



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0043258
 (43) 공개일자 2010년04월28일

(51) Int. Cl.
A61K 31/45 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C07D 223/12 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-7003839
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2008년08월01일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2010년02월22일
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2008/002635
 (87) 국제공개번호 WO 2009/016390
 국제공개일자 2009년02월05일
 (30) 우선권주장
 0715068.3 2007년08월02일 영국(GB)

(71) 출원인
캠브리지 엔터프라이즈 리미티드
 영국 씨비2 1티엔 캠브리지 트리니티 레인 더 올드 스쿨스
 (72) 발명자
그레인저, 데이비드, 존
 영국 캠브리지 씨비22 4알에이 덕스포드 세인트 존스 스트리트 9
폭스, 데이비드
 영국 옥스포드셔 오엑스16 2에이피 밴버리 워릭 로드 180
 (74) 대리인
김윤배, 강철중, 이범일, 조영신, 이상목

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 항-염증 조성물

(57) 요약

본 발명은 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온, 및 그것의 약제학적 조성물 그리고 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 그것의 사용에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

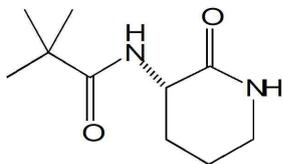
염증성 질환의 치료용 의약의 제조를 위한, 식 (I)의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 그것의 염의 용도:



(I)

청구항 2

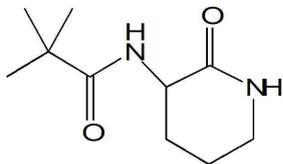
염증성 질환의 치료용 의약의 제조를 위한, 식(I')의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 그것의 염의 용도:



(I')

청구항 3

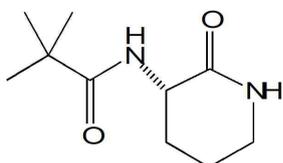
활성성분으로서 식 (I)의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 그것의 염, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 담체를 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 조성물:



(I)

청구항 4

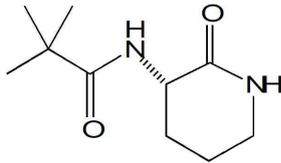
활성성분으로서 식 (I')의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 그것의 염, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 담체를 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 조성물:



(I')

청구항 5

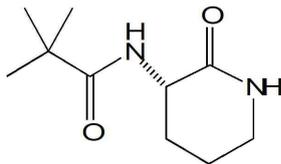
일반식 (I)의 화합물:



(I)

청구항 6

일반식 (I')의 화합물:



(I')

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 염증성 질환이 자가면역질환, 혈관장애, 바이러스 감염 또는 복제, 천식, 골다공증 (낮은 골 미네랄 밀도), 종양성장, 장기이식 거부 및/또는 지연된 이식 또는 장기 기능, 상승된 TNF- α 수준에 의해 특징되는 질병, 건선, 피부 상처, 세포 내 기생생물로 인한 질병, 신경 통증, 알러지, 알츠하이머병, 항원 유도된 추상반응, 면역 반응 억제, 류머티스성 관절염, 다발성 경화증, ALS, 섬유증, 및 접합형성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 식 (I) 또는 (I')의 화합물의 용도.

청구항 8

제7항에 있어서, 염증성 질환이 천식, 알러지성 비염 또는 만성 폐쇄성 폐질환인 식 (I) 또는 (I')의 화합물의 용도.

청구항 9

제7항에 있어서, 염증성 질환이 부인과 또는 외과 수술 후의 유착 형성인 식 (I) 또는 (I')의 화합물의 용도.

청구항 10

제7항에 있어서, 염증성 질환이 당뇨병성 신증을 포함하는 신증인 식 (I) 또는 (I')의 화합물의 용도.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 조성물 또는 의약의 항-염증성 양을 환자에게 투여하는 것인, 염증성 질환의 증상(약제에 대한 부정적 염증 반응을 포함)의 치료, 개선 또는 예방 방법.

청구항 12

제3항 또는 제4항에 있어서, 염증성 질환의 증상의 치료, 개선 또는 예방에 사용하기 위한 것인 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 질환은 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 질환으로부터 선택되는 것인 약제학적으로 허용가능한 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라하이드로피리딘-2-온, 및 그것의 약제학적 조성물 및 염증 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 그것의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증은 생리학적 숙주 방어의 중요한 구성요소이다. 그러나, 일시적으로 또는 공간적으로 부적절한 염증 반응이, (자가면역 질환, 천식 또는 아테롬성 동맥경화증과 같은) 명백한 백혈구 구성요소에 의한 질병과, 뿐만 아니라 (골다공증 또는 알츠하이머 질환과 같은) 통상적으로 백혈구를 포함하는 것으로 간주되지 않은 질병을 포함하여, 광범위한 질병에 일부 역할을 한다는 것이 점점 분명하다.

[0003] 케모킨은 인터킨 8에 상동성을 갖는 신호 분자의 큰 집단(family)으로, 생리적 및 병리적 조건 모두에서 왕래하는 백혈구를 조절하는데 포함된다. 케모킨 신호화에 포함되는 50개 이상의 리간드와 20개의 수용체로, 시스템은 골수로부터 복잡한 면역 조절과정을 통해 말초로 백혈구를 어드레스하고, 그리고 2차 림프관을 통해 되돌아오는 필수적인 정보 밀도를 갖는다. 그러나, 케모킨 시스템의 이러한 복잡성은 우선 케모킨 수용체 차단을 통해 염증성 반응을 조절하기 위한 약물학적 접근을 방해한다. 주어진 염증성 질환에서 치료적 이익을 가져오기 위해 케모킨 수용체(들)가 억제되어야 한다는 결정은 증명하기 어렵다.

[0004] 더욱 최근, 동시에 광범위한 케모킨에 의해 신호화를 차단하는 약제의 집단이 기재되어 있다: Reckless et al., *Biochem J.*(1999) 340:803-811. 첫번째 이와 같은 약제, "펩티드 3"으로 명명된 펩티드는 5개의 다른 케모킨들에 의해 유도된 백혈구 이동을 방해한다는 것을 발견되었고, 반면, (fMLP 또는 TGF-베타와 같은) 화학유인물질에 대한 반응에서의 이동은 변형되지 않고 남았다. 이 펩티드, 및 그것의 동족체, NR58-3.14.3 (즉, SEQ.ID.No.1 c(DCys-DGln-DIle-DTrp-DLys-DGln-DLys-DPro-DAsp-DLeu-DCys)-NH₂)는 용어 "광역 스펙트럼 케모킨 억제제 (BSCIs)로 통합된다. Grainger et al., *Biochem. Pharm.* 65 (2003) 1027-1034는 그 결과로서, BSCIs가 질병의 동물 모델의 범위에서 잠재적으로 유용한 항-염증성 활성을 갖는다는 것을 나타낸다. 흥미롭기는, 다중 케모킨의 동시적 차단은 외관상으로 급성 또는 만성 독성과 관련이 없고, 이 접근법은 스테로이드와 유사한 이점을 갖지만 부작용은 감소된, 새로운 항-염증성 의약의 개발을 위한 유용한 전략이라는 것을 제안한다.

[0005] 그러나, 펩티드와 NR58-3.14.3과 같은 펩티드 유도체들은, 인 비보에서 사용하기에 최적이지 않다. 이들을 합성하는 것은 상당히 비싸고, 비교적 바람직하지 않은 약물동태학 및 약효학적 특성을 갖는다. 예를 들면, NR58-3.14.3은 경구적으로 생물학적으로 이용가능하지 않고 정맥주사 후 30분 미만의 반감기를 갖는 혈액 플라즈마로부터 제거된다.

[0006] 두 개의 병행 전략이, 펩티드 3과 NR58-3.14.3의 항-염증성 특성을 보유하나 약으로 사용하도록 개선된 특성을 갖는 신규한 제제를 동정하기 위해 채택되었다. 우선, 일련의 펩티드 동족체가 개발되어 왔고, 그들 중 몇몇은 NR58-3.14.3보다 더 긴 플라즈마 반감기를 갖고 합성하기에 상당히 저렴하다. 둘째로, 구조: 펩티드의 활성 분석은 기원 펩티드의 유리한 특성을 보유할 수 있는 작은 비-펩티드 구조물을 고안하기 위해 약물특이분자단을 동정하기 위해 수행되어왔다.

[0007] 이 두번째 접근법은 N-치환된 3-아미노글루타르이미드의 범위뿐 아니라, 알칼로이드 요힘빈의 16-아미노 및 16-아미노알킬 유도체를 포함하여, 펩티드의 항-염증성 특성을 보유하는 여러 구조적으로 구별되는 일련의 화합물을 생산하였다(참조: Fox et al., *J Med Chem* 45(2002) 360-370:WO 99/12968 및 WO 00/42017). 이들 화합물들 전체는 비-케모킨 화학유인물질보다 우수한 선택성을 보유하는 넓은-스펙트럼 케모킨 억제제이고, 그들의 다수는 인 비보에서 급성 염증을 차단하는 것을 나타내었다.

[0008] 이들 화합물 중 가장 잠재적이고 선택적인 것은 (S)-3-(운테크-10-에노일)-아미노글루타르이미드(NR58.4)였고, 이것은 5nM의 ED₅₀으로 인 비트로에서 케모킨-유도 이동을 억제하였다. 그러나, 추가의 연구는 아미노글루타민 고리가 혈청에서 효소적 고리 열림에 민감하다는 것을 드러내었다. 결론적으로, 몇몇 적용에 있어서(예를 들면, 치료중인 염증이 자가면역 질환과 같은 만성인 경우), 이들 화합물은 최적의 특성을 갖지 않을 것이고, 유사한 항-염증성 특성을 갖는 더욱 안정한 화합물이 뛰어날 것이다.

[0009] 이와 같은 안정한 동족체를 동정하기 위한 접근법으로서, (S)-3-(운테크-100에노일)-아미노글루타르이미드의 여러 유도체들이 혈청에서의 그들의 안정성에 대해 시험되었다. 이와 같은 유도체의 하나인 6-테옥소 동족체 (S)-3-(운테크-10-에노일)-테트라하이드로피리딘-2-온은 인간 혈청에서 37°C에서 적어도 7일 동안 완전히 안정하지만,

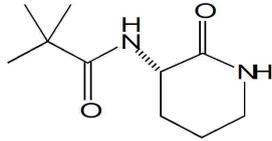
모 분자와 비교하여서는 상당히 감소된 효능을 갖는다.

- [0010] 이러한 류의 안정하고, 넓은 스펙트럼 케모킨 억제제(BSCIs) 중 하나는 7-원 모노락탐 고리를 갖는 3-아미노 카프로락탐이다 (예를 들면, W02005/053702 및 W02006/016152 참조). 그러나, 추가의 유용한 항-염증 화합물은 다양한 고리 크기를 갖는 다른 3-아미노락탐으로부터 발생되어왔다 (예를 들면, W02006/134385 참조). 헤테로원자 및 바이시클로락탐 고리 시스템의 도입을 포함하여, 락탐 고리에 대한 다른 변형은 또한, BSCI 활성을 갖는 다른 화합물을 생성한다 (예를 들면, W02006/018609 및 W02006/085096 참조).
- [0011] 오늘, BSCI 활성, 및 따라서 인 비보 항-염증특성을 갖는 광범위한 약제류의 동정은 BSCIs 활성의 경향을 최적화하는 것을 기준으로 한다. 예를 들면, 이전의 문헌들은 2,2-이치환 아실기가 열린사슬(W02005/053702 참조), 모노시클릭(W02006/134384 참조) 또는 폴리시클릭(W02006/016152 참조)인 경우, (아실-3-아미노락탐의 아실 측쇄에 알파- 또는 주요(key)-탄소 원자에서) 2,2-이치환의 도입이 급성 염증 모델의 인 비트로 및 인 비보 모두에서, BSCIs로서의 유효성의 상당한 증가를 가져온다고 가르쳐왔다.
- [0012] 그러나, 바람직한 약물학적 효과의 효능은, 비록 중요한 인자라 하더라도, 약제를 유용한 인간 약제인가를 결정하는 오직 하나의 인자이다. 특히, 약물동태학 (또는 신체 내의 약제의 기질)은 특정 약제의 유용성에 중요한 효과를 발휘한다.
- [0013] (신체에 대한 약물의 효과를 연구하는 약효학과 반대로, 약물에 대한 신체의 효과에 대한 연구로서 넓은 의미로 정의된) 약물동태학은, 흡수, 플라즈마 안정성, 분포용적 (및 특히 '표적' 조직으로의 평형률), (시토크롬 P450 이소엔자임 중재 산화와 같은 간 대사, 및 황산화 및 글루타르산산화와 같은 II 단계 대사, 혈청 효소적 변형과 같은 간의 대사를 포함하여), 대사성 형질전환 및 (광산 및 배변 제거로의 신장 제거와 같은) 배설을 포함하여, 복잡한 생리학적 과정의 숙주에 의존한다. 이러한 과정은 종종 약제의 'ADME' 특성으로 집합적으로 불린다(ADME는 Absorbtion, Distribution, Metabolism 및 Excretion의 머리글자이다).
- [0014] 인간 약물로서의 약제의 유용성을 결정하는 또 다른 중요한 인자는 안정성이다. 많은, 또는 모든 투여된 화합물은 다중 효과를 유발하지만 바람직한 약물학적 효과들은 통상 오직 한 분야이다. 나머지 효과들은 환자에게 해로운 (독성 효과) 또는 불편함 (부작용)을 가져올 수 있다. 후보 약제의 이와 같은 특성의 연구는 독성학 또는 안정성 약리시험으로 불린다. 원하지 않는 효과는 넓게 두 가지 유형으로 분류될 수 있다. 분류 결과는 바람직한 약리학적 작용으로 초기 분류되고, (더 넓게 또는 더 좁게는) 선택된 분자 표적을 조작하는 피할 수 없는 결과이다. 예를 들면, 염증 병리를 막기 위해 고안된 약제는, 어느 정도 면역억제 및 감염 위험의 증가를 가져온다. 이것은 염증 조직의 손상 및 감염이 면역 시스템 활성도에 불균형하게 연결되기 때문이다. 그 결과, 동일한 약리학적 표적을 공유하는 모든 분자들은 어느 정도 계통별 효과를 공유할 것이다. 반대로, 화합물 효과는 보통 (종종 예상하지 않은) 의도된 약리학적 표적과 구별되는 표적과 상호작용의 결과로서, 특정 화합물 구조와 특이적으로 관련된다. 대체로, 동일한 의도된 약리학적 효과를 갖지만 화합물-특이 부작용을 완전히 피한 또 다른 분자를 발견하는 것이 가능하다. (잠재적으로 치명적인 심장 부정맥을 가져오는 심박 동안 QT 간격의 위험한 연장을 가져올 수 있는 hERG 상호작용과 같은) 몇몇 화합물 효과는 통상적이고, 반면 다른 화합물 효과는 특정 화합물에 대해 명백히 독특할 것이다.
- [0015] 결정적으로, 수십 년 동안의 의약품 개발 경험에도 불구하고, 약제의 ADME 및 약물동태학적 특성 또는 그것의 독성 및 안정성 약리시험을 예측하기 위해 일반적으로 허용되는 방법이 아직 없다. 이 이유로, 우선 (hERG-발현 세포주와 같은) 인 비보 조사 시스템에서, 그리고 나서 동물에서 및 최종적으로 인간의 I 단계 임상 시도에서 사용하는 명백한 시험은 새로운 약제의 개발을 위해 전 세계적인 규제적 요구사항이다.
- [0016] 분자 구조의 조사로부터 ADME의 특정 면을 예측하는 방법이 기재되었고, 경험있는 의학 화학자는 순수한 이론적 근거를 기초로 많은 구조를 안정적으로 배제할 수 있다는 것에는 거의 의심의 여지가 없다. 이와 같은 "경험적 규칙"의 예는, 대부분의 증명된 약물이 분자 중량, 회전가능한 결합수 및 극성과 관련된 특정 규범을 따른다는 관찰을 근거로 하는 라핀스키의 "5가지 규칙"일 수 있다. 유사하기는, 크고 소수성기를 갖는 분자는 대부분 hERG 채널과 바람직하지 않은 상호작용을 보일 가능성이 있다는 것이 일반적으로 알려져 있다.
- [0017] 이와 같은 일반적인 지침은, 함께 적용되는 경우에도, 적절하지 않은 분자를 제거하는데 유용할 수 있지만, 여전히 많은 (다양한 이유로) 바람직하지 않은 분자들이 수사망을 빠져나갈 것이다. 현재, 아무도 순수한 이론적 근거로 활성 화합물의 한 부류로부터 약물 후보를 선택하는 것을 진지하게 찬성하지 않는다. 그 결과, 특히 유리한 ADME, 약물동태학, 독성학 및 안정성 약리시험적 특성을 갖는 부류 내에서 특정 화합물의 발견은 양호한 후보자들 중 상당한 실제적 실험을 요구하고 본 분야의 당업자에 의해서도 예측되지 않았던 새로운 발견이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 여기서, 본 발명자들은 지금까지 보고되지 않았던, 새로운 화합물 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온 (I)을 기재한다..



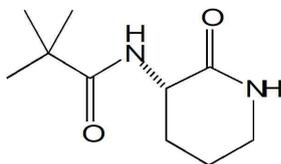
[0019]
[0020] (I)

[0021] 본 화합물은 이미 기재되었던 BSCIs의 광범위한 속 분류의 특정 멤버이다 (예를 들면, W02006/134385 참조). 그러나, 본 발명자들은 이 분류의 모든 분자들이 BSCIs 활성을 갖는 반면, 화합물 (I)은, 이 분류의 다른 멤버들과 실험적으로 비교하였을 때, ADME, 약물동태학, 독성학 및 안정성 약리시험적 특성과의 결합의 결과, 인간 약물로서 사용하기에 상당히 뛰어난 특성을 갖는다는 것을 증명한다.

[0022] 락탐 고리의 3 위치의 탄소 원자는 비대칭이고 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 적어도 두 종류의 구별되는 형태, 즉, "R" 및 "S" 배열을 갖는다. 본 발명은 두 거울상 이성질체 형을 갖고, 라세미체 "RS" 혼합물을 포함하여, 이들 형태의 모든 결합물을 포함한다. 단순한 관점으로, 구조식에 특정 배열이 표시되지 않으면, 두 종류의 개별적인 거울상이성질 형태 및 그들의 혼합물이 존재하는 것으로 이해되어야 한다. 거울상이성질체 반전은 화합물의 우수성에 책임이 있는 중요한 ADME 특성에 영향을 미치지 않으므로 (및 부가적으로 BSCIs로서의 화합물의 잠재력에 오직 작은 영향만을 미치므로), 둘 다의 거울상 형태는 그들의 혼합물과 마찬가지로 일반적으로 그 분류에 크게 뛰어난 특정 예를 나타낸다.

과제의 해결 수단

[0023] 바람직하기는, 본 발명의 식 (I)의 화합물은 식 (I')의 화합물일 것이다.



[0024]
[0025] (I')

[0026] 입체 중심에 (S)-배열을 갖는 화합물 (I')은 (R)-이성질체보다 BSCIs로서 5-25배 더욱 유효하다.

[0027] 또한 활성 성분으로서, 일반식 (I) 또는 (I')의 화합물, 또는 약제학적으로 허용가능한 그들의 염, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0028] 특히, 약제학적으로 허용가능한 염은 염화수소산염, 브롬화수소산염, 요오드화수소산염, 황산염, 인산염, 이인산염 및 질산염과 같은 무기산의 부가염 또는 아세테이트, 말레이트, 푸마레이트, 타르트레이트, 숙시네이트, 시트레이트, 락테이트, 메탄술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 팔모에이트 및 스테아레이트와 같은 유기산의 부가염을 의미한다. 또한, 본 발명의 범위 안에서, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨과 같은 염기로부터 형성된 염이 사용될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염의 다른 예로서, "Salt selection for basic drugs", *Int. J. Pharm.* (1986), **33**, 201-217을 참조할 수 있다.

[0029] 약제학적 조성물은 고체형태, 예를 들면, 분말, 과립, 정제, 젤라틴 캡슐, 리포솜 또는 좌약일 수 있다. 적절한 고체 지지체는 예를 들면, 인산칼슘, 스테아르산 마그네슘, 탈크, 슈가, 락토스, 텍스트린, 전분, 젤라틴, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 폴리비닐피롤리딘 및 왁스일 수 있다. 다른 적당한 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 운반체는 본 분야의 당업자에게 알려져 있다.

[0030] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 또한 액체형태, 예를 들면, 용액, 에멀전, 현탁액 또는 시럽으로 존재할 수 있다. 적당한 액체 지지체는, 예를 들면, 물, 글리세롤 또는 글리콜과 같은 유기 용매, 또한 그들과 물의 다양

한 비율의 혼합물일 수 있다.

