



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년02월28일
A61K 31/404 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0656004
	(24) 등록일자	2006년12월04일

(21) 출원번호	10-2004-7002183	(65) 공개번호	10-2004-0043193
(22) 출원일자	2004년02월13일	(43) 공개일자	2004년05월22일
심사청구일자	2004년06월04일		
변역문 제출일자	2004년02월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2002/025797	(87) 국제공개번호	WO 2003/015608
국제출원일자	2002년08월15일	국제공개일자	2003년02월27일

(30) 우선권주장 60/312,413 2001년08월15일 미국(US)

(73) 특허권자 수젠, 인크.
미국 캘리포니아 94080-4811 남샌프란시스코 이스트 그랜드가 230

파마시아 코포레이션
미국 미주리주 63017-1732 체스터필드 체스터필드 파크웨이 웨스트 700

(72) 발명자 마스퍼러 제이미
미국 미주리주 63011 발원 코트우드 레인 812

도시 파를
미국 미주리주 63011 와일드우드 히코리 크레스트 드라이브1 6763

세링톤 줄리
미국 캘리포니아주 94114 샌프란시스코 25번 스트리트 4495 에이

(74) 대리인 김창세
장성구

심사관 : 김은희

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 암의 치료를 위한 조합 요법

(57) 요약

본 발명은, 사이클로옥시게나아제 억제제, 특히 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제와 조합하여 단백질 티로신 키나아제 억제제를 사용하는 신생물 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

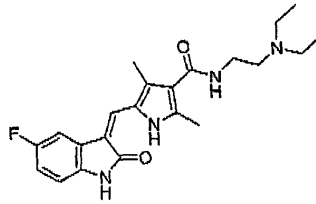
청구항 1.

단백질 키나아제 억제제로서 하기 화학식 I'의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 제 1 약학 조성물;
및

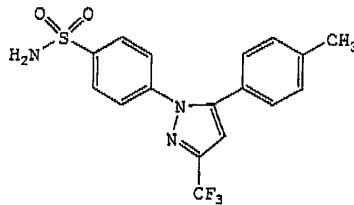
사이클로옥시게나아제 억제제로서 하기 화학식 III'의 셀레콕시브 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 제 2 약
학 조성물

을 포함하는, 암을 치료하기 위한 동시적 또는 순차적 투여용 키트:

화학식 I'



화학식 III'



청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.
삭제

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.
삭제

청구항 15.
삭제

청구항 16.
삭제

청구항 17.
삭제

청구항 18.
삭제

청구항 19.
삭제

청구항 20.
삭제

청구항 21.
삭제

청구항 22.
삭제

청구항 23.
삭제

청구항 24.
삭제

청구항 25.
삭제

청구항 26.
삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

청구항 33.

제 1 항에 있어서,

단백질 키나아제 억제제로서 화학식 I'의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하고, 이 때 약학적으로 허용가능한 염이 L-말레이트 염인, 키트.

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제

청구항 42.

삭제

청구항 43.

삭제

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 사이클로옥시게나아제 억제제, 특히 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제와 조합하여 단백질 트리오신 키나아제 억제제를 사용하는 신생물(neoplasia) 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

배경기술

신생물 또는 종양은 세포 성장의 비정상적이고 비조절적이며 조직파괴적인 증식이다. 신생물이 파괴적 성장, 침입 및 전이적 특성을 갖는 경우 이는 악성 또는 불치성이다. 침입은 주변 조직의 침투 또는 파괴에 의해, 전형적으로는 조직의 경계를 한정하는 기저판을 통해 파손시킴으로써 종종 신체 순환계에 들어가는 신생물의 국소적 확산을 지칭한다. 전이는 전형적으로 림프관 또는 혈관에 의한 종양 세포의 전염을 지칭한다. 또한, 전이는 장막강, 또는 지주막하 또는 다른 공간을 통한 직접 확산에 의한 종양 세포의 이동을 지칭한다. 전이 과정을 통해, 신체의 다른 부위로의 종양 세포 이동은 초기 출현의 자리로부터 떨어진 부위에 신생물을 자리잡게 한다.

암은 현재 미국내 두 번째의 주된 사망 원인이며, 미국에서 8,000,000명 이상이 암으로 진단된 바 있다. 1995년에는 암이 미국내 전체 사망률의 23.3%에 달하였다(문헌 [U.S. Dept. of Health and Human Services, National Center for Health Statistics, Health United States 1996-97 and Injury Chartbook 117(1997)]을 참조).

암은 현재 분자 수준으로 충분히 이해되지 않는다. 특정 바이러스, 특정 화학물질 또는 방사선과 같은 발암물질에 대한 세포의 노출이 "억제" 유전자를 비활성화시키거나 "종양유전자"를 활성화시키는 DNA 변성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 억제 유전자는 성장 조절 유전자로서, 돌연 변이시 세포 성장을 더 이상 조절할 수 없다. 종양유전자는 초기에는 돌연변이 또는 변성된 발현 환경에 의해 변형 유전자가 되는 정상 유전자(원종양유전자라 칭함)이다. 변형 유전자의 생성은 부적절

한 세포 성장을 야기시킨다. 20개 이상의 서로 다른 정상 세포 유전자가 유전적 변성에 의해 "종양유전자"가 될 수 있다. 변형된 세포는 세포 형태, 세포-대-세포 상호작용, 막 내용물, 세포골격 구조, 단백질 분비, 유전자 발현 및 사망을 비롯해 여러 면에서 정상 세포와 다르다(변형된 세포는 무제한으로 성장할 수 있다).

암은 현재 3가지 유형의 요법, 즉 수술, 방사선 및 화학요법중 하나 또는 이들의 조합으로 1차적으로 치료된다. 수술은 손상된 조직의 거대한 제거를 포함한다. 수술은 특정 부위, 예컨대 유방, 결장 및 피부에 위치한 종양을 제거하는데 때때로 효과적이지만 다른 부위, 예컨대 척추에 위치한 종양의 치료에는 사용될 수 없으며 백혈병과 같이 전염된 종양 징후의 치료에도 사용될 수 없다.

화학요법은 세포 복제 또는 세포 대사의 파괴를 포함한다. 이는 유방암, 폐암 및 고환암의 치료에 가장 흔하게 사용된다.

신생물 질병의 치료에 사용되는 전신 화학요법의 역효과는 암 치료를 받는 환자에게 있어 가장 두려운 점이다. 이러한 역효과중 메스꺼움 및 구토는 가장 흔한 현상이며 심각한 부작용이다. 다른 부정적인 부작용으로는 골수를 갱생시키는 높은 투여의 화학요법 및 방사선 요법을 받는 환자에서의 혈구 감소증, 감염, 악액질, 점막염; 독두병(탈모); 피부 합병증(참조: M.D. Abeloff 등; Alopecia and Cutaneous Complications. P.755-56. In Abeloff, M.D., Armitage, J.O., Lichter, A.S., and Niedehuber, J.E. (eds) Clinical Oncology. Churchill Livingstone, New York, 1992, for cutaneous reactions to chemotherapy agents), 예컨대 소양증, 두드러기 및 혈관부종; 신경 합병증; 방사선 또는 화학요법을 받는 환자에서의 폐 및 심장 합병증; 및 생식 및 내분비선 합병증을 포함한다.

화학요법-유도되는 부작용은 환자의 삶의 질에 상당한 영향을 주며 치료에 의한 합병증으로 환자에게 매우 큰 영향을 줄 수 있다.

또한, 화학치료제와 관련된 부정적인 부작용으로는 일반적으로 이러한 약물의 투여시 주요 투약량-제한 독성(DLT)이 있다. 예를 들어, 점막염은 대사길항물질 세포독성 약물 5-FU, 메토타렉세이트, 및 항암 항생물질, 예컨대 독소루비신을 비롯한 여러 항암제에 대한 주요 투약량 제한 독성중 하나이다. 다수의 이러한 화학요법-유도된 부작용은 심각한 경우, 입원을 유도할 수 있거나 통증 치료를 위해 진통제를 사용하는 치료가 요구될 수 있다.

화학치료제 및 방사선 요법에 의해 유도되는 부정적인 부작용은 암 환자의 임상적 관리에 대해 주된 중요성이 되고 있다.

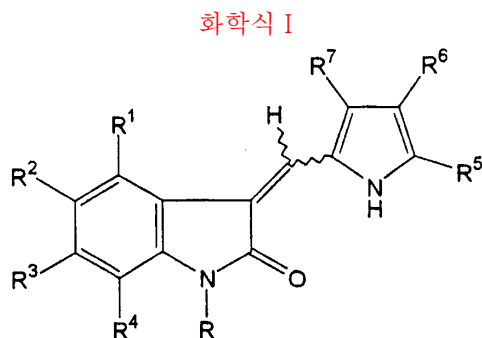
현재, 과학자들은 항혈관신생제의 사용을 통한 암의 치료에 주시하고 있다. 혈관신생은 종양이 필요한 영양분을 얻어 성장하고 체내 다른 위치로 전이하는 과정을 통한 메카니즘인 것으로 여겨진다. 항혈관신생제는 이러한 과정을 방해하고 종양을 파괴시키거나 제어한다.

예를 들어, 미국 특허 제 5,854,205 호는 내피 세포 증식 및 혈관신생의 억제제인 단리된 엔도스타틴 단백질을 기재하고 있고; 미국 특허 제 5,843,925 호는 7-[치환된 아미노]-9-[치환된 글리사이클로아미도]-6-테메틸-6-테옥시테트라사이클린을 사용하여 혈관신생 및 내피 세포 증식을 억제하는 방법을 기재하고 있고; 미국 특허 제 5,861,372 호는 혈관신생을 억제하기 위해 사용하는 응집물 내피 억제제, 안지오테스타틴의 용도를 기재하고 있고; PCT/GB97/00650 호는 혈관신생 및/또는 혈관 투과성 감소 효과를 생성하는데 사용되는 시놀린 유도체의 용도를 기재하고 있고; 타이-핑(Tai-Ping, D)의 문헌에서는 강력한 항혈관신생 요법을 기재하고 있으며(참조: Trends Pharmacol. Sci. 16, No.2, 57-66, 1995); 로드(Lode, H) 등은 항혈관신생 인테그린 알파 v 길항물질과 항체-사이토킨 융합 단백질 간의 상승효과로 자발적 종양 전이를 근절시킴을 기재하고 있고(참조: Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 96(4), 1591-1596, 1999); 잔니스(Giannis, A.) 등은 혈관신생 억제제로서 인테그린 길항물질 및 다른 저분자량 화합물을 기재하고 있고(참조: New drugs in cancer therapy. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36(6), 588-590, 1997); WO 97/41844 호는 인간 환자에게서의 맥관형성의 예방 및/또는 치료를 위한 안지오테스타틴 화합물의 조합을 사용하는 방법을 기재하고 있고; WO 98/22101 호는 항혈관신생제로서 [피로졸-1-일]벤젠설폰아미드를 사용하는 방법을 기재하고 있고; 미국 특허 제 5,792,783 호는 다양한 암의 치료를 위한 항혈관신생제 및 단백질 키나아제 억제제인 3-헤테로아릴-2-인돌리논의 사용을 기재하고 있다.

최근에는, ART-2 억제제, 특히 헤르셉틴(Herceptin, 등록상표)과 조합하여 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제, 특히 셀레코시브(Celecoxib, 등록상표)를 사용하는 결장암의 치료가 이들중 어느 하나의 약물이 단독으로 사용되는 경우보다 더욱 효과적인 것으로 보고된 바 있다. 따라서, 함께 사용하는 경우가 단독으로 사용되는 경우보다 더욱 효능적인 화학치료제의 새로운 조합의 발견이 요구된다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시킨다.

발명의 요약

한 양태에서, 본 발명은 사이클로옥시게나아제 억제제와 조합하여 하기 화학식 I의 단백질 키나아제 억제제 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 치료가 요구되는 포유류에 치료 효과량으로 투여함을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.



상기 식에서,

R은 수소, 피페라진-1-일메틸, 4-메틸피페라진-1-일메틸, 피페리딘-1-일메틸, 2-하이드록시메틸피롤리딘-1-일메틸, 2-카복시피롤리딘-1-일메틸 및 피롤리딘-1-일메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R¹은 수소, 할로, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로알리사이클릭, 하이드록시, 알콕시, -C(O)NR⁸R⁹, -NR¹³R¹⁴, -(CO)R¹⁵ 및 -(CH₂)₁R¹⁶로 이루어진 군으로부터 선택되고,

R²는 수소, 할로, 알킬, 치환된 알킬, 트리할로메틸, 하이드록시, 알콕시, 시아노, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -C(O)R¹⁵, 아릴, 헤테로아릴 및 -S(O)₂NR¹³R¹⁴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R³은 수소, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 트리할로메틸, 하이드록시, 알콕시, 아릴, 헤테로아릴, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³S(O)₂R¹⁴, -S(O)₂NR¹³R¹⁴, -NR¹³C(O)R¹⁴, -NR¹³C(O)OR¹⁴, -(CO)R¹⁵ 및 -SO₂R¹⁹로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R⁴는 수소, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 하이드록시, 알콕시 및 -NR¹³R¹⁴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R⁵는 수소, 알킬, 치환된 알킬 및 -C(O)R¹⁰으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R⁶은 수소, 알킬, 치환된 알킬 및 -C(O)R¹⁰으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R⁷은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 헤테로아릴, -C(O)R¹⁷ 및 -C(O)R¹⁰으로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단 R이 수소이면 R⁵, R⁶ 및 R⁷ 중 하나 이상이 -C(O)R¹⁰이거나; 또는

R⁶ 및 R⁷은 결합하여 -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅- 및 -(CH₂)₆-으로 이루어진 군으로부터 선택된 그룹을 형성하고;

R⁸ 및 R⁹는 독립적으로 수소, 알킬, 치환된 알킬 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R¹⁰은 하이드록시, 알콕시, 아릴옥시, -N(R¹¹)(알킬렌)_nR¹²(여기서, 알킬렌 그룹은 하이드록시 그룹으로 치환되거나 치환되지 않음) 및 -NR¹³R¹⁴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R¹¹은 수소, 알킬 및 치환된 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{12} 는 $-NR^{13}R^{14}$, 하이드록시, $-C(O)R^{15}$, 아릴, 헤테로아릴, $-N^+(O^-)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$ 및 $-NHC(O)R^{18}$ (여기서, R^{18} 은 알킬, 치환된 알킬, 할로알킬 또는 아르알킬이다)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{13} 및 R^{14} 는 독립적으로 수소, 알킬, 치환된 알킬, 하이드록시알킬아미노로 치환된 저급 알킬, 시아노알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는

R^{13} 및 R^{14} 는 결합하여 헤테로사이클로 그룹을 형성할 수 있고;

R^{15} 는 수소, 하이드록시, 알콕시 및 아릴옥시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

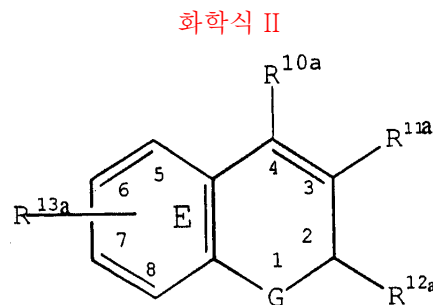
R^{16} 은 하이드록시, $-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)R^{15}$ 및 $-C(O)NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{17} 은 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{19} 는 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴 및 헤테로아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

n 및 r 은 독립적으로 1, 2, 3 또는 4이다.

바람직하게는, 화학식 I의 단백질 키나아제 억제제는 (i) 하기 화학식 II의 화합물, (ii) 하기 화학식 III의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제와 조합하여 사용된다.



상기 식에서,

G 는 O, S 및 $-NR^a$ (여기서, R^a 는 수소 또는 알킬이다)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

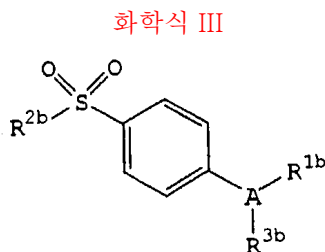
R^{10a} 는 수소 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{11a} 는 카복실, 알킬, 아르알킬, 아미노카보닐, 알킬설포닐아미노카보닐 및 알콕시카보닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{12a} 는 할로알킬, 알킬, 아르알킬, 사이클로알킬, 및 알킬티오, 니트로 및 알킬설포닐로부터 선택된 하나 이상의 라디칼로 선택적으로 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{13a} 는 수소, 할로, 알킬, 아르알킬, 알콕시, 아릴옥시, 헤테로아릴옥시, 아르알킬옥시, 헤테로아르알킬옥시, 할로알킬, 할로알콕시, 알킬아미노, 아릴아미노, 아르알킬아미노, 헤테로아릴아미노, 헤테로아릴알킬아미노, 니트로, 아미노, 아미노설포닐, 알킬아미노설포닐, 아릴아미노설포닐, 헤테로아릴아미노설포닐, 아르알킬아미노설포닐, 헤테로아르알킬아미노설포닐, 헤테로사이클로설포닐, 알킬설포닐, 하이드록시아릴카보닐, 니트로아릴, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 아르알킬카보닐, 헤테로아릴카보닐, 아릴카보닐, 아미노카보닐 및 알킬카보닐로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 라디칼이거나; 또는

R^{13a}는 고리 E와 함께 나프틸 고리를 형성한다.



상기 식에서,

A는 부분적 불포화 또는 불포화 헤테로사이클릴 및 부분적 불포화 또는 불포화 카보사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{1b}는 헤테로사이클릴, 사이클로알킬, 사이클로알케닐 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며, 이는 치환가능한 위치에서 알킬, 할로알킬, 시아노, 카복실, 알콕시카보닐, 하이드록실, 하이드록시알킬, 할로알콕시, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 니트로, 알콕시알킬, 알킬설퍼닐, 할로, 알콕시 및 알킬티오로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 라디칼로 선택적으로 치환되고;

R^{2b}는 메틸 및 아미노로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{3b}는 수소, 할로, 알킬, 알케닐, 알키닐, 옥소, 시아노, 카복실, 시아노알킬, 헤테로사이클릴옥시, 알킬옥시, 알킬티오, 알킬카보닐, 사이클로알킬, 아릴, 할로알킬, 헤테로사이클릴, 사이클로알케닐, 아르알킬, 헤테로사이클릴알킬, 아실, 알킬티오알킬, 하이드록시알킬, 알콕시카보닐, 아릴카보닐, 아르알킬카보닐, 아르알케닐, 알콕시알킬, 아릴티오알킬, 아릴옥시알킬, 아르알킬티오알킬, 아르알콕시알킬, 알콕시아르알콕시알킬, 알콕시카보닐알킬, 아미노카보닐, 아미노카보닐알킬, 알킬아미노카보닐, N-아릴아미노카보닐, N-알킬-N-아릴아미노카보닐, 알킬아미노카보닐알킬, 카복시알킬, 알킬아미노, N-아릴아미노, N-아르알킬아미노, N-알킬-N-아르알킬아미노, N-알킬-N-아릴아미노, 아미노알킬, 알킬아미노알킬, N-아릴아미노알킬, N-아르알킬아미노알킬, N-알킬-N-아르알킬아미노알킬, N-알킬-N-아릴아미노알킬, 아릴옥시, 아르알콕시, 아릴티오, 아르알킬티오, 알킬설퍼닐, 알킬설폰, 아미노설폰, 알킬아미노설폰, N-아릴아미노설폰, 아릴설폰 및 N-알킬-N-아릴아미노설폰으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

바람직하게는, 상기 화합물은 1종 이상의 상기 화합물 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물로서 투여된다. 특히, 본 발명의 치료제는 동시에 또는 다른 시간에 제공되는 개별 조성물로 조제될 수 있거나, 또는 단일 조성물로서 제공될 수 있다.

본 발명의 방법은, 말단흑자형흑색종, 광선각화증, 선암종, 선양 낭성 암종, 선종, 선육종, 선편평세포 암종, 성상세포 종양, 바르톨린선 암종, 기저세포 암종, 기관지샘 암종, 모세관 암종, 유암종, 암종, 암육종, 해면상 암종, 담관암종, 콘도육종(chondrosarcoma), 맥락막층 유두종/암종, 투명 세포 암종, 낭선종, 내배엽종 종양, 자궁내막 증식증, 간질 내막 육종, 자궁 내막양 선암, 상의 육종, 상피형 육종, 유잉 육종, 섬유층관형 종양, 국소결절성과증식 종양, 가스트린종, 생식 세포 종양, 교아종, 글루카곤종, 혈관아세포종, 혈관내피세포종, 혈관종, 간 선종, 간 선종증, 간세포 암종, 인슐린종, 상피내 종양, 상피간 편평상피세포 종양, 침윤성 편평상피세포 암종, 대세포 암종, 평활근 육종, 악성 흑자 흑색종, 악성 흑색종, 악성 중피종양, 수아세포종, 수질상피종, 흑색종, 뇌막성 암종, 중피 암종, 전이성 암종, 점액표피양 암종, 신경아세포종, 신경상피 선암 결절성 흑색종, 귀리 세포 암종, 회돌기아교성 선암종, 골육종, 체장폴리펩타이드 선암종, 유두상 장액성 선암종, 송과 세포 종양, 뇌하수체 종양, 형질세포종, 가육종, 폐아세포종, 신세포 암종, 망막아세포종, 횡문근육종, 육종, 장액성 암종, 소세포 암종, 연조직 암종, 소마토스타틴-분비 종양, 편평 암종, 편평세포 암종, 중피하(submesothelial) 흑색종, 표재 확장형 흑색종, 미분화 암종, 포도막 흑색종, 사마귀양 암종, 혈관활성 장펩티드종(vipoma), 분화도가 좋은 암종, 및 윌름 종양(Wilm's tumor)을 포함하는 신생물 질환의 치료 또는 예방에 유용하다.

본 발명의 방법은 하나 이상의 이점을 제공한다. 상기 이점중 하나는 본 발명의 조성물, 약물 및 요법이 낮은 투약량, 즉 단독으로 투여되는 개별 성분 각각에 대한 임상 상황에 통상적으로 사용되는 것보다 적은 양으로 조합 투여된다는 것이다.

포유류에 투여되는 본 발명의 화합물, 조성물, 약물 및 요법의 투약량을 감소시키는 이점은 더욱 높은 투여량과 관련된 역효과의 발생률의 감소를 포함한다. 예를 들어, 메토크레이트와 같은 화학치료제의 투여량을 감소시킴으로써 더욱 높은 투여량에서 관찰되는 것과 비교할 때 메스꺼움과 구토의 빈도 및 심각도가 감소할 것이다. 본 발명의 단백질 키나아제 억제제가 사이클로옥시게나아제 억제제, 특히 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제와 조합하여 사용되는 경우 유사한 이점이 고려된다.

역효과의 발생률을 감소시킴으로써, 암 치료를 받고 있는 환자의 삶의 질 개선이 고려된다. 역효과의 발생률을 감소시키는 추가적인 이점으로는 환자의 수용 상태의 개선, 역효과의 치료에 요구되는 입원 횟수의 감소, 및 역효과와 관련된 통증을 치료하는데 요구되는 진통제 투여의 감소를 들 수 있다.

고려되는 또다른 이점은, 단백질 키나아제 억제제가 사이클로옥시게나아제 억제제, 바람직하게는 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제와 조합하여 투여되는 경우 이들 약물중 하나만 단독으로 투여되는 경우보다 중양 억제제가 더욱 크다는 점이다.

본 발명은 COX-2 억제제 및 화학식 I의 단백질 키나아제 억제제를 포함하는 키트를 추가로 포함한다.

발명의 상세한 설명

정의

달리 정의되지 않으면, 본 발명의 명세서 및 청구범위에서 사용되는 다음의 용어들은 하기 논의되는 의미를 가진다.

"알킬"은 탄소수 1 내지 20의 직쇄 및 분지쇄를 포함하는 포화 지방족 탄화수소 라디칼을 의미한다(본원에서 "1-20"과 같은 수치 범위가 사용되는 경우, 이는 알킬 그룹인 경우, 이 그룹이 1개의 탄소원자, 2개의 탄소원자, 3개의 탄소원자 등 20개까지의 탄소원자를 함유할 수 있음을 의미한다). 탄소수 1 내지 4의 알킬 그룹은 저급 알킬 그룹으로 지칭된다. 상기 저급 알킬 그룹이 치환기가 부족한 경우, 저급 알킬 그룹으로 지칭된다. 더욱 바람직하게는, 알킬 그룹은 탄소수 1 내지 10의 중간 크기 알킬이고, 예를 들면 메틸, 에틸, 프로필, 2-프로필, n-부틸, 이소-부틸, tert-부틸, 펜틸 등이다. 가장 바람직하게는 이는 탄소수 1 내지 4의 저급 알킬, 예를 들면 메틸, 에틸, 프로필, 2-프로필, n-부틸, 이소-부틸 또는 tert-부틸 등이다.

"치환된 알킬"은 할로; 하이드록시; 저급 알콕시; 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 아릴; 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 아릴옥시; 고리내에 1 내지 3개의 질소 원자를 갖고, 고리내의 탄소가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 6원 헤테로아릴; 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖고, 그룹내 탄소 및 질소 원자가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 5원 헤테로아릴; 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖고, 그룹내 탄소 및 질소(존재하는 경우) 원자가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹, 머캅토, (저급 알킬)티오, 아릴티오(할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된다), 시아노, 아실, 티오아실, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, 니트로, N-설포아미도, S-설포아미도, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ 및 $-NR^{18}R^{19}$ (여기서 R^{18} 및 R^{19} 는 수소; 저급 알킬; 트리할로메틸; (C_3-C_6) 사이클로알킬; 저급 알케닐; 저급 알킬; 및 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨)로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 5- 또는 6원 헤테로알리사이클릭 그룹으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된 하나 이상, 더욱 바람직하게는 1 내지 3개, 더더욱 바람직하게는 1 또는 2개의 치환기(들)로 치환된 상기 정의한 바와 같은 알킬 그룹을 의미한다.

바람직하게는, 알킬 그룹은 하이드록시; 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖고, 그룹내 탄소 및 질소 원자(존재하는 경우)가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로

이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 5- 또는 6원 헤테로아릴; 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖고, 그룹내 탄소 및 질소 원자가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 5원 헤테로아릴; 고리내 1 내지 3개의 질소 원자를 갖고, 고리내의 탄소 원자가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 그룹으로 선택적으로 치환된 6원 헤테로아릴; 또는 $-NR^{18}R^{19}$ (여기서, R^{18} 및 R^{19} 는 수소 또는 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 치환기로 치환된다. 더욱 바람직하게는, 알킬 그룹은 하이드록시, 디메틸아미노, 에틸아미노, 디에틸아미노, 디프로필아미노, 피롤리디노, 피페리디노, 모르폴리노, 피페라지노, 4-저급 알킬피페라지노, 페닐, 이미다졸릴, 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 옥사졸릴, 트리아지닐 등으로 서로 독립적으로 이루어진 1 또는 2개의 치환기로 치환된다.

"사이클로알킬"은 고리 원자가 모두 탄소인 3 내지 8원 단환식 고리, 고리 원자가 모두 탄소인 5원/6원 또는 6원/6원 융합 이환식 고리 또는 다환식 융합 고리("융합" 고리 시스템은 시스템내 각 고리가 시스템내 서로 다른 고리와 인접한 쌍의 탄소원자를 공유하는 것을 의미한다) 그룹을 지칭하며, 상기 고리중 하나 이상은 하나 이상의 이중결합을 함유할 수 있지만 어떠한 고리도 완전히 공액된 파이-전자 시스템을 갖지 않는다.

사이클로알킬의 예는 사이클로프로판, 사이클로부탄, 사이클로펜탄, 사이클로헥센, 사이클로헥산, 사이클로헥사디엔, 아다만테인, 사이클로헵탄, 사이클로헵타트리엔 등이 있으며, 이로 한정되지는 않는다.

"치환된 사이클로알킬"은 저급 알킬; 트리할로알킬; 할로; 하이드록시; 저급 알콕시; 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1 또는 2개의 그룹으로 선택적으로 치환된 아릴; 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1 또는 2개의 그룹으로 선택적으로 치환된 아릴옥시; 고리내에 1 내지 3개의 질소 원자를 갖고, 고리내의 탄소가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1 또는 2개의 그룹으로 선택적으로 치환된 5원 헤테로아릴; 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖고, 그룹내 탄소 및 질소 원자가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1 또는 2개의 그룹으로 선택적으로 치환된 5원 헤테로아릴; 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖고, 그룹내 탄소 및 질소(존재하는 경우) 원자가 할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹, 머캅토, (저급 알킬)티오, 아릴티오(할로, 하이드록시, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 그룹으로 서로 독립적으로 이루어진 하나 이상, 바람직하게는 1 또는 2개의 그룹으로 선택적으로 치환된다), 시아노, 아실, 티오아실, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, 니트로, N-설포아미도, S-설포아미도, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ 및 $-NR^{18}R^{19}$ (이는 앞서 정의된 바와 같음)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상, 더욱 바람직하게는 1 또는 2개 치환기로 치환되는 상기 정의한 바와 같은 사이클로알킬 그룹을 의미한다.

"알케닐"은 2개 이상의 탄소 원자와 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합으로 구성된, 상기 정의된 바와 같은 저급 알킬 그룹을 지칭한다. 대표적인 예로는 에테닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 1-, 2-, 또는 3-부테닐 등이 포함되지만, 이로 한정되지는 않는다.

"알키닐"은 2개 이상의 탄소 원자와 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합으로 구성된, 상기 정의된 바와 같은 저급 알킬 그룹을 지칭한다. 대표적인 예로는 에티닐, 1-프로피닐, 2-프로피닐, 1-, 2- 또는 3-부티닐 등이 포함되지만, 이로 한정되지는 않는다.

"아릴"은 완전히 공액된 파이-전자 시스템을 갖는 1 내지 12개의 탄소 원자를 갖는, 고리 원자가 모두 탄소인 단환식 또는 융합 고리 다환식(즉, 고리가 인접한 쌍의 탄소 원자를 공유한다) 그룹을 지칭한다. 아릴 그룹의 예는 페닐, 나프탈레닐 및 안트라세닐이고, 이로 제한되지는 않는다. 아릴 그룹은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 하나 이상, 더욱 바람직하게는 1, 2 또는 3개, 더욱더욱 바람직하게는 1 또는 2개이고, 저급 알킬, 트리할로알킬, 할로, 하이드록시, 저급 알콕시, 머캅토, (저급 알킬)티오, 시아노, 아실, 티오아실, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, 니트로, N-설포아미도, S-설포아미도, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ 및 $-NR^{18}R^{19}$ (이때, R^{18} 및 R^{19} 는 상기 정의된 바와 같다)로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된다. 바람직하게는 아릴 그룹은 할로, 저급 알킬, 트리할로알킬, 하이드록시, 머캅토, 시아노, N-아미도, 모노- 또는 디-알킬아미노, 카복시 또는 N-설포아미도로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된다.

"헤테로아릴"은, N, O 또는 S로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 고리 헤테로원자를 함유하고 나머지 고리 원자가 C이고, 또한 완전히 공액된 파이-전자 시스템을 갖는 5 내지 12개의 고리 원자의 단환식 또는 융합 고리(즉, 고리가 인접한 원자 쌍을 공유한다) 그룹을 지칭한다. 비치환된 헤테로아릴 그룹의 예는 피롤, 푸란, 티오펜, 이미다졸, 옥사졸, 티아졸, 피라졸, 피리딘, 피리미딘, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 푸린 및 카바졸이고, 이로 제한되지는 않는다. 헤테로아릴 그룹은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 하나 이상, 더욱 바람직하게는 1, 2 또는 3개, 더더욱 바람직하게는 1 또는 2개이고, 저급 알킬, 트리할로알킬, 할로, 하이드록시, 저급 알콕시, 머캅토, (저급 알킬)티오, 시아노, 아실, 티오아실, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, 니트로, N-설폰아미도, S-설폰아미도, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ 및 $-NR^{18}R^{19}$ (이때, R^{18} 및 R^{19} 는 상기 정의된 바와 같다)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 바람직하게는, 헤테로아릴 그룹은 할로, 저급 알킬, 트리할로알킬, 하이드록시, 머캅토, 시아노, N-아미도, 모노- 또는 디-알킬아미노, 카복시 또는 N-설폰아미도로부터 독립적으로 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된다.

"헤테로알리사이클릭"은 1 또는 2개의 고리 원자가 N, O 또는 $S(O)_n$ (여기서, n 은 0 내지 2의 정수이다)이고, 나머지 고리 원자가 C인 5 내지 9개의 고리 원자를 갖는 단환식 또는 융합 고리 그룹을 지칭한다. 고리는 또한 하나 이상의 이중 결합을 가질 수 있다. 그러나, 고리는 완전히 공액된 파이-전자 시스템을 갖지는 않는다. 비치환된 헤테로알리사이클릭 그룹의 예는 피롤리디노, 피페리디노, 피페라지노, 모르폴리노, 티오모르폴리노, 호모피페라지노 등이고, 이로 제한되지는 않는다. 헤테로알리사이클릭 고리는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 하나 이상, 더욱 바람직하게는 1, 2 또는 3개, 더더욱 바람직하게는 1 또는 2개이고, 저급 알킬, 트리할로알킬, 할로, 하이드록시, 저급 알콕시, 머캅토, (저급 알킬)티오, 시아노, 아실, 티오아실, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, 니트로, N-설폰아미도, S-설폰아미도, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ 및 $-NR^{18}R^{19}$ (이때, R^{18} 및 R^{19} 는 상기 정의된 바와 같다)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 바람직하게는, 헤테로아릴 그룹은 할로, 저급 알킬, 트리할로알킬, 하이드록시, 머캅토, 시아노, N-아미도, 모노- 또는 디-알킬아미노, 카복시 또는 N-설폰아미도로부터 독립적으로 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된다.

바람직하게는, 헤테로알리사이클릭 그룹은 할로, 저급 알킬, 트리할로알킬, 하이드록시, 머캅토, 시아노, N-아미도, 모노- 또는 디-알킬아미노, 카복시 또는 N-설폰아미도로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된다.

"헤테로사이클"은 1 또는 2개의 고리 원자가 N, O 또는 $S(O)_n$ (여기서, n 은 0 내지 2의 정수이다)으로부터 선택된 헤테로 원자이고, 나머지 고리 원자가 C(이때, 1 또는 2개의 C 원자는 카보닐 그룹에 의해 선택적으로 치환될 수 있다)인 3 내지 8 개 고리 원자의 포화된 환식 라디칼을 의미한다. 헤테로사이클릭 고리는 선택적으로 치환된 저급 알킬(이는 카복시 또는 에스테르로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2개의 치환기로 치환됨), 할로알킬, 시아노알킬, 할로, 니트로, 시아노, 하이드록시, 알콕시, 아미노, 모노알킬아미노, 디알킬아미노, 아르알킬, 헤테로아르알킬, $-COR$ (여기서, R은 알킬이다) 또는 $-COOR$ (여기서, R은 수소 또는 알킬이다)로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 치환기로 독립적으로 선택적으로 치환될 수 있다. 보다 구체적으로는, 헤테로사이클릭이라는 용어는 테트라하이드로피라닐, 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란, 피페리디노, N-메틸피페리딘-3-일, 피페라지노, N-메틸피롤리딘-3-일, 3-피롤리디노, 모르폴리노, 티오모르폴리노, 티오모르폴리노-1-옥사이드, 티오모르폴리노-1,1-디옥사이드, 4-에틸옥시카보닐피페라지노, 3-옥소피페라지노, 2-이미다졸리돈, 2-피롤리디논, 2-옥소호모피페라지노, 테트라하이드로피리미딘-2-온 및 이들의 유도체를 포함하나 이로 한정되지는 않는다. 바람직하게는, 헤테로사이클 그룹은 할로, 저급 알킬, 카복시로 치환된 저급 알킬, 에스테르 하이드록시, 모노- 또는 디-알킬아미노를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

"하이드록시"는 $-OH$ 그룹을 지칭한다.

"알콕시"는 $-O-(알킬)$ 및 $-O-(사이클로알킬)$ 그룹을 둘다 지칭한다. 대표적인 예는 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 부톡시, 사이클로프로필옥시, 사이클로부틸옥시, 사이클로펜틸옥시, 사이클로헥실옥시 등을 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

"아릴옥시"는 본원에 정의된 바와 같은 $-O-아릴$ 및 $-O-헤테로아릴$ 그룹을 둘다 지칭한다. 대표적인 예는 페녹시, 피리디닐옥시, 프라닐옥시, 티에닐옥시, 피리미디닐옥시, 피라지닐옥시 등 및 이들의 유도체를 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

"머캅토"는 $-SH$ 그룹을 지칭한다.

"알킬티오"는 -S-알킬 및 -S-사이클로알킬 그룹을 둘다 지칭한다. 대표적인 예는 메틸티오, 에틸티오, 프로필티오, 부틸티오, 사이클로프로필티오, 사이클로부틸티오, 사이클로펜틸티오, 사이클로헥실티오 등을 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

"아릴티오"는 본원에 정의된 바와 같은 -S-아릴 및 -S-헤테로아릴 그룹을 둘다 지칭한다. 대표적인 예는 페닐티오, 피리디닐티오, 푸라닐티오, 티에닐티오, 피리미디닐티오 등 및 이들의 유도체를 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

"아실"은 -C(O)-R" 그룹을 지칭하며, 여기서 R"은 수소; 저급 알킬; 트리할로메틸; 사이클로알킬; 저급 알킬, 트리할로메틸, 저급 알콕시, 할로 및 -NR¹⁸R¹⁹ 그룹으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 치환기로 선택적으로 치환된 아릴; 저급 알킬, 트리할로알킬, 저급 알콕시, 할로 및 -NR¹⁸R¹⁹ 그룹으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 치환기로 선택적으로 치환된 헤테로아릴(고리 탄소를 통해 결합됨); 및 저급 알킬, 트리할로알킬, 저급 알콕시, 할로 및 -NR¹⁸R¹⁹ 그룹으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 치환기로 선택적으로 치환된 헤테로알리사이클릭(고리 탄소를 통해 결합됨)으로 이루어진 군에서 선택된다. 대표적인 아실 그룹은 아세틸, 트리플루오로아세틸, 벤조일 등을 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

"알데하이드"는 R"이 수소인 아실 그룹을 지칭한다.

"티오아실"은 -C(S)-R" 그룹(여기서, R"은 상기 정의된 바와 같다)를 지칭한다.

"에스테르"는 -C(O)O-R" 그룹(여기서, R"은 수소일 수 없는 것을 제외하고는 상기 정의된 바와 같다)를 지칭한다.

"아세틸" 그룹은 -C(O)CH₃ 그룹을 지칭한다.

"할로" 그룹은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드, 바람직하게는 불소 또는 염소를 지칭한다.

"트리할로메틸" 그룹은 -CX₃ 그룹(여기서, X는 상기 정의된 바와 같은 할로 그룹이다)을 지칭한다.

"트리할로메탄설폰일" 그룹은 X₃CS(=O)₂- 그룹(여기서, X는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"시아노"는 -C≡N 그룹을 지칭한다.

"메틸렌디옥시"는 -OCH₂O- 그룹(여기서 2개의 산소 원자는 인접한 탄소 원자와 결합됨)을 지칭한다.

"에틸렌디옥시"는 -OCH₂CH₂O-(여기서 2개의 산소 원자는 인접한 탄소 원자와 결합됨)을 지칭한다.

"S-설포아미도"는 -S(O)₂NR¹⁸R¹⁹ 그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"N-설포아미도"는 -NR¹⁸S(O)₂R¹⁹ 그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"O-카바밀" 그룹은 -OC(O)NR¹⁸R¹⁹ 그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"N-카바밀"은 R¹⁸OC(O)NR¹⁹- 그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"O-티오키아바밀"은 -OC(S)NR¹⁸R¹⁹ 그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"N-티오키아바밀"은 R¹⁸OC(S)NR¹⁹-그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"아미노"는 -NR¹⁸R¹⁹ 그룹(여기서, R¹⁸ 및 R¹⁹는 둘다 수소이다)을 지칭한다.

"C-아미도"는 $-C(O)NR^{18}R^{19}$ 그룹(여기서, R^{18} 및 R^{19} 는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"N-아미도"는 $R^{18}C(O)NR^{19}$ -그룹(여기서, R^{18} 및 R^{19} 는 상기 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

"니트로"는 $-NO_2$ 그룹을 지칭한다.

"할로알킬"은 하나 이상의 동일하거나 상이한 할로 원자로 치환된 상기 정의된 바와 같은 알킬, 바람직하게는 저급 알킬, 예를 들어 $-CH_2Cl$, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $-CH_2CCl_3$ 등을 의미한다.

"아르알킬"은 상기 정의된 바와 같은 아릴 그룹으로 치환된 상기 정의된 바와 같은 알킬, 바람직하게는 저급 알킬, 예를 들어 $-CH_2$ 페닐, $-(CH_2)_2$ 페닐, $-(CH_2)_3$ 페닐, $CH_3CH(CH_3)CH_2$ 페닐 등 및 이들의 유도체를 의미한다.

"헤테로아르알킬" 그룹은 헤테로아릴 그룹으로 치환된 상기 정의된 바와 같은 알킬, 바람직하게는 저급 알킬, $-CH_2$ 피리디닐, $-(CH_2)_2$ 피리미디닐, $-(CH_2)_3$ 이미다졸릴 등 및 이들의 유도체를 의미한다.

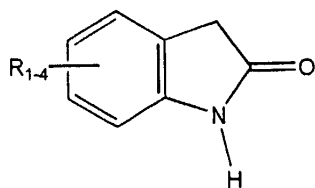
"모노알킬아미노"는 라디칼 $-NHR$ (여기서, R 은 상기 정의된 바와 같은 비치환된 알킬 또는 사이클로알킬 그룹이다), 예를 들어 메틸아미노, (1-메틸에틸)아미노, 사이클로헥실아미노 등을 의미한다.

"디알킬아미노"는 라디칼 $-NRR$ (여기서, R 은 각각 독립적으로 상기 정의된 바와 같은 비치환된 알킬 또는 사이클로알킬 그룹이다), 예를 들어 디메틸아미노, 디에틸아미노, (1-메틸에틸)-에틸아미노, 사이클로헥실메틸아미노, 사이클로펜틸메틸아미노 등을 의미한다.

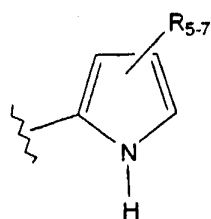
"시아노알킬"은 상기 정의된 바와 같은 알킬, 바람직하게는 저급 알킬(이는 1 또는 2개의 시아노 그룹으로 치환됨)을 의미한다.

"선택적인" 또는 "선택적으로"는 후속적으로 기술되는 사건 또는 상황이 일어날 수는 있지만 반드시 일어날 필요는 없으며, 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, "알킬 그룹으로 선택적으로 치환된 헤테로사이클 그룹"은 알킬 그룹이 존재할 수 있지만 반드시 존재할 필요는 없음을 의미하고, 헤테로사이클 그룹이 알킬 그룹으로 치환되는 상태 및 헤테로사이클로 그룹이 알킬 그룹으로 치환되지 않는 상태를 포함한다.

"2-인돌리논", "인돌린-2-온" 및 "2-옥신돌"이라는 용어는 하기 화학식의 분자를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다.



"피롤"이라는 용어는 하기 화학식의 분자를 지칭한다.



"피롤 치환된 2-인돌리논" 및 "3-피롤리데닐-2-인돌리논"이라는 용어는 화학식 I로 제시된 일반식을 갖는 화합물을 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

동일한 분자식을 가지나 원자 결합 특성 또는 순서 또는 공간에서의 원자 배열이 상이한 화합물을 "이성질체"라고 한다. 공간에서의 원자 배열이 상이한 이성질체를 "입체이성질체"라고 한다.

서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 "부분입체이성질체(diastereomer)"라고 하고, 서로 포개지지 않는 거울상 이미지인 것을 "거울상이성질체(enantiomer)"라고 한다. 화합물이 비대칭 중심을 갖는 경우, 예를 들어 화합물이 4개의 상이한 기에 결합된 경우, 한쌍의 거울상이성질체가 가능하다. 거울상이성질체는 비대칭 중심의 절대적 배치에 의해 특징지어지고, 칸 및 프렐로그(Cahn and Prelog)의 R- 및 S-배열 규칙에 의해 또는 분자가 편광 평면을 회전하는 방식에 의해 기술되며 시계방향 또는 시계반대방향(즉, 각각 (+) 또는 (-)-이성질체)으로서 명시된다. 키랄 화합물은 개별적인 거울상이성질체 또는 이들의 혼합물로서 존재할 수 있다. 거울상이성질체를 동일한 비율로 함유하는 혼합물을 "라세믹 혼합물"이라 한다.

본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 보유할 수 있으며, 따라서 이러한 화합물은 개별적인 (R)- 또는 (S)-입체이성질체 또는 이들의 혼합물로서 생성될 수 있다. 예컨대, 화학식 I의 화합물에서의 R⁶ 치환기가 2-하이드록시에틸인 경우, 하이드록시 그룹이 부착되어 있는 탄소는 비대칭 중심이며, 따라서 화학식 I의 화합물은 (R)- 또는 (S)-입체이성질체로서 존재할 수 있다. 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에서 특정 화합물의 기재 또는 명명은 개별적인 거울상이성질체 및 혼합물, 라세믹 또는 그 외의 것을 모두 포함시키고자 한다. 입체화학의 결정 및 입체이성질체의 분리를 위한 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다(참조: 문헌[Chapter 4 of "Advanced Organic Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992]).

본 발명의 화합물은 호변이성질화 및 구조 이성질화 현상을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I의 화합물은 2-인돌린은 잔기를 피롤 잔기에 연결시키는 이중 결합에 대해 E 또는 Z 배치를 채택할 수 있거나, E 및 Z의 혼합물일 수 있다. 본 발명은 RTK, CTK 및/또는 STK 활성을 조절하는 능력을 가지며 임의의 하나의 호변이성질체 또는 구조 이성질체 형태로 제한되지 않는 임의의 호변이성질체 또는 구조 이성질체 형태 및 이의 혼합물을 포함한다.

"약학 조성물"은 본원에 기술되는 하나 이상의 화합물 또는 그의 생리학적으로/약학적으로 허용가능한 염 또는 선구약물, 및 생리학적으로/약학적으로 허용가능한 담체 및 부형제와 같은 기타 화학적 성분과의 혼합물을 지칭한다. 약학 조성물의 목적은 유기체에 대한 화합물의 투여를 용이하게 하는 것이다.

본 발명의 화합물은 선구약물로서 작용할 수도 있다. "선구약물"은 생체내에서 모(parent) 약물로 전환되는 약물을 지칭한다. 선구약물은 일부 상황에서 모 약물보다 투여하기가 용이할 수 있어 종종 유용하다. 예를 들어, 선구약물은 경구 투여에 의해 생체이용가능한 반면, 모 약물은 그렇지 못하다. 선구약물은 또한 모 약물에 비해 약학 조성물중의 개선된 용해성을 가진다. 선구약물의 예로는 수 용해성이 이동하는데 불리한 경우 세포막을 가로지르는 전달이 용이하도록 에스테르("선구약물")로서 투여되나 이후 수 용해성이 이로운 경우 세포 내측에서 카복실산, 즉 활성체로 1회 대사적으로 가수분해되는 본 발명의 화합물이 있으나 이로 한정되지는 않는다.

선구약물의 추가의 예는 말단 아미노기를 통해 본 발명의 화합물의 카복시기에 결합된 짧은 폴리펩티드, 예를 들어 2 내지 10 아미노산 폴리펩티드일 수 있으나 이로써 제한되지 않으며, 여기서 상기 폴리펩티드는 생체내에서 가수분해 또는 대사되어 활성 분자를 방출시킨다. 화학식 I의 화합물의 선구약물은 본 발명의 범위내에 속한다.

또한, 화학식 I의 화합물은 인간과 같은 유기체의 체내에서 효소에 의해 대사되어 단백질 키나아제의 활성을 조절할 수 있는 대사물을 생성하는 것으로 고려된다. 이러한 대사물은 본 발명의 범위내에 속한다.

본원에서 사용되는 "생리학적으로/약학적으로 허용가능한 담체"는 유기체에 상당한 자극을 야기하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 없애지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다.

"약학적으로 허용가능한 부형제"는 화합물의 투여를 보다 용이하게 하도록 약학 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 부형제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 각종 당 및 전분류, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물유 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

본원에 사용되는 "약학적으로 허용가능한 염"이라는 용어는 모 화합물의 생물학적 효과 및 특성을 보유하는 염을 지칭한다. 이러한 염은 다음을 포함한다:

(1) 모 화합물의 유리 염기와, 염산, 브롬화수소산, 질산, 인산, 황산 및 과염소산 등과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산, 타르타르산, 시트르산, 숙신산 또는 말론산 등과 같은 유기산, 바람직하게는 염산 또는 (L)-말산의 반응에 의해 수득된 산 부가 염, 예컨대 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(2-디에틸아미노에틸)아미드의 L-말레이트 염; 또는

(2) 모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어 알칼리 금속 이온, 알칼리토금속 이온에 의해 치환되거나 또는 유기 염기로 배위될 때 형성되는 염. 상기 이온으로는 통상적인 원자의 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연을 포함한다. 바람직한 유기 염기는 트리메틸아민, 디에틸아민, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민(N-메틸글루카민) 및 프로카인을 일부 포함하는 양자화된 3급 아민 및 4급 암모늄 양이온을 포함한다.

"방법"은 화학, 약학, 생물학, 생화학 및 의학 분야에 공지되어 있거나, 상기 분야의 숙련자들에 의해 공지된 방식, 수단, 기술 및 과정으로부터 용이하게 개발되는 방식, 수단, 기술 및 과정을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 주어진 임무를 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 과정을 지칭한다.

