(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C07C 215/48 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년05월26일
(11) 등록번호 10-0583805
(24) 등록일자 2006년05월19일

(21) 출원번호 10-2000-7003077
(22) 출원일자 2000년03월22일
번역문 제출일자 2000년03월22일
(86) 국제출원번호 PCT/IT1998/000252
국제출원일자 1998년09월22일
(65) 공개번호 10-2001-0030671
(43) 공개일자 2001년04월16일
(87) 국제공개번호 WO 1999/15494
국제공개일자 1999년04월01일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 가나, 감비아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 RM97A000568 1997년09월22일 이탈리아(IT)

(73) 특허권자 시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테 에스.피.에이.
이탈리아 로마 00144 비알레 샤케스파아레 47

(72) 발명자 환토,니콜라
이탈리아,I-00142로마,50,비알레피코델라미란돌라

모레티,기안,피에로
이탈리아,I-00174로마,58,비아마르코발레리오코르보

포레스타,피에로
이탈리아,I-00040,46,비아엘.스투르조

(74) 대리인 백남훈

심사관 : 김동석

(54) 2-아미노테트랄린, 이의 제조방법, 그리고 염증성 질환 및/또는 자가면역 질환의 예방과 치료용 약제학적 조성물

요약

본 발명은 염증성 사이토카인의 병원적인 역할이 확인된 염증성 질환(상세하게는 패혈성 쇼크) 및/또는 자가면역 질환의 예방 및 치료를 위한 2-아미노테트랄린의 제조방법 및 이의 약제학적 조성물에 관한 것이다.

색인어

염증성 사이토카인, 패혈성 쇼크, 2-아미노테트랄린

명세서

기술분야

본 발명은 패혈성 쇼크(septic shock)의 예방 및 치료, 그리고 염증성 사이토카인이 병원적인 역할을 한다고 알려져 있는 (하기에 더욱 상세히 정의되어 있음) 염증성 질환, 자가면역 질환, 또는 염증성질환과 자가면역 질환을 함께 치료하기에 적합한 2-아미노테트랄린 유도체 및 이의 약리학적으로 허용 가능한 염의 제조방법 및 이의 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

6,7-치환된-2-아미노테트랄린은 패혈성 쇼크의 치료에 활성이 있는 것으로 잘 알려져 있다. 참고로 유럽공개특허 제0 730 861호에 상기와 같은 6,7-치환된-2-아미노테트랄린의 한 계열과 특히 (R,S)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린(다음에 ST 626으로 언급하고 있다) 화합물이 기술되어 있다.

본 발명에 따른 화합물을 사용하여 치료할 수 있는 염증성 질환, 자가면역질환, 또는 염증성 질환과 자가면역 질환으로서, 예를 들면 류머티즘성(rhematoid) 관절염, 췌장염, 염증성 장 질환, 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 뇌척수염이 있다.

여기서, 참고는 패혈성 쇼크에만 국한될 것이고, 이는 염증성 사이토카인으로 인한 다른 질환도 본 발명에 따라 효과적으로 치료될 수 있다.

패혈성 쇼크는 극도로 심한 의학적인 증후군으로서, 주로 그람-음성이나 그람-양성의 박테리아, 원생생물 또는 바이러스에 의한 감염의 결과라 할 수 있으며, 백혈구 증가, 열, 심장박동수의 증가(tachycardia), 저혈압 및 신장, 호흡, 심장 및 간의 부전증(insuffieciency)으로 특징지어 진다.

그러나, 패혈성 쇼크의 심한 정도는 그 증후군에 대한 미생물의 종류와는 무관하고[Parrillo J. E., Pathogenetic mechanisms of septic shock, *New Engl. J. Med.*, 328: 1471 ~ 1477, 1993], 유독성 손상의 원인이 되는 항원에 대한 각각의 염증반응 정도에 관련이 있다.

지난 수년간 항생제 치료법과 집중적인 치료를 위한 개입(intervention) 프로토콜에 있어서 상당한 향상이 있었음에도 불구하고, 쇼크는 이병률(morbidity)과 입원 환자의 사망률의 주요원인 중에 하나로 남아 있다. 이는 미국에서 1년당 약 100,000건의 사망에 대한 원인으로 평가되고 있다[Glauser M.P., Zanetti G., Baumgartner J.D., Cohen J., Septic shock: pathogenesis, *Lancet*, 338: 732 ~ 736, 1991].

패혈성 쇼크의 가장 결정적이고 특징적인 특성은 용균이나 미생물의 대사에서 유래되는 산물에 대한 신체반응이다.

이러한 물질로 가장 먼저 동정되고 실험적인 연구에 가장 많이 사용되는 것은 화학적으로 박테리아 종에 따라 다양한 다당체 부분에 있고, 마이셀 형태로 패혈증 환자의 혈액에 존재하는 지질 부분(lipid A)에 있는 그람-음성 박테리아 벽의 구성 성분인 지질다당류(lipopolysacharide, LPS)이다. 동물에 투여되는 경우, LPS는 쇼크에서 일어나는 모든 심장순환계 증상과 신경학적인 증상을 재현할 수 있다[Olson N.C., Salzer W.L., McCall C.E., Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxaemia, *Molec. Aspects Med.*, 10: 511 ~ 629, 1988]. 그러므로, 이는 응고 캐스케이드(coagulative)의 내부 및 외부 경로와 주로 마크로파지-모노사이트가 기원인 예를 들면, TNF, IL-1 및 INF-γ와 같은 사이토카인의 분비 활성화에 의한 의학적인 증상의 자극을 일으키는 연쇄적인 사건에서 원동기(原動機)(prime mover)로 동정이 가능하다[Bone R.C., A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. *J. Am. Med. Ass.*, 266; 1686 ~ 1691, 1991].

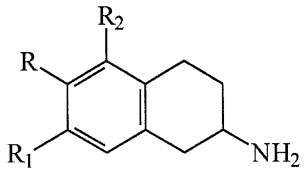
이러한 증상은 지난 몇 년간 중요성이 증대되어 왔으며, 현재 이용될 수 있는 이의 심한 정도와 부적당한 치료방법으로 인해 상기 질환이 증진되는 것을 효과적으로 막을 수 있는 치료제의 신속한 개발이 되도록 하였다.

이에 본 발명은 6,7-치환된-2-아미노테트랄린의 새로운 종류가 상기에 언급된 질환의 예방과 치료에 있어 효과적인 활성을 나타낸다는 것을 발견하였다.

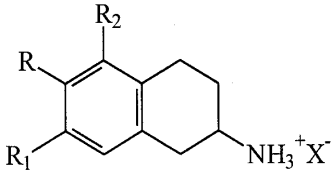
발명의 상세한 설명

본 발명에 따른 2-아미노테트랄린은 다음 화학식 1로 표시되는 자유 염기(free base)와 다음 화학식 2로 표시되는 약리학적으로 허용 가능한 염 모두가 존재할 수 있다.

화학식 1



화학식 2



상기에서:

R 및 R_1은, 각각 할로겐, 바람직하게는 플로린; 하이드록시; C_1~C_4 알콕시, 바람직하게는 메톡시, 선택적으로 ω위치가 OH, NH_2, NR_3R_4기로 치환되고, 이때 R_3 및 R_4는 각각 H, C_1~C_4 알킬, ω위치가 OH, NH_2로 치환되지 않거나 치환되며; C_1~C_4 알카노일, 바람직하게는 아세틸기; C_1~C_4 알킬; 카바모일; 카바모일옥시; 아미노; NR_3R_4기로 치환된 아미노, 이때 R_3 및 R_4는 상기에서 정의한 바와 같고;

R_2는 수소; 할로겐, 바람직하게는 플로린; 하이드록시; 메톡시, 다만 2-아미노테트랄린은 (a) R=R_1=CH_3O; OH; R_2=H; 또는 (b) R=F; R_1=CH_3O; OH; R_2=H로서 라세미체인 경우를 배제하고; 그리고

X^-는 약리학적으로 허용 가능한 산의 1가 음이온이다.

상기 화학식 2로 표시되는 약리학적으로 허용 가능한 염이 의미하는 것은 원치 않는 유독성이나 부작용을 일으키지 않는 산을 사용하는 이의 임의의 염들을 의미한다. 이러한 상기 산은 약리학자와 약학 및 약제학 업계의 당업자들에게 잘 알려져 있다.

상기 염의 예로서 클로라이드, 브로마이드, 오로테이트, 애시드 아스파테이트, 애시드 시트레이트, 애시드 포스페이트, 퓨마레이트 및 애시드 퓨마레이트, 락테이트, 말리에이트 및 애시드 말리에이트, 애시드 옥살레이트, 애시드 설페이트, 글루코스 포스페이트, 타르트레이트 및 애시드 타르트레이트가 있으며, 본 발명이 이에 한정되지는 않는다.

FDA에 의해 승인된 염들은 여기서 참고용으로 사용되는 문헌에 목록으로 되어 있다[*Int. J. of Pharm.* 33(1986), 201 ~ 217].

본 발명에 의한 구체적인 화합물의 바람직한 구현예는 다음에 기술된 바와 같다:

S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1237)

R(+)-2-아미노-6-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1238)

(R,S)-2-아미노-5,6-다이플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1269)

(R,S)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1275)

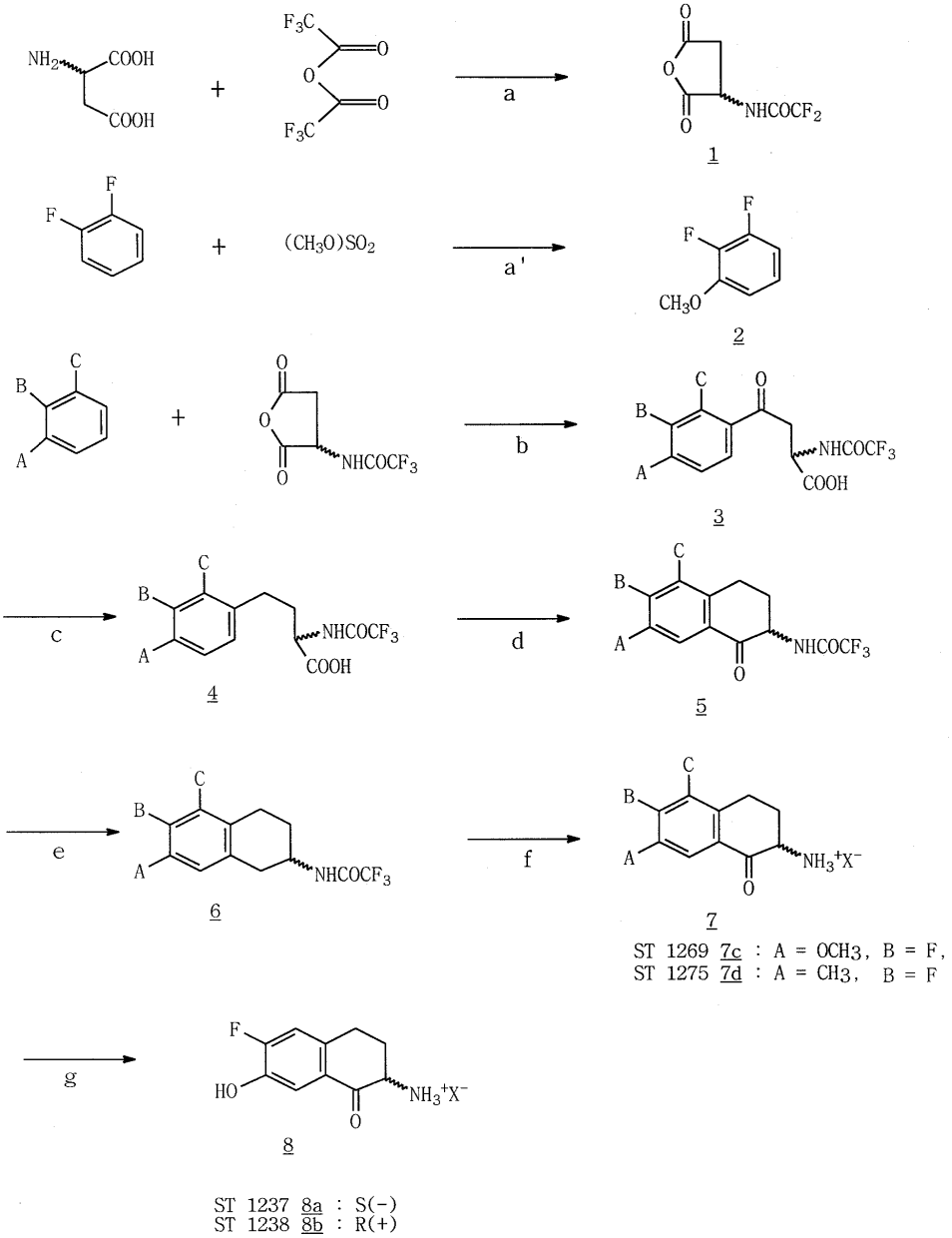
(R,S)-2-아미노-7-플루오로-6-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1267)

