



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월17일
(11) 등록번호 10-0874392
(24) 등록일자 2008년12월10일

(51) Int. Cl.

C07F 9/38 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7012236

(22) 출원일자 2002년09월17일

심사청구일자 2006년03월17일

번역문제출일자 2002년09월17일

(65) 공개번호 10-2002-0082890

(43) 공개일자 2002년10월31일

(86) 국제출원번호 PCT/US2001/008729

국제출원일자 2001년03월19일

(87) 국제공개번호 WO 2001/71022

국제공개일자 2001년09월27일

(30) 우선권주장

60/190,370 2000년03월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Tetrahedron Letters. 1977, 8, 679-682*

US05837845 A1

WO1998009668 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

유니버시티 오브 테네시 리서치 파운데이션

미국 테네시주 37996-1527 녹스빌 화이트 애비뉴
1534 스위트 403

(72) 발명자

밀러듀안, 디.

미국38163테네시주저먼타운메이플크릭코우브8706

티지이가버

미국38111테네시주멤피스웨이노카애비뉴3375

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 강영진

(54) LPA 수용체 아고니스트 및 안타고니스트, 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 본 명세서에 공개된 바와 같은 화학식(I)의 화합물 및 그러한 화합물을 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 또한, LPA 수용체의 아고니스트로서 또는 안타고니스트로서의 활성을 갖는 그러한 화합물을 사용하는 방법, 예컨대, LPA 수용체에 대한 LPA 활성을 저해하는 방법, LPA 수용체 활성을 조절하는 방법, 암을 치료하는 방법, 세포 증식을 촉진시키는 방법, 및 상처를 치료하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

달튼제임스, 티.

미국38104테네시주멤피스사우스에지우드16

사다비닛, 엠.

미국38111테네시주멤피스아파트6마이너650

엘로드돈, 비.

미국38105테네시주멤피스아파트103테크노레인539

수히평

미국38104테네시주멤피스에이1제트1914썸머빌엔.57

베이커다니엘, 엘.

미국38128테네시주멤피스놀쓰윈드드라이브3850

왕던

미국38104테네시주멤피스아파트309사우스폴라인23

릴리엄캐롤리

헝가리에이치-1214부다페스트라케타23

피셔데이비드, 제이.

미국38018테네시주코도바팀버크릭드라이브8685

비랙터마스

미국38104테네시주멤피스썸머빌#401엔.57

뉴서노라

미국38104테네시주멤피스썸머빌#215엔.57

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 미국

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

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

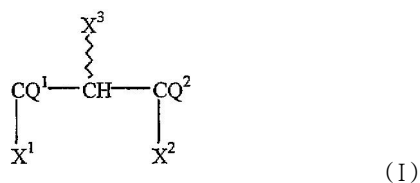
EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터키

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

특허청구의 범위

청구항 1

화학식(I)의 화합물:



상기 식에서,

X^1 은 $(\text{HO})_2\text{PO-Z}^1$ -이고;

X^2 및 X^3 은 동일하거나 상이하면서 둘 다 $\text{R}^1\text{R}^2\text{N-A-}$ (여기에서, A는 직접 결합, $(\text{CH}_2)_k$ (여기에서, k는 0 내지 30의 정수임) 또는 0 임)이며;

Z^1 은 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m-$ (여기에서, m은 1 내지 50의 정수임) 또는 -O-이고;

Q^1 및 Q^2 는 독립적으로 H_2 , $=\text{NR}^4$, $=\text{O}$, 또는 H 및 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 의 조합이고;

X^2 에서 R^1 은 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내지 C30 알케닐 또는 C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 고리 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실이고;

X^3 에서 R^1 은 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내지 C30 알케닐 또는 C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 고리 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실이고;

R^2 , R^4 , R^5 및 R^6 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내지 C30 알케닐, 고리의 일치환, 이치환 또는 삼치환을 갖거나 갖지 않은 방향족 고리 또는 헤테로방향족 고리, C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 고리 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴알킬, 또는 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬이고;

여기서, X^2 에서 R^2 가 H이고 Q^2 가 $=\text{O}$ 인 경우, R^1 은 직쇄 C10 내지 C18 알킬기이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

Q^1 이 H_2 이고;

Q^2 가 $=\text{O}$ 이며;

Z^1 이 0이며;

X^2 및 X^3 둘 다에서 R^2 가 H인 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

X^3 은 $-\text{NH}_2$ 이고;

X^2 에서 R^1 은 직쇄 C14 내지 C18 알킬인 화합물.

청구항 4

제3항에 있어서, X^2 에서 R^1 이 C14 알킬인 화합물.

청구항 5

제3항에 있어서, X^2 에서 R^1 이 C18 알킬인 화합물.

청구항 6

제2항에 있어서,

X^3 에서 R^1 이 아세틸기이고;

X^2 에서 R^1 이 C14 알킬인 화합물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항의 화합물을 포함하는 암 치료용 약제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 암이 전립선암 또는 난소암인 약제.

청구항 11

LPA 수용체 안타고니스트 활성을 보유하는 제1항의 화합물을 포함하는, 화상 상처, 신경성 궤양, 욕창, 정맥 울혈 궤양 및 당뇨병 궤양으로 구성되는 군으로부터 선택되는 상처 치료용 약제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 약제의 국소 투여를 위한 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약제.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 출원은 그 전체가 참고로 본원에 통합되며 2000년 3월 17일에 출원된 미국 가출원 제 60/190,370호의 이익을 누린다.
- <2> 본 발명은 부분적으로, 국립 보건원 Grant Nos.HL 07641-12와 GM43880 및 국립 과학 재단 Grant No.IBN-9728147에 의해 기금을 지원 받았다. 미국 정부는 본 발명에 일정 권리를 가질 수도 있다.
- <3> 본 발명은 리소포스파티드산("LPA") 수용체에 대해 아고니스트 또는 안타고니스트 활성을 갖는 LPA 유도체 및 이들의 전립선 암 치료, 난소 암 치료, 및 상처 치료를 포함하며 이에 제한되지 않는 다양한 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <4> 모든 비-형질전환 세포는 그들의 생존과 증식을 위해 성장 인자를 필요로 한다. 폴리펩티드 성장 인자에 더하여, 성장 인자와 유사한 특성을 가진 새로운 지질 부류가 발견되었으며, 인지질 성장 인자(PLGF)로 알려져 있다. 대부분의 정지 세포의 증식을 유도함(Jalink et al., 1994a; Tokumura, 1995; Moolenaar et al., 1997)에 있어 그들의 유사한 약리학적 특성에도 불구하고, PLGF는 구조적으로 두 개의 넓은 부류로 하위 분류될 수 있다. 첫 번째 부류는 글리세롤 주쇄를 보유하는 글리세로인지질 매개자(GPM)를 포함한다. GPM의 예로는 LPA, 포스파티드산(PA), 사이클릭 포스파티드산(사이클릭-PA), 알케닐 글리세롤 포스페이트(알케닐-GP), 및 리소포스파티딜 세린(LPS)를 포함한다. 두 번째 부류는 스펅고이드 염기 모티프를 보유하는 스펅고지질 매개자(SPM)를 포함한다. SPM의 예로는 스펅고신-1-포스페이트(SPP), 디히드로스펜고신-1-포스페이트, 스펅고실포스포릴콜린(SPC), 및 스펅고신(SPH)를 포함한다.
- <5> LPA(Tigyi et al., 1991; Tigyi and Miledi, 1992), PA(Myher et al., 1989), 알케닐-GP(Lilom et al., 1998), 사이클릭-PA(Kobayashi et al., 1999), SPP(Yatomi et al., 1995), 및 SPC(Tigyi et al., 2000)가 혈청에서 검출되었다. 이들 지질 매개자들은 동정되고 특성이 규명되었다. 성장 인자와 유사한 특성들을 나타내는, 혈청 및 혈장에 존재하는 알려지지 않은 PLGF가 여전히 존재한다(Tigyi and Miledi, 1992). 약 20 μ M 농도의 LPA가 혈청에 존재하는 가장 풍부한 PLGF이다(Tigyi and Miledi, 1992; Jalink et al., 1993).
- <6> 진핵 세포에서, LPA는 소포체 막에서 주로 일어나는 인지질 생합성의 초기 단계에서 핵심 중간체이다(Bosch, 1974; Bishop and Bell, 1988). 소포체에서, LPA는 글리세롤-3-포스페이트의 아실-CoA의 작용으로부터 유래되며, 추가로 아실화되어 PA를 생성한다. LPA의 PA로의 아실화 속도가 매우 높으므로, 극소량의 LPA가 생합성 부위에 축적된다(Bosch, 1974). LPA는 소포체에 한정되기 때문에, 대사 중간체로서의 그 역할은 아마도 시그널링 분자로서의 그 역할과는 무관한 것으로 보인다.
- <7> LPA는 혈청의 구성 성분이며 그 농도는 낮은 마이크로몰(μ M) 범위이다(Eicholtz et al., 1993). 응고 과정동안 활성화된 혈소판에 의해 LPA가 방출되기 때문에 이 농도가 예상된다. 혈청과는 달리, 새 혈액 또는 혈장에서는 검출되지 않는다(Tigyi and Miledi, 1992; Eicholtz et al., 1993). 혈청에 존재하는 LPA는 알부민에 결합되며, 전 혈청의 열에 안정하고 및 비투석성인 생물학적 활성의 대부분의 원인이다(Moolenaar, 1994). 제노푸스 난모세포에서 내향성 클로라이드 전류(chloride current)를 유발하는 활성 혈청 성분이 LPA인 것으로 확인되었다(18:0)(Tigyi and Miledi, 1992). 알부민-결합된 LPA(18:0) 다량이 리소-PC에 대한 리소포스포리파제 D(PLD)의 작용에 의해서라기 보다는 응고 과정동안 생산된다. 리소포스포리파제 D에 의한 경로는 헤파린 또는 시트레이트와 텍스트로스의 작용에 의해 비응고된 '성숙' 혈장내의 LPA의 존재에 대해 책임이 있다(Tokumura et al., 1986). 주목할 다른 점은 EDTA로 처리된 혈장에는 LPA가 존재하지 않는다는 것이다. 이 사실은 혈장 리소포스포리파제가 Ca^{2+} -의존성(Tokumura et al., 1986)일 수도 있음을 의미한다.
- <8> 알부민의 역할은 혈청에 존재하는 포스포리파제의 작용으로부터 LPA를 보호하는 것이다(Tigyi and Miledi, 1992). Tigyi와 Miledi는 알부민이 혈류에서 LPA의 운반체로 작용할 뿐만 아니라, 그 생리학적 반감기를 증가시킴을 제안했다. 제노푸스 난모세포에서 클로라이드 전류를 유도함에 있어 LPA 작용을 모방하는, 혈청 알부민에 존재하는 아직 확인되지 않은 지질 매개자가 있다.

- <9> LPA-반응성 세포 유형은 점균류 아메바와 제노푸스 난모세포에서 포유류 체세포에까지 이른다. 따라서, LPA의 공급원과 그 방출은 활성화된 혈소판에만 한정되지 않을 수도 있다. 최근의 실험은 펩티드 성장 인자들에 의해 자극될 경우, 포유류 섬유아세포가 신속히 LPA를 생산하고, 이는 이어서 세포의 매질로 방출됨을 보여주었다(Fukami and Takenawa, 1992).
- <10> 미지의 세포 기원의 비교적 다량의 생활성 LPA가 난소 암 환자의 복수액에 존재하며(Xu et al., 1995a), 그러한 환자로부터의 복수액이 난소 암 세포에 대한 강력한 분열 촉진 활성을 보유한다(Mills et al., 1988; Mills et al., 1990)는 증거가 있다. 종양 세포에 의해 세포의 액으로 분비되는지, 백혈구에 의해 분비되는지, 또는 다양한 포스포리파제의 작용을 통해 더욱 복잡한 지질로부터 생성되는지 여부는 확인되어야 한다.
- <11> GPM와 SPM는 계통발생도에 널리 걸친 다양한 세포 반응을 유발한다(Jalink et al., 1993a). LPA는 신경(Jalink et al., 1993; Durieux et al., 1992), 혈소판, 정상 및 형질전환된 섬유아세포(Jalink et al., 1990), 상피 세포(van Corven et al., 1989; Moolenaar, 1991), 및 제노푸스 난모 세포(Tigyi and Miledi, 1992; Durieux et al., 1992; Fernhout et al., 1992)와 같은 다양한 세포에서 세포내 저장물로부터 유래하는 일시적인 Ca^{2+} 시그널을 유도한다. LPA는 혈소판 응집(Schumacher et al., 1979; Tokumura et al., 1981; Gerrard et al., 1979; Simon et al., 1982)과 평활근 수축(Tokumura et al., 1980; Tokumura et al., 1994)을 유도하며, 정맥내 투여시 혈압에서 종의존적 변화를 유도한다(Schumacher et al., 1979; Tokumura et al., 1978).
- <12> 정지 섬유아세포에 첨가될 때, LPA는 DNA 합성과 세포 분열을 자극한다(van Corven et al., 1989; van Corven et al., 1992). LPA의 성장 유사 효과는 펩티드 성장 인자의 존재를 필요로 하지 않는다. 이 관찰은 세포 증식을 지탱하기 위해 인슐린 또는 상피 성장 인자(Moolenaar, 1991)의 존재를 필요로 하는 엔도테린 또는 바소프레신과 LPA가 구별되게 한다. 주목할 점은 Sp^2 골수종 세포에서 LPA는 cAMP 농도 증가에 의해 매개되는 항분열촉진 반응에 관여한다는 것이다(Tigyi et al., 1994; Fischer et al., 1998). 분열 촉진 경로와는 달리, 항분열촉진 경로는 페르투시스 독소(PTX)에 의해 영향받지 않았다. 또한, 폴스폴린과 이소부틸 메틸 잔틴의 첨가시, Sp^2 골수종 세포에서 LPA의 항분열촉진 작용은 첨가성이었다(Tigyi et al., 1994). 다양한 세포 유형에서, LPA는 섬유아세포에서 병소 집착 형성과 스트레스 섬유 형성을 포함하는 세포 골격 변화를 야기한다(Ridley and Hall, 1992). LPA는 또한 발생중인 축삭의 수축을 야기하여 신경 모세포종 분화의 역전과 억제를 촉진한다(Jalink et al., 1994a; Jalink et al., 1994b). 혈청 결핍된 N1E-115 신경 모세포종 세포에 나노몰(nmol)양의 LPA를 첨가할 경우(Jalink and Moolenaar, 1992), 즉각적인 축삭 수축을 야기하였으며, 이와 함께 신속하지만 일시적으로 세포 몸체가 둥글어졌다(Jalink et al., 1993b). LPA가 연속적으로 존재하는 경우, 신경모 세포는 그들의 미분화된 표현형을 유지하며, 유사 분열을 진행하지 못한다(Jalink et al., 1993b). 인슐린 유사 성장 인자들과 같은 부가적인 인자들이 세포 주기의 진행에 필요했다. 일단 세포가 형태적인 분화를 거치면, LPA의 첨가는 이 형태적인 변화를 역전시킨다. 따라서, LPA-유도된 축삭 수축은 기층에 대한 부착 손실에서가 아니라 액틴-세포 골격의 수축에 기인한다(Jalink et al., 1993b; Jalink et al., 1994b).
- <13> 다른 생리학 적 화학적 유인제(예, 인터루킨 8)와 유사하게, LPA는 사람 단핵구에서 주축성 기작에 의해 세포 이동을 유도한다(Zhou et al., 1995). 세포 이동을 유도하는 것에 더하여, LPA는 간암 및 암 세포가 중피 세포의 단층에 침입하는 것을 촉진한다(Imamura et al., 1993). 이 침입의 기작은 아직 불명확하나, 증가된 세포 이동성 및 증가된 세포 부착에 기인할 수도 있다. 마지막으로, LPA는 또한 신생 심장근세포 아포토시스를 차단하는 것으로 알려져 있다(Umanský et al., 1997).
- <14> 독특한 천연 인지질인 사이클릭-PA는 세포 유형에 따라, 다른 GPM와 유사하거나 반대되는 세포 작용을 일으키는 것으로 알려졌다. 제노푸스 난모세포에서 실험할 경우, 이것은 다른 GPM와 같은 클로라이드 전류를 유발시켰으나, 그 반응은 LPA에 의해 탈감작되지 않았다(Fischer et al., 1998). Murakami-Murofushi et al.(1993)은 사이클릭-PA가, 증식을 유도하는 LPA와 달리, 항증식 작용을 나타냄을 보여주었다.
- <15> PLGF 수용체(PLGFR)는 7-경막(7TM) 구아닌 뉴클레오티드-결합 조절 단백질(G 단백질)-결합된 수용체(GPCR) 상과에 속한다. 7-TM GPCR는 이중삼량체 G-단백질과 상호작용하여 세포 반응을 매개하는 세포-표면 수용체 과이다. EDG-2, EDG-4, EDG-7, 및 PSP-24를 포함하는 많은 LPA 수용체가 확인되었다. 이들 LPA 수용체와 다른 것들의 상관성을 보여주는 계통발생도가 도1에 나타난다.
- <16> 1996년에, Hecht et al.은 마우스 신피질 세포주로부터의 추정상의 사문석 수용체를 암호하는 cDNA를 클론하기 위해 차등 하이브리드화를 이용하였다(Hecht et al., 1996). 이 유전자는 심실 영역 유전자-1(Vzg-1)로 불렸다. 이 유전자는 피층 신경원성 영역에서 발현되며 41kDa(364 아미노산)의 분자량을 갖는 단백질을 암호하였다.

Vzg-1은 내피 분화 유전자-2(EDG-2)로 불리는 공개되지 않은 양 서열에 매우 유사하였다. 동일한 cDNA가 또한 마우스와 소 라이브러리로부터 올펜(orphan) 수용체로서 분리되었으며, rec1.3으로 알려졌다(Macrae et al.,1996). 이는 마우스 조직에서 널리 분포되며 뇌와 심장에서 가장 많이 발현되었다.

<17> 1996년에, Guo et al.,은 PCR계 프로토콜을 이용하여 제노푸스 난모 세포로부터 또 다른 추정 LPA 수용체 PSP-24(372 아미노산)를 분리하였다(Guo et al.,1996). 이 수용체는 Vzg-1/EDG-2/rec1.3과 거의 유사성을 보이지 않았다(Guo et al.,1996). EDG-2 사람 LPA 수용체의 cDNA 서열을 이용한, 스펡고리피드 수용체를 찾기 위한 서열 기초 조사 결과, 두 가지의 밀접하게 관련된 GPCR, 즉 래트 H218(EDG-5, 354 아미노산)과 EDG-3(378 아미노산)을 발견하였다(An et al.,1997a). 노던 분석은 심장 조직에서 EDG-3과 EGD-5를 암호하는 mRNA가 다량 발현됨을 보여주었다.

<18> EDG-2가 LPA를 위한 작용성 수용체임이 최근 확인되자, An et al.은 신규한 LPA 아형을 위한, 서열에 기초한 연구를 수행하였다(An et al.,1998a). GPCR을 암호하는 사람 cDNA가 발견되어 EDG-4로 명명되었다(An et al.,1998a). 노던 블롯 분석은 EDG-2와 EDG-4가 둘다 GPM 수용체로 작용함에도 불구하고, 그들의 조직 분포는 매우 상이함을 보여주었다. EDG-2와 달리, EDG-4는 일차적으로 말초 혈액 백혈구와 정소에서 발현되었다(An et al.,1998a).

<19> 사람 Jurkat T 세포로부터의 PCR 증폭 cDNA는 EDG 과에 속하는 이전에 알려지지 않았던 GPCR을 확인하였다. 확인된 GPCR은 EDG-7으로 명명되었다. 분자 질량은 40kDa(353 아미노산)이었다. 사람 조직에서 EDG-7 발현의 노던 블롯 분석은 심장, 체장, 전립선, 및 정소에서 발현됨을 보여주었다(Bandoh et al.,1999). 따라서, 두 가지 다른 과의 PLGF 수용체, PSP24와 EDG가 있으며, 총 10개의 PLGFR(도 1)가 있다. 리스트는 계속 증가한다.

<20> 이들 다양한 수용체는 GPM 또는 SPM에 대한 그들의 리간드 특이성에 기초하여 분류될 수 있으며, 하기 표 1과 같다.

표 1

<21> 인지질 성장 인자 수용체, 길이 및 주 리간드

PLGFR	아미노산 수	주 리간드
EDG-1	381	SPP
EDG-2	364	LPA
EDG-3	378	SPP
EDG-4	382	LPA
EDG-5	354	SPP
EDG-6	385	SPP
EDG-7	353	LPA
EDG-8	400	SPP
제노푸스 PSP24	372	LPA
쥐과 PSP24	373	LPA

<22> 제노푸스 PSP24와 쥐과 발현된 PSP24는 GPM(LPA, Fischer et al.,1998) 야기 진동성 클로라이드-전류를 특이적으로 변환한다. 이들은 구조적으로는 EDG 과에 상동성이 아니다(Tigyi and Miledi,1992;Fernhout et al.,1992). EDG 과는 두 개의 다른 하위그룹으로 분류될 수 있다. 첫 번째 그룹은 EDG-2, EDG-4, 및 EDG-7을 포함하며, 이들은 단지 GPM만을 위한 수용체로 작용하며(Hecht et al.,1996;An et al.,1998a;Bandoh et al.,1999;An et al.,1998b) 리간드 결합에 대한 반응으로 많은 시그날을 전달한다. 두 번째 그룹은 EDG-1, EDG-3, EDG-5, EDG-6 및 EDG-8에 관련되며, SPM에 대해 특이적이다(An et al.,1997a;Im et al.,2000;van Brocklyn et al.,1998;van Brocklyn et al.,2000;Spiegel and Milstein,2000). 다양한 PLGFR's의 주요 조직 발현이 하기 표2에 나타난다.

표 2

<23> 인지질 성장 인자 수용체의 사람 조직 발현

PLGFR	가장 많이 발현되는 사람 조직
EDG-1	도처
EDG-2	심혈관, CNS, 생식소 조직, GI
EDG-3	심혈관, 백혈구
EDG-4	백혈구, 정소
EDG-5	심혈관, CNS, 생식소 조직, 태반
EDG-6	림프계, 조혈 조직
EDG-7	심장, 췌장, 전립선, 정소
EDG-8	뇌
PSP24	CNS

<24> PLGF는 다수의 G-단백질-매개 시그널 전달 사건을 활성화한다. 이들 과정은 이중삼량체 G-단백질 과 $G_{q/11}$, $G_{i/o}$, 및 $G_{12/13}$ 을 통해 매개된다(Moolenaar, 1997; Spiegel and Milstein, 1995; Gohla, et al., 1998).

<25> $G_{q/11}$ 경로는 포스포리파제 C(PLC) 활성화를 일으키며, 이는 이노시톨 트리포스페이트(IP_3) 생산을 야기하며 다양한 세포에서 Ca^{2+} 의 이동을 일으킨다(Tokumura, 1995). 일부 세포에서, 이 반응은 PTX-민감성이며, 이는 다수의 PTX-민감성 및 비민감성 경로가 관여함을 의미한다(Tigyi et al., 1996). 이 경로는 단백질 키나아제 C(PKC)의 디아실 글리세롤(DAG)-매개 활성화에도 책임이 있다. PKC는 세포 포스포리파제 D(PLD)를 활성화하며, 이는 포스포파티딜 콜린이 유리 콜린과 PA로 가수분해 되도록 한다(van der Bend et al., 1992a). 또한, PLC는 MAP 키나제를 직접 또는 일부 세포 유형에서는 PKC의 DAG 활성화를 통해 활성화할 수 있다(Ghosh et al., 1997).

<26> 분열 촉진성-시그널링 경로는 G-단백질 이중삼량체 $G_{i/o}$ 서브유닛을 통해 매개된다. 형질감염 연구는 αi 서브유닛이 아닌 $G_{i\beta\gamma}$ 이량체가 Ras-MAP 키나제 활성화에 작용함을 나타낸다.

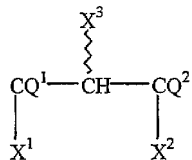
<27> Ras의 활성화는 EGF(Cunnick et al., 1998) 또는 PDGF 수용체(Herrlich et al., 1998)와 같은 수용체 티로신 키나제(RTK)의 트랜스활성화에 의해 선행된다. 트랜스활성화된 RTK는 Ras를 활성화시키며, 이는 Raf를 통해 MAP 키나제(ERK 1,2)의 활성화로 이끈다. PTX-민감성인 $G_{i\alpha}$ 서브유닛은 아데닐 사이클라제(AC)를 저해하여, 수용체를 인산화시키고 탈감작시키는 G-단백질-결합된 수용체 키나제(GRK)에 $\beta\gamma$ 이량체가 결합하도록 한다. 인산화된 수용체는 β -아레스틴에 의해 발견되어, src 키나제를 발견하며, 이는 EGF-수용체를 인산화하여, 그 활성 형태를 생성한다(Lin et al., 1997; Ahn et al., 1999; Luttrell et al., 1999). 트랜스활성화된 RTK는 Ras를 활성화시키며, 이는 Raf를 통해 MAP 키나제(ERK 1,2)를 활성화시킨다. PTX-민감성인 $G_{i\alpha}$ 서브유닛은 AC를 저해하여 사이클릭-AMP(cAMP) 농도를 감소시킨다. LPA에 의한 반대의 세포 효과, 즉, 유사 분열과 항유사분열은 cAMP 두 번째 메신저 시스템에 대한 반대 효과에 의해 수반된다. 유사 분열은 $G_{i\alpha}$ 경로를 통해 매개되며, 그 결과 cAMP 농도가 감소되는 반면(van Corven et al., 1989; van Corven et al., 1992), 항유사분열은 cAMP의 비-PTX 민감성 Ca^{2+} -의존성 증가에 의해 수반된다(Tigyi et al., 1994; Fischer et al., 1998).

<28> 대조적으로, 액틴-세포 골격의 재배열로 이끄는 PTX-비민감성 $G_{12/13}$ 시그널링 경로에 대해서는 별로 알려진 것이 없다. 이 경로는 또한 RTK의 트랜스활성화에 관여하며(Lin et al., 1997; Ahn et al., 1999; Luttrell et al., 1999; Gohla et al., 1998) 작은 GTPase, Rho에 집결할 수도 있다(Moolenaar, 1997). 다양한 단백질 파트너들이 분리되고 확인되어, Rho의 다운 스트림 시그널링에 대해 더 많이 알려져 있다. Rho는 Ser/Thr 키나제를 활성화시키며, 이는 미오신 경계 포스포타제(MLC-포스포타제)를 인산화하고, 저해한다(Kimura et al., 1996). 이 경로는 MLC의 인산화 형태의 축적을 일으키며, 세포 골격 반응으로 이끌어 축삭의 수축(Tigyi and Miledi, 1992; Tigyi et al., 1996; Dyer et al., 1992; Postma et al., 1996; Sato et al., 1997), 스트레스 섬유의 유도(Ridley and Hall, 1992; Gonda et al., 1999), 주화성의 자극(Jalink et al., 1993a), 세포 이동(Zhou et al., 1995; Kimura et al., 1992), 및 종양 세포 침입(Imamura et al., 1993; Imamura et al., 1996)과 같은 세포 효과로 이끈다. PLGF-유도된, Rho-매개된, 종양 세포 침입은 세포보통리늄 C3-특인에 의해 차단되며, 이는 ADP-의존 기작에서 Rho를 특이적으로 리보실화한다(Imamura et al., 1996).

- <29> 또한 Rho는 정지 섬유아세포에서 DNA 합성을 자극하는 능력을 갖는다(Machesky and Hall, 1996;Ridley,1996). Rho과(family) GTPase의 발현은 혈청-반응 인자(SRF)를 활성화시키며, 이는 초기 유전자 전사를 매개한다(Hill et al.,1995). 또한, PLGF(LPA)는 종양 세포 침입을 유도한다(Imamura et al.,1996). 하지만, 그것이 세포 골격 변화 또는 유전자 전사, 또는 둘다에 관여하는 지는 불명확하다.
- <30> 증식 및/또는 이들의 이동과 같은 다수의 세포 활성 및 세포 경로에서의 LPA/LPA 수용체 관여 및 상처 치료와 암에서의 관여에 의해, 전술한 LPA 수용체에서의 안타고니스트 또는 아고니스트로서 작용, 바람직하게는 선택적으로 작용할 수 있는 신규 화합물을 동정하는 것이 필요하다.
- <31> 현재 극소수의 합성 또는 내인성 LPA 수용체 저해제가 공지되어 있다. 현재까지 보고된 안타고니스트중, 대부분의 작업은 SPH, SPP, N-팔미토일-1-세린(Bittman et al.,1996), 및 N-팔미토일-1-티로신(Bittman et al., 1996)에 대한 것이었다. 전술한 화합물들은 제노푸스 난포 세포에서 LPA-유도된 클로라이드 전류를 저해함이 알려졌다(Bittman et al.,1996;Zsiros et al.,1998). 하지만, 이들 화합물들은 모든 세포 시스템에서 연구되지는 않았다. SPP는 종양 세포 침입을 저해하는 것으로 알려져 있으나, SPP가 LPA의 저해제가 됨으로써인지 또는 그 자신의 수용체의 작용을 통해서인지는 확실하지 않다. N-팔미토일-1-세린과 N-팔미토일-1-티로신은 또한 LPA-유도된 혈소판 응집을 저해하지만(Sugiura et al.,1994), 이들 화합물들이 LPA 수용체에서 작용하는 지 여부는 밝혀져야 한다. 리소포스파티딜 글리세롤(LPG)는 LPA 작용의 저해를 어느 정도 보여준 첫 번째 지질이다(van der Bend et al.,1992b). 하지만, 몇몇 LPA-반응성 세포 유형에서는 검출할 수 없었다(Lilom et al.,1996). 이들 저해제 중 어느 것도 특정 LPA 수용체에서 선택적으로 작용하는 것으로 나타나지는 않았다.
- <32> 폴리실폰화된 화합물인 수라민(Suramin)은 가역적이고 용량 의존적인 방식으로 LPA-유도된 DNA 합성을 저해하는 것으로 나타났다. 하지만, 수라민은 LPA 수용체에 대해 어떤 특이성도 갖지 않으며 매우 높은 밀리몰(mM) 농도에서만 LPA의 작용을 차단했다(van Corven et al.,1992).
- <33> 본 발명은 현재의 LPA 아고니스트와 LPA 안타고니스트와 관련된 문제를 극복하는 것에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

- <34> 발명의 요약
- <35> 본 발명은 하기 화학식(I)의 화합물에 관한 것이다:

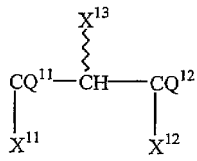


(I)

- <36> 상기 식에서,
- <37> X^1 , X^2 및 X^3 중 하나 이상은 $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^1-$ 또는 $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^2-\text{P}(\text{OH})\text{O}-\text{Z}^1-$ 이고, X^1 및 X^2 가 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OH})-\text{O}-$ 로 함께 연결되거나, X^1 및 X^3 이 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OH})-\text{NH}-$ 로 함께 연결되며;
- <38> X^1 , X^2 및 X^3 중 하나 이상은 $\text{R}^1-\text{Y}^1-\text{A}$ 이고, X^1 , X^2 및 X^3 중의 둘이 $\text{R}^1-\text{Y}^1-\text{A}$ 인 경우에 각각은 동일하거나 상이하며, 또는 X^2 및 X^3 이 $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^1)-$ 로 함께 연결되고;
- <39> 임의로, X^1 , X^2 및 X^3 중 하나는 H 이며;
- <40> A는 직접 결합, $(\text{CH}_2)_k$ (여기에서, k 는 0 내지 30의 정수임) 또는 0 이고;

- <41> Y^1 은 $-(\text{CH}_2)_l-$ (여기에서, l 은 1 내지 30의 정수임), $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}-$ 또는 $-\text{NR}^2-$ 이며;
- <42> Z^1 은 $-(\text{CH}_2)_m-$ 또는 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m-$ (여기에서, m 은 1 내지 50의 정수임), $-\text{C}(\text{R}^3)\text{H}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$ 또는 $-\text{S}-$ 이고;

제1 이탈기를 형성하고; Y^2 는 H 또는 보호기임]을 화학식(VI)의 중간체 화합물과 반응시키는 단계, 및 경우에 따라 탈보호하는 단계를 포함하며, 여기에서, 상기 반응 단계 및 탈보호 단계는 X^1 , X^2 및 X^3 중 하나 또는 둘이 $(HO)_2PO-Z^1$ - 또는 $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1$ -인 화학식(I)의 화합물을 제공하기에 효과적인 조건 하에서 수행한다:



(VI)

상기 식에서,

X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중 하나 이상은 $R^{11}-Y^{11}-A$ 이고, X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중의 둘이 $R^{11}-Y^{11}-A$ 인 경우에 각각은 동일하거나 상이하며, 또는 X^{12} 및 X^{13} 이 $-N(H)-C(O)-N(R^{11})-$ 로 함께 연결되고;

X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중 하나 이상은 OH, NH_2 , SH 또는 제2 이탈기이며;

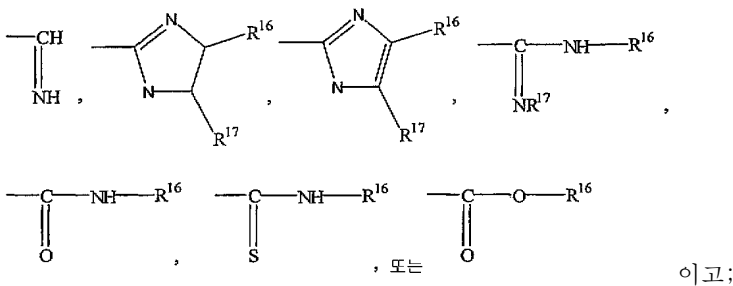
임의로, X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중 하나는 H 이고;

A는 직접 결합, $(CH_2)_k$ (여기에서, k 는 0 내지 30의 정수임) 또는 0 이며;

Y^{11} 은 $-(CH_2)_l-$ (여기에서, l 은 1 내지 30의 정수임), $-O-$, $-\overset{O}{\parallel}{C}-$, $-S-$ 또는 $-NR^{12}-$ 이고;

Q^1 및 Q^2 는 독립적으로 H_2 , $=NR^{13}$, $=O$, 또는 H 및 $-NR^{14}R^{15}$ 의 조합이며;

X^{11} , X^{12} 또는 X^{13} 각각에 있어서의 R^{11} 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내지 C30 알케닐, 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체가 있거나 없는 방향족 또는 헤테로방향족 고리, C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬,



이고;

R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} 및 R^{17} 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내지 C30 알케닐, 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체가 있거나 없는 방향족 또는 헤테로방향족 고리, C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴알킬, 또는 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬이다.

본 명세서에서 1 이상의 LPA 수용체의 아고니스트 또는 안타고니스트로서 확인된 본 발명의 화합물들은 LPA 수용체 시그널링에 의하여 매개되는 생화학적 경로를 각각 저해하거나 촉진하는 용도를 갖는다. LPA 수용체 시그널링을 조절함에 의하여, 상기 안타고니스트 및 아고니스트는 암 치료 및 상처 치료 촉진에 있어서의 특이적이고 실질적인 용도를 갖는다.

실시예

하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니되며,

본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 기재된 사항에 의하여 정하여진다.

<314> 재료 및 방법

<315> 토마스-후버(Thomas-Hoover) 모세관 융점 장치를 사용하여, 모든 융점(mps)(수정된 값이 아님)을 측정하였다.

<316> Bruker AX 300 분광계(300, 75.5 MHz) 상에서 ^1H 및 ^{13}C 핵자기 공명(NMR) 스캔트럼을 기록하였다. 화학적 이동 값(δ)은 테트라메틸실란(TMS)에 대한 상대적인 값을 백만분의 일(ppm) 단위로 나타내었다. 피크는 다음과 같이 약칭하였다: s-단일항(singlet); d-이중항(doublet); t-삼중항(triplet); q-사중항(quartet); bs-광역 단일항(broad singlet); m-다중항(multiplet).

<317> Bruker AX 300 분광계 상에서 양성자, 13번 탄소(^{13}C) 및 31번 인(^{31}P) 자기 공명 스캔트럼을 취득하였다. 양성자 및 1번 탄소에 대한 화학적 이동 값은 테트라메틸실란(TMS)에 대한 상대적인 값을 백만분의 일(ppm) 단위로 나타내었다. 31번 인에 대한 스캔트럼은 $d_6=0$ ppm에서 아세톤 중의 0.0485 M 트리페닐포스페이트에 대한 상대적인 값을 백만분의 일(ppm) 단위로 나타내었다.

<318> Perkin Elmer System 200-FTIR 상에서 적외선(IR) 스캔트럼을 기록하였다.

<319> 포지티브 모드(positive mode) 또는 네가티브 모드(negative mode)로 전자분사 인터페이스(Electrospray Interface; ESI)를 사용하는 직접 주입에 의해 Bruker Esquire AG 또는 Bruker Esquire LC/MC 분광계 상에서 질량 스캔트럼(MS)을 기록하였다. 스캔트럼 데이터는 지정된(assigned) 구조와 일치하였다.

<320> Atlantic Microlabs, Inc(미국 조지아주 노르크로스 소재)에서 원소 분석을 수행하였고, 측정값은 이론값의 $\pm 0.4\%$ 이내이었다.

<321> 실리카 겔(merck, 230-400 메쉬 또는 200-425 메쉬, 60 Å)은 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 사용하였다.

<322> 알루미늄 배킹(backing)(두께 200 마이크론 또는 250 마이크론)을 갖는 sigma Aldrich 실리카 겔 60 F 254 TLC 시트 상에서 분석용 TLC를 수행하였다.

<323> 특별한 언급이 없는 한, 모든 시약, 용매 및 크로마토그래피 매질은 추가 정제없이 Aldrich Chemical Company(미국 위스콘신주 밀워키 소재), Fisher Scientific(미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재) 또는 Sigma chemical Co.(미국 미주리주 세인트루이스 소재)에서 시판하는 것을 사용하였다. 지시약으로 벤조페논을 사용하여, 금속 나트륨으로부터 증류함으로써 테트라히드로푸란(THF)을 건조시켰다. 수소화칼슘(CaH_2)으로부터 무수 염화메틸렌(CH_2Cl_2)을 증류하였다. 모든 모노 글리세리드는 Nu-Check-Prep(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)에서 시판하는 제품을 구입하였다. t-Boc-L-세린은 Fluka에서 시판하는 제품을 구입하였다.

<324> 모든 지질은 Avanti Polar Lipids(미국 알라바마주 알라바스터 소재)에서 시판하는 제품을 구입하였다. 지방산이 없는 소 혈청 알부민(BSA)도 상기 회사 제품을 구입하였다. LPA는 사용 하기 전에 1 ml의 EGTA를 함유하지만 Ca^{2+} 이 없는 헹크스 평형 염 용액 중에 용해되어 있는 1 mM의 BSA와 복합체화되었다. 특별한 언급이 없는 한, 분취량의 모든 다른 지질은 MeOH 중에 용해시키고, 사용하기 전에 LPA와 혼합한다.

<325> 사이토펙텐(cytofectene) 형질전환 시약은 Bio-Rad(미국 캘리포니아주 헤르쿨레스 소재)에서 시판하는 제품을 구입하였다. Fura-2 AM은 Molecular Probes(미국 오리건주 유젠 소재)에서 시판되는 제품을 구입하였다.

<326> 배양 배지, 우태아 혈청(FBS) 및 G418은 Cellgro(미국 버지니아주 헤르돈 소재)에서 시판하는 제품을 구입하였다.

<327> 사람 Edg-4를 안정적으로 발현시키는 RH7777 세포는 이해심 많은 Kevin Lynch 박사(미국 버지니아주 찰스 로테스 빌레 소재 버지니아 대학)가 제공한 것이다. pCDNA3 발현 플라스미드(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재 Invitrogen사) 내에 삽입된, 표시 문자가 표지된(flag-tagged) cDNA의 암호화 사람 Edg-4 및 Edg-7은 Junken Aoki 박사(일본 도쿄 소재 도쿄 대학)로부터 선물받은 것이다. RH7777 및 NIH3T3 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)(미국 버지니아주 마나사스 소재)로부터 구입한 것이다. HEY 세포는 Lisa Jennings(헐피스 소재 테네시 대학)박사가 제공한 것이다. 모든 세포주는 10% FBS 및 2 mM 글루타민을 함유하는 돌베코 개량 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) 중에 유지시켰다. 난모 세포는 전술한 바와 같이(1999년 도에 발행된 Tigyi 등의 문헌 참조), 제노푸스 라에비스(*Xenopus laevis*) 개구리로부터 취득하였다.

