



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0079478
(43) 공개일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 263/54 (2006.01) A61K 31/423 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C07D 498/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0194235
(22) 출원일자 2014년12월30일
심사청구일자 2014년12월30일
(30) 우선권주장
1020130167132 2013년12월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박혜영
서울특별시 강남구 압구정동 압구정로 201, 86동 603호 (압구정동, 현대아파트)
정동주
충청북도 충주시 금릉로 46, 102동 409호 (칠금동, 부영아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

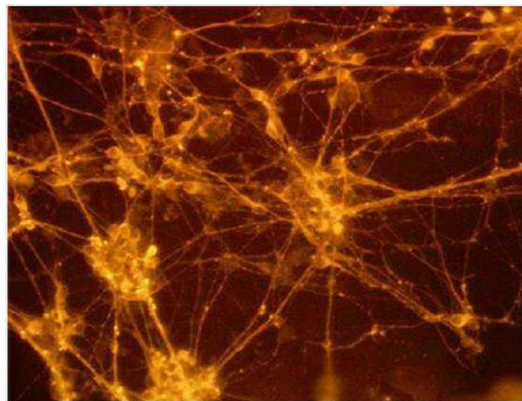
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료 효과가 있는 신규한 물질, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 벤즈옥사졸 및 피리디노티아졸 구조를 갖는 화합물 및 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공하며, 이의 제조방법 및 이를 포함한 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 화합물은 배아줄기세포를 신경세포로 분화를 유도하는 효과가 있으므로, 다양한 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 질환의 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이상훈

서울특별시 광진구 광나루로56길 32, 205동 402호
(구의동, 구의현대2단지아파트)

김진아

경기도 성남시 분당구 정자일로 80, 408동 802호
(정자동, 상록마을보성아파트)

김다롱

대구광역시 수성구 노변공원로 22, 105동 902호 (시지동, 동서우방아파트)

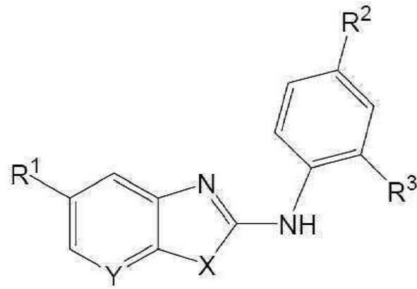
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물:

[화학식 1]



상기식에서,

X는 -O- 또는 -S-이고,

Y는 -CH- 또는 -N-이고,

R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂), 아미노(-NH₂) 또는 수소이고,

R²는 C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시이고,

R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고,

R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이다.

청구항 2

제1항에 있어서, [화학식 1]의 화합물은 X가 -O- 일 때, Y는 -CH- 이고, R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂), 또는 아미노(-NH₂)이고, R²는 C₁-C₄ 알킬이고, R³은 -C(O)CH₂R⁴이고, R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃인 [화학식 1]의 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, [화학식 1]의 화합물은 X가 -S- 일 때, Y는 -N- 이고, R¹은 수소이고, R²는 C₁-C₄ 알콕시이고, R³은 수소인 [화학식 1]의 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, [화학식 1]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나인 [화학식 1]의 화합물:

2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트; 및

2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸.

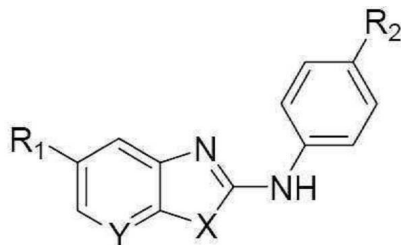
청구항 5

제1항에 있어서, [화학식 1]의 화합물은 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올 또는 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸 중 어느 하나인 [화학식 1]의 화합물.

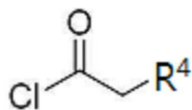
청구항 6

하기 [화학식 2]의 화합물과 하기 [화학식 3]의 화합물을 프리델 크리프트 아실화반응(Friedel-Crafts acylation)시켜 하기 [화학식 1]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제조하는 방법:

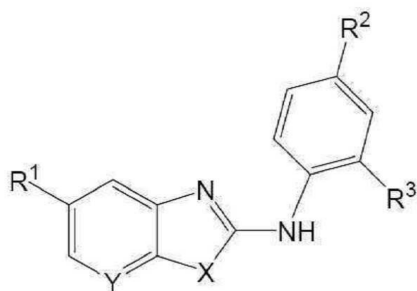
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 1]



상기식에서,

X는 -O-이고, Y는 -CH-이며,

R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂) 또는 아미노(-NH₂)이고, R²은 C₁-C₄ 알킬이며,

R³은 -C(O)CH₂R⁴이고, R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이다.

청구항 7

제6항에 있어서, 프리델 크리프트 아실화반응은 AlCl₃, BF₃, SbF₅, ZnCl₂, SnCl₄, TiCl₄, HCl, H₂SO₄ 및 PPA(Polyphosphoric acid)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 촉매 존재 하에서 수행되는 것인 [화학식 1]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제조하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 촉매의 사용량은 [화학식 3] 화합물 몰(mole) 기준으로 동 몰(mole) 사용하는 것인 [화학식 1]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제조하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 프리델 크리프트 아실화반응은 디클로로메탄, 톨루엔(toluene), 벤젠(benzene), 1,2-디클로로에탄($\text{Cl}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$), 니트로메탄(CH_3NO_2), 니트로벤젠(PhNO_2) 및 이황화탄소(CS_2)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매 하에서 수행되는 것인 [화학식 1]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제조하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, [화학식 1]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나인 [화학식 1]의 화합물:

2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

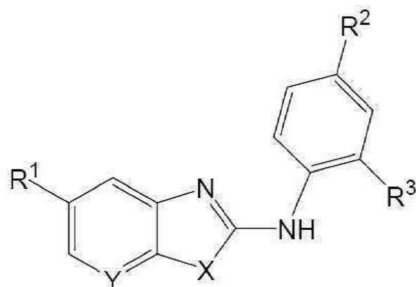
1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트.

청구항 11

하기 화학식 1의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 함유하는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기식에서,

X는 -O- 또는 -S-이고,

Y는 -CH- 또는 -N-이고,

R^1 은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬, 니트로($-\text{NO}_2$), 아미노($-\text{NH}_2$) 또는 수소이고,

R^2 은 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬 또는 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알콕시이고,

R^3 은 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{R}^4$ 또는 수소이고,

R^4 은 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알콕시, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 또는 $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 이다.

청구항 12

제11항에 있어서, [화학식 1]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나인 신경세포 분화 또는 재생용

약학 조성물:

2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트; 및

2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸.

청구항 13

제12항에 있어서, [화합식 1]의 화합물은 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올 또는 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸 중에서 선택된 어느 하나인 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 신경 손상 또는 신경질환은 뇌손상, 뇌질환, 척수손상, 말초신경손상, 말초신경질환, 또는 근 위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 중 어느 하나인 약학 조성물.

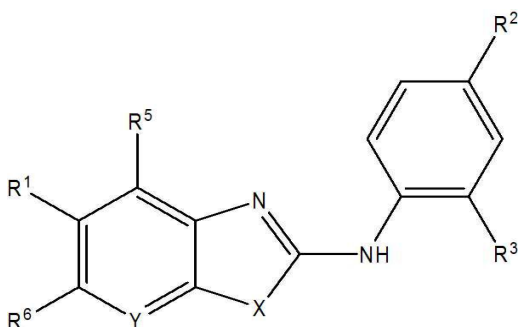
청구항 15

제14항에 있어서, 상기 뇌손상 또는 뇌질환은 치매(dementia), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 뇌전증(epilepsy), 뇌졸중(stroke), 중풍, 허혈성 뇌질환 또는 퇴행성 뇌질환 중 어느 하나인 약학 조성물.

청구항 16

하기 [화합식 4]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물:

[화합식 4]



상기식에서,

X는 -O- 또는 -S-이고,

Y는 -CH- 또는 -N-이고,

R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 알콕시, 니트로(-NO₂), 아미노(-NH₂) 또는 수소이고,

R²는 C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시이고,

R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고,

R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이고,

R^5 는 C_1-C_4 알킬 또는 수소이고,

R^6 은 C_1-C_4 알킬 또는 수소이다.

청구항 17

제16항에 있어서, [화학적식 4]의 화합물은 X가 -O- 일 때, Y는 -CH- 이고, R^1 은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 알콕시, 니트로($-NO_2$), 또는 아미노($-NH_2$)이고, R^2 는 C_1-C_4 알킬이고, R^3 은 $-C(O)CH_2R^4$ 이고, R^4 는 C_1-C_4 알콕시, $-CH_2C(O)OCH_3$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_3$, $-OC(O)CH_3$ 또는 $-OC(O)CH_2CH_3$ 인이고, R^5 는 C_1-C_4 알킬 또는 수소이고, R^6 은 C_1-C_4 알킬 또는 수소인 [화학적식 4]의 화합물.

청구항 18

제16항에 있어서, [화학적식 4]의 화합물은 X가 -S- 일 때, Y는 -N- 이고, R^1 은 수소이고, R^2 는 C_1-C_4 알콕시이고, R^3 은 수소이고, R^5 는 수소이고, R^6 은 수소인 [화학적식 4]의 화합물.

청구항 19

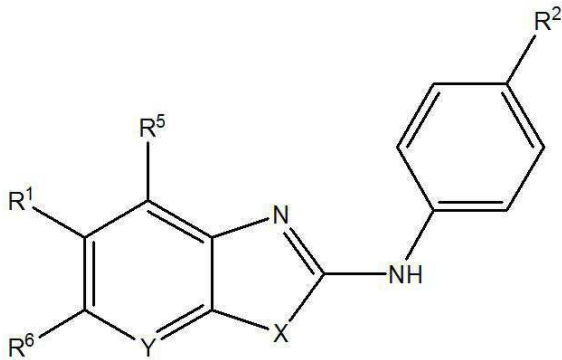
제16항에 있어서, [화학적식 4]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나인 [화학적식 4]의 화합물:

- 2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;
- 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄온;
- 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;
- 1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄온;
- 메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;
- 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸;
- 2-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((5-니트로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(2-((5-아미노벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(2-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- 2-(5-부틸-2-((5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트; 및
- 2-(5-부틸-2-((5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트.

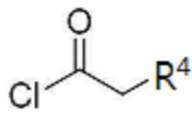
청구항 20

하기 [화학적식 5]의 화합물과 하기 [화학적식 3]의 화합물을 프리델 크리프트 아실화반응(Friedel-Crafts acylation)시켜 하기 [화학적식 4]의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제조하는 방법:

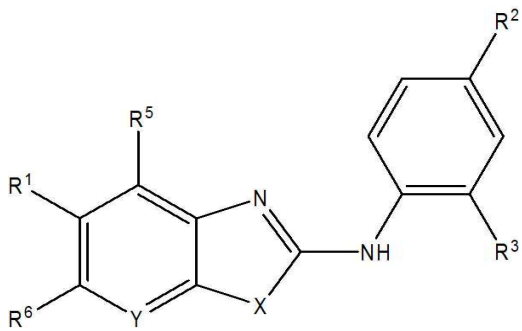
[화학식 5]



[화학식 3]



[화학식 4]



상기식에서,

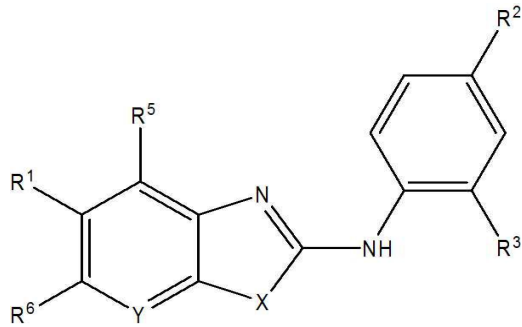
X는 -O-이고, Y는 -CH-이며,

R^1 은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 알콕시, 니트로($-NO_2$) 또는 아미노($-NH_2$)이고, R^2 는 C_1 - C_4 알킬이며, R^3 은 $-C(O)CH_2R^4$ 또는 수소이고, R^4 는 C_1 - C_4 알콕시, $-CH_2C(O)OCH_3$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_3$, $-OC(O)CH_3$ 또는 $-OC(O)CH_2CH_3$ 이고, R^5 는 C_1 - C_4 알킬 또는 수소이고, R^6 은 C_1 - C_4 알킬 또는 수소이다.

