



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년08월30일  
(11) 등록번호 10-0978832  
(24) 등록일자 2010년08월24일

(51) Int. Cl.

C07D 401/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7018173

(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년05월27일

심사청구일자 2008년05월26일

(85) 번역문제출일자 2004년11월10일

(65) 공개번호 10-2005-0003434

(43) 공개일자 2005년01월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2003/016804

(87) 국제공개번호 WO 2003/099809

국제공개일자 2003년12월04일

(30) 우선권주장

60/383,020 2002년05월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02000043369 A1

W02002008201 A2

전체 청구항 수 : 총 16 항

(73) 특허권자

엘란 파마슈티칼스, 인크.

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코  
게이트웨이 불리바드 800

(72) 발명자

콘라디안드레이더블유.

미국 94010 캘리포니아주 버링햄 빅토리아 로드  
30

샘코크리스토퍼엠.

미국 94536 캘리포니아주 프리몬트 노리스 로드  
4993

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김정옥, 박종혁, 정삼영

심사관 : 정다원

(54) 알파-4 인테그린에 의해 매개되는 백혈구 부착 저해테트로시클릭 화합물

(57) 요약

$\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4에 결합하는 화합물이 공개된다. 이러한 화합물 중 어떤 것은 또한 백혈구 부착, 상세하게는,  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4에 의해 매개되는 백혈구 부착을 저해한다. 그러한 화합물은 포유동물, 예를 들어 사람, 질병에 있어서 천식, 알츠하이머병, 죽상경화증, AIDS, 치매, 당뇨, 염증장병, 류마티스성 관절염, 조직이식, 암전이 및 심근허혈과 같은 염증 질병의 치료에 유용하다. 화합물은 또한 다발경화증과 같은 염증 뇌 질병의 치료를 위해 투여될 수 있다.

(72) 발명자

**수잉지**

미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 셰레사 드라이브 793

**스타펜벡프랑크**

미국 98119 와싱턴주 시애틀 웨스트 에비뉴 6 1411

**스투피브레인피.**

미국 94038 캘리포니아주 모스 비치 피.오. 박스 239 테라스 애비뉴421

**스미스제니퍼**

미국 94015 캘리포니아주 테일러 시티 필립 드라이브 331 에이피티. 103

**토르셋유진디.**

미국 94019 캘리포니아주 하프 문 베이 푸리시마 스트리트 326

**플레이스마이클에이.**

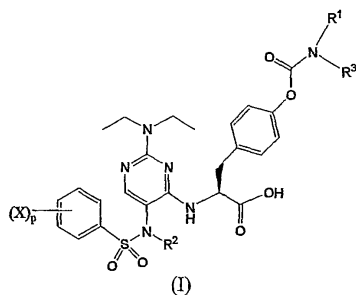
미국 94087 캘리포니아주 서니발레 스텔레 코트 848

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

식 (I)에 있어서,



상기 각 X는 독립적으로 플루오로, 클로로 또는 브로모이고;

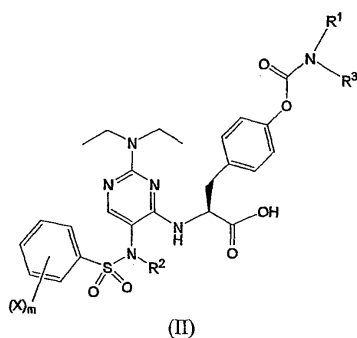
p는 0 내지 3의 정수이고;

$R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐, 피롤릴, 2,5-다이하이드로피롤-1-일, 피페리디닐, 또는 1,2,3,6-테트라하이드로피리딘-1-일을 형성하며;

$R^2$ 는 C1-C5알킬, C2-C6알케닐, 및 C1-C4알킬렌C3-C6시클로알킬로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

### 청구항 2

식 (II)에 있어서,



상기 각 X는 플루오로 및 클로로로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되고;

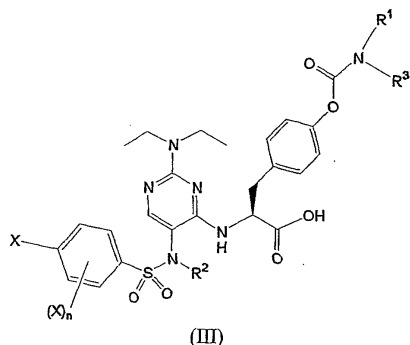
m은 1 또는 2와 같은 정수이고;

$R^2$ 는 C1-C5알킬, C2-C6알케닐, 및 C1-C4알킬렌C3-C6시클로알킬로 구성되는 군으로부터 선택되며;

$R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

### 청구항 3

식 (III)에 있어서,



상기 각 X는 독립적으로 플루오로 또는 클로로이고;

n은 0 또는 1이고;

$R^2$ 는  $-CH_2-R'$ 이고, 상기  $R'$ 은 수소, 메틸 또는  $-CH=CH_2$ 로 구성되는 군으로부터 선택되며;

$R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기  $R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 5

제 1항, 제 2항, 또는 제 3항의 어느 하나의 항에 있어서, 상기  $R^2$ 는  $CH_3$ 인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 X는 F 또는 Cl이고, n은 0인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 7

제 1항에 있어서,

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피페리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피페리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이플루오로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이플루오로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이플루오로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이플루오로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약 학적으로 허용되는 염.

#### 청구항 8

약학적으로 허용되는 캐리어 및 제 1항 내지 제 4항, 제 6항, 또는 제 7항 중 어느 한항의 화합물을 치료적으로 효과적인 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염증질환의 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

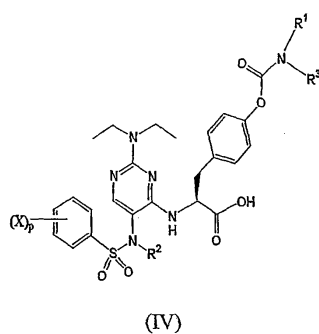
삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

식 (IV)에 있어서,



상기 각 X는 독립적으로 플루오로, 클로로 또는 브로모이고;

p는 0 내지 3의 정수이고;

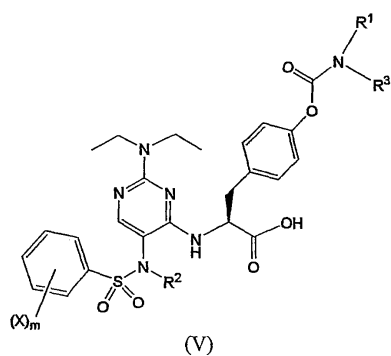
R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐, 피롤릴, 2,5-다이하이드로피롤-

1-일, 피페리디닐, 또는 1,2,3,6-테트라하이드로피리딘-1-일을 형성하며;

$R^2$ 는 C2-C6 알킬닐인 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

### 청구항 13

식 (V)에 있어서,



상기 각 X는 플루오로 및 클로로로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되고;

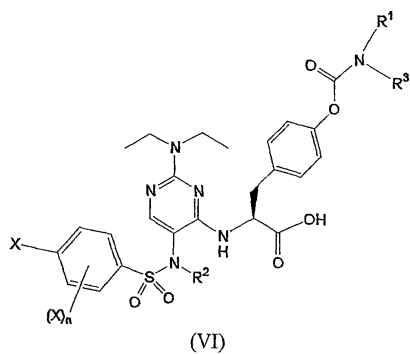
m은 1 또는 2와 같은 정수이고;

$R^2$ 는 C2-C6 알킬닐이며;

$R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐기를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

### 청구항 14

식 (VI)에 있어서,



상기 각 X는 독립적으로 플루오로 또는 클로로이고;

n은 0 또는 1이고;

$R^2$ 는 C2-C6 알킬닐이며;

$R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐기를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

### 청구항 15

제 12항에 있어서,  $R^1$  및  $R^3$ 은 그들이 결합되어 있는 질소 원자와 함께 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 16

제 12항, 제 13항, 또는 제 14항의 어느 하나의 항에 있어서, 상기  $R^2$ 는 프로파르길인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 17

제 15항에 있어서, 상기 X는 F 또는 Cl이고, n은 0인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 18

제 12항에 있어서,

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하이드록시페닐설폰)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하이드록시페닐설폰)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아세트산-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아세트산-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설폰)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염.

#### 청구항 19

약학적으로 허용되는 캐리어 및 제 12항 내지 제 15항, 제 17항, 또는 제 18항 중 어느 한항의 화합물을 치료적으로 효과적인 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염증질환의 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

### 명세서

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 백혈구 부착, 상세하게는  $\alpha_4$  인테그린, 여기에서  $\alpha_4$  인테그린은 바람직하게는 VLA-4,에 의해 매개되는 백혈구 부착을 저해하는 화합물과 관련된다.

### 배경 기술

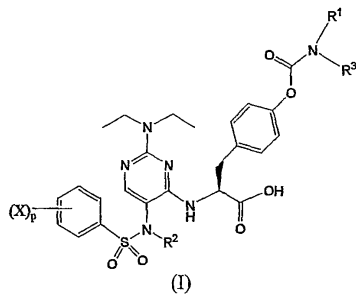
[0002] 참고문헌

- [0003] 다음의 문헌, 특허 및 특허 출원은 본 출원에서 위첨자 번호로 인용된다:
- [0004] <sup>1</sup> Hemler and Takada, *European Patent Application Publication No.* 330,506, published August 30, 1989
- [0005] <sup>2</sup> Elices, et al., *Cell*, 60: 577-584 (1990)
- [0006] <sup>3</sup> Springer, *Nature*, 346: 425-434 (1990)
- [0007] <sup>4</sup> Osborn, *Cell*, 62: 3-6 (1990)
- [0008] <sup>5</sup> Vedder, et al., *Surgery*, 106: 509 (1989)
- [0009] <sup>6</sup> Pretolani, et al., *J. Exp. Med.*, 180: 795 (1994)
- [0010] <sup>7</sup> Abraham, et al., *J. Clin. Invest.*, 93: 776 (1994)
- [0011] <sup>8</sup> Mulligan, et al., *J. Immunology*, 150: 2407 (1993)
- [0012] <sup>9</sup> Cybulsky, et al., *Science*, 251: 788 (1991)
- [0013] <sup>10</sup> Li, et al., *Arterioscler. Thromb.*, 13: 197 (1993)
- [0014] <sup>11</sup> Sasseville, et al., *Am. J. Path.*, 144: 27 (1994)
- [0015] <sup>12</sup> Yang, et al., *Proc. Nat. Acad. Science (USA)*, 90: 10494 (1993)
- [0016] <sup>13</sup> Burkly, et al., *Diabetes*, 43: 529 (1994)
- [0017] <sup>14</sup> Baron, et al., *J. Clin. Invest.*, 93: 1700 (1994)
- [0018] <sup>15</sup> Hamann, et al., *J. Immunology*, 152: 3238 (1994)
- [0019] <sup>16</sup> Yednock, et al., *Nature*, 356: 63 (1992)
- [0020] <sup>17</sup> Baron, et al., *J. Exp. Med.*, 177: 57 (1993)
- [0021] <sup>18</sup> van Dinther-Janssen, et al., *J. Immunology*, 147: 4207 (1991)
- [0022] <sup>19</sup> van Dinther-Janssen, et al., *Annals. Rheumatic Dis.*, 52: 672 (1993)
- [0023] <sup>20</sup> Elices, et al., *J. Clin. Invest.*, 93: 405 (1994)
- [0024] <sup>21</sup> Postigo, et al., *J. Clin. Invest.*, 89: 1445 (1991)
- [0025] <sup>22</sup> Paul, et al., *Transpl. Proceed.*, 25: 813 (1993)
- [0026] <sup>23</sup> Okarhara, et al., *Can Res.*, 54: 3233 (1994)
- [0027] <sup>24</sup> Paavonen, et al., *Int. J. Can.*, 58: 298 (1994)
- [0028] <sup>25</sup> Schadendorf, et al., *J. Path.*, 170: 429 (1993)
- [0029] <sup>26</sup> Bao, et al., *Diff.*, 52: 239 (1993)
- [0030] <sup>27</sup> Lauri, et al., *British J. Cancer*, 68: 862 (1993)



