



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0040596
(43) 공개일자 2012년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 311/18 (2006.01) *A61K 31/37* (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0102099

(22) 출원일자 2010년10월19일

심사청구일자 2010년10월19일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

이용섭

서울특별시 노원구 덕릉로112길 24, 청암아파트 103동 602호 (상계동)

류종훈

서울특별시 강남구 남부순환로 3032, 미도아파트 101동 609호 (대치동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유수미

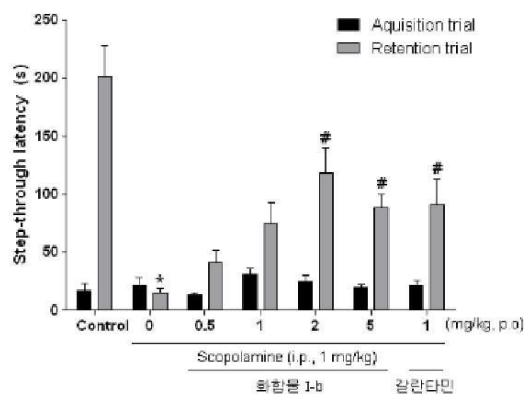
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 쿠마린 유도체, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 아세틸콜린에스테라제 저해력 및 기억력 증진효과가 우수한 쿠마린 유도체, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 쿠마린 유도체는 아세틸콜린의 감소가 원인이 될 수 있는 알츠하이머병을 포함하는 노인성 치매 등 각종 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

남승욱

경기도 수원시 권선구 하탑로21번길 36, 301호 (탑
동)

박동현

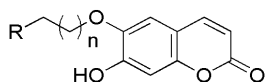
경기도 수원시 팔달구 경수대로642번길 42-46, 20
4호 (우만동)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 I]



n은 0 내지 4의 정수이고;

R은 NR_1R_2 이며;

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1-C_6 의 알킬기이거나, 결합되어 있는 질소원자와 함께 헤테로사이클을 형성한다.

청구항 2

제1항에 있어서,

R이 피롤리딘, 피페리딘, 메틸피페리딘, 페닐피페리딘, 벤질피페리딘, 모르폴린, 디메틸아미노, 메틸아미노, 에틸아미노, 프로필아미노, i-프로필아미노, 디에틸아미노, N-메틸피페라진, N-에틸피페라진, N-페닐피페라진, 또는 N-벤질피페라진인 것을 특징으로 하는 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제2항에 있어서, R이 피롤리딘인 것을 특징으로 하는 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 염산염인 것을 특징으로 하는 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 5

제1항에 있어서, 하기 화합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염:

6-(2-(디에틸아미노)에톡시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염;

7-히드록시-6-(2-(피롤리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염;

7-히드록시-6-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염;

7-히드록시-6-(2-모폴리노에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염;

6-(3-(디에틸아미노)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염;

7-히드록시-6-(3-(피롤리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염;

7-히드록시-6-(3-(피페리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염;

7-히드록시-6-(3-모폴리노프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염;

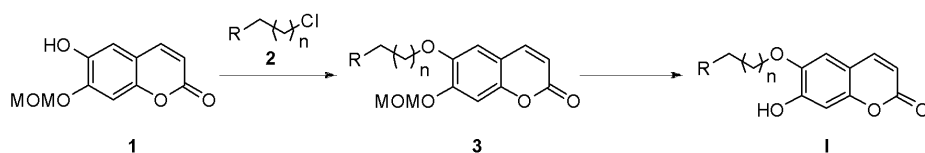
7-히드록시-6-(3-(4-메틸피페라진-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 이염산염;

6-(3-(4-에틸피페라진-1-일)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 이염산염; 및

7-히드록시-6-(3-(i-프로필아미노)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염.

청구항 6

- (i) 하기 화학식 1의 화합물과 하기 화학식 2의 화합물을 커플링 반응시켜 하기 화학식 3의 중간체 화합물을 수득하는 단계; 및
- (ii) 하기 화학식 3의 중간체 화합물을 탈보호하는 단계를 포함하는 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제조방법:



상기 식에서,

MOM은 메톡시메틸기를 나타내고,

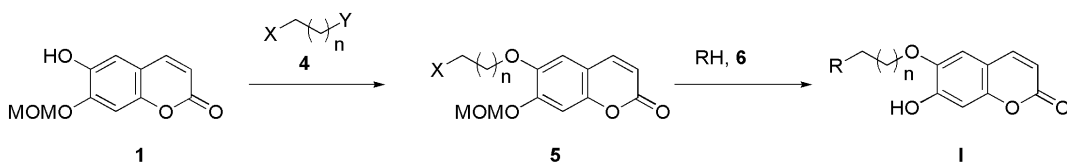
n은 0 내지 4의 정수이며;

R은 NR₁R₂이고;

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆의 알킬기이거나, 결합되어 있는 질소원자와 함께 헤테로사이클을 형성한다.