청구항 21

하기 화학식 4의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 함유하는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물:

[화학식 4]



상기식에서,

X는 -O- 또는 -S-이고,

Y는 -CH- 또는 -N-이고,

R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 알콕시, 니트로(-NO₂), 아미노(-NH₂) 또는 수소이고,

R²는 C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시이고,

R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고,

R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이고,

R⁵는 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이고,

R⁶은 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이다.

청구항 22

하기 열거된 화합물 중에서 선택된 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 함유하는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물:

2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸;

2-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-니트로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(2-((5-아미노벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(2-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
 2-(5-부틸-2-((5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
 2-(5-부틸-2-((5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
 2-(5-부틸-2-((5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트; 및
 N^2 -(3-브로모페닐)벤조[d]옥사졸-2,5-디아민.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경세포 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료 물질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유동물의 뇌는 신경줄기세포(neuronal stem cell)의 분열과 분화 및 생존과 사멸, 시냅스 형성 등 일련의 과정을 거쳐 체계적인 신경회로망(neural network)을 발생함으로써 복잡한 기능을 수행할 수 있게 된다. 성체시기에도 동물의 뇌신경 세포에서는 신경성장에 필요한 많은 물질을 생산하여 축색돌기(axon)와 수상돌기(dendrite)가 성장하게 되고 새로운 학습과 기억을 할 때마다 시냅스 연결과 신경회로망을 끊임없이 재구성(synaptic remodeling)하므로 분화가 계속된다고 할 수 있다. 신경세포는 세포분화하고 시냅스를 형성하는 과정에서 신경성장인자와 같은 표적유래 생존인자(target-derived survival factor)를 받지 못하면 세포사멸하며 스트레스와 세포독성물질(cytotoxic agent)에 의한 세포사멸은 퇴행성 뇌질환의 주요원인이 된다. 동물의 말초신경계는 손상되었을 때 중추신경계와 달리 축색이 오랜 시간에 걸쳐 재생한다. 신경 상해 부위의 뒤쪽 축색은 월러변성(Wallerian degeneration)으로 알려진 과정에 의해 퇴화되고 신경의 세포체는 축색의 성장(axonal regrowth)을 다시 시작하며 슈반세포는 분열한 후 생존과 사멸에 의해 표적신경을 결정하고 다시 분화하는 등, 발생과정을 다시 거쳐 재생하게 된다. 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료 신경재생물질로 가장 가능성이 큰 후보물질은 신경성장인자(neurotrophic factor)이다. 1940년대에 Hamburger와 Levi-Montalcini들이 Chick embryo limb의 분화과정에서 운동신경세포 생존에 결정적인 물질로 NGF(nerve growth factor)를 발견하였고, 그 후에 뇌에 존재하는 BDNF(brain-derived neurotrophic factor), NT-3(neurotrophic factor-3) 등의 뉴로트로핀(neurotrophin)들이 발견되었다. 아울러 일부 형질전환 동물실험으로 분화된 신경세포 집단의 생존에 필수적인 신경성장인자들의 종류도 밝혀져 있다. 최근에는 이외에도 사이토카인을 비롯한 여러 종류의 물질이 신경세포의 생존에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 신경성장인자들은 중추신경계와 말초신경계에서 신경간세포의 분열개시, 분열한 세포의 수를 사멸과정으로 조절하는 동시에 분화를 시작하도록 하며, 표적유래성장인자로서 정향 이동된 세포의 생존과 잘못된 방향으로 이동된 세포의 사멸을 유도하여 전시냅스 신경세포의 생존을 조절하는 한편 새로운 시냅스 형성과 재구성을 조절한다. 또한 성체의 신경 생존과 시냅스 가소성 및 신경손상 시 재생하는 과정에서도 유사한 기능을 가질 것으로 추측된다.

[0003] 한편, 지금까지 알려진 신경성장인자를 신경질환 치료에 이용하는 방법으로는 줄기세포에 직접 처리하여 이식하거나 유전자 전달 벡터로 바이러스를 이용하여 치료 유전자를 전달하는 유전자 치료 방법이 공지되었다. 예를 들어, 한국특허공개공보 제2007-0060721호에는 재조합 아데노바이러스(recombinant adenovirus)는 E1B 부위가 삭제된 복제결손 바이러스 매개체(replication defective viral vector)로써 최근 신경계 질환에 치료 유전자의 주입으로서 질환부위에 대한 치료 효과를 거두기 위해 연구된바 있으며, 이를 이용하여 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 질환의 치료에 효과가 있어, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 간질, 중풍, 말초신경 손상 등의 예방 및 치료에 유용하다는 것이 개시되어 있다.

[0004] 그러나, 유전자 치료방법은 그 물질의 반복 생산 공정이 어려우며 고가의 비용이 필요하다는 단점이 있다.

[0005] 따라서, 본 발명에서는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 합성 화합물을 제공하고자 한다

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국특허공개공보 제2007-0060721호(2007. 6. 13)
 (특허문헌 0002) 한국특허공개공보 제2005-0007056호(2005. 1. 17)
 (특허문헌 0003) 한국특허공개공보 제2008-0027191호(2008. 3. 26)

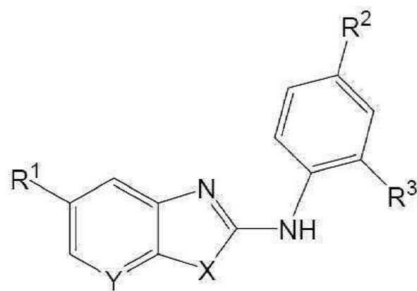
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 위한 신규한 화합물을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 목적은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료 효과가 있는 신규한 화합물의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 목적은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료 효과가 있는 신규한 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제공한다.
- [0011] [화학식 1]



- [0012] 상기식에서,
- [0013] X는 -O- 또는 -S-이고,
- [0014] Y는 -CH- 또는 -N-이고,
- [0015] R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂), 아미노(-NH₂) 또는 수소이고,
- [0016] R²는 C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시이고,
- [0017] R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고,
- [0018] R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이다.
- [0019] 상기 [화학식 1]에서, X가 -O- 일 때, Y는 -CH- 이고, R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂), 또는 아미노(-NH₂)이고, R²는 C₁-C₄ 알킬이고, R³은 -C(O)CH₂R⁴이고, R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃ 일 수 있다.
- [0020] 상기 [화학식 1]에서, X가 -S- 일 때, Y는 -N- 이고, R¹은 수소이고, R²는 C₁-C₄ 알콕시이고, R³은 수소일 수 있다.

다.

[0022] 본 발명에서, [화학식 1]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다:

[0023] 2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

[0024] 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

[0025] 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

[0026] 1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

[0027] 메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트; 및

[0028] 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸.

[0029] 본 발명에서, [화학식 1]의 화합물은 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올 또는 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸 중 어느 하나일 수 있다.

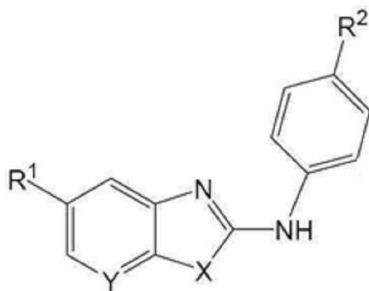
[0030] 본 발명에서, 약제학적으로 허용 가능한 염은 통상적으로 약제조업자가 의약품 제조하는데 사용하는 무기산 및 유기산염을 의미하며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플루오로아세트산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 말레인산, 벤조산, 글루콘산, 글리콜산, 숙신산, 4-모폴린에탄술폰산, 캄포술폰산, 4-니트로벤젠술폰산, 히드록시-O-술폰산, 4-톨루엔술폰산, 칼복투론산, 엠보산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에서, 상기 화학식 1의 화합물은 이의 기하이성질체, 입체이성질체 및 라세믹 혼합물을 포함할 수 있다. 당업자는 본 발명의 특정 화합물에 비대칭 중심이 포함될 수 있다는 것을 알 수 있으며, 이와 같은 비대칭 중심은 독립적으로 R 또는 S 배위가 될 수 있다. 이와 같은 이성질체는 공지의 방법을 사용 또는 채택하여 혼합물로부터 분리될 수 있다. 키랄 크로마토그래피 기술은 혼합물로부터 이성질체를 분리하는 한 가지 수단이 될 수 있으며, 키랄 재결정화 기술은 혼합물로부터 이성질체를 분리하는 또 다른 수단으로서 시도될 수 있다. 개별 이성질체 혼합물은 경우에 따라 키랄 전구물질을 사용하여 만들 수도 있다.

[0032] 본 발명에서, 용매화물은 하나 이상의 용매 분자와 본 발명의 화합물의 물리적인 연합을 의미하며, 물리적인 연합에는 수소 결합이 포함된다. 특정 경우에, 용매화물은 결정형 고체의 결정 격자 내에 하나 이상의 용매 분자가 결합되어 있을 때 분리될 수도 있다. 용매화물에는 용액-상 및 분리 가능한 용매화물이 모두 포함된다. 대표적인 용매화물에는 수화물, 에탄올화물 및 메탄올화물이 포함된다.

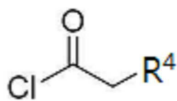
[0033] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 2]의 화합물과 하기 [화학식 3]의 화합물을 프리델 크리프트 아실화반응(Friedel-Crafts acylation)시켜 하기 [화학식 1]의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0034] [화학식 2]



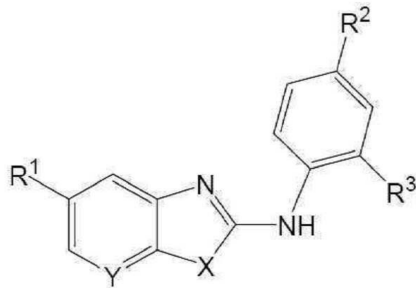
[0035]

[0036] [화학식 3]



[0037]

[0038] [화학식 1]



[0039]

[0040] 상기식에서,

[0041] X는 -O-이고, Y는 -CH-이며,

[0042] R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂) 또는 아미노(-NH₂)이고, R²는 C₁-C₄ 알킬이며, R³은 -C(O)CH₂R⁴이고, R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이다.

[0043] 본 발명의 제조방법에서, 출발물질로 사용되는 [화학식 2]의 화합물은 공지된 방법으로 직접 제조하여 사용할 수 있으며, 예를 들어, 한국특허공개공보 제2008-0027191호 및 제2005-0007056호, *Heterocycles* **70**, 571-580 (2006) 및 *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 7580 -7585 (2010) 등에 기재된 방법으로 제조할 수 있다.

[0044] 본 발명의 제조방법에서, [화학식 3]의 화합물은 상업적으로 시판되는 물질로서 용이하게 구입하여 사용할 수 있거나, 공지된 방법으로 직접 제조하여 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명의 제조방법에서, 프리델 크리프트 아실화반응은 AlCl₃, BF₃, SbF₅, ZnCl₂, SnCl₄, TiCl₄, HCl, H₂SO₄, 및 PPA(Polyphosphoric acid)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 촉매 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0046] 본 발명의 제조방법에서, 프리델 크리프트 아실화반응의 촉매의 사용량은 [화학식 3] 화합물 몰(mole) 기준으로 1 내지 2배 몰(mole) 사용할 수 있으나, 동 몰(mole) (1: 1)로 사용하는 것이 바람직하다.

[0047] 본 발명의 제조방법에서, 프리델 크리프트 아실화반응은 디클로로메탄, 톨루엔(toluene), 벤젠(benzene), 1,2-디클로로에탄(C1-CH₂CH₂-C1), 니트로메탄(CH₃NO₂), 니트로벤젠(PhNO₂) 및 이황화탄소(CS₂)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매 하에서 수행되는 것이 바람직하며, 용매의 사용량은 통상의 기술자가 프리델 크리프트 아실화반응시 사용하는 반응용매의 양으로 사용할 수 있으며, 예를 들어, [화학식 2]의 중량 대비 1 내지 100 부피비로 사용하는 것이 바람직하다.

[0048] 본 발명의 제조방법에서, 반응온도는 0 내지 50℃에서 수행할 수 있으며, 15 내지 30℃(실온)이 바람직하다.

[0049] 본 발명의 제조방법에서, [화학식 1]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다:

[0050] 2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

[0051] 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

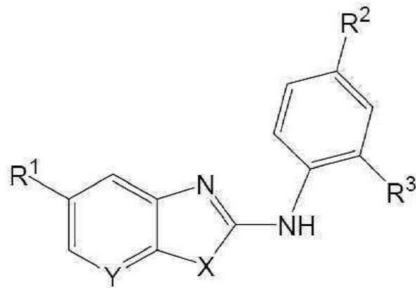
[0052] 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

[0053] 1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올; 및

[0054] 메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트.

