



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0136762  
(43) 공개일자 2012년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/166 (2006.01) A61K 31/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0055907

(22) 출원일자 2011년06월10일

심사청구일자 2011년06월10일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

송규용

대전광역시 중구 태평로 80, 412동 101호 (태평동, 삼부아파트)

오상택

서울특별시 서초구 신반포로 137, 경남APT 6동 709호 (반포동)

(74) 대리인

특허법인이름

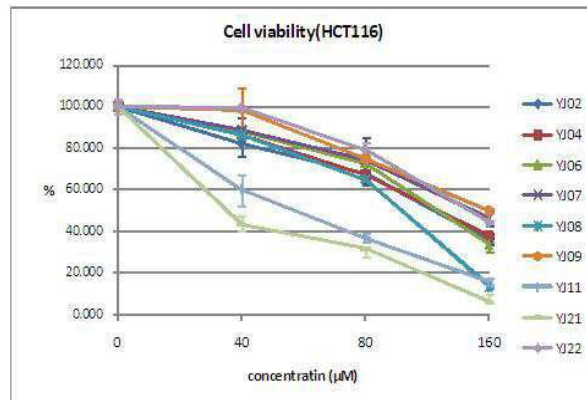
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 신나모일살리실아미드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 및 예방용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 하기 일반식 (I) 내지 (III)으로 표기되는 신나모일살리실아미드 유도체, 이의 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 하기 일반식 (I) 내지 (III)로 표기되는 신나모일살리실아미드 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 염은 Wnt 신호전달과정을 강력하게 억제할 뿐만 아니라, 감소된 세포생존율을 나타냈으므로, 각종 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-1232

부처명 교육과학기술부

연구사업명 광역경제권 선도산업 인재양성사업

연구과제명 Wnt 신호억제활성을 나타내는 신나모일살리실아마이드 유도체의 합성 및 그들의 항암효과

주관기관 교육과학기술부

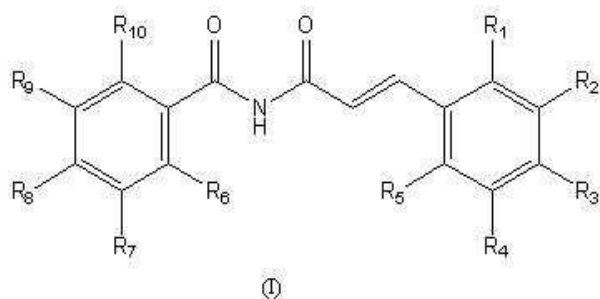
연구기간 2010.07.01 ~ 2011.05.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물:



상기 식에서,

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub>는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub> 저급알킬기 및 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>6</sub> 저급알콕시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이다.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub>는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시 및 에톡시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군인 약학조성물.

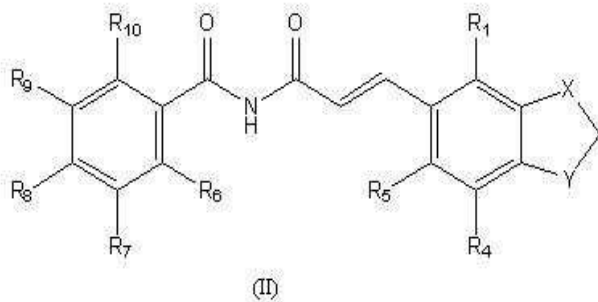
### 청구항 3

제 2항에 있어서,

N-[3-(2-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ01), N-[3-(4-히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ02), N-[3-(3-히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ03), N-[3-(2,3,4-트리메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ04), N-[3-(3,4-디클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ05), N-[3-(3,4-디에톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ06), N-[3-페닐-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ07), N-[3-메틸-4-메톡시페닐]-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ08), N-[3-(4-메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ09), N-[3-(3,4-디메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ10), N-[3-(3,4-디히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ11), N-[3-(3-니트로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ12), N-[3-(4-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ14), N-[3-(3-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ15), N-[3-(2-플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ16), N-[3-(4-플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ17), N-[3-(3,4-디플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ18), N-[3-(3-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ19), N-[3-(4-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ20), N-[3-(3,4-디히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ21), N-[3-(2,3,4-트리메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ22), N-[3-(2-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ23) 또는 N-[3-(3,4-디클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ25) 화합물인 약학조성물.

#### 청구항 4

하기 일반식 (II)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물:



상기 식에서,

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub> 저급알킬기 및 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>6</sub> 저급알콕시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, X 및 Y 치환기는 각각 독립적으로 O, S 또는 N으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자이다.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서,

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시 및 에톡시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, X 및 Y 치환기는 모두 O 원자인 화합물 군인 약학조성물.

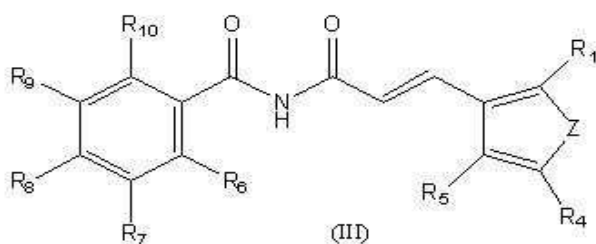
#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

N-[3-벤조[1,3]디옥솔-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ13) 화합물 군인 약학조성물.

#### 청구항 7

하기 일반식 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물:



상기 식에서,

$R_1$  내지  $R_{10}$  는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기,  $C_1$  내지  $C_3$  저급알킬기 및  $C_2$  내지  $C_6$  저급알콕시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, Z 치환기는 O, S 또는 N으로부터 선택된 이종원자이다.

#### 청구항 8

제 7항에 있어서,

$R_1$  내지  $R_{10}$  는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시 및 에톡시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, Z 치환기는 O 또는 S 원자인 화합물인 약학조성물.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

N-[3-티오펜-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ24)화합물 군인 약학조성물.

#### 청구항 10

제 1항, 제 4항 또는 제 7항에 있어서,

상기 암질환은 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 백혈병, 소장암, 직장암, 항문암, 식도암, 췌장암, 위암, 신장암, 자궁암, 폐암, 임파선암, 갑상선암, 피부암, 결장암, 뇌종양, 방광암, 난소암 또는 담낭암인 약학 조성물.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 암질환은 전립선암, 유방암, 자궁경부암 또는 대장암인 약학 조성물.

#### 청구항 12

제 1항에 개시된 일반식 (I)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Wint 신호전달 저해제.

#### 청구항 13

제 4항에 개시된 일반식 (II)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Wint 신호전달 저해제.

#### 청구항 14

제 7항에 개시된 일반식 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Wint 신호전달 저해제.

#### 청구항 15

제 1항에 기재된 일반식 (I)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

#### 청구항 16

제 4항에 기재된 일반식 (II)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

#### 청구항 17

제 7항에 기재된 일반식 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

#### 청구항 18

제 15항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암질환은 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 백혈병, 소장암, 직장암, 항문암, 식도암, 췌장암, 위암, 신장암, 자궁암, 폐암, 임파선암, 갑상선암, 피부암, 결장암, 뇌종양, 방광암, 난소암 또는 담낭암인 건강기능식품.

#### 청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 암질환은 전립선암, 유방암, 자궁경부암 또는 대장암인 건강기능식품.

#### 청구항 20

제 15항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태인 건강기능식품.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] [문헌 1] Coombs, Gary S et al., Wnt signaling in development, disease and translational medicine., Current Drug Targets, 9(7), 513-531 (2008).

[0003] [문헌 2] Dihlmann S et al., Wnt/ $\beta$ -catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics., International Journal of Cancer, 113, 515-524 (2005).

- [0004] [문헌 3] Tomas DM., Wnts, bone and cancer. Journal of Pathology, 220, 1-4 (2010).
- [0005] [문헌 4] 국립암센터 국가암관리사업단, 통계로 본 암 현황(Cancer Facts & Figures 2010), 보건복지부 (2010).
- [0006] [문헌 5] Lu W et al., Suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation, European Journal of Pharmacology, 602, 8-14 (2009).
- [0007] [문헌 6] Chesire DR et al., Detection and analysis of  $\beta$ -catenin mutation in prostate cancer. Prostate, 45, 32334 (2000).
- [0008] [문헌 7] Song GY et al., Decursin Suppresses Human Androgen-Independent PC3 Prostate Cancer Cell Proliferation by Promoting the Degradation of  $\beta$ -catenin. Molecular Pharmacology, 72, 1599-1606 (2007).
- [0009] [문헌 8] Lee JH et al., A mass preparation method of (+)-decursinol from the roots of *Angelica gigas*. Yakhak Hoechi., 50, 33844 (2006).
- [0010] [문헌 9] Park EJ et al., Novel small molecule activators of  $\beta$ -catenin-mediated signaling pathway: structure-activity relationships of indirubins., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19, 2282-2284 (2009).
- [0011] [문헌 10] D'Orazio et al., Food supplements containing benzaldehyde and benzene derivatives for improving the muscle function. PCT/WO2007134867 (2007).
- [0012] [문헌 11] Jeffrey A et al., The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates, Nature Reviews Drug Discovery 6, 636-649 (2007).
- [0013] [문헌 12] 의약화학 편집위원회, 의약화학, 신일상사, 121-133 (2004).
- [0014] [문헌 13] Patrick GL., An Introduction to Medicinal Chemistry, 5th edition, 128-209 (2009).
- [0015] [문헌 14] Ryabukhin Yu. I. et al. 2-Styryl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium salts. Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii, 9, 1184-9 (1975).
- [0016] [문헌 15] Ryabukhin Yu. I. et al. Synthesis of 4H-1,3-benzoxazin-4-onium salts and 4H-1,3-benzoxazin-4-ones. Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii, 2, 280 (1975).
- [0017] [문헌 16] Ryabukhin Yu. I. et al. Synthesis of 4H-1,3-benzoxazin-4-onium salts and 4H-1,3-benzoxazin-4-ones. Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii, 4, 460-464 (1975).
- [0018] [문헌 17] Park S et al., Hexachlorophene inhibits Wnt/beta-catenin pathway by promoting Siah-mediated beta-catenin degradation. Molecular Pharmacology, 70(3), 960-966 (2006).
- [0019] [문헌 18] Choi H et al., Murrayafoline A attenuates the Wnt/b-catenin pathway by promoting the degradation of intracellular b-catenin proteins, Biochemical and Biophysical Research Communications, 391, 915-920.
- [0020] [문헌 19] Cho M et al., Diclofenac attenuates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in colon cancer cells by activation of NF-kappaB. FEBS letters, 579(20), 4213-4218 (2005).
- [0021] [문헌 20] Robinson DR et al., Wnt signaling and prostate cancer, Current Drug Targets, 9, 571-580 (2008).
- [0022] [문헌 21] Paul S et al., Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication, Neoplasma, 55(3), 165-176 (2008).
- [0023] [문헌 22] Jiang YG et al., Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , International Journal of Urology, 14, 10341039 (2007).
- [0024] [문헌 23] Prowald A et al., Modulation of  $\beta$ -catenin-mediated TCF-signalling in prostate cancer cell

lines by wild-type and mutant p53, Prostate, 67(16), 1751-1760 (2007).

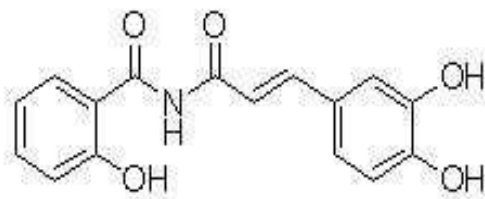
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0025] 최근들어, 성장 호르몬을 비롯한 다양한 signaling protein 및 kinase를 target으로한 신호전달 억제 활성 연구가 활발히 진행중이며 이를 기반으로 유용한 항암제 개발이 이루어지고 있다.
- [0026] 대표적인 백혈병 표적항암제로 각광받고 있는 글리벡(Gleevec)은 바로 Bcr/Abl 경로를 억제한 혁신 신약이며, 폐암과 대장암 치료에 쓰인 표적항암제 이레사(Gefitinib)와 어비투스(Cetuximab)는 EGFR 경로를, 대장암 치료제 아바스틴(Bevacizumab)은 VEGFR 경로를 차단한다.
- [0027] Wnt는 세포로부터 분비되는 시스테인(cystein)을 다량 함유한 당단백질(glycoprotein)으로서, 주변 세포의 receptor와 결합하고 활성화된 receptor를 통해 여러 단계를 거쳐 많은 유전자 발현을 유도하여 결과적으로 생명 현상을 조절하는 것으로 알려져 있다. Wnt gene은 처음에 mouse mammary tumor virus(MMTV)의 insertion에 의해서 유도되는 많은 종류의 tumor에서 공통적으로 발견되는 genomic sequence로서, 최초의 cellular oncogene으로 밝혀졌으며 'int'라고 명명되었다. 이 결과는 정상세포가 암의 원인 유전자(proto-oncogene)를 갖고 있다는 사실을 의미하며, 그 후에 Drosophila의 morphogenesis 과정에서 segment polarity gene이라고 알려진 wingless가 int-1의 homolog라는 사실이 밝혀진 이후로 int가 암의 형성뿐만 아니라, 세포 사이의 communication을 조절하는 signal로서 발생과정에서 중요한 역할을 한다고 제안되었고 wingless(wg)와 int-1이 homolog gene임을 밝혀진 후, wg와 int를 합쳐서 'Wnt'라고 부르게 되었다.
- [0028] 지난 20여년 간의 Wnt 신호 전달의 연구방향은 초기에, Wnt signaling의 신호전달에 관여하는 새로운 components의 발굴 및 기능연구, Wnt signaling의 발생 및 세포 분화에 있어서의 역할 연구가 주를 이루었지만 최근에는 모델 동물을 이용하여 Wnt signaling의 이상에 의해서 유도되는 질병들의 연구, Wnt signaling을 조절할 수 있는 small molecule의 발굴 및 target identification 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0029] Wnt 신호전달은 cytoplasmic  $\beta$ -catenin의 농도를 변화시킴에 의해서 유도되는 target 유전자의 발현을 조절하는 '(canonical) Wnt/ $\beta$ -catenin pathway'와 G 단백질을 통하여  $Ca^{++}$  fluxes와 phosphatidyl inositide metabolism을 조절하는 'non-canonical pathway'로 나눌 수 있다.
- [0030] Canonical pathway를 활성화시키는지 유무에 따라서 다양한 Wnt들이 분류가 되기도 한다. 예를 들면,  $\beta$ -catenin 농도를 증가시키는 Wnt 1, 3a, 8, 8b와 그렇지 않은 Wnt 4, 5a, 11 등으로 분류되어 진다.
- [0031] 또한 Wnt/ $\beta$ -catenin pathway 연구가 가장 활발히 이루어졌고 이 경로에 관여하는 인자(component)들의 돌연변이에 의해 암이 유발되고 성장하는 것이 다수 보고되어 본 연구는 Wnt/ $\beta$ -catenin pathway에 초점을 맞추어 진행하고자 했다.
- [0032] Wnt signaling이 없는 상태에서  $\beta$ -catenin, Axin, GSK3 $\beta$ 와 Adenomatous Polyposis Coli tumor supressor protein(APC)의 complex 내에서 GSK3 $\beta$ 가  $\beta$ -catenin을 인산화 시키고, E3 ubiquitination ligase인  $\beta$ -TrCP가 인산화 되어진  $\beta$ -catenin과 결합하여  $\beta$ -catenin의 ubiquitination-mediated proteasome degradation을 유발하게 된다
- [0033] 이 때, 핵 내에서는 TCF/LEF 전사인자와 전자 억제인자인 Groucho라는 단백질이 결합하여 Wnt 신호전달에 의해 조절되는 유전자의 발현을 억제하게 된다.
- [0034] Wnt 단백질이 수용체인 Frizzled에 결합하게 되면 Dvl을 활성화 시켜서 직접 또는 간접적으로 GSK3 $\beta$ 의 활성을 억제 시킨다. 이 때, Axin의 단백질 level도 감소하게 되어 cytoplasmic 내에 있는  $\beta$ -catenin의 분해가 억제된다. 따라서 cytoplasm 내에  $\beta$ -catenin이 축적되어지고, 축적된  $\beta$ -catenin은 핵 내로 이동하여, Groucho와 결합하여 전사를 억제하고 있는 TCF/LEF를 활성화시켜 여러 target유전자들의 발현을 촉진시킨다.
- [0035] 현재까지 Wnt 신호전달에 의하여 조절되는 약 50여 가지의 유전자가 밝혀져 있는데, 그 중 세포 주기를 조절하는 c-myc, cyclin D1과 초기 발생을 조절하는 전사 인자인 siamois나 brachyury 등이 대표적이라고 할 수 있다.

