



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월13일
(11) 등록번호 10-1394534
(24) 등록일자 2014년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/12 (2006.01) C07D 403/10 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0021943
(22) 출원일자 2012년03월02일
심사청구일자 2012년03월02일
(65) 공개번호 10-2013-0100587
(43) 공개일자 2013년09월11일
(56) 선행기술조사문헌
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters
(2010), 20(1), 334-337

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
이병호
대전 유성구 어은로 57, 135동 1303호 (어은동, 한빛아파트)
이규양
대전 유성구 어은로 57, 132동 605호 (어은동, 한빛아파트)
(74) 대리인
양부현

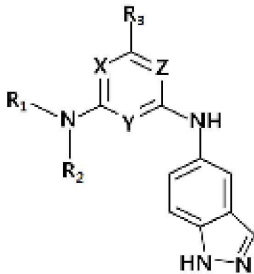
전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **신규한 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물 및 이를 포함하는 약제학적 조성물**

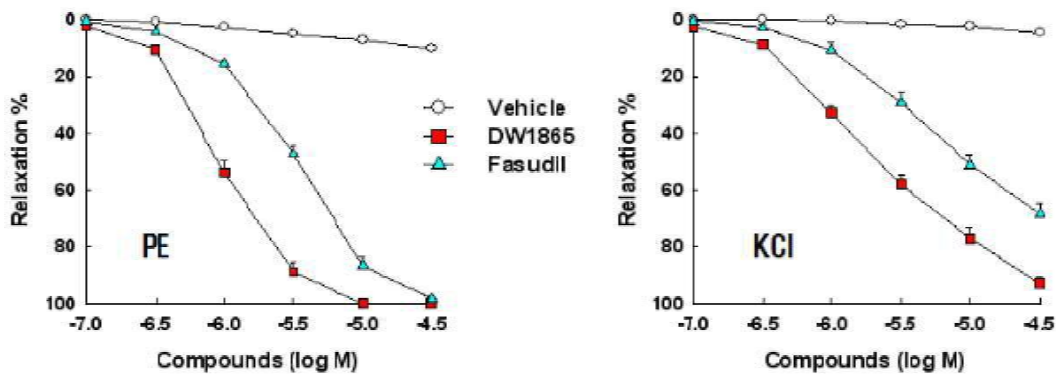
(57) 요약

본 발명은 다음 화학식으로 표시되는 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물에 관한 것이다:



본 발명의 화합물은 심혈관계 질환의 약리표적이 되는 Rho 키나아제의 서브타입 중 ROCK 2의 활성을 선택적으로 억제함으로써, 기존의 혈관수축저해제와 달리 ROCK 2에 대한 선택성(selectivity)이 향상되었다. 심부전의 직접적인 병리학적 소인인 심장세포 비대현상을 억제하며, 심장세포의 액틴 스트레스 섬유질 형성을 억제하고, 특히 기존의 ROCK 억제제보다 MYPT 및 MLC의 인산화 억제 및 혈관 수축 억제 효과가 매우 우수하다. 또한 본 발명의 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 혈관수축에 의해 야기되는 다양한 심혈관계 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

오광석

대전 유성구 구즉로 16, 110동 1003호 (송강동, 한마을아파트)

임채조

대전 유성구 배울2로 61, 1007동 1404호 (관평동, 대덕테크노밸리10단지아파트)

서호원

대전 중구 계백로1583번길 54, (유천동)

이진수

경기 용인시 수지구 성북2로 126, 303동 1903호 (성북동, 성동마을LG빌리지3차아파트)

박휘정

경기 수원시 팔달구 덕영대로697번길 47, 306동 603호 (화서동, 화서주공3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10038744-2011-02
부처명	지식경제부
연구사업명	지식경제기술혁신사업
연구과제명	Drug Repositioning 기술을 이용한 식약개발 활용시스템 구축
기여율	1/2
주관기관	한국화학연구원
연구기간	2011.12.01 ~ 2013.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

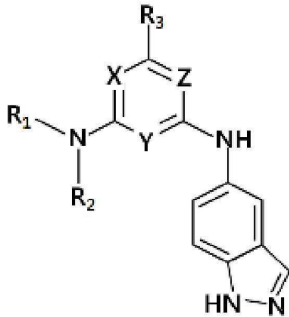
과제고유번호	A1000096-1112-0000300
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료기술연구사업
연구과제명	신약개발을 위한 in vitro kinase assay와 profiling system 구축
기여율	1/2
주관기관	한국화학연구원
연구기간	2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음 화학식 1로 표시되는 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물:

화학식 1



상기 화학식에서, R₁과 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₃ 알킬이고; R₁과 R₂가 연결되어 헤테로 고리화합물을 형성하는 경우 인접 질소원자와 함께 피페라진을 형성하고; R₃는 수소 또는 C₁₋₃ 알콕시이고; X는 질소 또는 CH이고; Y는 질소 또는 CR₁(R₁는 수소 또는 할로)이며; Z는 질소 또는 C-NO₂이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 R₁과 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 메틸이고, R₁과 R₂가 서로 연결된 경우는 피페라진인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 R₃는 수소 또는 메톡시인 것을 특징으로 하는 화합물.

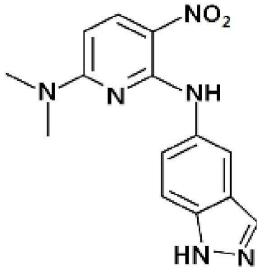
청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 X는 질소 또는 CH 이고, Y는 질소 또는 CF이며, Z는 질소 또는 C-NO₂인 것을 특징으로 하는 화합물.

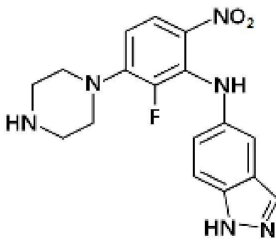
청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 다음 화학식 2 내지 화학식 4로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물:

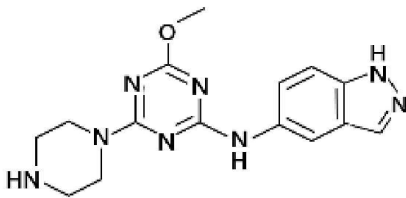
화학식 2



화학식 3



화학식 4



청구항 6

(a) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 1H-인다졸-5-일아미노가 치환된 헤테로사이클릭 화합물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 심부전, 울혈성심부전, 협심증, 심장비대, 재협착, 고혈압, 허혈성 심근질환, 심근증, 심근경색, 동맥경화증, 죽상경화증, 심근경색후반흔, 관상동맥질환, 말초혈관질환, 중추신경계 혈관질환, 심실중격결손, 심장판막결손, 심방중격결손, 선천성심장질환, 심실류 또는 심실재건이 요구되는 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6 항에 있어, 상기 조성물은 ROCK 2 (Rho kinase 2)의 활성을 선택적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 1#인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심혈관계 질환은 우리나라를 포함한 해외 국가들의 주요 사망원인으로서 성인병 증가와 고령인구의 증가로 심혈관계 질환자의 수는 계속 증가할 전망이다, 심부전, 심근경색을 치료하는 치료제는 기저질환 치료제를 제외하고는 거의 전무한 상태이다.

