(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 4 월 4 일 (04.04.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/071538 A1

(51) 국제특허분류:
C07D 263/58 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/003391

(22) 국제출원일: 2023 년 3 월 14 일 (14.03.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0122616 2022 년 9 월 27 일 (27.09.2022) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: **우현애 (WOO, Hyun Ae)**; 03024 서울특별시 종로구 통일로18길 9, 103동 1304호, Seoul (KR). **박혜영 (PARK, Hea Young)**; 06004 서울특별시 강남구 압구정로 201, 73동 202호, Seoul (KR). **김다롱 (KIM, Da-Rong)**; 42251 대구광역시 수성구 시지로14길 7-11, Daegu (KR). **박지영 (PARK, Ji-Young)**; 03767 서울특별시 서대문구 이화여대2나길 11, 403호, Seoul (KR). **유지혜 (YOO, Ji Hye)**; 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청택지로 14-1, 301호, Chungcheongbuk-do (KR). **허연주 (HEO, Yeon-ju)**; 14290 경기도 광명시 광명로865번길 13-1, B01호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY & LAW)**; 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).

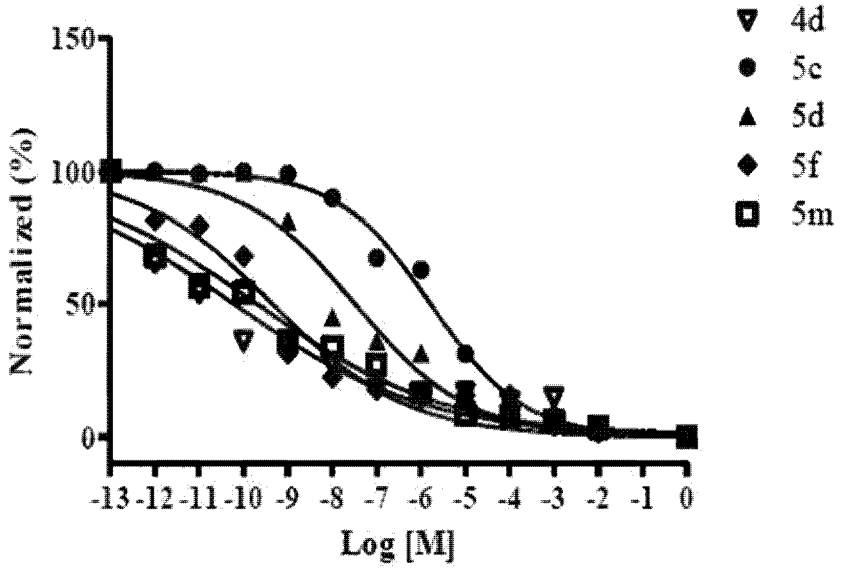
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** NOVEL BENZOXAZOLE DERIVATIVE COMPRISING 4-AMINO-BUTANAMIDE AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a novel benzoxazole derivative comprising 4-amino-butanamide and an anti-inflammatory use thereof.

(57) **요약서:** 본 발명은 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 및 이의 항염증 용도에 관한 것이다.

WO 2024/071538 A1

명세서

발명의 명칭: 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 및 이의 항염증 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 염증은, 조직 구조 및 기능의 궁극적 회복을 야기하는, 세균성 병원체(microbial pathogens), 자극물(irritants), 또는 독성 세포 성분과 같은 해로운 자극에의 조직 및 장기의 노출에 대한 호스트의 필수적인 면역 반응이다. 선천 및 적응 면역 반응은 병원체 특이적 방어(pathogen-specific defense) 및 면역 기억(immunological memory)에 중요한 호스트의 방어 시스템의 2가지 주된 필수구성요소이다. 선천 면역 체계에서, 많은 종류의 병원체는 공통의 분자 패턴으로 인식된다. 지질다당류(lipopolysaccharides; LPS), 알데하이드-유도체화 단백질(aldehyde-derivatized proteins), 만난(mannans), 테이코산(teichoic acids), 변성(denatured) DNA, 및 박테리아 DNA를 포함한 다양한 병원체-관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular patterns; PAMP)이 있다.

[4] 지질다당류(LPS)는 그램음성 박테리아 세포벽의 주된 성분이다. 이는 다양한 종류의 세포에서 염증성 사이토카인의 방출을 자극하므로, 박테리아성 LPS는 염증성 모델 구축에 널리 사용되고 있다. LPS는 혈청 중의 LPS 결합 단백질(LPS binding protein; LPB)에 의해 박테리아 멤브레인으로부터 추출되었다. LPS는 LPB에 의해 CD14로 전이되고, 단량체 분자로 절단되어 TLR4-MD-2 복합체에 제공되었다. LPS와 TLR4-MD-2 복합체의 결합 및 응집은 NK-κB 및 IRF3와 같은 다중 신호전달 요소의 활성화를 유도한다. 이후, 다양한 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인이 생산되고 염증 반응이 발생한다.

[5] 염증 반응은 염증성 사이토카인을 분비하는 LPS에 의해 유도된다. 대표적인 염증성 사이토카인은 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α를 포함한다. IL-1β는 CD4+ T 세포에 대한 자극효과를 가지며, T 도움 세포로 분화하도록 한다. IL-1β는 단핵구(monocytes), 대식세포(macrophages), 호중구(neutrophils), 간세포(hepatocytes), 및 조직 대식세포(tissue macrophages)와 같은 다양한 형태의 세포에 의해 합성된다. IL-6는 조혈(hematopoiesis) 및 B-의 항체생산형질세포(antibody-producing plasma cells)로의 최종 성숙, T 세포 활성화 및 분화에 관여한다. IL-6는 단핵식세포(mononuclear phagocytes), T 세포, B 세포, 섬유아세포(fibroblasts), 내피세포(endothelial cells), 각질형성세포(keratinocytes), 간세포(hepatocytes), 및 골수세포(bone marrow cells)에 의해 발현된다. TNF-α는 정상 세포의 증식 촉진에 관여하

고, 종양 세포에 대한 세포 용해(cytolytic) 또는 세포 증식 억제(cytostatic) 활성을 나타내며, 염증성, 항바이러스성, 및 면역조절 효과를 유도한다. TNF-α는 활성화된 대식세포로부터 주로 분비된다.

[6] 사이토카인 기능을 조절함으로써 면역 질환을 치료하기 위하여 많은 소분자 화합물들이 개발되어 왔다. 이들 화합물은 사이토카인 생산 경로에 연관된 단백질에 작용하여 사이토카인 생산 및 신호전달을 조절한다. 토파시티닙(tofacitinib), GNE-7915, GSKJ4, VX-765, 및 ONX 0914 등이 현재까지 개발되고 있는 대표적인 염증성 사이토카인 저해제이다. 단백질-기반 요법(protein-based therapies)과 같은 생물의약품(biopharmaceuticals)과는 달리, 이들 소분자 조절제는 세포내 단백질에 작용하여 비정상적인 사이토카인 신호전달 또는 하류 서열(downstream sequences)을 조절할 수 있다.

[7] 본 발명자들은 선행연구를 통해, 다양한 벤조옥사졸 유도체를 합성하고 그들의 생물학적 활성, 특히 항염증 효과를 연구하였다. 본 발명자들은 5-LOX(5-lipoxyganase) 억제 효과를 갖는 화합물들을 발굴하였다. 이들 화합물은 메타콜린-유도 기도 과민증(methacholine-induced airway hypersensitivity)의 개선된 효과를 가지며, 천식 치료제로서 잠재력을 가짐을 확인하였다. 또한, IL-6-매개 STAT3 인산화 저해제를 개발하였다. 이들 화합물 또한 주효(effector) Th1, Th2, 및 Th17 세포로부터 염증성 사이토카인 분비를 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 결과로부터, 상기 화합물들이 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis; RA) 치료를 위한 잠재적 후보임을 확인하였다. 나아가, 본 발명자들은 LPS에 의해 활성화되는 골수 유래 비만세포(bone marrow-derived mast cells; BMMC)로부터 IL-1β, IL-6, IL-13, TNF-α, 페리리핀(perilipin; PLIN) 2, 및 PLIN 3의 발현에 대한 억제효과를 갖는 화합물을 발굴하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 하나의 목적은 일련의 신규한 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는

염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명자들은 염증성 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 갖는 소분자 화합물을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 일련의 벤조옥사졸 유도체가 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1β, 및/또는 TNF-α의 발현 수준을 저해함으로써 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[15]

발명의 효과

[16] 본 발명의 화합물은 시험관 내 및 생체 내에서 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 발현을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 화합물 **4d**, **5c**, **5d**, **5f**, 및 **5m**의 농도에 따른 정상화된 IL-6 mRNA 발현 수준을 나타낸 도이다.

[19] 도 2는 LPS 처리한 AML-12 세포에서 화합물 **5f** 및 **4d**의 STAT3, IκB, 및 NF-κB 단백질 수준 억제 효과를 나타낸 도이다. (a)는 시험관 내 염증 관련 단백질의 발현 수준을, (b) 내지 (d)는 각각 표기된 단백질에 대해 정상화한 STAT3, IκB, 및 NF-κB의 단백질 발현 수준을 나타낸다. 양성 대조군으로는 화합물 **5f** 및 **4d** 대신에 PBS(비히클)를 처리한 세포를, 음성 대조군으로는 LPS를 처리하지 않고 PBS만을 처리한 세포를 사용하였다. 데이터는 평균±SD로 나타내었다(*: $p < 0.05$ compared with the group treated with the PBS, +: $p < 0.05$ compared with the group treated with the LPS).

[20] 도 3은 화합물 **5f** 및 **4d** 처리 후 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도이다. (a) 내지 (c)는 각각 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 mRNA 발현 수준을 나타낸다. 양성 대조군으로는 화합물 **5f** 및 **4d** 대신에 PBS(비히클)를 처리한 세포를, 음성 대조군으로는 LPS를 처리하지 않고 PBS만을 처리한 세포를 사용하였다. 데이터는 평균±SD로 나타내었다(*: $p < 0.05$ compared with the group treated with the PBS, +: $p < 0.05$ compared with the group treated with the LPS).

[21] 도 4는 LPS-유도 간 염증성 질환 모델에서 화합물 **5f** 및 **4d**의 생체 내 보호 효과를 나타낸 도이다. (a) 및 (b)는 각각 H&E 염색 및 F4/80 항체를 이용한 면역조직학적 염색을 이용한 조직병리학적 시험 결과를 나타낸다. 배율은 ×400이며, F4/80 양성 면적을 정량하였다. (c) 및 (d)는 간 염증시 상기 화합물들의 혈청 ALT 및 AST 수준에 대한 효과를 나타낸다. 데이터는 평균±SD로 나타내었다(*:

p < 0.05 compared with the group treated with the PBS, +: p < 0.05 compared with the group treated with the LPS).

[22]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[24] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[25] 아울러, 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

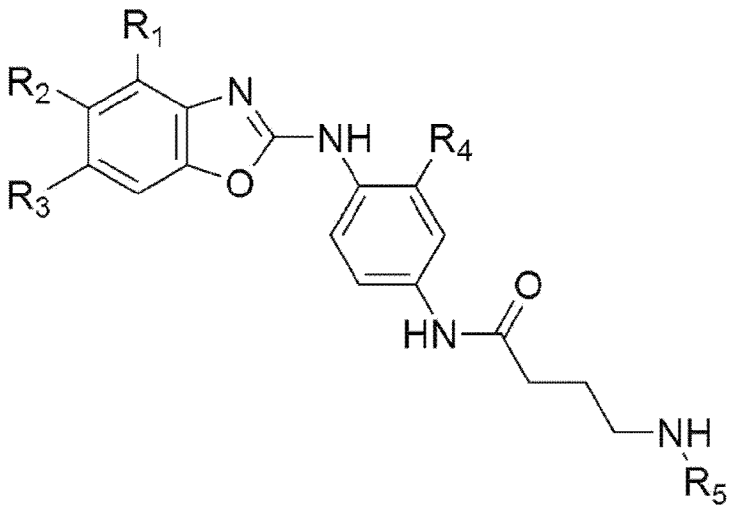
[26]

[27] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[28]

[29] 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 제1양태는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[30] [화학식 1]

[31] 

[32] 상기 화학식 1에서,

[33] R_1은 수소, 또는 C_{1-6} 알킬;

[34] R_2는 수소, 할로겐, C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 알콕시;

[35] R_3은 수소, 또는 C_{1-6} 알킬;

[36] R_4는 수소, 또는 C_{1-6} 알콕시;

[37] R_5는 수소 또는 C_{1-6} 알콕시카보닐임.

[38]

[39] 예컨대, 상기 화학식 1에서, R_1은 수소, 또는 메틸; R_2는 수소, 플루오로, 클로로, 메틸, tert-부틸, 또는 메톡시; R_3은 수소, 또는 메틸; R_4는 수소, 또는 메톡시; R_5는 수소 또는 tert-부톡시카보닐일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[40]

[41] 구체적으로, 상기 화합물은,

[42] 1. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[43] 2. tert-부틸 (4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸)카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[44] 3. tert-부틸 4-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[45] 4. tert-부틸 4-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[46] 5. tert-부틸 4-(4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[47] 6. tert-부틸 4-(4-(5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[48] 7. tert-부틸 4-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[49] 8. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[50] 9. tert-부틸 4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[51] 10. tert-부틸 4-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[52] 11. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[53] 12. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(3-methoxy-4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[54] 13. tert-부틸 4-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[55] 14. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[56] 15. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[57] 16. 4-아미노-N-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[58] 17. 4-아미노-N-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[59] 18. 4-아미노-N-(4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[60] 19. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[61] 20. 4-아미노-N-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[62] 21. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

[63] 22. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

[64] 23. 4-아미노-N-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

[65] 24. 4-아미노-N-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[66] 25. 4-아미노-N-(3-메톡시-4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(3-methoxy-4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide); 또는

[67] 26. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[68]

[69] 예컨대, 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산가염이

유용하다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[70] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[71] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[72] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[73] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화학식 1의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[74] 본 발명의 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 화합물의 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체 화합물과 동등한 약리활성을 나타내는 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체의 염이면 제한없이 모두 사용 가능하다.