- [0036] 이들 유전자의 발견으로 인해서 Wnt 유전자가 많이 발현되거나, Wnt 신호전달을 억제하는 Axin 또는 APC에 돌연변이가 일어나게 되면 다양한 암을 유발한다고 보고되었다.
- [0037] 최근 들어서는 cancer나 발생과정의 문제뿐만 아니라 adipogenesis, osteoporosis, schizophrenia 및 Alzheimer's disease 등과 같은 다양한 성인 질환에서도 Wnt signaling의 이상과 연관성이 있다는 보고가 많이 나와서, 기존의 cancer나 발생에서의 Wnt signaling의 역할 규명이라는 주제에서 다양한 성인질환의 병인으로써의 Wnt signaling의 역할 규명이라는 새로운 방향으로 연구가 진행되고 있다.
- [0038] 하지만 1982년 Wnt 경로가 밝혀진 이래 이 경로에 작용하는 약물은 개발되지 못했다. 미개척 분야의 약물 개발이라는 점에서 Wnt 신호전달경로를 차단, 암의 재발과 전이의 원인인 암줄기세포를 사멸시켜 근원적으로 암을 치료하는 표적항암물질 연구는 고부가가치 산업인 신약시장에 발전가능성이 높은 경쟁력을 갖추었다.
- [0039] 전립선암은 미국의 경우 남성에서 발병률이 가장 높고 사망률이 두 번째인 암으로, 비정상적인 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계의 활성화가 전립선암의 발생 및 진행과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다.
- [0040] 이중 비정상적인 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계의 활성화는 전립선암 발병 초기에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 전립선암이 진행됨에 따라 세포내에  $\beta$ -catenin의 수준이 증가하게 되고 증가된  $\beta$ -catenin이 핵으로 이동하여 전사인자인 TCF4와 결합하여 oncogene으로 알려져 있는 *c-myc*, *cyclin D1*, MMP7등의 발현을 활성화시키거나 adrogen receptor (AR)과 결합하여 AR의 활성을 증가시킴으로서 암으로의 전이가 일어난다. 전립선암이 림프절로 전이가 일어난 경우 70% 이상의 환자에서 세포내  $\beta$ -catenin 단백질 증가가 발견되고 뼈로 전이된 경우 80% 이상의 환자에서 세포내  $\beta$ -catenin 단백질 증가가 관찰되고 있다.
- [0041] 최근, 분자생물학적 방법 (예: sFRP-3의 과발현)을 이용하여 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계를 효과적으로 차단하였을 경우 호르몬 저항성 전립선암의 성장을 효과적으로 저해한다는 보고가 있음. 따라서 비정상적으로 증가되어있는  $\beta$ -catenin 단백질의 분해는 호르몬 저항성 전립선암 항암제 개발에 매우 효과적인 타겟이 될 수 있다.
- [0042] 본 연구실에서는 천연물로부터 Wnt신호를 저해하는 물질을 스크리닝한 결과 cinnamoyl group에 3,4-dihydroxyl기가 치환된 신나모일살리실아마이드(cinnamoylsalicylamide)계열의 선도물질 YJ090704 (N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide)이 강하게 Wnt 신호를 억제함을 발견하였다.

### 화학식 1



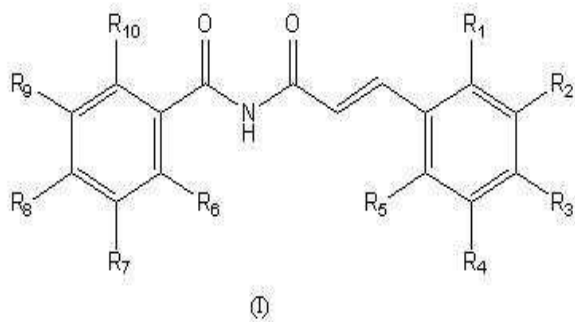
**YJ090704 구조**

- [0043]
- [0044] 이 화합물의 문헌조사 결과 벼과(Gramineae) 식물인 귀리(*Avena sativa*)에 함유된 성분이며 이전까지 의약화학 분야에서는 다루어지지 않은 신물질임을 확인하여 신약 개발 가능성이 높은 물질로 판단되며, 이전까지 합성되지 않은 신물질로서 유도체 합성은 물론 Wnt 신호 저해역제활성 및 항암억제활성에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.
- [0045] 따라서 본 연구의 최종목표는 Wnt 신호를 저해하는 새로운 선도 물질의 발굴(lead discovery)에 따라서 구조의 최적화(lead optimization) 과정을 통한 전임상 후보물질(candidates)을 발굴하고자 효율적인 합성 방법을 창안하고 여러 유도체를 다량 확보한 후 일차 약리 검색을 통하여 우수한 화합물을 선택할 것이다.
- [0046] 본 연구자는 합성한 다양한 신나모일살리실아마이드(cinnamoylsalicylamide) 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 염이 Wnt 신호전달과정을 강력하게 억제할 뿐만 아니라, 감소된 세포생존율을 나타냈으므로, 각종 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

### 과제의 해결 수단

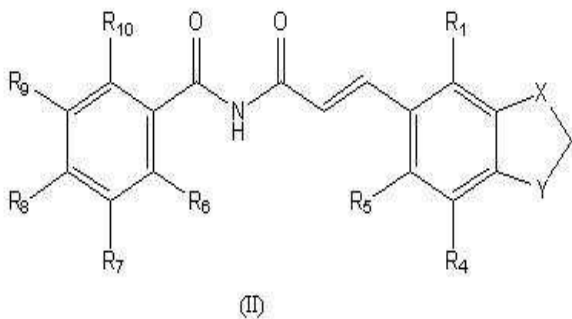
- [0047] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 하기 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Wint 신호전달 저해제를 제공한다.
- [0049] 또한, 본 발명은 하기 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

### 화학식 2



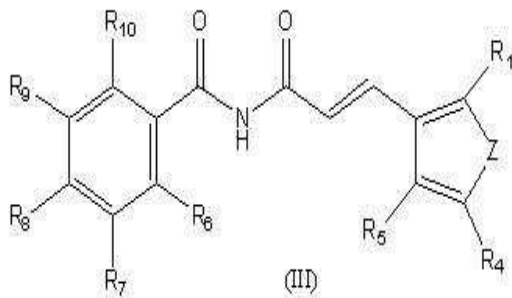
- [0050]
- [0051] 상기 식에서,
- [0052] R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub> 저급알킬기 및 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>6</sub> 저급알콕시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이다.

### 화학식 3



- [0053]
- [0054] 상기 식에서,
- [0055] R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub> 저급알킬기 및 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>6</sub> 저급알콕시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, X 및 Y 치환기는 각각 독립적으로 O, S 또는 N으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자이다.

화학식 4



[0056]

[0057]

상기 식에서,

[0058]

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>3</sub> 저급알킬기 및 C<sub>2</sub> 내지 C<sub>6</sub> 저급알콕시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, Z 치환기는 O, S 또는 N 으로부터 선택된 이종원자이다.

[0059]

상기 일반식 (I) 에 속하는 화합물군 중에 바람직하게는 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시 및 에톡시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군이다.

[0060]

상기 일반식 (II) 에 속하는 화합물군 중에 바람직하게는 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시 및 에톡시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, X 및 Y 치환기는 모두 O 원자인 화합물 군이다.

[0061]

상기 일반식 (III) 에 속하는 화합물군 중에 바람직하게는 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>10</sub> 는 각각 독립적으로 수소원자, 니트로기, 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시 및 에톡시기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며, Z 치환기는 O 또는 S 원자인 화합물 군이다.

[0062]

상기 일반식 (I) 에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로서,

[0063]

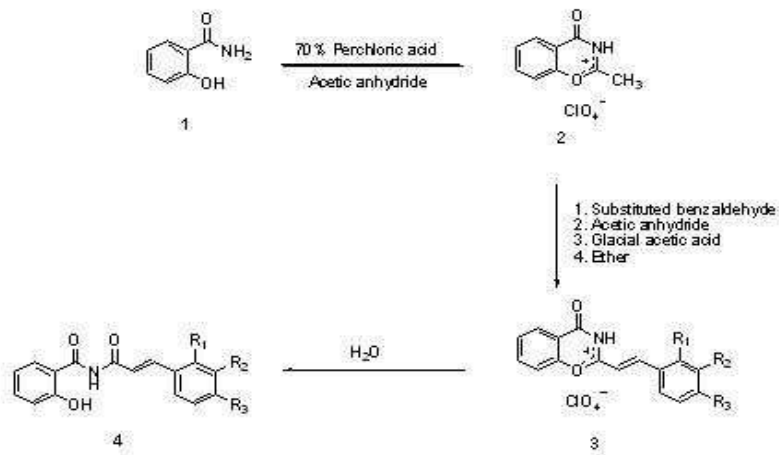
N-[3-(2-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ01), N-[3-(4-히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ02), N-[3-(3-히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ03), N-[3-(2,3,4-트리메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ04), N-[3-(3,4-디클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ05), N-[3-(3,4-디에톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ06), N-[3-페닐-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ07), N-[3-메틸-4-메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ08), N-[3-(4-메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ09), N-[3-(3,4-디메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ10), N-[3-(3,4-디히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ11), N-[3-(3-니트로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ12), N-[3-(4-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ14), N-[3-(3-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ15), N-[3-(2-플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ16), N-[3-(4-플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ17), N-[3-(3,4-디플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ18), N-[3-(3-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ19), N-[3-(4-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ20), N-[3-(3,4-디히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ21), N-[3-(2,3,4-트리메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ22), N-[3-(2-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ23), N-[3-(3,4-디클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ25)을 들 수 있다.

[0064]

상기 일반식 (II) 에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로서, N-[3-벤조[1,3]디옥솔-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ13)을 들 수 있다.

- [0065] 상기 일반식 (III)에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로서, N-[3-티오펜-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ24)를 들 수 있다.
- [0066] 상기 구조식 일반식 (I), (II) 또는 (III)로 표시되는 본 발명의 화합물들은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.
- [0067] 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [0068] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.
- [0069] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0070] 상기의 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이 수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 다른 목적은 상기 일반식 (I), (II) 또는 (III) 화합물의 제조방법을 제공하는 것으로, 당업계에 공지된 합성방법으로 제조가능하며, 하기의 반응식들에 도시된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있지만, 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.
- [0072] 다음 반응식들을 통해 여러 치환기가 도입된 benzaldehyde를 이용하여 2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate에 도입하는 방법을 착안하였고, 결과적으로 다양한 위치에 치환기가 도입된 cinnamoyl group을 포함한 salicylamide 유도체 합성이 가능할 것이라고 판단하여 하기와 같이 합성가능하다.
- [0073] (반응식 1)

[0074] 유도체 합성-1

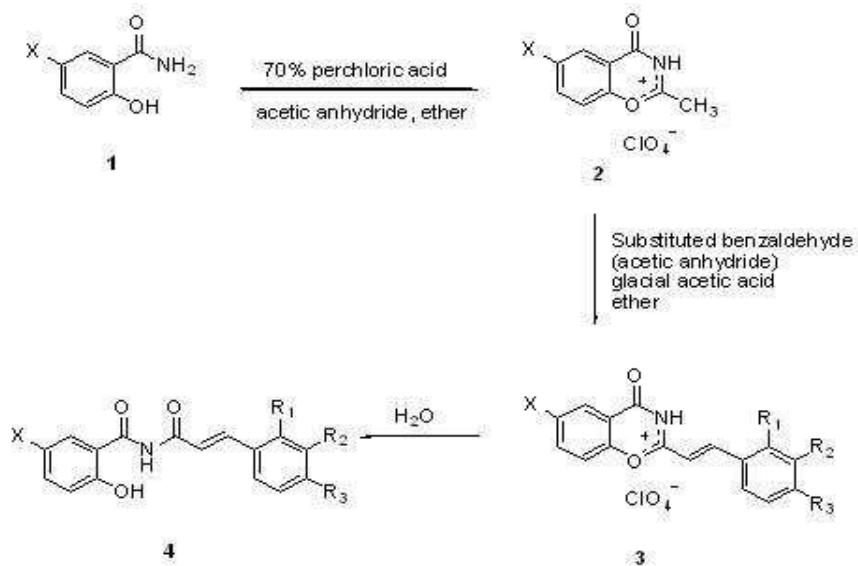


[0075]

[0076] 이 후 합성 연구에 필요한 materials 및 reagent의 재고 및 공급 가능 여부를 고려하여 Salicylamide group 혹은 cinnamoyl group에 알킬(alkyl)기, 알킬옥시(alkyloxy)기, 할로젠(halogen) 등 여러 치환기가 도입된 유도체들을 합성가능하다.

