



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0026632
(43) 공개일자 2023년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 487/18 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/504 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 487/18 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0108442

(22) 출원일자 2021년08월18일
심사청구일자 2021년08월18일

(71) 출원인

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이광호

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

두기탈라 크리스나바부

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

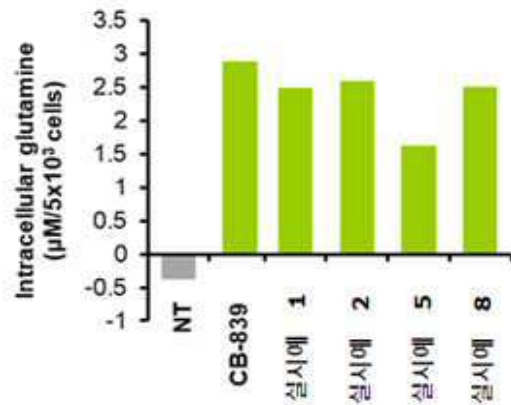
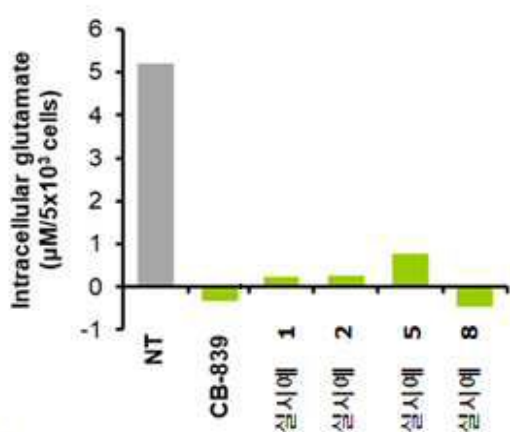
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 신규한 마크로사이클 화합물, 이의 제조방법, 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 마크로사이클 화합물, 이의 제조방법, 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 명세서에 기재된 화학식 1로 표시되는 화합물은 글루타미네이즈에 대한 우수한 억제 활성을 나타내면서, 암세포에 대한 세포 독성이 우수하여 암 또는 자가면역질환에 유용할 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/504 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

이유진

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

최길돈

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

채중학

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

정명은

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

조병철

서울특별시 용산구 이촌로 310, 래미안 첼리투스
102-404

윤미란

서울특별시 마포구 백범로 152, 공덕파크자이
102-1102

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711096429
과제번호	KK1932-30
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국화학연구원
연구사업명	한국화학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	약물전사체 통합 분석기반 생체면역조절 기술 연구
기 여 율	56/100
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711138697
과제번호	NRF-2016R1A2B3016282
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	다중오믹스와 환자유래 고정밀 전임상 모델을 이용한 3세대 EGFR 표적치료제 내성기 전연구
기 여 율	44/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2021.05.31

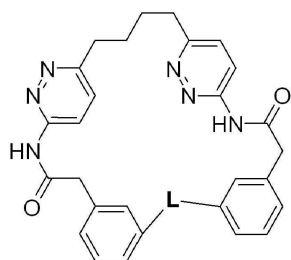
명세서

청구범위

청구항 1

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

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

L은 C₁₋₂₀의 직쇄 알킬렌이고, 여기서 알킬렌의 하나 이상의 탄소 원자는 산소 원자로 치환될 수 있다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 L은 -O-C₁₋₁₅ 직쇄 알킬렌-O-이고, 여기서 알킬렌의 하나 이상의 탄소 원자는 산소 원자로 치환될 수 있되 산소 원자끼리는 결합하지 않는다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 L은 -O-L¹-이고, 상기 L¹는 -[(CH₂)_p-O]_m-이며, p는 1 내지 10의 정수, m은 1 내지 5의 정수이고, L¹의 탄소 및 산소 개수의 합은 12 이내이다.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 L은 또는 이다.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

<1> 6,9-디옥사-2,13-디아자-1,14(3,6)-디피리다지나-5,10(1,3)-디벤제나시클로옥타데카판-3,12-디온;

<2> 15,19-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로노나데카판-3,12-디온;

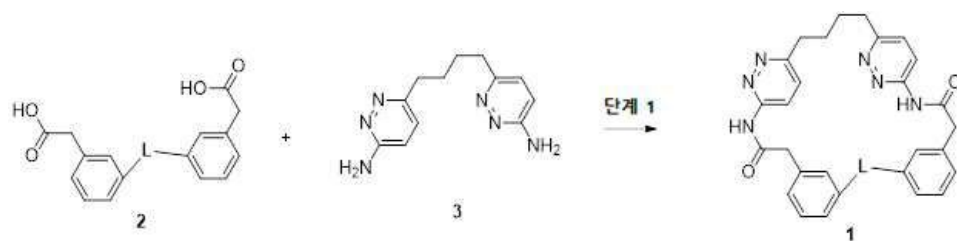
- <3> 15,20-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로이코사판-3,12-디온;
 <4> 15,21-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헤니코사판-3,12-디온;
 <5> 15,18,21-트리옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헤니코사판-3,12-디온;
 <6> 15,22-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로도코사판-3,12-디온;
 <7> 15,23-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온;
 <8> 15,19,23-트리옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온;
 <9> 15,18,21,24-테트라옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로테트라코사판-3,12-디온; 및
 <10> 15,18,21,24,27-펜타옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헵타코사판-3,12-디온.

청구항 6

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 아마이드화 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1)를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

L은 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

청구항 7

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는,

암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 화합물은 글루타미네이즈를 억제하는 것을 특징으로 하는,

약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 소세포폐암, 식도암, 담낭암, 난소암, 췌장암, 위암, 자궁 경부암, 갑상선암, 전립선암, 또는 피부암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효

성분으로 함유하는,

자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 자가면역질환은 건선, 류마티스성 관절염, 혈관염, 염증성 장 질환, 피부염, 골관절염, 천식, 염증성 근육 질환, 알러지성 질환, 질염, 간질 방광염, 경피증, 골다공증, 습진, 동종이계 또는 이종발생성 이식 거부, 이식 편대숙주질환(GVHD), 홍반성 낭창, 염증성 질환, I형 당뇨병, 폐 섬유증, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 갑상선염, 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 낭포성 섬유증, 만성적 재발성 간염, 원발성 담도성 간 경변증, 알러지성 결막염 또는 아토피 피부염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 12

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 마크로사이클 화합물, 이의 제조방법, 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 중앙 특이적 대사 경로를 공략하여 암을 선택적으로 억제하고자 하는 대사 항암제가 급부상하고 있다. 암은 증식과 생존을 위해 선택적 대사 경로를 사용하기 때문에, 대사의 재조정은 암 표현형의 주요 특성이다. 따라서 특정 유전 변이를 가지고 있는 암세포들이 어떤 특이적 대사 회로를 재조정하여 증식하는지 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0003] 글루코스(Glucose)와 글루타민(Glutamine)은 암 증식에 사용되는 주요 대사 연료이다. 대부분 암은 급속한 중앙 성장을 유지하는데 필요한 단백질 동화 및 이화성 요구를 충족시키기 위해 글루코스 대사의 높은 수준을 활용한다. 이때 항암제 등에 의한 대사 스트레스를 받으면 이를 극복하기 위해 아미노산과 같은 대체 영양소를 이용한다.

[0004] 글루타민은 혈액에서 발견되는 가장 풍부한 아미노산이며, 거대 분자 생합성 (macromolecular synthesis)에 중요한 전구체인 뉴클레오타이드, 비필수 아미노산 및 지방산 등의 생합성에 필요한 탄소와 질소 원자의 주요 공급원이다. 또한 글루타민과 글루타민 유래 대사산물은 에너지 생산, 산화 환원의 항상성, 유전자 전사 및 암세포의 세포 내 신호전달에도 참여하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 이와 같이 암세포에 있어서 글루타민 대사의 변화는 에너지 대사 및 산화 환원 반응뿐만 아니라 암세포의 지속적인 증식과 관련된 여러 가지 신호 전달체계를 활성화하며, 세포 노화 과정과 세포 사멸을 억제하는 방향으로 작용하여 암의 진행과 악화에 영향을 끼칠 수 있다. 따라서 글루타민 대사를 표적으로 하는 것은 다수의 암 아형에서 매력적인 치료 옵션이다.

