

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07C 237/38

(11) 공개번호 특1998-077254
(43) 공개일자 1998년11월16일

(21) 출원번호	특1997-014288
(22) 출원일자	1997년04월17일
(71) 출원인	주식회사 엘지화학 성재갑 서울특별시 영등포구 여의도동 20 번지
(72) 발명자	신유승 대전광역시 유성구 도룡동 388-11 LG 화학 구연립 4 세대 임종찬 대전광역시 유성구 신성동 153 하나아파트 103-203 홍창용 대전광역시 유성구 도룡동 381-42 럭키아파트 6-205 김영관 대전광역시 유성구 도룡동 381-42 럭키아파트 5-403 김인철 대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 126-1007 정원혁 경기도 안산시 선부3동 1107-4 황상연 서울특별시 성북구 장위1동 182-20
(74) 대리인	최규팔

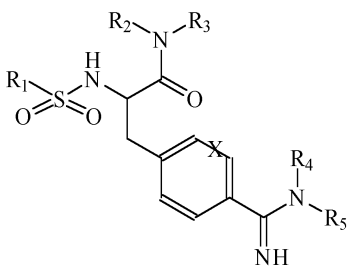
심사청구 : 없음

(54) 선택적 트롬빈 억제제

요약

본 발명은 트롬빈 억제제로 유용한 신규 화합물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 트롬빈에 대하여 선택적 억제효과를 가지고 있어서 강력한 혈전생성 억제효과를 나타내는 하기 화학식 1의 신규한 솔포닐 유도체, 그의 제조방법 및 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 혈액응고 예방 또는 각종 혈전증 치료를 위한 의약조성물에 관한 것이다:

[화학식 1]



상기식에서,

R₁ 은 치환되거나 비치환된 나프탈렌을 나타내며,

R₂ 및 R₃ 는 각각 독립적으로 저급알킬 또는 사이클로알킬을 나타내고,

R₄ 및 R₅ 는 각각 독립적으로 수소, 저급알킬 또는 아미노(NH₂)를 나타내며,

X 는 임의의 위치에 존재하는 질소원자(N)를 의미한다.

명세서

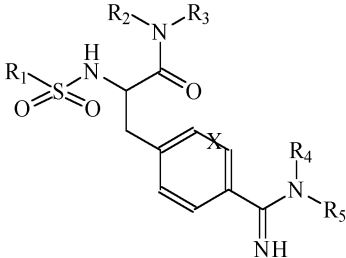
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 트롬빈 억제제로 유용한 신규 화합물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 선택적인 트롬빈 억제효과를 가지고 있어 강력한 혈전생성 억제효과를 나타내는 하기 화학식 1의 신규한 술포닐 유도체, 그의 제조방법 및 이 화합물을 유효성분으로 함유하는 혈액응고 예방 또는 각종 혈전증 치료를 위한 의약조성물에 관한 것이다:

[화학식 1]



상기식에서,

R_1 은 치환되거나 비치환된 나프탈렌을 나타내며,

R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 저급알킬 또는 사이클로알킬을 나타내고,

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 저급알킬 또는 아미노(NH_2)를 나타내며,

X 는 임의의 위치에 존재하는 질소원자(N)를 의미한다.

일반적으로 혈액응고 과정에는 여러가지 복잡한 효소반응이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그리고, 마지막 단계는 프로트롬빈을 트롬빈으로 전환시키는 반응을 포함하고 있다. 이 과정에서 생성된 트롬빈은 혈소판을 활성화시키고, 섬유소원을 섬유소로 바꾸는 등의 역할을 수행하는데, 이때 생성된 섬유소는 중합반응에 의해 고분자물질로 바뀌고, 활성화된 혈액인자 XIII 에 의해 교차결합되어 불용성 응혈이 된다. 트롬빈은 또한 혈액응고 과정에 참여하는 혈액인자 V 와 VIII 을 활성화시키는 역할도 하여 혈액응고 반응을 더욱 가속화시킨다. 따라서, 트롬빈의 억제제는 효과적인 항응혈제로 작용하는 동시에, 혈소판 활성을 억제하고 섬유소 생성 및 안정화를 막을 수 있으므로 오래 전부터 트롬빈 활성을 억제할 수 있는 신규한 물질을 개발함으로써 혈액응고를 예방하고 각종 혈전증을 치료하기 위한 방법이 모색되어 왔다.

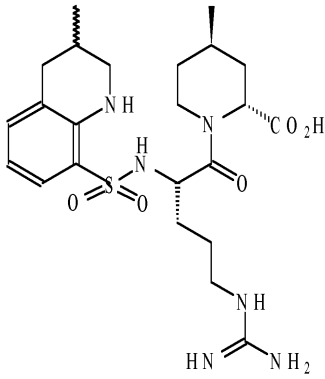
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

그러나, 단순히 트롬빈을 억제할 수 있다는 점만으로는 효과적인 항응혈제로 사용하는데 제약이 따른다. 그 이유는 트롬빈이 트립신과 유사한 세린계 단백질 분해효소이므로, 효과적인 트롬빈 억제제는 트립신에 대한 억제효과도 높은 특징이 있기 때문이다. 인체내, 특히 혈액내에는 트립신과 유사한 세린계 단백질 분해효소(대표적인 예: 플라스민)가 다양하게 존재하고 있기 때문에, 트롬빈 억제제를 개발함에 있어서는 이러한 세린계 단백질 분해효소를, 특히 트립신을 상대적으로 덜 억제하는 성질을 갖도록 하는 것이 매우 중요하다.

이러한 사정하에서 트롬빈을 효과적으로 억제하는 동시에 트립신에 대한 억제활성이 낮은 선택적 트롬빈 억제제를 개발하고자 하는 연구가 광범위하게 이루어 졌다.

효과적인 트롬빈 억제제로서 개발된 대표적인 화합물로는 첫째 아릴설포닐알지닌계 화합물인 하기 화학식 4 의 아가트로반(Argatroban)을 들 수 있다(참조: US 4258192 및 US 4201863).

