

미국뉴저지주07006노쓰캐드웰에버그린드라이브19

(74) 대리인

김창세

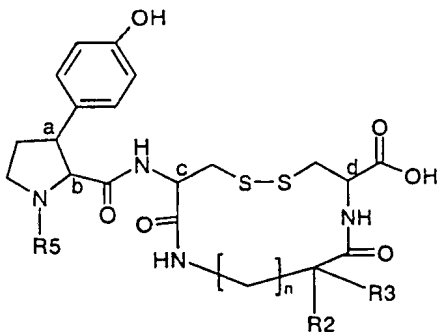
심사관 : 정의준

(54) 피롤리딘카보닐아미노 환상 디설파이드

요약

항-염증제로서의 활성을 갖는 하기 화학식 I의 화합물이 기재되어 있다:

화학식 I



세포가 내피에 결합하는 것을 억제하는 환상 디설파이드 화합물이 제공된다. 이러한 화합물은, 증상 및/또는 손상이 세포 유착 분자의 인테그린 발현 세포로의 결합에 관련된 염증성 질환(예: 천식)을 치료하는데 유용하다.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 염증성 질환의 치료에 유용한 치료제인 피롤리디닐 환상 디설파이드 화합물에 관한 것이다.

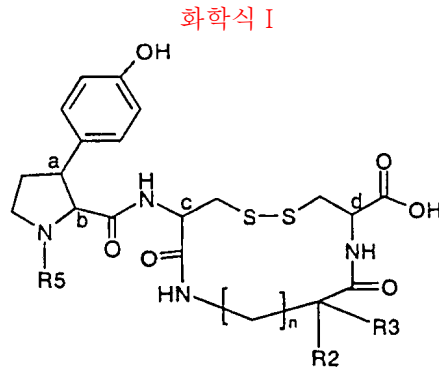
배경기술

면역글로불린(Ig) 슈퍼유전자 부류의 일종인 혈관 세포 유착 분자-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1)은 활성화된 내피에서 발현된다. 인테그린 VLA-4($\alpha_4\beta_1$)는 VCAM-1의 주요 수용체이다. VLA-4는 순환 림프구, 호산구, 호염기구 및 단핵세포를 비롯한 많은 세포 형태에서 발현된다. VCAM-1은 또한 B-세포 및 T-세포에서 발현되는 제 2 인테그린 LPAM-1[페어의 패치 유착 분자(Peyer's patch adhesion molecule)]에 결합한다. 인테그린 LPAM-1은 또한 점막 조절 세포 유착 분자(MadCAM)로 불리는 다른 세포 유착 분자와 결합할 수 있다. 인테그린 VLA-4 및 LPAM-1이 세포 유착 분자 VCAM-1 또는 MadCAM에 결합하면 일반적으로 거대분자 및 순환 세포가 혈액으로부터 조직내로 통과할 수 있게 된다. 그러나, 인테그린이 세포 유착 분자에 결합하면 상기 유형의 세포들이 조직에 침투하여 조직 손상을 야기하는 바람직하지 못한 염증을 일으킬 수 있다.

따라서, 인테그린이 세포 유착 분자에 결합하지 못하게 하는 세포 유착 분자/인테그린 길항물질은 바람직하지 못한 염증을 예방할 수 있다. 예를 들면, 상기 길항물질은 염증성 장 질환, 관절염에서 T-세포 방출, 천식에서 호산구 축적 및 기관지 수축, 및 조직 타가이식편의 생존기간 연장에 의해 야기되는 조직 손상을 예방하는데 필요하다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명의 목적은 하기 화학식 I의 화합물 및 그의 가수분해성 에스테르 또는 에테르를 제공하는 것이다:



상기 식에서,

R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 저급 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하며,

R_5 는 수소, 저급 알킬, $R-SO_2-$, $R_6-(CH_2)_m-CO-$ 또는 $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$ 이고,
 R 은 저급 알킬이고,

R_6 및 R_8 은 수소 또는 저급 알킬이고,

X 는 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이며,

m 은 1 내지 7의 정수이고,

y 는 0 내지 7의 정수이고,

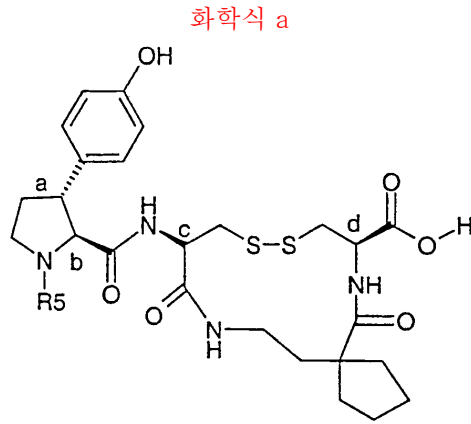
n 은 1 내지 3의 정수이며,

a , b , c 및 d 는 비대칭 탄소원자를 나타낸다.

R_2 및 R_3 은 이들이 부착된 탄소와 함께 4 내지 7개의 탄소원자를 함유하는 사이클로알칸 또는 사이클로알켄기, 예컨대 사이클로펜탄, 사이클로펜텐, 사이클로부탄, 사이클로부텐, 사이클로헥산 또는 사이클로헥센을 형성할 수 있다.

본 발명의 바람직한 태양은 다음과 같다:

- (i) R_2 와 R_3 이 이들이 부착된 탄소와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 사이클로알칸 고리를 형성하는 화학식 I의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;
- (ii) R_2 와 R_3 이 이들이 부착된 탄소와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 상기 (i)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;
- (iii) 하기 화학식 a로 표시되는 상기 (ii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



(iv) (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 상기 (iii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(v) R₅가 R₆-(CH₂)_m-CO-인 상기 (iii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(vi) (8R,13R)-13-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 상기 (v)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(vii) (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 상기 (v)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(viii) R₅가 R₈-X-(CH₂)_y-CO-인 상기 (iii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(ix) X가 산소인 상기 (viii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(x) R₅가 수소인 상기 (iii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xi) (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 상기 (x)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

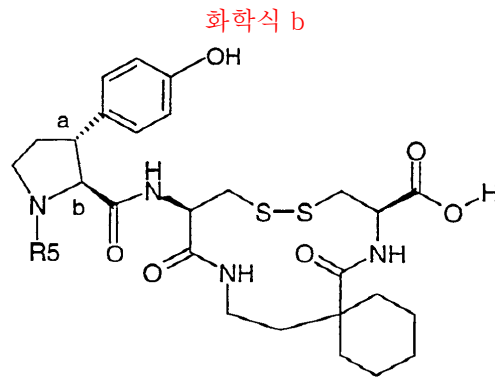
(xii) R₅가 R-SO₂-인 상기 (iii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xiii) R₅가 저급 알킬인 상기 (iii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xiv) (8R,13R)-13-[[[1-메틸설포닐-3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 상기 (xii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xv) R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소와 함께 사이클로헥산 고리를 형성하는 상기 (i)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xvi) 하기 화학식 b로 표시되는 상기 (xv)에 따른 화합물:

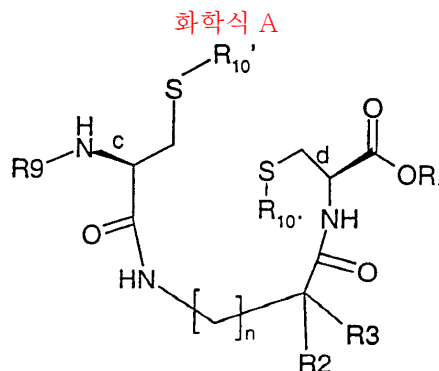


(xvii) (9R,14R)-14-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디티아-8,16-디아자스피로[5.12]옥타데칸-9-카복실산인 상기 (xvi)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xviii) R₅가 R₆-(CH₂)_m-CO-인 상기 (xvi)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xix) (9R,14R)-14-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디티아-8,16-디아자스피로[5.12]옥타데칸-9-카복실산인 상기 (xviii)에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염;

(xx) 하기 화학식 A로 표시되는 화합물:



[상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 저급 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하고,

R₉는 아미노 보호기이며,

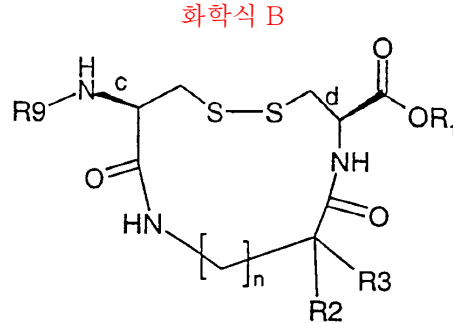
R₁₀ 및 R_{10'}은 티오 보호기이고,

n은 1 내지 3의 정수이다];

(xxi) R₂ 및 R₃이 이들이 결합된 탄소와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 상기 (xx)에 따른 화합물;

(xxii) 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-1-옥소-3-[(트리페닐메틸)티오]프로필]아미노]에틸]사이클로펜틸]카보닐]아미노-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 1,1-디메틸에틸 에스테르인 상기 (xxi)에 따른 화합물;

(xxiii) 하기 화학식 B로 표시되는 화합물:



[상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 저급 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하며,

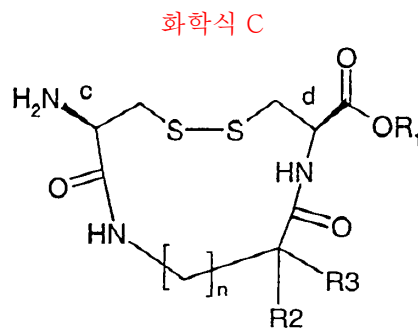
R₉는 아미노 보호기이고,

n은 1 내지 3의 정수이다];

(xxiv) R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 상기 (xxiii)에 따른 화합물;

(xxv) (8R,13R)-13-[[[(1,1-디메틸-에톡시)카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르인 상기 (xxiv)에 따른 화합물;

(xxvi) 하기 화학식 C로 표시되는 화합물, 및 그의 가수분해성 에스테르 및 에테르:



[상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 저급 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하며,

n은 1 내지 3의 정수이다];

(xxvii) R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 상기 (xxvi)에 따른 화합물; 및

(xxviii) (8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르인 상기 (xxvii)에 따른 화합물.

본 발명의 화합물은 효과적인 항염증제이다. 본 발명에 따르면, 환상 디설파이드 화합물은 α4 인테그린 발현 세포가 내피에 유착되지 않도록 함으로써 염증에 대항한다. 환상 디설파이드 화합물의 일반적인 작용은 α4 인테그린 발현 세포가 내피의 세포 유착 분자에 결합하는 것을 억제하는 것이다. 이 화합물은 또한 간 같은 염증 부위에서 상기 세포가 국부적으로 활성화되는 것도 억제할 수 있다. 본 발명의 화합물은 폐렴, 천식, 류마티스성 관절염, 다중 경화증(MS) 및 염증성 장 질환(IBD)을 포함하는 만성 염증성 질환에 수반되는 염증 같은 염증의 치료에 특히 유용하다.

본원 전체에 사용되는 용어 "저급 알킬"은 1 내지 7개의 탄소원자를 갖는 직쇄 및 분지쇄 알킬기, 예컨대 메틸, 에틸 및 프로필, 바람직하게는 메틸을 포함한다. 본원에 사용되는 용어 "저급 알콕시"는 1 내지 7개의 탄소원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알콕시기, 예를 들어 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 3급-부톡시 등을 포괄한다. 본원에 사용되는 용어 "저급 알칸산"은 2 내지 7개의 탄소원자를 갖는 알칸산, 예를 들어 프로피온산 및 아세트산을 포함한다. 또한, 본원에 사용되는 용어 "할로젠" 또는 "할로"는 달리 언급되지 않는 한 플루오르, 염소, 브롬 및 요오드를 포함한다.

용어 "치환된 저급 알킬"은 하이드록시, 할로젠, 시아노, 저급 알콕시, 저급 알카노일, 저급 알킬티오, 저급 알킬 설퍼닐, 저급 알킬 설포닐 및 치환된 아미노로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 기에 의해 치환된 저급 알킬기를 의미한다. 치환된 저급 알킬기의 예로는 2-하이드록시에틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 시아노메틸 및 2-니트로프로필이 있다.

용어 "저급 알카노일" 또는 "아실"은 2 내지 7개의 탄소원자를 갖는 지방족 카복실산으로부터 유도되는 라디칼, 예컨대 아세틸, 프로피오닐 등을 의미한다. 용어 "아실"은 "저급 알카노일"을 의미하는 외에 벤조일 같은 아로일도 포함한다.

또한, 본원에 사용되는 용어 "아릴"은 저급 알킬렌디옥시, 할로젠, 니트로, 저급 알킬 또는 저급 알콕시 치환기로 하나 이상의 위치에서 치환될 수 있거나 또는 치환되지 않을 수 있는 단핵 방향족 탄화수소 기(예: 페닐, 톨릴 등), 또는 전술한 기중 하나 이상에 의해 치환될 수 있는 다핵 아릴기(예: 나프틸, 안트릴, 페난트릴, 아줄릴 등)를 나타낸다. 바람직한 아릴기는 치환 및 치환되지 않은 단핵 아릴기, 특히 페닐이다. 용어 "아르알킬"은 수소원자중 하나가 아릴기에 의해 치환되는 저급 알킬기를 나타내고, 그 예로는 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필, 4-클로로-벤질, 4-메톡시벤질 등이 있다.

본원에 사용되는 용어 "가수분해성 에스테르기 또는 에테르기"는 가수분해되어 하이드록실기 및/또는 카복실기를 생성할 수 있는 임의의 에스테르 또는 에테르를 나타낸다. 이 목적에 유용한 예시적인 에스테르기는 아실 잔기가 저급 알칸산, 아릴 저급 알칸산 또는 저급 알칸 디카복실산으로부터 유도된 것이다. 활성화된 산 중에서 이러한 에스테르기를 형성하는데 사용될 수 있는 것은 아릴 또는 저급 알칸산으로부터 유도된 산 무수물 및 산 할라이드, 바람직하게는 산 클로라이드 또는 산 브로마이드이다. 무수물의 예는 아세트산 무수물, 카프로산 무수물, 벤조산 무수물, 저급 알칸 디카복실산 무수물, 예컨대 숙신산 무수물을 포함한다. 또한, 가수분해성 에스테르는 클로로포르메이트, 예컨대 트리클로로에틸클로로포르메이트로부터 형성될 수 있다.

적합한 에테르 보호기는, 예를 들어 테트라하이드로피라닐 에테르 또는 4-메톡시-5,6-디하이드로-2H-피라닐 에테르이다. 다른 것은 벤질, 벤즈하이드릴 같은 아릴메틸 에테르, 또는 트리틸 에테르 또는 α-저급 알콕시 저급 알킬 에테르, 예를 들어 메톡시메틸 또는 알릴 에테르, 또는 트리메틸 실릴 에테르 같은 알킬 실릴 에테르이다.

다르게는, "가수분해성 에스테르기"는 가수분해되어 카복실기를 형성할 수 있는 에스테르를 나타낸다. 전형적으로, 알콕실 잔기는 저급 알칸올 또는 치환된 저급 알칸올로부터 유도된다. 알칸올 중에서 상기 에스테르기를 형성하는데 사용될 수 있는 것은 치환되거나 치환되지 않은 1급, 2급 및 3급 알칸올, 예를 들어 에탄올, 메탄올, 이소프로판올, 3급-부탄올 및 2-(디메틸 아미노)에탄올이다.

용어 "티오 보호기"는 분리되어 자유 티오기를 형성할 수 있는 임의의 기를 나타낸다. 그중에서 바람직한 티오 보호기는 트리아릴메탄, 트리-알킬메탄, 아르아릴기, 예컨대 벤질이다. 바람직한 아실기는 저급 알카노일 및 아로일, 특히 벤조일이다. 일반적으로, 산에 의해 분리될 수 있는 티오 보호기, 예컨대 트리아릴메틸기를 사용하는 것이 바람직하며, 트리틸기가 특히 바람직하다.

