(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0043485
(43) 공개일자 2020년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07J 63/00 (2006.01) *A61K 31/56* (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
C07J 75/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07J 63/00 (2013.01)
A61K 31/56 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7010183
(22) 출원일자(국제) 2018년09월17일
심사청구일자 2020년04월08일
(85) 번역문제출일자 2020년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/106012
(87) 국제공개번호 WO 2019/052560
국제공개일자 2019년03월21일
(30) 우선권주장
201710841681.8 2017년09월18일 중국(CN)

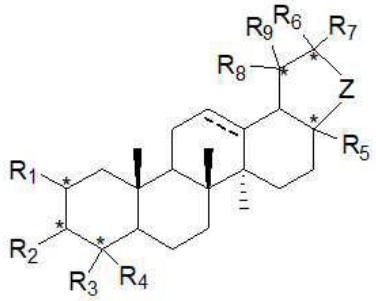
(71) 출원인
상하이 인스티튜트 오브 마테리아 메디카 차이니즈 아카데미 오브 싸이언시즈
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555
(72) 발명자
난, 파준
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555
시에, 신
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **펜타사이클릭트리테르펜계 화합물 및 이의 제조 방법, 약물 조성물 및 용도**

(57) 요 약

본 발명은 일반식 I로 표시되는 펜타사이클릭트리테르펜계 (Pentacyclic triterpenes) 화합물 및 이의 제조 방법을 제공하고, 상기 화합물은 FXR 수용체를 효과적으로 길항할 수 있다.



일반식 I:

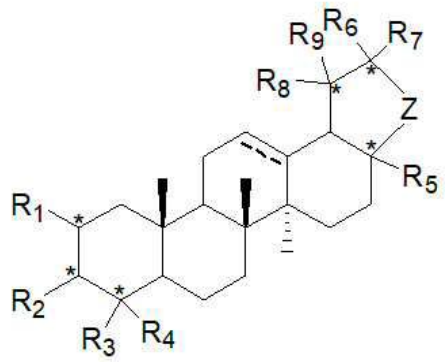
(52) CPC특허분류
A61K 31/58 (2013.01)
A61P 3/00 (2018.01)
C07J 75/00 (2013.01)
(72) 발명자
장, 첸루
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555
구오, 쉬멩
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555
장, 양밍
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555
왕, 시웨이
중국 상하이 201203 푸동 챙지앙 주창치 로드 555

명 세 서

청구범위

청구항 1

일반식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 있어서,

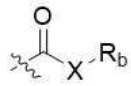


일반식 I:

R_1은 수소, 히드록실기, 할로겐 또는 C_1-C_6알킬기이고;

R_2는 수소, 히드록실기, 할로겐, C_1-C_6알콕시기, 3원 내지 10원 시클로알콕시기, =O, =N-OH, R-C(=O)-O-이며; R은 치환 또는 비치환된 C_1-C_8알킬기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기, 5원 내지 7원 헤테로아릴기, R_aNH- 또는 R_aO-이고; 각각의 R_a는 독립적으로 C_1-C_8알킬기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기 및 5원 내지 7원 헤테로아릴기로부터 선택되며;

R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된 C_1-C_6알킬기이고;

R_5는 수소, 히드록실기, 히드록시메틸기, 포르밀기,  로부터 선택되며; X는 NH, O 또는 S이고, R_b는 수소, 비치환 또는 치환된 C_1-C_6알킬기이며;

R_6, R_7, R_8 및 R_9는 각각 독립적으로 수소, 히드록실기 또는 C_1-C_6알킬기이고;

Z는 $-(CH_2)-_n$이며, n은 1, 2 또는 3이고;

 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며;

각각의 *는 독립적으로 R 배열, S 배열 또는 라세미를 나타내고;

상기 치환은 기의 수소가 히드록실기, 할로겐, C_1-C_6알킬기, C_1-C_6알콕시기, 카복실기(-COOH), 설폰산기($-SO_2OH$)로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 치환기에 의해 치환됨을 지칭하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서,

R_1은 수소 또는 히드록실기인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

R_2는 히드록실기, R-C(=O)-O-이고; R은 치환 또는 비치환된 C_1-C_6알킬기, C_3-C_8시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기, 5원 내지 7원 헤테로아릴기, R_aNH- 또는 R_aO-이며; 각각의 R_a는 독립적으로 C_1-C_6알킬기이고;

상기 치환은 기의 수소가 할로겐, C_1-C_6알킬기 및 C_1-C_6알콕시기로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 치환기에 의해 치환됨을 지칭하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

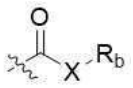
청구항 4

제1항에 있어서,

R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 C_1-C_4알킬기인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서,

R_5는 히드록시메틸기, 포르밀기,  로부터 선택되고; X는 NH 또는 O이며, R_b는 수소, 비치환 또는 치환된 C_1-C_4알킬기이고;

상기 치환은 기의 수소가 C_1-C_4알킬기, 카복실기(-COOH), 설폰산기(-SO_2OH)로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 치환기에 의해 치환됨을 지칭하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 6

제1항에 있어서,

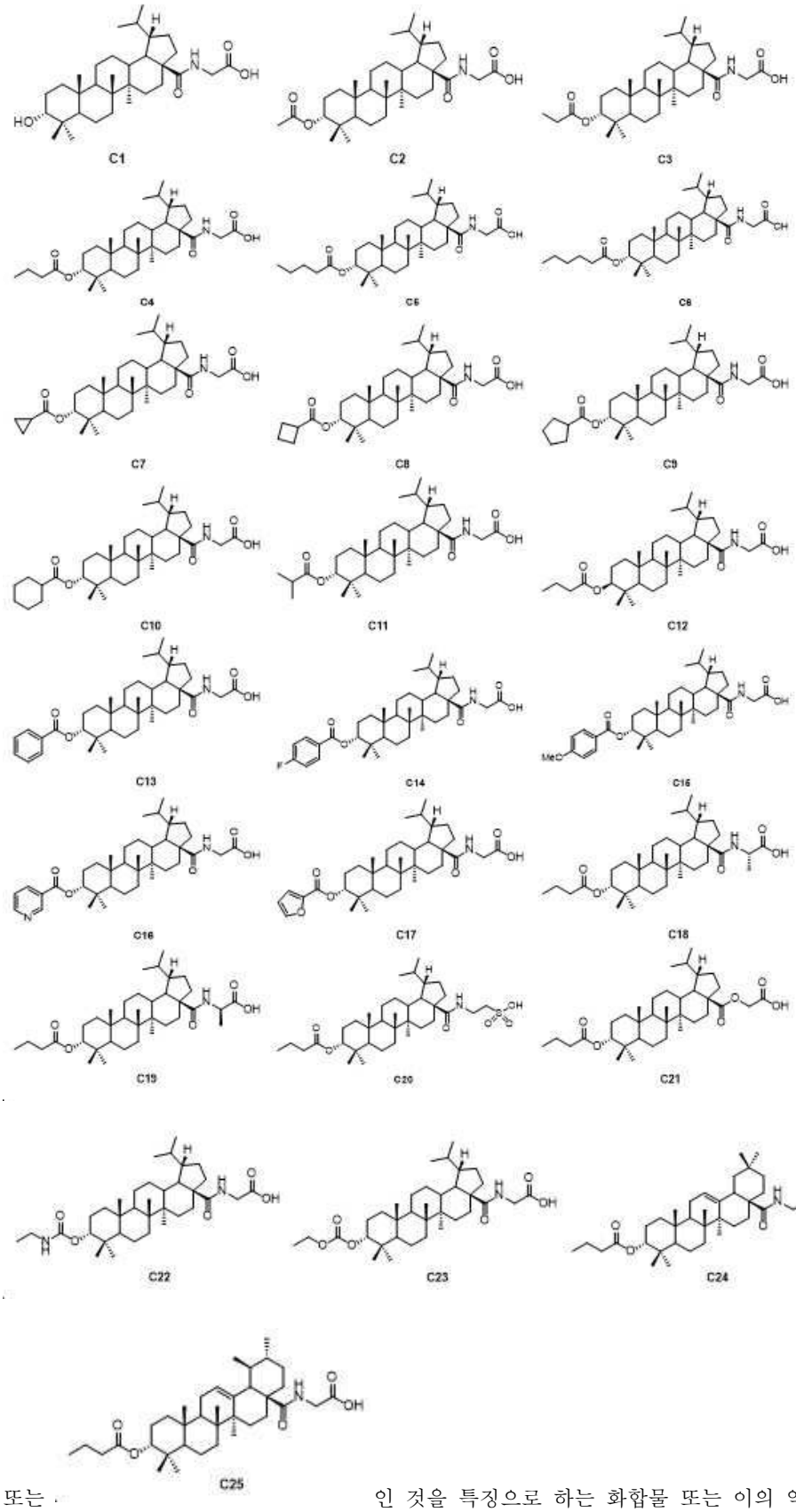
R_6 및 R_7은 각각 독립적으로 수소, 메틸기 또는 에틸기이고;

R_8 및 R_9는 각각 독립적으로 수소, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, tert-부틸기 또는 이소부틸기인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 7

제1항에 있어서,

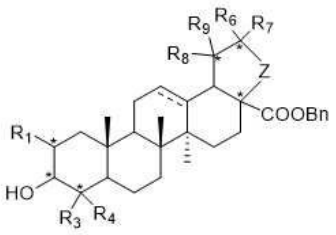
상기 화합물은,



또는 . 인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 8

제1항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조 방법에 있어서,



상기 방법은 을 원료로, 3 번 히드록실기에 에스터기를 도입하고, 수소화하여 17 번 카복실기의 벤질 보호기를 제거한 후, 카복실기에 아미노산 기를 도입하여 제1항에 따른 화합물을 얻으며, 식에서, 각각의 치환기는 제1항에 정의된 바와 같은 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및

약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약물 조성물.

청구항 10

(i) 파네소이드 유도체 X 수용체(FXR) 길항제를 제조하거나; 또는

(ii) 대사성 질환을 치료하는 약물을 제조하는 것을 특징으로 하는 제1항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제9항에 따른 약물 조성물의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 파네소이드 유도체 X 수용체(The farnesoid X receptor, FXR) 길항제에 관한 것으로, 구체적으로, 펜타사이클릭트리테르펜계 화합물 및 이의 제조 방법, 및 상기 화합물을 포함하는 약물 조성물, FXR 길항제를 제조하는 과정에서의 용도, 및 담즙울혈(cholestasis), 고혈지, 당뇨병 약물을 제조하는 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] FXR은 핵 수용체 슈퍼 패밀리의 맴버로, 간, 장, 신장, 부신 및 지방 조직에서 고발현된다. 내인성 담즙산의 주요 조절 인자로서, FXR은 담즙산 합성 및 이의 간장 순환 과정에서 관건적인 역할을 한다. FXR은 간장 대사 축의 복잡한 조절 네트워크를 통해 체내 트리글리세리드, 저밀도 지단백질, 고밀도 지단백질 및 혈당의 수준을 조절하고, 이외에, FXR은 간 손상과 염증, 간암 및 장내 균종 조절 등 과정에 관여한다.

[0003] FXR은 담즙산 대사 장애, 지방 대사 장애 및 당 대사 이상 등과 같은 많은 대사 질환에 관여하므로, FXR 조절제는 담즙울혈, 고혈지 및 당뇨병 등 일련의 대사성 질환을 치료하는 약물로 개발될 것으로 전망된다. 예를 들어, FXR 강력 작용제인 오베티콜릭산(obeticholic acid)은 원발성 담즙성 경변증을 치료하는 3기 임상에서 성공하여 상장 승인을 받았다. 이외에, 오베티콜릭산은 비알코올성 지방간염(NASH) 적응증이 수반되는 당뇨병 분야에서 임상연구가 진행되고 있다. 현재, FXR 길항제에 관한 보고가 많고, 일부 화합물은 체내 약력학적 실험에서 혈지 저하, 혈당감소 또는 담즙산 울혈 개선에 일정한 작용을 나타낸다. 연구에 의하면, 장내 특이적 FXR 유전자 녹아웃 마우스는 인슐린 내성과 비만에 쉽게 걸리지 않으며, 이 과제팀은 FXR을 길항할 수 있는 담즙산 유도체 T-β-MCA를 발견하였고, 이는 일련의 대사 기능 개선과 관련이 있지만, 상기 화합물은 장내 세균에 의해 분비되는 담즙산염 가수 분해 효소 BSH에 의해 신속하게 분해될 수 있다. 최근 담즙산 유도체 Gly-MCA도 문헌에 보고되었고, 이는 장내 FXR을 선택적으로 닫을 수 있어, 마우스의 지방간을 예방 및 역전시킬 수 있으며, 인슐린 및 혈당에 대한 고지방식이 사육 마우스의 민감도가 증가하고 BSH에 의해 분해되지 않는다. FXR 길항제의 개발은 비만, 고혈지, 2형 당뇨병 및 지방간 등과 같은 일부 대사성 질환의 치료에 새로운 아이디어를 제공할 수 있다.

