(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0023576
(43) 공개일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 498/18 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/436 (2006.01) *A61K 31/663* (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01) *A61P 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 498/18 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0103957
(22) 출원일자 2019년08월23일
심사청구일자 2020년08월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
류재상
서울특별시 강남구 삼성로 150, 211동 1208호(대치동, 한보미도맨션)
박윤정
서울특별시 성북구 숭인로 50, 114동 703호 (길음동, 래미안길음센터피스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

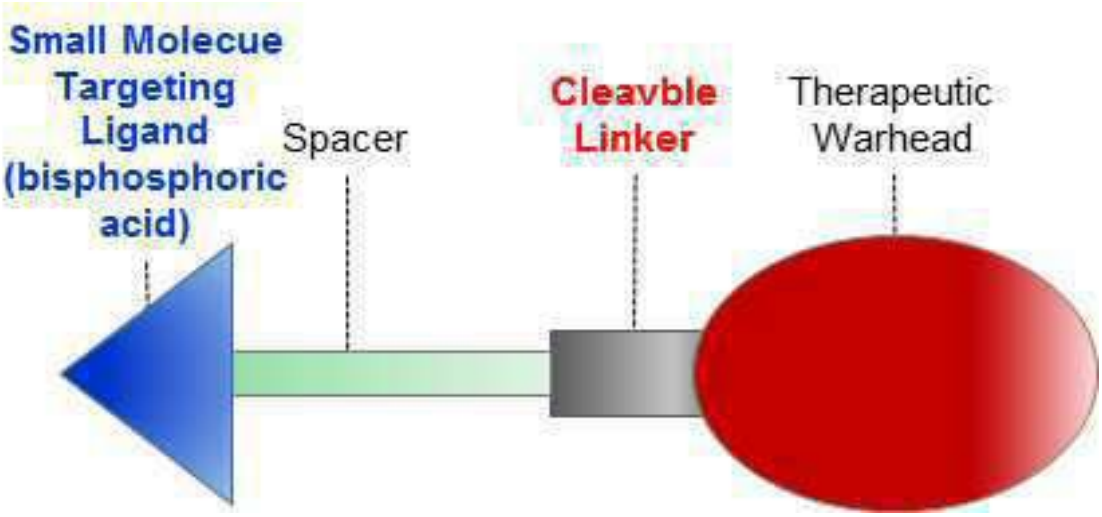
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **신규 mTOR 억제제 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 신규 mTOR 억제제 화합물은 뼈에 대하여 선택적으로 약물 전달이 가능하며 뼈에서 오랜 기간 서서히 방출될 수 있도록, 골 지향성 리간드를 mTOR 억제 뼈 질환 치료제에 연결한 표적지향성 화합물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/436 (2013.01)
A61K 31/663 (2013.01)
A61K 47/55 (2017.08)
A61P 19/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)

(72) 발명자
이소윤
부산광역시 부산진구 백양관문로 115, 104동 906호(당감동, 당감동일스위트)
이지선
서울특별시 서대문구 통일로 332, 302동 1004호(홍제동, 홍제청구3차아파트)
알리스테어 로버트 사드라
강원도 춘천시 삭주로70번길 29(교동)
허성오
강원도 춘천시 신동면 풍류1길 84-8
비네이 두베이
강원도 춘천시 성심로 12(교동) , 102호
유동관
경기도 성남시 분당구 양현로 272, 306동 1901호(야탑동, 기산아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082388
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업/ 바이오·의료기술개발사업/ 신약 성능 플랫폼 기술개발
연구과제명	골 종양 치료활성을 갖는 표적지향성 시롤리무스 접합체 개발연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2017.04.01 ~ 2020.03.31

명 세 서

청구범위

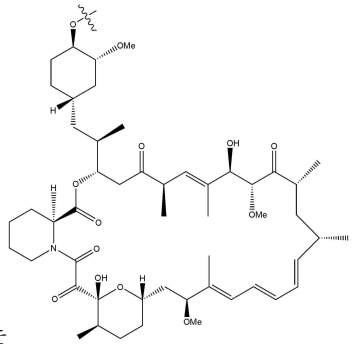
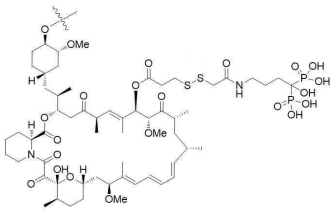
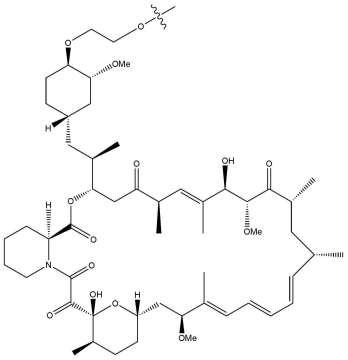
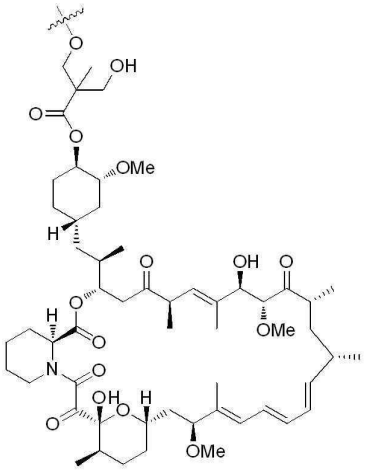
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염:

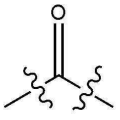
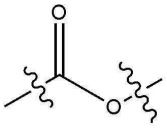
[화학식 1]

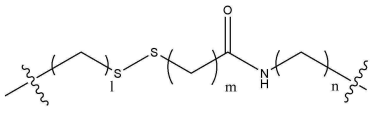
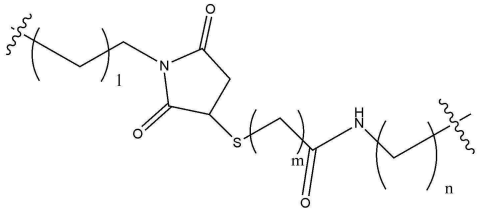
A-B-C-D

식 중에서

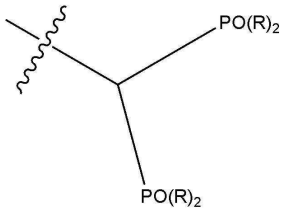
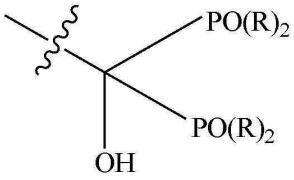
A는 , ,  및 

으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

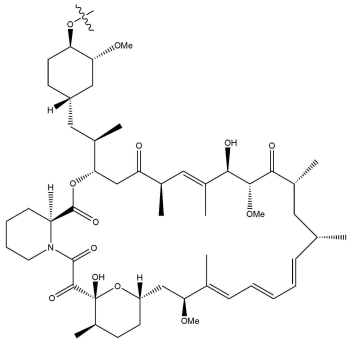
B는  또는  이고,

C는  또는  로서,

l, m n은 각각 1 내지 5 중 어느 하나의 정수이고,

D는  또는  이며, R은 OZ이며, Z는 탄소 수 1 내지 3개의 알킬 또는 알킬렌이다.

청구항 2

제1항에 있어서, A는  인 것인, 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서, A는 시롤리무스, 에베롤리무스 및 템시롤리무스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서, B는 산에 의해 분해되는 링커인 것인, 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서,

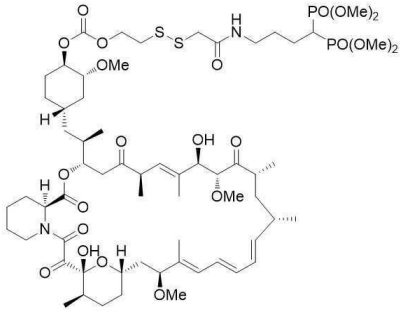
l, m은 1 또는 2이고,

n은 1 내지 3중 중 어느 하나의 정수인 것인, 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염.

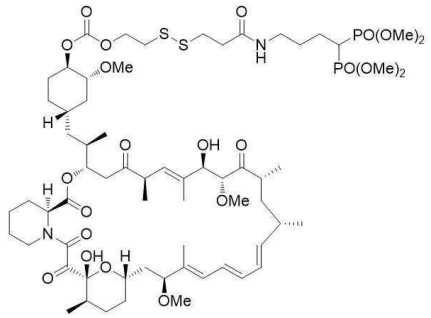
청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염:

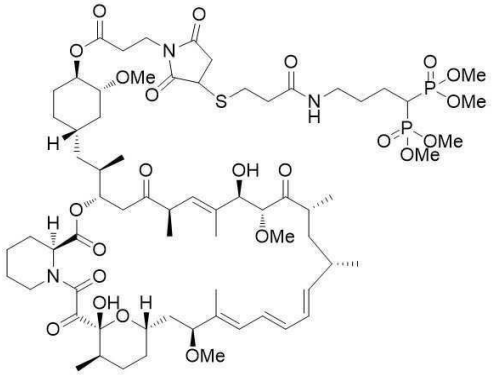
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 뼈 질환은 골다공증, 골수염, 골연화증, 암세포의 골전이에 의한 골 손상, 골육종, 다발성 골수종, 골 전이성 전립성암, 추간판 탈출증, 섬유성 골이형성증, 클리펠-파일 증후군 및 낭성 섬유뼈염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뼈 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 mTOR 억제제 화합물 및 그 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골육종(osteosarcoma, OS)은 어린이와 젊은 성인에서 가장 흔한 원발성 악성 신생물이며 높은 국소 공격성과 높은 전이성을 특징으로 한다. 골육종의 치료율은 진단 당시 전이가 동반될 때 약 25%이며, 이는 지난 20년 동안

거의 정체 상태에 있어 왔다.

[0003] 다발성 골수종 (Multiple myeloma, MM)은 두 번째로 흔한 파괴적인 클론 혈장 세포 악성 종양으로서 5 년 생존율이 45%에 불과하며 골수에서 발생한다. 새로운 면역 조절 약물과 프로테아좀 억제제의 도입을 포함하여 지난 30년 동안 많은 새로운 약리학적 전략이 개발되었지만 다발성 골수종은 여전히 불치의 상태로 남아 있다.

[0004] 골 전이성 전립선암은 가장 흔한 암으로 서양 남성의 암 관련 사망 원인 중 2 위를 차지하며 2008년에는 903,500건의 새로운 진단과 258,400건의 사망을 기록했다. 전립선암 발병 사례의 대다수는 질병에 대한 예후는 양호하지만, 일단 전이성 병기로 발전되면 사실상 치료가 불가능하다. 골전이성 전립선 암은 뼈로 전이되는 주요 암종으로 분류되며, 전립선 암환자의 약 75%가 골 전이를 경험하게 된다.

[0005] 상기 골육종, 다발성 골수종, 골 전이성 전립선 암과 같은 뼈 질환을 치료하기 위하여 다양한 연구가 수행되어 왔으며, 그중에서도 mTOR 억제제는 세포 성장과 증식을 억제함으로써 골육종에서 항종양 효과를 나타내며 골육종 환자의 생존율을 향상시킨다는 점이 밝혀졌다.

[0006] 다양한 골 질환 치료제가 연구되고 사용되어 왔으나, 메토트렉세이트, 독소루비신(아드리아마이신), 시스플라틴, 에피루비신, 이포스파마이드, 사이클로포스파마이드, 이토포사이드, 젬시타빈 및 토포테칸과 같은 약물들은 뼈 침투력이 약해 고용량으로 사용되며 이는 골수에 영향을 주어 백혈구 레벨을 낮춰 2차 감염을 유발하는 등의 부작용이 나타났으며, 멜팔란, 빈크리스틴(온코빈), 사이클로포스파마이드(시톡산), 이토포사이드(VP-16), 독소루비신(아드리아마이신), 리포솜 독소루비신(독실) 및 벤다무스틴(트레안다)와 같은 약물들 은 암세포뿐 아니라 정상세포들도 영향을 주어 머리카락 소실, 구강자극, 식용부진, 구토, 구역질, 면역력 저하 등의 부작용이 매우 심각하다는 문제를 내포하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 발명자들은 뼈로만 선택적으로 약물 전달이 가능하며 뼈에서 오랜 기간 서서히 방출되는 새로운 약물 전달 플랫폼을 가진 약물의 필요성을 느껴, 골 지향성 리간드를 mTOR 억제 뼈 질환 치료제에 연결한 표적지향성 화합물을 개발하여 기존 뼈 질환 치료제의 문제점을 해결하였다.

