



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년09월27일
(11) 등록번호 10-1068152
(24) 등록일자 2011년09월21일

(51) Int. Cl.

C07D 261/20 (2006.01) C07D 263/54 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0013114

(22) 출원일자 2009년02월17일

심사청구일자 2009년02월17일

(65) 공개번호 10-2010-0093946

(43) 공개일자 2010년08월26일

(56) 선행기술조사문헌

Alper-Hayta S 외 6인. Eur J Med Chem. 2008년 11월, Volume 43, Issue 11, 제2568 내지 제2578면*

W00155139 A1

US7332516 B2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전 유성구 장동 100번지

순천대학교 산학협력단

전라남도 순천시 매곡동 315

(72) 발명자

최상기

경기도 과천시 중앙동 37 주공아파트116-101

이규양

대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 132-605

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수영

전체 청구항 수 : 총 5 항

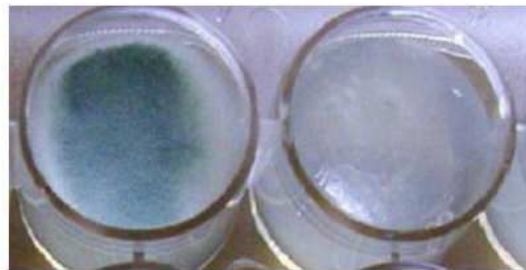
심사관 : 김미화

(54) 항진균 활성을 갖는 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체, 이의제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 병원성 진균류의 단백질 합성을 선택적으로 저해하여 우수한 항진균 활성을 갖는 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체, 이의 제조방법 및 항진균제로서의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(a) 대조군

(b) 실시예 1의 화합물

(72) 발명자

백형록

전라남도 광양시 광양읍 우산리 302-5번지

오재현

전라남도 보성군 벌교읍 벌교리 2-14번지

정상철

전라남도 광양시 옥룡면 죽천리 1055-1번지

김낙정

대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 101-601

채중학

대전광역시 서구 만년동 상아아파트 105-1401

김선우

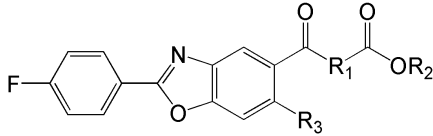
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 118-703

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



(상기 식에서, R₁은 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이고; 및 R₂ 및 R₃는 서로 같거나 다르며 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R₁은 C1~C4의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이고; 및 R₂ 및 R₃는 C1~C4의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기인 것인 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체는 3-[2-(4-플루오로페닐)-6-메틸-벤조옥사졸-5-일]-3-옥소-프로피오닉 엑시드 메틸에스터;

1-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)헥산-1,5-디온 ;

3-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)-3-옥소프로피오닉 엑시드 에틸에스터 ; 또는

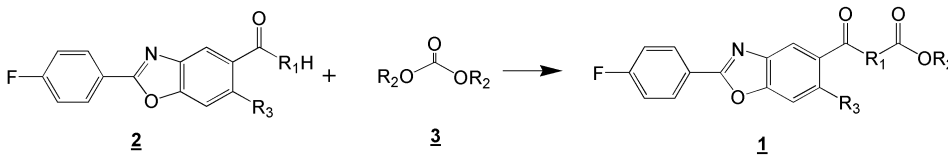
3-(6-에틸-2-(4-플루오로페닐)벤조[d]옥사졸-5-일)-3-옥소프로피오닉 엑시드 메틸 에스터 인 것인 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

하기 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 반응시켜 제1항의 화학식 1의 화합물을 제조하는 방법:

[반응식 1]



(상기 식에서, R₁은 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이고; 및 R₂ 및 R₃는 서로 같거나 다르며 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

청구항 5

제1항의 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체, 이의 제조방법 및 항진균제로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진균류의 세포벽과 세포막 합성효소 저해제에 대한 연구는 오래 전부터 진행되어 왔다. 그러나 발전 속도가 느리고 진균류만을 선택적으로 죽일 수 있는 연구에 대한 전반적인 지식이 불충분하여, 아직까지 진균류에 대하여 선택적으로 약효가 우수한 항진균제의 숫자가 매우 한정되어 있다.

[0003] 이에 생화학적인 방법으로 효소저해제가 발견되었으나, 이들 대부분이 독성이 높고 부작용이 많아 새로운 효소 저해제에 대한 필요성이 오래 전부터 대두되어 왔다. 더욱이 최근에는 AIDS나 장기이식시의 면역억제제 혹은 항암제 등의 장기간 사용에 따른 기회 감염에 의해 내장진균증이 더욱 더 증가하고 있는 추세이다 (T. J. Walsh, *et al.*, *Science*, 264, 371-373, 1994).

[0004] 따라서 이러한 감염증에 대한 대책으로서 조기진단법의 확립과 선택 독성이 뛰어난 화학요법제의 조속한 개발이 시급하며 이와 더불어 칸디다(*Candida*)나 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 등과 같은 다양한 진균류에 대해 화학 요법제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0005] 현재 개발된 항진균제는 작용부위에 따라 크게 3 그룹으로 나눌 수 있다 (Persidis, A., *Nature Biotech.* 17, 1141(1999)). 폴리엔(polyene)은 곰팡이의 세포막의 합성에 필요한 분자에 작용하고 아졸(azole)은 곰팡이의 주요한 스테롤인 에르고스테롤(ergosterol)의 합성을 저해하며, 5-프루오로사이토신(5-fluorocytosine)은 곰팡이의 고분자 합성을 저해한다. 그러나 화합물에 대한 곰팡이의 내성과 부작용이 문제가 되어 왔기 때문에 구조가 유사한 많은 새로운 화합물들이 개발되었다.

