

660.63
7373h
1998

GOVP 19904154

1998 년도
최종 보고서

분자수준화학의 응용기술 개발사업

Studies on Molecular Level Chemistry

Heterocyclic 화합물의 약리·활성 탐색 연구

- Synthetic studies on pharmacologically active heterocyclic compounds -

연구기관

한국화학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀하

본 보고서를 “분자수준화학의 응용기술 개발사업” 과제 (세부
과제명: Heterocyclic 화합물의 약리·활성 탐색 연구)의 보고서
로 제출합니다.

1999. 1

연 구 기 관 : 한국화학연구소
총괄연구 책임자 : 최 길 영
세부연구 책임자 : 박 노 상
책임 연구원 : 정 명 희, 성 철 민
선임 연구원 : 박 준 규, 정 영 식
이 종 철, 최 진 일
이 창 우
연 구 원 : 이 광 속, 조 귀 응
오 정 속, 구 은 회

요 약 문

I. 제 목

Heterocyclic 화합물의 약리·활성 탐색 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

여러 유형의 heterocyclic compound들로부터 신약탐색 연구 개발

III. 연구개발의 내용 및 범위

- Heterocyclic 화합물의 합성
- Biheterocyclic 화합물의 합성
- Heterocyclic 화합물의 활성연구

IV. 연구개발결과

- muscarinic M_1 agonist 효과를 갖는 arecoline 유도체의 합성
- CNS에 작용하는 quinoline 유도체의 합성

V. 연구개발결과의 활용계획

여러 유형의 heterocyclic 화합물을 합성하여 그들의 생리 활성과 약효의 상관관계를 연구하여 신약 탐색 도출을 유도한다.

SUMMARY

I. Title

Synthetic Studies on Pharmacologically Active Heterocyclic Compounds

II. Justification and Purpose of the Project

Synthetic studies on new heterocyclic compounds are essential for generation of new pharmaceuticals

III. Scope and Contents of the Research

- Synthesis of heterocyclic compounds
- Synthesis of biheterocyclic compounds
- Biological research of heterocyclic compounds

IV. Result of the Research

- New monoheterocyclic compounds, arecoline derivatives, having muscarinic M₁ agonist effect have synthesized
- New biheterocyclic compounds, quinoline derivatives, acting CNS antibacterial activities have synthesized

V. Future Plan Based on the Result

Through the efficacy tests and pharmacological research, new drug candidates for various diseases can be as leading compounds from those synthetic heterocyclic compounds.

CONTENTS

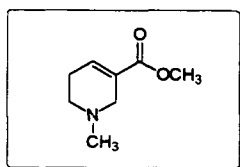
I. Introduction.....	7
II. State of the Development.....	12
III. Contents and Result of the Research.....	16
IV. Achivement and Contribution of Research Purpose.....	38
V. Future Plan Based on the Result.....	39
VI. References.....	40

목 차

제 1 장	서론.....	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	16
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도.....	38
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	39
제 6 장	참고문헌.....	40

제 1 장 서 론

본 연구에서는 heterocyclic compound를 대상으로 생리 활성 효과가 있는 화합물을 중점으로 합성하는 연구를 수행하고자 하였다. 그 예로 neurotransmitter인 acetylcholine의 화학 구조를 중심으로 연구가 활발히 진행중인 muscarinic agonist들 중 천연물인 빈낭자의 열매에서 추출한 arecoline은 구조가 아주 간단한 천연 alkaloid로써 그의 생리 활성효과는 노인성 치매, 즉 alzheimer 환자에게 임상적으로 적용했던 약물이다. arecoline은 다음과 같은 구조를 갖는다.¹⁾

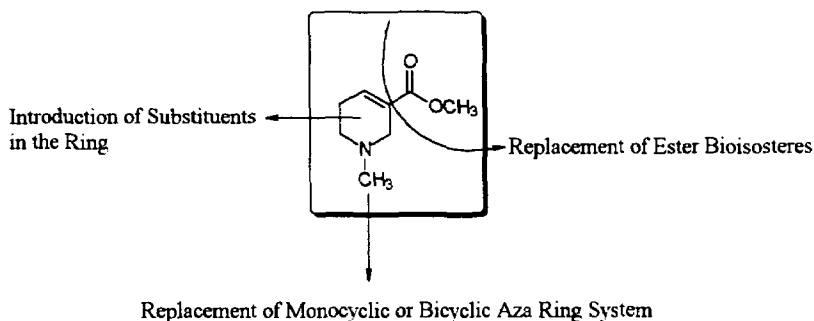


Arecoline

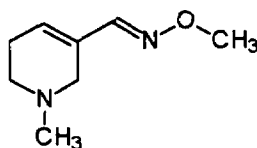
위의 구조에서 보듯이 3-위치의 methyl ester기가 체내에서 hydrolysis를 일으킬 수 있어서 metabolic stability의 문제점을 야기한다. 역시 그리하여 이 화합물은 임상에서의 low efficacy와 muscarinic subtype selectivity의 결손으로 문제점이 되어오고 있다.

본 연구에서는 이들의 보완을 목적으로 그와 유사한 화합물들을 합성하여 chemical neurotransmitter 작용중 cholinergic transmission으로서의 cholinergics와 cholinomimetics 효과를 갖는 생리 활성물질을 합성하고자 하였다. 우선 이를 위하여 arecoline 유도체의 modification을 다음과 같이 생각할 수 있으며 ester group의 bioisoster로의 치환, ring 내의 여러 치환체의 도입, monocyclic 혹은 bicyclic ring system 도입 등을 생각할 수 있다.²⁾

Modifications of Arecoline Derivatives

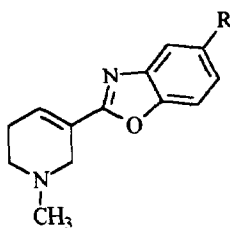


그 중 다음의 milameline(CI 979)은 Parke-Davis사와 Roussel Uclaf의 개발 중의 muscarinic M₁ agonist로써 ester bioisoster의 대표적인 약물이다. methyl ester 대신에 methoxyimine group을 치환한 이 화합물은 oral activity를 증가시킨 강력한 muscarinic agonist이다.³⁾



CI 979

arecoline 과 milameline의 구조적 유사성을 이용하여 본 연구에서는 다음과 같은 화합물의 유도체를 합성하고자 시도하였다.



3-위치의 치환체에 benzoxazole 유도체를 도입함으로써 milameline의 oxime 과의 유사성, arecoline의 ester 대신에 질소로 치환된 imine 형태의 bioisoster 형태를 최대한 응용하여 본 연구에서는 2-(1-methyl-1,2,5,6-tetra-

hydroxyridin-3-yl)benzoxazole 유도체들을 합성하여 그들의 muscarinic M₁ agonist로서 affinity에 관한 활성 탐색을 하였다.

또 이 일련의 arecoline 및 milameline의 구조적 변화를 시도함은 pharmacological 그리고 pharmacokinetic 성질을 개선하기 위한 것이다. 그리하여 보다 더 유용한 임상 의약품으로 개발하고자 하는 것이다. 또한 이들의 여러 유도체를 합성하여 그들의 활성을 비교 분석하여 computer modeling을 통한 신규 화합물 합성의 구조 계획 및 합성 시도를 통하여 보다 나은 화합물 합성에 접근할 수 있으며 상호간의 구조-활성의 상관관계를 통하여 lead compound 탐색 연구를 용이하게 하고자 한다.

o Bicyclic compounds:

근래 노년층 인구의 증가와 더불어 노후의 건강과 여러 가지 질환에 대한 사회적 인식과 관심이 높아지고 있다. 한 통계에 따르면 80세 이상의 노인의 과반수 이상이 적어도 한가지 이상 만성질환으로 고생하고 있는 것으로 조사되어 지고 있다. 또한 노화현상은 인체의 모든 장기에서 생길 수 있지만 특히 신경계의 노화현상은 빈번하고 정도가 심해 환자 자신뿐 아니라 가족에 미치는 영향도 매우 크다.⁴⁾ 최근 급진적인 문명과 산업의 발전과 함께 뇌졸중이나 치매를 포함하는 중추신경계 질환에 사회적인 관심이 집중되어 지고 있다.⁵⁾ 그럼에도 불구하고 이와같은 질환에 대한 예방이나 치료제는 전세계적으로 아직 상품화 되지 않고 있으며 극소수의 약물만이 임상실험 단계에 도달되어 있는 것으로 알려지고 있다. 이에따라 앞으로 효능있는 신규의 약품의 탄생은 더욱 절실히 요구되어 질것이고 그들의 시장성은 엄청난 수치로 확장되어 질 것으로 기대되어 진다. 위에서 언급한 신경성질환은 원인적 이유없이 급격한 증상을 보이며 시간이 경과함에 따라 점차 증상이 심해지는 것이 일반적 경향이다. 그 원인에 대한 많은 가설이 있으나 아직 확실한 결론을 내리지 못하고 있다. 그 원인에 대한 유력한 가설중 최근에 가장 관심의 초점이 되는 것은 신경세포의 분화, 성장 그리고 퇴화에 있어서 신경전달물질이나 신경성장인자(NGF)의 기능저하 또는 과활성화이다. 중추신경계의 신경전달물질 중 한부류인 L-glutamate, glycine, N-methyl-D-aspartate 그리고 L-aspartate등의 흥분성 아미노산 (EAA)은 과거 20년 동안 신경과학자들에 의하여 많은 연구가 되어 왔으며, NMDA agonist의 negative modulator로서 알려져 있는 또 하나의 NMDA 저해제부류인 PCP 결합부위의 ligand는 기존의 NMDA antagonists들의 BBB의 통과 의 난이성을 극복할 수 있는 구조적 특이성 때문에 현재 제약학상 가장 주

목되어지고 있는 noncompetitive NMDA receptor antagonist이다.^{6,7)} 이들 부류의 화합물로는 ketamine, Tiletamine, Dexoxadrol, 그리고 Merck Sharp & Dohme 사에서 개발된 MK-801등이 있으며, 이들은 현재 임상실험을 통하여 신경질환 치료제로서의 가능성이 타진되어 지고 있으나, 일반적으로 이들은 심각한 부작용을 동반하고 있기 때문에 임상에서의 사용이 제한되어 지고 있다.