[0077] (반응식 2)

[0078] 유도체 합성-2

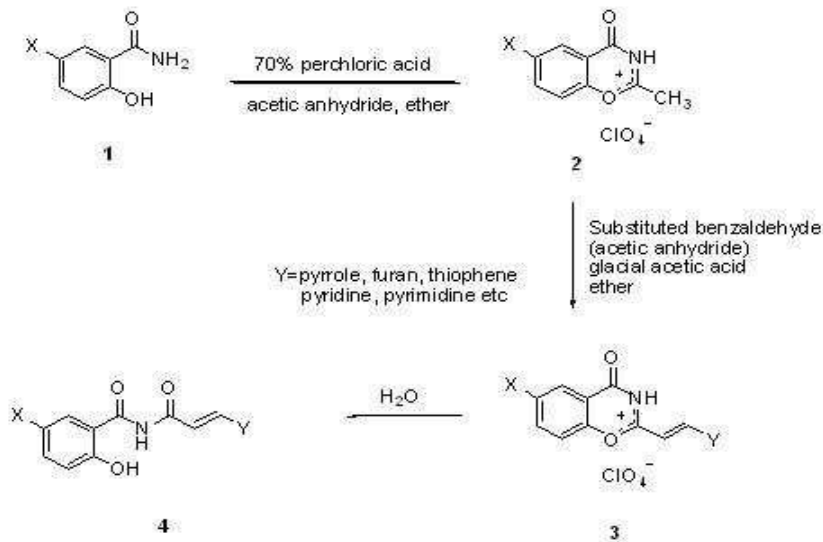


[0079]

[0080] 이 외에도 2-methyl-4H-1, 3-benzoxazin-4-onium perchlorate에 aldehyde가 치환된 헤테로(hetero) 고리 화합물을 도입한 salicylamide 유도체를 합성하는 방법도 가능할것이라고 판단되어 다음과 같은 합성가능하다.

[0081] (반응식 3)

[0082] 유도체 합성-3



[0083]

[0084] 본원에서 정의되는 “암질환”은 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 백혈병, 소장암, 직장암, 항문암, 식도암, 췌장암, 위암, 신장암, 자궁암, 폐암, 임파선암, 갑상선암, 피부암, 결장암, 뇌종양, 방광암, 난소암, 또는 담낭암, 바람직하게는 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 가장 바람직하게는 전립선암을 포함한다.

[0085] 본 발명의 다양한 신나모일살리실아마이드(cinnamoylsalicylamide) 유도체들이 Wint 신호전달과정을 강력하게 억제할 뿐만 아니라, 감소된 세포생존율을 나타냈으므로, 각종 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0086] 따라서 본 발명에서는 상기 일반식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 갖는 신나모일살리실아마이드 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 함유하는 암질환의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물을 제공한다.

[0087] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0088] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0089] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0090] 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0091] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라

다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 0.0001 ~ 500 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.001 ~ 1 중량%의 양으로 존재하여야 한다.

[0092] 또한, 본 발명의 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0093] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0094] 상기 약학적 조성물에서, 본 발명에 따른 일반식 (I), (II) 또는 (III)로 표시되는 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 이들의 염의 유효용량은 0.1 내지 500 mg/kg 또는 피부적용시 0.1 내지 200 mg/cm<sup>2</sup>이고, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg 또는 피부적용시 1 내지 10 mg/cm<sup>2</sup>이며, 하루 1-6회 투여될 수 있다. 단, 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0095] 본 발명은 암질환의 예방 및 개선 효과를 나타내는 일반식 (I), (II) 또는 (III)로 표기되는 신나모일살리실아마이드 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 개선용 건강 기능식품을 제공한다.

[0096] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 암질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0097] 본 발명의 화합물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0098] 본 발명의 상기 화합물은 암질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0099] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기화합물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0100] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0101] 본 발명에 따른 일반식 (I), (II) 또는 (III)로 표시되는 신나모일살리실아마이드 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 이들의 염은 마우스에 경구 투여, 복강내 투여 및 피하주사의 독성 실험을 수행한 결과, 경구투여 독성시험에 의한 50% 치사량(LD<sub>50</sub>)은 800 mg/kg 이상인 것으로 확인되었고 따라서, 본 발명에 따른 신나모일살리실아마이드 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 이들의 염은 비교적 안전한 물질로 판명되었다.

## 발명의 효과

[0102] 이상에서 상술한 바와 같이, 본 발명의 일반식 (I), (II) 또는 (III)로 표기되는 신나모일살리실아마이드 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 염은 Wint 신호전달과정을 강력하게 억제할 뿐만 아니라, 감소된 세포 생존율을 나타냈으므로, 각종 암 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있음을 확인하였다.

## 도면의 간단한 설명

[0103] 도 1은 농도에 따른 실시예 화합물들의 세포생존율에 대한 시험결과이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

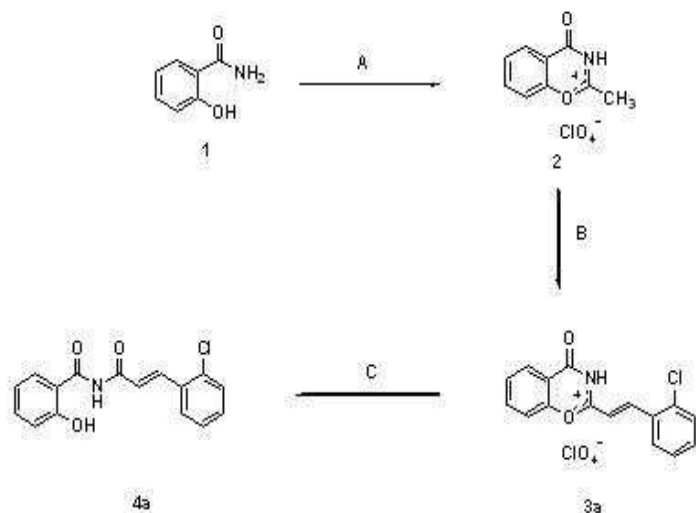
[0104] 이하, 본 발명을 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0105] 단, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

### 참고예 1. 실험 준비 및 기기

[0107] 본 실험에 사용한 분석기기로는  $^1\text{H}$ -NMR(400MHz) 및  $^{13}\text{C}$ -NMR(100MHz) 스펙트로미터(spectrometer, JNM-AL 400, JEOL Ltd., 일본), 멜팅 포인터(Melting pointer, Yamako, MD-S3, 일본)를 사용하였다. 각종 시약들은 알드리치사(Aldrich Chemical Co.)의 제품을 사용하였으며 기타 용매는 1급 이상의 시약을 정제하지 않고 사용하였다. 합성한 물질들의 정제를 위하여 실리카겔(Silica gel, Merck, 230-400 mesh)을 사용하였다.

### 실시예 1. N-[3-(2-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ01, 4a)의 합성



[0109]

### 단계 A

[0111] 완전히 건조시킨 500ml 라운드 플라스크에 살리실아마이드(1, salicylamide, 6.85g, 0.05mol)과 무수초산(acetic anhydride, 30ml)을 넣고 70% 과염소산(70% perchloric acid, 5ml, 0.058mol)을 천천히 적가한 후 상온에서 4시간동안 교반하였다. 이 후, 반응액에 에테르(ether, 200ml)를 넣어 30분 동안 더 교반한 후, 깔대기를 이용해 여과하여 여액은 제거하고 여과용지에 남아 있는 고체인 2-메틸-4H-1,3-벤즈옥사진-4-오늄 과염소산염(2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 2)을 건조하여 다음 단계에 적용하였다.

### 단계 B

[0113] 100ml 라운드 플라스크에 2-메틸-4H-1,3-벤즈옥사진-4-오늄 과염소산염(2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, **2**, 500mg, 1.91mmol)과 2-클로로벤즈알데히드(2-chlorobenzaldehyde, 0.26ml, 2.28mmol)를 넣고 무수초산(acetic anhydride, 1.5ml)과 빙초산(glacial acetic acid, 2ml)으로 용해시킨 후 히팅 맨틀(heating mantle)을 이용하여 80℃ 상에서 20분 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 방치한 후 에테르(ether)를 이용해 여과하여 여액을 제거한 후 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 2-(2-클로로스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-오늄 과염소산염(2-(2-chlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, **3a**)을 얻은 후 다음 단계에 적용하였다.

[0114] 단계 C

[0115] 100ml 라운드 플라스크에 건조시킨 2-(2-클로로스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-오늄 과염소산염(2-(2-chlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, **3a**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 히팅 맨틀(heating mantle)을 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 하기 물성치를 갖는 N-[3-(2-chlorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4a**, YJ01)를 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0116]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  11.22(s, NH), 10.51(s, OH), 8.17(d, J=4.8Hz, 1H), 8.09(d, J=3.2Hz, 1H), 7.91(m, 1H), 7.70(d, J=16.0Hz, 1H), 7.57-7.44(m, 4H), 7.04(m, 2H)

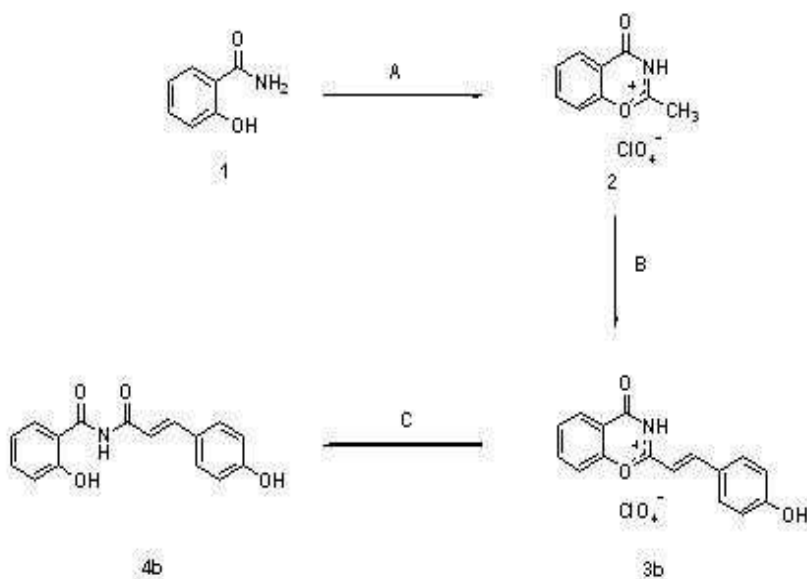
[0117] yield 41.3%

[0118] pale-yellow colored solid

[0119]  $R_f$  = 0.56 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0120] m.p. 187℃

[0121] 실시예 2. N-[3-(4-히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ02, **4b**)의 합성



[0122]

[0123] 단계 A

[0124] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0125] 단계 B

[0126] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 4-하이드록시벤즈알데히드(4-hydroxybenzaldehyde, 280mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(4-하이드록시스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-(4-hydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, **3b**)을 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0127] 단계 C

[0128] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(4-하이드록시스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-(4-hydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, **3b**)을 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 히팅멘틀(heating mantle)을 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 하기 물성치를 갖는 N-[3-(4-하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아미드(N-[3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide, **4b**, YJ02)를 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0129]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.46(s, NH), 10.88(s, OH), 10.01(s, OH), 7.86(d, J=9.6Hz, 1H), 7.66(d, J=15.6Hz, 1H), 7.54(d, J=8.8Hz, 2H), 7.46(t, J=8.4Hz, 1H), 7.28(d, J=16.0Hz, 1H), 6.99(m, 2H), 6.83(d, J=8.4Hz, 2H)

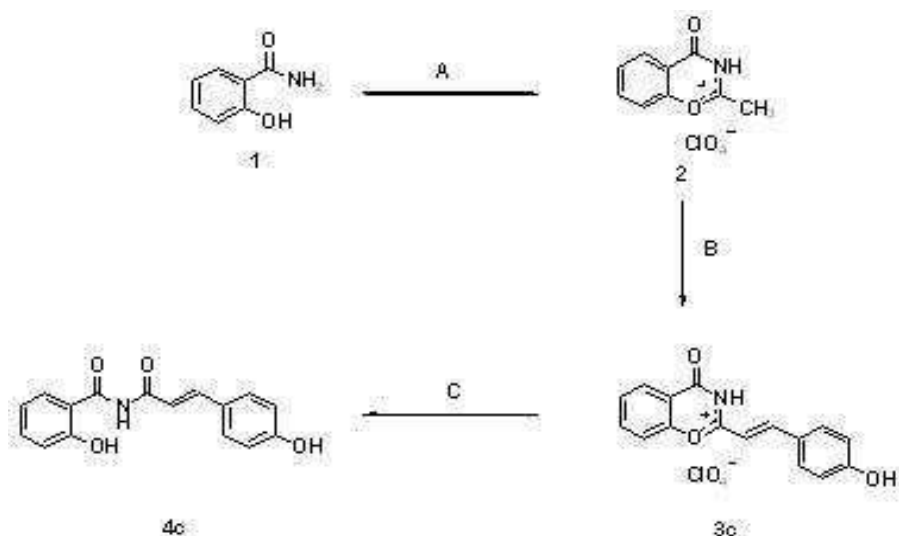
[0130] yield 56.5%

[0131] pale-yellow colored solid

[0132]  $R_f$  = 0.37 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0133] m.p. 216℃

[0134] 실시예 3. N-[3-(3-하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아미드(YJ03, **4c**)의 합성



[0135]

[0136] 단계 A

[0137] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0138] 단계 B

[0139] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3-하이드록시벤즈알데히드(3-hydroxybenzaldehyde, 280mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3-hydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3c**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0140] 단계 C

[0141] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3-hydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3c**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4c**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0142]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.43(s, NH), 10.96(s, OH), 9.66(s, OH), 7.84(d, J=8.4Hz, 1H), 7.63(d, J=16.0Hz, 1H), 7.46(t, J=8.4Hz, 1H), 7.39(d, J=16.0Hz, 1H), 7.25(t, J=7.6Hz, 1H), 7.11-6.89(m, 4H), 6.852(dd, J=2.0, 7.6Hz, 1H)

