

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0079285

(43) 공개일자 2020년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 207/06 (2006.01) *A61K 31/402* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *C07D 207/08* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 207/06 (2013.01)
A61K 31/402 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7015135
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월20일
 심사청구일자 2020년05월27일
- (85) 번역문제출일자 2020년05월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2018/122423
- (87) 국제공개번호 WO 2019/120257
 국제공개일자 2019년06월27일
- (30) 우선권주장
 201711394677.8 2017년12월21일 중국(CN)

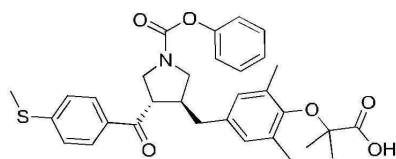
- (71) 출원인
 광둥 레이노벤트 바이오테크 컴퍼니 리미티드
 중국, 광둥, 선전 518000, 푸티엔 구, 푸티엔 가,
 푸 안 커뮤니티, 3037 진티엔 로드, 3406 진중후
 엔 인터내셔널 비즈니스 빌딩; 푸티엔 구, 푸티엔
 가, 푸 안 커뮤니티, 3037 진티엔 로드, 3406A
 진중후엔 인터내셔널 비즈니스 빌딩
- (72) 발명자
 위엔 즈리앙
 중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터종 로
 드 288
- 지앙 즈간
 중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터종 로
 드 288
- (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 PPAR 작용제인 피롤리딘 유도체의 무정형 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 PPAR 작용제인 피롤리딘 유도체의 무정형 및 그 제조 방법에 관한 것이다:



(I)

(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)

C07D 207/08 (2013.01)

C07B 2200/13 (2013.01)

(72) 발명자

허 하이잉

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터중 로드
288

장 시아오

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터중 로드
288

쉬 지원

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터중 로드
288

조우 웨이시앙

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터중 로드
288

리 지옌

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터중 로드
288

천 슈후이

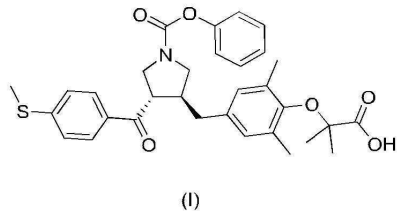
중국 상하이 200131 푸둥 뉴 에어리어 후터중 로드
288

명세서

청구범위

청구항 1

식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형에 있어서,



상기 무정형의 X-선 분말 회절 스펙트럼에서 날카로운 회절 피크가 없는 것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 무정형의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 10° 내지 25° 인 2θ 각도에서 하나의 넓고 온화한 회절 피크를 가지는

것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 무정형의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 도 1에 도시된 바와 같은

것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 무정형의 시차 주사 열량 곡선은 $69.28 \pm 3^\circ\text{C}$ 및 $239.33 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 두개의 흡열 피크의 출발점을 가지는

것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 무정형의 DSC 스펙트럼은 도 2에 도시된 바와 같은

것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 무정형의 열 중량 분석 곡선은 $120.00 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 0.9958%의 중량 손실을 나타내는

것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 무정형의 TGA 스펙트럼은 도 3에 도시된 바와 같은 것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형.

청구항 8

식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 제조 방법에 있어서,

식(I)으로 표시되는 화합물을 용매에 첨가하고, 가열 교반을 수행하거나 또는 재결정화하는 단계를 포함하고, 상기 용매는 메탄올, 에탄올, 테트라하이드로퓨란, 에틸 아세테이트 및 n-헵탄으로부터 선택되고, 상기 가열 교반의 교반 온도는 25℃ 내지 45℃이며, 상기 가열 교반 또는 재결정화 시간은 2시간 내지 48시간이며, 상기 제조 방법에서 화합물 및 용매의 질량/부피비는 1 : 3.5 내지 6g/ml인

것을 특징으로 하는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PPAR 작용제인 피롤리딘 유도체의 무정형 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

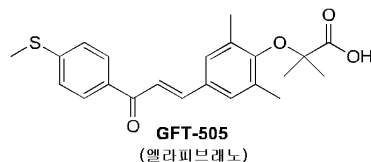
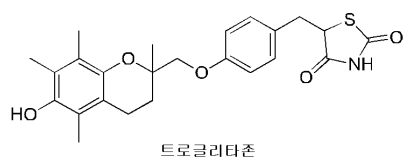
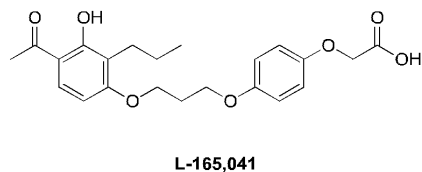
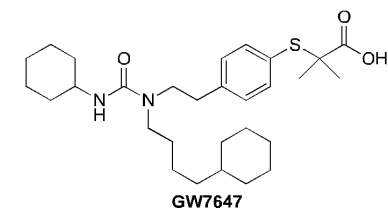
배경 기술

[0002] 비알코올성 지방성 간질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 선진국이나 지역에서 가장 흔히 볼 수 있는 간질환인 바, 과다한 지방이 트리글리세라이드 형태로 간장에 축적되는 것을 의미한다(지방증 > 5%의 간세포 조직). 과다한 지방이 있는 것 외에도, NAFLD의 환자는 간세포 손상과 염증(지방성 간염)이 동반되어 있으며, 후자는 즉 비알코올성 지방간염(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH)이다. NAFLD의 단순한 지방증은 단기적인 발병율 또는 사망율의 증가와 관련성이 없지만, 일단 NASH으로 발전되면 간경화, 간부전과 간세포암(HCC)의 위험은 현저하게 향상된다. NASH로 인한 간경화는 간이식이 날로 증가되는 원인 중의 하나이다. NASH 환자가 간질환으로 인한 발병율과 사망율은 모두 크게 증가하고, 심혈관 질환 발병율과 사망율의 증가와 밀접히 관련된다. 증상이 없는 중년 남성환자의 진단에 따르면 46%의 환자는 비알코올성 지방성 간질환(NAFLD)이고, 12.2%는 NASH이라고 나타났다. NAFLD 환자는 대다수가 남성, 노인, 고혈압 환자와 당뇨병 환자이다. 60~76%의 당뇨병 환자는 NAFLD를 앓고 있고, 22%는 NASH를 앓고 있다. NAFLD의 아동환자는 해마다 증가되고, 비만 아동 중의 38~53%가 NAFLD를 앓고 있다. 중국에서 비알코올성 지방간 발병은 이미 1 위에 올랐다.

[0003] 현재 이 질환을 치료하는 FDA 승인을 받은 약물은 없고, 중국 임상에서는 폴리엔 포스파티딜콜린, 실리마린, 우르소데옥시콜산, 감초산 등 간보호 약물을 자주 사용한다.

[0004] 과산화소체 증식체 활성화 수용체(PPAR)는 세포핵 호르몬 수용체 슈퍼패밀리의 성원으로서, 이는 유전자 발현을 조절하는 리간드-활성화 전사인자인 바, 주로 3개의 아형이 있되: PPAP α 는 주로 갈색 지방조직, 간장, 심장과 골격근에서 발현되어, 담즙산, 지질 및 당의 대사에 있어 중요한 역할을 하며; PPAP δ 는 발현 특이성이 뚜렷하지 않는 바, 항염증 효과가 있을 수 있으며; γ 는 인슐린 저항성에 일정한 역할을 한다. 이 수용체는 이상지질혈증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 아테롬성 동맥경화, 아테롬 발생, 과트라이글리세라이드혈증, 심부전, 심근경색, 혈관질환, 심혈관질환, 고혈압, 비만증, 염증, 관절염, 암, 알츠하이머병, 피부병, 호흡기질환, 눈 질환, IBD(스트레스성 장질환), 궤양성 대장염 및 크론병을 포함하는 다양한 질환상태와 관련된다. 간기능에 유익한 PPAR의 다양한 조건 메커니즘으로부터 보여지는 바와 같이, PPAR 작용제는 지방간 치료에 가장 효과적인 잠재적 약물 중의 하나이다.