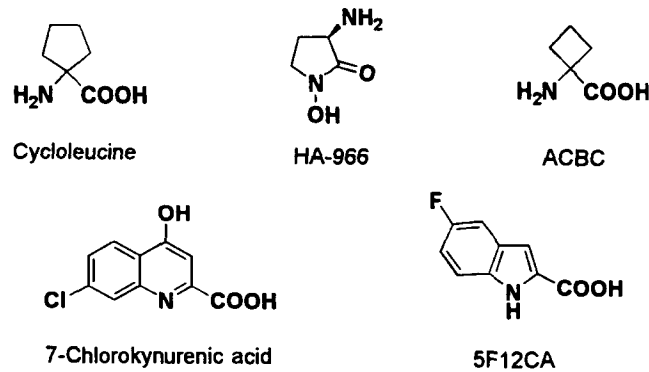


Figure 1. Antagonists at the glycine modulatory subunit of the NMDA receptor-effector complex.

또 다른 한 부류의 NMDA 수용체의 글라이신 결합부위 저해제로는 cycloserine이나 1-clopropane-1-carboxylic acid, HA966이 있으며, 저해제로는 cycloleucine, Kynurenic acid, 7-chlorokynurenic acid, 6,7-dinitro-quinoxaline-2,3-dione (DNQX) 그리고 1-aminocyclobutane-1-carboxylic acid (ACBC)등이 있다(Fig.1).^{8,9)} 이들은 NMDA 수용체에 대한 글루타민산의 결합을 allosteric effect에 의하여 용이하게 해주거나 제한시켜 주는 potentiator 또는 deactivator의 역할을 할수 있다. 따라서, 수용체의 활성을 간접적으로 통제시킬수 있는 약리학적 장점을 보이며 높은 약리활성을 보여주는 반면 쉽게 blood-brain barrier (BBB)를 통과할 수 없는 제한점을 갖고 있다.^{10,11)} 근래에 와서 문명의 급속한 발전에 따른 생활수준의 향상과 의학의 진보에 의하여 인간의 수명이 놀랄 만큼 연장되므로써, 노인인구 비율의 증가와 더불어 노인병에 대한 관심이 증가되고 있다. 대표적인 예로서 치매 즉 지적능력의 소실을 가져오는 중추신경계 질환들이 있으며, 현재 미국과 일본을 비롯한 세계제약 선진국들은 이와같은 신경퇴행성 질환 치료제의 개발에 박차를 가하고 있다. 특히 미의회는 1990년대를 "Decade of the

Brain"로서 선포하여 제약학계의 연구방향을 유도하고 있으며 미래 2000년대에는 중추신경계 질환 치료제 분야가 주요한 제약학적 산업 그리고 시장이 될 것임이 확실히 예견 되고 있다. 본 연구에서는 이와같은 세계적인 추세에 따른 신경 질환제의 개발의 일환으로 가장 핵심이 되고 가장 선도적인 분야인 NMDA 수용체의 글라이신 결합부위 길항제나 저해제의 개발을 꾀하였다. 현재까지 널리 알려져 있고 활성이 높은 기존의 receptor-ion channel complex에 특이성을 갖는 ligands의 구조 및 정전기적 특성을 바탕으로 새로운 세대의 화합물들을 합성함과 동시에 이들의 약리학적인 평가를 병행하였다.

제 2 장 국내의 기술개발 현황

본 연구에서 시도하고자 한 muscarinic agonist와 중추 신경계에 작용하는 약물들의 개발은 극소수의 약물만이 개발 또는 임상중에 있으며, 노인성 노화현상이나 뇌졸중 등의 중추신경계 질환의 발병 원인들의 복합적인 문제로 명확한 가설이 밝혀져 있지 않다. 최근의 일련의 가설중 신경전달물질 등의 기능 향진 또는 저하로 인한 원인을 토대로 신경학자들에 의해 많은 연구가 되고 있다. 그중 NMDA 수용체에 관한 연구가 중점적으로 행해지고 있으며, 현재 NMDA 수용체의 길항제나 저해제의 개발은 NMDA 수용체-이온통로 복합체의 결합부위 즉 글루타민산, 글라이신, 그리고 PCP 결합부위에 따라 크게 세방향으로 구분되어지며, 중요한 제약학상 유용한 후보물질로서 여러 화합물들이 개발되어 임상시험을 진행하고 있다. 최초의 글루타민산 결합부위의 저해제로는 aminophosphonopentanoate (AP5), aminophosphonoheptanoate (AP7)이었으며 이들은 새로운 합성물의 분류와 그들의 친화성의 기준이 되는 화합물로서의 역할을 하고 있다. 이들 선형구조를 갖는 AP5나 AP7의 유사물질로 구조적 견고성을 갖는 화합물의 분자적 설계는 Ciba-Geigy사의 cis-1-(2-carboxypiperidin-4-yl)methylphosphonic acid (CGS 19755)와 CGP 37849, Elly-Lilly사의 cis-fused된 dehydroisoquinoline 유도체 LY27461과 LY233536, 그리고 Dr J. Watkins의 CPP의 개발을 촉진시켰다(Fig.1). 이들 화합물은 NMDA 수용체의 저해제로서 높은 활성을 보여주었지만 쉽게 blood-brain barrier를 통과할 수 없는 제한점을 갖고 있다. 하지만 그중에 가장 높은 활성을 보여주는 CGP 37849의 α -carboxylic ester는 경구투여에 있어서도 획기적인 약리학적 활성을 보여 주었다. 또한 글루타민산의 포화고리 유사 화합물인 trans-2,3-piperidine-dicarboxylic acid (2,3-PDA)와 (2S, 3R, 4S)- α -carboxy cyclopropyl glycine [cis(2S, 3R, 4S) CCPG]등이 있으며, 이와같이 고리형 구조의 화합물의 높은 결합력은 내인성 글루타민산이 NMDA 수용체와 결합시 접혀지는 conformation을 선호함을 암시하며, 이는 미래의 또다른 효과있는 ligands에 대한 구조적 설계의 방향을 제시하여 주는 것이다(Fig.2).

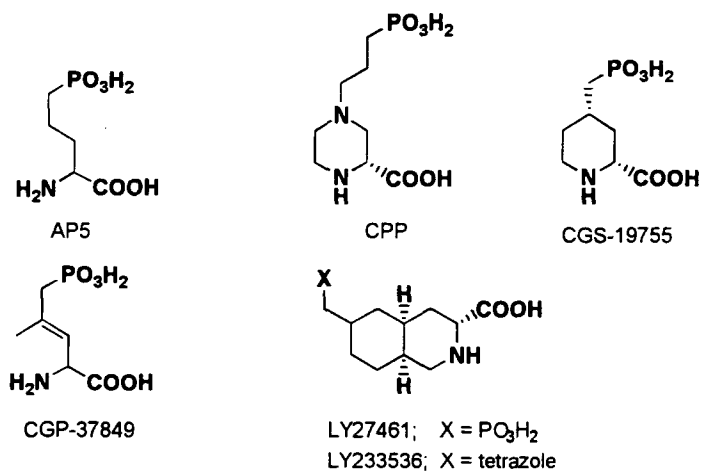


Figure 1. Antagonist at the NMDA-type receptor acting isosterically with NMDA and glutamate.

