



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월13일
(11) 등록번호 10-0758317
(24) 등록일자 2007년09월06일

(51) Int. Cl.

A61K 31/5375 (2006.01) A61P 9/04

(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0039225

(22) 출원일자 2006년05월01일

심사청구일자 2006년05월01일

(56) 선행기술조사문헌

KR 1020050084739 A

(73) 특허권자

한국과학기술연구원

서울 성북구 하월곡2동 39-1

(72) 발명자

김교창

서울 서대문구 연희1동 437-21번지 302호

김유승

서울 강남구 압구정동 433 현대아파트 109-406

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수길, 주성민

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 김은희

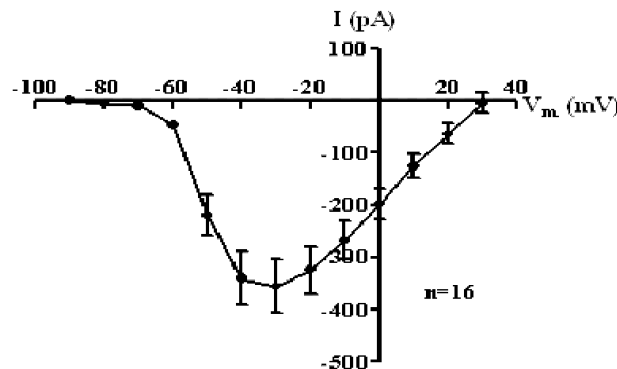
(54) 몰폴린-2-온 유도체를 포함하는 T-형 칼슘 채널 차단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신경세포내 T-형 칼슘 채널(T-type calcium channel)의 차단제로 유용한, 하기 화학식 1의 몰폴린-2-온(morpholin-2-one) 유도체를 포함하는 T-형 칼슘 채널 차단용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 세포막의 칼슘 채널을 억제하여 심근질환, 통증, 협심증, 고혈압, 간질 등과 같은 다수의 질환의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

상기 식에서, R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 명세서 중에서 정의한 바와 같다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강순방

서울 도봉구 방학1동 삼성래미안아파트1차 107-401

임혜원

서울 성북구 돈암동 616-100 한신아파트 111-1108

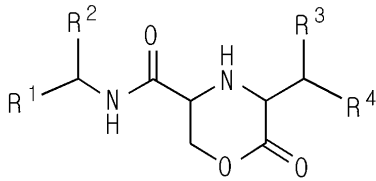
장민석

서울 광진구 광장동 극동아파트 5-202

구일희

서울 성북구 안암동5가 134-77 백송빌딩 302호

화학식 1

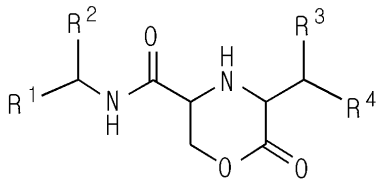


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 몰폴린-2-온(morpholin-2-one) 유도체, 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 함유하는, T-형 칼슘 채널을 억제함으로써, T-형 칼슘 채널의 과발현으로 인한 협심증, 고혈압, 심근 질환, 통증 및 간질로 이루어진 군 중에서 선택되는 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물:

화학식 1



상기 식에서,

R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 시클로알킬, 또는 비치환되거나 치환된 페닐, 여기서 치환기는 할로젠, 니트로, 하이드록시 또는 $C-C_6$ 알콕시이고,

R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_4 알킬, C_1-C_6 티오알킬, 아미노, 또는 비치환되거나 치환된 페닐, 여기서 치환기는 할로젠, 니트로, 하이드록시 또는 $C-C_6$ 알콕시이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 1의 화합물이 하기 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, T-형 칼슘 채널을 억제함으로써, T-형 칼슘 채널의 과발현으로 인한 협심증, 고혈압, 심근질환, 통증 및 간질로 이루어진 군 중에서 선택되는 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물:

3-아이소프로필-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-벤질-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-벤질-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 시클로헥실아마이드, 3-이차-부틸-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-(2-메틸설파닐-에틸)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-(4-플루오로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-(4-메톡시-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-(4-니트로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드, 3-(4-하이드록시-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드, 3-(4-니트로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드, 3-(4-플루오르-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드, 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드 및 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 몰폴린-2-은 유도체를 포함하는 T-형 칼슘 채널 차단용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 세포막의 칼슘채널을 억제하여 협심증, 고혈압, 심근질환, 통증, 간질과 같은 질환을 치료 및 예방하는데 유용한, 몰폴린-2-은 유도체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- <6> 전위활성화 칼슘채널(voltage-activated Ca^{2+} channel)은 동물의 세포막에 존재하는 막 단백질로서 전위의 탈분극(depolarization)에 의해 열리며, 이때 열린 채널을 통하여 외부의 칼슘이온이 농도 차에 의해 세포로 들어와 근육수축, 시냅스 전달, 호르몬 분비, 효소의 활성화 및 유전자 발현을 조절하게 된다.
- <7> 이와 같이 칼슘이온이 생체내에서 중요한 생리적 기능을 조절하기 때문에 특이 차단제를 이용한 칼슘채널 단백질의 생화학적 정제, 칼슘채널 유전자의 분자생물학적 클로닝, 분리된 세포에서 직접 또는 클로닝된 칼슘 채널 유전자를 다른 발현계에 발현시킨 후 칼슘채널의 전기생리학적 및 약리학적 특성 등에 관한 연구가 과거 20년간 활발히 진행되어 왔다.
- <8> 지금까지 알려진 칼슘채널의 구조는 칼슘채널의 전기생리학적 및 약리학적 기본 특성을 결정하는 $\alpha 1$ 구조체와 이의 기능을 보조하는 4개의 β , 3개의 $\alpha 2-\delta$ 등의 조합으로 구성되어있고 $\alpha 1$ 구조체는 다시 10개의 서브유닛($\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$, $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1E$, $\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$)으로 구성되어 있다. 여기서 칼슘채널은 생물리학적 성질에 근거하여 크게 3가지 형태, 즉, L-형 칼슘채널($\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$), 비(Non)-L-형 칼슘채널($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1E$) 및 T-형 칼슘채널($\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$)로 나눌 수 있다(Talley *et al.*, J. Neurosci. 1999, 19, 1895-1911).
- <9> 구체적으로, L-형 칼슘채널은 고전압-의존성 칼슘 채널(high voltage-activated Ca^{2+} channel, 이하 "HVA"라 약칭함)이라고도 하는데 전기생리학적으로 그 전류가 오래 유지되는(long-lasting) 특징을 가지고 있고 약리학적으로는 고혈압 치료제인 다이하이드로피리딘(예: 니페디핀), 벤조사이아제핀(예: 딜티아젠펜), 페닐알킬아민(예: 베타라파밀) 계열의 약물에 민감하게 차단되는 특징이 있으며 주로 동물의 골격근에 발현하여 근 수축 단백질인 액틴과 미오신의 수축작용 및 심근과 평활근의 수축작용을 유도한다.
- <10> 비(Non)-L-형 칼슘채널은 전위고정법에 의해 측정되는 전류가 오래 유지되지 않고, 다이하이드로피리딘(예: 니페디핀), 벤조사이아제핀(예: 딜티아젠펜), 페닐알킬아민(예: 베타라파밀) 계열의 약물에 차단되지 않는 특징이 있으며 주로 신경세포에 존재하는 것으로 알려져 있다.
- <11> 또한, T-형 칼슘 채널은 저전압-의존성 칼슘 채널(low voltage-activated Ca^{2+} channel, 이하 "LVA"라 약칭함)이라고도 하는데 전위고정법에 의해 전류 측정 시 휴지전위 근처에서 활성화되며 전류가 빠른 속도로 활성화되었다가 곧바로 비활성화되는 일시적(transient)인 모양을 나타낸다(Tsien *et al.*, Trends Neurosci., 1988, 11, 431-438).
- <12> 현재까지 T-형 칼슘 채널의 알려진 기능으로는 다른 칼슘채널에 비하여 활성화되는 역치가 매우 낮아 심장의 동결절과 신경세포들에서 자발적 활동전위를 일으키는 역할을 하고, 신경세포의 다발성 발화(bursting firing), 호르몬 알도스테론 분비 및 수정을 조절하는 것으로 알려져 있고 최근에는 통증의 완화작용에도 관여함이 밝혀졌다(Zhou *et al.*, J. Mol. Cell. Cardiol., 1994, 26, 1211-1219; Huguenard *et al.*, Annu. Rev. Physiol., 1996, 58, 329-348; Rossier *et al.*, Endocrinology, 1996, 137, 4817-4826; Arnoult *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93, 13004-13009; Ikeda *et al.*, Science, 2003, 299, 1237-1240).
- <13> 이러한 T-형 칼슘 채널이 유전적 또는 다양한 원인들에 의하여 과발현(over-expression)될 경우 간질, 고혈압, 심심비대, 통증, 협심증 등과 같은 질환들을 유발할 수 있다(Tsakiridou *et al.*, J. Neurosci., 1995, 15, 3110-3117; Self *et al.*, J. Vacs. Res., 1994, 31, 359-366; Nuss *et al.*, Circ. Res., 1995, 73, 7777-7825; Shin *et al.*, Science, 2003, 302, 117-119; Van Der Vring *et al.*, Am. J. Ther., 1999, 6, 229-233).
- <14> T-형 칼슘 채널에는 $\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$ 의 세 종류의 유전자가 있지만 현재까지 미베프라딜과 ZD7288(Felix *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 311, 187-192)을 제외하고 이러한 T-형 칼슘 채널을 선택적으로