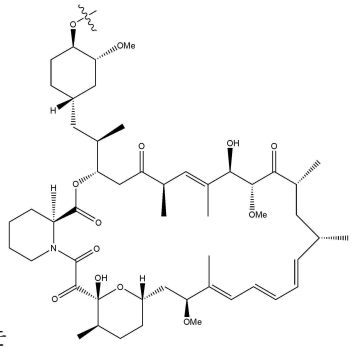
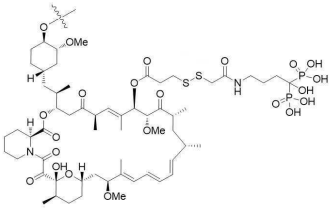
과제의 해결 수단

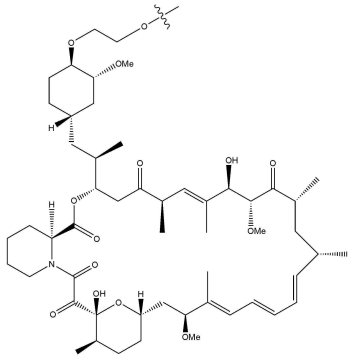
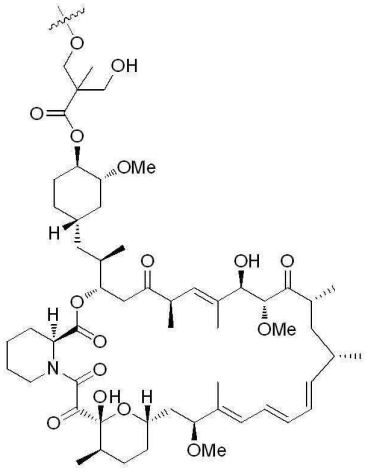
[0008] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

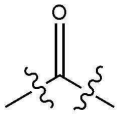
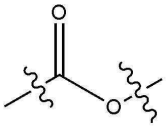
[0009] [화학식 1]

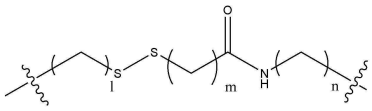
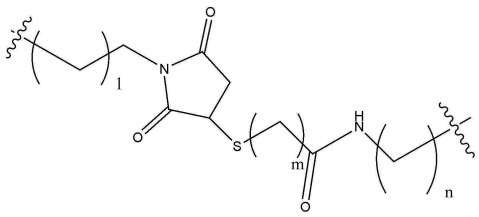
[0010] A-B-C-D

[0011] 식 중에서

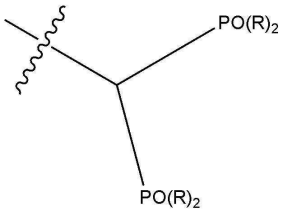
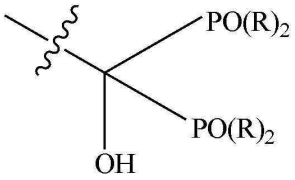
[0012] A는  ,  ,

[0013]  및  으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

[0014] B는  또는  이고,

[0015] C는  또는  로서,

[0016] l, m n은 각각 1 내지 5 중 어느 하나의 정수이고,

[0017] D는  또는  이며, R은 -OZ이며, Z는 탄소 수 1 내지 3개의 알킬 또는 알킬렌이다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 화합물 구조가 수행하는 역할에 대한 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 시롤리무스 화합물이 RPMI8226 세포에서 내인성mTORC 경로를 저해하는 정도를 확인하기 위해 인산화 S6 단백질의 웨스턴 블랏 실험을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 플레이트 웰을 세척하고 결합된 FITC-접합 알렌드로네이트를 흡광도로 그 양을 나타낸 것이다.

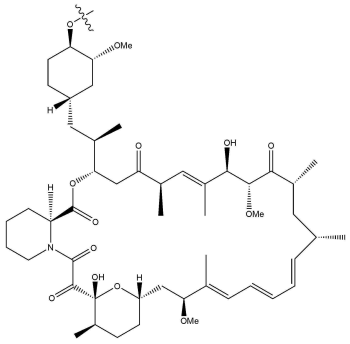
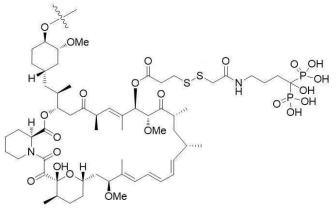
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

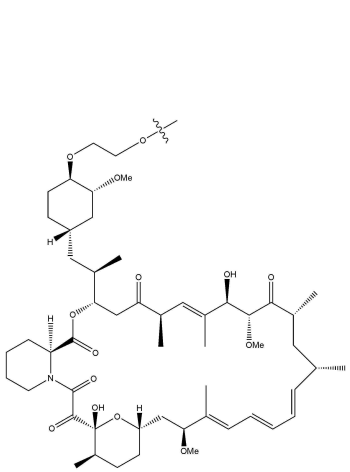
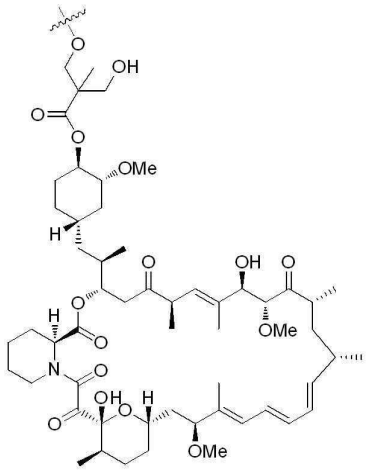
[0022] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

[0023] [화학식 1]

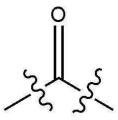
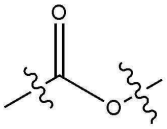
[0024] A-B-C-D

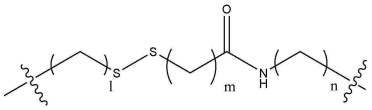
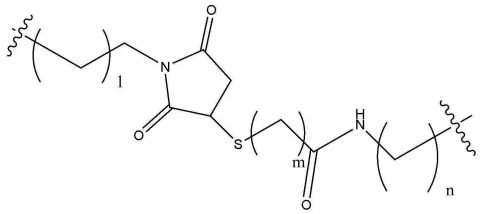
[0025] 식 중에서

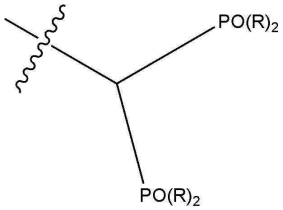
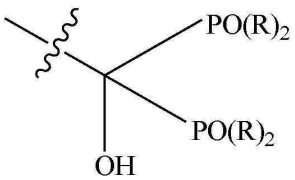
[0026] A는  ,  ,

[0027] 및 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고,

[0028] B는  또는  이고,

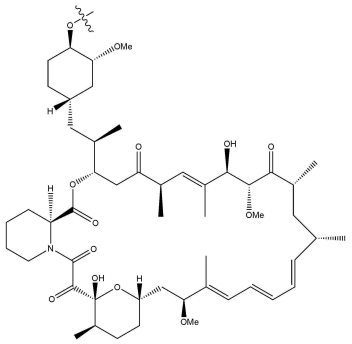
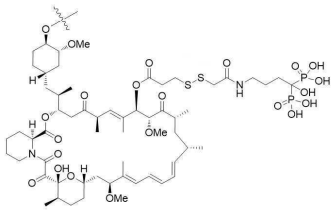
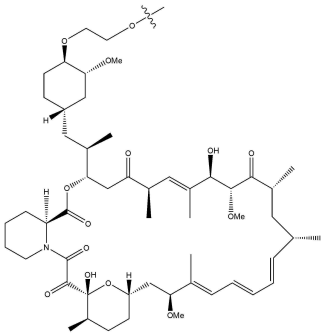
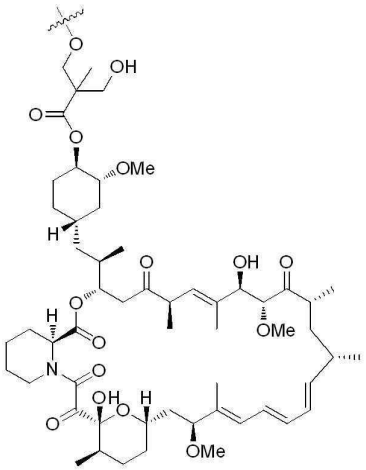
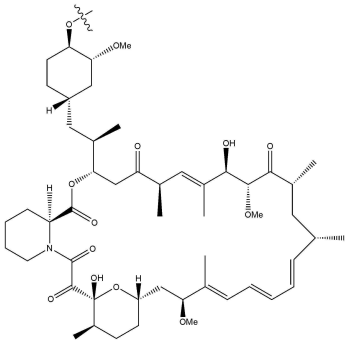
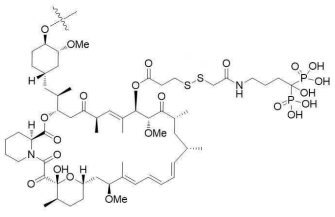
[0029] C는  또는  로서, l, m n은 각각 1 내지 5 중 어느 하나의 정수이고,

[0030] D는  또는  이며, R은 -OZ이며, Z는 탄소 수 1 내지 3개의 알킬 또는 알킬렌이다.

[0031] 본 발명에서, 탄소 수 1 내지 3개의 알킬은 예를 들어 메틸, 에틸, 프로필일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서, 탄소 수 1 내지 3개의 알킬렌은 이중결합을 가지는 탄화수소이다. 예컨대, 에틸렌, 프로필렌 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

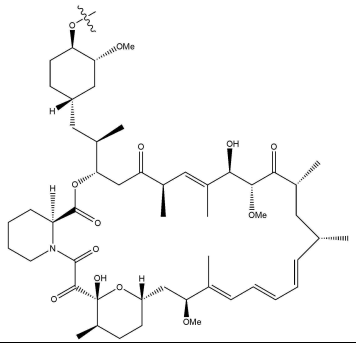
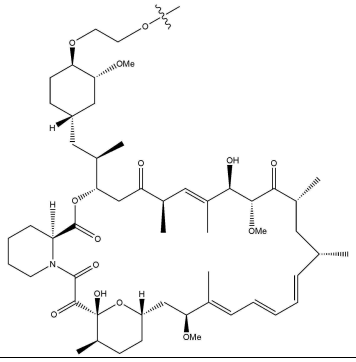
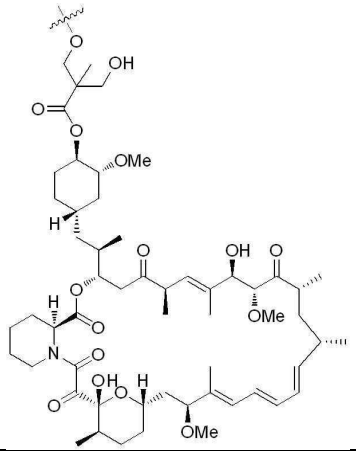
[0033] 본 발명에서, 상기 A는 뼈 질환 치료제에 해당하는 화학구조를 의미한다. 상기 골질환 치료제는 바람직하게는 mTOR 억제제일 수 있다. 상기 mTOR는 내부 및 외부 세포 신호를 모두 전달함으로써 영양소 및 에너지의 센서 역할을 수행하는 물질을 의미하며, 정상세포 및 암세포 모두에서 단백질 합성 및 광범위한 세포 생물학적 활성을 제어한다. 본 발명의 mTOR 억제제는 mTOR를 억제하여 뼈 질환을 발생시키는 악성 세포의 증식 등을 방지하는 역할을 수행한다.

[0034] 상기 A는 바람직하게 A는 , , , 및 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 구체적인 일 실시예에서, 상기 A는  또는  일 수 있다.

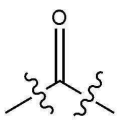
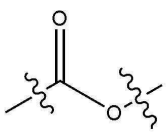
[0035] 상기 A는 하기 시롤리무스(=라파마이신), 에베롤리무스 및 템시롤리무스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다. 상기 시롤리무스, 에베롤리무스 및 템시롤리무스와 대응되는 화학구조를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0036]

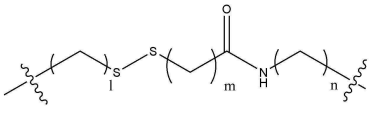
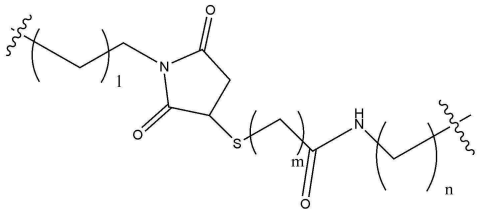
작용기의 명칭	화학구조
시롤리무스(=라파마이신)	
에베롤리무스	
템시롤리무스	

[0037] 본 발명에서, 상기 B는 산분해성 링커에 해당하는 화학구조를 의미한다. 산분해성 링커는 산에 의해 분해되어 표적에서 치료제를 방출할 수 있는 연결체를 의미한다. 종양의 뼈 전이가 일어났을 때 종양 전이 조직의 산 - 염기 균형이 깨지며 파골 세포가 양성자와 산성 가수분해 효소를 골 흡수 부위로 분비하여 뼈 기질의 무기질과 유기질이 소화된다. 이때 pH 값은 뼈 흡수 미세 환경에서 4.5로 감소한다. 상기 산 분해성 링커는 혈액의 중성 pH에서 안정하게 유지되도록 특별히 고안되었으며, 세포 구획의 산성 환경에서 가수 분해를 거쳐 뼈 질환 치료제를 방출한다는 점에서 기술적 특징이 존재한다.

[0038] 상기 B는 바람직하게는  또는  일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 산성 조건에서 분해될 수 있는 임의의 적절한 산분해성 링커가 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에서, 상기 C는 스페이서(Spacer)에 해당하는 화학구조를 의미한다. 스페이서는 약물 전달 화합물이 표적 리간드에 직접 근접하여 치료약물을 부착시키면 약물이 수용체에 결합하는 것이 방해될 수 있으므로, 표적지향성 리간드와 치료약물 사이에 삽입되어 입체적 장애를 회피하도록 설계된 화학구조를 의미한다. 상기 스페이서는 접합체가 수용체에 결합하는 것에 영향을 줄 뿐 아니라, 표적이 아닌 대상에 대한 비특이적 흡착에도 영향

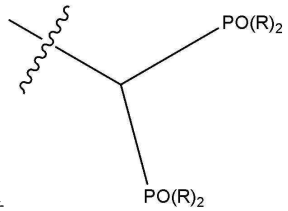
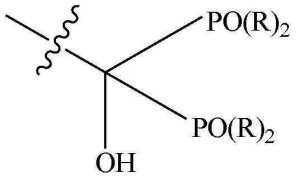
을 미친다. 상기 스페이서는 종양세포로의 침투, 대사, 배설 등 약동학 및 약력학에 영향을 줄 수 있기 때문에 스페이서 디자인은 접합체의 성능과 성공 여부에 큰 영향을 준다.