[0006] 아쉽게도 여전히 개발된 약에 대한 곰팡이의 저항성이 계속 증가되고 있다 (Cardenas, M.E., *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 583(1999)). 일례로, 곰팡이가 흡수된 특정 약을 배출시키는 현상이 발생한다. 이에 이러한 저항성을 이겨내기 위해서는 여러 유용한 새로운 화합물이 요구되는 가운데, 이러한 새로운 화합물은 기존에 알려진 약의 표적이 아닌 다른 부위에 작용할 뿐만 아니라, 곰팡이에 매우 특이적이고 숙주인 사람, 동물 등에는 부작용이 없어야 한다.

[0007] 원핵세포에서는 단백질 합성과정을 저해하는 항생제들이 이미 많이 밝혀져 있다. 그중 진핵세포에는 이 과정에 작용하는 항진균제가 개발되고 있는 중에 있지만 아직까지 실용화 된 것은 없다.

[0008] Sordarin은 항진균 활성이 있는 것으로 보고되었는데 (Hauser, D., 및 Sigg, H. P., *Helv. Chim. Acta.* 54, 1178(1971)) 최근 그 표적이 번역과정의 인자인 Elongation Factor 2(EF2)로 밝혀졌다 (Justice, M. C., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273, 3148(1998)). EF2는 단백질 합성중기 중 새롭게 합성된 펩티딜 티알라닐리 리보솜 내에서 위치를 바꾸는데 작용한다. 곰팡이는 진핵세포로서 사람과 비슷한 특성을 갖기 때문에 곰팡이에만 특이성을 갖는 항진균제를 찾기가 어렵다.

[0009] 또한 번역인자인 Elongation Factor 3(EF3)은 곰팡이에만 존재하는 필수 불가결한 유전자로서 항진균제의 좋은 표적이다. 이러한 EF3은 리보솜에 의존적인 에이티피아제(ATPase)활성을 갖고 있지만(Sandbaken, M.G., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265, 15838(1990)), 아직 기능이 완전히 밝혀져 있지 않기 때문에 인 비트로(*in vitro*)에서 스크리닝 방법을 만들기가 어렵다.

[0010] 항진균성 물질을 스크리닝하는 데는 크게 두 가지 방법이 있다. 그중 하나는 전통적인 방법으로 세포성장을 저해하는 물질을 찾는 것이고, 다른 방법은 특정한 표적 단백질의 기능을 억제하는 물질을 생화학적 반응시스템을 이용하여 찾는 것이다.

[0011] 현재 곰팡이에 특이적으로 존재하는 많은 표적 단백질들이 발굴되고 있으며 이들의 기능 또한 계속해서 확인되고 있는 중이다. 이에 상기 후자의 스크리닝 방법의 경우 정확하게 표적의 기능이 밝혀지지 않으면 스크리닝이 잘 되지 않는 단점이 있다. 즉, 그 표적 단백질이 세포 내에서 유일하게 존재하지 않는 대사과정 중에 있는 경우로서 항진균제의 개발을 위한 표적으로 적합하지 않다.

[0012] 이에 본 발명자들은 새로운 항진균제를 개발하기 위해 다각적으로 노력한 결과, 새로운 벤조옥사졸 화합물을 합성하였고, 상기 합성된 벤조옥사졸 화합물이 단백질 합성을 저해하여 곰팡이의 성장을 억제시키는 것을 확인하

여 항진균제로서 적합함을 파악하였다.

발명의 내용

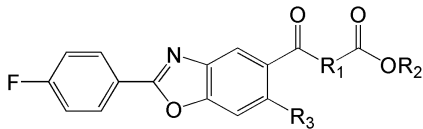
해결 하고자하는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 병원성 진균류의 단백질 합성을 선택적으로 저해하는 신규한 화합물, 이의 제조방법 및 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[0015] [화학식 1]



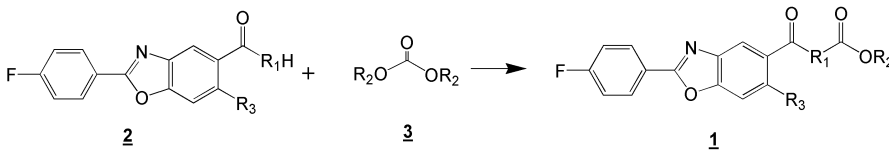
[0016] [0017] (상기 식에서, R₁은 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이고; 및 R₂ 및 R₃는 서로 같거나 다르며 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

[0018] 또한 본 발명은

[0019] 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0020] 하기 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 반응시켜 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공한다:

[0021] [반응식 1]



[0022] [0023] (상기 식에서, R₁, R₂, 및 R₃는 전술한 바를 따른다)

[0024] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물을 제공한다.