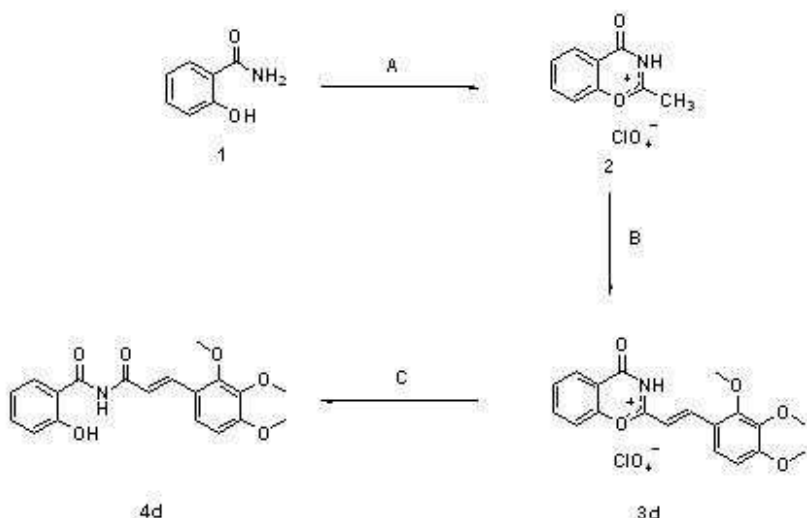
[0143] yield 60.0%

[0144] white colored solid

[0145]  $R_f$  = 0.38 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0146] m.p. 188℃

[0147] 실시예 4. N-[3-(2,3,4-트리메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ04, **4d**)의 합성



[0148]

[0149] 단계 A

[0150] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0151] 단계 B

[0152] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 2,3,4-트리메톡시벤즈알데히드(2,3,4-trimethoxybenzaldehyde, 449 mg, 2.29 mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(2,3,4-trimethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3d**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0153] 단계 C

[0154] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(2,3,4-trimethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3d**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4d**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0155]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  11.44(s, NH), 10.31(s, OH), 8.08(dd, J=1.2, 8.0Hz, 1H), 7.99(d, J=16.0Hz, 1H), 7.62(d, J=16.0Hz, 1H), 7.53(t, J=8.4Hz, 1H), 7.47(d, J=8.8Hz, 1H), 7.05-6.99(m, 2H), 6.91(d, J=8.8Hz, 1H)

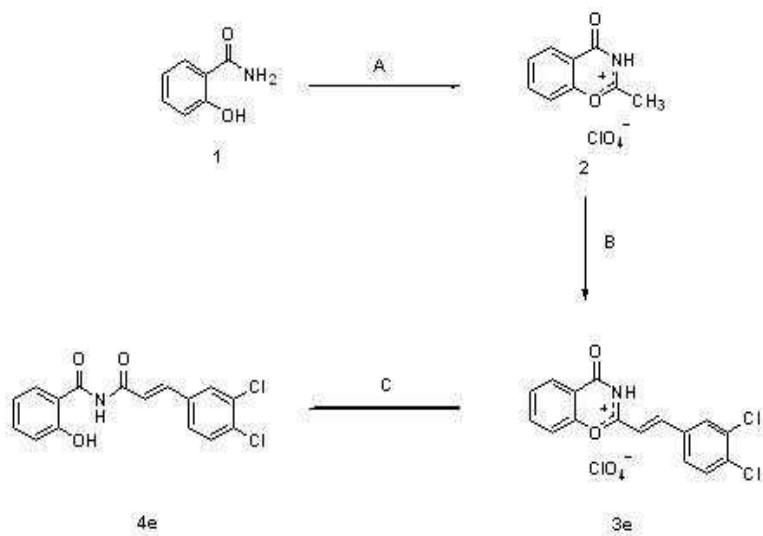
[0156] yield 17.3%

[0157] pale yellowish green-colored solid

[0158] R<sub>f</sub> = 0.41 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0159] m.p. 176℃

[0160] 실시예 5. N-[3-(3,4-디클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ05, **4e**)의 합성



[0161]

[0162] 단계 A

[0163] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0164] 단계 B

[0165] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3,4-디클로로벤즈알데히드(3,4-dichlorobenzaldehyde, 401mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3,4-dichlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3e**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0166] 단계 C

[0167] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3,4-dichlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3e**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4e**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0168]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, acetone- $\text{d}_6$ )  $\delta$  11.18(s, NH), 10.45(s, OH), 8.07(dd, J=1.2, 8.0Hz, 1H), 7.94(s, 1H), 7.77-7.65(m, 4H), 7.56-7.50(m, 1H), 7.06-7.00(m, 2H)

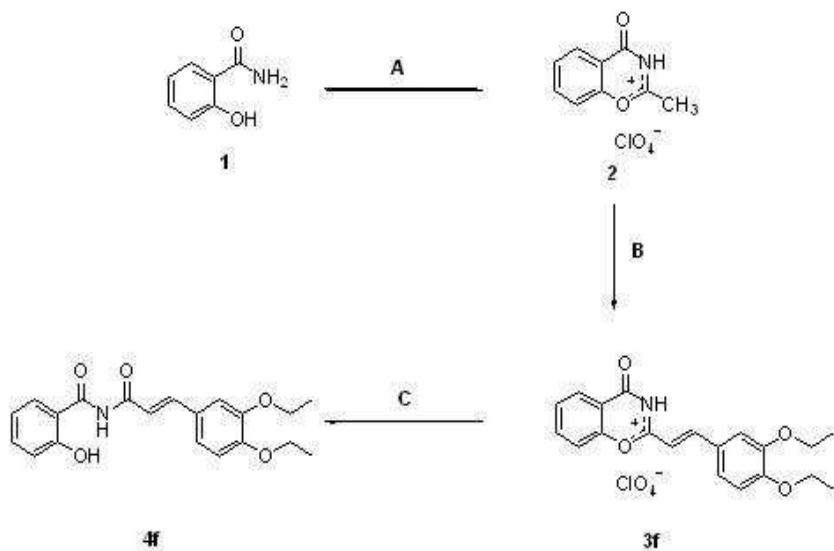
[0169] yield 26%

[0170] pale-yellow solid

[0171] Rf= 0.56 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0172] m.p. 183℃

[0173] 실시예 6. N-[3-(3,4-디에톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ06, **4f**)의 합성



[0174]

[0175] 단계 A

[0176] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0177] 단계 B

[0178] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3,4-디에톡시벤즈알데히드(3,4-diethoxybenzaldehyde, 0.67ml, 3.82mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3,4-diethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3f**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0179] 단계 C

[0180] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3,4-diethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3f**)를 넣고

3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-diethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4f**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0181]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  11.24(s, NH), 10.26(s, OH), 8.06(dd, J=1.6, 8.0Hz, 1H), 7.74(d, J=16.0Hz, 1H), 7.54-7.45(m, 2H), 7.29(s, 1H), 7.26(dd, J=2.0, 8.0Hz, 1H), 7.01(m, 3H), 4.132(m, 4H), 1.38(m, 6H)

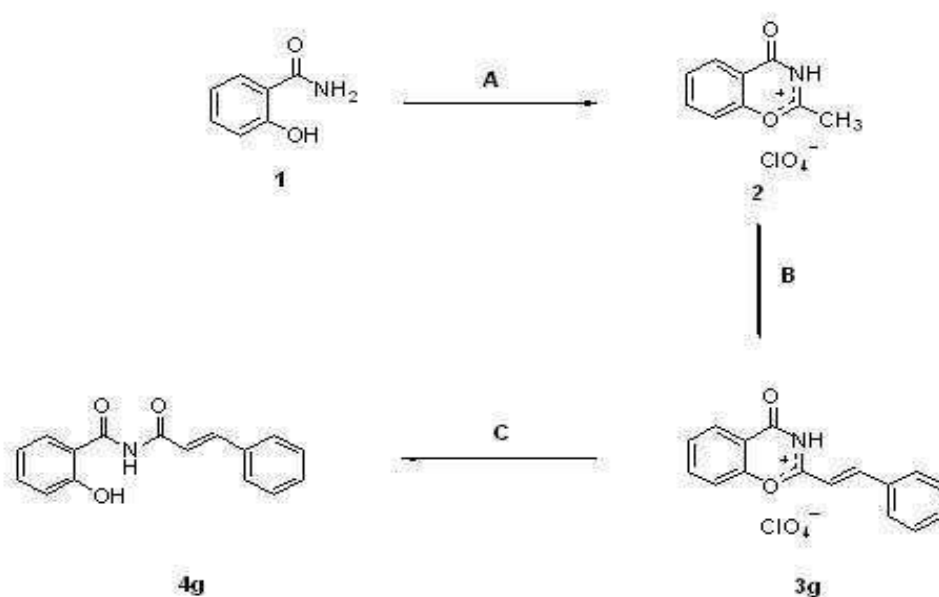
[0182] Yield 56.0%

[0183] pale-yellow solid

[0184] Rf= 0.55 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0185] m.p. 186℃

[0186] 실시예 7. N-[3-페닐-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ07, 4g)의 합성



[0187]

[0188] 단계 A

[0189] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0190] 단계 B

[0191] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 벤즈알데히드(benzaldehyde, 0.38ml, 3.82mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-styryl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3g**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0192] 단계 C

[0193] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-styryl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3g**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로

냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-(3-phenyl-1-oxo-2-propenyl)-2-hydroxybenzamide(**4g**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0194]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, acetone- $\text{d}_6$ )  $\delta$  11.22(s, NH), 10.37(s, OH), 8.07(dd,  $J=1.2, 8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.80(d,  $J=15.6\text{Hz}$ , 1H), 7.71(m, 2H), 7.64(d,  $J=16.0\text{Hz}$ , 1H), 7.55-7.44(m, 4H), 7.05-6.99(m, 2H)

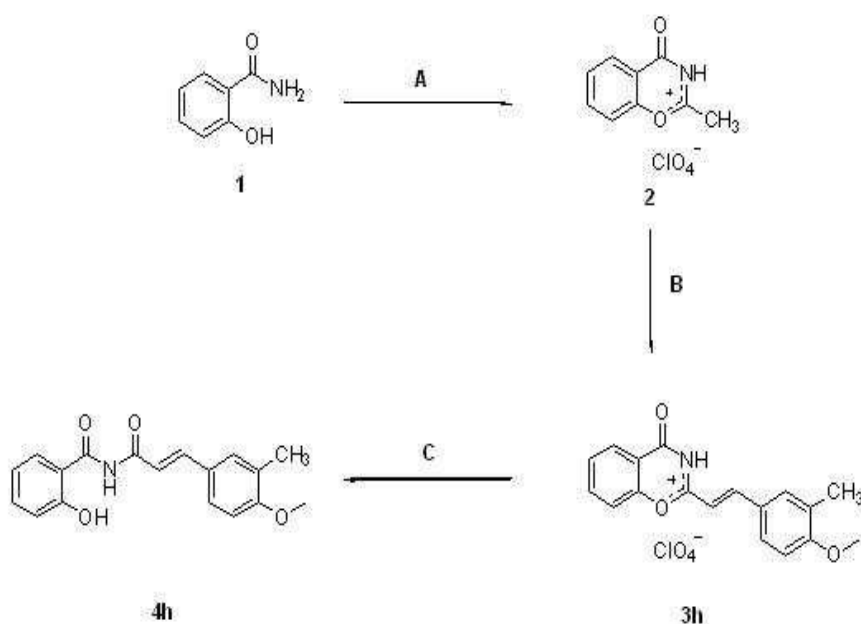
[0195] Yield 77%

[0196] ivory colored solid

[0197]  $R_f = 0.61$  (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0198] m.p.  $181^\circ\text{C}$

[0199] 실시예 8. N-[3-메틸-4-메톡시페닐]-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ08, **4h**)의 합성



[0200]

[0201] 단계 A

[0202] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0203] 단계 B

[0204] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 4-메톡시-3-메틸벤즈알데히드(4-methoxy-3-methylbenzaldehyde, 343mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(4-methoxy-3-methylstyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3h**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0205] 단계 C

[0206] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(4-methoxy-3-methylstyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3h**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여  $100^\circ\text{C}$  상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(4-methoxy-3-methylphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-

hydroxybenzamide(**4h**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0207]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.4(s, NH), 10.8(s, OH), 7.76(dd, J=1.6, 7.6Hz, 1H), 7.56(d, J=15.6Hz, 1H), 7.42-7.33(m, 3H), 7.22(d, J=16.0Hz, 1H), 6.93-6.85(m, 3H), 3.76(s, 3H), 2.08(s, 3H)

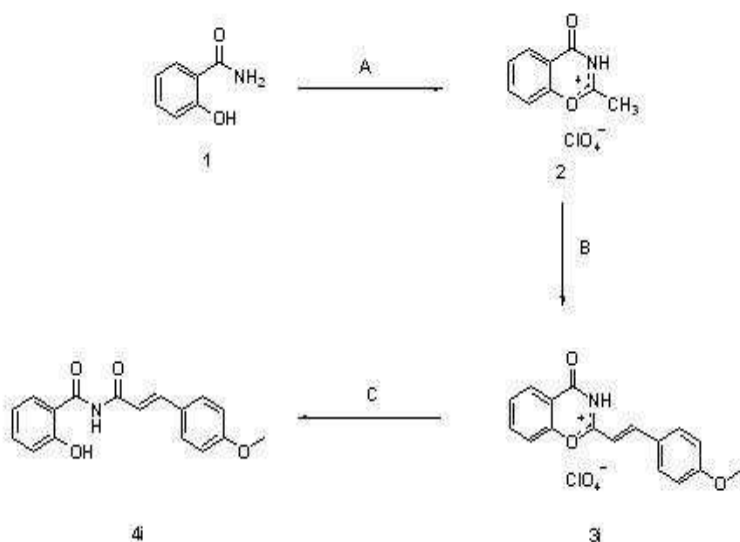
[0208] Yield 75.6%

[0209] pale brown-colored solid

[0210]  $R_f$  = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0211] m.p. 202°C

[0212] 실시예 9. N-[3-(4-메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ09, **4i**)의 합성



[0213]

[0214] 단계 A

[0215] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0216] 단계 B

[0217] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 4-메톡시벤즈알데히드(4-methoxybenzaldehyde, 0.28ml, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(4-methoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3i**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0218] 단계 C

[0219] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(4-methoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3i**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100°C 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4i**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0220]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.27(s, NH), 10.29(s, OH), 8.07(dd, J=1.6, 8.0Hz, 1H), 7.78(d, J=15.6Hz,

1H), 7.69-7.66(m, 2H), 7.55-7.66(m, 2H), 7.05-6.90(m, 4H), 3.87(s, 3H)

