(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월19일
(11) 등록번호 10-1829545
(24) 등록일자 2018년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 473/16 (2006.01) *A61K 31/52* (2006.01)
C07D 473/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 473/16 (2013.01)
A61K 31/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0111890
(22) 출원일자 2016년08월31일
심사청구일자 2016년10월21일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160101634 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 세종산학협력단
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
변영주
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 308동 501호
김상겸
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 503동 1704호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 최승희

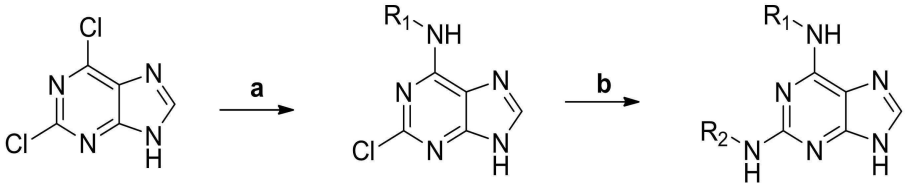
(54) 발명의 명칭 **간 독성 예방 및 치료 효과를 나타내는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 (N2,N6-substituted-9H-purine-2,6-diamine) 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 간 독성 예방 및 치료 효과를 나타내는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 (N2,N6-substituted-9H-purine-2,6-diamine) 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 하기 화학식 1로 표시되는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 약학 조성

(뒷면에 계속)

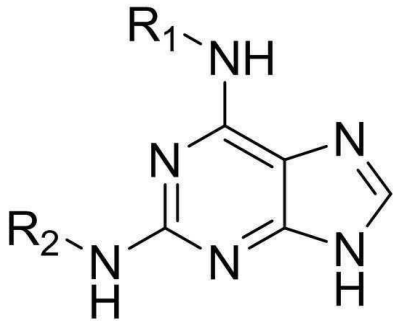
대 표 도 - 도1



Reagant and conditions: (a) appropriate amine (1.1 eq), Et_3N (1.05 eq), DMF,100°C, 8 hr
(b) appropriate amine (5 eq), n-BuOH, NaBF4 (1.5 eq), 180°C, microwave, 75 min or sealed tube, 3 hr

물에 관한 것이다:

<화학식 1>



상기 식에서,

R_1은 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이고,

R_2는 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이다.

(52) CPC특허분류
C07D 473/40 (2013.01)

(72) 발명자
김세윤
서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 301동 1308호
한용만
대전광역시 유성구 가정로 43, 110동 305호
이슬기
충청남도 천안시 서북구 쌍용11길 55, 205동 503호

(56) 선행기술조사문헌
ChemBioChem, 2002, 제9호, 페이지 897-901*
WO2016087665 A2*
PubChem(http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), CID115669326, Create Date 2016.1.29.*
J. Comb. Chem., 2007, 제9권, 페이지 197-199 및 추가 정보(Supporting Information)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015061639
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국생명공학연구원
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 인간 줄기세포 유래 간세포분화 원천기술 개발과 간세포 기반 독성·약효 평가 시스템 확립(1차/2단계)
기 여 율 1/1
주관기관 한국과학기술원
연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

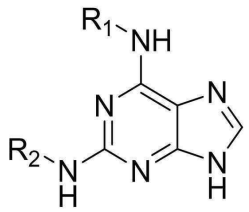
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 <화학식 1>로 표시되고, Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) 효소의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체:

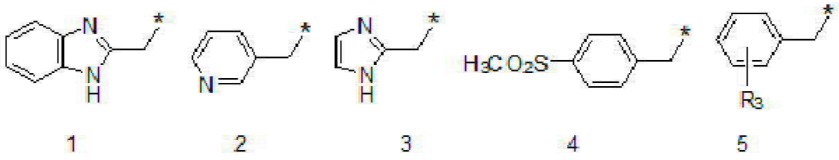
<화학식 1>



상기 식에서,

R_1은 하기 구조식 1 내지 4 중에서 선택되는 어느 하나이고, R_2는 하기 구조식 5이며,

<구조식>



1 2 3 4 5

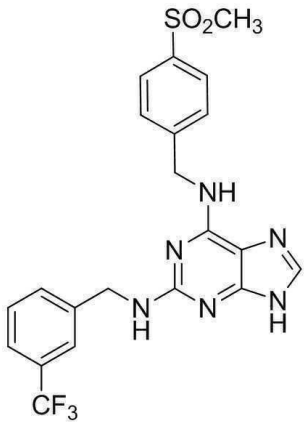
상기 <구조식>에서, R_3은 할로겐기, 니트로기 및 트리플루오로메틸기 중에서 선택되는 어느 하나이다.

청구항 2

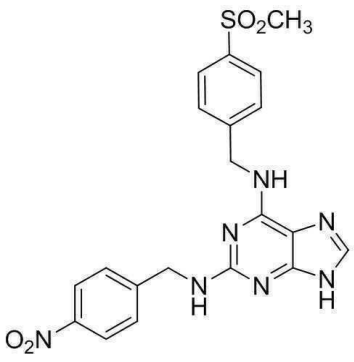
제1항에 있어서,

상기 <화학식 1>로 표시되는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체는 하기 <화학식 2> 내지 <화학식 15>로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물인 것을 특징으로 하는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체:

<화학식 2>

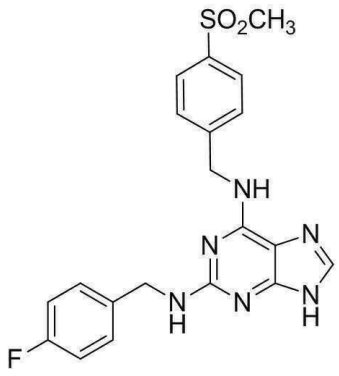


<화학식 3>

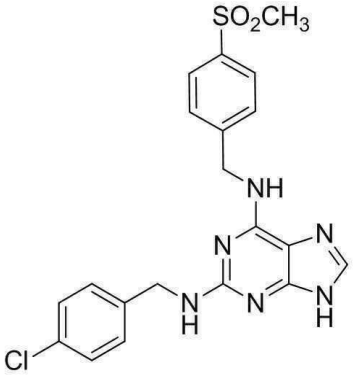


<화학식 4>

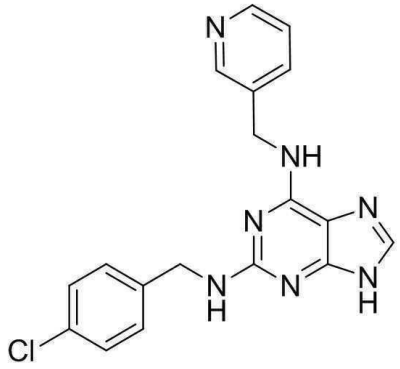
<화학식 5>



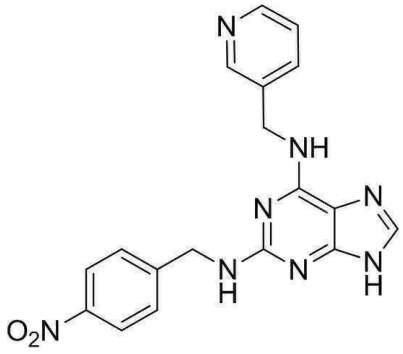
<화학식 6>



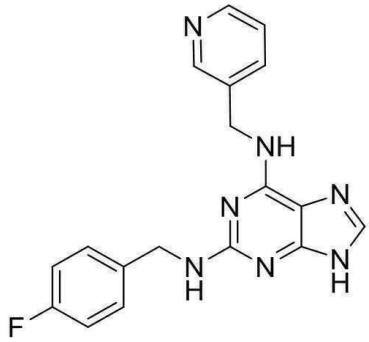
<화학식 7>



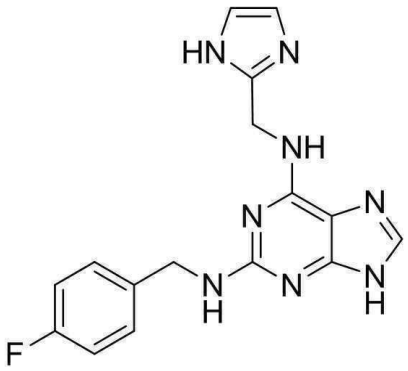
<화학식 8>



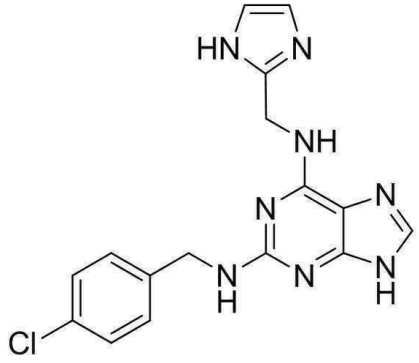
<화학식 9>



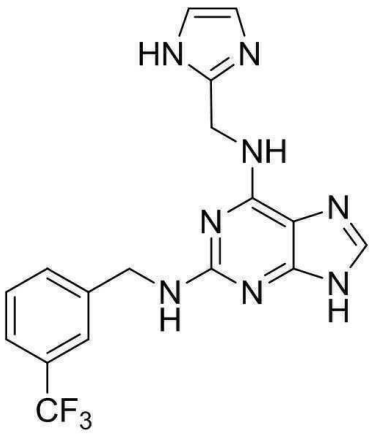
<화학식 10>



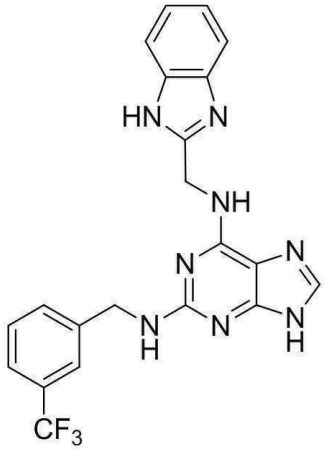
<화학식 11>



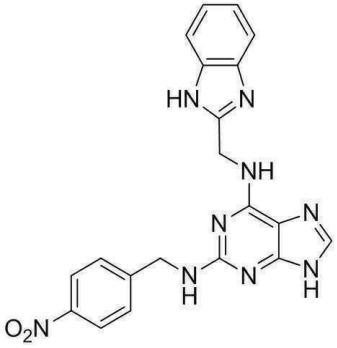
<화학식 12>



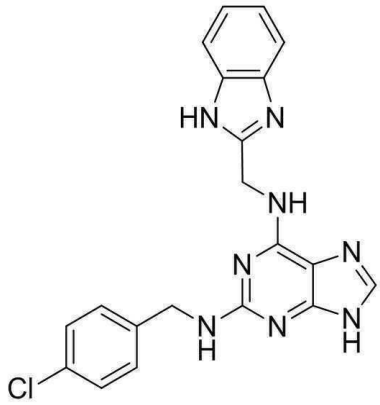
<화학식 13>

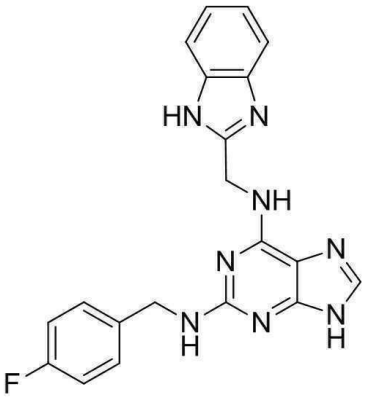


<화학식 14>



<화학식 15>





청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간 독성 예방 및 치료 효과를 나타내는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 (N2,N6-substituted-9H-purine-2,6-diamine) 유도체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] TNP (N2-(m-trifluorobenzyl),N6-(p-nitrobenzyl)purine)는 상업적으로 판매되는 화학물질로서, 현재까지 알려

