



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월03일
(11) 등록번호 10-1722410
(24) 등록일자 2017년03월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 261/08 (2006.01) A61K 31/435 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01) C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7002937
(22) 출원일자(국제) 2012년07월12일
심사청구일자 2015년06월25일
(85) 번역문제출일자 2014년02월04일
(65) 공개번호 10-2014-0051932
(43) 공개일자 2014년05월02일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/002941
(87) 국제공개번호 WO 2013/007387
국제공개일자 2013년01월17일
- (30) 우선권주장
11005722.1 2011년07월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/507,153 2011년07월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2011020615 A1
EP1894924 A
WO2000037077 A1
- (73) 특허권자
길리어드 사이언시즈, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94404 포스터 시티 레이크사이드
드라이브 333
- (72) 발명자
킨젤, 올라프
독일 69117 하이델베르크, 엠 하크토이펠 8.
스텐베크, 크리스토프
독일 69221 도젠하임, 슐스트라쎄 8.
크레모젤, 크로스
독일 69121 하이델베르크, 구겐무스웨그 20.
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 신규 FXR(NR1H4) 결합 및 활성 조절 화합물

(57) 요약

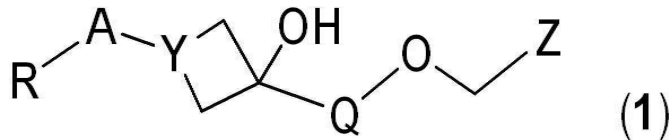
본 발명은 NR1H4 수용체(FXR)에 결합하고 FXR의 효능제로서 행동하는 화합물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 화합물에 의한 상기 핵 수용체의 결합을 통하여 질환 및/또는 상태의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 화합물의 용도 및 상기 화합물의 합성방법에 관한 것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (1)의 화합물, 이의 거울상체, 부분입체이성질체, 호변이성질체, 용매화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 염:



여기서,

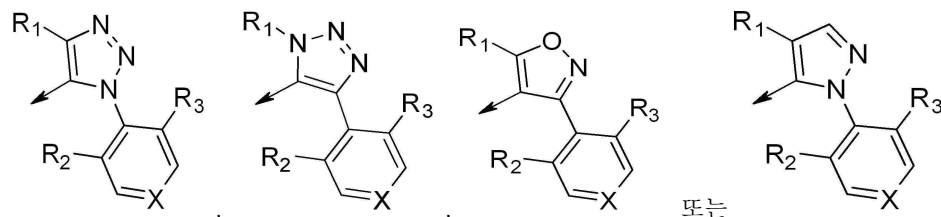
R 은 COOR_6 , CONR_7R_8 , 테트라졸릴, $\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$, C_{1-6} 알킬, $\text{SO}_2\text{-C}_{1-6}$ 알킬 및 H로 구성되는 군으로부터 선택되고, R_6 는 독립적으로 H 또는 C_{1-6} 알킬로 구성되는 군으로부터 선택되고, R_7 및 R_8 은 서로 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, 할로- C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬렌- R_9 및 $\text{SO}_2\text{-C}_{1-6}$ 알킬로 구성되는 군으로부터 선택되며, 여기서 R_9 은 COOH , OH 및 SO_3H 로 구성되는 군으로부터 선택되고;

A는 페닐, 피리딜, 피리미딜, 피라졸릴, 인돌릴, 티에닐, 벤조티에닐, 인다졸릴, 벤즈이족사졸릴, 벤조푸라닐, 벤조트리아졸릴, 퓨라닐, 벤조티아졸릴, 티아졸릴 및 옥사디아졸릴로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환 또는 OH, O- C_{1-6} 알킬, O-할로- C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬, 할로- C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬 및 할로겐으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되는 1 또는 2 개의 치환기로 치환되고;

Q는 페닐, 피리딜, 티아졸릴, 티오펜릴, 피리미딜로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 이들 각각은 비치환 또는 C_{1-6} 알킬, 할로- C_{1-6} 알킬, 할로겐 및 CF_3 로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2 개의 치환기로 치환되고;

Y는 N 또는 CH로부터 선택되고;

Z는



로부터 선택되고;

여기서

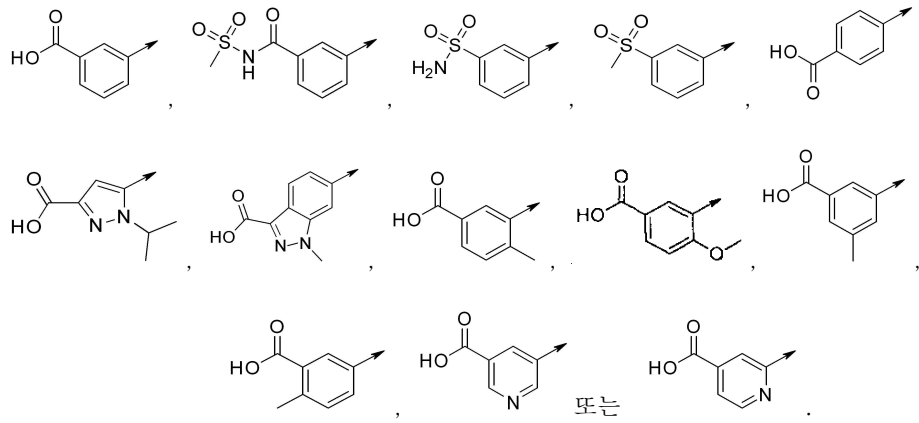
X는 CH, N 및 NO로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

R_1 은 수소, C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, C_{4-5} 알킬사이클로알킬로 구성되는 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-3} 알킬은 할로겐, 하이드록시 또는 C_{1-6} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3 개의 치환기로 선택적으로 치환되고;

R_2 및 R_3 는 수소, C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 할로알킬, C_{1-3} 알콕시, C_{1-3} 할로알콕시 및 할로겐으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된다.

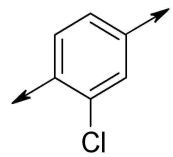
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R-A는 하기로부터 선택되는 화합물:



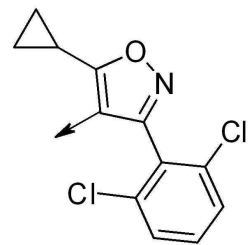
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Q는 하기에 표시되는 화합물:



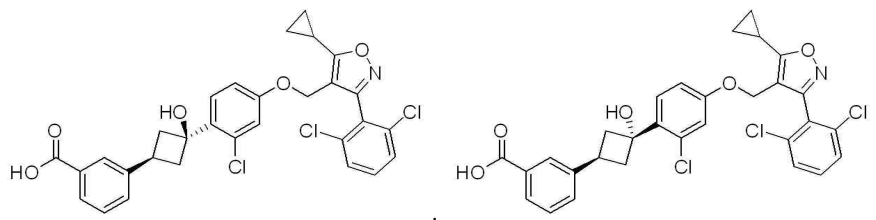
청구항 4

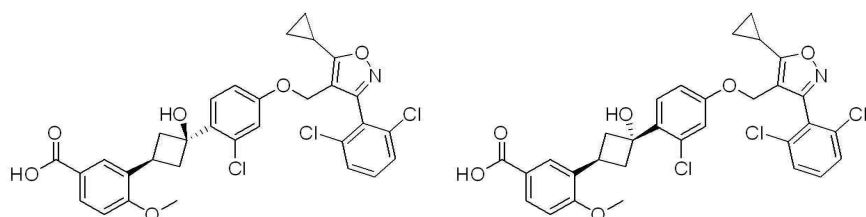
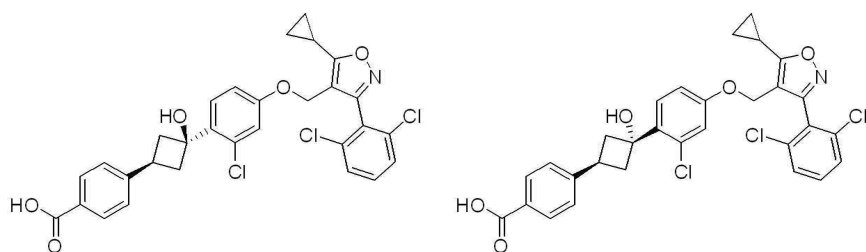
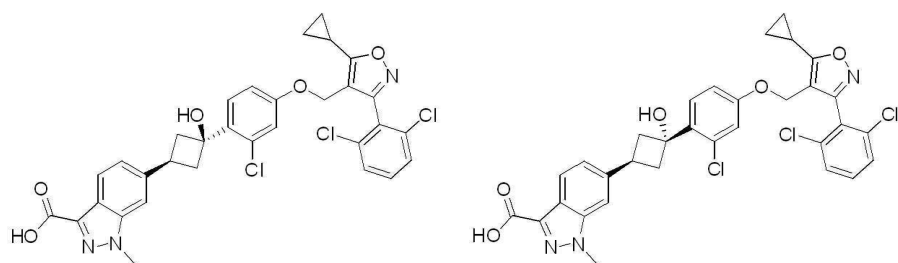
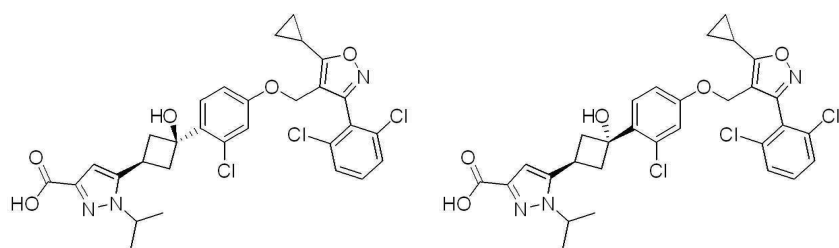
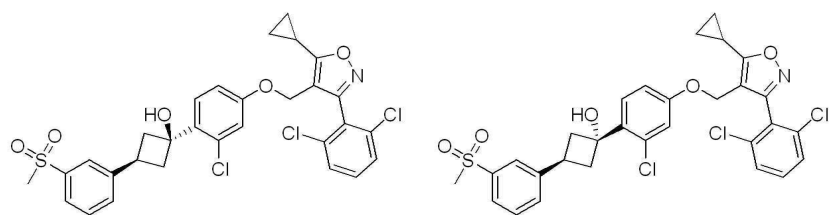
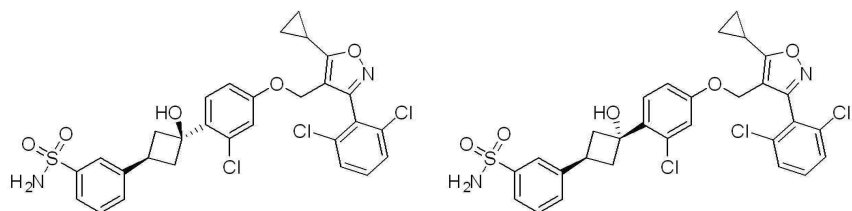
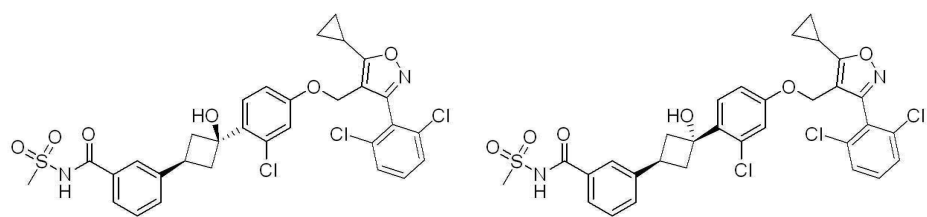
제1항에 있어서, 상기 Z는 하기에 표시되는 화합물:

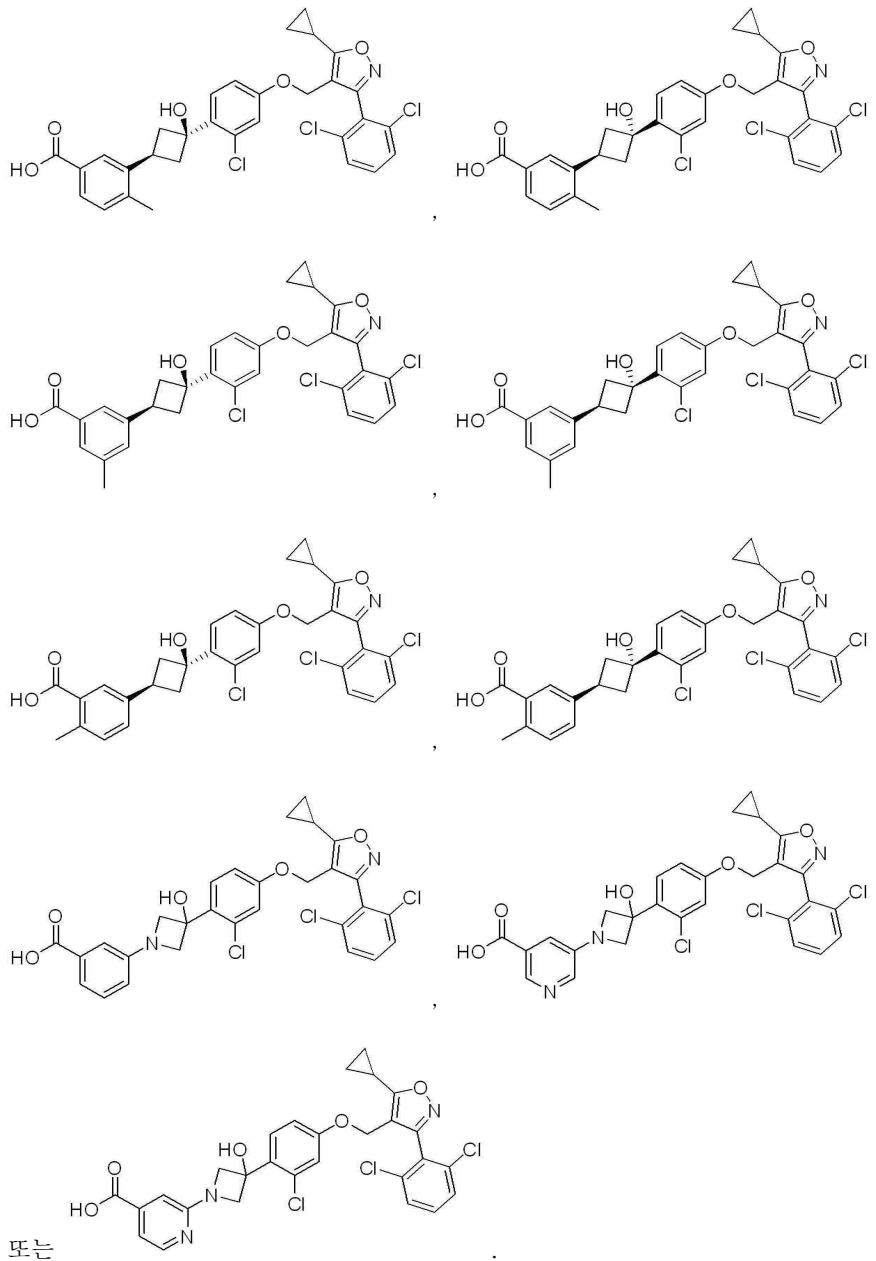


청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기로부터 선택되는 화합물:







청구항 6

FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 질환은

만성 간내 담즙정체 상태 또는 간외 담즙정체(cholestatic) 상태;

간섬유화(liver fibrosis);

간의 폐쇄 또는 만성 염증성 장애(chronic inflammatory disorders);

간경화증(liver cirrhosis);

간지방증(liver steatosis), 알코올로 유도된 경화증 또는 바이러스 매개 형태의 간염과 관련 있는 담즙정체(cholestatic) 또는 섬유화 증상(fibrotic effects);

간부전(liver failure) 또는 주요 간 절제 후 간허혈(liver ischemia);

화학요법과 관련된 지방간염(chemotherapy associated steatohepatitis (CASH));

급성 간부전(acute liver failure); 및

염증성 장질환(Inflammatory Bowel Diseases)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 화합물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 질환은

지질 및 지단백질 장애;

제II형 당뇨병과 제I형 및 제II형 당뇨병 임상합병증(clinical complications);

강화된 지질과 및 전섬유화성 경로의 연속적 활성화로 인해 기관의 만성 지방 및 섬유화성 퇴화로 유발되는 상태 및 질환;

비만 또는 대사증후군(metabolic syndrome); 및

급성 심근경색증(acute myocardial infarction), 급성 뇌졸중(acute stroke) 또는 만성 폐쇄 죽상동맥경화증 말단에 발생하는 혈전증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제I형 및 제II형 당뇨병 임상합병증은 당뇨병콩팥병증, 당뇨병신경병증, 당뇨병망막병증 및 장기적 당뇨병인 예방 또는 치료용 화합물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 강화된 지질은 트리글리세라이드 축적이고,

상기 기관의 만성 지방 및 섬유화성 퇴화로 유발되는 질환은 비알코올 지방간 질환(NAFLD) 또는 비알코올 간지방(NASH)인 예방 또는 치료용 화합물.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 질환은 비악성 과증식성 장애 및 악성 과증식성 장애인 예방 또는 치료용 화합물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 비악성 과증식성 장애 및 악성 과증식성 장애는 간세포암종, 결장 샘종, 폴립증, 결장 샘암종, 유방암, 췌장 샘암종, 바레트식도(Barrett's esophagus) 및 위장관 및 간의 종양질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 화합물.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는,

만성 간내 담즙정체 상태 또는 간의 담즙정체(cholestatic) 상태;

간섬유화;

간의 폐쇄 또는 만성 염증성 장애;

간경화증;

간지방증, 알코올로 유도된 경화증 또는 바이러스 매개 형태의 간염과 관련 있는 담즙정체 또는 섬유화 증상;

간부전 또는 주요 간 절제후 간허혈;

지방간염과 관련된 화학요법;

급성 간부전; 및

염증성 장질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는,

지질 및 지단백질 장애;

제II형 당뇨병과 제I형 및 제II형 당뇨병 임상합병증;

강화된 지질과 및 전섬유화성 경로의 연속적 활성화로 인해 기관의 만성 지방 및 섬유화성 퇴화로 유발되는 상태 및 질환;

비만 또는 대사증후군(metabolic syndrome); 및

급성 심근경색증(acute myocardial infarction), 급성 뇌졸중(acute stroke) 또는 만성 폐쇄 죽상동맥경화증 말단에 발생하는 혈전증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 제I형 및 제II형 당뇨병 임상합병증은 당뇨병콩팥병증, 당뇨병신경병증, 당뇨병망막병증 및 장기적 당뇨병인 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 강화된 지질은 트리글리세라이드 축적이고,

상기 기관의 만성 지방 및 섬유화성 퇴화로 유발되는 질환은 비알코올 지방간 질환(NAFLD) 또는 비알코올 간지방(NASH)인 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 비악성 과증식성 장애 및 악성 과증식성 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

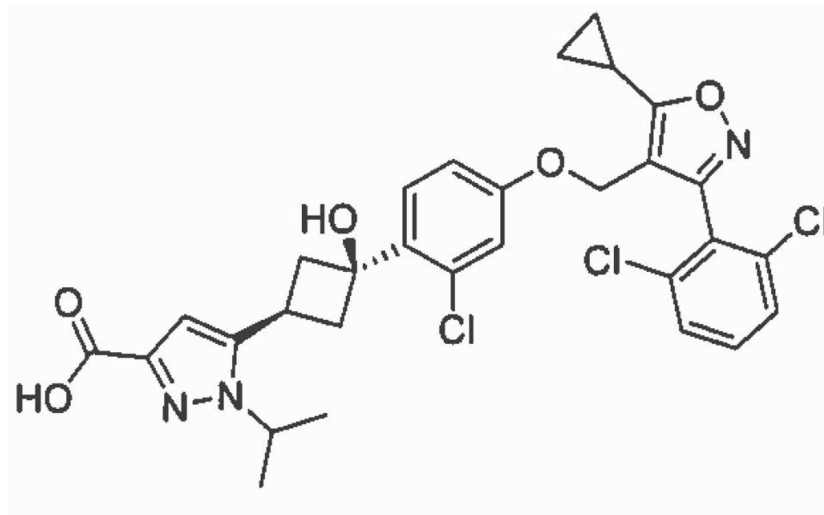
제18항에 있어서,

상기 비악성 과증식성 장애 및 악성 과증식성 장애는 간세포암종, 결장 샘종, 폴립증, 결장 샘암종, 유방암, 췌장 샘암종, 바레트식도(Barrett's esophagus) 및 위장관 및 간의 종양질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제 1항에 있어서,

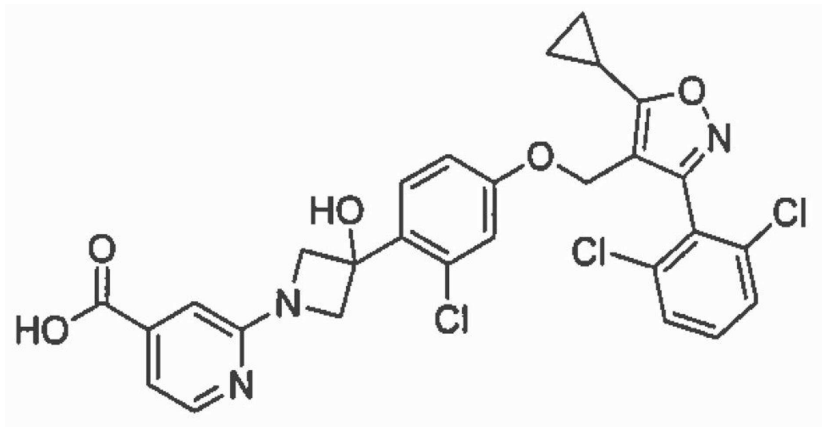
상기 화합물은 하기 구조식 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 가지는 화합물:



청구항 21

제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 구조식 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 가지는 화합물:



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NR1H4 수용체(FXR)에 결합하고 FXR의 효능제(agonists) 또는 조절인자(modulators)로서 행동하는 화합물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 화합물에 의해 상기 핵 수용체의 결합을 통하여 질환 및/또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 화합물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다세포 생물은 세포와 신체 구획 사이의 정보 전달의 진화된 기전에 의존된다. 전달되는 정보는 매우 복잡할 수 있고, 세포 분화, 증식, 또는 복제에 포함되는 유전자 프로그램의 변경을 초래할 수 있다. 신호나 호르몬은 종종 펩티드, 지방산 또는 콜레스테롤 유도체와 같은 저분자량의 분자이다.