효과

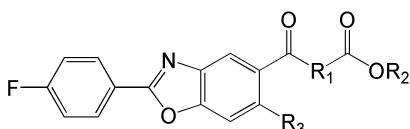
[0025] 본 발명에 따른 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체는 병원성 진균류의 단백질 합성을 선택적으로 저해하여 우수한 항진균 활성을 가져 각종 항진균제로서 바람직하게 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0026] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다:

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] (상기 식에서, R₁은 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이고; 및 R₂ 및 R₃는 서로 같거나 다르며 C1~C6의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

[0031] 바람직하기로, R₁은 C1~C4의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이고; 및 R₂ 및 R₃는 C1~C4의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다.

[0032] 더욱 바람직하기로, 상기 R₁은 메틸기 또는 에틸기이고, R₂ 및 R₃는 메틸기 또는 에틸기이다.

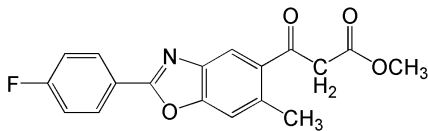
[0033] 더더욱 바람직하기로, 화학식 1의 벤조옥사졸 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 3-[2-(4-플루오르페닐)-6-메틸-벤조[d]옥사졸-5-일]-3-옥소-프로피오닉 에시드 메틸에스터 (3-(2-(4-fluorophenyl)-6-methylbenzo[d]oxazol-5-yl)-3-oxopropanionic acid methylester);

[0034] 화학식 5로 표시되는 1-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)헥산-1,5-디온 (1-(2-(4-fluorophenyl)-6-methylbenzo[d]oxazol-5-yl)hexane-1,5-dione);

[0035] 화학식 6으로 표시되는 3-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)-3-옥소프로피오닉 에시드 에틸에스터 (3-(2-(4-fluorophenyl)-6-methylbenzo[d]oxazol-5-yl)-3-oxopropanionic acid ethylester): 및

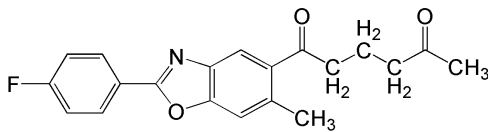
[0036] 화학식 7로 표시되는 3-(6-에틸-2-(4-플루오로페닐)벤조[d]옥사졸-5-일)-3-옥소프로피오닉 에시드 메틸 에스터 (3-(6-ethyl-2-(4-fluorophenyl)benzo[d]oxazol-5-yl)-3-oxopropanionic acid methylester)이다:

[0037] [화학식 4]



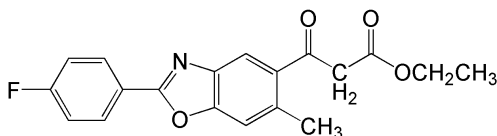
[0038]

[0039] [화학식 5]



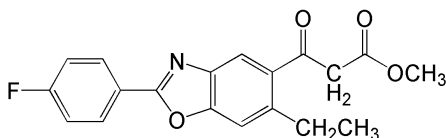
[0040]

[0041] [화학식 6]



[0042]

[0043] [화학식 7]



[0044]

[0045] 가장 바람직하기로 본 발명에 따른 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체는 화학식 4로 표시되는 3-[2-(4-플루오르페닐)-6-메틸-벤조[d]옥사졸-5-일]-3-옥소-프로피오닉 에시드 메틸에스터다.

[0046] 상기 화학식 1로 표시되는 본 발명의 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 이때 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다.

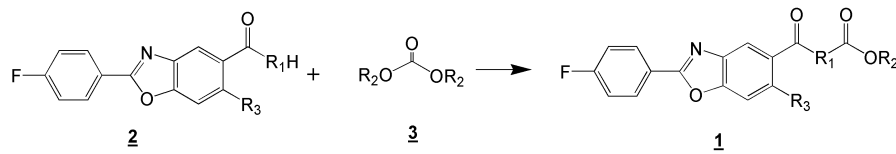
[0047] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탈설포산, 아세트산, 글리콜산, 석신

산, 타타르산, 4-톨루엔설포산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탄설포산 또는 염산을 사용할 수 있다.

[0048] 이때 상기 부가염은 통상의 방법, 즉, 화학식 1의 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 당량 또는 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전 시키거나 결정화시켜서 제조하거나, 또는 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조하거나 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 벤조옥사졸 화합물은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이, 하기 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 반응시켜 제조된다:

[0050] [반응식 1]



[0051]

[0052] (상기 식에서, R₁, R₂, 및 R₃는 전술한 바를 따른다)

[0053] 이때 아실화 반응은 반응 용매 하에 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 디알킬카보네이트(R₂OC(=O)OR₂)를 첨가하여 한다.

[0054] 일례로, 디메틸카보네이트(1내지 3당량)와 염기(2내지 5당량)를 사용하여 적당한 용매에서 반응시켜 제조할 수 있다. 여기서 염기로는 소듐하이드라이드(NaH), NaOMe, NaOEt, NaOH, 피롤리딘, 피페리딘 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종이 가능하다.

[0055] 상기 용매 또한 본 발명에서 특별히 한정하지 않으며, 상기 반응에 통상적으로 사용되는 테트라하이드로퓨란(THF), 디메틸포름아마이드(DMF), 에탄올, 메탄올, 벤젠, 톨루엔 또는 이들의 혼합 용매가 가능하다.

[0056] 이러한 반응은 상온에서 용매의 비등점 범위 내에서 이루어지며 1 내지 24시간 동안 수행한다.

