



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월28일
(11) 등록번호 10-0778163
(24) 등록일자 2007년11월14일

(51) Int. Cl.

C07D 401/14 (2006.01) C07D 401/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7011382

(22) 출원일자 2004년07월22일

심사청구일자 2004년07월22일

번역문제출일자 2004년07월22일

(65) 공개번호 10-2004-0081467

공개일자 2004년09월21일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/000613

국제출원일자 2003년01월22일

(87) 국제공개번호 WO 2003/062220

국제공개일자 2003년07월31일

(30) 우선권주장

0201508.9 2002년01월23일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

미국특허공보 5521184호

전체 청구항 수 : 총 15 항

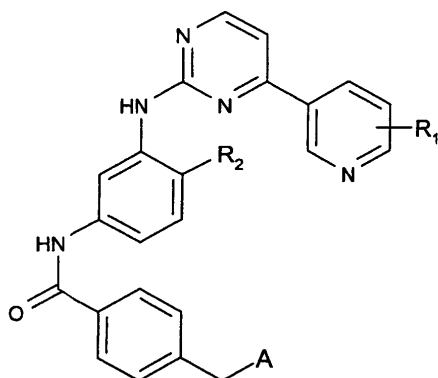
심사관 : 여경숙

(54) N-페닐-2-피리미딘-아민의 N-옥사이드 유도체

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나의 질소 원자가 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성하는 N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체, 그의 제조 방법, 상기 화합물을 포함하는 제약 조성물, 및 인간을 포함한 온혈 동물의 치료 요법용 제약 조성물 제조 시의 그의 용도에 관한 것이다.

<화학식 I>



(72) 발명자

그로쓰, 게르하르트

독일 79539 뢰라흐 마르쿠스 폴뤼거 스트라쎄 6

파르, 울리케

독일 79618 라인펠덴 라임그루벤스트라쎄 28

맨레이, 폴, 윌리엄

스위스 체하-4144 아를레스하임 브루그베크 12

침머만, 위르크

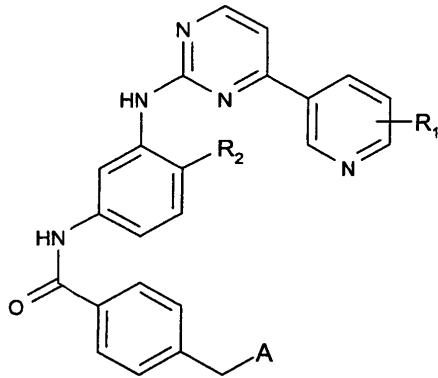
스위스 체하-4102 비닝겐 마르가르텐스트라쎄 41

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

<화학식 I>



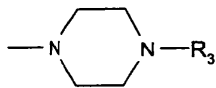
[여기서,

R₁은 수소 또는 히드록시이고,

R₂는 수소, 저급 알킬 또는 히드록시-저급 알킬이고,

A는 고리 탄소상에서 옥소에 의해 치환된 하기 화학식 (A')

<화학식 A'>



의 피페라지닐 기이고,

R₃은 수소, 저급 알킬 또는 아세틸이고,

접두어 "저급"은 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 라디칼을 나타냄].

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, R₁이 수소이고, R₂가 수소, 메틸 또는 히드록시메틸이고, R₃가 메틸 또는 수소인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서, 4-[(3-옥소-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

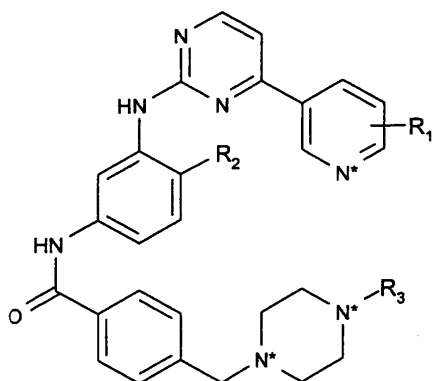
청구항 6

제1항에 있어서, 4-[(4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드인 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 7

하기 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염.

<화학식 II>



[여기서,

R₁은 수소 또는 히드록시이고,

R₂는 저급 알킬 또는 히드록시-저급 알킬이고,

R₃는 수소, 메틸 또는 아세틸이고,

별표(*)는 산소 원자를 선택적으로 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수 있는 질소 원자를 나타내고,

접두어 "저급"은 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 라디칼을 나타내고,

단, R₁이 수소이고, R₂가 메틸이고, R₃가 수소 또는 메틸인 경우, 별표로 표시된 3 개의 질소 원자 중 적어도 하나는 산소 원자를 보유함].

청구항 8

제7항에 있어서, R₁이 수소이고, R₂가 메틸 또는 히드록시메틸이고, R₃가 메틸이고, 별표가 산소 원자를 선택적으로 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수 있는 질소 원자를 나타내고, 단, R₂가 메틸인 경우, 별표로 나타낸 3 개의 질소 원자 중 적어도 하나는 산소 원자를 보유하는 것인, 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염.

청구항 9

제7항에 있어서, R₁이 수소이고, R₂가 히드록시-저급 알킬이고, R₃가 메틸이고, 별표가 산소 원자를 선택적으로 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수 있는 질소 원자를 나타내는 것인, 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염.

청구항 10

제7항에 있어서, 4-[(4-메틸-4-옥시도-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드인 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 11

제8항에 있어서, 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드인 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 12

제8항에 있어서, 4-[(4-메틸-1,4-디옥시도-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드인 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 13

제8항에 있어서, 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-히드록시메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드인 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 14

제1항에 있어서, 정제된 형태의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 15

제7항에 있어서, 정제된 형태의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

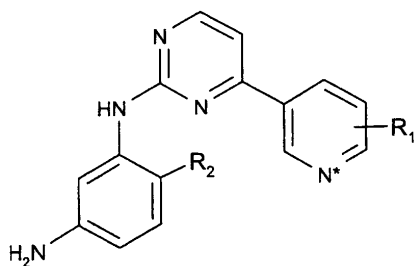
청구항 20

삭제

청구항 21

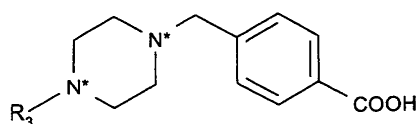
하기 화학식 (III)

<화학식 III>



[여기서, R₁ 및 R₂는 제7항에 따른 화학식 (II)의 화합물에 대하여 정의된 의미를 갖고, 별표는 산소 원자를 선택적으로 보유할 수 있는 질소 원자를 나타냄]의 화합물을 하기 화학식 (IV)

<화학식 IV>



[여기서, R₃는 제7항에 따른 화학식 (II)의 화합물에 대하여 정의된 의미를 갖고, 별표는 산소 원자를 선택적으로 보유할 수 있는 질소 원자를 나타냄]의 화합물과 반응시키고;

이렇게 수득한 화합물을 적당한 산화제를 사용하여 화학식 (II)의 N-옥사이드로 선택적으로 전환시키고;

이 때, 화학식 (III) 및 (IV)의 화합물에 존재하며 반응에는 참여시키지 않을 작용기는 필요하다면 보호된 형태로 존재하게 해주고, 단, 염-형성 기가 존재하고 염 형태의 반응이 가능한 경우, 존재하는 보호기를 절단하여 화학식 (III) 및 (IV)의 화합물이 염 형태로 존재하게 할 수도 있으며,

원한다면, 이렇게 수득한 화학식 (II)의 화합물을 치환기가 다른 화학식 (II)의 화합물로 전환시키고, 수득한 화학식 (II)의 유리 화합물을 염으로 전환시키고, 수득한 화학식 (II)의 화합물의 염을 유리 화합물 또는 또다른 염으로 전환시키고/시키거나, 화학식 (II)의 이성질체 화합물의 혼합물을 개별 이성질체로 분리하는 것을 특징으로 하는, 제7항에 따른 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염의 제조 방법.

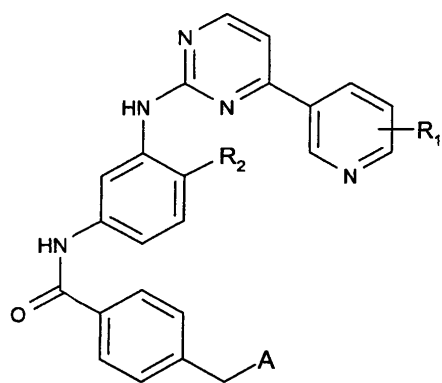
청구항 22

제1항에 있어서, 시험관내 합성된 것인 화학식 (I)의 화합물.

명세서

- <1> 본 발명은 적어도 하나의 질소 원자가 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성하는 N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체, 그의 제조 방법, 상기 화합물을 포함하는 제약 조성물, 및 인간을 포함한 온혈 동물의 치료 요법용 제약 조성물 제조 시의 그의 용도에 관한 것이다.
- <2> 본 발명은 구체적으로 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

화학식 I



- <3>
- <4> [여기서,
- <5> R₁은 수소 또는 히드록시이고,
- <6> R₂는 수소, 저급 알킬 또는 히드록시-저급 알킬이고,
- <7> A는 -NR₅R₆, -CR₅R₆ 또는 -OR₅R₆ (R₅, R₆는 함께 4, 5, 또는 6 개의 탄소 원자를 갖는 알킬렌, 1 개의 산소 원자 및 3 또는 4 개의 탄소 원자를 갖는 옥사-저급 알킬렌, 또는 1 또는 2 개의 질소 원자 및 2, 3, 또는 4 개의 탄소 원자를 갖는 아자-저급 알킬렌이고, 여기서, 질소 원자는 비치환되거나 저급 알킬, 히드록시-저급 알킬, 또는 아세틸에 의해 치환되고, 저급 알킬렌은 각각의 경우에 부분적으로 또는 전체적으로 불포화될 수 있고(있거나)

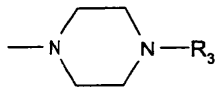
저급 알킬렌이 전체적으로 불포화되지 않은 경우, 저급 알킬렌의 탄소 원자는 저급 알킬, 히드록실, 저급 알콕시 또는 옥소 기에 의해 치환될 수 있음)이고, 여기서, 적어도 하나의 질소 원자는 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성하거나, 또는 어떠한 질소 원자도 산소 원자를 보유하지 않는 경우에 A는 고리 탄소상에서 옥소에 의해 치환됨].

<8> 바람직하게는, A는 고리 탄소상에서 옥소에 의해 치환된다.

<9> 바람직하게는, A는 피롤리디노, 피페리딜, 피페리디노, 피페라지닐, 피리딜, 피롤리디노, 피롤리디닐, 모르폴리노, 저급 알킬피페라지노, N-메틸피페라지노, 4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐, 3-옥소-1-피페라지닐, 1H-이미다졸릴, 1H-2-메틸이미다졸릴, 1H-4-메틸이미다졸릴, 1H-2,4-디메틸이미다졸릴, 시클로헥실 또는 페닐(고리 탄소상에서 옥소에 의해 선택적으로 치환될 수 있음)이다.

<10> 가장 바람직하게는, "A"는 하기 화학식 (A')의 피페라지노 기를 나타낸다:

<11> <화학식 A'>



<12> [여기서, R₃는 수소, 저급 알킬 또는 아세틸을 나타낸다].

<13> 상기 화학식 (I)에 있어서, R₁이 수소이고, R₂가 수소, 메틸 또는 히드록시메틸이고, A가 고리 탄소상에서 옥소에 의해 선택적으로 치환될 수 있는 A'이고, R₃가 메틸 또는 수소인 화합물 또는 그의 염이 바람직하다.

<14> "A"가 고리 탄소상에서 옥소에 의해 치환되는 경우, "A"는 바람직하게는, 4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐과 같은 저급 알킬-옥소-피페라지노 또는 3-옥소-1-피페라지닐과 같은 옥소-피페라지노, 옥소-피롤리딘, 옥소-피페리노, 옥소-피페리딜, 옥소-모르폴리노, 옥소-시클로헥실, 숙신이미도 또는 글루타리미도로부터 선택된다.

<15> 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성하는 질소 원자는 바람직하게는 피리미딘, 피린디닐, A 또는 상기 화학식 (A')의 피페라지노 기상에 위치하는 고리 질소 원자이다.

<16> 본 출원인은 "R₅R₆는 함께"라고 정의함으로써, NR₅R₆, CR₅R₆ 또는 OR₅R₆에 기재된 질소, 산소 또는 탄소기의 번호 매김을 포함하지 않는다.

<17> 접두어 "저급"은 최대 7 개 이하의 탄소 원자, 바람직하게는 최대 4 개 이하의 탄소 원자를 갖는 라디칼을 나타내고, 상기 라디칼은 직쇄 또는 단일 분지쇄 또는 다중 분지쇄를 갖는 분지쇄이다.

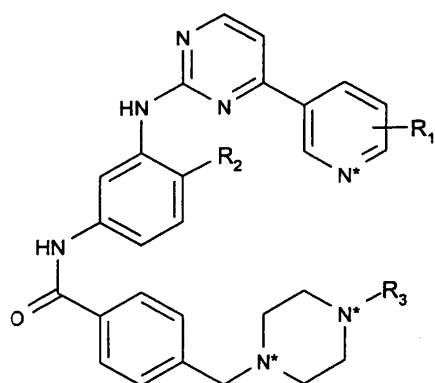
<18> 바람직하게는, 저급 알킬은 1 내지 7 개의 탄소 원자, 바람직하게는 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬이고; 바람직한 저급 알킬은 n-부틸, s-부틸, 이소부틸, t-부틸과 같은 부틸, n-프로필, 이소프로필과 같은 프로필, 에틸 또는 메틸이다. 보다 바람직한 알킬은 메틸, 프로필 또는 t-부틸이다.

<19> 바람직한 히드록시-저급 알킬은 히드록시메틸, 2-히드록시에틸 또는 2-히드록시-2-프로필이다.

<20> 바람직한 저급 알콕시는 메톡시, 에톡시, 이소프로필옥시, 또는 t-부틸옥시이다.

<21> 본 발명의 바람직한 측면에 있어서, 본 발명은 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염에 관한 것이다:

화학식 II



<22>

<23> [여기서, R₁은 수소 또는 히드록시이고,

<24> R₂는 저급 알킬 또는 히드록시-저급 알킬이고,

<25> R₃는 수소, 메틸 또는 아세틸이고,

<26> 별표(*)는 산소 원자를 선택적으로 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수 있는 질소 원자를 나타내고,

<27> 단, R₁이 수소이고, R₂가 메틸이고, R₃가 수소 또는 메틸인 경우, 별표로 표시된 3 개의 질소 원자 중 적어도 하나는 산소 원자를 보유한다].