진 바로는 이노시톨 펜타키포스페이트 키나아제 (inositol pentakisphosphate kinase)를 특이적으로 저해하는 약물이다 (비특허문헌 1). TNP는 5-이노시톨 파이로인산 (inositol pyrophosphate)의 생합성을 억제함으로써, 세포 내 5-이노시톨 다인산 (polyphosphate)의 수준을 낮출 뿐 아니라, 간세포의 인슐린 신호전달반응을 증가시킨다는 효과가 보고되어 있다 (비특허문헌 2). 또한, TNP는 골수 유래 중간엽 줄기세포에 처리할 경우, 세포의 노화진행반응을 감소시키는 효과를 갖는 것으로도 알려져 있다 (비특허문헌 3).

[0003] 그러나, 아직까지 TNP 약물에 대한 CYP3A4 대사와의 관련성은 전혀 보고된 바가 없다. CYP450 (cytochrome P450)은 약물 대사의 75%를 담당하는 것으로 알려져 있으며, 시판되는 약물의 50% 이상이 CYP450에 의해 대사되는 것으로 보고되어있다. CYP는 다양한 동종효소 (isoform)를 가지고 있으며, CYP3A4는 간이나 장에서 약물의 대사에 관여하는 대표적인 효소이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: J Biol Chem. Apr 17, 2009; 284(16): 10571-10582

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Cell. 2010; 143(6): 897-910

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Stem Cell Res Ther. 2014 Mar 26;5(2):33

발명의 내용

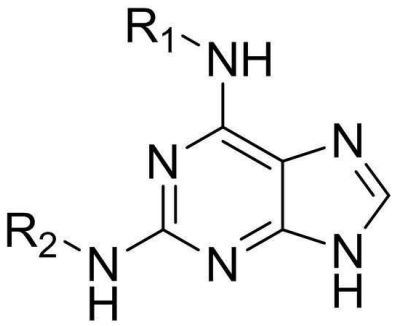
해결하려는 과제

[0005] 이에, 본 발명에서는 약물의 대사에 관여하는 CYP효소의 일종인 3A4에 의해서 대사되는 반응을 억제함으로써, 간 독성 예방 및 치료 효과를 나타내는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 (N2,N6-substituted-9H-purine-2,6-diamine) 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 하기 화학식 1로 표시되는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체를 제공한다:

화학식 1

[0007] 

[0008] 상기 식에서,

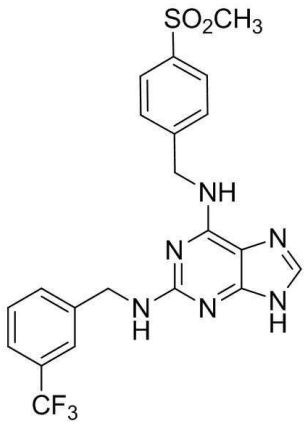
[0009] R_1은 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이고,

[0010] R_2는 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소

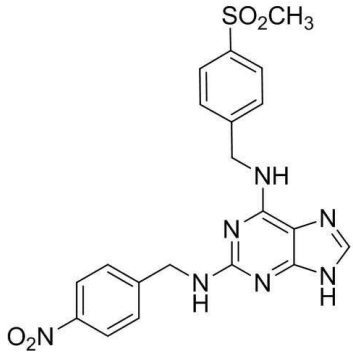
수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 하기의 화학식 2 내지 화학식 19로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물일 수 있다:

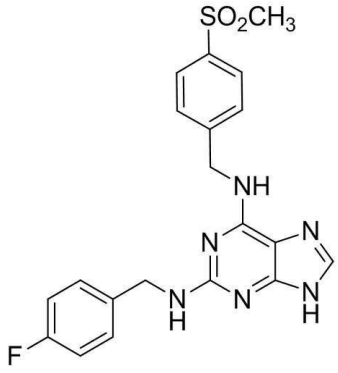
화학식 2

[0012] 

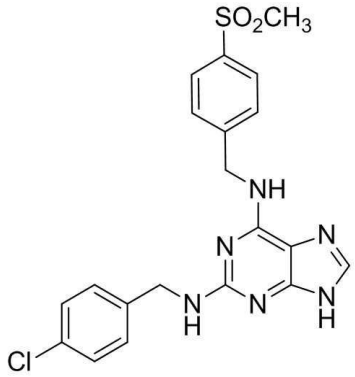
화학식 3

[0013] 

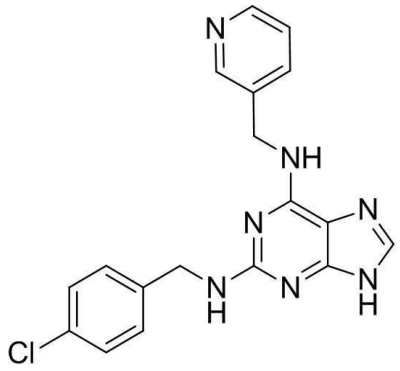
화학식 4

[0014] 

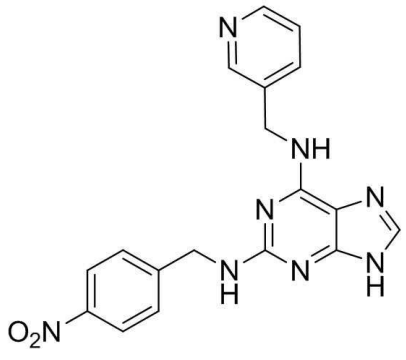
화학식 5

[0015] 

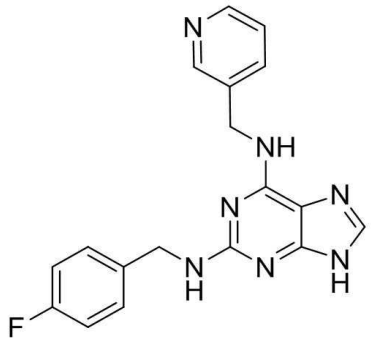
화학식 6

[0016] 

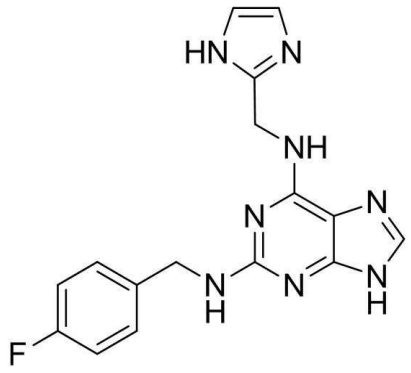
화학식 7

[0017] 

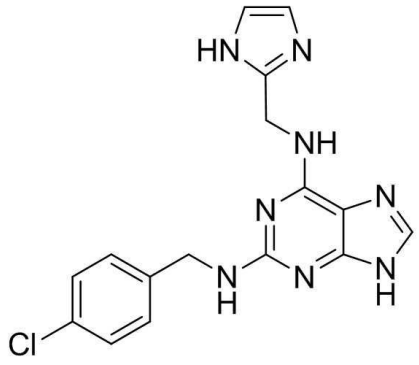
화학식 8

[0018] 

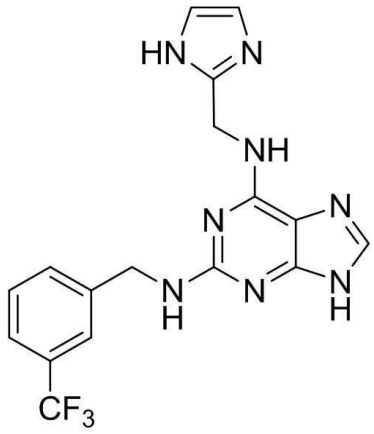
화학식 9

[0019] 

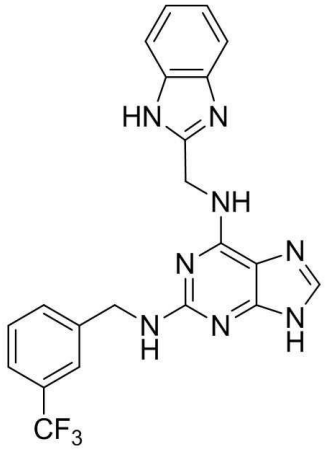
화학식 10

[0020] 

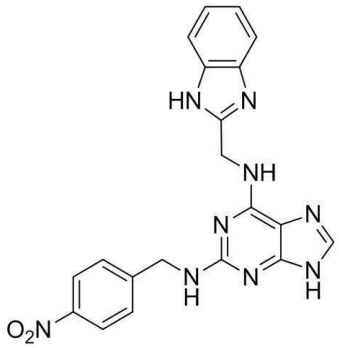
화학식 11

[0021] 

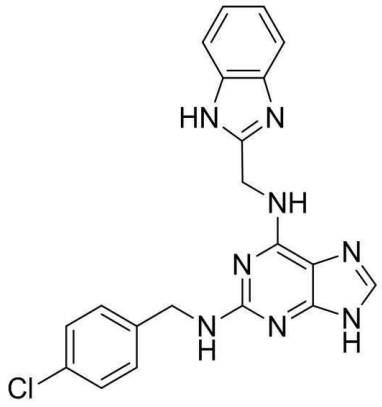
화학식 12

[0022] 