[0057] 상기 화학식 2의 화합물은 시판되는 것을 구입하거나 직접 제조하여 사용이 가능하다. 이러한 화학식 2의 화합물의 제조는 헤테로방향족 고리계를 제조하는 방법이 당업계에 널리 공지되어 있다. 특히, 합성 방법은 문헌 [Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Vol. 1 (Eds.: ARKatritzky, CW Rees), Pergamon Press, Oxford, 1984 and Comprehensive Heterocyclic Chemistry II: A Review of the Literature 1982-1995 The Structure, Reactions, Synthesis, and Uses of Heterocyclic Compounds, Alan R. Katritzky (Editor), Charles W. Rees (Editor), E.F.V. Scriven (Editor), Pergamon Pr, June 1996]에서 논의된다. 중요한 화합물의 합성을 돕는 다른 일반적인 방법으로는 문헌 [March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Wiley-Interscience; 5th edition (January 15, 2001)]을 들 수 있다. 국제특허 WO 2007/091106호; 대한민국 특허 2009-010025호; Tetrahedron Letters, 49(29-30), 4466, 2008에서 논의된 합성 방법이 특히 적합하다.

[0058] 일례로, 하기 반응식 2에 나타낸 바와 같이, 화학식 2의 화합물은

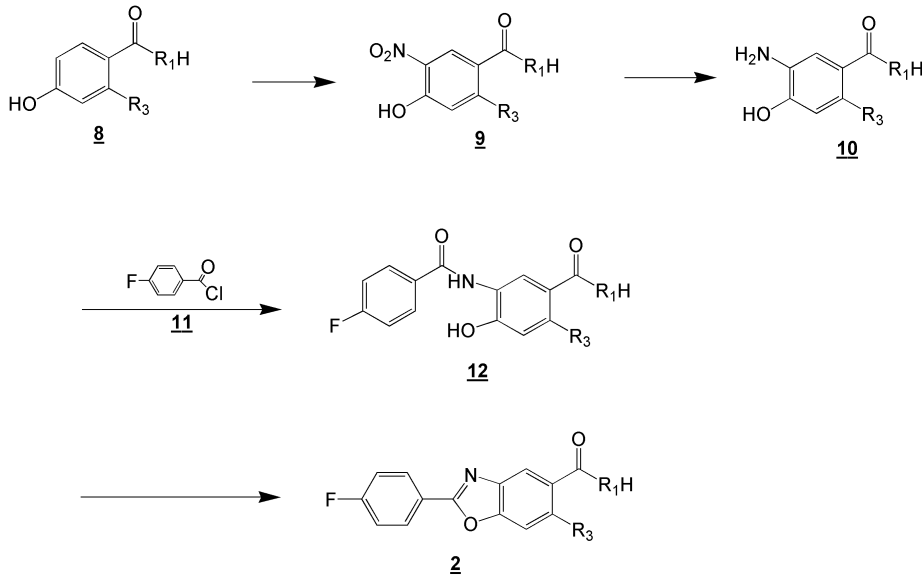
[0059] 하기 화학식 8의 화합물을 니트로화 반응하여 화학식 9의 니트로 화합물을 제조하고(단계 1);

[0060] 상기 화학식 9의 니트로 화합물을 환원시켜 화학식 10의 하이드록시 아민 화합물을 제조하고(단계 2);

[0061] 상기 화학식 10의 하이드록시 아민 화합물과 화학식 11의 화합물과의 아실화 반응을 통해 화학식 12의 아마이드 화합물을 제조하고(단계 3); 및

[0062] 상기 화학식 12의 화합물을 고리화 반응(단계 4)을 통해 제조된다:

[0063] [반응식 2]



[0064]

[0065] (상기 식에서, R₁, R₂, 및 R₃는 전술한 바를 따른다)

[0066] 이하 화학식 2의 제조방법을 각 단계별로 설명한다.

[0067] 먼저, 출발 원료인 화학식 8의 화합물을 니트로화 반응하여 화학식 9의 니트로 화합물로 제조한다(단계 1).

[0068] 상기 출발 원료는 직접 제조하거나 시판되는 것을 구입하여 사용한다.

[0069] 이때 니트로화 반응은 화학식 8의 화합물과 HNO₃, NaNO₃, NH₄NO₃ 등을 당량 또는 과량 사용하여 반응시켜 수행하며, 적절한 용매 하에 0℃ 내지 25℃에서 반응시켜 수행한다.

[0070] 상기 용매로는 황산, 아세트산, 무수초산, CH₃Cl₃, CHCl₃ 또는 이들의 혼합 용매가 가능하다.

[0071] 다음으로, 화학식 9의 니트로 화합물을 환원시켜 화학식 10의 하이드록시 아민 화합물을 제조한다(단계 2).

[0072] 구체적으로, 용매 내에서 화학식 9의 니트로 화합물을 팔라듐(활성탄 흡착) 촉매 존재 하에 1시간 내지 5시간 동안 25℃ 내지 용매의 비등점 내에서 수소화 반응시켜 제조한다.

[0073] 본 환원반응은 이러한 수소화 반응 외에 화학식 4의 화합물을 철(분말) 3 내지 10 당량, 염산 0.5 당량, 또는 주석(SnCl₂·2H₂O) 2당량으로 처리하여 수행이 가능하다. 구체적인 방법은 당업자에 의해 적절히 선정이 가능하다.