<28> 선택적으로, 2-피리미딘의 질소 원자는 1 또는 2 개의 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수도 있다.

<29> 바람직하게는, 상기 화학식 (II)의 화합물은 적어도 하나의 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성한다.

<30> 선택적으로, 피페라지닐은 옥소에 의해 치환되어, 4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐과 같은 저급 알킬-옥소-피페라지노 또는 3-옥소-1-피페라지닐과 같은 옥소-피페라지노를 형성한다.

<31> 상기 화학식 (II)의 화합물의 범주내에서 용어 "저급"은 최대 7 개 이하의 탄소 원자, 바람직하게는 4 개 이하의 탄소 원자를 갖는 라디칼을 나타낸다.

<32> R₁이 히드록시인 경우, 3-피리디닐 부분은 위치 2, 4, 5 또는 6의 고리 탄소 원자에서 히드록시에 의해 치환된다.

<33> 저급 알킬 R₂는 바람직하게는 메틸이다.

<34> 히드록시-저급 알킬 R₂는 바람직하게는 히드록시메틸이다.

<35> 염은 구체적으로 상기 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 제약적으로 허용가능한 염이다.

<36> 이러한 염은 예를 들어, 염기성 질소 원자를 갖는 상기 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물로부터 산, 바람직하게는 유기 또는 무기 산을 첨가한 염으로서, 구체적으로는, 제약적으로 허용가능한 염으로서 형성된다.

<37> 또한, 분리하고 정제하기 위해서는, 제약적으로 허용불가능한 염, 예를 들어 피크레이트 또는 퍼클로레이트를 사용할 수도 있다. 오직 제약적으로 허용가능한 염 또는 유리 화합물(발생하는 경우 제약 조성물의 형태)이 치료 용도를 달성할 수 있으므로 바람직하다.

<38> 유리 형태의 신규 화합물과 중간체로서 사용될 수 있는 염을 비롯한 염 형태의 신규 화합물 사이의 긴밀한 연관성을 고려해 볼 때, 예를 들어 신규의 화합물을 정제 또는 동정함에 있어서, 상기 또는 하기에 언급하는 유리 화합물은 편의상 필요에 따라 대응 염도 포함하는 것으로 이해해야 한다.

<39> 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 중요한 약리학적 특성을 갖고 있어서, 예를 들어 항종양제, 아테롬성 동맥경

화중 치료제, 재발협착증 치료제, 폐색성 세기관지염과 같은 이식-유도된 질환 예방용 및(또는) 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)와 같은 특정 세균에 의한 온혈 동물 세포 감염 예방용 항백혈병 제제로서 사용될 수 있다.

- <40> 단백질의 인산화는 세포의 분화 및 분열의 필수 단계로서 오랫동안 공지되어 있다. 인산화는 세린/트레오닌 키나아제 및 티로신 키나아제로 세분된 단백질 키나아제에 의해 촉매된다. 티로신 키나아제는 PDGF(Platelet-derived Growth Factor, 혈소판-유도된 성장 인자) 수용체 티로신 키나아제를 포함한다.
- <41> PDGF는 매우 통상적으로 발견되는 성장 인자로서, 발암 과정 및 혈관의 평활근 세포 질환(예, 아테롬성 동맥경화증 및 혈전증)에서 볼 수 있듯이, 정상 성장 및 병리학적 세포 증식 둘 다에서 중요한 역할을 한다.
- <42> PDGF-자극된 수용체 티로신 키나아제 시험관내 활성의 억제율은 문헌 [E. Andrejauskas-Buchdunger and Regenass in Cancer Research 52, 5353-5358 (1992)]에 기재된 바와 같이 A431 세포의 PDGF 수용체 면역 복합체에서 측정한다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 PDGF-의존성 무세포 수용체의 인산화를 억제한다. PDGF 수용체 티로신 키나아제의 억제율은 마이크로타이터 ESISA 분석법(문헌 [Trinks et al., J. Med. Chem. 37, 1015-27 (1994)] 참조)에서 측정한다.
- <43> 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 PDGF 수용체 티로신 키나아제를 억제하기 때문에, 또한 신경교종, 육종, 전립선 종양과 같은 종양 질환, 및 결장 종양, 유방 종양 및 난소 종양을 치료하는 데에도 적당하다.
- <44> 또한, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 SCF 수용체(Kit) 자동 인산화 및 SCF-자극된 MAPK 키나아제(mitogen-activated protein kinase, 유사분열 인자-활성화 단백질 키나아제) 활성화와 같은 소위 줄기 세포 인자[SCF, Stem-cell factor; 또한 c-키트(Kit) 리간드 또는 스틸(steel) 인자라고 공지되어 있음]와 연관된 세포 과정을 억제한다.
- <45> 구체적으로, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 c-키트의 티로신 키나아제 활성을 억제한다. 이것은 c-키트의 세포질 키나아제 영역을 사용하는 티로신 키나아제 억제 분석에서 나타난다. 이 분석은 다음과 같이 수행한다: 배큘로바이러스(baculovirus) 공여 벡터 pFbacG01(GIBCO제)을 사용하여, 인간 c-키트의 세포질 키나아제의 아미노산 영역 아미노산 544-976을 발현하는 재조합체 배큘로바이러스를 생성한다. c-키트의 세포질 영역에 대한 코딩 서열은 인간 자궁 c-DNA 라이브러리(Clontech제)로부터 PCR에 의해 증폭시킨다. 증폭된 DNA 단편 및 pFbacG01 벡터는 BamHI 및 EcoRI를 사용한 분해에 의해 절찰(ligation)에 적합하도록 제조한다. 이들 DNA 단편을 절찰시켜 배큘로바이러스 공여 플라스미드 c-키트를 얻는다. 바이러스 제조, Sf9 세포내에서의 단백질 발현 및 GST-융합된 단백질의 정제는 다음과 같이 수행한다:
- <46> 바이러스의 제조: c-키트 키나아제 도메인을 함유한 전이 벡터(pFbacG01-c-키트)를 DH10Bac 세포주(GIBCO제)내에 형질감염시키고, 형질감염된(transfected) 세포를 선택적 아가 플레이트상에 플레이트하였다. 융합 서열이 바이러스 게놈(세균이 보유함)내에 삽입되지 않은 콜로니는 청색이다. 단일 백색 콜로니를 골라내고 바이러스 DNA(bacmid)를 표준 플라스미드 정제 과정에 의해 세균으로부터 분리한다. 이어서, Sf9 세포 또는 Sf21 세포(American Type Culture Collection)를 25 cm² 플라스크 내에서 셀렉틴(cellfectin)시약을 사용하여 바이러스 DNA로 형질감염시킨다.
- <47> Sf9 세포내 소규모 단백질 발현의 측정: 바이러스를 함유한 배지를 형질전환된 세포 배양물로부터 수거하고, 이를 감염에 사용하여 타이터를 증가시킨다. 2회 감염 후 수득한 바이러스 함유 배지를 대규모 단백질 발현에 사용한다. 대규모 단백질 발현을 위하여, 100 cm² 등근 조직 배양 플레이트를 5x10⁷ 세포/플레이트로 접종하고, 1 ml의 바이러스 함유 배지(약 5 MOI)로 감염시킨다. 3 일 후, 세포를 플레이트에서 긁어내고, 500 rpm에서 5 분 동안 원심분리한다. 100 cm² 플레이트 10 내지 20 개로부터 얻은 세포 펠렛을 빙냉 용균용 완충액(25 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) 50 ml중에 재현탁시킨다. 세포를 얼음상에서 15 분 동안 교반한 후, 5000 rpm에서 20 분 동안 원심분리한다.
- <48> GST-태그된 단백질의 정제: 원심분리된 세포 용해물을 2 ml 글루타티온-세파로즈 컬럼(Pharmacia제)상에 로딩하고, 10 ml의 25 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl을 사용하여 3회 세척한다. GST-태그된 단백질을 25 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 10 mM의 환원된-글루타티온, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% 글리세롤에 의해 10개로 (각각 1 ml) 용출하고, -70 °C에서 보관한다.
- <49> 키나아제 분석: 정제된 GST-c-키트를 사용하는 티로신 단백질 키나아제 분석을 200 내지 1800 ng의 효소 단백질

(비(比)활성에 의존함), 20 mM 트리스-HCl(pH 7.6), 3 mM $MnCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 μM Na_3VO_4 , 5 μg /ml 폴리(Glu, Tyr) 4:1, 1% DMSO, 1.0 μM ATP 및 0.1 μCi [γ - ^{33}P]ATP를 함유한 30 μl 의 최종 부피 중에서 수행한다. [γ - ^{33}P]ATP로부터 ^{33}P 가 폴리(Glu, Tyr) 4:1 기질 내에 결합하는 것을 측정함으로써 억제제 존재하에 또는 억제제 없이 활성을 분석한다. 분석물(30 μl)은 하기 기재된 조건하에 상온에서 96-웰 플레이트에서 분석하고, 20 μl 의 125 mM EDTA를 첨가함으로써 종료한다. 이어서, 40 μl 의 반응 혼합물을 메탄올에 5 분간 미리 침지시킨 임포빌론-PVDF 막[미국 매사츄세츠주 베드포드(bedford)에 소재한 밀리포어(Millipore)제]상에 옮기고, 물로 세정한 후, 0.5% H_3PO_4 로 5 분간 침지시키고, 차단된 진공원을 갖는 진공 매니폴드상에 탑재한다. 모든 시료를 점적한 후, 진공을 연결하고, 각 웰을 0.5% H_3PO_4 200 μl 로 세정한다. 막을 제거하고, 진탕기상에서 1.0% H_3PO_4 로 4회 세척하고, 에탄올로 1회 세척한다. 막을 상온에서 건조시키고, 팩카드 탐카운트 96-웰 프레임 내에 탑재하고 10 μl /웰의 마이크로신티(MicrocintTM, Packard제)를 첨가한 후, 막을 계수한다. 2배수로 4가지 농도(대개 0.01, 0.1, 1 및 10 μM)의 각 화합물의 억제율을 선형 회귀 분석함으로써 IC_{50} 값을 계산한다. 단백질 키나아제 활성의 1 단위는 37 °C에서 단백질 mg당 1 분 동안 [γ - ^{33}P]ATP로부터 1 nmole의 ^{33}P ATP가 기질 단백질에 전달된 것으로 정의한다.

<50> 또한, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 SCF 수용체 (및 c-키트, 원종양 유전자)의 자동인산화를 억제한다. SCF 수용체의 자동인산화 억제는 예를 들어, M07e 세포, 즉 증식에 대해 SCF에 의존하는 인간 전거대핵세포 (promegakaryotic) 백혈병 세포주를 사용하여 측정할 수 있다. 이것은 미국 오레곤 헬스 사이언스즈 유니버시티 그로버 백바이(Grover Bagby, Oregon Health Sciences University)로부터 구한다. 10 FBS 및 2.5 ng/ml GC-CMF가 보충된 RPMI 1649 배지 중에서 세포를 배양한다. GM-SCF 및 SCF는 상업적으로 입수가능하다. 혈청-제거된 M07e 세포를 준비하고, 제조한 SCF에 의해 37 °C에서 10 분간 자극되기 전의 시험 물질과 함께 37 °C에서 90분간 배양한다. 동일한 양의 세포 용해물을 항-포스포티로신 항체를 사용하는 웨스턴 블롯에 의해 분석한다(문헌 [Buchdunger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92, 2558-62 (1995)] 참조). 면역-결합된 (immunodecorated) 단백질은 영국에 소재한 아머삼(Amersham)으로부터 구한 ECL 웨스턴 블롯팅 시스템에 의해 검출한다.

<51> 상기 기재된 특성에 기초하여, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 예를 들어, 소세포 폐암에서 종양-억제 물질로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 아테롬성 동맥경화증, 혈전증, 긴선, 경피증, 및 섬유증과 같이 악성이 아닌 증식성 질환의 치료제로서 사용할 수 있고, 또한, 예를 들어 5-플루오로우라실과 같은 화학요법제의 혈독성 효과에 대항하도록 줄기 세포를 보호하기 위해서, 그리고 천식에 사용할 수 있다. 구체적으로는, PDGF 수용체 키나아제의 억제에 반응하는 질병의 치료를 위해 사용할 수 있다.

<52> 추가로, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 기타 화학요법제를 사용하는 암 치료 시에 다중 약물 내성이 발생하는 것을 예방하거나, 또는 기타 화학요법제에 이미 존재하는 내성을 없애준다. 또한, 상기 기재된 효과와 무관하게, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을, 구체적으로는 다른 c-키트 억제제 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) 또는 c-Src 활성의 억제제와 같은 기타 항종양제와 함께 유리하게 사용할 수 있다.

<53> 또한, Abl 키나아제, 구체적으로 v-Abl 키나아제는 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물에 의해 억제된다. 문헌 [N. Lydon et al., Oncogene Research 5, 161-173 (1990)] 및 [J.F. Geissler et al., Cancer Research 52, 4492-8 (1992)]의 방법에 따라, v-Abl 티로신 키나아제의 억제율을 측정한다. 상기 방법에서는 [γ - ^{32}P]-안지오텐신 II 및 [γ - ^{32}P]-ATP를 기질로서 사용한다.

<54> 유사하게, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 또한 Bcr-Abl 키나아제를 억제하여(문헌 [Nature Medicine 2, 561-566 (1996)] 참조), Bcr-Abl-양성 암의 치료 및 백혈병(특히 아파토시스(apoptosis) 작용 기전이 발견되어져 있는 만성 골수 백혈병 및 급성 림프아구 백혈병)과 같은 종양 질환의 치료에 적당하고, 백혈병 줄기 세포의 아군에 대한 효과를 나타내고, 상기 세포 제거(예, 골수 제거) 후 이들 세포의 시험관내 정제 및 암세포가 일차 제거된 세포의 재이식(예, 정제된 골수 세포의 재이식)에 대해 가능성을 나타낸다.