[0004] 현 단계에서 보고된 FXR 길항제는 주로 천연물 길항제 및 합성 소분자 길항제 등 두 가지 유형을 포함한다. 천연물 구굴스테론(Guggulsterone, GS)은 최초로 보고된 FXR 길항제이지만, 선택성이 비교적 차하여 많은 핵 수용체에 대해 모두 작용이 있다. 2007년 Carter 등이 발견한 피토스테로(phytosterol)인 Stigmasterol Acetate 및 최씨(Choi)가 2011년에 보고한 일련의 해양 천연물인 Tuberatolides는 모두 FXR을 길항할 수 있지만, 화합물 천

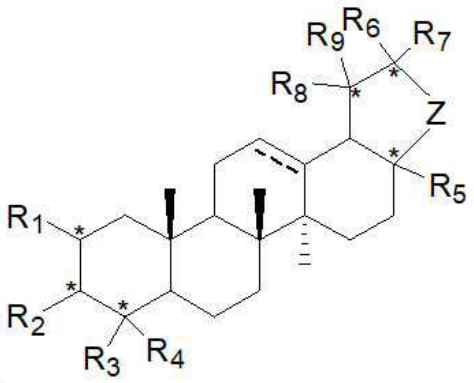
연 내원이 제한되고 합성 난이도가 비교적 크므로, 이 유형의 화합물의 구조적 최적화에 대한 보고는 없다. 최초의 비스테로이드성 FXR 소분자 길항제는 Kainuma팀에 의해 2007년에 보고되었고, FXR 작용제 GW4064로부터 개조되었다. 다른 유형의 대표적인 소분자 길항제는 2012년 Li Jian 과제팀에 의해 발견된 피라졸론계(pyrazolones) 화합물이고, 상기 화합물은 콜레스테롤 사육 마우스의 체내 약력학 실험에서 사용량 의존적으로 트리글리세리드 및 콜레스테롤의 수준을 감소시킬 수 있다. 천연물 소분자 FXR 길항제이든 합성 소분자 FXR 길항제이든, 보편적으로 활성이 비교적 약한 결함이 존재하고, 종류가 비교적 적다. 이들 대부분은 모두 천연물이고, 구조가 복잡하며, 후속 개발에 불리하다.

[0005] 현재, 펜타사이클릭트리테르펜계 화합물을 FXR 길항제로 사용한다는 보고가 거의 없고, 최초로 보고된 펜타사이클릭트리테르펜계 FXR 길항제는 플라티코딘D(Platycodin D)이며, 그 후, 올레오놀산(oleanolic acid)도 미약한 FXR 길항 활성을 구비한다는 것을 발견하였다. 최근에 Fang Wei-shuo 과제팀은 올레오놀산을 개조 시작점으로 3-beta-올레오놀산(3-beta-oleanolic acid) 유도체를 합성하였고, FXR 길항 활성은 제고되었지만, 지금까지 베툴린산(betulinic acid) 유도체가 FXR 길항제에 사용되는 보고가 없다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 목적은 FXR 길항제로 사용되는 펜타사이클릭트리테르펜계 화합물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 제1 양태에 따르면, 일반식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하고,

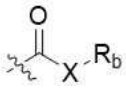


[0008] 일반식 I:

[0009] R_1은 수소, 히드록실기, 할로겐 또는 C_1-C_6알킬기이며;

[0010] R_2는 수소, 히드록실기, 할로겐, C_1-C_6알콕시기, 3원 내지 10원 시클로알콕시기, =O, =N-OH, R-C(=O)-O-이고; R은 치환 또는 비치환된 C_1-C_8알킬기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기, 5원 내지 7원 헤테로아릴기, R_aNH- 또는 R_aO-이며; 각각의 R_a는 독립적으로 C_1-C_8알킬기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기 및 5원 내지 7원 헤테로아릴기로부터 선택되고;

[0011] R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된 C_1-C_6알킬기이며;

[0012] R_5는 수소, 히드록실기, 히드록시메틸기, 포르밀기, 

로부터 선택되고; X는 NH, O 또는 S이며, R_b는 수소, 비치환 또는 치환된 C_1-C_6알킬기이고;

[0013] R_6, R_7, R_8 및 R_9는 각각 독립적으로 수소, 히드록실기 또는 C_1-C_6알킬기이며;

[0014] Z는 $-(CH_2)-_n$이고, n은 1, 2 또는 3이며;

[0015] ---- 는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고;

[0016] 각각의 *는 독립적으로 R 배열, S 배열 또는 라세미를 나타내며;

[0017] 상기 치환은 기의 수소가 히드록실기, 할로겐, C_1-C_6알킬기, C_1-C_6알콕시기, 카복실기(-COOH), 설폰산기(-

SO_2OH)로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 치환기에 의해 치환되는 것을 지칭한다.

[0018] 다른 바람직한 예에서, R_1은 수소 또는 히드록실기이다.

[0019] 또 다른 바람직한 예에서, R_1은 수소이다.

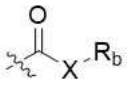
[0020] 또 다른 바람직한 예에서, R_2는 히드록실기, R-C(=O)-O-이고, R은 치환 또는 비치환된 C_1-C_6알킬기, C_3-C_8시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기, 5원 내지 7원 헤테로아릴기, R_aNH- 또는 R_aO-이며; 각각의 R_a는 독립적으로 C_1-C_6알킬기이고;

[0021] 상기 치환은 기의 수소가 할로겐, C_1-C_6알킬기 및 C_1-C_6알콕시기로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 치환기에 의해 치환되는 것을 지칭한다.

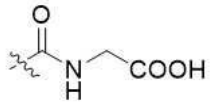
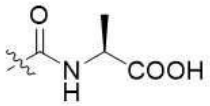
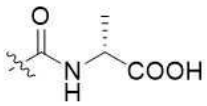
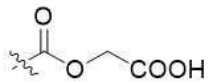
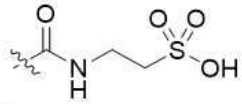
[0022] 또 다른 바람직한 예에서, R_2는 α 배열로 고리와 연결된다.

[0023] 또 다른 바람직한 예에서, R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 C_1-C_4알킬기이다.

[0024] 또 다른 바람직한 예에서, R_3 및 R_4는 동시에 메틸기이다.

[0025] 또 다른 바람직한 예에서, R_5는 히드록시메틸기, 포르밀기,  로부터 선택되고; X는 NH 또는 O이며, R_b는 수소, 비치환 또는 치환된 C_1-C_4알킬기이고;

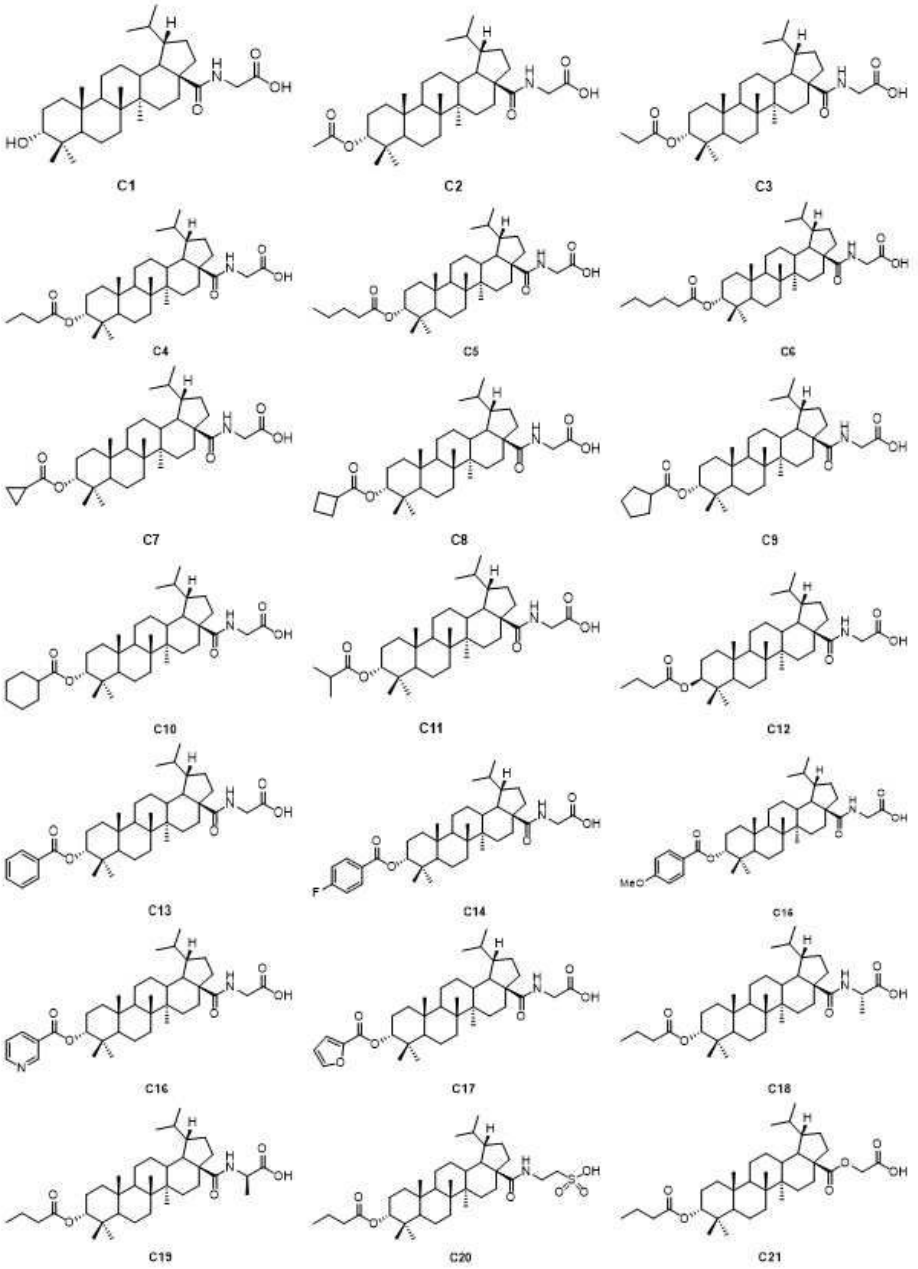
[0026] 상기 치환은 기의 수소가 C_1-C_4알킬기, 카복실기(-COOH), 설폰산기(-SO_2OH)로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 치환기에 의해 치환되는 것을 지칭한다.

[0027] 또 다른 바람직한 예에서, R_5는  ,  ,  ,  또는  이다.

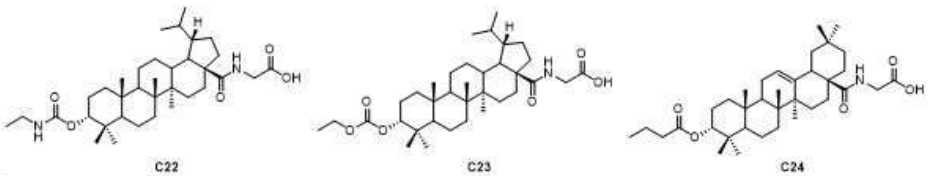
[0028] 또 다른 바람직한 예에서, R_6 및 R_7은 각각 독립적으로 수소, 메틸기 또는 에틸기이고;

[0029] R_8 및 R_9는 각각 독립적으로 수소, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, tert-부틸기 또는 이소부틸기이다.