억제하는 효과적인 차단제가 개발되지 않고 있다. 따라서, T-형 칼슘 채널을 선택적으로 억제하는 효과적인 차단제의 개발은 간질, 고혈압, 통증 관련 질환들에 대한 획기적인 치료제의 개발을 가져올 수 있을 것이다.

<15> 현재까지 T-형 칼슘 채널을 억제하는 대표적인 약물로는 미국의 제약회사인 호프만 라로슈(Hoffman La Roche)사의 미베프라딜(등록상표명: 포지콜(Posicor))을 예로 들 수 있다. 이 약물은 고혈압, 협심증 및 뇌졸중에 효과가 있는 물질로서 주로 고혈압 치료를 목적으로 시판되었다가 간의 CYP 3A4 효소 억제에 의한 약물-약물 상호작용에 의한 부작용으로 시장 출시 13개월만인 1999년 6월에 의약품 시장에서 자체 철수된 바 있다.

<16> 따라서, 현재 미베프라딜을 대체할 수 있는 새로운 구조의 선택적인 T-형 칼슘 채널 차단제가 절실히 요구되고 있는 실정이다.

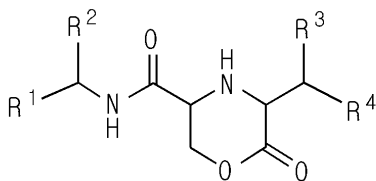
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<17> 본 발명의 목적은 미베프라딜에 상응하는 우수한 약효를 가지면서도 부작용이 없는 신규한 T-형 칼슘 채널 차단제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<18> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는, 하기 화학식 1로 표시되는 몰폴린-2-온(morpholin-2-one) 유도체, 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 T-형 칼슘 채널 차단용 조성물을 제공한다:

<19> 화학식 1



<20>

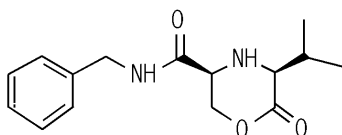
<21> 상기 식에서,

<22> R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 시클로알킬, 또는 비치환되거나 치환된 페닐, 여기서 치환기는 할로젠, 니트로, 하이드록시 또는 C_1-C_6 알콕시이고,

<23> R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_4 알킬, C_1-C_6 티오알킬, 아미노, 또는 비치환되거나 치환된 페닐, 여기서 치환기는 할로젠, 니트로, 하이드록시 또는 C_1-C_6 알콕시이다.

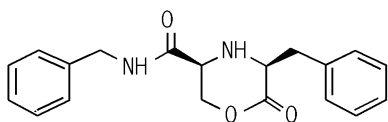
<24> 본 발명의 화학식 1의 화합물 중 바람직한 화합물은 다음과 같다.

<25> 3-아이소프로필-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01273)



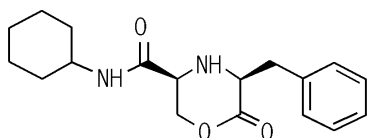
<26>

<27> 3-벤질-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01283)



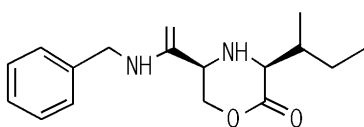
<28>

<29> 3-벤질-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 시클로헥실아마이드 (KKK01285)



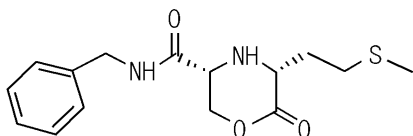
<30>

<31> 3-이차-부틸-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01296)



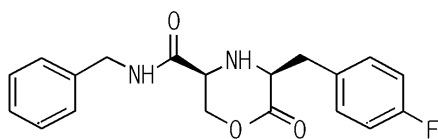
<32>

<33> 3-(2-메틸설파닐-에틸)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01300)



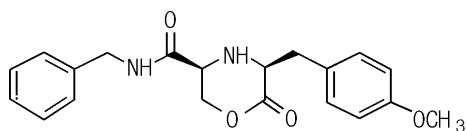
<34>

<35> 3-(4-플루오로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01391)



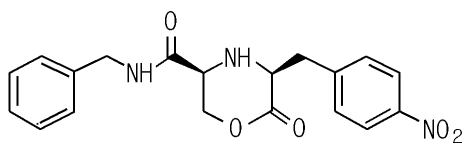
<36>

<37> 3-(4-메톡시-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01392)



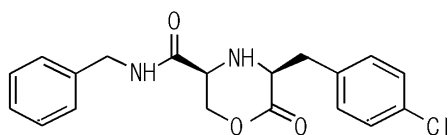
<38>

<39> 3-(4-니트로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01394)



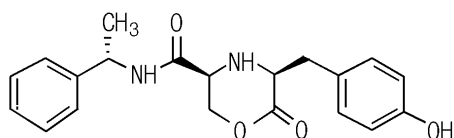
<40>

<41> 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드 (KKK01404)



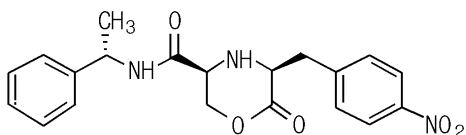
<42>

<43> 3-(4-하이드록시-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드 (KKK01406)



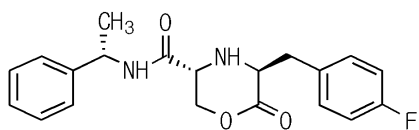
<44>

<45> 3-(4-니트로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드 (KKK01408)



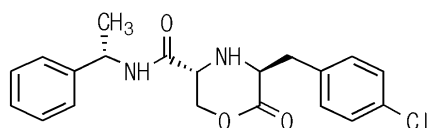
<46>

<47> 3-(4-플루오르-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드 (KKK01411)



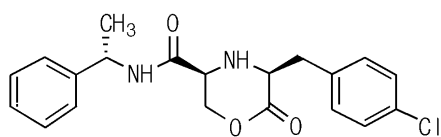
<48>

<49> 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드 (KKK01413)



