



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월11일

(11) 등록번호 10-2586854

(24) 등록일자 2023년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 498/14 (2006.01) A61K 31/5383 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 498/14 (2013.01)
A61K 31/5383 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7019438(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년06월19일
심사청구일자 2022년07월08일
(85) 번역문제출일자 2022년06월09일
(65) 공개번호 10-2022-0084425
(43) 공개일자 2022년06월21일
(62) 원출원 특허 10-2019-7001315
원출원일자(국제) 2017년06월19일
심사청구일자 2020년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2017/022478
(87) 국제공개번호 WO 2017/221869
국제공개일자 2017년12월28일
(30) 우선권주장
JP-P-2016-121453 2016년06월20일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
KR102447711 B1*
WO2012039414 A1
WO2010147068 A1
JP2014514137 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
시오노기세야쿠 가부시키가이샤
일본국 오사카후 오사카시 주오구 도쇼마치 3 조
메 1-8
(72) 발명자
시바하라, 세츠야
일본 6600813 효고켄 아마가사키시 구이세 데라지
마 2초메1반 3고 시오노기세야쿠 가부시키가이샤
내
푸쿠이, 노부아키
일본 6600813 효고켄 아마가사키시 구이세 데라지
마 2초메1반 3고 시오노기세야쿠 가부시키가이샤
내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장수길, 이석재

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 박지영

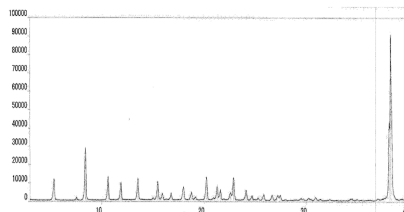
(54) 발명의 명칭 치환된 다환성 피리돈 유도체의 제조 방법 및 그의 결정

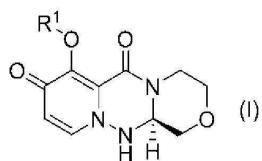
(57) 요약

치환된 다환성 피리돈 유도체의 제조 방법을 제공한다. 식 (I):

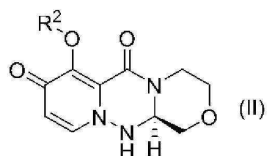
(뒷면에 계속)

대표도





(식 중, R^1 은 수소, 또는 비치환 알킬 이외의 보호기이다.)로 나타내는 화합물을, 나트륨염 및/또는 마그네슘염 존재 하에, 식: R^2-OH (식 중, R^2 는 비치환 알킬이다.)로 나타내는 화합물과 반응시키는 것을 특징으로 하는, 식 (II):



(식 중, R^2 는 상기와 동일한 의미이다.)로 나타내는 화합물의 제조 방법.

(52) CPC특허분류

A61P 31/16 (2018.01)

C07B 2200/13 (2013.01)

(72) 발명자

마키, 토시카츠

일본 6600813 효고켄 아마가사키시 구이세 테라지

마 2초메1반 3고 시오노기세야쿠 가부시카이가이사

내

아난, 코수케

일본 5610825 오사카후 도요나카시 후타바쵸 3쵸메

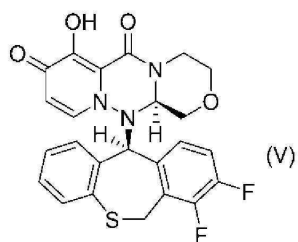
1반 1고시오노기세야쿠 가부시카이가이사 내

명세서

청구범위

청구항 1

분말 X선 회절의 2θ 값이 $9.6\pm 0.2^\circ$, $10.9\pm 0.2^\circ$, $17.8\pm 0.2^\circ$, $21.5\pm 0.2^\circ$, $22.1\pm 0.2^\circ$, $23.5\pm 0.2^\circ$ 및 $24.8\pm 0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 식 (V):



로 나타내는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 결정.

청구항 2

제1항에 있어서, 분말 X선 회절의 2θ 값이 $9.6\pm 0.2^\circ$, $10.9\pm 0.2^\circ$, $17.8\pm 0.2^\circ$, $21.5\pm 0.2^\circ$, $22.1\pm 0.2^\circ$, $23.5\pm 0.2^\circ$ 및 $24.8\pm 0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는 결정.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

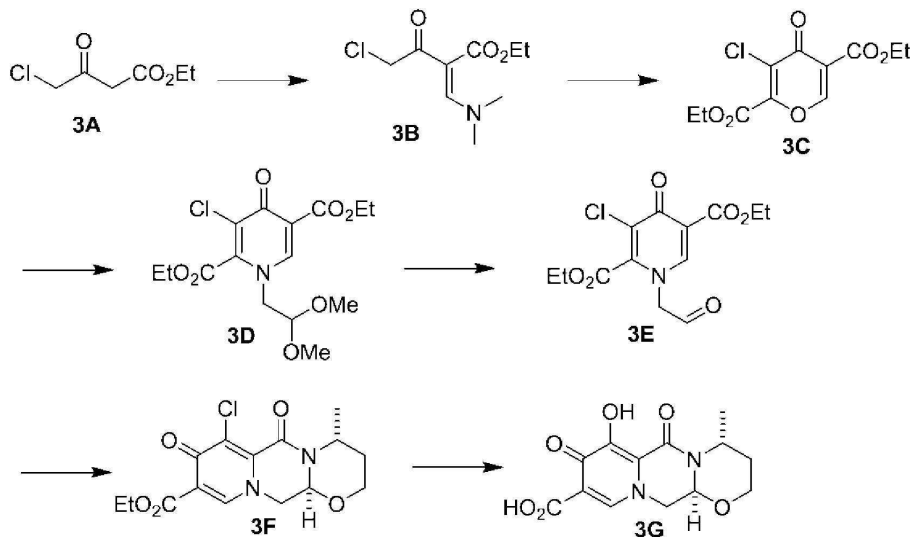
발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 치환된 다환성 피리돈 유도체의 제조 방법 및 그의 결정에 관한 것이다. 상세하게는, 캡 의존적 엔도뉴클레아제 저해 활성을 갖는 치환된 다환성 피리돈 유도체 및 그의 중간체의 제조 방법에 관한 것이다.

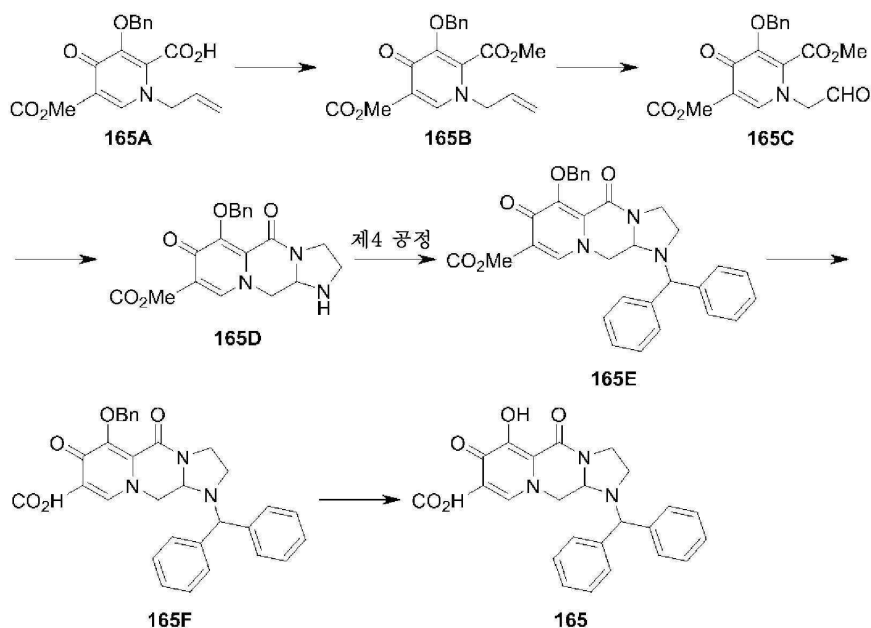
배경 기술

[0002] 특허문헌 1의 실시예 3에는, 피론 유도체 및 피리돈 유도체를 사용한 다환성 피리돈 유도체의 제조 방법이 기재되어 있다.



[0003]

[0004] 특허문헌 2 및 3의 실시예 165에는, 피리돈 유도체를 사용한 다환성 피리돈 유도체의 제조 방법이 기재되어 있다.



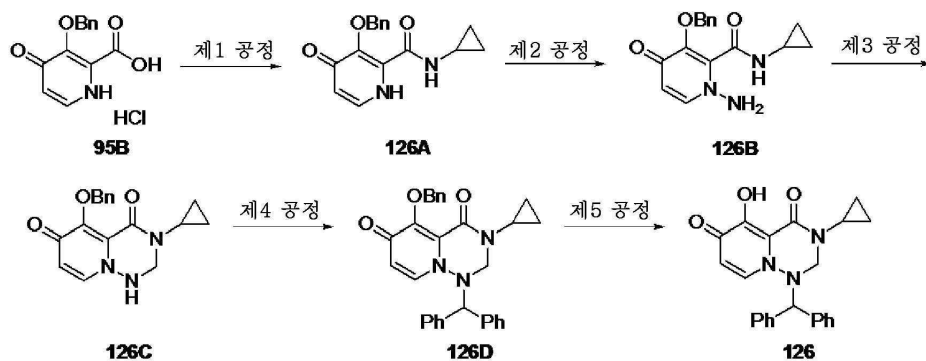
[0005]

[0006]

그러나, 특허문헌 1 내지 3에는 광학 활성의 다환성 피리돈 유도체와 티에핀 유도체를 커플링시키는 공정에 있어서, 벤질기로 보호된 다환성 피리돈 유도체를 사용하면 광학 순도가 저하되는 것은 기재되어 있지 않다. 한편, 핵실기로 보호된 다환성 피리돈 유도체를 사용하여 커플링 반응을 행하면 광학 순도의 저하 없이, 양호한 수율로 커플링 반응이 진행되는 것에 대해서는 기재도 시사도 되어 있지 않다. 또한 다환성 피리돈 유도체의 보호기를 비치환 알킬기 이외의 보호기로부터 비치환 알킬기로 교환하는 반응에 있어서, 마그네슘염 존재 하에서 반응을 행하면, 고수율이면서 광학 순도의 저하 없이 반응이 진행되는 것은 기재도 시사도 되어 있지 않다.

[0007]

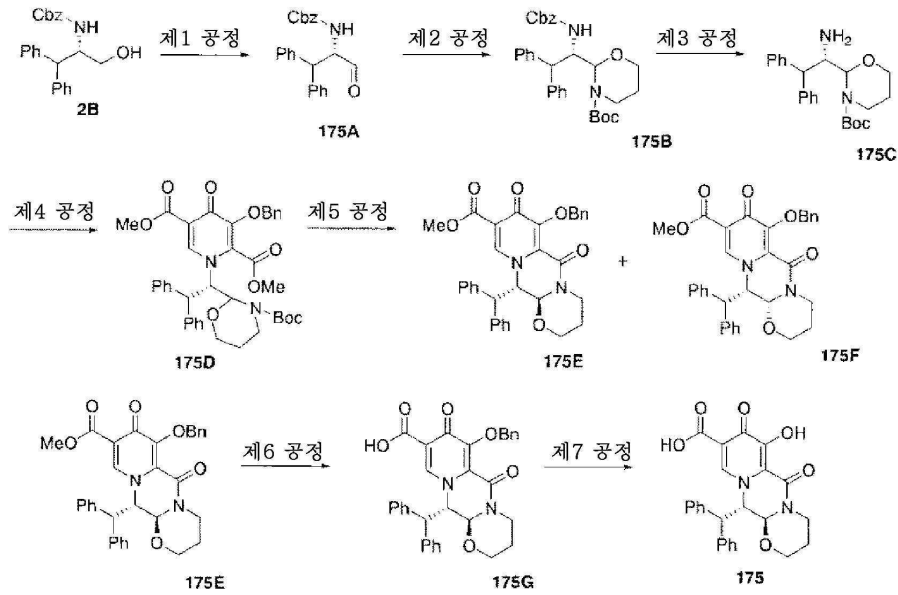
특허문헌 1의 실시예 21에 기재된 제조 방법은, 벤질기로 보호된 다환성 피리돈 유도체와 벤즈히드릴 유도체를 커플링시키는 공정이 기재되어 있다. 이 제조 방법에서는, 다환성 피리돈 유도체의 보호기를 교환하는 공정에 대해서는 기재도 시사도 되어 있지 않다.



[0008]

[0009]

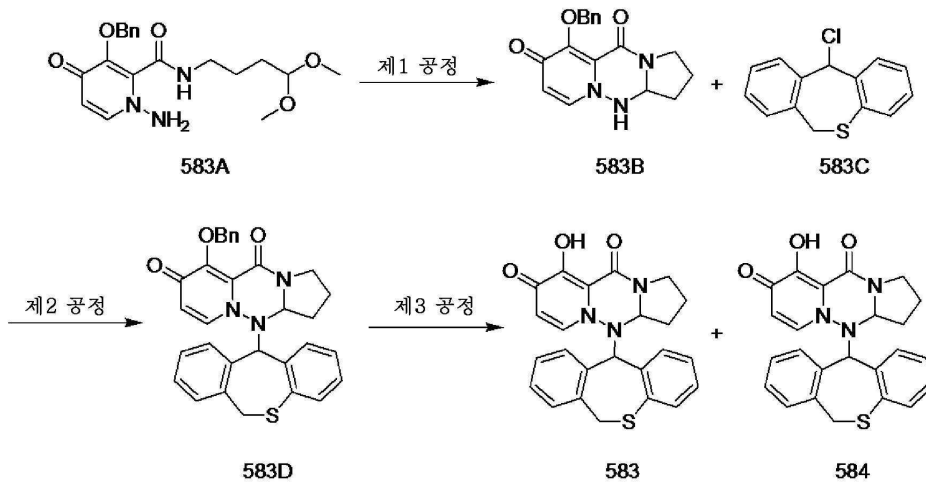
특허문헌 2의 실시예 175에는, 치환된 3환성 피리돈 유도체와 벤즈히드릴 유도체를 커플링시키는 공정이 기재되어 있다. 이 제조 방법에서는, 3환성 피리돈 유도체의 보호기를 교환하는 공정에 대해서는 기재도 시사도 되어 있지 않다.



[0010]

[0011]

특허문헌 2의 실시예 583 및 584에는, 치환된 3환성 피리돈 유도체와 티에핀 유도체를 커플링시키는 공정이 기재되어 있다. 이 제조 방법에서는, 3환성 피리돈 유도체의 보호기를 교환시키는 공정이나 광학 순도가 저하되는 것에 대해서는 기재도 시사도 되어 있지 않다.



[0012]

선행기술문헌

특허문헌

[0013]

(특허문헌 0001) 국제 공개 제2010/110409호 팸플릿

(특허문헌 0002) 국제 공개 제2010/147068호 팸플릿

(특허문헌 0003) 국제 공개 제2012/039414호 팸플릿

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014]

본 명세서 중, 식 (V) 또는 (VI)으로 나타내는 화합물이, 캡 의존적 엔도뉴클레아제 저해 활성을 가지고, 인플루엔자 바이러스에 감염됨으로써 유발되는 증상 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방제로서 유용한 것이

PCT/JP2016/63139에 기재되어 있다.

[0015] 본 발명의 목적은, 본 명세서 중, 식 (V) 또는 (VI)으로 나타내는 캡 의존적 엔도뉴클레아제 저해 활성을 갖는 치환된 다환성 피리돈 유도체 및 식 (II) 또는 (IV)로 나타내는 그의 중간체의 신규하고 유용한 제조 방법을 제공하는 것이다.

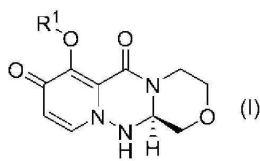
과제의 해결 수단

[0016] 본 발명자들은, 광학 활성의 치환 3환성 피리돈 유도체와 티에핀 유도체를 커플링시키는 공정에 있어서, 광학 활성의 치환 환성 피리돈 유도체의 광학 순도가 저하되는 것을 발견하였다.

[0017] 벤질기 등 비치환 알킬 이외의 보호기부터 헥실기로 교환함으로써, 광학 순도를 저하시키지 않고, 광학 활성의 치환 3환성 피리돈 유도체와 티에핀 유도체의 커플링 반응을 진행시키는 제조 방법을 발견하였다.

[0018] 즉, 본 발명은 이하에 관한 것이다.

[0019] (1) 식 (I):



[0020]

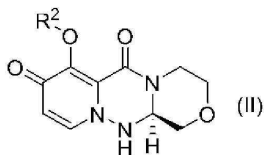
[0021] (식 중, R¹은 수소, 또는 비치환 알킬 이외의 보호기이다.)

[0022] 로 나타내는 화합물을, 나트륨염 및/또는 마그네슘염 존재 하에,

[0023] 식: R²-OH

[0024] (식 중, R²는 비치환 알킬이다.)

[0025] 로 나타내는 화합물과 반응시키는 것을 특징으로 하는, 식 (II):



[0026]

[0027] (식 중, R²는 상기와 동일한 의미이다.)

[0028] 로 나타내는 화합물의 제조 방법.

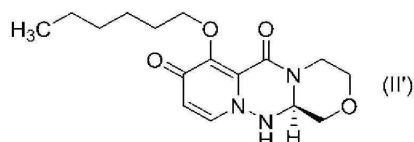
[0029] (2) 마그네슘염 존재 하에서 반응시키는 것을 특징으로 하는, 상기 (1) 기재의 제조 방법.

[0030] (3) 염화이소프로필마그네슘 존재 하에서 반응시키는 것을 특징으로 하는, 상기 (1) 기재의 제조 방법.

[0031] (4) R¹이 벤질인, 상기 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

[0032] (5) R²가 헥실인, 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

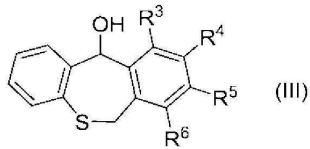
[0033] (6) 식 (II'):



[0034]

[0035] 로 나타내는 화합물과

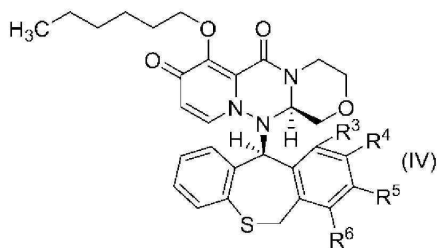
[0036] 식 (III):



[0037]

[0038] (식 중, R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐이며, R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 의 할로겐 수는 1 또는 2임)

[0039] 으로 나타내는 화합물을 반응시키는 것을 특징으로 하는, 식 (IV):



[0040]

[0041] (식 중의 기호는 상기와 동일한 의미임)

[0042] 로 나타내는 화합물의 제조 방법.