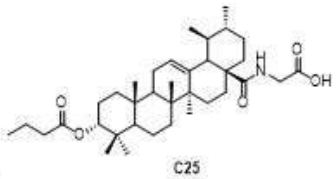
[0030] 또 다른 바람직한 예에서, 상기 화합물은,



[0031]

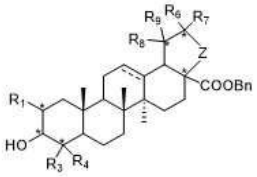


[0032]



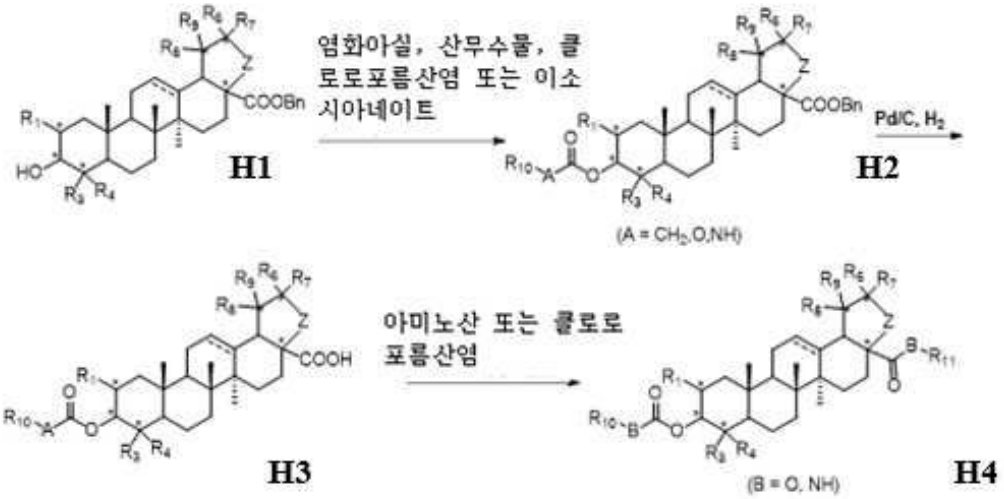
[0033] 또는 이다.

[0034] 본 발명의 제2 양태는 제1 양태에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공하고,



상기 방법은 을 원료로, 3 번 히드록실기에 에스터기를 도입하고, 수소화하여 17번 카복실기의 벤질 보호기를 제거한 후, 카복실기에 아미노산 기를 도입하여 제1 양태에 따른 화합물을 얻으며, 각각의 치환기는 제1 양태에 정의된 바와 같다.

[0035] 바람직한 일 실시형태에 따르면, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기와 같은 반응 경로를 통해 제조되고,



[0036]

[0037] 식 H1 화합물은 염화아실(acyl chloride), 산무수물, 클로로포름산염(chloroformate) 또는 이소시아네이트(isocyanate)와 반응하여 식 H2 화합물을 얻으며,

[0038] 식 H2 화합물은 벤질 보호기를 제거하여 식 H3 화합물을 얻고,

[0039] 식 H3 화합물은 아미노산 또는 클로로포름산염과 반응하여 식 H4 화합물을 얻으며,

[0040] 여기서, R_{10}은 치환 또는 비치환된 C_1-C_8알킬기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기, 5원 내지 7원 헤테로아릴기, R_aNH- 또는 R_aO-이고; 여기서, 각각의 R_a는 독립적으로 C_1-C_8알킬기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_6-C_{10}아릴기, 5원 내지 7원 헤테로아릴기로부터 선택되며; R_{11}은 수소, 비치환 또는 치환된 C_1-C_6알킬기로부터 선택된다.

[0041] 치환의 정의는 상술된 바와 같다.

[0042] 본 발명의 제3 양태는 약물 조성물을 제공하고, 상기 약물 조성물은 제1 양태에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0043] 본 발명의 제4 양태는 (i) 파네소이드 유도체 X 수용체(FXR) 길항제를 제조하거나 (ii) 대사성 질환을 치료하는 약물을 제조하는 것을 특징으로 하는 제1항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제9항에 따른 약물 조성물의 용도를 제공한다.

[0044] 다른 바람직한 예에서, 상기 대사성 질환은 고혈지, 담즙산울혈, 당뇨병, 비만, 비알코올성 지방간염, 담즙성 경변증으로부터 선택된다.

[0045] 고혈지를 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 제1항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제9항에 따른 약물 조성물을 이를 필요되는 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0046] 본 발명의 신규 펜타사이클릭트리테르펜계 화합물은 FXR을 효과적으로 길항할 수 있고, 마이크로몰 농도에서 FXR을 길항할 수 있으며, TGR5 수용체에 대해 작용 효과가 없고, 기존의 일부 천연 유래 FXR 길항제에 비해 더욱 풍부한 천연 공급원과 더욱 간단한 합성 방법이 있다.

[0047] 본 발명의 범위 내에서, 본 발명의 상기 각 기술적 특징 및 이하(예를 들어, 실시예)에서 구체적으로 설명되는 기술적 특징은 서로 조합되어 새로운 또는 바람직한 기술적 해결수단을 형성할 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서에 개시된 각각의 특징은 동일하거나 동등하거나 유사한 목적을 제공하는 임의의 대안적인 특징으로 대체될 수 있다. 편폭의 제한으로 인해 여기서 일일이 서술하지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 발명자들은 광범위하고 집중적인 연구를 거쳐, 처음으로 펜타사이클릭트리테르펜계 화합물을 연구 개발하였고, 이의 주요 특징은 3번 히드록실기를 역전 및 이의 17번 카복실기에 글리신 또는 타우린 등 기를 도입하여, FXR 길항 활성은 현저하게 증가시키는 것이다. 발명자는 이러한 구조가 활성에 미치는 영향 규율을 연구 개발하여, 일련의 성능이 우수한 화합물을 얻었으며, 기존의 일부 천연 유래의 FXR 길항제에 비해 공급원이 더욱 풍부할 뿐만 아니라 합성이 간단하여 상기 표적에 작용하는 대사성 질환을 치료하는 신규 약물이 될 것으로 전망된다. 이의 기초 상에서 본 발명을 완성하였다.

[0049] 용어

[0050] 본 발명에서, 상기의 알킬기는 바람직하게 지방족 알킬기이고, 직쇄 알킬기이거나 분지쇄 알킬기일 수 있으며, 비제한적으로 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기 등을 포함하고; "C1-C8"과 같은 서술은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 탄소 원자를 구비하는 상응한 기를 포함하는 것을 의미하며, 예를 들어, "C1-C8알킬기"는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 탄소 원자를 구비하는 알킬기를 지칭하고, "C2-C10알케닐기"는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 탄소 원자를 구비하는 알케닐기 지칭한다.

[0051] 본 발명에서, 상기 알케닐기는 바람직하게 비닐기(Vinyl group), 프로페닐기(propenyl group), 부테닐기(butenyl group), 스티릴기(styryl group), 신나밀기(cinnamyl group) 또는 유사 기다.

[0052] 본 발명에서, 할로겐은 바람직하게 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다.

[0053] 본 발명에서, 알콕시기는 -O-(알킬기)를 의미하고, 여기서, 알킬기의 정의는 상술된 바와 같다. "C_{1-6}알콕시기"는 1 ~ 6개의 탄소를 함유하는 알킬옥시기(Alkyloxy group)를 의미하고, 비제한적인 실시예는 메톡시기(Methoxy, 에톡시기(ethoxy group), 프로폭시기(propoxy group), 부톡시기(butoxy group) 등을 포함한다.

[0054] 본 발명에서, 상기 시클로알킬기는 포화 또는 부분 포화 모노시클로(Monocyclo) 또는 폴리시클로(polycyclo) 시클릭탄화수소(Cyclic hydrocarbon) 치환기일 수 있고, 여기서, 3개 내지 20개의 탄소 원자를 포함하며, 바람직하게 3개 내지 12개의 탄소 원자를 포함하고, 더욱 바람직하게, 시클로알킬기(Cycloalkyl group)는 3개 내지 10개의 탄소 원자를 포함한다. 모노시클로인 시클로알킬기의 비제한적 실시예는 시클로프로필기(Cyclopropyl group), 시클로부틸기(cyclobutyl group), 시클로펜테닐기(cyclopentenyl group), 시클로헥실기(cyclohexyl group), 시클로옥틸기(cyclooctyl group) 등을 포함하고, 폴리시클로인 시클로알킬기는 스피로 고리계, 축합 고리계 및 브릿지 고리계의 시클로알킬기를 포함한다.

[0055] 본 발명에서, 시클로알콕시기는 -O-(시클로알킬기)를 의미하고, 여기서, 시클로알킬기의 정의는 상술된 바와 같다.

[0056] 상기 아릴기는 6원 내지 10원 풀-탄소 모노시클로 또는 축합 폴리시클로(즉, 인접한 탄소 원자 쌍을 공유하는 고리) 기를 의미하고, 상기 기는 공액 π 전자 체계를 구비하며, 예를 들어, 페닐기 및 나프틸기이다. 상기 아릴기 고리는 헤테로시클로기(Heterocyclo group), 헤테로아릴기(Heteroaryl group) 또는 시클로알킬기(Cycloalkyl group)와 고리 축합 될수 있고, 비제한적인 실시예는 벤조이미다졸(Benzoimidazole), 벤조티아졸(benzothiazole), 벤조옥사졸(benzoxazole), 벤조이속사졸(benzoisoxazole), 벤조피라졸(benzopyrazole), 퀴놀린(quinoline), 벤조인돌(benzoindole), 벤조디히드로푸란(benzodihydrofuran)을 포함한다.

[0057] 상기 헤테로아릴기는 1개 내지 4개의 헤테로 원자, 5개 내지 14개의 시클로 원자를 포함하는 헤테로방향족 체계를 의미하고, 여기서, 헤테로 원자는 산소, 황 및 질소를 포함한다. 바람직하게, 헤테로아릴기는 5원 또는 6원이고, 예를 들어, 푸릴기 (furyl group), 티에닐기(thienyl group), 피리딜기 (pyridyl group), 피롤릴기(pyrrolyl group), N-알킬피롤릴기 (N-alkyl pyrrolyl group), 피리미디닐기 (pyrimidinyl group), 피라지닐기(pyrazinyl group), 이미다졸릴기 (imidazolyl group), 테트라졸릴기(tetrazolyl group) 등이다. 상기 헤테로아릴기는 아릴기, 헤테로시클로기 또는 시클로알킬기의 고리에 축합될 수 있고, 여기서, 모 구조에 연결된 고리

는 헤테로아릴기 고리이다.

[0058] 본 발명에서 달리 명시되지 않는 한, 는 연결 부위를 나타낸다.

[0059] 달리 설명하지 않는 한, 본 발명에 기술된 구조식은 모든 호변이성질체, 광학 이성질체 및 입체 이성질체 형식(예를 들어, 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체, 기하 이성질체 또는 형태 이성질체)을 포함하고, 예를 들어, 비대칭 중심의 R배열, S배열, 이중 결합의 (Z) 이성질체, (E) 이성질체, (Z) 형태 이성질체 및 (E) 형태 이성질체를 포함한다. 따라서, 본 발명의 화합물의 단일 입체화학 이성질체, 호변 이성질체 또는 이의 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체 또는 기하 이성질체 또는 형태 이성질체 또는 호변 이성질체의 혼합물은 모두 본 발명의 범위에 속한다.