<50>

<51> 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드 (KKK01414)



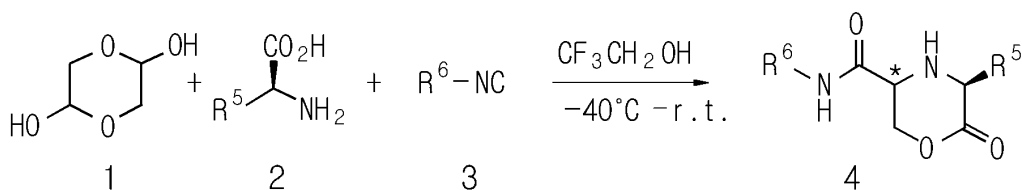
<52>

<53> 본 발명의 화학식 1의 화합물은 그 구조 내에 비대칭 탄소를 가질 수 있으므로, 개개의 거울이성질체 또는 부분 입체이성체로 존재할 수 있고, 라세미체를 포함한 이들의 혼합물로도 존재할 수 있으며, 이러한 이성체 또는 이들의 혼합물 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

<54> 화학식 1의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염에는 산부가염이 포함된다. 약제학적으로 허용가능한 산부가염을 이루는 산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산, 아세트산, 벤조산, 설폰산, 푸마르산, 말레인산, 시트르산, 락트산, 타르트르산, 옥살산 또는 유사한 약제학적으로 허용가능한 유기산 및 무기산 등을 포함한다.

<55> 본 발명의 화학식 1의 몰폴린-2-온 유도체는 공지된 방법, 예를 들면 하기 반응식 1로 표시되는 합성경로에 따라 제조할 수 있다.

반응식 1



<56>

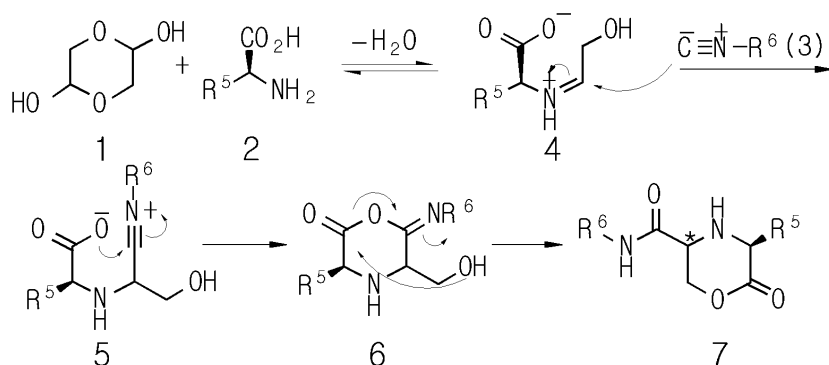
<57> 상기 식에서, R^5 는 $-\text{CH}(R^3)(R^4)$ 이고, R^6 는 $-\text{CH}(R^1)(R^2)$ 이며, 여기서, R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 상기 정의한 바와 같다.

<58> 즉, 상기 반응식 1에서와 같이, 한 분자내에 두개의 기능기(알데히드기 및 알콜기)를 함유하는 글라이콜 알데하이드 다이머 화합물(1)을 출발물질로 하여 알파-아미노산(2)과 아이소시아나이드(3)를 한 단계에서 반응시켜 헤테로 화합물인 본 발명의 몰폴린-2-온 유도체(4)를 합성할 수 있다.

<59> 상기 기재한 바와 같은 다성분 반응(Multi-component reactions, MCRs)은 다양한 축합 시약들을 한 단계에서 연속적으로 반응시켜 다양한 소분자들의 라이브러리를 유용하게 구축할 수 있을 뿐만 아니라 컴비캄에서 요구되는 분자 다양성을 완성할 수 있는 강력한 합성법 중에 하나이다. 이중 Ugi-4-성분반응(Ugi four-component reaction, U-4CR)은 카복시산, 아민, 카보닐, 아이소시아나이드의 4가지 화합물을 이용하여 한 단계의 반응으로 알파-아미노 아마이드 화합물을 합성하는 유용한 반응이다(Alexander Domling, Ivar Ugi, Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39, 3168-3210).

<60> 상기 반응식 1의 구체적인 메커니즘을 설명하면 하기 반응식 2에 나타난 바와 같다.

반응식 2



<61>

<62> 상기 식에서, R^5 및 R^6 는 상기 정의한 바와 같다.

<63> 구체적으로는, 반응식 2에 나타난 바와 같이, 우선 이소시아나이드 화합물(3)이, 화합물 (1)과 (2)로부터 형성된 이민 화합물(4)을 공격해서 중간체 화합물(5)를 형성하고 이 중간체의 카복실레이트기가 동일 분자 내에 있는 니트리늄 탄소를 공격하여 화합물 (6)을 형성하고 이어서 화합물 (6)의 하이드록시가 동일 분자내의 카복실레이트 탄소를 공격해서 최종 화합물 (7)이 형성되는 것으로 알려져 있다. 반응용매로는 일반적인 Ugi 반응에서 많이 사용하는 메탄올을 사용할 경우 메탄올 분자가 중간체를 공격하여 형성되는 부산물이 대량 생성되므로, 생성물의 순도와 수율 면을 고려하여 2,2,2-트리플루오로에탄올을 사용하는 것이 바람직하다(Youseung Kim *et al.*, Org. Lett. 2001, vol. 3, No. 26, 4149-4152).

<64> 상기 방법으로 얻어진 화학식 1의 화합물로부터 당분야에 공지된 방법들을 이용하여 약제학적으로 허용가능한 그의 염, 수화물, 용매화물, 이성체 등을 제조할 수 있다.

<65> 본 발명에 따른 화학식 1의 몰폴린-2-온 유도체 또는 이의 염은 세포막의 칼슘 채널을 억제하는 활성을 나타낸다.

<66> 따라서, 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 조성물은 세포막의 칼슘 채널을 억제하여 협심증, 고혈압, 심근질환, 통증, 간질 등과 같은 다수의 질환을 치료하는데 유리하게 사용될 수 있다.

<67> 본 발명에 따른 몰폴린-2-온 유도체 화합물 및 이의 염은 각종 투여수단에 적합한 조제로서 투여할 수 있다. 투여 유형은 치료할 환자의 증상 등에 따라 폭넓게 변할 수 있다.

<68> 유효 성분으로서 본 발명의 몰폴린-2-온 유도체 및 이의 염은 일반적으로 성인에 대해 2 $\mu\text{g/kg}$ (체중) 내지 60 mg/kg(체중) 범위의 양으로 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

<69> 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 화합물 또는 이의 염, 임의의 가능한 담체 및 부형제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물이 경구제형의 형태로 제조되는 경우, 사용되는 담체 및 부형제의 예로는 셀룰로오스, 규산칼슘, 옥수수전분, 락토오스, 수크로스, 텍스트로스, 인산칼슘 및 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산칼슘, 젤라틴, 탈크, 계면활성제, 현탁제, 유화제, 희석제 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물이 주사제의 형태로 제조되는 경우 사용되는 담체로는 물, 식염수, 포도당 수용액, 유사 당수용액, 알코올, 글리콜, 에테르(예, 폴리에틸렌글리콜 400), 오일, 지방산, 지방산에스테르, 글리세리드 또는 계면활성제, 현탁제, 유화제 등을 예로 들 수 있다.

<70> 본 발명의 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 제제화할 수 있으며, 정제, 환제, 산제, 캡셀제, 시럽, 에멀전, 마이크로에멀전 등의 다양한 경구 투여 형태 또는 근육내, 정맥내 또는 피하투여와 같은 비경구 투여 형태로 제조될 수 있다.