[75]

[76] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 수화물 등의 용매화물 및 가능한 모든 입체 이성질체를 제한없이 포함한다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물 및 입체이성질체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 화학식 1로 표시되는 화합물로부터 제조할 수 있다.

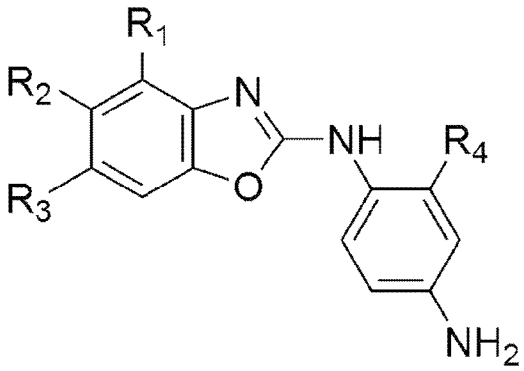
[77]

[78] 나아가, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 본 발명에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

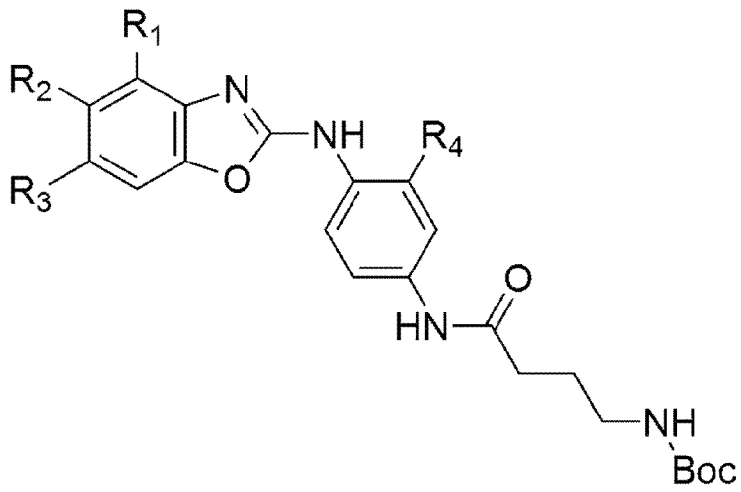
[79]

[80] 본 발명의 제2양태는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 tert-부틸 4-아미노-4-옥소부틸카바메이트와 반응시켜 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 제1단계; 및 선택적으로 산 존재하에 가수분해하여 tert-부톡시카보닐 보호기를 제거하는 제2단계를 포함하는, 제1양태의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공한다:

[81] [화학식 2]

[82] 

[83] [화학식 3]

[84] 

[85] 상기 화학식 2 및 3에서,

[86] R_1 내지 R_4는 제1양태에서 정의된 바와 같음.

[87] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[88]

[89] 예컨대, 상기 제1단계는 펩티드결합제(peptide coupling reagent) 및 후니그 염기(Hunig's Base) 존재 하에 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 상기 펩티드결합제로는 벤조트리아졸-1-일옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; PyBOP)를, 후니그 염기로는 디이소프로필에틸아민을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 나아가, 상기 반응은 -5 내지 10℃의 저온에서 교반하면서 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

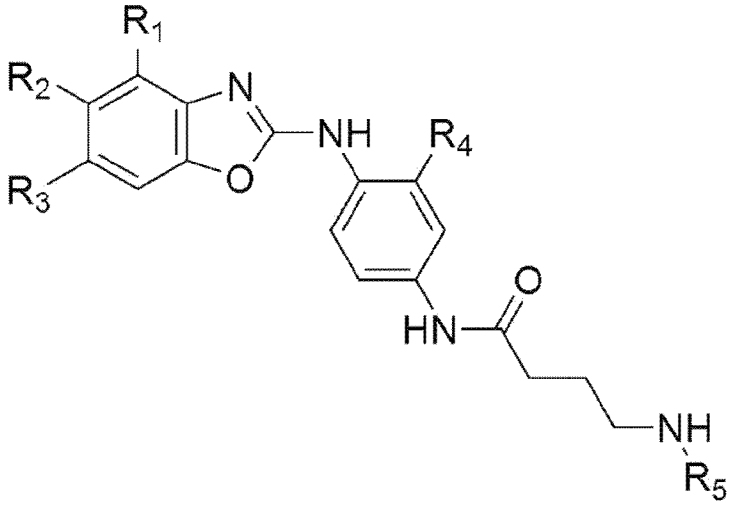
[90]

[91] 예컨대, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 시판되는 제품을 구매하여 사용하거나, 당업계에 공지된 일련의 방법에 따라 또는 이를 적절히 변형한 방법으로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 화학식 2의 화합물은 본 발명자의 선행특허인 특허출원 제10-2021-0187391호에 개시된 방법과 유사하게 합성하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[92]

[93] 본 발명의 제3양태는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[94] [화학식 1]

[95] 

[96] 상기 화학식 1에서,

[97] R_1은 수소, 또는 C_{1-6} 알킬;

[98] R_2는 수소, 할로겐, C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 알콕시;

[99] R_3은 수소;

[100] R_4는 수소, 또는 C_{1-6} 알콕시;

[101] R_5는 수소 또는 C_{1-6} 알콕시카보닐임.

[102] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[103]

[104] 예컨대, 상기 화학식 1에서, R_1은 수소, 또는 메틸; R_2는 수소, 플루오로, 클로로, 메틸, tert-부틸, 또는 메톡시; R_3은 수소; R_4는 수소, 또는 메톡시; R_5는 수소 또는 tert-부톡시카보닐일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[105]

[106] 구체적으로, 상기 화합물은,

[107] 1. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[108] 2. tert-부틸 (4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸)카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[109] 3. tert-부틸 4-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[110] 4. tert-부틸 4-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate)

[111] 5. tert-부틸 4-(4-(5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[112] 6. tert-부틸 4-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[113] 7. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[114] 8. tert-부틸 4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[115] 9. tert-부틸 4-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[116] 10. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[117] 11. tert-부틸 4-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

[118] 12. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[119] 13. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[120] 14. 4-아미노-N-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[121] 15. 4-아미노-N-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[122] 16. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[123] 17. 4-아미노-N-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

[124] 18. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

[125] 19. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

[126] 20. 4-아미노-N-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

[127] 21. 4-아미노-N-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide); 또는

[128] 22. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[129]

[130] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[131]

[132] 예컨대, 본 발명의 조성물은 시험관 내 또는 생체 내 염증성 사이토카인의 mRNA 발현을 감소시킴으로써 TLR 신호전달 경로를 조절할 수 있다. 상기 본 발명의 조성물로 조절 가능한 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-1β, 및 TNF-α로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 조성물에 유효성분으로 함유되는 화학식 1의 화합물은 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1β, 및/또는 TNF-α 등의 mRNA 발현을 감소시킬 수 있으므로, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[133]

[134] 예컨대, 상기 염증성 질환은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 감염성 질환, 알러지, 자가면역 질환, 대사성 질환 등의 급성 또는 만성 염증성 질환일 수 있다. 구체적으로, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 알러지성 점막염, 두드러기 및 아나필락스(anaphylax)를 포함하는 알러지성 질환, 경피증(systemic sclerosis), 피부근염(dermatomyositis) 및 포함체 근육염(inclusion body myositis)을 포함하는 근병증, 관절염, 아토피성 피부염, 건선, 천식, 다발성 경화증, ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염증, 패혈증, 다발성 연골염, 경피증, 습진, 통풍, 치주질환, 베체트 증후군, 부종, 맥관염, 가와사키병, 당뇨병성 망막염, 자가 면역 췌장염, 혈관염, 사구체 신염, 급성 및 만성 기관지염, 크론병 및 인플루엔자 감염증일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[135] 그러나, 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 질환은 이에 제한되는 것은 아니며, IL-6, IL-1β, 및/또는 TNF-α 등의 mRNA 발현을 감소시킴으로써 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 질환이면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[136]

[137] 바람직하게, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분으로서 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 조성물의 총중량을 기준으로 0.1 내지 75 중량%로, 보다 바람직하게는 1 내지 50 중량%로 함유할 수 있다.

[138] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사 용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[139] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토즈, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[140] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[141] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61. 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[142] 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있으며 활성 성분을 약 0.1 내지 75 중량%, 바람직하게는 약 1 내지 50 중량%의 범위에서 함유할 수 있다. 약 50 내지 70 kg의 포유동물에 대한 단위 제형은 약 10 내지 200 mg의 활성성분을 함유할 수 있다.

[143]

[144] 이때, 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대

한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[145] 예컨대, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[146] 구체적으로, 본 발명의 조성물에서 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 100 mg, 바람직하게는 5 내지 60 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[147]

[148] 본 발명의 제4양태는 상기 제3양태의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

[149] 본 발명의 용어, "제3양태의 약학적 조성물" 및 "염증성 질환"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[150]

[151] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 염증성 질환이 발명하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[152] 본 발명의 용어 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제,

미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[153]

[154] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 양을 의미한다.

[155] 본 발명의 약학적 조성물은 예방 또는 치료하고자 하는 질환의 종류에 따라, 유효성분으로서 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외의 공지된 각 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 공지의 약물을 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 암질환의 예방 또는 치료에 사용되는 경우 유효성분으로서 4-아미노-부탄아미드를 포함하는 신규한 벤조옥사졸 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외에 공지된 약물을 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.

[156]

발명의 실시를 위한 형태

[157] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[158]

[159] **<물질 및 방법>**

[160]

[161] 융점(melting points)은 전기 열 전자 융점 측정기(electro thermal digital melting point, Buchi, Germany) 상에서 보정 없이(without calibration) 측정하였다. ^{1}H-NMR 스펙트럼은 Varian NMR AS 및 Varian Unity Inova 400 MHz NMR 분광계 상에 기록하였다. 화학적 이동(chemical shifts)은 용매 피크에 상대적인 백만분율(parts per million; ppm, *d*) 단위로 나타내었다. ^{1}H NMR 데이터는 피크 다중성(peak multiplicities)으로 표기되었다(s for singlet; d for doublet; t for triplet; q for quartet; 및 m for multiplet). 커플링 상수는 헤르츠(hertz, Hz)로 표기하였다. MS 스펙트럼은 한국기초과학지원연구원(Korea Basic Science Institute, 대구)에서 Jeol JMS 700 고해상도 질량 분광계(high resolution mass spectrometer)를 사용하여 측정하였다. 시약은 공업용 등급(commercial grade)으로 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MI, USA), Merck(Darmstadt, Geramny), 및 Duksan Pure Chemical Co.(Ansan, Korea)로부터 구입하였다.

[162]

[163] **실시예 1: 1-(치환된-2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 유도체(1a-g) 의 합성**

[164]

[165] 먼저, 25 mL 메탄올을 다양하게 치환된 2-아미노페놀(100 mg, 1 eq.) 및 1-이소티오시아나토-4-니트로벤젠 또는 1-이소티오시아나토-2-메톡시-4-니트로벤젠(1 eq.)에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 상기 반응 혼합물로부터 감압 하에 유기 용매를 제거하여 일련의 1-(치환된-2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 또는 1-(2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아(**1a-m**)를 수득하였다.

[166]

[167] **1-(2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1a)**

[168] 노란색 고체(95.9%),

[169] mp 148-150℃,

[170] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 8.30 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1 H), 8.25 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1 H), 7.90 (brs, 1 H), 7.83 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 1 H), 7.70 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 7.30 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 7.09 (dd, J = 9.2, 1.2 Hz, 1 H), 7.03 (td, J = 7.9, 1.2 Hz, 1 H),

[171] HR-FABMS Calcd. for $C_{13}H_{12}N_3O_3S$ (M^+ + H): 290.0601, Found: 290.0592.

[172]

[173] **1-(5-플루오로-2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1b)**

[174] 녹갈색 고체(78.0%),

[175] mp 139-141℃,

[176] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.71 (s, 1 H), 10.04 (s, 1 H), 9.59 (s, 1 H), 8.22 (dt, J = 9.2, 2.4 Hz, 2 H), 7.98-7.94 (m, 3 H) 6.89-6.85 (m, 2 H),

[177] HR-FABMS Calcd. for $C_{13}H_{11}FN_3O_3S$ (M^+ + H): 308.0500, Found: 308.0503.

[178]

[179] **1-(2-히드록시-6-메틸페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1c)**

[180] 노란색 고체(91.3%),

[181] mp 168-170℃,

[182] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.23 (dd, J = 9.0, 2.8 Hz, 2 H), 7.83 (dd, J = 7.2, 2.4 Hz, 2 H), 7.16 (t, J = 3.2, 2.4 Hz, 2 H), 6.94 (t, J = 8.0, 7.2 Hz, 1 H),

[183] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_3S$ (M^+ + H): 304.3443, Found: 304.0751.