[0055] 본 발명은 또한 하기 화학식 1의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 함유하는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0056] [화학식 1]



[0057]

[0058]

상기식에서,

[0059]

X는 -O- 또는 -S-이고,

[0060]

Y는 -CH- 또는 -N-이고,

[0061]

R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, 니트로(-NO₂), 아미노(-NH₂) 또는 수소이고,

[0062]

R²는 C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시이고,

[0063]

R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고,

[0064]

R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이다.

[0065]

본 발명의 약학 조성물에서, [화학식 1]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 것이 바람직하다.

[0066]

2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

[0067]

1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

[0068]

메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

[0069]

1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

[0070]

메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트; 및

[0071]

2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸.

[0072]

본 발명의 약학 조성물에서, [화학식 1]의 화합물은 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올 또는 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸 중에서 선택될 수 있다.

[0073]

본 발명에서, 신경 손상 또는 신경질환은 뇌손상, 뇌질환, 척수손상, 말초신경손상, 말초신경질환, 또는 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 중 어느 하나일 수 있으며, 상기 뇌손상 또는 뇌질환은 치매(dementia), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 뇌전증(epilepsy), 뇌졸중(stroke), 중풍, 허혈성 뇌질환 또는 퇴행성 뇌질환 중 어느 하나일 수 있다.

[0074]

또한, 본 발명은 상기 [화학식 1]의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 염의 유효량을 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 요하는 인간을 포함하는 포유류에게 투여함으로써 신경세포의 분화 또는 재생시키거나, 신경손상 또는 신경질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0075]

또한, 본 발명은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 위한 약제학적 제제를 제조하는데 상기 [화학식 1]의 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 사용하는 용도를 제공한다.

[0076]

본 발명의 약학 조성물은 상기 [화학식 1]의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에 추가하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0077]

본 발명의 약학 조성물은, 투여를 위해서 상기한 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이

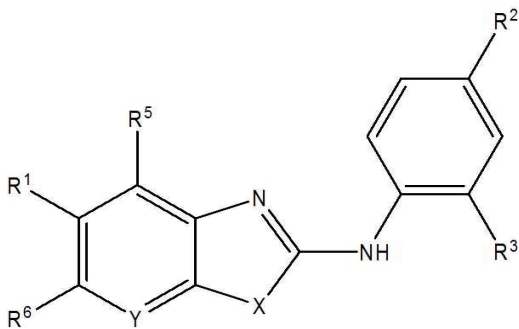
상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트 로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활 성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 화학식 1의 화합물의 일일 투여량은 약 10 내지 1,000mg/kg 이고, 바람직하게는 50 내지 500mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0079] 본 발명의 약학 조성물은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0080] 본 발명은 하기 화학식 4의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 제공한다.

[0081] [화학식 4]



[0082]

[0083] 상기식에서,

[0084] X는 -O- 또는 -S-이고,

[0085] Y는 -CH- 또는 -N-이고,

[0086] R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 알콕시, 니트로(-NO₂), 아미노(-NH₂) 또는 수소이고,

[0087] R²는 C₁-C₄ 알킬 또는 C₁-C₄ 알콕시이고,

[0088] R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고,

[0089] R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이고,

[0090] R⁵는 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이고,

[0091] R⁶은 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이다.

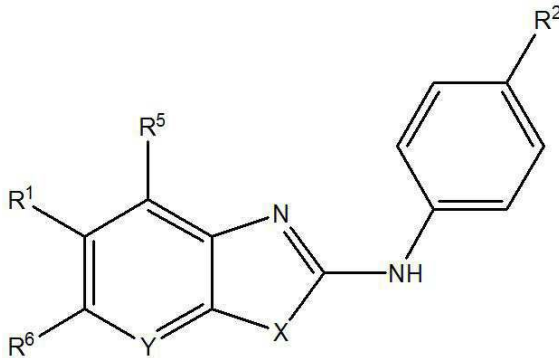
[0092] 상기 [화학식 4]에서, X가 -O- 일 때, Y는 -CH- 이고, R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 알콕시, 니트로(-NO₂), 또는 아미노(-NH₂)이고, R²는 C₁-C₄ 알킬이고, R³은 -C(O)CH₂R⁴이고, R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃인이고, R⁵는 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이고, R⁶은 C₁-C₄

알킬 또는 수소일 수 있다.

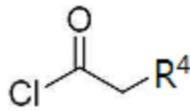
- [0093] 상기 [화학식 4]에서, X가 -S- 일 때, Y는 -N- 이고, R¹은 수소이고, R²는 C₁-C₄ 알콕시이고, R³은 수소이고, R⁵는 수소이고, R⁶은 수소일 수 있다.
- [0094] 본 발명에서, [화학식 4]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다:
- [0095] 2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;
- [0096] 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄온;
- [0097] 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;
- [0098] 1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄온;
- [0099] 메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;
- [0100] 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸;
- [0101] 2-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0102] 2-(5-부틸-2-((5-니트로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0103] 2-(5-부틸-2-((5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0104] 2-(2-((5-아미노벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0105] 2-(5-부틸-2-((4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0106] 2-(5-부틸-2-((6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0107] 2-(5-부틸-2-((5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0108] 2-(2-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0109] 2-(5-부틸-2-((5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0110] 2-(5-부틸-2-((5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트; 및
- [0111] 2-(5-부틸-2-((5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트.
- [0112] 본 발명에서, [화학식 4]의 화합물은 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트일 수 있다.
- [0113] 본 발명에서, 약제학적으로 허용 가능한 염은 통상적으로 약제조업자가 의약품을 제조하는데 사용하는 무기산 및 유기산염을 의미하며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플루오로아세트산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 말레인산, 벤조산, 글루콘산, 글리콜산, 숙신산, 4-모폴린에탄술폰산, 캄포술폰산, 4-니트로벤젠술폰산, 히드록시-0-술폰산, 4-톨루엔술폰산, 칼복투론산, 엠보산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.
- [0114] 본 발명에서, 상기 화학식 4의 화합물은 이의 기하이성질체, 입체이성질체 및 라세믹 혼합물을 포함할 수 있다. 당업자는 본 발명의 특정 화합물에 비대칭 중심이 포함될 수 있다는 것을 알 수 있으며, 이와 같은 비대칭 중심은 독립적으로 R 또는 S 배위가 될 수 있다. 이와 같은 이성질체는 공지된 방법을 사용 또는 채택하여 혼합물로부터 분리될 수 있다. 키랄 크로마토그래피 기술은 혼합물로부터 이성질체를 분리하는 한 가지 수단이 될 수 있으며, 키랄 재결정화 기술은 혼합물로부터 이성질체를 분리하는 또 다른 수단으로서 시도될 수 있다. 개별 이성질체 혼합물은 경우에 따라 키랄 전구물질을 사용하여 만들 수도 있다.
- [0115] 본 발명에서, 용매화물은 하나 이상의 용매 분자와 본 발명의 화합물의 물리적인 연합을 의미하며, 물리적인 연합에는 수소 결합이 포함된다. 특정 경우에, 용매화물은 결정형 고체의 결정 격자 내에 하나 이상의 용매 분자가 결합되어 있을 때 분리될 수도 있다. 용매화물에는 용액-상 및 분리 가능한 용매화물이 모두 포함된다. 대표적인 용매화물에는 수화물, 에탄올화물 및 메탄올화물이 포함된다.
- [0116] 본 발명은 또한, 하기 [화학식 5]의 화합물과 하기 [화학식 3]의 화합물을 프리델 크리프트 아실화반응

(Friedel-Crafts acylation)시켜 하기 [화학식 4]의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

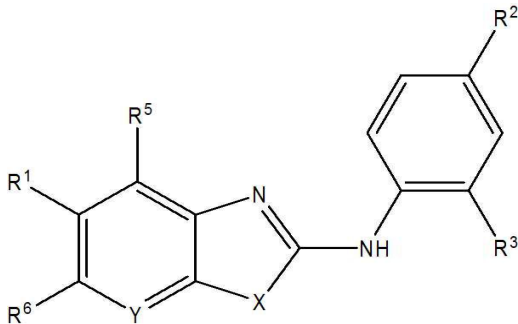
[화학식 5]



[화학식 3]



[화학식 4]



상기식에서,

X는 -O-이고, Y는 -CH-이며,

R¹은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 알콕시, 니트로(-NO₂) 또는 아미노(-NH₂)이고, R²는 C₁-C₄ 알킬이며, R³은 -C(O)CH₂R⁴ 또는 수소이고, R⁴는 C₁-C₄ 알콕시, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)OCH₂CH₃, -OC(O)CH₃ 또는 -OC(O)CH₂CH₃이고, R⁵는 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이고, R⁶은 C₁-C₄ 알킬 또는 수소이다.

본 발명의 제조방법에서, 출발물질로 사용되는 [화학식 5]의 화합물은 공지된 방법으로 직접 제조하여 사용할 수 있으며, 예를 들어, 한국특허공개공보 제2008-0027191호 및 제2005-0007056호, *Heterocycles* **70**, 571-580 (2006) 및 *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 7580 -7585 (2010) 등에 기재된 방법으로 제조할 수 있다.

본 발명의 제조방법에서, [화학식 3]의 화합물은 상업적으로 시판되는 물질로서 용이하게 구입하여 사용할 수 있거나, 공지된 방법으로 직접 제조하여 사용할 수 있다.

본 발명의 제조방법에서, 프리델 크리프트 아실화반응은 AlCl₃, BF₃, SbF₅, ZnCl₂, SnCl₄, TiCl₄, HCl, H₂SO₄, 및 PPA(Polyphosphoric acid)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 촉매 존재 하에서 수행될 수 있다.

본 발명의 제조방법에서, 프리델 크리프트 아실화반응의 촉매의 사용량은 [화학식 3] 화합물 몰(mole) 기준으로 0.1 내지 2배 몰(mole) 사용할 수 있으며, 바람직하게는, 0.1배 몰 내지 1배 몰을 사용할 수 있다.

본 발명의 제조방법에서, 프리델 크리프트 아실화반응은 디클로로메탄, 톨루엔(toluene), 벤젠(benzene), 1,2-

디클로로에탄($\text{Cl}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$), 니트로메탄(CH_3NO_2), 니트로벤젠(PhNO_2) 및 이황화탄소(CS_2)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매 하에서 수행되는 것이 바람직하며, 용매의 사용량은 통상의 기술자가 프리델 크리프트 아실화반응시 사용하는 반응용매의 양으로 사용할 수 있으며, 예를 들어, [화학식 5]의 중량 대비 1 내지 100 부피비로 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 제조방법에서, 반응온도는 0 내지 50℃에서 수행할 수 있으며, 15 내지 30℃(실온)이 바람직하다.

본 발명의 제조방법에서, [화학식 4]의 화합물은 다음의 화합물 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다:

2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;

1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;

메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸;

2-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-니트로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(2-((5-아미노벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(2-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

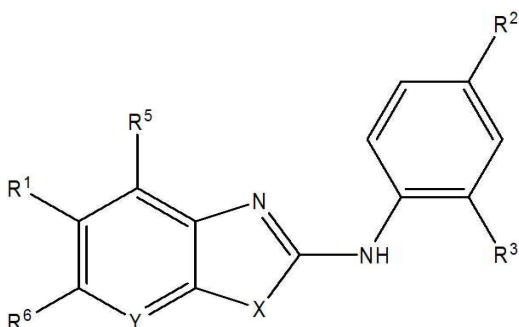
2-(5-부틸-2-((5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;

2-(5-부틸-2-((5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트; 및

2-(5-부틸-2-((5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트.