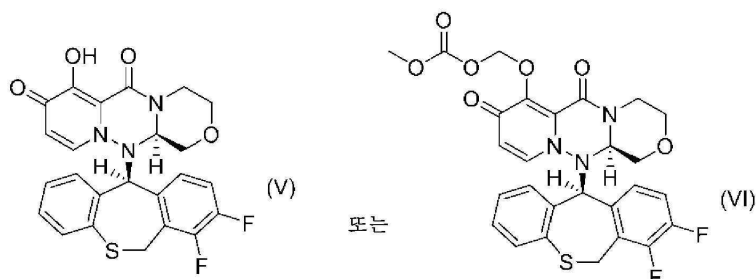
[0043] (7) R^3 이 수소이고,

[0044] R^4 가 수소이고,

[0045] R^5 가 불소이고, 또한

[0046] R^6 이 불소인, 상기 (6) 기재의 제조 방법.

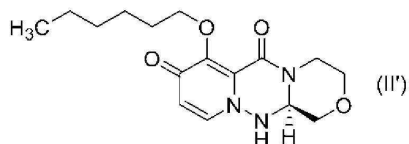
[0047] (8) 상기 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법을 함유하는, 식 (V) 또는 식 (VI):



[0048]

[0049] 으로 나타내는 화합물의 제조 방법.

[0050] (9) 식 (II'):



[0051]

[0052] 로 나타내는 화합물 또는 그의 염.

[0053] (10) 토실산염인, 상기 (9) 기재의 화합물의 염.

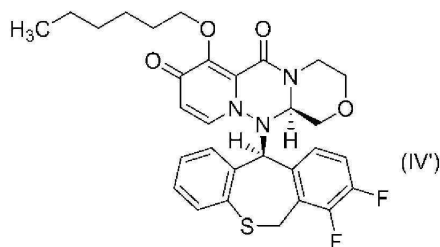
[0054] (11) 상기 (10) 기재의 염의 결정.

[0055] (12) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $5.9\pm 0.2^\circ$, $8.4\pm 0.2^\circ$, $11.6\pm 0.2^\circ$, $12.7\pm 0.2^\circ$, $13.1\pm 0.2^\circ$, $15.7\pm 0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 상기 (11) 기재의 결정.

[0056] (13) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $5.9\pm 0.2^\circ$, $8.4\pm 0.2^\circ$, $11.6\pm 0.2^\circ$, $12.7\pm 0.2^\circ$, $13.1\pm 0.2^\circ$, $15.7\pm 0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는, 상기 (11) 기재의 결정.

[0057] (14) 도 4에 실질적으로 일치하는 분말 X선 회절 스펙트럼에 의해 특징지어지는, 상기 (11) 기재의 결정.

[0058] (15) 식 (IV'):



[0059]

[0060] 로 나타내는 화합물 또는 그의 염.

[0061] (16) 염이 메실산염인, 상기 (15) 기재의 화합물의 염.

[0062] (17) 상기 (16) 기재의 염의 결정.

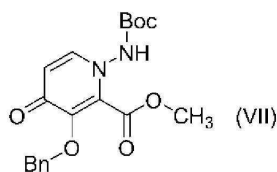
[0063] (18) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $7.1\pm 0.2^\circ$, $9.3\pm 0.2^\circ$, $12.6\pm 0.2^\circ$, $14.1\pm 0.2^\circ$, $17.7\pm 0.2^\circ$, $18.7\pm 0.2^\circ$, $19.2\pm 0.2^\circ$, $22.2\pm 0.2^\circ$, $25.4\pm 0.2^\circ$, $27.7\pm 0.2^\circ$, $28.5\pm 0.2^\circ$, $37.8\pm 0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 상기 (17) 기재의 결정.

[0064] (19) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $7.1\pm 0.2^\circ$, $9.3\pm 0.2^\circ$, $12.6\pm 0.2^\circ$, $14.1\pm 0.2^\circ$, $17.7\pm 0.2^\circ$, $18.7\pm 0.2^\circ$, $19.2\pm 0.2^\circ$, $22.2\pm 0.2^\circ$, $25.4\pm 0.2^\circ$, $27.7\pm 0.2^\circ$, $28.5\pm 0.2^\circ$, $37.8\pm 0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는, 상기 (17) 기재의 결정.

[0065] (20) 시차 주사 열량 측정에 있어서, 융점이 $219^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ 인, 상기 (17) 기재의 결정.

[0066] (21) 도 5에 실질적으로 일치하는 분말 X선 회절 스펙트럼에 의해 특징지어지는, 상기 (17) 기재의 결정.

[0067] (22) 식 (VII):



[0068]

[0069] 로 나타내는 화합물 또는 그의 염.

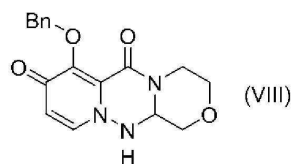
[0070] (23) 상기 (22) 기재의 화합물의 1수화물.

[0071] (24) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $5.4\pm 0.2^\circ$, $7.5\pm 0.2^\circ$, $8.4\pm 0.2^\circ$, $10.6\pm 0.2^\circ$, $11.9\pm 0.2^\circ$, $13.5\pm 0.2^\circ$, $20.2\pm 0.2^\circ$ 및 $22.9\pm 0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 상기 (23) 기재의 1수화물.

[0072] (25) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $5.4\pm 0.2^\circ$, $7.5\pm 0.2^\circ$, $8.4\pm 0.2^\circ$, $10.6\pm 0.2^\circ$, $11.9\pm 0.2^\circ$, $13.5\pm 0.2^\circ$, $20.2\pm 0.2^\circ$ 및 $22.9\pm 0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는, 상기 (23) 기재의 1수화물.

[0073] (26) 도 1에 실질적으로 일치하는 분말 X선 회절 스펙트럼에 의해 특징지어지는, 상기 (23) 기재의 1수화물.

[0074] (27) 식 (VIII):



[0075]

[0076] 로 나타내는 화합물의 용매화물.

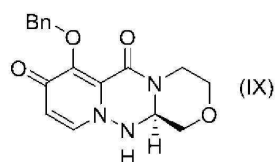
[0077] (28) 상기 식 (VIII)로 나타내는 화합물의 1/2수화물.

[0078] (29) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $9.5\pm0.2^\circ$, $13.4\pm0.2^\circ$, $18.0\pm0.2^\circ$, $19.3\pm0.2^\circ$, $21.2\pm0.2^\circ$, $22.5\pm0.2^\circ$, $22.8\pm0.2^\circ$, $23.6\pm0.2^\circ$, $27.5\pm0.2^\circ$, $28.1\pm0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 상기 (28) 기재의 1/2수화물.

[0079] (30) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $9.5\pm0.2^\circ$, $13.4\pm0.2^\circ$, $18.0\pm0.2^\circ$, $19.3\pm0.2^\circ$, $21.2\pm0.2^\circ$, $22.5\pm0.2^\circ$, $22.8\pm0.2^\circ$, $23.6\pm0.2^\circ$, $27.5\pm0.2^\circ$, $28.1\pm0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는, 상기 (28) 기재의 1/2수화물.

[0080] (31) 도 2에 실질적으로 일치하는 분말 X선 회절 스펙트럼에 의해 특징지어지는, 상기 (28) 기재의 1/2수화물.

[0081] (32) 식 (IX):



[0082]

[0083] 로 나타내는 화합물, 그의 염 또는 그것들의 용매화물.

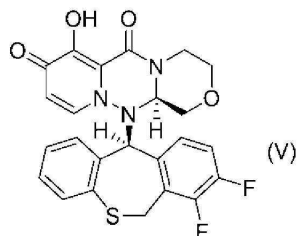
[0084] (33) 상기 식 (IX)로 나타내는 화합물의 결정.

[0085] (34) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $7.1\pm0.2^\circ$, $14.1\pm0.2^\circ$, $15.1\pm0.2^\circ$, $21.0\pm0.2^\circ$, $21.2\pm0.2^\circ$, $22.9\pm0.2^\circ$, $23.4\pm0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 상기 (33) 기재의 결정.

[0086] (35) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $7.1\pm0.2^\circ$, $14.1\pm0.2^\circ$, $15.1\pm0.2^\circ$, $21.0\pm0.2^\circ$, $21.2\pm0.2^\circ$, $22.9\pm0.2^\circ$, $23.4\pm0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는, 상기 (33) 기재의 결정.

[0087] (36) 도 3에 실질적으로 일치하는 분말 X선 회절 스펙트럼에 의해 특징지어지는, 상기 (33) 기재의 결정.

[0088] (37) 식 (V):



[0089]

[0090] 로 나타내는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 결정.

[0091] (38) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $9.6\pm0.2^\circ$, $10.9\pm0.2^\circ$, $17.8\pm0.2^\circ$, $21.5\pm0.2^\circ$, $22.1\pm0.2^\circ$, $23.5\pm0.2^\circ$ 및 $24.8\pm0.2^\circ$ 로부터 선택되는 2개 이상의 2θ 를 갖는, 상기 (37) 기재의 화합물의 결정.

[0092] (39) 분말 X선 회절의 2θ 값이 $9.6\pm0.2^\circ$, $10.9\pm0.2^\circ$, $17.8\pm0.2^\circ$, $21.5\pm0.2^\circ$, $22.1\pm0.2^\circ$, $23.5\pm0.2^\circ$ 및 $24.8\pm0.2^\circ$ 의 2θ 를 갖는, 상기 (37) 기재의 화합물의 결정.

[0093] (40) 도 6에 실질적으로 일치하는 분말 X선 회절 스펙트럼에 의해 특징지어지는, 상기 (37) 기재의 화합물의 결

정.

발명의 효과

[0094] 본 발명의 방법을 사용함으로써, 식 (V) 또는 (VI)으로 나타내는 다환성 피리돈 유도체를 높은 광학 순도로 효율적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0095] 도 1은, 화합물 3의 분말 X선 회절 데이터이다.
 도 2는, 화합물 9의 분말 X선 회절 데이터이다.
 도 3은, 화합물 13의 분말 X선 회절 데이터이다.
 도 4는, 화합물 20의 토실산염의 분말 X선 회절 데이터이다.
 도 5는, 화합물 21의 메실산염의 분말 X선 회절 데이터이다.
 도 6은, 화합물 (V)의 분말 X선 회절 데이터이다.
 도 7은, 화합물 (V)를 프로드러그화한 화합물 (VI)에 대하여, 비질식 하에서 래트에 경구 투여한 후의, 화합물 (V)의 혈장 중 농도 추이를 측정한 결과이다.
 도 8은, 화합물 (V)를 프로드러그화한 화합물 (VI)으로 나타내는 화합물에 대하여, 비질식 하에서 래트에 경구 투여한 후의, 화합물 (VI)으로 나타내는 화합물의 혈장 중 농도 추이를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 이하에 본 명세서에 있어서 사용되는 각 용어의 의미를 설명한다. 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한, 단독으로 사용되는 경우도 또는 다른 용어와 조합하여 사용되는 경우도, 동일한 의미로 사용된다.

[0097] 「이루어진다」라는 용어는, 구성 요건만을 갖는 것을 의미한다.

[0098] 「포함한다」라는 용어는, 구성 요건에 한정되지 않고, 기재되지 않은 요소를 배제하지 않는 것을 의미한다.

[0099] 「할로젠」이란, 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 포함한다. 불소 및 염소가 바람직하고, 특히 불소가 바람직하다.

[0100] 「알킬」이란, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지상의 알킬을 의미하고, 탄소수 1 내지 4의 알킬, 탄소수 1 내지 3의 알킬 등을 포함한다. 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펀틸, 헥실, 이소헥실 등을 들 수 있다.

[0101] R^1 에 있어서의 비치환 알킬 이외의 보호기로서는, 벤질을 들 수 있다.

[0102] R^2 에 있어서의 비치환 알킬로서는, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펀틸, 헥실, 이소헥실을 들 수 있고, n-프로필, 이소부틸, 헥실 등이 바람직하고, 헥실이 특히 바람직하다.

[0103] 「비치환 알킬 이외의 보호기」란, 나트륨염 및/또는 마그네슘염 존재 하에서 탈보호되는, 상기 「알킬」 이외의 보호기라면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 치환 알킬 등을 들 수 있고, 바람직하게는 벤질 등을 들 수 있다.

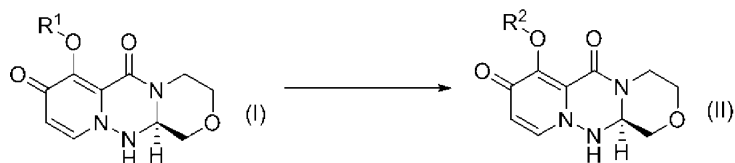
[0104] 「나트륨염」은 「알킬 이외의 보호기」가 탈보호되면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 수산화나트륨, 수산화나트륨, 나트륨이소프로필옥사이드, 나트륨tert-펜톡사이드, 염화이소프로필마그네슘 등을 들 수 있다. 바람직하게는 나트륨tert-펜톡사이드, 염화이소프로필마그네슘 등을 들 수 있고, 특히 염화이소프로필마그네슘이 바람직하다.

[0105] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 및 「나트륨염 및/또는 마그네슘염」의 바람직한 형태를 이하에 나타낸다. 하기의 가능한 조합의 화합물이 바람직하다.

- [0106] R^1 로서는, 수소, 또는 비치환 알킬 이외의 보호기를 들 수 있다.
- [0107] R^1 의 바람직한 형태로서는, 비치환 알킬 이외의 보호기가 바람직하고, 벤질이 특히 바람직하다.
- [0108] R^2 로서는, 비치환 알킬을 들 수 있다.
- [0109] R^2 의 바람직한 형태로서는, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 이소헥실 등을 들 수 있고, n-프로필, 이소부틸, 헥실 등이 바람직하고, 헥실이 특히 바람직하다.
- [0110] 「나트륨염 및/또는 마그네슘염」의 바람직한 형태로서는, 「마그네슘염」이 바람직하고, 염화이소프로필마그네슘, 염화시클로헥실마그네슘 등이 더욱 바람직하고, 염화이소프로필마그네슘이 특히 바람직하다.
- [0111] R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 로서는, 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠을 들 수 있고, R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 의 할로젠 수는 1 또는 2이다.
- [0112] R^3 의 바람직한 형태로서는, 수소를 들 수 있다.
- [0113] R^4 의 바람직한 형태로서는, 수소를 들 수 있다.
- [0114] R^5 의 바람직한 형태로서는, 불소를 들 수 있다.
- [0115] R^6 의 바람직한 형태로서는, 불소를 들 수 있다.
- [0116] 본 명세서 중, 「 R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 의 할로젠 수는 1 또는 2이다」란, R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 중 1개 또는 2개가 할로젠인 것을 의미한다.
- [0117] 또한, 본 명세서 중, 화합물과 화합물을 반응시키는 것에는, 그의 염 또는 그것들의 용매화물을 반응시키는 것을 포함한다.
- [0118] 본 발명에 따른 화합물의 제약상 허용되는 염으로서, 예를 들어 본 발명에 따른 화합물과, 알칼리 금속(예를 들어, 리튬, 나트륨, 칼륨 등), 알칼리 토금속(예를 들어, 칼슘, 바륨 등), 마그네슘, 전이 금속(예를 들어, 아연, 철 등), 암모니아, 유기 염기(예를 들어, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 디시클로헥실아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 메글루민, 에틸렌디아민, 피리딘, 피콜린, 퀴놀린 등) 및 아미노산과의 염, 또는 무기산(예를 들어, 염산, 황산, 질산, 탄산, 브롬화수소산, 인산, 요오드화수소산 등), 및 유기산(예를 들어, 포름산, 아세트산, 프로피온산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 락트산, 타르타르산, 옥살산, 말레산, 푸마르산, 만델산, 글루타르산, 말산, 벤조산, 프탈산, 아스코르브산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산, 메탄술폰산, 에탄술폰산 등)과의 염을 들 수 있다. 특히 염산, 황산, 인산, 타르타르산, 메탄술폰산과의 염 등을 들 수 있다. 이들 염은 통상적으로 행해지는 방법에 의해 형성시킬 수 있다.
- [0119] 식 (V)로 나타내는 화합물의 제약상 허용되는 염으로서, 특히 알칼리 금속(예를 들어, 리튬, 나트륨, 칼륨 등), 알칼리 토금속(예를 들어, 칼슘, 바륨 등), 마그네슘, 전이 금속(예를 들어, 아연, 철 등)이 바람직하고, 나아가 알칼리 금속(예를 들어, 리튬, 나트륨, 칼륨 등), 알칼리 토금속(예를 들어, 칼슘, 바륨 등)이 바람직하다.
- [0120] 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은, 용매화물(예를 들어, 수화물 등) 및/또는 결정 다형을 형성하는 경우가 있고, 본 발명은 그러한 각종 용매화물 및 결정 다형도 포함한다. 「용매화물」은, 본 발명에 따른 화합물에 대하여 임의의 수의 용매 분자(예를 들어, 물분자 등)와 배위되어 있어도 된다. 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 대기 중에 방치함으로써, 수분을 흡수하여, 흡착수가 부착되는 경우나, 수화물을 형성하는 경우가 있다. 또한, 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을, 재결정함으로써 결정 다형을 형성하는 경우가 있다.
- [0121] 이하에 본 발명의 결정체를 특징하는 방법에 대하여 설명한다.
- [0122] 특별히 언급이 없으면, 본 명세서 중 및 특허 청구 범위에 기재된 수치는, 대략적인 값이다. 수치의 변동은 장치 캘리브레이션, 장치 에러, 물질의 순도, 결정 사이즈, 샘플 사이즈, 기타 인자에서 기인한다.