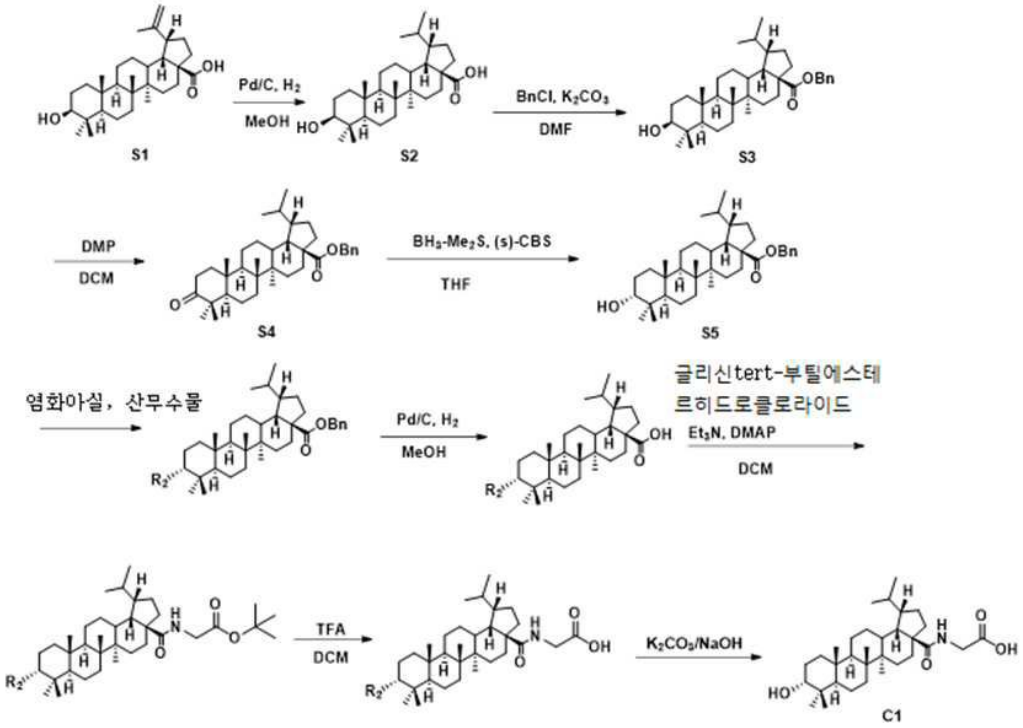
[0060] 용어 "호변 이성질체"는 상이한 에너지를 갖는 구조 이성질체가 낮은 에너지 장벽을 초과하여 호변될 수 있는 것을 나타낸다. 예를 들어, 양성자 호변 이성질체(즉, 프로토트로피 (prototropy))는 1H-인다졸 (1H-indazole)과 2H-인다졸 (2H-indazole), 1H-벤조[d]이미다졸 (1H-benzo[d]imidazole)과 3H-벤조[d]이미다졸(3H-benzo[d]imidazole)과 같은 양성자 이전을 통한 호변을 포함하고, 원자가 호변 이성질체는 일부 결합 전자의 재구성을 통한 호변을 포함한다.

[0061] 본 발명에서, 달리 제한되지 않는 한, 바람직하게, 상기의 약학적으로 허용 가능한 염은 무기산염, 유기산염, 알킬설포네이트(Alkyl sulfonate)와 아릴설포네이트(Aryl sulfonate)를 포함하고, 상기 무기산염은 염산염(Hydrochloride), 히드로브로마이드(Hydrobromide), 니트레이트(Nitrate), 설페이트(Sulfate), 및 포스페이트(Phosphate) 등을 포함하며, 상기 유기산염은 포르메이트(Formate), 아세테이트 (Acetate), 프로피오네이트(Propionate), 벤조에이트(Benzoate), 말레에이트 (Maleate), 푸마레이트(Fumarate), 숙시네이트(Succinate), 타르트레이트(Tartrate) 및 시트레이트(Citrate) 등을 포함하고, 상기 알킬설포네이트는 메틸설포네이트(methyl sulfonate) 및 에틸설포네이트 (Ethyl sulfonate) 등을 포함하며, 상기 아릴설포네이트는 베실레이트(Besylate) 및 p-톨루엔설포네이트(P-toluenesulfonate) 등을 포함한다.

[0062] 제조방법

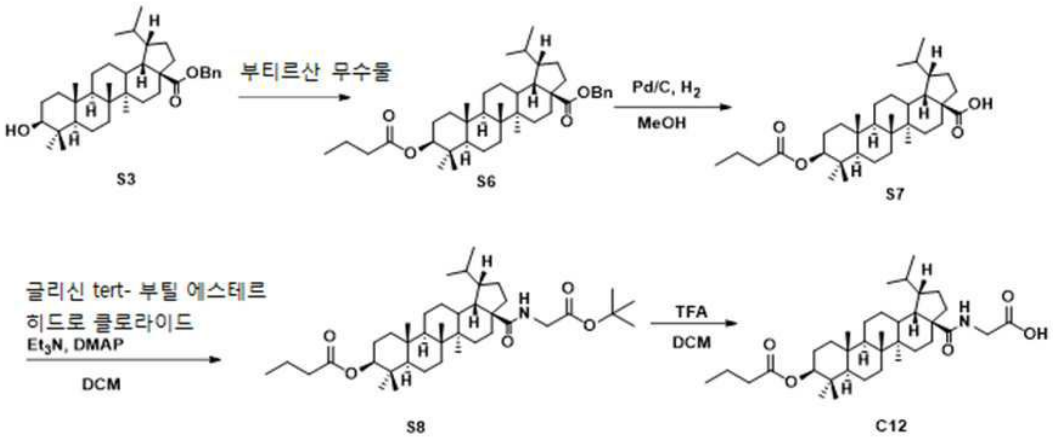
[0063] 본 발명의 펜타사이클릭트리테르펜계 화합물은 하기와 같은 경로를 통해 제조될 수 있다.

[0064] 제1 경로:



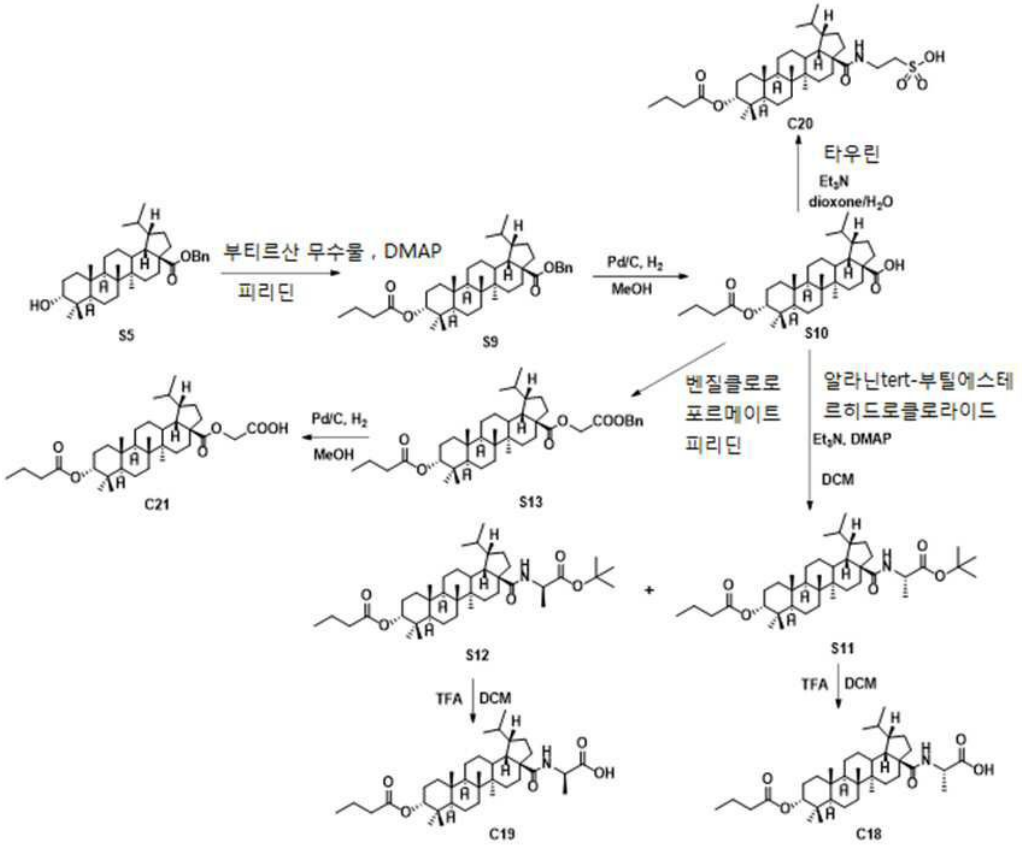
[0065]

[0066] 제2 경로:



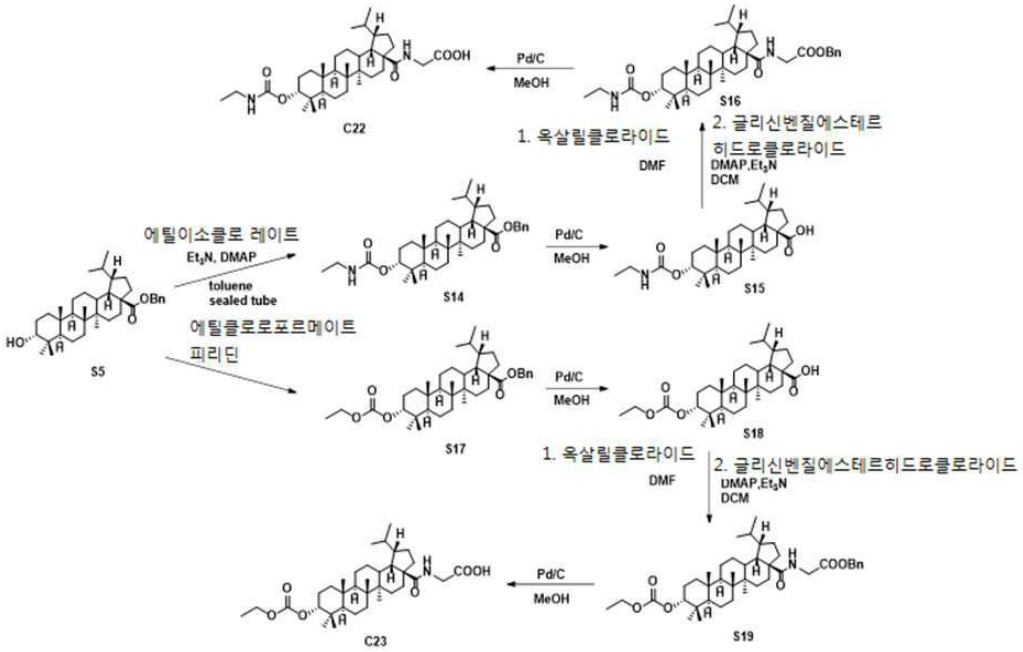
[0067]

[0068] 제3 경로:



[0069]

[0070] 제4 경로:



[0071]

[0072] 이하, 구체적인 실시예에 결부하여 본 발명을 더 자세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 것이지 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 하기 실시예에서 구체적인 조건이 명시되지 않은 실험 방법은 통상적인 조건(예를 들어, Sambrook 등, Molecular Cloning : Laboratory Manual (New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)에 기술된 조건) 또는 제조업체가 건의하는 조건에 따라 수행된다. 달리 언급되지 않는 한, 백분율 및 부수는 중량 백분율 및 중량 부수이다.

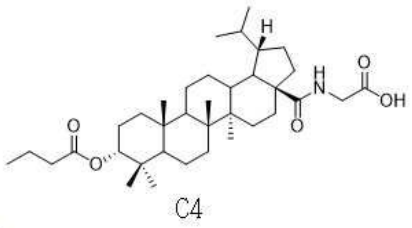
[0073] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 전문 용어 및 과학 용어는 당업자에게 숙지된 것과 동일한 의미를 갖는다. 이외에, 기재된 내용과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료는 모두 본 발명의 방법에 응용될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 바람직한 실시 방법 및 재료는 단지 예시적인 것이다.