용어 "아미노 보호기"는 분리되어 자유 아미노기를 형성할 수 있는 임의의 기를 의미한다. 아미노 보호기는 펩타이드 합성에 사용되는 임의의 통상적인 아미노 보호기일 수 있다. 일반적으로, 바람직한 아미노 보호기는 약 pH 2.0 내지 3.0의 순한 산성 조건하에서 분리될 수 있는 것이다. 구체적으로, 바람직한 아미노 보호기는 3급 저급 알킬, 저급 알킬 및 트리-저급 알킬 메틸기이다.

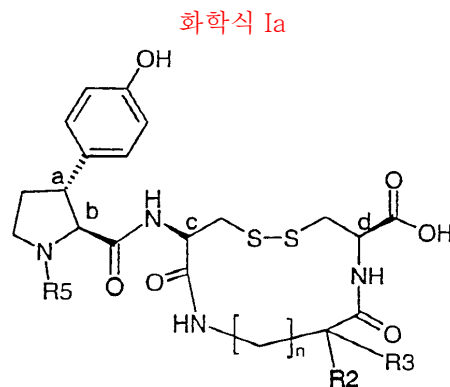
용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산, 시트르산, 포름산, 말레산, 아세트산, 숙신산, 타르타르산, 메탄설폰산, 과라 툴루엔 설폰산 등과 같은 약학적으로 허용가능한 무기 및 유기 염을 포함하는데 이용된다. 이러한 염은 표준 기법을 이용하여 당해 분야의 숙련자에 의해 매우 용이하게 제조될 수 있다.

본원 전체에 걸쳐 제공된 화합물의 화학식에서, 두꺼운 테이퍼진 선(▼)은 비대칭 탄소가 속해있는 고리의 평면 위에 있는 치환기를 나타내고, 점선(---)은 비대칭 탄소가 속해있는 고리의 평면 아래에 있는 치환기를 나타내며, 파선(~)은 분자의 평면 위쪽 또는 아래쪽 어디에나 존재할 수 있는 치환기를 나타낸다. 본원 전체에 걸쳐 제공된 화합물의 화학식은 편의상 기재된 것으로, 입체이성질체, 거울상이성질체 및 라세미체를 비롯한 다른 형태도 포함하는 것으로 간주되어야 하고, 도시된 특정 형태로만 한정되는 것으로 이해되어서는 안된다.

화학식 I 및 그의 약학적으로 허용가능한 염, 및 화학식 I의 화합물의 중간체는 입체이성질체를 나타낸다. 본 발명의 화합물은 화학식 I의 화합물의 임의의 이성질체 또는 이들 이성질체의 혼합물일 수 있다. 하나 이상의 비대칭 탄소원자를 갖는 본 발명의 화합물 및 중간체는 입체이성질체의 라세미 혼합물로서 수득될 수 있으며, 이를 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 본 발명의 방법중 적절한 단계에서 분할하여 소정의 입체이성질체 또는 목적하는 입체 구조를 갖는 순수한 거울상이성질체를 수득할 수 있다. 다르게는, 당해 분야에 공지되어 있는 방법에 의해 목적하는 이성질체를 직접 합성할 수도 있다.

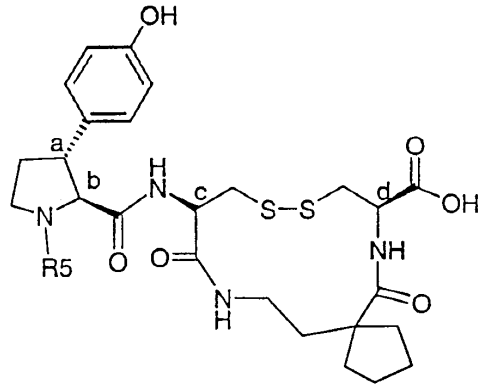
본 발명의 화합물에 존재하는 비대칭 탄소원자는 a, b, c 및 d로 표시된다. a, b, c 및 d로 표시된 각 비대칭 탄소원자의 입체구조는 그가 나타내는 특정 입체이성질체에 따라 지칭될 수 있다. 본 발명의 화합물은, "a"로 표시된 탄소원자가 S, R 또는 R,S-구조를 갖고, "b"로 표시된 탄소원자가 S, R 또는 R,S-구조를 가지며, "c"로 표시된 탄소원자가 S, R 또는 R,S-구조를 갖고, "d"로 표시된 탄소원자가 S, R 또는 R,S-구조를 갖는 화합물을 포함한다.

본 발명의 화합물의 바람직한 입체 구조는 화학식 I의 화합물의 순수한 입체이성질체이다. 이 바람직한 입체 구조를 갖는 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물이고, 그의 바람직한 구조는 하기 화학식 Ib의 화합물이다:



[상기 식에서, R₂ 및 R₃은 이들이 부착된 탄소원자와 함께 사이클로헥탄 고리를 형성한다]

화학식 Ib



화학식 I의 화합물, 특히 화학식 I의 화합물인 피롤리딘의 순수한 (+)-트랜스 이성질체로부터 유도된 유사체는 항염증제로서 큰 효능을 나타낸다. 이들 항염증제의 효능을 결정하는 수단은 인테그린 VLA-4가 세포 유착 분자 VCAM-1에 결합하는 것을 억제하는 이들의 능력을 측정하는 것이다. 예를 들어, VLA-4/VCAM-1 결합 분석에 의해 측정되는, VCAM/VLA4 결합을 50% 억제하는 해당 화합물의 농도(IC₅₀) 면에서 본원 화합물의 효능을 결정할 수 있다. 본 발명의 화합물, 특히 실질적으로 순수한 (+)-트랜스 이성질체 형태, 즉 상응하는 입체이성질체를 약 5% 미만 함유하는 (+)-트랜스 이성질체는 종래에 공지되어 있던 VCAM/VLA4 길항제보다 더 높은 효능을 나타낸다.

본 발명에 따르면, 당해 분야에 공지되어 있는 임의의 통상적인 방법을 이용하여 VCAM-1/VLA-4 결합 억제를 결정할 수 있다. 예를 들면, 고상 이중 항체 ELISA 또는 Ramos 세포계 스크리닝 분석을 이용하여 VCAM-1/VLA-4 결합 억제를 측정할 수 있다.

특히 바람직한 화학식 I의 화합물은 (8R,13R)-13-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]-카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산; (9R, 14R)-14-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]-카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디티아-8,16-디아자스피로[5.12]옥타데칸-9-카복실산; (8R,13R)-13-[[[1-메틸설포닐-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]-헵타데칸-8-카복실산; (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로-[4.12]-헵타데칸-8-카복실산; 및 (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산이다.

본 발명의 화합물은 경구, 직장 또는 비경구(예컨대, 정맥내, 근육내, 피하, 초내 또는 경피), 또는 설하 투여될 수 있거나, 또는 안과용 제제, 또는 폐렴 치료용 에어로졸로서 투여될 수 있다. 투여형의 예로는 경구투여용 캡슐, 정제, 현탁제 또는 용액제, 좌약, 주사용액, 점안액, 연고 또는 분무용액이 있다.

정맥내, 근육내, 경구 또는 흡입 투여가 바람직한 투여 유형이다. 본 발명의 화합물이 유효량으로 투여되는 투여량은 특정 활성성분의 성질, 환자의 연령과 조건, 및 투여방식에 따라 달라진다. 투여량은 임의의 통상적인 수단에 의해, 예를 들어 투여량-한정 임상 시험에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 본 발명은 VCAM-1 또는 피브로넥틴이 VLA-4-발현 세포에 결합하는 것을 억제하기에 충분한 양의 본 발명 화합물을 투여하여 질환의 증상 또는 손상을 감소시킴으로써, VCAM-1 또는 피브로넥틴이 VLA-4-발현 세포에 결합하는 것이 질환 증상 또는 손상의 발병요인인 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 1일당 약 0.1 내지 100mg/kg체중의 투여량이 바람직하고, 1일당 1 내지 25mg/kg체중의 투여량이 특히 바람직하며, 1일당 1 내지 10mg/kg체중의 투여량이 가장 바람직하다.

본 발명은 또한 약학적 효과량의 본 발명 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학 조성물을 포함한다. 이러한 조성물은 임의의 통상적인 수단에 의해 제형화될 수 있다. 정제 또는 과립제는 일련의 결합제, 충전제, 담체 또는 희석제를 함유할 수 있다. 액체 조성물은 예컨대 멸균수-혼합성 용액의 형태일 수 있다. 캡슐은 활성성분 외에 충전제 또는 증점제를 함유할 수 있다. 또한, 향미-개선 첨가제, 및 보존제, 안정화제, 수분-보유제 및 유화제로서 통상적으로 사용되는 성분은 물론 삼투압을 변화시키는 염, 완충제 및 기타 첨가제도 존재할 수 있다.

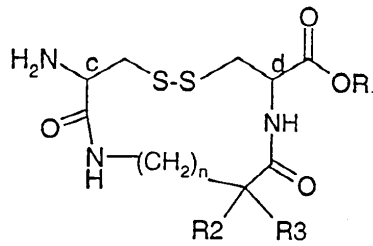
염증성 질환, 특히 인테그린이 세포 유착 분자에 바람직하지 못하게 결합함으로써 매개되는 질환(예: 천식)을 치료하기 위한 활성성분으로서 본 발명의 화합물을 함유하는 약제를 제조하기 위한 본 발명 화합물의 용도 또한 본 발명의 목적이다.

앞서 언급한 담체 물질 및 희석제는 약학적으로 허용가능한 임의의 통상적인 유기 또는 무기 성분, 예를 들어 물, 젤라틴, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 활석, 아라비아 검, 폴리알킬렌 글리콜 등을 포함할 수 있다.

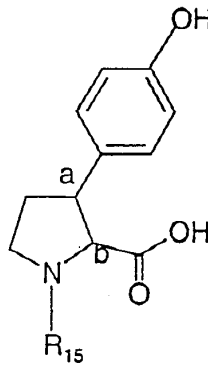
본 발명의 방법에 의해 제조된 화합물도 또한 본 발명의 목적이다.

본 발명에 따라, 하기 화학식 13의 환상 펩타이드 코어 화합물을 하기 화학식 19의 화합물과 반응시킴으로써 화학식 I의 화합물을 제조한다:

화학식 13



화학식 19



상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

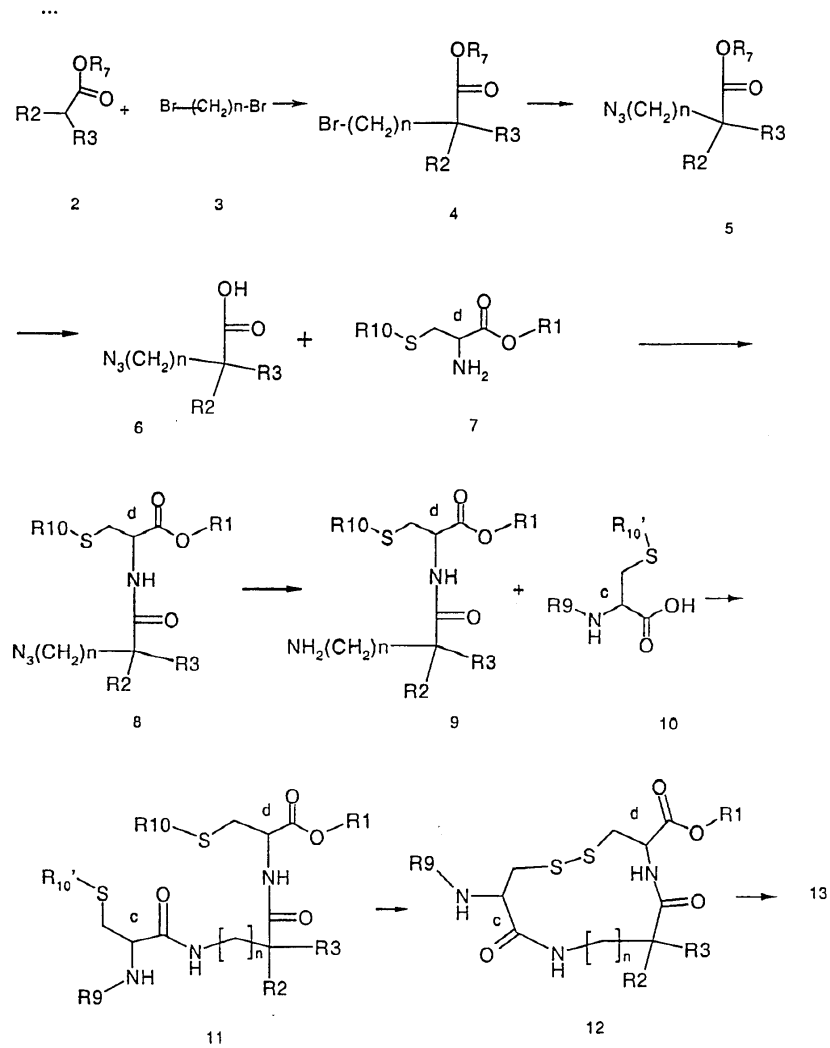
R₂ 및 R₃은 상기 정의된 바와 같으며,

R₁₅는 저급 알킬, R-SO₂⁻, R₆-(CH₂)_m-CO- 또는 R₈-X-(CH₂)_y-CO-이고,

R, R₆ 및 R₈은 상기 정의된 바와 같다.

본 발명의 화합물을 제조하는데 적합한 환상 펩타이드 코어(13)는 하기 반응식 1에 따라 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

반응식 1



상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 상기 정의된 바와 같으며,

R₇은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₉는 아미노 보호기이고,

R₁₀ 및 R_{10'}은 티오 보호기이며,

n은 상기 정의된 바와 같다.

화학식 2의 화합물의 R₇은 상응하는 산의 자유 카복시기를 에스테르화를 통해 보호함으로써 이 산으로부터 형성된다. R₇은 바람직하게는 메틸기 같은 저급 알킬이다. 화학식 2의 화합물을 제조함에 있어서는, 화학식 2의 화합물의 상응하는 자유 산을 알킬 할라이드와 반응시켜 보호성 에스테르를 형성한다. 화학식 2의 상응하는 자유 산기를 표준 가수분해성 에스테르 보호기로 전환시키는 임의의 통상적인 방법을 이용할 수 있다.

반응식 1에서는, 화학식 2의 화합물을 화학식 3의 디브로모알칸과 반응시킴으로써 화학식 2의 에스테르를 알킬화시킨다. 저온, 전형적으로는 -40 내지 -78°C 로 유지되는 불활성 용매, 예컨대 THF 중에서 화학식 2의 에스테르를 강염기, 예를 들어 리튬 디소프로필아미드와 반응시킨 다음, 반응 혼합물을 이 온도에서 화학식 3의 디브로모알칸과 반응시켜 화학식 4의 브로마이드를 제공함으로써 편리하게 상기와 같은 알킬화를 수행한다. 화학식 4의 브로마이드를 알칼리금속 아지드 화물과 반응시켜 화학식 5의 아지드를 형성한다. 할라이드를 아지드기로 전환시키는 임의의 통상적인 수단을 이 반응단계에 이용할 수 있다. 예를 들어, 실온 내지 80°C 에서 DMF 같은 적합한 불활성 용매중에서 아지드화나트륨을 사용하여 화학식 5의 아지드를 생성시킨다.

R_7 에 의해 형성된 에스테르 보호기를 가수분해시킴으로써 화학식 5의 아지드를 화학식 6의 화합물로 전환시킨다. 화학식 5의 아지드의 상응하는 자유 산인 화학식 6의 화합물을 생성하는 이러한 가수분해는 임의의 통상적인 에스테르 가수분해 수단에 의해 수행될 수 있다. 예컨대, 실온 내지 용매의 환류온도에서 수성 메탄올 중에서 과량의 수산화리튬으로 처리함으로써 화학식 5의 에스테르기를 가수분해시켜 화학식 6의 산을 형성시킬 수 있다.

다음 반응단계에서는, 화학식 6의 자유 산을 화학식 7의 아민과 반응시켜 화학식 6의 자유 산 기와 화학식 7의 자유 아미노기 사이에 아마이드 결합을 형성시킴으로써 화학식 8의 아지드 화합물을 수득한다. 화학식 8의 화합물을 형성하는데 있어서, 임의의 통상적인 아마이드 형성 방법을 이용하여 이 반응을 수행할 수 있다. 실온에서 적합한 용매, 예컨대 DMF 중에서 디소프로필에틸아민 같은 3급 염기의 존재하에 펩타이드 화학 분야에 사용되는 통상적인 커플링제, 예를 들어 HBTU를 사용하여 화학식 6의 화합물과 화학식 7의 화합물을 축합시킨다.