청구항 7

- (i) 하기 화학식 1의 화합물과 하기 화학식 4의 화합물을 커플링 반응시켜 하기 화학식 5의 중간체 화합물을 수득하는 단계; 및
- (ii) 하기 화학식 5의 중간체 화합물과 하기 화학식 6의 화합물을 커플링 반응시킨 다음 탈보호하는 단계를 포함하는 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제조방법:



상기 식에서,

MOM은 메톡시메틸기를 나타내고,

X 및 Y는 각각 독립적으로 클로로, 브로모 또는 요오도이며,

n은 0 내지 4의 정수이고;

R은 NR₁R₂이며;

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆의 알킬기이거나, 결합되어 있는 질소원자와 함께 헤테로사이클을 형성한다.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 커플링 반응이 염기의 존재 하에 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 염기로 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산세슘, 또는 이들의 조합을 사용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제6항 또는 제7항에 있어서, 탈보호 반응이 산의 존재하에 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 산으로 염산, 황산, 질산, 벤젠술포산, 또는 톨루엔술포산을 사용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 알츠하이머병을 포함하는 노인성 치매의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 쿠마린 유도체, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 아세틸콜린에스테라제 저해력 및 기억력 증진효과가 우수한 쿠마린 유도체, 그의 제조 방법 및 그를 포함하는 알츠하이머병을 포함하는 노인성 치매의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 치매는 정상적인 일상생활 수행 능력에 심각한 영향을 주는 뇌질환이다. 알츠하이머병은 노인에서 가장 흔히 나타나는 치매로 점진적으로 기억력, 인지기능, 판단력, 감정조절 능력이 소실되어 정신적인 장애를 일으키며, 심지어서 사망에 이르게 하는 특징이 있다. 알츠하이머병은 대개 60세 이후부터 발병하며, 나이가 들어감에 따라 발병빈도는 더욱 증가한다. 65세부터 74세 사이의 노인에서는 약 3%가 알츠하이머병에 걸려 있으며, 85세 이상의 노인에서는 절반 이상이 알츠하이머병에 걸려 있는 것으로 추산되고 있다. 게다가 현재 고령화 사회가 급속히 진행됨에 따라 치매로 고통 받는 환자의 증가는 크나큰 사회적인 문제로 대두되고 있다.

[0003] 최근 알츠하이머병은 콜린성 신경세포의 현저한 감소와 관계있는 것으로 알려져 있다. 이 신경세포의 신호는 신경전달물질인 아세틸콜린(이하 ACh라 지칭함)의 방출에 의해 매개되고 있다. 알츠하이머병 뿐만 아니라 파킨슨씨병, 정신분열증, 간질, 우울증, 조울증 등 다른 신경성 및 정신성 질환과 관련된 인지기능 장애에도 ACh 신호체계의 이상이 관련되어 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 콜린성 기능을 향상시키는 다양한 의약품들이 개발되어 왔다.

[0004] 아세틸콜린에스테라제(이하 AChE라 지칭함)는 콜린성 신경세포의 시냅스 간극(synaptic cleft)에 분비된 ACh를 콜린과 아세테이트로 분해하는 효소이다. 따라서 AChE를 저해하는 화합물은 뇌에서 ACh의 농도를 증가시킴으로써 ACh의 기능 저하가 관련된 치매 환자의 인지 및 학습기능이 개선될 것으로 생각된다. 현재 타크린(tacrine-HCl), 도네페질(donepezil-HCl), 리바스티그민(rivastigmine-tartrate), 갈란타민(galantamine-HBr)이 AChE 억제제로 FDA에 의해 승인되어 임상에서 사용되고 있다. 이들은 치매 환자의 인지 및 학습기능의 개선에 약효가 어느 정도 인정되고 있으나, 경련, 오심/구토, 설사, 불안, 발한, 침분비 과다, 불면증과 함께 간 독성 등의 부작용이 커서 치료를 중단해야 하는 경우가 자주 발생하는 등의 문제점이 지적되고 있다[참고문헌: Palmer, A. M., 'Trends in Pharmacological Science', 2002, Vol. 23, No. 9, p. 426-433]. 따라서 보다 약효가 개선되고 부작용이 적은 새로운 AChE 저해제의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 AChE 저해력이 우수한 화합물을 개발하고자 예의 연구 검토한 결과, 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체가 AChE 저해력이 우수함과 동시에 수동회피실험을 이용한 동물실험에서 기억력 개선작용이 우수함을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 AChE 저해력 및 기억력 개선작용이 우수한 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이다.

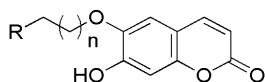
[0007] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머병을 포함하는 노인성 치매의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해력 및 기억력 개선작용이 우수한 하기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

[0010] [화학식 I]



[0011] 상기 식에서,
[0012] n은 0 내지 4의 정수이고;

[0013] R은 NR₁R₂이며;

[0014] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆의 알킬기이거나, 결합되어 있는 질소원자와 함께 헤테로사이클을 형성한다.

[0015] 본 명세서에서 C₁-C₆의 알킬기는 탄소수 1 내지 6개로 구성된 직쇄형 또는 분지형 탄화수소를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, t-부틸 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 또한, 상기 헤테로사이클은 질소원자를 포함하는 4 내지 7각형 고리를 의미하고, 질소원자 외에 산소, 황 및 질소로 구성된 그룹 중에서 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 추가로 포함할 수 있으며, 하나 이상의 수소가 C₁-C₆의 알킬기, 페닐기, 벤질기 등으로 치환될 수 있다.

[0017] 본 발명의 쿠마린 유도체에서 R은 바람직하게는 피롤리딘, 피페리딘, 메틸피페리딘, 페닐피페리딘, 벤질피페리딘, 모르폴린, 디메틸아미노, 메틸아미노, 에틸아미노, 프로필아미노, i-프로필아미노, 디에틸아미노, N-메틸피페라진, N-에틸피페라진, N-페닐피페라진, 또는 N-벤질피페라진이고, 보다 바람직하게는 피롤리딘이다.

[0018] 본 발명에서 약제학적으로 허용되는 염은 무독성 무기산염 및 유기산염이 모두 포함될 수 있으며, 예를 들어 염산염, 황산염, 질산염, 인산염, 아세테이트산염, 아디페이트산염, 아스파테이트산염, 벤조에이트산염, 벤젠설포네이트산염, 시트레이트산염, 캄포레이트산염, 캄포설포네이트산염, 디포스페이트산염, 에탄설포네이트산염, 푸마레이트산염, 글루타메이트산염, 말레이트산염, 락테이트산염, 메탄설포네이트산염, 숙시네이트산염, 타르트레이트산염, 피크레이트산염, 토실레이트산염 등이 포함된다. 이 중 염산염이 가장 바람직하다.

