브, 퍼프레페니돈, 메토트렉세이트, 류코보린, 아드리아마이신, 프레니손, 블레오마이신, 사이클로포스파미드, 5-플루오로유라실, 패클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 독소루비신, 타목시펜, 토레미펜, 메제스트를 아세테이트, 아나스트로졸, 고세렐린, 항-HER2 단클론 항체(예를 들어 허셉틴(Herceptin)(상표)), 카페시타빈, 랄록시펜 하이드로클로라이드, EGFR 억제제(예를 들어 이레사(Iressa)(등록상표), 타세바(Tarceva)(상표), 에르비툭스(Erbxitux)(상표)), VEGF 억제제(예를 들어 아바스틴(Avastin)(상표)), 프로테오솜 억제제(예를 들어 벨케이드(Velcade)(상표)), 글리벡(Glivec)(등록상표) 및 hsp90 억제제(예를 들어 17-AAG)를 포함한다. 추가로, 화학식 I에 따른 본 발명의 화합물을 다른 요법, 예를 들어 비제한적으로 방사선요법 또는 수술과 함께 투여할 수 있다. 특정 실시태양에서 상기 증식성 질환은 섬유증, 암, 골수증식성 질환 또는 백혈병 중에서 선택된다.

[0269] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 자가면역 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 글루코코르티코이드, 세포성장 억제제(예를 들어 퓨린 유사체), 알킬화제(예를 들어 질소 머스터드(사이클로포스파미드), 니트로소유래아, 백금 배위 치체), 대사길항물질(예를 들어 메토트렉세이트, 아자티오프린 및 머캅토퓨린), 세포독성 항생제(예를 들어 닥티노마이신 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오마이신, 및 미트라마이신), 항체(예를 들어 항-CD20, 항-CD25, 또는 항-CD3(OTK3) 단클론 항체, 아트감(Atgam)(등록상표) 및 티모글로불린(Thymoglobulin)(등록상표)), 사이클로스포린, 타크로리무스, 라파마이신(시로리무스), 인터페론(예를 들어 INF-β), TNF 결합 단백질(예를 들어 인플릭시맙, 에타너셉트 또는 아달리뮤맙), 마이코페놀레이트, 평고리모드 및 미리오신을 포함한다.

[0270] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 천식 및/또는 비염 및/또는 COPD의 치료 및/또는 예방을 위한 작용제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 베타2-아드레날린 수용체 작용물질(예를 들어 살부타몰, 레발부테롤, 터뷰탈린 및 비틀테롤), 에피네프린(흡입형 또는 정제), 항콜린제(예를 들어 이프라트로피움 브로마이드), 및 글루코코르티코이드(경구 또는 흡입형), 오래 작용하는 β2-작용물질(예를 들어 살메테롤, 포모테롤, 밤부테롤, 및 서방성 경구 알부테롤), 흡입형 스테로이드와 오래 작용하는 기관지 확장제의 조합(예를 들어 플루티카손/살메테롤, 부데소니드/포모테롤), 류코트리엔 길항물질 및 합성 억제제(예를 들어 몬테류카스트, 자피르류카스트 및 질류톤), 매개체 방출 억제제(예를 들어 크로모글리케이트 및 케토티펜), IgE 반응의 생물학적 조절제(예를 들어 오말리주맙), 항히스타민제(예를 들어 세테리진, 신나리진, 펙소페나딘), 및 혈관수축제(예를 들어 옥시메타졸린, 차일로메타졸린, 나파졸린 및 트라마졸린)를 포함한다.

[0271] 추가로, 본 발명의 화합물을 천식 및/또는 COPD에 대한 응급 요법과 함께 투여할 수도 있으며, 상기와 같은 요법은 산소 또는 헬리옥스 투여, 분무된 살부타몰 또는 터부탈린(항콜린제(예를 들어 이프라트로피움)와 임의로 병용됨), 전신 스테로이드(경구 또는 정맥 내, 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 덱사메타손 또는 하이드로코르티손), 정맥 내 살부타몰, 비-특이적 베타-작용물질, 주사제 또는 흡입제(예를 들어 에피네프린, 아이소에타린, 아이소프로테레놀, 메타프로테레놀), 항콜린제(IV 또는 분무형, 예를 들어 글리코페롤레이트, 아트로핀, 이프라트로피움), 메틸잔틴(테오필린, 아미노필린, 바미필린), 기관지확장 효과를 갖는 흡입 마취제(예를 들어 아이소플루란, 할로탄, 엔플루란), 케타민, 및 정맥 내 황산 마그네슘을 포함한다.

[0272] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 염증성 장 질병(IBD)의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 글루코코르티코이드(예를 들어 프레드니손, 부데소니드) 합성 질

병변형, 면역조절제(예를 들어 메토트렉세이트, 레플루노미드, 설파살라진, 메살라진, 아자티오프린, 6-메캅토퓨린 및 사이클로스포린) 및 생물학적 질병 변형, 면역조절제(인플릭시맙, 아다리뮤맙, 세르톨리주맙, 에트롤리주맙, 베돌리주맙, 우스테키뉴맙, 리툭시맙 및 아바타셉트)를 포함한다.

[0273] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 SLE의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 인간 단클론 항체(벨리뮤맙(벤리스타(Benlysta)(등록상표)), 질병-변형 항류마티스 약물(DMARD), 예를 들어 항말라리아약(예를 들어 플라퀘닐(Plaquenil)(등록상표), 하이드록시클로로퀸), 면역억제제(예를 들어 메토트렉세이트 및 아자티오프린), 사이클로포스파미드 및 마이코페놀산, 면역억제성 약물 및 진통제, 예를 들어 비스테로이드성 소염 약물, 오피에이트(예를 들어 텍스트로프로폭시펜 및 코-코다몰), 오피오이드(예를 들어 하이드로코돈, 옥시코돈, MS 콘틴(Contin)(등록상표), 또는 메타돈), 및 듀라제식(Duragesic)(등록상표) 펜타닐 경피 패치를 포함한다.

[0274] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 건선의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 국소 치료제, 예를 들어 입욕액, 보습제, 콜 타르를 함유하는 약물첨가된 크림 및 연고, 다이트라놀(안트랄린), 코르티코스테로이드 유사 데속시메타손(토피코트(Topicort)(상표)), 플루오시노니드, 비타민 D3 유사체(예를 들어 칼시포트리올), 아르간 오일 및 레티노이드(에트레티네이트, 아시트레틴, 타자로텐), 전신 치료제, 예를 들어 메토트렉세이트, 사이클로스포린, 레티노이드, 티오구아닌, 하이드록시유레아, 설파살라진, 마이코페놀레이트 모페틸, 아자티오프린, 타크로리무스, 퓨마르산 에스터 또는 생물제, 예를 들어 아메비브(Amevive)(상표), 엔브렐(Enbrel)(상표), 휴미라(Humira)(상표), 레미케이드(Remicade)(상표), 라프티바(Raptiva)(상표) 및 유스테키뉴맙(IL-12 및 IL-23 차단제)을 포함한다. 추가로, 본 발명의 화합물을 다른 요법들, 예를 들어 비제한적으로 광선요법, 또는 광화학요법(예를 들어 프소랄렌 및 자외선 A 광선요법(PUVA))과 함께 투여할 수 있다.

[0275] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 화합물을 알러지 반응의 치료 및/또는 예방을 위한 또 다른 치료제와 함께 투여하며, 특정한 작용제는 비제한적으로 항히스타민제(예를 들어 세티리진, 다이펜하이드라민, 펙소페나딘, 레보세티리진), 글루코코르티코이드(예를 들어 프레드니손, 베타메타손, 베클로메타손, 텍사메타손), 에피네프린, 테오필린 또는 항-류코트리엔(예를 들어 몬테류카스트 또는 자피르류카스트), 항-콜린제 및 울혈완화제를 포함한다.

[0276] 동시 투여는 숙련가에게 자명한 바와 같이 2개 이상의 치료제를 동일한 치료 섭생의 부분으로서 환자에게 전달하는 임의의 수단을 포함한다. 2개 이상의 작용제를 단일 제형으로, 즉 단일 약학 조성물로서 동시에 투여할 수도 있지만, 이는 필수적인 것은 아니다. 상기 작용제들을 상이한 제형으로 상이한 시점에서 투여할 수도 있다.

화학 합성 과정

일반적인 내용

[0279] 본 발명의 화합물을 하기의 일반적인 방법 및 과정을 사용하여 쉽게 입수할 수 있는 출발 물질로부터 제조할 수 있다. 전형적이거나 바람직한 공정 조건(즉 반응 온도, 시간, 반응물들의 몰비, 용매, 압력 등)이 주어지는 경우, 달리 나타내지 않는 한 다른 공정 조건들을 또한 사용할 수 있음을 알 것이다. 최적의 반응 조건은 사용되는 특정 반응물 또는 용매에 따라 변할 수 있지만, 상기와 같은 조건들은 통상적인 최적화 과정에 의해 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다.

[0280] 추가로, 당해 분야의 숙련가들에게 자명한 바와 같이, 몇몇 작용기들이 바람직하지 못한 반응을 겪지 않도록 하기 위해서 통상적인 보호 그룹이 필요할 수 있다. 특정 작용기에 적합한 보호 그룹뿐만 아니라 보호 및 탈보호에 적합한 조건의 선택은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 다수의 보호기, 및 그들의 도입 및 제거가 문헌[T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, Wiley-Blackwell; 4th Revised edition (2006)], 및 상기 문헌 중에 인용된 참고문헌들(Wuts & Greene 2006)에 기재되어 있다.

[0281] 하기의 방법들을 본 발명에서 상기에 나열한 본 발명의 화합물의 제조에 관한 상세한 내용과 함께 제공한다. 본 발명의 화합물을 유기 합성 분야의 숙련가에 의해 공지되거나 상업적으로 입수할 수 있는 출발 물질 및 시약으로부터 제조할 수 있다.

[0282] 모든 시약들은 상업적인 등급의 것들이며 달리 나타내지 않는 한 추가의 정제 없이 제공받은 대로 사용된다. 상업적으로 입수할 수 있는 무수 용매를 불활성 분위기 하에서 수행된 반응들에 사용한다. 달리 나타내지 않는 한 다른 모든 경우는 시약 등급 용매가 사용된다. 컬럼 크로마토그래피를 실리카 표준(30 내지 70 μm) 상에서

수행한다. 박층 크로마토그래피를 사전-코팅된 실리카겔 60 F-254 플레이트(두께 0.25 mm)를 사용하여 수행한다. ^1H NMR 스펙트럼은 400 MHz 브룩커 어밴스(Bruker Avance) 분광계 또는 300 MHz 브룩커 어밴스 DPX 분광계 상에 기록된다. ^1H NMR 스펙트럼에 대한 화학 이동(δ)은 내부 기준으로서 테트라메틸실란(δ 0.00) 또는 적합한 잔류 용매 피크에 대한 백만당 부(ppm)로 보고된다. 다중도는 단일선(s), 이중선(d), 삼중선(t), 사중선(q), 오중선(quin), 다중선(m) 및 브로드(br)로서 제공된다. 전기분무 MS 스펙트럼을 워터스 플랫폼(Waters platform) LC/MS 분광계 상에서 또는 워터스 액퀴티 PDA 검출기 및 SQD 질량 분광계와 함께 워터스 액퀴티(Waters Acquity) UPLC로 획득한다. 사용된 컬럼: 액퀴티 UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 mm x 30 mm 컬럼 또는 액퀴티 UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 mm x 50 mm 컬럼을 갖는 UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 mm x 5 mm 벤가드(VanGuard) 예비-컬럼. 상기 방법들은 모두 MeCN/H₂O 구배를 사용한다. MeCN 및 H₂O는 0.1% 포름산 또는 0.05% NH₃을 함유한다. 예비 LCMS: 사용된 컬럼, 워터스 액스브리지 프렙(Waters XBridge Prep) C18 5 μm ODB 30 x 100 mm(예비 컬럼) 및 워터스 액스브리지 C18 5 μm , 4.6 mm x 100 mm(분석 컬럼). 상기 방법들은 모두 MeCN/H₂O 구배를 사용한다. MeCN 및 H₂O는 0.1% 포름산 또는 0.1% 다이에틸아민을 함유한다.

표 1

[0283]

실험 부분에 사용된 약어들의 목록.

AcOH	아세트산
APMA	4-아미노페닐머큐리 아세테이트
aq.	수성
atm	대기
BINAP	(+/-)-2,2'-비스(다이페닐포스피노)-1,1'-바이나프틸
Boc	3급-부틸옥시-카보닐
br	넓은 신호
BSA	소 혈청 알부민
Calc	계산치
Cpd	화합물
d	이중선
δ	화학 이동
DCM	다이클로로메탄
dd	이중선의 이중선
DIPEA	다이아이소프로필에틸아민
DMAP	다이메틸아미노파리딘
DMF	다이메틸포름아미드
DMSO	다이메틸설폭사이드
dt	삼중선의 이중선
DTT	다이티오쓰레이톨
EDCI	<i>N</i> -(3-다이메틸아미노프로필)- <i>N'</i> -에틸카보다이이미드 하이드로클로라이드
EDTA	에틸렌다이아민테트라아세트산
eq.	당량
ES-	전기분무 음성
ES+	전기분무 양성
Et ₂ O	다이에틸 에테르
EtOAc	에틸 아세테이트
EtOH	에탄올
g	그램
h	시간
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
Hz	헤르츠
Int	중간체
iPrOH	아이소프로판올
LiOMe	리튬 메톡사이드
LiOtBu	리튬 3급-부톡사이드
m	다중선
MeCN	아세토니트릴
MeOH	메탄올

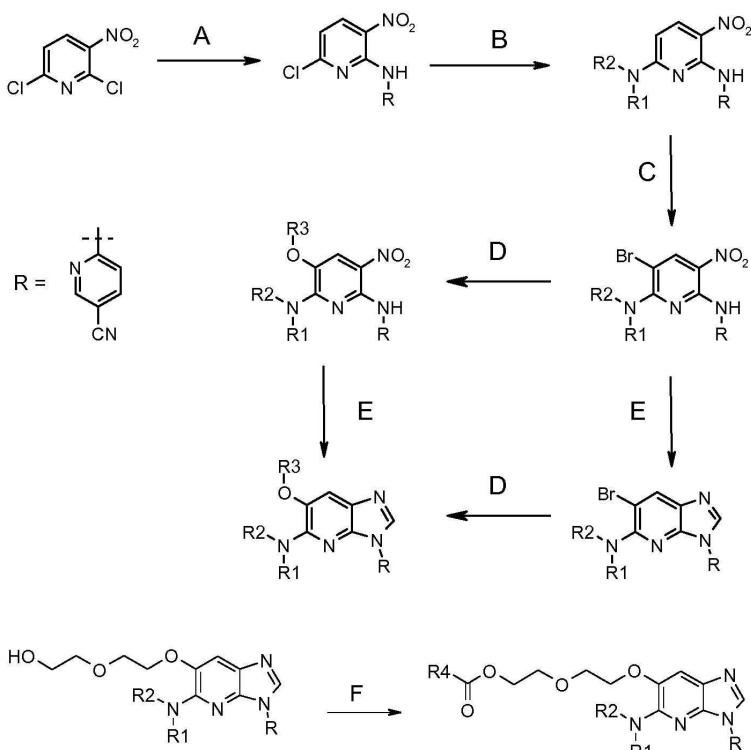
mg	밀리그램
MgOAc	마그네슘 아세테이트
MHz	메가헤르츠
min	분
mL	밀리리터
mmol	밀리몰
mol	몰
MOPS	3-(N-모폴리노)프로판설폰산
MS	질량 분광분석
MW	분자량
N	노르말 농도
NaBH(OAc) ₃	나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드
NaOtBu	나트륨 3-급-부틸레이트
NBS	N-브로모숙신이미드
NMR	핵자기 공명
Obsvd	관측치
PBS	포스페이트-완충된 염수
PBST	트윈 20을 갖는 포스페이트-완충된 염수
Pd(OAc) ₂	팔라듐 다이아세테이트
Pd/C	탄소상 팔라듐
ppm	백만당 부
q	사중선
qd	이중선의 사중선
quin	오중선
r.t.	실온
s	단일선
sat.	포화된
SEM	평균의 표준오차
t	삼중선
td	이중선의 삼중선
TEA	트라이에틸아민
TFA	트라이플루오로아세트산
THF	테트라하이드로퓨란
UPLC	초-성능 액체 크로마토그래피

[0284] 본 발명 화합물의 합성적 제조

[0285] 실시예 1. 일반적인 합성 방법

[0286]

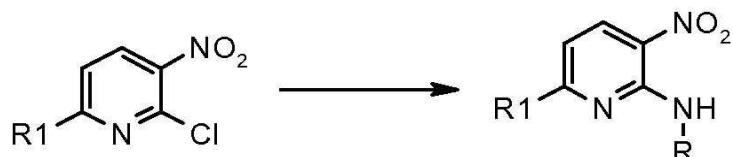
1.1. 합성 방법 개요



[0287]

[0288] 1.2. 일반적인 방법

[0289] 1.2.1. 일반적인 방법 A



[0290]

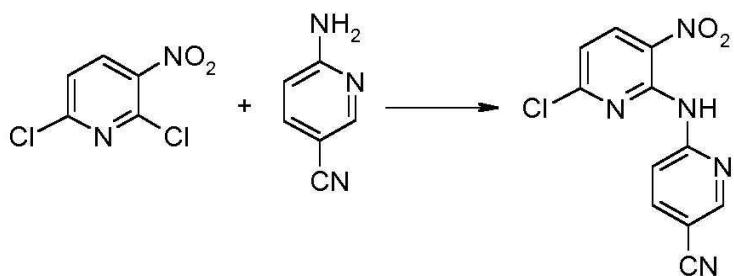
[0291]

0 °C에서 냉각된 무수 THF 중의 NaH(2 eq., 무기 오일 중 60%) 용액에 상응하는 6-아미노-니코티노니트릴(1.1 내지 1.2 eq.)을 가한다. 0 °C에서 30분 후에, 2-클로로-3-니트로피리딘(1 eq.)을 가하고 반응물을 r.t.에서 교반하고 UPLC-MS에 의해 모니터한다. 상기 반응이 완료되지 않은 경우, 상기 반응물을 0 °C로 다시 냉각시키고 NaH를 더 가한 다음 아민을 더 가한다. 상기 반응 혼합물을 빙수에 봇고 2h 동안 교반한다. 침전물을 여과하고, H₂O로 세척하고, 진공하에서 공기 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0292]

일반적인 방법 A의 예시적인 합성:

[0293] 6-(6-클로로-3-니트로-피리딘-2-일아미노)-니코티노니트릴(Int 1)



[0294]

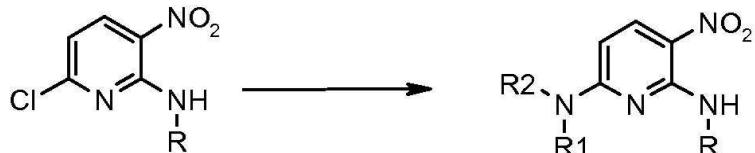
[0295]

0 °C에서 냉각된 무수 THF(50 mL) 중의 NaH(2.07 g, 51.81 mmol, 2 eq., 무기 오일 중 60%) 용액에 6-아미노-니코티노니트릴(3.4 g, 28.5 mmol, 1.1 eq.)을 가한다. 0 °C에서 30분 후에, 2,6-다이클로로-3-니트로-피리딘

(5 g, 25.91 mmol, 1 eq.)을 가하고 반응물을 r.t.에서 16h 동안 교반한다. 상기 반응물을 0 °C로 냉각시키고, NaH(0.5 g, 13 mmol, 0.5 eq.)를 가하고 반응물을 0 °C에서 1h 동안 교반하고 이어서 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 상기 반응 혼합물을 빙수에 붓고 2h 동안 교반한다. 상기 침전물을 여과하고, H₂O로 세척하고, 진공하에서 공기 건조시킨다. 수득된 고체를 MeCN(75 mL)에 용해시키고, r.t.에서 1h 30min 동안 및 0 °C에서 1h 동안 교반한다. 이어서 상기를 여과하고 MeOH로 세척하여 목적하는 화합물을 제공한다.

[0296] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.81 (1H, br s), 8.73 (1H, dd), 8.61 (1H, d), 8.31 (1H, dd), 8.01 (1H, dd), 7.36 (1H, d).

[0297] 1.2.2. 일반적인 방법 B

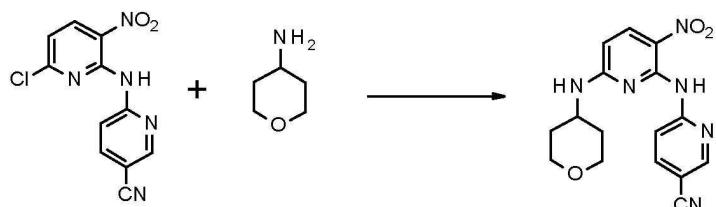


[0298]

[0299] DMSO 중의 6-클로로-3-니트로-피리딘-2-일아미노 유도체(1 eq.)에 상응하는 아민(1 eq.) 및 DIPEA(2 eq.)를 가하고, 이어서 상기 반응 혼합물을 반응의 완료시까지 전자레인저에서 110 내지 130 °C에서 가열한다. 상기 혼합물을 H₂O로 희석하고, 침전물을 여과하고 진공하에서 공기 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0300] 일반적인 방법 B의 예시적인 합성:

[0301] 6-[3-니트로-6-(테트라하이드로-피란-4-일아미노)-피리딘-2-일아미노]-니코티노니트릴(Int 8)

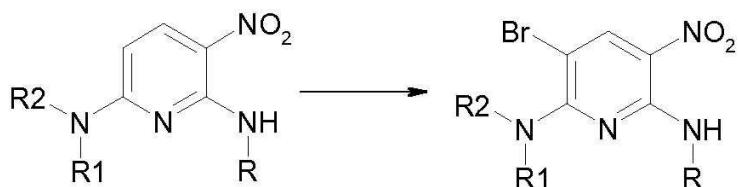


[0302]

[0303] DMSO(20 mL) 중의 6-(6-클로로-3-니트로-피리딘-2-일아미노)-니코티노니트릴(Int 1, 4 g, 14.51 mmol, 1 eq.)에 테트라하이드로-피란-4-일아민(1.65 mL, 15.96 mmol, 1.1 eq.) 및 DIPEA(5.05 mL, 29.02 mmol, 2 eq.)를 가하고, 이어서 반응 혼합물을 전자레인저에서 130 °C에서 20min 동안 가열한다. 상기 혼합물을 H₂O 및 Et₂O로 희석하고, 침전물을 여과하고 진공하에서 공기 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0304] ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.38 (1H, s), 8.78 (1H, d), 8.47-8.63 (2H, m), 8.39 (1H, dd), 8.17 (1H, d), 6.27 (1H, d), 3.98-4.12 (1H, m), 3.91 (2H, d), 3.52 (2H, t), 1.94 (2H, d), 1.33-1.67 (2H, m).