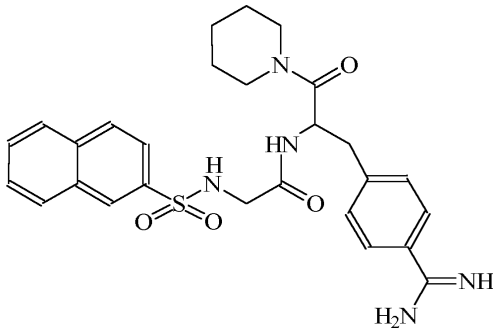
[화학식 4]



이 화합물은 트립신 대비 트롬빈 억제효과가 250 배로 보고 되었으며, 이미 1990 년에 일본에서 상품화되었으나(참조: Biochemistry 1984, 23, 85-90), 복잡한 합성과정에 의해 제조되는 단점이 있다.

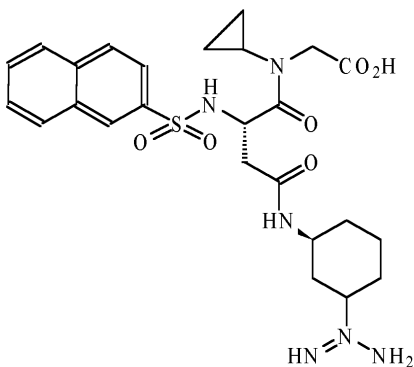
또한, 트롬빈 억제제로서 벤즈아미딘계 아릴설포닐 화합물인 하기 화학식 5 의 NAPAP 도 개발되었는데, 이 화합물은 합성이 용이할 뿐 아니라 효과적인 트롬빈 억제제임에도 불구하고 트립신 대비 트롬빈 억제효과가 50 배 정도 밖에 안된다는 문제점이 있다[참조: J. Biol. Chem. 1991, 266, 20085-20093].

[화학식 5]



한편 트립신 대비 선택성이 개선된 하기 화학식 6 의 Ro46-6240 화합물이 강력한 트롬빈 억제제로서 보고되었는데, 이 화합물은 정맥주사용 제제로서의 개발가능성을 보여 주고 있으나, 혈중반감기가 짧아서 경구투여제로서의 개발가능성은 없다(참조: J. Med. Chem. 1994, 37, 3889-3901).

[화학식 6]



또한, 최근에 특정의 피페라자이드계 화합물이 트롬빈 억제효과를 나타내며, 쥐에서 경구투여시에도 유효한 것으로 일부 보고되었으나, 이들 화합물도 트립신 대비 트롬빈에 대한 선택성이 매우 낮다는 단점이 있다(참조: WO 94/18185).

이에 본 발명자들은 합성이 비교적 용이하고 트립신 대비 트롬빈에 대한 선택성이 현저히 향상된 화합물을 개발하기 위해 오랫동안 집중적인 연구를 수행하여 왔다. 그 결과, 상기 정의된 화학식 1 의 화합물이 이러한 목적을 효과적으로 달성할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 구성 및 작용

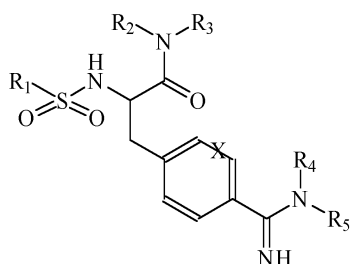
따라서, 본 발명의 목적은 트롬빈에 대한 선택성이 높은 신규한 트롬빈 억제제 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

또한 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 혈액응고 예방 및 각종 혈전증 치료용 조성물에 관한 것이다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물, 약제학적으로 허용되는 그의 염, 수화물, 용매화물 및 이성체에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기식에서,

R₁ 은 치환되거나 비치환된 나프탈렌을 나타내며,

R₂ 및 R₃ 는 각각 독립적으로 저급알킬 또는 사이클로알킬을 나타내고,

R₄ 및 R₅ 는 각각 독립적으로 수소, 저급알킬 또는 아미노(NH₂)를 나타내며,

X 는 임의의 위치에 존재하는 질소원자(N)를 의미한다.

본 발명에 따른 화학식 1 의 화합물의 치환기에 대한 정의에서 용어 저급알킬은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 이소부틸, t-부틸을 포함하는 탄소수 1 내지 4 의 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 의미하고, 용어 사이클로알킬은 사이클로펜틸을 포함한 탄소수 3 내지 8 의 사이클릭 알킬을 의미한다.

본 발명의 바람직한 화학식 1 의 화합물은 R₁ 이 비치환된 나프탈렌을 나타내고, R₂ 및 R₃ 가 각각 독립적으로 메틸 또는 사이클로펜틸을 나타내며, R₄ 및 R₅ 가 각각 독립적으로 수소 또는 아미노를 나타내는 화합물이다.

본 발명에 따른 화학식 1 의 대표적인 화합물에는 다음 화합물이 포함된다:

1. (R,S)-N-사이클로펜틸-N-메틸-3-[2-(하이드라지노-이미노-메틸)-피리딘-5-일]-2-(나프탈렌-2-술포닐아미노)-프로피온아미드
2. (R,S)-N-사이클로펜틸-N-메틸-3-[2-(아미노-이미노-메틸)-피리딘-5-일]-2-(나프탈렌-2-술포닐아미노)-프로피온아미드
3. (R,S)-N-사이클로펜틸-N-메틸-3-[3-(하이드라지노-이미노-메틸)-피리딘-6-일]-2-(나프탈렌-2-술포닐아미노)-프로피온아미드
4. (R,S)-N-사이클로펜틸-N-메틸-3-[3-(아미노-이미노-메틸)-피리딘-6-일]-2-(나프탈렌-2-술포닐아미노)-프로피온아미드

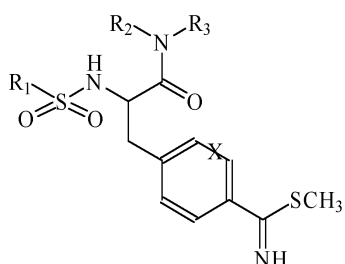
본 발명에 따른 화학식 1 의 화합물은 또한 약제학적으로 허용되는 염을 형성할 수도 있다. 이러한 약제학적으로 허용되는 염에는 약제학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 무독성 산부가염을 형성하는 산, 예를들면 염산, 황산, 질산, 인산, 브롬화수소산, 요오드화수소산 등과 같은 무기산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산 또는 트리플루오로아세트산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산 등과 같은 유기 카본산, 메탄술포산, 벤젠술포산, p-톨루엔술포산 또는 나프탈렌술포산 등과 같은 술포산 등에 의해 형성된 산부가염이 포함된다.