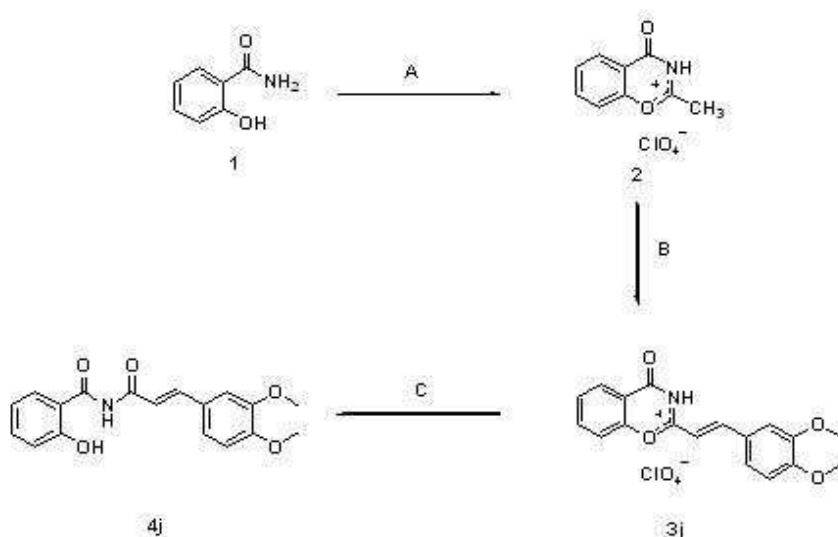
[0221] Yield 88.2%

[0222] pale green-colored solid

[0223] R<sub>f</sub> = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0224] m.p. 172°C

[0225] 실시예 10. N-[3-(3,4-디메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ10, 4j)의 합성



[0226]

[0227] 단계 A

[0228] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0229] 단계 B

[0230] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxybenzaldehyde, 405mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3,4-dimethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3j**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0231] 단계 C

[0232] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3,4-dimethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3j**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100°C 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4j**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0233] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ 11.46(s, NH), 10.87(s, OH), 9.61(s, OH), 9.28(s, OH), 7.87(d, J=7.6Hz, 1H), 7.59(d, J=15.6Hz, 1H), 7.47(t, J=7.6Hz, 1H), 7.27(d, J=15.6Hz, 1H), 7.12(s, 1H), 7.03-6.96(m, 3H), 6.80(d, J=8.4Hz, 1H)

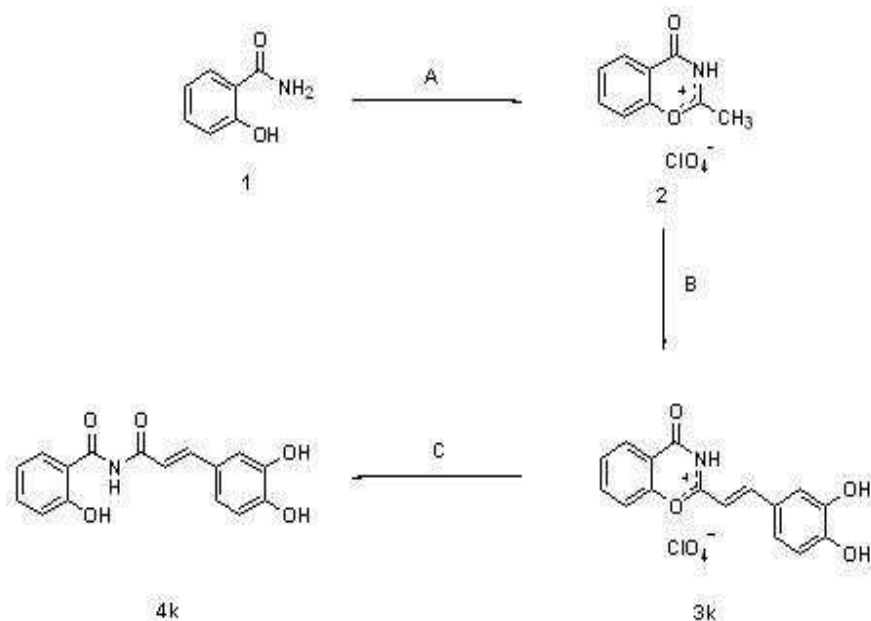
[0234] Yield 35%

[0235] Yellow colored solid

[0236] R<sub>f</sub> = 0.21 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0237] m.p. 188℃

[0238] 실시예 11. N-[3-(3,4-디히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ11, 4k)의 합성



[0239]

[0240] 단계 A

[0241] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0242] 단계 B

[0243] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3,4-디하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde, 317mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3,4-dihydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3k)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0244] 단계 C

[0245] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3,4-dihydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3k)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4k)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0246] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ 11.46(s, NH), 10.87(s, OH), 9.61(s, OH), 9.28(s, OH), 7.87(d, J=7.6Hz, 1H), 7.59(d, J=15.6Hz, 1H), 7.47(t, J=7.6Hz, 1H), 7.27(d, J=15.6Hz, 1H), 7.12(s, 1H), 7.03-6.96(m, 3H), 6.80(d, J=8.4Hz, 1H)

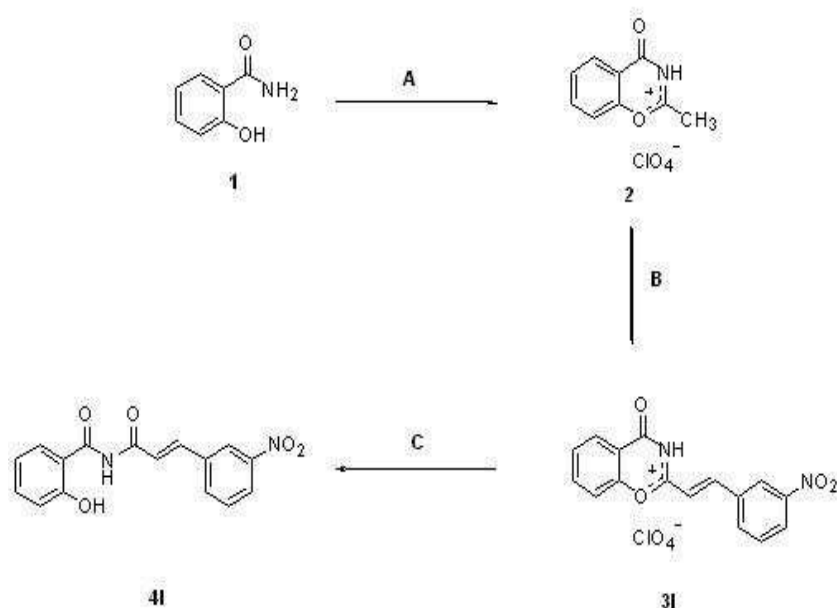
[0247] Yield 35%

[0248] Yellow colored solid

[0249] R<sub>f</sub> = 0.21 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0250] m.p. 206℃

[0251] 실시예 12. N-[3-(3-니트로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ12, 41)의 합성



[0252]

[0253] 단계 A

[0254] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0255] 단계 B

[0256] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3-니트로벤즈알데히드(3-nitrobenzaldehyde, 345mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3-nitrostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**31**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0257] 단계 C

[0258] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3-nitrostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**31**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3-nitrophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**41**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0259]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.42(s, NH), 11.04(s, OH), 8.25(dd, J=1.7, 8.0Hz, 1H), 8.14(t, J=1.6Hz, 1H), 7.82-7.72(m, 2H), 7.58(s, 1H), 7.65-7.62(m, 1H), 7.39(td, J=1.7, 7.6Hz, 1H), 7.01(t, J=7.6Hz, 1H), 6.95-6.89(m, 2H)

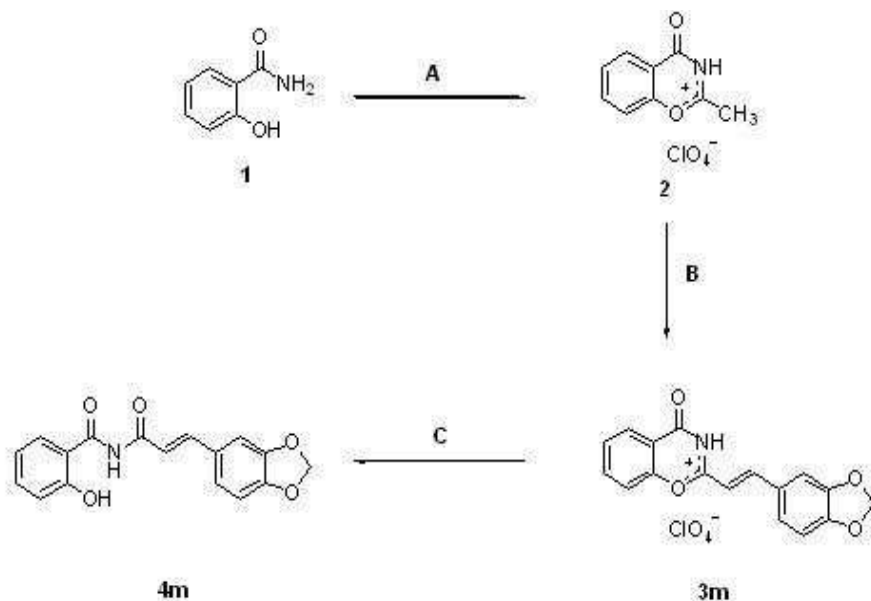
[0260] Yield 8.87%

[0261] yellow-colored solid

[0262]  $R_f$  = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0263] m.p. 126℃

[0264] 실시예 13. N-[3-벤조[1,3]디옥솔-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ13, 4m)의 합성



[0265]

[0266] 단계 A

[0267] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0268] 단계 B

[0269] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 피페로날(piperonal, 343mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-benzo[1,3]dioxole-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3m)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0270] 단계 C

[0271] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-benzo[1,3]dioxole-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3m)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-(3-benzo[1,3]dioxole-1-oxo-2-propenyl)-2-hydroxybenzamide(4m)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0272]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.43(s, NH), 10.90(s, OH), 7.84(dd, J=2.0, 8.4Hz, 1H), 7.64(d, J=15.6Hz, 1H), 7.45(t, J=7.2Hz, 1H), 7.28-7.245(m, 2H), 7.21(d, J=8.4Hz, 1H), 7.01-6.95(m, 3H), 6.03(s, 2H)

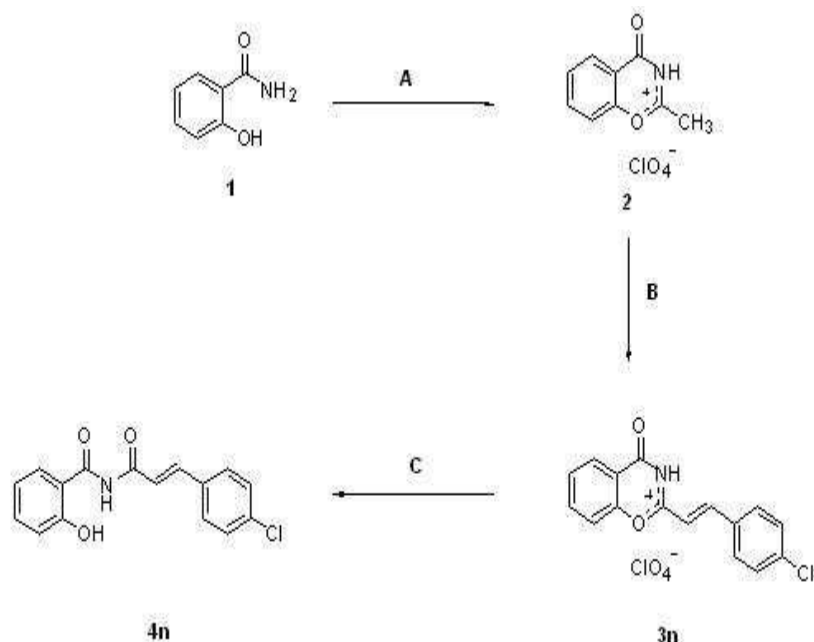
[0273] Yield 40.2%

[0274] Red-colored solid

[0275] Rf = 0.56 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0276] m.p. 196℃

[0277] 실시예 14. N-[3-(4-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ14, 4n)의 합성



[0278]

[0279] 단계 A

[0280] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0281] 단계 B

[0282] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 4-클로로벤즈알데히드(4-chlorobenzaldehyde, 321mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(4-chlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3n)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0283] 단계 C

[0284] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(4-chlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3n)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(4-chlorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4n)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0285]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.47(s, NH), 10.01(s, OH), 7.87(d, J=8.0Hz, 1H), 7.74-7.72(m, 3H), 7.53(d, J=7.2Hz, 2H), 7.48-7.45(m, 2H), 7.04-6.97(m, 2H)

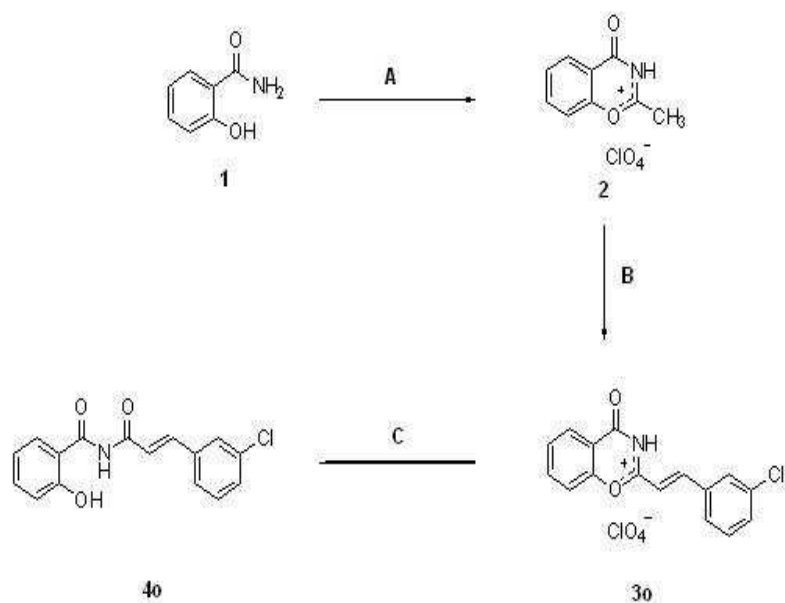
[0286] Yield 54%

[0287] pale yellow solid

[0288] Rf = 0.58 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0289] m.p. 182℃

[0290] 실시예 15. N-[3-(3-클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ15, 4o)의 합성



[0291]

[0292] 단계 A

[0293] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0294] 단계 B

[0295] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3-클로로벤즈알데히드(3-chlorobenzaldehyde, 0.26ml, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3-chlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3o)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0296] 단계 C

[0297] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3-chlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3o)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3-chlorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4o)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0298]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.48(s, NH), 11.03(s, OH), 7.87(d, J=8.0Hz, 1H), 7.78(s, 1H), 7.71(d, J=16.0Hz, 1H), 7.68(d, J=9.6Hz, 1H), 7.50-7.46(m, 4H), 7.03(d, J=8.4Hz, 1H), 6.99(t, J=7.2Hz, 1H)