화학식 7의 화합물에서, 카복실기는 R_1 에 의해 보호된다. 3급-부틸기를 사용하는 것이 바람직한데, 이는 3급-부틸기가 고리상의 다른 보호기에 영향을 끼치지 않으면서 상기 반응식의 후속 반응에서 용이하게 제거될 수 있기 때문이다. 화학식 7의 화합물에서 R_{10} 은 티오 보호기이다. 전술한 바와 같이, 임의의 적합한 티오 보호기를 사용할 수 있다.

"d"로 표시된 비대칭 탄소원자를 갖는 화합물(7)은 특수한 입체 구조를 가질 수 있다. 반면, 화합물(7)은 입체이성질체의 혼합물일 수 있다. 화합물(7)의 입체 구조는 반응식 전체에 영향을 끼친다. 따라서, 최종 생성물인 화합물(I)의 입체 구조는 화합물(7)의 입체 구조에 따라 달라진다. 즉, "d"로 표시된 비대칭 탄소원자에서, 화합물(I)은 화합물(7)의 특정 입체 구조와 동일한 입체 구조를 갖거나, 또는 화합물(7)이 입체이성질체의 혼합물인 경우 화합물(I)은 입체이성질체의 혼합물로서 생성될 것이다.

아지드기를 상응하는 1급 아민으로 환원시킴으로써 화학식 8의 화합물을 화학식 9의 화합물로 전환시킨다. 아지드를 상응하는 1급 아민으로 환원시키는 임의의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 일반적으로, 실온에서 디클로로메탄 같은 적합한 불활성 용매 중에서 통상적인 환원제, 바람직하게는 트리메틸포스핀 또는 트리페닐포스핀 같은 포스핀을 사용하여 아지드(8)를 환원시킴으로써 화학식 9의 아민을 형성한다.

다음 반응 단계에서는, 화학식 9의 1급 아민을 화학식 10의 시스테인 유도체의 자유 탄소환상 산과 커플링시켜 화학식 11의 화합물을 형성하는 펩타이드 결합을 형성시키는 아마이드 기를 형성한다. 전술한 바와 같은 임의의 펩타이드 커플링 방법에 의해 화학식 9의 아미노기를 시스테인 유도체(10)의 자유 산과 커플링시킨다. 화학식 11의 화합물을 제조하는데 있어서, 화합물(10)의 R_9 는 펩타이드 합성에 사용되는 임의의 통상적인 아미노 보호기일 수 있다. 일반적으로, 바람직한 아미노 보호기는 pH 약 2.0 내지 3.0의 순한 산성 조건에서 분리될 수 있는 것이다. 특히, 바람직한 아미노 보호기는 3급 저급 알콕시 카보닐기, 예를 들어 Boc 기이다. 또한 화학식 10의 화합물에서, R_{10} 은 티오 보호기이다. 전술한 바와 같이, 임의의 적합한 티오 보호기를 사용할 수 있다.

화합물(10)은 "c"로 표시된 비대칭 탄소원자에서 특정 입체 구조를 가질 수 있다. 반면, 화합물(10)은 입체이성질체의 혼합물일 수 있다. 화합물(10)의 입체 구조는 반응식 전체에 영향을 끼친다. 따라서, 최종 생성물인 화합물(I)의 입체 구조는 화합물(10)의 입체 구조에 따라 달라진다. 즉, "c"로 표시된 비대칭 탄소원자에서, 화합물(I)은 화합물(10)의 입체 구조와 동일한 특정 입체 구조를 갖거나, 또는 화합물(10)이 입체이성질체의 혼합물인 경우, 화합물(I)은 입체이성질체의 혼합물일 것이다.

화학식 9의 화합물과 화학식 10의 화합물 둘 다 또는 둘중 하나가 특정 입체 구조를 갖거나 또는 입체이성질체의 혼합물인 경우에 화학식 9의 화합물과 화학식 10의 화합물의 아마이드 커플링을 수행할 수 있다. 바람직하게는, 두 화합물은 모두 L-

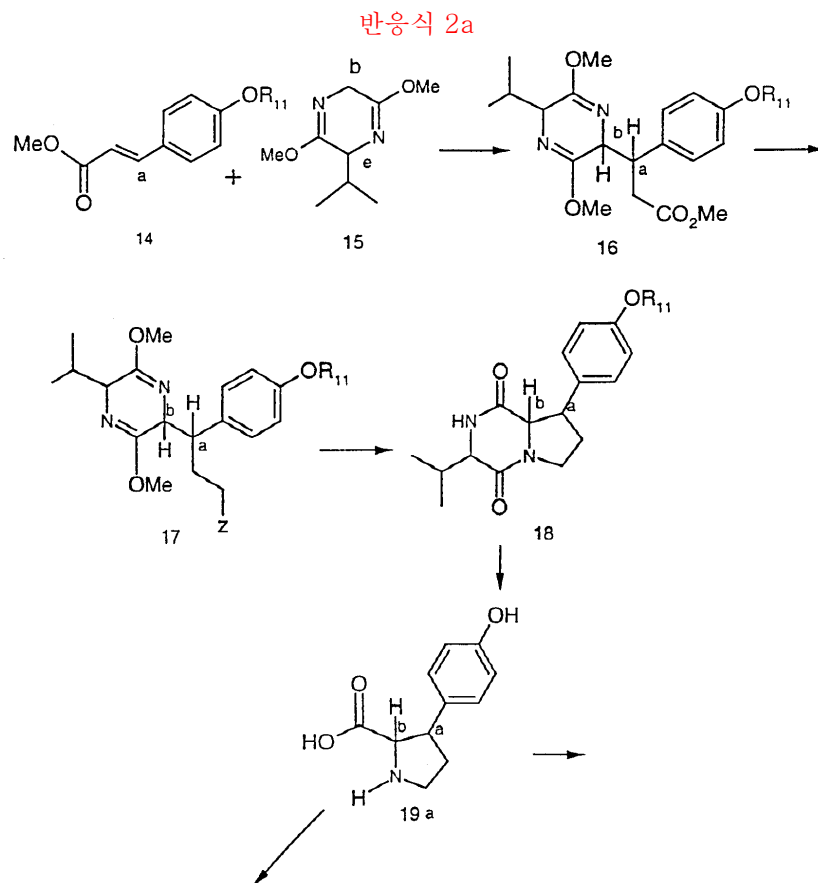
시스테인으로부터 유도된다. 입체이성질체의 혼합물이 사용되는 경우, 화합물(11)은 반응식 전체에서 유지되는 입체이성질체의 혼합물로서 생성된다. 다르게는, 화합물(11)이 한가지 입체이성질체로서 형성되는 경우, 그 입체이성질체의 특정 입체 구조는 반응식 전체에서 유지된다.

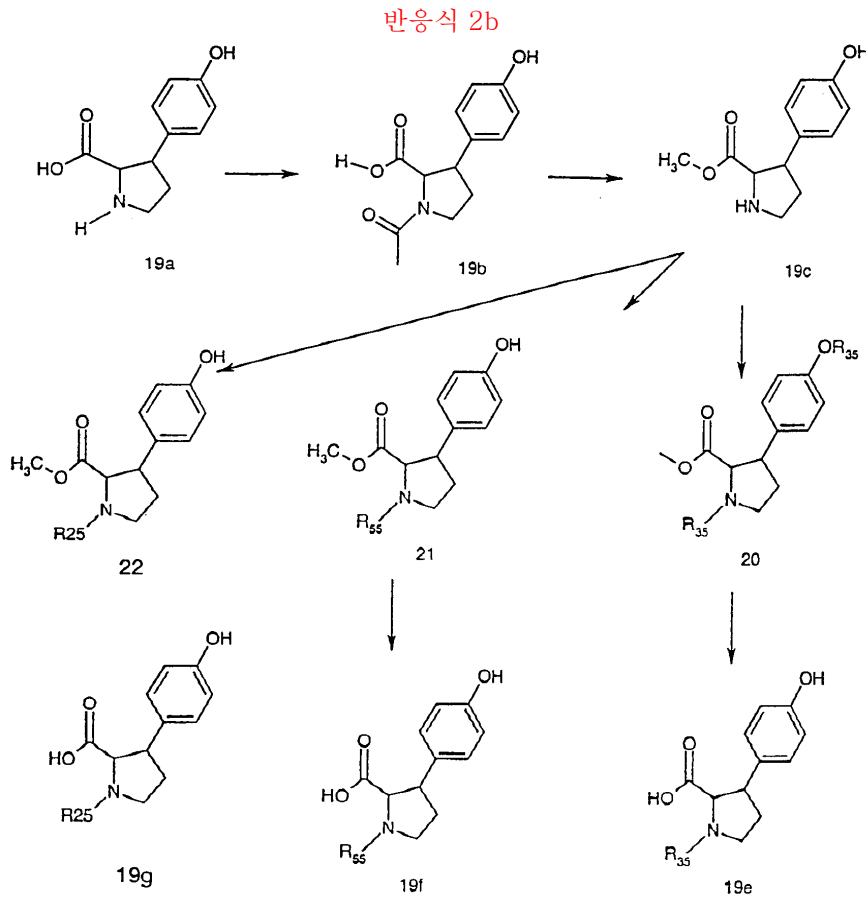
화학식 11의 화합물을 환화시켜 화학식 12의 화합물을 형성한다. 일반적으로, 대략 실온에서 요오드의 디클로로메탄 용액을 사용한 0.5 내지 2g/l의 묽은 용액중에서 처리함으로써 화합물(11)을 환화시켜 화학식 12의 환상 디설파이드를 제조할 수 있다. 이러한 조건하에서, 티오 보호기 R₁₀과 R_{10'}은 화학식 11의 화합물로부터 제거되어 두 티오기가 커플링되게 함으로써 화학식 11의 화합물을 환화시켜 환상 디설파이드(12)를 형성한다.

다음 반응 단계에서는, 환상 디설파이드 화합물(12)로부터 R₉ 아미노 보호기를 선택적으로 제거함으로써 화학식 13의 화합물을 형성한다. 환상 디설파이드(12)는 아미노 보호기 R₉와 에스테르 보호기 R₁을 함유한다. 따라서, 저온, 바람직하게는 0 내지 20°C에서 산성 조건하에 에틸 아세테이트중 1N HCl 중에서 화학식 12의 화합물을 처리하여, 영향을 받지 않는 R₁ 에스테르 보호기는 남긴 채 R₉ 아미노 보호기를 제거함으로써, 후속 커플링 단계에 적합한 자유 아민 유도체(13)를 제공한다. 바람직한 경우, 생성물(13)은 반응 혼합물로부터 침전될 수 있으며, 다른 경우에는 에테르 또는 헥산 같은 용매를 첨가하여 침전시키거나 또는 조심스럽게 농축시켜 분리할 수 있다.

화합물(11)의 비대칭 탄소 원자 "c" 및 "d"의 특정 입체 구조는 화합물(13)에까지 영향을 끼친다. 따라서, 화합물(13)의 입체 구조는 화합물(11)을 제조하는데 사용된 화합물(7, 10)의 입체 구조에 따라 달라진다.

화합물(19)은 하기 반응식 2a 및 2b에 도시된 절차에 따라 제조될 수 있다.





상기 두 반응식에서,

R_{11} 은 에테르 보호기이고,

Z는 이탈기이며,

R_{25} 는 저급 알킬이고,

R_{35} 는 $R-SO_2-$ 이고,

R_{55} 는 $R_6-(CH_2)_m-CO-$ 또는 $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$ 이며,

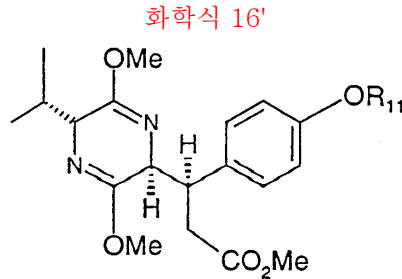
R, R_6 , R_8 , X, y 및 m은 상기 정의된 바와 같다.

먼저 화학식 14의 화합물을 화학식 15의 화합물과 반응시켜 화학식 16의 화합물을 형성함으로써 화학식 19의 화합물을 생성시킨다. 이 반응에 따라, 화합물(15)이 1,4-에놀레이트 첨가에 의해 화학식 14의 화합물의 이중 결합을 가로질러 첨가된다. 이중 결합을 가로지르는 에놀레이트 첨가를 위한 임의의 통상적인 방법을 이 반응에 이용할 수 있다. 예를 들면, 이 1,4-에놀레이트 첨가를 실행하는데 있어서, 화학식 14의 화합물을 화합물(15)의 R-비스락탐 디메틸 에테르를 n-BuLi와 반응시키는 것과 같은 통상적인 수단에 의해 화합물(14)을 그의 리튬 에놀레이트로 전환시킨다. -60 내지 -78°C 에서 화합물(14)과 화합물(15)을 반응시켜 목적하는 생성물(16)을 제공한다.

"a"로 표시된 비대칭 탄소 원자에서, 화합물(14)은 두가지 가능한 기하이성질체중 하나로서 또는 두 기하이성질체의 혼합물로서 존재할 수 있다. 마찬가지로, "e"로 표시된 비대칭 탄소 원자 때문에 화합물(15)은 하나의 특정 입체이성질체로서

또는 입체이성질체의 혼합물로서 존재할 수 있다. 따라서, 화합물(14, 15)의 특정 입체 구조에 따라, 화합물(16)의 4가지 가능한 입체이성질체 중 하나 또는 이들의 혼합물이 생성될 수 있다. 이들 다양한 입체 구조는 화합물(18)에까지 영향을 끼친다.

화합물(16)의 바람직한 입체 구조는 하기 화학식 16'과 같다:



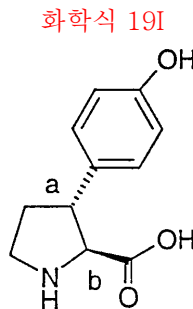
상기 식에서, R₁₁은 상기 정의한 바와 같다.

화학식 16의 화합물에서, R₁₁ 기는 바람직하게는 메틸이다. 화합물(16)의 카복시메틸기를 상응하는 CH₂OH 기로 환원시킨 다음, CH₂OH 기의 OH를 이탈기 Z로 전환시킴으로써 화학식 16의 화합물을 화학식 17의 화합물로 전환시킨다. 일반적으로는, -20℃ 내지 실온에서 적합한 불활성 용매, 예를 들어 THF 중에서 LiBH₄ 또는 LAH 같은 리튬 알루미늄 수소화물 또는 리튬 보로하이드라이드 환원제를 사용하여 이 환원 반응을 수행하여, 통상적으로 단리되지는 않으나 메실록시 또는 토실록시 같은 임의의 통상적인 이탈기일 수 있는 이탈기 Z를 생성하기에 적합한 약제와 반응시킴으로써 화합물(17)로 직접 전환되는 화합물을 제공한다. 화합물(17)을 반응시켜 이탈기 Z를 생성하기 위해 임의의 통상적인 수단, 예를 들어 3급 아민 염기(예: 디이소프로필에틸아민)의 존재하에 디클로로메탄중 메탄 설포닐 클로라이드로 처리하는 방법을 이용할 수 있다.

60 내지 130℃에서 DMF 중에서 요오드화나트륨의 존재하에 환화시킴으로써 화합물(17)을 락탐(18)으로 전환시킨다. 일반적으로, 반응온도가 반응이 종결되는 온도까지 상승됨에 따라 저비점 디클로로메탄 용매를 증류시킴으로써 편리하게 반응시킨다. 실리카 겔 크로마토그래피 같은 통상적인 수단에 의해 락탐(18)을 단리할 수 있다. 락탐(18)을 제조하는데 있어서, 화합물(17)의 헤테로환상 질소 함유 고리의 탄소에 부착된 2개의 메톡실기는 카보닐기로 전환된다.