[0003] 상기 신호의 대부분은 궁극적으로 특정 유전자의 전사를 변경하여 이의 효과를 생성한다. 다양한 신호에 반응하는 세포를 매개하는 잘 연구된 하나의 단백질군은 핵 수용체로 알려진 전사인자 가족이고, 이하 종종 “NR”로 언급한다. 상기 군의 구성원은 상기 군의 다른 구성원과 구조적으로 유사하지만 이에 대한 어떤 리간드도 알려지지 않은 단백질인 소위 고아수용체(orphan receptor)외에 스테로이드 호르몬, 비타민 D, 탈피호르몬(ecdysone), 시스 및 트랜스 레티노산, 갑상선 호르몬, 담즙산, 콜레스테롤-유도체, 지방산(및 다른 퍼옥시좀 증식체)에 대한 수용체를 포함한다. 고아 수용체는 세포내에서 알려지지 않은 신호경로의 표시될 수 있거나 리간드 활성화 없이 기능하는 핵 수용체일 수 있다. 상기 고아 수용체 일부에 의한 전사활성은 외인성 리간드 부재 및/또는 세포 표면으로부터 기원되는 신호전달경로를 통하여 발생할 수 있다(D. J. Mangelsdorf et al., Cell 1995, 83, 835; R. M. Evans, Mol. Endocrinol. 2005, 19, 1429).

[0004] 일반적으로 세 개의 기능적 도메인이 NR에 정의되었다. 아미노 말단 도메인은 일부 조절 기능을 갖는 것으로 여겨진다. 이어서 항상 2개의 징크 핑거(zinc finger) 요소를 포함하고 반응 유전자(responsive gene)의 프로모터내의 특정 호르몬 반응 요소(Hormone Responsive Element, 이하 “HRE”이라 언급함)를 인지하는 DNA-결합 도메인(DNA-binding domain, 이하 “DBD”라 언급함)이 차지한다. “DBD” 내의 특정 아미노산 잔기는 DNA 서열 결합 특성이 주어지는 것으로 알려져 왔다(M. Schena and K. R. Yamamoto, Science 1988, 241, 965). 이하 “LBD”라 언급되는 리간드-결합-도메인(ligand-binding-domain)은 알려진 NR의 카르복시-말단 부위에 있다.

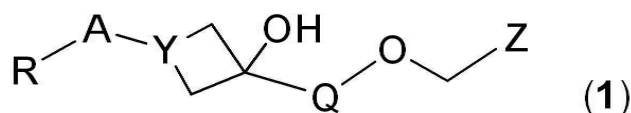
[0005] 호르몬의 부재에서, LBD는 자체의 HRE로 DBD의 상호작용을 방해하는 것으로 보인다. 호르몬 결합은 NR의 구조적 변화를 초래함으로써 상기 방해해 개방시킨다(A. M. Brzozowski et al., Nature 1997, 389, 753). LBD 없는 NR은 구성적으로 낮은 수준의 전사를 활성화한다.

- [0006] 보조활성인자(coactivator) 또는 전사 활성인자는 기초 전사 조직이며 또한 표적세포의 염색질 구조에 영향을 주는 특정 전사인자(transcription factors) 사이에 가교를 하는 것으로 제시된다. SRC-1, ACTR 및 Grip1과 같은 몇 가지 단백질은 리간드 강화 방식으로 NR과 상호작용한다(D. M. Heery et al., Nature 1997, 387, 733; T. Heinzel et al., Nature 1997, 387, 43; K. W. Nettles and G. L. Greene, Annu. Rev. Physiol. 2005, 67, 309).
- [0007] 스테로이드 호르몬과 같은 핵 수용체 조절인자(modulator)는 세포내 수용체에 결합하고 핵 수용체-리간드 복합체를 형성하여 특정 세포의 성장과 기능에 영향을 준다. 핵 수용체-호르몬 복합체는 특정 유전자의 제어 부위의 HRE와 상호작용하고 특정 유전자 발현을 변경시킨다(A. Aranda and A. Pascual, Physiol. Rev. 2001, 81, 1269).
- [0008] 파르네소이드 엑스 수용체 알파(Farnesoid X Receptor alpha) (인간 수용체를 언급할 때 이하, 종종 NR1H4이라 언급함)는 이질이합체(heterodimeric) 방식으로 레티노이드 X 수용체와 표적 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 유전자를 활성화시키는 원형 제2형 핵 수용체(prototypical type 2 nuclear receptor)이다(B. M. Forman et al., Cell 1995, 81, 687). 연관된 NR1H4의 생리학적인 리간드는 담즙산이다(D. J. Parks et al., Science 1999, 284, 1365; M. Makishima et al., Science 1999, 284, 1362). 가장 유력한 하나는 담즙산 항상성에 참여하는 몇 개의 유전자 발현을 조절하는 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid(CDCA))이다. 파네솔(farnesol) 및 유도체, 모두를 일컫는 파르네소이드는 원래 고농도에서 래트 상동유전자(orthologue)를 활성화할 수 있으나 인간 또는 마우스 수용체를 활성화하지 않는 것으로 설명되었다. FXR은 식도, 위, 십이지장, 소장, 결장, 난소, 부신 및 신장을 포함하는 전체 위장관에 걸쳐서 간에서 발현된다. 세포 내 유전자 발현의 제어를 넘어, FXR은 사이토카인 섬유모세포 성장 인자 15(설치류) 또는 19(원숭이, 인간)의 발현 상승을 조절하여 주변분비 및 내분비 신호에 또한 관여하는 것으로 보인다(J. A. Holt et al., 유전자 Dev. 2003, 17, 1581; T. Inagaki et al., Cell Metab. 2005, 2, 217).
- [0009] FXR 조절인자로서 행동하는 소분자 화합물을 하기의 발행물에 개시하였다. WO 제2000/037077호, WO 제2003/015771호, WO 제2004/048349호, WO 제2007/076260호, WO 제2007/092751호, WO 제2007/140174호, WO 제2007/140183호, WO 제2008/051942호, WO 제2008/157270호, WO 제2009/005998호, WO 제2009/012125호, WO 제2008/025539호 및 WO 제2008/025540호. 추가적으로 소분자 FXR 조절인자가 최근에 재검토되었다(M. L. Crawley, Expert Opin Ther. Pat. 2010, 20,1047; D. Merk et al., Future Med. Chem. 2012, 4, 1015).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 하기 화학식 (1)의 화합물, 이의 거울상체, 부분입체이성질체, 호변이성질체, 용매화합물, 전구약물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는데 있다.



- [0011]
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 의약으로서 사용되는 화합물을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료용 화합물을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 화합물의 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

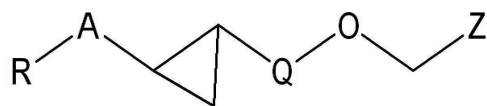
- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 화학식 (1)의 화합물, 이의 거울상체, 부분입체이성질체, 호변이성질체, 용매화합물, 전구약물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 의약으로서 사용되는 화합물을 제공한다.
- [0017] 나아가, 본 발명은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료용 화합물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 화합물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

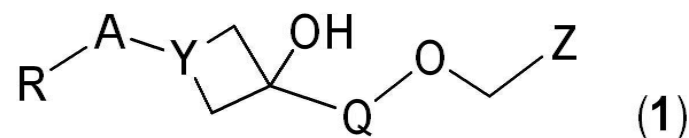
- [0019] 본 발명에 따른 화합물은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약으로서 사용될 수 있고 높은 경구 생체이용률의 결과를 보임으로써 종래의 의약보다 더 나은 적합성의 효과를 나타냈다.
- [0020]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] WO 제2011/020615호에서 본 발명자는 하기의 일반적 화학식의 카이랄 사이클로프로필리텐 화합물을 개시하였다.



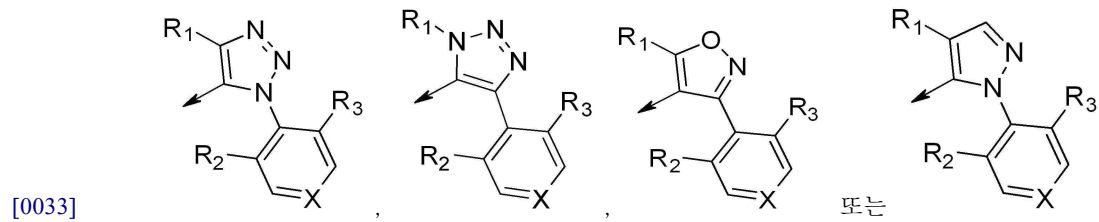
- [0022]
- [0023] 여기서 변수는 본 응용에서와 같이 유사하게 정의된다.
- [0024] 본 발명의 근본적인 문제는 특히 WO 제2011/020615호에 청구된 화합물에 비하여 일반적으로 향상된 물리화학적 성질 및 감소된 소수성, 향상된 용해도 및 더 나은 막 투과성을 갖는 FXR-효능제를 생산하는 것이다.
- [0025] 상기 문제는 하기 화학식(1)에 따른 화합물, 이의 거울상체, 부분입체이성질체, 호변이성질체, 용매화합물, 전구약물 또는 약학적으로 허용가능한 염에 의해 해결되었다.



- [0026]
- [0027] 여기서,
- [0028] R 은 COOR₆, CONR₇R₈, 테트라졸릴, SO₂NR₇R₈, C₁₋₆알킬, SO₂-C₁₋₆알킬 및 H로 구성되는 군으로부터 선택되고, R₆는 독립적으로 H 또는 C₁₋₆알킬로 구성되는 군으로부터 선택되고, R₇ 및 R₈은 서로 독립적으로 H, C₁₋₆알킬, 할로-C₁₋₆알킬, C₁₋₆알킬렌-R₉, SO₂-C₁₋₆알킬로 구성되는 군으로부터 선택되며, 여기서 R₉은 COOH, OH 및 SO₃H로 구성되는 군으로부터 선택되고;
- [0029] A는 페닐, 피리딜, 피리미딜, 피라졸릴, 인돌릴, 티에닐, 벤조티에닐, 인다졸릴, 벤즈이족사졸릴, 벤조퓨라닐, 벤조트리아졸릴, 퓨라닐, 벤조티아졸릴, 티아졸릴, 옥사디아졸릴로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 이들 각각은 선택적으로 OH, O-C₁₋₆알킬, O-할로-C₁₋₆알킬, C₁₋₆알킬, 할로-C₁₋₆알킬, C₃₋₆사이클로알킬 및 할로겐으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되는 1 또는 2 개의 치환기로 치환되고;
- [0030] Q는 페닐, 피리딜, 티아졸릴, 티오펜릴, 피리미딜로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 이들 각각은 선택적으로 C₁₋₆알킬, 할로-C₁₋₆알킬, 할로겐 및 CF₃로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 1 또는 2 개의 치환기로 치환되고;

[0031] Y는 N 또는 CH로부터 선택되고;

[0032] Z는



[0034] 로부터 선택되고;

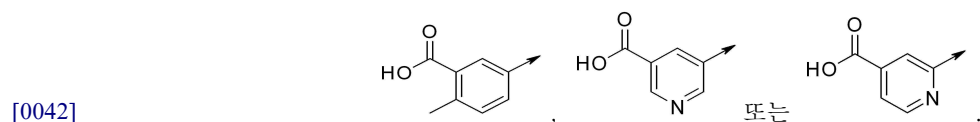
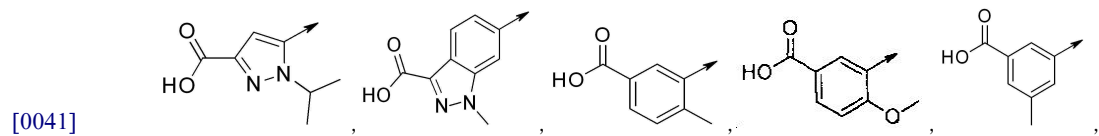
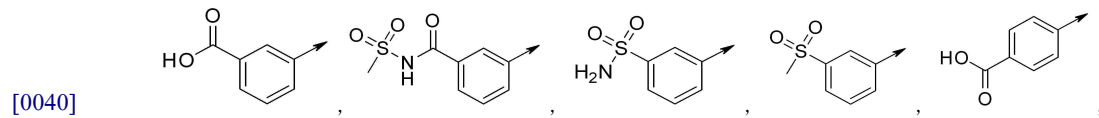
[0035] 여기서

[0036] X= CH, N, NO;

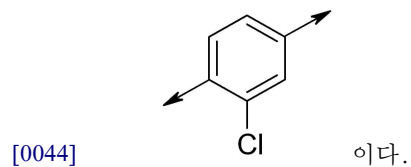
[0037] R₁은 수소, C₁₋₃알킬, C₃₋₆사이클로알킬, C₄₋₅알킬사이클로알킬로 구성되는 군으로부터 선택되고, 여기서 C₁₋₃알킬은 할로젠, 하이드록시 또는 C₁₋₆알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3 개의 치환기로 선택적으로 치환되고;

[0038] R₂ 및 R₃는 수소, C₁₋₃알킬, C₁₋₃할로알킬, C₁₋₃알콕시, C₁₋₃할로알콕시 및 할로젠으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된다.

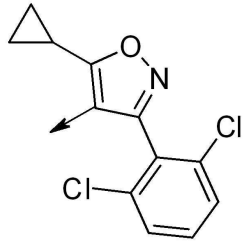
[0039] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 화학식(1)에 따른 화합물에서 R-A는 하기로부터 선택된다.



[0043] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 화학식(1)에 따른 화합물에서 Q는

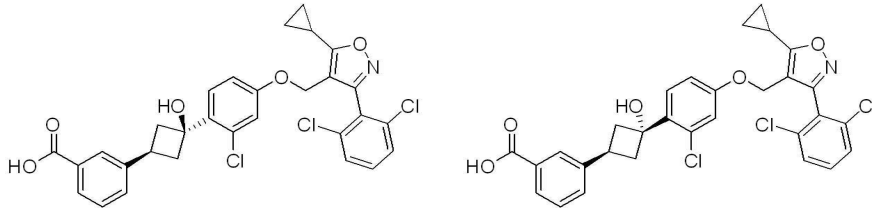


[0045] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 화학식(1)에 따른 화합물에서 Z는

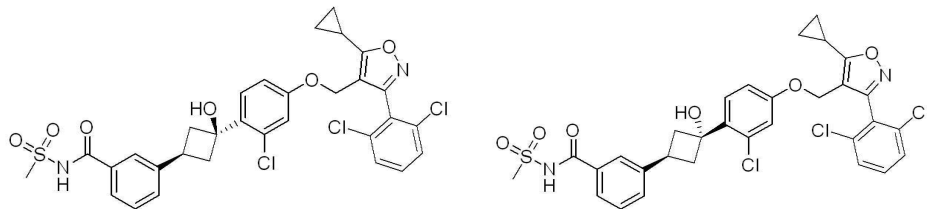


[0046] 이다.

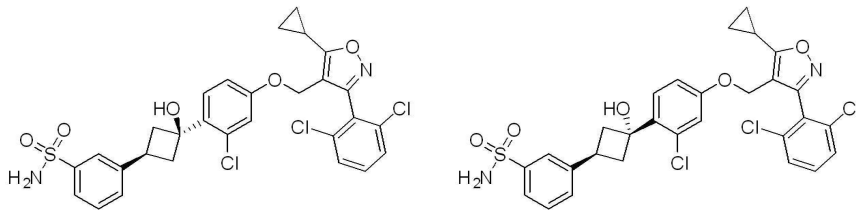
[0047] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 화학식(1)에 따른 화합물은



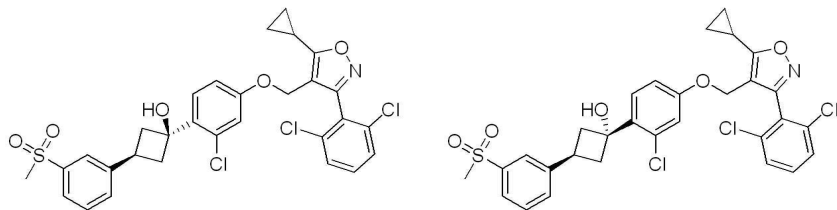
[0048] ,



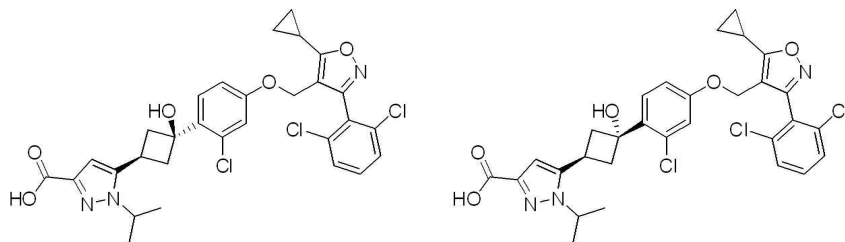
[0049] ,



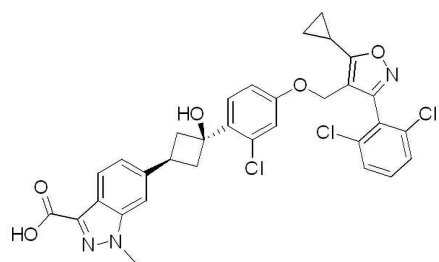
[0050] ,



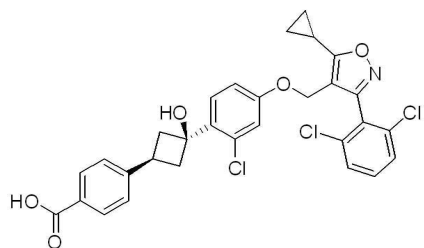
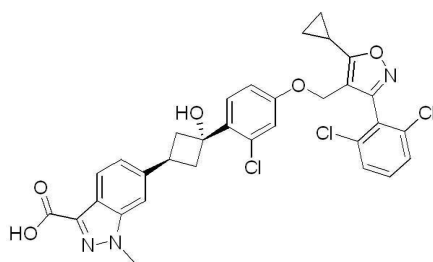
[0051] ,



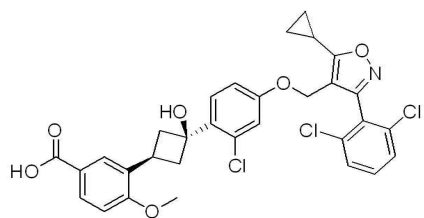
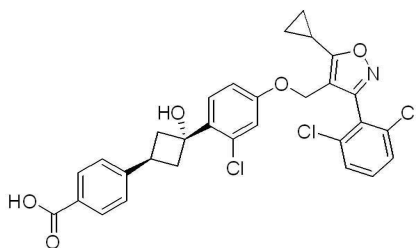
[0052] ,



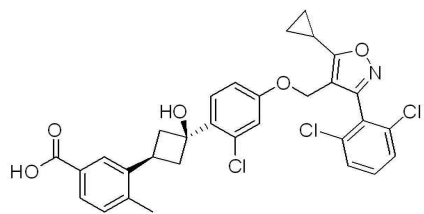
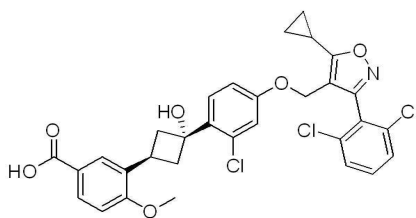
[0053]



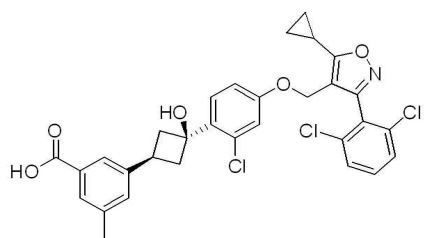
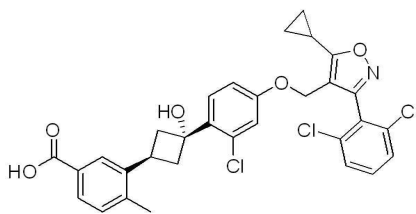
[0054]



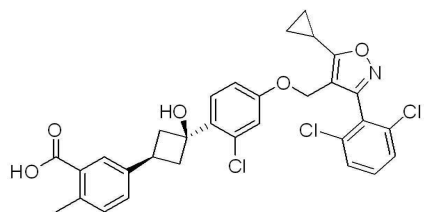
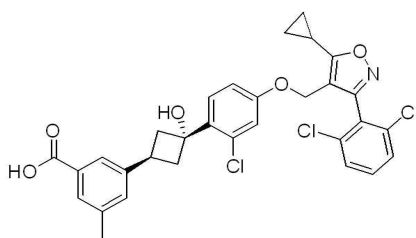
[0055]



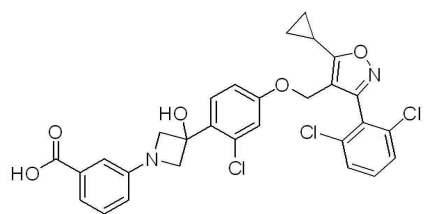
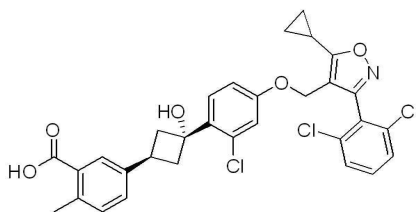
[0056]



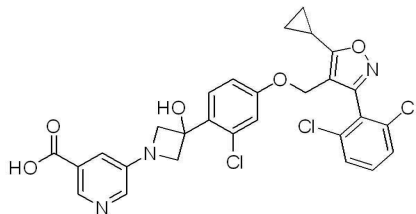
[0057]

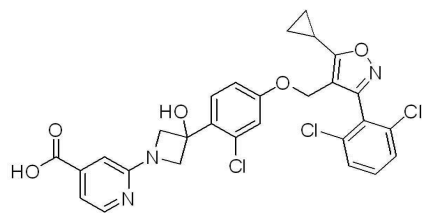


[0058]



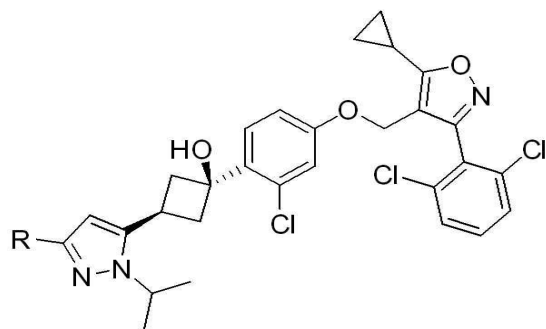
[0059]





또는 로부터 선택된다.

상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 화학식(1)에 따른 화합물은



여기서 R은 CO_2H , CONHSO_2Me 및 테트라졸릴로 구성되는 군으로부터 선택된다.