[0074] 하기 제조 실시예에서, NMR은 Varian에서 생산한 Mercury-Vx 300M 기기로 측정하고, NMR 보정(calibrate)은 δH 7.26 ppm($CDCl_3$), 2.50 ppm(DMSO-d_6)이며, 질량 분석은 Agilent 1200 Quadrupole LC/MS 액체 크로마토그래피 질량분석기 또는 SHIMADZU GCMS-QP5050A로 측정하고, 시약은 주로 상하이화학시약회사에서 제공하며, TLC 박막 크로마토그래피 실리카 겔 플레이트는 산둥옌타이후이유실리카겔개발유한회사에서 생산하였고, 모델은 HSGF 254이며, 화합물 정제에 사용되는 순상 칼럼 크로마토그래피 실리카 겔은 산둥칭다오해양화공장 분공장에서 생상하였고, 모델은 zcx-11이며, 200 ~ 300 메쉬이다.

[0075] 본 발명에서, 약어에 대응되는 명칭은 하기와 같다.

[0076] DMAP: 4-디메틸아미노피리딘(4-dimethylaminopyridine), DCM: 디클로로메탄(Dichloromethane), DMF: N,N-디메틸포름아미드(N, N-dimethylformamide), TFA: 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetate).

[0077] 실시예1



[0078]

[0079] (1) 실온 하에서 원료 베툴린산 S1(1.2 g, 2.63 mmol)을 메탄올(50 mL)에 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 Pd/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온에서 교반하였다. 24 시간

후 TLC 측정 결과 반응이 완료었다. 질소를 바꾼 후 Pd/C를 여과하여 제거하고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 석유에테르/에틸아세테이트가 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 1.04 g(2.27 mmol)의 화합물S2를 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 86 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.13 (t, 1H, J = 9.0, 6.9 Hz), 2.28-2.16 (m, 2H), 1.98-1.78 (m, 4H), 1.64-0.96 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.96 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.78 (s, 3H).

[0080] (2) 실온 하에서 상기 단계의 산물인 S2(1.04 g, 2.27 mmol)를 DMF(20 mL)에 용해시키고, 무수 탄산칼륨(0.626 g, 4.54 mmol)을 첨가하며, 교반하면서 염화벤질(benzyl chloride)(0.313 mL, 2.72 mmol)을 천천히 적가하였다. 적가 완료 후 반응액을 50 ℃로 이동시켜 3시간 동안 교반하고, TLC 모니터링 결과 반응이 완전히 진행된 것으로 나타났다. 혼합물을 실온까지 냉각시키고, 50 mL의 탈이온수를 첨가하여 희석하며, 에틸아세테이트(2X50 mL)로 추출하고, 합병된 유기층을 각각 탈이온수 및 포화 식염수로 세척하며, 황산나트륨으로 건조시킨 후 감압 증류하여 1.21 g(2.20 mmol)의 원하는 백색 고체 화합물 S3을 얻었으며, 바로 다음 단계의 반응에 사용되고, 몰 수율은 97 %이다.

[0081] (3) 아이스워터배스(ice-water bath) 하에서 S3(1.21 g, 2.20 mmol)을 DMF(30 mL)에 용해시키고, Dess-Martin 산화제(1.87 g, 4.40 mmol)를 차수를 나누어 첨가하며, 실온까지 천천히 가열하고 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과시킨 후 스핀 건조하고, 석유에테르/에틸아세테이트가 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 0.983 g(1.80 mmol)의 화합물 S4를 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 82 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 5.16-5.05 (m, 2H), 2.55-2.34 (m, 2H), 2.31-2.18 (m, 3H), 1.95-1.12 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.06 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.86 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 0.79-0.73 (m, 6H).

[0082] (4) 상기 단계의 산물인 S4(0.983 g, 1.80 mmol) 및 S-(-)-2-메틸옥사졸보란(S-(-)-2-methyloxazoleborane)(100 mg, 0.36 mmol)을 100 mL의 건조된 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 새로운 나트륨 와이어로 처리된 THF(70 mL)를 첨가하였다. 실온 하에서 10 M의 보란-테트라히드로푸란(Borane-tetrahydrofuran) 용액(0.32 mL)을 천천히 적가하고, 적가 속도를 제어하여 10분 내에 적가 완료하며, 실온 하에서 10분간 교반하고, TLC 모니터링 결과 이미 완전히 반응된 것으로 나타났다. 플라스크를 아이스워터배스로 옮기고, 메탄올을 천천히 적가하여 반응을 퀀칭(Quenching)하며, 기포가 더 이상 형성되지 않으면 용매를 스핀 건조하고, 석유에테르/에틸아세테이트가 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 827 mg (1.51 mmol)의 화합물 S5를 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 84 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.30 (m, 5H), 5.15-5.06 (m, 2H), 3.38 (t, 1H, J = 3.0 Hz), 2.55-2.34 (m, 2H), 2.31-2.18 (m, 3H), 1.95-1.12 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.94 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.85-0.82 (m, 9H), 0.75-0.73 (m, 6H).

[0083] (5) 화합물 S5(110 mg, 0.20 mmol) 및 촉매 량의 DMAP(2.4 mg, 0.02 mmol)를 DMF(5 mL)에 용해시키고, 트리에틸아민(Triethylamine)(83 μL, 0.60 mmol)을 첨가하며, 아이스워터배스 하에서 부티르산무수물(Butyric anhydride)(98 μL, 0.60 mmol)을 적가하고, 실온에서 12 시간 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하여 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하고, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하며, 무수 황산나트륨으로 건조하여 농축시키고, 석유에테르/에틸아세테이트가 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 111 mg (0.18 mmol)의 산물 S9를 얻었으며, 몰 수율은 90 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 5.15-5.06 (m, 2H), 4.62 (t, 1H, J = 3.0 Hz), 2.34-2.16 (m, 4H), 1.93-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.97 (t, 6H, J = 7.2 Hz), 0.87-0.86 (m, 3H), 0.84-0.82 (m, 6H), 0.76-0.73 (m, 6H).

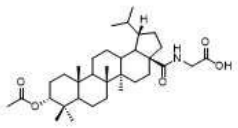
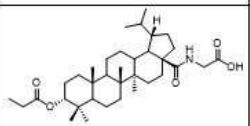
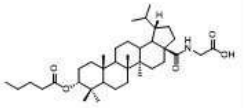
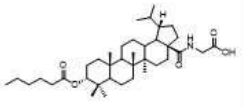
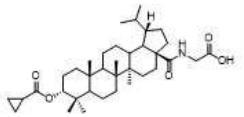
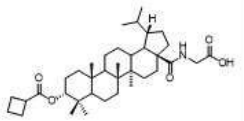
[0084] (6) 상기 단계의 산물인 S9(111 mg, 0.18 mmol)를 메탄올(10 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 Pd/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온 하에서 교반하였다. 1 시간 후 TCL 측정 결과 반응이 완료되었다. 질소 가스를 바꾼 후 Pd/C를 여과하여 제거하고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 석유에테르/에틸아세테이트가 9:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 79 mg(0.15 mmol)의 화합물 S10을 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 83 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.61 (s, 1H), 2.30 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.28-2.15 (m, 4H), 1.98-1.15 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.94 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.90 (t, 3H, J = 6.0 Hz), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.82 (s,

3H), 0.75 (s, 3H), 0.73 (s, 3H).

[0085] (7) 상기 단계의 산물인 S10(79 mg, 0.15 mmol) 및 촉매 량의 DMF(2 μL, 0.02 mmol)을 2 mL의 건조한 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 염화옥살릴(Oxalyl chloride)(125 μL, 1.5 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온까지 되돌린 후 3 시간 동안 교반하였다. 직접 DMF를 스핀하여 제거하고 오일 펌프로 완전히 제거한 후, 다음 단계의 반응에 사용하였다. 글리신tert-부틸에스테르히드로클로라이드(Glycine tert-butyl hydrochloride)(51 mg, 0.30 mmol) 및 촉매 량의 DMAP(3.7 mg, 0.03 mmol)를 1 mL의 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 트리에틸아민(103 μL, 0.75 mmol)을 적가한 후 새로 제조된 염화아실의 1 mL의 DMF 용액을 첨가하며, 10 분 후 실온까지 되돌리고, 실온에서 12 시간 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하고 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하며, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축하며, 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 83 mg(0.13 mmol)의 산물을 얻었으며, 몰 수율은 87 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.02 (t, 1H, J = 5.1 Hz), 4.62 (t, 1H, J = 3.0 Hz), 3.91-3.88 (m, 2H), 2.48-2.38 (m, 1H), 2.31 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.04-2.00 (m, 1H), 1.91-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.47 (s, 9H), 1.04-0.95 (m, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.86-0.82 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

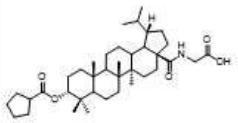
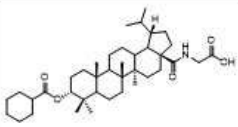
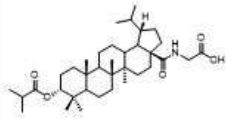
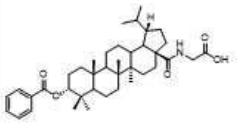
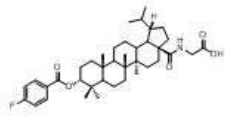
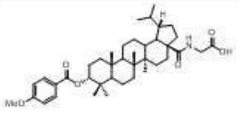
[0086] (8) 상기 단계의 83 mg(0.13 mmol)의 산물을 3 mL의 DMF에 용해시키고, 0.2 mL의 TFA를 첨가하며, 실온 하에서 1시간 동안 교반하고, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 용매를 직접 스핀 건조시키고, DMF/메탄올이 20:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 산물 C4(59 mg, 0.10 mmol)를 얻었으며, 몰 수율은 77 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.16 (s, 1H), 4.63 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 4.07 (s, 2H), 2.41-2.21 (m, 4H), 2.05-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00-0.95 (m, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

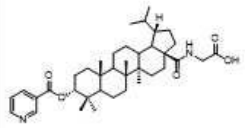
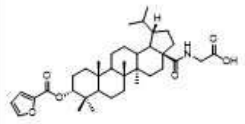
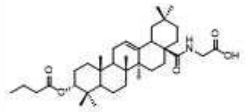
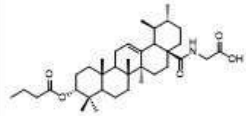
[0087] 실시예 1과 동일한 방법 및 다른 산 무수물 또는 염화아실로 하기의 화합물을 합성하였다.

화합물	구조	NMR
C2		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.23-6.19 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.04 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.42-2.33 (m, 1H), 2.31-2.23 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.02-1.05 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.86-0.82 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).
C3		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.13-6.09 (m, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 2.43-1.10 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz).
C5		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.16-6.13 (m, 1H), 4.62 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz), 4.06-4.04 (m, 2H), 2.43-2.23 (m, 3H), 2.04-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00 (s, 3H), 0.93-0.89 (m, 6H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).
C6		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.16-6.13 (m, 1H), 4.62 (t, 1H, *J* = 3.0 Hz), 4.06-4.04 (m, 2H), 2.43-2.40 (m, 4H), 2.04-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00 (s, 3H), 0.93-0.89 (m, 6H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).
C7		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.24 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 4.61 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz), 4.04 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz), 2.43-2.34 (m, 1H), 2.30-2.22 (m, 1H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.91-1.07 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.04-0.95 (m, 5H), 0.92 (s, 3H), 0.86-0.84 (m, 14H), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).
C8		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.18-6.15 (m, 1H), 4.62-4.60 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 3.23-3.11 (m, 1H), 2.42-2.16 (m, 6H), 2.11-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).