- [0031] 본 발명은 또한 염증 질환을 치료를 위해 고안된 의약의 제조를 위한, 식 (I) 또는 (I')의 화합물, 또는 그들의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [0032] 본 발명은 정의된 바와 같이, 화합물, 조성물 및 그들의 용도를 포함하고, 여기서 상기 화합물은 수화물 또는 용매화물 형태이다.
- [0033] 선행 기술과 비교하여, 본 발명의 개선은 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온이, (예를 들면, 상기 국제출원권과 같은) 상기의 락탐 BSCIs의 일반 류와 비교하여 뛰어난 ADME 특성을 갖는다는 뜻밖의 발견에 기인한다. 비록 이와 같은 화합물이 허용가능한 약제학적 특성을 갖는다고 보고되었고 (즉, 이들은 그들의 BSCI 활성의 결과로서 인비보 잠재적 항-염증 효과를 갖는다), 그리고 이들이 허용가능한 약물동태학적, 그리고 따라서 ADME 특성을 가져야 한다고 해석되지만, 그럼에도 불구하고 ADME 특성에 대한 직접적인 평가는 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온이 현저하고 뜻밖으로 뛰어나다는 것을 제안한다 (하기 실시예 참조).
- [0034] 특히, 이전의 혈청에서의 인 비트로 안정성 연구들은, 문헌(예를 들면, Fox et al. *J. Med. Chem.* 2005 48:867-74 참조)에 보고된 바와 같이, 이 락탐 BSCIs가 초기 이미드 BSCI보다 상당히 우수하다고 제안하지만(예를 들면, W099/12968 참조), BSCI의 많은 (또는 참으로 거의) 락탐 류가 원하지 않은 인 비트로 대사를 겪는다는 것이 분명하다.
- [0035] 본 발명자들은 아실아미노락탐 류의 12개 이상의 BSCI를 제조하고 시험하였고, 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온을 제외하고 지금까지 시험된 락탐류 BSCI의 모두는 신속한 간 대사(시토크롬 P450 매개 산화반응 및/또는 II 단계 대사)를 겪었다.
- [0036] 적어도 부분적으로 감소된 인 비보 대사의 결과로서, 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온의 총체적 제거(overall clearance)는 시험된 다른 락탐 BSCI에 대해서보다 현저히 낮다. 그 결과, 단일 경구 투여량에 따른 노출은 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온 보다 10 배 이상 높다. 그러므로, 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온은, 특히 만성 경구 노출이 효능을 위해 요구될 때, 이미 기재된 락탐 BSCI의 (전부가 아니라면) 대부분보다 인간 약제로서 사용하기에 더욱 안정하다.
- [0037] (NR58-3.14.3와 같은) 선행 펩티드는 다음과 같은 단점이 있다: (a) 이들은 고가이고 (적어도 더 긴 것에 대해) 고체상태의 합성을 필요로 하고, 그리고 (b)이들은 신장을 통해 매우 빠르게 제거되고 그리고 (c) 이들은 일반적으로 효능이 훨씬 낮다 (인 비트로에서 >25 배 덜 효능이고 인 비보에서 >10,000 배 효능이 덜 효능이다).
- [0038] 선행 기술의 아미노글루카미드는 저렴하고, 신장을 통해 빠르게 제거되고 인 비트로에서 더 효능을 갖지만, 이들은 혈청에서 매우 극단적으로 불안정하다(이미드 고리의 효소적 고리 림의 결과로서; 예를 들면, Fox et al. *J. Med. Chem.* 2005 48:867-74을 참조). 그 결과, (S)-3-(운데크-10-에노일아미노)글루타르이미드와 같은 아미노글루타르이미드 BSCIs는 2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온보다 인 비보에서, 심지어 (화합물 안전성과 ADME 특성의 충돌은 거의 보이지 않는, 전신성 TNF- α 생산에 의해 특징되는 LPS-유발 내독소 혈증과 같은) 실제 염증 모델에서도, 적어도 250-배 효능이 덜하다.
- [0039] 문헌에 기록되어 있는 또 다른 일련의 구조적으로 관련된 (그러나 기능적으로는 크게 다른) 화합물들은 보통 3-옥시-아실 측쇄를 갖는, 대략 6-원 호모세린락톤 구조를 기초로 하는 세균성 자가전염 화합물(예를 들면, 이와 같은 화합물의 큰 범위를 주장하는 Bycroft et al. US5,969,158 참조)이다. 흥미있게도, 비록 이러한 문헌이 락톤뿐 아니라 락탐을 포함하는 포괄적 식을 포함하지만, 세균성 자가전염 특성을 갖는 어느 예시적 화합물이 락탐 헤드기를 갖는 것은 거의 없다. 이와 같은 모든 화합물(특히 락톤 헤드기 및/또는 3-옥시아틸 꼬리기를 갖는 것을 제외하고)은 상대적으로 불안정하여 의약으로서 적용이 제한된다.
- [0040] 본 명세서에 기재된, 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온은 합성하기에 저렴하고 (그리고 여기에 기재된 방법은 Kg 단위로도 직접 합성할 수 있고), 인 비트로에서 단리된 혈청에서 뿐 아니라 또한 인 비보에서도 뛰어난 대사성 안정성(앞서 기재된 BSCIs의 전체 락탐류와 공유하는 특성)을 나타낸다. 그 결과, 본 발명의 화합물은 (현재 광범위하게 연구된 이들 화합물 중에서), 효능, 능력 및 ADME, 약물동태학, 독성학 및 안정성 약리시험과 같은 약제학적 특성의 항목에서 인간의 염증성 질환의 치료에 독특하게 완벽히 활용된다.
- [0041] 본 발명에 따르면, 일반식(I) 또는 (I')의 화합물 또는 그들의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그들을 활성성분으로서 함유하는 약제학적 조성물 또는 의약에 의해 예방 또는 치료될 것을 의도하는 염증성 질환은 명백히

다음을 포함한다:

- [0042] - 자가면역질환, 예를 들면 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 루프스, 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome), 크론씨병(Crohn's disease);
- [0043] - 뇌졸중, 관상동맥 질환, 심근경색, 불안정 협심증, 아테롬성동맥경화증 또는 맥관염, 예를 들면 베체트(Behcet's) 증후군, 거대세포 동맥염, 다근통 류마티즘, 베그너스(Wegener's) 육아종증, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군 맥관염, 헤노크-손레인(Henoch-Schonlein) 자반병 및 가와사키병을 포함하는 혈관병;
- [0044] - 바이러스 감염 또는 복제, 예를 들면, 폭스바이러스, 헤르페스 바이러스(예를 들면, Herpesvirus samiri), 사이토메갈로바이러스(CMV), 간염 바이러스 또는 렌티바이러스(lentivirus)를 포함하는 바이러스로 인한 또는 복제로 인한 감염;
- [0045] - 천식, 및 알러지성 비염과 및 COPD와 같은 관련 호흡기 질환;
- [0046] - 골다공증;(낮은 골 미네랄 밀도);
- [0047] - 종양성장;
- [0048] - 예를 들면, 신장이식 환자에서 장기이식 거부 및/또는 지연된 이식 또는 장기 기능;
- [0049] - 상승된 TNF- α 수준에 의해 특징되는 질병;
- [0050] - 건선;
- [0051] - 특발성 또는 당뇨병 (당뇨병성 신증)과 같은 기저질환의 결과로서의, 피부 상처 및 비후성 흉터(켈로이드 형성), 외과 또는 부인과 수술 후 유착 형성, 폐섬유증, 간 섬유증(알콜성 간 질환 포함) 또는 신장 섬유증을 포함하는 다른 섬유증 질환;
- [0052] - 말라리아 또는 결핵과 같은 세포 내 기생생물로 인한 질병;
- [0053] - (수술 후 환상 사지 통증, 포진-후 신경통 등과 같은) 신경 통증;
- [0054] - 알러지; 또는
- [0055] - 알츠하이머병.
- [0056] 본 발명에 따르면, 추가의 염증성 질환은 다음을 포함한다:
- [0057] - ALS;
- [0058] - 항원 유도된 추상반응;
- [0059] - 면역 반응 억제.
- [0060] 이들 임상적 징후는 상승된 TNF α 으로 특징되는 염증성 질환 또는 질환들의 일반적인 정의에 속한다.
- [0061] 의혹을 없애기 위해, 본 명세서에 청구된 화합물을 포함하여, BSCIs 작용의 주요 메카니즘은 면역시스템이라는 것을 명심해야 한다. 따라서, 바이러스성 감염 및/또는 복제 및 종양 성장과 같은 질병 (그들 자체의 병태는 면역 시스템의 주요 질환이 아니다)에 대한 청구된 유리한 효과는 바이러스의 감염 및/또는 복제 패턴에 대한, 또는 종양의 성장 및 확산에 대한 면역 시스템의 조절에 중요한 결과를 가져온다. 본 명세서에 청구된 화합물을 포함하여, BSCIs는 (일반적으로) 바이러스 복제 또는 종양 성장에 직접 영향을 미치지 않고, 이들은 손상되지 않은 및 기능적 면역 시스템이 존재하지 않는 단리된 시스템 (예를 들면, 배양된 세포주의 인 비트로 감염에, 또는 종양 세포주 증식 분석에)에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다. 따라서, 이와 같은 단리된 시스템의 효과에 대한 사전 정보는 BSCI의 존재에 정보를 제공할 수 없고, 이것은 면역 시스템에 작용한다.
- [0062] 법률적으로 허용되는 곳에서, 본 발명은 또한 여기에 청구된 화합물, 조성물 또는 의약의 항-염증성 양을 환자에게 투여함에 의해 염증성 질환의 증상(어느 약제에 대한 불리한 염증성 반응을 포함)의 치료, 개량 또는 예방법을 제공한다.
- [0063] 본 발명에 따른 의약의 투여는 국소적, 경구적, 비경구적, 근육내 주사에 의해 수행될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 의약의 예상되는 투여량은 사용된 활성 화합물에 따라 0.1 mg ~ 10g 이다.

[0065] 본 발명에 따르면, 일반식 (I) 또는 (I')의 화합물은 하기의 방법에 따라 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0066] **일반식 (I) 또는 (I')의 화합물의 제조**

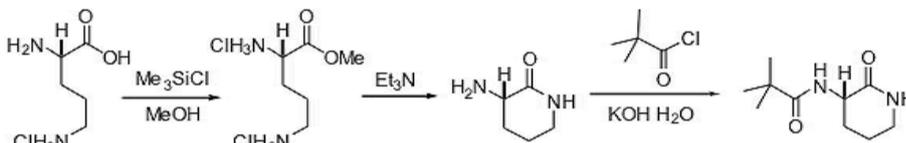
[0067] 일반식 (I) 또는 (I')의 모든 화합물은 본 분야의 당업자에게 알려진 일반적인 방법에 따라 쉽게 제조될 수 있다.

[0068] 화합물 (I)은 오르니틴과 2,2-디메틸프로피오닐 클로라이드로부터 제조될 수 있는 무색 결정성 화합물이다. (I')의 합성의 경우, 입체이성질상으로 순수한 (S)-오르니틴이 사용될 수 있다. 오르니틴 또는 그것의 메틸 에스테르로 시작되는 고리 형성(ring closure)이 가능하다. 아미노산은 트리메틸실릴 클로라이드를 사용한 HCl 인시츄 생성에 의해 무수 메탄올 중에서 에스테르화될 수 있다. 선택적으로, 단리된 에스테르는 트리에틸아민을 이용하는 어느 경우에나, 고리형성이 가능하다. 조 생성물은 그리고 나서 용매 교환 후 아실화될 수 있다.

[0069] 아실아미노락탐 생성물 (I)은 상당한 수용성을 갖고, 그 결과, 관련된, 더욱 소수성 생성물(예를 들면, WO2006/134385 참조)에 대해 사용된 아실화 조건은 불만족스럽다. 염기로서 3 당량의 탄산나트륨의 사용은 다량의 물(>4 mL/mmol 오르니틴)이 사용되지 않는 한, 탄산수소나트륨 부산물의 형성을 가져온다. 이 농도에서, 생성물의 디클로로메탄으로의 추출은 효과적이지 않다. 그러므로, 3 당량의 탄산 나트륨을 2.5 당량의 수산화칼륨으로 대체하였다 (이것은 고리 형성 단계에서 생성된 트리에틸아민 하이드로클로라이드 2.5 당량을 중화한다). 이 염기를 사용하여, 상당히 적은 양의 물을 사용할 수 있다 (1 mL/mmol 오르니틴 미만) (최종 pH 8-9). EtOAc (3 x 2 mL / mmol 오르니틴)에 의한 수성층의 추출 및 EtOAc (0.5 mL / mmol, hot) 및 40-60 페트럴륨 (5 mL / mmol)으로부터의 재결정은 53% 수득물로 첫번째 수득물을 얻었다(50 mmol 오르니틴으로부터 4.25g).

[0070] 수성층의 pH가 작업 중 너무 낮다면 소량의 트리에틸아민 하이드로클로라이드가 EtOAc 층으로 추출될 것임을 명심하라. 물로 이 EtOAc 용액을 세척하려는 시도는 아민 하이드로클로라이드와 함께 락탐 생성물(I)의 상당한 양을 추출할 것이다. 이것은 EtOAc 추출을 시도하기 전에 (예를 들면, 염산에 대해 대략 1 당량의 KOH를 첨가함으로써) 수성층의 pH를 12까지 올리고, 그리고 나서 오직 트리에틸아민 유리 염기를 락탐 생성물(I)(이것은 증발 또는 재결정 중에 쉽게 제거될 수 있다)과 함께 추출함으로써 피할 수 있다.

[0071] 따라서 다음과 같은 바람직한 합성 경로가 제공된다:



[0072] (S)-오르니틴 모노하이드로클로라이드 (50 mmol)를 무수 메탄올 (100 ml) 중에 현탁시키고 그리고 트리메틸실릴 클로라이드 (75mmol)를 첨가하였다. 반응물을 환류 중에 24시간 동안 가열하였다. 그리고 나서 트리에틸아민 (150 mmol)을 첨가하고 반응물을 환류 중에 48시간 동안 가열하였다. 그리고 나서 메탄올을 감압하에 제거하고 (제거가 용이하도록 임의로 마지막 단계에 톨루엔을 첨가할 수 있다), 그리고 잔류물을 물(20 mL)에 용해시키고, KOH (125 mmol)을 첨가하였다.

[0074] 혼합물을 0°C로 냉각하고, 그리고 나서 2,2-디메틸프로피오닐 클로라이드 (50 mmol)를 천천히 첨가하고 반응물을 주변온도로 가온하면서 18시간 동안 교반하였다. 그리고 나서 고체 KOH (50 mmol)를 첨가하고 한번 용해시키고 반응물을 EtOAc (3 x 100 mL)로 추출하였다. 결합된 유기층을 K₂CO₃ 및 Na₂SO₄의 결합물에서 재빠르게 건조시키고 감압하에 환원시켰다. 그리고 나서 고체 잔류물을 EtOAc (25 mL) / 40-60 페트럴륨 에테르(200-250 mL)로부터 재결정하여 결정성 고체로서 락탐(F)을 얻었다(수득률 50% 초과).

[0075] 생성물의 동정 및 순도를 프로톤 NMR 스펙트럼으로 확인하였다 (δH (400 MHz, CDCl₃) 6.63 (1H, br s, NH), 6.01 (1H, br s, NH), 4.20 (1H, dt, J 11, 5.5, CHNH), 3.40-3.31 (2H, m, CH₂NH), 2.61 (1H, dq, J 13, 4.5, CH₂), 1.97-1.88 (2H, m, CH₂), 1.50 (1H, dddd, J 13, 12, 9.5, 7.5, CH₂), 1.22 (9H, s, 3x CH₃).

정의

[0077] 용어 "약(about)"은 고려되는 값 근처의 간격을 말한다. 본 발명에 사용되는 바에 따라, "약 X"는 X에서 X-10%

내지 X+10%의 간격, 바람직하기는 X에서 X-5% 내지 X+5%의 간격을 의미한다.

[0078] 본 설명에서 숫자로 표시된 범위의 사용은 본 발명의 범위 내에서 범위 내의 모든 정수와 주어진 범위의 가장 넓은 범위 내에서 상한 및 하한 숫자의 모든 조합을 포함하는 것을 분명히 의도한다. 따라서, 예를 들면, 식 I에 관하여(무엇보다도) 특정된 1-20개의 탄소 원자의 범위는 4 내지 20 사이의 모든 정수와, 명백히 예시되거나 또는 예시되지 않거나, 상한과 하한의 각 조합의 범위를 포함하는 의도이다. 따라서, 예를 들면, 사용될 3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-케트라하이드로피리딘-2-온의 (특히) 투여량에 대해 명시된 0.1mg 내지 10g의 범위는 0.1mg 과 10g 그리고 명백히 예시되는 가와 상관없이, 높고 낮은 숫자의 모든 결합의 모든 하부 범위를 포함한다.

[0079] 여기서 사용된 바에 따르면, 용어 "포함하는"은 포함하는 것과 이루어지는 것 모두의 의미로 이해된다. 따라서, 본 발명이 화합물을 "활성성분으로서 포함하는 약제학적 조성물"에 관한 것일 때, 이 용어는 다른 활성성분이 존재할 수 있는 조성물과 또는 정의된 활성성분만으로 이루어진 조성물 모두를 포함하는 것으로 의도된다.

[0080] 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속한 분야에서 통상적인 전문가에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미이다. 유사하기는, 모든 공보, 특허 출원서, 모든 특허 및 여기서 언급된 모든 참조문헌은 (법적으로 허용되는 곳에서) 참조의 방법으로 병합된다

[0081] 다음의 실시예는 상기 과정을 설명하기 위한 것이고, 본 발명의 범위를 한정하기 위한 의도는 아니다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1 (패널 A 내지 E)은 시험된 5개의 화합물 (I') 내지 (V)에 관한, 래트에게 경구 투여를 통해 1% CMC 중의 단일 3mg/kg 투여량의 투여 후의 시간-농도 그래프이다. 각각의 화합물에 대한 3개의 선은 3개의 복제 동물을 나타낸다. Y-축은ng/ml (0-3000) 단위의 농도를 나타내고; X-축은 분 단위의 시간을 나타낸다(0-480).

도 2는 1% CMC 3mg/kg로 투여된, 시험된 5개의 화합물 (I') 내지 (V)의 각각의 단일 경구 투여량에 노출된 래트로부터 24시간에 걸쳐 수집된 풀된(pooled) 유린에서의 LC-MS-MS (전체 스캔 모드로)에 의해 동정된 주요 대사 산물들이다. 화합물 (IV)의 주요 대사산물은 동정되었지만, 그것의 구조는 공식적으로 이용가능한 대사산물 ID 데이터베이스의 단편화/재-배열의 비교에 의해 밝혀지지 않았다. 비록 개별적인 대사산물들의 농도는 측정되지 않았지만, 이들은 각각의 열의 좌측에 가장 풍부한 것으로, 유린에서의 풍부한 양의 순서로 나타내었다.

도 3은 각각 독립적인 실험에서, 비히클에 대해 또는 5개의 화합물 (I') 내지 (V)에 대해 노출되었을 때, hERG 유전자 생성물을 발현하는 세포에 대한 전류 및 시간 그래프를 나타낸다. 각각의 실험에서 복제 세포는 양성 대조 화합물에 노출되었고, 이것은 hERG-변환 전류를 완전히 블록한다. Y-축은 nA 단위로 전류를 나타내고; X-축은 초 단위의 시간을 나타낸다. 패널 G는 각각의 화합물 또는 0.1% DMSO 비히클 단독(Veh) 또는 양성 대조 화합물 E-4031 (+ve)에 노출된 복제 세포들에 대한 hERG 꼬리 전류(패널 A-F에서 시간 대 전류 그래프 하의 면적)를 나타낸다. 패널 G에서 히스토그램의 Y-축은 비처리 세포에 대한 hERG 꼬리 전류의 억제 비율을 나타낸다.

도 4는 화합물 (I')에 대한 통상의 결합 곡선을 나타낸다. 이 실험에서, 각각의 반응은 10nM 라벨된 BN83250 (화합물 (I'))과 동일한 수용체에 결합하는 락탐 BSCI)을 다양한 경쟁물질(10 μM-1pM)과 함께 수용하였다. 전체 특이 결합은 다량(100 μM)에 의해 대치된 양이다. 각각의 막대는 3개의 복제 측정의 평균으로, 세션(whiskers)은 SEM을 나타낸다. Y-축은 각각의 실험에서 결합된 방사능 카운트를 분당 카운트(cpm)의 단위로 나타낸다. 상부의 점선은 실험의 조건에서 총결합을 나타내고, 아래 점선은 비-특이 결합을 나타내고; 특이 결합은 점선들 사이의 거리로 나타낸다.

도 5는 CEREP 패널을 구성하는 75 개의 다른 수용체의 패널에 대한 5개 화합물 (I') 내지 (V) (패널 A: (II); B: (III); C: (V); D: (F) 그리고 E: (IV))의 각각에 대한 교차-반응성의 프로파일을 나타낸다(텍스트 참조). 화합물들을 단일 농도 (10 μM)에서 시험하였고, 75 수용체의 각각에 대한 공지의 리간드에 대해 결합의 억제 (각 히스토그램의 Y-축)를 보고하였다(따라서, -100%는 시험 화합물의 존재에서 특정 리간드의 결합의 2-배 증가를 나타낸다). 모든 반응은 이중으로 수행되었고, 막대는 평균을 나타낸다 (복제 오류의 평가는 그래프의 단 순화를 위해 표시하지 않았다). 이 분석에서 결합의 50% 또는 그 이상의 억제 (또는 자극) 만을 통계적으로 및 생리학적으로 중요하다고 간주하였다. 여기서 시험된 5개의 화합물에 대해, 오직 하나의 상호작용(패널 A에서 화살표로 표시한 NK2 수용체를 갖는 화합물의 상호작용)을, 비록 이 상호작용이 약하지만, 잠재적으로 중요하다고 간주하였다(예상 ED50 5-10 μM).

도 6 (패널 A-E)은 ChemoTx™ 세포배양판 이동 분석에서 5개의 화합물 (I') 내지 (V)의 각각에 대한, 인 비트로

케모킨-유도 백혈구 이동의 억제에 대한 대표적인 투여량 반응 곡선을 나타낸다. 각각의 실험에서, THP-1 세포는 각각의 화합물의 다양한 투여량(10 pM 내지 1 μM)의 존재 또는 부재에서 케모킨 MCP-1의 최대 효과적인 투여량을 사용하여 이동이 유도되었다. 적절한 대조 비히클이 각각의 실험에서 사용되었다. 각각의 시험 화합물의 각 농도에서 (MCP-1의 존재에서 이동된 세포의 수에서 하부 챔버로부터 제거된 MCP-1로 이동된 세포의 수를 빼 것으로 계산된) MCP-1 유도 이동의 억제 백분율을 각각의 실험에서 사용하였다. 각각의 시험 화합물의 각 농도에서 MCP-1 유도 이동의 억제 백분율을 SEM을 세선으로 표시하면서, 삼중 측정의 평균으로 나타내었다. ED50을 표시된 그래프의 선형 내삽(linear interpolation)으로 평가하였다. 각각의 그래프의 Y-축은 MCP-1 유도 이동의 억제 백분율을 나타내고; X-축은 nM 단위(0.01-1000)로 표시된 시험 화합물의 농도를 나타낸다.

도 7은 치사량-이하(sub-lethal) 내독소 혈증의 무린 모델에서 인 비보 LPS-유도 TNF-α 생산에 대한 대표적인 투여량 반응 곡선을 나타낸다. 각 실험에서, 6 마리 마우스 군을 경구 경로 (원) 또는 피하 경로 (삼각형)을 통해 다양한 투여량으로 5개 화합물 (패널 A: (II); B: (III); C: (V); D: (V) 및 E: (IV))로 예비-처리하였다. 30-60 분 후, 동물들을 복강내 경로를 통해 LPS로 유발되었고 (challenged), 그리고 혈청을 최종 출혈 3 시간 후에 제조하였다. 혈액 중 TNF-α 의 수준을 ELISA로 측정하였고, (LPS에 노출된 마우스에서 TNF-α 의 농도에서 내독소-프리 PBS에 대해 허위 노출된 마우스에서 TNF-α 의 농도를 빼는 것으로 계산된) LPS-유도 TNF-α 생산의 억제 정도를 6마리 동물의 평균으로 각각의 그래프의 Y-축에, SEMs을 세선으로 표시하면서 나타내었다. LPS를 수용하지만 BSCI 처리되지 않은 마우스에서 TNF-α 의 농도는 통상적으로 (유발되지 않은 마우스에서 <10pg/ml와 비교하여) 평균 5,000 내지 6,000 pg/ml였다. ED50은 그래프의 선형 내삽으로 평가하였다. 각각의 그래프의 X-축은 각각의 그룹 중의 마우스에 mg 단위로 투여된 각 화합물의 투여량을 나타낸다 (1E-07 내지 1).