다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 의약으로서 사용을 위한 화학식(1)에 따른 화합물에 관한 것이다.

다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 화학식(1)에 따른 화합물에 관한 것이다.

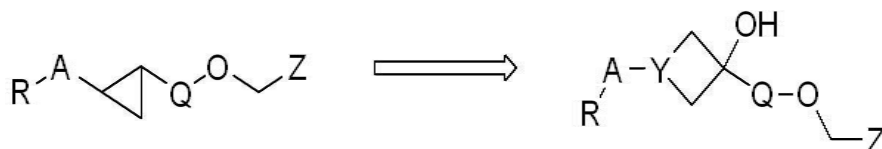
다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 FXR에 의해 매개되는 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 화학식(1)에 따른 화합물에 관한 것이다.

상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 상기 질환은 만성 간내 담즙정체 상태 또는 일부 형태의 간의 담즙정체 상태; 간섬유화; 간의 폐쇄 또는 만성 염증성 장애; 간경화증(liver cirrhosis); 간지방증(liver steatosis) 및 관련 증후군, 알코올로 유도된 경화증 또는 바이러스 매개 형태의 간염과 관련 있는 담즙정체(cholestatic) 또는 섬유화 증상(fibrotic effects); 간부전 또는 주요 간 절제후 간허혈(liver ischemia); 지방간염과 관련된 화학요법(chemotherapy associated steatohepatitis(CASH)); 급성 간부전(acute liver failure); 및/또는 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Diseases)으로부터 선택된다.

상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 상기 질환은 지질 및 지단백질 장애; 제 II형 당뇨병과 당뇨병콩팥병증(diabetic nephropathy), 당뇨병신경병증(diabetic neuropathy), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy) 및 장기적 당뇨병으로 인하여 임상적으로 나타난 다른 관찰된 작용을 포함하는 제I형 및 제II형 당뇨병 임상합병증; 강화된 지질과 특히 트리글리세리드 축적 및 전섬유화성 경로의 연속적 활성화로 인해 기관의 만성 지방 및 섬유화성 퇴화로 유발되는 상태 및 질환, 예를 들면 비알코올 지방간 질환(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease(NAFLD)), 또는 비알코올 간지방(Non-Alcoholic Steatohepatitis(NASH)); 비만 또는 대사증후군(이상지질혈증, 당뇨병 또는 비정상적 고체질량지수의 혼합된 상태); 및/또는 급성 심근경색증(cute myocardial infarction), 급성 뇌졸중(acute stroke) 또는 만성 폐쇄 죽상동맥경화증 말단에 발생하는 혈전증으로부터 선택된다.

[0069] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 다른 실시형태에 있어서, 상기 질환은 비악성 과증식성 장애 및 악성 과증식성 장애, 특히 간세포암종, 결장 샘종(colon adenoma) 및 폴립증(polyposis), 결장 샘암종(colon adenocarcinoma), 유방암, 췌장 샘암종(pancreas adenocarcinoma), 바레트식도(Barrett's esophagus) 또는 위 장관 및 간의 종양 질환의 다른 형태로부터 선택된다.

[0070] 향상된 물리화학적 성질은 전자의 1,2-사이클로프로필리덴 고리(1,2-cyclopropylidene ring)를 대체하는 1,3-사이클로부틸리덴(1,3-cyclobutylidene) 또는 1,3-아제티딘리덴(1,3-azetidinylidene)에 극성 하이드록실기의 도입에 의해 얻어진다.



[0071]

[0072] 놀랍게도, 생성된 화합물은 FXR 수용체에 자체의 활성을 유지하지만 더 높은 용해도 및/또는 막 투과성과 같은 향상된 물리화학적 성질을 나타냈다.

[0073] 본 발명의 화합물은 청구항 제1항의 화학식(1)에 따른 공통의 화학적 구조를 공유한다.

[0074] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 화학식(1)에 따른 화합물의 거울상체, 부분입체이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

[0075] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식(1)에서 R은 COOR₆, CONR₇R₈, SO₂NR₇R₈ 및 SO₂-C₁₋₆알킬로 구성되는 군으로부터 서로 독립적으로 선택된다.

[0076] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식(1)에서 R₆은 H이다.

[0077] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식(1)에서 R₇ 및 R₈은 H 및 SO₂-C₁₋₆알킬로 구성되는 군으로부터 선택되는 서로로부터 독립적이다.

[0078] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식(1)에서 R₇은 H이다.

[0079] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식(1)에서 R₈은 SO₂-C₁₋₆알킬이다.

[0080] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, A는 페닐, 피리딜, 피리미딜, 피라졸릴, 인다졸릴 및 옥사디아졸릴로 구성되는 군으로부터 선택된다.

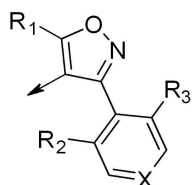
[0081] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, A는 C₁₋₆알킬, 더 바람직하게는 C₁₋₃알

킬로부터 독립적으로 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 치환된다. 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, A는 대체되지 않는다.

[0082] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, Q는 페닐이다.

[0083] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, Q는 할로젠, 더 바람직하게는 할로젠 으로부터 선택되는 하나의 기, 특히 Cl로부터 독립적으로 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 치환된다.

[0084] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, Z는



[0085] 이다.

[0086] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, X=CH이다.

[0087] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, R₁은 C₃₋₆사이클로알킬, 특히 사이클로 프로필이다.

[0088] 상기 또는 하기의 어느 실시형태와 조합하는 바람직한 실시형태에 있어서, R₂ 및 R₃는 할로젠, 특히 Cl로부터 독립적으로 선택된다.

[0089] 본 발명의 화합물은 전구약물 화합물의 형태일 수 있다. “전구약물 화합물”은 효소, 위산 또는 생체내의 생 리학적 상태와 반응, 예를 들면, 각각 효소로 진행되는 산화, 환원, 가수분해 등에 의하여 본 발명에 따른 화합 물로 전환되는 유도체를 의미한다. 전구약물의 예로는 본 발명의 화합물의 아미노기가 아실화, 알킬화 또는 인 산화하여 예를 들면, 에이코사노일아미노(eicosanoylamino), 알라닐아미노(alanylamino), 피발로일옥시메틸아미 노(pivaloyloxymethylamino)를 형성하거나 또는 여기서 하이드록실기는 아실화, 알킬화, 인산화 또는 보레이트 (borate)로 전환되어 예를 들면, 아세틸옥시(acetyloxy), 팔미토일옥시(palmitoyloxy), 피발로일옥시 (pivaloyloxy), 석시닐옥시(succinyloxy), 푸마릴옥시(fumarylloxy), 알라닐옥시(alanyloxy)로 되거나 또는 여 기서 카르복실기는 에스테르화 또는 아마이드화되는 화합물이다. 상기 화합물은 잘 공지된 방법에 따라 본 발명 의 화합물로부터 생성될 수 있다. 전구약물의 다른 예는 여기서, 본 발명의 화합물의 카르복실레이트 (carboxylate)가, 예를 들어, 알킬-, 아릴 -, 콜린-(choline-), 아미노, 아크릴옥시메틸에스테르 (acyloxymethylester), 리놀레노일에스테르(linolenoylester)로 전환된다.

[0090] 본 발명의 화합물의 대사물은 또한 본 발명의 범위 내에 있다.

[0091] 케토-에놀 상호변이성(keto-enol tautomerism)과 같은 본 발명의 화합물 또는 이의 전구약물의 상호변이성이 발 생하는 경우, 케토 및 에놀 형태와 같은 각각의 형태는 임의 비율의 혼합물뿐만 아니라 각각 본 발명의 범위 내 에 있다. 거울상체, 시스/트랜스 이성질체, 이형태체(conformer)과 같은 입체이성질체에도 동등하게 적용된다.

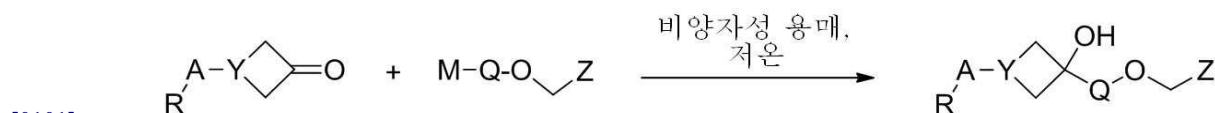
- [0092] 원하는 경우, 이성질체는 기술면에서 공지의 방법 예를 들면, 액체 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 거울상체에도 예를 들면, 카이랄 고정상(chiral stationary phases)을 사용하여 동등하게 적용된다. 추가적으로, 거울상체를 부분입체이성질체로 전환시킴으로써 즉, 거울상체적으로 순수한 보조 화합물과 커플링하여 생성된 부분입체이성질체를 연속적으로 분리하고 보조 잔류를 절단하여 분리할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 화합물의 어느 거울상체는 광학적으로 순수한 출발물질을 사용하여 입체선택적 합성으로 얻을 수 있다. 라세믹 혼합물로부터 순수한 거울상체를 얻는 또 다른 방법은 카이랄 상대이온(counterions)으로 광학선택적 결정화(enantioselective crystallization)를 얻을 수 있다.
- [0093] 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매일 수 있다. 용어 “약학적으로 허용가능한 염”은 무기 염기 또는 산 및 유기 염기 또는 산을 포함하는 약학적으로 허용가능한 비독성 염기 또는 산으로부터 제조되는 염을 의미한다. 본 발명의 화합물이 하나 또는 그 이상의 산 또는 염기를 포함하는 경우에 있어서, 본 발명은 이에 해당하는 약학적으로 또는 독물학적으로 허용가능한 염, 특히 이의 약학적으로 이용가능한 염을 포함한다. 따라서, 산성기를 포함하는 본 발명의 화합물은 상기 군에 존재할 수 있고 본 발명에 따라, 예를 들면, 알칼리 금속염, 알칼리성 토금속염 또는 암모늄염으로서 사용될 수 있다. 상기 염의 더 상세한 예로는 소듐염, 포타슘염, 칼슘염, 마그네슘염, 또는 에틸아민, 에탄올아민, 트리에탄올아민 또는 아미노산과 같은 암모니아 또는 유기 아민을 갖는 염을 포함한다. 양성자화될 수 있는 하나 또는 그 이상의 염기를 포함하는 본 발명의 화합물은 추가적으로 무기산 또는 유기산을 갖는 염의 형태로 본 발명에서 존재 및 사용될 수 있다. 적합한 산의 예로는 염화수소, 브롬화수소, 인산, 황산, 질산, 메탄설폰산(methanesulfonic acid), p-톨루엔설폰산(p-toluenesulfonic acid), 나프탈렌디설폰산(naphthalenedisulfonic acids), 옥살산(oxalic acid), 아세트산, 타르타르산, 락트산, 살리실산(salicylic acid), 벤조산(benzoic acid), 포름산(formic acid), 프로피온산(propionic acid), 피발산(pivalic acid), 디에틸아세트산(diethyl acetic acid), 말론산(malonic acid), 숙신산(succinic acid), 피멜산(pimelic acid), 푸마르산(fumaric acid), 말레산(maleic acid), 말산(malic acid), 설파민산(sulfaminic acid), 페닐프로피온산(phenylpropionic acid), 글루콘산(gluconic acid), 아스코르빈산(ascorbic acid), 이소니코틴산(isonicotinic acid), 시트르산(citric acid), 아디프산(adipic acid) 및 당염자에게 공지된 다른 산을 포함한다. 동시에 본 발명의 화합물이 분자에서 산 또는 염기를 포함하는 경우에, 본 발명은 또한 상기에서 언급된 염의 형태뿐만 아니라, 내염(inner salts) 또는 베타인(betaines)(양성이온(zwitterions))을 포함한다. 각각의 염은 당업자에게 공지된 통상적인 방법, 예를 들면, 유기산 또는 무기산, 또는 용매나 분산제에 있는 염기와 함께 상기의 염을 접촉시키거나 또는 다른 염으로 음이온 교환 또는 양이온 교환에 의한 방법으로 얻을 수 있다. 또한 본 발명은 낮은 생리학적 호환성 때문에 약학적으로 사용하기에는 적합하지 않지만 화학적 반응 또는 약학적으로 허용가능한 염의 제조를 위한 중간체로서 사용될 수 있는 본 발명의 화합물의 모든 염을 포함한다.
- [0094] 또한, 본 발명의 화합물은 용매화합물로서 물을 포함하는 용매화합물의 형태로 존재하거나 또는 알코올, 특히 에탄올과 같은 약학적으로 허용가능한 용매화합물의 형태로 존재할 수 있다.
- [0095] 나아가, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 유효성분으로서 본 발명의 적어도 하나의 화합물, 또는 이의 전구약물 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0096] “약학적 조성물”은 하나 또는 그 이상의 유효성분, 및 임의의 두 개 이상의 성분의 조합, 복합화 또는 응집으로부터, 또는 하나 이상의 성분의 해리로부터, 또는 하나 이상의 성분의 반응 또는 상호작용의 다른 형태로부터, 직접 또는 간접으로 얻어지는 어느 생성물뿐만 아니라 담체를 구성하는 하나 또는 그 이상의 불활성 성분을 의미한다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 적어도 하나의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 혼합하여 만들어지는 임의의 조성물을 포함한다.
- [0097] 본 발명의 약학적 조성물은 전구약물 화합물 또는 다른 핵 수용체 조절인자와 같은 유효성분으로서 하나 또는

그 이상의 다른 화합물을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0098] 비록 임의로 주어진 경우에서 가장 적합한 경로는 처리되는 상태의 성질 및 엄격성과 유효성분의 성질에 의존되지만, 상기 조성물은 경구, 직장, 국소, 비경구(피하조직, 근육내 및 정맥내 포함), 안구(눈), 폐(비강 또는 구강 흡입) 또는 비강 투여에 적합하다. 상기는 편리하게 단위 투여 형태로 나타낼 수 있고, 약학 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

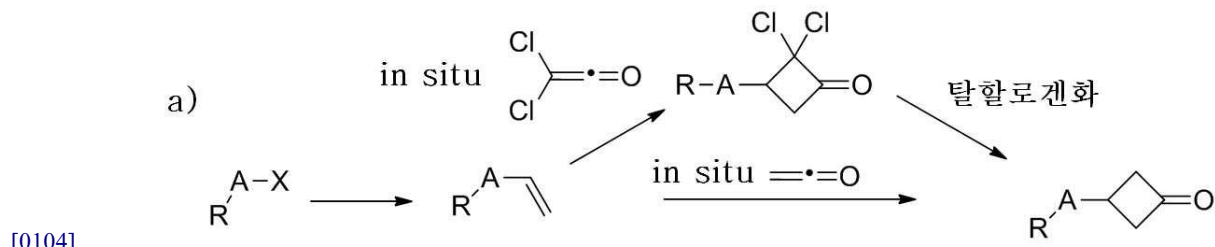
[0099] 본 발명의 화합물은 반응식 I 내지 III에 설명된 방법의 조합에 의해서 제조될 수 있다. 반응식 Ia에서 표현된 바와 같이, 3-위치의 치환기 A로 치환된 4각형 사이클릭케톤은 비양자성 용매 및 바람직하게는 저온에서 금속화된 방향족 또는 헤테로방향족 고리 M-Q-O-CH₂Z(M=metal, 예: Li)와 반응하여 하이드록실로 치환된 4각형 고리를 갖는 치환기 A 및 Q를 만들 수 있다. Y가 CH인 경우에 두 개의 이성질체가 형성될 수 있다(A 및 Q는 서로에 대하여 고리횡단(transannular) 시스 또는 트랜스). 최적화된 조건하에서 두 개의 이성질체 중 주요 하나가 얻어질 수 있다. 두 이성질체는 실리카겔 크로마토그래피 또는 프랩(prepare) RP-HPLC과 같은 기술에서 공지된 적절한 방법에 의해 분리될 수 있다.

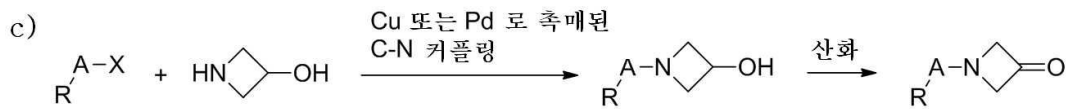
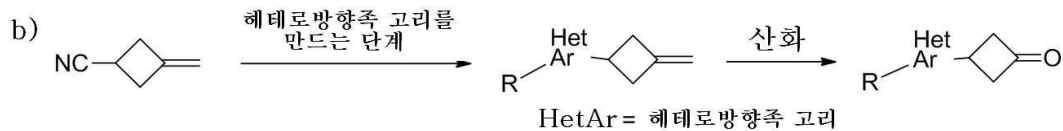
[0100] 반응식 I



[0102] 반응식 II에서 방법은 본 발명의 화합물의 합성에 필요한 4각형 사이클릭 케톤을 제조하기 위해 사용되는 것으로 요약된다. 선택 (a)에서 예를 들면, 출발물질 R-A-X(X=할로젠)을 함유하는 해당 할로겐의 비닐화에 의해 제조되는 비닐기를 갖는 중간체는 인시투(in situ) 형태의 α, α -디클로로케텐(α, α -dichloro ketene)과 반응하여 2,2-디클로로사이클로부타논(2,2-dichlorocyclobutanone)을 형성할 수 있다. 예를 들면, 역류하의 아세트산에서 아연으로 탈할로젠화 후, 원하는 3-치환된 사이클로부타논을 얻을 수 있다. 대안적으로, 비닐-중간체는 인시투 생성된 치환되지 않은 케텐과 반응하여 1단계에서 원하는 사이클로부타논 중간체를 만들 수 있다. 선택 (b)에서 3-메틸렌사이클로부탄카보니트릴(3-methylenecyclobutanecarbonitrile)을 출발물질로서 사용하였다. 치환된 헤테로사이클은 당업자에게 공지된 방법에 의해 여러 단계의 시아노기로부터 만들어질 수 있다. 원하는 사이클로부타논은 당업자에게 알려진 조건과 시약, 예를 들면, 산화제로서 OsO₄, 오존 또는 RhCl₃/NaIO₄를 사용하여 엑소사이클릭 이중결합(exocyclic double bond)의 산화절단에 의해 얻을 수 있다. 선택 (c)는 치환된 아제티딘논(azetidinones)을 제조하기 위해 사용된 방법을 나타낸다. 3-하이드록시-아제티딘과 할로-방향족 또는 할로-헤테로방향족 고리 사이의 Cu- 또는 Pd-촉매된 C-N 교차결합(cross coupling)은 산화에 의해 원하는 아제티딘논으로 변형될 수 있는 해당 N-치환된 3-하이드록시-아제티딘을 만든다.

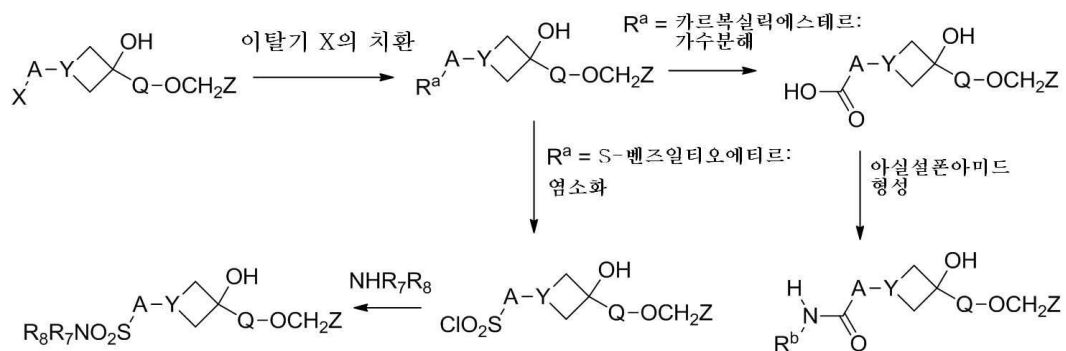
[0103] 반응식 II





반응식 III은 4각형 하이드록시를 갖는 고리의 형성 후에 A기에서 치환기의 변형을 수행하는 일부 가능성을 설명한다. 예를 들면, 이탈기 X(예: 브로마이드)는 전이금속으로 촉매되는 교차결합 반응에 의해 시아노기, 카르복실릭 에스테르, 메틸설포닐 또는 티오에테르에 의해 치환될 수 있다. 얻어진 유도체는 추가적으로 당업자에게 알려진 방법에 의해 다른 유도체로 변형될 수 있다. 예를 들면, 시아노 및 에스테르기를 염기조건하에서 가수분해시켜 아실-설포나미드로 변형될 수 있는 카르복실산을 만들 수 있다. 벤질티오에테르를 클로로화하여 암모니아와 반응하여 해당 설포나미드로 되는 클로로설포닐 중간체를 만들 수 있다.

반응식 III



결과로서, 본 발명은 FXR에 결합하고 FXR의 효능제 또는 조절인자로서 행동하는 일반화학식(1)에 따른 화합물에 관한 것이다.

또한 본 발명은 상기 화합물에 의한 상기 핵 수용체의 결합을 통하여 질환 및/또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 상기 화합물의 용도에 관한 것이다. 나아가 본 발명은 상기 화합물에 의한 상기 핵 수용체의 결합을 통하여 질환 및/또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 상기 화합물의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 만성 간내 담즙정체 상태 또는 일부 형태의 간외 담즙정체 상태, 간섬유화, 급성 간내 담즙정체 상태, 부적절한 담즙 조성에서 발생하는 간의 폐쇄 또는 만성 염증성 장애, 식이성 지방 및 지용성 식이 비타민의 감소 섭취를 갖는 위장관 상태, 염증성 장질환, 지질 및 지단백질 장애, 제II형 당뇨병과 제I형 및 제II형 당뇨병 임상합병증, 강화된 지질과 특히 트리글리세리드 축적 및 전섬유화성 경로의 연속적 활성화로 인해 기관의 만성 지방 및 섬유화성 퇴화로 유발되는 상태 및 질환, 비만 또는 대사증후군(이상지질혈증, 당뇨병 또는 비정상적 고체지방지수의 혼합된 상태), 급성 심근경색증, 급성 뇌졸중, 만성 폐쇄 죽상동맥경화증 말단에 발생하는 혈전증, 세포내 박테리아 또는 기생 원생동물에 의한 지속적 감염, 비악성 과증식성 장애, 악성 과증식성 장애, 결장 샘암종 및 특히 간세포 암종, 간지방증 및 관련 증후군, 만성 간 질환 또는 간 절제 후 간부전 또는 간 기능부전, B형 간염 감염, C형 간염 감염 및/또는 알코올로 유도된 경화증 또는 바이러스 매개 형태의 간염과 관련 있는 담즙정체 또는 섬유화 증상의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 화학식(1)에 따른 화합물의 용도에 관한 것이다.