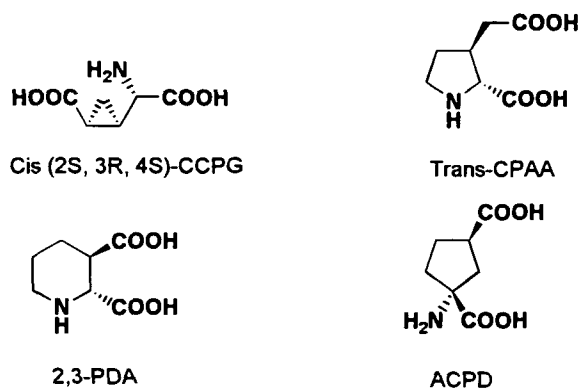


Figure 2. Agonists at the NMDA-type receptor acting isosterically with NMDA and glutamate

muscarinic agonist의 개발은 acetylcholine의 기본 모핵의 바탕으로 다음과 같은 여러 유형의 화합물들이 합성 시도되고 있다. (Fig.3)

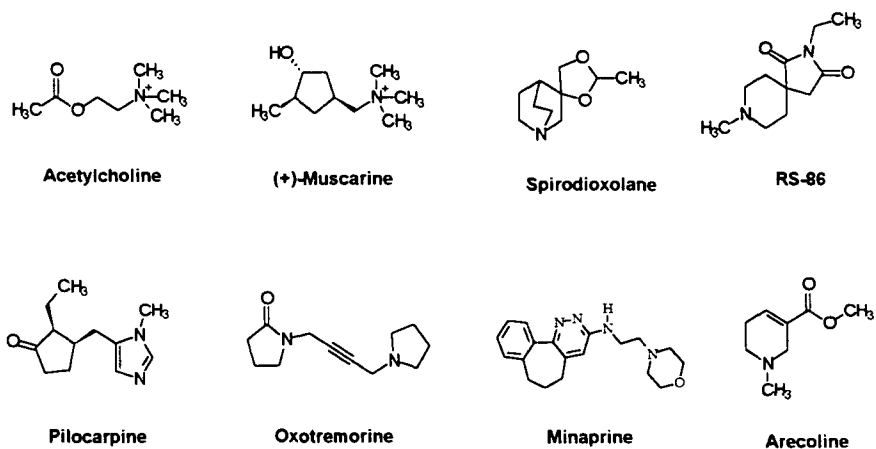


Fig.3 Muscarinic Agonists

이들 유형을 바탕으로 여러 가지 또다른 화합물들이 합성되고 있다. (Fig.4) 예를들면 muscarine 유도체는 muscarone과 allomuscarone들이 있으며¹²⁾ spirodioxolane 유도체는 AF 30¹³⁾과 AF 102¹⁴⁾등이 있고, RS-86 유도체는 YM796과 같은 화합물이 합성되었다¹⁵⁾. 또한 pilocarpine 유도체는 SDZ ENS 163과 같은 화합물¹⁶⁾이 발표되었으며, oxotremorine 유도체는 McN-A-343¹⁷⁾, BM-5¹⁸⁾, U-80816등¹⁹⁾이 합성되었으며 또한 minaprine 유도체로는 SR 95639A²⁰⁾, SR 46559A등²¹⁾과 같은 화합물이 합성되었다.

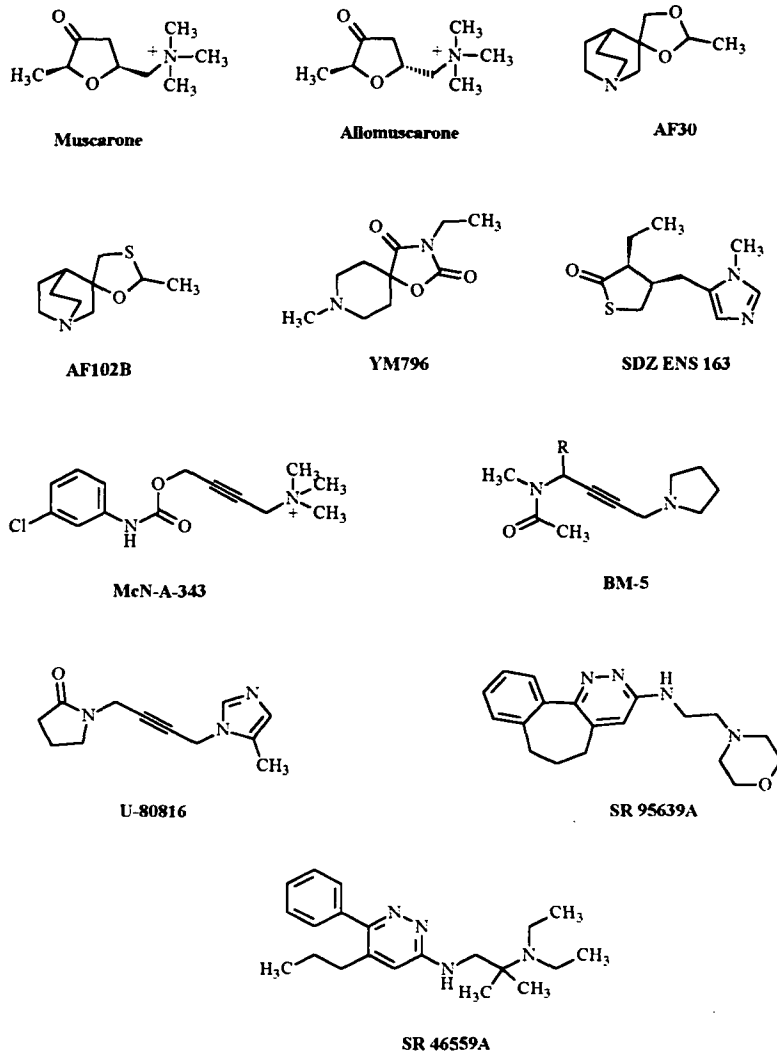


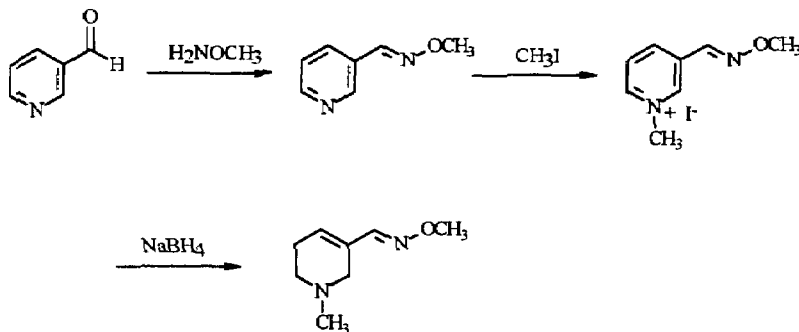
Fig. 4 여러 가지 유형의 muscarinic agonists

또한 그외에도 arecoline 유도체의 합성은 muscarinic agonists 유도체 합성 중에서는 많은 화합물들이 합성되었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

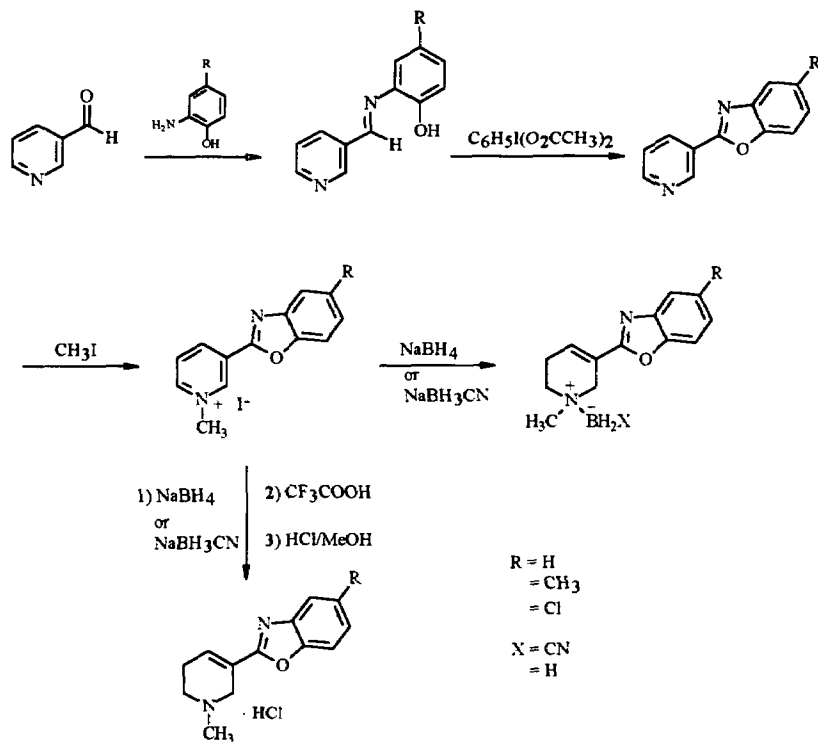
본 연구에서는 tetrahydropyridine ring에의 치환체 도입의 합성을 위주로 하였으며 이는 biologically unstable한 ester group을 다른 유도체의 도입으로 보다 더 metabolic stable한 유도체 합성을 시도하고자 하였다.

tetrahydropyridine ring에 또 다른 안정된 benzoxazol을 도입하여 arecoline 이나 milameline과 구조적으로 아주 유사하면서도 새로운 화합물을 합성하고자 시도하였으며 우선 신규 화합물의 약리학적 비교 시험을 위하여 본 연구에서는 다음과 같이 milameline을 합성하였다. 3-carboxaldehyde에 methoxyamine hydrochloride와 condensation 반응을 한 후 methyl iodide로 methylation한다. pyridiniumring을 sodiumborohydride를 사용하여 reduction 하면 얻고자하는 milameline을 합성할 수 있다.



pyridine ring에 benzoxazole ring을 도입하기 위하여 다음과 같은 방법으로 합성하였다. 3-carboxaldehyde에 aminophenol 유도체를 넣고 실온에서 ethanol상에서 교반한다. condensation 반응이 완료되면 노란색의 Schiff's base 화합물이 만들어진다. 여기에 iodobenzene diacetate를 사용하여 hypervalent iodine oxidative intramolecular cyclization 반응을 하여 benzoxazole ring을 도입하였다. 여기에 methyl iodide를 작용시켜 methylation 반응을 완료한다. 여기서 만들어진 pyridinium salt는 기존의 방법대로 환원제로서만은 pyridine ring이 reduction된 화합물이 만들어지지 않고 여기에 trifluoroacetic acid로 처리 할 때만이 얻고자하는 화합물을 만

들 수 있었다. 환원제만을 썼을 때는 pyridinium ring이 환원되면서 borane complex가 ylid 형태로 얻어졌으며 이는 일반적으로 pyridinium salt의 환원 시 얻을 수 있는 흔한 화합물은 아닌 것이다. 이에 본 연구에서는 이들의 구조 결정을 위하여 X-ray crystallography 방법을 이용하여 borane complex 화합물임을 입증하였다. 이들은 또한 생체내의 acetylcholine이 ammonium salt 형태로 되었듯이 borane complex 형태 역시 M₁ receptor에 binding affinity에 관한 화합물로 선정하였다. 산 처리 후의 화합물의 안정도와 순도를 위하여 hydrochloride 형태의 salt로 최종 화합물을 합성하였다. 이들의 M₁ receptor binding affinity assay를 조사하였다. 이때 비교화합물로는 arecoline과 milameline을 사용하였다.