(R,S)-7-아세틸-2-아미노-6-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1274)

(R,S)-2-아미노-7-플루오로-6-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1262)

본 발명에 따른 다음에 설명된 자유염기나 약리학적으로 허용 가능한 염들과 같은 화합물의 제조방법은 다음 반응식들로 나타내고 있다.

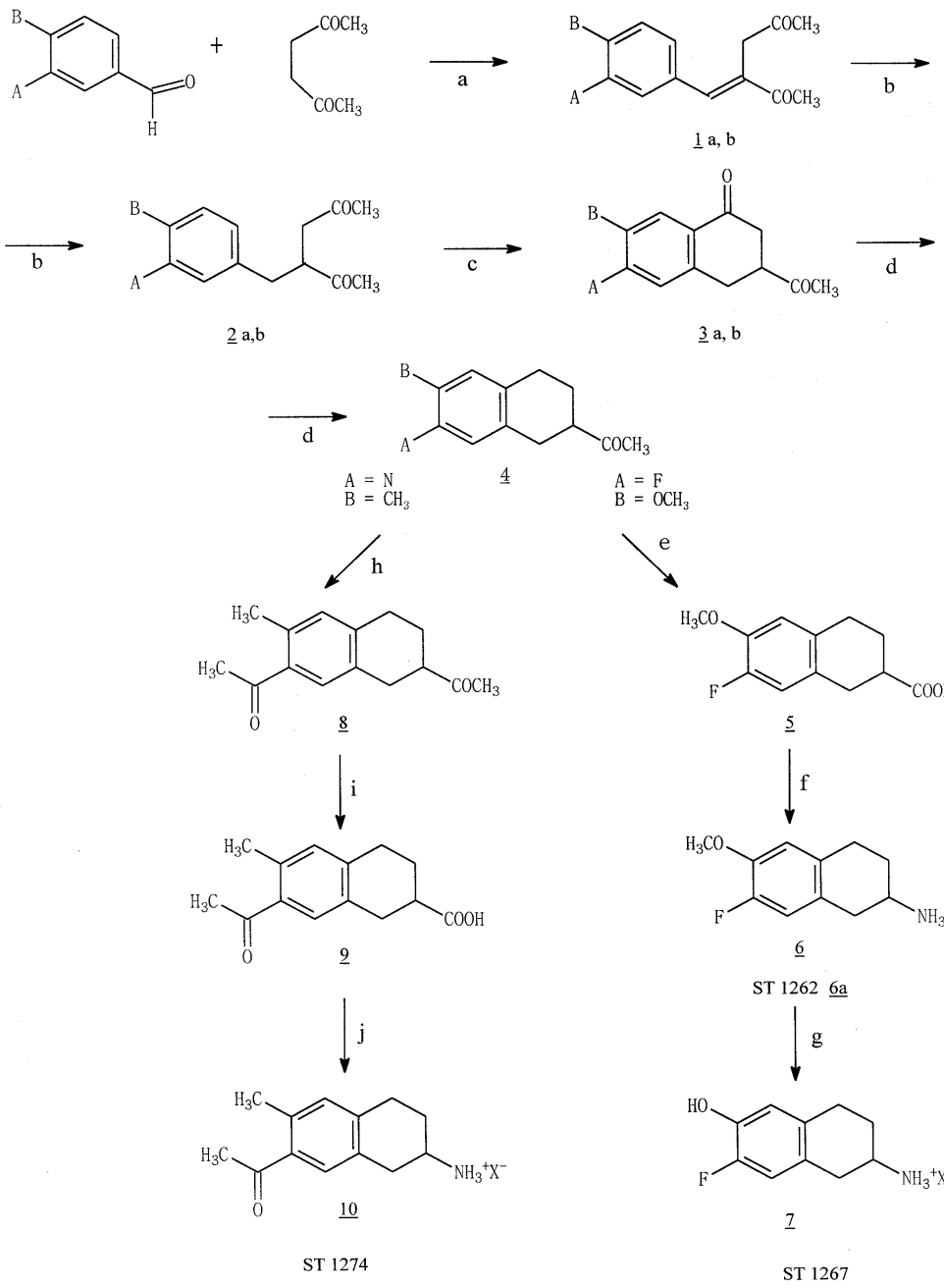
반응식 1



ST 1269 7c : A = OCH3, B = F,
ST 1275 7d : A = CH3, B = F

ST 1237 8a : S(-)
ST 1238 8b : R(+)

반응식 2



상기 반응식들을 참고로 하여 다음의 실시예를 상세히 설명하겠는바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1(반응식 1)

S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드 (ST 1237) 8a의 제조

a) S(-)-트리플루오로아세틸-아스파르트산 무수물 1a의 제조

트리플루오로아세트산(300 ㎖)에 L-아스파르트산(100g; 0.75몰)을 현탁시키고, 결과된 현탁액을 얼음/소금 조(bath)에서 계속 교반하면서 -20 ℃로 냉각시켰다. 상기 용액에 트리아세트산 무수물(300 ㎖; 2.16몰)을 교반하면서 서서히 첨가하였다. 첨가가 거의 다 되었을 때, 결과된 반응혼합물을 45 ℃에서 조심스럽게 밤새도록 환류시켰다.

반응이 끝나면 반응용액을 증류기에서 건조시키고, 고체 잔류물을 교반하면서 헥산으로 3번 세척하였으며, 매번 디켄테이션(decantation)에 의해 헥산을 제거하였고; 잔류물을 다시 완전히 건조하였다. 최종적으로, 잔류물을 헥산-에틸 에테르를 사용하여 교반하면서 분쇄하였고, 결과된 혼합물을 여과하고 잔류물을 진공하에서 건조하여 화합물 1a 150g(수율 95%)을 얻었다.

녹는점: 140 ~ 142 ℃

$[\alpha]_D$ = - 40.7(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR($DMSOd_6$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.85~3.3(2H, m, C<u>H</u>$_2$); 4.95~5.1(1H, m, C<u>H</u>NH); 9.6~9.8(1H, bd, CHN<u>H</u>$COCF_3$)

b) <u>S(+)-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-4-옥소-2-(N-트리플루오로-아세틸)-아미노부타노익 산 3a</u>

2-플루오로아니솔(300 ㎖; 2.67몰)에 S(-)-트리플루오로아세틸-아스파르트산 무수물(150g; 0.712몰)을 현탁시켰으며, 결과된 혼합물을 격렬하게 교반한 다음, 여기에 무수 알루미늄 클로라이드(240 g; 1.57몰)를 서서히 조금씩 첨가하였다. 첨가가 완료되었을 때, 반응혼합물을 40~45 ℃에서 24시간 동안 격렬한 교반을 유지하였다.

무수 CH_2Cl과 $AlCl_3$ 60g을 반응혼합물에 추가로 첨가하였고, 48시간 동안 교반을 더 유지하였다.

고체 잔류물을 교반하면서 분쇄에 의해 CH_2Cl_2 1ℓ를 사용하여 처리하였다. 과량의 플루오로아니솔을 포함하는 메틸렌 클로라이드를 분리하였다. 고체 잔류물을 여과하고 격렬하게 교반하면서 6M HCl 2ℓ를 분배하면서 첨가하였다. 첨가가 완료되면, 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 산층을 에틸 에테르를 사용하여 반복 추출하였다. 모아진 에테르층을 물로 세척하여 무수 소듐 설페이트로 수분을 제거한 다음 건조하였다. 정제하지 않은 고체 잔류물을 얻었으며, 이를 1:1 AcOEt/헥산으로 결정화하여 화합물 3a 188g(수율 78%)을 얻었다.

녹는점: 113 ~ 115 ℃

$[\alpha]_D$ = + 27.5(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 3.6(2H, m, C<u>H</u>$_2$NH); 3.96(3H, S, PhOC<u>H</u>$_3$); 4.88~5.01(1H, m, CH_2C<u>H</u>NH); 7.18~7.22(1H, t, Ar); 7.7~7.8(1H, dd, Ar); 7.82~7.9(1H, bd, Ar).

c) <u>S(+)-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-2-(N-트리플루오로-아세틸)-아미노부타노익 산 4a</u>

화합물 3a(100g; 0.297몰)를 트리플루오로아세트산(500 ㎖)에 용해시켰다. 결과용액을 0 ℃로 냉각시키고 여기에 트리에틸실란(300 ㎖; 1.89몰)을 서서히 첨가하였다. 첨가가 완료되었을 때, 반응혼합물을 서서히 끓는점까지 올리고, 끓는 온도에서 4시간 동안 유지하였다.

혼합물을 증류기에서 완전히 건조시킨 다음, 잔류물을 에틸 에테르를 사용하여 2번 세척하였으며, 트리플루오로아세트산을 완전히 제거하기 위하여 혼합물을 매번 건조하였다. 오일성 잔류물을 얻었으며, 얼음/소금 조에서 -20 ℃로 냉각시킨 다음, 교반하면서 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 처리하고 4N NaOH를 사용하여 pH를 10으로 조절하였다.