도 8은 대표적인 실험에서, 천식의 설치류 모델에서 BAL 유체 중의 세포 수로 평가한, 폐 염증에 대한 화합물 (I')의 효과를 나타낸다. Y 축에 10⁶ 세포의 단위로 나타낸, 막대는 5마리 동물의 군에 대해 SEM을 세선으로 하여 평균 세포 수를 나타낸다(* 2개의 테일을 갖는, 동일한 분산을 갖는다고 가정된 스튜던트 비독립 t-테스트를 사용하여 p < 0.01 에 대해 '민감되었다'). 수평선은 비유발 래트의 페로부터 BAL 유체에 존재하는 백혈구의 평균 수를 나타낸다. 나머지 3군의 모든 래트를 동일한 감각 및 유발요법 처리하였지만, 비히클 온리('민감된')로 처리하거나 또는 화합물(I') 0.3 mg/kg 체중으로 또는 몬테레우카스트('Singulair™') 30mg/kg 체중으로 처리하였고, 모두 매일 위관 영양법으로 투여하였다.

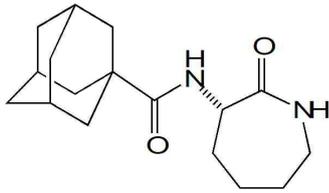
도 9는 대표적인 실험에서 T-헬퍼 세포에 대한 화합물 (I')의 효과를, 천식의 설치류 모델에서 CD4+ 비장세포에 의한 IFN-γ (Th1 마커 시토킨) 및 IL-4 (Th2 마커 시토킨) 생산의 유세포 측정에 의해 평가한 바에 따라 나타내었다. 막대는, Y 축에서 10 마리 동물의 군에 대한 평균 Th1/Th2 비를 나타내고, 세선은 SEM을 나타내고; * p < 0.05는 비유발된 래트이고; †p < 0.05은 감각 및 유발된 래트이고, 두 경우 2개의 테일을 갖는, 동일한 분산을 갖는다고 가정된 스튜던트 비독립 t-테스트를 사용하였다). 모든 래트는 (오브알부민에 노출되지 않은 'BN 래트'군을 제외하고) 동일한 감각 및 유발요법으로 처리하였지만, 비히클 온리('민감된 + 비히클')로 처리되거나 또는 화합물(I') 0.3 mg/kg 체중으로 또는 몬테레우카스트('Singulair™') 30mg/kg 체중으로 처리하였고, 모두 매일 위관 영양법으로 투여하였다.

도 10은 래트에서 다양한 범위의 BSCI 화합물에 대한 경구 노출에 대한 플라즈마 반감기(분)의 플롯이다. 각각의 경우, 반감기는 살린 중의 1% CMC, 0.9% DMSO에 용해된 1mg/kg 화합물의 단일 경구 투여량에 따라 정맥주사 (iv bolus) 투여 후 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 및 8 시간 후에 플라즈마 농도의 표준 1-구획 모델을 사용하여 평가하였다. 경구 노출(AUC0-t, min.ng/ml의 단위)을 살린 중의 1% CMC, 0.9% DMSO에 용해된 3mg/kg의 화합물의 단일 경구 투여 후 산출하였다. 화합물 (I')의 전환체이고 "(R)-(I)"로 동정된 화합물 (I)의 R-이성질체를 흰색 원으로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 실시예

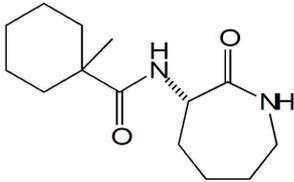
[0084] 하기의 실시예 1 내지 6의 각각에서, (S)-3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온 (화합물 I')을 여러 하부클래스의 대표로 선택된 다양한 다른 락탐 BSCIs들과 비교하였다. 예를 들면, (W02006/016152에 이미 기재된 바와 같은) 3-(아다만탄-1-카보닐아미노)-카프로락탐 (II)은 폴리시클로아실 락탐 BSCIs의 전형적인 서브클래스로서 선택되었다.



[0085]

[0086] (II)

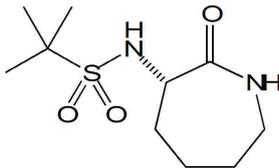
[0087] 유사하게, 3-(1'-메틸시클로헥실카보닐아미노)-카프로락탐 (III)은 (W02006/134384에 이미 기재된 바와 같은) 모노시틀로아실 락탐 BSCI의 전형적인 서브클래스로서 선택되었다.



[0088]

[0089] (III)

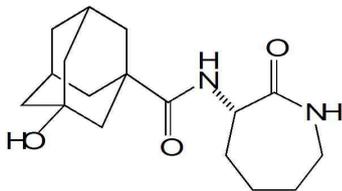
[0090] 화합물 3-(1',1'-디메틸에틸술폰아미노)-카프로락탐 (IV)은 (W02005/053702에 이미 기재된 바와 같은) 단순 (비시클릭) 알킬 측쇄를 갖는 BSCIs의 전형적인 서브클래스로서, 뿐만 아니라 (선택된 나머지 화합물에서 카보닐아미드 링커에 대한 대조로서) 술폰아미노 링커를 갖는 것으로서 선택되었다.



[0091]

[0092] (IV)

[0093] 선택된 최종 화합물, 3-(3'-히드록시아다만탈-1-카보닐아미노)-카프로락탐 (V)은 치환된 (구조에서 단순 선형, 분지된, 모노- 또는 폴리시클로 어느 것이든) 알킬 측쇄를 갖는 전형적인 BSCIs로서 선택되었다.



[0094]

[0095] (V)

[0096] 이들 BSCI 화합물 (II) 내지 (V) 모두는 이미 명확히 기재되어있고, 모두는 잠재적 인 비트로 BSCI 활성(MCP-1 유도된 THP-1 세포 이동의 억제)를 위해 ED50 <1nM)을 갖는다는 것을 명심하는 것이 중요하다. 모두는 혈청, 인 비트로에서 뛰어난 안정성을 갖고, 이론적 관점으로부터 인 비보에서 항-염증특성을 갖는 인간 약물로서 개발하는데 모두 뛰어난 후보자이다.

[0097] 상기 화합물 모두 (I', II, III, IV 및 V)은 락탐 입체중심에서 (S) 배열로 시험되었다.

[0098] **실시예 1. 단일 투여 후 약물동태학**

[0099] 화합물을 단일 투여량(정맥주사 경로로 5% DMSO 중 1mg/kg 체중, 또는 경구 투여 경로로 1% 카르복시메틸셀룰로스 중 3mg/kg)으로 (각각의 화합물과 각각의 투여 경로에 대해 다른 래트를 사용하여) 3마리의 성인 래트에 투여하였다.

[0100] 그리고 나서 혈액을 (투여 직전을 포함하여) 투여 후 24시간까지 다양한 시점에서 샘플화하였고, 다양한 화합물의 수준을 유효 LC-MS/MS 시험을 통해 평가하였다. 즉, 제단백 샘플 3-5µl를 95:5 물:아세트니트릴 중의 0.1% 포름산 중에 평형된 워터스 아틀란티스(Waters Atlantis) (C18 20x2.1mm, 비드 크기 3µm) 역상 크로마토그래피 칼럼에 적용하였다. 3.5분에 걸쳐 결합된 재료를 95:5 물:아세트니트릴 중의 0.1% 포름산으로 용출 구배하였고,

이어서 95:5 물:아세트니트릴 중의 0.1% 포름산으로 다시 단계적 구배하였다. 그리고 나서 칼럼 용출물을 양성 이온 모드에서 작동하는 Turbolonspray™ 이온 소스로, Applied Biosystems API 4000 / 3200 QTrap MS/MS 매스 스펙트로미터로 유도하였다. 경계 온도를 650℃로 맞추고, 각각의 MRM 전이에 대해 40ms의 유지 시간을 두고 다 음 이온들을 모니터링하였다.

분석물질	Q1 매스 (amu)	Q3 매스 (amu)
(II)	291.14	135.1
(III)	253.16	97.0
(V)	307.15	151.1
(I')	199.15	57.2
(IV)	249.15	129.3
내부 표준	213.19	57.1

[0101]

[0102]

각각의 측정에서 내부 표준은 관련 화합물 (S)-3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-카프로락탐이었고, 이것을 제 단백 전에 샘플에 가하였다. 이 분석에 대한 최저 정량한계(LLOQ)는, 38.1ng/ml인 화합물 (V)을 제외하고, 각각 의 화합물에 대해 2.4ng/ml였다.

[0103]

각 수집된 샘플의 LC-MS/MS 분석에 이어, 화합물의 약물동태학적 침전을, 이와 같은 적용에 대해 잘 알려져 있 는 소프트웨어인 Kinetica 소프트웨어를 사용하여 모형화하였다.

[0104]

결과

[0105]

경구 투여를 통해 각각의 화합물로 처리된 각각의 래트에 대한 개별 농도 대 시간 그래프를 도 1에 나타내었다. 이들 5개의 구조적으로 다양한 락탐 BSCIs 들 중 오직 (IV), (V) 및 (V) 만이 감지할 만한 경구 노출을 달성하 였고, 이들 (I')의 것은 다른 것보다 실질적으로 우수하였다는 것이 즉시 분명하였다.

[0106]

단일 1-구획 약물동태학적 모델의 계수들을 표 1에 나타내었다. 우선, 이것은 (I')로 달성된 뛰어난 노출이 다 음으로 우수한 화합물 (V)보다 거의 20배라는 것을 증명한다. 이러한 (min.ng/ml의 단위로, 농도 대 시간 곡선 하의 면적으로 계산되는) 뛰어난 노출의 이유는 또한 명백하고: ml/min/kg의 단위로 분 단위당 약물을 완전하게 제거하는 이론적인 혈액 부피로서 정의되는, (I')의 제거는 다른 락탐 BSCI에서 보다 10-배 이상 낮았다.

표 1

구조적으로 다른 락탐 BSCIs에 대한 약물동태학적 계수

[0107]

	F (%)	t1/2 (분)	제거 (ml/min/kg)	Vss (L/kg)	노출 (min.ng/ml)
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000
(II)	<1	16	84	0.8	477
(III)	5	11	55	0.6	2,900
(IV)	45	19	32	0.6	41,400
(V)	59	24 *	31	1.4	57,100

[0108]

각 화합물에 대한 단일 1-구획 약물동태학적 모델로부터, 3마리 래트 전체 평균으로부터의 경구 생체이용률(F, %), 우세 플라즈마 반감기 (t1/2, 분), 제거(ml/min/kg), 분포용적(Vss, L/kg) 및 노출 (AUC 0-> 무한, min.ng/ml).

[0109]

* 24 분은 주입된 약물의 95% 이상의 제거를 위한 (V)의 우세 반감기이다; 소수(minor) t1/2β는 110분이었다. 모든 경우, Cmax는 30분 내에 달성되었고, 최적 흡수와 일치하였다.

[0110]

(II) 및 (III)의 제거는 래트의 간 혈액 흐름과 유사하고, 이들 두 화합물은간의 첫번째 통과에서 거의 완전히 대사된다는 것을 강하게 제안한다. 유사하게, (IV)와 (V)의 제거는 래트에서 신장 혈액 흐름을 약 3~4배까지 초 과하고, 아마도 상당한 대사적 제거가 간 매개된다는 것을 제안한다. 극명히 대조적으로, 2.6 ml/min/kg에서의 (I')의 제거는 신장 혈액 흐름의 반 이하이고(통상적으로 7-9 ml/min/kg), 이것은 최소한의 대사적 제거를 제안 한다. (I')은 극히 수용성이므로, 분포 용적은 총 체액 중의 유리 평형과 완전히 일치하고(0.7 L/kg), 이것은 신장 혈액 흐름 미만의 제거가 (예를 들면, 친지질성 구획으로의 격리로 인한 신장에 대한 감소된 노출보다는) 신장 원위 세뇨관에서의 물의 재흡수를 나타내는 것으로 보인다.

[0111]

다른 화합물들과 비교하여 (I')의 훨씬 낮은 제거와 관련하여, (I')는 상당히 긴 플라즈마 반감기(다른 4개의

화합물의 30분 미만과 비교하여, 3 시간 이상)를 갖는다.

[0112] 비록 선택된 화합물 중 5개 모두가 급성 감염 종말점에서 경구 생물활성을 갖는다는 것이 알려졌지만, BSCIs의 모두에 대해 경구 생체 이용률을 갖는가를 관찰하지 않았다. 이것은 효율적으로 흡수되지만, BSCIs와 같은 활성을 유지하는 간을 통한 대사물의 첫번째 통과시 전환되는, (II) 및 (III)의 신속한 간-매개 대사작용을 반영하는 것으로 보인다(실시예 2 참조).

[0113] 이 약물동태학적 분석을 기준으로, 본 분야의 당업자에게는 이들 5개의 화합물에서 단리된 혈청 중의 유사한 화학적 안정성 및 인 비트로 안정성, 뿐 아니라 그들의 이론적 근거에 대한 유사한 예상 특성에도 불구하고, (I')는 다른 모든 것들보다 현저히 뛰어나다는 것이 명백하다. 특히, 이 화합물의 제거는, 아마도 간-매개된 대사에 대한 감소된 성향을 반영하여 훨씬 늦고, 그 결과 플라즈마 반감기는 10-배 더 길고 조사된 다음으로 우수한 화합물보다 거의 20-배 더 경구 노출된다.

[0114] 별도의 실험에서, (I')을 다양한 (비-설치류) 종, 개에서의 약물동태학에 대해 두번째 우수한 화합물 (V)과 비교하였다. 단일 투여량 (정맥 내, 5% DMSO 중 1mg/kg 또는 입으로, 1% CMC 중 3mg/kg)을 두 경로의 투여 사이에 1주 장 세척된 단일 교차 고안에 의해, 각각의 화합물에 대해 개 한마리에 투여하였다.

[0115] 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

최소 2개의 락탐 BSCIs에 대한 약물동태학 계수의 비교

정맥 내 PK (1mg/kg)					
화합물	종		반감기 (mins)	제거 (ml/min/kg)	Vss (L/kg)
(V)	랫트		24	33	0.8
	개		66	7.4	0.6
(I')	랫트		196	2.6	0.7
	개		236	1.9	0.6
경구 PK (3mg/kg)					
화합물	종	Tmax (mins)	반감기 (mins)	생체이용률 (%)	AUC (min.ng/ml)
(V)	랫트*	15	24	59	57100
	개	60	67	59	240000
(I')	랫트	115-120	226	81	939000
	개	60	217	75	1210638

[0116]

[0117] 개에서의 약물동태학은 랫트에서와 대체로 유사하였다. 두 종 모두에서, 화합물 (I')은 상당히 낮은 제거, 긴 플라즈마 반감기, 및 따라서 큰 노출(AUC, min.ng/ml)을 가졌다. 각각의 경우, 우세한 반감기(더 빠른 t1/2 α)는 주입된 투여량의 95% 이상의 제거를 가져온다.

[0118] 이들 관찰은 (I')의 뛰어난 약물동태학적 특성이 종 특이적이 아니고, 따라서 인간에게도 발견될 수 있는 가능성이 매우 높다는 것을 나타낸다.

[0119] **실시예 2. 일차 대사산물의 동정**

[0120] 대사 케이지에서 24시간 기간에 걸쳐 각각의 화합물의 단일 경구 투여량(3mg/kg in 1% CMC)에 노출된 랫트로부터 소변을 수집하였다. 이 풀된 소변 샘플을 상기 실시예 1에 기재된 바와 동일한 LC-MS 조건을 이용하여, 전체 주사 질량분석하였다. 생성 이온의 추가의 MS-MS 분석을 이후 수행하고, 공공 이용가능한 대사물질 ID 데이터베이스로부터 단편화/재-배열하였다.

[0121] 주요 대사 산물의 경우, 선정된 구조는 본 분야에 알려진 방법을 사용한 정통 샘플의 합성에 의해 확인될 수 있고, 이것을 소변 샘플과 동일한 조건에서 LC- MS-MS 분석하였다.

[0122] 대사산물 ID 연구는 다른 대사산물 존재의 상대적 양의 정성평가만을 제공하고, 각각의 대사산물 중의 양을 평가하기 위해서는 적절한 내부 표준으로 개별적인 유효한 분석이 요구된다는 것을 명심하라.

[0123] **결과**

- [0124] 검출된 대사산물을, 검출된 농도 순서로 분석된 5개의 화합물에 대해 도 2에 나타내었다. 여기서 사용된 방법론은 철저해야 할 필요는 없고, 더우기 (특히 부) 대사산물은 또한 여기에 적용된 방법에 대한 검출 한계 이하로 존재할 수 있다. 일반적으로, 주입된 투여량의 10% 이상을 나타내는 대사산물이 여기서 사용된 방법에 의해 검출되는 것으로 예상할 수 있다 (하지만 구조적으로 확인되어야 하는 것은 아니다).
- [0125] 화합물 (II) 및 (III)의 경우, 주요 대사 경로는, 간 혈액 흐름에 도달하는 속도로 신속한 제거와 일치하는, 시토크롬 P450-매개 수산화반응이다 (상기 실시예 1 참조). 두 화합물 모두에서의 수산화반응의 주요 부위는 시클로알킬 꼬리기 위이고, 두번째 (느린) 수산화반응은 락탐 헤드기에서 발생한다. 락탐 수산화반응 산물은 전자 분사 소스에서 7-히드록시 부가물의 불안정성으로 인해 -2amu (+16 amu와 대조적으로)에서 나타난다는 것을 명심하라.
- [0126] 화합물 (II)의 경우, 탈수산화 생성물은 소변에서 검출하기에 충분한 양으로 존재하였고, 반면 화합물 (III)의 경우 탈수산화반응 생성물은 검출되지 않았다. 두 경우, 추가의 부 생성물이 적용된 방법의 검출 수준 미만으로 또한 형성될 수 있을 것이다 (예를 들면, (II)의 3,5-디히드록시 및 3,5,7-트리히드록시 아다만틸 유도체, 뿐만 아니라 특히 (V)의 글루쿠로니드화된(glucuronidated) 부가물이 검출되었으므로, 히드록시-(II) 및 히드록시-(III)의 글루쿠로니드화된 부가물이 적용된 방법의 검출 수준 미만으로 또한 형성될 수 있을 것이다).
- [0127] 화합물 (V)의 경우, 글루쿠로니드화된 화합물은 주요 대사산물이고, 비록 래트에서 글루크론산염의 부 분획만이 소변에서 제거된다고 해도, 대부분은 대변으로 전달된다(글루쿠로니드화된 부가물이 우선 소변으로 배설되는 인간과 현저히 대조적이다). 기타 II 단계 대사산물(3'-O-설페이트)가 여기서 사용된 방법으로 검출되기에는 너무 낮은 수준(적어도 소변에서)으로 또한 형성되는 것이 가능하다. 화합물 (II) 및 (III)의 경우, 락탐 헤드기 위의 소량의 수산화 생성물이 (다시 주로 -2amu 생성물 이온으로서) 또한 검출되었다.
- [0128] 화합물 (IV)의 경우, 주요 대사산물은, 비록 부모 화합물의 손실(표 3 참조)이 확인되지 않은 대사산물의 형성과 분명히 관련되지만, 확인할 수 없었다. ((IV)의 주입된 투여량의 10% 미만은 변하지 않고 회수되었다. 화합물 (IV)는 있을 것 같지만, 현재 증명되지 않은 숄폰아미드 연결을 함유하는 유일한 약제임을 감안할 때 링커의 대사성 쪼개짐 (또는 다른 변형)이 일어났다. 즉, 락탐 헤드기에서 소량의 수산화반응이 또한 관찰되었다.
- [0129] 모든 다른 화합물들과 현저히 다르게, (I')의 중요한 대사산물은 소변 중에서 검출되지 않았고, 이것은 소변에 주입된 투여량의 대부분의 외관이 변하지 않은 형태이고(표 3 참조) 신장 혈액 흐름의 또는 그 이하의 제거율(상기 실시예 1 참조)과 관련된다. 이러한 대사산물 형성의 결핍은 인간 약제로서 개발하기 위해 본 발명에서 시험된 다른 화합물보다 (I')의 중요한, 그리고 예상하지 않은 이점이고, 적어도 부분적으로 상기 실시예 1에 기재된 뛰어난 약물동태학적 특성과 관련된다.
- [0130] 시험된 화합물 각각의 대사 정도의 정량적 평가를 증명하기 위해, 소변 중의 변하지 않은 부모 화합물의 양을 내부 표준으로서 (S)-3-(2',2'-디메틸프로파노일아미노)-카프로락탐을 사용하여, 실시예 1에 기재된 동일한 인증된 LC-MS 분석을 사용하여 측정하였다. 그 결과를 표 3에 나타내었다. 이에 더하여, 다양한 표적 조직에서 화합물들의 수준을 또한 평가하였다.

표 3

래트에 단일 투여 후 24시간의 화합물의 다양한 조직으로의 분포

화합물	심장	폐	신장	간	근육	뇌	소변 (ng/ml)
(II)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(III)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(V)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	16300
(I')	5.3	21.9	5.1	3.6	3.1	1.6	24567
(IV)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1010

[0132] nd = 검출안됨; LLOQ = 2.4 ng/g

[0133] 오직 화합물 (I'), (V) 및 (IV) 만이 단일 경구 투여 (1% CMC 중 3mg/kg) 24시간 후에 소변에서 검출되었다. 물론, 화합물 (I')은 대사가 상당히 덜 일어났다(주입된 투여량의 60% 이상이 소변에서 회수되었다). 더욱이, 화합물 (I') 만이 단일 투여 24시간 후 시험된 다른 조직에서 검출될 수 있었다. 이것은 본 발명에서 시험된 다

른 화합물들과 비교하여 화합물 (I')과 관련된 뛰어난 분포 및 증가된 노출 모두를 반영하는 것으로 보인다.

[0134] 다른 화합물들과 비교하여 (I')의 상당히 낮은 대사 비율은, 예상밖에 (I')이 인간 약제로서 개발하기 위해 이미 제시된 광범위한 락탐 BSCIs 보다 현저하게 뛰어나다는 것을 증명한다. 이 감소된 대사 (및 따라서 개선된 ADME 특성은) 상기 실시예 1에 나타난 극적으로 뛰어난 약물동태학적 특성의 원인인 것으로 보인다. 더욱이, BSCIs는 광범위한 조직으로의 부적절한 배혈구 증식을 표적으로 하는 항-염증제로서 개발하도록 의도되므로, 단일 투여 24시간 후 시험된 신체의 모든 조직에서 (I')이 발견된 반면, 시험된 다른 락탐 BSCIs 모두는 발견되지 않았다는 예상치 못한 발견은, 이 신규 화합물의 특별한 유용성을 명백히 나타낸다.