"치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 인간을 포함한 포유류가 그의 징후를 직접적으로 또는 간접적으로 개선시키기 위한 목적으로 의학적인 도움을 받아야 하는 경우의 모든 절차, 행동, 응용, 치유 등을 지칭한다. 특히 암에 대해, 상기 용어는 단순히 암으로 영향을 받는 개개인의 평균 수명을 증가시키거나 상기 질환의 하나 이상의 증상을 감소시키는 것을 의미한다. 이는 무엇보다도 1차 또는 2차 종양의 출현이 지연되고, 1차 또는 2차 종양의 발달이 늦춰지고, 1차 또는 2차 종양의 발생이 감소하고, 질병의 2차 영향의 심각성이 늦춰지거나 감소하고, 종양 성장을 억제시키고, 종양을 퇴화시키는 것을 통해 모니터링할 수 있다.

"예방"이란 용어는 위험한 상태의 개개인에 있어 임상적으로 명백한 신생물의 발현을 전적으로 예방하거나 예비임상적으로 명백한 단계의 신생물의 발현을 예방하는 것을 포함한다. 또한, 상기 정의는 악성 세포에 대한 개시의 예방 또는 전암 세포의 악성 세포로의 진행을 억제시키거나 전환시키는 것을 포함하고자 한다. 이는 신생물 발달의 위험성이 있는 환자의 예방적 처리를 포함한다.

"치유 효과적"이라는 문구는, 다른 요법과 전형적으로 관련된 부작용을 피하면서 각 약물 자체적으로 치료에 대해 신생물 질병 심각성 및 신생물 질병의 빈도의 개선이라는 목표를 달성할 각 약물의 양을 한정시키는 것으로 의도된다.

"치유 효과" 또는 "치유 효과량"은, 1) 암 세포 수를 감소시키는 것; 2) 종양 크기를 감소시키는 것; 3) 말초 기관으로의 암 세포의 침입을 억제시키는 것(즉, 어느 정도 늦추게 하는 것, 바람직하게는 정지시키는 것); 3) 종양의 전이를 억제시키는 것(즉, 어느 정도 늦추게 하는 것, 바람직하게는 정지시키는 것); 4) 종양 성장을 어느 정도 억제시키는 것; 5) 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시키거나 감소시키는 것; 및/또는 6) 항암제의 투여와 관련된 부작용을 경감시키거나 감소시키는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 신생물 질환의 증상 중 하나 이상을 어느 정도 경감시키는데 요구되는 항암제의 양을 한정시키는 것으로 의도된다.

"조합 요법"(또는 "공-요법(co-therapy)")이라는 문구는, 이러한 치료제의 공-작용으로부터 유익한 효과를 제공하도록 의도된 특정 치료 섭생의 일부로서의 단백질 키나아제 억제제 및 사이클로옥시게나아제-2 억제제의 투여를 포함한다. 상기 조합의 유익한 효과는 치료제의 조합으로부터 생성된 약물동태학적 또는 약물동력학적 공-작용을 포함하지만 이에 한정하지는 않는다. 이러한 치료제 조합의 투여는 전형적으로 한정된 기간(선택된 조합에 따라 통상 분, 시간, 일 또는 주)에 걸쳐 투여된다. "조합 요법"은 부수적으로 및 독자적으로 본 발명의 조합을 초래하는 별도의 단일치료 섭생의 일부로서의 2종 이상의 이들 치료제의 투여를 포함하는 것으로 일반적으로 의도된다. "조합 요법"은 이러한 치료제를 연속적인 방식으로 투여하는 것, 즉 각 치료제를 상이한 시간에 투여하는 것뿐 아니라 이들 치료제 또는 치료제 중 2개 이상을 실질적으로 동시적인 방식으로 투여함을 포함하는 것으로 의도된다. 실질적인 동시 투여는, 예컨대 각 치료제를 고정된 비율로 갖는 단일 캡슐 또는 각 치료제에 대한 다중, 단일 캡슐을 환자에 투여함으로써 달성될 수 있다. 각 치료제의 연속적 또는 실질적 동시 투여는 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 경로에 의해 실시될 수 있다. 치료제는 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 선택된 조합물의 제 1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면, 조합물의 다른 치료제는 경구 투여될 수 있다. 다르게는, 예컨대 두 치료제 모두를 경구 투여할 수 있으며 또는 두 치료제 모두를 정맥내 주사에 의해 투여할 수 있다. 치료제를 투여하는 순서는 거의 중요하지 않다. "조합 요법"은 또한 다른 생물학적 활성 성분(예를 들면 제 2 및 기타 항신생물 약물이 있지만 이에 한정되는 것은 아님) 및 비-약물 요법(예를 들면 수술 또는 방사선 치료가 있지만 이에 한정되는 것은 아님)과

추가로 조합하여 전술한 치료제를 투여함을 포함할 수 있다. 조합 요법이 방사선 치료를 추가로 포함하는 경우, 방사선 치료는 치료제와 방사선 치료 조합의 공-작용으로부터 유익한 효과가 달성되는 한 임의의 적합한 시간에 수행될 수 있다. 예를 들면, 적절한 경우, 유익한 효과는 수 일 또는 심지어 몇 주가 되는 치료제의 투여 중간에 방사선 치료를 일시적으로 없애는 경우에도 달성될 수 있다.

"부가 요법"은, 예컨대 항암 약물의 독성 영향을 감소시키는 약물(예: 골재흡수 억제제, 심장보호제), 화학요법, 방사선요법 또는 수술과 관련된 메스꺼움 및 구토 발생을 예방하거나 감소시키는 약물, 또는 골수억제성 항암 약물의 투여와 관련된 감염의 발생을 감소시키는 약물을 포함하지만 이에 한정되지 않는 본 발명의 조합 요법과 관련된 부작용을 감소시키거나 없애는 약물로 환자를 치료함을 포함한다.

바람직한 실시양태

광범위한 정의가 상기 발명의 요약에 개시되어 있지만, 하기 화학식 I, II 및 III의 특정 화합물은 본 발명을 수행하는데 바람직하다.

A. 단백질 티로신 키나아제 억제제 - 화학식 I의 화합물

- (1) 화학식 I의 화합물의 바람직한 그룹은 R^1 , R^3 및 R^4 가 수소인 것이다.
- (2) 화학식 I의 화합물의 또다른 바람직한 그룹은 R^1 , R^2 및 R^4 가 수소인 것이다.
- (3) 화학식 I의 화합물의 또다른 바람직한 그룹은 R^1 , R^2 및 R^3 이 수소인 것이다.
- (4) 화학식 I의 화합물의 또다른 바람직한 그룹은 R^2 , R^3 및 R^4 가 수소인 것이다.
- (5) 화학식 I의 화합물의 또다른 바람직한 그룹은 R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 가 수소인 것이다.
- (6) 화학식 I의 화합물의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^5 , R^6 또는 R^7 , 바람직하게는 R^5 또는 R^6 , 더욱 바람직하게는 R^6 이 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서, R^{10} 은 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서, R^{11} 은 수소 또는 저급 알킬, 바람직하게는 수소 또는 메틸이고; n 은 2, 3 또는 4, 바람직하게는 2 또는 3이고; R^{12} 는 $-NR^{13}R^{14}$ 이며, 여기서 R^{13} 및 R^{14} 는 독립적으로 알킬, 더욱 바람직하게는 저급 알킬이거나, R^{13} 및 R^{14} 는 결합하여 $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 또는 $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ 로부터 선택된 그룹을 형성하고, 바람직하게는 R^{13} 및 R^{14} 는 독립적으로 수소, 메틸, 에틸이거나 또는 결합하여 모르폴린-4-일, 피롤리딘-1-일, 피페라진-1-일 또는 4-메틸피페라진-1-일을 형성한다]인 것이다.
- 더욱 바람직하게는, 상기 (6)에서의 R^5 또는 R^6 은 N-(2-디메틸아미노에틸)아미노카보닐, N-(2-에틸아미노에틸)-N-메틸아미노카보닐, N-(3-디메틸아미노프로필)-아미노카보닐, N-(2-디에틸아미노에틸)아미노카보닐, N-(3-에틸아미노프로필)아미노카보닐, N-(3-디에틸아미노프로필)아미노카보닐, 3-피롤리딘-1-일-프로필아미노카보닐, 3-모르폴린-4-일프로필-아미노카보닐, 2-피롤리딘-1-일에틸아미노카보닐, 2-모르폴린-4-일에틸아미노카보닐, 2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸아미노카보닐, 2-(4-메틸피페라진-1-일)프로필아미노카보닐, 2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)에틸아미노카보닐 또는 2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)프로필아미노카보닐, 더더욱 바람직하게는 N-(2-디에틸-아미노에틸)아미노카보닐 또는 N-(2-에틸아미노에틸)아미노-카보닐이다.
- (7) 화학식 I의 화합물의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^5 , R^6 또는 R^7 , 바람직하게는 R^5 또는 R^6 , 더욱 바람직하게는 R^6 이 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서 R^{10} 이 $-NR^{13}R^{14}$ [여기서, R^{13} 은 수소이고; R^{14} 는 알킬, 바람직하게는 하이드록시로 치환된 저급 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로알리사이클릭 또는 카복시, 더욱 바람직하게는 하이드록시로 치환된 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸, 아릴, 헤테로알리사이클릭 (예: 피페리딘, 피페라진, 모르폴린 등), 헤테로아릴, 또는 카복시이다]인 것이다. 더더욱 바람직하게는 이러한 그룹(7)의 R^5 또는 R^7 은 2-에톡시카보닐메틸-아미노카보닐, 카복시메틸아미노-카보닐, 3-하

이드록시프로필-아미노카보닐, 2-하이드록시에틸아미노카보닐, 3-트리아진-1-일프로필아미노-카보닐, 트리아진-1-일에틸아미노카보닐, 4-하이드록시-페닐에틸아미노카보닐, 3-이미다졸-1-일프로필-아미노카보닐, 피리딘-4-일메틸아미노카보닐, 2-피리딘-2-일에틸아미노카보닐 또는 2-이미다졸-1-일에틸아미노카보닐이다.

(8) 화학식 I의 화합물의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^5 , R^6 또는 R^7 , 바람직하게는 R^5 또는 R^6 , 더욱 바람직하게는 R^6 이 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서 R^{10} 이 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서, R^{11} 은 수소 또는 알킬, 바람직하게는 수소 또는 메틸이고; n 은 2, 3 또는 4, 바람직하게는 2 또는 3이고; R^{12} 는 $-R^{13}R^{14}$ 이며, 여기서 R^{13} 및 R^{14} 는 함께 결합하여 헤테로사이클, 바람직하게는 카보닐 그룹 및 1 또는 2개의 질소 원자를 함유하는 5, 6 또는 7원 헤테로사이클을 형성한다]인 것이다. 바람직하게는, R^5 또는 R^6 은 2-(3-에톡시카보닐메틸피페라진-1-일)에틸아미노카보닐, 2-(3-옥소피페라진-1-일)에틸아미노카보닐, 2-(이미다졸리딘-1-일-2-온)에틸아미노카보닐, 2-(테트라하이드로피리미딘-1-일-2-온)에틸아미노카보닐, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)-에틸아미노카보닐, 3-(4-메틸피페라진-1-일)프로필아미노카보닐, 3-(3-에톡시카보닐메틸피페라진-1-일)-프로필아미노카보닐, 3-(3-옥소피페라진-1-일)프로필-아미노카보닐, 3-(이미다졸리딘-1-일-2-온)프로필-아미노카보닐, 3-(테트라하이드로피리미딘-1-일-2-온)-프로필아미노카보닐, 3-(2-옥소피롤리딘-1-일)프로필-아미노카보닐, 2-(2-옥소호모피페리딘-1-일)에틸아미노-카보닐 또는 3-(2-옥소호모피페리딘-1-일)프로필아미노카보닐이다.

(9) 화학식 I의 화합물의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^5 , R^6 또는 R^7 , 바람직하게는 R^5 또는 R^6 , 더욱 바람직하게는 R^6 이 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서, (a) R^{10} 은 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서, R^{11} 은 수소 또는 알킬, 바람직하게는 수소 또는 메틸이고; n 은 2, 3 또는 4, 바람직하게는 2 또는 3이고; R^{12} 는 $-NR^{13}R^{14}$ 이며, 여기서 R^{13} 은 수소이고 R^{14} 는 시아노알킬 또는 $-NHCOR^a$ (R^a 는 알킬이다)이다]이거나, 또는 (b) R^{10} 은 $-NR^{13}R^{14}$ [여기서, R^{13} 및 R^{14} 는 서로 결합하여 고리내 카보닐 그룹을 함유하지 않는 헤테로사이클을 형성한다]인 것이다. 바람직하게는, R^5 또는 R^6 은 2-(2-시아노에틸아미노)에틸아미노카보닐, 2-(아세틸아미노)-에틸아미노카보닐, 모르폴리노카보닐, 피페리딘-1-일-카보닐, 2-시아노메틸아미노에틸아미노카보닐 또는 피페리딘-1-일카보닐이다.

(10) 화학식 I의 화합물의 또다른 바람직한 그룹은 R^5 가 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서, R^{10} 은 $-NR^{13}R^{14}$ [여기서, R^{13} 은 수소이고 R^{14} 는 하이드록시로 치환된 저급 알킬, 하이드록시알킬아미노로 치환된 저급 알킬, 카복시, 또는 $-NR^{18}R^{19}$ (여기서, R^{18} 및 R^{19} 는 독립적으로 수소 또는 저급 알킬이다)이고, 더욱 바람직하게는 R^5 는 2-[(디에틸아미노)-2-하이드록시에틸]아미노카보닐, 2-(N-에틸-N-2-하이드록시에틸아미노)에틸아미노카보닐, 카복시메틸아미노-카보닐 또는 2-(2-하이드록시에틸아미노)에틸아미노-카보닐인 것이다.

(11) 화학식 I의 화합물의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^6 이 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서, R^{10} 은 $-NR^{13}R^{14}$ [여기서, R^{13} 은 수소이고, R^{14} 는 하이드록시로 치환된 저급 알킬, 하이드록시알킬아미노로 치환된 저급 알킬, 카복시, 또는 $-NR^{18}R^{19}$ (여기서, R^{18} 및 R^{19} 는 독립적으로 수소 또는 저급 알킬이다)이며, 더욱 바람직하게는 R^6 이 [2-(디에틸아미노)-2-하이드록시]에틸아미노카보닐, 2-(N-에틸-N-2-하이드록시에틸-아미노)에틸아미노카보닐, 카복시메틸아미노카보닐 또는 2-(2-하이드록시에틸아미노)에틸아미노-카보닐인 것이다.

(12) 화학식 I의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^5 가 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서, R^{10} 은 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서, R^{12} 는 $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ 또는 $-N(OH)R^{13}$ 이며, 이때 R^{13} 및 R^{14} 는 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다]이며, 더욱 바람직하게는 R^5 는 2-(N-하이드록시-N-에틸아미노)-에틸아미노카보닐 또는 2- $[N^+(O^-)(C_2H_5)_2]$ 에틸-아미노카보닐인 것이다.

(13) 화학식 I의 추가의 또다른 바람직한 그룹은 R^6 이 $-COR^{10}$ 이며, 상기에서, R^{10} 은 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서, R^{12} 는 $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$ 또는 $-N(OH)R^{13}$ (여기서, R^{13} 및 R^{14} 는 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다)이며, 바람직하게는 R^6 은 2-(N-하이드록시-N-에틸아미노)에틸아미노카보닐 또는 2- $[N^+(O^-)(C_2H_5)_2]$ 에틸-아미노카보닐인 것이다.

(14) R^5 가 $-COR^{10}$ 인 상기 바람직한 그룹 (6) 내지 (13)에서, 화합물의 더욱 바람직한 그룹은,

R^6 이 수소 및 알킬, 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 또는 n-부틸, 더욱 바람직하게는 수소 또는 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 이 수소, 알킬, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{17}$ [여기서, R^{17} 은 하이드록시, 알킬 또는 아릴이다], 더욱 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, n-, 이소-, tert-부틸, 페닐, 벤조일, 아세틸 또는 카복시, 더더욱 바람직하게는 메틸, 수소 또는 페닐로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

(15) R^5 가 $-COR^{10}$ 인 상기 바람직한 그룹 (6) 내지 (13)에서, 화합물의 또다른 더욱 바람직한 그룹은, R^6 및 R^7 이 결합하여 $-(CH_2)_4-$ 를 형성하는 것이다.

(16) R^6 이 $-COR^{10}$ 인 상기 바람직한 그룹 (6) 내지 (13)에서, 화합물의 더욱 바람직한 그룹은,

R^5 가 수소 및 알킬, 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 또는 n-부틸, 더욱 바람직하게는 수소 또는 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 이 수소, 알킬, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{17}$ [여기서, R^{17} 은 하이드록시, 알킬 또는 아릴이다], 더욱 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, n-, 이소-, tert-부틸, 페닐, 벤조일, 아세틸 또는 카복시, 더더욱 바람직하게는 메틸, 수소 또는 페닐로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

(17) 상기 바람직한 및 더욱 바람직한 그룹 (6) 내지 (16)에서, 화합물의 더더욱 바람직한 그룹은,

R^1 이 수소, 알킬, $-C(O)NR^8R^9$, 사이클로알킬 또는 아릴, 바람직하게는 수소, 페닐, 3,4-디메톡시페닐아미노카보닐, 4-메톡시-3-클로로페닐-아미노카보닐, 더더욱 바람직하게는 수소 또는 메틸, 가장 바람직하게는 수소이고;

R^2 가 시아노, 수소, 할로, 저급 알콕시, 아릴 또는 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ [여기서, R^{13} 은 수소이고, R^{14} 는 수소, 아릴 또는 알킬이다]이고, 바람직하게는 R^2 가 수소, 클로로, 브로모, 플루오로, 메톡시, 에톡시, 페닐, 디메틸아미노설포닐, 3-클로로페닐-아미노설포닐, 카복시, 메톡시, 아미노설포닐, 메틸아미노설포닐, 페닐아미노설포닐, 피리딘-3-일-아미노설포닐, 디메틸아미노설포닐, 이소프로필아미노-설포닐, 더욱 바람직하게는 수소, 플루오로 또는 브로모이고;

R^3 이 수소, 저급 알콕시, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, 아릴, 바람직하게는 저급 알킬, 할로 또는 저급 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된 아릴, 및 헤테로아릴, 바람직하게는 저급 알킬, 할로 또는 저급 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된 헤테로아릴이고; 바람직하게는 수소, 메톡시, 카복시, 페닐, 피리딘-3-일, 3,4-디클로로페닐, 2-메톡시-5-이소프로필페닐, 4-n-부틸페닐, 3-이소프로필페닐, 더욱 바람직하게는 수소 또는 페닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^4 가 수소인 것이다.

(18) 화학식 I의 또다른 더욱 바람직한 그룹은,

R^1 이 수소, 알킬, $-C(O)NR^8R^9$, 사이클로알킬 또는 아릴, 바람직하게는 수소, 3,4-디메톡시페닐아미노카보닐, 4-메톡시-3-클로로페닐아미노카보닐, 더더욱 바람직하게는 수소 또는 메틸, 특히 수소이고;

R^2 가 시아노, 수소, 할로, 저급 알콕시, 아릴 또는 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ [여기서, R^{13} 은 수소이고, R^{14} 는 수소, 아릴 또는 알킬이다]이고, 바람직하게는 R^2 가 수소, 클로로, 브로모, 플루오로, 메톡시, 에톡시, 페닐, 디메틸아미노설포닐, 3-클로로페닐-아미노설포닐, 카복시, 메톡시, 아미노설포닐, 메틸아미노설포닐, 페닐아미노설포닐, 피리딘-3-일-아미노설포닐, 디메틸아미노설포닐, 이소프로필아미노-설포닐, 더욱 바람직하게는 수소, 플루오로 또는 브로모이고;

R^3 이 수소, 저급 알콕시, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, 아릴, 바람직하게는 저급 알킬, 할로 또는 저급 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된 아릴, 및 헤테로아릴, 바람직하게는 저급 알킬, 할로 또는 저급 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 2개의 치환기로 선택적으로 치환된 헤테로아릴이고; 바람직하게는 수소, 메톡시, 카복시, 페닐, 피리딘-3-일, 3,4-디클로로페닐, 2-메톡시-5-이소프로필페닐, 4-n-부틸페닐, 3-이소프로필페닐, 더욱 바람직하게는 수소 또는 페닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^4 가 수소인 것이다.

상기 바람직한 그룹 (18)에서, 화합물의 더욱 바람직한 그룹은,

R^5 가 $-COR^{10}$ (여기서, R^{10} 은 상기 발명의 요약에 정의된 바와 같다), 바람직하게는 상기 발명의 요약에 정의된 바와 같은 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ 또는 $-NR^{13}R^{14}$ 이고;

R^6 이 수소 및 알킬, 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 또는 n-부틸, 더욱 바람직하게는 수소 또는 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 이 수소, 알킬, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{17}$ [여기서, R^{17} 은 하이드록시, 알킬 또는 아릴, 더욱 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, n-, 이소 또는 tert-부틸, 페닐, 벤조일, 아세틸 또는 카복시, 더더욱 바람직하게는 메틸, 수소 또는 페닐이다]로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

상기 바람직한 그룹 (18)에서, 화합물의 더욱 바람직한 그룹은

R^6 이 $-COR^{10}$ (여기서, R^{10} 은 상기 발명의 요약에 정의된 바와 같다), 바람직하게는 상기 발명의 요약에 정의된 바와 같은 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ 또는 $-NR^{13}R^{14}$ 이고;

R^5 는 수소 및 알킬, 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 또는 n-부틸, 더욱 바람직하게는 수소 또는 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 은 수소, 알킬, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{17}$ [여기서, R^{17} 은 하이드록시, 알킬 또는 아릴, 더욱 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 이소프로필, n-, 이소 또는 tert-부틸, 페닐, 벤조일, 아세틸 또는 카복시, 더더욱 바람직하게는 메틸, 수소 또는 페닐이다]로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

(19) 상기 화학식 I의 또다른 더욱 바람직한 그룹은

R^1 및 R^4 가 수소이고;

R^2 가 수소, 할로, 저급 알콕시, $-C(O)R^{15}$ 및 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3 이 수소, 저급 알콕시, $-C(O)R^{15}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^5 가 $-C(O)R^{10}$ 이고;

R^6 이 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 이 수소, 저급 알킬 및 $-C(O)R^{17}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.

상기 (15)에 기재된 바와 같은 구조를 갖는 화합물에서, R^{10} 이 하이드록시, 저급 알콕시 및 $NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서 n 은 2 또는 3이고; R^{11} 은 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^{12} 는 아릴 및 $-NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된다]로 이루어진 군으로부터 선택된 것은 본 발명의 또다른 현재 바람직한 실시양태이다.

이전의 두 문단에 기재된 구조를 갖는 화합물에서, R^{13} 및 R^{14} 가 수소, 저급 알킬 및 조합된 $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ 또는 $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 것은 본 발명의 추가의 현재 바람직한 실시양태이다.

(20) 본 발명의 또다른 현재 바람직한 실시양태는,

R^1 이 수소, 저급 알킬, $-(CH_2)_rR^{16}$ 및 $-C(O)NR^8R^9$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 가 수소, 할로젠, 아릴 및 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3 이 수소, 저급 알킬, 저급 알콕시, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^4 가 수소이고;

R^5 가 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 이 $-C(O)R^{10}$ 이고;

R^7 이 수소, 저급 알킬 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{16} 이 하이드록시 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

r 이 2 또는 3인 화합물이다.

본 발명의 현재 바람직한 실시양태는 R^3 이 저급 알킬, 저급 알콕시 및 할로로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 그룹으로 선택적으로 치환되는 바로 이전의 문단에 기재된 구조를 갖는 화합물이다.

(21) 또한, 본 발명의 현재 바람직한 실시양태는,

R^1 이 수소, 저급 알킬, $-(CH_2)_rR^{16}$ 및 $-C(O)NR^8R^9$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 가 수소, 할로젠, 아릴 및 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3 이 수소, 저급 알킬, 저급 알콕시, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^4 가 수소이고;

R^5 가 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 이 $-C(O)R^{10}$ 이고;

R^7 이 수소, 저급 알킬 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{16} 이 하이드록시 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

r 이 2 또는 3이고;

R^{10} 이 하이드록시, 저급 알콕시, $-NR^{13}R^{14}$ 및 $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ [여기서, n 은 1, 2 또는 3이고, R^{11} 은 수소이고, R^{12} 는 하이드록시, 저급 알콕시, $-C(O)R^{15}$, 헤테로아릴 및 $-NR^{13}R^{14}$ 이다]인 화합물이다.

(22) 본 발명의 추가의 현재 바람직한 실시양태는 R^{13} 및 R^{14} 가 수소, 저급 알킬, 헤테로아릴 및 조합된 $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ 또는 $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 바로 이전의 문단에 기재된 구조를 갖는 화합물이다.

(23) 본 발명의 또다른 현재 바람직한 실시양태는,

R^1 이 $-C(O)NR^8R^9$ [여기서, R^8 은 수소이고, R^9 는 할로, 하이드록시 및 저급 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 그룹으로 선택적으로 치환된 아릴이다]이고;

R^2 가 수소, 할로젠, 아릴 및 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3 이 수소, 저급 알킬, 저급 알콕시, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^4 가 수소이고;

R^5 가 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 이 $-C(O)R^{10}$ 이고;

R^7 이 수소, 저급 알킬 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{16} 이 하이드록시 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

r 이 2 또는 3인 화합물이다.

(24) 본 발명의 또다른 추가의 현재 바람직한 실시양태는,

R^1 이 수소 및 저급 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 가 수소, 할로, 저급 알콕시, 아릴, $-C(O)R^{15}$ 및 $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3 이 수소, 할로, 아릴, 헤테로아릴 및 $-C(O)R^{15}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^4 가 수소이고;

R^5 가 $-C(O)R^{10}$ 이고;

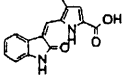
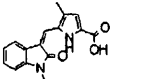
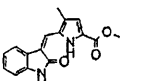
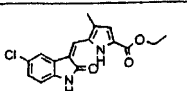
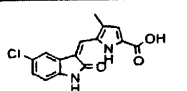
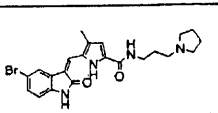
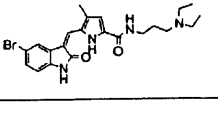
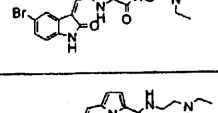
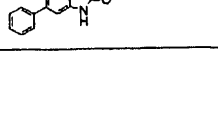
R⁶ 및 R⁷이 결합하여 -(CH₂)₄- 그룹을 형성하는 화합물이다.

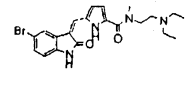
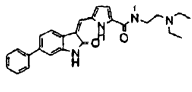
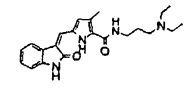
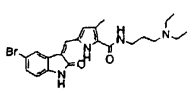
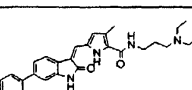
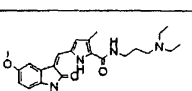
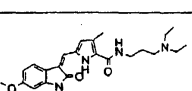
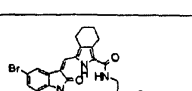
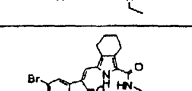
바로 이전의 문단에 기재된 바와 같은 구조를 갖는 화합물에서, R¹⁰이 하이드록시, 알콕시, -NR¹³R¹⁴ 및 -NH(CH₂)_nNR¹³R¹⁴ [여기서, n은 2 또는 3이다]으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 현재 바람직한 실시양태이다.

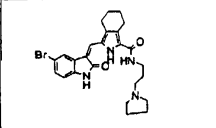
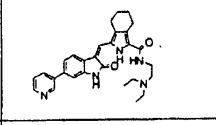
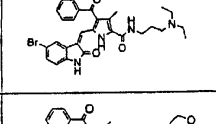
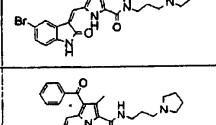
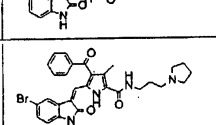
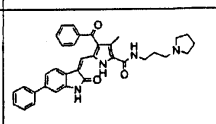
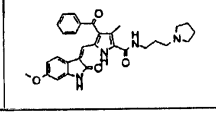
바로 이전의 두 문단에 기재된 바와 같은 구조를 갖는 화합물에서, R¹³ 및 R¹⁴가 수소, 저급 알킬, 및 조합된 -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅-, -(CH₂)₂O(CH₂)₂- 또는 -(CH₂)₂N(CH₃)(CH₂)₂-로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것이 본 발명의 현재 바람직한 실시양태이다.

화학식 I의 대표적인 화합물은 하기 표 I에 제시되어 있다.

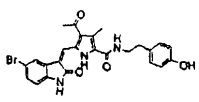
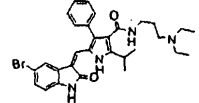
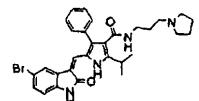
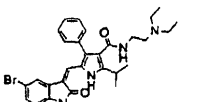
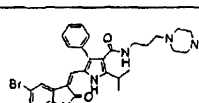
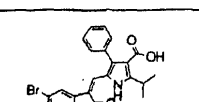
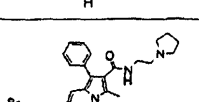
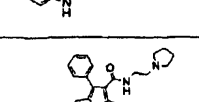
[표 I]

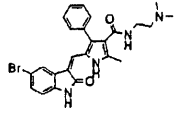
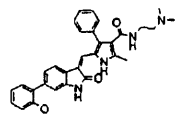
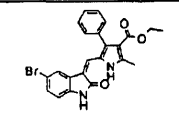
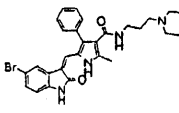
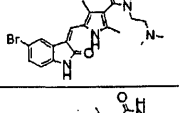
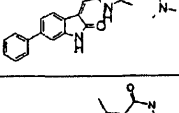
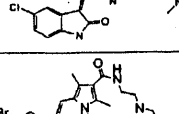
예	구조	명칭
1		4-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산
2		4-메틸-5-(1-메틸-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산
3		4-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 메틸 에스테르
4		5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 메틸 에스테르
5		(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산
6		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
7		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
8		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
9		5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

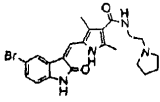
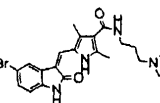
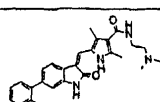
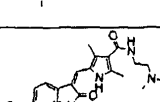
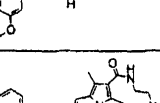
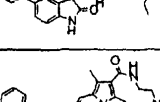
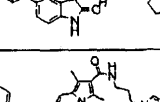
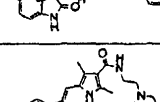
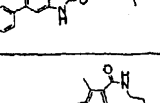
10		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)메틸아미드
11		5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)메틸아미드
12		3-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
13		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
14		3-메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
15		5-(5-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
16		5-(6-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
17		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
18		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

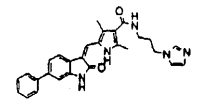
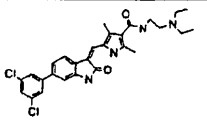
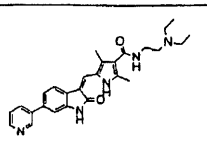
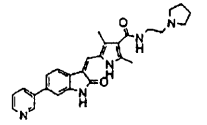
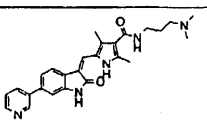
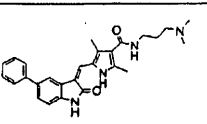
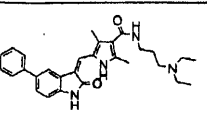
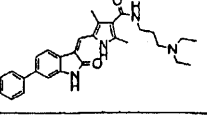
19		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
20		3-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
21		4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
22		4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-모르폴린-4-일프로필)아미드
23		4-벤조일-3-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
24		4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
25		4-벤조일-3-메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
26		4-벤조일-5-(6-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

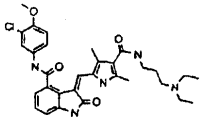
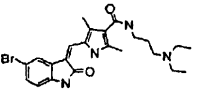
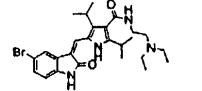
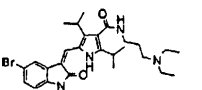
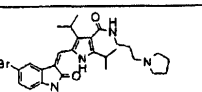
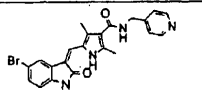
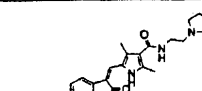
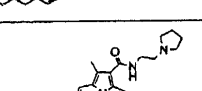
27		4-벤조일-5-(5-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
28		4-벤조일-5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
29		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
30		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
31		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-모르폴린-4-일프로필)아미드
32		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-하이드록시-프로필)아미드
33		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-하이드록시-에틸)아미드
34		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-모르폴린-4-일-에틸)아미드
35		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로 인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드

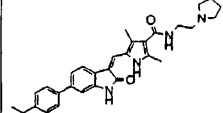
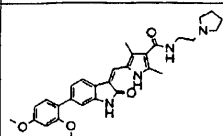
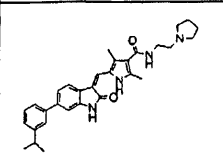
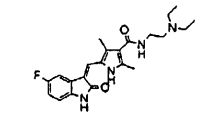
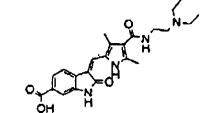
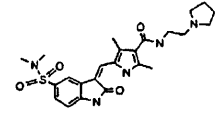
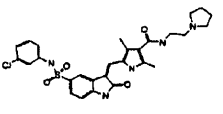
36		4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 [2-(4-하이드록시-페닐)-에틸]아미드
37		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
38		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
39		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
40		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 [3-(4-메틸-피페라진-1-일)-프로필]아미드
41		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산
42		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
43		5-[6-(2-메톡시-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드

44		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
45		5-[6-(2-메톡시-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
46		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르
47		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
48		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
49		2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
50		5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
51		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

52		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
53		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드
54		5-[6-(2-메톡시-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
55		5-[6-(3-메톡시-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
56		2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
57		2,4-디메틸-5-(2-옥소-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
58		2,4-디메틸-5-(2-옥소-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드
59		2,4-디메틸-5-(2-옥소-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
60		2,4-디메틸-5-(2-옥소-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드

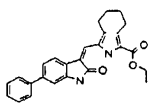
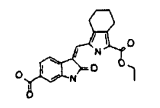
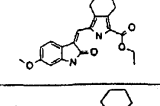
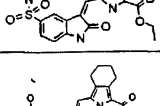
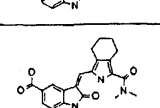
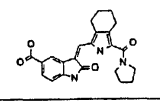
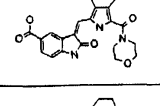
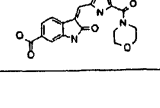
61		2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드
62		5-[6-(3,5-디클로로-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
63		2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
64		2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
65		2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디메틸아미노-프로필)아미드
66		2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디메틸아미노-프로필)아미드
67		2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
68		2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

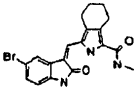
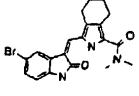
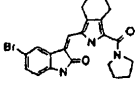
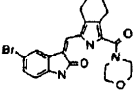
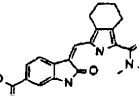
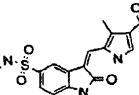
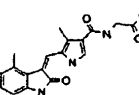
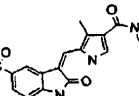
69		3-[4-(3-디에틸아미노-프로필카바모일)-3,5-디메틸-1H-피롤-2-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-4-카복실산 (3-클로로-4-메톡시-페닐)아미드
70		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
71		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
72		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드
73		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드
74		5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (피리딘-4-일메틸)아미드
75		5-[6-(4-부틸-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
76		5-[6-(5-이소프로필-2-메톡시-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드

77		5-[6-(4-에틸-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
78		5-[6-(2,4-디메톡시-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
79		5-[6-(3-이소프로필-페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
80		5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
81		3-[4-(2-디에틸아미노에틸카바모일)-3,5-디메틸-1H-피롤-2-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산
82		5-(5-디메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
83		5-[5-(3-클로로-페닐설파모일)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드

84		2,4-디메틸-5-[2-옥소-5-(피리딘-3-일설파모일)-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드
85		3-[3,5-디메틸-4-(4-메틸-피페라진-1-카보닐)-1H-피롤-2-일메틸렌]-4-(2-하이드록시-에틸)-1,3-디하이드로인돌-2-온
86		3-[3,5-디메틸-4-(4-메틸-피페라진-1-카보닐)-1H-피롤-2-일메틸렌]-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설폰산 페닐아미드
87		5-(5-디메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
88		5-[5-(3-클로로-페닐설파모일)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드
89		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드
90		3-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
91		3-(4-메틸-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르

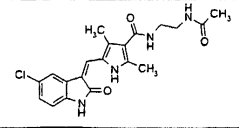
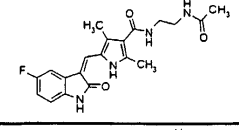
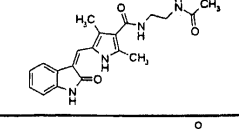
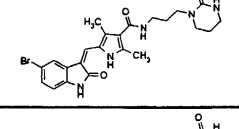
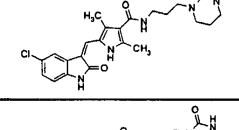
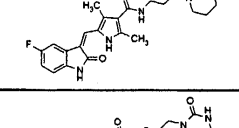
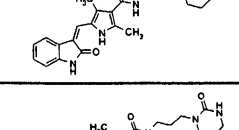
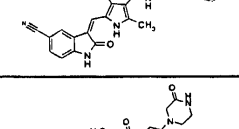
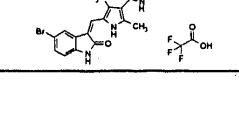
92		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
93		3-[3-에톡시카보닐-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-카복실산
94		3-(5-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
95		3-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
96		3-(2-옥소-5-설파모일-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
97		3-(5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
98		3-(5-디메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
99		3-(2-옥소-5-페닐설파모일-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
100		3-(6-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에스테르

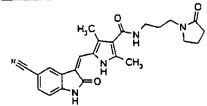
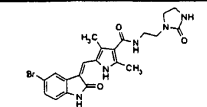
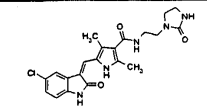
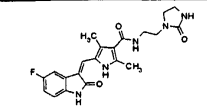
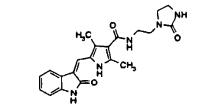
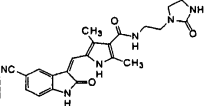
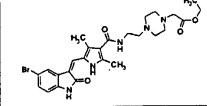
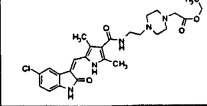
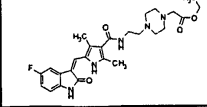
101		3-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
102		3-(3-에톡시카보닐-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌)-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산
103		3-(6-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
104		3-(5-이소프로필설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르
105		3-(3-메틸카바모일-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌)-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-카복실산
106		3-(3-디메틸카바모일-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌)-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-카복실산
107		2-옥소-3-[3-(피롤리딘-1-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-카복실산
108		3-[3-(모르폴린-4-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-카복실산
109		3-[3-(모르폴린-4-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산

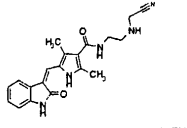
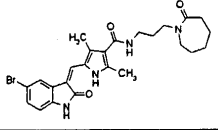
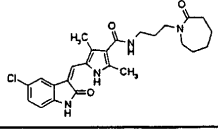
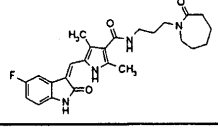
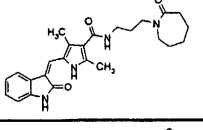
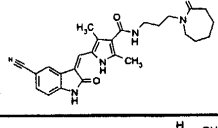
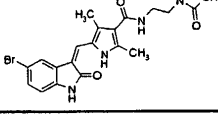
110		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 메틸아미드
111		3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 디메틸아미드
112		5-브로모-3-[3-(피롤리딘-1-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-1,3-디하이드로-인돌-2-온
113		5-브로모-3-[3-(모르폴린-4-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-1,3-디하이드로-인돌-2-온
114		3-(3-디메틸카바모일-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌)-2-2옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산
115		4-메틸-5-(5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산
116		{[4-메틸-5-(4-메틸-5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카보닐]-아미드}-아세트산 에틸 에스테르
117		{[4-메틸-5-(5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카보닐]-아미노}-아세트산 에틸 에스테르

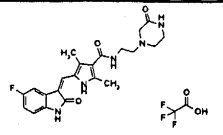
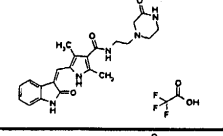
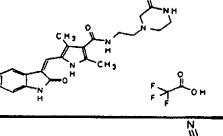
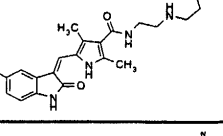
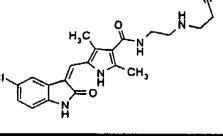
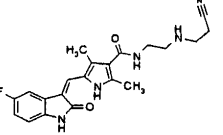
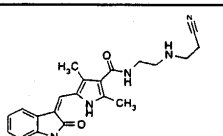
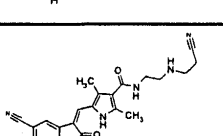
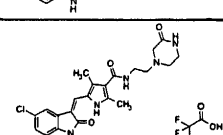
118		{[4-메틸-5-(5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카보닐]-아미노}-아세트산
119		3-[3-메틸-4-(피페리딘-1-카보닐)-1H-피롤-2-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설폰산 메틸아미드
120		5-메틸-2-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산
121		5-메틸-2-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르
122		2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르
123		2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-메틸-1H-피롤-3-카복실산
124		2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드
125		2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드

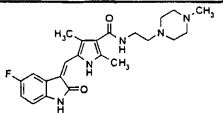
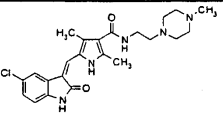
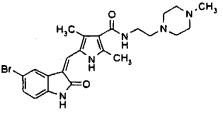
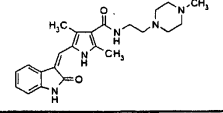
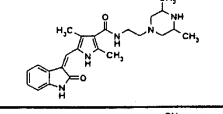
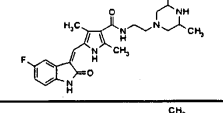
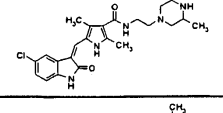
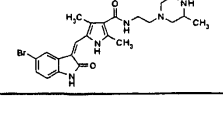
126		2,4-디하이드로-5-[2-옥소-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)-아미드	381 [M+1]
127		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)-아미드	415 [M+1]
128		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드	379 [M+1]
129		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드	397 [M+1]
130		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드	413 [M+1]
131		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)-아미드	353 [M+1]
132		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)-아미드	371 [M+1]

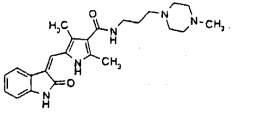
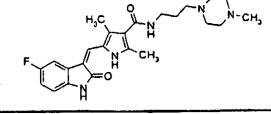
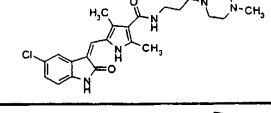
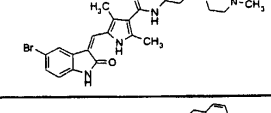
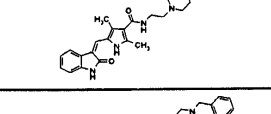
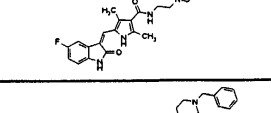
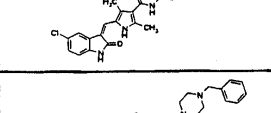
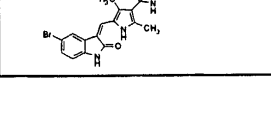
133		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-아세틸아미노-에틸)-아미드	399 [M-1]
134		5-[5-(플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-아세틸아미노-에틸)-아미드	383 [M-1]
135		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-아세틸아미노-에틸)-아미드	365 [M-1]
136		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-테트라하이드로-피리미딘-1-일)-프로필]-아미드	500 [M+1] 502 [M+1]
137		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-테트라하이드로피리미딘-1-일)-프로필]-아미드	454 [M-1]
138		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-테트라하이드로-피리미딘-1-일)-프로필]-아미드	438 [M-1]
139		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-테트라하이드로-피리미딘-1-일)-프로필]-아미드	422 [M+1]
140		5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-테트라하이드로-피리미딘-1-일)-프로필]-아미드	447 [M+1]
141		트리플루오로-아세트이트 4-[2-((5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카보닐)-아미노)-에틸]-2-옥소-피페라진-1-이음;	486 [M+1] 488 [M+1]

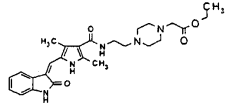
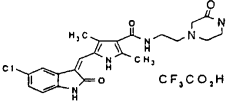
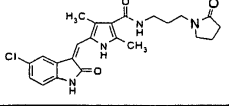
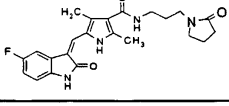
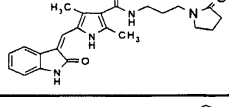
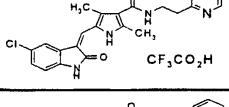
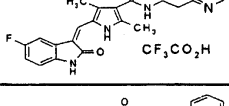
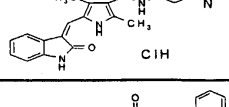
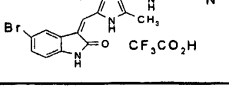
142		5-[5-시아노-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [3-(2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-1-일)- 프로필]-아미드	430 [M-1]
143		5-[5-브로모-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-1-일)- 에틸]-아미드	470 [M-1] 472 [M-1]
144		5-[5-클로로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-1-일)- 에틸]-아미드	428 [M+1]
145		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-1-일)- 에틸]-아미드	412 [M+1]
146		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2- (2-옥소-1,2-디하이드로-인돌- 1-일)-에틸]-아미드	392 [M-1]
147		5-[5-시아노-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-1-일)- 에틸]-아미드	419 [M+1]
148		{4-[2-((5-브로모-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카보닐)-아미노)-에틸]-피페라 진-1-일}-아세트산 에틸 에스테르	558 [M+1] 560 [M+1]
149		{4-[2-((5-클로로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카보닐)-아미노)-에틸]-피페라 진-1-일}-아세트산 에틸 에스테르	514 [M+1]
150		{4-[2-((5-플루오로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카보닐)-아미노)-에틸]-피페라 진-1-일}-아세트산 에틸 에스테르	498 [M+1]

153		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2-(시아노메틸-아미노)-에틸]-아미드	362 [M-1]
154		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-아제판-1-일)-프로필]-아미드	511 [M-1] 513 [M-1]
155		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-아제판-1-일)-프로필]-아미드	469 [M+1]
156		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-아제판-1-일)-프로필]-아미드	453 [M+1]
157		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-아제판-1-일)-프로필]-아미드	435 [M+1]
158		5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [3-(2-옥소-아제판-1-일)-프로필]-아미드	460 [M+1]
159		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-아세틸아미노-에틸)-아미드	443 [M-1] 445 [M-1]

160		트리플루오로-아세테이트 4-[2-({5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카보닐}-아미노)-에틸]-2-옥소-피페라진-1-이움	426 [M+1]
161		트리플루오로-아세테이트 4-[2-({2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카보닐}-아미노)-에틸]-2-옥소-피페라진-1-이움	408 [M+1]
162		트리플루오로-아세테이트 4-[2-({5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카보닐}-아미노)-에틸]-2-옥소-피페라진-1-이움	433 [M+1]
163		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(2-시아노-에틸아미노)-에틸]-아미드	454 [M-1] 456 [M-1]
164		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(2-시아노-에틸아미노)-에틸]-아미드	410 [M-1]
165		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(2-시아노-에틸아미노)-에틸]-아미드	394 [M-1]
166		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2-(2-시아노-에틸아미노)-에틸]-아미드	376 [M-1]
167		5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(2-시아노-에틸아미노)-에틸]-아미드	401 [M-1]
168		트리플루오로-아세테이트 4-[2-({5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카보닐}-아미노)-에틸]-2-옥소-피페라진-1-이움	440 [M-1]

168		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(4-메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	424 [M-1]
169		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(4-메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	440 [M-1]
170		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(4-메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	484 [M-1] 486 [M-1]
171		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2-(4-메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	406 [M-1]
172		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	422 [M+1]
173		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	438 [M-1]
174		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	456 [M+1]
175		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸-피페라진-1-일)-에틸]-아미드	498 [M-1] 500 [M-1]

176		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸] -1H-피롤-3-카복실산 [3-(4-메틸- 피페라진-1-일)-프로필]-아미드	422 [M+1]
177		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [3-(4-메틸-피페라진-1- 일)-프로필]-아미드	438 [M-1]
178		5-[5-클로로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [3-(4-메틸-피페라진-1- 일)-프로필]-아미드	454 [M-1]
179		5-[5-브로모-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [3-(4-메틸-피페라진-1- 일)-프로필]-아미드	498 [M-1] 500 [M-1]
180		2,4-디메틸-5-[2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2-(4- 벤질-피페라진-1-일)-에틸]- 아미드	482 [M-1]
181		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(4-벤질-피페라진-1- 일)-에틸]-아미드	500 [M-1]
182		5-[5-클로로-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(4-벤질-피페라진-1- 일)-에틸]-아미드	517 [M-1]
183		5-[5-브로모-2-옥소-1,2- 디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴 메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(4-벤질-피페라진-1- 일)-에틸]-아미드	560 [M-1] 562 [M-1]

184		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-2-온)-아미드	480 [M+1]
185		트리플루오로아세트이트 4-[2-{[5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카보닐}아미노)-에틸-2-옥소-피페라진-1-이움	440 [M-1]
186		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-2-온)-아미드	
187		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-2-온)-아미드	
188		5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-2-온)-아미드	
189		5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피리딘-2-일메틸)-아미드	
190		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피리딘-2-일메틸)-아미드 트리플루오로아세트이트 염	
191		5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피리딘-2-일메틸)-아미드 하이드로클로라이드 염	
192		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피리딘-2-일메틸)-아미드 트리플루오로아세트이트 염	

193		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-에틸아미노에틸)-아미드
194		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-아미노에틸)-아미드
195		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸-N-옥소아미노에틸)-아미드
196		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-에틸-N-하이드록시-아미노에틸)-아미드
197		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-2-하이드록시에틸)-아미드
198		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-에틸-2-(2-하이드록시에틸)아미노에틸]-아미드
199		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-에틸-2-(1-하이드록시에틸)아미노에틸]-아미드
200		5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-N-아세틸아미노에틸)-아미드
201		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (카복시메틸)-아미드

202		5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 [2-(2-하이드록시에틸아미노)에틸]-아미드
203		5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-피리딘-2-일에틸)-아미드 트리플루오로아세테이트
204		5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-2-온프로필)-아미드 트리플루오로아세테이트
205		3-(3,5-디메틸피롤-2-일메틸리덴)-1-(4-메틸피페리딘-1-일메틸)-2-인돌리논
206		3-(3,5-디메틸피롤-2-일메틸리덴)-1-(피롤리딘-1-일메틸)-2-인돌리논

화합물 번호는 본 발명의 실시예 1에 기재되어 있다. 즉, 표 I의 화합물의 합성은 실시예 1에 기재되어 있다. 표 I에 제시된 화합물은 단지 예일 뿐이며 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 간주되지 않는다. 이 방법에 사용될 수 있는 추가적인 단백질 키나아제 억제제로는 3-(3,5-디메틸피롤-2-일메틸리덴)-2-인돌리논(su 5416), 3-[3,5-디메틸-4-(2-카복시에틸)피롤-2-일메틸리덴]-2-인돌리논(su 6668) 및 3-[3-(2-카복시에틸)-5-메틸피롤-2-일메틸리덴]-2-인돌리논을 포함한다.