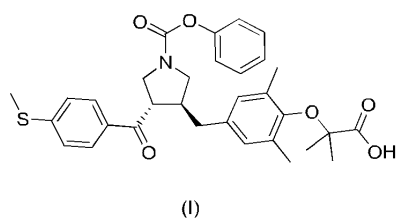
[0005] 이하 화합물은 이미 문헌에 보도된 PPAR 작용제 화합물이다.



[0006]

발명의 내용

[0007] 본 발명의 제1 목적은 종래 기술의 단점을 해결하는 것부터 시작하며, 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형을 제공하는 것이며, 상기 무정형은 상당한 안정성을 가지며, 일정한 약용 전망을 가지며, 식(I)으로 표시되는 화합물을 임상 약물로 개발하는 것을 위해 가능한 원료약 옵션을 제공한다:



[0008]

[0009] 본 발명의 상기 목적은 다음의 기술적 방안에 의해 실현된다:

[0010] 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형에 있어서, 상기 무정형의 X-선 분말 회절 스펙트럼(XRPD)에서 날카로운 회절 피크가 없는 것을 특징으로 한다.

[0011] 무정형(amorphous)이 열역학적인 고 에너지 상태에 속하며, 열역학적으로 준 안정성 구조이며, 그 화합물을 구성하는 기본 입자가 3 차원 공간에 무질서하게 배열되어 있으며, X-선 분말 회절 스펙트럼이 무정형 형태를 판단하는 가장 직관적인 방식 중 하나인 것은 당업자에게 잘 알려져 있으며; 구체적으로 화합물이 무정형 형태로 존재할 경우, 그 X-선 분말 회절 스펙트럼은 일반적으로 날카로운 회절 피크를 나타내지 않고, 즉, XRPD 스펙트럼에서 회절 피크를 나타내지 않거나 또는 하나 또는 복수의 넓고 온화한 회절 피크(업계에서 일반적으로 적으로 "만두 피크"로 함)을 나타내며; 당업자가 이해할 수 있다시피, 상기 무정형의 XRPD 스펙트럼에서 넓고 온화한 회절 피크가 결정 형태의 XRPD 스펙트럼에서 좁고 날카로운 회절 피크와 비교하는 것으며, 일반적으로 무정형의 XRPD 스펙트럼에서 넓고 온화한 회절 피크의 2θ 각도 스펙은 5° 이상일 수 있다.

[0012] 구체적으로, 상기 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 10° 내지 25° 인 2θ 각도에서 하나의 넓고 온화한 회절 피크를 가진다.

[0013] 본 발명의 하나의 구체적인 방안에서, 상기 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 도 1에 도시된 바와 같다.

[0014] 본 발명의 일부 방안에서, 상기 무정형의 시차 주사 열량 곡선(DSC)은 69.28±3℃ 및 239.33±3℃에서 두개의 흡열 피크의 출발점을 가진다.

[0015] 본 발명의 하나의 구체적인 방안에서, 상기 무정형의 DSC 스펙트럼은 도 2에 도시된 바와 같다.

[0016] 본 발명의 일부 방안에서, 상기 무정형의 열 중량 분석 곡선(TGA)은 120.00±3℃에서 0.9958%의 중량 손실을 나타낸다.

[0017] 본 발명의 하나의 구체적인 방안에서, 상기 무정형의 TGA 스펙트럼은 도 3에 도시된 바와 같다.

- [0018] 본 발명의 제2 목적은 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 제조 방법을 제공하는 것이며, 상기 제조 방법은 식(I)으로 표시되는 화합물을 용매에 첨가하고, 가열 교반을 수행하거나 또는 재결정화하는 단계를 포함하고, 상기 용매는 메탄올, 에탄올, 테트라하이드로푸란, 에틸 아세테이트 및 n-헵탄으로부터 선택되고, 상기 가열 교반의 교반 온도는 25℃ 내지 45℃이며, 상기 가열 교반(비팅) 시간은 2시간 내지 48시간이며, 상기 제조 방법에서 화합물 및 용매의 질량/부피비는 1 : 3.5 내지 6g/ml이다.
- [0019] 상기 방법은 안정한 공정, 온화한 반응 조건 및 용이하게 이용가능한 원료를 가지며, 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 대규모 산업 생산에 사용될 수 있다.
- [0020] [발명의 효과]
- [0021] 본 발명자는 놀랍게도 안정성이 낮고 의학적 특성이 나쁜 무정형 형태로 존재하는 종래의 화합물과 달리, 본 발명에서 언급된 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형이 비교적 높은 안정성을 가지고, 구체적으로 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형이 고온, 고습 등 조건 하에서 비교적 높은 안정성을 가지는 것을 발견하였으며, 기존의 안정성 데이터에 기초하여 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형이 일정한 약용 전망을 갖는 것으로 판단할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에서 언급된 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형은 PPAR 관련 경로의 사이트 카인에 명백한 억제 효과를 가지며, CC1₄에 의해 유발된 C57BL/6 마우스의 급성 간 손상 실험 및 MCD 음식 유발된 db/db마우스 NASH 모델을 통해 식(I)으로 표시되는 화합물이 간 손상, NAS 점수 및 간 섬유증 개선에 상당한 영향을 미치는 것을 발견하였다.
- [0023] 요약하면, 본 발명의 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형은 비교적 좋은 안정성을 가지며 일정한 약용 전망을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 검출 수단에 의해, 원료약 및/또는 제제 제품에서 식(I)으로 표시되는 화합물의 일부 또는 전부는 무정형 형태로 존재하는 것을 증명하면, 본 발명에 의해 제공되는 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형을 사용하는 것으로 간주되어야 한다. 전술한 X-선 분말 회절 이외에, 상기 검출 수단은 시차 주사 열량 측정법(DSC), 적외선 분광법(IR), 라만 분광법(Raman) 및 고체 핵자기 공명법(SSNMR) 및 다른 모든 본 발명의 식(I)으로 표시되는 화합물의 무정형의 검출 방법을 더 포함할 수 있으며, 스펙트럼 차감법과 같은 당업자에 의해 일반적으로 사용되는 방법을 사용하여 약물 부형제 등의 영향을 제거할 수 있다.
- [0024] [정의 및 설명]
- [0025] 별다른 설명이 없는 한, 본문에 사용되는 이하 용어와 짧은 문구는 하기 뜻을 구비하는데 목적이 있다. 하나의 특정된 짧은 문구 또는 용어는 특별히 정의되지 않을 경우, 불확정되거나 불명확한 것으로 이해해서는 아니되며 통상의 뜻에 따라 이해해야 한다. 본문에 상품명칭이 나타날 경우, 이는 이와 대응되는 상품 또는 이의 활성성분을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 중간체 화합물은 본 기술분야의 통상의 지식을 가진 자들이 숙지하고 있는 다양한 합성방법으로 제조될 수 있고, 이하 예를 든 구체적인 실시형태, 이와 기타 화학 합성방법으로 결합된 실시형태 및 본 기술분야의 통상의 지식을 가진 자들이 숙지하고 있는 등가적 대체방안, 바람직한 실시형태는 본 발명의 실시예를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 실시 방식의 화학 반응은 적합한 용매에서 완료되고, 상기 용매는 본 발명의 화학적 변화 및 그에 필요한 시약 및 물질에 적합해야 한다. 본 발명의 화합물을 획득하기 위해, 당업자는 기존의 실시 방식에 기초하여 합성 단계 또는 반응 과정을 변경하거나 또는 선택하는 것이 때때로 필요하다.
- [0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에 사용된 모든 용매는 시판되고 추가 정제없이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 사용된 용매는 시중에서 획득될 수 있다. 본 발명은 하기 약어를 사용한다: DCM은 디클로로 메탄을 나타내고; DMF는 N, N-디메틸포름아미드를 나타내고; DMSO는 디메틸 설펍사이드를 나타내고; EtOH는 에탄올을 나타내고; MeOH는 메탄올을 나타내고; TFA는 트리플루오로아세트산을 나타내고; TsOH는 파라톨루엔설폰산을 나타내고; mp는 용점을 나타내고; EtSO₃H는 에탄설폰산을 나타내고; MeSO₃H는 메탄설폰산을 나타내고; ATP는 아데노신 트리포스페이트를 나타내고; HEPES는 4-하이드록시에틸피페라진 에탄설폰산을 나타내고; EGTA는 에틸렌 글리콜 비스(2-아미노에틸에테르)테트라 아세트산을 나타내고; MgCl₂는 마그네슘 디클로라이드를 나타내고, MnCl₂는 망간 디클로라이드를 나타내고, DTT는 디티오프레이트를 나타낸다.