- [0112] 본 명세서에서 언급된 의약은 본 발명에 따른 화합물과 약학적으로 허용가능한 담체의 조합을 포함하여 종래의 방법에 의해서 제조될 수 있다.
- [0113] FXR은 핵 담즙산 감지기로서 제시되었다. 결과로서, FXR은 간의 담즙산의 합성 생산과 장내에서 이의 재생(담즙산 결합 단백질을 조절함으로써) 모두를 조절한다. 그러나 담즙산의 생리학적 측면을 넘어서, FXR은 콜레스테롤 담석(cholesterol gallstones), 제II형 당뇨병, 이상지질혈증(dyslipidemias) 또는 비만과 같은 대사장애, 염증성 장질환 또는 담즙정체 형태의 만성 간내 질환과 같은 만성염증 질환 및 많은 다른 질환만큼 다양한 질환 치료와 병의 원인에 관련되는 많은 다양한 생리학적 과정을 조절하는데 관련되어 있는 것처럼 보인다(T. Claudel et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 2020; Y. D. Wang et al., *Cell Res.* 2008, 18, 1087).
- [0114] FXR은 간 및 위장관에서 반응 유전자의 복잡한 형태를 조절한다. 유전자 생성물은 다양한 생리학적 과정에 영향을 미친다. FXR의 기능 분석 과정에서, 분석된 첫 번째 조절 네트워크는 담즙산 합성의 조절이었다. LXRs은 조절 핵 수용체인 LXR-1의 유도를 경유하여 콜레스테롤을 담즙산으로 전환하는 핵심 효소인 Cyp7A1을 유도하는 반면에, FXR은 LXR-1에 대해 우성적으로 억제하는 또 하나의 핵 수용체인 SHP를 부호화하는 mRNA의 상향조절을 경유하여 Cyp7A1의 유도를 억제한다. FXR은 상기 경로의 최종 생성물인 콜산(cholic acid) 또는 CDCA와 같은 주요 담즙산에 결합하기 때문에, 유전자 발현 수준에서 피드백 억제(feedback inhibition)의 하나의 예로써 간주될 수 있다(B. Goodwin et al., *Mol. Cell* 2000, 6, 517; T. T. Lu et al., *Mol. Cell* 2000, 6, 507). SHP를 경유한 담즙산의 억제와 병행하여, FXR은 독성 담즙산을 간세포 사이토솔(cytosol)로부터 배출하여 담즙을 기원으로 하는 소담관 분지형성인 소관염(canaliculi)으로 가도록 담당하는 소위 ABC(ATP-결합 카세트) 전달체 주변을 유도한다. FXR의 간 보호기능은 간에서 몇 개의 ABC-전달체의 저발현 또는 과발현을 나타내는 FXR 유전자 결핍 마우스의 분석으로 처음으로 명백해졌다(C. J. Sinal et al., *Cell* 2000, 102, 731). 추가적인 상세한 분석은 지질 단백질로부터 인지질로 지질 운반을 매개하는 핵심 효소인 PLTP(N. L. Urizar et al., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 39313) 뿐만 아니라 주요 담즙염 배출 펌프인 BSEP 또는 ABCB11(M. Ananthanarayanan et al., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28857; J. R. Plass et al., *Hepatology* 2002, 35, 589)와 인지질을 위한 두 개의 핵심 세관(canalicular) 세포막 운반체인 MRP-2(ABCC4)(H. R. Kast et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 2908) 및 MDR-3(ABCB4)(L. Huang et al., *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 51085)가 FXR에 의한 리간드-직접 전사 활성을 위한 직접 표적이라는 것을 발견했다(M. Miyata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 312, 759; G. Rizzo et al., *Curr. Drug targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005, 5, 289에 요약됨).
- [0115] FXR이 담즙산의 합성, 수출 및 재순환을 위한 주요 대사물 감지기 및 조절기를 하는 것으로 보인다는 사실이 더욱 친수성 조성으로 담즙의 흐름과 담즙산 조성의 변화를 유도하는 FXR 리간드의 용도를 제시한다. 도구 화합물로서 첫 번째 합성 FXR 리간드인 GW4064(P. R. Maloney et al., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 2971; T. M. Willson et al., *Med. Res. Rev.* 2001, 21, 513)와 반합성 인공 담즙산 리간드인 6-알파-에틸-CDCA의 발달로 인하여, 강력한 효능제에 의한 FXR의 초차극의 영향을 분석할 수 있었다. 두 개의 리간드 모두는 담관이 결합된(ligated) 동물에서 담즙 흐름을 유도함을 나타냈다. 나아가, 담즙분비촉진 증상(choleretic effects) 이외에 간보호 증상도 보였다(R. Pellicciari et al., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3569; Y. Liu et al., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1678). 또한, 간보호 증상은 매트릭스-메탈로프로테이나제(Matrix-Metalloproteinases)의 조직 억제제인 TIMP-1 및 2의 억제, 즉, 간성상세포(hepatic stellate cells)의 콜라겐-침착물 분해 매트릭스-메탈로프로테이나제 2의 유도와 FXR 효능제에 의해 모두 전염유성 요인인 알파-콜라겐 mRNA 및 전환성장인자 베타(transforming growth factor beta(TGF-beta)) mRNA의 연속적 감소로부터 초래되는 항염증 증상으로 좁혀졌다(S. Fiorucci et al., *Gastroenterology* 2004, 127, 1497; S. Fiorucci et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 314, 584). 나아가, 항담즙정체 활성(anti-cholestatic activity)은 에스트로젠-유도된 담즙정체의 동물 모델뿐만 아니라 담관이 결합된 동물에서도 나타났다(S. Fiorucci et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 313, 604).

- [0116] 유전자 연구는 담즙정체의 유전 형태(프로그레스브 페밀리어 간내 담즙정체(Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis)=PFIC, 제I-IV형)에서 FIC1 유전자 돌연변이의 결과(PFIC 제I형, 또한 바일러질환(Byler's Disease)이라 불림)로서 FXR 자체의 핵으로의 이동이 감소되거나(F. Chen et al., Gastroenterology 2004, 126, 756; L. Alvarez et al., Hum. Mol. Genet. 2004, 13, 2451) 또는 MDR-3 인지질 배출펌프(export pump)를 부호화하는 FXR 표적 유전자의 정도가 감소됨(PFIC 제III형에서)을 보였다. 상기 모두와 함께 FXR과 결합하는 화합물은 원발성 담즙성 간경변(Primary Biliary Cirrhosis(PBS)) 또는 원발성 경화성 담관염(Primary Sclerosing Cholangitis(PSC))과 같은 만성 담즙정체 상태의 치료요법에 상당한 임상적 유용성을 입증할 많은 양의 증거가 있다(G. Rizzo et al., Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. 2005, 5, 289; G. Zollner et al., Mol. Pharm. 2006, 3, 231; S. Y. Cai et al., Expert Opin. Ther. Targets 2006, 10, 409에서 리뷰됨).
- [0117] FXR의 활성화가 담즙산 대사 및 배출에 갖는 큰 영향은 담즙정체 증후군에 관련이 있다는 것뿐만 아니라 담석 형성에 대한 치료에 대해 더 직접적이라는 것이다. 콜레스테롤 담석 형성은 간세포 밖으로 활발하게 펌핑되어 소관염의 내강으로 가는 콜레스테롤의 낮은 용해도 때문이다. 상기는 혼합된 미포(micelles)의 형성 및 따라서 담즙에서 자유 콜레스테롤의 확실한 용해도를 결정하는 세 가지 구성요소, 담즙산, 인지질 및 자유 콜레스테롤 함량의 상대적 비율이다. FXR은 담석 질환에 기여하는 하나의 요인으로서 양적 형질 유전좌(quantitative trait loci)로서 지도를 다형성한다(H. Wittenburg, Gastroenterology 2003, 125, 868). 합성 FXR 도구 화합물인 GW4064를 사용하여, FXR의 활성화가 콜레스테롤 포화지수(CSI)의 향상 및 직접적으로 담석에 잘 걸리는 마우스, C57L에서 담석 형성의 제거가 유도됨을 보인 반면, FXR 결핍 마우스에서 의약 치료는 담석 형성에 효과가 없음을 나타냈다(A. Moschetta et al., Nature Medicine 2004, 10, 1352).
- [0118] 상기 결과는 콜레스테롤 담석 형성을 방지하거나 또는 외과적 제거 또는 충격파 쇄석술 후에 담석의 재형성을 방지하기에 사용될 수 있는 소분자 효능제의 발달을 위한 좋은 표적으로서 FXR에게 자격이 있음을 나타낸다(S. A. Doggrell, Curr. Opin. Investig. Drugs 2006, 7, 344에서 논의됨).
- [0119] 따라서, 본 발명의 일 실시형태에서, 화학식 (1)에 따른 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 콜레스테롤 담석으로 알려진 담석증(cholelithiasis)과 같은 부적절한 담즙 조성물로부터 발생하는 폐쇄 또는 만성 염증성 장애의 예방 및/또는 치료에 사용된다.
- [0120] FXR이 간에서 소분자로 자극된 활성을 나타내는 항섬유성 증상뿐만 아니라 강력한 간 보호 및 담즙분비 촉진을 넘어, FXR은 종양 변형과 폴립의 발달 및 장내 샘암종으로의 전이로부터 장을 보호하는 역할을 하는 것으로 보인다(S. Modica et al., Cancer Res. 2008, 68, 9589 and R. R. Maran et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009, 328, 469). 장에서 유사한 상황과 같이, FXR의 부재는 간암의 가장 현저한 형태인 간세포 암종(HCC) 형성의 높은 증가로 연결된다(I. Kim et al., Carcinogenesis 2007, 28, 940 and F. Yang et al., Cancer Res. 2007, 67, 863). 기능적 FXR은 결장 샘암종과 간세포 암종의 형성을 방지하는 반면, FXR의 활성화는 간 절제술 후 간 재생을 유도한다(W. Huang et al., Science 2006, 312, 233).
- [0121] FXR의 활성화와 관련된 혼합된 간 보호, 항종양 및 간의 재생적 증상은 심각한 간 질환의 치료에서 FXR 효능제의 사용을 위해 치료상으로 잘 활용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 HCC, 주요 간 절제와 관련된 간 재생장의 자극 및 부작용의 개선, 간 이식이나 주요 간 수술 과정에서 병의 원인과 독립된 간경화증(liver cirrhosis) 및 간허혈과 같은 간 질환의 예방 및 치료에 사용되었다.
- [0122] 첫 번째 합성 FXR 효능제의 발견과 설치류에게 효능제를 투여한 이후로 FXR은 혈청 트리글리세라이드의 핵심 조절인자가 되었다(P. Maloney et al., J. Med. Chem. 2000, 43, 2971; T. Willson et al., Med. Res. Rev. 2001, 21, 513). 합성 효능제의 의해 FXR의 활성화는 주로 감소된 VLDL의 형태로, 혈청 트리글리세라이드의 상

당한 감소뿐만 아니라 감소된 총 혈청 콜레스테롤도 유도한다는 지난 6년 동안 축적된 증거가 게재되었다(H. R. Kast et al., Mol. Endocrinol. 2001, 15, 1720; N. L. Urizar et al., Science 2002, 296, 1703; G. Lambert et al., J. Biol. Chem. 2003, 278, 2563; M. Watanabe et al., J. Clin. Invest. 2004, 113, 1408; A. Figge et al., J. Biol. Chem. 2004, 279, 2790; S. Bilz et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006, 290, E716).

[0123] 그러나, 혈청 트리글리세라이드의 저하는 독립적 증상이 아니다. db/db 또는 ob/ob 마우스에 합성 FXR 효능제 GW4064로 치료한 결과는, 혈청 트리글리세라이드, 총 콜레스테롤, 자유 지방산, 3-OH 부티레이트(Butyrate)와 같은 케톤체에 대해 표시가 나고 복합적인 감소를 나타냈다. 나아가, FXR의 활성화는 간세포에서 세포내 인슐린 신호 경로에 관여하고, 그 결과로써 간 글루코네오제네시스(gluconeogenesis)로부터 글루코오스의 생성을 감소시키지만, 동시에 간 글리코겐에서는 증가를 나타낸다. 글루코오스 내성뿐만 아니라 인슐린 민감도는 FXR 치료에 의해 긍정적인 효과를 받는다(K. R. Stayrook et al., Endocrinology 2005, 146, 984; Y. Zhang et al., PNAS 2006, 103, 1006; B. Cariou et al., J. Biol. Chem. 2006, 281, 11039; K. Ma et al., J. Clin. Invest. 2006, 116, 1102; D. Duran-Sandoval et al., Biochimie 2005, 87, 93). 체중 감소에 대한 증상은 최근에 고지방 음식으로 과식시킨 마우스에서 관찰되었다(C. Lihong et al., American Diabetes Association (ADA) 66th annual scientific sessions, June 2006, Abstract Number 856-P). 체중 감소 증상은 체중 감량과 운동 표현형을 유도하는 것으로 알려진 섬유모세포 성장인자인 FGF-19의 FXR's 유도로부터 초래될 수 있다(J. Holt et al., 유전자 Dev. 2003, 17, 1581; E. Tomlinson et al., Endocrinology 2002, 143, 1741). 최근의 특허 문헌에서, 체중 감소에 대한 FXR 효능제의 효과가 설명되었다(WO 제2004/087076호; WO 제2003/080803호).

[0124] 상기의 모두를 합하여, FXR 효능제의 약학적 효과를 다른 치료 방법으로 활용할 수 있다. FXR 결합 화합물은 자체의 인슐린 민감화, 글리코겐노제닉(glycogenogenic) 및 지질 저하 효과 때문에 제II형 당뇨병의 치료에 좋은 후보가 될 것으로 여겨진다.

[0125] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물과 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 FXR이 매개된 체계적인 인슐린 민감도 및 간에서 세포내 인슐린 신호의 상향조절, 말초신경 글루코오스 흡수 및 대사의 증가, 간에서 글리코겐 축적의 증가, 간-매개 글루코네오제네시스에서 혈청으로의 글루코오스 생성의 감소에 의해 극복될 수 있는 제II형 당뇨병의 예방 및 치료에 사용된다.

[0126] 추가 실시형태에서, 상기 화합물 및 약학적 조성물은 PBC, PSC, 프로그레스브 페밀리어 간내 담즙정체(PFIC), 알코올로 유도된 경화증 및 연관된 담즙정체, 및 간의 담즙정체 상태의 일부 형태, 또는 간 섬유증과 같은 만성 간 내의 예방 및/또는 치료에 사용된다.

[0127] 본 발명은 장의 담즙산 및 인지질 수준을 증가시켜 극복될 수 있는 식이지방 흡수의 감소 및 지용성 식이 비타민 흡수의 감소가 동반되는 위장관 증상들의 예방 및/또는 치료를 위한 화학식(1)의 화합물 또는 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0128] 추가 실시형태에서, 상기 화합물 또는 약학적 조성물은 임상조건 증상으로서 전체 혈장 콜레스테롤 저하, 혈청 트리글리세라이드 저하, 간 콜레스테롤을 담즙산으로 전환의 증가, 간의 VLDL 및 다른 지질단백질의 제거 및 대사 전환의 증가를 갖는 FXR의 유익한 효과에 의해 개선될 수 있는 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 고중성혈증(hypertriglyceridemia) 및 죽상동맥경화증(atherosclerosis)과 같은 지질 및 지질단백질 장애로 구성된 군으로부터 선택되는 질환 예방 및 치료에 사용된다.

[0129] 추가 실시형태에서, 상기 화합물 및 약학적 조성물은 FXR로 표적된 의약이 간지방증(liver steatosis) 및 NASH와 같은 관련 증후군, 또는 알코올로 유도된 경화증 또는 바이러스 매개 형태의 간염과 관련 있는 담즙정체

및 섬유화 증상의 치료를 위해 활용될 수 있는 복합된 지질 저하, 항담즙정체 및 항섬유화 증상의 질환의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다.

[0130] 저지질혈증 증상(hypolipidemic effects)과 함께 기능적 FXR의 손실은 ApoE 유전자 결핍 마우스에서 죽상동맥경화증 증가로 유도됨을 또한 나타냈다(E. A. Hanniman et al., J. Lipid Res. 2005, 46, 2595). 따라서, FXR 효능제는 항죽상경화판(anti-atherosclerotic) 및 심장보호 의약으로서 임상적 유용성이 있을 수 있다. 맥관성 평활근세포에서 엔도텔린-1(endothelin-1)의 하향조절은 유익한 치료 효과에 또한 기여할 수 있다(F. He et al., Circ. Res. 2006, 98, 192).

[0131] 또한, 본 발명은 급성 심근경색증, 급성 뇌졸중 또는 만성 폐쇄 죽상동맥경화증의 말단에 발생하는 혈전증과 같은 심장혈관 장애의 예방 및 외상후 치료를 위한 화합식 (1)에 따른 화합물 또는 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0132] 장 및 결장 폴립 형성의 제어를 넘어, FXR은 유방암 조직과 세포주뿐만 아니라 건강한 유방 조직에도 발현되는 것 같고, ER 양성 유방암 세포에서 에스트로겐 수용체와 상호작용하는 것으로 보인다(K. E. Swales et al., Cancer Res. 2006, 66, 10120 and F. Journe et al., Breast Cancer Res. Treat. 2009, 115, 523).

[0133] 상기는 FXR을 특히 FXR의 작은 분자 반응 형태를 표현하는 전이성 암 형태인 증식성 질환의 치료를 위한 잠재적 표적으로서 간주할 수 있게 한다.

[0134] 추가 실시형태에서, 상기 화합물 및 약학적 조성물은 다양한 형태의 암, 특히 FXR 리간드의 간섭으로 인해 유익한 영향이 있을 유방, 간 또는 결장암의 특정 형태와 같은 악성 과증식성 장애의 예방 및/또는 치료에 사용된다.

[0135] 마지막으로, 비록 정확한 기전이 제공되지는 않았지만 FXR은 장에서 항균방어의 제어에 관여하는 것으로도 보인다 (T. Inagaki et al., PNAS. 2006, 103, 3920). 그러나, 상기 발표 자료에서, FXR 효능제에 의한 치료는 염증성 장 장애(IBD), 특히 장의 상단부분(회장)이 영향을 받는 형태(예: 회장 크론병(Crohn's disease))의 치료에 유익한 영향을 미칠 수 있다는 결론을 내릴 수 있는데, 왜냐하면 이 부분이 세균 증식에 미치는 FXR 제어의 행동 부위라고 여겨지기 때문이다. IBD에서 적응 면역 반응의 감각저하는 어떻게든 장 면역 체계를 손상시킨다. 세균의 과도증식은 만성 염증 반응을 일으키는 계기의 원인이 될 수 있다. 따라서, FXR 매개 기전에 의한 세균 증식을 꺾는 것이 급성 염증 사건을 방지하기 위한 핵심 기전일 수 있다.

[0136] 따라서, 본 발명은 크론병 또는 궤양성 대장염(Colitis ulcerosa)과 같은 염증성 장질환과 관련된 질병을 예방 및/또는 치료하기 위한 화합식 (1)에 따른 화합물 또는 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. FXR-매개된 장 장벽 기능의 회복 및 비공생균 부하(non-commensal bacterial load)에서의 감소는 장내 면역체계에 대한 세균 항원의 노출을 감소시키는 데 도움이 될 것으로 생각되며, 따라서 염증 반응을 감소시킬 수 있다.

[0137] 또한, 본 발명은 FXR-매개된 혈청 트리글리세라이드, 혈액 글루코오스 및 증가된 인슐린 민감도의 저하와 FXR-매개된 체중감소에 의해 극복될 수 있는 대사증후군(metabolic syndrome) (이상지질혈증(dyslipidemia), 당뇨병 또는 비정상적 고체지방지수의 혼합된 상태)과 같은 비만 및 이와 관련된 장애의 예방 및/또는 치료를 위한 화합물 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0138] 추가 실시형태에서, 본 발명의 화합물 또는 약학적 조성물은 제I형 및 제II형 당뇨병의 임상합병증의 예방 및

치료에 유용하다. 상기 합병증의 예로는 당뇨병 콩팥병증, 당뇨병망막병증, 당뇨병신경병증, 또는 말초신경 동맥 폐쇄성 질환(PAOD)을 포함한다. 당뇨병의 다른 임상합병증도 본 발명에 포함된다.

[0139] 나아가, 강화된 지질과 특히 트리글리세리드 축적 및 전섬유화성 경로의 연속적 활성화로 인해 기관의 만성 지방 및 섬유성 퇴화로부터 초래되는 상태 및 질환은 본 발명의 화합물 및 약학적 조성을 적용하여 예방 및/또는 치료될 수 있다. 상기 상태 및 질환은 간에서 NASH 및 만성 담즙정체 상태, 신장에서 사구체경화증 및 당뇨병 콩팥병증, 안구에서 황반변성(Macula Degeneration) 및 당뇨병망막병증 및 뇌에서 알츠하이머 질환과 같은 신경변성 질환, 또는 말초신경계에서 당뇨병신경병증을 포함한다.

[0140] 실제 사용에 있어서, 본 발명의 화합물을 종래의 약학적 조제 기술에 따른 약학적 담체를 갖는 친숙한 혼합물에서 유효 성분으로서 혼합할 수 있다. 담체는 투여, 예를 들면, 경구 또는 비경구(정맥 포함)를 위해 원하는 제조형태에 따라 다양한 유형의 형태로 취할 수 있다. 경구투여 형태를 위한 조성물의 제조에 있어서, 통상의 약학적 매개체는, 예를 들면, 현탁액, 엘릭시르(elixirs) 및 용액제와 같은 경구 액체제제 같은 경우에서 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향미제, 보존제, 착색제 등을 사용할 수 있고, 또는 분말, 경질 및 연질 캡슐 및 정제와 같은 경구 고형제제 경우에서 전분, 설탕, 미정질 셀룰로오스, 희석제, 과립제, 윤활제, 결합제, 붕해제 등과 같은 담체를 사용할 수 있는데 액체 제제보다 고체 경구제제를 더 바람직하게 사용할 수 있다.