- [0031] <sup>28</sup> Kawaguchi, et al., *Japanese J. Cancer Res.*, 83: 1304 (1992)
- [0032] <sup>29</sup> Konradi, et al., PCT/US00/01686, filed January 21, 2000.
- [0033] 상기 모든 문헌은 마치 각 문헌이 그것의 전체로 참고문헌에 의해 상세하고 개별적으로 지시된 것과 같은 정도로 그들의 전체로 참고문헌에 의해 본원에 통합된다.
- [0034] 기술 상황
- [0035] 헤파와 타카다에 의해 최초로 분리된, <sup>1</sup> VLA-4 (또한  $\alpha_4\beta_1$  인테그린 및 CD49d/CD29로서 불려짐)는 세포 표면 수용체의  $\beta_1$  인테그린 패밀리 중의 하나인데, 각각은 하나의  $\alpha$  사슬과 하나의  $\beta$  사슬인 두 개의 소단위체를 포함한다. VLA-4는  $\alpha_4$  사슬과  $\beta_1$  사슬을 포함한다. 전부 동일한  $\beta_1$  사슬을 공유하고 각각 다른  $\alpha$  사슬을 가지는 적어도 9 개의 인테그린이 존재한다. 이러한 9 개의 수용체 모두는 피브로넥틴, 라미닌, 및 콜라겐과 같은 다양한 세포 기질 분자의 다른 보체에 결합한다. 예를 들어, VLA-4는 피브로넥틴에 결합한다. 또한 VLA-4는 내피 및 다른 세포에 의해 발현되는 비-기질 분자에 결합한다. 이러한 비-기질 분자는 시토카인-활성 인간 제정맥 내피 세포의 배양에서 발현되는 VCAM-1을 포함한다. VLA-4의 특정 항원결정기는 피브로넥틴 및 VCAM-1 결합력에 대하여 중요하며, 각 결합력은 독립적으로 저해된다고 보고되었다.<sup>2</sup>
- [0036] VLA-4 및 다른 세포 표면 수용체에 의해 매개되는 세포간 부착은 많은 염증 반응과 연관된다. 손상 또는 다른 염증 자극의 부위에서, 활성화된 혈관 내피 세포는 백혈구에 부착하는 분자를 발현한다. 내피 세포에 백혈구 부착의 기작은 부분적으로 내피 세포의 상응하는 세포 표면 분자에 백혈구의 세포 표면 수용체의 인식과 결합에 연관된다. 일단 결합하면, 백혈구는 혈관 벽을 따라 이주하여 손상 부위로 이동하고 감염에 대항하기 위하여 화학적 매개물질을 방출한다. 면역계의 부착 수용체의 리뷰에 대하여는 예를 들어, Springer<sup>3</sup> 및 Osborn<sup>4</sup>을 참고.
- [0037] 실험 자가면역 뇌척수염 (EAE), 다중경화증 (MS) 및 수막염과 같은 염증 뇌 질병은 내피/백혈구 부착 기작으로 건강한 뇌 조직 조작 파괴되는 중추신경계 질병의 예이다. 이러한 염증 질병을 가진 환자에서 다수의 백혈구가 혈관 뇌 장벽 (BBB)을 가로질러 이동한다. 백혈구는 손상된 신경 전도 및 마비를 야기시키는 심각한 조직 손상의 원인인 독성 매개물질을 방출한다.
- [0038] 다른 기관계에 있어서, 조직 손상은 또한 백혈구의 이주 및 활성화로 결과되는 부착 기작을 통하여 발생한다. 예를 들어, 심장 조직의 초기 손상 후 심근허혈은 더욱 더 손상을 야기하는 손상 조직으로의 백혈구 이동에 의하여 더 복잡하게 된다 (Vedder et al.).<sup>5</sup> 부착 기작에 의하여 매개되는 다른 염증 또는 병리 상태의 예로서 천식<sup>6-8</sup>, 알츠하이머병, 죽상경화증<sup>9-10</sup>, AIDS, 치매<sup>11</sup>, 당뇨<sup>12-14</sup> (급성 소아당뇨병을 포함), 염증장병<sup>15</sup> (궤양결장염 및 크론병을 포함), 다중경화증,<sup>16-17</sup> 류머티스성 관절염,<sup>18-21</sup> 조직 이식,<sup>22</sup> 암 전이,<sup>23-28</sup> 수막염, 뇌염, 중풍, 및 다른 뇌손상, 신장염, 망막염, 아토피성 피부염, 건선, 심근허혈 및 성인 호흡곤란증후군에서 발생하는 것과 같은 백혈구 매개 폐 손상을 포함한다.
- [0039] 하나의 계열로서, 치환된 아미노피리미딘이 VLA-4가 VCAM-1에 결합하는 것을 저해하고, 따라서, 항-염증 특성을 나타낸다는 것으로 공개되었다.<sup>29</sup> 이러한 화합물은 그러한 결합에 길항제 특징을 보유하고, 이러한 화합물의 향상된 생이용성은 그들의 효율성을 증가시킬 것이다.
- [0040] 발명의 요약
- [0041] 본 발명은 그들의 AUC에 의하여 측정되었을 때, 이전에 공개된 다른 치환된 아미노피리미딘 화합물과 비교하여 뜻밖의 우수한 생이용성을 가지는 어떠한 N-[2-N',N'-다이에틸아미노-5-아미노설폰닐페닐피리미딘-4-일]-p-카르보닐옥시-페닐알라닌 화합물을 발견을 제시한다.

[0042] 본 조성물의 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 식 (I)의 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제시한다:



[0043]

[0044] 상기에서, 각 X는 독립적인 플루오로, 클로로 또는 브로모이고;

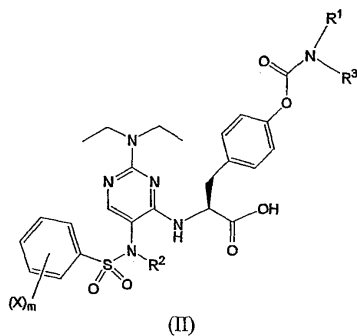
[0045] p는 0 내지 3의 정수이고;

[0046] 그들은 질소 원자와 함께 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐, 피롤릴, 2,5-다이하이드로피롤-1-일, 피페리디닐, 또는 1,2,3,6-테트라하이드로피리딘-1-일을 형성하며;

[0047] R<sup>2</sup>는 저급 알킬, 저급 알케닐, 및 저급 알킬렌시클로알킬으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0048] 바람직한 구체예에 있어서, 그들은 질소 원자와 함께 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성한다.

[0049] 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명은 식 (II)의 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[0050]

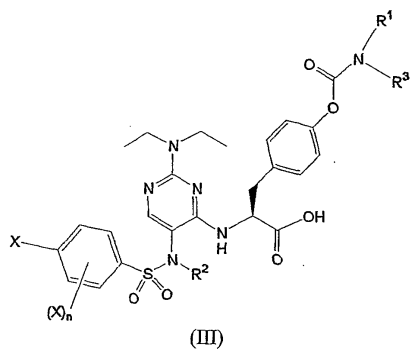
[0051] 상기에서, 각 X는 플루오로 및 클로로로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0052] m은 1 또는 2와 같은 정수이고;

[0053] R<sup>2</sup>는 저급 알킬, 저급 알케닐, 및 저급 알킬렌시클로알킬으로 구성되는 군으로부터 선택되며;

[0054] 그들은 질소 원자와 함께 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성한다.

[0055] 특별히 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명은 식 (III)의 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[0056]

[0057]

[0058]

[0059]

[0060]

[0061]

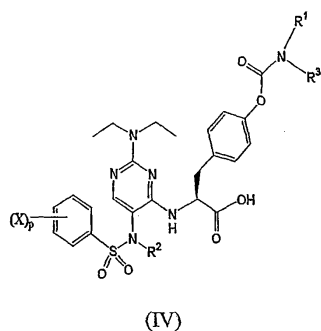
상기에서, 각 X는 독립적인 플루오로 또는 클로로이고;

n은 0 또는 1이고;

$R^2$ 는  $-CH_2-R'$ 이고, 상기  $R'$ 은 수소, 메틸 또는  $-CH=CH_2$ 로 구성되는 군으로부터 선택되며;

그들은 질소 원자와 함께  $R^1$  및  $R^3$ 에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐, 또는 피페리디닐기를 형성한다.

본 조성물의 다른 관점에 있어서, 본 발명은 식 (IV)의 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제시한다:



[0062]

[0063]

[0064]

[0065]

[0066]

[0067]

상기에서, 각 X는 독립적인 플루오로, 클로로 또는 브로모이고;

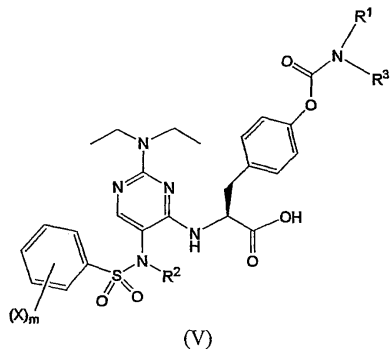
p는 0 내지 3의 정수이고;

그들은 질소 원자와 함께  $R^1$  및  $R^3$ 에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐, 피롤릴, 2,5-다이하이드로피롤-1-일, 피페리디닐, 또는 1,2,3,6-테트라하이드로피리딘-1-일을 형성하며;

$R^2$ 는 저급 알킬닐이다.

바람직한 구체예에 있어서, 그들은 질소 원자와 함께  $R^1$  및  $R^3$ 에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐기를 형성하고,  $R^2$ 는 프로파르길이다.

[0068] 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명은 식 (V)의 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[0069]

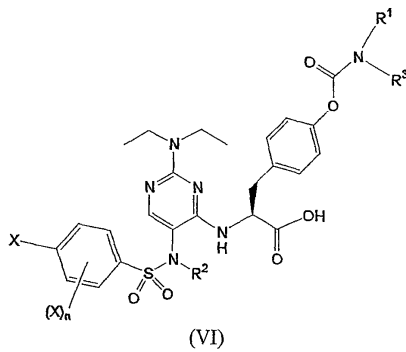
[0070] 상기에서, 각 X는 플루오로 및 클로로로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0071] m은 1 또는 2와 같은 정수이고;

[0072] R<sup>2</sup>는 저급 알킬닐이며;

[0073] 그들은 질소 원자와 함께 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐기를 형성한다.

[0074] 특별히 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명은 식 (VI)의 화합물 및 그들의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[0075]

[0076] 상기에서, 각 X는 독립적인 플루오로 또는 클로로이고;

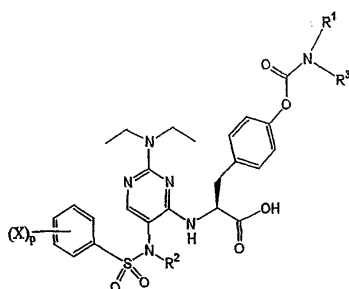
[0077] n은 0 또는 1이고;


[0078] R<sup>2</sup>는 저급 알킬닐이며;

[0079] 그들은 질소 원자와 함께 R<sup>1</sup> 및 R<sup>3</sup>에 결합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐기를 형성한다.

[0080] 본 발명의 범위 내의 N-[2-N',N'-다이에틸아미노-5-아미노설포닐페닐피리미딘-4-일]-p-카르보밀옥시-페닐알라닌 화합물은 다음과 같은 표 1에 나타난 것들을 포함한다.

丑 1



R <sup>1</sup> 및 R <sup>3</sup>	R <sup>2</sup>		화합물 번호
피롤리디닐	에틸	4-플루오로페닐	2
피롤리디닐	메틸	4-플루오로페닐	3
피롤리디닐	메틸	4-클로로페닐	4
피롤리디닐	에틸	4-클로로페닐	1
피페리디닐	메틸	4-플루오로페닐	5
아제티디닐	에틸	4-플루오로페닐	7
아제티디닐	메틸	4-플루오로페닐	8
아제티디닐	메틸	4-클로로페닐	9
아제티디닐	에틸	4-클로로페닐	10
피페리디닐	에틸	4-플루오로페닐	6
아제티디닐	에틸	2,4-다이플루오로페닐	14
피롤리디닐	메틸	2,4-다이플루오로페닐	11
피롤리디닐	에틸	2,4-다이플루오로페닐	12
아제티디닐	메틸	2,4-다이플루오로페닐	13
피롤리디닐	프로파르길	4-플루오로페닐	15
피롤리디닐	프로파르길	2,4-다이플루오로페닐	16
아제티디닐	프로파르길	2,4-다이플루오로페닐	17
아제티디닐	프로파르길	4-플루오로페닐	18
피롤리디닐	프로파르길	4-클로로페닐	19

[0081]

[0082] 본 발명의 범위 내의 특별한 화합물은 다음 화합물을 포함한다. 하기에 사용되는 것으로, 이러한 화합물들은 페닐알라닌 유도체에 기초하여 명명되지만, 선택적으로 이러한 화합물은 N-[2-N',N'-다이에틸아미노-5-아미노설포닐페닐-피리미딘-4-일]-*p*-카르보밀옥시페닐알라닌 유도체 또는 2-{2-다이에틸아미노-5-[(벤젠설페닐) 메틸아미노]-피리미딘-4-일아미노}3-*p*-카르바모일옥시-페닐)프로피온산 유도체에 기초하여 명명될 수 있다.

**[0083]** N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰일)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

[0084] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰닐)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

[0085] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰일)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

[0086] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰닐)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

[0087] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰일)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피페리딘-1-일)

카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;

- [0088] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰일)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피페리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0089] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰일)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0090] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰일)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0091] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설폰일)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카 르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0092] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설폰일)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카 르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0093] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하플루오로페닐설폰일)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘 -1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0094] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하플루오로페닐설폰일)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘 -1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0095] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하플루오로페닐설폰일)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘 -1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0096] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하플루오로페닐설폰일)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘 -1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0097] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰일)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘 -1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0098] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하플루오로페닐설폰일)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)- 4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0099] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이하플루오로페닐설폰일)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)- 4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0100] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰일)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘 -1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌;
- [0101] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설폰일)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘- 1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌; 및
- [0102] 그들의 약학적으로 허용되는 염.
- [0103] 다른 관점에 있어서, 본 발명은 약학적으로 허용되는 캐리어 및 치료적으로 효과적인 양의 본원에서 정의되는 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0104] 본 방법의 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 환자에서  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4에 의하여 적어도 부분 적으로 매개되는 질병의 치료 방법을 제시하며, 상기 방법은 약학적으로 허용되는 캐리어 및 본원의 치료적으로 효과적인 양의 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0105] 본 발명의 화합물 및 약학적으로 허용되는 조성물은  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4, 또는 백혈구 부착에 의 하여 적어도 부분적으로 매개되는 질병 상태를 치료하는데 유용하다. 그러한 질병 상태의 예로서 천식, 알츠하이머병, 죽상경화증, AIDS, 치매, 당뇨병 (급성 소아당뇨병을 포함), 염증장병 (궤양결장염 및 크론병을 포함), 다중경화증, 류머티스성 관절염, 조직 이식, 암 전이, 수막염, 뇌염, 중풍, 및 다른 뇌손상, 신장염, 망막염, 아토피성 피부염, 건선, 심근허혈 및 성인 호흡곤란증후군에서 발생하는 것과 같은 백혈구-매개 폐 손상을 포함 한다.
- [0106] 다른 질병 상태는 결절홍반, 알레르기결막염, 시각신경염, 포도막염, 알레르기비염, 감작척추염, 건선관절염,

맥관염, 레이터 증후군, 전신흡반루푸스, 전신평부경화증, 다발근육염, 피부근육염, 웨그너 육아종증, 대동맥염, 사르코이드증, 림프구감소증, 측두동맥염, 심장막염, 심근염, 울혈심부전증, 결절다발동맥염, 과민 증후군, 알레르기, 과다호산구 증후군, 처그-스트라우스 증후군, 만성폐쇄폐질환, 과민폐렴, 만성활동간염, 사이질방광염, 자가면역내분비부전, 원발췌관간경화, 자가면역재생불량성빈혈, 만성지속간염 및 감상샘염과 같은 염증 상태를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아니다.

[0107] 바람직한 구체예에 있어서, 질병 상태는 염증 질병이다.

### 발명의 상세한 설명

[0108] 상기와 같이, 본 발명은 백혈구 부착 및, 바람직하게는,  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 백혈구 부착을 저해하는 화합물과 관련된다. 그러나, 본 발명을 더 상세하게 설명하기 이전에, 다음의 용어가 먼저 정의될 것이다.