[0135] **실시예 3. 안정성 약리시험**

[0136] 5개의 화합물을 가능성 있는 유전자 독성을 평가하기 위해 표준 AMES 시험하였다. *S. Typhinurium*의 3개의 His-영양요구체 균주(TA102, TA98 및 TA100)을 S9 래트 간 마이크로솜 대사 시스템의 존재 및 부재 중에서 5개의 농도(최대 5mg/ml)에서 각각의 화합물로 처리하였다. 복귀주 콜로니의 수를 흔적-His 최소 매질 상에 플로팅하여 측정하였다.

[0137] 결과(표 4)는 5개의 화합물 중 어느 것에서도 시험된 어느 균주에서 상당히 증가된 복귀주 콜로니 형성(대사성 활성화와 함께 또는 없이)이 없었다는 것을 나타낸다.

표 4

AMES 시험에서의 복귀주 콜로니 형성

[0138]

화합물	TA100	TA100 +S9	TA102	TA102 +S9	TA98	TA98 +S9
(II)	0.59 *	0.73	0.50 *	0.93	0.58 *	0.60 *
(III)	0.79	0.81	0.69	0.88	0.68	0.55
(V)	0.78	0.88	0.93	1.09	0.96	0.91
(I')	0.97	0.95	0.82	0.93	2.00 **	1.23
(IV)	0.89	0.90	0.85	0.88	0.82	0.90
+ve 대조	6.89	7.18	5.97	2.65	9.68	19.05

[0139] 5mg/ml에서:

[0140] * = 희박한 세균 백그라운드 론(background lawn)

[0141] ** = 본 실험에서 낮은 대조값

[0142] = 복귀주에서의 상당한 증가시험된 화합물 중 어느 시험 농도에서 복귀주 콜로니 형성에 상당한 증가를 가져온 것은 없었다(최고의 투여량에 대한 자료만을 나타내었다). 화합물 (II)이 5mg/ml에서 세균 론 성장의 억제를 일으켰다는 것을 확인하라.

[0143] 별개의 실험에서, 5개의 화합물 모두를 hERG 이온 채널과의 상호작용에 대해 시험하였다. hERG와 반응하는 화합물은 QT 연장 및 치명적인 심장 부정맥을 일으킬 잠재적 위험이 있다. 10 μM에서 50% 이상으로 hERG 꼬리 전류를 억제하는 화합물은 일반적으로 인간 약제로서 개발하기에 위험성이 높다고 간주된다.

[0144] hERG를 발현하기 위해 안정적으로 트랜스펙트된 HEK239 세포를 10 μM (0.1% DMSO)에서 화합물을 함유하는 배스 용액으로 관류시켰다. 3개의 세포로부터의 hERG 꼬리 전류를 패치-클램프 분석 및 이어서 5초간 +20mV로의 탈극화에 의해 기록하였다. 그리고 나서 hERG 상호작용의 경향을 10 μM에서 상당한 변조를 나타내는 어느 화합물에 대한 4-지점 투여량-반응 곡선에서 측정하였다.

[0145] 결과(도 3)는 5개의 화합물 어느 것도 10 μM에서 hERG 채널과 상당한 상호작용을 하지 않았다는 것을 나타낸다.

[0146] 본 발명자들은, 안정성 약리시험 관점으로부터, (I')을 포함하여 5개 화합물 모두 인간 약제로서 개발하기에 똑같이 적당하다고 결론지었다. 특히, 상기 실시예 1 및 2에 설명된 바와 같이, (I')의 상당히 뛰어난 ADME 및 약물동태학적 특성은 상응하는 더 나쁜 안전 약리학 프로필을 수반하지 않는다.

[0147] **실시예 4. 일반 약리학**

[0148] 5개의 화합물을 특히 표적 수용체에 대해, 그리고 여러 표적 수용체의 구조와 관련된 다양한 수용체에 대해, 일

반 약리학을 평가하였다. 표적 수용체에 대한 특이 결합을 [³H]-BN83250의 결합에 대한 경쟁으로 평가하였다 (BN83250은 (S)-3-(2',2'-디메틸도데카노일아미노)-카프로락탐이다; Fox et al. J Med Chem. 200;48(3): 867-74; 락탐 BSCIs와 동일한 표적 수용체에 결합한다고 알려진 약제가 기재된다). 비-표적 수용체에 대한 결합은 본 분야에 잘 알려진 다른 수용체에 대한 다양한 특이 방사리간드의 결합에 대한 경쟁으로 평가하였다.

[0149] 특이 결합을 위해, 인간 단구성 세포주를 10nM [³H]-BN83250 (100% 에탄올 1µM 스톱; 30Ci/mmol) 및 다양한 경쟁자(1% DMSO 최대 비히클 농도)의 존재하에 40°C에서 결합 완충액(20mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4; 10⁶ 세포/반응) 중에 현탁시켰다. 반응물을 2시간 동안 얼음 위에서 배양하고, 0.5% 폴리에틸렌이민 중에 미리 적신 GF/C 필터를 통해 여과하였다. 비결합된 재료들을 느린 진공하에서 5x 5ml 빙냉 세척 완충액(20mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4)으로 세척하여 버렸다. 이러한 조건은 (10µM 냉각된 BN83250와 경쟁할 수 있는) 적어도 80%의 결합 특이로, 평형 결합을 달성하는 것으로 이미 알려져 있다.

[0150] 화합물 (I'), (II) 및 (V)와 특이 [³H]-BN83250에 대한 경쟁을 1pM 내지 10µM의 다양한 농도에서 측정하였다. 화합물 (III) 및 (IV)은 이 실험에서 조사하지 않았다. (I')에 대한 통상의 경쟁 결합 곡선을 도 4에 나타내었다.

[0151] 다양한 화합물에 대해 비선형 모델링을 경쟁 결합 곡선에 적용하여, (BN83250의 특이 상호작용의 부위로서 정의된) 표적 수용체에 결합하는 약제로서 그들의 특성을 비교하였다. 생성된 모델의 계수들을 표 5에 제공하였다.

표 5

[0152] 경쟁 반응 곡선의 비-선형 모델

화합물	기능적 ED50 대 MCP-1 (pM)	표적 수용체에서 Ka (pM)	힐 경사도
(II)	80	8,200	-0.5
(III)	80	시험하지 않음	Not tested
(V)	120	10,000	-0.5
(I')	50	50	-1.0
(IV)	800	시험하지 않음	시험하지 않

[0153] 락탐 BSCIs (II) 및 (V)와 현저히 다르게, 화합물 (I')은 표적 수용체에 대한 이상적이고 예측가능한 결합을 나타낸다는 것을 확인하는 것이 중요하다. 특히, 수용체에 대한 결합의 외관상 친화력은 이동 억제 분석에서 기능적 ED50 값과 유사한 크기이다. 유사하기는, 힐 경사도는 약 -1.0 (단순, 비-협조적 경쟁 결합 모델에 대한 이론적 예상치)이고, 반면, 다른 락탐 BSCIs는 상당히 낮은 힐 경사도를 나타내었다. 화합물 (II)과 (V)의 표적 수용체에 대한 이상적 결합으로부터의 이탈의 원인은 알려지지 않았지만, 이 차이는 화합물 (I')의 예상하지 못한 뛰어난 특성을 더욱 강조한다.

[0154] 비-표적 수용체에 대한 결합을, 본 분야에 잘 알려진 각각의 수용체에 대한 특이 방사리간드를 이용하여, 유사한 프로토콜을 사용하여 평가하였다. 각각의 화합물을 오직 단일 농도(10µM)에서 각각의 리간드의 특이 결합에 대한 경쟁에 대해 시험하였다. 결합의 억제가 20% 내지 80% 사이인 경우, 상호작용에 대한 Ka를 평가하였다. 억제가 <20%인 경우, 화합물은 수용체와 경쟁적으로 상호작용하지 않는다고 가정하였다. 억제가 >80% 인 경우, Ka는 < 1µM로 기록하였다. 스크린된 수용체의 상세, 및 조사에 사용된 방사리간드 및 세포형은 www.cerep.fr에서 이용가능하다.

[0155] 결과(도 5)는 시험된 락탐 BSCI 화합물 모두가 이 75 수용체 패널을 기준으로 주요 교차-반응성이 없다는 것을 증명한다(평가된 Ka <1 µM의 상호작용은 기록된 것이 없다). 오직 하나의 약한 (그러나 통계적으로 중요한) 교차-반응이 기록되었다(NK2 수용체와 화합물(II)). 이것을 근거로, 화합물 (I')은 (II)보다 표적 수용체에 한계적으로 더욱 특이적이지만, 시험된 락탐 BSCI 화합물 모두는 이 고처리량 스크린 분석 포맷에서 확인된 오프-표적 결합이 없음을 근거로 인간 제약으로서 개발하기에 적절하다.

[0156] 실시예 5. 인 비트로에서 광-스펙트럼 케모킨 억제 활성

[0157] 본 발명의 화합물의 생리적 활성은 Boyden 챔버 및 관련된 트랜스웰 이동 분석, 언더-아가로스 이동 분석 및 Dunn 챔버와 같은 직접 가시화 챔버를 포함하는 인 비트로 백혈구 이동의 광범위한 기능적 분석을 이용하여 실

명될 수 있지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

- [0158] 예를 들면, 케모킨에 대한 반응으로 백혈구 이동의 억제를 설명하기 위해, Neuroprobe의 96-웰 포맷 트랜스웰 분석 시스템(Gaithersburg, MD, USA)이 사용되었다. 기본적으로, 이 분석은 다공성 막으로 분리된 2개의 챔버로 이루어진다. 화학유인물질은 하부 구획에 놓이고 세포들은 상부 구획에 놓인다. 37°C에서 일정기간 배양 후, 세포는 화학유인물질을 향해 이동하고, 하부 구획의 세포 수는 (일련의 대조물에 비해) 화학유인물질 활성에 비례한다.
- [0159] 이 분석은 다양한 범위의 백혈구 개체에 사용될 수 있다. 예를 들면, 새롭게 준비된 인간 말초 혈액 백혈구가 사용될 수 있다. 선택적으로, 밀도구배 원심분리 또는 마그네틱 비드 분리법과 같은 본 분야에 알려진 방법을 사용하여, 다핵형 세포 또는 림프구 또는 단핵세포를 포함하는 백혈구 서브셋이 제조될 수 있다. 선택적으로, 단핵세포의 모델로서 THP-1 세포 또는 나이브(naive) 세포의 모델로서 Jurkat 세포를 포함하여, 인간 말초혈액 백혈구의 모델로서 광범위하게 확인된 불멸화 세포계가 사용될 수 있지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다.
- [0160] 비록 본 분석의 조건 범위가 케모틴-유도 백혈구 이동의 억제를 설명하는데 만족스럽지만 (예를 들면, 인 비트로 이동 분석에 요구되는 조건에 대하여 Frow et al. *Med Res Rev.* 2004;24(3):276-98에 의해 제공된 참고를 참조하라), 특정 실시예가 여기에 제공된다.
- [0161] 재료
- [0162] 트랜스웰 이동 시스템은 Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA에 의해 제조되었다. 사용된 플레이트는 ChemoTx™ 플레이트(Neuroprobe 101-8)와 30μl 투명 플레이트(Neuroprobe MP30)이다.
- [0163] Geys' 평형 염 용액을 Sigma(Sigma G-9779)로부터 구매하였다. MTT, 즉 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드를 Sigma (Sigma M-5655)로부터 구매하였다. 페놀 레드-프리 RPMI-1640을 Sigma (Sigma R-8755)로부터 구매하였다.
- [0164] THP-1 세포계(Euroean Cell Culture Collection)를 백혈구 세포 개체군으로 사용하였다.
- [0165] 시험 프로토콜
- [0166] 하기의 과정은 케모킨에 의해 유도된 백혈구 이동을 특이적으로 블록하는 능력에 대한 본 발명의 화합물을 시험하기 위해 사용된다:
- [0167] 우선, 상부 구획에 놓이게 되는 세포 현탁액을 제조하였다. THP-1 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고(770×g; 4분) 1mg/ml BSA와 함께 Geys' 평형 염 용액으로 세척하였다(GBSS+BSA). 그리고 나서 세척을 반복하고, 그리고 계수를 위해 작은 부피의 GBSS+BSA에 재현탁시키기 전에, 세포를 예를 들면 표준 혈구계산기로 재펠렛화하였다.
- [0168] 그리고 나서, GBSS+BSA의 부피를 존재 세포의 수에 따라, 세포의 최종 밀도가 GBSS+BSA의 ml 당 4.45×10^6 세포가 되도록 조절하였다. 이것은 플레이트의 상부 챔버에 놓이게 될 용액 25μl 당 100,000 THP-1 세포가 있도록 보장한다.
- [0169] 단일 화합물을 케모킨 유도 이동을 억제하는 능력에 대하여 시험하기 위해, 세포를 2 몫으로 제조하는 것이 필요하다. 4.45×10^6 세포/ml에서 THP-1의 현탁액을 2개의 포트에 나누었다. 하나의 포트에 시험 중의 억제제를, 적당한 매개물 중에서 적당한 최종 농도(예를 들면, 1% 이하의 DMSO 중의 1μM)로 첨가하였다. 두번째 포트에 GBSS+BSA 플러스 적절한 매개물(예를 들면, 1% 미만의 DMSO)의 동일한 부피를 대조물로서 작용하도록 첨가한다.
- [0170] 다음, 하부 구획에 놓일 화학유인물질을 제조한다. 예를 들면, MCP-1을 GBSS+BSA 중에 희석하여 최종 농도 25ng/ml를 얻는다. 이것을 세포 현탁액과 같이 2개의 포트에 나눈다. 하나의 포트에, 시험 화합물을 세포 현탁액에 첨가된 농도와 동일한 최종 농도로 첨가하고, 다른 포트에는 GBSS+BSA 플러스 적절한 매개물(예를 들면, 1% 미만의 DMSO)의 동일한 부피를 첨가한다. 선택적으로, 다른 케모킨들이 사용될 수 있다(표적 세포 개체군으로서 호중구를 사용하여 7.5ng/ml에서 SDF-1α; 50ng/ml에서 RANTES; 10 ng/ml에서 IL-8). 각각의 경우, (개별적인 실험에서) 선택된 표적 백혈구 개체군의 이동을 최대 자극을 가져오는 각각의 케모킨의 농도를 측정하는 것이 중요하다. 그리고 나서 이 최대 농도는 본 발명의 화합물의 억제 활성을 시험하기 위한 실험에서 사용된다. 케모킨은 통상적으로 중-모양 투여량-반응 곡선으로 백혈구 이동을 유도하기 때문에, 최대-하(sub-maximal) 또는 초-최대(supra-maximal) 케모킨 농도의 사용은 인위적 결과를 가져올 수 있다(예를 들면, 케모킨

억제제인 화합물은, 화학유인물질의 초-최대 농도가 실험에서 부정확하게 선택된다면, 백혈구 이동의 역설적 자극을 가져올 수 있다. 인 비트로 백혈구 이동 실험의 고안에서 이 중요한 인자의 추가의 설명은 Frow 및 그의 동료들에 의해 제공되었다 (Med Res Rev. 2004;24(3):276-98). 이에 더하여, 비-케모킨 화학유인물질이 또한 본 발명의 화합물의 생리적 활성의 케모킨-선택성을 증명하는데 사용될 수 있다 (예를 들면, 표적 세포 개체군으로서 친핵체를 사용하는 25ng/ml에서 C5a, 또는 표적 개체군으로서 THP-1 세포를 사용하는 10ng/ml에서 TGF-β 1).

- [0171] 하부 구획의 용액에서의 MCP-1의 최종 농도 및 상부 구획에서의 최종 농도를 확립할 때, 본문의 화합물의 첨가물을 제조하기 위해 첨가되어야 하는 액체의 부피를 고려해야 함을 주의해야 한다.
- [0172] 일단 하부 웰의 화학유인물질과 상부 챔버의 세포 용액이 제조되면, 이동 챔버를 조립해야 한다. 적당한 화학유인물질 용액 29 μ l를 챔버의 하부 웰에 놓는다. 분석은 각 조건에서 적어도 3회 측정으로 실시되어야 한다. 일단 모든 하부 챔버가 채워지면, 제조자 지침에 따라 다공성 막을 챔버에 적용한다. 최종적으로, 적당한 세포 용액 25 μ l를 각각의 상부 챔버에 놓는다. 증발을 막기 위해 장치 전체에 걸쳐플라스틱 뚜껑을 덮는다.
- [0173] 조립된 챔버를 37°C, CO₂ 5%에서 2시간 동안 배양한다. GBSS+BSA 중의 세포 현탁액을 튜브에서 동일한 조건하에 배양한다: 이들 세포는 각 조건에서 하부 챔버로 이동된 세포의 수를 측정하기 위한 표준 곡선을 구성하는데 사용될 것이다.
- [0174] 배양의 마지막에, 액체 세포를 부드럽게 상부 챔버로부터 제거하고, PBS 중의 빙냉된 20mM EDTA 20 μ l를 상부 챔버에 첨가하고, 장치를 4°C에서 15분 동안 배양한다. 이 과정에서 막의 하부에 고착된 어느 세포는 하부 챔버로 떨어진다.
- [0175] 이 배양 후, 필터를 GBSS+BSA로 조심스럽게 씻어내려 EDTA를 씻어버리고, 그리고 나서 필터를 제거한다.
- [0176] 각 조건에서 하부 챔버로 이동한 세포 수는 직접 계수법, 형광 또는 방사성 마커로, 또는 생체 염료를 통한 표지화 방법을 포함하여, 여러 방법으로 측정할 수 있다. 통상적으로, 본 발명자들은 생체 염료 MTT를 사용한다. 스톡 용액 3 μ l를 각 웰에 첨가하고, 그리고 나서 플레이트를 37°C에서 1-2시간 동안 배양하였다. 그 시간 동안 세포 내의 디하이드로게나제 효소는 가용성 MTT를 분광광도계로 정량화할 수 있는 불용성 블루 포르마잔 생성물로 전환시킨다.
- [0177] 병행하여, 8-포인트 표준 곡선을 셋업한다. 각 상부 챔버에 첨가된 다수의 세포(100,000)로 시작하여 GBSS+BSA 중에 2-배로 희석하여 내려가면서, 세포를 MTT 스톡 용액 3 μ l이 첨가된 25 μ l의 플레이트에 첨가한다. 표준 곡선 플레이트를 이동 플레이트와 함께 배양한다.
- [0178] 배양 마지막에, 침전된 포르마잔 생성물을 방해하지 않도록 조심하면서, 액체를 하부 챔버로부터 조심스럽게 제거하였다. 간단히 공기 건조시킨 후, DMSO 20 μ l를 각 하부 챔버에 첨가하여 블루 염료를 용해시키고, 595nm에서의 흡광도를 96-웰 플레이트 리더(reader)를 사용하여 측정하였다. 그리고 나서 각 웰의 흡광도를 표준 곡선에 삽입하여 각각의 하급 챔버 중의 세포의 수를 평가하였다.
- [0179] 화학유인물질 자극 이동을, 화학유인물질이 25ng/ml로 존재하는 하부 구획에 도달하는 평균 세포의 수에서 화학유인물질이 첨가되지 않은 웰에서 하부 구획에 도달하는 평균 세포의 수를 제하여 평가하였다.
- [0180] 시험 물질의 충격은 여러 농도의 시험 물질의 존재 또는 비존재 하에서 발생하는 화학유인물질-유도된 이동을 비교하여 산출한다. 통상적으로, 이동의 억제제 화합물의 존재에 의해 방해되는 전체 화학유인물질 유도 이동의 백분율로 표현된다. 대부분의 화합물의 경우, 투여량-반응 그래프는 다양한 화합물 농도의 범위(통상적으로 약한 활성 화합물의 경우 1nM 내지 1 μ M 이상의 범위)에서 발생하는 화학유인물질 유도 이동의 억제를 측정하여 구성한다. 각각의 화합물의 억제 활성을 화학유인물질-유도 이동이 50%(ED50 농도)까지 감소시키는데 요구되는 화합물의 농도로서 표현하였다. 통상적으로, THP-1 세포의 MCP-1 유도된 이동은 다양한 범위의 화합물의 생리적 활성의 비교를 위한 표준화된 시험 시스템으로서 사용되어 왔다 (예를 들면, Reckless & Grainger *Biochem J.* 1999 Jun 15;340 (Pt 3):803-11; Reckless et al. *Immunology.* 2001 Jun;103(2):244-54; Fox et al. *J Med Chem.* 2002 Jan 17;45(2):360-70; Fox et al. *J Med Chem.* 2005 Feb 10;48(3):867-74; the International applications *supra* 참조). 하나 이상의 케모킨에 의해 유도되지만, 비-키모킨 화학유인물질(TGF-β 또는 C5a)에 의해서는 유도되지 않는 백혈구 이동을 억제하는 화합물은 광역-스펙트럼 케모킨 억제제(BSCIs; 예를 들면, Grainger & Reckless *Biochem Pharmacol.* 2003 Apr 1;65(7): 1027-34; Grainger et al. *Mini Rev Med Chem.* 2005 Sep;5(9):825-32 참조)로 정의된다. .

[0181] **결과**

[0182] THP-1 세포의 MCP-1 유도 이동을 억제하는 화합물 (I')에 대한 통상의 투여량 반응 곡선을, 특히 높은 잠재력 (즉, < 1nM)을 갖는다고 알려진 다른 선택된 락탐 BSCIs에 대한 비교가능한 투여량 곡선과 함께, 도 6에 나타내었다. ED50 값으로 표현된, 화합물 (I')에 대한 다양한 케모킨 및 비-케모킨 화학유도물질의 효능을 표 6에 나타내었고 상기의 다른 락탐 BSCIs와 비교하였다.