가수분해에 의해 락탐(18)을 화학식 19a의 화합물로 전환시킨다. 화학식 18의 화합물의 R₁₁에 의해 형성되는 보호기 및 락탐기 둘 다를 가수분해시키는 임의의 공지 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 100 내지 130℃에서 아세트산중 48% HBr로 락탐(18)을 수시간동안 처리하면 R₁₁ 기가 제거되고 락탐 고리가 개환되어 화합물(19a)을 제공한다. 가수분해시, 화합물(18)의 비대칭 탄소원자 "a" 및 "b"의 특정 입체 구조는 화합물(19a)에까지 영향을 끼친다. 따라서, 화합물(19a)의 입체 구조는 화합물(16)을 제조하는데 사용되는 화합물(14, 15)의 입체 구조에 기인한다.

화합물(19)의 바람직한 입체이성질체는 하기 화학식 19I의 화합물이다:



본 발명에 따라, 중탄산나트륨 같은 유기 약염기의 존재하에 화학식 19a의 화합물을 아세트릴 클로라이드와 반응시킴으로써 화학식 19a의 화합물을 화학식 19b의 화합물로 전환시킨다. 이러한 방식으로 화학식 19b의 화합물의 자유 아미노기가 보호된다.

40 내지 80°C에서 메탄올 중에서 무수 염산으로 화학식 19b의 화합물을 처리함으로써 화학식 19b의 화합물을 화학식 19c의 화합물로 전환시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 화학식 19b의 화합물을 자유 아미노기를 갖는 보호된 산(19c)으로 전환시킨다. 자유 아미노기를 각각 치환기 R₂₅, R₅₅ 및 R₃₅로 전환시킬 수 있다.

화학식 19c의 화합물을 R₂₅가 알킬기인 화학식 22의 화합물로 전환시키는데 있어서는, 화학식 19c의 화합물을 저급 알킬 알데히드로 처리하여 중간체 아민을 형성하고, 이를 전형적으로 유기 약산(예: 아세트산)의 존재하에 나트륨 시아노 보로 하이드라이드 같은 적합한 환원제로 처리하여 화학식 22의 화합물로 전환시킨다. 알칼리성 염기, 예를 들어 수산화나트륨으로 처리하는 것과 같은 염기성 조건하에서 가수분해시킴으로써 화학식 22의 화합물을 화학식 19g의 화합물로 전환시킨다.

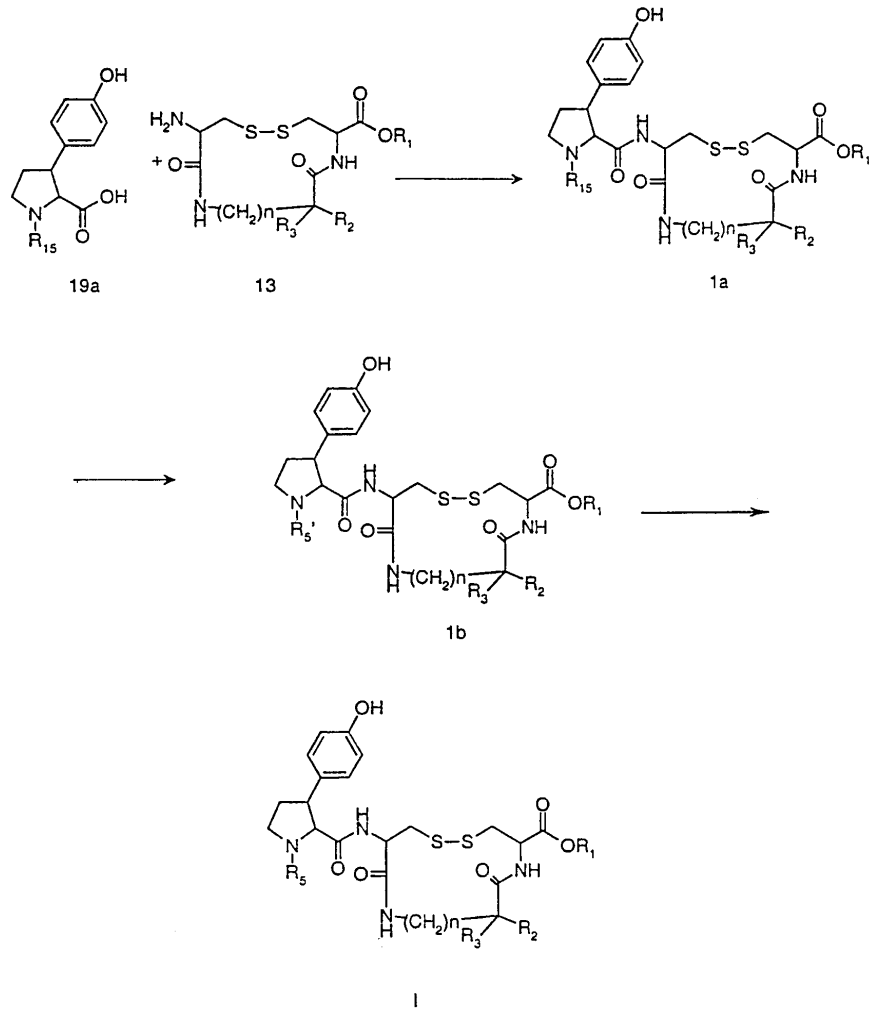
한편, 저급 알킬 설포닐 클로라이드로 처리함으로써 화학식 19c의 화합물을 화학식 19e의 화합물로 전환시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 화합물(19c)을 화학식 20의 화합물로 전환시킨다. 저급 알킬 설포닐 클로라이드와 2급 아민을 축합시키는 임의의 통상적인 방법을 이용하여 화학식 19c의 화합물을 화학식 20의 화합물로 전환시킬 수 있다. 수성 조건하에 알칼리성 염기, 예를 들어 수산화나트륨을 이용하는 것과 같은 염기성 조건하에서 가수분해시킴으로써 화학식 20의 화합물을 화학식 19e의 화합물로 전환시킨다. 이러한 방식으로, R₃₅가 저급 알킬 설포닐기인 화학식 19e의 화합물을 생성할 수 있다.

화학식 19c의 화합물을 아실화제, 특히 화학식 $R_6-(CH_2)_m-C(=O)OH$ 또는 $R_8-X-(CH_2)-C(=O)OH$ 의 반응성 유도체와 반응시킴으로써 화학식 19c의 화합물을 화학식 21의 화합물로 전환시킨다.

반응성 유도체는 산 할라이드 또는 산 무수물을 포함한다. 이들 산 무수물 또는 산 할라이드로 2급 아민을 아실화시키는 임의의 통상적인 방법을 이 절차에 이용할 수 있다. 이러한 방식으로, 화학식 19f의 화합물을 생성시킨다.

화학식 19의 화합물은 화학식 19f, 19g 및 19e의 화합물로 이루어진다. 이 화합물은 하기 반응식 3에 의해 화학식 I의 화합물로 전환될 수 있다:

반응식 3



상기 식에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ 및 R₁₅는 상기 정의한 바와 같다.

전술한 바와 같이, 표준 아마이드 합성에 의해, 예를 들어 실온 내지 +45°C에서 DMF 같은 비양성자성 극성 용매 중에서 약간 과량의 HBTU 및 디이소프로필에틸아민으로 화합물(13, 19)을 처리함으로써, 화학식 13 및 19의 화합물을 화학식 1a의 화합물로 전환시켜, 화학식 1a의 화합물을 제조한다. R₁은 그가 부착된 산소원자와 함께 전술한 바와 같은 가수분해성 에스테르기를 형성한다. 가수분해성 에스테르를 분리하기에 적합한 산성 조건 하에서, 예컨대 실온에서 디옥산/디클로로메탄중 4N 염산으로 처리하고, 반응이 종결된 후 에테르로 생성물을 침전시켜 본 발명의 화합물(I)을 생성한다.

R₁₅가 3급-부톡시 카보닐기(Boc 기), 즉 R₈이 3급 부틸이고 X가 0이고 y가 0인 R₈-X-(CH₂)_y-CO-인 화학식 1a의 화합물을 화학식 I의 화합물로 전환시키는데 있어서, 산 가수분해에 의해 화학식 1a의 화합물로부터 이 기를 제거하여 R₅가 수소인 화학식 I의 화합물을 생성한다. 한편, 화학식 19c의 화합물로부터 화학식 21의 화합물을 형성하는데 이용된 것과 동일한 조건하에 R₅가 수소인 화학식 I의 화합물을 Boc 무수물과 반응시킴으로써 R₅가 수소인 화학식 I의 화합물을 다시 Boc 기로 전환시킬 수 있다. 반응식 3의 출발물질로서 화합물(19a) 대신 화학식 19g의 화합물을 사용하는 경우에는, 아미노기가 R₂₅로 치환된 화학식 I의 화합물이 형성된다. 한편, 반응식 3에 화학식 19a의 화합물 대신 화학식 19f의 화합물을 사용하는 경우에는, 치환기 R₅₅를 갖는 화학식 I의 화합물이 생성될 것이다. 한편, 반응식 3에서 화학식 19a의 화합물 대신 화학식 19e의 화합물을 사용하는 경우에는, 치환기 R₃₅를 갖는 화학식 I의 화합물이 형성된다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명된다. 실시예에 사용된 용어는 다음과 같이 정의된다:

THF는 테트라하이드로푸란이고,

DMF는 N,N-디메틸포름아미드이고,
 HOBT는 1-하이드록시벤조트리아졸이며,
 BOP는 [(벤조트리아졸-1-일)옥시]트리스-(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트이며,
 HATU는 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트이고,
 HBTU는 O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트이고,
 DIPEA는 디이소프로필에틸아민이고,
 DMAP는 4-(N,N-디메틸아미노)피리딘이고,
 DPPA는 디페닐포스포릴 아지드이고,
 DBU는 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔이고,
 NaH는 수소화나트륨이고,
 염수는 포화 염화나트륨 수용액이고,
 TLC는 박층 크로마토그래피이며,
 LiOH는 수산화리튬이고,
 LDA는 리튬 디이소프로필아미드이고,
 BOP-Cl은 비스(2-옥소-3-옥사졸리디닐)포스핀산 클로라이드이며,
 NMP는 N-메틸 피롤리디논이고,
 Fmoc는 (9-플루오레닐메톡시)카보닐이고,
 TFA는 트리플루오로아세트산이며,
 HOAc는 아세트산이며,
 HRMS는 고해상도 질량 분광분석법이며,
 Trityl은 트리페닐메틸이며,
 LAH는 수소화리튬알루미늄이고,
 DCM은 디클로로메탄이고,
 Boc는 [(1,1-디메틸)에톡시]카보닐-이고,
 Boc 무수물은 디-3급-부틸-디카보네이트이며,
 Boc₂O는 디-3급-부틸-디카보네이트이고,

HRP는 양고추냉이(horseradish) 퍼옥시다제이고,

DMSO는 디메틸 설펍사이드이고,

BSA는 소의 혈청 알부민이며,

CHO는 차이니즈 햄스터 난소이고,

EDTA는 에틸렌디아민 테트라아세트산이고,

PMSF는 p-톨루엔설포닐 플루오라이드이고,

PBS는 포스페이트 완충 용액이다.

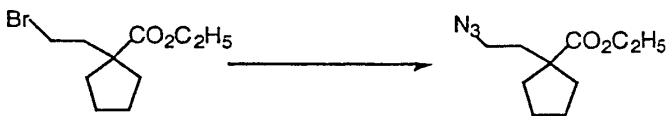
실시예

실시예 1

1-(2-아지도에틸)사이클로펜탄 카복실산의 제조



a. THF 85mL중 디이소프로필아민(56mL, 0.396몰)의 빙냉 용액에 hexan중 n-부틸 리튬의 용액(240mL, 1.6M, 0.393몰)을 20분에 걸쳐 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 30분간 교반하고, -65℃의 욕 온도로 냉각시킨 다음, 20분간에 걸쳐 THF (50mL)중 에틸 사이클로펜탄 카복실레이트(37.4g, 0.263몰)를 첨가하였다. 1시간 후, THF(50mL)중 1,2-디브로모에탄 (47mL, 0.545몰)의 용액을 첨가하고, 혼합물을 3시간동안 -65℃로 유지시킨 다음, 하룻밤동안 실온으로 가온시켰다. 포화 염화암모늄 용액(200mL)을 첨가함으로써 반응을 급냉시키고, 층을 분리한 후, 수성 층을 에틸 아세테이트(100mL)로 추출하였다. 모아진 추출물을 1:1 염수:물(250mL)로 세척하고 건조시켰다(Na₂SO₄). 이 용액을 여과 및 농축시키고, 톨루엔(100mL)으로 희석시킨 다음, 농축시켰다. 희석 및 농축을 2회 반복하여 에틸 1-(2-브로모에틸)사이클로펜탄 카복실레이트인 브로마이드(52.5g)를 수득하였다.



b. DMF(200mL)중 상기 브로마이드(52.5g, 0.211몰)와 아지드화나트륨(54g, 0.831몰)의 용액을 질소 분위기 하에 50℃에서 5시간동안 교반하고 여과하였다. 여액을 거의 건조될 때까지 농축시키고 에틸 아세테이트(500mL)로 희석시킨 다음, 여과 및 농축하여 조질의 에틸 1-(2-아지도에틸)사이클로펜탄 카복실레이트(40.9g)를 갈색 오일로서 수득하였다. 이 물질을 이전 단계로부터의 생성물과 혼합하고(총 63.5g), hexan중 5% 에틸 아세테이트로 용리시키면서 실리카 겔 250g 상에서 크로마토그래피함으로써 정제하여 에틸 1-(2-브로모에틸)사이클로펜탄 카복실레이트 50.3g을 담갈색 오일로서 수득하였다.



c. 상기로부터 수득한 에틸 1-(2-브로모에틸)사이클로펜탄 카복실레이트 (50.3g, 0.238몰)를 THF(750mL) 및 메탄올 (375mL)에 용해시키고 물(300mL)중 수산화리튬 수화물(15g, 0.357몰)의 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 하룻밤동안

40°C에서 교반하고 농축시켰다. 1N 수산화나트륨 40mL를 함유하는 물 2L에 잔류물을 용해시키고 hexan(1L)으로 세척하였다. 수성 층을 1N HCl(375mL)로 산성화시키고 에테르(2×1L)로 추출하였다. 모아진 추출물을 건조시키고(Na_2SO_4) 농축시켜 1-(2-아지도에틸)-사이클로펜탄 카복실산(37.5g)을 호박색 액체로서 수득하였다.

실시예 2

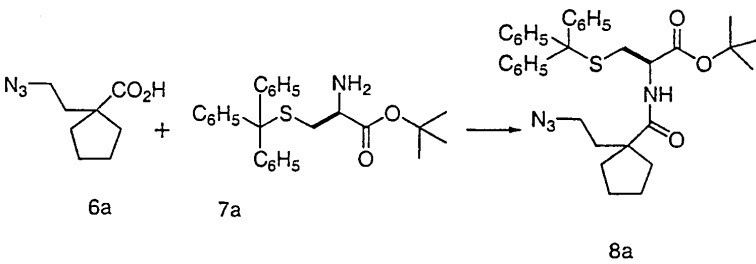
N-플루오레닐메톡시카보닐-S-트리틸-L-시스테인-3급-부틸 에스테르의 제조



무수 톨루엔(10mL)중 Fmoc-S-트리틸-L-시스테인(2.9g, 5밀리몰)의 현탁액을 80°C로 가열하였다. 디-3급-부틸-디메틸포름아미드 아세탈(4.8mL, 20밀리몰)을 20분간에 걸쳐 이 현탁액에 첨가하였다. 용액을 냉각시키고 물 및 포화 중탄산나트륨(2×10mL)으로 세척한 다음, 증발시켰다. 에틸 아세테이트/hexan(15/85)으로 용리시키는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 잔류물을 정제함으로써 N-플루오레닐메톡시카보닐-S-트리틸-L-시스테인-3급-부틸 에스테르 2.2g을 수득하였다.