[0109] 정의

[0110] 특별한 진술이 없는 경우에, 명세서와 청구의 범위에서 사용되는 용어는 아래 주어진 의미를 가진다:

[0111] 본원에서 사용되는 것으로, "저급 알킬"은 곧은 및 분지된 사슬 알킬기를 포함하는 1 내지 5 탄소 원자를 가지는 1가 알킬기를 나타낸다. 본 용어는 메틸, 에틸, 이소-프로필, n-프로필, n-부틸, 이소-부틸, sec-부틸, t-부틸, n-펜틸 및 이들과 유사한 것과 같은 군에 의하여 예시된다.

[0112] 용어 "저급 알킬렌"은 곧은 및 분지된 사슬 알킬렌기를 포함하는 1 내지 4 탄소 원자를 가지는 2가 알킬렌기를 나타낸다. 본 용어는 메틸렌, 에틸렌, n-프로필렌, 이소-프로필렌 ( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$  및  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ ) 및 이들과 유사한 것과 같은 군에 의하여 예시된다.

[0113] 용어 "저급 알케닐"은 바람직하게 2 내지 6 탄소 원자를 가지고 적어도 1 위치 및 바람직하게 단지 1 위치의 알케닐 불포화 (즉,  $>\text{C}=\text{C}<$ )를 가지는 알케닐기를 나타낸다. 본 용어는 알릴, 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 및 그것들과 유사한 것과 같은 군에 의하여 예시된다.

[0114] 용어 "저급 알키닐"은 바람직하게 2 내지 6 탄소 원자를 가지고 적어도 1 위치 및 바람직하게 단지 1 위치의 알키닐 불포화 (즉,  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ )를 가지는 알키닐기를 나타낸다. 본 용어는 아세틸 ( $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 프로파르길( $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3-부티닐( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}_3$ ) 및 그것들과 유사한 것과 같은 군에 의하여 예시된다.

[0115] 용어 "저급 시클로알킬"은 예로서, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 포함하는 단일 시클릭고리를 가지는 3 내지 6 탄소 원자의 시클릭알킬기를 나타낸다.

[0116] 용어 "저급 알킬렌시클로알킬"은 본원에서 정의된 바와 같이, 저급 알킬렌-저급 시클로알킬로 구성되는 군을 나타낸다. 그러한 군은 메틸렌시클로프로필 ( $-\text{CH}_2-$ 시클로프로필), 에틸렌시클로프로필 및 그것들과 유사한 것에 의하여 예시된다.

[0117] "약학적으로 허용되는 염"은 일반적으로 안전하고, 무-독성이며, 생물학적 또는 다른 면으로도 바람직한 약학적 조성물을 제조하는데 유용한 캐리어를 의미하며, 인간 약학적 사용 뿐만 아니라 수의학적 사용에 대해 허용되는 캐리어를 포함한다. 본 명세서와 청구의 범위에서 사용되는 것으로 "약학적으로 허용되는 염"은 1 및 그 이상의 그러한 캐리어를 포함한다.

[0118] "치료하는" 또는 질병의 "치료"는

[0119] (1) 질병에 노출되거나 걸리기 쉽지만 아직 감염 또는 질병의 증상을 나타내지 않은 포유동물에서 질병의 임상적 증상이 발전하지 않게 하는 질병의 예방,

[0120] (2) 질병 또는 그것의 임상적 증상의 발전을 멈추거나 감소시키는 질병의 저해, 또는

[0121] (3) 질병 또는 그것의 임상적 증상을 퇴보시키는 질병의 구제를 포함한다.

[0122] "치료적으로 효과적인 양"은 질병을 치료하기 위하여 포유동물에 투여되었을 때, 질병에 대한 그러한 치료에 효과를 나타내기에 충분한 화합물의 양을 의미한다. "치료적으로 효과적인 양"은 화합물, 질병, 그것의 심각성 및 치료되는 포유동물의 나이, 체중 등에 따라 다양하게 될 것이다.



- [0123] "약학적으로 허용되는 염"은 식 I의 화합물의 약학적으로 허용되는 염을 나타내고, 그것의 염은 당해 기술분야에서 잘 알려진 다양한 유기 및 무기 반대이온으로부터 유도되며, 단지 예로서, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄, 및 그것들과 유사한 것; 및 분자가 기초적인 기능성을 함유할 때, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 아세테이트, 말레이트, 옥살레이트 및 그것들과 유사한 것과 같은 유기 또는 무기산염을 포함한다.
- [0124] 인테그린은 콜라겐, 피브로넥틴, 및 라미닌과 같은 대부분의 세포의 기질 단백질에 결합하기 위한 동물세포 상의 주요한 수용체인 상동성 트랜스멤브레인 링커 단백질의 거대 패밀리아이다. 인테그린은  $\alpha$  사슬과  $\alpha\beta$  사슬을 포함하는 이형이량체이다. 현재까지, 9 개의 다른  $\alpha$  소단위체 및 14 개의 다른  $\beta$  소단위체로 만들어진 20 개의 다른 인테그린 이형이량체가 동정되었다. 용어 " $\alpha_4$  인테그린"은 어떠한  $\beta$  소단위체와 짝지어진  $\alpha_4$  소단위체를 함유한 이형이량체 종인 효소-결합 세포 표면 수용체를 나타낸다. VLA-4는  $\alpha_4$  인테그린의 예이고,  $\alpha_4$  및  $\beta_1$  소단위체의 이형이량체이며, 또한  $\alpha_4\beta_1$  인테그린으로 나타낸다.
- [0125] 화합물 제조
- [0126] 본 발명의 화합물은 쉽게 이용가능한 출발물질로부터 하기 실시예에서 설명된 방법 및 과정을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 방법과 과정은 N-[2-N',N'-다이에틸아미노-5-아미노설포닐페닐-이리미딘-4-일]-p-카르보밀옥시-페닐알라닌 화합물을 제조하기 위한 특이적 반응 프로토콜을 개시한다. 이러한 실시예와 방법에서 예시되지 않지만 본 범위 내의 화합물은 상업적으로 이용가능하거나 당해기술 분야에서 잘 알려진 출발물질의 적절한 치환에 의하여 쉽게 제조된다.
- [0127] 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 다른 과정 및 반응 조건은 하기에 설명된 실시예에서 설명된다. 추가적으로, 본 발명의 특정 관점에서 유용한 화합물을 제조하기 위한 다른 과정이 2002년 12월 10일에 간행된 U. S. Patent 6,492,372에서 공개되었으며, 그 전체가 참고자료로서 본원에 통합된다.
- [0128] 약학적 제형
- [0129] 약물로서 적용될 때, 본 발명의 화합물은 대개 약학적 조성물의 형태로 투여된다. 이러한 조성물은 경구, 직장, 경피, 피하, 정맥내, 근육내, 및 비강내를 포함하는 다양한 경로로 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 주사 및 경구 전달 양자에 효과적이다. 그러한 조성물은 약학 분야에서 잘 알려진 방식으로 제조될 수 있으며, 적어도 하나의 활성 화합물을 포함한다.
- [0130] 본 발명은 또한 활성 성분으로서 약학적으로 허용되는 캐리어와 연관되어 상기 식 I의 1 또는 그 이상의 화합물을 함유하는 약학적 조성물을 포함한다. 본 발명의 조성물을 제조하는데 있어서, 활성 성분은 대개 첨가제와 혼합, 첨가제에 의하여 희석, 또는 캡슐, 새시 (sachet), 종이 또는 다른 컨테이너의 형태로 될 수 있는 그러한 캐리어 내에 봉입된다. 적용된 첨가제는 전형적으로 환자 또는 다른 포유동물에 투여하기에 적합한 첨가제이다. 첨가제가 희석제로 작용할 때, 그것은 활성 성분을 위한 운반체, 캐리어 또는 매질로 작용하는 고체, 반-고체, 또는 액체 물질일 수 있다. 그러므로, 본 조성물은 정제, 알약, 분말, 함당정제, 새시, 캐시 (cachet), 엘릭시르, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, (고체 또는 액체 매질 내) 에어로졸, 예를 들어, 활성 화합물 중량의 최대 10 % 까지 함유하는 연고, 연질 및 경질 젤라틴 캡슐, 좌약, 살균주사액, 및 살균포장분말의 형태일 수 있다.
- [0131] 제형의 제조에 있어서, 다른 성분과 조합하기 이전에 적절한 입자 크기를 제공하기 위하여 활성 화합물을 분쇄하는 것이 필요할 수 있다. 만약 활성 화합물이 실질적으로 불용성이라면, 통상 그것은 200 메쉬 (mesh) 보다 작은 크기로 분쇄된다. 만약 활성 화합물이 실질적으로 수용성이라면, 입자크기는 제형에 있어서 실질적인 단일한 분포, 예를 들어, 약 40 메쉬를 제공하기 위하여 분쇄에 의하여 일반적으로 조절된다.
- [0132] 적합한 첨가제의 예는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 녹말, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 트래거캔스, 젤라틴, 칼슘 실리카이트, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 및 메틸 셀룰로오스를 포함한다. 제형은 활석, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일과 같은 윤활제, 습윤제, 에멀전 및 현탁화제, 메틸- 및 프로필하이드록시-벤조에이트와 같은 보존제, 감미료, 및 방향제를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 당해기술 분야에서 잘 알려진 과정을 적용함에 의하여 환자에게 투여한 후 활성 성분의 신속한, 지속 또는 지연된 방출을 제공하기 위하여 제제될 수 있다.
- [0133] 본 조성물은 바람직하게 활성 성분의 단위 투여 형태로 제제될 수 있으며, 각 투여량은 약 5 내지 약 100 mg, 더 일반적으로 약 10 내지 약 30 mg을 함유한다. 용어 "단위 투여 형태"는 적절한 약학적 첨가제와 관련하여



환자와 다른 포유동물에 대한 단일 투여로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 나타내며, 각 단위는 희망하는 치료적 효과를 나타내기 위하여 계산된 미리 결정된 양의 활성 물질을 함유한다.

[0134] 활성 화합물은 넓은 투여량 범위 이상에서도 효과적이며, 일반적으로 약학적으로 허용되는 양으로 투여된다. 그러나, 실질적으로 투여되는 화합물의 양은 치료되는 조건, 선택된 투여 경로, 실질적으로 투여된 화합물, 나이, 체중, 및 환자 개인의 반응, 환자의 증상의 심각성, 및 그것들과 유사한 것을 포함하는 관련된 환경에 따라 내과의에 의하여 결정되어 질 것이다.

[0135] 정제와 같은 고체 조성물을 제조하기 위하여, 기본적인 활성 성분은 본 발명의 화합물의 동질 혼합물을 함유하는 고체 전제형 (preformulation) 조성물을 형성하기 위하여 약학적 첨가제와 혼합된다. 동질로서 이러한 전제형 조성물을 나타낼 때, 활성 성분은 조성물 전체에 균등하게 분산되고 조성물은 정제, 알약 및 캡슐과 같은 동등하게 효과적인 단위 투여 형태로 쉽게 나누어 질 수 있는 것을 의미한다. 본 고체 전제형은 다음으로, 예를 들어, 본 발명의 활성 성분의 0.1 내지 약 500 mg을 함유하는 상기 설명된 타입의 단위 투여 형태로 나누어진다.

[0136] 본 발명의 정제 또는 알약은 지속된 활동의 이점을 제공하기 위하여 코팅 또는 화합물화될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 알약은 내부 투여 및 외부 투여 요소를 포함할 수 있는데, 후자는 전자 위에 포장의 형태로 된다. 두 요소는 위에서의 분해에 저항을 제공하고 내부 요소가 그대로 십이지장으로 통과하거나 방출이 지연되게 할 수 있는 장층에 의하여 분리될 수 있다. 다양한 폴리머산 및 폴리머산과 셀락 (shellac), 세틸 알코올, 및 셀룰로오스 아세테이트 같은 그러한 물질의 혼합물을 포함하는 다양한 물질들이 그러한 장층 및 코팅에 사용되기 위해 이용될 수 있다.

[0137] 경구적으로 또는 주사에 의한 투여를 위하여 통합될 수 있는 액체 형태의 본 발명의 신규 조성물은 적절한 맛의 시럽 수용액, 수성 또는 유성 현탁액, 및 목화씨유, 참깨유, 코코넛유, 또는 땅콩유와 같은 식용유를 포함한 풍미를 가진 에멀전 뿐만 아니라, 엘릭시르 및 유사한 약학적 운반체를 포함한다.

[0138] 흡입 또는 취입 (insufflation)을 위한 조성물은 약학적으로 허용되는 용액 및 현탁액, 수성 또는 유기 용매, 또는 그들의 혼합물, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 설명된 바와 같은 적절한 약학적으로 허용되는 첨가제를 포함할 수 있다. 바람직하게 본 조성물은 국부 또는 전신 효과를 위하여 경구 또는 비강 호흡 경로로 투여될 수 있다. 바람직한 약학적으로 허용되는 용매에서의 조성물은 불활성 기체의 사용에 의하여 분무될 수 있다. 분무된 용액은 분무 장치로부터 직접적으로 호흡될 수 있거나, 분무 장치가 얼굴 마스크 텐트 또는 간헐적인 양압 호흡 기계에 부착될 수 있다. 용액, 현탁액, 또는 분말 조성물은 적절한 방식으로 제형을 전달하는 장치로부터, 바람직하게 경구적으로 또는 비강으로 투여될 수 있다.

[0139] 다음의 제형 예는 본 발명의 약학적 조성물을 설명한다.

[0140] 제형 예 1

[0141] 다음 성분을 함유한 경질 젤라틴 캡슐이 제조된다:

성분	함량 (mg/캡슐)
활성 성분	30.0
녹말	305.0
마그네슘 스테아레이트	5.0

[0142]

[0143] 상기 성분은 혼합되고 340 mg 양으로 경질 젤라틴 캡슐로 충전된다.

[0144] 제형 예 2

[0145] 정제 제형은 다음 성분을 사용하여 제조된다:

<u>성 분</u>	<u>함 량</u> <u>(mg/정제)</u>
활성 성분	25.0
셀룰로오스, 미정질	200.0
콜로이드 실리콘 다이옥사이드	10.0
스테아르산	5.0

[0146]

구성요소들은 섞이고 각 240 mg 중량으로 정제를 형성하기 위하여 압축된다.