- <328> 안정적인 형질전환
- <329> 사람 Edg-2, Edg-4 또는 Edg-7을 암호화하는 cDNA 구조물로 RH7777 세포를 형질전환한 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 사이토펙텐 형질전환 시약을 사용하여 pCDNA3 발현 벡터 내에 서브클로닝하였다. 형질전환된 세포는 10% FBS 및 1 mg/ml의 게네티신(geneticine)을 함유하는 DMEM 내에서 선별하였다. 내성 세포를 수집하고, 제한 희석(limiting dilution)에 의해 서브클로닝하였다. 이어서, 생성되는 클론은 기능 분석 및 RT-PCR 분석을 사용하여 스크리닝하였다. 데이터는 개별 클론의 대표적인 데이터이다.
- <330> 일시적인 형질전환
- <331> RH7777 세포는 형질전환 전에 1일 동안 폴리리신이 코팅된 유리 커버글라스(미국 뉴저지주 바인랜드 소재 Bellco) 상에 도말하였다. 다음날, 6 μ l의 사이토펙텐과 혼합된 1 μ g의 플라스미드 DNA로 밤새도록(16-18 시간) 세포를 형질전환하였다. 이어서, DMEM으로 세포를 2회 행구고, 10% FBS를 함유하는 DMEM 중에서 배양하였다. 다음날, DMEM으로 세포를 행구고, 세포내 Ca^{2+} 를 모니터링하기 전에 최소 2시가 동안 혈청을 회수하였다.
- <332> 세포내 Ca^{2+} 의 측정 및 데이터 분석
- <333> 전술한 바와 같이(1999년도에 발행된 Tigyi 등의 문헌 참조), 형광 Ca^{2+} 지시약 Fura-2 AM을 사용하여, 세포내 Ca^{2+} 에 있어서의 변화를 모니터링하였다. FL WinLab software(미국 웨레스레이 소재 Perkin-Elmer)에 의해 측정 시, 세포내 Ca^{2+} 측정으로부터 수득한 데이터 포인트는 유도된 Ca^{2+} 의 일시적 산물(transient)의 총 피크 면적을 나타내었다. 데이터 포인트는 평균 3회 이상의 측정 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 데이터 포인트의 중요성은 학생 t-테스트를 사용하여 측정하고, $p < 0.05$ 에서 유의적인 의미를 갖는다고 간주하였다.
- <334> 제노푸스 난모 세포에 있어서의 전자물리적 기록
- <335> 전술한 바와 같이(1999년도에 발행된 Tigyi 등의 문헌 참조), 2개의 전극 전압 클램프 시스템을 사용하여, LPA에 의해 유도된 오실레이터 Cl^- 전류를 기록하였다.
- <336> Edg 및 PSP24 mRNA의 RT-PCR 분석
- <337> 하기 올리고뉴클레오티드 서열을 사용하여, 전술한 바와 같이(1999년도에 발행된 Tigyi 등의 문헌 참조), RT-PCR에 의한 Edg 및 PSP24 수용체 mRNA의 동정을 수행하였다.
- <338> EDG-1
- <339> 정방향 프라이머(forward primer) 5'-₈₁TCATCGTCCGGCATTACAATA-3'(서열 번호 9);
- <340> 역방향 프라이머(reverse primer) 5'-GAGTGAGCTTGAGGTGGTG₃₅₁-3'(서열 번호 10);
- <341> EDG-2
- <342> 정방향 프라이머 5'-₆₅AGATCTGACCAGCCGACTCAC-3'(서열 번호 11);
- <343> 역방향 프라이머 5'-GTTGGCCATCAAGTAATAAATA₄₂₂-3'(서열 번호 12);
- <344> EDG-3
- <345> 정방향 프라이머 5'-₁₃₇CTTGGTCATCTGCAGCTTCATC-3'(서열 번호 13);
- <346> 역방향 프라이머 5'-TGCTGATGCAGAAGGCAATGTA₅₉₇-3'(서열 번호 14);
- <347> EDG-4
- <348> 정방향 프라이머 5'-₆₃₄CTGCTCAGCCGCTCCTATTTG-3'(서열 번호 15);
- <349> 역방향 프라이머 5'-AGGAGCACCCACAAGTCATCAG₁₁₉₅-3'(서열 번호 16);
- <350> EDG-5

- <351> 정방향 프라이머 5'-₁₁ATGGGCAGCTTGTACTCGGAG-3'(서열 번호 17);
- <352> 역방향 프라이머 5'-CAGCCAGCAGACGATAAAGAC₇₂₀-3'(서열 번호 18);
- <353> EDG-6
- <354> 정방향 프라이머 5'-₂₈₀TGAACATCACGCTGAGTGACCT-3'(서열 번호 19);
- <355> 역방향 프라이머 5'-GATCATCAGCACCGTCTTCAGC₇₉₀-3'(서열 번호 20);
- <356> EDG-7
- <357> 정방향 프라이머 5'-₉₁AGCAACACTGATACTGTGATG-3'(서열 번호 21);
- <358> 역방향 프라이머 5'-GCATCCTCATGA'rrGACATGTG₄₄₆-3'(서열 번호 22);
- <359> EDG-8
- <360> 정방향 프라이머 5'-₈₈ATCTGTGCGCTCTATGCAAGGA-3'(서열 번호 23);
- <361> 역방향 프라이머 5'-GGTGTAGATGATAGGATTCAGCA₁₁₆₁-3'(서열 번호 24);
- <362> PSP24
- <363> 정방향 프라이머 5'-₃₂₀CTGCATCATCGTGTACCAGAG-3'(서열 번호 25); 및
- <364> 역방향 프라이머 5'-ACGAACCTCTATGCAGGCCTCGC₁₁₈₄-3'(서열 번호 26).
- <365> 세포 증식 분석
- <366> 전술한 바와 같이(1999년도에 발행된 Tigyi 등의 문헌 참조), 직접 세포 계수에 의해 NIH3T3 세포의 증식을 평가하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM 내에서 밀도가 10,000개의 세포/웰인 24-웰 평판 내에 NIH3T3 세포를 도말하였다. 다음날, 세포를 행구고, DMEM 내에서 6시간 동안 혈청이 결핍된 상태로 하였다. 이어서, 24시간 동안 지질을 첨가하였다. 쿨터 계수기(Coulter counter)(미국 플로리다주 히알레아 소재 Coulter Electronics) 내에서 계수함으로써, 세포수를 측정하였다.
- <367> ³H-티미딘의 혼입
- <368> 전술한 바와 같이(1999년도에 발행된 Tigyi 등의 문헌 참조), RH7777 세포 내로의 ³H-티미딘의 혼입을 측정하였다.
- <369> 실시예 1- N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β 락톤(중간체 화합물 25)의 합성
- <370> 500 ml 삼구 플라스크에 저온 온도계 및 100 ml 적하 깔때기(dropping funnel)을 장착하였다. 모든 유리 기구는 사용하기 이전에 불꽃 건조하고, 아르곤(Ar) 하에서 실온으로 냉각시켰다. 플라스크에 트리페닐포스핀(Ph₃P)(10 g, 38 mmol, 진공 하에서 72시간 동안 P₂O₅ 위에서 건조됨)을 첨가하고, THF(190 ml)를 새로 증류시켰다. 용액을 냉각시키고, 아르곤 대기 하의 -78 °C(건조 냉 아세톤 배쓰(bath))에서 교반하였다. 격렬히 교반하면서, 새로 증류된 디에틸아조디카르복실레이트(DEAD)(6.2 ml, 39.9 mmol)를 30분 이상 시린지(syringe)를 사용하여 첨가하였다. 첨가 완료 후, 우유빛 백색 페이스트를 수득할 때까지(약 30분-40분) 혼합물을 교반하였다. 새로 증류된 THF(75 ml) 중의 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린(24)(7.79 g, 38 mmol, 진공 하에서 72시간 동안 P₂O₅ 위에서 건조됨) 용액을 반응 혼합물에 45분 이상 첨가하였다. 아르곤 하에서 -78 °C에서 밤새도록 혼합물을 교반하고, 0 °C로 데웠다(온도가 -10 °C에 이를 때까지 빙조 내에 플라스크를 배치시켰다). 약 30분 후, 빙조를 수조로 대체하고, 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하고, 회전 증발기 상에서 농축시켜, 30 °C에서 담황색 오일을 수득하였다. 이어서, 상기 오일을 25% EtOAc/헥산(100 ml)로 처리하고, 생성되는 백색 고체를 여과에 의해 제거하고, 실리카 겔 상에서 25% EtOAc/헥산(2 × 70 ml)로 세척하고, 25%(500 ml) 및 300%(1500 ml) EtOAc/헥산을 연속적으로 사용하여 잔류 오일의 플래쉬 크로마토그래피를 수행하였다.
- <371> 적당한 분획물을 배합하여 백색 고체로서의 3.4 g(47%)의 화합물(25)을 수득하였다: mp 119-121 °C dec (Lit.

119.5–120.5 °C dec); ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 1.44 (s, 9H), 4.38–4.42 (m, 2H), 4.96–5.03 (q, $J_1 = 6.1$ Hz, $J_2 = 12.5$ Hz, 1H), 5.39 (s, br, 1H); ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 28.31, 60.01, 66.63, 81.50, 155.01, 169.94; IR (KBr) 3361, 2978, 1843, 1680, 1533, 1370, 1292 cm^{-1} ; $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 51.33; H, 6.94; N, 7.50. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 51.41; H, 7.01; N, 7.51.

<372> **실시예 2 - 화합물 26-34의 합성**

<373> 사용되는 유리 기구를 불꽃 건조시키고, 아르곤 대기 하에서 실온으로 냉각시켰다. 아르곤 대기 내에서 반응을 수행하였다. THF는 사용 전에 새로 증류하였다.

<374> **화합물 26: tert-부틸 N-[1-(히드록시메틸)-2-(노닐아미노)-2-옥소에틸]카르바메이트**

<375> THF(60 ml) 중의 테실 아민(490 mg, 3.20 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β -락톤(300 mg, 1.60 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 밤새도록 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<376> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 왁스형 분말로서의 290 mg(52%)의 화합물(26)을 수득하였다: mp 50–52°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H) 1.26 (s, 14H), 1.46 (s, 9H), 3.04 (bs, 1H), 3.16–3.34 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 4.06–4.15 (m, 2H), 5.53 (bs, 1H), 6.63 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 1409, 22.65, 26.80, 28.27, 29.24, 29.27, 29.37, 29.50, 29.51, 31.86, 39.43, 54.34, 62.87, 77.20, 80.34, 171.52; IR (KBr) 3282, 3098, 2929, 2856, 1666, 1547, 1467, 1369, 1300, 1248, 1179 cm^{-1} ; $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 62.76; H, 10.53; N, 8.13. $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 63.00; H, 10.46; N, 7.98.

<377> **화합물 27: tert-부틸 N-[1-(히드록시메틸)-2-옥소-2-(테트라데실아미노)에틸]카르바메이트**

<378> THF(40 ml) 중의 테트라데실 아민(273 mg, 1.28 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β -락톤(200 mg, 1.06 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 밤새도록 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<379> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 분말로서의 245 mg(57%)의 화합물(27)을 수득하였다: mp 59–62°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.88 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.25 (s, 24H), 1.45 (s, 9H), 3.15–3.36 (m, 3H), 3.63–3.65 (m, 1H), 4.07–4.13 (m, 2H), 5.60–5.63 (m, 1H), 6.72 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 14.10, 22.66, 26.81, 27.99, 28.27, 29.25, 29.33, 29.37, 29.50, 29.57, 29.62, 29.66, 31.90, 39.47, 54.58, 62.87, 77.20, 80.52, 156.34, 171.37; IR (KBr) 3345, 2920, 2852, 1708, 1688, 1655, 1637, 1572, 1529, 1472, 1248, 1173 cm^{-1} ; $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 65.96; H, 11.07; N, 6.99. $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 66.04; H, 11.17; N, 6.96.

<380> **화합물 28: tert-부틸 N-[1-(히드록시메틸)-2-(옥타데실아미노)-2-옥소에틸]카르바메이트**

<381> THF(60 ml) 중의 옥타데실 아민(516 mg, 2.08 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β -락톤(300 mg, 1.60 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 밤새도록 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<382> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 분말로서의 300 mg(41%)의 화합물(28)을 수득하였다: mp 69–71°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.88 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.25 (s, 30H), 1.46 (s, 9H), 3.03 (bs, 1H), 3.16–3.34 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 4.05–4.21 (m, 2H), 5.64 (bs, 1H), 6.62 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 14.10, 22.68, 26.81, 28.28, 29.25, 29.35, 29.51, 29.58, 29.69, 31.91, 39.43, 54.29, 62.87, 77.20, 171.53; IR (KBr) 3345, 2919, 2852, 1687, 1636, 1570, 1528, 1473, 1305, 1173 cm^{-1} ; $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 0.2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 67.86; H, 11.39; N, 5.91. $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 0.2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 에 대한 원소 분석 실측치: C,

67.59; H, 11.46; N, 6.1.

<383> **화합물 29: tert-부틸 N-{1-(히드록시메틸)-2-옥소-2-[4-(테트라데실옥시)아닐리노]에틸}카르바메이트**

<384> THF(40 ml) 중의 4-(테트라데실옥시)아닐린(150 mg, 0.490 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β-락톤(91 mg, 0.490 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 밤새도록 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(2회)를 수행하였다.

<385> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 분말로서의 110 mg(45%)의 화합물(29)을 수득하였다: mp 92-94 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.6 Hz, 3H), 1.25 (s, 22H), 1.48 (s, 9H), 1.76 (m, 2H), 3.67-3.72 (dd, J₁=4.9 Hz, J₂= 7.2 Hz, 1H), 3.92 (t, J=6.5 Hz, 2H), 4.23-4.26 (m, 2H), 5.65 (bs, 1H), 6.83-6.87 (m, J_o=8.9 Hz, 2H), 7.36-7.40 (m, J_o=8.9 Hz), 8.6 (bs, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 14.10, 22.69, 26.01, 28.28, 29.25, 29.34, 29.39; 29.56, 29.58, 29.64, 31.91, 62.53, 68.30, 77.20, 111.17, 114.81, 121.70, 130.25, 156.22, 169.78; IR (KBr) 3304, 2920, 2852, 1658, 1514, 1472, 1238, 1174 cm⁻¹; C₂₈H₄₈N₂O₅ · 0.05CHCl₃에 대한 원소 분석 이론치: C, 67.56; H, 9.71; N, 5.62. C₂₈H₄₈N₂O₅ · 0.05CHCl₃에 대한 원소 분석 실측치: C, 67.80; H, 9.67; N, 5.60.

<386> **화합물 30: tert-부틸 N-[1-(히드록시메틸)-2-(4-메톡시아닐리노)-2-옥소에틸]카르바메이트**

<387> THF(20 ml) 중의 p-아니시딘(100 mg, 0.8 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β-락톤(151 mg, 0.8 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 밤새도록 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<388> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 분말로서의 135 mg(54%)의 화합물(30)을 수득하였다: mp 109-111°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.48 (s, 9H), 3.68-3.73 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.24-4.27 (m, 2H), 5.68 (bs, 1H), 6.83-6.88 (m, J_o=9 Hz, 2H), 7.37-7.42 (m, J_o=9 Hz, 2H), 8.61 (bs, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 28.29, 54.96, 55.47, 62.54, 81.00, 114.18, 121.78, 130.45, 156.64, 156.98, 169.59; IR (KBr) 3340, 2978, 1673, 1603, 1516, 1298; 1238, cm⁻¹; C₁₅H₂₂N₂O₅에 대한 원소 분석 이론치: C, 58.05; H, 7.15; N, 9.03. C₁₅H₂₂N₂O₅에 대한 원소 분석 실측치: C, 58.04; H, 7.17; N, 9.06.

<389> **화합물 31: tert-부틸 N-{1-(히드록시메틸)-2-옥소-2-[3-(테트라데실옥시)아닐리노]에틸}카르바메이트**

<390> THF(25 ml) 중의 3-(테트라데실옥시)아닐린(179 mg, 0.588 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β-락톤(91 mg, 0.490 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 48시간 동안 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<391> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 분말로서의 105 mg(43%)의 화합물(31)을 수득하였다: mp 70-72°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.88 (t, J=6.6 Hz, 3H), 1.26 (s, 22H), 1.48 (s, 9H), 1.76 (m, 2H), 3.67-3.73 (dd, J₁=5.1 Hz, J₂= 6.9 Hz, 1H), 3.93 (t, J=6.5 Hz, 2H), 4.23-4.26 (m, 2H), 5.66 (bs, 1H), 6.64-6.68 (m, 1H), 6.93-6.96 (m, 1H), 7.19 (t, J_o=8.1 Hz, 1H), 7.23 (t, J_m=2 Hz, 1H), 8.75 (bs, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 14.11, 22.68, 26.02, 28.28, 29.23, 29.35, 29.39, 29.60, 29.66, 31.92, 62.38, 68.07, 77.20, 106.22, 111.10, 111.92, 129.67, 138.54, 159.75; IR (KBr) 3368, 2918, 2851, 1679, 1618, 1498, 1472, 1286 cm⁻¹; C₂₈H₄₈N₂O₅ · 0.05CHCl₃에 대한 원소 분석 이론치: C, 67.56; H, 9.71; N, 5.62. C₂₈H₄₈N₂O₅ · 0.05CHCl₃에 대한 원소 분석 실측치: C, 67.44; H, 9.79; N, 5.57.

<392> **화합물 32: tert-부틸 N-[1-(히드록시메틸)-2-(3-메톡시아닐리노)-2-옥소에틸]카르바메이트**

<393> THF(30 ml) 중의 m-아니시딘(171 mg, 1.38 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β-락톤(200 mg, 1.06 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 밤새도록 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축

시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<394> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 황색 오일로서의 154 mg(46%)의 화합물(32)을 수득하였다: ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.48 (s, 9H), 3.68-3.73 (dd, $J_1=4.8$ Hz, $J_2=6.9$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.22-4.25 (d, $J=10.23$ Hz, 2H), 5.66 (bs, 1H), 6.66-6.69 (m, 1H), 6.96-6.99 (m, 1H), 7.21 (m, $J_o=8.1$ Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 8.79 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 28.28, 29.68, 55.30, 62.39, 77.20, 81.11, 105.67, 110.55, 112.15, 129.73, 138.63, 160.19, 169.89.

<395> **화합물 33: tert-부틸 N-{1-(히드록시메틸)-2-옥소-2-[2-(테트라데실옥시)아닐리노]에틸}카르바메이트**

<396> THF(25 ml) 중의 2-(테트라데실옥시)아닐린(200 mg, 0.654 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β -락톤(102 mg, 0.545 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 48시간 동안 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<397> 적당한 분획물을 모아 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 황색 오일로서의 33 mg(<10%)의 화합물(33)을 수득하였다: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.88 (t, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.26 (s, 22H), 1.48 (s, 9H), 1.76 (m, 2H), 3.67-3.73 (dd, $J_1=5.1$ Hz, $J_2=6.9$ Hz, 1H), 3.93 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 4.23-4.26 (m, 2H), 5.66 (bs, 1H), 6.64-6.68 (m, 1H), 6.93-6.96 (m, 1H), 7.19 (t, $J_o=8.1$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J_m=2$ Hz, 1H), 8.75 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 14.10, 22.68, 25.88, 28.30, 29.17, 29.35, 29.58, 29.64, 29.68, 31.91, 55.73, 63.03, 68.71, 77.20, 111.06, 119.86, 119.86, 120.78, 124.21, 127.27, 147.75, 157.22, 169.25.

<398> **화합물 34: tert-부틸 N-[1-(히드록시메틸)-2-(2-메톡시아닐리노)-2-옥소에틸]카르바메이트**

<399> THF(30 ml) 중의 o-아니시딘(238 mg, 1.93 mmol) 용액에 N-(tert-부톡시카르보닐)-L-세린 β -락톤(200 mg, 1.06 mmol)을 첨가하고, 아르곤 하에서 48시간 동안 혼합물을 환류시켰다. 회전 증발기 상에서 반응 혼합물을 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<400> 적당한 분획물을 모으고, CHCl_3 /헥산으로부터 결정화함으로써, 황색 분말로서의 150 mg(45%)의 화합물(34)을 수득하였다: mp 92-94°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.49 (s, 9H), 3.87 (s, 3H), 3.73-3.83 (m, 1H), 4.21-4.34 (m, 2H), 5.64 (bs, 1H), 6.86-6.97 (m, 2H), 7.03-7.09 (m, $J_o=7.80$ Hz, $J_m=1.8$ Hz, 1H), 8.28-8.31 (dd, $J_o=8.9$ Hz, $J_m=1.5$ Hz, 1H) 8.9 (bs, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 28.28, 55.73, 62.87, 80.65, 110.14, 120.03, 120.97, 124.30, 127.13, 148.33, 169.43; IR (KBr) 3525, 3319, 2982, 1672, 1653, 1548, 1528, 1465, 1256, 1160, 1006 cm^{-1} ; $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 58.05; H, 7.15; N, 9.03. $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 58.04; H, 7.07; N, 8.85.

<401> **실시예 3 -화합물 35-43의 합성**

<402> **화합물 35: N-1-노닐-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<403> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (1 ml) 중의 화합물(26) (20 mg, 0.0580 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(1 ml)를 첨가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 19 mg(95%)의 화합물(35)을 수득하였다: mp 168-170°C; ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.88 (t, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.27 (s, 14H), 1.50 (m, 2H), 3.20 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.70-3.78 (m, 1H), 3.81-3.88 (m, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.44, 23.74, 27.96, 30.30, 30.42, 30.47, 30.70, 30.73, 30.78, 30.80, 33.10, 40.71, 56.30, 61.77, 167.97; IR (KBr) 3280, 2919, 2850, 1654, 1573, 1464, 1231, 1141, 1089, 1059 cm^{-1} . $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 50.27; H, 8.16; N, 7.82. $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 50.15; H, 8.30; N, 7.95.

<404> **화합물 36: N-1-테트라데실-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<405> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (1.5 ml) 중의 화합물(27) (50 mg, 0.124 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(1.5 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 48 mg(94%)의 화합물(36)을 수득하였다: mp 168–171°C; ^1H NMR (CD_3OD), δ 0.89 (t, J=6.3 Hz, 3H), 1.28 (s, 22H), 3.22 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.73–3.80 (m, 1H), 3.84–3.91 (m, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.43, 23.73, 27.95, 30.29, 30.41, 30.47, 30.69, 30.73, 30.78, 30.80, 33.08, 40.71, 56.29, 61.77, 167.99; IR (KBr) 3277, 2919, 2850, 1656, 1573, 1464, 1231, 1141, 1089, 1059 cm^{-1} ; $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 55.06; H, 9.00; N, 6.76. $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 54.94; H, 8.99; N, 6.58.

<406> **화합물 37: N-1-옥타데실-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<407> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (1 ml) 중의 화합물(28) (25 mg, 0.0547 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(1 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 23 mg(92%)의 화합물(37)을 수득하였다: mp 170–172°C; ^1H NMR (CD_3OD) 80.89 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.27 (s, 30H), 1.49–1.54 (m, 2H), 3.22 (t, J=7.0 Hz, 2H), 3.74–3.81 (m, 1H), 3.83–3.91 (m, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.43, 23.74, 27.95, 30.30, 30.41, 30.47, 30.69, 30.78, 33.07, 40.71, 56.30, 61.77, 167.97; IR (KBr) 3276, 2919, 2850, 1657, 1468, 1207, 1181, 1138, 1059 cm^{-1} ; $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 0.15 CH_2Cl_2 에 대한 원소 분석 이론치: C, 57.53; H, 9.45; N, 5.80. $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 0.15 CH_2Cl_2 에 대한 원소 분석 실측치: C, 57.45; H, 9.55; N, 5.81.

<408> **화합물 38: N-1-[4-(테트라데실옥시)페닐]-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<409> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (0.050 ml) 중의 화합물(29) (54 mg, 0.110 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(0.050 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 55 mg(99%)의 화합물(38)을 수득하였다: mp 135–139°C; ^1H NMR (CD_3OD), δ 0.89 (t, J=6.3 Hz, 3H), 1.28 (s, 21H), 1.43 (m, 2H), 1.74 (m, J=6.5 Hz, 2H), 3.86–4.03 (m, 5H), 6.84–6.88 (m, J_o =9.0 Hz, 2H), 7.41–7.47 (m, J_o =9.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.42, 23.72, 30.41, 30.46, 30.50, 30.67, 30.74, 33.06, 56.81, 61.72, 69.26, 115.71, 122.96, 131.84, 157.80, 166.06; IR (KBr) 3281, 2920, 2852, 1672, 1604, 1559, 1515, 1240, 1210, 1132 cm^{-1} ; $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 59.27; H, 8.16; N, 5.53. $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 59.48; H, 8.09; N, 5.49.

<410> **화합물 39: N-1-(4-메톡시페닐)-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<411> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (0.049 ml) 중의 화합물(30) (50 mg, 0.161 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(0.049 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시킨 후, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 50 mg(96%)의 화합물(39)을 수득하였다: mp 182–183°C dec; ^1H NMR (CD_3OD), δ 3.76 (s, 3H), 3.87–3.94 (m, 1H), 3.97–4.04 (m, 2H), 6.85–6.91 (m, J_o =9.1 Hz, 2H), 7.44–7.49 (m, J_o =9.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 55.86, 56.80, 61.73, 115.07, 122.95, 131.99, 158.31, 166.10; IR (KBr) 3278, 3099, 2964, 1673, 1562, 1517, 1196, 1131, cm^{-1} ; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 44.45; H, 4.66; N, 8.64. $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 44.31; H, 4.67; N, 8.58.

<412> **화합물 40: N-1-[3-(테트라데실옥시)페닐]-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<413> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (0.062 ml) 중의 화합물(31) (45 mg, 0.091 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(0.062 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 45 mg(99%)의 화합물(40)을 수득하였다: mp 115–119 °C; ^1H NMR (CD_3OD), δ 0.89 (s, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.28 (s, 21H), 1.43 (m, 2H), 1.75 (m, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 3.8–3.93 (m, 4H), 4.01–4.05 (m, 1H), 6.67–6.71 (m, 1H), 7.04–7.07 (m, 1H), 7.20 (t, $J_o=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.28 (t, $J_m=2.1\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.44, 23.75, 27.18, 30.38, 30.49, 30.52, 30.73, 30.78, 33.09, 56.96, 61.66, 69.05, 107.71, 111.75, 113.16, 130.72, 140.16, 161.07, 166.36; IR (KBr) 3266, 2920, 2852, 1676, 1608, 1566, 1496, 1438, 1211, 1130, 1045 cm^{-1} ; $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 59.27; H, 8.16; N, 5.53. $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 59.49; H, 8.13; N, 5.41.

<414> **화합물 41: N-1-(3-메톡시페닐)-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<415> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (1 ml) 중의 화합물(32) (120 mg, 0.386 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(1 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 회색 고체로서의 123 mg(98%)의 화합물(41)을 수득하였다: mp 137–140°C; ^1H NMR (CD_3OD), δ 3.77 (s, 3H), 3.88–3.99 (m, 2H), 4.01–4.06 (m, 1H), 6.68–6.71 (m, 1H), 7.02–7.10 (m, 1H), 7.22 (t, $J_o=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.29 (t, $J_m=2.1\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 55.70, 56.94; 61.67, 107.14, 111.11, 113.28, 130.73, 140.22, 161.61, 166.43; IR(KBr) 3265, 1675, 1609, 1566, 1496, 1433, 1268, 1196, 1044, cm^{-1} ; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 44.45; H, 4.66; N, 8.64. $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 44.52; H, 4.59; N, 8.66.

<416> **화합물 42: N-1-[2-(테트라데실옥시)페닐]-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<417> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (1 ml) 중의 화합물(33) (21 mg, 0.386 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(1 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 회색 고체로서의 21 mg(95%)의 화합물(42)을 수득하였다: mp 63–66 °C; ^1H NMR (CD_3OD), δ 0.88 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.27 (s, 21H), 1.146 (m, 2H), 1.83 (m, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 3.90–4.07 (m, 4H), 4.18 (t, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 6.87–6.93 (m, 1H), 6.99–7.02 (m, 1H), 7.08–7.14 (m, 1H), 7.96–7.99 (m, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.43; 23.73, 27.07, 30.27, 30.48, 30.57, 30.79, 33.07, 56.198, 61.67, 69.84, 112.93, 121.40, 123.38, 126.80, 127.53, 150.93, 166.74; IR (KBr) 3282, 2925, 2851, 1679, 1556, 1496, 1458, 1213, 750, cm^{-1} ; $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 58.24; H, 8.21; N, 5.43. $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 58.59; H, 8.09; N, 5.24.

<418> **화합물 43: N-1-(2-메톡시페닐)-2-아미노-3-히드록시프로판아미드 트리플루오로아세테이트**

<419> 아르곤 대기 하에서, CH_2Cl_2 (1 ml) 중의 화합물(34) (80 mg, 0.257 mmol)의 냉각(0 °C, 빙조) 용액에 TFA(1 ml)를 적가하였다. 첨가 완료 후, 실온에서 3시간 동안 반응물을 교반하고, 실온에서 감압 하에 농축시키고, 진공 펌프 상에서 건조시킴으로써, 회색 고체로서의 81 mg(97%)의 화합물(43)을 수득하였다: mp 131–133 °C; ^1H NMR (CD_3OD), δ 3.88 (s, 3H), 3.91–4.02 (m, 2H), 4.18–4.22 (m, 1H), 6.89–6.94 (m, 1H), 7.01–7.04 (m, 1H), 7.10–7.16 (t, $J_o=8.1\text{Hz}$, 1H), 8.00–8.03 (t, $J_m=2.1\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 56.27, 56.34, 56.47, 61.81, 111.94, 121.52, 123.21, 126.71, 127.54, 151.43, 166.80; IR (KBr) 3271, 1675, 1546, 1499, 1465, 1439, 1268, 1207, 1130, cm^{-1} ; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 44.45; H, 4.66; N, 8.64. $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 44.18; H, 4.57; N, 8.59.

<420> **실시예 4 - 중간체 화합물 50-54의 합성**

- <421> 사용되는 유리 기구를 불꽃 건조시키고, 아르곤 대기 하에서 실온으로 냉각시켰다. 무수 피리딘으로 출발 물질인 알콜을 세척하고(3회), 건조시켰다(48시간 동안 고진공 하에서). 아르곤 대기 내에서 반응을 수행하였다. THF 및 CH_2Cl_2 는 사용하기 전에 새로 증류하였다.
- <422> **화합물 50: tert-부틸 N-[1-(([(디(벤질옥시)포스포릴]옥시)메틸]-2-(노닐아미노)-2-옥소에틸]카르바메이트**
- <423> 피리딘으로 세척된 출발 물질 화합물 (28)(252 mg, 0.551 mmol)에 1H-테트라졸(231 mg, 3.31 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/ CH_2Cl_2 (50 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트 (1.14 mg, 3.31 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비스설피트(Na-metabisulfite)를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서, THF 및 CH_2Cl_2 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(70 ml)로 처리하고, Na-메타비스설피트(2 × 25 ml), NaHCO_3 (2 × 30 ml), 물(2 × 30 ml) 및 염수(2 × 30 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 NaSO_4 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.
- <424> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 무색 오일로서의 195 mg(49%)의 화합물(50)을 수득하였다: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.25 (bm, 29H), 1.34 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 3.17-3.23 (m, 2H), 4.01-4.09 (m, 1H), 4.31-4.43 (m, 2H), 4.96-5.09 (m, 4H), 5.55 (bs, 1H), 6.33 (bs, 1H) 7.31-7.39 (m, 10H); ^{13}C (CDCl_3) δ 14.09, 22.66, 26.79, 28.25, 29.24, 29.27, 29.42, 29.50, 29.53, 31.86, 39.68, 66.98, 69.66, 69.73, 77.20, 128.06, 128.10, 128.64, 128.70, 128.72, 135.02, 168.50; MS m/z 603 (M-H); IR (KBr) 3349, 2919, 2852, 1717, 1685, 1654, 1516, 1470, 1457, 1242, 1163, 1037, 1025, 999 cm^{-1} .
- <425> **화합물 51: tert-부틸 N-[1-(([(디(벤질옥시)포스포릴]옥시)메틸]-2-옥소-2-(테트라데실아미노)에틸]카르바메이트**
- <426> 피리딘으로 세척된 출발 물질 화합물 (27)(305 mg, 0.761 mmol)에 1H-테트라졸(319 mg, 4.56 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/ CH_2Cl_2 (40 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트 (1.57 mg, 4.56 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비스설피트(Na-metabisulfite)를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서, THF 및 CH_2Cl_2 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(70 ml)로 처리하고, Na-메타비스설피트(2 × 30 ml), NaHCO_3 (2 × 40 ml), 물(2 × 35 ml) 및 염수(2 × 35 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na_2SO_4 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.
- <427> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 왁스형 고체로서의 451 mg(89%)의 화합물(51)을 수득하였다: mp 33-35 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.23-1.25 (bm, 22H), 1.44 (s, 9H), 1.52-1.55 (m, 2H), 3.16-3.23 (m, 2H), 4.02-4.09 (m, 1H), 4.31-4.43 (m, 2H), 5.00-5.15 (m, 4H), 5.57 (bs, 1H), 6.34 (t, J=5.0 Hz, 1H) 7.31-7.40 (m, 10H); ^{13}C (CDCl_3) δ 14.08, 19.03, 22.67, 26.81, 28.27, 29.25, 29.33, 29.44, 29.51, 29.59, 29.62, 29.65, 31.91, 39.69, 46.49, 54.47, 67.00, 67.07, 67.24, 67.32, 69.66, 69.68, 69.74, 76.12, 77.20, 77.84, 80.57, 128.0, 128.05, 128.09, 128.58, 128.64, 128.68, 135.45, 135.54, 135.59, 168.51; $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_7\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 0.5\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 63.14; H, 8.78; N, 3.88. $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_7\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 0.5\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 에 대한 원소 분석 실험치: C, 62.80; H, 8.38; N, 4.21.
- <428> **화합물 52: tert-부틸 N-[1-(([(디(벤질옥시)포스포릴]옥시)메틸]-2-(옥타데실아미노)-2-옥소에틸]카르바메이트**
- <429> 피리딘으로 세척된 출발 물질 화합물 (26)(270 mg, 0.783 mmol)에 1H-테트라졸(329 mg, 4.70 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/ CH_2Cl_2 (50 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포

스포라미데이트 (1.62 mg, 4.70 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트(Na-metabisulfite)를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서, THF 및 CH₂Cl₂를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(50 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 25 ml), NaHCO₃(2 × 25 ml), 물(2 × 25 ml) 및 염수(2 × 25 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<430> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 138 mg(28%)의 화합물(52)을 수득하였다: mp 52-54 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.23 (bm, 14H), 1.44 (s, 9H), 1.63 (m, 2H), 3.17-3.24 (m, 2H), 4.01-4.09 (m, 1H), 4.30-4.44 (m, 2H), 5.00-5.05 (m, 4H), 5.56 (bs, 1H), 6.32 (bs, 1H) 7.29-7.39 (m, 10H); ¹³C (CDCl₃) δ 14.11, 22.68, 26.80, 28.25, 29.26, 29.35, 29.42, 29.52, 29.60, 29.64, 29.69, 31.91, 39.68, 67.00, 67.07, 69.69, 69.74, 77.20, 127.93, 128.06, 128.10, 128.65, 128.70, 128.73, 135.43, 168.51, 170.07; IR (KBr) 3349, 2919, 2852, 1717, 1685, 1654, 1516, 1242, 1163, 1037, 1025, 999 cm⁻¹; C₄₀H₆₅N₂O₇P · 0.75H₂O · 1C₄H₈O₂에 대한 원소 분석 이론치: C, 64.56; H, 9.17; N, 3.42. C₄₀H₆₅N₂O₇P · 0.75H₂O · 1C₄H₈O₂에 대한 원소 분석 실측치: C, 64.23; H, 9.05; N, 3.78.

<431> **화합물 53: tert-부틸 N-[1-(([[디(벤질옥시)포스포릴]옥시)메틸]-2-옥소-2-[4-(테트라데실옥시)아닐리노]에틸]카르바메이트**

<432> 피리딘으로 세척된 출발 물질 화합물 (29)(310 mg, 0.647 mmol)에 1H-테트라졸(450 mg, 6.42 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/CH₂Cl₂(40 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트 (2.21 mg, 6.42 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트(Na-metabisulfite)를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서, THF 및 CH₂Cl₂를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(70 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 25 ml), NaHCO₃(2 × 35 ml), 물(2 × 35 ml) 및 염수(2 × 35 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<433> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 81 mg(17%)의 화합물(53)을 수득하였다: mp 74-76 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.87 (t J=6.5 Hz, 3H), 1.30 (s, 22H), 1.46 (s, 9H), 1.71-1.80 (m, 2H), 3.91 (t, J=6.5Hz, 3H), 4.01-4.16 (m, 1H), 4.42-4.49 (m, 2H), 4.96-5.09 (m, 4H), 5.65 (bs, 1H), 6.80-6.86 (m, J_o=9.0 Hz, 2H) 7.31-7.39 (m, 12H), 8.82 (bs, 1H); ¹³C (CDCl₃) δ 14.10, 22.67; 26.02, 28.26, 29.26, 29.34, 29.40, 29.57, 29.64, 31.91, 68.31, 69.84, 77.20, 114.79, 121.72, 128.07, 128.13, 128.65, 128.74, 130.03, 166.71; IR (KBr) 3340, 2920, 2852, 1717, 1677, 1513, 1457, 1237, 1059, 998 cm⁻¹; C₄₂H₆₁N₂O₈P · 1H₂O · 0.45C₆H₁₄에 대한 원소 분석 이론치: C, 66.31; H, 8.63; N, 3.46. C₄₂H₆₁N₂O₈P · 1H₂O · 0.45C₆H₁₄에 대한 원소 분석 실측치: C, 65.92; H, 9.02; N, 3.84.

<434> **화합물 54: tert-부틸 N-[1-(([[디(벤질옥시)포스포릴]옥시)메틸]-2-(4-메톡시아닐리노)-2-옥소에틸]카르바메이트**

<435> 피리딘으로 세척된 출발 물질 화합물 (30)(225 mg, 0.725 mmol)에 1H-테트라졸(254 mg, 3.625 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/CH₂Cl₂(20 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트 (1.25 mg, 3.625 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트(Na-metabisulfite)를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 회전 증발기 상에서 THF 및 CH₂Cl₂를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(50 ml)로 처리하고,

Na-메타비설피트(2×15 ml), NaHCO_3 (2×25 ml), 물(2×25 ml) 및 염수(2×25 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na_2SO_4 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<436> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 백색 고체로서의 195 mg(47%)의 화합물(54)을 수득하였다: mp $82-84^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.44 (s, 9H), 4.11 (s, 3H), 4.09-4.18 (m, 1H), 4.43-4.51 (m, 2H), 4.98-5.05 (m, 4H), 5.72 (bs, 1H), 6.78-6.82 (m, $J_o=9.0$ Hz, 2H) 7.26-7.33 (m, 10H), 7.36-7.41 (m, $J_o=9.0$ Hz, 2H), 8.41 (bs, 1H); ^{13}C (CDCl_3) δ 28.26, 55.45, 66.93, 67.00, 69.76, 69.83, 69.90, 77.20, 80.91, 114.11, 121.75, 128.06, 128.12, 128.64, 128.72, 128.73, 130.38, 135.28, 135.42, 156.62, 166.75; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 16.72 (1P); IR (KBr) 3337, 2969, 1716, 1689, 1665, 1514, 1457, 1304, 1245, 999 cm^{-1} ; $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 61.05; H, 6.18; N, 4.91. $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 60.80; H, 6.20; N, 4.88.

<437> **실시예 5 - 화합물 55-59의 합성**

<438> **화합물 55: 2-아미노-3-(노닐아미노)-3-옥소프로필 2수소 포스페이트**

<439> EtOH(15 ml) 중의 화합물(50)(100 mg, 0.165 mmol) 용액에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 50 psi에서 4시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 4시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 백색 분말로서의 48 mg(90%)의 화합물(55)을 수득하였다: mp $196-198^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CF_3COOD) δ 0.81-0.82 (m, 3H), 1.26-1.30 (m, 14H), 1.59 (m, 2H), 3.37-3.38 (m, 2H), 4.54-4.59 (m, 1H), 4.72-4.81 (m, 2H); ^{13}C NMR (CF_3COOD) δ 14.66, 24.39, 28.60, 28.60, 30.46, 30.94, 31.16, 31.30, 31.39, 33.81, 43.53, 57.21, 66.42, 167.86; MS m/z 323 (M-H); IR (KBr) 3314, 2920, 2853, 1670, 1575, 1477, 1246, 1063, 1043 cm^{-1} ; $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{P} \cdot 0.5\text{CH}_3\text{OH}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 47.64; H, 9.18; N, 8.23. $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{P} \cdot 0.5\text{CH}_3\text{OH}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 47.24; H, 8.84; N, 8.02.

<440> **화합물 56: 2-아미노-3-(노닐아미노)-3-옥소프로필 2수소 포스페이트**

<441> EtOH(15 ml) 중의 화합물(51)(145 mg, 0.219 mmol) 용액에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 45 psi에서 3시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 3시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 백색 분말로서의 75 mg(90%)의 화합물(56)을 수득하였다: mp $189-190^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CF_3COOD) δ 0.81 (bs, 3H), 1.24 (s, 23H), 1.57 (m, 2H), 3.37 (m, 2H), 4.54-4.58 (m, 1H), 4.73-4.78 (m, 2H); ^{13}C NMR (CF_3COOD) δ 14.43, 24.16, 28.34, 30.21, 30.69, 31.01, 31.17, 31.22, 31.27, 33.62, 43.27, 56.96, 66.16, 167.60; ^{31}P NMR (CF_3COOD) δ 17.93 (1P); MS m/z 379 (M-H); IR (KBr) 3318, 2923, 2852, 1671, 1657, 1563, 1475, 1242, 1055 cm^{-1} ; $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 53.67; H, 9.80; N, 7.36. $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 53.40; H, 9.73; N, 7.31.

<442> **화합물 56a: 2-(아세틸아미노)-3-옥소-3-(테트라데실아미노)프로필 2수소 포스페이트**

<443> 0.5 ml의 피리딘 중의 화합물(56)(20 mg, 0.052 mmol) 샘플에 과량의 무수 아세트산을 첨가하였다. 실온에서 밤새도록 혼합물을 교반하였다. 회전 증발기 상에서 과량의 피리딘 및 무수 아세트산을 배치시켰다. 생성되는 혼합물을 20 ml의 수성 HCl로 교반하였다. EtOAc(2×25 ml)로 산성 혼합물을 추출하였다. EtOAc층을 물(2×25 ml)과 EtOAc(2×25 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na_2SO_4 위에서 건조시키고, 여과하였다. 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 점착성(gummy) 고체로서의 15 mg(71%)의 화합물(56a)을 수득하였다: ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.89 (t, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.27 (s, 22H), 1.99-2.02(m, 3H), 3.15-3.20 (m, 2H), 4.104.28 (m, 2H), 4.54-4.62 (m, 1H); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) 13.48, 16.19, 22.23, 26.50, 28.91, 29.21, 31.48; 30.21, 31.01, 31.17, 31.22,

31.27, 33.62, 43.27, 56.96, 66.16, 163.02, 174.96; IR (KBr) 3316, 2923, 2853, 1671, 1657, 1560, 1467, 1247, 1059 cm^{-1} .