[0183] 이 자료로부터 화합물 (I')이 (이 화합물이 다양한 케모킨에 의해 유도된 백혈구 이동을 강하게 그리고 효과적으로 억제하지만, 비-케모킨 화학유도물질, 이 경우 C5a 아나필로톡신에 의해 유도된 백혈구 이동에는 효과가 없기 때문에) BSCI로 분류될 수 있다는 것이 분명하다. 더욱이, 화합물 (I')은 인 비트로에서 적어도 이미 기재된 선택된 락탐 BSCI으로서 BSCI 만큼 효과적이고 강력하다(예를 들면, WO2006/016152의 화합물 (II) 또는 WO2005/053702의 화합물 (IV)). 본 발명에서 시험된 락탐 BSCIs 중 모두는 (NR58,4, 요힘바미드, 리저가미드 및 펩티드 3와 같은 이미드 및 NR58-3.14.3와 같은 관련 구조물을 포함하여) 지금까지 기재된 비-락탐 BSCIs 중 어느 것보다 상당히 더 효력있다. 참으로 화합물 (I')은 기재된 또는 앞서 기재된 어느 다른 화합물보다 인 비트로에서(적어도 MCP-1 유도 이동에 대해) BSCI 보다 더 강력하다. 비록 BSCI 정도의 효력은 선행기술에서 BSCIs에 대해 정성적으로 뛰어나지만(적은 양이기는 하지만), 화합물 (I)를 선행기술의 BSCI보다 예상밖으로 뛰어나게 하는 특성은 아니다. 대신, 이것은 앞서 기재된 다양한 BSCI과 비교하여 화합물 (I)의 예상 밖의 그리고 상당히 뛰어난, ADME 및 약물동태학적 특성이 인 비트로에서 BSCIs 만큼의 힘과 효력의 손실없이 달성되었다는 것을 증명한다.

표 6

[0184] **인 비트로 백혈구 이동에서 선택된 락탐 BSCIs의 효과**

화합물	MCP-1	SDF-1a	RANTES	IL-8 호중구	C5a 호중구
(II)	80	100	100	600	>1,000,000
(III)	80	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음
(V)	120	200	250	500	>1,000,000
(I')	50	50	80	600	>1,000,000
(IV)	800	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음

[0185] 각각의 경우, 50%까지 (ED50) 일정 화학유도물질의 최대 투여량에 대한 반응으로 백혈구 이동을 억제하는데 요구되는 화합물의 투여량 (pM 단위로)을 나타내었다. 다른 언급이 없는 한, 자료는 THP-1 세포주에 대해 기록되었다.

[0186] C5a 유도 이동에서 시험된 화합물 중 시험된 최고 농도(1 μM)에서도 어느 정도로 호중구 이동을 억제한 것이 없었다.

[0187] **실시예 6. 인 비트로 항-염증 활성**

[0188] 본 발명자들은 치사량 이하 LPS-유도 내독소혈증 시험을 사용하여 앞서 기재된 BSCIs의 인 비보 일반화된 항-염증 특성을 증명하였다(예를 들면, Fox et al. *J Med Chem.* 2002;45(2):360-70; Fox et al. *J Med Chem.* 2005;48(3): 867-74 참조). 이 분석에서, 마우스에 세균성 내독소(LPS)를 사용한 비-특이 전-염증성 공격, 그리고 (본질적으로 정상 조건하의 혈액에는 없지만, 광범위한 면역 자극의 반응으로 신속히 상승하는, 중심 전-염증성 시토킨 TNF-α의 혈청 수준으로 측정된) 전신성 염증 반응의 정도가 제공된다. 본 발명자들은 이 모델 자체로는 어느 인간 면역 질환 조건에 특별히 밀접한 것은 아니지만, TNF-α는 (류마티스성 관절염, 자가면역질환, 크론씨병, 아테롬성 동맥경화증, 천식 등을 포함하여) 매우 많은 질병에서 중요하다고 알려져 있기 때문에 이 모델을 선택하였다. 결과적으로, TNF-α 생성물은 이미 이와 같은 다양한 질병을 치료하기 위해 임상적으로 사용되고 있다 (예를 들면, Enbrel™ 및 기타 항-TNF-α 항체 생성물). 따라서, 이 모델에서 TNF-α 억제 활성의 증명은 다양한 범위의 질병에서 임상적으로 유용한 항-염증 효과의 높은 전조가 된다.

[0189] 마우스 (6개의 그룹)을 각각의 화합물의 다양한 투여량으로, LPS 도전 30분 전에 피하경로로, 또는 LPS 60분 전

에 경구 경로(위관을 통해) 예비처리하였다. 그리고 나서 마우스를 세균성 LPS 750 µg을 복강내 주사로 도전하고 3 시간 후 희생시켰다. 심장 천공에 의해 말단 혈액으로부터 혈청을 제조하고, TNF-α의 농도를 ELISA(R&D Systems)로 측정하였다. 각각의 실험에서, 6마리 마우스의 균은 음성 대조로서 작용하기 위해 LPS를 수여하지 않았고, 두번째 균은 (후보 억제제 없이) 오직 LPS 만을 수여하였다. 약물 전-처리 없이 LPS를 수여한 동물의 혈청 중 TNF-α의 농도를 임의로 100%으로 맞추었다(이것은 음성 대조군 중 <10pg/ml의 수준과 비교하여, 통상 약 6,000 pg/ml이었다). 본 발명자들은 (다양한 범위의 염증성 질환에 항-염증 의약 활성제로 잘 알려진) 합성 코르티코스테로이드 텍사메타손이 이 모델에서 적어도 90%까지 LPS-유도 TNF-α 생산을 억제하고, 반면 (본 명세서에 기재된 BSCIs와 같은 백혈구 모집 억제제로서보다 세포성 TNF-α 생산의 수준에서 작용하는 TNF-α 생산 억제제로서 알려진) 탈리도미드는 약 60%까지 LPS-유도 TNF-α 생산을 억제한다는 것을 이미 나타내었다.

[0190] 다양한 투여량에서 화합물 (I')의 효과를 다른 선택된 락탐 BSCIs와 함께 도 7에 나타내었다. 예상한 바와 같이, 본 화합물은 피하경로(원) 또는 경구 경로(삼각형)로 전달되는 경우 LPS-유도 TNF-α 생산을 강력하게 억제한다. 1µg/마우스 초과와 투여량에서, LPS-유도 TNF-α 수준은 일반적으로 코르티코스테로이드 텍사메타손의 효과와 비교하여, 90%보다 많이 억제되었다.

[0191] 또한 시험된 다른 락탐 BSCIs들도, 비록 (I')의 인 비보 효력이 시험된 다른 화합물 어느 것보다 크지만 (그리고, 참으로 이 조사에서 시험되었던, 어느 문헌에서 이미 기재된 다른 락탐 BSCIs의 효력보다 크다), 투여량-의존 방법에서 LPS-유도 TNF-α를 억제하였다(도 7). 이러한 효력에서의 정성적 증가(비록 작더라도)는 본 발명자들이 화합물 (I)를 선행 기술의 BSCIs보다 예상밖으로 뛰어나다고 주장하는 주요 이유는 아니다. 대신, 이것은 앞서 기재된 다양한 범위의 BSCIs와 비교하여 화합물 (I)의, 예상 밖의, 그리고 실질적으로 뛰어난, ADME 및 약물동태학이 인 비보 항-염증제로서의 힘 또는 효력의 손실없이 달성되었다는 것을 증명한다. 이에 더하여, 이러한 발견은 증가된 TNF-α 생산이 병원성 메카니즘의 성분인 다양한 염증성 질병에서의 유용성을 나타내는 염증 모델에서, 인 비보 항-염증제로서의 유용성을 명백히 증명한다.

[0192] 이 모델에서 발견된 초-급성 염증은 특히 시험된 항-염증제의 ADME 및 약물동태학에 특히 민감하다는 것을 명심하는 것이 중요하다. LPS 자극이 약물 후 30분에만 투여되므로, (화합물 (II) 및 (III)과 같은) 매우 짧은 플라즈마 유지시간을 갖는 약제라도 강력한 항-염증 효과를 이끌어 내기에 충분한 농도로 플라즈마에 남는다. 그러므로, 이와 같은 시험은 청구된 화합물의 선행기술을 넘는 우수성을 강조하지 않고, 그럼에도 불구하고 본 화합물의 유용성을 증명한다.

[0193] 청구된 화합물의 유용성은 인간 질병 천식(LPS 노출에 대한 반응으로 관찰된 초급성 염증 반응은, 비록 이것이 일반적으로 분명히 급성 염증을 유발한 모델이긴 하지만, 전형적인 어느 특정 인간 질병이 아니다)의 동물 모델에서의 연구에 의해 더욱 증명된다. 이들 연구에서, 설취류 (통상적으로 래트)는 다음의 실험 고안에 따라 오브알부민에 노출된다:

[0194] 성인 갈색 노르웨이 래트 (200-300g 체중; n=10 /군)를 제0일에 오브알부민 0.1mg을 단일 복강내 주사하여 감각시켰다. 그리고 나서 각각의 래트에 제8일에 1% 오브알부민(w/v), 제 15, 18 및 21일에 2% 오브알부민(w/v) 용액으로 기관 내 도전으로 주입하였다. 그리고 나서 동물을 제21일에 최종 도전 3시간 후에 희생시켰다. 오브알부민 (Sigma; 퓨렛 이용 등급)을 EndoTrap™ 레드 칼럼 (Cambrex 사로부터 구입; 제조사 지침에 따라 사용) 상에서 계대 배양하여 내독소-프리 제조하였고, 내독소 수준은 LAL assay (QCL-1000™; Cambrex; 제조사 지침에 따라 수행; 표준 내독소 1mg은 ~900,000 EU/mg를 함유)을 사용한 <5 EU/mg 단백질로 확인되었다. 이것은 폐 염증 반응이 높은 순도 등급의 시판 오브알부민 제제에 의해 발생하는 의도되지 않은 LPS 자극에 의하기보다는, 오브알부민 단백질에 대한 알러지 반응에 의해 생긴다는 것을 확인하고, 따라서 이 모델이 인간 천식의 기본적인 분자 병리학을 더욱 근접하게 나타낸다는 것을 확인한다.

[0195] (기본 대조로서 작용하는) 마우스의 한 균은, 나머지는 동일하게 처리되었지만, 오브알부민 도전을 받지 않았다. 제2군 (양성 대조)은 도전은 받았지만, 약물 처리는 받지 않았다. 제3군은 제8일에서부터 제21일까지 위관 영양법으로 0.3mg/kg의 투여량으로 화합물 (I')을 매일 투여받고, 투여는 동일 일자 제조된 오브알부민으로 어느 순차적 도전 1시간 전에 투여된 것을 제외하고, 동일하게 처리되었다. 화합물 (I')은 내독소-프리 인산염 완충 살린의 멸균액으로서 투여되었다. 제4군은 화합물 (I')과 동일한 처리 일정으로, 위관 영양법으로 30mg/kg으로 몬테레우카스트(시판 천식 약물 Singulair™의 활성성분)를 수여받았다.

[0196] 희생시, 총 폐 백혈구 모집을 기관 삽입술을 통해 도입된 3ml 살균 인산염-완충 살린 4 로트를 사용하여 기관지 폐포 세척(BAL)을 수행하여 평가하였다. 각각의 동물에 대해, BAL 세척물을 결합하고, (혈구 계수기를 사용하여) 총 세포 개체군을 계수하였다. 부가적으로, 존재하는 백혈구의 유형을 선행기술에 잘 알려진 과정에

따라 흐름세포분석기를 사용하여 평가하였다.

- [0197] 각각의 마우스로부터 비장을 또한 제거하고 RPMI +10% FCS + 항생물질에 놓았다. 그리고 나서 단-세포 현탁물을 생성하기 위해 비장을 멸균 페트리 접시에 놓인 멸균 망 컵의 미세-메쉬(100 μm) 나일론 막을 통해 눌렀다. 생성된 세포 현탁물을 원심분리(328g; 5 mins)하고 새로운 매질에 재현탁하기 전에 RPMI +10% FCS + 항생물질로 세척하고, 혈구계수기로 계수하였다.
- [0198] 전체 중 총 4×10^6 비장세포 (excluding RBCs)를 각 마우스로부터 96 웰 플레이트 (100 μl volume/웰/ 1×10^6 cells/well)의 4개 웰 중 무린 IL-2 2U/ml (10ng/ml)의 존재하에 밤새도록 RPMI+10%FCS + 항생물질 중에서 배양하였다(37°C; 5% CO₂). 대략 24시간 후, 4 웰을 2 웰의 군으로 나누었다: 한 군은 처리하지 않고 남기고, 두번째 군은 4시간 동안 37°C에서 500ng/ml Ionomycin 및 50ng/ml PMA로 자극하였다. 이 배양의 나중 2시간 동안 10 μg/ml Brefeldin A (EtOH 중 스톱 1mg/ml)을 각각의 세트 중 하나의 웰에 첨가하였다. Brefeldin A는 단백질이 골지체로 이송하는 것을 막고 따라서 ER 중 단백질의 축적을 허용한다.
- [0199] Brefeldin A가 없는 웰을 추가 48 시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 마지막에, 세포 현탁액을 원심분리하고 (328g; 5 분) 상등액을 무린 IL-4(Th2 세포의 마커) 및 무린 인터페론-γ (IFN-γ; Th1 세포의 마커)에 대해 ELISA 분석하였다 (R&D Systems; 제조사 지침에 따라 수행).
- [0200] Brefeldin A를 갖는 웰은 다음과 같이 4시간 배양의 마지막 직후에 세포내 IL-4 및 IFN-γ로 염색하였다: 세포를 얼음 위에서 30분 동안 항-CD4-FITC 항체(eBioscience Rat IgG2b, Cat. Code. 11-0041)으로 염색하고, 그리고 나서 2두들베코 PBS 중에서 세척하고 2두들베코 PBS 중의 2% 파라포름알데히드 (최종 농도) 중에서 20분 동안 고정하였다. 고정 후, 세포를 실온에서 10분 동안 2두들베코PBS/1 %BSA/0.5% 사포닌(Sigma S7900)으로 투과시켰다. 각각의 웰로부터의 세포를 3개의 개별적인 FACS 튜브로 나누고 다음으로 실온에서 30분 동안 배양하였다:
- [0201] • IFN-γ-PE (eBioscience Rat IgG1, Cat. Code. 12-7311-82, 100 μg) 또는
 - [0202] • IL-4-PE (eBioscience Rat IgG1, Cat. Code. 12-7041-82, 100 μg) 또는
 - [0203] • 이소타입 대조 (Rat IgG2b-FITC, eBioscience Cat. Code 11- 4031 및 Rat IgG1-PE의 혼합물, eBioscience Cat. Code 12-4301).
- [0204] 그 후 세포를(막 클로저 되도록 PBS/BSA/사포닌으로 2회 및 그 후 사포닌 없이 PBS/BSA로) 세척하고 그리고 유세포측정을 위해 준비된 2두들베코 PBS에 재현탁하였다.
- [0205] (그들을 T-헬퍼 세포로서 식별하는) FITC 채널 상에서 CD4에 대해 특이 염색된 세포를 PE 채널 상에 IL-4 또는 IFN-γ에 대한 특이 염색의 존재에 대해 분석하였다. IFN-γ에 대한 양성 오염된 CD4+ 세포 대 IL-4에 대한 양성 오염된 CD4+ 세포의 비를 Th1/Th2 비로 기록하였다. 처리하지 않은 갈색 노르웨이 래트의 Th1/Th2 의 비는 비장에서 대략 2.7이었다 (즉, 비장에서 대략 2.7배 이상의 CD4+ 세포가 IL-4로서 INF-γ를 합성한다). 감각 및 오브알부민으로 반복 도전 후, 상기 비는 1.5 미만으로 감소되고, 이것은 천식을 수반하는 마크된 Th2 편광을 설치류와 인간 모두에서 변화한다는 것을 증명한다(낮은 Th1/Th2 비는 상대적인 Th2 편광을 나타내고, 반면 증가된 Th1/Th2 비는 상대적인 Th1 편광을 나타낸다.).
- [0206] 화합물 (I') 및 양성-대조 비교기 화합물 몬테레우카스트 모두의 매일 투여는 BAL 세척에서 백혈구의 수를 상당히 감소시킨다(화합물 (I')로 70% 감소; p < 0.01 Student's unpaired t-test; 도 8).
- [0207] 이것은 명백히 본 발명의 화합물이 인간 천식 모델에 유용한 항염증 효과를 갖고, 케모킨에 대해 백혈구 이동을 블록할 수 있다는 것을 증명한다. 이와 같은 효과의 크기는 적어도 인간 천식의 치료를 위한 (Singular™와 같은) 시판 약제의 효과와 비교할 수 있고, 화합물 (I')의 뛰어난 약물동태학 및 생체 분포 계수는 몬테레우카스트와 비교하여 상당히 증가된 효능에 의해 설명된다 (화합물 (I')의 투여량 0.3mg/kg에 의한 BAL 백혈구 수 감소와 유사한 결과를 가져오기 위해 몬테레우카스트 투여량 30mg/kg이 요구된다).
- [0208] 양성-대조 비교자 화합물 몬테레우카스트의 투여없이, 화합물 (I')의 매일 투여는, 여기에 사용된 오브-알부민-유도 폐 염증 모델, 그리고 인간 천식 모델 모두에서 천식 병인의 주요 작동자로 고려되는 Th2 편광을 상당히 반대로 하였다(도 9). 경구로 0.3mg/kg정도의 상당히 낮은 투여량의 화합물 (I')로의 치료는 오브알부민과 같은 항원에 대한 만성 노출에 의한 Th2 편광을 완전히 없애고, 화합물 (I')로 치료된 동물에서의 Th1/Th2 균형은 본질적으로 도전되지 않은 갈색 노르웨이 래트와 본질적으로 구별할 수 없었다.

[0209] 아테롬성동맥경화증과 같은, 다른 만성 염증성 질병은 (Th2와 반대로) Th1과 관련된다는 것을 기억하여야 한다. 두 유형의 질병 모두에서, T-헬퍼 세포 시토킨 프로파일의 불균형은 질병의 만성 염증성 성분의 주요 병원성 원인으로 기재되어 왔다. (아테롬성 동맥경화증과 같은) Th1 편광과 관련된 질병 모델에서, 본 발명자들은 본 명세서에서 청구한 화합물 (I')와 같은 BSCI로 치료 후 Th2로의 표시 전환을 관찰하였다. apoE (apoE^{-/-} mice)를 암호화하는 유전자의 동형 결찰을 갖는 마우스는, 심지어 일반 수유 식이에서도 여러 지질 혈관 병변을 발현시키고, Th1/Th2의 비는 (기본 C57B16 야생형 균주의 3.2와 비교하여) 약 8이다. 그러나, (지질 병변 개발이 가장 잘 발생하는 기간인 12주령에서 24주령까지의) 3개월간 BSCI로 치료 후, Th1/Th2 비는 정상화하였다 (그리고 이 모델의 매우 높은 투여량에서 Th2 편광을 가져왔다). 천식의 오브알부민-유도 폐 염증 모델에서의 자료를 함께 취함으로써, 본 발명자들은 BSCI이 강조된 병원성 결함 (천식에서와 같이) Th2 편광인지 또는 (아테롬성 동맥경화증과 같이) Th1 편광인지와 관계없이 T-헬퍼 세포 시토킨 생산 프로파일을 정상화 또는 재균형화 할 수 있다는 것을 증명하였다. 본 발명자들은 BSCI이 현재 T-헬퍼 세포 개체군에 대한 이러한 "재균형" 효과를 갖는다고 기재된 유일한 약제라고 믿는다. 이러한 메카니즘적 통찰력은 (염증성 성분을 갖는 다양한 질병의 수많은 동물 모델에서 효능 데이터와 함께) BSCIs, 그리고 특히 본 명세서에 청구된 특정 화합물(I)이 (예상 밖의 뛰어난 약물동태학 및 체내 분배 특성의 결과로서) 염증성 성분을 갖는 다양한 범위의 병태를 치료하는 의약으로서 유용하다는 본 발명자들의 주장을 더욱 입증한다.

[0210] **실시예 7. 구조적으로 관련된 유사체들과 화합물 (I')의 비교**

[0211] 화합물 (I)이 다른 아실아미노락탐 BSCIs와 비교하여, 특히 약물동태학적인 면에서 놀라운 뛰어난 약제학적 특성을 갖는다고 확인됨에 의해, 본 발명자들은 이 화합물을 지금까지 알려진 가장 구조적으로 유사한 유사체들과 직접 비교하였다.

[0212] 실시예 1 내지 6에서 비교된 화합물들의 원래의 패널을, 앞서 기재된 아실아미노락탐 BSCIs의 범위 내에서 가능한 한 구조적으로 다른 것들로 조립하였다. 화합물 (I)은, 비록 6-원 락탐 '헤드기'가 7-원 락탐 고리보다 일반적으로 뛰어나다 (또는 참으로 열등하다)고 가정할 특별한 이유는 없지만, 이들이 이 패널에 포함되한다는 것을 보증하였다 (인 비트로 BSCIs로서 효능의 항목에서 다양한 고리 크기의 아실아미노락탐 유사체들의 광범위한 비교를 위해 W02006/134385 참조). 유사하기는, 패널은 남은 분자 중 아미노 링커와 구별하기 위해 숏폰아미드 링커 (IV)의 단일 예를 포함한다.

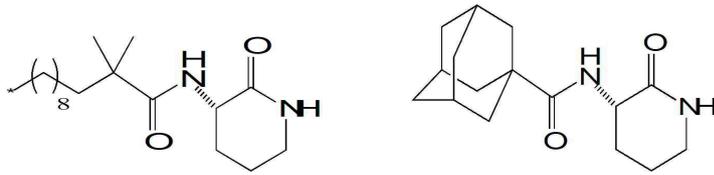
[0213] '꼬리기'에 대해, 패널은 2개의 단순 알킬기 (둘 다 피보일) 및 3개의 시클릭 알킬기 (메틸시클로헥실기, 및 두 개의 아드만탄, 이들 중 하나는 치환되었다)를 포함한다. 5개의 화합물 모두는 주요-탄소(key carbon)에서 (사면체 배열에서 이 중요-탄소에 대해 4 탄소 원자가 결합된, 아미노카보닐의 카보닐에 대해 2 위치에서) 사면체 결합각을 갖는 잘-확립된 2,2'-이치환체를 공유한다. 이러한 중요-탄소에서 2'2'-이치환 특성은 선형 알킬 '꼬리기'와 비교하여 BSCIs 및 또는 본질적으로 사면체 배열에서 이 중요 탄소에 결합된 4개의 탄소원자가 부족한 다른 구조물에 추가 효능을 부여하는 것으로서 이미 기재되어 있다(W02006/016152).

[0214] 그 결과, 원래 패널 중의 '꼬리기'는 충분한 인 비트로 효능을 보장하기 위해, 이 2',2'-이치환 특성을 갖고, 또한 생성된 분자에서 허용가능한 물리적 특성을 가져올 수 있는 요건을 갖고 선택된다. 예를 들면, 아다만탄, 시클로헥실 및 짧은 사슬 2'2'-분지된 알킬기는 허용가능한 수 용해도를 갖는, 결정형 (또는 세미-결정형) 고체 형태의 화합물을 가져올 것이다. 반대로, (주요 2-위치의 탄소 원자의 바람직한 배열과 일치하는) 2',2'-디메틸도데카노일과 같은 다른 가능한 꼬리기는 그들의 고체로서의 왁스같은, 무정형 물리적 형태 및 생리적 완충액 중의 극단적인 불용성을 근거로 패널에서 배제되었다. 이들 인자 둘 다는, 예를 들면 제제화 또는 정제화 동안 화합물을 다루기 어렵게 하므로 ADME 및 독성학적 특성을 측정하기 전에도 화합물의 약제학적 개발을 위한 바람직함을 감소시키고, 이것은 만성 투여 중 지방 저장의 축적 또는 경구 생체이용율의 결핍과 같은 부적당한 ADME 특성의 가능성을 증가시킨다.