[0148] 제형 예 3

[0149] 건조 분말 흡입기 제형은 다음 구성요소를 함유하여 제조된다:

<u>성 분</u>	<u>중 량 %</u>
활성 성분	5
락토오스	95

[0150]

활성 혼합물은 락토오스와 혼합되고, 그 혼합물은 건조 분말 흡입 적용을 위하여 첨가된다.

[0152] 제형 예 4

[0153] 활성 성분 각 30 mg을 함유하는 정제는 다음과 같이 제조된다:

<u>성 분</u>	<u>함 량</u> <u>(mg/정제)</u>
활성 성분	30.0 mg
녹말	45.0 mg
미정질 셀룰로오스	35.0 mg
폴리비닐피롤리돈(10% 수용액으로)	4.0 mg
나트륨 카르복시메틸 녹말	4.5 mg
마그네슘 스테아레이트	0.5 mg
활석	1.0 mg

[0154] 합계 120 mg

[0155] 활성 성분, 녹말 및 셀룰로오스가 No.20 mesh U. S. sieve에 통과되고 완전히 혼합되었다. 폴리비닐피롤리돈의 용액이 결과적인 분말과 혼합되고, 다음에 16 mesh U. S. sieve에 통과된다. 그렇게 생산된 입자는 50 °C 내지 60 °C에서 건조되고 16 mesh U. S. sieve에 통과된다. No. 30 mesh U. S. sieve에 미리 걸러진 나트륨 카르복시메틸 녹말, 마그네슘 스테아레이트, 및 활석이 다음으로 입자에 첨가되고, 혼합 후에 각 120 mg 중량 정제를 얻기 위하여 정제 기계 상에서 압축되었다.

[0156] 제형 예 5

[0157] 약물 각 40 mg을 함유하는 캡슐이 다음과 같이 만들어졌다:

<u>성 분</u>	<u>함 량</u> <u>(mg/캡슐)</u>
활성 성분	40.0 mg
녹말	109.0 mg
마그네슘 스테아레이트	<u>1.0 mg</u>
합계	150.0 mg

[0159] 활성 성분, 녹말, 및 마그네슘 스테아레이트가 혼합되고, No. 20 mesh U. S. sieve에 통과되고, 그리고 150 mg 양으로 경질 젤라틴 캡슐로 충전되었다.

[0160] 제형 예 6

[0161] 활성 성분 각 25 mg을 함유하는 좌약이 다음과 같이 만들어졌다:

<u>성 분</u>	<u>함 량</u>
활성 성분	25 mg
포화 지방산 글리세라이드	2,000 mg

[0163] 활성 성분이 No. 60 mesh U. S. sieve에 통과되고, minimum heat necessary를 사용하여 미리 용해된 포화된 지방산 글리세라이드에 현탁되었다. 혼합물은 다음으로 2.0 g 함량의 좌약 틀에 부어지고, 식혀진다.

[0164] 제형 예 7

[0165] 5.0 ml 투여량 당 약물 50 mg을 각 함유하는 현탁액이 다음과 같이 만들어졌다:

<u>성 분</u>	<u>함 량</u>
활성 성분	50.0 mg
산탄검	4.0 mg
나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스(11%)	
미정질 셀룰로오스(89%)	50.0 mg
수크로오스	1.75 g
나트륨 벤조에이트	10.0 mg
방향제 및 발색제	q.v.
정제수로	5.0 ml

[0167] 약물, 수크로오스 및 산탄검이 혼합되고, No. 10 mesh U. S. sieve에 통과되고, 다음으로 미리 만들어진 미정질 셀룰로오스 및 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스의 수용액과 혼합된다. 나트륨 벤조에이트, 향, 및 색이 약간의 물에 희석되고, 교반되면서 첨가되었다. 다음으로 충분한 물이 희망하는 부피를 생산하기 위하여 첨가되었다.

[0168] 제형 예 8

<u>성 분</u>	<u>함 량</u> <u>(mg/캡슐)</u>
활성 성분	15.0 mg
녹말	407.0 mg
마그네슘 스테아레이트	<u>3.0 mg</u>
합계	425.0 mg

[0169]

[0170] 활성 성분, 녹말, 및 마그네슘 스테아레이트가 혼합되고, No. 20 mesh U. S. sieve에 통과되고, 425 mg 양으로 경질 젤라틴 캡슐로 충전된다.

[0171] 제형 예 9

[0172] 정맥내주사 제형이 다음과 같이 제조된다:

<u>성분</u>	<u>함량</u>
활성 성분	250.0 mg
등장식염수	1000 ml

[0173]

[0174] 제형 예 10

[0175] 국부적 제형이 다음과 같이 제조된다:

<u>성분</u>	<u>함량</u>
활성 성분	1 - 10 g
에멀전화 왁스	30 g
액체 파라핀	20 g
백색 연질 파라핀	100 g 으로

[0176]

[0177] 백색 연질 파라핀이 녹을 때까지 가열된다. 액체 파라핀 및 에멀전화 왁스가 통합되고 용해될 때까지 교반된다. 활성 성분이 첨가되고 분사된 때까지 교반이 계속되었다. 그 다음에 혼합물이 고체가 될 때까지 식혀졌다.

[0178] 본 발명의 방법에 있어서 적용된 다른 바람직한 제형은 경피적 전달 장치 ("패치")를 적용한다. 그러한 경피적 패치는 조절된 양으로 본 발명의 화합물의 연속 또는 불연속 주입을 제공하기 위하여 사용될 수 있다. 약학적 제제의 전달을 위한 경피적 패치의 구성과 사용은 당해 기술분야에서 잘 알려져있다. 참고자료로서 본원에 통합된 1991년 6월 11일에 간행된 U. S. Patent 5,023,252 참고. 그러한 패치는 약학적 제제의 연속적, 규칙적, 또는 전달 요구에 따라 구성될 수 있다.

[0179] 직접 또는 간접적인 장착 기술이 뇌로 약학적 조성물을 도입하기 위하여 희망되고 필요되어질 때 사용될 수 있다. 직접적인 기술은 혈액-뇌 장벽을 우회하기 위하여 숙주의 심실계 (ventricular system)속으로 약물 전달 카테터의 장착과 연관된다. 생물학적 인자를 신체의 특정해부학적 부위로 수송하기 위하여 사용되는 하나의 그러한 이식 전달 시스템은 참고자료로서 본원에 통합된 U. S. Patent 5,011,472에서 설명된다.

[0180] 일반적으로 바람직한 간접적인 기술은 대개 친수성 약물을 지용성 약물로의 전환에 의하여 약물 잠복성을 제공하기 위한 약물 조성물을 제제하는 것과 연관된다. 잠복성은 일반적으로 약물에 존재하는 하이드록시, 카르보닐, 설페이트, 및 1차 아민기의 차단을 통하여 약물이 더 지용성이 되게 하여 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송이 가능하게 하여 이루어진다. 선택적으로, 친수성 약물의 전달은 일시적으로 혈액-뇌 장벽을 개방할 수 있는 고장액의 혈관내 주입에 의하여 향상될 수 있다.

[0181] 용도

[0182] 본 발명의 화합물은 생체 내에서  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 백혈구의 내피 세포에 결합을  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4에 경쟁적으로 결합함으로써 저해한다. 따라서, 본 발명의 화합물은  $\alpha_4$  인테그린, 바람직하게는 VLA-4, 또는 백혈구 부착에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 포유동물 질병의 치료에 사용될 수 있다. 그러한 질병은 천식, 알츠하이머병, 죽상경화증, AIDS, 치매, 당뇨 (급성 소아당뇨병을 포함), 염증장병 (퀘양결장염 및 크론병을 포함), 다중경화증, 류머티스성 관절염, 조직 이식, 암 전이, 수막염, 뇌염, 중풍, 및 다른 뇌손상, 신장염, 망막염, 아토피성 피부염, 건선, 심근허혈 및 성인 호흡곤란증후군에서 발생하는 것과 같은 백혈구-매개 폐 손상과 같은 포유동물에서의 염증 질병을 포함한다.

[0183] 포유동물에 투여하는 양은 투여되는 종류, 예방 또는 치료와 같은 투여의 목적, 질병체의 상태, 투여의 방법, 및 이와 유사한 것에 의존하여 다양하게 될 것이다. 치료적 적용에 있어서, 조성물은 이미 질병으로 고통받는 동물에 치료 또는 적어도 부분적으로 질병의 증상 및 그것의 합병증을 멈추기에 충분한 양으로 투여된다. 이것

을 성취하기에 적절한 양은 "치료적으로 효과적인 양"으로 정의된다. 본 용도에 효과적인 양은 치료되는 질병 상태 뿐만 아니라 염증의 심각성, 나이, 체중 및 환자의 일반적 상태, 및 그와 유사한 것과 같은 인자들에 의존하여 담당의사의 판단에 의하여 결정될 것이다.

[0184] 환자에게 투여되는 조성물은 상기 설명한 약학적 조성물의 형태이다. 이러한 조성물은 종래의 살균 기술에 의하여 살균될 수 있거나, 살균 여과 될 수 있다. 결과적인 수용액은 투여 이전에 살균 수성 캐리어와 조합된 동결건조된 제조로서 사용되기 위하여 포장될 수 있다. 화합물 제조의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 도다 바람직하게는 5 내지 9 및 가장 바람직하게는 7 내지 8일 것이다. 특정 전술한 첨가제, 캐리어, 또는 안정제의 사용은 약학적 염의 형성으로 결과된다는 것은 당연한 것이다.

[0185] 본 발명의 화합물의 치료적 투여량은 예를 들어, 특별한 용도에 기여하는 치료, 화합물의 투여 방식, 환자의 건강 및 상태, 및 처방의사의 판단에 따라 다양하게 될 것이다. 예를 들어, 정맥 내 투여에 대하여 투여량은 킬로그램 체중 당 전형적으로 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 의 범위, 바람직하게는 킬로그램 체중 당 약 100  $\mu\text{g}$  내지 약 300  $\mu\text{g}$ 일 것이다. 비강내 투여에 대한 적절한 투여량 범위는 일반적으로 킬로그램 체중 당 0.1  $\mu\text{g}$  내지 1 mg이다. 효과적인 투여량은 시험관 내 또는 동물 모델 측정 시스템으로부터 유도된 투여량-반응 곡선으로부터 외삽법에 의하여 추정될 수 있다.

[0186] 하기 합성 및 생물학적 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 제공되는 것이며, 본 발명의 범위를 한정하는 어떠한 방법으로 이해되지 않아야 한다. 특별한 진술이 없다면 모든 온도는 섭씨 온도이다.

### 실시예

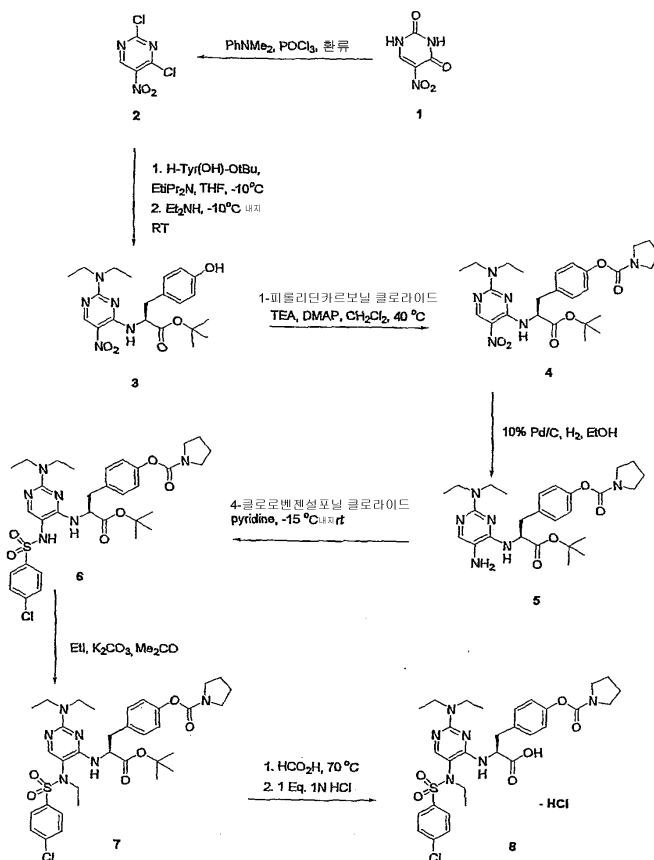
[0187] 하기 실시예에 있어서, 다음의 약어들은 다음의 의미를 가진다. 만약 약어가 정의되지 않으면, 그것은 그것의 일반적으로 받아들여지는 의미를 가진다.