[184]

[185] **1-(2-히드록시-5-메틸페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1d)**

[186] 노란색 고체(85.8%),

[187] mp 158-159℃,

[188] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.25 (dt, J = 9.4, 2.6 Hz, 2 H), 7.86 (brs, 1 H), 7.73 (brs, 1 H), 7.69 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 7.11 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1 H), 7.07 (s, 1 H), 6.98 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 2.31 (s, 3 H),

[189] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_3S$ (M^+ + H): 304.3443, Found: 304.0752.

[190]

[191] **1-(2-히드록시-4-메틸페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1e)**

[192] 겨자색 고체(91.3%),

[193] mp 130-136℃,

[194] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.23 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 2 H), 7.83 (brs, 1 H), 7.71 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 7.15 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 6.90 (s, 1 H), 6.83 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 2.36 (s, 3 H),

[195] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_3S$ (M^+ + H): 304.3443, Found: 304.0749.

[196]

[197] **1-(5-tert-부틸-2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1f)**

[198] 회황색 고체71.8%),

[199] mp 141-145℃,

[200] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.25 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 7.92 (brs, 1 H), 7.80 (brs, 1 H), 7.70 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 7.33 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 7.25 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 1.3 (s, 9 H),

[201] HR-FABMS Calcd. for $C_{17}H_{20}N_3O_3S$ (M^+ + H): 346.4240, Found: 346.1221.

[202]

[203] **1-(2-히드록시-5-메톡시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 (1g)**

[204] 녹색 분말(89.0%),

[205] mp 122-124℃,

[206] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.30-8.22 (m, 3 H), 7.85 (s, 1 H), 7.74 (s, 1 H), 7.67 (d, J = 7.2 Hz, 2 H), 7.03-7.00 (m, 1 H), 6.88-6.86 (m, 2 H), 3.78 (s, 3 H),

[207] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_4S$ (M^+ + H): 320.07, Found: 320.0699.

[208]

[209] **실시예 2: 1-(치환된-2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 유도체(1h-m)의 합성**

[210]

[211] 1-이소시아나토-2-메톡시-4-니트로벤젠(1 eq.)를 이용하여 상기 실시예 1과 유사한 방법으로 일련의 1-(치환된-2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐) 티오우레아를 수득하였다.

[212]

[213] **1-(2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 (1h)**

[214] 밝은 노란색 고체(90.6%),

[215] mp 135-138℃,

[216] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.85 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 8.37 (s, 1 H), 7.92 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 7.71 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.32 (q, J = 8.0 Hz,1 H), 7.09 (d, J = 7.2 Hz, 1 H), 7.04 (td, J = 7.7, 1.0 Hz, 1 H), 6.04 (brs, 1 H), 3.84 (s, 3 H),

[217] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_4S$ (M^+ + H): 320.3437, Found: 320.0700.

[218]

[219] **1-(5-플루오로-2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 (1i)**

[220] 노란색 고체(99.3%),

[221] mp 133-137℃,

[222] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.09 (s, 1 H), 10.01 (s, 1 H), 9.97 (s, 1 H), 8.67 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 7.93-7.84 (m, 3 H), 6.89-6.86 (m, 2 H), 4.01 (s, 3 H),

[223] HR-FABMS Calcd. For $C_{14}H_{13}FN_3O_4S$ (M^+ + H): 338.0605, Found: 338.0606.

[224]

[225] **1-(5-클로로-2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 (1j)**

[226] 황갈색 고체(86.0%),

[227] mp 153-154℃,

[228] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.27 (s, 1 H), 10.08 (s, 1 H), 9.97 (s, 1 H), 8.69 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.01 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.89 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1 H), 7.84 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.07 (dd, J = 8.6, 2.6 Hz, 1 H), 6.92 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 4.01 (s, 3 H),

[229] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{12}ClN_3O_4S$ (M^+ + H): 354.0315, Found: 354.0319.

[230]

[231] **1-(2-히드록시-5-메틸페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 (1k)**

[232] 황갈색 고체(94.3%),

[233] mp 131-137℃,

[234] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.85 (dd, J = 8.8, 4.4 Hz, 1 H), 8.36 (brs, 1 H), 7.94 (dd, J = 8.8, 4.4 Hz, 1 H), 7,73 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 7.60 (brs, 1 H), 7.13 (d, J = 4.8 Hz, 1 H), 6.98 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 5.72 (brs, 1 H), 3.86 (s, 3 H), 2.33 (s, 3 H),

[235] HR-FABMS Calcd. for $C_{15}H_{16}N_3O_4S$ (M^+ + H): 334.3702, Found: 334.0857.

[236]

[237] **1-(2-히드록시-4-메틸페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 (1l)**

[238] 노란색 고체(88.7%),

[239] mp 140-142℃,

[240] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.96 (s, 1 H), 9.75 (s, 2 H), 8.83 (s, 1 H), 7.89-7.86 (m, 1 H), 7.81 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 7.47 (s, 1 H), 6.73 (s, 1 H), 6.62 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 3.98 (s, 3 H), 2.23 (s, 3 H),

[241] HR-FABMS Calcd. for $C_{15}H_{16}N_3O_4S$ (M^+ + H): 334,0856, Found: 334.0856.

[242]

[243] **1-(5-tert-부틸-2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 (1m)**

[244] 노란색 고체(87.9%),

[245] mp 63-65℃,

[246] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.03 (s, 1 H), 9.68 (s, 2 H), 8.81 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.88 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 7.82 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.74 (s, 1 H), 7.08 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 3.89 (s, 3 H), 1.24 (s, 9 H),

[247] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{22}N_3O_4S$ (M^+ + H): 376.1326, Found: 376.1326.

[248]

[249] **실시예 3: 치환된-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 유도체(2a-g)의 합성**

[250]

[251] 먼저, 5 mL 건조 아세토니트릴을 N_2 대기 하에 과산화칼륨(potassium superoxide, KO_2, 5 eq.)에 첨가하였다. 상기 실시예 1에 따라 준비한 각각의 1-(치환된-2-히드록시페닐)-3-(4-니트로페닐)티오우레아 유도체(**1a-g**, 100 mg, 1 eq.) 아세토니트릴 용액을 KO_2-아세토니트릴 혼합물에 적가하였다. 상기 반응 혼합물을 N_2 대기 하에 실온에서 16시간 동안 격렬히 교반하였다. 반응을 완료한 후, 상기 반응 혼합물에 냉수를 첨가하고 디클로로메탄으로 추출한 후, 염수로 세척하였다. 무수 $MgSO_4$로 건조 및 여과 후, 감압 하에 유기 용매를 제거하여 화합물 **2a-g**를 수득하였다.

[252]

[253] **N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2a)**

[254] 노란색 고체(72.4%),

[255] mp 219-220℃,

[256] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.31 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 2.4 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 7.22 (t, J = 7.8 Hz, 1H),

[257] HR-FABMS Calcd. for $C_{13}H_{10}N_3O_3$ (M^+ + H): 256.2368, Found: 256.0717.

[258]

[259] **5-플루오로-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2b)**

[260] 밝은 노란색 고체(63.7%),

[261] mp 254-256℃,

[262] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.30 (dt, J = 7.0, 2.2 Hz, 2H), 9.82 (dt, J = 7.0, 2.2 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.31 (q, J = 4.4 Hz, 1H), 6.93 (td, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H),

[263] HR-FABMS Calcd. for $C_{13}H_9FN_3O_3$ (M^+ + H): 274.0622, Found: 274.0624.

[264]

[265] **4-메틸-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2c)**

[266] 노란색 고체(83.8%),

[267] mp 227-228℃,

[268] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.30 (dt, J = 9.6, 2.6 Hz, 2H), 7.84 (dt, J = 8.4, 5.0 Hz, 2H), 7.23 (t, J = 디, 4.4 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 2.59 (s, 3H),

[269] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{12}N_3O_3$ (M^+ + H): 270.2634, Found: 270.0877.

[270]

[271] **5-메틸-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2d)**

[272] 밝은 노란색 고체(67.4%),

[273] mp 256-257℃,

[274] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.29 (dd, J = 7.2, 2.0 Hz, 2H), 7.82 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H),

[275] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{12}N_3O_3$ (M^+ + H): 270.2634, Found: 270.0879.

[276]

[277] **6-메틸-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2e)**

[278] 노란색 고체(69.0%),

[279] mp 226-228℃,

[280] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.29 (dt, J = 9.5, 2.7 Hz, 2H), 7.81 (dt, J = 9.8, 2.6 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H),

[281] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{12}N_3O_3$ (M^+ + H): 270.2634, Found: 270.0874.

[282]

[283] **5-tert-부틸-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2f)**

[284] 노란색 고체(69.0%),

[285] mp 217-218℃,

[286] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.29 (dt, J = 9.7, 2.7 Hz, 2H), 7.82 (dt, J = 9.7, 2.5 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H),

[287] HR-FABMS Calcd. for $C_{17}H_{18}N_3O_3$ (M^+ + H): 312.3431, Found: 312.1343.

[288]

[289] **5-메톡시-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2g)**

[290] Yellow powder (52%),

[291] mp 217-221℃,

[292] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.31-8.27 (m, 2H), 7.83-7.79 (m, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.11 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H),

[293] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{12}N_3O_4$ (M^+ + H): 286.0823, Found: 286.0822.

[294]

[295] **실시예 4: 치환된-N-(2-메톡시-4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 유도체(2h-m)의 합성**

[296]

[297] 상기 실시예 2에 따라 준비한 1-(치환된-2-히드록시페닐)-3-(2-메톡시-4-니트로페닐)티오우레아 유도체(**1h-m**, 1 eq.)를 이용하여, 상기 실시예 3과 유사한 방법으로 일련의 치환된-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 유도체(**2h-m**)를 수득하였다.

[298]

[299] **N-(2-메톡시-4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2h)**

[300] 노란색 고체(86.9%),

[301] mp 168-169℃,

[302] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.68 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.05 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.93 (brs, 1H), 7.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.25 (dtd, J = 33.2, 7.6, 1.2 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H),

[303] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{12}N_3O_4$ (M^+ + H): 286.2628, Found: 286.0824.

[304]

[305] **5-플루오로-N-(2-메톡시-4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2i)**

[306] 노란색 고체(70.4%),

[307] mp 199-201℃,

[308] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.54 (s, 1H), 8.57 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 8.8, 4.0 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.01-6.96 (m, 1H), 3.98 (s, 3H),

[309] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{11}FN_3O_4$ (M^+ + H): 304.0728, Found: 304.0728.

[310]

[311] **5-클로로-N-(2-메톡시-4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2j)**

[312] 노란색 고체(85.1%),

[313] mp 202-204℃,

[314] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 8.59 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H),

[315] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{10}ClN_3O_4$ $(M + H)^+$: 320.0433, Found: 320.0435.

[316]

[317] **N-(2-메톡시-4-니트로페닐)-5-메틸벤조[d]옥사졸-2-아민 (2k)**

[318] 노란색 고체(78.1%),

[319] mp 163-168℃,

[320] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.66 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.89 (brs, 1H), 7.80 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.01 (dd, J = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 2.45 (s, 3H),

[321] HR-FABMS Calcd. for $C_{15}H_{14}N_3O_4$ (M^+ + H): 300.2894, Found: 300.0982.

[322]

[323] **N-(2-메톡시-4-니트로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-2-아민 (2l)**

[324] 노란색 고체(61.9%),

[325] mp 205-207℃,

[326] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.33 (s, 1H), 8.62 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 2.40 (s, 3H),

[327] HR-FABMS Calcd. for $C_{15}H_{14}N_3O_4$ (M^+ + H): 300.0979, Found: 300.0980.

[328]

[329] **5-tert-부틸-N-(2-메톡시-4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 (2m)**

[330] 노란색 고체(62.4%),

[331] mp 150-153℃,

[332] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.35 (s, 1H), 8.64 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 9.2, 2.0 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.41 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 1.33 (s, 9H),

[333] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{20}N_3O_4$ (M^+ + H): 342.1448, Found: 342.1451.

[334]

[335] **실시예 5: N^1-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 유도체(3a-g)의 합성**

[336]

[337] 상기 실시예 3에 따라 준비한 치환된-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 유도체(**2a-g**, 100 mg, 1 eq.)에 10 mL 에탄올을 가하고, 염화주석(Tin(II) chloride, 12 eq.)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 초음파처리하였다. 수산화칼륨(potassium hydroxide) 용액을 상기 반응 용액에 첨가하고, 상기 혼합물을 에틸아세테이트로 추출한 후, 염수로 세척하였다. 무수 $MgSO_4$로 건조 및 여과 후, 감압 하에 유기 용매를 제거하여 화합물 **3a-f**를 수득하였다.

[338] 또는, 상기 실시예 3에 따라 준비한 치환된-N-(4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 유도체(**2a-g**, 100 mg, 1 eq.)를 메탄올에 용해시켜 Pd/C 적당량을 가한 혼합물을 수소 치환 하에 3시간 동안 실온에서 교반하며 반응시킨 후, 여과하여 Pd/C를 제거하였다. 이어 용매를 감압하에 증발시켜 제거하여 화합물 **3a-f**를 수득하였다.

[339]

[340] **N^1-(벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3a)**

[341] 짙은 회색 고체(40.9%),

[342] mp 198-201℃,

[343] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.02 (brs, 1H), 7.39 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.15 (td, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.04 (td, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 6.58 (dt, J = 9.4, 2.6 Hz, 2H), 4.84 (s, 2H),

[344] HR-FABMS Calcd. for $C_{13}H_{12}N_3O$ (M^+ + H): 226.2539, Found: 226.0975.