- [0123] 본 명세서 중에서 사용하는 「결정」이란, 질서있는 긴 범위의 분자 구조를 갖는 물질을 의미한다. 결정 형태의 결정화도는, 예를 들어 분말 X선 회절, 수분 흡착, 시차, 열량 분석, 용액 비색, 용해 특성을 포함한 많은 기술에 의해 측정할 수 있다.
- [0124] 일반적으로 결정성 유기 화합물은, 3차원 공간에 주기적으로 배열된 다수의 원자로 이루어진다. 구조 주기성은, 일반적으로 대부분의 분광학적 프로브(예를 들어, X선 회절, 적외 스펙트럼, 라만 스펙트럼 및 고체 NMR)에 의해 명확하게 구별 가능한 물리적 특성을 발현한다.
- [0125] 그 중에서도 분말 X선 회절(XRPD)은, 고체의 결정성을 측정하기 위한 가장 감도가 좋은 분석법 중 하나이다. X선이 결정에 조사되면, 결정 격자면에서 반사되고, 서로 간섭하여, 브래그 법칙에 따라서 예측되는 조건을 만족시키는 방향의 회절선만 강도가 증대되고, 그 이외에는 없어져 관측되지 않는다. 한편, 비정질 고체에 대해서는 광범위한 질서있는 회절선은 확인되지 않는다. 비정질 고체는, 통상 반복되는 결정 격자의 넓은 범위의 질서가 존재하지 않기 때문에, 할로 패턴이라 불리는 브로드한 XRPD 패턴을 나타낸다.
- [0126] 본 출원에서 개시하는 다환성 피리돈 유도체, 중간체, 그의 염 및/또는 그들의 용매화물의 결정 형태는, 바람직하게는 구별 가능한 분말 X선 회절 프로필을 갖는다. 예를 들어, 화합물 (V)의 경우, 바람직하게는 특징적인 회절 피크의 존재에 의해 각 결정체를 특정하여, 다른 결정체와 구별할 수 있다. 본 명세서 중에서 사용하는 특징적인 회절 피크는, 관찰된 회절 패턴으로부터 선택되는 피크이다. 바람직하게는, 특징적인 피크는 회절 패턴에 있어서의 약 20개, 보다 바람직하게는 약 10개, 가장 바람직하게는 약 5개로부터 선택된다.
- [0127] 일반적으로, 후술하는 표 및 도면에 있어서 표시되는 피크의 상대 강도는, 많은 인자, 예를 들어 X선 빔에 대한 결정의 배향 효과, 분석되는 물질의 순도 또는 샘플의 결정화도에 의해 변동될 수 있는 것이 알려져 있다. 또한, 피크 위치에 대해서도, 샘플 높이의 변동에 기초하여 시프트할 수 있다. 또한, 다른 파장을 사용하여 측정하면 브래그식($n\lambda=2d\sin\theta$)에 따라서 다른 시프트가 얻어지지만, 이러한 다른 파장의 사용에 의해 얻어지는 다른 XRPD 패턴도, 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0128] 본 발명의 결정체는 열분석의 방법에 의해서도 특정할 수 있다.
- [0129] DSC(시차 주사 열량 측정)
- [0130] DSC는, 열분석의 주요한 측정 방법의 하나로, 원자·분자의 집합체로서의 물질의 열적 성질을 측정하는 방법이다. DSC에 의해, 의약 활성 성분의 온도 또는 시간에 관한 열량의 변화를 측정하고, 얻어진 데이터를 온도 또는 시간에 대하여 플롯함으로써 시차 주사 열량 곡선이 얻어진다. 시차 주사 열량 곡선으로부터, 의약 활성 성분이 용해될 때의 온세트(onset) 온도, 용해에 수반하는 흡열 피크 곡선의 최댓값 및 엔탈피에 관한 정보를 얻을 수 있다.
- [0131] (본 발명의 화합물의 제조법)
- [0132] 본 발명의 화합물의 일반적 제조법을 이하에 예시한다. 또한, 추출, 정제 등은 통상의 유기 화학의 실험에서 행하는 처리를 행하면 된다.
- [0133] 본 발명의 화합물의 합성은 당해 분야에 있어서 공지된 방법을 참작하면서 실시할 수 있다.
- [0134] 원료 화합물은 시판되고 있는 화합물, 본 명세서에 있어서 기재된 것, 본 명세서에 있어서 인용된 문헌에 기재된 것, 및 기타 공지 화합물을 이용할 수 있다.
- [0135] 본 발명의 화합물의 염을 취득하고자 할 때, 본 발명의 화합물이 염 형태로 얻어지는 경우에는, 그대로 정제하면 되고, 또한 유리 형태로 얻어지는 경우에는, 적당한 유기 용매에 용해 또는 현탁시키고, 산 또는 염기를 첨가하여 통상의 방법에 의해 염을 형성시키면 된다.
- [0136] 또한, 본 발명의 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염은, 물 또는 각종 용매와의 부가물(수화물 내지 용매화물) 형태로 존재하기도 하지만, 이들 부가물도 본 발명에 포함된다.
- [0137] 「췌기형」 및 「파선」은 절대 입체 배치를 나타낸다.
- [0138] 본 발명의 제조 방법은, 예를 들어 이하와 같이 실시할 수 있다.

[0139] 제1 공정



[0140]

[0141] (식 중, R^1 은 수소, 또는 비치환 알킬 이외의 보호기이며, R^2 는 비치환 알킬이다.)

[0142] 식 (I)로 나타내는 화합물을 나트륨염 및/또는 마그네슘염 존재 하에, 식: R^2-OH 로 나타내는 알코올과 반응시킴으로써 식 (II)로 나타내는 화합물을 얻는 공정이다.

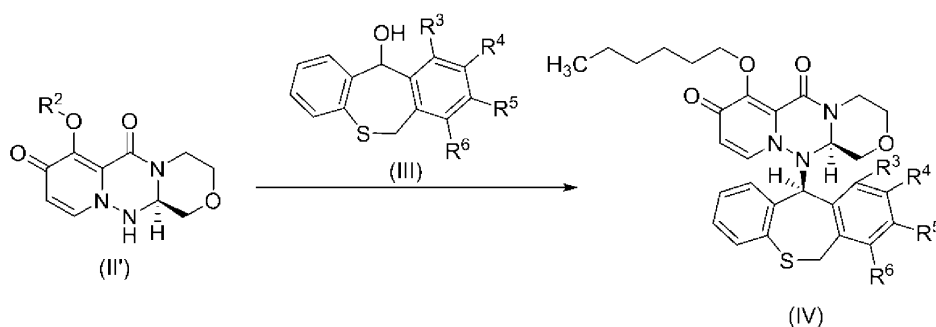
[0143] 용매로서는, 상기 공정을 효율적으로 진행시키는 것이면 특별히 제한되지 않는다. 디클로로메탄, 톨루엔, 테트라히드로푸란 등을 들 수 있고, 단독 또는 혼합 또는 무용매 하에서 반응시킬 수 있다. 바람직하게는 테트라히드로푸란을 들 수 있다.

[0144] 나트륨염 및/또는 마그네슘염으로서, 수산화나트륨, 수소화나트륨, 나트륨이소프로폭사이드, 나트륨tert-펜톡사이드, 염화이소프로필마그네슘, 염화시클로헥실마그네슘 등을 들 수 있다. 바람직하게는 염화이소프로필마그네슘을 들 수 있다. 화합물 (I)에 대하여 0.1몰 당량 내지 5몰 당량, 바람직하게는 0.3몰 당량 내지 0.5몰 당량 사용하여 반응시키면 된다.

[0145] 반응 온도는 특별히 제한되지 않지만, 통상 약 0 내지 100℃, 바람직하게는 0℃ 내지 실온에서 행할 수 있다.

[0146] 반응 시간은 특별히 제한되지 않지만, 통상 0.5시간 내지 24시간, 바람직하게는 1 내지 10시간이다.

[0147] 제2 공정



[0148]

[0149] (식 중, R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 은 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이며, R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 의 할로젠 수는 1 또는 2이다. 기타 기호는 상기와 동일한 의미이다.)

[0150] 식 (II')로 나타내는 화합물을 축합제 존재 하에, 식 (III)으로 나타내는 화합물과 반응시킴으로써, 식 (IV)로 나타내는 화합물을 얻는 공정이다.

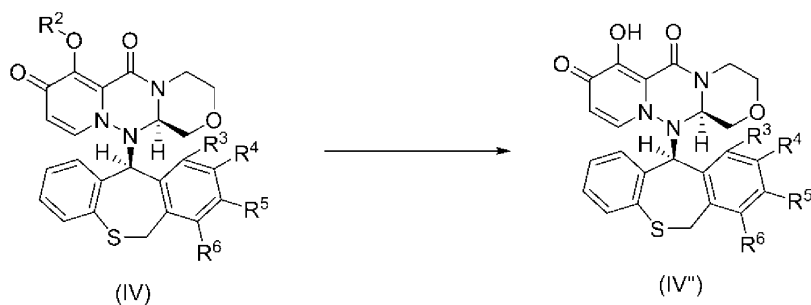
[0151] 용매로서는, 상기 공정을 효율적으로 진행시키는 것이면 특별히 제한되지 않는다. 아세트산에틸, 시클로헥산, 아세트산이소프로필, 아세트산프로필, 톨루엔, 1,4-디옥산, DMA, DMF, 톨루엔, 헵탄, 시클로펜틸메틸에테르 등을 들 수 있고, 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 아세트산에틸과 시클로헥산의 혼합 용매를 들 수 있다.

[0152] 축합제로서는, 프로필포스폰산 무수물, 메탄술폰산, 트리플루오로아세트산, p-톨루엔술폰산 1수화물, 10-감파술폰산, 농황산, 디클로로아세트산, 황산수소테트라메틸암모늄 등을 들 수 있고, 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 프로필포스폰산 무수물과 메탄술폰산의 혼합을 들 수 있다. 화합물 (II')에 대하여 1몰 당량 내지 5몰 당량, 바람직하게는 1몰 당량 내지 3몰 당량 사용하여 반응시키면 된다.

[0153] 반응 온도는 특별히 제한되지 않지만, 통상 약 0 내지 100℃, 바람직하게는 0℃ 내지 실온에서 행할 수 있다.

[0154] 반응 시간은 특별히 제한되지 않지만, 통상 0.5시간 내지 24시간, 바람직하게는 1 내지 10시간이다.

[0155] 제3 공정



[0156]

[0157] (식 중의 기호는 상기와 동일한 의미이다.)

[0158] 식 (IV)로 나타내는 화합물을 금속염과 반응시킴으로써, 식 (IV'')로 나타내는 화합물을 얻는 공정이다.

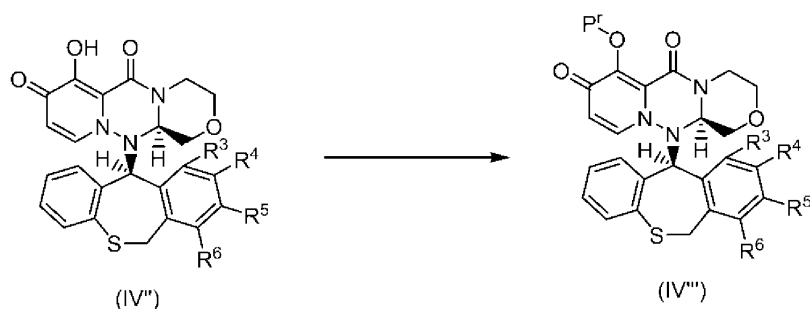
[0159] 용매로서는, 상기 공정을 효율적으로 진행시키는 것이면 특별히 제한되지 않는다. N-메틸피롤리돈, N,N-디메틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드 등을 들 수 있고, 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 N-메틸피롤리돈을 들 수 있다.

[0160] 금속염으로서, 염화리튬, 브롬화리튬을 들 수 있다. 바람직하게는 염화리튬을 들 수 있다. 화합물 (IV)에 대하여 1몰 당량 내지 20몰 당량, 바람직하게는 5몰 당량 내지 10몰 당량 사용하여 반응시키면 된다.

[0161] 반응 온도는 특별히 제한되지 않지만, 통상 약 0 내지 100℃, 바람직하게는 실온 내지 100℃에서 행할 수 있다.

[0162] 반응 시간은 특별히 제한되지 않지만, 통상 0.5시간 내지 48시간, 바람직하게는 12 내지 24시간이다.

[0163] 제4 공정

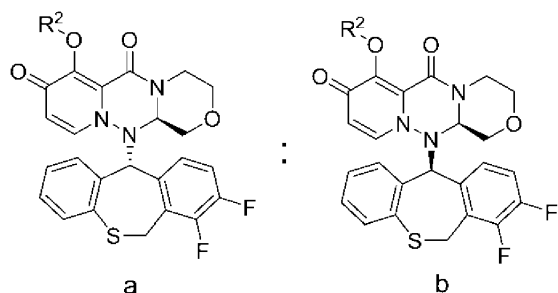


[0164]

[0165] (식 중, P^r은 에스테르기 또는 에테르기 등의 히드록시기의 보호기이며, 기타 기호는 상기와 동일한 의미이다.)

[0166] 화합물 (IV'')의 히드록실기를 에스테르기 또는 에테르기로 변환하는 일반적인 방법에 의해 화합물 (V''')를 얻을 수 있다. 예를 들어, Protective Groups in Organic Synthesis, Theodora W Green(John Wiley & Sons), Prog. Med.5:2157-2161(1985) 및 Supplied by The British Library-"The world's Knowledge" 등에 기재된 방법을 이용할 수 있다.

[0167] 본 명세서에 있어서 「디아스테레오머」란, 예를 들어 다음 식으로 나타내는 화합물의 경우, 하기에 나타내는 2개의 입체 이성체의 HPLC 면적 백분율비를 나타낸다.



[0168]

[0169]

식 (V)로 나타내는 화합물은 인플루엔자 바이러스에 의해 유발되는 증상 및/또는 질환에 유용하다. 예를 들어, 발열, 오한, 두통, 근육통, 전신 권태감 등을 수반하는 감기와 유사한 증상이나, 인두염, 콧물, 코막힘, 기침, 담 등의 기도염 증상, 복통, 구토, 설사와 같은 위장 증상, 또한 급성 뇌증, 폐렴 등의 2차 감염을 수반하는 합병증의 치료 및/또는 예방, 증상 개선에 유효하다.

[0170]

식 (VI)으로 나타내는 화합물은, 경구 흡수성이 높고, 양호한 생체이용률을 나타내며, 양호한 클리어런스를 나타내고, 폐 이행성이 높은 등의 이점을 갖기 때문에, 우수한 의약품이 될 수 있다.

[0171]

식 (V)로 나타내는 화합물은, 바이러스 특이적 효소인 캡 구조 의존적 엔도뉴클레아제에 대한 저해 활성이 높고, 선택성이 높은 등의 효과를 갖기 때문에, 부작용이 경감된 의약품이 될 수 있다.

[0172]

또한, 식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물은, 대사 안정성이 높고, 용해도가 높고, 경구 흡수성이 높으며, 양호한 생체이용률을 나타내고, 양호한 클리어런스를 나타내며, 폐 이행성이 높고, 반감기가 길며, 비단백 결합율이 높고, hERG 채널 저해가 낮으며, CYP 저해가 낮고, CPE(Cyto Pathic Effect, 세포 변성 효과) 억제 효과가 확인되고/되거나 광독성 시험, 에임스(Ames) 시험, 유전 독성 시험에서 음성을 나타내거나, 또는 간 장애 등의 독성을 갖지 않은 등의 이점도 갖는다. 따라서, 식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물은, 우수한 의약품이 될 수 있다.

[0173]

식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물은, 경구적 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 경구 투여에 의한 경우, 식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물은 통상의 제제, 예를 들어 정제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 고형제; 수제; 유성 현탁제; 또는 시럽제 또는 엘릭시르제 등의 액제 중 어느 제형으로서도 사용할 수 있다. 비경구 투여에 의한 경우, 식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물은, 수성 또는 유성 현탁 주사제, 점비액으로서 사용할 수 있다. 그의 제조 시에는, 관용의 부형제, 결합제, 활택제, 수성 용제, 유성 용제, 유화제, 현탁화제, 보존제, 안정제 등을 임의로 사용할 수 있다. 식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물을 함유하는 의약 조성물은, 치료 유효량의 식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물을 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 함께 조합함(예를 들어 혼합함)으로써 제조된다.

[0174]

식 (V)로 나타내는 화합물 및/또는 식 (VI)으로 나타내는 화합물의 투여량은, 투여 방법, 환자의 연령, 체중, 상태 및 질환의 종류에 따라서도 상이하지만, 통상 경구 투여의 경우, 성인 1일당 약 0.05mg 내지 3000mg, 바람직하게는 약 0.1mg 내지 1000mg을, 필요하면 분할하여 투여하면 된다. 또한, 비경구 투여의 경우, 성인 1일당 약 0.01mg 내지 1000mg, 바람직하게는 약 0.05mg 내지 500mg을 투여한다.

[0175]

이하에 본 발명의 실시예, 참고예 및 중간체 합성예, 그리고 시험예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0176]

참고예 및 실시예에서 얻어진 NMR 분석은 400MHz에서 행하고, DMSO-d₆, CDCl₃을 사용하여 측정하였다.

[0177]

분말 X선 회절 패턴의 측정

[0178]

일본 약전의 일반 시험법에 기재된 분말 X선 회절 측정법에 따라서, 각 실시예에서 얻어진 결정의 분말 X선 회절 측정을 행하였다. 측정 조건을 이하에 나타낸다.