[0188]	AUC	=	곡선 아래 지역
[0189]	bd	=	광역 더블렛
[0190]	bs	=	광역 싱글렛
[0191]	BSA	=	소 혈청 알부민
[0192]	d	=	더블렛
[0193]	DMAP	=	4-N,N-다이메틸아미노피리딘
[0194]			에틸카르보다이이미드
[0195]			하이드로클로라이드
[0196]	EDTA	=	에틸렌다이아민 테트라아세트산
[0197]	EtOAc	=	에틸 아세테이트
[0198]	EtOH	=	에탄올
[0199]	eq.	=	등가
[0200]	FACS	=	형광 활성화 세포 분류기
[0201]	FITC	=	플루오레세인 이소티오시아네이트
[0202]	g	=	그램
[0203]	i.p.	=	복막내
[0204]	h	=	시간
[0205]	HBSS	=	Hank's Balanced Saline Solution
[0206]	Hct	=	적혈구용적율, 또는 다량의
[0207]			혈액 샘플의 원심분리에 의하여

[0208]			획득된 압축된 적혈구의 측정
[0209]	HB 또는 Hb	=	헤모글로빈
[0210]	HEPES	=	4-(2-하이드록시에틸)-1-
[0211]			피페라진-에탄설폰산
[0212]	IgG Fc	=	면역글로불린의 결합 영역
[0213]	kg	=	킬로그램
[0214]	L	=	리터
[0215]	m	=	멀티플렛 (NMR 데이터로 사용될 때)
[0216]	M	=	몰농도
[0217]	MCH	=	평균적혈구혈색소량; Hb/RBC
[0218]	MCHC	=	백분율로 표시된 평균적혈구혈색소수;
[0219]			Hb/Hct .
[0220]	MCV	=	평균적혈구부피; 적혈구 당
[0221]			입방 마이크로미터에서 전통적으로
[0222]			표현되는적혈구의 평균 부피
[0223]	MeOH	=	메탄올
[0224]	mg	=	밀리그램
[0225]	mL	=	밀리리터
[0226]	mm	=	밀리미터
[0227]	mM	=	밀리몰농도
[0228]	mol	=	몰
[0229]	mmol	=	밀리몰
[0230]	mpk	=	킬로그램 당 밀리그램
[0231]	N	=	노르말
[0232]	ng	=	나노그램
[0233]	PBS++	=	인산완충염
[0234]	psi	=	제곱인치 당 파운드
[0235]	q.s. 또는 Q.S.	=	최종 부피
[0236]	Rfs 또는 R <sub>f</sub>	=	체류 인자
[0237]	rpm	=	분당 회전
[0238]	rt 또는 RT	=	실온
[0239]	s	=	싱글렛
[0240]	t	=	트리플렛
[0241]	TFA	=	트리플루오로아세트산
[0242]	THF	=	테트라하이드로푸란

[0243]	TLC 또는 tlc	=	박막크로마토그래피
[0244]	$\mu\text{L}$	=	마이크로리터
[0245]	$\mu\text{g}$	=	마이크로그램
[0246]	$\mu\text{m}$	=	마이크론
[0247]	$V_t$	=	총 부피
[0248]	WBC	=	백혈구
[0249]	w/v	=	무게 대 부피

[0250] 본 발명의 화합물은 참고도 1에서 설명되는 바와 같이, 그리고 하기 방법에서 설명되는 바와 같이 제조될 수 있다:



[0251] 실시예 1

[0252] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설포닐)-N"에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0254] 단계 1: 2,4-다이클로로-5-니트로피리미딘 (2)의 제조. 5-니트로우라실 (1)이 화합물 2를 얻기 위하여 Whittaker (J. Chem. Soc. 1951, 1565)의 과정에 따라 포스포로스 옥시클로라이드 ( $\text{POCl}_3$ ) 및 N,N-다이에틸아닐린 ( $\text{PhNMe}_2$ )로 처리되었다. 화합물 2는 또한 City Chemical (West Haven, CT)로부터 이용할 수 있다.

[0255] 단계 2: N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-니트로피리미딘-4-일)-L-티로신 삼-부틸 에스테르 (3)의 제조.  $-10^\circ\text{C}$ 에서 L-티로신 삼-부틸 에스테르 ( $\text{H-Tyr(OH)-OtBu}$ ) (30.6 g, 0.129 mol)의 THF (250 mL)용액에 2,4-다이클로로-5-니트로피리미딘 (25 g, 0.129 mol)이 동안  $5^\circ\text{C}$  아래로 유지되면서 첨가되었다. 일단 첨가가 완성되면, N,N-다이에틸아민 ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ) (66.73 mL, 0.645 mol)이 천천히 첨가되고, 다음으로 반응 혼합물은 실온에서 오버나이트로 보온되었다. 반응 혼합물은 다이에틸 에테르 (500 mL)로 희석되고, 유기층이 0.2 N 시트르산 (3



x 150 mL), 물 (1 x 150 mL), 및 10 %  $K_2CO_3$  (3 x 150 mL)로 세척되었다. 유기 상은 건조 ( $Na_2SO_4$ ), 여과, 및 진공에서 농축되어 황색 잔여물을 수득하였다. 잔여물은 플래쉬 크로마토그래피 (실리카겔 상에 20 % EtOAc/헥산)로 정제되어, 황색 거품으로서 37.39 g (67 %)의 화합물 3을 수득하였다.  $R_f=0.21$  (실리카겔 상에 25 % EtOAc/헥산).

[0256]

**단계 3: N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5- 니트로피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (4)의 제조.** N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-니트로피리미딘-4-일)-L-티로신 삼-부틸 에스테르 (37.39 g, 0.087 mol)의  $CH_2Cl_2$  (150 mL)용액에 DMAP (10.59 g, 0.087 mol)이 첨가되었다. 5 분 후 트리메틸아민 (TEA) (18.19 mL, 0.131 mol)이 조금씩 첨가되었다. 1-피롤리딘카르바모일 클로라이드 (14.42 mL, 0.131 mol)이 조금씩 첨가되고, 반응은 유동으로 오버나이트 동안 가열 (40 °C)되었다. 반응 혼합물은 진공에서 농축되고, EtOAc (300 mL)에 용해되었다. 유기 상은 0.2 N 시트르산 (3 x 150 mL), 물 (1 x 150 mL), 포화  $NaHCO_3$  (3 x 150 mL), 브린 (1 x 150 mL)으로 세척, 건조 ( $Na_2SO_4$ ), 여과, 및 진공에서 농축되어 황색 고체로서 43.07 g (94 %)의 화합물 4를 수득하였다.  $R_f=0.5$  (실리카겔 상에 50 % EtOAc/헥산).

[0257]

**단계 4: N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-아미노피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (5)의 제조.** N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-니트로피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (43.07 g, 0.081 mol) 및 10 % Pd/C (4.3 g, 10 wt% Pd)의 EtOH (200 mL) 혼합물을 45 psi 수소 하에서 TLC (실리카겔 상에 50 % EtOAc/헥산)가 산물로 100 % 전환을 나타낼 때까지 (48 h) 흔들여 주었다. 반응 혼합물은 다음으로 Celite plug를 통하여 여과되고, 진공에서 농축되어 보라색 거품으로 40.29 g (100 %)의 화합물 5를 수득하였다.  $R_f=0.11$  (실리카겔 상에 6:1 EtOAc/헥산).

[0258]

**단계 5: N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐-설폰닐)아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (6)의 제조.** N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-아미노피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (40.29 g, 0.081 mol)의 피리딘 (160 mL)용액이 트라이아이스/ $CH_3CN$  조에서 -20 °C로 냉각되었다. 혼합물은 30 분 간 교반되고, 다음으로 4-클로로벤젠설폰닐 클로라이드 (17.06 g, 0.081 mol)이 천천히 첨가되었다. 반응물은 -20 °C 내지 -15 °C에서 4 h 동안 교반되고, 다음으로 실온에서 오버나이트로 보온되었다. 반응물은 EtOAc (400 mL)로 희석되고, 유기 상은 0.2 N 시트르산 (3 x 150 mL), 물 (1 x 150 mL), 포화  $NaHCO_3$  (3 x 150 mL), 브린 (1 x 150 mL)로 세척, 건조 ( $Na_2SO_4$ ), 여과, 및 진공에서 농축되어 갈색 잔여물을 수득하였다. 잔여물은 플래쉬 크로마토그래피 (실리카겔 상에 50 % EtOAc/헥산)로 정제되어 황색 거품으로 43.49 g (80 %)의 화합물 6을 수득하였다.  $R_f=0.35$  (실리카겔 상에 50 % EtOAc/헥산).

[0259]

**단계 6: N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐-설폰닐)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (7)의 제조.** N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐-설폰닐)아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (42.92 g, 0.064 mol)의 아세톤 ( $Me_2CO$ ) (600 mL)용액에  $K_2CO_3$  (12.75 g, 0.096 mol)가 첨가되고, 혼합물이 실온에서 1 h 동안 교반되었다. 다음으로 요오드에탄 (EtI) (7.73 mL, 0.096 mol)이 천천히 첨가되고, 반응 혼합물은 실온에서 오버나이트로 교반되었다. 반응 혼합물은 진공에서 농축되어 잔여물이 EtOAc (300 mL)에 용해되었다. 유기 상이 물 (2 x 300 mL), 브린 (1 x 100 mL)으로 세척, 건조 ( $Na_2SO_4$ ), 여과, 및 진공에서 농축되었다. 잔여물은 플래쉬 크로마토그래피 (실리카겔 상에 2:1 헥산/EtOAc)에서 정제되어 백색 고체로서 37.36 g (85 %)의 화합물 7을 수득하였다.  $R_f=0.53$  (실리카겔 상에 50 % EtOAc/헥산).

[0260]

**단계 7: N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설폰닐)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 하이드로클로라이드 (8)의 제조.** N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐-설폰닐)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르 (36.21 g, 0.052 mol)의 포름산 (500 mL)용액이 70 °C로 2 h 동안 가열되고, 다음으로 진공에서 농축되었다. 잔여물이 포름산 (500 mL)으로 다시 용해되고, 다시 70 °C로 2 h 동안 가열되었다. 용액은 80 %의 부피로 감소되고, 다음으로 적어도 1 eq.의 1.0 N HCl (52 mL, 0.052 mol)로 처리되고 다음으로 증류수 (100 mL)가 가해졌다. 결과적인 이형 혼합물은 진공에서 농축되었다. 증류수 (100 mL)가 첨가되고, 이형 혼합물은 진공에서 농축되었다. 후자의 단계가 두번 반복되어 젖은 백색 산물이 수득되었다. 이것은 40 °C에서 높



은 진공 상태로 놓아 두고 (7 일 간) 건조시켜 흐르지 않는 백색 고체로서 32.8 g (93 %)의 화합물 8을 수득하였다.  $R_f=0.25$  (7/3 MeOH/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA, 역상).

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.22 (bs, 1H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.64-7.60 (m, 2H), 7.36-7.33 (m, 1H), 7.22-7.13 (m, 2H), 7.07-6.98 (m, 2H), 4.91-4.90 (m, 1H), 4.80-4.79 (m, 1H), 4.12-4.10 (m, 1H), 3.87-3.75 (m, 1H), 3.55-3.53 (m, 4H), 3.41-3.40 (m, 3H), 3.26-3.19 (m, 2H), 2.03 (bs, 1H), 1.97-1.89 (m, 3H), 1.27-1.15 (m, 6H), 1.10-1.05 (t, 1.5H), 0.97-0.92 (t, 1.5H)

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 175.8, 175.7, 166.5, 162.7, 162.2, 155.8, 155.7, 155.7, 152.6, 148.1, 147.7, 142.0, 138.5, 136.2, 132.6, 132.3, 131.9, 131.7, 123.7, 111.8, 111.5, 62.3, 57.8, 44.9, 38.7, 38.0, 27.4, 26.6, 15.3, 14.9, 14.7, 14.0, 13.9

[0261]

[0262]

### 실시예 2

[0263]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰닐)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0264]

단계 1, 2, 3, 4, 6 및 7은 실시예 1에서와 같이 수행되었다. 단계 5는 4-클로로벤젠설폰닐 클로라이드의 위치에 4-플루오로벤젠설폰닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.17 (bs, 1H), 7.90-7.87 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 2H), 7.20-7.16 (m, 1H), 7.08-7.00 (m, 3H), 5.52-5.51 (m, 1H), 4.96-4.93 (m, 2H), 5.78-5.70 (m, 1H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.59-3.53 (m, 4H), 4.47-4.43 (m, 2H), 3.44-3.24 (m, 2H), 2.02-1.94 (m, 3H), 1.24-1.16 (m, 6H), 1.10-1.05 (t, 1.5H), 0.99-0.94 (t, 1.5H)

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 133.0, 132.9, 132.5, 132.2, 123.7, 123.6, 118.6, 57.1, 44.3, 38.3, 27.3, 26.6, 14.7, 14.1

[0265]

MS  $m/z$  629.5 (MH<sup>+</sup>)

[0266]

### 실시예 3

[0267]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰닐)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0268]

단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 2에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 에틸 요오다이드의 위치에 다이메틸 설페이트를 사용하여 수행되었다.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.16 (bs, 1H), 7.89-7.88 (m, 1H), 7.39-7.35 (m, 3H), 7.20-7.13 (m, 1H), 7.05-7.00 (m, 2H), 4.85-4.84 (m, 1H), 4.14-4.12 (m, 1H), 3.59-3.54 (m, 5H), 3.45-3.44 (m, 2H), 3.45-3.33 (m, 3H), 3.13-3.12 (m, 1H), 3.02-3.01 (m, 1H), 2.04-1.95 (m, 4H), 1.29-1.18 (m, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 176.5, 169.8, 166.9, 166.4, 156.2, 152.7, 151.8, 150.4, 136.8, 133.3, 133.2, 132.5, 123.7, 118.8, 118.5, 57.8, 57.1, 48.3, 44.5, 41.0, 38.8, 27.5, 26.7, 14.1

[0269]

MS  $m/z$  615.2 (MH<sup>+</sup>)

[0270]

### 실시예 4

[0271]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-클로로페닐설폰닐)-N"-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0272]

단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 1에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 에틸 요오다이드의 위치에 다이메틸 설페이트를 사용하여 수행되었다.