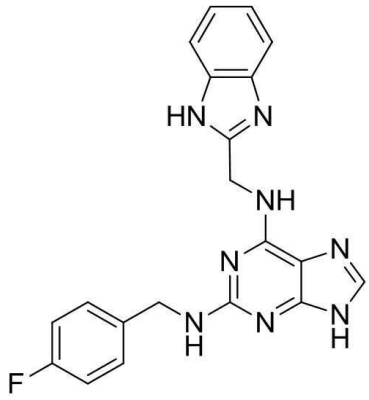
화학식 13

[0023] 

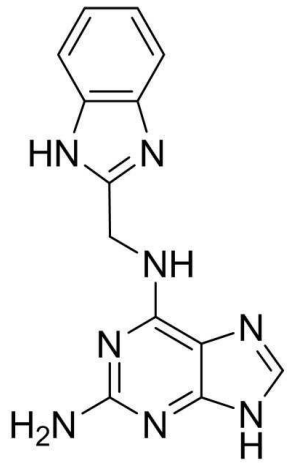
화학식 14

[0024] 

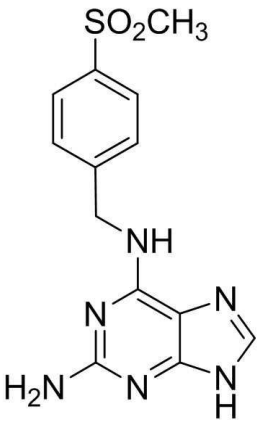
화학식 15

[0025] 

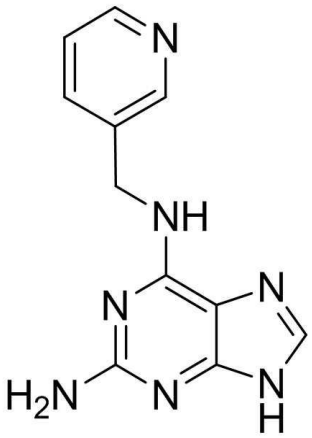
화학식 16

[0026] 

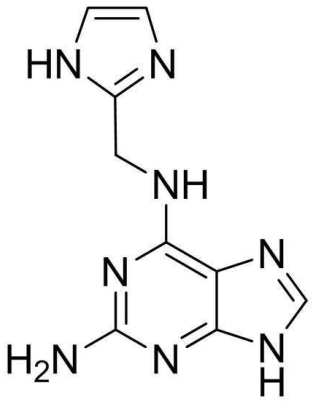
화학식 17

[0027] 

화학식 18

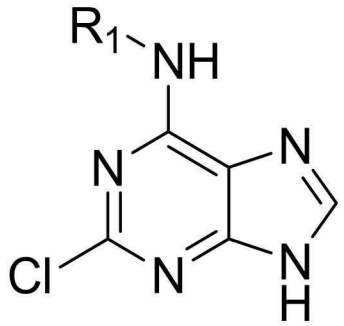
[0028] 

화학식 19

[0029] 

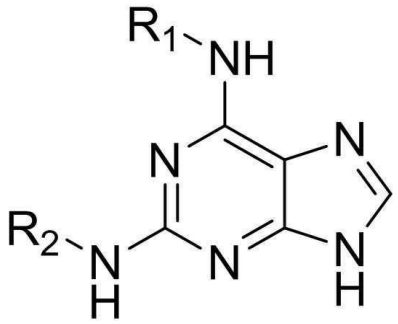
[0030] 또한, 본 발명은 하기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 아민, n-부탄올 및 $NaBF_4$와 반응시킴으로써 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체의 제조방법을 제공한다:

화학식 20



[0031]

[0032] <화학식 1>



[0033]

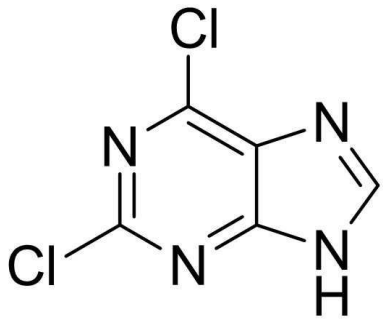
[0034] 상기 식에서,

[0035] R_1은 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이고,

[0036] R_2는 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물은 하기 화학식 21로 표시되는 화합물을 DMF 중에서 아민 및 트리에틸아민과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

화학식 21



[0038]

[0039] 더 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체 또는 그 염을 유효

성분으로 함유하는 간독성 예방 및 치료를 위한 약학 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약학 조성물은 다른 간독성 예방 및 치료를 위한 약물, 담체, 희석제, 보조제 및 안정화제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 안정화제는 단백질, 당질, 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따르면, 약물의 대사에 관여하는 CYP효소의 일종인 3A4에 의해서 대사되는 반응을 억제함으로써, 간독성 예방 및 치료 효과를 나타내는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체 및 이를 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 이를 이용해서 다양한 간독성을 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 퓨린 유도체의 6번 위치와 2번 위치에 4-설포닐벤질아민, 3-피리딜메틸아민, 이미다졸릴메틸아민, 벤즈이미다졸릴메틸아민기가 치환된 화합물들의 합성과정을 개략적으로 도시한 반응 개요도이다.

도 2a 내지 2j는 TNP 약물의 p450 CYP 효소 활성조절 평가 결과 (인간 간 마이크로좀)를 나타낸 그래프이다.

도 3은 TNP 약물의 CYP3A4 활성저해능 평가 결과 (인간 CYP3A4 마이크로좀)를 나타낸 그래프이다.

도 4는 TNP 약물의 CYP3A4 활성저해능 평가 결과 (줄기세포유래 간세포)를 나타낸 그래프이다.

도 5는 TNP 유도체들의 CYP3A4 억제효능 개선 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 TNP 유도체들의 CYP3A4 억제효능 상실 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

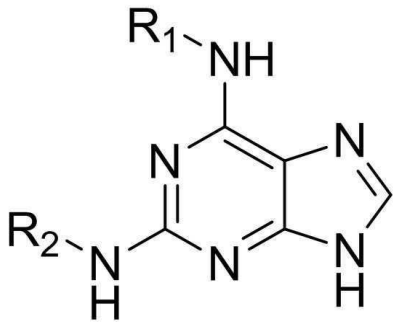
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[0045] 본 발명에서는 하기 화학식 1의 일반식을 갖는 퓨린 유도체들이 대사에 관여하는 CYP3A4를 효과적으로 저해함을 최초로 확인하였으며, 이를 기반으로 본 발명을 완성하게 되었다.

[0046] 따라서, 본 발명에서는 하기 화학식 1로 표시되는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체를 제공한다:

[0047] <화학식 1>

[0048] 

[0049] 상기 식에서,

[0050] R_1은 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이고,

[0051] R_2는 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이다.

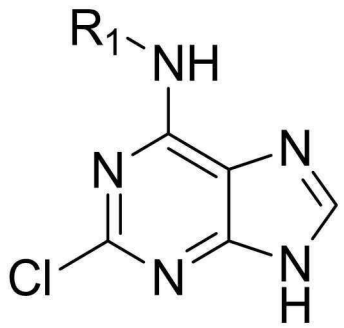
[0052] 참고로, 본 발명에 있어서, "치환된 알킬", 또는 "치환된 사이클로알킬"이라 함은, 상기 화학식 1의 퓨린 모체

의 R_1 또는 R_2 위치에 알킬기가 부착되고, 이러한 알킬기에 사이클로알킬기가 부착된 치환기를 포함하는 의미로 사용된다.

[0053] 본 발명에 따른 퓨린 유도체는 방향족 치환반응을 통해서 제조할 수 있는 바, 예를 들어 출발 물질인 2,6-다이클로로-9-퓨린에 치환된 아릴알킬아민 또는 헤테로아릴알킬아민을 사용하여 반응시킴으로써 다양한 유도체를 합성할 수 있다.

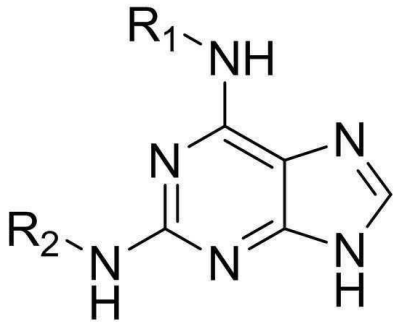
[0054] 따라서, 본 발명은 또한 하기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 아민, n-부탄올 및 $NaBF_4$와 반응시킴으로써 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 유도체의 제조 방법을 제공한다:

[0055] <화학식 20>



[0056]

[0057] <화학식 1>



[0058]

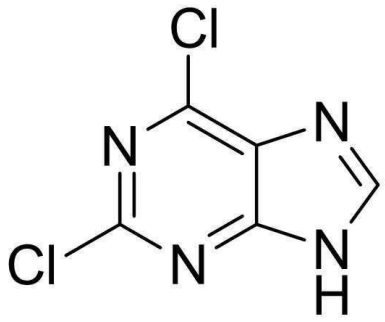
[0059] 상기 식에서,

[0060] R_1은 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이고,

[0061] R_2는 탄소수 1 내지 20의 치환된 알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 사이클로알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 사이클로헤테로알킬, 탄소수 3 내지 20의 치환된 아릴알킬, 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로알킬, 또는 탄소수 1 내지 20의 치환된 헤테로아릴알킬이다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물은 하기 화학식 21로 표시되는 화합물을 DMF 중에서 아민 및 트리에틸아민과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

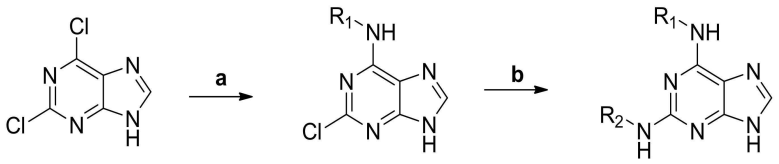
[0063] <화학식 21>



[0064] .