[0074] 상기 용매로는 에탄올, 메탄올, CH₂Cl₂, 또는 이들의 혼합 용매가 가능하다.

[0075] 다음으로, 화학식 10의 하이드록시 아민 화합물과 화학식 11의 화합물과의 아실화 반응을 통해 화학식 12의 아마이드 화합물을 제조한다(단계 3).

[0076] 상기 아실화 반응은 용매 내에서 화학식 10 및 9의 화합물을 염기 존재 하에 0℃ 내지 25℃의 온도 범위 내에서 반응시켜 수행한다.

[0077] 이때 염기로는 공지된 바의 피리딘, 트리에틸아민, K₂CO₃등을 1내지 3당량 사용할 수 있고, 또한 용매로는 CH₂Cl₂, 테트라하이드로퓨란, DMF, 또는 이들의 혼합 용매가 가능하다.

[0078] 다음으로, 화학식 12의 아마이드 화합물을 고리화 반응을 통해 화학식 2의 화합물을 제조한다(단계 4).

- [0079] 상기 고리화 반응은 용매 존재 하에 화학식 12의 아미드 화합물에 산을 첨가하여 25°C 내지 용매의 비등점 내에서 수행할 수 있다.
- [0080] 이때 산으로는 p-톨루엔 설펡산, 염산, 황산, 폴리포스포릭 엑시드(PPA) 또는 POCl₃등을 0.3내지 3당량이 가능하며, 용매로는 톨루엔, 벤젠, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매가 가능하다.
- [0081] 각 단계의 구체적인 반응 조건은 이 분야의 기술자에 의해 한정될 수 있으며, 본 발명에서 특별히 제한하지는 않는다.
- [0082] 전술한 바의 본 발명에 따른 플루오로페닐 옥사졸 유도체는 병원성 진균류의 단백질 합성을 저해하여 항진균제, 즉 항진균제 조성물로 적용이 가능하다.
- [0083] 본 발명의 바람직한 실험예 1에 따르면, 단백질 합성 저해제로서의 활성 테스트를 수행한 결과 병원성 진균류의 단백질 합성 저해 활성을 크게 저하시킴을 알 수 있다.
- [0084] 또한 생체의외(in vitro) 단백질 합성 활성 측정 결과, 화학식 1의 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체는 진균의 단백질 합성을 억제함을 알 수 있다.
- [0085] 바람직한 실험예 2 및 3에 따르면, 화학식 1의 옥사졸 유도체의 단세포 곰팡이 및 사상성 병원성 곰팡이 성장에 대한 저해활성에 대한 실험을 수행한 결과, IC₅₀이 약 10 μg/ml로서 우수하여 여러 가지 병원성 진균류에 대하여 우수한 항균활성을 나타냄을 확인하였다.
- [0086] 이러한 병원성 진균류는 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 캔디다 알비칸(*Candida albicans*), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대하여, 낮은 농도에서 우수한 항균 활성을 나타내며 생체 내(in vivo) 효과도 탁월하다.
- [0087] 전술한 바의 항진균제 조성물은 화학식 1의 옥사졸 유도체에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0089] 본 발명에 의한 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하고 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용할 수 있으며, 제제화 할 경우에는 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다.
- [0090] 경구투여를 위한 고형제제는 본 발명에 의한 하나 이상의 이미다졸 유도체에 적어도 하나의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 혼합하여 제조할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등의 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 포함되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0091] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 상기 비수성용제 또는 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있으며, 상기 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0092] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하

거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 또한 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

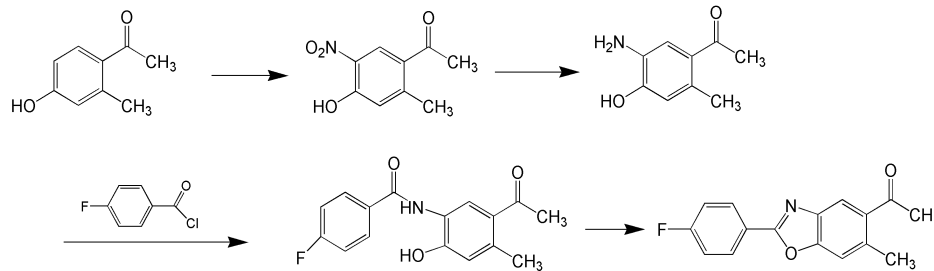
[0093] 본 발명의 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체를 마우스에 경구 투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 플루오로페닐 벤조옥사졸 유도체의 50% 치사량(LD₅₀)은 적어도 1g/kg 이상인 것으로 나타나 안전한 물질로 판단된다.

[0094] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0095] <실시예 1> 2,2-디브로모-1-(2-(4-플루오로페닐)벤조[d]벤조옥사졸-5-일)에탄논의 제조

[0096] 하기 반응식 3의 순서대로, 공지된 방법(국제특허 WO 2007/091106호; 대한민국특허 2009-010025호; Tetrahedron Letters, 49(29-30), 4466, 2008)으로 1-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)에탄논을 제조하였다.