페이지를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.20 (bs, 1H), 7.83-7.80 (m, 2H), 7.67-7.64 (m, 2H), 7.37-7.34 (m, 1H), 7.21-7.18 (m, 1H), 7.10-7.03 (m, 2H), 4.88-4.87 (m, 1H), 4.13-4.10 (m, 1H), 3.55-3.45 (m, 6H), 3.42-3.40 (m, 2H), 3.24-3.23 (m, 2H), 3.11-3.10 (m, 1H), 3.02-3.01 (m, 1H), 2.04-2.03 (m, 1H), 1.98-1.90 (m, 3H), 1.28-1.18 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  176.0, 166.4, 161.8, 155.9, 155.4, 152.6, 146.5, 142.2, 137.6, 137.4, 136.4, 132.5, 131.9, 123.7, 114.6, 62.4, 58.1, 57.7, 45.0, 40.8, 38.6, 38.3, 27.4, 26.6, 15.3, 13.9

[0273]

[0274]

#### 실시예 5

[0275]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰닐)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피페리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0276]

단계 1, 2, 4, 5, 6 및 7은 실시예 3에서와 같이 수행되었다. 단계 3은 1-피롤리딘카르보닐 클로라이드의 위치에 1-피페리딘카르보닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.16 (bs, 1H), 7.90-7.88 (m, 2H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.21-7.20 (m, 1H), 7.14-7.13 (m, 1H), 7.02-7.01 (m, 2H), 5.51 (bs, 1H), 4.83-4.77 (m, 1H), 3.64-3.53 (m, 6H), 3.34-3.33 (m, 2H), 3.20-3.17 (m, 1H), 3.12-3.11 (m, 2H), 3.02-3.01 (m, 1H), 1.68-1.65 (m, 6H), 1.19-1.17 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  185.0, 169.7, 166.3, 152.7, 136.6, 135.0, 133.2, 133.0, 132.5, 131.8, 126.3, 123.6, 121.7, 118.6, 118.3, 57.6, 54.5, 46.9, 44.3, 39.6, 38.7, 27.6, 25.9, 14.0

[0277]

[0278]

#### 실시예 6

[0279]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰닐)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피페리딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0280]

단계 1, 2, 4, 5, 6 및 7은 실시예 2에서와 같이 수행되었다. 단계 3은 1-피롤리딘카르보닐 클로라이드의 위치에 1-피페리딘카르보닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.17 (bs, 1H), 7.91-7.85 (m, 2H), 7.39-7.31 (m, 3H), 7.20-7.16 (m, 1H), 7.05-6.97 (m, 2H), 4.88-4.69 (m, 2H), 4.71-4.69 (m, 1H), 3.80-3.75 (m, 1H), 3.62-3.39 (m, 6H), 3.34-3.32 (m, 2H), 3.30-3.16 (m, 3H), 1.68-1.65 (m, 4H), 1.23-1.17 (m, 6H), 1.10-1.05 (t, 1.5H), 0.99-0.94 (t, 1.5H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  199.9, 187.6, 183.1, 176.2, 169.7, 166.3, 163.0, 162.7, 153.9, 152.9, 136.5, 133.1, 133.0, 132.7, 132.4, 123.8, 118.8, 118.4, 111.1, 110.6, 102.8, 79.4, 57.3, 55.4, 44.4, 38.9, 38.4, 27.7, 26.1, 15.1, 14.8, 14.3, 14.2

[0281]

[0282]

#### 실시예 7

[0283]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰닐)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일 카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0284] 단계 1, 2, 4, 5, 6 및 7은 실시예 2에서와 같이 수행되었다. 단계 3은 다음 과정에 따라 수행되었다.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.92-7.86 (m, 2H), 7.41-7.32 (m, 3H), 7.22 (d, 1H), 7.04-6.91 (m, 3H), 4.29-3.98 (m, 4H), 3.88-3.72 (m, 1H), 3.69-3.37 (m, 4H), 2.40-2.24 (m, 2H), 1.28-1.11 (m, 6H), 1.10-1.00 (t, 1.5H), 1.01-0.89 (t, 1.5H)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.2, 169.7, 166.4, 163.2, 162.8, 157.0, 153.3, 153.2, 152.4, 144.3, 143.8, 136.1, 135.6, 135.5, 133.2, 133.1, 132.5, 132.2, 123.7, 118.9, 118.6, 112.9, 112.6, 57.5, 38.1, 37.7, 17.4, 14.7, 14.5, 13.8, 13.7

[0285] MS  $m/z$  615 ( $\text{MH}^+$ )

[0286] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-니트로피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르의 다른 제조.  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 로 교반된 화합물 3 (24.9 g, 0.0578 mol) 및 4-니트로페닐 클로로포르메이트 (11.7 g, 0.0578 mmol)의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL)용액에 반응 혼합물의 온도가  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 를 초과하지 않는 속도로 트리에틸아민 (24.2 mL, 0.173 mol)이 첨가되었다. 20 min 동안 교반 후에, 아제티딘 (3.30 g, 0.0578 mmol)이 천천히 첨가되고, 반응 혼합물은 실온에서 보온되고, 오버나이트로 교반되었다. 반응 혼합물은 EtOAc (100 mL) 및 헥산 (100 mL)으로 희석되고, 다음으로 황색 (4-니트로페놀)이 수층에서 보이지 않을 때까지 10 % 수성  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 로 반복적으로 추출되었다. 유기층이 브린 (75 mL)으로 세척,  $\text{MgSO}_4$ 로 건조, 여과, 및 증발되어 정제 없이 사용되는 황색 고체로서 28.5 g (96 %)의 N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-니트로피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌 삼-부틸 에스테르를 수득하였다.  $R_f=0.17$  (실리카겔 상에 2:5 EtOAc/헥산).

[0287] 실시예 8

[0288] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰닐)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0289] 단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 7에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 에틸 요오다이드의 위치에 다이메틸 설페이트를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.95-7.76 (m, 2H), 7.44-7.11 (m, 4H), 7.01-6.83 (m, 3H), 4.30-3.93 (m, 4H), 3.66-3.41 (m, 4H), 3.14-2.92 (m, 3H), 2.42-2.21 (m, 2H), 1.32-1.01 (m, 6H)

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  152.3, 136.3, 133.4, 133.2, 132.4, 123.6, 118.8, 118.5, 38.2, 17.4, 13.8

[0290] MS  $m/z$  601 ( $\text{MH}^+$ )

[0291] 실시예 9

[0292] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로페닐설폰닐)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0293] 단계 1, 2, 3, 4, 6 및 7은 실시예 8에서와 같이 수행되었다. 단계 5는 4-플루오로벤젠설폰닐 클로라이드의 위치에 4-클로로벤젠설폰닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.83 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.36-7.18 (m, 2H), 7.06-6.86 (m, 3H), 4.29-3.97 (m, 4H), 3.66-3.34 (m, 5H), 3.15-2.95 (m, 4H), 2.41-2.22 (m, 2H), 1.26-1.06 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  157.2, 153.0, 152.5, 142.9, 142.5, 136.4, 132.5, 132.1, 132.0, 123.8, 57.9, 52.2, 40.7, 38.0, 17.4, 13.6

MS  $m/z$  617 ( $\text{MH}^+$ )

[0294]

#### 실시예 10

[0295]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-클로로벤젠설포닐)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0296]

[0297]

단계 1, 2, 3, 4, 6 및 7은 실시예 7에서와 같이 수행되었다. 단계 5는 4-플루오로벤젠설포닐 클로라이드의 위치에 4-클로로벤젠설포닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.86-7.76 (m, 2H), 7.70-7.60 (m, 2H), 7.32 (bd, 1H), 7.21 (bd, 1H), 7.03-6.97 (m, 2H), 6.90 (bs, 1H), 4.29-4.00 (m, 4H), 3.89-3.72 (m, 1H), 3.70-3.36 (m, 5H), 3.28-3.10 (m, 2H), 2.42-2.24 (m, 2H), 1.28-1.13 (m, 6H), 1.11-1.02 (t, 1.5H), 1.01-0.90 (t, 1.5H)

MS  $m/z$  631 ( $\text{MH}^+$ )

[0298]

#### 실시예 11

[0299]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이하플루오로벤젠설포닐)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0300]

[0301]

단계 1, 2, 3, 4, 6 및 7은 실시예 3에서와 같이 수행되었다. 단계 5는 4-플루오로벤젠설포닐 클로라이드의 위치에 2,4-다이하플루오로벤젠설포닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.16 (bs, 6H), 1.93 (bs, 4H), 2.50-3.75 (m, 13H), 4.83 (bs, 1H), 6.60-7.40 (m, 7H), 7.60 (bs, 1H), 7.77 (m, 1H), 9.41 (bs, 1H)

[0302]

#### 실시예 12

[0303]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이하플루오로벤젠설포닐)-N''-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0304]

[0305]

단계 1, 2, 3, 4, 6 및 7은 실시예 2에서와 같이 수행되었다. 단계 5는 4-플루오로벤젠설포닐 클로라이드의 위치에 2,4-다이하플루오로벤젠설포닐 클로라이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.91 (t,  $J=6.9$ , 1.8H), 1.12 (m, 7.2H), 1.92 (bs, 4H), 2.50-4.00 (m, 13H), 4.78 (m, 0.6H), 4.88 (m, 0.4H), 6.55 (d,  $J=6.9$ , 0.4H), 6.77 (d,  $J=6.3$ , 0.6H), 6.80-7.38 (m, 6H), 7.51 (s, 0.4H), 7.58 (s, 0.6H), 7.74 (m, 1H), 9.33 (m, 1H)

[0306]

#### 실시예 13

[0307]

N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(2,4-다이하플루오로벤젠설포닐)-N''-메틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아제티딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0308]

[0309] 단계 1, 2, 4, 5, 6 및 7은 실시예 11에서와 같이 수행되었다. 단계 3은 실시예 7에서와 같이 수행되었다.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.14 (t,  $J=6.6$ , 6H), 2.32 (m, 2H), 2.50-3.80 (m, 9H), 4.13 (m, 4H), 4.62 (m, 0.6H), 4.81 (m, 0.4H), 5.81 (bd, 0.6H), 5.90 (bd, 0.4H), 6.90-7.40 (m, 7H), 7.77 (m, 1H)

MS  $m/z$  619.2 ( $\text{MH}^+$ )

[0310]

[0311]

#### 실시예 14

[0312] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이플루오로페닐설폰닐)-N"-에틸아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아세트산-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0313] 단계 1, 2, 4, 5, 6 및 7은 실시예 12에서와 같이 수행되었다. 단계 3은 실시예 7에서와 같이 수행되었다.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (t,  $J=6.7$ , 1.8H), 1.16 (m, 7.2H), 2.28 (m, 2H), 3.00-4.00 (m, 8H), 4.09 (bs, 4H), 4.79 (m, 0.6H), 4.88 (m, 0.4H), 6.80-7.30 (m, 7H), 7.57 (s, 0.4H), 7.62 (s, 0.6H), 7.75 (m, 1H), 11.9 (bs, 1H)

MS  $m/z$  633.2 ( $\text{MH}^+$ )

[0314]

[0315]

#### 실시예 15

[0316] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(4-플루오로페닐설폰닐)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0317] 단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 2에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 에틸 요오다이드의 위치에 프로파르길 브로마이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.18 (m, 6H), 1.93 (bs, 4H), 2.37 (s, 1H), 3.00-3.70 (m, 10H), 3.80 (d,  $J=21.3$ , 0.6H), 3.98 (d,  $J=18.3$ , 0.4H), 4.51 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 6.75-7.35 (m, 7H), 7.58 (s, 0.6H), 7.63 (s, 0.4H), 7.86 (m, 2H), 9.71 (bs, 1H)

[0318]

[0319]

#### 실시예 16

[0320] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이플루오로페닐설폰닐)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0321] 단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 11에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 다이메틸 설페이트의 위치에 프로파르길 브로마이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.17 (m, 6H), 1.94 (m, 4H), 2.40 (m, 1H), 3.00-3.75 (m, 10H), 3.99 (d,  $J=18.0$ , 0.6H), 4.18 (d,  $J=18.0$ , 0.4H), 4.50 (m, 1H), 4.90 (m, 1H), 6.75-7.35 (m, 7H), 7.81 (m, 2H), 10.0 (bs, 1H)

[0322]

[0323]

#### 실시예 17

[0324] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N"-(2,4-다이플루오로페닐설폰닐)-N"-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아세트산-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0325] 단계 1, 2, 4, 5, 6 및 7은 실시예 16에서와 같이 수행되었다. 단계 3는 실시예 7에서와 같이 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.18 (m, 6H), 2.34 (m, 3H), 3.00-3.75 (m, 6H), 3.80-4.25 (m, 5H), 4.47 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 6.75-7.35 (m, 7H), 7.79 (m, 2H), 10.3 (bs, 1H)

[0326] MS m/z 643.2 ( $\text{MH}^+$ )

[0327] 실시예 18

[0328] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-[N''-(4-플루오로페닐설폰닐)-N''-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(아세트딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0329] 단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 7에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 에틸 요오다이드의 위치에 프로파르길 브로마이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.25 (m, 6H), 2.28 (m, 3H), 3.00-3.75 (m, 6H), 3.80-4.25 (m, 5H), 4.47 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 6.75-7.35 (m, 7H), 7.57 (s, 0.6H), 7.62 (s, 0.4H), 7.79 (m, 2H), 10.6 (bs, 1H)

[0330] MS m/z 625.2 ( $\text{MH}^+$ )

[0331] 실시예 19

[0332] N-(2-[N',N'-다이에틸아미노]-5-N''-(4-클로로페닐설폰닐)-N''-프로파르길아미노]피리미딘-4-일)-4'-(피롤리딘-1-일카르보닐옥시)-L-페닐알라닌의 제조

[0333] 단계 1, 2, 3, 4, 5 및 7은 실시예 1에서와 같이 수행되었다. 단계 6은 에틸 요오다이드의 위치에 프로파르길 브로마이드를 사용하여 수행되었다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.13 (s, 1H), 7.86-7.82 (m, 2H), 7.62-7.58 (m, 2H), 7.32-7.28 (m, 2H), 7.19-7.17 (m, 1H), 7.04-6.98 (m, 2H), 4.83-4.5 (m, 2H), 4.12-3.82 (m, 1H), 3.63-3.37 (m, 8H), 3.27-3.08 (m, 2H), 2.72 (bs, 1H), 2.04-1.86 (m, 4H), 1.24-1.07 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  177.2, 176.5, 162.7, 156.7, 155.7, 154.5, 153.2, 142.6, 140.3, 137.4, 137.3, 133.1, 132.9, 132.8, 132.7, 132.2, 132.1, 124.3, 111.3, 80.5, 80.3, 77.7, 58.2, 57.7, 44.9, 43.4, 28.1, 27.3, 14.8, 14.7

[0334] MS m/z 655 ( $\text{MH}^+$ )

[0335] 다음의 방법은 본 발명의 화합물을 시험하기 위하여 사용될 수 있다.

[0336] 실시예 A

[0337]  $\alpha^4\beta^1$  인테그린 부착 측정:

[0338] 인간 원형질 피브로벡틴에 Jurkat<sup>TM</sup> 세포의 부착

[0339] 과정

[0340] 96 well plate (Costar 3590 EIA plates)에 4 °C, 오버나이트로 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 인간 피브로벡틴 (Gibco/BRL, cat # 33016-023)이 코팅되었다. 다음으로 플레이트는 소 혈청 알부민 (BSA; 0.3 %)의 염용액으로 보호되었다. Jurkat<sup>TM</sup> 세포 (대수증식기로 유지)가 제조자의 지시에 따라 Calcein AM으로 표지되고,

Hepes/Saline/BSA에서  $2 \times 10^6$  세포/mL의 농도로 부유되었다. 다음으로 세포는 피브로넥틴 코팅 플레이트의 각 웰로 전달하기 전에 실온에서 30 분 동안 실험군 및 대조군 화합물에 노출되었다. 부착이 37 °C에서 35 분 동안 발생되게 두어졌다. 다음으로 웰은 약한 흡입 및 새로운 염으로 피펫팅하며 세척되었다. 결과적인 부착 세포들과 연관된 형광이 fluorescence plate reader를 사용하여 EX 485/EM 530에서 정량되었다.