[0019] 본 발명의 화합물 중 대표적인 화합물은 하기 그룹에서 선택된다.

[0020] 6-(2-(디에틸아미노)에톡시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-a);

[0021] 7-히드록시-6-(2-(피롤리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-b);

[0022] 7-히드록시-6-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-c);

[0023] 7-히드록시-6-(2-모폴리노에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-d);

[0024] 6-(3-(디에틸아미노)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-e);

[0025] 7-히드록시-6-(3-(피롤리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-f);

[0026] 7-히드록시-6-(3-(피페리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-g);

[0027] 7-히드록시-6-(3-모폴리노프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-h);

[0029] 7-히드록시-6-(3-(4-메틸피페라진-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 이염산염 (I-i);

[0030] 6-(3-(4-에틸피페라진-1-일)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 이염산염 (I-j); 및

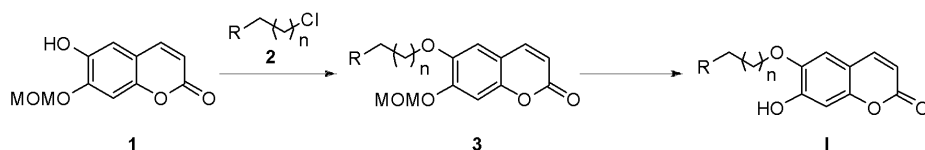
[0031] 7-히드록시-6-(3-(i-프로필아미노)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-k)

[0032] 다른 한편으로, 본 발명은 상기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0033] (1) 하기 화학식 1의 화합물과 하기 화학식 2의 화합물을 커플링 반응시켜 하기 화학식 3의 중간체 화합물을 수득하는 단계; 및

[0034] (ii) 하기 화학식 3의 중간체 화합물을 탈보호하는 단계를 포함한다.

[0035] [반응식 1]



[0036]

[0037] 상기 식에서,

[0038] MOM은 메톡시메틸기를 나타내고,

[0039] n 및 R은 화학식 I에서 정의한 바와 같다.

[0040] 상기 단계 (i)에서는 화학식 1의 화합물과 화학식 2의 화합물을 바람직하게는 염기의 존재하에 커플링 반응시켜 화학식 3의 중간체 화합물을 수득한다.

[0041] 이 때 염기로는 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산세슘, 또는 이들의 조합을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 탄산칼륨과 탄산세슘을 함께 사용한다.

[0042] 반응용매로는 N,N-디메틸포름아미드, 아세톤, 메틸에틸 케톤 등을 사용할 수 있으며, 반응온도는 상온이 바람직하다.

[0043] 화학식 1의 화합물은 에스쿨레틴 (esculetin)으로부터 공지의 방법[Nemoto, T. et al., *Tetrahedron* 2003, Vol. 59, p. 6889-6897]에 따라 제조할 수 있으며, 에스쿨레틴 (esculetin)은 상업적으로 구입하여 사용하거나, 필요에 따라서는 공지된 방법[Crosby, D. G. et al., *Journal of Organic Chemistry* 1962, Vol. 27, No. 9, p. 3083-3085]에 의하여 제조하여 사용할 수 있다.

[0044] 상기 단계 (ii)에서는 화학식 3의 중간체 화합물에서 메톡시메틸기를 탈보호하여 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제조한다.

[0045] 탈보호 반응은 산의 존재하에 수행하는 것이 바람직하며, 산을 사용할 경우에는 화학식 I의 쿠마린 유도체의 산 부가염이 형성된다.

[0046] 이때 산으로는 염산, 황산, 질산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 염산을 사용한다.

[0047] 반응용매로는 메탄올, 에탄올 및 프로판올과 같은 알콜 등을 사용할 수 있다.

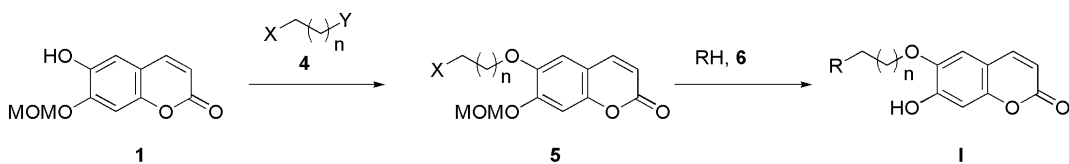
[0048] 또 다른 한편으로, 본 발명은 상기 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 다른 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법은 하기 반응식 2에 나타낸 바와 같이,

[0049] (i) 하기 화학식 1의 화합물과 하기 화학식 4의 화합물을 커플링 반응시켜 하기 화학식 5의 중간체 화합물을 수득하는 단계; 및

[0050] (ii) 하기 화학식 5의 중간체 화합물과 하기 화학식 6의 화합물을 커플링 반응시킨 다음 탈보호하는 단계를 포

함한다.

[반응식 2]



상기 식에서,

MOM은 메톡시메틸기를 나타내고,

X 및 Y는 각각 독립적으로 클로로, 브로모 또는 요오도이며,

n 및 R은 화학식 I에서 정의한 바와 같다.

상기 단계 (i)에서는 화학식 1의 화합물과 화학식 4의 화합물을 바람직하게는 염기의 존재하에 커플링 반응시켜 화학식 5의 중간체 화합물을 수득한다.

화학식 4의 화합물은 1-브로모-2-클로로에탄, 1-브로모-3-클로로프로판, 1-브로모-4-클로로부탄 등과 같이 X 및 Y가 서로 다른 화합물을 사용할 수도 있고, 1,2-디브로모에탄, 1,3-디브로모프로판, 1,4-디브로모부탄 또는 이들의 디클로로알칸과 같이 X 및 Y가 동일한 화합물을 사용할 수도 있다.