[0179]

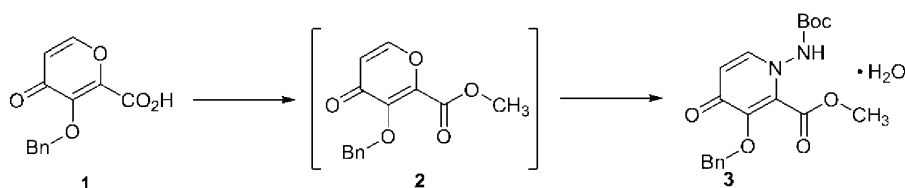
(장치)

[0180]

리가쿠사제 MinFlex600RINT-TTRIII

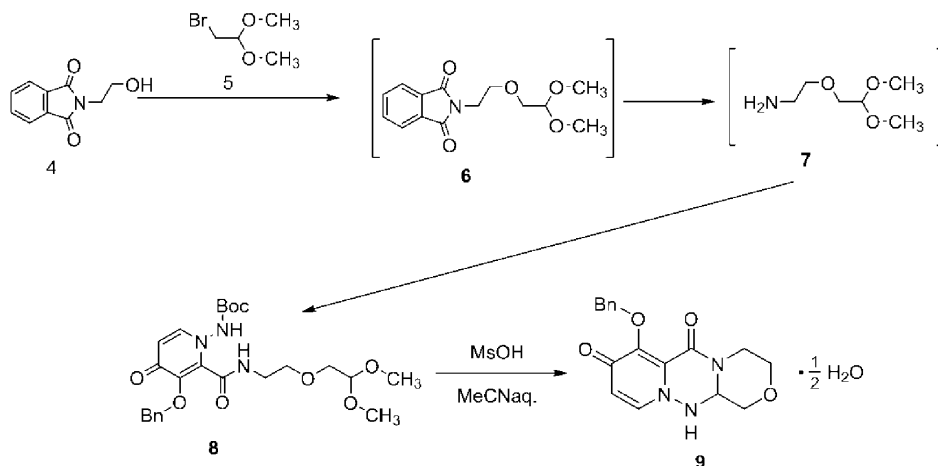
- [0181] (조작 방법)
- [0182] 검출기: 고속 일차원 검출기(D/TecUltra2) 및 가변 나이프엣지
- [0183] 측정법: 반사법
- [0184] 광원의 종류: Cu관구
- [0185] 사용 파장: CuK α 선
- [0186] 관전류: 10mA 또는 15mA
- [0187] 관전압: 30Kv 또는 40KV
- [0188] 시료 플레이트: 알루미늄 또는 유리
- [0189] X선의 입사각(θ): 3-40° , 샘플링 폭: 0.01° , 또는
- [0190] X선의 입사각(θ): 4-40° , 샘플링 폭: 0.02°
- [0191] 일반적으로, 분말 X선 회절에 있어서의 회절 각도(2θ)는 $\pm 0.2^\circ$ 의 범위 내에서 오차가 발생할 수 있으므로, 회절 각도의 값은 $\pm 0.2^\circ$ 정도의 범위 내의 수치도 포함한다. 따라서, 분말 X선 회절에 있어서의 피크의 회절 각도가 완전히 일치하는 결정뿐만 아니라, 피크의 회절 각도가 $\pm 0.2^\circ$ 정도의 오차로 일치하는 결정도 본 발명에 포함된다.
- [0192] (칼 · 피셔법에 의한 수분량의 측정 방법)
- [0193] 수분에 대해서는, 일본 약전 일반 시험법 수분(전기량 적정)에 의해 시험을 행하였다. 단, 양극액으로서 미쓰비시 가가꾸제 아쿠아미크론(등록 상표) AX, 음극액으로서 아쿠아미크론(등록 상표) CXU를 사용하였다.
- [0194] 일반적으로, 칼 · 피셔법에 의한 수분 측정은 $\pm 0.3\%$ 의 범위 내에서 오차가 발생할 수 있으므로, 수분 함량의 값은 $\pm 0.3\%$ 정도의 범위 내의 수치도 포함한다.
- [0195] TG/DTA의 측정
- [0196] 각 실시예에서 얻어진 결정의 TG/DTA의 측정을 행하였다. 알루미늄팬에 시료를 칭량하고, 개방계로 측정하였다. 측정 조건을 이하에 나타낸다.
- [0197] 장치: 히타치 하이테크 사이언스사제 TG/DTA7200
- [0198] 측정 온도 범위: 30℃-250℃
- [0199] 승온 속도: 10℃/분
- [0200] 일반적으로, TG/DTA에 의한 측정은 $\pm 2^\circ\text{C}$ 의 범위 내에서 오차가 발생할 수 있으므로, TG/DTA에 의한 측정값은 $\pm 2^\circ\text{C}$ 정도의 범위 내의 수치도 포함한다.
- [0201] 수분 흡탈착 등온선 측정(DVS)
- [0202] 각 실시예에서 얻어진 결정의 수분 흡탈착 등온선 측정을 행하였다. 샘플 팬에 시료를 칭량하여 측정을 행하였다. 측정 조건을 이하에 나타낸다.
- [0203] 장치: Surface Measurement Systems Ltd.사제 DVS Advantage
- [0204] 측정 포인트: 0%RH로부터 5%마다 95%RH까지. 그 후 95%RH로부터 5%마다 0%RH까지
- [0205] 온도: 25℃ 또는 60℃
- [0206] 시차 주사 열량(DSC)의 측정
- [0207] 각 실시예에서 얻어진 결정의 DSC의 측정을 행하였다. 스테인레스 스틸팬에 시료를 칭량하고, 간이 밀봉하여 측정하였다. 측정 조건을 이하에 나타낸다.
- [0208] 장치: METTLER TOLEDO DSC822e
- [0209] 측정 온도 범위: 30℃-300℃

- [0210] 승온 속도: 10℃/분
- [0211] 분위기: N₂ 40mL/분
- [0212] 일반적으로, 시차 주사 열량(DSC)에 의한 측정은 ±2℃의 범위 내에서 오차가 발생할 수 있으므로, 시차 주사 열량(DSC)에 의한 측정값은 ±2℃ 정도의 범위 내의 수치도 포함한다.
- [0213] 실시예 중의 각 용어의 의미는 이하와 같다.
- [0214] DMA: N,N-디메틸아세트아미드
- [0215] THF: 테트라히드로푸란
- [0216] T3P: 프로필포스폰산 무수물(환상 삼량체)
- [0217] 실시예 1 화합물 3의 제조 방법



- [0218]
- [0219] 공정 1 화합물 3의 제조 방법
- [0220] 화합물 1(100.00g, 406mmol)에 DMA(300mL)를 첨가하여 교반하였다. 탄산수소나트륨(44.41g, 529mmol), 디메틸 황산(58.91g, 467mmol) 및 DMA(100mL)를 첨가하여 25℃에서 7시간 교반하였다. 반응액에 합성 염산(16.90g) 및 물(500g)을 첨가하고, 아세트산에틸(1000, 550mL)로 2회 추출하였다. 유기층을 5% 식염수(300g) 및 물(300g)로 세정하였다. 감압 농축에 의해, 액 중량을 약 500g까지 용매를 증류 제거하였다. 또한 농축액에 아세트산에틸(350mL)을 첨가하고, 감압 농축에 의해, 액 중량을 약 500g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 DMA(300mL)를 첨가하고, 감압 농축에 의해 액 중량을 약 400g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 피리딘 파라톨루엔술포산(265.42g) 및 DMA(100mL)를 첨가한 후, 반응액을 60℃로 승온하였다. 그 후, 반응액에 카르바진산tert-부틸(69.80g, 528mmol)의 DMA(100mL) 용액을 6시간에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 반응액을 60℃에서 3시간 교반하고, 25℃까지 냉각시켰다. 반응액에 에탄올(100mL) 및 물(290mL)을 첨가한 후, 30℃까지 승온하였다. 반응액에 에탄올(100mL) 및 물(520mL)의 혼합액을 천천히 첨가하였다. 반응액을 0℃까지 냉각시킨 후에, 0℃에서 1시간 반 교반하였다. 발생한 담황백색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 에탄올(480mL) 및 물(720mL)의 혼합액으로 세정하고 건조시킴으로써, 화합물 3의 1수화물(122.70g, 수율 77%)을 담황백색 고체로서 얻었다.
- [0221] ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ: 1.45(s, 9H), 3.77(s, 3H), 5.26(s, 2H), 6.39(d, J=7.6Hz, 1H), 7.27-7.47(m, 6H), 7.64-8.23(brs, 1H)
- [0222] 분말 X선 회절 2θ(°): 5.4, 7.5, 8.4, 10.6, 11.9, 13.5, 20.2, 22.9
- [0223] 화합물 3의 분말 X선 회절 결과를 도 1에 도시한다.
- [0224] 칼 피셔법에 의한 수분량의 측정 결과: 4.5%

[0225] 실시예 2 화합물 9의 제조 방법



[0226]

[0227] 공정 1 화합물 6의 제조 방법

[0228] 화합물 4(20.00g, 104.6mmol)에 화합물 5(28.29g, 167.4mmol) 및 DMA(65mL)를 첨가하여 교반하였다. 반응액을 40℃까지 승온한 후, 나트륨tert-부톡시드(15.09g, 157.0mmol)를 천천히 첨가하였다. 반응액을 40℃에서 3시간 교반한 후, 20℃로 냉각시켰다. 반응액에 아세트산(3.14g) 및 10% 식염수(64g)를 첨가하고, 아세트산에틸(60mL)로 2회 추출하였다. 유기층에 물(144mL)을 첨가하여 0℃까지 냉각시켰다. 발생한 담황백색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 메탄올(5.4g) 및 물(48.6g)의 혼합액으로 세정하고 건조시킴으로써, 화합물 6(20.44g, 수율 78%)을 담황백색 고체로서 얻었다.

[0229] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3.34(s, 6H), 3.53(d, J=5.2Hz, 2H), 3.76(t, J=5.6Hz, 2H), 3.90(t, J=5.6Hz, 2H), 4.43(t, J=5.2Hz, 1H), 7.70-7.73(m, 2H), 7.84-7.87(m, 2H)

[0230] 공정 2 화합물 8의 제조 방법

[0231] 화합물 6(20.02g, 71.68mmol)에 에탄올(20mL) 및 물(20mL)을 첨가하여 교반하였다. 반응액을 60℃까지 승온하였다. 반응액에 60% 히드라진 1수화물 수용액(8.99g, 107.7mmol)을 첨가한 후, 60℃에서 4시간 교반하였다. 반응액에 물(40mL)을 첨가하고, 30℃까지 냉각시킨 후, 17% 수산화칼륨 수용액(92.12g)을 첨가하였다. 반응액을 염화메틸렌(120, 78, 78, 78mL)으로 4회 추출하였다. 유기층을 물(20mL)로 세정하고, 감압 농축에 의해 액 중량을 약 160g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 THF(100mL)를 첨가하고, 감압 농축에 의해 액 중량을 약 40g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 THF(100mL)를 첨가하고, 감압 농축에 의해 액 중량을 약 40g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 THF(20mL)를 첨가하고, 감압 농축에 의해 15g의 화합물 7의 THF 용액을 얻었다.

[0232] 화합물 3(10.00g, 25.5mmol)에 상기 화합물 7의 THF 용액(14.71g), THF(7g) 및 1,8-디아자비시클로[5.4.0]-7-운데센(379.0mg)을 첨가하여 교반하였다. 반응을 60℃까지 승온한 후, 60℃에서 24시간 교반하였다. 반응액을 25℃까지 냉각시킨 후, 물(28g) 및 아세트산(3.72g)을 첨가하였다. 반응액을 아세트산에틸(50, 30mL)로 2회 추출하고, 유기층을 5% 탄산수소나트륨 수용액(30g) 및 물(28g)로 세정하였다. 감압 농축에 의해 액 중량을 약 36g까지 용매를 증류 제거하였다. 반응액에 아세트산에틸을 첨가하고, 감압 농축에 의해 액 중량을 약 36g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 헵탄(65mL)을 첨가하고, 5℃까지 냉각시켰다. 5℃에서 1시간 교반한 후, 발생한 담황백색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 헵탄(32mL) 및 아세트산에틸(14mL)의 혼합액으로 세정하고 건조시킴으로써, 화합물 8(10.10g, 수율 81%)을 담황백색 고체로서 얻었다.

[0233] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 1.44(s, 9H), 3.32-3.48(m, 12H), 4.41(t, J=5.2Hz, 1H), 5.29(s, 2H), 6.38(d, J=7.6Hz, 1H), 7.11-7.50(m, 7H), 8.46(s, 1H).

[0234] 공정 3 화합물 9의 제조 방법

[0235] 화합물 8(19.99g, 40.7mmol)에 아세트니트릴(170mL) 및 물(30mL)을 첨가하여 교반하였다. 반응액을 60℃까지 승온하고, 메탄술폰산(11.70g, 121.7mmol)을 천천히 첨가하였다. 반응액을 60℃에서 6시간 교반한 후, 25℃까

지 냉각시켰다. 반응액에 30% 수산화나트륨 수용액(15.91g)을 첨가하고, 감압 농축에 의해 액 중량을 약 100g 까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 물(50mL)을 첨가하여 감압 농축에 의해 액 중량을 약 100g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액을 25℃에서 30분간 교반한 후, 발생한 황색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 물(40mL)로 세정하고 건조시킴으로써, 화합물 9의 0.5수화물(10.43g, 수율 76%)을 황색 결정으로서 얻었다.

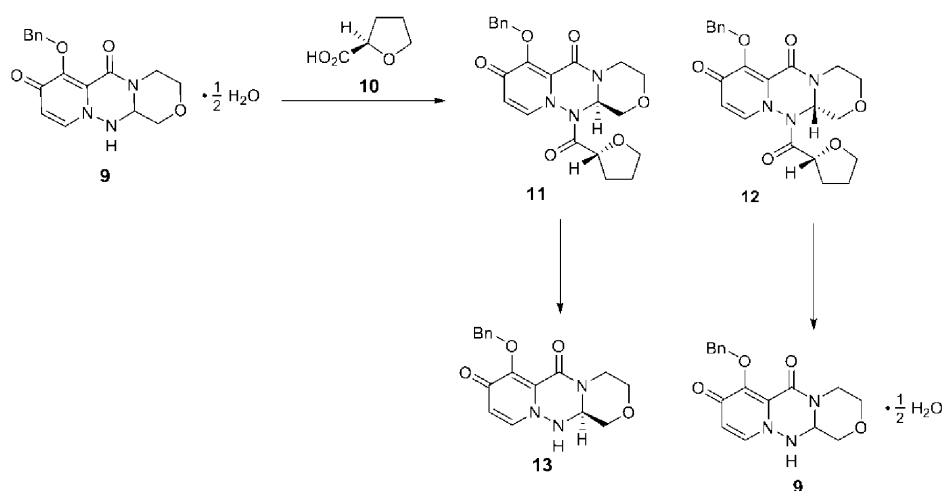
[0236] ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ : 2.95(ddd, $J=13.7, 12.3, 4.3\text{Hz}$, 1H), 3.13(dd, $J=11.2, 10.0\text{Hz}$, 1H), 3.44(td, $J=11.9, 3.1\text{Hz}$, 1H), 3.96-4.08(m, 2H), 4.14(dd, $J=13.9, 2.4\text{Hz}$, 1H), 4.80(ddd, $J=12.6, 9.9, 4.5\text{Hz}$, 1H), 5.08(s, 2H), 6.22(d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.24-7.41(m, 4H), 7.52-7.60(m, 2H), 7.69(d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)

[0237] 분말 X선 회절 $2\theta(^{\circ})$: 9.5, 13.4, 18.0, 19.3, 21.2, 22.5, 22.8, 23.6, 27.5, 28.1

[0238] 화합물 9의 분말 X선 회절 결과를 도 2에 도시한다.

[0239] 칼 피셔법에 의한 수분량의 측정 결과: 2.8%

[0240] 실시예 3 화합물 13의 제조 방법



[0241]

[0242] 공정 1 화합물 11 및 12의 제조 방법

[0243] 화합물 9의 0.5수화물(30.00g, 89.2mmol)에 아세트산에틸(87mL), 50(w/w)% T3P 아세트산에틸 용액(145.80g, 229.1mmol)을 첨가하여 교반하였다. 반응액을 60℃까지 승온하고, 트리에틸아민(18.55g, 183.3mmol)을 첨가한 후, (R)-(+)-테트라히드로푸란-2-카르복실산(12.24g, 105.4mmol)을 천천히 첨가하였다. 반응액을 60℃에서 4시간 반 교반하고, 0℃까지 냉각시킨 후, 발생한 담황색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 아세트산에틸(120mL)로 세정함으로써, 화합물 11(18.34g, 미건조)을 담황색 고체로서 얻었다. 또한, 여과액과 세정액을 혼합하여, 화합물 12의 아세트산에틸 용액(358.60g)을 얻었다.

[0244] 공정 2 화합물 13 및 9의 제조 방법

[0245] 화합물 11(15.28g)에 아세트산에틸(120mL) 및 1,8-디아자비시클로[5.4.0]-7-운데센(530mg, 3.5mmol)을 첨가하여 교반하였다. 반응액을 30℃까지 승온하고, 메탄올(1.67g) 및 아세트산에틸(43mL)의 혼합액을 천천히 첨가하였다. 반응액을 실온에서 1시간 교반하고, 발생한 백색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 결정을 아세트산에틸(60mL)로 세정하고 건조시킴으로써, 화합물 13(11.06g, 수율 45%)의 백색 결정을 얻었다.

[0246] ^1H -NMR(CDC $_3$) δ : 2.84-2.92(m, 2H), 3.45(td, $J=3.2\text{Hz}, 12.0\text{Hz}$, 1H), 3.82(dd, $J=4.0\text{Hz}, 11.2\text{Hz}$, 1H), 3.92(dd, $J=4.4\text{Hz}, 11.6\text{Hz}$, 1H), 4.13(dd, $J=2.8\text{Hz}, 13.6\text{Hz}$, 1H), 4.47-4.54(m, 1H), 4.96(d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 5.27(d, $J=10.0\text{Hz}$, 1H), 5.76(d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 6.19(d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.22(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.30-7.38(m, 3H), 7.59(dd, $J=1.6\text{Hz}, 8.0\text{Hz}$, 2H).

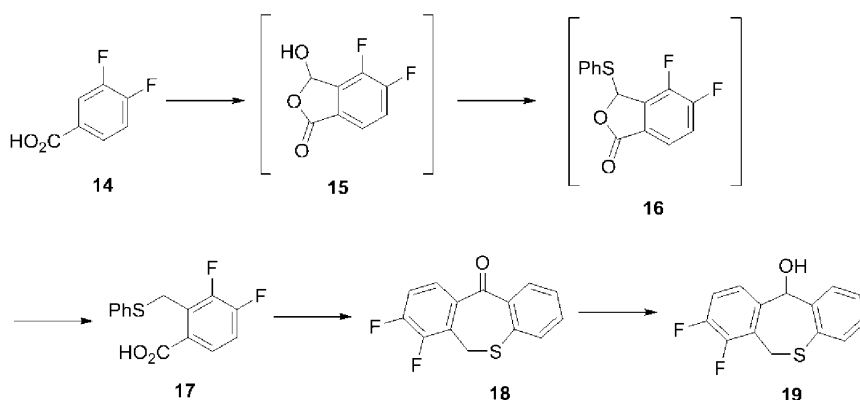
[0247] 분말 X선 회절 $2\theta(^{\circ})$: 7.1, 14.1, 15.1, 21.0, 21.2, 22.9, 23.4

[0248] 화합물 13의 분말 X선 회절 결과를 도 3에 도시한다.

[0249] 화합물 12의 아세트산에틸 용액(334.69g)을 감압 증류 제거하고, 액 중량을 약 170g까지 용매를 증류 제거하였

다. 농축액을 25℃로 조정하여 교반하였다. 반응액에 아세토니트릴(224mL), 물(56mL) 및 24% 수산화나트륨 수용액(150g)을 천천히 첨가하고, 유기층과 수층으로 분리하였다. 얻어진 수층에 물(14mL)을 첨가한 후, 아세토니트릴(168mL)로 추출을 2회 행하였다. 유기층을 합하여 감압 증류 제거하고, 액 중량을 약 250g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액을 60℃까지 승온하고, 1,8-디아자비시클로[5.4.0]-7-운데센(19.01g, 124.9mmol)을 첨가하였다. 반응액을 60℃에서 3시간 반 교반하고, 40℃까지 냉각시켰다. 반응액에 5.8% 염산수(50.40g)을 첨가하고, 25℃까지 냉각시켜 314.96g의 용액을 얻었다. 용액의 일부(158.86g)를 감압 농축시켜, 액 중량을 약 85g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액을 20℃에서 2시간 교반한 후, 물(28mL)을 첨가하였다. 반응액을 감압 농축시켜 액 중량을 약 100g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액을 20℃에서 1시간 교반한 후, 석출된 담황백색 결정을 여과 취출하였다. 얻어진 결정을 물(42mL)로 세정하고 건조시킴으로써, 화합물 9(5.93g, 수율 42%)을 담황백색 결정으로서 얻었다.