[0031] **1.1 X-선 분말 회절계(XRPD)**

[0032] 기기 모델: Bruker D8 advance X-선 회절계

[0033] 테스트 방법: XRPD 검출에 약 10 내지 20 mg의 샘플이 사용됨.

[0034] 자세한 XRPD 매개변수는 다음과 같다.

[0035] 라이트 튜브: Cu, $k\alpha$, ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$).

[0036] 라이트 튜브 전압: 40kV, 라이트 튜브 전류: 40mA

[0037] 발산 슬릿: 0.60 mm

[0038] 검출기 슬릿: 10.50 mm

[0039] 안티 산란 슬릿: 7.10 mm

[0040] 스캔 범위: 4-40 deg

[0041] 스텝 폭: 0.02 deg

[0042] 스텝 길이: 0.12 초

[0043] 샘플 팬 속도: 15 rpm

[0044] **1.2 시차 주사 열량계(DSC)**

[0045] 기기 모델: TA Q2000 시차 주사 열량계

[0046] 테스트 방법: 테스트를 위해 샘플(~1mg)을 DSC 알루미늄 냄비에 놓고, 방법은 하기와 같다: 50mL/min N_2 의 조건 하에서, 샘플을 25℃에서 350℃로 가열하며, 가열 속도는 10℃/분이다.

[0047] **1.3 열 중량 분석기(TGA)**

[0048] 기기 모델: TA Q5000IR 열 중량 분석기

[0049] 테스트 방법: 테스트를 위해 샘플(2 내지 5mg)을 TGA 알루미늄 냄비에 놓고, 방법은 하기와 같다: 25mL/min N_2 의 조건 하에서, 샘플을 10℃/min의 가열 속도로 실온에서 350℃로 가열하며, 가열 속도는 10℃/분이다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 식 (I)의 화합물의 무정형의 Cu-K α 방사선의 XRPD 스펙트럼을 나타낸다.

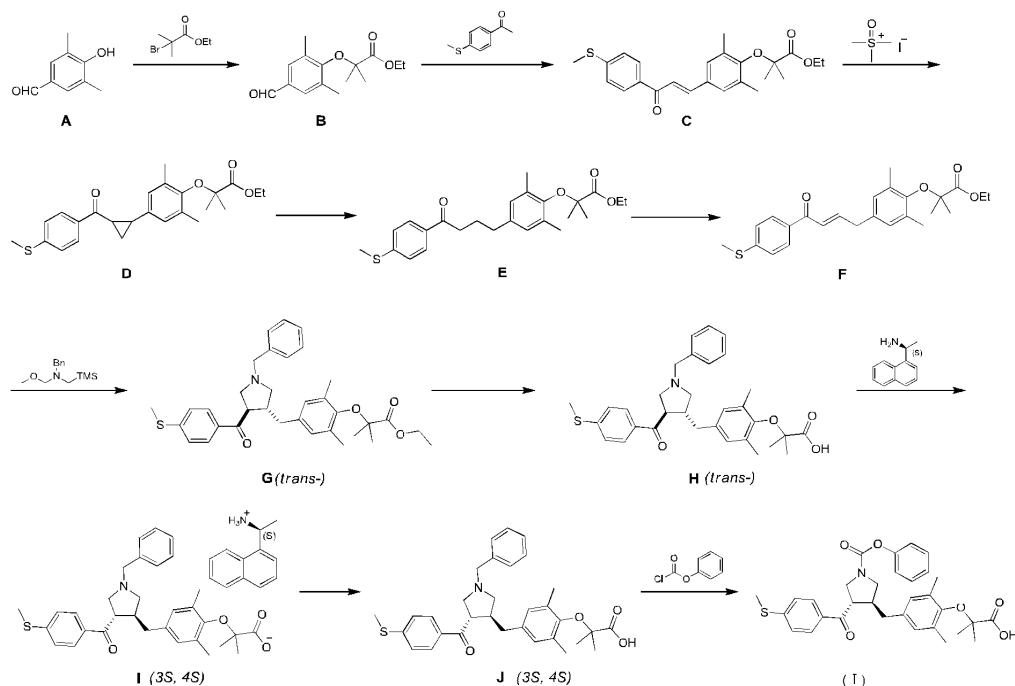
도 2는 식 (I)의 화합물의 무정형의 DSC 스펙트럼을 나타낸다.

도 3은 식 (I)의 화합물의 무정형의 TGA 스펙트럼을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 하기 실시예를 통해 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에서 본발명을 상세하게 설명하는바 그 구체적인 실시방식도 개시하며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않은 한 본 발명의 구체적인 실시방식에 대한 다양한 변형 및 개선을 진행할 수 있다는 것은 해당 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

[0052] 실시예 1: 식(I)의 화합물의 제조



[0053]

[0054] 제1단계: 화합물 B의 제조

[0055]

25℃에서 50L의 반응케틀에 아세트니트릴(30L)을 첨가하고, 교반을 시작한 후, 화합물 A (2.00kg, 13.32mol, 1.0eq), 에틸 브로모아소부틸레이트(7.79kg, 39.95mol, 3.0eq) 및 탄산 칼륨(5.52kg, 39.95mol, 3.0eq)을 첨가하였다. 반응액을 80℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 25℃로 낮추고 여과하고, 여과액을 감압농축시켰다. 획득된 잔류물을 에틸 아세테이트(5L)에 용해시켰다. 여과 케이크를 에틸 아세테이트(5L×2)로 세척하고, 에틸 아세테이트 용액을 병합하였다. 유기상에서 원료 점 A가 박층 크로마토그래피(석유에테르: 에틸 아세테이트=5:1)에 의해 검출되지 않을 때까지 병합된 유기상을 수산화 나트륨 수용액(1mol/L, 5L/회)으로 세척하였다. 유기상을 포화 식염수(5L×2)로 세척하고, 무수황산나트륨으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켰다. 화합물 B (1.51kg, 수율42.9%)를 얻었다.