이 때 염기로는 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산세슘, 또는 이들의 조합을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 탄산칼륨과 탄산세슘을 함께 사용한다.

반응용매로는 N,N-디메틸포름아미드, 아세톤, 메틸에틸 케톤 등을 사용할 수 있으며, 반응온도는 상온이 바람직하다.

상기 단계 (ii)에서는 화학식 5의 중간체 화합물과 화학식 6의 아민 화합물을 커플링 반응시킨 다음 탈보호하여 화학식 I의 쿠마린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제조한다.

커플링 반응은 염기의 존재하에 수행하는 것이 바람직하고, 염기로는 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산세슘, 또는 이들의 조합을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 탄산칼륨과 탄산세슘을 함께 사용한다.

커플링 반응용매로는 N,N-디메틸포름아미드, 아세톤, 메틸에틸 케톤 등을 사용할 수 있으며, 반응온도는 상온이 바람직하다.

탈보호 반응은 산의 존재하에 수행하는 것이 바람직하며, 산을 사용할 경우에는 화학식 I의 쿠마린 유도체의 산 부가염이 형성된다.

이때 산으로는 염산, 황산, 질산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 염산을 사용한다.

반응용매로는 메탄올, 에탄올 및 프로판올과 같은 알콜 등을 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 상기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 아세틸콜린에스테라제 활성을 저해하고 기억력이 감퇴된 동물을 이용한 수동회피실험에서 학습 및 기억력을 높은 수준으로 향상시키는 효과를 가진다(시험예 1 및 2 참조).

따라서 본 발명은 상기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 알츠하이머병을 포함하는 노인성 치매의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물은 경구적으로 (복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로 (예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 경피흡수, 직장투여 등) 투여될 수 있으며, 사용목적에 따라 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸라에 (fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탕액제, 현탁액제, 약물처리된 시럽제 등 여러 형태로 제형화될 수 있다. 상기 여러 형태의 약제는 부형제, 결합제, 붕해제(disintegrator), 윤활제, 방부제, 향산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기제(base), 분산제, 안정제, 착색제 등 상기 형태의 약제에 관용적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하는 공지기술에 의해 제조된

다.

[0070] 상기 약제학적 조성물의 제조에 있어서 본 발명의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 함량은 약제의 형태에 따라 다르지만, 바람직하게는 0.01 내지 100 중량%의 농도이다.

[0071] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 질환의 정도 및 의사의 판단 등에 따라 넓은 범위에서 다양하게 변화된다. 그러나, 일반적으로 경구투여의 경우에는 체중 1kg당 하루에 활성성분 0.01 내지 50 mg이 투여될 수 있고, 비경구투여의 경우에는 체중 1kg당 하루에 활성성분 0.01 내지 10 mg이 투여될 수 있다. 상술한 일일 투여량은 한번에 또는 나누어서 사용될 수 있으며, 질환의 정도 및 의사의 판단에 따라 임의로 변화될 수 있다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에 따른 상기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 아세틸콜린에스테라제 활성을 저해하고 기억력을 증진시키는 효과를 가지므로, 아세틸콜린의 감소가 원인이 될 수 있는 알츠하이머병을 포함하는 노인성 치매 등 각종 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 시험예 2의 수동회피실험에서 화합물 I-b의 기억력 회복효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 시험예2의 수동회피실험에서 화합물 I-f의 기억력 회복효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0075] **실시예 1: 6-(2-(디에틸아미노)에톡시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-a)**

[0076] 단계 1: 6-(2-(디에틸아미노)에톡시)-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (3a)

[0077] 6-히드록시-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (83 mg, 0.37 mmol)과 2-(디에틸아미노)에틸 클로라이드 (96 mg, 0.56 mmol)를 N,N-디메틸포름아미드 (5 ml)에 녹인 후, K₂CO₃ (77 mg, 0.56 mmol)과 Cs₂CO₃ (120 mg, 0.37 mmol)를 가하고 실온에서 3일 동안 교반하였다. 반응혼합물을 진공에서 농축한 후 디클로로메탄과 물로 희석하고 유기층을 분리하였다. 유기층을 증류수와 10% NaOH 용액과 포화 소금물로 차례대로 씻어준 후, 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압하에서 용매를 제거하였다. 잔사를 에틸 아세테이트와 헥산으로 고체화하여 표제 화합물 (수율 45%)을 얻었다.

[0078] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 7.06 (1H, s, H-7), 6.97 (1H, s, H-4), 6.24 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), 5.21 (2H, s, -CH₂-O-CH₃), 4.27 (2H, t, J = 5.6 Hz, -CH₂-CH₂-O-), 3.42 (3H, s, -CH₂-O-CH₃), 3.05 (2H, t, J = 5.6 Hz, -N-CH₂-CH₂-), 2.82 (4H, q, J = 7.2 Hz, CH₃-CH₂-N-), 0.98 (6H, t, J = 7.2 Hz, CH₃-CH₂-N-).

[0079] 단계 2: 6-(2-(디에틸아미노)에톡시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염

[0080] 상기 단계 1에서 얻은 화합물 (50 mg, 0.16 mmol)을 메탄올 (2 ml)에 녹인 후 3N HCl 용액 (1 ml)을 가하고 3 시간 동안 85 °C로 가열하였다. 반응혼합물을 농축한 후 에틸 아세테이트와 헥산으로 고체화하여 표제 화합물 (수율 96%)을 얻었다.