[345]

[346] **N^1-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3b)**

[347] 짙은 회색 고체(39.3%),

[348] mp 187-191℃,

[349] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.16 (brs, 1H), 7.39 (q, J = 4.3 Hz, 1H), 7.33 (dt, J = 9.1, 2.5 Hz, 2H), 7.17 (dd, J = 9.4, 2.6 Hz, 1H), 6.84 (td, J = 9.3, 2.6 Hz, 1H), 6.57 (dt, J = 9.0, 2.4 Hz, 2H), 4.87 (s, 2H),

[350] HR-FABMS Calcd. for $C_{13}H_{11}FN_3O$ (M^+ + H): 244.0881, Found: 244.0885.

[351]

[352] **N^1-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3c)**

[353] 갈색 고체(75.2%),

[354] mp 137-138℃,

[355] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.94 (brs, 1H), 7.36 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.99-6.91 (m, 2H), 6.59 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 2.41 (s, 3H),

[356] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O$ (M^+ + H): 240.2805, Found: 240.1140.

[357]

[358] **N^1-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3d)**

[359] 짙은 회색 고체(64.0%),

[360] mp 170-178℃,

[361] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.96 (s, 1H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.85 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 6.57 (dt, J = 9.6, 2.8 Hz, 2H), 4.85 (brs, 2H), 2.34 (s, 3H),

[362] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O$ (M^+ + H): 240.2805, Found: 240.1137.

[363]

[364] **N^1-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3e)**

[365] 회색빛 분홍색 고체(49.4%),

[366] mp 153-154℃,

[367] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.94 (brs, 1H), 7.35 (dt, J = 9.2, 2.6 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.97 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 6.57 (dt, J = 9.0, 2.6 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 2.36 (s, 3H),

[368] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O$ (M^+ + H): 240.2805, Found: 240.1137.

[369]

[370] **N^1-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3f)**

[371] 회색 고체(84.4%),

[372] mp 185-190℃,

[373] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.96 (s, 1H), 7.36 (dt, J = 9.2, 2.8 Hz, 3H), 7.28 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.57 (dt, J = 9.2, 2.6 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 1.31 (s, 9H),

[374] HR-FABMS Calcd. for $C_{17}H_{20}N_3O$ (M^+ + H): 282.3602, Found: 282.1608.

[375]

[376] **N^1-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3g)**

[377] 짙은 갈색 고체(51.3%),

[378] mp 192-201℃,

[379] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.99 (brs, 1H), 7.34 (dt, J = 9.6, 2.6 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.57 (dt, J = 9.2, 2.6 Hz, 2H), 4.83 (s, 2H), 3.75 (s, 3H),

[380] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_2$ (M^+ + H): 256.2799.

[381]

[382] **실시예 6: 2-메톡시-N^1-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 유도체(3h-m)의 합성**

[383] 상기 실시예 4에 따라 준비한 각각의 치환된-N-(2-메톡시-4-니트로페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 유도체(**2h-m**, 1 eq.)을 이용하여, 상기 실시예 5와 유사한 방법으로 일련의 N^1-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 유도체(**3h-m**)를 수득하였다.

[384]

[385] **N^1-(벤조[d]옥사졸-2-일)-2-메톡시벤젠-1,4-디아민 (3h)**

[386] 회색 고체(58.2%),

[387] mp 110-112℃,

[388] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.06 (s, 1H), 7.33 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.14-7.10 (m, 1H), 7.02-6.97 (m, 1H), 6.31 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.70 (s, 3H),

[389] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{14}N_3O_2$ (M^+ + H): 256.1081, Found: 256.1082.

[390]

[391] **N^1-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)-2-메톡시벤젠-1,4-디아민 (3i)**

[392] 흰색 고체(41.5%),

[393] mp 118-120℃,

[394] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.25 (s, 1H), 7.34 (dd, J = 8.8, 4.8 Hz, 1H), 7.246 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 5.6, 2.4 Hz, 1H), 6.82-6.76 (m, 1H), 6.31 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.70 (s, 3H),

[395] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{13}FN_3O_2$ (M^+ + H): 274.0986, Found: 274.0989.

[396]

[397] **N^1-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)-2-메톡시벤젠-1,4-디아민 (3j)**

[398] 회색 고체(42.3%),

[399] mp 117-120℃,

[400] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.45 (s, 2H), 9.29 (s, 1H), 7.43 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.06-7.03 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H),

[401] HR-FABMS Calcd. for $C_{14}H_{13}ClN_3O_2$ (M^+ + H): 290.0691, Found: 290.0692.

[402]

[403] **2-메톡시-N^1-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3k)**

[404] 갈색 고체(44.4%),

[405] mp 123-125℃,

[406] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 8,98 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.80 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.32 (s, 3H),

[407] HR-FABMS Calcd. for $C_{15}H_{16}N_3O_2$ (M^+ + H): 270.1237, Found: 270.1238.

[408]

[409] **2-메톡시-N^1-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 (3l)**

[410] 회색 고체(57.0%),

[411] mp 186-189℃,

[412] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 8.94 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (dd, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (dd, J = 8.0, 2.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.34 (s, 3H),

[413] HR-FABMS Calcd. for $C_{15}H_{16}N_3O_2$ (M^+ + H): 270.1237, Found: 270.1240.

[414]

[415] **N^1-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일)-2-메톡시벤젠-1,4-디아민 (3m)**

[416] 갈색 고체(68.8%),

[417] mp 185-188℃,

[418] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 8.98 (s, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.17 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.29 (s, 9H),

[419] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{22}N_3O_2$ (M^+ + H): 312.1707, Found: 312.1707.

[420]

[421] 실시예 **7: tert-**부틸 **4-(4-(**치환된**-**벤조**[d]**옥사졸**-2-**일아미노)페닐아미노)**-4-**옥소부틸카바메이트 유도체**(4a-g)**의 합성

[422]

[423] 먼저, 10 mL 디메틸포름아미드 상기 실시예 5에 따라 준비한 N^1-(치환된 벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 유도체(**3a-g**, 100 mg, 1 eq.), Boc-GABA-OH(1 eq.) 및 PyBOP(1.2 eq.)에 첨가하고, 0℃에서 교반하였다. 상기 반응 혼합물에 디이소프로필에틸아민(2 eq.)을 첨가하고, 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 상기 반응 혼합물에 10% HCl 용액을 첨가하고, 에틸아세테이트로 추출한 후, 중탄산나트륨(sodium bicarbonate) 용액과 염수로 세척하였다. 무수 $MgSO_4$로 건조 및 여과 후, 감압 하에 유기 용매를 제거하여 화합물 **4a-g**를 수득하였다.

[424]

[425] **tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4a)**

[426] 밝은 노란색 고체(38.1%),

[427] mp 124-126℃,

[428] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.50 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 7.65 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.47-7.41 (m, 2H), 7.23-7.19 (m, 1H), 7.13-7.09 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 2.95 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[429] HR-FABMS Calcd. for $C_{22}H_{27}N_4O_4$ (M^+ + H): 411.2027, Found: 411.2025.

[430]

[431] **tert-부틸 4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4b)**

[432] 녹색 고체(75.7%),

[433] mp 185-180℃,

[434] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.62 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.47 (dd, J = 8.8, 4.4 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 6.94-6.89 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 2.96 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[435] HR-FABMS Calcd. for $C_{22}H_{26}FN_4O_4$ (M^+ + H): 429.1933, Found: 429.1931.

[436]

[437] **tert-부틸 4-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4c)**

[438] 회색 고체(33.9%),

[439] mp 127-129℃,

[440] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.04-6.98 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 2.95 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.28 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.75-1.67 (m, 2H), 1.38 (s, 9H),

[441] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{29}N_4O_4$ (M^+ + H): 425.2183, Found: 425.2190.

[442]

[443] **tert-부틸 4-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4d)**

[444] 흰색 분말(34.5%),

[445] mp 186-189℃,

[446] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 7.63 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.91 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 2.95 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[447] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{29}N_4O_4$ (M^+ + H): 425.2183, Found: 425.2184.

[448]

[449] **tert-부틸 4-(4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4e)**

[450] 밝은 갈색 고체(50.9%),

[451] mp 173-176℃,

[452] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.39 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 7.65-7.60 (m, 2H), 7.55-7.52 (m, 2H), 7.26 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.99-6.96 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 2.92 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.24 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.65 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.35 (s, 9H),

[453] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{29}N_4O_4$ (M^+ + H): 425.2183, Found: 425.2184.

[454]

[455] **tert-부틸 4-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4f)**

[456] 갈색 오일(60.2%),

[457] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 7.65 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.4 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 2.96 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.32 (s, 9H),

[458] HR-FABMS Calcd. for $C_{26}H_{35}N_4O_4$ (M^+ + H): 467.2653, Found: 467.2656.

[459]

[460] **tert-부틸 4-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4g)**

[461] 미색 고체(90.0%),

[462] mp 190-192℃,

[463] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.45 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.83

(t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.96 (dd, *J* = 13.2, 6.8 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[464] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{29}N_4O_5$ (M^+ + H): 441.2132, Found: 441.2128.

[465]

[466] **실시예 8: tert-부틸 4-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 유도체(4h-m)의 합성**

[467]

[468] 상기 실시예 6에 따라 수득한 각각의 2-메톡시-N^1-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일)벤젠-1,4-디아민 유도체(**3h-m**, 1 eq.)를 이용하여, 상기 실시예 7과 유사한 방법으로 일련의 tert-부틸 4-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 유도체(**4h-m**)를 수득하였다.

[469]

[470] **tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4h)**

[471] 갈색 오일(81.1%),

[472] mp 110-112℃,

[473] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.90 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.43-7.35 (m, 1H), 7.19 (dd, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.97 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.29 (s, 2H), 1.69 (s, 2H), 1.38 (s, 9H),

[474] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{29}N_4O_5$ (M^+ + H): 441.2132, Found: 441.2137.

[475]

[476] **tert-부틸 4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸)-카바메이트 (4i)**

[477] 밝은 갈색 고체(59.5%),

[478] mp 166-170℃,

[479] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.91 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.8, 4.4 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.90-6.84 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[480] HR-FABMS Calcd. for $C_{24}H_{31}N_4O_5$ (M^+ + H): 455.2289, Found: 455.2292.

[481]

[482] **tert-부틸 4-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸)-카바메이트 (4j)**

[483] 자주색 고체(85.4%),

[484] mp 60-63℃,

[485] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.92 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.94-7.81 (m, 1H), 7.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.20-7.08 (m, 2H), 6.84 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.96 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[486] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{28}ClN_4O_5$ (M^+ + H): 475.1743, Found: 475.1743.

[487]

[488] **tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸)-카바메이트 (4k)**

[489] 흰색 고체(73.9%),

[490] mp 88-85℃,

[491] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.90 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 7.92 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.31-2.99 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.69 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[492] HR-FABMS Calcd. for $C_{24}H_{31}N_4O_5$ (M^+ + H): 455.2289, Found: 455.2289.

[493]

[494] **tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸)-카바메이트 (4l)**

[495] 흰색 고체(91.3%),

[496] mp 150-153℃,

[497] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.89 (s, 1H), 9.39 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.12 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.96 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.69 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H),

[498] HR-FABMS Calcd. for $C_{24}H_{31}N_4O_5$ (M^+ + H): 455.2289, Found: 455.2292.

[499]

[500] **tert-부틸 4-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 (4m)**

[501] 흰색 고체(83.7%),

[502] mp 168-171℃,

[503] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 9.89 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.14-7.09 (m, 2H), 6.84 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.99-2.94 (m, 2H), 2.29 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.69 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.382 (s, 9H),

[504] HR-FABMS Calcd. for $C_{27}H_{37}N_4O_5$ (M^+ + H): 497.2758, Found: 497.2762.

[505]

[506] **실시예 9: 4-아미노-N-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 유도체(5a-g)의 합성**

[507]

[508] 먼저, 4 M HCl-디옥산 용액(3 mL)을 상기 실시예 7에 따라 준비한 각각의 tert-부틸 4-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 유도체(**4a-g**, 100 mg, 1 eq.)의 클로로포름 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 감압 하에 유기 용매를 제거하여 화합물 **5a-g**를 수득하였다.

[509]

[510] **4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5a)**

[511] 밝은 노란색 고체(90.5%),

[512] mp 110-112℃,

[513] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.54 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 7.80 (s, 2H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.23-7.19 (m, 1H), 7.13-7.09 (m, 1H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.86 (t, J = 7.6 Hz, 2H),

[514] HR-FABMS Calcd. for $C_{17}H_{19}N_4O_2$ (M^+ + H): 311.1503, Found: 311.1505.

[515]

[516] **4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5b)**

[517] 녹색 고체(69.9%),

[518] mp 115-118℃,

[519] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.66 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 7.66-7.64 (m, 2H), 7.59-7.57 (m, 2H), 7.51-7.46 (m, 1H), 7.27 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 6.95-6.90 (m, 1H), 2.85 (dd, J = 14.8, 6.0 Hz, 2H), 2.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.85 (t, J = 7.6 Hz, 2H),

[520] HR-FABMS Calcd. for $C_{17}H_{18}FN_4O_2$ (M^+ + H): 329.1408, Found: 329.1413.

[521]

[522] **4-아미노-N-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5c)**

[523] 갈색 고체(34.8%),

[524] mp 155-158℃,

[525] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.47 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 7.68 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.04-6.98 (m, 2H), 2.83 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 2.46-2.40 (m, 2H), 1.88-1.83 (m, 2H),

[526] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{21}N_4O_2$ (M^+ + H): 325.1659, Found: 325.1659.