<71> 이하 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

- <72> 실시예 1: 3-아이소프로필-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1273)의 제조
- <73> 무수 조건에서 25 ml 플라스크 내부를 질소 가스로 채운 다음, L-발린 (117.1 mg, 1.0 mmol) 및 2,2,2-트라이플루오로에탄올 (10.0 ml)을 차례로 넣고 -40 °C로 온도를 낮춘 다음 격렬하게 교반시켰다. 또한, 무수 조건에서 또 다른 10 ml 플라스크에 질소 가스를 채운 후 글라이콜알데하이드 다이머 (60.05 mg, 0.5 mmol)를 넣고 2,2,2-트라이플루오로에탄올 (4.0 ml)을 넣었다. 여기에 벤질아이소시아나이드 (134.0 μ l, 1.1 mmol)를 첨가한 후 혼합하여 얻어진 용액을 상기 L-발린이 들어있는 플라스크에 천천히 적가하였다. 이어서, 얻어진 혼합물을 -40 °C에서 3시간 동안 교반하고 서서히 상온으로 올려 24시간 동안 추가로 교반한 다음, 용매를 감압 하에서 제거하고 물 (10.0 ml)과 에틸아세테이트 (20.0 ml)를 넣은 후, 에틸아세테이트 (20.0 ml)로 3회 추출하고 모아진 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거하였다. 얻은 잔사를 컬럼크로마토그래피(실리카-겔, 에틸아세테이트:헥산 = 2:1)로 정제하여 표제 화합물 (154.7 mg, 수율: 56%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 2.9:1)을 수득하였다.
- <74> $[\alpha]_D^{28} = -48.21$ (c 0.0014, CHCl₃)
- <75> FT-IR (neat): 3468, 3365, 2959, 1743, 1464, 1374, 1243, 1048 cm⁻¹
- <76> ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.59 (br.s, 1H), 7.36-7.23 (m, 5H), 4.59 (ddd, 2H, $J = 16.5, 11.5, 5.5$ Hz), 4.45 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.85 (t, 1H, $J = 4.5$ Hz), 3.53 (d, 1H $J = 4.5$ Hz), 2.29-2.22 (m, 1H), 2.12 (br.s, 1H), 1.02 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 0.97 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz)
- <77> ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.3, 170.1, 137.6, 128.8, 127.6, 127.5, 67.8, 59.6, 54.1, 43.3, 29.9, 19.1, 17.5
- <78> MS (EI) m/e (rel intensity): 276 (M⁺, 2), 142 (32), 114 (34), 91 (100)
- <79> HRMS calcd for C₁₅H₂₀N₂O₃ (M⁺) 276.1474, found 276.1476
- <80> 실시예 2: 3-벤질-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1283)의 제조
- <81> L-페닐알라닌 (0.6457 g, 3.91 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (0.2347 g, 1.955 mmol) 및 벤질아이소시아나이드 (0.5266 g, 4.496 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (1.0778 g, 수율: 85%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 1.5:1)을 수득하였다.
- <82> FT-IR (KBr): 3334, 3028, 2924, 1752, 1669, 1521, 1152 cm⁻¹
- <83> ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.57 (br.s, 1H), 7.35-7.16 (m, 10H), 4.63-4.61 (m, 1H), 4.50-4.47 (m, 1H), 4.38-4.35 (m, 2H), 3.94-3.93 (m, 1H), 3.70 (br.s, 1H), 3.28 (dd, 1H, $J = 14.0, 3.0$ Hz), 2.90 (dd, 1H, $J = 14.0, 8.0$ Hz), 2.17 (br.s, 1H)
- <84> ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.8, 170.3, 137.7, 136.5, 129.3, 128.7, 128.6, 127.4, 127.2, 127.1, 67.7, 54.6, 54.0, 43.1, 37.7
- <85> MS (EI) m/e (rel intensity): 233 (14), 190 (10), 162 (10), 105 (19), 91 (100)
- <86> HRMS calcd for C₁₂H₁₃N₂O₃ (M-PhCH₂)⁺ 233.0926, found 233.0953
- <87> 실시예 3: 3-벤질-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 시클로헥실아마이드(KKK1285)의 제조
- <88> L-페닐알라닌 (1.3903 g, 8.4164 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (0.5054 g, 4.2082 mmol) 및 벤질아이소시아나이드 (1.2034 ml, 9.6789 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (1.4565 g, 수율: 53%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 5.4:1)을 수득하였다.
- <89> $[\alpha]_D^{26} = -31.07$ (c 0.0014, CHCl₃)

- <90> FT-IR (KBr): 3319, 3028, 2856, 1750, 1660, 1521, 1156 cm^{-1}
- <91> $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.35-7.25 (m, 5H), 7.11 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 4.52 (ddd, 2H, $J = 42.0, 12.0, 4.0$ Hz), 3.94 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.71-3.66 (m, 2H), 3.32 (dd, 1H, $J = 14.5, 4.0$ Hz), 2.92 (dd, 1H, $J = 14.5, 9.0$ Hz), 2.10 (br.s, 1H), 1.81-1.78 (m, 2H), 1.68-1.64 (m, 2H), 1.60-1.57 (m, 1H), 1.38-1.30 (m, 2H), 1.22-1.14 (m, 1H), 1.14-1.04 (m, 2H)
- <92> $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.7, 169.0, 136.6, 129.4, 128.8, 127.1, 68.0, 54.8, 54.0, 47.8, 38.0, 32.7, 32.6, 25.3, 24.5
- <93> MS (EI) m/e (rel intensity): 316 (M^+ , 6), 225 (54), 190 (50), 162 (46), 105 (46), 91 (100), 56 (84)
- <94> HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ (M^+) 316.1787, found 316.1848
- <95> 실시예 4: 3-이차-부틸-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1296)의 제조
- <96> L-루이신 (0.8860 g, 6.7544 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (0.4056 g, 3.3772 mmol) 및 벤질아이스오시아나이드 (0.9460 ml, 7.7676 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (1.3063 g, 수율: 67%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 5.3:1)을 수득하였다.
- <97> $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -50.08$ (c 0.0066, CHCl_3)
- <98> FT-IR (neat): 3397, 2963, 1750, 1665, 1524 cm^{-1}
- <99> $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45 (br.s, 1H), 7.27-7.15 (m, 5H), 4.49 (ddd, 2H, $J = 23.0, 11.5, 5.0$ Hz), 4.36 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.75 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.48 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz), 2.00 (br.s, 1H), 1.88-1.82 (m, 1H), 1.47-1.39 (m, 1H), 1.19-1.10 (m, 1H), 0.91 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 0.79 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz)
- <100> $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.2, 169.9, 137.6, 128.8, 127.6, 127.5, 68.0, 59.6, 54.2, 36.9, 25.1, 15.6, 11.8
- <101> MS (EI) m/e (rel intensity): 290 (M^+ , 5), 156 (100), 128 (39), 112 (53), 91 (74)
- <102> HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 313.1528, found 313.1527
- <103> 실시예 5: 3-(2-메틸설파닐-에틸)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1300)의 제조
- <104> D-메티오닌 (100.0 mg, 0.6702 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (40.2 mg, 0.3351 mmol) 및 벤질아이스오시아나이드 (90.0 μl , 0.7372 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (82.7 mg, 수율: 44%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 1.6:1)을 수득하였다.
- <105> FT-IR (neat) 3332, 2929, 1755, 1666, 1523 cm^{-1}
- <106> $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.63 (br.s, 1H), 7.27-7.13 (m, 5H), 4.57 (ddd, 2H, $J = 60.5, 12.0, 4.5$ Hz), 4.37 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 3.82 (dd, 1H, $J = 6.5, 5.0$ Hz), 3.79 (dd, 1H, $J = 4.5, 4.5$ Hz), 2.56 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 2.39 (br.s, 1H), 2.19-2.12 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.87-1.81 (m, 1H)
- <107> $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 171.0, 170.2, 137.6, 128.7, 127.6, 127.5, 68.0, 54.2, 52.7, 43.3, 30.5, 30.2, 15.3
- <108> MS (EI) m/e (rel intensity): 308 (M^+ , 60), 217 (34), 174 (100), 126 (39), 91 (50), 61 (98)
- <109> 실시예 6: 3-(4-플루오로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1391)의 제조