[0065] 하기 반응식 1에는 본 발명의 일 구현예에 따른 퓨린 유도체의 제조방법에 대한 개략적인 반응식을 도시하였다:

[0066] <반응식 1>

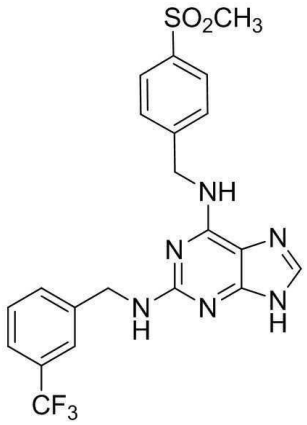


Reagant and conditions: (a) appropriate amine (1.1 eq), Et_3N (1.05 eq), DMF,100°C, 8 hr
(b) appropriate amine (5 eq), n-BuOH, NaBF4 (1.5 eq), 180°C, microwave, 75 min or sealed tube, 3 hr

[0067]

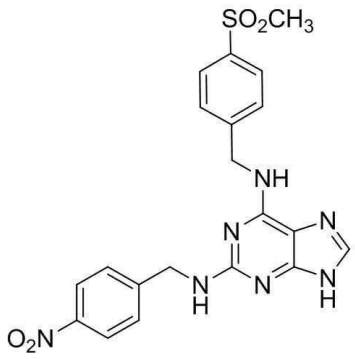
[0068] 예를 들어, 아릴알킬아민으로서 4-설포닐벤질아민을, 헤테로아릴알킬아민으로서 3-피리딜메틸아민, 이미다졸릴메틸아민 또는 벤즈이미다졸릴메틸아민을 사용하는 경우, 하기 화학식 2 내지 19로 표시되는 다양한 퓨린 유도체들을 제조하는 것이 가능하다.

[0069] <화학식 2>



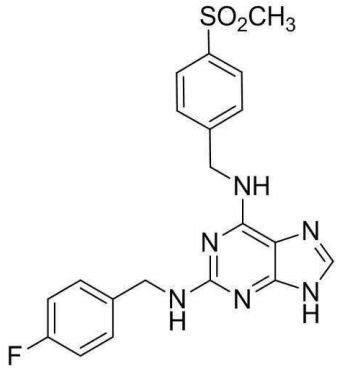
[0070]

[0071] <화학식 3>



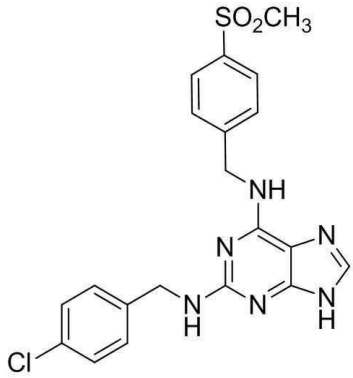
[0072]

[0073] <화학식 4>



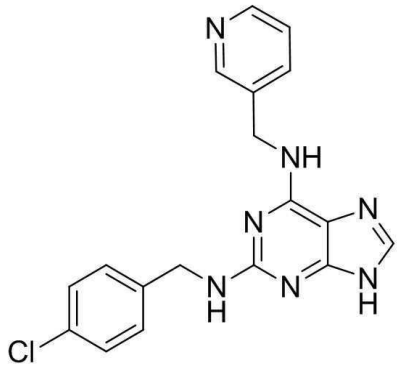
[0074]

[0075] <화학식 5>



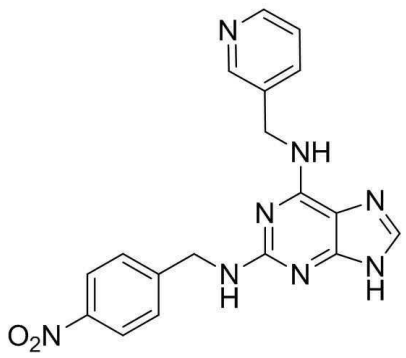
[0076]

[0077] <화학식 6>



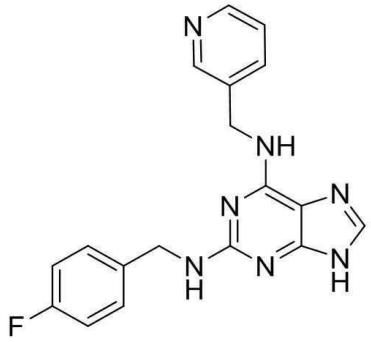
[0078]

[0079] <화학식 7>



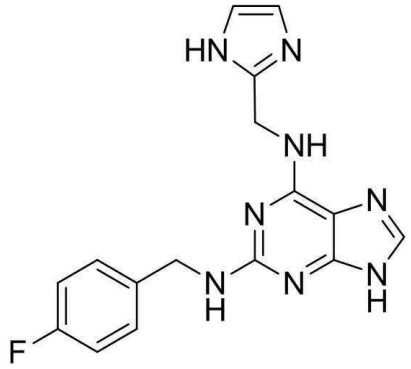
[0080]

[0081] <화학식 8>



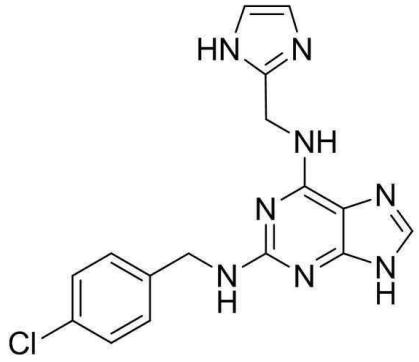
[0082]

[0083] <화학식 9>



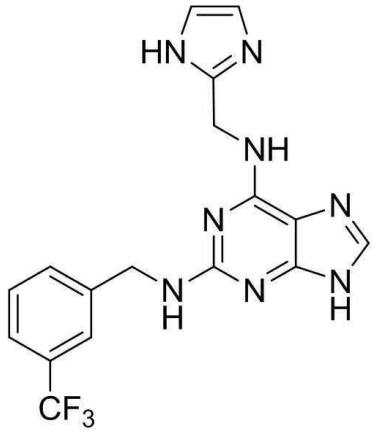
[0084]

[0085] <화학식 10>



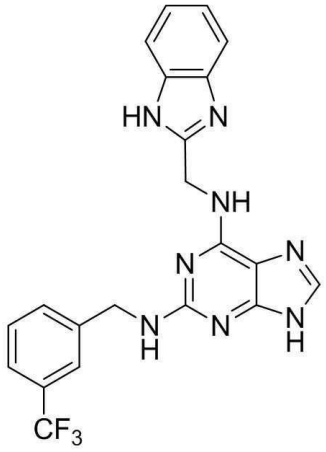
[0086]

[0087] <화학식 11>



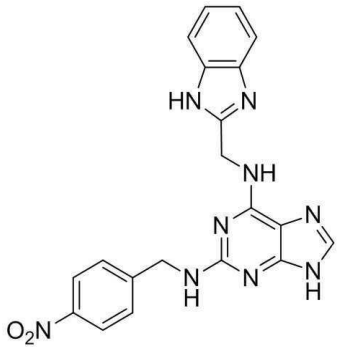
[0088]

[0089] <화학식 12>



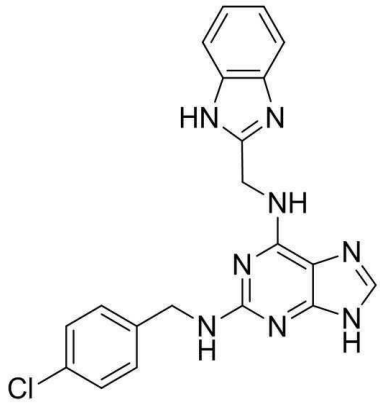
[0090]

[0091] <화학식 13>



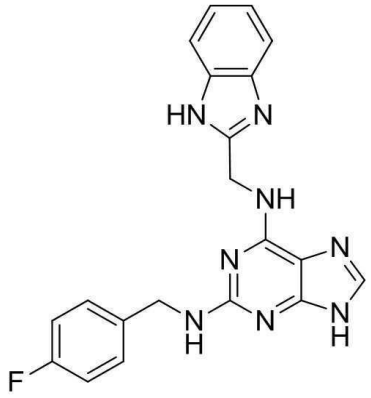
[0092]

[0093] <화학식 14>



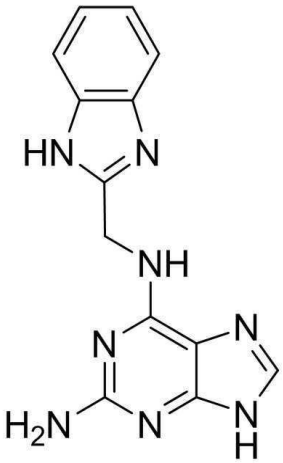
[0094]

[0095] <화학식 15>



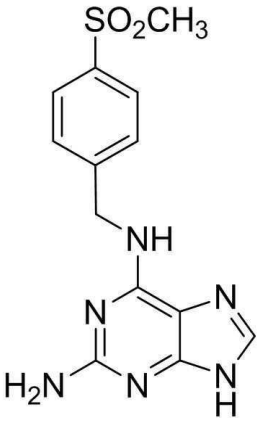
[0096]

[0097] <화학식 16>



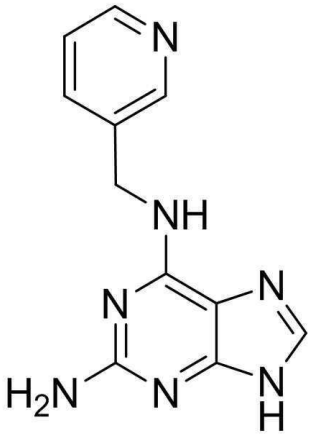
[0098]

[0099] <화학식 17>



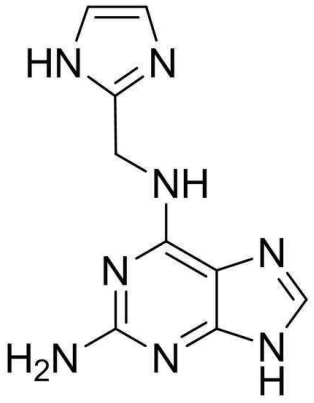
[0100]

[0101] <화학식 18>



[0102]

[0103] <화학식 19>



[0104] .

[0105] 한편, 본 발명에서는 상기 화학식 1로 표시되는 퓨린 유도체 또는 그 염을 유효성분으로 함유하는 간 독성 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0106] 본 발명에서, "유효 성분으로 포함"이라는 용어는, 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다. 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 대상 질병을 치료하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 조성물의 형태, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 심각도 등과 같은 다양한 인자에 따라서 변화될 수 있다. 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

[0107] 전술한 바와 같이, 상기 화학식 1의 화합물은 2 내지 19로 표시되는 화합물로부터 선택된 어느 하나의 퓨린 유도체일 수 있다.