한편, 본 발명에 따른 화합물은 비대칭 탄소중심을 가질 수 있으므로 라세미 화합물, 부분입체이성체 혼합물 및 개개의 부분입체이성체로서 존재할 수 있으며, 이들 모든 이성체는 본 발명의 범위에 포함된다.

본 발명은 상기 정의된 화학식 1 의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 상기 정의된 화학식 1 의 화합물은 하기 화학식 2 의 메틸머캅토 유도체를 하기 화학식 3 의 아민 유도체와 반응시킴으로써 제조할 수 있다.

[화학식 2]



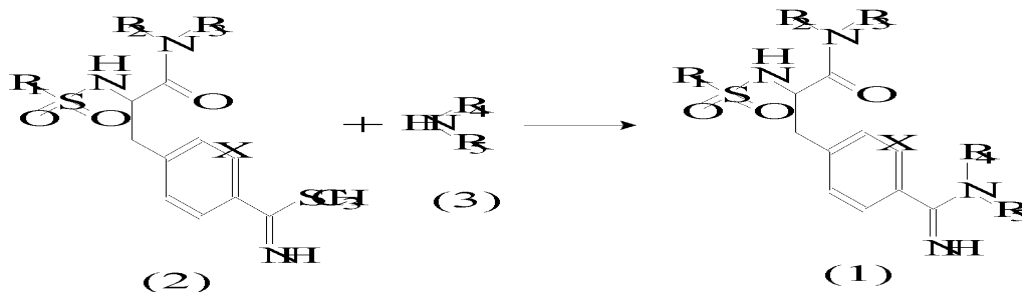
[화학식 3]



상기식에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ 및 X 는 상기에서 정의한 바와 같다.

본 발명에 따르는 화학식 1 의 화합물의 제조방법은 다음 반응식 1 로 표시할 수 있다.

[반응식 1]



상기 반응식 1 에 도시한 바와 같이, 본 발명에 따르는 화학식 1 의 화합물은 화학식 2 의 메틸머캅토 화합물을 친핵체인 화학식 3 의 아민 유도체와 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 이 반응은 바람직하게는 용매의 존재하에서 수행할 수 있다. 이러한 목적으로 바람직하게 사용될 수 있는 용매의 예로는 반응에 악영향을 미치지 않는 유기용매라면 어느 것이나 사용할 수 있으나, 일반적으로는 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 알콜 용매가 바람직하게 사용된다.

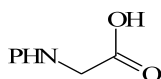
본 반응에서 반응량, 반응온도, 반응시간 등을 포함한 반응조건은 특정의 반응물질에 따라 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 반응온도는 다양하게 변화시킬 수 있으나, 특히 바람직하게는 10 내지 20℃ 에서 반응을 수행한다. 또한 반응시간은 일반적으로 2 내지 30 시간이 소요되나, 바람직하게는 4 내지 10 시간 동안 반응을 수행한다.

본 반응이 완결된 후에 생성물은 통상적인 후처리 방법, 예를들면 크로마토그래피, 재결정화 등의 방법에 의해 분리 및 정제할 수 있다.

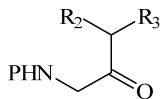
상기 반응식 1 에서 화학식 1 의 화합물을 제조하는데 중간체로 사용된 화학식 2 의 메틸머캅토 화합물은 예를들어 화학식 7 의 화합물을 R₂ 및 R₃가 치환된 아민 그룹과 커플링시켜 화학식 8 의 화합물을 수득하고, 이 화학식 8 의 화합물을 화학식 9 의 브로모메틸시아노피리딘과 반응시켜 화학식 10 의 화합물을 생성시키고, 화학식 10 의 화합물로 부터 아미노-보호그룹을 제거하여 화학식 11 의 화합물을 수득하고, 화

학식 11 의 화합물을 술포닐 유도체($\text{R}_1\text{-SO}_2\text{Cl}$)와 반응시켜 화학식 12 의 화합물을 수득한 후, 이 화합물을 염기의 존재하에서 황화수소로 포화시켜 화학식 13 의 화합물을 수득한 후 메틸화시킴으로써 제조할 수 있다.

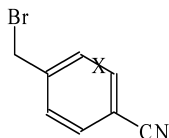
[화학식 7]



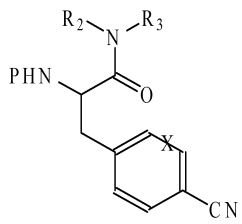
[화학식 8]



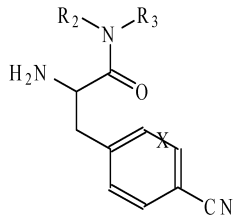
[화학식 9]



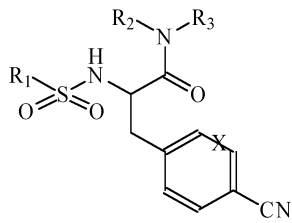
[화학식 10]



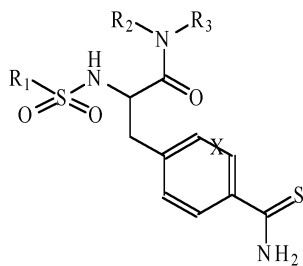
[화학식 11]



[화학식 12]