[0215] 그러므로, 실시예 1 내지 6에서 조사된 5개의 화합물은 약제학적 개발에 적합한 대략 동등한 기회를 갖는다. 그들의 ADME 특성을 측정하기 전에, 뛰어난 것을 불가능하다.

[0216] 그러나, 실시예 1 내지 6에 기재된 시험이 완료된 후, 화합물 (I)이 다른 화합물보다 실질적으로 및 예상 밖으로 뛰어나다는 것은 분명해진다. 화합물(I)은 패널에서 6-원 고리를 갖는 유일한 화합물이므로, 뛰어난 특성은 락탐 고리 때문일 수 있다. 이것이 사실인가를 확인하기 위해, 본 발명자들은 BSCI 활성을 갖는 아실아미노락탐 화합물의 모든 선형 예를 검토하였고, (I)과 큰 구조적 유사성을 갖는 두개의 화합물을 선택하였다. BSCIs 활성을 갖는 모든 기준에 알려진 화합물 중, 두 화합물이 화합물 (I)과 가장 구조적으로 유사하다.

[0217] 선택된 화합물은 3-(2',2'-디메틸도데카노일아미노)-테트라히드로피리딘-2-온 (WO2006/134385의 실시예 3; 본 명세서에서 VI로 표기) 및 3-(아다만탄-1-카보닐아미노)-테트라히드로피리딘-2-온 (WO2006/134385의 실시예 1; 본 명세서에서 VII로 표기)이다:



(VI)

(VII)

[0218]

[0219]

[0220] 이들 화합물들은 일반적으로, 본질적으로 사면체 배열에서, 아마이드 카보닐 기에 대해 2-위치에서 중요 탄소에 결합된 4 원소를 갖는, (I)과 6-원 락탐 고리, 아마이드 링커 및 2',2'-이치환체의 존재를 공유한다.

[0221] 화합물 (VI) 및 (VII)는 실시예 1 중 화합물 (I)내지 (V)에 앞서 적용된 정확하게 동일한 프로토콜을 사용하는 래트에서 약물동태학적 분석된다. (VI) 및 (VII) 둘 다의 (S) 거울상 이성질체는 이들 시험에 사용되었고, 이들은 지금까지 기재된 모든 다른 아실아미노락탐 BSCI와 더욱 활성 이성질체일 것으로 예상될 수 있기 때문이다.

[0222] **결과**

[0223] 불행히도, (VI)는 용매를 유지하는 경향이 있는 밀랍같은 고체이다. 용매-프리 (VI)의 체제를 얻기 것은 어렵고, 이것은 수 주일 동안의 상당한 건조 후 결과적으로 달성된다. 그러나, 이 샘플은 앞선 화합물의 정맥 투여를 위한 비히클로서 사용되는 살린 중 5% DMSO 중에 완전히 불용성이다. 그 결과, 정맥 투여에 적절한 용액을 제조하기 위해 완전히 다른 비히클을 사용하는 것이 필요하다.

[0224] 화합물 (VI)을 정맥내 투여를 위해 50% PEG400 / 20% 솔루톨 / 30% 살린 중에 용해시켰다. (VI)을 포함하여, 모든 화합물을 경구투여를 위해 살린 중의 1% 카르복시메틸셀룰로스 중에 현탁 (또는 용해)하였다. 비록 다양한 비히클을 이용한 실험들 중 (비히클이 화합물의 거트 흡수에 상당히 영향을 미칠 수 있으므로) 경구 생체이용률을 비교하는 것이 일반적으로 추천되지는 않지만, 그럼에도 불구하고 비히클의 선택은 (I')와 같은 다른 화합물과 비교하여 (VI)의 정맥내 투여 후 관찰된 반감기에 상당한 영향을 미치는 것으로 보인다.

[0225] 단일 1-구획 약물동태학적 모델의 계수들을 표 7에 나타내었다. 상기 표 1로부터 화합물 (I')의 데이터를 비교를 위해 나타낸다. (VI)와 (VII)는 모두 (I')에 비해 현저히 열등하고, 제거율은 10배 이상 높고, 25~50 배 미만의 경구 노출이 (I')에 의해 달성되었다.

표 7

선택된 6-고리 아실아미노락탐 BSCIs에 대한 약물동태학 계수

	F (%)	t1/2 (mins)	제거 (ml/min/kg)	Vss (L/kg)	노출 (min.ng/ml)
(VI)	16	46	40.3	1.95	11,000
(VII)	35	20	31.1	0.7	32,500
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000

[0226]

[0227] 각각의 화합물에 대한 단순 1-구획 약물동태학적 모델로부터 3 마리 래트의 평균으로의, 경구 생체이용률 (F, %), 정맥 투여 후 우세한 플라즈마 반감기 (t1/2, mins), 제거 (ml/min/kg), 분포용적(Vss, L/kg) 및 경구 노출 (AUC 0-t, min.ng/ml). (VII)의 경우, Cmax는 15분 내에 달성하였고, (I')와 같이 최적 흡수와 일치한다. 그러나, 소수성(VI)은 느리게 흡수되었고, Tmax는 60 내지 120분 사이이다.

[0228] 참으로, 표 7과 표 1의 비교로부터, 화합물 (VI)과 (VII)은 노출에 있어 (IV)와 (V) 만큼 양호하지 않다는 것이 확인되었다. (I)과 6-락탐 고리를 공유함에도 불구하고, 화합물(VI) 및 (VII)는 ADME 특성이 현저히 열등하였고, 앞서 기재된 다양한 범위의 다른 아실아미노락탐 BSCI 화합물보다 더 낮지 않았다.

[0229] (I')와 비교하여 (VI) 및(VII)의 훨씬 높은 제거와 일치하여, 이들 화합물은 실질적으로 (I')보다 플라즈마 반감기가 상당히 짧다 (3시간 이상과 비교하여, 1시간 미만).

[0230] 이러한 약물동태학적 분석을 근거로, 본 분야의 당업자에게 있어서, 유사한 화학적 안정성뿐만 아니라 이론적 근거 및 그들의 구조적 유사성을 근거로 하는 그들의 유사한 예상되는 특성에도 불구하고, (I')는 (VI) 및 (VII) 둘 다보다 현저히 뛰어나고, 이들 6-고리 락탐 유사체의 어느 것보다 25~50 배 더 나은 경구 노출을 갖는다는 것은 당연할 것이다. 본 발명자들은 (I')의 예상 밖의 뛰어난 ADME 특성이 6-고리 락탐에 기인하지도 않고 (왜냐하면, (VI) 및 (VII)와 같은 다른 6-고리 락탐은 뛰어난 ADME 특성을 공유하지 않으므로) 또는 아마이드 링커에 기인하지도 않고(왜냐하면, (II), (III) 및 (V)을 포함하는 다른 아마이드 링커 화합물이 그들의 뛰어난 ADME 특성을 공유하지 않으므로), 또한 피보일 꼬리기에 기인하지도 않는다 (왜냐하면, 화합물(IV)은 이 기를 공유하지마 (I')의 뛰어난 ADME 특성은 공유하지 않으므로)고 결론지었다. 본 발명자들은 (I')의 뜻밖의 뛰어난 ADME 특성이 6-고리 락탐, 아마이드 링커, 또는 피보일 꼬리기에 기인할 수 없다고 결론지었다 (왜냐하면, 화합물 (IV)은 (I')와 이 기를 공유하지만 뛰어난 ADME 특성을 공유하지 않기 때문이다). 대신, (I')의 놀라운 그리고 현저하게 뛰어난 ADME 특성은 구조적 특성의 특정 결합에 의존하였고, 이것은 예상할 수 없었다.

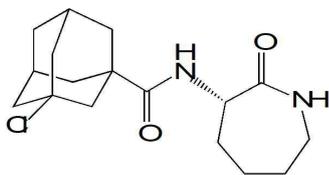
[0231] **실시예 8. (I')와 동등한 ADME 특성을 갖는 아실아미노락탐 BSCI을 합리적으로 고안하기 위한 시도.**

[0232] 화합물 (I')의 뛰어난 ADME 특성을 확인하는 과정에서, 본 발명자들은 인 비트로에서 BSCIs로서 서브-나노몰 효능을 갖는 수 많은 다른 아실아미노락탐의 약물동태학을 분석하였다. 그 결과, 본 발명자들은 이 구조적 공간 내에서 분자에 대한 ADME 특성을 변화시키는 인자에 대한 몇몇 통찰력을 얻을 것을 예상하였다. 따라서 본 발명자들은 이 경험을 (I')의 것과 가능한 한 유사한 ADME 특성을 갖는 앞서 기재된 구조적 분류들 중 제2 아실아미노락탐 BSCI 화합물을 선택하는데 사용하려고 시도하였다.

[0233] (I')과 비교하여 화합물 (IV)의 비교적 신속한 제거(상기 표 1 참조)는 아마이드 링커가 뛰어난 ADME 특성과 관련됨을 제안하였다. 따라서, 본 발명자들은 아마이드 링커를 갖는 화합물로 선택을 제한하였다.

[0234] 화합물 (II)은 매우 잘 흡수되지만, 아마도 간 시토크롬 P450 이소엔자임의 작용을 통해, 인 비보에서 신속히 (V)로 전환되었다. 화합물 자체는 외관상 (아마도 아다만틴 고리 상의 전자 회수 치환의 결과로서) 더욱 산화되지 않았고, 그럼에도 불구하고 비교적 신속히 제거되었다. 소변에서 검출가능한 일차 대사물질의 부재는 신속한 제거가, 래트의 분변에서 분비되는 글루쿠로니드와 같은 II 단계 컨쥬게이트의 형성에 의해 조정되었다는 것을 강력하게 제안한다. II 단계 컨쥬게이트는 (V)의 3-히드록시 아다만탄과 같은, 히드록시기에서 쉽게 형성된다. 그 결과, 본 발명자들은 할로 치환체와 같은 II 단계 컨쥬게이트를 형성할 수 없는 (시토크롬 P450 또는 다른 간 히드록실라제 또는 옥시다제에 의한 아다만틴 고리의 히드록실화를 막기 위해) 안정한 전자-회수 치환체를 갖는 (II)의 유도체가 우리가 찾던 최적 ADME 특성을 가질 것이라는 것을 제안하였다.

[0235] 그 결과, 아래의 화합물 (VIII)을 합성하였고 시험하였다. 본 발명자들은 (플루오로-치환 유사체 보다) 클로로-치환 유사체를 선택하였는데, 이것은 합성 경로를 쉽게 이용할 수 있는 공지 화합물(WO2006/016152의 실시예 8 참조)이기 때문이다. 더욱이, 지방족 C-F 결합의 도입은 합성적으로 도전적이고, 대략 크기에 따라 활성 억제적 성분에 대한 양호한 비용을 증가시킬 수 있다.



[0236] (VIII)

[0238] 상기와 같이 (실시예 7 참조), 본 발명자들은 일반적으로 아실아미노락탐 화합물의 (S)-거울상이성질체가 인 비트로에서 더 큰 BSCI 활성을 갖는다고 알려져 있기 때문에, 이 화합물의 (S)-거울상이성질체를 제조하고 평가하기 위해 선택하였다.

[0239] 본 분자와 관련된 당연한 관심은 C-Cl 결합의 안정성이었다. 본 발명자들은 그러므로 생리적 식염수 및 래트 간 마이크로솜 제제 모두에서, 인 비트로 (VIII)의 안정성을 시험하였다. 고무적으로, (VIII)의 2% 미만은 37°C에서 24시간 후에도 가수분해되었다 (가수분해 산물 (V)과 부모 화합물 (VIII)의 이중 이온 검출에 의해, LC/MS에 의해 확인). 유사하게는, (VIII)의 1µM 에서 래트 마이크로솜 제제로의 1시간 동안 37°C에서의 배양은 "no NADPH" 블랭크 작업과 비교하여 10% 미만 분해하였다. 그 결과, 본 발명자들은 화합물 (VIII)이 (I')와 유사한 인 비트로 안정성 및 고유 제거를 갖는다고 결론지었다.

[0240] 그러므로, (I')의 발견으로부터 얻은 경험을 사용한 이론적 근거, 뿐만 아니라 ADME 특성을 예측하는 본 분야의

일반적 기술을 근거로, 또한 간 마이크로솜 제제에서의 인 비트로 안정성 및 고유 제거와 같은, 통상의 인 비트로 스크리닝 분석을 사용하여, 화합물 (VIII)는 (I')와 비교가능한 ADME 특성을 갖는다고 예상되었다.

[0241] 그러므로, 본 발명자들은 실시예 1과 7에 사용된 화합물 (I') 내지 (VII)에 대해 이미 적용된 것과 정확히 동일한 프로토콜을 사용하여 래트에서 약물동태학적 분석을 (VIII)에 대해 수행하였다.

[0242] **결과**

[0243] 단일 1-구획 약물동태학적 모델의 계수들을 표 8에 나타내었다. 상기 표 1로부터 화합물 (I')에 대한 데이터를 비교를 위해 나타내었다. 화합물 (VIII)은 제거율은 20-배 이상 높고, 검출가능한 경구 생체이용률은 없었으나, (I')보다 현저히 열등하였다.

표 8

[0244] **선택된 락탐 BSCIs에 대한 약물동태학적 계수**

	F (%)	t1/2 (mins)	제거 (ml/min/kg)	Vss (L/kg)	노출 (min.ng/ml)
(VIII)	<1%	15	62.8	0.7	<100
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000

[0245] 각각의 화합물에 대해, 3마리 래트에서 평균하여, 단순 1-구획 약물동태학적 모델로부터의 경구 생체이용률 (F, %), 정맥 투여 후 우세한 플라즈마 반감기 (t1/2, mins), 제거 (ml/min/kg), 분포용적(Vss, L/kg) 및 경구 노출 (AUC 0-t, min.ng/ml). (VIII)에 대해, 분석물의 수준은 경구 투여 후 모든 시점에서 정량화 한계(~2ng/ml)보다 낮았다.

[0246] 결론적으로, 본 발명자들이 이론적 고려 및 인 비트로 스크리닝 시험을 근거로, 최적 ADME 특성을 갖는다고 채택한 화합물 (VIII)은, 그럼에도 불구하고, 적어도 약제로서 개발하기 위해 PK를 측정할 것들 중에서 가장 덜 적합한 아실아미노락탐 화합물이었다. 화합물은 신속한 제거, 그 결과 짧은 플라즈마 반감기를 나타내었고, 부가적으로 모두 경구 생체이용률을 나타내지 않았다.

[0247] 화합물 (I')의 뛰어난 정도를 도 10에 설명하였다. 여기서 본 발명자들은 래트에서의 약물동태학적으로 분석된 모든 BSCI 화합물에 대해 두 개의 PK 계수 (플라즈마 반감기 및 경구 노출)를 플랫폼하였다. 화합물 (I')은, 일반적으로 구조적 공간에 있는 화합물들의 불량한 ADME 특성 (및 매우 많은 전체적으로 관련없는 약물 후보자의 종류의 특이하지 않음)을 나타내는 클러스터로부터 멀리 떨어져 있었고, 화합물 (I')이 예상 밖으로, 그리고 뜻밖으로 뛰어나다는 것을 나타낸다.

[0248] **실시예 9. (I)의 (S)- 및 (R)- 거울상이성질체의 비교**

[0249] 화합물 (I')은 뜻밖에, 그리고 현저하게 뛰어난 ADME 특성을 갖는 것으로 나타났다 (실시예 1 참조). 화합물은 (아미드 링커를 갖는 고리 교차점에) 비대칭 탄소 원자를 갖고 따라서 두 개의 입체이성질체를 나타낸다: (V)로 표시되는 (S)-거울상 이성질체 및 (R)-(I)로 표시되는 마주보는 (R)-거울상이성질체.

[0250] 지금까지 기재된 모든 다른 아실아미노락탐 BSCIs와 마찬가지로, (I)의 (S)-거울상이성질체는 상응하는 (R)-거울상이성질체보다 인비트로에서 BSCI로서 더욱 잠재력이 있다. 이 이유로, (I')이 단리된 (R)-거울상이성질체 또는 거울상이성질체의 혼합물보다 대부분의 실험에서 연구되었다. 그러나, ADME 특성은 제1의 약물학적 활성과 관련될 가능성이 없다. 참으로, 많은 화합물의 경우, (많은 경우) 화합물의 물리적 특성은 인 비보 성향의 결정에서 특히 우세하고 거울상이성질체 쌍들의 물리적 특성은 동일하기 때문에, 거울상이성질체 쌍의 ADME 특성은 매우 유사하다.

[0251] 그 결과, 본 발명자들은 (R)-거울상이성질체가 (I')의 특별히 뛰어난 ADME 특성을 공유하는가를 시험하였다. 어느 특정 화합물의 유용성은 제1의 약리작용(들)의 효능과, (효과가 있기 위해서는 약물 분자는 의도된 표적 부위(들)에 그들의 약리 작용을 발휘하기에 충분한 농도로 존재해야 하므로) 인 비보 분자의 배열에 의존하므로, 낮은 효능을 갖지만 뛰어난 ADME 특성을 갖는 화합물이 효능을 뛰어나지만 ADME 특성이 낮은 경쟁 화합물보다 더 효과가 있을 것이다.

[0252] 그러므로, 단리된 (I)의 (R)-거울상이성질체를 ((S)-오르니틴 출발물질을 상업적으로 허용가능한 높은 입체화학

적 순도의 (R)-오르니틴으로 대체한 것 이외에는 정확히 단리된 (S)-거울상이성질체에 대해 본 명세서에 기재된 바와 같이) 합성하였고, 이 약제의 PK 특성을 상기 (실시에 1, 7 및 8 참조)와 동일한 방법론을 사용하여 측정하였다.

[0253] **결과**

[0254] 단일 1-구획 약물동태학적 모델의 계수들을 표 9에 나타내었다. 표 1의 화합물 (I')의 데이터를 비교를 위해 나타내었다. (R)-(I)는 (I')의 예상 밖의 뛰어난 ADME 특성을 크게 공유하는 것이 확인된다. (I')와 마찬가지로, (R)-(I)는 또한 본질적으로 정량적으로 경구적으로 생리학적 활성이고, 3mg/kg으로 단일 경구 투여 후 지금까지 시험된 다음으로 가장 좋은 화합물보다 5-배 이상 높은 노출을 달성하였다 (실시에 1의 화합물 (V); 표 1 참조).

표 9

[0255] **(I)의 단리된 (R)- 및 (S)-거울상이성질체의 약물동태학적 계수들**

	F (%)	t1/2 (mins)	제거 (ml/min/kg)	Vss (L/kg)	노출 (min.ng/ml)
(R)-(I)	84	81	8.6	0.9	295,000
(I')	69	196	2.6	0.7	939,000

[0256] 3 마리 래트의 평균으로의, 각 화합물에 대한 단순 1-구획 약물동태학적 모델로부터의 경구 생체이용률 (F, %), 정맥 투여 후의 우세한 플라즈마 반감기(t1/2, mins), 제거 (ml/min/kg), 분포용적(Vss, L/kg) 및 경구 노출 (AUC 0-t, min.ng/ml). 두 경우 모두, 피크 플라즈마 농도는 통상적으로 30 분까지 관찰되었고, 양호한 흡수와 일치한다.

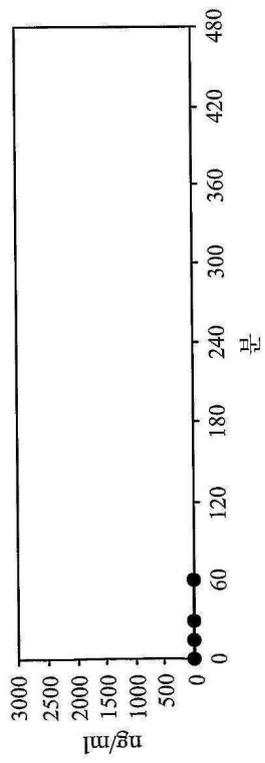
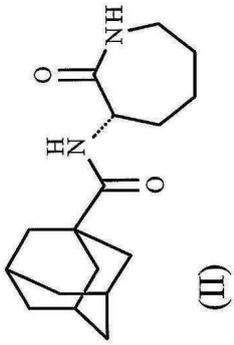
[0257] 비록 (R)-(I)이 (I')의 특별히 유용한 ADME 특성을 상당한 정도 명백히 공유하지만, 그럼에도 불구하고 몇몇 통계적으로 중요한 차이가 있다. 가장 현저한 것은 증가된 플라즈마 제거였고 ((I')와 비교하여 (R)-(I)의 경우 ~3배 높다), 단일 경구 투여 후 노출은 3-배 낮고, 뿐만 아니라 정맥 투여 후 플라즈마 반감기는 2-배 짧았다.

[0258] (R)-(I)의 제거는 래트에서 사구체 여과 속도에 근접하였고 (통상적으로, 9 ml/min/kg), 반면 (I')의 제거는 상당히 낮았다. 일단 이러한 발견의 가능한 설명은 (I')이, 아마도 네프론의 원위세뇨관에서 적극적으로 재흡수되고, 이 재흡수 과정이 (R)-거울상이성질체보다 (S)-거울상이성질체에 대해 선택적일 수 있다는 것이다. 그럴듯하게 보이는 바와 같이, (I')의 뜻밖의 그리고 매우 뛰어난 ADME 특성은, 부분적으로, (R)-거울상이성질체로부터 (S)-거울상이성질체를 구별할 수 있는 수송자를 거쳐 네프론에서 재흡수에 기인한다면, 이것은 ADME 특성의 예측불가능성을 강조하고, 추가로 여기서 기재된 발명의 진보성을 더욱 설명한다.