최종 알칼리성 층을 0 ℃에서 6N HCl을 사용하여 조심스럽게 pH 3으로 산성화시켰다. 침전물을 얻었으며, 이를 CH_2Cl_2로 반복하여 추출하였다. 모아진 유기층을 소량의 물로 세척하여 무수 Na_2SO_4로 수분을 제거한 다음 건조하였다. 오일성 잔류물을 소량의 에틸 아세테이트에 용해시키고 헥산을 사용하여 교반하면서 침전시켰다. 혼합물을 밤새도록 교반한 다음 여과하고 잔류물을 건조하여 화합물 4a 72g(수율 75%)을 얻었다.

녹는점: 113 ~ 115 ℃

[α] $_D$= + 11.3(c = 1%, 메틸 알코올) 분석: 표준으로 확인하였다.

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.0～2.18(1H, m, C<u>H</u>HCHNH); 2.22～2.36(1H, m, CH<u>H</u>CHNH); 2.6～2.7(2H, t, PhC<u>H</u> $_2$$CH_2$); 3.84(3H, S, PhOC<u>H</u> $_3$); 4.6～4.7(1H, m, CH_2C<u>H</u>NH); 6.78(1H, bd, CHN<u>H</u>$COCF_3$); 6.8～6.92(2H, m, Ar).

d) <u>S(-)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시-1-테트랄론 5a</u>

화합물 4a(70g; 0.217몰)을 무수 메틸렌 클로라이드(1400 ㎖)에 용해시켰다. 결과용액을 얼음조에서 0 ℃로 냉각시킨 다음 포스포러스 펜타클로라이드(70g; 0.336몰)을 서서히 첨가하였다. 첨가가 완료되었을 때, 반응혼합물을 0 ℃에서 2시간 동안 유지하면서 교반한 다음, -20 ℃로 냉각하였다. 알루미늄 클로라이드(56g; 0.42몰)을 조금씩 반응혼합물에 첨가하였다.

상기 첨가 후에, 반응혼합물을 2시간 동안 실온으로 유지한 다음, 조심스럽게 끓는점까지 가열하고, 끓는 온도에서 6시간을 유지하였다.

혼합물을 0 ℃로 냉각하고 과량의 반응물을 파괴하기 위하여 분쇄된 얼음(약 300 ㎖)을 교반하면서 분배시켜 첨가하였다. 혼합물을 CH_2Cl_2를 사용하여 3번 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 Na_2SO_4로 수분을 제거한 다음 건조하였다. 노란색 고체를 얻었으며, 이를 소량의 에틸 아세테이트에 용해시키고 헥산을 사용하여 교반하면서 침전시켜 화합물 5a 40g(수율 60%)을 얻었다.

녹는점: 184 ～ 185 ℃

[α] $_D$= - 55.4(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.83～2.2(1H, m, C<u>H</u>HCHNH); 2.8～2.88(1H, m, CH<u>H</u>CHNH); 2.9～3.0(1H, m, C<u>H</u>HCH_2); 3.15～2.26(1H, m, CH<u>H</u>CH_2); 3.92(3H, S, PhOC<u>H</u> $_3$); 4.53～4.62(1H, m, CH_2C<u>H</u>NHCOCF_3); 6.88(1H, d, Ar); 7.57(1H, d, Ar); 7.43(1H, bs, CHN<u>H</u>$COCF_3$).

e) <u>S(-)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시-테트랄린 6a</u>

화합물 5a(40g; 0.131몰)를 보로에테레이트 트리플로라이드(340 ㎖)에 현탁시켰다. 0 ℃에서 트리에틸실란(90 ㎖; 0.56몰)을 상기 현탁액에 첨가하였고, 현탁액을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완료되었을 때, 포화 $NaHCO_3$(pH 8～9) 용액을 반응혼합물에 첨가하고 수용액층을 CH_2Cl_2를 사용하여 3번 추출하였다. 모아진 유기층을 물로 세척하고 무수 Na_2SO_4로 수분을 제거한 다음 여과하고 건조하였다.

정제되지 않은 화합물을 얻었으며, 이를 이소프로필 알코올로 재결정하여 화합물 6a 30g(수율 78%)을 얻었다.

녹는점: 45 ～ 47 ℃

[α] $_D$= - 80(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.78～1.9(1H, m, C<u>H</u>HCHNH); 2.0～2.15(1H, m, CH<u>H</u>CHNH); 2.6～2.72(1H, dd, PhC<u>H</u>HCHNH); 2.73～2.9(2H, m, PhCH<u>H</u>CHNH, PhC<u>H</u>HCH_2); 3.03～3.15(1H, dd, PhCH<u>H</u>CH_2); 4.2～4.35(1H, m, C<u>H</u>NH); 6.38(1H, bd, CHN<u>H</u>$COCF_3$); 6.6(1H, d, Ar); 6.8(1H, d, Ar).

f) <u>S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드 7a</u>

K_2CO_3(54g; 0.391몰)가 녹아있는 메탄올(225 ㎖)과 물(225 ㎖)의 혼합용액에 화합물 6a(30g; 0.13몰)를 용해시켰다.

결과용액을 3시간 동안 교반하면서 환류시켰다.

메탄올을 진공하에서 제거하고 반응용액에 물 100 ㎖를 더 첨가하였다.

수용액층을 CH_2Cl_2를 사용하여 반복 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 Na_2SO_4로 수분을 제거한 다음 여과하고 건조하였다. 오일성 고체를 얻었으며, 이를 에틸 에테르에 용해시키고 HCl(15% 에탄올 용액)로 산성화시켜, 고체 침전물을 여과하고 메탄올에 재용해시킨 다음 활성탄으로 탈색하고 여과하여 진공하에서 농축하였고, 최종적으로 프로판올로 재결정하였다.

결정화를 두 번 반복하여 화합물 7a 12.6g(수율 53%)을 얻었다.

녹는점: 263 ~ 265 ℃

$[\alpha]_D$ = - 52.5(c = 1%, H_2O)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.6～1.8(1H, m, CHHCHN+); 2.0～2.15(1H, m, CHHCHN+); 2.6～2.75(3H, m, PhCHHCHN+ , PhCH$_2$CH$_2$); 2.95～3.05(1H, DD, PhCHHCHN+); 3.45～3.55(1H, m, CHN+); 6.7～6.7(2H, m, Ar).

g) S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1237) 8a의 제조

하이드로브롬산(47% 수용액)에 S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드 7a(3g; 0.13몰)를 녹여 환류온도로 밤새도록 유지하였다.

환류가 끝날 때 용액을 농축하고 진공하에서 건조하였다. 잔류물을 얻었으며 교반하면서 아세톤으로 반복하여 세척하고 물/메탄올 1:1 혼합물에 재용해시켜 여과한 다음, 염기형태로 활성화된 암베르리스트(Amberlyst) A 21 수지 60 ㎖가 함유된 컬럼을 통하여 용리시켰다.

용리액을 2N 염산으로 산성화하고 진공하에서 건조시켜 농축하였으며; 잔류물을 아세톤으로 세척하여 여과하고 다시 물/메탄올 1:1 용액에 용해시켜 산형태로 활성화된 암베르리스트(Amberlyst) A 21 수지 60 ㎖가 함유된 컬럼을 통하여 용리시켰다.

용리액을 활성탄으로 탈색하고, 셀라이트(celite)를 통하여 여과 후 소량으로 농축시켰다. 여기에 아세톤을 첨가하여 침전물을 얻어 이를 여과하고 진공하에서 건조하였다.

화합물 8a를 2.2g(수율 78%) 얻었다.

녹는점: 259 ~ 261 ℃

$[\alpha]_D$ = - 55.4(c = 1%, H_2O)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.6～1.8(1H, m, CH_2CHHCHN+); 2.0～2.1(1H, m, CH_2CHHCHN+); 2.5～2.7(3H, m, PhCH$_2$CH$_2$), PhCHHN+); 2.85～3.0(1H, m, PhCHHN+); 3.4～3.55(1H, m, CHN+); 6.55～6.8(2H, 2d, Ar).

실시예 2(반응식 1)

R(+)-2-아미노-6-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1238) 8b의 제조

a) R(+)-트리플루오로아세틸 아스파르틱 1b의 제조

출발물질로 D(-)아스파르트산을 사용하여 S(-)-트리플루오로-아세틸-아스파르틱 1a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 86%).

녹는점: 142 ~ 144 ℃

$[\alpha]_D$ = + 40.0(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR: 생성물 1a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

b) R(-)-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-4-옥소-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익 산 3b의 제조

출발물질로 무수물 1b를 이용하여 S(+)-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)4-옥소-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 3a에 대한 제조방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 57%).

녹는점: 86 ~ 88 ℃

$[\alpha]_D$ = - 28.0(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR: 생성물 3a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

c) R(-)-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 4b의 제조

출발물질로 산 3b를 이용하여 S(+)-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-2-(N-트리플루오로아세틸)-아미노부타노익산 4a에 대한 제조방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 65%).

녹는점: 110 ~ 112 ℃

$[\alpha]_D$ = - 11.2(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR: 생성물 4a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

d) R(+)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시-1-테트랄론산 5b의 제조

출발물질로 무수물 4b를 이용하여 S(-)-2-(N-트리플루오로아세틸)-아미노-6-플루오로-7-메톡시-1-테트랄론산 5a에 대한 제조방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 84%).

녹는점: 185 ~ 186 ℃

$[\alpha]_D$ = + 66.0(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR: 생성물 5a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

e) R(+)-2-(N-트리플루오로아세틸)-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린산 6b의 제조

출발물질로 테트랄론 5b를 이용하여 S(-)-2-(N-트리플루오로아세틸)-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린산 6a에 대한 제조방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 47%).

녹는점: 145 ~ 147 ℃

[α] $_D$= + 92.0(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR: 생성물 6a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

f) R(+)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드 7b의 제조

출발물질로 테트랄린 6b를 이용하여 S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드 7a에 대한 제조방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 64%).

녹는점: 260 ~ 262 ℃

[α] $_D$= + 48.5(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR: 생성물 7a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

g) R(+)-2-아미노-5-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1238) 8b의 제조

출발물질로 테트랄린 하이드로클로라이드 7b를 이용하여 S(-)-2-아미노-5-플루오로-7-하이드록시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1237) 8a에 대한 제조방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 78%).

녹는점: 260 ~ 262 ℃

[α] $_D$= + 55.0(c = 1%, 메틸 알코올)

^{1}H-NMR(D_2O), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.6～1.8(1H, m, CH_2C<u>H</u>HCHN+); 2.0～2.1(1H, m, CH_2CH<u>H</u>CHN+); 2.5～2.7(3H, m, PhC<u>H</u> $_2$$CH_2$) PhC<u>H</u>HN+); 2.85～3.0(1H, m, PhCH<u>H</u>CHN); 3.4～3.55(1H, m, C<u>H</u>N+); 6.55～6.8 (2H, 2d, Ar).

실시예 3(반응식 1)

(R,S)-2-아미노-5,6-다이플루오로-7-메톡시테르랄린 하이드로클로라이드(ST 1269) 7c의 제조

a) (R,S)-트리플루오로아세틸 아스파틱 무수물 1c의 제조

출발물질로 D,L-아스파르트산을 사용하여 S(-)-트리플루오로아세틸-아스파틱 무수물 1a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 96%).