[0108] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 간 독성 예방 및 치료용 다른 약물과 함께 복합 제제의 형태로 투여되거나, 또는 담체, 희석제, 보조제 및 안정화제 등과 같은 기타 성분을 포함할 수도 있다.

[0109] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0110] **본 발명에 따른 퓨린 유도체의 합성**

[0111] 하기 방법에 의해서 전술한 화학식 2 내지 19에 따른 퓨린 유도체들을 합성하였다.

[0112] 6-치환된 퓨린 유도체의 일반적인 합성 방법

[0113] DMF (7 mL)에 녹인 2,6-디클로로퓨린 (1.58 mmol) 용액에 적절한 아민 (1.74 mmol)과 트리에틸아민 (1.66 mmol)을 첨가하였다. 혼합액을 100 ℃에서 6-8 시간 동안 교반하였다. 반응액을 상온으로 식힌 후, 감압장치를 사용하여 과량의 용매를 제거하였다. 이어서, 에탄올과 물을 이용하여 재결정을 진행함으로써, 6-치환된 퓨

린 유도체를 제조하였다.

[0114] N-((1H-벤조[d]이미다졸-2-일)메틸)-2-클로로-9H-퓨린-6-아민 (화학식 16)

[0115] 수율: 83%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.97 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, =CH-N), 7.80-7.79 (m, 2H, Ar-H), 7.46-7.755 (m, 2H, Ar-H), 5.13 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H] + calcd for C13H10ClN7: 300.6886, found: 300.0677

[0116] 2-클로로-N-(4-(메틸설포닐)벤질)-9H-퓨린-6-아민 (화학식 17)

[0117] 수율: 85%, 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6): δ 12.96 (br, 1H, NH), 8.79 (br, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, =CH-N), 7.87 (d, 2H, Ar-H, J = 8.1 Hz), 7.58 (d, 2H, Ar-H, J = 7.8 Hz), 5.27 (br, 1H, NH), 4.75 (s, 2H, CH2), 3.33 (s, 3H, CH3), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C13H12ClN5O2S: 338.0400, found: 338.0539.

[0118] 2-클로로-N-(피리딘-3-일메틸)-9H-퓨린-6-아민 (화학식 18)

[0119] 수율: 71%, 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6): δ 13.05 (br, 1H, NH), 8.72 (br, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, Ar-H), 8.44 (d, 1H, Ar-H, J = 4.5 Hz), 8.15 (s, 1H, =CH-N), 7.75 (d, 2H, Ar-H, J = 7.2 Hz), 7.40-7.30 (m, 2H, Ar-H), 5.18 (br, 1H, NH), 4.68 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C11H9ClN6: 261.0577, found: 261.0680.

[0120] N-((1H-이미다졸-2-일)메틸)-2-클로로-9H-퓨린-6-아민 (화학식 19)

[0121] 수율: 76%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.13 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, =CH-N), 7.17 (s, 2H, Ar-H), 4.95 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C9H8ClN7: 250.0530, found: 250.0595

[0122] 2,6-이치환된 퓨린 유도체의 일반적인 합성 방법

[0123] 부탄올 (butanol, 5 mL)에 녹인 6-치환된 퓨린 중간체 (0.15 mmol)에 적절한 아민 (0.75 mmol)과 소듐 테트라플루오로보레이트 (0.23 mmol)를 첨가하였다. 혼합액을 180 ℃에서 마이크로웨이브 조사를 75분 동안 진행하거나, 혹은 밀봉된 튜브를 이용하여 3시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압하여 용매를 제거하였다. 이어서, 잔류액을 역상 칼럼 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 2,6-이치환된 퓨린 유도체를 제조하였다.

[0124] N6-(4-(메틸설포닐)벤질)-N2-(3-(트리플루오로메틸)벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 2)

[0125] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 90% A로 20분 동안; 90% 내지 10%로 30분 동안 되도록 구성하였다. Rt =11.53 min. 수율: 38%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.47 (br, 1H, NH), 7.83 (d, 2H, Ar-H, J = 8.4 Hz), 7.73 (s, 1H, =CH-N), 7.61 (s, 1H, Ar-H), 7.55-7.32 (m, 5H, Ar-H), 4.79 (s, 2H, CH2), 4.59 (s, 2H, CH2), 3.01 (s, 3H, CH3), 13C NMR (75 MHz, CD3OD): 195.54, 154.35, 146.55, 142.50, 139.03, 136.14, 130.29, 128.58, 127.75, 127.07, 123.13, 122.85, 44.45 (CH2), 43.02 (CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C21H19F3N6O2S: 477.4748, found: 477.1087

[0126] N6-(4-(메틸설포닐)벤질)-N2-(4-니트로벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 3)

[0127] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 70% A로 35분 동안; 70% 내지 10%로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt =12.97 min. 수율: 55%, 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6): δ 12.24 (br, 1H, NH), 8.19-8.07 (m, 2H, Ar-H), 7.97 (br, 1H, NH), 7.79 (d, 2H, Ar-H, J = 6.0 Hz), 7.68 (s, 1H, =CH-N), 7.59-7.43 (m, 4H, Ar-H), 7.04 (br, 1H, NH), 4.65 (br, 1H, NH), 4.50 (s, 4H, (CH2)2), 3.15 (s, 3H, CH3), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C20H19N7O4S: 454.1219, found: 454.1286

[0128] N2-(4-플루오로벤질)-N6-(4-(메틸설포닐)벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 4)

[0129] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 90% A로 30분 동안; 70% 내지 10%로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt =12.69 min. 수율: 43%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 7.85 (d, 2H, Ar-H, J = 8.1 Hz), 7.75 (s, 1H, =CH-N), 7.60-7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.32-7.17 (m, 2H, Ar-H), 7.10-6.90 (m, 2H, Ar-H), 4.84 (s, 2H, CH2), 4.50 (s, 2H, CH2), 3.10 (s, 3H, CH3), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C20H19FN6O2S: 427.1274, found: 427.1279

[0130] N2-(4-클로로벤질)-N6-(4-(메틸설포닐)벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 5)

[0131] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 70% A로 35분 동안; 70% 내지 10%로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt =15.32 min. 수율: 41%, 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6): δ 8.18 (br, 1H, NH), 7.90 (br, 1H, NH), 7.80 (d, 2H, Ar-H, J = 7.8 Hz), 7.68 (s, 1H, =CH-N), 7.58-7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.32-7.19 (s, 4H, Ar-H), 6.86 (br, 1H, NH), 4.68 (br, 1H, NH), 4.38 (s, 4H, (CH2)2), 3.15 (s, 3H, CH3), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C20H19ClN6O2S: 443.0979, found: 443.0739

[0132] N2-(4-니트로벤질)-N6-(피리딘-3-일메틸)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 6)

[0133] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 1 mL/min의 유속에서, 1% A 내지 65% A로 35분 동안; 65% 내지 1% A로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt =6.26 min. 수율: 49%, 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6): δ 8.45 (br, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, Ar-H), 8.08 (d, 2H, Ar-H, J = 8.1 Hz), 7.70-7.53 (m, 2H, Ar-H), 7.48 (d, 2H, Ar-H, J = 8.4 Hz), 7.23 (s, 1H, Ar-H), 4.51 (s, 4H, (CH2)2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C18H16N8O2: 377.1396, found: 377.1434

[0134] N2-(4-클로로벤질)-N6-(피리딘-3-일메틸)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 7)

[0135] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 1 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 90% A로 35분 동안; 90% 내지 10% A로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt =6.93 min. 수율: 37%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.54-8.36 (m, 2H, Ar-H), 7.78-7.68 (m, 2H, Ar-H), 7.36-7.29 (m, 1H, Ar-H), 7.28-7.18 (m, 4H, Ar-H), 4.75 (s, 2H, CH2), 4.52 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C18H16ClN7: 366.1156, found: 366.1208

[0136] N6-((1H-이미다졸-2-일)메틸)-N2-(4-플루오로페닐)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 9)

[0137] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 1 mL/min의 유속에서, 1% A 내지 35% A로 35분 동안; 35% 내지 1% A로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 13.18 min. 수율: 33%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.31 (br, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, =CH-N), 7.32- 7.24 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.03-6.94 (m, 2H, Ar-H), 4.87 (s, 2H, CH2), 4.48 (s, 2H, CH2), 13C NMR (75 MHz, CD3OD): 165.80, 163.38, 160.16, 159.40, 154.09, 152.05, 136.56, 136.42, 128.53, 128.42, 119.63, 114.62, 114.34, 44.13 (CH2), 36.51 (CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C16H15FN8: 339.1404, found: 339.1501

[0138] N6-((1H-이미다졸-2-일)메틸)-N2-(4-클로로벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 10)

[0139] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 0% A 내지 30% A로 40분 동안; 30% 내지 0% A로 45분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 15.49 min. 수율: 39%, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.31 (br, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, =CH-N), 7.47 (s, 1H, NH), 7.24 (s, 4H, Ar-H), 7.19 (s, 2H, Ar-H), 4.87 (s, 2H, CH2), 4.48 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C16H15ClN8: 355.1108, found: 355.1170

[0140] N6-((1H-이미다졸-2-일)메틸)-N2-(3-(트리플루오로메틸)벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 11)

[0141] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 0% A 내지 30% A로 45분 동안; 30% 내지 0% A로 50분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 18.06 min. 수율: 42 %, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.37 (s, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, =CH-N), 7.62-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.09 (s, 2H, Ar-H), 4.84 (s, 2H, CH2), 4.60 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C17H15F3N8: 389.1372, found: 389.1446

[0142] N6-((1H-벤조[d]이미다졸-2-일)메틸)-N2-(3-(트리플루오로메틸)벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 12)

[0143] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 50% A로 30분 동안; 50% 내지 10% A로 35분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 11.97 min. 수율: 67 %, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.21 (s, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, =CH-N), 7.56-7.41 (m, 3H, Ar-H), 7.35-7.21 (m, 4H, Ar-H), 7.09-7.15 (m, 1H, Ar-H), 5.02 (s, 2H, CH2), 4.53 (s, 2H, CH2), 13C NMR (300 MHz, CD3OD): 166.45, 160.92, 156.17, 155.07, 153.70, 143.90, 138.80, 138.29, 132.24, 132.13, 131.71, 130.38, 128.08, 124.99, 124.86, 124.78, 124.73, 115.99, 114.15, 46.30 (CH2), 39.97 (CH2), HRMS (ESI):