B. 사이클로옥시게나아제-2-선택적 억제제 - 화학식 II 및 III의 화합물

본 발명에 사용될 수 있는 COX-2 억제제의 비제한적인 예는 하기 표 II 및 III에 명시되어 있다.

[표 II]

화합물	상업적/ 학술적 명칭	참조 문헌	사용량
1,5-디페닐-3-치환된 피라졸		WO 97/13755	
	라디시콜	WO 96/25928. Kwon et al (Cancer Res(1992) 52 6296)	
	GB-02283745		
	TP-72	Cancer Res 1998 58 4 717-723	
1-(4-클로로벤조일)-3-[4-(4-플루오로-페닐)티아졸-2-일메틸]-5-메톡시-2-메틸-인돌	A-1838270		
	GR-253035		
4-(4-사이클로헥실-2-메틸옥사졸-5-일)-2-플루오로벤젠설폰아미드	JTE-522	JP 9052882	
5-클로로-3-(4-(메틸설폰닐)페닐)-2-(메틸-5-피리디닐)-피리딘			
2-(3,5-디플루오로-페닐)-3-4-(메틸설폰닐)-페닐)-2-사이클로펜텐-1-원			
	L-768277		
	L-783003		
	MK-966; VIOXX®	US 5968974	12.5-100 mg po
인돌메타신-유도된 인돌알카노산		WO 96/374679	200 mg/kg/day
1-메틸설폰닐-4-[1,1-디메틸-4-(4-플루오로-페닐)사이클로펜타-2,4-디엔-3-일]벤젠		WO 95/30656. WO 95/30652. WO 96/38418. WO 96/38442.	
4,4-디메틸-2-페닐-3-[4-(메틸설폰닐)페닐]사이클로-			

화합물	상업적/ 학술적 명칭	참조 문헌	사용량
부테논			
2-(4-메톡시페닐)-4-메틸-1-(4-설파모일페닐)-피롤		EP 799823	
N-[5-(4-플루오로)페녹시]티오펜-2-메탄설폰-아미드	RWJ63556		
5(E)-(3,5-디-tert-부틸-4-하이드록시)벤질리덴-2-에틸-1,2-이소티아졸리딘-1,1-디옥사이드	S-2474	EP 595546	
3-포르밀아미노-7-메틸설폰닐아미노-6-페녹시-4H-1-벤조피란-4-온	T-614	DE 38/34204	
벤젠설폰아미드, 4-(5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일	셀레코시브	US 5466823	
CS 502	산쿄(Sankyo)		
2-[(2-클로로-6-플루오로페닐)아미노]-5-메틸벤젠아세트산	루미라코시브 (Cox-189)	WO 99/11605	
5-클로로-6'-메틸-3-[4-(메틸설폰닐)페닐]-2,3'-비피리딘	에토리코시브 (MK 663)	WO 98/03484	
	BMS 34070	US 6180651	
	멜록시캄 (meloxicam)	US 4233299	15-30 mg/day
	니메술라이드 (nimesulide)	US 3840597	

[표 III]

WO 99/30721	WO 99/30729	US 5760068	WO 98/15528
WO 99/25695	WO 99/24404	WO 99/23087	FR 27/71005
EP 921119	FR 27/70131	WO 99/18960	WO 99/15505
WO 99/15503	WO 99/14205	WO 99/14195	WO 99/14194
WO 99/13799	GB 23/30833	US 5859036	WO 99/12930
WO 99/11605	WO 99/10332	WO 99/10331	WO 99/09988
US 5869524	WO 99/05104	US 5859257	WO 98/47890
WO 98/47871	US 5830911	US 5824699	WO 98/45294
WO 98/43966	WO 98/41511	WO 98/41864	WO 98/41516
WO 98/37235	EP 86/3134	JP 10/175861	US 5776967
WO 98/29382	WO 98/25896	ZA 97/04806	EP 84/6,689
WO 98/21195	GB 23/19772	WO 98/11080	WO 98/06715
WO 98/06708	WO 98/07425	WO 98/04527	WO 98/03484
FR 27/51966	WO 97/38986	WO 97/46524	WO 97/44027
WO 97/34882	US 5681842	WO 97/37984	US 5686460
WO 97/36863	WO 97/40012	WO 97/36497	WO 97/29776
WO 97/29775	WO 97/29774	WO 97/28121	WO 97/28120
WO 97/27181	WO 95/11883	WO 97/14691	WO 97/13755
WO 97/13755	CA 21/80624	WO 97/11701	WO 96/41645
WO 96/41626	WO 96/41625	WO 96/38418	WO 96/37467
WO 96/37469	WO 96/36623	WO 96/36617	WO 96/31509
WO 96/25405	WO 96/24584	WO 96/23786	WO 96/19469
WO 96/16934	WO 96/13483	WO 96/03385	US 5510368
WO 96/09304	WO 96/06840	WO 96/06840	WO 96/03387
WO 95/21817	GB 22/83745	WO 94/27980	WO 94/26731
WO 94/20480	WO 94/13635	FR 27/70,131	US 5859036
WO 99/01131	WO 99/01455	WO 99/01452	WO 99/01130
WO 98/57966	WO 98/53814	WO 98/53818	WO 98/53817
WO 98/47890	US 5830911	US 5776967	WO 98/22101
DE 19/753463	WO 98/21195	WO 98/16227	US 5733909
WO 98/05639	WO 97/44028	WO 97/44027	WO 97/40012
WO 97/38986	US 5677318	WO 97/34882	WO 97/16435

WO 97/03678	WO 97/03667	WO 96/36623	WO 96/31509
WO 96/25928	WO 96/06840	WO 96/21667	WO 96/19469
US 5510368	WO 96/09304	GB 22/83745	WO 96/03392
WO 94/25431	WO 94/20480	WO 94/13635	JP 09052882
GB 22/94879	WO 95/15316	WO 95/15315	WO 96/03388
WO 96/24585	US 5344991	WO 95/00501	US 5968974
US 5945539	US 5994381	US 6180651	

피라졸은 WO 95/15316 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 피라졸은 WO 95/15315 호에 기재된 방법에 의해 추가로 제조될 수 있다. 또한, 피라졸은 WO 96/03385 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 티오펜 유사체는 WO 95/00501 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 티오펜 유사체의 제조는 또한 WO 94/15932 호에 기재되어 있다. 옥사졸은 WO 95/00501 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 옥사졸의 제조법은 또한 WO 94/27980 호에 기재되어 있다. 이속사졸은 WO 96/25405 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 이미다졸은 WO 96/03388 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 이미다졸의 제조는 또한 WO 96/03387 호에 기재되어 있다. 사이클로펜탄 사이클로옥사게나아제-2-억

제제는 미국 특허 제 5,344,991 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 사이클로펜탄 Cox-2 억제제의 제조는 또한 WO 95/00501 호에 기재되어 있다. 터페닐 화합물은 WO 96/16934 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 티아졸 화합물은 WO 96/03392 호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 피리딘 화합물은 또한 WO 96/24585 호에 기재되어 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 셀레콕시브는 미국 특허 제 5,466,823 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 발데콕시브는 미국 특허 제 5,633,272 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 파레콕시브는 미국 특허 제 5,932,598 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 로페콕시브는 미국 특허 제 5,968,974 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 재팬 토바코(Japan Tobacco) JTE-552는 JP 90/52882 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 루미라콕시브(Cox-189)는 WO 99/11605 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

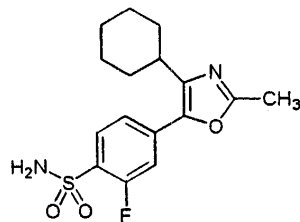
본 발명의 조합 치료에 사용된 에토리콕시브(MK 663)는 WO 98/03484 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본 발명의 조합 치료에 사용된 브리스톨 메이어스 스쿼브즈(Bristol Meyers Squibb's) BMS 34070 호는 미국 특허 제 6,180,651 호에 개시된 방식으로 제조될 수 있다.

본원에 기재된 본 발명에 사용하기 적합한 여러 COX-2 억제제 및 그의 제조방법을 기재한 표 II 및 III에 나열된 상기 참조 문헌은 개별적으로 참조로 인용되어 있다.

본 발명에 사용될 수 있는 바람직한 COX-2 억제제는 하기 화합물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

C1)



JTE-522, 4-(4-사이클로헥실-2-메틸옥사졸-5-일)-2-플루오로벤젠설포나미드,

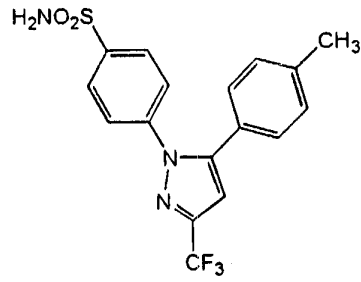
C2)

5-클로로-3-(4-(메틸설포닐)페닐)-2-(메틸-5-피리디닐)피리딘,

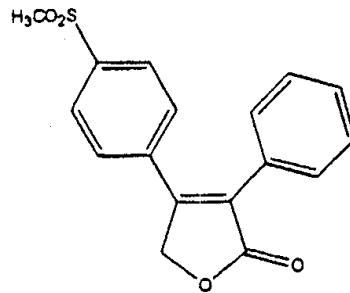
C3)

2-(3,5-디플루오로페닐)-3-4-(메틸설포닐)페닐)-2-사이클로펜텐-1-온,

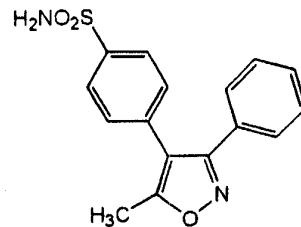
C4)



4-[5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일]벤젠설포나미드,
C5)

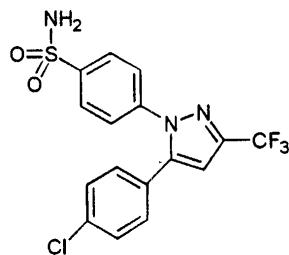


로페콕시브, 4-(4-(메틸설포닐)페닐)-3-페닐-2(5H)-푸라논,
C6)

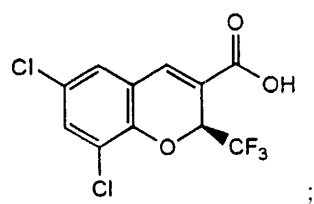


4-(5-메틸-3-페닐이소자졸-4-일)벤젠설포나미드,
C7)

N-[[4-(5-메틸-3-페닐이소자졸-4일)페닐]설포닐]프로판아미드,
C8)

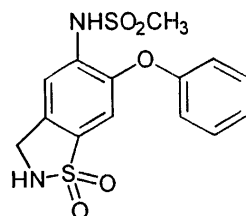


4-[5-(4-클로로페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일]벤젠설포나미드,
C9)



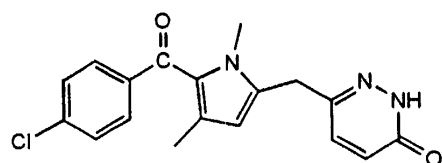
;

C10)



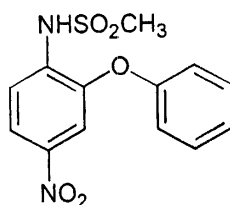
;

C11)



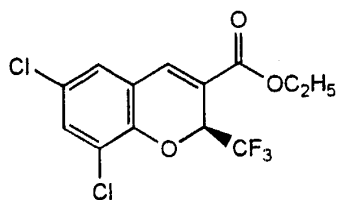
6-[[5-(4-클로로벤조일)-1,4-디메틸-1H-피롤-2-일]메틸]-3(2H)-피리다지논,

C12)

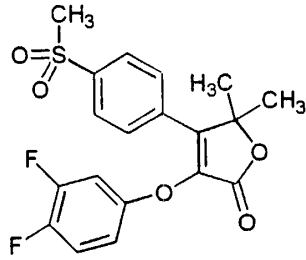


N-(4-니트로-2-페녹시페닐)메탄설폰아미드,

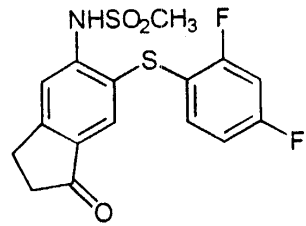
C13)



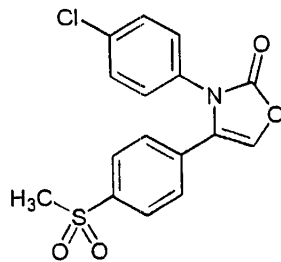
C14)



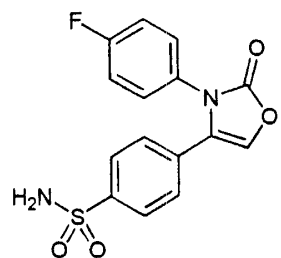
3-(3,4-디플루오로페녹시)-5,5-디메틸-4-[4-(메틸설포닐)페닐]-2(5H)-푸라논,
C15)



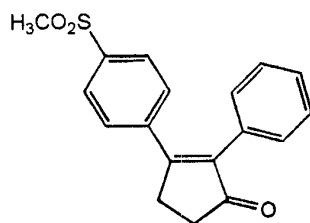
N-[6-[(2,4-디플루오로페닐)티오]-2,3-디하이드로-1-옥소-1H-인덴-5-일]메탄설포나미드,
C16)



3-(4-클로로페닐)-4-[4-(메틸설포닐)페닐]-2(3H)-옥사졸론,
C17)

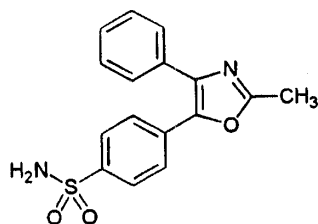


4-[3-(4-플루오로페닐)-2,3-디하이드로-2-옥소-4-옥사졸릴]벤젠설포나미드,
C18)



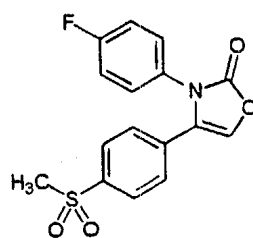
3-[4-(메틸설포닐)페닐]-2-페닐-2-사이클로펜텐-1-온,

C19)



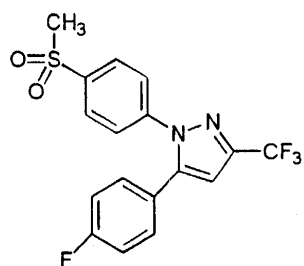
4-(2-메틸-4-페닐-5-옥사졸릴)벤젠설포나미드,

C20)



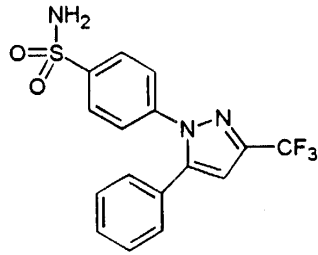
3-(4-플루오로페닐)-4-[4-(메틸설포닐)페닐]-2-(3H)-옥사졸론,

C21)

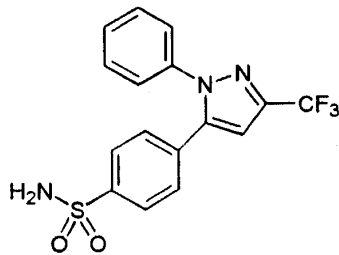


5-(4-플루오로페닐)-1-[4-(메틸설포닐)페닐]-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸,

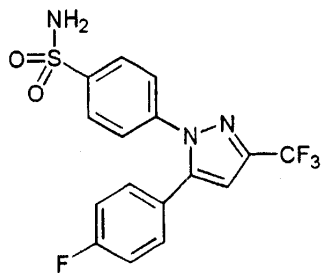
C22)



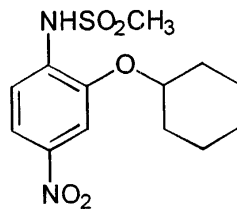
4-[5-페닐]-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일]벤젠설포나미드,
C23)



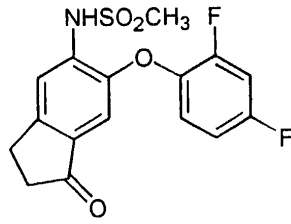
4-[1-페닐-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-5-일]벤젠설포나미드,
C24)



4-[5-(4-플루오로페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1일]벤젠설포나미드,
C25)

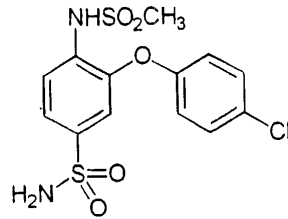


N-[2-(사이클로헥실옥시)-4-니트로페닐]메탄설포나미드,
C26)



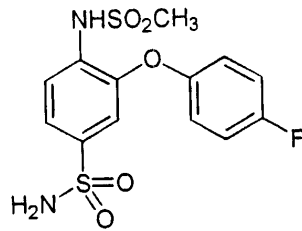
N-[6-(2,4-디플루오로페녹시)-2,3-디하이드로-1-옥소-1H-인덴-5-일]메탄설포나미드,

C27)



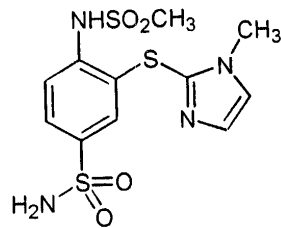
3-(4-클로로페녹시)-4-[(메틸설포닐)아미노]벤젠설포나미드,

C28)



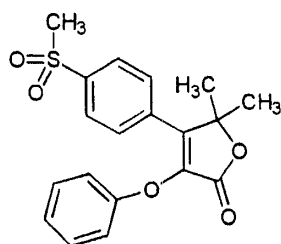
3-(4-플루오로페녹시)-4-[(메틸설포닐)아미노]벤젠설포나미드,

C29)

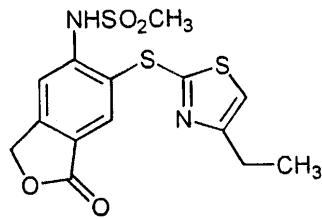


3-[(1-메틸-1H-이미다졸-2-일)티오]-4[(메틸설포닐)아미노]벤젠설포나미드,

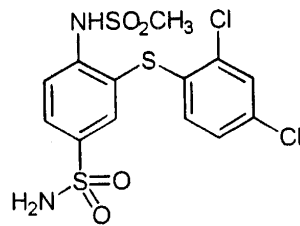
C30)



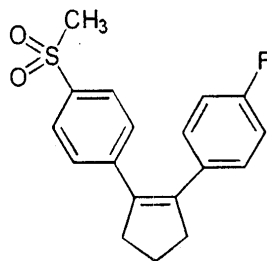
5,5-디메틸-4-[4-(메틸설포닐)페닐]-3-페녹시-2(5H)-푸라논,
C31)



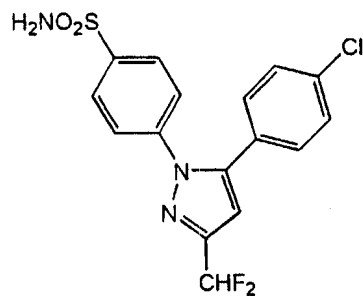
N-[6-[(4-에틸-2-티아졸릴)티오]-1,3-디하이드로-1-옥소-5-이소벤조푸라닐]메탄설포나미드,
C32)



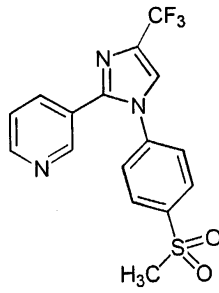
3-[(2,4-디클로로페닐)티오]-4-[(메틸설포닐)아미노]벤젠설포나미드,
C33)



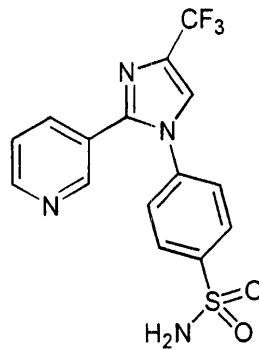
1-플루오로-4-[2-[4-(메틸설포닐)페닐]사이클로펜텐-1-일]벤젠,
C34)



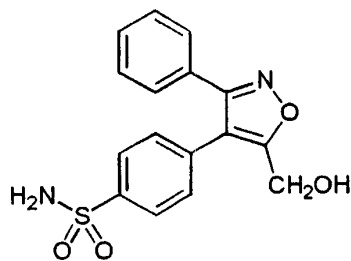
4-[5-(4-클로로페닐)-3-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일]벤젠설포나미드,
C35)



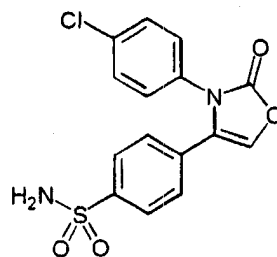
3-[1-[4-(메틸설포닐)페닐]-4-(트리플루오로메틸)-1H-이미다졸-2-일]피리딘,
C36)



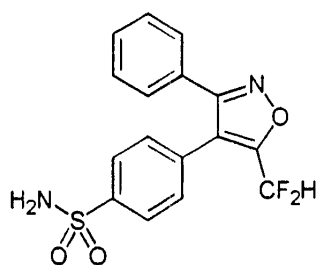
4-[2-(3-피리디닐)-4-(트리플루오로메틸)-1H-이미다졸-1-일]벤젠설포나미드,
C37)



4-[5-(하이드록시메틸)-3-페닐이소자졸-4-일]벤젠설포나미드,
C38)

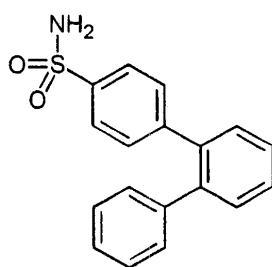


4-[3-(4-클로로페닐)-2,3-디하이드로-2-옥소-4-이소자졸릴]벤젠 설포나미드,
C39)



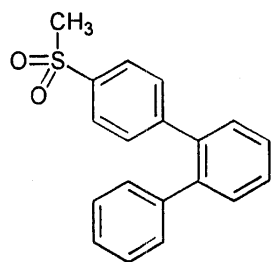
4-[5-(디플루오로메틸)-3-페닐이소자졸-4-일]벤젠설포나미드,

C40)



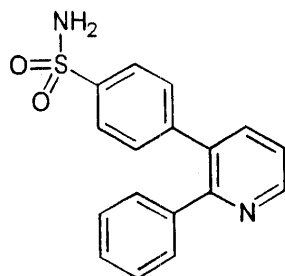
[1,1':2',1''-터페닐]-4-설포나미드,

C41)



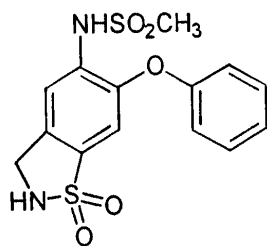
4-(메틸설포닐)-1,1',2',1''-터페닐,

C42)



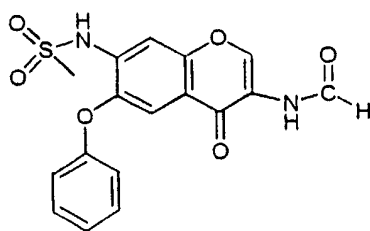
4-(2-페닐-3-피리디닐)벤젠설포나미드,

C43)



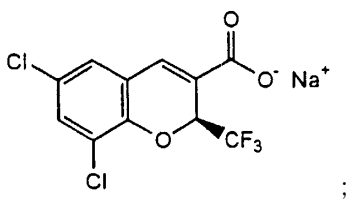
N-(2,3-디하이드로-1,1-디옥시도-6-페녹시-1,2-벤즈이소티아졸-5-일)메탄설폰아미드,

C44)

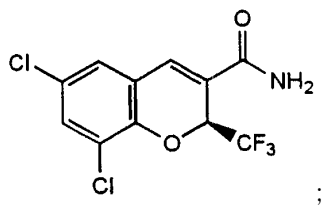


N-[3-(포르밀아미노)-4-옥소-6-페녹시-4H-1-벤조피란-7-일]메탄설폰아미드,

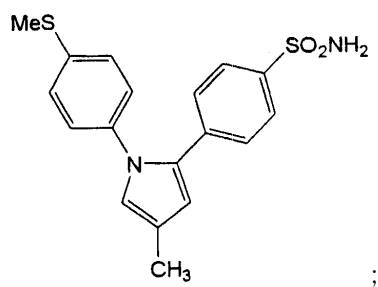
C45)



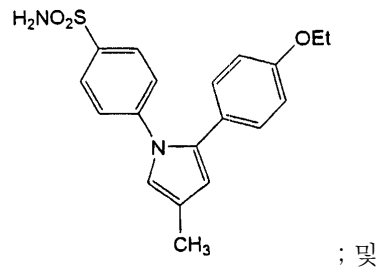
C46)



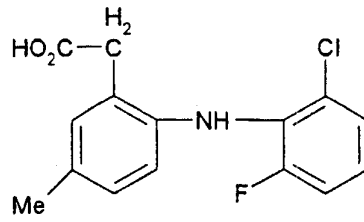
C47)



C48)

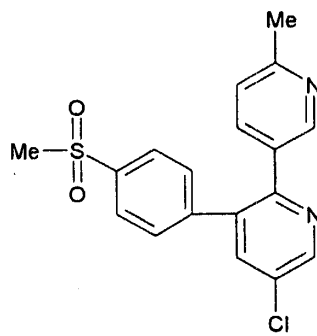


C49) 루미라콕시브(COX-189)



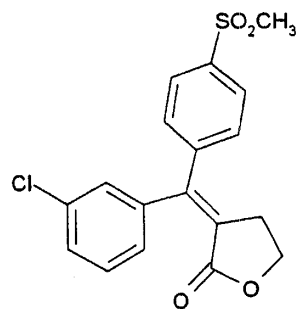
2-[(2-클로로-6-플루오로페닐)아미노]-5-메틸벤젠아세트산,

C50) 에토리콕시브(MK 663)



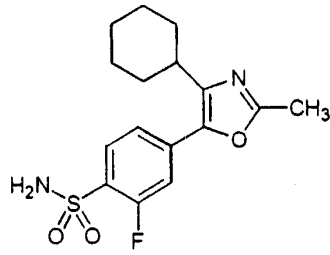
5-클로로-6'-메틸-3-[4-(메틸설포닐)페닐]-2,3'-비피리딘,

C51) BMS 34070



본 발명에 사용될 수 있는 더욱 바람직한 COX-2 억제제는 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

I)



JTE-522, 4-(4-사이클로헥실-2-메틸이속사졸-5-일)-2-플루오로벤젠설포나미드,

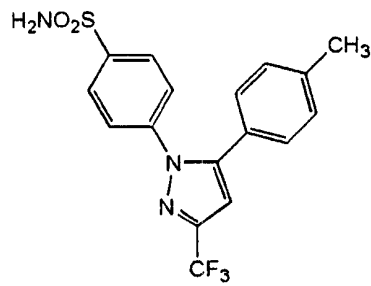
II)

5-클로로-3-(4-(메틸설포닐)페닐)-2-(메틸-5-피리디닐)피리딘,

III)

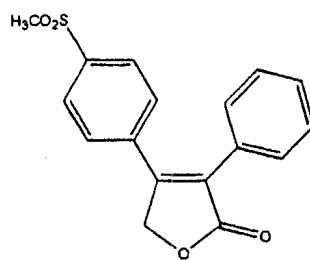
2-(3,5-디플루오로페닐)-3-4-(메틸설포닐)페닐)-2-사이클로펜텐-1-온,

IV)



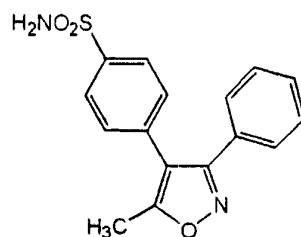
4-[5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일]-벤젠설포나미드,

V)



로페콕시브, 4-(4-(메틸설포닐)페닐)-3-페닐-2(5H)-푸라논,

VI)

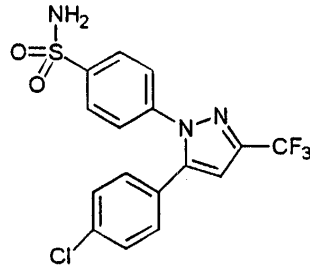


4-(5-메틸-3-페닐이속사졸-4-일)벤젠설포아미드,

VII)

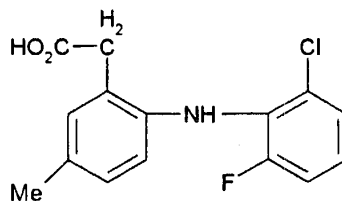
N-[[4-(5-메틸-3-페닐이속사졸-4-일)페닐]설포닐]프로판아미드,

VIII)



4-[5-(4-클로로페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일]벤젠설포아미드, 및

IX) 루미라콕시브(COX-189)



2-[(2-클로로-6-플루오로페닐)아미노]-5-메틸벤젠아세트산.

더더욱 바람직하게는, 본 발명에 사용될 수 있는 COX-2 억제제는 셀레콕시브, 발데콕시브, 파레콕시브, 로페콕시브, 루미라콕시브 및 재팬 도바코 JTE-522를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

또한, 기재된 화합물의 이성질체 형태, 선구물질 및 호변이성질체, 및 그의 약학적으로 허용가능한 염이 본 발명의 조합물에 포함된다. 약학적으로 허용가능한 염의 예는, 포름산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 글루쿠론산, 말레산, 푸마르산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤조산, 아트라닐산, 메실산, 스테아르산, 살리실산, p-하이드로벤조산, 페닐아세트산, 만델산, 엠본산(파모산), 메탄설포산, 에탄설포산, 벤젠설포산, 판토텐산, 톨루엔설포산, 2-하이드록시에탄설포산, 설파닐산, 사이클로헥실아미노설포산, 알겐산, b-하이드로부티르산, 갈락타르산 및 갈락투론산으로부터 제조된 것이다.

용도

본 발명의 화합물은 단백질 키나아제(PK)와 사이클로옥시게나아제 효소, 특히 사이클로옥시게나아제-2 효소의 억제제이고, 따라서, 암의 치료에 유용하다.

촉매 활성이 본 발명의 화학식 I의 화합물에 의해 조절되는 PK는 단백질 티로신 키나아제, 예를 들면 수용체 티로신 키나아제(RTK), 세포성 티로신 키나아제(CTK) 및 세린-트레오닌 키나아제(STK)를 포함한다. RTK 매개되는 신호 전달은 특정 성장 인자(리간드)와의 세포외 상호작용에 의해 개시된 후 수용체가 이량체화되고, 고유의 단백질 티로신 키나아제 활성이 일시적으로 자극되고 인산화되어 이루어진다. 이에 의해 결합 부위는, 세포내 신호 전달 분자를 위해 만들어지고 적절한 세포 반응(예를 들면 세포 분할, 세포외의 미세환경에 대한 물질대사 효과 등)을 용이하게 하는 광범위한 세포질 신호 전달 분자와 착체를 형성하게 된다. 슬레징거(Schlessinger)와 울리히(Ullrich)의 문헌[1992, Neuron, 9:303-391]을 참고할 수 있다.

성장 인자 수용체 상의 티로신 인산화 부위는 신호전달 분자의 SH2(src 동족체) 도메인에 대해 높은 친화성을 갖는 결합 부위로서 작용하는 것으로 나타났다. 판틀(Fantl) 등의 문헌[1992, Cell, 69:413-423], 송양(Songyang) 등의 문헌[1994, Mol. Cell. Biol. 14:2777-2785], 송양 등의 문헌[1993, Cell, 72:767-778] 및 코흐(Koch) 등의 문헌[1991, Science 252:668-678]을 참고할 수 있다. RTK와 연관되어 있는 여러 세포내 기질 단백질이 규명된 바 있다. 이들은 2개의 주요 군, 즉 1) 촉매 도메인을 갖는 기질, 및 2) 이런 도메인은 없지만, 어댑터(adapter)로서 작용하여 촉매 활성 분자와 연관되는 기질로 나누어질 수 있다. 송양 등의 문헌[1993, Cell 72:767-778]을 참고할 수 있다. 수용체와 이들 기질의 SH2 도메인사이의 상호작용의 특이성은 인산화된 티로신 잔기를 바로 둘러싸고 있는 아미노산 잔기에 의해 결정된다. SH2 도메인과 특정 수용체상의 포스포티로신 잔기를 둘러싼 아미노산 서열사이의 결합 친화성의 차이는 기질 인산화 프로파일에서 관찰되는 차이와 일치한다. 송양 등의 문헌[1993, Cell 72:767-778]을 참고할 수 있다. 이런 관찰은 각각의 RTK의 작용이 이의 발현 패턴 및 리간드 이용가능성 뿐만 아니라 특정 수용체에 의해 활성화되는 다운스트림 신호 전달 경로의 배열에 의해서 결정됨을 제안한다. 따라서, 인산화는 분화 인자 수용체 뿐만 아니라 특정 성장 인자 수용체에 의해 보충되는 신호 경로의 선택성을 결정하는 중요한 조절 단계를 제공한다.

주로 세포질성인 STK는 종종 PTK 이벤트에 대한 하부 선(down-line) 반응으로서 세포의 내부 생화학에 영향을 미친다. STK는 DNA 합성과 후속적인 유사 분열을 개시하여 세포를 증식시키는 신호전달 과정과 관련되어왔다.

따라서, PK 신호 전달은 다른 반응 중에서도 세포 증식, 분화, 성장 및 물질대사를 야기한다. 비정상적인 세포 증식은 신생물의 발생(예를 들면 암종, 육종, 교아종 및 혈관종), 질환(예를 들면 백혈병, 건선, 죽상동맥경화, 관절염 및 당뇨병 망막증) 및 통제되지 않은 혈관신생 및/또는 맥관형성과 관련된 다른 질환을 포함하는 광범위한 질환과 질병을 일으킬 수 있다.

본 발명을 실시하기 위해서 본 발명의 화합물이 PK를 억제하는 기작을 정확하게 이해할 필요는 없다. 그러나, 특정한 기작이나 이론에 얽매이지는 않지만, 화학식 I의 화합물이 PK의 촉매 영역의 아미노산과 상호작용할 것으로 믿어진다. PK는 PK들 사이에서 아미노산이 보존되어 있는 영역인 2개의 엽사이의 골짜기에 ATP가 결합하는 것으로 보이는 이엽(葉) 구조를 전형적으로 갖고 있다. PK의 억제제는 전술된 ATP가 PK에 결합하는 동일한 전반적인 영역에서 수소 결합, 반 데르 발스 힘 및 이온 상호작용과 같은 비-공유결합성 상호작용에 의해 결합되는 것으로 보인다. 보다 구체적으로, 화학식 I의 화합물의 2-인돌리논 성분은 정상적으로는 ATP의 아데닌 고리가 차지하는 전반적인 공간에 결합하는 것으로 생각된다. 그렇다면, 특정 PK에 대한 특정 분자의 특이성은 2-인돌리논 코어 상의 다양한 치환기와 특정 PK에 대해 특정 아미노산 도메인 사이의 추가의 상호작용의 결과로서 발생할 수 있다. 따라서, 서로 다른 인돌리논 치환기들이 특정 PK로의 우선적인 결합에 기여할 수 있다. 서로 다른 ATP(또는 다른 뉴클레오타이드) 결합 부위에서 활성인 화합물을 선택하는 능력으로 인해 화학식 I의 화합물은 이런 부위를 갖는 임의의 단백질을 표적화하는데 유용하게 된다. 따라서, 본원에 개시된 화학식 I의 화합물은 이런 단백질과의 상호작용을 통한 생체 내 치유 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 이런 단백질에 대한 생체 외 검증에서도 유용성을 가진다.

추가로, 화학식 I의 화합물은 암종, 육종(카포시 육종 포함), 적모구종, 교아종, 수막종, 성상세포종, 흑색종 및 근아세포종을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 많은 종류의 고형 종양의 치료에 대한 치료학적 접근법을 제공한다. 백혈병과 같은 비-고형 종양 암의 치료 또는 예방 또한 본 발명에 의해 고려된다. 증후는 뇌암, 방광암, 난소암, 위암, 췌장암, 결장암, 혈액암, 폐암 및 골암을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

본 발명의 화합물이 예방, 치료 및 연구에 유용할 수 있는 부적절한 PK 활성과 관련된 질환의 유형의 추가의 예는 세포 증식 질환, 섬유 질환 및 대사 질환이 있지만 이에 한정되지는 않는다.

본 발명에 의해 예방, 치료 또는 추가로 연구될 수 있는 세포 증식 질환에는 암, 혈관 증식 질환 및 사구체간질 세포 증식 질환이 포함된다.

혈관 증식 질환은 비정상적인 맥관형성(혈관 형성) 및 혈관신생(혈관의 확장)과 연관되어 있는 질병을 의미한다. 맥관형성 및 혈관신생은 배아 발생, 황체 형성, 상처 치료 및 기관 재생과 같은 다양한 정상적인 생리학적 과정에도 중요한 역할을 하지만, 이들은 또한 결과적으로 종양이 살아있도록 유지하는데 필요한 새로운 모세혈관을 형성시키는 암의 전개에도 중추적인 역할을 한다. 혈관 증식 질환의 다른 예는 관절염(여기서는 새로운 모세혈관이 관절을 침입하여 연골을 파괴시킨다) 및 당뇨병 망막증(여기서는 망막의 새로운 모세혈관이 유리체를 침입하여, 출혈이 일어나 실명하게 된다)과 같은 안과 질환이다.

다음과 같은 2개의 구조적으로 연관된 RTK가 높은 친화성으로 VEGF에 결합하는 것으로 확인되었다: fms형 티로신 1 (fit-1) 수용체(시부야(Shibuya) 등의 문헌[1990, Oncogene, 5:519-524]; 드 브리스(De Vries) 등의 문헌[1992,

Science, 255:989-991]), 및 VEGF-R2로도 알려져 있는 KDR/FLK-1 수용체. 혈관 내피 성장 인자(VEGF)는 생체의 내피 세포 성장 촉진 활성을 갖는 내피 세포에 특이적인 유사분열물질로 보고되어 있다. 페라라(Ferrara) 및 헨젤(Henzel)의 문헌[1989, Biochem. Biophys. Res. Comm., 161:851-858]; 바이스만(Vaisman) 등의 문헌[1990, J. Biol. Chem., 265:19461-19566]을 참고할 수 있다. 미국 특허출원 제 08/193,829 호, 제 08/038,596 호 및 제 07/975,750 호에 개시된 정보는 VEGF가 내피 세포 증식을 야기할 뿐만 아니라, 또한 정상적인 혈관신생과 병리학적 혈관신생의 주된 조절자임을 강력하게 제안한다. 일반적으로 클라스번(Klagsburn)과 소커(Soker) 등의 문헌[Current Biology, 3(10):699-702]; 후크(Houck) 등의 문헌[1992, J. Biol. Chem., 267:26031-26037]을 참고할 수 있다.

정상적인 맥관형성 및 혈관신생은 배아 발생, 상처 치료, 기간 재생 및 여성의 생식 과정(예를 들면, 배란 과정시 황체에서 난포의 성장 및 임신 후 태반 성장)과 같은 다양한 생리학적 과정에서 중요한 역할을 한다. 포크만(Folkman) 및 싱(Shing)의 문헌[1992, J. Biological Chem., 267(16):10931-34]을 참조할 수 있다. 비조절성 맥관형성 및/또는 혈관신생은 성장을 위해 혈관 형성에 의존하는 악성 고형 종양뿐만 아니라, 당뇨병과 같은 질병에 연관되어 있다. 클라스번과 소커의 문헌[1993, Current Biolgy, 3(10):699-702]; 포크만의 문헌[1991, J. Natl. Cancer Inst., 82:4-6]; 와이드너(Weidner) 등의 문헌[1991, New Engl. J. Med., 324:1-5]을 참고할 수 있다.

혈관신생 및 맥관형성 과정에서 내피 세포의 증식 및 이동에 있어 VEGF의 추측되는 역할은 이들 과정에서 KDR/FLK-1 수용체에 대한 중요한 역할을 시사한다. 질병, 예를 들면 당뇨병(포크만의 문헌[198, XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis(Verstraeta et al., eds.), pp. 583-596, Leuven University Press, Leuven]), 및 관절염, 또한 악성 종양 성장은 비조절성 혈관신생의 결과일 수 있다. 예를 들면 포크만의 문헌[1971, N. Engl. J. Med., 285:1182-1186]을 참고할 수 있다. VEGF가 특이적으로 결합하는 수용체는 맥관형성 및/또는 혈관신생 및 이런 과정에 의해 야기되는 비정상적인 세포 성장을 포함하는 여러 심각한 질병의 조절과 조율을 위한 중요하고 막강한 목표이다. 플로우만(Plowman) 등의 문헌[1994, DN&P, 7(6): 334-339]을 참고할 수 있다. 보다 구체적으로, 새로운 혈관 형성에서의 KDR/FLK-1 수용체의 매우 특이적인 역할로 인해 이는 비조절성 혈관 형성을 포함하는 암 및 다른 질병의 치료에 대한 치료학적 접근을 위한 우수한 목표가 된다.

따라서, 본 발명은 혈관신생 및/또는 맥관형성을 억제하거나 촉진하기 위해서 KDR/FLK-1 수용체 신호 전달을 포함하는 티로신 키나아제 신호 전달을 제어하고/하거나 조율할 수 있는 화합물, 즉, VEGF와 같은 리간드에 의해 활성화되었을 때 KDR/FLK-1에 의한 신호 전달을 억제, 예방 또는 방해할 수 있는 화합물을 제공한다. 비록 본 발명의 화합물이 티로신 키나아제 신호 전달 경로를 따라 수용체 또는 다른 요소에 작용하는 것으로 믿어지지만, 이들은 비조절성 혈관신생의 결과인 종양 세포에 직접 작용할 수도 있다.

비록, 일반적인 "flk-1" 수용체의 인간과 쥐의 대응체의 명칭은 다르지만, 이들은 많은 면에서 상호교환가능하다. 쥐의 수용체인 Flk-1과 이의 인간 대응체인 KDR은 세포내 도메인 내부에서 93.4%의 서열 상동성을 공유한다. 유사하게 쥐의 FLK-1은 쥐의 VEGF와 동일한 친화성으로 인간의 VEGF에 결합하고, 따라서, 둘 중 한 종으로부터 유래된 리간드에 의해 활성화된다. 밀라우어(Millauer) 등의 문헌[1993, Cell, 72:835-846]; 퀸(Quinn) 등의 문헌[1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7533-7537]. FLK-1은 또한 293 세포(인간의 배아 신장 섬유아세포)에서 동시 발현되었을 때 인간의 RTK 기질(예를 들면 PLC- γ 또는 p85)과 결합한 후, 티로신을 인산화시킨다.

따라서, FLK-1 수용체에 의존하는 모델은 KDR 수용체를 이해하는데 직접 적용할 수 있다. 예를 들면 쥐의 신호 전달 경로를 조절하는 화합물을 확인하는 방법에서 쥐의 FLK-1 수용체의 용도는 인간 신호 전달 경로를 조절하는데 사용될 수 있는 화합물, 즉 KDR 수용체와 연관된 활성을 조절하는 화합물의 확인에 직접 적용될 수 있다. 따라서, KDR/FLK-1의 생체의 억제제로서 확인되는 화학적 화합물은 적합한 생체 내 모델에서 확인될 수 있다. 생체내 마우스 및 래트 동물 모델 둘 모두 KDR/FLK-1 유도된 신호 전달 경로에 작용하는 약물의 임상적 가능성을 조사하는데 매우 뛰어난 가치를 갖고 있는 것으로 증명되었다.

따라서, 본 발명은 KDR/FLK-1 수용체의 효소 활성화에 영향을 미치고 KDR/FLK-1에 의한 신호 전달을 간섭함으로써 맥관형성 및/또는 혈관신생을 조절하고, 조율하고/하거나 억제하는 화합물을 제공한다. 따라서, 본 발명은 교아종, 흑색종 및 카포시 육종을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 많은 종류의 고형 종양, 및 난소암, 폐암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 결장암 및 표피 암종의 치료에 대한 치료학적 접근법을 제공한다. 또한, 자료는 KDR/Flk-1 매개되는 신호 전달 경로를 억제하는 화합물의 투여가 또한 혈관종, 재발협착증 및 당뇨병 망막증의 치료에 사용될 수 있음을 제안한다.

또한, 본 발명은 flt-1 수용체를 포함하는 경로를 포함하여 다른 수용체-매개되는 경로에 의한 맥관형성 및 혈관신생의 억제에 관한 것이다.

수용체 티로신 키나아제 매개되는 신호 전달은 특정 성장 인자(리간드)와의 세포외 상호작용에 의해 개시된 후, 수용체가 이량체화되고, 고유의 단백질 티로신 키나아제 활성이 일시적으로 촉진되고 자가인산화됨으로써 이루어진다. 이에 의해 결합 부위가 세포내 신호 전달 분자를 위해 만들어지고, 이는 적절한 세포 반응(예를 들면 세포 분할 및 세포의 미세환경에 대한 대사 효과)을 용이하게 하는 광범위한 세포질 신호 분자와의 착체 형성을 야기한다. 슬레징거 및 율리히의 문헌 [1992, *Neuron*, 9:1-20]을 참고할 수 있다.

KDR/FLK-1과 PDGF- β 수용체(50.3% 상동성) 및/또는 연관된 flt-1 수용체의 세포내 영역의 밀접한 상동성은 서로 겹치는 신호 전달 경로의 유도를 나타낸다. 예를 들면 PDGF- β 수용체의 경우, src 계열의 일원(트왈리(Twamley) 등의 문헌 [1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7696-7700]), 포스포티딜이노시톨-3'-키나아제(휴(Hu) 등의 문헌 [1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12:981-990]), 포스포리파제 γ (카시시안(Kashishian)과 쿠퍼(Cooper)의 문헌 [1993, *Mol. Cell. Biol.*, 4:49-51]), ras-GTP아제 활성화 단백질(카시시안 등의 문헌 [EMBO J., 11:1373-1382]), PTP-ID/syp(카즐라우스카스(Kazlauskas) 등의 문헌 [1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10 90:6939-6943]), Grb2(아르비드슨(Arvidsson) 등의 문헌 [1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:6715-6726]) 및 어댑터 분자인 Shc와 Nck(니시무라(Nishimura) 등의 문헌 [1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13:6889-6896])은 서로 다른 자가인산화 부위를 포함하는 영역에 결합하는 것으로 나타났다. 일반적으로 클라에슨-웰쉬(Claesson-Welsh)의 문헌 [1994, *Prog. Growth Factor Res.*, 5:37-54]을 참고할 수 있다. 따라서, KDR/FLK-1에 의해 활성화된 은호 전달 경로는 아마도 ras 경로(로자키스(Rozakis) 등의 문헌 [1992, *Nature*, 360:689-692]), PI-3'-키나아제, Src-매개 경로 및 plcy-매개 경로를 포함할 것이다. 이들 경로는 각각 내피 세포에서 KDR/FLK-1의 혈관신생 및/또는 맥관형성 효과에서 중요한 역할을 할 수 있다. 결론적으로, 본 발명의 또다른 양태는 이들 경로에 의해 조절되는 혈관신생 및 맥관형성을 조절하는 본원에 개시된 유기 화합물의 용도에 관한 것이다.

역으로, 혈관의 축소, 수축 또는 폐쇄와 연관된 질병, 예를 들면 재발협착증이 또한 예상되며, 이는 본 발명의 방법에 의해 치료 또는 예방될 수 있다.

섬유증 질병은 세포외 매트릭스의 비정상적인 형성을 의미한다. 섬유증 질병의 예는 간경변과 사구체간질 세포 증식 질환을 포함한다. 간 경화증은 세포외 매트릭스 성분이 증가하여 결과적으로 간에 흉터가 형성되는 것을 특징으로 한다. 간의 흉터를 만들어내는 세포외 매트릭스의 증가는 또한 간염과 같은 바이러스 감염에 기인할 수 있다. 지방세포는 간경변에서 중요한 역할을 한다. 예상되는 다른 섬유증 질환에는 죽상동맥경화가 포함된다.