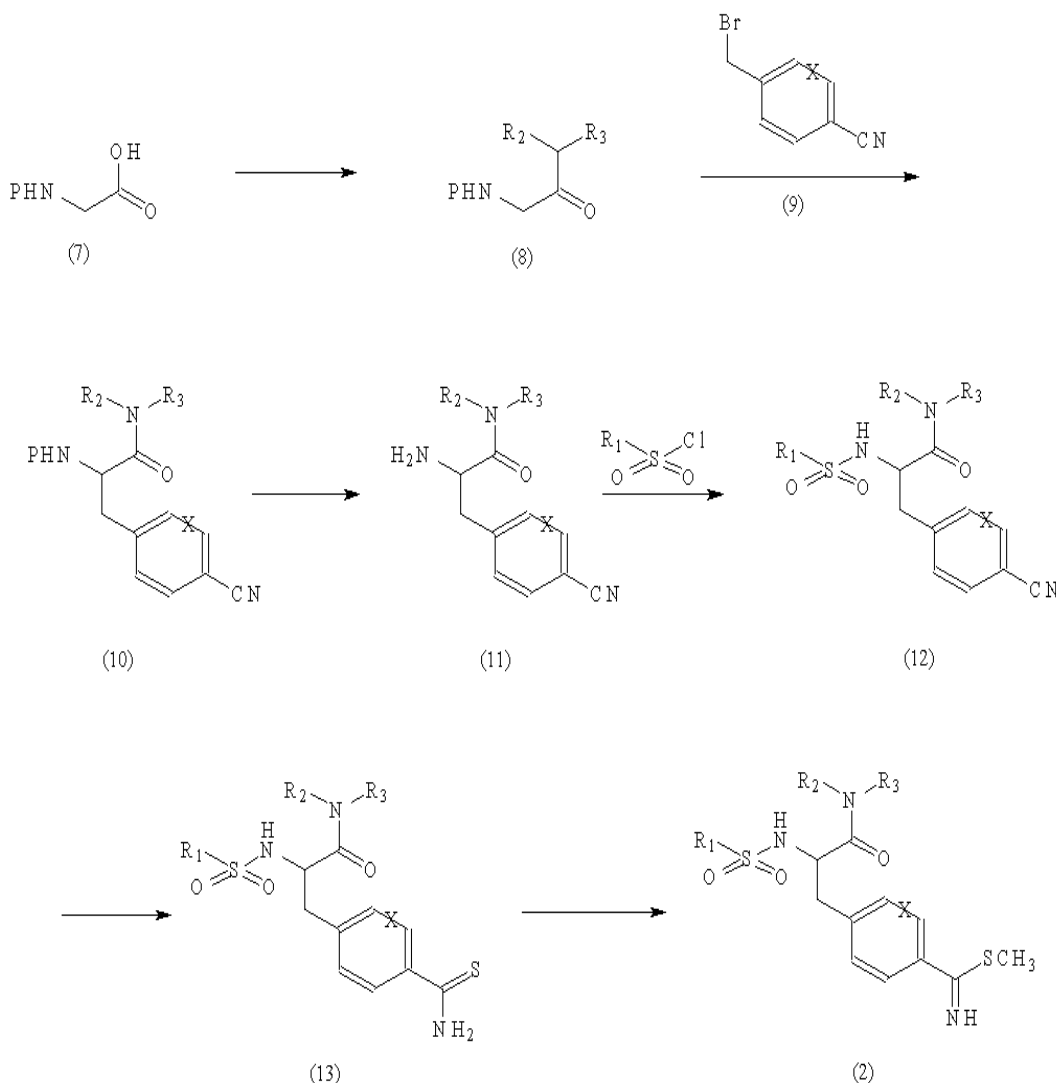
[화학식 13]



상기식에서, R_1 , R_2 , R_3 및 X 는 상기에서 정의한 바와 같고, P 는 벤질옥시카르보닐, 알릴옥시카르보닐, t -부톡시카르보닐 또는 트리틸 그룹 등과 같은 통상적인 아미노 보호그룹을 나타낸다.

상기한 바와 같은 화학식 2 화합물의 제조방법은 하기 반응식 2 로 나타낼 수 있다.

[반응식 2]



반응식 2 에 따르면 우선, 화학식 7 의 아미노기가 보호된 글라이신에 먼저 R_2 및 R_3 가 치환된 아민 그룹을 커플링시켜 화학식 8 의 화합물을 수득한다.

화학식 7 화합물과 아민 그룹과의 커플링반응에서 사용될 수 있는 공지의 커플링시약에는 디사이클로헥실 카보다이미드(DCC), 3-에틸-3'-(디메틸아미노)-프로필카보다이미드(EDC), 비스-(2-옥소-3-옥사졸리디닐)-포스핀산클로라이드(BOP-Cl), 디페닐포스포릴아지드(DPPA) 등이 포함되나, 단 이들로 제한되는 것은 아니다.

이 반응에서 사용된 화학식 7 의 카복실산 화합물은 그대로 사용할 수도 있으나, 바람직하게는 그의 반응성 유도체, 예를들면 산 할라이드 및 그밖의 다른 활성화 에스테르 유도체로 전환시켜 커플링반응에 사용함으로써 반응을 촉진시킬 수 있다. 카복실산의 활성화 유도체는 아민과의 커플링반응에 의해 아마이드 결합을 형성하거나, 알콜과의 커플링반응에 의해 에스테르 결합을 형성시키기 위해 필요하다. 이러한 반응성 유도체에는 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 의해 제조할 수 있는 통상적인 유도체들이 포함되는데, 예를들어 산 할라이드에는 산 클로라이드가 포함되고, 활성화 에스테르에는 메톡시카보닐클로라이드, 이소부틸옥시카보닐클로라이드 등의 알콕시카보닐할라이드와 커플링 시약으로 부터 유도된 카복실산의 무수물, N-하이드록시프탈이미드-유도된 에스테르, N-하이드록시숙신이미드-유도된 에스테르, N-하이드록시-5-노르보반-2',3'-디카복시이미드-유도된 에스테르, 2,4,5-트리클로로페놀-유도된 에스테르 등이 포함되나, 단 이들로 제한되는 것은 아니다.