<55> c-Abl 단백질 티로신 키나아제에 대한 활성 시험: 시험은 다음과 같이 필터 결합 분석법에 따라 수행한다. c-Abl의 His-표지된 키나아제 영역을 클로닝하고, 문헌 [Bhat et al., J. Biol. Chem. 272, 16170-5 (1997)]에 기재된 바와 같이 배클로바이러스/Sf9 시스템에서 발현시킨다. 37 kD (c-Abl 키나아제)의 단백질을 코발트 금

속 착화합물 컬럼에 이어서 음이온 교환 컬럼에 걸친 2단계 과정에 의해 정제하여 1 내지 2 mg/l의 Sf9 세포를 수득한다. c-Ab1 키나아제의 순도는 SDS-PAGE 후 코마시 블루 염색에 의해 90% 초과인 것으로 판정되었다. 분석물은 총 부피 30 μ l로 1% DMSO 존재하에 30 μ g/ml Poly-Ala, Glu, Lys, Tyr - 6:2:5:1 (Poly-AEKY, Sigma P1152)을 사용하여 c-Ab1 키나아제(50 ng), 20 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 μ M Na₃VO₄, 1 mM DTT 및 0.06 μ Ci/분석물 [γ ³³P]-ATP (5 μ M ATP)를 함유한다. 반응은 10 μ l의 250 mM EDTA를 첨가함으로써 종료시키고, 30 μ l의 반응 혼합물을 메탄올에 5분간 미리 침지시킨 임포빌론-PVDF 막[미국 매사츄세츠주 베드포드에 소재한 밀리포어제]상에 옮기고, 물로 세정한 후, 0.5% H₃PO₄로 5 분간 침지시키고, 차단된 진공원을 갖는 진공 매니폴드상에 탑재한다. 모든 시료를 점적한 후, 진공을 연결하고, 각 웰을 0.5% H₃PO₄ 200 μ l로 세정한다. 막을 제거하고, 진탕기상에서 0.5% H₃PO₄로 (4회) 세척하고, 에탄올로 1회 세척한다. 막을 상온에서 건조시키고, 팩카드 탐카운트 96-웰 프레임내에 탑재하고, 10 μ l/웰의 마이크로신티(MicroscintTM, Packard제)를 첨가한 후, 막을 계수한다.

<56> Bcr-Ab1에 대한 활성 시험: p210 Bcr-Ab1 발현 벡터 pGDP210Bcr/Ab1 (32D-bcr/Ab1)로 형질전환된 생쥐 골수계 선조 세포주 32Dc13은 제이. 그리핀[J. Griffin, 미국 매사츄세츠주 보스턴에 소재한 다나 패이버 캔서 인스티튜트(Dana Faber Cancer Institute)제]으로부터 얻었다. 세포는 구조적으로 활성을 갖는 Ab1 키나아제와 함께 융합 Bcr-Ab1 단백질을 발현하고, 독립적 성장 인자를 증식시킨다. 세포는 RPMI 1640(AMIMED), 10% 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민(Gibco제)("완전 배지") 중에서 팽창시키고, 작업 스톱은 동결 배지[95% FCS, 5% DMSO (SIGMA 제)] 중에 바이알 당 2 x 10⁶ 세포의 분취액을 동결시킴으로써 제조한다. 해동시킨 후, 실험용으로 최대 10 내지 12 계대(passage) 동안 사용한다.

<57> 세포 분석에 있어서, 화합물을 DMSO에 용해시키고, 완전 배지로 희석시켜 초기 농도 10 μ M을 얻고, 이어서 완전 배지 중의 연속 3배 희석액을 제조한다. 50 μ l 완전 배지 중의 200,000 32D-Bcr/Ab1 세포를 96웰 둥근 바닥 조직 배양물 플레이트 내의 각 웰에 접종한다. 시험 화합물의 연속 3배 희석액을 웰당 50 μ l씩 세포에 3배수로 첨가한다. 미처리 세포는 대조군으로서 사용한다. 화합물을 세포와 함께 37 °C에서 90분간 배양한 후, 조직 배양 플레이트를 1300 rpm(Backman, GPR 원심분리기)에서 원심분리하고, 임의의 펠릿 세포가 제거되지 않도록 조심스럽게 흡인함으로써 상층액을 제거하였다. 세포 펠릿은 150 μ l 용균용 완충액(50 mM 트리스/HCl, pH 7.4, 150 mM 염화나트륨, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 2 mM 나트륨 오르도-바나테이트, 1 mM PMSF, 50 μ g/ml 아프로티닌 및 80 μ g/ml 류페틴)을 첨가함으로써 용해시키고, ELISA에 대해 즉시 사용하거나 사용전까지 -20 °C의 플레이트에 동결 보관한다.

<58> 블랙 ELISA 플레이트(Packard HTRF-96 블랙 플레이트)를 50 μ l PBS 중 토끼 다클론 항-Ab1-SH3 도메인 Ab 06-466(Upstate 제) 50 ng/웰을 사용하여 4 °C에서 미리 밤새 코팅한다. 0.05% 트윈(Tween) 20(PBST) 및 0.5% 탑블록(TopBlock; Juro)를 함유한 200 μ l/웰 PBS를 사용하여 3회 세척한 후, 나머지 단백질 결합 부위는 200 μ l/웰 PBST, 3% 탑블록을 사용하여 실온에서 4시간 동안 차단한 후, 4 °C에서 3 내지 4시간 동안 50 μ l의 비처리 또는 화합물-처리된 세포의 용해물(웰당 총 단백질 20 μ g)과 함께 배양한다. 3회 세척한 후, 차단 완충액 중에 0.2 μ g/ml로 희석된, 알칼리 포스파타제(Zymed)로 표지된 50 μ l/웰의 항-포스포티로신 Ab PY20(AP)를 첨가하고, 4 °C에서 밤새 배양한다. 모든 배양 단계에 대하여, 플레이트를 플레이트 실러(Costar)로 밀폐시킨다. 최종적으로, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 탈이온수로 1회 세척한 후, 에머랄드(Emerald) II를 갖는 AP-기질 CDPStar RTU의 90 μ l/웰을 첨가한다. 플레이트를 팩카드 탑실-A(Packcard TopsealTM-A) 플레이트 실러로 밀봉하고, 실온의 어두운 곳에서 45 분간 배양하고, 팩카드 탐카운트 마이크로플레이트 신틸레이션 카운터(Packcard Top Count Microplate Scintillation Counter, Top Count제)를 사용하여 초당 계수(CPS, count per second)를 측정함으로써 발광을 정량한다. 비처리 32D-Bcr/Ab1 세포의 용해물을 사용하여 얻은 ELISA-관독(CPS)와 분석-배경값(세포 용해물을 제외한 모든 성분)에 대한 관독 사이의 차이를 계산하고, 이들 세포내에 존재하는 구성적으로 인산화된 Bcr-Ab1 단백질은 100%로 간주한다. Bcr-Ab1 키나아제 활성에 대한 화합물의 활성을 Bcr-Ab1 인산화의 감소율로 나타낸다. IC₅₀ 및 IC₉₀에 대한 값은 그래프의 외삽법에 의해 투여량 반응 곡선으로부터 결정한다.

<59> 돌연변이 Bcr-Ab1에 대한 활성시험: 32Dc13 세포가 p210 Bcr-Ab1 대신 돌연변이 Bcr-Ab1로 형질감염된 것을 제외하고는 상기 기재된 바와 같이, M351T 돌연변이 Bcr-Ab1 키나아제 활성에 대한 화합물의 활성을 평가한다.

<60> c-Raf-1 단백질 키나아제 분석: 재조합 c-Raf-1 단백질은 활성있는 c-Raf-1 키나아제 제조에 필요한 V-Src 재조

합 배클로바이러스 및 v-Ras 재조합 배클로바이러스와 함께 GST-c-Raf-1 재조합 배클로바이러스를 사용하여 Sf21 세포를 삼중 감염시킴으로써 얻는다(문헌 [Williams et al., PNAS 1992; 89 : 2922-6]). 활성있는 Ras(v-Ras)는 c-Raf-1을 세포막으로 이동(recruit)시키는 데 필요하고, v-Src는 c-Raf-1을 인산화시킴으로써 완전히 활성화시키는 데 필요하다.

<61> 150 mm 디시 당 2.5×10^7 세포로 세포를 접종하여, 실온에서 1시간 동안 150 mm 디시에 부착되도록 한다. 배지(10% FBS를 함유한 SF 900 II)를 흡인하고, 총 부피 4 내지 5 ml에서 재조합 배클로바이러스 GST-c-Raf-1, v-Ras 및 v-Src를 각각 3.0, 2.5 및 2.5 MOI로 첨가하였다. 세포를 실온에서 1 시간 동안 배양한 후 15 ml 배지를 첨가한다. 감염된 세포를 27 °C에서 48 내지 72 시간 동안 배양한다. 감염된 Sf21 세포를 긁어내고, 50 ml 튜브에 수거하고, 소르볼(Sorvall) 원심분리기에서 4 °C, 1100 g로 10분간 원심분리한다. 세포 펠릿을 빙냉 PBS로 1회 세척하고, 2.5×10^7 세포당 0.6 ml 용균용 완충액을 사용하여 용해시킨다. 얼음상에서 때때로 피펫팅한 지 10분 후에는 세포가 완전히 용해된다. 세포 용해물을 ss-34 로터가 장착된 소르볼 원심분리기에서 4 °C, 14,500 g로 10분간 원심분리하고, 상층액을 신선한 튜브로 옮겨, -80°C에 보관한다. 2.5×10^7 세포당 빙냉 PBS 중에 평형 상태로 된 100 μ l의 팩킹된 글루타티온-세파로즈 4B 비드를 사용하여 세포 용해물로부터 c-Raf-1을 정제한다. GST-c-Raf-1은 4 °C에서 1시간 동안 요동시키면서 상기 비드에 결합시킨다. 비드에 결합된 GST-c-Raf-1을 컬럼에 옮긴다. 컬럼을 용균용 완충액으로 1회 세척하고, 빙냉 트리스 완충 식염수로 2회 세척한다. 빙냉 용출 완충액을 첨가하고, 컬럼 흐름을 정지시켜서, 유리 글루타티온이 글루타티온 세파로즈 비드와 GST-c-Raf-1과의 상호작용을 와해시킨다. 분획물(1 ml)를 미리 냉각된 튜브에 수거한다. 각각의 튜브에는 동결 해동 주기 동안 키나아제의 활성을 유지시키기 위한 10% 글리세롤(최종 농도)을 함유한다. GST-c-Raf-1 키나아제 단백질의 정제된 분획물을 -80 °C에 보관한다.

<62> I κ B를 c-Raf-1 키나아제에 대한 기질로서 사용한다. I κ B는 세균에서 His-태그된 단백질 BL21로서 발현된다. I κ B 플라스미드를 함유한 LysS 세균은 LB 배지 중 0.6의 OD600으로 성장한 후, IPTG(최종 농도 1 mM)와 함께 37 °C에서 3 시간 동안 I κ B를 발현하도록 유도하고, 이어서 초음파 처리(각각 초음파 처리 완충액[50 mM 트리스(pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM EDTA] 중 1 분간 3 회로 마이크로팁 제한 세팅}에 의해 세균을 용해시키고, 10,000 g에서 15 분간 원심분리한다. 상층액을 황산암모늄과 혼합하여 최종 농도 30%를 얻는다. 혼합물을 4 °C에서 15 분간 요동시킨 후, 10,000 g에서 15 분간 회전시킨다. 펠릿을 10 mM BSA를 함유한 결합 완충액(Novagen제)중에 재현탁시킨다. 용액을 Ni-아가로스(Novagen제)에 적용하고, 노바젠 매뉴얼에 따라 세척한다. 용출용 완충액[0.4 M 이미다졸, 0.2 M NaCl, 8 mM 트리스(pH 7.9)]을 사용하여, I κ B를 컬럼으로부터 용출시킨다. 단백질을 함유한 분획물을 50 mM 트리스(pH 8), 1 mM DTT 중에 투석한다.

<63> c-Raf-1 단백질 키나아제의 활성은 억제제 존재하에 또는 억제제 없이, [γ -³³P]ATP로부터 ³³P가 I κ B 내에 결합하는 것을 측정함으로써 분석한다. 분석은 96-웰 플레이트내에서 상온으로 60 분간 수행한다. 분석물은 총 부피 30 μ l로서 c-Raf-1 키나아제(400 ng), 25 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 10 μ M Na₃VO₄, 1mM DTT 및, 1% DMSO 존재하에 600 ng의 I κ B를 사용하는 0.3 μ Ci/분석물 [γ -³³P]-ATP (10 μ M ATP)를 함유한다. 반응은 10 μ l의 250 mM EDTA를 첨가함으로써 종료시키고, 30 μ l의 반응 혼합물을 메탄올에 5 분간 미리 침지시킨 임포빌론-PVDF 막[미국 매사츄세츠주 베드포드에 소재한 밀리포어제]상에 옮기고, 물로 세정한 후, 0.5 % H₃PO₄로 5 분간 침지시키고, 차단된 진공원을 갖는 진공 매니폴드상에 탑재한다. 모든 시료를 점적한 후, 진공을 연결하고, 각 웰을 0.5% H₃PO₄ 200 μ l로 세정한다. 막을 제거하고, 진탕기상에서 0.5% H₃PO₄로 (4회) 세척하고, 에탄올로 1회 세척한다. 막을 상온에서 건조시키고, 팩카드 탐카운트 96-웰 프레임내에 탑재하고, 10 μ l/웰의 마이크로신티(MicroscintTM, Packard제)를 첨가한 후, 막을 계수한다.

<64> 또한, 놀랍게도 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물이 세포, 특히 종양 및 뇌에서 생체 환원(탈산소화) 반응으로 인해 저산소증-선택성 제품으로서 작용하는 예상외의 가능성을 가진 것으로 발견되었다. 특히, 저산소증-활성화 전구약물은 암 치료에 유용하다. 왜냐하면, 심각한 저산소증이 고형 종양 조직 또는 뇌에서 발생하기 때문이다. 저산소성 세포는 비독성 저산소증-활성화 전구약물에 의한 치료용으로 개발될 수 있다. 따라서, N-옥사이드 부분의 순 환원 반응으로 인해, 종양 또는 뇌에서 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물이 보다 잘 흡수되고, 종양 또는 뇌에 화학식 (I) 또는 (II)의 환원된 형태의 화합물이 축적된다.

<65> 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 또다른 장점은 (포화성 시스템, 아마도 P-gp에 의한) 담체-매개 유출에 대하

여 화합물 A보다 탁월한 효과를 갖는 것이다. 이렇게 보다 적게 유출된 것의 결과는

<66>

- 보다 높은 흡수성

<67>

- 뇌내의 보다 높은 약물 수준, 및

<68>

- 종양내의 보다 높은 약물 수준이다.