[0088]

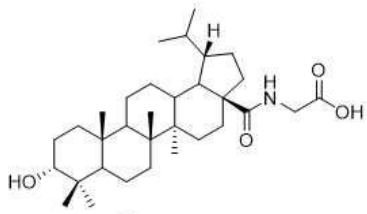
[0089]

C9		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.16-6.12 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 2.83-2.73 (m, 1H), 2.44-2.34 (m, 1H), 2.31-2.24 (m, 1H), 2.04-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).
C10		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.16-6.13 (m, 1H), 4.61-4.59 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 2.44-2.24 (m, 3H), 2.05-1.09 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.88-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz).
C11		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.20 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 4.59 (s, 1H), 4.06-4.04 (m, 2H), 2.63-2.53 (m, 1H), 2.43-2.21 (m, 2H), 2.13-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.20 (d, 3H, *J* = 1.5 Hz), 1.17 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz), 0.99 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz).
C13		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07-8.04 (m, 2H), 7.59-7.54 (m, 1H), 7.50-7.44 (m, 2H), 6.16-6.12 (m, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.08-4.05 (m, 2H), 2.45-2.36 (m, 1H), 2.32-2.25 (m, 1H), 2.11-1.15 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.04 (s, 3H), 0.96-0.95 (m, 6H), 0.92-0.91 (m, 6H), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz)
C14		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.08-8.03 (m, 2H), 7.17-7.11 (m, 2H), 6.14-6.11 (m, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.08-4.05 (m, 2H), 2.45-2.37 (m, 2H), 2.32-2.24 (m, 2H), 2.08-1.13 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.13 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.91 (s, 6H), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz).
C15		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.01(d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.95 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.15 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 4.85 (t, 1H, *J* = 3.0 Hz), 4.08-4.05 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.44-2.36 (m, 1H), 2.31-2.24 (m, 1H),

		2.11-1.16 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.04 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.91-0.90 (m, 6H), 0.85 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 0.75 (d, 3H, J = 6.6 Hz).
C16		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.26 (s, 1H), 8.83-8.81 (m, 1H), 8.41-8.37 (m, 1H), 7.53-7.48 (m, 1H), 6.17-6.14 (m, 1H), 4.94-4.92 (m, 1H), 4.08-4.05 (m, 2H), 2.45-2.38 (m, 1H), 2.32-2.25 (m, 1H), 2.06-1.97 (m, 2H), 1.84-1.16 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.03 (s, 6H), 0.96 (s, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (d, 3H, J = 6.6 Hz), 0.75 (d, 3H, J = 6.9 Hz).
C17		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.59 (s, 1H), 7.13 (d, 1H, J = 3.3 Hz), 6.52-6.50 (m, 1H), 6.14 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.85 (s, 1H), 4.07-4.05 (m, 2H), 2.44-2.36 (m, 1H), 2.32-2.24 (m, 1H), 2.06-1.15 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.03 (s, 6H), 0.95 (s, 6H), 0.93 (s, 3H), 0.90-0.85 (m, 9H), 0.75 (d, 3H, J = 6.6 Hz).
C24		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.69-6.66 (m, 1H), 5.48-5.46 (m, 1H), 4.65-4.63 (m, 1H), 4.09 (dd, J = 17.7, 5.4 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 17.7, 5.4 Hz, 1H), 2.60-2.56 (m, 1H), 2.31 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.10-1.06 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99-0.85 (m, 18H), 0.74 (s, 3H).
C25		^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.67-6.65 (m, 1H), 5.42-5.40 (m, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.06 (dd, J = 17.7, 5.1 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 18.0, 4.2 Hz, 1H), 2.60-2.56 (m, 1H), 2.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.05-1.06 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99-0.89 (m, 15H), 0.85 (s, 3H), 0.74 (s, 3H).

[0090]

[0091] 실시예 2

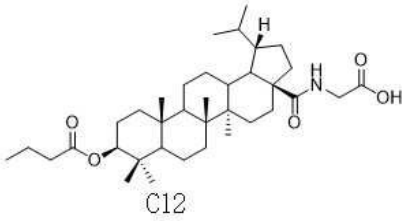


C1

[0092]

[0093] 화합물 C4(42 mg, 0.07 mmol)를 메탄올 및 물(4:1)의 혼합 용매에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 수산화나트륨(28 mg, 0.7 mmol)을 첨가하며, 10분 후 실온으로 되돌린 후, 12시간 동안 교반하였다. TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 메탄올을 스핀하여 제거하고, 희염산을 첨가하여 pH 값을 중성으로 조절하며, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하고, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하며, 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축하며, DMF/메탄올이 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 21 mg(0.04 mmol)의 산물 C1을 얻었고, 몰 수율은 57 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.13-6.10 (m, 1H), 4.04 (d, 2H, J = 4.8 Hz), 3.40 (t, 1H, J = 3.0 Hz), 2.43-1.12 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.97 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.87-0.82 (m, 9H), 0.75 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

[0094] 실시예 3

[0095] 

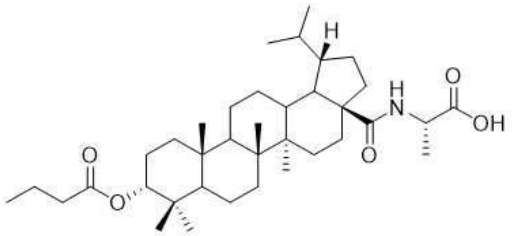
[0096] (1) 화합물 S3(148 mg, 0.27 mmol) 및 촉매 량의 DMAP(3.7 mg, 0.03 mmol)를 DMF(5 mL)에 용해시키고, 트리에틸아민(112 μL, 0.81 mmol)을 첨가하며, 아이스워터배스 하에서 부티르산무수물(132 μL, 0.81 mmol)을 적가하고, 실온에서 12시간 동안 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하고 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하고, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하며, 무수 황산나트륨으로 건조하고 농축하며, 석유에테르/에틸아세테이트가 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 산물 S6을 142 mg(0.23 mmol) 얻었고, 몰 수율은 85 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.30 (m, 5H), 5.15-5.05 (m, 2H), 4.50-4.45 (m, 1H), 2.34-2.14 (m, 4H), 1.86-1.09 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99-0.92 (m, 6H), 0.85-0.79 (m, 9H), 0.75-0.73 (m, 6H).

[0097] (2) 상기 단계의 산물인 S6(142 mg, 0.23 mmol)을 메탄올(15 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 Pd/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온 하에서 1 시간 교반하였다. 1 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료되었다고. 질소 가스를 바꾼 후 Pd/C를 여과하여 제거하고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 101 mg(0.19 mmol)의 화합물 S7을 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 83 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.48 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 2.28 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.30-2.15 (m, 4H), 1.90-1.07 (m, other aliphatic ring protons), 0.94 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.90 (t, 3H, J = 6.0 Hz), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.73 (s, 3H).

[0098] (3) 상기 단계의 산물인 S7(101 mg, 0.19 mmol) 및 촉매 량의 DMF(2 μL, 0.02 mmol)를 2 mL의 건조 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 염화옥살릴(158 μL, 1.9 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온까지 되돌린 후 3 시간 동안 교반하였다. DMF를 직접 스핀시켜 제거하고 오일 펌프로 완전히 제거한 후, 다음 단계의 반응에 사용하였다. 글리신tert-부틸에스테르히드로클로라이드(65 mg, 0.38 mmol) 및 촉매 량의 DMAP(3.7 mg, 0.03 mmol)를 1 mL의 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 트리에틸아민(130 μL, 0.95 mmol)을 적가한 후, 새로 제조된 염화아실의 DMF 용액을 1 mL 적가하며, 10 분 후 실온으로 되돌리고, 실온에서 12시간 동안 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하고 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하며, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조하여 농축하며, 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 105 mg(0.17 mmol)의 산물 S8을 얻었고, 몰 수율은 89 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.01 (t, 1H, J = 5.1 Hz), 4.51-4.45 (m, 1H), 3.91-3.88 (m, 2H), 2.48-2.38 (m, 1H), 2.30-2.25 (m, 3H), 2.03-2.00 (m, 1H), 1.81-1.11 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.47 (s, 9H), 0.97-0.91 (m, 9H), 0.86-0.83 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

[0099] (4) 105 mg(0.17 mmol)의 상기 단계의 산물인 S8을 5 mL의 DMF에 용해시키고, 0.2 mL의 TFA를 첨가하며, 실온 하에서 1시간 동안 교반하고, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 용매를 직접 스핀 건조하고, DMF/메탄올이 20:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 산물 C12(82 mg, 0.14 mmol)를 얻었으며, 몰 수율은 82 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.15-6.11 (m, 1H), 4.51-4.45 (m, 1H), 4.05 (t, 1H, J = 4.8 Hz), 2.38-2.25 (m, 4H), 2.02-1.12 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.97-0.90 (m, 9H), 0.86-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

[0100] 실시예 4



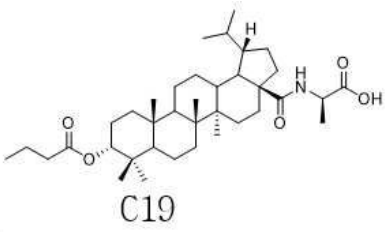
C18

[0101]

[0102] (1) 상기 단계의 산물인 S10(50 mg, 0.095 mmol) 및 촉매 량의 DMF(1 μL, 0.01 mmol)를 1 mL의 건조 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 염화옥살릴(125 μL, 0.95 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온으로 되돌린 후 3 시간 동안 교반하였다. DMF를 직접 스핀시켜 제거하고 오일 펌프로 완전히 제거한 후, 다음 단계의 반응에 사용하였다. 글리신tert-부틸에스테르히드로클로라이드(36 mg, 0.19 mmol) 및 촉매 량의 DMAP(2.4 mg, 0.02 mmol)를 1 mL의 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 트리에틸아민(67 μL, 0.48 mmol)을 적가한 후, 새로 제조된 염화아실의 DMF 용액을 1 mL 적가하며, 10 분 후 실온으로 되돌리고, 실온에서 12시간 동안 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하여 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하고, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하며, 황산나트륨으로 건조하여 농축하고, 석유에테르/에틸아세테이트가 15:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 47 mg(0.072 mmol)의 산물을 얻었고, 몰 수율은 76 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.18 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 4.62 (t, 1H, J = 3.0 Hz), 4.48-4.38 (m, 1H), 2.44-2.27 (m, 4H), 2.01-1.03 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99-0.92 (m, 9H), 0.86-0.82 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

[0103] (2) 47 mg(0.072 mmol)의 상기 단계의 산물을 2 mL의 DMF에 용해시키고, 0.2 mL의 TFA를 첨가하며, 실온 하에서 1 시간 동안 교반하고, TLC결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 용매를 직접 스핀 건조하고, DMF/메탄올이 20:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 산물 C18(36 mg, 0.060 mmol)을 얻었으며, 몰 수율은 83 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.06 (d, 1H, J = 6.6 Hz), 4.63 (s, 1H), 4.59-4.49 (m, 1H), 2.41-2.28 (m, 4H), 2.00-1.08 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00-0.93 (m, 9H), 0.88-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

[0104] 실시예 4와 동일한 방법으로 D-알라닌히드로클로라이드(D-alanine hydrochloride)을 사용하여 화합물 C19를 합성하였다.

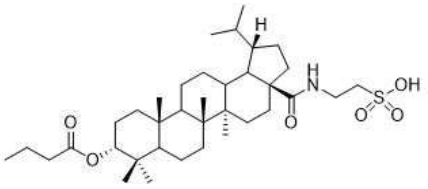


C19

[0105]

[0106] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.06 (d, 1H, J = 6.3 Hz), 4.63 (t, 1H, J = 3.0 Hz), 4.55-4.46 (m, 1H), 2.43-2.24 (m, 4H), 2.03-1.05 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00-0.92 (m, 9H), 0.87-0.83 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

[0107] 실시예 5

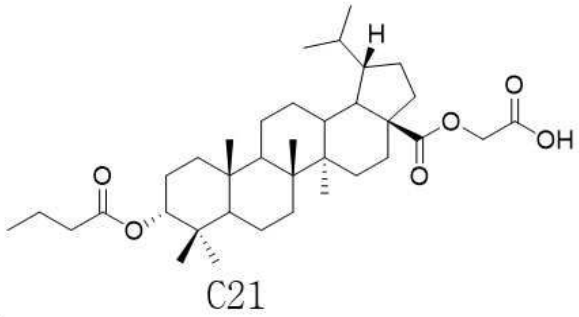


C20

[0108]

[0109] 화합물 S10(50 mg, 0.095 mmol) 및 촉매 량의 DMF(1 μL, 0.01 mmol)를 2 mL의 건조한 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 염화옥살릴(80 μL, 0.95 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온으로 되돌린 후 3시간 동안 교반하였다. DMF를 직접 스핀시켜 제거하고 오일펌프로 완전히 제거한 후, 다음 단계의 반응에 사용하였다. 새로 제조된 염화아실 및 트리에틸아민(263 μL, 1.9 mmol)을 디옥산(3 mL)에 용해시킨 후, 0 ℃의 온도 하에서 1 mL 의 타우린(Taurine)(36 mg, 0.285 mmol) 및 트리에틸아민(263 μL, 1.9 mmol) 수용액을 적가하고, 10 분 후 실온까지 되돌리며, 실온에서 3시간 동안 반응시키고, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 희염산을 첨가하여 pH 값을 산성으로 조절하고, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하며, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조하여 농축하며, DMF/메탄올이 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 16 mg(0.025 mmol)의 산물 C20을 얻었고, 몰 수율은 27 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.09 (br s, 1H), 4.61 (s, 1H), 3.20-3.03 (m, 4H), 2.33-2.28 (m, 2H), 1.72-1.60 (m, 4H), 1.44-1.07 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99-0.89 (m, 9H), 0.87-0.81 (m, 12H), 0.73-0.72 (m, 3H).