[0305] 1.2.3. 일반적인 방법 C



[0306]

[0307] NBS(1.1 내지 2 eq.)를 무수 MeCN 중의 3-니트로-피리딘-2,6-디아미노 유도체(1 eq.) 용액에 가하고, 상기 반응물을 r.t.에서 교반하고 UPLC-MS에 의해 모니터한다. 완전한 종료에 도달되지 않는 경우, 출발 물질이 남지 않

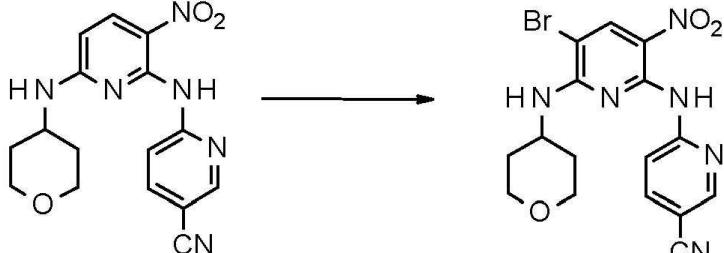
을 때까지 추가적인 NBS를 가한다. 상기 형성된 침전물을 여과하고, Et₂O로 세척하고 진공하에서 공기 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0308]

일반적인 방법 C의 예시적인 합성:

[0309]

6-[5-브로모-3-니트로-6-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-페리딘-2-일아미노]-니코티노니트릴(Int 11)



[0310]

[0311]

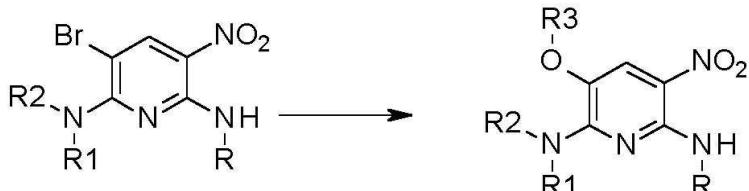
NBS(2.04 g, 11.46 mmol, 1.3 eq.)를 무수 MeCN(150 mL) 중의 6-[3-니트로-6-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-페리딘-2-일아미노]-니코티노니트릴(Int 8, 3 g, 8.81 mmol, 1 eq.) 용액에 가하고 반응물을 r.t.에서 4h 동안 교반한다. NBS(0.31 g, 1.76 mmol, 0.2 eq.)를 가하고 반응물을 r.t.에서 추가로 16h 동안 교반한다. 형성된 침전물을 여과하고, Et₂O로 세척하고 진공하에서 공기 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0312]

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.10 (1H, br s), 8.80 (1H, m), 8.34-8.50 (3H, m), 7.72 (1H, d), 4.05-4.25 (1H, m), 3.93 (2H, m), 3.38-3.55 (2H, m), 1.70-1.87 (4H, m).

[0313]

1.2.4. 일반적인 방법 D



[0314]

[0315]

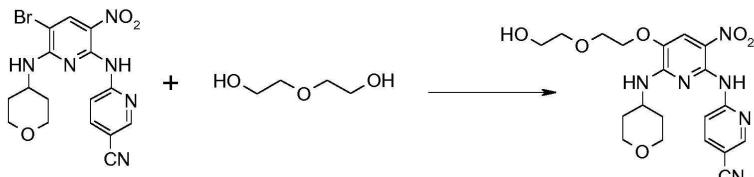
LiOtBu(3 eq.)를 무수 1,4-다이옥산 또는 용매로서 사용된 상응하는 알콜 중의 상응하는 알콜(5 eq.) 용액에 조금씩 나누어 가한다. 이어서 2-아미노-3-브로모 페리딘 유도체(1 eq.)를 가한 다음 CuI(0.6 eq.)를 가한다. 상기 반응물을 전자레인저에서 80 내지 120 °C, 또는 110 내지 150 °C에서 상기 반응의 완료시까지 가열한다. 상기 혼합물을 빙수에 끊거나 또는 HCl의 1N 수용액을 가한다. 침전물을 여과하고 진공하에서 공기 건조시킨다. 이어서 잔사를 실리카겔상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 수득한다.

[0316]

일반적인 방법 D의 예시적인 합성:

[0317]

6-[5-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-3-니트로-6-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-페리딘-2-일아미노]-니코티노니트릴(Int 19)



[0318]

[0319]

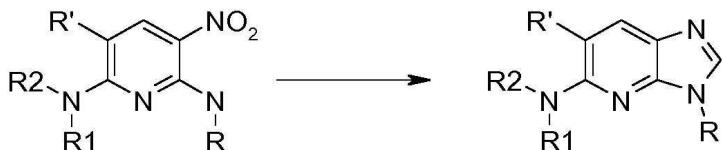
LiOtBu(2.87 g, 35.8 mmol, 3 eq.)를 무수 1,4-다이옥산(50 mL) 중의 2-(2-하이드록시-에톡시)-에탄올(5.7 mL, 59.7 mmol, 5 eq.) 용액에 조금씩 나누어 가한다. 6-[5-브로모-3-니트로-6-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-

피리딘-2-일아미노]-니코티노니트릴(Int 11, 5.0 g, 11.9 mmol, 1 eq.)에 이어서 CuI(1.36 g, 7.2 mmol, 0.6 eq.)를 가한다. 이어서 상기 반응물을 120 °C에서 4h 동안 가열한다. 상기 혼합물을 0 °C로 가열하고, 1N HCl 수용액(50 mL)을 가하고 생성 혼합물을 r.t.에서 20min 동안 교반한다. 침전물을 여과하고 진공하에서 건조시킨다. 이어서 잔사를 DCM 중의 0 내지 5%의 MeOH로 용출시키면서 실리카겔상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0320] MW (calcd): 444.45; MW (obsd): 445.18 ES+.

[0321] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.42 (1H, s), 8.75–8.79 (1H, m), 8.47–8.50 (1H, m), 8.38 (1H, dd), 7.87 (1H, d), 7.69 (1H, s), 4.58–4.72 (1H, m), 4.21–4.26 (2H, m), 4.11–4.21 (1H, m), 3.94 (2H, dd), 3.82 (2H, dd), 3.44–3.57 (6H, m), 1.81–1.90 (2H, m), 1.74 (2H, qd).

[0322] 1.2.5. 일반적인 방법 E



[0323]

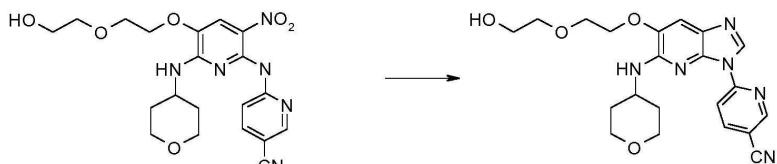
무수 MeOH 중의 2,6-다이아미노-5-나트로-피리딘 유도체(1 eq.) 용액에 트라이메틸오쏘포르메이트(0.1 mmol의 2,6-다이아미노-5-나트로-피리딘 유도체에 대해 대충 0.1 mL) 및 포름산(0.1 mmol의 2,6-다이아미노-5-나트로-피리딘 유도체에 대해 대충 0.1 mL)을 가한다. 이어서 NH₄Cl(4 eq.) 및 Zn(4 내지 5 eq.)을 가하고 상기 혼합물을 반응의 완료시까지 70 °C로 가열한다. 이어서 상기 반응 혼합물을 r.t.로 냉각시킨다.

[0325] 냉각시 침전이 관찰되는 경우, 고체를 여과하고 DCM/CHCl₃ 및 2% 포름산 수용액으로 후처리하여 목적하는 화합물을 제공한다.

[0326] 냉각시 침전이 발생하지 않는 경우, 용매를 증발시키고 이어서 잔사를 실리카겔상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 수득한다.

[0327] 일반적인 방법 E의 예시적인 합성:

[0328] 6-[6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]-니코티노니트릴(화합물 1)



[0329]

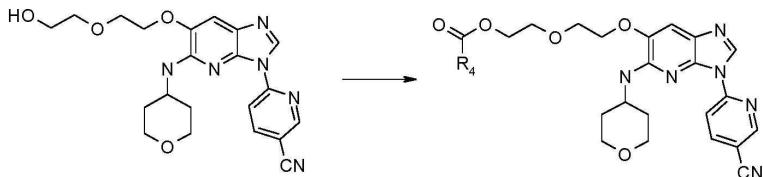
무수 MeOH(60 mL) 중의 6-[5-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-3-나트로-6-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-피리딘-2-일아미노]-니코티노니트릴(Int 19, 2.3 g, 5.2 mmol, 1 eq.) 용액에 트라이메틸오쏘포르메이트(10 mL) 및 포름산(10 mL)을 가한다. 이어서 NH₄Cl(1.1 g, 20.7 mmol, 4 eq.) 및 Zn(1.4 g, 20.7 mmol, 4 eq.)을 가하고 상기 혼합물을 2h 동안 가열 환류시킨다. NaOH(30 mL)를 가하고 반응 혼합물을 1h 동안 가열 환류시킨다.

[0331] 상기 혼합물을 r.t.으로 냉각시키고, 형성된 침전물을 여과하고 진공하에서 건조시킨다. MeOH(100 mL) 및 포름산(2 mL)을 가하고 생성 혼합물을 1h 동안 환류하에서 교반한다. 상기 혼합물을 r.t.으로 냉각시키고 빙수에 붓고 형성된 침전물을 여과하고 진공하에서 건조시킨다. 상기 고체를 DCM 및 CHCl₃의 혼합물에 혼탁시키고, 셀라이트를 통해 여과하고 여액을 2% 포름산 수용액으로 세척한다. 유기상을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0332] MW (calcd): 424.46; MW (obsd): 425.40 ES+

[0333] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.89–8.95 (1H, m), 8.75 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.59 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.61–4.69 (1H, m), 4.22 (2H, dd), 4.05–4.17 (1H, m), 3.90–3.98 (2H, m), 3.83 (2H, dd), 3.50–3.60 (6H, m), 1.99 (2H, m), 1.55–1.70 (2H, m).

1.2.6. 일반적인 방법 F

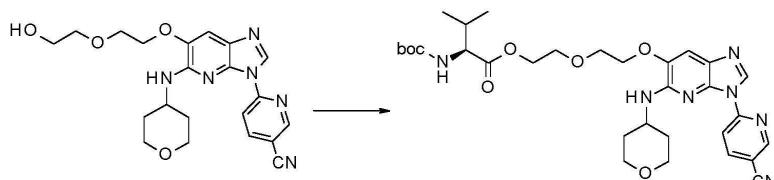


[0335]

[0336] 화합물 1, 상응하는 카복실산(1.5 eq.), DMAP(1.5 eq.) 및 EDCI(2.25 eq.)의 혼합물을 반응의 완료시까지 r.t.에서 DMC 중에서 교반한다. 상기 반응물을 H₂O로 급냉시키고, DCM으로 추출하고, 이어서 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고 증발 건조시킨다. 잔사를 실리카겔상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 목적하는 화합물을 수득한다.

[0337] 일반적인 방법 F의 예시적인 합성:

[0338] (S)-2-3급-부톡시카보닐아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-페리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터(Int 30)



[0339]

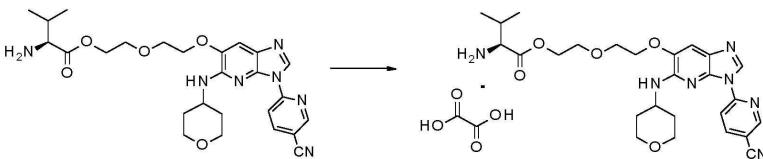
[0340] 화합물 1(42 mg, 0.1 mmol, 1 eq.), boc-(S)-발린(33 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.), DMAP(19 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.) 및 EDCI(45 mg, 0.225 mmol, 2.25 eq.)의 혼합물을 r.t.에서 3h 동안 DCM(5 mL) 중에서 교반한다. 상기 반응물을 H₂O로 급냉시키고, DCM으로 추출하고, 이어서 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고 증발 건조시킨다. 잔사를 햅탄 중 0 내지 100%의 EtOAc로 용출시키면서 실리카겔상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

1.2.7. 일반적인 방법 G: 염화 방법

[0342] 출발 물질을 고온 EtOAc 또는 EtOAc와 MeOH(5/1)의 고온 혼합물에 용해시킨다. 옥살산(EtOAc 중의 0.2 M, 1 eq.)을 상기 고온 용액에 가한다. 침전물이 형성되며, 이를 여과하고, Et₂O로 세정하고 건조시켜 목적하는 화합물을 상기 출발 물질의 옥살산염으로서 제공한다.

[0343] 일반적인 방법 G의 예시적인 합성:

[0344] (S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-페리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터 옥살산염(화합물 10)

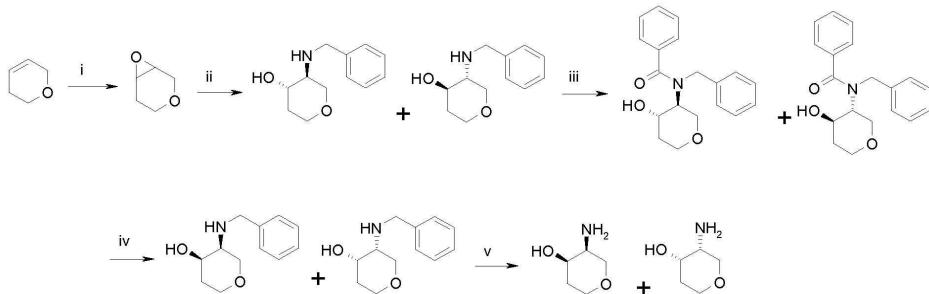


[0345]

[0346] 화합물 9(100 mg, 0.19 mmol, 1 eq.)를 고온 EtOAc(10 mL)에 용해시키고 옥살산(EtOAc 중의 0.2 M, 0.96 mL, 0.19 mmol, 1 eq.)을 상기 고온 용액에 가한다. 상기 형성된 침전물을 여과하고, Et₂O로 세정하고 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0347]

1.2.8. (3,4 시스)-3-아미노-테트라하이드로-페란-4-올(Int 28)의 합성



[0348]

단계 i): 3,7-다이옥사-바이사이클로[4.1.0]헵탄

[0350]

DCM(15 mL) 중의 m-클로로페벤조산(23.51 g, 136.2 mmol, 2 eq.) 용액에 DCM(10 mL) 중의 3,6-다이하이드로-2H-페란(5.73 g, 68.1 mmol, 1 eq.) 용액을 가한다. 상기 반응 혼합물을 r.t.에서 6h 동안 교반하고, 그 후에 m-클로로페벤조산(11.76 g, 68.1 mmol, 1 eq.)을 가한다. 상기 반응 혼합물을 r.t.에서 16h 동안 교반하고 여과한다. 여액을 Na_2SO_3 , NaHCO_3 및 물의 포화 용액으로 세척한다. 이어서 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 여과하고 진공하에서 농축시켜 목적하는 화합물을 제공하고, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에 사용한다.

[0351] 단계 ii): (3,4-트랜스)-3-벤질아미노-테트라하이드로-페란-4-올

[0352]

EtOH(10 mL) 중의 3,7-다이옥사-바이사이클로[4.1.0]헵탄(2.7 mmol, 1 eq.) 및 벤질아민($300 \mu\text{l}$, 2.7 mmol, 1 eq.) 혼합물을 환류 온도에서 18h 동안 가열한다. 이어서 EtOH를 증발시키고 조물질을 DCM:MeOH:NH₄OH 10:1:0.1로 용출시키면서 실리카겔상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0353] 단계 iii): N-벤질-N-((3,4 트랜스)-4-하이드록시-테트라하이드로-페란-3-일)-벤즈아미드

[0354]

염화 벤조일($78 \mu\text{l}$, 0.68 mmol, 1 eq.)을 DCM(2 mL) 중의 선행 단계로부터의 (3,4 항)-3-벤질아미노-테트라하이드로-페란-4-올(140 mg, 0.68 mmol, 1 eq.) 및 TEA($280 \mu\text{l}$, 2.03 mmol, 3 eq.)의 냉냉 용액에 적가한다. 상기 반응 혼합물을 r.t.에서 1h 동안 교반한다. 이어서 상기 혼합물을 2N 수성 HCl 용액으로 2회 세척한다. 수성층을 DCM으로 추출하고, 이어서 합한 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 진공하에서 농축시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0355] 단계 iv): (3,4 시스)-3-벤질아미노-테트라하이드로-페란-4-올

[0356]

DCM(2.5 mL) 중의 N-벤질-N-((3,4 트랜스)-4-하이드록시-테트라하이드로-페란-3-일)-벤즈아미드(220 mg, 0.71 mmol, 1 eq.) 용액을 0 °C에서 염화 티오닐($195 \mu\text{l}$, 2.68 mmol, 3.8 eq.)에 적가한다. 반응 혼합물을 r.t.에서 4h 동안 교반하고 이어서 진공하에서 농축시킨다. 상기 잔사에 6N 수성 HCl 용액(2 mL)을 가하고, 생성 혼합물을 실온에서 18h 동안 가열한다. 냉각 후에, 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 여액을 EtOAc로 추출한다. 상기 수성 층에 Et₂O를 가하고 2N NaOH 수용액을 가하여 상기 혼합물을 알칼리성으로 만든다. 상들이 분리되며 수성상을 DCM 및 EtOAc로 추출한다. 이어서 합한 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 진공하에서 농축시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

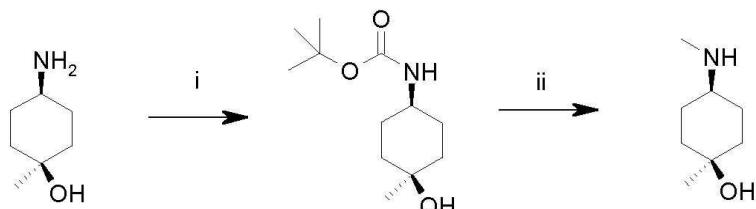
[0357] 단계 v): (3,4 시스)-3-아미노-테트라하이드로-페란-4-올

[0358]

MeOH(3 mL) 중의 (3,4 시스)-3-벤질아미노-테트라하이드로-페란-4-올(100 mg, 0.48 mmol, 1 eq.) 용액을 1 atm의 H_2 하에 r.t.에서 1.5h 동안 10% Pd/C(40 mg)상에서 수소화시킨다. 촉매를 셀라이트를 통한 여과에 의해 제거하고, MeOH로 세척하고 여액을 증발시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0359]

1.2.9. (시스-1,4)-1-메틸-4-메틸아미노-사이클로헥산올(Int 29)의 합성



[0360]

[0361]

단계 i) (시스-1,4)-(4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)-카bam산 3급-부틸 에스터

[0362]

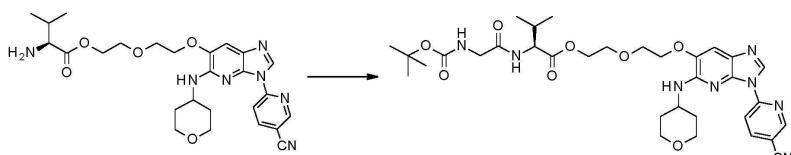
MeCN(15 mL) 중의 시스-4-아미노-1-메틸사이클로헥산올(1.0 g, 7.74 mmol, 1 eq.)의 혼탁액에 다이-3급-부틸 다이카보네이트(1.85 g, 8.47 mmol, 1.1 eq.)를 가하고 상기 혼합물을 r.t.에서 16h 동안 교반한다. 침전물을 여과하고, 헥산으로 세척하고 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0363] 단계 ii): (시스-1,4)-1-메틸-4-메틸아미노-사이클로헥산올

THF(7 mL, 14.0 mmol, 4.9 eq.) 중의 LiAlH₄의 2.0 M 용액에 r.t.에서 (시스-1,4)-(4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)-카bam산 3급-부틸 에스터(600 mg, 2.9 mmol, 1 eq.)를 나누어 가한다. 반응 혼합물을 r.t.에서 1h 동안 및 환류하에서 45min 동안 교반한다. 상기 반응 혼합물을 r.t.으로 냉각시키고, 이어서 물 및 THF를 가한다. 상기 침전물을 여과하고 THF로 세척한다. 상기 여액을 농축건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0365]

1.2.10. 중간체 34: 2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸(2S)-2-[2-(3급-부톡시카보닐아미노)아세틸]아미노]-3-메틸-부타노에이트



[0366]

[0367]

화합물 9(170 mg, 0.40 mmol, 1 eq.), 2-(3급-부톡시카보닐아미노)아세트산(Boc-Gly-OH, 105 mg, 0.60 mmol, 1.5 eq.), EDCI(173 mg, 0.90 mmol, 2.25 eq.) 및 DMAP(73 mg, 0.6 mmol, 1.5 eq.)를 DCM(4 mL) 중에서 혼합하고 r.t.에서 밤새 교반한다. 상기 반응물을 염수로 급냉시키고, DCM로 추출하고 합한 유기상들을 증발시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

표 2

[0368]

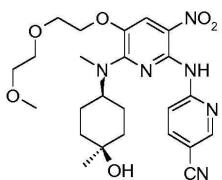
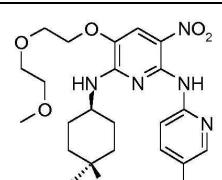
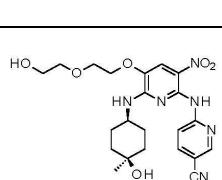
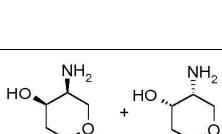
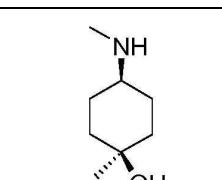
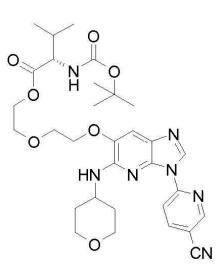
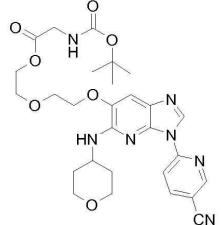
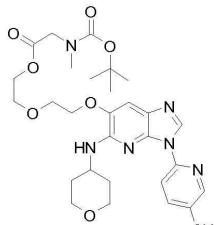
본 발명의 화합물에 대해 사용되는 중간체들 (SM = 출발 물질, Mtd = 방법, MS Mes'd = 측정된 질량)