[0040] 상기 C는 바람직하게는  또는  로서, l, m n은 각각 1 내지 5 중 어느 하나의 정수일 수 있다.

[0041] 구체적인 일 실시예에서, 상기 l, m은 1 또는 2이고, n은 1 내지 3중 중 어느 하나의 정수인 것일 수 있다.

[0042] 본 발명에서, 상기 D는 비스포스포네이트(Bisphosphonate)에 해당하는 화학구조를 의미한다. 상기 비스포스포네이트 화학구조는 공통적으로 2개의 PO_3 작용기가 하나의 탄소와 공유결합으로 연결되어 있다는 점을 구조적 특징으로 한다. 바람직하게 상기 D에서 R은 -H, -OH 또는 -OZ이며, Z는 메틸 일 수 있다. 상기 비스포스포네이트는 광물화 뼈 매트릭스에 결합할 수 있고, 골 매트릭스에서 종양 형성을 억제하며, 전구 세포로부터 파골 세포가 생성되며, 혈관 형성을 억제 할 수 있으며, 파골 세포와 종양 세포의 세포사멸(apoptosis)을 일으킬 수 있다.

[0043] 따라서 상기 비스포스포네이트는 골수종, 골다공증, 뼈 전이 및 기타 뼈 관련 질환을 치료하는 데 사용될 수 있으며, 종양 조직의 혈관 신생을 억제할 수 있으며, 뼈와 강한 결합력과 친화력을 나타낸다. 이에 따라, 비스포스포네이트는 뼈를 표적으로 하는 치료를 위한 우수한 리간드로 사용될 수 있다.

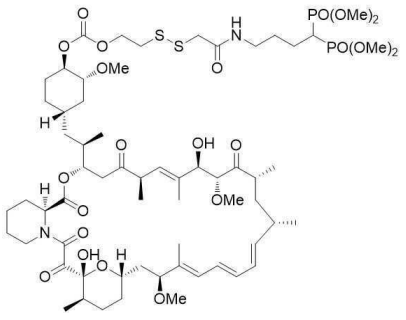
[0044] 상기 D는 바람직하게는  또는  이며, R은 -OZ이며, Z는 탄소수 1 내지 3개의 알킬 또는 알킬렌이나, 이에 제한되는 것은 아니며 원하는 치료효과에 따라 적절한 임의의 비스포스포네이트가 사용될 수 있다.

[0045] 상기 임의의 비스포네이트는 상기 비스포스포네이트(bisphosphonate)는 알렌드로네이트(Alendronate, Alen), 파미드로네이트(Pamidronate), 졸레드로네이트(Zoledronate), 네리드로네이트(Neridronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이반드로네이트(Ibandronate), 리센드로네이트(Risendronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate) 및 티루드로네이트(Tiludronate)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 알렌드로네이트(Alendronate)인 것이 바람직할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

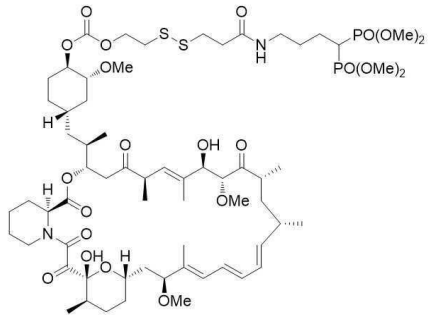
[0046] 상기 알킬 및 알킬렌에 대한 정의는 앞서 정의하였던 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0047] 구체적으로 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다:

[0048] [화학식 2]

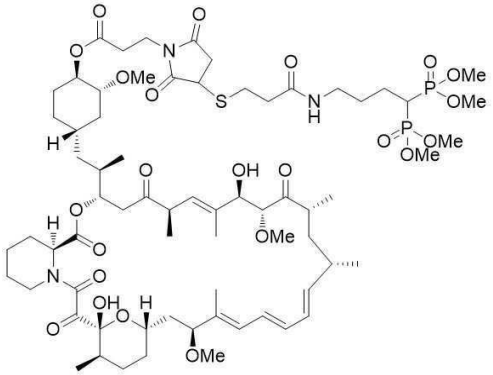
[0049] 

[0050] [화학식 3]



[0051]

[0052] [화학식 4]



[0053] .

[0054] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 1 개 이상의 비대칭 탄소를 함유할 수 있으며, 이에 따라 라세미체, 라세믹 혼합물, 단일의 에난티오머, 부분입체이성체 혼합물 및 각각의 부분입체이성체로서 존재할 수 있다.

[0055] 상기 화학식 2, 3 및 4의 화합물은 본 발명에서 합성한 다른 합성예 화합물에 비해 뼈 표적에 대해 더 뛰어난 표적 지향성 성질을 가져 골 질환에 대해 더 큰 효과를 나타낼 수 있다.

[0056] 이러한 이성질체는 종래기술, 예를 들어 화학식 1로 표시된 화합물은 관 크로마토그래피 또는 HPLC 등의 분할에 의해 분리가 가능하다. 또는, 화학식 1로 표시되는 화합물 각각의 입체 이성질체는 공지된 배열의 광학적으로 순수한 출발 물질 및/또는 시약을 사용하여 입체 특이적으로 합성할 수 있다.

[0057] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 통상적으로 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[0058] **화학식 1의 화합물의 용도**

[0059] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0060] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 염; 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 광학이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 뼈 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 여기서, 상기 뼈 질환은 골다공증, 골수염,

골연화증, 암세포의 골전이에 의한 골 손상, 골육종, 다발성 골수종, 골 전이성 전립성암, 추간판 탈출증, 섬유성 골이형성증, 클리펠-파일 증후군 및 낭성 섬유뼈염으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0062] 본 발명에 따른 조성물은 강력한 독성을 나타내는 뼈 세포독성 물질에 표적분자(targeting moiety)를 부착하도록 구조를 고안하여 악성 세포에 선택적으로 치료제를 전달할 수 있으므로 질환의 치료에 우수한 효과를 나타낼 뿐만 아니라 부작용이 현저하게 적다.

[0063] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 부형제를 1 종 이상 더 포함할 수 있다. 예컨대, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 부형제를 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. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 패치제, 액제, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 좌제 등일 수 있다. 이들 제제는 당 분야에서 제제화에 사용되는 통상의 방법 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법으로 제조될 수 있으며 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 다양한 제제로 제제화될 수 있다.

[0064] 본 발명의 약학적 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 0.01 내지 1000 ㎎/㎏ 이고, 바람직하게는 0.1 내지 100 ㎎/㎏ 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[0065] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1의 유도체 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 외에 동일 또는 유사한 약효를 나타내는 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 치료학적으로 유효한 양을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 뼈 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명에서 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 뼈 질환의 치료에 유효한 상기 화학식 1의 화합물의 양을 나타낸다.

[0068] 본 발명의 치료방법은 상기 화학식 1의 화합물을 투여함으로써, 징후의 발현 전에 질병 그 자체를 다룰 뿐만 아니라, 이의 징후를 저해하거나 피하는 것을 또한 포함한다. 질환의 관리에 있어서, 특정 활성 성분의 예방적 또는 치료학적 용량은 질병 또는 상태의 본성(nature)과 심각도, 그리고 활성 성분이 투여되는 경로에 따라 다양할 것이다. 용량 및 용량의 빈도는 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이다. 적합한 용량 용법은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 치료방법은 상기 화학식 1의 화합물과 함께 질환 치료에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 더 포함할 수 있으며, 추가적인 활성제제는 상기 화학식 1의 화합물과 함께 시너지 효과 또는 보조적 효과를 나타낼 수 있다.

[0069] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 광학이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0070] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0071] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안정청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0072] 본 발명의 식품 조성물은 뼈 질환의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화학식 1의 화합물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함할 수 있다. 또한, 뼈 질환의 예방 및/

또는 개선을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환, 음료 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0073] 또한 본 발명은 뼈 질환 치료에 사용하기 위한 화학식 1의 화합물, 이의 광학이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0074] 또한, 본 발명은 상기 뼈 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1의 화합물, 이의 광학이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공하고자 한다. 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1의 화합물은 허용되는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다.

[0075] 본 발명의 조성물, 용도, 치료방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0076] 본 발명은 또한 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물을 제공한다.

[0077] 상기 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물이란, 뼈 조직에 특이적으로 도달하는 약물 전달용 조성물을 의미하는 것으로, 본 발명에서는 상기 비스포스포네이트가 화학식 1의 화합물, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 비스포네이트의 뼈 친화성으로 인해 체내 뼈 조직에 특이적으로 도달할 수 있는 조성물을 의미한다. 상기 조성물은 뼈 조직에 특이적으로 도달한 후 파골 세포에 의해 산성화된 환경에 의해 산 분해성 링커가 특이적으로 분해되어 뼈 질환 치료제를 특이적으로 방출하게 된다.

[0078] 상기 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물은 약제학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 제형화하여 사용될 수 있으나, 경구투여 또는 비경구투여를 위한 제형일 수 있으며, 구체적으로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제일 수 있다. 제제화할 경우에는 당업계에서 통상적으로 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0079] 본 발명의 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물은 비수성용제, 현탁용제로써 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0080] 상기 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있고, 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로도 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젖산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다.

[0081] 본 발명의 뼈 타겟팅 약물 전달용 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구투여할 수 있으며, 하루에 체중 1 ㎏당 0.1~500 ㎎, 바람직하게는 1~100 ㎎의 양으로 투여되도록 1회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설률, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0082] **실시예**

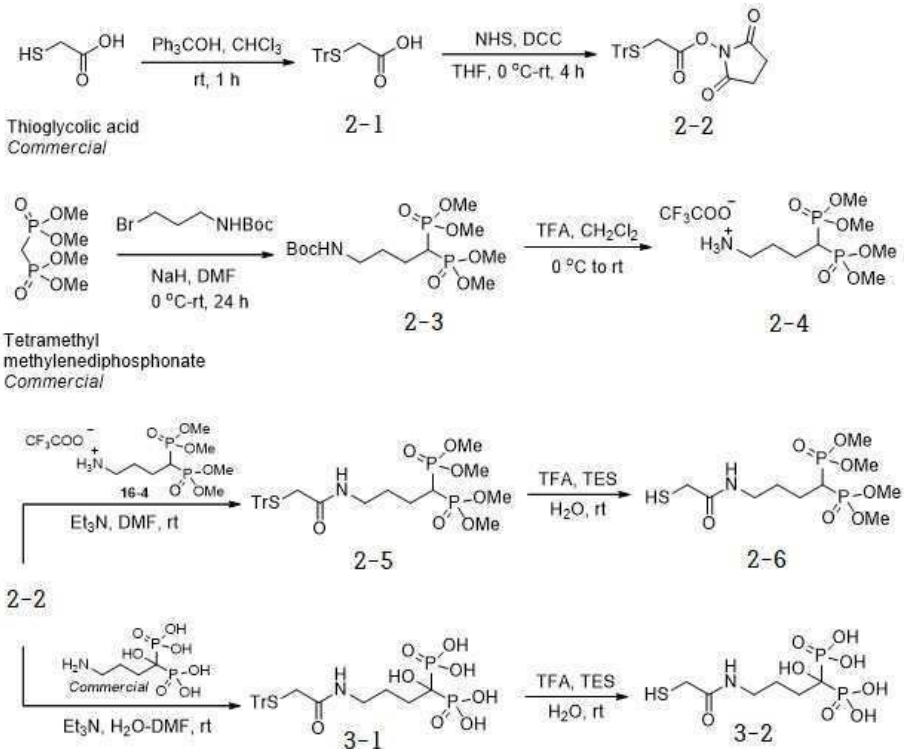
[0083] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0084] **합성예**

[0085] **합성예 1. 화학식 2의 화합물의 합성**

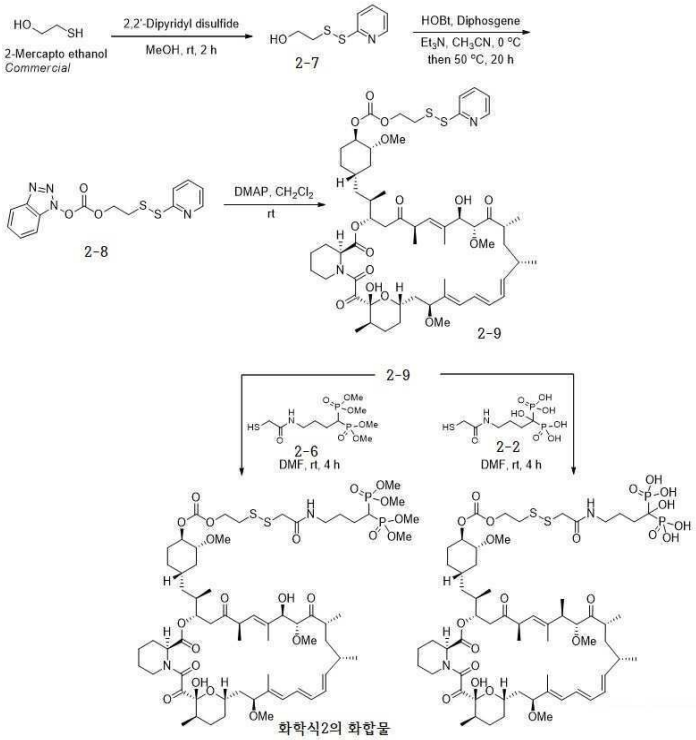
[0086] 상기 화학식 2 및 화학식 3의 화합물의 합성과정을 하기 반응식 1 및 2에 나타내었으며, 구체적인 중간단계 화합물의 합성과정을 하기에 설명하였다.