- [0341] 세포 배양이 제 1일에 정지기 Jurkat<sup>TM</sup> 세포를 1 : 10으로 먼저 분리하고, 제 3일에 측정을 수행하기 위하여 제 2일에 1 : 2로 나누어 준비되었다. 제 1일에 1 : 10으로 나눈 세포는 제 4일에 측정을 위하여 제 3일에 1 : 4로 나누어졌다.
- [0342] 측정 플레이트는 먼저 10 µg/mL, Gibco/BRL Human Fibronectin (cat # 33016-023)의 PBS++ 실험 용액의 제조에 의하여 준비되었다. 다음으로 Costar 3590 EIA plate가 실온에서 (그것은 또한 4 °C에서 오버나이트로 남겨질 수 있다) 2 시간 동안 50 µL/well로 코팅되었다. 마지막으로 플레이트는 흡입되고 RT에서 1 시간 동안 100 µL/well로 Hepes/Saline Buffer로 보호되고, 150 µL의 PBS++로 3 회 세척되었다.
- [0343] 화합물 희석은 다음과 같이 화합물의 1 : 3 순차적 희석을 제조함으로써 이루어진다. 각 플레이트에 대하여 (4 화합물/플레이트), 600 µL가 Titertube rack에서 4 Bio-Rad Titertube로 첨가되었다. 충분한 화합물이 각 적절한 튜브에 첨가되어 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 2X 농도를 주었다. Falcon Flexiplate를 사용하여, 100 µL Hepes/Saline buffer 또는 인간 혈청이 열 B 내지 G까지 첨가되었다. 균등하게 4 틱 간격 피펫인 180 µL로 세팅된 다중-채널 피펫이 사용되었다. 4 튜브의 각 세트는 5 회 혼합되었고, 180 µL의 2X 화합물이 열 A를 빈 것으로 남겨두고 열 B의 각 화합물 희석의 제 1 컬럼으로 전달되었다. 180 µL가 열 A의 다른 웰에 첨가되었다. 연속적인 희석이 다음 희석으로 50 µL를 전달함에 의하여 플레이트 아래로 수행되었고, 5 회 혼합하고, 혼합 후 매번 틱을 바꾸었다. 희석은 열 F에서 정지되었다. 열 G에는 화합물이 존재하지 않는다.
- [0344] Hepes/Saline buffer 또는 인간 혈청에 21/6 항체 20 µg/mL 용액이 양성 대조군이고 세포 부유 플레이트에 첨가되기 위하여 시약으로 남겨졌다.
- [0345] 세포 염색은 50 mL 튜브에서 원심분리하여 (1100 rpm, 5 min) 대수기 Jurkat<sup>TM</sup> 세포를 처음으로 수집하여 이루어진다. 세포는 50 mL PBS++로 재현탁되고, 원심분리되고, 20 mL PBS++에 재현탁된다. 세포는 20 µL의 Calcein AM을 첨가하여 RT에서 30 분 동안 두어 염색되었다. 부피를 Hepes/Saline buffer로 50 mL로 맞추고 세포가 헤어지고, 원심분리되고, resuspend to  $2 \times 10^6$  cells/mL in Hepes/Saline buffer 또는 인간 혈청에  $2 \times 10^6$  세포/mL로 재현탁되었다.
- [0346] 화합물은 다음 과정을 사용하여 배양되었다. 새로운 flexiplate에서, 65 µL의 염색된 세포가 열 B 내지 H로 첨가되었다. 다음으로 65 µL의 2X 화합물이 플레이트 준비 후에 적절한 열에 첨가되고 3 회 혼합되었다. 65 µL의 2X-21/6 항체가 열 H에 첨가되고 3X 혼합되었다. 마지막으로 플레이트는 실온에서 30 분 동안 배양되었다.
- [0347] 피브로넥틴 부착이 다음의 작업 과정 후에 fluorescent plate reader를 사용하여 EX 485/EM 530에서 측정되었다. 배양 후, 세포는 3 회 혼합되고, 100 µL가 피브로넥틴 코팅 플레이트에 전달되고, 37 °C에서 35 분 동안 배양되었다. 각 플레이트는 RT에서 열에 따라 100 µL의 약한 피펫팅에 의하여 세척되었다. PBS++ 가 웰의 측면 하부에 놓여지고 흡입을 위하여 플레이트를 90 도 돌렸다. 이 과정은 총 3 회 세척 동안 반복되었다. 각 웰은 웰의 측면 하부를 피펫팅하여 세척한 후에 100 µL로 채워졌다.
- [0348] IC<sub>50</sub> 값이 인간 혈청의 존재 및 인간 혈청의 부재 양쪽에서 각 화합물에 대하여 계산되었다. IC<sub>50</sub>은 성장 및 활성이 50 %로 저해되는 농도이다. 결과는 다음 표에서 나타난다.



[0349]

인간 원형질 피브로넥틴에 세포 부착 (인간 혈청 부재)

실시에 번호	IC <sub>50</sub> (ug/mL)
1.	0.011
2.	0.001
3.	0.004
4.	0.012
5.	0.00377
6.	0.003
7.	0.001
8.	0.001
9.	0.002
10.	0.00256
11.	0.005293
12.	0.005632
13.	0.001515
14.	0.002146
15.	0.063
16.	0.009
17.	0.00337
18.	0.003663
19.	0.004538

[0350]

[0351]

인간 원형질 피브로넥틴에 세포 부착 (인간 혈청 함유)

실시에 번호	IC <sub>50</sub> (ug/mL)
1.	0.264
2.	0.38
3.	1.062
4.	1.437
5.	0.987
6.	0.451
7.	0.053
8.	0.135
9.	0.128
10.	0.052332
11.	0.305436
12.	0.147085
13.	0.055391
14.	0.03259
15.	1.102
16.	0.371
17.	0.080426
18.	0.3
19.	4.114982

[0352]



[0353] 실시예 B

[0354]  $\alpha^4\beta^1$ 에 후보 화합물의 결합을 결정하기 위한 시험관 내 포화 측정

[0355] 다음은 다음 실시예에서 설명되어지는 실험적 자가면역 뇌척수염 모델 ("EAE") 또는 다른 생체 내 모델에서 활성을 나타내기 위한 화합물에 요구되는 원형질 수준을 결정하기 위한 시험관 내 측정을 설명한다.

[0356] 대수-증식기 Jurkat 세포는 세척되고 20  $\mu\text{g/mL}$ 의 15/7 항체 (Yednock, et al., J Biol. Chem., (1995) 270 (48): 28740)를 함유한 정상적인 동물 원형질에 재현탁되었다.

[0357] Jurkat 세포는 표준 곡선에 대하여 표준 12 포인트 연속 희석을 사용하여 66  $\mu\text{M}$  내지 0.01  $\mu\text{M}$  범위의 다양한 농도로 알려진 후보 화합물 양을 함유하는 정상 원형질 샘플 또는 후보 화합물-처리 동물의 말초혈액으로부터 획득된 원형질 샘플로 2 배 희석된다.

[0358] 다음으로 세포는 실온에서 30 분 동안 배양되고, 결합되지 않은 15/7 항체를 제거하기 위하여 2 % 소태아혈청을 함유한 phosphate-buffered saline ("PBS") 및 1 mM의 각 염화칼슘 및 염화마그네슘 (측정 배지)으로 2 회 세척된다.

[0359] 다음으로 세포는 연구된 동물 종으로부터 5 % 혈청으로 동시-배양에 의하여 어떠한 비-특이적인 교차-활성이 흡수된 1 : 200으로 phycoerythrin-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG Fc (Immunotech, Westbrook, ME)에 노출되고, 4 °C에서 30 분 동안 암실에서 배양되었다.

[0360] 세포는 측정 배지로 2 회 세척되고, 재현탁되었다. 다음으로 그들은 Yednock et al. J. Biol. Chem., 1995, 270: 28740에서 설명된 바와 같이 standard fluorescence activated cell sorter ("FACS")으로 분석되었다.

[0361] 다음으로 결과가 형광 대 투여량, 예를 들어, 정상 투여량-반응 방식으로 그래프로 나타났다. 곡선의 상부 평탄으로 결과되는 투여량 수준은 생체 내 모델에서 효율성을 획득하기 위하여 요구되는 수준을 나타낸다.

[0362] 실시예 C

[0363] 생적합성을 결정하기 위한 카세트 투여 및 혈청 분석

[0364] 경구적 생적합성이 카세트, 즉 투여 용액 당 6 화합물의 혼합물로 쥐에 투여함으로써 검색되었다. 카세트는 총 10 mg/kg에 대하여 5 검사항목 및 1 표준 화합물을 포함한다. 각 화합물/검사항목은 등몰 1 N NaOH로 나트륨염으로 전환되었고, 2 mg/mL로 물에 용해되었다. 카세트는 동일 부피의 각 6 용액을 혼합하여 제조된다. 카세트 투여 용액은 잘 혼합되고, 다음으로 pH가 7.5 - 9로 조절되었다. 투여 용액은 연구 전날 제조되고, 실온에서 오버나이트로 교반되었다.

[0365] Charles River Laboratories로부터 6 - 8 주된 수컷 Sprague Dawley (SD) 쥐가 본 검색에 사용되었다. 쥐들은 적어도 하루 동안 격리되고 먹이와 물에 계속 접근되었다. 카세트의 투여 전날 밤에 쥐들은 근사적으로 16 h 동안 절식되었다.

[0366] 4 SD 쥐가 각 카세트에 할당되었다. 단일 투여액이 각 쥐에 경구적으로 투여되었다. 투여 부피 (5 mL/kg) 및 시간이 기록되고 쥐들은 투여 후 2 h 에 먹이를 주었다.

[0367] 혈액 샘플이 4 h, 8 h 및 12 h의 시간 후에 심장천공을 통하여 채집되었다. 혈액 채집 바로 전에, 쥐는 CO<sub>2</sub> 가스로 10 - 20 초 내에서 마취되었다. 12 h 샘플이 채집된 후에, 쥐는 자궁 탈구 후 CO<sub>2</sub> 질식으로 안락사된다.

[0368] 혈액 샘플은 가공되기 전에 대기-이하 온도 (4 °C)하에서 해파린화된 마이크로테이너 튜브 (microtainer tube)에 유지되었다. 혈액 샘플은 원심분리되고 (10000 rpm, 5 분 동안) 원형질 샘플이 제거되고, 약물 수준을 위해 분석될 때 까지 -20 °C에 저장되었다. 원형질에서의 약물 수준은 직접적인 원형질 침전에 대한 다음 프로토콜을 사용하여 분석되었다.

[0369] 생체 내 원형질 샘플이 1.5 mL 96-well plate에서 100  $\mu\text{L}$ 의 시험 원형질, 150  $\mu\text{L}$ 의 메탄올을 차례로 첨가하고 10 - 20 초 동안 볼텍싱하여 제조되었다. 0.05 ng/ $\mu\text{L}$ 의 내부표준 아세트니트릴 150  $\mu\text{L}$ 가 첨가되고 30 초 동안 볼텍싱되었다. 샘플에 0.5 ng/mL - 2,000 ng/mL의 표준 곡선 범위를 얻기 위하여 50 % 메탄올에 0 - 200 ng (10 농도)의 흥미로운 화합물이 첨가되었다. 다시, 샘플은 30 초 동안 볼텍싱되었다.

[0370] 다음으로 샘플은 80 - 90 %의 상등액이 깨끗한 96-well plate에 전달되기 전에 Eppendorf microfuge에서 3,000

rpm으로 20 - 30 분 동안 원심분리되었다. 다음으로 유기용매는 샘플이 건조될 때까지 증발되었다 (N<sub>2</sub> 하에서 40 °C/30 - 60 분 (ZymarkTurbovap)).

[0371] 다음으로 잔여물은 200 - 600 L의 이동상 (50 % CH<sub>3</sub>OH/0.1 % TFA)에 용해되었다. 다음으로 LC/MS/MS가 PE-Sciex API-3000 triple quadrupole mass spectrometer (SN0749707), Perkin-Elmer, Series200auto-sampler, 및 shimadzu 10A pump를 사용하여 가동되었다. 수득은 PE-Sciex Analyst (v1.1)로 행하여졌고, 결과 분석 및 정량은 PE-Sciex Analyst (v1.1)을 사용하여 이루어졌다. 5 - 50 µL 샘플 부피가 25 % CH<sub>3</sub>OH, 0.1 % TFA-100 % CH<sub>3</sub>OH, 0.1 % TFA의 이동상을 사용하여 역상 ThermoHypersil DASH-18 column (Keystone 2.0 x 20 mm, 5 µm, PN: 8823025-701)에 주입되었다. 작동시간은 약 300 µL/min의 속도에서 약 8 min이다.

[0372] AUC가 선상 사다리꼴 법칙을 사용하여 t=0 부터 마지막 샘플링 시간 t<sub>x</sub> 까지 계산되었다 (Handbook of Basic Pharmacokinetics, Wolfgang A. Ritschel and Gregory L. Kearns, 5th ed, 1999 참고).

[0373] 
$$AUC^{0 \rightarrow t_x} = S((C_n + C_{n+1})/2)) \cdot (t_{n+1} - t_n)[(\mu g/mL)h]$$

[0374] 혈관의 투여 후 4, 8 및 12 h에서의 샘플의 카세트 투여예에 있어서, AUC가 t=0 부터 t=12 h 까지 계산되었다. AUC<sup>0→12 h</sup> 값이 각 동물에 대하여 계산되었고, 평균 AUC<sup>0→12 h</sup>가 다음 표에 나타난다.