녹는점: 133 ~ 134 ℃

^{1}H-NMR: 생성물 1a를 사용하여 얻은 것과 일치함.

a') 2,3-다이플루오로아니솔 2의 제조

2,3-다이플루오로페놀 20g(0.154몰)을 완전히 용해시키기 위하여 물 60 ㎖에 NaOH 6.24g을 녹인 용액에 넣어 실온에서 생성물을 흔들어 염화시켰다.

용액을 약 10 ℃로 냉각하기 위해, 다이메틸 설페이트 14.4 ㎖를 천천히 첨가하였고, 용액을 환류온도로 가열하여 24시간 동안 환류시켰다.

반응혼합물을 실온에서 메틸렌 클로라이드로 추출하여 유기층을 물, N 황산으로 세척하고 중성 pH가 될 때까지 다시 물을 사용하였다.

용액을 무수 소듐 설페이트로 탈수시키고 진공하에서 용매를 제거하여 붉은 빛을 띤 오일성 화합물 a' 21g을 얻었고, NMR에 의해 분석하여 이를 이용하였다(정제되지 않은 물질의 수율 94%).

^{1}H-NMR(D_2O), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 3.9(3H, S, PhOC<u>H</u> $_3$); 6.6～7.2(3H, m, 아로마틱).

b)<u>(R,S)-4-(2,3-다이플루오로-4-메톡시페닐)-4-옥소-2(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 3c의 제조</u>

출발물질로 무수물 1c 및 2,3-다이플로오로아니솔을 이용하고 반응시간은 48시간 대신 2 및 72시간으로 하여 S(+)-4-(3-플로오로-4-메톡시페닐)-4-옥소-2(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 3a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 23%).

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ(p.p.m) 3.45～3.7(2H, m, C<u>H</u> $_2$-C<u>H</u>NH); 3.97(3H, s, PhOCH_3); 4.95～5.05 (1H, m, C<u>H</u> $_2$-C<u>H</u>NH); 7.0～7.1(1H, bt, Ar); 7.68～7.78(1H, bt, Ar).

c) <u>(R,S)-4-(2,3-다이플루오로-4-메톡시페닐)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 4c의 제조</u>

출발물질로 산 3c를 이용하여 S(+)-4-(3-플로오로-4-메톡시페닐)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 4a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 76%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.0～2.2(1H, m, C<u>H</u>HCHN+), 2.2～2.4(1H, m, CH<u>H</u>CHCN); 2.6～2.8 (2H, t, PhC<u>H</u> $_2$$CH_2$); 3.86(3H, S, PhOC<u>H</u> $_3$); 4.6～4.72(1H, bq, CH_2C<u>H</u>NH); 6.6～6.7(1H, bt, Ar); 6.75～6.88(2H, m, Ar, CHN<u>H</u>$COCF_3$).

d) <u>(R,S)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-5,6-다이플루오로-7-메톡시-1-테트랄론 5c의 제조</u>

출발물질로 산 4c를 이용하고, 반응시간으로 6시간 대신 알루미늄 클로라이드 첨가 후에 3시간 동안 환류하는 방법을 이용하여 S(-)-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시-1-테트랄론 5a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 26%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.85～2.0(1H, m, C<u>H</u>HCHN+), 2.84～3.07(2H, m, CH<u>H</u>NH, PhC<u>H</u>HCH_2); 3.13～3.24(1H, m, PhCH<u>H</u>CH_2); 3.93(1H, S, PhOC<u>H</u> $_3$); 4.55～4.65(1H, m, CH_2C<u>H</u>NH); 7.38～7.42 (1H, dd, Ar); 7.43(1H, bs, CHN<u>H</u>$COCF_3$).

e) <u>(R,S)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-5,6-다이플루오로-7-메톡시테트랄린 6c의 제조</u>

출발물질로 테트랄론 5c를 이용하고, 반응시간을 4일 대신 7일 반응시키는 방법을 이용하여 S(-)-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 6a(실시예 1)에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 46%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.75～1.9(1H, m, C<u>H</u>HCHN+), 2.04～2.16(2H, m, CH<u>H</u>CHNH); 2.6～2.9(3H, m, PhC<u>H</u> $_2$CHNH, PhC<u>H</u>HCH_2); 3.05～3.15(1H, dd, PhCH<u>H</u>CH_2); 3.84(3H, s, PhOC<u>H</u> $_3$); 4.2～4.33 (1H, m, C<u>H</u>NHCOCF_3); 6.22(1H, bs, CHN<u>H</u>$COCF_3$); 6.9～6.94(1H, bd, Ar).

f) <u>(R,S)-2-아미노-5,6-다이플루오로-7-메톡시-1-테트랄린 하이드로클로라이드 ST(1269) 7c의 제조</u>

출발물질로 테트랄린 6c를 이용하고, 결정화 용매로 이소프로판올을 이용하여 S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드 7a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 62%).

^{1}H-NMR(D_2O), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.6～1.8(1H, m, $CH_2CHHCHN^+$), 2.0～2.2(1H, m, $CH_2CHHCHN^+$); 2.5～2.9(3H, m, $PhCHHCHN^+$, $PhCH_2CH_2$); 2.9～3.1(1H, m, $PhCHCHN^+$); 3.4～3.6(1H, m, CHN^+); 6.5～6.6(1H, d, Ar).

실시예 4(반응식 1)

(R,S)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테르랄린 하이드로클로라이드(ST 1275) 7d의 제조

a) (R,S)-트리플루오로아세틸 아스파틱 무수물 1c의 제조

(실시예 3에 나타나 있다)

b) (R,S)-4-(3-플루오로-4-메틸-페닐)-4-옥소-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 3d의 제조

출발물질로 플루오로톨루엔을 사용하고 반응시간은 48시간 대신 72시간으로 하여 S(+)-4-(3-플로오로-4-메톡시페닐)-4-옥소-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 3a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 36%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.15(3H, d, $PhCH_3$); 3.35～3.42(1H, dd, $CHHCHNH$); 3.5～3.6(1H, dd, $CHHCHNH$); 4.68～4.76(1H, m, CH_2CHNH); 6.85～6.95(1H, t, Ar); 7.55～7.65(2H, m, Ar); 8.0～8.1(1H, bd, $CHNHCOCF_3$).

c) (R,S)-4-(3-플루오로-4-메틸-페닐)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 4d의 제조

출발물질로 산 3d를 이용하여 S(+)-4-(3-플로오로-4-메톡시페닐)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노부타노익산 4a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 52%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.15(3H, d, $PhCH_3$), 2.0～2.4(2H, dd, CH_2CHNH); 2.5～2.7(2H, t, $PhCH_2CH_2$); 4.5～4.7(1H, bq, CH_2CHNH); 6.6～6.7(1H, m, Ar); 6.75～6.95(2H, m, Ar); 7.35～7.5(1H, bd, $CHNHCOCF_3$).

d) (R,S)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메틸-1-테트랄론 5d의 제조

출발물질로 산 4d를 이용하고, 반응시간을 6시간 환류하여 알루미늄 클로라이트를 첨가 후에 실온에서 2시간 대신 1시간 동안 환류시키는 방법을 이용하여 S(-)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시-1-테트랄론 5a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 80%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m):

1.83～2.0(1H, d, $CHHCHNH$), 2.3～(3H, d, $PhCH_3$); 2.8～2.9(1H, m, $CHHCHNH$); 2.92～3.03(1H, m, $CHHCH_2$); 3.13～3.25(1H, m, $CHHCH_2$); 4.53～4.62(1H, m, $CH_2CHNHCOCF_3$); 7.3(1H, d, Ar); 7.6(1H, d, Ar); 7.45(1H, bs, $CHNHCOCF_3$).

e) (R,S)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메틸-테트랄린 6d의 제조

출발물질로 테트랄론 5d를 이용하여 S(-)-2-(N-트리플루오로아세틸)아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 6a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 60%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.75～1.9(1H, m, CHHCHNH), 2.0～2.15(1H, m, CHHCHNH); 2.2(3H, s, PhCH_3); 2.6～2.7(1H, dd, PhCHHCHNH); 2.7～2.9(2H, m, PhCHHCHNH, PhCHHCH_2); 3.03～3.15(1H, dd, PhCHHCH_2); 4.25～4.35(1H, m, CHNH); 6.2(1H, b,s, NHCOCF_3); 6.7(1H, d, Ar); 6.9(1H, d, Ar).

f) (R,S)-2-아미노-6-플루오로-7-메틸테트랄린 하이드로클로라이드 ST(1275) 7d의 제조

출발물질로 테트랄린 6d를 이용하여 S(-)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드 7a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 67%).

녹는점 : 230 ℃에서 분해

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.7～1.9(1H, m, CH_2CHHCHN+); 2.15～2.25(1H, m, CH_2CHHCHN+); 2.19(3H, S, PhCH_3); 2.7～2.9(3H, m, PhCHNH+ , PhC$H_2$$CH_2$); 3.05～3.6(1H, m, PhCHHCHN+); 3.45～3.6(1H, m, CHNH_3+); 6.75～6.8(1H, d, Ar); 6.95～7.0(1H, d, Ar).

실시예 5(반응식 2)

(R,S)-2-아미노-6-메톡시-7-플루오로테르랄린 하이드로클로라이드(ST 1262) 6a의 제조

a) 4-(6-메톡시-7-플루오로페닐)-3-카르보메톡시-3-부타노익 산 1a의 제조

무수 메탄올 15㎖에 3-플루오로-p-아니스알데하이드 9.4g(0.061몰)과 다이메틸 숙시네이트 10g(0.068몰)을 용해시켰다. 상기 용액에 미리 제조해둔 소듐 메톡사이드 1.66g(0.073몰)이 녹아있는 용액을 실온에서 한 방울씩 적가하였다. 반응 혼합물을 질소기류하에 3시간 동안 환류시킨 다음, 냉각하고 진공하에서 부피의 반을 농축하였다.

그리고, 상기 용액을 얼음조에서 냉각하여 2N HCl로 산성화시킨 다음, 생성물의 침전이 생길 때까지 물을 사용하여 희석하였다. 침전물을 여과하고 이를 포화 소듐 하이드로겐 카보네이트 용액에 용해시켰다. 수용액을 에틸 에테르를 첨가하여 반복하여 흔들고, 2N HCl을 사용하여 재산성화하고 얼음조에서 냉각하였다.

수용액층으로부터 생성물을 반복 추출하였고, 무수 소듐 설페이트로 수분을 제거한 다음, 진공하에서 용매를 제거하고 에틸 아세테이트/n-헥산 혼합물로 결정화하여 얻은 고체 생성물을 건조하여 산 1a 5.5g(수율 33%)을 얻었다.

녹는점: 141～144 ℃

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 3.55(2H, s, CH_2COOH); 3.83(3H, s, COOCH_3); 3.9(3H, s, PhOCH_3); 6.95～7.2(3H, m, Ar); 7.8(1H, s, C H=C).

b) (R,S)-4-(6-메톡시-7-플루오로페닐)-3-카르보메톡시부타노익 산 2a의 제조

에틸 아세테이트 80㎖에 4-(6-메톡시-7-플루오로페닐)-3-카르보메톡시-3-부타노익산 2g(0.0075몰)을 용해시키고, 1.5시간 동안 5.5 p.s.i. 수소압력하에서 Pd/C 200 ㎎를 사용한 파르(Parr) 기기에서 수소화시켰다.