[M+H]+ calcd for C21H17F3N8: 439.1528, found: 439.1634

[0144] N6-((1H-벤조[d]이미다졸-2-일)메틸)-N2-(4-니트로벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 13)

[0145] 화학식 13의 화합물은 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 역상 HPLC에 의해서 정제하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 40% A로 30분 동안; 40% 내지 10% A로 35분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 6.47 min. 수율: 55 %, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.16 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 1H, =CH-N), 7.80-7.68 (m, 2H, Ar-H), 7.47-7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.28-7.15 (m, 4H, Ar-H), 4.98 (s, 2H, CH2), 4.56 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C20H17N9O2: 416.1505, found: 416.1585

[0146] N6-((1H-벤조[d]이미다졸-2-일)메틸)-N2-(4-클로로벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 14)

[0147] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 50% A로 45분 동안; 50% 내지 10% A로 35분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 12.85 min. 수율: 40 %, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 7.84 (s, 1H, =CH-N), 7.57-7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.40-7.31 (m, 2H, Ar-H), 7.07-6.86 (m, 4H, Ar-H), 5.07 (s, 2H, CH2), 4.42 (s, 2H, CH2), 13C NMR (300 MHz, CD3OD): 158.26, 154.01, 152.94, 151.36, 138.87, 137.44, 135.06, 131.86, 127.97, 127.74, 123.69, 113.85, 44.02 (CH2), 37.87 (CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C20H17ClN8: 405.1265, found: 405.1358

[0148] N6-((1H-벤조[d]이미다졸-2-일)메틸)-N2-(4-플루오로벤질)-9H-퓨린-2,6-다이아민 (화학식 15)

[0149] 아세토니트릴 (A)/물 (B) 중 0.1% 포름산을 사용하는 HPLC를 수행하였다. 농도 구배는, 2 mL/min의 유속에서, 10% A 내지 50% A로 30분 동안; 50% 내지 10% A로 35분 동안 되도록 구성하였다. Rt = 7.31 min. 수율: 46 %, 1H NMR (300 MHz, CD3OD): δ 8.17 (br, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, =CH-N), 7.56-7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.37-7.25 (m, 2H, Ar-H), 7.13-7.01 (m, 2H, Ar-H), 6.74-6.61 (m, 1H, Ar-H), 5.05 (s, 2H, CH2), 4.42 (s, 2H, CH2), HRMS (ESI): [M+H]+ calcd for C20H17FN8: 389.1560, found: 389.1606

[0150] **실험예 1: CYP3A4 저해 효능 평가 (LC/MS 기반)**

[0151] 반응 용액은 최종 농도 0.2 mg/ml 마이크로좀 단백질, 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.4), 1 mM NADPH와 기질 혼합액 (A 세트: 페나세틴 (phenacetin, CYP1A2), 쿠마린 (coumarin, CYP2A6), 아모디아퀸 (amodiaquine, CYP2C8), S-메페니토인 (mephenytoin, CYP2C19), 덱스트로메토르판 (dextromethorphan, CYP2D6), 및 미다졸람 (midazolam, CYP3A4); B 세트: 부프로피온 (bupropion, CYP2B6), 톨부타마이드 (tolbutamide, CYP2C9), 클로르족사존 (chlorzoxazone, CYP2E1), 및 테스토스테론 (testosterone, CYP3A4))에 의해 최종 부피 200 μl로 구성되었다. 기질은 페나세틴 50 μM, 쿠마린 5 μM, 아모디아퀸 2 μM, S-메페니토인 100 μM, 덱스트로메토르판 5 μM, 미다졸람 5 μM, 부프로피온 50 μM, 톨부타마이드 100 μM, 클로르족사존 50 μM, 및 테스토스테론 50 μM 농도로 사용하였다. 모든 실험에 사용된 기질은 아세토니트릴에 녹여 사용했으며, 반응액에서 아세토니트릴의 최종농도는 0.2 % (A 세트) 및 0.25 % (B 세트)이었다. 37 ℃에서 5분 동안 사전-배양을 진행한 후에, 최종농도 1 mM NADPH를 가하여 반응을 시작하였다. 반응 용액은 10분간 37 ℃ 진탕배양기를 이용하여 배양하였다. 200 μl 부피의 얼음 냉각 반응 종결액 (내부 표준물질로 100 nM 카르바마제핀 (carbamazepine) 및 500 nM 4-메틸벨리페론 (4-methylumbelliferone)을 포함하는 아세토니트릴)을 가하여 반응을 종결하였다. 각 반응액을 4 ℃, 3,000 rpm, 20분간 원심분리한 후, A와 B 세트의 상등액을 1 : 1로 섞은 후 분석하였다. 양성대조군으로 CYP 3A4의 선택적인 저해제인 케토코나졸 (ketokonazole)을 0.5 μM 농도로 사용하였다. 시험물질인 TNP는 0, 0.62, 1.85, 5.56, 16.67과 50 μM 농도를 사용했다.

[0152] 시료의 분석방법은 LC-MS를 이용하여 하기와 같이 진행하였다. 샘플 10 μl를 질량분석기에 주입하여 대사체를 0.4 ml/min의 유속으로 Atlantis™ C18 컬럼 (3 μm 2.1×50 mm; Waters)과 SecuityGuard™ C18 (2.0×4.0mm i.d., Phenomenex, Torrance, CA) 가드 컬럼을 이용하여 분리하였다. 이동상으로 0.1% 포름산이 각각 포함된 탈이온수 (이동상 A)와 아세토니트릴 (이동상 B)를 이용하였다. 설정된 장비의 조건은 다음과 같다: 이온 소스 온도, 600 ℃; 분무 가스 속도, 50 l/min; 보조 가스 속도, 4.0 l/min; 커튼 가스 속도, 20 l/min; 및 충돌 가스 (질소) 압력, 3.4×105 Torr. 초순도 질소 가스가 CUR (커튼 가스), CAD (collisionally activated dissociation, 충돌 활성화 해리) 및 NEB (분무기 가스)를 위해서 사용되었다. MRM 트랜지션, 충돌 에너지와 머무름 시간은 각각 대사체와 내부 표준물질에 대해 측정되었다. 샘플의 분석은 포지티브 및 네거티브 (6-하이드록시클로르족사존, 6-hydroxychlorzoxazone) 다중 반응 모니터링 (MRM) 스캔 모드를 이용하여 각각 형성된 대사체와 내부 표준물질의 피크 넓이를 통해서 계산하였다. 분석의 머무름 시간은 각 채널 별로 0.08초로 설정하였다. 분석된 값들은 Analyst™ 소프트웨어 (version 1.5.2, Applied Biosystems, Foster City, CA)를 통해

처리하였다.

[0153] **실험예 2: CYP3A4 저해 효능 평가 (형광분석기반)**

[0154] CYP3A4 효소의 억제 효율은 Invitrogen 사에서 제공하는 Vivid®CYP4503A4Blue screening kit (CatNo.P2858)를 이용하여 측정하였다. 반응물은 다양한 농도의 TNP와 유도체 화합물들을 포함하는 시험 약물과, Vivid® CYP450 3A4 BACULOSOMES 5 nM, CYP450 3A4 기질 Vivid®BOMCC 10μM, NADP+ 100μM, 1XVivid®CYP450 반응 완충용액 I, 1XVivid® 재생 시스템에 의해 최종 부피 100 ㎕로 구성되었다. 실험에 사용된 기질 CYP450 3A4 기질 Vivid BOMCC와 3A4 선택적 저해제인 케토코나졸은 아세토니트릴에 녹여 사용하였으며, TNP와 유도체 화합물들은 DMSO에 녹여 사용하였고, 최종 반응액에서 아세토니트릴과 DMSO의 최종 농도는 각각 0.1 %이었다. 시험 약물과 Vivid®CYP450 BACULOSOMES 시약과 Vivid® 재생 시스템을 섞은 시험 약물 반응 용액 90 ㎕을 96-웰의 빈 플레이트에 분주하였고, 상온에서 20분 간 전처리하였다. 최종 농도 100 μM의 NADP+와 최종 농도 10 μM의 CYP450 3A4 기질 Vivid®BOMCC가 첨가된 Vivid®CYP450 반응 완충용액 10㎕를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응하였다. CYP450 3A4의 억제 효과를 평가하는 반응에서 사용된 TNP와 케토코나졸의 최종 농도는 50, 100, 250, 500, 1000 nM이고, TNP와 유도체 화합물들의 억제 효과 비교 반응은 최종 농도 100 nM에서 수행되었다. 분석은 하기와 같이 진행하였다. 최종 반응물의 형광값은 Berthold 사의 Mithras LB940 플레이트 판독기의 키네틱 모드를 이용하여 여기 405 nm / 발광 460 nm 조건에서 1분 간격으로 10분 동안 측정하였다. 측정된 형광값을 이용해서 시험 약물의 반응 속도와 양성대조군 (케토코나졸)과 음성대조군 (0.1 % 아세토니트릴, 0.1 % DMSO)의 반응 속도를 비교함으로써 시험 약물의 CYP450 3A4 억제 효율 (%)을 계산하였다.

[0155] **실험예 3. 인간 배아 줄기세포 (hESC) 유래 간세포의 배양**

[0156] 인간 배아 줄기세포 (hESC)로부터 내배엽과 같은 다른 분화적 계통 세포로의 분화 여부를 확인하기 위하여, 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽인 20 간세포 (hepatocytes)로의 분화를 유도하였다 (Cai, J. et. al, (2007) Hepatology 45(5): 1229-1239). 구체적으로, hESC 세포주는 CHA-hESC 세포주로 지지세포가 없는 시스템 (feeder-free system)에서 조절된 배지 (conditioned medium)에 가득 차도록 3일 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 hESC 세포를 50 ng/㎖ 액티빈 A (Activin A; Peprotech사, 미국)를 포함하는 RPMI-1640 (Hyclone사, 미국) 배지에서 5 일간 배양하여 분화를 유도하였다. 상기 분화된 세포는 30 ng/㎖ 섬유아세포 성장인자 4 (fibroblast growth factor4; Peprotech사) 및 20 ng/㎖ 골 형성 단백질 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2; Peprotech사)를 포함하는 간세포 배양 배지 (hepatocyte culture medium, HCM; Lonza 사, 미국)에서 5 일간 배양한 후, 20 ng/㎖ 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, HGF; Peprotech 사)를 첨가한 간세포 배양 배지에서 5일 동안 추가로 배양하여 hESC로부터 간세포로 분화를 유도하였다. 상기 분화된 간세포는 105 ng/㎖ 온코스태틴 M (oncostatin M; R&D Systems 사, 미국) 및 0.1 μM 덱사메타손 (dexametasone; 시그마-알드리치 사, 미국)을 첨가한 간세포 배양 배지에서 5 일간 배양하면서 간세포의 성숙을 유도하여 성숙된 간세포를 수득하였다.