Int#	구조	명칭	SM	Mtd	MW	Ms Mes'd
1		6-[(6-클로로-3-니트로-2-파리딜)]파리딘-3-카보니트릴	2,6-다이클로로-3-니트로파리딘	A	275.7	276.3
2		6-[[6-[(시스-3,4-디하이드로-4-하이드록시-2-옥시-1-파이록산-2-일)아미노]-3-니트로-2-파리딜]]파리딘-3-카보니트릴	Int 1 + Int 28	B	356.3	357.4

3		6-[[6-[(1,1-다이옥소티안-4-)아미노]-3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1	B	388.4	389.2
4		6-[[6-[(시스-1,4)-4-4--]--]3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1 + Int 29	B	382.4	-
5		6-[[6-[(시스-1,4)-4-4--]--]3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1	B	368.4	-
6		6-[[6-[(3-하이드록시사이클로헥실)아미노]-3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1	B	354.4	355.4
7		6-[[6-[(4,4-다이플루오로사이클로헥실)아미노]-3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1	B	374.4	375.4
8		6-[[3-니트로-6-(테트라하이드로페란-4-일)아미노]-3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1	B	340.3	341.4
9		6-[[6-[메틸(테트라하이드로페란-4-일)아미노]-3-니트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 1	B	354.4	-

10		6-[[5-브로모-6-[(시스-3,4)-4-하이드록시테트라하이드로피란-3-일]아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 2	C	435.2 437.3	435.4 437.3
11		6-[[5-브로모-6-(태트라하이드로피란-4-일)아미노]-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 8	C	419.2	419.5 421.4
12		6-[[5-브로모-6-[(1,1-다이옥소티안-4-일)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 3	C	467.3	467.2 469.3
13		6-[[5-브로모-6-[(4-하이드록시-1-메틸사이클로헥실)메틸-아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 4	C	461.3	-
14		6-[[5-브로모-6-[((시스1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 5	C	447.3	-
15		6-[[5-브로모-6-[((시스1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 6	C	433.3	433.4 435.4
16		6-[[5-브로모-6-[(4,4-다이플루오로사이클로헥실)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 7	C	453.3 455.3	453.3 455.3

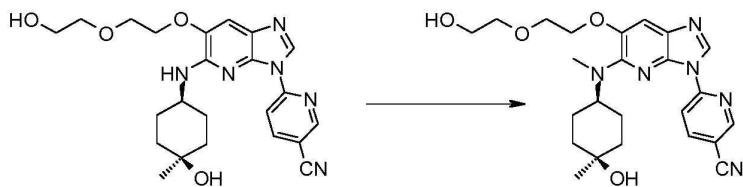
17		6-[[5-브로모-6-[메틸(테트라하이드로피란-4-일)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 9	C	433.3 435.4	433.4 435.4
18		6-[[5-[2-(2-하이드록시에톡시에톡시)에톡시]-6-[(시스-3,4)-4-하이드록시테트라하이드로피란-3-일]아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 10	D	460.5	-
19		6-[[5-[2-(2-하이드록시에톡시에톡시)에톡시]-3-니트로-6-(테트라하이드로피란-4-일아미노)-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 11	D	444.5	445.2
20		6-[[6-[(1,1-다이옥소티안-4-일)아미노]-5-[2-(2-하이드록시에톡시에톡시)에톡시]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 12	D	492.5	493.6
21		6-[[5-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-6-[메틸(테트라하이드로피란-4-일)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 17	D	472.5	473.6
22		6-[[5-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-3-니트로-6-(테트라하이드로피란-4-일아미노)-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 11	D	458.5	459.5
23		6-[[6-[(3-하이드록시프로필)아미노]-5-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 15	D	458.5	459.5
24		6-[[6-[(4,4-다이플루오로사이클로헥실)아미노]-5-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 16	D	478.5	479.5

25		6-[6-[((시스1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)-메틸-아미노]-5-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 13	D	500.6	-
26		6-[6-[((시스1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)아미노]-5-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 14	D	486.5	-
27		6-[5-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-6-[(시스1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)아미노]-3-니트로-2-파리딜]아미노]파리딘-3-카보니트릴	Int 14	D	472.5	-
28		(3,4-시스)-3-아미노-4-올 + HO-2H-파란-4-올 → 3,6-다이하이드로-2H-파란-4-올	3,6-다 이하 이 드로- 2H-파 란	실시예 1.2.8	117.2	-
29		(시스-1,4)-1-메틸-4-메틸아미노-사이클로헥산올	시스-4-아미노-1-메틸사이클로헥산올	실시예 1.2.9	143.2	-
30		2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노에이트	Cpd 1	F	623.7	624.9
31		2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(3급-부톡시카보닐아미노)아세테이트	Cpd 1	F	581.6	582.7
32		2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-[3급-부톡시카보닐(메틸)아미노]아세테이트	Cpd 1	F	595.7	596.7

33		01-3-부틸 02-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸] (2S)-파롤리딘-1,2-다이카복실레이트	Cpd 1	F	621.6	622.8
34		2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸] (2S)-2-[2-[3-부톡시카보닐아미노]아세틸]아미노]-3-메틸-부타노에이트	Cpd 9	실시예 1.2.10	680.8	681.8
35		04-3-부틸 01-[2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸] (2S)-2-[3-부톡시카보닐아미노]부탄다이오에이트	Cpd 1	F	695.8	696.9
36		05-3-부틸 01-[2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸] (2S)-2-[3-부톡시카보닐아미노]펜坦다이오에이트	Cpd 1	F	709.8	710.8
37		04-3-부틸 01-[2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]에틸] 부탄다이오에이트	Cpd 1	F	580.6	581.7

[0369] 실시예 2. 본 발명 화합물의 제조

[0370] 2.1. 화합물 3: 6-{6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)-메틸-아미노]-이미다조[4,5-b]파리딘-3-일}-니코티노니트릴

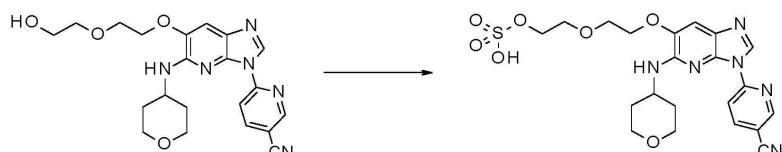


[0371]

[0372] 포름알데하이드($3.1 \mu\ell$, 0.11 mmol, 1 eq.)를 TFA/DCM(2 $\mu\ell$, 1/1)의 혼합물 중의 화합물 12(50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) 용액에 가한다. r.t.에서 30min 동안 교반 후, NaBH(OAc)₃(47 mg, 0.22 mmol, 2 eq.)를 가하고 반응물을 r.t.에서 1h 동안 교반한다. 이어서 상기 반응 혼합물을 증발건조시키고 조 생성물을 예비 HPLC-MS에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 수득한다.

[0373]

2.2. 화합물 8: 황산 모노-(2-[3-(5-시아노-파리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-6-일옥시]-에톡시)-에틸 에스터

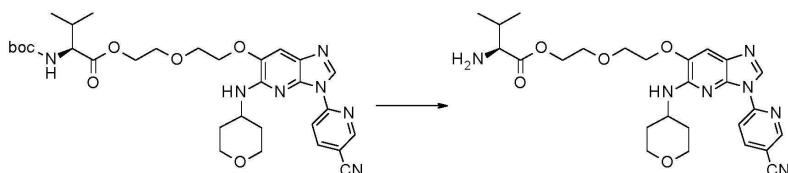


[0374]

[0375] 화합물 1(84 mg, 0.2 mmol, 1 eq.)을 파리딘(5 $\mu\ell$) 중의 파리딘-SO₃ 복합체(127 mg, 0.8 mmol, 4 eq.) 용액에 가하고 반응물을 16h 동안 가열 환류시킨다. 이어서 상기 혼합물을 증발건조시키고 100% EtOAc에서 100%(DCM/MeOH/AcOH/H₂O:90/10/1/1) 이어서 100%(DCM/MeOH/AcOH/H₂O:85/15/2/2)로 용출시키면서 실리카겔상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0376]

2.3. 화합물 9: (S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-파리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-페란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸 에스터

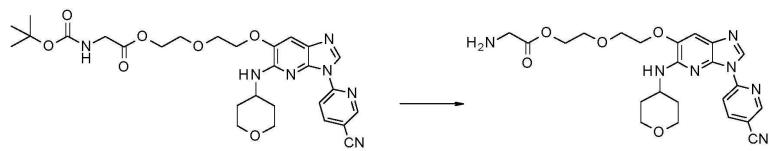


[0377]

[0378] TFA(0.5 $\mu\ell$)를 DCM(10 $\mu\ell$) 중의 Int 30(20 mg, 0.032 mmol, 1 eq.) 용액에 가하고 상기 혼합물을 r.t.에서 1h 동안 교반한다. 상기 반응물을 NaHCO₃의 포화된 수용액으로 급냉시키고 EtOAc로 추출한다. 유기층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고 증발건조시킨다. 잔사를 펜탄 중의 DCM/Et₂O 용매 시스템으로부터 재결정화시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0379]

2.4. 화합물 16: 2-[2-[3-(5-시아노-2-파리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]파리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-아미노아세테이트

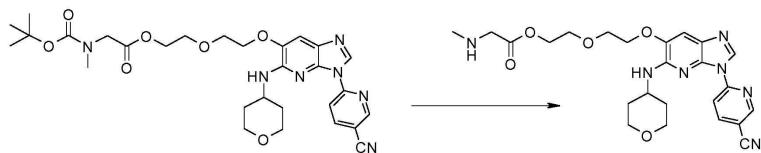


[0380]

[0381] Int31(195 mg, 0.34 mmol, 1 eq.)을 TFA/DCM 혼합물(1/5 $\mu\ell$)에 놓고 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 이어서 상기 반응 혼합물을 톨루엔으로 희석하고 증발 건조시킨다. 잔사를 DCM에 용해시키고, 포화된 NaHCO₃ 수 용액으로 세척하고 유기상을 증발 건조시킨다. 잔사를 최소량의 DCM에 용해시키고, 다량의 Et₂O를 가하고 형성된 고체를 플라스크의 바닥에 정착시킨다. 용매를 조심스럽게 제거하여, 상기 플라스크 중에 고체를 남기고,

펜탄을 가하고 상기 고체를 여과하여 목적하는 화합물을 제공한다.

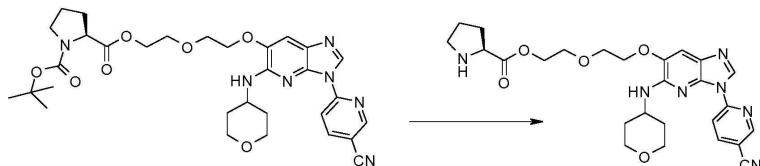
- [0382] 2.5. 화합물 17: 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(메틸아미노)아세테이트



[0383]

- [0384] Int 32(205 mg, 0.34 mmol, 1 eq.)를 TFA/DCM 혼합물(1/5 ml)에 넣고 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 이어서 상기 반응 혼합물을 톨루엔으로 희석하고 증발 건조시킨다. 잔사를 DCM에 용해시키고, 포화된 NaHCO₃ 수용액으로 세척하고 유기상을 증발건조시킨다. 잔사를 최소량의 DCM에 용해시키고, 다량의 Et₂O를 가하고 형성된 고체를 플라스크의 바닥에 정착시킨다. 용매를 조심스럽게 제거하여, 상기 플라스크 중에 고체를 남기고, 펜탄을 가하고 상기 고체를 여과하여 목적하는 화합물을 제공한다.

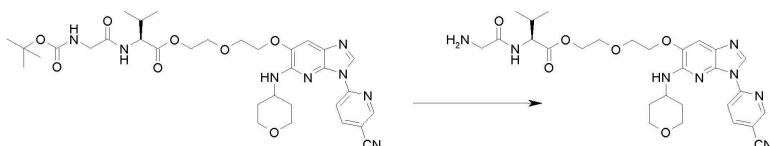
- [0385] 2.6. 화합물 18: 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 (2S)-페롤리딘-2-카복실레이트



[0386]

- [0387] Int 33(211 mg, 0.34 mmol, 1 eq.)를 TFA/DCM 혼합물(1/5 ml)에 넣고 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 이어서 상기 반응 혼합물을 톨루엔으로 희석하고 증발 건조시킨다. 잔사를 DCM에 용해시키고, 포화된 NaHCO₃ 수용액으로 세척하고 유기상을 증발건조시킨다. 잔사를 최소량의 DCM에 용해시키고, 다량의 Et₂O를 가하고 형성된 고체를 플라스크의 바닥에 정착시킨다. 용매를 조심스럽게 제거하여, 상기 플라스크 중에 고체를 남기고, 펜탄을 가하고 상기 고체를 여과하여 목적하는 화합물을 제공한다.

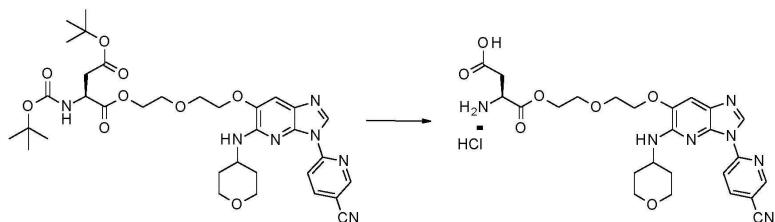
- [0388] 2.7. 화합물 19: 2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 (2S)-2-[(2-아미노아세틸)아미노]-3-메틸-부타노에이트



[0389]

- [0390] Int 34(212 mg, 0.31 mmol, 1 eq.)를 TFA/DCM 혼합물(1/5 ml)에 넣고 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 이어서 톨루엔을 가하고 용매를 증발 건조시킨다. 잔사를 DCM에 용해시키고, 포화된 NaHCO₃ 수용액의 첨가 후에 고체가 침전된다. 이를 여과하고 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

- [0391] 2.8. 화합물 27: (3S)-3-아미노-4-[2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-4-옥소-부탄산 염산염

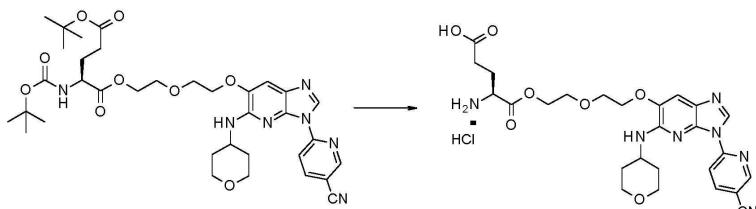


[0392]

[0393] 1,4-다이옥산 중의 HCl 용액(4 M, 0.4 mL, 1.6 mmol, 5 eq.)을 1,4-다이옥산(4 mL) 중의 Int 35(222 mg, 0.32 mmol, 1 eq.)에 가한다. 상기 혼합물을 r.t.에서 3h 동안 교반하고 이어서 증발건조시킨다. 잔사를 1,4-다이옥산 중의 HCl 용액(4 M, 6 mL)에 용해시키고, 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반하고 1,4-다이옥산 중의 HCl 용액(4 M, 2 mL)을 더 가한다. r.t.에서 1h 교반후에, 상기 용매를 증발 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0394]

2.9. 화합물 28: 4S)-4-아미노-5-[2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에톡시]-5-옥소-펜탄산 염산염

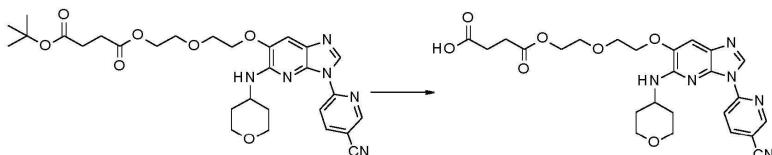


[0395]

[0396] 1,4-다이옥산 중의 HCl 용액(4 M, 0.41 mL, 1.63 mmol, 5 eq.)을 1,4-다이옥산(4 mL) 중의 Int 36(232 mg, 0.33 mmol, 1 eq.)에 가한다. 상기 혼합물을 r.t.에서 3h 동안 교반하고 이어서 증발건조시킨다. 잔사를 1,4-다이옥산 중의 HCl 용액(4 M, 6 mL)에 용해시키고, 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 상기 용매를 증발 건조시켜 목적하는 화합물을 제공한다.

[0397]

2.10. 화합물 33: 4-[2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에톡시]-4-옥소-부탄산



[0398]

[0399] Int 37(90 mg, 0.16 mmol, 1 eq.)을 TFA/DCM 혼합물(1/5 mL)에 넣고 반응물을 r.t.에서 2h 동안 교반한다. 이어서 톨루엔을 가하고 용매를 증발 건조시킨다. 잔사를 DCM 중의 0 내지 6% MeOH로 용출시키면서 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제시키고, 수득된 생성물을 MeOH로부터 침전시켜 여과 후에 목적하는 화합물을 제공한다.

표 3

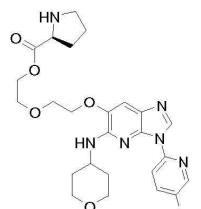
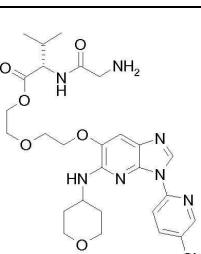
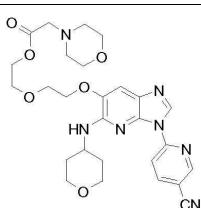
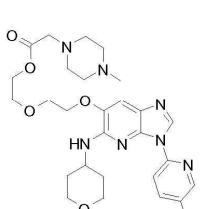
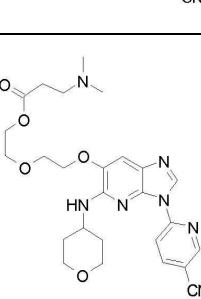
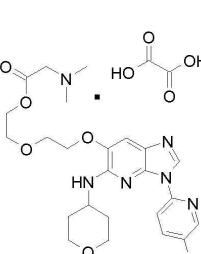
[0400]

본 발명의 예시적인 화합물들 (SM = 출발 물질, Mtd = 방법, MS Mes'd = 측정된 질량)

Int #	구조	명칭	SM	Mtd	MW	Ms Mes'd
1		6-[[5-브로모-6-[(1,1-다이옥소티안-4-일)아미노]-3-나트로-2-페리딜]아미노]페리딘-3-카보니트릴	Int 19	E	424.5	ES+ 425.4

2		6-{5-(1,1-다이옥소-테트라하이드로-2H-티오피란-4-일아미노)-6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일}-니코티노니트릴	Int 20	E	472.5	ES+ 473.6 ES- 471.5
3		6-{6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-5-[(시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸-사이클로헥실)-메틸-아미노]-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일}-니코티노니트릴	Cpd 12	실시예 2.1	466.5	ES+ 467.6
4		6-{6-[2-(2-메톡시-에톡시)-에톡시]-5-[메틸-(테트라하이드로-피란-4-일)-아미노]-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일}-니코티노니트릴	Int 21	E	452.5	453.6
5		6-[6-[2-(2-메톡시-에톡시)-에톡시]-5-(테트라하이드로-피란-4-일아미노)-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]-니코티노니트릴	Int 22	E	438.5	ES+ 439.5 ES- 437.5
6		6-{5-(3-하이드록시-사이클로헥실아미노)-6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일}-니코티노니트릴	Int 23	E	438.5	ES+ 439.49
7		6-{5-(4,4-다이플루오로-사이클로헥실아미노)-6-[2-(2-하이드록시-에톡시)-에톡시]-이미다조[4,5-b]피리딘-3-일}-니코티노니트릴	Int 24	E	458.5	ES+ 459.5 ES- 457.4
8		황산모노-(2-{2-[3-(5-시아노-피리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-피란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸) 에스터	Cpd 1	실시예 2.2	504.5	ES+ 505.4 ES- 503.4
9		(S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-피리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-피란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸에스터	Int 30	실시예 2.3	523.6	ES+ 524.6 ES- 522.6

10		(S)-2-아미노-3-메틸-부티르산 2-{2-[3-(5-시아노-피리딘-2-일)-5-(테트라하이드로-파란-4-일아미노)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일옥시]-에톡시}-에틸에스터 옥살산염	Cpd 9	G	613.6	524.4
11		6-[6-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-5-[(시스-3,4)-4-하이드록시테트라하이드로파란-3-일]아미노]이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]피리딘-3-카보니트릴	Int 18	E	440.5	441.3
12		6-[6-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸사이클로헥실)아미노]이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]피리딘-3-카보니트릴	Int 27	E	452.5	453.0
13		6-[5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸사이클로헥실)-메틸-아미노]-6-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]피리딘-3-카보니트릴	Int 25	E	480.6	481.4
14		6-[5-[((시스-1,4)-4-하이드록시-4-메틸사이클로헥실)아미노]-6-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]이미다조[4,5-b]피리딘-3-일]피리딘-3-카보니트릴	Int 26	E	466.5	467.3
15		2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-(다이메틸아미노)아세테이트	Cpd 1	F	509.6	510.4
16		2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로파란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]-에틸 2-아미노아세테이트	Int 31	실시예 2.4	481.5	482.4

17		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(메틸아미노)아세테이트	Int 32	실시예 2.5	495.5	496.3
18		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 (2S)-페롤리딘-2-카복실레이트	Int 33	실시예 2.6	521.6	522.5
19		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 (2S)-2-[(2-아미노아세틸)아미노]-3-메틸-부탄에이트	Int 34	실시예 2.7	580.6	603.4(M+ Na)
20		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-모폴리노아세테이트	Cpd 1	F	551.6	552.4
21		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(4-메틸페페라진-1-일)아세테이트	Cpd 1	F	564.6	565.3
22		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 3-(다이메틸아미노)프로파노에이트	Cpd 1	F	523.6	524.3
23		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(다이메틸아미노)아세테이트 옥살산염	Cpd 15	G	599.6	ES+ 510.3

24		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-아미노아세테이트옥살산염	Cpd 16	G	571.6	ES+ 482.3
25		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(메틸아미노)아세테이트옥살산염	Cpd 17	G	585.6	ES+ 496.3
26		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 (2S)-피롤리딘-2-카복실레이트옥살산염	Cpd 18	G	611.6	ES+ 522.3
27		(3S)-3-아미노-4-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-4-옥소부탄산염	Int 35	실시예 2.8	576.0	ES+ 540.5
28		(4S)-4-아미노-5-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]-5-옥소-펜탄산염	Int 36	실시예 2.9	590.0	ES+
29		2-[2-[3-(5-시아노-2-페리딜)-5-(테트라하이드로페란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]페리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 (2S)-2-[(2-아미노아세틸)아미노]-3-메틸-부타노에이트옥살산염	Cpd 19	F	670.6	ES+ 581.4

