



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년01월15일
(11) 등록번호 10-1222736
(24) 등록일자 2013년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/14 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7000186
(22) 출원일자(국제) 2005년07월04일
심사청구일자 2010년07월05일
(85) 번역문제출일자 2007년01월04일
(65) 공개번호 10-2007-0041495
(43) 공개일자 2007년04월18일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2005/001092
(87) 국제공개번호 WO 2006/004532
국제공개일자 2006년01월12일
(30) 우선권주장
0401762-0 2004년07월05일 스웨덴(SE)
(56) 선행기술조사문헌
WO2002074767 A1
전체 청구항 수 : 총 12 항

(73) 특허권자
아스트라제네카 아베
스웨덴 에스이-151 85 쇠터탈제
(72) 발명자
가보스, 발린트
스웨덴 에스-221 87 룬드 아스트라제네카 알 앤
디 룬드
리파, 레나
스웨덴 에스-221 87 룬드 아스트라제네카 알 앤
디 룬드
스텐발, 크리스티나
스웨덴 에스-221 87 룬드 아스트라제네카 알 앤
디 룬드
(74) 대리인
김영, 장수길

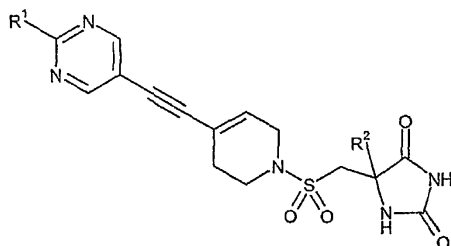
심사관 : 김용

(54) 발명의 명칭 폐쇄성 기도 질환의 치료를 위한 신규 히단토인 유도체

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 I의 화합물, 그의 제조 방법, 상기 화합물을 함유하는 제약 조성물, 이 제약 조성물의 제조 방법, 및 요법에서 상기 화합물 및 조성물의 용도를 제공한다.

<화학식 I>



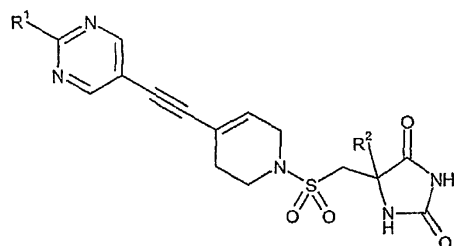
상기 식에서, R¹ 및 R²는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

<화학식 I>



상기 식에서,

R^1 은 C1-2 알킬, 시클로프로필, OCH_3 , SCH_3 또는 OCF_3 을 나타내며; 상기 알킬기 또는 시클로프로필기는 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환되고;

R^2 는 C1-3 알킬을 나타낸다.

청구항 2

제1항에 있어서, R^1 이 C1-2 알킬 또는 시클로프로필을 나타내며, 상기 알킬기 또는 시클로프로필기가 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환되는 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서, R^1 이 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된 C1-2 알킬을 나타내는 화합물.

청구항 4

제3항에 있어서, R^1 이 CF_3 을 나타내는 화합물.

청구항 5

제2항에 있어서, R^1 이 시클로프로필을 나타내는 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 메틸 또는 에틸을 나타내는 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, R^2 가 메틸을 나타내는 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서,

(5S)-5-({[4-[(2-시클로프로필피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온;

(5S)-5-메틸-5-({[4-([2-(메틸티오)피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온;

(5S)-5-메틸-5-({[4-({[2-(트리플루오로메틸)피리미딘-5-일]에티닐}-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온;

(5S)-5-메틸-5-({[4-[(2-메틸피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온;

(5S)-5-({[4-[(2-에틸피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온;

(5S)-5-({[4-[(2-메톡시피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온; 및 이들의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항 내지 제5항 및 제8항 중 어느 한 항에 기재된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제5항 및 제8항 중 어느 한 항에 기재된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물의 제조 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항 내지 제5항 및 제8항 중 어느 한 항에 기재된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 폐쇄성 기도 질환의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 폐쇄성 기도 질환이 천식 또는 만성 폐쇄성 폐 질환인 제약 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

제8항에 있어서, (5S)-5-({[4-[(2-시클로프로필피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온 또는 그의 제약상 허용되는 염인 화합물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규 히단토인 유도체, 그의 제조 방법, 상기 유도체를 함유하는 제약 조성물, 및 요법에서 상기 유도체 및 제약 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0002] 메탈로프로테이나제는 그 수가 최근에 급격하게 증가한 프로테이나제 (효소)의 슈퍼패밀리이다. 구조 및 기능적 고려에 기초하여, 상기 효소는 문헌 [N. M. Hooper (1994) FEBS Letters 354: 1-6]에 기재된 바와 같은 패밀리 및 서브패밀리로 분류되어 왔다. 메탈로프로테이나제의 예로는 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP), 예를 들어 콜라게나제 (MMP1, MMP8, MMP13), 젤라티나제 (MMP2, MMP9), 스트로멜리신 (MMP3, MMP10, MMP11), 매트릴리신 (MMP7), 메탈로엘라스타제 (MMP12), 에나멜리신 (MMP19), MT-MMP (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17); TNF 전

환 효소 (ADAM10 및 TACE)와 같은 세크레타제 및 쉐다제(sheddase)를 포함하는 MDC 패밀리를 포함하는 아다말리신; 프로콜라겐 프로세싱 프로테이나제 (PCP)와 같은 효소를 포함하는 아스타신 패밀리를 포함하는 아스타신; 및 다른 메탈로프로테이나제, 예를 들면 아그레카나제, 엔도텔린 전환 효소 패밀리를 포함하는 엔도텔린 전환 효소 패밀리를 포함하는 엔도텔린 전환 효소 패밀리를 들 수 있다.

[0003] 메탈로프로테이나제는 배아 발달, 뼈 형성 및 월경 동안의 자궁 리모델링과 같은 조직 리모델링에 관련된 과도한 생리학적 질환 과정에서 중요한 것으로 여겨진다. 이는 메탈로프로테이나제가 콜라겐, 프로테오글리칸 및 피브로넥틴과 같은 광범위한 매트릭스 기질을 절단하는 능력에 기초한다. 메탈로프로테이나제는 또한 종양 피사 인자 (TNF)와 같은 생물학적으로 중요한 세포 매개자의 프로세싱 또는 분비; 및 저친화도 IgE 수용체 CD23 (보다 완전한 목록은 문헌 [N. M. Hooper et al., (1997) Biochem J. 321: 265-279] 참고)과 같은 생물학적으로 중요한 막 단백질의 번역후 단백질분해 프로세싱 또는 쉐딩 (shedding)에 중요한 것으로 여겨진다.

[0004] 메탈로프로테이나제는 많은 질환 또는 증상과 관련되어 왔다. 하나 이상의 메탈로프로테이나제 활성의 억제는 상기 질환 또는 증상, 예를 들어 다양한 염증성 및 알레르기성 질환, 예를 들어 관절염 (특히, 류마티스성 관절염, 골관절염 및 통풍), 위장관 염증 (특히, 염증성 장 질환, 궤양성 결장염 및 위염), 피부염 (특히, 건선, 습진 및 피부부염); 종양 전이 또는 침입; 세포외 매트릭스의 비제어된 분해와 관련된 질환, 예를 들어 골관절염; 골 흡수성 질환 (예를 들어 골다공증 및 파제트병); 이상 혈관신생과 관련된 질환; 당뇨병, 치주 질환 (예를 들어 치은염), 각막 궤양형성, 피부 궤양형성, 수술후 증상 (예를 들어 결장 연결) 및 피부 창상 치유와 관련된 증가된 콜라겐 리모델링; 중추 및 말초 신경계의 수초제거 질환 (예를 들어 다발성 경화증); 알츠하이머병; 및 재발협착증 및 죽상경화증과 같은 심혈관 질환에서 관찰되는 세포외 매트릭스 리모델링; 천식; 비염; 및 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)에 유익할 수 있다.

[0005] 대식세포 엘라스타제 또는 메탈로엘라스타제로도 알려져 있는 MMP12는 샤피로(Shapiro) 등에 의해 마우스에서 최초로 클로닝되었으며 [1992, Journal of Biological Chemistry 267: 4664], 1995년에 동일한 군에 의해 인간에서 클로닝되었다. MMP12는 활성화된 대식세포에서 차별적으로 발현되며, 흡연자의 폐포 대식세포로부터 분비될 뿐만 아니라 [Shapiro et al, 1993, Journal of Biological Chemistry, 268: 23824] 죽상경화증 병소 내 포말 세포에서 분비되는 것으로 나타났다 [Matsumoto et al, 1998, Am. J. Pathol. 153: 109]. COPD의 마우스 모델은 6개월에 걸쳐 한 주에 6일 동안 하루에 담배 2개를 흡연하도록 한 마우스를 검사하는 것을 기초로 한다. 야생형 마우스는 이러한 처리 후에 폐기종이 발병되었다. MMP12 녹아웃 마우스를 상기 모델에서 시험하는 경우, 이들 마우스에서는 유의한 기종이 발병되지 않았으며, 이는 MMP12가 COPD 병리학에서 주요 효소임을 강하게 암시한다. COPD (기종 및 기관지염)에서 MMP12와 같은 MMP의 역할은 문헌 [Anderson and Shinagawa, 1999, Current Opinion in Anti-inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs 1(1):29-38]에 논의되어 있다. 최근, 흡연은 인간 경동맥 플라크 칸가바리(Kangavari)에서 대식세포 침윤 및 대식세포-유래 MMP-12 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 [Matetzky S, Fishbein MC et al., Circulation 102:(18), 36-39 Suppl. S, Oct 31, 2000].

[0006] MMP9 (젤라티나제 B; 92kDa 타입 IV 콜라게나제; 92kDa 젤라티나제)는 1989년에 최초로 정제된 후 클로닝 및 서열결정된 분비된 단백질이다 [S.M. Wilhelm et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (29): 17213-17221; published erratum in J. Biol. Chem. (1990) 265 (36): 22570]. MMP9에 대한 최근의 검토는 상기 프로테아제에 대한 상세한 정보 및 참고문헌에 대한 우수한 공급원을 제공한다 [T.H. Vu & Z. Werb (1998) (In: Matrix Metalloproteinases, 1998, edited by W.C. Parks & R.P. Mecham, pp. 115-148, Academic Press. ISBN 0-12-545090-7)]. 문헌 [T.H. Vu & Z. Werb (1998)]에 의하면 상기 검토로부터 다음과 같은 점들이 도출된다.