[0141] 투여의 용이성으로 인하여, 정제 및 캡슐은 고체 약학적 담체가 분명히 사용되는 경우에 가장 유리한 경구 투여 단위 형태를 대표한다. 원하는 경우, 정제는 표준 수성 또는 비수성 기술에 의해 코팅될 수 있다. 상기 조성물 및 제제는 적어도 0.1% 유효 화합물을 포함해야만 한다. 상기 조성물에서 유효 화합물의 %는 물론 다양할 수 있고 편리하게는 단위 중량의 약 2% 내지 약 60% 일 수 있다. 상기 치료학적으로 유용한 조성물에서 유효 화합물의 양은 유효적 투여량이 얻어지는 양이다. 또한 유효 화합물을 액체방울 또는 분무로서 비강내로 투여할 수 있다.

[0142] 정제, 환제, 캡슐 등은 또한 트라가칸스 검(gum tragacanth), 아카시아(acacia), 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산(alginic acid) 등의 붕해제; 마그네슘스테아레이트와 같은 윤활제; 및 수크로오스, 락토오스 또는 사카린과 같은 감미제를 포함할 수 있다. 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 상기 유형의 물질 외에도, 지방오일과 같은 액체 담체를 포함할 수 있다.

[0143] 다양한 다른 물질은 코팅 또는 투여 단위의 물리적 형태를 변형시켜서 존재할 수 있다. 예를 들면, 정제는 셀락(shellac), 설탕 또는 둘 모두로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 유효성분 외에 감미제로서 수크로오스, 보존제로서 메틸 및 프로필파라벤(propylparabens), 염료 및 체리 또는 오렌지 향미와 같은 향미제를 포함할 수 있다.

[0144] 본 발명의 화합물은 주로 카르복실산 또는 이의 유사한 음이온 이소스테르(anionic isosters)를 나타내고, 이온성 의약 화합물의 염 형태는 실질적으로 의약 화합물의 생체이용률(bioavailability)에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명의 화합물은 또한 다양한 양성자를 띠는 반대이온을 갖는 염으로서 사용할 수 있으므로 경구적으로 가능한 제제를 생산할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 양이온은 암모늄, 알칼리 금속 소듐 또는 포타슘 또는 알칼리 토금속 마그네슘 또는 칼슘, 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, 에틸렌디아민, 디에틸아민, 피페라진 또는 다른 것과 같은 특정 약학적으로 허용가능한 아민, 또는 리신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)과 같은 특정 양이온 아미노산과 같은 일가(mono)- 또는 이가(vibalent) 이온 중에서 있을 수 있다.

[0145] 본 발명의 화합물은 비경구적으로 투여될 수 있다. 상기 유효성분의 용액 또는 현탁액은 하이드록시-프로필셀룰로오스와 같은 계면활성제를 적절히 혼합하여 물에서 제조될 수 있다. 분산제는 글리세롤, 액체 폴리에틸렌

글리콜 및 오일에 있는 이의 혼합물에서 제조될 수 있다. 평범한 조건의 저장 및 사용에서, 상기 제조는 미생물의 증식을 방지하기 위해서 보존제를 포함한다.

[0146] 주사용으로 적합한 약학적 형태는 멸균 주사 용액 또는 분산제의 즉석 제조를 위한 멸균 용액 또는 분산제 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에서, 상기 형태는 멸균해야만 하고 주사가 용이한 정도의 액체(fluid)이어야만 한다. 제조 및 저장의 조건하에서 안정적이어야만 하고 세균 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야만 한다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌글리콜), 이의 적절한 혼합물 및 식물성 오일을 포함하는 용매 또는 분산배지일 수 있다.

[0147] 임의의 적합한 투여 경로는 본 발명의 화합물의 유효량과 함께, 특히 인간 포유류에 제공하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 국소, 비경구, 안구, 폐, 비강 등이 사용될 수 있다. 투여 형태는 정제, 구내정(troches), 분산제, 현탁액, 용액, 캡슐, 크림, 연고, 에어로졸 등을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물을 경구 투여할 수 있다.

[0148] 사용되는 유효성분의 유효적 투여량은 사용되는 특정 화합물, 투여형태, 치료되는 증상 및 치료되는 증상의 심각도에 따라 다양할 수 있다. 상기 투여량은 당업자에 의해 쉽게 확인될 수 있다.

[0149] 본 발명의 화합물을 위한 FXR이 매개된 상태를 치료 또는 예방이 지적될 때, 본 발명의 화합물을 동물 체중 kg 당 1일 약 0.10 mg 내지 약 100 mg의 투여량으로 투여, 바람직하게는 1일 1회 투여량 또는 1일 2회 내지 6회로 나누어, 또는 지속형 방출 형태로 투여하였을 때, 일반적으로 만족스러운 결과를 얻을 수 있다. 가장 큰 포유류인 경우, 총 1일 투여량은 약 1.0 mg 내지 약 1000 mg, 바람직하게는 약 1 mg 내지 약 50 mg이다. 70 kg 성인의 경우, 총 1일 투여량은 일반적으로 약 7 mg 내지 약 350 mg일 것이다. 상기 투여처방은 최적의 치료반응을 제공하도록 조정될 수 있다.

[0150] 본 발명의 화합물은 적합한 재료를 사용하여 하기의 반응식 및 실시예의 방법에 따라 제조될 수 있고, 하기의 구체적인 실시예에 의해 추가적으로 예시된다. 또한, 기술 분야의 통상의 기술과 함께, 본 명세서에 설명된 방법을 이용하여, 본 명세서에서 청구하는 본 발명의 추가 화합물을 용이하게 제조할 수 있다. 그러나, 실시예에서 설명한 화합물을 본 발명으로 간주되는 단지 속(genus)을 형성하는 것으로 해석되어서는 안된다. 실시예는 본 발명의 화합물의 제조를 위한 세부사항을 추가적으로 설명한다. 당업자는 공지된 조건의 변형 및 하기의 제조방법이 상기 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 쉽게 이해할 것이다. 본 화합물들은 일반적으로 상기에서 설명한 바와 같이, 이의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 분리된다.

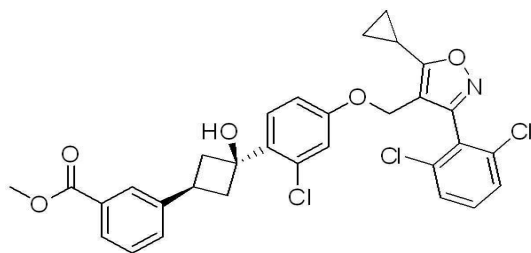
[0151] 분리된 염에 해당하는 아민 없는 염기는 수성 탄산수소나트륨(sodium hydrogen carbonate), 탄산나트륨, 소듐하이드록사이드 및 포타슘하이드록사이드와 같은 적절한 염기로 중화하고, 유리된 아민 없는 염기를 유기 용매에 추출한 후 증발시켜서 생성시킬 수 있다. 상기와 같은 방식으로 분리된 아민 없는 염기를 유기 용매에서 분해시킨 후 적절한 산의 첨가 및 연속적 증발, 침전 또는 결정화에 의해 추가적으로 다른 약학적으로 허용가능한 염으로 전환시킬 수 있다. 분리된 염에 대응하는 카르복실 없는 산은 수성 염산, 소듐하이드로젠설페이트, 소듐디하이드로젠포스페이트와 같은 적합한 산을 중화시키고 유리된 카르복실 없는 산을 유기 용매에 추출한 후 증발시켜서 생성시킬 수 있다. 상기와 같은 방식으로 분리된 카르복실산을 유기 용매에 용해시킨 후, 적절한 염기를 추가하고 연속적으로 증발, 침전 또는 결정화시켜서 추가적으로 또 다른 약학적으로 허용가능한 염으로 전환시킬 수 있다.

[0152] 본 발명의 화합물의 제조에 대한 설명을 하기에 나타냈다. 반응식에 달리 표시되지 않는 한, 변수는 상기에서 설명한 바와 동일한 의미를 갖는다. 하기에 제시된 실시예들은 본 발명의 특정 실시형태를 예시하도록 의도된다. 적합한 출발물질, 빌딩블록(building blocks) 및 하기에 설명한 바와 같이 합성에서 사용된 시약은 시그마

알드리치(Sigma-Aldrich) 또는 아크로스 오가닉스(Acros Organics)로부터 상업적으로 구입할 수 있거나, 예를 들면, “March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure”, 5th Edition; John Wiley & Sons or T. Eicher, S. Hauptmann “The Chemistry of Heterocycles; Structures, Reactions, Synthesis and Application”, 2nd edition, Wiley-VCH 2003; “Fieser et al., Fieser's Reagents for organic Synthesis” John Wiley & Sons 2000의 문헌에 기재된 절차에 의해 정기적으로 제조될 수 있다.

[0153] 실시예

[0154] 실시예 1: 메틸 3-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시 사이클로부틸)벤조에이트 (1)



[0155]

[0156] 단계 1: 4-((4-브로모-3-클로로페녹시)메틸)-5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)-이속사졸(1a)

[0157] CH₂Cl₂(DCM)(200 ml)내 (5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메탄올(13 g, 45.8 mmol)에 SOCl₂(40 ml, 336 mmol)을 적가하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 상온에서 교반하고 용매를 감압하에서 제거했다. 잔류물을 N,N-디메틸포름아미드(DMF)(200 ml) 및 4-브로모-3-클로로페놀(9.7 g, 47 mmol)에 용해시키고, K₂CO₃(40 g, 290 mmol) 및 NaI(12 g, 80 mmol)를 상기 용액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 60℃에서 밤새 교반한 후, 상온으로 냉각, 물(1000 ml)로 희석하고 에틸아세테이트(EA)로 추출하였다(500 ml × 3). 혼합된 유기층을 식염수(brine)로 세척하고(500 ml × 3), Na₂SO₄로 건조시키고 진공속에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 플래시 크로마토그래피(flash chromatography)(CC)로 정제하여 흰색 고체로서 표제 화합물 **1a**(19 g, 88%)를 얻었다.

[0158] 단계 2: 메틸 3-(2,2-디클로로-3-옥소사이클로부틸)벤조에이트(1b)

[0159] 질소 분위기에서 응축기, 오버헤드 교반기와 압력을 같게 한 적가 깔대기가 장착된 3구 둥근 바닥 플라스크에, 건조 Et₂O(150 ml)내 메틸 3-비닐벤조에이트(5 g, 31 mmol)를 용해시켰다. 상기 플라스크에 아연진(Zinc dust(6 g, 3 당량))을 첨가하고, 반응물을 30분 동안 초음파 분해하였다. 이후, 다음 30분 동안 초음파 분해를 계속하는 동안 건조 Et₂O(50 ml)내 트리클로로아세틸클로라이드 용액(8.7 ml, 2.5 당량)을 적가하였다. 상기 과정 동안, 반응 혼합물을 35℃로 가열하였다. 초음파분해는 역류상에서 2.5시간 동안 계속되었고 반응물을 ¹H NMR 분석에 의해 완성시켰다. 반응물을 상온으로 냉각시키고 물(약 50 ml)로 급냉시켰다. 지연되는 발열반응이 발생하기 때문에 상기를 몇 차례 산재된 적가방식으로 2-3 분까지 수행하였다. 물에서 20분 동안 교반한 후에, 상기 반응 혼합물은 세라이트(celite) 패드를 통하여 여과시키고 Et₂O를 통하여 행구었다. 유기층을 물의 일부(2 x 250 ml), 포화된 소듐바이오카보네이트(2 x 250 ml) 및 식염수(1 x 250 ml)로 세척하고, 소듐설페이트로 건조시키고, 여과 및 감압하에서 농축시켜서 검은 노란색 두꺼운 오일(원유 8.7 g)로서 조생성물 **1b**를 생성하였다.

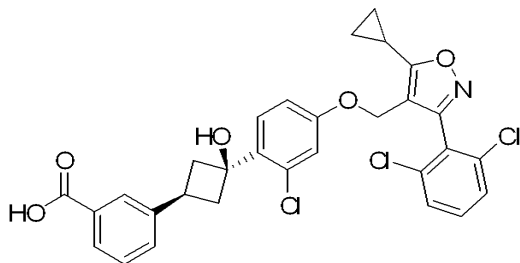
[0160] 단계 3: 메틸 3-(3-옥소사이클로부틸)벤조에이트(1c)

[0161] 조생성물 **1b**(8.7 g)을 질소 분위기에서 둥근 바닥 플라스크에 있는 빙초산(55 ml)에 용해시켰다. 아연진(4.6 g, 2.2 당량)을 상기 플라스크에 첨가하고 반응물을 교반하고 3시간 동안 120℃에서 가열하였다. 상온으로 냉각시킨 후에 반응물을 세라이트 패드를 통하여 여과시키고 에틸아세테이트(EA)의 일부로 세척하였다. 혼합된 용액을 EA(500 ml)에 용해시키기 전에 감압하에서 농축시키고, 식염수로 세척(150 ml × 2)한 후에 소듐설페이트로 건조시키고, 다시 여과 및 농축시켰다. 조혼합물을 클로로포름(250 ml)에서 5분 동안 교반하고 소결된 깔때기를 통하여 여과시켰다. 여과액을 농축시켜 옅은 노란색 오일의 조생성물을 얻었다. 상기 조생성물을 (PE/EA = 9:1, PE = 석유 에테르)에서 CC에 의해 정제하여 옅은 노란색 오일로서 원하는 생성물 **1c**(2단계에서 2.5 g, 38%)를 얻었다.

[0162] 단계 4: 메틸 3-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)벤조에이트(**1**)

[0163] 질소 분위기의 -78℃에서 10분 이상 동안, 건조 THF(30 ml)내 교반중인 화합물 **1a**(1.67 g, 3.5 mmol) 용액에 *n*-BuLi(헥산에서 2.5 M, 1.2 당량, 1.69 ml)을 적가하였다. 건조 THF(10 ml)내 화합물 **1c** 용액(0.72 g, 1 당량)을 첨가하기 전에 상기 온도에서 1시간 동안 교반하고, 상기 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 천천히 상온으로 가온하고 밤새 교반하도록 방치하였다. 상기 반응물을 포화된 암모늄클로라이드 용액(50 ml) 및 EA(250 ml)로 급냉시켰다. 유기층을 분리시키고 수층을 EA로 세척하였다(2 x 100 ml). 혼합된 유기 추출물을 소듐설페이트로 건조, 여과 및 농축시켜서 갈색 오일의 조생성물을 얻었다. 상기 생성물을 PE/EA(19:1 내지 3:1)를 갖는 CC로 분리시켰다. 상기 반응과 정제를 동일한 규모로 2회 반복하고 혼합된 생성물(3.13 g)을 동일한 조건하에서 재정제하여 최종생성물 **1**(1.7 g, 19%)을 얻었다. ¹H NMR (CDCl₃): 7.93 (m, 1H), 7.90-7.85 (m, 1H), 7.50-7.30 (m, 5H), 6.88 (s, 1H), 6.75-6.72 (m, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.20-3.10 (m, 1H), 3.00-2.91 (m, 2H), 2.60-2.49 (m, 2H), 2.15-2.08 (m, 1H), 1.30-1.25 (m, 2H), 1.15-1.10 (m, 2H).

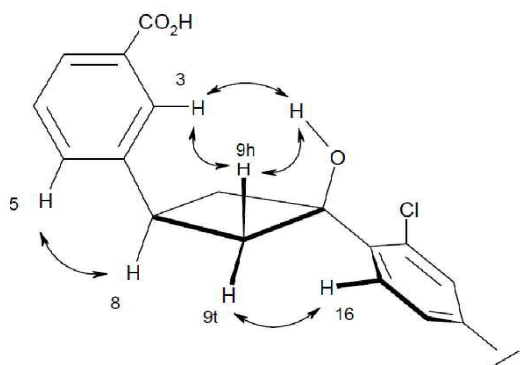
[0164] 실시예 2: 3-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)벤조산 (**2**)



[0165]

[0166] 화합물 **1**(1.7 g, 2.84 mmol)을 상온에서 THF(100 ml)에 용해시켰다. 물(20 ml)내 LiOH 용액(285 mg, 4.2 당량)을 첨가하고 상기 용액을 교반하고 3일 동안 35℃로 가온시켰다. 이후 THF를 감압하에서 제거하였다. 잔류 수용액을 물(25 ml)로 희석시키고 Et₂O로 세척하였다(2 x 50 ml). 수층을 둥근 바닥 플라스크로 옮기고 1N HCl를 사용하여 pH 6으로 산성화시켰다. 형성된 하얀색 침전물을 여과시키고 50℃에서 감압하에서 건조시켜 흰색 고체로서 표제 화합물 **2**(1.3 g, 78%, ¹H-NMR 및 LC-MS에 의한 단일 이성질체)를 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.98 (s, 1H), 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.58-7.46 (m, 5H), 7.41 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.29-3.25 (m, 2H), 2.96 (m, 1H), 2.55-2.49 (m, 2H), 2.37 (m, 1H), 1.24-1.22 (m, 4H). MS (ESI⁻) m/z: 584 (582) [M-1]⁻.

[0167] 관련된 집중적 NOEs(ROESY 스펙트럼으로부터 얻음; 하기 화살표)는 두 개의 방향족 부분이 실시예 2에서 우선 시되는 1,3-트랜스인 것을 나타낸다.



[0168]

[0169]

실시예 2에 대한 대체 경로

[0170]

단계 1: 3-(3-브로모페닐)사이클로부타논 (2a)

[0171]

N,N-디메틸아세트아미드(9.0 g, 103 mmol)를 1,2-디클로로에탄(200 ml)에 용해시켰다. 트리플루오로메탄설포닉 무수물(63 g, 223 mmol)을 첨가하기 전에 상기 용액을 0℃로 냉각시켰다. 반응물을 0℃에서 추가 60분 동안 교반한 후 1-브로모-3-비닐벤젠(15 g, 81.9 mmol) 및 2,4,6-콜리딘(10.5 g, 86.6 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 밤새 역류로 가열하였고 물(30 ml)을 첨가하여 급냉시키고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 DCM(300 ml × 3)으로 추출하였다. 혼합된 유기층을 Na₂SO₄로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. CC(EA/PE = 1:20)에 의한 정제로 옅은 노란색 고체로서 표제 화합물 **2a**(5.0 g, 27%)를 얻었다.

[0172]

단계 2: 3-(3-브로모페닐)-1-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사줄-4-일)메톡시)페닐)사이클로부타논 (2b)

[0173]

-78℃에서 건조 THF(500 ml)내 화합물 **1a**의 용액(14 g, 29.6 mmol)에 *n*-불리(18.5 ml, 헥산에서 1.6 M, 29.6 mmol)를 적가하였다. 혼합물을 -78℃에서 추가적으로 1시간 동안 교반하고 건조 THF(50 ml)내 화합물 **2a**의 용액(6.5 g, 28.9 mmol)을 적가하였다. 생성된 혼합물을 -78℃에서 1시간 동안 교반시킨 후 상온으로 가온하고 포화된 수성 NH₄Cl(500 ml)으로 급냉시켰다. 상기 혼합물을 EA로 추출하고(500 ml × 2), 혼합된 유기층을 식염수로 세척하고, Na₂SO₄로 건조 및 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 CC(EA/PE = 1:5)로 정제하여 흰색 고체로서 표제 화합물 **2b**(6.5 g, 37%)를 얻었다.

[0174]

단계 3: 3-(3-시아노페닐)-1-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사줄-4-일)메톡시)페닐)사이클로부타논 (2c)

[0175]

아르곤 분위기에서 DMF(50 ml)내 화합물 **2b**의 용액(3.1 g, 5 mmol)에 Zn(CN)₂(500 mg, 4.3 mmol), Pd₂(dba)₃(300 mg, 0.33 mmol) 및 잔트포스(Xantphos)(150 mg, 0.31 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 극초단파 조사하에서 10시간 동안 115℃에서 교반하였다. 상온으로 냉각한 후 반응 혼합물을 물(250 ml)로 희석하고 EA로 추출하였다(250 ml × 2). 혼합된 유기층은 식염수로 세척하고(100 ml × 3) Na₂SO₄로 건조시켰다. 잔류물을 CC(EA/PE)로 정제하여 옅은 노란색 고체로서 표제 화합물 **2c**(1.2 g, 42%)를 얻었다.

[0176]

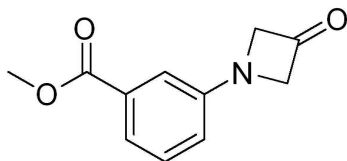
단계 4: 3-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사줄-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)벤조산 (2)

[0177]

에탄올(750 ml)내 화합물 **2c**의 용액(15 g, 24.2 mmol)에 수성 NaOH(물 100 ml에 40 g)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 역류로 밤새 가열한 후 상온으로 냉각하였다. 반응물을 진공하에서 농축시켜 휘발성 용매를 제거하고, 물(1000 ml)로 희석 및 희석된 수성 염산(1N)으로 pH를 2로 조절하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고 노란색 고체의 조생성물(13.8 g)을 얻었다. 프레퍼레티브 역상 크로마토그래피(preparative reversed phase HPLC(RP-HPLC))에 의한 정제로 하얀색 고체로서 화합물 **2**(8.0 g, 56%, ¹H-NMR에 의한 단일 이성

질체)를 얻었다.

[0178] 제조예 3



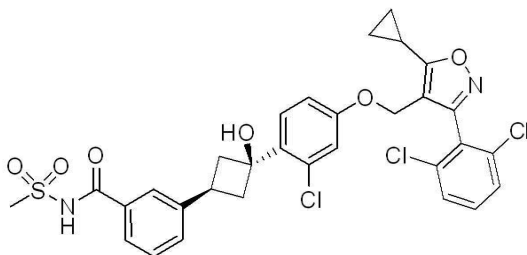
[0179] 단계 1: 메틸 3-(3-하이드록시아제티딘-1-일)벤조에이트(**3a**)

[0181] DMSO(30 ml)내 메틸3-요오드벤조에이트 용액(4.5 g, 17.2 mmol)에 3-아제티딘-3-올하이드로젠클로라이드(3-azetidin-3-ol hydrogen chloride salt(1.3 g, 11.8 mmol)), Cs₂CO₃(9.5 g, 29.2 mmol), CuI(446 mg, 2.3 mmol) 및 L-프롤린(540 mg, 4.7 mmol)을 첨가한 후 혼합물을 아르곤 분위기하에서 90℃에서 18시간 동안 가열하였다. 용액을 EA 및 물로 희석하고 유기층을 식염수로 3회 세척하고, 감압하에서 농축 및 CC(PE/EA = 2:1)로 정제하여 노란색 고체로서 화합물 **3a**(1.6 g, 66%)를 얻었다.