실험방법

Pyridine-3-carbaldehyde *O*-methyloxime의 합성(1)

3-Pyridinecarboxaldehyde 1.00 g(9.34 mmol)을 30 mL benzene에 녹이고 여기에 methoxylamine hydrochloride 0.82 g(9.80 mmol, 1.05 eq)을 가한 후 2 시간 Dean-Stark column을 써서 가열환류하고 실온으로 식힌 후 NaHCO₃ 용액으로 세척하였다. 물층을 CH₂Cl₂로 추출하고 유기층을 합하여 MgSO₄로 건조한 다음 농축하였다. 잔류물을 flash chromatography(SiO₂, 10%→20%→50% EtOAc-Hex)하여 1.14 g(90%)의 무색 투명한 액체를 얻었다. 이는 E : Z = 28 : 1의 혼합물로서 더 이상 분리하지 않고 그대로 다음 실험에 사용되었다.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (1 H, m, C-2 H), 8.62 (1 H, m, C-4 H), 8.09 (1 H, s, CH=N), 7.98 (1 H, m, C-6 H), 7.33 (1 H, C-5 H), 4.02 (s, 3 H, OCH₃).

1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-carbaldehyde *O*-methyloxime의 합성(2)

3-*O*-Methylpyridinecarboxaldoxime 1.00 g(7.34 mmol)을 20 mL acetone에 녹이고 MeI 3.66 mL(58.76 mmol, 8.0 eq)을 가한 후 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 생긴 침전물을 걸르지 않고 그대로 농축하여 2.04 g(99.5%)의 노란색 고체를 얻었다. 이를 30 mL의 MeOH에 녹이고 -20 °C로 냉각한 다음 여기에 NaBH₄ 0.42 g을 조금씩 가하여 -10 °C가 넘지 않도록 하였다. 0 °C에서 1 시간 더 교반한 후 감압농축하고 잔류물을 물에 녹이고 CH₂Cl₂로 추출하였다. 유기층을 MgSO₄로 건조한 다음 감압농축하고 잔류물을 flash chromatography(SiO₂, EtOAc→10% MeOH-EtOAc)하여 0.72 g(64%)의 황갈색 액체를 얻었다.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (1 H, s, CH=N), 6.00 (1 H, m, C-6 H), 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 3.16 (2 H, d, *J* = 2.2 Hz, C-2 H), 2.53 (2 H, t, *J* = 5.5 Hz, C-6 H), 2.41 (3 H, s, NCH₃), 2.36 (2 H, m, C-5 H).

2-Pyridine-3-yl-benzoxazole의 합성(3)

2.04 g (18.70 mmol)의 2-aminophenol과 2.00 g (18.70 mmol)의 3-pyridinecarboxaldehyde을 50 ml absolute ethanol에 넣고 2시간 교반한 후 여기에 6.62 g (20.54 mmol)의 iodobenzene diacetate를 넣는다. 10분 교반후 용매를 evaporator에서 제거하고 잔유물을 ethyl acetate에 녹인 후 the aqueous sodiumhydrogencarbonate solution으로 세척한다. 유기층을 분리한 후 brine으로 세척하고 anhydrous magnesium sulfate로 건조시킨 후 *in vacuo* 상태에서 용매를 제거한다. 잔유물을 chromatography 법으로 분리 정제한다. (hexane:ethyl acetate = 4:1). Yield 1.17 g (31.9 %); mp 104-106°; ir (potassium bromide): 3050, 1620, 1570, 740 cm^{-1} ; ^1H -nmr (deuteriochloroform): δ 9.48 (s, 1 H, C2-H), 8.76 (dd, 1 H, C6-H), 8.50 (m, 1 H, C4-H), 7.84-7.40 (m, 5 H, arom. H, C5-H); ^{13}C -nmr (deuterio-chloroform): δ 160.7 (C-2), 152.0 (C-6), 150.7 (C-8), 148.7 (C-2), 141.7 (C-9), 134.7 (C-4), 123.5 (C-3), 125.7, 124.9, 123.7, 120.2, 110.7 (C-5, arom. C).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$: C, 73.46; H, 4.11; N, 14.28. Found: C, 73.12; H, 4.28; N, 14.31.

5-Methyl-2-pyridine-3-yl-benzoxazole의 합성(4)

2-amino-*p*-cresol과3-pyridinecarboxaldehyde를 사용하여 위의 방법대로 실험한다. chromatography법으로 분리 정제한다. (hexane:ethyl acetate = 4:1). Yield 48.2 %; mp 98-100°; ir (potassium bromide): 3050, 3000, 1600, 1410, 1070 cm^{-1} ; ^1H -nmr (deuteriochloroform): δ 9.47 (s, 1 H, C2-H), 8.75 (dd, 1 H, C6-H), 8.46 (m, 1 H, C4-H), 7.57 (s, 1 H, C4-H), 7.48-7.17 (m, 3 H, arom. H, C5-H), 2.49 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C -nmr (deuteriochloroform): δ 160.3

(C-2), 152.1 (C-6), 148.4 (C-8), 147.8 (C-2), 141.4 (C-9), 134.5 (C-4), 134.4 (C-5), 122.8 (C-3), 126.9, 124.2, 123.7, 119.7, 110.4 (C-5, arom. C), 20.9 (CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₃H₁₀N₂O: C, 74.21; H, 4.79; N, 13.33. Found: C, 73.90; H, 4.87; N, 13.34.

5-Chloro-2-pyridine-3-yl-benzoxazole의 합성(5)

같은 방법으로 2-amino-4-chlorophenol과 3-pyridinecarboxaldehyde를 사용하여 합성한다. chromatography법으로 분리 정제한다. (hexane:ethyl acetate = 4:1). Yield 41.7 %; mp 147-148°; ir (potassium bromide): 3080, 3020, 1610, 1590, 1550 cm⁻¹; ¹H-nmr (deuteriochloroform): δ 9.43 (s, 1 H, C2-H), 8.76 (dd, 1 H, C6-H), 8.46 (m, 1 H, C4-H), 7.74 (s, 1 H, C4-H), 7.49-7.26 (m, 3 H, arom. H, C5-H). ¹³C-nmr (deuteriochloroform): δ 162.0 (C-2), 152.4 (C-6), 149.3 (C-8), 148.8 (C-2), 142.8 (C-9), 134.8 (C-4), 130.4 (C-5), 123.0 (C-3), 126.0, 123.7, 120.2, 111.4 (C-5, arom. C).

Anal. Calcd. for C₁₂H₇N₂OCl: C, 62.49; H, 3.06; N, 12.15. Found: C, 62.09; H, 3.06; N, 12.02.

2-(1-Methyl)pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide의 합성(6)

1.17 g (5.95 mmol)의 pyridine-3-yl-benzoxazole을 30 ml acetone 에 6.77 g (47.68 mmol) iodomethane을 10 ml acetone에 녹인 용액을 가한다., 혼합액을 20 시간 실온에서 교반한다. 침전물을 여가하고 침전물을 acetone으로 세척한 후 reduced pressure에서 건조하여 상기 화합물을 얻는다.. Yield 1.68 g (83.2 %); mp 252-254°; ir (potassium bromide): 3000, 1640, 1490, 760 cm⁻¹; ¹H-nmr (deuterio-dimethyl sulfoxide): δ 9.87 (s, 1 H, C2-H), 9.20 (m, 2 H, C5, C6-H), 8.34 (dd, 1 H, C4-H), 7.98-7.50 (m, 4 H, C4, 5,

6, 7-H), 4.51 (s, 3 H, CH₃); ¹³C-nmr (deuterio-dimethyl sulfoxide) δ 57.1 (C-2), 150.3 (C-8), 147.3 (C-6), 144.5 (C-2), 142.1 (C-5), 140.7 (C-9), 126.3 (C-3), 128.2, 127.1, 125.8, 120.3, 111.4 (C-4, arom. C), 48.7 (CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₃H₁₁N₂OI: C, 46.18; H, 3.28; N, 8.28. Found: C, 46.37; H, 3.27; N, 8.28.