[0007] MMP9의 발현은 통상적으로 영양막, 호중구 및 대식세포를 비롯한 몇몇 세포 유형에 국한된다. 그러나, 발현은 세포의 성장 인자 또는 사이토킨에 대한 노출을 비롯한 여러 매개자에 의해 상이한 동일한 세포 및 다른 세포 유형에서 유도될 수 있다. 이들은 흔히 염증 반응을 개시하는데 있어서 관련하는 것과 동일한 매개자이다. 다른 분비된 MMP와 같이, MMP9는 비활성 프로-효소로서 방출된 다음, 절단되어 효소적으로 활성인 효소를 형성한다. 생체내에서 이러한 활성화에 필요한 프로테아제는 알려져 있지 않다. 활성 MMP9 대 비활성 효소의 균형은 자연 발생적인 단백질인 TIMP-1 (메탈로프로테이나제-1의 조직 억제제)과의 상호작용에 의해 생체내에서 추가로 조절된다. TIMP-1은 MMP9의 C-말단 영역에 결합하여 MMP9의 촉매 도메인을 억제한다. 프로MMP9의 유도된 발현, 프로 형태에서 활성 MMP9로의 절단 및 TIMP-1의 존재의 균형이 복합적으로 작용하여 국소 부위에 존재하는 촉매적으로 활성인 MMP9의 양을 결정한다. 단백질분해로 활성이 되는 MMP9는 젤라틴, 엘라스틴 및 천연 유형 IV 및 유형 V 콜라겐을 포함하는 기질을 공격하며, 천연 유형 I 콜라겐, 프로테오글리칸 또는 라미닌에 대해

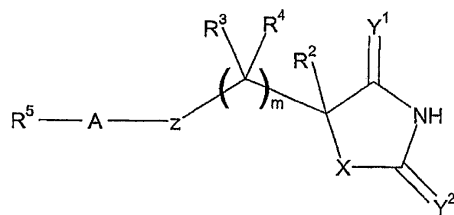
서는 활성을 갖지 않는다.

[0008] 다양한 생리학적 및 병리학적 과정에서 MMP9에 대한 역할을 암시하는 자료가 증가하고 있다. 생리학적 역할로는 배아 이식의 초기 단계에서 자궁 상피를 통한 배아 영양막의 침입; 뼈의 성장 및 발달에서의 몇몇 역할; 및 혈관계로부터 조직으로 염증 세포의 이동을 들 수 있다.

[0009] 효소 면역검정을 이용하여 측정된 MMP9 방출은 치료받지 않은 천식환자들로부터의 체액 및 AM 상등액에서 다른 집단의 것들에 비해 상당히 증가되었다 [Am. J. Resp. Cell & Mol. Biol., Nov 1997, 17 (5):583-591]. 또한, 증가된 MMP9 발현은 다른 특정 병리학적 증상에서 관찰되며, 이에 따라 COPD, 관절염, 종양 전이, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 및 죽상경화증에서의 플라크 파열 (심근경색과 같은 급성 관상동맥 증상을 초래함)과 같은 질환 과정에 MMP9를 관여시킨다.

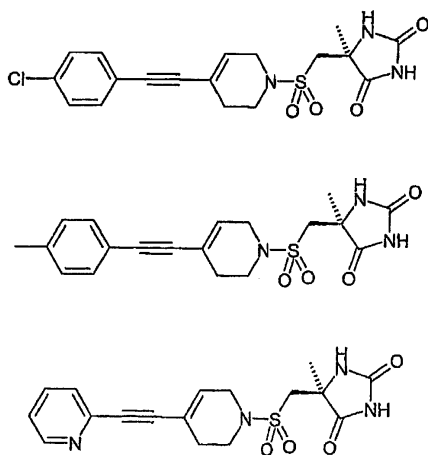
[0010] 다수의 메탈로프로테이나제 억제제가 공지되어 있다 (예를 들어, MMP 억제제에 대한 검토를 위해서는 문헌 [Beckett R.P. and Whittaker M., 1998, Exp. Opin. Ther. Patents, 8(3):259-282] 및 문헌 [Whittaker M. et al, 1999, Chemical Reviews 99(9):2735-2776]을 참조한다).

[0011] WO 02/074767은 MMP 억제제, 특히 강력한 MMP12 억제제로서 유용한 하기 화학식의 히단토인 유도체를 개시한다.



[0012] 이하의 세 가지 화합물은 WO 02/074767에 구체적으로 개시되어 있다.

[0013]

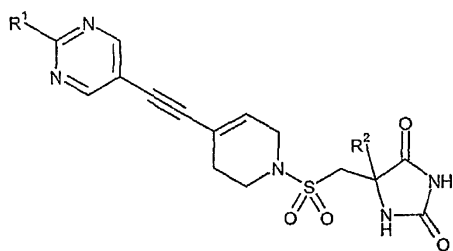


[0014]

[0015] 본 발명에 이르러, 메탈로프로테이나제 억제제이며 MMP12 및 MMP9와 같은 MMP를 억제하는데 있어서 특히 관심의 대상이 되는 일군의 화합물이 발견되었다. 본 발명의 화합물은 유익한 효능, 선택도 및/또는 약동학적 특성을 갖는다. 본 발명의 화합물은 WO 02/074767의 포괄적인 범위 내에 들지만 이 문헌에 구체적으로 예시되지 않은 유형의 화합물이다.

[0016] 따라서, 본 발명에 따라, 하기 화학식 I의 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염이 제공된다.

화학식 I



[0017]

[0018]

상기 식에서,

[0019]

R¹은 C1-2 알킬, 시클로프로필, OCH₃, SCH₃ 또는 OCF₃을 나타내며; 상기 알킬기 또는 시클로프로필기는 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환되고;

[0020]

R²는 C1-3 알킬을 나타낸다.

[0021]

화학식 I의 화합물은 거울상이성질체 형태로 존재할 수 있다. 모든 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체 및 이들의 혼합물이 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0022]

화학식 I의 화합물은 다양한 호변이성질체 형태로 존재할 수도 있다. 모든 가능한 호변이성질체 형태 및 그의 혼합물이 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0023]

한 실시양태에서, R¹은 C1-2 알킬 또는 시클로프로필을 나타내며; 상기 알킬기 또는 시클로프로필기는 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된다.

[0024]

다른 실시양태에서, R¹은 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된 C1-2 알킬을 나타낸다.

[0025]

한 실시양태에서, R¹은 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된 시클로프로필을 나타낸다.

[0026]

한 실시양태에서, R¹은 시클로프로필을 나타낸다.

[0027]

한 실시양태에서, R¹은 트리플루오로메틸을 나타낸다.

[0028]

한 실시양태에서, R¹은 OCH₃ 또는 SCH₃을 나타낸다.

[0029]

한 실시양태에서, R²는 메틸 또는 에틸을 나타낸다. 한 실시양태에서, R²는 메틸을 나타낸다.

[0030]

한 실시양태에서, R¹은 C1-2 알킬 또는 시클로프로필을 나타내며; 상기 알킬기 또는 시클로프로필기는 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환되고, R²는 메틸 또는 에틸을 나타낸다.

[0031]

한 실시양태에서, R¹은 C1-2 알킬 또는 시클로프로필을 나타내며; 상기 알킬기 또는 시클로프로필기는 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환되고; R²는 메틸을 나타낸다.

[0032]

한 실시양태에서, R¹은 또한 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된 C1-2 알킬을 나타내며, R²는 메틸 또는 에틸을 나타낸다.

[0033]

한 실시양태에서, R¹은 CF₃을 나타내며, R²는 메틸 또는 에틸을 나타낸다.

[0034]

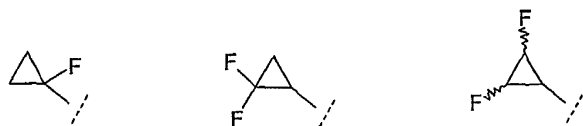
한 실시양태에서, R¹은 시클로프로필을 나타내며, R²는 메틸 또는 에틸을 나타낸다.

[0035]

달리 나타내지 않는다면, 본원에 언급된 용어 "C1-3 알킬"은 1개 내지 3개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기를 나타낸다. 이러한 기의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필 및 i-프로필을 들 수 있다. 용어 "C1-2 알킬"은 메틸 또는 에틸을 나타낸다.

[0036] 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된 C1-2 알킬의 예로는 CF₃, CH₂F, CH₂CF₃, CF₂CH₃ 및 CF₂CF₃을 들 수 있다.

[0037] 임의로 1개 이상의 플루오로 원자에 의해 치환된 시클로프로필 고리의 예로는 하기 화학식으로 표시되는 1-플루오로-1-시클로프로필, 2,2-디플루오로-1-시클로프로필 및 2,3-디플루오로-1-시클로프로필을 들 수 있다:



[0038]

[0039] 본 발명의 화합물의 예로는

[0040] (5S)-5-({[4-[(2-시클로프로필피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온;

[0041] (5S)-5-메틸-5-({[4-([2-(메틸티오)피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온;

[0042] (5S)-5-메틸-5-({[4-([2-(트리플루오로메틸)피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온;

[0043] (5S)-5-메틸-5-({[4-[(2-메틸피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온;

[0044] (5S)-5-({[4-[(2-에틸피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온;

[0045] (5S)-5-({[4-[(2-메톡시피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온; 및 이들의 제약상 허용되는 염을 들 수 있다.

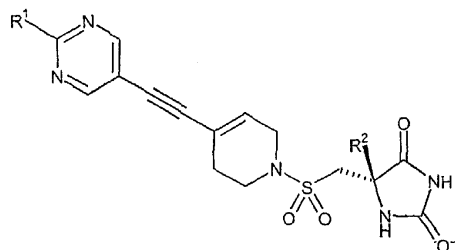
[0046] 예시된 각 화합물은 본 발명의 특정한 독립된 측면을 나타낸다.