커플링반응에 의해 수득된 화학식 8 의 화합물은 그후에 C- α 위치에 화학식 9 의 니트릴 유도체를 도입시켜 화학식 10 의 화합물을 수득하고, N-말단 아미노 보호그룹을 제거하여 화학식 11 의 화합물을 수득한다. 이 화학식 11 의 화합물의 N-말단 부위에 술포닐 그룹을 도입시켜 화학식 12 의 화합물을 수득한 후, 이 화학식 12 의 니트릴 화합물을 피리딘 및 트리메틸아민과 같은 염기의 존재하에서 황화수소로 포화시켜 화학식 13 의 티오아미드 화합물을 생성시킨다. 이 화학식 13 의 티오아미드 화합물을 메틸화제로 메틸화시킴으로써 목적하는 출발물질인 화학식 2 의 메틸머캅도 화합물을 수득할 수 있다. 화학식 13 의 화합물을 메틸화시키기 위한 메틸화제로는 요오드화메탄, 디메틸술포이트($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$) 또는 메틸트리플레이트(CH_3OTf) 등이 사용될 수 있다.

상기 언급한 바와 같이 본 발명에 따른 화학식 1 의 화합물은 트롬빈에 대하여 선택적인 억제효과를 나타내며, 따라서 혈액응고 예방 및 혈전증의 치료에 유용하다.

따라서, 본 발명은 또한 화학식 1 의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 혈액응고 예방 및 혈전증 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

본 발명의 화합물을 임상적인 목적으로 투여시에 단일용량 또는 분리용량으로 숙주에게 투여될 총 일일용량은 체중 1kg 당 0.001mg 내지 10mg 의 범위가 바람직하나, 특정환자에 대한 특이용량 수준은 사용될 특정화합물, 개개 환자의 체중, 성, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률, 약제혼합 및 질환의 중증도에 따라 적절히 결정될 수 있다.

본 발명의 화합물은 바람직하게는 주사용 제제로 제형화하여 투여할 수 있다.

주사용 제제, 예를들면 멸균주사용 수성 또는 유성 현탁액은 공지된 기술에 따라 적합한 분산제, 습윤제, 또는 현탁제를 사용하여 제조할 수 있다. 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 용매에는 물, 링거액 및 등장성 NaCl 용액이 있으며 멸균 고정오일은 통상적으로 용매 또는 현탁매질로서 사용한다. 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있으며, 또한 올레산과 같은 지방산도 주사용 제제에 사용한다.

한편, 본 발명의 화합물을 임상적으로 투여하여 목적하는 항응혈 효과 및 혈전용해효과를 얻고자 하는 경우에, 본 발명에 따른 화학식 1 의 활성화합물은 혈전용해제 및 혈소판 활성 억제제중에서 선택된 1 종 이상의 성분과 동시에 투여를 할 수 있다. 이러한 방식으로 본 발명의 화합물과 혼합하여 투여될 수 있는 혈전용해제로는 t-PA, 유로키나제(Urokinase), 스트렙토키나제(Streptokinase) 등이 포함될 수 있으며, 혈소판 활성 억제제로는 아스피린, 티클로피딘(Ticlopidin), 클로피드로겔(Clopidogrel), 7E3 단일항체 등이 포함된다.

그러나, 혈전의 치료 및 예방을 목적으로 본 발명에 따른 화합물을 함유하는 제제는 상술된 것으로 제한되는 것은 아니며, 혈전의 치료 및 예방에 유용한 제제라면 어떠한 것도 포함될 수 있다.

본 발명은 하기 실시예 및 실험예에 의해 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명의 범위가 이들에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

제조예 1

사이클로펜틸-메틸아민 염산염의 합성

사이클로펜탄은 10ml 를 메탄올 50ml 에 용해시킨 후, 물 50ml 를 가하였다. 여기에 메틸아민 염산염 7.6g 을 가하고 나트륨보로시아노하이드라이드(NaBH₃CN) 7.1g 을 가하였다. 반응용액을 pH 6 에서 가열 환류시키면서 12 시간 동안 교반하였다. 감압하여 메탄올을 제거한 후 0°C 로 냉각시키고 묽은 염산으로 pH 2 로 조정하였다. 반응용액을 디에틸에테르로 3 회 세척하고 수층을 다시 0°C 로 냉각시키고 6N 수산화나트륨 용액으로 pH 11 로 조정하였다. 여기에 디옥산 50ml 를 가하고 t-부틸옥시카보닐 안하이드라이드 37g 을 가하여 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후에 반응용액을 감압증류하여 30ml 정도로 농축하였다. 잔류용액을 에틸아세테이트로 추출하고 산, 염기 수용액으로 세척하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하고 농축하였다. 수득된 흰색 고체를 칼럼크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 수득된 고체를 4N 염산-디옥산 용액 60ml 에 용해시켜 30 분간 교반한 후에 감압하여 용매를 제거하고 진공하에서 건조시켜 표제화합물 13.7g 을 수득하였다.

¹H NMR(CD₃OD, ppm) δ : 3.50(m, 1H), 2.68(s, 3H), 2.10(m, 2H), 1.86-1.50 (m, 6H)

제조예 2

2-(3-급-부틸옥시카보닐아미노)-N-사이클로펜틸-N-메틸-아세트아미드의 합성

N-(3-급-부틸옥시카보닐)글라이신 17.5g 을 테트라하이드로푸란 200ml 에 용해시킨 용액을 -20°C 로 냉각시켜 유지하면서 N-메틸모폴린 22g 과 이소프로필클로로포르메이트 13.7g 을 가하고 30 분 동안 교반한 후, 제조예 1 에서 수득한 화합물 13.5g 을 가하였다. 반응용액을 1 시간에 걸쳐 상온으로 상승시켜 반응을 완결시키고 감압하에서 용매를 제거한 후, 잔류물에 에틸아세테이트를 가해 희석하고 1N-염산 수용액 및 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 차례로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과하여 진공하에서 건조시켜 표제화합물 23.8g 을 수득하였다.