[0003] Rho kinase (ROCK)는 혈관 평활근 수축기전 중 Ca^{2+} -비의존적 기전의 주된 조절인자로, 혈관활성물질(예컨대, 안지오텐신 II, 세로토닌, 유로텐신 II 및 트롬복세인 A2)관련 수용체와 평활근 수축사이의 연결고리 메커니즘이 보고되면서 심부전, 협심증 및 고혈압을 포함한 심혈관치료제 개발에서 주목받는 약리표적이 되고 있다. ROCK 발현 자체는 염증 반응을 일으키는 자극(예컨대, 안지오텐신 II, 인터루킨-1 β , 프로테인 키나아제 C/NF- κ B)에 의하여 직접적으로 항진되며, 실제 관상동맥 평활근 세포에서의 염증성 병변과 동맥경화성 병변부위에서 ROCK의 유전자 발현의 증가가 확인되었다. ROCK의 병리학적 역할을 살펴보면, 고혈압, 허혈성 심근질환, 울혈성 심부전환자에서의 ROCK 과발현 및 활성화대가 관찰되었으며, 혈관내피 세포의 기능부전, 혈관에서의 대식세포의 축적 및 혈관합병증 유발, 평활근세포의 수축반응 항진 및 스트레스 섬유(stress fiber) 유발 등 심혈관 질환의 다양한 병리학적 소인과의 상관관계가 증명되고 있다. ROCK 저해제 개발의 필요성으로는 현재까지 다양한 동물실험에서 ROCK 저해제가 기존에 잘 알려진 약제의 기능 중에서 스타틴(statin)의 콜레스테롤 강하작용만을 제외하고 여러 가지 약제들의 거의 대부분의 효과를 포함하는 작용을 보이는 것으로 밝혀지고 있다.

[0004] 현재 임상적으로 이용 가능한 ROCK 저해제는 일본 Asahi Kasei Pharma사가 1995년 칼슘감작제(Calcium sensitiser)로써 뇌혈관장애제로 시판한 염산파수딜(Fasudil hydrochloride, HA-1077)이 추후 약리기전 연구를 통해 ROCK 저해제로 밝혀졌으며, 주로 뇌혈관 수축의 치료제로 정맥주사제의 형태로 사용되고 있고, ROCK 서브타입(Subtype)에 대한 선택성이 없다는 문제점이 있다.

[0005] 최근 연구경향은, 다른 키나아제인 i) MAP 키나아제, ii) PKA (Protein kinase A), iii) PKC (Protein kinase C), iv) 수용체 티로신 키나아제는 물론, v) 주로 폐, 간, 신장, 비장 및 정소에 분포하는 ROCK 1과의 교차활성도(crossactivity)가 없는, 선택성(selectivity)이 향상되고, ROCK 저해효과가 우수한 저해제 개발을 위한 노력으로, 뇌와 심장에 주로 분포하는 ROCK 2의 리간드 바인딩 포켓(ligand binding pocket)과의 도킹 시뮬레이션을 통하여 피리딘, 1#인다졸, 이소퀴놀린과 테트라하이드로이소퀴놀린과 같은 ROCK 2 저해제 개발을 연구 진행 중이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 혈관수축에 의해 야기되는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 심혈관계 질환의 약리표적이 되는 로키나아제(Rho kinase)의 서브타입 중 ROCK 2의 활성을 선택적으로 억제함으로써, 기존의 혈관수축저해제와 달리 ROCK 2에 대한 선택성(selectivity)을 향상시킨 화합물을 합성하였다. 이 물질들이 심부전의 직접적인 병리학적 소인인 심장세포 비대현상을 억제하며, 심장세포의 액틴 스트레스 섬유질 형성을 억제함을 확인하였고, 특히 기존의 ROCK 억제제보다 MYPT 및 MLC의 인산화 억제 및 혈관 수축 억제 효과가 매우 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 1#인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물 또는 그의 약제학적으로

허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제공하는 데 있다.

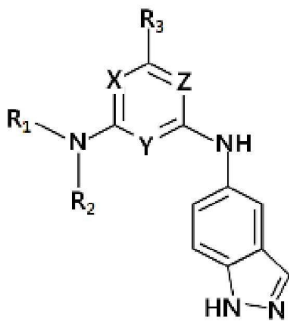
[0009] 본 발명의 다른 목적은 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제공한다:

[0012] **화학식 1**



[0013] 상기 화학식에서, R₁과 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₃ 알킬이고; R₁과 R₂가 연결되어 헤테로 고리화합물을 형성하는 경우 인접 질소원자와 함께 피페라진을 형성하고; R₃는 수소 또는 C₁₋₃ 알콕시이고; X는 질소 또는 CH이고; Y는 질소 또는 CR₁(R₁는 수소 또는 할로)이며; Z는 질소 또는 CR₅(R₅는 수소 또는 니트로)이다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

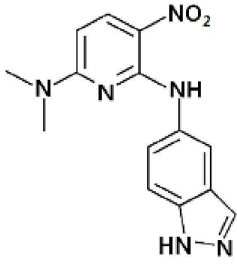
[0016] 본 발명자들은 혈관수축에 의해 야기되는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 심혈관계 질환의 약리표적이 되는 Rho 키나아제의 서브타입 중 ROCK 2의 활성을 선택적으로 억제함으로써, 기존의 혈관수축저해제와 달리 ROCK 2에 대한 선택성(selectivity)을 향상시킨 화합물을 합성하였다. 이 물질들이 심부전의 직접적인 병리학적 소인인 심장세포 비대현상을 억제하며, 심장세포의 액틴 스트레스 섬유질 형성을 억제함을 확인하였고, 특히 기존의 ROCK 억제제보다 MYPT 및 MLC의 인산화 억제 및 혈관수축 억제 효과가 매우 우수함을 확인하였다.

[0017] 화학식 1로 표시되는 본 발명의 화합물은 뇌와 심장에 주로 분포하는 ROCK 2의 활성을 선택적으로 억제하는 것으로, 기존의 ROCK 저해제가 ROCK 서브타입(Subtype)에 대한 선택성이 없어 주로 폐, 간, 신장, 비장 및 정소에 분포하는 ROCK 1의 활성에도 영향을 준다는 문제점을 해결하고, 그 보다 개선된 혈관수축 억제효과를 보이는 물질을 개발하고자 노력한 결과 본 발명의 화합물이 분자설계 되고 합성되었다.

[0018] 본 명세서에서, 화학식 1의 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물을 정의하기 위하여 사용되는 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 트리데실, 펜타데실 및 헵타데실 등을 포함한다. C₁₋₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁₋₃ 알킬이 치환된 경우

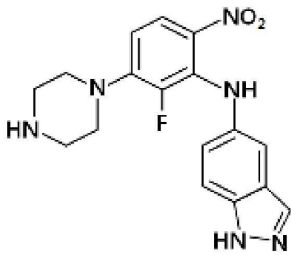
치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