[0047] 화학식 I의 화합물은 거울상이성질체 형태로 존재할 수 있다. 따라서, 모든 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체 및 이들의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 통상의 기술, 예를 들면 분별 결정화 또는 HPLC를 이용하여 화합물의 라세미 혼합물을 분리함으로써 다양한 광학 이성질체를 분리할 수 있다. 별법으로, 광학 이성질체는 비대칭 합성 또는 광학상 활성인 출발 물질로부터의 합성에 의해 얻을 수 있다.

[0048] 본 발명의 화합물에서 광학상 이성질체가 존재하는 경우, 본 발명자는 본 발명의 개별적인 특정 실시양태로서 본 발명의 화합물의 모든 개별적인 광학상 활성 형태 및 조합물 뿐만 아니라 이들의 상응하는 라세미체를 개시한다.

[0049] 바람직하게는, 화학식 Ia의 화합물은 하기 나타낸 바와 같은 (5S)-입체화학을 갖는다:

화학식 Ia



[0050]

[0051] 본 발명의 화합물에서 호변이성질체가 존재하는 경우, 본 발명자들은 본 발명의 개별적인 특정 실시양태로서 본 발명의 화합물의 모든 개별적인 호변이성질체 형태 및 조합물을 개시한다.

[0052] 본 발명은 염 형태의 화학식 I의 화합물을 포함한다. 적합한 염으로는 유기산 또는 무기산 또는 유기 또는 무기 염기와 함께 형성된 염을 들 수 있다. 이러한 염은 일반적으로 제약상 허용되는 염이지만, 특정 화합물의

제조 및 정제에서 제약상 허용되지 않는 염이 사용될 수 있다. 상기 염으로는 산 부가 염, 예를 들면 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 시트레이트, 토실레이트 및 말레이트 염, 및 인산 또는 황산과 함께 형성된 염을 들 수 있다. 다른 측면에서, 적합한 염은 염기 염, 예를 들면 알칼리 금속염, 예컨대 나트륨염 또는 칼륨염, 알칼리 토금속염, 예컨대 칼슘염 또는 마그네슘염, 또는 유기 아민 염, 예컨대 트리에틸아민이다.

- [0053] 화학식 I의 화합물의 염은 유리 염기 또는 그의 다른 염을 1 당량 이상의 적합한 산 또는 염기와 반응시킴으로써 형성될 수 있다.
- [0054] 화학식 I의 화합물은 동물에서 약리학적 활성을 보유하기 때문에 유용하며, 따라서 약제로서 잠재적으로 유용하다. 특히, 본 발명의 화합물은 메탈로프로테이나제 억제제이므로, MMP12 및/또는 MMP9에 의해 매개된 질환 또는 증상, 예를 들면 천식, 비염, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 관절염 (예, 류마티스성 관절염 및 골관절염), 죽상경화증 및 재발협착증, 암, 침입 및 전이, 조직 파괴를 포함하는 질환, 고관절 치환물의 이완, 치주 질환, 섬유성 질환, 경색 및 심장 질환, 간 및 신장 섬유증, 자궁내막증, 세포외 매트릭스의 약화와 관련된 질환, 심부전, 대동맥류, CNS 관련 질환, 예를 들면 알츠하이머병 및 다발성 경화증 (MS), 및 혈액 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0055] 일반적으로, 본 발명의 화합물은 MMP9 및 MMP12의 강력한 억제제이다. 본 발명의 화합물은 또한 다양한 다른 MMP, 예를 들면 MMP8, MMP14 및 MMP19의 억제의 상대적 결여에 있어서 양호한 선택도를 나타낸다. 또한, 본 발명의 화합물은 일반적으로 개선된 로그 D 값, 특히 $0.5 < \text{로그 D} < 2.0$ 범위의 로그 D 값을 갖는다. 로그 D는 생리학적 pH에서 화합물의 친지질성을 반영하는 파라미터이다. 이러한 바람직한 로그 D 값의 결과로서, 본 발명의 화합물은 개선된 용해도 특징 및 감소된 혈장 단백질 결합을 보유하여 개선된 약물동태학 및 약동학적 특성을 나타낸다.
- [0056] 따라서, 본 발명은 요법에 사용되는 것으로 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.
- [0057] 다른 측면에서, 본 발명은 이하에서 요법에 사용되는 약물의 제조에서 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0058] 다른 측면에서, 본 발명은 MMP12 및/또는 MMP9의 억제가 유익한 질환 또는 증상의 치료에 사용되는 약물의 제조에서 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0059] 다른 측면에서, 본 발명은 염증 질환의 치료에 사용되는 약물의 제조에서 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0060] 다른 측면에서, 본 발명은 폐쇄성 기도 질환, 예를 들면 천식 또는 COPD의 치료에 사용되는 약물의 제조에서 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0061] 본 명세서에 있어서, 용어 "요법"은 달리 나타내지 않는다면 "예방"을 또한 포함한다. 용어 "치료" 및 "치료적"은 그에 따라 이해되어야 한다.
- [0062] 예방은 기존에 당해 질환 또는 증상으로 고통받았거나 또는 이러한 질환 또는 증상의 위험이 증가된 것으로 고려되는 개인의 치료와 특히 관련되는 것으로 예상된다. 특정 질환 또는 증상이 발병될 위험이 있는 개인으로는 일반적으로 질환 또는 증상의 가족력이 있는 개인 또는 유전적 시험 또는 스크리닝에 의해 상기 질환 또는 증상이 특히 발병되기 쉬운 것으로 확인된 개인을 들 수 있다.
- [0063] 추가로 본 발명은 환자에게 상기 정의된 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, MMP12 및/또는 MMP9의 억제가 유익한 질환 또는 증상의 치료 방법을 제공한다.
- [0064] 또한, 본 발명은 환자에게 상기 정의된 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 폐쇄성 기도 질환, 예를 들면 천식 또는 COPD의 치료 방법을 제공한다.
- [0065] 상기 언급된 치료적 용도의 경우, 투여량은 물론 사용되는 화합물, 투여 방식, 바람직한 치료 및 치료될 장애에 따라 달라질 것이다. 화학식 I의 화합물/염 (활성 성분)의 일일 투여량은 0.001 mg/kg 내지 75 mg/kg, 특히 0.5 mg/kg 내지 30 mg/kg의 범위일 수 있다. 이러한 일일 투여량은 필요에 따라 분할 투여량으로 제공될 수 있다. 전형적으로, 단위 투여 형태는 본 발명의 화합물 약 1 mg 내지 500 mg을 함유할 것이다.
- [0066] 화학식 I의 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염은 그 자체로 사용될 수 있지만, 일반적으로는 화학식 I의 화합물/염 (활성 성분)이 제약상 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 함께 투여될 것이다. 투여 방식에 따라, 제

약 조성물은 활성 성분을 바람직하게는 0.05 내지 99 중량% (중량 퍼센트), 보다 바람직하게는 0.10 내지 70 중량% 및 제약상 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체를 1 내지 99.95 중량%, 보다 바람직하게는 30 내지 99.90 중량% 포함할 것이며, 여기서 모든 중량%는 전체 조성물을 기준으로 한다. 적합한 제약 제제의 선택 및 제조를 위한 통상의 절차는 예를 들어 문헌 ["Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs", M. E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988]에 기재되어 있다.

[0067] 따라서, 본 발명은 또한 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0068] 추가로, 본 발명은 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하는 것을 포함하는, 본 발명의 제약 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0069] 본 발명의 제약 조성물은 치료가 요망되는 질환 또는 증상에 대하여 표준 방식으로 경구, 국소, 비경구, 구강, 비내, 질내 또는 직장 투여 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이들 목적을 위해, 본 발명의 화합물은 당업계 에 공지된 수단에 의해, 예를 들어 정제, 캡슐, 수성 또는 유성 용액, 현탁액, 에멀전, 크림, 연고, 젤, 비내 스프레이, 좌제, 흡입을 위한 미분 분말 또는 에어로졸, 및 비경구 사용(정맥내, 근육내 또는 주입 포함)의 경우에는 멸균 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액 또는 멸균 에멀전 형태로 제제화될 수 있다.

[0070] 본 발명의 제약 조성물은, 본 발명의 화합물 이외에, 상기 언급된 하나 이상의 질환 또는 증상을 치료하는데 있어서 유용한 하나 이상의 약리학적 작용제, 예를 들면 "심비코트(Symbicort; 상표명)" 제품을 함유할 수도 있고, 이러한 작용제와 공동(동시 또는 순차)투여될 수도 있다.

[0071] 추가로, 본 발명은

[0072] a) 하기 화학식 II의 화합물을 하기 화학식 III의 화합물 (또는 그의 염)과 반응시키는 단계; 또는

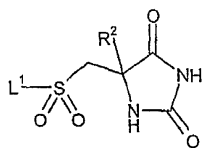
[0073] b) 하기 화학식 X의 화합물을 하기 화학식 IX의 아세틸렌계 화합물과 반응시키는 단계; 또는

[0074] c) 하기 화학식 XI의 화합물을 하기 화학식 VI의 아릴 할라이드 또는 트리플레이트와 반응시키는 단계; 및

[0075] 임의로 이후에 제약상 허용되는 염을 형성시키는 단계

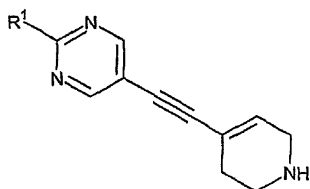
[0076] 를 포함하는, 상기 정의된 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 제조 방법을 제공한다.