<444> **화합물 57: 2-아미노-3-(옥타데실아미노)-3-옥소프로필 2수소 포스페이트**

<445> EtOH(15 ml) 중의 화합물(52)(117 mg, 0.164 mmol) 용액에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 50 psi에서 4시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 4시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 백색 분말로서의 70 mg(98%)의 화합물(57)을 수득하였다: mp 190-192 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CF_3COOD) δ 0.81 (t, J=6.9 Hz, 3H), 1.25 (s, 31H), 1.58 (m, 2H), 3.34-3.44 (m, 2H), 4.49-4.59 (m, 1H), 4.71-4.81 (m, 2H); ^{13}C NMR (CF_3COOD) δ 14.70, 24.43, 28.60, 30.46, 30.95, 31.28, 31.31, 31.44, 31.48, 31.55, 33.89, 43.53, 57.12, 57.21, 66.35, 167.85; MS m/z 435 (M-H); IR (KBr) 3325, 2922, 2852; 1674, 1655, 1560, 1472, 1045 cm^{-1} ; $\text{C}_{21}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 57.77; H, 10.39; N, 6.42. $\text{C}_{21}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 57.61; H, 10.22; N, 6.25.

<446> **화합물 58: 2-아미노-3-옥소-3-[4-(테트라데실옥시)아닐리노]프로필 2수소 포스페이트**

<447> EtOH(15 ml) 중의 화합물(53)(40 mg, 0.054 mmol) 용액에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 50 psi에서 4시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 4시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 백색 분말로서의 22 mg(88%)의 화합물(58)을 수득하였다: mp 187-190 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CF_3COOD) δ 0.80-0.82 (m, 3H), 1.25 (m, 20H), 1.77-1.84 (m, 2H), 4.20 (t, J=6.0 Hz, 2H), 4.64-4.74 (m, 1H), 4.90-4.91 (m, 2H), 7.04-7.07 (d, J=9.0 Hz, 2H), 7.32-7.35 (d, J=9.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (CF_3COOD) δ 14.81, 24.54, 27.57, 30.62, 31.19, 31.38, 31.46, 31.52, 31.60, 31.65, 33.99, 57.70, 66.53, 73.66, 119.32, 126.55, 131.25, 158.87, 167.06; MS m/z 471 (M-H); IR (KBr) 3325, 2923, 2852, 1665, 1553, 1515, 1469, 1240, 1046 cm^{-1} ; $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 0.5\text{CH}_3\text{OH} \cdot 0.5\text{CHCl}_3$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 52.58; H, 8.00; N, 5.11. $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 0.5\text{CH}_3\text{OH} \cdot 0.5\text{CHCl}_3$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 52.89; H, 7.83; N, 5.29.

<448> **화합물 59: 2-아미노-3-(4-메톡시아닐리노)-3-옥소프로필 2수소 포스페이트**

<449> EtOH(15 ml) 중의 화합물(54)(125 mg, 0.219 mmol) 용액에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 45 psi에서 2시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 2시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 백색 분말로서의 82 mg(96%)의 화합물(59)을 수득하였다: mp 199-202 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CF_3COOD) δ 3.93 (s, 3H), 4.65-4.75 (m, 1H), 4.88-4.94 (m, 2H), 7.01-7.04 (d, J=9.0 Hz, 2H), 7.31-7.34 (d, J=9.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 57.60, 58.00, 66.54, 117.69, 126.64, 131.07, 159.62, 167.07; MS m/z 289 (M-H); IR (KBr) 3317, 2961, 1680, 1565, 1515, 1478, 1236, 1045 cm^{-1} ; $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ 에 대한 원소 분석 이론치: C, 41.39; H, 5.21; N, 9.65. $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ 에 대한 원소 분석 실측치: C, 41.25; H, 5.35; N, 9.73.

<450> **실시예 6 -화합물 63-65의 합성**

<451> 사용되는 유리 기구를 불꽃 건조시키고, 아르곤 대기 하에서 실온으로 냉각시켰다. 출발 물질인 알콜을 무수 피리딘으로 세척하고(3회), 고진공 상에서 48시간 동안 건조시켰다. 아르곤 대기 내에서 반응을 수행하였다. THF 및 CH_2Cl_2 는 사용하기 이전에 새로 증류하였다.

<452> **화합물 63: 1,2-(3-옥타데실옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<453> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 d1-바틸 알콜(화합물 60, 225 mg, 0.652 mmol)에 1H-테트라졸(229 mg, 3.26 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/ CH_2Cl_2 (50 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질 디이소프로필 포스포라미데이트(1.12 mg, 3.26 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반

하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 ℃(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 및 CH₂Cl₂를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(70 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 25 ml), NaHCO₃(2 × 30 ml), 물(2 × 30 ml) 및 염수(2 × 30 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<454> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 303 mg(53%)의 화합물(63)을 수득하였다: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.86 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.24 (bm, 28H), 1.33-1.35 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 3.29-3.36 (m, 2H), 3.48-3.50 (d, J=5.2 Hz, 2H), 4.04-4.22 (m, 2H), 4.60 (m, 1H), 5.00 (m, 8H), 7.27-7.33 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14.05, 18.96, 22.62, 25.95, 29.29, 29.41, 29.49, 29.53, 29.59, 29.63, 31.85, 46.48, 66.58, 69.20, 69.23, 69.28, 69.36, 71.75, 75.37, 127.76, 127.82, 127.86, 127.88, 127.94, 128.36, 128.45, 128.49, 128.61, 128.62, 135.46, 135.54, 135.59, 135.65, 135.68, 135.75, 135.79; MS m/z 866 (M+H)⁺.

<455> **화합물 64: 1,2-(3-도데실옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<456> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 dl-3-0-n-도데실-1,2-프로판디올(화합물 61, 400 mg, 1.5 mmol)에 1H-테트라졸(645 mg, 9.2 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/CH₂Cl₂(40 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트(3.18 mg, 9.2 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 ℃(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 및 CH₂Cl₂를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(80 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 35 ml), NaHCO₃(2 × 40 ml), 물(2 × 30 ml) 및 염수(2 × 30 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<457> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 100 mg(<10%)의 화합물(64)을 수득하였다: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.86 (t, J=6.3 Hz, 3H), 1.23 (bm, 18H), 1.46 (m, 2H), 3.13-3.36 (m, 2H), 3.49-3.51 (d, J=5.2 Hz, 2H), 4.03-4.23 (m, 2H), 4.59 (m, 1H), 5.01 (m, 8H), 7.26-7.34 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14.11, 22.68, 26.01, 29.35, 29.47, 29.54, 29.59, 29.63, 29.66, 31.91, 69.01, 69.06, 69.26, 69.30, 69.34, 69.42, 69.62, 71.83, 77.21, 127.83, 127.89, 127.94, 127.95, 128.44, 128.52, 128.56, 135.64, 135.74, 135.85; IR(NaCl, neat) 3427, 1276, 1000, 885, 499 cm⁻¹; MS m/z 781 (M+H)⁺, m/z 803 (M+Na)⁺.

<458> **화합물 65: 1,2-(3-헥사데실옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<459> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 dl-3-0-n-헥사데실-1,2-프로판디올(화합물 62, 500 mg, 1.57 mmol)에 1H-테트라졸(664 mg, 9.47 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF/CH₂Cl₂(50 ml)의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트(3.27 mg, 9.47 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 ℃(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 및 CH₂Cl₂를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(80 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 35 ml), NaHCO₃(2 × 40 ml), 물(2 × 30 ml) 및 염수(2 × 30 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<460> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 205 mg(15%)의 화합

물(65)을 수득하였다: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.87 (t, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.25 (bm, 26H), 1.46 (m, 2H), 3.30-3.42 (m, 2H), 3.49-3.51 (d, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.97-4.23 (m, 2H), 4.60 (m, 1H), 5.01 (m, 8H), 7.26-7.35 (m, 20H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 14.11, 22.68, 26.00, 29.35, 29.47, 29.54, 29.59, 29.64, 29.68, 31.91, 69.00, 69.06, 69.26, 69.29, 69.34, 69.41, 71.82, 71.74, 75.52, 75.60, 77.20, 126.97, 127.82, 127.88, 127.93, 127.95, 127.99, 128.43, 128.51, 128.55, 128.60, 135.63, 135.73, 135.79, 135.83; IR(NaCl, neat) 3423, 1269, 1016, 736, cm^{-1} ; MS m/z 837 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z 859 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

<461> **실시예 7 -화합물 66-68의 합성**

<462> **화합물 66: 1,2-(3-옥타데실옥시프로판)-비스(2수소 포스페이트)**

<463> EtOH(15 ml) 중의 화합물(63)(135 mg, 0.156 mmol)의 용액에 10% Pd/C(촉매량)를 첨가하였다. 60 psi에서 4시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 4시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과하고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 투명한 왁스로서의 70 mg(89%)의 화합물(66)을 수득하였다: ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.89 (t, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.28 (s, 30H), 1.55 (m, 2H), 3.45-3.50 (m, 2H), 3.62-3.64 (m, 2H), 4.00-4.16 (m, 2H), 4.47 (m, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.43, 19.30, 23.73, 27.20, 30.47, 30.64, 30.78, 33.07, 72.80; MS m/z 503 ($\text{M}-\text{H}$); IR(NaCl Neat) 1011 cm^{-1} .

<464> **화합물 67: 1,2-(3-도데실옥시프로판)-비스(2수소 포스페이트)**

<465> EtOH(15 ml) 중의 화합물(64)(70 mg, 0.089 mmol)의 용액에 10% Pd/C(촉매량)를 첨가하였다. 60 psi에서 4시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 4시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과하고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 투명한 왁스로서의 35 mg(94%)의 화합물(67)을 수득하였다: ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.79 (t, $J=6.7$ Hz, 3H), 1.90 (s, 18H), 1.46 (m, 2H), 3.34-3.41 (m, 2H), 3.49-3.73 (m, 2H), 3.78-4.05 (m, 2H), 4.47 (m, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.43, 23.71, 23.74, 27.20, 30.49, 30.64, 30.76, 30.81, 33.08, 66.80, 72.79; MS m/z 419 ($\text{M}-\text{H}$); IR(NaCl Neat) 1008 cm^{-1} .

<466> **화합물 68: 1,2-(3-헥사데실옥시프로판)-비스(2수소 포스페이트)**

<467> EtOH(15 ml) 중의 화합물(65)(138 mg, 0.164 mmol)의 용액에 10% Pd/C(촉매량)를 첨가하였다. 60 psi에서 4시간 동안 수소화 반응을 수행하였다. 4시간 후, TLC로 반응의 완결을 검측하고, 셀라이트를 통해 반응 혼합물을 여과하고, 감압 하에 용출액을 농축시킴으로써, 투명한 왁스로서의 75 mg(96%)의 화합물(68)을 수득하였다: ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.89 (t, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.28 (s, 23H), 1.56 (m, 2H), 3.43-3.50 (m, 2H), 3.58-3.65 (m, 2H), 3.89-4.16 (m, 2H), 4.47 (m, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 14.44, 23.74, 27.20, 30.48, 30.64, 30.80, 33.08, 72.80; MS m/z 475 ($\text{M}-\text{H}$); IR(NaCl, Neat) 1011 cm^{-1} .

<468> **실시예 8 -중간체 화합물 77-84의 합성**

<469> 사용되는 유리 기구를 불꽃 건조시키고, 아르곤 대기 하에서 실온으로 냉각시켰다. 출발 물질인 알콜을 무수 피리딘으로 세척하고(3회), 고진공 상에서 48시간 동안 건조시켰다. 아르곤 대기 내에서 반응을 수행하였다. THF 및 CH_2Cl_2 는 사용하기 이전에 새로 증류하였다.

<470> **화합물 77: 1,2-(3-테트라데카노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<471> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노미리스틴(화합물 69, 800 mg, 2.6 mmol)에 1H-테트라졸(1.01 g, 14.5 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(45 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트(5.02 mg, 14.5 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 $^{\circ}\text{C}$ (빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비실피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비실피트(2 $\times$ 50 ml),

NaHCO₃(2 × 75 ml), 물(2 × 50 ml) 및 염수(2 × 50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<472> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 600 mg(28%)의 화합물(77)을 수득하였다: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.3 Hz, 3H), 1.25 (bm, 20H), 1.53 (m, 2H), 2.17-2.32 (m, 2H), 3.96-4.24 (m, 4H), 4.61-4.70 (m, 1H), 4.99-5.08 (m, 8H), 7.29-7.35 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14.10, 22.67, 24.70, 29.08, 29.23, 29.33, 29.44, 29.59, 29.62, 29.66, 31.90, 33.86, 64.24, 65.82, 69.41, 69.46, 69.48, 69.53, 69.57, 77.20, 127.85, 127.91, 127.98, 127.99, 128.04, 128.57, 128.59, 128.70, 128.71 135.50, 135.59, 173.09; IR(NaCl, Neat) 3422, 1742, 1457, 1274, 1035, 1001 cm⁻¹; MS m/z 8823 (M+H)⁺, m/z 845 (M+Na)⁺.

<473> **화합물 78: 1,2-(3-펜타데카노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<474> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노펜타데카노인(화합물 70, 800 mg, 2.5 mmol)에 1H-테트라졸(970 mg, 13.9 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(45 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질다이소프로필 포스포라미데이트 (4.80 mg, 13.9 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 50 ml), NaHCO₃(2 × 100 ml), 물(2 × 50 ml) 및 염수(2 × 50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<475> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 741 mg(35%)의 화합물(78)을 수득하였다: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.25 (bm, 22H), 1.53 (m, 2H), 2.17-2.32 (m, 2H), 3.95-4.24 (m, 4H), 4.61-4.70 (m, 1H), 4.99-5.07 (m, 8H), 7.29-7.35 (m, 20H); ¹³C NMR(CDCl₃) δ 14.09, 22.66, 24.69, 29.08, 29.23, 29.33, 29.44, 29.59, 29.62, 29.65, 31.89, 33.85, 64.23, 65.86, 69.40, 69.46, 69.48, 69.53, 69.56, 77.20, 127.84, 127.90, 127.97, 127.98, 128.03, 128.56, 128.59, 128.69, 128.71 135.50, 135.59, 173.09; IR(NaCl, Neat) 3421, 1742, 1457, 1275, 1035, 1014, 1001 cm⁻¹; MS m/z 837 (M+H)⁺, m/z 859 (M+Na)⁺.

<476> **화합물 79: 1,2-(3-헥사데카노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<477> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노팔미틴(화합물 71, 800 mg, 2.4 mmol)에 1H-테트라졸(1.00 g, 14.2 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(45 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질다이소프로필 포스포라미데이트(4.90 mg, 14.2 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 × 50 ml), NaHCO₃(2 × 100 ml), 물(2 × 50 ml) 및 염수(2 × 50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<478> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 786 mg(38%)의 화합물(79)을 수득하였다: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.25 (bm, 24H), 1.53 (m, 2H), 2.17-2.32 (m, 2H), 3.96-4.24 (m, 4H), 4.61-4.70 (m, 1H), 4.99-5.08 (m, 8H), 7.29-7.35 (m, 20H); ¹³C NMR(CDCl₃) δ 14.09, 22.66, 24.71, 29.09, 29.23, 29.33, 29.45, 29.60, 29.63, 29.67, 31.90, 33.87, 62.23, 62.30, 65.89, 69.43, 69.48, 69.50, 69.55, 69.58, 77.20, 126.96, 127.85, 127.91, 127.98, 128.04, 128.56, 128.59, 128.64, 128.71 135.52, 135.61, 173.07; IR(NaCl, Neat) 3421, 1742, 1457, 1273, 1035, 1016, 1001

cm^{-1} ; MS m/z 851 ($M+H$)⁺, m/z 873 ($M+Na$)⁺.

<479> **화합물 80: 1,2-(3-헵타데카노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<480> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노헵타데카노인(화합물 72, 800 mg, 2.32 mmol)에 1H-테트라졸(980 mg, 13.9 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(40 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질다이소프로필 포스포라미데이트 (4.81 mg, 13.9 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 ×50 ml), NaHCO₃(2 × 100 ml), 물(2 ×50 ml) 및 염수(2 ×50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<481> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 1.48 g(74%)의 화합물(80)을 수득하였다: ¹H NMR(CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.23-1.25 (bm, 26H), 1.53 (m, 2H), 2.20 (t, J=7.2 Hz, 2H), 4.02-4.24 (m, 4H), 4.66 (m, 1H), 4.99-5.05 (m, 8H), 7.29-7.35 (m, 20H); ¹³C NMR(CDCl₃) δ 14.10, 22.66, 24.69, 29.07, 29.23, 29.33, 29.44, 29.59, 29.63, 29.66, 31.89, 33.84, 62.21, 62.27, 65.85, 69.40, 69.45, 69.47, 69.52, 69.56, 74.04, 74.23, 77.20, 127.83, 127.87, 127.96, 127.97, 128.53, 128.55, 128.57, 128.59, 135.47, 135.56, 173.07; IR(NaCl, Neat) 3483, 1743, 1457, 1281, 1035, 1013, 1000 cm^{-1} ; MS m/z 865 ($M+H$)⁺, m/z 887($M+Na$)⁺.

<482> **화합물 81: 1,2-(3-옥타데카노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<483> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노스테아린(화합물 73, 800 mg, 2.2 mmol)에 1H-테트라졸(1.00 g, 14.2 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(40 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질다이소프로필 포스포라미데이트 (4.92 mg, 14.2 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 ×50 ml), NaHCO₃(2 × 100 ml), 물(2 ×50 ml) 및 염수(2 ×50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<484> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 870 mg(45%)의 화합물(81)을 수득하였다: ¹H NMR(CDCl₃) δ 0.87 (t, J=6.4 Hz, 3H), 1.23-1.25 (bm, 28H), 1.53 (m, 2H), 2.20 (t, J=7.2 Hz, 2H), 3.97-4.24 (m, 4H), 4.66 (m, 1H), 4.99-5.07 (m, 8H), 7.29-7.35 (m, 20H); ¹³C NMR(CDCl₃) δ 14.09, 22.66, 24.69, 29.08, 29.23, 29.33, 29.45, 29.59, 29.63, 29.67, 31.89, 33.85, 62.22, 62.28, 64.23, 65.87, 68.69, 69.23, 69.42, 69.50, 69.54, 69.58, 74.07, 74.25, 127.60, 127.84, 127.90, 127.98, 128.03, 128.54, 128.56, 128.58, 128.60, 128.71, 135.47, 135.57, 173.08; IR (NaCl, Neat) 3421, 1742, 1457, 1273, 1251, 1216, 1035, 1016, 1000 cm^{-1} ; MS m/z 879 ($M+H$)⁺, m/z 901 ($M+Na$)⁺.

<485> **화합물 82: 1,2-(3-노나데카노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<486> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노노나데카노인(화합물 74, 800 mg, 2.1 mmol)에 1H-테트라졸(977 mg, 13.9 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(40 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질다이소프로필 포스포라미데이트 (4.81 mg, 13.9 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 °C(빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비설피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비설피트(2 ×50 ml), NaHCO₃(2 × 125 ml), 물(2 ×75 ml) 및 염수(2 ×50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na₂SO₄ 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<487> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 1.47 g(78%)의 화합물(82)을 수득하였다: ^1H NMR(CDCl_3) δ 0.87 (t, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.23-1.25 (bm, 30H), 1.53 (m, 2H), 2.20 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.02-4.24 (m, 4H), 4.66 (m, 1H), 4.99-5.03 (m, 8H), 7.29-7.36 (m, 20H); ^{13}C (CDCl_3) δ 14.08, 22.65, 24.67, 29.06, 29.22, 29.32, 29.43, 29.58, 29.61, 29.66, 31.88, 33.83, 62.25, 65.84, 69.38, 69.46, 69.51, 69.54, 74.03, 74.10, 74.15, 74.22, 77.20, 127.82, 127.88, 127.96, 128.53, 128.56, 135.45, 135.55, 173.06; IR(NaCl, Neat) 3483, 1743, 1457, 1273, 1282, 1216, 1035, 1013 cm^{-1} ; MS m/z 893 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z 915 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

<488> **화합물 83: 1,2-(3-이코사노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<489> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노아라키딘(화합물 75, 800 mg, 2.06 mmol)에 1H-테트라졸(1.00 g, 14.2 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(40 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트 (4.81 mg, 13.9 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 $^{\circ}\text{C}$ (빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비실피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비실피트(2×50 ml), NaHCO_3 (2×125 ml), 물(2×75 ml) 및 염수(2×50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na_2SO_4 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<490> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 1.39 g(74%)의 화합물(83)을 수득하였다: ^1H NMR(CDCl_3) δ 0.87 (t, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.23-1.25 (bm, 32H), 1.53 (m, 2H), 2.20 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.02-4.24 (m, 4H), 4.66 (m, 1H), 4.99-5.05 (m, 8H), 7.29-7.36 (m, 20H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 14.09, 22.65, 24.69, 29.07, 29.23, 29.33, 29.44, 29.59, 29.63, 29.67, 31.89, 33.84, 62.21, 62.27; 65.86, 69.40, 69.45, 69.48, 69.52, 69.56, 74.05, 74.12, 74.16, 74.24, 77.20, 127.83, 127.89, 127.97, 128.53, 128.55, 128.57, 128.59, 135.47, 135.56, 173.07; IR(NaCl, Neat) 3483, 1743, 1457, 1273, 1282, 1216, 1035, 1012, 1000 cm^{-1} ; MS m/z 907 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z 929 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

<491> **화합물 84: 1,2-(3-도코사노일옥시프로판)-비스(디벤질포스페이트)**

<492> 피리딘으로 세척된 출발 물질인 모노베헤닌(화합물 76, 800 mg, 1.92 mmol)에 1H-테트라졸(1.00 g, 14.2 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물에 새로 증류된 THF(40 ml)를 첨가하였다. 10분 후, 디벤질디이소프로필 포스포라미데이트(5.14 mg, 14.8 mmol)를 첨가하고, 아르곤 대기 하에서 90분 동안 반응물을 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC는 생성물의 형성을 나타내었다. 이 혼합물을 0 $^{\circ}\text{C}$ (빙조)로 냉각시키고, 과량의 과아세트산을 첨가하였다. 혼합물을 35분 동안 추가로 교반한 후, Na-메타비실피트를 첨가하여, 과량의 과아세트산을 급랭시켰다. 감압 하에서 THF 를 제거하였다. 농축물을 EtOAc(100 ml)로 처리하고, Na-메타비실피트(2×50 ml), NaHCO_3 (2×125 ml), 물(2×75 ml) 및 염수(2×50 ml)로 세척하였다. 유기 부분을 Na_2SO_4 위에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 다양한 조성의 EtOAc/헥산으로 용리하면서, 잔류물의 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

<493> 적당한 분획물을 모으고, 농축시켜 진공 내에서 건조시킴으로써, 투명한(clear) 오일로서의 1.27 g(71%)의 화합물(84)을 수득하였다: ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.87 (t, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.23-1.25 (bm, 36H), 1.53 (m, 2H), 2.20 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.02-4.24 (m, 4H), 4.66 (m, 1H), 4.99-5.03 (m, 8H), 7.29-7.36 (m, 20H); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 14.08, 22.65, 24.68, 29.07, 29.22, 29.32, 29.44, 29.59, 29.62, 29.66, 31.88, 33.84, 62.20, 62.26, 65.85, 69.40, 69.45, 69.48, 69.53, 69.57, 74.05, 74.16, m 74.24, 77.20, 127.83, 127.88, 127.96, 127.97, 128.30, 128.52, 128.54, 128.57, 128.58, 135.46, 135.55, 173.07; MS m/z 935 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z 957 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

<494> **실시예 9 - 화합물 85-92의 합성**

<495> **화합물 85: 1,2-(3-테트라데카노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<496> EtOH(15 ml) 중 **77**의 용액(385 mg, 0.468 mmol)에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **85**를 210 mg(98%) 얻었다: ^1H NMR(CD_3OD) δ 0.89(t, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), 1.28(s, 20H), 1.56-1.63(m, 2H), 2.24-2.38(m, 2H), 3.93-4.42(m, 4H), 4-5.9(m, 1H); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 14.44, 23.73, 26.09, 30.71, 30.23, 30.43, 30.47, 30.61, 30.75, 33.07, 34.80, 34.94, 61.90, 61.96, 63.96, 63.70, 66.24, 74.33, 77.51, 175.02; MS m/z 461(M-H) $^-$; IR(NaCl Neat) 3386, 1702, 1216, 1019 cm^{-1} .

<497> **화합물 86: 1,2-(3-펜타데카노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<498> EtOH(15 ml) 중 **78**의 용액(451 mg, 0.538 mmol)에 10% Pd/C(촉매량)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **86**를 250 mg(97%) 얻었다: ^1H NMR(CD_3OD) δ 0.89(t, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), 1.28(s, 22H), 1.58(m, 2H), 2.24-2.38(m, 2H), 3.97-4.21(m, 4H), 4.38(m, 1H); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 14.44, 23.74, 26.05, 30.16, 30.36, 30.48, 30.57, 30.76, 33.08, 35.11, 61.36, 63.70, 63.90, 66.24, 67.77, 70.22, 77.33, 77.40, 77.51, 175.63; MS m/z 475(M-H) $^-$; IR(NaCl Neat) 3380, 1728, 1216, 1031 cm^{-1} .

<499> **화합물 87: 1,2-(3-헥사데카노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<500> EtOH(15 ml) 중 **79**의 용액(561 mg, 0.659 mmol)에 10% Pd/C(610 mg)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **87**를 300 mg(92%) 얻었다: ^1H NMR(CD_3OD) δ 0.89(t, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), 1.28(s, 24H), 1.56-1.63(m, 2H), 2.24-2.38(m, 2H), 3.95-4.40(m, 4H), 4.39(m, 1H); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 14.43, 23.73, 25.89, 26.05, 26.09, 30.15, 30.23, 30.36, 30.44, 30.47, 30.56, 30.61, 30.67, 30.75, 33.07, 34.08, 34.94, 35.11, 61.36, 64.00, 66.22, 67.74, 70.22, 77.33, 77.40, 77.51, 175.03; MS m/z 489(M-H) $^-$; IR(NaCl Neat) 3357, 1729, 1216, 1029 cm^{-1} .

<501> **화합물 88: 1,2-(3-헵타데카노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<502> EtOH(15 ml) 중 **80**의 용액(636 mg, 0.736 mmol)에 10% Pd/C(724 mg)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **88**를 365 mg(98%) 얻었다: ^1H NMR(CD_3OD) δ 0.89(t, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 1.28(s, 26H), 1.56-1.63(m, 2H), 3.96-4.17(m, 4H), 4.22-4.42(m, 1H); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 14.54, 23.73, 25.90, 26.10, 30.16, 30.24, 30.36, 30.43, 30.47, 30.56, 30.61, 30.76, 33.07, 34.81, 34.95, 61.37, 61.92, 63.97, 66.26, 67.70, 67.78, 70.06, 74.42, 77.46, 175.04; MS m/z 503(M-H) $^-$; IR(NaCl Neat) 3357, 1710, 1216, 1032 cm^{-1} ; 분석·계산치($\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_{10}\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$): C, 45.97; H, 8.49. 실측치: C, 46.32; H, 8.73.

<503> **화합물 89: 1,2-(3-옥타데카노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<504> EtOH(15 ml) 중 **81**의 용액(530 mg, 0.603 mmol)에 10% Pd/C(617 mg)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **89**를 305 mg(97%) 얻었다: ^1H NMR(CD_3OD) δ 0.89(t, $j=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.28(s, 28H), 1.56-1.61(m, 2H), 2.42-2.38(m, 2H), 3.91-4.17(m, 4H), 4.24-4.42(m, 1H); ^{13}C

NMR(CD₃OD) δ 14.43, 23.74, 25.90, 26.06, 26.10, 30.16, 30.24, 30.36, 30.47, 30.57, 30.61, 30.67, 30.76, 33.08, 34.81, 34.95, 35.11, 61.37, 63.72, 66.26, 67.68, 67.75, 70.25, 77.48, 175.04; MS m/z 517(M-H)⁻; IR(NaCl Neat) 3388, 1731, 1216, 1020 cm⁻¹.

<505> **화합물 90: 1,2-(3-노나데카노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<506> EtOH(25 ml) 중 **82**의 용액(952 mg, 1.06 mmol)에 10% Pd/C(1.00 g)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **90**을 555 mg(98%) 얻었다: ¹H NMR(CD₃OD) δ 0.89(t, J=6.4 Hz, 3H), 1.27(s, 29H), 1.56-1.63(m, 2H), 2.24-2.38(m, 2H), 4.06-4.17(m, 2H), 4.22-4.42(m, 2H), 4.59(m, 1H); ¹³C NMR(CD₃OD) δ 14.44, 23.74, 25.90, 26.06, 30.16, 30.24, 30.36, 30.48, 30.57, 30.63, 30.76, 30.79, 33.08, 34.81, 35.12, 63.94, 66.25, 175.03; MS m/z 531(M-H)⁻; IR(NaCl Neat) 1735, 1216, 1012 cm⁻¹.

<507> **화합물 91: 1,2-(3-이코사노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<508> EtOH(25 ml) 중 **83**의 용액(711 mg, 0.784 mmol)에 10% Pd/C(813 mg)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **91**을 419 mg(91%) 얻었다: ¹H NMR(CD₃OD) δ 0.89(t, J=6.4Hz 3H), 1.28(s, 32H), 1.58(m, 2H), 2.24-2.38(m, 2H), 3.95-4.42(m, 4H), 4.58(m, 1H); ¹³C NMR(CD₃OD) δ 14.44, 23.74, 25.90, 26.06, 30.16, 30.24, 30.36, 30.48, 30.57, 30.63, 30.67, 30.76, 33.08, 34.81, 35.11, 61.37, 61.98, 66.26, 67.69, 67.77, 77.42, 175.03; MS m/z 545(M-H)⁻; IR(NaCl Neat) 3418, 1735, 1261, 1019 cm⁻¹.

<509> **화합물 92: 1,2-(3-도코사노일옥시프로판)-비스(디하이드로전포스페이트)**

<510> EtOH(25 ml) 중 **84**의 용액(451 mg, 0.538 mmol)에 10% Pd/C(710 mg)을 첨가하였다. 수소첨가 반응은 60 psi에서 4시간 동안 수행되었다. 4시간 후, TLC에 의해 반응 종료를 확인하고, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과한 후, 용출액을 감압하에 농축시켜 백색 왁스로서 화합물 **92**를 400 mg(98%) 얻었다: ¹H NMR(CD₃OD) δ 0.89(t, J=6.3Hz, 3H), 1.27(s, 36H), 1.58(m, 2H), 2.24-2.38(m, 2H), 3.98-4.42(m, 4H), 4.59(m, 1H); ¹³C NMR(CDC1₃/CD₃OD) δ 13.72, 22.40, 24.71, 28.84, 28.97, 29.08, 29.18, 29.41, 31.65, 34.1660.15, 60.99, 62.42, 63.17, 65.16, 65.30, 65.98, 73.24, 173.79; MS m/z 573(M-H)⁻; IR(NaCl Neat) 3431, 1739, 1254, 1177 cm⁻¹.

<511> **실시예 10 - 제노푸스 난모세포 분석**

<512> 내인적으로 PSP24 PLGFR을 발현하는 제노푸스 난모세포를 사용하여, 새로이 설계되고 합성된 화합물들을 LPA 저해 활성에 대하여 선별하였다.

<513> 난모세포는 무균 조건하에서 크실라진으로 마취시킨 성체 제노푸스(*Xenopus laevis*)로부터 얻어, 실험용으로 제조하였다. V-VI 단계의 난모세포를 Ca²⁺가 없는 난소 링거-2 용액((OR-2) 82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5, NaOH 함유함) 중에서 1.4 mg/ml로 콜라게나아제 A형 처리(Boehringer, IN)하여 여포 세포층을 박리시켰다. 난모세포를 17-20℃의 인큐베이터 내에서 바스액(Barth's solution) 중에 유지시켰고, 분리 후 2-7일동안 사용하였다.

<514> 전기생리학적 기록은 -60 mV의 막 전위를 유지하는 표준 2 전극-전압-클램프 증폭기(GeneClamp 500, Axon Instruments, Ca)를 사용하여 수행하였다. 시험 화합물을 MeOH 중에 용해시키고, 지방산이 없는 BSA로 복합체화한 후, 개구리 Na⁺-링거액(120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH 7)으로 희석하였고, 이것을 난모세포에 5 ml/분의 유속으로 수퍼퓨전(superfusion)에 의해 제공하였다. 막 전류는 NIC-310 디지털 오실로스

코프(Nicolet, Madison, WI)를 사용하여 기록하였다. 15분(최소)의 간격으로 적용하여, 적절한 세출(washout) 및 탈감작으로부터 복구(회복)가 이루어지도록 하였다.

- <515> 도 21-27은 화합물 56, 57, 66 및 92이 LPA에 의해 유도된 클로라이드 전류를 용량-의존적으로 저해함을 나타낸다.
- <516> 화합물 36은 비-인산화 유도제 가운데 가장 우수한 저해제였다. 화합물 36을 세포내 주사하여 이것의 저해 효과가 세포 표면에 대한 작용의 결과인지 또는 저해가 세포내 작용의 결과인지 여부를 알고자 할 때, 36의 세포내 적용은 작용 부위에 대한 어떠한 정보도 제공하지 않았다. 따라서, 유리 하이드록시 화합물(35-43)과는 별도로, 세포 표면상에서 상호작용하고 세포내로 침투하지 않는 인산화 화합물(55-59)을 합성하였다.
- <517> 화합물 56, 57, 66 및 92는 제노푸스 난모세포 내에서 LPA에 의해 유도된 클로라이드 전류에 대한 저해제이다. 화합물 56, 57, 66 및 92는 용량 의존적인 방식으로 LPA의 작용을 차단할 수 있었다. 더욱이, 제노푸스 난모세포를 세척하면 LPA 반응이 완벽히 복구되었는데, 이 실험은 화합물 56, 57, 66, 92가 LPA에 의해 유도된 클로라이드 전류를 가역적으로 저해할 수 있었다는 것을 의미한다. 5 μ M의 화합물 66은 제노푸스 난모세포에서의 LPA 효과를 완전히 제거하였고, 약 1.2 μ M의 IC₅₀을 가졌다(도 23 및 24). 또한, 66을 세포내로 미세주입한 후(화살표, 도 23B), LPA(10 nM)를 세포의 적용시켰을 때, 이것은 LPA 반응을 저해하지 못했는데, 이 실험은 화합물 66의 저해 작용이 세포외적 특성이라는 것을 암시한다.
- <518> 화합물 35, 및 37-43을 제노푸스 난모세포에 대하여 시험하였으나, 그 결과는 결정적이지 못했다. 1 μ M의 화합물 55는 약한 저해를 나타내었다(2 nM LPA에 대하여 38%). SAP 시리즈에 있어서, 화합물 58 및 59는 제노푸스 난모세포 분석에서 시험되어야 한다. 비스포스페이트 시리즈에 있어서, 화합물 89는 LPA에 의해 유도된 반응을 저해하였다(2 nM LPA에 대하여 59%). 그러나, 화합물 67(역치 $\sim$ 1 μ M), 68(역치 $\sim$ 10 nM) 및 85(역치 $\sim$ 100 nM)는 단독으로 반응을 일으킬 수 있었고, 화합물 86, 87, 88, 90 및 91은 평가되어야 한다. 화합물 56a를 설계하고 합성하여 유리 아미노기의 중요성을 시험하였다. 56a를 제노푸스 난모세포 분석에서 평가할 때, 'LPA와 함께 사용되는 경우 LPA의 반응을 증강시켰다. 화합물 56a는 2 μ M에서는 반응을 일으키지 않았지만(도시하지 않음), 10 μ M에서 56a는 반응을 일으킬 수 있었는데, 이 실험은 유리 아미노기가 저해 활성화에 필수적이라는 것을 암시한다.
- <519> **실시예 11 - HEY 난소 세포 이동**
- <520> 두개의 LPA 수용체인 EDG-2 및 EDG-7은 HEY 난소 암 세포 중에서 발현되는 것으로 알려져 있어서, LPA에 의해 유도된 세포 이동성을 저해하는 능력에 대하여 화합물 56, 56a, 및 66을 평가하였다(화합물 농도: 0.1 μ M의 LPA 농도에 대하여 1 μ M).
- <521> HEY 난소 세포를 10% 태아 송아지 혈청(FBS, Hyclone)으로 보충한 2 mM L-글루타민(GIBCO BRL)을 함유한 RPMI 1640 배지에 유지시켰다. 모든 세포를 이틀간 융합물(confluency)으로 성장시킴으로써, 동시에 G₀/G₁ 단계로 이르게 하였다. 세포를 재플레이트하고, 세포가 플라스크상에서 약 50 내지 60% 융합되었을 때 실험용으로 수집하였다. 세포를 플라스크로부터 제거한 후, 이들을 37°C의 PBS 내에서 0.53 mM EDTA에 5분간 노출시켰다. EDTA를 동용적의 RPMI 1640 + 2 mM L-글루타민 및 10% FBS로 중화하였다. 세포를 실온에서 800 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 수집된 세포를 2 mM L-글루타민 배지를 함유한 RPMI 1640로 2회 세척하고, 1 x 10⁶ 세포수/ml의 농도로 재현탁시킨 후, 37°C에서 1시간 동안 두었다.
- <522> 개질된 정량적 세포 이동 분석(Cat. #ECM500, Chemicon, Temecula, Ca)을 사용하여 세포 이동성을 시험하였다. 케미콘 챔버 멤브레인은 피브로넥틴을 함유한 직경 8 마이크론의 세공으로 피복되어 있었다. 저해제(1 μ M)를 포함하거나 포함하지 않는 400 μ l RPMI/2 mM L-글루타민을 하부 챔버내로 피펫팅하였다. RPMI 1640/2 mM L-글루타민 중 약 5 x 10⁴ 세포를 상부 챔버에 첨가하였다. 삽입물을 가진 24-웰 플레이트를 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C로 4시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 말기에, 챔버를 새로운 24-웰 플레이트로 이동시키고, 내부 챔버상의 세포를 탈지면으로 수차례 제거하고, 제조된 셀 스테인 솔루션 내에 실온에서 30분간 두었다. 항온처리의 말기에, 셀 스테인 솔루션을 웰로부터 제거하였다. 챔버를 웰당 1 ml PBS로 3회 세척하였다. 최종 PBS 세척 후, 적절한 세포 형태를 확인하기 위하여 챔버를 검사하였고, 역상 현미경을 사용하여 부착 세포를 계수하였다.
- <523> 새로이 합성된 화합물이 LPA에 의해 유도된 HEY 난소 암 세포의 이동에 미치는 효과는 도 27에 제시되어 있다. 화합물 66은 LPA에 의해 유도된 세포 이동성을 약 70% 저해하였지만, 화합물 55(경계면) 및 56a는 LPA에 의해

유도된 세포 이동성을 증강시켰다.

실시예 12 - 화합물 세포독성

임 등(2000) 및 RT-PCR 데이터는 전립선 암 세포주 DU-145, PC-3 및 LNCaP에서 PLGFR의 존재를 보여주었다. 제노푸스 난모세포에서 기대되는 저해 활성 및 세포 이동성 분석에 기인하여, DU-145, PC-3 및 LNCaP 전립선 암 세포주에 대하여 다수의 화합물이 미치는 성장 저해 효과를 검사하였다.

DU-145, PC-3 및 LNCaP 세포를 150 cm² 플라스크(10% 태아 송아지 혈청(FBS)으로 보충한 둘베코의 개질 이글 배지 또는 RPMI-1640을 함유함)에서 증식시켰다. 트립신을 사용하여 모액 플라스크로부터 세포를 제거하고, 원심 분리하여, 새로운 배지 중에 재현탁시키고, 96-웰 배양 플레이트 중에 약 2,000 세포수/웰의 밀도로 플레이트하였다. 최종 약물 농도는 0.05 내지 10 또는 50 μM이었다. 약물이 첨가되지 않은(음성 대조군), 그리고 5-플루오로우라실(양성 대조군) 대조군 실험을 병렬적으로 수행하였다. 48시간에서 배지를 제거하고, 교체하여 실험 과정에서 약물 열화(劣化)에 의한 영향을 최소화하였다. 96 시간의 약물 노출 후, 저온의 50% 트리클로로아세트산(TCA)을 첨가하고, 4℃에서 1시간 동안 항온처리함으로써 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 설펠로 다민 B(SRB)로 염색하고, 세포수 대 흡광도의 표준 곡선과 비교하는 등의 방식으로 540 nm에서의 흡광도를 비교함으로써 세포수를 측정하였다. 실험은 2회 수행되었다. 대조군(미처리 웰)의 백분율로서의 세포수를 약물 농도에 대하여 플롯하고, 세포의 성장을 50%로 저해하는 농도(IC₅₀)를 비선형 회귀법에 의해 결정하였다(WinNonlin, Pharsight Corporation).

전립선 암 세포주 DU-145, PC-3, 및 LNCaP 상에서, 기준 화합물 5F-우라실, LPA(18:1), SPH(13:0), SPP(13:0) 및 N-팔미토일 L-세린 인산(15:0)과 함께 수행된 세포독성 연구를 하기 표 3에서 제시한다.