[0056]

^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ ppm 9.85 (s, 1H), 7.50 (s, 2H), 4.31-4.23 (m, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.45 (s, 6H), 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 1H).

[0057]

제2단계: 화합물 C의 제조

[0058]

드라이 아이스 에탄올조(-60℃)에서 염화수소 가스(3.67kg, 100.54mol, 5.3eq)를 에탄올(12L)에 넣고, 시스템 온도를 0℃ 미만으로 제어하였다. 50L 반응케틀에 에탄올(13L)과 새로 제조된 염화수소 에탄올 용액을 첨가하고, 교반을 시작하고, 자연적으로 온도를 25°로 승온시켰다. 이어서, 화합물 B(5.01kg, 18.97mol, 1.0eq)를 첨가하였다. 원료가 완전히 용해된 후, p-메틸티오아세트페논(2.83kg, 17.07mol, 0.9eq)을 분할하여 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 시스템을 흡인여과하고, 여과 케이크를 에틸 아세테이트(30L)에 용해시키고, 물(10L×2), 수산화 나트륨 수용액(1N, 8L×2) 및 포화 식염수(8L×2)로 세척하고, 무수황산나트륨(1.5kg)으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켜, 화합물 C(6.10kg, 수율76.8%)를 얻었다.

[0059]

MS m/z (ESI): 413.1 [M+1].

[0060]

^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.95 (d, J=8.28 Hz, 2H), 7.71 (d, J=15.56 Hz, 1H), 7.42 (d, J=15.56 Hz, 1H), 7.31-7.28 (m, 4H), 4.30 (q, J=7.28 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.25 (s, 6H), 1.50 (s, 6H), 1.36 (t, J=7.15 Hz, 3H).

[0061]

제3단계: 화합물 D의 제조

[0062]

50L의 반응케틀에 N,N-디메틸포름아미드(15L)를 첨가하고, 교반을 시작하고, 트리메틸설폭소늄 요오다이드

(3.78kg, 16.01mol 1.2eq)를 첨가한 후, 온도를 0℃로 냉각시키고, 칼륨 tert-부톡사이드(1.79kg, 16.01mol, 1.2eq)를 분할하여 첨가하였다. 0℃에서 30분 동안 교반한 후, 화합물 C(5.5kg, 13.34mol, 1.0eq)의 N,N-디메틸 포름아미드(15L) 용액을 천천히 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액을 빙수(0~5℃, 30L)에 천천히 붓고, 석유 에테르/에틸 아세테이트(1:1, 10L×3)로 추출하였다. 병합한 유기상을 물(10L×2) 및 포화 식염수(10L×2)로 세척하고, 무수황산나트륨(2kg)으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켜, 화합물 D(5.48kg, 수율96.3%)를 얻었다.

[0063] MS m/z (ESI): 427.2 [M+1].

[0064] ^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.91 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.27 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.81 - 6.70 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.29 (q, J=7.0 Hz, 2H), 2.83 - 2.74 (m, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.18 (s, 6H), 1.84 (m, 1H), 1.46 (s, 6H), 1.35 (t, J=7.2 Hz, 3H).

[0065] 제4단계: 화합물 E의 제조

[0066] 건조된 50L의 반응케틀에 에탄올(35.0L)을 첨가하고, 교반을 시작한 후, 화합물 D(5.45kg, 12.79mol, 1.0eq) 및 빙초산(2.30kg, 38.37mol, 3.0eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 80℃로 가열한 후, 아연 분말(2.45kg, 38.37mol, 3.0eq)을 분할하여 첨가하였다. 생성된 현탁액을 80℃에서 16시간 동안 계속 교반하였다. 반응액을 여과하고, 여과 케이크를 에틸 아세테이트(3L×2)로 세척하고, 유기상을 병합하고 감압농축시켰다. 농축액을 에틸 아세테이트(10L)에 용해시키고, 50L 분액 깔때기로 펌핑하였다. 에틸 아세테이트(15L) 및 물(10L)을 50L 분액 깔때기로 펌핑하고, 5 분 동안 교반한 후, 분액되도록 방지하였다. 유기상을 10% 탄산나트륨 수용액(10L×2) 및 포화 식염수(10L×1)로 순차적으로 세척하고, 무수황산나트륨으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켜, 화합물 E(5.15kg, 수율92.9%)를 얻었다.

[0067] MS m/z (ESI): 429.2 [M+1].

[0068] ^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.74 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.17 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.71 (s, 2H), 4.21 (q, J=7.1 Hz, 2H), 2.82 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.51 (t, J=7.7 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.09 (s, 6H), 1.94 (quin, J=7.5 Hz, 2H), 1.39 (s, 6H), 1.28 (t, J=7.0 Hz, 3H)

[0069] 제5단계: 화합물 F의 제조

[0070] 50L의 반응케틀에 무수 디클로로메탄(20L)을 첨가하고, 교반을 시작한 후, 화합물 E(5.21kg, 12.02mol, 1.0eq) 및 2,6-디메틸피리딘(4.50kg, 42.07mol, 3.5eq)을 첨가하고, 0℃로 냉각하였다. 반응액에 트리메틸실릴 트리플레이트(8.01kg, 36.06mol, 3.0eq)를 적가하고, 0℃에서 약 30분 동안 계속 교반하였다. 반응액을 박층 크로마토그래피(석유에테르: 에틸 아세테이트=5:1)로 검출하였다. 냉수(5~10℃, 10L)를 50L 분액 깔때기로 펌핑하고, 반응액을 교반하면서 펌핑하고, 5분 동안 교반한 후, 분액하였다. 유기상을 포화 식염수(10L)로 세척하고 감압농축시켰다. 농축액을 메탄올/물(2:1, 30L)의 혼합 용액에 첨가하고, 약 20 분 동안 교반하여, 황색 고체를 침전시켰다. 혼합물을 여과하고 감압 하에서 흡인건조하여 황색 고체 조질 생성물을 얻었다.

[0071] 50L의 반응케틀에 무수 톨루엔(35L)을 첨가하고 교반을 시작한 후, 감압 하에서 흡인건조된 조질 생성물을 반응 케틀에 첨가하였다. 0℃로 냉각하고, 디클로로 디시아노 벤조퀴논(2.99kg, 13.22mol, 1.1eq)을 반응케틀에 분할하여 첨가하고, 0℃에서 1시간 동안 계속 교반하였다. 반응액을 박층 크로마토그래피(석유에테르: 에틸 아세테이트=5:1)로 검출하였다. 물(50L) 및 아황산나트륨(3.00kg)을 120L 버킷에 첨가하고, 교반 및 정화 후, 반응액을 이 아황산나트륨 용액에 천천히 붓고, 에틸 아세테이트(15L)를 첨가하였다. 10분 동안 신속히 교반한 후, 다량의 황색 고체를 침전하고, 흡인여과하고, 여과 케이크를 석유 에테르/에틸 아세테이트(3:1, 10L×2)로 세척하였다. 여액을 병합하고 유기상을 분리하였다. 유기상을 5 % 아황산나트륨 용액(10L×2) 및 포화 식염수(10L×2)로 세척하고, 무수황산나트륨(2.00kg)으로 건조하였다. 여과하고 감압농축시켰다(40℃ 내지 50℃). 4.29kg의 조질 생성물을 얻었다. 이어서, 조질 생성물을 12L의 무수 에탄올에 첨가하고, 25℃에서 0.5시간 동안 교반한 후 여과하였다. 여과 케이크를 수집하고 감압 건조하여 화합물 F(3.50kg, 수율69.9%)를 얻었다.