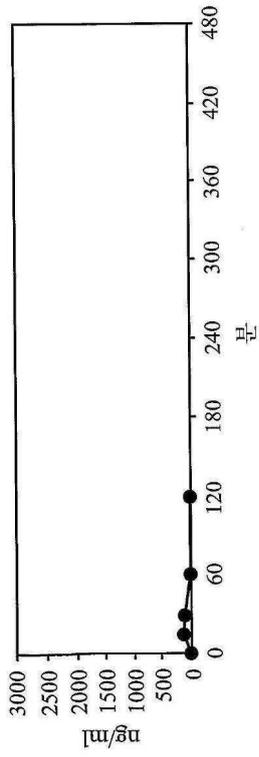
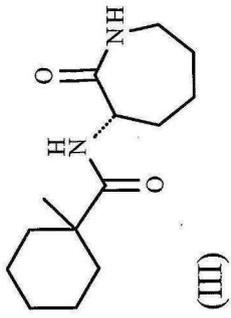
[0259] 그럼에도 불구하고, (R)-(I)는 (도 10의 흰색 원으로 표시된 바와 같이) 본 발명에 따른 뛰어난 화합물임이 분명하고, 이것은 아실아미노락탐의 일반 류보다 ADME 특성에서 (I')에 더 흡사하다. 따라서, 결론적으로 (R)-(I) 및 (I') 둘 다, 그리고 따라서 더욱 일반적으로 화합물 (I)는 기재된 다른 아실아미노락탐 BSCIs와 비교하여 뜻밖, 그리고 현저하고, 뛰어난 ADME 특성을 갖는 것을 나타낸다. 더욱이, 화합물 (I')은 약간, 그러나 상당히 화합물 (I)보다 뛰어나고 따라서 바람직하다.

도면

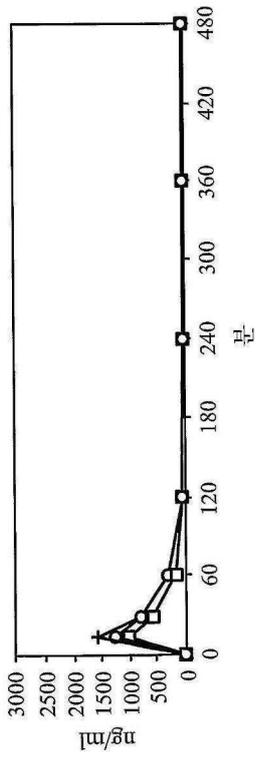
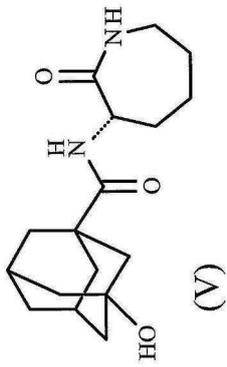
도면1a



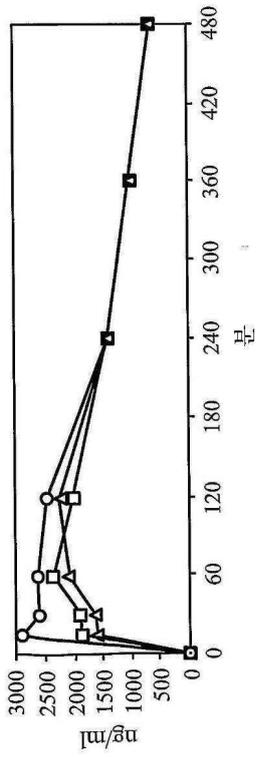
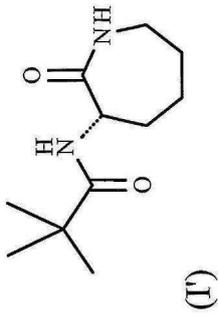
도면1b



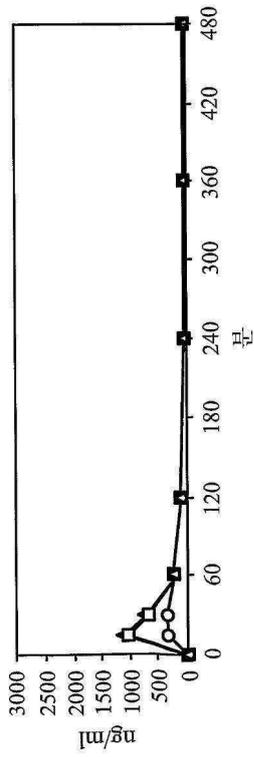
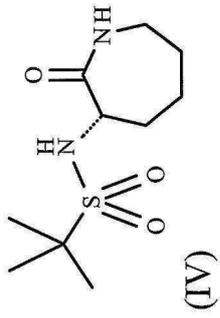
도면1c