[표 3]

합성된 화합물이 전립선 암 세포주에 대하여 미치는 세포독성

화합물	IC ₅₀ ± SEM (μM) ^x		
	DU145	PC-3	LNCaP
플루오로우라실	6.8±3.3	10.2±4.1	2.8±1.6
LPA (18:1)	WA	28.5±6.3	WA
SPP (13:0)	> 10	WA	NA
SPH (13:0)	13.9±1.1	11.7±2.3	5.7±2.1
N-팔미토일-L-세린(15:0)	WA	WA	WA
27	19.7±6.0	WA	10.9±2.7
38	38.9±8.9	?	?
51	8.1±1.3	25.4±3.6	19.9±6.4
55	24.9±4.1	31.6±9.0	4.9±2.6
56	2.3±1.2	0.7±0.1	13.5±4.7
56a	0.7±0.1	WA	30.3±7.9
57	9.1±0.8	WA	10.7±2.1
66	NA	NA	3.1±3.2
67	WA	WA	25.2±12.3
68	WA	WA	29.3±21.7
85	NA	NA	11.6±10.3
86	NA	NA	?
87	NA	NA	WA
88	NA	NA	?
89	WA	NA	?
90	> 50	WA	WA
91	42.2±1.9	WA	WA
92	WA	WA	WA

^x 대조군(미처리 웰)의 백분율로서의 세포수를 약물 농도에 대하여 플롯하고, 세포의 성장을 50%로 저해하는 농도(IC₅₀)를 비선형 회귀법에 의해 결정하였다(WinNonlin, Pharsight Corporation).

- <532> WA = 약한 활성; NA = 활성 없음; ? = 최대 저해는 50%임.
- <533> 화합물 55, 56, 56a, 66 및 85는 일정 범위의 성장 저해 활성을 나타내었다. 화합물 56은 5-플루오로우라실에 비해 더욱 강력한 DU-145 및 PC-3 세포 성장 저해제였다. 흥미롭게도, 56a는 DU-145 세포의 성장을 선택적으로 저해하였지만, PC-3 세포에 대해서는 그다지 효능을 가지지 못했고; 화합물 55는 DU-145 및 PC-3 세포에 비해 LNCaP 세포 성장의 보다 강력한 저해제였다. 화합물 66은 LNCaP 세포 성장을 선택적으로 저해하였지만, PC-3 및 LNCaP 세포에 대해서는 활성을 보이지 않았다. 화합물 85는 비스포스페이트(*sn-1*-아실) 가운데 가장 활성이 큰 것이었다.
- <534> **실시예 1-12에 대한 논의**
- <535> 3개 세트의 화합물을 특이적으로 합성하고, 분석하였다(35-43, 55-59, 66-68 및 85-92). 제1 및 제2 세트는 합성 저해제인 N-팔미토일 L-세린 인산을 가진 내인성 저해제인 SPH 및 SPP의 아말감화를 포함한 반면, 제3 시리즈는 비스포스페이트를 포함하였다. 화합물 56, 57, 66 및 92는 제노푸스 난모세포 내에서 LPA에 의해 유도된 클로라이드 전류에 대한 저해제였다. 또한, (*sn-1*) 위치에 더 짧은 길이의 쇄를 가진 비스포스페이트는 제노푸스 난모세포에서 클로라이드의 전류를 유도할 수 있었다[67(역치 ~ 1 μ M), 68(역치 ~ 10 nM) 및 85(역치 ~ 100 nM)]. 화합물 66은 HEY 난소 암 세포주에서 LPA에 의해 유도된 세포 이동성을 저해하는 것으로 나타났다. DU-145, PC-3 및 LNCaP 전립선 암 세포주에 대한 상기 합성 화합물의 성장 저해 효과를 평가한 결과, 3가지의 매우 강력하고 선택적인 화합물(56, 56a, 66)이 발견되었다.
- <536> 상기 데이터(표 3)는 첫째, 포스페이트가 없고 알코올을 포함하는 화합물이 활성이 더 작고(27 vs. 56), 둘째 보호된 포스페이트 부분을 가진 화합물이 활성이 더 작으며(51 vs. 56), 셋째 아민의 알킬화는 활성을 감소시키지 아니하고(56a), 넷째 가장 강력한 비스포스페이트는 *sn-1* 위치에 에테르 결합을 가지며, 다섯째 SAP 시리즈에서 쇄의 길이가 짧아지면(55 대 56), DU-145 및 PC-3에 대한 효능이 감소되고(그러나, 이것은 LNCaP 세포에 대해서는 더욱 강력하였음), 여섯째 비스포스페이트(*sn-1* 알킬) 화합물에 있어서 쇄의 길이가 짧아지면 효능이 감소되었지만, LNCaP 세포에 대한 선택성은 그대로였고, 일곱째 *sn-1* 위치에서의 치환(아실 vs. 알킬)은 효능을 증가시키지 않았다는 것을 나타낸다. 이들 분자에 대한 표적 부위는 세포막(예를 들어, 세포막 신장 수용체)상 일 것 같은데, 그 이유는 (활성 수용 시스템이 존재할 가능성이 있기는 하지만) 극성 포스페이트 유도체가 세포막을 쉽게 가로지를 것 같지 않기 때문이다. 이들 결과는 PLGFR의, 또는 다운스트림 신호 전달 과정에서의 차이가 전립선 암 세포에서 이들 화합물의 성장 저해 특성에 있어서 중요한 역할을 할 수 있음을 암시한다.
- <537> **실시예 13 - Edg-2, Edg-4 및 Edg-7을 발현하는 안정한 세포주의 제조 및 특성 규명**
- <538> Edg-2, -4 및 -7 수용체에 대한 선택적인 안타고니스트를 개발하기 위하여, 가능성 있는 화합물을 선별하기 위한 시스템을 먼저 확립하였다. RH7777 세포는 다양한 세포 분석에서 LPA에 비반응성인 것으로 보고되었고, 임의의 공지된 Edg 수용체에 대한 mRNA가 결손된 것으로 알려져 있었기 때문에, 이를 모델 시스템으로서 선택하였다(Fukushima et al., 1998). EDG 수용체로 세포감염시킨 안정한 세포주 및 비어있는 벡터로 세포감염시킨 대조군 세포주를 RH7777 세포내에 확립시켰다.
- <539> 세포내 Ca^{2+} 과도 상태(transient)를 모니터링함으로써, 그리고 RT-PCR에 의해, 생성된 클론을 선별하였다. 이 선별 방법을 사용하여 Edg-2 및 -7을 발현하는 3개 이상의 양성 세포주를 동정하였으나, Edg-4를 발현하는 양성 세포주는 동정할 수 없었다. 벡터로 세포감염된 세포는 또한 LPA에 비반응성인 것으로 나타났다. Edg-4를 발현하는 안정한 클론이 분리되었지만, Edg-4의 일시적인 발현 결과, LPA가 매개하는, 세포내 Ca^{2+} 과도 상태의 활성화가 일어났는데, 이것은 구조체가 이들 세포내에서 기능적으로 활성임을 증명하였다. 이 실험에 사용된 안정한 Edg-4 세포주가 임 등(친절하게 우리에게 그 클론을 제공하였음)에 의해 분리되고, 특성 규명되었다(Im et al., 2000).
- <540> 가능성있는 안타고니스트를 선별하기 위한 적합한 분석법을 동정하기 위하여, 세포주를 추가로 규명하였다. LPA에 의해 유도된 ERK 1/2의 활성화는 Edg-2 및 Edg-4 발현 세포에서 나타났지만, ERK 1/2는 Edg-7 발현 세포에서는 활성화되지 않았다. LPA는 Edg-2, -4, 및 -7을 발현하는 안정한 세포주에서 Ca^{2+} 과도 상태를 일으켰다. 용량 응답 곡선은 Edg-2, -4 및 -7 발현 세포에 대하여 각각 378 ± 53 , 998 ± 67 및 214 ± 26 nM의 EC_{50} 수치를 나타내었다(도 28A-C). 안정한 Edg-4 클론내에서 측정된 EC_{50} 수치가 이전에 보고된 것과 상이하였기 때문에, 또한 Edg-4를 일시적으로 발현하는 세포에 대하여 용량 응답 곡선을 확립하였고(도 28B, 안 등, 1998a; 안 등,

1998b), 이것은 186 ± 39 의 EC_{50} 수치를 산출하였다.

<541> 안정한 세포주에서 DNA 합성을 자극하는 LPA의 능력은 ^3H -티미딘 혼입을 측정함으로써 검사하였다. 야생형, 그 리고 벡터로 세포감염된 RH7777 둘다 10 μ M LPA로 24시간 항온처리한 후에 ^3H -티미딘 혼입을 증가시키는 것으로 나타나지 않았고, 이것은 이들 세포에서 LPA가 유사분열원성이라는 이전의 보고와 상반된다. Edg-2 발현 세포는 ^3H -티미딘 혼입에서 1.8배 증가를 나타낸 반면에, Edg-4 및 -7 발현 세포는 대조 세포에 비해 ^3H -티미딘 혼입의 증가를 나타내지 않았다.

<542> **실시예 14 - Edg-2 및 Edg-7 수용체에 대한 단쇄 포스파티데이트 활성**

<543> Ca^{2+} 과도 상태가 Edg-2, -4 및 -7을 발현하는 3가지 모든 안정한 세포주에서 유도되었기 때문에, 이 분석을 사용하여 가능성있는 안타고니스트를 선별하였다. LPA에 의해 활성화된 Edg 수용체류, 즉 Edg-2, Edg-4, 및 Edg-7에 대한 선택적인 안타고니스트를 동정하기 위하여, LPA 파마코포아의 구조적인 특징을 출발점으로 하였다. 단쇄(8:0) LPA 또는 LPA(8:0) 및 LPA(18:1)의 혼합물을 Edg-2, -4 또는 -7의 저해제로서 시험하였다. LPA 8:0 및 LPA 18:1의 혼합물을 사용하여 세포를 켈린지할 때, Ca^{2+} 반응은 임의의 3가지 안정한 세포주에서 영향을 받지 않았다(도 30A-C, 31A-C 및 32A-B). LPA 8:0(10 μ M의 농도)은 단독으로 임의의 세포에서 Ca^{2+} 반응을 유도할 수 없었다

<544> 이들 결과에 기초하여, 출원인은 LPA 파마코포아의 개질(지방산 쇠의 이동성을 입체적으로 제한함)이 그 리간드 특성에 영향을 줄 수 있음을 가정하였다. 이러한 이유로, 우리들은 sn-2 위치에 제2 단쇄 지방산을 가진 화합물을 시험하였다. 이러한 단쇄 포스파티데이트는 상응하는 단쇄 LPA에 비하여 소수성이 증가되었고, 이것은 수용체의 결합 포켓-리간드와의 상호작용을 억제할 수 있다.

<545> 포스파티딘산(PA) 및 디아실글리세롤 피로포스페이트(DGPP)는 LPA 파마코포아와 일부 중요한 화학적 특성을 공유하는 천연 지질로서, 이온성 포스페이트기(들) 및 지방산 쇠를 가진다. 역시 Edg 수용체의 아고니스트는 아니다(하기 참조). 이러한 유사점에 주목하여, 단쇄 DGPP를 제조하고, Edg-2, -4 또는 -7의 저해제로서 시험하였다. 도 29A-D는 10배 과량의 DGPP(8:0)이, 안정한 세포주내에서 LPA에 의해 유도된 Ca^{2+} 반응에 대하여 미치는 효과를 보여주고 있다. Edg-2 발현 세포에서의 Ca^{2+} 반응은 약 50%로 저해된 반면(도 29A), Edg-7 발현 세포에서의 반응은 완전히 제거되었다(도 29C). 대조적으로, Edg-4 발현 세포에서의 Ca^{2+} 반응은 DGPP 8:0에 의해 영향을 받지 않았다(도 29B). Edg-4의 안정하고 일시적인 발현에 대한 EC_{50} 수치에서의 차이에 기인하여(도 29B), DGPP 8:0을 Edg-4에 의해 일시적으로 세포감염된 세포 상에서 유사한 방식으로 시험하였다. 안정한 세포에서의 실험 결과와 동일하게, Ca^{2+} 반응은 Edg-4를 일시적으로 발현하는 세포에서 DGPP 8:0에 의해 영향을 받지 않았다(도 29D). DGPP 8:0에 대하여 전술한 분석 각각에 있어서, PA 8:0으로 유사한 관찰 결과가 얻어졌다(하기 참조).

<546> 증가된 농도의 DGPP 8:0을 사용하여 Edg-2 및 -7 발현 세포에서 저해 곡선을 결정한 반면, LPA의 농도는 연구된 수용체에 대한 EC_{50} 으로 일정하게 유지하였다. Edg-7에 대한 285 ± 28 nM(도 30A) 및 Edg-2에 대한 11.0 ± 0.68 μ M(도 31A)의 IC_{50} 수치를 곡선으로부터 결정하였다. IC_{50} 수치에 근접한 DGPP 8:0의 일정량을 사용하는 경우(Edg-7에 대하여 250 nM, Edg-2에 대하여 3 μ M), Edg-7(도 30B) 및 Edg-2(도 31B)에 대한 용량 응답 곡선은 오른쪽으로 이동하였는데, 이것은 경쟁적 저해 메커니즘을 나타낸다.

<547> DGPP에 대한 구조 활성 상관관계를 더욱 잘 정의하기 위하여, LPA, DGPP, PA 및 DAG의 단쇄-(8:0) 및 장쇄(18:1) 종을 Edg-2 및 -7 발현 세포주에 대하여 시험하였다. 도 30C는 LPA 18:1의 조합물 및 이들 각각의 지질에 노출되었을 때, Edg-7 발현 세포내에서 Ca^{2+} 반응에 대한 이들 지질의 효과를 나타낸다. 이들 실험에 있어서, LPA의 농도는 EC_{50} 부근에서 선택된 반면, 시험 지질은 DGPP 8:0의 IC_{50} 과 동일한 농도로 사용되었다. LPA 8:0은 Edg-7에 대한 어떠한 효과도 가지지 않았지만, DGPP 8:0 및 PA 8:0 양자는 Ca^{2+} 반응을 각각 50% 및 56% 유의성 있게 저해하였다. 대조적으로, DAG 8:0은 Ca^{2+} 반응을 유의성있게 증가시켰다. DDPGG 및 PA의 쇠 길이가 18:1로 증가되면, 이들 유사체는 더 이상 Edg-7의 저해제가 아니었다(도 30C). 또한, DPG 18:1은 Edg-7에 대한 저해 효

과를 가지지 않았다.

<548> 동일한 세트의 지질을 Edg-2 발현 세포에 대하여 시험하였다(도 31C). DPGG, PA, 및 DAG의 옥틸 쇠 길이 유사체를 10 μ M로 사용하는 경우, 모두 각각 대조군의 50, 19 및 64%로 반응을 감소시켰다. 쇠 길이가 18:1로 증가되면, DGPP 및 DAG는 더 이상 저해 효과를 가지지 않았지만, PA 18:1은 적당한 저해 효과를 유지하여, Ca^{2+} 반응을 18% 저하시켰다. 지질 판넬을 또한 Edg-4 발현 세포에 대하여 시험하였다(도 32A-B). 이들 지질을 Edg-4를 발현하는 안정한 세포주에서 분석하였을 때, 단쇄 또는 장쇄 지질의 어느 것도 저해 효과를 가지지 않았으나, PA 8:0 및 18:1은 Ca^{2+} 반응을 대조군의 각각 162 및 137%로 유의성있게 증가시켰다. 안정한 클론으로부터 얻어진 결과를 확인하기 위하여, 지질 판넬을 일시적으로 Edg-4를 발현하는 세포에 대하여 시험하였다(도 32B). 다시, 안정한 세포주에서의 결과와 일치하여, 단쇄 그리고 장쇄 종의 DGPP 또는 PA 어느 것도 Ca^{2+} 반응에 대하여 저해 효과를 가지지 않았다. 안정한 Edg-4 클론과 대조적으로, PA 유사체는 Edg-4을 일시적으로 발현하면서, 세포내에서 Ca^{2+} 의 반응을 증강시켰다. 단독으로 적용되었을 때, 10 μ M 이하의 농도에서는 PA의 어떤 종도 안정하게 또는 일시적으로 Edg-4를 발현하는 세포에서 반응을 일으키지 않았다.

<549> DGPP 8:0가 내인적으로 LPA 수용체를 발현하는 세포에 대하여 미치는 효과를 또한 검토하였다. DGPP 8:0은 세포노푸스 난모세포에서 LPA에 의해 유도되고 Ca^{2+} 이 매개하는 내부로의 Cl^{-} 전류를 저해하며, 96 ± 21 nM의 IC_{50} 를 가지는 것으로 나타났다(도 33A). DGPP 8:0 200 nM 농도 존재하에서, LPA 18:1에 대한 용량 응답 곡선이 오른쪽으로 이동하였는데, 이것은 Edg-2 및 -7 클론에서 발견되는 것과 같은 경쟁적인 작용 메커니즘을 의미한다(도 33B). DGPP 8:0이 세포내 또는 세포외 메커니즘을 통해 작용하는 가의 여부를 알아보기 위하여, DGPP 8:0을 세포내로 주사하고, 난모세포를 LPA 18:1에 노출시켰다. 도 32C는 DGPP 8:0을 세포내로 주사하여 농도를 300 nM 높게 한 다음, 5 nM LPA 18:1을 세포외 적용하면 대조군과 동일한 크기의 반응이 유도되었다는 것을 도시한다. 비교용으로, DGPP 8:0을 세포외에 적용하였을 때, LPA 18:1에 의해 정상적으로 유도된 반응은 완전히 저해되었다(도 33C). DGPP 8:0의 저해 효과는, 10분간 세척 후 반응이 대조군 레벨로 회복되는 것과 같이 가역적이다.

<550> 난모세포에서 발현되는 LPA 수용체에 대한 DGPP 8:0의 특이성을 나타내기 위하여, 폴리 A + 래트 뇌의 mRNA를 주사함으로써 신경전달물질 수용체의 발현을 유도하였다. 그 결과, 아세틸콜린 및 세로토닌에 대한 G-단백질 결합된 수용체가 발현되었는데, 이것은 주사되지 않은 난모세포에서는 발현되지 않았다. 이들 신경전달물질은 LPA에 의해 활성화되는, 동일한 이노시톨 트리포스페이트- Ca^{2+} 신호전달경로는 활성화시킨다(Tigyi et al., 1990). 이들 난모세포에서, DGPP 8:0은 세로토닌 또는 카바콜에 의해 유도된 반응을 저해하지 않았는데, 이것은 LPA 수용체에 대한 DGPP 8:0의 특이성을 입증하는 것이었다. 유사한 농도로 사용되는 경우, PA 8:0은 또한 난모세포에서 LPA에 의해 유도된 반응을 저해하는 데 유효하였다.

<551> LPA에 의해 유도된 반응에 대한 DGPP 8:0의 효과를, LPA 수용체를 내인적으로 발현하는 포유동물 시스템에서 검사하였다. Edg 및 PSP24 수용체에 대한 mRNA의 존재에 대한 RT-PCR에 의해 NIH3T3 세포를 선별하였다. 도 34A는 NIH3T3 세포에서 Edg-2, -5 및 PSP24에 대한 mRNA 전사물이 검출되었음을 나타낸다. DGPP 8:0이 LPA에 의해 유도되지만 S1P에 의해 유도되지 않는 Ca^{2+} 반응을 저해하는 데 특이적이라는 것을 보여주기 위하여, NIH3T3 세포를 10 μ M DGPP 8:0의 존재하에서 100 nM LPA 또는 S1P에 노출시켰다. 도 34B에서 보는 바와 같이, DGPP 8:0은 LPA에 의해 유도된 Ca^{2+} 반응을 유의성있게 저해한 반면, S1P에 의해 유도된 반응은 영향을 받지 않았다.

<552> LPA는 난소 암에서 생성되고, 또한 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Xu et al., 1995a). 그러므로, DGPP 8:0을 또한 HEY 난소 암 세포에 대하여 시험하여 이것이 치료적으로 관련된 표적에 대하여 영향을 미치는지의 여부를 결정하였다. 도 34D는 DGPP 8:0이 LPA에 의해 유도된 Ca^{2+} 의 반응을 대조군의 12%로 저해하였지만, DGPP 18:1은 아무런 효과도 없었음을 보여준다. 또한, PA 8:0은 Ca^{2+} 반응을 대조군의 6%로 저해한 반면, PA 18:1은 아무런 효과도 가지지 않았다. HEY는 Edg-1, -2, -5, -7 수용체에 대한 mRNA 전사물을 발현한다(도 34C).

<553> **실시예 15 - NIH3T3 세포 증식의 저해**

<554> 성장 인자의 대표적인 효과는 이의 세포 증식 유도 능력이다. LPA는 다양한 다른 유형의 세포 증식을 자극하는 것으로 나타났으므로(Goetzl et al., 2000), DGPP 8:0의 세포 증식 저해능을 NIH3T3 세포에서 검사하였다. 도 35는 DGPP 8:0이 NIH3T3 세포에서 LPA에 의해 유도된 증식을 유의성있게 저해하여 세포의 수를 대조군 수준으로

감소시킨다는 것을 보여주는 반면에, 용매 처리된 대조군 세포에 대해서는 아무런 효과를 가지지 않았다. DGPP 8:0의 저해 효과에 대한 구조-활성 상관관계를 정의하기 위하여, 단쇄 및 장쇄 중의 DGPP, PA 및 DAG를 분석에 포함시켰다. 도 35에 제시된 바와 같이, 시험 관널에 함유된 어떤 지질도 용매 처리된 대조군 세포에 대하여 유의성 있는 저해 또는 자극 효과를 가지지 않았다. 단지 DGPP 8:0은 LPA에 의해 유도된 증식을 저해하였다. DGPP 18:1, 및 장쇄 그리고 단쇄 PA 및 DAG는 LPA에 의해 유도된 증식에 대하여 역시 영향을 주지 않았다. 흥미롭게도, PA 8:0은 이 분석에서 유의성있는 저해능을 가지지 않았다.

<555> 실시예 13-15의 논의

<556> Edg-2, -4 및 -7 수용체의 이중 발현을 위해 RH7777 세포를 사용하여 가능성있는 안타고니스트를 선별하였다. 우리의 이전 Edg 수용체 계산 모델링(Parrill et al., 2000) 및 이용가능한 구조-활성 데이터(Jalink et al., 1995)를 토대로 할 때, 상기 실험 결과는 단쇄 포스파티데이트 DGPP 8:0이 Edg-7의 선택적이고 경쟁적인 안타고니스트이며, 285 ± 28 nM의 IC_{50} 을 갖는다는 것을 증명하고 있다. 이 분자는 11.0 ± 0.68 μ M의 IC_{50} 을 가지는, Edg-2에 대한 불량한 저해제인 것으로 나타났으나, Edg-4를 저해하지 않았다. DGPP 8:0은 제노푸스 난모세포에서 내인성 LPA 반응을 저해하였고, 이것의 IC_{50} 은 96 ± 21 nM이었다. PA 8:0은 유사한 저해 특성을 보여주었다. 그러므로, 이들 단쇄 포스파티데이트는 Edg-2에 비해 Edg-7에 대하여 40-100배의 선택성을 나타낸다.

<557> 단쇄 포스파티데이트에 대한 상기 결과는 반도(Bandoh) 등의 결과(2000)를 확인시켜 주는데, 이들은 탄소수 12 이하의 아실쇄를 가진 LPA는 Edg-2, -4, 또는 -7를 발현하는 곤충 세포에서 반응을 일으키지 않는다는 것을 증명하였다. 앞서 증명된 바와 같이, LPA 8:0은 포유동물 발현 시스템에서 Edg-2, -4, 또는 -7의 아고니스트도 안타고니스트도 아니었다. Edg-7은 *sn-2* 대 *sn-1*에 에스테르화된 지방산 쇄를 가진 LPA에 대하여 10배의 선택성을 가진다(Bandoh et al., 2000). 그러므로, 포스페이트기에 대한 탄화수소 쇄의 거리는 수용체와의 결합 및 수용체의 활성화를 무효화하지 않는다. Edg-7은 또한 장쇄 포화 지방산에 비해 장쇄 불포화 지방산에 대하여 선택적이다. 에테르 결합 또는 비닐-에테르 측쇄가 존재하는 경우, EC_{50} 이 2배 감소되었다(Bandoh et al., 2000). 더욱이, 탄소수 18의 탄화수소쇄가 최적인 반면, 탄소수 20의 유사체는 보다 약한 아고니스트이었다. Edg-7의 이러한 약리학적 특성은 수용체 활성화가 쇄의 길이 및 측쇄의 유연성(에스테르 대 에테르 결합)에 따라 좌우되는 것임을 암시한다.

<558> Edg-1 수용체의 계산 모델링으로 리간드 결합에 필요한 3개의 전하된 잔기를 확인하게 되었다. 이들 잔기중 하나인 아르기닌 120(포스페이트기와 상호작용하는 것으로 예상됨)은 모든 Edg류에서 보존된다. 제2 잔기인 아르기닌 292는, Edg-8을 제외한 모든 Edg류가 양이온성에 가까운 잔기를 가지는 위치에 존재한다. 제3 잔기인 글루타메이트 121은 Edg-2, -4 및 -7에서 상응하는 자리에 글루타민을 가지며, LPA-특이적인 Edg 수용체 가운데 보존되지 않는다. 이 글루타민 잔기는 LPA의 하이드록실기와 상호작용할 것으로 예상된다. 이 잔기를 알라닌 치환하면, 수용체의 리간드 결합 및 활성화가 상실되는데, 이것은 PLGF 파마코포아의 전하된 부분과 이들 3개의 잔기의 이온성 상호작용이 Edg-1에 있어서 리간드 결합에 필수적이라는 사실을 암시한다(Parrill et al., 2000). 더욱이, 수용체와 탄화수소 쇄의 상호작용 그 자체는 리간드 결합 및 활성화에 충분치 않았다(Parrill et al., 2000). 그러므로, 이온성 앵커 및 소수성 꼬리 양자를 포함하는 상호작용의 조합이 아고니스트 활성화에 필요하다고 가정하였다. 상기 결과는 소수성 꼬리와 리간드 결합 포켓 사이의 상호작용의 중요성에 근거하여, 단쇄 LPA 8:0이 Edg-2, -4, 또는 -7를 활성화할 수 없다는 것을 증명함으로써 상기 가정을 뒷받침하고 있다. 그 결과로서, 출원인은 소수성 꼬리를 PLGF 파마코포아의 "역전" 부위로 명명하였다. 이들 수용체에 의한 지방산의 *sn-1* 및 *sn-2* 치환의 상대적인 허용성(tolerance) 때문에, 출원인은 이들의 절단된 탄화수소쇄에 의해 수용체를 활성화할 수 없다고 여겨졌던 단쇄 포스파티데이트에 주목하였다. 포스파티데이트 중의 아실쇄의 구조적 이동성은 또한 인접한 지방산 부분에 의해 제한된다. 출원인은 또한 피로포스페이트 부분의 효과를 연구하였는데, 이것은 부위를 고정시키는 음전하 특성을 변화시키는 것이 아니라, 전하를 증가시킨다.

<559> 이러한 개념의 약물 설계를 Edg-2, -4 및 -7 수용체를 발현하는 클론 세포주에 대하여 시험하였다. DGPP 8:0 및 PA 8:0의 약리학적 특성은 3가지 수용체 사이에 매우 상이한 것으로 나타났다. 상기 분자 둘다는 Edg-7을 저해하는 데 유효하였던 반면에, 이들은 Edg-2에 대해서는 그다지 유효하지 않았다. 역시 Edg-4에 대하여 유효하지 않았다. DGPP 8:0은 또한 Edg-2 및 -7 둘다에 대한 경쟁적인 저해제로서 밝혀졌고, 용량 응답 곡선을 오른쪽으로 이동시켜, 순차적으로 두가지 수용체에 대한 LPA의 EC_{50} 을 증가시켰다. 상응하는 장쇄 중의 PA 및 DGPP의 아고니스트 활성 결핍은 결합 포켓에서의 일반적인 제한 사항으로 주의를 집중시킨다. 결합 포켓에서 리간드를 결합시키는 데 있어서 이온성 앵커의 중요성은, 비록 이것의 세포내 효과가 기타 분자 표적(예를 들어, PKC)에 대

한 세포내 작용과 혼동될 수 있지만, DAG 8:0에 의한 저해 결핍에 의해 뒤받침된다.

<560> PA 및 DGPP는 천연 인지질이다. DGPP (8:0)는 식물에서 신규한 지질로서 1993년에 발견되었고, 포스파티데이트 키나아제에 의한 PA의 인산화 생성물이다(Wissing and Behrbohm, 1993; Munnik et al., 1996). DGPP는 세균, 효모 및 식물에서 동정되었지만, 포유동물에서는 동정되지 않았다. 최근의 연구로부터, DGPP가 세포질 포스포릴 라아제 A₂를 활성화시킴으로써 프로스타글란딘의 생산을 자극하고 대식 세포를 활성화한다는 것이 밝혀졌는데, 이것은 면역 반응에 있어서 DGPP의 역할을 암시한다(Balboa et al., 1999; Balsinde et al., 2000). 이들 앵커는 이러한 효과들이 LPA 수용체에 의해 매개되는 가능성을 배제하였다. 장쇄 DGPP 및 PA 유사체를 사용한 상기 결과는 이 개념을 확인시켜 주었는데, 그 이유는 이들 화합물이 10 μM 이하의 농도에서는 Edg 수용체 발현 세포주에서 아고니스트 특성을 가지지 않았기 때문이었다.

<561> 단쇄 포스파티데이트의 효과를, 또한 3가지 상이한 세포 유형에서 내인적으로 발현되는 LPA 수용체에 대하여 검사하였다. DGPP 8:0 및 PA 8:0은 *제노푸스*에서 LPA에 의해 유도된 Cl⁻ 전류의 유효한 저해제인 것으로 밝혀졌다. 작용 부위를 알아보기 위하여, DGPP 8:0을 난모세포에 주사한 후, LPA를 세포외 적용하였다. DGPP 8:0은 세포외로 적용되었을 때 LPA에 의해 유도된 Cl⁻ 전류를 저해하는 데에만 단지 유효했는데, 이것은 DGPP가 세포 표면에 대하여 안타고니스트 효과를 가진다는 것을 증명하였다. LPA 수용체에 대한 DGPP 8:0의 특이성은 난모세포 및 NIH3T3 세포에서 증명되었다. 이들 세포에서, DGPP 8:0은 LPA에 의해 유도된 Ca²⁺ 반응을 저해하는 데에만 단지 유효할 뿐, S1P, 아세틸콜린 또는 세로토닌에 의해 유도된 반응에는 유효하지 않았다.

<562> RT-PCR 분석 결과, Edg-4, 또는 -7이 아닌 단지 Edg-2가 NIH3T3 세포에서 발현되었음이 확인되었다. NIH3T3 세포에서, 100배 과량의 DGPP 8:0은 단지 Ca²⁺ 반응을 40% 저해하였다. Edg-2를 발현하는 안정한 세포주에서 보여지는 저해 정도는 유사하였고, 즉 이것은 약한 저해제였다. 단쇄 DGPP 및 PA를, HEY 난소 암 세포상에서 LPA에 비해 10배 과량으로 평가하였을 때, 양자는 유효한 저해제였으나, 장쇄 분자는 역시 아무런 효과도 나타내지 않았다. RT-PCR 결과는 대부분의 mRNA가 HEY 세포에서 Edg-7에 관한 것인 반면, 단지 미량의 Edg-2 mRNA가 검출되었을 뿐이었다. Edg-7을 발현하는 안정한 세포주에서 보여지는 저해 정도는 유사하였으며, 여기서 DGPP 8:0 및 PA 8:0 둘다 유효한 저해제였다.

<563> 단쇄 포스파티데이트 둘다를, LPA에 의해 유도된 NIH3T3의 세포 증식을 차단하는 능력에 대하여 평가하였다. DGPP 8:0은 LPA에 의해 유도된 증식을 유효하게 저해하였으나, 장쇄 DGPP는 그렇지 않았다. PA 8:0은 Ca²⁺ 반응을 저해하는 데 유효하였으나, 세포 증식을 저해하는 데에는 유효하지 않았다. 이들 결과는, PA(12:0)이 PA 18:1의 유사분열원성 효과를 저해하지 않았다는 이전의 보고와 일치하는 것이다.(van Corven et al., 1992). 장기 분해 분석에서는 분자의 안정성이 관심의 대상이 되는데, 그 이유는 지질 포스파타아제가 안타고니스트를 불활성화할 수 있기 때문이다. PA 및 DAG 양자가 증식을 저해하는 데 실패하였다는 사실은, DGPP 8:0이 이 분석을 실시하는 동안 더욱 안정할 것임을 암시한다. DGPP의 안정성은, 실험 도중 DGPP가 대사되지 아니하였음을 보고한 발보아(Balboa) 등의 문헌(1999)에 의해 입증되었다.

<564> DGPP 8:0은 Edg 수용체 및 PLGF 수용체 연구 분야에 있어서 중요한 새로운 수단을 제공한다. Edg류의 계산 모델링으로부터 얻어진 PLGF 파마코포아의 소수성 반전 및 이온성 앵커의 개념은 새로운 저해제의 설계와 합성에 도움이 될 것이다.

<565> 실시예 16

<566> 직쇄 포스페이트 중간체 101-105의 합성

<567> 화합물 101 : 인산 디벤질 에스테르 부틸 에스테르

<568> 소수성 n-부탄올 74 mg(1.00 mmol) 및 1*H*-테트라졸 365 mg(5.17 mmol)을 100 ml의 둥근 바닥 플라스크내에서 무수 염화메틸렌 34 ml중에 용해시켰다. 무수 염화메틸렌 5 ml 중 디벤질-N,N-디이소프로필 포르포라미데이트 0.895 g(2.58 mmol)의 용액을 아르곤 대기 하에서 시린지를 통해 교반하면서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 ~38℃의 이소프로필 알코올/드라이 아이스조에서 냉각시켰다. 무수 염화메틸렌 28 ml 중 32% 피아세트산 0.815 g(3.43 mmol)을 첨가 갈때기를 통해 적가하였다. 첨가가 끝난 후, 반응 혼합물의 온도를 얼음조를 사용하여 0℃로 상승시켰다. 반응 혼합물을 얼음조에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 분별 갈때기로 옮겨 염화메틸렌 200 ml로 희석하였다. 유기 층을 10% 나트륨 메타바이설파이트(2 x 40 ml), 포화 중탄산나트륨(2 x 40 ml), 물(30 ml), 및 염수(40 ml)로 세척하였다. 유기층을 무

수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하여, 진공하에서 농축시켜 건조하였다. 이어서, 용리제로서 1:1 헥산/에틸 아세테이트를 사용한 실리카겔 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여 투명한 오일로서 화합물 **101** (과량의 인산화제로부터 소량의 불순물을 함유한 309 mg)을 얻었다. ^1H NMR(CDCl_3) 0.88(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.34(sextet, $J=7.2\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59(quintet, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.99(dt, $J=6.6\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 5.02(d, $J=1.8\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 5.05(d, $J=2.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 7.35(br s, 10H, 2 x ArH); ^{13}C NMR(CDCl_3) 13.55, 18.60, 32.16(d, $J_{\text{C,p}}=6.8\text{ Hz}$), 67.72(d, $J_{\text{C,p}}=6.1\text{Hz}$), 69.13(d, $J_{\text{C,p}}=5.5\text{Hz}$), 127.90, 128.47, 128.55, 136.00(d, $J_{\text{C,p}}=6.8\text{Hz}$); ^{31}P NMR(CDCl_3) 16.84; MS(포지티브 모드): m/z 357.3에서 $[\text{M}+^{23}\text{Na}]$.

<569> **화합물 102: 인산 디벤질 에스테르 옥틸 에스테르**

<570> 무수 n-옥탄올 130 mg(1.00 mmol)을 사용하였고, 화합물 **101**에서와 유사한 방법을 수행하였다. 용리제로서 7:3 헥산/에틸 아세테이트를 사용한 실리카겔 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여, 화합물 **102**(351 mg, 90%)를 투명한 오일로서 얻었다. ^1H NMR(CDCl_3) 0.88(t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.24(br s, 10H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.60(quintet, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 3.98(dt, $J=6.6\text{Hz}$, 6.9Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 5.02(d, $J=2.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 5.05(d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H OCH_2Ar), 7.34(br s, 10H, 2 x ArH); ^{13}C NMR(CDCl_3) 14.19, 22.62, 25.38, 29.06, 29.14, 30.17(d, $J_{\text{C,p}}=6.9\text{Hz}$), 31.75, 68.05(d, $J_{\text{C,p}}=6.2\text{Hz}$), 69.12(d, $J_{\text{C,p}}=5.5\text{Hz}$), 127.90, 128.47, 128.56, 135.97(d, $J_{\text{C,p}}=6.9\text{Hz}$); ^{31}P NMR(CDCl_3) 16.83; MS(포지티브 모드): m/z 413.4에서 $[\text{M}+^{23}\text{Na}]^+$.

<571> **화합물 103: 인산 디벤질 에스테르 도데실 에스테르**

<572> 무수 n-부탄올을 186 mg(1.00 mmol)을 사용하였고, 화합물 **101**에서와 유사한 방법을 이용하였다. 용리제로서 7:3 헥산/에틸 아세테이트를 사용한 실리카겔 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여, 화합물 **103**(361 mg, 81%)를 투명한 오일로서 얻었다. ^1H NMR(CDCl_3) 0.88(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.24(br s, 18H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.60(quintet, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 3.98(td, $J=6.9\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 5.02(d, $J=2.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 5.05(d, $J=2.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 7.34(br s, 10H, 2 x ArH); ^{13}C NMR(CDCl_3) 14.13, 22.69, 25.38, 29.12, 29.35, 29.49, 29.56, 29.63, 30.18(d, $J_{\text{C,p}}=7.0\text{Hz}$), 31.92, 68.05(d, $J_{\text{C,p}}=6.1\text{Hz}$), 69.12(d, $J_{\text{C,p}}=5.4\text{Hz}$), 127.89, 128.46, 128.55, 135.97(d, $J_{\text{C,p}}=6.8\text{ Hz}$); ^{31}P NMR(CDCl_3) 16.84; MS(포지티브 모드): m/z 469.1에서 $[\text{M}+^{23}\text{Na}]^+$.

<573> **화합물 104: 인산 디벤질 에스테르 옥타데실 에스테르**

<574> 옥타데칸올 270 mg(1.00 mmol)을 사용하였고, 화합물 **101**에서와 유사한 방법을 사용하였다. 용리제로서 7:3 헥산/에틸 아세테이트를 사용한 실리카겔 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여, 화합물 **104**(474 mg, 89%)를 투명한 오일로서 얻었다. ^1H NMR(CDCl_3) 0.88(t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.25(br s, 30H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 1.60(quintet, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 3.98(td, $J=6.6\text{Hz}$, 6.9Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 5.02(d, $J=2.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 5.05(d, $J=2.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 7.34(br s, 10H, 2 x ArH); ^{13}C NMR(CDCl_3) 14.12, 22.70, 25.40, 29.13, 29.38, 29.51, 29.58, 29.68, 29.72, 30.20(d, $J_{\text{C,p}}=6.9\text{Hz}$), 31.94, 68.06(d, $J_{\text{C,p}}=6.1\text{Hz}$), 69.14(d, $J_{\text{C,p}}=5.4\text{Hz}$), 127.90, 128.47, 128.55, 136.00(d, $J_{\text{C,p}}=6.8\text{Hz}$); ^{31}P NMR(CDCl_3) 16.83; MS(포지티브 모드): m/z 553.3에서 $[\text{M}+^{23}\text{Na}]^+$.

<575> **화합물 105: 인산 디벤질 에스테르 도코사닐 에스테르**

<576> 도코사놀 327 mg(1.00 mmol)을 사용하였고, 화합물 **101**에서와 유사한 방법을 사용하였다. 용리제로서 7:3 헥산/

에틸 아세테이트를 사용한 실리카겔 크로마토그래피에 의해 미정제 생성물을 정제하여, 화합물 **105**(516 mg, 88%)을 흡습성 백색 고체로서 얻었다. ^1H NMR(CDCl_3) 0.88(t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.25(br s, 38H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 1.60(quintet, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 3.98(td, $J=6.6\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 5.02(d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 5.05(d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H, OCH_2Ar), 7.35(br s, 10H, 2 x ArH); ^{13}C NMR(CDCl_3) 14.13, 22.70, 25.39, 29.12, 29.37, 29.50, 29.57, 29.66, 29.71, 30.18(d, $J_{\text{C},\text{p}}=6.9\text{Hz}$), 31.93, 68.06(d, $J_{\text{C},\text{p}}=6.0\text{Hz}$), 69.13(d, $J_{\text{C},\text{p}}=5.6\text{Hz}$), 127.89, 128.47, 128.55, 135.98(d, $J_{\text{C},\text{p}}=6.9\text{Hz}$); ^{31}P NMR(CDCl_3) 16.83; MS(포지티브 모드): m/z 609.3에서 $[\text{M}+^{23}\text{Na}]^+$.

<577> **실시예 17 - 직쇄 포스페이트 화합물 106-110의 합성**

<578> **화합물 106: 인산 모노부틸 에스테르**

<579> 화합물 **101** 200 mg(0.60 mmol)을 두꺼운 벽을 가진 압력 용기내에서 30 ml의 무수 메탄올 중에 용해시켰다. 이 용기를 아르곤으로 세정하고, 10%, Pd/C 200 mg을 첨가하였다. 용기를 수소첨가 반응 장치내에 연결시키고, 실온에서 반응 용기내부에 50 psi 이하의 수소 대기를 8시간 동안 유지시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 메탄올로 세척한 셀라이트 패드를 통해 진공 여과시켰다. 용매를 진공하에서 증발시켜, 황색 오일 **106** 70 mg(86%)을 남겼다. ^1H NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0.95(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.43(sextet, $J=7.5\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{H}_2\text{CH}_3)$), 1.66(quintet, $J=6.9$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.99(td, $J=6.6\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 13.71, 19.02, 32.72(d, $J_{\text{C},\text{p}}=7.2\text{Hz}$), 66.86(d, $J_{\text{C},\text{p}}=5.5\text{Hz}$); ^{31}P NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 18.84; MS(네가티브 모드): m/z 153.0에서 $[\text{M}-1]^-$.