상기 용액을 셀라이트를 통하여 촉매를 여과하고 진공하에서 용매를 제거하여 오일성 생성물 1.9g을 얻었으며 자발적으로 결정화되었다(수율 93%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ(p.p.m): 2.3～2.45(1H, m, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2.5～2.75(2H, m, C<u>H</u>$_2$COOH); 2.8～3.1(2H, m, PhC<u>H</u>$_2$); 3.6(3H, s, COOC <u>H</u>$_3$); 3.8(3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6.75～6.9(3H, m, Ar)

c) <u>(R,S)-6-메톡시-7-플루오로-4-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익 산 에틸 에스테르 3a의 제조</u>

무수 메틸렌 클로라이드 100㎖에 (R,S)-4-(6-메톡시-7-플로오로페닐)-3-카르보메톡시-부타노익산 2a를 5.6g(0.021몰) 용해시키고; 포스포러스 펜타클로라이드 5g(0.024몰)을 첨가하고 0 ℃에서 45분 동안 유지하였다. 온도를 -10 ℃로 올리고, 알루미늄 클로라이드 3.6g(0.027몰)을 첨가하고 용액을 방치하여 온도를 40분 동안 20℃가 되게한 다음, 1시간 동안 환류온도로 가열하였다.

용매를 진공하에서 증발시키고; 차가운 물 100㎖를 첨가하여 현탁시키고 에틸 아세테이트로 3번 추출하였고; 유기용액을 무수 소듐 설페이트로 탈수시키고 진공하에서 용매를 제거하여 고체 생성물 4.3g을 얻었다(수율 81%).

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.7～2.95(2H, m, $PhCH_2$); 3.1～3.22(3H, m, PhCOC<u>H</u>$_2$, CHCOOC<u>H</u>$_3$); 3.7(3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 3.9(3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6.95(1H, d, Ar); 7.6(1H, d, Ar).

d) <u>(R,S)-6-메톡시-7-플루오로-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익 산 메틸 에스테르 4a의 제조</u>

무수 메탄올과 차가운(glacial) 아세트산 50㎖로 구성된 혼합물 100㎖에 (R,S)-6-메톡시-7-플로오로-4-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 메틸 에스테르 3a를 6g(0.024몰) 용해시키고; 용액을 4시간 동안 50 p.s.i. 수소압력하에서 Pd/C 800 ㎎를 사용한 파르(Parr) 기기에서 수소화시켰다.

촉매를 셀라이트를 통하여 여과하고, 용매를 진공하에서 제거하여 고체 생성물 5.5g을 얻었다(수율 98%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.75～1.9(1H, m, C<u>H</u>HCHCOOCH$_3$); 2.1～2.22(1H, m, CH<u>H</u>CHCOOCH$_3$); 2.6～2.8(3H, m, PhC<u>H</u>$_2$CHCOOCH$_3$, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2.9(2H, d, PhC<u>H</u>$_2$CH$_2$); 3.7(3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 3.83(3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6.62(1H, d, Ar); 6.78(1H, d, Ar).

e) <u>(R,S)-6-메톡시-7-플루오로-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익 산 5a의 제조</u>

50% 메탄올 수용액 50㎖에 포타슘 카보네이트 2.2g이 용해된 용액으로 (R,S)-6-메톡시-7-플로오로-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 4a를 5.2g(0.022몰) 현탁시키고; 결과용액을 1시간 동안 환류시켰다.

메탄올을 진공하에서 제거하고 용액을 물 150㎖로 희석하고 에틸 에테르로 세척하여; 수용액을 12N HCl로 산성화시켰다.

얻어진 침전물을 여과하고 건조하여 생성물 4.8g을 얻었다(수율 97%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.8～1.95(1H, m, C<u>H</u>HCHCOOCH$_3$); 2.1～2.25(1H, m, CH<u>H</u>CHCOOCH$_3$); 2.65～2.85(3H, m, PhC<u>H</u>$_2$CHCOOCH$_3$, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2.95(2H, d, PhC<u>H</u>$_2$CH$_2$); 3.82(3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6.6(1H, d, Ar); 6.8(1H, d, Ar).

f) <u>(R,S)-2-아미노-6-메톡시-7-플루오로테트랄린-하이드로 클로라이드(ST 1262) 6a의 제조</u>

질소기류하에서 티오닐 클로라이드 9㎖에 (R,S)-6-메톡시-7-플로오로-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 5a를 4.11g(0.018몰) 용해시키고, 용액을 4시간 동안 60 ℃에서 가열한 다음; 톨루엔을 첨가하고 진공하에서 반복하여 용액을 추출하였다.

녹색 오일을 얻었으며, 이를 무수 아세톤 12㎖에 용해시키고 반응혼합물을 0℃로 냉각하여 물 12㎖에 소듐 아자이드 1.75g(0.024몰)을 녹아있는 용액을 상기 용액에 한 방울씩 첨가하였다.

혼합물을 30분 동안 교반하면서 방치하여 반응시키고, 20 ℃로 온도를 상승시켰다. 혼합물을 다시 0~5℃로 냉각하였고 물 150㎖를 첨가하였다.

침전물을 얻었으며, 이를 진공하에서 건조하여 애시드 아자이드 3.9g을 얻었다.

생성물을 톨루엔 12㎖에 용해시키고 30분 동안 100℃로 가열한 다음, 용매를 제거하여 농축된 오일을 얻었으며, 무수 벤질 알코올 10㎖를 첨가하고 다시 100 ℃에서 6시간 동안 가열하였다.

용액을 밤새도록 5℃로 냉각하여; 침전물을 얻은 다음, 여과하고 건조하여 카르보벤즈옥시 유도체 4.7g을 얻었다.

생성물을 무수 에탄올 350㎖에 넣고, 서서히 가열하면서 용해하여 진한 HCl 약 2㎖로 산성화하고; Pd/C 500 mg을 첨가하고 파르(Parr) 기기에 넣어 혼합물을 얻었으며 50 p.s.i. 수소압력하에서 5시간 동안 수소화시켰다.

촉매를 셀라이트로 여과하고 가열된 에탄올로 반복 세척하여; 용매를 진공하에서 제거하고 에탄올/에틸 에테르 혼합물로 결정화하여 고체를 얻었다(수율 58%).

녹는점: 230 ℃에서 분해

^{1}H-NMR($DMSOd_6$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.6~1.8(1H, m, CHHCHN+); 2.0~2.2(1H, m, CHHCHN+); 2.6~3.0(4H, m, PhCH $_2$CH$_2$, PhCH $_2$CHN+); 3.8(3H, s, OCH $_3$); 6.8~7.0(2H, 2d, Ar).

실시예 6(반응식 2)

g) (R,S)-2-아미노-6-하이드록시-7-플루오로테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1267) 7의 제조

물에 녹아있는 47% 브롬산 8㎖에 (R,S)-2-아미노-6-메톡시-7-플루오로테트랄린 하이드로클로라이드 6a를 0.6g (0.061몰) 현탁시킨 다음, 밤새도록 130℃에서 가열하였다.

진공하에서 증발에 의해 물을 제거하고; 거무스름한 고체를 얻었으며, 50% 메탄올 수용액에 용해시키고 염기형태로 활성화된 A-21 수지 20 ㎖의 컬럼을 통하여 용리시켰다.

용리용액을 3N 염산을 사용하여 pH 2로 산성화시키고, 진공하에서 농축하고 염화수소 형태로 활성화된 A-21 수지 20㎖ 컬럼을 통하여 용리시켰다.

용매를 진공하에서 완전히 제거하였다.

고체를 얻었으며, 이를 아세톤으로 처리하고 여과하여 메탄올로부터 에틸 에테르 첨가에 의해 결정화하여; 생성물 350 mg을 얻었다(수율 62%).

녹는점: 200 ℃에서 분해

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.7~1.9(1H, m, CHHCHN+); 2.1~2.3(1H, m, CHHCHN+); 2.7~3.1(4H, m, PhCH $_2$CH$_2$; PhCH $_2$CHN+); 3.4~3.6(1H, m, CHN+); 6.6~6.85(2H, 2d, Ar).

실시예 7(반응식 2)

(R,S)-2-아미노-6-메틸-7-아세틸테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1274) 10의 제조

a) 4-(6-메틸페닐)-3-카르보메톡시-3-부타노익산 1b의 제조

출발물질로 p-톨루알데하이드를 이용하고, 결정화 용매로 사이클로헥산/에틸 아세테이트 혼합물을 사용하여 4-(6-메톡시-7-플루오로페닐)-3-카르보메톡시-3-부타노익산 1a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 27%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ(p.p.m): 2.35(3H, s, PhC<u>H</u>$_3$); 3.58(2H, s, C<u>H</u>$_2$COOH); 3.83(3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 7.15~7.3(4H, m, Ar); 7.87(1H, s, C<u>H</u>=C).

b) <u>4-(6-메톡시페닐)-3-카르보메톡시-3-부타노익산 2b의 제조</u>

출발물질로 산 1b를 이용하고, 수소화시간을 2.5시간으로 하여 4-(6-메톡시-7-플루오로페닐)-3-카르보메톡시-3-부타노익산 2a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 94%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ(p.p.m): 2.23(1H, s, PhC<u>H</u>$_3$); 2.28~2.45(1H, m, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2.55~2.75(2H, m, C<u>H</u>$_2$COOH); 2.9~3.1(2H, m, PhC<u>H</u>$_2$); 3.62(3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 6.9~7.1(4H, m, Ar)

c) <u>(R,S)-6-메톡시-4-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 메틸 에스테르 3b의 제조</u>

출발물질로 산 2b를 이용하여 (R,S)-6-메톡시-7-플로오로-4-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 메틸 에스테르 3a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 94%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.35(3H, s, PhC<u>H</u>$_3$); 2.7~2.9(2H, m, PhC<u>H</u>$_2$); 3.1~3.2(3H, m, PhCOC<u>H</u>$_2$, C<u>H</u>COOCH$_3$); 3.7(3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 7.1~7.35(2H, m, Ar); 7.8(1H, s, Ar).

d) <u>(R,S)-6-메틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익 산 메틸 에스테르 4b의 제조</u>

출발물질로 메틸 에스테르 3b를 이용하여 (R,S)-6-메톡시-7-플로오로-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 메틸 에스테르 4a에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 94%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.7~1.95(1H, m, C<u>H</u>HCHCOCCl$_3$); 2.1~2.3(1H, m, CH<u>H</u>CHCOOCH$_3$); 2.3(3H, s, PhC<u>H</u>$_3$); 2.6~2.85(3H, m, PhC<u>H</u>$_2$CHCOOCH$_3$, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2.9~3.0(2H, d, PhC<u>H</u>$_2$CH$_2$); 3.72(3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 6.85~7.1(3H, m, Ar).

h) <u>(R,S)-6-메틸-7-아세틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 메틸 에스테르 8의 제조</u>

메틸렌 클로라이드 30 ㎖에 (R,S)-6-메틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 메틸 에스테르 4b 3.8g(0.0186몰)을 용해시킨 다음; 질소기류하에서 용액을 5℃로 냉각하여 알루미늄 클로라이드 5.2g을 첨가하고 같은 온도에서 아세틸 클로라이드 1.6 ㎖를 교반하면서 한 방울씩 첨가하였다.