- <110> L-4-플루오르 페닐알라닌 (25.0 mg, 0.1365 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (8.2 mg, 0.0683 mmol) 및 벤질 아이소시아나이드 (18.3 μ l, 0.1503 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (41.1 mg, 수율: 94%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 3.9:1)을 수득하였다.
- <111> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.43-7.15 (m, 8H), 6.97-6.91 (m, 3H), 4.72-4.67 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 4.57-4.52 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 4.40-4.38 (m, 3H), 3.96-3.92 (q, 1H), 3.80-3.78 (m, 1H,), 3.27-3.21 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 2.98-2.89 (m, 1H)
- <112> $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 169.9, 137.6, 131.1, 130.9, 128.8, 127.6, 127.4, 115.8, 115.6, 67.8, 54.7, 54.1, 43.3, 36.9
- <113> 실시예 7: 3-(4-메톡시-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1392)의 제조
- <114> L-4-메톡시 페닐알라닌 (50.0 mg, 0.2561 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (15.4 mg, 0.1280 mmol) 및 벤질 아이소시아나이드 (34.3 μ l, 0.2816 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (64.5 mg, 수율: 71%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 3.2:1)을 수득하였다.
- <115> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.51 (br.s, 1H), 7.37-7.10 (m, 8H), 6.82-6.77 (br.s, 2H), 4.68-4.63 (dd, 1H, J = 6.0, 3.0 Hz), 4.55-4.50 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 4.41-4.34 (m, 2H), 3.93-3.89 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.69-3.67 (m, 1H), 3.25-3.19 (dd, 1H, J = 6.0, 3.0 Hz), 2.91-2.83 (q, 1H)
- <116> 실시예 8: 3-(4-니트로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1394)의 제조
- <117> L-4-니트로 페닐알라닌 (50.0 mg, 0.2378 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (14.3 mg, 0.1189 mmol) 및 벤질 아이소시아나이드 (32.0 μ l, 0.2616 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (31.0 mg, 수율: 35%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비= 2.9:1)을 수득하였다.
- <118> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.06 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.40-7.26 (m, 8H), 7.14-6.98 (m, 3H), 4.76-4.54 (dq, 2H, J = 3.69Hz), 4.43-4.28 (m, 3H), 4.15-4.03 (m, 2H), 3.82 (br.s, 1H), 3.36-3.06 (m, 2H)
- <119> $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 169.9, 169.7, 147.1, 144.2, 137.3, 130.6, 128.8, 127.7, 127.3, 123.8, 67.9, 54.5, 54.1, 43.3, 37.6
- <120> 실시예 9: 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 벤질아마이드(KKK1404)의 제조
- <121> L-4-클로로 페닐알라닌 (117.0 mg, 0.5861 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (35.2 mg, 0.2930 mmol) 및 벤질 아이소시아나이드 (85.6 μ l, 0.7033 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (155.6 mg, 수율: 74%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의비 = 2.5:1)을 수득하였다.
- <122> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.39-7.13 (m, 10H), 4.68-4.67 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 4.57-4.52 (dd, 1H, J = 3.0, 6.0 Hz), 4.40-4.38 (m, 2H), 3.97-3.93 (m, 1H), 3.79 (br.s, 1H), 3.27-3.21 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 2.97-2.92 (q, 1H)
- <123> $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 169.9, 137.6, 134.9, 133.2, 130.8, 129.0, 128.8, 127.6, 127.4, 67.9, 54.6, 54.1, 43.3, 37.2
- <124> 실시예 10: 3-(4-하이드록시-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드(KKK1406)의 제조
- <125> L-타이로신 (100.0 mg, 0.5519 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (33.2 mg, 0.2760 mmol) 및 (S)-알파-메틸 벤질아이소시아나이드 (85.5 μ l, 0.6072 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (91.7 mg, 수율: 47%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의비 = 4.6:1)을 수득하였다.
- <126> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.57-7.55 (br.m, 1H), 7.36-7.22 (m, 6H), 7.09-7.07 (br.m, 2H), 6.77-6.74 (br.m, 2H), 5.10-4.97 (quintet, 1H), 4.60-4.55 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 4.49-4.43 (dd, 1H, J = 6.0, 6.0 Hz), 3.89-3.82 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.23-3.17 (dd, 1H, J = 3.0, 3.0 Hz), 2.91-2.84 (q, 1H), 1.42

(d, 3H, $J = 9.0$ Hz)

<127> ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 171.3, 170.1, 155.8, 143.1, 131.0, 129.2, 128.2, 128.0, 126.4, 116.2, 68.3, 55.2, 54.5, 49.3, 37.5, 22.3

<128> 실시예 11: 3-(4-니트로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드(KKK1408)의 제조

<129> L-4-니트로 페닐알라닌 (100.0 mg, 0.4756 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (28.6 mg, 0.2378 mmol) 및 (S)-알파-메틸 벤질아이소시아나이드 (73.7 μl , 0.5232 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (54.0 mg, 수율: 85%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 5.9:1)을 수득하였다.

<130> ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.16-8.09 (br.d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 7.46-7.37 (m, 2H), 7.37-7.20 (m, 8H), 5.06-5.01 (quintet, 2H), 4.70-4.53 (m, 2H), 4.07-4.05 (m, 1H), 3.80 (br.s, 1H), 3.41-3.37 (m, 1H), 3.18-3.11 (m, 1H), 1.41 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz)

<131> 실시예 12: 3-(4-플루오로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산(1-페닐-에틸)-아마이드(KKK1411)의 제조

<132> L-4-플루오로 페닐알라닌 (33.0 mg, 0.1802 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (10.8 mg, 0.0901 mmol) 및 (S)-알파-메틸 벤질아이소시아나이드 (26.8 μl , 0.1982 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (21.0 mg, 수율: 32%, 주생성물:부생성물 부분이성질체의 비 = 3.5:1)을 수득하였다.

<133> ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.37-7.18 (m, 9H), 7.02-6.96 (m, 2H), 5.04 (quintet, 1H), 4.66-4.49 (dq, 2H, $J = 4.1\text{Hz}$), 3.93 (q, 1H), 3.70 (br.s, 1H), 3.30-3.24 (m, 1H), 3.00-2.93 (m, 1H), 1.42 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz)

<134> ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 168.9, 142.6, 132.1, 131.1, 128.7, 127.5, 126.0, 115.9, 115.6, 68.0, 54.8, 54.1, 48.6, 37.1, 21.7

<135> 실시예 13: 3-(4-클로로-벤질)-2-옥소-몰폴린-5-카복시산 (1-페닐-에틸)-아마이드(KKK1413, KKK1414)의 제조

<136> L-4-클로로 페닐알라닌 (31.3 mg, 0.1568 mmol), 글라이콜알데하이드 다이머 (9.4 mg, 0.0784 mmol) 및 (S)-알파-메틸 벤질아이소시아나이드(23.3 μl , 0.1725 mmol)를 사용하여 실시예 1과 유사한 공정을 수행하여 표제 화합물 (19.7 mg, 수율: 34%, 주생성물(KKK1413) : 부생성물(KKK1414) 부분이성질체의 비 = 4.2 : 1)을 수득하였다.