5-Methyl-2-(1-methyl)pyridinium-3-yl-benzoxzole iodide의 합성(7)

위 화합물은 같은 methylation 방법으로 하여 얻는다. Yield 82.6 %; mp 226-227°; ir (potassium bromide): 3050, 3000, 1640, 1490 cm⁻¹; ¹H-nmr (deuteriodimethyl sulfoxide): δ 9.83 (s, 1 H, C2-H), 9.17 (m, 2 H, C5, C6-H), 8.34 (dd, 1 H, C4-H), 7.77-7.37 (m, 3 H, C4, 6, 7-H), 4.51 (s, 3 H, NCH₃), 2.46 (s, 3 H, arom.-CH₃); ¹³C-nmr (deuteriodimethyl sulfoxide): δ 158.3 (C-2), 150.7 (C-8), 148.1 (C-6), 145.7 (C-2), 143.5 (C-5), 142.8 (C-9), 137.3 (C-5), 129.2 (C-3), 129.7, 129.6, 121.5, 111.8 (C-4, arom. C), 49.7 (NCH₃), 21.5 (arom. CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₄H₁₃N₂OI: C, 47.75; H, 3.72; N, 7.95. Found: C, 47.97; H, 3.69; N, 7.97.

5-Chloro-2-(1-methyl)pyridinium-3-yl-benzoxzole iodide의 합성(8)

위 화합물 역시 methylation으로 같은 방법으로 얻는다. Yield 63.8 %; mp 237-240°; ir (potassium bromide): 3500, 3100, 1640, 1440 cm⁻¹; ¹H-nmr (deuterio-dimethyl sulfoxide): δ 9.85 (s, 1 H, C2-H), 9.20 (m, 2 H, C5, C6-H), 8.38 (dd, 1 H, C4-H), 8.05-7.56 (m, 3 H, C4, 6, 7-H), 4.52 (s, 3 H, CH₃). ¹³C-nmr (deuteriodimethyl sulfoxide): δ 158.6 (C-2), 149.2 (C-8),

147.7 (C-6), 144.7 (C-2), 142.4 (C-5), 142.0 (C-9), 126.0 (C-3), 129.9, 128.3, 127.2, 120.2, 112.9 (C-4, arom. C), 48.5 (CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₃H₁₀N₂OICl: C, 41.91; H, 2.71; N, 7.52. Found: C, 41.87; H, 2.65; N, 7.38.

2-(1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)benzoxazole-trihydroborane의 합성(9)

-10° 에서 0.87 g (2.57 mmol)의 2-(1-methyl-pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide를 30 ml methanol에 용해하고 0.19 g (5.14 mmol) sodium borohydride을 조금씩 가한다. 0°에서 1시간동안 교반하고, 용매를 감압하에 제거하고 잔유물을 ethyl acetate에 녹인 후, aqueous sodium hydrogen-carbonate solution으로 세척한 후 유기층을 brine으로 세척한 후 anhydrous magnesium sulfate로 건조한 다음, *in vacuo*상태로 용매를 제거한다. 잔유물을 chromatography법으로 분리 정제한다. (hexane:ethyl acetate = 4:1). Yield 0.20 g (36.5 %); mp 116-118°; ir (potassium bromide): 3500, 3000, 2350 (borane), 1660, 1450 cm⁻¹; ¹H-nmr (deuteriochloroform): δ 7.71-7.30 (m, 4 H, arom. H), 7.13 (m, 1 H, C4-H), 3.90 (m, 2 H, C2-H), 3.07 (m, 2 H, C6-H), 2.68 (s, 3 H, CH₃), 2.59 (m, 2 H, C5-H); ¹³C-nmr (deuteriochloroform): δ 160.5 (C-2), 150.2 (C-8), 141.4 (C-9), 122.1 (C-3), 130.3, 125.6, 124.7, 120.1, 110.4 (C-4, arom. C), 57.3 (C-2), 55.2 (C-6), 48.7 (C-5), 22.5 (CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₃H₁₇BN₂O: C, 68.45; H, 7.51; N, 12.28. Found: C, 68.50; H, 7.68; N, 12.18.

5-Methyl-2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)benzoxazole-cyanodihydroborane의 합성(10)

-100에서 0.60 g (1.70 mmol)의 5-methyl-2-(1-methyl)pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide를 30 ml tetrahydrofuran에 suspension 시킨 후 0.16 g (2.56 mmol) sodium cyanoborohydride를 소량씩 넣어준다. 상온에서 2시간 동안 교반한 후, 용매를 감압하에 제거한 후 잔유물을 ethyl acetate에 녹이고 aqueous sodium hydrogencarbonate solution으로 세척한다. 유기층을 brine으로 세척하고, anhydrous magnesium sulfate로 건조하고, *in vacuo* 상태에서 용매를 제거한다. 잔유물을 chromatography법으로 분리 정제하면 상기 화합물을 얻는다.(hexane:ethyl acetate = 4:1). Yield 0.15 g (38.5 %); mp 160-162°; ir (potassium bromide): 2900, 2400 (nitrile), 1660, 1520 cm^{-1} ; ^1H -nmr (deuterio-chloroform): δ 7.47-7.14 (m, 3 H, arom. H), 7.12 (m, 1 H, C4-H), 3.99 (m, 2 H, C2-H), 3.21 (m, 2 H, C6-H), 2.78 (s, 3 H, NCH₃), 2.65 (m, 2 H, C5-H), 2.46 (s, 3 H, CH₃); ^{13}C -nmr (deuteriochloroform): δ 159.8 (C-2), 148.3 (C-8), 141.3 (C-9), 134.6 (C-5), 121.2 (C-3), 129.4, 126.9, 120.0, 109.8 (C-4, arom. C), 56.2 (C-2), 53.9 (C-6), 46.8 (C-5), 21.7 (NCH₃), 21.4 (CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₅H₁₈BN₃O: C, 67.44; H, 6.79; N, 15.73. Found: C, 67.25; H, 6.84; N, 15.59.

5-Chloro-2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)benzoxazole-cyano-dihydroborane의 합성(11)

위의 화합물은 5-chloro-2-(1-methyl)pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide을 출발물질로 사용하며 방법은 2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)-benzoxazole-trihydroborane 합성에서와 같은 방법으로 실험한다. Yield 46.2 %; mp 196-198°; ir (potassium bromide): 3100, 2400 (nitrile), 1660, 1530, 1450 cm^{-1} ; ^1H -nmr (deuteriochloroform): δ 7.67-7.33 (m, 3 H, arom. H), 7.18 (m, 1 H, C4-H), 4.02 (m, 2 H, C2-H), 3.22 (m, 2 H, C6-H), 2.80

(s, 3 H, NCH₃), 2.68 (m, 2 H, C5-H); ¹³C-nmr (deuteriochloroform): δ 161.4 (C-2), 149.2 (C-8), 142.8 (C-9), 130.7 (C-5), 121.4 (C-3), 131.3, 126.5, 120.6, 111.7 (C-4, arom. C), 56.6 (C-2), 54.4 (C-6), 47.5 (C-5), 22.3 (CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₄H₁₅BN₃OCl: C, 58.48; H, 5.26; N, 14.61. Found: C, 58.47; H, 5.34; N, 14.51.

2-(1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)benzoxazole

Hydrochloride의 합성(12)

-10° 에서 0.87 g (2.57 mmol)의 2-(1-methyl-pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide)를 30 ml methanol에 용해하고 0.19 g (5.14 mmol) sodium borohydride을 조금씩 가한다. 0°에서 1시간동안 교반하고, -10~-20 °C에서 CF₃COOH 3ml를 넣고 상온에서 1시간 더 교반한다. 증류수를 가한후 가스발생후 3시간을 교반하고 50% NaOH 용액을 사용하여 pH 7로 맞추고 methylene Chloride로 추출한다. anhydrous sodium sulfate로 건조한 다음, *in vacuo*상태로 용매를 제거한다. 잔유물을 chromatography법으로 분리 정제한다. (hexane:ethyl acetate = 5:1). 얻은 화합물을 소량의 methanol에 녹이고 HCl gas (in methanol)용액을 적가하여 흰색의 상기 화합물을 얻는다. Yield 0.11 g (17.1 %); mp 250-255°; ¹H-nmr (deuteriomethanol): δ 7.72-7.37 (m, 4 H, arom. H), 7.28 (m, 1 H, C4-H), 4.33 (s, 2 H, C2-H), 3.57 (m, 2 H, C6-H), 3.10 (s, 3 H, CH₃), 2.89 (m, 2 H, C5-H).

5-Methyl-2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)benzoxazole

Hydrochloride의 합성(13)

위의 화합물은 5-Methyl-2-(1-methyl)pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide을

출발물질로 사용하며 방법은2-(1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)-benzoxazole Hydrochloride합성에서와 같은방법으로 실험한다.

Yield 12%; mp 224°; ¹H-nmr (deuteriomethanol): δ 7.42-7.11 (m, 4 H, arom. H, C4-H), 4.78 (s, 2 H, C2-H), 4.40, 4.05 (m, 2 H, C6-H), 3.02 (s, 3 H, NCH₃), 2.65 (m, 2 H, C5-H), 2.37 (s, 3 H, CH₃).