¹H NMR(CDCl₃, ppm) δ : 4.95(m, 1H), 4.00(d, 1H), 3.93(d, 1H), 2.85(d, 3H), 1.91-1.39(m, 17H)

제조예 3

5-시아노-2-메틸피리딘의 합성

5-하이드록시-2-메틸피리딘 10.9g 및 트리메틸아민 10.1g 을 디클로로메탄 300ml 에 가하여 생성된 용액을 0°C 로 냉각시키고 트리플루오로메틸술폰산 무수물 29g 을 30 분 동안에 걸쳐서 적가하였다. 반응용액을 1 시간 동안 교반한 후, 포화 식염수로 2 회 세척하고, 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과하여 진공하에서 건조시켰다. 건조된 잔류물에 아세트니트릴 1ℓ 를 가해 용해시킨 용액에 칼륨시아나이드 33g, 니켈브로마이드 21.8g, 금속아연 6.5g 및 트리페닐포스핀 50g 을 가한 후 5 시간 동안 가열환류시켰다. 반응용액을 상온으로 냉각시켜 불용성 물질을 제거하고 감압하에서 농축시키고, 잔류물을 칼럼크로마토그래피[용출제: 에틸아세테이트/헥산(3/7, 부피비)]시켜 정제된 표제화합물 7.8g 을 수득하였다.

¹H NMR(DMSO-d₆, ppm) δ : 8.91(s, 1H), 8.19(d, 1H), 7.50(d, 1H), 2.59(s, 3H)

Mass(FAB, m/e) : 119(M⁺+1)

제조예 4

2-브로모메틸-5-시아노피리딘의 합성

제조예 3 에서 수득한 화합물 4.96g 을 클로로포름 100ml 에 용해시킨 용액에 N-브로모숙신이미드 10.47g 및 벤조일퍼옥사이드 0.5g 을 가한 후에 5 시간 동안 가열환류시켰다. 반응용액을 상온으로 냉각시켜 불용성물질을 제거하고 감압하에서 농축시켜 칼럼크로마토그래피[용출제: 에틸아세테이트/헥산(3/7, 부피비)]시켜 정제하여 표제화합물 3.5g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta : 8.81(\text{s}, 1\text{H}), 8.00(\text{d}, 1\text{H}), 7.60(\text{d}, 1\text{H}), 4.59(\text{s}, 2\text{H})$

Mass(FAB, m/e) : 197(M⁺1)

제조예 5

2-시아노-5-메틸피리딘의 합성

3-피콜린-N-옥사이드 15.7g 및 트리에틸아민 40ml 를 아세토니트릴 300ml 에 용해시킨 용액에 트리에틸실릴시아나이드 30g 을 가하였다. 반응용액을 10 시간 동안 가열 환류시킨 후 상온으로 냉각시키고 감압하에서 용매를 제거하였다. 잔류물을 에틸아세테이트로 희석하여 포화 식염수로 세척한 후 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과하고 감압하에서 농축시켰다. 농축액을 칼럼크로마토그래피[용출제: 에틸아세테이트/헥산(3/7, 부피비)]시켜 정제된 표제화합물 4.7g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta : 8.60(\text{s}, 1\text{H}), 7.77(\text{d}, 1\text{H}), 7.50(\text{d}, 1\text{H}), 2.62(\text{s}, 3\text{H})$

Mass(FAB, m/e) : 119(M⁺1)

제조예 6

5-브로모메틸-2-시아노피리딘의 합성

제조예 5 에서 수득한 화합물 3.5g 을 사용하여 제조예 4 와 동일한 방법으로 반응을 수행하여 표제화합물 2.8g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta : 8.81(\text{s}, 1\text{H}), 7.97(\text{d}, 1\text{H}), 7.76(\text{d}, 1\text{H}), 4.59(\text{s}, 2\text{H})$

Mass(FAB, m/e) : 197(M⁺1)

제조예 7

(R,S)-2-(3 합성

디이소프로필아민 2.1g 및 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민 2.33g 을 테트라하이드로푸란 100ml 에 가한 용액을 -78°C 로 냉각시킨 후, 부틸리튬 13ml(1.6M 용액)를 천천히 가해 30 분 동안 교반하고, 제조예 2 에서 수득한 화합물 2.56g 을 반응용액에 가하였다. 반응용액을 1 시간에 걸쳐 상온으로 상승시키고 다시 -78°C 로 냉각시켜 제조예 4 에서 수득한 화합물 1.97g 을 가하고 2 시간에 걸쳐 상온으로 상승시켰다. 반응용액으로 부터 감압하에서 용매를 제거하고 잔류물에 에틸아세테이트를 가해 희석한 후 1N-염산 수용액 및 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 차례로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과하여 감압하에서 농축시킨 후, 칼럼크로마토그래피[용출제: 에틸아세테이트/헥산(3/7, 부피비)]시켜 정제된 표제화합물 2.35g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta : 8.84(\text{s}, 1\text{H}), 7.88(\text{d}, 1\text{H}), 7.34(\text{d}, 1\text{H}), 5.59(\text{d}, 1\text{H}), 5.10(\text{br}, 1\text{H}), 4.90(\text{m}, 1\text{H}), 3.20(\text{m}, 2\text{H}), 1.92-1.29(\text{m}, 17\text{H})$

Mass(FAB, m/e) : 373(M⁺1)

제조예 8

(R,S)-2-(3 합성

제조예 7 과 동일한 방법으로 반응을 수행하되, 제조예 4 에서 수득한 화합물 대신에 제조예 6 에서 수득한 화합물 1.97g 을 사용하여 반응을 수행하여 표제화합물 3.5g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta : 8.63(\text{s}, 1\text{H}), 8.58(\text{d}, 1\text{H}), 7.69(\text{d}, 1\text{H}), 5.69(\text{m}, 1\text{H}), 5.11(\text{m}, 1\text{H}), 3.01(\text{m}, 1\text{H}), 2.98(\text{d}, 3\text{H}), 2.10-0.79(\text{m}, 17\text{H})$

Mass(FAB, m/e) : 373(M⁺1)

실시예 1

합성

제조예 8 에서 수득한 화합물 0.46g 을 피리딘 10ml 및 트리에틸아민 0.8ml 에 용해시킨 용액에 황화수소 가스를 통과시켜 포화시켰다. 반응용액을 상온에서 3 일 동안 방치한 후 감압하에서 용매를 제거하고 건조시켰다. 건조된 잔류물에 아세토니트릴 10ml 를 가해 용해시키고 요오드화메탄 0.4ml 를 가해 30 분 동안 가열환류시킨 후 냉각시키고 진공하에서 건조시켰다. 건조된 잔류물을 무수 메탄올 10ml 에 용해시킨 용액을 0°C 로 냉각시키고 80% 하이드라진 0.8ml 를 가한 후 30 분 동안 교반하고 감압하에서 농축시켰다. 농축액을 HPLC 로 정제하여 표제화합물 0.28g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$: 8.84–7.65(m, 10H), 4.72(m, 1H), 4.31(m, 1H), 3.10(m, 2H), 2.60(d, 3H), 2.05–0.78(m, 10H)