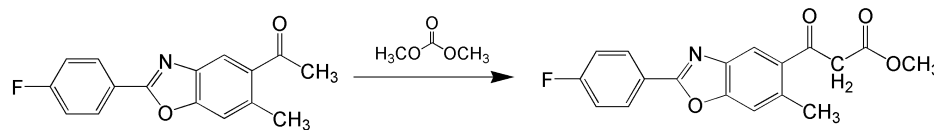
[0097] [반응식 3]



[0098] ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ 2.66(s, 3H), 2.67(s, 3H), 7.20-7.26(m, 2H), 7.43(s, 1H), 8.13(s, 1H), 8.22-8.27(m, 2H); MS(m/e, M⁺): 587

[0100] 상기 제조한 1-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)에탄논을 하기 반응식 4를 통해 반응하여 3-[2-(4-플루오로페닐)-6-메틸-벤조옥사졸-5-일]-3-옥소-프로피오닉 엑시드 메틸에스터를 제조하였다.

[0101] [반응식 4]



[0102] 1-[2-(4-플루오로페닐)-6-메틸-벤조옥사졸-5-일]-에탄논 3.0g(11.15 mmol)을 건조한 테트라하이드로퓨란(THF) 30ml에 용해시키고 다이메틸 카보네이트 1.4 ml (16.72 mmol)과 NaH(60% in oil) 1.4g(33.4 mmol)을 천천히 첨가시킨 후, 3시간 동안 환류 가열하였다. 반응 완료 후 반응용액을 상온으로 냉각시키고 물을 천천히 첨가하여 반응을 종결하였다. 이어서 물(50ml)로 희석하고 에틸아세테이트로 추출(70ml x 2)한 후, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조, 여과한 다음 용매를 감압 하에 증발, 농축시켰다. 여기서 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(n-헥산/에틸아세테이트 = 4/1)로 정제하여 흰색고체 상태의 2.85 g(수율 78%)의 목적화합물을 얻었다.

[0103] ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃): δ 2.69(s, 3H), 3.77(s, 3H), 4.06(s, 2H), 7.20-7.25(m, 2H), 7.47(s, 1H), 8.09(s, 1H), 8.21-8.27(m, 2H);

[0104] MS(m/e, M⁺); 327(M⁺);

- [0106] $R_f = 0.4$ (n-헥산/에틸아세테이트= 3/1)
- [0107] <실시에 2> 1-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)헥산-1,5-디온의 제조
- [0108] 출발물질로 반응식 3의 1-(4-하이드록시페닐)에타논 대신 1-(4-하이드록시페닐)부탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 표제 화합물을 제조하였다. Ms 339(M+).
- [0109] <실시에 3> 3-(2-(4-플루오로페닐)-6-메틸벤조[d]옥사졸-5-일)-3-옥소프로피오닉 엑시드 에틸에스터의 제조
- [0110] 출발물질로 반응식 4의 디메틸카보네이트 대신 디에틸카보네이트를 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 표제 화합물을 제조하였다. Ms 341(M+).
- [0111] <실시에 4> 3-(6-에틸-2-(4-플루오로페닐)벤조[d]옥사졸-5-일)-3-옥소프로피오닉 엑시드 메틸 에스터의 제조
- [0112] 출발물질로 반응식 3의 1-(4-하이드록시페닐)에타논 대신 1-(2-에틸-4-하이드록시페닐)에타논을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 표제 화합물을 제조하였다. Ms 341(M+).
- [0113] 실시예 1에서 제조된 2-(4-플루오로페닐)-7,8-다이하이드로-6H-나프토[2,3-d]벤조옥사졸-5(6H)-온에 대하여 하기와 같은 실험을 실시하고 여러 가지 약리효과에 대해 평가하였다.
- [0114] <실험예 1> 단백질 합성 저해 분석
- [0115] (1) 생화학적인 단백질 합성
- [0116] 효모균주를 YpD 액체배지 (bacto-peptone 20g, bacto-yeast extract 10g, 2% dextrose/ℓ) 3ml에 접종하여 30℃에서 200rpm으로 전 배양하였다. 본 배양시 흡광도 600nm에서 1.0~2.0 사이가 될 때의 세포를 회수하였다 (4℃, 3,000rpm, 5분). 수확한 균체를 8.5% 만니톨이 첨가된 HB 완충용액 (30mM HEPES, pH 7.4, 100mM KOAc, 2mM MgOAc, 2mM 디티오프레이트) 15ml에 현탁한 다음 원심분리 (4℃, 3,000rpm, 5분)하였다. 동일한 완충용액 10ml를 넣고 현탁하여 원심분리 (4℃, 3,000rpm, 5분) 후, 같은 방법으로 세 번 더 세척하였다. 마지막으로 동일한 완충 용액 10ml에 현탁한 후, 원심분리 (4℃, 4,000rpm, 5분)하였다. 0.5mM PMSF가 첨가된 HB 완충용액 (30mM HEPES, pH 7.4, 100mM KOAc, 2mM MgOAc, 2mM 디티오프레이트, 8.5% 만니톨)을 수확한 균체 무게의 1.5배를 넣고, 산으로 이미 세척된 지름이 0.45mm 크기의 글라스 비드를 균체 무게의 6배가 되도록 넣은 후, 50ml 팔콘 튜브로 옮겼다. 이어 4℃ 냉장실에서 초당 2회로 팔을 굽혔다 펴는 과정을 1분간 하고, 튜브를 얼음에 1분간 방치하며 이 과정을 6차례 반복하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄액을 50ml 원심 분리기 튜브로 옮겨 원심분리 (4℃, 18,000rpm, 6분)하여 상등액을 취하였다. 0.5mM PMSF가 첨가된 HB 완충용액 (30mM HEPES, pH 7.4, 100mM KOAc, 2mM MgOAc, 2mM 디티오프레이트, 8.5% Mannitol)로 이미 포화된 겔 여과 칼럼(gel filtration column)에 상등액을 올려놓은 후 같은 완충용액으로 흘려보냈다. 이때 260nm에서 0.D가 100인 분획들을 모아 실험에 사용하였으며, 이를 단백질 합성 추출액이라 칭한다. -80℃ 동결 건조기(deep freezer)에 보관하면서 기내 번역(*in vitro translation*)시 사용하였다.
- [0117] 5'에 capping되고 3'에 poly(A)를 갖는 루시퍼레이즈 mRNA는 T7 프로모터 하에서 제조되었다. AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kits (EPICENTRE)를 이용하였으며 실험 방법은 다음과 같다.
- [0118] 실온에서 20μl의 반응액 (x μl RNase-Free water, 1μg DNA, 2μl 10X AmpliScribe T7 Reaction 완충용액, 1.5μl 100mM ATP, 1.5μl 100mM CTP, 1.5μl 100mM GTP, 1.5μl 100mM UTP, 2μl 100mM DTT, 2μl AmpliScribe T7 Enzyme Solution)을 제조하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응액을 RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells (QIAGEN)의 방법을 약간 수정하여 루시퍼레이즈 mRNA를 제조하였다. 반응액 20μl에 330μl의 재현탁액을 넣고 섞은 후 1 부피(350μl)의 70% EtOH를 넣고 잘 섞은 다음 2ml 수집용 튜브로 옮긴다. 원심분리 (12,000rpm, 1분)후 700μl의 세척 용액을 RNeasy 칼럼에 분주하고 원심분리 (12,000rpm, 1분)하였다. 이어 RNeasy 칼럼을 새로운 튜브로 옮긴 후 세척 용액에 EtOH가 80%첨가된 완충용액을 500μl 넣고 원심분리