- [0019] 용어 “헤테로 고리화합물”은 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알케닐, 헤테로아릴을 포함한다. 상기 헤테로원자는 바람직하게는 산소 또는 질소이고, 가장 바람직하게는 질소이다. 헤테로원자의 개수는 바람직하게는 1-4개, 보다 바람직하게는 1-3개, 보다 더 바람직하게는 1-2개, 가장 바람직하게는 2개이다.
- [0020] 상기 용어 “헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 헤테로사이클로알킬”은 탄소와 수소 그리고 최소 하나의 헤테로원자(산소, 황 또는 질소)를 포함하는 비-방향족성 사이클릭 탄화수소기를 의미한다. 용어 “헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 헤테로사이클로알케닐”은 탄소와 수소 그리고 최소 하나의 헤테로원자(산소, 황 또는 질소) 및 최소 하나의 이중결합을 포함하는 비-방향족성 사이클릭 탄화수소기를 의미한다. 용어 “헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 헤테로아릴”은 헤테로사이클릭 방향족기로서, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 것이다.
- [0021] 용어 “알콕시”는 -O알킬기를 의미하며, 예를들어, 메톡시, 에톡시 등을 포함하고, C₁₋₆ 알콕시가 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0022] 용어 “니트로”는 -NO₂로 표시되는 작용기를 의미한다.
- [0023] 용어 “할로”는 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오드를 포함한다.
- [0024] 용어, “약제학적으로 허용되는 염”은 소망하는 약리학적 효과, 즉 혈관 수축을 억제하는 활성을 갖는 상기 화학식 1의 화합물의 염을 나타낸다. 이러한 염은 통상적으로 약제조업자가 의약품을 제조하는데 사용하는 무기산 및 유기산염을 의미하며, 예컨대 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드 및 하이드로요오다이드와 같은 무기산; 아세트레이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 비설페이트, 설파메이트, 설페이트, 나프틸레이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포실포네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설페이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 2-히드록시에탄설페이트, 락테이트, 말리에이트, 메탄설페이트, 2-나프탈렌설페이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 토실레이트 및 운데카노에이트와 같은 유기산을 이용하여 형성된다.
- [0025] 용어, “약제학적으로 허용되는 용매화물”은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 화학식 1의 용매화물을 나타낸다. 용어, “약제학적으로 허용되는 수화물”은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 화학식 1의 화합물의 수화물을 나타낸다. 상기 용매화물 및 수화물도 상기한 산을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 R₁과 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 메틸이고, R₁과 R₂가 서로 연결된 경우는 피페라진이다.
- [0027] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 R₃는 수소 또는 메톡시이며, X는 질소 또는 CH 이고, Y는 질소 또는 CF이며, Z는 질소 또는 C-NO₂이다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 다음 화학식 2 내지 화학식 4로 구성된 군으로부터 선택되는 화학식으로 표시되는 화합물이며 단, 이들 화합물 중 니트로피리딘 계열 화합물인 화합물 2(WO 01/38306)와 메톡시 트리아진 계열 화합물인 화합물 4(KR 01/17143)는 간염 치료제로서 연구된 바 있는 화합물이다. 이들 화합물은 다음과 같다:
- [0029] **화학식 2**



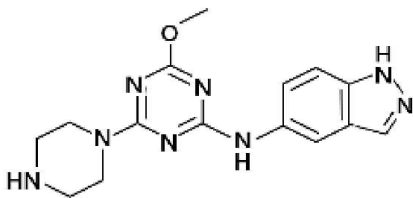
[0030]

[0031] 화학식 3



[0032]

[0033] 화학식 4

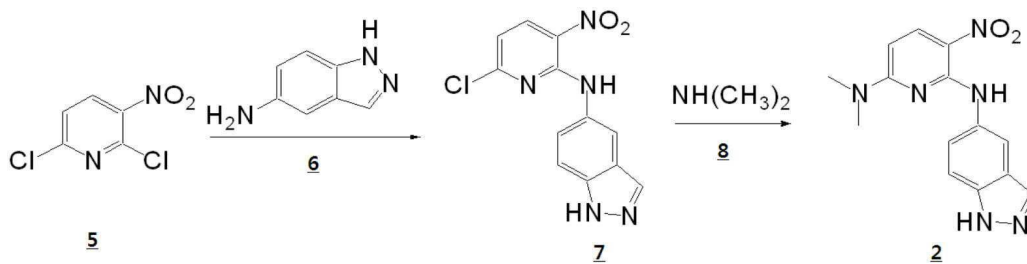


[0034]

[0035] 상기 화학식 2 내지 화학식 4의 화합물은 각각 아래와 같은 방법에 의해 합성될 수 있다.

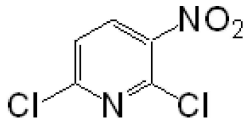
[0036] 상기 화학식 2의 화합물은 하기 단계를 포함하는 합성방법에 의해 제조된다:

[0037] 반응식 1



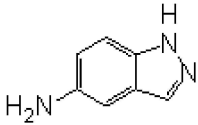
[0038]

[0039] 화학식 5



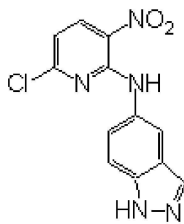
[0040]

[0041] 화학식 6



[0042]

[0043] 화학식 7



[0044]

[0045] 화학식 8

[0046] $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$

[0047] 단계 (a): 6-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-니트로피리딘 화합물의 합성

[0048] 우선, 화학식 5의 2, 6-디클로로-3-니트로피리딘과 화학식 6의 5-아미노인다졸 화합물을 염기 존재 하에서 반응시켜 화학식 7의 6-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-니트로피리딘 화합물을 합성한다.

[0049] 상기 화학식 2 내지 화학식 4의 합성에서 출발물질로 사용되는 6-디클로로-3-니트로피리딘, 2,3,4-트리플루오로니트로벤젠, 2,4-디클로로-6-메톡시-1,3,5-트리아진 및 5-아미노인다졸 화합물은 상업적으로 시판되는 물질로서 용이하게 구입하여 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명의 화합물 합성에서 사용되는 “염기”는 다양한 유기 염기와 무기 염기를 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 예컨대 트리에틸아민, N,N-디이소프로필에틸아민, N-메틸모르포린, N-메틸피페리딘, 4-디메틸아미노피리딘, N,N-디메틸아닐린, 2,6-루티딘 및 피리딘 등의 삼급 유기 염기로 이들 중에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하며, 무기 염기로는 수산화나트륨 또는 소듐 하이드라이드를 사용하는 것이 바람직하다.

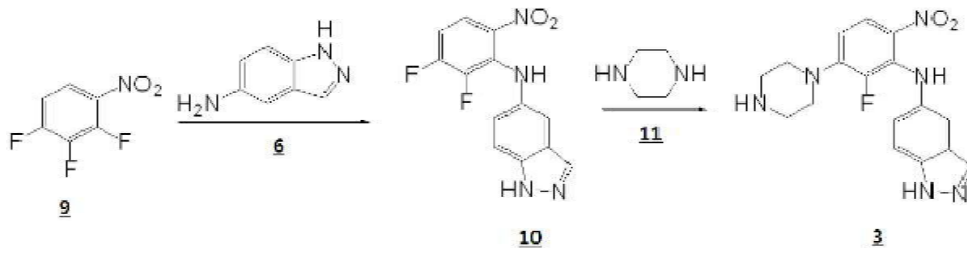
[0051] 본 발명의 화합물 합성 반응은 반응용매 내에서 이루어지며, 상기 반응 용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 등의 알코올류와 아세트니트릴, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 테트라히드로푸란, N,N-디메틸포름아미드, N-메틸피롤리디논 및 디메틸술폰옥시드 에서 선택된 단일용매 또는 혼합용매를 사용하는 것이 바람직하며, 반응 온도는 치환되는 화합물에 따라 달라질 수 있으나, 0-80°C인 것이 바람직하다.