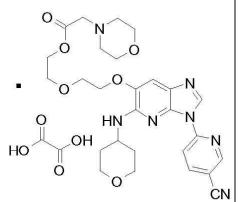
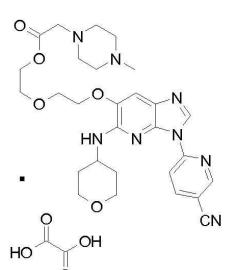
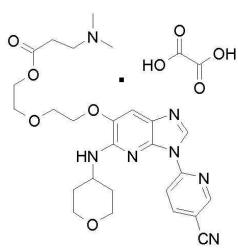
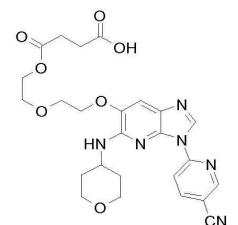
30		2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로피란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-모폴리노아세테이트 옥살산염	Cpd 20	G	641.6	ES+ 510.3
31		2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로피란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 2-(4-메틸페라진-1-일)아세테이트 옥살산염	Cpd 21	G	654.6	ES+ 565.6
32		2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로피란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]에틸 3-(다이메틸아미노)프로파노에이트 옥살산염	Cpd 22	G	613.6	ES+ 524.4
33		4-[2-[2-[3-(5-시아노-2-피리딜)-5-(테트라하이드로피란-4-일아미노)이미다조[4,5-b]피리딘-6-일]옥시에톡시]-4-옥소-부탄산	Int 37	실시예 2.10	524.5	ES+ 525.3

표 4

본 발명의 전형적인 화합물들의 NMR 데이터

Cpd #	NMR 데이터
1	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.89-8.95 (1H, m), 8.75 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.59 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.61-4.69 (1H, m), 4.22 (2H, dd), 4.05-4.17 (1H, m), 3.90-3.98 (2H, m), 3.83 (2H, dd), 3.50-3.60 (6H, m), 1.98-2.01 (2H, m), 1.55-1.70 (2H, m)
2	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.87-9.06 (2H, m), 8.63 (1H), 7.65 (1H, br s), 6.38 (1H, d), 4.64 (1H, br s), 4.17-4.30 (3H, m), 3.80-3.88 (2H, m), 3.50-3.60 (4H, m), 3.40-3.48 (2H, m), 3.09-3.19 (3H, m), 2.15-2.35 (4H, m)
3	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.98-9.03 (1H, m), 8.94 (1H), 8.87 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.66 (1H, s), 4.58-4.70 (1H, m), 4.13-4.22 (2H, m), 4.08 (1H, s), 3.85-3.96 (1H, m), 3.80 (2H, dd), 3.46-3.58 (4H, m), 2.93 (3H, s), 1.91-2.07 (2H, m), 1.62 (2H, d), 1.50 (2H, d), 1.35-1.45 (2H, m), 1.13 (3H, s)
4	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 9.02-9.11 (1H, m), 8.93 (1H, s), 8.75 (1H, d), 8.13 (1H, dd), 7.51 (1H, s), 4.16-4.29 (3H, m), 4.09 (2H, dd), 3.85-3.97 (2H, m), 3.67-3.74 (2H, m), 3.55-3.63 (2H, m), 3.41-3.55 (2H, m), 3.40 (3H, s), 3.00 (3H, s), 2.01 (2H, qd), 1.76 (2H, dd)

5	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.00 (1H, dd), 8.92 (1H, dd), 8.76 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.00 (1H), 4.21 (2H, dd), 4.06-4.17 (1H, m), 3.90-3.97 (2H, m), 3.80-3.84 (2H, m), 3.61-3.66 (2H, m), 3.54 (2H, td), 3.47-3.51 (2H, m), 3.27 (3H, s), 1.99 (2H, dd), 1.54-1.67 (2H, m)
6	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 8.99 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.74 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.55 (1H, s), 6.19 (1H, d), 4.72 (1H, d), 4.61-4.68 (1H, m), 4.15-4.23 (2H, m), 3.89-4.02 (1H, m), 3.77-3.87 (2H, m), 3.67 (1H, td), 3.50-3.57 (4H, m), 2.17 (1H, d), 1.87-1.96 (1H, m), 1.71-1.86 (2H, m), 1.14-1.45 (4H, m)
7	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 8.86-9.07 (2H, m), 8.76 (1H, br s), 8.63 (1H, d), 7.58 (1H, br s), 6.13 (1H, d), 4.51-4.76 (1H, m), 4.13-4.26 (2H, m), 3.72-3.94 (2H, m), 3.47-3.63 (5H, m), 2.09 (8H, m)
8	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD) d 9.03 (1H, d), 8.88-8.95 (1H, br s), 8.84 (1H, d), 8.41 (1H, dd), 7.46 (1H, br s), 4.14-4.36 (5H, m), 3.95-4.12 (4H, m), 3.86 (2H, dd), 3.60-3.76 (2H, m), 2.12 (2H, d), 1.64-1.85 (2H, m)
9	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.02 (1H, d), 8.83 (1H, s), 8.76 (1H, br s), 8.13 (1H, d), 7.42 (1H, br s), 5.31 (1H, d), 4.36 (2H, br s), 4.24 (2H, br s), 4.18 (1H, br s), 4.08 (2H, d), 3.91 (2H, br s), 3.81 (2H, d), 3.62 (2H, t), 3.36 (1H, d), 2.16 (2H, d), 2.05 (1H, d), 1.26 (2H, br s), 0.98 (3H, d), 0.91 (3H, d)
10	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.00 (1H, d), 4.40-4.46 (1H, m), 4.21-4.31 (3H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.91-3.99 (2H, m), 3.85-3.90 (2H, m), 3.83 (1H, s), 3.75-3.80 (2H, m), 3.51-3.60 (2H, m), 2.04-2.15 (1H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m), 0.89-0.98 (6H, m)
11	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) d 9.00 (1H, d), 8.84 (1H, d), 8.76 (1H, s), 8.59 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 5.80 (1H, d), 5.25 (1H, br s), 4.65 (1H, br s), 4.20-4.27 (2H, m), 4.16 (1H, tt), 4.02-4.10 (1H, m), 3.79-3.84 (2H, m), 3.66-3.75 (2H, m), 3.56-3.62 (2H, m), 3.54 (4H, s), 1.82-1.94 (1H, m), 1.65-1.76 (1H, m)
12	¹ H NMR (600 MHz, DMSO-d ₆) d 8.86-8.99 (2H, m), 8.69 (1H, s), 8.49-8.58 (1H, m), 7.50 (1H, s), 5.82 (1H, d), 4.58-4.71 (1H, m), 4.17 (2H, d), 4.11 (1H, s), 3.81 (2H, d), 3.68-3.77 (1H, m), 3.53 (4H, s), 1.71-1.86 (4H, m), 1.62 (2H, d), 1.44-1.53 (2H, m), 1.17 (3H, s)
13	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) d 9.00 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.87 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.65 (1H, s), 4.11-4.21 (2H, m), 4.08 (1H, s), 3.89 (1H, tt), 3.72-3.82 (2H, m), 3.55-3.62 (2H, m), 3.44-3.50 (2H, m), 3.25 (3H, s), 2.93 (3H, s), 1.99 (2H, qd), 1.62 (2H, d), 1.50 (2H, d), 1.40 (2H, td), 1.12 (3H, s)
14	¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) d 8.92-8.99 (2H, m), 8.73 (1H, s), 8.59 (1H, dd), 7.54 (1H, s), 5.79 (1H, d), 4.18 (2H, t), 4.08 (1H, br s), 3.80 (2H, t), 3.72-3.82 (1H, m), 3.60-3.68 (2H, m), 3.45-3.52 (2H, m), 3.26 (3H, s), 1.72-1.83 (4H, m), 1.57-1.68 (2H, m), 1.43-1.56 (2H, m), 1.17 (3H, s)
15	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.03 (1H, dd), 8.83 (1H, s), 8.76 (1H, dd), 8.14 (1H, dd), 7.40 (1H, s), 5.42 (1H, d), 4.37-4.39 (2H, m), 4.07-4.26 (5H, m), 3.93-3.95 (2H, m), 3.82-3.84 (2H, m), 3.61-3.67 (2H, m), 3.24 (2H, s), 2.37 (6H, s), 2.14-2.24 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m)
16	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.05 (1H, d), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, d), 8.16 (1H, dd), 7.44 (1H, s), 5.34 (1H, d), 4.38-4.40 (2H, m), 4.08-4.28 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.83-3.85 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.52 (2H, s), 2.37 (6H, s), 2.15-2.22 (2H, m), 1.65-1.75 (2H, m)
17	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.05 (1H, dd), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, dd), 8.16 (1H, dd), 7.43 (1H, s), 5.36 (1H, d), 4.38-4.41 (2H, m), 4.08-4.28 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.83-3.85 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.45 (2H, s), 2.48 (3H, s), 2.15-2.22 (2H, m), 1.68-1.76 (2H, m)
18	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.05 (1H, d), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, d), 8.16 (1H, dd), 7.43 (1H, s), 5.38 (1H, d), 4.37-4.40 (2H, m), 4.08-4.27 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.82-3.86 (3H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.08-3.14 (1H, m), 2.91-2.97 (1H, m), 2.12-2.21 (3H, m), 1.86-1.95 (1H, m), 1.60-1.82 (4H, m)

19	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.02 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.77 (1H, d), 8.64 (1H, dd), 8.30 (1H, br s), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 5.14 (2H, br s), 4.09- 4.35 (6H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.85-3.87 (2H, m), 3.74-3.76 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.35 (2H, br s), 1.96-2.10 (3H, m), 1.58-1.68 (2H, m), 0.85-0.88 (6H, m)
20	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.03 (1H, d), 8.83 (1H, s), 8.77 (1H, d), 8.14 (1H, dd), 7.42 (1H, s), 5.34 (1H, d), 4.36- 4.39 (2H, m), 4.07-4.26 (5H, m), 3.93-3.95 (2H, m), 3.81-3.84 (2H, m), 3.74-3.77 (4H, m), 3.61-3.67 (2H, m), 3.28 (2H, s), 2.59-2.61 (4H, m), 2.16-2.20 (2H, m), 1.65-1.75 (2H, m)
22	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) d 9.04 (1H, dd), 8.84 (1H, s), 8.77 (1H, dd), 8.14 (1H, dd), 7.42 (1H, s), 5.35 (1H, d), 4.33- 4.36 (2H, m), 4.07-4.27 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.81-3.83 (2H, m), 3.61-3.68 (4H, m), 2.54-2.68 (4H, m), 2.27 (6H, s), 2.16-2.20 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m)
23	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.00 (1H, dd), 8.92 (1H, dd), 8.77 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.02 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.06-4.18 (1H, m), 3.91-3.95 (2H, m), 3.84-3.86 (2H, m), 3.73-3.76 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, br s), 3.51-3.57 (2H, m), 2.5 (6H, s), 1.96-2.01 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m)
24	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.32-4.35 (2H, m), 4.24-4.26 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.92-3.97 (2H, m), 3.86-3.89 (2H, m), 3.84 (2H, s), 3.77-3.79 (2H, m), 3.53-3.59 (2H, m), 1.98-2.02 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
25	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.33-4.35 (2H, m), 4.23-4.26 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.92-3.98 (4H, m), 3.86-3.89 (2H, m), 3.76-3.79 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 2.58 (3H, s), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
26	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.29-4.42 (3H, m), 4.23-4.26 (2H, m), 4.10-4.18 (1H, m), 3.92-3.97 (2H, m), 3.87-3.89 (2H, m), 3.77-3.80 (2H, m), 3.53-3.59 (2H, m), 3.12-3.25 (4H, m), 2.19-2.27 (1H, m), 1.92-2.03 (3H, m), 1.81-1.89 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
28	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.04 (1H, dd), 8.92-8.94 (H, m), 8.78 (1H, s), 8.66 (1H, dd), 8.54 (3H, br s), 7.59 (1H, s), 4.38-4.43 (1H, m), 4.24-4.34 (3H, m), 4.08-4.17 (2H, m), 3.87-3.97 (4H, m), 3.77-3.80 (2H, m), 3.51-3.56 (2H, m), 2.37-2.54 (2H, m), 1.97-2.06 (4H, m), 1.59-1.69 (2H, m)
30	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.01 (1H, dd), 8.93 (1H, d), 8.77 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.08-4.18 (1H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.72-3.76 (2H, m), 3.52-3.60 (6H, m), 3.32 (2H, s), 2.53-2.57 (4H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
31	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, d), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.08-4.26 (5H, m), 3.92-3.98 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.72-3.76 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.36 (2H, s), 2.60-3.15 (11H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
32	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 9.01 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.84-3.89 (2H, m), 3.73-3.78 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.24-3.28 (2H, t), 2.82-2.86 (2H, t), 2.73 (6H, s), 1.96-2.04 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m)
33	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) d 12.19 (1H, br s), 9.02 (1H, dd), 8.94 (1H, dd), 8.77 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.08-4.25 (5H, m), 3.91-3.97 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.70-3.75 (2H, m), 3.51-3.59 (2H, m), 2.45-2.55 (4H, m), 1.96-2.03 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)

[0402] 생물학적 실시예

[0403] 실시예 3. 시험관내 분석

3.1. 인간 IRAK-4에 대한 IC₅₀ 측정[0405] IRAK-4에 대한 IC₅₀ 값을 방사능 필터 플레이트 분석에서 측정한다. 상기 분석의 원리는 [³³P]ATP 및 ATP를

사용하여 효소 IRAK-4에 의한 인산화시 RIP140 기질에 통합된 ^{33}P 의 측정이다. 통합되지 않은 ^{33}P 를, 필터 플레이트상에 상기 샘플을 로딩하고(수화기(퍼킨엘머(PerkinElmer)를 사용하여) 6회의 후속 세척 단계에 의해 제거한다. RIP140 중의 통합된 ^{33}P 를, 상기 필터 플레이트에 마이크로신트(MicroScint)(상표)-20(퍼킨엘머, 6013621)의 첨가후 섬광 카운터(탑카운트(Topcount), 퍼킨엘머)에 의해 측정한다.

[0406] 100% DMSO 모액으로부터 수 희석된(1/5 희석) 일련의 시험 화합물($20 \mu\text{M}$ 또는 $6.6 \mu\text{M}$ 최고 농도로부터 출발하여) $5 \mu\text{l}$ 를 상기 웰들에 가한다(반응 분석에서 1%의 최종 DMSO 농도). IRAK-4(카르나 바이오사이언시스(Carna Biosciences), 09-145) 및 RIP140(SEQ ID1, cf. 표 VII)을 각각 10 ng/ml 및 $4 \mu\text{M}$ 의 최종 농도로 사용한다. 상기 효소 및 기질을 25 mM 트리스 pH 7.5, 0.025% 트리톤 X-100, 5 mM MnCl_2 , 및 2 mM DTT 중에서 총 $11 \mu\text{l}$ 의 부피로 희석한다. 상기 반응을, 효소 및 기질과 동일한 완충체 중에서 희석된, $9 \mu\text{l}$ 의 $1 \mu\text{M}$ ATP(시그마, A6419-5G) + $0.25 \mu\text{Ci} [\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$ (퍼킨엘머, NEG602K001MC)의 첨가에 의해 출발시킨다. 상기 혼합물을 30°C 에서 45min 동안 배양한다. $25 \mu\text{l}$ 의 150 mM 인산(VWR, 1.00573.1000)의 첨가에 의해 상기 반응을 종료시킨다. 샘플을 필터 플레이트로 옮기고 통합된 방사능을 섬광 카운터를 사용하여 측정한다.

[0407] $10 \mu\text{M}$ 스타우로스포린(1% DMSO)을 양성 대조용(100% 억제)으로서 사용하고; 음성 대조용(0% 억제)으로서 비히클(물 + 1% DMSO)을 사용한다.

표 5

Cpd#	hIRAK-4 IC ₅₀ (nM)
1	6.35
2	25.4
3	21.7
4	523
5	13.8
6	4.85
7	14.3

Cpd#	hIRAK-4 IC ₅₀ (nM)
8	51.4
9	13.5
11	14.3
12	0.95
13	39.1
14	3.45

[0408]

[0409] 본 발명 화합물의 시험관내 인간 IRAK-4 IC₅₀

[0410] 3.2. 키나제 선택성 프로파일링(광범위 패널)

[0411] 인간 키나제의 억제를 리액션 바이올로지(REACTION BIOLOGY)(Reaction Biology Corp., 1 Great Valley Parkway, Suite 2 Malvern, PA 19355, USA)에서 방사선계측 키나제 분석에서 측정한다.

[0412] IC₅₀을 측정하기 위해서 화합물을 $10 \mu\text{M}$ (최고 농도)로부터 출발하여, 3-배 연속 희석된 10회 용량으로 시험한다. IC₅₀ 값은 남아있는 효소 활성%(DMSO 대조용에 비해)의 용량-반응 곡선을 정합시킴으로써 유도된다.

[0413] 3.3. 키나제 선택성 프로파일링(집중적인 패널)

[0414] 본 분석의 목적은 억제시 바람직하지 못한 부작용을 생성시킬 수도 있는 선택된 범위의 인간 키나제에 대한 본 발명 화합물의 활성 및 선택성을 측정하기 위한 것이다(Dy & Adjei 2013; Force & Kolaja 2011).

[0415] 3.3.1. 분석 프로토콜

[0416] 표적-외 키나제에 대한 IC₅₀ 값을 방사능 필터 플레이트 분석에서 측정한다. 상기 분석의 원리는 [$\gamma - ^{33}\text{P}$]ATP 및 ATP를 사용하여 상기 키나제 효소에 의한 인산화시 캡타이드 기질에 통합된 ^{33}P 의 측정이다. 통합되지 않은 ^{33}P 를, 필터 플레이트상에 상기 샘플을 로딩하고(수화기(퍼킨엘머)를 사용하여) 6회의 후속 세척 단계에 의해 제거한다. 상기 캡타이드 기질 중의 통합된 ^{33}P 를, 상기 필터 플레이트에 마이크로신트(상표)-20(퍼킨엘머, 6013621)의 첨가후 섬광 카운터(탑카운트, 퍼킨엘머)에 의해 측정한다.

[0417]

100% DMSO 모액으로부터 수 희석된(1/5 희석) 일련의 시험 화합물($20 \mu\text{M}$ 또는 $6.6 \mu\text{M}$ 최고 농도로부터 출발하여) $5 \mu\text{l}$ 를 상기 웰들에 가한다(반응 분석에서 1%의 최종 DMSO 농도). 효소 및 웹타이드 기질을 최적화된 농도 (cf. 표 VI)로 사용한다. 상기 효소 및 기질을 총 $11 \mu\text{l}$ 의 부피로 분석 완충제에서 희석한다. 상기 반응을, 효소 및 기질과 동일한 완충제 중에서 희석된, $9 \mu\text{l}$ 의 $1 \mu\text{M ATP} + [\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$ 의 첨가에 의해 출발시킨다. 상기 혼합물을 30°C 에서 배양한다. $25 \mu\text{l}$ 의 150 mM 인산의 첨가에 의해 상기 반응을 종료시킨다. 샘플을 필터 플레이트로 옮기고 통합된 방사능을 설팡 카운터를 사용하여 측정한다.

[0418]

상기 배양 시간, 분석 완충제 조성, 및 ATP, 효소 및 기질의 농도를 예를 들어 키나제 표적-외 분석에 대해 표 VI에 보고한다.

[0419]

$10 \mu\text{M}$ 스타우로스포린(1% DMSO)을 양성 대조용(100% 억제)으로서 사용하고; 음성 대조용(0% 억제)으로서 비히클(물 + 1% DMSO)을 사용한다.

표 6

[0420]

인간 키나제 표적-외 억제 분석을 위한 조건				
키나제, [키나제]	기질, [기질]	ATP	분석 완충제	배양 시간
ABL (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), P3049), $40 \text{ ng}/\text{ml}$	PolyGT (시그마 알드리 치, P0275), $5 \mu\text{g}/\text{ml}$	$0.5 \mu\text{M ATP} +$ $0.25 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	50 mM 트리스 pH 7.7 0.03% 트리톤 X-100 1 mM DTT 25 mM MgCl_2	60 min
오로라(Aurora) B (카 르나 바이오사이언시 즈, 05-102), $10 \text{ ng}/\text{ml}$	히스톤(Histone) H3 웹 타이드 (SEQ ID2), $0.5 \mu\text{M}$	$1.3 \mu\text{M ATP}$ $+0.25 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	25 mM 트리스 pH 7.7 0.01% 트리톤 X-100 5 mM MgCl_2 5 mM DTT	90 min
CDK2 (카르나 바이오 사이언시즈, 04-103), $30 \text{ ng}/\text{ml}$	히스톤 H1-유래된 웹타 이드 (SEQ ID3), $0.36 \mu\text{M}$	$0.1 \mu\text{M ATP}$ $+0.25 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	8 mM MOPS pH 7.0 0.01% 브리즈-35 1 mM DTT 5 mM MnCl_2	60 min
CDK9 (밀리포어(Millipore), 14-685), $230 \text{ ng}/\text{ml}$	PDKtide (SEQ ID4), $0.5 \mu\text{M}$	$0.25 \mu\text{M ATP}$ $+0.125 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	20 mM MOPS pH 7.0 0.01% 트리톤 X-100 5 mM MnCl_2	60 min
c-KIT (밀리포어, 14-559), $0.01 \text{ mU}/\mu\text{l}$	PolyGT (시그마 알드리 치, P0275), $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$	$3 \mu\text{M ATP} +$ $0.25 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	16 mM 트리스 pH 7.0 $500 \mu\text{M EDTA}$ 0.01% 트리톤 X-100 10 mM MnCl_2 1 mM DTT 10 mM MgOAc	90 min
GSK3b (카르나 바이오 사이언시즈, 04-141), $20 \text{ ng}/\text{ml}$	포스포 글리코겐 신타 제 웹타이드2 (밀리포 어, 12-241), $1.25 \mu\text{M}$	$1.5 \mu\text{M ATP}$ $+0.25 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	50 mM 트리스 pH 8.0 0.01% 브리즈-35 1 mM DTT 5 mM MgOAc	90 min
c-SRC (카르나 바이오 사이언시즈, 08-173), $8 \text{ ng}/\text{ml}$	PolyGT (시그마 알드리 치, P0275), $2 \mu\text{g}/\text{ml}$	$0.25 \mu\text{M ATP}$ $+0.125 \mu\text{Ci}/25 \mu\text{l}$ $[\gamma - ^{33}\text{P}]ATP$	25 mM MOPS pH 7.0 10 mM MnCl_2 2.5 mM DTT 0.01% 브리즈35	60 min

표 7

[0421]

인간 키나제 표적-외 억제 분석에 사용된 웹타이드 기질			
기질	서열번호	서열	제공자

RIP140 웹타이드	1	CYGVASSHLKTLLKSKVKDQ	Almac Group Ltd. 20 Seagoe Industrial Estate Craigavon BT63 5QD UK
히스톤 H3 웹타이드	2	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLC	AnaSpec Inc. 34801 Campus Drive Fremont, CA 94555 USA
히스톤 H1-유래된 웹타이드	3	GGGPATPKKAKKL	AnaSpec Inc. 34801 Campus Drive Fremont, CA 94555 USA
PDKtide	4	KTFCGTPEYLAPEVRREPRILSEEEQEMFRDFDYIADWC	Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman St. Waltham, MA 02451 USA

표 8

[0422]

본 발명의 예시적인 화합물의 시험관내 인간 키나제 표적-외 IC₅₀

Cpd#	ABL IC ₅₀ (nM)	Aurora B IC ₅₀ (nM)	CDK2 IC ₅₀ (nM)	CDK9 IC ₅₀ (nM)	GSK3b IC ₅₀ (nM)	c-SRC IC ₅₀ (nM)
1	-	-	>6670	>1330	>6670	>1330
2	-	-	>1330	712	>1330	>1330
5	2690	-	>4000	2290	>4000	>2940
6	656	-	2670	1030	>4000	754
9	633	-	>4000	639	3250	286
11	-	-	>1330	834	>1330	>1330
12	138	>1880	944	1150	>1330	477
14	-	-	1380	1390	2240	319

[0423]

3.3.2. 결론

[0424]

표 VIII의 데이터는 표 V의 데이터와 관련하여, 키나제 표적-외 대 IRAK-4에서 본 발명 화합물의 보다 낮은 억제 효능을 나타낸다. 이들 데이터는 IRAK-4에 대한 본 발명 화합물의 선택성을 입증하며, 따라서 키나제 표적-외 억제와 관련된 부작용의 위험이 제한된다.