(12,000rpm, 1분)하였다. 다시 한 번 원심분리 (12,000rpm, 2분) 후 새로운 1.5ml 수집용 튜브로 RNeasy 칼럼을 옮기고, 30-50 μ l의 RNase-free water를 칼럼에 분주하고 1분 후 원심분리 (12,000rpm, 2분)하였다. 제조된 루시퍼레이스 mRNA를 흡광도 260nm에서 정량 후 기내 번역(*in vitro translation*)에 이용하였다.

[0119] 단백질 합성 각테일(cocktail)은 단백질 합성 반응액에 다음과 같은 최종농도가 되도록 제조하였다: 22mM HEPES 완충용액, pH 7.4, 120mM KAc, 2mM MgOAc, 0.75mM ATP, 25mM 크레아틴 포스페이트, 0.04mM 20종류의 전체 아미노산, 1.7mM 디티오프레이톨, 0.1mM GTP, 0.1단위 크레아틴 포스포키나제, 0.007 μ l/ μ l RNA 억제제 (Promega, USA).

[0120] 단백질 합성은 25 $^{\circ}$ C에서 수행하였으며 위의 각테일 존재 하에서 루시퍼레이스를 효율적으로 합성하는 조건을 확립하였다. 특정시료 (한약재, 미생물 배양 상층액 등)가 단백질 합성 저해능력이 있는지를 단백질 합성 각테일 10 μ l에 인광반응기질 100 μ l를 넣고 인광측정기 (BioOrbit 1250 luminometer)로 측정하여 알아보았다.

[0121] 단백질 합성은 25 $^{\circ}$ C에서 행하였으며 각테일 존재 하에서 리포터(reporter) 단백질인 루시퍼레이스를 비교적 효율적으로 합성하는 조건을 확립하였다.

[0122] (2) *in vitro* 단백질 합성 억제 활성

[0123] 단백질 활성 테스트 시 반응액 6 μ l (depc H2O 2.15 μ l, 6배 번역 완충용액 A 1.25 μ l, B 1.25 μ l, RNase 억제제 0.1 μ l, CPK 1.0 μ l, 루시퍼레이스 RNA 0.25 μ l)에 효모에서 추출한 단백질 추출물 7.5 μ l를 섞고, 화학식 1의 화합물을 1.5 μ l를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 40분간 반응시켰다. 이때 화학식 1의 화합물은 DMSO에 각 농도별로 녹인 후 사용하였다.

[0124] 이렇게 반응시킨 반응물 10 μ l와 루시퍼레이스 분석 기관 100 μ l를 잘 섞은 후, 단백질 활성을 측정하였다.

[0125] 도 1은 실시예 1의 화합물의 단백질 합성 억제 활성을 보여주는 그래프이다. 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물은 3.4nM 내지 0.34 μ M 사이에서 단백질 합성을 저해하는 활성이 있음을 알 수 있다.

[0126] <실험예 2> 단세포 곰팡이성장의 저해활성검색

[0127] 0.165 M MOPS (morpholinepropanesulfonic acid) 완충용액을 이용하여 pH7.0으로 적정한 RPMI1640배지를 사용하여 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*)를 하루 성장시킨 배양액을 0.5 x 10⁴ 내지 2.5 x 10⁵ /ml의 최종농도로 접종하였다.