[0081] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.94 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 7.34 (1H, s, H-7), 6.92 (1H, s, H-4), 6.25 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), 4.38 (2H, brs, -CH₂-CH₂-O-), 3.53 (2H, brs, -N-CH₂-CH₂-), 3.21 (4H, q, J = 7.2 Hz, -N-CH₂-CH₃), 1.27 (6H, t, J = 7.2 Hz, -N-CH₂-CH₃);

- [0082] ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 162.3, 151.5, 150.6, 144.5, 143.6, 111.8, 111.7, 111.3, 103.0, 63.4, 50.8, 48.4, 7.8.
- [0083] 실시예 2: 7-히드록시-6-(2-(피롤리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-b)
- [0084] 단계 1: 7-(메톡시메톡시)-6-(2-(피롤리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 (3b)
- [0085] 6-히드록시-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (100 mg, 0.45 mmol)과 1-(2-클로로에틸)피롤리딘 (116 mg, 0.68 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 단계 1과 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 51%)을 얻었다.
- [0086] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.79 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.13 (1H, s, H-7), 7.03 (1H, s, H-4), 6.20 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 5.21 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 4.10 (2H, t, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.40 (3H, s, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 2.89 (2H, t, $J = 5.6$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$), 2.62~2.65 (4H, m, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 1.73~1.79 (4H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$).
- [0087] 단계 2: 7-히드록시-6-(2-(피롤리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염
- [0088] 상기 단계 1에서 얻은 화합물 (73 mg, 0.23 mmol)을 실시예 1의 단계 2에서와 같이 메톡시메틸기를 탈보호하여 표제 화합물 (수율 84%)을 얻었다.
- [0089] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.87 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.27 (1H, s, H-7), 6.85 (1H, s, H-4), 6.26 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 4.40 (2H, t, $J = 5.6$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.72 (2H, t, $J = 5.6$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.37~3.38 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 3.30~3.34 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 2.17~2.21 (4H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$);
- [0090] ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 163.6, 152.8, 152.1, 145.8, 145.0, 113.3, 113.2, 112.8, 104.5, 65.8, 55.5, 55.0, 49.7, 49.3, 49.2, 23.9.
- [0091] 실시예 3: 7-히드록시-6-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-c)
- [0092] 단계 1: 7-(메톡시메톡시)-6-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 (3c)
- [0093] 6-히드록시-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (50 mg, 0.23 mmol)과 1-(2-클로로에틸)피페리딘 (54 mg, 0.29 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 단계 1과 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (21%)을 얻었다.
- [0094] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.17 (1H, s, H-7), 7.00 (1H, s, H-4), 6.24 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 5.27 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 4.37 (2H, brs, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.49 (3H, s, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 3.07 (2H, brs, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 2.82 (2H, brs, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 2.66 (2H, brs, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 1.55 (4H, brs, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.25 (2H, brs, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).
- [0095] 단계 2: 7-히드록시-6-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염
- [0096] 상기 단계 1에서 얻은 화합물 (12 mg, 0.04 mmol)을 실시예 1의 단계 2에서와 같이 메톡시메틸기를 탈보호하여 표제 화합물 (수율 85%)을 얻었다.
- [0097] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.76 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.16 (1H, s, H-7), 6.73 (1H, s, H-4), 6.14

(1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.33 (2H, br s, $-N-CH_2-\underline{CH_2}-O-$), 3.52~3.59 (2H, m, $-N-\underline{CH_2}-CH_2-O-$), 3.38~3.42 (2H, m, $-\underline{CH_2}-N-\underline{CH_2}-$), 2.91 (2H, br s, $-\underline{CH_2}-N-\underline{CH_2}-$), 1.71~2.05 (6H, m, $-\underline{CH_2}-CH_2-N-CH_2-\underline{CH_2}-\underline{CH_2}-$);

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 163.6, 152.9, 152.2, 145.7, 145.0, 113.4, 113.3, 112.8, 104.5, 64.5, 54.7, 24.2, 22.7.

실시예 4: 7-히드록시-6-(2-모폴리노에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-d)

단계 1: 7-(메톡시메톡시)-6-(2-모폴리노에톡시)-2H-크로멘-2-온 (3d)

6-히드록시-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (100 mg, 0.45 mmol)과 4-(2-클로로에틸)모폴린 (126 mg, 0.68 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 단계 1과 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 20%)을 얻었다.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.14 (1H, s, H-7), 6.98 (1H, s, H-4), 6.31 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 5.30 (2H, s, $-\underline{CH_2}-O-CH_3$), 4.31 (2H, brs, $-N-CH_2-\underline{CH_2}-O-$), 3.86 (4H, br s, $-\underline{CH_2}-O-\underline{CH_2}-$), 3.54 (3H, s, $-CH_2-O-\underline{CH_3}$), 2.66~3.02 (6H, m, $-\underline{CH_2}-N-\underline{CH_2}-$, $-N-\underline{CH_2}-CH_2-O-$).

단계 2: 7-히드록시-6-(2-모폴리노에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염

상기 단계 1에서 얻은 화합물 (29 mg, 0.09 mmol)을 실시예 1의 단계 2에서와 같이 메톡시메틸기를 탈보호하여 표제 화합물 (수율 88%)을 얻었다.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.33 (1H, s, H-7), 6.86 (1H, s, H-4), 6.26 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.39 (2H, brs, $-N-CH_2-\underline{CH_2}-O-$), 3.87~4.05 (4H, m, $-\underline{CH_2}-O-\underline{CH_2}-$), 3.47~3.59 (4H, m, $-\underline{CH_2}-N-\underline{CH_2}-$), 3.20 (2H, br s, $-N-\underline{CH_2}-$);

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 163.5, 152.8, 152.1, 145.7, 144.9, 113.5, 113.4, 112.8, 104.4, 65.0, 64.2, 57.4, 53.5.