<137> ^1H -NMR (KKK1413, 300 MHz, CDCl_3): δ 7.35-7.14 (m, 8H), 6.99-6.96 (m, 2H), 4.96 (quintet, 1H), 4.76-4.69 (q, 1H), 4.08 (t, 1H, $J = 12.0$ Hz), 3.84 (m, 1H), 3.42 (br.t, 1H), 3.34-3.28 (m, 1H), 2.73-2.65 (m, 1H), 1.25 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz)

<138> ^{13}C -NMR (KKK1413, 125 MHz, CDCl_3): δ 172.2, 168.5, 142.8, 135.8, 132.9, 130.5, 128.77, 128.75, 127.4, 125.7, 66.1, 53.9, 52.9, 48.1, 35.3, 21.8

<139> ^1H -NMR (KKK1414, 300 MHz, CDCl_3): δ 7.35-7.17 (m, 1H), 5.03 (quintet, 1H), 4.67-4.49 (dq, 2H, $J = 4.1$ Hz), 3.94 (q, 1H), 3.69 (t, 1H, $J = 4.0$ Hz), 3.28-3.22 (m, 1H), 3.01-2.94 (m, 1H), 1.41 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz)

<140> ^{13}C -NMR (KKK1414, 125 MHz, CDCl_3): δ 170.3, 168.9, 142.6, 134.9, 133.2, 130.9, 129.0, 128.7, 127.5, 126.0, 67.9, 54.7, 54.1, 48.6, 37.3, 21.6

<141> 생리 활성 검색

<142> 본 발명에서는 T-형 칼슘 채널의 효과적인 차단제의 개발을 위해서 제조된 화합물에 대하여 1차 검색 방법으로 T-형 칼슘 채널 중 $\alpha 1\text{H}$ 를 발현시킨 개구리 미수정란을 이용하여 채널 억제효과를 검색하였다. T-형 칼슘 채널 유전자 중 신경세포에 주로 존재하는 $\alpha 1\text{G}$ 만을 선택적으로 발현시킨 포유동물 HEK 293 세포주 (인간 신장 암종 세포로부터 유래한, 미국 버지니아주 소재의 유니버시티 오브 버지니아의 에드워드 페레즈-레이에스 교수에 의

해 확립된 세포주)를 이용하여 본 발명에서 합성된, 1차 검색에서 50% 이상의 억제 효과를 보이는 T-형 칼슘 채널 차단제 후보물질들을 문헌 [Rhim *et al.*, Biochemical and Biophysical Research communication, 2004, 324, 401-408]에 기재된 바와 같은 전기생리학적 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 T-형 칼슘 채널의 활성화에 대하여 검색하고 그 중 효능이 있다고 판단되는 후보물질들에 대하여 N-형 칼슘채널 억제효과를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 화합물은 우수한 칼슘 채널 억제 효과를 보이는 것으로 밝혀졌다.

<143> 시험예 1-1: 개구리 미수정란 (*Xenopus oocytes*)의 준비 및 $\alpha 1H$ T-형 칼슘 통로의 cRNA 합성

<144> T-형 칼슘 채널 $\alpha 1H$ ($Ca_v 3.2$) 유전자를 개구리 미수정란에 발현시키기 위하여, 상기 채널 cRNA (AF051946)가 삽입되어 있는 5' 말단을 제한 효소 AflII로 자른 후, T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 상응하는 cRNA를 암비온 (Ambion) 회사의 실험서에 따라 합성하였다(mMESSAGE mMACHINE 키트, Ambion, Austin, USA). 합성된 cRNA는 분광광도계로 O.D.값을 측정하여 정량하였다. 이때 미수정란은 제노퍼스 래비스(*Xenopus laevis*, Xenopus I, USA)의 암컷으로부터 다음의 방법에 따라 준비하였다. 개구리의 배를 1 cm 정도 절개하여 3-4개의 옆(lobes)을 가위로 잘라낸 후 몇 개의 알이 붙어있는 작은 덩어리로 분리하였다. 이들을 콜라게나제 타입 IAj (Sigma, USA)가 담긴 OR 용액 (82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7.6)에서 가수분해하여 난포를 제거하였다(defolliculation). 건강한 알만 해부현미경 하에서 골라낸 후 이들을 SOS 용액(100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 2.5 mM 피루베이트, 50 $\mu M/ml$ 겐타마이신, pH 7.6)에서 3-4시간 동안 회복시켰다. 나노주입기(nano-injector)를 사용하여 2-5 ng의 cRNA를 각 미수정란에 주입한 후 18 $^{\circ}C$ 로 유지시키며, 4-5일 후부터 발현된 채널의 전기적 특성을 연구하였다.

<145> 시험예 1-2: 전위 고정법에 의한 개구리 미수정란(*Xenopus oocytes*)의 $\alpha 1H$ T-형 칼슘 채널의 전기 생리학적 특성 파악

<146> 전위 고정법(two-electrode voltage clamping)을 사용하여 개구리 미수정란에 발현된 칼슘채널의 전류를 측정하였다. 전류는 10 mM Ba^{2+} 용액(10 mM $Ba(OH)_2$, 90 mM NaOH, 1 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM HEPES, 메탄술폰산으로 pH를 7.4로 조정함)에서 측정하였다. 이 때 미수정란용 증폭기(모델 OC-725C, Warner Instrument Corp., USA)를 통하여 전위 고정(voltage clamp) 및 전류 측정을 조절하며, 이때 아날로그 신호는 Digidata 2000A (Analog-Digital converter, Axon Instrument)를 사용하여 디지털 신호로 바꾸고, 모든 데이터의 획득, 저장 및 분석은 EPC-9 증폭기(HEKA, German)를 통하여 펜티엄(Pentium) IV 컴퓨터에 기록하였다. 데이터는 주로 5 KHz에서 모으고, 1 KHz에서 여과하였다(모델 902 필터, 미국 메릴랜드주 하버힐 소재의 프리퀀시 디바이시스사(frequency devices)). T-형 전류의 발생은 일반적으로 미수정란을 -90 mV로 고정된 상태에서 매 15초마다 -20 mV의 테스트 전위를 가하여 일으키고, 이 때 약물의 처리 전과 후를 비교하여 차단 퍼센트를 계산하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

<147> 시험예 2: HEK 293 세포 배양법 및 전세포 패치법을 이용한 T-형 칼슘 채널 활성 측정법

<148> 배양용액은 돌베코 개질 이글 배지(Dulbecco's modified Eagles's medium, DMEM)에 10% 소태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신(v/v)을 넣어 만들어 사용하고 세포는 95% 공기/5% CO_2 의 습한 조건의 인큐베이터에서 온도 36.5 $^{\circ}C$ 에서 배양하였다. 배양용액은 3-4일에 한번씩 바꾸어주고 세포는 일주일마다 분주(sub-culture)해 주며 G-418 (0.5 mg/ml) 용액을 사용하여 $\alpha 1G$ T-형 칼슘 채널을 발현시킨 HEK 293 세포만을 자라게 하였다. T-형 칼슘 채널 활성 측정법에 사용된 세포들은 매번 분주할 때 폴리-L-리신 (0.5 mg/ml)으로 코팅 처리한 커버슬립에 배양한 후 2-7일 후에 기록하였다. 단일세포 수준에서 T-형 칼슘 채널의 전류 측정을 위해 EPC-9 증폭기 (HEKA, German)를 사용하여 전기생리학적 전세포 패치 클램프 방법으로 측정하였다. T-형 칼슘 채널 활성 측정법의 용액 조성으로는 세포 외부용액으로 140 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES (pH 7.4)를 사용하고 세포 내부용액으로는 KCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 11 mM, MgATP 5 mM (pH 7.4)을 사용하였다. 낮은 전압에서 활성화되는 T-형 칼슘 채널 활성 프로토콜로는 위에서 만든 세포 내부용액을 넣은 3-4 M Ω 저항의 미세유리 전극을 단일세포에 찔러 전세포 기록(whole-cell recording) 모드가 되게 한 후 세포막 전위를 -100 mV로 고정된 후 매 10초마다 -30 mV (50 ms 지속시간)로 저분극시켰을 때의 T-형 칼슘 채널 활성화로 인한 내향전류의 크기를 측정하였다.