[0110] 실시예 6



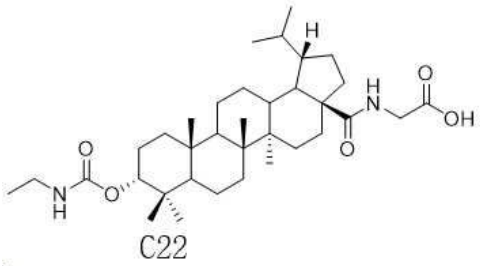
C21

[0111]

[0112] (1) 화합물 S10(100 mg, 0.189 mmol)을 슈퍼 드라이(Super Dry) DMF(3 mL)에 용해시키고, 무수 탄산칼륨(65.3 mg, 0.473 mmol)을 첨가하며, 교반하면서 벤질브로모아세테이트(Benzyl bromoacetate)(0.148 mL, 0.945 mmol)을 천천히 적가하고, 적가 완료 후 실온에서 3시간 동안 교반하며, TLC 모니터링 결과 완전히 반응된 것으로 나타났다. 30 mL의 탈이온수를 첨가하여 희석하고, 에틸아세테이트(2X30 mL)로 추출하며, 합병된 유기층을 각각 탈이온수 및 포화 식염수로 세척하고, 황산나트륨을 거쳐 건조하여 농축시키며, 석유에테르/에틸아세테이트가 30:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 124 mg(0.183 mmol)의 산물 S13을 얻었고, 몰 수율은 97 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38-7.34 (m, 5H), 5.24-5.13 (m, 2H), 4.63-4.62 (m, 3H), 2.32 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.28-2.20 (m, 2H), 1.96-1.77 (m, 3H), 1.71-1.64 (m, 2H), 1.61-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00-0.92 (m, 9H), 0.87-0.83 (m, 9H), 0.75 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

[0113] (2) 상기 단계의 산물인 S13(124 mg, 0.183 mmol)을 메탄올(15 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 Pd/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온 하에서 교반하였다. 1 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 질소 가스를 바꾼 후 Pd/C를 여과하여 제거하고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 DMF/메탄올이 20:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 80 mg(0.137 mmol)의 화합물 C21을 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 75 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.66-4.58 (m, 3H), 2.32 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.24-2.17 (m, 3H), 1.94-1.77 (m, 4H), 1.71-1.64 (m, 2H), 1.61-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 1.00-0.92 (m, 9H), 0.87-0.82 (m, 9H), 0.75 (d, 3H, J = 6.6 Hz).

[0114] 실시예 7

[0115] 

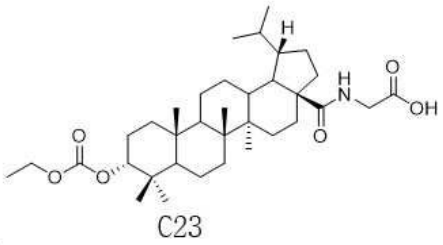
[0116] (1) 화합물 S5(100 mg, 0.182 mmol), 에틸이소시아네트(150 μL, 1.82 mmol), 트리에틸아민(505 μL, 3.64 mmol) 및 DMAP(1.22 mg, 0.01 mmol)를 3 mL의 톨루엔에 용해시키고, 120 ℃의 조건에서 튜브로 실링하여 2일간 반응시키며, TLC 모니터링 결과 완전히 반응된 것으로 나타났다. 30 mL의 탈이온수를 첨가하여 희석하고, 에틸아세테이트(2X30 mL)로 추출하며, 합병된 유기층은 각각 탈이온수 및 포화 식염수로 세척하고, 황산나트륨을 거쳐 건조하여 농축시키며, 석유에테르/에틸아세테이트가 15:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 85 mg(0.137 mmol)의 산물 S14를 얻었고, 몰 수율은 75 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.26 (m, 5H), 5.15-5.06 (m, 2H), 4.64 (br s, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.24-3.20 (m, 2H), 2.31-2.15 (m, 4H), 1.85-1.77 (m, 4H), 1.68-1.01 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.96 (s, 3H), 0.86-0.82 (m, 12H), 0.75-0.73 (m, 6H).

[0117] (2) 상기 단계의 산물인 S14(85 mg, 0.137 mmol)를 메탄올(15 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 $Pd(OH)_2$/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온 하에서 교반하였다. 1 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료되었다. 질소 가스를 바꾼 후 Pd(OH)2/C를 여과시키고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 61 mg(0.115 mmol)의 화합물 S15를 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 84 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.67 (br s, 1H), 4.50 (s, 1H), 3.27-3.17 (m, 2H), 2.29-2.16 (m, 4H), 1.91-1.78 (m, 4H), 1.68-1.06 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.99 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.86-0.85 (m, 12H), 0.75 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

[0118] (3) 상기 단계의 산물인 S15(61 mg, 0.115 mmol) 및 촉매 량의 DMF(1 μL, 0.01 mmol)를 2 mL의 건조 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 염화옥살릴(96 μL, 1.15 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온으로 되돌린 후 3시간 동안 교반하였다. DMF를 직접 스핀시켜 제거하고 오일 펌프로 완전히 제거한 후, 다음 단계의 반응에 사용하였다. 글리신tert-벤질에스테르히드로클로라이드(47 mg, 0.23 mmol), 촉매 량의 DMAP(2.4 mg, 0.02 mmol)를 1 mL의 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 트리에틸아민(80 μL, 0.58 mmol)을 적가한 후, 새로 제조된 염화아실의 1 mL의 DMF 용액을 적가하며, 10 분 후 실온으로 되돌리고, 실온에서 12시간 동안 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하여 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하고, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하며, 무수 황산나트륨을 거쳐 건조하여 농축시키고, 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 산물 52 mg(0.077 mmol)의 S16을 얻었으며, 몰 수율은 67 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.34 (m, 5H), 6.07 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 5.22-5.13 (m, 2H), 4.65 (br s, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.08-3.97 (m, 2H), 3.26-3.17 (m, 2H), 2.46-2.23 (m, 3H), 2.03-1.04 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.97 (s, 3H), 0.90 (s, 1H), 0.85-0.83 (m, 9H), 0.74 (d, 3H, J = 6.9 Hz)

[0119] (4) 상기 단계의 산물인 S16을 메탄올(10 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 52 mg(0.077 mmol) 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 Pd/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수로 가스를 바꾸고, 실온 하에서 교반하였다. 1 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료되었다. 질소 가스를 바꾼 후 Pd/C를 여과하여 제거하고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 DMF/메탄올이 20:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 화합물 C22(38 mg, 0.065 mmol)를 얻었으며, 몰 수율은 84 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.17 (s, 1H), 4.66 (br s, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.04-3.97 (m, 2H), 3.28-3.20 (m, 2H), 2.44-2.27 (m, 3H), 2.04-1.05 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.98 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.86-0.84 (m, 9H), 0.74 (d, 3H, J = 6.6 Hz)

[0120] 실시예 8



C23

[0121]

[0122] (1) 화합물 S5(130 mg, 0.237 mmol)를 3 mL의 피리딘(Pyridine)에 용해시키고, -20 ℃의 온도 하에서 에틸클로로포르메이트(Ethyl chloroformate)(113 μL, 1.19 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온으로 되돌린 후 교반하며, 2 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료되었다. 30 mL의 탈이온수를 첨가하여 희석하고, 에틸아세테이트(2X30 mL)로 추출하며, 합병된 유기층을 각각 희염산, 탈이온수 및 포화 식염수로 세척하고, 황산나트륨을 거쳐 건조하여 농축시키며, 석유에테르/에틸아세테이트가 10:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 97 mg(0.156 mmol)의 산물 S17을 얻었고, 몰 수율은 66 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 5.15-5.06 (m, 2H), 4.46 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 4.19 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 2.30-2.14 (m, 4H), 1.96-1.02 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.95 (s, 3H), 0.90-0.83 (m, 15H), 0.75-0.73 (m, 6H).

[0123] (2) 화합물 S17(97 mg, 0.156 mmol)을 메탄올(20 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 $Pd(OH)_2$/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온 하에서 교반하였다. 1 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료되었다. 질소 가스를 바꾼 후 $Pd(OH)_2$/C를 여과시키고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여 48 mg(0.091 mmol)의 화합물 S18을 얻었으며, 백색 고체이고, 몰 수율은 58 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.47 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 4.20 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 2.28-2.14 (m, 4H), 1.91-1.14 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.98 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88-0.84 (m, 9H), 0.75 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

[0124] (3) 상기 단계의 산물인 S18(48 mg, 0.091 mmol) 및 촉매 량의 DMF(1 μL, 0.01 mmol)을 2 mL의 건조한 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 염화옥살릴(76 μL, 0.91 mmol)을 첨가하며, 10 분 후 실온으로 되돌리고 3시간 동안 교반하였다. DMF를 직접 스핀시켜 제거하고 오일 펌프로 완전히 제거한 후, 다음 단계의 반응에 사용하였다. 글리신tert-벤질에스테르히드로클로라이드(37 mg, 0.18 mmol), 촉매 량의 DMAP(2.4 mg, 0.02 mmol)를 1 mL의 DMF에 용해시키고, 0 ℃의 온도 하에서 트리에틸아민(64 μL, 0.46 mmol)을 적가한 후, 새로 제조된 염화아실의 1 mL의 DMF 용액을 적가하며, 10 분 후 실온으로 되돌리고, 실온에서 12시간 동안 반응시키며, TLC 결과 반응이 완료된 것으로 나타났다. 농축하여 용매를 제거한 후, 에틸아세테이트를 첨가하여 희석하고, 각각 물 및 포화 염화나트륨 수용액으로 유기상을 세척하며, 무수 황산나트륨을 거쳐 건조하여 농축시키고, 석유에테르/에틸아세테이트가 8:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 49 mg(0.072 mmol)의 산물 S19를 얻었으며, 몰 수율은 79 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.35 (m, 5H), 6.04 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 5.22-5.14 (m, 2H), 4.47 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 4.19 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 4.05 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 2.46-2.37 (m, 1H), 2.31-2.23 (m, 1H), 2.02-1.10 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.97 (s, 3H), 0.90-0.83 (m, 15H), 0.74 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

[0125] (4) 상기 단계의 산물인 S19를 메탄올(10 mL) 및 소량의 에틸아세테이트에 49 mg (0.072 mmol) 용해시키고, 질소 가스를 바꾼 후, 신속하게 10 %의 Pd/C를 첨가하며, 다시 질소 가스를 바꾼 후 수소 가스를 바꾸고, 실온 하에서 교반하였다. 1 시간 후 TLC 측정 결과 반응이 완료되었다. 질소 가스를 바꾼 후 Pd/C를 여과하여 제거하고, 반응액을 스핀 건조시킨 후 DMF/메탄올이 20:1인 용리제 체계로 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리하여, 화합물 C23(35 mg, 0.060 mmol)을 얻었으며, 몰 수율은 83 %이다. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.15 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 4.46 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 4.19 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 4.05-4.03 (m, 2H), 2.42-2.32 (m, 1H), 2.29-2.21 (m, 1H), 2.02-1.12 (m, 다른 지방고리 양성자), 0.97 (s, 3H), 0.91-0.84 (m, 12H), 0.74 (d, 3H, J = 6.9 Hz).