<69>

P-gp 및 수송 기전에 대한 상기 효과는 다음과 같이 증명할 수 있다: 수송 실험을 위하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 필터(Falcon™)상에서 성장한 Caco-2 세포 단일층을 21 내지 25 일 동안 사용한다. 각각 강력한 유출 펌프 억제제인 CsA 및 베라파밀(Verapamil) 존재 하에 및 부재 하에, PET 필터상에 성장된 Caco-2 세포 단일층을 통한 화합물의 유출량 및 Caco-2 세포 없이 PET 필터만을 통한 화합물의 유출량을 다음과 같이 측정한다: 수송 실험 전에, 수용체 구획내 배양 배지(선단 면에 대해서는 0.2 ml, 하측 면에 대해서는 1.0 ml)를 37 °C에서 미리 배양된 수용체 용액(HBSS, 적절하게는 목적하는 억제제를 함유함)으로 대체시킨다. 실험을 시작하기 위하여, 공여 구획내 배지(선단 면에 대해 0.2 ml, 하측 면에 대해 1.15 ml)를 37 °C에서 미리 배양된 공여 용액(HBSS 중의 화합물, 적절하게는 목적하는 억제제를 함유함)으로 대체시킨다. 150 μ l의 분취액들을 약 1 분 및 120 분 후에 공여면 및 수용면으로부터 제거한다. 선단에서 하측으로의 수송 실험 및 하측에서 선단으로의 수송 실험 둘 다를, 진탕하지 않고 37 °C의 인큐베이터내에서 3배수로 수행한다.

<70>

더우기, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 혈장 단백질 결합성은 화합물 A에서 관찰되었던 것보다, 유리 분획물 측면에서 및(또는) 혈장 단백질[예, 알부민, AAG(α -1-산 당단백질, α -1-acid glycoprotein)]과의 결합성에 있어서 우수하다. AAG와의 결합성이 낮을수록 N-옥사이드의 유리 분획물의 다양성이 보다 적게 나타나고, 화합물 A 화합물들의 유리 분획물의 효과를 갖게 된다. 400 mg 일일 투여량(화합물 A 900-2600 ng/ml 농도)의 임상 적으로 적당한 투여량에서 화합물 A의 유리 분획물은 4 내지 5%의 범위내에 있다. 적혈구 분배(partitioning)를 사용한 경우에, 화합물 A는 주로 알부민 및 α -1-산 당단백질(AAG)과 결합하는 것으로 밝혀졌다. 지질 단백질 및 감마 글로블린과 결합한 분획물은 5% 미만이었다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 혈장 단백질 결합 감소는 하기 실시예에서 나타난다.

<71>

화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 유리(또는 비결합된) 분획물은 화합물 A에 대해서도 사용되는 초원심분리법에 의해 측정한다(유럽 특허 출원 1250140호 또는 2000년 12월 22일에 출원된 PCT 특허 공개 WO 01/47507 참조). 인간 혈청 알부민(40 g/l) 및 α -1-산 당단백질(1 g/l)의 용액을 서렌센(Sørensen) 완충액(pH 7.4, 0.9% NaCl (w/v) 함유) 중에서 제조한다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 원액 30 μ l를 단백질 용액 3 ml 내에 직접 소량 첨가하여, 화학식 (I) 또는 (II)의 원하는 최종 농도 300-5000 ng/ml(에탄올 최종 농도 0.5%, 인자 1:200)을 얻는다. 일정하고 완만한 교반하에 37 °C로 30 분간 배양한 후, 소량 첨가된 단백질 시료를 폴리카르보네이트 원심분리 후막관을 사용하여 (고정 앵글 로터가 장착된) 원심분리기에서 37 °C, 200,000 g로 5 시간 이상 동안 원심분리한다. 제동 없이 회전을 정지시킨다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 농도는 (원심분리 전) 배양 후에 측정하고 원심분리 후 상층액 중에서 측정한다.

<72>

화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 약물동태학은 C_{max} (질량/부피의 단위로 혈장내 최고 관측 농도), 반감기(약물 투여 후 측정된 약리학적 반응이 반감된 것으로 관측된 시간; 한편으로, 반감기는 50% 이상 증가될 때에는 증대됨) 또는 수송 기전(예, P-gp)으로서 혈장내 AUC[질량-시간/부피 단위의 곡선 하 면적(AVC, Area Under the Curve)으로서 정의되는, 시간에 따른 혈장 농도]에 있어서 화합물 A보다 유리하다. 이러한 유리한 약물동태학은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 단일 투여량을 동물(동물 중 일군은 정맥내 투여하고, 동물 중 일군은 경구 투여함)에게 제공함으로써 나타난다. 혈액은 선택한 시간[예, 0.083 분(iv: intra-venous, 정맥내 투여) 및 iv 또는 po(po: per orally dosing, 경구 투여) 후 0.25, 0.5, 1.2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 및 48 시간]에 채취한다. 혈액을 원심분리함으로써 즉시 혈장을 제조한다. 변화되지 않은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 및 화합물 A는 HPLC/UV 검출 또는 LC-MS를 사용하여 혈장 중에서 측정한다.

<73>

더우기 화학식 (I) 또는 (II) 화합물의 혈장 단백질에 대한 결합 감소는, 결합되지 않은 약물의 분획(fu, fraction of unbound drug) 비율이 보다 높아짐으로 인해, 분포의 겉보기 부피가 증가될 수 있다. 유리하게는, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 기관 및 조직(뇌 포함)내의 분포는 화합물 A의 분포와는 다르다. 이것은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

<74>

- 방사능 표지되지 않은 N-옥사이드 투여한 후 생쥐 또는 쥐의 뇌 중의 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 및 화합물 A

<75> 동물(예, 생쥐 또는 쥐)은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 단일 투여량을 수용한다(동물 중 일군은 정맥내 치료되고, 동물 중 일군은 경구 치료됨). 동물은 선택한 시간[예, 0.083 분(iv 투여) 및 iv 또는 po 투여 후 1, 8, 24 및 48시간]에 희생시킨다. 치료된 동물의 뇌를 취하고, 뇌의 균질물을 제조하고, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 및 화합물 A의 분석(HPLC/UV 또는 LC-MS)을 위해 시료를 준비한다(예, 메탄올, 아세트니트릴 등과 같은 유기 용매를 사용한 균질물의 추출). 뇌 및 혈장 중의 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 및 화합물 A의 농도를 측정하고 뇌/혈장 비율을 결정한다.

<76> - 방사능 표지된 N-옥사이드 투여시 생쥐 또는 쥐 중의 방사성 물질의 분포

<77> 조직 분포 연구를 위하여, 예를 들어 방사성 표지된 N-옥사이드(예, [¹⁴C]-표지; 100 μCi/체중 kg)를 경구 투여 동물에게 체중 1 kg당 10 mg을 투여한다. 동물 신체 전체의 흡수/분포를 QWABL(quantitative whole-body autoradioluminography, 정량적인 신체 전반의 자동 방사 발광 사진)을 사용하여 조사한다. 선택한 시간에 동물을 희생시키고, 약 -75 °C의 드라이아이스와 헥산의 혼합물 중에 동결시킨다. 동결된 동물을 약 -75 °C의 예냉된 Na-CMC의 2% 수성 겔 중에 내장시킨다. -20 °C의 크라이오매크로컷 극저온 박절기[CryoMacrocut cryomicrotome, 독일 D-뉴슬로흐(D-Nussloch)에 소재한 레이카 인스트루. 게엠베하(Leica Instr. GmbH)]에서 두꺼운 절편을 얻는다. 단편을 -23 °C의 극저온 박절기에서 24 내지 60 시간 동안 탈수시킨다. 배경값의 증가를 최소화하기 위해 납 차폐 상자에서 실온으로 1일간 BAS III 이미징 플레이트[일본 도쿄에 소재한 후지 포토 필름 컴퍼니., 리미티드(Fuji Photo Film Co., Ltd)제]에 노출시킨다. 노출 기간 동안 약 2 dpm/mg (즉, 방사능이 신체에 고루 분포되어 있는 경우 총 방사능 선량의 약 0.2 내지 0.4%에 해당하는 방사능 농도)을 검출할 수 있다. 노출 종료 직후, 억제된 광 조건하에 1024 분해의 100 μm 스캐닝 단계로 후지(Fuji) BAS 2000 TR인 영상기에서 스캐닝을 수행한다. 이미지 분석을 다음과 같이 수행한다: 수득한 광자극된 광 데이터 파일을 배경값을 감함으로써 보정하고, MCID/M4 (3.0 Rev. 1.3) 이미지 분석기[캐나다 온타리오주 세인트캐더린에 소재한 이미징 리서치(Imaging Research) 제]를 사용하여 전기적으로 처리하고, 시료와 유사한 조건하에 처리된 방사능 혈액 스케일로부터 수득된 일차 다항식 보정 곡선을 사용하여 방사능 농도로 자동 전환시킨다. 검출 한계(LD) 및 정량 한계(QL)는 다음과 같이 결정한다:

<78> LD = 배경값 평균(n=10) + 3 SD ;

<79> QL = 3 LD.

<80> 측정된 면적 크기는 보정 곡선을 설정하는데 사용된 혈액 스케일의 각 혈액 표준의 것과 동일하다. 이미지 파일은 아도브 포토숍(Adobe Photoshop, 등록 상표) 소프트웨어를 사용하여 처리한다.

<81> QWABL을 사용하는 전체 방사능 물질 분포에 대해서는, 치료된 동물 중 절반만이 HPLC/UV 또는 HPLC 방사능 및 (또는) LC-MS를 사용하여 선택된 시료내 변화되지 않은 N-옥사이드 및(또는) 화합물 A를 측정하기 위한 기관 또는 조직으로 사용될 수 있다.

<82> 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 N-옥사이드가 보다 더 극성이기 때문에 CYP450s[1,2]에 대해 보다 작은 친화력을 갖는다. 이들 효소는 시판되는 대부분의 약물을 대사작용시킨다. 친화력이 적을 수록 보다 적은 약물/약물 상호작용 가능성으로 바뀌어진다. 구체적으로, 피페라진/피리딘 부분 내 염기성 질소 등을 차단하면, CYP2D6 효소에 대한 친화력이 감소하고, 효소는 피페라진 고리계 내 질소 같은 염기성 부분을 필요로 하는 아스파르트레이트 잔기와의, 특히 이온 상호작용에 의해 기질에 결합한다. 10 개의 다른 인간 간 마이크로솜에서 취한 풀(pool)은 각각 CYP450 이소자임 비활성에 대한 정해진 마커 기질을 사용하여, 마이크로솜의 대사 활성에 필요한 보조인자(NADPH)와 함께 배양한다. 가능한 억제제를 농도를 증가시키면서 첨가하고, 대사 반응은 해당 분석법(LC/MS, HPLC, 형광분석법)에 의해 평가한다. 억제제 없는 전환율을 100%로 설정하고, 억제율은 50% 전환을 억제하는데 필요한 억제제의 농도(IC₅₀)로서 계산한다. 하기 마커 기질을 사용한다:

<83>

CYP	기질	
	바람직한	허용가능한
1A2	에톡시레조루핀	카페인(저조한 대사 회전)
	펜아세틴	테오필린(저조한 대사 회전)
		아세트아닐리드(간세포에 대부분 적용됨)
		메톡시레조루핀
2A6	쿠마린	

2C8	패클리택셀(표준 이용 가능성?)	
2C9	S-와르파린	톨부트아미드(저조한 대사 회전)
	디클로페낙	
2C19	S-메페니토인(4-히드록시 대사 물질)	
	오메프라졸	
2D6	부푸라롤	메토프롤롤
	텍스트로메톨판	데브리소퀸
		코데린(모두 문제점은 없지만, 그리 흔하게 사용되지 않음)
2E1	클로르조옥사존	4-니트로페놀
		라우르산
3A4	미다졸람	니페디핀
	테스토스테론(2종 이상의 구조적으로 무관한 기질을 사용하는데 강력히 추천됨)	펠로디핀
		시클로스포린
		테르페나딘
		에리트로마이신
		심바스타틴

<84> 추가로, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 이식 결과 발생하는 질환, 예를 들어 동종 이식, 특히 폐색성 기관지염(OB, obliterative bronchiolitis), 즉 동종 폐 이식의 만성 거부와 같은 조직 거부의 치료에 유용한 효과를 나타낸다. OB 환자는 그렇지 않은 환자들과는 대조적으로 기관지 폐포 세척액 중의 PDGF 농도가 상승된 것으로 종종 나타난다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 기관 동종 이식된 쥐에게 예를 들어 50 mg/kg i.p.의 투여량으로 투여하는 경우, 가능한 상피 병변 및 기도 폐색의 형태를 분석하고 작용하는 면역조직화학적 경로를 조사하기 위하여 10일 후 및 30 일 후에 일군당 10 개의 이식편을 제거한 후에는, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물이 상피 괴사 또는 염증 세포에 의한 침투에 대해 어떠한 중요한 효과를 나타내지 않지만, 대조군과 비교하여 섬유 증식 및 루멘의 폐색이 현저히 감소된다. 상승 효과는 기타 면역 조절 물질 또는 소염성 물질과 함께, 예를 들어 시클로스포린 A(CsA), 라파마이신, 또는 아스코마이신과 함께, 또는 면역억제제 동족체, 예를 들어 시클로스포린 G, FK-506 또는 이에 필적하는 화합물[코르티코스테로이드, 시클로포스포미드, 아자티오프린, 메토티렉세이트, 브레퀴나, 레플루노미드, 미조리빈, 미코페놀산, 미코페놀레이트 모페틸, 15-데옥시스페구알린, 면역억제 항체, 구체적으로 백혈구 수용체에 대한 항체(예, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45, CD58 또는 그의 리간드)]와 함께, 또는 CTLA4Ig와 같은 면역조절화합물과 함께 사용될 때, 상승 효과가 나타날 수 있다. 예를 들어, CsA(1mg/kg s.c.)가 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물(50 mg/kg)과 혼합되면, 상승 작용이 관찰될 수 있다.

<85> 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 재발협착증 및 아테롬성 동맥경화증과 같은 혈관의 평활근 세포 유주(migration) 및 증식(PDGF 및 PDGF 수용체가 종종 일역을 담당함)과 관련된 질환에도 효과적이다. 이러한 시험관내 및 생체내 혈관의 평활근 세포의 유주 또는 증식에 대한 효과 및 결과는 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 투여함으로써 또한 생체내 기계적 손상에 따른 혈관 내막의 농후화(thickening)에 대한 효과를 조사함으로써 나타난다.