<149> 시험예 3: 개구리 미수정란 ($\alpha 1H$)과 HEK 293 세포 ($\alpha 1G$)에 대한 T-형 칼슘 채널 활성 측정

<150> 본 발명의 시험예 2에서 사용한 세포 및 측정법이 T-형 칼슘 채널 차단제 검색에 적당한 검색 시스템인지 확인

하기 위해 $\alpha 1G$ T-형 칼슘 채널 활성의 전류-전압 상관 관계, 각 전압에서의 실제적인 전류, $\alpha 1G$ T-형 칼슘 채널 억제제로 알려진 니켈(Ni^{2+}) 및 미베프라딜(mibefradil) 농도에 따른 전류를 측정하고, 그 결과를 각각 도 1 내지 4에 나타내었으며, 이를 공지문헌(Monteil *et al.*, J. Biol. Chem. 275, 6090-6100, 2000)에 발표된 $\alpha 1G$ T-형 칼슘 채널 연구 결과와 비교 분석하였다. 그 결과, -30 mV의 낮은 전압에서 최대로 활성화되는 성질(도 1), 활성화된 전류의 빠른 활성-비활성 특징(도 2), 기존의 T-형 칼슘 채널 차단제로 알려진 Ni^{2+} 과 미베프라딜에 대한 IC_{50} 값의 비교(도 3 및 4) 등에 의해 본 발명의 T-형 칼슘 채널 차단제 검색법으로 합당하다고 판단하여 차단제의 효능을 선별 검색하였다. 각 화합물은 100% 디메틸설폭시드(DMSO)에 녹여 10 mM 스톱 용액을 만들고 1000배 희석농도인 10 μM (0.1% DMSO 포함)에서 T-형 칼슘 채널 전류에 대한 영향을 검사하였다. 각 화합물은 세포 외부용액과 함께 60-80초 동안 100 μM 또는 10 μM 농도로 개구리 미수정란($\alpha 1H$) 및 HEK 세포($\alpha 1G$)에 처리하였으며 화합물에 의한 피크 전류의 억제 정도를 백분율로 계산하고 50% 이상의 억제 효과를 나타내는 농도를 측정하여 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

【표 1】

<151>

화합물	개구리 미수정란 ($\alpha 1H$)	HEK 293 세포 ($\alpha 1G$)	
	억제 정도 (100 μM 의 농도) (%)	억제 정도(10 μM 의 농도) (%)	IC_{50} (μM)
KKK01273	82.0	78.8 ± 0.8	0.99 ± 0.44
KKK01283	87.0	78.9 ± 2.8	1.01 ± 0.06
KKK01285	76.0	73.6 ± 3.3	2.18 ± 0.62
KKK01296	70.0	63.4 ± 7.3	1.22 ± 0.08
KKK01300	74.0	75.1 ± 1.2	1.86 ± 0.19
KKK01391	70.9	77.6 ± 3.2	2.75 ± 0.35
KKK01392	54.6	74.0 ± 1.5	2.04 ± 0.43
KKK01394	74.8	86.2 ± 3.3	1.13 ± 0.21
KKK01404	73.5	83.6 ± 0.7	0.45 ± 0.02
KKK01406	45.9	77.0 ± 1.0	1.39 ± 0.42
KKK01408	60.9	80.2 ± 2.5	2.13 ± 0.17
KKK01411	83.7	80.8 ± 1.2	1.48 ± 0.26
KKK01413	73.4	79.0 ± 1.5	1.33 ± 0.36
KKK01414	48.4	64.0 ± 2.5	1.61 ± 0.37
미베프라딜	86.0	89.8 ± 3.3	1.34 ± 0.49

<152>

본 발명의 대조물질로 사용한 미베프라딜의 칼슘 채널 억제 효과를 시험예 2에 기재된 활성 검색법으로 측정한 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 개구리 미수정란($\alpha 1H$)에서는 86%의 억제효과(100 μM 의 농도)를 가지며, HEK 293 세포($\alpha 1G$)에서는 89.8%의 억제효과(10 μM 의 농도) 및 IC_{50} 값은 1.34 μM 을 가진다. 한편, 본 발명의 화합물도 이와 유사한 우수한 칼슘 채널 억제 효과를 나타내며, 본 발명의 화합물 중 KKK1273, KKK1283, KKK1296, KKK1394, KKK1404 및 KKK1413은 대조물질인 미베프라딜보다 우수한 칼슘 채널 차단 효과를 보이고, 특히 KKK1404는 미베프라딜보다 3배 정도 우수한 T-형 칼슘채널 차단효과를 보임을 알 수 있다.

<153>

시험예 4: 본 발명에 따른 화합물의 기타 이온 채널에 대한 선택성 확인

<154>

본 발명의 화합물의 다른 이온채널에 대한 선택성을 확인하기 위하여 실시예 1 내지 13에서 제조한 화합물에 대하여 공지의 방법(Lee, J.-H. *et al.*, J. Neurophysiol., 2002, 87, 2844-2850)을 이용하여 $\alpha 1B$ 칼슘채널이 표현된 HEK 293 세포주에서 N-형 칼슘채널 억제 효과를 측정하였다.

<155>

실험동물로는 250 g 내외의 수컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 쥐를 사용하였다. 펜토바르비탈 나트륨 (50 mg/kg, *i.p.*)으로 쥐를 마취시킨 뒤 즉시 개복하여 전립선의 외측에 위치한 주골반 신경절을 적출하고, 이를 차가운(4 $^{\circ}C$) 헹크 염 용액(Hank's balanced salt solution, HBSS, GibcoBRL)으로 옮겼다. 신경절을 둘러싸는 연결조직을 벗기고 예리한 칼로 조심스럽게 작은 틈을 만든 후, 이를 0.7 mg/ml 콜라게나제 (타입 D), 0.3 mg/ml 트립신과 0.1 mg/ml의 DNase 타입 I이 들어있는 10 ml의 개질 얼스 염 용액(modified Earle's balanced salt solution, EBSS, pH 7.4, GibcoBRL)에서 1시간 동안 35 $^{\circ}C$ 에서 배양하였다(Zhu 등, 1995; Park 등, 2001). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 글루코스와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 배양 플라스크를 흔들어

단일 신경세포들로 분리한 후, 임상용 원심분리기 (International Equipment Company, MA, USA)를 이용하여 1000 rpm의 속도로 원심 분리하였다. 분리된 단일 신경세포들을 10% 소 태아 혈청, 1% 글루타민, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 MEM (GibcoBRL)에 재부유(resuspend)시킨 뒤, 폴리-L-리신으로 코팅되어 있는 폴리스티렌 배양 접시(35 mm)에 도말하였다. 이를 37 °C 세포 배양기(humidified incubator, 95% 공기 - 5% CO₂)에서 배양하였으며, 분리한 후 24시간 이내에 실험에 사용하였다.