[0126] 실시예 9: FXR 길항제 시험

[0127] 1. 실험 목적

[0128] 리포터 유전자 실험으로 FXR에 대한 화합물의 길항 활성을 측정하였다.

[0129] 2. 실험 원리

[0130] FXR은 담즙산에 의해 활성화된 핵 수용체이고, 체내 당대사 및 지방대사 등에 대해 조절 작용이 있다. FXR이 활성화된 후, 일련의 유전자의 발현을 개시하여 외부 자극에 응답할 수 있다. 루시페라제(Luciferase) 리포터 유전자 시스템은 파이어플라이 루시페라제(Firefly Luciferase) 활성을 검출하기 위한 리포팅 체계(reporting system)이다. 루시페라제는 형광 기질 루시페린(Luciferin)의 산화에 촉매 작용을 하는 동시에 생물학적 형광을 방출할 수 있고, 형광 강도를 검출함으로써 루시페라제 발현량을 추정할 수 있다. 본 실험에서, 테스트될 화합물은 FXR을 표적으로 할 수 있고, GW4064는 이미 알려진 FXR 작용제로서, FXR 리간드 도메인에 결합한 후 일련의 유전자의 발현을 개시한다. 따라서, 리포터 유전자 실험을 활용하여, LBD(hFXR)-pbind 및 PGL4.31-Luc 2가지 유형의 플라스미드를 HEK293 세포에 공동으로 형질 전환하여, 세포가 FXR 리간드 도메인을 발현하도록 하였다. 각각 2가지 유형의 테스트될 화합물을 제공하고 블랭크(blank) 대조군을 설정하며, 작용제를 더 첨가하고, 만약 화합물이 FXR에 대해 친화력이 있으면, FXR 리간드 도메인에 결합하기 위한 작용제와 경쟁하여 pGL4.31-Luc의 루시페라제 발현에 영향을 미친다. Envision2101 다기능 마이크로 플레이트 리더로 화학 발광기기의 값을 측정하였고, 형광 강도에 근거하여 FXR 활성에 대한 테스트될 화합물의 영향을 판단하였다.

[0131] 3. 실험 샘플

[0132] 시험하기 전, 화합물을 DMSO에 용해시켜 모액을 조제하고, 사용시 배양액으로 원하는 농도로 희석하였다.

[0133] 4. 실험 방법

[0134] 2 μg의 키메라 플라스미드 LBD(hFXR)-pbind 및 2 μg의 루시페라제 리포터 플라스미드(reporter plasmid)를 2 X 10^6의 HEK293 세포에 공동으로 형질 감염하고, 백색 불투명한 96웰 플레이트에 접종하며, 24시간 후 배양액을 버리고, 테스트될 화합물(1 %의 DMSO를 함유한 무 혈청 배양액으로 희석함)을 첨가하여 1시간 동안 인큐베이션한 후, FXR 작용제 GW4064(300 nM)를 첨가하여 6시간 동안 자극하며, 마지막으로 루시페라제 기질을 첨가하여 진탕 용해시키고, Envision 2104 다기능 마이크로 플레이트 리더로 발광 값을 측정하였다.

[0135] 5. 실험 결과: (C1 등 6개의 화합물을 예로 들었지만, 이러한 화합물에 제한되지는 않음)

표 1

[0136] 화합물 FXR 길항 활성 테스트 결과

화합물 번호	FXR(IC_{50}/μM)
C1	13.95
C2	6.31
C3	3.89
C4	2.05
C12	8.27
C16	5.67

[0137] 주: IC_{50}은 FXR 길항 활성에 대한 샘플 약물의 평가이고, 반수 50 % 유효 농도이다.

[0138] 6. 결과 및 토론

[0139] 이러한 화합물은 FXR 리간드 도메인을 발현하는 HEK293 세포에서 FXR 작용제 GW4064와 경쟁할 수 있고, FXR에 대한 GW4064의 활성 작용을 길항하며, 이의 활성은 조제량 의존 관계를 나타내며, IC_{50} 값은 표 1과 같다. 결과적으로 이러한 화합물이 FXR의 길항제라는 것을 설명한다.

[0140] 실시예 10: TGR5 작용 시험 실시예

[0141] 1. 실험 목적

[0142] TGR5를 순간적으로 형질전환시킨 HEK293 세포용 화합물로 자극한 후, 균질 시간 분해 형광(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence, HTRF)으로 이러한 화합물이 TGR5에 작용하는지 여부를 검출하였다.

[0143] 2. 실험 원리

[0144] TGR5는 담즙산 막 수용체이자 GPCR 패밀리의 멤버로서, 담즙산, 지방류 및당류의 대사에 대해 조절 작용이 있다. TGR5 및 Gs 단백질에 커플링되고, 활성화된 후 아데닐릴시클라제(adenylyl cyclase)를 추가로 활성화시켜, 2차 전달자(second messenger) cAMP를 생성한다. HTRF는 cAMP 함량을 측정하는 방법으로써, 이는 형광공명에너지전달(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 및 시분해형광(Time Resolved Fluorescence, TRF) 2가지 유형의 기술을 결합하였다. Eu를 함유한 크립테이트(cryptate)는 형광 공여체로서, 이의 방출 스펙트럼 및 형광 수용체 여기 스펙트럼은 부분적으로 중첩되고, FRET에 의해 수용체를 유도하여 형광을 생성하지만, Eu의 형광 수명은 길며, TRF에 의해 형광 백그라운드에서 수용체에서 방출되는 형광 신호를 구분할 수 있다. 형광 공여체를 cAMP 특이성 항체와 결합시키고, 동시에 형광 수여체로 cAMP를 표지하며, 이 둘은 항원 항체 특이적 식별 반응을 통해 서로 근접하여 FRET를 생성하지만, 세포에서 생성된 cAMP 항체 결합 부위에 대하여 표지된 cAMP와 경쟁하여 형광 강도를 감소시켰다. 본 실험은 TGR5 작용제 INT777을 양성 대조로 하여, TGR5에 대한 화합물의 작용을 탐구하였다.

[0145] 3. 실험 샘플

[0146] 시험 전, 화합물을 DMSO에 용해시켜 모액을 조제하고, 사용시, 배양액을 사용하여 원하는 농도로 희석하였다.

[0147] 4. 실험 방법

[0148] 4.1. 테스트될 화합물을 1xPBS로 최종 농도의 2배로 조제조하였다. 여기서, 최종 농도는 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM 및 DMSO(각각의 웰에 모두 1 %의 DMSO를 함유)이다.

[0149] 4.2. 세포 처리:

[0150] 4.2.1. 판크레아틴(pancreatin)으로 세포를 소화한 후, 무 혈청 배양액으로 부유시켰다.

[0151] 4.2.2. 세포 밀도를 측정하는 동시에 무 혈청 배양액에 IBMX(최종 농도가 500 μM임)를 첨가하고, 세포 수는 웰당 2000/5 μl이다.

[0152] 4.2.3. 5 μl의 테스트될 화합물을 및 IBMX가 함유된 5 μl의 세포 현탁액을 첨가하여 혼합하고, 은박지로 384 웰 플레이트를 완전 실링하며, 실온 암흑 조건에서 30 분 이하 반응시켰다.

[0153] 4.3. 검출 기질 배합

[0154] 4.3.1. 1 μl의 cAMP-d2를 cAMP & cGMP 접합체 및 용해 완충액(conjugates & lysis buffer)으로 20 μl까지 희석시킨다.

[0155] 4.3.2. 1 μl의 항-cAMP-크립테이트(anti-cAMP-Cryptate)를 cAMP & cGMP 접합체 및 용해 완충액으로 20 μl까지 희석시킨다.

[0156] 4.3.3. 30분 후, 5 μl(1.3.1) + 5 μl(1.3.2)를 첨가하고, 은박지로 384 웰 플레이트를 완전 실링하여 실온 암흑 조건에서 60분 동안 반응시킨다.

[0157] 4.4. 60 분 후, Envision2101 다기능 마이크로 플레이트 리더(PerkinElmer) 리딩하였다.

[0158] 5. 실험 결과

[0159] (C1 등 6개의 화합물을 예로 들었지만, 이러한 화합물에 제한되지는 않음)

표 2

[0160] 화합물 TGR5 작용 활성 테스트 결과

화합물 번호	FXR(IC_{50}/μM)
INT777	50.46
C1	NR
C2	NR
C3	NR
C4	NR

C12	NR
C16	NR

[0161] 주: IC_{50}은 FXR 길항 활성에 대한 샘플 약물의 평가이고, 반수 50 % 유효 농도이다. NR은 100 μM의 농도 하에서 활성이 없는 것을 나타낸다.

[0162] 6. 결과 및 토론

[0163] 이러한 화합물은 TGR5를 발현하는 HEK293 세포에서 세포 내의 cAMP 누적을 향상시킬 수 없고, 표 2와 같이, 화합물은 FXR의 길항 작용에 대해 선택성이 있는 것을 나타낸다.

[0164] 실시예 11: CCK-8 시험 실시예

[0165] 1. 실험 목적

[0166] CCK-8 실험으로 화합물의 세포 독성을 평가하였다.

[0167] 2. 실험 원리

[0168] CCK-8는 산화환원반응의 지시약이고, 전자 담체 1-Methoxy PMS가 존재하는 조건에서, 살아 있는 세포의 탈수소효소를 이용하여 테트라졸륨염 WST-8을 촉매하여 포르마잔 염료를 생성하며, 포르마잔 염료의 생성량은 살아 있는 세포의 수량과 선형관계를 이루며, 마이크로 플레이트 리더로 450 nm 파장의 광 흡수 값을 측정하였고, 살아 있는세포 수량을 간접적으로 반영할 수 있다. 따라서 이러한 방법은 일부 생물학적 활성 요소의 활성 검사, 대규모의 항종양 약물 선별, 세포 증식 시험, 세포 독성 시험 및 감수성 시험 등에 사용된다. 이 실험으로 화합물의 세포 독성을 평가하였다.

[0169] 3. 실험 샘플

[0170] 시험 전, 화합물을 DMSO에 용해시켜 모액을 조제하고, 사용시 배양액을 사용하여 원하는 농도로 희석한다.

[0171] 4. 실험 방법

[0172] 먼저 2 μg의 키메라 플라스미드 LBD(hFXR)-pbind 및 2 μg의 루시페라제 보고 플라스미드를 2×10^6 HEK293 세포에 공동으로 형질 감염시키고, 투명 96 웰 플레이트에 접종하며, 24시간 후 배양액을 버리고, 테스트될 화합물(1 %의 DMSO를 함유한 무 혈청 배양액으로 희석함)을 첨가하여 1시간 동안 인큐베이션한 후, FXR 작용제 GW4064(300 nM)를 첨가하여 4시간 동안 자극하며, 각각의 웰에 10 μl의 CCK-8 검출 시약을 첨가하고, 2시간 후 Flextation 기기로 450 nm 및 650 nm(참조 파장으로서)의 흡광도를 측정하였다.

[0173] 5. 실험결과: (C1 등 6개의 화합물을 예로 들었지만, 이러한 화합물에 제한되지는 않음)

표 3

[0174] 화합물 CCK-8 테스트 결과

화합물 번호	CCK-8 Assay (30 μM)	CCK-8 Assay (100 μM)
C1	무	무
C2	무	무
C3	무	무
C4	무	무
C12	무	무
C16	무	무

[0175] 6. 결과 및 토론

[0176] 표 3의 실험 결과에 의하면, 이러한 화합물은 30 μM 및 100 μM 농도 하에서 HEK293 세포에 대해 모두 현저한 독성이 없는 것으로 나타났다.

[0177] 본 발명에서 언급된 모든 문헌은 각각의 문헌이 별도로 인용된 것처럼 본 발명에 참조된다. 이외에, 본 발명의 상기 교시 내용을 열독한 후, 당업자는 본 발명을 다양하게 변경 또는 수정할 수 있으며, 이러한 등가 형태도

본 발명의 청구범위에 의해 정의된 범위 내에 속한다는 것을 이해해야 한다.