본 발명은 또한 하기 화학식 4의 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 함유하는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[화학식 4]



상기식에서,

X는 -O- 또는 -S-이고,

Y는 -CH- 또는 -N-이고,

- [0156] R^1 은 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 알콕시, 니트로($-NO_2$), 아미노($-NH_2$) 또는 수소이고,
- [0157] R^2 는 C_1-C_4 알킬 또는 C_1-C_4 알콕시이고,
- [0158] R^3 은 $-C(O)CH_2R^4$ 또는 수소이고,
- [0159] R^4 는 C_1-C_4 알콕시, $-CH_2C(O)OCH_3$, $-CH_2C(O)OCH_2CH_3$, $-OC(O)CH_3$ 또는 $-OC(O)CH_2CH_3$ 이고,
- [0160] R^5 는 C_1-C_4 알킬 또는 수소이고,
- [0161] R^6 은 C_1-C_4 알킬 또는 수소이다.
- [0162] 본 발명에서, 신경 손상 또는 신경질환은 뇌손상, 뇌질환, 척수손상, 말초신경손상, 말초신경질환, 또는 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 중 어느 하나일 수 있으며, 상기 뇌손상 또는 뇌질환은 치매(dementia), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 뇌전증(epilepsy), 뇌졸중(stroke), 중풍, 허혈성 뇌질환 또는 퇴행성 뇌질환 중 어느 하나일 수 있다.
- [0163] 또한, 본 발명은 상기 [화학식 4]의 화합물 또는 약제학적으로 허용가능한 염의 유효량을 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 요하는 인간을 포함하는 포유류에게 투여함으로써 신경세포의 분화 또는 재생시키거나, 신경손상 또는 신경질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0164] 또한, 본 발명은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 위한 약제학적 제제를 제조하는데 상기 [화학식 4]의 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 사용하는 용도를 제공한다.
- [0165] 본 발명의 약학 조성물은 상기 [화학식 4]의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에 추가하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0166] 본 발명의 약학 조성물은, 투여를 위해서 상기한 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0167] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 화학식 4의 화합물 및 하기 열거된 화합물 중에서 선택된 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물의 일일 투여량은 약 10 내지 1,000mg/kg 이고, 바람직하게는 50 내지 500mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0168] 본 발명의 약학 조성물은 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0169] 본 발명은 또한 하기 열거된 화합물 중에서 선택된 화합물, 이들의 이성질체, 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 함유하는 신경세포의 분화 또는 재생, 신경손상 또는 신경질환의 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0170] 2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트;
- [0171] 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;
- [0172] 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;

- [0173] 1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄올;
- [0174] 메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트;
- [0175] 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸;
- [0176] 2-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0177] 2-(5-부틸-2-((5-니트로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0178] 2-(5-부틸-2-((5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0179] 2-(2-((5-아미노벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0180] 2-(5-부틸-2-((4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0181] 2-(5-부틸-2-((6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0182] 2-(5-부틸-2-((5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0183] 2-(2-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0184] 2-(5-부틸-2-((5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0185] 2-(5-부틸-2-((5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트;
- [0186] 2-(5-부틸-2-((5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트; 및
- [0187] N²-(3-브로모페닐)벤조[d]옥사졸-2,5-디아민.

발명의 효과

- [0188] 본 발명의 화합물은 배아줄기세포를 신경세포로 분화를 유도하는 효과가 있으므로, 다양한 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 질환의 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0189] 도1은 본 발명의 화합물 4b의 신경세포분화 효과를 나타낸 사진이다.
- 도2는 본 발명의 화합물 4f의 신경세포분화 효과를 나타낸 사진이다.
- 도3은 실험예에서 대조군으로 사용된 DMSO의 세포분화 결과 사진이다.
- 도4는 본 발명의 화합물 4b 및 4f에 의해 발현이 유도되는 유전자를 나타낸 그림이다.
- 도5는 본 발명의 화합물 4b의 신경세포들에서 발현되는 뉴런의 특정 마커에 대한 효과를 나타낸 사진이다.
- 도6은 본 발명의 화합물 4b의 신경세포들에서 발현되는 뉴런의 특정 마커에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도7은 신경 줄기세포 분화시 bFGF 제거하고 DMSO를 각각 5 μ M 농도로 첨가하여 분화 유도한 대조군 그룹(-)과 실시예 3의 화합물, 실시예 18의 화합물을 첨가하여 분화 유도 6일후 각 그룹 간의 신경세포 (Tuj1)와 성상세포 (GFAP) 로의 분화 양상을 보여주는 도이다.
- 도8은 실시예 3의 화합물, 실시예 18의 화합물을 각각 5 μ M 농도로 첨가하여 분화 유도 6일 후 각 그룹 간의 신경세포 (Tuj1)와 성상세포 (GFAP)로의 분화양을 정량화한 그래프이다.

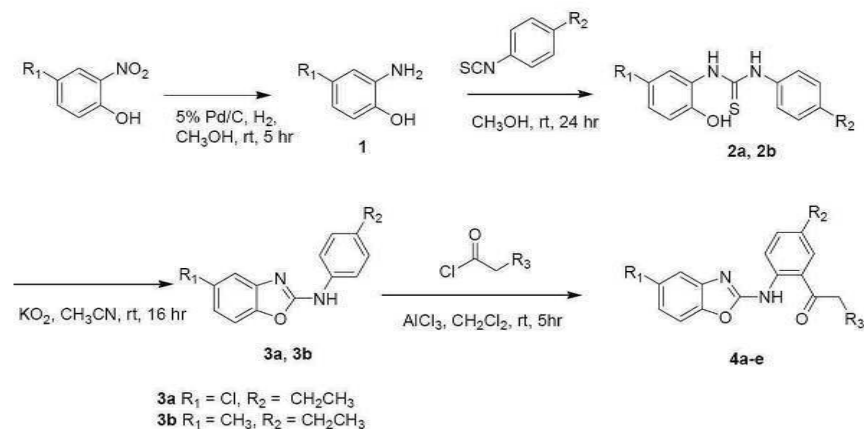
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0190] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0191] 또한, 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 Aldrich 사로부터 구입한 것이며, ¹H-NMR 데이터는 400 MHz Varian FT-NMR spectrometer 기계로 측정된 값이며, Mass 데이터는 JMS-700 (Jeol, Japan) 기계로 측정된 값이다.

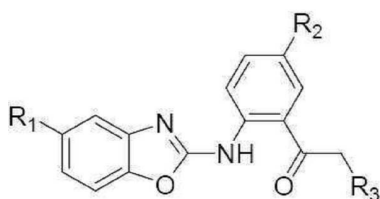
1. *N*-페닐벤조[*d*]옥사졸-2-아민 (*N*-phenylbenzo[*d*]oxazol-2-amine) 유도체의 합성

가. *N*-페닐벤조[*d*]옥사졸-2-아민 유도체의 합성과정은 [반응식 1]에 제시되었다. 2-아미노페놀(2-amino pheno l)류와 페닐이소티오시아네이트(phenyl isothiocyanate)류를 상온에서 반응시켜 페닐티오우레아 (phenylthiourea) 중간체인 물질 **2a** 및 **2b**를 얻었다. 이후 5 당량의 KO_2 와 반응시켜 벤조옥사졸 고리 물질 **3a** 및 **3b**를 제조한 후, Friedel-Crafts acylation 반응으로 **4a** 내지 **4e**를 제조하였다.

[반응식 1]



[표 1] 치환된 (2-(치환된 벤조[*d*]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸벤젠) 유도체의 구조

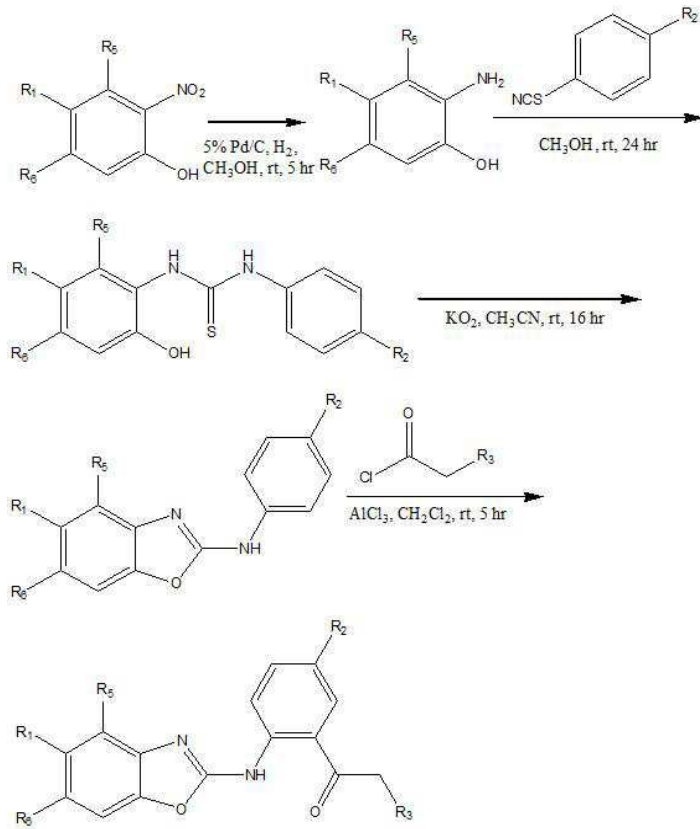


Compound	R_1	R_2	R_3
4a	Cl	CH_2CH_3	
4b	Cl	CH_2CH_3	OCH_3
4c	Cl	CH_2CH_3	
4d	CH_3	CH_2CH_3	OCH_3
4e	CH_3	CH_2CH_3	

나. *N*-페닐벤조[*d*]옥사졸-2-아민 유도체의 합성과정은 [반응식 2]에 제시되었다. 2-아미노페놀(2-amino pheno l)류와 페닐이소티오시아네이트(phenyl isothiocyanate)류를 상온에서 반응시켜 페닐티오우레아 (phenylthiourea) 중간체인 물질을 얻었다. 이후 5 당량의 KO_2 와 반응시켜 벤조옥사졸 고리 물질을 제조한 후, Friedel-Crafts acylation 반응으로 **4a** 내지 **4e** 및 실시예 7 내지 17을 제조하였다.

[0200]

[반응식 2]

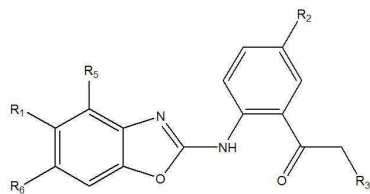


[0201]

4a 내지 4e 및 실시예 7 내지 17

[0202]

[표 2] 치환된 (2-(치환된 벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸벤젠) 유도체의 구조



[0203]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆
4a (실시예 1)	Cl	CH ₂ CH ₃		H	H
4b (실시예 2)	Cl	CH ₂ CH ₃		H	H
4c (실시예 3)	Cl	CH ₂ CH ₃		H	H
4d (실시예 4)	CH ₃	CH ₂ CH ₃		H	H
4e (실시예 5)	CH ₃	CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 7	CH ₃	CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 8	NO ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 9	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 10	NH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 11	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		CH ₃	H
실시예 12	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	CH ₃
실시예 13	tert-butyl	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 14	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 15	F	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 16	Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H
실시예 17	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		H	H

2. 아미노피리디노티아졸 {aminopyridinethiazole} 유도체의 합성

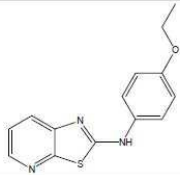
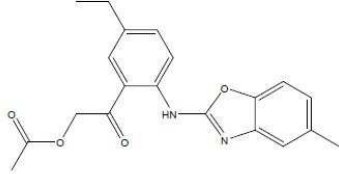
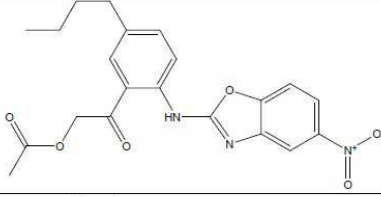
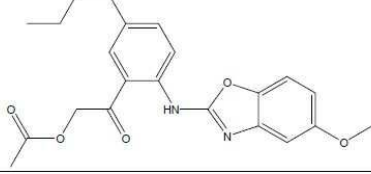
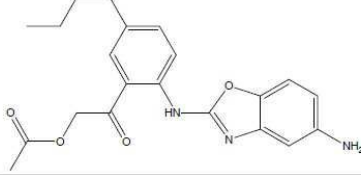
3-아미노-2-히드록시피리딘(3-amino-2-hydroxypyridine)류와 페닐이소티오시아네이트(phenyl isothiocyanate)류를 반응시켜 페닐티오우레아(phenylthiourea)를 합성하는 단계 및 산을 이용한 폐환 반응을 통하여 아미노피리디노티아졸 유도체 화합물(4f)를 합성하였다.

상기 방법들로 합성된 화합물 4a 내지 4f 및 실시예 7 내지 18의 구조는 [표 3]과 같다.