[0006] 특히 글루타민이 글루타메이트(Glutamate)로, 이어 알파-케토글루타레이트(Alpha-ketoglutarate, AKG)로 전환하는 일련의 과정인 글루타민 분해(glutaminolysis)의 재조정이 전이 및 항암제 내성과 밀접한 관련이 있다는 연구 보고와 함께, 글루타민 대사 관련 효소 중 글루타민아제 (glutaminase, GLS1)가 중앙 대사의 중요한 표적으로 주목받고 있다(비특허문헌 1, Medina, et al, *J. Nutr.*, September 1, 2001, Vol. 131, No. 9, 2539S-2542S).

[0007] 특히, 폐 선암종 (lung adenocarcinomas)에서 세 번째로 가장 많이 돌연변이 된 유전자로 알려진 KEAP1은 KRAS 발암성 돌연변이와 빈번하게 동시 발생한다. KEAP1- 또는 NRF2- 돌연변이를 가진 암이 상향 조절된 글루타민 분해에 상당히 의존적이며, 이 특성이 글루타민아제의 약리학적 억제를 통해 치료적으로 이용될 수 있음이 보고되고 있다 (비특허문헌 2, R. Romero, et al, *Nature Medicine*, November 2017, Vol. 23, No. 11).

[0008] 또한, 글루타미네이즈는 자가면역질환과도 관련되어 있다고 알려져 있다(비특허문헌 3, Michihito Kono, et al, *Arthritis & Rheumatology*, 2019 Nov;71(11):1869-1878).

[0009] 대한민국 공개특허공보 제10-2015-0091389호에는 글루타미네이즈 저해제 화합물들이 개시되어 있고, 이중 CB-839 화합물이 항암제로서 개발되고 있다.

[0010] 본 발명자들은 글루타미네이즈의 새로운 억제제를 개발하기 위하여, 신규한 마크로사이클 화합물을 합성하였고, 이들이 글루타미네이즈에 대한 저해 활성을 타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 일 목적은 글루타미네이즈를 저해하는 신규한 마크로사이클 화합물을 제공하는 데 있다.

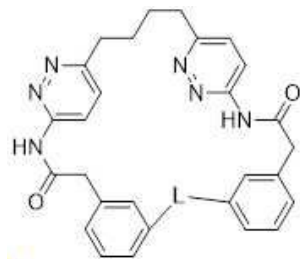
[0012] 본 발명의 다른 목적은 신규한 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0015] [화학식 1]



[0016] 

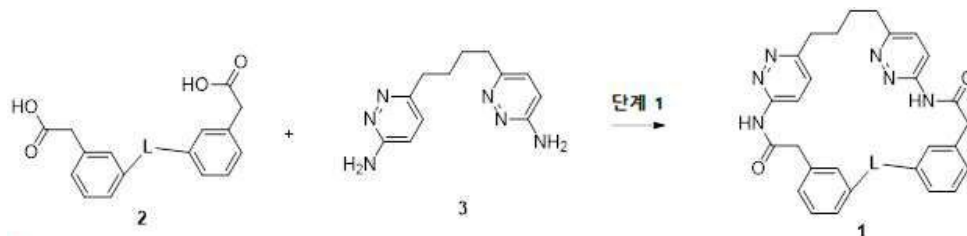
[0017] 상기 화학식 1에서,

[0018] L은 C₁₋₂₀의 직쇄 알킬렌이고, 여기서 알킬렌의 하나 이상의 탄소 원자는 산소 원자로 치환될 수 있다.

[0019] 다른 측면에서, 본 발명은 하기 반응식 1에서 나타낸 바와 같이,

[0020] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 아마이드화 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1)를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0021] [반응식 1]



[0022] 

[0023] 상기 반응식 1에서,

[0024] L은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0025] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 명세서에 기재된 화학식 1로 표시되는 화합물은 글루타미네이즈에 대한 우수한 억제 활성을 나타내면서, 암 세포에 대한 세포 독성이 우수하여 암 또는 자가면역질환에 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 ALK-TKI 내성 세포에 본 발명에 따른 화합물을 처리한 후, 글루타민과 글루타메이트 레벨을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

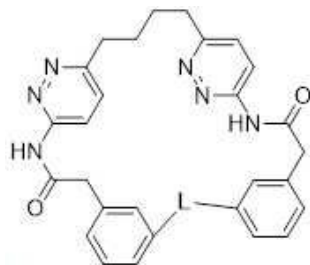
[0030] 한편, 본 발명의 실시 형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.

[0031] 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0032] 본 발명의 일 측면은,

[0033] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] 본 발명의 일 실시형태에서,

[0037] 상기 화학식 1에서,

[0038] L은 C₁₋₂₀의 알킬렌이고, 여기서 알킬렌의 하나 이상의 탄소 원자는 산소 원자로 치환될 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시형태에서,

[0040] 상기 화학식 1에서,

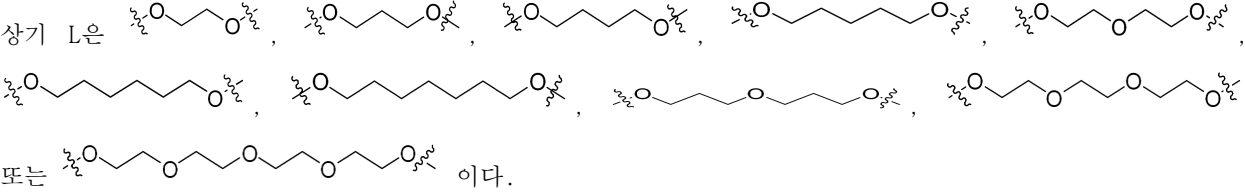
[0041] L은 C₁₋₂₀의 직쇄 알킬렌이고, 여기서 알킬렌의 하나 이상의 탄소 원자는 산소 원자로 치환될 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시형태에서,

[0043] 상기 화학식 1에서,

[0044] 상기 L은 -O-C₁₋₁₅ 직쇄 알킬렌-O-이고, 여기서 알킬렌의 하나 이상의 탄소 원자는 산소 원자로 치환될 수 있고 산소 원자끼리는 결합하지 않는다.

[0045] 본 발명의 일 실시형태에서,

- [0046] 상기 화학식 1에서,
- [0047] 상기 L은 $-O-L^1-$ 이고, 상기 L^1 는 $-[(CH_2)_p-O]_m-$ 이며, p는 1 내지 10의 정수, m은 1 내지 5의 정수이고, L^1 의 탄소 및 산소 개수의 합은 12 이내이다.
- [0048] 본 발명의 일 실시형태에서,
- [0049] 상기 화학식 1에서,
- [0050] 상기 L은 이다.
- [0051] 본 발명의 일 실시형태에서,
- [0052] 상기 화학식 1에서 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [0053] <1> 6,9-디옥사-2,13-디아자-1,14(3,6)-디피리다지나-5,10(1,3)-디벤제나시클로옥타데카판-3,12-디온;
- [0054] <2> 15,19-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로노나데카판-3,12-디온;
- [0055] <3> 15,20-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로이코사판-3,12-디온;
- [0056] <4> 15,21-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헤니코사판-3,12-디온;
- [0057] <5> 15,18,21-트리옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헤니코사판-3,12-디온;
- [0058] <6> 15,22-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로도코사판-3,12-디온;
- [0059] <7> 15,23-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온;
- [0060] <8> 15,19,23-트리옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온;
- [0061] <9> 15,18,21,24-테트라옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로테트라코사판-3,12-디온; 및
- [0062] <10> 15,18,21,24,27-펜타옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헥타코사판-3,12-디온.
- [0063] 용어 “알킬렌” 또는 “알킬”은, 달리 명시되지 않는 한, 직쇄 또는 분지쇄의 포화된 탄화수소 잔기를 포함한다. 예를 들어, “ C_{1-6} 알킬”은 1 내지 6개 탄소로 골격이 이루어진 알킬을 의미한다. 구체적으로 C_{1-6} 알킬은 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸, t-펜틸, sec-펜틸, 네오펜틸, 헥실 등을 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류, 트리플루오로아세트산, 아세테이트, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로

피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설폰에이트, 프로판설폰에이트, 나프탈렌-1-설폰에이트, 나프탈렌-2-설폰에이트, 만델레이트 등을 포함한다.

[0065] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0066] 용어 "수화물(hydrate)"은 비공유적 분자간력(non-covalent intermolecular force)에 의해 결합된 화학양론적(stoichiometric) 또는 비화학양론적(non-stoichiometric) 양의 물을 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 포함할 수 있다. 상기 수화물은 1당량 이상, 바람직하게는, 1 당량 내지 5당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.