[0052] 단계(b): 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-디메틸아미노-3-니트로피리딘 화합물의 합성

[0053] 상기 단계(a)에서 합성된 화학식 7의 화합물과 화학식 8의 디메틸아민 화합물을 반응용매 하에서 반응시켜 화학식 2의 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-디메틸아미노-3-니트로피리딘 화합물을 합성한다. 상기 합성과정에서 수득한 화합물을 추가적으로 여과 및 진공건조 함으로써 목적 화합물을 수득할 수 있다.

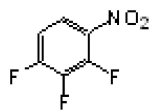
[0054] 상기 화학식 3의 화합물은 하기 단계를 포함하는 합성방법에 의해 제조된다:

[0055] 반응식 2



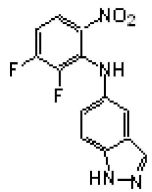
[0056]

[0057] 화학식 9



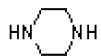
[0058]

[0059] 화학식 10



[0060]

[0061] 화학식 11



[0062]

[0063] 단계 (a): 3,4-디플루오로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노니트로벤젠 화합물의 합성

[0064] 우선, 화학식 9의 2,3,4-트리플루오로 니트로피리딘과 화학식 6의 5-아미노인다졸 화합물을 염기 존재 하에서 반응시켜 화학식 10의 3,4-디플루오로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노니트로벤젠 화합물을 합성한다.

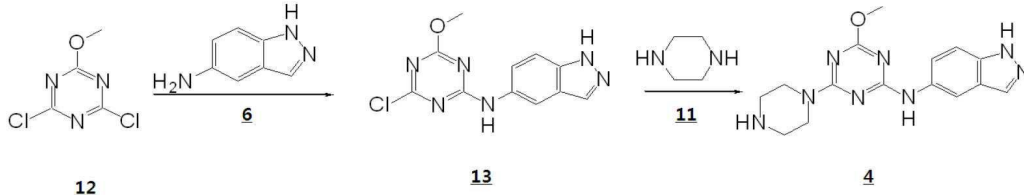
[0065] 상기 반응은 반응용매 하에서 일어나며, 사용되는 상기 염기, 상기 반응용매 및 반응조건은 화학식 2의 화합물의 합성방법인 “6-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-니트로피리딘 화합물의 합성” 에 기재된 바와 같다.

[0066] 단계 (b): 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-플루오로-4-(피페라진-1-일)니트로벤젠의 합성

[0067] 상기 단계 (a)에서 합성된 화학식 10의 화합물과 화학식 11의 피페라진 화합물을 반응용매 하에서 반응시켜 화학식 3의 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-플루오로-4-(피페라진-1-일)니트로벤젠 화합물을 합성한다. 상기 합성 과정에서 수득한 화합물을 추가적으로 여과 및 진공건조 함으로써 목적 화합물을 수득할 수 있다.

[0068] 상기 화학식 4의 화합물은 하기 단계를 포함하는 합성방법에 의해 제조된다:

[0069] 반응식 3



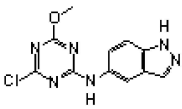
[0070]

[0071] 화학식 12



[0072]

[0073] 화학식 13



[0074]

[0075] 단계 (a): 4-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-메톡시-1,3,5-트리아진의 합성

[0076] 우선 화학식 12의 2,4-디클로로-6-메톡시-1,3,5-트리아진과 화학식 6의 5-아미노인다졸 화합물을 염기 존재 하에서 반응시켜 화학식 13의 4-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-메톡시-1,3,5-트리아진 화합물을 합성한다.

[0077] 상기 반응은 반응용매 하에서 일어나며, 사용되는 상기 염기, 상기 반응용매 및 반응조건은 화학식 2의 화합물의 합성방법인 “6-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-니트로피리딘 화합물의 합성”에 기재된 바와 같다.

[0078] 단계 (b): 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-4-메톡시-6-(피페라진-1-일)-1,3,5-트리아진의 합성

[0079] 상기 단계 (a)에서 합성된 화학식 13 화합물과 화학식 11의 피페라진 화합물을 반응용매 하에서 반응시켜 화학식 4의 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-4-메톡시-6-(피페라진-1-일)-1,3,5-트리아진 화합물을 합성한다. 상기 합성 과정에서 수득한 화합물을 추가적으로 여과 및 진공건조 함으로써 목적 화합물을 수득할 수 있다.

[0080] 본 발명의 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 심혈관계 질환에서 혈관수축을 억제하거나 예방, 치료하는 데 매우 유효하다. 본 발명의 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물이 예방 또는 치료할 수 있는 심혈관계 질환은 심부전, 울혈성심부전, 협심증, 심장비대, 재협착, 고혈압, 허혈성 심근질환, 심근증, 심근경색, 동맥경화증, 죽상경화증, 심근경색후반흔, 관상동맥질환, 말초혈관질환, 중추신경계 혈관질환, 심실중격결손, 심장판막결손, 심방중격결손, 선천성심장질환, 심실류 또는 심실제전이 요구되는 질환을 포함한다.

[0081] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물은 ROCK 2 (Rho kinase 2)의 활성을 선택적으로 억제한다.

[0082] 본 발명의 조성물이 심부전의 예방 또는 치료에 사용되는 경우, 본 발명의 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 물리적 수술 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 심부전을 치료할 수 있다.

[0083] 본 발명의 1H-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 약제학적 조성물로 제공될 수 있다.

[0084] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸

히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0085] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0086] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.0001-1000 mg/kg이다.

[0087] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0088] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0089] (a) 본 발명의 신규한 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 심혈관계 질환의 약리표적이 되는 Rho 키나아제의 서브타입 중 ROCK 2의 활성을 선택적으로 억제함으로써, 기존의 혈관수축저해제와 달리 ROCK 2에 대한 선택성(selectivity)이 향상되었다.

[0090] (b) 심부전의 직접적인 병리학적 소인인 심장세포 비대현상을 억제하며, 심장세포의 액틴 스트레스 섬유질 형성을 억제함을 확인하였고, 특히 기존의 ROCK 억제제보다 MYPT 및 MLC의 인산화 억제 및 혈관 수축 억제 효과가 매우 우수하다.

[0091] (c) 또한 본 발명의 1*H*-인다졸-5-일아미노-치환 헤테로사이클릭 화합물은 혈관수축에 의해 야기되는 다양한 심혈관계 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 본 발명에 따른 화합물의 ROCK 아형 (subtype)에 대한 선택성 평가를 위한 약리 활성평가결과이다(M : 각 화합물의 농도).

도 2는 화합물 DW 1865(화학식 4)의 직접적인 ROCK 2의 저해효과를 검증하기 위하여 ROCK 2의 직접적인 기질로 알려진 미오신 포스파타아제(MYPT; myosin phosphatase) 및 미오신 L 사슬(MLC; myosin light chain)의 인산화 억제에 대한 약효 평가를 웨스턴 블롯(Western blotting)으로 실시한 결과이다.

도 3은 화합물 DW 1865의 세포비대 억제능을 통해 ROCK 2 저해능을 검증하기 위한 실험을 실시한 결과이다. 도 3a는 화합물 DW 1865가 안지오텐신 II에 의하여 유발되는 심장세포 비대 억제 효과를 현미경으로 확인한 결과이고(접안렌즈 10배 X 대물렌즈 10배), 도 3b는 안지오텐신 II에 의해 유발된 심장세포상태를 기준으로 하여 심장비대 억제되는 정도를 퍼센트(%)로 나타내어, 각각의 농도별 심장비대 억제효과를 나타낸 것이다.

도 4은 화합물 DW 1865의 액틴 스트레스 섬유질형성 억제능을 통해 ROCK 2 저해능을 검증하기 위한 실험을 실시한 결과이다.