사구체간질 세포 증식 질환은 사구체간질 세포의 비정상적인 증식에 의해 발생하는 질병을 의미한다. 사구체간질 증식 질환은 다양한 인간의 신장 질병, 예를 들면, 사구체신염, 당뇨병 신장병증 및 악성 신경화증, 및 또한 혈전성 미세혈관장애 증후군, 이식 거부 및 사구체병증과 같은 질환을 포함한다. RTK PDGFR은 사구체간질 세포 증식의 유지에 연관되어 왔다. 플로기(Floege) 등의 문헌 [1993, *Kidney International* 43:47S-54S].

다수의 암이 세포 증식 질환이고, 이전에 언급된 바와 같이, PK는 세포 증식 질환과 관련되어 있다. 따라서, PK, 예를 들면 RTK 계열의 일원이 암의 전개와 관련되어 있는 것은 놀라운 일이 아니다. 이들 수용체의 일부, 예를 들면 EGFR(투지(Tuzi) 등의 문헌 [1991, *Br. J. Cancer* 63:227-233], 토르프(Torp) 등의 문헌 [1992, *APMIS* 100:713-719]), HER2/neu(슬라몬(Slamon) 등의 문헌 [1989, *Science* 244:707-712]) 및 PDGF-R(쿠마브(Kumabe) 등의 문헌 [1992, *Oncogene*, 7:627-633])은 많은 종양에서 과발현되고/되거나, 자기분비 루프에 의해 지속적으로 활성화된다. 실제로, 대부분의 흔하고 위중한 암에서는 이들 수용체의 과발현(아크바삭(Akbasak)과 수너-아크바삭(Suner-Akbasak) 등의 문헌 [1992, *J. Neurol. Sci.*, 111:119-133], 딕슨(Dickson) 등의 문헌 [1992, *Cancer Treatment Res.* 61:249-273], 코크(Korc) 등의 문헌 [1992, *J. Clin. Invest.* 90:1352-1360])과 자기분비 루프(리(Lee) 및 도노휴(Donoghue)의 문헌 [1992, *J. Cell. Biol.*, 118:1057-1070], 코르크(Korc) 등의 상기 문헌, 아크바삭과 수너-아크바삭 등의 상기 문헌)이 입증되었다. 예를 들면, EGFR은 편평세포 암종, 성상세포종, 교아종, 두경부암, 폐암 및 방광암과 관련되어 있다. HER2는 유방암, 난소암, 위암, 폐암, 췌장암 및 방광암과 관련되어 있다. PDGFR은 교아종과 흑색종, 및 또한 폐암, 난소암 및 전립선암과 관련되어 있다. RTK c-met는 또한 악성 종양 형성과 관련되어 있다. 예를 들면 c-met는 다른 암종에서도, 결장직장암, 갑상선암, 췌장암, 위암 및 간세포 암종 및 림프종과 관련되어 있다. 추가로 c-met는 백혈병과 관련되어 있다. c-met 유전자의 과발현은 또한 호킨슨병 및 버키츠(Burkitts)병이 있는 환자에서 검출된 바 있다.

IGF-IR은 영양학적 지지와 제II형 당뇨병에 연관되어 있는 것에 추가하여, 또한 여러 유형의 암과 연관되어 있다. 예를 들면 IGF-I는 인간 유방암 암종 세포(아르테아가(Arteaga) 등의 문헌 [1989, *J. Clin. Invest.* 84:1418-1423]) 및 작은 폐암 세포(마쿨리(Macaulay) 등의 문헌 [1990, *Cancer Res.*, 50:2511-2517])와 같은 여러 종양 유형에 대한 자기분배 성장 촉진제로서 관여하고 있다. 또한 IGF-I는 신경계의 정상적인 성장과 분화에 일체적으로 관여하고 있으면서 또한 인간의 글리오마의 자기분배 촉진제인 것으로 보인다. 샌드버그-노드퀴비스트(Sandberg-Nordqvist) 등의 문헌 [1993, *Cancer*

Res. 53:2475-2478]을 참고할 수 있다. 세포 증식에서 IGF-IR과 그의 리간드의 중요성은 배양액중의 많은 세포 유형(섬유아세포, 내피 세포, 평활근 세포, T-림프구, 골수 세포, 연골 세포 및 조골 세포(골수의 줄기 세포))이 IGF-I에 의해 자극되어 성장된다는 사실에 의해 추가로 지지된다. 골드링(Goldring)과 골드링의 문헌[1991, Eukaryotic Gene Expression, 1:301-326]을 참고할 수 있다. 바세르가(Baserga)와 코폴라(Coppola)는 IGF-IR이 형질전환의 기작에 중추적인 역할을 하고, 따라서, 광범위한 인간의 악성종양에 대한 치유적 간섭을 위한 바람직한 대상일 수 있다고 제안한다. 바세르가의 문헌[1995, Cancer Res., 55:249-252], 바세르가의 문헌[1994, Cell, 79:927-930], 코폴라 등의 문헌[1994, Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595]을 참고할 수 있다.

STK는 특히 유방암을 포함하는 많은 유형의 암에 관련되어 왔다(캔스(Cance) 등의 문헌[Int. J. Cancer, 54:571-77 (1993)]).

비정상적인 PK 활성화와 질병간의 연관성은 암으로 제한되지 않는다. 예를 들면, RTK는 건선, 당뇨병, 자궁내막증, 혈관신생, 죽종 플라크 전개, 알츠하이머병, 재발협착증, 폰 히펠-린도(von Hippel-Lindau)병, 표피의 과다증식, 신경퇴화성 질병, 나이와 연관된 반점 퇴행 및 혈관종과 관련되어 왔다. 예를 들면, EGFR은 각막 및 피부 상처 치료에 나타난다. 인슐린-R 및 IGF-1R에서의 결함이 제II형 당뇨병에 나타난다. 특이적인 RTK와 이들의 치료학적 처방사이의 보다 완전한 상관성은 플로우만(Plowman) 등의 문헌[1994, DN&P 7:334-339]에 개시되어 있다.

이전에 언급한 바와 같이, RTK뿐만 아니라 src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr 및 yrk를 포함하지만 이로 한정되지는 않는 CTK(볼렌(Bolen) 등의 문헌[1992, FASEB J., 6:3403-3409])는 증식과 물질대사 신호 전달 경로에 연관되어 있고, 따라서, 본 발명의 대상인 많은 PTK-매개 질병에 관여할 것으로 예상될 수 있고, 그렇게 보인다. 예를 들면, 돌연변이된 src(v-src)는 닭에서는 종양단백질(pp60^{v-src})인 것으로 보인다. 더욱이, 이의 세포 동족체인 원종양유전자인 pp60^{c-src}은 많은 수용체의 종양발생 신호를 전달한다. 종양에서의 EGFR이나 HER2/neu의 과발현으로 인해 pp60^{c-src}이 구성적으로 활성화되는데, 이는 정상 세포에는 없는 악성 세포의 특징이다. 한편으로, c-src의 발현이 결핍된 마우스는 골화식증성 표현형을 나타내고, 이는 과골세포 작용에 c-src의 결정적인 참여와 연관된 질병에서의 가능한 연관성을 시사한다.

유사하게, Zap70은 자가면역 질환과 연관될 수 있는 T-세포 신호전달에 관련되어 있다.

STK는 염증, 자가면역 질환, 면역반응 및 과증식 질환, 예를 들면 재발협착증, 섬유증, 건선, 골관절염 및 류마티스성 관절염과 연관되어 있다.

PK는 또한 배아의 착상에 연관되어 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 이런 배아의 착상을 방지하는 효과적인 방법을 제공할 수 있어, 산아 제한제로서 유용하다. 본 발명의 화합물을 이용하여 치료되거나 예방될 수 있는 추가의 질병은 면역 질병, 예를 들면 자가면역 질환, AIDS 및 심혈관계 질병, 예를 들면 죽상동맥경화증이다.

최종적으로, RTK와 CTK 둘모두 현재 고도면역 질환에 관련되어 있는 것으로 추정되고 있다.

여러 PTK에 대한 본 발명의 다수의 예시적인 화합물의 효과의 예는 하기 표 2에 제시되어 있다. 제시된 화합물과 자료는 어떤 방식으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

B. 사이클로옥시게나아제-2 억제제 또는 COX-2 억제제 또는 사이클로옥시게나아제-2 억제제는 효소의 한 부류인 사이클로옥시게나아제-2를 특히 억제하고, 사이클로옥시게나아제-1은 덜 억제하는 약물을 포함한다. 바람직하게는, 이는 약 0.2 μ M 미만의 사이클로옥시게나아제-2 IC₅₀을 갖고, 또한 사이클로옥시게나아제-1보다 사이클로옥시게나아제-2를 50배 이상, 바람직하게는 100배 이상 선택적으로 억제하는 화합물을 포함한다. 보다 더 바람직하게는, 화합물은 약 1 μ M 이상, 보다 바람직하게는 10 μ M 이상의 사이클로옥시게나아제-1 IC₅₀을 가진다.

연구는 사이클로옥시게나아제에 의해 합성된 프로스타글란딘이 암의 개시와 촉진에 결정적인 역할을 함을 나타낸다. 또한, COX-2는 결장, 유방, 폐, 전립선, 식도, 췌장, 내장, 자궁경부, 난소, 방광, 두경부의 신생물 병변에서 과발현된다. 여러 생체의 및 동물 모델에서 COX-2 억제제는 종양 성장 및 전이를 억제시켰다.

암 그 자체에 추가하여, COX-2는 또한 과형성 및 종양형성 병변 내부와 이에 인접한 혈관신생된 맥관에서 발현되어, COX-2가 혈관신생에서 중요한 역할을 함을 나타낸다. 마우스와 래트 둘모두에서, COX-2 억제제는 bFGF-유도된 혈관

신생을 현저하게 억제한다. 화학적 예방제, 혈관신생 억제제 및 화학적 치료제로서의 COX-2 억제제의 용도는 본원에 참고로 인용되어 있는 코키(Koki) 등의 문헌[Potential utility of COX-2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. Exp. Opin. Invest. Drugs(1999)8(10) pp.1623-1638]에 개시되어 있다. HER-2/neu(ErbB2)의 증폭 및/또는 과발현은 인간의 유방암 및 난소암 중 20-30%, 및 또한 위암과 식도암 중 5-15%로 일어나고, 나쁜 예후와 연관되어 있다. 또한, 최근 COX-2 발현이 HER-2/neu 종양유전자를 과발현시키는 세포에서 상승 조절됨을 생체 외에서 발견하였다(본원에 참고로 인용된 수바라마이아(Subbaramaiah) 등의 문헌[Increased expression of cyclooxygenase-2 in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. Cancer Research(1999)]). 이 연구에서 비-형질전환된 대용 세포주에 비해 현저하게 증가된 수준의 PGE₂ 생성, COX-2 단백질 및 mRNA가 HER-2/neu 형질전환된 포유류의 상피 세포에서 검출되었다. COX-2 활성의 산물, 즉, 프로스타글란딘은 증식을 촉진시키고, 악성 세포의 침입성을 증가시키고, 혈관 내피 성장 인자의 생성을 증가시키고, 이는 혈관신생을 촉진한다. 또한, HER-2/neu는 혈관 내피 성장 인자와 같은 혈관신생 인자의 생성을 유도한다.

결과적으로, 항 HER-2/neu 항체, 예를 들면 트라스투주마브(trastuzumab, 등록상표, 헤르셉틴(Herceptin)) 및 HER-2/neu를 억제하고자하는 다른 치료제와 조합된 COX-2 억제제의 투여는 HER-2/neu가 과발현되는 암을 치료할 것으로 예상된다.

또한, c-myc, N-myc, L-myc, K-ras, H-ras, N-ras를 포함하지만 이로 한정되지는 않는 다른 종양유전자가 증폭 및/또는 과발현되는 종양에서 COX-2 수준이 증가할 것으로 생각된다. COX-2 활성의 산물은 세포 증식을 촉진시키고, 면역 감독을 억제하고, 악성종양 세포의 침입성을 증가시키고, 신생혈관생성을 촉진시킨다. 결론적으로 본 발명의 COX-2 억제제와 조합된 단백질 키나아제 억제제의 투여는 종양유전자가 과발현되는 암을 예방하거나 치료하는데 유용하다.

특정 COX-2 억제제는 암의 치료에 유용하고(WO98/16227), 여러 동물 모델에서 다양한 성장 인자에 의해 유래된 혈관신생을 감소시킨다(WO98/22101). 항-혈관신생은 bFGF, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 또는 카라기난(잘 공지된 혈관신생 성질을 갖는 단백질)이 이식된 래트에서 COX-2 억제제를 이용하여 달성된다(마스페러(Masferrer) 등의 문헌[89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, March 1998]).

약학 조성물 및 투여

본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 그대로 인간 환자에게 투여될 수 있거나, 전술된 물질이 적합한 담체 또는 부형제와 혼합된 약학 조성물로 투여될 수 있다. 약물의 조제 및 투여에 관한 기법은 문헌["Remington's Pharmacological Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, 최신판]에서 찾을 수 있다.

본원에서 사용되는 "투여"는 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 본 발명의 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학 조성물을 PK-관련된 질환의 예방 또는 치료를 위해 생체내로 전달하는 것을 의미한다.

적합한 투여 경로는 경구, 직장, 국소, 경점막 또는 내장 투여, 근육내, 피하, 골수내, 초내, 직접적인 심실내, 혈관내, 유리체내, 복강내, 비강내 또는 안구내 주사를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 투여 경로는 경구와 비경구이다.

다르게는, 종종 축적 또는 서방형 제제로 예를 들면 고형 종양으로의 화합물의 직접적인 주입을 통해 전신 방식이 아닌 국소 방식으로 화합물을 투여할 수 있다.

또한, 표적 약물 전달 시스템, 예를 들면 종양-특이적 항체로 피복된 리포솜으로 약물을 투여할 수 있다. 리포솜은 종양으로 표적화되어 선택적으로 흡수된다.

본 발명의 약학 조성물은 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 드라제-제조, 빵기, 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결건조 과정과 같은 당 분야에 잘 숙련된 과정을 통해 제조될 수 있다.

본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물은 활성 화합물의 약학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체를 이용하여 통상적인 방식으로 조제될 수 있다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 의존할 것이다.

주사를 위해서, 본 발명의 화합물은 수용액, 바람직하게는 생리학적으로 상용성인 완충액, 예를 들면 헵크 용액, 링거 용액 또는 생리학적 염수 완충액으로 조제될 수 있다. 경점막 투여의 경우, 투과되는 차단벽에 적절한 침투제를 제제에 이용한다. 이런 침투제는 일반적으로 당 분야에 공지되어 있다.

경구 투여를 위해서는, 활성 화합물을 당 분야에 잘 공지된 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합함으로써 화합물을 조제할 수 있다. 이런 담체는 본 발명의 화합물이 환자가 구강으로 섭취기 위해 정제, 환제, 로젠지, 드라제, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 조제될 수 있게 해준다. 경구 용도를 위한 약학 제제는 고형 부형제를 이용하고, 선택적으로 생성된 혼합물을 분쇄하고, 경우에 따라 다른 적합한 보조제를 첨가한 후 과립의 혼합물을 가공하여 정제 또는 드라제 코어를 수득하여 제조될 수 있다. 유용한 부형제는 특히 예를 들면 당(예를 들면 락토즈, 슈크로즈, 만니톨 또는 소르비톨), 셀룰로즈 제제(예를 들면 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 고구마 전분) 및 다른 물질, 예를 들면 젤라틴, 트라가칸트 고무, 메틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐 피롤리돈(PVP)을 포함하는 충전제이다. 경우에 따라, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가 또는 알긴산과 같은 붕해제를 첨가할 수 있다. 나트륨 알기네이트와 같은 염 또한 사용될 수 있다.

드라제 코어는 적합한 코팅과 함께 제공된다. 이 목적으로 위해서 농축된 당 용액을 이용할 수 있고, 이는 선택적으로 아라비아 고무, 활석, 폴리비닐 피롤리돈, 카보폴 젤, 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 이산화티탄, 래커 용액 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있다. 활성 화합물의 투여량의 서로 다른 조합을 확인하고 특징짓기 위해 염료 또는 안료를 정제 또는 드라제 코팅에 첨가할 수 있다.

경구로 사용될 수 있는 약학 조성물은 젤라틴으로 만들어진 푸쉬-피트(push-fit) 캡슐, 및 또한 젤라틴과 가소화제(예를 들면 글리세롤 또는 소르비톨)로 만들어진 연질의 밀봉된 캡슐을 포함한다. 푸쉬-피트 캡슐은 충전제(예를 들면 락토즈), 결합제(예를 들면 전분) 및/또는 윤활제(예를 들면 활석 또는 마그네슘 스테아레이트) 및 선택적으로 안정화제와 혼합된 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 화합물은 적합한 액체, 예를 들면 지방 오일, 액체 과립 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 안정화제 또한 이들 제제에 첨가될 수 있다.

캡슐은 활성 성분을 빛으로부터 보호하기 위해서 갈색 유리병 또는 플라스틱 병에 포장될 수 있다. 활성 화합물 캡슐 제제를 함유하는 용기는 제어되는 실온(15-30℃)에서 저장되어야만 한다.

흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 편의상 압축 팩 또는 네블라이저 및 적합한 추진제(예컨대 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라-플루오로에탄 또는 이산화탄소가 있지만 이에 한정되는 것은 아님)를 사용하는 에어로졸 스프레이 형태로 전달된다. 압축된 에어로졸의 경우, 투약 단위는 측정량을 전달시키기 위한 밸브를 제공함으로써 조절될 수 있다. 예컨대, 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물과 적합한 분말 베이스(예: 락토스 또는 전분)의 혼합 분말을 함유하며 조제될 수 있다.

또한, 화합물은 예컨대 일시 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 조제될 수 있다. 주사용 제제는 보존화제가 첨가된 단위 투약 형태, 예컨대 앰플 또는 다중-투여 용기로 존재할 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 담체로 현탁액, 용액 또는 유화액과 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 조제 물질을 함유할 수 있다.

비경구 투여를 위한 약학 조성물은 예를 들면 활성 화합물의 염이 있지만 이에 한정되지 않는 수용성 형태의 수용액을 포함한다. 또한, 활성 화합물의 현탁액은 친유성 베히클로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 베히클로는 지방 오일, 예컨대 참기름, 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올리에이트 및 트리글리세라이드, 또는 리포솜과 같은 물질을 들 수 있다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점성을 증가시키는 물질, 예컨대 소듐 카복시메틸 셀룰로즈, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 선택적으로는, 현탁액은 또한 적합한 안정화제 및/또는 고도로 농축된 용액의 제조를 가능하게 하도록 화합물의 용해도를 증가시키는 제제를 함유할 수 있다.

다르게는, 활성 성분은 사용하기 전 적합한 담체, 예컨대 무균의 발열물-부재 물로 구성된 분말 형태일 수 있다.

또한, 화합물은 예컨대 통상적인 좌약 베이스, 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 사용하는 좌약 또는 지연 관장제와 같은 직장 조성물로 조제될 수도 있다.

전술한 제제에 덧붙여, 화합물은 또한 저장형 제제로서 조제될 수 있다. 이러한 장시간 작용하는 제제는 이식(예컨대 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은, 이온 교환 수지를 갖는 적합한 중합체 성 또는 소수성 물질(예컨대 약리학적으로 허용가능한 오일을 갖는 유화액으로)을 사용하는 이러한 투여 경로를 위해 또는 난용성(sparingly soluble) 유도체(예컨대 난용성 염이 있지만 이에 한정되지 않음)로서 조제될 수 있다.

본 발명의 소수성 화합물을 위한 약학적 담체의 비제한적인 예는, 벤질 알콜, 비극성 계면활성제, 수-혼화성 유기 중합체 및 VDP 공-용매 시스템과 같은 수성상을 포함하는 공용매 시스템이다. VDP는 3% w/v 벤질 알콜, 8% w/v 비극성 계면활성제 폴리소르베이트(Polysorbate) 80, 및 65% w/v 폴리에틸렌 글리콜 300이다(무수 에탄올의 부피로 만들어짐). VDP 공-용매 시스템(VDP:D5W)은 수용액에서 5% 텍스트로스로 1:1 희석된 VDP로 구성된다. 이 공-용매 시스템은 소수성 화합물을 잘 용해시키고, 자체가 시스템 투여시 낮은 독성을 생성한다. 당연히, 이러한 공-용매 시스템의 비율은 용해성 및 독성 특성을 파괴하지 않으면서 상당히 변할 수 있다. 더욱이, 공-용매 성분의 규명은 변할 수 있으며, 예를 들면 저-독성 비극성 계면활성제가 폴리소르베이트 80 대신 사용될 수 있고, 폴리에틸렌 글리콜의 분획 크기가 변할 수 있으며, 다른 생체적합성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈을 대신할 수 있고, 다른 당 또는 다당류가 텍스트로스를 대신할 수 있다.

다르게는, 소수성 약학적 화합물을 위한 다른 전달 시스템이 사용될 수 있다. 리포솜 및 유화액은 소수성 약물을 위한 전달 베타를 또는 담체의 잘 알려진 예이다. 또한, 특정 유기 용매, 예컨대 디메틸설폭사이드가 종종 더욱 큰 독성의 댓가를 치르더라도 사용될 수도 있다.

또한, 화합물은 서방성 시스템, 예컨대 치유제를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 사용하여 전달될 수 있다. 다양한 서방성 물질이 확립되어 있으며 당해 분야의 숙련자에 의해 익히 공지되어 있다. 서방성 캡슐은 몇 주에서 100일 이상까지 동안 화학적 속성에 따라 화합물을 방출할 수 있다. 치료 시약의 화학적 속성 및 생물학적 안정성에 따라, 단백질 안정화를 위한 추가적인 은 방법이 사용될 수 있다.

본원의 약학 조성물은 또한 적합한 고체 또는 겔 상 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예로는 탄산칼슘, 인산칼슘, 여러 당, 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴 및 중합체(예: 폴리에틸렌 글리콜)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

다수의 본 발명의 PK 조율 화합물은, 청구된 화합물이 음 또는 양으로 하전된 종을 형성할 수 있는 약리학적으로 허용가능한 염으로 제공될 수 있다. 화합물이 음으로 하전된 잔기를 형성하는 염의 예로는, 4급 아민(본원 다른 곳에 정의됨), 염, 예컨대 하이드로클로라이드, 설페이트, 카보네이트, 락테이트, 타르트레이트, 말레이트, 말리에이트, 숙시네이트를 포함하지만 이에 한정되지 않는다(상기 4급 아민의 질소원자는 적절한 산과 반응하는 본 발명의 선택된 화합물의 질소이다). 본 발명의 화합물이 음으로 하전된 종을 형성하는 염은 적절한 염기(예: 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 수산화칼슘(Ca(OH)₂), 등)과 화합물중의 카복실산 그룹의 반응에 의해 형성된 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘 염을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 사용하기 적합한 약학 조성물은 의도된 목적, 예컨대 PK 활성의 조율 또는 PK-관련 질환의 치료 또는 예방을 달성하기에 충분한 양으로 활성 성분을 함유하는 조성물을 포함한다.

더욱 구체적으로, 치료 효과량은 질병의 증상을 예방하거나, 완화시키거나 개선시키거나 또는 치료되는 환자의 생존을 연장시키기에 효과적인 양을 의미한다.

치료 효과량은 당해 분야의 숙련자의 능력내에서, 특히 본원에 제공된 상세한 개시내용에 비추어 잘 한정될 수 있다.

본 발명의 방법에 사용된 어떠한 화합물인 경우에도, 치료 효과량 또는 투여량은 세포 배양 검정으로부터 처음에 평가될 수 있다. 이후, 투여량은 세포 배양시 측정된 IC₅₀(즉, PK 활성의 최대 억제의 절반을 달성하는 시험 화합물의 농도)를 포함하는 순환 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에 사용하도록 조제될 수 있다. 이어, 이러한 정보는 인간에 유용한 투여를 더욱 정확히 결정하는데 사용될 수 있다.

본원에 기재된 화합물의 독성 및 치료 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약학적 절차, 예컨대 대상 화합물에 대한 IC₅₀ 및 LD₅₀(둘 모두는 본원 다른 곳에 개시되어 있음)을 측정함으로써 측정될 수 있다. 이들 세포 배양 검정 및 동물

연구로부터 얻어진 데이터는 인간에 사용하기 위한 투약 범위를 배합하는데 사용될 수 있다. 투약량은 사용된 투약 형태 및 이용된 투여 경로에 따라 변할 수 있다. 정확한 조제, 투여 경로 및 투약량은 환자의 상태를 고려하여 의사 개인에 의해 선택될 수 있다. (핀글(Fingl) 등의 문헌 ["The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1(1975)]을 참조함).

투약량 및 간격은 키나아제 조절 효과를 유지시키기에 충분한 플라즈마 수준의 활성 중을 제공하도록 개별적으로 조정될 수 있다. 이러한 플라즈마 수준은 최소 효과 농도(MEC)로 지칭된다. MEC는 각 화합물에 대해 변할 것이지만 생체의 데이터로부터 평가될 수 있으며, 예컨대 50 내지 90% 억제율 달성하는데 필요한 농도가 본원에 기재된 검정을 사용하여 확인될 수 있다. MEC를 달성하는데 요구되는 투약량은 개개의 특성 및 투여 경로에 따라 다를 것이다. HPLC 검정 또는 생물검정은 플라즈마 농도를 측정하는데 사용될 수 있다.

투약 간격도 또한 MEC 값을 이용하여 결정할 수 있다. 화합물은 10 내지 90%, 바람직하게는 30 내지 90%, 가장 바람직하게는 50 내지 90%의 시간 동안 MEC를 상기 플라즈마 수준으로 유지시키는 섭생법을 이용하여 투여될 수 있다.

현재, 화학식 I의 화합물의 치료 효과량은 대략 0.25 내지 1500mg/m²/일, 바람직하게는 약 3mg/m²/일, 더더욱 바람직하게는 50mg/qm qd에서 400mg/qd일 수 있다.

사이클로옥시게나아제 억제제의 치료 효과량은 상기 징후의 치료에 대해 약 0.1 내지 약 10,000mg이고, 바람직한 수준은 약 1.0 내지 약 1,000mg이다.

다른 항암제와 조합되어 단일 투약 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 치료된 수용자 및 특정 투여 방식에 따라 변할 것이다.

국소 투여 또는 선택적 흡수의 경우, 약물의 효과적인 국소 농도는 플라즈마 농도와 관련되지 않을 수 있고, 본 발명에 공지된 다른 절차는 올바른 투약량 및 간격을 정의하는데 사용될 수 있다.

물론, 투여된 조성물의 양은 치료되는 환자, 고통의 심각성, 투여 방식, 진찰하는 의사의 판단 등에 따라 달라질 수 있다.

조성물은 목적에 따라 활성 성분을 함유한 하나 이상의 단위 투약 형태를 함유하는 팩 또는 디스펜서 장치, 예컨대 FDA 승인된 키트로 존재할 수 있다. 팩은 예컨대 금속 또는 플라스틱 호일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여에 관한 지시가 수반될 수 있다. 또한, 팩 또는 디스펜서는 약학물의 제조, 용도 또는 판매를 규정하는 정부 기관에 의해 정해진 형태로 용기와 관련된 공지가 수반될 수 있으며, 이러한 공지는 인간 또는 수의학적 투여의 조성물의 형태의 기관에 의한 승인이 반영된 것이다. 이러한 공지는 예컨대 삽입물의 처방 약물에 대한 미국식품의약국에 의해 승인된 표지문일 수 있거나, 승인된 산물 삽입물일 수 있다. 혼합성 약학적 담체로 조제된 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물이 또한 제조되어 적절한 용기에 위치되고, 지시된 징후의 치료를 위해 라벨링된다. 라벨에 지시된 적합한 징후는 종양, 혈관신생의 억제, 섬유증의 치료, 당뇨 등을 포함할 수 있다.

또한, 본원에 기재된 화합물, 그의 염 또는 선구약물이 전술한 질병 및 질환의 치료를 위해 다른 화학치료제와 조합될 수 있는 것도 본 발명의 양태이다. 예를 들어, 본 발명의 화합물, 염 또는 선구약물은 알킬화제, 예컨대 플루오우라실(5-FU) 단독으로 조합되거나 또는 루코보린과 추가로 조합하여; 또는 다른 피리미딘 유사체(예컨대, UFT, 카페시타빈, 겐시타빈 및 사이타라빈), 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판(만성 과립성 백혈병 치료에 사용됨), 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예컨대 벤조데파, 카보쿠온, 메투레데파 및 우레데파; 에틸렌이민 및 메틸멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌에티오포스포라미드 및 트리메틸올멜라민; 및 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실(만성 림프성 백혈병, 원발성 매크로글로불린혈증 및 비-호지킨림프종의 치료에 사용됨), 사이클로포스파미드(호지킨병, 다발성 골수종, 신경아세포종, 유방암, 난소암, 폐암, 율름 종양 및 횡문근육종의 치료에 사용됨), 에스트라무스틴, 이포스파미드, 노벤브리친, 프레드니무스틴 및 우라실 머스타드(원발성 혈소판증가증, 비-호지킨림프종, 호지킨병 및 난소암의 치료에 사용됨); 및 트리아진, 예컨대 다카르바진(연조직 육종의 치료에 사용됨)의 예로 들지만 이에 한정되지 않는 알킬화제와 조합될 수 있다.

본 발명의 화합물, 염 또는 선구약물은, 폴산 유사체, 예컨대 메토트렉세이트(급성 림프성 백혈병, 용모상피암, 근상식육종, 유방암, 두경부암 및 골육종의 치료에 사용됨) 및 프테로프테린; 및 급성 과립성 백혈병, 급성 림프성 백혈병 및 만성 과립성 백혈병의 치료에 사용되는 것으로 알려진 푸린 유사체, 예컨대 머캅토프린 및 티오구아닌을 예로 들지만 이에 한정되지 않는 다른 대사길항물질 화학치료제와 조합하여 사용될 수도 있다.

본 발명의 화합물, 염 또는 선구약물이 또한 빈블라스틴(유방암 및 고환암의 치료에 사용됨), 빈크리스틴 및 빈데신; 에피포도파이로토신, 예컨대 에토포사이드 및 테니포사이드(둘다 고환암 및 카포시 육종의 치료에 유용함); 항생 화학치료제, 예컨대 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 미토마이신(위암, 경부암, 결장암, 유방암, 방광암 및 췌장암을 치료하는데 사용됨), 닥티노마이신, 테모줄로마이드, 플라카마이신, 블레오마이신(피부, 식도 및 비뇨생식기로 암의 치료에 사용됨); 및 효소 화학치료제, 예컨대 L-아스파라기나아제를 예로 들지만 이에 한정되지 않는 천연 산물계 화학치료제와 조합하여 사용될 수 있다.

상기에 부가하여, 또한 본 발명의 화합물, 염 또는 선구약물은, 백금 배위 착체(시스플라틴 등); 치환된 우레아, 예컨대 하이드록시우레아; 메틸하이드라진 유도체, 예컨대 프로카바진; 부신피질 억제제, 예컨대 미토탄, 아미노글루테티미드; 호르몬 및 호르몬 길항물질, 예컨대 부신피질 자극 호르몬(예: 프레드니손), 프로게스테론(예: 하이드록시프로게스테론 카프로에이트); 에스트로겐(예: 디에틸stil베스테롤); 항에스트로겐, 예컨대 타목시펜; 안드로겐, 예컨대 테스토스테론 프로피오네이트; 및 아로마타아제 억제제, 예컨대 아나스트로졸과 조합하여 사용될 수도 있다.

당해 분야에 공지된 다른 항신생물제가 본 발명의 조합 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 항신생물제 및 기타 항신생물제의 예는 1998년 12월 23일자로 출원한 미국 특허출원 제 60/113,786 호; 및 PCT 출원 공개번호 WO 00/38716 호에 제시되어 있으며, 상기 개시내용은 본원에 참조로 인용된다.

마지막으로, 본 발명의 화합물의 조합물은 고형 종양 암 또는 급성 골수성(비-림프성) 백혈병을 예로 들지만 이에 한정되지 않는 백혈병의 치료를 위한 마이트산트론과 조합시 효과적인 것이다.

실시예

합성 실시예

하기 제조에 및 실시예는 당해 분야의 숙련자가 더욱 명확하게 이해하고 본 발명을 실행할 수 있도록 제공된다. 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 고려되어서는 안되며 단지 예시적이고 대표적인 것으로서만 고려되어야 한다.

본 발명의 화학식 I의 화합물의 단백질 키나아제 억제제의 합성

일반적인 합성 절차:

하기 일반적인 방법론은 본 발명의 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다.

적절히 치환된 2-옥신돌(1 당량), 적절히 치환된 알데하이드(1.2 당량) 및 염기(0.1 당량)를 용매(1 내지 2mL/밀리몰 2-옥신돌)중에 혼합시킨 후, 혼합물을 약 2 내지 약 12시간 동안 가열한다. 냉각시킨 후, 형성되는 침전물을 여과하고, 저온 에탄올 또는 에테르로 세척하고, 진공 건조시켜 고체 생성물을 수득한다. 침전물이 형성되지 않는 경우, 반응 혼합물을 농축시키고, 잔여물을 디클로로메탄/에테르로 분쇄하고, 생성된 고체를 여과에 의해 수거한 후, 건조시킨다. 생성물은 선택적으로 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다.

염기는 유기 또는 무기 염기일 수 있다. 유기 염기가 사용되는 경우, 바람직하게는 질소 염기이다. 유기 질소 염기의 예로는 디이소프로필아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 아닐린, 피리딘, 1,8-디아자비사이클로[5.4.1]운데크-7-엔, 피롤리딘 및 피페리딘을 들 수 있으며, 이에 한정되지는 않는다.

무기 염기의 예로는 암모니아, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 수산화물, 인산염, 탄산염, 중탄산염, 중황산염 및 아미드가 있지만 이에 한정되지 않는다. 알칼리 금속으로는 리튬, 나트륨 및 칼륨을 포함하며, 알칼리 토금속으로는 칼슘, 마그네슘 및 바륨을 포함한다.

본 발명의 현재 바람직한 실시양태에서, 용매가 양성자성 용매, 예컨대 물 또는 알콜인 경우, 염기는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 무기 염기, 바람직하게는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 수산화물이다.

공지된 유기 합성의 일반 원리 및 본원의 개시내용 모두에 따라, 반응에 가장 적합한 염기가 고려되는 것은 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

반응을 수행하는 용매는 양성자성 또는 비양성자성 용매일 수 있으며, 바람직하게는 양성자성 용매이다. "양성자성 용매"는 수소 원자가 감지할 정도의 산성이 되게 함으로써 수소 결합을 통해 용질과 "공유"될 수 있는 산소 또는 질소 원자와 공유 결합된 수소 원자(들)을 갖는 용매이다. 양성자성 용매의 예로는 물 및 알코올을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

"비양성자성 용매"가 극성 또는 비극성일 수 있지만, 어느 경우에도 산성 수소를 함유하지 않으므로 수소가 용질과 결합할 수 없다. 비극성 비양성자성 용매의 예로는 펜탄, 헥산, 벤젠, 톨루엔, 염화메틸렌 및 사염화탄소가 있지만 이에 한정되지 않는다. 극성 비양성자성 용매의 예는 클로로포름, 테트라하이드로푸란, 디메틸설폭사이드 및 디메틸포름아미드가 있다.

본 발명의 현재 바람직한 실시양태에서, 용매는 양성자성 용매, 바람직하게는 물 또는 에탄올과 같은 알콜이다.

반응은 실온보다 높은 온도에서 수행한다. 온도는 일반적으로 약 30℃ 내지 약 150℃, 바람직하게는 약 80℃ 내지 약 100℃, 가장 바람직하게는 약 75℃ 내지 약 85℃이며, 이는 대략 에탄올의 비점이다. "약"이란, 온도 범위가 바람직하게는 언급된 온도의 10℃ 이내, 더욱 바람직하게는 언급된 온도의 5℃ 이내, 가장 바람직하게는 언급된 온도의 2℃ 이내임을 의미한다. 따라서, 예컨대 "약 75℃"란 $75^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, 바람직하게는 $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, 가장 바람직하게는 $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 의미한다.

2-옥신들 및 알데하이드는 화학 기술분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 용이하게 합성될 수 있다. 본 발명의 화합물을 형성하기 위한 다른 합성 경로가 이용될 수 있으며, 하기는 제한하지 않는 예로서 제공되는 것임을 당해 분야의 숙련자에 의해 이해될 것이다.

방법 A: 피롤의 포르밀화

POCl_3 (1.1 당량)를 -10℃에서 디메틸포름아미드(3 당량)에 적가한 후, 디메틸포름아미드에 용해된 적절한 피롤을 첨가한다. 2시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 H_2O 로 희석시키고, 10N KOH를 사용하여 pH 11로 염기화한다. 형성되는 침전물을 여과에 의해 수거하고, H_2O 로 세척하고, 진공 오븐에서 건조시켜 목적하는 알데하이드를 수득한다.

방법 B: 피롤카복실산 에스테르의 비누화

EtOH중의 피롤카복실산 에스테르와 KOH(2 내지 4 당량)의 혼합물을 반응 완결이 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 확인될 때까지 환류시킨다. 냉각된 반응 혼합물을 1N HCl로 pH 3으로 산성화한다. 형성되는 침전물을 여과에 의해 수거하고, H_2O 로 세척하고, 진공 오븐에서 건조시켜 목적하는 피롤카복실산을 수득한다.

방법 C: 아미드화

디메틸포름아미드(0.3M)중에 용해된 피롤카복실산의 교반된 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필)카보디이미드(1.2 당량), 1-하이드록시벤조트리아졸(1.2 당량) 및 트리에틸아민(2 당량)을 첨가한다. 적절한 아민을 첨가하고(1 당량), TLC에 의해 완결이 확인될 때까지 반응물을 교반한다. 이어서, 에틸 아세테이트를 반응 혼합물에 첨가하고, 용액을 포화 NaHCO_3 및 염수(여분의 염 사용)로 세척하고, 무수 MgSO_4 상에서 건조시키고, 농축시켜 목적하는 아미드를 수득한다.

방법 D: 카복실산 치환기를 함유하는 옥신들 및 알데하이드의 축합

에탄올(0.4M)중의 옥신들(1 당량), 알데하이드 1 당량 및 피페리딘(또는 피롤리딘) 1 내지 3 당량의 혼합물을 TLC에 의해 반응 완결이 확인될 때까지 90 내지 100℃에서 교반한다. 이어서, 혼합물을 농축시키고, 잔여물을 2N HCl로 산성화한다. 형성되는 침전물을 H_2O 및 EtOH로 세척한 후, 진공 오븐에서 건조시켜 생성물을 수득한다.

방법 E: 카복실산 치환기를 함유하지 않는 옥신들 및 알데하이드의 축합

에탄올(0.4M)중의 옥신들(1 당량), 알데하이드 1 당량 및 피페리딘(또는 피롤리딘) 1 내지 3 당량의 혼합물을 TLC에 의해 반응 완결이 확인될 때까지 90 내지 100℃에서 교반한다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 형성되는 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하고, 건조시켜 생성물을 수득한다. 침전물이 반응 혼합물의 냉각시 형성되지 않는다면, 혼합물을 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피로 정제한다.

C: 옥신들 합성의 예

대표적인 옥신들의 합성의 하기 실시예는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 본 발명의 화합물을 제조하는데 사용되는 제시된 옥신들뿐 아니라 기타 옥신들에 대한 다른 경로들은 하기 개시내용에 기초하여 당해 분야의 숙련자에게 명백해질 것이다. 이러한 합성 및 옥신들은 본 발명의 범위 및 취지 내에 있다.

5-아미노-2-옥신들

5-니트로-2-옥신들(6.3g)을 탄소 상 10% 팔라듐 상에서 메탄올중에 수소화하여 백색 고체로서 표제 화합물 3.0g(6.0% 수율)을 수득하였다.

5-브로모-2-옥신들

20ml의 아세토니트릴중의 2-옥신들(1.3 g)을 -10℃로 냉각시키고, N-브로모숙신이미드 2.0g을 교반하에 서서히 첨가하였다. 반응물을 -10℃에서 1시간 동안, 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 침전물을 수거하고, 물로 세척하고, 건조시켜 표제 화합물 1.9g(90% 수율)을 수득하였다.

4-메틸-2-옥신들

무수 에테르 20ml중의 디에틸 옥살레이트(30ml)를 무수 에테르 50ml중에 현탁시킨 포타슘 에톡사이드 19g에 교반하에 첨가하였다. 혼합물을 얼음 욕에서 냉각시키고, 무수 에테르 20ml중의 3-니트로-*o*-자일렌 20ml를 서서히 첨가하였다. 짙은 암적색 혼합물을 0.5시간 동안 환류하에 가열하고, 암적색 고체로 농축시키고, 대부분의 모든 고체가 용해될 때까지 10% 수산화나트륨으로 처리하였다. 암적색 혼합물을 적색이 황색으로 변할 때까지 30% 과산화수소로 처리하였다. 또는, 암적색이 더 이상 존재하지 않을 때까지 혼합물을 10% 수산화나트륨 및 30% 과산화수소로 처리하였다. 고체를 여과하고, 여액을 6N 염산으로 산성화하였다. 생성된 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 물로 세척하고, 진공하에 건조시켜 회백색 고체로서 2-메틸-6-니트로페닐아세트산 9.8g(45% 수율)을 수득하였다. 고체를 탄소상 10% 팔라듐 상에서 메탄올중에 수소화하여 백색 고체로서 표제 화합물 9.04g을 수득하였다.

7-브로모-5-클로로-2-옥신들

5-클로로-2-옥신들(16.8g) 및 N-브로모숙신이미드 19.6g을 아세토니트릴 140ml중에 현탁시키고 3시간 동안 환류시켰다. 환류 2시간에서의 박막 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트)는 5-클로로-2-옥신들 또는 N-브로모숙신이미드 (Rf 0.8), 생성물(Rf 0.85) 및 제 2 생성물(Rf 0.9)(분획물은 추가의 환류 시간 이후에도 변화지 않는다)을 나타내었다. 혼합물을 10℃로 냉각시키고, 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올 25ml로 세척하고, 펄에서 20분 동안 흡입 건조하여 습윤 생성물 14.1g(56% 수율)을 수득하였다. 고체를 변성 에탄올 200ml중에 현탁시키고, 슬러리를 교반하에 세척하고, 10분 동안 환류시켰다. 혼합물을 얼음 욕에서 10℃로 냉각시켰다. 고체 생성물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올 25ml로 세척하고, 진공하에 40℃에서 건조시켜 7-브로모-5-클로로-2-옥신들 12.7g(51% 수율)을 수득하였다.

5-플루오로-2-옥신들

5-플루오로이사틴(8.2 g)을 하이드라진 하이드레이트 50ml중에 용해시키고, 1.0시간 동안 환류시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 빙수에 부었다. 이어서, 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 진공 오븐에서 건조시켜 표제 화합물을 수득하였다.

5-니트로-2-옥신들

2-옥신들(6.5g)을 진한 황산 25ml중에 용해시키고, 훈증(fuming) 질산 2.1ml를 적가하는 동안 혼합물을 -10 내지 -15℃에서 유지시켰다. 질산을 첨가한 후, 반응 혼합물을 0.5시간 동안 0℃에서 교반하고, 빙수에 부었다. 침전물을 여과에 의해 수거하고, 물로 세척하고, 50% 아세트산으로부터 결정화하였다. 이어서, 결정성 생성물을 여과한 후, 물로 세척하고, 진공하에 건조시켜 5-니트로-2-옥신들 6.3g(70%)를 수득하였다.

5-아미노설폰-2-옥신들

클로로설폰산 27ml로 충전한 100ml 플라스크에 2-옥신돌 13.3g을 서서히 첨가하였다. 첨가하는 동안 반응 온도를 30℃ 이하로 유지하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 1.5시간 동안 실온에서 교반하고, 1시간 동안 68℃로 가열하고, 냉각시키고, 물에 부었다. 침전물을 물로 세척하고, 진공 오븐에서 건조시켜 추가의 정제없이 사용되는 5-클로로설폰-2-옥신돌 11.0g(50% 수율)을 수득하였다.

5-클로로설폰-2-옥신돌(2.1g)을 에탄올 10ml중의 수산화암모늄 10ml에 첨가하고, 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 농축시키고, 진공 여과에 의해 고체를 수거하여 회백색 고체로서 표제 화합물 0.4g(20% 수율)을 수득하였다.

5-이소프로필아미노설폰-2-옥신돌

클로로설폰산 27ml로 충전한 100ml 플라스크에 2-옥신돌 13.3g을 서서히 첨가하였다. 반응 온도를 첨가하는 동안 30℃ 이하로 유지시켰다. 반응 혼합물을 1.5시간 동안 실온에서 교반하고, 1시간 동안 68℃로 가열하고, 냉각시키고, 물에 부었다. 형성된 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 진공 오븐에서 건조시켜 추가의 정제 없이 사용되는 5-클로로설폰-2-옥신돌 11.0g(50%)을 수득하였다.

디클로로메탄 50ml중의 5-클로로설폰-2-옥신돌 3g, 이소프로필아민 1.15g 및 피리딘 1.2ml의 현탁액을 백색 고체가 형성되는 시간 동안인 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 슬러리를 고온 에탄올로 세척하고, 냉각시키고, 진공 여과에 의해 수거하고, 진공하에 40℃에서 밤새 건조시켜 5-이소프로필아미노설폰-2-옥신돌 1.5g(45%)을 수득하였다.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.69 (s, br, 1H, NH), 7.63 (dd, *J* = 2 및 8 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7 Hz, 1H, NH-SO₂-), 6.93 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.14-3.23 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 0.94 (d, *J* = 7 Hz, 6H, 2xCH₃).

5-페닐아미노설폰-2-옥신돌

디클로로메탄(20ml)중의 5-클로로설폰-2-옥신돌(1.62g, 7밀리몰), 아닐린(0.782ml, 8.4밀리몰) 및 피리딘(1ml)의 현탁액을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(300ml)로 희석시키고, 1N 염산(16ml)으로 산성화하였다. 유기층을 중탄산나트륨 및 염수로 세척하고, 건조시키고, 농축시켰다. 잔여물을 에탄올(3ml)로 세척한 후, 메탄올/디클로로메탄 1:9로 용출시키는 실리카 겔 상에서 크로마토그래피하여 5-페닐아미노설폰-2-옥신돌을 수득하였다.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.71 (s, br, 1H, NH), 10.10 (s, br, 1H, NH), 7.57-7.61 (m, 2H), 7.17-7.22 (m, 2H), 7.06-7.09 (m, 2H), 6.97-7.0 (m, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.52 (s, 2H).

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설폰산 피리딘-3-일아미드

피리딘(15ml)중의 5-클로로설폰-2-옥신돌(3g) 및 3-아미노피리딘(1.46g)의 용액을 밤새도록, 즉 갈색 고체가 존재하는 동안 실온에서 교반하였다. 고체를 여과하고, 에탄올로 세척하고, 진공하에 건조시켜 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설폰산 피리딘-3-일아미드 1.4g(38%)을 수득하였다.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10.74 (s, 1H, NH), 10.39 (s, 1H, SO₂NH), 8.27-8.28 (d, 1H), 8.21-8.23 (m, 1H), 7.59-7.62 (m, 2H), 7.44-7.68 (m, 1H), 7.24-7.28 (m, 1H), 6.69-6.71 (d, 1H), 3.54 (s, 2H).

MS *m/z* (APCI+) 290.2.

5-페닐옥신돌

5-브로모-2-옥신돌(5g, 23.5밀리몰)을 교반하고 거의 가열하지 않으면서 톨루엔 110ml 및 에탄올 110ml중에 용해시켰다. 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(1.9g, 1.6밀리몰)에 이어 2M 수성 탄산나트륨 40ml(80밀리몰)를 첨가하였다. 이 혼합물에 벤젠 보론산(3.7g, 30.6밀리몰)을 첨가하고, 혼합물을 12시간 동안 100℃ 오일 욕에서 가열하였다. 반응물을

냉각시키고, 에틸 아세테이트(500ml)로 희석시키고, 포화 중탄산나트륨(200ml), 물(200ml), 1N HCl(200ml) 및 염수(200ml)로 세척하였다. 유기층을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 농축시켜 갈색 고체를 수득하였다. 디클로로메탄으로 분쇄하여 황갈색 고체로서 5-페닐-2-옥신돌 3.8g(77%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.4 (br s, 1H, NH), 7.57 (dd, $J = 1.8$ 및 7.2 Hz, 1H), 7.5 to 7.35 (m, 5H), 7.29 (m, 1H), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.51 (s, 2H, CH_2CO).

MS m/z 209 [M^+].

유사한 방식으로, 하기 옥신돌들을 제조할 수 있다:

6-(3,5-디클로로페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.46 (br, 1H, NH), 7.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.27 (m, 2H), 7.05 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 3.5 (s, 2H).

MS-EI m/z 277/279 [M^+].

6-(4-부틸페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.39 (s, 1H, NH), 7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8$ Hz, 3H), 7.17 (dd, $J = 1.5$ 및 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH_2CO), 2.60 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.57 (m, 2H, CH_2), 1.32 (m, 2H, CH_2), 0.9 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3).

6-(5-이소프로필-2-메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.29 (br s, 1H, NH), 7.16-7.21 (m, 2H), 7.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.97-7.01 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.47 (s, 2H, CH_2CO), 2.86 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 281 [M^+].

6-(4-에틸페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.39 (br s, 1H, NH), 7.50 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 1.6$ & 7.5 Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 3.48 (s, 2H, CH_2CO), 2.63 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.20 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH_2CH_3).

MS-EI m/z 237 [M^+].

6-(3-이소프로필페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.37 (br s, 1H, NH), 7.43 (m, 1H), 7.35-7.39 (m, 1H), 7.17-7.27 (m, 3H), 7.01 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.49 (s, 2H, CH_2CO), 2.95 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 251 [M^+].

6-(2,4-디메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.28 (br s, 1H, NH), 7.17 (m, 2H), 6.93 (dd, J = 1.6 & 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 2.4 & 8.5 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.45 (s, 2H, CH_2CO).
MS-EI m/z 269 [M] $^+$.