[527]

[528] **4-아미노-N-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5d)**

[529] 회색 고체(56.5%),

[530] mp 158-160℃,

[531] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.48 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.65 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 2.85 (dd, J = 14.8, 6.0 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.86 (t, J = 8.0 Hz, 2H),

[532] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{21}N_4O_2$ (M^+ + H): 325.1659, Found: 325.1658.

[533]

[534] **4-아미노-N-(4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5e)**

[535] 밝은 갈색 고체(43.5%),

[536] mp 126-129℃,

[537] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.46 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 7.82 (s, 2H), 7.67-7.64 (m, 2H), 7.58 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.03-7.01 (m, 1H), 2.85 (dd, J = 14.8, 6.0 Hz, 2H), 2.43-2.38 (m, 5H), 1.86 (t, J = 7.6 Hz, 2H),

[538] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{21}N_4O_2$ (M^+ + H): 325.1659, Found: 325.1661.

[539]

[540] **4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5f)**

[541] 갈색 고체(24.4%),

[542] mp 165-168℃,

[543] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.48 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.86 (s, 2H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 2.83 (s, 2H), 2.42 (s, 2H), 1.88-1.81 (m, 2H), 1.32 (s, 9H),

[544] HR-FABMS Calcd. for $C_{21}H_{27}N_4O_2$ (M^+ + H): 367.2129, Found: 367.2133.

[545]

[546] **4-아미노-N-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5g)**

[547] 미색 고체(84.7%),

[548] mp 216-219℃,

[549] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.51 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.86 (s, 2H), 7.65 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.35 (d, = 8.8 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.87-2.80 (m, 2H), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.86 (t, J = 8.0 Hz, 2H),

[550] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{21}N_4O_3$ (M^+ + H): 341.1608, Found: 325.1607.

[551]

[552] **실시예 10: 4-아미노-N-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드 유도체(5h-m)의 합성**

[553]

[554] 상기 실시예 8에 따라 수득한 각각의 tert-부틸 4-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트 유도체(**4h-m**, 1 eq.)를 이용

하여, 상기 실시예 9와 유사한 방법으로 일련의 4-아미노-N-(4-(치환된-벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 유도체(**5h-m**)를 수득하였다.

[555]

[556] **4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드 (5h)**

[557] 흰색 고체(87.7%),

[558] mp 98-100℃,

[559] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.08 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.50 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.21-7.15 (m, 1H), 7.07-7.02 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.89-2.83 (m, 2H), 2.44 (t, J = 14.4 Hz, 2H), 1.87 (t, J = 8.0 Hz, 2H),

[560] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{21}N_4O_3$ (M^+ + H): 341.1608, Found: 341.1609.

[561]

[562] **4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드 (5i)**

[563] 흰색 고체(56.4%),

[564] mp 193-195℃,

[565] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.10 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 7.50 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 8.0, 3.6 Hz, 1H), 7.21-7.15 (m, 2H), 6.91-6.85 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.85 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 2.44 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.87 (t, J = 8.0 Hz, 2H),

[566] HR-FABMS Calcd. for $C_{23}H_{28}FN_4O_5$ (M^+ + H): 459.2038, Found: 459.2041.

[567]

[568] **4-아미노-N-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드 (5j)**

[569] 자주색 고체(37.3%),

[570] mp 110-113℃,

[571] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.09 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.19-7.15 (m, 1H), 7.07 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.88-2.82 (m, 2H), 2.44 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.87 (t, J = 7.6 Hz, 2H),

[572] HR-FABMS Calcd. for $C_{18}H_{20}ClN_4O_3$ (M^+ + H): 375.1218, Found:375.1218.

[573]

[574] **4-아미노-N-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5k)**

[575] 흰색 고체(95.7%),

[576] mp 166-168℃,

[577] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.05 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.79 (s, 2H), 7.49 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 8.4,

2.4 Hz, 2H), 6.89 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.88-2.83 (m, 3H), 2.43 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.87 (t, J = 8.0 Hz, 2H),

[578] HR-FABMS Calcd. for $C_{19}H_{23}N_4O_3$ (M^+ + H): 355.1765, Found:355.1762.

[579]

[580] **4-아미노-N-(3-메톡시-4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5l)**

[581] 흰색 고체(69.2%),

[582] mp 215-217℃,

[583] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.20 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 8.01 (s, 2H), 7.89 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.24 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.19 (dd, J = 9.2, 2.0 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.83 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.88 (t, J = 7.2 Hz, 2H),

[584] HR-FABMS Calcd. for $C_{19}H_{23}N_4O_3$ (M^+ + H): 355.1765, Found: 355.1765.

[585]

[586] **4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 (5m)**

[587] 갈색 고체(24.4%),

[588] mp 165-168℃,

[589] ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 10.48 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.86 (s, 2H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 2.83 (s, 2H), 2.42 (s, 2H), 1.88-1.81 (m, 2H), 1.32 (s, 9H),

[590] HR-FABMS Calcd. for $C_{21}H_{27}N_4O_2$ (M^+ + H): 367.2129, Found: 367.2133.

[591]

[592] **실험예 1: 세포 배양**

[593]

[594] 인간 각질형성세포(keratinocytes) HaCaT 또는 알파 마우스 간 12(alpha mouse liver 12; AML-12) 세포를 Cell Lines Service GmbH(Eppelheim, Germany)로부터 획득하였다. 상기 세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, HyClone)(HaCaT cells) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, HyClone)이 추가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone)에 배양하고, 5% CO_2 함유 습식 대기 중에 37℃에서 유지하였다. AML-12 세포는 LPS 처리 1시간 전에 10 μM 농도의 화합물로 선처리하고, 이어서 LPS(100 ng/mL)로 24시간 동안 처리하였다.

[595]

[596] **실험예 2: MTT 어세이에 의한 세포 생존율 평가**

[597]

[598] MTT 어세이에 의해 세포 생존율을 측정하였다. HaCaT 세포를 96-웰 플레이트에 5.0×10^4 cells/well의 밀도로 분주하였다. 다음 날, 상기 세포를 LPS 처리 1시간 전에 표시된 농도의 화합물로 처리하였다. LPS(Sigma-Aldrich)를 6시간 동안 성장배지에 두고, 이후 세포를 성장배지로 2회 부드럽게 세척하고, 0.5 mg/mL MTT(Sigma-Aldrich)와 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 활성 미토콘드리아에 의해 형성된 포르마잔 결정(formazan crystals)을 DMSO에 용해시키고 각 웰에 대해 분광광도계로 A540을 측정하였다.

[599]

[600] **실험예 3: 동물 모델**

[601]

[602] 10주령 수컷 C57BL/6J 마우스(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)를 실험에 사용하였다. 모든 동물실험은 이화여자대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of EwhaWomans University; EWHA IACUC 19-001)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다. 상기 마우스를 온도가 조절되는(temperature-controlled) 방(20 내지 22℃ with a 12 h light:12 h dark cycle)에 보관하였다. 상기 실시예 1 내지 10에 따라 준비한 화합물들을 올리브 오일(vehicle, sigma)을 주입하여 200 μL 부피(10 mg/kg)로 희석하고, LPS 투여 1시간 전에 마우스(수컷 C57BL/6J, 8주령)에 투여하였다. LPS(1 mg/kg, 6 h)를 염수에 재현탁시켜 1 mg/kg 체중의 용량으로 복강내 주사하였다. 실험이 끝나면, 마우스를 희생시키고(Tribromoethanol, 250 mg/kg, i.p.), 추가적인 분석을 위해 간과 혈액을 수집하였다.

[603]

[604] **실험예 4: 혈액 매개변수(Blood Parameter)의 측정**

[605]

[606] 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 혈액을 수집하고, 3000 rpm으로 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 제조업자의 권고에 따라 EnzyChromTM 어세이 키트(BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 사용하여 혈장 알라닌 아미노전달효소(alanine aminotransferase; ALT) 및 아스파르테이트 아미노전달효소(aspartate transaminase; AST) 농도를 결정하였다.

[607]

[608] **실험예 5: 조직학 및 면역조직학**

[609]

[610] 먼저, 4% 파라포름알데하이드-고정된 간 조직을 표준절차에 따라 파라핀에 포매시켰다. 4-마이크론 두께의 간 조직 단편을 준비하고, 제조업자의 지시에 따라 면역조직화학적(immunohistochemical) 염색을 수행하였다. 4-마이크론 두께의 간 조직 단편을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin; H&E)으로 염색하거나 F4/80에 특이적인 항체(Abcam, Cambridge, MA, UK)를 이용하여 면역조직화학적 특성분석을 수행하였다. 모든 단계를 실온에서 수행하였으며, 각 단계 이후 조직

을 수돗물로 세척하였다. AxioCam 소프트웨어를 구비한 Zeiss 현미경(CarlZiess, Thronwood, NY, USA)을 사용하여 단편을 사진으로 찍었다.

[611]

[612] **실험예 6: 면역블로팅**

[613]

[614] 세포 및 마우스 조직 내의 단백질 수준을 면역블롯 분석으로 확인하였다. 폴리트론 균질기(Polytron Homogenizer) 또는 초음파발생장치(sonicator)를 이용하여 차가운 용해 완충액(lysis buffer, 20 mM HEPES pH 7.0, 0.15 M NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β-phosphoglycerate, 1 mM Na_3VO_4, 5 mM NaF, 1 μg/mL aprotinin, 1 μg/mL leupeptin, 100 μM PMSF)으로 세포와 조직을 용해시켰다. 상기 균질액(homogenates)을 15,000 rpm으로 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 브래드포드 어세이(Bradford assay, Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 용해물(lysates, 상층액) 중의 단백질 농도를 정량한 후, 용해물을 샘플 완충액(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.0125% bromophenol blue, 2.5% β-mercaptoethanol)과 혼합하여, 95℃에서 5분 동안 가열하였다. 샘플을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 젤 상에 로딩하고, SDS 완충액(3 g/L Tris, 14.35 g/L glycine, 1 g/L SDS)에서 전기영동으로 분리하였다. 메탄올을 함유하는 전이 완충액(transfer buffer, 3.03 g/L Tris, 14.17 g/L glycine, 20% methanol)으로 상기 단백질을 0.45 μm 기공 크기를 갖는 활성화된 폴리비닐리덴 디플루오라이드(plolyvinylidene difluoride; PVDF) 멤브레인(Millipore, Darmstadt, Germany) 상에 옮겼다. 상기 멤브레인을 5% The membrane was incubated with 5% 소혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 포함하는 트윈-20 트리스 완충 염용액(tween-20 Tris-buffered saline; TTBS)으로 로커(rocker)를 사용하여 실온에서 20분 동안 인큐베이션한 후, 항체(1:2000 dilution)와 함께 로커 상에서 밤새도록 4℃에서 인큐베이션하였다. 면역 복합체(immune complexes)를 HRP(horseradish peroxidase) 결합된(njugated)-이차 항체(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 검출하고, IQ800(GE Healthcare, Sweden)을 사용하여 화학발광 시약(Ab Frontier, Daejeon, Korea)으로 향상시켰다. 표적 단백질의 풍족도(abundance)를 면역블롯의 밀도분석(densitometric analysis)으로 정량하였다. 브래드포드 어세이(SpectraMax M2 Microplate Reader, Molecular Device) 데이터는 이화여자대학교 형광코어이미지분석센터(Fluorescence Core Imaging Center on Ewha Womans University)에서 획득하였다.

[615]

[616] **실험예 7: 정량적 실시간 PCR 분석**

[617]

[618] TRIzol 시약(Irnvitrogen)을 사용하여 조직으로부터 총 RNA(total RNA)를 분리하고, ABI PRISM 7700 시스템(PE Biosystems)으로 역전사(reverse transcription;

RT) 및 실시간(real-time) PCR 분석을 진행하였다. 데이터는 GAPDH mRNA의 양에 대해 정상화하였다. 사용한 프라이머들을 하기 **표 1**에 나타내었다.

[619] [표1]

유전자	정방향 프라이머 (forward Primer)	역방향 프라이머(reverse primer)
GAPDH	AGAACATCATCCCTGCATCC (서열번호 1)	GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG (서열번호 2)
IL-1β	TCGTGCTGTCGGACCCATAT (서열번호 3)	GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT (서열번호 4)
IL-6	ACAACCACGGCCTTCCCTACTT (서열번호 5)	CACGATTTCCCAGAGAACATGTG (서열번호 6)
TNF-α	GCCACCACGCTCTTCTG (서열번호 7)	GGTGTGGGTGAGGAGCA (서열번호 8)

[620]

[621] **실험예 8: 통계적 분석**

[622]

[623] 모든 정량적 데이터는 GraphPad Prism 소프트웨어로 분석하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었다. 대조군(control) 및 실험군(treatment groups) 간의 데이터의 통계적 유의성(statistical significance)은 일원분산분석(one-way analysis of variance; ANOVA)을 이용하여 결정한 후, 투키사후검증(Tukey posthoc test)을 이용하여 으로 이어지는 실험군 간의 차이를 결정하였다. 0.05 미만의 p 수치는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[624]

[625] **실시예 11: 시험관 내(in vitro) IL-6 및 IL-1β mRNA 발현 수준 억제**

[626]

[627] IL-6 및 IL-1β의 mRNA 발현 수준을 측정하여 13개 신규한 합성 화합물(화합물 **5a** 내지 **5m**) 및 3개 합성 중간체(화합물 **4d**, **4e**, 및 **4l**)를 스크리닝하였다. mRNA 발현 억제 효과를 평가하기 위하여 인간 각질형성세포 HaCaT 세포주를 사용하였다. 화합물 **5d, 5c, 5f, 5m**, 및 합성 중간체 **4d**가 강한 활성을 나타내었다(**표 2**). 각각의 화합물을 10 μM의 농도로 투여하였다. LPS만을 투여하여 염증을 유도했을 때 IL-6의 증가된 mRNA 발현양을 100%로 했을 때와 비교하여, 각 화합물로 전처리 후 LPS를 투여했을 때 IL-6 mRNA 발현양은 화합물 **4d**에 의해 2.4%, 화합물 **5c**에 의해서는 2.08%, 화합물 **5d**에 의해서는 3.39%, 화합물 **5f**에 의해서는 3.26%, 및 화합물 **5m**에 의해서는 4.07%로 100%에 비해 현저히 더 낮았다.