<156>

전압의존적 칼슘 및 나트륨 전류는 패치 클램프 증폭기 (patch clamp amplifier, Axopatch 1D, Axon Instruments, Foster city, CA, USA)를 사용하여 전형적인 패치 클램프 방법으로 전세포 파열 형태 (whole-cell ruptured configuration)에서 기록하였다 (Hamil 등, 1981; Jeong 및 Ikeda 등, 1998). 전극은 붕규산염 유리 모세관 (외경: 1.65 mm, 내경: 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)으로 P-97 플래밍-브라운 자동미량 분주기 (Flaming-Brown micropipette puller) (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)를 사용하여 만들었다. 만들어진 전극은 미세세공기(microforge)로 열처리하여 다듬었고, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 2~5 MΩ이 되는 것을 사용하였다. 신경세포가 들어 있는 배양 접시를 도립현미경 (inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포외액을 중력에 의해 약 1~2 ml/min 속도로 관류되도록 하였다. 세포막의 전기용량(membrane capacitance)과 직렬 저항(series resistance)은 증폭기로 80% 이상 보정하였다. 전압생성 및 칼슘 전류의 기록은 아날로그/디지털 전환기 (Digidata 1200, Axon Instruments Co.)가 연결된 컴퓨터에서 펄스/펄스핏(Pulse/Pulsefit, HEKA, German) 소프트웨어를 이용하였다. 칼슘 전류는 2~5 kHz로 저역 통과 필터 (low pass filter)를 통과시킨 뒤 컴퓨터에 저장하였고, 펄스(Pulse)와 프리즘(Prism)(Graphpad software Inc., CA, USA)로 분석하였다. 모든 실험은 실온 (20~22°C)에서 시행하였다.

<157>

칼슘 전류 측정을 위해 사용된 전극 내 용액의 조성은 100 mM CsCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM BAPTA, 3.6 mM MgATP, 0.1 mM GTP, 14 mM 포스포크레아틴 50 units/ml 크레아틴 포스포키나아제(pH 7.4)로 하였다. 세포외 관류액의 조성은 151 mM TEACl, 5 mM BaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM 글루코스(pH 7.4)로 실험하였다. 또한, 전압이 -80 mV에서 0 mV까지 이르게 하면서 200 ms 동안의 탈분극화 단계를 거쳐 15초마다 전기적 자극을 유발시켰다. 그 실험 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

【표 2】

<158>

화합물명 (KIST-Code)	HEK 293 세포 (N-형)	선택성 (T/N-형)
	억제 정도 (10 μM의 농도) (%)	
KKK01273	25.3±0.9	3.1
KKK01283	4.8±1.1	16.4
KKK01285	9.4±1.2	7.8
KKK01296	1.7±0.9	37.3
KKK01300	15.4±1.4	4.9
KKK01391	7.1±2.2	10.9
KKK01392	2.5±2.2	29.6
KKK01394	7.6±1.6	11.3
KKK01404	33.7±1.7	2.5
KKK01406	4.7±1.2	16.4
KKK01408	4.0±0.8	20.1
KKK01411	11.3±0.5	7.2
KKK01413	4.0±0.4	19.8
KKK01414	10.9±0.9	5.9
미베프라딜	57.4±1.3	1.6

<159>

표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 대조 화합물인 미베프라딜의 경우 칼슘 채널의 서브 타입에 대한 선택성이 매우 낮은 반면, 본 발명의 화합물은 높은 T-형 선택성을 갖는다. 특히, 화합물 KKK1283, KKK1296, KKK1391, KKK1392, KKK1394, KKK1406, KKK1408, KKK1413 등은 10배 이상의 높은 비율로 T-형을 선택적으로 억제하는 높은 선택성을 보여줌을 알 수 있다.

발명의 효과

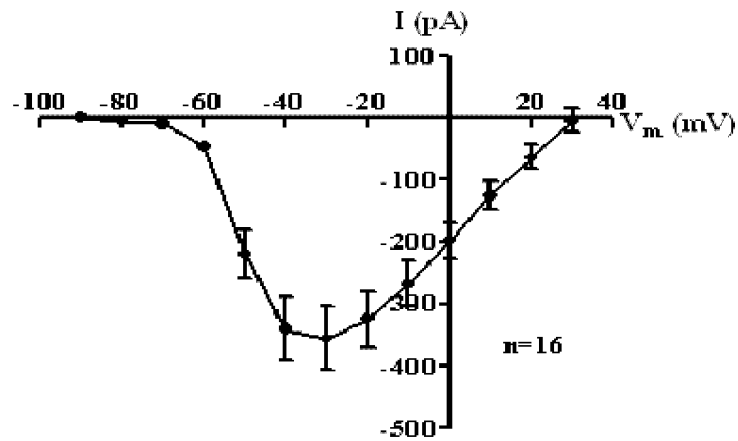
<160> 상기 설명한 바와 같이, 본 발명의 화학식 1의 몰폴린-2-온 유도체는 세포막의 칼슘 채널을 억제하는 활성을 가져 상기 화합물을 포함하는 제약 조성물은 협심증, 고혈압, 심근질환, 통증, 간질과 같은 다수의 질환을 치료 및 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

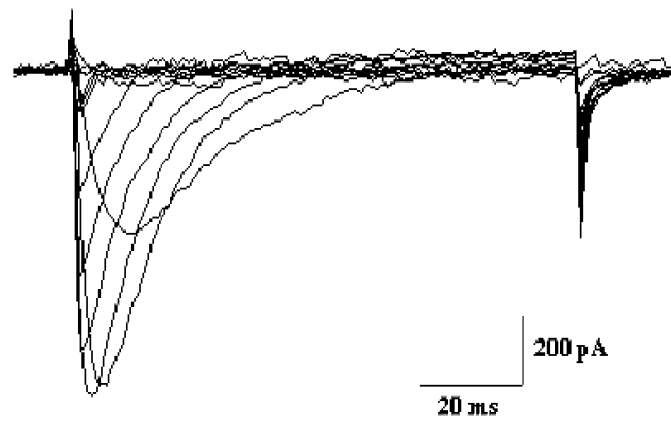
- <1> 도 1은 HEK 293 세포에서의 $\alpha 1G$ T-형 칼슘 채널 활성의 전류-전압 상관 그래프.
- <2> 도 2는 HEK 293 세포에서의 각 전압에서 실제적인 전류를 측정된 그래프.
- <3> 도 3은 HEK 293 세포에서의 니켈(Ni^{2+}) 이온 농도에 따른 전류를 나타내는 그래프.
- <4> 도 4는 HEK 293 세포에서의 미베프라딜(mibefradil) 농도에 따른 전류를 나타내는 그래프.

도면

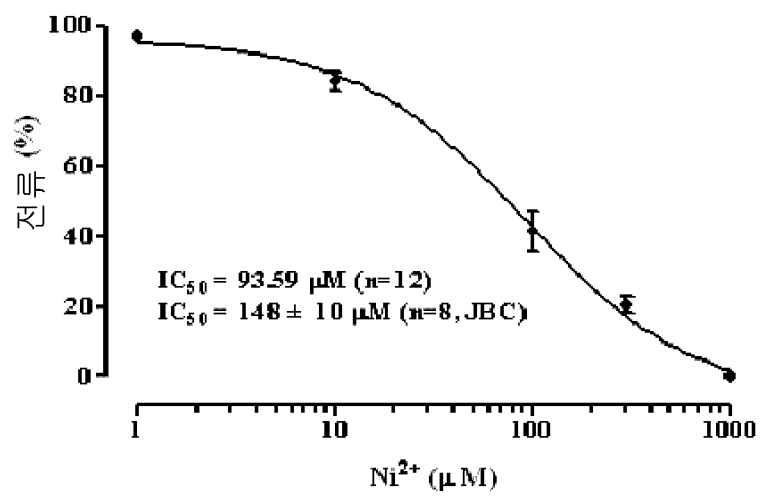
도면1



도면2



도면3



도면4