반응혼합물을 1.5시간 동안 실온에서 반응시키고, 매우 서서히 차가운 물 100 ㎖를 교반하면서 첨가하여 냉각하였다. 용액을 메틸렌 클로라이드 100 ㎖(총부피)로 반복 추출하고 차가운 물로 반복하여 세척하였다.

유기층을 무수 소듐 설페이트로 무수화시키고, 용매를 진공하에서 건조하여 거무스름한 고체를 얻었으며, 이를 건조하여 정제되지 않은 생성물 3.8g을 얻어 n-헥산/에틸 아세테이트 8:2 용매를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

진공하에서 용매를 제거하여 생성물 1.8g을 얻었다(수율 40%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.78～2.0(1H, m, CHHCHCOCOOCH $_3$); 2.1～2.3(1H, m, CHHCHCOCOOCH$_3$); 2.45(3H, s, COCH $_3$); 2.55(3H, s, PhC H $_3$); 2.65～2.85(3H, m, PhCH $_2$CHCOOCH$_3$, CHCOOCH$_3$); 2.95(2H, d, PhCH $_2$CH$_2$); 6.95(1H, s, Ar); 7.45(1H, s, Ar).

i) (R,S)-6-메틸-7-아세틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 9의 제조

출발물질로 메틸 에스테르 8을 이용하고, 반응시간으로 1.5시간 동안 환류시키며 결정화 혼합물로 n-헥산/에틸 아세테이트를 이용하여 (R,S)-6-메톡시-7-플루오로-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 5에 대한 이용방법과 근본적으로 비슷한 방법으로 제조하였다(수율 82%).

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 2.78～2.92(1H, m, CHHCHCOOH); 2.1～2.25(1H, m, CHHCHCOOH); 2.4(3H, s, COCH $_3$); 2.5(3H, s, PhCH $_3$); 2.7～2.9(3H, m, PhCH $_2$CHCOOH, CHCOOH); 2.9～3.0(2H, d, PhCH $_2$CH $_2$); 6.9(1H, s, Ar); 7.4(1H, s, Ar).

l) (R,S)-2-아미노-6-메틸-7-아세틸테트랄린 하이드로 클로라이드(ST 1274) 10의 제조

무수 아세톤 40 ㎖에 (R,S)-6-메틸-7-아세틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2-나프토익산 9 6.5g(0.028몰)을 현탁시키고; 트리에틸아민 4.3 ㎖(0.0307몰)을 상기 현탁액으로 서서히 한 방울씩 첨가하였다. 용액의 온도를 -5℃로 내리고 에틸-클르오로포르미에이트 2.95 ㎖(0.0307몰)가 용해된 아세톤 4 ㎖ 용액을 서서히 한 방울씩 첨가하였다.

소듐 아자이드 3.65g(0.056몰)이 물 80 ㎖에 용해되어 있는 용액을 0℃를 유지하면서 상기 용액에 한 방울씩 첨가하고; 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 유지하여 침전물을 얻었다. 여기에 차가운 물 80 ㎖를 추가로 첨가하고 용액을 톨루엔 100 ㎖로 추출하여 유기용매를 무수 소듐 설페이트로 탈수시켰다.

용액에 톨루엔 30 ㎖를 첨가하여 100℃로 가열하고, 100℃에서 1.5시간을 더 유지하였다.

용매를 진공하에서 증발시켜 제거하여 엷게 착색된 오일 4.9g을 얻었고, 이를 8N HCl 50 ㎖에 현탁시켜 100 ℃에서 1.5시간 동안 교반하면서 가열하였다.

용매를 진공하에서 제거하고; 물 100 ㎖를 첨가한 다음 얼음조에서 냉각하여 현탁액을 4N 소듐 카보네이트로 교반하면서 pH 10이 되게 하였다.

수용액을 소량씩 분배하여 에틸 에테르 120 ㎖로 추출하였다. 유기층을 무수 소듐 설페이트로 탈수시키고, 가스상태의 염산을 에테르 용액속으로 버블시켰다.

침전물을 진공하에서 여과하고 공기중에서 건조하여 엷게 착색된 고체 2.3g을 얻어 에틸 아세테이트/메탄올 혼합물로 결정화하였다.

고체를 오븐에서 건조하여 무색 결정 생성물 2g을 얻었다(수율 30%).

녹는점: 195～197 ℃에서 분해

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ(p.p.m): 1.75～1.85(1H, m, CHHCHN+); 2.15～2.3(1H, m, CHHCHN+); 2.42 (3H, s, CH $_3$CO); 2.53(3H, s, CH $_3$Ph); 2.8～3.0(4H, m, PhCH $_2$CHN+), PhCH $_2$CH$_2$); 3.5～3.65(1H, m, CHN+); 7.05(1H, s, Ar); 7.6(1H, s, Ar).

패혈성 쇼크, 증상발현전의 조사로 물질의 가능한 방어효과를 평가하는 목적을 위해 가장 광범위하게 사용되는 방법론적인 접근은 실험 동물속에 직접 주입된 독성 물질(외 또는 내독소)로 중독된 실험모델 또는 동물에 접종된 감염된 세포에 의해 대량 방출되는 실험 모델을 이용하는 것이다.

다음의 약리학적 테스트의 상세한 설명에서는 참조 화합물 (R,S)-2-아미노-6-플루오로-7-메톡시테트랄린 하이드로클로라이드(ST 626)와 비교해 볼 때, 본 발명에 따른 화합물의 몇몇을 사용하여 얻은 결과를 보여주고 있다.

상기에서 언급된 바와 같이, 화합물 626은 구조적으로 그리고 약리학적 활성이 본 발명의 화합물과 비슷한 것으로 이미 알려져 있다.

이러한 결과는 본 발명의 화합물의 예방 및 치료학적 효능을 설명해주고 있으며, 또한 화합물의 유리한 약리학적 측면에 대한 책임이 있는 가능한 작용기전의 징후, 즉 혈액 중에서 염증성 사이토카인 레벨(TNF, IL-1β, IL-6 및 IFN-ɣ)의 격렬한 저감이 나타난다.

패혈성 쇼크의 쥐(murine) 모델에서의 ST 1238, ST 1274 및 ST 1275 효과의 평가

약 6주된 수컷 마우스 BALB/C(C.River)를 이용하였다(실험군 당 10 마리의 동물사용).

상기의 동물은 22±2 ℃의 일정한 온도와 50±15 %의 상대습도가 유지된 우리내에 두었으며, 12시간 동안 빛을 주고(7 am ~ 7 pm) 12시간 동안 어둡게 하였고(7 pm ~ 7 am), 음식과 마실 물에 접근이 제한되지는 않았다.

사용된 물질은 다음과 같다: LPS(대장균(*Escherichia coli*) 혈청형 O26:B6), 1회분의 73570 JB(Difco), 1회분의 LPS(살모넬라속 티푸스균, *Salmonella typhosa*), SEB(황색포도상 구균, *Staphylococcus aureus*), 1회분의 144H4024(시그마), 및 D-갈락토사민 1회분의 031EE002485(머크).

상기 시험 화합물은 ST 1238, ST 1274 및 ST 1275를 사용하였다.

상기 화합물 용액의 pH는 pH 5.5 보다 더 낮지 않은 수치를 갖도록 0.1 N NaOH(저온 교반으로 유지되는 용액)로 적절히 보정하였다.

***S. typhosa*(살모넬라속 티푸스균) LPS에 의해 유도된 치사율**

동물들은 사용하기에 앞서 *S. thphosa* LPS를 복강내(i.p.)에 투입하였으며, 내독소는 무균염 내에 처음 용해한 다음 LD_{80}에 거의 부합되는 투여량인 27.0 ㎎/㎏으로 200 ㎕ 부피로 주입하였다.

상기 시험 화합물은 내독소 공격(LPS)의 30분 전 및 5 분 후에 LD_{50}의 약 1/10에 거의 부합되는 투여량으로 200 ㎕ 부피의 무균염을 정맥내 주사(i.v.)로 투여하였다.

D-갈락토사민으로 증감된(sensitised) 마우스에서 대장균(*E. coli*) LPS(대장균 혈청형)에 의해 유도된 치사율

동물들은 D-갈락토사민(1000 ㎎/㎏, i.p.)으로 증감하였고, 동시에 대장균(*E. coli*) LPS (0.30 ㎎/㎏, i.p.)를 처리하여 총 부피가 200 ㎕이 되었다.

상기 LPS의 투여량은 D-갈락토사민에 의해 증감된 상기 동물들에 있어 LD_{50}의 1/10에 거의 부합되는 양을 사용하였다.

상기 시험 화합물들은 LPS 공격의 30분 전 및 5 분 후, 또는 5분전 30분 후에 LD_{50}의 약 1/10 에 거의 부합되는 무균염 200 ㎕ 부피를 정맥내 주사(i.v.)로 투여하였다.

D-갈락토사민으로 증감된 마우스의 SEB(*Staphylococcus aureus*)에 의해 유도된 치사율

동물들은 D-갈락토사민(1000 ~ 1500 ㎎/㎏, i.p.)으로 증감되고, 동시에 장독소 SEB(3 ㎎/㎏, i.p.)를 투입하여 총 부피가 200㎕이 되었다. 상기 SEB의 투여량은 대략적으로 LD_{80}에 부합되는 양으로 사용하였으며, 이러한 함량은 예비실험으로 측정하였다.

상기 시험 화합물들은 SEB 공격의 30분 전 및 5 분 후, 또는 5분전 30분 후에 LD_{50}의 약 1/10에 거의 부합되는 무균염 200 ㎕ 부피를 정맥내 주사(i.v.)로 투여하였다.

각각의 동물의 사망을 주시하면서, 모든 실험에서 10일 동안 생존율을 측정하였다.

상기 방어 효과의 통계학적 유의성은 원-테일드 피셔(one-tailed Fisher's)의 정확성 시험을 이용하여 평가하였다.

S. typhsa LPS에 의해 유도된 치사율

S. typhosa LPS의 이러한 내독소 쇼크의 실험모델에 있어, 상기 ST 1274, ST 1275 화합물은 공격투여 전 및 후에 투여할 때 치사율이 확연히 감소하였다(각각 $p<0.01$ 및 $p<0.05$)(표 1).

[표 1]

S. typhosa LPS 주입에 의해 마우스에 유도된 치사율에 대한 ST 1274 및 ST 1275의 정맥내주사 투여 효과.

전/후 공격투여 처리 계획(30분 전 및 5분 후)

처리(투여량)	사망수/전체	생존 증가율(%)[a]	P[b]
LPS 대조군	14/20	-	-
ST 626(6 mg/kg, i.v.)	6/20	+40	<0.05
LPS 대조군	18/20	-	-
ST 1274(5.5 mg/kg, i.v.)	10/20	+40	<0.01
LPS 대조군	10/10	-	-
ST 1275(4 mg/kg, i.v.)	6/10	+40	<0.05
a : LPS와 비교하여 투여된 동물의 생존 증가율			
b : 원-테일드(one-tailed) 피셔의 정확성 시험에 의해 측정된 통계학적 유의성			

D-갈락토사민으로 증감된 마우스내 대장균(_E. coli_) LPS에 의해 유도된 치사율

ST 1238 화합물은 일시적인 투여 프로토콜을 채택하여($p<0.001$ 및 $p<0.01$)(표 2 및 표 3) 치사율의 상당한 감소를 보이는 반면에, ST 1274 및 ST 1275의 화합물은 공격투여 전 및 후의 투여 프로토콜(표 2)에서 생존율(20 %)내로 약간의 증가량을 보인다.