[0072] MS m/z (ESI): 427.2 [M+1].

[0073] ^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.85 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.28 - 7.27 (m, 2H), 7.22 - 7.14 (m, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 4.30 (s, 2H), 3.53 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.21 (s, 6H), 1.49 (s, 6H), 1.38 (s, 3H).

[0074] 제6단계: 화합물 G의 제조

[0075] 건조된 50L의 반응케틀에 2-메틸 테트라하이드로푸란(30L)을 첨가하고, 교반을 시작하고, 화합물 F(3.0kg, 6.50mol, 1.0eq) 및 트리플루오로아세트산(37.05g, 0.33mol, 0.05eq)을 첨가한 후, N-메톡시메틸-N-(트리메틸실릴메틸)벤질아민(1.85kg, 7.80mol, 1.2eq)을 천천히 첨가하고, 내부 온도를 30℃ 미만으로 제어하였다. 적하 종료 후 25℃에서 12시간 동안 계속 교반하였다. 반응액을 50L 분액 깔때기로 펌핑하고, 5% 탄산나트륨 수용액(10L×2) 및 포화 염화나트륨 수용액(10L×2)으로 순차적으로 세척하고, 무수황산나트륨(2kg)으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켜, 화합물 G(3.92kg)를 얻었다.

[0076] MS m/z (ESI): 560.0 [M+1].

[0077] ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.71 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.31 - 7.20 (m, 9H), 6.71 (s, 1H), 4.30 - 4.23 (m, 2H), 3.76 - 3.36 (m, 6H), 3.07 - 2.96 (m, 2H), 2.68 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 2.10 - 2.03 (m, 6H), 1.36 - 1.22 (m, 9H).

[0078] 제7단계: 화합물 H의 제조

[0079] 화합물 G(3.92kg, 5.04mol, 1.0eq)를 무수 에탄올(20L)에 용해시키고, 50L의 반응케틀에 첨가하고, 교반을 시작하였다. 수산화나트륨(604.8 g, 15.12mol, 3.0eq)을 물(6L)에 용해시킨 후, 반응액에 천천히 첨가하였다. 첨가가 완료된 후, 25℃에서 16시간 동안 계속 교반하였다. 반응액을 감압농축시키고, 대부분의 용매(에탄올)를 제거하였다. 농축된 액체를 50L 분액 깔때기로 펌핑하고, 교반을 시작한 후, 에틸 아세테이트(20L)를 펌핑하고, 10% 칼륨 바이셀레이트 수용액(10L×2) 및 포화 염화나트륨 수용액(10L×2)으로 세척하고, 무수황산나트륨(1.5kg)으로 건조하고, 감압농축시켰다. 잔류 용매를 약 8L로 농축하여, 다량의 고체 석출되면, 농축을 정지하고, 25℃로 냉각하였다. 농축된 현탁액을 여과하고, 여과 케이크를 에틸 아세테이트(2L×3)로 세척하고, 흡인건조하고, 진공 건조 박스를 통해 감압건조시켜, 화합물 H (2.44kg, 수율89.85%)를 얻었다.

[0080] MS m/z (ESI): 532.1[M+1].

[0081] ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.66 (dd, J=4.0, 8.3 Hz, 2H), 7.41 - 7.33 (m, 2H), 7.23 - 7.08 (m, 5H), 6.79 (d, J=2.0 Hz, 2H), 4.12 (q, J=7.0 Hz, 2H), 3.93 - 3.60 (m, 4H), 3.48 - 3.32 (m, 1H), 2.97 - 2.84 (m, 1H), 2.67 (d, J=7.8 Hz, 2H), 2.57 - 2.49 (m, 3H), 2.25 - 2.13 (m, 6H), 1.46 (s, 6H), 1.36 (t, J=7.2 Hz, 3H).

[0082] 제8단계: 화합물 I의 제조

[0083] 건조된 50L의 반응케틀에 아세토니트릴(24L) 및 이소프로판올(6L)을 첨가하고, 교반을 시작한 후, 화합물 H(3.04kg, 5.65mol, 1.0eq)를 첨가하였다. (S)-(-)-(1-나프틸) 에틸아민(724.79g)을 80℃에서 천천히 첨가하였다. 첨가가 완료된 후, 80℃에서 1시간 동안 계속 교반하였다. 가열을 멈추고 자연 냉각을 수행하고, 30℃에서 16시간 동안 계속 교반하였다. 교반을 멈추고, 흡인여과하고, 여과 케이크를 이소프로판올(2L×2)로 세척하고, 흡인건조한 후, 고체를 회전증발기로 옮기고 감압 건조시켜, 화합물 I (1.63kg)를 얻었다.

[0084] 키랄 분리조건: 키랄 컬럼: Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D., 3μm; 이동상: 40% 메탄올(0.05% DEA)-CO₂; 유속: 4mL/min; 컬럼온도: 40℃.

[0085] 화합물 I에 대응되는 체류시간: 1.604 분.

[0086] 제9단계: 화합물 J의 제조

[0087] 건조된 50L의 반응케틀에 무수 에탄올(30L) 및 무수 메탄올(4.5L)을 첨가하고, 교반을 시작하고, 화합물 I(2.93kg, 4.17mol, 1.0eq)을 첨가하였다. 온도를 80℃로 승온하고, 1시간 동안 교반하고, 가열을 멈추고 자연 냉각을 수행하고, 30℃에서 16시간 동안 계속 교반하였다. 현탁액을 흡인여과하고, 여과 케이크를 에탄올(2L×2)로 세척하고, 감압건조하였다. 잔류물에 메탄올(1.5L) 및 에틸 아세테이트(15L)를 첨가하고 교반한 후, 50L 분액기로 펌핑하였다. 유기상을 10% 염화수소칼륨 수용액(10L×5), 포화 염화나트륨 수용액(5L×2)으로 세척하고, 무수황산나트륨(1kg)으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켜, 화합물 J(0.97kg)를 얻었다.

[0088] 키랄 분리조건: 키랄 컬럼: Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D., 3μm; 이동상: 40% 메탄올(0.05% DEA)-CO₂; 유속: 4mL/min; 컬럼온도: 40℃.