[0425]

3.4. 세포 분석: PBMC에서 CL097 활성화된 TNF α 방출 억제

[0426]

본 발명의 화합물을, 특이적인 TLR7/8 작용물질, CL097을 사용하여 TLR 활성화시 염증성 사이토킨 TNF α의 분비를 측정하기 위해 1차 단리된 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 사용하는 세포 분석에서 시험한다. 상기 세포 배양 상등액에서 TNF α 단백질의 방출을 인간 TNF α 효소-결합된 면역흡수 분석(ELISA) 프로토콜에 의해 정량분석한다.

[0427]

3.4.1. 인간 벼피 코트로부터 인간 1차 PBMC의 단리

[0428]

인간 벼피 코트(크로아티아 수혈 약물 연구소(the Croatian Institute for Transfusion Medicine)에 의해 제공됨)를 4 °C에서 밤새 보관하고 다음날 PBMC의 단리를 위해 처리한다. PBMC를 피콜 파크(Ficoll-Paque)(상표) PLUS(GE 헬쓰케어(HealthCare), 17-1440-02)를 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 단리한다. 같은 부피의 벼피 코트를 멸균 PBS(1X)로 1:4 희석하고 35 mL을 적합한 50 mL 팔콘(Falcon)(등록상표) 튜브의 15 mL 피콜 파크 PLUS의 상단에 조심스럽게 충상화한다. 상기 튜브를 가속이나 중단없이 r.t.에서 1500 rpm에서 35min 동안 원심분리시킨다. 원심분리 후에, 상부 혈장층을 제거하고 단핵세포 고리를 조심스럽게 단리하여 새로운 팔콘(등록상표) 튜브로 옮긴다. 상기 단리된 세포 혼탁액을 PBS 중에서 50 mL 이하로 희석한 다음 r.t.에서 10min 동안 1300 rpm에서 원심분리 단계를 수행한다. PBS 중에서 2회의 추가적인 세척 단계 및 세포 풀링 후에, 남아있는 적혈구를 50 mL의 AKL 용해 완충제(150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 1 mM Na₂EDTA, pH 7.4) 중에 상기 세포 펠릿을 재현탁시킨 다음 서서히 혼합하여 용해시킨다. 이어서 상기 50 mL 혼탁액을 r.t.에서 1300 rpm에서 10min 동안 원심분리시킨 다음 상등액을 제거하고 배양 배지(RPMI 1640(깁코(Gibco), 21875) + 56 °C에서 30min 동안 열 불활성화된 10% 소 태아 혈청(FBS, 바이오웨스트(Biowest), S1810) + Pen/Strep(깁코, 15240)) 중에 상기

세포 펠릿을 재현탁시킨다.

[0429] 3.4.2. PBMC 분석에서 화합물 처리 및 촉발

[0430] 세포를 혈액학적 분석기(시스맥스(Sysmex) XS-500i)를 사용하여 카운트하고 96-웰 배양 플레이트 중의 160 μl 배양 배지 중에 웰당 4.0×10^5 세포의 밀도로 도말한다. 후속으로, PBMC를 37 °C 및 5% CO₂에서 1시간 동안 20 μl 의 10X 농축된 화합물 용액을 첨가하여 시험 화합물과 예비-배양한다. 상기 화합물을 상이한 농도에서 시험하고 이를 DMSO 중의 10 mM 모액으로부터 3배 연속 희석에 이어서 1% FBS 및 1% Pen/Strep이 보충된 2X M199 배지(집코, 21157-029)에서 1:50 희석 단계에 의해 제조한다. 상기 분석에서 최종 시험 농도는 20 μM 로부터 출발하여, 후속으로 3배 연속 희석하며 0.2%의 동일한 최종 DMSO 농도를 갖는다. 상기 화합물의 예비-배양 단계 후에, 상기 웰에 20 μl 의 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CL097 용액(인비보젠(InvivoGen), tlr1-c97-5)을 200 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 최종 분석 부피 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 CL097 촉발 농도로 가하여 상기 PBMC를 촉발시킨다. 음성 대조용은 CL097 촉발제 없이 동일한 DMSO 농도로 조절된다. 이어서 상기 분석 플레이트를 37 °C 및 5% CO₂에서 가습 배양기에서 4h 동안 배양한다. 이어서 세포 상등액을, 상기 세포 배지를 384 깊은 웰 플레이트로 옮김으로써 수확하고 인간 TNF α의 정량분석을 위해 ELISA 플레이트로 바로 옮긴다.

[0431] 3.4.3. ELISA에 의한 TNF α의 정량분석

[0432] 세포 상등액 중의 분비된 TNF α의 수준을 항체 포획 활성 분석(ELISA)에서 정량분석한다. 백색 그레이너 러미트랙(Greiner Lumitrac)(상표) 384-웰 플레이트를 4 °C에서 밤새 배양을 위해 PBS 중에서 희석된 웰당 40 μl 의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-인간 TNF α 항체 용액(MAb1; BD 바이오사이언시즈, 551220)으로 코팅한다. 상기 웰을 100 μl PBS로 세척 후에, 남아있는 결합 부위를 100 μl 의 차단 완충제(PBS + 1% 소 혈청 알부민 + 5% 슈크로스)로 차단하고 r.t.에서 4h 동안 배양한다. 상기 차단 단계에 이어서, 상기 웰을 트윈 20(PBST)과 함께 PBS로 1회 세척한 다음, 샘플 및 표준을 가한다. TNF α를 함유하는 샘플을 희석 완충제 중에서 1/3 희석하고 40 μl 를 4 °C에서 밤새 배양을 위해 가한다. 이어서 상기 웰을 PBST 2회, PBS 1회로 3회 세척한 다음 250 ng/ml의 최종 농도에서 1/2000 희석된 포맷으로 35 μl 의 2차 비오틴화된 항-TNF α 검출 항체(MAb11; BD 바이오사이언시즈, 554511)를 가한다. r.t.에서 2시간 배양하고 적합한 세척 단계(2x PBST, 1x PBS) 후에, 상기 웰을 35 μl 의 1/4000 희석된 양고추냉이 폐록시다제-접합된 스트렙트아비딘 용액(라이프 테크놀로지스, SNN2004)과 배양한 다음 암실에서 r.t.에서 45min 배양 단계를 수행한다. 이어서 상기 웰을 3회(2x PBST, 1x PBS) 세척한 다음 50 μl 의 화학발광 ELISA 기질 용액(롯슈(Roche), 11582950001)과 5min 배양한다. 상기 전환된 기질 발광 신호를 퍼킨엘머 엔비전(Envision) 2104 멀티라벨(Multilabel) 플레이트 판독기에서 측정한다.

[0433] 3.4.4. 데이터 분석

[0434] 모든 대조용을 상기 ELISA의 인간 TNF α 표준 곡선의 선형 범위내에서 측정한다. 모든 데이터를 분석 성질 매개변수(신호/배경>2 및 Z'>0.3)에 대한 타당성에 대해 검사한다.

[0435] 자극되지 않은 샘플(촉발제/비히클(0.2% DMSO) 없음)을 양성 대조용(100% 억제)으로서 사용한다. 음성 대조용(0% 억제)으로서, 자극된 샘플(촉발제/비히클(0.2% DMSO))을 사용한다. 상기 양성 및 음성 대조용을 사용하여 Z'를 계산하고 하기 식에 따라 억제 퍼센트(PIN) 값을 계산한다:

$$\text{PIN} = (\text{RCLU 촉발제/비히클} - \text{RCLU 시험 화합물}) / (\text{RCLU 촉발제/비히클} - \text{RCLU 촉발제/비히클 없음}) \times 100; \text{ 이때 RCLU = 상대적인 화학발광성 광 단위.}$$

[0437] PIN 값을 농도-반응 방식으로 시험된 화합물에 대해 플롯팅하고, IC₅₀ 값을 비-선형 회귀(s자) 곡선 정합을 적용하는 그래프패드 프리즘(등록상표) 소프트웨어를 사용하여 유도한다.

[0438] 3.5. 세포 분석: 암세포 분석

[0439] 3.5.1. 세포주

[0440] OCI-Ly3, OCI-Ly10, OCI-Ly7, 및 OCI-Ly19 세포주(DSMZ, 독일 또는 ATTC, 미국으로부터)로부터의 인간 립프종 세포를 37 °C에서 5% CO₂ 중에서 10% 소 태아 혈청(인비트로젠, S7524) 또는 20% 인간 혈청(인비트로젠, 34005100)이 보충된 IMDM(집코(등록상표), 21980-032)에서 배양한다.

[0441] 3.5.2. 세포 성장 분석

[0442] 램프종 세포(2 내지 7 x 10³)를 96-웰 플레이트에 도말하고, 30 μM로부터 상이한 용량의 시험 화합물로 처리한다(1/3 희석, 8개 점). 상기 처리된 세포를 37 °C에서 5% CO₂에서 7일 동안 배양한다. 스타우로스포린(10 μM)을 양성 대조용으로서 사용한다.

[0443] 세포 성장을, 상기 세포를 제조사의 설명에 따라 alamarBlue(등록상표)(인비트로젠, DAL 1025)와 배양함으로써 측정한다. 형광을 퍼킨엘머 엔비전(등록상표) 플레이트 판독기를 사용하여 측정한다. 성장 억제 비율을 0% 억제로서 DMSO 비히를 값 및 100% 억제로서 스타우로스포린 값을 사용하여 계산한다.

[0444] 3.6. SW1353 세포에서 IL-1 및 TNF α 반응 세포 분석

[0445] 본 분석의 목적은 시험관내 인간 세포 분석 환경에서 상기 활성화된 TLR/IRAK-4 경로에 대한 본 발명 화합물의 선택성을 평가하기 위한 것이다. SW1353 세포는 연골세포 세포주로부터의 것이며 인터류킨 1(IL-1) 및 TNF α 사이토킨 촉발제 모두에 대해 반응성이다. 상기 두 사이토킨 촉발제는 모두 이들 세포에 의한 인터류킨 6(IL-6) 및 MMP13의 발현을 유도한다. IL-6 및 MMP13 방출을 상기 분석에서 판독결과로서 사용하며 이는 상기 시험된 화합물에 의한 상기 TLR/IRAK-4 경로의 억제 수준에 대한 크기를 나타낸다. 상기 IL-1 촉발제는 IRAK-4의 존적인 경로를 통해 신호를 전달하는 반면, TNF α는 신호전달에 IRAK-4를 필요로 하지 않는다. 따라서, IRAK-4를 선택적으로 억제하는 화합물은 SW1353 세포에 의한 MMP13 또는 IL-6의 IL-1 구동된 발현에만 영향을 미칠뿐이며 이들 단백질의 TNF α 구동된 발현에는 영향을 미치지 않는다.

[0446] 3.6.1. SW1353 세포의 수확 및 시딩

[0447] SW1353 세포를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 배양한다. 세포를 5% CO₂의 가습 분위기에서 37 °C에서 배양하고 1주일에 2회 계대배양한다. 계대배양 동안, 트립신-EDTA를 사용하여 상기 세포를 탈착시킨 다음, 세포 배양 배지로 중화 단계를 수행한다. 원심분리(5min 동안 1,000 rpm) 후에, 상기 펠럿을 세포 배양 배지에 재현탁시키고 세포를 자동 세포 카운터(인비트로젠 카운테스(Countess)(상표))를 사용하여 카운트한다.

[0448] 세포를 계대 16으로 사용하고 96-웰 배양 플레이트에서 120 μl 세포 배양 배지 중에 웰당 15,000 세포의 밀도로 도말한다. 세포는 밤새 배양 동안 탈착된다.

[0449] 3.6.2. SW1353 분석에서 화합물 처리 및 촉발

[0450] SW1353 세포를 37 °C 및 5% CO₂에서 2h 동안 15 μl의 10X 농축된 화합물 용액의 첨가에 의해 시험 화합물과 예비-배양한다. 상기 화합물을 상이한 농도에서 시험하고 이를 DMSO 중의 10 mM 모액으로부터 3배 연속 희석에 이어서 세포 배양 배지에서 1/50 희석 단계에 의해 제조한다. 상기 분석에서 최종 시험 농도는 20 μM로부터 출발하여, 0.2%의 동일한 최종 DMSO 농도로 후속으로 3배 연속 희석된다. 상기 화합물의 예비-배양 단계 후에, 상기 웰에 15 μl의 10X 농축된 IL-1β(펩프로테크(Peprotech), 200-01B) 또는 TNF α 촉발제(펩프로테크, 300-01A)를 150 μl/웰의 최종 분석 부피 및 각각 1 ng/ml 및 10 ng/ml의 최종 촉발제 농도로 가하여 상기 SW1353을 촉발시킨다. 음성 대조용은 촉발제 없이 동일한 DMSO 농도로 조절된다. 이어서 상기 분석 플레이트를 37 °C 및 5% CO₂에서 가습 배양기에서 배양한다. 세포 상등액을, 상기 세포 배지를 24h 및 48h 후에 V-바닥 폴리프로필렌 96-웰 플레이트로 옮김으로써 수확하고 ELISA 판독시까지 -80 °C에서 보관한다.

[0451] 3.6.3. ELISA에 의한 IL-6의 정량분석

[0452] 세포 상등액 중의 분비된 IL-6의 수준을 효소-결합된 면역흡수 분석(ELISA)에서 정량분석한다. 백색 루미트랙(Lumitrac)(상표) 384-웰 플레이트를 4 °C에서 PBS 중에서 희석된 웰당 40 μl의 1 μg/ml 항-인간 IL-6 마우스 항체(R&D 시스템스, MAB206)으로 밤새 코팅한다. 상기 웰을 100 μl PBST로 2회 세척하고 PBS로 1회 세척 후에, 남아있는 결합 부위를 100 μl의 차단 완충제(PBS 중 1% BSA 및 5% 슈크로스)로 차단하고 r.t.에서 4h 동안 배양한다. 상기 차단 단계에 이어서, 상기 웰을 PBST로 1회 세척한 다음, 샘플 또는 표준으로서 재조합 인간 IL-6(R&D 시스템스, 206-IL-050)을 가한다. 샘플을 희석 완충제 중에서 1/20 희석하고 40 μl를 4 °C에서 밤새 배양을 위해 가한다. 이어서 상기 웰을 PBST 2회, PBS 1회로 3회 세척한 다음 50 ng/ml의 최종 농도에서 35 μl의 2차 비오틴화된 항-IL-6 검출 항체(인간 IL-6 비오틴화된 염소 다클론 항체(R&D 시스템스, BAF206))를 가한다. r.t.에서 2시간 배양하고 적합한 세척 단계(2x PBST, 1x PBS) 후에, 상기 웰을 35 μl의 1/2,000 희석된 스트렙트아비딘-HRP 용액(인비트로젠, SNN2004)과 배양한 다음 암실에서 r.t.에서 45min 배양한다. 이어서 상기 웰을 3회(2x PBST, 1x PBS) 세척한 다음 50 μl의 화학발광 ELISA 기질 용액(롯슈, 11 582 950 001)과 5min

배양한다. 상기 전환된 기질 발광을 루미노스캔(Luminoskan)(상표) 어센트(Ascent) 발광계로 측정한다.

[0453] 3.6.4. ELISA에 의한 MMP13의 정량분석

[0454] 세포 상등액 중의 분비된 MMP13의 수준을 항체 포획 활성 분석에서 정량분석한다. 이를 위해서, 흑색 넝크(Nunc)(등록상표) 맥시솝(MaxiSorp)(상표) 384-웰 플레이트를 4 °C에서 밤새 35 μl의 1.5 μg/ml 항-인간 MMP13 항체 용액으로 코팅한다. 상기 웰을 PBST로 2회 세척 후에, 남아있는 결합 부위를 100 μl의 PBS 중의 5% 무-지방 분유로 4 °C에서 24h 동안 차단한다. 상기 차단 단계에 이어서, 상기 웰을 PBST로 2회 세척한 다음, 샘플 및 표준을 첨가한다. 샘플을 희석 완충제 중에서 1/5 희석하고 35 μl를 r.t.에서 4h 동안 가한다. 이어서 상기 웰을 PBST로 2회 세척한다. 후속으로, 상기 MMP13 단백질을 35 μl의 1.5 mM APMA 용액(시그마 알드리치, A9563)의 첨가에 의해 완전히 활성화시키고 37 °C에서 1h 동안 배양한다. 이어서 상기 웰을 PBST로 2회 세척하고 35 μl의 MMP13 기질(OMNIMMP(등록상표) 형광원성 기질(BIOMOL, P-126))을 가한다. 37 °C에서 1h 배양 후에, 상기 전환된 기질의 형광을 퍼킨엘머 엔비젼(등록상표)(여기과장: 320 nm, 방출과장: 405 nm)으로 측정한다.

[0455] 3.6.5. 데이터 분석 및 계산

[0456] 모든 대조용을 상기 ELISA의 인간 IL-6 및 MMP13 표준 곡선의 선형 범위내에서 측정한다. 모든 데이터를 분석 성질 매개변수(신호/배경>2 및 Z'>0.3)에 대해 확인한다.

[0457] 자극되지 않은 샘플(촉발제/비히클(0.2% DMSO) 없음)을 양성 대조용(100% 억제)으로서 사용한다. 음성 대조용(0% 억제)으로서, 자극된 샘플(촉발제/비히클(0.2% DMSO))을 사용한다. 상기 양성 및 음성 대조용을 사용하여 Z' 및 억제 퍼센트(PIN) 값을 계산한다:

[0458] 억제 비율(PIN) = ((RU촉발제/비히클 - RU시험 화합물)/(RU촉발제/비히클 없음) x 100); 이 때 RU는 각각 IL-6 및 MMP13 ELISA에 대한 상대적인 화학발광성 광 단위 또는 상대적인 형광 단위를 의미한다. PIN 값을 농도-반응 방식으로 시험된 화합물에 대해 플롯팅하고, IC₅₀ 값을 비-선형 회귀(s자) 곡선 정합을 적용하는 그래프패드 프리즘(등록상표) 소프트웨어를 사용하여 유도한다.

표 9

본 발명의 예시적인 화합물들의 SW1353 세포 선택성 분석 결과					
	IL-1β 촉발제			TNF α 촉발제	
Cpd#	IL-6 IC ₅₀ (nM) [PIN at 20 μM]	MMP13 IC ₅₀ (nM) [PIN at 20 μM]	IL-6 IC ₅₀ (nM) [PIN at 20 μM]	MMP13 IC ₅₀ (nM) [PIN at 20 μM]	
1	54 [89%]	36 [81%]	>20000 [54%]	>20000 [26%]	
12	40 [80%]	29 [75%]	>20000 [22%]	>20000 [36%]	

[0460] 3.6.6. 결론

[0461] 표 IX의 데이터는 본 발명의 화합물이 효능 및 최대 진폭 모두에 관하여, IL-1β에 의해 촉발된 SW 1352 세포에서의 IL-6 및 MMP13 발현을 효능있게 억제하는 반면 TNF α 촉발된 사건에 대한 상기와 같은 화합물의 효과는 제한됨을 보인다. 이들 데이터는 IRAK-4 구동된 경로에 대한 본 발명 화합물의 선택성을 입증하며, 이때 TNF α 신호전달에 대해서는 매우 제한된 영향을 갖고, 이는 차례로 백혈구감소증 및 감염과 같은 치료-관련 부작용의 발생을 제한할 수 있다.

[0462] 실시예 4. ADME 분석

[0463] 4.1. 동역학적 용해도

[0464] 화합물의 3.3 mM DMSO 모액으로부터 출발하여, 일련의 상기 화합물의 희석물을 DMSO 중에서 1/2 희석을 수행하여 제조한다: 3.3, 1.6, 0.83, 0.41 및 0.21 mM. 상기 연속 희석물을 투명한 V-바닥 96 웰 플레이트(그레이너, 651201)로 옮기고 0.1M 포스페이트 완충제 pH 7.4 또는 0.1M 시트레이트 완충제 pH 3.0 중에서 1/33.5 추가 희석한다. 최종 화합물 농도는 99.5, 49.7, 24.9, 12.4 및 6.22 μM이다. 최종 DMSO 농도는 3%를 초과하지 않는다. 침전에 대한 양성 대조용으로서, 파이렌(30 mM)을 각각의 96 웰 플레이트의 구석 지

점에 가한다. 상기 분석 플레이트를 밀봉하고 230 rpm에서 진탕시키면서 37 °C에서 1h 동안 배양한다. 이어서 상기 플레이트를 백색광 현미경 하에서 스캐닝하여, 농도당 침전물의 개별적인 사진(50x 배율)을 제공한다. 각 웰을 상 분석 소프트웨어에 의해 분석하고, 상기 화합물이 완전히 용해된 것으로 이는 최고 농도를 기록한다.

[0465]

4.2. 마이크로솜 안정성

[0466]

DMSO 중의 화합물의 10 mM 모액을 DMSO에서 3배 희석한다. 이어서 상기 예비-희석된 화합물 용액을 96 깊은 웰 플레이트(녕크, 278752)에서 105 mM 포스페이트 완충제(pH 7.4) 중에 2 μM로 희석하고 37 °C에서 예온시킨다.