제조예 1: 6-(3-클로로프로폭시)-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (5a)

6-히드록시-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온 (83 mg, 0.37 mmol)과 1-브로모-3-클로로프로판 (165 mg, 1.05 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 (5 ml)에 녹인 후, K₂CO₃ (75 mg, 0.54 mmol)과 Cs₂CO₃ (114 mg, 0.35 mmol)을 가하고 실온에서 하루 동안 교반하였다. 반응혼합물을 진공에서 농축한 후 디클로로메탄과 물로 희석하고 유기층을 분리하였다. 유기층을 증류수와 10% NaOH 용액과 포화 소금물로 차례대로 씻어준 후, 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압하에서 용매를 제거하였다. 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(에틸 아세테이트:헥산 = 2:1)로 정제하여 표제 화합물과 6-(3-브로모프로폭시)-7-(메톡시메톡시)-2H-크로멘-2-온의 혼합물 (수율 86%, 표제 화합물을 기준으로 수율 계산)을 얻었다.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.54 & 7.50 (1H, two d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.06 & 6.99 (1H, two s, H-7), 6.88 & 6.86 (1H, two s, H-4), 6.23 & 6.22 (1H, two d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 5.20 (2H, s, $-O-\underline{CH_2}-O-CH_3$), 4.12~4.16 (2H, m, $-O-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-$), 3.58~3.72 (2H, m, $-O-CH_2-CH_2-\underline{CH_2}-$), 3.44 (3H, s, $-OCH_3$), 2.18~2.28 (2H, m, $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-Cl$).

실시예 5: 6-(3-(디에틸아미노)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-e)

- [0111] 제조예 1에서 얻은 화합물 (90 mg, 0.30 mmol)과 디에틸아민 (17 mg, 0.20 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 (4 ml)에 녹인 후, K₂CO₃ (48 mg, 0.40 mmol)과 Cs₂CO₃ (75 mg, 0.20 mmol)을 가하고 실온에서 3일 동안 교반하였다. 반응혼합물을 진공에서 농축한 후 디클로로메탄과 물로 희석하고 유기층을 분리하였다. 유기층을 증류수와 10% NaOH 용액과 포화 소금물로 차례대로 씻어준 후, 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압하에서 용매를 제거하였다. 잔사를 메탄올 (2 ml)에 녹인 후 3N HCl 용액 (1 ml)을 가하고 3 시간 동안 85 °C로 가열하였다. 반응혼합물을 농축한 후 디클로로메탄과 물로 희석하고, 분리된 물층을 디클로로메탄으로 씻어주었다. 물층의 물을 진공에서 농축한 후 디클로로메탄과 에틸 아세테이트로 고체화하여 표제 화합물(수율 16%)을 얻었다.
- [0112] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.75 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 7.09 (1H, s, H-7), 6.71 (1H, s, H-4), 6.12 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-2), 4.13 (2H, t, J = 5.5 Hz, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 3.36~3.33 (4H, m, -CH₂-N-CH₂-), 3.22~3.20 (2H, m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.12~2.16 (2H, m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 1.26 (6H, q, J = 7.3 Hz, CH₃-CH₂-N-CH₂-CH₃);
- [0113] ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 163.8, 151.8, 145.9, 145.9, 112.9, 112.6, 112.2, 104.2, 68.2, 51.3, 49.3, 24.9, 9.2
- [0114] **실시예 6: 7-히드록시-6-(3-(피롤리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-f)**
- [0115] 제조예 1에서 얻은 화합물 (92 mg, 0.31 mmol)과 피롤리딘 (17.0 mg, 0.24 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 5와 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 19%)을 얻었다.
- [0116] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.87 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 7.20 (1H, s, H-7), 6.81 (1H, s, H-4), 4.23 (2H, t, J = 5Hz, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 3.30~3.42 (6H, m, -CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-), 2.30~2.32 (2H, m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 1.93 (4H, br s, -CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-);
- [0117] ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 163.7, 151.5, 146.1, 145.9, 145.8, 113.0, 112.7, 112.6, 104.1, 68.5, 56.8, 54.7, 24.8, 24.3.
- [0118] **실시예 7: 7-히드록시-6-(3-(피페리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-g)**
- [0119] 제조예 1에서 얻은 화합물 (100 mg, 0.33 mmol)과 피페리딘 (22.1 mg, 0.26 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 5와 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 17%)을 얻었다.
- [0120] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.87 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 7.20 (1H, s, H-7), 6.83 (1H, s, H-4), 6.25 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-2), 4.24 (2H, t, J = 5.4 Hz, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 3.32 ~ 3.42 (6H, m, -CH₂-N-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.17 ~ 2.33 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 1.80~2.00 (4H, m, -CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-);
- [0121] ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 162.2, 149.9, 144.5, 144.2, 111.3, 111.1, 110.1, 102.5, 66.7, 55.0, 52.9, 23.3, 22.8, 21.2.
- [0122] **실시예 8: 7-히드록시-6-(3-모폴리노프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-h)**
- [0123] 제조예 1에서 얻은 화합물 (100 mg, 0.33 mmol)과 모폴린 (23 mg, 0.26 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 5와 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 16%)을 얻었다.
- [0124] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.93 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 7.25 (1H, s, H-7), 6.84 (1H, s, H-4),

6.25 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 4.26 (2H, t, $J = 5.4$ Hz, $-O-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-N-$), 3.97~4.07 (4H, m, $-\underline{CH_2}-O-\underline{CH_2}-$), 3.48~3.54 (4H, m, $-\underline{CH_2}-N-\underline{CH_2}-$), 3.32~3.33 (2H, m, $-O-CH_2-CH_2-\underline{CH_2}-N-$), 2.36~2.42 (2H, m, $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-N-$);

[0125] ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 163.9, 152.8, 151.6, 146.2, 145.8, 112.9, 112.7, 111.7, 104.1, 68.1, 65.1, 56.8, 53.4, 24.6.