도 5는 적출혈관 이완효과(즉, 혈압 강하효과로서 혈관수축제에 대한 방어효과)를 통한 조직학적 검증을 통해 화합물 DW 1865의 ROCK 2 저해제로서의 효능을 검증하기 위한 실험을 실시한 결과이다. 그래프는 각각의 혈관 평활근 이완효과를 나타낸 것이다(M : 각 화합물의 농도).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0094] **합성예**

[0095] **합성예 1: 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-디메틸아미노-3-니트로피리딘의 합성**

[0096] <1-1> 6-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-니트로피리딘의 합성

[0097] 메탄올 50 ml에 2,6-디클로로-3-니트로피리딘 4 g(20 mmol)과 트리에틸아민 3.2 ml(23 mmol)을 넣은 후, 상기 용액에 5-아미노인다졸 2.8 g(21 mmol)을 0-5℃에서 서서히 첨가하여 상온(20-30℃)에서 약 12시간동안 반응시켰다. 반응이 완결됨을 앓은 막 크로마토그래피(Thin-layer chromatography, TLC)로 확인한 후, 물 30 ml을 서서히 첨가하고 20℃에서 1시간동안 교반하였다. 상기 반응물을 여과하여 메탄올 30 ml로 세척한 후, 약 40℃에서 진공 건조하여 목적 화합물 4.7 g(수율: 78%)을 수득하였다: ¹H-NMR (DMSO-d₆)(ppm):6.94(d, 1H), 7.44(d, 1H), 7.56(d, 1H), 7.91(s, 1H), 8.08(s, 1H), 8.53(d, 1H), 10.20(s, 1H), 13.12(brs, 1H).

[0098] <1-2> 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-디메틸아미노-3-니트로피리딘의 합성

[0099] 아세트니트릴 10 ml에 상기 <1-1>에서 수득한 6-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-니트로피리딘 화합물 200 mg(0.69 mmol)과 디메틸아민 3 ml를 넣은 후, 상온(20-30℃)에서 24시간 반응시켰다. 반응이 완결됨을 앓은 막 크로마토그래피로 확인한 후, 용매를 감압 증류하여 농축하고, 상기 농축물에 메탄올 5 ml을 적가하여 1시간동안 상온(20-30℃) 교반시켰다. 이때 생성된 고체를 여과하고 메탄올 5 ml로 세척한 후, 약 40℃에서 진공 건조하여 목적화합물 195 mg(수율: 95%)을 수득하였다: ¹H-NMR (DMSO-d₆)(ppm):3.09(s, 6H), 6.31(d, 1H), 7.50(m, 2H), 8.02(s, 1H), 8.06(s, 1H), 8.15(d, 1H), 10.68(s, 1H).

[0100] **합성예 2: 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-플루오로-4-(피페라진-1-일)니트로벤젠의 합성**

[0101] <2-1> 3,4-디플루오로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노 니트로벤젠의 합성

[0102] 아세트니트릴 50 ml에 2,3,4-트리플루오로니트로벤젠 2 g(11.3 mmol)과 트리에틸아민 1.73 ml(12.4 mmol)을 넣은 후, 상기 용액에 5-아미노인다졸 1.57 g(11.8 mmol)을 상온에서 첨가하여 약 16시간 동안 상온(20-30℃)에서 반응시켰다. 반응이 완결됨을 앓은 막 크로마토그래피로 확인한 후, 물 30 ml을 서서히 첨가하고 20℃에서 1시간동안 교반하였다. 상기 반응물을 여과하여 아세트니트릴:물=1:1 용액 30 ml로 세척한 후, 약 40℃에서 진공 건조하여 목적 화합물 2.5 g(수율: 78%)을 수득하였다: ¹H-NMR (DMSO-d₆)(ppm):7.09(dd, 1H), 7.17(d, 1H), 7.34(s, 1H), 7.43(d, 1H), 7.92(s, 1H), 7.97(dd, 1H), 8.99(s, 1H).

[0103] <2-2> 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-3-플루오로-4-(피페라진-1-일)니트로벤젠의 합성

[0104] 에탄올 50 ml에 상기 <2-1>에서 수득한 3,4-디플루오로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노니트로벤젠 화합물 1.3 g(4.48 mmol)과 피페라진 1.9 g(22.4 mmol)을 넣은 후, 상온(20-30℃)에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 완결됨을 앓은 막 크로마토그래피로 확인한 후, 물 40 ml을 적가하고 상온에서 1시간동안 교반시켰다. 이때 생성된 고체를 여과하고 메탄올:물=1:1 20 ml로 세척한 후, 약 40℃에서 진공 건조하여 목적화합물 1.2 g(수율: 77%)을 수득하였다: ¹H-NMR (DMSO-d₆)(ppm)3.73(t, 4H), 3.09(t, 4H), 6.68(t, 1H), 7.10(d, 1H), 7.22(s, 1H), 7.40(d, 1H), 7.86(d, 1H), 7.89(s, 1H), 8.75(s, 1H).

[0105] **합성예 3: 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-4-메톡시-6-(피페라진-1-일)-1,3,5-트리아진의 합성**

[0106] <3-1> 2-클로로-4-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-메톡시-1,3,5-트리아진의 합성

[0107] 메탄올 20 ml에 2,4-디클로로-6-메톡시-1,3,5-트리아진 0.5 g(3.11 mmol)과 트리에틸아민 0.65 ml(4.67 mmol)를 넣은 후, 상기 용액에 5-아미노인다졸 0.41 g(3.11 mmol)을 0-5℃에서 첨가하여 약 3시간동안 상온(20-30℃)에서 반응시켰다. 반응이 완결됨을 얇은 막 크로마토그래피로 확인하였다. 상기 반응물을 여과하여 메탄올 20 ml로 세척한 후, 약 40℃에서 진공 건조하여 목적 화합물 0.76 g(수율: 88%)을 수득하였다: ¹H-NMR (DMSO-d₆)(ppm):3.93(s, 3H), 7.46-7.56(m, 2H), 7.55-8.11(m, 2H), 10.54-10.67(m, 1H), 13.05(brm, 1H).

[0108] <3-2> 2-(1H-인다졸-5-일)아미노-4-메톡시-6-(피페라진-1-일)-1,3,5-트리아진의 합성

[0109] 메탄올 30 ml에 상기 <3-1>에서 수득한 4-클로로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-메톡시-1,3,5-트리아진 화합물 0.76 g(2.75 mmol)과 피페라진 1.2 g(13.8 mmol)을 넣은 후, 상온(20-30℃)에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 완결됨을 얇은 막 크로마토그래피로 확인하였다. 이때 생성된 고체를 여과하고 메탄올 10 ml로 세척한 후, 약 40℃에서 진공 건조하여 목적화합물 0.63 g(수율: 70%)을 수득하였다: ¹H-NMR (DMSO-d₆)(ppm)2.65(m, 4H), 3.64(brm, 4H), 3.79(s, 3H), 7.41(d, 1H), 7.52(d, 1H), 7.96(s, 1H), 8.04(brs, 1H), 9.45(brs, 1H).