6-피리딘-3-일-1,3-디하이드로인돌-2-온

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.55 (dd, J = 1.8 및 5.7 Hz, 1H), 8 (m, 1H), 7.45 (dd, J = 5.7 및 9.3 Hz, 1H), 7.3 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.51 (s, 2H, CH_2CO).
MS m/z 210 [M] $^+$.

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-4-카복실산 (3-클로로-4-메톡시페닐)-아미드

디메틸포름아미드(15ml)중의 4-카복시-2-옥신돌(200mg, 1.13밀리몰) 및 3-클로로-4-메톡시페닐아민(178mg, 1.13밀리몰)의 용액에 실온에서 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(BOP 시약, 997 mg, 2.26밀리몰)에 이어 4-디메틸아미노피리딘(206mg, 1.69밀리몰)을 첨가하였다. 혼합물을 72시간 동안 실온에서 교반하였다. 이어서, 반응물을 에틸 아세테이트(300ml)로 희석시키고, 포화 중탄산나트륨(100ml), 물, 2N 염산(100ml), 물 ($3 \times 200\text{ml}$) 및 염수로 세척하였다. 이어서, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 잔여물을 에틸 아세테이트로 분쇄하여 분홍색 고체로서 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-4-카복실산 (3-클로로-4-메톡시페닐)-아미드를 수득한다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.50 (s, br, 1H, NH), 10.12 (s, br, 1H, NH), 7.9 (s, J = 2.5 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 2.5 & 9 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 2H, CH_2).
MS-EI m/z 316 [M] $^+$.

4-카복시-2-옥신돌

헥산(2M)중의 트리메틸실릴디아조메탄의 용액을 더 이상의 기체 방출이 나타나지 않을 때까지 실온에서 메탄올 20ml중의 2-클로로-3-카복시-니트로벤젠 2.01g의 용액에 적가하였다. 이어서, 아세트산을 첨가하여 과량의 트리메틸실릴디아조메탄을 켄칭시켰다. 반응 혼합물을 진공하에 증발시키고, 잔여물을 밤새 오븐에서 건조시켰다. 수득된 2-클로로-3-메톡시카보닐니트로벤젠은 하기 반응에 대해 충분히 순수하였다.

디메틸 말로네이트(6.0ml)를 DMSO 15ml중의 수소화나트륨 2.1g의 얼음-냉각된 현탁액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 100°C에서 교반한 후, 실온으로 냉각시켰다. 2-클로로-3-메톡시카보닐니트로벤젠(2.15g)을 한번에 첨가하고, 혼합물을 1.5시간 동안 100°C로 가열하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 빙수에 붓고, pH 5로 산성화시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜 디메틸 2-메톡시카보닐-6-니트로페닐-말로네이트 3.0g을 수득하였다.

디메틸 2-메톡시카보닐-6-니트로페닐말로네이트(3.0g)을 6N 염산 50ml에서 밤새 환류시켰다. 혼합물을 농축 건조시키고, 에탄올 20ml 및 염화주석(II) 1.1g을 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 농축시키고, 용출액으로서 에틸 아세테이트:헥산:아세트산을 사용하여 실리카 겔 상에서 크로마토그래피하여 백색 고체로서 4-카복시-2-옥신돌 0.65g(37%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 12.96 (s, br, 1H, COOH), 10.74 (s, br, 1H, NH), 7.53 (d, J = 8Hz, 1H), 7.39 (t, J = 8Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8Hz, 1H), 3.67 (s, 2H).

D. 피롤 치환된 2-인돌리논의 합성

실시예 1

4-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산

4-메틸-2-피롤카복실산 에틸 에스테르(시판됨)을 방법 A를 사용하여 포르밀화하여 5-포르밀-4-메틸-2-피롤카복실산 에틸 에스테르(73%)를 수득하였다. 이어서, 방법 B를 사용하여 가수분해하여 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산(58%)을 수득하였다.

옥신돌(133mg, 1밀리몰)을 방법 D를 사용하여 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산(153mg)과 축합시켜 오렌지색-적색 고체로서 표제 화합물 268mg(100%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.84 (s, br, 1H, NH), 12.84 (s, br, 1H, COOH), 10.98 (s, br, 1H, NH), 7.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.67 (s, 1H, H-비닐), 7.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H, CH_3).
MS (네가티브 모드) 266.8 $[\text{M}-1]^+$.

실시예 2

4-메틸-5-(1-메틸-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산

1-메틸-1,3-디하이드로인돌-2-온(146mg, 1밀리몰)을 방법 D를 사용하여 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산(153mg)과 축합시켜 표제 화합물 250mg(86%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 12.88 (s, br, 1H, 7.83 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H, H-비닐), 7.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.02-7.09 (m, 2H), 6.70 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H, CH_3).
MS m/z 283.0 $[\text{M}+1]^+$.

실시예 3

4-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 메틸 에스테르

옥신돌(105mg, 0.79밀리몰)을 방법 E를 사용하여 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 메틸 에스테르(110mg, 0.67밀리몰)와 축합시켜 표제 화합물 153.2mg(81%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.98 (s, br, 1H, NH), 10.97 (s, br, 1H, NH), 7.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.67 (s, 1H, H-비닐), 7.2 (dt, $J = 1.2$ & 7.7 Hz, 1H), 7.01 (dt, $J = 1.2$, 7.7 Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 2$ Hz, 1H).
MS (ES) m/z 283 $[\text{M}^++1]$.

실시예 4

5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르

5-클로로-1,3-디하이드로인돌-2-온(2.22g, 13.2밀리몰)을 방법 E를 사용하여 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르(2.43g)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 4.1g(94%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.95 (s, br, 1H, NH), 7.98 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.18 (dd, $J = 2.2$ & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 7.34 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.27 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).
MS-EI m/z 330 $[\text{M}^+]$.

실시예 5

5-(5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산

메탄올(25ml) 및 에탄올(25ml) 중의 5-(5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르(1.3g, 4밀리몰) 및 수산화칼륨의 혼합물을 밤새도록 환류하에 가열하였다. 불용성 물질을 여과에 의해 제거하고, 혼합물을 6N 염산으로 중화하여 표제 화합물 0.876g(70%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.80 (s, br, 1H, NH), 12.90 (s, br, 1H, COOH),

11.06 (s, br, 1H, NH), 8.02 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.81 (s, 1H, H-비닐), 7.20 (dd, $J = 1.8$ & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 6.72 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-3'), 2.35 (s, 3H, CH_3).

MS-EI m/z 302 [M^+].

실시예 6

5-(5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.16g, 0.76밀리몰)을 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일-프로필)아미드(0.2g, 방법 C에 의해 제조됨)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 60mg(17%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 8.42 (t,

$J = 5.8$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 8.12 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.30 (dd, $J = 1.8$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 6.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.22-3.31 (m, 2H, CH $_2$), 2.38-2.43 (m, 6H, 3xCH $_2$), 2.35 (s, 3H, CH $_3$), 1.62-1.71 (m, 6H, 3xCH $_2$).

MS-EI m/z 456 및 458 [M^+-1 및 M^++2].

실시예 7

5-(5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.16g, 0.75밀리몰)을 5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드(0.2g, 방법 C에 의해 제조됨)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 30mg(8%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 8.40

(m, 1H, CONHCH $_2$), 8.12 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.30 (dd, $J = 1.5$ & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7), 6.78 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.23 (m, 2H, CH $_2$), 2.38-2.45 (m, 6H, CH $_2$ & N(CH $_2$ CH $_3$) $_2$), 2.35 (s, 3H, CH $_3$), 1.61 (m, 2H, CH $_2$), 0.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, N(CH $_2$ CH $_3$) $_2$).

MS-EI m/z 458 및 460 [M^+-1 및 M^++2].

실시예 8

5-(5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(212mg, 1밀리몰)을 5-포르밀-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(방법 A, B 및 C에 의해 에틸 피롤-2-카복실레이트로부터 제조됨)와 축합시켜 표제 화합물 162mg(38%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.53 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 8.37 (t, 1H, CONHCH₂), 7.89 (m, 2H), 7.32 (dd, J = 2.0 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.80-6.84 (m, 2H), 3.3 (m, 2H, CH₂), 2.45-2.55 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
MS-EI m/z 430 및 432 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 9

5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(209mg, 1밀리몰)을 5-포르밀-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드와 축합시켜 표제 화합물 182mg(42%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.56 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 8.36 (t, 1H, CONHCH₂), 7.77 (s, 1H, H-비닐), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.96 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 3.31-3.32 (m, 2H, CH₂), 2.46-2.53 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 0.96 (t, J = 6.9 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
MS-EI m/z 428 [M^+].

실시예 10

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드-메틸아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(212mg, 1밀리몰)을 5-포르밀-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)메틸아미드와 축합시켜 표제 화합물 246mg(55%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.54 (s, br, 1H, NH), 11.06 (s, br, 1H, NH), 7.90 (m, 2H), 7.33 (dd, J = 1.8 & 8.4 Hz, 1H), 6.82-6.85 (m, 3H), 3.55 (s, br, 2H, CH₂), 3.25 (s, br, 3H, NCH₃), 2.57 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 2.45 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0.91 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
MS-EI m/z 444 및 446 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 11

5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)메틸아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(209mg, 1밀리몰)을 5-포르밀-1H-피롤-2-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)메틸아미드와 축합시켜 표제 화합물 277mg(63%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.58 (s, br, 1H, NH), 11.04 (s, br, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.33-7.36 (m, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.84 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 3.55 (s, br, 2H, CH₂), 3.25 (s, br, 3H, NCH₃), 2.58 (t, 2H, CH₂), 2.44 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0.92 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

실시예 12

3-메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

옥신돌(66.5mg, 0.5밀리몰)을 5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(방법 B 및 C에 의해 3-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르로부터 제조됨)와 축합시켜 표제 화합물 39mg(21%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.34 (s, br, 1H, NH), 10.88 (s, br, 1H, NH), 7.62-7.67 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 6.99 (m, 1H), 6.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 1$ Hz, 1H), 3.26-3.32 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 380 [M^+].

실시예 13

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(106mg, 0.5밀리몰)을 5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드와 축합시켜 표제 화합물 35mg(15%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.35 (s, br, 1H, NH), 11.00 (s, br, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-4), 7.80 (s, 1H, H-비닐), 7.74 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, CONHCH_2), 7.31 (dd, $J = 1.9$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 6.63 (s, 1H, H-3'), 3.26 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 458 및 460 [$\text{M}^+ - 1$ 및 $\text{M}^+ + 1$].

실시예 14

3-메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(105mg, 0.5밀리몰)을 5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드와 축합시켜 표제 화합물 67.8mg(30%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.37 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 7.23-7.73 (m, 11H), 3.29 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.64 (m, 2H, CH_2), 0.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 456 [M^+].

실시예 15

5-(5-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

5-메톡시-1,3-디하이드로인돌-2-온(82.5mg, 0.5밀리몰)을 5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드와 축합시켜 표제 화합물 80mg(39%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.45 (s, br, 1H, NH), 10.70 (s, br, 1H, NH), 7.68-7.70 (m, 2H), 7.32 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.72-6.79 (m, 2H), 6.60 (s, 1H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.28 (m, 2H, CH_2), 2.41-2.48 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, J = 7.0 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 410 [M^+].

실시예 16

5-(6-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

6-메톡시-1,3-디하이드로인돌-2-온(82.5mg, 0.5밀리몰)을 5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드와 축합시켜 표제 화합물 63mg(31%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.22 (s, br, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, NH), 7.39-7.63 및 6.37-6.55 (m, 6H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.3 (m, 2H, CH_2), 2.45 (m, 6H, CH_2 & $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.28 (s, 3H, CH_3), 1.63 (m, 2H, CH_2), 0.93 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 410 [M^+].

실시예 17

3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드

4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르(May, Donald A.; Lash, Timothy D.; J.Org.Chem., 1992, 57:18, 4820-4828)를 방법 A에 이어 B를 사용하여 포르밀화하여 3-포르밀-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산을 수득하였다.

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(1.43g, 6.8밀리몰)을 3-포르밀-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(1.97g)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 2.2g(67%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.47 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, NH), 8.0 (d, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, CH), 7.28 (dd, J = 2.1 및 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.16 (m, 1H, ArH), 6.8 (d, J = 8.3Hz, 1H, ArH), 3.3 (s, 2H, CONH), 2.5 (m, 6H, $3\times\text{NCH}_2$), 2.78 (br m, 2H, 피롤 CH_2), 2.72 (br m, 2H, 피롤 CH_2), 1.7 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.74 (br s, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 484 및 486 [M^+-1 및 M^++1].

실시예 18

3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(20mg, 0.1밀리몰)을 3-포르밀-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(30mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 33mg(46%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10.9 (s, 1H, NH), 8.0 (m, 1H, NH), 7.68 (m, 1H, ArH), 7.4 (m, 1H, ArH), 7.29 (d, $J = 1.9$ 및 8.5Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 2.7 (br m, 4H, $2\times\text{NCH}_2$), 2.4 (m, 8H, $4\times\text{NCH}_2$), 1.7 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.6 (br m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 499 및 501 [M^+ 및 $\text{M}^+ + 2$].

실시예 19

3-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(80mg, 0.4밀리몰)을 3-포르밀-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드(120mg)와 축합시켜 황갈색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 43mg(22%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.4 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH), 8.0 (m, 1H, NH), 7.69 (m, 1H, ArH), 7.49 (m, 1H, ArH), 7.28 (d, $J = 1.7$ 및 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 3.3 (br m, 2H, $2\times\text{NCH}_2$), 2.8 (m, 4H, $2\times$ 피롤 CH_2), 2.5 (br m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.6 (br m, 8H, $2\times$ 피롤 CH_2CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 및 CONHCH_2).

MS-EI m/z 497 및 499 [M^+ 및 $\text{M}^+ + 2$].

실시예 20

3-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

6-피리딘-3-일-1,3-디하이드로인돌-2-온(60mg, 0.4밀리몰)을 3-포르밀-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(80mg)와 축합시켜 적색조의 고체로서 표제 화합물 50mg(38%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.4 (s, 1H, NH), 11 (s, 1H, NH), 8.9 (d, 1H, NH), 8.7 (dd, 1H, ArH), 8.1 (dd, 1H, ArH), 7.9 (d, 1H, ArH), 7.6 (s, 1H, CH), 7.5 (dd, 1H, ArH), 7.3 (dd, 1H, ArH), 7.1 (m, 2H, ArH), 3.35 (m, 2H, CONHCH_2), 2.8 (m, 4H, $2\times$ 피롤 CH_2), 2.5 (br m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 및 NCH_2), 1.75 (br s, 4H, $2\times$ 피롤 CH_2CH_2), 0.9 (t, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 484 [M^+].

실시예 21

4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

디클로로에탄중의 벤조일 클로라이드(1 당량)와 알루미늄 클로라이드(1 당량)의 혼합물에 0℃에서 에틸 3,5-디메틸-2-피롤카복실레이트(1 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 4시간 동안 80℃에서 교반하였다. 이어서, 혼합물을 에틸 아세테이트(EtOAc) 및 H_2O 로 추출하였다. 합쳐진 유기 추출물을 포화 중탄산나트륨 및 염수로 세척하고, 건조시키고, 농축시켜 4-벤조일-3,5-디메틸-1H-피롤-2-카복실산을 수득하였다(51%).

테트라하이드로푸란(THF):아세트산(HOAc): H_2O 1:1:1 50ml중의 4-벤조일-3,5-디메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르(4.13g, 15.2밀리몰)와 세릭 암모늄 니트레이트(33g, 4 당량)의 혼합물을 밤새 환류시켰다. 이어서, 반응 혼합물을

냉각시키고, EtOAc로 추출한 후, 탄산나트륨으로 pH 9로 염기화하였다. 이어서, 유기층을 염수로 세척하고, 건조시키고 (MgSO₄), 농축시킨 후, 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 황색 고체로서 4-벤조일-5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르 3.25g(75%)을 수득하였다.

5-브로모-1,3-디하이드로-인돌-2-온을 방법 D를 사용하여 4-벤조일-5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산과 축합시켜 4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리텐메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산을 수득하였다.

이어서, 상기 카복실산을 방법 C를 사용하여 N,N-디에틸-1,3-프로판디아민과 커플링하여 표제 화합물을 수득하였다.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 7.96 (m, 1H, CONHCH₂), 7.76 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.68 (t, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.40 (s, 2H) 7.33 (dd, *J* = 1.6 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.46 (m, 6H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.65 (m, 2H, CH₂), 0.94 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS 전자 충격 *m/z* 564 [M⁺+1].

실시예 22

4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-모르폴린-4-임프로필)아미드

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14.10 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 7.92 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 7.69 (t, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.42 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 1.9 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.56 (m, 4H, 2xCH₂), 3.33 (m, 2H, CH₂), 2.35 (m, 6H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂).

실시예 23

4-벤조일-3-메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-임프로필)아미드

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.18 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.01 (m, 1H, CONHCH₂), 7.74 (m, 1H), 7.67 (m, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.32 (s, 1H, H-vinyl), 7.17 (m, 1H), 6.92 (m, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.44 (m, 6H, 3xCH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.65-1.75 (m, 6H, 3xCH₂).

MS 전자 충격 *m/z* 482 [M⁺].

실시예 24

4-벤조일-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-4-임프로필)아미드

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14.01 (s, 1H, NH), 11.18 (br s, 1H, NH), 7.98 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 2.0 & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.47 (m, 6H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.64 (m, 4H, 2xCH₂).

실시예 25

4-벤조일-3-메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.15 (s, 1H, NH), 11.16 (br s, 1H, NH), 7.98 (m, 1H, CONHCH₂), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.53-7.63 (m, 4H), 7.44 (m, 2H), 7.33-7.37 (m, 2H), 7.24 (s, 2H), 7.12 (s, 1H), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.43-2.48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃), 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.69 (m, 4H, 2xCH₂).

MS 전자 충격 m/z 558 [M^+].

실시예 26

4-벤조일-5-(6-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.99 (s, 1H, NH), 11.05 (br s, 1H, NH), 7.93 (m, 1H, CONHCH₂), 7.72 (m, 2H), 7.65 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.15 (s, 1H, H-비닐), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-4), 6.51 (dd, J = 2.3 & 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.44 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-7), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.46 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.72 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

MS 전자 충격 m/z 512 [M^+].

실시예 27

4-벤조일-5-(5-메톡시-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.24 (s, 1H, NH), 10.90 (br s, 1H, NH), 7.97 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.24 (s, 1H, H-비닐), 6.79 (m, 2H), 6.66 (m, 1H), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.43-2.48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 1.71 (m, 2H, CH₂), 1.66 (m, 4H, 2xCH₂).

MS 전자 충격 m/z 512 [M^+].

실시예 28

4-벤조일-5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.20 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.03 (m, 1H, CONHCH₂), 7.75 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.38 (s, 1H, H-비닐), 7.08 (m, 1H), 7.01 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 3.34 (m, 2H, CH₂), 2.42-2.48 (m, 6 H, 3xCH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

MS 전자 충격 m/z 500 [M^+].

실시예 29

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로-인돌-2-온을 4-아세틸-5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(방법 B 이어 방법 C에 의해 4-아세틸-5-포르밀-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 에틸 에스테르로부터 제조됨)와 축합시켜 표제 화합물을 수득하였다

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.19 (br s, 1H, NH), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 8.11 (s, 1H, H-비닐), 7.72 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, J = 1.8 & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 3.27 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.46 (m, 9 H, CH₃ & 3xCH₂), 1.64 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, J = 7.1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

실시예 30

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.14 (m, 1H, CONHCH₂), 8.10 (s, 1H, H-비닐), 7.70 (d, 1H, H-4), 7.36 (dd, J = 1.6 & 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7), 3.32 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.35-2.48 (m, 6H, 3xCH₃), 1.65-1.71 (m, 6H, 3xCH₂).

MS m/z 499 & 501 [M^+] & [$M^+ + 2$].

실시예 31

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-모르폴린-4-일프로필)아미드

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.20 (s, 1H, NH), 11.26 (br s, 1H, NH), 8.09 (m, 2H, H-비닐 & CONHCH₂), 7.73 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, J = 1.5 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.55 (m, 4H, 2xCH₂), 3.26 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.35 (m, 6H, 3xCH₃), 1.68 (m, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 514 & 516 [$M^+ - 1$] & [$M^+ + 1$].

실시예 32

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (3-하이드록시프로필)아미드

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.17 (s, 1H, NH), 11.25 (br s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-비닐), 8.03 (m, 1H, CONHCH₂), 7.71 (br s, 1H, H-4), 7.37 (br d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 4.51 (br s, 1H, OH), 3.51 (br s, 2H, CH₂), 3.36 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 445 & 447 [$M^+ - 1$] & [$M^+ + 1$].

실시예 34

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-모르폴린-4-일메틸)아미드

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.19 (s, 1H, NH), 11.14 (br s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-비닐), 7.84 (m, 1H, CONHCH₂), 7.71 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, J = 1.8 & 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 3.58 (m, 4H, 2xCH₂), 3.40 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.45 (m, CH₃ & CH₂).

MS-EI m/z 500 & 502 [M^+ -1] & [M^+ +1].

실시예 35

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 (2-피롤리딘-1-일메틸)아미드

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.17 (s, 1H, NH), 11.23 (s, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, H-비닐), 7.91 (m, 1H, CONHCH₂), 7.73 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.39 (dd, J = 1.9 & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7), 3.40 (m, 2H, CH₂), 2.62 (m, 2H, CH₂), 2.57 (s, 3H, CH₃CO), 2.49 (m, 4H, 2xCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.69 (m, 4H, 2xCH₂).

실시예 36

4-아세틸-5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-3-메틸-1H-피롤-2-카복실산 [2-(4-하이드록시페닐)에틸]아미드

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.21 (s, 1H, NH), 11.18 (s, 1H, OH), 9.09 (s, 1H, NH), 8.06-8.10 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 3.42 (m, 2H, CH₂), 2.72 (m, 2H, CH₂), 2.56 (s, 3H, CH₃CO), 2.37 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 507 & 509 [M^+ -1] & [M^+ +1].

실시예 37

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

H₂O 중의 2-아미노아세트페논 하이드로클로라이드(1 당량), 에틸 이소부티릴아세테이트(1.2 당량) 및 소듐 아세테이트(2.4 당량)의 혼합물을 18시간 동안 100℃에서 교반한 후, 실온으로 냉각시켰다. 수성층을 경사분리하고, 오일을 에틸 아세테이트중에 용해시켰다. 이어서, 물 및 염수로 세척하고, 건조시켜 적갈색 오일로서 2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르를 수득하였다(93%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.21 (s, br, 1H, NH), 7.14-7.27 (m, 5H), 6.70 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.02 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.65 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.22 (d, J = 7.5 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1.04 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 257 [M^+].

상기 피롤을 방법 A를 사용하여 포르밀화하여 적색조의 고체로서 5-포르밀-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르를 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.35 (s, br, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, CHO), 7.36 (s, 5H), 3.96 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.74 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.29 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.90 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS-EI m/z 285 [M^+].

피롤카복실산 에스테르를 방법 B를 사용하여 가수분해하여 베이지색 고체로서 5-포르밀-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산을 수득하였다(57%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.28 (s, br, 1H, COOH), 12.02 (s, br, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, CHO), 7.35 (s, 5H), 3.81 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.28 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 257 [M^+].

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(120mg, 0.31밀리몰)을 5-포르밀-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(방법 C에 의해 제조됨)와 축합시켜 표제 화합물 120mg(71%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.23 (s, br, 1H, NH), 11.08 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.55 (m, 7H, Ar-H & CONHCH_2), 7.30 (s, 1H, H-비닐), 7.26 (dd, J = 1.8 & 7.8 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.36 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.07 (m, 2H, CH_2), 2.34 (q, J = 7.1 Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.22 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH_2), 1.40 (m, 2H, CH_2), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 565.1 [$\text{M}^+ + 1$].

실시예 38

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산(127mg, 0.28밀리몰)을 3-피롤리딘-1-일-프로필아민(43mg, 0.336밀리몰)과 축합시켜 표제 화합물 140mg(66%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.40 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.47 (m, 7H), 7.23-7.27 (m, 2H), 6.84 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.36 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.08 (m, 2H, CH_2), 2.30 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.20 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 1.62 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 1.31 (d, J = 7.2 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 560 및 562 [$\text{M}^+ - 1$ 및 $\text{M}^+ + 1$].

실시예 39

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(57mg, 0.27밀리몰)을 5-포르밀-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(120mg)과 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 78g(53%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.23 (s, br, 1H, NH), 11.09 (s, br, 1H, NH), 7.38-7.51 (m, 6H), 7.25-7.28 (m, 2H), 7.19 (t, 1H, CONHCH₂), 6.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.43 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.11 (m, 2H, CH₂), 2.28-2.39 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, CH(CH₃)₂), 0.85 (t, J = 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 548 및 550 [M^+ -1 및 M^+ +1].

실시예 40

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 [3-(4-메틸피페라진-1-일)프로필]아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(53mg, 0.25밀리몰)을 5-포르밀-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 [3-(4-메틸피페라진-1-일)프로필]아미드(300mg)와 축합시켜 표제 화합물 65mg을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.22 (s, br, 1H, NH), 11.08 (s, br, 1H, NH), 7.23-7.50 (m, 9H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.37 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.05 (m, 2H, CH₂), 2.24 (m, 8H, 4xCH₂), 2.11 (m, 5H, CH₂ & CH₃), 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.31 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 589 및 591 [M^+ -1 및 M^+ +1].

실시예 41

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(170mg, 0.8밀리몰)을 방법 D를 사용하여 5-포르밀-2-이소프로필-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산(205mg)과 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 210mg(58%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.31 (s, br, 1H, NH), 11.16 (s, br, 1H, NH), 7.26-7.44 (m, 7H), 7.11 (s, 1H, H-vinyl), 6.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.34 (d, J = 6.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 452 [M^+ +1].

실시예 42

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일 에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(44mg, 0.21밀리몰)을 5-포르밀-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일 에틸)아미드(70mg, 상기 이소프로필 유사체와 동일한 방식으로 제조됨)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 0.03g(27%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.87 (s, br, 1H, NH), 11.11 (s, br, 1H, NH), 7.36-7.51 (m, 6H), 7.26 (dd, J = 1.8 & 8.1 Hz, 1H), 7.2 (s, 1H, H-비닐), 7.09 (m, 1H, CONHCH₂), 6.83 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.17 (m, 2H, NCH₂), 2.48 (m, CH₃), 2.29-2.35 (m, 6H, 3xNCH₂), 1.59 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 518 및 520 [M^+ -1 및 M^+ +1].

실시예 43

5-[6-(2-메톡시페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-(2-메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(50mg, 0.21밀리몰)을 5-포르밀-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(70mg)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.04g(35%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 7.48 (m, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.32 (m, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.16 (s, 1H, H-비닐), 7.08 (m, 2H), 7.03 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.19 (m, 2H, NCH_2), 2.49 (m, CH_3), 2.32-2.38 (m, 6H, $3\times\text{NCH}_2$), 1.59 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS-EI m/z 546 [M^+].

실시예 44

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(46mg, 0.22밀리몰)을 5-포르밀-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(65mg)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 60mg(55%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.86 (s, br, 1H, NH), 11.09 (s, br, 1H, NH), 7.47-7.49 (m, 2H), 7.38-7.41 (m, 4H), 7.26 (dd, $J = 2.2$ & 8.3 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H, H-비닐), 7.04 (m, 1H, CONHCH_2), 6.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.15 (m, 2H, NCH_2), 2.48 (m, CH_3), 2.16 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $3\times\text{NCH}_2$), 2.02 (s, 6H, $2\times\text{NCH}_3$).

MS m/z 493 및 494.8 [M^+ 및 M^++2].

실시예 45

5-[6-(2-메톡시페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드

6-(2-메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(53mg, 0.22밀리몰)을 5-포르밀-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(65mg)와 축합시켜 오렌지색 검으로서 표제 화합물 0.05g(44%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (s, br, 1H, NH), 11.02 (s, br, 1H, NH), 7.37-7.52 (m, 5H), 7.32 (m, 1H), 7.22-7.27 (m, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.08 (m, 2H), 7.03 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.15 (m, 2H, NCH_2), 2.49 (m, CH_3), 2.16 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, NCH_2), 2.02 (s, 6H, $2\times\text{NCH}_3$).

MS m/z 521 [M^++1].

실시예 46

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(60mg, 0.29밀리몰)을 5-포르밀-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르(75mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 78mg(60%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 14.01 (s, br, 1H, NH), 11.13 (s, br, 1H, NH), 7.42-7.46 (m, 3H), 7.27-7.34 (m, 4H), 7.12 (s, 1H), 6.84 (dd, $J = 2.2$ & 8.3 Hz, 1H), 3.99-4.03 (m, 2H, OCH_2CH_3), 2.61 (s, 3H, CH_3), 0.98-1.03 (m, 3H, OCH_2CH_3).

MS-EI m/z 450 및 452 [$\text{M}^+ - 1$ 및 $\text{M}^+ + 1$].

실시예 47

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.47g, 2.2밀리몰)을 5-포르밀-2-메틸-4-페닐-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(0.75g)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.11g(42%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.86 (s, br, 1H, NH), 7.42-7.46 (m, 3H), 7.37-7.50 (m, 7H), 7.24-7.28 (m, 2H), 6.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.09 (m, 2H, NCH_2), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.38 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$), 2.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, NCH_2), 1.42 (m, 2H, NCH_2), 0.87 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$).

MS-EI m/z 535.0 및 537 [M^+ 및 $\text{M}^+ + 2$].

실시예 48

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드

아세트산 중의 tert-부틸 3-옥소부티레이트와 아질산나트륨(1당량)의 혼합물을 실온에서 교반하여 tert-부틸-2-하이드록시이미노-3-옥소부티레이트를 수득하였다.

아세트산중의 에틸-3-옥소부티레이트(1 당량), 아연말(3.8당량) 및 조질의 tert-부틸-2-하이드록시이미노-3-옥소부티레이트를 1시간 동안 60°C에서 교반하였다. 반응 혼합물을 H_2O 에 붓고, 여액을 수거하여 2-tert-부틸옥시카보닐-3,5-디메틸-4-에톡시카보닐피롤을 수득하였다.

트리플루오로아세트산중의 2-tert-부틸옥시카보닐-3,5-디메틸-4-에톡시카보닐피롤과 트리에틸 오르토포르메이트(1.5당량)의 혼합물을 1시간 동안 15°C에서 교반하였다. 반응물을 농축시키고, 잔여물을 정제하여 황색 바늘 모양으로서 2,4-디메틸-3-에톡시카보닐-5-포르밀피롤(64%)을 수득하였다.

2,4-디메틸-3-에톡시카보닐-5-포르밀피롤을 방법 B를 이용하여 가수분해하여 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 수득하였다(90%).

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 12 (br s, 2H, NH 및 CO_2H), 9.58 (s, 1H, CHO), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3).

MS m/z 267 [M^+].

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.17g, 0.8밀리몰)을 방법 B를 이용하여 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(0.2g, 방법 C에 의해 제조됨)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 0.3g(83%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, br, 1H, NH), 10.94 (s, br, 1H, NH), 8.07 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4), 7.75 (s, 1H, H-비닐), 7.44 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.24 (dd, $J = 1.8$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 3.26-3.33 (m, 2H, NCH $_2$), 2.42 (s, 3H, CH $_3$), 2.41 (s, 3H, CH $_3$), 2.38 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2.18 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$).

MS-EI m/z 430 및 432 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 49

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.17g, 0.8밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(0.2g)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.13g(36%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.59 (s, br, 1H, NH), 10.93 (s, br, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 7.92$ Hz, 1H, H-4), 7.63-7.65 (m, 3H), 7.40-7.47 (m, 3H), 7.32-7.36 (m, 1H, Ar-H), 7.30 (dd, $J = 1.6$ & 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.11 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-7), 3.28-3.34 (m, 2H, NCH $_2$), 2.43 (s, 3H, CH $_3$), 2.41 (s, 3H, CH $_3$), 2.38 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2.18 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$).

MS-EI m/z 428 [M^+].

실시예 50

5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드

5-클로로-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.1g, 0.6밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(0.15g)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 0.22g(90%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.98 (s, br, 1H, NH), 7.96 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-4), 7.75 (s, 1H, H-비닐), 7.50 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.12 (dd, $J = 2.0$ & 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 3.26-3.31 (m, 2H, NCH $_2$), 2.42 (s, 3H, CH $_3$), 2.40 (s, 3H, CH $_3$), 2.36 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2.17 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$).

MS-EI m/z 386 [M^+].

실시예 51

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.17g, 0.8밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(0.2g)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 0.09g(26%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.98 (s, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-4), 7.76 (s, 1H, H-비닐), 7.42 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.24 (dd, $J = 1.7$ & 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-7), 3.23-3.32 (m, 2H, NCH $_2$), 2.46-2.55 (m, 6H, 3xNCH $_2$), 2.43 (s, 3H, CH $_3$), 2.42 (s, 3H, CH $_3$), 0.96 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, 2xNCH $_2$ CH $_3$).

MS-EI m/z 458 및 460 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 52

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.09g, 0.4밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(0.1g)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.14g(81%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.98 (, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-4), 7.76 (s, 1H, H-비닐), 7.53 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.24 (dd, $J = 1.9$ & 8.5 Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-7), 3.29-3.35 (m, 2H, NCH $_2$), 2.54 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2.47 (m, under DMSO), 2.42 (s, 3H, CH $_3$), 2.40 (s, 3H, CH $_3$), 1.66-1.69 (m, 4H, 2xCH $_2$).

MS-EI m/z 456 및 458 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 53

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.09g, 0.4밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드(0.1g)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.1g(59%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.63 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.77 (s, 1H, H-비닐), 7.71 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.65 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (dd, $J = 2.2$ & 8.4 Hz, 1H, H-6), 7.20 (s, 1H, Ar-H), 6.89 (s, 1H, Ar-H), 6.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 4.02 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, NCH $_2$), 3.18 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2.43 (s, 3H, CH $_3$), 2.41 (s, 3H, CH $_3$), 1.93 (m, 2H, CH $_2$).

MS-EI m/z 467 및 469 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 54

5-[6-(2-메톡시페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드

6-(2-메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(30mg, 0.13밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(30mg)와 축합시켜 황색-오렌지색 검으로서 표제 화합물 0.06g(100%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, br, 1H, NH), 10.89 (s, br, 1H, NH), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H, H-비닐), 7.46 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.28-7.35 (m, 2H), 6.99-7.11 (m, 4H), 3.76 (s, 3H, OCH $_3$), 3.27-3.31 (m, 2H, NCH $_2$), 2.43 (s, 3H, CH $_3$), 2.39 (s, 3H, CH $_3$), 2.37 (m, 2H, NCH $_2$), 2.18 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$).

MS-EI m/z 458 [M^+].

실시예 55

5-[6-(3-메톡시페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드

6-(3-메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(30mg, 0.13밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드(30mg)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 8mg(14%)을 수득하였다.

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.59 (s, br, 1H, NH), 10.92 (s, br, 1H, NH), 7.84 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H, H-비닐), 7.42 (m, 1H, CONHCH₂), 7.36 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 1.6 & 7.6 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 2.8 & 7.8 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.21-3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.36-2.40 (m, 2H, NCH₂), 2.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 458 [M⁺].

실시예 56

2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

5-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(80mg, 0.4밀리몰)을 방법 B를 사용하여 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(0.1g)와 축합시켜 표제 화합물 79mg(46%)을 수득하였다.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.66 (s, br, 1H, NH), 10.95 (s, br, 1H, NH), 8.15 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H, H-비닐), 7.71 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.40-7.47 (m, 4H), 7.31 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.2-3.31 (m, 2H, NCH₂), 2.46-2.55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.44 (s, 6H, 2xCH₃), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 456 [M⁺].

실시예 57

2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

5-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.04g, 0.2밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(0.04g)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물을 수득하였다.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.65 (s, br, 1H, NH), 10.96 (s, br, 1H, NH), 8.15 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H, H-비닐), 7.71 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.49 (t, J = 6.3 Hz, 1H, CONHCH₂), 7.41-7.46 (m, 3H), 7.31 (m, 1H), 6.95 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.08 (m, 4H, 2xNCH₂), 3.32 (m, 2H, NCH₂), 2.55 (t, J = 7.1 Hz, 2H, NCH₂), 2.47 (m, under DMSO), 2.43 (s, 6H, 2xCH₃), 1.66 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 454 [M⁺].

실시예 58

2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드

5-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(8mg, 0.04밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드(10mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 10mg(59%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.67 (s, br, 1H, NH), 10.96 (, br, 1H, NH), 8.16 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H, H-비닐), 7.65-7.72 (m, 4H), 7.44 (m, 3H), 7.31 (m, 1H, CONHCH₂), 7.21 (s, 1H, Ar-H), 4.02 (t, J = 6.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.19 (q, J = 6.5 Hz, 2H, CONHCH₂), 2.44 (s, 6H, 2xCH₃), 1.93 (m, 2H, CH₂CH₂ CH₂).

MS-EI m/z 465 [M^+].

실시예 59

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.08g, 0.4밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(0.1g)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 65mg(38%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 7.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62-7.66 (m, 3H), 7.40-7.47 (m, 3H), 7.28-7.36 (m, 2H), 7.10 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.26 (m, 2H, NCH₂), 2.46-2.55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J = 7.2 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 456 [M^+].

실시예 60

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(30mg, 0.15밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(40mg)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 5.9mg(8.5%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 7.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.63-7.66 (m, 3H), 7.51 (m, 1H, CONHCH₂), 7.45 (m, 2H), 7.28-7.36 (m, 2H), 7.10 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 3.31 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.55 (t, J = 6.6 Hz, 2H, NCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 454 [M^+].

실시예 61

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(8mg, 0.04밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-이미다졸-1-일프로필)아미드(10mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 7.3mg(43%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 10.99 (, br, 1H, NH), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62-7.70 (m, 5H), 7.45 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.30 (dd, J = 1.4 & 8.2 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.10 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.02 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 3.19 (m, 2H, NCH₂ CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.93 (t, J = 6.9 Hz, 2H, NCH₂).

MS-EI m/z 465 [M^+].

실시예 62

5-[6-(3,5-디클로로페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

6-(3,5-디클로로페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(64mg, 0.23밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(60mg)와 축합시켜 밝은 갈색 고체로서 표제 화합물 53mg(44%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 10.99 (s, 1H, NH), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-4), 7.69-7.71 (m, 3H), 7.55 (m, 1H, CONHCH₂), 7.37 (m, 2H), 7.14 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-7), 3.27 (m, 2H, NCH₂), 2.48-2.58 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 3xNCH₂CH₃).

MS m/z 526.9 [M^+ +1].

실시예 63

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

6-피리딘-3-일-1,3-디하이드로인돌-2-온(40mg, 0.19밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(50mg)와 축합시켜 밝은 오렌지색 고체로서 표제 화합물 29mg(33%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, br, 1H, NH), 11.05 (s, br, 1H, NH), 8.86 (s, br, 1H), 8.53 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.91 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H, H-비닐), 7.40-7.48 (m, 2H), 7.35 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 3.26 (m, 2H, NCH₂), 2.48-2.55 (m, 3xNCH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 0.96 (t, J = 6.9 Hz, 6H, 2xNCH₂CH₃).

MS-EI m/z 457 [M^+].

실시예 64

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-피리딘-3-일-1,3-디하이드로인돌-2-온(60mg, 0.28밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(75mg)와 축합시켜 밝은 오렌지색 고체로서 표제 화합물 90mg(71%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.05 (s, br, 1H, NH), 8.86 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.54 (dd, J = 1.5 & 4.8 Hz, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.91 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H, H-비닐), 7.44-7.53 (m, 2H), 7.36 (dd, J = 1.5 & 8.1 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, NCH₂), 2.47-2.57 (m, 6H, 3xNCH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI m/z 455 [M^+].

실시예 65

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-피리딘-3-일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디메틸아미노프로필)아미드

6-피리딘-3-일-1,3-디하이드로인돌-2-온(42mg, 0.2밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디메틸아미노프로필)아미드(50mg)와 축합시켜 황색-갈색 고체로서 표제 화합물 67mg(75%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, br, 1H, NH), 11.00 (s, br, 1H, NH), 8.86 (s, br, 1H), 8.54 (s, br, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.90 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, H-비닐), 7.63 (m, 1H), 7.45-7.48 (m, 1H), 7.35 (dd, J = 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 3.21-3.27 (m, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.28 (m, 2H, NCH_2), 2.14 (s, 6H, $2\times\text{NCH}_3$), 1.64 (m, 2H, CH_2).

MS-EI m/z 443 [M^+].

실시예 66

2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디메틸아미노프로필)아미드

5-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(67mg, 0.32밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디메틸아미노프로필)아미드(81mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 40mg(28%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.66 (s, br, 1H, NH), 10.92 (s, br, 1H, NH), 8.14 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.44 (m, 3H), 7.32 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 3.33 (m, 2H, NCH_2), 2.43 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.27 (m, 2H, NCH_2), 2.13 (s, 6H, $2\times\text{NCH}_3$), 1.63 (m, 2H, CH_2).

MS-EI m/z 442 [M^+].

실시예 67

2,4-디메틸-5-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

5-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(1.5 g, 7.16밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(2g)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 1.3g(40%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.64 (s, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH), 8.14 (d, J = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.8 (s, 1H, ArH), 7.7 (dd, J = 1.2 및 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.6 (t, J = 5.3 Hz, 1H, CONHCH_2), 7.4 (m, 3H, ArH), 7.3 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.9 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 3.2 (m, 2H, CONHCH_2), 2.5 (m, 12H, $3\times\text{NCH}_2$ 및 $2\times\text{CH}_3$), 1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.93 (t, J = 6.7 Hz, 6H, NCH_2CH_3).

MS-EI m/z 470 [M^+].

실시예 68

2,4-디메틸-5-(2-옥소-6-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드

6-페닐-1,3-디하이드로인돌-2-온(1.5g, 7.16밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(2g)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 1.9g(57%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.58 (s, 1H, NH), 10.94 (s, 1H, NH), 7.8 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, ArH), 7.6 (m, 4H, ArH), 7.4 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 7.3 (m, 2H), 7.1 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, ArH), 3.2 (m, 2H, CONHCH₂), 2.5 (m, 12H, 3xNCH₂ 및 2xCH₃), 1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.93 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI m/z 470 [M^+].

실시예 69

3-[4-(3-디에틸아미노프로필카바모일)-3,5-디메틸-1H-피롤-2-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-4-카복실산 (3-클로로-4-메톡시페닐)아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-4-카복실산 (3-클로로-4-메톡시페닐)아미드(1g, 3.16밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(1g, 3.58밀리몰)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 1.7g(85%)을 수득하였다.

MS-EI m/z 578.2 [M^+].

실시예 70

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.5g, 2.36밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(0.51g)와 축합시켜 적색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.84g을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, 1H, NH), 10.99 (s, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.7 (m, 4H), 7.2 (dd, $J = 1.8$ 및 8.3 Hz, 2H, ArH), 6.8 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 3.3 (br s, 4H, 2xNCH₂), 3.2 (m, 2H, CONHCH₂), 2.6 (br s, 2H, NCH₂ 및 2xCH₃), 2.4 (s, 6H, 2xCH₃), 1.66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0.98 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI m/z 472 및 474 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 71

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(100mg, 0.47밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(150mg)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 0.15g(62%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.97 (s, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, ArH), 7.84 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.23 (dd, $J = 1.3$ 및 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.8 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 3.5 (m, 1H, CH), 3.3 (m, 3H, CH 및 NHCH₂), 2.5 (br m, 6H, 3xNCH₂), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, 2xCH₃), 1.23 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2xCH₃), 0.96 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS-EI m/z 514 및 516 [$M^+ - 1$ 및 $M^+ + 1$].

실시예 72

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리텐메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노-프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(90mg, 0.42밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (3-디에틸아미노프로필)아미드(140mg)와 축합시켜 적색-갈색 고체로서 표제 화합물 54mg(25%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.98 (s, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH), 8.09 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.23 (dd, J = 1.7 및 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 3.5 (m, 1H, CH), 3.25 (m, 2H, NHCH₂), 3.15 (m, 1H, CH), 2.7 (br s, 6H, 3xNCH₂), 1.7 (br m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.28 (d, J = 6.9 Hz, 6H, 2xCH₃), 1.24 (d, J = 5.9 Hz, 6H, 2xCH₃), 1.06 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

MS-EI m/z 528 및 530 [M^+ -1 및 M^+ +1].

실시예 73

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(130mg, 0.6밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디이소프로필-1H-피롤-3-카복실산 (3-피롤리딘-1-일프로필)아미드(150mg, 0.45밀리몰)와 축합시켜 황갈색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 36mg(15%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.98 (s, 1H, NH), 10.97 (s, 1H, NH), 8.10 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.23 (dd, J = 1.6 및 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 3.5 (m, 1H, CH), 3.25 (m, 2H, NHCH₂), 3.15 (m, 1H, CH), 2.7 (br s, 6H, 3xNCH₂), 1.7 (br m, 6H, 3xNCH₂CH₂), 1.28 (d, J = 5.6 Hz, 6H, 2xCH₃), 1.24 (d, J = 5.7 Hz, 6H, 2xCH₃).

MS-EI m/z 526 및 528 [M^+ -1 및 M^+ +1].

실시예 74

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (피리딘-4-일메틸)아미드

5-브로모-1,3-디하이드로인돌-2-온(170mg, 0.8밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (피리딘-4-일메틸)아미드(200mg)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 14mg(4%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.67 (s, 1H, NH), 11.01 (s, br, 1H, NH), 8.51 (dd, J = 1.6 & 4.3 Hz, 2H), 8.23 (t, J = 6.0 Hz, 1H, CONHCH₂), 8.11 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H, H-비닐), 7.31 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.25 (dd, J = 1.9 & 8.1 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H, NCH₂), 2.46 (s, 6H, 2xCH₃).

MS-EI m/z 450 및 452 [M^+ -1 및 M^+ +1].

실시예 75

5-[6-(4-부틸페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일메틸)아미드

5-[6-(4-부틸페닐)]-1,3-디하이드로인돌-2-온(50mg, 0.19밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일메틸)아미드(50mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 74mg(76%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.58 (s, 1H, NH), 10.93 (s, br, 1H, NH), 7.82 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H, H-비닐), 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.46 (m, 1H, CONH), 7.26 (m, 3H), 7.09 (s, 1H), 3.30 (m, 2H, CH_2), 2.52-2.63 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.68 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.58 (m, 2H, CH_2), 1.34 (m, 2H, CH_2), 0.91 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_2CH_3).

MS-EI m/z 510 [M^+].

실시예 76

5-[6-(5-이소프로필-2-메톡시페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-(5-이소프로필-2-메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(50mg, 0.17밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(45mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 67mg(75%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, 1H, NH), 10.82 (s, br, 1H, NH), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H, H-비닐), 7.45 (m, 1H, CONH), 7.0-7.19 (m, 5H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.32 (m, 2H, CH_2), 2.87 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.56 (m, 2H, CH_2), 2.48 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.68 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.21 (d, J = 6.8 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 527.2 [$\text{M}^+ + 1$].

실시예 77

5-[6-(4-에틸페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-(4-에틸페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(45mg, 0.19밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(50mg)와 축합시켜 황색-오렌지색 고체로서 표제 화합물 60mg(65%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.59 (s, 1H, NH), 10.96 (s, br, 1H, NH), 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H, H-비닐), 7.51-7.56 (m, 3H), 7.25-7.30 (m, 3H), 7.08 (d, J = 1 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H, CH_2), 2.63 (m, 2H, CH_2CH_3), 2.55 (m, 2H, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.67 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.20 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH_2CH_3).

MS-EI m/z 482 [M^+].

실시예 78

5-[6-(2,4-디메톡시페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-(2,4-디메톡시페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(51mg, 0.19밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(50mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 30mg(31%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.59 (s, 1H, NH), 10.86 (s, br, 1H, NH), 7.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H, H-비닐), 7.49 (m, 1H, CONH), 7.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (m, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.58-6.65 (m, 2H), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.33 (m, 2H, CH_2), 2.55 (m, 2H, CH_2), 2.50 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3), 1.67 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS-EI m/z 514 [M^+].

실시예 79

5-[6-(3-이소프로필페닐)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

6-(3-이소프로필페닐)-1,3-디하이드로인돌-2-온(48mg, 0.19밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(50mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 59mg(63%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.97 (s, br, 1H, NH), 7.87 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H, H-비닐), 7.24-7.55 (m, 6H), 7.13 (s, 1H), 3.34 (m, 2H, CH_2), 3.30 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.60 (m, 2H, CH_2), 2.50 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 1.70 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.27 (d, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 496 [M^+].

실시예 80

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드

5-플루오로-1,3-디하이드로인돌-2-온(0.54g, 3.8밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드와 축합시켜 녹황색 고체로서 표제 화합물 0.83g(55%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.66 (s, 1H, NH), 10.83 (s, br, 1H, NH), 7.73 (dd, J = 2.5 & 9.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, H-비닐), 7.37 (t, 1H, CONH CH_2CH_2), 6.91 (m, 1H), 6.81-6.85 (m, 1H), 3.27 (m, 2H, CH_2), 2.51 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 0.96 (t, J = 6.9 Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 398 [M^+].

실시예 80(다른 합성법)

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드

하이드라진 하이드레이트(55%, 3000ml) 및 5-플루오로이사틴(300g)을 100℃로 가열하였다. 추가의 5-플루오로-이사틴(500g)을 120분에 걸쳐 교반하에 일부(100g) 첨가하였다. 혼합물을 110℃로 가열하고, 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 고체를 진공 여과에 의해 수거하여 조질의 (2-아미노-5-플루오로-페닐)-아세트산 하이드라지드(748g)를 수득하였다. 하이드라지드를 물(700ml)중에 현탁시키고, 혼합물의 pH를 12N 염산을 사용하여 pH 3 미만으로 조정하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 물로 2회 세척하였다. 생성물을 진공하에 건조시켜 갈색 분말로서 5-플루오로-1,3-디하이드로-인돌-2-온(600g, 73% 수율)을 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (디메틸설폭사이드- d_6) δ 3.46 (s, 2H, CH_2), 6.75, 6.95, 7.05 (3 x m, 3H, 방향족), 10.35 (s, 1H, NH). MS m/z 152 [$\text{M}+1$].