5-Chloro-2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)benzoxazole Hydrochloride의 합성(14)

위의 화합물은 5-Chloro-2-(1-methyl)pyridinium-3-yl-benzoxazole iodide을 출발물질로 사용하며 방법은2-(1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-yl)-benzoxazole Hydrochloride합성에서와 같은방법으로 실험한다.

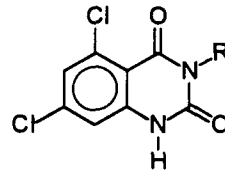
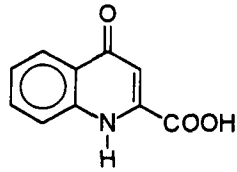
Yield 15 %; mp 227-230°; ¹H-nmr (deuteriomethanol): δ 7.72-7.40 (m, 3 H, arom. H), 7.34 (m, 1 H, C4-H), 4.32 (s, 2 H, C2-H), 3.52 (m, 2 H, C6-H), 3.11 (s, 3 H, NCH₃), 2.84 (m, 2 H, C5-H).

In Vitro M₁ Muscarinic Receptor Binding Assay

Compounds	10 μM	100 μM
9	24.9	36.9
10	3.9	11.6
11	8.0	4.4
12	53.0	80.4
13	8.3	41.6
14	22.2	75.2
arecoline	20.0	56.1
milameline	18.5	62.5

o Bicyclic compounds

먼저 NMDA 수용체의 길항제나 개발은 내인성 흥분성 신경전달 물질인 글루탐산이나 글라이신의 유사체로부터 시작되었으며, 일반적으로 receptor-ligands interaction은 entropic 요인 및 steric 요인에 영향을 고려하게 된다. 이것은 대부분의 기존의 높은 결합능력을 갖고 있는 화합물들은 고리형 구조를 갖기 때문에 그들 자체 내의 본드들의 회전을 고정시키고 제한된 conformation을 갖게되어 빠르고 견고한 결합능력을 얻게 되는 것으로 입증되어 졌다. 또한 NMDA 연관 글리신 자리와 반응하는 글리신-리간드 화합물을 개발하는데 있어서 가장 큰 문제는 이들 화합물의 대부분이 혈액-뇌-막 (Blood-Brain Barrier, 이하 “BBB” 라 약칭함)을 통과하지 못한다는 것이었다. 이에 혈액-뇌-막을 통과할 수 있는 글리신-부위 리간드 개발에 집중 노력한 결과, 키뉴레닉 산 (kynurenic acid) 유도체 (2-카복시 퀴놀린), 2-카복시인돌 유도체, 퀴녹살린 (Quinoxaline) 유도체 및 2-퀴놀론 유도체 등이 개발되었다. 이들은 NMDA 수용체들에 대하여 선택적 비경쟁적으로 작용하는 길항제들로서 경구투여시에도 활성을 나타낸다. 최근, 키뉴레닉 산 유도체가 NMDA 길항제로서 선택성을 나타낸다는 사실이 발견되었다. 즉 트립토판 대사 경로의 내생적인(endogenous) 산물인 키뉴레닉 산 유도체는 NMDA 수용체의 글리신 조절 자리를 봉쇄하여 선택적인 NMDA 길항 활성을 갖는 것이다. 대부분의 기존의 NMDA 길항제에 관한 구조 활성 관계 (SAR; Structure Activity Relationship) 연구에서, 키뉴레닉 산의 C-4 위치의 히드록실기가 수용체의 H-결합과 서로 영향을 미치며, 그의 공간적인 오리엔테이션이 결합 활성에 매우 중요하다는 것이 밝혀졌다. 즉 키뉴레닉 산 모핵의 C-4 위치에 전자가 풍부한 치환기를 적절히 도입하면 NMDA 수용체에 대한 결합 친화도가 증가한다. 특히, 최근 해리슨 등은 키뉴레닉 산의 C4 위치의 히드록실기를 헤테로원자가 연결된 아세트산으로 치환시킨 화합물이 키뉴레닉 산 자체보다 효능이 우수하고 선택성이 있다는 사실을 발견하였다.



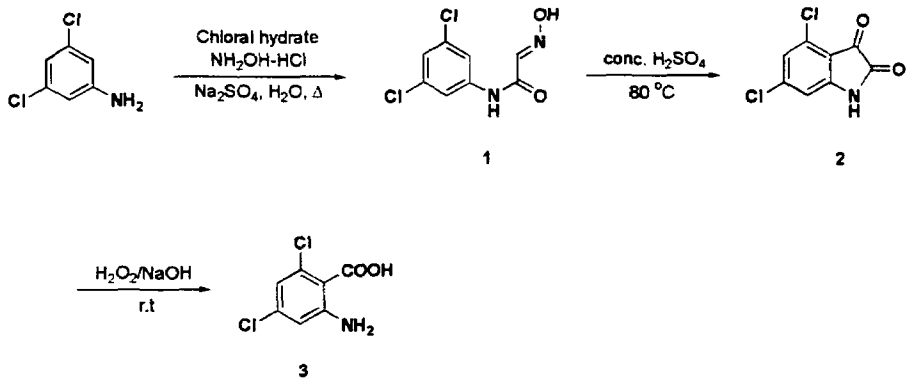
R= alkyl, aryl, aralkyl, carbamate, amino,
aryl, heterocyclic etc.

그림 1. Kynurenic acid(lead compound) & Target compounds

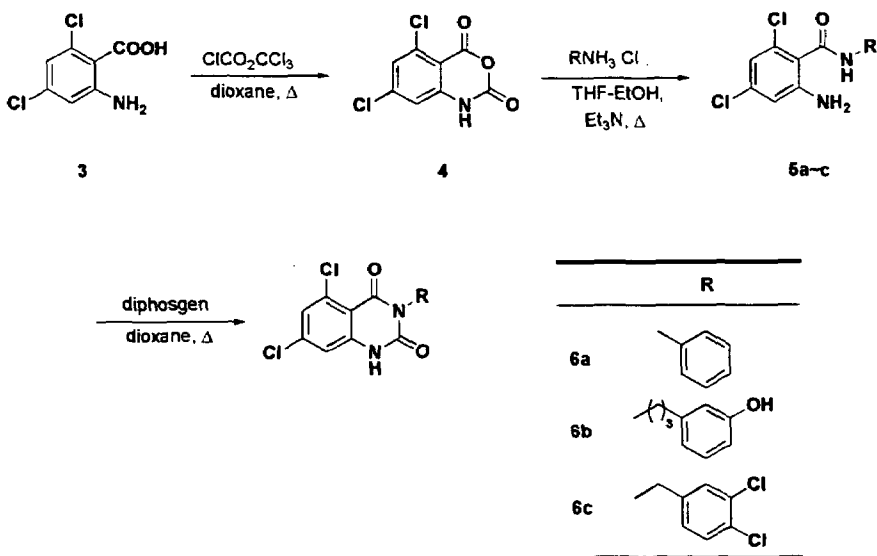
그러나 이 화합물들은 카복실기의 높은 극성으로 인하여 BBB 를 잘 투과하지 못하므로 생체내 활성이 부족하다는 단점이 그들의 신약물질로서의 개발에 치명적인 제한을 주고 있다.

이에 본 실험에서는 기존의 키뉴레닉 산 유도체의 단점들을 극복 할 수 있으며, 생체내 활성이 우수한 새로운 NMDA 수용체 길항제의 개발을 도모하였다. 아래의 그림1에서 보여 주는 목표화합물들은 글루탐산이나 글라이신의 핵심적인 골격을 포함함과 동시에 방향성 고리형 구조를 갖는 유도체들이다. 이들은 흥분성 아미노산들의 필수적인 아미노기 및 1-카복실기의 구조적 equivalent인 NH-C=O 기를 포함하고 있으며, 동시에 bicyclic ring 구조에 hetero atom인 N을 첨가함으로써 그들의 약리적 활성 및 bioavailability를 증가 시키려 하였다. 더욱이, 이들은 수용체의 활성을 간접적으로 통제시킬 수 있는 약리학적 장점을 보이며 높은 약리활성을 보여주는 반면 쉽게 blood-brain barrier (BBB)를 통과할 수 있도록 설계되었다. 첨가적으로, 이들은 기존의 kynurenic acid 유사체에서 야기되어지는 C1-C2 또는 C2-N 결합의 회전으로 인한 entropic & steric tolerance 측면에서의 불리한 요인을 보완하였으며, NMDA receptor와의 H-bonding의 방향성을 고정시켜 줄 수 있도록 설계되어 있다. 또한 고리형 구조의 3번 질소상의 여러 가지 치환기들을 도입 하여 첨가적인 지용성결합부위를 고려해주었다. 이는 receptor와 결합시 hydrophobic interaction에 의한 complex의 안정화를 도모할 수 있고 Blood Brain Barrier의 통과성 증가를 동시에 얻을 수 있다

본 실험의 목표화합물인 1H-퀸이졸린-2,4-디온 유도체들의 합성은 아래의 반응식으로 도식화될 수 있다. 먼저, 출발물질인 디클로로아닐린은 크로탈하이드레이트 및 히드록시암모늄클로라이드 혼합물과 반응하여 옥심화합물 2로 전환되었다.