[0182] 단계 2: 메틸 3-(3-옥소아제티딘-1-일)벤조에이트(**3**)

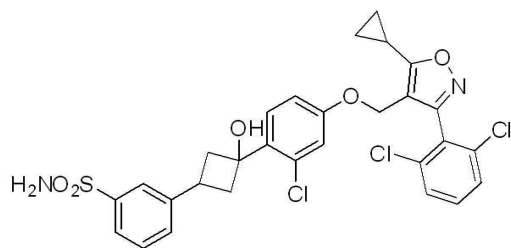
[0183] 0℃에서 건조 DCM(30 ml)내 화합물 **3a**의 용액(1.60 g, 7.7 mmol)에 데스-마틴 페리오디난(Dess-Martin periodinane(6.5 g, 15.4 mmol))을 첨가하고 혼합물을 질소 분위기하에서 2 시간 동안 상온에서 교반하였다. 혼합물을 포화된 소듐바이카보네이트 용액으로 급냉시키고 EA로 희석하였다. 유기 부분을 식염수로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과시키고, 감압하에서 농축시키고 CC(PE/EA = 4:1)로 정제하여 흰색 고체로서 화합물 **3**(1.2 g, 75%)을 얻었다.

[0184] 실시예 4: 3-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-N-(메틸설포닐)벤즈아미드 (**4**)



[0185] DCM(5 ml)내 화합물 **2**의 용액(100 mg, 0.17 mmol)에 EDCI·HCl(100 mg, 0.52 mmol), DMAP(100 mg, 0.81 mmol) 및 MeSO₂NH₂(40 mg, 0.42 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 밤새 동안 30℃에서 교반한 후 EA로 희석하고 H₂O 및 식염수로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 진공하에서 농축 및 프랩(prepare)-TLC에 의한 정제는 밝은 노란색 고체로서 거친 표적(crude target) 화합물을 얻었다. RP-HPLC 정제로 흰색 고체로서 화합물 **4**(38 mg, 33%)를 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.87 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.61-7.53 (m, 4H), 7.50-7.46 (m, 2H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.38(s, 3H), 3.30-3.26 (m, 2H), 3.01 (m, 1H), 2.57-2.51 (m, 2H), 2.37 (m, 1H), 1.25-1.23 (m, 4H). MS (ESI⁻) m/z: 659 [M-1]⁻.

[0187] 실시예 5: 3-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)벤젠설포아미드 (**5**)



[0188]

[0189]

단계 1: 3-(3-(벤즈일티오)페닐)-1-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)사이클로부탄올 (5a)

[0190]

아르곤 분위기하에서 톨루엔(20 ml)내 화합물 2b의 용액(619 mg, 1 mmol)에 K₂CO₃(276 mg, 2 mmol), 페닐메탄티올(125 mg, 1 mmol), Pd₂(dba)₃(200 mg, 0.22 mmol) 및 잔트포스(75 mg, 0.16 mmol)를 첨가한 후 혼합물을 4시간 동안 115°C에서 교반하였다. 상온으로 냉각한 후에, 상기 반응물을 물(100 ml)로 희석하고 EA(100 ml × 2)로 추출하였다. 혼합된 유기층을 식염수(100 ml × 2)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조 및 농축하여 건조시켰다. CC에 의한 정제로 옅은 노란색 고체로서 화합물 5a(200 mg; 30%)를 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.36-7.32 (m, 3H), 7.28-7.07 (m, 9H), 7.01 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.66 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.06-3.00 (m, 2H), 2.84-2.78 (m, 2H), 2.44-2.38 (m, 3H), 2.09 (m, 1H), 1.24-1.18 (m, 2H), 1.11-1.08 (m, 2H). MS (ESI⁺) m/z: 662 [M+1]⁺.

[0191]

단계 2: 3-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시 사이클로부틸)벤젠-1-설포닐클로라이드 (5b)

[0192]

CH₃CN/HOAc/H₂O(1 ml/37 μl/25 μl)내 화합물 5a의 용액(34 mg, 0.05 mmol)에 2,4-디클로로-5,5-디메틸히단티온(2,4-dichloro-5,5-dimethylhydantion(20 mg, 0.1 mmol)). 혼합물을 2시간 동안 0-5°C에서 교반하였다. 상기 반응물을 물로 희석하고 CH₂Cl₂로 추출하였다. 혼합된 유기층을 5% NaHCO₃ 용액, 식염수로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 농축하여 건조시켜서 무색 오일로서 조생성물 5b(30 mg)을 얻었고, 하기 단계에 직접 사용되었다.

[0193]

[0194]

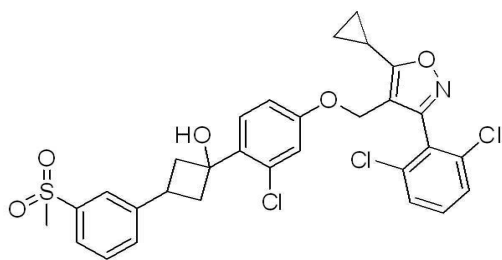
단계3:3-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시 사이클로부틸)벤젠설포나미드 (5)

[0195]

CH₃CN(2 ml)내 화합물 5b(30 mg)의 용액에 NH₄OH(0.3 ml)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 농축하여 건조시키고 프랩(pre) RP-HPLC에 의해 정제하여 흰색 고체로서 표제 화합물 5(3.5 mg, 2단계 동안 10%)를 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.85 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.54-7.41 (m, 5H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.75 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.77 (s, broad, 2H), 3.20 (t, J = 10.4 Hz, 2H), 3.04 (m, 1H), 2.58 (t, J = 10.6 Hz, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.31-1.30 (m, 2H), 1.20-1.16 (m, 2H). MS (ESI⁻) m/z: 617 [M-1]⁻.

[0196]

실시예 6: 1-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-(3-(메틸설포닐)페닐)사이클로부탄올 (6)



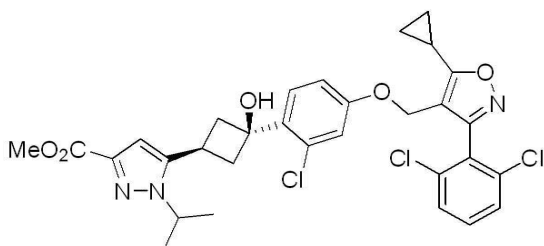
[0197]

[0198]

DMSO내 화합물 **2b**의 용액(200 mg, 0.32 mmol)에 소듐메탄설파네이트(sodium methanesulfinate(50 mg, 0.46 mmol)), CuI(20 mg, 0.1 mmol), *L*-프롤린(37 mg, 0.32 mmol) 및 디이소프로필에틸아민(DIEA)(41 mg, 0.32 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 밤새 동안 95℃에서 교반한 후 물로 희석하고 EA로 추출하였다. 혼합된 유기층을 물로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 농축시켜 감압하에서 건조시키고 프랩 RP-HPLC로 정제하여 흰색 고체로서 표제 화합물 **6**(35 mg, 21%, ¹H NMR 및 LC-MS에 의한 단일 이성질체)을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.84 (s, 1H), 7.79 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.44-7.41 (m, 3H), 7.34 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 3.24-3.19 (m, 2H), 3.08-3.04 (m, 4H), 2.62-2.56 (m, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.31-1.29 (m, 2H), 1.20-1.16 (m, 2H). MS (ESI+) m/z: 618 (620) [M+1]⁺, 600 (602) [M-H₂O+1]⁺.

[0199]

실시예 7: 메틸 5-((1*s*,3*s*)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시 사이클로부틸)-1-이소프로필-1*H*-피라졸-3-카르복실레이트 (**7**)



[0200]

[0201]

단계 1: 메틸 1-이소프로필-5-비닐-1*H*-피라졸-3-카르복실레이트 (**7a**)

[0202]

건조 THF(40 mL)내 메틸트리페닐포스포니움브로마이드 용액(2.69 g, 7.52 mmol)을 -78℃로 냉각시키고 *n*-부틸리튬(헥산에서 1.6 M 용액, 3.7 mL, 5.91 mmol)을 적가하였다. 노란-오렌지색 현탁액을 50분 동안 -78℃에서 교반시킨 후 건조 THF(10 mL)내 메틸 5-포르밀-1-이소프로필-1*H*-피라졸-3-카르복실레이트 용액(WO 제 2011/020615호에서 설명한 대로 제조함, 1.05 g, 5.37 mmol)을 적가하였다. 혼합물을 1.75시간 동안 -78℃에서 교반하고, 냉각용기(cooling bath)를 제거하고 혼합물(희석을 띤 흰색 현탁액)을 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 혼합물을 희석된 수성 NaHCO₃ 용액(150 mL)과 EA(150 mL)사이에서 분할하였다. 수성층을 EA(각각 50 mL)로 2회 추출하고 혼합된 유기층을 물(각각 50 mL)로 2회 세척 및 건조시키지 않고 농축하여 천천히 결정화되는 2.74 g의 노란색 오일을 얻었다. 조생성물을 CC(CH₂Cl₂)로 전흡착(preadsorption), 헥산/EA 4:1로 정제하여 무색 오일로서 알켄 **7a**(590 mg, 57%)을 얻었다. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 7.02 (s, 1H), 6.87 (dd, J = 17.3, 11.2 Hz, 1H), 5.94 (dd, J = 17.3, 1.3 Hz, 1H), 5.45 (dd, J = 11.2, 1.3 Hz, 1H), 4.80 (sept, J = 6.6 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 1.38 (d, J = 6.6 Hz, 6H). C₁₀H₁₄N₂O₂ (194.23). LC-MS (ESI): 195 [M+H]⁺.

[0203]

단계 2: 메틸 1-이소프로필-5-(3-옥소사이클로부틸)-1*H*-피라졸-3-카르복실레이트 (**7b**)

[0204]

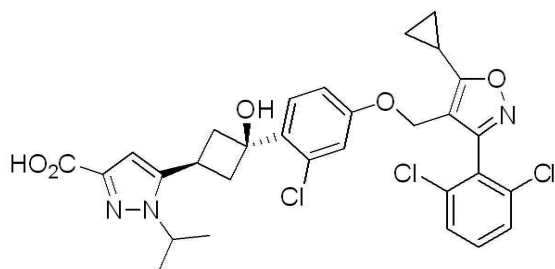
반응은 두 개의 건조 밀봉된 튜브에서(동일한 양의 2회분)에서 실행하였다. 각 회분을 정밀검사 및 정제를 위해 혼합하였다. 단일 회분 절차: 질소 분위기하에서 -15 내지 -20℃에서 1,2-디클로로에탄(12 mL)내 *N,N*-디메

틸아세트아미드(0.22 ml, 2.34 mmol)용액에 불투명한 현탁액을 형성하는 트리플루오로메탄설포닉 무수물(0.43 ml, 2.57 mmol)을 적가하였다. 혼합물을 10분 동안 -15℃에서 교반하고, 알켄 **7a** 용액(151 mg, 0.78 mmol) 및 1,2-디클로로에탄(3 ml)내 대칭-콜리딘(sym.-collidine(0.42 ml, 3.12 mmol))을 적가하였다(노란색 용액이 형성됨). 첨가를 완성함에 따라 냉각용기를 제거하고, 혼합물을 상온으로 가온되도록 방치하고(오렌지색 탁한 용액) 상기 튜브를 밀봉하였다. 혼합물을 15시간 동안 90℃에서 교반하였다(갈색 혼합물). 물(5 ml)을 상온에서 첨가하고 혼합물을 2시간 동안 100℃에서 교반하였다(탁한 2층 용액). 상온으로 냉각한 후에, 혼합물을 혼합하고, 희석된 수성 NaHCO₃ 용액과 CH₂Cl₂ 사이에서 분할시켰다. 수성층을 CH₂Cl₂(각각 30 ml)로 3회 추출하였다. 혼합된 유기층을 건조시키고(Na₂SO₄), 여과 및 농축하여 갈색 오일(2.2 g)을 얻었다. CC(6 × 13 cm, CH₂Cl₂로 전흡착, 톨루엔/EA 3:1)로 정제하여 노란색 오일로서 사이클로부타논 **7b**(115.5 mg, 31%)을 얻었다. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 6.81 (s, 1H), 4.58 (sept, J = 6.5 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.85-3.73 (m, 1H), 3.59-3.45 (m, 2H), 3.37-3.24 (m, 2H, 수신호에 의해 부분적으로 중복됨), 1.39 (d, J = 6.6 Hz, 6H). C₁₂H₁₆N₂O₃ (236.27). LC-MS (ESI): 237 [M+H]⁺.

[0205] 단계 3: 메틸 5-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-이소프로필-1H-피라졸-3-카르복실레이트 (**7**)

[0206] 건조 THF(6 ml)내 브로마이드 **1a** 용액(368 mg, 0.78 mmol)을 -78℃로 냉각시키고 헥산내 1.6M *n*-부틸리튬 용액(0.48 ml, 0.76 mmol)을 적가하였다. 혼합물을 20분 동안 -78℃에서 교반하고 건조 THF(4 ml)내 사이클로부타논 **7b** 용액(164 mg, 0.69 mmol)을 적가하였다. 혼합물을 2.5시간 동안 -78℃에서 교반하고 포화된 수성 NH₄Cl 용액(1 ml)을 상기 온도에서 적가하였다. 냉각용기를 제거하고 혼합물을 상온으로 가온되도록 방치하고 0.5시간 동안 상온에서 교반하였다. 혼합물을 희석된 수성 NH₄Cl 용액에 첨가하고 EA로 3회 추출하였다. 혼합된 유기층을 건조시키고(Na₂SO₄), 여과 및 농축하여 516 mg의 거의 무색 오일을 얻었다. CC(4.5 × 23 cm, CH₂Cl₂로 전흡착, 헥산/아세톤 용리액= 2:1)로 정제하여 사이클로부타논 **7b**(31.3 mg, 19%, 약간 노란색 오일) 및 비순수 생성물(333 mg)을 회수하였다. CC 또는 프랩-TLC에 의한 재정제(4 × 22 cm, 헥산/EA = 1:1)로 흰색 거품으로서 순수 생성물 **7**(210 mg, 48%)을 얻었다. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 7.65 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.59-7.48 (m, 2H), 6.92 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.42 (quint-like m, J = 6.5 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.24-3.11 (m, 2H, 수신호에 의해 부분적으로 중복됨), 3.04-2.90 (m, 1H), 2.54-2.33 (m, 3H, DNSO 신호에 의해 부분적으로 중복됨), 1.32 (d, J = 6.5 Hz, 6H), 1.26-1.08 (m, 4H). C₃₁H₃₀Cl₃N₃O₅ (630.95). LC-MS (ESI): 630, 632 [M+H]⁺.

[0207] 실시예 8: 5-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-이소프로필-1H-피라졸-3-카르복실산 (**8**)



[0208]

[0209] 에스테르 **7**(98.3 mg, 0.156 mmol)을 THF(7.5 ml), MeOH(2.5 ml) 및 물(2.5 ml)의 혼합물에 용해시키고 LiOH·H₂O(65 mg, 1.56 mmol)를 상온에서 첨가하였다. 혼합물을 18시간 동안 상온에서 교반하였다. 혼합물을 희석된 수성 NH₄Cl 용액과 EA 사이에서 분할하고 유기층을 물로 1회 세척하였다. 혼합된 수성층을 EA로 2회 추출하였다. 혼합된 유기층을 건조시키고(Na₂SO₄), 여과 및 농축하여 103 mg의 거의 흰색 고체를 얻었다. 생

성물을 $CC(3 \times 3.5 \text{ cm, EA/EtOH} = 10:1 \text{ 내지 } 1:4)$ 로 정제하여 흰색 고체로서 **8**(94.8 mg, 99%)을 얻었다. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ : 7.66–7.60 (m, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.59–7.49 (m, 2H), 6.91 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H), 6.76 (dd, $J = 8.6, 2.4 \text{ Hz}$, 1H), 6.38 (s, 1H), 5.51 (s, 1H, D_2O 로 교환가능함), 4.92 (s, 2H), 4.31 (quint-like m, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.25–3.08 (m, 2H, 수신호에 의해 부분적으로 중복됨), 2.93–2.77 (m, 1H), 2.57–2.43 (m, 1H, DMSO 신호에 의해 가려짐), 2.43–2.29 (m, 2H, DMSO 신호에 의해 부분적으로 중복됨), 1.29 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 6H), 1.26–1.08 (m, 4H). CO_2H 신호는 스펙트럼에서 나타나지 않음. $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_5$ (616.92). LC-MS (ESI): 616, 618 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0210] 실시예 8에 대한 대체 경로

[0211] 단계 1: 1-(3-메틸렌사이클로부틸)에탄논 (8a)

[0212] 메틸렌사이클로부탄카보니트릴(5.0 g, 53.7 mmol)을 건조 디에틸에테르(25 ml)에 용해시키고, 얼음 용기에서 냉각시키고 MeMgBr (26.8 ml, 80.5 mmol, 에테르에서 3 M)을 적가하였다. 혼합물을 밤새 동안 상온에서 교반하고, 0°C 로 냉각시킨 후 15% NaHSO_4 수성 용액(100 ml)으로 조심스럽게 급냉시켰다. 혼합물을 30분 동안 상온에서 교반하고 층을 분리하였다. 수성층을 펜탄(50 ml) 및 디에틸에테르(50 ml)로 추출하였다. 혼합된 유기층을 식염수로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 진공하에서 상온에서 제거하고 노르스름한 액체의 조생성물을 얻었다.

[0213] 단계 2: 에틸 4-(3-메틸렌사이클로부틸)-2,4-디옥소부타노에이트 (8b)

[0214] 소듐(1.15 g, 49.9 mmol)을 건조 EtOH(30 ml, 5% 디에틸에테르로 변성시킴)에 용해시켰다. 화합물 **8a**(5.5 g, 49.9 mmol, 미정제)를 건조 EtOH(45 ml)에 용해시키고 상기에서 제조된 소듐에톡사이드 용액을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 상온에서 교반한 후 디에틸옥살산염(diethyl oxalate(6.8 ml, 49.9 mmol)을 적가하였다. 반응 혼합물을 예열된(67°C 까지) 오일용기(oil bath)로 옮기고 4.5시간 동안 상기 온도에서 교반하였다. 혼합물을 밤새 동안 상온에서 방치하였다. 용매를 제거하고, EA(100 ml) 및 1 M HCl (70 ml)를 첨가하고 유기층을 분리시켰다. 수층을 EA(50 ml)로 재추출하였다. 혼합된 유기층을 물, 식염수로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 감압하에서 제거하고 잔류물을 용리액으로서 헥산/MTBE 9:1을 사용하여 실리카겔상에서 정제하여 순수 생성물 **8b**를 얻었다. 수율: 6.29 g, 2 단계에 걸쳐 56%. ^1H -NMR (CDCl_3), δ (ppm): 6.36 (s, 1H), 4.85–4.80 (m, 2H), 4.34 (q, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2H), 3.35–3.25 (m, 1H), 3.05–2.85 (m, 4H), 1.36 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 3H).

[0215] 단계 3: 에틸 1-이소프로필-5-(3-메틸렌사이클로부틸)-1H-피라졸-3-카르복실레이트 (8c)

[0216] 화합물 **8b**(6.29 g, 29.9 mmol)을 건조 EtOH(65 ml, 5% of MeOH로 변성시킴)에 용해시키고 이소프로필하이드라진하이드로클로라이드(isopropyl hydrazine hydrochloride(3.97 g, 35.9 mmol))를 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하고 EA(100 ml), 물(50 ml) 및 포화된 NaHCO_3 (50 ml)를 연속적으로 유질의 잔류물에 첨가하였다. 층을 분리하고 수층을 EA(50 ml)로 재추출하였다. 혼합된 유기층을 식염수(70 ml)로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 진공하에서 제거하고 잔류물을 감압하에서 건조시켰다. 수율: 7.23 g(NMR에 의해 3.4%의 EtOAc을 포함, 계산된 순수 수율: 6.98 g, 94%). 조생성물 **8c**는 HPLC 및 NMR에 의해 98% 순수이다. ^1H -NMR (CDCl_3), δ (ppm): 6.62 (s, 1H), 4.88–4.82 (m, 2H), 4.42–4.32 (m, 3H), 3.56–3.45 (m, 1H), 3.17–3.07 (m, 2H), 2.88–2.79 (m, 2H), 1.49 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 6H), 1.37 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 3H).

[0217] 단계 4: 에틸 1-이소프로필-5-(3-옥소사이클로부틸)-1H-피라졸-3-카르복실레이트 (8d)

[0218] 화합물 **8c**(6.45 g, 26.0 mmol)을 MeCN 혼합물(77 ml) 및 물(13 ml)에 용해시키고 얼음용기에서 냉각시켰다. 상기 용액에 $\text{RuCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (0.19 g, 0.86 mmol)에 이어 NaIO_4 의 일부(19.35 g, 90.9 mmol)를 첨가하였다. 상기를 첨가하는 동안에 발열이 관찰되었다. 얻어진 두꺼운 슬러리를 45분 동안 상온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수성 용액(10%, 260 ml), 물(50 ml) 및 DCM(100 ml)으로 희석하였다. 층을 분리하고 상기 수성층을 DCM(2×70 ml)으로 추출하였다. 혼합된 유기층을 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수성 용액(10%, 50 ml), 물(100 ml), 식염수(100 ml)로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 조생성물(6.5 g)을 실리카겔상에서 정제하고, 헥산/MTBE로 용리하여 -20°C 에 저장함에 따라 고체화되는 오일로서 순수 생성물을 얻었다. 수율: 5.8 g(2 단계에 걸쳐 78%). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6), δ (ppm): 6.78 (s, 1H), 4.57 (h, J = 8.0 Hz, 1H), 4.26 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.58-3.45 (m, 2H), 3.35-3.25 (m, 2H), 1.39 (d, J = 8.0 Hz, 6H), 1.28 (t, J = 8.0 Hz, 3H).

[0219] 단계 5: 4-((4-브로모-3-클로로페녹시)메틸)-5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸 (**8e**)

[0220] 3-클로로-4-브로모페놀(3.8 g, 18.3 mmol)을 톨루엔 (150 ml)에서 (5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메탄올(3.47 g, 12.2 mmol) 및 트리페닐포스핀(6.41 g, 24.4 mmol)과 혼합하였다. 혼합물을 얼음용기에서 냉각시키고 톨루엔(10 ml)에 있는 용액으로서 DIAD(4.8 ml, 24.4 mmol)를 적가하였다. 반응물을 21시간 동안 상온에서 교반하고 용매를 회전증발기상에서 제거하여 노란색 유질의 잔류물을 남겼다. 상기를 DCM(200 ml)에 용해시키고, 실리카(~ 20 g)를 첨가하고 혼합물을 증발시켜 건조시켰다. 상기 물질을 실리카 컬럼 상단에 넣고 헥산/MTBE 9:1로 용리 정제하였다. 분획을 포함하는 생성물을 모으고 용매를 감압하에서 제거하여 밤새 동안 진공하에서 결정화되는 무색의 순수 생성물 **8e**를 얻었다. 수율: 5.07 g (88%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.45-7.30 (m, 4H), 6.90 (s, 1H), 6.60-6.55 (m, 1H), 2.15-2.07 (m, 1H), 1.32-1.25 (m, 2H), 1.20-1.11 (m, 2H).