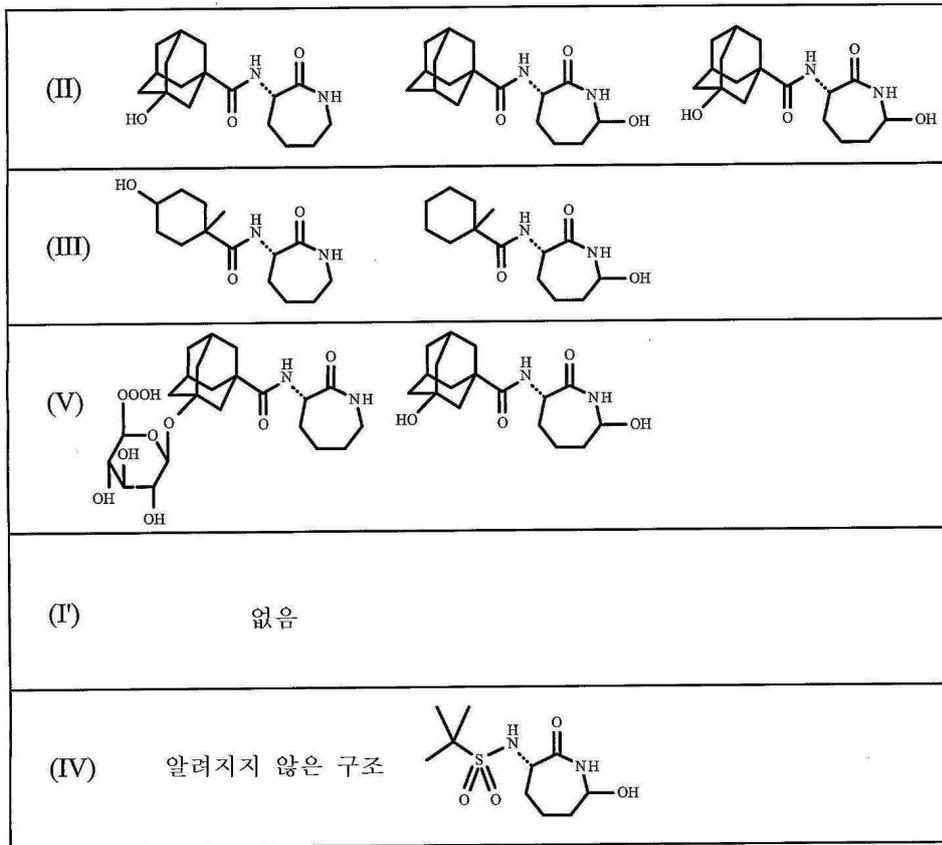
도면1d



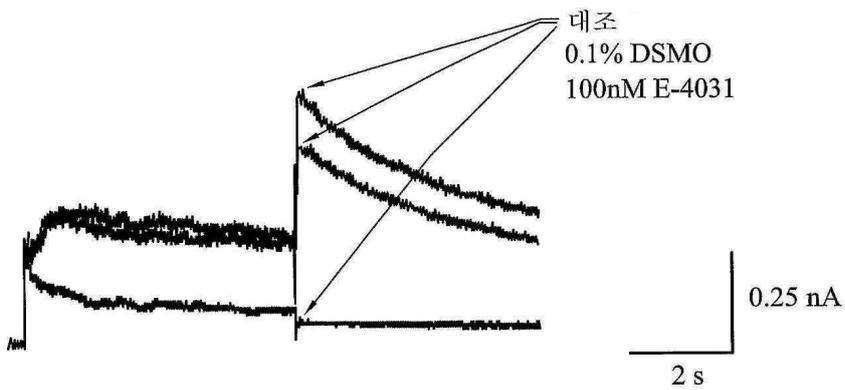
도면1e



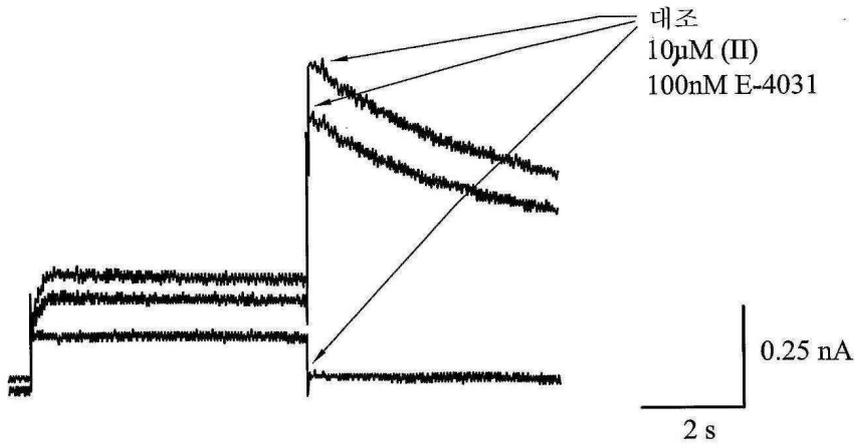
도면2



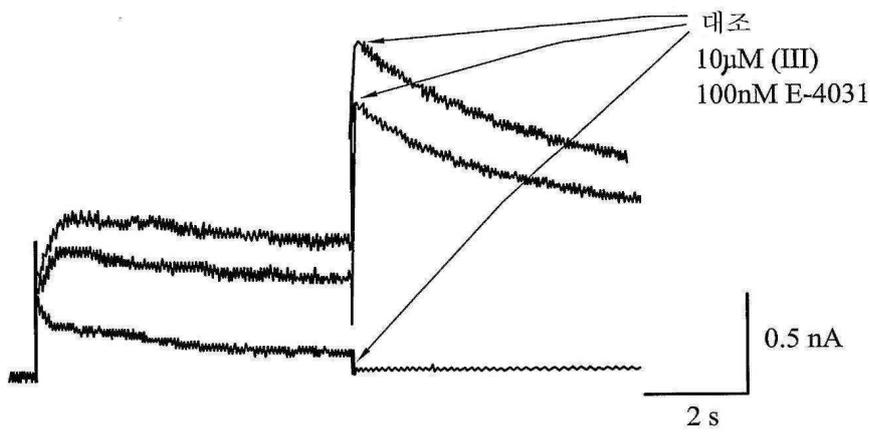
도면3a



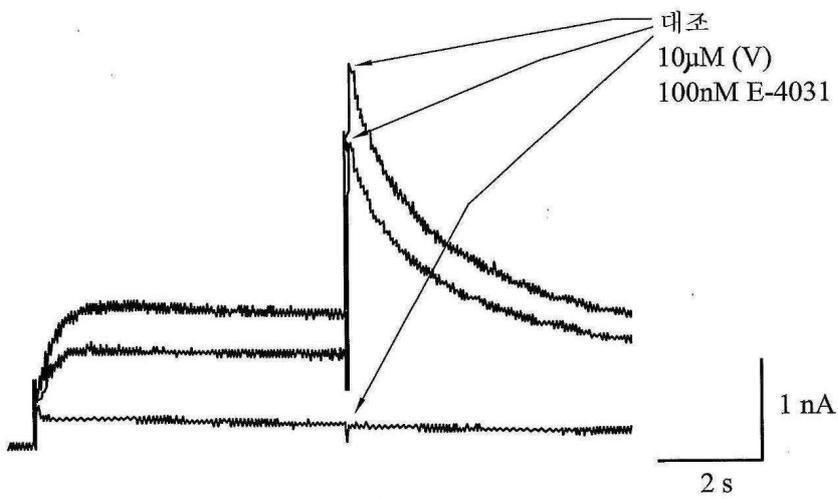
도면3b



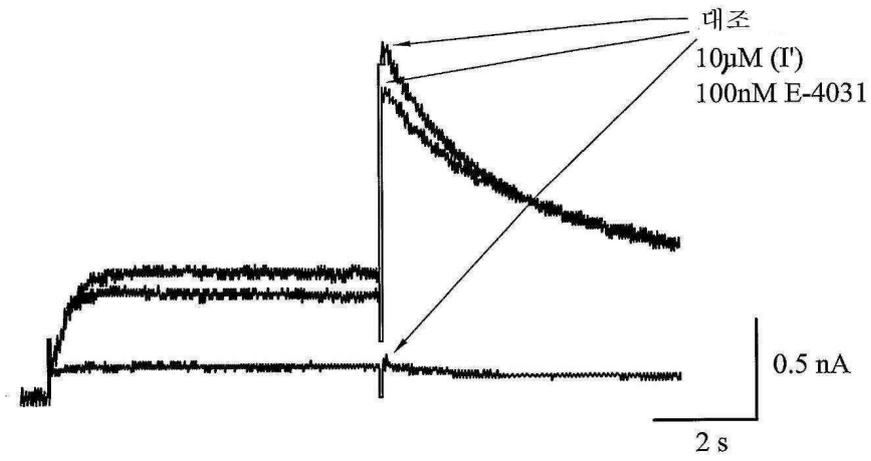
도면3c



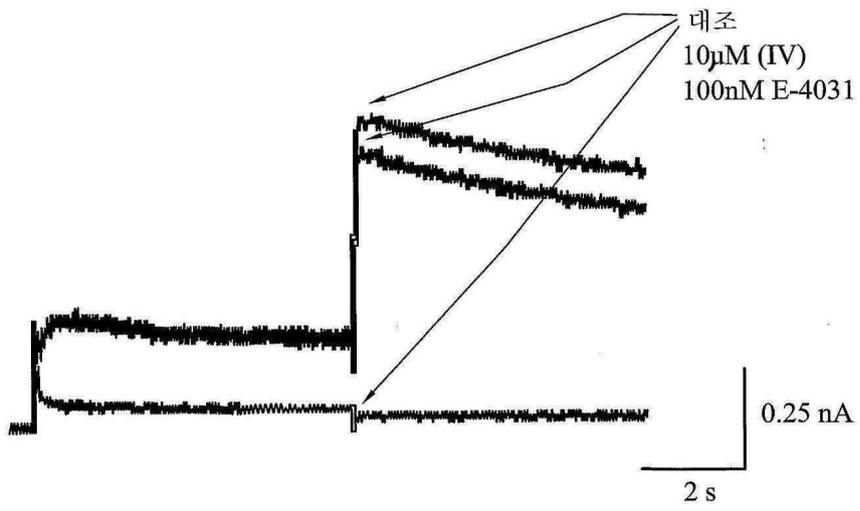
도면3d



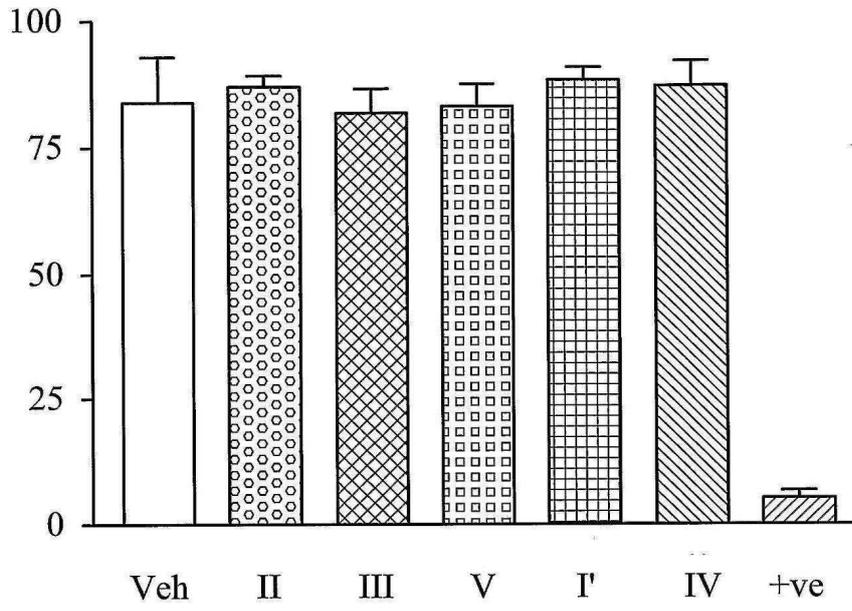
도면3e



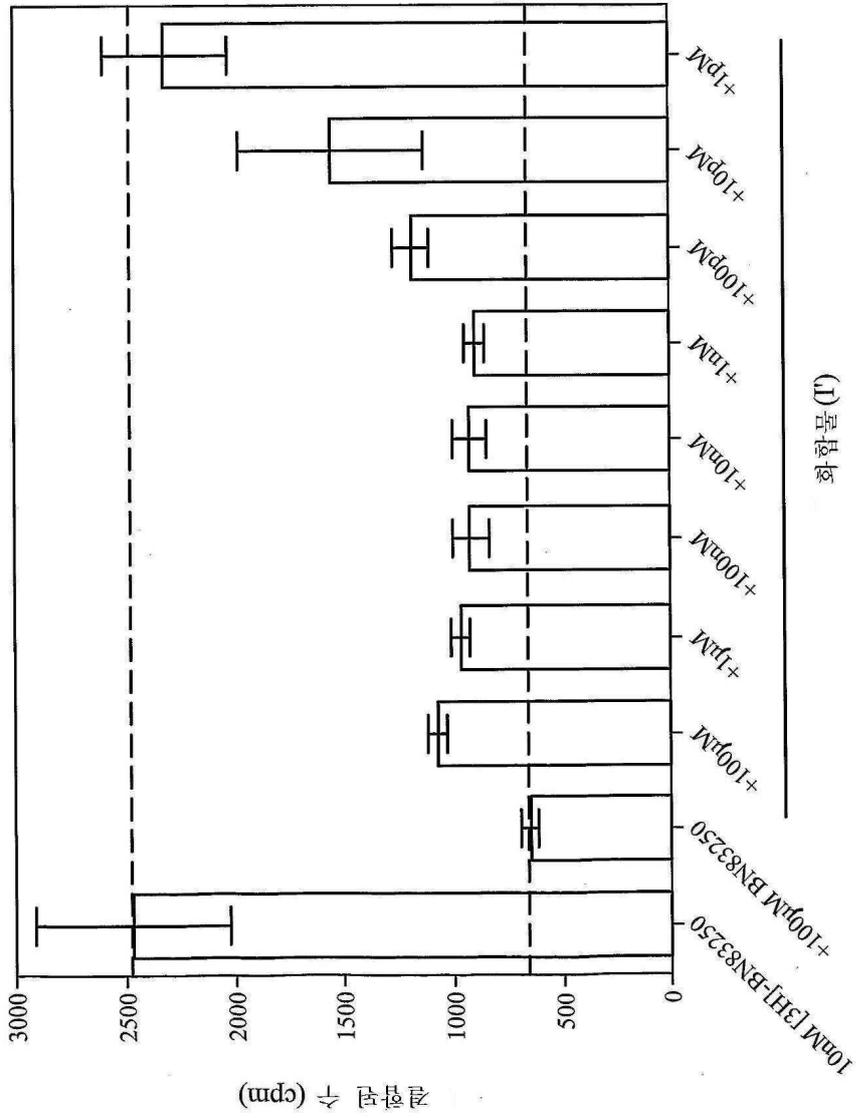
도면3f



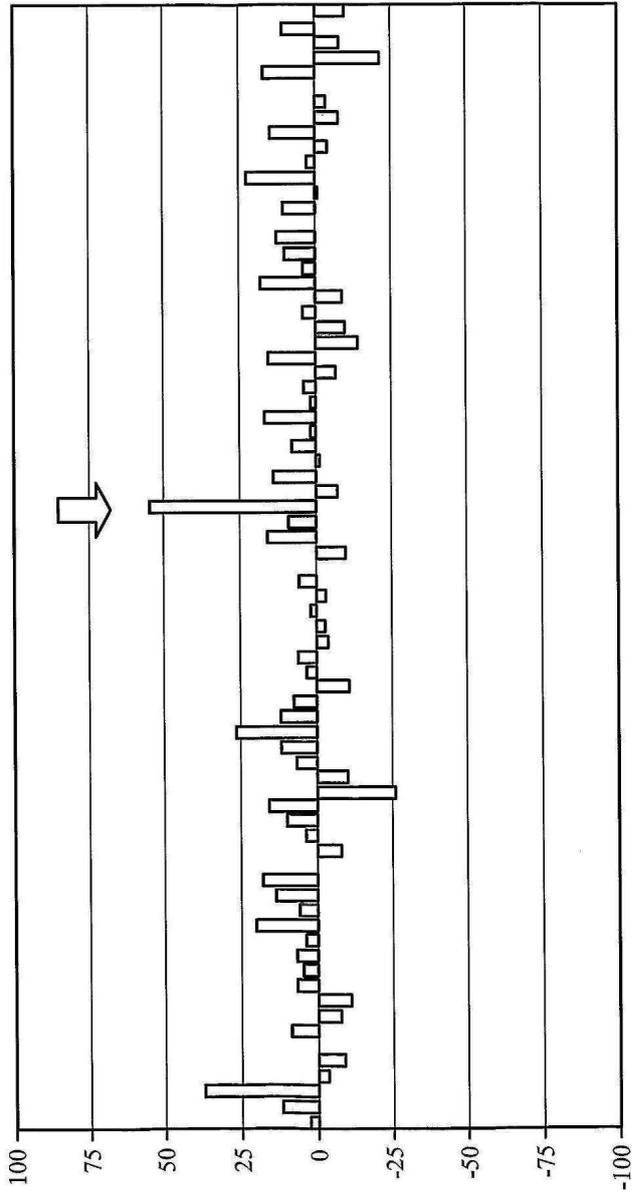
도면3g



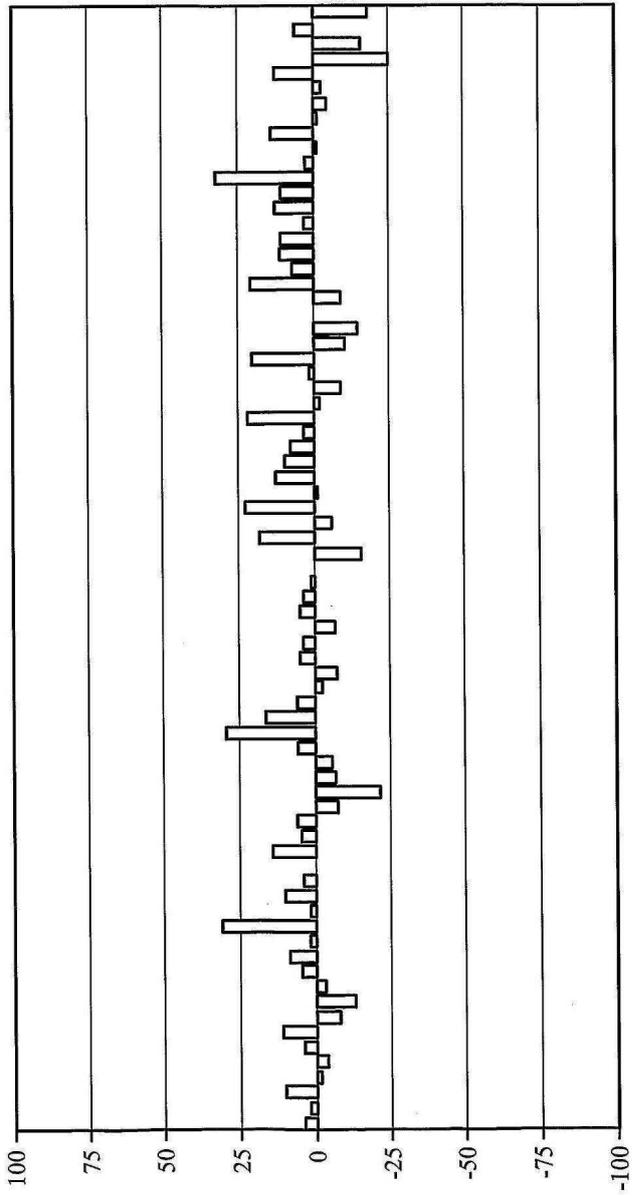
도면4



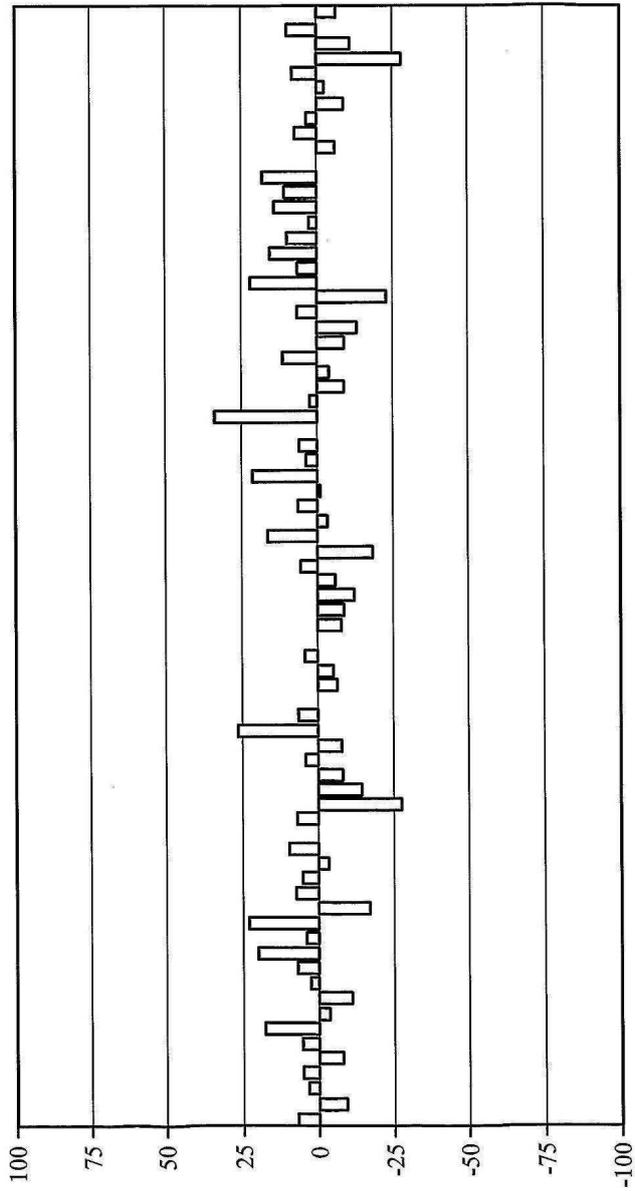
도면5a



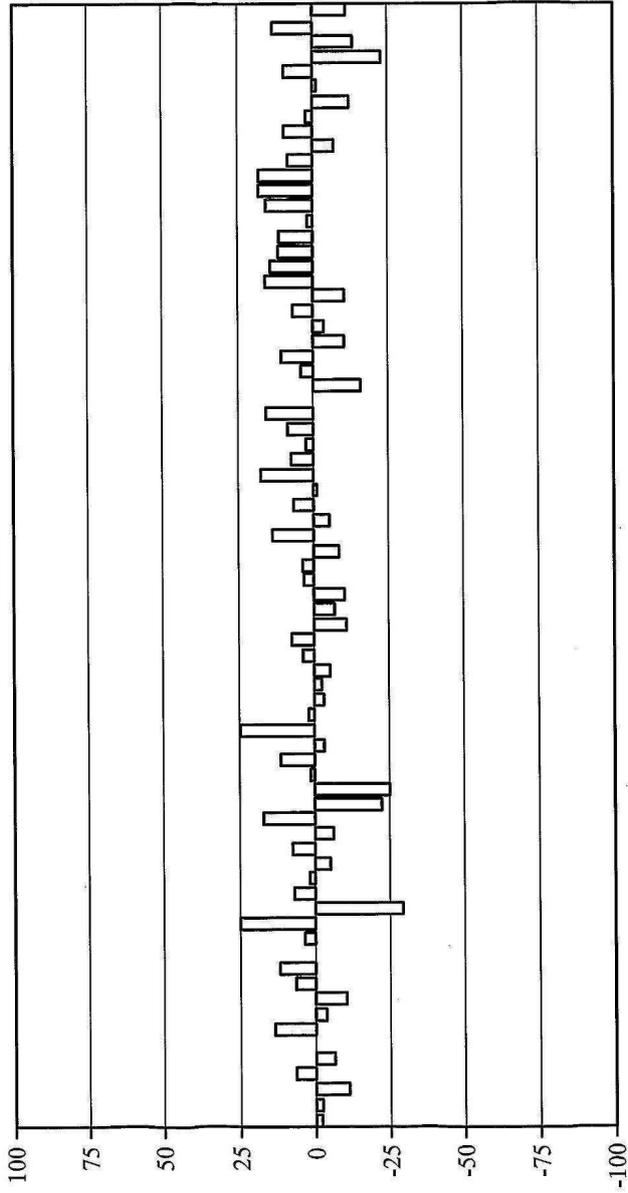
도면5b



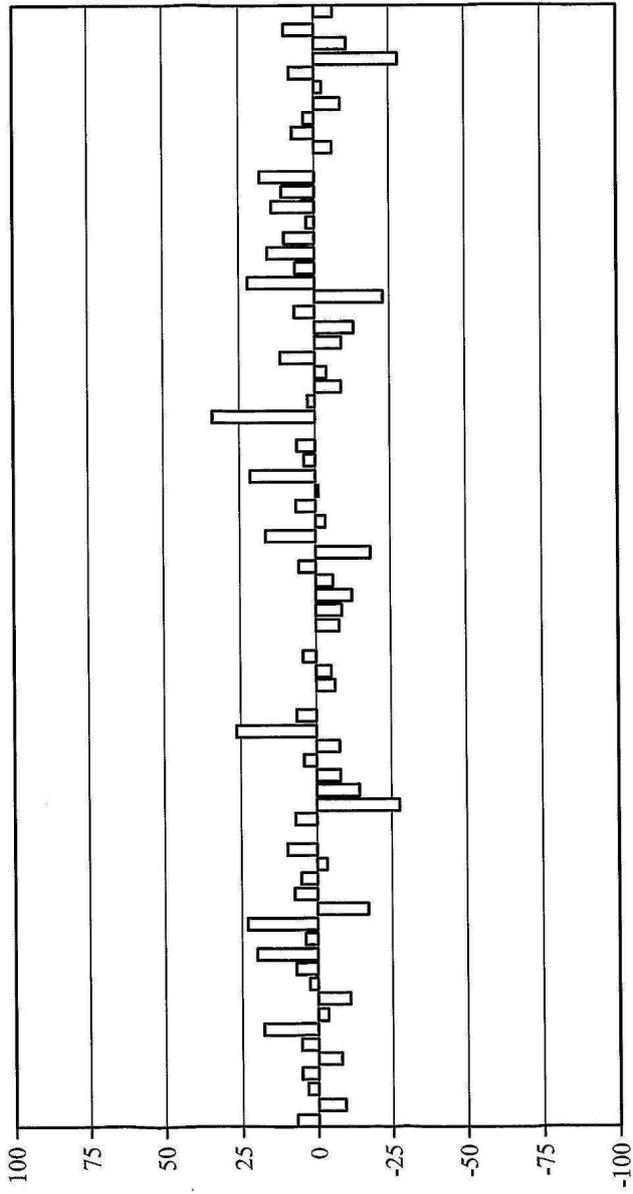
도면5c



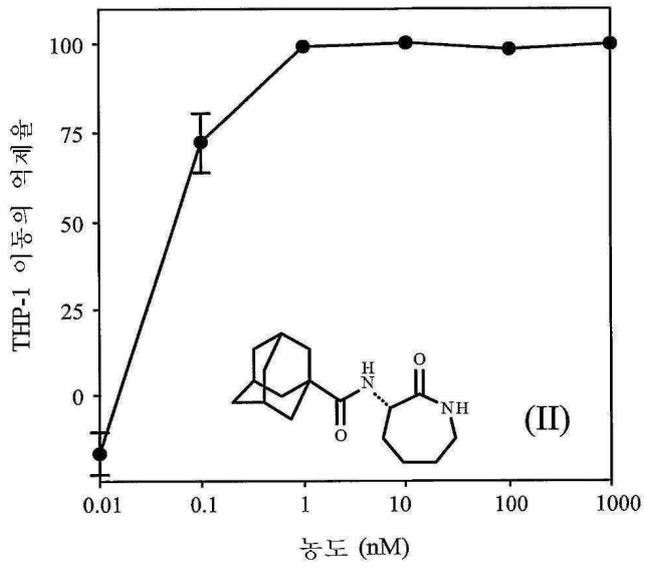
도면5d



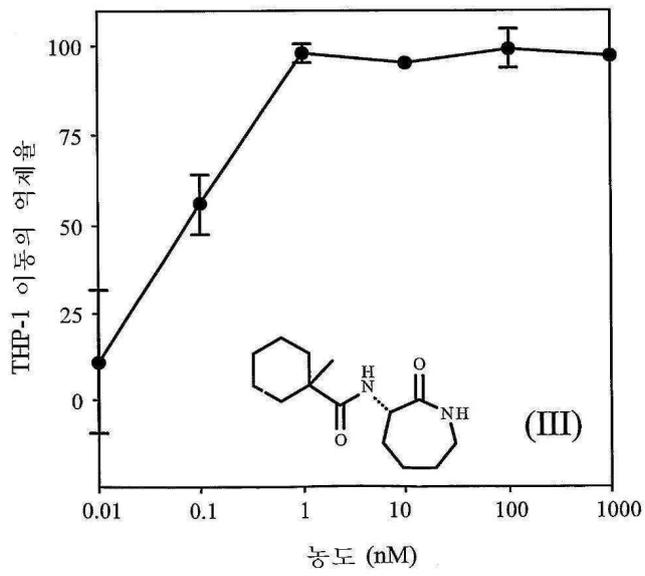
도면5e



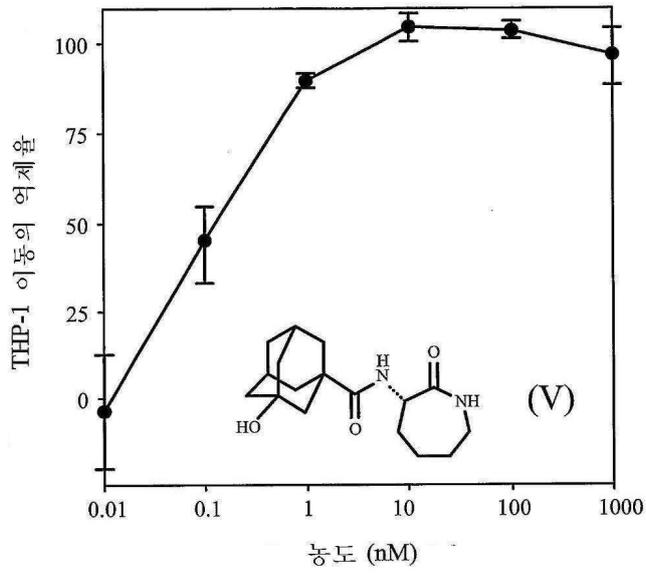
도면6a



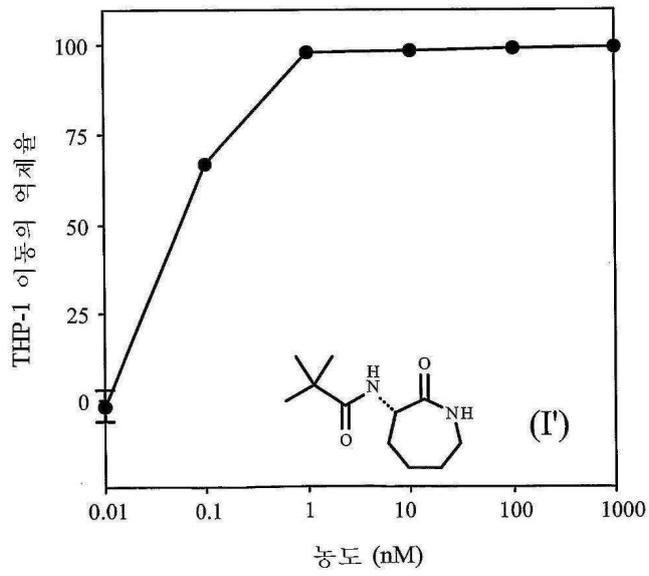
도면6b



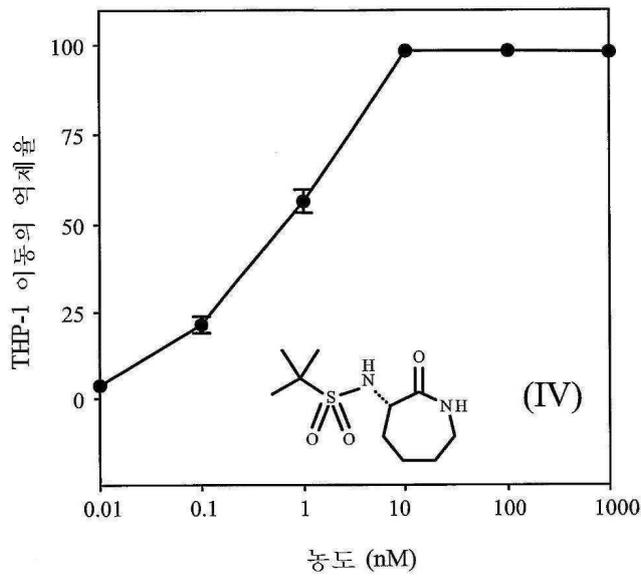
도면6c



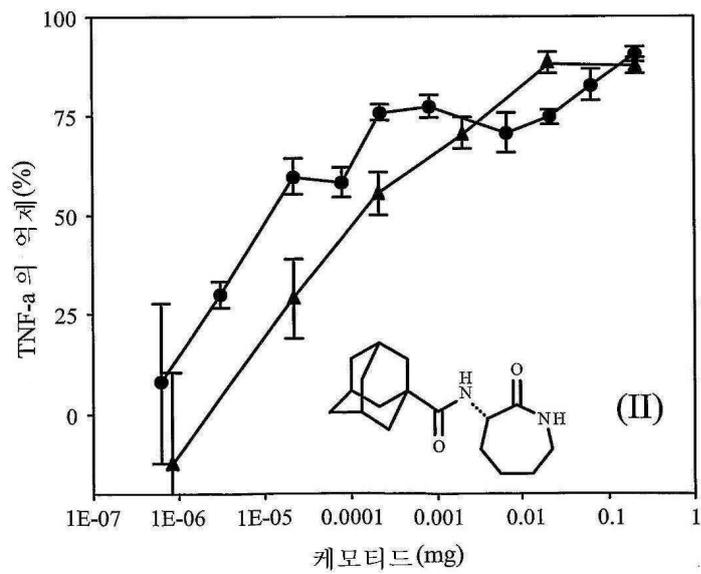
도면6d



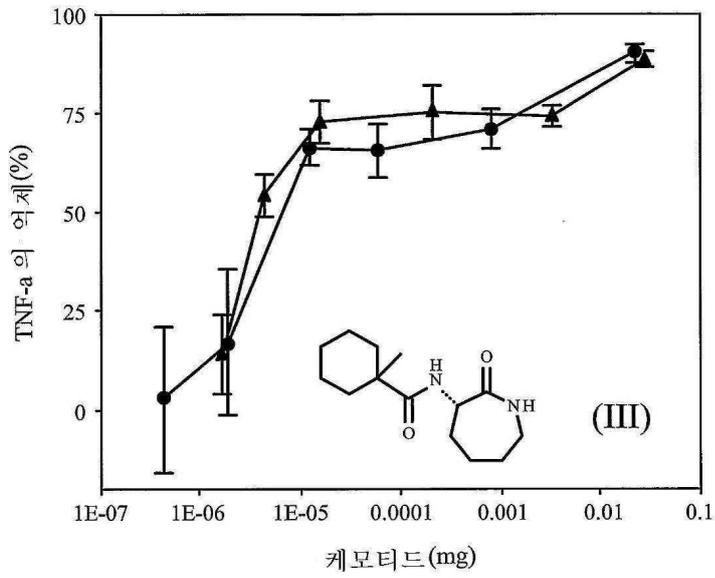
도면6e



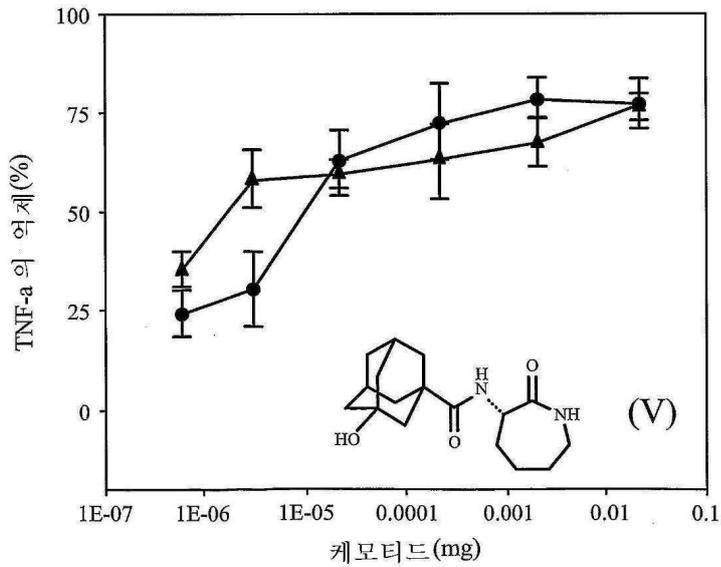
도면7a



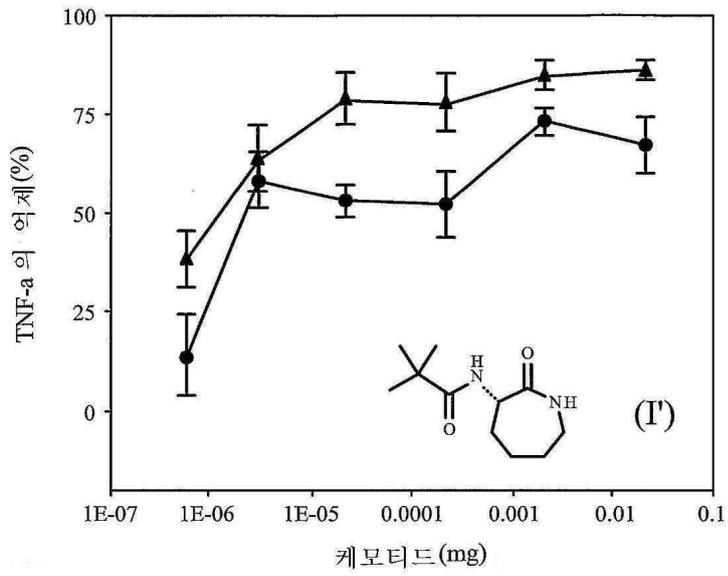
도면7b



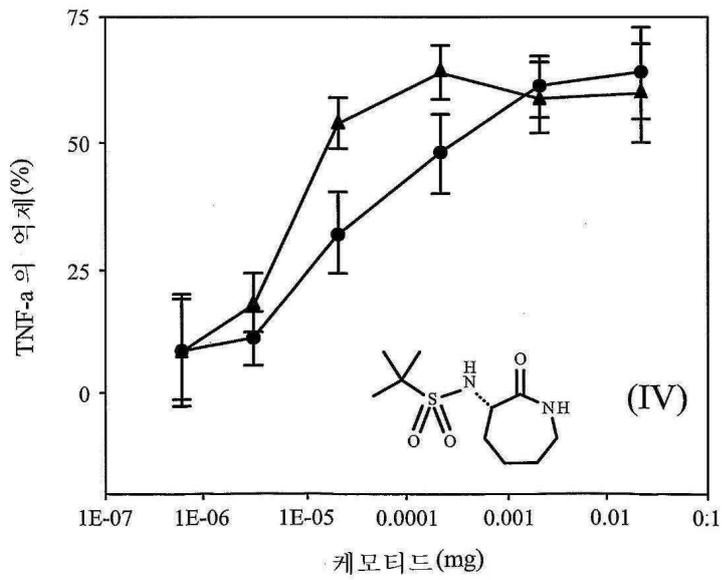
도면7c



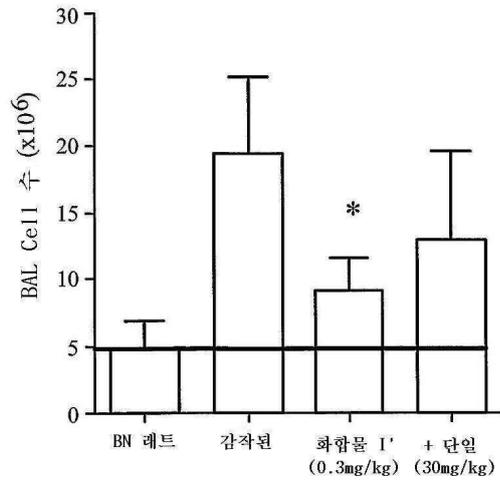
도면7d



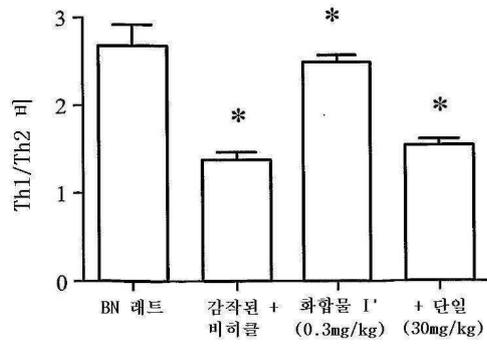
도면7e



도면8



도면9



도면10