화학식 II



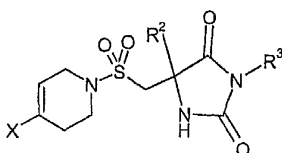
[0077]

화학식 III



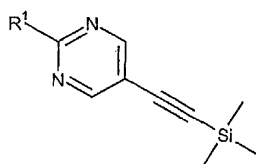
[0078]

화학식 X



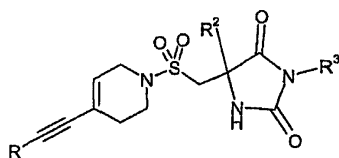
[0079]

화학식 IX



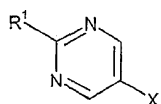
[0080]

화학식 XI



[0081]

화학식 VI



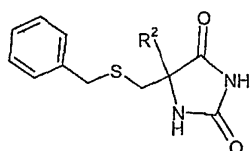
[0082]

[0083] 상기 식에서, R^1 및 R^2 는 상기 화학식 I에서 정의된 바와 같고, L^1 은 이탈기를 나타내고, R^3 은 H 또는 적합한 보호기이고, X는 할라이드 또는 트리플레이트와 같은 이탈기이고, R은 H 또는 트리메틸실릴을 나타낸다.

[0084] 상기 과정 (a)에서, 적합한 이탈기 L^1 로는 할로, 특히 클로로를 들 수 있다. 바람직하게는 반응은 임의로 주변 내지 환류 온도에서 적합한 시간, 전형적으로 0.5 내지 24 시간 동안 첨가된 염기의 존재하에 적합한 용매 중에서 수행된다. 전형적으로는 용매, 예를 들면 피리딘, 디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란, 아세토니트릴 또는 디클로로메탄이 사용된다. 사용되는 경우, 첨가된 염기는 유기 염기, 예를 들면 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민, N-메틸모르폴린 또는 피리딘, 또는 무기 염기, 예를 들면 알칼리 금속 카르보네이트일 수 있다. 반응은 전형적으로는 주변 온도에서 0.5 내지 16 시간 동안, 또는 크로마토그래피 또는 분광계 방법에 의해 반응이 완료된 것으로 결정된 때까지 수행된다. 술폰일 할라이드와 다양한 1급 및 2급 아민의 반응은 문헌에 잘 알려져 있으며, 조건을 변화시키는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0085] 화학식 II의 술폰닐클로라이드 (여기서, L^1 은 염소를 나타냄)는 당업자에게 자명한 방법 [Mosher, J., J. Org. Chem. 1958. 23, 1257; Griffith, O., J. Biol. Chem. 1983. 258, (3), 1591; WO 02/074767]을 이용하여 하기 화학식 IV의 화합물을 산화적으로 염소화함으로써 편리하게 제조된다.

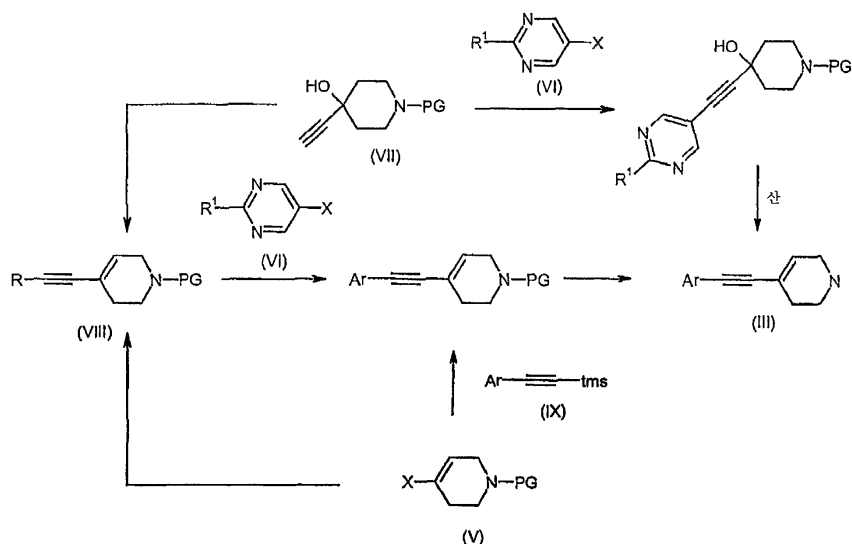
화학식 IV



[0086]

[0087] 합성 유기 화학 분야의 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 화학식 III의 화합물은 문헌에 기재된 다양한 방법 또는 이들의 변형법에 의해 제조할 수 있다. 적합한 방법은 이하에 기술된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 하기 반응식 1에 나타나 있다.

반응식 1



[0088]

[0089]

반응식 1에서, PG는 적합한 보호기, 예를 들면 t-Boc를 나타내고; X는 이탈기, 예를 들면 할라이드 또는 트리플레이트를 나타내고; R은 수소 또는 트리메틸실릴을 나타내고; tms는 트리메틸실릴을 나타내고; Ar은 2-위치에서 R¹에 의해 치환된 5-피리미디닐 고리를 나타내고; R¹은 화학식 I에 정의된 바와 같다.

[0090]

아릴- 또는 비닐 유도체 [V 또는 VI]와 아세틸렌 [VII, VIII 또는 IX] 사이의 반응은, 아민 염기, 예를 들면 피페리딘, 트리에틸아민, 디이소프로필아민 또는 디이소프로필에틸아민과 함께, 첨가된 구리 염의 존재 또는 부재 하에, 예를 들면 PdCl₂(PPh₃)₂인 적합한 팔라듐 염과 같은 촉매를 사용해서 임의로는 적합한 용매 중에서 달성될 수 있다. 사용되는 경우, 첨가된 용매는 예를 들어 테트라히드로푸란, 아세토니트릴 또는 N,N-디메틸포름아미드일 수 있다. 크로마토그래피 또는 분광계 방법이 반응 완료를 나타낼 때까지 20분 내지 수시간 동안 주변 내지 환류 온도에서 반응을 수행한다. 아세틸렌계 화합물을 포함하는 팔라듐 촉매화된 반응은 문헌에 잘 알려져 있으며, 조건에 대한 변형은 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 유형에 대한 일반적인 방법은, 예를 들어 문헌 [Brandsma, L., Synthesis of Acetylenes, Allenes and Cumulenes: Methods and Techniques, 2004, Elsevier Academic Press, chapter 16, pages 293-317; Transition Metals-Catalysed Couplings of Acetylenes with sp²-halides, Sonogashira, K., J. Organomet. Chem., 2002, 653, 46-49; Tykwinski, R. R., Angew. Chem. Int.Ed., 2003, 42, 1566-1568]에 기재되어 있다.

[0091]

X가 O-트리플레이트이고 PG가 t-Boc인 비닐 트리플레이트 V는 문헌 [Wustrow, D. J., Synthesis, 1991, 993-995]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0092]

화학식 VI의 적합한 치환된 피리미디닐 할라이드 또는 트리플레이트는 예를 들어 문헌 [Budesinsky, Z. et al., Coll. Czech. Chem. Commun., 1949, 14, 223-235; Takahashi et al., Chem. Pharm. Bull., 1958, 6, 334-337; US 4,558,039]에 기재된 다양한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0093]

아세틸렌계 화합물 VIII은 트리플레이트 V로부터, 트리메틸실릴아세틸렌과의 팔라듐 촉매화된 커플링 반응에 이어서 필요하다면, 예를 들어 적합한 용매 중의 칼륨 플루오라이드를 사용하는 트리메틸실릴기의 탈보호를 통해 제조할 수 있다. 별법으로, R이 H이고 PG가 t-Boc인 화합물 VIII의 제조는 화학식 VII의 화합물을 탈수함으로써, 예를 들어 메실화에 이어서 적합한 염기, 예를 들면 디이소프로필에틸아민으로 처리함으로써 달성할 수 있다.

[0094]

화학식 IX의 아세틸렌계 헤테로아릴 화합물은 문헌에 기재된 다양한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0095]

공정 (b)에서, 화학식 VIII의 화합물의 제조에 대하여 상기 기술된 것과 유사한 방법을 이용해서 반응을 수행한다. 필요하다면, SEMCl (R³ = SEM)을 사용하여 화학식 X의 화합물의 히단토인 고리 내의 하나의 질소를 탈보호한 다음, 팔라듐 촉매화된 반응을 수행한다. 화학식 I의 화합물의 제조에 대하여 상기 기술된 것과 동일한 방식으로, 화학식 V (PG = t-Boc)의 화합물을 산 촉매화된 탈보호에 이어서 화학식 II의 화합물과 반응시킴으로써

화학식 X의 화합물을 제조할 수 있다.