[0110]

[0111] 실험예

[0112] 실험예 1: 로키나아제 2(Rho kinase 2) 억제 효과 확인 실험

[0113] 본 발명에 따른 신규 화합물들의 ROCK 2에 대한 억제 활성을 MDS사 (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA)에서 제공하는 시차성형광분석법 (IMAP-TR-FRET Screening Express Kit)을 기반으로 실험하였다. 완충용액은 인산화 반응용액(MDS사에서 제공하는 0.01% Tween20이 포함된 반응버퍼를 5배 희석 후, 5 mM DTT 첨가)과, 형광검출용액(MDS사에서 제공하는 결합용액 A, B, 용액을 각기 7:3의 비율로 혼합하고 IMAP binding reagent 1/600, turbium donor 1/400 첨가)의 두 종류를 준비하고, 20 μM의 기질(S6 ribosomal protein-derived substrate; MDS)과 100 μg/ml의 효소 ROCK 2 (#14-451; Upstate) 및 10 mM ATP (Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 준비하였다. 100 μg/ml ROCK 2와 20 μM 기질 그리고 10 mM ATP를 각각 0.4 μg/ml (최종 반응농도: 0.1 μg/ml), 4 μM(최종 반응농도: 1 μM)과 12 μM(최종 반응농도: 3 μM)이 되도록 희석하였다. 모든 희석과 준비과정에서 사용되는 완충용액은 인산화 반응용액이며, 형광검출용액은 마지막에 시차성형광반응을 유도할 때 사용하였다.

[0114] 준비된 시료의 분주는 흰색 미소판(Multiwell 384 well plates, #3572, Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA)에 16 채널 파이펫(multi 16-channel, Finnpipette, Thermo Scientific, Essex, UK)을 이용하여 각 웰(well)당 전체 인산화 반응부피가 20 μl가 되게 반응물을 분주하였다. 이때, 음성 대조군(negative control)으로는 5% DMSO 5 μl, 기질액 5 μl, 인산화반응용액 5 μl를 사용하였으며, 양성 대조군(positive control)으로는 5% DMSO 5 μl, 기질액 5 μl, ROCK 2 용액 5 μl를 사용하였다. 실험군으로는 합성예에서 제조한 화합물 5 μl, 기질액 5 μl, ROCK 2 용액 5 μl를 사용하였다. 인산화 반응 전에 약 10분간 화합물과 효소간의 전처리를 실시한 후, ATP 5 μl를 첨가하여 인산화 반응을 유도하였다. 각 화합물, 효소, 기질 및 ATP는 반응 시 전체부피의 25%,씩을 차지하게 되므로, 첨가 직전에는 각기 4배의 고농도로 준비하였다. 상기 인산화 반응이후, 3분간 약하게 흔들어 주고 상온에서 45분간 인산화 반응을 유도한 후, 시차성형광반응을 유도하기 위하여 미리 준비해 놓은 형광검출용액 60 μl 첨가하여 시차성형광반응을 유도하였다. 형광검출용액 내에는 3개의 메탈이온으로 구성되어 있는 나노입자(nanoparticle)와 링커(linker) 및 형광물질인 터비움(Turbium, Tb)이 표지되어 있는 감작제(Tb-공여자)가 혼합되어 있어, 나노입자와 링커 및 Tb 공여자의 연쇄적인 결합반응을 통해 시차성형광반응이 유도된다. 상온에서 그대로 3시간동안 방치시킨 후 시차성형광반응(Time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET) 값을 다기능형광측정기(multilabel counter, Envision, PerkinElmer, Turku, Finland)를 이용하여 측정하였으며(방출파장: 495 nm, 520 nm, 여기파장: 340 nm), 하기 수학적 1 및 수학적 2에 따라 시차성형광 반응율 및 저해율을 계산하고, 인비트로에서 ROCK 2 활성을 50% 저해한 화합물의 농도인 IC₅₀값을 표시하였다(표 1).

[0115] 수학적 1

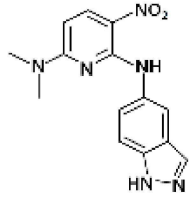
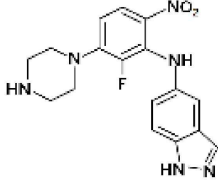
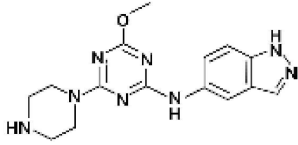
[0116] 시차성형광반응율 = (520 nm 방출파장/495 nm 방출파장) X 10000

[0117] 수학적 식 2

[0118] $\text{저해율 (\%)} = (\text{화합물의 시차성형광반응율} - \text{음성대조군의 시차성형광반응율}) / (\text{양성대조군의 시차성형광반응율} - \text{음성대조군의 시차성형광반응율}) \times 100$

표 1

[0119] 합성 화합물들의 ROCK2에 대한 저해율 및 IC₅₀값 측정결과

-	구조	화합물 명칭	저해율 (10 μM)	IC ₅₀ (μM)
화학식 2		2-(1H-인다졸-5-일)아미노-6-디메틸아미노-3-니트로페리딘	97.76%	0.15
화학식 3		3-플루오로-2-(1H-인다졸-5-일)아미노-4-(피페라진-1-일) 니트로벤젠	95.39%	0.15
화학식 4 (DW1865)		2-(1H-인다졸-5-일)아미노-4-메톡시-6-(피페라진-1-일)-1,3,5 트리아진	99.6%	0.02

[0120] 실험예 2: 효소 아형(Rho kinase 1, ROCK 1) 억제 효과 확인 실험

[0121] 본 발명에 따른 화합물의 ROCK 아형(subtype)에 대한 선택성 평가를 위한 약리 활성평가는 상기 ROCK 2에서 실시한 실험 조건과 동일하게 진행하였다. 각 효소간의 비슷한 감도를 검증하기 위하여 사용된 효소의 농도는 EC₅₀ 값으로 동일하게 사용하였다. 다만, ROCK 2 대신 ROCK 1 (Rho kinase 1, #PV 3691; Invitrogen)를 사용하였고, EC₅₀ 값을 구하여 최종 반응농도 0.4 μg/ml에서 시차성 형광억제를 및 인비트로에서 ROCK 활성을 50% 저해한 화합물의 농도인 IC₅₀값으로 표시하였다. 화합물 DW1865의 ROCK1 및 ROCK2에 대한 IC₅₀ 수치를 구하여 하기 표 2에 나타내었고, 각각의 저해효과를 그래프로써 도 1에 나타내었다.

표 2

[0122] 화합물 DW1865의 ROCK1 및 ROCK2에 대한 저해율 및 IC₅₀값 측정결과

-	ROCK1의 IC ₅₀ (μM)	ROCK2의 IC ₅₀ (μM)
화합물 DW1865	0.02	0.10
과수딜	0.25	0.40
Y27632	0.18	0.14

[0123] 실험예 3: MYPT/MLC 인산화 억제 확인 실험

[0124] 본 발명에 따른 화합물의 직접적인 ROCK 2의 저해효과를 검증하기 위하여 ROCK 2의 직접적인 기질로 알려진 미오신 포스파타아제(MYPT; myosin phosphatase) 및 미오신 L 사슬(MLC; myosin light chain)의 인산화 억제에

대한 약효 평가를 안지오펜신 II로 활성화시킨 흰쥐 유래의 심장 세포주 (H9c2)를 이용하여 웨스턴 블롯 (Western blotting)을 실시하였다.