[0467]

700 U/ml의 글루코스-6-포스페이트-데하이드로게나제(G6PDH, 롯슈, 10127671001) 실행 모액을 105 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4에서 1:700 인자로 희석한다. 0.528 M MgCl₂·6H₂O(시그마, M2670), 0.528 M D-글루코스-6-포스페이트(시그마, G7879) 및 0.208 M NADP+(시그마, N0505)를 함유하는 보조-인자 혼합물을 105 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4 중에서 인자 1:8로 희석한다.

[0468]

관심 종(예를 들어 인간, 마우스, 래트, 개)의 간 마이크로솜(테뷰 바이오(Tebu-bio)) 1 mg/ml, 1.2 U/ml G6PDH 및 보조-인자 혼합물(6.6 mM MgCl₂, 6.6 mM 글루코스-6-포스페이트, 2.6 mM NADP+)을 함유하는 실행 용액을 제조한다. 상기 혼합물을 15min 동안, 그러나 결코 20min을 넘지 않게 r.t.에서 예비-배양한다.

[0469]

예비-배양 후, 상기 화합물 희석액 및 상기 마이크로솜을 함유하는 혼합물을 함께 동량으로 가하고 300 rpm에서 30min 동안 배양한다. 0min 시점에 대해서, 2 부피의 MeCN을 상기 화합물 희석액에 가한 후에 상기 마이크로솜 혼합물을 가한다. 배양 중 최종 농도는 1 μM 시험 화합물 또는 대조용 화합물, 0.2% DMSO, 0.5 mg/ml 마이크로솜, 0.6 U/ml G6PDH, 3.3 mM MgCl₂, 3.3 mM 글루코스-6-포스페이트 및 1.3 mM NaDP+이다.

[0470]

37 °C에서 30min 배양 후, 2 부피의 MeCN으로 상기 반응을 중단시킨다.

[0471]

샘플을 혼합하고, 원심분리시키고, 상등액을 LC-MS/MS상에서의 분석을 위해 수확한다. 장비 반응(즉 피크 높이)은 남아있는 화합물의 비율을 측정하기 위해서 0시점 샘플(100%로서 간주됨)을 참조한다. 프로프라놀ول 및 베라파밀을 상기 분석 설계에 참조로서 포함시킨다.

[0472]

마이크로솜 안정성에 대한 데이터를 30min 배양후 남은 화합물의 총량의 비율로서 나타낸다.

[0473]

4.3. S9 세포이하 분획에서 대사 안정성

[0474]

본 분석의 목적은 S9 세포이하 분획 중 시험관내 대사 안정성의 측정에 의해 알데하이드 옥시다제에 의한 화합물 대사를 평가하는 것이다.

[0475]

DMSO 중의 10 mM 화합물 모액을 먼저 DMSO(40배)에서 희석하여 250 μM 농도를 획득한다. 상기 화합물 용액을 물(5배)로 추가 희석하여 50 μM 화합물 실행 용액(1 μM의 화합물 최종 농도를 획득하기 위해)을 수득한다. 하이드랄라진(알데하이드 옥시다제의 선택성 억제제)을 수중에서 5 mM(100 μM의 최종 농도를 획득하기 위해)로 제조한다. 10 μl의 간 S9 혼탁액(인간, 래트, 마우스, 원숭이, BD 젠테스트(Gentest)(상표), 20 mg/ml)을 37 °C에서 86 μl의 50 mM 칼륨 포스페이트 완충제, pH 7.4에 가함으로서 배양 혼합물을 제조한다. 2 μl의 5 mM 하이드랄라진을 선택성 억제제의 첨가와 함께 또는 억제제 부재하의 배양을 위해서 2 μl의 물과 함께 배양을 위해 가한다. 5min 예온 후에, 2 μl의 50 μM 시험 화합물을 상기 배양 혼합물에 가함으로써 상기 반응을 개시시킨다. 0, 3, 6, 12, 18 및 30min의 배양 후에, 분석 내부 표준으로서 10 ng/ml의 와파린을 함유하는 1% 아세트산 혼합물과 함께 300 μl의 MeCN:MeOH(2:1)로 상기 반응(100 μl)을 종료시킨다. 샘플을 혼합하고, 원심분리시키고 상등액을 LC-MS/MS에 의해 분석한다. 프탈라진을 양성 대조용으로서 포함시킨다.

[0476]

내부 반응(화합물 및 내부 표준의 피크 면적비)은 남아있는 화합물의 비율을 측정하기 위해서 0 시점 샘플(100%로서 간주됨)을 참조한다. 남아있는 화합물의 %의 플롯을, 상기 그레프패드 프리즘(등록상표) 소프트웨어를 사용하여 상기 S9 배양에서의 반감기 및 고유한 제거율을 측정하는데 사용한다. 하기의 식을 사용하여 시험관내 고유한 제거율(μl/min/mg)을 계산한다:

[0477]

$$CL_{int} (\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}) = 0.693/t_{1/2}(\text{min}) * (\text{배양 ml}/\text{단백질 mg}) * 1000$$

[0478]

시험 화합물을, S9에 의한 제거율이 하이드랄라진에 의해 억제되는 경우 알데하이드 옥시다제의 기질로서 분류 할 수 있다. 시험 화합물의 종 특이적인 제거율은 또한 알데하이드 옥시다제에 의한 대사를 가리킬 수 있다.

[0479]

4.4. 간세포에서 대사 안정성

- [0480] DMSO 중의 10 mM 시험 화합물 모액을 먼저 DMSO에서 3 mM로 희석하고, 이어서 변형된 크렙스 헨셀라이트(Krebs-Henseleit) 완충제(시그마, K3753)에서 5 μM로 희석한다. 상기 화합물 희석액을 37 °C에서 서서히 진탕시키면서 저온보존된 혼주 간세포(바이오리클러메이션(Bioreclamation)IVT)의 혼탁액에 가한다. 최종 반응 조건은 1 μM의 시험 화합물, 0.03% DMSO, 0.5 x 10⁶ 개의 생육성 간세포/ml, 및 75 μl의 배양 부피이다. 테스토스테론(1 μM) 및 7-하이드록시쿠마린(1 μM)을 각각 I기 및 II기 대사 반응 대조용으로서 사용한다.
- [0481] 0, 10, 20, 45, 90, 120 및 180min의 배양 후에, 분석 내부 표준으로서 10 ng/ml의 와파린 나트륨을 함유하는 225 μl의 MeCN:MeOH(2:1)로 상기 반응을 종료시킨다. 샘플을 혼합하고, 원심분리시키고 상등액을 LC-MS/MS에 의해 분석한다.
- [0482] 장비 반응(시험 화합물 및 내부 표준 피크 면적의 비)은 남아있는 화합물의 비율을 측정하기 위해서 0 시점 샘플(100%로서 간주됨)을 참조한다.
- [0483] 남아있는 화합물 비율의 플롯을, 상기 그래프패드 프리즘(등록상표) 소프트웨어를 사용하여 상기 간세포 배양에서의 반감기 및 고유한 제거율을 측정하는데 사용한다.
- [0484] 4.5. CYP 억제
- [0485] 인간 시토크롬 P450 동종효소(CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 및 3A4)에 대한 시험 화합물의 억제 가능성을 cDNA-발현된 인간 시토크롬 P450 동종효소 및 형광 대사산물로 대사되는 비-형광 기질을 사용하여 평가한다.
- [0486] 화합물을 0.3%의 최종 DMSO 농도로, 3.3 및 10 μM에서 시험한다. 화합물을 보조인자-기질 혼합물의 첨가 전에 효소와 15min 동안 배양한다. CYP3A4(BD 바이오사이언시즈, 456202), CYP2C9(BD 바이오사이언시즈, 456258), CYP2C19(BD 바이오사이언시즈, 456259) 및 CYP1A2(BD 바이오사이언시즈, 456203) 분석을 위한 보조인자 혼합물 중 최종 반응 농도는 0.4 U/ml 글루코스-6-포스페이트-데하이드로게나제(G6PDH, 롯슈, 10165875001), 3.3 mM MgCl₂(시그마, M2670), 3.3 mM D-글루코스-6-포스페이트(시그마, G7879) 및 1.3 mM NADP+(시그마, N0505)이다. CYP2D6(BD 바이오사이언시즈, 456217)의 경우, 상기 분석에서 최종 반응 농도는 0.4 U/ml G6PDH, 0.41 mM MgCl₂, 0.41 mM D-글루코스-6-포스페이트 및 8.2 μM NADP+이다. 효소 및 기질의 농도를 표 X에 보고한다. 배양 기간후에, 정지액을 가하여 상기 반응을 정지시킨다. 기질로서 DBF에 대한 실험을 위해서, 2N NaOH 정지액을 사용하는 반면, 모든 다른 기질의 경우 상기 정지액은 80% MeCN/20% 0.5M 트리스 염기이다.
- [0487] 형광을 즉시(CEC, AMMC, BFC의 경우) 또는 20min 후(기질로서 DBF를 사용하는 CYP2C9 및 CYP3A4의 경우) 적합한 여기 및 방출 파장(cf. 표 X)에서 페킨엘머 엔비젼(등록상표) 판독기상에서 판독한다.
- [0488] 이어서 상기 시험 화합물에 의한 CYP의 억제 비율을, 상기 데이터를 블랭크 샘플에 표준화함으로써 계산한다: 100% 억제는 상기 효소/기질 혼합물 첨가 전에 정지된 블랭크 샘플이고, 0% 억제는 상기 효소 반응이 발생한 후(50min) 정지된 블랭크 샘플이다.

표 10

연구된 각각의 CYP450 동종효소에 사용된 억제 분석 조건들						
	CYP3A4	CYP3A4	CYP2C19	CYP2C9	CYP1A2	CYP2D6
기질 (μM)	1	-	-	0.5	-	-
DBF	-	-	35	-	4	-
CEC	-	-	-	-	-	0.5
AMMC	-	120	-	-	-	-
BFC						
포스페이트 완충제 pH 7.4 (mM)	200	90	25	25	25	25
효소 (pmol/웰)	1	1.5	6	2	1.5	3
배양시간 (min)	50	50	50	50	50	50
양성 대조용	케토코나졸	케토코나졸	플루복사민	설파페나졸	플루복사민	퀴니딘
여기파장 (nm)	485	400	400	485	400	380

방출파장 (nm)	530	530	460	530	460	460
AMMC: 아미노에틸-7-메톡시-4-메틸쿠마린						
BFC: 7-벤질옥시-4-트라이플루오로메틸쿠마린						
CEC: 3-시아노-7-에톡시쿠마린						
DBF: 다이벤질플루오레세인						

[0490] 4.6. MDCKII-MDR1 침투성

[0491] MDCKII-MDR1 세포는 P-당단백질(P-gp)을 암호화하는, 인간 다중약물 내성(MDR1) 유전자를 과발현하는 마딘-달비(Madin-Darby) 개 신장 상피세포이다. 세포를 네덜란드 암 연구소로부터 수득하며 24-웰 밀리셀(Millice11)(등록상표) 세포 배양 삽입물 플레이트(밀리포어, PSRP010R5)에서 3 내지 4일 배양 후에 사용한다. 양방향 MDCKII-MDR1 침투성 분석을 하기에 개시하는 바와 같이 수행한다.

[0492] 3×10^5 세포/ mL (1.2×10^5 세포/웰)을 DMEM(시그마, D5796) + 1% 글루타맥스(Glutamax)-100(시그마, G8541) + 1% 항생제/항진균제(시그마, A5955) + 10% FBS(시그마, F7524; 56 °C에서 30min 불활성화된)로 이루어지는 도말 배지에 시팅한다. 세포를 CO_2 배양기에 3 내지 4일간 둔다. 상기 배지를 시팅 후 24시간째 및 실험 당일에 교환한다.

[0493] 시험 및 참조 화합물(암프레나비어(모라벡 바이오케미칼스(Moravek Biochemicals, M1613), 디클로페낙(시그마, D6889))을 둘째코의 포스페이트 완충 염수(D-PBS, pH 7.4; 시그마, D8662)에서 제조하고 상기 밀리셀 세포 배양 플레이트 조립체의 정상($400 \mu\text{l}$) 또는 측정($800 \mu\text{l}$) 챔버에 1%의 최종 DMSO 농도와 함께 $10 \mu\text{M}$ (암프레나비어의 경우 $0.5 \mu\text{M}$)의 최종 농도로 가한다. 수용 용액(D-PBS + 1% DMSO)을 상기 멀티셀 세포 배양 플레이트의 반대 챔버에 가한다.

[0494] $100 \mu\text{M}$ 루시퍼 엘로우(시그마, L0259)를, 루시퍼 엘로우 침투를 모니터함으로써 상기 세포 단층의 통합성을 평가하기 위해 모든 공여 완충제 용액에 가한다. 루시퍼 엘로우는 세포주변 수송 경로에 대한 형광 마커이며 상기 분석 동안 모든 세포 단층의 밀착연접 통합성을 확인하기 위해서 내부 대조용으로서 사용된다.

[0495] 궤도 진탕기에서 150 rpm으로 진탕시키면서 37 °C에서 1시간 배양 후에, $75 \mu\text{l}$ 의 분액을 상기 정상 및 기저 챔버 모두로부터 취하고 96 웰 플레이트 중에 분석학적 내부 표준(10 ng/mL 와파린)을 함유하는 $225 \mu\text{l}$ MeCN:수용액(2:1)에 가한다. 분액을 공여 용액으로부터 상기 실험의 초기에 또한 수행하여 초기 농도를 획득한다.

[0496] 상기 샘플 중 화합물의 농도를 고성능 액체-크로마토그래피/질량 분광학(LC-MS/MS)에 의해 측정한다.

[0497] 루시퍼 엘로우를 모든 수용 웰들(측정 또는 정상부)로부터의 액체 $150 \mu\text{l}$ 를 함유하는 96 웰 플레이트에서 써모 사이언티픽 플루오로스캔 어센트 FL(여기파장: 485 nm, 측정파장: 530 nm)로 측정한다.

[0498] 실시예 5. 전혈 분석

[0499] 5.1. 생체외 인간 TNF α 방출 억제(전혈분석)

[0500] 본 분석의 목적은 생체외 인간 전혈 환경에서 상기 활성화된 TLR/IRAK-4 경로에 대한 본 발명 화합물의 활성을 평가하기 위한 것이다. 틀형 수용체(TLR)는 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)이라 칭하는 광범위하게 다양한 미생물 분자를 인식하는 패턴 인식 수용체이다. 인간 TLR7 및 TLR8은 이미다조퀴놀린 화합물(예를 들어 CL097) 및 그의 천연 리간드로서 단일 가닥 RNA를 인식한다. TLR의 활성화는 상기 TLR 작용물질-처리된 세포에 의한 다수의 사이토킨(예를 들어 TNF α, IL-8, IL-6)의 생산을 유도한다. 사이토킨 방출을 상기 분석에서 관찰결과로서 사용하며 이는 상기 시험된 화합물에 의한 상기 TLR/IRAK-4 경로의 억제 수준에 대한 크기를 나타낸다. 완전한 유기체와 관련하여, 상기 TLR/IRAK-4 경로에 의존하지 않는 상기 사이토킨에 대한 다른 공급원, 예를 들어 대식 세포(Fc γ 수용체의 활성화(Yan et al. 2012)) 또는 T 세포(상기 T 세포 수용체의 활성화(Brehm et al. 2005))가 존재한다.

[0501] 5.1.1. 실험 설계

[0502] 정맥천자에 의해 건강한 자원자로부터 리튬 혜파린튜브에 혈액을 채혈하고, 이어서 여러번 서서히 뒤집어 응고를 방지하고 회전 막서 진탕기상에서 37 °C에서 적어도 15min 동안 배양한다. 이어서 $200 \mu\text{l}$ 의 혈액을 2 mL -미세튜브에 분배하고 37 °C에서 15min 동안 상이한 농도(10 내지 $0.01 \mu\text{M}$, 글루타민(라이프 테크놀로지스, 31870) 없이 RPMI 1640에서 3배 희석)에서 DMSO 0.3% 또는 시험 화합물과 중복해서 예비-배양한다. 상기 예비-

배양 후에, 혈액을 37 °C에서 3h 30min 동안 CL097(수중 1 mg/ml 용액으로부터 2 µg/ml; 인비보젠, t1rl-C97) 또는 비히클(종류수)로 촉발시킨다. 미세튜브를 5000xg에서 4 °C에서 10min 동안 원심분리시키고, 대략 80 µl의 혈장을 폴리스타이렌 96-웰 플레이트에 수집한다. 혈장을 새로 분석하거나 또는 촉발 직후 -80 °C에서 동결시킬 수 있다. 최종적으로, TNF α의 정량분석을, 제조사의 설명에 따라 인간 TNF-알파 듀오셋트(DuoSet) ELISA 키트(R&D 시스템스, DY210)를 사용하여 상기 혈장을 40배 희석함으로써 수행한다. 광학 밀도(OD)를 퍼킨엘머 엔비전 2102 멀티라벨 플레이트 판독기상에서 450 nm에서 측정한다.

[0503]

5.1.2. 데이터 분석

[0504]

x-축상의 농도에 대해 y-축상의 평균 흡광도를 플롯팅함으로써 표준 곡선을 작성하고 최적합 곡선을 상기 그래프상의 점들을 통해 그린다. 선형 회귀 분석을 수행하여 방정식($y=ax + b$) 및 R-제곱 값을 측정한다. 각각의 혈액 샘플에 대해 반복하고, 하기 식을 사용하여 회석 인자를 고려하여 TNF α 농도를 계산한다:

[0505]

$$\text{TNF } \alpha \text{ 농도}_{\text{샘플1}} = 40 * (\text{OD}_{\text{샘플1}} - b) / a$$

[0506]

이어서 데이터를 하기 식을 사용하여 각 반복에 대한 억제 비율(PIN)로서 나타낸다:

[0507]

$$\text{PIN 샘플 1} = (\text{CL097에 의한 평균 TNF} - \text{TNF } \alpha \text{ 샘플1}) / (\text{CL097에 의한 평균 TNF } \alpha - \text{비히클에 의한 평균 TNF } \alpha) \times 100$$

[0508]

상기에서, 'CL097에 의한 평균 TNF α'는 CL097에 의해 촉발된 반복 샘플의 평균 TNF α 농도이고; 'TNF α 샘플 1'은 샘플 1의 TNF α 농도이고; '비히클에 의한 평균 TNF α'는 비히클로 처리된 반복 샘플의 평균 TNF α 농도이다.

[0509]

곡선 정합을 평균 PIN±SEM을 사용하여 생성시킨다. 그래프 및 IC₅₀ 계산을 그래프패드 프리즘(등록상표) 소프트웨어를 사용하여 유도한다.

[0510]

5.2. 생체외 래트 TNF α 방출 억제(전혈 분석)

[0511]

본 분석의 목적은 생체외 래트 전혈 환경에서 상기 활성화된 TLR/IRAK-4 경로에 대한 본 발명 화합물의 활성을 평가하는 것이다. 틀형 수용체(TLR)는 병원체-관련 문자 패턴(PAMP)이라 칭하는 광범위하게 다양한 미생물 문자를 인식하는 패턴 인식 수용체이다. 인간 TLR7 및 TLR8은 모두 이미다조퀴놀린 화합물(예를 들어 CL097) 및 그의 천연 리간드로서 단일 가닥 RNA를 인식한다. 설치류 TLR8은 활성화를 위해 올리고데옥시뉴클레오타이드(예를 들어 폴리(dT))와 같은 추가적인 인자를 필요로 한다.

[0512]

5.2.1. 실험 설계

[0513]

스프래그 다우리 래트(수컷, 7 내지 8주 된 것, 200 내지 250 g 체중)를 장비에 랩스(Janvier Labs)(프랑스 소재)로부터 수득한다.

[0514]

채혈에 의해 수득한 혈액을 적어도 2마리 래트로부터 리튬 헤파리네이트 튜브내로 수집하고, 이어서 진동 믹서 진탕기상에서 37 °C에서 적어도 15min 동안 예비-배양한다. 모든 래트로부터의 혈액을 50 ml 폴리프로필렌 튜브내에서 혼합하여 특유의 혈액 배치를 얻는다. 이어서, 200 µl의 혈액을 2 ml 미세튜브에 분배하고 37 °C에서 15min 동안 상이한 농도(10 내지 0.01 µM, 글루타민(라이프 테크놀로지스, 31870) 없이 RPMI 1640에서 3배 회석)에서 DMSO 0.3% 또는 시험 화합물과 중복해서 배양한다. 상기 예비-배양 후에, 혈액을 37 °C에서 3h 30min 동안 CL097(수중 1 mg/ml 용액으로부터 10 µg/ml) 및 폴리(dT)(수중 100 µM 용액으로부터 1 µM; 인비보젠, t1rl-pt17) 또는 비히클(종류수)로 촉발시킨다. 미세튜브를 5000xg에서 4 °C에서 10min 동안 원심분리시키고, 대략 80 µl의 혈장을 폴리스타이렌 96-웰 플레이트에 수집한다. 혈장을 새로 분석하거나 또는 촉발 직후 -80 °C에서 동결시킬 수 있다. 최종적으로, TNF α의 정량분석을, 제조사의 설명에 따라 래트 TNF-알파 콘티킨(Quantikine) ELISA 키트(R&D 시스템스, SRTA00)를 사용하여 혈장(1:3 회석됨)상에서 수행한다. 광학 밀도(OD)를 퍼킨엘머 엔비전 2102 멀티라벨 플레이트 판독기상에서 450 nm에서 측정한다.