실시예 3

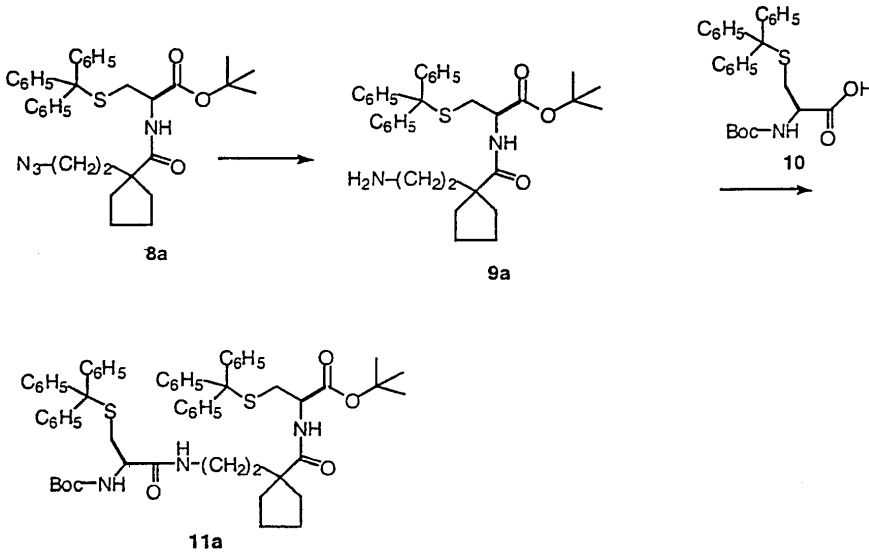
N-[[1-(2-아지도에틸)사이클로펜탄]카보닐]-S-트리페닐메틸-L-시스테인 1,1-디메틸에틸 에스테르의 제조



DMF 5mL중 N-플루오레닐메톡시카보닐-S-트리틸-L-시스테인 1,1-디메틸에틸 에스테르(640mg, 1밀리몰)의 용액에 피페리딘 2mL를 첨가하였다. 용액을 20분간 교반하고 용매를 증발시켰다. 고체를 DMF(3×20mL)와 함께 공비시키고 고진공하에 1시간동안 건조시킴으로써 잔류하는 피페리딘을 제거하여 S-트리틸-L-시스테인 1,1-디메틸에틸 에스테르를 고체로서 수득하였다. 이 고체에 DMF 5mL를 첨가하고 이어 1-(2-아지도에틸)사이클로펜탄 카복실산(6a)(183mg, 1밀리몰), HBTU(379mg, 1밀리몰) 및 DIPEA(0.18mL, 1밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 용액을 5시간동안 교반하고 고진공하에 용매를 제거하였다. 용리제로서 에틸아세테이트/hexan(15/85)을 사용하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 잔류물을 정제하여, N-[[1-(2-아지도에틸)사이클로펜탄]카보닐]-S-트리페닐메틸-L-시스테인 1,1-디메틸에틸 에스테르 500mg(86%)을 수득하였다.

실시예 4

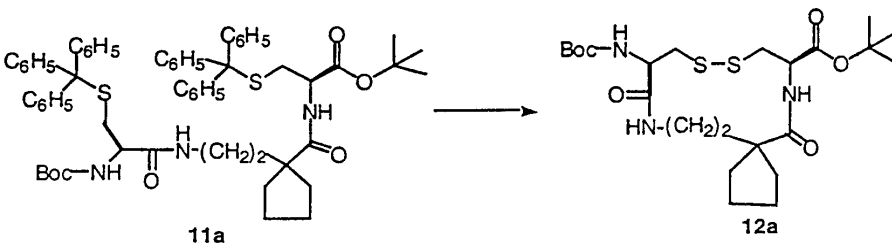
2(R)-[[[1-[[2(R)-[[[1,1-디메틸에톡시]카보닐]아미노]-1-옥소-3-[(트리페닐메틸)티오]프로필]아미노]에틸]사이클로펜탄]카보닐]아미노-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 1,1-디메틸에틸 에스테르(11a)의 제조



아르곤하에 THF 5mL중 N-[[1-(2-아지도에틸)사이클로펜틸]카보닐]-S-트리페닐메틸-L-시스테인 1,1-디메틸에틸 에스테르(500mg, 0.86밀리몰)의 용액에 THF중 트리메틸포스핀의 용액(1M 용액 1.41mL, 1.5당량)을 첨가하였다. 용액을 3시간동안 교반한 후, 물 6방울을 첨가하였다. 생성된 용액을 15분간 교반하고 진공하에 용매를 증발시킨 후, 잔류물을 고진공하에 14시간동안 건조시켰다. 생성된 오일에 DMF 5mL중 N-[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]-S-트리틸-L-시스테인 10(463mg, 1밀리몰), HBTU(379mg, 1밀리몰) 및 DIPEA(0.18mL, 1밀리몰)의 용액을 첨가하였다. 용액을 6시간동안 교반하고, 용매를 고진공하에 증발시켰다. 헥산중 35% 에틸 아세테이트로 용리시키는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 잔류물을 정제하여, 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-1-옥소-3-[(트리페닐메틸)티오]프로필]아미노]에틸]사이클로펜틸]카보닐]아미노-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 1,1-디메틸에틸 에스테르(11a) 510mg (59%)을 수득하였다.

실시예 5

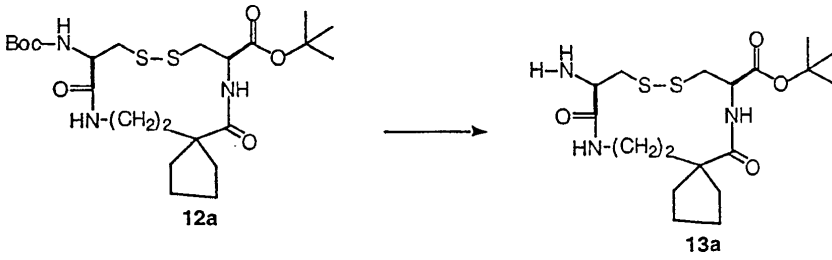
(8R,13R)-13-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르의 제조



9/1 디클로로메탄-메탄올 500mL중 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-1-옥소-3-[(트리페닐메틸)티오]프로필]아미노]에틸]사이클로펜틸]카보닐]아미노-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 1,1-디메틸에틸 에스테르(11a) (510mg, 0.51밀리몰)의 용액에 9/1 디클로로메탄-메탄올 500mL중 요오드(520mg, 4당량)의 용액을 5분간에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 10분간 교반하고 0.1M Na₂S₂O₃ 300mL로 급냉시켰다. 층을 분리시킨 다음, 수성 층을 디클로로메탄 200mL로 추출하였다. 모아진 유기 층을 물로 세척하고 황산마그네슘 상에서 건조시킨 후, 증발시켜 오일을 수득하였다. 1/1 에틸 아세테이트/헥산으로 용리시키는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제함으로써 (8R,13R)-13-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 160mg(61%)을 수득하였다.

실시예 6

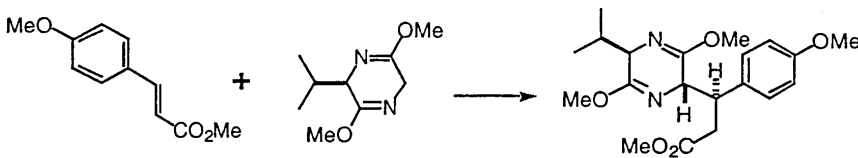
(8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르의 제조



아르곤 분위기하에 0℃에서 에틸 아세테이트 5mL중 메탄올(0.15mL, 3.8밀리몰)의 혼합물에 아세틸 클로라이드 (0.27mL, 3.8밀리몰)를 첨가하였다. 용액을 0℃에서 10분간 교반하고 실온에서 30분간 교반하였다. 이 용액에 (8R,13R)-13-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르(130mg, 0.25밀리몰)를 첨가하였다. 혼합물을 7시간동안 교반하였다. 침전물을 유리 프리팅상에 모으고, 에틸 에테르로 세척하였다. 고진공하에 건조시킨 후, (8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 92mg을 수득하였다(여액 및 세척액을 증발시킨 후 회수된 출발물질을 기준으로 하여 96% 수율).

실시예 7

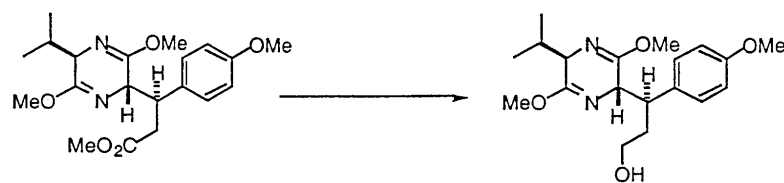
3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로판산 메틸 에스테르의 제조



-70℃(내부 온도)의 무수 THF 250mL중 (R)-2,5-디메톡시-3-이소프로필-3,6-디하이드로피라진(18.4g, 100밀리몰)의 용액에, -70℃ 미만의 내부 온도를 유지하도록 3시간에 걸쳐 n-BuLi의 용액(헥산중 1.6M, 63mL, 100밀리몰)을 적가하였다. 첨가한 다음, 용액을 -70℃에서 40분간 교반하였다. 이 용액에 메틸 트랜스-4-메톡시신나메이트(21.2g, 110밀리몰)의 THF 용액 90mL를 1시간에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 용액을 -70℃에서 4시간동안 추가로 교반하였다. -70℃의 아세트산(6.1mL, 100밀리몰)을 첨가함으로써 반응을 급냉시키고, 생성된 현탁액을 실온으로 가온하여 황색 용액을 수득하였다. 이 용액을 에테르로 1000mL까지 희석시키고, 유기 층을 물(3×80mL) 및 염수(3×80mL)로 세척한 다음, MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 용매를 제거한 후, 에틸 아세테이트/헥산(1:5.5)으로 용리시키는 실리카 겔 상에서의 HPLC에 의해 잔류물(44.3g)을 정제하여, 3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로판산 메틸 에스테르(30.6g, 81.3밀리몰, 81.3%)를 수득하였다. TLC: Rf=0.3, 에틸 아세테이트/헥산(1/5). HRMS, 실측치: 377.2071, 계산치: 377.2076. C₂₀H₂₆N₂O₅에 대한 분석: 계산치 C, 64.16; H, 7.00; N, 7.48. 실측치 C, 64.05; H, 7.28; N, 7.37.

실시예 8

3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로판올의 제조

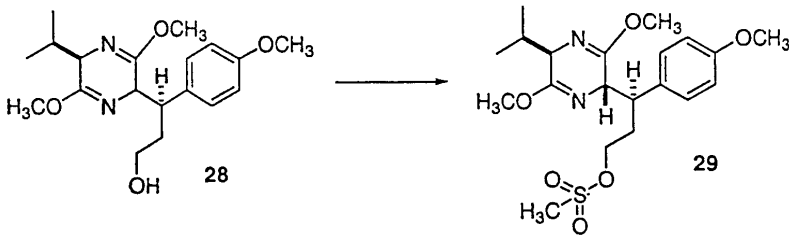


적하 깔때기와 온도계가 장착된 건조한 2구 플라스크에 3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로판산 메틸 에스테르(17.5g, 46.48밀리몰) 및 무수 THF 559mL를 첨가하였다. 이 용액을 아르곤 하에 아세톤-빙욕에서 -10℃로 냉각시켰다. 이 용액에 THF중 수소화리튬알루미늄의 용액(0.8M, 60mL,

48밀리몰)을 0℃ 미만의 내부 온도가 유지되도록 하는 속도로 적가하였다. 첨가한 후, 빙욕을 제거하고 반응혼합물을 실온에서 2시간동안 교반하였다. 에틸 아세테이트 10mL, 이어 황산나트륨 포화 용액 25mL를 첨가함으로써 반응을 급냉시켰다. 생성된 백색 침전물을 여과하고 에틸 아세테이트(4×100mL)로 세척하였다. 모아진 여액을 농축시켜 3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로판올을 무색 오일로서 수득하였다(17.7g). TLC(Rf: 0.5, 에틸 아세테이트/헥산=1:1) 단일 반점.

실시예 9

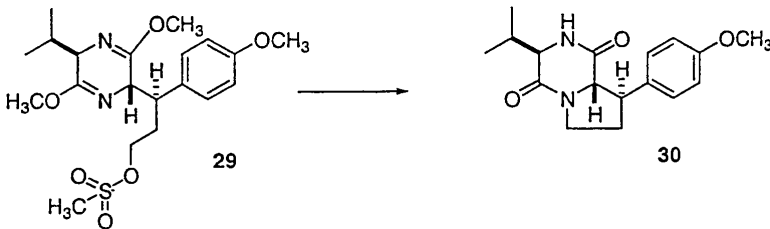
메탄설폰산 3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로필 에스테르(29)의 제조



상기 오일 3(R)-[(2S,5R)-2,5-디하이드로-3,6-디메톡시-5-(1-메틸에틸)-2-피라지닐]-3-(4-메톡시페닐)프로판올(28)(17.7g)을 디클로로메탄 300mL에 용해시켰다. -5℃에서 이 용액에 메탄 설폰일 클로라이드(8.02g, 5.42mL, 70밀리몰), 이어 디이소프로필에틸아민(DIPEA, 12mL, 70밀리몰)을 10분에 걸쳐 적가하였다. 0℃에서 2시간동안 반응물을 교반하였다. 담황색 용액을 에테르 2L로 희석시키고 물(3×200mL) 및 염수(2×200mL)로 세척하였다. 이를 황산나트륨 상에서 건조시킨 후, 용액을 20℃에서 진공하에 160mL의 부피까지 농축시켰다. EA/H(1:1)중에서의 TLC: Rf=0.74, 큰 반점; Rf=0.21, 작은 반점.

실시예 10

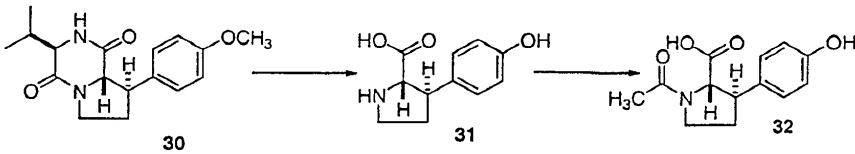
(3R,8R,8aS)-헥사하이드로-8-(4-메톡시페닐)-3-(1-메틸에틸)피롤로[1,2-a]피라진-1,4-디옥사이드(30)의 제조



압력이 균등하게 된 적하 깔때기, 온도계 및 경로가 짧은 스틸 헤드(short path still head)가 장착된 2L들이 3구 플라스크에 DMF 1000mL 및 요오드화 나트륨(33g, 200밀리몰)을 넣었다. 상기 실시예 9에서 수득한 조질의 메탄 설폰네이트(29)의 용액을 아르곤하에 60 내지 120℃의 욕 온도에서 1.2시간에 걸쳐 적하 깔때기를 통해 DMF 용액에 첨가하였다. 첨가한 다음, 100mm 압력에서 스틸 헤드를 통해 증류시킴으로써 저온 비등 성분을 제거하였다. 잔류물을 120℃(내부 온도)에서 2.5시간동안 추가로 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 다음, 용매를 진공하에 증발시키고 잔류물을 에틸 아세테이트(700mL)로 희석시켰다. 생성된 백색 고체를 여과에 의해 모으고, 에틸 아세테이트(3×100mL)로 세척한 다음, 버렸다. 모아진 여액을 물(3×100mL)로 세척하였다. 수층을 NaCl로 포화시키고 에틸 아세테이트(3×200mL)로 추출하였다. 모아진 에틸 아세테이트 층을 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음, 농축시켜, 조질 생성물(30) 16.5g을 수득하였다. 에틸 아세테이트로 용리시키는 실리카 겔 300g을 통해 여과한 후, 생성물(30)을 수득하였다(DMF 1당량을 함유하는 11.5g). 에틸 아세테이트:헥산(8:1)으로 용리시키는 실리카 겔 컬럼 상에서의 HPLC 정제에 의해 생성물(30) 9.3g을 백색 포움상 고체로서 수득하였다. HRMS(M+ H): 실측치 302.1627, 계산치 302.1630.