[0250] 실시예 4 화합물 19의 제조 방법



[0251]

[0252] 공정 1 화합물 15의 제조 방법

[0253] THF(25mL)에 디이소프로필아민(7.69g, 76.0mmol)을 첨가하여 교반하고, -40℃까지 냉각시켰다. 반응액에 1.6mol/L n-부틸리튬(43.5mL, 69.6mmol)을 천천히 첨가한 후, 0℃에서 1시간 교반하였다. -40℃로 냉각시키고, 3,4-디플루오로벤조산(5.00g, 31.6mmol)의 THF(25mL) 용액을 천천히 첨가하였다. 반응액을 -40℃에서 1시간 교반하고, N,N-디메틸포름아미드(5.74g, 78.5mmol)를 천천히 첨가하였다. 반응액에 6mol/L 염산수(34.25mL)를 첨가하고, 25℃까지 승온한 후, 유기층과 수층으로 분리하였다. 얻어진 수층을 아세트산에틸(15mL)로 추출하였다. 유기층을 합한 후, 물(5mL)로 세정하였다. 감압 농축시킨 후, 잔사에 톨루엔을 가함으로써, 화합물 15의 톨루엔 용액을 얻었다.

[0254] 공정 2 화합물 16의 제조 방법

[0255] 상기에서 얻은 화합물 15의 톨루엔 용액에, 톨루엔(17.8mL), 티오펜올(3.90g, 35.4mmol) 및 D-캄포술포산(1.16g, 5.0mmol)을 첨가하여 교반하고, 60℃로 승온하였다. 반응액을 60℃에서 4시간 교반한 후, 5℃까지 냉각시켰다. 반응액에 2mol/L 수산화나트륨 수용액(10mL)을 첨가하여, 25℃까지 승온하였다. 반응액을 톨루엔(10mL)으로 추출하고, 얻어진 유기층을 2mol/L 수산화나트륨 수용액(5mL) 및 물(10mL)로 세정하였다. 감압 농축시킨 후, 톨루엔을 가함으로써, 화합물 16의 톨루엔 용액을 얻었다.

[0256] 공정 3 화합물 17의 제조 방법

[0257] 염화알루미늄(5.52g, 41.4mmol)에 톨루엔(25mL)을 첨가하여 교반하고, 0℃까지 냉각시켰다. 반응액에 1,1,3,3-테트라메틸디실록산(5.56g, 41.4mmol)의 톨루엔(10mL) 용액을 적하하고, 25℃까지 승온하였다. 반응액에 상기에서 얻은 화합물 16의 톨루엔 용액을 천천히 첨가하고, 25℃에서 2시간 반 교반하였다. 반응액에 15% 황산수(35mL)를 첨가하여 교반한 후, 유기층과 수층으로 분리하였다. 얻어진 유기층을 물(20mL)로 2회 세정하였다. 감압 농축에 의해, 액 중량을 약 16g까지 용매를 증류 제거하였다. 농축액에 헵탄(40mL)을 천천히 첨가하고, 0℃까지 냉각시킨 후, 발생한 백색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 헵탄(20mL)으로 세정한 후, 건조시킴으로써, 화합물 17(7.20g, 수율 81.3%)을 백색 고체로서 얻었다.

[0258] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 4.61(d, J=1.6Hz, 2H), 7.09-7.15(m, 1H), 7.23-7.27(m, 3H), 7.34-7.37(m, 2H), 7.84-

7.88(m, 1H)

[0259] 공정 4 화합물 18의 제조 방법

[0260] 폴리인산(425.0g)을 80℃로 승온하여 교반하였다. 거기에 화합물 17(85.0g)을 첨가하여 120℃까지 승온하고, 반응액을 120℃에서 3시간 교반하였다. 반응액을 80℃까지 냉각시키고, 물(200mL)을 천천히 첨가하였다. 반응액을 30℃까지 냉각시키고, 물(850mL)을 첨가하고, 아세트산에틸(850mL)로 추출하였다. 유기층을 물(425mL) 및 10% 탄산수소나트륨 수용액(255mL)으로 세정하였다. 용매를 감압 농축에 의해 증류 제거하고, 얻어진 잔사에 헵탄(340mL)을 첨가하였다. 용매를 감압 농축에 의해 증류 제거하고, 얻어진 잔사에 헵탄(85mL)을 첨가하였다. 반응액을 30℃에서 30분간 교반한 후, 발생한 갈색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 헵탄(42mL)으로 세정한 후, 건조시킴으로써, 화합물 18(72.0g, 수율 91%)을 갈색 고체로서 얻었다.

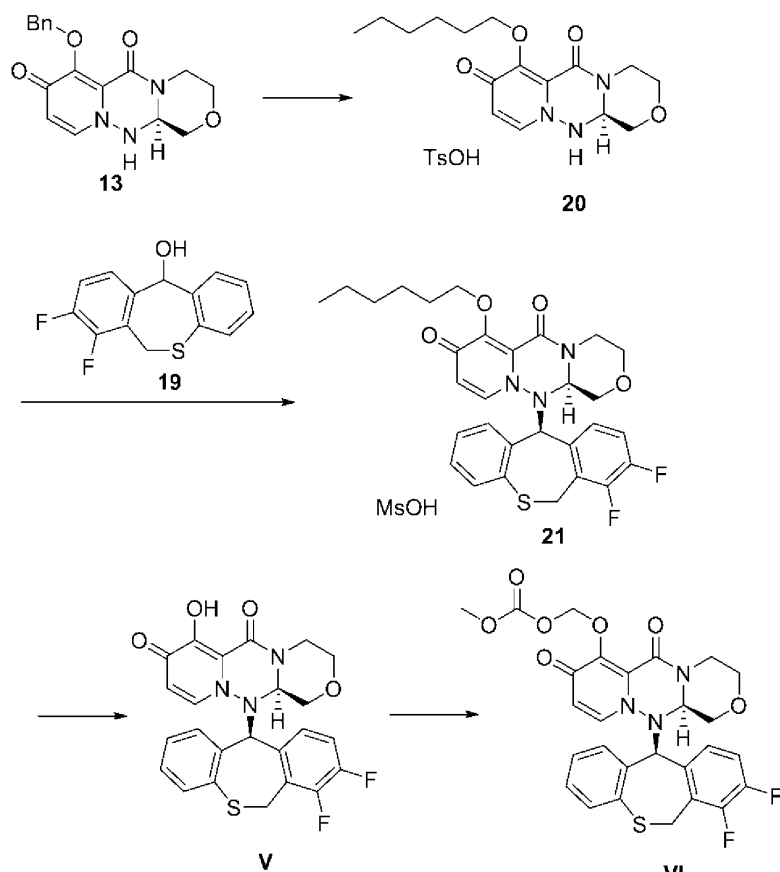
[0261] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 4.14(d, $J=1.0\text{Hz}$, 2H), 7.09–7.18(m, 1H), 7.27–7.33(m, 1H), 7.34–7.45(m, 3H), 8.19(dd, $J=8.5\text{Hz}$, 1.4Hz, 1H)

[0262] 공정 5 화합물 19의 제조 방법

[0263] 수소화붕소나트륨(234.0mg, 6.2mmol)을 0.5% 수산화나트륨 수용액(1.8mL)에 현탁시켜, 수소화붕소나트륨 현탁액을 제조하였다. 화합물 18(4.5g, 17.2mmol)에 2-프로판올(20mL) 및 물(2.25mL)을 첨가하여 교반하고, 40℃까지 승온하였다. 반응액에 상기에서 제조한 수소화붕소나트륨 현탁액을 천천히 첨가하였다. 반응액을 40℃에서 1시간 반 교반하고, 25℃까지 냉각시켰다. 반응액에 물(32mL)을 첨가하고, 추가로 물(6.7mL) 및 62% 황산수(460mg)의 혼합액을 첨가하였다. 반응액을 5℃까지 냉각시키고, 발생한 갈색 침전을 여과 취출하였다. 얻어진 고체를 물(18mL)로 세정한 후, 건조시킴으로써, 화합물 19(4.4g, 수율 97%)를 갈색 고체로서 얻었다.

[0264] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 2.67(d, $J=3.8\text{Hz}$, 1H), 4.20(dd, $J=14.4$, 1.4Hz, 2H), 4.68(dd, $J=14.5$, 1.3Hz, 2H), 7.02(dt, $J=9.7$, 8.3Hz, 1H), 7.12–7.21(m, 4H), 7.44–7.49(m, 1H)

[0265] 실시예 5 화합물 (V) 및 화합물 (VI)의 제조 방법



[0266]

- [0267] 공정 1-1 화합물 20의 제조 방법
- [0268] 1-헥산올(22.5g, 220mmol)과 THF(24.6g)를 혼합하여, 20℃로 온도를 조절하였다. 혼합액에 염화이소프로필마그네슘의 THF 용액(2mol/L, 7.2g, 14.7mmol)을 첨가하고, 마그네슘헥속시드 용액을 제조하였다.
- [0269] 화합물 13(12.0g, 36.7mmol)에 1-헥산올(22.5g, 220mmol)을 첨가하여 교반하고, 20℃로 온도를 조절하였다. 얻어진 슬러리액에 상기에서 제조한 마그네슘헥속시드 용액을 첨가하였다. 반응액을 20℃에서 4시간 교반한 후, 시트르산 수용액(시트르산 1수화물 3.1g, 물 36g)과 혼합하였다. THF(10.7g)로 추출하고, 얻어진 유기층을 물(24g)로 세정하였다. 감압 농축에 의해, 액 중량을 약 55g까지 용매를 증류 제거하였다. 얻어진 액에 파라톨루엔술포산의 THF 용액(파라톨루엔술포산 1수화물 7.0g, 테트라히드로푸란 42.8g)을 첨가하였다. 감압 농축에 의해, 액 중량을 약 61g까지 용매를 증류 제거하였다. THF(42.7g)를 첨가하고, 감압 농축에 의해, 액 중량을 약 61g까지 용매를 증류 제거하였다. 50℃까지 승온한 후, 메틸tert-부틸에테르(133.0g)를 첨가하고, 10℃까지 냉각시켰다. 10℃에서 1시간 반 교반하고, 발생한 백색 침전을 여과 추출하였다. 메틸tert-부틸에테르(40.0g)와 아세트산에틸(16.0g)의 혼합액으로, 얻어진 고체를 세정한 후, 건조시킴으로써, 화합물 20의 토실산염(15.8g, 수율 87.2%)을 백색 결정으로서 얻었다.
- [0270] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 0.88(t, J=7.2Hz, 3H), 1.25-1.34(m, 4H), 1.34-1.43(m, 2H), 1.76-1.85(m, 2H), 2.34(s, 3H), 3.04(ddd, J=13.6, 11.7, 4.3Hz, 3H), 3.36(dd, J=11.6, 10.0Hz, 3H), 3.43(ddd, J=13.6, 12.0, 4.4Hz, 3H), 4.00(dd, J=11.7, 4.3Hz, 1H), 4.06-4.18(m, 4H), 4.80(br, s, 1H), 7.16(d, J=7.8Hz, 1H), 7.62(d, J=7.8Hz, 1H), 7.62(d, J=7.1Hz, 1H), 8.17(d, J=7.1Hz, 1H), 8.40(br, s, 1H).
- [0271] 분말 X선 회절 $2\theta(^{\circ})$: 5.9, 8.4, 11.6, 12.7, 13.1, 15.7
- [0272] 화합물 20의 분말 X선 회절 결과를 도 4에 도시한다.
- [0273] 공정 1-2 화합물 20의 제조 방법
- [0274] 상기 공정 1-1에 있어서, 염화이소프로필마그네슘의 THF 용액(0.4eq) 대신에, 염화시클로헥실마그네슘의 THF 용액(16.2wt%, 0.4eq)을 사용하여 반응시켜, HPLC에 의해 반응액을 분석하고, 화합물 20 생성율을 측정하였다.
- [0275] 화합물 20의 HPLC 면적 백분율: 90.9%(RT=11.0min)
- [0276] 그 외에는, 상기 공정 1-1과 동일한 방법이다.
- [0277] (측정 조건)
- [0278] (1) 칼럼: X Select(등록 상표) CSH C18 (3.5 μm i.d. 4.6x100mm)(Waters)
- [0279] 유속: 1.0mL/분; UV 검출 파장: 254nm;
- [0280] 이동상: [A] 0.1% 포름산 함유 수용액, [B] 아세트오니트릴
- [0281] 5분간 15% 용매 [B]를 유지하고, 10분간 15%-60% 용매 [B]의 리니어 구배를 행하고, 2분간 60%-85% 용매 [B]의 리니어 구배를 행한 후, 3분간 85% 용매 [B]를 유지하였다.
- [0282] 공정 1-3 화합물 20의 제조 방법
- [0283] 화합물 13(4.91g, 15.0mmol)에 1-헥산올(27.5g, 270mmol)을 첨가하여 교반하고, 0℃로 온도를 조절하였다. 얻어진 슬러리액에 나트륨tert-펜톡시드의 THF 용액(1.4mol/L, 45.0mmol)을 첨가하였다. 반응액을 0℃에서 2.5시간 교반한 후, HPLC에 의해 반응액을 분석하고, 화합물 20 생성율을 측정하였다.
- [0284] 화합물 20의 HPLC 면적 백분율: 93.3%(RT=9.5min)
- [0285] (측정 조건)
- [0286] (1) 칼럼: CHIRALPAK(등록 상표) IB (5.0 μm i.d. 4.6x250mm)(DAICEL)
- [0287] 유속: 1.0mL/분; UV 검출 파장: 254nm;
- [0288] 이동상: [A] 0.1% 포름산 함유 수용액, [B] 아세트오니트릴
- [0289] 5분간 35% 용매 [B]를 유지하고, 6분간 35%-85% 용매 [B]의 리니어 구배를 행한 후, 2분간 85% 용매 [B]를

유지하였다.

[0290] 상기에 나타내는 바와 같이, 마그네슘염 또는 나트륨염을 사용하여 반응을 행하면, 양호한 수율로 반응이 진행되는 것을 알았다. 특히 염화이소프로필마그네슘을 사용한 경우에 고수율로 목적물을 얻을 수 있었다.

[0291] 공정 2 화합물 21의 메실산염의 제조 방법

[0292] 화합물 20(12.0g, 24.3mmol)에 화합물 19(8.0g, 30.3mmol), 아세트산에틸(48.7g) 및 시클로헥산(14.1g)을 첨가하여 25℃에서 교반하였다. 50(w/w)% T3P 아세트산에틸 용액(20.91g, 32.9mmol)을 첨가하고, 다음으로 메탄술폰산(3.5g, 36.4mmol)을 첨가하였다. 60℃로 승온하고, 24시간 교반하였다. 25℃로 냉각 후, THF(32.0g) 및 물(24.0g)을 첨가하였다. 24% 수산화나트륨 수용액(30.8g)을 천천히 첨가하고, 정치 후, 유기층과 수층으로 분리하였다. 유기층을 7% 식염수(60.0g)로 2회 세정하였다. 얻어진 용액에 시클로헥산(9.3g), 아세트산에틸(32.1g) 및 메탄술폰산(2.80g, 29.1mmol)의 혼합 용액을 첨가하였다. 25℃에서 2시간 교반하고, 발생한 백색 침전을 여과 취출하였다. 아세트산에틸(43.3g)로, 얻어진 고체를 세정한 후, 건조시킴으로써, 화합물 21의 메실산염(13.65g, 수율 84.6%)을 백색 결정으로서 얻었다.

[0293] $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ δ : 0.90(3H, t, J=6.0Hz), 1.29-1.36(4H, m), 1.39-1.49(2H, m), 1.67-1.79(2H, m), 2.38(3H, s), 2.94(1H, brs), 3.30(1H, td, J=11.6, 2.4Hz), 3.51(1H, t, J=10.4Hz), 3.66(1H, dd, J=11.2, 2.8Hz), 3.92-4.01(2H, m), 4.07(1H, d, J=14.3Hz), 4.20(1H, s), 4.42-4.52(1H, m), 5.43(1H, dd, J=14.4, 2.1Hz), 5.79-5.83(2H, m), 6.81(1H, td, J=7.6, 1.2Hz), 6.96(1H, dd, J=7.8, 1.0Hz), 7.09(1H, J=8.0, 1.6Hz), 7.12-7.18(1H, m), 7.32(1H, d, J=7.7Hz), 7.37-7.49(2H, m)

[0294] 분말 X선 회절 $2\theta(^{\circ})$: 7.1, 9.3, 12.6, 14.1, 17.7, 18.7, 19.2, 22.2, 25.4, 27.7, 28.5, 37.8

[0295] 화합물 21의 분말 X선 회절 결과를 도 5에 도시한다.

[0296] DSC: 온세트 216℃, 피크 219℃

[0297] 공정 3 화합물 (V)의 제조 방법

[0298] 화합물 21(15.0g, 22.6mmol)에 N-메틸피롤리돈(52.4g)을 첨가하여 교반하였다. 염화리튬(8.6g, 203.3mmol)을 첨가하여 75℃까지 승온하였다. 75℃에서 20시간 교반하고, 그 후 40℃까지 냉각시켰다. 아세토니트릴(20.0g)을 첨가하고, 추가로 물(11.6g)을 첨가하였다. 30℃까지 냉각시키고, 30분간 교반한 후, 물(142.5g)을 천천히 첨가하였다. 30℃에서 1시간 반 교반한 후, 발생한 백색 침전을 여과 취출하였다. 2-프로판올(60.1g)로 얻어진 고체를 세정한 후, 건조시킴으로써, 화합물 (V)(9.91g, 수율 90.7%)를 백색 결정으로서 얻었다.

[0299] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3.00(td, J=11.8, 3.2Hz, 1H), 3.46(td, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 3.59(t, J=10.0Hz, 1H), 3.82(dd, J=12.2, 3.0Hz, 1H), 3.96(dd, J=11.0, 3.0Hz, 1H), 4.07(d, J=13.6Hz, 1H), 4.58(dd, J=10.0, 2.8Hz, 1H), 4.67(dd, J=13.6, 2.0Hz, 1H), 5.26-5.30(m, 2H), 5.75(d, J=8.0Hz, 1H), 6.69(d, J=7.6Hz, 1H), 6.83-6.87(m, 1H), 6.99-7.04(m, 2H), 7.07-7.15(m, 3H).

[0300] 분말 X선 회절 $2\theta(^{\circ})$: 9.6, 10.9, 17.8, 21.5, 22.1, 23.5, 24.8

[0301] 화합물 (V)의 분말 X선 회절 결과를 도 6에 나타낸다.