[0515]

5.2.2. 데이터 분석

[0516]

x-축상의 농도에 대해 y-축상의 평균 흡광도를 플롯팅함으로써 표준 곡선을 작성하고 최적합 곡선을 상기 그래프상의 점들을 통해 그린다. 선형 회귀 분석을 수행하여 방정식($y=ax + b$) 및 R-제곱 값을 측정한다. 각각의 혈액 샘플에 대해 반복하고, 하기 식을 사용하여 회석 인자를 고려하여 TNF α 농도를 계산한다:

- [0517] $TNF\alpha$ 농도_{샘플1} = $40 * (OD_{샘플1} - b) / a$
- [0518] 이어서 데이터를 하기 식을 사용하여 각 반복에 대한 억제 비율(PIN)로서 나타낸다:
- [0519] PIN 샘플 1 = $(CL097에 의한 평균 TNF\alpha - TNF\alpha 샘플1) / (CL097에 의한 평균 TNF\alpha - 비히클에 의한 평균 TNF\alpha) \times 100$
- [0520] 상기에서, 'CL097에 의한 평균 TNF\alpha'는 CL097+폴리(dT)에 의해 촉발된 반복 샘플의 평균 TNF\alpha 농도이고; 'TNF\alpha 샘플1'은 샘플 1의 TNF\alpha 농도이고; '비히클에 의한 평균 TNF\alpha'는 비히클로 처리된 반복 샘플의 평균 TNF\alpha 농도이다.
- [0521] 곡선 정합을 평균 PIN \pm SEM을 사용하여 생성시킨다. 그래프 및 IC₅₀ 계산을 그래프패드 프리즘(등록상표) 소프트웨어를 사용하여 유도한다.
- [0522] 실시예 6. 생체내 분석
- [0523] 6.1. 이미퀴모드, TLR7/8 작용물질의 국소 적용에 의해 유발된 건선-형 표피 과형성의 귀 모델
- [0524] 6.1.1. 물질
- [0525] 알다라(Aldara)(등록상표) 5% 이미퀴모드 크림을 MEDA로부터 수득한다.
- [0526] 항-마우스 IL-12/IL-23 p40 FG 정제된 항체(C17.8)를 애피메트릭스 아바이오사이언스(Affymetrix eBioscience)(cat no. 16-7123-85)로부터 수득한다.
- [0527] 6.1.2. 동물
- [0528] Balb/cJ 마우스(암컷, 18~20 g 체중)를 장비에 랩스(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기 (07:00 ~ 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22 \pm 2 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.
- [0529] 6.1.3. 연구 설계
- [0530] 본 연구의 설계는 반 더 피츠 엘(Van der Fits L.) 등(van der Fits et al. 2009)으로부터 개정된 것이다.
- [0531] 첫째날, 상기 마우스를 아이소플루란으로 가볍게 마취하에 2개의 귀 주변을 면도한다.
- [0532] 30 mg의 상업적으로 입수할 수 있는 이미퀴모드 크림(알다라 5% 크림)을 4일 연속해서(이는 1.5 mg의 활성 화합물 1일 용량으로 번역된다) 각 귀의 내부 및 외부 표면 모두에 적용한다. 대조용 동물은 동일한 양의 바셀린을 수용하였다.
- [0533] 1일부터 5일까지, 마우스에게, 이미퀴모드 적용(5일째에, 상기 마우스에게 안락사 2h 전에 오직 1회 투여한다) 전에, 메틸 셀룰로스 0.5% 중의 시험 화합물 10 또는 30 mg/kg을 p.o., b.i.d. 투여한다.
- [0534] 양성 참조 그룹에서, 상기 동물을 1일로부터 1일 및 3일 전에 항-마우스 IL-12/IL-23 p40 항체 10 mg/kg을 2회 복강내 주사로 수용한다.
- [0535] 6.1.4. 질병의 평가
- [0536] 양쪽 귀의 두께를 두께 게이지(미투토요(Mitutoyo), 앱솔루트 디지매틱(Absolute Digimatic), 547-321)로 매일 측정한다. 체중을 상기 실험의 초기 및 희생시 평가한다. 5일째에, 최종 투여 2h 후, 상기 마우스를 희생시킨다. 귓바퀴를 절단하여, 연골을 제외한다. 상기 귓바퀴를 칭량하고 이어서 유전자 발현을 평가하기 위해 1 ml의 RNAlater(등록상표) 용액을 함유하는 바이알에 담그거나 조직학을 위해서 포르말린에 담근다.
- [0537] 그룹당 14마리의 마우스가 존재한다. 결과를 평균 \pm SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 이미퀴모드-비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0538] 6.1.5. 조직학
- [0539] 희생 후, 귀를 수집하고 3.7% 포름알데하이드 중에 고정시킨 후 파라핀 포매시킨다. 2 μ m 두께 절편을 절단하고 혜마톡실린 및 에오신으로 염색한다. 귀 표피 두께를 상 분석(SisNcom 소프트웨어)에 의해 측정하며, 이때 귀당 6개의 상이 20x 배율로 포착된다. 데이터를 평균 \pm SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 이미퀴모드-비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.

[0540] 6.1.6. 유전자 발현 분석

귀를 상기 RNAlater(등록상표) 용액으로부터 제거하고 프레셀리스(Precellys) 장치에서 1.4 mm 세라믹 비드로 파괴후 트리졸(Trizol)(등록상표)에 넣는다. 이어서 전체 RNA를 뉴클레오스핀(NucleoSpin)(등록상표) RNA 키트를 사용하여 정제시킨다. cDNA를 제조하고 정량적인 PCR을 Viia7 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)에서 SYBR 그린 기술을 사용하여 쿼아겐(Qiagen)으로부터의 유전자-특이적인 프라이머로 수행한다. 각 유전자(IL17A, IL1B, IL22, LCN2, S100A8 및 S100A9)의 발현 수준을 사이클로필린 A 하우스키핑 유전자 발현 수준에 비교하여 계산한다. 데이터를 상대적인 양의 평균±SEM으로서 나타낸다($RQ = 2^{-\Delta C_T}$, 여기에서 $\Delta C_T = C_T$ 샘플 - C_T 사이클로필린 A). 사용된 통계학적 검정은 이미퀴모드-비히를 그룹에 대해 둔네트의 사후 검정에 대한 분산의 ANOVA 분석이다.

[0542] 6.2. IL-23의 피내 주사에 의해 유발된 건선-형 표피 과형성의 귀 모델

[0543] 6.2.1. 물질

마우스 재조합 IL-13, 무담체(14-8231, CF)가 e-바이오사이언스로부터 제공된다.

[0545] 6.2.2. 동물

Balb/c 마우스(암컷, 18~20 g 체중)를 CERJ(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기(07:00 ~ 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.

[0547] 6.2.3. 연구 설계

본 연구의 설계는 리조 에이치엘(Rizzo HL) 등(Rizzo et al. 2011)으로부터 개정된 것이다.

첫 째날(D1), 상기 마우스를 2개의 귀 주변에서 면도한다.

4 연속일(D1 내지 D4) 동안, 상기 마우스는 아이소플루란 흡입에 의해 유발된 마취하에 우측 귓바퀴에 마우스 재조합 IL-23(PBS/0.1% BSA 중의 1 µg/20 µl) 및 좌측 귓바퀴에 20 µl의 PBS/0.1% BSA의 1일 피내 용량을 수용한다.

D1부터 D5까지, 마우스에게, IL-23 주사 1h 전에, 시험 화합물(메틸셀룰로스 0.5% 중의 10, 30 또는 100 mg/kg) 또는 비히클을 p.o., q.d. 투여한다.

[0552] 6.2.4. 질병의 평가

양쪽 귀의 두께를 자동 캘리퍼스로 매일 측정한다. 체중을 초기 및 희생시 평가한다. 5일째에, 최종 투여 2h 후, 상기 마우스를 희생시킨다. 귓바퀴를 절단하여, 연골을 제외한다. 상기 귓바퀴를 칭량하고 이어서 1 ml의 RNAlater(등록상표) 용액을 함유하는 바이알에 또는 포름알데하이드에 넣는다.

[0554] D4에서, 혈액 샘플을 또한 투여 직전(T0) 및 투여-후 1h, 3h, 6h째에 PK 프로파일링을 위해 후안와 공동으로부터 채혈한다.

[0555] 그룹당 8마리의 마우스가 존재한다. 결과를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 IL-23 비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.

[0556] 6.2.5. 조직학

희생 후, 귀를 수집하고 3.7% 포름알데하이드 중에 고정시킨 후 파라핀 포매시킨다. 2 µm 두께 절편을 절단하고 해마톡실린 및 에오신으로 염색한다. 귀 표피 두께를 상 분석(Sis'Ncom 소프트웨어)에 의해 측정하며, 이때 귀당 6개의 상이 20x 배율로 포착된다. 데이터를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 IL-23 비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.

[0558] 6.2.6. 유전자 발현 분석

귀 절반을 상기 RNAlater(등록상표) 용액으로부터 제거하고 프레셀리스 장치에서 1.4 mm 세라믹 비드로 파괴후 트리졸(등록상표)에 넣는다. 이어서 전체 RNA를 뉴클레오스핀(NucleoSpin)(등록상표) RNA 키트를 사용하여 정제시킨다. cDNA를 제조하고 정량적인 PCR을 Viia7 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)에서 SYBR 그린 기술을 사용하여 쿼아겐으로부터의 유전자-특이적인 프라이머로 수행한다. 각 유전자(IL17A, IL1B, IL22, LCN2, S100A8 및 S100A9)의 발현 수준을 사이클로필린 A 하우스키핑 유전자 발현 수준에 비교하여 계산한다.

데이터를 상대적인 양의 평균±SEM으로서 나타낸다($RQ = 2^{-\Delta C_T}$, 여기에서 $\Delta C_T = C_T$ 샘플 - C_T 사이클로필린 A). 사용된 통계학적 검정은 IL-23 비히클 그룹에 대해 둔네트의 사후 검정에 대한 분산의 ANOVA 분석이다.

[0560] 6.3. PK/PD 모델: 특이적인 TLR7/8 작용물질, CL097에 의해 유발된 TNF α 방출

[0561] 본 분석의 목적은 본 발명 화합물의 투여시 생체내에서 IRAK-4 의존적인 사건의 억제와 상기 화합물의 순환 농도 수준간의 관계를 측정하는 것이다.

[0562] 6.3.1. 물질

[0563] CL097(cat no. tlrl-c97) 및 폴리(dT)(cat no. tlrl-pt17)를 인비보젠으로부터 수득한다.

[0564] 알파리사(AlphaLISA)(등록상표) 마우스 TNF α 키트를 퍼킨 엘머(cat no. AL505C)로부터 수득한다.

[0565] 6.3.2. 동물

[0566] DBA/1J 마우스(수컷, 18-20 g 체중)를 장비에 랩스(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기(07:00 - 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22±2 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.

[0567] 6.3.3. 연구 설계

[0568] 상기 마우스는 경구 용량의 시험 화합물을 수용한다. 어떠한 투여도 수용하지 않은 완전한 동물의 그룹을 t=0 시점으로서 사용한다.

[0569] 심장-내 샘플링(아이소플루란 마취하의)에 의해 수득된 2개의 혈액 샘플을 투여-후 30min, 1h, 3h, 8h 또는 24h 째에 리튬 헤파리네이트 튜브에 수집한다. 하나는 약동학(PK) 분석에 사용하고 두 번째는 약역학(PD) 마커 정량분석에 사용한다.

[0570] 6.3.4. 혈장 중 화합물 수준의 정량분석

[0571] 전혈 샘플을 5000 rpm에서 10min 동안 원심분리시키고 생성되는 혈장 샘플을 분석시까지 -20 °C에서 보관한다. 각 시험 화합물의 혈장 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정한다.

[0572] 6.3.5. 약동학적 매개변수의 측정

[0573] 약동학적 매개변수를 윈놀린(WinNonlin)(등록상표)(파사이트(Pharsight)(등록상표), 미국소재)을 사용하여 계산한다.

[0574] 6.3.6. PD 마커의 정량분석

[0575] 각 혈액 샘플을 37 °C에서 2h 동안 CL097 및 폴리(dT)로 자극한다. 이어서 혈장을 수집하고 제조사의 설명에 따라 알파리사에 의해 TNF α에 대해 분석한다.

[0576] 그룹당 6마리의 마우스가 존재한다. 결과를 TNF α 농도(pg/ml)로서, 또는 t=0 시점에 대한 억제 비율(PIN)로서 나타낸다. 데이터를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 상용하는 시점의 비히클 그룹에 대해 일원ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.

[0577] 6.4. MC903의 국소 적용에 의해 유발된 아토피성 피부염의 쥐 예방학적 모델

[0578] 6.4.1. 물질

[0579] 메틸셀룰로스 0.5%를 VWR(cat no. AX021233)으로부터 수득한다. MC903(칼시포트리올)을 토크리스 바이오사이언스(Tocris Bioscience)(cat no. 2700/50)로부터 수득한다. 프로센스(ProSense)(등록상표) 680을 퍼킨엘머(cat no. NEV10003)로부터 수득한다. RNAlater(등록상표)를 앰비온(Ambion)(cat no. AM7021)으로부터 수득한다. 이말진(Imalgene)(등록상표) 1000(메리얼(Merial)) 및 롬펀(Rompun)(등록상표) 2%(바이엘(Bayer))를 센트라베트(Centravet)(cat no. IMA004-6827812 및 ROM001-6835444)로부터 수득한다.

[0580] 6.4.2. 동물

[0581] BALB/cN 마우스(암컷, 18-20 g 체중) 또는 CD1/스위스 마우스(암컷, 24-26 g 체중)를 장비에 랩스(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기(07:00 - 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22±2 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.

- [0582] 6.4.3. 연구 설계
- [0583] 본 연구의 설계는 리 앤(Li M.) 등(Li et al. 2006)으로부터 개정된 것이다.
- [0584] 첫째날(D1)에, 상기 마우스를 이말진 및 루펜(7.5%/2.5%; 0.1 ml/10 g)의 복강내 주사로 마취시키고 2개의 귀 주변을 면도하였다.
- [0585] D1로부터, 20 μ l EtOH 또는 2 nmol의 MC903(20 μ l EtOH 중의)을 5 연속일 동안 마우스의 양쪽 귀에 국소 적용한다.
- [0586] D1에서부터 D8까지, 상기 마우스에게 시험 화합물(메틸셀룰로스 0.5% 중의 15 또는 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) 또는 박사메타손(메틸셀룰로스 0.5% 중의 5 mg/kg, p.o., q.d.) 또는 비히클을 투여한다.
- [0587] 6.4.4. 혈장 중 화합물 수준의 정량분석
- [0588] 각 시험 화합물의 혈장 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하며, 여기에서 질량 분광계가 양 또는 음의 전기분무 방식으로 작동된다.
- [0589] 6.4.5. 약동학적 매개변수의 측정
- [0590] 약동학적 매개변수를 피닉스(Phoenix)(등록상표) 원놀린(등록상표)(파사이트(등록상표), 미국 소재)을 사용하여 계산한다.
- [0591] 6.4.6. 질병의 평가
- [0592] 양쪽 귀의 두께를 상기 연구 개시시, 이를마다 및 희생시, 두께 게이지(미투토요, 앱솔루트 디지매틱, 547-321)를 사용하여 측정한다(아이소플루란 흡입에 의해 유도된 마취 하에).
- [0593] 체중을 상기 연구의 개시시, 이를마다 및 희생시 평가한다.
- [0594] D4에서, 모든 그룹으로부터의 마우스는 프로센스(ProSense)(등록상표)(0.8 nmol/10 g, IP)를 수용한다. D5에서, 상기 마우스를 이말진 및 루펜(7.5%/2.5%; 0.1 ml/10 g)의 복강내 주사로 마취시킨다. 과립구 침윤을 생체내 분자 영상화(브룩커 인비보 익스트림(Bruker In-Vivo Xtreme) 영상화 시스템, 여기파장: 630 nm, 방출파장: 700 nm, 포착 시간: 5초)를 사용하여 측정한다.
- [0595] D8에서, 최종 투여 2h 후에, 마우스를 희생시키고 전체 혈액을 EDTA-코팅된 튜브에 수집하고 혈장을 추가의 측정을 위해 동결시킨다(순환 화합물 포함). 혈액 샘플을 또한 혜파린-코팅된 튜브에 수집한다.
- [0596] 귓바퀴를 수집하고 청량한다. 하나의 귀는 종방향으로 반으로 절단한다. 한쪽 반은 조직학을 위해 포름알데하이드 완충제 4% 중에 고정시키고; 다른 한쪽은 유전자 발현의 평가를 위해 RNAlater(등록상표)에 담근다.
- [0597] 그룹당 8마리의 마우스가 존재한다. 결과를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 체중의 경우 EtOH 비히클 그룹에 대해, 귀 두께 및 체중의 경우 MC903 비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0598] 6.4.7. 조직학
- [0599] 희생 후, 반쪽 귀들을 수집하여 3.7% 포름알데하이드 중에 고정시킨 후 파라핀 포매시킨다. 4 μ m 두께 절편을 특이적인 세포 마커 항체: T 세포의 경우 CD3 및 호산구의 경우 EPX를 사용하여 면역조직화학에 의해 면역염색 시킨다. 마우스당 전체 절편으로부터의 상기 면역염색된 세포 면적을 상 분석(칼로픽스(Calopix) 소프트웨어, TRIBVN 헬쓰케어)에 의해 측정한다. 데이터를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 MC903 비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0600] 6.4.8. 유전자 발현 분석
- [0601] 귓을 RNAlater(등록상표) 용액으로부터 제거하고 베르틴(Bertin) 장비 프레셀리스(등록상표) 균질화기에서 1.4 mm 세라믹 바이드로 파괴후 트리졸(등록상표)에 넣는다. 이어서 전체 RNA를 페놀/클로로포름 프로토콜을 사용하여 추출하고 RNeasy(등록상표) 96 QIAcube(등록상표) HT 키트(퀴아겐, cat no. 74171)를 사용하여 QIAcube로 정제시킨다. cDNA를 제조하고 정량적인 PCR을 ViiA7 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)에서 SYBR 그린 기술을 사용하여 퀴아겐으로부터의 유전자-특이적인 프라이머로 수행한다. 각 유전자(IL4, IL5, IL13, TSLP, IL33, ST2, IL25, IL31, IFN γ , IL6, IL10, LCN2, S100A8 및 S100A9)의 발현 수준을 HPRT, GAPDH 및 β -액틴 하우스키핑 유전자 발현 수준에 비교하여 계산한다. 데이터를 상대적인 양의 평균±SEM으로서 나타낸다

($RQ = 2^{-\Delta C_T}$, 여기에서 $\Delta C_T = C_T$ 샘플 - 평균(C_T HPRT, C_T GAPDH, C_T β -액틴). 사용된 통계학적 검정은 EtOH/MC903 비히클 그룹에 대해 둔네트의 사후 검정에 대한 분산의 ANOVA 분석이다.

[0602] 6.5. MC903의 국소 적용에 의해 유발된 아토피성 피부염의 쥐 치료 모델

[0603] 6.5.1. 물질

[0604] 메틸셀룰로스 0.5%를 WWR(cat no. AX021233)으로부터 수득한다. MC903(칼시포트리올)을 토크리스 바이오사이언스(cat no. 2700/50)로부터 수득한다. 프로센스(등록상표) 680을 퍼킨엘머(cat no. NEV10003)로부터 수득한다. RNAlater(등록상표)를 앰비온(cat no. AM7021)으로부터 수득한다. 이말진(등록상표) 1000(메리얼) 및 롬펜(등록상표) 2%(바이엘)를 센트라베트(cat no. IMA004-6827812 및 ROM001-6835444)로부터 수득한다.

[0605] 6.5.2. 동물

[0606] BALB/cN 마우스(암컷, 18~20 g 체중) 또는 CD1/스위스 마우스(암컷, 24~26 g 체중)를 장비에 랩스(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기(07:00 ~ 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22±2 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.

[0607] 6.5.3. 연구 설계

[0608] 본 연구의 설계는 리 앤(Li M.) 등(Li et al. 2006)으로부터 개정된 것이다.

[0609] 첫째날(D1)에, 상기 마우스를 이말진 및 롬펜(7.5%/2.5%; 0.1 ml/10 g)의 복강내 주사로 마취시키고 2개의 귀주변을 면도한다.

[0610] D1로부터, 20 μ l EtOH 또는 2 nmol의 MC903(20 μ l EtOH 중의)을 D9, D11 또는 D15(주말 동안은 제외)까지 마우스의 양쪽 귀에 국소 적용한다.

[0611] D5로부터, 상기 마우스에게 시험 화합물(메틸셀룰로스 0.5% 중의 15 또는 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) 또는 텍사메타손(메틸셀룰로스 0.5% 중의 5 mg/kg, p.o., q.d.) 또는 비히클을 D10, D12 또는 D16까지 투여한다.

[0612] 6.5.4. 혈장 중 화합물 수준의 정량분석

[0613] 각 시험 화합물의 혈장 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하며, 여기에서 질량 분광계가 양 또는 음의 전기분무 방식으로 작동된다.

[0614] 6.5.5. 약동학적 매개변수의 측정

[0615] 약동학적 매개변수를 피닉스(등록상표) 윈놀린(등록상표)(파사이트(등록상표), 미국 소재)을 사용하여 계산한다.

[0616] 6.5.6. 질병의 평가

[0617] 양쪽 귀의 두께를 MC903의 적용 전, 상기 연구 개시시, 1주일에 3회 및 희생시, 두께 게이지(미투토요, 앱솔루트 디지매틱, 547-321)를 사용하여 측정한다(아이소플루란 흡입에 의해 유도된 마취 하에).

[0618] 체중을 상기 연구의 개시시, 1주일에 3회 및 희생시 평가한다.

[0619] D8, D10 또는 D11에서, 모든 그룹으로부터의 마우스는 프로센스(등록상표) 680 탐침(0.8 nmol/10 g, IP)을 수용한다. 다음날(D9, D11 또는 D12), 상기 마우스를 이말진 및 롬펜(7.5%/2.5%; 0.1 ml/10 g)의 복강내 주사로 마취시킨다. 과립구 침윤을 생체내 문자 영상화(브룩커 인비보 익스트림 영상화 시스템, 여기파장: 630 nm, 방출파장: 700 nm, 포착 시간: 5초)를 사용하여 측정한다.

[0620] D10, D12 또는 D16에서, 최종 투여 2h 후에, 마우스를 희생시키고 전체 혈액을 EDTA-코팅된 튜브에 수집하고 혈장을 추가의 측정을 위해 동결시킨다(순환 화합물 포함).

[0621] 귓바퀴를 수집한다. 하나의 귀는 종방향으로 반으로 절단한다. 한쪽 반은 조직학을 위해 포름알데하이드 완충제 4% 중에 고정시키고; 다른 한쪽은 유전자 발현의 평가를 위해 RNAlater(등록상표)에 담근다.

[0622] 그룹당 8마리의 마우스가 존재한다. 결과를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 체중의 경우 EtOH 비히클 그룹에 대해, 귀 두께 및 체중의 경우 MC903 비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.