[0208] [표 3] 화합물 4a 내지 4f 및 실시예 7 내지 18의 구조

화합물	구조
4a (실시예 1)	
4b (실시예 2)	
4c (실시예 3)	
4d (실시예 4)	
4e (실시예 5)	

[0209]

4f (실시예 6)	
실시예 7	
실시예 8	
실시예 9	
실시예 10	

실시예 11	
실시예 12	
실시예 13	
실시예 14	
실시예 15	
실시예 16	
실시예 17	
실시예 18	

[0210] <제조예 1> 1-(5-클로로-2-히드록시페닐)-3-(4-에틸페닐)티오우레아 {1-(5-Chloro-2-hydroxyphenyl)-3-(4-ethylphenyl)thiourea} (2a)의 제조

[0211] 메탄올 10 mL에 녹인 2-아미노-4-클로로페놀 (3.48 mmol, 1 eq)에 4-에틸페닐이소시아네이트(4-ethylphenyl isothiocyanate, 3.48 mmol, 1eq)를 넣고 24시간 동안 실온(15 내지 30℃)에서 교반하였다. 유기 용매를 감압 하에서 증발 제거 한 후 침전을 n-헥산(n-hexane)으로 감압 여과하여 물질 2a를 1.01 g 얻었다.

[0212] Brown solid (95%); ¹H NMR (Acetone-d₆, 400 MHz) δ 9.339 (s, 1H), 8.685 (s, 1H), 8.249 (dd, J = 14.2 Hz, 1H), 7.449-7.420 (m, 2H), 7.263 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.036 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.922 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 2.649 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.220 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

[0213] <제조예 2> 1-(4-에틸페닐)-3-(2-히드록시-5-메틸페닐)티오우레아 {1-(4-Ethylphenyl)-3-(2-hydroxy-5-methylphenyl)thiourea} (2b)의 제조

- [0214] **단계 1: 2-아미노-4-메틸페놀 {2-Amino-4-methylphenol} (1)의 제조**
- [0215] 메탄올 20 mL를 4-메틸-2-니트로페놀 (1.31 mmol, 1eq)과 5% Pd/C (0.4 g)에 천천히 적가한 후 수소를 충전시켜 5시간 동안 실온(15 내지 30℃)에서 교반하였다. 반응액을 셀라이트(celite)로 여과한 후 여액의 용매를 감압 하에서 제거하여 물질 1을 얻었다.
- [0216] Brown solid (96%); ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 6.582 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.493 (s, 1H), 6.261 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.115 (s, 3H).
- [0217] **단계 2: 1-(4-에틸페닐)-3-(2-히드록시-5-메틸페닐)티오우레아 {1-(4-Ethylphenyl)-3-(2-hydroxy-5-methylphenyl)thiourea} (2b)의 제조**
- [0218] 메탄올 3 mL에 녹인 2-아미노-4-메틸페놀 (1.25 mmol, 1 eq)에 4-에틸페닐이소시아네이트(4-ethylphenyl isothiocyanate, 1.25 mmol, 1eq)를 넣고 24시간 동안 실온(15 내지 30℃)에서 교반하였다. 유기 용매를 감압 하에서 증발 제거 한 후 침전을 n-헥산(n-hexane)으로 감압 여과하여 물질 2b를 0.3 g 얻었다.
- [0219] Brown powder (95%); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.631 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.313 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.202 (m, 3H), 6.901 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.570 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.362 (s, 3H), 1.173 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).
- [0220] **<제조예 3> 5-클로로-N-(4-에틸페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 {5-Chloro-N-(4-ethylphenyl)benzo[d]oxazol-2-amine} (3a)의 제조**
- [0221] 질소가스 치환 하의 빙수조(ice bath)에서 KO₂ (12.05 mmol, 5eq)에 아세토니트릴 15 mL를 천천히 가하며 교반하였다. 이후 아세토니트릴 20 mL에 녹인 물질 1-(5-클로로-2-히드록시페닐)-3-(4-에틸페닐)티오우레아(2.41 mmol, 1eq)를 천천히 가하였다. 실온(15 내지 30℃)에서 16시간 동안 반응시킨 후 얼음물(35 ml)에 부어 희석시켰다. 디클로로메탄 (30 ml) 으로 추출하고 포화 NaCl 수용액(30 ml)으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 제거시켜 얻은 침전물을 EtOAc: hexane = 1: 10(v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0222] White powder (51%); ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 9.537 (s, 1H), 7.741 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.426 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.382 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.246 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.123 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.633 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.221 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).
- [0223] **<제조예 4> N-(4-에틸페닐)-5-메틸벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-ethylphenyl)-5-methylbenzo[d]oxazol-2-amine} (3b)의 제조**
- [0224] 질소가스 치환 하의 빙수조(ice bath)에서 KO₂ (12.05 mmol, 5eq)에 아세토니트릴 15 mL를 천천히 가하며 교반하였다. 이후 아세토니트릴 20 mL에 녹인 물질 1-(4-에틸페닐)-3-(2-히드록시-5-메틸페닐)티오우레아(2.41 mmol, 1eq)를 천천히 가하였다. 실온(15 내지 30℃)에서 16시간 동안 반응시킨 후 얼음물(35 ml)에 부어 희석시켰다. 디클로로메탄(30 ml) 으로 추출하고 포화 NaCl 수용액(30 ml) 으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 제거시켜 얻은 침전물을 EtOAc: n-hexane = 1: 10(v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0225] White powder (98%); ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 9.318 (s, 1H), 7.757 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.224 (m, 4H), 6.926 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.624 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.392 (s, 3H), 1.217 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).
- [0226] **<실시예 1> 2-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸 아세테이트 {2-(2-(5-Chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-ethylphenyl)-2-oxoethyl acetate} (4a)의 제조**
- [0227] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄 10 mL에 녹인 5-클로로-N-(4-에틸페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민(0.37 mmol, 1eq)에 AlCl₃ (0.73 mmol, 2eq)를 가한 후 실온(15 내지 30℃)에서 10분간 교반 했다. 이후 빙수조(ice bath)에서 아세톡시아세틸클로라이드(acetoxyacetyl chloride, 0.73 mmol, 2eq)을 가하고 실온(15 내지 30℃)에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 mL를 가하고 EtOAc 10 mL로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10% HCl 수용액

(10 ml) 으로 2회, 포화 NaCl 수용액(10 ml) 으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 n-hexane: EtOAc: ether = 5: 2: 1(v/v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0228] White powder (83%), mp 174.1-175.5°C; ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 7.660 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.522 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.403 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.369 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.355 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.292 (s, 2H), 2.739 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.085 (s, 3H), 1.277 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

[0229] <실시예 2> 1-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄온 {1-(2-(5-Chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-ethylphenyl)-2-methoxyethanone} (4b)의 제조

[0230] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄 10 mL에 녹인 5-클로로-N-(4-에틸페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민(0.37 mmol, 1eq)에 AlCl₃ (0.73 mmol, 2eq)를 가한 후 실온(15 내지 30°C)에서 10분간 교반했다. 이후 빙수조(ice bath)에서 메톡시메틸카르보닐클로라이드(0.73 mmol, 2eq)을 가하고 실온(15 내지 30°C)에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 mL를 가하고 EtOAc 10 mL로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10% HCl 수용액(10 ml) 으로 2회, 포화 NaCl 수용액(10 ml) 으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 n-hexane: EtOAc: ether = 5: 2: 1(v/v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0231] White powder (28%), mp 121.6-123°C; ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 7.653 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.533 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.357 (m, 4H), 4.611 (s, 2H), 3.367 (s, 3H), 2.728 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.271 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). HR-FABMS Calcd for C₁₈H₁₈ClN₂O₃ (M⁺H): 345.1006, Found: 345.1004.

[0232] <실시예 3> 메틸 4-(2-(5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트 {Methyl 4-(2-(5-chlorobenzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-ethylphenyl)-4-oxobutanoate} (4c)의 제조

[0233] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄 10 mL에 녹인 5-클로로-N-(4-에틸페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민(0.37 mmol, 1eq)에 AlCl₃ (0.73 mmol, 2eq)를 가한 후 실온(15 내지 30°C)에서 10분간 교반했다. 이후 빙수조(ice bath)에서 메톡시카르보닐에틸카르보닐클로라이드(0.73 mmol, 2eq)을 가하고 실온(15 내지 30°C)에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 mL를 가하고 EtOAc 10 mL로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10% HCl 수용액(10 ml) 으로 2회, 포화 NaCl 수용액(10 ml) 으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 n-hexane: EtOAc: ether = 5: 2: 1(v/v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0234] White powder (16%), mp 143-145°C; ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 7.651 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.548 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.400-7.373 (m, 3H), 7.349 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.637 (s, 3H), 3.090 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.736-2.678 (m, 4H), 1.268 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). HR-FABMS Calcd for C₂₀H₂₀ClN₂O₄ (M⁺H): 387.1112, Found: 387.1108.

[0235] <실시예 4> 1-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-메톡시에탄온 {1-(2-(5-Methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-ethylphenyl)-2-methoxyethanone} (4d)의 제조

[0236] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄 10 mL에 녹인 N-(4-에틸페닐)-5-메틸벤조[d]옥사졸-2-아민(0.37 mmol, 1eq)에 AlCl₃ (0.73 mmol, 2eq)를 가한 후 실온(15 내지 30°C)에서 10분간 교반했다. 이후 빙수조(ice bath)에서 메톡시메틸카르보닐클로라이드(0.73 mmol, 2eq)을 가하고 실온(15 내지 30°C)에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 mL를 가하고 EtOAc 10 mL로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10% HCl 수용액(10 ml) 으로 2회, 포화 NaCl 수용액(10 ml) 으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 n-hexane: EtOAc: ether = 5: 2: 1(v/v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0237] White powder (12%), mp 107.8-108.8°C; ¹H NMR (Acetone-*d*₆, 400 MHz) δ 7.438 (s, 1H), 7.372 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.357-7.306 (m, 4H), 7.152 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.575 (s, 2H), 3.355 (s, 3H), 2.714 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.436 (s, 3H), 1.261 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). HR-FABMS Calcd for C₁₉H₂₁N₂O₃ (M⁺H): 325.1552, Found: 325.1548.

- [0238] <실시예 5> 메틸 4-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-4-옥소부타노에이트 {Methyl 4-(2-(5-methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-ethylphenyl)-4-oxobutanoate} (4e)의 제조
- [0239] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄 10 mL에 녹인 N-(4-에틸페닐)-5-메틸벤조[d]옥사졸-2-아민(0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl₃ (0.73 mmol, 2eq)를 가한 후 실온(15 내지 30℃)에서 10분간 교반했다. 이후 빙수조(ice bath)에서 메톡시카르보닐에틸카르보닐클로라이드(0.73 mmol, 2eq)을 가하고 실온(15 내지 30℃)에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 mL를 가하고 EtOAc 10 mL로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10% HCl 수용액(10 ml) 으로 2회, 포화 NaCl 수용액(10 ml) 으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 n-hexane: EtOAc: ether = 5: 2: 1(v/v/v)으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0240] White powder; ¹H NMR (Acetone-d₆, 400 MHz) δ 7.928 (s, 1H), 7.444 (s, 1H), 7.392 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.374-7.324 (m, 2H), 7.202-7.153 (m, 2H), 3.631 (s, 3H), 3.049 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.719-2.671 (m, 2H), 2.589 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 2.435 (s, 3H), 1.256 (t, J = 7.2 Hz, 3H).
- [0241] <실시예 6> 2-[N-(4-에톡시페닐)] 아미노피리디노티아졸 {2-[N-(4-Ethoxyphenyl)] aminopyridinethiazol} (4f)의 합성
- [0242] 단계 1: 3-아미노-2-히드록시피리딘(3-Amino-2-hydroxypyridine)의 합성
- [0243] 3-니트로-2-히드록시피리딘(1.4 mmol, 200 mg, 1eq)에 Pd/C(4.2 mmol, 3eq mg)를 촉매로 가한 후 펌프를 이용해 공기를 완전히 빼내주었다. MeOH 10 mL를 주입해 시약을 녹이고 수소풍선을 달아 수소로 치환하였다. 5시간 동안 실온(15 내지 30℃)에서 강하게 교반 후 셀라이트에 여과하여 Pd/C를 제거하고 여액을 감압 농축하여 2-아미노-3-히드록시피리딘을 140 mg (89%) 얻었다.
- [0244] 단계 2: N-(2-히드록시피리디노)-N'-(4-에톡시페닐) 티오우레아 {N-(2-Hydroxypyridino)-N'-(4-ethoxyphenyl) thiourea}의 합성
- [0245] 3-아미노-2-히드록시피리딘 100mg (0.91mmol)에 4-에톡시페닐이소티오시아네이트 (4-ethoxyphenyl isothiocyanate, 162.9mg, 0.91mmol)를 동일한 당량 넣고 MeOH 25ml를 가해 완전히 녹인 후 24시간 동안 실온(15 내지 30℃)에서 교반하였다. 시간이 지나면서 생긴 침전을 감압 여과하고, 용매 제거 후 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0246] White powder, IR(KBr, cm⁻¹) 3456, 1660, 1477, 1375, ¹H NMR (Acetone-d₆, 400MHz) δ 1.248(t, J=7.2Hz, 3H), 3.966(q, J=7.2Hz, 2H), 6.132(t, J=6.8Hz, 1H), 6.835~6.857(m, 2H), 7.011(dd, J=2.0 and 6.8Hz, 1H), 7.235~7.257(m, 2H), 7.051(dd, J=2.0 and 6.8Hz, 1H)
- [0247] 단계 3: 2-[N-(4-에톡시페닐)]아미노피리디노티아졸 {2-[N-(4-Ethoxyphenyl)] aminopyridinethiazol} (4f)의 합성
- [0248] N-(2-히드록시피리디노)-N'-(4-에톡시페닐)티오우레아(100mg, 0.345mmol)와 트리플루오로아세트산(TFA)(5 mL)의 혼합물을 24시간 동안 환류시킨 후 실온(15 내지 30℃)으로 식혔다. TFA를 회전 증류기(rotary evaporation)로 제거한 후 컬럼크로마토그래피(EtOAc: n-Hexane = 1: 3(v/v))를 이용하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0249] Pale brown powder, mp: 138~139℃, ¹H NMR (Acetone-d₆, 400 MHz) δ 1.37 (t, J=6.8 Hz, 3H), 4.05 (q, J=6.8 Hz, 2H), 6.94~6.97 (m, 2H), 7.31 (dd, J=8.0, 4.8 Hz, 1H), 7.70~7.729 (m, 2H), 7.79 (dd, J=8.0, 1.6 Hz, 1H), 8.20 (dd, J=4.8, 1.6 Hz, 1H); FABHRMS (m/z): 272.0858 (M⁺+1, requires C₁₄H₁₄N₃OS: 272.0862)
- [0250] <실시예 7> 2-(2-(5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-에틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트{2-(2-(5-Methylbenzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-ethylphenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성
- [0251] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-에틸페닐)-5-메틸페닐벤조[d]옥사졸-2-아민{N-(4-ethylphenyl)-5-methylphenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl₃ (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조