- [0096] 공정 (c)에서, 화학식 VIII의 화합물의 제조에 대하여 상기 기술된 것과 유사한 방식으로 반응을 수행한다. 필요하다면, SEMCI ($R^3 = SEM$)을 사용해서 화학식 XI의 화합물의 히단토인 고리 내의 하나의 질소를 탈보호할 수 있으며, 이어서 팔라듐 촉매화된 반응을 수행한다. 화학식 II의 화합물과 화학식 III의 화합물 사이의 반응에 대하여 상기 기술된 바와 같이, 화합물 XI은 화합물 VIII (R은 트리메틸실릴이고 PG는 t-Boc임)로부터, t-Boc기의 산 촉매화된 제거 (예, 메탄올 중 아세틸 클로라이드를 사용함)에 이어서 화학식 II의 화합물과의 반응에 의해 편리하게 제조한다.
- [0097] 당업자라면 본 발명의 공정에서 출발 시약 또는 중간체 화합물 내의 잠재적으로 반응성인 특정 관능기, 예를 들면 히드록실 또는 아미노기를 적합한 보호기에 의해 보호할 필요가 있을 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 화합물의 제조는 다양한 단계에서 하나 이상의 보호기의 부가 및 제거를 포함할 수 있다.
- [0098] 이러한 기들을 부가 및 제거하기 위한 적합한 보호기 및 공정 세부사항은 문헌 ['Protective Groups in Organic Chemistry', edited by J.W.F. McOmie, Plenum Press (1973) and 'Protective Groups in Organic Synthesis', 3rd edition, T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience (1999)]에 기재되어 있다.
- [0099] 본 발명의 화합물 및 그에 대한 중간체는 이들의 반응 혼합물로부터 분리할 수 있으며, 필요하다면 표준 기술을 이용하여 추가로 정제할 수 있다.
- [0100] 본 발명은 하기 예시적인 실시예를 참고로 더 설명될 것이다.
- [0101] 일반적인 방법
- [0102] 1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 배리언 이노바(Varian Inova) 400 MHz 또는 배리언 머큐리(Varian Mercury)-VX 300 MHz 장치 상에서 기록하였다. 클로로포름- d (δ_H 7.27 ppm), 디메틸설폭시드- d_6 (δ_H 2.50 ppm), 아세토니트릴- d_3 (δ_H 1.95 ppm) 또는 메탄올- d_4 (δ_H 3.31 ppm)의 중심 피크를 내부 기준으로 사용하였다. 실리카겔 (0.040-0.063 mm, Merck)을 사용해서 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 크로마실(Kromasil) KR-100-5- C_{18} 컬럼 (250 x 20 mm, Akzo Nobel) 및 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴/물의 혼합물 (유속 10 mL/분)을 분취용 HPLC에서 사용하였다. 달리 언급하지 않는다면, 출발 물질은 시판되는 것들이다. 모든 용매 및 시판 시약은 실험실 등급의 것이며 수령한 것을 사용하였다.
- [0103] 이하의 방법을 LC/MS 분석에서 사용하였다:
- [0104] 인스트루먼트 에이질렌트(Instrument Agilent) 1100; 컬럼 워터스 시메트리(Column Waters Symmetry) 2.1 x 30 mm; 질량 APCI; 유속 0.7 mL/분; 파장 254 또는 220 nm; 용매 A: 물 + 0.1% TFA; 용매 B: 아세토니트릴 + 0.1% TFA; 농도구배 15-95%/B 2.7분, 95% B 0.3분.
- [0105] 이하의 방법을 LC 분석에서 사용하였다:
- [0106] 방법 A. 인스트루먼트 에이질렌트 1100; 컬럼: 크로마실 C18 100 x 3 mm, 5 μ 입도, 용매 A: 0.1%TFA/물, 용매 B: 0.08%TFA/아세토니트릴 유속 1 mL/분, 농도구배 10-100%/B 20분, 100% B 1분. 흡광도를 220, 254 및 280 nm에서 측정하였다.
- [0107] 방법 B. 인스트루먼트 에이질렌트 1100; 컬럼: XTerra C8, 100 x 3 mm, 5 μ 입도, 용매 A: 15 mM NH_3 /물, 용매 B: 아세토니트릴 유속 1 mL/분, 농도구배 10-100%/B 20분, 100% B 1분. 흡광도를 220, 254 및 280 nm에서 측정하였다.
- [0108] 약어:
- [0109] Ac 아세틸
- [0110] DMF N,N-디메틸포름아미드
- [0111] DMSO 디메틸 설폭시드
- [0112] eq. 당량
- [0113] Et 에틸

[0114]	LDA	리튬 디이소프로필 아미드
[0115]	Me	메틸
[0116]	MS	질량 분광학
[0117]	tert	3급
[0118]	THF	테트라히드로푸란
[0119]	TFA	트리플루오로아세트산

실시예

[0120] 실시예 1

[0121] (5S)-5-({[4-[(2-시클로프로필피리미딘-5-일)에틸닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온

[0122] 문헌 [Yamanaka et al, Synth. Commun., 1983, 312-314]의 일반적인 방법에 따라 표제 화합물을 제조하였다. 35 °C에서 THF (3 mL) 중 5-브로모-2-시클로프로필피리미딘 (110 mg, 0.55 mmol) 및 (5S)-5-({[4-에틸닐-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온 (180 mg, 0.61 mmol)에 Et₃N (1 mL) 및 DMF (1 mL)를 가하였다. 용액이 형성된 다음, CuI (4 mol%) 및 PdCl₂(PPh₃)₂ (2 mol%)를 첨가하고, 혼합물을 72 °C에서 6시간 동안 가열하였다. 혼합물을 EtOAc (15 mL)와 물 (10 mL) 사이에 분배시키고, EtOAc로 수층을 3회 추출하였다. 모아진 유기층을 건조 및 농축하여 황색 오일인 조 생성물을 얻었다. 분취용 HPLC를 사용하여 정제함으로써 표제 화합물 (65 mg)을 얻었다.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10.75 (1H, s); 8.72 (2H, s); 8.03 (1H, s); 6.28 (1H, m); 3.84 (2H, m); 3.47 (2H, q); 3.30 (2H, m); 2.37 (2H, m); 2.21 (1H, m); 1.33 (3H, s); 1.10 (2H, m); 1.02 (2H, m).

[0123] APCI-MS m/z: 416 [MH⁺].

[0124] a) 5-브로모-2-시클로프로필피리미딘

[0125] 문헌 [Budesinsky, Z., Coll. Czech. Chem. Commun., 1949, 14, 223-235]의 방법에 의해 5-브로모-2-시클로프로필피리미딘을 제조하였다. 시클로프로판카르복스이미다미드 히드로클로라이드 (2.5 g, 20.7 mmol)를 EtOH (4 mL) 중에 용해시키고, 새로 제조된 EtOH (4.8 mL) 중 4.1 M NaOEt를 가한 다음, 뮌코브롬산 (2.7 g, 10.3 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 56 °C로 가열하고, EtOH 중 더 많은 NaOEt (4.1 M, 3.2 mL)를 가하고, 반응물을 56 °C에서 15분 더 교반한 다음, 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 증발 제거하고, 수성 HCl (2 M, 10 mL)를 가하고, 갈색 고체를 여과 제거하였다. 수층을 디클로로메탄으로 3회 추출하였다. 모아진 유기층을 건조 및 농축하여 갈색 오일을 얻었으며, 고체와 함께 조질의 중간체 5-브로모-2-시클로프로필피리미딘-4-카르복실산 (1.6 g)을 얻었다. 조질의 중간체를 140 °C에서 8분 동안 가열하여 갈색 점착성 오일을 얻은 다음, 디클로로메탄 중에 용해시켰다. 혼합물로부터 용액을 따라내고, 농축하여 오일인 부제 화합물 (673 mg)을 얻었다.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.61 (2H, s); 2.25 (1H, m); 1.13 (4H, m).

[0126] APCI-MS m/z: 199/201 1:1 [MH⁺].

[0127] b) (5S)-5-({[4-에틸닐-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온

[0128] (5S)-5-메틸-5-({[4-((트리메틸실릴)에틸닐)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온 (2.27 g, 6.0 mmol) 및 칼륨 플루오라이드 (1.07 g, 18.4 mmol)를 메탄올 (50 mL) 중에서 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 증발 제거하고, 잔류물을 EtOAc 중에 용해시키고, 물에 이어서 염수로 세척하고, 건조하고 (황산나트륨), 증발시켰다. 잔류물을 이소-헥산/EtOAc 1:1로 용출시키는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 고체 생성물 (1.81 g)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.66 (3H, s), 2.37 (2H, dt), 2.95 (1H, s), 3.24 - 3.50 (4H, m), 3.89 (2H, t), 6.11 (1H, s), 6.68 (1H, s), 8.75 (1H, s).
APCI-MS m/z : 298 [MH^+].

[0129]

c) (5S)-5-메틸-5-({[4-[(트리메틸실릴)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술폰일}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온

[0131]

4-[(트리메틸실릴)에티닐]-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 히드로클로라이드 (3.43 g, 15.9 mmol)를 [(4S)-4-메틸-2,5-디옥소이미다졸리딘-4-일]메탄술폰일 클로라이드 (3.39 g, 15 mmol)와 함께 THF (100 mL) 중에서 교반하고, 얼음 염 조(ice salt bath)(온도 약 -10°C)에서 냉각시켰다. THF (100 mL) 중 N-에틸디이소프로필아민 (5.13 mL, 30 mmol)을 2시간에 걸쳐 적가하고, 혼합물을 2시간 더 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 세척하고, 수층을 EtOAc (x2) 중에서 추출하고, 유기상을 모아서 2 M HCl (x2), 포화 중탄산염 용액 (x2), 이어서 염수로 세척하고, 건조 (황산나트륨) 및 증발시켜 조 생성물 (5.06 g)을 얻었다. 얻어진 생성물을 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0132]

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 10.74 (1H, s), 8.01 (1H, s), 6.13 (1H, quintet), 3.75 (2H, d), 3.44 (2H, dd), 3.23 (2H, t), 2.18 - 2.28 (2H, m), 1.32 (3H, s), 1.32 (9H, s).
APCI-MS m/z : 370 [MH^+].

[0133]

d) 4-[(트리메틸실릴)에티닐]-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 히드로클로라이드

[0134]

tert-부틸 4-[(트리메틸실릴)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카르복실레이트 (2.75 g, 9.8 mmol)를 메탄올 (10 mL) 중에서 교반하고, 아세틸 클로라이드 (2.1 mL, 29.2 mmol)를 적가하였다. 첨가 동안 온도는 18°C 에서 30°C 로 상승되었으며, tlc에 의해 출발 물질이 더 이상 존재하지 않은 것으로 나타난 때까지 혼합물을 40°C 에서 유지하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, EtOAc (15 mL)를 가하고, 고체를 여과 제거하여 회색을 띤 백색 고체 (1.6 g)를 얻었다.

[0135]

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9.46 (2H, s), 6.09 (1H, quintet), 3.60 (2H, dd), 3.13 (2H, t), 2.35 (2H, td), 0.17 (8H, s).
APCI-MS m/z : 180 [MH^+].

[0136]

e) tert-부틸 4-[(트리메틸실릴)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카르복실레이트

[0137]

WO 96/05200에서와 같이 N-Boc-피페리딘-4-온으로부터 제조하였다.

[0138]

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.05 (1H, s), 3.94 (2H, dd), 3.47 (2H, t), 2.23 (2H, dq), 1.45 (10H, s), 0.15 (8H, s).
GCMS-MS m/z : 223 [$\text{M}-55$].

[0139]

f) [(4S)-4-메틸-2,5-디옥소이미다졸리딘-4-일]메탄술폰일 클로라이드

[0140]

문헌 [Mosher, J., J. Org. Chem. 1958. 23, 1257; Griffith, O., J. Biol. Chem. 1983. 258, (3), 1591; and WO 02/074767]에 기재된 방법에 따라 제조하였다.