<86> 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 화합물은 시험관내 연구에 대해서 0.1 N HCl 또는 10 mM의 DMSO의 농도로 사용한다. 원액을 또한 세포 배양물로 희석하고, 실험용으로 10 내지 0.1 μM의 농도로 사용한다. 생체내 실험을 위하여, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 예를 들어 DMSO 중에 200 mg/ml의 농도로 용해시킨 후, 0.9% 식염수 용액중의 1% 트윈을 사용하며 1:20의 비율로 희석한다. 초음파 처리 후, 맑은 용액을 수득한다. 원액은 투여하기 전에 각각의 날짜에 신선하게 제조한다[화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 경구 투여용으로 이온수 중에 또는 비경구 투여용으로 0.9% 식염수 용액 중에 간단히 용해시킬 수 있다]. 수술하기 24 시간 전에 투여한다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 전체 관찰 기간 동안 매일 50 mg/kg i.p.의 일회 투여량으로 쥐에게 투여한다. 대조군 쥐에게는 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물이 없는 것을 제외하고는 동일한 제제를 제공한다.

경구 투여도 가능하다.

- <87> 평활근 대동맥 세포의 일차배양물은 문헌 [Thyberg et.al., Differentiation 25, 156-67 (1983)]에 기재된 방법을 약간 수정하여 9 내지 11 일생 DA(AG-B4, RT1a) 쥐 대동맥으로부터 분리한다. 대동맥을 세로 방향으로 절개하여 열고, 내피를 주의하여 제거한다. 외막 및 중간막을 분리하고, 중간막을 37 °C의 인산염 완충 생리 식염수 중의 0.1% 콜라게나제 및 DNase로 30 분간 분해시킨다. 세포를 원심분리하고, 배양 배지를 현탁시킨 후, 플라스틱 바이알 상에서 성장시킨다. 일차 세포를 2 내지 6 계대 접종한 후 실험에 사용한다. 계대이차 배양물은 10% 소 태아 혈청, 2 mmol/ml 글루타민, 100 mmol/ml 스트렙토마이신 및 100 IU/ml 페니실린이 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 중에 보관한다. 동정하기 위해서는, 세포를 유리 슬라이드 커버 상에서 성장시키고, 평활근 세포로부터 수득한 항- α -액틴 항체를 사용하여 면역조직화학적으로 염색한다 (하기 참조).
- <88> 평활근 세포의 유주는 상부 구획 및 하부 구획이 8 μ m 공극 크기의 폴리카르보네이트 막에 의해 분리되어 있는 트랜스웰(Transwell) 세포 배양 삽입물[미국 매사츨세츠주 캄브릿지에 소재한 코스타(Costar)제]를 사용하여 시험관내 정량한다. 세포 (1백만 세포/ml의 농도, 100 μ l)를 상부 구획에서 노출시킨다. 2시간 후에, 하부 구획에 60 ng/ml PDGF-BB또는 PDGF-AA[미국 뉴욕주 레이크 플래시드 (Lake Placid)에 소재한 업스테이트 바이오 테크놀로지 인크.(Upstate Biotechnology Inc.)제]를 첨가하고, 0.5% 소 태아 혈청 및 0.1% 소혈청 알부민이 보충된 하부 구획에 첨가하고, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 및 0.003 μ M의 농도로 첨가한다. 피브로넥틴-의존성 유주를 측정하기 위해서는, 트랜스웰 챔버를 4 °C의 10 mg/ml농도의 피브로넥틴(인간 세포 피브로넥틴, 업스테이트 바이오 테크놀로지 인크. 제)과 함께 24시간 동안 덮어둔다. 유주한 지 24 시간 후에 필터를 제거하고, 메탄올 중에 고정시키고, 메이어 해마톡실린 (Mayer's haematoxylin) 및 에오신으로 염색한다. 필터 막의 하부 면상에 유주된 세포는 400배 배율의 광학현미경의 도움으로 필터상의 특정 단편 영역을 계수함으로써 측정한다. 유주 억제율은 대조군에 대한 세포의 백분율로서 정량한다. 독성 효과의 가능성을 배제시키려면, 10% 소 태아 혈청이 보충된 DMEM 중에 3H-티미딘을 결합시킴으로써, 세포의 생존가능성을 시험한다. PDGF-AA에 의해, 특히 PDGF-BB에 의해 유도된 유주 억제는 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물에서 관찰된다.
- <89> 실험동물: 수컷 위스타(Wistar) 쥐[핀란드 헬싱키 대학의 래보라토리 애니멀 센터(Laboratory Animal Centre)로부터 구입]의 대동맥 및 경동맥을 박피한다. 쥐를 240 mg/kg 클로랄 수화물 i.p.로 마취시키고, 부프레노르핀 [영국 홀(Hull)에 소재한 템제식, 렉티트 앤 콜만(Temgesic, Reckitt & Coleman)제]을 수술 전후기 및 수술 후의 고통 완화를 위하여 투여한다. 모든 동물을 NIH의 "실험 동물 케어의 원리(Principles of Laboratory Animal Care)" 및 "실험 동물 케어 및 이용 지침(Guide for the care and Use of Laboratory Animals)" (NIH 간행물 86-23, 1985년 개정)을 준수하여, 사람이 관리한다. 200 내지 300 g의 쥐를 박피 과정에 사용한다. 2F 색전 절제술 카테터[미국 캘리포니아주 27, 산타 애나(Santa Ana)에 소재한 백스터 헬스케어 코퍼레이션(Baxter Healthcare Corporation)제]의 관내 계대 접종을 통하여 좌측 총경 동맥의 내막을 박피한다. 내막을 제거하기 위하여, 카테터를 3회 루멘을 통해 통과시키고, 0.2 ml 공기로 팽창시킨다. 카테터를 제거한 후 외 경동맥을 결찰시키고, 상처를 봉합한다. 조직학적 변화는 박피한 지 4 일 후에 중간 경동맥 단편을 참고로 평가한다. 2F 포카티(Fogarty) 동맥 색전 절제술 카테터를 사용하여 흉부 대동맥의 내막을 박피한다. 카테터는 좌측 장골 동맥을 통해 흉부 대동맥내로 삽입하고, 0.2 ml 공기로 팽창시키고, 루멘을 통해 5회 통과시켜 내막을 제거한다. 이어서 장골 동맥을 결찰시킨다. 조직학적 변화는 3회(3, 7 및 14일)를 선택하여 평가한다.
- <90> 증식성 세포를 정량하기 위하여, 쥐 경동맥 박피 후에 세포를 브로모데옥시유리딘(BrdU)으로 표지하기 위하여 3 가지 다른 공정을 사용한다. 이 모델에서는, 박피한 지 24 시간 후에 배지 세포 증식이 시작되고, 72 내지 96 시간 후에 내막내의 세포가 최초로 나타난다. 내막내의 세포가 나타나기 전에 평활근 세포의 증식을 정량하기 위하여, 박피한 지 0 내지 72 시간의 수술 후 기간 동안 0.1ml BrdU-표지 시약[미국 캘리포니아주 샌프란시스코에 소재한 지메드(ZYMED)제]을 정맥내 투여한다(총 0.1 ml 6회). 유주의 초기 과동 동안의 증식을 정량하기 위하여, 쥐에게 수술 후 72 내지 96 시간의 기간에 걸쳐 8 시간 간격으로 0.1 ml BrdU-표지 시약을 3회 제공한다. 유주의 초기 과동 종료시의 증식을 정량하기 위하여, 제 3군의 쥐에게 희생시키기 3시간 전에 펄스 투여량인 0.3 ml BrdU를 제공한다.
- <91> 조직학적 시료를 파라핀중에 내장시키기 위해 3% 파라포름알데히드 용액중에 4 시간 동안 고정시킨다. 형태학적 변화는 메이어 해마톡실린-에오신으로 염색된 파라핀 단편으로부터 평가한다. 다른 혈관 단편의 세포는 400 배 배율에서 계수한다. 배양물 중의 세포, 및 박피 상해 4일 이내에 신내막(neo-intima)에 나타나는 세포를 동정하기 위해서는, 평활근 세포로부터 수득한 항- α -액틴 항체[이스라엘 레호보트(Rehovot)에 소재한 바이오 메

이커(Bio-Maker)제]를 사용하여 아세톤-고정된 시료의 면역조직화학적 염색을 수행한다. 제 1 평활근 세포는 동일한 염색법을 사용하여 아세톤 고정된 유리 커버 슬라이드상에서 동정한다. 단편을 제 1 항체와 함께 배양 (희석 비율 1:2000)하고, 세척하고, 퍼옥시다제-접합된 토끼-항-생쥐-Ig 및 염소-항-토끼-Ig과 함께 연속적으로 배양한 후, 색소원 3-아미노-9-에틸카르바졸 및 과산화수소와 함께 기질 용액으로 처리한다. BrdU 균주는 제 1 생쥐 항체[Bu20a, 덴마크 A/S 다코(Dako)제] 및 벡타스테인 엘리트 ABC-키트[Vectastain Elite ABC-Kit, 미국 캘리포니아주 버리네임(Burliname)에 소재한 벡터 래보라토리즈(Vector Laboratories)제]를 사용하여 파라핀 단편으로부터 제조한다. 단편을 탈파라핀시키고, 500 W의 전자파로 처리(pH 6의 0.1 M 시트르산 완충액 중에 5 분간 2회)한 후, 0.15 M 시트르산삼나트륨 중의 95% 포르마미드로 70 °C에서 45 분간 처리한다. 제조사의 지침에 따라 항체 희석액을 제조한다. 단편을 메이어 해마톡실린 및 에오신으로 대조 염색하고, 내막, 중간막 및 외막에 대하여 분리하여 양성 세포를 계수한다.

<92> 치료된 동물의 경동맥에서는, 평활근 세포를 계산한 결과, 세포 수가 현저히 감소된 것으로 밝혀졌다. 외막 및 중간막에서도 세포 수가 현저히 감소된 것으로 나타났다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 결과로서, 처음 두 표지 기간(0-72시간 및 72-96 시간) 동안 BrdU-표지된 세포의 절대수는 내막, 중간막 및 외막에서 약간 감소된 것으로 나타나고, 그 후 93-96 시간 동안 표지된 세포의 수는 모든 구획에서 감소된 것으로 나타났다. 평활근 세포 수가 감소된 것은 대동맥-박피된 동물에서도 유사하게 발견되어 있다.

<93> 이러한 발견에 따라서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 증식, 구체적으로 혈관 평활근 세포의 유주를 억제할 수 있다.

<94> 또한, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 맥관 형성을 억제할 수 있다. 이것은 다음과 같이 나타낼 수 있다: 성장 인자(VEGF 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PDGF 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 bFGF 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 또는 성장 인자 없이 아가(0.8%) 및 헤파린(2U/ml)을 함유한 챔버를 정상 생쥐(C57 BL/6)내에 피하 이식한다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 누드 생쥐 이중 이식 모델에서 우수한 항-종양 활성을 나타내는 투여량으로 경구 투여한다. 챔버를 이식하기 하루 전에 투여를 시작한다. 5일 후에 챔버를 제거한다. 맥관 형성 효과는 이식 주변의 성장된 혈관신생 조직 및 조직(외부 혈액)의 혈액 함량을 모두 측정함으로써 정량한다. 혈액은 헤모글로빈을 측정함으로써 결정된다. 혈관이 아가내로 성장하기 않지만, 항맥관형성 효과가 존재하는 경우에 아가는 진한 적색이 된다. 화합물이 성장 인자에 의해 유도되어 혈액이 증가하는 것을 억제하는 경우, 당해 화합물이 관련 성장 인자의 맥관 형성 효과를 차단하는 것으로 보여진다. 혈액의 부피가 아니라 중량을 억제시키게 되면, 섬유아세포의 증식에 대한 효과를 갖는 것으로 생각된다. 억제 반응을 억제하는 것은 창상 치유를 억제하는 것으로 간주된다. 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 매일 일회 50 mg/kg으로 경구 투여되면 세가지 성장 인자(VEGF, PDGF, 및 bFGF) 모두의 맥관 형성 효과를 억제한다.

<95> 흥미롭게도, 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-히드록시메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드, 4-[(메틸-4-옥시도-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드, 및 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드는 N-[4-메틸-3-(4-피리딘-3-일-피리미딘-2-일아미노)-페닐]-4-(4-메틸-피페라진-1-일메틸)-벤즈아미드(STI 571 또는 이하, 화합물 A)의 대사 물질을 나타내고, 화합물 A를 투여한 후에 인체에서 발견될 수 있는 형태이다. 화합물 A는 EP 0 564 409 B1에 기재되어 있고, 또한 PCT 특허 공개 WO 99/03854 에는 메탄 설포네이트 염의 형태로 기재되어 있다.

<96> 상기 언급된 대사 물질 뿐만 아니라, 다음과 같은 추가의 화합물 A 대사 물질이 원숭이에서 동정되어 있다: 4-[(4-메틸카르보닐-1-피페라지닐)메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐}벤즈아미드, 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)메틸]-N-{4-카르복시-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐}벤즈아미드, 피리디닐 부분이 고리 탄소 원자에서 히드록시에 의해 치환되는 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드, 및 피리디닐 부분이 고리 탄소 원자에서 히드록시에 의해 치환되는 4-[(1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드.

<97> 화학식 (II)에 있어서, R_1 이 수소이고, R_2 가 메틸 또는 히드록시메틸이고, R_3 가 메틸이고, 별표는 산소 원자를 선택적으로 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수 있는 질소 원자를 나타내고, 단, R_2 가 메틸인 경우, 별표로 표시된 3 개의 질소 원자중 적어도 하나는 산소를 보유하는 화합물 또는 그의 염이 바람직하다.

<98> 또한, 화학식 (II)에 있어서, R_1 이 수소이고, R_2 가 히드록시-저급-알킬이고, R_3 가 메틸이고, 별표는 산소를 선택적으로 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성할 수 있는 질소 원자를 나타내는 화합물 또는 그의 염이 보다 더

바람직하다.

<99>

보다 더 바람직한 화합물은 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)메틸]-N-{4-히드록시메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐}벤즈아미드, 4-[(4-메틸-4-옥시도-1-피페라지닐)메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐}벤즈아미드, 및 4-[(메틸-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드, 및 이들 화합물의 제약적으로 허용가능한 염으로부터 선택된다.

<100>

추가로, 하기 실시예에 기재된 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그의 염, 특히 그의 제약적으로 허용가능한 염이 가장 바람직하다.