시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0252] White powder (28%), mp 113.5~114°C; ^1H NMR (Acetone- d_6 , 400MHz) δ 7.442 (s, 1H), 7.387~7.365 (m, 2H), 7.352~7.326 (m, 2H), 7.144 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 5.261 (s, 2H), 2.724 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.434 (s, 3H), 2.079~2.040 (m, 3H), 1.266 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H). HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^++H): 353.1501, Found: 353.1502.

[0253] <실시예 8> 2-(5-부틸-2-((5-니트로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트{2-(5-butyl-2-((5-nitrobenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

[0254] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-니트로페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-5-nitrophenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl_3 (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO_4 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0255] Pale yellow powder (18.3%), mp 89~90°C, ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 8.522 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 8.213~8.241 (dd, $J=2.4\text{Hz}$, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.883 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.371 (s, 4H), 5.281 (s, 2H), 2.661 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 2.106 (s, 3H), 1.570~1.646 (m, 2H), 1.306~1.399 (m, 2H), 0.928 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H), HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6$ (M^++H): 413.1534, Found: 413.1543

[0256] <실시예 9> 2-(5-부틸-2-((5-메톡시벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(5-butyl-2-((5-methoxybenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

[0257] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-메톡시페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-5-methoxyphenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl_3 (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO_4 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0258] Brown powder (10%), mp 150~152°C, ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.507 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.293~7.351 (m, 3H), 7.251 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.887 (dd, $J=2.8\text{Hz}$, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 5.211 (s, 1H), 4.496 (s, 1H), 3.788 (s, 3H), 2.644 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.075 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 3H), 1.557~1.614 (m, 2H), 1.314~1.370 (m, 2H), 0.921 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^++H): 397.1758, Found: 397.1764

[0259] <실시예 10> 2-(2-((5-아미노벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트 { 2-(2-((5-aminobenzo[d]oxazol-2-yl)amino)-5-butylphenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

[0260] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-아미노페닐벤조[d]옥사졸-2-아민{N-(4-butylphenyl)-5-aminophenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl_3 (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO_4 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

- [0261] Dark brown powder (40.74%), mp 170~172°C ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 7.690 (d, *J*=1.6Hz, 1H), 7.619 (dd, *J*=2.0Hz, *J*=6.8Hz, 1H), 7.401 (d, *J*=8.8Hz, 1H), 7.252 (dd, *J*=2.0Hz, *J*=8.8Hz, 1H), 7.182 (d, *J*=8.4Hz, 2H), 5.223 (s, 2H), 4.654 (s, 2H), 4.523 (s, 2H), 2.545 (t, *J*=7.8Hz, 2H), 2.132 (d, *J*=1.6Hz, 3H), 1.504~1.580 (m, 2H), 1.279~1.353 (m, 2H), 0.900 (t, *J*=7.2Hz, 3H), HR-FABMS Calcd for C₂₁H₂₄N₃O₄ (M⁺+H): 382.1761, Found: 382.1768
- [0262] <실시예 11> 2-(5-부틸-2-((4-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(5-butyl-2-((4-methylbenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성
- [0263] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-4-메틸페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-4-methylphenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl₃ (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0264] White powder (27.13%), mp 82~83°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 7.405 (dd, *J*=1.2Hz, *J*=7.6Hz, 1H), 7.327 (d, *J*=4.0Hz, 3H), 7.177~7.240 (m, 2H), 5.227 (s, 2H), 2.642 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 2.070 (s, 3H), 1.554~1.630 (m, 2H), 1.293~1.385 (m, 2H), 0.917 (t, *J*=7.4Hz, 3H), HR-FABMS Calcd for C₂₂H₂₅N₃O₄ (M⁺+H): 381.1809, Found: 381.1811
- [0265] <실시예 12> 2-(5-부틸-2-((6-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(5-butyl-2-((6-methylbenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성
- [0266] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-6-메틸페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-6-methylphenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl₃ (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0267] White powder (10%), mp 82~83°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 7.544 (d, *J*=8.4Hz, 1H), 7.438 (s, 1H), 7.290~7.347 (m, 4H), 7.185 (d, *J*=8.8Hz, 1H), 5.169 (s, 2H), 2.641 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 2.397 (s, 3H), 2.069 (s, 3H), 1.552~1.629 (m, 2H), 1.291~1.384 (m, 2H), 0.917 (t, *J*=7.4Hz, 3H), HR-FABMS Calcd for C₂₂H₂₅N₃O₄ (M⁺+H): 381.1809, Found: 381.1815
- [0268] <실시예 13> 2-(5-부틸-2-((5-(tert-부틸)벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(5-butyl-2-((5-(tert-butyl)benzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성
- [0269] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-tert-부틸페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-5-tert-butylphenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl₃ (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO₄로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.
- [0270] White powder (7.6%), mp 82~83°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 7.762 (d, *J*=1.6Hz, 1H), 7.510 (d, *J*=8.4Hz,

1H), 7.376 (dd, $J=2.4\text{Hz}$, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.288~7.349 (m, 3H), 5.217 (s, 2H), 2.643 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.082 (s, 3H), 1.556~1.631 (m, 2H), 1.359 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.295 (s, 9H), 0.920 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+H): 423.2278, Found: 423.2283

[0271] <실시예 14> 2-(2-(벤조[d]옥사졸-2-일아미노)-5-부틸페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(2-(benzo[d]oxazol-2-ylamino)-5-butylphenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

[0272] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)benzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl_3 (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO_4 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0273] White powder (12%), mp 66~68°C, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.664~7.688 (m, 1H), 7.601~7.624 (m, 1H), 7.305~7.387 (m, 4H), 5.229 (s, 2H), 2.647 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.080 (s, 3H), 1.588 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.342 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 0.921 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H), HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+H): 367.1652, Found: 367.1658

[0274] <실시예 15> 2-(5-부틸-2-((5-플루오로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(5-butyl-2-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

[0275] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-플루오로페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-5-fluorophenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl_3 (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO_4 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0276] White powder (7.4%), mp 67~69°C, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.638~7.671 (m, 1H), 7.568 (dd, $J=2.4\text{Hz}$, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.364~7.315 (m, 3H), 7.194~7.141 (m, 1H), 5.237 (s, 2H), 2.650 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 2.088 (s, 3H), 1.562~1.637 (m, 2H), 1.317~1.373 (m, 2H), 0.924 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H), HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{FN}_2\text{O}_4$ (M^+H): 385.1558, Found: 385.1550

[0277] <실시예 16> 2-(5-부틸-2-((5-클로로벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트 {2-(5-butyl-2-((5-chlorobenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

[0278] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-클로로페닐벤조[d]옥사졸-2-아민 {N-(4-butylphenyl)-5-chlorophenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 AlCl_3 (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. MgSO_4 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0279] Ivory powder (41.48%), mp 85~88°C, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.787 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.658 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.316~7.368 (m, 4H), 5.235 (s, 2H), 4.485 (s, 1H), 2.649 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 2.088 (s, 3H), 1.560~1.636 (m, 2H), 1.298~1.390 (m, 2H), 0.922 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H), HR-FABMS Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+H): 401.1263, Found: 401.1266

[0280] <실시예 17> 2-(5-부틸-2-((5-메틸벤조[d]옥사졸-2-일)아미노)페닐)-2-옥소에틸아세테이트{2-(5-butyl-2-((5-methylbenzo[d]oxazol-2-yl)amino)phenyl)-2-oxoethylacetate}의 합성

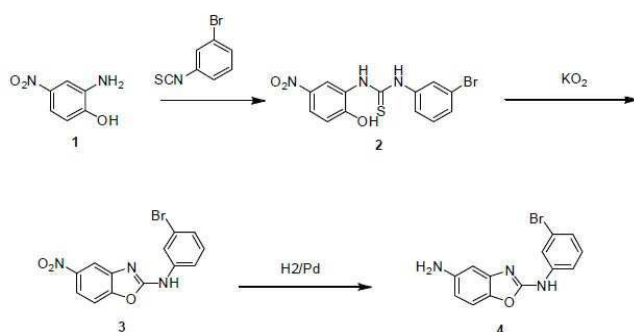
[0281] 질소가스 치환 하에서 디클로로메탄(dichloromethane) 10 ml에 녹인 N-(4-부틸페닐)-5-메틸페닐벤조[d]옥사졸-2-아민{N-(4-butylphenyl)-5-methylphenylbenzo[d]oxazol-2-amine} (0.37 mmol, 1 eq)에 $AlCl_3$ (0.073mmol, 0.2eq)를 가한 후 실온에서 10분간 교반하였다. 이후 ice bath에서 아세톡시아세틸 클로라이드(acetoxyacetyl chloride) (0.73 mmol, 2 eq)을 가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 증류수 10 ml를 가하고 EtOAc 10 ml로 3회 추출하였다. 이 유기층을 모아 10 % HCl 수용액으로 2회, 포화 NaCl 수용액으로 2회 씻었다. $MgSO_4$ 로 건조시킨 후 용매를 감압 농축시켰다. 이후 침전물을 hexane : EtOAc : ether = 5:2:1 으로 감압 여과하여 표제의 화합물을 수득하였다.

[0282] White powder (51.6%), mp 94~95°C, 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.465~7.486 (m, 1H), 7.291~7.350 (m, 4H), 7.120~7.147 (m, 1H), 5.198 (s, 2H), 2.622~2.674 (m, 2H), 2.400 (s, 3H), 2.064 (t, J =8.0Hz, 3H), 1.554~1.631 (m, 2H), 1.293~1.367 (m, 2H), 0.919 (t, J =7.4Hz, 3H), HR-FABMS Calcd for $C_{22}H_{25}N_2O_4$ (M^+): 381.1809, Found: 381.1813

[0283] <실시예 18> N^2 -(3-브로모페닐)벤조[d]옥사졸-2,5-디아민 { N^2 -(3-bromophenyl)benzo[d]oxazole-2,5-diamine}의 합성

[0284] 실시예 18의 화합물의 합성방법은 하기 [반응식 3]에 제시되었다.