<580> **화합물 107: 인산 모노옥틸 에스테르**

<581> 화합물 **102** 200 mg(0.51 mmol)을 사용하였고, 화합물 **106**에서와 유사한 방법을 이용하여, 백색/황색의 점성 고체 **107** 100 mg(93%)을 분리하였다. ^1H NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0.89(t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.29(br s, 10H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.67(quintet $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 3.97(dt, $J=6.6\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), ^{13}C NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14.18, 22.98, 25.89, 29.57, 29.58, 30.76(d, $J_{\text{C},\text{p}}=7.3\text{Hz}$), 32.18, 67.16(d, $J_{\text{C},\text{p}}=5.2\text{Hz}$); ^{31}P NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 20.55; MS(네가티브 모드): m/z 209.1에서 $[\text{M}-1]^-$.

<582> **화합물 108: 인산 모노도데실 에스테르**

<583> 화합물 **103** 200 mg(0.45 mmol)을 사용하였고, 화합물 **106**에서와 유사한 방법을 이용하여 백색 고체 **108** 112 mg(94%)을 얻었다. ^1H NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0.88(t, $J=6.6\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.27(br s, 18H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.67(quintet, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 3.97(dt, $J=6.6\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$); ^{13}C NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14.21, 22.98, 25.84, 29.57, 29.67, 29.89, 29.92, 29.96, 29.98, 30.69(d, $J_{\text{C},\text{p}}=7.4\text{Hz}$), 32.25, 67.22(d, $J_{\text{C},\text{p}}=5.7\text{Hz}$); ^{31}P NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 21.22; MS(네가티브 모드): m/z 265.0에서 $[\text{M}-1]^-$.

<584> **화합물 109: 인산 모노옥타데실 에스테르**

<585> 화합물 **104** 200 mg(0.38 mmol)을 사용하였고, 화합물 **106**에서와 유사한 방법을 사용하여 백색 고체 **109** 104 mg(79%)을 얻었다. ^1H NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0.89(t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H, CH_3), 1.27(br s, 30H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 1.68(quintet, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$); 3.98(dt, $J=6.6\text{Hz}$, 6.9Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$); ^{13}C NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14.26, 23.14, 26.01, 29.74, 29.84, 30.06, 30.09, 30.16, 30.87(d, $J_{\text{C},\text{p}}=7.2\text{Hz}$), 32.42, 67.32(d, $J_{\text{C},\text{p}}=5.8\text{Hz}$); ^{31}P NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 21.69; MS(네가티브 모드): m/z 349.1에서 $[\text{M}-1]^-$.

<586> **화합물 110: 인산 모노도코실 에스테르**

<587> 화합물 105 200 mg(0.34 mmol)을 사용하고, 화합물 106에서와 유사한 방법을 사용하여 백색 고체 110 98 mg(71%)을 얻었다. ^1H NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0.88(t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.26(br s, 38H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 1.66(quintet, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 3.97(td, $J=6.6\text{Hz}$, 6.6Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$); ^{13}C NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14.22, 23.01, 25.87, 29.61, 29.71, 29.93, 29.97, 30.04, 30.73(d, $J_{\text{C,P}}=7.4\text{Hz}$), 32.29, 67.27(d, $J_{\text{C,P}}=5.6\text{Hz}$); ^{31}P NMR($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 20.66; MS(네가티브 모드): m/z 405.1에서 $[\text{M}-1]^-$.

<588> **실시예 18 - 직쇄 포스페이트 화합물 106-110**

<589> 내인적으로 PSP24 PLGFR을 발현하는 제노푸스 난모세포를 사용하여, 화합물 106-110을 LPA 저해 활성에 대하여 선별하였다. 난모세포는 무균 조건하에서 크실라진으로 마취시킨 성체 제노푸스로부터 얻어, 실험용으로 제조하였다. V-VI 단계의 난모세포는 Ca^{2+} 가 없는 난소 링거-2 액((OR-2) 82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7.5, NaOH 함유함) 중에서 1.4 mg/ml로 콜라게나아제 A형 처리(Boehringer, IN)하여 여포 세포층을 박리시켰다. 난모세포를 17-20°C의 인큐베이터 내에서 바스액(Barth's solution) 중에 유지시켰고, 분리 후 2-7 일동안 사용하였다.

<590> 전기생리학적인 기록은 -60 mV의 막 전위를 유지하는 표준 2 전극-전압-클램프 증폭기(GeneClamp 500, Axon Instruments, CA)를 사용하여 수행하였다. 시험 화합물을 MeOH 중에 용해시키고, 지방산이 없는 BSA로 복합체화한 후, 개구리 Na^+ -링거액(120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES; pH 7)으로 희석하였고, 이것을 난모세포에 5 ml/분의 유속으로 수퍼퓨전에 의해 제공하였다. 막 전류는 NIC-310 디지털 오실로스코프(Nicolet, Madison, WI)를 사용하여 기록하였다. 15분(최소)의 간격으로 적용하여, 적절한 세출 및 탈감작으로부터 복구(회복)가 이루어지도록 하였다.

<591> 도 36은, 화합물 106-110이 LPA에 의해 유도된 클로라이드 전류를 용량 의존적으로 저해함을 보여준다. 화합물 108은 가장 좋은 저해제이며, 약 8.1 nM의 IC_{50} 을 가진다. 화합물 107이 약 10.2 nM의 IC_{50} 수치를 가지면서 유사한 정도의 유효성을 나타내었지만, 보다 길거나 짧은 직쇄 알킬기를 가진 화합물은 LPA에 의해 유도된 클로라이드의 전류를 저해하는 데 있어서 유효성이 감소되는 것으로 나타났다. 도 37은 양성 대조 용액(LPA 단독)에 대한 EC_{50} , 25 nM와, LPA 및 화합물 108 100 nM을 함유하는 용액에 대한 EC_{50} , 343 nM를 비교하고 있다. 그러므로, 화합물 108은 제노푸스 난모세포에서 PSP24 수용체의 LPA 신호전달을 유효하게 저해한다.

<592> 상기 결과에 기초하여, 개개의 수용체를 이종적으로 발현하는 RH7777 세포에서 Edg-2, -4 및 -7의 안타고니스트로서의 유용성에 대하여 화합물 108을 시험하였다.

<593> 도 38은 LPA 18:1 및 화합물 108의 조합물에 노출시켰을 때 Edg-2, -4 및 -7을 발현하는 세포에서 Ca^{2+} 반응에 대한 화합물 108의 효과를 도시하고 있다. 이 실험에서, LPA의 농도는 ED_{50} 부근에서 선택되었다. 화합물 108은 Edg-2 및 Edg-7 발현 세포주에서 Ca^{2+} 반응을 각각 대조군의 약 63% 및 56%로 유의성있게 저해하였다. 대조적으로, 화합물 108은 Edg-4 발현 세포주에서 Ca^{2+} 반응을 대조군의 약 148%로 유의성있게 증가시켰다.

<594> 따라서, 직쇄 포스페이트는 생체내에서 Edg-2 및 Edg-7 활성을 선택적으로 저해하고, 생체내에서 Edg-4 활성을 선택적으로 증강시킬 것으로 예상된다.

<595> **참고 문헌 목록**

<596> 다음의 참고 문헌 각각은 본 출원의 명세서에 그 자체로서 참고로 포함된다.

- Ahn et al., "Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling," *J. Biol. Chem.* **274**:1185-1188 (1999).
- An et al., "Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids," *FEBS. Lett.* **417**:279-282 (1997a).
- An et al., "Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**(3):619-622 (1997b).
- An et al., "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid," *J. Biol. Chem.* **273**:7906-7910 (1998a).
- An et al., "Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization," *Mol. Pharmacol.* **54**:881-888 (1998b).
- Balazs et al., "Topical application of LPA accelerates wound healing," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **905**:270-273 (2000).
- Balboa et al., "Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate," *J. Biol. Chem.* **274**:522-526 (1999).
- Balsinde et al., "Group IV cytosolic phospholipase A2 activation by diacylglycerol pyrophosphate in murine P388D1 macrophages," *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:11-15 (2000).
- Bandoh et al., "Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid," *J. Biol. Chem.* **274**:27776-27785 (1999).

<597>

- Bandoh et al., "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species; Structure-activity relationship of cloned LPA receptors," *FEBS Lett.* **478**: 159-165 (2000).
- Bishop and Bell, "Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation," *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:579-610 (1988).
- Bittman et al., "Inhibitors of lipid phosphatidate receptors: N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids," *J. Lipid Res.* **37**:391-398 (1996).
- Bosch, "Phosphoglyceride metabolism," *Annu. Rev. Biochem.* **43**:243-277 (1974).
- Cherrick et al., "Effects of topically applied 5-fluorouracil in the Syrian hamster," *J. Invest. Dermatol.*, **63**:284-286 (1974).
- Cunnick et al., "Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway," *J. Biol. Chem.* **273**:14468-14475 (1998).
- Durieux et al., "Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive Ca^{2+} -activated Cl^{-} current in *Xenopus laevis* oocytes," *Am. J. Physiol.* **263**:896-900 (1992).
- Dyer et al., "The effect of serum albumin on PC12 cells: I. Neurite retraction and activation of the phosphoinositide second messenger system," *Mol. Brain Res.* **14**:293-301 (1992).
- Eicholtz et al., "The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets," *Biochem. J.* **291**:677-680 (1993).
- Fernhout et al., "Lysophosphatidic acid induces inward currents in *Xenopus laevis* oocytes; evidence for an extracellular site of action," *European Journal of Pharmacology* **213**:313-315 (1992).
- Fischer et al., "Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes," *Mol. Pharmacol.* **54**:979-988 (1998).
- Fukami and Takenawa, "Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal," *J. Biol. Chem.* **267**:10988-10993 (1992).
- Fukushima et al., "A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6151-6 (1998).
- Gerrard et al., "Lysophosphatidic acids influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux," *Am. J. Path.* **96**:423-438 (1979).

- Ghosh et al., "Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling," *Faseb. J.* **11**:45-50 (1997).
- Goetzl et al., "Lysophospholipid Growth Factors," in *Cytokine Reference* (Oppenheim, J, ed.), Academic Press, New York, 1407-1418 (2000).
- Gohla et al., "The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho," *J. Biol. Chem.* **273**:4653-4659 (1998).
- Gonda et al., "The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signaling pathways," *Biochem. J.* **337**:67-75 (1999).
- Guo et al., "Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor- like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:14367-14372 (1996).
- Hecht et al., "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex," *J. Cell. Biol.* **135**:1071-1083 (1996).
- Herrlich et al., "Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid- stimulated mitogenic activity in L cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:8985-8990 (1998).
- Hill et al., "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF," *Cell* **81**:1159-1170 (1995).
- Hoffmann-Wellenhof et al., "Correlation of melanoma cell motility and invasion *in vitro*," *Melanoma. Res.* **5**:311-319 (1995).
- Hooks et al., "Characterization of a receptor subtype-selective lysophosphatidic acid mimetic," *Mol. Pharmacol.* **53**:188-194 (1998).
- Hunt and Goodson, In: *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way, Appleton & Lange), pp. 86-98 (1988).
- Im et al., "Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate," *Mol. Pharmacol.* **57**:753-759 (2000).
- Imamura et al., "Serum requirement for *in vitro* invasion by tumor cells," *Jpn. J. Cancer Res.* **82**:493-496 (1991).
- Imamura et al., "Induction of *in vitro* tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D," *Biochem. Biophys. Res. Com.* **193**:497-503 (1993).
- Imamura et al., "rho-Mediated protein tyrosine phosphorylation in lysophosphatidic-acid- induced tumor-cell invasion," *Int. J. Cancer* **65**:627-632 (1996).

- Jalink et al., "Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca^{2+} - mobilizing stimulus for fibroblasts," *J. Biochem.* **265**:12232-12239 (1990).
- Jalink and Moolenaar, "Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers," *J. Cell Biol.* **118**:411-419 (1992).
- Jalink et al., "Lysophosphatidic Acid is a Chemoattractant for Dictyostelium Discoideum Amoebae," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:1857-1861 (1993a).
- Jalink et al., "Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action," *Cell Growth Differ.* **4**:247-255 (1993b).
- Jalink et al., "Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator," *Biochimica. et. Biophysica. Acta.* **1198**:185-196 (1994a).
- Jalink et al., "Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho," *J. Cell Biol.* **126**:801-810 (1994b).
- Jalink et al., "Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis," *Biochem. J.* **307**:609-616 (1995).
- Kartha et al., "Adenine nucleotides stimulate migration in wounded cultures of kidney epithelial cells," *J. Clin. Invest.*, **90**:288-292 (1992).
- Kawasawa et al., "Brain-specific expression of novel G-protein-coupled receptors, with homologies to *Xenopus* PSP24 and human GPR45," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**(3):952-956 (2000).
- Kimura et al., "Effect of sphingosine and its N-methyl derivatives on oxidative burst, phagokinetic activity, and trans-endothelial migration of human neutrophils," *Biochem. Pharmacol.* **44**:1585-1595 (1992).
- Kimura et al., "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)," *Science* **273**:245-248 (1996).
- Kobayashi et al., "Existence of a Bioactive Lipid, Cyclic Phosphatidic Acid in Human Serum," *Life Sci.* **56**:245-253 (1999).
- Lilom et al., "N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids are selective competitive antagonists of the lysophosphatidic acid receptors," *Mol. Pharmacol.* **50**:616-623 (1996).
- Lilom et al., "Identification of a novel growth factor-like lipid, 1-O-cis-alk-1'-enyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate (alkenyl-GP) that is present in commercial sphingolipid preparations," *J. Biol. Chem.* **273**:13461-13468 (1998).

- Lin et al., "Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1," *J. Biol. Chem.* **272**:31051-31057 (1997).
- Liotta et al., "Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastasis," *Anticancer Drug Des.* **2**:195-202 (1987).
- Liu et al., "Synthesis, calcium mobilizing, and physicochemical properties of D- chiro- inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate, a novel and potent ligand at the D-myo- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor," *J. Med. Chem.* **42**:1991-1998 (1999).
- Luttrell et al., "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes," *Science* **283**:655-661 (1999).
- Lynch et al., "Structure/activity relationships in lysophosphatidic acid: the 2-hydroxyl moiety," *Mol. Pharmacol.* **52**:75-81 (1997).
- Machesky and Hall, "Rho: a connection between membrane signaling and cytoskeleton," *Trends Cell Biol.* **6**:304-310 (1996).
- Macrae et al., "Cloning, characterization, and chromosomal localization of rec1.3, a member of the G-protein-coupled receptor family highly expressed in brain," *Brain Res. Mol. Brain Res.* **42**:245-254 (1996).
- Mills et al., "A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization, and mechanism of action," *Cancer Res.* **48**:1066-1071 (1988).
- Mills et al., "Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells," *J. Clin. Invest.* **86**:851-855 (1990).
- Miyata et al., "New wound-healing model using cultured corneal endothelial cells: Quantitative study of healing process," *Jpn. J. Ophthalmol.*, **34**:257-266 (1990).
- Moolenaar, "G-protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis, and cell proliferation," *Cell Growth Differ.* **2**:359-364 (1991).
- Moolenaar, "A novel lipid mediator with diverse biological actions," *Trends in Cell Biology* **4**:213-219 (1994).
- Moolenaar, "Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger," *J. Biol. Chem.*, **270**:12949-12952 (1996).
- Moolenaar et al., "Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses," *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:168-173 (1997).
- Mukai et al., "Mechanism of tumor cell invasion studied by a culture model-- modification of invasiveness by host mediators," *Hum. Cell* **6**:194-198 (1993).
- Muller et al., "Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5600-5604 (1987).

- Munnik et al., "Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants," *J. Biol. Chem.* **271**:15708-15715 (1996).
- Murakami-Murofushi et al., "Inhibition of cell proliferation by a unique lysophosphatidic acid, PHYLPA, isolated from *Physarum polycephalum*: signaling events of antiproliferative action by PHYLPA," *Cell Struct. Funct.* **18**:363-370 (1993).
- Myher et al., "Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human plasma: comparison to red blood cells," *Lipids* **24**:408-418 (1989).
- Ohkawara et al., In: *Biochemistry of Cutaneous Epithelial Differentiation*, Seiji et al., eds., University Park Press, Baltimore, 1977, pp. 274-278.
- Parrill et al., "Identification of edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate," *J. Biol. Chem.* **275**:39379-393784 (2000).
- Postma et al., "Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor," *Embo. J.* **15**:2388-2392 (1996).
- Ridley, "Rho: theme and variations," *Curr. Biol.* **6**:1256-1264 (1996).
- Ridley and Hall, "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors," *Cell* **70**:389-399 (1992).
- Sato et al., "Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis," *J. Cell Biol.*, **107**:1199-1205 (1988).
- Schumacher et al., "Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysodervatives: identity with substances in aged serum (DAS)," *Thrombos. Haemostas.* **42**:631-640 (1979).
- Simon et al., "Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators?," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**:1743-1750 (1982).
- Spiegel and Milstien, "Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors," *Biochim. et. Biophys. Acta.* **1484**:107-116 (2000).
- Sugiura et al., "Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: Comparison with platelet activating factor," *Arch. Biochem. Biophys.* **311**:358-368 (1994).
- Sun et al., "Synthesis of Chiral 1-(2'-Amino-2'-carboxyethyl)-1,4-dihydro-6,7-quinoxaline-2,3-diones: α -amino- 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate Receptor Agonists and Antagonists," *J. Med. Chem.* **39**:4430-4438 (1996).

- Tigyi et al., "A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1521-1525 (1990).
- Tigyi et al., "A factor that activates oscillatory chloride currents in *Xenopus* oocytes copurifies with a subfraction of serum albumin," *J. Biol. Chem.* **266**:20602-20609 (1991).
- Tigyi and Miledi, "Lysophosphatides bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells," *J. Biol. Chem.* **267**:21360-21367 (1992).
- Tigyi et al., "Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1908-1912 (1994).
- Tigyi et al., "Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide- Ca^{2+} signaling and Rho," *J. Neurochem.* **66**:537-548 (1996).
- Tigyi et al., "Pharmacological characterization of phospholipid growth factor receptors," *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:34-53 (2000).
- Tokumura et al., "Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acid on the arterial blood pressure of different animal species," *Lipids* **13**:572-574 (1978).
- Tokumura et al., "Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats," *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **245**:74-83 (1980).
- Tokumura et al., "Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**:391-398 (1981).
- Tokumura et al., "Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma," *Biochim. et. Biophys. Acta.* **875**:31-38 (1986).
- Tokumura et al., "Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta," *Am. J. Physiol.* **267**:204-210 (1994).
- Tokumura, "A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism, and bioactions," *Prog. Lipid Res.* **34**:151-184 (1995).
- Umansky et al., "Prevention of rat neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by stimulated in vitro ischemia and reperfusion," *Cell Death Diff.* **4**:608-616 (1997).
- van Brocklyn et al., "Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi- coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival," *J. Cell. Biol.* **142**:229-240 (1998).

- van Brocklyn et al., "Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6," *Blood* **95**:2624-2629 (2000).
- van Corven et al., "Lysophosphatidic-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins," *Cell* **59**:45-54 (1989).
- van Corven et al., "Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts: Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin," *Biochem. J.* **281**:163-169 (1992).
- van der Bend et al., "The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D: Comparison with the response to endothelin," *Biochem. J.* **285**:235-240 (1992a).
- van der Bend et al., "Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid," *EMBO. J.* **11**:2495-2501 (1992b).
- Verrier et al., "Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene," *EMBO J.*, **5**:913-917 (1986).
- Wissing and Behrbohm, "Diacylglycerol pyrophosphate, a novel phospholipid compound," *FEBS Lett.* **315**: 95-99 (1993).
- Xu et al., "Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients," *Clin. Cancer Res.* **1**:1223-1232 (1995a).
- Xu et al., "Effect of lysophospholipids on signaling in the human Jurkat T cell line," *J. Cell. Physiol.*, **163**:441-450 (1995b).
- Yatomi et al., "Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets," *Blood* **86**:193-202 (1995).
- Zhou et al., "Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes," *J. Biol. Chem.* **270**:25549-25556 (1995).
- Zsiros et al., "Naturally occurring inhibitors of lysophosphatidic acid," *Abstr. 6th. International Congress on Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators*, p.128 (1998).

<604>

<605>

본 명세서에서는 바람직한 구체예를 구체적으로 기술하고 있지만, 관련 기술의 당업자는 본 발명의 본질을 벗어나지 않는 다양한 개질, 부가, 치환 등이 가능함을 명확히 숙지하고 있을 것이므로, 이러한 것들은 다음의 특허 청구범위에서 정해지는 발명의 범위에 속하는 것으로 해석된다.

도면의 간단한 설명

<68>

도 1은 LPA 수용체 EDG-2, EDG-4, EDG-7 및 PSP-24(α, β)를 비롯한 10개의 인지질 성장 인자 수용체의 부류 및 관련성을 설명하는 계통발생도이다.

<69>

도 2는 세린 아미드 화합물 **35-43**의 제조에 이용되는 합성 개요를 나타낸다.

<70>

도 3은 세린 아미드 포스페이트 화합물 **55-59**의 제조에 이용되는 합성 개요를 나타낸다.

<71>

도 4는 바이포스페이트 화합물 **66-68**의 제조에 이용되는 합성 개요를 나타낸다.

<72>

도 5a 및 5b는 바이포스페이트 화합물의 합성법을 나타낸다. 도 5a는 1,2-바이포스페이트 화합물 **85-92**의 제조에 이용되는 합성 개요를 나타낸다. 도 5b는 1,3-바이포스페이트 화합물을 제조하기 위한 합성 개요를 나타낸다.

<73>

도 6a 및 6b는 피로포스페이트 화합물의 제조를 위한 합성 개요를 나타낸다.

<74>

도 7a 내지 7c는 토실레이트-보호된 디-에테르 중간체로부터 치환된 모노-포스페이트 및 모노-포스포네이트의 제조를 위한 합성 개요를 나타낸다.

<75>

도 8은 직쇄 지방산 포스페이트 화합물 **106-110**의 제조에 이용되는 합성 개요를 나타낸다.

<76>

도 9는 직쇄 티오인산 모노알킬 에스테르의 합성법을 나타낸다.

- <77> 도 10은 직쇄 알킬아미도-인산의 합성법을 나타낸다.
- <78> 도 11은 배좌 구속된(conformationally restrained) 사이클릭 포스페이트 화합물의 제조를 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <79> 도 12는 배좌 구속된 사이클릭 포스페이트 화합물의 제조를 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <80> 도 13은 배좌 구속된 사이클릭 포스페이트 화합물의 제조를 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <81> 도 14는 유리 포스페이트 부분을 갖는 배좌 구속된 화합물의 제조를 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <82> 도 15는 2-모노포스페이트를 제조하기 위한 대안적 합성 개요를 나타낸다.
- <83> 도 16은 1,3-바이포스페이트 화합물을 제조하기 위한 대안적 합성 개요를 나타낸다.
- <84> 도 17은 X^3 으로서 -N(H)-아실기를 갖는 화합물을 제조하기 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <85> 도 18은 X^3 으로서 -N(H)-이미다졸기를 갖는 화합물을 제조하기 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <86> 도 19는 X^3 으로서 -N(H)-C(O)-O-R⁷을 갖는 화합물을 제조하기 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <87> 도 20은 X^3 으로서 -N(H)-C(S)-O-R⁷을 갖는 화합물을 제조하기 위한 합성 개요를 나타낸다.
- <88> 도 21은 **56**(SAP, 14:0)의 세포외 적용에 의한 제노푸스(*Xenopus*) 난모세포에서의 LPA-유도 클로라이드 전류의 용량-의존적 저해를 나타내는 그래프이다.
- <89> 도 22은 **57**(SAP, 18:0)의 세포외 적용에 의한 제노푸스 난모세포에서의 LPA-유도 클로라이드 전류의 용량-의존적 저해를 나타내는 그래프이다.
- <90> 도 23a 및 23b는 **66**(MAGDP, 18:0)의 세포외 적용에 의한 제노푸스 난모세포에서의 LPA-유도 클로라이드 전류의 용량-의존적 저해를 나타내는 그래프이다. 화살표는 5 μ M **66**의 세포내 주사 시간을 나타내며, 이어서 LPA의 세포외 적용이 이루어진다.
- <91> 도 24는 **66**(MAGDP, 18:0)의 용량-저해 효과를 나타내는 그래프이다. LPA 일정량(5 nM)을 **66** 증가량과 함께 난모세포에 적용하였다. 데이터 포인트들은 측정된 클로라이드 전류의 피크 크기를 나타낸다.
- <92> 도 25는 **92**(MAGDP, 22:0)의 세포외 적용에 의한 제노푸스 난모세포에서의 LPA-유도 클로라이드 전류의 용량-의존적 저해를 나타내는 그래프이다.
- <93> 도 26은 제노푸스 난모세포에 대한 **56a**(SDAP, 14:0/2:0)의 용량-의존적 효과를 나타내는 그래프이다.
- <94> 도 27은 LPA-유도 HEY 세포 이동에 대한 화합물 **56**(SAP, 14:0), **56a**(SDAP, 14:0/2:0) 및 **66**(MAGDP, 18:0)의 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 시험 화합물 농도는 1 μ M 이었고; LPA 농도는 0.1 μ M 이었다.
- <95> 도 28a 내지 28c는 Edg-2(28a), Edg-4(28b) 또는 Edg-7(28c)을 이중성으로 발현시키는 RH7777 세포에서의 Ca^{2+} 응답에 대한 용량-응답 관계를 나타내는 그래프이다. 각각의 데이터 포인트는 3번 이상의 측정값의 평균 $\pm$ S.D.를 나타낸다.
- <96> 도 29a 내지 29d는 Edg-2 및 Edg-7을 발현시키거나 Edg-4를 발현시키지 않는 RH7777 세포에 있어서 LPA에 의하여 유발된 Ca^{2+} 응답의 DGPP 8:0 저해를 나타내는 그래프이다. Edg-2, -4 또는 -7을 발현시키는 RH7777 세포를 100 nM LPA 18:1 및 1 μ M DGPP 8:0의 혼합물에 노출시켰다. 대조군 세포들을 100 nM LPA 18:1에 노출시켰다. 안정한 Edg-2(29a), Edg-4(29b) 및 Edg-7(29c) 발현 세포들, 또는 Edg-4(29d)를 일시적으로 발현시키는 세포들에 대한 대표적인 Ca^{2+} 응답을 나타낸다.
- <97> 도 30a 내지 30c는 Edg-7을 발현시키는 RH7777 세포들(Edg-7 세포들)에 있어서 DGPP 8:0에 의한 LPA 응답의 저해의 약리학적 특성을 나타내는 그래프이다. 증가 농도의 DGPP 8:0와 혼합된 250 nM 농도의 LPA 18:1에 세포들을 노출시켰고, 생성된 Ca^{2+} 응답의 피크 면적을 측정하였다(30a). 또한, 500 nM 농도의 DGPP 8:0과 혼합된 증가 농도의 LPA 18:1에 세포들을 노출시켰다(30b). 500 nM 농도의 지시된 지질과 혼합된 250 nM 농도의 LPA 18:1에 Edg-7 세포들을 노출시켰다(30c). Ca^{2+} 응답의 피크 면적은 최소 세 번의 측정값의 평균 $\pm$ S.D.로 나타

낸다.

<98> 도 31a 내지 31c는 Edg-2를 발현시키는 RH7777 세포들(Edg-2 세포들)에 있어서 DGPP 8:0에 의한 LPA 응답의 저해의 약리학적 특성을 나타내는 그래프이다. 증가 농도의 DGPP 8:0과 혼합된 250 nM 농도의 LPA 18:1에 안정한 Edg-2 세포들을 노출시켰고, Ca^{2+} 응답의 피크 면적을 측정하였다(31a). 10 μM 농도의 DGPP 8:0과 혼합된 증가 농도의 LPA 18:1에 Edg-2 세포들을 노출시켰다(31b). 10 μM 농도의 지시된 지질과 혼합된 250 nM 농도의 LPA 18:1에 Edg-2 세포들을 노출시켰다(31c). 응답은 최소 세 번의 측정값의 평균 $\pm$ S.D.로 나타낸다.

<99> 도 32a 및 32b는 Edg-4 발현 RH7777 세포들에서 DGPP에 대한 구조-활성 관계를 나타내는 그래프이다. 5 μM 농도의 지시된 지질과 혼합된 500 nM 농도의 LPA 18:1에 안정한 Edg-4 세포들을 노출시켰다(32a). 1 μM 농도의 지시된 지질과 혼합된 100 nM 농도의 LPA 18:1에 Edg-4 세포들을 일시적으로 발현시키는 세포들을 노출시켰다(32b). Ca^{2+} 응답의 피크 면적을 측정하였고, 최소 세 번의 측정값의 평균 $\pm$ S.D.로 나타낸다.

<100> 도 33a 내지 33c는 제노푸스 난모세포에서 LPA-유발 Cl^- 전류에서의 DGPP 8:0의 약리학적 특성을 설명하는 그래프이다. 증가 농도의 DGPP 8:0과 혼합된 5 nM 농도의 LPA 18:1에 난모세포들을 노출시켰고, 생성된 진동 Cl^- 전류의 피크 크기를 측정하였다(33a). 200 nM 농도의 DGPP 8:0과 혼합된 증가 농도의 LPA 18:1에 난모세포들을 노출시켰다(33b). 데이터 포인트들은 최소 세 번의 측정값의 평균 $\pm$ S.D.를 나타낸다. 지시된 바와 같이, 5 nM LPA 18:1, 또는 5 nM LPA 18:1 및 1 μM DGPP 8:0의 혼합물로 난모세포들을 처리하였다(33c). 1 μM DGPP 8:0의 세포내 주사를 화살표로 나타낸다.

<101> 도 34a 내지 34d는 NIH3T3 섬유아세포 및 HEY 난소 암세포에 있어서 LPA-유발 Ca^{2+} 응답을 저해하는 DGPP 8:0을 나타내는 그래프이다. Edg 및 PSP24 수용체 전사체에 대한 NIH3T3 세포의 RT-PCR 분석(34a). 10 μM 농도의 DGPP 8:0과 혼합된, 100 nM 농도의 LPA 18:1, 또는 S1P에 NIH3T3 세포를 노출시켰다(34b). Edg 및 PSP24 전사체의 존재에 대한 HEY 세포들의 RT-PCR 분석(34c). 1 μM 농도의 DGPP 8:0과 혼합된, 100 nM 농도의 LPA 18:1, 또는 S1P에 HEY 세포들을 노출시켰다(34d). 생성된 Ca^{2+} 응답의 피크 면적을 측정하였고, 최소 세 번의 측정값의 평균 $\pm$ S.D.로 나타낸다.

<102> 도 35는 NIH3T3 세포들의 LPA-유발 증식의 DGPP 8:0 저해를 나타내는 그래프이다. NIH3T3 세포들을 6 시간 동안 혈청 결핍된 상태(serum-starvation)에서 배양하고, 10 μM 농도의 지시된 지질과 혼합된 5 μM 농도의 LPA 18:1에 노출시켰다. LPA 18:1 대신에 용매(BSA)에 대조군 세포들을 위치시켰다. 상기 세포들을 24 시간 동안 지질로 항온처리하고 계수하였다. 데이터는 세 번의 실험으로 나타낸다.

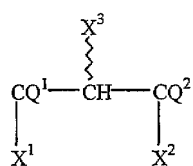
<103> 도 36은 제노푸스 난모세포에서의 직쇄 지방산 포스페이트 화합물 106-110에 의한 LPA 응답의 저해의 약리학적 특성을 나타내는 그래프이다.

<104> 도 37은 제노푸스 난모세포에서의 직쇄 지방산 포스페이트 화합물 108에 의한 LPA 응답의 저해의 약리학적 특성을 나타내는 그래프이다.

<105> 도 38은 Edg-2, Edg-4 또는 Edg-7 수용체를 각각 발현시키는 RH7777 세포들을 직쇄 지방산 포스페이트 화합물 108에 노출 시킨 후의, 상기 세포들의 안타고니스트 또는 아고니스트 유도 응답의 약리학적 특성을 나타내는 그래프이다. Ca^{2+} 응답의 피크 면적을 측정하였다.

<106> 발명의 상세한 설명

<107> 본 발명의 한 실시 양태는 하기 화학식(I)의 화합물에 관한 것이다:



<108> (I)

<109> 상기 식에서,

<110> X^1 , X^2 및 X^3 중 하나 이상은 $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^1-$ 또는 $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^2-\text{P}(\text{OH})\text{O}-\text{Z}^1-$ 이고, X^1 및 X^2 가 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OH})-\text{O}-$ 로 함께 연결

되거나, X^1 및 X^3 이 -O-PO(OH)-NH-로 함께 연결되며;

<111> X^1 , X^2 및 X^3 중 하나 이상은 R^1-Y^1-A -이고, X^1 , X^2 및 X^3 중의 둘이 R^1-Y^1-A -인 경우에 각각은 동일하거나 상이하
며, 또는 X^2 및 X^3 이 -N(H)-C(O)-N(R^1)-로 함께 연결되고;

<112> 임의로, X^1 , X^2 및 X^3 중 하나는 H 이며;

<113> A는 직접 결합, $(CH_2)_k$ (여기에서, k 는 0 내지 30의 정수임) 또는 O 이고;

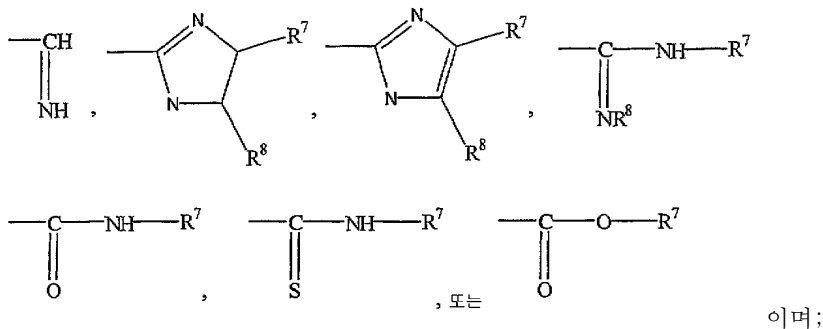
<114> Y^1 은 $-(CH_2)_l$ -(여기에서, l 은 1 내지 30의 정수임), -O-, $\begin{array}{c} O \\ || \\ -C- \end{array}$, -S- 또는 $-NR^2$ -이며;

<115> Z^1 은 $-(CH_2)_m$ - 또는 $-O(CH_2)_m$ -(여기에서, m 은 1 내지 50의 정수임), $-C(R^3)H$ -, $-NH$ -, $-O$ - 또는 $-S$ -이고;

<116> Z^2 는 $-(CH_2)_n$ - 또는 $-O(CH_2)_n$ -(여기에서, n 은 1 내지 50의 정수임) 또는 $-O$ -이며;

<117> Q^1 및 Q^2 는 독립적으로 H_2 , $=NR^4$, $=O$, 또는 H 및 $-NR^5 R^6$ 의 조합이고;

<118> X^1 , X^2 또는 X^3 각각에 있어서의 R^1 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄
C2 내지 C30 알케닐, 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체가 있거나 없는 방향족 또는 헤테로방향족 고리, C1
내지 C30 알킬 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포
함하는 아릴알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬,



<119> R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 및 R^8 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내
지 C30 알케닐, 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체가 있거나 없는 방향족 또는 헤테로방향족 고리, C1 내지
C30 알킬 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하
는 아릴알킬, 또는 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬이다.

<120> 전술한 R 기(예, R^1-R^8) 각각에 있어서, 직쇄 알킬은 화학식 $-(CH_2)_xCH_3$ (여기에서, x 는 0 내지 29임)을 갖는 것
이고; 분지쇄 알킬은 상기 직쇄 알킬에 대하여 정의된 바와 같은 화학식을 갖는 것이나, 단, 하나 이상의 CH_2 기
는 CHW 기(여기에서, W는 알킬 측쇄임)로 대체된 것이며; 직쇄 알케닐은 화학식 $-(CH_2)_{xa}CH=CH(CH_2)_{xb}CH_3$ (여기에
서, xa 및 xb 각각은 0 내지 27이고, $(xa + xb)$ 는 27 이하임)을 갖는 것이고; 분지쇄 알케닐은 상기 직쇄 알케
닐에 대하여 정의된 바와 같은 화학식을 갖는 것이나, 단, 하나 이상의 CH_2 기가 CHW 기(여기에서, W는 알킬 측
쇄임)로 대체된 것이거나, 하나의 CH 기가 CW 기(여기에서, W는 알킬 측쇄임)로 대체된 것이다.

<121> 방향족 또는 헤테로방향족 고리로는 페닐, 인텐, 피롤, 이미다졸, 옥사졸, 피라졸, 피리딘, 피리미딘,
피롤리딘, 피페리딘, 티오펜, 퓨란, 나프탈, 바이-페닐 및 인돌 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상
기 방향족 또는 헤테로방향족 고리는 그 고리가 R^1-Y^1-A - 쇠의 Y^1 기에 결합하는 위치에 대하여 그 고리 상의 오
르토, 메타 또는 파라 위치에 위치한 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체를 포함할 수 있다. 상기 고리 상의
치환체들로는 알킬, 알콕시, 아민(예, 2차 또는 3차 아민), 알킬아민, 아마이드, 알킬아미드, 산, 알콜 등이 있
으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

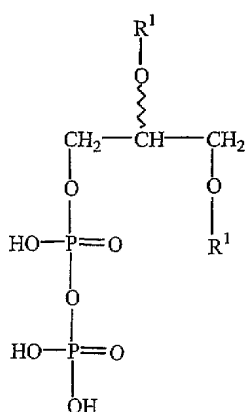
<122> 아실기는 전술한 바와 같은 알킬, 알케닐, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함할 수 있다.

<123> 아릴알킬 및 아릴옥시알킬기로는 전술한 바와 같은 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬기(이 알킬기는 R^1-Y^1-A -쇄의 Y^1 기에 결합됨)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

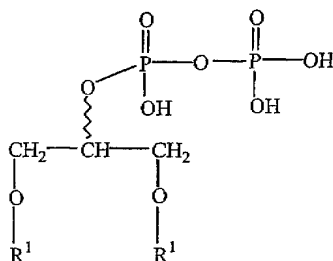
<124> 하기와 같은 이미 공지된 내인성 화합물 또는 합성 화합물은 화학식(I)의 화합물의 전술한 정의에서 특히 배제된다: 리소포스파티드산, 포스파티드산, 사이클릭 포스파티드산, 알케닐 글리세롤포스페이트, 디옥틸 글리세롤 피로포스페이트 및 N-팔미토일-L-세린.

<125> 화학식(I) 화합물의 예로는 하기 화학식(II)-(V)의 서브클래스 화합물이 있다.

<126> 화학식(II)A 및 (II)B의 구조에 있어서, Q^1 및 Q^2 는 모두 H_2 이고; X^1 , X^2 및 X^3 중 하나는 $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$ (여기에서, Z^1 및 Z^2 는 O임)이며; X^1 , X^2 및 X^3 중 둘은 R^1-Y^1-A (여기에서, 각각에 대하여 Y^1 은 O이고, A는 직접 결합임)이다. 각각의 R^1 은 화학식(I)에 대하여 전술한 바와 같이 독립적으로 정의된다.

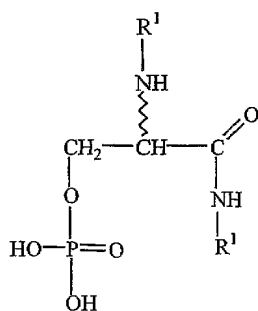


<127> (II)A



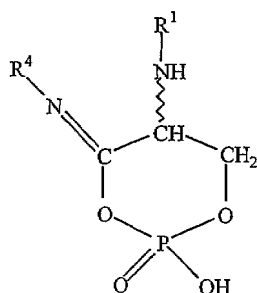
<128> (II)B

<129> 화학식(III)의 구조에 있어서, Q^1 은 H_2 이고; Q^2 는 =O이며; X^1 은 $(HO)_2PO-Z^1-$ (여기에서, Z^1 은 O임)이고; X^2 및 X^3 은 R^1-Y^1-A (여기에서, 각각에 대하여 Y^1 은 $-NH-$ 이고, A는 직접 결합임)이다. 각각의 R^1 은 화학식(I)에 대하여 전술한 바와 같이 독립적으로 정의된다. 화학식(III)의 범위 내에 있는 바람직한 화학종은 X^3 이 $-NH_2$ 이고, X^2 가 $-NHR^1$ (여기에서, R^1 은 C14 내지 C18 알킬이거나, 더욱 바람직하게는 C14 알킬 또는 C18 알킬임)인 것이거나; 또는 X^3 이 $-NHR^1$ (여기에서 R^1 은 아세틸기임)이고, X^2 가 $-NHR^1$ (여기에서, R^1 은 C14 알킬임)인 것이다.



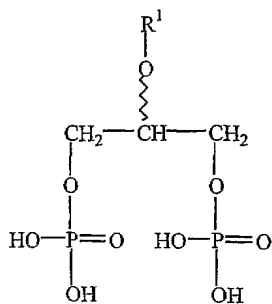
<130> (III)

<131> 화학식(IV)의 구조에 있어서, Q^1 은 $=NR^4$ 이고; Q^2 는 H_2 이며; X^1 및 X^2 는 $-O-PO(OH)-O-$ 로 함께 연결되고; X^3 은 R^1-Y^1-A -(여기에서, A는 직접 결합이며, Y^1 은 $-NH-$ 임)이다. R^1 및 R^4 는 화학식(I)에 대하여 전술한 바와 같이 정의된다.