실시예 11

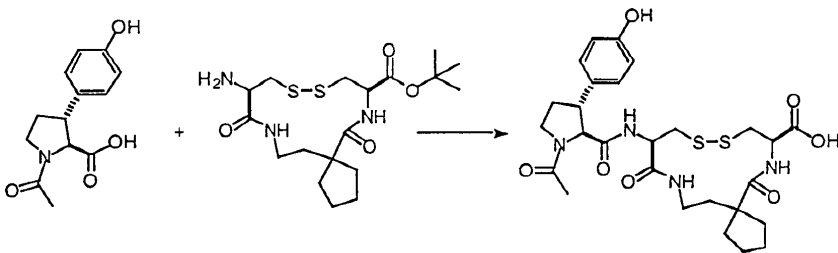
(+)-(2S,3R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시)페닐프롤린(32)의 제조



상기 실시예 10에서 수득한 화합물(30)(8.0g, 26.45밀리몰)을 48% 수성 브롬화수소산 60mL 및 아세트산 18mL에 용해시켰다. 용액을 130 내지 135°C의 욕 온도에서 3.5시간동안 교반하였다. 역상 HPLC에 의해 반응을 모니터링하였다. 진공하에 총 65mL의 용매를 증류하고 잔류물을 실온으로 냉각시켰다. 생성된 백색 결정질 고체(발린 하이드로브로마이드, 2.15g)를 여과에 의해 제거하고, 여액을 물(70mL)로 희석시켰다. 수성 층을 고체 NaHCO_3 (25.6g)로 처리하여 화합물(31)의 갈색 현탁액을 수득하였다. 20°C에서 2시간동안에 걸쳐 THF 60mL중 아세틸 클로라이드(12.2mL, 171밀리몰)를 이 현탁액에 첨가하였다. 첨가하는 동안 NaHCO_3 1.2g을 수회로 나누어 추가로 첨가하여 반응 pH를 7보다 높게 유지시켰다. 다 첨가한 다음, 현탁액을 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. TFA로 산성화시켜 pH를 3 미만으로 만든 다음, 현탁액을 건조할 때까지 농축시키고 갈색 잔류물을 아세톤(2×250mL)으로 추출하였다. 아세톤 용액을 황산나트륨 상에서 건조시키고 농축시켜 갈색 검을 수득하였다. 이 갈색 잔류물을 고온의 에틸 아세테이트(2×250mL)로 추출하여 N-아세틸발린을 제거하였다. 잔류하는 갈색 검(11.2g)을 물 60mL에 용해시키고 RP-HPLC(5×30cm Waters C-18 Delta Prep 컬럼, 5% 내지 95%의 선형 구배를 이루는 물중 아세토니트릴로 용리, 150mL/분)에 의해 정제하여, (+)-(2S,3R)-1-메틸카보닐-3-(4-하이드록시)페닐프롤린(32)을 백색 고체로서 수득하였다(3.45g, 14.24밀리몰)(53.8%). HRMS (M+ H), 실측치 250.1078, 계산치 250.1079.

실시예 12

(8R,13R)-13-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산의 제조

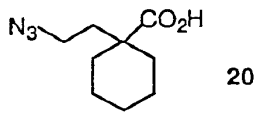


실온에서 DMF 20mL중 실시예 11에서 제조된 (2S,3R)-1-메틸카보닐-3-(4-하이드록시)페닐프롤린(29)(1.37g, 5.5밀리몰) 및 실시예 6에서 제조된 (8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르(2.27g, 5.0밀리몰)의 용액에 HBTU(2.08g, 5.5밀리몰) 및 DIPEA(2.7mL, 15밀리몰)를 첨가하였다. 이 용액을 아르곤하에 1.5시간동안 교반하였다. 염수 30mL로 반응을 급냉시키고, 생성된 혼합물을 에틸 아세테이트 (3×100mL)로 추출하였다. 모아진 유기 층을 0.1N 염화수소, 포화 NaHCO_3 및 염수(각각 2×30mL)로 세척하고 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 용매를 제거한 다음, 생성된 황색 포음을 디클로로메탄-헥산으로부터 재결정시켜 (8R,13R)-13-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르를 담황색 분말(3.01g)로서 수득하였다.

실온에서 무수 디클로로메탄 15mL중 이 에스테르(3.01g)의 용액에 디옥산중 4N HCl(50mL)을 한꺼번에 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 4.5시간동안 교반하여 현탁액을 수득하였다. 이 현탁액을 혼합된 용매(3:7 디클로로메탄:에테르)로 희석시키고 여과하였다. 담황색 여과 케이크를 상기 혼합된 용매(2×20mL), 이어 에테르(2×20mL)로 세척하였다. 진공하에 상기 케이크를 건조시켜 담황색 분말(2.51g, HPLC 순도: >85%)을 수득하였다. RP-HPLC에 의해 최종적으로 정제시켜 (8R,13R)-13-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산을 백색 고체(1.55g, 2.61밀리몰)로서 52% 수율로 수득하였다. HRMS(M+ H) 실측치 593.209, 계산치 593.2103

실시예 13

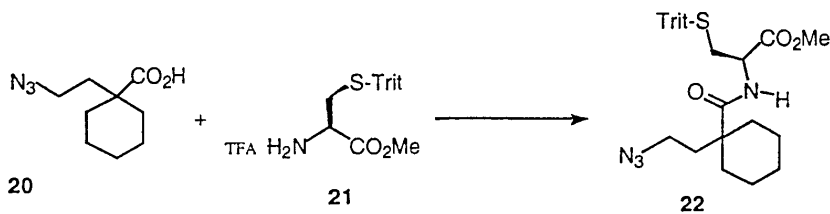
1-(2-아지도에틸)사이클로헥산 카복실산의 제조



실시에 1에 기재된 방법을 이용하고 사이클로헥산 카복실산 에틸 에스테르로부터 출발하여, 1-(2-아지도에틸)사이클로헥산 카복실산을 오일로서 수득하였다. 저해상도 질량 스펙트럼(ES-) m/z 196.1 [$C_9H_{14}N_3O_2$ 에 대한 (M-H) 계산치: 196.1].

실시에 14

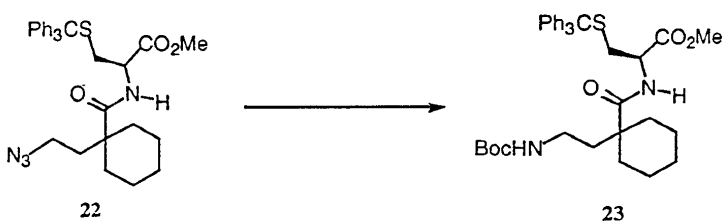
N-[[[1-(2-아지도에틸)사이클로헥산]카보닐]-S-트리페닐메틸-L-시스테인 메틸 에스테르(22)의 제조



DMF(12mL)중 1-(2-아지도에틸)사이클로헥산 카복실산(20)(0.60g, 3.0밀리몰), S-트리페닐메틸-L-시스테인 메틸 에스테르의 TFA 염(1.4g, 3.0밀리몰) 및 디이소프로필에틸아민(0.78g, 6.0밀리몰)의 용액에 HBTU(1.1g, 3.0밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 4시간동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100mL) 및 물(35mL)을 함유하는 분별 깔때기에 반응 혼합물을 부어넣었다. 수성 층을 분리하고 에틸 아세테이트(2×50mL)로 재추출하였다. 모아진 유기 층을 포화 염수로 세척하고 $MgSO_4$ 상에서 건조시킨 다음, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 헥산:에틸 아세테이트(8:1)로 용리시키는 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제함으로써 아지드(22)(1.25g, 74%)를 백색 고체로서 수득하였다. 고해상도 질량 스펙트럼 m/z 579.2396 [(M+Na)⁺; $C_{32}H_{36}N_4O_3SNa$ 에 대한 계산치: 579.2406].

실시에 15

N-[[[1-[2-[[[1,1-디메틸에톡시]카보닐]아미노]-에틸]사이클로헥산]카보닐]-S-트리페닐메틸-L-시스테인 메틸 에스테르(23)의 제조



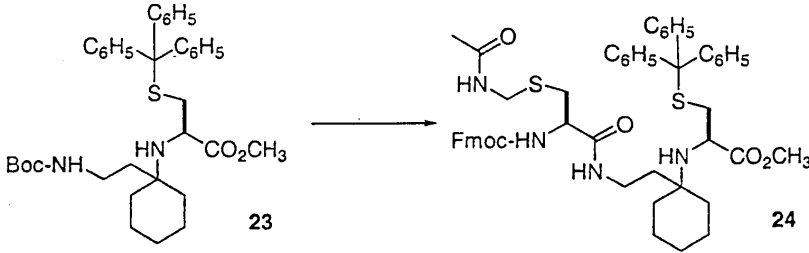
THF(10mL)중 상기 실시에 14에서 수득한 아지드(22)(1.24g, 2.2밀리몰)의 용액에 트리메틸포스핀(2.5mL, THF중 1M, 2.5밀리몰)을 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 30분간 교반하고, 물(0.080g, 4.5밀리몰)을 반응혼합물에 첨가하였다. 2시간동안 교반한 다음, 반응혼합물을 CH_2Cl_2 (70mL)로 희석시키고 Na_2SO_4 상에서 건조시키며 여과한 다음, 진공에서 농축시켰다. 오일을 고진공하에 5시간동안 건조시켰다.

조질 아민을 에틸 아세테이트(10mL)에 용해시키고, 혼합물에 Boc_2O (1.0g, 4.6밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 하룻밤동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(75mL)와 물(25mL)을 함유하는 분별 깔때기에 반응혼합물을 부어넣었다. 수성 층을 분리하고 에틸 아세테이트(1×50mL)로 재추출하였다. 모아진 유기 층을 포화 염수로 세척하고 $MgSO_4$ 상에서 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 헥산-에틸 아세테이트(6:1, 이후 4:1)로 용리시키는 플래쉬 컬럼 크로마토그래피

에 의해 정제하여, N-[[[1-[2-[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-에틸]사이클로헥산]카보닐]-S-트리페닐메틸-L-시스테인 메틸 에스테르(23)(0.88g, 62%)를 수득하였다. 고해상도 질량 스펙트럼 m/z 653.3007 [(M+ Na)⁺; C₃₇H₄₆N₂O₅SNa에 대한 계산치: 653.3025].

실시예 16

2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]아미노]에틸]사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[[[트리페닐메틸]티오]프로판산 메틸 에스테르(24)의 제조

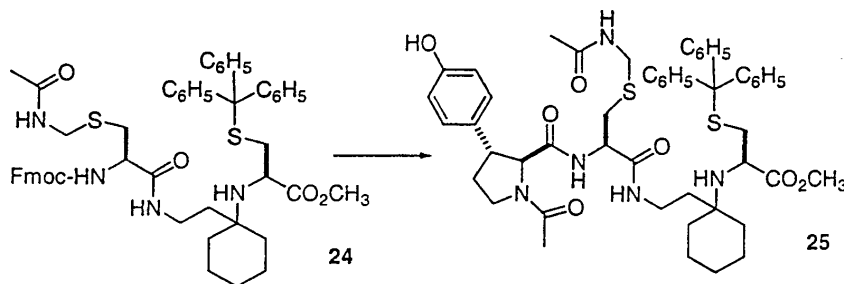


디클로로메탄(10mL)중 실시예 15에서 생성된 에스테르(23)(0.88g, 1.4밀리몰)의 용액에 TFA(5mL)를 첨가하였다. 혼합물을 45분간 교반하고 진공에서 농축시켰다. TFA 염을 고진공하에 2시간동안 건조시켰다.

DMF(10mL)중 조질 TFA 염, Fmoc-Cys(Acm)-OH(575mg, 1.4밀리몰) 및 디이소프로필에틸아민(1mL, 과량)의 용액에 HBTU(595mg, 1.6밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 하룻밤동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(150mL)를 함유하는 분별 깔때기에 반응 혼합물을 부어넣고, 0.3M HCl(2×30mL)로 세척하였다. 수성 층을 모으고 에틸 아세테이트(1×50mL)로 재추출하였다. 모아진 유기 층을 포화 NaHCO₃(1×30mL)로 세척하고 MgSO₄ 상에서 건조시킨 다음, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 헥산-에틸 아세테이트(1:1, 이어 2:3)로 용리시키는 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제함으로써 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]아미노]에틸]사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[[[트리페닐메틸]티오]프로판산 메틸 에스테르(24)(1.05g, 80%)를 수득하였다. HRMS: (C₅₃H₅₈N₄O₇S₂): 실측치, m/z 949.3636 (M+ Na)⁺ 계산치 949.3645.

실시예 17

2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[2(S),3(R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-일]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]-아미노]에틸]-사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[[[트리페닐메틸]티오]프로판산 메틸 에스테르의 제조

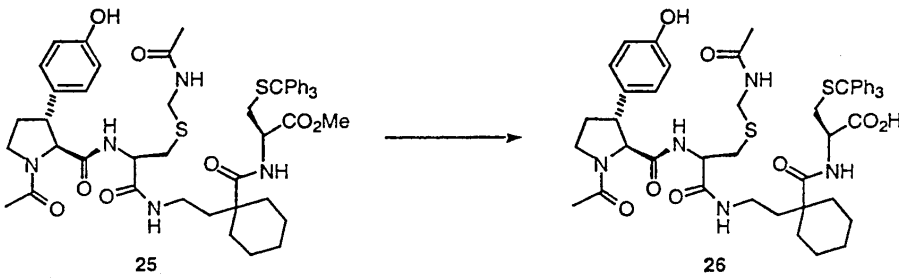


DMF(3mL)중 화합물 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]아미노]에틸]사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[[[트리페닐메틸]티오]프로판산 메틸 에스테르(24)(500mg, 0.54밀리몰)의 용액에 피페리딘(2mL)을 첨가하였다. 혼합물을 1시간동안 교반하고 진공하에 농축시켰다. 잔류물을 고진공에서 하룻밤동안 건조시켰다. 조질의 잔류물을 헥산(3×25mL)으로 세척하고, 고진공하에 45분간 건조시켜 화합물(24)로부터 Fmoc기를 제거함으로써 조질 아민(364mg)을 수득하였다. 이 조질 아민을 아르곤하에 -10℃에서 보관하였다.

DMF(1mL)중 상기 아민(50mg, 0.07밀리몰), (2S,3R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시)페닐피롤리딘(32)(18mg, 0.07밀리몰) 및 디이소프로필에틸아민(0.05mL, 과량)의 용액에 HBTU(30mg, 0.08밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 3.5시간동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(50mL)를 함유하는 분별 깔때기에 반응 혼합물을 부어넣고, 0.5M HCl (2×15mL)로 세척하였다. 수성 층을 모으고 에틸 아세테이트(1×20mL)로 재추출하였다. 모아진 유기 층을 포화 NaHCO₃ (1×15mL)로 세척하고, MgSO₄상에서 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켜, 조질 화합물(25) 50mg을 수득하였다. 이 물질은 정제하기가 곤란하였기 때문에, 메틸 에스테르를 가수분해시킨 다음, 특성을 결정하였다.

실시예 18

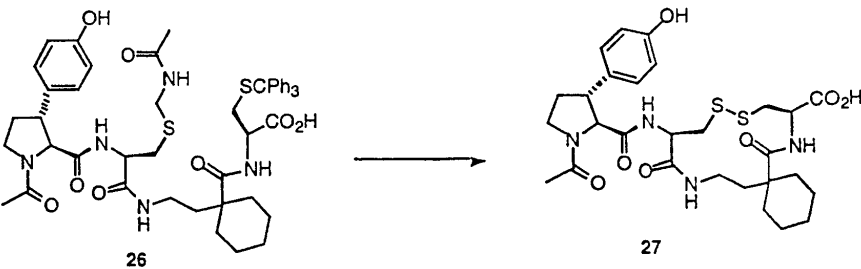
2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[2(S),3(R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시)페닐]피롤리딘-2-일]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]-아미노]에틸]-사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 (26)의 제조



MeOH(0.5mL)중 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[2(S),3(R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시)페닐]피롤리딘-2-일]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]아미노]에틸]-사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 메틸 에스테르(25)(50mg, 조질)의 용액에 물(0.25mL)중 수산화리튬(2.5mg, 0.060밀리몰)의 용액을 첨가하였다. 이 혼합물을 2시간동안 교반하고 반응혼합물을 0.5M HCl(몇방울)로 산성으로(pH 1 내지 2) 만들었다. 에틸 아세테이트(20mL)와 물(5mL)을 함유하는 분별 깔때기에 반응 혼합물을 부어넣었다. 수성 층을 분리하고 에틸 아세테이트 (2×10mL)로 재추출하였다. 모아진 유기 층을 포화 염수로 세척하고 MgSO₄상에서 건조시킨 다음, 여과하고 진공하에 농축시켰다. 25분간에 걸쳐 15% 내지 95%의 아세토니트릴-물 구배를 이용하는 역상 HPLC에 의해 정제함으로써 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[2(S),3(R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시)페닐]피롤리딘-2-일]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]-아미노]에틸]-사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산(26) (42mg)을 수득하였다. 고해상도 질량 스펙트럼 m/z 944.3701 (M+ Na)⁺; C₅₀H₅₉N₅O₈S₂Na에 대한 계산치: 944.3703.