[0126] **실시예 9: 7-히드록시-6-(3-(4-메틸피페라진-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 이염산염 (I-i)**

[0127] 제조예 1에서 얻은 화합물 (53 mg, 0.18 mmol)과 1-메틸피페라진 (23 mg, 0.22 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 5와 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 38%)을 얻었다.

[0128] 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.87 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.20 (1H, s, H-7), 6.83 (1H, s, H-4), 6.25 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 4.26 (2H, t, $J = 5.5$ Hz, $-O-\underline{CH_2}-CH_2-$), 3.55~3.60 (4H, m, $-N-\underline{CH_2}-$), 3.32~3.34 (4H, m, $-N-\underline{CH_2}-$), 3.03 (3H, s, $-N-\underline{CH_3}$), 2.36~2.43 (2H, m, $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-N-$);

[0129] ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 163.9, 151.6, 146.1, 145.9, 145.8, 113.1, 112.8, 112.7, 104.1, 67.9, 54.1, 51.2, 35.4, 24.9.

[0130] **실시예 10: 6-(3-(4-에틸피페라진-1-일)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 이염산염 (I-j)**

[0131] 제조예 1에서 얻은 화합물 (100mg, 0.33 mmol)과 1-에틸피페라진 (30 mg, 0.26 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 5와 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 12%)을 얻었다.

[0132] 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.18 (1H, s, H-7), 6.82 (1H, s, H-4), 6.23 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.24 (2H, t, $J = 5.0$ Hz, $-O-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-N-$), 3.45~3.58 (4H, m, $-N-\underline{CH_2}-$), 3.30~3.42 (8H, m, $-N-\underline{CH_2}-$), 2.32~2.39 (2H, m, $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-N-$), 1.42 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, $-N-CH_2-\underline{CH_3}$).

[0133] **실시예 11: 7-히드록시-6-(3-(i-프로필아미노)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-k)**

[0134] 제조예 1에서 얻은 화합물 (100 mg, 0.33 mmol)과 i-프로필아민 (15 mg, 0.26 mmol)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 5와 같은 방법을 수행하여 표제 화합물 (수율 30%)을 얻었다.

[0135] 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.86 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 7.19 (1H, s, H-7), 6.80 (1H, s, H-4), 6.22 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-2), 4.25 (2H, t, $J = 5.6$ Hz, $-O-\underline{CH_2}-CH_2-CH_2-N-$), 3.46 (1H, m, $-NH-\underline{CH}-(CH_3)_2$), 3.32~3.36 (2H, m, $-CH_2-\underline{CH_2}-NH-$), 2.22~2.28 (2H, m, $-O-CH_2-\underline{CH_2}-CH_2-NH-$), 1.40~1.41 (6H, m, $-CH-(CH_3)_2$);

[0136] ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 163.8, 152.9, 151.7, 145.9, 113.0, 112.7, 111.9, 104.0, 68.7, 52.1, 44.7, 27.1, 19.3.

[0137] **생리활성 검색**

[0138] **시험예 1: 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해력 측정**

[0139] 본 발명에 따른 쿠마린 유도체의 AChE 활성 저해력은 비색법 (colorimetric method)를 기본으로 하여 아세틸티오콜린 요오드화물 (acetylthiocholine iodide)를 사용하여 공지의 방법에 따라 측정하였다 [참고문헌: Ellman, G.L. et al., Biochemical Pharmacology 1961, Vol. 7, p. 88-95; Kim, D.H. et al., European Journal of

Pharmacology 2006, Vol. 542, p. 129-35].

[0140] 구체적으로, 수컷 ICR 마우스 (25-30 g)의 뇌를 적출하여 인산염 완충액 (pH 8.0, 0.1 M)을 뇌의 무게 50배 만큼의 부피를 넣고, 유리 테플론 균질화기 (glass Teflon homogenizer, Eylea, Japan)를 사용하여 균질화시켰다. 그런 다음, 4℃에서 20분간 14000 rpm에서 원심분리 과정을 진행하여 상층액을 얻어 분석 효소로 사용하였다.

[0141] 쿠마린 유도체 각각은 먼저 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 후, 실험 직전에 각각의 유도체를 다양한 농도로 희석하여 사용하였다. 희석된 유도체에 인산염 완충액 (0.1 M, pH 8.0)을 640 μ l와 5 μ l의 아세틸티오콜린 요오드화물 용액 (75 mM) 그리고 엘라만 시약 (Ellaman's reagent) (10 mM 5,5'-dithio-bis[2-nitrobenzoic acid] 및 15 mM sodium bicarbonate) 25 μ l를 혼합하여 완충액 A (10 μ l)를 만든 후, 10분간 상온에서 반응시킨 후, 효소 100 μ l를 첨가하여 410 nm의 파장에서 UV 분광광도계 (OPTIZEN 2120UV, Mecasys Co, Ltd, Korea)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 5분 동안 30초 간격으로 측정하였으며, 측정된 값은 그래프화하여 결과 값으로 나타내었다. 결과 값을 분석하여 활성이 좋은 물질을 IC₅₀, 즉 활성도가 50%가 되는 농도를 측정하였다.

[0142] 본 발명에 따른 화합물들의 아세틸콜린에스테라제 저해력 측정결과를 하기 표 1에 나타내었다. 100 μ M에서 50% 이상 효소 저해력을 보이는 화합물들은 여러 농도에서 측정하여 IC₅₀ 값을 측정하였다.