[0087] [반응식 1]



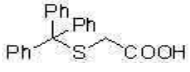
[0088]

[0089] [반응식 2]



[0090]

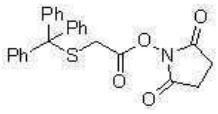
[0091] **합성예 1-1. 2-(Tritylthio)acetic acid의 합성(2-1)**

[0092] 

[0093] Mercaptoacetic acid (0.87 mL, 12.4 mmol, 1 당량)와 triphenylmethanol (3.25 g, 12.4 mmol, 1 당량)을 chloroform (12 mL)에 녹이고, trifluoroacetic acid (2.4 mL)를 상기 혼합액에 한 방울씩 첨가하였다. 상기

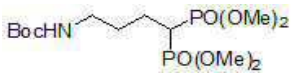
혼합물을 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 Hexane/CH_2Cl_2 2:1 혼합용액으로 재결정하여 화합물 **2-1**을 수득(3.0 g, 72%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.0 (s, 2H), 7.20-7.34 (m, 9H), 7.38-7.44 (m, 6H).

[0094] **합성예 1-2. 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-(tritylthio)acetate의 합성 (2-2)**

[0095] 

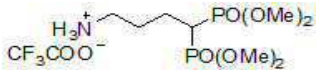
[0096] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 tritylthioacetic acid **2-1** (500 mg, 1.5 mmol, 1 당량) 및 NHS (N-Hydroxysuccinimide) (172.5 mg, 1.5 mmol, 1 당량)를 무수 THF (5 mL)에 녹였다. 상기 혼합물에 DCC가 녹아 있는 THF(5 mL)를 0 ℃에서 한 방울씩 첨가하고, 1시간에 걸쳐 상온으로 올리고 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되고, CELITE로 여과하여 DCC urea를 제거하고 여과된 고체를 THF(2 mL)로 세척하였다. 상기의 여과액을 감압하에 증발건조하고, 잔여물을 EtOAc로 재결정하여 화합물 **2-2**를 흰색 고체로 수득(300 mg, 46%)하였다. ^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 2.80 (s, 4H), 3.18 (s, 2H), 7.21-7.28 (m, 3H), 7.28-7.35 (m, 6H), 7.39-7.45 (m, 6H).

[0097] **합성예 1-3. *tert*-butyl 4,4-bis(dimethoxyphosphoryl)butylcarbamate (2-3)**

[0098] 

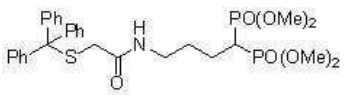
[0099] 아르곤 기체하에서 ^{t}BuOK (53 mg, 0.473 mmol, 1.1 당량)를 무수 DMF (0.25 mL)에 녹였다. 상기 혼합물을 0 ℃로 냉각하고, tetramethyl methylene diphosphonate (100 mg, 0.43 mmol, 1 당량)가 녹아있는 DMF (0.75 mL)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 15분간 교반하고, 다시 0 ℃로 냉각하였다. 3-(Boc-amino)propyl bromide (307.6 mg, 1.29 mmol, 3 당량)가 녹아있는 DMF(0.75 mL + 0.25 mL rinse)를 첨가하고, 상기 혼합물을 상온에서 41시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되고, NH_4Cl 포화수용액을 첨가하고 EtOAc(3 x 20 mL)로 추출하였다. 유기층을 brine으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하였다. 회전 증발하여 농축하고 잔여물을 컬럼 크로마토그래피(49:1 → 9:1 CH_2Cl_2/MeOH)로 정제하여 목적 화합물 **2-3**과 tetramethyl methylene diphosphonate 혼합물을 투명한 액체로 수득(70 mg, 41 %)하였다.

[0100] **합성예 1-4.4,4-Bis(dimethoxyphosphoryl)butan-1-aminium 2,2,2-trifluoroacetate의 합성 (2-4)**

[0101] 

[0102] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 **2-3** (44 mg, 0.113 mmol, 1 당량)을 무수 CH_2Cl_2(0.5mL)에 녹이고, 상기 혼합물을 0 ℃로 냉각하였다. TFA (0.05mL, 0.678mmol 6.0 당량)을 첨가하고, 상기 혼합물을 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 상기 잔여물을 ether (4 x 1 mL)로 세척하고, 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물 **2-4**을 투명한 액체로 수득(15 mg, 45%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.85-2.03 (m, 4H), 2.72-3.00 (m, 3H), 3.75-3.90 (m, 12H).

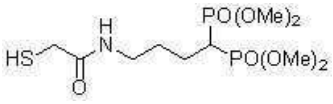
[0103] **합성예 1-5.Tetramethyl (4-(2-(tritylthio)acetamido)butane-1,1-diyl)*bis*(phosphonate) 의 합성 (2-5)**

[0104] 

[0105] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 **2-4** (50 mg, 0.124 mmol, 1 당량) 및 상기 제조된 화합물 NHS ester **2-2** (53.4 mg, 0.124 mmol, 1 당량)를 무수 DMF(1 mL)에 녹였다. 상기 혼합물에 트리에틸아민(Et_3N)(24 mL, 0.186 mmol, 1.5 당량)을 한 방울씩 첨가하고, 상온에서 3시간 교반하였다. 반응이 종결된 후, 냉각수를 첨가하고 10분간 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 EtOAc(2 x 10 mL)로 추출하였다. 추출한 유기층을 brine으로 세척하

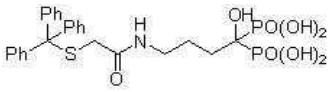
고, 무수 Na_2SO_4로 건조시키고 여과하고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피(95:5 CH_2Cl_2/MeOH)로 정제하여 목적 화합물 **2-5**를 투명한 액체로 수득(40 mg, 53 %)하였다. R_f = 0.3 (95:5 CH_2Cl_2/MeOH). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.56-1.68 (m, 2H), 1.74-1.90 (m, 2H), 2.31 (tt, *J* = 24.4, 6.4 Hz, 1H), 2.9-3.0 (m, 2H), 3.10 (s, 2H), 3.74-3.84 (m, 12 H), 7.18-7.34 (m, 9H), 7.36-7.44 (m, 6H).

[0106] **합성예 1-6. Tetramethyl (4-(2-mercaptoacetamido)butane-1,1-diyl)*bis*(phosphonate)의 합성 (2-6)**

[0107] 

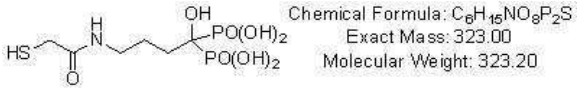
[0108] 상기 제조된 화합물 **2-5** (40 mg, 0.066 mmol, 1 당량)을 trifluoroacetic acid (1 mL)와 H_2O (0.3mL) 혼합액에 녹이고, 상기 혼합물에 triethylsilane (0.04 mL, 0.264 mmol, 4 당량)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 30분 동안 교반하였다. 반응이 종결되고, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 Hexane:EtOAC 9:1 혼합 용액으로 세척하였다 (3 x 3mL). 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물 **2-6**를 액체로 수득(15 mg, 62%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.70-1.87 (m, 2H), 1.87-2.08 (m, 2H), 2.39 (tt, *J* = 24.4, 6 Hz, 1H), 3.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.25-3.38 (m, 2H), 3.7-3.9 (m, 12H), 7.00 (bs, 1H).

[0109] **합성예 1-7. (1-Hydroxy-4-(2-(tritylthio)acetamido)butane-1,1-diyl)diphosphonic acid의 합성 (3-1)**

[0110] 

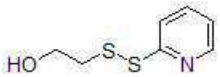
[0111] alendronic acid (249 mg, 1 mmol, 1 당량)를 H_2O (3 mL)에 녹이고 상기 혼합물에 트리에틸아민(Et_3N) (0.83 mL, 6 mmol, 6 당량)을 첨가한 후, 5분간 교반하였다. 상기 제조된 NHS ester **2-2** (646 mg, 1.5 mmol, 1.5 당량)를 무수 DMF (5 mL)에 녹이고, 이를 상기 혼합물에 첨가한 후, 상온에서 1시간 동안 교반하고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 H_2O(5 mL)와 EtOAc(10 mL)에 녹인 후 혼합물을 30분간 교반하였다. 혼합액을 분리한 후, 수용액을 회전 증발하여 흰색 고체인 목적 화합물 **3-1**를 수득(600 mg, 76%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ 1.40-1.54 (m, 2H), 1.58-1.72 (m, 2H), 2.63-2.72 (m, 2H), 2.98 (S, 2H), 7.10-7.22 (m, 9H), 7.26-7.32 (m, 6H).

[0112] **합성예 1-8. (1-Hydroxy-4-(2-mercaptoacetamido)butane-1,1-diyl)diphosphonic acid의 합성 (3-2)**

[0113] 

[0114] 상기 제조된 화합물 **3-1** (100 mg, 0.130 mmol, 1 당량)을 trifluoroacetic acid(1.5 mL)과 H_2O(0.4mL) 혼합액에 녹이고 상기 혼합물에 triethylsilane(0.08 mL, 0.52 mmol, 4 당량)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 30분 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 상기 잔여물을 EtOAC로 세척하였다 (5 x 5 mL). 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물 **3-2**를 무색 액체로 수득(40 mg, 95 %)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ 1.60-1.72 (m, 2H), 1.74-1.90 (m, 2H), 3.06 (s, 2H), 3.02-3.10 (m, 2H). ^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O): δ 18.95 ppm. ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_6H_{14}NO_8P_2S[M-H]^-$: 321.9928, found: 321.9928.

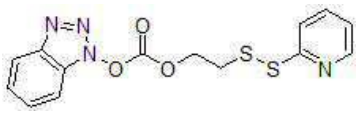
[0115] **합성예 1-9. 2-(Pyridin-2-yldisulfanyl)ethanol의 합성 (2-7):**

[0116] 

[0117] 아르곤 기체하에서 2,2-Ddipyridyl disulfide (1.33 g, 6.06 mmol, 2 당량)를 methanol (10 mL)에 녹이고, 상기 혼합물을 아르곤 기체를 이용하여 15분 동안 디게싱(degassing)하였다. 아르곤 기체하에서 2-mercaptoethanol (0.2 mL, 3.03 mmol, 1 당량)를 한 방울씩 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된

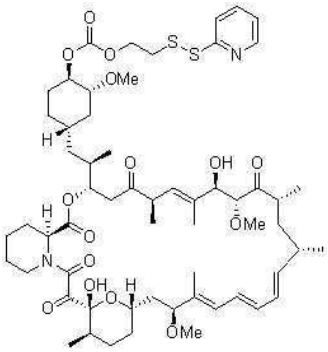
후, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피(7:3 Hexanes/EtOAc)로 정제하여 목적 화합물 **2-7**를 투명한 용액으로 수득(500 mg, 80%)하였다. R_f= 0.3 (95:5 hexanes/EtOAc). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.94-2.99 (m, 2H), 3.76-3.85 (m, 2H), 5.65-5.75 (m, 1H), 7.12-7.18 (m, 1H), 7.38-7.43 (m, 1H), 7.55-7.62 (m, 1H), 8.49-8.54 (m, 1H).

[0118] **합성예 1-10. *H*-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 2-(pyridin-2-yldisulfanyl)ethyl carbonate의 합성 (2-8)**

[0119] 

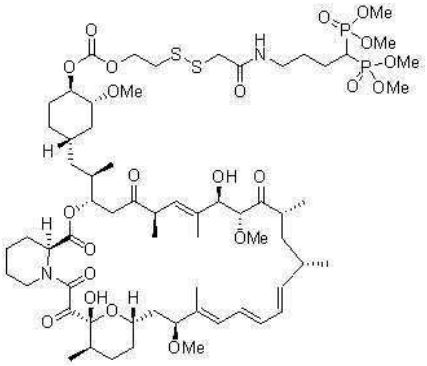
[0120] 상기 제조된 2-(pyridine-2-yl-disulfanyl) 화합물 **2-7** (300 mg, 1.60 mmol, 1.0 당량), HOBt (490 mg, 3.20 mmol, 2 당량)와 triethyl amine (0.22 mL, 1.60 mmol, 1 당량)을 CH_3CN (15 mL)에 녹였다. diphosgene (0.19 mL, 1.60 mmol, 1 당량)을 0 ℃에서 상기 혼합물에 첨가하고, 50 ℃에서 20 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 EtOAc (15mL)에 녹인 후, $NaHCO_3$ 포화수용액(2 x 10 mL)으로 세척하였다. 상기로부터 합한 유기 추출물을 무수 $MgSO_4$로 건조 시키고 여과하고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 2:1 Hexane/CH_2Cl_2 혼합용액에서 재결정하여 목적 화합물 **2-8**을 희색 고체로 수득(350 mg, 62 %) 하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.28 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.12-7.18 (m, 1H), 7.52-7.58 (m, 1H), 7.70-7.82 (m, 3H), 7.98-8.04 (m, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 4.8 Hz 1H).