[0157] 도 2a 내지 2j는 인간 간 마이크로좀에서 TNP 약물이 p450 CYP 효소 9종에 대한 활성을 억제하는 것을 평가한 그래프로서, 도 2를 참조하면, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6과 CYP2E1에 대한 TNP의 억제능은 본 실험에서 사용한 최대 농도인 50 μM에서 20% 미만으로 관찰되었다. 반면에, CYP3A4의 활성을 미다졸람 (midazolam)과 테스토스테론 (testosterone)으로 측정하였을 때, TNP는 각각에 대해 IC_{50} 값이 65.4와 31.4 μM로 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 TNP가 다른 cytochrome P450에 비하여 CYP3A4에 대한 억제효과가 선택적임을 의미한다.

[0158] 도 3은 인간 유래 cytochrome P450 동족효소 3A4로 구성된 마이크로좀에 대하여 TNP의 억제효과를 형광분석기반으로 평가한 결과를 나타낸 것이다. TNP는 50, 100, 250, 500, 1000 nM에서 음성대조군인 DMSO와 비교하였을 때, 5.2, 40.2, 71, 84, 92.4 %의 억제 효과를 가지는 것으로 관찰되었다. 반면에, cytochrome P450 동족효소 3A4의 선택적 억제제로 알려진 케토코나졸은 동일 농도 조건에서 20.8, 31.6, 88.3, 93.7, 95.2 %의 억제 효과를 보였다. 이러한 결과는 TNP의 cytochrome P450 동족효소 3A4 억제 효과가 양성대조군인 케토코나졸과 유사하게 처리 농도에 비례하여 증가함을 의미한다.

[0159] 도 4는 인간 배아줄기세포 유래 간세포에서 TNP의 cytochrome P450 동족효소 3A4에 대한 억제 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다. 도 4를 참조하면, 10 uM 농도로 TNP를 처리한 그룹의 세포에서 cytochrome P450 동족효소 3A4의 활성이 전혀 관찰되지 않았다. 이는 TNP가 인간 배아줄기세포 유래 간세포의 cytochrome P450 동족효소 3A4의 활성을 효과적으로 억제함을 보여준다.

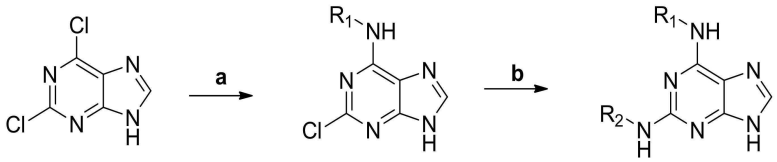
[0160] 도 5는 인간 유래 cytochrome P450 동족효소 3A4로만 구성된 마이크로좀에 대한 TNP와 그 유도체 화합물 6, 7, 14, 15와 양성대조군인 케토코나졸의 억제 효과를 비교 분석한 결과이다. 도 5를 참조하면, TNP의 억제 효과를 100%으로 하였을 때, 유도체 화합물 6, 7, 14, 15은 128, 133.2, 118.9, 124.4 %의 cytochrome P450 동족효소 3A4 억제 효과를 보이는 것으로 분석되었다. 따라서, 화합물 6, 7, 14 및 15는 TNP 보다 상대적으로 높은 cytochrome P450 동족효소 3A4 억제효과를 나타내는 것으로 보인다.

[0161] 도 6은 인간 유래 cytochrome P450 동족효소 3A4로만 구성된 마이크로좀에 대하여 TNP와 그 유도체 화합물 3, 13, 16의 억제 효과를 비교 분석한 결과이다. 도 6을 참조하면, TNP의 억제 효과를 100%로 하였을 때, 화합물 3, 13, 16은 동일 농도 조건에서 26.1, 29.2, 39.3 %의 cytochrome P450 동족효소 3A4 억제 효과를 나타내었다. 따라서, 화합물 3, 13 및 16은 TNP보다 상대적으로 낮은 CYP3A4 억제 효과를 가지는 것으로 보인다.

[0162] 종합하면, 본 발명에 따른 N2,N6-치환된-9H-퓨린-2,6-다이아민 (N2,N6-substituted-9H-purine-2,6-diamine) 유도체는 약물의 대사에 관여하는 CYP효소의 일종인 3A4에 의해서 대사되는 반응을 억제함으로써, 간 독성 예방 및 치료 효과를 나타내며, 따라서, 이를 이용하여 다양한 간독성 예방 및 치료제를 제공할 수 있다.

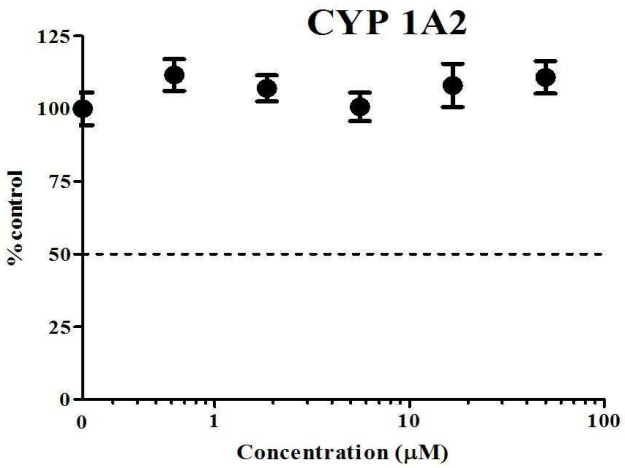
도면

도면1

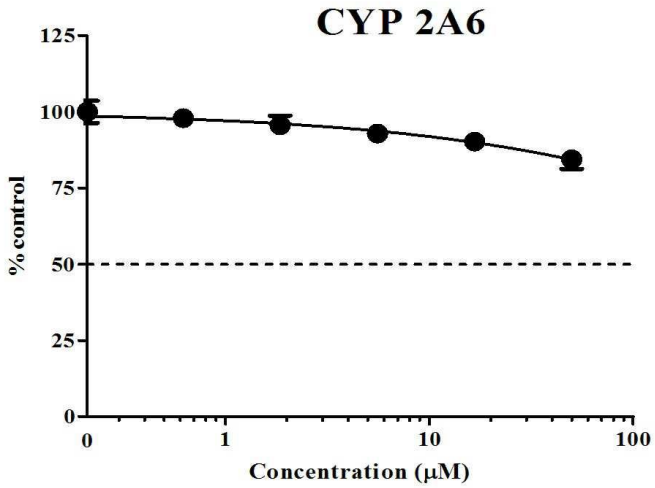


Reagant and conditions: (a) appropriate amine (1.1 eq), Et_3N (1.05 eq), DMF,100°C, 8 hr
(b) appropriate amine (5 eq), n-BuOH, NaBF4 (1.5 eq), 180°C, microwave, 75 min or sealed tube, 3 hr