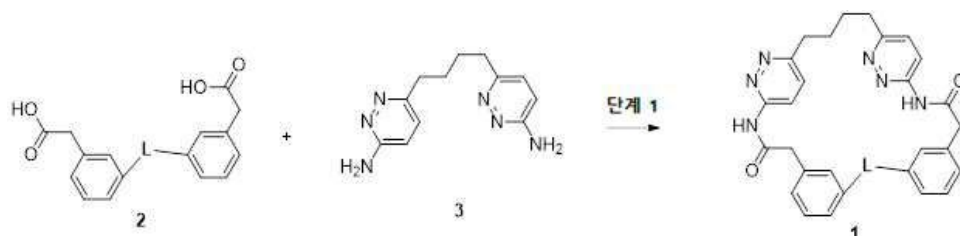
[0067] 용어 "용매화물(solvate)"은 비공유적 분자간력에 의해 결합된 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 그에 관한 바람직한 용매들로는 휘발성, 비독성, 및/또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들이 있다.

[0069] 본 발명의 다른 일 측면에서,

[0070] 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0071] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 아마이드화 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1)를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0072] [반응식 1]



[0073] 

[0074] 상기 반응식 1에서,

[0075] L은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0076] 이하, 상기 반응식 1의 제조방법을 상세히 설명한다.

[0077] 상기 반응식 1의 제조방법에서, 단계 1은 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 아마이드화 반응시키는 단계로서, 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다. 이때 용매로는 유기용매, 예를 들면 DMF나 톨루엔 등이 사용될 수 있으며, 아마이드화 반응을 위해 통상적으로 사용되는 조건을 사용하여 수행할 수 있다.

[0078] 상기 제조방법은 하나의 예시로서 제시된 본 발명의 일 실시예에 한정되는 것은 아니며, 통상의 유기화학적 인 지식 하에 용매, 반응 물질, 온도 조건 등을 변형하여 수행 가능하다.

[0080] 본 발명의 다른 일 측면에서,

[0081] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0082] 상기 화합물은 글루타미네이즈를 억제하는 것을 특징으로 한다.

- [0083] 상기 화합물은 암세포에 대해서 세포독성을 가지며, 암세포는 기존 항암제 내성 암세포일 수 있고, 일례로서 세리티닙(Ceritinib)에 내성을 갖는 암세포일 수 있다.
- [0084] 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 소세포폐암, 식도암, 담낭암, 난소암, 췌장암, 위암, 자궁 경부암, 갑상선암, 전립선암, 및 피부암 중 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0085] 상기 자가면역질환은 건선, 류마티스성 관절염, 혈관염, 염증성 장 질환, 피부염, 골관절염, 천식, 염증성 근육 질환, 알러지성 질환 (예를 들면, 알러지성 비염), 질염, 간질 방광염, 경피증, 골다공증, 습진, 동종이개 또는 이종발생성 이식 (장기, 골수, 줄기세포 및 다른 세포 및 조직) 이식 거부, 이식편대숙주질환, 홍반성 낭창, 염증성 질환, I형 당뇨병, 폐 섬유증, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 갑상선염 (예를 들면, 하시모토 및 자가면역 갑상선염), 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 낭포성 섬유증, 만성적 재발성 간염, 원발성 담도성 간경변증, 알러지성 결막염 및 아토피 피부염 중 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0086] 본 발명에 있어서, 용어 “유효성분으로 함유하는” 이란, 암 또는 자가면역질환의 예방, 개선, 또는 치료의 효과를 가져오는 용량 범위로 함유하는 것을 의미하고, 중증도 및 제형에 따라 용량 범위는 변할 수 있으며, 적용 횟수도 적용 대상의 연령, 체중 및 체질에 따라 변할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물 내에서 화학식 1로 표시되는 화합물은 예를 들어, 0.001 mg/kg 이상, 바람직하게는 0.1 mg/kg 이상, 보다 바람직하게는 10 mg/kg 이상, 보다 더 바람직하게는 100 mg/kg 이상, 보다 더욱 더 바람직하게는 250 mg/kg 이상, 가장 바람직하게는 0.1 g/kg 이상 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물 내에 포함되는 화학식 1로 표시되는 화합물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0087] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효량의 화학식 1로 표시되는 화합물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0088] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제는 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 물질을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0089] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다.
- [0090] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다.
- [0091] 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [0092] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제, 트로키제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니

톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염 등과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0093] 본 발명에 있어서, 용어 “예방”이란, 본 발명의 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물을 암 또는 자가면역질환의 투병중이지 않은 개체에게 투여, 섭취 또는 적용하여 암 또는 자가면역질환의 증세를 억제 또는 차단함으로써, 암 또는 자가면역질환의 증세가 사전에 발생되지 않도록 하는 것을 의미한다.

[0094] 본 발명에 있어서, 용어 “치료”란, 본 발명의 약학적 조성물을 암 또는 자가면역질환 투병중인 개체에게 투여한 결과로서 암 또는 자가면역질환의 증세의 완치는 물론 암 또는 자가면역질환의 증세의 부분적 완치, 호전 및 경감을 포함한다.

[0095] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0096] 본 발명에 있어서, 용어 “약학적으로 유효한 양”이란, 의학적 치료 또는 개선에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0097] 나아가, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 이의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 용매화물, 수화물 등의 형태로 사용될 수 있다.

[0098] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나, 사용중인 다른 항암제와 병용투여하여 사용할 수 있다.

[0099] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 항암제와 병용투여함으로써 항암 효과를 증진시킬 수 있다.

[0101] 본 발명의 다른 일 측면에서,

[0102] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0103] 본 발명에 있어서, 용어 “개선”이란, 본 발명의 약학적 조성물, 식품 조성물을 암 또는 자가면역질환 투병 개체에게 투여, 섭취 또는 적용하여 암 또는 자가면역질환의 증세의 경감 또는 완화를 포함하는 의미이다.

[0104] 본 발명의 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0105] 본 발명은 다른 측면에서, 본 명세서에 기재된 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료 방법이 제공된다.

[0106] 본 발명은 또 다른 측면에서, 암 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료에 있어서의, 본 명세서에 기재된 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[0107] 상기 방법 또는 용도에 있어서, 전술한 약학적 조성물에 대한 상세한 설명이 적용될 수 있다.

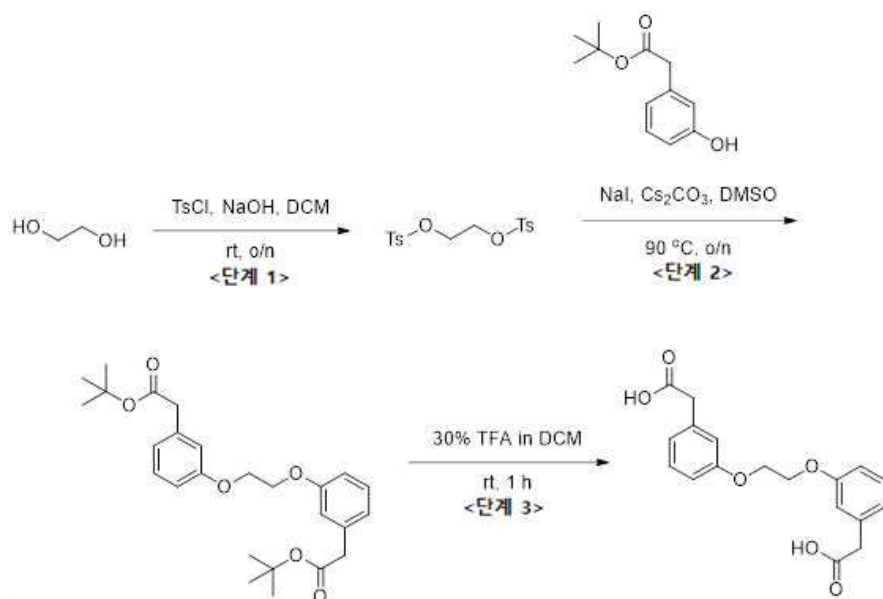
[0109] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다.

[0110] 단, 후술하는 실시예 및 실험예는 본 발명을 일 측면에서 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0111] <참조예> CB-839 (2-(pyridin-2-yl)-N-(5-(4-(6-(2-(3-(trifluoromethoxy)phenyl)acetamido)pyridazin-3-yl)butyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide)

[0112] 글루타미네이즈의 억제제로 알려져 있는 CB-839를 레퍼런스로 사용하였으며, 셀렉캠코리아(SelleckChem Korea Co., Ltd)에서 구매하였다.