표 1

화합물명	100 μ M 농도에서 AChE 저해력(%)	AChE 저해력 (IC ₅₀ , μ M)
6-(2-(디에틸아미노)에톡시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-a)	69.42	18.65 $\pm$ 2.37
7-히드록시-6-(2-(피롤리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-b)	93.95	6.85 $\pm$ 0.38
7-히드록시-6-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-c)	75.48	12.16 $\pm$ 2.22
7-히드록시-6-(2-모폴리노에톡시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-d)	37.68	-
6-(3-(디에틸아미노)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-e)	70.40	30.53 $\pm$ 4.28
7-히드록시-6-(3-(피롤리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-f)	95.14	2.87 $\pm$ 0.17
7-히드록시-6-(3-(피페리딘-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-g)	76.29	10.09 $\pm$ 1.53
7-히드록시-6-(3-모폴리노프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-h)	2.44	-
7-히드록시-6-(3-(4-메틸피페라진-1-일)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-i)	40.44	-
6-(3-(4-에틸피페라진-1-일)프로폭시)-7-히드록시-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-j)	80.79	26.98 $\pm$ 2.95
7-히드록시-6-(3-(i-프로필아미노)프로폭시)-2H-크로멘-2-온 염산염 (I-k)	26.1	-
스코폴레틴	2.49	476.37 $\pm$ 79.54
갈란타민	91.94	2.50 $\pm$ 0.14

[0144] 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 쿠마린 유도체들은 대부분 공지의 화합물인 스코폴레틴 보다 훨씬 강력한 아세틸콜린에스테라제 저해력을 보였다. 특히 화합물 I-b와 I-f의 아세틸콜린에스테라제 저해력은 임상에서 사용되고 있는 갈란타민과 거의 동등하였다. 이는 본 발명의 화합물들이 강력한 아세틸콜린에스테라제 저해력을 보이면서도 구조적으로 간단하여 우수한 치매 치료제로 사용 가능성이 높음을 의미한다.

[0145]

[0146] 시험예 2: 수동회피실험 (passive avoidance test)을 이용한 기억력 회복효과 측정

[0147] 2-1: 실험동물의 준비

[0148] 수컷 ICR 마우스 5주령 (26-28 g)을 (주)오리엔트 (Seoul, Korea)에서 공급받아 경희대학교 약학대학의 동물 실험실에서 약 5일간 적응시켜 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도 (23 ± 2 °C), 습도 (50 ± 10 %) 및 명암주기 (12 시간, 07:30-19:30)는 자동으로 조절되도록 하였다.

[0149] 2-2: 통계처리

[0150] 모든 실험 결과의 값은 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었다. 수동회피실험 결과는 Kruskal-Wallis의 비지표 (non-parametric) 방법을 이용하여 통계처리하였고, 유의성이 인정될 경우 던스 포스트-닥 테스트 (Dunn's post-doc test)를 이용하여 95% 신뢰 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다. 통계적 유의성은 P 값 < 0.05 일 때로 정의하였다.

[0151] 3-3: 수동회피실험

[0152] 본 발명에 따른 쿠마린 유도체는 0.9% 생리식염수에 용해시킨 후 여러 가지 용량 (0.25, 0.5, 1, 2 및 5 mg/kg)으로 7일간 1일 1회 경구 투여하였으며, 대조군에는 0.9% 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

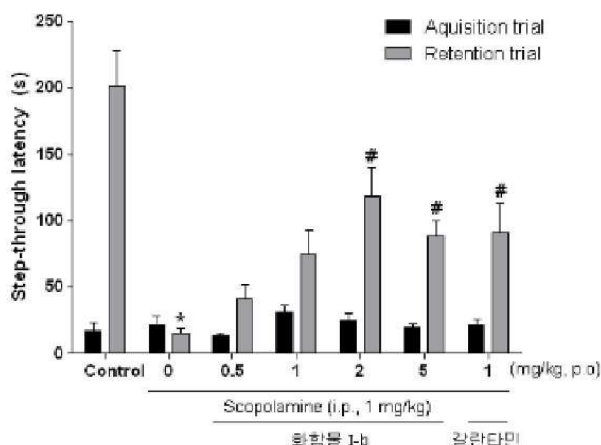
[0153] 쿠마린 유도체의 마지막 투여 1시간 후에 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 20초의 탐색시간 후 길로틴문 (guillotin door)을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. 이때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시켰다. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문을 닫고 0.5 mA의 전기 충격을 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 하여 쥐가 이러한 전기 작용을 기억하게 하였다. 스코폴라민은 1 mg/kg의 용량으로 전기 충격을 가하기 30분 전에 경구로 투여하였다.

[0154] 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행하였다. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간 (latency time: 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다. 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다.

[0155] 각 그룹 당 8~10마리의 마우스를 사용하여 본 발명에 따른 쿠마린 유도체를 용량별로 투여한 마우스와 대조군 마우스에 대한 수동회피실험을 실시한 결과를 도 1 및 2에 나타내었다. 도 1 및 2에서 보듯이 수동회피실험에서 쿠마린 화합물들의 투여에 의해 머무름 시간이 용량의존적으로 증가하였다. 스코폴라민을 투여한 그룹에서는 머무름 시간이 약 20초로 짧는데 비해 화합물 I-b는 머무름 시간이 2 mg/kg에서 117 ± 88 초이며, 화합물 I-f는 1 mg/kg에서 142 ± 28 초로 나타나, 본 발명의 화합물들에 의한 기억력 회복효과가 매우 뛰어남을 알 수 있다. 반면에 갈란타민은 가장 긴 머무름 시간을 나타낸 용량인 1 mg/kg에서 95.87 ± 22.42 초로 나타나, 본 발명의 화합물들에 의한 기억력 회복효과가 갈란타민 보다 우수한 것으로 확인되었다.

도면

도면1



도면2