[0121] **합성예 1-11.Rapamycin-Carbonate conjugates의 화합물 (2-9):**

[0122] 

[0123] 아르곤 기체하에서 시롤리무스(300 mg, 0.328 mmol, 1 당량)와 상기 제조된 화합물 **2-8**(171 mg, 0.492 mmol, 1.5 당량)을 무수 CH_2Cl_2에 녹였다. 상기 혼합물에 DMAP (60 mg, 0.492 mmol, 1.5 당량)을 첨가하고 상온에서 5 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하고 컬럼 크로마토그래피(7:3 → 2:3 Hexane/EtOAc)로 정제하여 목적 화합물 **2-9**를 흰색 고체로 수득(250 mg, 67 %)하였다. R_f = 0.4 (1:1 Hexane/EtOAc). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.72-1.90 (m, 43H), 1.90-2.02 (m, 2H), 2.02-2.18 (m, 2H), 2.25-2.40 (m, 2H), 2.53-2.63 (m, 1H), 2.67-2.79 (m, 1H), 3.05-3.24 (m, 6H), 3.24-3.74 (m, 11H), 3.80-3.93 (m, 1H), 4.14-4.20 (m, 1H), 4.31-4.42 (m, 2H), 4.42-4.55 (m, 1H), 4.74-4.82 (s, 1H), 5.12-5.20 (m, 1H), 5.24-5.32 (m, 1H), 5.38-5.44 (m, 1H), 5.45-5.62 (m, 1H), 5.92-6.00 (m, 1H), 6.08-6.20 (m, 1H), 6.24-6.44 (m, 1H), 7.16-7.24 (m, 1H), 7.70-7.84 (m, 2H), 8.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H).

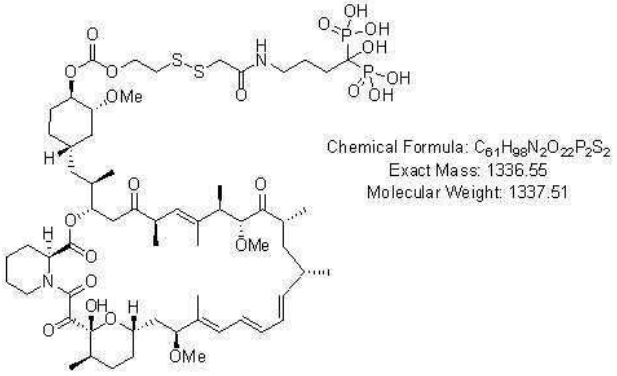
[0124] **합성예 1-12. Ligand-rapamycin conjugate 화학식 2의 화합물의 합성**



[0125]

[0126] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 **2-9**(46 mg, 0.041 mmole, 1 당량)와 상기 제조된 **2-6**(15 mg, 0.041 mmol, 1 당량)을 무수 DMF (0.5 mL)에 녹였다. 상기 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 종결되고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피(49:1 → 9:1 CH_2Cl_2/MeOH)로 정제하여 목적 화합물 **화학식 2의 화합물**을 투명한 액체로 수득(36 mg, 63%)하였다. R_f = 0.3 (95:5 CH_2Cl_2/MeOH). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.78-1.89 (m, 43H), 1.89-2.23 (m, 12H), 2.21-2.90 (m, 4H), 2.90-3.05 (m, 3H), 3.05-3.23 (m, 5H), 3.22-3.45 (m, 8H), 3.5-3.75 (m, 3H), 3.75-3.90 (m, 12H), 4.12-4.30 (m, 1H), 4.30-4.44 (m, 3H), 4.44-4.56 (m, 1H), 4.76 (bs, 1H), 5.04-5.20 (m, 1H), 5.22-5.30 (m, 1H), 5.36-5.44 (m, 1H), 5.44-5.60 (m, 1H), 5.80-6.04 (m, 1H), 6.06-6.20 (m, 1H), 6.24-6.44 (m, 2H), 6.72 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H).

[0127] **합성예 1-13. Rapamycin-ligand conjugate 화합물의 합성**



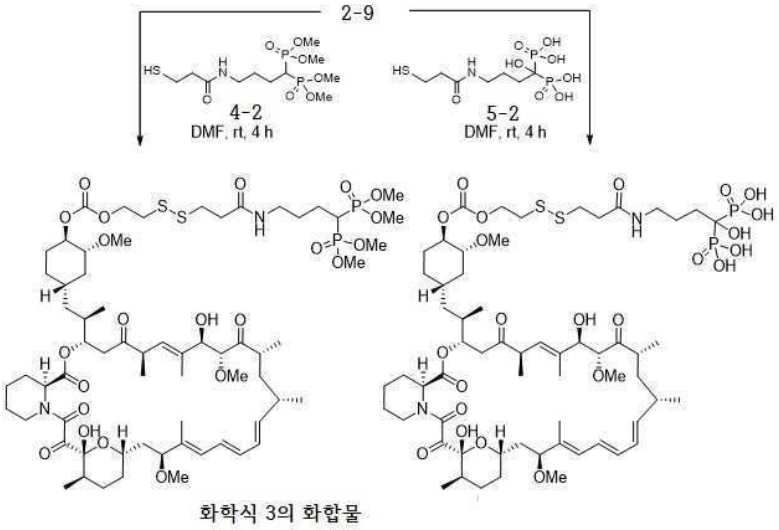
[0128]

[0129] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-carbonate **2-9**(30 mg, 0.026 mmol, 1 당량)와 상기 제조된 화합물 thiol **3-2**(14 mg, 0.026 mmol, 1 당량)를 무수 DMF(0.5 mL)에 녹이고 상온에서 4 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되고, 회전 증발하여 농축하였다. 상기 잔여물을 Hexane/EtOAC 1:1 혼합 용액으로 세척하였다 (5 x 5 mL). 상기 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물을 흰색 고체로 수득 (25 mg, 72%)하였다. ^{1}H-NMR (400MHz, CD_3OD): δ 0.75-1.55 (m, 27H), 1.55-2.22 (m, 24H), 2.22-2.38 (m, 2H), 2.55-2.65 (m, 1H), 2.75-2.86 (m, 1H), 2.95-3.09 (m, 3H), 3.08-3.59 (m, 20H), 3.65-3.73 (m, 1H), 3.95-4.25 (m, 3H), 4.25-4.42 (m, 4H), 4.42-4.52 (m, 1H), 5.02-5.19 (m, 2H), 5.19-5.30 (m, 1H), 5.4-5.51 (m, 1H), 6.05-6.35 (m, 3H), 6.38-6.51 (m, 1H). ^{31}P-NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ 18.80 ppm. ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_{61}H_{97}N_2O_{22}P_2S_2$ $[M-H]^-$: 1337.5248, found: 1338.5245.

[0130] **합성예 2. 화학식 3의 화합물의 합성**

[0131] 상기 화학식 3의 화합물의 합성과정을 하기 반응식 3에 나타내었으며, 구체적인 중간단계 화합물의 합성과정을 하기에 설명하였다.

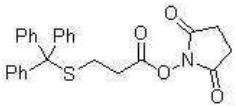
[0132] [반응식 3]



화학식 3의 화합물

[0133]

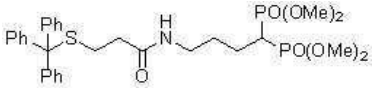
[0134] **합성예 2-1. 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(tritylthio)propanoate의 합성 (16-10)**



[0135]

[0136] 아르곤 기체하에서 3-(tritylthio)propionic acid(500 mg, 1.436 mmol, 1 당량)와 NHS(165.2 mg, 1.436 mmol, 1 당량)를 무수 THF(5 mL)에 녹였다. DCC가 녹아있는 THF (3 mL)를 0 ℃에서 상기 혼합물에 한 방울씩 첨가하고, 1시간에 걸쳐 상온으로 올리고 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되고, CELITE로 여과하여 DCC urea를 제거하고, 여과된 고체를 THF(2 mL)로 세척하였다. 상기의 여과액을 감압하에 증발 건조하고, 잔여물을 EtOAc로 재결정하여 목적 화합물 **2-10**를 수득(430 mg, 71%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.34-2.42 (m, 2H), 2.48-2.58 (m, 2H), 2.78 (s, 4H), 7.15-7.24 (m, 3H), 7.25-7.31 (m, 7H), 7.40-7.45 (m, 5H).

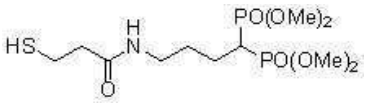
[0137] **합성예 2-2.Tetramethyl (4-(3-(tritylthio)propanamido)butane-1,1-diyl)bis(phosphonate)의 합성 (4-1)**



[0138]

[0139] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 **2-4** (50 mg, 0.124 mmol, 1 당량) 및 상기 제조된 화합물 NHS ester **2-10** (55.1 mg, 0.124 mmol, 1 당량)를 무수 DMF (1 mL)에 녹였다. 상기 혼합물에 트리에틸아민(Et_3N) (26 mL, 0.186 mmol, 1.5 당량)을 한 방울씩 첨가하고, 상기 화합물을 상온에서 3시간 교반하였다. 반응이 종결되고 상기 반응 혼합물을 냉각된 NH_4Cl 포화수용액(10 mL)에 첨가하고, 10분간 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 EtOAc(2 x 10 mL)로 추출하였다. 추출한 유기층을 brine으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 건조시키고 여과하고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피(95:5 CH_2Cl_2/MeOH)로 정제하여 목적 화합물 **4-1**을 투명한 액체로 수득(51 mg, 67%)하였다. R_f = 0.3 (95:5 CH_2Cl_2/MeOH). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.65-1.79 (m, 2H), 1.82-2.0 (m, 2H), 2.05 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.33 (tt, J = 24.0, 6.0 Hz, 1H), 2.49 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.70-3.85 (m, 12H), 7.16-7.24 (m, 3H), 7.24-7.32 (m, 6H), 7.38-7.44 (m, 6H).

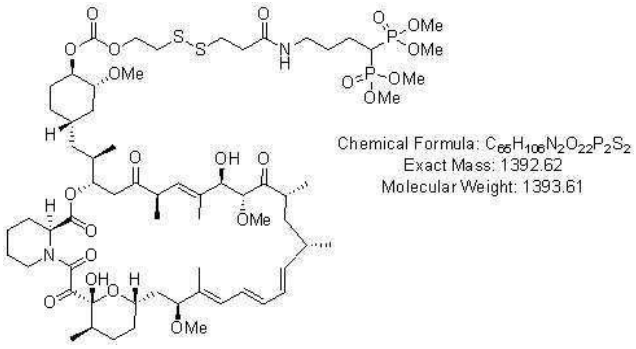
[0140] **합성예 2-3.Tetramethyl (4-(3-mercaptopropanamido)butane-1,1-diyl)bis(phosphonate)의 합성 (4-2)**



[0141]

[0142] 상기 제조된 화합물 **4-1** (51 mg, 0.082 mmol, 1 당량)을 trifluoroacetic acid (1 mL)와 H_2O (0.3mL) 혼합액에 녹이고 상기 혼합물에 triethylsilane(0.05 mL, 0.329 mmol, 4당량)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 30분 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 hexane(3 x 5 mL)과 Hexane:EtOAC 95:1 혼합 용액으로 세척하였다(5 mL). 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물 **4-2**를 투명한 액체로 수득(25 mg, 80%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.72-1.82 (m, 2H), 1.84-2.00 (m, 2H), 2.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.66-2.98 (m, 3H), 3.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.76-3.86 (m, 12H).

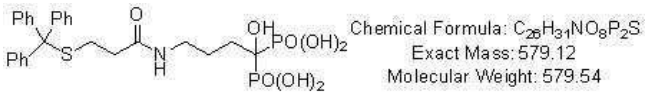
[0143] **합성예 2-4.Rapamycin-ligand conjugate 화학식 3의 화합물의 합성**



[0144]

[0145] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-carbonate **2-9** (18 mg, 0.016 mmol, 1 당량)와 상기 제조된 **4-2** (7.2 mg, 0.019 mmol, 1 당량)를 무수 DMF (0.5 mL)에 녹였다. 상기 혼합물을 상온에서 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 상기 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (49:1 → 9:1 CH_2Cl_2/MeOH)로 정제하여 목적 화합물 **화학식 3의 화합물**을 투명한 액체로 수득(16 mg, 71%)하였다. R_f = 0.3 (95:5 CH_2Cl_2:MeOH). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.78-1.85 (m, 41H), 1.85-2.20 (m, 14H), 2.20-2.50 (m, 4H), 2.55-2.65 (m, 3H), 2.65-2.80 (m, 2H), 2.88-3.05 (m, 4H), 3.05-3.50 (m, 10H), 3.50-3.72 (m, 2H), 3.72-3.90 (m, 12H), 4.10-4.32 (m, 1H), 4.32-4.45 (m, 2H), 4.45-4.60 (m, 1H), 4.72-5.0 (m, 1H), 5.05-5.2 (m, 1H), 5.20-5.35 (m, 1H), 5.35-5.45 (m, 1H), 5.45-5.60 (m, 1H), 5.65-6.05 (m, 1H), 6.05-6.20 (m, 1H), 6.20-6.45 (m, 2H).

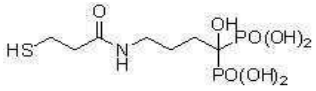
[0146] **합성예 2-5. (1-Hydroxy-4-((3-(tritylthio)propanoyl)oxy)butane-1,1-diyl)diphosphonic acid의 합성 (5-1)**



[0147]

[0148] Alendronic acid (18.6 mg, 0.074 mmol, 1 당량)를 H_2O (0.5 mL)에 녹이고, 트리에틸아민(Et_3N) (0.06mL, 0.444 mmol, 6 당량)을 첨가한 후, 5분간 교반하였다. NHS ester **2-2** (50 mg, 0.112 mmol, 1.5 당량)를 무수 DMF (0.5 mL)에 녹여서, 상기 혼합물에 첨가하였다. 희색 침전물이 형성되었을 때, 추가로 트리에틸아민(Et_3N) (0.06 mL, 6 당량)를 첨가하고, 혼합물을 상온에서 1시간 동안 교반하고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 EtOAc(4 x 2 mL)로 세척하고, 남은 잔여물을 회전 증발하여 목적 화합물 **5-1**을 흰색 고체로 수득(60 mg, 62 % based on ^{1}H-NMR)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ 1.54-1.68 (m, 2H), 1.68-1.84 (m, 2H), 2.03 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.95-3.10 (m, 4H), 7.10-7.24 (m, 9H), 7.26-7.34 (m, 6H) ppm. ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_{26}H_{30}NO_8P_2S[M-H]^-$: 578.1180, found: 578.1215.