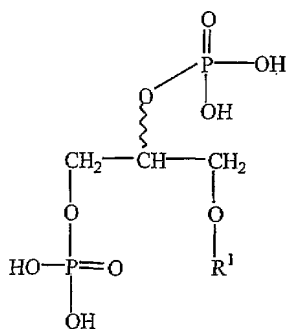


(IV)

<132>
<133> 화학식(V)A 및 (V)B의 구조에 있어서, Q^1 및 Q^2 는 모두 H_2 이고; X^1 , X^2 및 X^3 중 둘은 $(HO)_2PO-Z^1-$ -(여기에서, 각각에 대하여 Z^1 은 O임)이며; X^1 , X^2 및 X^3 중 하나는 R^1-Y^1-A -(여기에서, A는 직접 결합이고, Y^1 은 $-O-$ 임)이다. R^1 은 화학식(I)에 대하여 전술한 바와 같이 정의된다. 화학식(V)A 및 (V)B의 범위 내에 있는 바람직한 화합물은 R^1 이 C21 알킬을 포함하는 아실인 화합물이거나, R^1 이 C18 알킬인 화합물이다.



(V)A



(V)B

<134>
<135>
<136> 화합식(I)의 화합물 및 그 하위 부류의 화학식(II)A, (II)B, (III), (IV), (V)A 및 (V)B의 화합물은 하기 합성 개요를 이용하여 제조할 수 있다.

<137> 세린 아미드(SA) 및 세린 아미드 포스페이트(SAP) 시리즈(화학식(III))를 합성하기 위하여, 우선 전구체 *t*-Boc 보호된 β -락톤(**25**)을 합성하였다. 시판 *t*-Boc-L-세린(도 2, **24**)을 출발 물질로 하여, 미추노보(Mitsunobo) 조건 하에서 트리페닐 포스핀(PPH_3) 및 디에틸아지도디카복실레이트(DEAD)를 도입하여, 약 50 %의 수율로 화합물 **25**를 수득하였다(Sun 등, 1996). 다양한 1차 아민을 사용하여 매우 불안정한 β -락톤 **25**를 개방시켜 하이드록시 아미드 **26-34**를 얻으려는 Sun 등이 개발한 방법을 이용한 시도들은, 다양한 시약들(트리에틸 아민 등)의 사용에도 불구하고, 실패하였다. 그 대신에, THF 중의 β -락톤으로 1차 아민을 환류시킴으로써, *t*-Boc 보호된 하이드록시 아미드 **26-34**를 수득하였다. 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화합물 **26-34**를 정제하였다. *t*-Boc 보호기의 트리플루오로아세트산 (TFA)-매개 제거는 TFA 염으로서 화합물 **35-43**을 제공하였다.

<138> 화합물 **55-59**의 합성을 위하여, *t*-Boc 보호된 하이드록시 아미드 **26-30**을 포스포릴화시켰다. 최종 화합물의 주

의 깊은 연구는 최종 화합물이 매우 소수성인 영역과 매우 친수성인 영역을 포함할 것임을 암시하였다. 상기 두 영역 모두는 추출 과정 중에 문제를 야기하고/하거나 정제 단계 중에 컬럼에 부착될 수 있다. 이러한 잠재적인 문제들을 회피하기 위하여, 포스포아미데이트 화학을 이용하였다. 포스포아미데이트 화학을 이용함에 의해서, 포스페이트 하이드록실기를 보호하여 완전하게 소수성인 분자를 제공함으로써 좀 더 용이하게 정제할 수 있을 것이라는 가설을 세웠다.

<139> 본질적으로, 과정들을 조합하여 이용함으로써 소정 생성물(55-59)을 수득하였다(Lynch 등, 1997; Bittman 등, 1996; Liu 등, 1999). 출발 하이드록시아미드(26-30)를 무수 피리딘으로 반복하여 세척하고, 고진공 중에서 48 시간 동안 건조시켰다. 피리딘-세척된 하이드록시아미드를 아르곤 대기 하에서 유지시켰다. 그 다음, 1H-테트라졸 및 새로 증류한 THF/CH₂Cl₂ 1:1 혼합물을 첨가하였다. 포스포릴화제인 디벤질디이소프로필 포스포아미데이트를 첨가하였다. TLC에 의하여 상기 반응을 모니터링한 후, 과아세트산으로 상기 포스포네이트를 계내에서 포스페이트로 산화시켰다. 컬럼 크로마토그래피를 통하여 상기 반응 혼합물을 정제하여 벤질-보호된 포스페이트로서 화합물 50-54를 제공하였다. 60 psi에서 H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 화합물 50-54를 촉매적 환원시킴으로써 에탄올 내에서 상기 보호 벤질기의 제거 과정을 수행하여 화합물 55-59를 수득하였다(도 3). 56을 아세트산 무수물과 반응시켜 화합물 56a를 제공하였다(도 3).

<140> 일단 SAP 시리즈(화합물 55-59)의 합성에 대한 포스포릴화 기술이 밝혀졌을 때, 유사한 과정을 이용하여 비스포스페이트(화학식(V)A 및 (V)B)를 합성하였다(도 4, 5a 및 5b). 시판 디올 60-62를 무수 피리딘으로 세척하고, 고진공 하에서 48 시간 동안 건조시켰다. 이들 건조 디올(60-62)을 새로 증류한 1:1 THF/CH₂Cl₂에 용해시킨 후, 1H-테트라졸을 첨가하였다. 이 교반 혼합물에 디벤질디이소프로필 포스포아미데이트를 첨가하였다. TLC를 통하여 상기 반응 혼합물을 모니터링하고, 적절한 시간에 과아세트산으로 상기 포스포네이트를 계내에서 포스페이트로 산화시켰다. 상기 반응 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 벤질-보호된 비스포스페이트로서 화합물 63-65를 제공하였다. 60 psi에서 H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 화합물 63-65를 촉매적 환원시킴으로써 에탄올 내에서 상기 보호 벤질기의 제거 과정을 수행하여 비스포스페이트로서 화합물 66-68을 수득하였다. 66-68의 합성에 대한 전술한 과정과 유사한 과정으로 화합물 85-92를 수득하였다.

<141> 화합물 85-92는 1,2-바이포스페이트이지만, 도 5b는 1,3-바이포스페이트의 합성을 도시한다. 시판 2-페녹시-1,3-프로판-디올을 출발 물질로 사용하였다. 우선, 상기 출발물질을 메틸 요오다이드의 존재하에서 *t*-BuOK로 보호한 후, 촉매적 수소화를 수행함으로써, 추후 할라이드(RX, 여기에서 R은 R¹에 대하여 전술한 바와 같이 정의됨)와 반응하는 중간체를 수득하였다. 상기 수득된 중간체는 이어서 에틸-SH의 존재하에 AlCl₃으로 처리하여, 주쇄의 C2에 결합된 RO 기를 갖는 1,3 디올을 수득하였다. 상기 회수된 1,3 디올을 새로 증류한 1:1 THF/CH₂Cl₂에 용해시킨 후, 1H-테트라졸을 첨가하였다. 이 교반 혼합물에 디벤질디이소프로필 포스포아미데이트를 첨가하였다. TLC를 통하여 상기 반응 혼합물을 모니터링하고, 적절한 시간에 과아세트산으로 상기 포스포네이트를 계내에서 포스페이트로 산화시켰다. 상기 반응 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 벤질-보호된 비스포스페이트 화합물을 수득하였다. 60 psi에서 H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 상기 화합물을 촉매적 환원시킴으로써 에탄올 내에서 상기 보호 벤질기의 제거 과정을 수행하여 1,3-비스포스페이트 화합물을 수득하였다.

<142> 화학식(II)A 및 (II)B의 피로포스페이트를 합성하기 위하여, 출발물질로서 글리시달 토실레이트((2R)(-) 또는 (2R)(+))를 사용하였다(도 6a 및 6b). 알코올의 존재하에 BF₃과 같은 루이스산으로 상기 고리의 개방을 촉매화하여, C1 위치에 토실레이트-보호된 중간체를 제공하였다. 다음 단계에서, 과량의 R-트리플레이트 및 2,6-디-*tert*-부틸-4-메틸피리딘을 사용하여 상기 알코올의 C2 위치를 R 기(예, 전술한 바와 같은 R¹)로 치환함으로써 디-에테르 중간체를 수득하였다. 트리스(테트라-*n*-부틸암모늄) 하이드로젠 피로포스페이트로 상기 디-에테르 중간체를 처리함으로써 상기 토실레이트의 친핵성 공격을 야기시켜 상기 토실레이트를 C1 위치에서 피로포스페이트 치환체로 치환시켰다.

<143> 화학식(II)B의 피로포스페이트를 제조하기 위하여, 2,6-디-*tert*-부틸-4-메틸피리딘 및 트리플릭 무수물의 존재 하에서 상기 토실레이트 보호된 중간체를 벤질 알콜로 처리하여, 중간체를 C2 위치에서 벤질화시킨다. 우선, 18-크라운-6의 존재 하에 포타슘 수퍼옥사이드를 작용시켜 상기 벤질레이트 중간체 상의 토실레이트 보호기를 제거함으로써 C1 위치에 하이드록실기를 제공하였고, 이를 과량의 R-트리플레이트 및 2,6-디-*tert*-부틸-4-메틸

피리딘을 사용하여 R 기(예, 전술한 바와 같은 R^1)로 치환시켰다. 생성된 디-에테르 중간체는 여전히 C2 위치에 벤질 보호기를 가지고 있었다. 수소화에 의하여 상기 벤질 보호기를 제거하고, 이어서 피리딘 및 *p*-톨루엔 설폰일 클로라이드를 작용시켜 하이드록실기를 토실레이트화함으로써 C2 위치에 토실기를 보유한 디-에테르를 생성시켰다. 트리스(테트라-*n*-부틸암모늄) 하이드로젠 피로포스페이트로 처리하여 친핵성 공격을 수행시킴에 의하여 상기 토실레이트기를 제거하고, C2 위치에서 피로포스페이트 치환체로 치환시켰다.

<144> 포스페이트 및 바이포스페이트(및 피로포스페이트, 포스포네이트, 등)를 제조하기 위한 대안적 개요는 도 15 및 16에 도시한다.

<145> 도 15에 있어서, 알콜(ROH)과 함께 출발물질로 글리시달 브로마이드를 사용하였다. 반응 조건으로서는 K_2CO_3 로 처리한 후, 암모늄 염 $C_6H_5CH_2N^+(C_2H_5)_3Cl^-$ 로 처리함으로써, 상기 브로마이드를 R 기로 치환시켰다. 그 다음, 알콜(R^1OH) 및 에테르 중의 1M HCl로 처리한 후, 상기 글리시달 중간체의 고리를 개방시켜, C2 위치에 하이드록실기를 갖는 디-에테르 중간체를 제공하였다. 상기 디-에테르를 1H-테트라졸과 혼합하고, 이 교반 혼합물에 디벤질디이소프로필 포스포아미데이트를 첨가하였다. TLC를 통하여 상기 반응 혼합물을 모니터링하고, 적절한 시간에 과아세트산으로 상기 포스포네이트를 계내에서 포스페이트로 산화시켰다. 상기 반응 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 벤질-보호된 포스페이트를 제공하였다. 60 psi에서 H_2 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 상기 벤질-보호된 포스페이트를 촉매적 환원시킴으로써 에탄올 내에서 상기 보호 벤질기의 제거 과정을 수행하여 모노포스페이트 화합물을 수득하였다.

<146> 도 16에 있어서, 유사한 반응 개요를 이용하였다. 단, 글리시달 브로마이드를 알콜(ROH)과 반응시키는 대신에, BnOH를 사용하여 C3 부위를 보호하였다. 반응 조건으로서는 K_2CO_3 로 처리한 후, 암모늄 염 $C_6H_5CH_2N^+(C_2H_5)_3Cl^-$ 로 처리함으로써, 상기 브로마이드를 Bn 기로 치환시켰다. 그 다음, 무수 BnOH 및 에테르 중의 1M HCl로 처리한 후, 상기 글리시달 중간체의 고리를 개방시켜, C1 위치를 보호하였다. 생성된 디-에테르 중간체는 C2 위치에 하이드록실기를 갖는다. 상기 디-에테르를 수성 K_2CO_3 중의 할라이드 염(RX)과 혼합하여, C2 위치에 에테르 결합을 통하여 부착된 R 기를 갖는 보호된 중간체를 수득하였다. 60 psi에서 H_2 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 촉매적 환원시킴으로써 상기 중간체를 탈보호시켜 1,3 디올을 수득하였다. 상기 디올을 1H-테트라졸과 배합한 후, 이 교반 혼합물에 디벤질디이소프로필 포스포아미데이트를 첨가하였다. TLC를 통하여 상기 반응 혼합물을 모니터링하고, 적절한 시간에 과아세트산으로 상기 포스포네이트를 계내에서 포스페이트로 산화시켰다. 상기 반응 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 벤질-보호된 포스페이트 화합물을 수득하였다. 60 psi에서 H_2 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 상기 벤질-보호된 포스페이트를 촉매적 환원시킴으로써 에탄올 내에서 상기 보호 벤질기의 제거 과정을 수행하여 1,3-비스포스페이트 화합물을 수득하였다.

<147> 도 6a에 나타낸 바와 같이 제조한 디-에테르 중간체(예, R 및 R^1 치환체 포함)를 사용하여, 토실기의 제거시 C1 부위에 다수의 개질 포스페이트 및 포스포네이트를 부착시킬 수 있다. 도 7a에 도시한 바와 같이, 염기 조건하에서 중간체를 $X^4-Z^1-PO(O-보호기)_2$ (여기에서, Z^1 은 $-(R^3)CH-$ 이고, X^4 는 H임)와 반응시킨다. 상기 염기 조건은 토실레이트 보호기를 제거하여, 개질된 포스페이트- $Z^1-PO(O-보호기)_2$ 가 C1 부위에 단일 결합을 형성하도록 한다. TMSBr로 처리한 후, 상기 보호기를 제거함으로써 C1 부위에 $-(R^3)CH-PO(OH)_2$ 기를 제공한다. 도 7b에 나타낸 바와 같이, $X^4-Z^1-PO(OH)-Z^2-PO(OH)_2$ (여기에서, Z^1 은 $-O-$ 이고, Z^2 는 $-CH_2-$ 이며, X^4 는 H임)를 갖는 트리스(테트라-*n*-부틸암모늄)과 상기 중간체를 염기 조건 하에서 반응시킨다. 상기 염기 조건은 토실레이트 보호기를 제거하여, 개질된 포스포네이트 $-Z^1-PO(OH)-Z^2-PO(OH)_2$ 가 C1 부위에 단일 결합을 형성하도록 한다. 산성 조건 및 CH_3CN 으로의 처리에 의해서, $-O-PO(OH)-CH_2-PO(OH)_2$ 기가 C1 부위에 부착된다. 도 7c에 나타낸 바와 같이, 상기 중간체를 $X^4-Z^1-PO(O-보호기)_2$ (여기에서, Z^1 은 $-OCH_2CH_2-$ 이고, X^4 는 H임)와 염기 조건 하에서 반응시킨다. 상기 염기 조건은 토실레이트 보호기를 제거하여, 개질된 포스페이트 $-Z^1-PO(O-보호기)_2$ 가 C1 부위에 단일 결합을 형성하도록 한다. 콜리딘 중의 TMSBr 및 물 세척액으로 처리한 후, 상기 보호기를 제거함으로써 C1 부위에

-OCH₂CH₂-PO(OH)₂ 기를 제공하였다.

- <148> 화학식(III)의 배좌 제한된 사이클릭-포스페이트 화합물을 제조하기 위하여, 도 11에 도시된 합성 개요에서 출발물질로 화합물 **26-30**을 사용하였다. 화합물 **26-30**을 1H-테트라졸과 반응시키고, 그 생성물을 디-*tert*-부틸 디이소프로필포스포아미데이트로 처리하여 분자내 고리화 반응을 유발시켰다. 계내에서 상기 포스포네이트를 과아세트산으로 산화시켜 사이클릭 포스페이트 중간체를 수득하였다. TFA로 환원시켜 화학식(III)의 화합물을 수득하였다.
- <149> 기타 배좌 제한된 화합물도 제조할 수 있다.
- <150> 도 12에 도시한 바와 같이, X¹과 X²가 함께 -O-PO(OH)-O-인 사이클릭 포스페이트를 제조하기 위한 대안적 개요를 나타낸다. 벤질-보호된 1,3 디올 중간체를 POCl₃과 반응시켜 분자내 고리화 반응을 초래한다. (전술한 바와 같이) H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 처리하여 C2 탄소에 결합된 하이드록실기를 포함하는 사이클릭 포스페이트를 제공한다. 그 다음, 상기 사이클릭 중간체를 과량의 R-트리플레이트 및 2,6-디-*tert*-부틸-4-메틸피리딘으로 처리하여 최종 화합물을 수득한다.
- <151> 도 13에 도시한 바와 같이, X¹과 X³이 함께 -O-PO(OH)-NH-인 사이클릭 포스페이트를 제조하기 위한 개요를 나타낸다. 출발물질로서 전술한 바와 같이 제조한 중간체 **35-43**을 사용하여, 그들을 트리스(1,2,4-트리아졸)포스페이트로 처리한 후, 2 % HCl 세척액으로 처리하여 분자내 고리화 반응을 초래한다.
- <152> 도 14에 도시한 바와 같이, 포스페이트기가 고리의 일부가 아닌, 구체적으로, X²와 X³이 함께 -N(H)-C(O)-N(R¹)-인 사이클릭 화합물을 제조하기 위한 개요를 나타낸다. 출발물질로서 전술한 바와 같이 제조한 중간체 **50-54**를 사용하고, 그들을 무수 COCl₂로 처리하여, 고리화 반응 중에 C2 및 C3 탄소에 결합된 아민들 사이에 카보닐을 삽입시킨다. (전술한 바와 같이) H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 상기 포스페이트로부터 벤질 보호기를 제거한다.
- <153> LPA 수용체의 아고니스트 또는 안타고니스트로서 사용할 수 있는 기타 화합물 부류는 지방산 포스페이트 또는 직쇄 포스페이트이다. 도 8에 도시한 바와 같이, 무수 n-알칸올 및 1H-테트라졸을 무수 메틸렌 클로라이드에 용해시킬 수 있다. 무수 메틸렌 클로라이드 중의 디벤질-N,N-디이소프로필 포스포아미다이트의 용액을 첨가할 수 있다. 이어서, 무수 메틸렌 클로라이드 중의 과아세트산을 적가하여 벤질-보호된 지방산 포스페이트 **101-105**를 얻을 수 있다. (전술한 바와 같이) H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 무수 메탄올 중에서 처리한 후, 상기 벤질-보호기를 제거하여 지방산 포스페이트 **106-110**을 제공한다.
- <154> 지방산 포스페이트를 제조하기 위한 대안적 방법으로서, 티오포스페이트 및 아미도포스페이트를 또한 제조할 수 있다. 도 9에 도시한 바와 같이, 예를 들어, n-머캅토알칸 및 1H-테트라졸을 무수 메틸렌 클로라이드에 용해시킬 수 있다. 무수 메틸렌 클로라이드 중의 디벤질-N,N-디이소프로필 포스포아미다이트의 용액을 첨가할 수 있다. 이어서, 무수 메틸렌 클로라이드 중의 과아세트산을 적가하여 벤질-보호된 지방산 티오포스페이트를 얻을 수 있다. (전술한 바와 같이) H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 무수 메탄올 중에서 처리한 후, 상기 벤질-보호기를 제거하여 지방산 티오포스페이트를 제공한다. 도 10에 도시한 바와 같이, 예를 들어, n-알킬아민 및 1H-테트라졸을 무수 메틸렌 클로라이드에 용해시킬 수 있다. 무수 메틸렌 클로라이드 중의 디벤질-N,N-디이소프로필 포스포아미다이트의 용액을 첨가할 수 있다. 이어서, 무수 메틸렌 클로라이드 중의 과아세트산을 적가하여 벤질-보호된 지방산 아미도포스페이트를 얻을 수 있다. (전술한 바와 같이) H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 무수 메탄올 중에서 처리한 후, 상기 벤질-보호기를 제거하여 지방산 아미도포스페이트를 제공한다.
- <155> 도 17 내지 20에 도시한 바와 같이 1차 아민기를 공격함에 의해서 전술한 반응 개요 각각을 추가로 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 화합물 **50-54**로부터 중간체를 제조하는데, 화합물 **50-54**를 TFA로 처리함으로써 t-Boc 보호기를 제거하여, 보호된 포스페이트를 이탈시키면서 C2 부위에 1차 아민을 제공한다.
- <156> 도 17에 있어서, C2 위치에 1차 아민을 보유하는 중간체 화합물을 산 할라이드(예, R¹COCl)로 공격하여, 상기 1차 아민을 아미드(-N(H)-C(O)-R¹)로 전환시킨다. 그 다음, (전술한 바와 같이) H₂ 대기 하에서 활성탄 상의 10

% 팔라듐(Pd/C)을 사용하여 벤질-보호된 포스페이트를 탈보호시킬 수 있다.

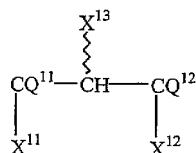
<157> 도 18에 있어서, C2 위치에 1차 아민을 보유하는 중간체 화합물을 POCl_3 중의 N-아세틸 이미다졸린으로 공격하여, 상기 1차 아민을 2차 아민(-N(H)-이미다졸)으로 전환시킨다. 전환된 이미다졸린을 사용할 수도 있다. 그 다음, (전술한 바와 같이) H_2 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 처리하여 벤질-보호된 포스페이트를 탈보호시킬 수 있다.

<158> 도 19에 있어서, C2 위치에 1차 아민을 보유하는 중간체 화합물을 $\text{R}^1\text{OC(O)Cl}$ 로 공격하여, 상기 1차 아민을 카바메이트(-N(H)-C(O)-O-R¹)로 전환시킨다. 그 다음, (전술한 바와 같이) H_2 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 처리하여 벤질-보호된 포스페이트를 탈보호시킬 수 있다.

<159> 도 20에 있어서, C2 위치에 1차 아민을 보유하는 중간체 화합물을 R^1NCO 또는 R^1NCS 로 공격하여, 상기 1차 아민을 우라미드(-N(H)-C(O)-N(H)-R¹) 또는 티오우라미드(-N(H)-C(S)-N(H)-R¹)로 전환시킨다. 그 다음, (전술한 바와 같이) H_2 대기 하에서 활성탄 상의 10 % 팔라듐(Pd/C)으로 처리하여 벤질-보호된 포스페이트를 탈보호시킬 수 있다.

<160> 따라서, 본 발명의 비-사이클릭 화합물은 $(\text{Y}^2\text{O})_2\text{PO}-\text{Z}^{11}-\text{Z}^{13}$ 또는 $(\text{Y}^2\text{O})_2\text{PO}-\text{Z}^{12}-\text{P(OH)O}-\text{Z}^{11}-\text{Z}^{13}$ [여기에서, Z^{11} 은 $-(\text{CH}_2)_m-$ 또는 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m-$ (여기에서, m 은 1 내지 50의 정수임), $-\text{C}(\text{R}^3)\text{H}-$ 또는 $-\text{O}-$ 이고; Z^{12} 는 $-(\text{CH}_2)_n-$ 또는 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ (여기에서, n 은 1 내지 50의 정수임) 또는 $-\text{O}-$ 이며; Z^{13} 은 H 또는 제1 이탈기이거나, $-\text{Z}^{11}-\text{Z}^{13}$ 이 함께 제1 이탈기를 형성하고; Y^2 는 H 또는 보호기임]을 화학식(VI)의 중간체 화합물과 반응시키고, 경우에 따라, 탈보호함으로써 제조할 수 있는데, 여기에서, 상기 반응 단계 및 탈보호 단계는 X^1 , X^2 및 X^3 중 하나 또는 둘이 $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^{11}-$ 또는 $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^{12}-\text{P(OH)O}-\text{Z}^{11}-$ (여기에서, Z^{11} 및 Z^{12} 는 전술한 바와 같이 정의됨)인 화학식(I)의 화합물을 제공하기에 효과적인 조건 하에서 수행한다.

<161> 화학식(VI)의 중간체 화합물은 다음과 같은 구조를 갖는다.



(VI)

<162> 상기 식에서,

<163> X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중 하나 이상은 $\text{R}^{11}-\text{Y}^{11}-\text{A}$ -이고, X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중의 둘이 $\text{R}^{11}-\text{Y}^{11}-\text{A}$ -인 경우에 각각은 동일하거나 상이하며, 또는 X^{12} 및 X^{13} 이 $-\text{N(H)-C(O)-N(R}^{11})-$ 로 함께 연결되고;

<164> X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중 하나 이상은 OH, NH_2 , SH 또는 제2 이탈기이며;

<165> 임의로, X^{11} , X^{12} 및 X^{13} 중 하나는 H 이고;

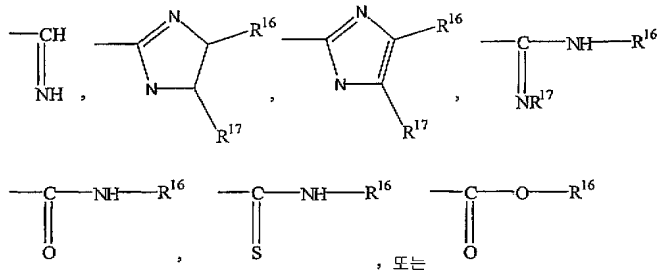
<166> A는 직접 결합, $(\text{CH}_2)_k$ (여기에서, k 는 0 내지 30의 정수임) 또는 0 이며;

<167> Y^{11} 은 $-(\text{CH}_2)_l-$ (여기에서, l 은 1 내지 30의 정수임), $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}-$ 또는 $-\text{NR}^{12}-$ 이고;

<168> Q^1 및 Q^2 는 독립적으로 H_2 , $=\text{NR}^{13}$, $=\text{O}$, 또는 H 및 $-\text{NR}^{14}$ R^{15} 의 조합이며;

<169> X^{11} , X^{12} 또는 X^{13} 각각에 있어서의 R^{11} 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지

쇄 C2 내지 C30 알케닐, 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체가 있거나 없는 방향족 또는 헤테로방향족 고리, C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬,



이고;

<171> R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} 및 R^{17} 은 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬, 직쇄 또는 분지쇄 C2 내지 C30 알케닐, 고리의 모노-, 디- 또는 트리-치환체가 있거나 없는 방향족 또는 헤테로방향족 고리, C1 내지 C30 알킬 또는 방향족 또는 헤테로방향족 고리를 포함하는 아실, 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴알킬, 또는 직쇄 또는 분지쇄 C1 내지 C30 알킬을 포함하는 아릴옥시알킬이다.

<172> 본 발명의 LPA 수용체 아고니스트와 안타고니스트를 제조하면, 그러한 화합물들은 후술하는 환자들의 치료에 적합한 약학 조성물의 제조에 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양상은 약학적 허용 담체와 본 발명 화합물을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 이 약학 조성물은 또한 적절한 부형제, 또는 안정화제를 포함할 수 있으며, 정제, 캡슐, 분말, 용액, 현탁액, 또는 에멀전과 같은 고체 또는 액체 형태일 수 있다. 일반적으로, 이 조성물은 약 0.01 내지 99%, 바람직하게는 약 20 내지 75%의 활성 화합물과 함께 담체, 부형제, 안정화제 등을 포함할 것이다.

<173> 고체 단위 투여 형태는 통상적인 형태일 수 있다. 고체 형태는 본 발명의 화합물과 담체, 예를 들어 율활제 및 락토스, 슈크로스, 또는 옥수수 전분과 같은 불활성 충전제를 함유하는 통상의 젤라틴 타입과 같은 캡슐일 수 있다. 다른 구체예에서, 이들 화합물들은, 아카시아, 옥수수전분, 또는 젤라틴과 같은 결합제, 옥수수전분, 감자 전분, 또는 알긴산과 같은 붕해제, 및 스테아르산 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 율활제와 함께 락토스, 슈크로스, 또는 옥수수전분과 같은 통상의 정제 기제를 이용하여 정제화된다.

<174> 본 발명 화합물은 또한 약학적 담체와 함께 생리학적 허용 부형제 중의 이들 물질의 용액 또는 현탁액에 의해 주사형 또는 국소-적용형 투여형태로 투여될 수 있다. 그러한 담체는 계면 활성제를 첨가하거나 첨가하지 않은 물과 오일같은 멸균 액체 및 아유반트, 부형제 또는 안정화제를 포함한 약학적 및 생리학적 허용 담체를 포함한다. 오일의 예로는 페트롤륨유, 동물유, 식물유, 또는 합성유, 예를 들어 땅콩유, 대두유, 또는 광유를 들 수 있다. 일반적으로, 물, 식염수, 수성 텍스트로스 및 관련 당용액, 및 글리콜(예, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜)이 바람직한 액체 담체이며, 특히 주사용 용액에 적합하다.

<175> 에어로졸로 사용하는 경우, 용액 또는 현탁액중의 본 발명 화합물은 적절한 추진제(예, 프로판, 부탄 또는 이소부탄과 같은 탄화수소 추진제)와 통상의 아유반트와 함께 가압된 에어로졸 용기내에 팩킹될 수 있다. 또한 본 발명의 물질은 분무기 또는 분사기와 같은 비가압 형태로 투여될 수 있다.

<176> 원하는 치료에 따라, 본 발명 화합물은 경구, 국소, 경피, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 비강내 점적, 동내, 또는 방광내 점적, 안구내, 동맥내, 병변내, 또는 점막(예, 코 점막, 목 점막 및 기관지 관 점막)에의 도포로 투여될 수 있다.

<177> 본 발명 범위내의 조성물은 본 발명 화합물이 그 의도하는 목적을 이루는데 효과적인 양으로 함유된 모든 조성물을 포함한다. 각자의 필요에 따라, 각 성분의 유효량의 적정 범위의 결정은 당업계의 기술 범위내이다. 일반적인 투여량은 약 0.01~약 100mg/kg체중을 포함한다. 바람직한 투여량은 약 0.1~약 100mg/kg체중을 포함한다. 가장 바람직한 투여량은 약 1~약 100mg/kg체중을 포함한다. 본 발명 화합물의 투여를 위한 치료 섭생법은 또한 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

<178> 본 발명의 일부 화합물은 LPA 수용체의 아고니스트로 유용한 것으로 밝혀진 한편, 본 발명의 다른 화합물은 LPA 수용체의 안타고니스트로 유용한 것으로 밝혀졌다. 그들의 활성 차이때문에, 다양한 화합물들이 다른 용도를 갖는다. 본 발명의 바람직한 동물 환자는 포유류, 즉, 포유류강에 속하는 개체이다. 본 발명은 특히 사람 환자의 치료에 유용하다.

- <179> 본 발명의 한 가지 양상은 LPA 수용체 활성을 조절하는 방법에 관한 것으로서, LPA 수용체 아고니스트 또는 LPA 수용체 안타고니스트로서의 활성을 갖는 본 발명 화합물을 제공하는 단계 및 LPA 수용체를 LPA 수용체 활성을 조절하기에 효과적인 조건하에서 본 발명 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- <180> LPA 수용체는 정상적으로 LPA 수용체를 발현하거나 또는 특정 LPA 수용체를 발현하도록 형질전환된 세포상에 존재한다. 적절한 LPA 수용체는 제한없이 EDG-2, EDG-4, EDG-7, 및 PSP-24 수용체를 포함한다. 정상적으로 이들 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 조직은 상기 표 1에 나타난다. 세포를 본 발명의 LPA 수용체 아고니스트 또는 LPA 수용체 안타고니스트와 접촉시킬 때, 접촉은 세포가 생체외 또는 생체내에 있는 동안 수행될 수 있다.
- <181> 정상적으로는 이들 수용체를 발현하지 않는 숙주 세포에서 이들 수용체를 이종성으로 발현시키기 위해, 그러한 수용체 하나 이상을 암호하는 핵산 분자를, 적절한 전사 및 번역 조절 영역(즉, 프로모터 및 전사 종결 시그널)을 포함하는 발현 벡터내로 센스 방향으로 삽입하고, 이어서 숙주 세포를 이 발현 벡터로 형질전환시킬 수 있다. 발현 벡터는 세포 게놈내로 통합될 수도 있고, 또는 염색체외 핵 물질로 존재할 수도 있다. 발현은 구성형이거나 유도성일 수 있으며, 구성형 발현이 대부분의 목적에 부합된다.
- <182> EDG-2의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 공지이며 An et al.(1997b)에서 보고되었으며, Genbank 기탁 번호 제 U80811호이며, 본원에 참고로 통합된다. EDG-2 암호 핵산 분자는 하기하는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는다:
- <183> atggctgcc a tctctacttc catccctgta atttcacagc ccagttcac agccatgaat 60
- <184> gaaccacagt gcttctacaa cgagtcatt gccttctttt ataaccgaag tggaaagcat 120
- <185> ctgtccacag aatggaacac agtcagcaag ctggtgatgg gacttggaat cactgtttgt 180
- <186> atcttcatca tgttggccaa cctattggtc atggtggcaa tctatgtcaa ccgccgcttc 240
- <187> cattttecta ttattacct aatggcta atctgctctg cagacttctt tgctgggttg 300
- <188> gcctacttct atctcatgtt caacacagga cccaatactc ggagactgac tgttagcaca 360
- <189> tggctcctgc gtcagggcct cattgacacc agcctgacgg catctgtggc caacttactg 420
- <190> gctattgcaa tcgagaggca cattacggtt ttccgcatgc agtccacac acgcatgagc 480
- <191> aaccggoggg tagtggtggt catttgtgtc atctggacta tggccatcgt tatgggtgct 540
- <192> ataccgatg tgggctggaa ctgtatctgt gatattgaaa attgttcaa catggcaccc 600
- <193> ctctacagt actcttactt agtcttcttg gccattttca acttgggtgac ctttgttgta 660
- <194> atggtggttc tctatgctca catctttggc tatgttcgcc agaggactat gagaatgtct 720
- <195> cggcatagtt ctggaccccg gcggaatcgg gataccatga tgagtcttct gaagactgtg 780
- <196> gtcattgtgc ttggggcctt tatcatctgc tggactcctg gattggtttt gttacttcta 840
- <197> gacgtgtgct gtccacagtg cgacgtgctg gcctgtgaga aattcttctt tctccttgct 900
- <198> gaattcaact ctgcatgaa ccccatcatt tactctacc gcgacaaaga aatgagcgcc 960
- <199> acctttagc agatcctctg ctgccagcgc agtgagaacc ccaccggccc cacagaaagc 1020
- <200> tcagaccgct cggttctct cctcaaccac accatcttgg ctggagtcca cagcaatgac 1080
- <201> cactctgtgg ttttag 1095
- <202> 암호된 EDG-2 수용체는 하기하는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는다:
- <203> MAAISTSIPV ISQPQFTAMN EPQCFYNESI AFFYNRSGKH LATEWNTVSK LVMGLGITVC 60
- <204> IFIMLANLLV MVAIYVNR RFHEPIYYLMAN LAAADFFAGL AYFYLMFNTG PNTRRLTVSY 120
- <205> WLLRQGLIDT SLTASVANLL AIAIERHITV FRMLHTRMS NRRVVVVIVV IWTMAIVMGA 180
- <206> IPSVGWNCIC DIENCSNMAP LYSDSYLVFW AIFNLVTFVV MVVLYAHIFG YVRQRTMRMS 240

- <207> RHSSGPRNR DTMSLLKTV VIVLGAFIIC WTPGLVLLLL DVCCPQCDVL AYEKFFLLLA 300
- <208> EFNSAMNPII YSYRDKEMSA TERQILCCQR SENPTGPTES SDRSASSLNH TILAGVHSND 360
- <209> HSVV 364
- <210> EDG-4를 위한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 공지이며 An et al.(1998b)에서 보고되었으며, Genbank 기탁 번호 제NM_004720호이며, 본원에 참고로 통합된다. EDG-4 암호 핵산 분자는 하기와 같은 서열 번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:
- <211> atgggtcatca tgggccagtgc ctactacaac gagaccatcg gcttcttcta taacaacagt 60
- <212> ggcaaagagc tcagctccca ctggcggccc aaggatgtgg tcgtggtggc actggggctg 120
- <213> accgtcagcg tgcgtgtgct gctgaccaat ctgctggtca tagcagccat cgcctccaac 180
- <214> cgccgcttcc accagcccat ctactacctg ctgggcaatc tggccgcggc tgacctcttc 240
- <215> gcgggcgctgg cctacctctt cctcatgttc cactactggc cccgcacagc ccgactttca 300
- <216> cttaggggct gggtcctgcg gcagggttg ctggacacaa gcctcactgc gtcggtggcc 360
- <217> aactgctgg ccatcgccgt ggagcggcac cgcagtgtga tggccgtgca gctgcacage 420
- <218> cgctgcccc gtggcgcgt ggatcatgtc attgtggcg tgtgggtggc tgccctgggc 480
- <219> ctggggctgc tgctgcccc ctctggcac tgctctgtg ccctggaccg ctgctcacgc 540
- <220> atggcacccc tgctcagccg ctctgtttg gccgtctggg ctctgtcgcg cctgcttgc 600
- <221> ttctctgca tgggtgctgt gtacaccgc attttcttct acgtcggcg gcgagtgcag 660
- <222> cgcattggc agcatgtcag ctgccacccc cgtaccgag agaccacgt cagcctggc 720
- <223> aagactgttg tcatcatcct gggggcgctt gtggtctgct ggacaccagg ccagggtgta 780
- <224> ctgctcctgg atggtttagg ctgtgagtcc tgcaatgtcc tggctgtaga aaagtacttc 840
- <225> ctactgttgg ccgaggccaa ctactggc aatgctgctg tgtactcttg ccgagatgct 900
- <226> gagatgcgc gcaccttccg ccgcottctc tctgtcgcg gcctccgca gtccaccgc 960
- <227> gactctgtcc actatacatc ctctgccag ggaggtgcca gactcgcat catgcttccc 1020
- <228> gagaacggcc acccactgat ggactccacc ctttag 1056
- <229> 암호된 EDG-4 수용체는 하기하는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 갖는다:
- <230> MVIMGQCYYN ETIGFFYNNS GKELSSHWRP KDVVVALGL TVSVLVLLTN LLVIAAIASN 60
- <231> RRFHQPIYYL LGNLAAADLF AGVAYLFLMF HTGPRTARLS LEGWFLRQGL LDTSLTASVA 120
- <232> TLLATAVERH RSVMAVQLHS RLPRGRVVML IVGVVVAALG LGLLPAHSHW CLCALDRCR 180
- <233> MAPLLSRSYL AVMALSSLLV FLLMVAVYTR IFFYVRRRVQ RMAEHVSCHP RYRETTLSLV 240
- <234> KTVVVIIGAF VVCWTQGVV LLDGLGCES CNLAVEKYF LLLAEANSLV NAAVYSCRDA 300
- <235> EMRRTERRLL CCACLRQSTR ESVHYTSSAQ GGASTRIMLP ENGHPLMDST L 351
- <236> EDG-7을 위한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 공지이며 Bandoh et al.(1999)에서 보고되었으며, Genbank 기탁 번호 제NM_012152호이며, 본원에 참고로 통합된다. EDG-7 암호 핵산 분자는 하기와 같은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:
- <237> atgaatgagt gtcactatag caagcacatg gacttttttt ataataggag caacactgat 60

<238> actgtcgatg actggacagg aacaaagcitt gtgattgttt tgtgtgttgg gacgtttttc 120
 <239> tgcctgttta ttttttttc taattctctg gtcacgcgg cagtgatcaa aaacagaaaa 180
 <240> tttcatttcc ctttctacta cctgttggct aatttagctg ctgccgattt cttcgtctga 240
 <241> attgcctatg tattcctgat gtttaacaca ggcccagttt caaaaacttt gactgtcaac 300
 <242> cgctggtttc tccgtcaggg gcttctggac agtagcttga ctgcttcctt caccaacttg 360
 <243> ctggttatcg ccgtggagag gcacatgtca atcatgagga tgcgggtcca tagcaacctg 420
 <244> accaaaaaga ggggtgacct gctcgttttg cttgtctggg ccatcgccat ttttatgggg 480
 <245> gcggtcccca cactgggctg gaattgcctc tgcaacatct ctgcctgctc ttccttgccc 540
 <246> cccatttaca gcaggagtta ctttgttttc tggacagtgt ccaacctcat ggccttcctc 600
 <247> atcatggttg tgggtgtacct gcggatctac gtgtacgtca agaggaaaac caacgtcttg 660
 <248> tctccgata caagtgggtc catcagccgc cggaggacac ccatgaagct aatgaagacg 720
 <249> gtgatgactg tcttaggggc gtttgtggta tgcctggacc cgggcctggt ggttctgctc 780
 <250> ctcgacggcc tgaactgcag gcagtgtggc gtgcagcatg tgaaaagggt gttcctgctg 840
 <251> ctggcgtgc tcaactcgt cgtgaacccc atcatctact cctacaagga cgaggacatg 900
 <252> tatggacca tgaagaagat gatctgctgc ttctctcagg agaaccaga gaggcgtccc 960
 <253> tctcgcatcc cctccacagt cctcagcagg agtgacacag gcagccagta catagaggat 1020
 <254> agtattagcc aaggtgcagt ctgcaataaa agcacttcct aa 1062

<255> 암호된 EDG-7 수용체는 하기하는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 갖는다:

<256> MNECHYDKHM DFFYNRSNTD TVDDWTGTLK VIVLCVGTFE CLFIFFSNL VIAAVIKNRK 60
 <257> FHFPPFYLLA NLAAADFFAG IAYVFLMNT GPVSKTLTVN RWFLRQGLLD SSLTASLTNL 120
 <258> LVIAVERHMS IMRMVHSNL TKKRVTLIL LVWAIAlFMG AVPTLGWNCL CNISACSSLA 180
 <259> PIYSRSLVF WTVSNLMAFL IMVVYLRIY VYVKRKTNL SPHTSGSISR RRTPMKIMKT 240
 <260> VMTVLGAFVV CWTPLVLL LDGLNCRQCG VQHVKRWFL LALLNSVNP IIYSYKDEDM 300
 <261> YGTMKKMICC FSQENPERRP SRIPSTVLSR SDTGSQYIED SISQAVCNK STS 353

<262> PSP-24를 위한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 공지이며 Kawasawa et al.(2000)에서 보고되었으며, Genbank 기탁 번호 제AB030566호이며, 본원에 참고로 통합된다. PSP-24 암호 핵산 분자는 하기와 같은 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다:

<263> atggtcttct cggcagtggt gactgcgttc cataccggga catccaacac aacatttgc 60
 <264> gtgtatgaaa acacctacat gaatattaca ctccctccac cattccagca tcttgacctc 120
 <265> agtccattgc ttagatatag ttttgaaacc atggctccca ctggtttgag ttccttgacc 180
 <266> tgaatagta cagctgtgcc cacaacacca gcagcattta agagcctaaa cttgcctctt 240
 <267> cagatcacc tttctgctat aatgatattc attctgtttg tgtcttttct tgggaacttg 300
 <268> gttgtttgcc tcatggttta ccaaaaagct gccatgaggt ctgcaattaa catectcctt 360
 <269> gccagcctag cttttgcaga catgttgctt gcagtgtga acatgccctt tgcccttgta 420
 <270> actattctta ctaccgatg gatttttggg aaattcttct gtagggtatc tgctatgttt 480

<271> ttctggttat ttgtgataga aggagtagcc atcctgctca tcattagcat agataggttc 540
 <272> cttattatag tccagaggca ggataagcta aacccatata gagctaaggt tctgattgca 600
 <273> gtttcttggg caacttcctt ttgtgtagct ttctctttag ccgtaggaaa ccccgacctg 660
 <274> cagatacctt cccgagctcc ccagigtgtg ttgggtaca caaccaatcc aggctaccag 720
 <275> acttaigtga ttttgatttc tctcatttct ttcttcatac ccttcctggg aatactgtac 780
 <276> tcatttatgg gcatactcaa cacccttcgg cacaatgcct tgaggatcca tagctaccct 840
 <277> gaaggtatat gcctcagcca ggccagcaaa ctgggtctca tgagtctgca gagacctttc 900
 <278> cagatgagca ttgacatggg ctttaaaaca cgtgccttca ccactatttt gattctcttt 960
 <279> gctgtcttca ttgtctgctg ggccccattc accacttaca gccttgtggc aacattcagt 1020
 <280> aagcactttt actatcagca caactttttt gagattagca cctggctact gtggctctgc 1080
 <281> tactcaagt ctgcattgaa tccgctgac tactactgga ggattaagaa attccatgat 1140
 <282> gcttgctgg acatgatgcc taagtccttc aagtttttgc cgcagctccc tggtcacaca 1200
 <283> aagcgacgga tacgtcctag tgctgtctat gtgtgtgggg aacatcgac ggtggtgtga 1260

<284> 암호된 PSP-24 수용체는 하기하는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는다:
 <285> MVFSAVLTAH HTGTSNTTFV VYENTYMNIT LPPPFQHPDL SPLLRYSFET MAPTGLSSLT 60
 <286> VNSTAVPTTP AAFKSLNLPL QITLSAIMIF ILFVSFLGNL VVCLMVYQKA AMRSAINILL 120
 <287> ASLAFADMLL AVLNMPFALV TILTTRWIFG KFFCRVSAMF FWLFVIEGVA ILLIISIDRF 180
 <288> LIIVQRQDKL NPYRAKVLIA VSWATSFCVA FPLAVGNPDL QIPSRAPQCV FGYYTNPGAQ 240
 <289> AYVILISLIS FFIPFLVILY SFGILNLTIR HNALRIHSYP EGICLSQASK LGLMSLQRPF 300
 <290> QMSIDMGFKT RAFTTILILF AVFIVCWAPF TTYSLVATFS KHFFYYQHNFF EISTWLLWIC 360
 <291> YLKSALNPLI YYWRIKKFHD ACLDMMPKSF KFLPQLPGHT KRRIRPSAVY VCGEHRITV 419

<292> LPA 수용체 아고니스트는 LPA 수용체로부터 LPA-유사 활성을 유도할 것이며, 이는 화학적으로, 예를 들어 난모 세포에서의 Ca^{2+} 또는 Cl^{-} 전류, 또는 세포 형태, 이동성, 증식 등의 변화 관찰에 의해 측정될 수 있다. 대조적으로, LPA 수용체 안타고니스트는 LPA 수용체로부터 LPA-유사 활성을 차단할 것이다. 이 또한 화학적으로 예를 들어 난모 세포에서의 Ca^{2+} 또는 Cl^{-} 전류, 또는 세포 형태, 이동성, 증식 등의 변화 관찰에 의해 측정될 수 있다.