[0113] <제조예 1> 2,2'-((에탄-1,2-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조



[0114]

[0115] <단계 1> 에탄-1,2-디일 비스(4-메틸벤젠설포네이트) (ethane-1,2-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate))의 제조

[0116] 250mL의 둥근 바닥 플라스크에서 에틸렌 글리콜(1.00g, 16.1mmol) 및 NaOH(5.16g, 128.9mmol)를 0℃에서 DCM(30mL)에 용해시켰다. 혼합물에 DCM(20mL) 중 토실 클로라이드(12.3g, 64.4mmol)를 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 조 물질을(crude)을 DCM 및 물로 추출하고, 염수로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 추가 정제 없이 사용하였다.

[0117] ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.76 - 7.71 (m, 4 H), 7.37 - 7.31 (m, 4 H), 4.18 (s, 4H), 2.46 (s, 6 H); LCMS: 371.5 [M+H⁺].

[0118] <단계 2> 디-*tert*-부틸 2,2'-((에탄-1,2-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세테이트 (di-*tert*-butyl 2,2'-((ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetate)의 제조

[0119] 100mL의 둥근 바닥 플라스크에서, *tert*-부틸 2-(3-히드록시페닐)아세테이트(1.20g, 5.76mmol) 및 에탄-1,2-디일 비스(4-메틸벤젠설포네이트)(1.07g, 2.88mmol)를 용해시켰다. 실온에서 DMSO(20mL). 혼합물에 Cs₂CO₃(3.75g, 11.5mmol) 및 NaI(870mg, 5.76mmol)를 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 90℃에서 밤새 교반하였다. 조 물질을 에틸 아세테이트 및 물로 추출하고, 염수로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 MPLC(0→20 EA/HX)를 사용하여 정제하여 무색 오일의 목적 생성물을 얻었다(820 mg, 수율: 64%).

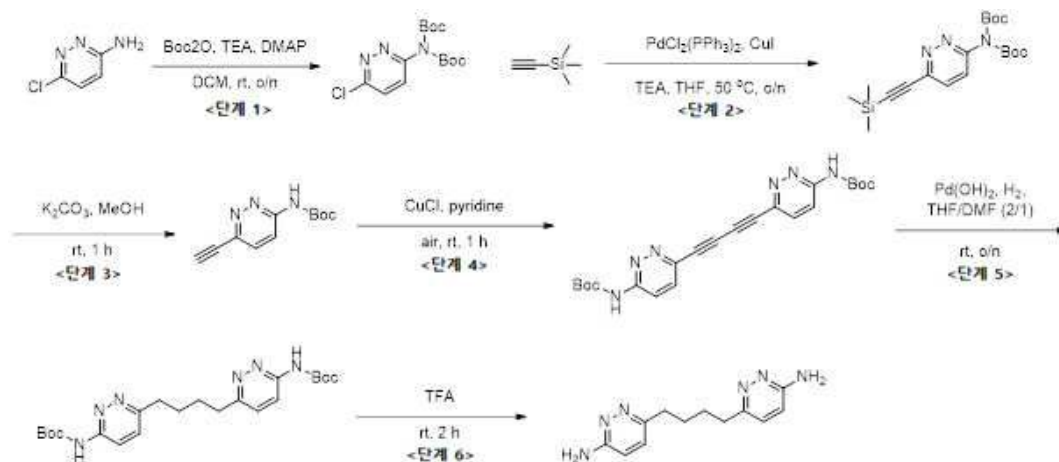
[0120] ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.24 (t, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 6.90 - 6.82 (m, 6 H), 4.31 (s, 4 H), 3.50 (s, 4 H), 1.44 (s, 18 H); LCMS: 443.8 [M+H⁺].

[0121] <단계 3> 2,2'-((에탄-1,2-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조

[0122] 100mL 둥근 바닥 플라스크에서, DCM(20mL)의 30% TFA에 디-*tert*-부틸 2,2'-((에탄-1,2-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세테이트(820mg, 1.85mmol)를 용해시켰다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 증류 제거하였다. 잔류물을 DCM에 재용해하고 3회 증발시켰다. 제조예 1의 백색 고체는 추가 정제 없이 사용되었다.

[0123] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.27 - 7.19 (m, 2 H), 6.91 - 6.79 (m, 6 H), 4.28 (s, 4 H), 3.54 (s, 4 H); LCMS: 331.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0124] <제조예 2> 6,6'-(-부탄-1,4-디일)비스(피리다진-3-아민) (6,6'-(butane-1,4-diyl)bis(pyridazin-3-amine))의 제조



[0125]

[0126] <단계 1> tert-부틸(tert-부톡시카르보닐)(6-클로로피리다진-3-일)카르바메이트 (*tert-butyl (tert-butoxycarbonyl)(6-chloropyridazin-3-yl)carbamate*)의 제조

[0127] DCM(80mL)에 6-클로로피리다진-3-아민(5.00g, 38.6mmol)가 용해된 용액에 트리메틸아민(26.8mL, 193mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘(450mg, 3.86mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 교반하여, DCM(50mL)에 디-tert-부틸 디카보네이트(25.3g, 111mmol)가 용해된 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 MPLC(0→10% EA/DCM)를 사용하여 정제하여 백색 고체의 원하는 생성물을 얻었다(7.98 g, 수율: 63%).

[0128] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.01 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 1.39 (s, 18 H); LCMS: 330.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0129] <단계 2> tert-부틸(tert-부톡시카르보닐)(6-((트리메틸실릴)에티닐)피리다진-3-일)카르바메이트 (*tert-butyl (tert-butoxycarbonyl)(6-((trimethylsilyl)ethynyl)pyridazin-3-yl)carbamate*)의 제조

[0130] 테트라히드로푸란(30mL)에 tert-부틸(tert-부톡시카르보닐)(6-클로로피리다진-3-일)카르바메이트(3.00g, 9.10mmol) 및 트리메틸아민(30mL)가 용해된 용액을 Ar 기체로 15분 동안 탈기시켰다(degassed). 에티닐트리메틸 실란 (2.50mL, 18.2mmol), CuI(175mg, 0.91mmol) 및 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (640mg, 0.91mmol)를 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 50℃에서 밤새 가열하였다. 혼합물을 셀라이트(celite)를 통해 여과하고, 에틸 아세테이트로 세척하였다. 잔류물을 농축하였다. 조 물질을 MPLC(0→30% EA/HX)를 사용하여 정제하여 진한 녹색 고체의 원하는 생성물을 얻었다(2.83 g, 수율: 79%).

[0131] ^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 7.58 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 7.50 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 1.46 (s, 18 H), 0.30 (s, 9 H).

[0132] <단계 3> tert-부틸(6-에티닐피리다진-3-일)카바메이트 (*tert-butyl (6-ethynylpyridazin-3-yl)carbamate*)의 제조

[0133] 메탄올(150mL)에 tert-부틸(tert-부톡시카르보닐)(6-((트리메틸실릴)에티닐)피리다진-3-일)카르바메이트(2.83g, 7.23mmol) 및 K_2CO_3 (4.00g, 28.9mmol)가 용해된 혼합물을 실온에서 30분간 교반하였다. 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 및 H_2O 의 혼합물에 재용해시키고, 1N HCl 용액으로 pH 7로 중화시켰다. 유기물을 분리하고, 염수로 세척하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 물질을 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