3,5-디메틸-1H-피롤-2,4-디카복실산 2-tert-부틸 에스테르 4-에틸 에스테르(2600g) 및 에탄올(7800ml)을 격렬히 교반시키면서 10N 염산(3650ml)을 서서히 첨가하였다. 온도가 25℃에서 35℃로 상승되고, 기체 방출이 시작되었다. 혼합물을 54℃로 가온하고, 온도가 67℃가 되는 1시간 동안 추가로 가열하면서 교반하였다. 혼합물을 5℃로 냉각시키고, 얼음과 물 32L를 교반하에 서서히 첨가하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 물로 3회 세척하였다. 고체를 일정한 중량으로 공기 건조시켜 핑크색조의 고체로서 2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르(1418g, 87% 수율)를 수득하였다.

¹H-NMR

(디메틸설폭사이드 -d₆) δ 2.10, 2.35 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4.13 (q, 2H, CH₂), 6.37 (s, 1H, CH), 10.85 (s, 1H, NH). MS m/z 167 [M+1].

디메틸포름아미드(322g) 및 디클로로메탄(3700ml)을 빙욕에서 4℃로 냉각시키고, 포스포러스 옥시클로라이드(684g)를 교반하에 첨가하였다. 고체 2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르(670g)를 15분에 걸쳐 분취량으로 첨가하였다. 도달하는 최대 온도는 18℃이었다. 혼합물을 1시간 동안 환류하에 가열시키고, 빙욕에서 10℃로 냉각시키고, 빙수 1.6ℓ를 격렬하게 교반시키면서 신속히 첨가하였다. 온도는 15℃로 상승하였다. 10N 염산(1.6ℓ)을 격렬히 교반시키면서 첨가하였다. 온도는 22℃로 상승하였다. 혼합물을 30분 동안 방치시키고, 층이 분리되게 두었다. 온도는 최대 40℃로 도달하였다. 첨가 도중 온도가 55℃에 도달하고 머물도록 하는 속도로 10N 수산화칼륨(3.8L)을 사용하여 수성층을 pH 12 내지 13으로 조정하였다. 첨가를 완결한 후, 혼합물을 10℃로 냉각시키고, 1시간 동안 교반하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 물로 4회 세척하여 황색 고체로서 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르(778g, 100% 수율)를 수득하였다.

¹H-

NMR (DMSO-d₆) δ 1.25 (t, 3H, CH₃), 2.44, 2.48 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4.16 (q, 2H, CH₂), 9.59 (s, 1H, CHO), 12.15 (br s, 1H, NH). MS m/z 195 [M+1].

5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르(806g), 수산화칼륨(548g), 물(2400ml) 및 메탄올(300ml)을 2시간 동안 교반하에 환류시킨 후, 8℃로 냉각시켰다. 혼합물을 디클로로메탄으로 2회 추출하였다. 온도를 15℃ 아래로 유지하면서 수성층을 10N 염산 1000ml를 사용하여 pH 4로 조정하였다. 물을 첨가하여 교반을 용이하게 하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 물로 3회 세척하고, 50℃ 진공하에 건조시켜 황색 고체로서 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(645g, 93.5% 수율)을 수득하였다.

NMR (DMSO-d₆) δ 2.40, 2.43 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 9.57 (s, 1H, CHO), 12.07 (br s, 2H, NH+COOH). MS m/z 168 [M+1].

1-(3-디메틸-아미노프로필-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(2071g), 하이드록시벤조트리아졸(1460g), 트리 에틸아민(2016ml) 및 디에틸에틸렌디아민(1215ml)을 첨가하면서, 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(1204g) 및 디메틸포름아미드 6020ml를 실온에서 교반하였다. 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물 3000ml, 염수 2000ml 및 포화 중탄산나트륨 용액 3000ml로 희석시키고, pH를 10N 수산화나트륨으로 10 초과로 조정하였다. 혼합물을 각각 디클로로메탄중의 10% 메탄올 5000ml로 2회 추출하고, 추출물을 합치고, 무수 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 회전 증발 건조시켰다. 혼합물을 톨루엔 1950ml로 희석시키고, 다시 회전 증발 건조시켰다. 잔여물을 3:1 헥산:디에틸 에테르(4000ml)로 분쇄하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 에틸 아세테이트 400ml로 2회 세척하고, 34℃ 진공하에 21시간 동안 건조시켜 밝은 갈색 고체로서 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(819g, 43% 수율)을 수득하였다.

¹H-NMR (디메틸설폭사이드 -d₆) δ 0.96 (t, 6H, 2xCH₃), 2.31, 2.38 (2xs,

2 x CH₃), 2.51 (m, 6H 3xCH₂), 3.28 (m, 2H, CH₂), 7.34 (m, 1H, 아미드 NH), 9.56 (s, 1H, CHO), 11.86 (s, 1H, 피롤 NH). MS m/z 266 [M+1].

5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)-아미드(809g), 5-플루오로-1,3-디하이드로-인돌-2-온(438g), 에탄올(8000ml) 및 피롤리딘(13ml)을 3시간 동안 78℃에서 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 진공 여과에 의해 고체를 수거하고, 에탄올로 세척하였다. 고체를 에탄올(5900ml)과 함께 72℃에서 30분 동안 교반하였

다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하고, 130시간 동안 54℃ 진공하에 건조시켜 오렌지색 고체로서 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(1013g, 88% 수율)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (디메틸설폭사이드 - d_6) δ 0.98 (t, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.43, 2.44 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.50 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 3.28 (q, 2H, CH_2), 6.84, 6.92, 7.42, 7.71, 7.50 (5xm, 5H, 방향족, 비닐, CONH), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.68 (s, 1H, 피롤 NH). MS m/z 397 [M^+].

실시예 81

3-[4-(2-디에틸아미노에틸카바모일)-3,5-디메틸-1H-피롤-2-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산(80mg, 0.45밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드와 축합시켜 황색 오렌지색 고체로서 표제 화합물 210mg(92%)을 수득하였다.

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.6 (s, 1H, NH), 7.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H, H-비닐), 7.57 (dd, $J = 1.5$ & 8.0 Hz, 1H), 7.40-7.42 (m, 2H), 3.28 (m, 2H, CH_2), 2.88 (m, H-피페리딘), 2.54 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 1.56 (m, H-피페리딘), 0.97 (t, $J = 6.98$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

MS m/z 424 [M^+].

실시예 82

5-(5-디메틸설포모일-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설포산 디메틸아미드(90mg, 0.38밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(100mg)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 100mg(54%)을 수득하였다.

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.65 (s, 1H, NH), 11.30 (s, br, 1H, NH), 8.25 (d, 1H), 7.92 (s, 1H, H-비닐), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.07 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, CH_2), 2.61 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.56 (t, 2H, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 1.67 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS-EI m/z 485 [M^+].

실시예 83

5-[5-(3-클로로페닐설포모일)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설포산 (3-클로로-페닐)아미드(120mg, 0.38밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(100mg)와 축합시켜 황색 오렌지색 고체로서 표제 화합물 150mg (69%)을 수득하였다.

$^1\text{HNMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.26 (br s, 1H, NH), 10.30 (br s, 1H, NH), 8.26 (d, 1H), 7.79 (s, 1H, H-비닐), 7.51-7.57 (m, 2H), 7.22 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.44 (m, 2H, CH_2), 2.57 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 1.68 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS m/z 568 [M^+].

실시예 84

2,4-디메틸-5-[2-옥소-5-(피리딘-3-일설펜모일)-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설펜산 피리딘-3-일아미드(110mg, 0.38밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)아미드(100mg)와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 150mg(74%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.58 (s, 1H, NH), 8.21 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 8.04 (m, 1H), 7.76 (s, 1H, H-비닐), 7.49-7.54 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.33 (m, 2H, CH_2), 2.56 (t, J = 7.06 Hz, 2H, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.43 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.68 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

MS m/z 535 [M^+].

실시예 85

3-[3,5-디메틸-4-(4-메틸피페라진-1-카보닐)-1H-피롤-2-일메틸렌]-4-(2-하이드록시에틸)-1,3-디하이드로인돌-2-온

4-(2-하이드록시에틸)-1,3-디하이드로인돌-2-온(71mg, 0.4밀리몰)을 3,5-디메틸-4-(4-메틸피페라진-1-카보닐)-1H-피롤-2-카르보알데하이드와 축합시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 90mg(55%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 14.25(s, 1H, NH), 10.88 (s, 1H, NH), 7.57 (s, 1H, H-비닐), 7.03 (m, 1H), 6.75-6.82 (m, 2H), 4.86 (m, 1H, OH), 3.70 (m, 2H, CH_2), 3.04 (m, 2H, CH_2), 2.48 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.28 (br s, 7H), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.18 (s, 3H, CH_3).

MS m/z (+ve) 4.09.3 [M^+].

실시예 86

3-[3,5-디메틸-4-(4-메틸피페라진-1-카보닐)-1H-피롤-2-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설펜산 페닐아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설펜산 페닐아미드(110mg, 0.4밀리몰)을 3,5-디메틸-4-(4-메틸피페라진-1-카보닐)-1H-피롤-2-카르보알데하이드(100mg)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 50mg(24%)을 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.52(s, 1H, NH), 11.26 (s, 1H, NH), 10.08 (s, 1H, NH), 8.21 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H, H-비닐), 7.50 (dd, J = 1.6 & 8.3 Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 7.10 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.28 (m, 10H, $2\times\text{CH}_3$ & $2\times\text{CH}_2$), 2.18 (s, 3H, CH_3).

MS-EI m/z 519 [M^+].

실시예 87

5-(5-디메틸설펜모일-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설펜산 디메틸아미드(90mg, 0.38밀리몰)를 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(100mg)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 80mg(43%)을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H, NH), 8.27 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H, H-비닐), 7.49 (dd, J = 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 7.44 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7.07 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.26 (m, 2H, CH₂), 2.60 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.53 (m, 2H, CH₂), 2.45-2.50 (m, 10H, 2xCH₃ & N(CH₂CH₃)₂), 0.96 (t, J = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 487 [M^+].

실시예 88

5-[5-(3-클로로페닐설파모일)-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드

2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-5-설폰산 (3-클로로-페닐)아미드(120mg, 3.8밀리몰)을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)아미드(100mg)와 축합시켜 황색 고체로서 표제 화합물 80mg(37%)을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.55 (s, 1H, NH), 11.24 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, NH), 8.25 (d, J = 1.87 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H, H-비닐), 7.52 (dd, J = 1.87 & 8.3 Hz, 1H), 7.42 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7.22 (t, J = 8.02 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 2 Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.0 (m, 2H), 3.27 (m, 2H, CH₂), 2.48-2.57 (m, 6H, 3xCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J = 7.0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 570.1 [M^+].

실시예 95

3-(2-옥소-5-페닐-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.74 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.13 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-비닐), 7.70 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.49 (dd, J = 1.7 & 8.0 Hz, 1H), 7.44 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.32 (m, 1H), 6.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.26 (q, J = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.79 (m, 2H, CH₂), 2.72 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 412 [M^+].

실시예 99

3-(2-옥소-5-페닐설파모일-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-카복실산 에틸 에스테르

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.64 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH), 8.24 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-비닐), 7.57 (dd, J = 1.8 & 8.0 Hz, 1H), 7.21 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.27 (q, J = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.80 (m, 2H, CH₂), 2.73 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 491 [M^+].

실시예 109

3-[3-(모르폴린-4-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.60 (s, 1H, NH), 12.75 (br s, 1H, COOH), 11.08 (s, 1H, NH), 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H, H-비닐), 7.62 (dd, *J* = 1.4 & 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 3.65 (m, 4H, 2xCH₂), 3.55 (m, 4H, 2xCH₂), 2.81 (m, 2H, CH₂), 2.54 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 421 [M⁺].

실시예 112

5-브로모-3-[3-(피롤리딘-1-카보닐)-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌]-1,3-디하이드로-인돌-2-온

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.56 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.05 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H, H-비닐), 7.28 (dd, *J* = 1.3 & 8.3 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.57 (m, 4H, 2xCH₂), 2.79 (m, 2H, CH₂), 2.65 (m, 2H, CH₂), 1.88 (m, 4H, 2xCH₂), 1.71 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 439 & 441 [M⁺-1] & [M⁺+1].

실시예 114

3-(3-디메틸카바모일-4,5,6,7-테트라하이드로-2H-이소인돌-1-일메틸렌)-2-옥소-2,3-디하이드로-1H-인돌-6-카복실산

¹HNMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13.60 (s, 1H, NH), 12.72 (br s, 1H, COOH), 11.05 (s, 1H, NH), 7.85 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H, H-비닐), 7.62 (dd, *J* = 1.3 & 7.9 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.03 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.81 (m, 2H, CH₂), 2.55 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 4H, 2xCH₂).

MS-EI *m/z* 379 [M⁺].

실시예 115

4-메틸-5-(5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) □ 13.56 (br s, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H, H-비닐), 7.74 (d, *J* = 2.96 Hz, 1H), 7.56 (dd, *J* = 1.5 & 8.1 Hz, 1H), 7.20 (br m, 1H, NHCH₃), 7.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃).

MS-EI *m/z* 361 [M⁺].

실시예 116

{[4-메틸-5-(4-메틸-5-메틸설파모일-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카보닐]-아미노}-아세트산 에틸 에스테르

4-메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르(참조문헌: D. O. Cheng, T. L. Bowman and E. LeGoff; J. Heterocyclic Chem.: 1976 ; 13 ; 1145-1147)를 방법 A를 사용하여 포르밀화하고, 방법 B를 사용하여 가수분해한 후, 아미드화(방법 C)하여 [(5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-3-카보닐)-아미노]-아세트산 에틸 에스테르를 수득하였다.

4-메틸-5-메틸아미노설포닐-2-옥신돌(50mg, 0.21밀리몰)을 에탄올(2ml)중의 [(5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-3-카보닐)-아미노]-아세트산 에틸 에스테르(100mg, 0.42밀리몰) 및 피페리딘(0.1ml)과 축합시켜 표제 화합물 50mg(52%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.59 (s, 1H, NH), 11.29 (v.br. s, 1H, NH-CO), 8.33 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 7.83 (d, $J = 3.11$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H, H-비닐), 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.34 (br m, 1H, NHCH $_3$), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH $_2$ CH $_3$), 3.92 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, GlyCH $_2$), 2.86 (s, 3H, CH $_3$), 2.48 (s, 3H, CH $_3$), 2.42 (d, $J = 4.71$ Hz, 3H, HNCH $_3$), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, OCH $_2$ CH $_3$).

MS-EI m/z 460 [M^+].

실시예 117

{[4-메틸-5-(5-메틸설포닐-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카보닐]-아미노}-아세트산 에틸 에스테르

에탄올(5ml)중의 5-메틸아미노설포닐-2-옥신돌(0.06g, 0.22밀리몰), [(5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-3-카보닐)-아미노]-아세트산 에틸 에스테르(0.075g, 0.27밀리몰) 및 피페리딘(2 방울)의 혼합물을 12시간 동안 90°C에서 밀봉 튜브에서 가열하였다. 냉각시킨 후, 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하고, 디클로로메탄/에테르로 분쇄하고, 건조시켜 황색조의 갈색 고체로서 표제 화합물 0.035g(36%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.6 (s, 1H, NH), 11 (v.br. s, 1H, NH-CO), 8.30 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, CONHCH $_2$), 8.25 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H, H-비닐), 7.84 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 1.9$ & 8.5 Hz, 1H), 7.14 (br m, 1H, NHCH $_3$), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.11 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, OCH $_2$ CH $_3$), 3.92 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, GlyCH $_2$), 2.55 (s, 3H, CH $_3$), 2.41 (m, 3H, NCH $_3$), 1.20 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, OCH $_2$ CH $_3$).

MS m/z 446 [M^+].

실시예 118

{[4-메틸-5-(5-메틸설포닐-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카보닐]-아미노}-아세트산

메탄올(10ml)중의 [(5-포르밀-4-메틸-1H-피롤-3-카보닐)-아미노]-아세트산 에틸 에스테르(0.142g, 0.59밀리몰)와 1N NaOH(1.2ml)의 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 농축시키고, 잔여물을 에탄올(12ml)중의 5-메틸아미노설포닐-2-옥신돌(0.13g, 0.48밀리몰) 및 피페리딘(0.12ml)과 축합시켜 표제 화합물 0.11g(52%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.98 (br s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 2$ & 8.2 Hz, 1H), 7.21 (m on br s, 2H), 6.97 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.41 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H, CH $_2$ NH), 2.54 (s, 3H, 피롤-CH $_3$), 2.39 (s, 3H, ArCH $_3$).

MS m/z 417 [$M-1$] $^+$.

실시예 120

5-메틸-2-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.77 (br s, 1H, NH), 12.49 (s, 1H, COOH), 11.07 (s, 1H, NH), 8.39 (s, 1H, H-비닐), 7.43 (d, $J = 7.47$ Hz, 1H), 7.20 (t, $J = 7.47$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 7.47$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 7.47$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 1.53$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H, CH $_3$).

MS m/z 269 [$M+H$] $^+$.

실시예 121

5-메틸-2-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.79 (s, 1H, NH), 11.08 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H-비닐), 7.45 (d, $J = 7.52$ Hz, 1H), 7.20 (t, $J = 7.52$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 7.52$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 7.52$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS m/z 297.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

실시예 122

2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 에틸 에스테르

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.72 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, H-비닐), 7.53 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 2.0$ & 8.05 Hz, 1H), 6.87 (t, $J = 8.05$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 7.03$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.33 (t, $J = 7.03$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

MS m/z 375 & 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

실시예 123

2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.72 (s, 1H, NH), 12.57 (s, 1H, COOH), 11.19 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H-비닐), 7.51 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 1.4$ & 8.17 Hz, 1H), 6.87 (t, $J = 8.17$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.35 (s, 3H, CH_3).

MS m/z 347 & 349 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

실시예 124

2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일에틸)-아미드

디메틸포름아미드(3ml)중의 2-포르밀-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산(250mg, 1.63밀리몰)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보다이미드(376mg, 1.2 당량), 1-하이드록시벤조트리아졸(265mg, 1.2 당량), 트리에틸아민(0.45ml, 2 당량) 및 1-(2-아미노에틸)피롤리딘(0.23ml, 1.1 당량)을 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 반응물을 포화 중탄산나트륨 및 염수(여분의 염을 사용)로 희석시키고, 디클로메탄중의 10% 메탄올로 추출하였다. 합쳐진 유기층을 염수로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜 2-포르밀-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드 130mg을 수득하였다.

에탄올(2ml)중의 5-브로모-2-옥신돌(106mg, 0.5밀리몰), 2-포르밀-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드(125mg, 1 당량) 및 피페리딘(0.2ml)의 혼합물을 1시간 동안 80°C에서 밀봉 튜브에서 가열한 후, 냉각시켰다. 형성된 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올 및 에틸 아세테이트로 세척하고, 건조시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물을 수득하였다.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.06 (br s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, H-비닐), 8.15 (m, 1H, CONHCH₂), 7.48 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 1.8 & 7.9 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.35 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2.56 (t, J = 6.91 Hz, 2H, HNCH₂CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.67 (m, 4H, 2xCH₂).
MS m/z 443/ 445 [M^+ 및 $M^+ + 2$].

실시예 125

2-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)-아미드

디메틸포름아미드(3ml)중의 2-포르밀-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산(320mg, 2.1밀리몰)에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(483mg, 1.2 당량), 1-하이드록시벤조트리아졸(340mg, 1.2 당량), 트리에틸아민(0.59ml, 2 당량) 및 N,N-디에틸에틸렌디아민(0.32ml, 1.1 당량)을 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 반응물을 포화 중탄산나트륨 및 염수(여분의 염을 사용)으로 희석시키고, 디클로로메탄중의 10% 메탄올로 추출하였다. 합쳐진 유기층을 염수로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜 2-포르밀-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노에틸)-아미드를 수득하였다.

에탄올(2ml)중의 5-브로모-2-옥신돌(106mg, 0.5밀리몰), 2-포르밀-5-메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(126mg, 1 당량)와 피페리딘(0.2ml)의 혼합물을 1시간 동안 80℃에서 밀봉 튜브에서 가열한 후, 냉각시켰다. 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올 및 에틸 아세테이트로 세척하고, 건조시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물을 수득하였다.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13.62 (s, 1H, NH), 11.11 (br s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H-비닐), 8.1 (m, 1H, CONHCH₂), 7.49 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 2.2 & 8.3 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 2.24 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2.59 (m, 6H, 3xCH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 0.99 (t, J = 6.8 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
MS m/z 445/ 447 [M^+ 및 $M^+ + 2$].

실시예 126

2,4-디메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드

에탄올중의 1,3-디하이드로-인돌-2-온(266mg, 2밀리몰), 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(530mg, 2밀리몰) 및 피페리딘(1 방울)의 혼합물을 2시간 동안 90℃에서 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고, 생성된 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하고, 건조시켜 밝은 황색 고체로서 표제 화합물 422mg(55%)을 수득하였다.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.7 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH), 7.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H, H-비닐), 7.41 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.13 (dt, J = 1.2 & 7.6 Hz, 1H), 6.99 (dt, J = 1.2 & 7.6 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.28 (m, 2H), 2.48-2.55 (m, 6H), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 0.97 (t, J = 7.2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).
MS + ve APCI 381 [$M^+ + 1$].

실시예 127

5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드

에탄올중의 5-클로로-1,3-디하이드로-인돌-2-온(335mg, 2밀리몰), 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(530mg, 2밀리몰) 및 피페리딘(1 방울)의 혼합물을 2시간 동안 90℃에서 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고, 생성된 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하고, 건조시켜 오렌지색 고체로서 표제 화합물 565mg(68%)을 수득하였다.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.65 (s, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, NH), 7.98 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H) 7.77 (s, 1H H-비닐), 7.44 (t, NH), 7.13 (dd, $J = 2, 1$ & 8.4 Hz, 1H) 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.28 (g, 2H), 2.48-2.53 (m, 6H), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 0.97 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)
MS + ve APCI 415 [$\text{M}^+ + 1$].

실시예 128

2,4-디메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-에틸)-아미드

1,3-디하이드로-인돌-2-온을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드와 축합시켜 표제 화합물을 수득하였다.

MS + ve APCI 379 [$\text{M}^+ + 1$]

실시예 129

5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드

5-플루오로-1,3-디하이드로-인돌-2-온을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드와 축합시켜 표제 화합물을 수득하였다.

MS + ve APCI 397 [$\text{M}^+ + 1$]

스케일-업(scale-up) 절차:

5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(61g), 5-플루오로-1,3-디하이드로-인돌-2-온(79g), 에탄올(300ml) 및 피롤리딘(32ml)을 4.5시간 동안 환류시켰다. 아세트산(24ml)을 혼합물에 첨가하고, 30분간 지속적으로 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 2회 세척하였다. 고체를 12N 염산(6.5ml)을 함유하는 물(400ml)중의 40% 아세톤에서 130분 동안 교반하였다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 수중 40% 아세톤으로 2회 세척하였다. 고체를 진공하에 건조시켜 오렌지색 고체로서 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(86g, 79% 수율)을 수득하였다.

^1H -NMR (디메틸설폭사이드 - d_6) δ 2.48,

2.50 (2xs, 6H, 2x CH_3), 6.80, 6.88, 7.68, 7.72 (4xm, 4H, 방향족 및 비닐), 10.88 (s, 1H,

CONH), 12.12 (s, 1H, COOH), 13.82 (s, 1H, 피롤 NH). MS m/z 299 [$\text{M}-1$].

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(100g) 및 디메틸포름아미드(500ml)를 교반하고, 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(221g), 1-(2-아미노에틸)피롤리딘(45.6g) 및 트리에틸아민(93ml)을 첨가하였다. 혼합물을 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 고체 생성물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하였다. 고체를 64℃에서 1시간 동안 에탄올(500ml)중에서 교반에 의해 슬러리-세척하고, 실온으로 냉각시켰다. 고체를 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하고, 진공하에 건조시켜 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드(101.5g, 77% 수율)를 수득하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (디메틸설폭사이드 - d_6) δ 1.60 (m, 4H, 2xCH₂), 2.40, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 4H, 2xCH₂), 2.57, 3.35 (2xm, 4H, 2XCH₂), 7.53, 7.70, 7.73, 7.76 (4xm, 4H, 방향족 및 비닐), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.67 (s, 1H, 피롤 NH). MS m/z 396 [M+1].

실시예 130

5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드

5-클로로-1,3-디하이드로-인돌-2-온을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드와 축합시켜 표제 화합물을 수득하였다.

MS + ve APCI 413 [M⁺ + 1].

실시예 131

2,4-디메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)-아미드

1,3-디하이드로-인돌-2-온을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노-에틸)아미드와 축합시켜 표제 화합물을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.63 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H H-비닐), 7.48 (t, 1H, NH), 7.13 (dt, 1H), 6.98 (dt, 1H), 6.88 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.31 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂)
MS + ve APCI 353 [M⁺ + 1].

실시예 132

5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)-아미드

5-플루오로-1,3-디하이드로-인돌-2-온을 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디메틸아미노에틸)아미드와 축합시켜 표제 화합물을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.68 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 7.76 (dd, J = 2.4 & 9.4 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H H-비닐), 7.51 (t, 1H, NH), 6.93 (m, 1H), 6.84 (dd, J = 4.6 & 8.4 Hz, 1H), 3.31 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.38 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂)
MS + ve APCI 371 [M⁺ + 1].

실시예 193

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-에틸아미노-에틸)-아미드

5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-에틸아미노-에틸)-아미드(99g), 에탄올(400ml), 5-플루오로-2-옥신돌(32g) 및 피롤리딘(1.5g)을 교반하에 3시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 고체를 진공 여과에 의해 수거하였다. 고체를 60℃에서 에탄올중에 교반하고, 실온으로 냉각시키고, 진공 여과에 의해 수거하였다. 생성물을 진공하에 건조시켜 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-에틸아미노-에틸)-아미드(75g, 95% 수율)를 수득하였다.

¹H-NMR (디메틸설폭사이드 -d₆) δ 1.03 (t, 3H, CH₃), 2.42, 2.44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.56 (q, 2H, CH₂), 2.70, 3.30 (2xt, 4H, 2xCH₂), 6.85, 6.92, 7.58, 7.72, 7.76 (5xm, 5H, 방향족, 비닐 및 CONH), 10.90 (br s, 1H, CONH), 13.65 (br s, 1H, 피롤 NH). MS *m/z* 369 [M-1].

실시예 195

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸-N-옥소아미노-에틸)-아미드

방법 A:

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(598mg) 및 디클로로메탄(60ml)를 빙욕에서 3-클로로피벤조산(336mg)으로 처리하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용매를 회전 증발시키고, 잔여물을 메탄올(20ml)중에 현탁시켰다. 수산화나트륨(240mg)을 함유하는 물(20ml)을 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 물 5ml로 세척하고, 진공하에 건조시켜 오렌지색 고체로서 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸-N-옥소아미노-에틸)-아미드(510mg, 82% 수율)를 수득하였다.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 13.72 (br s, 1H, NH), 11.02 (br s, 1H, CONH), 9.81 (br s, 1H, CONH), 7.75 (dd, 1H, 방향족), 7.70 (s, 1H, 방향족), 6.93 (td, 1H, 방향족), 6.84 (m, 1H, 방향족), 3.63 (m, 2H, CH₂), 3.29 (m, 2H, CH₂), 3.14 (m, 4H, 2xCH₂), 2.47 (s, 1H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 1.64 (t, 6H, 2xCH₃). MS *m/z* 415 [M+1].

방법 B:

5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)-아미드(10g)를 디클로로메탄(100ml)중에 현탁시키고, 빙욕에서 냉각시킨다. 3-클로로-피옥시벤조산(13.1g)을 교반하에 첨가하고, 혼합물을 실온으로 가온시킨 후, 밤새 교반시킨다. 혼합물을 회전 증발 건조시키고, 디클로로메탄중의 20% 메탄올로 용출시키는 실리카 겔 칼럼 상에서 크로마토그래피하였다. 생성물을 함유하는 분획물을 합치고, 회전 증발 건조시켜 5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸-N-옥소아미노-에틸)-아미드(9g, 83% 수율)를 수득하였다.

5-포르밀-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸-N-옥소아미노-에틸)-아미드(9g), 5-플루오로-1,3-디하이드로-인돌-2-온(9g, 83% 수율) 및 피롤리딘(9g, 83% 수율(0.1g))을 4시간 동안 에탄올(30ml)중에서 환류시켰다. 혼합물을 빙욕에서 냉각시키고, 침전물을 진공 여과에 의해 수거하고, 에탄올로 세척하였다. 고체를 에틸 아세테이트(30ml)중에 교반시키고, 진공 여과에 의해 수거하고, 에틸 아세테이트로 세척하고, 진공하에 건조시켜 오렌지색 고체로서 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸-N-옥소아미노-에틸)-아미드(10.3g, 80% 수율)를 수득하였다.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 13.72 (br s, 1H, NH), 11.02 (br s, 1H, CONH), 9.81 (br s, 1H, CONH), 7.75 (dd, 1H, 방향족), 7.70 (s, 1H, 방향족), 6.93 (td, 1H, 방향족), 6.84 (m, 1H, 방향족), 3.63 (m, 2H, CH₂), 3.29 (m, 2H, CH₂), 3.14 (m, 4H, 2xCH₂), 2.47 (s, 1H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 1.64 (t, 6H, 2xCH₃). MS *m/z* 415 [M+1].

실시예 190

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)에틸]-아미드

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(120mg, 0.4밀리몰)을 실온에서 2 내지 3일 동안 무수 DMF(3ml)중에서 EDC, HCl(96mg, 0.5밀리몰), 무수 1-하이드록시-벤조트리아졸(68mg, 0.5밀리몰) 및 알드리치(Aldrich)사로부터 구입한 2-(2-아미노에틸피리딘과 함께 진탕시켰다. 반응 혼합물을 1M NaHCO₃(1.5ml)에 이어 물 8ml로 희석시켰다. 침전된 조생성물을 여과에 의해 수거하고, 물로 세척하고, 건조시키고, 결정화 또는 크로마토그래피에 의해 정제하여 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드를 수득하였다.

실시예 189

5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(127mg)으로 대체한 것을 제외하고는 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 처리하여 5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드를 수득하였다.

실시예 192

5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(145mg)으로 대체한 것을 제외하고는 상기 실시예 190에 기재된 바와 같이 처리하여 5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드를 수득하였다.

실시예 191

5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐-메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(113mg)으로 대체한 것으로 제외하고는 상기 실시예 190에 기재된 바와 같이 처리하여 5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드를 수득하였다.

실시예 203

5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3- 카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(123mg)으로 대체한 것을 제외하고는 상기 실시예 190에 기재된 바와 같이 처리하여 5-[5-시아노-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(피리딘-1-일)-에틸]아미드를 수득하였다.

실시예 142, 186, 187, 188 및 204

2-(2-아미노에틸)피리딘을 1-(2-아미노에틸)피롤리딘(알드리치 케미칼 캄파니 인코포레이티드(Aldrich Chemical Company, Inc.)로부터 구입)으로 대체한 것을 제외하고는 상기 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 143 내지 147

2-(2-아미노에틸)피리딘을 1-(2-아미노에틸)이미다졸린-2-온(롬 앤 하스 캄파니(Rohm & Hass Co.)에게 허여된 미국 특허 제 2613212(1950) 호에 기재된 절차에 따라 디메틸 카보네이트를 밀봉 플라스크에서 비스(2-아미노에틸)아민(2 당량)과 30분 동안 150℃로 가열하여 제조됨. 조생성물을 클로로포름-메탄올-수성 암모니아 80:25:2의 용출 혼합물을 사용하여 실리카 겔 상에서 정제하였다)으로 대체한 것을 제외하고는 상기 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 148 내지 151 및 184

2-(2-아미노에틸)피리딘을 4-(2-아미노에틸)피페라진-1-아세트산 에틸 에스테르(다음과 같이 제조됨: 피페라진-1-아세트산 에틸 에스테르(11.22g)를 0℃에서 에틸 아세테이트(260ml)중의 탄산칼륨(6.9g)의 존재하에 요오도아세토니트릴(5.0ml)로 처리하였다. 요오도아세토니트릴의 첨가를 완결한 후(45분), 반응 혼합물을 11시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 증발시켰다. 잔여물을 에탄올 중에서 2일 동안 50 psi에서 실온에서 코발트 보라이드(CoCl₂ 및 소듐 보로하이드라이드로부터 제조됨)의 존재하에 수소화하였다. 여과, 증발 및 클로로포름-메탄올-수성 암모니아 80:25:2의 용출 혼합물을 사용하는 크로마토그래피 정제에 의해 목적하는 아민(3.306g)을 옅은 황색 오일로서 수득하였다)로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 152 내지 153

2-(2-아미노에틸)피리딘을 2-[(2-아미노에틸아미노)]아세토니트릴(다음과 같이 제조됨: 에탄올(80ml)중의 요오도아세토니트릴(50밀리몰)의 용액을 30분 동안에 걸쳐 0℃에서 에탄올(60ml)중의 에틸렌 디아민(150ml)의 용액에 첨가하였다. 0℃에서 추가의 1시간 동안 지속적으로 교반한 후, 14시간 동안 실온에서 교반하였다. 탄산칼륨 55밀리몰을 첨가하고, 30분 동안 교반하고, 여과하고, 여액을 실온에서 농축시켰다. 잔여물을 클로로포름-메탄올-수성 암모니아 80:15:1.5의 용출 혼합물을 사용하여 실리카 겔 상에서 정제하여 즉시 사용되는 2-[(2-아미노에틸아미노)]-아세토니트릴(3.550g)을 수득하였다)로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 154 내지 158

2-(2-아미노에틸)피리딘을 1-(3-아미노프로필)-아제핀-2-온(리튬 하이드록사이드(1 hr), DBU 5ml, 물 2ml, 리튬 하이드록사이드 하이드레이트 420mg의 존재하에 145℃에서 DBU의 가수분해를 수행한 것을 제외하고는 문헌 [Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14]에서의 절차에 따라 제조되며, 클로로포름-메탄올-수성 암모니아 80:40:4를 용출 혼합물로 사용하여 실리카 상에서 조생성물을 정제하여 1-(3-아미노프로필)아제핀-2-온(4.973g, 87% 수율)을 수득하였다)으로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 133 내지 135, 159 및 200

2-(2-아미노에틸)피리딘을 N-아세틸 에틸렌 디아민(밀봉 용기에서 1시간 동안 160℃로 에틸렌 디아민(1.5 당량)와 에틸 아세테이트의 혼합물을 가열함으로써 제조됨. 진공 증류에 의해 56% 수율로 목적하는 생성물을 수득한다. N-아세틸에틸렌 디아민은 또한 알드리치로부터 구입한다)으로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 146 내지 140

2-(2-아미노에틸)피리딘을 1-(3-아미노프로필)-테트라하이드로-피리미딘-2-온(문헌 [Kraft, A: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14]에 기재된 절차에 따라 1-(3-아미노프로필)-아제핀-2-온과 동일한 방식으로 제조됨: 간단하게, 1,3,4,6,7,8-헥사하이드로-2H-피리미노[1,2-a]피리미딘(4.939g), 리튬 하이드록시테트라하이드레이트(918 mg) 및 물 2ml를 밀봉 용기에서 1시간 동안 145℃로 용매 없이 가열하였다. 조생성물을 클로로포름-메탄올-수성 암모니아 80:40:4를 사용하는 실리카 칼럼 상에서 정제하여 순수한 아민(5.265g, 94% 수율)을 수득하였다)로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 141, 160 내지 162 및 185

2-(2-아미노에틸)피리딘을 1-(2-아미노에틸)-피페라진-2-온(다음과 같이 제조됨: 순수한 tert-부틸디페닐실릴 클로라이드(25ml, 97.7밀리몰)를 5분내에 수조 상에서 냉각시키면서 무수 디메틸 아세트아미드(80ml)중의 DBU(19.5ml, 130밀리몰) 및 비스(2-아미노에틸)아민(4.32ml, 40밀리몰)의 용액내로 실온에서 적가하였다. 혼합물을 5시간 동안 교반하였다. 브로모아세트산 에틸 에스테르(6.70ml, 60밀리몰)을 실온으로 냉각하면서 첨가하였다. 반응물을 25분 동안 교반한 후, 고진공 상에서 증발시켰다. 잔여물을 메탄올(200ml)중에 용해시키고, KHCO_3 (10g) 및 KF(12g, 200밀리몰)를 첨가하고, 혼합물을 5시간 동안 60°C에서 교반하였다. Na_2CO_3 10g을 첨가하고, 10분 동안 교반하고, 냉각시키고, 여과하였다. 여액을 증발시켰다. 잔여물을 헥산으로 추출하였다(250ml씩 2회). 헥산-불용성 물질을 에탄올(60ml)중에 용해시키고, 여과하고, 증발시켰다. 잔여물을 클로로포름-메탄올-수성 암모니아 80:40:4중의 실리카 칼럼 상에서 정제하여 순수 아민을 수득하였다(4.245g, 74% 수율)으로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 163 내지 167

2-(2-아미노에틸)피리딘을 3-[(2-아미노에틸)아미노]프로피오니트릴(문헌 [Israel, M. 등; *J. Med. Chem.* 7, 1964, 710-16]에 기재된 바와 같이 실온에서 THF중의 에틸렌 디아민(150밀리몰) 및 아크릴로니트릴(50밀리몰)로부터 제조됨)로 대체한 것을 제외하고는 실시예 190, 189, 191, 192 및 203에 기재된 바와 같이 처리하여 목적하는 화합물을 수득하였다.

실시예 168

5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(4-메틸피페라진-1-일)-에틸]-아미드

20ml의 반응 튜브에서의 5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(90mg), DMF (0.8ml) 및 TEA(0.084ml)의 황색의 탁한 교반된 혼합물에 BOP 시약(199mg)을 첨가하였다. 혼합물은 5분 후 점점 투명해졌다. 2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸아민¹(51mg)을 투명한 혼합물에 첨가하였다. 생성된 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 황색 고체 생성물이 반응 시스템으로부터 침전되었다. 박막 크로마토그래피(염화메틸렌중의 10% 메탄올)는 모든 출발 물질이 생성물로 전환되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과에 의해 단리시키고, 에탄올로 1회 세척하였다(1ml). 고체를 디에틸 에테르(2ml)중에서 20분 동안 초음파세척하고, 진공 여과에 의해 수거하였다. 진공하에 건조시킨 후, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드(79mg, 62% 수율)를 수득하였다.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂), 2.47 (m, 8H, 4xCH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.82 (dd, J=4.5, 8.7Hz, 1H), 6.91(td, ²J=2.4, ³J=8.8Hz, 1H), 7.43-(t, J=5.6Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.75 (dd, J=2.8, 9.6Hz, 1H) (방향족 및 비닐), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.67 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 424.4 (M-1).

실시예 169

5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(95mg, 0.3밀리몰)으로 대체한 것을 제외하고는 상기 실시예 168에서의 절차를 따라서 5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드(76mg, 58%)를 수득하였다.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.13 (s, 3H, CH_3), 2.41, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH_3), 2.42 (m, 2H, CH_2), 2.48 (m, 8H, 4x CH_2), 3.30 (m, 2H, CH_2), 6.84 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.11 (dd, $J=2.0$, 8.0Hz, 1H), 7.44 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H) (방향족 및 비닐), 10.98 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 440.2 (M-1).

실시예 170

5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드

5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산을 5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산으로 대체한 것을 제외하고는 실시예 168에 기재된 절차에 따라서 5-(5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드(39mg, 54%)를 수득하였으며, SU011670(54mg, 0.15 밀리몰)로부터 수득되었다.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.14 (s, 3H, CH_3), 2.41, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH_3), 2.42 (m, 2H, CH_2), 2.48 (m, 8H, 4x CH_2), 3.31 (m, 2H, CH_2), 6.80 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.23 (dd, $J=2.0$, 8.0Hz, 1H), 7.44 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.09 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H) (방향족 및 비닐), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 486.6 (M).

실시예 172

5-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드

5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 SU014900을 5-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산으로 대체한 것을 제외하고는 상기 실시예 168에 기재된 절차에 따라서 5-(2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (4-메틸피페라진-1-일-에틸)-아미드(136mg, 84%)가 수득되었다(112.8mg, 0.4 밀리몰).

^1H -NMR (DMSO- d_6) δ 2.13 (s, 3H, CH_3), 2.39, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH_3), 2.42 (m, 2H, CH_2), 2.48 (m, 8H, 4x CH_2), 3.30 (t, 2H, CH_2), 6.86 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.96 (t, $J=7.4\text{ Hz}$, 1H), 7.10 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.41 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.76 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H) (방향족 및 비닐), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.61 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 406.6 (M-1).

실시예 171

5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)에틸]아미드

20ml의 반응 튜브에서 5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (112.8 mg, 0.4 밀리몰), DMF(0.5ml) 및 트리에틸아민(0.111ml)의 황색의 탁한 교반된 혼합물에 BOP 시약(265mg)을 첨가하였다. 혼합물은 5분 후 투명해졌다. 2-(2,6-디메틸피페라진-1-일)에틸아민(68.6mg)(참조: Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innerarity, A. Orjales, *J. Med. Chem.*, 1999,42, 2870-2880)을 투명한 혼합물에 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 박막 크로마토그래피(염화메틸렌중의 10% 메탄올)는 출발 물질이 모두 생성물로 전환되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 증발 건조시킨 후, 플래쉬 크로마토그래피($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}=20/1$ 내지 15/1)에 의해 정제한 후, 재결정화하여 5-[2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리덴메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)에틸]아미드(83mg, 50% 수율)을 수득하였다.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J=11.6Hz, 2H, CH₂), 2.41, 2.47 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.03 (d, J=10Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.86 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.97 (t, J=7.2 Hz, 1H), 7.11 (t, J=7.8Hz, 1H), 7.48 (t, J=5.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.75 (d, J=7.6 Hz, 1H) (방향족 및 비닐), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 422.2 (M+1).

실시예 173

5-[5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)에틸]아미드

상기 실시예 168에 기재된 절차에 따라서 목적하는 화합물을 수득하였다.(60mg, 0.2밀리몰).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 0.891, 0.907 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.49 (t, J=10.4Hz, 2H), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2x CH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂), 2.74 (m, 4H), 3.30 (m, 2H), 6.82 (dd, J=4.5, 8.7Hz, 1H), 6.90 (td, $^2J=2.4$, $^3J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.42 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.74 (dd, J=4.6, 8.4Hz, 1H) (방향족 및 비닐), 10.88 (s, 1H, CONH), 13.65 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 438.4 (M-1).

실시예 174

5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)에틸]아미드

상기 실시예 171에 대한 절차에 따라서 목적하는 화합물(31.2mg, 34%)을 5-[5-클로로-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(63mg, 0.2밀리몰)으로부터 수득하였다.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J=11.6Hz, 2H, CH₂), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.03 (d, J=11.2Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.85 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.11 (dd, J=2.0, 8.0Hz, 1H), 7.52 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.97 (d, J=2.0Hz, 1H) (방향족 및 비닐), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.63 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 456.2 (M+1).

실시예 175

5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 [2-(3,5-디메틸피페라진-1-일)에틸]아미드

실시예 171에 기재된 절차에 따라서 목적하는 화합물(40mg, 40%)을 5-[5-브로모-2-옥소-1,2-디하이드로-인돌-(3Z)-일리텐메틸]-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산(74mg, 0.2밀리몰)으로부터 수득하였다.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.15, 1.16 (2xs, 6H, 2xCH₃), 1.95 (t, J=11.6Hz, 2H, CH₂), 2.40, 2.42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂), 3.03 (d, J=10.4Hz, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.81 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.24 (dd, J=2.0, 8.4Hz, 1H), 7.51 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.10 (d, J=2.0Hz, 1H) (방향족 및 비닐), 10.99 (s, 1H, CONH), 13.62 (s, 1H, NH). LC-MS (m/z) 498.4 (M-1).

실시예 205

(3Z)-3-[(3,5-디메틸-1H-피롤-2-일)-메틸리덴]-1-[1-(4-메틸피페라지닐)메틸]-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-온

N-메틸피페라진(10g, 100밀리몰)을 메탄올(100ml)중의 수성 포름알데하이드(38% 용액 10g, 100밀리몰)와 3-(3,5-디메틸-1H-피롤-2-일메틸리덴)-1,3-디하이드로-인돌-2-온(2.38g, 10밀리몰)의 교반된 용액에 첨가하였다. 용액을 1시간 동안 60℃에서 가열하고, 작은 부피로 농축시키고, 침전물을 여과하고, 메탄올로 세척하고, 건조시켜 표제 화합물 2.38g을 수득하였다(용점 160 내지 164℃). HPLC Rt 4.72분.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.26 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.43 (br s, 4H), 2.70 (br s, 4H), 4.59 (s, 2H), 5.96 (d, 1H), 7.02-7.08 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H) 및 13.0 (br s, 1H). $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$ 에 대한 계산치: C, 71.97; H, 7.48; N, 15.99. 측정치: C, 71.75; H, 7.46; N, 15.87.

(3Z)-3-[(3,5-디메틸-1H-피롤-2-일)-메틸리덴]-1-[1-(4-메틸피페라진일)-메틸]-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-온을 디하이드로클로라이드 염으로 전환하였다.

실시에 206

(3Z)-3-[(3,5-디메틸-1H-피롤-2-일)-메틸리덴]-1-(1-피롤리딘일메틸)-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-온의 합성

피롤리딘(450mg, 6.3밀리몰)을 메탄올(50ml)중의 수성 포름알데하이드(38% 용액 580mg, 6.0밀리몰)와 3-(3,5-디메틸-1H-피롤-2-일메틸리덴)-1,3-디하이드로-인돌-2-온(900mg, 3.8밀리몰)에 첨가하였다. 15분 후, 용액을 0℃로 냉각시키고, 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 건조시켜 표제 화합물 1.08g을 수득하였다(용점:129 내지 132℃).

HPLC Rt 4.87 분. $^1\text{H NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] δ 1.65 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.62 (m, 4H), 4.72 (s, 2H) 6.07 (d, 1H), 7.00 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.76 (d, 2H) 및 13.1 (br s, 1H). $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ 에 대한 계산치: C, 74.74; H, 7.21; N, 13.07. 측정치: C, 74.61; H, 7.25; N, 13.03.

생물학적 실시예

화학식 I의 단백질 키나아제 억제제

하기 분석들은 하나 이상의 단백질 키나아제(이후 본원에서 PK)에 대한 화학식 I의 화합물의 활성 및 효과의 수준을 측정하는데 사용될 수 있다. 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 임의의 PK에 대해 유사한 분석이 동일한 계획대로 디자인될 수 있다.

A. 분석 절차

본원에 기술된 몇몇 분석은 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay) 형식[볼러(Voller) 등의 1980년 문헌 ["Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, "Manual of Clinical Immunology, 2nd ed., Rose and Friedman, Am. Soc. Of Microbiology, Washington, D.C., pp. 359-371]]으로 실시한다. 일반 절차는 다음과 같다. 화학식 I의 화합물을, 시험 키나아제가 수용체라면 상기 수용체를 활성화시키는 것으로 알려진 리간드를 첨가한 후, 선택된 기간 동안, 시험 키나아제를 자연적으로 또는 재조합적으로 발현시키는 세포에 도입시킨다. 세포를 용해시키고, 상기 용해물을, 효소-인산화 반응의 기질을 인식하는 특정 항체로 이미 코팅된 ELISA 플레이트의 웰(well)에 이동시킨다. 세포 용해물의 비-기질 성분을 세척하여 제거하고, 포스포티로신을 특이적으로 인식하는 항체를 사용하여, 시험 화합물과 접촉하지 않은 대조 세포와 비교하여 기질에 대한 인산화량을 검출한다.

특정 PK를 위한 ELISA 실험을 실시하기 위한 현재의 바람직한 프로토콜은 아래에 제시한다. 그러나, 세포질 티로신 키나아제(CTK) 및 세린 트레오닌 티로신 키나아제(STK) 뿐만 아니라, 다른 수용체 티로신 키나아제(RTK)에 대한 화합물의 활성을 측정하기 위한 이들 프로토콜은, 당해 분야의 숙련자의 지식 범주내에서 채택하는 것이 바람직하다. 본원에 기술된 다른 분석은 시험 키나아제의 활성에 반응하여 생성된 DNA의 양을 측정하며, 이는 증식 반응의 일반적인 측정치이다. 이 분석에 대한 일반 절차는 다음과 같다. 화합물을, 시험 키나아제가 수용체라면 상기 수용체를 활성화시키는 것으로 알려진 리간드를 첨가한 후, 선택된 기간 동안, 시험 키나아제를 자연적으로 또는 재조합적으로 발현시키는 세포에 도입시킨

다. 적어도 밤새도록 항온처리한 후, DNA-표지 시약, 예컨대 5-브로모데옥시우리딘(BrdU) 또는 H^3 -티미딘을 첨가한다. 표지된 DNA의 양을 안티-BrdU 항체를 사용하거나 또는 방사성을 측정하여 검출하고, 시험 화합물과 접촉시키지 않은 대조 세포와 비교한다.

GST-FLK-1 생체분석

이 분석은 폴리(glu, tyr) 펩타이드에 대한 GST-Flk 1의 티로신 키나아제 활성을 분석한다.