실시에 번호	AUC
1.	14.798
2.	15.971
3.	22.271
4.	13.829
5.	2.1654
6.	0.5125
7.	0.8979
8.	2.4082
9.	2.0774
10.	2.1113
11.	14.818
12.	4.7816
13.	1.283
14.	0.3566
15.	90.317
16.	23.808
17.	0.8628
18.	4.7528

[0375]

[0376] **실시에 D**

[0377] 천식 모델

[0378] α<sub>4</sub>β<sub>1</sub> 인테그린에 의하여 매개되는 염증 상태는 예를 들어, 호산구 유입, 기도 과대-반응 및 만성 천식에서 발생하는 폐색을 포함한다. 다음은 천식을 치료하는 용도로 본 발명의 화합물의 생체 내 효과를 연구하는데 사용된 천식 동물 모델을 설명한다.

[0379] **쥐 천식 모델**

[0380] 본 모델은 그것의 전체로서 참고자료로 통합된 Chapman et al, Am J. Resp. Crit. Care Med,. 153 4, A219 (1996) 및 Chapman et al, Am. J. Resp. Crit Care Med 155: 4, A881 (1997)에 의해 설명된 과정을 따른다. 오발부민 (OA; 10 mg/mL)이 수산화알루미늄 (10 mg/mL)과 혼합되고, 제 0 일에 Brown Norway 쥐로 주사 (i. p.)된다. 첨가물과 함께 OA의 주사는 제 7 및 14 일에 반복되었다. 제 21 일에 감작된 동물은 플라스틱 튜브

에 두어지고 단지 코로 노출되는 시스템에서 OA (10 mg/kg)의 에어로졸에 노출 (60 min)되었다. 동물은 72 h 후 펜토바르비탈로 죽인다 (250 mg/kg, i.p.). 폐는 Hank's solution (HBSS x 10, 100 mL; EDTA 100 mM, 100 mL; HEPES 1 M, 25 mL; H<sub>2</sub>O로 1 L를 만듦) 3 분할량 (4 mL)을 사용하여 기관삽입을 통하여 세척되고; 회수된 세포를 모으고 회수된 체액의 총 부피가 Hank's solution의 첨가에 의하여 12 mL로 조절되었다. 총 세포가 카운트되고 (Sysmex microcell counter F-500, TOA Medical Electronics Otd., Japan), 도말표본이 회수된 체액을 희석하여 만들어지고 (근사적으로  $10^6$  cells/mL), 분할량 (100  $\mu$ L)을 원심분리 (Cytospin, Shandon, U. K.)로 피펫팅하였다. 도말표본이 공기건조되고, 메탄올 (2 mg/mL)에서 fast green 용액을 사용하여 5 초 동안 고정되었고, 호산구, 호중구, 대식세포 및 림프구를 분별하기 위하여 에오신 G (5 초) 및 티아진 (5 초) (Diff-Quick, Browne Ltd. U. K.)으로 염색하였다. 도말표본 당 총 500 세포가 오일 침투하에 광학현미경 (x 100)으로 카운트되었다. 본 발명의 화합물은 0.5 % 카르복시메틸셀룰로오스 및 2 % Tween 80 현탁액 내에서 제제되고, 알레르기항원 오발부민에 감작된 쥐들에 경구적을 투여되었다. 감작된 Brown Norway 쥐의 기도에 알레르기항원-유도된 백혈구 축적을 저해하는 화합물은 본 모델에서 활성이 있는 것으로 간주된다.

#### [0381] 생쥐 천식 모델

[0382] 화합물은 또한 그것의 전체로서 참고문헌에 각각 통합된 Kung et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 13: 360-365, (1995) 및 Schneider et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 20: 448-457, (1999)에 의하여 설명된 과정에 따라 급성폐염증의 생쥐 모델에서 평가되었다. 암컷 흑색/6 마리 생쥐 (8 - 12 주)가 제 1일에 20  $\mu$ g의 ova (Grade 4, Sigma) 및 2 mg의 inject Alum (Pierce)을 함유한 0.2 mL의 ova/alum 혼합물의 복강내주사 (i.p.)에 의하여 감작되었다. 추가접종이 제 14 일에 투여되었다. 생쥐는 제 28 일 및 제 29 일에 에어로졸화된 1 % ova (0.9 % 생리식염수)에 20 분 동안 처리되었다. 생쥐는 안락사되고 기관지 세척 샘플 (3 mL)은 첫 처리 후 48 시간, 제 30 일에 수집되었다. 호산구는 FACs/FITC 염색법에 의하여 정량되었다. 본 발명의 화합물은 0.5 % 카르복시메틸셀룰로오스 및 2 % Tween 80 현탁액 내에서 제제되고, 알레르기항원 오발부민에 감작된 생쥐들에 경구적을 투여되었다. 감작된 C57BL/6 생쥐의 기도에 알레르기항원-유도된 백혈구 축적을 저해하는 화합물은 본 모델에서 활성이 있는 것으로 간주된다.

#### [0383] 양 천식 모델

[0384] 본 모델은 그것의 전체로 참고문헌에 의하여 통합된 Abraham et al, J. Clin. Invest, 93: 776-787 (1994) 및 Abraham et al, Am J. Respir Crit Care Med 156: 696-703 (1997)에 의하여 설명된 과정을 따른다. 본 발명의 화합물은 돼지회충항원에 감수성인 양에 정맥내 (생리식염수), 경구적 (2 % Tween 80, 0.5 % 카르복시메틸셀룰로오스), 및 에어로졸 투여에 의하여 평가된다. 초기 항원-유도 기관지 응답을 감소 및/또는 후기-단계 기도 응답을 차단하는, 예를 들어 항원-유도 후기 응답 및 기도 과대반응 ("AHR")에 대한 방어 효과를 가지는 화합물은 본 모델에서 활성이 있는 것으로 간주된다.

[0385] 흡입된 돼지회충항원에 대하여 초기 및 후기 기관지 반응의 발달을 나타내는 알레르기성 양이 후보 화합물의 기도효과를 연구하기 위하여 사용되었다. 2 % 리도카인으로 비강 통로의 국부마취 후에, 풍선 카테터가 한쪽 코구멍을 통하여 하부식도로 진행되었다. 다음으로 동물은 안내자로서 굴곡기관지경을 자기고 다른 코구멍을 통하여 테두리된 기관내관으로 배양되었다.

[0386] 늑막압이 Abraham (1994)에 따라 측정되었다. 에어로졸 (다음 제형 참고)은 Andersen cascade impactor로 결정된 것으로 3.2  $\mu$ m의 공기역학 중간 질량 직경을 가지는 에어로졸을 제공하는 일회용 의학분무기를 사용하여 생성되었다. 분무기는 솔레노이드 밸브 및 압축기체원 (20 psi)으로 구성되는 약량계와 연결된다. 분무기의 방출은 플라스틱 T-부분으로 보내지는데, 그것의 한쪽 끝은 피스톤 인공호흡기의 흡입 부분에 연결된다. 솔레노이드 밸브는 인공호흡기의 흡입 순환의 초기에 1 초 동안 활성화된다. 에어로졸은 500 mL의 V<sub>T</sub> 및 20 breaths/minute의 속도로 전달된다. 0.5 % 나트륨 바이카르보네이트 용액이 유일하게 대조군으로 사용되었다.

[0387] 기관지 반응을 평가하기 위하여, 카르바콜 (carbachol)에 대한 점증적 농도반응 곡선이 Abraham (1994)에 따라 생성되었다. 기관지 생검은 처리 개시 전 및 후 그리고 항체 적용 후 24 h에 행하여졌다. 기관지 생검은 Abraham (1994)에 따라 행하여졌다.

[0388] 폐포대식세포의 시험관 내 부착 연구가 또한 Abraham (1994)에 따라 행하여지고, 부착 세포의 백분율이 계산되었다.

#### [0389] 에어로졸 제형

[0390] 0.5 % 나트륨 바이카르보네이트/생리식염수 (w/v)에서 30.0 mg/mL 농도의 후보화합물의 용액이 다음과 같은 과정을 사용하여 제조되었다:

[0391] A. 0.5 % 나트륨 바이카르보네이트/생리식염수 저장 용액: 100.0 mL의 제조

성 분	그 램 /100.0 mL	최종 농도
나트륨 바이카르보네이트	0.5 g	0.5%
생리식염수	q.s. ad 100.0 mL	q.s. ad 100%

[0392]

[0393] 과정:

[0394] 1. 0.5 g 나트륨 바이카르보네이트를 100 mL 부피 플라스크에 첨가.

[0395] 2. 근사적으로 90.0 mL 생리식염수를 첨가 및 용해될 때까지 소내케이트.

[0396] 3. 생리식염수로 100.0 mL로 Q.S. 및 완전히 혼합.

[0397] B. 30. 0 mg/mL 후보 화합물: 10.0 mL의 제조

성 분	그 램 / 10.0 mL	최종 농도
후보 화합물	0.300 g	30.0 mg/mL
0.5% 나트륨 바이카르보네이트/생리식염수 저장 용액	q.s. ad 10.0 mL	q.s ad 100%

[0398]

[0399] 과정:

[0400] 1. 0.300 g 후보화합물을 10.0 mL 부피 플라스크에 첨가.

[0401] 2. 근사적으로 9.7 mL 0.5 % 나트륨 바이카르보네이트/생리식염수 저장 용액 첨가.

[0402] 3. 후보화합물이 완전히 용해될 때까지 소내케이트.

[0403] 4. Q. S. to 10.0 mL with 0.5 % 나트륨 바이카르보네이트/생리식염수 저장 용액으로 10.0 mL로 Q.S. 및 완전히 혼합.

# [0404] 실시예 E

[0405] C57B6 생쥐의 10 일 독성연구

[0406] 10 일 연구가 암컷 C57B6 생쥐에 대한 본 발명의 화합물의 독성을 평가하기 위하여 도입되었다. 본 화합물은 5 투여 단계, 0 (운반체 대조군), 10, 30, 100, 300 및 1,000 mg/kg (mpk)에서 각 투여 단계에서 5 생쥐를 가지고 위관영양법에 의하여 투여되었다. 모든 단계의 투여 부피는 10 mL/kg이었다. 투여 용액 또는 현탁액은 0.5 % 카복시메틸 셀룰로오스 (CMC)의 2 % Tween 80에서 제조되었고 새로운 투여 용액 또는 현탁액은 매 2 - 3 일 에 제조되었다. 살아있는 동안 관찰은 체중 (관찰일 1, 2, 3, 5, 7, 8 및 11), 일상적인 우리 임상관찰 (1 - 2/day) 및 주기적인 (관찰일-1, 2 및 9) 작용관찰 테스트를 포함한다.

[0407] 마지막으로, 혈액 샘플은 임상병리학 (혈액학 및 임상화학) 및 약물수준을 위하여 심장천공으로 채집된다. EDTA 혈액 샘플이 총 백혈구 카운트, 적혈구 카운트, 헤모글로빈, 적혈구용적율, 적혈구 징후 (MCV, MCH, MCHC), 혈소판 및 WBC 5 부분 차이 (호중구, 림프구, 단핵구, 호산구 및 호염기성구)에 대하여 분석되었다. 헤파린화된 원형질 샘플이 알라닌 트랜스아미나아제, 아스파르테이트 트랜스아미나아제, 알카라인 포스파타아제, 총 빌리루빈, 알부민, 단백질, 칼슘, 글루코오스, 우레아 질소, 크레아틴, 콜레스테롤 및 트리글리세라이드에 대하여 분석되었다.

[0408] 혈액 채집 후, 시체는 부검되고 기관 (간, 이자, 신장, 심장 및 흉선)의 무게가 측정되었다. 뇌, 침샘, 흉선, 심장, 폐, 간, 신장, 부신이자, 위, 십이지장, 회장, 직장 및 자궁/난소의 조직 샘플이 채집되고 포르말린으로 고정되었다. 운반체 대조군 및 300 및 1,000 mpk 육지동물로부터의 조직이 H & E 염색된 유리 슬라이드에 가공되어서, 조직병리학적 손상이 평가되었다.

[0409] 체중 변화, 절대적 및 상대적 기관 무게 및 임상병리학 결과는 Prism 소프트웨어를 사용한 Dunnet's multiple comparison test에 의하여 운반체 대조군과 비교된 통계적인 중요한 차이에 대하여 분석되었다. 작용관찰 테스트

트 결과는 Dunnet's, Fisher's exact test를 사용하여 차이에 대하여 분석되고, SAS 소프트웨어를 사용한 Cochran-Mantel-Haenszel correlation test에 의하여 투여 경향 효과가 분석되었다.

[0410] 종래의 경구적 제형을 사용하여, 본 발명의 화합물은 본 모델에서 활성을 가지게 될 것이다.

[0411] **실시예 F**

[0412] 쥐에서 애주번트-유도된 관절염

[0413] 애주번트 유도된 관절염 ("AIA")은 Lewis 쥐 꼬리의 기부에서 *M. tuberculosis*를 주사하여 유도되는 류머티즘 관절염 (RA)연구에 유용한 동물모델이다. 주사 후 10 일 내지 15 일 사이에, 동물은 심각한, 진행성 관절염으로 발전한다.

[0414] 일반적으로, 화합물은 쥐에서 애주번트 유도된 부종으로부터 결과되는 뒷다리 포 (paw) 부종 및 골 손상을 변화시키는 그들의 작용에 대하여 검사되었다. AIA로부터 결과되는 뒷다리 포 부종의 저해를 정량하기 위하여, 2 상의 염증이 정의되었다: (1) 제 1 차 및 제 2 차 주사된 뒷다리 포, 및 (2) 일반적으로 주사된 포의 염증 유도로부터 약 11 일에 발달을 시작하는 제 2 차 비-주사된 뒷다리 포. 후자 형태의 염증의 감소는 면역억제 활성의 지시이다. Chang, Arth. Rheum., 20, 1135-1141 (1977) 참고.

[0415] AIA와 같은 RA의 동물 모델을 사용하여, 질병의 초기 상태에 연관되는 세포성 기작을 연구할 수 있다. 대식세포 및 림프구 상의 CD44 발현은 애주번트 관절염의 발달 동안에 증가-조절되지만, LFA-1 발현은 질병의 발달에서 나중에 증가-조절된다. 애주번트 관절염의 이른 초기상태에서 부착 분자 및 내피 사이의 상호작용은 RA의 치료에 사용되는 방법에서 중요한 발전을 이끌 수 있을 것이다.