[0221] 단계 6: 에틸 5-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-이소프로필-1H-피라졸-3-카르복실레이트 (**8f**)

[0222] LiCl (0.684 g, 16.15 mmol)를 상온에서 THF(20 ml)에 용해시키고 $i\text{PrMgCl}$ (THF에서 2.0 M, 8.1 ml, 16.15 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 상온에서 교반하고, 얼음용기에서 냉각시키고 THF(20 ml)내 화합물 **8e**의 용액(2.55 g, 5.38 mmol)을 5분 이상 동안에 걸쳐 첨가하였다. 냉각용기를 제거하고 혼합물을 4시간 동안 상온에서 교반하였다. 혼합물을 10°C 로 냉각시키고 THF(16 ml)내 화합물 **8d**의 용액(1.48 g, 5.92 mmol)을 빠르게 첨가하였다. 혼합물을 90분 동안 상온에서 교반한 후 0.5 M 수성 NaHSO_4 (35 ml) 및 EA(50 ml)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 10분 동안 교반하여, 층을 분리시키고 수층을 EA(30 ml)로 추출하였다. 혼합된 유기층을 수성 NaHCO_3 (50 ml), 식염수(50 ml)로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 제거하여 흰색 거품의 조생성물(3.79 g)을 얻었다. 3.6 g의 상기 조생성물을 실리카 컬럼상에서 정제하여, 헥산/EA 3:2로 용리시켜서 고체 거품의 순수 생성물 **8f**를 얻었다. 수율: 1.62 g (49%). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6), δ (ppm): 7.65-7.47 (m, 4H), 6.93-6.91 (m, 1H), 6.79-6.72 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.42 (h, J = 8.0 Hz, 1H), 4.26 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.22-3.14 (m, 2H), 3.05-2.90 (m, 1H), 2.45-2.35 (m, 2H), 1.35-1.10 (m, 14H).

[0223]

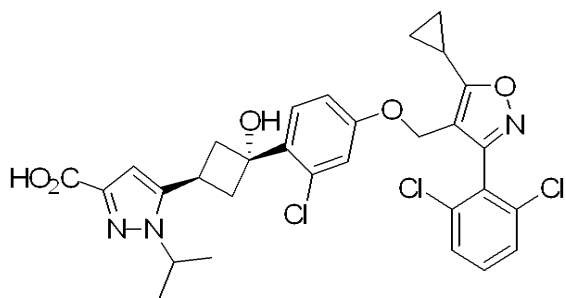
[0224] 단계 7: 5-((1s,3s)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-이소프로필-1H-피라졸-3-카르복실산 (**8**)

[0225] 화합물 **8f**(1.60 g, 2.48 mmol)을 THF(100 ml)에 용해시킨 후, MeOH(50 ml), 물(50 ml) 및 $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ (1.04 g, 24.8 mmol)를 연속적으로 첨가했다. 혼합물 4.5시간 동안 상온에서 교반하고 감압하에서 농축하여 MeOH 및 THF를 제거하였다. 잔류 수성 용액을 1 M HCl 수성(24 ml)을 첨가하여 4.05의 pH가 되도록 산성화하였다(pH 전극 제어). 약 pH 7에서 이미 침전물이 형성되기 시작했다. 형성된 고체를 여과하고, 물로 여과기를 세척하고 상

온에서 진공하에서 건조시켜 흰색 가루의 생성물 **8**을 얻었다. 수율: 1.40 g (92%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.44-7.32 (m, 4H), 6.91 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.75 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.35-4.20 (m, 1H), 3.25-3.14 (m, 2H), 3.04-2.90 (m, 1H), 2.62-2.54 (m, 2H), 2.21-2.11 (m, 1H), 1.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 6H), 1.34-1.28 (m, 2H), 1.20-1.14 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 172.7, 164.8, 159.2, 158.4, 147.2, 141.3, 135.8, 134.1, 132.8, 131.3, 128.1, 127.6, 127.3, 117.7, 113.3, 110.0, 106.3, 73.1, 59.8, 51.1, 41.7, 22.6, 22.0, 8.5, 7.8. MS (ESI^+) m/z : 616.4 $[\text{M}+1]^+$.

[0226]

실시예 8A: 5-((1*r*,3*r*)-3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-이소프로필-1*H*-피라졸-3-카르복실레이트 (**8A**)



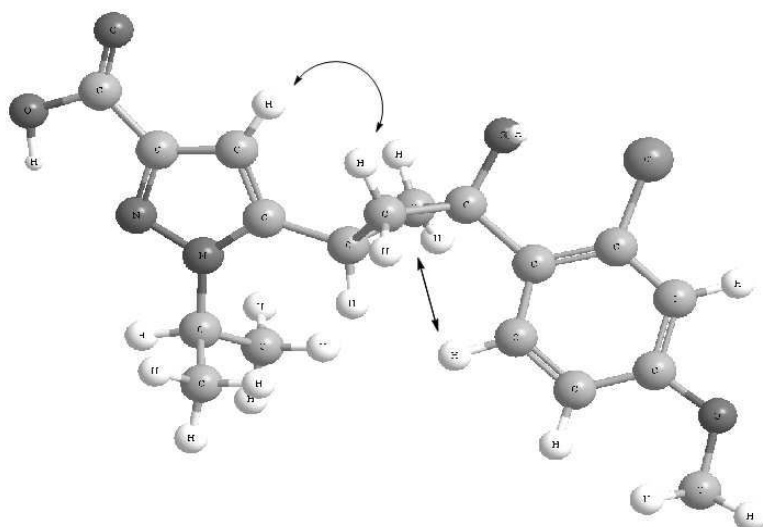
[0227]

[0228]

실시예 **8A**를 **8**에서 설명한 바와 같이 조생성물 **8f**를 에스테르 가수분해로 실행하여 제조하고 프랩 RP-HPLC에 의한 거울이성질체로서 조생성물 **8**로부터 분리하였다. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 7.42-7.30 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.75-6.65 (m, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.50-4.41 (m, 1H), 3.96-3.85 (m, 1H), 2.98-2.90 (m, 2H), 2.67-2.57 (m, 2H), 2.20-2.09 (m, 1H), 1.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 6H), 1.32-1.14 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 172.6, 166.2, 159.2, 158.4, 147.4, 141.2, 135.7, 134.6, 132.8, 131.3, 128.1, 127.7, 127.5, 116.8, 113.5, 110.0, 105.8, 75.1, 59.8, 51.2, 41.8, 25.4, 22.6, 8.5, 7.8. MS (ESI^+) m/z : 616.3 $[\text{M}+1]^+$.

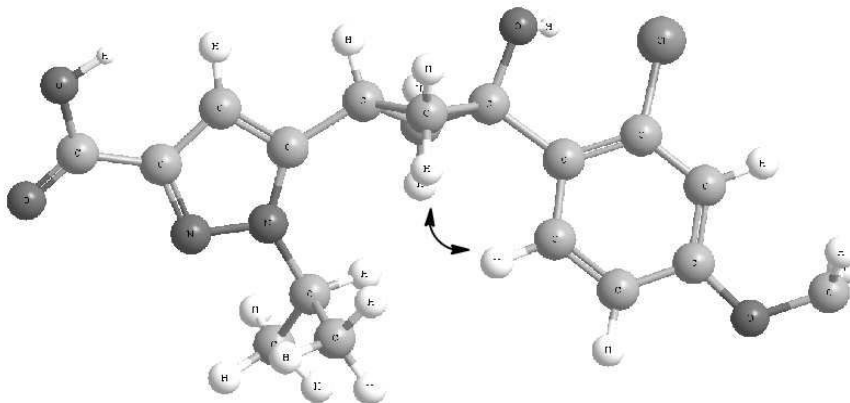
[0229]

주요 이성질체(화합물 **8**) 및 소수 거울이성질체(화합물 **8A**)의 고리형단 구성을 NOE 실험으로 확인하였다. 양자 사이에 검출된 NOEs를 하기 그림에서 이중 화살표로 표시하였다.



[0230]

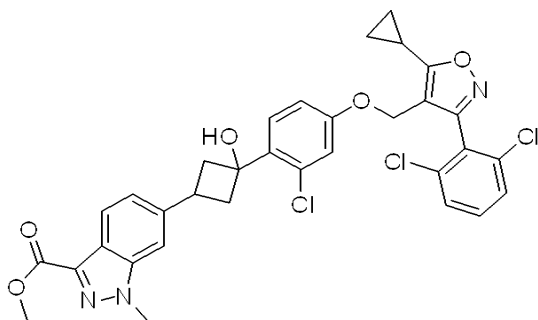
[0231] 방향족 부분의 1,3-트랜스 고리횡단 구성을 갖는 실시예 8을 위해 검출된 NOEs



[0232]

[0233] 방향족 부분의 1,3-시스 고리횡단 구성을 갖는 실시예 8A를 위해 검출된 NOEs

[0234] 실시예 9: 메틸 6-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-메틸-1H-인다졸-3-카르복실레이트 (9)



[0235]

[0236] 단계 1: 메틸 1-메틸-6-비닐-1H-인다졸-3-카르복실레이트 (9a)

[0237] DMF(10 ml)내 메틸 6-브로모-1-메틸-1H-인다졸-3-카르복실레이트(60 mg, 0.22 mmol)용액에, 트리부틸(비닐)틴 (99 μ l, 0.34 mmol), Pd(Ph₃)₄(11 mg, 9 μ mol)을 첨가하였다. 첨가를 끝낸 후에, 혼합물을 아르곤 질소에서 4시간 동안 90°C에서 교반하였다. 용매를 감압하에서 제거하였다. CC에 의한 정제로 화합물 9a(52 mg, 88%)를 얻었다.

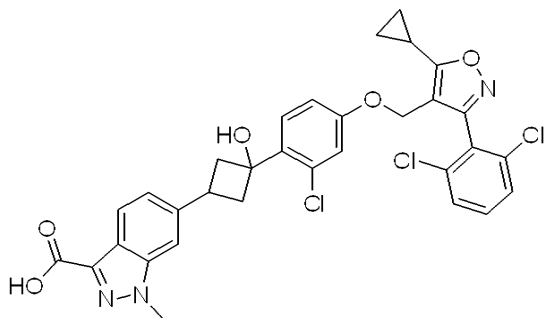
[0238] 단계 2: 메틸 1-메틸-6-(3-옥소사이클로부틸)-1H-인다졸-3-카르복실레이트 (9b)

[0239] 실시예 7/단계 2에서 설명한 바와 같은 방법을 따라서, 9a로부터 57% 수율로 화합물 9b를 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.13 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.87-3.79 (m, 1H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.33-3.26 (m, 2H). m/z: 259 [M+1]⁺.

[0240] 단계 3: 메틸 6-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-메틸-1H-인다졸-3-카르복실레이트 (9)

[0241] 실시예 7/단계 3에서 설명한 바와 같은 방법을 따라서, **9b**로부터 40% 수율로 화합물 **9**를 얻었다.

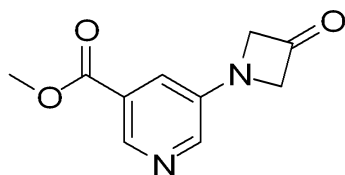
[0242] **실시예 10:** 6-(3-(2-클로로-4-((5-사이클로프로필-3-(2,6-디클로로페닐)이속사졸-4-일)메톡시)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)-1-메틸-1*H*-인다졸-3-카르복실산 (**10**)



[0243]

[0244] 실시예 8에서 설명한 바와 같은 방법을 따라서, 화합물 **9**로부터 45% 수율로 흰색고체의 화합물 **10**을 얻었다.
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.43-7.32 (m, 4H), 7.29 (m, 1H), 6.92 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 7.2 Hz, 2.4 Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.18 (s, 3H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.28-3.23 (m, 2H), 3.19-3.10 (m, 1H), 2.68-2.63 (m, 2H), 2.21-2.14 (m, 1H), 1.33-1.29 (m, 2H), 1.20-1.15 (m, 2H). m/z: 638 [M+1]⁺.

[0245] **제조예 11**



[0246]

[0247] 단계1: 메틸 5-(3-하이드록시아제티딘-1-일)니코티네이트 (**11a**)

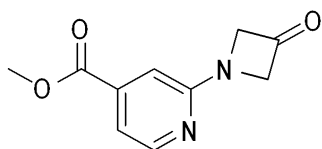
[0248] 건조 디옥산(115 ml)내 메틸 5-브로모니코티네이트(2.00 g, 9.26 mmol), 아제티딘-3-올(1.01 g, 9.26 mmol), Cs₂CO₃(9.06 g, 27.8 mmol), BINAP(1.15 g, 1.85 mmol) 및 Pd(OAc)₂(0.44 g, 1.85 mmol)의 혼합물을 질소 분위기하에서 밤새 동안 85℃에서 가열하였다. 생성된 혼합물을 여과시키고, 감압하에서 농축하고 프랩-HPLC로 정제하여 노란색 고체의 화합물 **11a**(250 mg, 13%)를 얻었다.

[0249] 단계 2: 메틸 5-(3-옥소아제티딘-1-일)니코티네이트 (**11**)

[0250] 건조 DCM(15 ml)내 화합물 **11a**의 용액(250 mg, 1.20 mmol)에 질소 분위기하에서 0℃에서 데스-마틴 페리오디난(1.014 g, 2.40 mmol)을 첨가하고 용액을 2시간 동안 상온에서 교반하였다. 얻어진 용액을 포화된 소듐바이카보네이트 용액으로 급냉시키고 EA로 희석하였다. 유기 부분을 식염수로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과 및 감압하에서 농축하여 CC(DCM/MeOH = 150:1)로 정제하여 노란색 고체의 화합물 **11**(140 mg, 57%)을 얻었다.

[0251] **제조예 12**

[0252] 제조예 11에서 설명한 바와 같이 유사한 방법을 사용하여 하기 화합물을 제조하였다.



12

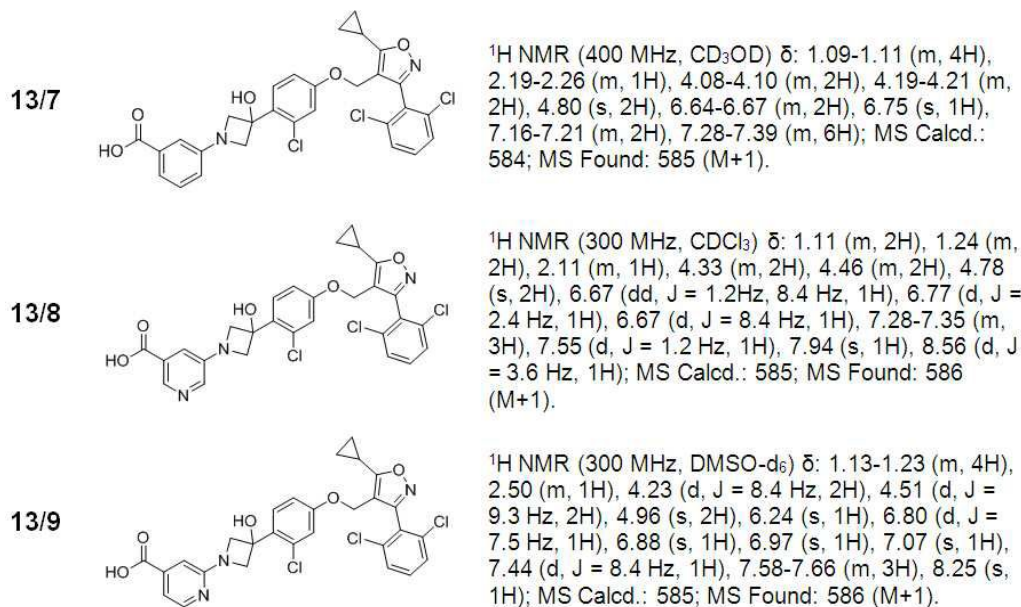
[0253]

[0254] 실시예 13/1 내지 13/9

[0255] 하기의 표는 상기에 언급된 제조예 및 실시예에 따른 준비된 추가 실시예를 나열한다. 나열된 모든 화합물은 단일 이성질체로서 제조하였다.

#	구조	분석데이터
13/1		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.15-1.25 (m, 4H), 2.35-2.50 (m, 5H, partially under solvent 신호), 2.80-2.91 (m, 1H), 3.11-3.20 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 6.72-6.81 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 7.40-7.51 (m, 2H), 7.52-7.60 (m, 2H), 7.62-7.66 (m, 2H), 7.85-7.90 (m, 2H). MS Calcd.: 583; MS Found: 584 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
13/2		^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.05-1.12 (m, 4H), 2.18-2.34 (m, 9H), 2.62-2.71 (m, 1H), 2.99-3.09 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 6.60-6.64 (m, 1H), 6.72-6.78 (m, 1H), 6.85 (s, 2H), 7.30-7.42 (m, 4H). MS Calcd.: 611; MS Found: 612 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
13/3		^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.10-1.23 (m, 4H), 2.36-2.49 (m, 3H), 3.00-3.12 (m, 1H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 4.95 (s, 2H), 6.72-6.80 (m, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.90-7.00 (m, 1H), 7.42-7.60 (m, 4H), 7.89-7.93 (m, 1H), 7.98 (s, 1H). MS Calcd.: 613; MS Found: 612 $[\text{M}-\text{H}]^-$.
13/4		^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.20-1.30 (m, 4H), 2.27 (s, 3H), 2.30-2.55 (m, 3H), 2.98-3.10 (m, 1H), 3.25-3.40 (m, 2H, partially under solvent 신호), 4.95 (s, 2H), 6.76-6.84 (m, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.20-7.25 (m, 1H), 7.43-7.63 (m, 4H), 7.75-7.82 (m, 1H), 8.03 (s, 1H). MS Calcd.: 597; MS Found: 596 $[\text{M}-\text{H}]^-$.
13/5		^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.20-1.25 (m, 4H), 2.33-2.43 (m, 4H), 2.46-2.56 (m, 2H), 2.88-2.97 (m, 1H), 3.22-3.30 (m, 2H), 4.94 (s, 2H), 6.78-6.82 (m, 1H), 6.90 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.43-7.60 (m, 4H), 7.69 (s, 1H), 7.78 (s, 1H). MS Calcd.: 597; MS Found: 596 $[\text{M}-\text{H}]^-$.
13/6		^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.17-1.23 (m, 4H), 2.31-2.40 (m, 4H), 2.42-2.50 (m, 2H), 2.83-2.92 (m, 1H), 3.19-3.26 (m, 2H), 4.92 (s, 2H), 6.74-6.80 (m, 1H), 6.88 (s, 1H), 7.19-7.22 (m, 1H), 7.43-7.57 (m, 4H), 7.83 (s, 1H). MS Calcd.: 597; MS Found: 598 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0257]



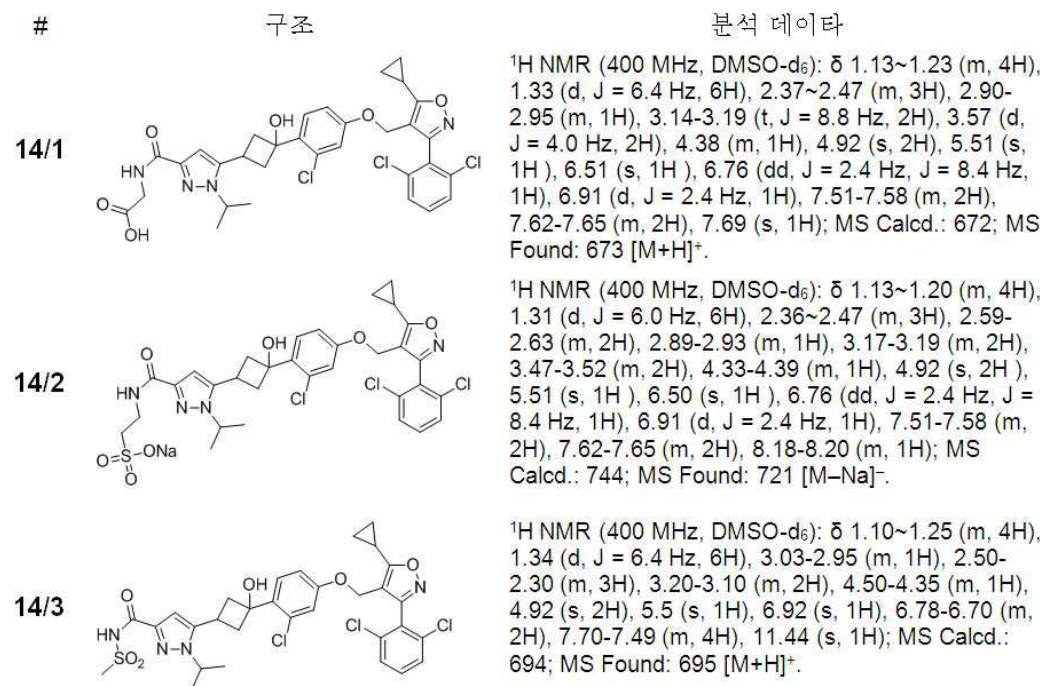
[0258]

[0259]

실시예 14/1 및 14/2

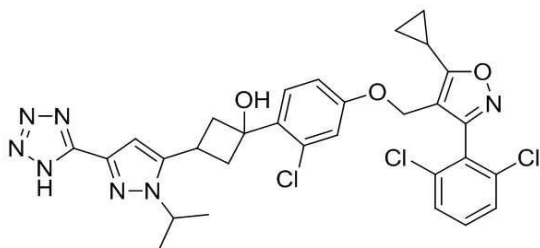
[0260]

실시예 1 내지 13 및 상기 반응식에서 설명한 바와 같은 유사한 방법을 사용하여 하기 화합물을 적합한 빌딩블록 사용에 의해 얻었다.



[0261]

[0262] 하기 화합물 상기에서 언급한 유사한 방법을 사용하여 같은 방식으로 제조하였다.