- [0089] 화합물 J에 대응되는 체류시간: 1.576분.
- [0090] 제10단계: 식(I)의 화합물의 제조
- [0091] 건조된 50L의 반응케틀에 무수 디클로로메탄(7L)을 첨가하고 교반을 시작하고, 화합물 J(700g, 1.31mol, 1.0eq) 및 트리에틸아민(1.33kg, 13.1mol, 10.0eq)을 첨가하였다. 페닐클로로포르메이트(2.24kg, 13.1mol, 10.0eq)를 0℃에서 반응액에 적가하였다. 첨가가 완료된 후, 0℃에서 1시간 동안 계속 교반하였다. 반응액에 탄산칼륨(543.37g, 3.94mol, 3.0eq)의 순수(3L) 용액을 첨가하고, 온도를 40℃로 승온시키고 20 분 동안 계속 교반하였다. 이어서, 수산화리튬(165.60 g, 3.94mol, 3.0eq)을 첨가하고, 25℃에서 20 분 동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 분액하고, 유기상을 포화 염화나트륨 수용액(2L)으로 세척하고, 무수황산나트륨(500g)으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켰다. 농축액을 에틸 아세테이트(1.5L)에 용해시킨 후, 빠른 교반하에 n-헵탄(5.6L)을 천천히 첨가하였다. 첨가 후, 30 분 동안 교반을 계속하고 여과하였다. 여과 케이크를 n-헵탄/에틸 아세테이트(4:1, 3.5L×3)에 첨가하고, 30 분 동안 신속히 교반하고 비팅하고, 여과하였다. 획득된 여과 케이크를 tert-부틸메틸에테르(5L)에 용해시키고, 5% 칼륨 바이셀레이트 수용액(1.5L×2), 탈이온수(1L×2)로 순차적으로 세척하고, 무수황산나트륨(300g)으로 건조하고, 여과하고, 감압농축시켰다. 획득된 고체를 진공 오븐(40-45℃)에서 건조하여, 식(I)의 화합물을 얻었다.
- [0092] MS m/z (ESI): 584.1 [M+23].
- [0093] ^1H NMR (400MHz, MeOD- d_4) δ ppm 7.65 (d, J=6.8 Hz, 2H), 7.43 - 7.37 (m, 2H), 7.29 - 7.22 (m, 3H), 7.16 (t, J=7.2 Hz, 2H), 6.87 (s, 2H), 4.13 - 3.92 (m, 2H), 3.89 - 3.80 (m, 1H), 3.69 (dd, J=5.4, 10.7 Hz, 1H), 3.58 - 3.49 (m, 1H), 2.81 (d, J=14.1 Hz, 2H), 2.71 - 2.63 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.23 (s, 6H), 1.43 (s, 6H).
- [0094] 키랄 분리조건: 키랄 컬럼: Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D., 3 μ m; 이동상: 40% 메탄올(0.05% DEA)-CO₂; 유속: 2.8mL/min; 컬럼온도: 40℃.
- [0095] 식(I)의 화합물에 대응되는 체류시간: 2.018분.
- [0096] **실시예 2: 식(I)의 화합물의 무정형 제조**
- [0097] 온도를 25℃로 제어하고, 담황색 고체 조질 생성물 식(I)의 화합물(310.5g)을 3L 반응 플라스크에 첨가한 후, n-헵탄(1500mL)을 첨가하고, 첨가가 완료된 후, 25℃에서 2시간 동안 반응을 교반하고, 여과하고, 여과 케이크를 n-헵탄(500mL)으로 세척한 후 여과하여 조질 생성물을 획득하고, 조질 생성물을 진공 건조 박스에서 건조하고, 그 형태를 XRPD로 검출하였으며, 획득된 최종 생성물의 형태는 무정형이었다.
- [0098] 획득된 최종 생성물의 Cu-K α 방사선의 XRPD 스펙트럼은 도 1에 도시된 바와 같고, DSC 스펙트럼은 도 2에 도시된 바와 같으며, TGA 스펙트럼은 도 3에 도시된 바와 같다.
- [0099] **실시예 3: 식(I)의 화합물의 무정형 제조**
- [0100] 식(I)의 화합물(40.0mg)을 4.0mL 유리병에 넣고, 150 μ L의 에틸 아세테이트를 첨가하고 혼합액으로 만들었다. 자기 교반기에서 40℃에서 2일 동안 교반한 후, 샘플을 원심분리하고, 용매가 휘발될 때까지 상청액을 통기월에 방치한다. 이어서, 획득된 고체를 40℃ 진공 건조 박스에서 밤새 건조하였다. 획득된 최종 생성물은 실시예 1과 동일한 무정형이었다.
- [0101] **실시예 4: 식(I)의 화합물의 무정형 제조**
- [0102] 식(I)의 화합물(39.9mg)을 4.0mL 유리병에 넣고, 150 μ L의 테트라하이드로푸란을 첨가하고 혼합액으로 만들었다. 자기 교반기에서 40℃에서 2일 동안 교반한 후, 샘플을 원심분리하고, 용매가 휘발될 때까지 상청액을 통기월에 방치한다. 이어서, 획득된 고체를 40℃ 진공 건조 박스에서 밤새 건조하였다. 획득된 최종 생성물은 실시예 1과 동일한 무정형이었다.
- [0103] **실시예 5: 고온 및 고습 조건 하에서 식(I)의 화합물의 무정형의 고체 안정성 시험**
- [0104] 각각 약 100mg의 식(I)의 화합물의 무정형 샘플을 두 번 칭량하고, 이를 유리 샘플 병의 바닥에 놓고 얇은 층으로 펼쳤다. 샘플이 놓인 병의 개구를 알루미늄 호일로 밀봉하며, 샘플이 주변 공기와 충분히 접촉할 수 있도록 알루미늄 호일에 작은 구멍을 뚫었으며, 40℃/75% 습도의 항온 항습 상자에 배치하였다. 상기 조건하에 놓인 샘플을 10일, 30일, 60일 및 90일에 샘플링하여 테스트한 결과, 0일의 초기 테스트 결과와 비교하며, HPLC 분석

방법을 표 1에 도시된 바와 같으며, 테스트 결과는 하기 표 2에 도시된 바와 같았다.

표 1. HPLC 분석 방법

크로마토그래피컬럼:	Waters Xbridge C18 (3.5 μ m, 150mm*4.6mm)		
유속:	1.0 mL/min		
검출 파장:	220 nm		
컬럼 온도:	35°C		
샘플 주입 체적:	10 μ L		
러닝 타임:	50 min		
이동상:	이동상 A: 0.1%TFA-물 이동상 B: 아세토니트릴		
그라디언트:	시간(min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
	0.00	90	10
	5.00	65	35
	35.00	5	95
	38.00	5	95
	40.00	90	10
	45.00	90	10
희석제	물 : 아세토니트릴= 50: 50 (v/v)		
니들 세척액	물 : 아세토니트릴= 50: 50 (v/v)		

표 2. 식(I)의 화합물의 무정형의 고체 안정성 시험

시점(일)	외관	순도 (%)	총불순물 (%)
0	오프 화이트 분말	97.37	2.63
10	오프 화이트 분말	97.49	2.51
30	오프 화이트 분말	97.31	2.69
60	오프 화이트 분말	97.59	2.41
90	오프 화이트 분말	97.28	2.72

상기 실험 데이터에 따라, 본 발명에 의해 제공되는 식(I)의 화합물의 무정형은 고온 및 고습 조건 하에서 함량 및 불순물이 크게 변화하지 않았고, 비교적 높은 고온 및 고습 안정성을 갖는다는 것을 나타냈다.