Mass(FAB, m/e) : 495($\text{M}^+ + 1$)

실시예 2

합성

제조예 8 에서 수득한 화합물 0.46g 을 피리딘 10ml 및 트리에틸아민 0.8ml 에 용해시킨 용액에 황화수소 가스를 통과시켜 포화시켰다. 반응용액을 상온에서 3 일 동안 방치한 후 감압하에서 용매를 제거하고 건조시켰다. 건조된 잔류물에 아세토니트릴 10ml 를 가해 용해시키고 요오드화메탄 0.4ml 를 가해 30 분 동안 가열환류시킨 후, 냉각시켜 진공하에서 건조시켰다. 건조된 잔류물을 무수 메탄올 10ml 에 용해시킨 용액에 암모늄아세테이트 0.2g 을 가하고 2 시간 동안 가열환류시킨 후 감압하에서 농축시켰다. 농축액을 HPLC 로 정제하여 표제화합물 0.17g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$: 8.31–7.54(m, 10H), 4.59(m, 1H), 4.27(m, 1H), 3.02(m, 2H), 2.45(d, 3H), 2.17–0.86(m, 10H)

Mass(FAB, m/e) : 480($\text{M}^+ + 1$)

실시예 3

합성

제조예 7 에서 수득한 화합물 0.46g 을 사용하여 실시예 1 의 방법과 동일한 방법에 따라 반응을 수행하여 표제화합물 0.25g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$: 8.69(d, 1H), 8.36(d, 1H), 8.06–7.33(m, 8H), 4.82(m, 1H), 4.49(m, 1H), 3.08(m, 2H), 2.73(s, 2H), 2.46(s, 1H), 1.68–1.34(m, 8H)

Mass(FAB, m/e) : 495($\text{M}^+ + 1$)

실시예 4

합성

제조예 7 에서 수득한 화합물 0.46g 을 사용하여 실시예 2 와 동일한 방법에 따라 반응을 수행하여 표제화합물 0.16g 을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm}) \delta$: 8.74(d, 1H), 8.41(d, 1H), 7.96–7.27(m, 8H), 4.72(m, 1H), 4.54(m, 1H), 3.14(m, 2H), 2.71(s, 2H), 2.54(s, 1H), 1.76–1.44(m, 8H)

Mass(FAB, m/e) : 480($\text{M}^+ + 1$)

발명의 효과

실험예 1 : 트롬빈 저해제의 억제활성

본 발명의 화합물인 트롬빈 억제제의 효소억제효과는 효소와 반응하여 색을 생성하는 기질을 사용하여 분광광도법으로 측정된 속도상수 K_i 및 K_s 로 결정하였다. 속도상수 K_i 값은 효소와 기질 및 억제제를 동시에 가하였을 경우에 억제제가 효소활성을 억제하는 정도를 나타낸 것이고, 속도상수 K_s 값은 효소와 저해제를 미리 일정 시간 동안 반응시킨 다음 기질을 가수분해하는 속도를 측정하여 얻은 값이다. 트롬빈 이 기질인 크로모자임 TH(토실-Gly-Pro-Arg-4-니트로아닐리드아세테이트)를 가수분해하면 파라-니트로아닐리드가 생성된다. 이렇게 생성되는 노란색의 파라-니트로아닐리드의 양을 시간에 따른 흡광도의 변화로 측정하였다. 이 속도로 부터 효소의 활성을 측정할 수 있으며, 억제제의 효소활성 억제능력을 측정할 수 있다.

트롬빈에 대한 본 발명에 따르는 억제제의 효소활성 억제능력은 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

1.5ml 큐벳에 150mM NaCl, 0.1% PEG8000(폴리에틸렌글리콜, 분자량 약 8000)이 함유되어 있는 0.1M 트리스 완충용액(pH 7.8)을 1160 μl 씩 가하였다. 기질용액으로는 색소생성기질인 크로모자임 TH 를 디메틸술폭사이드(DMSO)에 10mM 농도로 용해시킨 후 상기 완충용액으로 희석하여 0.1mM 농도가 되도록 제조한 것을 사용하였다. 이렇게 제조한 0.1mM 기질용액 225 μl 를 큐벳에 가하였다. 억제제 용액으로는 본 발명에 따른 억제제 화합물을 디메틸술폭사이드에 10mg/ml 되게 용해시킨 후 상기 완충용액으로 희석하여 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml 농도로 만든 것을 양이 0 내지 10 μg 사이가 되게 취한 후 트리스 완충용액으로 전체 부피가 100 μl 되도록 하여 이미 완충용액과 기질이 들어 있는 큐벳에 가하였다.

실온에서 반응용액이 들어 있는 큐벳에 각각 상기 트리스 완충용액에 0.1mg/ml 농도로 용해시킨 트롬빈(human thrombin) 15 μl 를 가하여 효소 가수분해반응을 시작하였다. 효소를 가한 순간부터 2 분 동안 반응에 의해 생성되는 파라-니트로아닐리드의 양을 381nm 에서의 흡광도의 변화로 모니터하여 반응시간 대 흡광도의 연속 스펙트럼을 도시하였다. 여러 종류의 억제제 농도에 대해 위의 실험을 수행하여 연속 스펙트럼을 얻었다.

각 스펙트럼에서 반응시간 초기 30 초 이내에 기울기로 부터 초기속도 V_i 를 구한 후, 억제제 농도 대비 초기속도의 역수($1/V_i$) 그래프를 도시하였다. 그래프 위의 점들을 만족하는 1 차식을 계산해낸 후 그

식의 x 절편으로 부터 하기 효소반응식을 사용하여 K_i 를 계산해 낼수 있다. 이 계산에 사용된 K_m 값은 $5.2\mu\text{M}$ 로 일정 효소농도에서 기질의 농도를 변화시킴으로서 구한 것이다.