- [0134] ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.21 (d, J = 9.3 Hz, 1 H), 7.90 (s, 1 H), 7.55 (dd, J = 9.3, 0.6 Hz, 1 H), 3.33 (s, 1 H), 1.54 (s, 9 H).
- [0135] <단계 4> 디-*tert*-부틸 (부타-1,3-디인-1,4-디일비스(피리다진-6,3-디일))디카르바메이트 (di-*tert*-butyl (buta-1,3-diyne-1,4-diylbis(pyridazine-6,3-diyl))dicarbamate)의 제조
- [0136] 실온에서 피리딘(50mL) 중 *tert*-부틸(6-에티닐피리다진-3-일)카바메이트(1.34g, 6.11mmol)의 용액에 CuCl(450mg, 3.36mmol)을 첨가하였다. 모든 *tert*-부틸 (6-에티닐피리다진-3-일)카르바메이트가 소모됨에 따라 생성된 혼합물을 공기 스트립 하에 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 NH_4Cl 수용액으로 희석하였다. 침전물을 흡인 여과에 의해 수집하고, H_2O 로 세척하고, 건조시켜 회색 고체의 생성물을 얻었다.
- [0137] ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.90 (s, 2 H), 8.13 (d, J = 9.3 Hz, 2 H), 7.97 (d, J = 9.4 Hz, 2 H), 1.49 (s, 18 H).
- [0138] <단계 5> 디-*tert*-부틸(부탄-1,4-디일비스(피리다진-6,3-디일))디카르바메이트 (di-*tert*-butyl (butane-1,4-diylbis(pyridazine-6,3-diyl))dicarbamate)의 제조
- [0139] 디-*tert*-부틸(부타-1,3-디인-1,4-디일비스(피리다진-6,3-디일))디카르바메이트(1.12g, 2.57mmol)를 THF/DMF(110mL/ 220mL) 혼합물에 용해시켰다. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (2.35g, 16.7mmol)를 천천히 첨가하였다. H_2 는 여러 번 추가 및 방출되었다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 THF로 세척하였다. 여액을 감압 하에 증발시켰다. 조 물질을 MPLC(0→30% EA/HX에 이어 0→10% MeOH/DCM)를 사용하여 정제하여 밝은 갈색 고체의 원하는 생성물을 얻었다(750 mg, 수율: 56%).
- [0140] ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.27 (s, 2 H), 7.95 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 7.50 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 2.92 - 2.79 (m, 4 H), 1.76 - 1.63 (m, 4 H), 1.47 (s, 18 H).
- [0141] <단계 6> 6,6'-(부탄-1,4-디일)비스(피리다진-3-아민) (6,6'-(butane-1,4-diyl)bis(pyridazin-3-amine))의 제조
- [0142] 디-*tert*-부틸(부탄-1,4-디일비스(피리다진-6,3-디일))디카르바메이트(750 mg, 1.69 mmol)를 트리플루오로아세트산(3 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 조 물질(crude)을 농축하고 DCM에 3회 재용해시켰다. 제조에 2의 화합물을 추가 정제 없이 사용하였다.
- [0143] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.53 (s, 4 H), 7.79 (d, J = 9.5 Hz, 2 H), 7.44 (d, J = 9.4 Hz, 2 H), 2.77 - 2.71 (m, 4 H), 1.71 - 1.60 (m, 4 H).
- [0144] <제조예 3> 2,2'-((프로판-1,3-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((propane-1,3-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0145] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 3의 화합물을 얻었다.
- [0146] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.21 (t, J = 7.7 Hz, 2 H), 6.88 - 6.78 (m, 6 H), 4.11 (t, J = 6.3 Hz, 4 H), 3.52 (s, 4 H), 2.16 (p, J = 6.2 Hz, 2 H); LCMS: 345.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0147] <제조예 4> 2,2'-((부탄-1,4-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((butane-1,4-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0148] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 4의 화합물을 얻었다(수율: 95%).
- [0149] ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.21 (td, J = 7.4, 1.5 Hz, 2 H), 6.86 - 6.77 (m, 6 H), 4.06 - 3.96 (m, 4 H), 3.52 (s, 4 H), 1.92 - 1.80 (m, 4 H); LCMS: 359.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0150] <제조예 5> 2,2'-((펜탄-1,5-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((pentane-1,5-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조

- [0151] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 5의 화합물을 얻었다.
- [0152] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.20 (td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 2 H), 6.86 – 6.76 (m, 6 H), 3.96 (t, $J = 6.4$ Hz, 4 H), 3.52 (s, 4 H), 1.77 (p, $J = 6.8$ Hz, 4 H), 1.61 – 1.50 (m, 2 H); LCMS: 373.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0153] <제조예 6> 2,2'-(((옥시비스(에탄-2,1-디일))비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-(((oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0154] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 연한 황갈색 고체의 제조예 6의 화합물을 얻었다.
- [0155] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.32 (s, 2 H), 7.20 (t, $J = 7.9$ Hz, 2 H), 6.88 – 6.77 (m, 6 H), 4.13 – 4.05 (m, 4 H), 3.84 – 3.75 (m, 4 H), 3.52 (s, 4 H); LCMS: 375.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0156] <제조예 7> 2,2'-((헥산-1,6-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((hexane-1,6-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0157] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 7의 화합물을 얻었다.
- [0158] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.20 (td, $J = 7.8, 7.4, 1.3$ Hz, 2 H), 6.85 – 6.76 (m, 6 H), 3.94 (t, $J = 6.4$ Hz, 4 H), 3.52 (s, 4 H), 1.80 – 1.65 (m, 4 H), 1.54 – 1.42 (m, 4 H); 387.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0159] <제조예 8> 2,2'-((헵탄-1,7-디일비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((heptane-1,7-diylbis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0160] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 8의 화합물을 얻었다.
- [0161] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.30 (s, 2 H), 7.19 (td, $J = 7.4, 1.4$ Hz, 2 H), 6.85 – 6.76 (m, 6 H), 3.93 (t, $J = 6.4$ Hz, 4 H), 3.51 (s, 4 H), 1.78 – 1.64 (m, 4 H), 1.50 – 1.34 (m, 6 H); LCMS: 401.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0162] <제조예 9> 2,2'-(((옥시비스(프로판-3,1-디일))비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-(((oxybis(propane-3,1-diyl))bis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0163] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 9의 화합물을 얻었다.
- [0164] ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 6.84 – 6.75 (m, 3 H), 3.99 (t, $J = 6.3$ Hz, 2 H), 3.58 – 3.48 (m, 4 H), 1.94 (p, $J = 6.3$ Hz, 2 H); LCMS: 403.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0165] <제조예 10> 2,2'-((((에탄-1,2-디일비스(옥시))비스(에탄-2,1-디일))비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((((ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0166] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 흰색 고체의 제조예 10의 화합물을 얻었다.
- [0167] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.20 (td, $J = 8.4, 7.4$ Hz, 2 H), 6.85 – 6.78 (m, 6 H), 4.07 – 4.03 (m, 4 H), 3.76 – 3.71 (m, 4 H), 3.61 (s, 4 H), 3.52 (s, 4 H); LCMS: 419.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0168] <제조예 11> 2,2'-((((옥시비스(에탄-2,1-디일))비스(옥시))비스(에탄-2,1-디일))비스(옥시))비스(3,1-페닐렌))디아세트산 (2,2'-((((oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(3,1-phenylene))diacetic acid)의 제조
- [0169] 제조예 1과 같은 방법으로 제조하여, 제조예 11의 화합물을 얻었다.
- [0170] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.24 (t, $J = 7.9$ Hz, 2 H), 6.99 – 6.82 (m, 6 H), 4.15 (t, $J = 4.8$ Hz, 4 H), 3.86 (t, $J = 4.8$ Hz, 4 H), 3.77 – 3.67 (m, 8 H), 3.62 (s, 4 H).