물질 및 시약:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트(코닝 카탈로그 제 5805-96 호).
2. 폴리(glu, tyr) 4:1, 동결건조물(시그마 카탈로그 제 P0275 호).
3. 폴리(glu, tyr)(pEY)-코팅된 분석 플레이트의 제조: PBS 100 μ l중의 폴리(glu, tyr)(pEY) 2 μ g/웰을 코팅시키고, 2시간 동안 실온으로 또는 밤새도록 4 $^{\circ}$ C로 고정시킨다. 플레이트를 증발이 방지되도록 잘 덮는다.
4. PBS 완충액: 1 ℓ 에 대해, KH_2PO_4 0.2g, Na_2HPO_4 1.15g, KCl 0.2g 및 NaCl 8g을 dH₂O 약 900ml중에서 혼합한다. 모든 시약이 용해되는 경우, HCl을 사용하여 pH를 7.2로 조정한다. dH₂O를 사용하여 총 부피를 1 ℓ 로 만든다.
5. PBST 완충액: PBS 완충액 1 ℓ 에 Tween-20 1.0ml를 첨가한다.
6. TBB-블록킹 완충액: 1 ℓ 에 대해, TRIS 1.21g, NaCl 8.77g, TWEEN-20 1ml을 dH₂O 약 900ml중에서 혼합한다. HCl을 사용하여 pH를 7.2로 조정한다. BSA 10g을 첨가하고, 교반하여 용해시킨다. dH₂O를 사용하여 총 부피를 1 ℓ 로 만든다. 여과하여 미립자 물질을 제거한다.
7. PBS중의 1% BSA: 1x 작업 용액을 제조하기 위해, BSA 10g을 PBS 완충액 약 990ml에 첨가하고, 교반하여 용해시킨다. BPS 완충액을 사용하여 총 부피를 1 ℓ 로 만든다. 여과하여 미립자 물질을 제거한다.
8. pH 7.5의 50mM HEPES.
9. sf9 재조합 바쿨로바이러스 형질변형으로부터 정제된 GST-Flk 1cd(수젠 인코포레이티드(SUGEN, Inc.)).
10. dH₂O중의 4% DMSO.
11. dH₂O중의 10mM ATP.
12. 40mM MnCl₂.
13. 키나아제 희석 완충액(KDB): HEPES(pH 7.5) 10ml, 5M NaCl 1ml, 100mM 소듐 오르토바나테이트 40 μ l 및 dH₂O중의 5% BSA 0.4ml를 dH₂O 88.56ml와 함께 혼합한다.
14. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트, 어플라이드 사이언티픽(Applied Scientific) 카탈로그 제 AS-72092 호.
15. EDTA: 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 14.12g을 dH₂O 약 70ml에 혼합한다. EDTA가 용해될 때까지 10N NaOH를 첨가한다. pH를 8.0으로 조정한다. dH₂O를 사용하여 총 부피를 100ml로 만든다.
16. 1⁰ 항체 희석 완충액: PBS 완충액중의 5% BSA 10ml을 TBST 89.5ml과 혼합한다.

17. 양고추냉이(horseradish) 퍼옥시다아제에 공액결합된 안티-포스포티로신 단핵성 항체(PY99 HRP, 산타 크루즈 바이오텍(Sant Cruz Biotech)).

18. 2,2'-아지노비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-설폰산)(ABTS, Moss, Cat. No. ABST).

19. 10% SDS.

절차:

1. 물질 및 시약 부분의 제 3 단계에서 기술된 바와 같이, 코닝 96-웰 ELISA 플레이트를 무균 PBS중의 폴리EY 펩타이드 2 μ g으로 코팅한다.

2. 플레이트를 뒤집어 미결합된 액체를 웰로부터 제거한다. TBST로 1회 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체를 제거한다.

3. PBS중의 1% BSA 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 1시간 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.

4. 제 2 단계를 반복한다.

5. 웰을 50mM HEPES(pH 7.5)로 적신다(150 μ l/웰).

6. 시험 화합물을 96-웰 폴리프로필렌 플레이트내의 요구되는 최종 분석 농도가 되도록 dH₂O/4% DMSO로 4회 희석시킨다.

7. 희석된 시험 화합물 25 μ l을 ELISA 플레이트에 첨가한다. 대조 웰내에 dH₂O/4% DMSO 25 μ l를 넣는다.

8. 40mM MnCl₂ 25 μ l를 4 × ATP(2 μ M)로 각각의 웰에 첨가한다.

9. 0.5M EDTA 25 μ l를 네거티브 대조 웰에 첨가한다.

10. KDB를 사용하여 GST-Flk 1을 0.005 μ g(5ng)/웰로 희석한다.

11. 희석된 효소 50 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.

12. 15분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.

13. 250mM EDTA 50 μ l를 첨가하여 반응을 중단시킨다(pH 8.0).

14. TBST로 3회 세척하고, 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체를 제거한다.

15. 항체 희석 완충액중에 안티-포스포티로신 HRP 공액결합물을 1:5,000의 희석률로 100 μ l/웰로 첨가한다. 90분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.

16. 제 14 단계에서와 같이 세척한다.

17. 실온의 ABTS 용액 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.

18. 10 내지 15분 동안 진탕시키면서 항온처리한다. 거품을 제거한다.

19. 10% SDS 20 μ l를 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중단시킨다.

20. 시험 필터를 410nm에서 및 기준 필터를 630nm에서 사용하여 다이나테크(Dynatech) MR7000 ELISA 판독기상의 결과를 판독한다.

PYK2 생체분석

이 분석은 ELISA 분석에서 HA 에피토프(epitope)-표지된 전장 pyk2(FL.pyk2-HA)의 생체의 키나아제 활성을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트.
2. 12CA5 단핵성 안티-HA 항체(수젠 인코포레이티드).
3. PBS(둘베코의 포스페이트-완충된 염수, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)(김코(Gibco) 카탈로그 제 450-1300EB).
4. TBST 완충액: 1ℓ에 대해, NaCl 8.766g, TRIS 6.057g, Triton X-100 1ml를 dH₂O 약 900ml중에서 혼합한다. pH를 7.2로 조정하고, 총 부피를 1ℓ로 만든다.
5. 블로킹 완충액: 1ℓ에 대해, 10% BSA 100g, 100mM TRIS 12.1g, 1M NaCl 58.44g, 1% TWEEN-20 10ml을 혼합한다.
6. sf9 세포 용해물로부터 정제된 FL.pyk2-HA(수젠 인코포레이티드).
7. MilliQue H₂O중의 4% DMSO.
8. dH₂O중의 10mM ATP.
9. 1M MnCl₂.
10. 1M MgCl₂.
11. 1M 디티오프레이톨(DTT).
12. 10X 키나아제 완충 인산화: 1M HEPES(pH 7.5) 5.0ml, 1M MnCl₂ 0.2ml, 1M MgCl₂ 1.0ml, 10% 트리톤 X-100 1.0ml를 dH₂O 2.8ml중에 혼합한다. 사용 바로 직전에, 1M DTT 0.1ml를 첨가한다.
13. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트.
14. dH₂O중의 500mM EDTA.
15. 항체 희석 완충액: 100ml에 대해, TBS 88ml중의 5% BSA/PBS 1ml 및 10% Tween-20 1ml.
16. HRP-공액결합된 안티-Ptyr PY99(산타 크루즈 바이오텍, Cat. No. SC-7020).
17. ABTS, Moss, Cat. No. ABST-2000.
18. 10% SDS.

절차:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트를 PBS 100 μ l 중의 0.5 μ g/웰의 안티-HA 항체로 코팅한다. 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 플레이트를 뒤집어 미결합된 HA 항체를 웰로부터 제거한다. 플레이트를 dH₂O로 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 툭툭 두들겨 과량의 액체를 제거한다.
3. 블로킹 완충액 150 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
4. 플레이트를 TBS-T로 4회 세척한다.
5. PBS중의 용해물을 희석시킨다(1.5 μ g 용해물/100 μ l PBS).
6. 희석된 용해물 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 1시간 동안 실온에서 진탕시킨다.
7. 제 4 단계에서와 같이 세척한다.
8. 포획된 pyk2-HA를 함유하는 ELISA 플레이트에 2X 키나아제 완충액 50 μ l를 첨가한다.
9. 4% DMSO중의 400 μ M 시험 화합물 25 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 대조 웰의 경우, 4% DMSO만을 사용한다.
10. 0.5M EDTA 25 μ l를 네거티브 대조 웰에 첨가한다.
11. 20 μ M ATP 25 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 10분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
12. 500mM EDTA(pH 8.0) 25 μ l를 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중단시킨다.
13. 제 4 단계에서와 같이 세척한다.
14. 항체 희석 완충액중의 안티-Ptyr 희석된 1:5,000의 공액결합된 HRP 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 1시간 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
15. 플레이트를 TBST로 3회 및 PBS로 1회 세척한다.
16. ABST 용액 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.
17. 필요하다면, 10% SDS 20 μ l를 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중단시킨다.
18. 시험 필터를 410nm에서 및 기준 필터를 630nm에서 사용하여 ELISA 판독기상의 플레이트를 판독한다.

FGFR1 생체분석

이 분석은 ELISA 분석에서 FGF1-R의 생체의 키나아제 활성을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약

1. 코스타르(Costar) 96-웰 ELISA 플레이트(코닝 카탈로그 제 3369 호).
2. 폴리(Glu-Tyr)(시그마 카탈로그 제 PO275 호).
3. PBS(깁코 카탈로그 제 450-1300EB 호).

4. 50mM HEPES 완충액 용액.
5. 블로킹 완충액(5% BSA/PBS).
6. 정제된 GST-FGFR1(수젠 인코포레이티드)
7. 키나아제 희석 완충액: 1M HEPES(깁코) 500 μ l, 5% BSA/PBS 20 μ l, 100mM 소듐 오르토바나데이트 10 μ l 및 5M 염화나트륨 50 μ l을 혼합한다.
8. 10mM ATP.
9. ATP/염화망간 인산화 혼합물: ATP 20 μ l, 1M 염화망간 400 μ l 및 dH₂O 9.56ml를 혼합한다.
10. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트(어플라이드 사이언티픽 카탈로그 제 AS-72092 호).
11. 0.5M EDTA.
12. 0.05% TBST: TWEEN 500 μ l를 TBS 1l에 첨가한다.
13. 토끼 다핵성 안티-포스포티로신 혈청(수젠 인코포레이티드).
14. 염소 안티-토끼 IgG 퍼옥시다아제 공액결합물(바이오소스, 카탈로그 제 ALI0404 호).
15. ABTS 용액.
16. ABTS/H₂O₂ 용액.

절차:

1. PBS 100 μ l중의 1 μ g/웰의 폴리(Glu, Tyr)로 코스타르 96 웰 ELISA 플레이트를 코팅한다. 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 코팅된 플레이트를 PBS로 1회 세척한다.
3. 5% BSA/PBS 블로킹 완충액 150 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 1시간 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
4. 플레이트를 PBS로 2회 세척한 후, 50mM HEPES로 1회 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체 및 거품을 제거한다.
5. 4% DMSO중의 0.4mM 시험 화합물 25 μ l 또는 4% DMSO만(대조군)을 플레이트에 첨가한다.
6. 키나아제 희석 완충액중에 정제된 GST-FGFR1(5ng 키나아제/50 μ l KDB/웰)을 희석시킨다.
7. 희석된 키나아제 50 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.
8. 25 μ l/웰의 새로 마련된 ATP/Mn⁺⁺(새로 제조된 1M 염화망간 0.4ml, 10mM ATP 40 μ l, dH₂O 9.56ml)를 첨가함으로써 키나아제 반응을 시작한다.
9. 이는 빠른 키나아제 반응이며, ATP 첨가와 유사한 방식으로 0.5M EDTA 25 μ l를 사용하여 중단되어야 한다.
10. 플레이트를 새로운 TBST로 4회 세척한다.

11. 항체 희석 완충액의 제조: 50ml당, 5% BSA 5ml, 5% 우유 250 μ l 및 100mM 소듐 바나테이트 50 μ l를 혼합하고, 0.05% TBST와의 최종 부피를 만든다.
12. 100 μ l/웰의 anti 프스포티로신(ADB중 1:10000 희석률)을 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
13. 제 10 단계에서와 같이 세척한다.
14. 100 μ l/웰의 바이오소스 염소 anti-토끼 IgG 퍼옥시다아제 공액결합물(ADB중 1:6000 희석률)을 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
15. 제 10 단계에서와 같이 세척한 후, PBS로 세척하여 거품 및 과량의 TWEEN을 제거한다.
16. ABTS/H₂O₂ 용액 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.
17. 10 내지 20분 동안 진탕시키면서 항온처리한다. 거품을 제거한다.
18. 다이나텍 MR 7000 ELISA 판독기상에서의 분석 판독: 필터를 410nm에서 시험하고, 기준 여액을 630nm에서 판독한다.

EGFR 생체분석

이 분석은 ELISA 분석에서 FGF1-R의 생체의 키나아제 활성을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트.
2. SUMO1 단백질 항-EGFR 항체(수전 인코포레이티드).
3. PBS.
4. TBST 완충액.
5. 블로킹 완충액: 100ml에 대해, 카네이션 인스턴트 논-페트 밀크(Carnation Instant Non-fat Milk, 등록상표) 5.0g을 PBS 100ml와 혼합한다.
6. A431 세포 용해물(수전 인코포레이티드).
7. TBS 완충액.
8. TBS + 10% DMSO: 1l에 대해, TRIS 1.514g, NaCl 2.192g 및 DMSO 25ml를 혼합하고, dH₂O를 사용하여 총 부피를 1l로 만든다.
9. dH₂O중의 ATP(아데노신-5'-트리포스페이트, 에퀀 머슬(Equine muscle, 시그마 Cat. No A-5394), 10mM 용액. 이 시약은 사용 전에 바로 조성되어 얼음 위에 보관되어야 한다.
10. 1.0mM MnCl₂.
11. ATP/MnCl₂ 인산화 혼합물: 10ml를 조성하기 위해, 1mM ATP 300 μ l, MnCl₂ 500 μ l 및 dH₂O 9.2ml를 혼합한다. 사용 바로 전에 제조하여 얼음 위에 보관한다.

12. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트.
13. EDTA.
14. 토끼 다핵성 안티-포스포티로신 혈청(수제 인코포레이티드).
15. 염소 안티-토끼 IgG 퍼옥시다아제 공액결합물(바이오소스, 카탈로그 제 ALI0404 호).
16. ABTS.
17. 30% 과산화수소.
18. ABTS/H₂O₂.
19. 0.2M HCl.

절차:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트를 PBS 100 μ l 중의 SUMO1 0.5 μ g으로 코팅하고, 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 플레이트를 뒤집어 액체를 제거함으로써 미결합된 SUMO1을 웰로부터 제거한다. dH₂O로 1회 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체를 제거한다.
3. 블로킹 완충액 150 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
4. 탈이온수로 플레이트를 3회 세척한 후, TBST로 1회 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체 및 거품을 제거한다.
5. PBS중의 용해물을 희석시킨다(7 μ g 용해물/100 μ l PBS).
6. 희석된 용해물 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 1시간 동안 실온에서 진탕시킨다.
7. 상기 제 4 단계에서와 같이 플레이트를 세척한다.
8. 포획된 EGFR을 함유하는 ELISA 플레이트에 TBS 120 μ l를 첨가한다.
9. 시험 화합물을 TBS중에 1:10으로 희석시키고, 웰중에 위치시킨다.
10. 희석된 시험 화합물 13.5 μ l를 ELISA 플레이트에 첨가한다. 대조 웰에 10% DMSO중의 TBS 13.5 μ l를 첨가한다.
11. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
12. 인산화 혼합물 15 μ l를 네거티브 대조 웰을 제외한 모든 웰에 첨가한다. 최종 웰 부피는 각각의 웰내에서 3 μ M ATP/5mM MnCl₂으로 약 150 μ l이어야 한다. 5분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
13. EDTA 용액 16.5 μ l를 진탕시키면서 첨가하여 반응을 중단시킨다. 추가로 1분 동안 진탕시킨다.
14. 탈이온수로 4회, TBST로 2회 세척한다.
15. 100 μ l/웰의 안티-포스포티로신(TBST중 1:3000 희석률)을 첨가한다. 실온에서 30 내지 45분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.

16. 상기 제 4 단계에서와 같이 세척한다.
17. 100 μ l/웰의 바이오소스 염소 안티-토끼 IgG 퍼옥시다아제 공액결합물(TBST중 1:2000 희석률)을 각각의 웰에 첨가한다. 실온에서 30분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
18. 제 4 단계에서와 같이 세척한다.
19. ABTS/H₂O₂ 용액 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.
20. 5 내지 10분 동안 진탕시키면서 항온처리한다. 거품을 제거한다.
21. 필요하다면, 100 μ l/웰의 0.2M HCl을 첨가하여 반응을 중단시킨다.
22. 시험 필터를 410nm에서 및 기준 필터를 630nm에서 사용하여 다이나텍 MR7000 ELISA 판독기상의 분석을 판독한다.

PDGFR 생체분석

이 분석은 ELISA 분석에서 FGF1-R의 생체의 키나아제 활성을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트.
2. 28D4C10 단핵성 안티-PDGFR 항체(수젠 인코포레이티드).
3. PBS.
4. TBST 완충액.
5. 블로킹 완충액(PDGFR 생체분석에서와 동일함).
6. PDGFR- β 발현 NIH 3T3 세포 용해물(수젠 인코포레이티드).
7. TBS 완충액.
8. TBS + 10% DMSO
9. ATP.
10. MnCl₂.
11. 키나아제 완충액 인산화 혼합물: 10ml에 대해, 1M TRIS 250 μ l, 5M NaCl 200 μ l, 1M MnCl₂ 100 μ l 및 100mM 트리톤 X-100 50 μ l를 충분한 dH₂O중에서 혼합하여 10ml를 만든다.
12. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트.
13. EDTA.
14. 토끼 다핵성 안티-포스포티로신 혈청(수젠 인코포레이티드).

15. 염소 안티-토끼 IgG 퍼옥시다아제 공액결합물(바이오소스, 카탈로그 제 ALI0404 호).
16. ABTS.
17. 과산화수소, 30% 용액.
18. ABTS/H₂O₂.
19. 0.2M HCl.

절차:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트를 PBS 100 μ l 중의 28D4C10 0.5 μ g으로 코팅하고, 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 플레이트를 뒤집어 액체를 제거함으로써 미결합된 28D4C10을 웰로부터 제거한다. dH₂O로 1회 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체를 제거한다.
3. 블로킹 완충액 150 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
4. 탈이온수로 플레이트를 3회 세척한 후, TBST로 1회 세척한다. 페이퍼 타올상의 플레이트를 톡톡 두들겨 과량의 액체 및 거품을 제거한다.
5. HNTG중의 용해물을 희석시킨다(10 μ g 용해물/100 μ l HNTG).
6. 희석된 용해물 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 60분 동안 실온에서 진탕시킨다.
7. 제 4 단계에서 기술된 바와 같이 플레이트를 세척한다.
8. 포획된 PDGFR을 함유하는 ELISA 플레이트에 키나아제 완충액 80 μ l를 첨가한다.
9. 시험 화합물을 96-웰 폴리프로필렌 플레이트내의 TBS중에 1:10으로 희석시킨다.
10. 희석된 시험 화합물 10 μ l를 ELISA 플레이트에 첨가한다. 대조 웰에 TBS 10 μ l + 10% DMSO를 첨가한다. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
11. ATP 10 μ l를 네거티브 대조 웰을 제외한 모든 웰에 직접 첨가한다. (최종 웰 부피는 각각의 웰내에서 20 μ M ATP로 약 100 μ l이어야 한다.) 30분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
12. EDTA 용액 10 μ l를 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중단시킨다.
13. 탈이온수로 4회, TBST로 2회 세척한다.
14. 100 μ l/웰의 안티 포스포티로신(TBST중 1:3000 희석률)을 첨가한다. 실온에서 30 내지 45분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
15. 제 4 단계에서와 같이 세척한다.
16. 100 μ l/웰의 바이오소스 염소 안티-토끼 IgG 퍼옥시다아제 공액결합물(TBST중 1:2000 희석률)을 각각의 웰에 첨가한다. 실온에서 30분 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
17. 제 4 단계에서와 같이 세척한다.

18. ABTS/H₂O₂ 용액 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.
19. 10 내지 30분 동안 진탕시키면서 항온처리한다. 거품을 제거한다.
20. 필요하다면, 웰당 0.2M HCl 100 μ l를 첨가하여 반응을 중단시킨다.
21. 시험 필터를 410nm에서 및 기준 필터를 630nm에서 사용하여 다이내텍 MR7000 ELISA 판독기상의 분석을 판독한다.

세포 HER-2 키나아제 분석

이 분석은 ELISA 형태로 모든 세포에서의 HER-2 키나아제 활성을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약:

1. DMEM(깁코 카탈로그 제 11965-092 호).
2. 56°C에서 30분 동안 수욕내에서 가열 불활성화된, 소 태반 혈청(FBS, 깁코 카탈로그 제 16000-044).
3. 트립신(깁코 카탈로그 제 25200-056 호).
4. L-글루타민(깁코 카탈로그 제 25030-081).
5. HEPES(깁코 카탈로그 제 15630-080).
6. 성장 배지: DMEM 500ml, 가열 불활성된 FBS 55ml, HEPES 10ml 및 L-글루타민 5.5ml를 혼합한다.
7. 결핍 배지: DMEM 500ml, 가열 불활성된 FBS 2.5ml, HEPES 10ml 및 L-글루타민 5.5ml를 혼합한다.
8. PBS.
9. 평탄 바닥 96-웰 조직 배양 마이크로 타이터 플레이트(코닝 카탈로그 제 25860 호).
10. 15cm 조직 배양 디쉬(코닝 카탈로그 제 08757148 호).
11. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트.
12. NUNC 96-웰 바닥 폴리프로필렌 플레이트.
13. 트랜스타 96에 대한 코스타 트랜스퍼 카트리지(코스타 카탈로그 제 7610 호).
14. SUM01: 단핵성 안티-EGFR 항체(수젠 인코포레이티드).
15. TBST 완충액.
16. 블로킹 완충액: PBS중의 5% 카네이션 인스턴트 밀크(등록상표).
17. EGF 리간드: EGF-201, 일본 신코 어메리칸(Shinko American). 10mM HCl 100 μ l중에 분말을 현탁시킨다. 10mM NaOH 100 μ l를 첨가한다. PBS 800 μ l를 첨가하고, 에펜도르프관에 옮기고, 사용할 때까지 -20°C에서 저장한다.

18. HNTG 용해 완충액: 스톡 5X HNTG의 경우, HEPES 23.83g, NaCl 43.83g, 글리세롤 500ml, 트리톤 X-100 100ml 및 충분한 dH₂O를 혼합하여 총 용액 1ℓ를 만든다. 1X HNTG의 경우, HNTG 2ml, 0.1M Na₃VO₄ 100μl, 0.2M Na₄P₂O₇ 250μl 및 EDTA 100μl를 혼합한다.
19. EDTA.
20. Na₃VO₄: 원료 용액을 제조하기 위해, Na₃VO₄ 1.84g을 dH₂O 90ml와 혼합한다. pH를 10으로 조정한다. 1분 동안 마이크로웨이브내에서 비등시킨다(용액이 끓아짐). 실온으로 냉각시킨다. pH를 10으로 조정한다. pH가 10으로 유지될 때까지 가열/냉각 사이클을 반복한다.
21. 200mM Na₄P₂O₇.
22. 포스포티로신에 특이적인 토끼 다핵성 항혈청(안티-Ptyr 항체, 수젠 인코포레이티드).
23. 친화성 정제된 항혈청, 염소 안티-토끼 IgG 항체, 퍼옥시다아제-공액결합물(바이오소스 카탈로그 제 ALI0404).
24. ABTS 용액.
25. 30% 과산화수소 용액.
26. ABTS/H₂O₂.
27. 0.2M HCl.

절차:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트를 100μl 최종부피/웰 PBS중의 1.0μg/웰로 SUMO1로 코팅한다. 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 사용하는 날에는, 코팅 완충액을 제거하고, 플레이트를 dH₂O로 3회 세척하고, TBST 완충액으로 1회 세척한다. 달라지적되지 않는 한, 이 분석의 모든 세척은 상기 방식으로 실시해야 한다.
3. 블로킹 완충액 100μl를 각각의 웰에 첨가한다. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 플레이트를 항온처리한다. 사용 바로 직전에 플레이트를 세척한다.
4. 이 분석을 위해 EGFr/HER-2 키메라/3T3-C7 세포주를 사용한다.
5. 80 내지 90% 합류점(confluence)를 갖는 디쉬를 선택한다. 트립신화에 의해 세포를 수거하고, 5분 동안 실온에서 1000rpm으로 원심분리시킨다.
6. 결핍 배지중의 세포를 재현탁시키고, 트리판 청색을 계수한다. 90% 이상의 생존력이 요구된다. 결핍 배지중의 세포를 2,500개 세포/웰의 밀도, 90μl/웰로 96-웰 마이크로적정기 플레이트내에 씨딩(seeding)한다. 씨딩된 세포를 5% CO₂하의 37℃에서 밤새도록 항온처리한다.
7. 씨당한지 2일 후에 분석을 시작한다.
8. 시험 화합물을 4% DMSO중에 용해시킨다. 그 다음, 샘플을 결핍-DMEM으로 플레이트상에서 직접 희석시킨다. 전형적으로, 이 희석은 1:10 이상일 것이다. 그 다음, 모든 웰을 추가 1:10 희석률로 세포 플레이트에 옮긴다(10μl 샘플 및 배지를 결핍 배지 90μl내로). 최종 DMSO 농도는 1% 이하이어야 한다. 일련의 표준 희석물이 또한 사용될 수 있다.
9. 2시간 동안 37℃에서 5% CO₂하에 항온처리한다.

10. 미온의 DMEM중의 원료 EGF(16.5 μ M)를 150 μ M로 희석시켜 EGF 리간드를 제조한다.
11. 웰당 100 μ l에 충분한 새로운 HNTG*를 제조하고, 얼음위에 위치시킨다.
12. 시험 화합물과 함께 2시간 동안 항온처리한 후, 제조된 EGF 리간드를 50nM의 최종 농도를 위해 웰당 50 μ l로 세포에 첨가한다. 포지티브 대조 웰은 동일량의 EGF를 수용한다. 네거티브 대조군은 EGF를 수용하지 못한다. 10분 동안 37℃에서 항온처리한다.
13. 시험 화합물, EGF 및 DMEM을 제거한다. 세포를 PBS로 1회 세척한다.
14. HNTG*를 웰당 100 μ l로 세포에 옮긴다. 5분 동안 얼음위에 위치시킨다. 한편, 블로킹 완충액은 ELISA 플레이트로부터 제거하여 세척한다.
15. 마이크로피페터를 사용하여 세포를 플레이트로부터 긁어모으고, HNTG*를 용해 완충액을 흡입하고 분배하는 것을 반복하여 세포 물질을 균질화시킨다. 용해물을 코팅되고 블로킹되고 세척된 ELISA 플레이트에 옮긴다. 또는, 코스타 트랜스퍼 카트리지를 사용하여 용해물을 상기 플레이트에 옮긴다.
16. 1시간 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
17. 용해물을 제거하고 세척한다. 새로이 희석된 안티-Ptyr 항체(TBST중 1:3000)를 100 μ l/웰로 ELISA 플레이트에 옮긴다.
18. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
19. 안티-Ptyr 항체를 제거하고 세척한다. 새로이 희석된 BIOSOURCE 항체를 ELISA 플레이트(TBST중 1:8000, 100 μ l/웰)에 옮긴다.
20. 30분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
21. BIOSOURCE 항체를 제거하고 세척한다. 새로이 제조된 ABTS/H₂O₂ 용액을 100 μ l/웰로 ELISA 플레이트에 옮긴다.
22. 5 내지 10분 동안 진탕시키면서 항온처리한다. 거품을 제거한다.
23. 100 μ l/웰의 0.2M HCl을 첨가하여 반응을 중단시킨다.
24. 시험 필터를 410nm에서 및 기준 필터를 630nm에서 사용하여 다이내텍 MR7000 ELISA 판독기상의 분석을 판독한다.

CDK2/사이클린 A 분석

이 분석은 신틸레이션 근접 분석(SPA)에서 인간 cdk2/사이클린의 생체의 세린/트레오닌 키나아제 활성을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약:

1. 왈락 96-웰 폴리에틸렌 테레프탈레이트(flexi) 플레이트(왈락 카탈로그 제 1450-401 호).
2. 아메르삼 레디뷰에(Amersham Redivue)[γ ³³P] ATP(아메르삼 카탈로그 제 AH 9968).
3. 아메르삼 스트랩타비딘-코팅된 포릴비닐톨루엔 SPA 비이드(아메르삼 카탈로그 제 RPNQ0007). 비이드는 마그네슘 또는 칼슘 없이 PBS중에서 20mg/ml로 재구성되어야 한다.

4. Sf9 세포로부터 정제된 활성화 cdk2/사이클린 A 효소 복합물(수젠 인코포레이티드).
5. 바이오틀화(biotinylated) 펩타이드 기질(덱타이드(Debtide). 펩타이드 바이오틀-X-PKTPKKAKKL을 5mg/ml의 농도로 dH₂O중에 용해시킨다.
6. 펩타이드/ATP 혼합물: 10ml에 대해, dH₂O 9.970ml, "콜드(cold)" ATP 0.00125ml, 덱타이드 0.010ml 및 γ -³³P ATP 0.010ml를 혼합한다. 웰당 최종 농도는 0.5μM의 "콜드" ATP, 0.1μg 덱타이드 및 0.2μCi γ -³³P ATP일 것이다.
7. 키나아제 완충액: 10ml에 대해, 사용 바로 직전에 새로이 첨가된, dH₂O 8.85ml, TRIS(pH 7.4) 0.625ml, 1M MgCl₂ 0.25ml, 10% NP40 0.25ml, 1M DTT 0.025ml를 혼합한다.
8. dH₂O중의 10mM ATP.
9. HCl을 사용하여 1M TRIS의 pH를 7.4로 조정한다.
10. 1M MgCl₂.
11. 1M DTT.
12. PBS(깁코 카탈로그 제 14190-144 호).
13. 0.5M EDTA.
14. 중단 용액: 10ml에 대해, PBS 9.25ml, 100mM ATP 0.005ml, 0.5M EDTA 0.1ml, 10% 트리톤 X-100 0.1ml 및 20mg/ml의 SPA 비이드 1.25ml를 혼합한다.

절차:

1. 시험 화합물의 용액을 5% DMSO중의 요구되는 최종 분석 농도의 5배로 제조한다.
2. cdk2/사이클린 A 용액 5μl를 키나아제 완충액 2.1ml로 2회 희석시킨다.
3. 효소 20μl를 각각의 웰에 첨가한다.
4. 0.5M EDTA 10μl를 네거티브 대조 웰에 첨가한다.
5. 키나아제 반응을 시작하기 위해, 펩타이드/ATP 혼합물 20μl를 각각의 웰에 첨가한다. 진탕시키지 않고서 1시간 동안 항온처리한다.
6. 중단 용액 200μl를 각각의 웰에 첨가한다.
7. 적어도 10분 동안 지속한다.
8. 3 내지 5분 동안 약 2300rpm으로 플레이트를 회전시킨다.
9. 트릴룩스(Trilux) 또는 유사 관독기를 사용하여 플레이트를 계수한다.

MET 인산화교환반응 분석

이 분석은, 기질의 met 인산화교환반응의 작용제/길항제를 확인하는 수단으로서 폴리(글루탐산:티로신(4:1))에 대한 포스포티로신 수준을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약:

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트, 코닝 카탈로그 제 25805-96 호.
2. 폴리(glu, tyr) 4:1, 시그마 카탈로그 제 P0275 호.
3. PBS, 김코 카탈로그 제 450-1300EB 호.
4. 50mM HEPES.
5. 블로킹 완충액: 소의 혈청 알부민(시그마 Cat. No A-7888) 25g을 PBS 500ml중에 용해시키고, 4 μ m 필터를 통해 여과한다.
6. MET 키나아제 도메인을 함유하는 정제된 GST 융합 단백질(수젠 인코포레이티드).
7. TBST 완충액.
8. 10% 수성 (MilliQue H₂O) DMSO.
9. 10mM 수성 (dH₂O) 아데노신-5'-트리포스페이트(시그마 Cat. No A-5394).
10. 2X 키나아제 희석 완충액: 100ml에 대해, 1M HEPES(pH 7.5) 10ml, 5% BSA/PBS 0.4ml, 0.1M 소듐 오르토바나데이트 0.2ml 및 5M 염화나트륨 1ml를 dH₂O 88.4ml중에서 혼합한다.
11. 4X ATP 반응 혼합물: 10ml에 대해, 1M 염화마그네슘 0.4ml 및 0.1M ATP 0.02ml를 dH₂O 9.56ml중에서 혼합한다.
12. 4X 네거티브 대조 혼합물: 10ml에 대해, 1M 염화마그네슘 0.4ml를 dH₂O 9.6ml중에서 혼합한다.
13. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트, 어플라이드 사이언티픽 카탈로그 제 AS-72092 호.
14. 500mM EDTA.
15. 항체 희석 완충액: 100ml에 대해, 5% BSA/PBS 10ml, PBS중의 5% 카네이션 인스턴트 밀크(등록상표) 및 TBST 88.4ml중의 0.1M 소듐 오르토바나데이트 0.1ml를 혼합한다.
16. 토끼 다핵성 안토포스포티로신 항체(수젠 인코포레이티드).
17. 염소 안티-토끼 양고추냉이 퍼옥시다아제-공액결합된 항체(바이오소스 인코포레이티드, Biosource Inc.)
18. ABTS 용액: 1l에 대하여, 시트르산 19.21g, Na₂HPO₄ 35.49g 및 ABTS 500mg을 충분한 dH₂O와 함께 혼합하여 1l로 만든다.
19. ABTS/H₂O₂: 사용하기 5분 전에 ABST 15ml를 H₂O₂ 2 μ l와 혼합한다.
20. 0.2M HCl.

절차:

1. PBS 100 μ l중의 폴리(Glu-Tyr) 2 μ g으로 ELISA 플레이트를 코팅하고, 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 60분 동안 5% BSA/PBS 150 μ l로 플레이트를 블로킹한다.

3. PBS로 2회, 50mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 1회 플레이트를 세척한다.
4. 희석된 키나아제 50 μ l를 모든 웰에 첨가한다. (정제된 키나아제를 키나아제 희석 완충액으로 희석시킨다. 최종 농도는 10ng/웰이어야 한다.)
5. (4% DMSO중의) 시험 화합물 또는 (dH₂O중의 4%) DMSO 단독 25 μ l를 첨가한다.
6. 15분 동안 키나아제/화합물 혼합물을 항온처리한다.
7. 40mM MnCl₂ 25 μ l를 네거티브 대조 웰에 첨가한다.
8. ATP/MnCl₂ 혼합물 25 μ l를 다른 모든 웰(네거티브 대조군은 제외됨)에 첨가한다. 5분 동안 항온처리한다.
9. 500mM EDTA 25 μ l를 첨가하여 반응을 중단시킨다.
10. 플레이트를 TBST로 3회 세척한다.
11. 항체 희석 완충액중의 1:10,000으로 희석된 토끼 다핵성 안티-Ptyr 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
12. 플레이트를 TBST로 3회 세척한다.
13. 항체 희석 완충액중의 1:6,000으로 희석된 바이오소스 HRP 공액결합된 안티-토끼 항체를 희석시킨다. 100 μ l/웰로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
14. 플레이트를 PBS로 1회 세척한다.
15. ABTS/H₂O₂ 용액 100 μ l를 각각의 웰에 첨가한다.
16. 필요하다면, 100 μ l/웰의 0.2M HCl을 첨가하여 전개 반응을 중단시킨다.
17. 시험 필터를 410nm에서 및 기준 필터를 630nm에서 사용하여 다이내텍 MR7000 ELISA 판독기상의 분석을 판독한다.

IGF-1 인산화교환반응 분석

이 분석은, 기질의 gst-IGF-1 인산화교환반응의 작용제/길항제를 확인하는 수단으로서 폴리(글루탐산:티로신(4:1))에 대한 포스포티로신 수준을 측정하는데 사용한다.

물질 및 시약

1. 코닝 96-웰 ELISA 플레이트.
2. 폴리(Glu-Tyr)(4:1)(시그마 카탈로그 제 P 0275 호).
3. PBS(깁코 카탈로그 제 450-1300EB 호).
4. 50mM HEPES.
5. TBB-블록킹 완충액: 1ℓ에 대해, BSA 100g, TRIS(pH 7.5) 12.1g, NaCl 58.44g, 1% TWEEN-20 10ml를 혼합한다.

6. IGF-1 키나아제 도메인을 함유하는 정제된 GST 융합 단백질(수젠 인코포레이티드).
7. TBST 완충액: 1ℓ에 대해, TRIS 6.057g, NaCl 8.766g 및 TWEEN-20 0.5ml를 충분한 dH₂O와 함께 혼합하여 1ℓ를 만든다.
8. Milli-Q H₂O중의 4% DMSO.
9. dH₂O중의 10mM ATP.
10. 2X 키나아제 희석 완충액: 100ml에 대해, 1M HEPES(pH 7.5) 10ml, dH₂O중의 5% BSA 0.4ml, 0.1M 소듐 오르토바나데이트 0.2ml 및 5M 염화나트륨 1ml를 충분한 dH₂O와 함께 혼합하여 100ml를 만든다.
11. 4X ATP 반응 혼합물: 10ml에 대해, 1M MnCl₂ 0.4ml, 0.01M ATP 0.008ml 및 dH₂O 9.56ml를 혼합한다.
12. 4X 네거티브 대조 혼합물: 0.4ml에 대해, 1M 염화망간 0.4ml를 dH₂O 9.6ml중에서 혼합한다.
13. NUNC 96-웰 V 바닥 폴리프로필렌 플레이트.
14. dH₂O중의 500mM EDTA.
15. 항체 희석 완충액: 100ml에 대해, PBS중의 5% BSA 10ml, PBS중의 5% 카네이션 인스턴트 논-펫 밀크(등록상표) 및 TBST 88.4ml중의 0.1M 소듐 오르토바나데이트 0.1ml를 혼합한다.
16. 토끼 다핵성 안토포스포티로신 항체(수젠 인코포레이티드).
17. 염소 안티-토끼 HRP 퍼옥시다아제-공액결합된 항체(바이오소스).
18. ABTS 용액.
20. ABTS/H₂O₂: 사용하기 5분 전에 ABST 15ml를 H₂O₂ 2μl와 혼합한다.
21. dH₂O중의 0.2M HCl.

절차:

1. PBS 100μl중의 2.0μg/웰의 폴리(Glu, Tyr)로 ELISA 플레이트를 코팅한다. 4℃에서 밤새도록 저장한다.
2. 코팅된 플레이트를 PBS로 1회 세척한다.
3. TBB 블로킹 완충액 100μl를 각각의 웰에 첨가한다. 1시간 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
4. 플레이트를 PBS로 1회 세척한 후, 50mM HEPES 완충액(pH 7.5)로 2회 세척한다.
5. 4% DMSO중의 시험 화합물(100% DMSO중의 10mM 시험 화합물의 원료 용액을 dH₂O로 희석시켜 수득됨) 25μl를 플레이트에 첨가한다.
6. 키나아제 희석 완충액중의 GST-FGF-1 키나아제 10.0ng을 모든 웰에 첨가한다.

7. 4X ATP 반응 혼합물 25 μ l를 모든 시험 웰 및 포지티브 대조 웰에 첨가하여 키나아제 반응을 시작한다. 4X 네거티브 대조 혼합물 25 μ l를 모든 네거티브 대조 웰에 첨가한다. 10분 동안 실온에서 진탕시키면서 항온처리한다.
8. 0.5M EDTA(pH 8.0) 25 μ l를 모든 웰에 첨가한다.
9. 플레이트를 TBST 완충액으로 4회 세척한다.
10. 항체 희석 완충액 100 μ l중의 1:10,000으로 희석된 토끼 다핵성 안티-포스포티로신 안티-혈청을 모든 웰에 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
11. 제 9 단계에서와 같이 플레이트를 세척한다.
12. 항체 희석 완충액중의 1:10,000으로 희석된 바이오소스 염소 안티-토끼 HRP 100 μ l를 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 진탕시키면서 항온처리한다.
13. 제 9 단계에서와 같이 플레이트를 세척한 후, PBS로 1회 세척하여 거품 및 과량의 TWEEN-20을 감소시킨다.
14. 100 μ l/웰의 ABTS/H₂O₂ 용액을 각각의 웰에 첨가하여 전개시킨다.
15. 약 5분 후, 시험 필터를 410nm에서 기준 여액을 630nm에서 ELISA 판독기상에서 판독한다.

BRDU 혼입 분석

하기 분석들은 선택된 수용체를 발현시키도록 가공된 세포를 사용한 후, DNA내로의 BrdU 혼입을 측정함으로써 리간드-유도된 DNA 합성의 활성화에 대한 해당 화합물의 효과를 평가한다.

하기 물질, 시약 및 절차는 다음의 각 BrdU 혼입 분석에 있어 일반적인 것이다. 특정 분석에서의 변형은 지적되어 있다.

물질 및 시약

1. 적절한 리간드.
2. 적절한 가공된 세포.
3. BrdU 표지화 시약: 10mM, PBS중(pH 7.4)(비링거 만하임(Boehringer Mannheim), 독일).
4. FixDenat: (사용하도록 준비된) 고정 용액(비링거 만하임, 독일).
5. 안티-BrdU-POD: 퍼옥시다아제로 공액결합된 마우스 단핵성 항체(비링거 만하임, 독일).
6. TMB 기질 용액: 테트라메틸벤지딘(TMB, 비링거 만하임, 독일).
7. PBS 세척 용액: 1X PBS, pH 7.4.
8. 알부민, 소(BSA), 분획 V 분말(시그마 케미칼 캄파니, 미국).

절차:

1. 세포를 96-웰 플레이트내에서 DMEM중의 10% CS, 2mM Gln중 8000개 세포/웰로 씨딩한다. 세포를 5% CO₂중에 37°C에서 밤새도록 항온처리한다.

2. 24시간 후, 세포를 PBS로 세척한 후, 24시간 동안 혈청-부재 배지(0% CS DMEM + 0.1% BSA)중에서 혈청-결핍시킨다.
3. 3일째, 적절한 리간드 및 시험 화합물을 세포에 동시에 첨가한다. 네거티브 대조 웰은 단지 0.1% BSA와 함께 혈청-부재 DMEM을 수용하고, 포지티브 대조 웰은 리간드는 수용하지만 시험 화합물을 수용하지 않는다. 시험 화합물을 96-웰 플레이트내에 리간드와 함께 혈청-부재 DMEM중에서 제조하고, 일련의 7개의 시험 농도로 희석시킨다.
4. 리간드 활성화 18시간 후, 희석된 BrdU 표지화 시약(DMEM중 1:100, 0.1% BSA)을 첨가하고, 세포를 BrdU(최종 농도 = 10 μ M)와 함께 1.5시간 동안 항온처리한다.
5. 표지화 시약으로 항온처리한 후, 페이퍼 타올상의 뒤집은 플레이트를 서서히 기울이고 톡톡 두들겨 배지를 제거한다. FixDenat 용액을 첨가하고(50 μ l/웰), 플레이트를 플레이트 진탕기상에서 45분 동안 실온에서 항온처리한다.
6. 페이퍼 타올상의 뒤집은 플레이트를 서서히 기울이고 톡톡 두들겨 FixDenat 용액을 완전히 제거한다. 우유를 블로킹 용액으로서 첨가하고(PBS중의 5% 탈수유, 200 μ l/웰), 플레이트를 플레이트 진탕기상에서 30분 동안 실온에서 항온처리한다.
7. 블로킹 용액을 서서히 기울여 제거하고, 웰을 PBS로 1회 세척한다. 안티-BrdU-POD 용액(PBS중 1:200 희석, 1% BSA)을 첨가하고(50 μ l/웰), 플레이트를 플레이트 진탕기상에서 90분 동안 실온에서 항온처리한다.
8. 웰을 PBS로 5회 서서히 기울이고 행귀 항체 공액결합물을 완전히 제거하고, 플레이트를 페이퍼 타올상에서 뒤집어서 톡톡 두들겨 건조시킨다.
9. TMB 기질 용액을 첨가하고(100 μ l/웰), 광도 검출에 충분한 색 전개가 될 때까지 플레이트 진탕기상에서 실온에서 20분 동안 항온처리한다.
10. 샘플의 흡수도를 다이내믹 ELISA 플레이트 판독기상에서 410nm에서 (기준 파장으로서 490nm에서 필터 판독하는 "이중 파장" 모드로) 측정한다.

EGF-유도된 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 마우스 EGF, 201(도요보 캄파니 리미티드(Toyobo Co., Ltd.), 일본).
2. 3T3/EGFRc7.

EGF-유도된 Her-2-유도 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 마우스 EGF, 201(도요보 캄파니 리미티드, 일본).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr(Her-2 키나아제 도메인을 갖는 EGFr).

EGF-유도된 Her-4-유도 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 마우스 EGF, 201(도요보 캄파니 리미티드, 일본).
2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr(Her-4 키나아제 도메인을 갖는 EGFr).

PDGF-유도된 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 인간 PDGF B/B(뵈링거 맘하임, 독일).
2. 3T3/EGFRc7.

FGF-유도된 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 인간 FGF2/bFGF(집코 BRL, 미국).
2. 3T3c7/EGFr.

IGF1-유도된 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 인간, 재조합(G511, 프로메가 코포레이션, 미국).
2. 3T3/IGF1r.

인슐린-유도된 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 인슐린, 결정성, 소(bovine), 아연(13007, 집코 BRL, 미국).
2. 3T3/H25.

HGF-유도된 BrdU 혼입 분석

물질 및 시약

1. 재조합 인간 HGF(카탈로그 제 249-HG, R&D 시스템즈 인코포레이티드, 미국).
2. BxPC-3 세포(ATCC CRL-1687).

절차:

1. 세포를 96-웰 플레이트내에서 RPMI 10% FBS중 9000개 세포/웰로 씨딩한다. 세포를 5% CO₂중에 37℃에서 밤새도록 항온처리한다.
2. 24시간 후, 세포를 PBS로 세척한 후, 24시간 동안 혈청-부재 배지(RPMI + 0.1% BSA)중에서 혈청-결핍시킨다.
3. 3일째, 리간드(0.1% BSA를 사용하여 RPMI중에 1μg/ml로 제조하고; 최종 HGF 농도는 200ng/ml이다)를 함유하는 25 μl 및 시험 화합물을 세포에 첨가한다. 네거티브 대조 웰은 단지 0.1% BSA와 함께 혈청-부재 RPMI 25μl를 수용하고, 포지티브 대조 웰은 리간드(HGF)는 수용하지만 시험 화합물은 수용하지 않는다. 시험 화합물을 96-웰 플레이트내에 리간드와 함께 혈청-부재 RPMI중에서 제조하고, 일련의 7개의 시험 농도로 희석시킨다. 전형적으로, 시험 화합물의 가장 높은 최종 농도는 100μM이고, 1:3 희석액을 사용한다(즉, 최종 시험 화합물의 농도 범위는 0.137 내지 100μM이다).

4. 리간드 활성화 18시간 후, 희석된 BrdU 표지화 시약(RPMI중 1:100, 0.1% BSA)을 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 BrdU(최종 농도 = 10 μ M)와 함께 1시간 동안 항온처리한다.
5. 일반 절차와 동일하다.
6. 일반 절차와 동일하다.
7. 블로킹 용액을 서서히 기울여 제거하고, 웰을 PBS로 1회 세척한다. 안티-BrdU-POD 용액(PBS중 1:100 희석, 1% BSA)을 첨가하고(100 μ l/웰), 플레이트를 플레이트 진탕기상에서 90분 동안 실온에서 항온처리한다.
8. 일반 절차와 동일하다.
9. 일반 절차와 동일하다.
10. 일반 절차와 동일하다.

HUV-EC-C 분석

이 분석은, 모두가 HUV-EC 세포에 의해 자연적으로 발현되는, PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF 또는 Flk-1/KDR에 대한 화합물의 활성을 측정하는데 사용한다.

0일

1. HUV-EC-C 세포(인간 배꼽 정맥 내피 세포, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection), 카탈로그 제 1730 CRL)를 세척 및 트립신화시킨다. 둘베코의 포스페이트-완충된 염수로 약 1ml/10cm²의 조직 배양 플라스크에서 2회 세척한다. 비-효소 세포 해리 용액(시그마 케미칼 캠페니, 카탈로그 제 C-1544 호)중에서 0.05% 트립신-EDTA로 트립신화시킨다. 0.25% 트립신/1mM EDTA(김코, 카탈로그 제 25200-049 호)를 세포 해리 용액중에 희석시켜 0.05% 트립신을 제조한다. 37℃에서 약 5분 동안 약 1ml/25-30cm²의 조직 배양 플라스크로 트립신화시킨다. 플라스크로부터 세포를 탈착시킨 후, 동일한 부피의 분석 배지를 첨가하고, 50ml 무균 원심분리관(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 카탈로그 제 05-539-6 호)으로 옮긴다.
2. 분석 배지 약 35ml를 50ml 무균 원심분리관중에 첨가하여 세포를 세척하고, 약 200xg으로 10분 동안 원심분리시키고, 상청액을 흡입하고, D-PBS 35ml로 재현탁시킨다. D-PBS로 2회 이상 반복적으로 세척하고, 약 1ml 분석 배지/15cm² 조직 배양 플라스크내에서 세포를 재현탁시킨다. 분석 배지는 F12K 배지(김코 BRL, 카탈로그 제 21127-014 호) 및 0.5% 열-불활성화 소 태반 혈청으로 이루어진다. 컬터 카운터(Coulter Counter, 등록상표)(컬터 일렉트로닉스 인코포레이티드)로 세포를 계수하고, 분석 배지를 세포에 첨가하여 0.8 내지 1.0 $\times 10^5$ 세포/ml의 농도를 수득한다.
3. 96-웰 평탄-바닥 플레이트에 100 μ l/웰 또는 0.8 내지 1.0 $\times 10^5$ 세포/ml의 농도로 세포를 첨가하고, 5% CO₂ 35℃하에서 약 24시간 동안 항온처리한다.