[0285] [반응식 3]



[0286]

[0287] 단계 1: 페닐티오우레아(phenylthiourea) 중간체인 물질 2의 합성

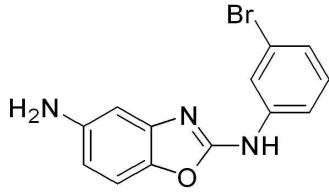
[0288] 메탄올 10mL에 녹인 2-아미노-4-나이트로페놀 (3.244mmol, 1eq)에 3-브로모페닐 이소시아네이트(3-bromophenyl isothiocyanate, 3.244mmol, 1eq)를 넣고 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 유기용매를 감압 하에서 증발 제거한 후 침전을 n-헥산(n-hexane)으로 감압 여과하여 물질 2를 얻었다.

[0289] 단계 2: 벤조옥사졸 고리 물질 3의 합성

[0290] 질소가스 치환 하의 빙수조(ice bath)에서 KO_2 (6.302mmol, 5eq)에 아세토니트릴 10mL을 천천히 가하며 교반하였다. 이후 아세토니트릴 20mL에 녹인 티오우레아 물질 2 (1.2604mmol, 1eq)를 천천히 가하였다. 실온에서 16시간 동안 반응시킨 후 얼음물에 부어 희석시켰다. 디클로로메탄 20mL로 3회 추출하고 포화 NaCl 수용액으로 씻었다. $MgSO_4$ 로 건조시킨 후 용매를 감압 제거시켰다.

[0291] 단계 3: 벤조옥사졸 고리 물질 3의 환원

[0292] 물질3 (0.3531mmol)에 5% Pd/C 0.2g을 넣고 메탄올 10mL를 천천히 적가한 후 수소를 충전시켜 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응액을 셀라이트로 여과한 후 여액의 용매를 감압 하에서 제거하여 하기 구조의 표제 화합물을 수득하였다.



수율: 85.93%, 녹는점: 247~249℃,

Rf: 0.214 [헥산:에틸아세테이트(1:1)]

¹H-NMR (Acetone-d₆, 400MHz): δ 9.718 (brs, 1H), 7.870 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.513 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.404 (t, J=8.0Hz, 2H), 7.095 (t, J=7.2Hz, 2H)

<실험예 1>

1) 생쥐의 배아줄기세포인 R1 세포를 이용한 녹색형광단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)발현 세포주 작성

1X10⁶ 개의 생쥐유래 R1 세포(Andras Nagy 박사제공, Mount Sinai Hospital, New York, New York, USA)에 Oct4 유전자의 프로모터를 통해 GFP를 발현하는 플라스미드를 전기천공법 (electroporation)을 이용하여 집어넣었다. GFP 발현 플라스미드는 Oct4 유전자의 프로모터를 포함하는 18kb (프로모터)의 유전자 분획을 포함하는 플라스미드이다(GOF-18ΔPE, Hans R. Scholler 박사제공, Max-Planck-Gesellschaft, Munster, Germany)(Yeom, Y.I., et al., *Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells*. Development, 1996. 122(3): p. 881-94.). 항생제 선택을 위해서 전기천공시 항 네오마이신(anti-neomycin) 유전자를 함유하고 있는 Pgk-neoPA 플라스미드(Hirofumi Suemori 박사제공, Kyoto University, Japan)를 함께 세포에 넣어주었다. 전기천공된 세포는 항 네오마이신 유전자를 발현하는 생쥐의 배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF) 세포 위에서 네오마이신이 0.2 mg/ml 포함된 줄기 세포용 배지를 이용하여 배양하였다. 증식된 콜로니들은 따로 떼어내어 대량으로 배양하고 현광현미경을 통해 전분화능 (Pluripotency)상태에서만 발현되는 GFP를 확인하였다. 확인된 세포주들은 R1-GFP라 명명하고 액체질소에 보관하다 필요 시에 꺼내어 사용하였다.

2) R1-GFP 세포주의 분화유도

생쥐의 배아줄기세포인 R1은 배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)위에서 배양하였다. 분화실험을 위해서 R1-GFP 세포는 0.1% 젤라틴이 코팅된 배양접시에서 2시간 배양하여 MEF를 제거한 뒤 페트리접시에 옮겨서 배상체(embryoid body, EB)형성을 유도하였다. EB 형성을 위해서는 R1-GFP 세포를 페트리접시에 6일간 37℃, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였고 형성된 배상체(EB)들은, 약 15~20개씩 96 웰-플레이트(well-plate)의 각 웰(well)에 분주하였다. 생쥐 줄기세포의 분화억제제로 배지에 첨가되는 백혈병억제인자(Leukemia inhibitory factor, LIF)는 분화유도를 위해 배상체(EB)의 형성 때부터 배지에서 제외하였다. 실시예 2에서 합성된 화합물 4b 및 실시예 6에서 합성된 화합물 4f를 각각 5 μM 농도로 배지에 첨가한 뒤 이를 각 웰에 넣어주어 분화를 유도하였다. 대조군으로는 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 동량 사용하였다. 각 화합물이 포함된 배지는 24시간 간격으로 새로운 배지로 교환해주면서 37℃, 5% CO₂ 상태에서 배양을 계속하였다.

3) 면역조직화학

분화가 이루어진 세포는 4% aldehyde로 고정을 하고 1차 항체를 이용하여 세포동정을 실시하였다. R1-GFP세포를 염색하기 위해서 1차 항체로는 항 튜불린 베타-III (anti-tubulin β-III) (AB cam) 및 항 미오신-H-사슬 (anti-myosin heavy chain)(Millipore)을 사용하였고, F-액틴(F-actin)을 염색하기 위해서 알렉사 555(Alexa 555)가 결합된 팔리오딘(phalloidin)(Invitrogen)을 사용하였다. 고정된 세포를 0.1% triton-X100가 포함된 인산완충식염수(PBST) 1ml로 10분간 처리한 뒤 해당 항체가 포함된 5% skim milk-PBST로 4℃에서 12시간 처리하였다. 이후 PBST로 3회 세척한 뒤에 형광물질이 결합된 2차 항체가 첨가된 PBST로 실온(15 내지 30℃)에서 2시간 배양하였다. 이후 세포는 PBST로 3회 세척한 뒤에 Gold Antifade 마운팅 액 (Invitrogen)으로 덮고 커버슬립을 씌워 공초점(confocal) 현광현미경을 통해 100배로 증폭하여 동정하였다.

4) 신경세포 분화 유도 확인

96-웰 플레이트의 각 웰에 분주된 R1 EB 콜로니들은 실시예 2에서 합성된 화합물 4b 및 실시예 6에서 합성된 화

합물 4f를 각각 5 μ M의 농도로 처리한 후 13일째 되는 날부터 신경세포의 특징적인 형태가 생성되는 것이 관찰되기 시작하였다. 세포들은 신경세포의 독특한 수상돌기와 축삭 구조를 보였으며 이를 통해 신경세포간 활발한 연결을 형성하였다. 또한 신경세포에 특이적인 베타-III 튜불린 (β -III tubulin)의 발현을 확인함으로써 분화된 세포가 신경세포임을 동정하였다(도 1 및 도 2). 반면에 DMSO를 처리한 세포에서는 어떤 특정한 분화패턴도 확인할 수 없었다(도 3). 도 1 내지 3에서 스케일바(scale bar)= 200 μ m을 나타낸다.

<실험예 2>

1) Microarray 실험

R1 세포에 실시예 2에서 합성된 화합물 4b 및 실시예 6에서 합성된 화합물 4f를 각각 μ M 농도의 각 화합물로 1주일간 처리하고 total RNA를 분리하였다. 대조군으로는 동량의 DMSO를 같은 기간 처리한 R1세포로부터 추출한 total RNA를 사용하였다. 얻어진 RNA를 이용하여 cDNA를 제조하고 이를 Agilent사의 mouse cDNA microarray chip에 적용하여 화합물 4b 및 화합물 4f에 의해 발현이 유도되는 유전자를 스크리닝하였다. DMSO를 처리한 대조군과 비교하여 화합물을 처리한 세포에서 더 높은 농도로 발현된 유전자를 선택하였고, 기준은 화합물에 의해 발현되는 유전자의 양이 DMSO를 처리한 세포에서의 발현양보다 $\log_2$ 스케일로 2 이상 증가된 유전자로 하였다.

2) 유전자 발현유도 비교 분석

실시예 2 및 실시예 6에서 각각 합성한 화합물 4b 및 화합물 4f에 의해 발현이 유도되는 유전자들을 microarray 방법을 통하여 확인하였다. 화합물 4b 및 화합물 4f를 각각 처리한 R1 세포에서 발현되는 유전자는 상호 중첩되는 것뿐만 아니라 각각의 화합물에 의해 독특하게 발현되는 유전자도 존재하였다(도 4). 화합물 4b 및 화합물 4f에 의해 발현되는 유전자는 표 4에 정리하였다. 이들 유전자중 상당수가 신경세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다.

[표 4]

화합물 4b 및 4f에 의해 발현되는 유전자
4b-induced genes Htr4: 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor ABCA4: ATP-binding cassette A 4 Sst: Somatostatin L3mbtl4: L3 mbt-like 4 IL-9: Interleukin-9 Siglec1: Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin Golga7b: Golgi autoantigen 7b
4b and 4f-induced genes Sifn1: Schlafen like 1 ABCA12: ATP-binding cassette A 12 Col12: Collagen type 12 Spink6: Serine peptidase inhibitor, Kazal type 6 Accn5: Amiloride-sensitive cation channel 5
4f-induced genes Ncal: Neurocalcin delta Sox9: SRY-box containing gene 9 Apbb1ip: Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family 8, member 1 interacting protein Cyslr1: cysteinyl leukotriene receptor 1 (Cyslr1) Sv2c: Synaptic vesicle glycoprotein 2c Oprm1: Opioid receptor, mu 1 Uts2: Urotensin 2 Pglyrp4: Peptidoglycan recognition protein 4 Mrgprb1: MAS-related GPR, member B1 Q9EPV1: B6 olfactory receptor

[0313] <실험예 3>

[0314] 1) ENSTem-A 사람 신경아세포의 배양

[0315] ENSTem-A 사람 신경아세포 (neural progenitor cell)와 이의 배양을 위한 배지 및 배지첨가물 등은 모두 Millipore사에서 구입하여 제조자가 제시한 방법에 따라 배양하고 저장하였다.

[0316] 2) ENSTem-A 사람 신경아세포의 분화유도

[0317] 신경 증식 배지 (ENSTem-A™ Neural expansion medium, (Millipore))에서 자란 신경아세포에 배지를 제거하고 실시예 2 및 실시예 6에서 각각 합성한 화합물 4b 및 화합물 4f를 각각 5 μ M씩 신경 분화 배지 (ENSTem-A™ Neural differentiation medium, (Millipore))에 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 대조군 세포는 상기 화합물과 동량의 DMSO가 첨가된 분화배지에서 같은 조건으로 배양을 하였다. 이후 매 3일 간격으로 세포들에 상기 화합물 또는 DMSO가 첨가된 신선한 분화배지를 계속적으로 공급해주었다. 분화를 유도한지 3주부터는 1 μ M의 AraC를 배지에 첨가하여 분화되지 않고 증식하는 세포들을 제거하였다.

[0318] 3) 면역조직화학 및 신경세포 분화 유도 확인

[0319] 분화된 신경세포들에서 발현되는 뉴런의 특정 마커들은 항체를 이용한 면역조직화학 방법으로 검출하였다. 우선 분화를 유도한 사람 신경아세포에 AraC를 첨가하여 첨가하여 분화되지 않고 증식하는 세포를 제거한 후 1주일 간 배양하였다. 분화가 이루어진 세포는 4% 알데하이드(aldehyde)로 고정을 하고 1차 항체를 이용하여 세포동정을 실시하였다. ENSTem-A 세포를 염색하기 위해서는 분화된 신경세포의 동정을 위하여 항 ChAT 항체 (콜린성(cholinergic) 뉴런의 마커), 항 DARPP32 항체 (도파민성(dopaminergic) 뉴런의 마커), 항 VGluT1 항체 (글루타민성(glutaminergic) 뉴런의 마커), 항 HB9 항체 (운동성(motor) 뉴런의 마커), 및 항 GAD65 항체 (GABA성(GABAergic) 뉴런의 마커)의 각각의 분화 마커에 대한 항체를 이용하였다. 고정된 세포를 0.1% triton-X100가 포함된 인산완충식염수(PBST) 1ml로 10분간 처리한 뒤 해당 항체가 포함된 5% skim milk-PBST로 4℃에서 12시간 처리하였다. 이후 PBST로 3회 세척한 뒤에 형광물질이 결합된 2차 항체가 첨가된 PBST로 실온(15 내지 30℃)에서 2시간 배양하였다. 이후 세포는 PBST로 3회 세척한 뒤에 Gold Antifade 마운팅 액 (Invitrogen)으로 덮고 커버글라스를 씌워 공초점 (confocal) 형광현미경을 통해 100배로 증폭하여 동정하였다.