[0125] 심장세포(H9c2)에 1 시간 동안 화합물 DW 1865(화학식 4)를 전처리 하고, 15분 동안 안지오펜신 II로 세포내 신호전달을 활성화 시켰다. 배지를 제거하고 국내 인트론사에서 제공하는 세포용해 완충액(PRO-PREP protein extraction solution)를 처리하여 세포의 총 단백질을 추출하였다. 이를 사용하여 8% 또는 12% 글라이신 (Glycine) SDS-PAGE를 수행하였으며, 니트로셀룰로오즈(nitrocellulose) 막(membrane)에 단백질을 전이 (transfer)시킨 후, 항인산-MYPT 항체와 항인산-MLC 항체(Cell signalling)를 사용하여 MYPT 및 MLC의 인산화 정도 및 인산화 억제율을 확인하였다. 이때, 동량의 단백질이 분석된 것을 보이기 위해 항-MYPT 항체와 항MLC 항체를 사용하여 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0126] 도 2에서 보는 바와 같이, 화합물 DW 1865는 직접적인 ROCK의 저해를 통해 안지오펜신 II에 의하여 유도된 MYPT 및 MLC의 인산화를 억제하고 있음을 확인하였다.

[0127] **실험예 4: 세포비대(Cellular hypertrophy) 억제 확인 실험**

[0128] 심부전의 직접적인 병리학적 소인인 심장세포비대의 주된 인자 중의 하나로 ROCK 2의 과잉 활성이 인지되고 있다. 따라서 본 발명에 따른 화합물의 세포비대 억제능을 통해 ROCK 2 저해능을 검증하기 위한 실험을 하기와 같이 실시하였다.

[0129] 심장세포(H9c2)에 1 시간동안 화합물 DW 1865를 전처리 하고, 심장세포 비대의 유발인자인 안지오펜신 II(100 nM)를 4일간 지속적으로 투여하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 1% 글루타르알데하이드 (Sigma, St. Louis, MD, USA)로 30분간 세포를 고정시켰다. 고정시킨 세포를 0.1% 크리스탈바이올렛(Sigma)으로 10분간 염색한 후, 디지털 카메라가 장착되어있는 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 세포 이미지를 수집하였고, Image-Pro PLUS software (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 세포의 수 및 크기를 분석하였다. 그 결과, 심장세포비대의 유발인자인 안지오펜신 II를 4일간 지속적으로 투여함으로써 약 40%정도의 심장세포비대가 유발됨을 확인하였다. 안지오펜신 II에 의해 유발된 심장세포상태를 기준으로 하여 심장비대 억제되는 정도를 퍼센트 (%)로 나타냈으며, 각각의 농도별 심장비대 억제효과를 도 3에 나타내었다.

[0130] 도 3a 및 도 3b에서 보는 바와 같이, 화합물 DW 1865가 안지오펜신 II에 의하여 유발되는 심장비대를 농도 의존적으로 억제시킴을 확인할 수 있었고, 특히 0.1 μM에서는 73.1%의 억제능을 확인하였다. 이는 기존의 ROCK 억제제로 알려진 표준(reference) 화합물인 파수딜(Fasudil)의 억제능과 유사함을 확인하였다.

[0131] **실험예 4: 액틴 스트레스 섬유질 형성(Actin stress fiber formation) 억제 확인 실험**

[0132] 액틴 스트레스 섬유질 형성은 미오신 L 사슬 인산화 반응 이후 발생하는 심장세포 및 혈관수축의 직접적인 세포의 형태학적 현상으로, 화합물 DW 1865의 액틴 스트레스 섬유질형성 억제능을 통해 ROCK 2 저해능을 검증하기 위한 실험을 하기와 같이 실시하였다.

[0133] 챔버 슬라이드(chamber slide; 16 well)에서 배양된 심장세포(H9c2)에 1시간동안 상기 화합물을 전처리 하고, 2시간동안 안지오펜신 II로 세포내 신호전달을 활성화 시켜, F-액틴 스트레스 섬유질 형성을 유도하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후, 4% 파라포름알데하이드(Sigma, St. Louis, MD, USA)로 30분간 세포를 고정시켰다. 고정시킨 세포를 0.5% 트리톤X-100 용액에 5분간 재고정 시킨 후, 1% BSA (bovine serum albumin)가 함유된 저지용액(blocking solution)으로 30분간 상온에서 처리하였다. Alexa fluor 586 팔로이딘 및 Hoechst 염색시약을 사용하여 F-액틴 스트레스 섬유질 및 핵을 염색하고, 디지털 카메라가 장착되어있는 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 세포 이미지를 수집하였다.

[0134] 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, 안지오펜신 II(300 nM)에 의하여 강하게 발생하는 F-액틴 스트레스 섬유질 형성이 화합물 DW 1865의 2시간 전처리를 통하여 농도-의존적으로 억제됨을 확인하였다. 특히 전형적인 ROCK 저해제의 양상처럼, 굵은 주변부 액틴(peripheral actin)보다는 세포내 중심부 액틴(central actin)의 억제가 보다 더 강하게 진행되었음을 확인하였다.

[0135] **실험예 5: 혈관 수축 저해능력 확인 실험(vascular relaxation assay)**

[0136] 과잉 활성화된 ROCK 2는 혈관의 과도한 수축을 유발하고 이는 고혈압 및 심혈관질환의 병리학적 소인으로 인지되고 있다. 따라서 적출혈관 이완효과(즉, 혈압 강하효과로서 혈관수축제에 대한 방어효과)를 통한 조직학적 검증을 통해 화합물 DW 1865의 ROCK 2 저해제로서의 효능을 검증하기 위한 실험을 하기와 같이 실시하였다.

[0137] 스프라그-다우리(SD, 웅성)계 마우스(오리엔트사, 한국)를 항온(22.5±1°C), 항습(55±5%) 및 12시간 간격으로 명암이 자동 조절되는 청정 동물 사육실에서 최소한 2주 이상 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 마우스의 후두부를 강타하여 기절시킨 후, 경동맥을 잘라 혈액을 유실시켰다. 흉곽을 절개한 후 하행성 대동맥을 신속하게 적출하고 내피가 손상되지 않도록 조심스럽게 지방조직 및 주위조직을 제거하였다. 이로부터 혈관을 2-3 mm 길이로 잘라 크랩스-한셀레이트 완충용액(Krebs-Henseleit buffer: NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM 및 글루코스 11.0 mM, 준세(Junsei)사, 일본, 이하 "K-H 완충용액 "이라 함)이 담긴 조직 챔버(tissue chamber) 내에 현수하였다. 이때, 챔버 내의 온도는 37° C를 유지하였으며, O₂/CO₂ 혼합 기체(O₂:CO₂=95:5)로 포화시켜 pH를 7.4로 유지하였다. 2 g의 초기장력으로 90분 동안 평형화시켰으며, 15분 간격으로 신선한 K-H 완충용액으로 교환하였다. 혈관의 수축/이완성은 힘 변위 변환기(force displacement transducer, 제품명: 그라스(Grass) FT03, 그라스사, 미국)를 통해 차트 기록기(chart recorder, 제품명: 멀티코더 (Multicorder) MC 6625, 휴고 사취(Hugo Sachs)사, 독일)로 기록하였다.