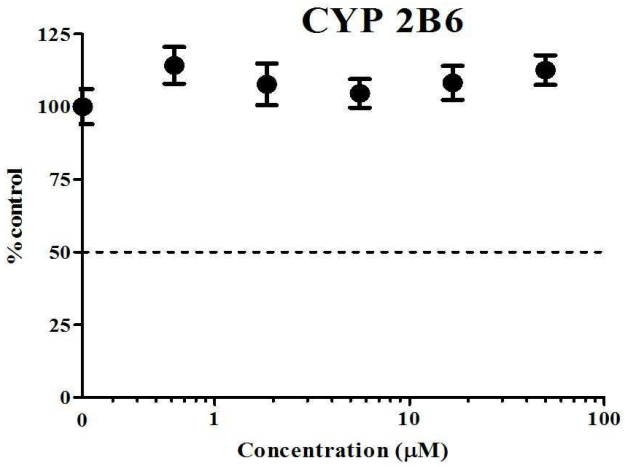
도면2a



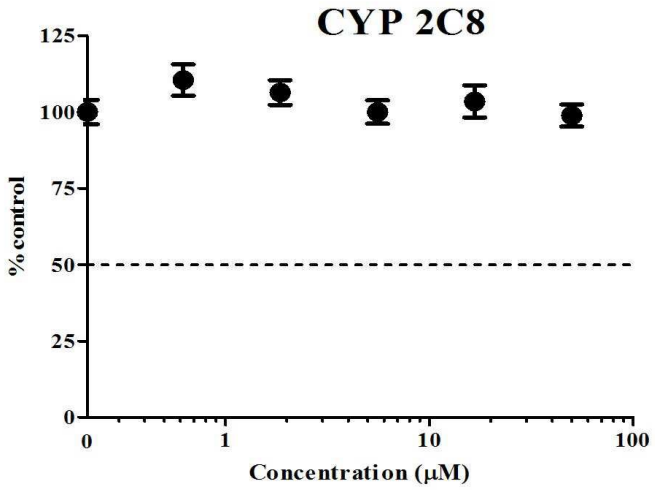
도면2b



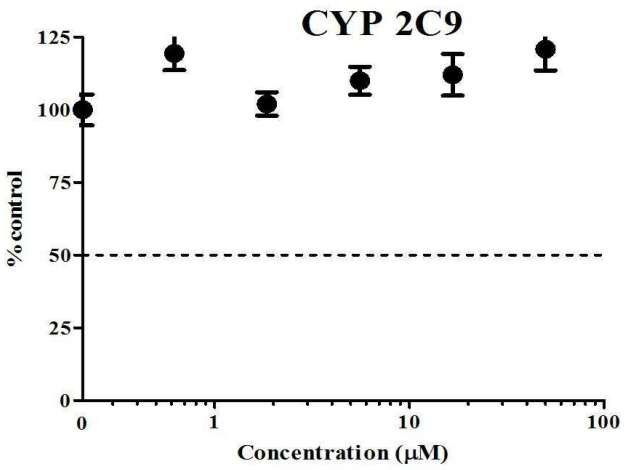
도면2c



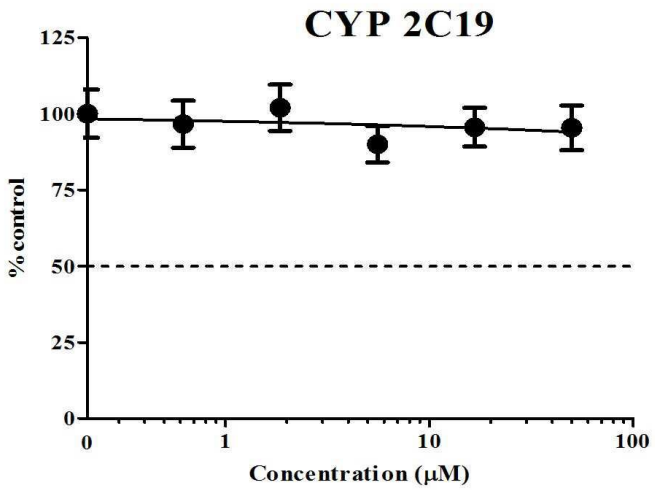
도면2d



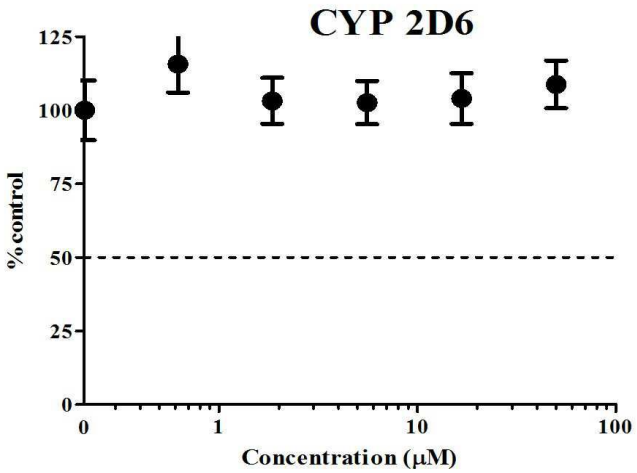
도면2e



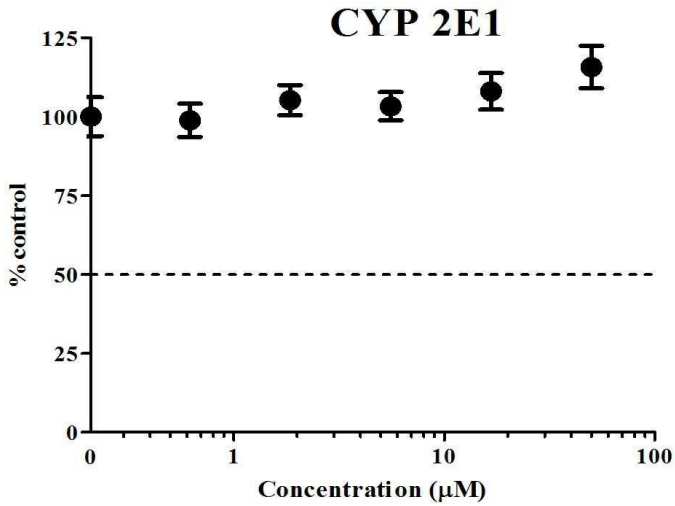
도면2f



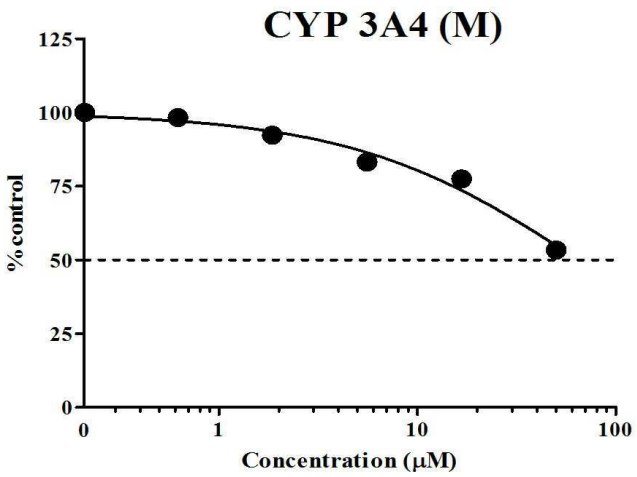
도면2g



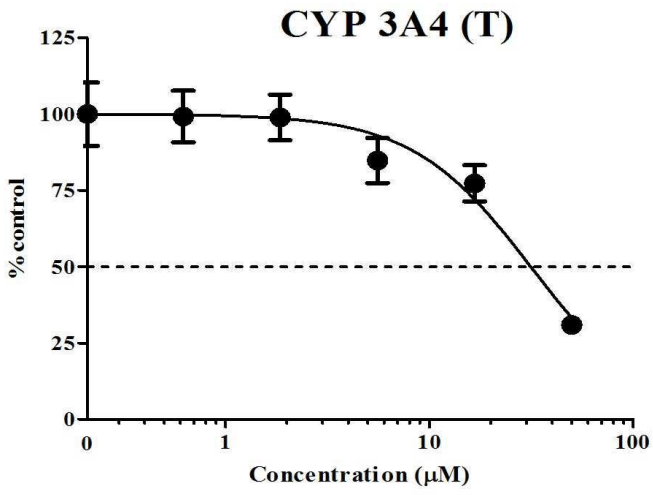
도면2h



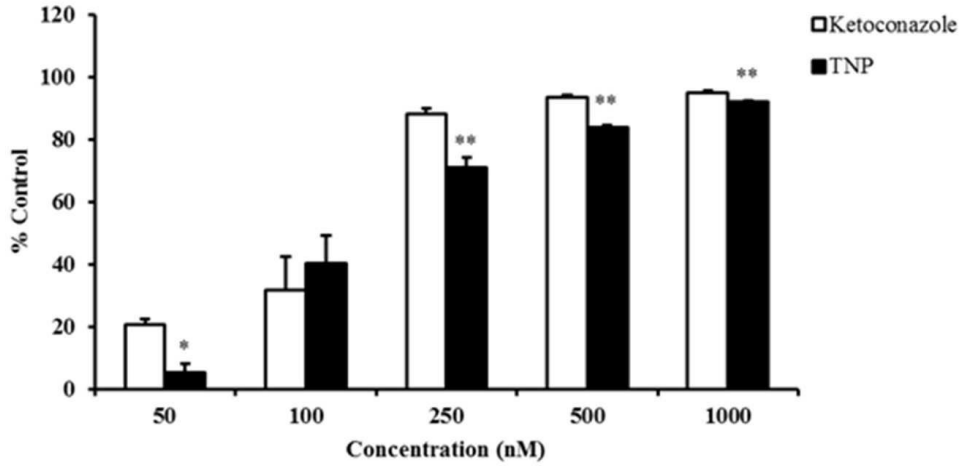
도면2i



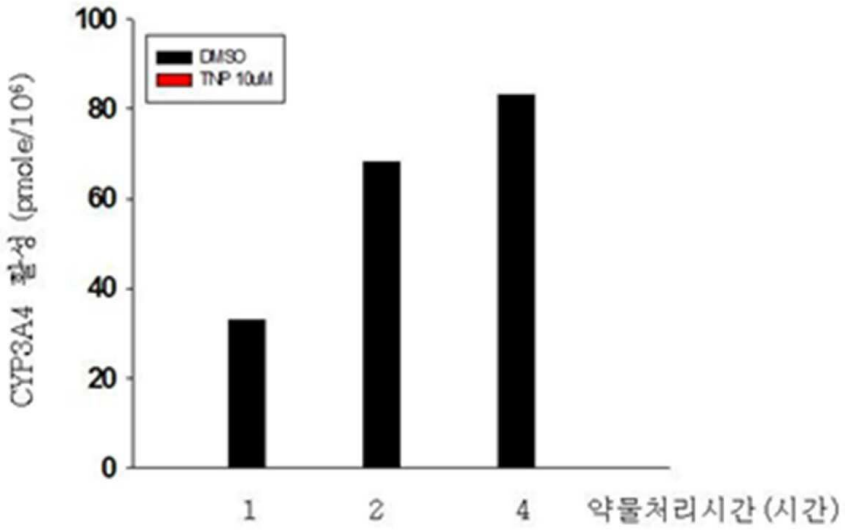
도면2j



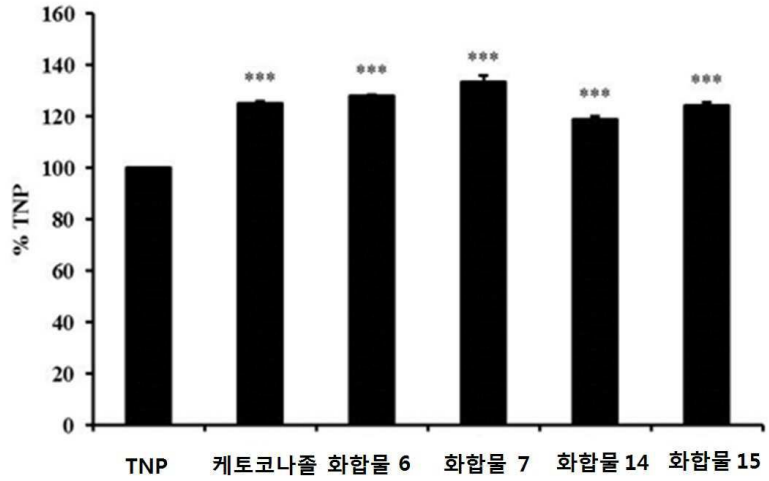
도면3


Ketoconazole
TNP
% Control
120
100
80
60
40
20
0
*
**
**
**
50
100
250
500
1000
Concentration (nM)

도면4


DMSO
TNP 10uM
CYP3A4 활성 (pmole/10⁶)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
약물처리시간 (시간)

도면5


% TNP
160
140
120
100
80
60
40
20
0
***
***
***
***
***
TNP
케토코나졸
화합물 6
화합물 7
화합물 14
화합물 15

도면6