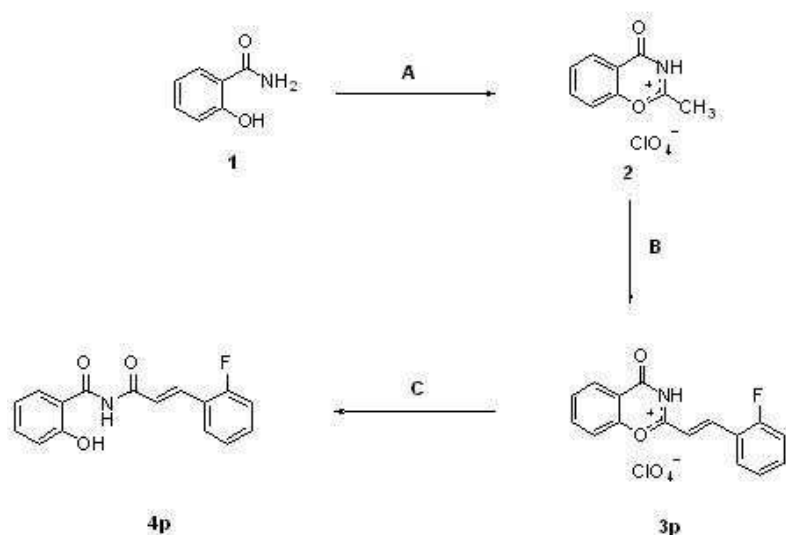
[0299] Yield 59.7%

[0300] white colored solid

[0301] Rf = 0.60 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0302] m.p. 189℃

[0303] 실시예 16. N-[3-(2-플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ16, 4p)의 합성



[0304]

[0305] 단계 A

[0306] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0307] 단계 B

[0308] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 2-플루오로벤즈알데히드(2-fluorobenzaldehyde, 0.4ml, 3.82mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(2-(2-fluorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3p)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0309] 단계 C

[0310] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(2-(2-fluorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3p)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(2-fluorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4p)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0311]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.45(s, NH), 11.07(s, OH), 7.85(d, J=7.6Hz, 1H), 7.81-7.74(m, 2H), 7.56-7.45(m, 3H), 7.36-7.30(m, 2H), 7.02(d, J=8.4Hz, 1H), 6.98(t, J=7.6Hz, 1H)

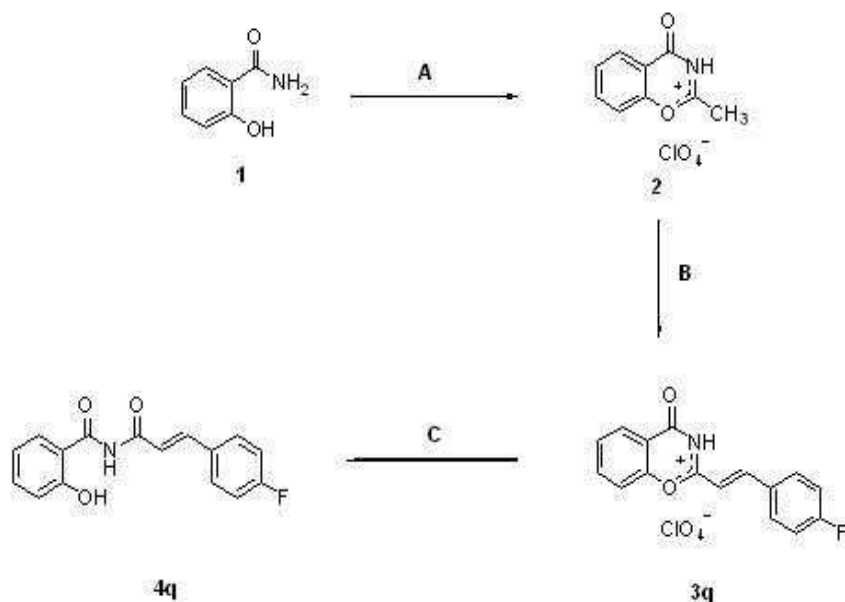
[0312] Yield = 50.8%

[0313] pale yellow colored solid

[0314]  $R_f$  = 0.63 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0315] m.p. 203℃

[0316] 실시예 17. N-[3-(4-플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ17, 4q)의 합성



[0317]

[0318] 단계 A

[0319] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0320] 단계 B

[0321] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 4-플루오로벤즈알데히드(4-fluorobenzaldehyde, 0.4ml, 3.82mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(4-fluorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3q)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0322] 단계 C

[0323] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(4-fluorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3q)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(4-fluorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4q)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0324]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.22(s, NH), 10.38(s, OH), 8.07(dd, J=2.0, 8.4Hz, 1H), 7.82-7.78(m, 3H), 7.60(d, J=16.0Hz, 1H), 7.54(td, J=2.0, 7.2Hz, 1H), 7.25(t, J=8.8Hz, 2H), 7.04(t, J=8.0Hz, 2H)

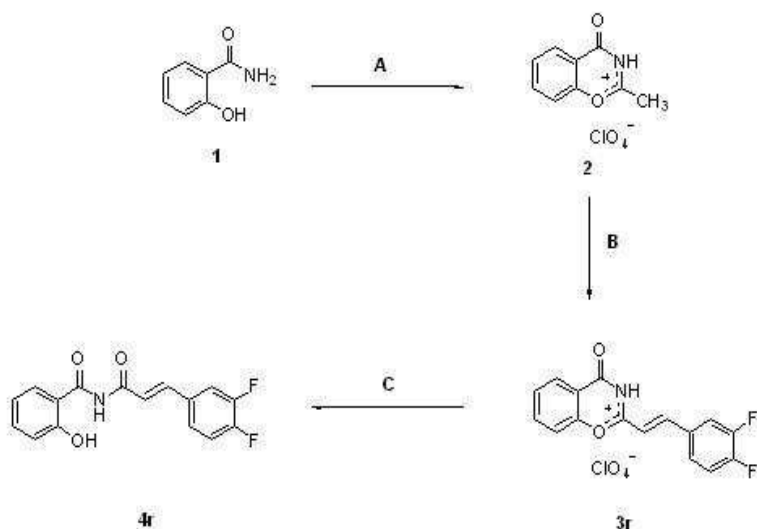
[0325] Yield =37%

[0326] white solid

[0327]  $R_f$  = 0.6 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0328] m.p. 180℃

[0329] 실시예 18. N-[3-(3,4-디플루오로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ18, 4r)의 합성



[0330]

[0331] 단계 A

[0332] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0333] 단계 B

[0334] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3,4-디플루오로벤즈알데히드(3,4-difluorobenzaldehyde, 0.42ml, 3.81mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3,4-difluorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3r**)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0335] 단계 C

[0336] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3,4-difluorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**3r**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-difluorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(**4r**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0337] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, acetone-d<sub>6</sub>) 11.202(s, NH), 10.426(s, OH), 8.076(dd, J=8Hz, 1.6Hz, 1H), 7.821(dd, J=8Hz, 1.6Hz, 1H), 7.731(m, 2H), 7.614(d, J=16Hz, 1H), 7.546(t, J=8Hz, 1H), 7.430(t, J=8Hz, 1H), 7.035(m, 2H)

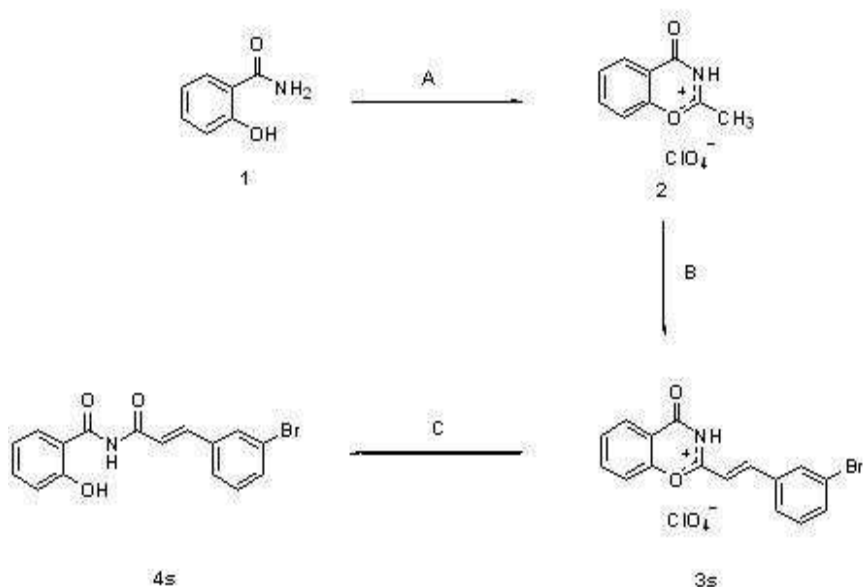
[0338] Yield = 25.3%

[0339] pale ivory colored solid

[0340] R<sub>f</sub> = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0341] m.p. 170℃

[0342] 실시예 19. N-[3-(3-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ19, 4s)의 합성



[0343]

[0344] 단계 A

[0345] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0346] 단계 B

[0347] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 3-브롬벤즈알데히드(3-bromobenzaldehyde, 0.44ml, 3.81mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(3-bromostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3s)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0348] 단계 C

[0349] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3-bromostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3s)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3-bromophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4s)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0350]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  11.21(s, NH), 10.44(s, OH), 8.08(dd, J=1.7, 8.0Hz, 1H), 7.92(t, J=1.6Hz, 1H), 7.78-7.72(m, 2H), 7.68(s, 1H), 7.65-7.62(m, 1H), 7.54(td, J=1.7, 7.6Hz, 1H), 7.44(t, J=7.6Hz, 1H), 7.06-7.00(m, 2H)

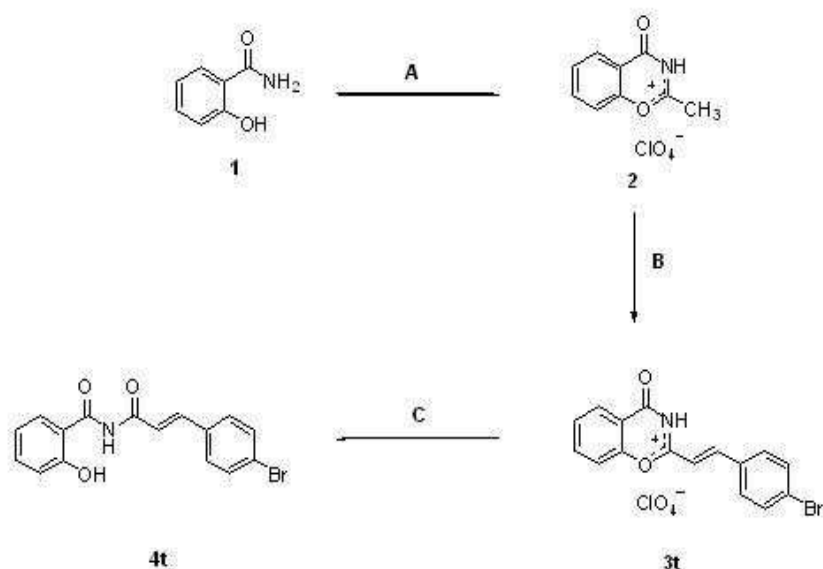
[0351] Yield = 18.4%

[0352] ivory-colored solid

[0353] Rf = 0.57 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0354] m.p. 110℃

[0355] 실시예 20. N-[3-(4-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ20, 4t)의 합성



[0356]

[0357] 단계 A

[0358] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0359] 단계 B

[0360] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 4-브로벤즈알데히드(4-bromobenzaldehyde, 423mg, 2.29mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(4-bromostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3t)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0361] 단계 C

[0362] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(4-bromostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3t)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(4-bromophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4t)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0363]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.48(s, NH), 11.03(s, OH), 7.87(m, 1H), 7.72-7.66(m, 5H), 7.49-7.45(m, 2H), 7.03-7.01(m, 2H)

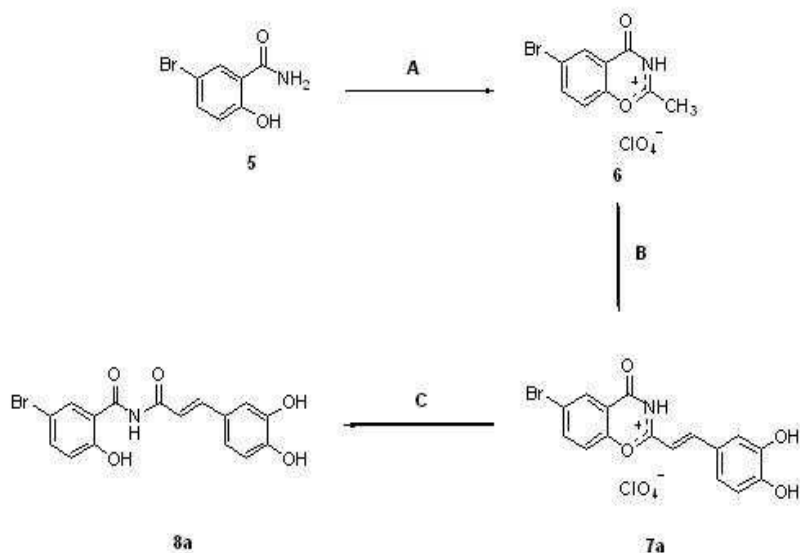
[0364] Yield = 17.9%

[0365] light ivory-colored solid

[0366]  $R_f$  = 0.57 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0367] m.p. 192℃

[0368] 실시예 21. N-[3-(3,4-디히드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ21, 8a)의 합성



[0369]

[0370] 단계 A

[0371] 완전히 건조시킨 250ml 라운드플라스크에 5-브로말리실아마이드(5, 5-bromosalicylamide, 1g, 4.63mmol)과 무수아세트산(acetic anhydride, 10ml)을 넣고 70% 과염소산(70% perchloric acid, 0.5ml, 4.63mmol)을 천천히 적가한 후 상온에서 4시간동안 교반하였다. 이 후, 반응액에 에테르(ether, 200ml)를 넣어 30분 동안 더 교반한 후, 깔대기를 이용해 여과하여 여액은 제거하고 여과용지에 남아 있는 고체(6-bromo-2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 6)를 건조하여 다음 단계에 적용하였다.

[0372] 단계 B

[0373] 100ml 라운드 플라스크에 6-bromo-2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(6, 300mg, 0.88mmol)과 3,4-디하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde, 146mg, 1.06mmol)을 넣고 무수아세트산(acetic anhydride, 1.5ml)과 빙초산(glacial acetic acid, 2ml)로 용해시킨 후 heating mantle를 이용하여 80℃ 상에서 20분 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 방치한 후 에테르(ether)를 이용해 여과하여 여액을 제거한 후 여과지 위에 남은 물질을 건조(6-bromo-2-(3,4-dihydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 7a)하여 다음 단계에 적용하였다.