[0128] 여기에 실시예 1의 화합물을 0.03 내지 64 μ g/ml의 농도로 각각 첨가한 후, 30 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 배양시킨 후 억제 활성을 측정하였다. 이때 대조군으로는 실시예 1의 화합물을 사용하지 않은 것을 사용하였다.

[0129] 도 2는 실시예 1의 화합물의 6.25 μ g/ml의 농도로 사용한 경우 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*)의 성장 억제 활성을 나타내는 그래프이다. 도 4를 참조하면, 실시예 1의 화합물이 대조군에 비해 곰팡이의 성장을 효과적으로 저해함을 알 수 있다.

[0130] <실험예 3> 사상성 병원성 곰팡이성장의 저해활성검색

[0131] 사상성 병원성 균주 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)는 감자 텍스트로즈 아가 배지(감자전분 0.4%, 텍스트로스 20%, 아가 15%)에 5일 동안 배양한 후 0.1% Tween 20가 포함된 증류수용액을 프레이트에 부어 루프를 이용하여 포자를 수확하였다. 수확한 포자를 vortex하여 균질하게 한 후에 포자균액을 접종원으로 하여 최종농도가 10⁵ CFU/ml이 되게 조절하여 피검균 접종 균액으로 사용하였다. 감자 텍스트로즈 아가 배지에 화합물을 균질하게 혼합되도록 한 후에 수확한 포자를 접종하였다. 이 배지에서 25 $^{\circ}$ C로 5일 동안 충분히 배양하여 화합물이 포함되지 않은 대조군과 비교하여 화합물이 곰팡이 성장을 저해하는지 여부를 결정하였다.

[0132] 실시예 1에서 제조된 화합물은 멸균된 증류수를 이용하여 2배 희석 계열을 만든 후, 멸균하여 50 $^{\circ}$ C로 유지시킨 감자 텍스트로즈 아가 배지와 9 : 1의 비율로 혼합하여 최종 농도가 0.1 및 100 μ M이 되도록 평판에 분주하였다. 배지가 고형화되면 위에서 제조한 피검균들의 접종 균액이나 아가 블록을 각 평판마다 일정량씩 접종하여 25 내지 30 $^{\circ}$ C에서 5일 동안 배양한 후 육안으로 관찰하여 균의 생육이 억제된 농도를 최소생육저지농도(MIC)로 정하였다.

[0133] 그 결과, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물의 성장이 저해되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 MIC가 60 µg/ml임을 알 수 있다.

[0134] 도 3은 대조군(blank)과 실시예 1의 화합물의 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대한 저해 활성을 보여주는 사진으로, 대조군에 비해 실시예 1의 화합물의 곰팡이 성장 저해 활성이 우수함을 알 수 있다.

[0135] <실험예 4> 마우스에 대한 경구투여 급성독성 실험

[0136] 본 발명에 의한 화합물의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0137] 상기 실시예 1에서 제조된 화합물 200mg을 1%의 히드록시프로필메틸셀룰로스 배산체를 조제하여 5주령의 웅성 ICR계 마우스(20g± 2g) 5마리에 1g/10ml/kg으로 경구투여하고, 2주간 사망율, 체중, 임상증상 등을 관찰하여 최소치사량(MLD, mg/kg)을 조사하였다.

[0138] 그 결과 경구투여 최소치사량이(LD₅₀) 1g/kg 이상으로 안전한 물질로 판단되었다.

산업이용 가능성

[0139] 본 발명에 따른 플루오로페닐 옥사졸 유도체는 항진균제로 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

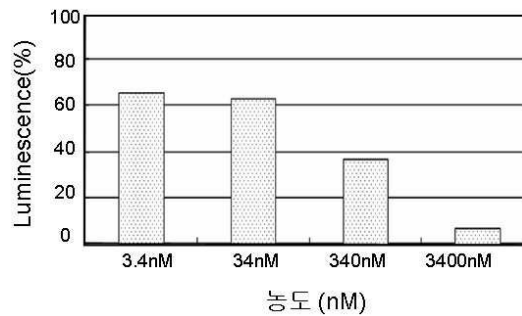
[0140] 도 1은 실시예 1의 화합물의 단백질 합성 억제 활성을 보여주는 그래프이다.

[0141] 도 2는 실시예 1의 화합물의 6.25 µg/ml의 농도로 사용한 경우 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)의 성장 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

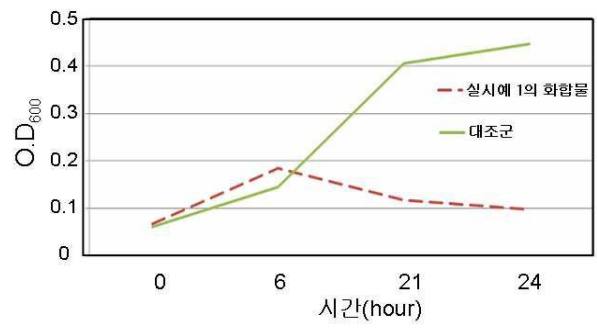
[0142] 도 3은 대조군(blank)과 실시예 1의 화합물의 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대한 저해 활성을 보여주는 사진이다.

도면

도면1



도면2



도면3