[0149] **합성예 2-6. (1-Hydroxy-4-(3-mercaptopropanamido)butane-1,1-diyl)diphosphonic acid (5-2)**

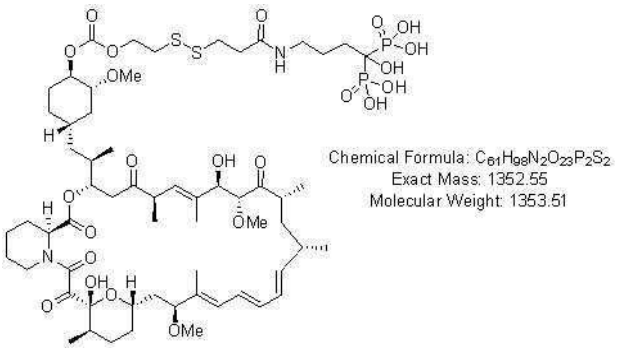


[0150]

[0151] 상기 제조된 화합물 **5-1** (60 mg, 0.076 mmol, 1 당량)을 trifluoroacetic acid (1.5 mL)와 H_2O(0.4mL) 혼합액에 녹이고 triethylsilane (0.05 mL, 0.52 mmol, 4 당량)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 30분 동안 교

반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 EtOAC(4 x 3 mL)로 세척하였다. 남은 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물 **5-2**를 희색 고체로 수득(33 mg, 80%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ 1.58-1.70 (m, 2H), 1.74-1.88 (m, 2H), 2.36 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H).

[0152] **합성예 2-7. Rapamycin-ligand conjugate 화합물의 합성:**



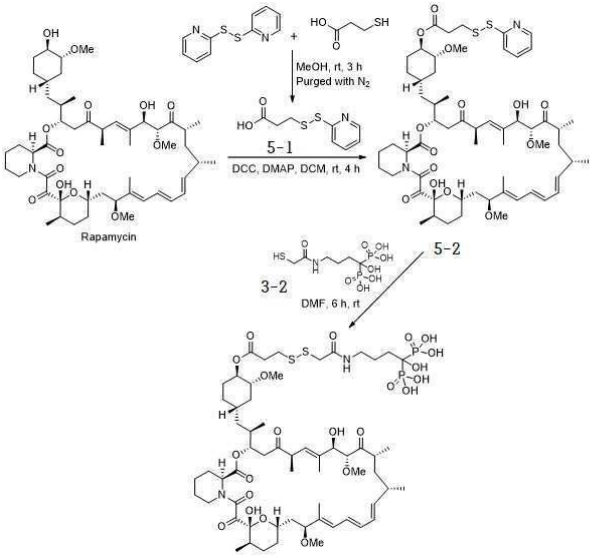
[0153]

[0154] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-carbonate **2-9**(56 mg, 0.05 mmole, 1.3 당량)와 상기 제조된 thiol compound **5-2**(13 mg, 0.038 mmol, 1 당량)를 무수 DMF(0.5 mL)에 녹이고 상온에서 4 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 Hexane/EtOAC 1:1 혼합 용액으로 세척하였다(5 x 5 mL). 남은 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물을 흰색 고체로 수득(28 mg, 55%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.75-1.54 (m, 25H), 1.54-2.35 (m, 23H), 2.55-2.65 (m, 4H), 2.9-3.05 (m, 6H), 3.05-3.50 (m, 16H), 3.5-3.75 (m, 2H), 3.96-4.2 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.04-4.20 (m, 2H), 4.3-4.42 (m, 4H), 4.42-4.54 (m, 1H), 5.02-5.18 (m, 2H), 5.2-5.28 (m, 1H), 5.42-5.5 (m, 1H), 6.06-6.34 (m, 4H), 6.38-6.52 (m, 1H) ppm. ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_{61}H_{97}N_2O_{23}P_2S_2[M-H]^-$: 1351.5404, found: 1351.5395.

[0155] **합성예 3. Rapamycin-ligand conjugate 화합물의 합성**

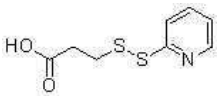
[0156] 상기 Rapamycin-ligand conjugate 화합물의 합성과정을 하기 반응식 4에 나타내었으며, 구체적인 중간단계 화합물의 합성과정을 하기에 설명하였다.

[0157] [반응식 4]



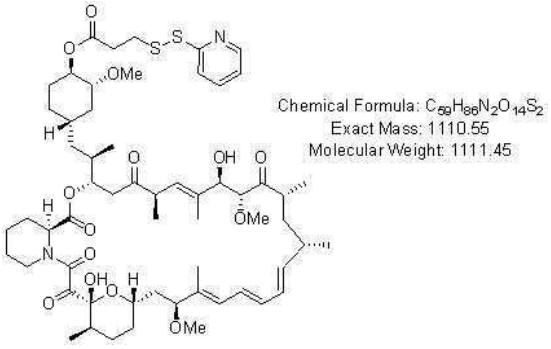
[0158]

[0159] **합성예 3-1. 3-(Pyridin-2-yldisulfanyl)propanoic acid의 합성 (6-1)**

[0160] 

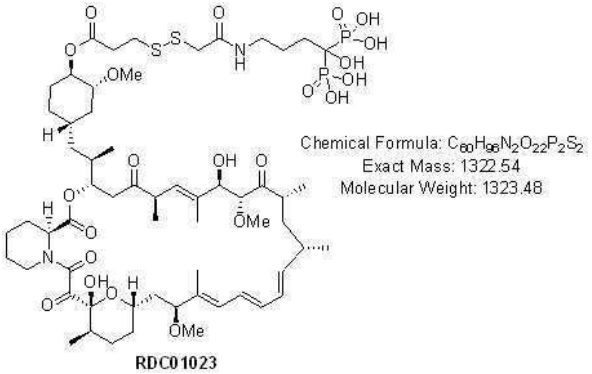
[0161] 아르곤 기체하에서 2,2-dipyridyl disulfide (2 g, 9.09 mmol, 1.5 당량)을 methanol (20 mL)에 녹이고, 아르곤 기체로 15분간 디게싱(degassing)하였다. 3-mercaptopropionic acid (0.52 mL, 6.06 mmol, 1 당량)를 상기 혼합물에 한 방울씩 첨가하고, 3시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, 상기 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (85:15 → 70:30 Hexane/EtOAc)로 정제하여 희색고체인 목적 화합물 **23-1**을 수득(912 mg, 70%) 하였다. R_f = 0.3 (50: 50 Hexane:EtOAc). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.80 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.10-7.20 (m, 1H), 7.63-7.72 (m, 2H), 8.45-8.51 (m, 1H).

[0162] **합성예 3-2. Rapamycin ester conjugate의 합성 (6-2)**

[0163] 

[0164] 시롤리무스 (100 mg, 0.109 mmol, 1 당량), 상기 제조된 화합물 **6-1** (23.4 mg, 0.109 mmol, 1.0 당량) 그리고 DCC (27 mg, 0.109 mmol, 1 당량)를 상온에서 무수 CH_2Cl_2(2 mL)에 녹였다. 상기 혼합물에 DMAP(3 mg, 0.021 mmol, 0.2 당량)을 첨가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후, CELITE로 여과하여 DCC urea를 제거하고 DCM (2 mL)으로 남은 고체를 세척하였다. 여과액을 감압하에 증발 건조하고 컬럼 크로마토그래피 (3:2 → 2:3 Hexane/EtOAc)로 정제하여 희색고체인 목적 화합물 **6-2**를 수득(40 mg, 33%)하였다. R_f= 0.3 (1:1 Hexane/EtOAc). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.72-1.90 (m, 44H), 1.90-2.15 (m, 4H), 2.24-2.40 (m, 2H), 2.50-2.90 (m, 5H), 2.95-3.20 (m, 5H), 3.25-3.50 (m, 7H), 3.52-3.92 (m, 3H), 4.16-4.30 (m, 1H), 4.60-4.74 (m, 1H), 4.77 (bs, 1H), 5.10-5.22 (m, 1H), 5.22-5.32 (m, 1H), 5.32-5.48 (m, 1H), 5.48-5.62 (m, 1H), 5.84-6.04 (m, 1H), 6.08-6.22 (m, 1H), 6.22-6.44 (m, 2H), 7.08-7.18 (m, 1H), 7.64-7.78 (m, 2H), 8.44-8.54 (m, 1H). ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_{59}H_{86}N_2O_{14}NaS_2$ $[M+Na]^+$: 1133.5413, found: 1133.5407.

[0165] **합성예 3-3. Rapamycin-ligand conjugate 화합물의 합성**

[0166] 

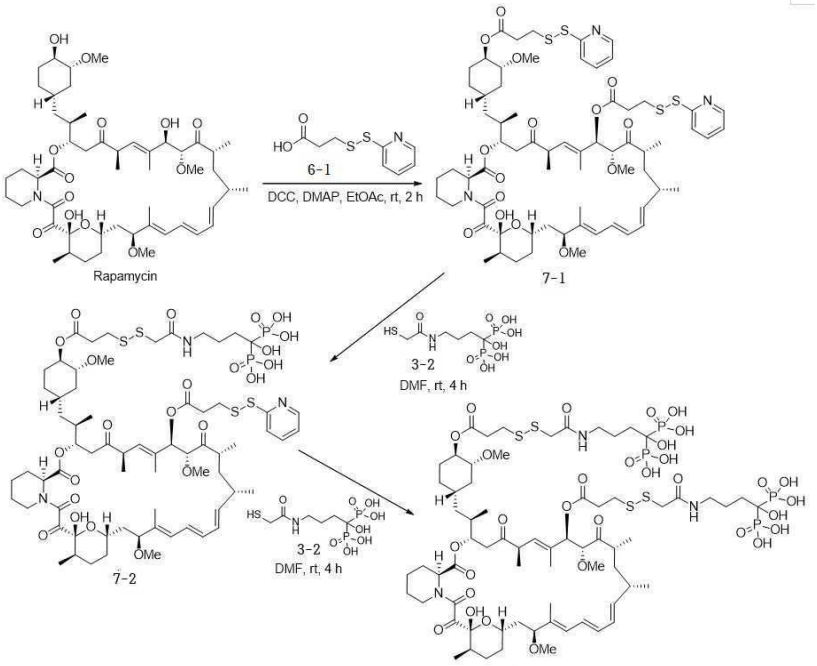
[0167] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-ester **6-2** (22 mg, 0.02 mmol, 1 당량)와 상기 제조된 화합물 **3-2**(6 mg, 0.02 mmol, 1 당량)를 무수 DMF(0.4 mL)에 녹이고 상온에서 4 시간 동안 교반한 후, 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 Hexane/EtOAC 1:1 혼합 용액으로 세척하였다(5 x 4 mL). 남은 잔여물을 감압하에 증

발 건조하여 목적 화합물을 흰색 고체로 수득 (12 mg, 45%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.72-1.88 (m, 45H), 1.88-2.52 (m, 7H), 2.72-2.85 (m, 4H), 2.92-3.05 (m, 4H), 3.05-3.37 (m, 15H), 3.37-3.80 (m, 5H), 3.95-4.40 (m, 2H), 4.60-4.72 (m, 1H), 5.05-5.15 (m, 2H), 5.15-5.40 (m, 2H), 5.4-5.6 (m, 1H), 6.05-6.22 (m, 2H), 6.22-6.36 (m, 1H), 6.40-6.52 (m, 1H). ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_{60}H_{95}N_2O_{22}P_2S_2$ $[M-H]^-$: 1321.5299, found: 1321.5298.

[0168] **합성예 4. Rapamycin diester conjugate 화합물의 합성**

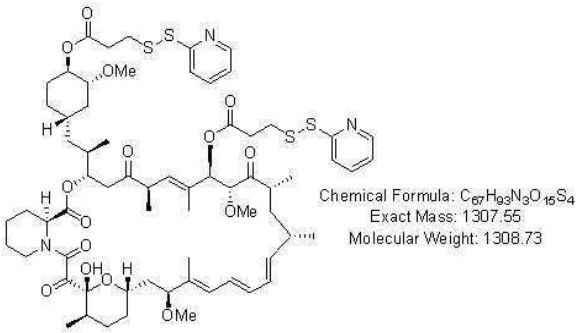
[0169] 상기 화학식 7의 화합물의 합성과정을 하기 반응식 5에 나타내었으며, 구체적인 중간단계 화합물의 합성과정을 하기에 설명하였다.