<293> LPA 수용체 안타고니스트로 작용하는 본 발명 화합물에 의해, 본 발명은 또한 LPA 수용체에 대한 LPA 유도된 활성을 억제하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 LPA 수용체 안타고니스트로서의 활성을 갖는 본 발명 화합물을 제공하고, LPA 수용체의 LPA-유도된 활성을 저해하기에 효과적인 조건하에서 이 화합물을 LPA 수용체와 접촉시키는 것을 포함한다. LPA 수용체는 상기에서 정의한 대로일 수 있다. LPA 수용체는 수용체를 정상적으로 발현하거나 수용체를 이중성으로 발현하는 세포상에 존재한다. LPA 수용체를 본 발명 화합물과 접촉시키는 것은 생체 외 또는 생체 내에서 수행될 수 있다.

<294> 전술한 대로, LPA는 전술한 LPA 수용체를 포함한 LPA 수용체를 통한 시그널링에 관련된 많은 다른 세포 경로에 관련된 시그널링 분자이다. 따라서, 본 발명 화합물은 LPA 수용체 안타고니스트 또는 LPA 수용체 아고니스트로 작용함으로써 세포 행동에 대한 LPA의 효과를 조절할 것이다.

<295> 본 발명의 한 가지 양상은 암 치료 방법에 관한 것으로서, 본 발명 화합물을 제공하고 이 화합물의 유효량을 암 치료에 효과적인 방식으로 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명 화합물로 치료될 수 있는 암의 유형은 그

행동이 적어도 부분적으로 LPA-매개 활성화에 기인하는 암 세포에 의해 특징지어지는 암을 포함한다. 일반적으로, 이러한 유형의 암은 LPA 수용체의 하나 이상의 유형을 발현하는 암세포에 의해 특징지어진다. 암의 예시적인 형태는 제한 없이 전립선 암과 난소 암을 포함한다.

<296> 암 치료에 특히 유용한 본 발명 화합물은 LPA 수용체 안타고니스트이다.

<297> 본 발명 화합물을 투여할 때, 이들은 전신성으로 투여될 수 있고, 또는 다르게는 암 세포가 존재하는 특정 부위에 직접 투여될 수 있다. 따라서, 투여는 화합물을 암세포에 전달하는 데 효과적인 임의 방식으로 이루어질 수 있다. 이론에 얽매임 없이, LPA 수용체 안타고니스트는 LPA 수용체에 결합시 암세포의 증식 또는 전이를 저해할 것이며, 그렇지 않으면 이들 암세포를 파괴할 것이다. 실시예 12에서 나타난 것처럼, 본 발명의 몇몇 LPA 안타고니스트 화합물들은 전술한 유형의 하나 이상의 LPA 수용체를 발현하는 전립선 암 세포주에 대해 세포독성이었다.

<298> 본 발명의 LPA 안타고니스트 화합물 또는 약학 조성물이 암 치료를 위해 투여될 때, 이 약학 조성물은 또한 다양한 유형의 암 치료를 위해 현재 알려지거나 이후에 개발될 치료제 또는 치료 섭생법을 포함하거나 병행하여 투여될 수 있다.

<299> 암 침입은 개별적인 세포 또는 세포 집단이 일차 종양으로부터 떨어지고 전신성 순환계 또는 림프계에 도달하여 다른 기관으로 번지는 복잡한 다단계 과정이다(Liotta et al.,1987). 이 과정동안, 종양 세포는 모세 혈관에서 멈추고, 혈관의 유출되고, 조직의 기질내로 이동하여 이차 병소를 만든다. 먼저, 종양 세포는 순환계로부터 그들을 정지시키는 내피 세포상의 시그널을 인식해야 한다. 두 번째, 종양 세포는 세포 표면 라미닌 수용체를 통해 기저막 글리코단백질 라미닌에 부착해야 한다. 기저막에의 부착에 이어, 종양 세포는 프로테아제를 분비하여 기저막을 분해한다. 부착 및 국소적 단백질 분해에 이어, 침입의 세 번째 단계는 종양 세포 이동이다. 세포 이동성은 종양 세포 침입 및 전이에서 중심적인 역할을 한다. 동물 실험에서 생체외에서의 종양 세포의 이동성과 전이적 행동 사이의 관계는 강한 직접적 관련성을 나타낸다(Hoffman-Wellenhof et al.,1995). PLGFs가 증식을 촉진하고 생체외에서 암세포의 침입을 증가시키는 잘 알려진 사실이다. Imamura와 그 동료들은 암 세포가 그들의 침입을 위해 혈청 인자를 필요로 함을 확립하였다(Imamura et al.,1991). 그리고 그 후 무혈청 시스템에서 종양 세포 침입을 완전히 회복할 수 있는 가장 중요한 혈청 성분으로 LPA를 확인하였다(Xu et al.,1995a;Imamura et al.,1993;Mukai et al.,1993).

<300> PLGFR이 난소 암 세포주, 즉, OCC1과 HEY 세포에서 발현됨이 밝혀졌다. 구체적으로, RT-PCR 분석은 이들 세포주에서 EDG-2와 EDG-7 수용체의 존재를 보여준다. 최근에, Im et al.(2000)은 EDG-7이 전립선 암 세포주, 즉, PC-3와 LNCaP 세포에서 발현됨을 보여주었다. 전립선 암 세포주 DU-145, PC-3 및 LNCaP 주에 대한 RT-PCR 분석은 EDG-2,4,5 및 EDG-7이 모든 세 전립선 암 세포주에 존재하는 반면, EDG-3은 LNCaP와 DU-145 전립선 암 세포주에 존재함을 보여주었다.

<301> 실시예에 나타난 것처럼, 본 발명의 몇몇 LPA 수용체 안타고니스트는 특정 전립선 암 세포주와 특정 난소 암 세포주를 표적화할 수 있다. 따라서, 본 발명의 LPA 안타고니스트는 전립선 암과 난소 암을 포함한 LPA-매개 암의 치료를 위한 대체 접근법을 제공한다.

<302> 본 발명의 다른 양상은 세포 증식을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 세포 증식을 증진하는 이 방법은 LPA 수용체의 아고니스트로서의 활성을 갖는 본 발명 화합물을 제공하고, 세포의 LPA 수용체-유도된 증식을 증진하기에 효과적인 방식으로 화합물을 세포 상의 LPA 수용체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

<303> LPA가 암 세포 활성을 조절하는 데서 하는 역할에 더하여, LPA가 또한 자연 상처 치료에서 생리학적 역할을 가짐을 제안하는 강한 증거가 있다. 상처 부위에서, 활성화 혈소판에서 유래된 LPA는 다른 혈소판-유래 인자들과 함께 적어도 부분적으로, 상처 부위에서의 세포 증식과 염증을 자극하는 것으로 생각된다(Balaz et al.,2000). 더욱이, LPA 스스로 혈소판 응집을 자극하며, 이는 다시 초기 응집성 반응으로의 양성 피드백 인자를 개시하는 인자일 수 있다(Schumacher et al.,1979;Tokumura et al.,1981;Gerrard et al.,1979;Simon et al.,1982).

<304> 세포 증식에서의 LPA 의 역할에 의해, LPA 수용체 아고니스트 활성을 갖는 화합물은 상처 치유를 촉진하기에 효과적인 방식으로 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양상은 상처를 치료하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 LPA 수용체의 아고니스트로서의 활성을 갖는 본 발명 화합물을 제공하고 유효량의 화합물을 상처 부위에 전달하며, 여기서 화합물은 상처 치유를 촉진하는 세포상의 LPA 수용체에 결합하고, 따라서 LPA 수용체 아고니스트-유도된 세포 증식을 자극하여 상처 치료를 촉진함으로써 이루어진다.

<305> 상처 치료에서 일차 목표는 상처 봉합을 이루는 것이다. 개방된 피부 상처는 하나의 주요 부류의 상처를 나타내

며, 화상 상처, 신경성 궤양, 욕창, 정맥 울혈 궤양, 및 당뇨병 궤양을 포함한다. 개방된 피부 상처는 일상적으로 6 가지의 주요 성분을 포함하는 과정에 의해 치유된다: i) 염증, ii) 섬유아세포 증식, iii) 혈관 증식, iv) 연결 조직 합성, v) 상피 세포화, 및 vi) 상처 수축. 상처 치료는 이들 성분이 개별적으로 또는 전체적으로 적절히 기능하지 못할 때 손상된다. 영양 부족, 감염, 약학 제제(예, 액티노마이신과 스테로이드), 당뇨병, 및 노령을 포함한 많은 인자들이 상처 치료에 영향을 줄 수 있다.

<306> 인지질은 세포 분열(Xu et al., 1995b), 어팍토시스, 세포 부착 및 유전자 발현 조절을 포함한 세포 활성의 중요한 조절 인자인 것으로 입증되었다. 구체적으로, 예를 들어 LPA는 세포 증식(Moolenaar, 1996)과 세포 이동(Imamura et al., 1993)에 대해 성장 인자와 유사한 효과를 유발한다. 또한 LPA가 상처 치료와 재생에서 역할을 함이 제안되었다(Tigyi and Mileti, 1992).

<307> 일반적으로, 섬유아세포, 내피 및 상피 세포가 상처내로 더 빨리 유입되도록 하는 제제는 상처가 치료되는 속도를 증가시킨다. 상처 치료에 유용한 본 발명 화합물은 많은 생체외 및 생체내 모델에서 확인되고 시험될 수 있다.

<308> 생체외 시스템은 상처 치료 과정의 다른 성분들, 예를 들어 조직 배양 세포(예, 섬유아세포(Verrier et al., 1986)), 내피 세포(Miyata et al., 1990) 또는 상피 세포(Kartha et al., 1992))의 "상처난" 융합성 단층으로의 세포의 복귀를 보여준다. 다른 시스템은 내피 세포 이동 및/또는 증식의 측정을 허용한다(Muller et al., 1987; Sato et al., 1988).

<309> 상처 치료를 위한 생체내 모델은 또한 당업계에 공지이며, 상처난 돼지 표피(Ohkawara et al., 1977) 또는 햄스터 뺨 낭에서의 약제-유발 구강 점막 병변(Cherrick et al., 1974)을 포함한다.

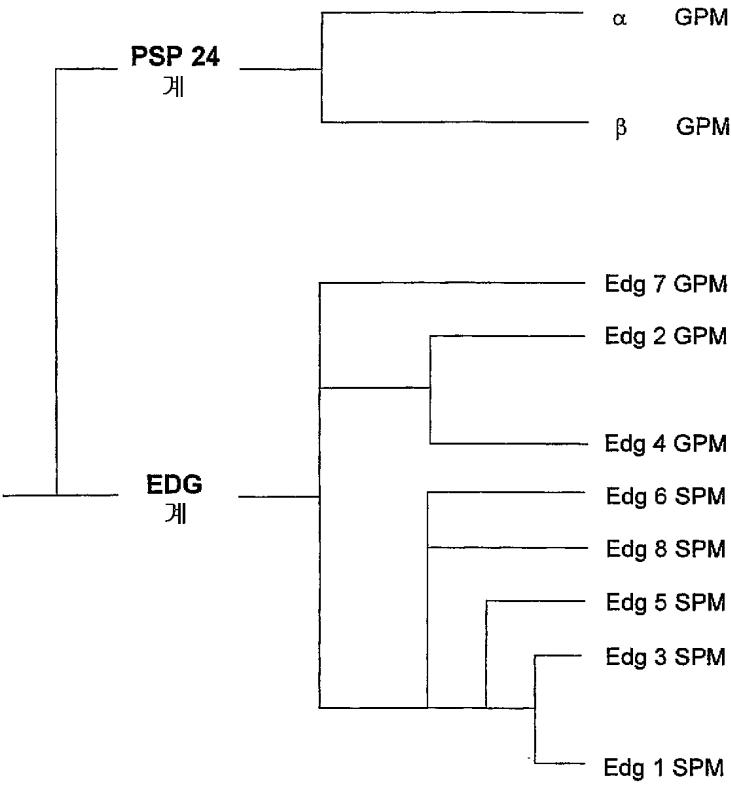
<310> 상처 치료에 효과적인 본 발명 화합물은 또한 본 발명 조성물로 배합하거나 또는 다른 경로를 통하여 동시에, 항균제, 항바이러스제, 항진균제, 항기생충제, 항염증제, 진통제, 항소양제, 또는 이들의 배합물로 이루어지는 군으로부터 선택된 약제와 함께 투여될 수 있다.

<311> 상처 치료를 위해, 바람직한 투여 방식은 국소 경로에 의한 것이다. 하지만, 별법으로, 또는 병행하여, 제제를 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 경피 경로로 투여할 수 있다. 별법으로, 또는 병행하여, 경구 경로로 투여할 수도 있다. 투여되는 투여량은 연령, 건강, 및 수용체의 체중, 만일 있다면 병행되는 치료 종류, 치료 빈도, 및 원하는 효과의 특성에 의존할 것이다.

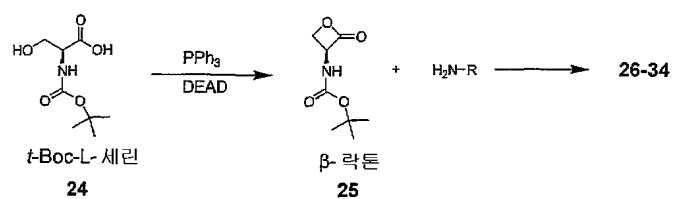
<312> 바람직한 국소 적용을 위해, 상처를 가진 사람과 동물의 치료의 경우 특히, 본 발명의 화합물을 상처 영역, 예를 들어 피부 표면에 유효량 투여하는 것이 바람직하다. 이 양은 일반적으로 한번 도포시 약 0.001mg 내지 약 1g이며, 치료할 영역, 증상의 심각성, 및 이용되는 국소 부형제의 특성에 의존한다. 바람직한 국소 제제는 연고 기재(예, PEG-1000) ml당 약 0.01 내지 약 50mg의 활성 성분이 이용되는 연고이다.

도면

도면1



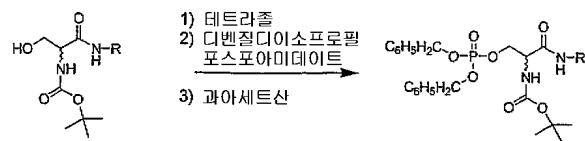
도면2



- 26 R = (CH₂)₉CH₃
 27 R = (CH₂)₁₃CH₃
 28 R = (CH₂)₁₇CH₃
 29 R = p-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 30 R = p-C₆H₄OCH₃
 31 R = m-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 32 R = m-C₆H₄OCH₃
 33 R = o-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 34 R = o-C₆H₄OCH₃

- 35 R = (CH₂)₉CH₃
 36 R = (CH₂)₁₃CH₃
 37 R = (CH₂)₁₇CH₃
 38 R = p-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 39 R = p-C₆H₄OCH₃
 40 R = m-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 41 R = m-C₆H₄OCH₃
 42 R = o-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 43 R = o-C₆H₄OCH₃

도면3



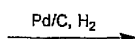
26-30

50-54

- 26 R = (CH₂)₉CH₃
 27 R = (CH₂)₁₃CH₃
 28 R = (CH₂)₁₇CH₃
 29 R = p-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 30 R = p-C₆H₄OCH₃

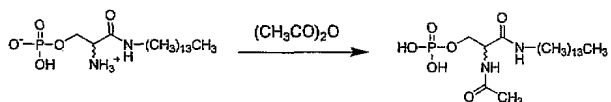
- 50 R = (CH₂)₉CH₃
 51 R = (CH₂)₁₃CH₃
 52 R = (CH₂)₁₇CH₃
 53 R = p-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 54 R = p-C₆H₄OCH₃

50-54



55-59

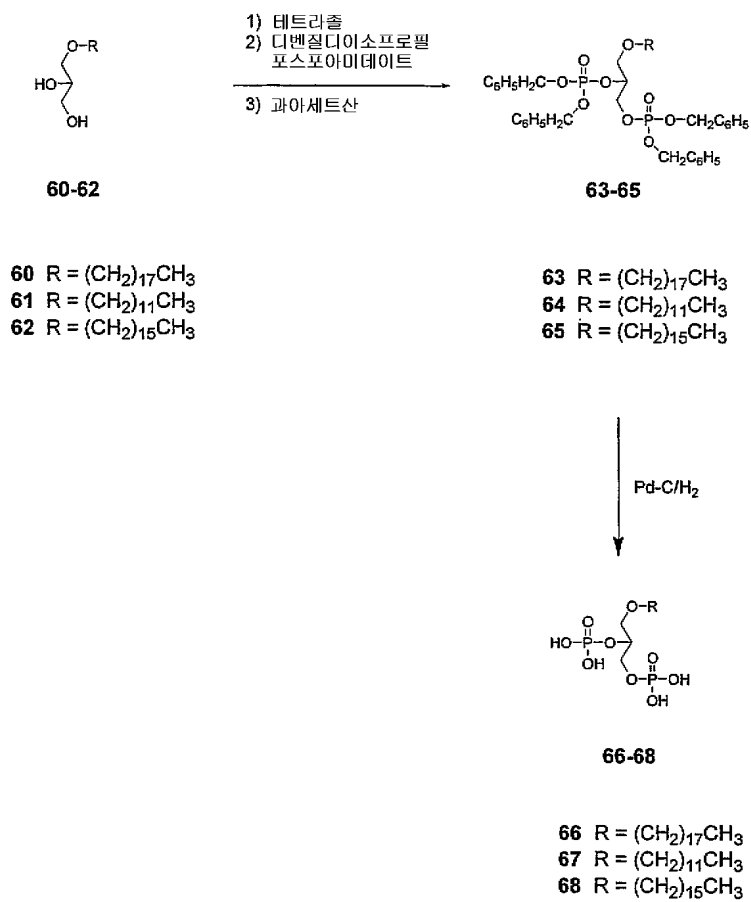
- 55 R = (CH₂)₉CH₃
 56 R = (CH₂)₁₃CH₃
 57 R = (CH₂)₁₇CH₃
 58 R = p-C₆H₄O(CH₂)₁₃CH₃
 59 R = p-C₆H₄OCH₃