[0374] 단계 C

[0375] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 6-bromo-2-(3,4-dihydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(7a)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-5-bromo-2-hydroxybenzamide(8a)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0376]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.6(s, NH), 10.9(s, OH), 9.68(s, OH), 9.33(s, OH), 7.93(d, J=2.4Hz, 1H), 7.64(dd, J=2.4, 8.4Hz, 1H), 7.63(d, J=16.0Hz, 1H), 7.19(d, J=16.0Hz, 1H), 7.14(d, J=2.0Hz, 1H), 7.03(dd, J=2.0, 8.4Hz, 1H), 7.02(d, J=8.4Hz, 1H), 6.85(d, J=8.4Hz, 1H)

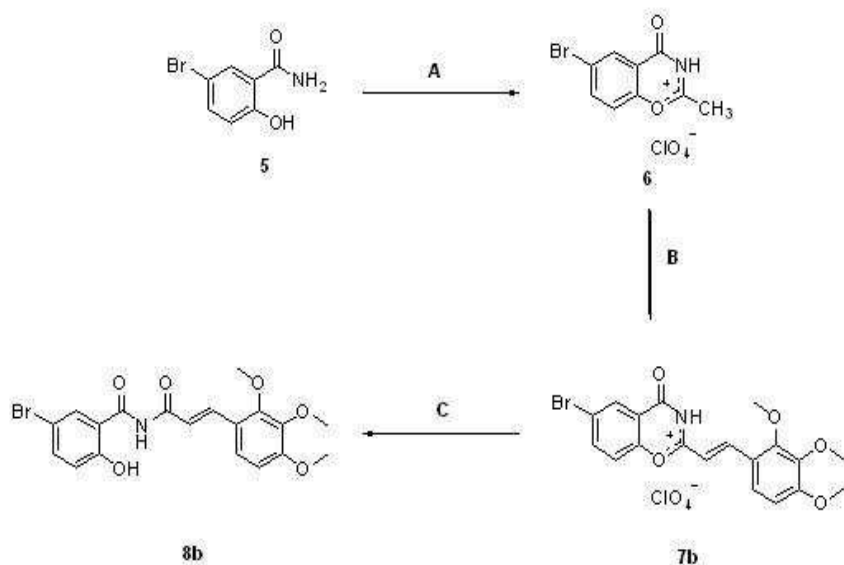
[0377] Yield = 37%

[0378] yellow-colored solid

[0379] R<sub>f</sub> = 0.23 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0380] m.p. 242℃

[0381] 실시예 22. N-[3-(2,3,4-트리메톡시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ22, 8b)의 합성



[0382]

[0383] 단계 A

[0384] 실시예 21의 단계 A와 동일

[0385] 단계 B

[0386] 100ml 라운드 플라스크에 6-bromo-2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**6**, 500mg, 1.46mmol)과 2,3,4-트리메톡시벤즈알데히드(2, 3,4-trimethoxybenzaldehyde, 345mg, 1.76mmol)을 넣고 무수아세트산(acetic anhydride, 1.5ml)과 빙초산(glacial acetic acid, 2ml)로 용해시킨 후 heating mentle를 이용하여 80℃ 상에서 20분 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 방치한 후 에테르(ether)를 이용해 여과하여 여액을 제거한 후 여과지 위에 남은 물질을 건조(6-bromo-2-(2,3,4-trimethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, **7b**)하여 다음 단계에 적용하였다.

[0387] 단계 C

[0388] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 6-bromo-2-(2,3,4-trimethoxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(**7b**)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mentle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-5-bromo-2-hydroxybenzamide(**8b**)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0389] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ 11.5(s, NH), 10.9(s, OH), 7.86(d, J=2.0Hz, 1H), 7.80(d, J=16.4Hz, 1H), 7.59(dd, J=2.0, 8.8Hz, 1H), 7.42(d, J=8.8Hz, 1H), 7.32(d, J=16.0Hz, 1H), 6.96(d, J=13.2Hz, 1H), 6.94(d, J=13.2Hz, 1H), 3.86(s, OCH<sub>3</sub>), 3.77(s, OCH<sub>3</sub>X2)

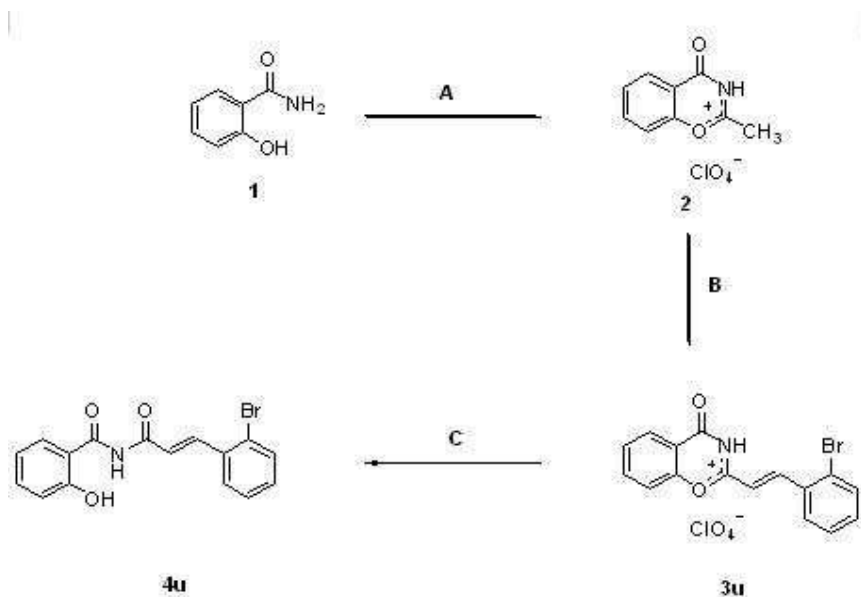
[0390] Yield = 3.6%

[0391] light green colored solid

[0392]  $R_f = 0.45$  (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0393] m.p. 182℃

[0394] 실시예 23. N-[3-(2-브로모페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ23, 4u)의 합성



[0395]

[0396] 단계 A

[0397] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0398] 단계 B

[0399] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 2-브로벤즈알데히드(4-bromobenzaldehyde, 0.45ml, 3.82mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 2-(2-bromostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3u)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0400] 단계 C

[0401] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(2-bromostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3u)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(2-bromophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide(4u)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0402]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, Acetone- $d_6$ ) 11.205(br, NH), 10.491(br, OH), 8.135(d,  $J=16\text{Hz}$ , 1H), 8.090(dd,  $J=8\text{Hz}$ , 1.6Hz, 1H), 7.893(dd,  $J=8\text{Hz}$ , 1.6Hz, 1H), 7.738(dd,  $J=8\text{Hz}$ , 1.6Hz, 1H), 7.660(d,  $J=16\text{Hz}$ , 1H), 7.528(m, 2H), 7.397(t,  $J=8\text{Hz}$ , 1H), 7.039(m, 2H)

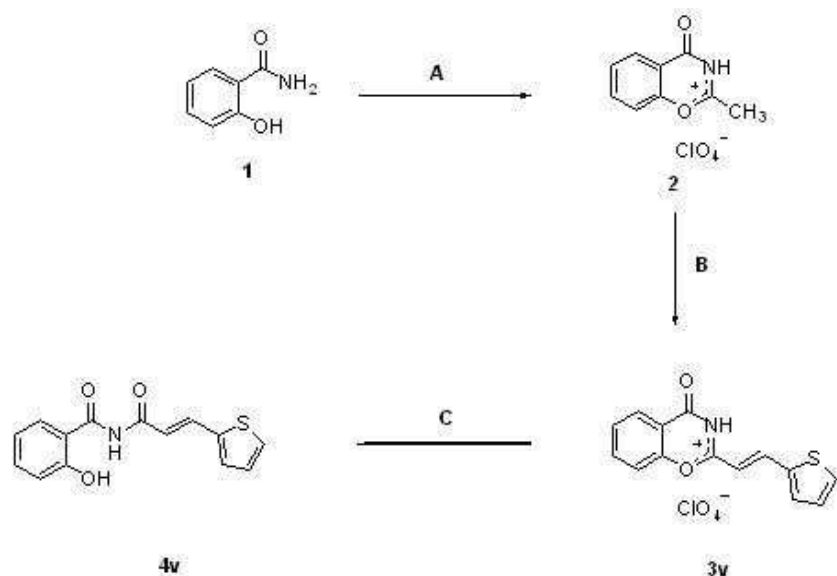
[0403] Yield 26.4%

[0404] pale yellow solid

[0405]  $R_f = 0.58$  (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0406] m.p. 175°C

[0407] 실시예 24. N-[3-티오펜-1-옥소-2-프로페닐]-2-히드록시벤즈아미드(YJ24, 4v)의 합성



[0408]

[0409] 단계 A

[0410] 실시예 1의 단계 A와 동일

[0411] 단계 B

[0412] 실시예 1의 단계 B에서 2-클로로벤즈알데히드 대신 2-치오펜카르복시알데히드(2-thiophenecarboxaldehyde, 0.27ml, 2.87mmol)로 바꾸는 점만 제외하고 동일한 공정을 수행하여 [2-(2-thiophene)vinyl]-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3v)를 얻어 다음단계에 적용하였다.

[0413] 단계 C

[0414] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 [2-(2-thiophene)vinyl]-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(3v)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mantle를 이용하여 100°C 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-(3-thiophene-1-oxo-2-propenyl)-2-hydroxybenzamide(4v)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

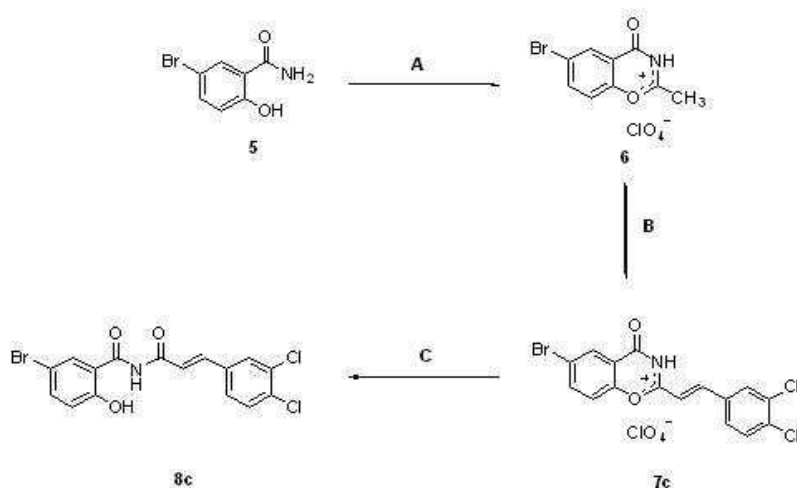
[0415]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.33(s, NH), 10.3(s, OH), 8.08(dd, J=1.6, 8.0Hz, 1H), 7.97(d, J=15.2Hz, 1H), 7.67(d, J=5.2Hz, 1H), 7.55-7.51(m, 2H), 7.44(d, J=15.6Hz, 1H), 7.18(dd, J=4.0, 5.2Hz, 1H), 7.03(d, J=16.4Hz, 1H), 7.01(d, J=16.4Hz, 1H)

[0416] yield 32.4%

[0417] pale yellow solid

[0418]  $R_f$  = 0.54 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0419] 실시예 25. N-[3-(3,4-디클로로페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-5-브로모-2-히드록시벤즈아미드(YJ25, 8c)의 합성



[0420]

[0421] 단계 A

[0422] 실시예 21의 단계 A와 동일

[0423] 단계 B

[0424] 100ml 라운드 플라스크에 6-bromo-2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(6, 500mg, 1.46mmol)과 3,4-디클로로벤즈알데히드(3,4-dichlorobenzaldehyde, 308mg, 1.76mmol)을 넣고 무수아세트산(acetic anhydride, 1.5ml)과 빙초산(glacial acetic acid, 2ml)로 용해시킨 후 heating mentle를 이용하여 80℃ 상에서 20분 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 방치한 후 에테르(ether)를 이용해 여과하여 여액을 제거한 후 여과지 위에 남은 물질을 건조(6-bromo-2-(3,4-dichlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 7c)하여 다음 단계에 적용하였다.

[0425] 단계 C

[0426] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 6-bromo-2-(3,4-dichlorostyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate(7c)를 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 heating mentle를 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1-oxo-2-propenyl]-5-bromo-2-hydroxybenzamide(8c)을 얻어 실험예의 시료로 사용하였다.

[0427]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  11.1(s, NH), 10.4(s, OH), 8.07(dd, J=1.6, 8.0Hz, 1H), 7.93(d, J=2.0Hz, 1H), 7.77-7.65(m, 4H)

[0428] yield 26.5%

[0429] pale yellow solid

[0430] Rf = 0.45 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0431] m.p. 217℃

[0432] 실험예 1. 루시페라제(Luciferase) 어세이법을 통한 Wnt 신호전달 억제 활성

[0433] 상기 실시예에서 합성된 유도체들의 루시페라제(Luciferase) 어세이법을 통한 Wnt 신호전달 억제 활성을 측정하기 위하여 문헌에 기재된 방법에 따라 하기와 같이 실험하였다 (Gwak, J., Park, S., Cho, M., Song, T., Cha,

S. H., Kim, D. E., Jeon, Y. J., Shin, J.G. and Oh, S. (2006). *Polysiphonia japonica* extract suppresses the Wnt/b-catenin pathway in colon cancer cells by activation of NF- $\kappa$ B. *Int. J. Mol. Med.* 17, 1005-1010).

[0434] ‘Reporter gene assay’란 특정 유전자의 promoter 혹은 regulatory element를 reporter gene의 5' region에 클로닝(cloning)하여 reporter vector를 제작, 이를 적절한 세포 (E. coli에서 mammalian cell에 이르기까지)에 도입시킨 후, 여러가지 처리 (transcription factor를 발현하는 vector의 동시 도입, 유효 화합물의 처리 등)한 후, promoter의 활성변화에 의해 전사-번역된 reporter enzyme의 활성을 측정함으로써 유전자 발현의 정도를 정량화하는 방법을 이용하였다.

[0435] Luciferase assay는 reporter gene assay의 일종으로 원하는 signal이 transcription level에서 조절되는지 알아보기 위한 실험으로 Luciferin은 ATP와  $Mg^{2+}$ 가 있는 상태에서 luciferase에 의해 산화한다. Substrate와 enzyme이 결합하면 화학 에너지가 빛 에너지로 바뀌면서 형광이 생기는데 이 형광을 측정하는 것이다 (Park, S., Gaw, J., Cho, M., Song, T., Won, J., Kim, D.-E., Shin, J.-G. and Oh, S. (2006). Hexachlorophene inhibits Wnt/b-catenin pathway by promoting Siah-Mediated  $\beta$ -catenin degradation. *Mol. Pharmacol.* 70, 960-966).