[0170] [반응식 5]



[0171]

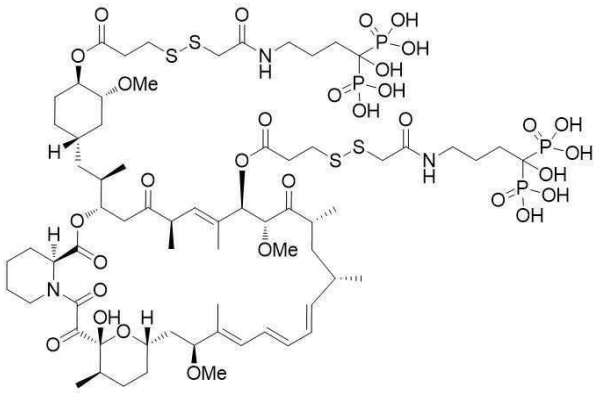
[0172] **합성예 4-1. Rapamycin diester conjugate 7-1의 합성:**

[0173] 

[0174] 시롤리무스 (100 mg, 0.109 mmol, 1 당량), 상기 제조된 화합물 **6-1** (70.5 mg, 0.328 mmol, 3.0 당량) 그리고 DCC (67.5 mg, 0.328 mmol, 3 당량)를 상온에서 무수 EtOAc (3 mL)에 녹였다. 상기 혼합물에 DMAP (4 mg, 0.032 mmol, 0.3 당량)를 첨가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되고, CELITE로 여과하여 DCC urea를 제거하고 EtOAc(2 mL)로 남은 고체를 세척하였다. 여과액을 감압하에 증발 건조하고 컬럼 크로마토그래피 (3:2 → 2:3 Hexane/EtOAc)로 정제하여 흰색고체인 목적 화합물 **7-1**를 수득(82 mg, 68%)하였다. R_f= 0.3 (1:1 Hexane/EtOAc). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.52-8.44 (m, 2H), 7.80-7.64 (m, 4H), 7.18-7.08 (m, 2H), 6.46-6.22 (m, 2H), 6.22-6.08 (m, 1H), 6.05-9.96 (m, 1H), 5.62-5.50 (m, 1H), 5.46-5.30 (m, 2H), 5.30-5.23 (m, 1H), 5.22-5.12(m, 1H), 3.90-3.80 (m, 2H), 3.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.63-3.52 (m, 1H),

3.41-3.26 (m, 1H), 3.22-3.10 (m, 5H), 3.10-2.96 (m, 4H), 2.82-2.72 (m, 4H), 2.66-2.50 (m, 2H), 2.40-2.24 (m, 2H), 2.15-2.05 (m, 2H), 2.04-1.93 (m, 3H), 1.92-1.82 (m, 1H), 1.82-1.76 (m, 2H), 1.76-1.72 (m, 4H), 1.72-1.64 (m, 6H), 1.64-1.54 (m, 2H), 1.54-1.38 (m, 5H), 1.38-1.28 (m, 3H), 1.25-1.17 (m, 2H), 1.17-1.08 (m, 4H), 1.08-0.96 (m, 8H), 0.96-0.94 (m, 3H), 0.94-0.74 (m, 4H). ESI-HRMS *m/z* calcd for $C_{67}H_{93}N_3O_{25}S_4Na$ $[M+Na]^+$: 1330.5382, found: 1330.5388.

[0175] **합성예 4-2. Rapamycin diester conjugate 화합물의 합성:**



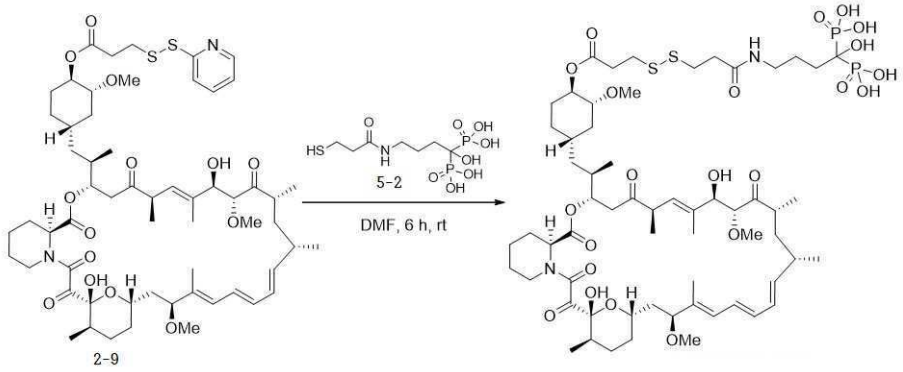
[0176]

[0177] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-ester **7-1** (90 mg, 0.081 mmole, 1.2 당량)과 상기 제조된 화합물 **3-2** (22 mg, 0.067 mmol, 1 당량)를 무수 DMF(0.25 mL)에 녹이고 상온에서 5 시간 동안 교반하였다. 상기 반응혼합물을 회전 증발하여 농축하고 Hexane/EtOAC 1:1 혼합 용액으로 세척하였다(5 x 5 mL). 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물 흰색 고체로 수득(**13 mg**)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.50-6.38 (m, 1H), 6.36-6.24 (m, 1H), 6.24-6.16 (m, 1H), 6.16-6.08 (m, 1H), 5.56-5.42 (m, 1H), 5.38-5.28 (m, 1H), 5.14-5.01 (m, 2H), 4.74-4.59 (m, 1H), 4.29 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.76-3.64 (m, 1H), 3.60-3.52 (m, 1H), 3.52-3.32 (m, 11H), 3.30-3.18 (m, 14H), 3.18-3.10 (m, 4H), 3.06-2.90 (m, 4H), 2.88-2.62 (m, 5H), 2.50-2.04 (m, 10H), 1.99-1.57 (m, 19H), 1.57-1.27 (m, 17H), 1.18-1.02 (m, 6H), 1.02-0.78 (m, 9H).

[0178] **합성예 5. Rapamycin-ester conjugate 화합물의 합성**

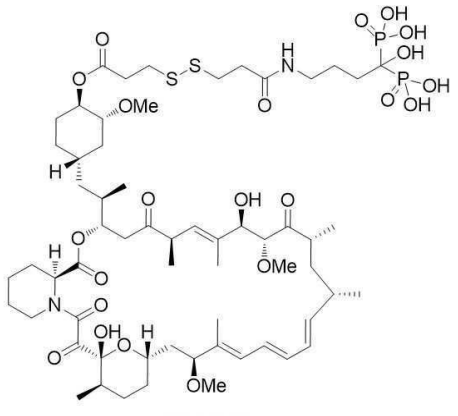
[0179] 상기 Rapamycin-ester conjugate 화합물의 합성과정을 하기 반응식 6에 나타내었으며, 구체적인 중간단계 화합물의 합성과정을 하기에 설명하였다.

[0180] [반응식 6]



[0181]

[0182] **합성예 5-1. Rapamycin-ester conjugate 화합물의 합성**



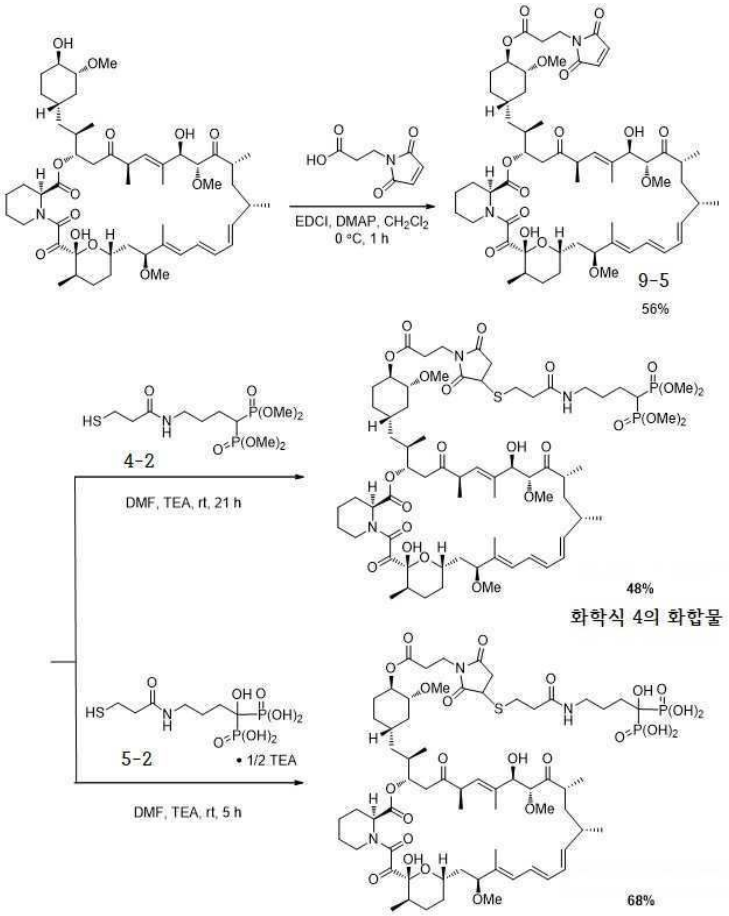
[0183]

[0184] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-ester **2-9** (26 mg, 0.023 mmole, 1 당량)와 상기 제조된 화합물 **5-2**(9.6 mg, 0.028 mmol, 1.2 당량)를 무수 DMF(0.4 mL)에 녹이고 상온에서 6 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 회전 증발하여 농축하고 Hexane/EtOAC 1:1 혼합 용액으로 세척하였다(5 x 5 mL). 상기 잔여물을 감압하에 증발 건조하여 목적 화합물을 흰색 고체로 수득(22 mg, 72%)하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.51-6.40 (m, 1H), 6.38-6.20 (m, 2H), 6.20-6.05 (m, 1H), 5.47 (dd, *J* = 9.6, 14.8 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.18-5.0 (m, 2H), 4.74-4.58 (m, 2H), 4.20-4.16 (m, 1H), 3.99 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.74-3.64 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 1H), 3.44-3.34 (m, 6H), 3.29-3.26 (m, 2H), 3.26-3.16 (m, 13H), 3.14 (s, 3H), 3.02-2.89 (m, 9H), 2.82-2.70 (m, 5H), 2.66-2.54 (m, 6H), 2.14-1.96 (m, 7H), 1.96-1.85 (m, 5H), 1.85-1.78 (m, 3H), 1.78-1.68 (m, 5H), 1.68-1.56 (m, 3H), 1.56-1.37 (m, 5H), 1.37-1.28 (m, 9H), 1.21-1.09 (m, 3H), 1.09-1.02 (m, 4H), 1.02-0.93 (m, 4H), 0.93-0.74 (m, 6H).

[0185] **합성예 6. 화학식 4의 화합물의 합성**

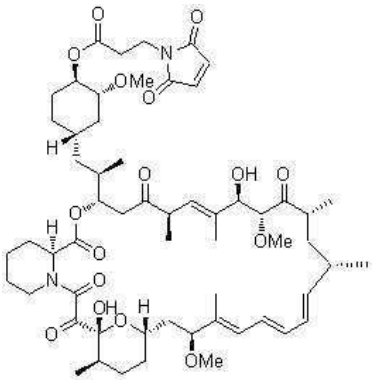
[0186] 상기 화학식 4의 화합물의 합성과정을 하기 반응식 7에 나타내었으며, 구체적인 중간단계 화합물의 합성과정을 하기에 설명하였다.

[0187] [반응식 7]



[0188]

[0189] **합성예 6-1. Maleimidopropionyl Rapamycin (9-5)**

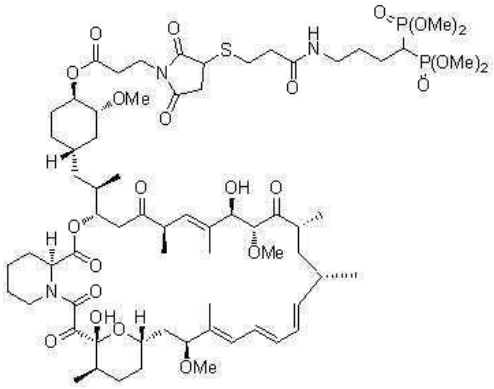


[0190]

[0191] 아르곤 기체하에서 maleimidopropionic acid (72.1 mg, 426 μmol, 1.3 당량), EDCI (94.3 mg, 492 μmol, 1.5 당량) 그리고 DMAP(8.01 mg, 65.6 μmol, 0.2 당량)을 무수 CH_2Cl_2 (5 mL)에 녹이고, 상기 혼합물을 상온에서 15분 동안 교반하였다. 시롤리무스(300 mg, 328 μmol, 1.0 당량)를 무수 CH_2Cl_2(1 mL)에 녹인 용액을 0 ℃에서 첨가하고, 0 에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 (5 mL)에 희석하고 NH_4Cl 포화수용액(5 mL)을 추가한 후, CH_2Cl_2 (3 x 5 mL)으로 추출하였다. 유기층을 무수 $MgSO_4$로 건조시키고 여과하고 회전 증발하여 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (1:1 → 1:1.5 → 1:2 Hexane:EtOAc)로 정제하여 목적 화합물 **9-5**을 노란색 고체로 수득(197 mg, 185 μmol, 56%)하였다. **TLC**: R_f 0.63 (2:1 EtOAc/Hexane). ^{1}H-NMR confirmed a mixture of rotamers. Major rotamer: **^{1}H-NMR** (400 MHz, benzene-d_6): δ 6.48(d,J = 10.4 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.19 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.02 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.70 (s, 2H), 5.56-5.47 (m,

3H), 5.41 (m, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.24 (dm, J = 5.6 Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.67-3.53 (m, 4H), 3.47 (m, 1H), 3.45 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.26-3.04 (m, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 2.77 (m, 1H), 2.73 (dd, J = 17.2, 6.4 Hz, 1H), 2.60 (d, J = 17.2, 6.4 Hz, 1H), 2.53-2.41 (m, 2H), 2.20-2.09 (m , 3H), 2.08-1.95 (m, 3H), 1.71-1.47 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.42-1.26 (m, 10H), 1.23-0.73 (m, 5H), 1.17 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.02 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.81 (d, J = 6.8 Hz, 3H). HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{58}H_{84}N_2NaO_{16}^+$ $[M+Na]^+$ 1464.6540, found 1464.6523.