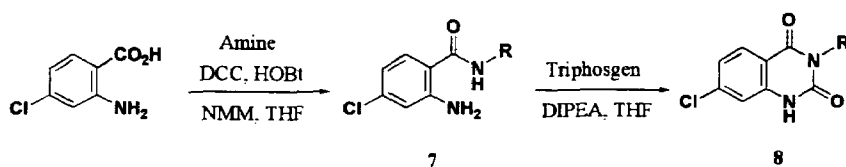


그 후 농축황산하 80 °C 에서 고리화 반응을 거친 후, 알카리 수용액하에서 과산화수소에 의한 인접된 디카르보닐 구조의 산화적 결합해체반응에 의하여 안트라닐릭 산 3이 제조되었다. 이 핵심 중간체인 안트라닐릭 산은 dioxane 용매하에서 디포스젠과 환류 반응한후, 여러 가지 아랄킬아민류와 축합반응에 의하여 해당하는 2-아미노 벤즈아마이드들 5a-c로 전환되었다. 마지막으로 이들 방향족 아마이드들은 다시 디포스젠과의 반응에 의하여 목표 화합물인 1H-퀴놀린-2,4-디온 유도체들 6a-c로 변형되어졌다.

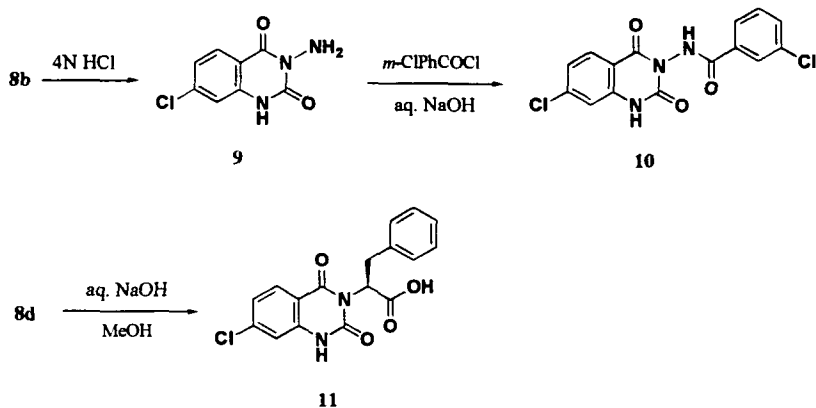


또한, 상업적으로 판매되어지는 4-클로로안트라닐릭 산은 정제함이없이 그대로 사용되었으며, 이는 새로이 본 실험실에서 개발된 아래 그림에서 보여주는 DCC-HOBT-NMM 축합방법에 의하여 위의 방법보다 짧은 과정을 거쳐 해당 목표화합물 8로 전환되어졌다. 더욱이 이들 결과 화합물은 그들의 유기합성 방법론적인 응용성을 검증하였다.

이와같이 합성되어진 potential NMDA receptor의 저해제들의 약리학적 평가는 우선 동물의 뇌세포로부터 분리 정제되어지는 NMDA receptor 혼합물과 radio label 된 ligands를 사용하는 in vitro assay에 의하여 수행되어졌다. 그들의 binding activity는 목적화합물 10 uM 농도에서의 수용체의 내인성 기질의 치환 정도를 측정하였다. 이들의 측정치는 아래의 도표에 기술하였다 (Table 1). 그들 화합물 중 페닐아미노가 치환된 유도체가 가장 높은 수용체와의 결합력을 나타내고 있으며, 3번위치의 아미노산구조나 극성 작용기를 갖는 아미노 치환기의 도입은 활성을 현저하게 저하시킬수 있음을 보여 주었다.



Comp.	R	7 Yield (%)	8 Yield (%)
a	NHPh	75	95
b	NHCO ₂ C(CH ₃) ₃	85	98
c	CH ₂ Ph	88	96
d		87	97



반면에 페닐아미노기와 같은 소수성 구조의 도입은 분자 전체의 극성을 현격히 감소시키어, 수용체와의 결합력의 증가 뿐만아니라, *in-vivo* 실험에 있어서 Brain Blood Barrier(BBB)를 용이하게 통과할 수 있다는 장점을 갖고 있기 때문에 차세대 전구약물로서의 가능성을 높여주었다. 이들의 *in-vivo* 실험은 현재 계속 진행중이다.

Table 1. Pharmacological data of 3-substituted-1H-quinazoline-2,4-diones

Entry	Inhibition at 10 uM (%)
6a	9.7
6b	12.5
6c	7.3
8a	25.8
8b	3.4
8c	6.0
8d	6.5
9	2.7
10	1.4
11	2.8

실험방법

General : All melting points were taken on a Thomas-Hoover melting point apparatus and were uncorrected. $^1\text{H-NMR}$ spectra were obtained on Varian Gemini 200MHz spectrometer. Chemical shifts were reported in parts per million (δ) relative to a tetramethylsilane as an internal standard. Mass spectra were obtained using a Jeol JMS-DX 303 GC/MS and Shimadzu GCMS-QP 5000 mass spectrometer. Analytical thin-layer chromatography was performed using 0.25 mm silica gel glass-backed plates. E. Merck silica gel (230-400 mesh) was used for flash chromatography. Solvents and reagents were dried and purified prior to use when deemed necessary. Reactions were carried out under nitrogen or argon atmosphere unless otherwise stated.

N-(3,5-Dichlorophenyl)-2-hydroxyimino-acetamide (1)

A mixture of 3,5-dichloroaniline (10.0g, 61.7 mmol) in H_2O (50 mL), concentrated HCl (12 mL) and 1,4-dioxane (20 mL) was heated to be clear solution, and then added to a mixture of chloral hydrate (10.5g, 66.9 mmol) and Na_2SO_4 (66.0g) in H_2O (224 mL) which has been warmed to $50\text{ }^\circ\text{C}$. To the above mixture was added hydroxylamine hydrochloride (13.0g, 180 mmol) in H_2O (60 mL), and the mixture was refluxed for 50 min. After cooling down to room temperature, the insoluble solids was filtered, was washed with excess H_2O , and dried in vacuo to provide 12.8g (89%) of the (hydroxyimino)-acetanilide 1 as a pale yellow solid: TLC $R_f = 0.5$ ($\text{EtOAc}:\textit{n}$ -hexane = 1:3); mp $196\text{-}197\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6)$ δ 7.39 (1H, t, $J = 1.8\text{ Hz}$, ArH), 7.70 (s, 1H, CHNOH), 7.89 (2H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, ArH), 10.54 (br s, 1H, NH), 12.40 (br s, 1H, NOH); MS(EI) m/e 233 [M^+], 216, 202, 189, 161.

4,6-Dichloro-1H-indole-2,3-dione (2)

The (hydroxyimino)-acetanilide 1 (10.0g, 42.9 mmol) was slowly added to concentrated H_2SO_4 (50 mL) in ice bath. At this moment the reaction mixture should be maintaining below $50\text{ }^\circ\text{C}$. After complete addition, the dark solution was heat $90\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. The resulting mixture was

cooled down to room temperature, poured onto 10 times the reaction volume of crushed ice, and then swirled vigorously for 1h. The forming insoluble solid was collected, washed with H₂O, and dried in vacuo to produce a desired isatin **2** as an orange colored solid in a 96% (8.90g) yield: TLC R_f = 0.4 (EtOAc:*n*-hexane = 1:3); mp 228~230 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 6.97 (d, 1H, J = 1.8 Hz, ArH), 7.32 (d, 1H, J = 1.8 Hz, ArH), 11.42 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 216 [M⁺], 188, 160.

2-Amino-4,6-dichlorobenzoic acid (3)

To a solution of the isatin **2** (5.0g, 23.1 mmol) in 75 mL of 1N NaOH (aq) was added portionwise a hydrogen peroxide (28% v/v, 10 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 2h and was filtered to remove insoluble dark brown solids. The filtrate was cautiously acidified with concentrated HCl at pH 2. The formed yellow precipitates were collected, washed with H₂O, and dried in vacuo. After recrystallization from benzene a pure anthranilic acid **3** was obtained as an ivory colored solid in a 82% (3.90g) yield: TLC R_f = 0.1 (EtOAc:*n*-hexane = 1:1); mp 188~189 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 6.76 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 6.85 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH); MS(EI) *m/e* 206 [M⁺], 162.

5,7-Dichloroanthranilic acid anhydride (4)

A solution of the anthranilic acid **3** (5.85g, 28.3 mmol) and diphosgen (11.2g, 56.8 mmol) in 40 mL of 1,4-dioxane was refluxed for 2h. the reaction mixture was cooled to room temperature to produce a insoluble solid. The solid was filtered and was washed with *n*-*n*-hexane several times. After drying in vacuo, pure anthranilic anhydride **4** was obtained as a bright yellow crystal in a 5.25g (80%): yield: mp = 264~268 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 7.19 (d, 1H, J = 1.9, ArH), 7.56 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 12.04 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 232 [M⁺], 188, 160.

3-Substituted- 5,7-dichloro-1H-quinazoline-2,4-dione (5a~c)

To a solution of the anthranilic anhydride **4** (0.5g, 2.15 mmol) and the appropriate amine hydrochloride (2.15 mmol) in 40 mL of THF-EtOH (3:1) was added triethylamine (0.60 mL, 4.30 mmol) at room temperature,

and then was refluxed 2h. After concentration of the mixture, the residue was diluted with methylene chloride, washed with 1N HCl (aq) and H₂O, and dried over anhydrous MgSO₄. Evaporation of the solvent under reduced pressure give the corresponding anthranilic amide **5a~c**. Without further purification, these anthranilic amides was treated with diphosgene (0.85g, 4.3 mmol) in 20 mL of 1,4-dioxane at refluxing temperature. The mixture was evaporated under reduced pressure to give the corresponding N-substituted pyrimidinedione **6a~c**. Pure samples were obtained by column chromatography or washing with hot methanol several times.