[0302] 공정 4 화합물 (VI)의 제조 방법

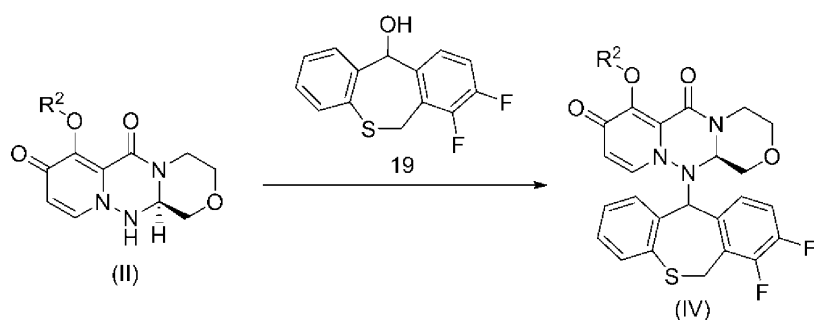
[0303] 화합물 (V)(1.00g, 2.07mmol)의 DMA(5ml)의 현탁액에, 클로로메틸메틸카르보네이트(0.483g, 3.10mmol) 및 탄산칼륨(0.572g, 4.14mmol), 요오드화칼륨(0.343g, 2.07mmol)을 첨가하고, 50℃로 승온하여 6시간 교반하였다. 추가로 반응액에, DMA(1ml)를 첨가하여 6시간 교반하였다. 반응액을 실온까지 냉각시키고, DMA(6ml)를 첨가하여 50℃에서 5분간 교반하고, 여과하였다. 얻어진 여과액에, 빙냉하에 1mol/L 염산수(10ml) 및 물(4ml)을 적하하고, 1시간 교반하였다. 석출된 고체를 여과 취출하고, 60℃에서 3시간 감압 건조를 행하여, 화합물 (VI)(1.10g, 1.93mmol, 수율 93%)을 얻었다.

[0304] $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6)$ δ : 2.91-2.98(1H, m), 3.24-3.31(1H, m), 3.44(1H, t, J=10.4Hz), 3.69(1H, dd, J=11.5, 2.8Hz), 3.73(3H, s), 4.00(1H, dd, J=10.8, 2.9Hz), 4.06(1H, d, J=14.3Hz), 4.40(1H, d, J=11.8Hz), 4.45(1H, dd, J=9.9, 2.9Hz), 5.42(1H, dd, J=14.4, 1.8Hz), 5.67(1H, d, J=6.5Hz), 5.72-5.75(3H, m), 6.83-6.87(1H, m), 7.01(1H, d, J=6.9Hz), 7.09(1H, dd, J=8.0, 1.1Hz), 7.14-7.18(1H, m), 7.23(1H, d, J=7.8Hz),

7.37-7.44(2H, m).

[0305] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.91-2.98(1H, m), 3.24-3.31(1H, m), 3.44(1H, t, $J=10.4\text{Hz}$), 3.69(1H, dd, $J=11.5$, 2.8Hz), 3.73(3H, s), 4.00(1H, dd, $J=10.8$, 2.9Hz), 4.06(1H, d, $J=14.3\text{Hz}$), 4.40(1H, d, $J=11.8\text{Hz}$), 4.45(1H, dd, $J=9.9$, 2.9Hz), 5.42(1H, dd, $J=14.4$, 1.8Hz), 5.67(1H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 5.72-5.75(3H, m), 6.83-6.87(1H, m), 7.01(1H, d, $J=6.9\text{Hz}$), 7.09(1H, dd, $J=8.0$, 1.1Hz), 7.14-7.18(1H, m), 7.23(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 7.37-7.44(2H, m).

[0306] 실시예 6 화합물 33 내지 41의 제조 방법 및 그것들의 디아스테레오머비



화합물 (II)	화합물 (IV)	R ²	수율 %	디아스테레오머비 a : b
24	33		-	3 : 1
25	34		50	6 : 1
26	35		-	3 : 1
27	36		87	3.8 : 1
20	21		89	15.5 : 1
28	37		24	2.3 : 1
29	38		-	1.9 : 1
30	39		-	3.1 : 1
31	40		63	4.9 : 1
32	41		89	6.3 : 1

[0307]

[0308] 공정 1 화합물 24 내지 32의 제조 방법

[0309] 상기 실시예 5의 공정 1-1, 1-2, 1-3 및 통상의 방법에 따라서, 화합물 24 내지 32를 합성하였다.

[0310] 공정 2 화합물 33 내지 41의 제조 방법

[0311] 상기 실시예 5의 공정 2에 따라서, 화합물 24 내지 32와 화합물 19를 반응시키고, HPLC에 의해 반응액을 분석하여, 화합물 33 내지 41의 디아스테레오머비를 측정하였다.

[0312] 화합물 33a: 유지 시간 6.4min/화합물 33b: 유지 시간 6.7min

[0313] 화합물 34a: 유지 시간 8.9min/화합물 34b: 유지 시간 9.3min

[0314] 화합물 35a: 유지 시간 9.8min/화합물 35b: 유지 시간 10.1min

- [0315] 화합물 36a: 유지 시간 10.7min/화합물 36b: 유지 시간 11.1min
- [0316] 화합물 37a: 유지 시간 12.5min/화합물 37b: 유지 시간 12.8min
- [0317] 화합물 38a: 유지 시간 13.4min/화합물 38b: 유지 시간 13.8min
- [0318] 화합물 39a: 유지 시간 8.7min/화합물 39b: 유지 시간 9.0min
- [0319] 화합물 40a: 유지 시간 9.9min/화합물 40b: 유지 시간 10.2min
- [0320] 화합물 41a: 유지 시간 10.6min/화합물 41b: 유지 시간 11.0min
- [0321] (측정 조건)
- [0322] 칼럼: KINETEX(등록 상표)(2.6 μ m C18 i.d. 4.6x100mm)(Shimadzu)
- [0323] 유속: 1.0mL/분; UV 검출 파장: 254nm;
- [0324] 이동상: [A] 0.1% 포름산 함유 수용액, [B] 0.1% 포름산 함유 아세토니트릴
- [0325] 25% 용매 [B]로부터 개시하고, 10분간 25%-70% 용매 [B]의 리니어 구배를 행한 후, 8분간 70% 용매 [B]를 유지하였다.
- [0326] 시험예 1: 캡 의존적 엔도뉴클레아제(CEN) 저해 활성의 측정
- [0327] 1) 기질의 제조
- [0328] 5' 말단의 G를 2인산화 수식, 또한 2' 위치의 수산기를 메톡실화 수식하고, 5' 말단에서 6번째의 U를 Cy3 표지, 3' 말단을 BHQ2 표지한 30merRNA(5'-pp-[m2'-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA-BHQ2-3': 닛 본 바이오 서비스사제)를 구입하고, EPICENTRE사제의 스크립트캡(ScriptCap) 시스템을 사용하여 cap 구조를 부가하였다(산물은 m7G[5']-ppp-[5']-[m2'-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA(-BHQ2)-3'). 이것을 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법으로 분리·정제하고, 기질로서 사용하였다.
- [0329] 2) 효소의 제조
- [0330] RNP는 통상적인 방법을 따라서 바이러스 입자로부터 제조하였다(참고 문헌: VIROLOGY(1976) 73, p327-338 OLGA M. ROCHOVANSKY). 구체적으로는 A/WSN/33 바이러스 1x10³ PFU/mL, 200 μ L를 10일령 발육 계란에 접종하고, 37℃에서 2일간 배양 후, 계란의 장노액을 회수하였다. 20% 수크로오스를 사용한 초원심 분리에 의해 바이러스 입자를 정제하고, TritonX-100과 리솔레시틴을 사용하여 바이러스 입자를 가용화 후, 30-70% 글리세롤 밀도 구배를 사용한 초원심 분리에 의해 RNP 분획(50 내지 70% 글리세롤 분획)을 채취하고, 효소액(약 1nM의 PB1·PB2·PA 복합체를 포함함)으로서 사용하였다.
- [0331] 3) 효소 반응
- [0332] 폴리프로필렌제의 384웰 플레이트에 효소 반응액(조성: 53mM Tris-염산염(pH 7.8), 1mM MgCl₂, 1.25mM 디티오프레이트, 80mM NaCl, 12.5% 글리세롤, 효소액 0.15 μ L)을 2.5 μ L 분주하였다. 다음으로 디메틸설폭시드(DMSO)로 단계적으로 희석한 피검 화합물 용액 0.5 μ L, 포지티브 컨트롤(PC) 및 네거티브 컨트롤(NC)에는, DMSO 0.5 μ L를 첨가하여 잘 혼합하였다. 다음으로 기질 용액(1.4nM 기질 RNA, 0.05% Tween20) 2 μ L를 첨가하여 반응을 개시하고, 실온에서 60분간 인큐베이트한 후, 반응액 1 μ L를 10 μ L의 Hi-Di 포름아미드(Formamide) 용액(사이징 마커로서 GeneScan 120 Liz Size Standard를 포함함: 어플라이드 바이오시스템(ABI)사제.)에 첨가하고, 반응을 정지하였다. NC는 반응 개시 전에 EDTA(4.5mM)를 가함으로써 미리 반응을 정지시켰다(표기 농도는 모두 최종 농도임).
- [0333] 4) 저해율(IC₅₀ 값)의 측정
- [0334] 반응 정지시킨 용액을 85℃에서 5분간 가열하고, 빙상에서 2분간 급랭 후, ABI PRIZM 3730 제네틱 애널라이저로 분석하였다. 해석 소프트웨어 ABI Genemapper에 의해 캡 의존적 엔도뉴클레아제 산물의 피크를 정량하고, PC, NC의 형광 강도를 각각 0% 저해, 100% 저해로 하여 피검 화합물의 CEN 반응 저해율(%)을 구한 후, 커브 피팅 소프트웨어(XLfit2.0: Model 205(IDBS사제) 등)를 사용하여 IC₅₀ 값을 구하였다.
- [0335] 시험예 2: CPE 억제 효과 확인 시험

- [0336] <재료>
- [0337] · 2% FCS E-MEM(MEM(최소 필수 배지(Minimum Essential Medium))(Invitrogen)에 카나마이신 및 FCS를 첨가하여 조정)
- [0338] · 0.5% BSA E-MEM(MEM(최소 필수 배지)(Invitrogen)에 카나마이신 및 BSA를 첨가하여 조정)
- [0339] · HBSS(헝크 평형 염 용액(hanks' Balanced Salt Solution))
- [0340] · MDBK 세포
- [0341] 2% FCS E-MEM으로 적당 세포수(3×10^5 /mL)로 조정하였다.
- [0342] · MDCK 세포
- [0343] HBSS로 2회 씻은 후, 0.5% BSA E-MEM으로 적당 세포수(5×10^5 /mL)로 조정하였다.
- [0344] · 트립신 용액
- [0345] 돼지 췌장으로부터의 트립신(Trypsin from porcine pancreas)(SIGMA)을 PBS(-)로 용해시키고, 0.45um의 필터로 여과하였다.
- [0346] · EnVision(PerkinElmer)
- [0347] · WST-8 키트(기시다 가가꾸)
- [0348] · 10% SDS 용액
- [0349] <조작 수순>
- [0350] · 피검 시료의 희석, 분주
- [0351] 배양액으로서, MDBK 세포 사용 시에는 2% FCS E-MEM을 사용하고, MDCK 세포 사용 시에는 0.5% BSA E-MEM을 사용하였다. 이하, 바이러스 · 세포 · 피검 시료의 희석에 대하여 동일한 배양액을 사용하였다.
- [0352] 미리 피검 시료를 배양액으로 적당한 농도로 희석하고, 96웰 플레이트에 2 내지 5배 단계 희석계열을 제작하였다($50 \mu\text{L}/\text{well}$). 항Flu 활성 측정용, 세포 독성 측정용 2매를 제작하였다. 각 약제에 대하여 3중 측정을 실시하였다.
- [0353] MDCK 세포 사용 시에는, 항Flu 활성 측정용에만, 세포에 트립신을 최종 농도 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되게 첨가하였다.
- [0354] · 인플루엔자 바이러스의 희석, 분주
- [0355] 미리, 인플루엔자 바이러스를 배양액으로 적당한 농도로 희석하고, 피검 시료가 들어간 96웰 플레이트에 $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 분주하였다. 세포 독성 측정용 플레이트에는, 배양액을 $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 분주하였다.
- [0356] · 세포의 희석, 분주
- [0357] 적당한 세포수로 조정한 세포를, 피검 시료가 들어간 96웰 플레이트에 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 분주하였다.
- [0358] 플레이트 믹서로 혼화하고, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 항Flu 활성 측정용, 세포 독성 측정용 모두, 3일간 배양하였다.
- [0359] · WST-8의 분주
- [0360] 3일간 배양한 96웰 플레이트를 눈으로 현미경 하에서 관찰하고, 세포의 형태 · 결정의 유무 등을 확인하였다. 플레이트로부터 세포를 빨아들이지 않도록 상청을 제거하였다.
- [0361] WST-8 Kit를 배양액으로 10배 희석하고, 이 WST-8 용액을 각 웰에 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하였다. 플레이트 믹서로 혼화 후, CO_2 인큐베이터에서 1 내지 3시간 배양하였다.
- [0362] 항Flu 활성 측정용 플레이트에 대해서는, 배양 후, 각 웰에 10% SDS 용액을 $10\mu\text{L}$ 씩 분주하고, 바이러스를 불활성화하였다.
- [0363] · 흡광도의 측정

- [0364] 혼화한 96웰 플레이트를, EnVision에서 450nm/620nm의 2 파장으로 흡광도를 측정하였다.
- [0365] <각 측정 항목값의 산출>
- [0366] 다음과 같은 계산식에 기초하여 Microsoft Excel 또는 동등한 계산 처리 능력을 갖는 프로그램을 사용하여 산출하였다.
- [0367] · 50% 인플루엔자 감염 세포사 저해 농도(EC₅₀) 산출
- [0368] $EC_{50}=10^Z$
- [0369] $Z=(50\% - \text{High}\%)/(\text{High}\% - \text{Low}\%) \times \{\log(\text{High conc.}) - \log(\text{Low conc.})\} + \log(\text{High conc.})$
- [0370] 화합물 (V)에 대하여, 시험예 1 및 시험예 2의 측정 결과를 이하에 나타낸다.
- [0371] 시험예 1(CEN IC₅₀): 1.93nM,
- [0372] 시험예 2(CPE EC₅₀): 1.13nM
- [0373] 이상의 결과로부터, 식 (V)로 나타내는 화합물은 높은 캡 의존적 엔도뉴클레아제(CEN) 저해 활성 및/또는 높은 CPE 억제 효과를 나타내기 때문에, 인플루엔자 바이러스에 감염됨으로써 유발되는 증상 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방제로서 유용한 의약이 될 수 있다.
- [0374] 이하에, 화합물 (V) 및 화합물 (VI)의 생물 시험예를 기재한다.
- [0375] 시험예 3: CYP 저해 시험
- [0376] 시판되고 있는 풀드(pooled) 인간 간 마이크로솜을 사용하여, 인간 주요 CYP5 분자종(CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4)의 전형적 기질 대사 반응으로서 7-에톡시레스루핀의 O-탈메틸화(CYP1A2), 톨부타미드의 메틸-수산화(CYP2C9), 메페니토인의 4'-수산화(CYP2C19), 텍스트로메토르판의 O-탈메틸화(CYP2D6), 테르페나딘의 수산화(CYP3A4)를 지표로 하여, 각각의 대사물 생성량이 화합물 (V)에 의해 저해되는 정도를 평가하였다.
- [0377] 반응 조건은 이하와 같음: 기질 0.5 μ mol/L 에톡시레스루핀(CYP1A2), 100 μ mol/L 톨부타미드(CYP2C9), 50 μ mol/L S-메페니토인(CYP2C19), 5 μ mol/L 텍스트로메토르판(CYP2D6), 1 μ mol/L 테르페나딘(CYP3A4); 반응 시간 15분; 반응 온도 37℃; 효소 풀드 인간 간 마이크로솜 0.2mg단백질/mL; 화합물 (V)의 화합물 농도 1, 5, 10, 20 μ mol/L(4점).
- [0378] 96웰 플레이트에 반응 용액으로서, 50mmol/L HEPES 완충액 중에 각 5종의 기질, 인간 간 마이크로솜, 화합물 (V)를 상기 조성으로 첨가하고, 조효소인 NADPH를 첨가하여, 지표로 하는 대사 반응을 개시하였다. 37℃, 15분간 반응한 후, 메탄올/아세트니트릴=1/1(V/V) 용액을 첨가함으로써 반응을 정지하였다. 3000rpm, 15분간의 원심 후, 원심 상청 중의 레소루핀(CYP1A2 대사물)을 형광 멀티 라벨 카운터로 정량하고, 톨부타미드 수산화체(CYP2C9 대사물), 메페니토인 4'수산화체(CYP2C19 대사물), 텍스트로르판(CYP2D6 대사물), 테르페나딘알코올체(CYP3A4 대사물)를 LC/MS/MS로 정량하였다.
- [0379] 화합물 (V)를 용해시킨 용매인 DMSO만을 반응계에 첨가한 것을 컨트롤(100%)로 하고, 용매에 첨가한 화합물 (V)의 각 농도에 있어서의 잔존 활성(%)을 산출하고, 농도와 억제율을 사용하여, 로지스틱 모델에 의한 역 추정에 의해 IC₅₀을 산출하였다.
- [0380] (결과)
- [0381] 화합물 (V): 5종>20 μ mol/L
- [0382] 시험예 4: BA 시험
- [0383] 경구 흡수성의 검토 실험 재료와 방법
- [0384] (1) 사용 동물: 마우스 또는 SD 래트를 사용하였다.
- [0385] (2) 사육 조건: 마우스 또는 SD 래트는 고형 사료 및 멸균 수돗물을 자유 섭취시켰다.
- [0386] (3) 투여량, 군 분류의 설정: 경구 투여, 정맥 내 투여를 소정의 투여량에 의해 투여하였다. 이하와 같이 군을 설정하였다. (화합물마다 투여량은 변경 있음)