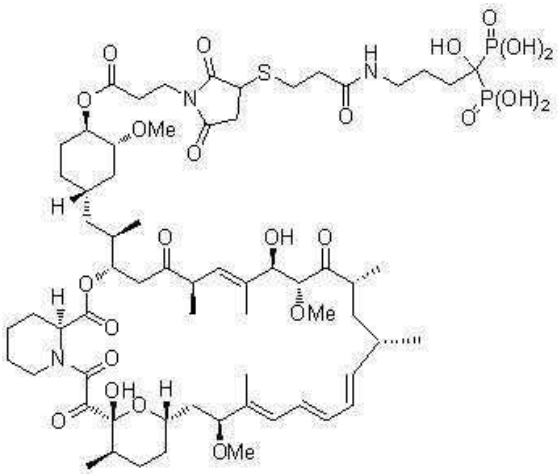
[0192] **합성예 6-2. Rapamycin-succinimide-bisphosphonate conjugate 화학식 4의 화합물의 합성**



[0193]

[0194] 상기 제조된 화합물 rapamycin-ester **9-5** (25.0 mg, 23.5 μmol, 1 당량)와 상기 제조된 화합물 thiol **9-4** (8.9 mg, 23.5 μmol, 1 당량)을 무수 DMF(0.24 mL)에 녹이고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물에 트리에틸아민(Et_3N) (1.3 μL, 9.4 μmol, 0.4 당량)을 첨가하고 상온에서 19시간 교반하였다. 반응 혼합물을 회전 증발하여 농축하고, 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (40:1 → 20:1 CH_2Cl_2/MeOH)로 정제하여 목적 화합물 **화학식 4의 화합물**을 흰색 고체로 수득(16.2 mg, 11.5 μmol, 48%)하였다. **TLC**: R_f 0.55 (7:1 EtOAc/MeOH). ^{1}H-NMR confirmed a mixture of rotamers. Major rotamer: **^{1}H-NMR** (400 MHz, benzene-d_6): δ 6.42-6.34 (m, 2H), 6.33 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.16 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.97 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.57 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.42 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.28 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.18 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 3.92-3.72 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.68-3.64 (m, 2H), 3.56 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 3.45-3.37 (m, 5H), 3.36 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.22-3.06 (m, 4H), 3.14 (s, 3H), 3.05 (m, 1H), 2.74-2.64 (m, 4H), 2.61-2.51 (m, 3H), 2.37 (tt, J = 24.4, 6.0 Hz, 1H), 2.36-2.30 (m, 2H), 2.10-1.91 (m, 6H), 1.87-1.63 (m, 7H), 1.75 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.62-1.47 (m, 4H), 1.42-1.06 (m, 8H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.99 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88-0.79 (m, 2H). HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{69}H_{109}N_3NaO_{23}P_2S^+$ $[M+Na]^+$ 1464.6540, found 1464.6523.

[0195] **합성예 6-3. Rapamycin-succinimide-alendronate conjugate 화합물의 합성**

[0196] 

[0197] 아르곤 기체하에서 상기 제조된 화합물 rapamycin-ester **9-5** (28.9 mg, 27.2 μmol, 1.3 당량)와 상기 제조된 화합물 thiol **10-2** (8.1 mg, 20.9 μmol, 1 당량)을 무수 DMF(0.25 mL)에 녹였다. 상기 혼합물에 트리에틸아민 (Et_3N) (1.17 μL, 8.36 μmol, 0.4 당량)을 첨가하고 상기 혼합물을 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 회전 증발하여 농축하고, 잔여물을 diethyl ether (3 x 5 mL)로 세척하고 증발 건조하여 목적 화합물을 흰색 고체로 수득(20 mg, 14.3 μmol, 68%)하였다. ^{1}H-NMR confirmed a mixture of rotamers. Major rotamer: **TLC**: R_f 0.01 (10:1 CH_2Cl_2/MeOH). **^{1}H-NMR** (400 MHz, CD_3OD): δ 6.47((d, J = 10.8 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.23 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 6.16 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.10 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.49 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.45 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.24 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.13-5.07 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.18 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 8.8, 4.0 Hz, 1H), 3.79-3.72 (m, 2H), 3.69 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 3.55 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 3.46-3.14 (m, 9H), 3.39 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.00-2.93 (m, 2H), 2.83 (dm, J = 14.4 Hz, 1H), 2.68-2.60 (m, 3H), 2.58-2.53 (m, 3H), 2.52-2.44 (m, 3H), 2.32-2.11 (m, 5H), 2.06-2.00 (m, 3H), 1.96-1.88 (m, 4H), 1.83 (s, 3H), 1.76-1.56 (m, 4H), 1.72 (s, 3H), 1.49-1.37 (m, 5H), 1.22-0.80 (m, 4H), 1.05 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, 3H). HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{65}H_{100}N_3O_{24}P_2S^-$ $[M-H]^-$ 1400.5898, found 1400.5886.

[0198] **실험예 1 : 다발성 골수종 RPMI8226 세포에서 mTORC1 경로의 저해 시험**

[0199] 합성한 시롤리무스-접합체가 내인성 mTOR 활성을 억제하는 정도를 확인하기 위해 시롤리무스-접합체로 처리한 후 인산화 S6 단백질(phosphorylated S6 protein)의 웨스턴 블랏으로 측정하였다.

[0200] 다발성 골수종 RPI8226 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 다발성 골수종 RPI8226 세포는 습도와 온도(37 ℃)가 일정하게 유지된 5% CO_2 인큐베이터에서 RPMI 배지 (RPMI-1640, 10% fetal bovine serum (heat-inactivated) plus 50 U/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin)위 에서 성장토록 유지하였다. 증식 배지 성분 및 기타 화학 약품들은 ThermoFisher (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 품질 관리를 위해 Universal Mycoplasma Detection Kit (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) (ATCC30-1012K)를 사용하여 mycoplasma 감염 여부를 정기적으로 확인하였다.

[0201] 시롤리무스 접합체들은 절단이 유도되는 골종양 세포 환경을 모방하여, 약산성 완충액 (pH 4.8 구연산 완충액)에 50 uM 농도로 37 ℃에서 1 시간 동안 처리한 후, pH 7로 중화하였다. 최종 목표 pH는 0.2M Na_2HPO_4와 0.1 M 시트르산을 섞어 맞추었다. PBS로 처리된 시롤리무스 접합체(sirolimus conjugate)를 비절단 화합물의 음성 대조군으로 사용하였다. RPMI 배지에서 RPMI8226 세포(96-well plate에서 샘플 당 40,000 세포)를 90 nM 농도의 절단/비절단 시롤리무스 접합체 100 uL로 2 시간 동안 처리 한 후, 용해 완충액(lysis buffer)(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-Cl pH 8, 2 mM EDTA + 프로테아제 억제제 (Roche, Basel, Switzerland)의 칵테일)으로 처리하였다.

[0202] 10,000 세포의 세포 용해물(cell lysates)을 도데실 황산나트륨-폴리아크릴아미드겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (10% 환원 겔)으로 분리하고 폴리비닐리덴 디플루오리드 멤브레인(polyvinylidene difluoride membranes) (Millipore, Bedford, MA, USA)에 옮겼다. 5% 탈지유 (Difco / Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 멤브레인을 차단한 후, 포스포-S6 리보솜 단백질(phospho-S6 ribosomal protein) (Ser240/244) mAb (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)로 4 ℃에서 하룻밤 동안 방치하고 TBST (10 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6)로 세척 하였다.

[0203] 멤브레인을 적절한 2차 항체와 함께 실온에서 3 시간 동안 배양하고, 다시 TBST로 세척하였다. Western blot 밴드는 ECL (enhanced chemiluminescence) (Luminata Forte; Millipore)에 의해 시각화되었다. 이어서, 세포 용해물 샘플의 양이 동량임을 비교하기 위해 멤브레인을 β-액틴 Ab로 다시 주사하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0204] 도 2에서 *는 화합물을 37 °C, pH 4.8에서 10 분동안 처리한 후 다름과 같이 저농도와 고종도에서 비교한 것이다. Compound concentration: L(15 nM) / H(90 nM) IM9 cell line (MM) 부모 라파마이신은 양성 대조군으로, 비처리세포를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0205] 상기 실험 결과, 합성예 3-3의 화합물은 중성 pH 보다 낮은 pH, 고용량에서 더 좋은 효과를 나타내었으며, 3개의 접합체(화학식 2, 3 및 4의 화합물)는 중성 pH, 저농도 pH, test 등 모든 농도에서 효과를 나타내었다.

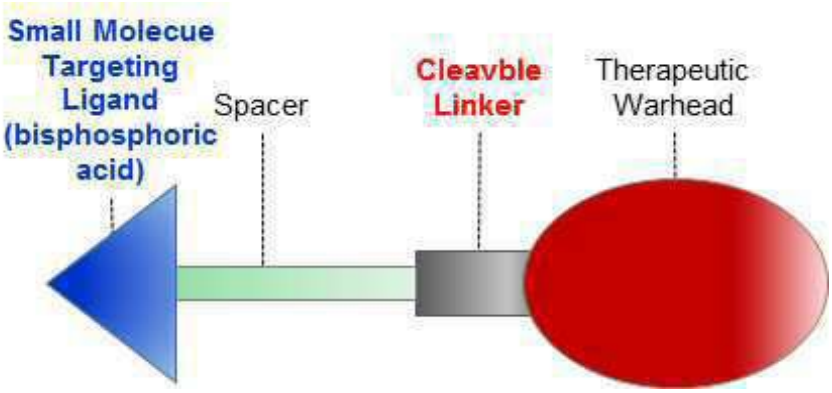
[0206] **실험예 2 : 하이드록시 아파타이트 비드 결합 시험**

[0207] 알렌드로네이트(alendronate)-시롤리무스(sirolimus) 접합체가 하이드록시 아파타이트 비드에 결합하는 정도를 정량화하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다. 시험 화합물이 FITC(fluorescein isothiocyanate)-접합된 알렌드로네이트가 하이드록시 아파타이트 매트릭스에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 정도를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 통해 정량하였다. 0.5 g의 dry hydroxyapatite (HAP) 비드(평균 직경 40 ㎛) (cat # 1584000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 실온에서 3 시간 동안 인산 완충 식염수 (PBS) 1 ml로 재구성하였다. 다음 PBS로 3 회 세척하고 1% 소 혈청 알부민 (BSA)이 들어있는 PBS에 재현탁 하였다. 재구성된 비드를 4 ℃에서 보관 하였다. 50 μL의 비드 슬러리를 둥근 바닥 96-웰 플레이트(well plate)에 분배시키고, 10 nM FITC-접합된 알렌드로네이트의 존재하에 150 μL의 시험 화합물과 함께 배양하였다. 하이드록시 아파타이트 비드에 결합은 어두운 곳에서 실온에서 30 분 동안 진탕 플랫폼상에서 진행되도록 허용하였다. 플레이트를 원심분리하고, 포획HAP 비드를 PBS에 녹인 1% BSA로 3 회 세정하였다. horse-radish 과산화 효소 (HRP) (cat # ab6656, Abcam, Cambridge, UK)와 직접 접합된 항-FITC 항체를 0.2 μg/mL 농도로 1% BSA가 들어있는 PBS에 녹인 후, HAP 비드를 함유하는 플레이트 웰에 첨가하고, 30분 동안 실온에서 플레이트-떨림-플랫폼(the plate shaking platform)에서 배양하였다. 그런 다음 플레이트 웰을 세척하고 결합된 FITC-접합 알렌드로네이트의 량을 Ultra-TMB 기질 용액 키트 (cat # 34028, Thermo Fisher)를 사용하여 마이크로 타이터 플레이트 판독기 (microtiter plate reader) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 판독한 흡광도로 결정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

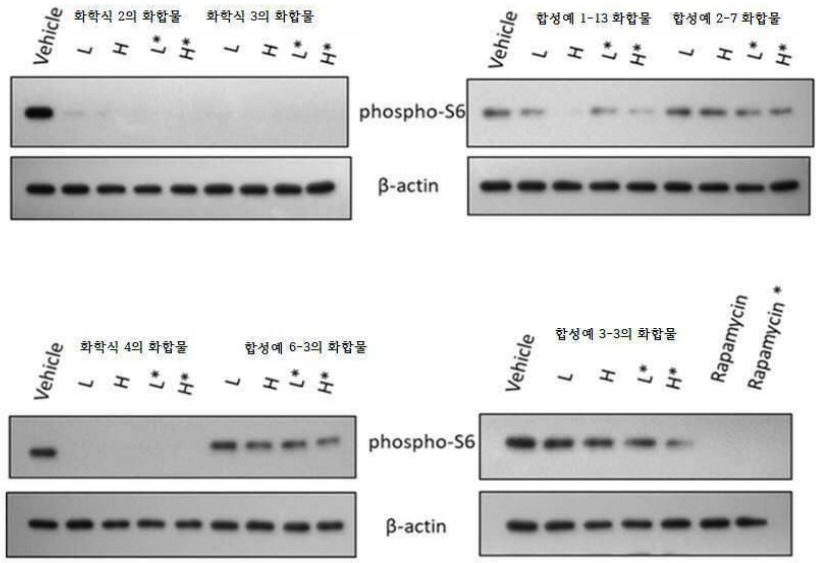
[0209] 이상과 같이 실시예를 통하여 본 발명을 설명하였다. 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 상술한 실시예들은 모든 면에 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