[0141]

실시예 2

[0142]

(5S)-5-메틸-5-({[4-([2-(메틸티오)피리미딘-5-일]에티닐)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술폰일}메틸)이미다졸리딘-2,4-디온

[0143]

문헌 [Nishihara et al., J. Org. Chem., 2000, 65, 1780-1787]에 기재된 일반적인 방법에 의해 표제 화합물을 제조하였다. DMF (5 mL) 중 2-(메틸티오)-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘 (0.55 g, 2.47 mmol) 및 1-[(4-메틸-2,5-디옥소이미다졸리딘-4-일)메틸]술폰일-1,2,3,6-테트라히드로피리딘-4-일 트리플루오로메탄술포네이트 (0.94 g, 2.22 mmol)의 용액에 CuI (10 mol%) 및 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (5 mol %)를 첨가하고, 혼합물을 85°C 에서 6 시간 동안 가열하였다. 혼합물을 EtOAc (20 mL)와 물 (10 mL) 사이에 분배시키고, EtOAc로 수층을 3회 추출하였다. 모아진 유기층을 염수, 물로 세척하고 농축하여 갈색 오일 (1.6 g)을 얻었다. 분취용 HPLC (0.06% NH_3 을 함유하는 물 중 5-35%의 아세토니트릴 농도구배 (12분)로 Xterra-Prep-MS-C18 (50 x 19) 컬럼을 사용함)

에 의해 정제하여 고체인 표제 화합물 (10 mg)을 얻었다.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 10.75 (1H, s); 8.73 (2H, s); 8.02 (1H, s); 6.29 (1H, m); 3.84 (2H, m); 3.48 (2H, q); 3.30 (2H, m); 2.53 (3H, s); 2.38 (2H, m); 1.33 (3H, s).
APCI-MS m/z : 422 [MH^+].

[0144]

[0145]

a) 5-브로모-2-(메틸티오)피리미딘

[0146]

문헌 [Takahashi et al., Chem. Pharm. Bull., 1958, 6, 334-337]의 방법에 따라 부제 화합물을 제조하였다. 실온에서 EtOH 중 5-브로모-2-클로로피리미딘 (1.0 g, 5.2 mmol)의 용액에 나트륨 메탄티올레이트 (0.36 g, 5.2 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 혼합물을 EtOAc (15 mL)와 물 (10 mL) 사이에 분배시켰다. EtOAc로 수층을 2회 추출하고, 염수로 세척하였다. 모아진 유기층을 건조 및 농축하여 백색 고체인 부제 화합물 (1.1 g)을 얻었다.

[0147]

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 8.66 (2H, s); 2.54 (3H, s).
APCI-MS m/z : 204/206 1:1 [MH^+].

[0148]

b) 2-(메틸티오)-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘

[0149]

문헌 [Yamanaka et al., Synth. Commun., 1983, 312-314]의 방법에 따라 부제 화합물을 제조하였다. Et_3N (3 mL) 중 5-브로모-2-(메틸티오)피리미딘 (0.60 g, 2.9 mmol)에 DMF (0.5 mL), CuI (5 mol%) 및 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (3 mol%)를 첨가하였다. 혼합물을 밀폐된 튜브에 넣고 95 °C에서 12시간 동안 가열한 다음, Et_2O (30 mL)와 물 (10 mL) 사이에 분배시켰다. 수층을 Et_2O 로 2회 추출하고, 모아진 유기층을 물로 세척하고, 건조 및 농축하여 갈색 오일인 조 생성물을 얻었다. 이 화합물을 헵탄 중 10-60% EtOAc의 농도구배를 이용하는 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 무색 오일인 부제 화합물 (0.55 g)을 얻었다.

[0150]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 8.56 (2H, s); 2.58 (3H, s); 0.27 (9H, s).
APCI-MS m/z : 223 [MH^+].

[0151]

c) 1-([(4S)-4-메틸-2,5-디옥소이미다졸리딘-4-일]메틸)술포닐)-1,2,3,6-테트라히드로피리딘-4-일 트리플루오로메탄술포네이트

[0152]

4-([(트리플루오로메틸)술포닐]옥시)-1,2,3,6-테트라히드로피리디늄 클로라이드를 실시예 1c에서와 동일한 방식으로 [(4S)-4-메틸-2,5-디옥소이미다졸리딘-4-일]메탄술포닐 클로라이드 (실시예 1f)와 반응시켰다.

[0153]

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 10.77 (1H, s), 8.04 (1H, d), 6.10 (1H, t), 3.88 (2H, q), 3.36 - 3.58 (4H, m), 2.50 - 2.56 (2H, m), 1.32 (3H, s).
APCI-MS m/z : 422 [MH^+].

[0154]

d) 4-([(트리플루오로메틸)술포닐]옥시)-1,2,3,6-테트라히드로피리디늄 클로라이드

[0155]

tert-부틸 4-([(트리플루오로메틸)술포닐]옥시)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카르복실레이트 (3.77 g, 11.4 mmol)를 THF (15 mL) 및 농축 염산 (15 mL)과 혼합하였다. 1시간 후, 혼합물을 증발시키고, 톨루엔 및 메탄올을 사용하는 공비 증발에 의해 건조하여, 베이지색 고체 (88%)를 얻었으며, 이 고체는 더 정제하지 않고서도 사용할 수 있었다.

[0156]

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 9.72 (2H, s), 6.22 (1H, s), 3.75 (2H, q), 3.30 (2H, t), 2.65 (2H, td).
APCI-MS m/z : 232 [MH^+].

[0157]

e) tert-부틸 4-([(트리플루오로메틸)술포닐]옥시)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카르복실레이트

[0158]

THF (80 mL) 중 N-boc-피페리딘-4-온 (10.14 g, 50 mmol)의 용액을, 대략 30분에 걸쳐 THF (30 mL, 60 mmol, 1.2 당량) 및 THF (80 mL) 중 2 M LDA의 냉각 용액 (-78 °C)에 가하였다. 10분 더 교반한 다음, THF (80 mL) 중 1,1,1-트리플루오로-N-페닐-N-[(트리플루오로메틸)술포닐]메탄술포나미드 (20 g, 56 mmol, 1.1 당량)의 용액을 가하고, 혼합물을 실온으로 가온시켰다. 용액을 물로 세척하고, 수층을 EtOAc (x2)로 세척하고, 유기상을

모아서 암모늄 클로라이드 포화 용액, 염수로 세척하고, 건조시키고 (황산나트륨), 증발시켰다. n-헵탄에 이어서 n-헵탄/EtOAc 9:1로 용출시키는 중성 알루미늄 (200 g)를 통해 잔류물을 여과시켰다. 증발 후, $^1\text{H-NMR}$ 에서는 일부 트리플화제(triflating agent)가 여전히 존재하는 것으로 나타났지만, 조 생성물은 추가로 정제하지 않고 사용하였다. 수율 (13.17 g, 79.5%). [Wustrow, D. J., Synthesis, 1991, 993-995].

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.77 (1H, s), 4.05 (2H, q), 3.64 (2H, t), 2.45 (2H, quintet), 1.48 (9H, s).

GCMS-MS m/z: 274 [M-57].

실시예 3

(5S)-5-메틸-5-([4-([2-(트리플루오로메틸)피리미딘-5-일]에티닐)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐)메틸)이미다졸리딘-2,4-디온

실시예 2에서 기술된 것과 동일한 방법에 의해 2-(트리플루오로메틸)-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘으로부터 표제 화합물을 48% 수율로 제조하였다. 95% EtOH로부터 백색 고체. 분해 240-245 °C.

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 10.8 (1H, br s), 9.16 (2H, s), 8.05 (1H, s), 6.42 (1H, m), 3.88 (2H, m), 3.56 (1H, d), 3.42 (1H, d), 3.32 (2H, m), 2.41 (2H, m) and 1.33 (3H, s).

APCI-MS m/z: 444 [MH^+].

a) 2-(트리플루오로메틸)-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘

2-(트리플루오로메틸)피리미딘-5-일 트리플루오로메탄술포네이트 (0.45 g, 1.5 mmol) 및 건조 트리에틸아민 (1.0 mL)을 스크류-캡 바이알에서 혼합하였다. 용액을 건조 아르곤으로 10분 동안 퍼징하였다. 트리메틸실릴 아세틸렌 (0.43 mL, 3.0 mmol), 미분 CuI (0.010 g, 0.05 mmol) 및 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.020 g, 0.030 mmol)를 첨가하였다. 바이알을 밀폐하고, 알루미늄 블록에서 80 °C에서 가열하였다. 5시간 동안 교반한 다음, 휘발성물질을 실온에서 증발시켰다 (생성물은 35-40 °C/10 mbar에서 승화됨). 흑색 잔류물을 EtOAc (20 mL) 중에 용해시켰으며, 실리카(약 5 내지 10 g)와 함께 농축시켜 건조하였다. EtOAc/헵탄 (1:30)을 사용하는 실리카 상 플래시 크로마토그래피에 의해 백색 고체인 2-(트리플루오로메틸)-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘 (0.35 g, 95%)을 얻었다. 융점 75.5-76.0 °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.90 (2H, s) and 0.30 (9H, s).

APCI-MS m/z: 245 [MH^+].

b) 2-(트리플루오로메틸)피리미딘-5-일 트리플루오로메탄술포네이트

얼음 조 온도에서 2-(트리플루오로메틸)피리미딘-5-올 (미국 특허 제4,558,039호에 따라 제조됨) (0.82 g, 5.0 mmol), 톨루엔 (10 mL) 및 수성 삼칼륨 포스페이트 (30 중량%, 10 mL)의 교반된 혼합물에 트리플산 무수물 (1.01 mL, 6.0 mmol)을 첨가하였다 [Frantz et al., Organic Letters, 2002, 4(26), 4717-4718]. 첨가를 완료했을 때, 얼음 조를 꺼내고, 용액을 주변 온도에서 30분 동안 교반하였다. 투명한 상이 분리되었으며, 유기층을 물에 이어서 염수로 세척하였다. 무수 황산나트륨 상에서 유기상의 건조, 여과 및 회전 증발에 의한 농축(실온)에 의해 무색 오일인 2-(트리플루오로메틸)-피리미딘-5-일 트리플루오로메탄술포네이트 (1.38 g, 93%)를 얻었다. 비점 75-77 °C (10 mbar).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.90 (2H, s).