[0436] 이러한 원리에 기초하여 일정농도에서 cell line에 Wnt3a를 자극하여 활성 자극 후, 유도체들을 첨가하여 억제 활성을 알아보는 실험을 수행하고자 하기 표 1과 같은 스크리닝 계획을 수립하였다.

### 표 1

[0437] Wnt/ $\beta$ -catenin 경로 억제활성을 확인하기 위한 스크리닝법

| Wnt/ $\beta$ -catenin 경로 억제활성을 확인하기 위한 스크리닝법                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| HEK293 reporter (TOPFlash) 세포를 96-well plates (15,000 cells/well)에 접종하고 24 시간동안 생장시킴 |
| Wnt3a-CM을 첨가하고 시료들을 각웰에 첨가함.                                                         |
| 15 시간 후에, 플레이트들을 이중 루시페라제 어세이 키트(Promega)를 이용한 firefly luciferase 활성을 측정.            |

[0438] HEK293, PC-3 그리고 Wnt3a-secreting L 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)에서 구입하였고, 10% fetal bovine serum (FBS), 120  $\mu$ g/ml penicillin 그리고 200  $\mu$ g/ml streptomycin을 보충한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 보관하였다.

[0439] Wnt-3a conditioned medium (Wnt3a CM)은 10% FBS의 DMEM에서 4일간 배양한 Wnt3a-secreting L cell을 배양하여 준비하였다. 채취된 배지는 0.22- $\mu$ m filter로 제공하였다. 새 배지가 추가되고, 세포는 3일 더 배양되었으며, 배지는 모아서 이전 배지와 합하였다. 형질 주입은 제조사의 설명에 따라 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 가지고 수행하였다. Luciferase assays는 Dual Luciferase Assay kit (Promega, Madison, WI)를 사용하였다.

[0440] 스크리닝(Screening for a Small-Molecule inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling)은 HEK 293 reporter (TOP-Flash) cell line은 G418 (1 mg/ml)을 포함한 배지를 사용하여, plasmid expressing hFz-1과 TOPFlash를 가지고 상호-형질 감염된 HEK293을 선정함으로써 구축되었다.<sup>75</sup> 세포주는 24시간동안 복제와 증식하여 각 well 마다 15,000개의 세포들로 96-well plate에서 배양된다. Wnt3a CM을 추가하여 넣고, 여기에 상기 실시예에서 합성된 유도체들을 30  $\mu$ g/ml의 농도로 각 well에 넣었다. 15시간 후, plates는 luciferase activity와 cell viability를 검출되었다.

[0441] Wnt/ $\beta$ -catenin의 신호전달을 억제하는 물질을 찾기 위하여, TOPFlash 리포터 및 hFz-1 발현 플라스미드를 포함하는 HEK293 리포터 세포를 만들기 위해서 HEK293 세포를 안정적으로 형질전환하였다. HEK293 리포터 세포가 Wnt3a CM과 함께 항온배양 되었을 때, TOPFlash 리포터 활성은 매우 증가하였다. 이 후, cinnamoylsalicylamide 유도체를 처리하여 억제 활성을 관찰하였다. 대조군은 Wnt3a CM의 존재 또는 부존재하에

서 분석되었다. TOPFlash의 활성은 Cell titer 활성으로 표준화(normalize) 하였다.

[0442] 본 실험 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, cinnamoylsalicylamide 유도체를 처리하지 않은 상태에서 세포주(HEK293)에 Ligand(Wnt3a)를 처리할 경우 활성이 증가됨을 알 수 있다. 유도체의 농도를 40  $\mu$ M과 80  $\mu$ M으로 하여 억제 활성을 관찰해 본 결과, YJ02, YJ04, YJ09, YJ11, YJ21, YJ22, YJ23, YJ24와 같이 두 농도에서 농도 의존적으로 억제 활성을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, YJ04, YJ11, YJ22, YJ23, YJ24는 40  $\mu$ M에서도 상대적으로 매우 월등한 억제활성을 보였다.

[0443] 유도체 내 cinnamoyl group에서 2번 위치(YJ01, Y16, YJ23) 또는 4번 위치(YJ02, YJ09, YJ14, YJ17, YJ20)에 치환기가 있을 경우, 3번 위치(YJ03, YJ15, YJ19)에 치환기가 있을 때보다 억제 활성이 효과적인 것을 알 수 있었으며, 특히 3번 위치에 치환기가 있을 경우는 오히려 Wnt/ $\beta$ -catenin pathway 활성을 증가시키는 것으로 관찰되었다.

[0444] Salicylamide group의 5번 위치에 bromine의 치환유무에 따라서 구조활성을 관찰하였을 때, bromine이 치환되지 않은 물질(YJ04, YJ05, YJ11) bromine이 치환된 물질(YJ21, YJ22, YJ25)보다 보다 향상된 억제 활성을 보이는 것으로 관찰되었다.

[0445] 또한, cinnamoyl group 대신 YJ13, YJ24와 같이 heterocyclic ring을 포함한 salicylamide 유도체의 경우 전반적으로 우수한 Wnt 억제 활성을 보이는 것으로 관찰되었다.

## 표 2

[0446] 합성된 유도체의 Wnt/ $\beta$ -catenin 활성 억제 효과

| Wnt3a                                                                      | Compound | Relative<br>*FL/Cell titer |            | Wnt3a | Compound | Relative<br>*FL/Cell titer |            |
|----------------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------|------------|-------|----------|----------------------------|------------|
|                                                                            |          | 40 $\mu$ M                 | 80 $\mu$ M |       |          | 40 $\mu$ M                 | 80 $\mu$ M |
| -                                                                          | -        | 2.479                      |            | +     | YJ13     | 81.259                     | 27.688     |
| +                                                                          | -        | 100                        |            | +     | YJ14     | 126.204                    | 52.750     |
| +                                                                          | YJ01     | 151.241                    | 116.556    | +     | YJ15     | 123.727                    | 156.167    |
| +                                                                          | YJ02     | 81.298                     | 48.836     | +     | YJ16     | 103.584                    | 17.928     |
| +                                                                          | YJ03     | 173.744                    | 156.855    | +     | YJ17     | 102.379                    | 18.573     |
| +                                                                          | YJ04     | 4.580                      | 0.469      | +     | YJ18     | 137.080                    | 86.537     |
| +                                                                          | YJ05     | 86.971                     | 67.646     | +     | YJ19     | 132.772                    | 160.138    |
| +                                                                          | YJ06     | 114.115                    | 96.395     | +     | YJ20     | 102.134                    | 75.389     |
| +                                                                          | YJ07     | 95.920                     | 71.876     | +     | YJ21     | 67.057                     | 8.826      |
| +                                                                          | YJ08     | 134.187                    | 126.146    | +     | YJ22     | 31.202                     | 24.940     |
| +                                                                          | YJ09     | 82.343                     | 15.905     | +     | YJ23     | 2.949                      | 0.876      |
| +                                                                          | YJ10     | 158.690                    | 134.541    | +     | YJ24     | 46.508                     | 2.890      |
| +                                                                          | YJ11     | 34.316                     | 9.542      | +     | YJ25     | 119.890                    | 99.670     |
| +                                                                          | YJ12     | 92.069                     | 62.365     |       |          |                            |            |
| *FL/Cell titer : Luciferase assay value/ cell titer assay value로 보정한 상대적 값 |          |                            |            |       |          |                            |            |

[0447] 실험예 2. In vitro 세포독성측정 연구

[0448] 실시예에서 합성된 유도체들의 세포독성을 검정하기 위하여 문헌에 기재된 방법(Park, S., Gawk, J., Cho, M., Song, T., Won, J., Kim, D.-E., Shin, J.-G. and Oh, S. (2006). Hexachlorophene inhibits Wnt/b-catenin pathway by promoting Siah-Mediated  $\beta$ -catenin degradation. *Mol. Pharmacol.* 70, 960-966)에 따라 하기와 같이 실험하였다.

[0449] Luciferase assay에 의한 분석법은 억제활성에 의한 것 외에 chemical에 대한 toxicity에 의한 세포사멸 때문에 낮은 수치가 나올 수 있다.

[0450] Cell viability test란 살아있는 세포의 ATP 값을 측정하는 방법으로 luciferase assay와 함께 수행함으로써 세포의 viability에는 영향을 미치지 않고  $\beta$ -catenin-dependent transcription만 효과적으로 감소시킬 수 있

는 물질을 선정할 수 있어야 한다. 따라서 cell viability를 알아보기 위해 CellTiter-Glo Assay를 실시하며 수행 방법은 하기 표 3와 같다.

[0451]

**표 3**

[0452]

CellTiter-Glo Assay

|                                                                                                                    |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Cinnamoylsalicylamide 유도체 관련 CellTiter-Glo Assay 수행 계획                                                             |  |
| HCT-116 결장암(colon cancer cells, ACTT(American type Culture Collection)으로부터 구매)을 96-well plates(5000 cells)에 접종하였다. |  |
| 시료를 48시간 처리함                                                                                                       |  |
| 개개 시료들의 세포 생존율을 3중으로 제조사의 지시서대로 Celltiter-Glo assay kit (Cat# G7570, Promega) 로 측정하였다.                             |  |

[0453]

Cell Viability Assay에서 Cells은 96-well plated에서 배양하였고, 48시간동안 시료를 처리 하였다. 제조사의 설명에 따라 CellTiter-Glo assay kit (Promega)을 사용하여 각각의 처리된 샘플로부터 cell viability가 3회씩 측정되었다.

[0454]

위의 스크리닝을 통해 활성을 보인 물질 중 YJ02, YJ04, YJ06, YJ07, YJ08, YJ09, YJ11, YJ21, YJ22를 선별하여 cell viability assay을 수행하였다. 인간의 대장암 세포인 HCT116에 대한 효과를 알아보았으며 이는 대장암 세포에서  $\beta$ -catenin의 축적이 빈번하게 일어나기 때문에 이에 대한 효과를 테스트하고자 함이었다.

[0455]

본 시험 결과, 결과적으로, 실험한 물질들은 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M에서 완전한 세포독성이 관찰되었다. cinnamoyl group에 3,4-dihydroxy기가 치환된 YJ21, YJ11이 암세포의 viability를 가장 많이 감소시켰으며 luciferase assay에서 가장 억제 활성이 좋은 YJ04, YJ22와 같은 cinnamoyl group에 2,3,4-trimethoxy기가 포함된 물질들도 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M 등 농도가 증가할수록 cell viability를 감소시켰다 (도 1 참조).

[0456]

하기에 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0457]

**제제예 1. 산제의 제조**

[0458]

화합물 YJ21 20 mg

[0459]

유당 100 mg

[0460]

탈크 10 mg

[0461]

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0462]

**제제예 2. 정제의 제조**

[0463]

화합물 YJ02 10 mg

[0464]

옥수수전분 100 mg

[0465]

유당 100 mg

[0466]

스테아린산 마그네슘 2 mg

[0467]

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0468] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

|        |             |         |
|--------|-------------|---------|
| [0469] | 화합물 YJ04    | 10 mg   |
| [0470] | 결정성 셀룰로오스   | 3 mg    |
| [0471] | 락토오스        | 14.8 mg |
| [0472] | 마그네슘 스테아레이트 | 0.2 mg  |

[0473] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0474] **제제예 4. 주사제의 제조**

|        |                                                      |         |
|--------|------------------------------------------------------|---------|
| [0475] | 화합물 YJ06                                             | 10 mg   |
| [0476] | 만니톨                                                  | 180 mg  |
| [0477] | 주사용 멸균 증류수                                           | 2974 mg |
| [0478] | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 26 mg   |

[0479] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0480] **제제예 5. 액제의 제조**

|        |          |       |
|--------|----------|-------|
| [0481] | 화합물 YJ07 | 20 mg |
| [0482] | 이성화당     | 10 g  |
| [0483] | 만니톨      | 5 g   |
| [0484] | 정제수      | 적량    |

[0485] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0486] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

|        |             |             |
|--------|-------------|-------------|
| [0487] | 화합물 YJ08    | 1000 mg     |
| [0488] | 비타민 혼합물     | 적량          |
| [0489] | 비타민 A 아세테이트 | 70 $\mu$ g  |
| [0490] | 비타민 E       | 1.0 mg      |
| [0491] | 비타민 B1      | 0.13 mg     |
| [0492] | 비타민 B2      | 0.15 mg     |
| [0493] | 비타민 B6      | 0.5 mg      |
| [0494] | 비타민 B12     | 0.2 $\mu$ g |
| [0495] | 비타민 C       | 10 mg       |
| [0496] | 비오틴         | 10 $\mu$ g  |
| [0497] | 니코틴산아미드     | 1.7 mg      |
| [0498] | 엽산          | 50 $\mu$ g  |

|        |                                                                                                                                                                        |           |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| [0499] | 판토텐산 칼슘                                                                                                                                                                | 0.5 mg    |
| [0500] | 무기질 혼합물                                                                                                                                                                | 적량        |
| [0501] | 황산제1철                                                                                                                                                                  | 1.75 mg   |
| [0502] | 산화아연                                                                                                                                                                   | 0.82 mg   |
| [0503] | 탄산마그네슘                                                                                                                                                                 | 25.3 mg   |
| [0504] | 제1인산칼륨                                                                                                                                                                 | 15 mg     |
| [0505] | 제2인산칼륨                                                                                                                                                                 | 55 mg     |
| [0506] | 구연산칼륨                                                                                                                                                                  | 90 mg     |
| [0507] | 탄산칼슘                                                                                                                                                                   | 100 mg    |
| [0508] | 염화마그네슘                                                                                                                                                                 | 24.8 mg   |
| [0509] | 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다. |           |
| [0510] | <b>제제예 7. 건강 음료의 제조</b>                                                                                                                                                |           |
| [0511] | 화합물 YJ09                                                                                                                                                               | 1000 mg   |
| [0512] | 구연산                                                                                                                                                                    | 1000 mg   |
| [0513] | 올리고당                                                                                                                                                                   | 100 g     |
| [0514] | 매실농축액                                                                                                                                                                  | 2 g       |
| [0515] | 타우린                                                                                                                                                                    | 1 g       |
| [0516] | 정제수를 가하여                                                                                                                                                               | 전체 900 ml |
| [0517] | 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.                                    |           |
| [0518] | 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.                                                          |           |

도면

도면1