실시예 6: 고습 조건 하에서 식(I)의 화합물의 무정형의 고체 물리적 안정성 시험

각각 약 100mg의 식(I)의 화합물의 무정형을 두 번 칭량하고, 유리 샘플 병의 바닥에 놓고 얇은 층으로 펼쳤다. 샘플이 놓인 병의 개구를 알루미늄 호일로 밀봉하며, 샘플이 주변 공기와 충분히 접촉할 수 있도록 알루미늄 호일에 작은 구멍을 뚫었다. 제조된 샘플을 각각 25°C/92.5%의 상대 조건하에 두고, 10 일째에 샘플의 물리적 안정성을 검사하였다. 동시에, 약 100mg의 식(I)의 화합물의 무정형을 별도로 측정하고, 유리 샘플 병의 바닥에 놓고, 스크류 캡으로 밀봉한 후, -20°C에서 보관하고, 대조군으로 사용하였다. 10일째에, 모든 샘플을 꺼내고, 실온으로 되돌리고, 샘플의 외관 변화를 관찰하고, XRPD에 의해 샘플 형태를 검출하였다. 가속샘플을 대조 샘플과 비교함으로써 식(I)의 화합물의 무정형의 고체 물리적 안정성을 판단하였다. 하기 표3은 식(I)의 화합물의 무정형의 고체 물리적 안정성 실험 결과를 나타냈다.

표 3. 고습 조건 하에서 식(I)의 화합물의 무정형의 고체 물리적 안정성 시험

조사 항목	시점	25°C/92.5%상대 습도(개방)
형태	10 일	무정형
형상	10 일	오프 화이트 분말

[0114] 상기 실험 데이터에 따라, 본 발명에 의해 제공되는 식(I)의 화합물의 무정형은 고습 조건 하에서 형태 및 형상이 변화하지 않았고, 높은 고습 안정성을 갖는다는 것을 나타냈다.

[0115] **실시예 7: 상이한 용매에서 식(I)의 화합물의 무정형의 안정성 시험**

[0116] 각각 약 20mg의 식(I)의 화합물의 무정형을 여러 번 칭량하고, 각각 하기 표에 도시된 단일 또는 혼합 용매 0.3-0.4mL를 첨가하고, 40℃에서 교반하였다. 2 일 동안 교반한 후, 샘플이 용액 상태이거나 용액 상태에 가까운 경우, 여과 후 자연 휘발로 용매를 제거하였고; 샘플이 여전히 현탁액인 경우, 샘플을 원심분리하고 침전물을 수집하고, 용매가 휘발될 때까지 상정액을 통기월에 방치한다. 이어서 침전하고 및 용매 휘발된 고체를 40℃ 진공 건조 박스에서 밤새 건조시켰다. 모든 샘플로부터 고체를 수집하고 XRPD에 의해 그 상태를 검출하였다. 결과를 표 4에 나타냈다.

[0117] **표 4. 상이한 용매에서 식(I)의 화합물의 무정형의 안정성 시험**

번호	용매	외관	결과
1	메탄올	휘발로 용매 제거 후 고체 석출	무정형
2	에탄올	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
3	아세토니트릴	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
4	아세톤	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
5	에틸 아세테이트	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
6	테트라하이드로푸란	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
7	1,4-디옥산	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
8	메탄올 : 물=3:1	휘발로 용매 제거 후 고체 석출	무정형
9	에탄올 : 물=3:1	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
10	아세토니트릴 : 물=3:1	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형
11	아세톤 : 물=3:1	현탁액(2 일)/휘발로 용매 제거 후 고체 석출	모두 무정형

[0118]

[0119] 상기 실험 데이터에 따라, 본 발명에 의해 제공되는 식(I)의 화합물의 무정형은 통상적인 용매에서 형태 변화가 없고, 높은 안정성을 갖는다는 것을 나타냈다.

[0120] **생물학적 활성 테스트**

[0121] **실험예 8: 인-비트로 평가**

[0122] PPAR 작용제 활성 인-비트로 테스트 원리

[0123] 세포핵호르몬수용체(NHR)테스트

[0124] PathHunter의 NHR 단백질 상호작용과 핵변위 테스트는 균일하고 비이미징화된 실험에서의 세포핵 핵호르몬 수용체의 활성화 능력을 검출하기 위한 것이다. 이 기술은 효소단편보완(ETC)라고 하며, DiscoverX에서 개발하였다.

[0125] NHR 단백질 테스트는 활성화 상태에서의 표준길이의 NHR 단백질과 하나의 스테로이드 수용체 공활성화 펩타이드(SRCP) 영역, 하나 또는 복수의 표준 LXXLL 작용서열의 세포핵 융합단백질의 단백질-단백질 상호작용을 검출한다.

[0126] NHR는 EFC 테스트 체계의 ProLink™ 조성성분에 표시되고, SRCP 영역과 효소 수용체 조성성분(EA)은 융합되어 세포핵에서 발현된다. 리간드와 결합될 때, NHR는 세포핵에 전이되어 SRCP 영역을 얻는 바, 여기서 상보작용을 일으켜, 1eq의 활성화-갈락토시다아제(-Gal)를 생성하고, 화학적 광신호도 생성한다. 이러한 경로와 관련되는 효과는 화합물 배양시간을 줄이고, NHR 타겟 포인트를 직접 테스트하고, 표준길이의 인간 NHR 서열을 사용하며 및 단백질-단백질 상호작용을 파괴하여 새로운 종류의 화합물을 선택한다.

[0127] NHR NT 실험에서는 하나의 NHR가 세포질과 세포핵 격벽 사이에서 전이되는 것을 검출하였다. 수용체는 EFC 테스트 체계의 ProLink™ 조성성분에 표시되는 동시에, EA와 세포핵 서열은 융합됨으로써, EA가 세포핵에 대한 발현

을 제한한다. NHR이 세포핵으로 전이됨에 따라 EA와 상보작용을 이루어, 1eq의 활성화-갈락토시다아제(-Gal)를 생성하고, 화학적 광신호도 생성한다.

[0128] 세포처리:

[0129] 1. PathHunter NHR 세포주를 표준 조작에 따라 냉동저장고에서 펼쳐놓는다.

[0130] 2. 세포를 20 μ L/웰의 384 웰 백색 세포판에 접종시키고 테스트 전 37°C에서 적당한시간 동안 배양시킨다. 배지에는 혈청을 여과해낸 활성화된 글루칸을 함유하여, 호르몬 발현의 등급을 낮추도록 한다.

[0131] 작용제 실험모드:

[0132] 1. 작용제 활성을 측정함에 있어서, 반응을 유도하기 위해 세포와 화합물을 같이 배양해야 된다.

[0133] 2. 완충용액으로 화합물을 5배로 희석된 저장용액으로 조제한다.

[0134] 3. 5 μ L의 5 배 희석된 화합물 용액을 세포에 넣고, 37 °C(또는 실온)에서 3-16시간동안 배양한다. 최종적인 매질농도가 1%가 되도록 확보한다.

[0135] 억제제 실험모드:

[0136] 1. 억제 활성을 측정함에 있어서, 세포를 사전에 길항제와 함께 배양시키고, 그 다음 작용제를 사용하여 EC80 농도에서 도전해야 한다.

[0137] 2. 완충용액으로 화합물을 5 배로 희석된 저장용액으로 조제한다.

[0138] 3. 5 μ L의 5배 희석된 화합물 용액을 세포에 넣고, 37 °C(또는 실온)에서 60 분간 배양한다. 최종적인 매질농도가 1%가 되도록 확보한다.

[0139] 4. 완충용액으로 6배 희석한 EC80 작용제 5 μ L를 세포에 넣고, 37 °C(또는 실온)에서 3-16시간동안 배양한다.

[0140] 신호검출:

[0141] 1. 실험신호를 한번 첨가되는 12.5 μ L 또는 15 μ L(50% v/v)PathHunter 테스트 시약 혼합물에 의해 생성하며, 그 후에 상기 시약을 실온에서 1시간동안 배양해야 한다.