1일

1. 별도의 96-웰 플레이트에서 2 $\times$ 시험 화합물을 일반적으로 50 μ M 내지 0 μ M로 제조한다. 0일의 제 2 단계에서 언급된 바와 동일한 분석 배지를 사용한다. 90 μ l/웰의 시험 화합물을 특정 플레이트 칼럼의 상부 웰에 200 μ M(4X 최종 웰 농도)으로 첨가하여 적정한다. 원료 시험 화합물이 통상적으로 DMSO중에 20mM이므로, 200 μ M 약물 농도는 2% DMSO를 함유한다.

분석 배지중의 2% DMSO를 만드는 희석액을 시험 화합물의 적정을 위한 희석제로서 사용하여 상기 시험 화합물은 희석되지만 DMSO 농도는 일정하게 유지된다. 이 희석액을 칼럼내의 잔여 웰에 60 μ l/웰로 첨가한다. 칼럼의 상부 웰내의 200 μ M 시험 화합물 희석액 120 μ l중 60 μ l를 취하고, 칼럼의 제 2 웰내의 60 μ l와 혼합한다. 이 웰로부터 60 μ l를 취하고, 칼럼의 제 3 웰내의 60 μ l와 혼합하고, 2 $\times$ 적정이 완결될 때까지 계속한다. 최종 웰 이전의 웰을 혼합하는 경우, 이 웰내의 120 μ l중 60 μ l를 취하고, 이를 폐기한다. 최종 웰에 비-시험 화합물-함유 대조군으로서 DMSO/배지 희석액 60 μ l가 남는다. (1)

VEGF(펩트로 테크 인코포레이티드(Peptro Tech Inc.)로부터 제조됨, 카탈로그 제 100-200 호), (2) 내피 세포 성장 인자(ECGF)(산성 아섬유 성장 인자 또는 FGF로서도 또한 공지됨)(뵈링거 만하임 바이오케미카, 카탈로그 제 1439 600), 또는 (3) 인간 PDGF B/B(1276-956, 뵈링거 마인하임, 독일) 및 분석 배지 대조군에 대한 각각의 3× 웰에 충분한 적정된 시험 화합물의 9개 칼럼을 제작한다. ECGF는 나트륨 헤파린과의 제조물이 된다.

2. 0일로부터의 0.8 내지 1.0×10^4 세포/100 μ l/웰의 HUV-EC-C 세포를 함유하는 96-웰 분석 플레이트에 50 μ l/웰의 시험 화합물 희석액을 옮기고, 5% CO₂ 37°C에서 약 2시간 동안 항온처리한다.

3. 3×에서, 80 μ g/ml의 VEGF, 20ng/ml의 ECGF 또는 배지 대조군을 50 μ l/웰로 각각의 시험 화합물을 조건에 첨가한다. 시험 화합물에 대해, 성장 인자 농도는 요구되는 최종 농도의 4배이다. 0일 제 2 단계로부터의 분석 배지를 사용하여 성장 인자의 농도를 조성한다. 5% CO₂ 37°C에서 약 24시간 동안 항온처리한다. 각각의 웰은 시험 화합물의 희석액 50 μ l, 성장 인자 또는 배지 50 μ l 및 세포 100 μ l를 가질 것이며, 총 200 μ l/웰로 계산된다. 따라서, 시험 화합물 및 성장 인자의 4X 농도는 웰에 1회 첨가된 전체와 동일하게 된다.

2일

1. ³H-티미딘(아메르삼, 카탈로그 제 TRK-686 호)을 1 μ Ci/웰(RPMI 배지중에 조성된 100 μ Ci/ml 용액 + 10% 열-불활성화 소 태반 혈청 10 μ l/웰)로 첨가하고, 5% CO₂ 37°C에서 약 24시간 동안 항온처리한다. RPMI는 킵코 BRL 카탈로그 제 11875-051 호로부터 수득된다.

3일

1. -20°C에서 밤새도록 플레이트를 동결시킨다.

4일

플레이트를 해빙시키고, 96-웰 플레이트 하비스터(harvester)(톰테크 하비스터 96(Tomtech Harvester 96, 등록상표)를 사용하여 필터 매트(왈락, 카탈로그 제 1205-401 호)상으로 채취하고, 왈락 베타플레이트(Wallac Betaplate, 상표명) 액체 신틸레이션 계수기상에서 계수를 관독한다.

표 2는 화학식 I의 화합물의 몇몇 예에 대한 생물학적 시험 결과를 제시한다. 상기 결과는, 시험 화합물이 첨가되지 않은 대조군에서의 PTK의 활성화에 비교되는, 표적 PKT의 활성화에서의 50% 변화를 초래하는 시험되는 화합물의 IC₅₀(μ M 농도)에 대해 기록한다. 특히, 제시된 결과는 표적 PKT의 활성화의 50% 감소를 야기시키는데 필요한 시험 화합물의 농도를 나타낸다. 화합물을 평가하는데 사용되어 왔거나 또는 사용될 수 있는 생체분석이 아래 상세하게 기술되고 있다.

[표 2]

예	바이오 nkGST IC50 (μ M)	바이오 FGFR1 IC50 (μ M)	바이오 PDGF IC50 (μ M)	바이오 EGF IC50 (μ M)	세포 EGF IC50 (μ M)	Her2 키나아제 IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	바이오 pyk2 IC50 (μ M)
1	57.68	15.16	>100	>100	>100			>100
2	>100		>100	>100	>100			
3	9.85	9.62	>100	>100	>100			>100
4	3.57	>20	>100	>100	>100	>100		
5	8.3	16.06	>100	>100	>100	>100		
6	4.04		>100	3.26	7.82	2.43		
7	7.74		>100	5.07	9.8	4.24		
8	12.1		>100	51.34	20.08	5.5		
9	0.96		>100	>100	>100	16.38		
10	5.72		>100	94.04	15.86	8.06		
11	9.77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21.46	>100		27.73		
13	>20		81.92	8.17		2.66		
14	13.01		42.41	>100		66.02		
15	>20		>100	>100		98.61		
16	>20		98.06	>100		23.32		
17	8.25	2.47	94.35	0.83	11.47	15.94	>10	
18	2.67			2.57	9.23	4.99		
19	7.5			6.86	34.18	8.37		
20	11.53			>100	41.16	8		
21	7.18		>100	40.34		27.69		
22	>20		>100	>100		87.67		
23	>20		>100	36.64		4.05		
24			>100	16.84		5.31		
25	12.55		>100	23.48		7.9		
26	16.03		66.87	34.67		10.04		
27			>100	26.5		3.91		

예	바이오플kGST IC50 (μ M)	바이옫GFR1 IC50 (μ M)	바이옫DGF IC50 (μ M)	바이옫GF IC50 (μ M)	세포 EGF IC50 (μ M)	Her2 키나아제 IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	바이옫pyk2 IC50 (μ M)
28	4.5		71.27	53.66		2.67		
29	10.12		>100	26.72		3.98		
30	9.4		>100	18.69		4.1		
31	>50		>100	9.83		47.19		
32	45.74		5.94	>100		>100		
34	>50		>100	>100		>100		
35	>20		>100	80.4		54.14		
36	>20		>100	>100		>100		
37	0.22		3.06	10.78	9.84	1.4		
38	4.17		3.06	6.04	8.97	2.16		
39	3.38		4.69	3.67	14.54	3.53		
40	4.5		7.9	6.52		6.27		
42	0.1		0.12	11.95	74.55	20.43		
43	1.12		8.38	>100	37.33	53.37		
44	<0.05		0.02	20.73	67.46	6.99		
45	1.71		>100	>100	29.95	>100		
46	30.62		6.18	>100	>100	>100		
47	0.08	1.56	0.06	11.42	41.54	8.4	>20	1.05
48	0.006	0.3	<0.78	17.88	21.58	7.93		0.09
49			<0.78	>100	43.86	>100		
50			<0.78	>100	20.34	>100		
51	0.006	1.66	0.01	18.1	21.61	23.24	16.69	0.35
52	0.08	1.26	<0.78	12.53	>100	>100	10.66	0.45
53			<0.78	>100	>100	>100		
54	1.98		<0.78	23.88	9.76	7.02		
55	0.27		0.53	6.03	35.99	77.82		
56	2.32		3.19	>100	10.03	7.11		
57	0.06		7.98	>100	9.97	6.94		
58			21.14	>100	>100	>100		
59			<0.78	>100	>100	>100		
60			<0.78	>100	>100	>100		
61			<0.78	>100	>100	>100		
62	8.00		8.32	>100	>100	>100		
63	0.21		<0.78	8.59	>100	>100		
64	0.55		<0.78	30.49	>100	>100		
65	0.37		<0.05	>100	74.36	15.97		
66	<0.05			>100	11.84	2.76		
67	0.39		24.77	31.38	19.79	2.56		

예	바이오플kGST IC50 (μ M)	바이오풀FGFR1 IC50 (μ M)	바이오풀PDGF IC50 (μ M)	바이오풀EGF IC50 (μ M)	세포EGF IC50 (μ M)	Her2 키나아제 IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	바이오풀pyk2 IC50 (μ M)
68	1.16		0.03	>100	23.52	34.13		
69	0.3		56.55	>100	97.54	>100		
70	0.09	1.50	0.0030	10.57	6.42	7.99	12.62	0.63
71	15.21		22.5	>100		9.91		
72	6.06		10.54	>100	39.94	9.65		
73	5.95		14.12	>100	39.5	8.59		
74	1.2		0.09	46.75		>100		
75	2.7		61.55	>100		>100		
76	3.33		19.18	5.11		3.01		
77	0.49		25.01	>100		>100		
78	1.94		70.62	9.33		4.25		
79	1.49		>100	27.39		>100		
80	0.13	4.29	0.001	>100		50.19	17.19	0.28
81	0.21		0.18	>100		>100		
82	2.03	7.69	6.88	>100		>100		0.31
83	0.34	0.41	9.46	2.18		86.9		0.008
84	1.38		12.51	67.2		5.86		0.006
85	0.2	0.8	2.59	>100		3.76		
86	1.45	1.3	19.6	41.8		>100		3.58
87	3.27	7.56	6.46	>100		9.1		0.17
88	0.35	1.18	8.06	2.36		>100		0.09
89	7.84		47.58	8.53	9.67	15.97		
115	7.3		7.48	>100		>100	0.006	
116	>20		>100	>100		>100	<0.0005	
117	0.91		12.9	>100		>100	0.006	
118	1.93		1.2	>100		>100	0.002	
119	1.38		61.63	>100		>100	<0.0005	

생체내 동물 모델에서

이종이식 동물 모델

가슴샘이 없는 마우스내의 이종이식편으로서 성장하는 인간 종양의 능력은, 인간 종양의 치료에 대한 생물학적 반응을 연구하는 생체내 모델로서 유용하게 제공된다. 인간 종양을 가슴샘이 없는 마우스내에 이종이식한 최초의 성공 사례 이후(리가드(Rygaard) 및 포블센(Povlsen)의 문헌 "1969, *Acta Pathol. Microbial. Scand.* 77:758-760"), 다수의 여러 인간 종양 세포주(예컨대, 포유류, 허파, 비뇨생식기, 외장관, 두경부, 아교모세포종, 뼈 및 악성 흑색종)가 누드 마우스내에 이식되어 성공적으로 성장되었다. 아래 분석은 활성 수준, 특히 화학식 I의 여러 화합물의 효과를 측정하는데 사용될 수 있다.

3개의 일반 유형 즉, 세포/축매적, 세포/생물학적 및 생체내의 분석은 화학식 I의 화합물을 평가하는데 유용하다. 세포/축매적 분석의 목적은, 세포내의 공지된 기질상에서 티로신을 인산화시키는 TK의 능력에 대한 화학식 I의 화합물의 영향을 측정하는 것이다. 세포/생물학적 분석의 목적은 TK에 의해 자극된 생물학적 반응에 대한 화학식 I의 화합물의 영향을 측정하는 것이다. 생체내 분석의 목적은 암과 같은 특정 장애를 앓는 동물 모델에서의 화학식 I의 화합물의 영향을 측정하는 것이다.

피하 이종이식 실험에 적합한 세포주는 C6 세포(신경교종, ATCC # CCL 107), A375 세포(멜라노마, ATCC # CRL 1619), A431 세포(편평세포 암종, ATCC # CRL 1555), Calu 6 세포(허파, ATCC # HTB 56), PC3 세포(전립선, ATCC # CRL 1435), SKOV3TP5 세포, 및 EGFR, PDGFR, IGF-1R 또는 임의의 다른 시험 키나아제를 과발현시키도록 유전적으로 가공된 NIH 3T3 아섬유를 포함한다. 하기 프로토콜은 이종이식 실험을 실시하는데 사용될 수 있다.

가슴샘이 없는 암컷 마우스(BALB/c, nu/nu)는 시몬센 레보레토리즈(Simonsen Laboratories)(길로이(Gilroy), 캘리포니아주)로부터 취득된다. 모든 동물은 청결한 방 조건하에서 유지시킨다. 이들은 무균 설치류 먹이 및 물을 수시로 공급받는다.

세포주를 적절한 배지(예컨대, MEM, DMEM, Ham's F10, 또는 Ham's F12 plus 5% - 10% 소 태반 혈청(FBS) 및 2mM 글루타민(GLN))중에서 성장시킨다. 모든 세포 배양 배지, 글루타민 및 소 태반 혈청은 달리 지적되지 않는 한 기코 라이프

테크놀로지스(그랜드 아일랜드, 뉴욕주)로부터 구입한다. 모든 세포를 37℃에서 90 내지 95% 공기 및 5 내지 10% CO₂의 습한 분위기에서 성장시킨다. 모든 세포주를 통상적으로 1주일에 2회 2차배양하며, 미코텍(Mycotect) 방법(깁코)에 의해 측정하면 미코플라즈마에 대해 네거티브하다.

세포를 0.05% 트립신-EDTA로 또는 그와 유사하게 수확하고, 10분 동안 450xg에서 펠렛처리한다. 펠렛을 무균 PBS 및 배지(PBS가 없음)중에서 특정 농도로 재현탁시키고, 세포를 마우스의 뒷다리 측면내에 이식한다(8 내지 10마리 마우스/군, 2 내지 10 × 10⁶개 세포/동물). 종양 성장은 베니어 캘리퍼(venier caliper)를 사용하여 3 내지 6주에 걸쳐 측정한다. 종양의 부피는 달리 지적되지 않는 한 길이 × 폭 × 높이의 결과로서 계산한다. 스튜던츠 t-시험을 사용하여 P 값을 계산한다. 이식 1일 후에 일반적으로 시작하는 여러 농도로 IP 주입에 의해, 부형제(DMSO 또는 VPD:D5W) 50 내지 100μl 중의 화학식 I의 시험 화합물을 전달할 수 있다.

종양 침투 모델

하기 종양 침투 모델이 개발되어 왔으며, KDR/FLK-1 수용체에 선택적으로 억제하도록 정의된 화학식 I의 화합물의 치료 값 및 효능의 평가에 사용될 수 있다.

절차

생후 8주의 누드 마우스(암컷)(시몬센 인코포레이티드)를 실험 동물로서 사용한다. 종양 세포의 이식을 라미나 플로우 후드(laminar flow hood)내에서 실시할 수 있다. 마취를 위해, 크실라진/케타민 콕테일(Cocktail)(100mg/kg의 케타민 및 5 mg/kg의 크실라진)을 복강내로 투여한다. 복강이 노출되도록(약 1.5cm 길이) 중간 절개를 실시하여 10⁷개의 종양 세포를 100μl 부피의 배지로 주입한다. 세포를 이자의 십이지장엽내로 또는 결장의 장막 아래에 주입한다. 복막 및 근육을 6-0 연속 실크 봉합사로 봉합하고, 피부를 권취된 클립을 사용하여 봉합한다. 동물을 매일 관찰한다.

분석

2 내지 6주 후, 동물의 전반적인 관찰에 따라, 마우스를 희생시키고, 다양한 기관(허파, 간, 뇌, 위, 비자, 심장, 근육)에 대한 국부 종양 전이부를 절개하고, 분석한다(종양의 크기, 침투 정도, 면역화학, 동일 부분에서의 하이브리드화 측정 등).

C-키트 분석

이 분석을 사용하여 c-키트 티로신 인산화의 수준을 검출한다.

MO7E(인간 급성 골수 백혈병) 세포를 0.1% 혈청중에서 밤새도록 혈청 결핍시킨다. 세포를 리간드 자극 전에 (혈청 결핍화와 함께) 화학식 I의 화합물로 예비처리하였다. 세포를 15분 동안 250ng/ml rh-SCF로 자극하였다. 자극 후, 세포를 용해시키고, 안티-c-키트 항체로 면역침전시킨다. 웨스턴 블로팅으로 포스포티로신 및 단백질 수준을 측정하였다.

MTT 증식 분석

MO7E 세포를 혈청 결핍시키고, 인산화 실험에 기술된 바와 같이 화학식 I의 화합물로 예비처리한다. 세포를 96-웰 디쉬 내에서 RPMI 100μl + 10% 혈청중의 4X10⁵ 세포/웰에 위치시킨다. rh-SCF(100ng/ml)를 첨가하고, 플레이트를 48시간 동안 항온처리하였다. 48시간 후, 5mg/ml MTT[3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드] 10μl를 첨가하고, 4시간 동안 항온처리한다. 산 이소프로판올(이소프로판올중 0.04N HCl 100μl)을 첨가하고, 광학 밀도를 550nm의 파장에서 측정하였다.

세포사멸 분석

MO7E 세포를 rh-GM-SCF(10ng/ml) 및 rh-IL-3(10ng/ml)과 함께 10% FBS중의 +/- SCF 및 +/- 화학식 I의 화합물로 항온처리하였다. 샘플을 24시간 및 48시간에서 분석하였다. 활성화 카스파제-3을 측정하기 위해, 샘플을 PBS로 세척하고, 빙냉 70% 에탄올로 투과화시켰다(permeabilize). 그 다음, 세포를 PE-공액결합된 다핵성 토끼 안티-활성 카스파제-3으로 염색하고, FACS로 분석하였다. 절개된 PARP를 측정하기 위해, 샘플을 용해시키고, 안티-PARP 항체를 사용하는 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다.

추가 분석

화학식 I의 화합물을 평가하는데 사용될 수 있는 추가 분석으로는, 제한없이 bio-flk-1 분석, 모든 세포종의 EGF 수용체-HER2 키메라 수용체 분석, bio-src 분석, bio-lck 분석, 및 raf의 인산화 기능을 측정하는 분석이 포함된다. 이들 각각의 분석에 대한 프로토콜은, 본원에 임의의 도면을 비롯해 참고로 인용되고 있는 미국 특허출원 제 09/099,842 호에서 알 수 있다.

세포 독성의 측정

치료 화합물은 세포독성 효과를 발휘하기보다는 수용체 티로신 키나아제 활성을 억제하는데 더욱 효과적이어야 한다. 화합물의 효능 및 세포 독성의 측정은 치료 지수, 즉 IC_{50}/LD_{50} 를 측정함으로써 획득될 수 있다. 50% 억제에 도달하는데 필요한 투여량(IC_{50})은 본원에 기술된 바와 같은 표준 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 50% 독성을 나타내는 투여량(LD_{50})은 표준 기술[모스만(Mossman)의 문헌 "1983, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63"]을 사용하거나, LDH 방출된 양을 측정하거나[코르제니에브스키(Korzeniewski) 및 칼레와에르트(Callewaert)의 문헌 "1983, *J. Immunol. Methods*, 64:313", 데커(Decker) 및 로만-매테스(Lohmann-Matthes)의 문헌 "1988, *J. Immunol. Methods*, 115:61"], 또는 동물 모델내의 치사 투여량을 측정함으로써 측정될 수 있다. 큰 치료 지수를 갖는 화합물이 바람직하다. 치료 지수는 2 초과, 바람직하게는 10 이상, 더욱 바람직하게는 50 이상이어야 한다.

B. 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))을 사용하는 세포 분석 결과의 예

(하기) 생화학적 분석에서 검출된 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 영향력을 확인하기 위해, 리간드-의존성 RTK 인산화를 억제하려는 상기 화합물의 능력을, Flk-1 또는 인간 PDGFR β 를 과발현시키도록 가공된 NIH-3T3 마우스 세포를 사용하는 세포-기초 분석에서 평가하였다. 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))는 약 0.03 μ M의 IC_{50} 값을 가지며 VEGF-의존성 Flk-1 티로신 인산화를 억제하였다. 이 값은, 생화학적 분석에서 측정된 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))에 의한 Flk-1의 억제에 의해 측정된 0.009 μ M의 K_i 값과 유사하다. 이는 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))이 세포내로 쉽게 투과한다는 것을 나타낸다. (하기) 생화학적 데이터에서 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))이 Flk-1 또는 인간 PDGFR β 에 대한 상당한 활성을 갖는다는 것을 나타내는 것과 일치하게, 이는 또한 약 0.03 μ M의 IC_{50} 값을 갖는 세포내에서 PDGF-의존성 수용체 인산화를 억제하는 것이 밝혀졌다. 줄기 세포 인자(SCF)와 결합하는 매우 관련된 RTK인 c-키트를 억제하는 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 능력을, 이 수용체를 발현하는 MO7E 세포를 사용하여 측정하였다. 이들 세포에서, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))은 0.01 내지 0.1 μ M의 IC_{50} 값을 가지므로 SCF-의존성 c-키트 인산화를 억제하였다. 이 화합물은 또한 환자의 말초조직의 혈액으로부터 단리된 급성 골수 백혈병(AML) 블라스트에서의 SCF-자극성 c-키트 인산화를 억제하였다.

세포내에서 리간드-의존성 수용체 인산화를 억제하는 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 능력을 시험하는 것과 더불어, 세포의 리간드-의존성 증식 반응에 대한 그의 효과를 또한 생체외에서 시험하였다(표 4 참조). 이들 연구에서, 밤샘 혈청 결핍에 의해 정지된 세포를, 적절한 분열촉진 리간드의 첨가에 따라 DNA가 합성되도록 유도시킨다. 표 3에 제시된 바와 같이, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))는, 각각 0.031 및 0.069 μ M의 IC_{50} 값을 갖는 PDEFR β 또는 PDGFR α 를 과발현시키는 NIH-3T3의 PDGF-유도된 증식을 억제하고, 0.007 μ M의 IC_{50} 값을 갖는 MO7E 세포의 SCF-유도된 증식을 억제하였다.

[표 3]

수용체	생화학적	세포 IC ₅₀	
	K _i ¹ (μ M)	수용체 인산화 (μ M)	리간드-의존성 증식 (μ M)
Flk-1/KDR	0.009	0.03 ²	0.004 ³
PDGFR α	0.008	0.03 ⁴	0.031 ⁴
PDGFR β	ND	ND	0.069 ⁵
FGFR	0.83	ND	0.7 ⁵
c-kit	ND	0.01-0.1 ⁶	0.007 ⁶

ND = 측정되지 않음

¹ 재조합 효소를 사용하여 측정

² 혈청-결핍 NIH-3T3 세포 발현 Flk-1를 사용하여 측정

³ 혈청-결핍 HUVEC를 사용하여 측정

⁴ 혈청-결핍 NIH-3T3 세포 발현 PDGFR α 를 사용하여 측정

⁵ 혈청-결핍 NIH-3T3 세포 발현 PDGFR β 를 사용하여 측정

⁶ 혈청-결핍 MOTE 세포를 사용하여 측정

표 3에 제시된 바와 같이, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))가 세포막을 가로지른다는 결론을 지지하는 상기 화합물의 생화학적 활성과 세포학적 활성 사이의 총체적인 일체가 존재한다. 또한, 세포 반응이 지적 표적에 대한 화합물(80)의 활성의 결과라고 결론지어질 수 있다. 반면, 생체의 완전 성장 배지의 존재하에서 시험하는 경우, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 실제 농도(> 10 μ M)가 다양한 인간 종양 세포의 성장을 억제하는데 요구되었다(표 4 참조). 이는 상기 화합물이 리간드-의존성 수용체 인산화 및 세포 증식을 억제하는데 필요한 농도에서 이들 세포의 성장을 직접 억제하지 않는 것을 의미한다.

[표 4]

세포주	기인	IC ₅₀ (μ M)	LD ₅₀ (μ M)
HT29	결장암	10	22
A549	폐암	9.5	22
NCI-H460	NSC 폐암	8.9	20
SF767T	신경교종	7.9	14
A431	편평세포 암종	6.0	18

요약하면, 표 4에 제시된 결과는 세포를 일련의 희석액 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 존재하에 완전 성장 배지중에 48시간 동안 항온처리하여 수득하였다. 성장 기간의 말단부에서, 세포의 상대수를 측정하였다. 미처리된 세포에 비해 세포의 성장을 50%로 억제시키는 화합물의 농도에서 IC₅₀ 값을 계산하였다. 상기 실험의 시작 당시에 비해 세포의 수를 50%로 감소시키는 화합물의 농도에서 LD₅₀ 값을 계산하였다.

5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 항혈관신생 포텐셜을 평가하는 더욱 상대적인 세포-기초 분석은, 혈관신생 과정에 중요한 내피 세포 증식을 위한 모델 시스템으로써 인간 배꼽 정맥 내피 세포(HUVEC)를 사용하는 세포외 세포분열 분석이다. 이 분석에서, DNA 합성에서 증가하는 것으로 측정된 세포분열 반응은 VEGF 또는 FGF의 첨가에 따라 혈청-결핍 HUVEC중에서 유도된다. 이들 세포에서, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))은, 화합물이 48시간 분석전반에 걸쳐 존재하는 경우, 각각 0.004 및 0.7 μ M의 IC₅₀ 값을 갖는 투여량-의존성 방식으로 VEGF- 및 FGF-유도된 세포분열 반응을 억제하였다.

요약하면, 24시간 동안 일련의 희석액 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 존재하에 VEGF(100ng/ml) 및 FGF(30ng/ml)의 세포분열 농도로 항온처리한 혈청-결핍 HUVEC를 사용하여 전술된 결과를 수득하였다. 리간드 및 억제제의 존재하에 다음 24시간 동안의 세포분열 반응을 세포 DNA내로의 브로모데옥시우리딘의 혼입을 기초로 하는 DNA 합성의 측정에 의해 정량화하였다.

별도의 실험에서, 화합물(80)은 투여량-의존성 방식으로 ERK 1/2(p42/44MAP 키나아제)의 VEGF-의존성 인산화, Flk-1/KDR의 초기 다운스트림 표적을 억제하였다. 화합물(80)의 억제 활성은 또한 이 시스템에서 오래 지속되는 것으로, 화합물의 마이크로몰 농도로 짧은 시간(2시간) 노출시킨 다음, 배지로부터 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))를 제거한 후, 48시간 정도의 오랜 기간 동안 ERK 1/2의 VEGF-의존성 인산화를 억제하였다.

VEGF는 내피 세포에 중요한 생존 인자인 것으로 인식되어 왔다. 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))이 HUVEC의 VEGF-의존성 세포분열 반응을 억제하기 때문에, HUVEC 생존에 대한 화합물의 효과가 조사되었다. 이들 실험에서, 카스파제 3 기질 폴리-ADP-리보실 폴리머라제(PARP)의 절단을 세포사멸에 대한 관독으로서 사용하였다. 24시간 동안 혈청-부재 조건에서 배양된 HUVEC는 23kDa PARP 분할 단편의 축적에 의해 검출됨에 따라 PARP 분할의 실제 수준을 나타냈다. 이는 세포 배지에 VEGF를 첨가함으로써 크게 방지되며, 이는 VEGF가 이 분석에서 생존 인자로서 작용하는 것을 의미한다. 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))은 KDR 신호화를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))는 투여량-의존성 방식으로 VEGF-매개된 HUVEC 생존을 억제한다. 따라서, 이들 데이터는 화합물(80)이 VEGF의 존재하에 배양중인 내피 세포종의 세포사멸을 유도하였던 것을 의미한다.

C. 세포내 효능 연구

i. 확립된 종양 이식편에 대한 효능

가슴샘이 없는 마우스의 뒷다리 측면 영역내에 이식된 인간 종양 세포를 사용하는 피하(SC) 이식 모델에서, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 세포내 효능을 연구하였다. 이식 후, 종양을 화합물로 경구 치료로 시작하기 전에 100 내지 550mm³의 크기로 확립시켰다.

치료시 A431 종양 성장의 투여량-의존성 억제를 초래하는 화합물(80)의 일일 경구 투여를, 종양이 400mm³의 크기로 자란 후에 시작하였다. 종양 성장의 통계학적으로 의미있는(P<0.05) 억제가 40mg/kg/일(74% 억제) 및 80mg/kg/일(84% 억제)의 투여량에서 보여졌다(표 6 참조). 예비 실험에서, 화합물의 높은 (160mg/kg/일) 투여량은 80mg/kg/일 투여량보다 확립된 A431 종양에 대한 효능이 더 좋지 않다. 또한, 화합물의 160mg/kg/일 투여량에서 치료된 마우스에서 체중이 감소하였는데, 이는 고투여량이 내성적이지 못하다는 것을 나타낸다. 유사한 결과가 A431 종양을 100mm³ 크기에 도달하게 한 실험에서 수득되었다(표 4 참조). 이 제 2 실험에서, 종양의 완전한 퇴보는 21일 동안 80mg/kg/일에서 처리한 8마리 동물중 6마리에서 나타났다. 이들 6마리 동물에서, 종양은 처리가 끝난지 110일 관찰 기간 동안 재성장하지 않았다. 종양이 큰 크기(2000 내지 3000mm³)로 재성장한 2마리 동물에서, 종양은 화합물(80)로 제 2 치료에 반응하여 퇴보하였다. 모든 효능 실험에서 중요한 것은, 80mg/kg/일의 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))은 100일 이상의 기간 동안 연속적인 투여의 경우에도 우수한 내성을 가졌다.

[표 5]

초기 종양 부피(mm ³)	화합물 ¹ (mg/kg/일)	억제율(%) (일)	P-값
400	80	84(36)	0.001
	40	74(36)	0.003
	20	51(36)	0.130
300	80	93(40)	0.002
	40	75(40)	0.015
	10	61(40)	0.059
¹ 화합물 80			

요약하면, 표 5에 제시된 결과는 가슴샘이 없는 마우스의 뒷다리 측면 영역내에 SC를 이식한 A431 세포(0.5×10^6 세포/마우스)를 사용하여 수득하였다. 종양이 지정된 평균 부피에 도달하는 경우, 크레모포-기초 베히클 또는 베히클 대조군 중의 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))의 일일 경구 투여를 시작하였다. 베니어 캘리퍼를 사용하여 종양을 측정하고, 종양 부피를 길이 $\times$ 폭 $\times$ 높이의 결과로서 계산하였다. 스튜던츠 t-시험을 사용하여 실험의 최종 일자에, 화합물(80)로 치료한 동물(n=8)의 종양의 크기를 베히클로 치료한 동물(n=16)의 것과 비교함으로써 P 값을 계산하였다.

Colo205(결장 암종), SF763T(신경교종) 및 NCI-H460(비-소세포 허파 암종) 이식편을 사용하여, 상이한 기원의 확립된 인간 종양에 대한 화합물(80)의 효능을 측정하였다(표 6 참조). 이들 실험은 80mg/kg/일로 경구 투여된 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))을 사용하여 실시하였으며, 효과적이고 우수한 내성을 갖는 투여량이었다.

[표 6]

	종양 유형	초기 종양 부피 (mm ³)	억제율% (일)	P-값
A431 ¹	표피양	100	93(40)	0.002
A431 ¹	표피양	400	84(36)	0.001
Colo205	결장	370	77(54)	0.028
NCI-H460	폐	300	61(54)	0.003
SF763T	신경교아종	550	53(30)	0.001

¹ 표 5에 보고된 실험으로부터의 데이터이다.

전술된 실험에서, 종양이 일단 지정 크기에 도달하면, 화합물(80)을 매일 크레모포-기초 베히클중에 80mg/kg/일로 1회 투여하였다. 베히클-치료 대조군과 비교한 억제율(%)을 실험의 말단부에서 계산하였다. 투-테일드(two-tailed) 스튜던츠 t-시험을 사용하여, 상기 화합물로 치료한 동물의 종양 크기를 베히클로 치료한 동물의 종양 크기와 비교함으로써 P 값을 계산하였다.

5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))가 표 7에서 제시된 모든 종양 유형의 성장을 억제할지라도, 상이한 이식 모델에 반응하여 상이한 결과를 나타냈다. 특히, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드(화합물(80))로 치료하는 경우, NCI-H460 및 SF763T 종양의 성장은 저지되거나 크게 느려진 반면, A431과 같은 Colo205 종양은 퇴보되었다.

이식 모델들 사이에서의 반응에 따른 차이점에 대해 분자적 기초로 측정하기 위해, SF763T 종양을 연구하였다. 따라서, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카복실산 (2-디에틸아미노-에틸)아미드를 사용한 치료에 대해 덜 반응적인 SF763T 종양을, 면역조직학적 기술을 사용하여 분자 수준에서 평가하여 상기 화합물을 사용한 치료의 효과를 측정하였다. 이들 연구는 초기에 이 유형의 종양에서 실시하였는데, 이는 SF763T 종양이 내피 세포 마커 CD31을 크게 발현하는 미세용기로 크게 도관화하고 종양 미세용기 밀도(MVD)의 연구에 적합하기 때문이다. SF763T 종양의 면역조직학적 평가에서, 치료된 동물로부터의 종양이 베히클-치료 대조군에 비해 MVD가 감소되고, 화합물(80)에 대한 활성의 항혈관신생 메커니즘이 일관적인 것으로 나타났다. MVD는, 베히클로만 치료한 동물이 39.3 ± 5.7 인데 비해, 화합물(80)로 치료된 동물에서는 24 ± 4.1 이었다. 관련 종양 성장 저지로부터 예측되는 바와 같이, 종양 세포 증식의 탁월한 억제가 화합물(80)로 치료한 종양에서 증명되었다. 이들 종양은 베히클-치료 종양에서보다 2/1 유사분열 지수를 가졌다(데이터는 제시되지 않음). MVD 및 종양 세포 증식에 대한 화합물(80)의 효과는, 종양이 퇴보되지 않는 조건하에서도, 상기 화합물이 큰 항혈관신생 및 항종양 효과를 갖는 것으로 나타난다.

또한, PDGFR 인산화 및 후속적인 생체내 신호화를 억제하는 화합물(80)의 능력을, 높은 수준의 PDGFR β 를 발현하는 SF763T 종양에서 평가하였다. SF763T 종양을 화합물(80)로 치료하면, 확립된 SF763T 종양에서의 PDGFR β 티로신 인산화가 크게 억제시켰다. 화합물(80)은 또한 PDGFR 활성의 속효성 다운스트림 지시자인 인산화(활성화) 포스포리파제 C 감마(PLC- γ)의 수준을 감소시켰다. 이들 데이터에서는 화합물(80)의 경구 투여가 생체내 종양 중의 표적(PDGFR) 활성화에 대한 직접적인 효과를 나타내는 것으로 입증된다.

생체의 HUVEC내의 VEGF-의존성 신호화를 억제하는 화합물(80)의 능력이 장시간 지속된다는 입증은 기초로(하기 설명), 화합물의 효능을 Colo205 종양 모델에서 상기 화합물을 빈번하게 투여할 때 평가하였다. 표 7에 제시된 바와 같이, 80mg/kg/일(91% 억제) 및 40mg/kg/일(84% 억제)이 일일 투여의 경우에는 효과적이었지만, 매주 2회 투여의 경우에는 그렇지 못하였다. 반면, 높은 투여량의 화합물(80)(160mg/kg)은 매주 2회 투여의 경우 확립된 Colo205 종양의 성장을 억제시켰다(52% 억제). 이는 이 화합물이 높은 투여량으로 빈번히 투여하는 경우의 효능을 입증할 수 있음을 암시하는 것이다. 투여 섭생은 부적절한 실험 없이 당해 분야의 숙련자에게 통상적인 것에 의해 결정될 수 있음을 주지해야 한다.

[표 7]

투여량(mg/kg)	빈도수	억제율%	P-값
160	주 2회	52	0.085
	주 1회	17	NS
80	매일	91	0.039
	주 2회	19	NS
	주 1회	0	NS
40	매일	84	0.028
	주 2회	36	NS

NS:중요하지 않음(P>0.05)

요약하면, 표 7에 제시된 결과는 가슴샘이 없는 마우스의 뒷다리 측면 영역내에 SC를 이식한 Colo205 세포(0.5×10^6 세포/마우스)를 사용하여 수득하였다. 종양이 400mm³에 도달하는 경우, 지정된 계획에 따라 화합물(80)의 경구 투여를 시작하였다. 베니어 캘리퍼를 사용하여 종양을 측정하고, 길이 × 폭 × 높이의 결과로서 계산하였다. 투-테일드 스튜던츠 t-시험을 사용하여 실험의 최종 일자에, 화합물(80)로 치료한 동물의 종양의 크기를 베히클로 치료한 동물의 것과 비교함으로써 P 값을 계산하였다.

ii. 전염 질환을 앓는 모델에서의 화합물(80)의 효능

고형 주 종양의 지속 성장을 지지하면서, 혈관신생은 또한 상기 주 종양으로부터의 전이로 인해 전염된 질환의 전개를 지지하는 필수 요소이다. 전염 질환의 전개에 대한 화합물(80)의 효과를 B16-F1 마우스 흑색종 허파 콜로니화 모델에서 검사하였다. 이 모델에서, 가슴샘이 없는 마우스의 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 접종된 B16-F1 세포는 허파에서 콜로니를 형성하고 종양을 형성한다. 표 7에 제시된 바와 같이, 80mg/kg/일에서의 화합물(80)의 경구 투여는 총 허파 종양의 측정에 의한 평가에 따르면 허파내의 B16-F1 세포의 부담을 효과적으로 감소시켰다. 이들 데이터에서는 화합물(80)이 생체내 전염 질환을 억제시킬 수 있음이 암시된다.

[표 8]

	폐 중량(g)	억제율%	P-값
베히클	0.83± 0.07	-	-
화합물 ¹	0.41± 0.04	50	<0.001

¹ 화합물 80

요약하면, 표 8에 제시된 결과는 꼬리 정맥을 통해 B16-F1 종양 세포(5×10^5 세포/마우스)로 접종된 가슴샘이 없는 마우스를 사용하여 수득하였다. 종양 세포 접종 후 24일 동안, 80mg/kg/일의 화합물(80)의 경구 투여(n=10) 또는 베히클(n=18)로 일일 치료하였다. 치료 기간의 말단에서, 마우스를 희생시키고, 그의 허파를 제거하여 칭량하였다. 화합물(80)로 치료한 동물의 허파 중량을 베히클로 치료한 동물의 것과 비교함으로써 억제율(%)을 계산하였다. 투-테일드 스튜던츠 t-시험을 사용하여 P 값을 계산하였다.

II. COX-2 억제제

하기 기술되는 루이스 링 모델(Lewis Lung Model)을 사용하여, 종양의 성장을 저지하는 COX-2 억제제의 능력을 시험하였다.

마우스는 좌측 발내의 피하 주사(30% Matrigel내에 현탁된 1×10^6 종양 세포)되었고, 종양 부피는 30 내지 60일 동안 매주 2회 플레티스모미터(phlethysmometer)를 이용하여 측정하였다. 혈액은 플라즈마 농도 및 AUC 분석에 의한 총 노출을 평가하는 24시간 프로토콜에서의 실험 동안에 2회 채취되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시한다. 스튜던츠 및 만-휘트니(Mann-Whitney) 시험은 인스타트 소프트웨어 패키지를 이용하는 수단들간의 차이를 평가하는데 이용하였다. 160 내지 3200ppm 사이의 투여량에서 식이요법으로 제공된 셀레콕시브는 이러한 종양의 성장을 지연시켰다. 셀레콕시브의 억제 효과는 대조 종양과 비교된 바와 같이 투여량에 의존하며 48% 내지 85% 범위이었다. 허파 전이의 분석은 입체현미경으로 전이를 계수하고 후속적인 허파 부분의 조직화학적 분석에 의해 모든 동물에서 실시하였다. 셀레콕시브는 더욱 낮은 160ppm 투여량에서 허파 전이에 영향을 미치지 않았지만, 표면 전이는 480 내지 3200ppm 사이의 투여량에서 제공된 경우 50% 이상 감소되었다. 게다가, 조직병리학 분석으로 셀레콕시브가 허파내에서 전이 병소의 크기를 투여량에 따라 감소되었음이 밝혀졌다.

2. HT-29 모델:

마우스는 좌측 발내의 피하 주사(30% Matrigel내에 현탁된 1×10^6 종양 세포)되었고, 종양 부피는 30 내지 60일 동안 매주 2회 플레티스모미터를 이용하여 측정하였다. 누드 마우스내로의 인간의 결장암 세포의 이식은 30 내지 50일 사이에 0.6 내지 2ml에 도달할 종양을 형성한다. 혈액은 혈장 농도 및 AUC 분석에 의한 총 노출을 평가하는 24시간 프로토콜에서의 실험동안에 2회 채취되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시한다. 스튜던츠 및 만-휘트니 시험은 인스타트 소프트웨어 패키지를 이용하는 수단 사이의 차이를 평가하는데 이용하였다.

A. HT-29 암 세포로 주사된 마우스는 식이요법으로 셀레콕시브의 존재 또는 부재에서 5, 7 및 9일에 50mg/kg의 투여량으로 세포독성 복강내로 치료되었다. 두 약제의 효능은 종양 부피를 측정함으로써 결정되었다. 셀레콕시브 연관된 COX-2 억제제(SC-58236)를 이용하는 치료는 89%만큼 종양 부피를 감소시켰다. 동일 시험에서, 식수내의 2mg/kg/일의 최대 내성화된 투여량 근접하게 제공된 인도메타신은 77%만큼 종양 형성을 억제하였다. 더욱이, COX-2 선택된 억제제는 허파 전이의 형성을 완전히 억제하는 반면, 비선택적인 NSAID 인도메타신은 효과적이지 않았다. 이러한 연구로부터의 결과는, 종양을 앓는 마우스에 식이요법으로 투여된 셀레콕시브가 단독 치료법으로서 투여되는 경우, 종양 및 전이의 성장을 지연할 수 있음을 예증한다. 더욱이, 사이클로옥시파마이드와 같은 세포독성제와 함께 셀레콕시브가 투여되는 경우 긍정적인 이점이 관찰된다.

B. 제 2 시험에 있어서, HT-29 결장암 세포로 주사된 마우스를 10일에 시작하는 식이요법으로 셀레콕시브(10, 40 또는 160ppm)로 치료하였다. 대략의 투여량-의존 효과를 관찰하였다.(표 9)

[표 9]

셀레콕시브는 HT-29 인간 결장암을 억제함				
일	베히클	10 ppm	40 ppm	160 ppm
14	0.114	0.124	0.125	0.120
22	0.25	0.25	0.19	0.14
28	0.45	0.36	0.27	0.21
35	0.79	0.57	0.4	0.3
42	1.38	0.89	0.68	0.49
50	1.9	1.49	1.04	0.8
부피(ml)				

III. 암을 치료하기 위한 사이클로옥시게나아제-2 선택적인 억제제와 공동으로 단백질 키나아제를 이용하는 생체내 시험

COX-2 선택적 억제제와 함께 종양의 성장을 지연시키는 단백질 키나아제 억제제의 능력은 후술되는 1483 이식 모델에서 시험할 수 있다.

1483 이식편은 종양 세포 및 혈관계내에서 사이클로옥시게나아제-2(COX-2)를 나타내는 인간의 상피암을 모델화한 동물 이식편이다.

종양 세포 및 혈관계내의 COX-2를 나타내는 머리 및 목 편형 세포암(1483 세포주)에 대한 인간의 종양 이식 누드 마우스 모델은 인간의 상피암과 유사하다. 출원인은 이 모델이 인간의 상피암을 나타내고 COX-2 억제제를 포함하는 항암 약물의 효능을 인간에 효능에 관련시키는 우수한 모델일 것으로 생각한다.

물질 및 방법:

세포 배양:

1483 인간의 머리 및 목 편형 세포암(HNSCC) 세포는 3×10^6 세포, 90%의 소 태반 혈청(FBS) 및 10%의 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 함유한 동결 바이알내에 저장된다. 동결 바이알을 취하여 37°C에서 빨리 녹여 15mM 헤페스 완충액, L-글루타민, 피리독신 하이드로클로라이드 및 10% FBS와 함께 D-MEM/F12 배지(GibcoBRL) 함유한 T-162cm²(코닝) 플라스크 내에 위치시킨다. 세포는 5%의 CO₂ 및 37°C의 온도를 갖는 인큐베이터내에서 성장된다. 배지는 격일로 바뀌고, 세포는 80 내지 90% 합류시에 통과된다. 세포 통과를 위해, 포스페이트 완충된 염수(PBS) 플라스크를 세척하고 흡입시키고 2mL의 트립신/EDTA(0.25%/1mM, GibcoBRL)을 첨가하고, 인큐베이터내에 위치시키고 5분 후 세포는 떨어질 것이다. 8mL의 상기 배지를 플라스크에 첨가하고, 행구고, 살균 50mL 원심분리관으로 전달한다. 30mL 이상의 배지를 첨가하고 혼합하며 헤마사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 세포를 계수하며, 3 내지 4×10^6 함유한 T-162cm²내에 세포를 평판 배양한다.

1483 동물 모델

누드 마우스내에 주입하기 전에 1483 세포의 수확 24시간 전 배지를 교체한다. 세포 배양 부분에서 전술된 바와 같이 1483 세포를 트립신화시킨다. 세포를 계수하고, 세포의 수를 측정한다. 실온에서 5분 동안 1000rpm으로 세포를 원심분리시킨다. 세포 펠렛을 재현탁시키고, 이들을 한크의 완충된 염수 용액(Hank's buffered saline solution)(HBSS, GibcoBRL)과 함께 하나의 50mL 원심분리관내에 모으고, 이전과 같이 원심분리시킨다. 주입을 위해 기타 세포를 원하는 약 25% 더 많은 세포를 가질 수 있다. 72마리 마우스를 주입하여 100×10^6 세포를 갖는다면, 마우스에 주입하기 위해 모든 세포를 준비한다. 1483 세포를 0.03mL/마우스중의 1×10^6 세포로 주입한다.

30% Matrigel(Collaborative Biomedical Products) 및 70% HBSS와 함께 세포를 주입한다. 저온의 HBSS 2.1(70%) 및 이어서 해빙된 차가운 액화 Matrigel 0.9mL(30%)와 함께 굳진 펠렛을 재현탁시킨다. 이 세포 제조물을 마우스내에 주입하기 전에는 항상 얼음위에 보관한다. 생후 4 내지 6주 누드 마우스 수컷을 이들 연구에 사용한다(Harlen). CO₂/O₂ 기체를 사용하여 마취시킨 후, 이들을 0.5cc 투베르쿨린 주사기를 사용하여 오른쪽 뒷발의 중앙에 주입한다(Beckerson & Dickerson). 연구를 시작하기 위한 기준 체중에 대해, 주입하는 날(0일)에서의 체중에 대해 마우스를 칭량한다. 7일에 마우스를 칭량하고, 플레티스모미터를 사용하여 발 중앙 부피에 대해 오른쪽 뒷발을 측정한다(Stoelting Co.). 플레티스모미터는 물로 대체하여 발 부피를 측정하는 기계이다. 왼쪽 비주입된 발들을 측정하고 배경 측정치에 대해 평균을 내어 오른쪽 종양을 갖는 발로부터 뺀다.

종양이 100 내지 200μL 크기가 되는 경우 동물을 먹이 형태의 시험 화합물상에 위치시키고, 연구 전반에 걸쳐 화합물 먹이를 계속 공급한다. 몇몇 마우스에는 단일 단백질 키나아제 억제제 또는 사이클로옥시게나아제-2 선택적 억제제를 제공한다. 몇몇 마우스에는 매일 단백질 키나아제 억제제 및 사이클로옥시게나아제-2 선택적 억제제 모두를 생체의 분석 결과를 기초로 결정된 적합한 투여량으로 제공한다.

연구 전반에 걸쳐 7, 10, 14, 17, 21, 24 및 28일에 마우스를 칭량하고 측정한다. 0일에 화합물 치료를 시작할 수 있거나(예방), 또는 일단 시작하면 7일 부근에 확립된 종양이 존재한다(치료). 30일 부근에, 베히클(대조군) 마우스는 큰 종양(약 1.0 내지 1.5mL)을 갖고 체중 감소가 시작될 것이며, 이때 베히클 동물을 죽인다. 치료 군에서 종양 억제제가 보여지고 이들이 양호한 건강 상태가 되면, 치료 군의 1/2을 마취시키고 치료 군의 1/2을 살아있게 하여 종양 성장에서의 지연을 결정한다.

당해 분야의 숙련자는 본 발명이 목적을 실시하고 본원에 언급된 것 뿐만 아니라 원래 존재하는 목적 및 이점을 얻도록 채택된 것으로 쉽게 이해할 것이다. 본원에 기술된 분자 착제, 방법, 절차, 치료, 분자, 특정 화합물이 바람직한 실시양태의 대표예이고, 예시적인 것이며, 발명의 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다. 당해 분야의 숙련자에게는 그의 변형 및 다른 용도가 청구의 범위에 의해 한정된 발명의 취지내에 포함되게 할 것이다.

당해 분야의 숙련자에게는 본원에 개시된 발명에 대한 치환 및 변화가 발명의 범주 및 취지에 어긋나지 않고서 변형될 수 있음을 쉽게 알 것이다.

명세서에 언급된 모든 특허 및 문헌은 발명에 관련된 당해 분야의 숙련자의 수준을 나타내는 것이다. 모든 특허 및 문헌은, 각각의 개별 문헌이 참고로 인용됨을 특별히 개별적으로 언급하고 있더라도 동일하게 참고로 본원에 인용되고 있다.