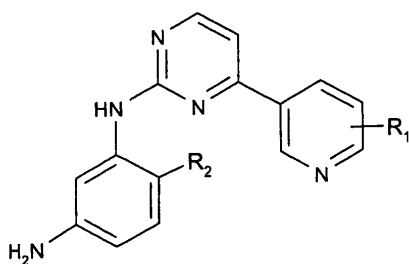
<101>

화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그의 염은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 제조에 관하여 상기 기재되어 있지 않은 자체 공지된 방법, 특히 하기 방법 (a) 또는 방법 (b)에 따라 제조한다:

<102>

(a) 하기 화학식 (III)

화학식 III

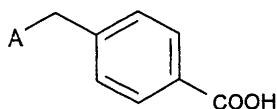


<103>

<104>

[여기서, R₁ 및 R₂는 화학식 (I)에 정의된 의미를 가짐]의 화합물을 하기 화학식 (IV)

화학식 IV



<105>

<106>

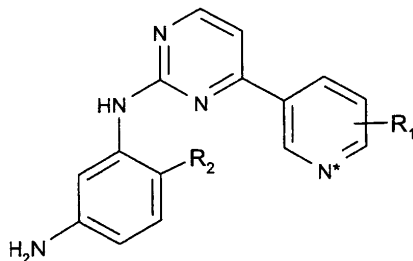
[여기서, A는 화학식 (I)에 기재된 의미를 가짐]의 화합물과 반응시키고, 이렇게 수득한 화합물을 적당한 산화제를 사용하여 화학식 (I)의 N-옥사이드로 전환시키거나, 또는 N-옥사이드로 전환되지 않았다면, A가 고리 탄소상에서 옥소에 의해 치환시켜야 하는 방법,

<107>

바람직하게는, 하기 화학식 (III)

<108>

<화학식 III>

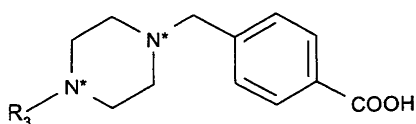


<109>

<110>

[여기서, R₁ 및 R₂는 화학식 (II)에 기재된 의미를 가짐]의 화합물을 하기 화학식 (IV)

<111> <화학식 IV>

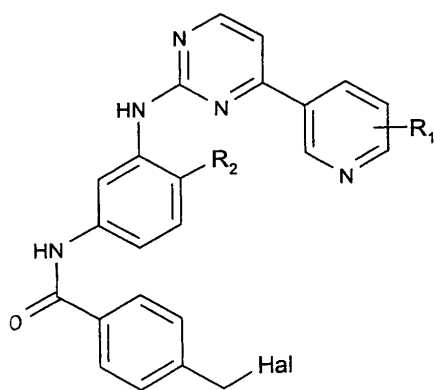


<112>

<113> [여기서, R₃는 화학식 (II)에 기재된 의미를 갖고, 별표는 산소 원자를 선택적으로 보유할 수 있는 질소 원자를 나타냄]의 화합물과 반응시키고, 이렇게 수득한 화합물을 적당한 산화제를 사용하여 화학식 (II)의 N-옥사이드로 선택적으로 전환시키는 방법; 또는

<114> (b): 하기 화학식 (V)

화학식 V



<115>

<116> [여기서, R₁ 및 R₂는 화학식 (I)에 기재된 의미를 갖고, Hal은 할로(예, -Cl, -Br, -F, -I)임]의 화합물을 하기 화학식 (VI)

화학식 VI

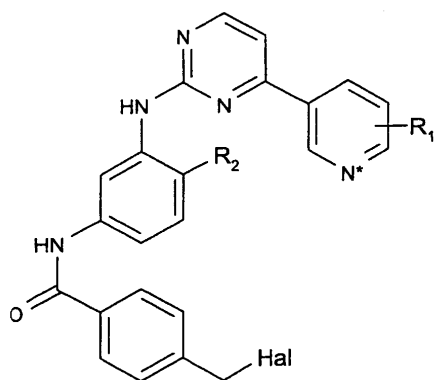
AH

<117>

<118> [여기서, A는 화학식 (I)에 기재된 의미를 가짐]의 화합물과 반응시키고, 이렇게 수득한 화합물을 적당한 산화제를 사용하여 화학식 (I)의 N-옥사이드로 선택적으로 전환시키는 방법,

<119> 바람직하게는, 하기 화학식 (V)

<120> <화학식 V>

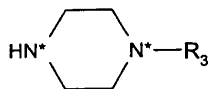


<121>

<122> [여기서, R₁ 및 R₂는 화학식 (II)에 기재된 의미를 갖고, Hal은 할로(예, -Cl, -Br, -F, -I)이고, 별표는 산소

원자를 선택적으로 보유할 수 있는 질소 원자를 나타냄]의 화합물을 하기 화학식 (VI)

<화학식 VI>



[여기서, R₃은 화학식 (II)에 기재된 의미를 갖고, 별표는 산소 원자를 선택적으로 보유할 수 있는 질소 원자를 나타냄]의 화합물과 반응시키고;

이렇게 수득한 화합물을 적당한 산화제를 사용하여 화학식 (II)의 N-옥사이드로 전환시키고;

방법 (a) 또는 (b)의 개시 화합물에 존재하며 반응에는 참여하지 않는 작용 기는 필요하다면 보호된 형태로 존재하게 해주고, 단, 염-형성 기가 존재하고 염 형태의 반응이 가능한 경우, 존재하는 보호기를 절단하여 상기 개시 화합물이 염 형태로 존재할 수 있게 해주고;

원한다면, 방법 (a) 또는 (b)에 의해 수득한 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 치환기가 다른 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물로 전환시키고, 수득한 화학식 (I) 또는 (II)의 유리 화합물을 염으로 전환시키고, 수득한 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 염을 유리 화합물 또는 또 다른 염으로 전환시키고(시키거나) 화학식 (I) 또는 (II)의 이성질체 화합물의 혼합물을 개별 이성질체로 분리하는 것을 특징으로 하는 방법.

가장 바람직한 구현예에 있어서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 실질적으로 순수한 형태이다.

용어 "실질적으로 순수한"은 본 발명의 명세서에서 혈액 중에 발견되는 생물학적 물질이 실질적으로 없는, 바람직하게는 10% 미만, 보다 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 이러한 생물학적 물질이 없는 것을 의미하는 것으로 이해한다.

변형 방법에 관한 상세한 설명

방법 (a) 또는 (b)에 의해 수득한 화합물을 화학식 (I) 또는 (II)의 N-옥사이드로 전환시키기에 적당한 산화제는 바람직하게는 과산화수소 또는 적당한 과산, 예를 들어, 보다 바람직하게는 m-클로로-퍼벤조산과 같은 적당한 퍼벤조산이다. 반응은 불활성 용매, 예를 들어 디클로로메탄과 같은 할로겐화 탄화수소 중에서 약 -20 °C 내지 당해 용매의 비등점, 대개 +100 °C 이하의 온도에서 수행한다. 과산화수소를 산화제로 사용하는 경우, 바람직하게는, 반응을 약 실온의 물 중에서 수행한다. 이어서, 원하는 N-옥사이드를 예를 들어 컬럼 크로마토그래피 또는 재결정과 같은 통상적인 방법을 사용하여 정제할 수 있다.

한편, 화학식 (I) 또는 (II)의 N-옥사이드는 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 합성할 때 사용된 출발 물질을 먼저 산화시킴으로써 상기 단락에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다.

방법 (a)에 있어서;

화학식 (III)의 화합물과 화학식 (IV)의 화합물 사이의 반응을 바람직하게는 불활성 용매, 보다 바람직하게는 N, N-디메틸포름아미드 중에서, 프로필포스폰산 무수물[스위스 브흐(Buch)에 소재한 플루카(Fluka) 제] 및 바람직하게는 트리에틸아민과 같은 염기 존재하에, 바람직하게는 실온에서 수행한다.

방법 (b)에 있어서;

화학식 (V)의 화합물과 화학식 (IV)의 화합물 사이의 반응을 적당한 불활성 용매, 바람직하게는 알콜(예, 보다 바람직하게는 에탄올과 같은 저급 알콜) 중에서 상승된 온도, 바람직하게는 사용 용매의 비등점 부근에서 수행한다.

화학식 (V)의 화합물에 존재하는 할로는 예를 들어, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도, 바람직하게는 클로로이다.

추가적 방법 단계

원하면 수행하는 추가 방법 단계에 있어서, 반응에 참여해서는 안되는 개시 화합물의 작용기는 보호되지 않은 형태로 존재하거나, 예를 들어 1종 이상의 보호기에 의해 보호될 수 있다. 이어서, 보호기는 공지된 방법 중 하나에 따라 전체적으로 또는 부분적으로 제거한다. 보호기 및 보호기가 도입되고 제거되는 방법은 예를 들어,

문헌["Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London, New York (1973), 및 "Methoden der Organischen Chemie", Houben-Weyl, 4th edition, Vol. 15/1, George-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974) 및 Teodora W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, New York (1981)]에 기재되어 있다. 보호기의 특징은 예를 들어 가용매분해, 환원, 광분해에 의해 또는 대안적으로 생리적 조건하에 원하지 않은 이차 반응이 일어나지 않고, 보호기를 용이하게 제거할 수 있다는 것이다.

<141> 그러나, 화학식 (I) 또는 (II)의 최종 생성물은 화학식 (I) 또는 (II)의 다른 최종 생성물을 제조하기 위한 출발 물질 중에 보호기로서 사용될 수 있는 치환기를 함유할 수도 있다. 따라서, 본 발명의 범주 내에서, 화학식 (I)의 특정 목적 최종 생성물의 구성 성분이 아니고 용이하게 제거 가능한 기만을 본 명세서에 다른 표시가 없는 한 "보호기"로 표시한다.

<142> 일반적인 방법 조건

<143> 본 명세서에 기재된 모든 방법 단계는 공지된 반응 조건 하에, 바람직하게는 구체적으로 기재된 반응 조건 하에, 용매 또는 희석제의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 사용된 시약에 불활성이고 이들을 용해시킬 수 있는 용매 또는 희석제의 존재 또는 부재 하에, 촉매, 촉합제 또는 중화제, 예를 들어 이온 교환기, 대표적으로 양이온 교환기(예, 반응 유형 및(또는) 반응물에 따라 양성자화(H⁺) 형태)의 존재 또는 부재 하에, 낮은 온도, 상온 또는 상승된 온도[예, -100 °C 내지 약 190 °C, 바람직하게는 약 -80 °C 내지 약 150 °C(예, -80 내지 -60 °C, 상온, -20 내지 40 °C, 0 내지 100 °C 또는 사용된 용매의 비등점)]에서, 대기압 하에 또는 밀폐 용기 중에서, 필요하다면 감압하에 및(또는) 불활성(예, 아르곤 또는 질소) 분위기 중에 수행한다.

<144> 본 발명은 임의의 단계에서 중간체로서 수득가능한 화합물로부터 개시하고 누락 단계를 수행하는 방법의 구현에 관한 것으로서, 임의의 단계에서 중단하거나, 또는 반응 조건 하에 출발 물질을 형성하거나, 또는 반응성 유도체 또는 염의 형태의 상기 출발 물질을 사용하거나, 또는 상기 방법 조건 하에 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한 화합물을 생성하는 방법의 구현에 및 상기 화합물이 자체의 추가적 방법의 구현에 관한 것이다. 바람직한 구현에 있어서, 개시 화합물로부터 시작하여 상기 기재된 화합물을 얻는다.

<145> 바람직한 구현에 있어서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 실시예에 한정된 방법 및 방법 단계에 따라 제조한다.

<146> 화학식 (I) 또는 (II)의 그의 염을 포함한 화합물은 수화물, 또는 예를 들어 결정화에 사용된 용매를 함유한 그의 결정(용매화물로서 존재함)의 형태로도 수득할 수 있다.

<147> 출발 물질

<148> 신규의 출발 물질 및(또는) 중간체, 뿐만아니라 그의 제조 방법은 본 발명의 주제이다. 바람직한 구현에에서는 바람직한 화합물이 수득될 수 있도록 선택된 반응 조건 하에 이러한 출발 물질을 사용한다.

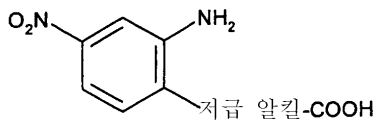
<149> 공지된 방법(EP 0 564 409 B1 참조)에 따라 제조할 수 있거나 시판되는, 상기 기재된 방법에 사용되는 출발 물질은 공지되어 있고, 이들 출발 물질은 실시예에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

<150> 출발 물질의 제조 시에, 반응에 참여하지 않고 존재하는 작용기는 필요하다면 보호되어야 한다. 바람직한 보호기, 보호기의 도입 및 제거에 관해서는 상기에 또는 실시예에 기재되어 있다. 각각의 출발 물질 및 과도체 대신에, 그의 염을 반응에 사용할 수 있다. 단, 염-형성 기가 존재하고, 염과의 반응도 가능하다. 상기 또는 하기에 기재된 용어 출발 물질은 합리적으로 가능한 한 언제나 그의 염을 포함한다.

<151> R₂가 저급 알킬이고 별표로 표시된 질소 원자가 치환기로서 산소 원자를 보유하지 않는 화학식 (II)의 화합물은 EP 0 564 409 B1에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 이어서, 이러한 화합물은 "변형 방법의 상세한 설명의 하단에 상기 기재된 적당한 산화제를 사용하여 대응하는 N-옥사이드로 전환시킬 수 있다.

<152> R₂가 히드록시-저급 알킬인 화학식 (III)의 화합물은 하기 화학식 (VII)의 화합물을 사용하여 시작함으로써, 실시예 1과 유사하게 제조할 수 있다:

화학식 VIII



<153>

<154> 예를 들어 EP 0 564 409 B1에 기재된 것과 유사한 공지된 방법에 따라 제조할 수 있거나 상업적으로 입수가능한 나머지 출발 물질은 공지되어 있거나, 또는 바람직하게는 실시예에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 대응하는 N-옥사이드를 형성하는 적당한 N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체도 또한 EP 0 564 409 B1에 기재되어 있다.

<155> 또한, 본 발명은 관련 질환, 특히 현저한 항증식성 효과 및 바람직하게는 종양 억제 효과를 갖는 화학식 (I) 또는 (II)의 각종 화합물을 치료를 필요로 하는 인간을 포함한 온혈 동물에게 투여하는, 상기 질환, 특히 종양 질환을 앓고 있는 인간을 포함한 온혈 동물의 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 언급된 티로신 키나아제, 특히 PDGF 수용체 키나아제, v-Ab1 키나아제 및(또는) c-키트 수용체 키나아제의 억제를 위한 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 용도, 또는 인간을 포함한 온혈 동물 치료, 특히 신경 교종, 난소 종양, 전립선 종양, 결장 종양 및 특히, 작은 세포 폐 암종과 같은 폐 종양, 및 유방 종양 또는 기타 부인과 종양과 같은 종양 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 용도에 관한 것이다. 종, 연령, 개별적 상태, 투여 방식 및 당해 임상적 특징에 따라, 유효 투여량, 예를 들어 약 1-2500 mg, 바람직하게는 1-1000 mg, 보다 더 바람직하게는 5-500 mg의 매일 투여량은 약 70 kg 체중의 인간을 포함한 온혈 동물에게 투여한다.