[0142] 2. 마이크로웰판의 생성되는 화학적 발광신호는 PerkinElmer Envision 기기에 의해 검출된다.

[0143] 데이터 분석:

[0144] 1. 화합물 활성은 CIBS 데이터 분석 소프트웨어에 의해 얻어진다(ChemInnovation, CA).

[0145] 2. 작용제 모드의 실험에 있어서, 백분율 활성은 이하 공식에 의해 계산된다.

[0146] $\%활성 = 100\% \times (\text{측정된 화합물RLU 평균치} - \text{매질 배경 RLU 평균치}) / (\text{리간드 최대제어 평균치} - \text{매질배경 RLU 평균치})$

[0147] 3. 길항제 모드의 실험에 있어서, 백분율 활성은 이하 공식에 의해 계산된다.

[0148] $\%억제 = 100\% \times (1 - (\text{측정된 화합물 RLU 평균치} - \text{매질 배경 RLU 평균치}) / (\text{EC80 대조 화합물의 RLU 평균치} - \text{매질 배경 RLU 평균치}))$

[0149] 4. 주의해야 할 것은, 리간드의 반응은 수용체 활성을 떨어뜨린다(지속적인 활성 타겟 포인트를 갖는 역방향 작용제). 이러한 역방향 작용제의 활성은 이하 공식에 의해 계산된다.

[0150] $\%역방향 작용제 활성 = 100\% \times (\text{매질 배경 RLU 평균치} - \text{측정된 화합물 RLU 평균치}) / (\text{매질 배경RLU 평균치} - \text{리간드 최대제어 RLU 평균치})$

[0151] 실험결과는 표 1에 나타난다.

[0152] 표 5: 본 발명 화합물 인-비트로 선별시험 결과

화합물	PPAR α		PPAR δ		PPAR γ	
	EC ₅₀ nM	최고 여기응답 치%	EC ₅₀ nM	최고 여기응답 치%	EC ₅₀ nM	최고 여기응답 치%
GW7647	A	100%	/	/	/	/
L-165,041	/	/	A	100%	/	/
트로글리타존	/	/	/	/	E	100%
GFT-505 (엘라피브라노)	E	I	C	II	E	II
식(I)의 화합물	A	I	A	II	E	I

[0153]

[0154] 주 1: 이미 알고 있는 PPAR α 작용제 GW7647, PPAR δ 작용제 L-165, 041과 PPAR γ 작용제 트로글리타존의 인-비트로 플랫폼 최고 여기 응답치는 100%로서, 기타 화합물의 최고 응답치와 그를 비교하여 상응한 최고 여기 응답치를 얻는다. 일반적으로 최고 여기 응답치가 80%보다 클 때 완전 작용제이고, 50%보다 크고 80%보다 작을 때 부분 작용제이고, 50%보다 작을 때 여기효과가 불완전하다.

[0155] 주 2: A $\leq$ 100 nM; 100 nM < B $\leq$ 150 nM; 150 nM < C $\leq$ 200 nM; 200 nM < D $\leq$ 250 nM; E > 250 nM.

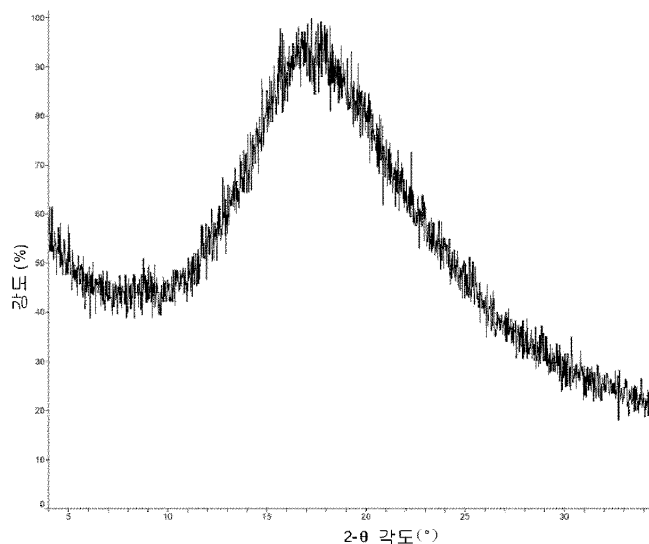
[0156] 주 3: 100% $\geq$ I $\geq$ 80%; 80% > II $\geq$ 50%; III < 50%.

[0157] 이상 시험 데이터는 식(I)의 화합물이 PPAR α 와 δ 수용체에 대한 활성화 작용이 뚜렷하고, PPAR γ 수용체에 대해 선택적으로 활성화 작용을 갖는 것을 나타낸다.

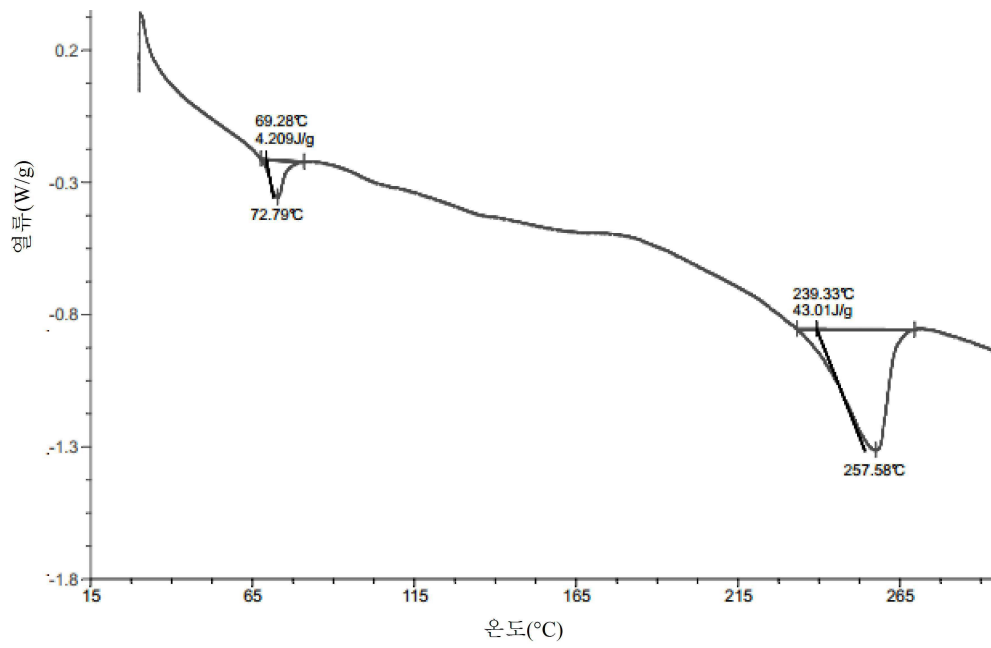
[0158] 식(I)의 화합물의 무정형의 안정성 및 활성화에 대한 상기 평가 실험에 따라, 당업계의 약물 무정형의 통상적인 인식과 달리, 본 발명에 의해 제공되는 식(I)의 화합물의 무정형은 비교적 높은 화학적 특성 및 물리적 형태 안정성을 가지며, 식(I)의 화합물의 무정형이 PPAR관련 경로의 사이토 카인을 유의하게 억제하고, 간 손상, NAS 점수 및 간 섬유증 개선에 상당한 영향을 미치는 것을 알 수 있고, 식(I)의 화합물의 무정형이 좋은 약용 전망을 가진 것을 알 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