[표 2]

D-갈락토사민으로 증감된 마우스의 대장균(E.coli) LPS의 투여에 의해 유도된 치사율에 대한 ST 1238, ST 1274 및 ST 1275의 정맥내 주사 투여 효과.

전/후 공격투여 투여 계획(30분 전 및 5분 후)

처리(투여량)	사망수/전체	생존 증가율(%)[a]	P[b]
LPS+D-GaIN 대조군	25/29	-	-
ST 626(6 mg/kg, i.v.)	21/28	+11	ns
LPS+D-GaIN 대조군	17/20	-	-
ST 1238(18 mg/kg, i.v.)	5/20	+40	<0.001
LPS+D-GaIN 대조군	7/10	-	-
ST 1274(5.5 mg/kg, i.v.)	5/10	+20	ns
LPS+D-GaIN 대조군	7/10	-	-
ST 1275(4 mg/kg, i.v.)	5/10	+20	ns
a : 대조군과 비교하여 투여된 동물의 생존 증가율 b : 원-테일드(one-tailed) 피셔의 정확성 시험에 의해 측정된 통계학적 유의성			

[표 3]

D-갈락토사민으로 증감된 마우스내 대장균(E.coli) LPS의 투여에 의해 유도된 치사율에 대한 ST 1238의 정맥내 주사 투여 효과.

후 공격투여 투여 계획

처리(투여량)	사망수/전체	생존 증가율(%)a	Pb
LPS+D-GaIN 대조군	16/20	-	-
ST 1238(18 mg/kg, i.v.)	07월 19일	+44	<0.01
a : 대조군과 비교하여 투여된 동물의 생존 증가율 b : 원-테일드(one-tailed) 피셔의 정확성 시험에 의해 측정된 통계학적 유의성			

D-갈락토사민으로 증감된 마우스의 SEB(*Staphylococcus aureus*)에 의해 유도된 치사율

이러한 실험 모델에서 모든 화합물은 대조군(70% ~ 90%)과 비교하여 공격투여 30분 전 및 5분 후 투여한 경우 치사율이 감소한다(표 4). ST 1238은 여전히 상기 공격투여 전의 투여 계획($p<0.001$)에서 매우 상당한 방어 효과를 유지한다(표 5).

[표 4]

D-갈락토사민으로 증감된 마우스에서 SEB 내독소로부터 LPS의 투여에 의해 유도된 치사율에 대한 ST 1238, ST 1274 및 ST 1275의 정맥내주사 투여 효과.

공격 투여 전 및 후의 투여 계획(30분 전 및 5분 후)

처리(투여량)	사망수/전체	생존 증가율(%)[a]	p[b]
SEB+D-GaIN 대조군	15/20	-	-
ST 1238(18 mg/kg, i.v.)	1/20	+70	<0.001
SEB+D-GaIN 대조군	9/10	-	-
ST 1274(5.5 mg/kg, i.v.)	0/10	+90	<0.001
SEB+D-GaIN 대조군	9/10	-	-
ST 1275(4 mg/kg, i.v.)	1/10	+80	<0.01
a : 대조군과 비교하여 투여된 동물의 생존 증가율 b : 원-테일드(one-tailed) 피셔의 정확성 시험에 의해 측정된 통계학적 유의성			

[표 5]

D-갈락토사민으로 증감된 치사율에 대한 ST 1238의 정맥내주사 투여 효과.

후 공격투여 투여계획(5분 후 및 30분 후)

처리(투여량)	사망수/전체	생존 증가율(%)[a]	p[b]
SEB+D-GaIN 대조군	18/20	-	-
ST 1238(18 mg/kg, i.v.)	4/20	+70	<0.001
a : 대조군과 비교하여 투여된 동물의 생존 증가율 b : 원-테일트(one-tailed) 피셔의 정확성 시험에 의해 측정된 통계학적 유의성			

랫트 혈액배양 내의 LPS에 의해 유도된 혈청 TNF(종양 괴사 인자)에 대한 ST 1238 효과의 평가

LPS에 의해 자극된 전체 혈액세포 배지가 실험 모델로 이용되었다. 이러한 모델은 어느 정도의 한계성이 있음에도 불구하고 그람-음성 박테리아가 혈류속으로 지방질-당류를 방출하여 면역계 세포와 접촉하게 되는 증후군인 내독소 중독의 생리병리학적인 측면을 모방하게 된다.

실제로, 이러한 모델은 최근 TNF 및 IL-1 방출의 잠재적 억제제를 평가하기 위한 것으로 채택되어 왔다[GC Rice 등, *Shock*, 4:254~266, 1994, AJH Gearing 등, *Nature*, 370:555~557, 1994. K. Tschaikowsky, *Biochim. Biophysical. Acta*, 1222:113~121, 1994, A Haziot 등, *J. Immunol.*, 152:5868~5876, 1994].

약 175 ~ 200g 무게의 수컷 위스터 랫트(C. River)가 이용되었다.

상기의 동물은 22±2 ℃의 일정한 온도와 50±15 %의 상대습도가 유지된 우리내에 두었으며, 12시간 동안 빛을 주고(7 am ~ 7 pm) 12시간 동안 어둡게 하였고(7 pm ~ 7 am), 음식과 마실 물에 접근이 제한되지는 않았다.

상기 시험 화합물은 ST 1238을 사용하였다.

상기 내독소는: 살모넬라 티포사 1회분의 81H4018(시그마)로부터 LPS가 이용되었다.

혈액 시료의 처리

단두에 의해 위스터 랫츠로부터 헤파린화된 혈액 시료, 0.450 mL/바이얼을 채취하였다.

무균염에 용해된 상기 시험 화합물(최종 농도 0.050 mM) 부피 0.025㎖(20x 용액)를 혈액 시료가 포함된 바이얼에 첨가하였다.

Salminella typhosa(살모넬라 티푸스) LPS(LPS내 최종 농도는 1㎍/㎖)의 0.025 ㎖(졸 20x)를 5% 이산화탄소로 습윤된 대기하에 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 상기 시료에 첨가하였다.

상기 시료를 동일한 조건하에서 4시간 동안 항온배양한 다음, 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상등액을 TNF 분석을 위해 -80℃에서 냉동보관하였다.

TNF 생물학적 활성은 1% FCS가 함유된 RPMI 배지내에서 측정하였다.

TNF 생물학적 평가

TNF 분석을 위해 TNF가 함유된 상기 시료(50 ㎕)의 연속적인 희석은 프리마리아 96-웰 미세적정 판(Primaria 96-well microtiter plates)속에서 직접 제조하였다; 최종 농도가 4 ㎍/㎖인 액티노마이신 D-마니톨(50㎕)은 1% FCS를 첨가하여 RPMI 배지내 제조되었고, 상기 웰 내에 첨가되었다. 이러한 억제제는 TNF에 대한 세포 민감도를 증가시킨다.

L929(TNF의 독성 작용으로 민감해진 쥐과 동물 섬유육종)의 현탁액(4×10^5 세포/㎖에서 표준화된) 100㎕을 각각의 웰속으로 분산하였다. 적절한 대조군, 예를 들면, 액티노마이신-D 대조군(TNF가 없는 것을 제외하고, 세포 + 액티노마이신-D)과 또한 세포 대조군(세포 + 단독 배양 배지)을 제조하였다.

5% 이산화탄소가 포함된 대기하에 18시간 동안 37℃에서 항온배양한 다음, 신선하게 제조된 용액 1 ㎎/mL XTT(소디엄 3'-[1-[(페닐아미노)-카르보닐]-3,4-테트라졸리움]-비스(4-메톡시-6-니트로)벤젠-술포닉 애시드 하이드레이트) 및 125 μM으로 상기 세포를 염색하였다.

상기 방법에 따른 PMS(페나진 매토설페이트)는 다음에 기술되었다.

상기 XTT는 RPMI 배지내 60 ℃에서 용해하였다(1 ㎎/㎖).

상기 PMS 모액 100 mM(20일 동안 4℃ 어둠 속에서 안정한)를 PBS 내에 PMS를 용해하여 제조하였으며, PMS를 완전히 용해하기 위하여 간단히 초음파를 수행하였다. 상기 PMS 용액 100 mM를 XTT로 1:800 희석하여 최종농도가 PMS 내 125μM 및 XTT 내 1㎎/㎖가 되도록 하였다. 상기 염료 혼합물은 사용하기 전에 우선적으로 여과하여야 한다.

세포는 각각 PMS 내 25 μM, XTT 내 0.2 ㎎/㎖의 최종농도를 가지도록 최종 부피가 250 ㎕/well인 XTT-PMS 염료 용액 50 ㎕/well 첨가에 의해 염색되었다. 블랭크는 배양배지 200㎕와 XTT-PMS 용액 50㎕가 포함된 웰내에서 제조되었다.

마이크로타이터 플레이트는 5% 이산화탄소 하에 37℃에서 2~2.5 시간 동안 항온 배양시켰다(총 배양시간 = 약 20시간)

각 시료의 흡수값은 마이크로타이터 플레이트 판독기로 450 nm 리딩(reading) 파장 및 620 nm 기준 파장을 해독하여 측정하였다(마이크로타이터 플레이트 판독기는 시료값으로부터 "블랭크"에서 얻은 값을 빼도록 프로그램화되었다).

상기 TNF 적정은 다음 방법을 이용하여 계산되었다.

정의에 의하면, 생물학적 활성의 1 단위는 액티노마이신-D 흡수도의 세미맥시멀(semimaximal)에 의해 얻었다.

시료의 희석은 흡수값 곡선을 그리고 선형부분을 y = ax + b에 의해 설명하였다.

y에 대한 액티노마이신-D 대조군의 a 및 b값을 대입하고(컴퓨터에 의해 선형 회귀 분석으로부터 얻은) 세미맥시멀(semimaximal) 흡수값(1 생물학적 단위로 부합되는)을 대용한 후에 식을 시료 희석의 역수를 나타내는 x에 대하여 계산하였다.

U/mL에서 TNF 적정을 얻었다.

데이터는 투-테일드 스튜던츠 *t* 테스트(two-tailed Studuent's *t* test)를 이용하여 통계학적으로 분석하였다.

결과

다음 표 6에서 얻은 결과에서 화합물 ST 1238은 LPS를 사용하여 자극된 랫 혈액 배양에 의해 TNF 생산이 감소(39%)되는 것을 보이고 있다.

[표 6]

S. thphosa LPS(1㎍/mL)를 사용하여 자극된 랫 혈액 배양으로 TNF 생산에 대한 ST 1238의 효과가 유도되었다.

화합물들은 50㎛M의 농도에서 시험하였다. 실험조건은 상기 물질 및 방법들로 설명하였다.