<156> 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 적어도 하나의 질소 원자가 산소 원자를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성하는 N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염의 증식성 질환 치료용 제약 조성물을 제조하기 위한 용도에 관한 것이다.

<157> 바람직하게는, 본 발명은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염의 증식성 질환 치료용 제약 조성물을 제조하기 위한 용도에 관한 것이다.

<158> 가장 바람직하게는, 증식성 질환은 종양 또는 뇌 증식성 질환에서 선택된다.

<159> 또한, 본 발명은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염을 증식성 질환을 앓고 있는 온혈 동물에게 상기 질환에 대해 유효 투여량으로 투여하는 것을 포함하는, 인간을 포함한 온혈 동물을 치료하는 방법을 제공한다.

<160> 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 적어도 하나의 질소 원자가 산소를 보유하여 대응하는 N-옥사이드를 형성하는 1종 이상의 N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염을 제약적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

<161> 바람직하게는, 본 발명은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염을 제약적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

<162> 본 발명의 제약 조성물은 4-(4-메틸피페라진-1-일메틸)-N-[4-메틸-3-(4-피리딘-3-일)피리미딘-2-일아미노]페닐]벤즈아미드와 같은 1종 이상의 추가적인 제약 활성 화합물을 포함할 수 있다.

<163> 바람직하게는, 본 발명은 화학식 (I) 또는 (II)의 활성성분 화합물 또는 그의 제약적으로 허용가능한 염을 제약적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는, 인간을 포함한 온혈 동물의 증식성 질환을 치료하기 위한 제약 조성물을 제공한다.

<164> 따라서, 본 발명은 예를 들어 경피 투여, 경장 투여(예, 경구 투여 또는 직장 투여), 또는 비경구 투여에 적당하고, 특히 상기 질환 중 하나를 예방 또는 치료하기 위한, 활성 성분으로서 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 제약적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 특히, 활성 성분을 희석제[예, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스 및(또는)글리세린] 및(또는)윤활제[예, 실리카, 활석, 스테아르산 또는 그의 염, 대표적으로는 마그네슘 스테아레이트 또는 칼슘 스테아레이트 및(또는) 폴리에틸렌 글리콜]와 함께 함유하는 정제 또는 젤라틴 캡슐을 경구 투여용으로 사용한다. 이렇게 정제는 활성 물질을 결합제[예, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 대표적으로 옥수수 전분, 밀 전분 또는 쌀 전분, 젤라틴, 메틸

셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈 및(또는) 폴리비닐피롤리돈] 및 원한다면 봉해제 [예, 전분, 아가, 알긴산, 또는 그의 염, 대표적으로 알긴산 나트륨 및(또는) 거품 형성 혼합물], 또는 흡착제, 착색제, 풍미제, 및 감미제와 함께 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 제약학적으로 활성있는 화합물은 비경구 투여 또는 침출 용액을 위한 제제 형태로 사용될 수 있다. 이러한 용액을 바람직하게는 등장 수용액 또는 현탁액이고, 활성 성분을 단독으로 또는 담체 (예, 만니톨)와 함께 함유하는 동결건조 제제의 경우처럼 사용 전에 제조될 수 있다. 제약 물질은 멸균될 수 있고, 부형제[예, 방부제, 안정화제, 습윤제 및(또는)유화제], 가용화제, 삼투압 조절용 염 및(또는) 완충액을 함유할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 원한다면, 기타 c-키트 억제제 또는 VEGF 수용체의 억제제 또는 c-Src 활성 억제제와 같은 제약학적으로 활성 있는 물질을 추가로 함유할 수 있고, 자체 공지된 방법, 예를 들어 통상적인 혼합, 제립, 코팅, 용해 또는 동결건조 방법에 의해 제조되고, 약 1 내지 100%, 바람직하게는 약 1 내지 약 20%의 활성 물질 또는 활성 물질들을 함유한다.

실시예

<165> 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하지 않는다.

<166> 약자

<167> DMF N,N-디메틸포름아이드

<168> h 시간

<169> min 분

<170> m.p. 용융점

<171> RT 실온

<172> THF 테트라히드로푸란

<173> 실시예 1: 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-히드록시메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드

<174> 무수 N,N-디메틸포름아이드 (5 ml) 중의 N-(5-아미노-2-히드록시메틸페닐)-4-(3-피리디닐)-2-피리미딘아민(117 mg, 0.4 mmol), 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-벤조산 디히드로클로라이드(123 mg, 0.4 mmol) 및 트리에틸아민 (445 μ l, 3.2 mmol)의 교반된 혼합물에 N,N-디메틸포름아이드[스위스 브호에 소재한 플루카(Fluka)제] 중의 프로필포스포산 무수물의 용액을 20 min간 일부분씩 첨가한다. 혼합물을 RT에서 24h 동안 교반한다. 감압하에 용매를 증발시키고, 잔류물을 탄산수소나트륨 포화 수용액(20 ml)으로 처리하고, 에틸 아세테이트(2회, 20 ml)로 추출한다. 혼합한 추출물을 염화나트륨 포화 수용액(15ml)로 세척하고, (MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 증발시켜서 조 생성물을 수득하고, 역상 고압 액체 크로마토그래피 [Nagel Polygoprep C₁₈, 7 μ m, 300Å; 독일 뒤렌(Dueren)에 소재한 마케레이-나겔(Macherey-Nagel)제, 용출제: 물 중의 0.1% 트리플루오로아세트산-아세트니트릴 중의 0.1% 트리플루오로아세트산]에 의해 정제한다. 순수한 생성물을 함유한 분획물들을 혼합하고, 탄산수소나트륨 포화 수용액으로 염기화하고, 감압하에 증발건조시킨다. 잔류물을 탄산수소나트륨 포화 수용액으로 처리하고, 에틸 아세테이트로 (5회) 추출한다. 혼합된 추출물을 물로 세척하고, (MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 메탄올-에틸 아세테이트로부터 재결정시켜 m.p. 196-198 °C의 담황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다.

<175> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ): 2.14(s, 3H), 2.25-2.45(m, 8H), 3.52(s, 2H), 4.56(s, 2H), 5.50(br.s, 1H), 7.29(d, J=8.3 Hz, 1H), 7.41(dd, J=2.0, 8.3 Hz, 1H), 7.44(d, J=8.1 Hz, 2H), 7.50(d, J=5.1 Hz, 1H), 7.52(dd, J=3.3, 8.1 Hz, 1H), 7.93(d, J=8.1 Hz, 2H), 8.56(d, J=2.0 Hz, 1H), 8.57(d, J=5.1 Hz, 1H), 8.59(ddd, J=1.4, 2.1, 8.1 Hz, 1H), 8.69(dd, J=1.4, 3.3 Hz, 1H), 9.10(s, 1H), 9.33(d, J=2.1 Hz, 1H) 및 10.22(s, 1H)

<176> 단계 1.1: 2-아미노-4-니트로벤젠메탄올

<177> 20°C의 무수 THF (500 ml) 중의 2-아미노-4-니트로벤조산(Aldrich제; 18.2 g, 100 mmol)의 교반된 용액을 보관-THF 복합체의 용액(BH₃·THF; 플루카제; 1.0 M의 100ml)으로 사용하여 45 min 동안 적하 처리하여서, 가스 발생을 억제한다. 이어서 혼합물을 65 °C에서 2 h 동안 가열한다. 교반된 혼합물을 0 °C로 냉각시키고, 물(20 ml)

로 처리하고, RT로 상승시켜 준다. 가스 발생을 정지 시키는 즉시, 염산(12 M의 20 ml)을 첨가한 후, 65 °C로 30 분간 가열한다. 이어서 냉각된 혼합물을 감압하에 회전 증발시킴으로써, 약 150 ml의 부피로 농축시켜 현탁액을 얻는다. 현탁액을 여과하고, 침전물을 에틸 아세테이트(500 ml)로 재용해 시키고, 탄산수소나트륨 포화 수용액(2회, 150 ml)으로 세척한다. 용액을 (Na₂SO₄로) 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 에틸 아세테이트-헥산으로부터 재결정에 의해 정제하여 m.p. 126-128 °C의 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 얻는다.

<178> 단계 1.2: 2-[(2-프로페닐옥시)-메틸]-5-니트로벤젠아미드

<179> 아르곤 분위기하에 0 °C의 무수 THF (350 ml)중의 2-아미노-4-니트로벤젠메탄올 (14.3 g, 85 mmol)의 교반된 용액을 THF(Fluka제) 1.0 M의 85 ml 중의 t-부틸산 칼륨의 용액으로 35 min동안 적하처리한다. 혼합물을 0 °C에서 15 min 동안 교반한 후, 0 °C의 무수 THF(80 ml)중의 알릴브로마이드(94 mmol, 7.9 ml)의 용액으로 50 min 동안 적하 처리한 후, 20 °C에서 90 min동안 교반한다. 혼합물을 에틸 아세테이트 (800 ml)로 희석한다. 수득한 용액을 포화 수성 염화 암모늄으로 세척(3회, 400 ml)하고,(MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압하여 증발시켜 조 생성물을 얻고, 실리카겔상의 컬럼 크로마토그래피(용출제: 헥산 중의 에틸 아세테이트)에 정제하여 갈색 오일로서 표제 화합물을 얻는다.

<180> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ): 4.06(d, J=5.3 Hz, 2H); 4.47(s, 2H); 5.22 및 5.34(dd, J=10.4, 17.3 Hz, 2H); 5.65(br.s, 2H); 5.98(m, J=5.3, 10.4, 17.3 Hz, 1H), 7.35(d, J=8.3 Hz, 1H), 7.38(dd, J=2.0, 8.3 Hz, 1H) 및 7.52(d, J=2.0 Hz, 1H).

<181> 단계 1.3: {2-[(2-프로페닐옥시)-메틸]-5-니트로페닐}-구아니딘

<182> 질산(1.04 ml, 65%, 15 mmol)을 20 °C의 에탄올 (30 ml)중의 2-[(2-프로페닐옥시)-메틸]-5-니트로벤젠아미드 (3.15 g, 15 mmol)의 교반된 용액에 첨가한다. 이어서 물(1 ml) 중의 시안아미드(0.95 g, 22.5 mmol)의 용액을 상기 교반된 용액에 95 °C로 60 min에 걸쳐 적하 첨가한다. 혼합물을 95 °C로 14 h동안 가열함에 있어서, 이 기간 동안 시안아미드(총 2.2 g, 58 mmol)의 추가 분취액을 첨가하면서, 질산(65%)을 첨가함으로써 주기적으로 산도를 pH 3으로 조정한다. 수득한 혼합물을 0 °C로 냉각시키고, 수성 암모니아 (25% 5 ml)로 염기화하고, 물(150 ml)로 희석하고, 에틸 아세테이트(3회, 100 ml)로 추출한다. 혼합한 추출물은 염화암모늄 포화수용액(50 ml)으로 세척하고, (MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 증발시켜 갈색 오일로서 표제 화합물을 수득하고, 추가로 정제하지 않고 다음 단계에 직접 사용한다.

<183> 단계 1.4: N-{2-[(2-프로페닐옥시)-메틸]-5-니트로-페닐}-4-(3-피리디닐)-2-피리미딘아민

<184> 1-부탄올 (50 ml)중의 {2-[(2-프로페닐옥시)-메틸]-5-니트로-페닐}-구아니딘 (3.75 g, 15 mmol), 3-(디메틸아미노)-1-(3-피리디닐)-2-프로펜-1-온(2.60 g, 15 mmol) 및 에틸 디소프로필아민(2.6 ml, 15 mmol)의 교반된 혼합물을 120 °C에서 20 h 동안 가열한다. 이어서 용매를 감압하에 증발시켜 잔류물을 수득하고 이를 에틸 아세테이트(100 ml) 중에 용해시킨다. 수득한 혼합물을 (셀라이트로) 여과시키고, 염화나트륨 포화 수용액(50 ml)으로 세척하고, (MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(용출제: 에틸 아세테이트)에 의해 정제하고, 에틸 아세테이트-헥산으로부터 재결정하여, 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 213-215°C).

<185> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ): 4.10(d, J=5.3 Hz, 2H); 4.77(s, 2H); 5.22 및 5.35(dd, J=10.4, 17.3 Hz, 2H); 5.96(m, J=5.3, 10.4, 17.3 Hz, 1H), 7.58(dd, J=4.8, 7.9 Hz, 1H), 7.66(d, J=8.4 Hz, 1H), 7.69(d, J=5.2 Hz, 1H), 7.95(ddd, J=1.2, 1.2, 7.9 Hz, 1H), 8.51(dd, J=1.6, 8.4 Hz, 1H), 8.67(d, J=5.2 Hz, 1H), 8.73(dd, J=1.2, 4.8 Hz, 1H), 9.05(d, J=1.2 Hz, 1H), 9.23(br.s, 1H) 및 9.35(d, J=1.6 Hz, 1H).

<186> 단계 1.5: N-(2-히드록시메틸-5-니트로-페닐)-4-(3-피리디닐)-2-피리미딘아민

<187> 무수 THF(60 ml) 중의 N-{2-[(2-프로페닐옥시)-메틸]-5-니트로-페닐}-4-(3-피리디닐)-2-피리미딘아민(2.60g, 7.2 mmol)의 교반된 용액에 폴리메틸히드로실옥산(860 mg), 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(70mg) 및 염화아연(THF 중의 0.5 M 2.66 ml, 1.33 mmol)를 첨가한다. 이어서 혼합물을 30 °C의 아르곤 분위기 하에 30 h 동안 교반한다. 이어서 용매를 감압하에 건조시켜 수득한 잔류물을 염화나트륨 포화 수용액(50 ml)으로 처리하고, 에틸아세테이트(3회, 50 ml)로 추출한다. 혼합한 추출물을 (Na₂SO₄로) 건조시키고, 여과하고, 용매를

감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 THF로부터 재결정하여 담황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 247-250 °C)

<188> 단계 1.6: N-(5-아미노-2-히드록시메틸-페닐)-4-(3-피리디닐)-2-피리딘아민

<189> 에탄올(230 ml) 중의 N-(2-히드록시메틸-5-니트로-페닐)-4-(3-피리디닐)-2-피리미딘아민(0.23 g, 0.71 mmol)의 용액을 25 °C에서 라네이 니켈(Raney nickel)상에서 대기압 하에 수소 첨가한다. 계산된 양의 수소를 13 h 동안 흡수한다. 이어서, 혼합물을 여과하고, 용매를 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[용출제: 25% 수성 암모니아-에탄올-디클로로메탄(1:9:90)]에 의해 정제하여, 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 213-215 °C).