실시예 4

(5S)-5-메틸-5-([4-([2-(메틸피리미딘-5-일]에티닐)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐)메틸)이미다졸리딘-2,4-디온

tert-부틸 4-([2-(메틸피리미딘-5-일]에티닐)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카복실레이트를 EtOH 중 TFA로 처리하고, 반응 완료 후에 용매를 증발시키고, 혼합물을 동결 건조하였다. 잔류물을 DMF (1.5 mL) 중에 용해시키고, 혼합물을 4 °C로 냉각시켰다. N-에틸디소프로필아민 (2.2 당량)을 첨가하고, 혼합물을 20분 동안 교반한 다음, DMF (1 mL) 중 [(4S)-4-메틸-2,5-디옥소이미다졸리딘-4-일]메탄술포닐 클로라이드 (실시예 1f) (1.1 당

량)를 가하였다. 혼합물을 4 °C에서 10분 동안 교반하고, 이어서 실온에서 2시간 동안 교반한 다음, 용매를 증발시켰다. 생성물을 분취용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물 (0.022 g, 30%)을 얻었다.

^1H NMR (DMSO- d_6); 10.75 (1H, s); 8.80 (2H, s); 8.02 (1H, s); 7.80 (1H, m); 7.32 (1H, d, J = 8.1 Hz); 6.24 (1H, s); 3.81 (2H, d, J = 3.2 Hz); 3.34 - 3.21 (2H, m); 3.30 (3H, s); 2.75 (2H, q, J = 20.8 Hz); 2.34 (2H, m); 1.29 (3H, s); 1.19 (3H, t, J = 7.6 Hz).
APCI-MS m/z : 390 [MH^+].

a) 2-메틸-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘

Et_3N (2 mL) 및 THF (2 mL) 중 5-브로모-2-메틸-피리미딘 (UK 특허 출원 제GB 2 157 288호에 따라 제조됨) (0.2 g, 1.16 mmol), (트리메틸실릴)아세틸렌 (164 μl , 1.3 mmol), CuI (0.022 g, 0.116 mmol) 및 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.082 g, 0.116 mmol)를 80 °C에서 4시간 동안 교반하였다. 냉각 후, 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 크로마토그래피하여 부제 화합물 (0.16 g, 50%)을 얻었다.

APCI-MS m/z : 191 [MH^+].

b) tert-부틸 4-[(2-메틸피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카복실레이트

실온에서 DMF (2 mL) 중 CuCl (1 mg, 0.01 mmol) 및 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.003 g, 0.004 mmol)의 용액에 2-메틸-5-[(트리메틸실릴)에티닐]피리미딘 (0.088 g, 0.462 mmol) 및 tert-부틸 4-[(트리플루오로메틸)술포닐]옥시)-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-카복실레이트 (실시예 2e) (0.183 g, 0.555 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 80 °C에서 8시간 동안 교반하였다. 냉각 후, 혼합물을 1 N HCl로 켄칭하고, 에테르로 추출하였다 (3x). 모아진 유기층을 NaHCO_3 포화 수용액, 염수로 세척하고, 건조하였다. 여과 및 증발시켜 갈색 오일을 얻고, 이를 HPLC 상에서 정제하여 부제 화합물 (0.062 g, 45%)을 얻었다.

APCI-MS m/z : 300 [MH^+].

실시예 5

(5S)-5-([4-[(2-에틸피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐)메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온 트리플루오로아세트레이트

실시예 4에서와 동일한 방식으로 표제 화합물을 제조하였다. GB 2 157 288의 방법을 이용해서 5-브로모-2-에틸-피리미딘 출발 물질을 제조하였다.

^1H NMR (DMSO- d_6); 10.75 (1H, s); 8.82 (2H, s); 8.05 (1H, s); 6.24 (1H, s); 3.81 (2H, d, J = 3.2 Hz); 3.34 - 3.21 (2H, m); 3.30 (3H, s); 2.92 (2H, q, J = 17.8 Hz); 2.75 (2H, q, J = 20.8 Hz); 2.34 (2H, m); 1.26 (3H, t, J = 12.8 Hz); 1.19 (1H, s).
APCI-MS m/z : 404 [MH^+].

실시예 6

(5S)-5-([4-[(2-메톡시피리미딘-5-일)에티닐]-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일]술포닐)메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온

실시예 1에 기술된 것과 동일한 방식으로 5-브로모-2-메톡시피리미딘 및 (5S)-5-[(4-에티닐-3,6-디히드로피리딘-1(2H)-일)술포닐]메틸)-5-메틸이미다졸리딘-2,4-디온으로부터 표제 화합물을 제조하였다.

^1H NMR (DMSO- d_6); δ 10.75 (1H, s); 8.73 (2H, s); 8.04 (1H, s); 6.26 (1H, s); 3.95 (3H, s); 3.81 (2H, d, J = 3.2 Hz); 3.34 - 3.21 (2H, m); 3.30 (3H, s); 2.75 (2H, q, J = 20.8 Hz); 2.34 (2H, m); 1.19 (3H, t, J = 7.6 Hz).
APCI-MS m/z : 406 [MH^+].

약리학적 실시예

- [0189] 단리된 효소 검정
- [0190] MMP12
- [0191] 문헌 [Parkar A.A. et al, (2000), Protein Expression and Purification, 20, 152]에 기재된 바와 같이 재조합 인간 MMP12 촉매 도메인을 발현시켜 정제할 수 있다. 정제된 효소를 사용해서 다음과 같이 활성의 억제제를 모니터링할 수 있다: MMP12 (최종 농도 50 ng/ml)를 실온에서 60분 동안 억제제의 존재 (10 농도) 또는 부재하에 검정 완충액 (0.1 M "Tris-HCl" (상표명) 완충액 (pH 7.3), 0.1 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0.020 mM ZnCl 및 0.05% (w/v) "Brij 35" (상표명) 시약 함유) 중에서 합성 기질인 Mca-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂ (10 μM)와 함께 인큐베이션한다. λ_{ex} 320 nm 및 λ_{em} 405 nm에서의 형광을 측정함으로써 활성을 결정한다. 억제율은 다음과 같이 계산된다:
- [0192]
$$\text{억제율}(\%) = [\text{형광}_{+\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}] / [\text{형광}_{-\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}]$$
- [0193] MMP8
- [0194] 정제된 프로-MMP8을 칼바이오캠(Calbiochem)사로부터 구입하였다. 효소 (10 μg/ml에서)는 35 °C에서 2.5시간 동안 1 mM의 p-아미노-페닐-머큐릭 아세테이트 (APMA)에 의해 활성화된다. 활성화된 효소를 사용해서 다음과 같이 활성의 억제제를 모니터링할 수 있다: MMP8 (최종 농도 200 ng/ml)을 35 °C (80% H₂O)에서 90분 동안 억제제의 존재 (10 농도) 또는 부재하에 검정 완충액 (0.1 M "Tris-HCl" (상표명) 완충액 (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 30 mM CaCl₂, 0.040 mM ZnCl 및 0.05% (w/v) "Brij 35" (상표명) 시약 함유) 중에서 합성 기질인 Mca-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂ (12.5 μM)와 함께 인큐베이션한다. λ_{ex} 320 nm 및 λ_{em} 405 nm에서의 형광을 측정함으로써 활성을 결정한다. 억제율은 다음과 같이 계산된다:
- [0195]
$$\text{억제율}(\%) = [\text{형광}_{+\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}] / [\text{형광}_{-\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}]$$
- [0196] MMP9
- [0197] 재조합 인간 MMP9 촉매 도메인을 발현시킨 다음, Zn 킬레이트 컬럼 크로마토그래피에 이어서 히드록사메이트 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 효소를 사용해서 다음과 같이 활성의 억제제를 모니터링할 수 있다: MMP9 (최종 농도 5 ng/ml)를 실온에서 30분 동안 억제제의 존재 (10 농도) 또는 부재하에 검정 완충액 (0.1 M "Tris-HCl" (상표명) 완충액 (pH 7.3), 0.1 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0.020 mM ZnCl 및 0.05% (w/v) "Brij 35" (상표명) 시약 함유) 중에서 합성 기질인 Mca-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂ (5 μM)와 함께 인큐베이션한다. λ_{ex} 320 nm 및 λ_{em} 405 nm에서의 형광을 측정함으로써 활성을 결정한다. 억제율은 다음과 같이 계산된다:
- [0198]
$$\text{억제율}(\%) = [\text{형광}_{+\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}] / [\text{형광}_{-\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}]$$
- [0199] MMP14
- [0200] 문헌 [Parkar A.A. et al, (2000), Protein Expression and Purification, 20, 152]에 기술된 바와 같이 재조합 인간 MMP14 촉매 도메인을 발현시켜 정제할 수 있다. 정제된 효소를 사용해서 다음과 같이 활성의 억제제를 모니터링할 수 있다: MMP14 (최종 농도 10 ng/ml)를 실온에서 60분 동안 억제제의 존재 (5 농도) 또는 부재하에 검정 완충액 (0.1 M "Tris-HCl" (상표명) 완충액 (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0.020 mM ZnCl 및 0.05% (w/v) "Brij 35" (상표명) 시약 함유) 중에서 합성 기질인 Mca-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂ (10 μM)와 함께 인큐베이션한다. λ_{ex} 320 nm 및 λ_{em} 405 nm에서의 형광을 측정함으로써 활성을 결정한다. 억제율은 다음과 같이 계산된다:
- [0201]
$$\text{억제율}(\%) = [\text{형광}_{+\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}] / [\text{형광}_{-\text{억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}]$$
- [0202] 발현 및 정제된 프로 MMP를 사용해서 MMP9를 비롯한 다른 매트릭스 메탈로프로테이나제에 대하여 시험하는 프로토콜은 예를 들어 문헌 [C. Graham Knight et al., (1992) FEBS Lett., 296(3), 263-266]에 기재되어 있다.
- [0203] MMP19
- [0204] 문헌 [Parkar A.A. et al, (2000), Protein Expression and Purification, 20, 152]에 기술된 바와 같이 재조