효소반응식(Michaelis-Menten equation)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

상기 효소반응식에서 $[I]$ 는 억제제의 농도를 나타내고, $[S]$ 는 기질의 농도를 의미하며, V_{max} 는 최고 초기속도를 의미하고, K_m 은 미카엘리스(Michaelis) 상수로 여기에서는 $5.2\mu\text{M}$ 을 의미한다.

속도상수 K_s 는 상기 K_i 를 구할 때 사용한 것과 동일한 용액을 동일한 농도로 사용하였으나 실험방법은 다음과 같다.

즉, 1.5ml 용량 큐벳에 완충용액 $1160\mu\text{l}$ 를 가하고, 여기에 0.1mg/ml 트롬빈(human thrombin) 용액 $15\mu\text{l}$ 및 억제제 용액 $100\mu\text{l}$ 를 가하여 실온에서 15 분 동안 방치한 후 0.1mM 기질용액 $225\mu\text{l}$ 를 가하면서 2 분 동안 시간의 변화에 따른 흡광도의 변화를 모니터하였다. 얻어진 연속 스펙트럼에서 직선을 나타내는 부분의 기울기를 측정하여 V_s 로 나타낸다. 이 실험을 여러 억제제 농도에서 실행하여 각 억제제 농도에서 V_s 값을 얻어 억제제 농도에 대한 $1/V_s$ 의 그래프를 도시하였다. 그래프 위의 점들을 만족시키는 1 차식을 얻어낸 후 그의 x 절편으로 부터 효소반응식을 이용하여 K_s 값을 결정하였다.

한편, 트립신에 대한 본 발명에 따른 화합물의 억제활성도 상기 트롬빈의 경우에 대해 설명한 바에 따라 실시하여 측정하였다.

기질로는 N-벤조일-발린-글리신-알기닌 파라-니트로아닐리드 하이드로클로라이드의 $20\mu\text{M}$ 용액을 사용하였으며, 억제제는 0 내지 $120\mu\text{g}$ 범위내에서 여러가지 농도를 사용하였다. 또한, 트립신은 0.1N HCl 에 용해시킨 것을 실험 직전에 상기 트리스 완충용액으로 $45\mu\text{g/ml}$ 로 만든 후 $40\mu\text{l}$ 를 사용하였다. 트롬빈에 대한 실험과 마찬가지로 반응용액의 총부피는 1.5ml 로 하고 그밖에도 동일한 방법으로 실험하였으며, K_i 계산에 사용된 K_m 값도 동일한 방법으로 결정하였는데 그값은 $20.2\mu\text{M}$ 이었다.

이상 설명한 방법에 따라 트롬빈과 트립신에 대해 측정된 본 발명에 따른 억제제의 효소활성 억제능력 및 트롬빈에 대한 선택성(트립신/트롬빈)은 하기 표 1 에 나타내었다.

[표 1]

본 발명의 억제제의 트롬빈과 트립신에 대한 억제능력

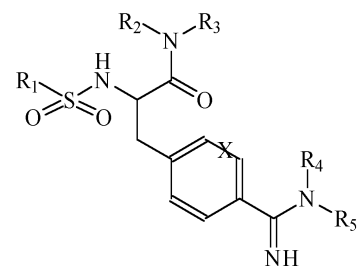
화합물 (실시에 번호)	트롬빈에 대한 억제능력	트립신에 대한 억제능력	선택성 (트립신/트롬빈)
1	$K_s = 29.8\text{nM}$	$K_s = 20108\text{nM}$	675
2	$K_s = 83.2\text{nM}$		
3	$K_s = 71.3\text{nM}$		
4	$K_s = 299.8\text{nM}$		

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1 로 표시되는 화합물, 그의 약제학적으로 허용되는 염 및 그의 이성체:

[화학식 1]



상기식에서,

R_1 은 치환되거나 비치환된 나프탈렌을 나타내며,

R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 저급알킬 또는 사이클로알킬을 나타내고,

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 저급알킬 또는 아미노(NH_2)를 나타내며,

X 는 임의의 위치에 존재하는 질소원자(N)를 의미한다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, R_1 이 비치환된 나프탈렌을 나타내고, R_2 및 R_3 가 각각 독립적으로 메틸 또는 사이클로펜틸을 나타내며, R_4 및 R_5 가 각각 독립적으로 수소 또는 아미노를 나타내는 화합물

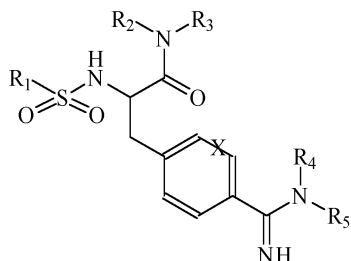
청구항 3

제 2 항에 있어서, 및 구성된 그룹중에서 선택된 화합물.

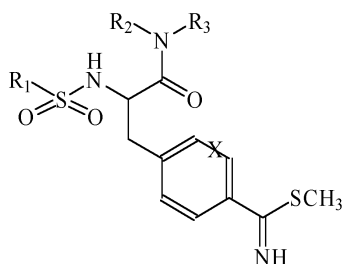
청구항 4

하기 화학식 2 의 메틸머캅토 화합물을 하기 화학식 3 의 아민 유도체와 반응시킴을 특징으로 하여 화학식 1 의 화합물 및 그의 염을 제조하는 방법:

[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



상기식에서,

R_1 은 치환되거나 비치환된 나프탈렌을 나타내며,

R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 저급알킬 또는 사이클로알킬을 나타내고,

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 저급알킬 또는 아미노(NH_2)를 나타내며,

X 는 임의의 위치에 존재하는 질소원자(N)를 의미한다.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 반응을 용매의 존재하에서 수행함을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 용매가 알콜 용매임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

약제학적으로 허용되는 담체와 함께 활성성분으로서 제 1 항에 따르는 화학식 1 의 화합물을 함유하는 트롬빈 억제제 조성물.