<190> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ): 4.42(d, J=5.1 Hz, 2H), 5.05(br.s, 2H), 5.26(t, J=5.1 Hz, 1H), 6.23(dd, J=2.1, 8.0 Hz, 1H), 6.91(d, J=8.0 Hz, 1H), 7.35(d, J=2.0 Hz, 1H), 7.45(d, J=5.1 Hz, 1H), 7.56(dd, J=4.7, 8.0 Hz, 1H), 8.47(ddd, J=1.8, 1.8, 8.0 Hz, 1H), 8.53(d, J=5.1 Hz, 1H), 8.70(dd, J=1.4, 4.7 Hz, 1H), 8.88(s, 1H) 및 9.29(d, J=2.4 Hz, 1H)

<191> 실시예

2:4-[(4-메틸-4-옥시도-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-3-(피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드

<192> -20 °C의 디클로로메탄(70 ml) 중의 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-3-(피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드(EP 0 564 409 B1, 실시예 21, 2.00 g, 4.05 mmol)의 교반된 용액에 3-클로로퍼옥시벤조산(스위스, 브호에 소재한 플루카제, 55% 2.06 g, 4.27 mmol)을 첨가한다. 이어서 수득한 혼합물을 RT에서 72 h 동안 교반한다. 이어서 용매를 감압하에 증발시켜 혼합물을 수득하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[용출제: 디클로로메탄-메탄올-물 (70:30:5)]에 의해 정제하여 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 154-158 °C).

<193> 실시예

3:4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드

<194> 에탄올(5 ml) 중의 4-클로로메틸-N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드(220 mg, 0.49 mmol)의 교반된 현탁액에 N-메틸피페라진(99 mg, 1.0 mmol)을 첨가한다. 이어서, 혼합물을 100 °C에서 15 h 동안 교반하여 용액을 얻은 후, RT로 냉각시키고, 에틸아세테이트(200 ml)로 처리한다. 수득한 용액을 수산화나트륨 수용액(2 M, 100 ml) 및 염화나트륨 포화 수용액(100 ml)로 세척하고, (Na₂SO₄)로 건조시키고, 여과시키고, 용매를 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[용출제: 수성 암모니아-메탄올-디클로로메탄 (0.5:10:90)]에 의해 정제하여 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 얻는다(m.p. 232-235 °C).

<195> 단계 3.1: N-[4-메틸-3-[[4(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드

<196> 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드 대신에 N-[4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드(EP 0 564 409 B1, 실시예 20에 기재된 바대로 제조됨)를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 2에 기재된 공정을 이용하여 표제 화합물을 제공하고, 실리카겔 크로마토그래피(용출제: 디클로로메탄 중의 10% 메탄올)에 의해 정제하고, 에탄올로부터 재결정하여 담황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 258-260°C).

<197> 단계 3.2: 4-메틸-N-3-[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-1,3-벤젠디아민

<198> n-프로판올(9 ml)중의 N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드(0.43g, 1.08 mmol)의 현탁액에 염산(4 M, 9 ml)를 첨가하고, 수득한 혼합물을 100°C에서 34 h 동안 가열한다. 냉각된 혼합물을 감압하에 증발시켜 오일을 얻고, 물(10 ml)중에 용해시키고, 여과하고, 수성 수산화나트륨(4 M)으로 염기성화시킨다. 수득한 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 건조시켜 조 생성물을 얻고, 에탄올로부터 재결정하여 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 104-106°C).

<199> 단계 3.3: 4-클로로메틸-N-[4-메틸-3-[[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐]-벤즈아미드

- <200> 디옥산(5 ml)중의 4-메틸-N-3-[4-(1-옥시도-3-피리디닐)-2-피리미디닐]-1,3-벤젠디아민(275mg, 0.937 mmol)의 용액에, 디옥산(2 ml)중의 4-(클로로메틸)-벤조일 클로라이드[184 mg, 0.977 mmol, 스위스 브흐에 소재한 플루카제]의 용액을 적하 첨가하고, 혼합물을 20 °C에서 75 min 동안 교반한다. 이어서, 디옥산(1 ml)중에 용해된 4-(클로로메틸)-벤조일 클로라이드(60 mg, 0.317 mmol)의 이차 부분을 첨가하고, 혼합물을 120 min 동안 추가로 교반한다. 수득한 현탁액을 에틸 아세테이트(50 ml)로 처리하여, 용액을 수득하고, 수성 수산화나트륨(2 M의 50 ml, 2회)으로 세척한다. 에틸 아세테이트 용액을 (Na₂SO₄로) 건조시키고, 여과시키고, 용매를 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (용출제: 디클로로메탄 중의 5% 메탄올)에 의해 정제하여 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 얻는다(m.p. 224-226°C).
- <201> 실시예 4: 4-[(4-메틸-1,4-디옥시도-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드
- <202> 수성 과산화수소(3%, 30 ml)에 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)-메틸]-N-{4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-아미노]-페닐}-벤즈아미드 모노메탄설포네이트 (3.00 g, 5 mmol; PCT 특허 공개 WO99/03854에 기재된 바대로 제조됨)를 첨가하고, 수득한 용액을 20 °C에서 160 h 동안 교반한다. 이어서 수성 수산화나트륨(4 M)을 사용하여 용액의 pH를 14로 조정하고, 수득한 현탁액을 1.5 h 동안 교반한다. 조 생성물을 여과하고, 물로 세척하고, 건조시키고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 [용출제: 25% 수성 암모니아-에탄올-디클로로메탄 (5:30:70)]에 의해 정제하여 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 242-244°C).
- <203> 실시예 5: 4-[(4-메틸-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-히드록시메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드
- <204> 무수 N,N-디메틸포름아미드(5 ml)중의 실시예 1 단계 1.6에 기재된 N-[2-[5-아미노-(2-히드록시)메틸]페닐]-4-(3-피리디닐)-2-피리미디아민(117 mg, 0.4 mmol), 4-[(4-메틸-피페라지닐)메틸]벤조산, 디히드로클로라이드 (123 mg, 0.4 mmol) 및 트리에틸아민(445 μl, 3.2 mmol)의 교반된 혼합물에 N,N-디메틸포름아미드(50% 350 μl, 0.6 mmol)중의 프로필포스포산 무수물의 용액을 20분에 걸쳐 일부분씩 첨가한다. 혼합물을 실온에서 24 h 동안 교반한다. 용매를 감압하에 증발시키고, 잔류물을 탄산수소나트륨 포화수용액(20 ml)으로 처리하고, 에틸 아세테이트(20 ml)로 (2회) 추출한다. 혼합된 추출물을 염화나트륨 포화 수용액(15 ml)으로 세척하고, (MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압하에 증발시켜, 조 생성물을 얻고, 역상 고압 액체 크로마토그래피 [Nagel Polygoprep C₁₈, 7 μm, 300 Å; 독일 뒤렌에 소재한 마케레이-나겔제, 용출제: 물중의 0.1% 트리플루오로아세트산-아세트오닐트릴 중의 0.1% 트리플루오로아세트산]에 의해 정제한다. 순수한 생성물을 함유한 분획을 혼합하고, 탄산수소나트륨 포화수용액으로 염기성화시키고, 감압하에 증발 건조시킨다. 잔류물을 탄산수소나트륨 포화 수용액으로 처리하고, 에틸 아세테이트로 (5회) 추출한다. 혼합된 추출물을 물로 세척하고, (MgSO₄로) 건조시키고, 여과하고, 용매를 감압하에 증발시켜, 생성물을 수득하고, 메탄올-에틸 아세테이트로부터 재결정하여 담황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 얻는다(m.p. 196-198°C).
- <205> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ): 2.14(s, 3H), 2.25-2.45(m, 8H), 3.52(s, 2H), 4.56(s, 2H), 5.50(br.s, 1H), 7.29(d, J=8.3 Hz, 2H), 7.41(dd, J=2.0, 8.3 Hz, 1H), 7.44(d, J=8.1 Hz, 2H), 7.50(d, J=5.1 Hz, 1H), 7.52(dd, J=3.3, 8.1 Hz, 1H), 7.93(d, J=8.1 Hz, 2H), 8.56(d, J=2.0 Hz, 1H), 8.57(d, J=5.1 Hz, 1H), 8.59(ddd, J=1.4, 2.1, 8.1 Hz, 1H), 8.69(dd, J=1.4, 3.3 Hz, 1H), 9.10(s, 1H), 9.33(d, J=2.1 Hz, 1H) 및 10.22(s, 1H).
- <206> 실시예 6: 4-[(3-옥소-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드
- <207> 무수 N,N-디메틸포름아미드(4 ml)중의 4-메틸-N-[4-(3-피리디닐)-2-피리미디닐]-1,3-벤젠디아민(416 mg, 1.5 mmol), 4-[(3-옥소-1-피페라지닐)메틸]벤조산 (351 mg, 1.5 mmol) 및 트리에틸아민 (1.7 ml, 12 mmol)의 교반된 혼합물에 N,N-디메틸포름아미드 중의 프로필포스포산 무수물의 용액(50% 1.3 ml, 2.25 mmol, 스위스 브흐에 소재한 플루카제)을 적하 첨가한다. 혼합물을 실온에서 17 h 동안 교반한 후, 탄산수소나트륨 포화 수용액(100 ml)으로 처리한다. 수득한 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 건조시키고, 메탄올로부터 재결정하여, 크림색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다.
- <208> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ) ppm 2.21(s, 3H), 2.63(t, J=5.49 Hz, 2H), 2.80(s, 3H), 2.96(s, 2H), 3.26(t, J=5.42 Hz, 2H), 3.60(s, 2H), 7.19(d, J=8.39 Hz, 1H), 7.42(d, J=5.19 Hz, 1H), 7.46(m, 3H), 7.51(dd,

J=7.93, 4.73 Hz, 1H), 7.91(d, J=8.09, 1H), 8.06(s, 1H), 8.47(m, 1H), 8.50(d, J=5.04 Hz, 1H), 8.67(dd, J=4.73, 1.53 Hz, 1H), 8.99(s, 1H), 9.26(d, J=1.98 Hz, 1H) 및 10.18(s, 1H).

<209> 4-[(3-옥소-1-피페라지닐)메틸]벤조산

<210> 메탄올(50 ml)중의 3-브로모메틸벤조산(4.30 g, 20 mmol), 피페라진-2-온 (2.0 g, 20 mmol) 및 분말 탄산 칼륨 (2.76 g, 20 mmol)의 혼합물을 실온에서 17 h 동안 교반한다. 수득한 혼합물을 여과하고, 용매를 감압하에 증발시켜 잔류물을 수득하고, 염산(80 ml, 0.25 M)으로 처리하고 5 min 동안 교반한다. 침전된 생성물을 여과하고, 물로 세척하고, 건조시키고, 메탄올로부터 재결정하여, 크림색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다.

<211> 실시예 7: 4-[(4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐)메틸]-N-[4-메틸-3-[[4-피리디닐]-2-피리미디닐]아미노]페닐]벤즈아미드

<212> 4-[(3-옥소-1-피페라지닐)메틸]벤조산 대신에 4-[(4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐)메틸]벤조산을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 6에 기재된 방법을 이용하여, 황색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다(m.p. 187-192°C).

<213> ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆, δ) 2.21(s, 3H), 2.55(t, J=5.34 Hz, 2H), 2.91(s, 2H), 3.15(m, 2H), 3.61(s, 2H), 7.19(d, J=8.24 Hz, 1H), 7.42(d, J=5.19 Hz, 1H), 7.46(t, J=8.01 Hz, 1H), 7.48(m, 2H), 7.51(dd, J=7.86, 4.81 Hz, 1H), 7.77(s, 1H), 7.91(d, J=8.09 Hz, 2H), 8.07(s, 1H), 8.47(d, J=7.94 Hz, 1H), 8.50(d, J=5.19 Hz, 1H), 8.67(d, J=3.36 Hz, 1H), 8.99(s, 1H), 9.27(s, 1H) 및 10.18(s, 1H).

<214> 4-[(4-메틸-3-옥소-1-피페라지닐)메틸]벤조산

<215> 피페라진-2-온 대신에 1-메틸피페라진-2-온을 사용하는 것을 제외하고는 4-[(3-옥소-1-피페라지닐)메틸]벤조산에 대하여 기재된 방법을 이용하여 크림색 결정질 고체로서 표제 화합물을 수득한다.

<216> 실시예 8

<217> 화학식 (II)의 화합물, 예를 들어 실시예 1-4에 기재된 화학식 (II)의 화합물 중 하나 100 mg을 함유한 정제를 하기 조성으로 일반적으로 제조한다:

<218> 조성:

<219> 활성 성분 100 mg

<220> 결정질 락토즈 240 mg

<221> 아비셀(Avicel) 80 mg

<222> PVPPXL 20 mg

<223> 에어로실(Aerosil) 2 mg

<224> 마그네슘 스테아레이트 5 mg

<225> 447 mg

<226> 제제: 활성 성분을 담체 물질과 혼합하고, 정제기(Korsch EKO, 펀치 직경 10 mm)상에서 압축시킨다.

<227> 아비셀(Avicel)은 미세결정질 셀룰로즈[미국 필라델피아주에 소재한 에프엠씨(FMC)제]이다.

<228> PVPPXL은 교차결합된 폴리비닐폴리롤리돈[독일 바스프(BASF)제]이다.

<229> 에어로실(Aerosil)은 이산화규소[독일 데구싸(Degussa)제]이다.

<230> 실시예 9

<231> 화학식 (II)의 화합물, 예를 들어 실시예 1-4에 기재된 화학식 (II)의 화합물 중 하나 100 mg을 함유한 캡슐을 하기 조성으로 일반적으로 제조한다:

<232> 조성:

<233> 활성 성분 100 mg

<234> 아비셀 200 mg

<235>	PVPPXL	15 mg
<236>	에어로실	2 mg
<237>	마그네슘 스테아레이트	<u>1.5 mg</u>
<238>		318.5 mg

<239> 제제: 캡슐은 성분을 혼합하고, 혼합물을 사이즈 1의 경질 젤라틴 캡슐내에 충전함으로써 제조한다.