[628] [표2]

화합물	mRNA 발현 (%) (10 μM)

	IL-6	IL-1β
LPS	100.0	
4d	2.40	0.03
5c	2.08	0.79
5d	3.39	0.03
5f	3.26	2.83
5m	4.07	0.49

[629] 상기 5개 화합물에 대해 상이한 농도에서 용량-의존적(dose-response) 연구를 수행하여 IC_{50} 값(uM)을 획득하였다(**도 1 및 표 3**). 화합물 **4d**의 IC_{50}은 6.04×10^{-5}, 화합물 **5c**의 IC_{50}은 1.64, 화합물 **5d**의 IC_{50}은 3.27×10^{-2}, 화합물 **5f**의 IC_{50}은 4.44×10^{-4}, 그리고 화합물 **5m**의 IC_{50}은 1.99×10^{-4}이었다. MTT 어세이로 세포 생존율을 측정하여 상기 화합물들이 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(데이터는 개시하지 않음).

[630] [표3]

화합물	Log [M]	IC_{50} (μM)
4d	-10.22	6.04×10^{-5}
5c	-5.78	1.64
5d	-7.48	3.27×10^{-2}
5f	-9.35	4.44×10^{-4}
5m	-9.70	1.99×10^{-4}

[631] 상기 5개 화합물 중 2개 화합물(화합물 **4d** 및 **5f**)의 인간 간 간세포 AML-12 세포주(human liver hepatocytes AML-12 cells)에서 염증의 LPS-유도 신호전달에 대한 억제 효과를 확인하기 위하여, 어떠한 세포독성도 관찰되지 않는 농도 범위를 사용하여 간세포에 대한 이들 화합물의 억제 효과를 테스트하였다. STAT3 또는 NF-κB 활성에서의 변화를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅 어세이를 수행하고, 상기 2개 화합물로 처리된 AML-12 세포에서 STAT3 또는 IκB-α의 인산화가 방지됨을 확인하였으며, 10 μM 화합물로 처리한 군에서 통계적 유의성을 확인하였다. **도 2**에 나타난 바와 같이, AML-12 세포에서 pY-STAT3, p-IκBα, 및 p-NF-κB p65의 발현 수준은 화합물 **5f** 및 **4d**에 의해 현저히 하향조절되었다. 기존의 많은 연구는 LPS가 STAT3 또는 NF-κB 경로를 활성화함으로써 염증성 반응을 유도함을 나타내었으며, 이로부터 본 발명의 화합물 **4d** 및 **5f**는 STAT3/NF-κB 활성을 억제함으로써 염증을 조절함을 유추할 수 있었다.

[632]

[633] **실시예 12: 마우스에서 생체 내(in vivo) IL-6 및 IL-1β mRNA 발현 수준 억제**

[634]

[635] 생체 내 어세이를 위해 2개 화합물(화합물 **4d** 및 **5f**)을 선택하였다. 이들 화합물을 올리브 오일로 희석하여 LPS(1 mg/kg, 6 h)를 마우스에 투여하기 1시간 전에 마우스에 투여하였다. LPS는 염수에 재현탁시켜 1 mg/kg 체중의 용량으로 복강내(i.p.) 주사하였다. 실험이 끝나면, 마우스를 희생시키고, 혈액과 간을 수집하였다. 마우스에서 항염증 활성(anti-inflammatory activity)을 평가하기 위하여, IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 mRNA 발현을 측정하고, 그 결과를 **도 3**에 나타내었다.

[636]

[637] **실시예 13: 간 형태 및 대식세포 침윤(macrophage infiltration)**

[638]

[639] LPS 처리에 의해 간 조직학은 대조군에 비해 염증성 활성을 나타내었다(**도 3a**). LPS 투여의 결과로서, 간 조직 내로의 대식세포 침윤(macrophage infiltration)이 관찰되었다. 화합물 **5f** 및 **4d**를 투여했을 때, 염증성 반응은 LPS 만을 투여했을 때와 비교하여 개선되었다.

[640] LPS-유도 염증 내에 축적된 대식세포의 표현형(phenotype)을 특징짓기 위하여, 성숙 대식세포(mature macrophage)의 마커로 F4/80에 대한 항체를 이용하여 면역조직학적 연구를 수행하였다(**도 4b**). 염증 반응을 유도하기 위하여 LPS 만을 투여했을 때, 간의 대식세포 축적은 증가하였다. 그 결과로서, F4/80-양성 세포의 수의 뚜렷한 증가(marked elevation)가 있었다. 화합물 **5f** 및 **4d**를 투여했을 때, F4/80 양성 세포의 현저한 감소가 관찰되었다.

[641] 변화된 조직학적 특징에 부합되게, 혈장 알라닌 아미노전달효소(alanine aminotransferase; ALT) 및 아스파르테이트 아미노전달효소(aspartate transaminase; AST) 수준은 LPS 투여 후 증가하였고(**도 4c, 및 4d**), 화합물 **5f** 및 **4d**를 투여했을 때, ALT 및 AST 수준은 감소하였다.

[642]

[643] **<결론>**

[644] 본 발명에서는 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드 모이어티를 포함하는 13개의 신규한 화합물을 합성하고, 이들의 생물학적 활성을 평가하였다. 이중 5개 화합물(화합물 **5d**, **5c**, **5f**, **5m**, 및 합성 중간체 **4d**)은 시험관 내에서 IL-1β 및 IL-6 mRNA 발현에 대한 강한 억제 활성을 나타내었다. 나아가, 2개 화합물(화합물 **5f** 및 **4d**)은 생체 내에서 간독성(hepatotoxicity) 없이 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 mRNA 수준을 현저히 감소시켰다. 이와 같은 생체내 및 시험관 내 테스트 결과로부터, 이들 합성된 화합물이 대표적인 염증성 사이토카인의 억제에 효과적임을 확인하였다.

[645]

[646] **<토의>**

[647] 본 발명에서는 벤조옥사졸 모이어티를 갖는 신규한 화합물들을 합성하고 이들의 염증성 사이토카인의 mRNA 발현에 대한 억제효과 및 LPS 투여에 대한 생체

내 항염증 효과를 확인하였다. tert-부틸옥시카보닐(boc)-γ-부티르산 to 다양한 치환기를 갖는 벤조옥사졸 모이어티에 tert-부틸옥시카보닐(boc)-γ-부티르산을 결합시킨 후 산성 조건 하에 가수분해에 의해 boc 보호기를 제거함으로써 총 13개 화합물을 합성하였다. 상기 13개 최종 화합물 및 boc 보호기 가수분해 이전의 3개 중간체에 대한 생물학적 활성 평가를 수행하였다.

[648] 염증성 반응을 유도하기 위하여, 시험관 내 및 생체 내 테스트에 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)를 사용하였다. LPS는 그램음성 박테리아의 박테리아 세포벽(bacterial cell wall)이며, 통상 단핵구(monocytes)/대식세포(macrophages)의 강한 활성제(activator)로 인식되며, 이의 효과는 염증성 사이토카인과 같은 주요 매개체의 변화된 생산을 포함한다. LPS는 또한 피부 염증제(pro-skin inflammation agents)로 알려져 있으며, 많은 연구에서 LPS는 시험관 내 세포 피부 염증 모델을 구축하기 위한 자극으로 사용되었다.

[649] 박테리아성 LPS는 TLR 신호전달을 통해 생성되는 염증 효과의 풍족도로 인해 염증 연구에 널리 사용되고 있다. TLR은 신호전달에 관여하는 세포내 도메인 및 병원체 리간드(pathogen ligand)와 상호작용하는 세포외 도메인을 갖는 막관통수용체(transmembrane receptors)이다. 특히, TLR은 각질형성세포에서 병원체를 인식하는데 중요한 역할을 한다. 본 발명에서는 인간 각질형성세포 HaCat 세포주에서 염증을 유도하기 위해 LPS를 사용하였으며, 이와 같이 제조한 모델을 이용하여 상기 실시예에 따라 합성한 신규 화합물들의 염증성 사이토카인 발현에 대한 억제 효과를 확인하였다.

[650] 이에 본 발명자들은 실험군의 IL-6 및 IL-1β의 mRNA 발현 수준을 측정하여대조군과 비교하였다. IL-6 및 IL-1β에 대한 상기 화합물들의 억제 효과는 유사한 경향으로 나타났다. IL-6 mRNA 발현을 억제하는데 가장 효과적인 화합물들(화합물 **5c**, **5d**, **5f**, **5m**, 및 **4d**) 또한 IL-1β mRNA 발현을 억제하는데 가장 효과적이었다. 화합물 **5m**을 제외하고, 강한 활성을 갖는 화합물들은 벤젠고리의 2번 위치(R_4)에 메톡시기가 치환되지 화합물이었다. IL-6 및 IL-1β 모두에서 높은 활성을 나타내는 화합물 **5f** 및 **4d**는 벤조옥사졸의 5번 위치(R_2)에 각각 tert-부틸기와 메틸기가 치환되었다. boc 보호기를 제거하지 않은 중간체인 화합물 **4d**는 다른 중간체(화합물 **4e** 및 **4l**)에 비해 높은 항염증 활성을 나타내었다. 상기 화합물 중, R_2 위치의 치환기가 tert-부틸기일 때, R_4 위치의 메톡시기의 존재 여부와 무관하게 (화합물 **5f** 및 **5m**) 우수한 활성을 나타내었다. R_2 위치에 메틸기를 포함하는 경우, R_4 위치의 메톡시기 및 R_5 위치의 boc 보호기 존재 여부와 무관하게 전반적으로 우수한 활성을 나타내었다. R_3 위치에 메틸기가 존재하는 경우, 활성은 좋지 못하였다.

[651] 시험관 내 테스트로부터 2개 화합물을 선택하고, 마우스에 LPS를 주사하여 IL-6, IL-1β, 및 TNF-α의 발현에 대한 억제 활성을 평가하기 위한 생체 내 테스트를 수행하였다. LPS 투여 후, 심한 대식세포 침윤이 간 조직에서 관찰된 반면, 화

합물 **5f** 및 **4d**의 투여는 염증 반응을 완화시켰다. 나아가, 본 발명자들은 간 조직에서 IL-6, IL-1β, 및 TNF-α의 mRNA 수준을 확인하였다. 화합물 **5f** 및 **4d**는 IL-6, IL-1β, 및 TNF-α 발현 수준에 대한 현저한 억제 활성을 나타내었다. 또한, ALT 및 AST 수준을 측정하여 상기 화합물들의 간독성(hepatotoxicity)을 확인하고, LPS만을 투여한 대조군에 비해 상기 화합물을 투여한 군에서 더 낮은 간독성을 나타냄을 확인하였다. 본 발명자들은 생체 내 연구를 통해 상기 2개 화합물의 강한 항염증 활성을 확인하였으며, 2개 화합물 간의 유의미한 활성 차이는 나타나지 않았다.

[652] LPS-유도 염증 반응을 통해, 염증성(proinflammatory) 사이토카인 IL-6, IL-1β, 및 TNF-α는 활성화되며, 이들 사이토카인은 염증성 반응에서 중요한 역할을 하므로 이들 사이토카인을 효과적으로 조절하는 것은 중요하다.

[653] 본 발명에서는, 신규한 벤조옥사졸 유도체를 발굴하고 이들이 염증성 사이토카인 발현을 조절함으로써 항염증 활성을 나타냄을 확인하였다. 시험관 내 및 생체 내 테스트 결과로부터, 본 발명에 따라 합성된 화합물들이 IL-1β, IL-6 및 TNF-α와 같은 대표적인 염증성 사이토카인의 억제에 효과적임을 확인하였다. 따라서, 추가적인 연구를 통해 이들 화합물로부터 염증성 질환을 위한 소분자 조절자(modulators) 개발이 가능할 것이다.

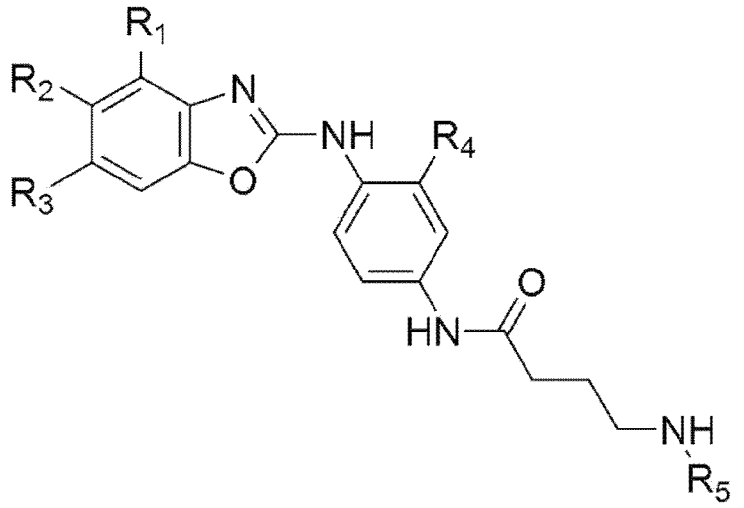
[654]

[655] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 수소, 또는 C_{1-6} 알킬;

R_2는 수소, 할로겐, C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 알콕시;

R_3은 수소, 또는 C_{1-6} 알킬;

R_4는 수소, 또는 C_{1-6} 알콕시;

R_5는 수소 또는 C_{1-6} 알콕시카보닐임.