- [0387] 경구 투여 1 내지 30mg/kg(n=2 내지 3)
- [0388] 정맥 내 투여 0.5 내지 10mg/kg(n=2 내지 3)
- [0389] (4) 투여액의 제조: 경구 투여는 용액 또는 현탁액으로서 투여하였다. 정맥 내 투여는 가용화하여 투여하였다.
- [0390] (5) 투여 방법: 경구 투여는, 경구 존데에 의해 강제적으로 위 내에 투여하였다. 정맥 내 투여는, 주사 바늘을 구비한 시린지에 의해 꼬리 정맥으로부터 투여하였다.
- [0391] (6) 평가 항목: 경시적으로 채혈하고, 혈장 중 식 (V) 및 (VI)으로 나타내는 화합물의 화합물 농도를 LC/MS/MS를 사용하여 측정하였다.
- [0392] (7) 통계 해석: 혈장 중 식 (V) 및 (VI)으로 나타내는 화합물의 화합물 농도 추이에 대하여, 비선형 최소 제곱법 프로그램 WinNonlin(등록 상표)을 사용하여 혈장 중 농도-시간 곡선하 면적(AUC)을 산출하고, 경구 투여군과 정맥 내 투여군의 AUC로부터 식 (V) 및 (VI)으로 나타내는 화합물의 생체이용률(BA)을 산출하였다.
- [0393] (결과)
- [0394] 화합물 (V): 4.2%
- [0395] 화합물 (VI): 14.9%
- [0396] 이상의 결과로부터, 프로드러그는 친화합물보다 생체이용률이 향상되었다.
- [0397] 따라서, 식 (VI)으로 나타내는 화합물은, 경구 흡수성이 우수하고, 인플루엔자 바이러스에 감염됨으로써 유발되는 증상 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방제로서 유용한 의약이 될 수 있다.
- [0398] 시험예 5: 대사 안정성 시험
- [0399] 시판되고 있는 폴드 인간 간 마이크로솜과 화합물 (V)를 일정 시간 반응시켜, 반응 샘플과 미반응 샘플의 비교에 의해 잔존율을 산출하고, 화합물 (V)가 간에서 대사되는 정도를 평가하였다.
- [0400] 인간 간 마이크로솜 0.5mg단백질/mL를 포함하는 0.2mL의 완충액(50mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150mmol/L 염화칼륨, 10mmol/L 염화마그네슘) 중에서, 1mmol/L NADPH 존재 하에서 37°C, 0분 또는 30분간 반응시켰다(산화적 반응). 반응 후, 메탄올/아세트니트릴=1/1(v/v) 용액의 100 μ L에 반응액 50 μ L를 첨가, 혼합하고, 3000rpm으로 15분간 원심하였다. 그 원심 상청 중의 화합물 (V)를 LC/MS/MS로 정량하고, 반응 후의 화합물 (V)의 잔존량을 0분 반응 시의 화합물량을 100%로 하여 계산하였다. 또한, 가수 분해 반응은 NADPH 비존재 하에서, 글루쿠론산 포함 반응은 NADPH 대신에 5mmol/L UDP-글루쿠론산의 존재 하에서 반응을 행하고, 이후 동일한 조작을 실시하였다.
- [0401] (결과) 화합물 농도 2 μ mol/L에서의 산화적 대사에 있어서의 잔존율을 나타낸다.
- [0402] 화합물 (V): 90.1%
- [0403] 시험예 6: CYP3A4 형광 MBI 시험
- [0404] CYP3A4 형광 MBI 시험은, 대사 반응에 의한 화합물 (V)의 CYP3A4 저해의 증강을 조사하는 시험이다. CYP3A4 효소(대장균 발현 효소)에 의해 7-벤질옥시트리플루오로메틸쿠마린(7-BFC)이 탈벤질화되어, 형광을 발하는 대사물 7-히드록시트리플루오로메틸쿠마린(7-HFC)이 발생한다. 7-HFC 생성 반응을 지표로 하여 CYP3A4 저해를 평가하였다.
- [0405] 반응 조건은 이하와 같음: 기질 5.6 μ mol/L 7-BFC; 예비 반응 시간 0 또는 30분; 반응 시간 15분; 반응 온도 25°C(실온); CYP3A4 함량(대장균 발현 효소) 예비 반응 시 62.5pmol/mL, 반응 시 6.25pmol/mL(10배 희석 시); 화합물 (V)의 화합물 농도 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ mol/L(6점).
- [0406] 96웰 플레이트에 예비 반응액으로서 K-Pi 완충액(pH 7.4) 중에 효소, 화합물 (V)의 용액을 상기 예비 반응의 조성으로 첨가하고, 별도의 96웰 플레이트에 기질과 K-Pi 완충액으로 1/10 희석되게 그의 일부를 이행하고, 조효소인 NADPH를 첨가하여 지표로 하는 반응을 개시하고(예비 반응 없음), 소정의 시간 반응 후, 아세트니트릴/0.5mol/L Tris(트리스히드록시아미노메탄)=4/1(V/V)을 첨가함으로써 반응을 정지하였다. 또한 나머지의 예비 반응액에도 NADPH를 첨가하여 예비 반응을 개시하고(예비 반응 있음), 소정 시간 예비 반응 후, 별도의 플레이트에 기질과 K-Pi 완충액으로 1/10 희석되도록 일부를 이행하여 지표로 하는 반응을 개시하였다. 소정의 시간 반응 후, 아세트니트릴/0.5mol/L Tris(트리스히드록시아미노메탄)=4/1(V/V)을 첨가함으로써 반응을 정지하였다.

각각의 지표 반응을 행한 플레이트를 형광 플레이트 리더로 대사물인 7-HFC의 형광값을 측정하였다. (Ex=420nm, Em=535nm)

- [0407] 화합물 (V)를 용해시킨 용매인 DMSO만을 반응계에 첨가한 것을 컨트롤(100%)로 하고, 화합물 (V)를 각각의 농도 첨가했을 때의 잔존 활성(%)을 산출하고, 농도와 억제율을 사용하여, 로지스틱 모델에 의한 역 추정에 의해 IC₅₀을 산출하였다. IC₅₀값의 차가 5 μ mol/L 이상인 경우를 (+)라 하고, 3 μ mol/L 이하인 경우를 (-)라 하였다.
- [0408] (결과)
- [0409] 화합물 (V): (-)
- [0410] 시험예 7: 변동 에임스 시험(Fluctuation Ames Test)
- [0411] 화합물 (V)의 변이원성을 평가하였다.
- [0412] 동결 보존하고 있는 쥐티푸스균(살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium) TA98주, TA100주) 20 μ L를 10mL 액체 영양 배지(2.5% 옥소이드 영양 브로스(Oxoid nutrient broth) No.2)에 접종하여 37°C에서 10시간, 진탕 배양하였다. TA98주는 9mL의 균액을 원심(2000 \times g, 10분간)하여 배양액을 제거하였다. 9mL의 MicroF 완충액(K₂HPO₄: 3.5g/L, KH₂PO₄: 1g/L, (NH₄)₂SO₄: 1g/L, 시트르산삼나트륨 2수화물: 0.25g/L, MgSO₄·7H₂O: 0.1g/L)에 균을 현탁시키고, 110mL의 익스포저(Exposure) 배지(비오틴: 8 μ g/mL, 히스티딘: 0.2 μ g/mL, 글루코오스: 8mg/mL를 포함하는 MicroF 완충액)에 첨가하였다. TA100주는 3.16mL 균액에 대하여 익스포저 배지 120mL에 첨가하여 시험 균액을 제조하였다. 화합물 (V)의 DMSO 용액(최고 용량 50mg/mL로부터 2 내지 3배 공비로 수단계 희석), 음성 대조로서 DMSO, 양성 대조로서 비대사 활성화 조건에서는 TA98주에 대해서는 50 μ g/mL의 4-니트로퀴놀린-1-옥시드 DMSO 용액, TA100주에 대해서는 0.25 μ g/mL의 2-(2-푸틸)-3-(5-니트로-2-푸틸)아크릴아미드 DMSO 용액, 대사 활성화 조건에서는 TA98주에 대하여 40 μ g/mL의 2-아미노안트라센 DMSO 용액, TA100주에 대해서는 20 μ g/mL의 2-아미노안트라센 DMSO 용액 각각 12 μ L와 시험 균액 588 μ L(대사 활성화 조건에서는 시험 균액 498 μ L와 S9 mix 90 μ L의 혼합액)를 혼합하고, 37°C에서 90분간 진탕 배양하였다. 화합물 (V)에 폭로된 균액 460 μ L를, 인디케이터(Indicator) 배지(비오틴: 8 μ g/mL, 히스티딘: 0.2 μ g/mL, 글루코오스: 8mg/mL, 브로모크레졸 퍼플: 37.5 μ g/mL를 포함하는 MicroF 완충액) 2300 μ L에 혼합하여 50 μ L씩 마이크로플레이트에 분주하고(48웰/용량), 37°C에서 3일간 정치 배양하였다. 아미노산(히스티딘) 합성 효소 유전자의 돌연변이에 의해 증식능을 획득한 균을 포함하는 웰은, pH 변화에 따라서 자색에서 황색으로 변색되기 때문에, 1용량당 48웰 중의 황색으로 변색한 균 증식 웰을 계수하고, 음성 대조군과 비교하여 평가하였다. 변이원성이 음성인 것을 (-), 양성인 것을 (+)로서 나타낸다.
- [0413] (결과)
- [0414] 화합물 (V): (-)
- [0415] 시험예 8: hERG 시험
- [0416] 화합물 (V)의 심전도 QT 간격 연장 리스크 평가를 목적으로 하여, 인간 에테르-아-고-고 관련 유전자(human ether-a-go-go related gene)(hERG) 채널을 발현시킨 HEK293 세포를 사용하여, 심실 재분극 과정에 중요한 역할을 하는 지연 정류 K⁺ 전류(I_{Kr})에 대한 화합물 (V)의 작용을 검토하였다.
- [0417] 전자동 패치 클램프 시스템(PatchXpress 7000A, Axon Instruments Inc.)을 사용하여, 호울 셀 패치 클램프법에 의해, 세포를 -80mV의 막 전위로 유지한 후, +40mV의 탈분극 자극을 2초간, 추가로 -50mV의 재분극 자극을 2초간 부여했을 때에 유발되는 I_{Kr}을 기록하였다. 발생하는 전류가 안정된 후, 화합물 (V)를 목적으로 하는 농도로 용해시킨 세포외액(NaCl: 135mmol/L, KCl: 5.4mmol/L, NaH₂PO₄: 0.3mmol/L, CaCl₂·2H₂O: 1.8mmol/L, MgCl₂·6H₂O: 1mmol/L, 글루코오스: 10mmol/L, HEPES(4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산): 10mmol/L, pH=7.4)을 실온에서, 10분간 세포에 적용시켰다. 얻어진 I_{Kr}로부터, 해석 소프트웨어(Data Xpress ver.1, Molecular Devices Corporation)를 사용하여, 유지 막 전위에 있어서의 전류값을 기준으로 최대 테일 전류의 절댓값을 측정하였다. 또한, 화합물 (V) 적용 전의 최대 테일 전류에 대한 저해율을 산출하고, 매체 적용군(0.1% 디메틸 술폭시드 용액)과 비교하여, 화합물 (V)의 I_{Kr}에 대한 영향을 평가하였다.
- [0418] (결과) 화합물 농도 0.3 내지 10 μ mol/L에서의 저해율을 나타낸다.

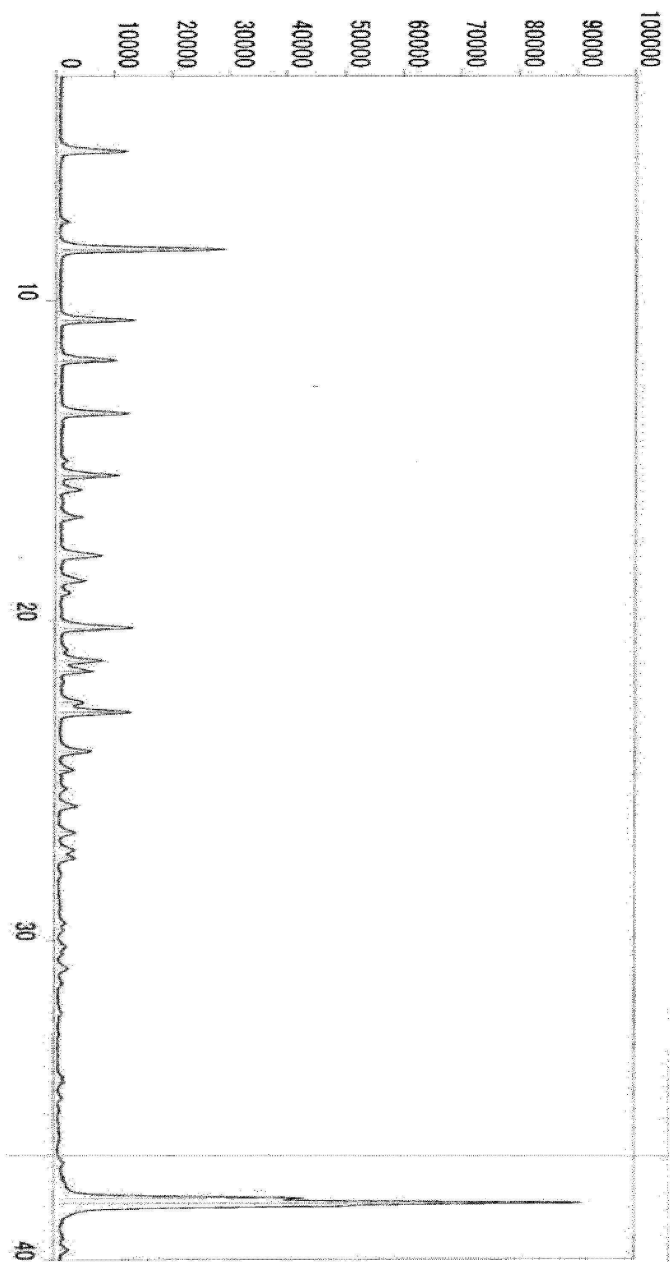
- [0419] 화합물 (V): 7.9%
- [0420] 시험예 9: 용해성 시험
- [0421] 화합물 (V)의 용해도는 1% DMSO 첨가 조건 하에서 결정하였다. DMSO로 10mmol/L 화합물 용액을 제조하고, 화합물 (V)의 용액 2 μ L를 각각 JP-1액(염화나트륨 2.0g, 염산 7.0mL에 물을 첨가하여 1000mL로 함), JP-2액(인산이수소칼륨 3.40g 및 무수 인산수소이나트륨 3.55g을 물에 녹여 1000mL로 한 것의 1용량에 물 1용량을 첨가함) 198 μ L에 첨가하였다. 실온에서 1시간 진탕시킨 후, 혼합액을 여과하였다. 각 여과액을 메탄올/물=1/1(V/V)로 10배 희석하고, 절대 검량선법에 의해 LC/MS를 사용하여 여과액 중 농도를 측정하였다.
- [0422] (결과)
- [0423] 화합물 (V): 42.2 μ mol/L
- [0424] 시험예 10: 분말 용해도 시험
- [0425] 적당한 용기에 화합물 (V)를 적량 넣고, 각 용기에 JP-1액(염화나트륨 2.0g, 염산 7.0mL에 물을 첨가하여 1000mL로 함), JP-2액(pH 6.8의 인산염 완충액 500mL에 물 500mL를 첨가함), 20mmol/L 타우로콜산나트륨(TCA)/JP-2액(TCA 1.08g에 JP-2액을 첨가하여 100mL로 함)을 200 μ L씩 첨가하였다. 시험액 첨가 후에 전체량 용해시킨 경우에는, 적절히 화합물 (V)를 추가하였다. 밀폐하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 진탕 후에 여과하고, 각 여과액 100 μ L에 메탄올 100 μ L를 첨가하여 2배 희석을 행하였다. 희석 배율은 필요에 따라서 변경하였다. 기포 및 석출물이 없는 것을 확인하고, 밀폐하여 진탕하였다. 절대 검량선법에 의해 HPLC를 사용하여 화합물 (V)를 정량하였다.
- [0426] (결과)
- [0427] 화합물 (V): JP-1액 7.1 μ g/mL, JP-2액 4.4 μ g/mL, 20mmol/L TCA/JP-2액 16.1 μ g/mL
- [0428] 시험예 11 에임스 시험
- [0429] 살모넬라균(살모넬라 티피무리움) TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 대장균(*Escherichia coli*) WP2uvrA를 시험균주로서 사용하여, 프리인큐베이션법에 의한 비대사 활성화 조건 하 및 대사 활성화 조건 하에서 에임스 시험을 실시하고, 화합물 (V)에 관한 화합물의 유전자 돌연 변이 유발성의 유무를 조사하였다.
- [0430] (결과)
- [0431] 화합물 (V): (-)
- [0432] 시험예 12 광 용혈 시험
- [0433] 화합물 (V)를 목적으로 하는 농도로 용해시키고, 마이크로플레이트 상에 있어서, 양 탈섬유혈로부터 제조한 0.1 내지 0.0008% 농도의 적혈구 부유액(2.5v/v%)과 혼합하고, 자외선 형광 램프(GL20SE 램프, 산요 텐키 및 FL20S-BLB 램프, 파나소닉)를 사용하여 UVA 및 UVB 영역에서의 광 조사(10J/cm², 290 내지 400nm)를 행하였다. 광 조사 종료 후의 혼합액을 채취하고, 원심을 행하였다. 원심 후의 상청을 채취하여 마이크로플레이트로 옮긴 후, 상청의 흡광도(540 또는 630nm)를 측정, 흡광도를 기초로 한 판정을 행하였다. 540 및 630nm에서의 흡광도는, 각각 생체막 손상(광 용혈율%) 및 지질막 과산화(메트헤모그로빈 산생)의 지표로 하였다. 광 용혈율이 10% 미만이고, 630nm에서의 흡광도의 변화량이 0.05 미만인 경우를 (-)라 하고, 광 용혈율이 10% 이상이며, 630nm에서의 흡광도의 변화량이 0.05 이상인 경우를 (+)라 하였다.
- [0434] (결과)
- [0435] 화합물 (V): (-)
- [0436] 도 7 및 8은, 화합물 (V)를 프로드러그화한 화합물 (VI)에 대하여, 비절식 하에서 래트에 경구 투여한 후의, 화합물 (V) 및 화합물 (VI)의 혈장 중 농도 추이를 측정한 결과를 나타내고 있다.
- [0437] 또한, 화합물 (VI)은 전체 혈장 샘플 중의 농도는 정량 하한 이하였기 때문에, 화합물 (V)의 프로드러그인 화합물 (VI)은, 투여 후 생체 내에서 빠르게 화합물 (V)로 변화되고 있음을 알 수 있다(도 8 참조).
- [0438] 이들 시험 결과로부터, 프로드러그화된 화합물은 경구 투여 후에 체 내에 흡수되어, 혈 중에서 빠르게 친화합물로 변환되는 것이 판명되었다. 따라서, 식 (V) 또는 (VI)으로 나타내는 화합물은, 인플루엔자 바이러스에 감염

됨으로써 유발되는 증상 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방제로서 유용한 의약이 될 수 있다.