[0263]

[0264] 분석

[0265] FRET 활성분석

[0266] 핵 수용체 FXR에 대한 리간드 결합을 정량화하기 위해 리간드 매개된 보조인자 펩티드 상호작용의 측정을 하기
와 같이 수행하였다: 인간 FXR 알파 리간드 결합 도메인의 제조: 인간 FXR알파 LBD를 N-말단에 GST가 표시된 용
합 단백질로서 대장균(*E. Coli*) 균주 BL21(DE3)에서 발현시켰다. FXR 리간드 결합 도메인을 부호화하는 DNA를
pDEST15 벡터(Invitrogen)에 클로닝하였다. 발현은 IPTG로 유도되는 T7 프로모터의 제어하에 있다. 리간드 결
합 도메인의 아미노산 경계는 데이터베이스 항목 NM_005123(RefSeq)의 아미노산 187-472이다. FXR-LBD의 발현
및 정제: 형질전환된 대장균 균주의 밤새 예비배양을 LB-암피실린 배지에서 1:20으로 희석하고, OD₆₀₀=0.4-0.6의
광학 밀도가 되도록 30℃에서 증폭시켰다. 유전자 발현을 0.5 mM IPTG를 첨가하여 유도하였다. 대장균을 180
rpm, 30℃에서 6시간 동안 추가적으로 배양하였다. 대장균을 원심분리(7000 x g, 7분, 상온)로 수집하였다.
본래 대장균 배양의 리터당, 대장균을 10 ml 용해버퍼(lysis buffer)(50 mM 글루코오스, 50 mM 트리스 pH 7.9,
1 mM EDTA 및 4 mg/ml 라이소자임)에 재현탁하고 30분 동안 얼음에 방치하였다. 대장균을 초음파분해하고 대장
균 파편을 원심분리(22000 x g, 30분, 4℃)로 제거하였다. 상등액의 10 ml당 미리 세척된 0.5 ml의 글루타티온
4B 세파로스 슬러리(Qiagen)를 첨가하고 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 천천히 회전시켰다. 글루타티온 4B 세파
로스 비드를 원심분리(2000 x g, 15초, 4℃)로 펠렛하고 세척버퍼(25 mM Tris, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ 및 1M
NaCl)에서 2회 세척하였다. 펠렛을 본래 배양의 리터당 3 ml 용리버퍼(elution buffer)에 재현탁하였다(용리버
퍼: 20 mM 트리스, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 및 80 mM 글루타티온을 가루로서 사용하기 전에 즉시 첨가). 현탁액
을 4℃에서 15분 동안 회전하도록 방치하고, 비드를 첫번째 보다 용리버퍼의 절반 부피로 다시 펠렛 및 용리하
였다. 용출물을 모으고 1 mM 디티오프라이톨(dithiothreitol) 및 10%(v/v) 글리세롤뿐만 아니라 60 mM KCl, 5
mM MgCl₂을 포함하는 20 mM 헤페스 버퍼(pH 7.5)에서 밤새 동안 투석(dialysed)하였다. 단백질을 SDS-페이지
(SDS-Page)로 분석하였다.

[0267] 상기 방법은 FXR 리간드 결합 도메인(LBD)이 발현되는 정제된 대장균과 SRC-1(LCD2, 676-700)의 잔기 676-
700에 기반한 합성 바이오틴화된 펩티드 사이의 상호작용을 조절하는 것으로 추정되는 리간드의 능력을 측정하
다. 사용된 펩티드 서열은 N-말단이 바이오틴화(B)된 B-CPSSSSLTERHKILHRLQLQEGSPS-COOH이었다. FXR의 리간드
결합 도메인(LBD)은 pDEST15 벡터를 사용하여 BL-21 대장균에서 GST를 갖는 융합 단백질을 발현되었다. 대
장균을 초음파 분해에 의해 용해시키고 융합 단백질을 제조업체의 지침에 따라 글루타티온 세파로스(Pharmaci
a)로 정제하였다. FXR-펩티드 상호작용에 대한 자체의 영향을 위한 화합물의 스크리닝을 위해서, 퍼킨 엘머 란
세(Perkin Elmer LANCE) 기술이 적용되었다. 상기 방법은 주개로부터 관심있는 결합 파트너에 부착된 받개
(acceptor)의 형광단으로 결합에 따른 에너지 전달에 의존한다. 취급의 용이성 및 화합물 배경(background)의
감소를 위해서, 형광 란세 기술은 일반적 형광단 표시(generic fluorophore labels)를 사용하게 하고 시간분해
(time-resolved) 검출분석은 GST에 융합된 20-60 ng/well의 재조합적으로 발현되는 FXR-LBD, 즉 SRC1 아미노산
676-700, 200 ng/well 스트렙타비딘-xIAPC 접합체(Prozyme) 및 6-10 ng/well Eu W1024-항GST(Perkin Elmer)를
대표하는 200-600 nM의 N-말단에 바이오틴화 된 펩티드를 포함하는 트리스-기반 버퍼(20 mM 트리스-HCl pH 7.5;
60 mM KCl, 5 mM MgCl₂; 35 ng/μl BSA)가 있는 384 웰 플레이트의 25 μl의 최종 볼륨에서 수행되도록 하게
한다. 시료의 DMSO 함유량은 1%에서 유지되었다. 분석 혼합 생성과 잠재적인 FXR 조절용 리간드를 희석한 후
에, 상기 분석을 어두운 상온에서 1시간 동안 FIA-플레이트 블랙 384 웰(Greiner)에서 평형시켰다. 란세 신호

는 퍼킨 엘머 VICTOR2VTM 다표시 계측기(Perkin Elmer VICTOR2VTM Multilabel Counter)에 의해 검출되었다. 결과를 665 및 615 nm에서 발광된 빛 사이의 비율을 도표화하여 육안으로 보았다. FXR-펩티드 형성의 기저 수준은 첨가된 리간드 부재에서 관찰되었다. 복합체 형성을 증진시키는 리간드는 시간분해 형광신호(time-resolved fluorescent signal)에서 농도-의존적 증가를 유도한다. 단량체 FXR 및 FXR-펩티드 복합체 모두에 동등하게 잘 결합하는 화합물은 신호에서 어느 변화도 주지않는 것으로 예상되고, 반면에 단량체 수용체에 우선적으로 결합하는 리간드는 관찰된 신호에서 농도-의존적 감소를 유도하는것으로 예상된다.

[0268] 화합물의 억제 잠재성을 평가하기 위하여, EC₅₀-값을 하기의 표1에서 열거된 바와 같이 실시예 화합물을 위해 측정하였다(A = EC₅₀ < 25 nM; B = 25 = EC₅₀ < 100 nM; C = EC₅₀ = 100 nM).

표 1

[0269]

군	실시예 #
A	4, 8, 10, 13/8, 13/9, 14/1, 14/2
B	1, 2, 5, 6, 8A, 13/1, 13/3, 13/4, 13/5, 13/7
C	13/2, 13/6

[0270] 포유류 1 하이브리드(M1H) 분석(Mammalian one hybrid (M1H) assay)

[0271]

리간드 결합이 매개된 FXR 활성을 정량화하게 위해서, 리간드 매개된 Gal4 프로모터(promoter)에 의해 움직이는 전사촉진의 측정을 하기와 같이 실행하였다. FXR 리간드 결합 도메인을 부호화하는 cDNA 부분을 벡터 pCMV-BD(Stratagene)로 클로닝하여CMV 프로모터의 제어하에서 효모 GAL4 DNA 결합 도메인에 융합시켰다. 리간드 결합 도메인의 아미노산 경계는 데이터베이스 항목 NM_005123(RefSeq)의 아미노산 187-472이었다. 플라스미드 pFR-Luc(Stratagene)는 효모 GAL4 결합 부위에 5개의 일렬반복을 갖는 합성 프로모터를 포함하고, 정보제공 유전자(reporter gene)로서 포티누스 피칼리스(Photinus pyralis (미국 반딧불)) 루시페라제 유전자(luciferase gene) 발현을 움직이는 정보제공 플라스미드로 사용되었다. 실험적 정확성을 향상시키기 위해서, 플라스미드 pRL-CMV(Promega)를 동시 형질전환시켰다. pRL-CMV는 레닐라 레니포르미스(Renilla reniformis) 루시페라제 발현을 제어하는 구성 CMV 프로모터를 포함한다. 모든 Gal4 정보제공 유전자 분석은 37°C, 5% CO₂에서 10% 소 태아혈청, 0.1 mM 비필수아미노산, 1 mM 피루브산나트륨(sodium pyruvate) 및 mL당 100 단위 페니실린/스트렙타 비딘이 보충되는 얼'스 BSS(Earle's BSS)와 L-글루타민이 있는 MEM에서 배양된 HEK293 세포에서 실행되었다 (DSMZ로부터 구입, Braunschweig, Germany). 배지 및 보충제 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 구입하였다. 분석을 위해서, 96웰 플레이트에서 페놀 레드 및 L-글루타민 없이 10% 쏫/텍스트란이 처리된 FBS (HyClone, South Logan, Utah), 0.1 mM 비필수아미노산, 2 mM 글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 및 mL당 100 단위 페니실린/스트렙타비딘이 보충되는 얼'스 BSS를 갖는 MEM 100μl(웰당)로서 웰당 5 x 10⁵ 세포를 깔고 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 다음날, 세포는 90% 이상의(>90%) 치밀함을 나타내었다. 배지를 제거하고 세포를 상기에서 설명된 3개의 플라스미드를 포함하여 웰당 20μl의 옵티MEM, 폴리에틸렌-이민(polyethylene-imine)에 기반하는 형질전환-시약(OptiMEM, Invitrogen; 폴리에틸렌이민, Aldrich 카탈로그 번호. 40,827-7)을 사용하여 형질전환시켰다. 깔려진 세포에 사용된 것과 동일한 조성을 갖는 MEM을 형질전환 혼합액 첨가 후 2-4시간에 첨가하였다. MEM에 미리 희석된 화합물 원료를 첨가하였다(최종 비히클 농도는 0.1%를 넘지 않음). 세포를 추가적으로 16시간 동안 배양한 후, 반딧불 및 레닐라 루시페라제 활성을 이중-빛-루시페라제 분석(Dual-Light-Liciferase Assay)시스템을 사용하여 동일한 세포 추출물에 연속적으로 측정하였다(Dyer et al., Anal. Biochem. 2000, 282, 158-161). 모든 실험을 3회씩 측정하였다.

[0272] 실시예 화합물의 FXR 효능제 잠재성을 평가하기 위하여, 잠재성 범위를 하기의 표2에 열거한 M1H 분석으로 측정하였다(A = EC₅₀ < 25 nM; B = 25 = EC₅₀ < 100 nM; C = EC₅₀ = 100 nM).

표 2

[0273]

군	실시예 #
A	13/4, 13/5, 13/6
B	2, 8, 8A, 10, 13/1, 13/3, 13/7
C	1, 4, 5, 6, 13/2, 13/8, 13/9, 14/1

[0274]

수용해도 분석(Aqueous solubility assay)

[0275]

PBS, pH 7.4에서 수용해도를 하기과 같이 측정하였다. DMSO내 10 mM 화합물 원료 용액을 PBS(pH 7.4)에 첨가하여 200 μ M의 이론적 최종 농도가 되게 하였다. 얻어진 용액/현탁액을 1시간 동안 1250 rpm에서 진탕한 후 23시간 동안 어두운 상온에 저장하였다. 임의 침전물을 30분 동안 3900rpm에서 원심분리에 의해 용액으로부터 분리하였다. 수용해도는 유기 용매(메탄올/물 60:40, v/v)의 표준교정(calibration standard(200 μ M))에 있는 주요 피크의 피크면적과 버퍼 시료에 있는 해당 피크의 피크 면적을 비교하여 결정하였다. 검출 방법으로서 230 nm에서 HPLC-UV/VIS를 사용하였다.

[0276]

평행 인공 멤브린 투과 분석(Parallel Artificial Membrane Permeation Assay(PAMPA))

[0277]

PAMPA를 위해서, 테스트 품목의 5 mM 원료용액을 DMSO에서 제조하였다. 참고 품목의 5 mM 원료 용액을 각각 EtOH (카르바마제핀(carbamazepine), 구아나벤즈(guanabenz)) 또는 EtOH:H₂O 1:1 (v/v) (세프트리악손(ceftriaxone))에서 제조하였다. 화합물을 PBS(pH 7.4)에서 희석하여 각각 5%의 관련 유기 용매 및 250 μ M 참고 화합물 또는 10 μ M 테스트 품목을 포함하는 출발 용액을 얻었다. 분석을 위해서, 칸시외 다수(Kansy et al., J. Med. Chem. 1998, 41, 1007)에 의해 설명된 PAMPA의 변경된 절차를 사용하였다. 저(세프트리악손), 중간(구아나벤즈) 및 고투과성(카르바마제핀)을 위한 참고 화합물을 내부 대조군으로서 포함하였다.

[0278]

투과 실험은 96-웰 다중스크린 고정(받개)에 의해 덮혀있는 다중스크린 96 웰 트레이(주개)에서 수행하였다. 고정 플레이트의 소수성 여과기 물질을 70% 에탄올로 미리 젖게하고 지질용액(도데칸에 용해된 레시틴)으로 처리하였다. 주개 플레이트를 테스트 화합물 및 참고 화합물로 채우고 두 플레이트 모두를 서로에 삽입하고 100 rpm에서 15분 동안 진탕기 상에 두었다. 이동 연구(transport study)는 테스트 및 참고 화합물을 포함하는 150 μ L PBS-버퍼를 주개 플레이트에 적용하여 시작하였다. 상온에서 15-16시간의 확산후에, 받개 및 주개 플레이트의 함유물을 수집하고 LC/MS-검출(테스트 품목) 또는 스펙트라마क्स 플러스³⁸⁴ (Spectramax Plus³⁸⁴ (Molecular Devices))(참고 품목)를 사용한 UV 분광기에 의해 정량화하였다. 참고 품목인 세프트리악손, 구아나벤즈 및 카르바마제핀에 대한 최대 흡수는 각각 240 nm, 270 nm 및 286 nm이었다. 회수 시료는 투과 분석 시료에 대해 설명한 바와 같이 제조하였고 동일한 조건하에서 투과기간 동안에 대표 바이알에서 배양하였다.

[0279]

테스트 품목의 LC/MS 분석을 위하여, 100 μ L 배양물을 받개 및 주개 구획으로부터 제거하고 하기에 설명한 바와 같이 아세토니트릴(ACN) 침전을 진행하였다. 추가적으로, 지질층으로부터 테스트 품목 시료를 150 μ L EA로 각 웰을 2회 씻어내어 추출하였다. 용액을 1.5 mL 반응 튜브에 수집하고 용매를 증발시켰다. 건조된 잔류물을 받개 및 주개 시료(즉, 5% DMSO가 보충된 100 μ L 버퍼, 200 μ L ACN+ISTD)의 조성을 반영하는 PBS/DMSO/ACN 혼합물에서 재현탁하였다. 각 시료의 최종 용매 함유물은 66% ACN이었다.

[0280]

주개 및 받개 구획 및 표준교정으로부터의 시료를 각각 200 μ L ACN/ISTD 또는 400 μ L ACN/ISTD 첨가에 의해 침전을 시켰다. 격렬하게 흔들고(10초) 원심분리(4800 x g에서 5분, 상온)후에, 입자 없는 상등액을 LC-MS/MS에

도입하였다. 멤브린 구획을 상기에서 설명한 바와 같이 추출하였다. 재구성 후에, 시료를 격렬하게 흔들고(10 초) 스피ندا운하였다(4800 x g에서 5분, 상온). 입자 없는 상등액을 LC-MS/MS에 도입하였다.

[0281] 본 발명에 따른 화합물 분석을 위하여, HPLC 시스템을 아셀라 U-HPLC 펌프(Accela U-HPLC pump) 및 아셀라 자동 시료기(Thermo Fisher Scientific, USA)로 구성하였다. 질량분광법은 PC를 움직이는 표준 소프트웨어 X칼리버 2.1에 연결된 가열된 전기분무(H-ESI2) 접촉면(electrospray interface)(Thermo Fisher Scientific, USA)으로 설치된 대표 질량분광계(Exactive mass spectrometer)(정확한 질량을 갖는 오비트랩(orbitrap) 기술) 상에서 수행하였다.

[0282] LC를 유기층 (A)로서 ACN/0.1% 포름산 및 수층 (B)로서 10 mM 암모늄포르메이트/0.1% 포름산을 사용하여 변화하는 방식(표 3)으로 수행하였고 펌프 유속량을 500 μl /분으로 설정하였다. 분리는 전처리(pre)-컬럼(Gemini C6-Phenyl, 3 μm , 4x2.0 mm)과 같이 제미니 C6-페닐(Gemini C6-Phenyl), 3 μm , 50x2.0 mm(Phenomenex, Germany) 분석 컬럼상에서 수행하였다.

표 3

HPLC 변화

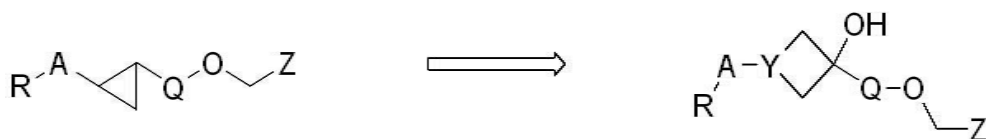
유동층	0 분	0.1 분	1.2 분	2.6 분	2.7 분	3.5 분
A (%)	5	5	97	97	5	5
B (%)	95	95	3	3	95	95

[0283]

[0284] MS 조율 파일로서, 일반적인 조절 파일은 양성적 또는 음성적 이온 방식을 적용하여 모든 분석체에 대해서 사용되었다. 내부 질량표준화에 대한 잠금 질량(lock mass)으로서 용매 시스템에 편재하는 디이소옥틸 프탈레이트(diisooctyl phthalate)(m/z 391.28429)의 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 이온을 사용하였다.

[0285] 분석물은 단동위원소(monoisotopic) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 또는 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 이온의 예상되는 질량주위의 스캐닝 $\pm$ 톱슨에 의하여 획득되었다. 오비트랩의 질량 해상도를 50,000으로 설정하였다. 각 분석물의 정확한 질량은 피크 통합을 위해 사용되었다. 추가적으로 기계 설정은 하기와 같았다. HCD-가스 꺼짐, AGC 고 다이내믹 범위, 최대 트랩 주입 시간 100 ms, 차단 가스 30, 보조 가스 8, 청소 가스 2, 분무 전압 4 kV, 모세관 온도 250 $^{\circ}\text{C}$, ESI 2 가열기 온도 250 $^{\circ}\text{C}$.

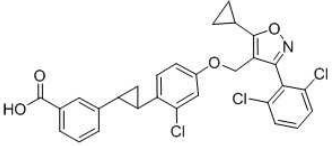
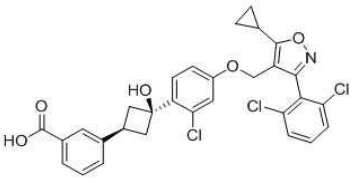
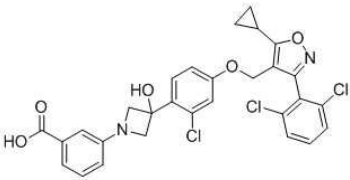
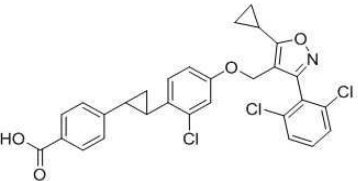
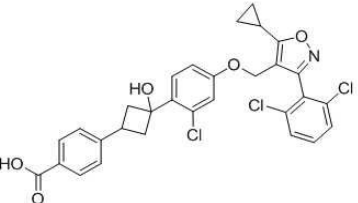
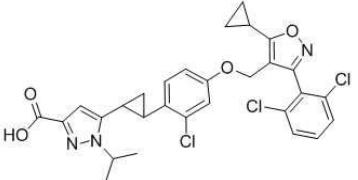
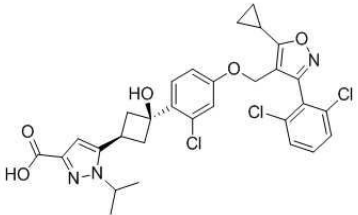
[0286] 본 발명의 목적은 WO 제2011/020615호에서 청구된 화합물과 비교하여 향상된 물리화학적 성질을 갖는 FXR-효능제를 생산하는 것이다. 상기는 전자의 1,2-사이클로프로필렌 고리를 대체하는 1,3-사이클로부타디엔 또는 1,3-아제티딘리덴기 상에 폴라 하이드록실기를 도입하여 달성시킬수 있다.



[0287]

[0288] 놀랍게도, 생성된 화합물은 FXR 수용체상에서 자체의 활성을 유지하나, 높은 수용해도 및/또는 멤브린 투과성과 같은 향상된 물리화학적 성질을 나타냈다. 두 개의 일련의 해당 화합물의 직접적 비교를 표 4에 나타냈다.

표 4

	구조	수용해도 (PBS, pH 7.4)	PAMPA, *유속 %에서 멤브린 투과도	clogD (캠엑손(ChemAxon) 소프트웨어)
		20 μ M	13.6	5.1
		192 μ M	24.0	4.4
		195 μ M	n.d.**	4.4
[0289]				
		72 μ M	20.7	5.2
[0290]				
		192 μ M	21.1	4.5
[0291]				
		158 μ M	28.9	4.2
[0292]				
		171 μ M	46.1	3.5

* 유속 (%) = (c 수용체 웰) / 합계 (c 기증체 웰 + c 수용체 웰) $\times$ 100 $\times$ 2

** n.d. = 결정되지 않음

[0293]

- [0294] 각각의 수용해도 또는 PAMPA 멤브린 투과도의 경우이거나 또는 모두는 하이드록시-사이클로부틸 또는 하이드록시-아제티딜 부분의 도입에 의해 상당히 개선되었다. 대부분 핵 수용체 활성 분자와 같이, FXR 효능제는 일반적으로 매우 친지질성이다(M. L. Crawley, Expert Opin. Ther. Patents 2010, 20, 1047). 따라서, 더 나은 수용해도 및 PAMPA 멤브린 투과성은 높은 경구 생체이용률 및 의약으로서 상기 화합물의 임상적 발달을 위한 일반적으로 더 나은 적합성의 결과를 나타낼 것으로 예상된다(L. Huang, J. Dong, S. Karki 예비임상적 발달을 위한 의약 후보들의 평가(Eds. C. Han, C. B. Davis, B. Wang), Wiley & Sons, Hoboken 2010, 187-217).