[청구항 2] 제1항에 있어서,

R_1은 수소, 또는 메틸; R_2는 수소, 플루오로, 클로로, 메틸, tert-부틸, 또는 메톡시; R_3은 수소, 또는 메틸; R_4는 수소, 또는 메톡시; R_5는 수소 또는 tert-부톡시카보닐인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

상기 화합물은,

1. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

2. tert-부틸 (4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸)카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

3. tert-부틸 4-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-yl amino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

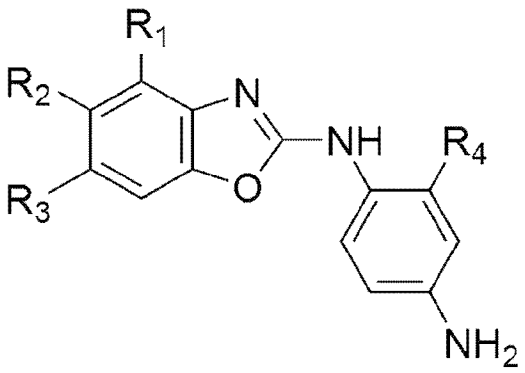
4. tert-부틸 4-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-yl amino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
5. tert-부틸 4-(4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-yl amino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
6. tert-부틸 4-(4-(5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
7. tert-부틸 4-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
8. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
9. tert-부틸 4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
10. tert-부틸 4-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
11. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
12. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(3-methoxy-4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
13. tert-부틸 4-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
14. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
15. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
16. 4-아미노-N-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
17. 4-아미노-N-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);

18. 4-아미노-N-(4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
19. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
20. 4-아미노-N-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
21. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);
22. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);
23. 4-아미노-N-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);
24. 4-아미노-N-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
25. 4-아미노-N-(3-메톡시-4-(6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(3-methoxy-4-(6-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide); 또는
26. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

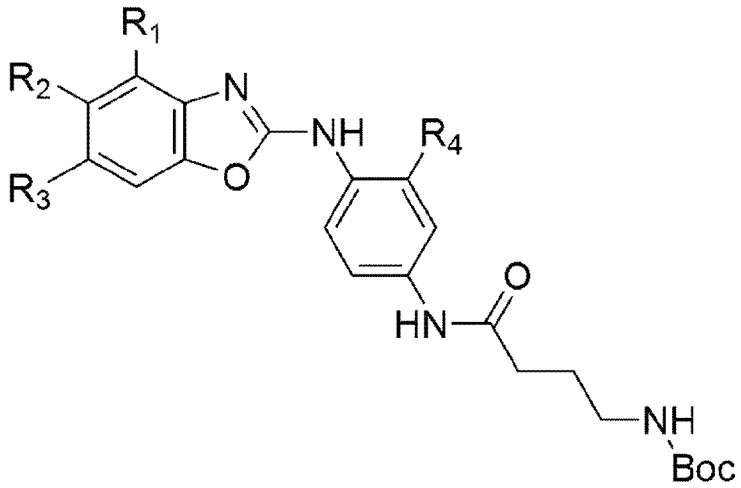
[청구항 4] 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 tert-부틸 4-아미노-4-옥소부틸카바메이트와 반응시켜 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 제1단계; 및

선택적으로 산 존재하에 가수분해하여 tert-부톡시카보닐 보호기를 제거하는 제2단계를 포함하는, 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법:

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식 2 및 3에서,

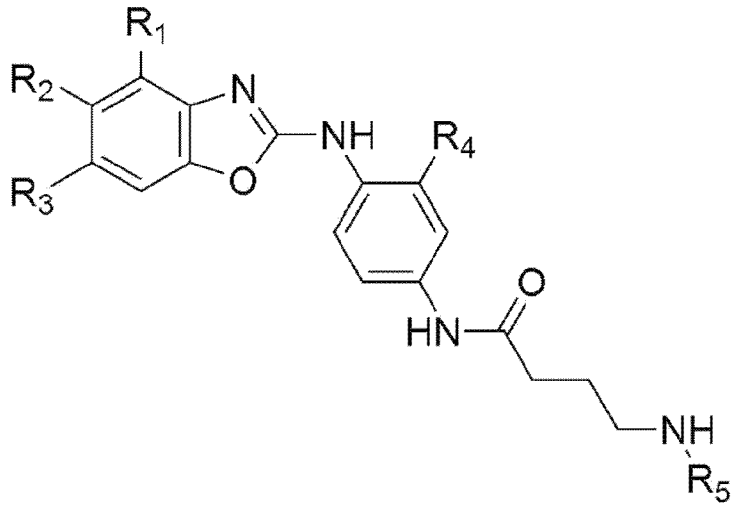
R_1 내지 R_4는 제1항에 정의된 바와 같음.

[청구항 5] 제4항에 있어서,

상기 제1단계는 펩티드결합제(peptide coupling reagent) 및 후니그 염기(Hunig's Base) 존재 하에 수행하는 것인, 제조방법.

[청구항 6] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 수소, 또는 C_{1-6} 알킬;

R_2는 수소, 할로겐, C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 알콕시;

R_3은 수소;

R_4는 수소, 또는 C_{1-6} 알콕시;

R_5는 수소 또는 C_{1-6} 알콕시카보닐임.

[청구항 7] 제6항에 있어서,

R_1은 수소, 또는 메틸; R_2는 수소, 플루오로, 클로로, 메틸, tert-부틸, 또는 메톡시; R_3은 수소; R_4는 수소, 또는 메톡시; R_5는 수소 또는 tert-부톡시카보닐인, 조성물.

[청구항 8] 제6항에 있어서,

상기 화합물은,

1. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

2. tert-부틸 (4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸)카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

3. tert-부틸 4-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-yl amino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);

4. tert-부틸 4-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-yl amino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate)

5. tert-부틸 4-(4-(5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
6. tert-부틸 4-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
7. tert-부틸 4-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
8. tert-부틸 4-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
9. tert-부틸 4-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
10. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐아미노)-4-옥소부틸-카바메이트(tert-butyl 4-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
11. tert-부틸 4-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐아미노)-4-옥소부틸카바메이트(tert-butyl 4-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenylamino)-4-oxobutylcarbamate);
12. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
13. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
14. 4-아미노-N-(4-(4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(4-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
15. 4-아미노-N-(4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
16. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
17. 4-아미노-N-(4-(5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-methoxybenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide);
18. 4-아미노-N-(4-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);
19. 4-아미노-N-(4-(5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-fluorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

20. 4-아미노-N-(4-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-3-메톡시페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);

21. 4-아미노-N-(3-메톡시-4-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(3-methoxy-4-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)phenyl)butanamide); 또는

22. 4-아미노-N-(4-(5-tert-부틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)페닐)부탄아미드(4-amino-N-(4-(5-tert-butylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-3-methoxyphenyl)butanamide);인, 조성물.

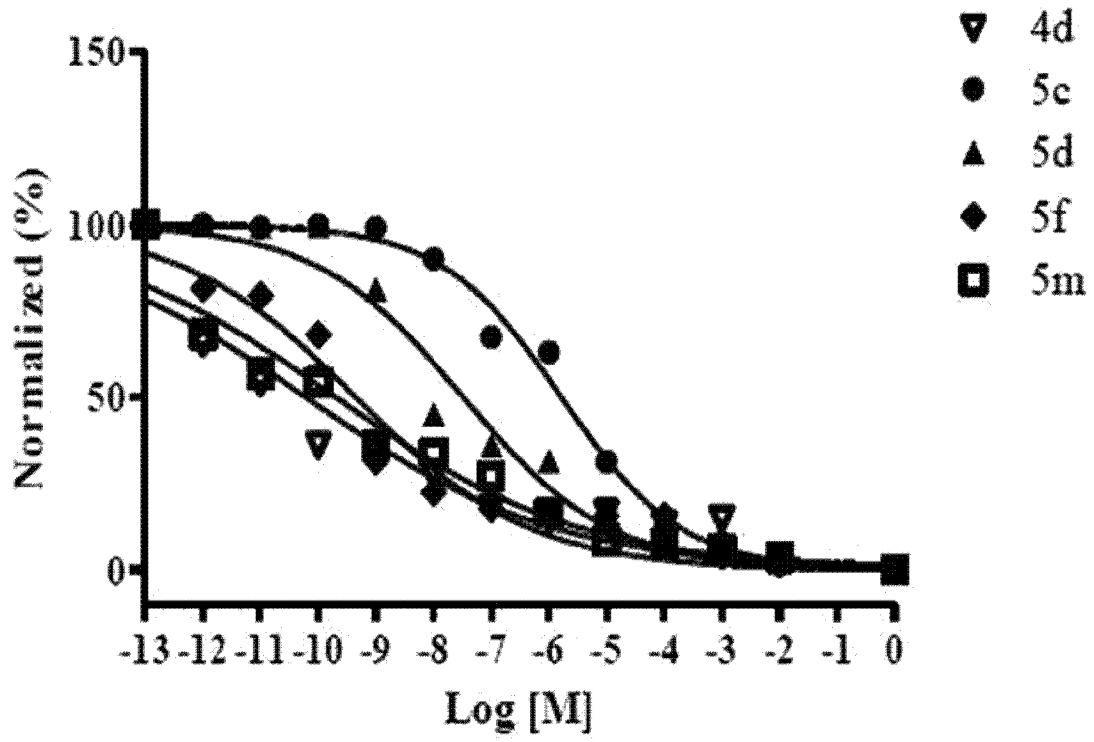
[청구항 9] 제6항에 있어서,

시험관 내 또는 생체 내 염증성 사이토카인의 mRNA 발현을 감소시킴으로써 TLR 신호전달 경로를 조절하는 것인, 조성물.

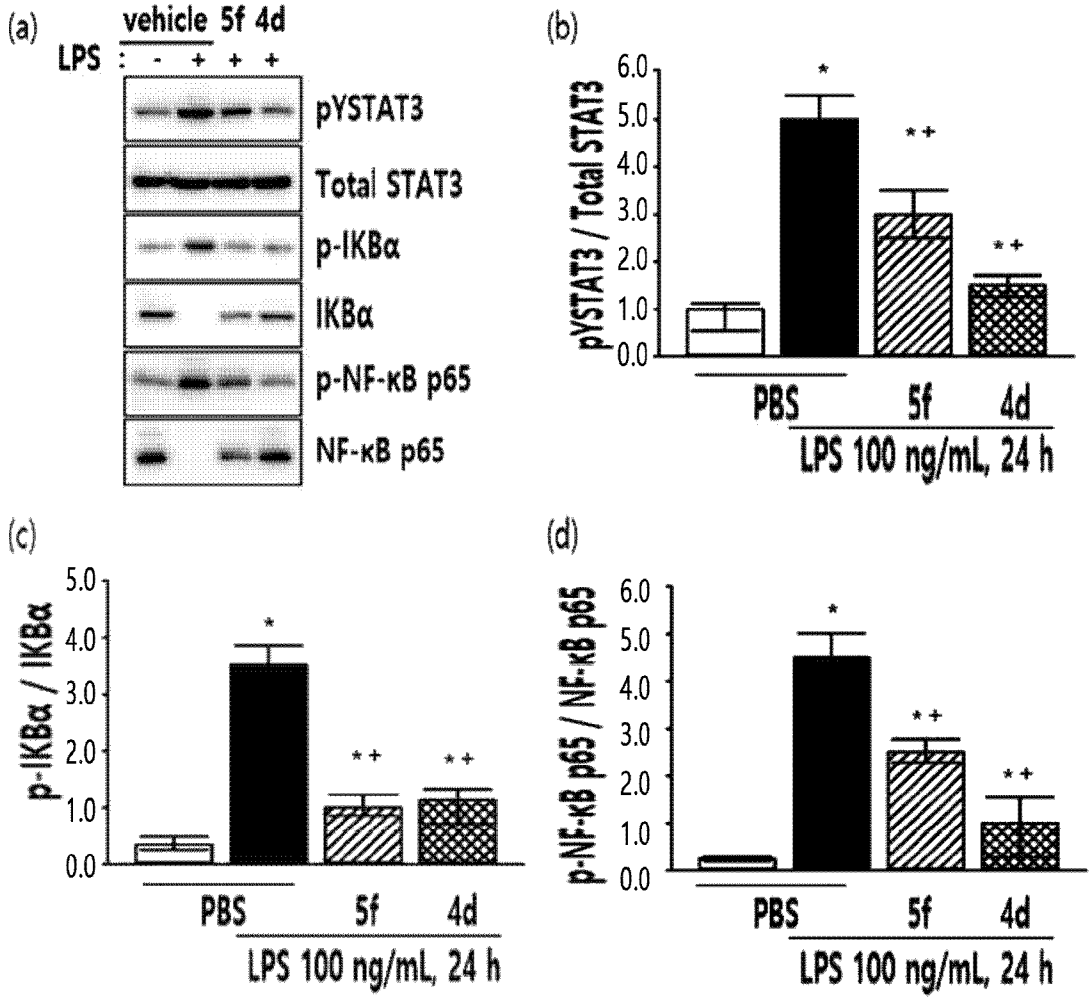
[청구항 10] 제9항에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-1β, 및 TNF-α로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