실시예 19

(9R,14R)-14-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시)페닐]-2-(S)-피롤리딘]카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디아-8,16-디아자스피로-[5.12]옥타데칸-9-카복실산의 합성

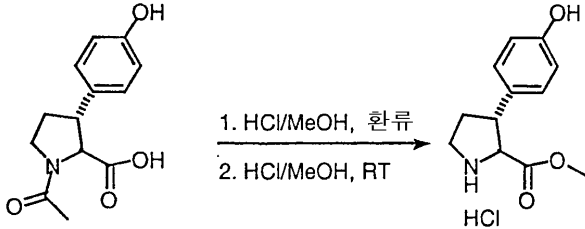


실온에서 CH₂Cl₂/MeOH(100mL, 9:1)중 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[[아세틸아미노]메틸]티오]-2(R)-[[[2(S),3(R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시)페닐]피롤리딘-2-일]카보닐]아미노]-1-옥소프로필]아미노]에틸]사이클로헥실]카보닐]아미노]-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산(26)(40mg, 0.045밀리몰)의 용액에 CH₂Cl₂/MeOH(100mL, 9:1)중 I₂(41mg, 0.16밀리몰)의 용액을 25분간에 걸쳐 첨가하였다. 다 첨가한 다음, 반응혼합물을 5분간 교반하고 Na₂S₂O₅의 포화 용액

(1mL)을 적가하였다. 반응혼합물을 여과하고 진공하에 농축시켰다. 25분간에 걸쳐 15 내지 95% 아세토니트릴-물 구배를 이용하는 역상 HPLC에 의해 정제하여, (9R,14R)-14-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]-카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디티아-8,16-디아자스피로-[5.12]옥타데칸-9-카복실산(6mg, 23%)을 수득하였다. 고해상도 질량 스펙트럼 m/z 607.2255 [(M+H)⁺; C₂₈H₃₉N₄O₇S₂에 대한 계산치: 607.2260].

실시예 20

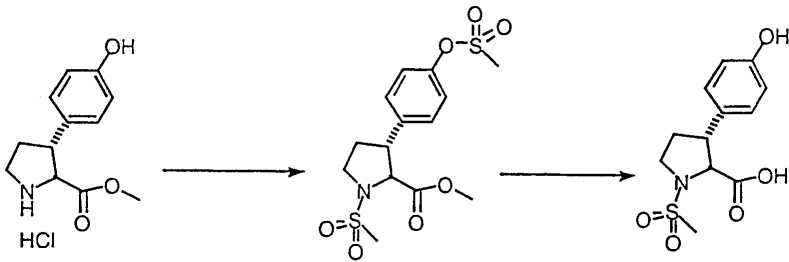
(2S,3R)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르 하이드로클로라이드의 합성



메탄올 50mL중 (2S,3R)-1-아세틸-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 (1.0g)의 용액을 HCl 기체로 포화시켰다. 이 용액을 24시간동안 환류시키고 용매를 증발시켜 갈색 고체를 수득하였다. 이어서, 이 고체를 메탄올중 무수 포화 HCl 20mL에 용해시킨 다음, 생성된 용액을 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, (2S,3R)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르 하이드로클로라이드를 담갈색 고체로서 수득하였다(0.83g).

실시예 21

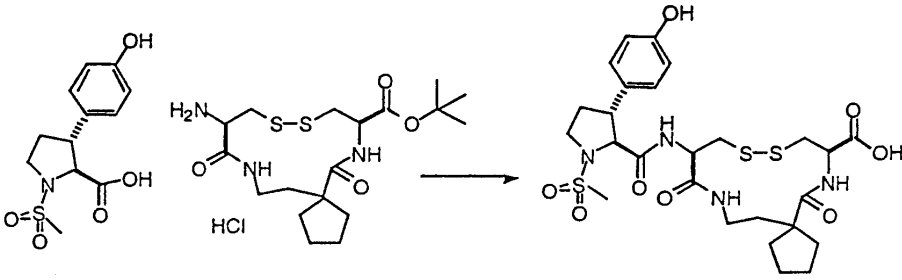
(2S,3R)-1-메탄설포닐-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산의 합성



0°C에서 디클로로메탄(2mL)중 실시예 20에서 제조된 (2S,3R)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르 하이드로클로라이드(100mg, 0.38밀리몰)의 현탁액에 DIPEA(129mg, 1.15밀리몰) 및 메탄 설포닐 클로라이드 (80.2mg, 0.70밀리몰)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 6시간동안 교반하고 에틸 아세테이트(20mL)로 희석시켰다. 용액을 포화 중탄산나트륨(2×5mL) 및 염수(2×5mL)로 세척하고 농축시켰다. 실리카 겔 패드를 통해 잔류물을 여과시켜 무색 오일(89.9mg)을 수득하였다. 이 오일을 MeOH/THF(1mL/1mL)에 용해시키고 생성된 용액을 1N 수산화나트륨(0.5mL, 0.5밀리몰)으로 처리하였다. 용액을 실온에서 4시간동안 교반하고 아세트산으로 산성화시켰다. 역상 HPLC(물중 TFA 0.75%를 함유하는 아세토니트릴 5 내지 95%, 40분간 선형 구배)에 의해 조질 생성물을 정제하여, (2S,3R)-1-메탄설포닐-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산을 백색 고체(22mg, 0.08밀리몰)로서 수득하였다. HRMS (M+H): 실측치 286.0757, 계산치 286.0750.

실시예 22

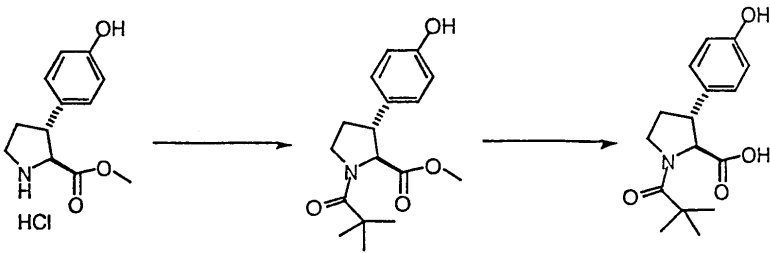
(8R,13R)-13-[[[1-메틸설포닐-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]-헵타데칸-8-카복실산의 합성



DMF 0.2mL중 (2S,3R)-1-메탄설포닐-3-(4-하이드록시페닐)-피롤리딘-2-카복실산(15mg, 0.05밀리몰) 및 실시예 6에서 제조한 (8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 하이드로클로라이드(22.7mg, 0.05밀리몰)의 혼합물에 DIPEA(19.4mg, 0.15밀리몰) 및 HBTU (19mg, 0.05밀리몰)를 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 3시간동안 교반하고 물로 3mL까지 희석시켰다. 생성된 백색 침전물을 수거하고 감압에서 하룻밤동안 건조시켜 백색 고체 40mg을 수득하였다. 이 건조된 고체를 디클로로메탄 1mL에 용해시키고 용액을 디옥산중 4N HCl(2mL)로 처리하였다. 이 용액을 하룻밤동안 교반하고 농축시켰다. 역상 HPLC(40분간에 걸쳐 물중 TFA 0.75%를 함유하는 아세토니트릴 5 내지 95%의 선형 구배)에 의해 잔류물을 정제시킴으로써, (8R,13R)-13-[[[1-메틸설포닐-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]-헵타데칸-8-카복실산을 백색 고체(17.3mg)로서 수득하였다. HRMS (M+ H): 실측치 629.1767, 계산치 629.1773.

실시예 23

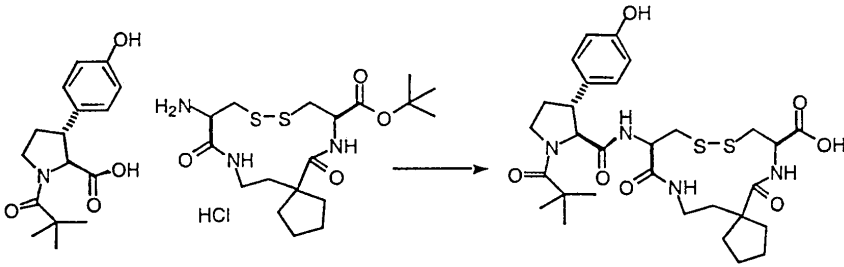
(2S,3R)-1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(4-하이드록시페닐)-피롤리딘-2-카복실산의 합성



THF/H₂O(2mL/1mL)중 실시예 20에서 제조한 (2S,3R)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르 하이드로클로라이드(200mg, 0.76밀리몰)의 용액에 포화 NaHCO₃(5mL)를 첨가하였다. 상기 혼합물에 트리메틸아세틸 클로라이드 (420mg, 3.5밀리몰)를 20분간에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 4시간동안 교반하고 에틸 아세테이트로 30mL까지 희석시켰다. 이어, 유기 층을 염수(2×5mL)로 세척하고 농축시켜, (2S,3R)-1-(1-옥소-2,2,2-트리메틸에틸)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르를 백색 고체(320mg)로서 수득하였다. 이 고체를 EtOH 3mL에 용해시키고 실온에서 8시간동안 1N 수산화나트륨(3mL, 3밀리몰)과 함께 교반하였다. 6N HCl로 산성화시킨 다음, 용매를 제거하고 잔류물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 농축시킨 다음, 잔류물을 에테르로 세척하여, (2S,3R)-1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산을 백색 고체(117mg)로서 수득하였다. HRMS (M+ H): 실측치 292.1556, 계산치 292.1549.

실시예 24

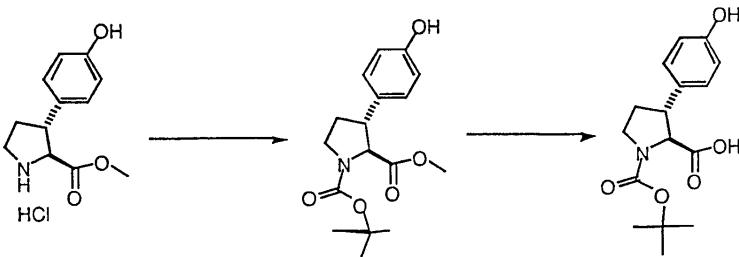
(8R,13R)-13-[[[1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산의 합성



DMF 0.5mL중 (2S,3R)-1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산(45mg, 0.15밀리몰) 및 실시예 6에서 제조한 (8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 하이드로클로라이드(70mg, 0.15밀리몰)의 혼합물에 DIPEA(58mg, 0.45밀리몰) 및 HBTU(59mg, 0.15밀리몰)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 3시간동안 교반하고 물로 3mL까지 희석시켰다. 생성된 백색 침전물을 수거하고 감압에서 하룻밤동안 건조시켜 (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리딘]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 98mg을 백색 고체로서 수득하였다. 이 건조된 고체를 디클로로메탄 1mL에 용해시키고 용액을 디옥산중 4N HCl(2mL)로 처리하였다. 이 용액을 하룻밤동안 교반하고 농축시켰다. 역상 HPLC(40분간에 걸쳐 물중 TFA 0.75%를 함유하는 아세트오니트릴 5 내지 95%의 선형 구배)에 의해 잔류물을 정제함으로써 (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리딘]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산을 백색 고체(9mg)로서 수득하였다. HRMS (M+ H): 실측치 635.2543, 계산치 635.2573.

실시예 25

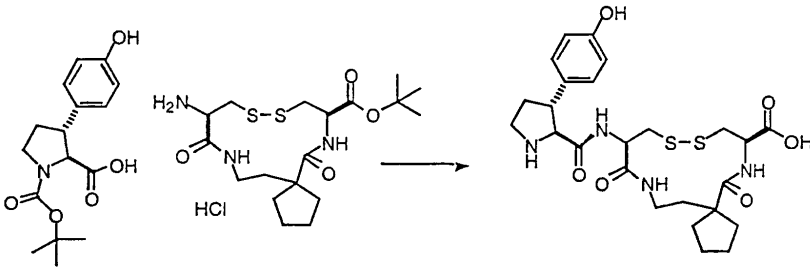
(2S,3R)-1-[(1,1-디메틸에톡실)카보닐]-3-(4-하이드록시페닐)-피롤리딘-2-카복실산의 합성



20°C에서 THF(2mL)중 실시예 20에서 제조한 (2S,3R)-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르 하이드로클로라이드(100mg, 0.38밀리몰)의 현탁액에 DIPEA(65mg, 0.5밀리몰) 및 Boc₂O(218mg, 1밀리몰)를 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 16시간동안 교반하고 에틸 아세테이트(20mL)로 희석시켰다. 이 용액을 포화 중탄산나트륨(2×5mL) 및 염수(2×5mL)로 세척하고 농축시켰다. 실리카 겔을 통해 잔류물을 여과하여 (2S,3R)-1-[(1,1-디메틸에톡실)카보닐]-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산 메틸 에스테르를 무색 오일(113mg)로서 수득하였다. 이 오일을 MeOH/THF(2mL/1mL)에 용해시키고, 생성된 용액을 1N 수산화나트륨(0.7mL, 0.7밀리몰)으로 처리하였다. 이 용액을 실온에서 4시간동안 교반하고 아세트산으로 산성화시켰다. 역상 HPLC(40분간에 걸쳐 물중 TFA 0.75%를 함유하는 아세트오니트릴 5 내지 95%의 선형 구배)에 의해 조절 생성물을 정제하여, (2S,3R)-1-[(1,1-디메틸에톡실)카보닐]-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산을 백색 고체(70mg, 0.22밀리몰)로서 수득하였다. HRMS (M+ H): 실측치 308.1511, 계산치 308.1498.

실시예 26

(8R,13R)-13-[[[3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리딘]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산의 합성



DMF 0.5mL중 (2S,3R)-1-[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]-3-(4-하이드록시페닐)피롤리딘-2-카복실산(46mg, 0.15밀리몰) 및 실시예 6에서 제조한 (8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 하이드로클로라이드(70mg, 0.15밀리몰)의 혼합물에 DIPEA(58mg, 0.45밀리몰) 및 HBTU(59mg, 0.15밀리몰)를 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 3시간동안 교반하고 물로 3mL까지 희석시켰다. 생성된 백색 침전물을 수거하고 감압에서 하룻밤동안 건조시켜, (8R,13R)-13-[[[3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르 105mg을 백색 고체로서 수득하였다. 이 건조된 고체(85mg)를 디클로로메탄 2mL에 용해시키고 용액을 디옥산중 4N HCl(2mL)로 처리하였다. 이 용액을 하룻밤동안 교반하고 용매를 제거하였다. 역상 HPLC(40분간에 걸쳐 물중 TFA 0.75%를 함유하는 아세토니트릴 5 내지 95%의 선형 구배)에 의해 잔류물을 정제함으로써, (8R,13R)-13-[[[3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산을 백색 고체(58mg)로서 수득하였다. HRMS (M+H): 실험치 551.2017, 계산치 551.1998.