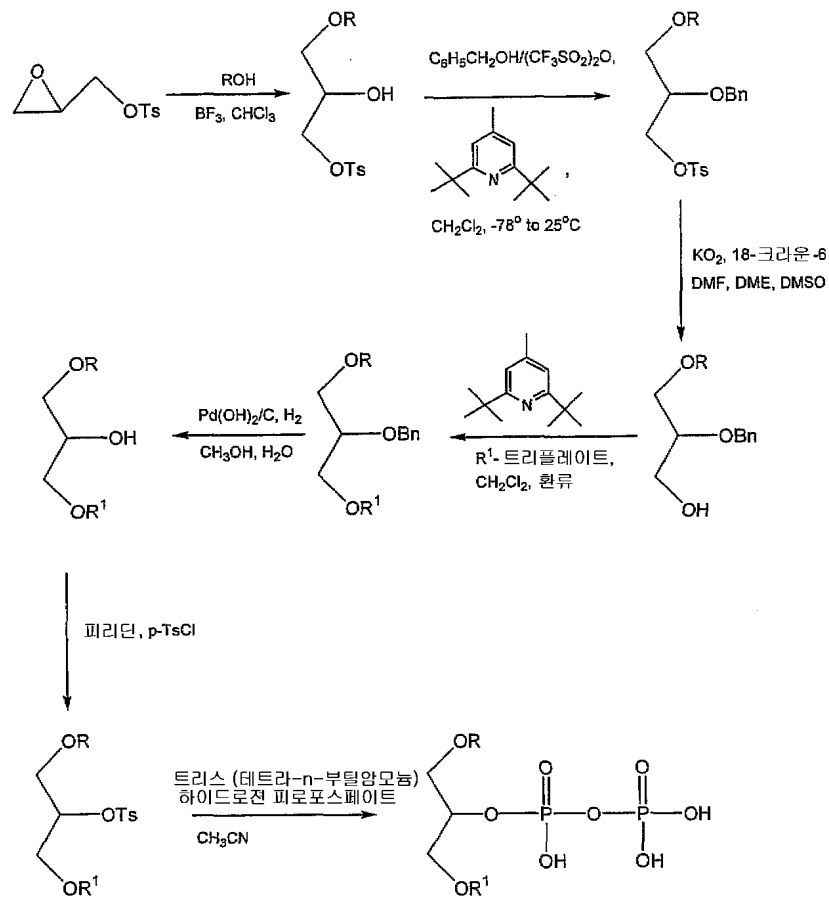
56

56a

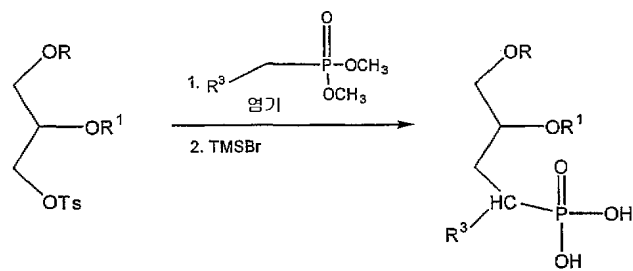
도면4



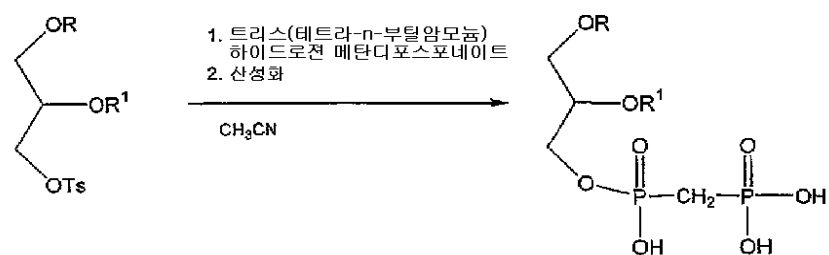
도면6b



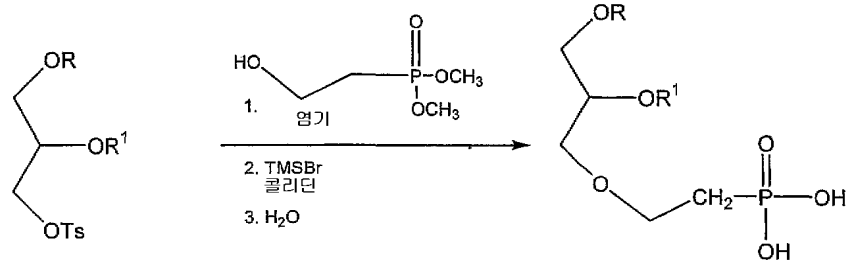
도면7a



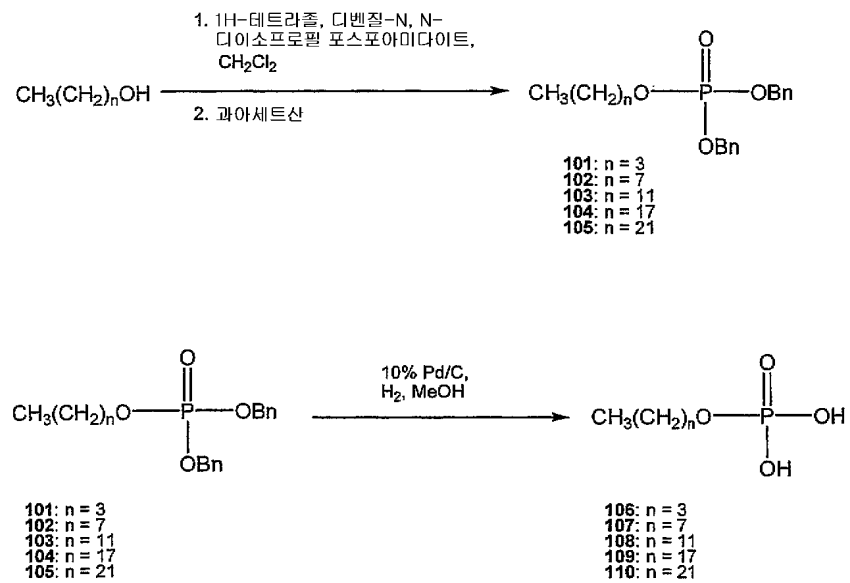
도면7b



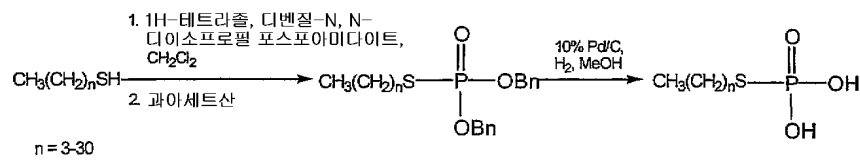
도면7c



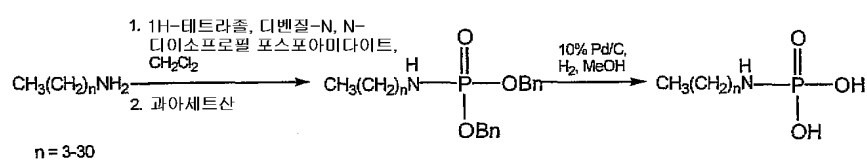
도면8



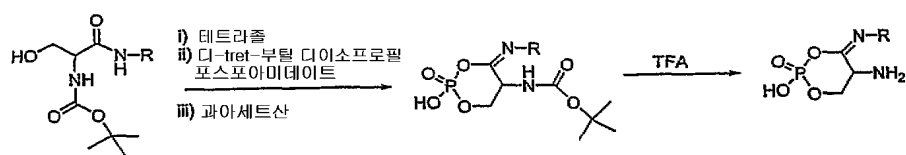
도면9



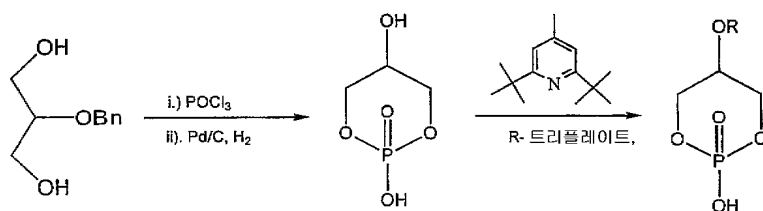
도면10



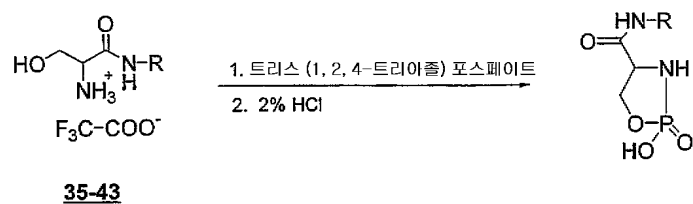
도면11



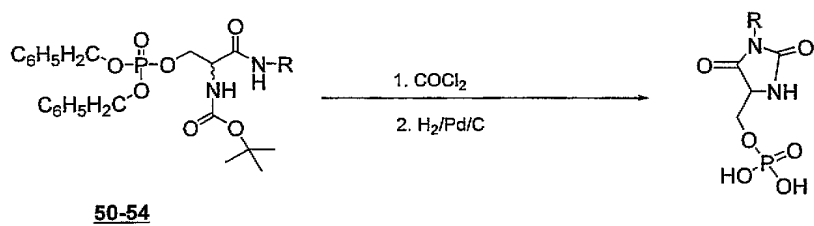
도면12



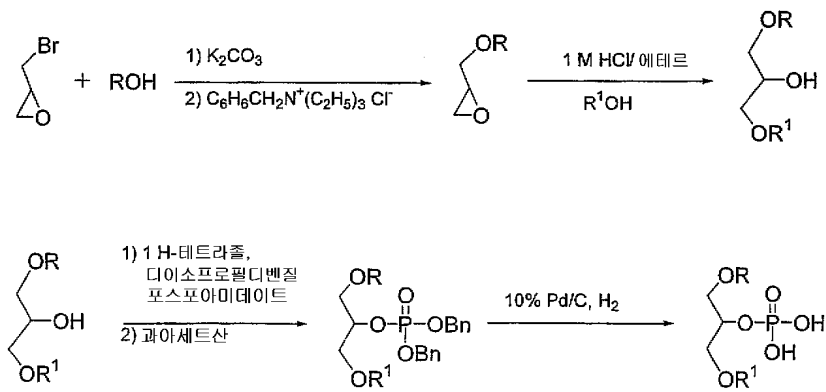
도면13



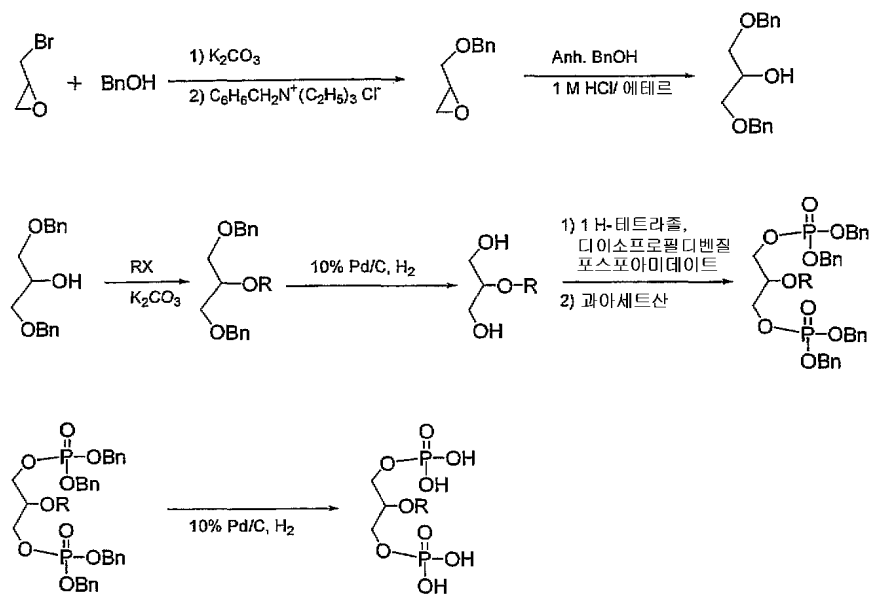
도면14



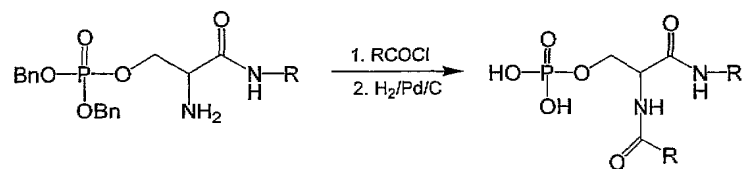
도면15



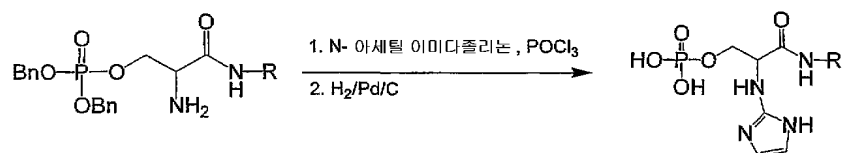
도면16



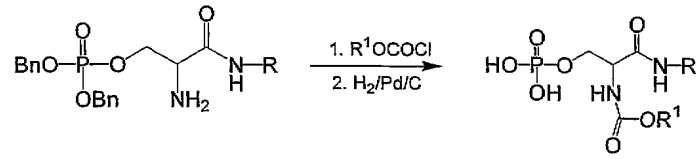
도면17



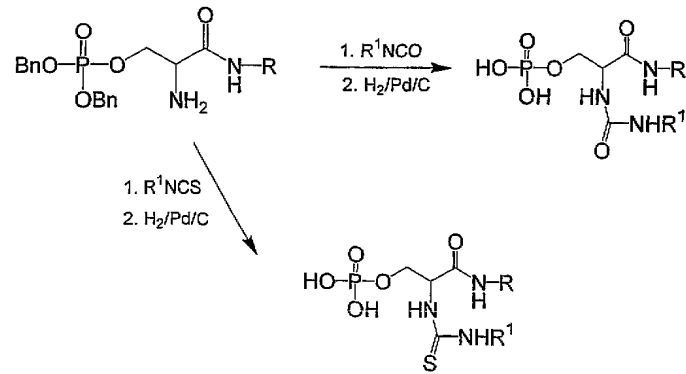
도면18



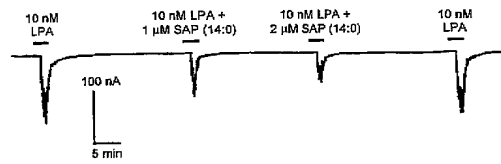
도면19



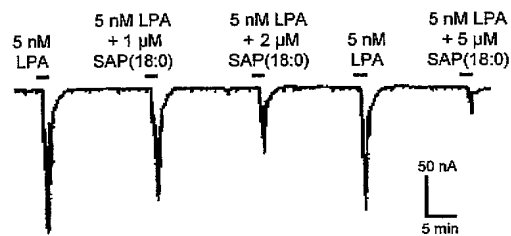
도면20



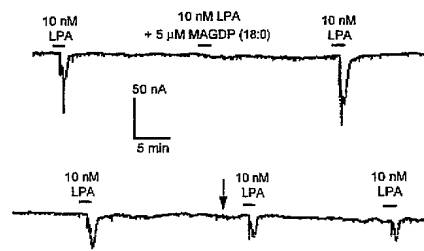
도면21



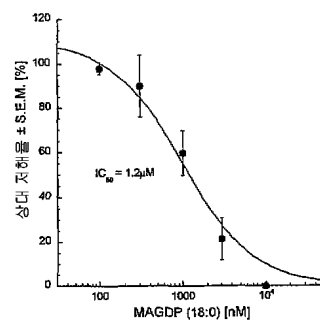
도면22



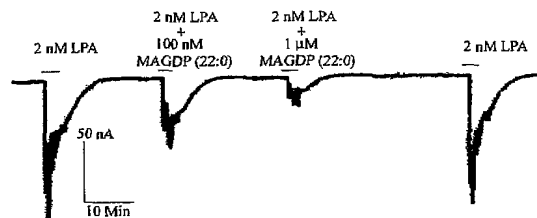
도면23



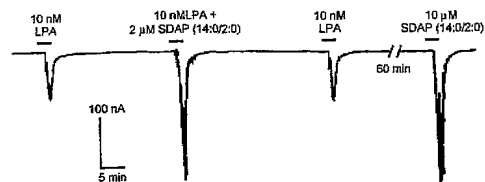
도면24



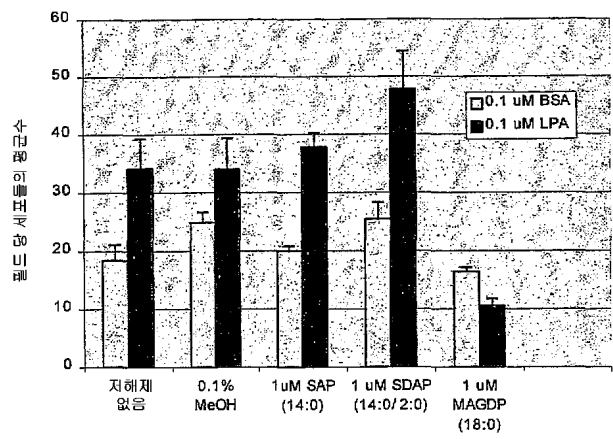
도면25



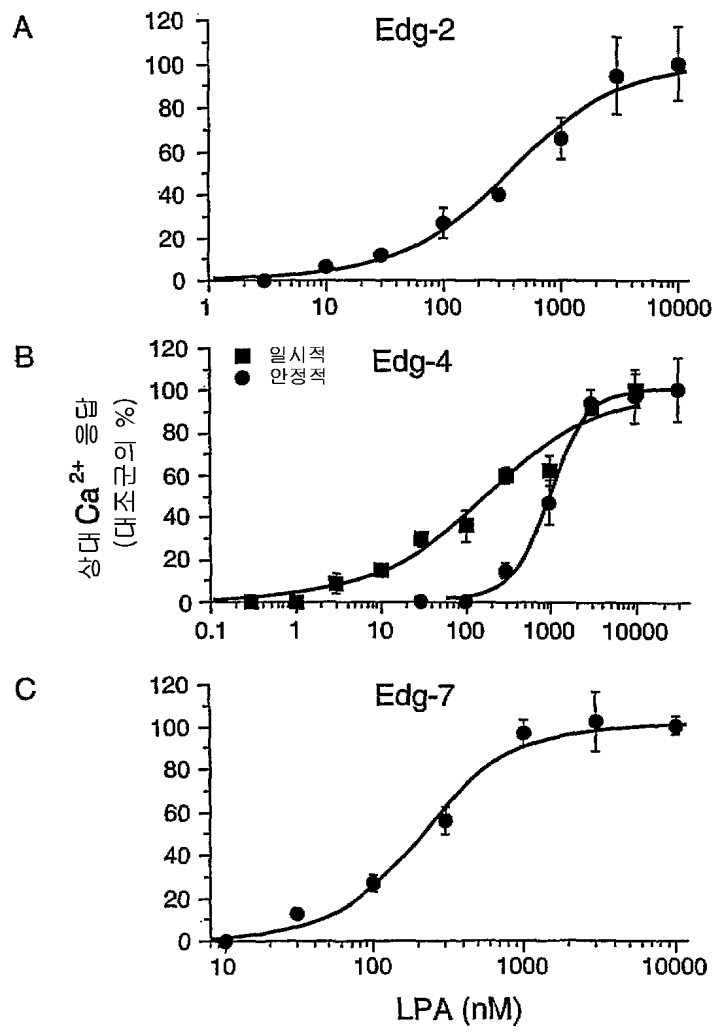
도면26



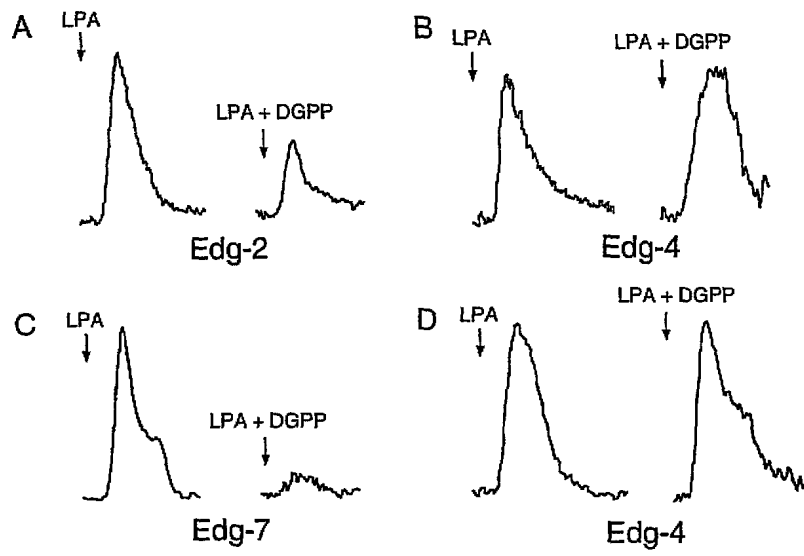
도면27



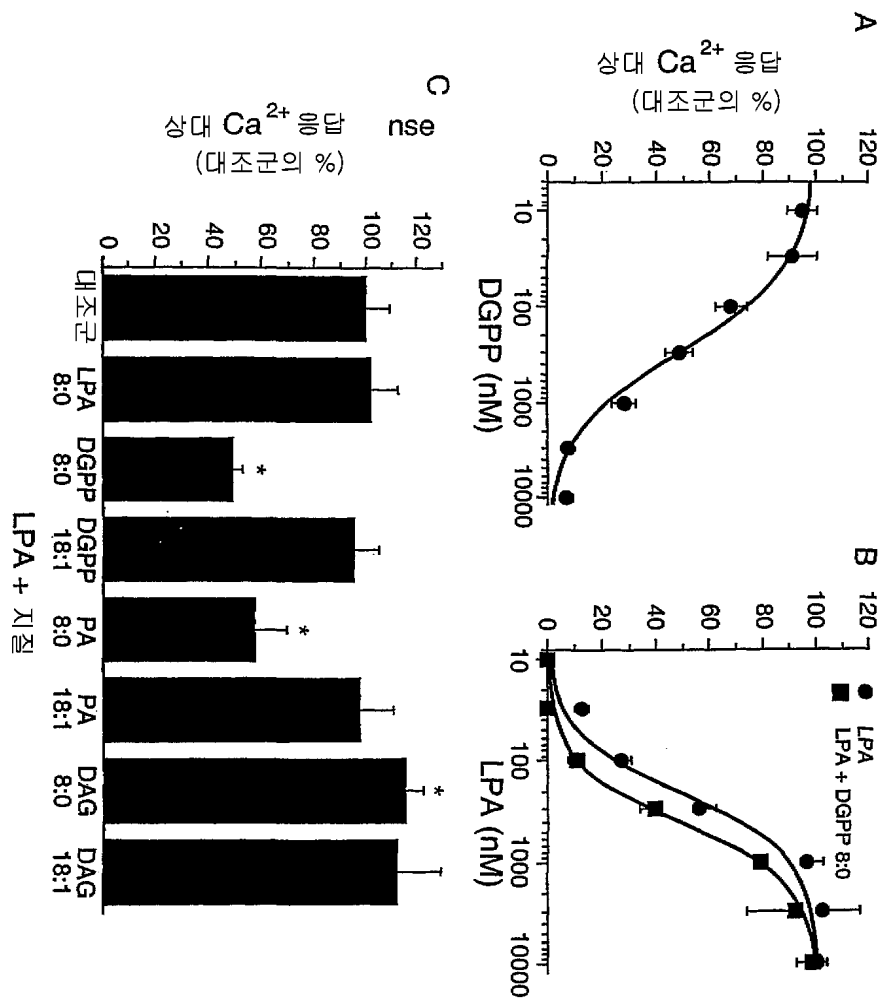
도면28



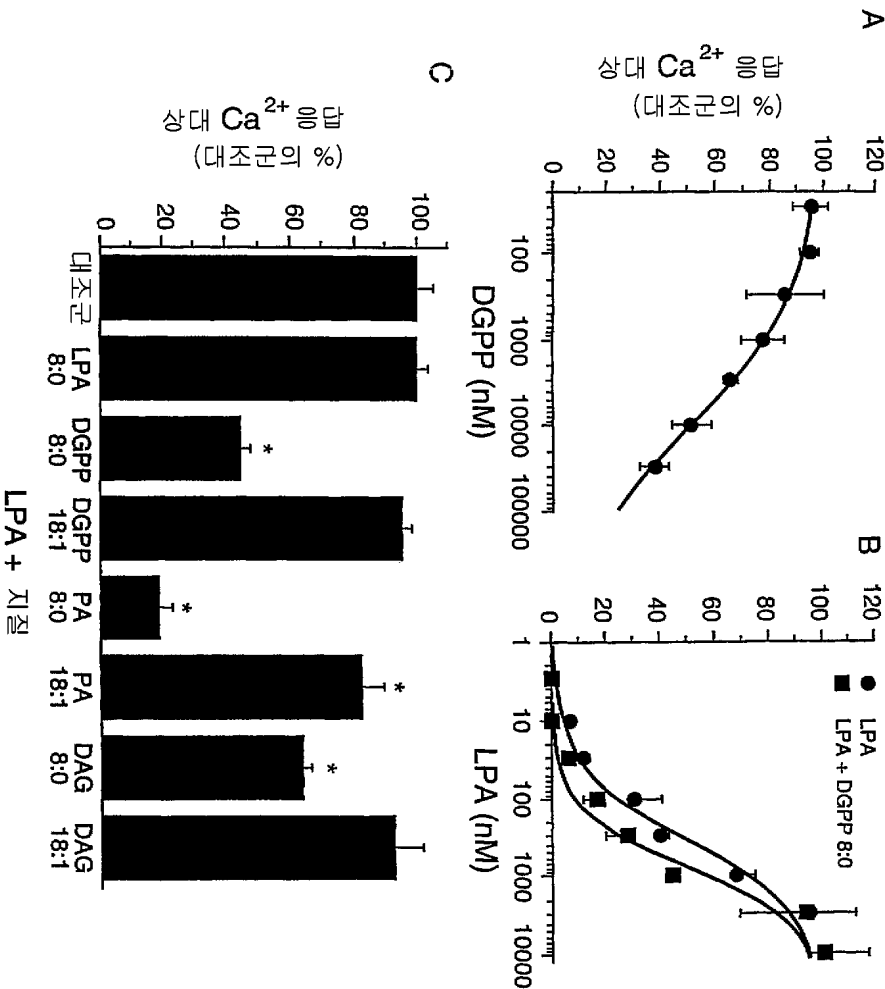
도면29



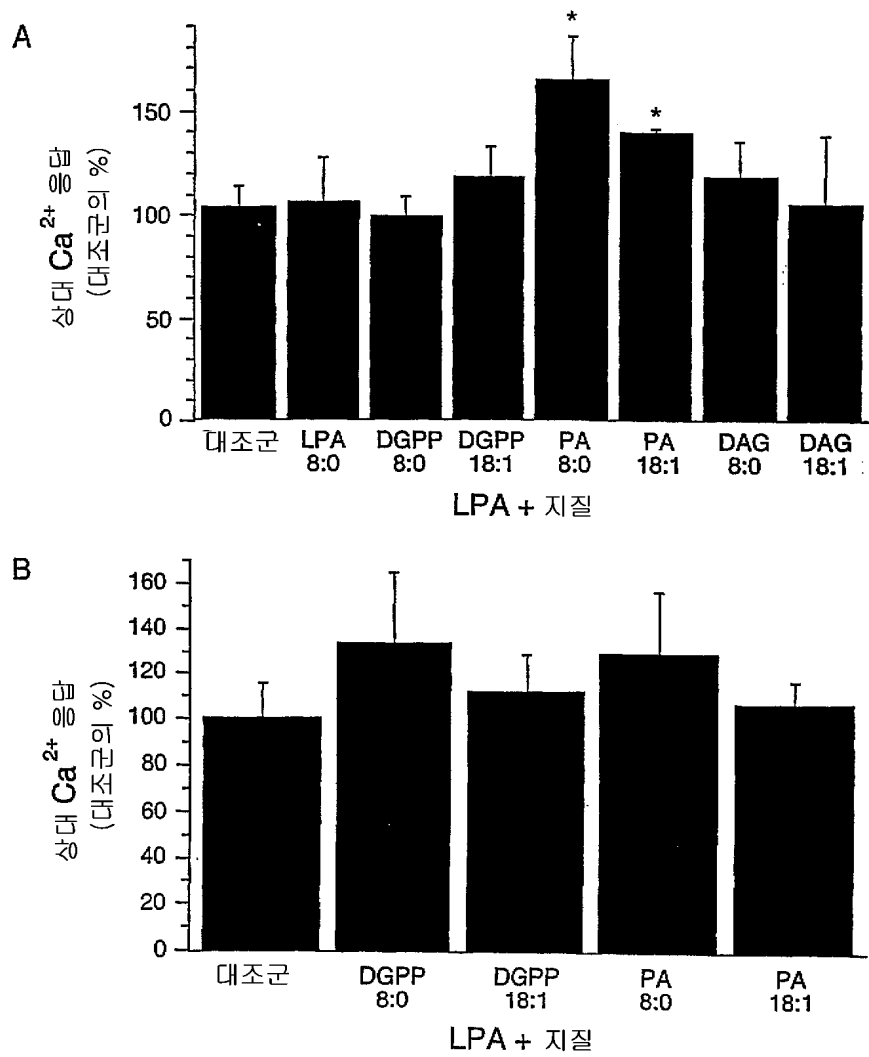
도면30

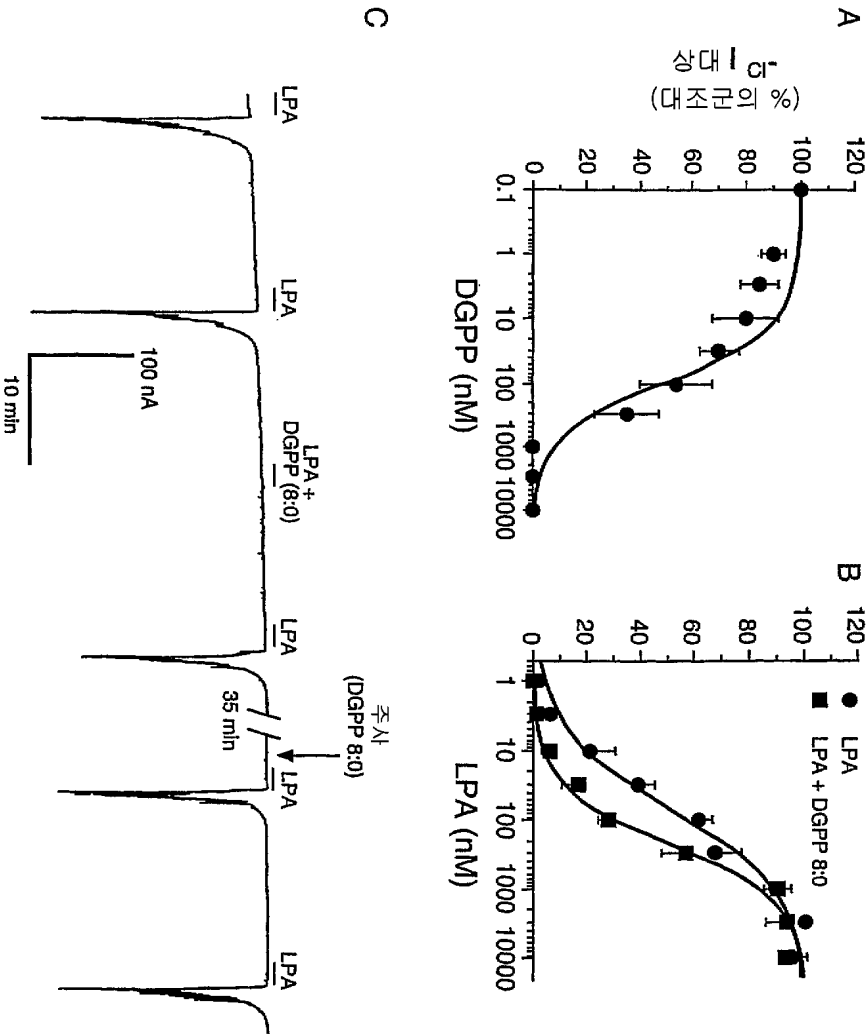


도면31

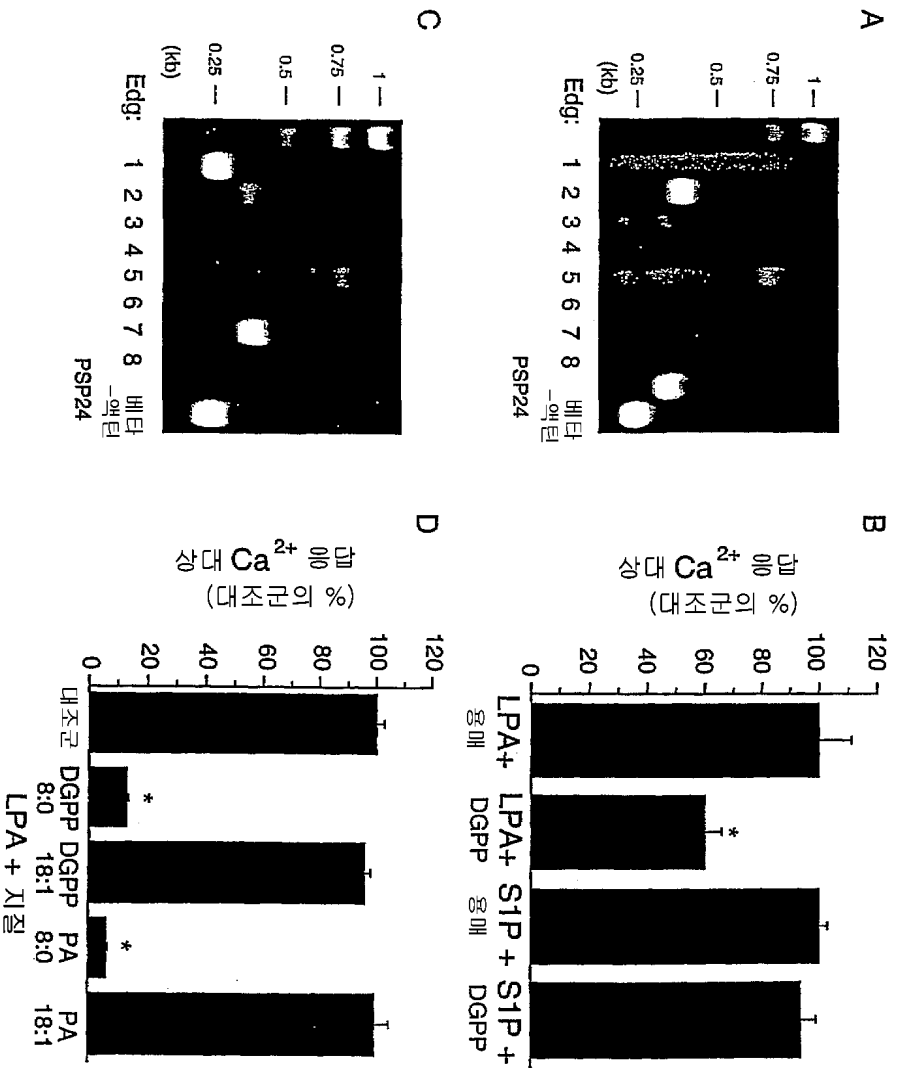


도면32

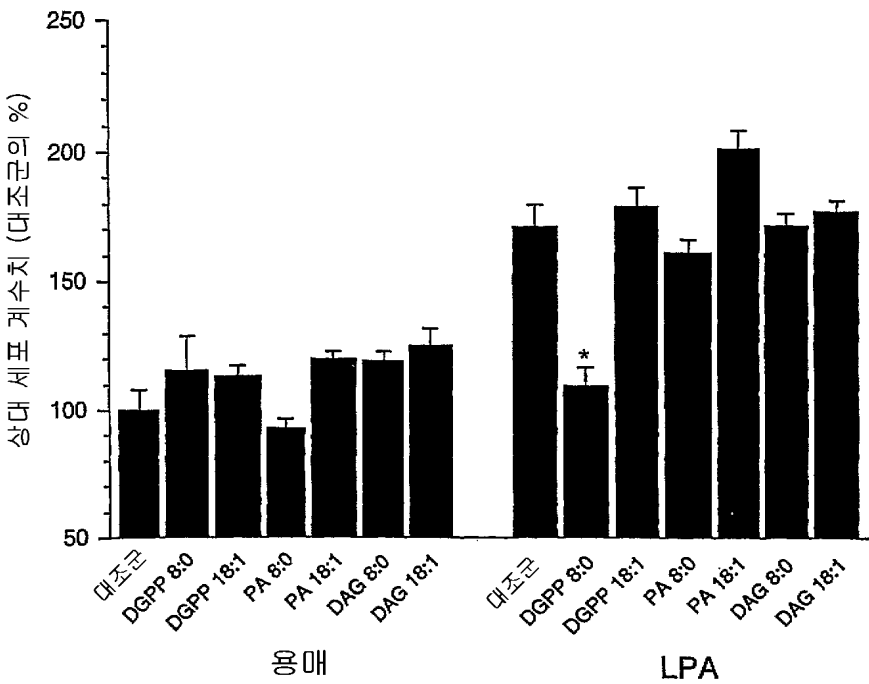




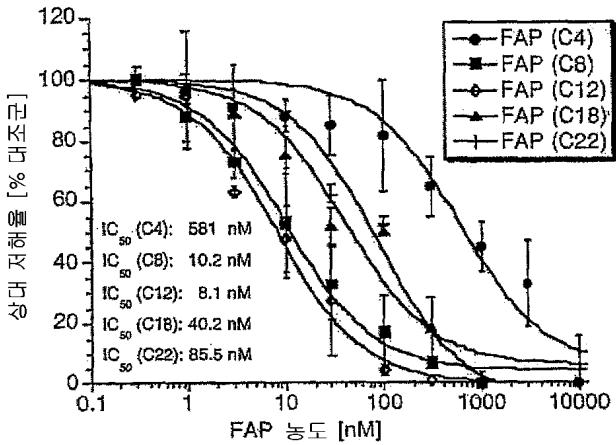
도면34



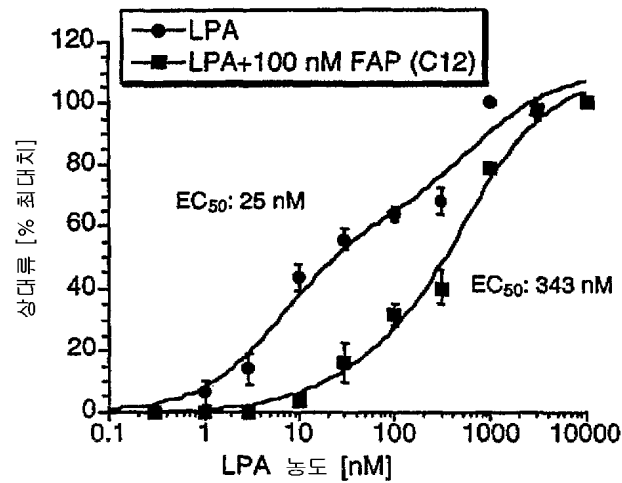
도면35



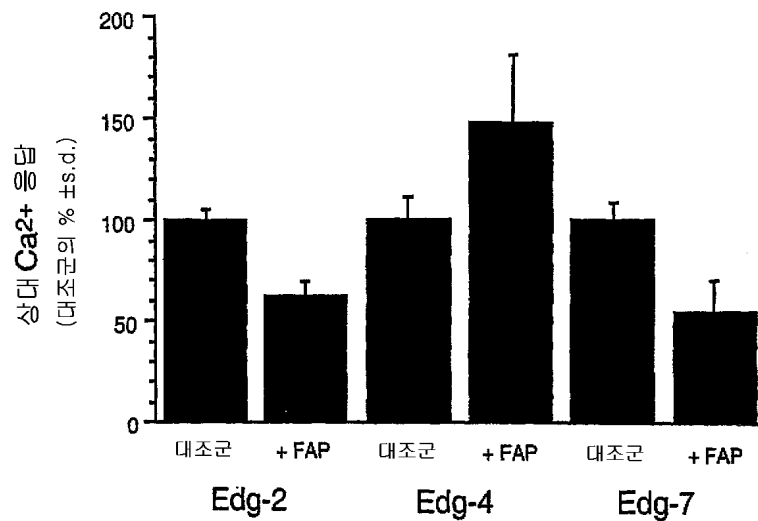
도면36



도면37



도면38



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> The University of Tennessee Research Corporation
- <120> LPA RECEPTOR AGONISTS AND ANTAGONISTS AND METHODS OF USE
- <130> 20609/185
- <140><141>
- <150> 60/190,370
- <151> 2000-03-17
- <160> 26
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1095
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggtgcca tctctacttc cateccgtga atttcacagc cccagttcac agccatgaat 60
gaaccacagt gcttctacaa cgagtcattt gccttctttt ataaccgaag tggaaagcat 120
cttgccacag aatggaacac agtcagcaag ctggtgatgg gacttggaat cactgtttgt 180
atcttcatca tgttggccaa cctattgggtc atggtggcaa tctatgtcaa cgcgcgttc 240
cattttccta tttattacct aatggctaata ctggctgctg
cagacttctt tgctgggttg 300
gcctacttct atctcatgtt caacacagga cccaatactc ggagactgac tgtagcaca 360
tggctcctgc gtcagggcct cattgacacc agcctgacgg catctgtggc caacttactg 420
gctattgcaa tcgagaggca cattacggtt ttccgcatgc agctccacac acggatgagc 480
aacggcgagg tagtgggtgt cattgtgggtc atctggacta tggccatcgt tatgggtgct 540
ataccacagt tgggctggaa ctgtatctgt gatattgaaa attgttcaa catggcaccc 600
ctctacagtg actcttactt agtcttctgg gccattttca acttgggtgac ctttgtgta 660
atggtgggtc tctatgtca catctttggc
tatgttcgcc agaggactat gagaatgtct 720
cggcatagtt ctggacccc gcggaatcgg gataccatga tgagtcttct gaagactgtg 780
gtcattgtgc ttggggcctt tatcatctgc tggactcctg gattggtttt gttacttcta 840
gacgtgtgct gtccacagtg cgacgtgctg gcctatgaga aattcttctt tctccttget 900
gaattcaact ctgcatgaa ccccatcatt tactcctacc gcgacaaaga aatgagcgcc 960
accttaggc agatcctctg ctgccagcgc agtgagaacc ccaccggccc cacagaaagc 1020
tcagaccgct cggcttctc cctcaaccac accatcttgg ctggagttca cagcaatgac 1080
cactctgtgg ttttag 1095

```

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Ala Ile Ser Thr Ser Ile Pro Val Ile Ser Gln Pro Gln Phe
  1             5             10            15
Thr Ala Met Asn Glu Pro Gln Cys Phe Tyr Asn Glu Ser Ile Ala Phe
      20             25            30
Phe Tyr Asn Arg Ser Gly Lys His Leu Ala Thr Glu Trp Asn Thr Val
      35             40            45
Ser Lys Leu Val Met Gly Leu Gly Ile Thr Val
Cys Ile Phe Ile Met
      50             55            60
Leu Ala Asn Leu Leu Val Met Val Ala Ile Tyr Val Asn Arg Arg Phe
      65             70            75            80
His Phe Pro Ile Tyr Tyr Leu Met Ala Asn Leu Ala Ala Asp Phe
      85             90            95
Phe Ala Gly Leu Ala Tyr Phe Tyr Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Asn
      100            105            110
Thr Arg Arg Leu Thr Val
Ser Thr Trp Leu Leu Arg Gln Gly Leu Ile
      115            120            125
Asp Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Asn Leu Leu Ala Ile Ala Ile
      130            135            140
Glu Arg His Ile Thr Val Phe Arg Met Gln Leu His Thr Arg Met Ser
      145            150            155            160
Asn Arg Arg Val Val Val Val Ile Val Val Ile Trp Thr Met Ala Ile
      165            170            175
Val
Met Gly Ala Ile Pro Ser Val Gly Trp Asn Cys Ile Cys Asp Ile
      180            185            190
Glu Asn Cys Ser Asn Met Ala Pro Leu Tyr Ser Asp Ser Tyr Leu Val
      195            200            205

```

Phe Trp Ala Ile Phe Asn Leu Val Thr Phe Val Val Met Val Val Leu
 210 215 220
 Tyr Ala His Ile Phe Gly Tyr Val Arg Gln Arg Thr Met Arg Met Ser
 225 230 235 240

Arg His Ser Ser Gly Pro Arg Arg Asn Arg Asp Thr Met Met Ser Leu
 245 250 255
 Leu Lys Thr Val Val Ile Val Leu Gly Ala Phe Ile Ile Cys Trp Thr
 260 265 270
 Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp
 275 280 285
 Val Leu Ala Tyr Glu Lys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Glu Phe Asn Ser
 290 295 300

Ala Met Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Met Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys Cys Gln Arg Ser Glu Asn Pro Thr Gly
 325 330 335
 Pro Thr Glu Ser Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile
 340 345 350
 Leu Ala Gly Val His Ser Asn Asp His Ser Val Val
 355 360

<210> 3

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggtcatca tgggccagtg ctactacaac gagaccatcg gcttcttcta taacaacagt 60
 ggcaaagagc tcagctccca ctggcgggccc aaggatgtgg tctgtggtggc actggggcgtg 120
 accgtcagcg tgcgtggtct gctgaccaat ctgctggtca tagcagccat cgcctccaac 180
 cgccgcttcc accagcccat ctactacctg ctccggcaatc tggcccgcggc tgacctcttc 240
 gcgggcggtgg cctacctctt cctcatgttc cacactggtc cccgcacagc ccgactttca 300
 cttagagggt ggttctctcg gcagggttg ctggacacaa gcctcactgc
 gtcggtggcc 360
 aactgctgg ccatcgccgt ggagcggcac cgcagtgtga tggccgtgca gctgcacagc 420
 cgcctgcccc gtggccgctt ggtcatgtc attgtgggcg tgtgggtggc tgccctgggc 480
 ctggggctgc tgctgcccc ctcttgccac tgctctgtg ccctggaccg ctgctcacgc 540
 atggcaccac tgcctagccg ctctatttg gccgtctggg ctctgtcgag cctgcttgtc 600
 ttctctgtca tgggtggtgt gtacaccgc attttcttct acgtgcggcg gcgagtgcag 660
 cgcattggcag agcatgtcag ctgccacccc cgctaccgag agaccacgct cagcctggtc 720
 aagactgttg tcatcatcct gggggcggtt gtggtctgct
 ggacaccagg ccaggtggta 780
 ctgctcctgg atggtttagg ctgtgagtcc tgcaatgtcc tggctgtaga aaagtacttc 840
 ctactgttgg ccgaggccaa ctactggtc aatgctgctg tgtactcttg ccgagatgct 900
 gagatgcgcc gcaccttccg ccgccttctc tgctgcgcgt gcctccgcca gtccaccgc 960
 gagtctgtcc actatacatc ctctgccag ggaggtgcca gcactcgcat catgcttccc 1020
 gagaacggcc acccactgat ggactccacc cttag 1056

<210> 4

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Val Ile Met Gly Gln Cys Tyr Tyr Asn Glu
 Thr Ile Gly Phe Phe
 1 5 10 15
 Tyr Asn Asn Ser Gly Lys Glu Leu Ser Ser His Trp Arg Pro Lys Asp

20 25 30
 Val Val Val Val Ala Leu Gly Leu Thr Val Ser Val Leu Val Leu Leu
 35 40 45
 Thr Asn Leu Leu Val Ile Ala Ala Ile Ala Ser Asn Arg Arg Phe His
 50 55 60
 Gln Pro Ile Tyr Tyr Leu
 Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Phe
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Ala Tyr Leu Phe Leu Met Phe His Thr Gly Pro Arg Thr
 85 90 95
 Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gly Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp
 100 105 110
 Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Thr Leu Leu Ala Ile Ala Val Glu
 115 120 125
 Arg
 His Arg Ser Val Met Ala Val Gln Leu His Ser Arg Leu Pro Arg
 130 135 140
 Gly Arg Val Val Met Leu Ile Val Gly Val Trp Val Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Gly Leu Leu Pro Ala His Ser Trp His Cys Leu Cys Ala Leu Asp
 165 170 175
 Arg Cys Ser Arg Met Ala Pro Leu Leu Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Val
 180 185 190

 Trp Ala Leu Ser Ser Leu Leu Val Phe Leu Leu Met Val Ala Val Tyr
 195 200 205
 Thr Arg Ile Phe Phe Tyr Val Arg Arg Arg Val Gln Arg Met Ala Glu
 210 215 220
 His Val Ser Cys His Pro Arg Tyr Arg Glu Thr Thr Leu Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Val Ile Ile Leu Gly Ala Phe Val Val Cys Trp Thr Pro
 245 250
 255
 Gly Gln Val Val Leu Leu Leu Asp Gly Leu Gly Cys Glu Ser Cys Asn
 260 265 270
 Val Leu Ala Val Glu Lys Tyr Phe Leu Leu Leu Ala Glu Ala Asn Ser
 275 280 285
 Leu Val Asn Ala Ala Val Tyr Ser Cys Arg Asp Ala Glu Met Arg Arg
 290 295 300
 Thr Phe Arg Arg Leu Leu Cys Cys Ala Cys Leu Arg Gln Ser Thr Arg
 305 310
 315 320
 Glu Ser Val His Tyr Thr Ser Ser Ala Gln Gly Gly Ala Ser Thr Arg
 325 330 335
 Ile Met Leu Pro Glu Asn Gly His Pro Leu Met Asp Ser Thr Leu
 340 345 350

<210> 5

<211> 1062

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgaatgagt gtcactatga caagcacatg gacttttttt ataataggag caacactgat 60

actgtcgatg actggacagg aacaaagctt gtgattgttt tgtgtgttgg gacgtttttc

120

tgcctgttta tttttttttc taattctctg gtcacgcgg cagtgatcaa aaacagaaaa 180

tttcatttcc cttctacta cctgttggt aatttagctg ctgccgattt cttcgctgga 240

attgcctatg tattcctgat gtttaacaca ggcccagttt caaaaacttt gactgtcaac 300

cgctggtttc tccgtcaggg gcttctggac agtagcttga ctgcttcctt caccaacttg 360
 ctggttatcg ccgtggagag gcacatgtca atcatgagga tgcgggtcca tagcaacctg 420
 accaaaaaga gggtagacct gctcatittg cttgtctggg ccatcgccat ttttatgggg 480
 gcgggtccca cactgggctg gaattgcctc tgcaacatct ctgcctgctc
 ttccctggcc 540
 cccatttaca gcaggagtta ccttgttttc tggacagtgt ccaacctcat ggccttcctc 600
 atcatggttg tgggtgtacct gcggatctac gtgtacgtca agaggaaaac caacgtcttg 660
 tctccgcata caagtgggtc catcagccgc cggaggacac ccatgaagct aatgaagacg 720
 gtgatgactg tcttaggggc gtttgtggta tgcctggacc cgggcctggt ggttctgctc 780
 ctgcacggcc tgaactgcag gcagtgtggc gtgcagcatg tgaagaggtg gttcctgctg 840
 ctggcgctgc tcaactccgt cgtgaacccc atcatctact cctacaagga cgaggacatg 900
 tatggcacca tgaagaagat gatctgctgc ttctctcagg
 agaaccaga gaggcgtccc 960
 tctcgatcc cctccacagt cctcagcagg agtgacacag gcagccagta catagaggat 1020
 agtattagcc aaggtgcagt ctgcaataaa agcacttctt aa 1062
 <210> 6
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Met Asn Glu Cys His Tyr Asp Lys His Met Asp Phe Phe Tyr Asn Arg
 1 5 10 15
 Ser Asn Thr Asp Thr Val Asp Asp Trp Thr Gly Thr Lys Leu Val Ile
 20 25 30

 Val Leu Cys Val Gly Thr Phe Phe Cys Leu Phe Ile Phe Phe Ser Asn
 35 40 45
 Ser Leu Val Ile Ala Ala Val Ile Lys Asn Arg Lys Phe His Phe Pro
 50 55 60
 Phe Tyr Tyr Leu Leu Ala Asn Leu Ala Ala Asp Phe Phe Ala Gly
 65 70 75 80
 Ile Ala Tyr Val Phe Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Val Ser Lys Thr
 85 90 95

 Leu Thr Val Asn Arg Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp Ser Ser
 100 105 110
 Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asn Leu Leu Val Ile Ala Val Glu Arg His
 115 120 125
 Met Ser Ile Met Arg Met Arg Val His Ser Asn Leu Thr Lys Lys Arg
 130 135 140
 Val Thr Leu Leu Ile Leu Leu Val Trp Ala Ile Ala Ile Phe Met Gly
 145 150 155
 160
 Ala Val Pro Thr Leu Gly Trp Asn Cys Leu Cys Asn Ile Ser Ala Cys
 165 170 175
 Ser Ser Leu Ala Pro Ile Tyr Ser Arg Ser Tyr Leu Val Phe Trp Thr
 180 185 190
 Val Ser Asn Leu Met Ala Phe Leu Ile Met Val Val Val Tyr Leu Arg
 195 200 205
 Ile Tyr Val Tyr Val Lys Arg Lys Thr Asn Val Leu Ser Pro His Thr
 210 215
 220
 Ser Gly Ser Ile Ser Arg Arg Arg Thr Pro Met Lys Leu Met Lys Thr
 225 230 235 240
 Val Met Thr Val Leu Gly Ala Phe Val Val Cys Trp Thr Pro Gly Leu
 245 250 255
 Val Val Leu Leu Leu Asp Gly Leu Asn Cys Arg Gln Cys Gly Val Gln

260 265 270
 His Val Lys Arg Trp Phe Leu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Ser Val Val
 275
 280 285
 Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Lys Asp Glu Asp Met Tyr Gly Thr Met
 290 295 300
 Lys Lys Met Ile Cys Cys Phe Ser Gln Glu Asn Pro Glu Arg Arg Pro
 305 310 315 320
 Ser Arg Ile Pro Ser Thr Val Leu Ser Arg Ser Asp Thr Gly Ser Gln
 325 330 335
 Tyr Ile Glu Asp Ser Ile Ser Gln Gly Ala Val Cys Asn Lys Ser
 Thr
 340 345 350
 Ser
 <210> 7
 <211> 1260
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 atggtcttct cggcagtgtt gactgcgttc cataccggga catccaacac aacatttgtc 60
 gtgtatgaaa acacctacat gaatattaca ctccctccac cattccagca tcttgacctc 120
 agtccattgc ttagatatag ttttgaaacc atggctccca ctgggttgag ttccttgacc 180
 gtgaatagta cagctgtgcc cacaacacca gcagcattta agagcctaaa ctigcctctt 240
 cagatcaccc
 tttctgctat aatgatattc attctgtttg tgtcttttct tgggaacttg 300
 gttgtttgcc tcatggttta ccaaaaagct gccatgaggt ctgcaattaa catctcctt 360
 gccagcctag cttttgcaga catgttgctt gcagtgtga acatgccctt tgcctggta 420
 actattctta ctaccgatg gatttttggg aaattcttct gtagggtatc tgctatgttt 480
 ttctggttat ttgtataga aggagtagcc atcctgtca tcattagcat agataggttc 540
 cttattatag tcagaggca ggataagcta aacctatata gagctaaggt tctgattgca 600
 gtctcttggg caacttcctt ttgtgtagct tttcctttag ccgtaggaaa ccccgacctg 660

 cagatacctt cccgagctcc ccagtgtgtg tttgggtaca caaccaatcc aggctaccag 720
 gcttatgtga ttttgatttc tctcatttct ttcttcatac ctttctggt aatactgtac 780
 tcatttatgg gcatactcaa cacccttcgg cacaatgcct tgaggatcca tagctacct 840
 gaaggtatat gcctcagcca ggccagcaaa ctgggtctca tgagtctgca gagacctttc 900
 cagatgagca ttgacatggg ctttaaaaca cgtgccttca ccactatctt gattctcttt 960
 gctgtcttca ttgtctgtg ggccccattc accacttaca gccttgtggc aacattcagt 1020
 aagcactttt actatcagca caactttttt gagattagca cctggctact gtggctctgc
 1080
 tacctcaagt ctgcattgaa tccgtgtgac tactactgga ggattaagaa attccatgat 1140
 gcttgctctg acatgatgcc taagtccttc aagtttttgc cgcagctccc tggtcacaca 1200
 aagcgacgga tacgtcctag tgctgtctat gtgtgtgggg aacatcgac ggtggtgtga 1260
 <210> 8
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Met Val Phe Ser Ala Val Leu Thr Ala Phe His Thr Gly Thr Ser Asn
 1 5 10 15
 Thr Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Thr Tyr Met Asn Ile Thr Leu Pro
 20
 25 30
 Pro Pro Phe Gln His Pro Asp Leu Ser Pro Leu Leu Arg Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Glu Thr Met Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Ser Thr
 50 55 60

Ala Val Pro Thr Thr Pro Ala Ala Phe Lys Ser Leu Asn Leu Pro Leu
65 70 75 80
Gln Ile Thr Leu Ser Ala Ile Met Ile Phe Ile Leu Phe Val Ser Phe

85 90 95
Leu Gly Asn Leu Val Val Cys Leu Met Val Tyr Gln Lys Ala Ala Met
100 105 110
Arg Ser Ala Ile Asn Ile Leu Leu Ala Ser Leu Ala Phe Ala Asp Met
115 120 125
Leu Leu Ala Val Leu Asn Met Pro Phe Ala Leu Val Thr Ile Leu Thr
130 135 140
Thr Arg Trp Ile Phe Gly Lys Phe Phe Cys Arg
Val Ser Ala Met Phe
145 150 155 160
Phe Trp Leu Phe Val Ile Glu Gly Val Ala Ile Leu Leu Ile Ile Ser
165 170 175
Ile Asp Arg Phe Leu Ile Ile Val Gln Arg Gln Asp Lys Leu Asn Pro
180 185 190
Tyr Arg Ala Lys Val Leu Ile Ala Val Ser Trp Ala Thr Ser Phe Cys
195 200 205
Val Ala Phe Pro Leu Ala
Val Gly Asn Pro Asp Leu Gln Ile Pro Ser
210 215 220
Arg Ala Pro Gln Cys Val Phe Gly Tyr Thr Thr Asn Pro Gly Tyr Gln
225 230 235 240
Ala Tyr Val Ile Leu Ile Ser Leu Ile Ser Phe Phe Ile Pro Phe Leu
245 250 255
Val Ile Leu Tyr Ser Phe Met Gly Ile Leu Asn Thr Leu Arg His Asn
260 265 270
Ala
Leu Arg Ile His Ser Tyr Pro Glu Gly Ile Cys Leu Ser Gln Ala
275 280 285
Ser Lys Leu Gly Leu Met Ser Leu Gln Arg Pro Phe Gln Met Ser Ile
290 295 300
Asp Met Gly Phe Lys Thr Arg Ala Phe Thr Thr Ile Leu Ile Leu Phe
305 310 315 320
Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Ala Pro Phe Thr Thr Tyr Ser Leu Val
325 330 335

Ala Thr Phe Ser Lys His Phe Tyr Tyr Gln His Asn Phe Phe Glu Ile
340 345 350
Ser Thr Trp Leu Leu Trp Leu Cys Tyr Leu Lys Ser Ala Leu Asn Pro
355 360 365
Leu Ile Tyr Tyr Trp Arg Ile Lys Lys Phe His Asp Ala Cys Leu Asp
370 375 380
Met Met Pro Lys Ser Phe Lys Phe Leu Pro Gln Leu Pro Gly His Thr
385 390 395
400
Lys Arg Arg Ile Arg Pro Ser Ala Val Tyr Val Cys Gly Glu His Arg
405 410 415
Thr Val Val
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer,

forward EDG-1

<400> 9
tcatcgtccg gcattacaac ta 22
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer,
reverse EDG-1

<400> 10
gagtgcgctt gtaggtggtg 20
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer,
forward EDG-2

<400> 11
agatctgacc agccgactca c 21
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
primer,
reverse EDG-2

<400> 12
gttgccatc aagtaataaa ta 22
<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer,
forward EDG-3

<400> 13
cttggctatc tgcagcttca tc 22
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer,
reverse EDG-3

<400> 14
tgctgatgca
gaaggcaatg ta 22
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer,
forward EDG-4

<400> 15
 ctgctcagcc gctcctatTT g 21
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 reverse EDG-4
 <400> 16
 aggagcaccc acaagtcacT ag 22

 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 forward EDG-5
 <400> 17
 atgggcagct tgtactcgga g 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 reverse EDG-5
 <400> 18
 cagccagcag acgataaaga c 21
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 forward EDG-6
 <400> 19
 tgaacatcac gctgagtgac cT 22
 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 reverse EDG-6
 <400> 20
 gatcatcagc accgtcttca gc 22
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: primer,
 forward EDG-7
 <400> 21

agcaacactg atactgtcga tg 22
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 reverse EDG-7
 <400> 22
 gcatcctcat gattgacatg tg 22
 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 forward EDG-8
 <400> 23

 atctgtgcgc tctatgcaag ga 22
 <210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 reverse EDG-8
 <400> 24
 ggtgtagatg ataggattca gca 23
 <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 forward PSP24
 <400> 25
 ctgcatcatc gtgtaccaga g 21

 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer,
 reverse PSP24
 <400> 26
 acgaactcta tgcaggcctc gc 22