- [0171] <제조예 12> 5-(4-(6-아미노피리다진-3-일)부틸)-1,3,4-티아디아졸-2-아민 (5-(4-(6-aminopyridazin-3-yl)butyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine)의 제조
- [0172] tert-부틸(6-(4-시아노부틸)피리다진-3-일)카르바메이트 (620 mg, 2.24 mmol)를 개방형 상부 환류 응축기가 장착된 둥근 바닥 플라스크에 채웠다. 플라스크에 히드라진카르보티오아미드 (225 mg, 2.47 mmol) 및 트리플루오로아세트산(5 mL)을 첨가하였다. 반응 슬러리를 65℃에서 3시간 동안 가열하였다. 조 물질을 농축하고 DCM에 3회 재용해시켰다. 디옥산 중 4 N HCl 1mL를 혼합물에 한 방울씩 첨가하였다. 감압 하에 용매를 제거하고, 에테르를 첨가하여 제거하였다. 잔류물을 MPLC(알루미나 염기성 컬럼 포함)(0→30% MeOH/DCM)를 사용하여 정제하여 회백색 고체의 제조예 12의 화합물을 얻었다(235 mg, 수율: 42%).
- [0173] ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.13 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.69 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 2H), 2.81 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.68 - 1.57 (m, 4H).
- [0174] <제조예 13> 5,5'-(부탄-1,4-디일)비스(1,3,4-티아디아졸-2-아민) (5,5'-(butane-1,4-diyl)bis(1,3,4-thiadiazol-2-amine))의 제조
- [0175] 아디프산 (adipic acid)(5.00g, 31.1mmol) 및 티오세미카바지드 (thiosemicarbazide)(5.69g, 62.4mmol)가 용해된 포스포릴 클로라이드(45mL)의 혼합물을 90℃에서 밤새 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고 얼음과 물의 혼합물에 부었다. 염기성(pH 14)이 될 때까지 수산화나트륨 펠릿을 혼합물에 첨가하였다. 백색 침전물을 흡인 여과로 수집하고 물로 행구고 건조하여 흰색 고체의 제조예 13의 화합물을 얻었다(수율: 88%).
- [0176] ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6.98 (s, 4 H), 2.89 - 2.69 (m, 4 H), 1.74 - 1.53 (m, 4 H).
- [0177] <실시에 1> 6,9-디옥사-2,13-디아자-1,14(3,6)-디피리다지나-5,10(1,3)-디벤제나시클로옥타데카판-3,12-디온 (6,9-dioxa-2,13-diaza-1,14(3,6)-dipyridazina-5,10(1,3)-dibenzenacyclooctadecaphane-3,12-dione)의 제조
- [0178] 제조예 1의 화합물(0.11 mmol), 옥살릴 클로라이드 (30 μL , 0.33 mmol) 및 DMF 한 방울의 무수 톨루엔 (1.0 mL) 용액을 상온의 아르곤 기체 하에서 1시간 동안 저어주었다. 용매를 감압 하에 증발시켰다. 아실 클로라이드 조 물질(crude)을 추가 정제 없이 다음 변환에 사용하였다. 제조예 2의 화합물(0.10 mmol) 및 트리에틸아민 (30 μL , 0.20mmol)이 녹아있는 차가운 DMF (2 mL) 용액에, 아르곤 기체 하에서 DMF (3 mL)에 녹인 아실 클로라이드를 한 방울씩 첨가하였다. 교반을 추가 20분 동안 계속한 후, 얼음 배스(ice bath)를 제거하고 혼합물을 실온에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 반응 종료 후 물을 첨가하여 추출하였다. 석출된 고체를 여과하고 건조하여 실시예 1의 화합물을 얻었다(수율: 20%).
- [0179] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.45 - 11.21 (m, 2 H), 8.21 - 8.12 (m, 1 H), 7.57 - 7.49 (m, 1 H), 7.27 - 7.04 (m, 3 H), 7.03 - 6.63 (m, 7 H), 4.35 - 4.16 (m, 4 H), 3.73 (s, 4 H), 2.98 - 2.73 (m, 4 H), 1.85 - 1.49 (m, 4 H).
- [0180] <실시에 2> 15,19-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로노나데카판-3,12-디온 (15,19-dioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclononadecaphane-3,12-dione)의 제조
- [0181] 반응물은 제조예 3의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 실시예 2의 화합물을 얻었다(수율: 6%).
- [0182] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.51 - 11.18 (m, 2 H), 8.19 - 8.13 (m, 1 H), 7.57 - 7.47 (m, 1 H), 7.25 - 7.01 (m, 3 H), 7.02 - 6.61 (m, 7 H), 4.16 - 4.01 (m, 4 H), 3.71 (s, 4 H), 2.92 - 2.79 (m, 4 H), 2.21 - 2.06 (m, 2 H), 1.79 - 1.51 (m, 4 H).
- [0183] <실시에 3> 15,20-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로이코사판-3,12-디온 (15,20-dioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacycloicosaphane-3,12-dione)의 제조
- [0184] 반응물은 제조예 4의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 실시예 3의 화합물을 얻었다(수율: 18%).
- [0185] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.60 (s, 1 H), 11.41 - 11.20 (m, 1 H), 8.20 - 8.12 (m, 1 H), 7.56 - 7.49

(m, 1 H), 7.25 - 7.01 (m, 3 H), 6.99 - 6.59 (m, 7 H), 4.05 - 3.92 (m, 4 H), 3.73 (s, 4 H), 2.99 - 2.77 (m, 4 H), 1.89 - 1.78 (m, 4 H), 1.74 - 1.50 (m, 4 H).

[0186] <실시예 4> 15,21-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헨ικο사판-3,12-디온 (15,21-dioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphane-3,12-dione)의 제조

[0187] 반응물은 제조예 5의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 실시예 4의 화합물을 얻었다(수율: 31%).

[0188] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.39 - 11.17 (m, 2 H), 8.21 - 8.12 (m, 1 H), 7.56 - 7.46 (m, 1 H), 7.23 - 7.03 (m, 3 H), 6.96 - 6.59 (m, 7 H), 3.99 - 3.86 (m, 4 H), 3.71 (s, 4 H), 2.96 - 2.75 (m, 4 H), 1.81 - 1.48 (m, 10 H).

[0189] <실시예 5> 15,18,21-트리옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헨ικο사판-3,12-디온 (15,18,21-trioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphane-3,12-dione)의 제조

[0190] 반응물은 제조예 6의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 실시예 5의 화합물을 얻었다(수율: 2.4%).

[0191] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.45 - 11.12 (m, 2 H), 8.21 - 8.10 (m, 1 H), 7.57 - 7.45 (m, 1 H), 7.26 - 7.04 (m, 3 H), 6.99 - 6.61 (m, 7 H), 4.15 - 3.97 (m, 4 H), 3.87 - 3.58 (m, 8 H), 2.93 - 2.75 (m, 4 H), 1.83 - 1.52 (m, 4 H).

[0192] <실시예 6> 15,22-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로도코사판-3,12-디온 (15,22-dioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclodocosaphane-3,12-dione)의 제조

[0193] 반응물은 제조예 7의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 실시예 6의 화합물을 얻었다(수율: 7%).

[0194] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 - 11.17 (m, 2 H), 8.22 - 8.10 (m, 1 H), 7.57 - 7.46 (m, 1 H), 7.24 - 7.03 (m, 3 H), 7.01 - 6.58 (m, 7 H), 4.00 - 3.84 (m, 4 H), 3.71 (s, 4 H), 3.04 - 2.72 (m, 4 H), 1.80 - 1.53 (m, 8 H), 1.50 - 1.38 (m, 4 H).

[0195] <실시예 7> 15,23-디옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온 (15,23-dioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclotricosaphane-3,12-dione)의 제조

[0196] 반응물은 제조예 8의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 실시예 7의 화합물을 얻었다(수율: 78%).

[0197] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.35 - 11.16 (m, 1 H), 8.20 - 8.12 (m, 1 H), 7.55 - 7.46 (m, 1 H), 7.24 - 7.03 (m, 3 H), 6.97 - 6.61 (m, 7 H), 3.97 - 3.85 (m, 4 H), 3.70 (s, 4 H), 2.95 - 2.74 (m, 4 H), 1.81 - 1.52 (m, 8 H), 1.47 - 1.33 (m, 6 H).

[0198] <실시예 8> 15,19,23-트리옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온 (15,19,23-trioxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclotricosaphane-3,12-dione)의 제조

[0199] 반응물은 제조예 9의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 갈색 고체의 실시예 8의 화합물을 얻었다(수율: 24%).

[0200] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.58 - 11.16 (m, 2 H), 8.20 - 8.10 (m, 1 H), 7.56 - 7.46 (m, 1 H), 7.23 - 6.99 (m, 3 H), 6.95 - 6.57 (m, 7 H), 4.01 - 3.90 (m, 4 H), 3.70 (s, 4 H), 3.54 - 3.49 (m, 4 H), 2.94 - 2.79 (m, 4 H), 1.99 - 1.86 (m, 4 H), 1.77 - 1.52 (m, 4 H).

[0201] <실시예 9> 15,18,21,24-테트라옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로테트라코사

판-3,12-디온 (15,18,21,24-tetraoxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclotetracosaphane-3,12-dione)의 제조

[0202] 반응물은 제조예 10의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 갈색 고체의 실시예 9의 화합물을 얻었다(수율: 27%).

[0203] ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) 11.58 - 11.16 (m, 2 H), 8.20 - 8.10 (m, 1 H), 7.56 - 7.46 (m, 1 H), 7.23 - 6.99 (m, 3 H), 6.95 - 6.57 (m, 7 H), 4.06 (s, 4 H), 3.74 (s, 6 H), 3.61 (s, 6 H), 3.05 - 2.64 (m, 4 H), 1.34 - 1.19 (m, 2 H), 1.13 (m, 2 H).

[0204] **<실시예 10> 15,18,21,24,27-펜타옥사-4,11-디아자-5,10(3,6)-디피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로헵타코사판-3,12-디온 (15,18,21,24,27-pentaoxa-4,11-diaza-5,10(3,6)-dipyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacycloheptacosaphane-3,12-dione)의 제조**

[0205] 반응물은 제조예 11의 화합물과 제조예 2의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 갈색 고체의 실시예 10의 화합물을 얻었다(수율: 36%).

[0206] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.58 - 11.16 (m, 2 H), 8.20 - 8.10 (m, 1 H), 7.56 - 7.46 (m, 1 H), 7.23 - 6.99 (m, 3 H), 6.95 - 6.57 (m, 7 H), 4.12 - 3.93 (m, 4 H), 3.72 (s, 4 H), 3.56 (, $J = 9.7, 9.1$ Hz, 6 H), 3.38 (s, 6 H), 3.03 - 2.74 (m, 4 H), 1.87 - 1.53 (m, 2 H), 1.37 - 1.19 (m, 2 H).