합 인간 MMP19 촉매 도메인을 발현시켜 정제할 수 있다. 정제된 효소를 사용해서 다음과 같이 활성의 억제제를 모니터링할 수 있다: MMP19 (최종 농도 40 ng/ml)를 35 °C에서 120분 동안 억제제의 존재 (5 농도) 또는 부재 하에 검정 완충액 (0.1 M "Tris-HCl" (상표명) 완충액 (pH 7.3), 0.1 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0.020 mM ZnCl 및 0.05% (w/v) "Brij 35" (상표명) 시약 함유) 중에서 합성 기질인 Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (5 μM)와 함께 인큐베이션한다. λ_{ex} 320 nm 및 λ_{em} 405 nm에서의 형광을 측정함으로써 활성을 결정한다. 억제율은 다음과 같이 계산된다:

$$\text{억제율}(\%) = [\text{형광}_{\text{+억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}] / [\text{형광}_{\text{-억제제}} - \text{형광}_{\text{배경}}]$$

[0206] 단백질 결합

[0207] 자동화된 96 웰 포맷 검정에서 한외여과에 의해 혈장 단백질 결합을 측정하였다. 각 시험의 경우에서, 기준 화합물 (부테소니드)의 혈장 단백질 결합을 나란히 모니터링하였다.

[0208] 시험 화합물 (DMSO 중에 용해된 10 mM)을 10 μM의 최종 농도로 혈장에 가하고, 실온에서 10분 동안 평형화하였다. 혈장 350 μl를 한외여과 플레이트인 마이크로콘(Microcon)-96 (10kDa 컷오프, 밀리포어)에 전달하였다. 한외여과 플레이트를 실온에서 70분 동안 3000G에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 얻어진 혈장 물 중 화합물의 농도 (결합되지 않은 비율)를 3-점 측정 그래프를 사용하는 LC-MS/MS에 의해 결정하고, 최초 스파이킹된 혈장 중의 농도와 비교하였다.

[0209] 이동상으로서 아세트산/아세트니트릴을 사용하는 농도구배 크로마토그래피 시스템을 사용해서 분석을 수행하였다. 전자분무 인터페이스를 갖는, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)사 제조의 트리플 퀵드로폴 질량 분광계 API3000 또는 API4000을 사용해서 검출을 수행하였다.

[0210] 용해도 결정을 위한 프로토콜

[0211] 0.1 M 인산염 완충액 (pH 7.4) 중 시험 화합물은 용해도를 다음과 같이 결정하였다:

[0212] 시험 화합물 (1 mg)을 칭량하여 스크류 캡을 갖는 2 mL 유리 바이알에 넣고, 0.1 M 인산염 완충액 (pH 7.4)(1.00 mL)을 가하였다. 이어서, 샘플 바이알을 약 10분 동안 초음파처리한 다음, 20 °C에서 밤새 진탕 보드에 두었다. 이후, 샘플 바이알의 내용물을 밀리포어 밀렉스(Millipore Millex)-LH (0.45 μm) 필터를 통해 새로운 2 mL 유리 바이알로 여과하여 투명한 용액을 얻었다. 투명한 용액 (40 μl)을 새로운 2 mL 유리 바이알로 전달하고, 0.1 M 인산염 완충액 (pH 7.4)(960 μl)으로 희석하였다.

[0213] 공지된 농도의 용액을 사용해서 각각의 특정 시험 화합물에 대한 표준 측정 그래프를 작성하였다. 공지된 농도의 상기 용액은 일반적으로 약 10 μg/mL 및 약 50 μg/mL의 농도를 갖도록 선택되었다. 이 용액은 공지된 중량의 화합물을 99.5 % 에탄올 (500 μl) 중에 용해시킨 다음, 필요하다면 1분 동안 초음파처리함으로써 제조되었다. 화합물이 여전히 완전하게 용해되지 않은 경우, DMSO (500 μl)를 가하고, 혼합물을 추가의 1분 동안 초음파처리하였다. 이어서, 생성된 용액을 아세트니트릴/100 mM 암모늄 아세테이트(pH 5.5 20-50/80-50)의 혼합물로 적절한 부피로 희석하였다. 필요하다면, 추가로 더 희석된 표준 용액을 희석에 의해 제조하였다.

[0214] 이후, 아래와 같은 파라미터를 이용하는 UV-검출을 포함하는 HPLC에 의해 시험 화합물 용액 및 표준 용액을 분석하였으며, 0.1 M 인산염 완충액 중 시험 화합물의 용해도를 결정하였다:

[0215] HPLC-장치: HP1100/HP1050

[0216] 컬럼: HyPURITY 어드밴스드(Advanced), 5 μm, 125 x 3 mm

[0217] 컬럼 온도: 실온

[0218] 유속: 1 mL/분

[0219] 이동상: A = 아세트니트릴

[0220] B = 100 mM 암모늄 아세테이트 pH 5.5

[0221] 동용매(Isocratic) 비율: A/B 20-50/80-50

[0222] UV 검출기: 254 nm (220-280 nm)

[0223] 주입 부피: 20 μl

[0224] 크로마토그래피 데이터 취급 시스템: ATLAS/Xchrome

[0225] **로그 D의 결정을 위한 프로토콜**

[0226] 진탕 플라스크 방법을 이용해서 pH 7.4에서의 로그 D 값을 결정하였다. 실온에서 스크류 캡을 갖는 2 mL 유리 바이알에 적절한 소량의 시험 화합물을 넣고, 1-옥탄올 (10 mM 인산염 완충액(pH 7.4)으로 포화됨) 600 μ l를 가하였다. 이어서, 바이알을 1분 동안 초음파분해하여 화합물을 완전히 용해시켰다. 이어서, 10 mM 인산염 완충액(pH 7.4)(1-옥탄올로 포화됨) 600 μ l를 가하고, 바이알을 4분 동안 진탕시켜 두 개의 상을 혼합하였다. 이후, 실온에서 10분 동안 샘플을 1000g에서 원심분리하여 두 개의 상을 분리하였다. 마지막으로, 이하의 조건을 사용하는 HPLC에 의해, 분리된 수상 및 유기상을 2회 반복 분석하였다:

[0227] 인젝터: 스파크 홀란드(Spark Holland), 엔듀런스(Endurance)

[0228] 펌프: HP1050

[0229] 검출기: 크라토스(Kratos), 스펙트로플로우(Spectroflow) 783

[0230] 컬럼: YMC Pro C18, 5 μ m, 50 x 4mm, 부품 번호 AS12S050504QT

[0231] 컬럼 온도: 실온

[0232] 유속: 1 mL/분

[0233] 이동상: A = 아세토니트릴

[0234] B = 25 mM 포름산

[0235] C = 100 mM 암모늄 아세테이트 pH 5.5

[0236] D = 0.05% 암모늄 아세테이트

[0237] 농도구배: 0.00분 A/B 또는 A/C 또는 A/D 5/95

[0238] 5.00분 A/B 또는 A/C 또는 A/D 100/0

[0239] 7.00분 A/B 또는 A/C 또는 A/D 100/0

[0240] 7.02분 A/B 또는 A/C 또는 A/D 5/95

[0241] UV 검출기: 254 nm

[0242] 주입 부피: 회석되지 않은 수상 50 μ l 및 (메탄올로) 10배 회석된 유기상 5 μ l

[0243] 주입 주기 시간: 11분

[0244] 원심분리기: 헤티치(Hettich), 유니버설(Universal) 30RF

[0245] 볼텍스: 사이언티픽 인더스트리즈(Scientific Industries), 볼텍스(Vortex)-2 제니(genie)

[0246] 크로마토그래피 데이터 취급 시스템: ATLAS/Xchrome

[0247] ATLAS 크로마토그래피 데이터 취급 시스템으로부터 보고된 화합물 피크 면적 반응을 수동으로 타이핑한 다음 엑셀 시트에 의해 로그 D_{pH 7.4} 값을 자동으로 계산하였다 (하기 방정식 참조).

[0248] 로그 D_{pH 7.4}를 계산하는 방정식:

$$\text{Log D} = \frac{\left[\frac{\text{분석물}_{\text{org}}}{\text{분석물}_{\text{aq}}} \right]}{\approx \log \left(\frac{\text{면적}_{\text{org}} \times \text{회석 인자}_{\text{org}}}{\text{면적}_{\text{aq}} \times \text{회석 인자}_{\text{aq}} \times \frac{V_{\text{inj}}(\text{org})}{V_{\text{inj}}(\text{aq})}} \right)}$$

[0249]

[0250] 하기 표는 본 발명에서 대표적으로 선택된 화합물 및 WO 02/074767로부터 선택된 화합물에 대한 데이터를 나타낸다.

화합물	hMMP12 IC ₅₀ (nM)	hMMP9 IC ₅₀ (nM)	hMMP8 IC ₅₀ (nM)	hMMP14 IC ₅₀ (nM)	hMMP19 IC ₅₀ (nM)	용해도 pH 7.4 (μ M)	단백질 결합 (유리%)
실시예 5	9	9	1,140	>10,000	>10,000	91	47
실시예 3	6	5	547	>10,000	7,900	118	33
실시예 1	6	5	2,530	>10,000	>10,000	396	18
WO 02/074767, 120면 (5S)-5-({[4-[(4- 클로로페닐)에틸닐- 3,6- 디히드로 피리딘- 1(2H)-일]술포닐]- 메틸)-5-메틸- 이미다졸리딘-2,4-디온	2	9	180	4,300	3,980	49	1.75
WO 02/074767, 120면 (5S)-5-메틸-5-({[4-[(4- 메틸페닐)에틸닐]- 3,6- 디히드로 피리딘- 1(2H)-일]술포닐)- 메틸)이미다졸리딘- 2,4- 디온	3	34	384	4,430	1,970	72	2.25

[0251]