- [0623] 6.5.7. 조직학
- [0624] 희생 후, 반쪽 귀들을 수집하여 3.7% 포름알데하이드 중에 고정시킨 후 파라핀 포매시킨다. 4 μm 두께 절편을 항-CD3 항체를 사용하여 면역조직화학에 의해 면역염색시킨다. 마우스당 전체 절편으로부터의 상기 면역염색된 세포 면적을 상 분석(칼로픽스 소프트웨어, TRIBVN 헬쓰케어)에 의해 측정한다. 데이터를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 MC903 비히클 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0625] 6.5.8. 유전자 발현 분석
- [0626] 귀를 RNAlater(등록상표) 용액으로부터 제거하고 베르틴 장비 프레셀리스(등록상표) 균질화기에서 1.4 mL 세라믹 비드로 파괴후 트리졸(등록상표)에 넣는다. 이어서 전체 RNA를 페놀/클로로포름 프로토콜을 사용하여 추출하고 RNeasy(등록상표) 96 QIAcube(등록상표) HT 키트(퀴아젠, cat no. 74171)를 사용하여 QIAcube로 정제시킨다. cDNA를 제조하고 정량적인 PCR을 ViiA7 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)에서 SYBR 그린 기술을 사용하여 퀴아젠으로부터의 유전자-특이적인 프라이머로 수행한다. 각 관심 유전자(GOI = IL4, IL5, IL13, TSLP, IL33, ST2, IL25, IL31, IFN γ , IL6, IL10, LCN2, S100A8 및 S100A9)의 발현 수준을 HPRT, GAPDH 및 β -액틴 하우스키핑 유전자 발현 수준에 비교하여 계산한다.
- [0627] 모든 qPCR 데이터를 표준화된 상대적인 양(NRQ = $2^{(\Delta Cq \text{ GOI})}/\text{기하평균} (2^{(\Delta Cq \text{ HPRT}), 2^{(\Delta Cq \text{ GAPDH}), 2^{(\Delta Cq \text{ } \beta\text{-액틴}}))}$ (여기에서 $\Delta Cq = Cq \text{ 평균} - Cq \text{ 샘플}$)의 평균±SEM으로서 나타낸다. 사용된 통계학적 검정은 EtOH/MC903 비히클 그룹에 대해 둔네트의 사후 검정에 대한 분산의 ANOVA 분석이다.
- [0628] 6.6. 이미퀴모드의 표피 적용에 의해 유발된 전신 홍반성 루푸스의 쥐 모델
- [0629] 6.6.1. 물질
- [0630] 알다라(등록상표) 5% 이미퀴모드 크림을 MEDA로부터 수득한다.
- [0631] 마우스 항-이중가닥 DNA 항체 ELISA 키트를 알파 다이아그노스틱 인터내셔널(Alpha Diagnostic International)(cat no. 5120)로부터 수득한다. 마우스 뇌 알부민 ELISA 키트를 애브캠(Abcam)(cat no. ab108792)으로부터 수득한다. 뇌 크레아티닌 분석 키트를 아브노바(Abnova)(cat no. KA4344)로부터 수득한다.
- [0632] 6.6.2. 동물
- [0633] BALB/cJ 마우스(암컷, 18-20 g 체중)를 장비에 랩스(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기 (07:00 - 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22±2 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.
- [0634] 6.6.3. 연구 설계
- [0635] 본 연구의 설계는 요코가와 엠(Yokogawa M.) 등(Yokogawa et al. 2014)으로부터 개정된 것이다.
- [0636] 첫 째날(D1)에, 상기 마우스의 오른쪽 귀 주변을 면도한다.
- [0637] 상기 마우스는 12주 연속해서(D1 내지 D86) 우측 귓바퀴에 주당 3회 1.25 mg 의 이미퀴모드의 표피 적용을 수용한다. 대조용 그룹은 동일한 양의 바셀린을 수용한다.
- [0638] D1에서부터 D86까지, 마우스에게 시험 화합물(메틸셀룰로스 0.5% 중의 30 mg/kg, p.o., q.d.) 또는 비히클(10 mL/kg)을 투여한다.
- [0639] 6.6.4. 질병의 평가
- [0640] 귀의 두께를 자동 게이지(미투토요, 앱솔루트 디지매틱, 547-321)로 1주일에 1회 측정한다.
- [0641] 체중을 상기 실험의 개시 및 희생시까지 1주일에 1회 평가한다. 부검시, 비장 중량을 또한 측정한다. 상기 마우스를 최종 투여 2h 후에 희생시킨다.
- [0642] 상이한 시점들(예를 들어 D28, D56 및 D84에서)에서, 상기 마우스를 개별적으로 대사 우리에 넣어 소변 분석을 수행하고 단백뇨(알부민 대 크레아티닌 비)를 평가한다.
- [0643] 상이한 시점들에서(예를 들어 D28, D56 및 D86에서) 혈청을 수집하여 항-이중 가닥-DNA IgG 수준을 평가한다.
- [0644] D13에서, 혈액 샘플을 또한 투여 직전(T0) 및 투여-후 1h, 3h, 6h째에 PK 프로파일링을 위해 역-안와 공동으로 부터 수집한다.

- [0645] 그룹당 8 내지 19마리의 마우스가 존재한다. 결과를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 이미퀴모드 비히를 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0646] 6.6.5. 혈장 중 화합물 수준의 정량분석
- [0647] 각 시험 화합물의 혈장 농도를 LC-MS/MS 방법에 의해 측정하며, 여기에서 질량 분광계가 양 또는 음의 전기분무 방식으로 작동된다.
- [0648] 6.6.6. 약동학적 매개변수의 측정
- [0649] 약동학적 매개변수를 피닉스(등록상표) 윈놀린(등록상표)(파사이트(등록상표), 미국 소재)을 사용하여 계산한다.
- [0650] 6.6.7. 조직학
- [0651] 회생 후, 좌측 신장을 수집하고 종방향으로 2개 부분으로 절단한다. 하나의 부분은 3.7% 포름알데하이드에 고정시킨 후 파라핀 포매시킨다. 4 μm 두께의 절편을 만들고 피리오드 산-쉬프(PAS)로 염색하거나 또는 CD3(T 세포), CD20(B 세포) 및 F4/80(대식세포)으로 면역염색시킨다.
- [0652] 6.6.7.1. 조직병리학
- [0653] 각 사구체에서, 메산지움증식, 모세관내 증식, 메산지움 기질 팽창 및 부분 경화증을 포함하는 4개의 상이한 판독결과를 0 내지 2의 규모로 등급화하고 이어서 평가한다. 각각의 신장에 대해서, 약 50개의 사구체를 채점하고 이어서 평균하여 하나의 사구체 병변 점수를 제공한다(Yokogawa et al. 2014). 데이터를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 이미퀴모드 비히를 그룹에 대해 크루스칼 왈리스 검정에 이어서 둔스 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0654] 6.6.7.2. 세포 정량분석
- [0655] 각각의 세포 유형에 대해서, 면역조직화학 분석을 전체 조직 절편상에서 x20의 배율로 상 분석(칼로픽스(CaloPix) 소프트웨어, TRIBVN 헬쓰케어)을 사용하여 수행한다. 데이터를 평균±SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 이미퀴모드 비히를 그룹에 대해 일원 ANOVA에 이어서 둔스 사후 검정을 사용하여 수행한다.
- [0656] 6.6.8. 유전자 발현 분석
- [0657] 회생시, 상기 좌측 신장의 두 번째 부분을 1.4 mm 세라믹 비드를 함유하는 튜브에 넣고 베르틴 장비 프레셀리스(등록상표) 균질화기로 1% DTT RLT 용해 완충제(퀴아젠, cat no. 79216)에서 파괴시킨다. 이어서 전체 RNA를 RNeasy(등록상표) 96 QIAcube(등록상표) HT 키트(퀴아젠, cat no. 74171)를 사용하여 QIAcube로 정제시킨다. cDNA를 제조하고 정량적인 PCR을 ViiA7 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)에서 SYBR 그린 기술을 사용하여 퀴아젠으로부터의 유전자-특이적인 프라이머로 수행한다. 각 관심 유전자(GOI = CD3, CD68, CD20, OAS1, Mx1, IFIT1, CXCL11 및 Usp18)의 발현 수준을 사이클로필린, GAPDH 및 β -액틴 하우스키핑 유전자 발현 수준에 비교하여 계산한다.
- [0658] 회생시, 상기 비장의 1/3을 1.4 mm 세라믹 비드를 함유하는 튜브에 넣고 베르틴 장비 프레셀리스(등록상표) 균질화기로 트리졸(등록상표)에서 파괴시킨다. 전체 RNA를 폐놀/클로로포름 과정을 사용하여 추출하고 이어서 RNeasy(등록상표) 96 QIAcube(등록상표) HT 키트(퀴아젠, cat no. 74171)를 사용하여 QIAcube로 정제시킨다. cDNA를 제조하고 정량적인 PCR을 ViiA7 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)에서 SYBR 그린 기술을 사용하여 퀴아젠으로부터의 유전자-특이적인 프라이머로 수행한다. 각 관심 유전자(GOI = CD20, IRF7, OAS1, Mx1, IFIT1, CXCL11, Usp18, BCL6, CXCL13, CXCR5, MAF, ICOSL, PDCD1, SH2D1a)의 발현 수준을 사이클로필린, GAPDH 및 β -액틴 하우스키핑 유전자 발현 수준에 비교하여 계산한다.
- [0659] 모든 qPCR 데이터를 표준화된 상대적인 양(NRQ = $2^{(\Delta Cq - GOI)}$)/기하평균 ($2^{(\Delta Cq - 사이클로필린)}$), $2^{(\Delta Cq - GAPDH)}$, $2^{(\Delta Cq - \beta\text{-액틴})}$ (여기에서 $\Delta Cq = Cq_{\text{평균}} - Cq_{\text{샘플}}$)의 평균±SEM으로서 나타낸다. 사용된 통계학적 검정은 이미퀴모드 비히를 그룹에 대해 둔네트의 사후 검정에 대한 분산의 ANOVA 분석이다.
- [0660] 6.7. IL-23의 과발현에 의해 유발된 건선성 관절염의 쥐 모델
- [0661] 6.7.1. 물질
- [0662] 마우스 IL-23 증대된 에피솜 발현 백터(EEV)를 시스템 바이오사이언시즈(cat no. EEV651A-1)로부터 수득한다.

링거액 표를 시그마 알드리치(cat no. 96724-100TAB)로부터 수득한다. 마우스 IL-23 콘티킨(Quantikine) ELISA 키트를 R&D 시스템스(cat no. M2300)로부터 수득한다. 프로센스(ProSense)(등록상표) 680 및 오스테오센스(OsteoSense)(등록상표) 750EX를 퍼킨엘머(cat no. NEV10003 및 NEV10053EX)로부터 수득한다. RNAlater(등록상표)를 앰비온(cat no. AM7021)으로부터 수득한다. 이말진(등록상표) 1000(메리얼) 및 롬펜(등록상표) 2%(바이엘)를 센트라베트(cat no. IMA004-6827812 및 ROM001-6835444)로부터 수득한다.

- [0663] 6.7.2. 동물
- [0664] B10.RIII 마우스(수컷, 8주 된 것)를 찰스 리버(Charles River)(프랑스 소재)로부터 수득한다. 마우스를 12h 명/암 주기(07:00 ~ 19:00)로 유지시킨다. 온도를 22±2 °C에서 유지시키고, 음식물 및 물을 자유롭게 제공한다.
- [0665] 6.7.3. 연구 설계
- [0666] 본 연구의 설계는 셜록 제이피(Sherlock JP) 등(Sherlock et al. 2012)으로부터 개정된 것이다.
- [0667] 첫째날(D1)에, 상기 마우스는 링거 또는 링거 중의 IL-23 EEV의 꼬리 정맥내로의 유체역학적 주사를 겪는다($3 \mu\text{g}/2.1 \text{ ml}$, 4 내지 6초의 기간에 걸쳐 IV 주사됨).
- [0668] D5로부터, 1주일에 2회, 상기 마우스를 실험의 종료시까지 임상 증상에 대해 채점한다.
- [0669] D5에서, 하악하 정맥에서 첨자에 의해 채혈하여 혈청 IL-23 농도를 평가한다.
- [0670] D9에서, 모든 그룹으로부터의 마우스는 프로센스(등록상표) 680 탐침(0.8 nmol/10 g, IP)을 수용한다. D10에서, 상기 마우스를 이말진 및 롬펜(7.5%/2.5%; 0.1 ml/10 g)의 복강내 주사로 마취시킨다. 이어서 과립구 침윤을 생체내 분자 영상화(브룩커 인비보 익스트림 영상화 시스템, 여기파장: 630 nm, 방출파장: 700 nm, 포착 시간: 5초)를 사용하여 측정한다.
- [0671] D11에서, 프로센스(등록상표) 680 분자 영상화 및 채점에 따라 무작위화를 수행한다.
- [0672] D12로부터, 마우스에게 시험 화합물(메틸셀룰로스 0.5% 중의 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) 또는 비히클을 투여한다.
- [0673] D19에서, 혈액을 T0, 최종 투여후 T1h, T3h 및 T6h 시간에서 샘플링한다. 혈장을 분리시키고 생물분석시까지 20 °C에서 유지시킨다.
- [0674] D36에서, 모든 그룹으로부터의 마우스를 화합물의 최종 투여 2h 후에 희생시킨다. 하기를 수집한다:
- 좌측 뒷다리의 골부착부(피부 없는) 둘레의 뒤꿈치를 프레셀리스 튜브에서 즉시 급속 냉동시킨다. 손가락을 RNAlater(등록상표)를 함유하는 튜브에 수집한다. 우측 뒷다리를 조직학 평가를 위해 즉시 포름알데하이드 완충제 4% 중에 고정시킨다. X-선 측정을 고정후 48시간째에 수행한다.
 - 한쪽 귀를 전사물 분석을 위해 RNAlater(등록상표)를 함유하는 튜브에 수집한다.
- [0677] - 전체 혈액을 혈청 혈액 튜브에 수집하고 8 내지 10회 서서히 뒤집어 혼합한다. 응고후, 혈액 샘플을 1800xg에서 10min 원심분리시킨다. 원심분리후, 혈청을 -80 °C에서 보관한다.
- [0678] - 결장 부분(1 cm 원위 결장)을 전사물 분석을 위해 프레셀리스 튜브에 즉시 급송 냉동시킨다. 또 다른 부분(1 cm 원위 결장)을 추가의 조직학 분석을 위해 포름알데하이드 완충제 4% 중에 즉시 고정시킨다.
- [0679] 6.7.4. 질병의 평가
- [0680] 체중을 상기 연구의 개시시, 이어서 1주일에 2회 및 희생시 평가한다.
- [0681] 매주 2회, 염증의 임상적 징후를 채점한다: 정상적인 발의 경우 0; 한 손가락이 부은 경우 1; 2개 이상의 손가락이 부은 경우 2; 전체 발이 부인 경우 3. 전체 사지의 점수를 합하여 총점을 생성시킨다.
- [0682] D23에서, 모든 그룹으로부터의 마우스는 프로센스(등록상표) 680 탐침(0.8 nmol/10 g, IP)을 수용한다. D24에서, 상기 마우스를 이말진 및 롬펜(7.5%/2.5%; 0.1 ml/10 g)의 복강내 주사로 마취시킨다. 이어서 과립구 침윤을 생체내 분자 영상화(브룩커 인비보 익스트림 영상화 시스템, 여기파장: 630 nm, 방출파장: 700 nm, 포착 시간: 5초)를 사용하여 측정한다.
- [0683] D32에서, 모든 그룹으로부터의 마우스는 프로센스(등록상표) 680 탐침(0.8 nmol/10 g, IP) 및 오스테오센스(등록상표) 750EX 탐침(0.8 nmol/10 g, IP)을 수용한다. D33에서, 상기 마우스를 이말진 및 롬펜(7.5%/2.5%; 0.1

$\text{ml}/10 \text{ g}$)의 복강내 주사로 마취시킨다. 과립구 침윤 및 골 재건을 생체내 분자 영상화(브룩커 인비보 익스트림 영상화 시스템; 프로센스(등록상표) 680 탐침의 경우 여기파장: 630 nm, 방출파장: 700 nm, 포착 시간: 5초; 오스테오센스(등록상표) 750EX 탐침의 경우 여기파장: 720 nm, 방출파장: 790 nm, 포착 시간: 5초)를 사용하여 측정한다.

[0684] 그룹당 10마리의 마우스가 존재한다. 결과를 평균 \pm SEM으로서 나타내고 통계학적 분석을 채점 및 영상화 분석의 경우 병든 비하를 그룹에 대해, 체중의 경우 모의 비하를 그룹에 대해, 일원 ANOVA에 이어서 둔네트의 사후 검정을 사용하여 수행한다.

최종 소견

[0686] 당해 분야의 숙련가들은 상기 설명이 사실상 예시적이고 설명적이며, 본 발명과 그의 바람직한 실시태양들을 예시하고자 함을 알 것이다. 통상적인 실험을 통해서, 숙련가는 본 발명의 진의로부터 이탈됨 없이 수행될 수 있는 명백한 변형 및 변화들을 인식할 것이다. 첨부된 청구의 범위 내에 있는 모든 상기와 같은 변형들을 포함시키고자 한다. 따라서, 본 발명을 상기 설명에 의해서가 아닌, 하기의 청구의 범위 및 그의 등가물들에 의해서 한정하고자 한다.

[0687] 본 명세서에 인용된, 비제한적으로 특허 및 특허 출원을 포함한 모든 공보들은, 각각의 개별적인 공보가 마치 완전히 개시된 것처럼 본 발명에 참고로 인용됨을 구체적이고 개별적으로 가리키는 바와 같이 본 발명에 참고로 인용된다.

[0688] 다양한 화합물들의 차별적인 세포 침투 능력과 같은 인자들이 시험관 내 생화학에서 화합물의 활성과 세포 분석 간의 불일치에 기여할 수도 있음을 물론이다.

[0689] 본 출원에 제공되고 나타낸 바와 같은 본 발명 화합물들의 화학 명칭들 중 적어도 일부는 상업적으로 입수할 수 있는 화학물질 명명 소프트웨어 프로그램의 사용에 의해 자동화된 토대로 발생될 수 있으며 독립적으로 입증되지는 않았다. 이러한 기능을 수행하는 전형적인 프로그램은 오픈아이 사이언티픽 소프트웨어 인코포레이티드(OpenEye Scientific Software, Inc.)에 의해 판매되는 렉시켐(Lexicem) 명명 도구 및 MDL 인포메이션 시스템스 인코포레이티드(Information Systems, Inc.)에 의해 판매되는 오토놈(Autonom) 소프트웨어 도구를 포함한다. 상기 나타낸 화학물질 명칭 및 도시된 구조가 상이한 경우에, 상기 도시된 구조는 억제될 것이다.

참고문헌

- [0691] Bain J et al. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **371**, 199-204.
- [0692] Brehm MA, Daniels KA, Welsh RM. 2005. Rapid Production of TNF- α following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells. *J. Immunol.* **175**, 5043-5049.
- [0693] Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. 2011. Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted? *World J. Clin. Oncol.* **2**, 80-93.
- [0694] Bundgaard H. 1985. *Design of prodrugs*, Elsevier.
- [0695] Carmi Y et al. 2013. The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. *J. Immunol.* **190**, 3500-3509.
- [0696] Chiang EY, Yu X, Grogan JL. 2011. Immune Complex-Mediated Cell Activation from Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis Patients Elaborate Different Requirements for IRAK1/4 Kinase Activity across Human Cell Types. *J. Immunol.* **186**, 1279-1288.
- [0697] Cohen P. 2009. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 317-324.
- [0698] Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 633-652.
- [0699] Dy GK, Adjei AA. 2013. Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. *CA. Cancer J. Clin.* **63**, 249-279.
- [0700] Fabian MA et al. 2005. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat.*

Biotechnol. **23**, 329–336.

- [0701] van der Fits L et al. 2009. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* **182**, 5836–5845.
- [0702] Force T, Kolaja KL. 2011. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 111–126.
- [0703] Koziczak-Holbro M et al. 2009. The critical role of kinase activity of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in animal models of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* **60**, 1661–1671.
- [0704] Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM. 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38 α dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 769–778.
- [0705] Li D et al. 2014. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 1422–1432.e11.
- [0706] Li M et al. 2006. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 11736–11741.
- [0707] Li S et al. 2002. IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5567–5572.
- [0708] Li Z et al. 2015. Inhibition of IRAK1/4 sensitizes T cell acute lymphoblastic leukemia to chemotherapies. *J. Clin. Invest.* **125**, 1081–1097.
- [0709] McHedlidze T et al. 2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* **39**, 357–371.
- [0710] Nabe T. 2014. Interleukin (IL)-33: New Therapeutic Target for Atopic Diseases. *J. Pharmacol. Sci.* **126**, 85–91.
- [0711] Ngo VN et al. 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* **470**, 115–119.
- [0712] Rankin AL et al. 2010. IL-33 Induces IL-13-Dependent Cutaneous Fibrosis. *J. Immunol.* **184**, 1526–1535.
- [0713] Rhyasen GW, Starczynowski DT. 2015. IRAK signalling in cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 232–237.
- [0714] Ringwood L, Li L. 2008. The involvement of the interleukin-1 Receptor-Associated Kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine* **42**, 1–7.
- [0715] Rizzo HL et al. 2011. IL-23-Mediated Psoriasis-Like Epidermal Hyperplasia Is Dependent on IL-17A. *J. Immunol.* **186**, 1495–1502.
- [0716] Salimi M et al. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* **210**, 2939–2950.
- [0717] Sherlock JP et al. 2012. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR γ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.* **18**, 1069–1076.
- [0718] Staschke KA et al. 2009. IRAK4 Kinase Activity Is Required for Th17 Differentiation and Th17-Mediated Disease. *J. Immunol.* **183**, 568–577.
- [0719] Sundberg TB et al. 2014. Small-molecule control of cytokine function: new opportunities for treating immune disorders. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **23**, 23–30.
- [0720] Treon SP et al. 2012. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 826–833.
- [0721] Vidal-Vanaclocha F et al. 2000. IL-18 regulates IL-1 β dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 734–739.
- [0722] Wang Z et al. 2009. IRAK-4 Inhibitors for Inflammation. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 724–737.

- [0723] Wuts PGM, Greene TW. 2006. *Greene의 Protective Groups in Organic Synthesis* 4th ed., Wiley-Interscience.
- [0724] Yan C et al. 2012. C5a-regulated CCAAT/Enhancer-binding Proteins α and β Are Essential in Fcγ Receptor-mediated Inflammatory Cytokine and Chemokine Production in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**, 3217-3230.
- [0725] Yokogawa M et al. 2014. Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads to Systemic Autoimmunity in Wild-Type Mice: A New Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 694-706.

서 열 목록

<110> Galapagos NV
 <120> NOVEL COMPOUNDS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF FOR THE
 <130> GAL-226-WO-PCT
 <160> 4
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RIP140 peptide
 <400> 1
 Cys Tyr Gly Val Ala Ser Ser His Leu Lys Thr Leu Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Lys Val Lys Asp Gln
 20

<210> 2
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Histone H3 peptide

<400> 2
 Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
 1 5 10 15
 Arg Lys Gln Leu Cys
 20
 <210> 3
 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Histone H1-derived peptide

<400> 3

Gly Gly Gly Pro Ala Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDktide

<400> 4

Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Arg Arg

1 5 10 15

Glu Pro Arg Ile Leu Ser Glu Glu Glu Gln Glu Met Phe Arg Asp Phe

20 25 30

Asp Tyr Ile Ala Asp Trp Cys

35