[0207] **<비교예 1> 6,9-디옥사-2,13-디아자-1(2,5)-티아디아졸라-14(3,6)-피리다지나-5,10(1,3)-디벤제나시클로옥타데카판-3,12-디온 (6,9-dioxa-2,13-diaza-1(2,5)-thiadiazola-14(3,6)-pyridazina-5,10(1,3)-dibenzenacyclooctadecaphane-3,12-dione)의 제조**

[0208] 반응물은 제조예 1의 화합물과 제조예 12의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 비교예 1의 화합물을 얻었다(수율: 13%).

[0209] ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 - 11.14 (m, 1 H), 8.23 - 8.11 (m, 1H), 7.58 - 7.46 (m, 1 H), 7.27 - 7.08 (m, 2 H), 7.00 - 6.66 (m, 6 H), 4.39 - 4.15 (m, 4 H), 3.72 (s, 4 H), 3.02 - 2.91 (m, 2 H), 2.90 - 2.79 (m, 2 H), 1.83 - 1.55 (m, 4 H).

[0210] **<비교예 2> 15,19,23-트리옥사-4,11-디아자-5,10(2,5)-디티아디아졸라-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온 (15,19,23-trioxa-4,11-diaza-5,10(2,5)-dithiadiazola-1,14(1,3)-dibenzenacyclotricosaphane-3,12-dione)의 제조**

[0211] 반응물은 제조예 9의 화합물과 제조예 13의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 노란색 고체의 비교예 2의 화합물을 얻었다(수율: 25%).

[0212] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.21 - 7.05 (m, 2 H), 6.91 - 6.63 (m, 6 H), 4.01 - 3.91 (m, 4 H), 3.71 (s, 4 H), 3.53 - 3.49 (m, 4 H), 3.00 - 2.91 (m, 4 H), 1.95 - 1.87 (m, 4 H), 1.76 - 1.66 (m, 4 H).

[0213] **<비교예 3> 15,19,23-트리옥사-4,11-디아자-5(2,5)-티아디아졸라-10(3,6)-피리다지나-1,14(1,3)-디벤제나시클로트리코사판-3,12-디온 (15,19,23-trioxa-4,11-diaza-5(2,5)-thiadiazola-10(3,6)-pyridazina-1,14(1,3)-dibenzenacyclotricosaphane-3,12-dione)의 제조**

[0214] 반응물은 제조예 9의 화합물과 제조예 12의 화합물이며, 실시예 1과 같은 방법으로 제조하여 비교예 3의 화합물을 얻었다(수율: 15%).

[0215] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 - 11.18 (m, 1 H), 8.21 - 8.12 (m, 1 H), 7.56 - 7.45 (m, 1 H), 7.22 - 7.10 (m, 2 H), 6.94 - 6.68 (m, 6 H), 4.01 - 3.93 (m, 4 H), 3.72 (s, 4 H), 3.56 - 3.49 (m, 4 H), 3.01 - 2.92 (m, 2 H), 2.92 - 2.79 (m, 2 H), 1.97 - 1.87 (m, 4 H), 1.74 - 1.58 (m, 4 H).

[0216] 본 발명에 따른 제조예, 실시예 및 비교예 화합물을 정리하여 각각 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

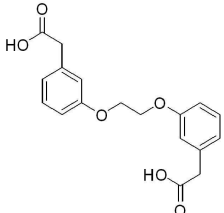
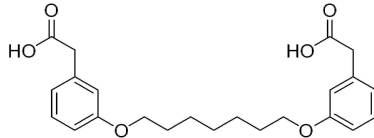
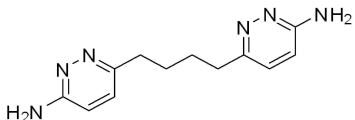
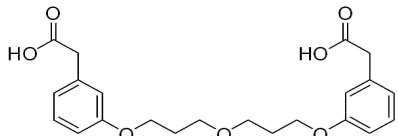
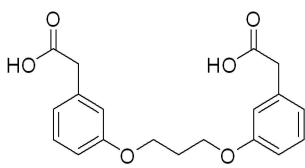
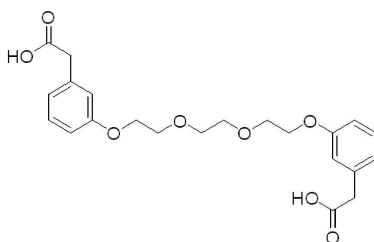
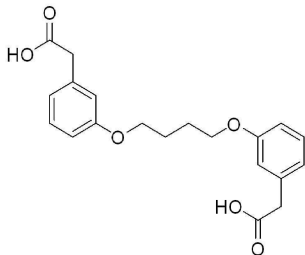
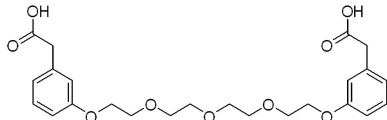
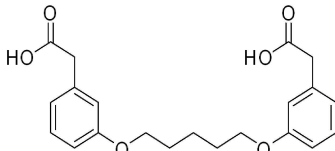
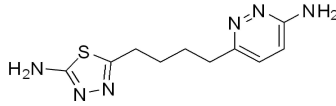
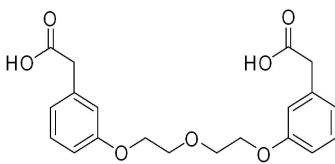
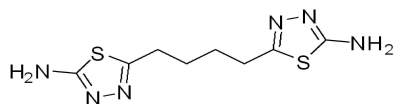
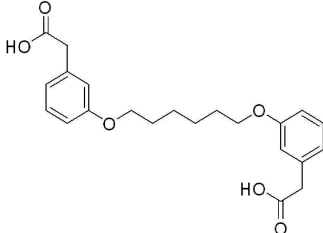
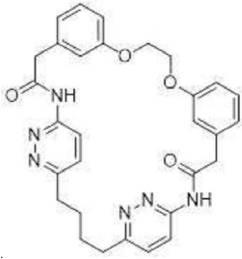
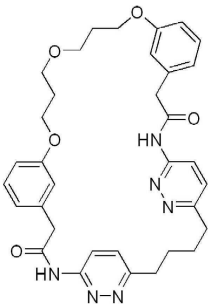
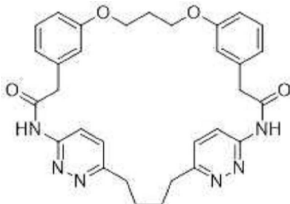
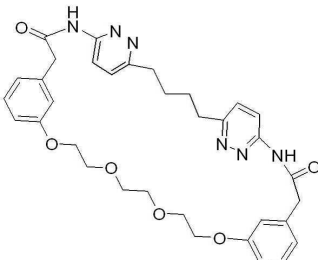
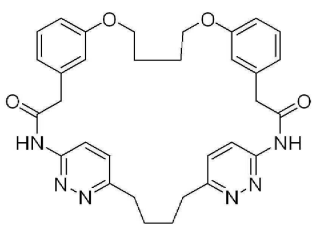
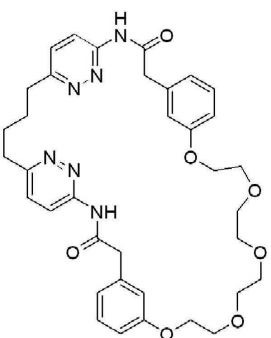
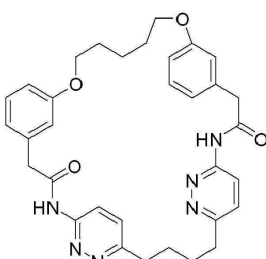
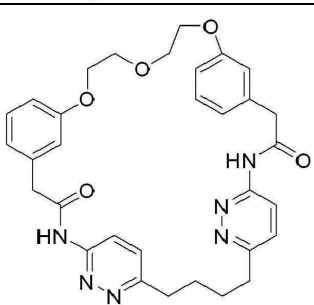
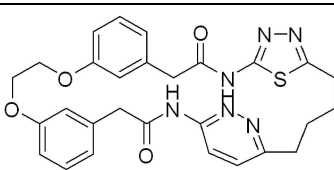
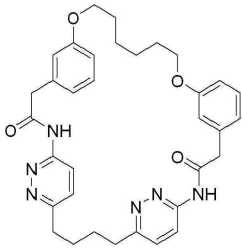
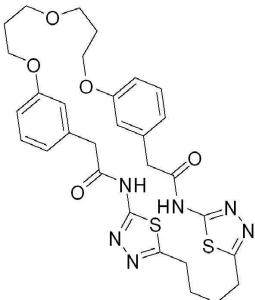
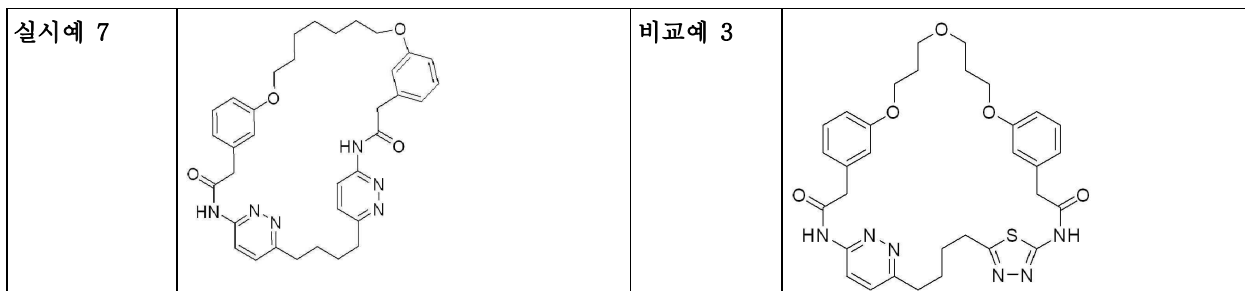
제조예 1		제조예 8	
제조예 2		제조예 9	
제조예 3		제조예 10	
제조예 4		제조예 11	
제조예 5		제조예 12	
제조예 6		제조예 13	
제조예 7			