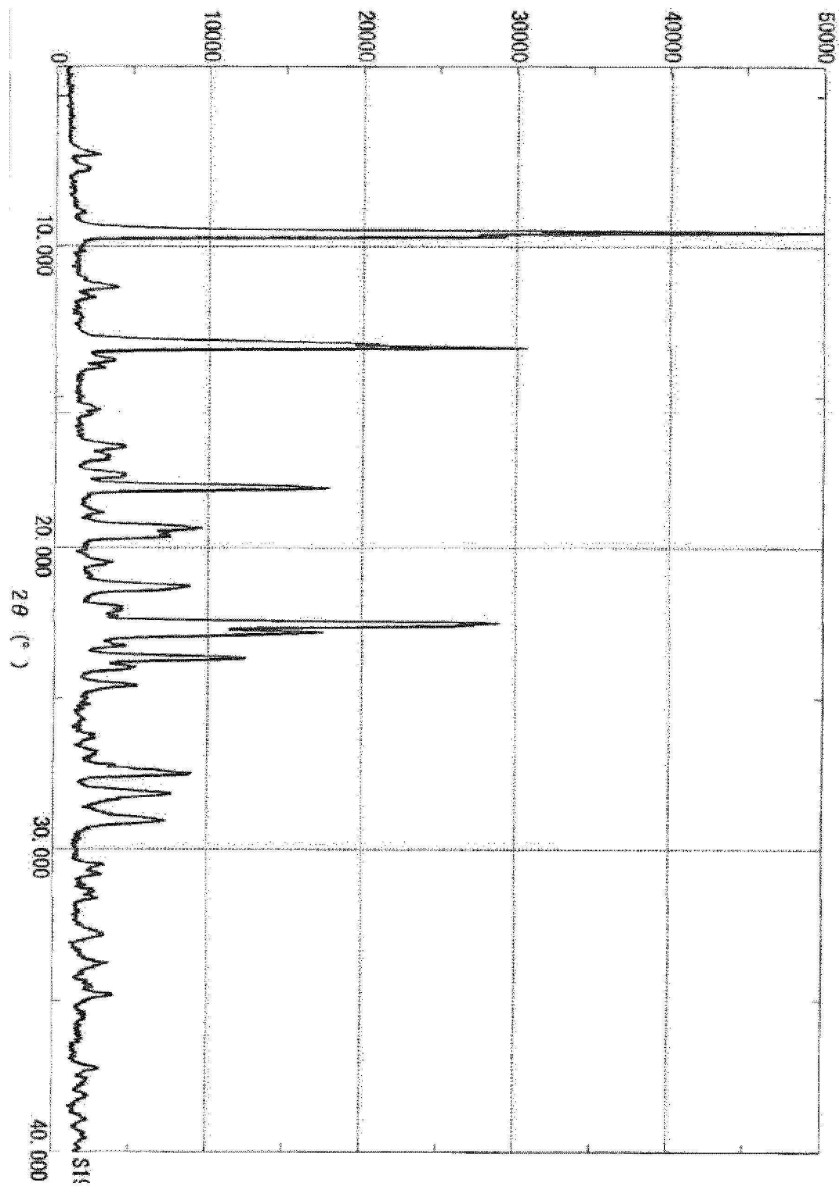
- [0439] 시험예 13 정맥 내 투여 시험
- [0440] 정맥 내 투여 시험의 검토 실험 재료와 방법
- [0441] (1) 사용 동물: SD 래트를 사용하였다.
- [0442] (2) 사육 조건: SD 래트는 고형 사료 및 멸균 수돗물을 자유 섭취시켰다.
- [0443] (3) 투여량, 군 분류의 설정: 소정의 투여량에 의해 정맥 내에 투여하였다. 이하와 같이 군을 설정하였다. (화합물마다 투여량은 변경 있음)
- [0444] 정맥 내 투여 0.5 내지 1mg/kg(n=2 내지 3)
- [0445] (4) 투여액의 제조: 정맥 내 투여는 가용화하여 투여하였다.
- [0446] (5) 투여 방법: 정맥 내 투여는, 주사 바늘을 구비한 시린지에 의해 꼬리 정맥으로부터 투여하였다.
- [0447] (6) 평가 항목: 경시적으로 채혈하고, 혈장 중 화합물 (V)의 화합물 농도를 LC/MS/MS를 사용하여 측정하였다.
- [0448] (7) 통계 해석: 혈장 중 화합물 (V)의 화합물 농도 추이에 대하여, 비선형 최소 제곱법 프로그램 WinNonlin(등록 상표)을 사용하여 전신 클리어런스(CL_{tot}) 및 소실 반감기(t_{1/2}, z)를 산출하였다.
- [0449] (결과)
- [0450] 화합물 (V):
- [0451] CL_{tot}: 16.4mL/min/kg
- [0452] t_{1/2}, z: 3.4시간
- [0453] 이상의 결과로부터, 식 (V)로 나타내는 화합물은 전신 클리어런스가 낮으며, 반감기가 긴 화합물인 것이 판명되었다.
- [0454] 따라서, 식 (V)로 나타내는 화합물은 지속성이 우수하고, 인플루엔자 바이러스에 감염됨으로써 유발되는 증상 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방제로서 유용한 의약이 될 수 있다.
- [0455] 본 발명에 따른 화합물 및 제조 방법은, 인플루엔자 바이러스에 감염됨으로써 유발되는 증상 및/또는 질환의 치료 및/또는 예방제로서 유용한 화합물을 제조하기 위한 중간체로서 유용하다. 본 발명 방법에 의해, 효율적으로 식 (V)로 나타내는 화합물 및 (VI)으로 나타내는 화합물을 제조할 수 있다.

도면

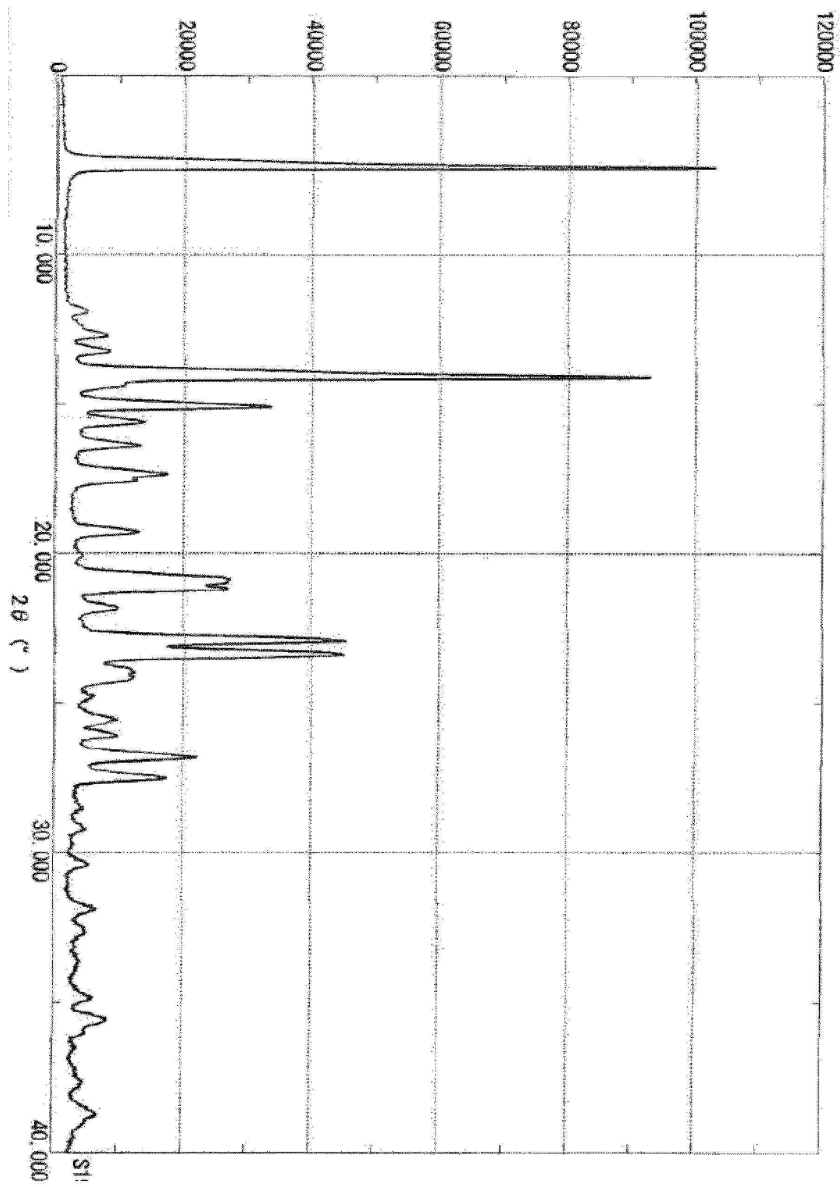
도면1



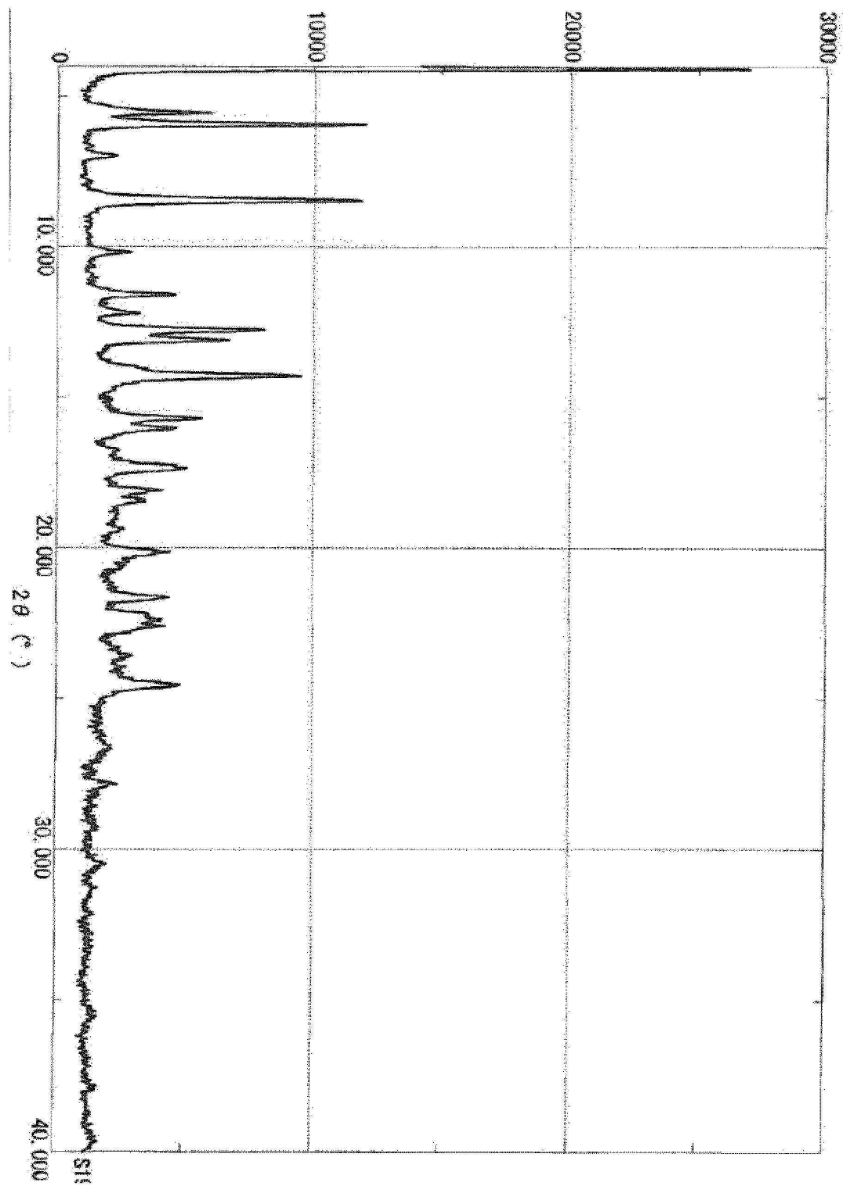
도면2



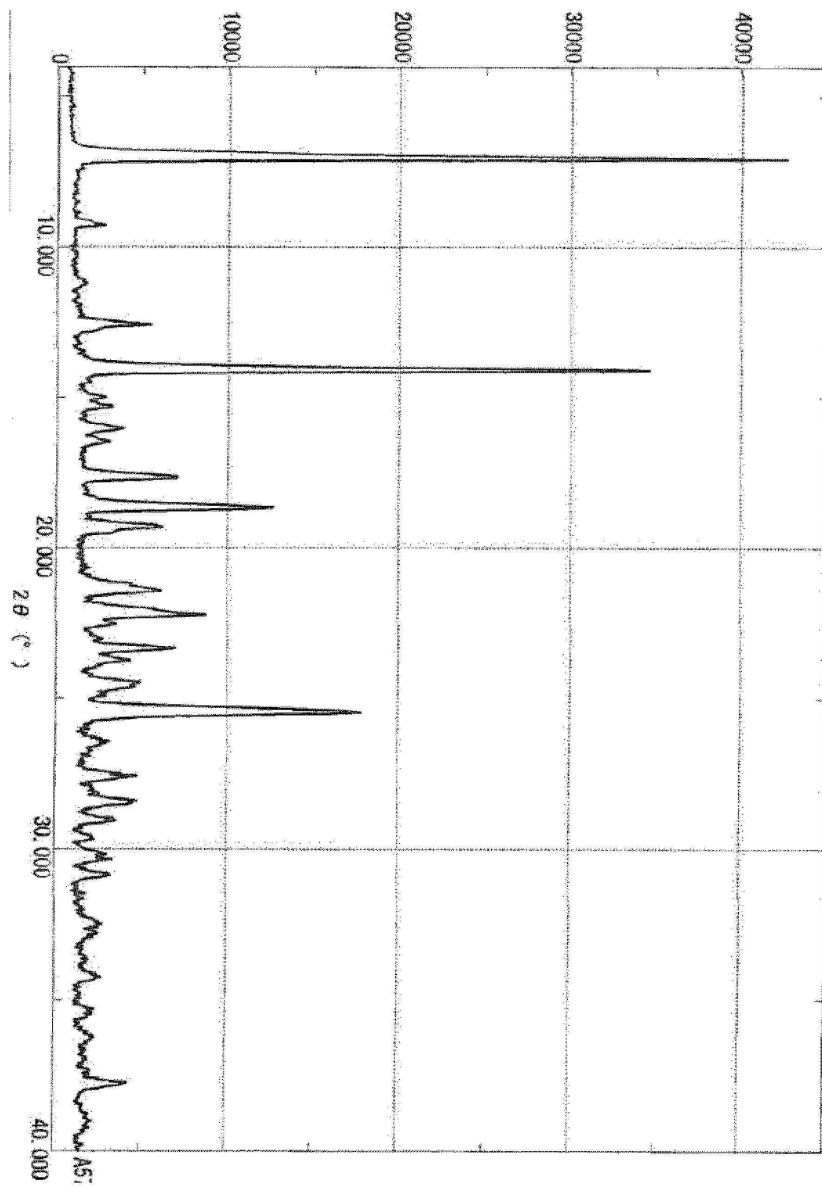
도면3



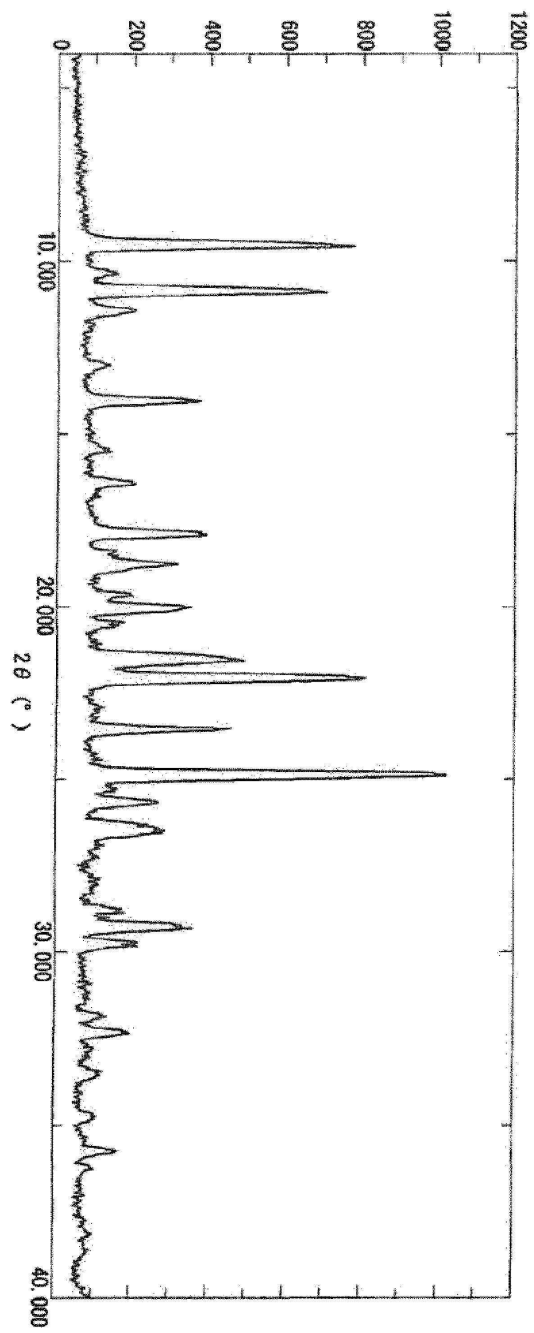
도면4



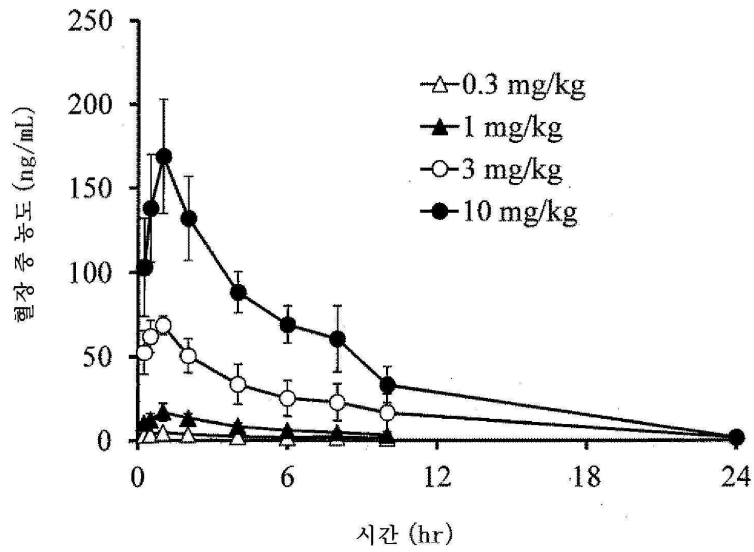
도면5



도면6



도면7



도면8

시간 (hr)	혈장 중 농도 (ng/mL)			
	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
0.25	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
4	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
10	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ :정량 하한 미만 (< 0.500 ng/mL)