실시예 27

VLA-4/VCAM-1 스크리닝 분석

부동화된 VCAM-1에 대한 결합을 경합하는 능력으로서 정의되는 VLA-4 길항 활성을 고상 이중항체 ELISA를 이용하여 정량화하였다. 항-인테그린 β1 항체:HRP-컨쥬게이트된 항-마우스 IgG:색원체 기질(K-Blue)의 복합체에 의해 VCAM-1에 결합된 VLA-4(α4β1 인테그린)를 검출한다. 먼저, 재조합 인간 VCAM-1(100μl PBS중 0.4μg)으로 96개 웰이 있는 플레이트(Nunc Maxisorp)를 피복하고, 각 플레이트를 밀봉한 다음, 플레이트를 4℃에서 18시간동안 정치시켰다. 이어, VCAM-피복된 플레이트를 1% BSA/0.02% NaN₃로 블록킹하여 비특이적 결합을 감소시켰다. 분석하는 날, 모든 플레이트를 VCAM 분석 완충액(50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM MnCl₂, 0.05% Tween 20 200μl/웰; pH 7.4)으로 2회 세척한다. 시험 화합물을 100% DMSO에 용해시킨 다음, 1mg/mL BSA로 보충된 VCAM 분석 완충액중에 1:20으로 희석시킨다(즉, 최종 DMSO=5%). 1:4 희석을 계속 수행하여 각 시험 화합물에 대해 0.005nM 내지 1.563μM의 농도를 달성하였다. VCAM-피복된 플레이트에 각 희석액을 웰당 100μl씩 넣은 다음, Ramos 세포-유도된 VLA-4 10μl를 넣는다. 이들 플레이트를 연속적으로 플랫폼 셰이커(platform shaker)에서 1분간 혼합하고 37℃에서 2시간동안 배양한 다음, 200μl/웰의 VCAM 분석 완충액으로 4회 세척한다. 마우스 항-인간 인테그린 b1 항체 100μl를 각 웰(VCAM 분석 완충액 + 1mg/mL BSA중 0.6μg/mL)에 첨가하고, 37℃에서 1시간동안 배양한다. 이 배양 기간이 끝난 후, 모든 플레이트를 VCAM 분석 완충액(200μl/웰)으로 4회 세척한다. 반응하는 제 2 항체인 HRP-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG(100μl/웰, VCAM 분석 완충액 + 1mg/mL BSA중 1:800 희석)를 각 웰에 첨가한 다음, 실온에서 1시간동안 배양하고 VCAM 분석 완충액으로 3회 세척(200μl/웰)함으로써 배양을 끝낸다. 각 웰당 100μl의 K-Blue를 첨가함으로써(15분 배양, 실온) 색을 전개시키기 시작하고, 웰당 100μl의 Red 중지 완충액(Red Stop Buffer)을 첨가함으로써 종결시킨다. 모든 플레이트를 650nm에서 UV/Vis 분광광도계에서 판독한다. 결과를 전체 결합(즉, 시험 화합물의 부재하에 VLA-4 + VCAM-1)에 대한 억제%로서 계산한다.

실시예 28

Ramos(VLA-4)/VCAM-1 세포계 스크리닝 분석 프로토콜

재료:

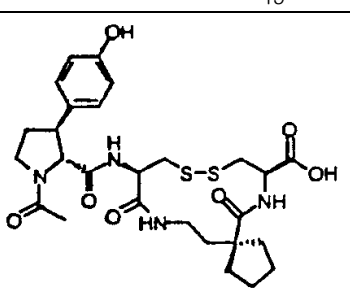
면역친화력 크로마토그래피에 의해 가용성 재조합 인간 VCAM-1(5-Ig 도메인과 7-Ig 도메인의 혼합물)을 CHO 세포 배양 매질로부터 정제하고, 0.1M Tris-글리신(pH 7.5), 0.1M NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 0.02% NaN₃ 및 10μg/mL 류벡틴을 함유하는 용액중에 유지시켰다. 분자칼라 프로브즈 인코포레이티드(Molecular Probes Inc.)로부터 칼세인-AM (Calcein-AM)을 구입하였다.

방법:

Ramos-VCAM-1 세포 유착 분석을 이용하여, 부동화된 VCAM-1에 결합하는데 있어서 세포-표면 VLA-4와 결합하는 능력으로서 정의되는 VLA-4(a4b1 인테그린) 길항 활성을 정량화하였다. 세포-표면 VLA-4를 갖는 Ramos 세포를 형광 염료(칼세인-AM)로 라벨링하고 시험 화합물의 존재 또는 부재하에 VCAM-1과 결합하도록 두었다. 유착성 세포에 수반되는 형광강도의 감소(% 억제)는 시험 화합물에 의해 VLA-4 매개되는 세포 유착이 경쟁적으로 억제됨을 반영하였다.

먼저, 96개 웰이 있는 플레이트(Nunc Maxisorp)를 재조합 인간 VCAM-1(100μl PBS중 100ng)으로 피복하고, 각 플레이트를 밀봉한 다음, 플레이트를 4°C에서 18시간동안 정치시켰다. 이어 VCAM-피복된 플레이트를 PBS중 0.05% Tween-20으로 2회 세척하고, 블록킹 완충액(1% BSA/0.02% 티메로살) 200μl로 1시간동안(실온) 블록킹시켜 비특이적 결합을 감소시켰다. 블록킹 완충액을 사용하여 배양한 다음, 플레이트를 뒤집어서 블롯팅한 다음, 잔류하는 완충액을 흡출해내었다. 각 플레이트를 PBS 300μl로 세척하고 뒤집은 다음, 잔류하는 PBS를 흡출해내었다.

시험 화합물을 100% DMSO에 용해시킨 다음, VCAM 세포 유착 분석 완충액(4mM CaCl₂, 50mM TRIS-HCl중 4mM MgCl₂, pH 7.5)중에서 1:25로 희석시켰다(최종 DMSO = 4%). 각 시험 화합물에 대해 1:4 희석을 8회 수행하였다(통상적인 농도: 1nM 내지 12,500nM). 각 희석액 100μl/웰을 VCAM-피복된 플레이트에 첨가한 다음, Ramos 세포 100μl(1% BSA/PBS중 200,000세포/웰)를 첨가하였다. 시험 화합물 및 Ramos 세포를 함유하는 플레이트를 실온에서 45분간 배양한 다음, PBS 165μl/웰을 첨가하였다. 플레이트를 뒤집어 비유착성 세포를 제거하고 블롯팅시킨 후, PBS 300μl/웰을 첨가하였다. 플레이트를 다시 뒤집고 블롯팅한 다음, 잔류하는 완충액을 온화하게 흡출시켰다. Lysis 완충액(50mM TRIS-HCl중 0.1% SDS, pH 8.5) 100μl를 각 웰에 첨가하고 회전 웨이킹 플랫폼에서 2분간 진탕시켰다. 이어, Cytofluor 2300 (밀리포어(Millipore)) 형광 측정 시스템(여기=485nm, 방출=530nm)에서 플레이트를 형광 강도에 대해 판독하였다.

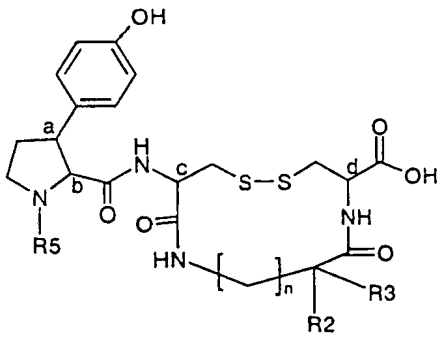
하기 실시예로부터의 화합물	Elisa 분석 IC ₅₀ nM	Ramos 세포 분석 IC ₅₀ nM
TBC772	227	1,800
12	0.185	0.21
24	0.14	0.18
26	0.19	0.15
22	0.17	0.32
19	0.12	0.28
	1.65	24

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 가수분해성 에스테르 또는 에테르, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

화학식 I



상기 식에서,

R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 C_{1-7} 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하며,

R_5 는 수소, C_{1-7} 알킬, $R-SO_2-$, $R_6-(CH_2)_m-CO-$ 또는 $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$ 이고,

R 은 C_{1-7} 알킬이고,

R_6 및 R_8 은 수소 또는 C_{1-7} 알킬이고,

X 는 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이며,

m 은 1 내지 7의 정수이고,

y 는 0 내지 7의 정수이며,

n 은 1 내지 3의 정수이고,

a , b , c 및 d 는 비대칭 탄소원자를 나타낸다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

R_2 및 R_3 이 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 사이클로알칸 고리를 형성하는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3.

제 2 항에 있어서,

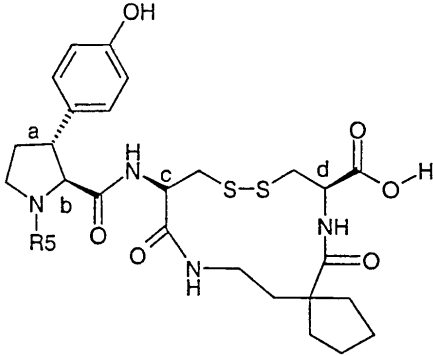
R_2 및 R_3 이 이들이 부착된 탄소원자와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

하기 화학식 a의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

화학식 a



청구항 5.

제 4 항에 있어서,

(8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6.

제 4 항에 있어서,

R₅가 R₆-(CH₂)_m-CO-인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 7.

제 6 항에 있어서,

(8R,13R)-13-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8.

제 6 항에 있어서,

(8R,13R)-13-[[[1-(2,2-디메틸-1-옥소프로필)-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]-카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 9.

제 4 항에 있어서,

R_5 가 $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$ 인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 10.

제 9 항에 있어서,

X가 산소인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 11.

제 4 항에 있어서,

R_5 가 수소인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 12.

제 11 항에 있어서,

(8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 13.

제 4 항에 있어서,

R_5 가 $R-SO_2-$ 인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 14.

제 4 항에 있어서,

R_5 가 C_{1-7} 알킬인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 15.

제 13 항에 있어서,

(8R,13R)-13-[[[1-메틸설포닐-3(R)-(4-하이드록시페닐)-2(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 16.

제 2 항에 있어서,

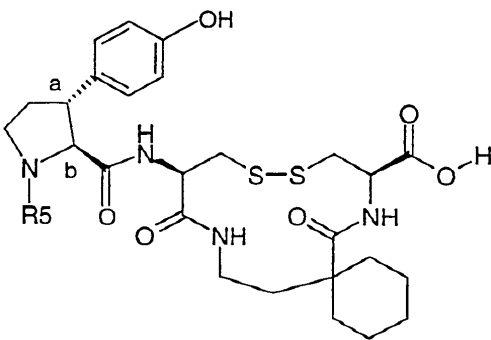
R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소원자와 함께 사이클로헥산 고리를 형성하는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 17.

제 16 항에 있어서,

하기 화학식 b의 화합물.

화학식 b



청구항 18.

제 17 항에 있어서,

(9R,14R)-14-[[[3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디티아-8,16-디아자스피로[5.12]옥타데칸-9-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 19.

제 17 항에 있어서,

R₅가 R₆-(CH₂)_m-CO-인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 20.

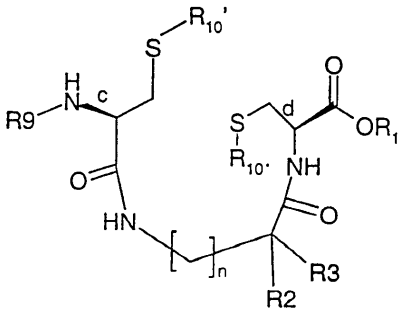
제 19 항에 있어서,

(9R,14R)-14-[[[1-아세틸-3-(R)-(4-하이드록시페닐)-2-(S)-피롤리디닐]카보닐]아미노]-7,15-디옥소-11,12-디티아-8,16-디아자스피로[5.12]옥타데칸-9-카복실산인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 21.

하기 화학식 A의 화합물:

화학식 A



상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 C₁₋₇ 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하고,

R₉는 아미노 보호기이고,

R₁₀ 및 R_{10'}은 티오 보호기이고,

n은 1 내지 3의 정수이다.

청구항 22.

제 21 항에 있어서,

R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소원자와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 화합물.

청구항 23.

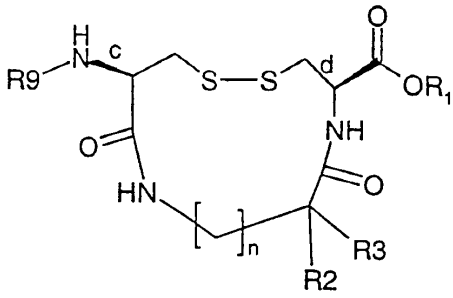
제 22 항에 있어서,

2(R)-[[[1-[[2(R)-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-1-옥소-3-[(트리페닐메틸)티오]프로필]아미노]에틸]사이클로펜틸]카보닐]아미노-3-[(트리페닐메틸)티오]프로판산 1,1-디메틸에틸 에스테르인 화합물.

청구항 24.

하기 화학식 B의 화합물:

화학식 B



상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 C₁₋₇ 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하고,

R₉는 아미노 보호기이고,

n은 1 내지 3의 정수이다.

청구항 25.

제 24 항에 있어서,

R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소원자와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 화합물.

청구항 26.

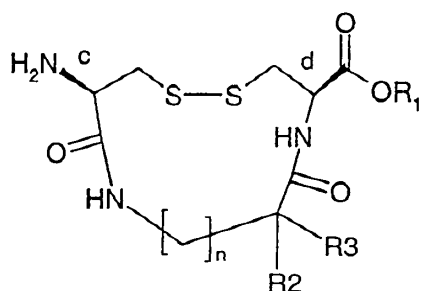
제 25 항에 있어서,

(8R,13R)-13-[[[(1,1-디메틸에톡시)카보닐]아미노]-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르인 화합물.

청구항 27.

하기 화학식 C의 화합물 또는 그의 가수분해성 에스테르 또는 에테르:

화학식 C



상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 C₁₋₇ 알킬이거나, 또는 이들이 부착된 탄소원자와 함께 4 내지 6개의 탄소원자를 함유하는 지방족 탄소환상 고리를 형성하고,

n은 1 내지 3의 정수이다.

청구항 28.

제 27 항에 있어서,

R₂ 및 R₃이 이들이 부착된 탄소원자와 함께 사이클로펜탄 고리를 형성하는 화합물.

청구항 29.

제 28 항에 있어서,

(8R,13R)-13-아미노-6,14-디옥소-10,11-디티아-7,15-디아자스피로[4.12]헵타데칸-8-카복실산 1,1-디메틸에틸 에스테르인 화합물.

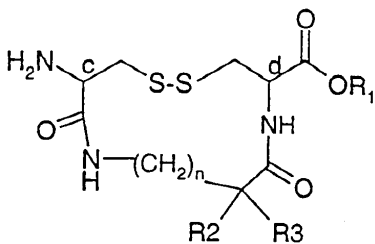
청구항 30.

염증성 질환, 특히 인테그린이 세포 유착 분자에 바람직하지 못하게 결합함으로써 매개되는 염증성 질환, 예컨대 천식을 치료하기 위한 약학적 효과량의 제 1 항 내지 제 20 항중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 및 필요한 경우 약학적 불활성 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 31.

하기 화학식 13의 환상 코어 화합물을 하기 화학식 19의 화합물과 반응시킴을 특징으로 하는, 제 1 항에 따른 화합물의 제조방법:

화학식 13

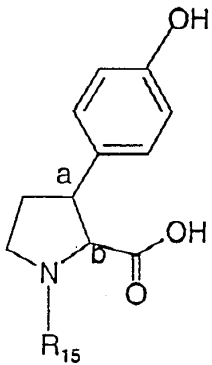


[상기 식에서,

R₁은 그가 부착된 산소와 함께 가수분해성 에스테르기를 형성하고,

R_2 , R_3 , n , c 및 d 는 제 1 항에서 정의된 바와 같다]

화학식 19



[상기 식에서,

R_{15} 는 C_{1-7} 알킬, $R-SO_2-$, $R_6-(CH_2)_m-CO-$ 또는 $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$ 이고,

R , R_6 , R_8 , X , m , y , a 및 b 는 제 1 항에서 정의된 바와 같다].

청구항 32.

제 1 항 내지 제 20 항중 어느 한 항에 있어서,

제 31 항의 방법에 의해 제조된 화합물.

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제