표 2

[0218]

실시예 1		실시예 8	
실시예 2		실시예 9	
실시예 3		실시예 10	
실시예 4			
실시예 5		비교예 1	
실시예 6		비교예 2	



<실험예 1> 세포 외에서의 글루타미네이즈 억제 활성 분석

세포 외에서의 글루타미네이즈 억제 활성을 확인하기 위하여, 실시예 화합물을 처리하였을 때 글루타미네이즈에 대한 억제 활성 IC_{50} 를 측정하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

글루타미네이즈 활성을 측정하기 위하여 BPS Bioscience사에서 제공하는 GLS1 inhibitor screening assay kit (카탈로그 번호 #79596)를 사용하였다. 먼저 GLS1(신장형 글루타미네이즈) 10 ng 을 포함하고 있는 8 μ L 용액을 384 플레이트 (black, low volume, round bottom) 각각의 well에 분주하였다. 효소 용액에 최종 농도보다 5 배 진하게 준비된 화합물 용액을 2 μ L 추가하고 상온에서 두 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤, L-글루타민, NAD⁺, 커플링 시약(coupling reagent)를 GLS1 완충용액을 사용하여 혼합하고, 이 혼합물 10 μ L 를 각각의 well에 분주하였다. 그 후 추가로 30분동안 상온에서 반응시킨 후 형광값을 측정하여 효소 활성을 확인하였다. 글루타미네이즈 억제 활성 IC_{50} 값은 6가지의 서로 다른 화합물 농도에서 글루타미네이즈의 활성을 각각 측정하고, 그 결과를 GraphPad Prism 으로 분석하여 결정하였다. 그 결과는 하기 표 3와 같다.

표 3

실시예	글루타미네이즈 IC_{50} (μ M)	실시예	글루타미네이즈 IC_{50} (μ M)
CB-839	0.2	7	0.68
1	0.18	8	0.31
2	0.18	9	1
3	0.87	10	2
4	0.78	비교예 1	0.5
5	0.43	비교예 2	1.7
6	0.57	비교예 3	0.8

표 3를 보면, 실시예 1 내지 10의 평균 글루타미네이즈 억제 활성 IC_{50} 은 0.7 μ M이며, 특히 실시예 1, 2 및 8의 경우 0.3 μ M 정도로 낮은 값을 나타낸다.

한편, 본원의 실시예 화합물은 피리다지닐렌이 대칭적으로 결합된 구조적 특성을 가지고 있다. 이와 달리 비교예 화합물들은 티아디아졸릴렌이 1 또는 2 결합된 화합물인데, 비교예 1과 실시예 1을 비교해보면, 실시예 1의 IC_{50} 가 낮은 것을 통해서 피리다지닐렌이 대칭적으로 결합된 실시예 화합물은 글루타미네이즈 억제 활성이 우수한 것을 알 수 있다.

또한, 비교예 2 및 3과 실시예 8의 비교를 통해서도 피리다지닐렌이 대칭적으로 결합된 실시예 화합물의 글루타미네이즈 억제 활성이 우수한 것을 확인할 수 있다.

따라서, 실시예 1 내지 10과 같이 양 쪽에 피리다지닐렌이 결합된 경우, 한 쪽에만 피리다지닐렌이 결합되어 있거나 양 쪽에 티아디아졸릴렌이 결합된 경우에 비하여 글루타미네이즈 억제 활성이 뛰어난 것으로 평가된다.

<실험예 2> 세포독성 실험

본 발명에 따른 화합물의 항암 효과를 확인하기 위하여, ALK-TKI 내성 세포인 LR (Ceritinib (LDK378) resistant) pool 세포주에서 CB-839를 레퍼런스로 하여 농도에 따른 세포 생존성을 통해서 IC_{50} 를 측정하였다.

ALK 저해제인 Ceritinib에 민감성을 보이는 ALK 양성 비소세포폐암인 H3122 세포주에, Ceritinib의 농도를 0.01 μ M에서 1 μ M까지 지속적으로 증가시켰다. 살아남은 H3122 세포주를 1 μ M Ceritinib이 첨가된 배지에서 계

속 배양하여, 획득 내성 비소세포페암 세포주를 구축하였다(이하 H3122-LR pool이라 명명함).

[0230] 시퀀싱 결과, 이 내성 세포주는 글루타미네이즈 억제제의 반응 예측 바이오 마커인 NRF2 증폭을 나타내었다. 이에 화합물의 항암 효과를 테스트하기 위해 적합한 모델로 선정하게 되었다. 실험 방법은 다음과 같다.

[0231] 세포를 96 Well White/Clear Bottom Plate에 seeding 후, 다음날 화합물과 CB-839 레퍼런스를 각각 연속 희석(serial dilution)하여 세포에 처리하였다. 처리 후 72시간 켜에 살아있는 세포에 존재하는 ATP를 측정하여 세포 생존성을 확인하는 CellTiter-Glo 시약을 첨가하여 GloMax® luminometer로 발광을 측정하였다. 약물 처리하지 않은 control 대비 처리한 약물 농도별 세포생존율(% of control)을 계산 후 50% 세포 생존을 나타내는 약물 농도(IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration)를 산출하였다. 그 결과는 하기 표 4와 같다.

표 4

실시예	H3122-LR IC ₅₀ (μM)	실시예	H3122-LR IC ₅₀ (μM)
CB-839	0.055	5	0.53
1	0.21	8	0.065
2	0.21		

[0233] 표 4를 보면, 실시예 화합물의 H3122-LR 세포독성 IC₅₀는 모두 1 μM 이하이며, 특히 실시예 8의 경우 0.1 μM 이하로 항암 효과가 뛰어남을 알 수 있다.

[0234] <실험예 3> 세포 내에서의 글루타미네이즈 억제 활성 분석

[0235] 세포 내에서의 글루타미네이즈 억제 활성을 확인하기 위하여, 실시예 화합물을 세포에 처리한 후 글루타민과 글루타미네이트의 레벨을 비교하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

[0236] 세포를 96 Well White/Clear Bottom Plate에 seeding 후 다음날 화합물과 CB-839 레퍼런스를 각각 0.3 μM 처리하였다. 24시간 배양 후 Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay kit를 이용하여 세포내 글루타민/글루타메이트 레벨을 측정하였다. 이때 배양 배지는 glucose, glutamine, 그리고 pyruvate가 없는 serum-free 배지에 5 mM glucose, 2 mM glutamine, dialyzed FBS 10%를 첨가하여 사용하였다.

[0237] 도 1을 보면, 실시예 화합물 0.3 μM을 처리한 경우 글루타민 농도는 높은 반면, 글루타메이트의 농도가 낮은 것을 확인할 수 있다. 글루타미네이즈에 의해 글루타민이 글루타메이트로 전환되므로, 글루타민의 농도가 글루타메이트의 농도에 비해 현저하게 높은 것을 통해, 본 발명에 따른 화합물은 세포 내로 흡수되어 세포 내에서도 글루타미네이즈 억제 활성이 뛰어남을 알 수 있다.

도면

도면1