[0320] DMSO를 처리한 신경아세포의 경우는 다양한 종류의 뉴런 마커가 발현됨을 알 수 있었다. 도파민성(dopaminergic) 뉴런의 마커, 콜린성(cholinergic) 뉴런의 마커, 및 글루타민성(glutaminergic) 뉴런의 마커가 비교적 많은 양이 발현되었고, GABA성(GABAergic) 뉴런의 마커도 비록 소량이지만 발현이 관찰되었고, 운동성(motor) 뉴런의 마커는 발현이 매우 낮았다. 이와 다르게 화합물 4b를 처리한 신경아세포는 대부분의 분화된 세포에서 특징적으로 콜린성(cholinergic) 뉴런의 마커와 글루타민성(glutaminergic) 뉴런의 마커만이 발현되었고, 그 중에서도 콜린성(cholinergic) 뉴런의 마커 발현 양이 많았다(도 5).

[0321] 4) Real-Time qPCR 실험 및 신경세포 분화 유도 확인

[0322] 분화된 신경세포의 동정을 위해서 상기 면역조직화학 방법뿐 아니라 실시간 증량효소연쇄반응 정량검사(Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)방법을 통해 분화된 세포들로부터 RNA를 추출하여 신경세포의 마커 유전자 발현을 정량적으로 분석하였다. RT-qPCR은 Applied Biosystem사에서 제조한 Power SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 실험하였다. 사용된 프라이머(primer)의 염기서열은 다음과 같다. GAPDH (Forward: 5'ATGGAAATCCCATCACCATCTT3', Reverse: 5'GCCCCACTTGATTTTGG3'), ChAT (Forward: GATGAAACCTACCTGATGAGCAACC3', Reverse: CAGCTGTGAAAGCTAGAGATGCAGA3'), TH (Forward: 5'TCACCAAGTTCGACCCTGACC3', Reverse: 5'GCGATCTCAGCAATCAGCTTC3', DARPP32 (Forward: 5'AGGCACCATCTCAAGTCGAAG3', Reverse: 5'AGACTGCAGGTGAGACTCAGCAA3').

[0323] 화합물 4b와 DMSO 처리에 의한 유전자 발현의 변화는 대조군인 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로제나아제(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (GAPDH)를 이용하여 발현 비율(Induction Fold) (유전자/GAPDH) 값으로 계산하여 수치화하였다.

[0324] RT-qPCR로 분석한 결과 화합물 4b에 의해 분화된 신경세포는 DMSO를 처리한 세포에 비해서 상대적으로 많은 양의 콜린성(cholinergic) 뉴런 마커인 ChAT의 발현이 높은 것으로 나타났다. 이에 반해 도파민성(dopaminergic) 뉴런 마커인 DARPP32, 그리고 노르아드레날린성(noradrenergic) 뉴런 마커인 TH의 발현은 낮았다(도 6). 따라서 화합물 4b에 의해 ENSTem-A 사람 신경아세포는 특징적으로 콜린성(cholinergic) 뉴런으로 분화됨을 알 수 있다.

[0325]

<실험예 4>

[0326]

흰쥐 대뇌피질유래 신경 줄기세포(Rat embryonic cortices at embryonic day 14 (E14))를 cm^2 당 30,000 세포로 배양하였다(폴리오르니틴(polyornithine)/피브로넥틴(fibronectin)로 전-코팅된 24웰 플레이트(Nunc) 상에 초기 밀도 3×10^4 /웰로 접종하고, bFGF(20 ng/ml; R&D system)로 보충된 무혈청 N2 배지에서, 37 °C, 5% CO_2 에서 3일 동안 배양하였다.) bFGF를 배지로부터 배제한 후 배양(배양 배지에서 bFGF를 넣지 않고 배양)함으로써 세포 분화가 유도되었다. bFGF를 배지로부터 배제하는 방법으로 분화배지로 무혈청 N2 배지를 격일로 갈아주면서 6일 동안 세포 분화를 유도하였다.

[0327]

배양된 세포는 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde; PFA)로 고정하고 0.1% BSA/0.3% Triton X-100로 블록킹하고 1차 항체 (Tuj1(1:500, Covance)/GFAP(1:200, MP Biomedicals))와 함께 4°C에서 하룻밤 배양하였다. Alexa 488-(1:200, Invitrogen) 및 Cy3-(1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories) 표지된 2차 항체가 적용되었고 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole) (DAPI, Vector Laboratories INC.)를 함유하는 VECRASHIELD[®]에 올려졌다. 면역반응성 세포를 형광 현미경 하에서 분석하였다. 최종 배율 200에서 접안 그리드(eye-piece grid)를 이용하여 현미경 하에서 세포 계수(cell counting)를 수행하였다. 각각의 웰에서 10 초과의 현미경 시야(microscopic field)를 무작위적으로 선택하여 정량하였다.

[0328]

Immunocytochemistry(면역세포조직화학) 결과, 신경세포의 마커 Tuj1과 성상세포의 마커 GFAP 발현 양상을 확인하고(도 7 참조) 정확한 수치 값을 얻기 위해 counting 한 결과가 도 8이다.

[0329]

도7은 신경 줄기세포 분화시 bFGF 제거하고 DMSO를 첨가하여 분화 유도한 대조군 그룹(-)과 실시예 3의 화합물, 실시예 18의 화합물을 각각 5 μM 농도로 첨가하여 분화 유도 6일후 각 그룹 간의 신경세포 (Tuj1)와 성상세포 (GFAP) 로의 분화 양상을 보여주는 도이다.

[0330]

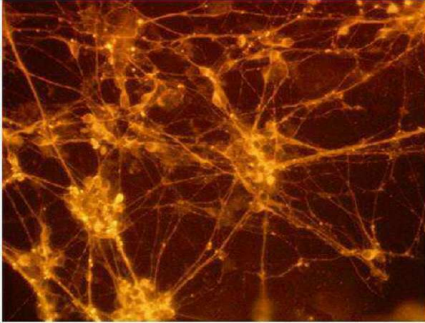
도8은 실시예 3의 화합물, 실시예 18의 화합물을 첨가하여 각각 5 μM 농도로 첨가하여 분화 유도 6일 후 각 그룹 간의 신경세포 (Tuj1)와 성상세포 (GFAP)로의 분화량을 정량화한 그래프이다.

[0331]

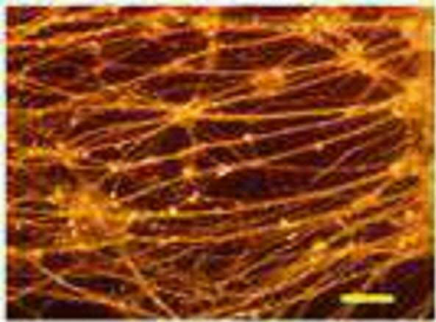
도 7에서 대조군(-)과 비교하여 실시예 3의 화합물을 처리한 결과 신경세포 마커 Tuj1이 더 많이 발현되었으며, 실시예 18의 화합물을 처리한 경우 대조군(-)과 비교하여 성상세포 마커 GFAP의 발현이 더 높음을 확인 할 수 있다. 구체적으로, 분화 유도시 DMSO 첨가 대조군(-)과 비교하여 실시예 3의 화합물을 5 μM 농도로 처리하였더니 신경세포의 분화가 그림과 같이 44%에서 67%로 증가하였다. 반면 성상세포의 경우, 36%에서 22%로 감소함을 보였다. 결과로 보아 실시예 3의 화합물은 신경 줄기세포에 신경세포로의 운명결정에 관여하는 것을 알 수 있다. 성체의 뇌 조직에서 정상적으로 신경줄기세포가 존재하며 새로운 신경세포가 형성되는지 입증되었다. 그리고 이와 같은, 새로운 신경세포 생성은 뇌손상 시, 증가 된다고 알려져 있다. 그러나, 파킨슨과 알츠하이머 같은 뇌신경퇴행성질환에서는 신경줄기세포로부터의 새로운 신경세포로의 분화가 충분하지 않아 이와 같은 질환을 치료하는데 있어서는 뇌손상부위에 존재하는 신경줄기세포를 자극하여 신경세포로의 분화를 촉진하는 것이 가장 중심적인 치료 전략이다. 또한, 신경줄기세포로부터 성상세포로 분화가 이루어지며 분화된 성상세포는 신경세포의 기능을 도와주는 역할을 한다. 그러므로 신경퇴행성 질환을 치료하는 데 있어서는 신경줄기세포로부터 신경세포로의 분화와 아울러 신경세포의 기능을 돕고 보호할 수 있는 성상세포로의 분화도 중요하다. 따라서, 상기 실험을 통해 본 발명의 화합물, 예컨대 실시예 3의 화합물과 실시예 18의 화합물이 다양한 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 질환의 치료에 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

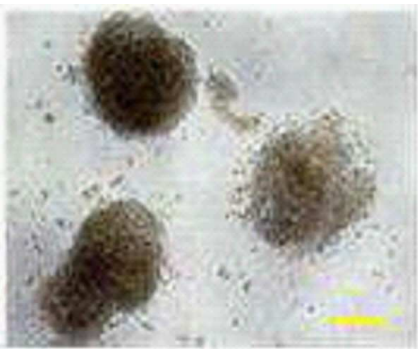
도면1



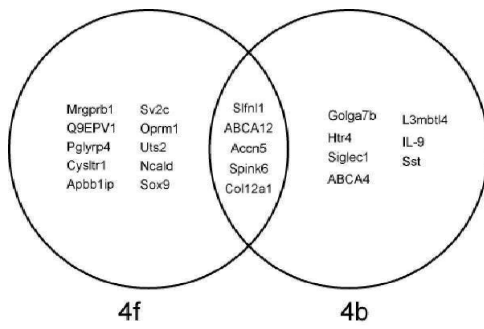
도면2



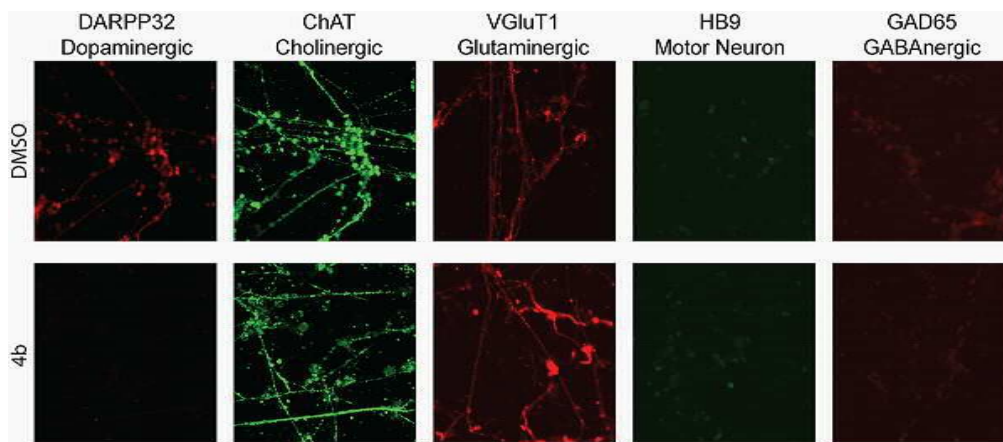
도면3



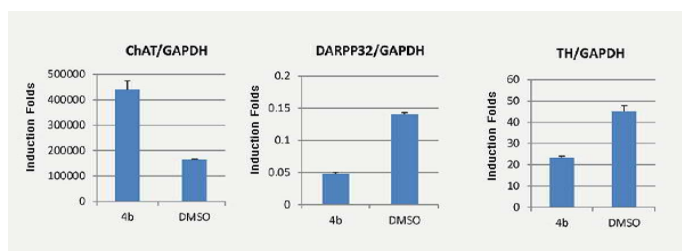
도면4



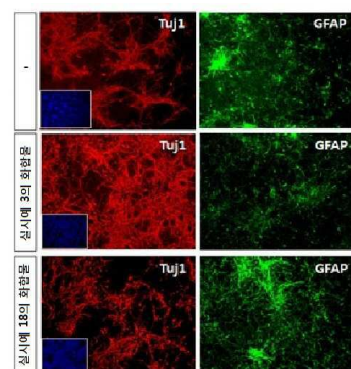
도면5



도면6



도면7



도면8