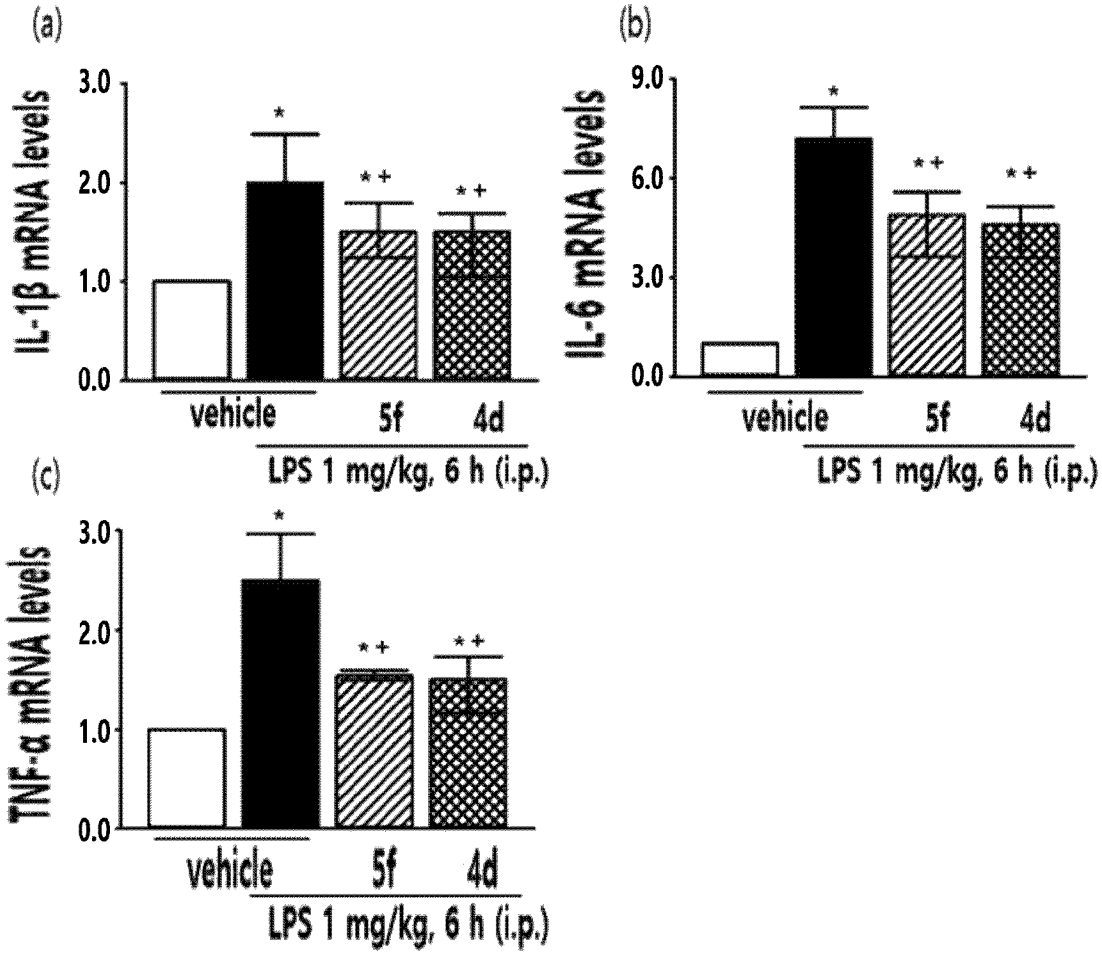
[도1]


4d
5c
5d
5f
5m
Normalized (%)
150
100
50
0
-13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0
Log [M]

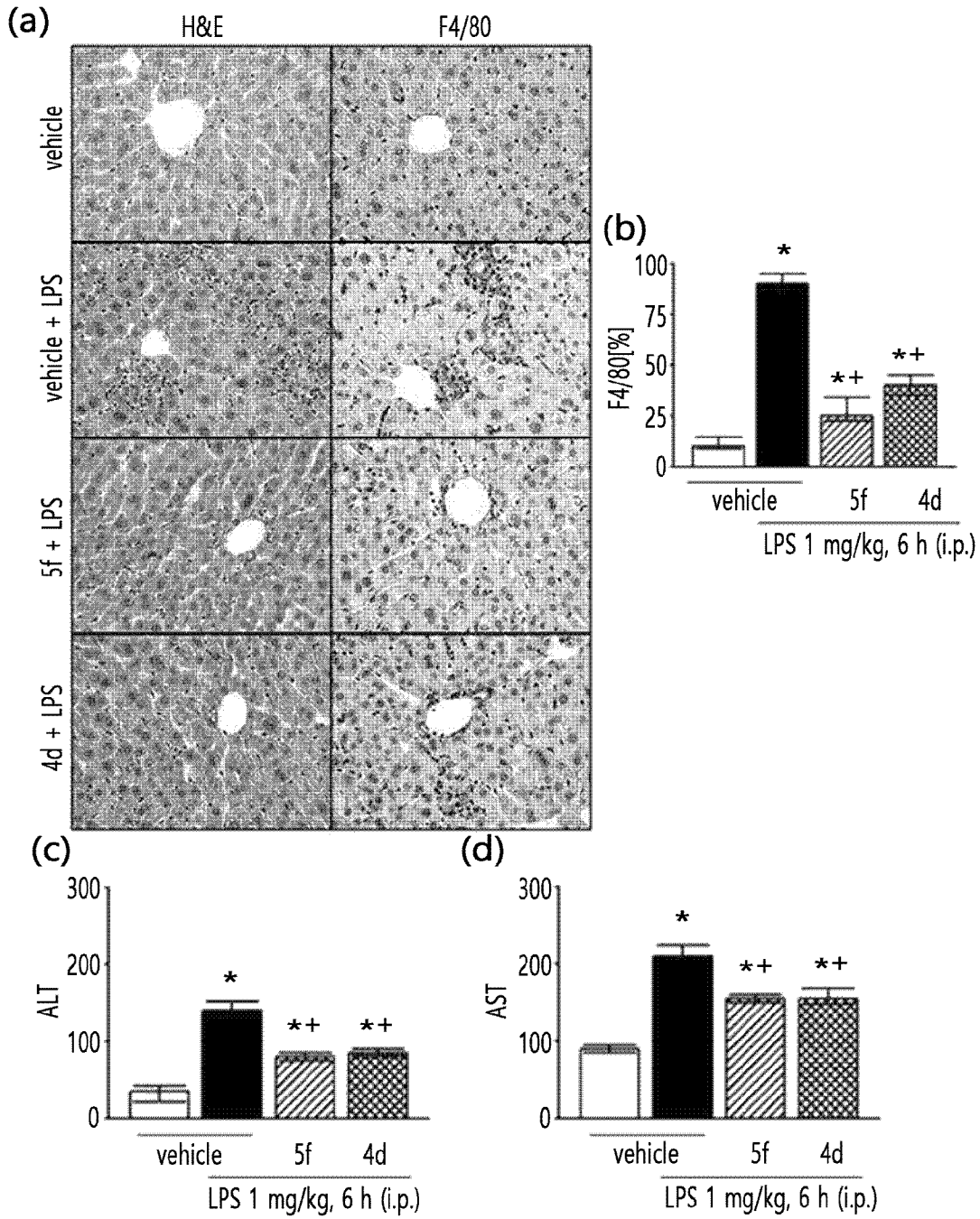
[도2]


(a)
vehicle 5f 4d
LPS : - + + +
pYSTAT3
Total STAT3
p-IKBα
IKBα
p-NF-κB p65
NF-κB p65
(b)
pYSTAT3 / Total STAT3
PBS 5f 4d
LPS 100 ng/mL, 24 h
(c)
p-IKBα / IKBα
PBS 5f 4d
LPS 100 ng/mL, 24 h
(d)
p-NF-κB p65 / NF-κB p65
PBS 5f 4d
LPS 100 ng/mL, 24 h

[도3]


(a)
IL-1β mRNA levels
3.0
2.0
1.0
0.0
vehicle
5f
4d
LPS 1 mg/kg, 6 h (i.p.)
(b)
IL-6 mRNA levels
9.0
6.0
3.0
0.0
vehicle
5f
4d
LPS 1 mg/kg, 6 h (i.p.)
(c)
TNF-α mRNA levels
3.0
2.0
1.0
0.0
vehicle
5f
4d
LPS 1 mg/kg, 6 h (i.p.)

[도4]


(a)
H&E
F4/80
vehicle
vehicle + LPS
5f + LPS
4d + LPS
(b)
F4/80[%]
100
75
50
25
0
vehicle
5f
4d
LPS 1 mg/kg, 6 h (i.p.)
(c)
ALT
300
200
100
0
vehicle
5f
4d
LPS 1 mg/kg, 6 h (i.p.)
(d)
AST
300
200
100
0
vehicle
5f
4d
LPS 1 mg/kg, 6 h (i.p.)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/003391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 263/58(2006.01)i; **A61K 31/423**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 263/58(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/423(2006.01); C07D 263/54(2006.01); C07D 263/57(2006.01); C07D 413/12(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (registry, caplus) & keywords: 4-아미노-부탄아미드(4-amino-butanamide), 벤조옥사졸 유도체(benzoxazole derivatives), 염증(inflammation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOO, J. et al. Novel benzoxazoles containing 4-amino-butanamide moiety inhibited LPS-induced inflammation by modulating IL-6 or IL-1β mRNA expression. International journal of molecular sciences. 10 May 2022, vol. 23, article no. 5331, pp. 1-21. See abstract; table 1; and formula 1. ※ This document is a document `declaring exceptions to lack of novelty` in an earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.	1-10
X	KR 10-1446301 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 06 October 2014 (2014-10-06) See paragraphs [0014]-[0017], [0021]-[0023] and [0042].	1-2,4-5
A	KR 10-2017-0024522 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 07 March 2017 (2017-03-07) See entire document.	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 June 2023	**15 June 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005-037829 A1 (MERCK PATENT GMBH) 28 April 2005 (2005-04-28) See entire document.	1-10
A	KR 10-2021-0039972 A (KLOTHO SCIENCES) 12 April 2021 (2021-04-12) See entire document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/003391

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/003391

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1446301	B1	06 October 2014	None			
KR	10-2017-0024522	A	07 March 2017	KR	10-1770310	B1	24 August 2017
WO	2005-037829	A1	28 April 2005	EP	1664039	A1	07 June 2006
				EP	1664039	B1	05 March 2014
				JP	2007-506687	A	22 March 2007
				JP	5103013	B2	19 December 2012
				US	2006-0281762	A1	14 December 2006
				US	2012-0220611	A1	30 August 2012
				US	8242128	B2	14 August 2012
KR	10-2021-0039972	A	12 April 2021	CN	114502541	A	13 May 2022
				EP	4039676	A1	10 August 2022
				JP	2023-503217	A	27 January 2023
				KR	10-2021-0056309	A	18 May 2021
				KR	10-2337399	B1	09 December 2021
				WO	2021-066608	A1	08 April 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/003391

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 263/58(2006.01)i; **A61K 31/423**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 263/58(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/423(2006.01); C07D 263/54(2006.01); C07D 263/57(2006.01); C07D 413/12(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(registry, caplus) & 키워드: 4-아미노-부탄아미드(4-amino-butanamide), 벤조옥사졸 유도체(benzoxazole derivatives), 염증(inflammation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YOO, J. 등, "Novel benzoxazoles containing 4-amino-butanamide moiety inhibited LPS-induced inflammation by modulating IL-6 or IL-1β mRNA expression", International journal of molecular sciences, 2022.05.10, 23권, 아티클번호 5331, 페이지 1-21 초록; 표 1; 도식 1 ※ 위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원에서 `공지예외주장` 된 문헌임	1-10
X	KR 10-1446301 B1 (서울대학교산학협력단 등) 2014.10.06 단락 [0014]-[0017], [0021]-[0023], [0042]	1-2,4-5
A	KR 10-2017-0024522 A (이화여자대학교 산학협력단) 2017.03.07 전문	1-10
A	WO 2005-037829 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2005.04.28 전문	1-10
A	KR 10-2021-0039972 A (주식회사 클로소사이언스) 2021.04.12 전문	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년06월15일(15.06.2023)	**2023년06월15일(15.06.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/003391

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/003391

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1446301 B1	2014/10/06	없음	
KR 10-2017-0024522 A	2017/03/07	KR 10-1770310 B1	2017/08/24
WO 2005-037829 A1	2005/04/28	EP 1664039 A1	2006/06/07
		EP 1664039 B1	2014/03/05
		JP 2007-506687 A	2007/03/22
		JP 5103013 B2	2012/12/19
		US 2006-0281762 A1	2006/12/14
		US 2012-0220611 A1	2012/08/30
		US 8242128 B2	2012/08/14
KR 10-2021-0039972 A	2021/04/12	CN 114502541 A	2022/05/13
		EP 4039676 A1	2022/08/10
		JP 2023-503217 A	2023/01/27
		KR 10-2021-0056309 A	2021/05/18
		KR 10-2337399 B1	2021/12/09
		WO 2021-066608 A1	2021/04/08