처리	TNF (평균% 수치)	표준 편차	P*
LPS 대조군	100	0	-
LPS + ST 1238	61	25	<0.01

* 투-테일드 스튜던츠 *t* 테스트(two-tailed Student's *t* test)로 측정된 통계학적 유의성.

두 종류의 쥐 쇼크 모델에서 혈청 TNF 레벨에 대한 ST 1238의 효과의 평가

약 6주된 수컷 마우스 BALB/C(C. RIVER)가 사용되었다(실험군 당 10마리의 동물사용).

상기의 동물은 22±2 ℃의 일정한 온도와 50±15 %의 상대습도가 유지된 우리내에 두었으며, 12시간 동안 빛을 주고(7 am ~ 7 pm) 12시간 동안 어둡게 하였고(7 pm ~ 7 am), 음식과 마실 물에 접근이 제한되지 않았다.

시험된 화합물은 ST 1238이었다.

사용된 물질은 다음과 같다: LPS(에스케리키아 콜라이 혈청형 O26:B6), 1회분의 73570 JB(Difco), SEB (*Staphylococcus aureus*), 1회분의 144H4024(시그마), 및 D-갈락토사민 1회분의 031EE002485(머크).

D-갈락토사민으로 증감된(sensitized) 마우스에서 대장균(*E. coli*)에 의해 유도된 치사율

실험 조건은 정확하게 상기 앞서 설명된 바와 같다.

D-갈락토사민으로 증감된(sensitized) 마우스에서 SEB(*Staphylococcus aureus*)에 의해 유도된 치사율

실험 조건은 정확하게 상기 앞서 설명된 바와 같다.

혈액 시료

두 개의 실험 모델에서, 혈액시료는 시험후에 90분에 채혈되었다(혈청 TNF 레벨의 피크).

에테르-마취된 마우스에서 후-안와(眼窩) 동 천자(retro-ornital sinus puncture)로 혈액을 얻었다. 혈액 시료는 상온에서 2시간 동안 항온배양되었고, 상기에서 얻어진 혈청은 20분간 3000 rpm에서 원심분리되었으며, TNF 분석을 위해 -80℃에서 냉동보관되었다.

TNF 생물학적 분석

생물학적 활성은 1% FCS를 포함하는 RPMI 매체에서 결정하였다.

TNF를 포함하는 시료 중의 일련의 희석의 50 μL/웰은 프리마리아 마이크로타이터 플레이트(Primaria microtiter plates)에 직접 첨가하였다.

실험 조건은 정확하게 상기 앞서 설명된 바와 같다.

데이터는 원-테일드 스튜던츠 *t* 테스트(one-tailed Student's *t* test)를 이용하여 통계학적으로 분석하였다.

결과

D-갈락토사민으로 증감된(sensitized) 마우스에서 대장균(*E. coli*)에 의해 유도된 치사율

이러한 실험에서 얻은 결과는 다음 표 7에 나타내었다. 화합물 ST 1238은 두 처리방법 계획으로 대장균(*E. coli*) LPS에 의해 유도된 TNF 레벨이 상당히 감소한다(전-/후- 공격처리 및 단지 후-공격 처리; 각각 $p < 0.008$ 및 $p < 0.0001$).

[표 7]

D-갈락토사민으로 증감된(sensitised) 마우스에 대장균(E. coli) LPS 주입에 의해 TNF 생산에 대한 ST 1238, 18 mg/kg, 정맥내 주사 투여의 효과.

전- 및 후-공격 처리 계획(-30 및 +5분)과 단지 후-공격 처리만 하는 계획(+5 및 +30분)

처리	-30/+5 분 계획			+5/+30분 계획		
	TNF(U/mℓ)			TNF(U/mℓ)		
	평균	S.D.	P	평균	S.D.	P
LPS 대조군	154.2	41	-	-	-	-
ST 626 (6mg/kg, i.v.)	35	10	<0.01	-	-	-
LPS + D-GaIN 대조군	13.6	4.7	-	18.1	1.8	-
ST 1238	0.4	0.2	0.008	2.2	0.6	0.0001
* *Salmonella typhosa* LPS와 접촉 실험						

D-갈락토사민으로 증감된(sensitized) 마우스에서 SEB에 의해 유도된 치사율

D-갈락토사민으로 증감된(sensitized) 동물속에서 SEB 내독소로부터 LPS에 의해 유도된 TNF 생산의 실험 모델(표 8)로 얻은 결과는 전-/후-공격처리 계획($p < 0.0001$)과 단지 후-공격처리 계획($p < 0.0002$) 둘다 사용하여 화합물 ST 1238이 TNF 생산을 상당히 감소시키는 것으로 보이고 있다.

[표 8]

D-갈락토사민으로 증감된(sensitised) 마우스에 SEB 내독소로부터 LPS에 의해 유도된 TNF 생산에 대한 ST 1238, 18 mg/kg, 정맥내 주사 투여의 효과.

전- 및 후-공격처리 계획(-30 및 +5분)과 단지 후-공격처리 방법 계획(+5 및 +30분).

처리	-30/+5 분 계획			+5/+30분 계획		
	TNF(U/mℓ)			TNF(U/mℓ)		
	평균	S.D.	P	평균	S.D.	P
SEB + D-GalN 대조군	240.9	49.4	-	240.9	49.4	-
ST 1238	6.2	3	0.0001	27	3.9	0.0002

마우스에서 내독소 SEB에 의해 유도된 혈청 인터로이킨-1 베타(IL-β), 인터로이킨-6(IL-6) 및 인터페론-감마(IFN-γ)에 대한 SR 1238 효과의 평가

약 6주된 수컷 마우스 BALB/C(C. RIVER)가 사용되었다(실험군 당 10마리의 동물사용).

상기의 동물은 22±2 ℃의 일정한 온도와 50±15 %의 상대습도가 유지된 우리내에 두었으며, 12시간 동안 빛을 주고(7 am ~ 7 pm) 12시간 동안 어둡게 하였고(7 pm ~ 7 am), 음식과 마실 물에 접근이 제한되지 않았다.

시험된 화합물은 ST 1238이었다.

사용된 물질은 SEB(*Staphylococcus aureus*), 1회분의 144H4024(시그마) 및 D-갈락토사민 1회분의 031EE002485(머크)로부터 얻은 LPS이었다.

치사율은 D-갈락토사민으로 증감된 마우스에서 *S. aureus* SEB에 의해 유도되었다.

실험 조건은 정확하게 상기 앞서 설명된 바와 같다.

혈액 시료

혈액 시료는 IL-6에 대해 2시간 동안 후-공격처리 하고; IL-1β에 대해 4시간 동안 후-공격처리 및 IFN-g에 대해 6시간 동안 후-공격(challenge) 처리하여 채혈되었다.

에테르-마취된 마우스에서 후-안와(眼窩) 동 천자(retro-ornital sinus puncture)로 혈액을 얻었다. 혈액 시료는 상온에서 2시간 동안 항온배양되었고, 상기에서 얻어진 혈청은 20분간 3000 rpm에서 원심분리되었으며, TNF 분석을 위해 -80℃에서 냉동보관되었다.

TNF 생물학적 분석

생물학적 테스트는 각각 다음과 같은 분석 킷츠(kits)를 이용하여 나타내는 과정에 따라 수행하였다:

- 마우스 IL-1β 면역분석(MLBOO. R&D 시스템)

- 마우스 IL-6 EIA 킷(8-6706, PerSeptive Diagnostics)

- 마우스 IFN-ɣ EIA 킷(8-6716, PerSeptive Diagnostics).

데이터는 원-테일드 스튜던츠 *t* 테스트(one-tailed Student's *t* test)를 이용하여 통계학적으로 분석하였다.

결과

화합물 ST 1238은 분석된 염증성 사이토카인의 생산을 상당히 감소시켰고(IL-1β에 대해 $p < 0.001$; IL-6에 대해 $p < 0.0001$; IFN-ɣ에 대해 0.01); 실험에서 얻은 결과는 다음 표 9에 나타내었다.

[표 9]

D-갈락토사민으로 증감된(sensitised) 마우스에서 S. aureus SEB로부터 LPS를 사용하여 외독소의 모델로 IL-1β, IL-6 및 IFN-γ의 혈청 레벨에 대한 ST 1238, 19 mg/kg, 정맥내 주사 투여의 효과.

전- 및 후-공격 처리 계획(-30 및 +5분).

처리	IL-1β (pg/mℓ)			IL-6 (pg/mℓ)			IFN-γ (pg/mℓ)		
	평균	s.e.	P	평균	s.e.	P	평균	s.e.	P
SEB + D-갈락토사민 대조군	18	4	-	3493	558	-	40	3	-
ST 1238	0.9	0.5	0.001	599	163	0.0001	25	4	0.01

산업상 이용 가능성

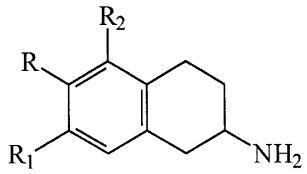
이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 2-아미노테트랄린, 또는 상기 화학식 2로 표시되는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염은 염증성 사이토카인의 병원적인 역할이 확인된 염증성 질환(상세하게는 패혈성 쇼크) 및/또는 자가면역 질환의 예방 및 치료를 위해 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

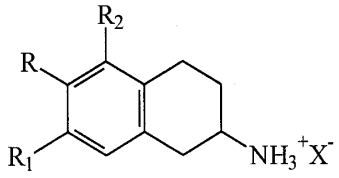
청구항 1.

다음 화학식 1로 표시되는 2-아미노테트랄린, 또는 다음 화학식 2로 표시되는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염인 것임을 특징으로 하는 화합물.

화학식 1



화학식 2



상기에서: R은 C_1~C_4 알킬기이고, R_1은 C_1~C_4 알카노일기이고, R_2는 수소이고, X^-는 약리학적으로 허용 가능한 산의 1가 음이온이다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 약리학적으로 허용 가능한 산의 1가 음이온은 클로라이드, 브로마이드, 오로테이트, 애시드 아스파테이트, 애시드 시트레이트, 애시드 포스페이트, 퓨마레이트 및 애시드 퓨마레이트, 락테이트, 말리에이트 및 애시드 말리에이트, 애시드 옥살레이트, 애시드 설페이트, 글루코스 포스페이트, 그리고 타르트레이트 및 애시드 타르트레이트 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, (R,S)-2-아미노-6-메틸-7-아세틸테트랄린 하이드로클로라이드(ST 1274)인 것임을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

상기 청구항 1 내지 3 중에서 선택된 어느 한 항의 화합물과, 약리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 이들이 동시에 포함되어 이루어지며, 경구적 또는 비경구적으로 투여할 수 있는 것임을 특징으로 하는 패혈성 쇼크(septic shock)의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7.

상기 청구항 1 내지 3 중에서 선택된 어느 한 항의 화합물과, 약리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 이들이 동시에 포함되어 이루어지며, 경구적 또는 비경구적으로 투여할 수 있는 것임을 특징으로 하는 류머티즘성(rhematoid) 관절염, 췌장염, 염증성 장 질환, 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 뇌척수염의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.