[0138] 적출혈관을 조직 챔버 내에서 적응시키기 위하여, 0.3 μM의 페닐에프린 (PE) (Sigma-Aldrich, 미국) 또는 45 mM KCl (Sigma-Aldrich)로 수축시킨후, K-H 완충용액으로 45분에 걸쳐 3회 세척하고 상기 적출혈관을 다시 페닐에프린으로 수축시켜 안정 상태에 도달한 후, 1 μM 아세틸콜린 클로라이드(acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich,)를 가해 혈관이 완전히 이완되는 것으로 혈관내피가 손상되지 않았음을 확인하였다. 화합물 DW 1865는 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시킨 후 K-H 완충용액으로 희석하여 사용하였으며, 최고농도에서의 DMSO 농도는 0.03%였다. 혈관이완측정은 페닐에프린 또는 KCl에 의해 수축된 혈관에 농도 누적법 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 30 μM)으로 시료를 가해 혈관의 이완정도를 측정하였다. 이때, 실험결과는 페닐에프린에 의해 수축된 상태를 기준으로 하여 이완되는 정도를 퍼센트(%)로 나타냈으며, 선형회귀분석을 통해 EC₅₀ 수치(50% 이완시키는 농도)를 구하여 하기 표 3에 나타내었고 각각의 혈관평활근 이완효과를 그래프로써 도 5에 나타내었다.

표 3

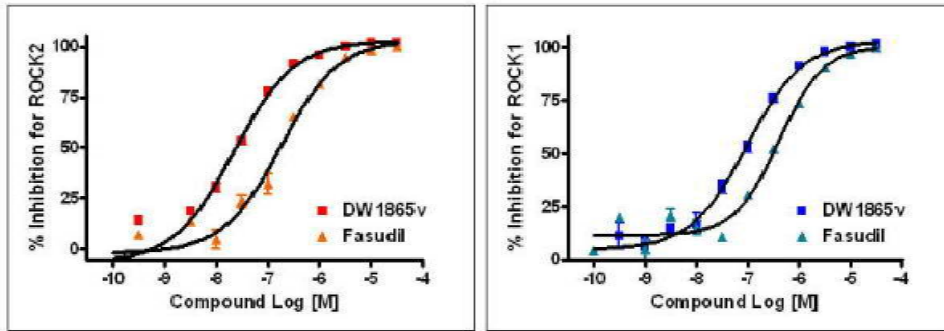
-	페닐에프린 (IC ₅₀ , μM)	KCl (IC ₅₀ , μM)
DW 1865	1.0 ± 0.1	2.6 ± 0.4
파수딜	3.2 ± 0.2	11.0 ± 2.3

[0140] 도 5에서 보는 바와 같이, 상기 화합물 DW 1865이 혈관수축제에 의해 수축된 혈관을 농도-의존적으로 이완시켰다. 화합물 DW 1865의 혈관수축 저해능력은 각기 1.0±0.1 μM 또는 2.6±0.4 μM의 IC₅₀ 값으로 분석되었으며, 이는 기존의 ROCK 저해제 표준 화합물인 파수딜(3.2±0.2 μM 또는 11.0±2.3 μM) 보다 3-5배의 강한 저해 효과로 분석되었다.

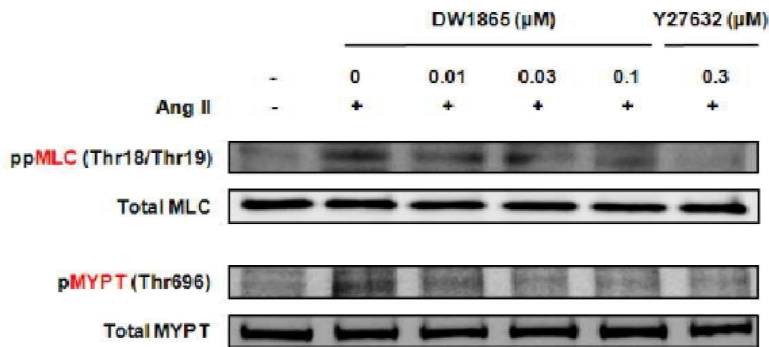
[0141] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

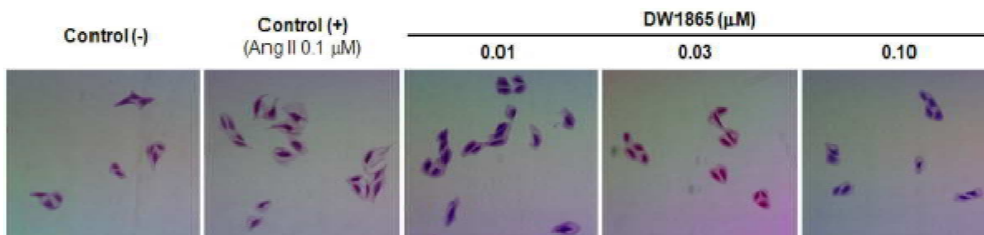
도면1



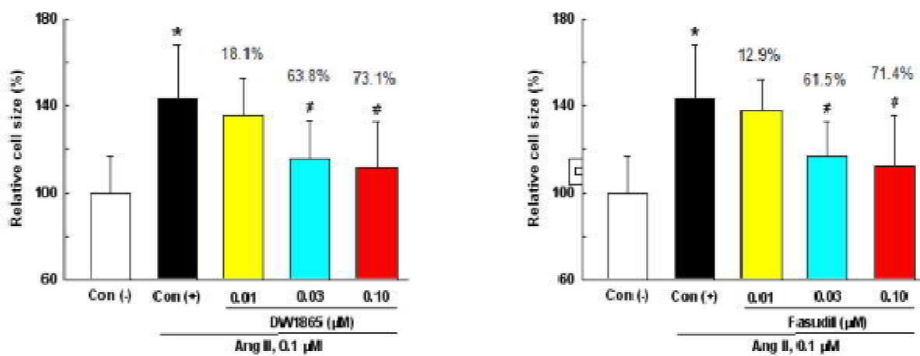
도면2



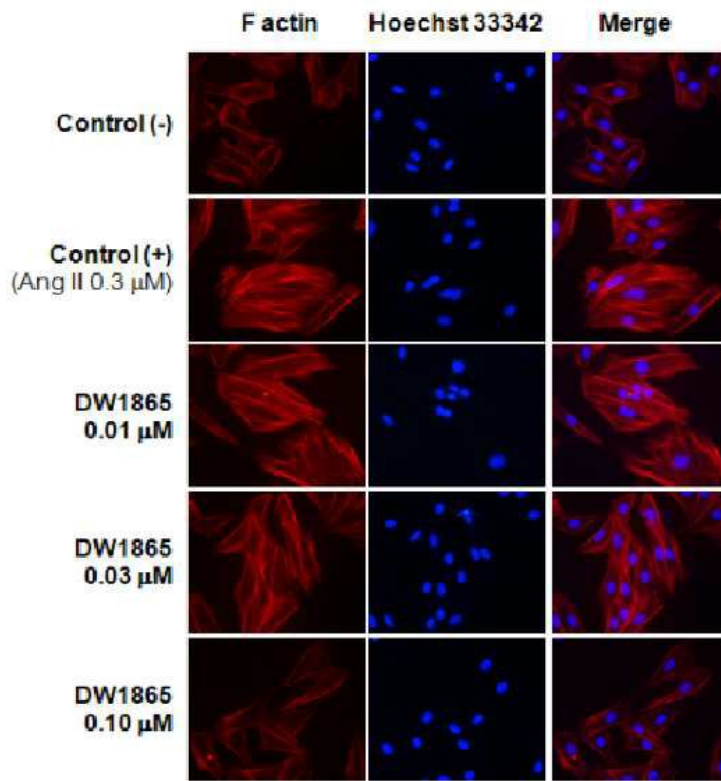
도면3a



도면3b



도면4



도면5