5a: ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 7.02 (m, 1H, ArH), 7.25~7.49 (5H, m, ArH), 8.08 (s, 1H, ArH), 8.54 (br s, 1H, NH), 9.54 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 281 [M⁺], 189, 161.

6a: 89% yield, purified by washing with hot methanol, a white solid; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 7.19 (m, 1H, ArH), 7.48 (4H, m, ArH), 7.83 (d, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 10.62 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 307 [M⁺], 216 [M⁺-Ar], 187, 158.

5b: ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 1.76 (m, 2H, CH₂), 2.52 (m, 2H, ArCH₂), 3.18 (m, 2H, NCH₂), 6.71(3H, m, ArH), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.34 (d, 1H, J = 2.0 Hz, ArH), 8.20 (d, 1H, J = 2.0 Hz, ArH), 8.29 (s, 1H, OH), 9.32 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 339 [M⁺], 189, 161.

6b: 78% yield, purified by column chromatography (EtOAc: *n*-hexane = 1:1), a white solid; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 1.91 (m, 2H, CH₂), 2.61 (m, 2H, ArCH₂), 3.98 (m, 2H, NCH₂), 6.66 (m, 2H, ArH), 6.68 (s, 1H, ArH), 7.12 (d, 1H, J = 2.1, 8.1 Hz, ArH), 7.20 (d, 1H, J = 2.1 Hz, ArH), 7.39 (s, 1H, ArH), 9.30 (br s, 1H, OH), 11.68 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 365 [M⁺], 245, 232, 187.

5c: ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 4.49 (2H, d, J = 5.8 Hz, ArCH₂N), 6.87 (br s, 2H, NH₂), 7.05 (s, 1H, ArH), 7.39 (d, 1H, J = 1.9, 8.3 Hz, ArH), 7.65 (s,

1H, ArH), 7.66 (d, 1H, J = 8.3 Hz, ArH), 7.88 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 9.10 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 364 [M^+], 189, 175, 161.

6c: 82% yield, purified by washing with hot methanol, a white solid; $^1\text{H-NMR(DMSO-}d_6)$ δ 5.13 (s, 2H, ArCH₂N), 7.42 (d, 1H, J = 8.4 Hz, ArH), 7.46 (s, 1H, ArH), 7.66 (d, 1H, J = 8.4 Hz, ArH), 7.69 (s, 1H, ArH), 8.14 (s, 1H, ArH), 11.78 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 391 [M^+], 373, 345, 216, 188, 160.

General procedure for the preparation of amides 7.

To a precooled (-12 °C) solution of 2-amino-4-chlorobenzoic acid (1.72g, 10 mmol), phenyl-hydrazine (0.98 mL, 10 mmol), and HOBt (2.7g, 20 mmol) in dry THF (50 mL) was added N-methylmorpholine (1.1 mL, 10 mmol). After 5 min, DCC (2.06g, 10 mmol) was added. The reaction mixture was allowed to warm to ambient temperature after 1h and stirred an additional 48h. The mixture was cooled to 0 °C and filtered through Celite. The filtrate was diluted with ethylacetate and washed with saturated NaHCO₃ solution twice, dried over MgSO₄, and concentrated. The product was recrystallized from ethyl acetate and hexane to give **7a** (1.96g, 75%) as a white powder.

N-1-Phenyl-2-amino-4-chlorobenzamide (7a): mp 166~168 °C; $^1\text{H-NMR(CDCl}_3)$ δ 5.66 (br s, 2H, NH₂), 6.28 (d, J = 3.4Hz, 1H, NH), 6.67~6.74 (m, 2H, ArH), 6.93~6.99 (m, 3H, ArH), 7.29~7.33 (m, 2H, ArH), 7.43 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 263 [$M^+ + 2$], 261 [M^+], 154, 99.

tert-Butyl-2-(2-amino-4-chlorobenzoyl)-1-hydrazine carboxylate (7b): yield 85%, a white powder; mp 200~202 °C; $^1\text{H-NMR(DMSO-}d_6)$ δ 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 6.53 (dd, J = 2.1, 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.67 (br s, 2H, NH₂), 6.79 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 8.79 (s, 1H, NH), 9.95 (s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 285 [M^+], 154, 99, 84, 57.

N-1-Benzyl-2-amino-4-chlorobenzamide (7c): yield 88%, a white solid; mp 108~109 °C; $^1\text{H-NMR(CDCl}_3)$ δ 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂),

5.66 (br s, 2H, NH₂), 6.27 (br s, 1H, NH), 6.56 (dd, J=2.0, 8.4 Hz, 1H, ArH), 6.66 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.19~7.36 (m, 6H, ArH); MS(EI) *m/e* 263 [M⁺+2], 261 [M⁺], 154, 106, 91.

Ethyl 2(S)-2-[(2-amino-4-chlorobenzoyl)amino]-3-phenylpropanoate (7d): yield 87%, a gray solid; mp 138~140 °C; ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.26 (t, 3H, CH₃), 3.21 (m, J = 2.6, 2H, CH₂), 4.19 (q, 2H, CH₂), 4.92~5.02 (m, 1H, CH), 5.60 (br s, 2H, NH₂), 6.44 (br d, 1H, NH), 6.53~6.64 (m, 2H, ArH), 7.05~7.32 (m, 6H, ArH); MS(EI) *m/e* 348 [M⁺+2], 346 [M⁺], 255, 154.

General procedure for the preparation of 3-Substituted quinazoline 2,4-diones 8.

To a 0 °C solution of triphosgen (0.39g, 1.3 mmol) in THF (7 mL) were dropwise added **7a** (0.94g, 3.6 mmol) and diisopropylethylamine (0.62 mL, 3.6 mmol) in THF (12 mL) via cannula. After for 2h, the reaction mixture was diluted with ethylacetate and washed with 5% NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄, and concentrated. The product was recrystallized from ethyl acetate and hexane to give **8a** (0.98g, 95%) as a white solid.

3-Anilino-7-Chloro-1,2,3,4-tetrahydro-2,4-quinazolinedione (8a): mp 265~266 °C; ¹H-NMR(CDCl₃+DMSO-d₆) δ 6.74~6.89 (m, 3H, ArH), 7.13~7.23 (m, 3H, ArH), 7.28 (d, J = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.80 (s, 1H, NH), 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 11.59 (s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 289 [M⁺+2], 287 [M⁺], 180, 154, 84.

***tert*-Butyl**

N-(7-chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-3-quinazolinyl)carbamate (8b): yield 98%, a white solid; mp 303~305 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 7.25~7.34 (m, 2H, ArH), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 9.69 (s, 1H, NH), 11.78 (s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 238 [M⁺-OC(CH₃)₃], 210 [M⁺-CO₂C(CH₃)₃], 180, 57.

3-Benzyl-7-chloro-1,2,3,4-tetrahydro-2,4-quinazolinedione (8c): yield 96%, a white solid; mp 266~268 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 5.08 (s, 2H,

CH₂), 7.22~7.33 (m, 7H, ArH), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 11.70 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 288 [M⁺+2], 286 [M⁺], 181, 154, 91.

Ethyl-2(S)-2-(7-chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-3-quinazolinyl)-3-phenyl propanoate (8d): yield 97%, a white solid; mp 126~128 °C; ¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.27 (t, 3H, CH₃), 3.45 (dd, J = 10.2, 14.2 Hz, 1H, CH₂), 3.65 (dd, J = 5.4, 14.2 Hz, 1H, CH₂), 4.27 (q, 2H, CH₂), 5.81 (dd, J = 5.4, 10.2 Hz, 1H, CH), 6.98 (d, J = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.10~7.27 (m, 6H, ArH), 7.97 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 10.14 (s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 374 [M⁺+2], 372 [M⁺], 299, 176, 131.

3-Amino-7-chloro-1,2,3,4-tetrahydro-2,4-quinazolinedione (9): mp 298~300 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 5.49 (br s, 2H, NH₂), 7.22~7.30 (m, 2H, ArH), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 11.78 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 211 [M⁺], 180, 84.

N-1-(7-Chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-3-quinazolinyl)-3-chloro benzamide (10)

The compound **8b** (1.55g, 5.0 mmol) was dissolved in 4M HCl in dioxane (30 mL) and stirred for 6h. The solution was evaporated and dissolved in THF. The mixture was adjusted to pH>10 with 2N NaOH. The resulting solution was added 3-chlorobenzoyl chloride (1.75 mL, 10 mmol). After for 10h, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate, dried over MgSO₄, and concentrated. The product was recrystallized from ethyl acetate and hexane to give **10** (1.23g, 70%) as a white solid: mp 282~283 °C; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 7.28-7.36 (m, 2H, ArH), 7.58~7.77 (m, 2H, ArH), 7.90~8.00 (m, 3H, ArH), 11.40 (br s, 1H, NH), 11.90 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 350 [M⁺], 180, 139, 11.

2(S)-2-(7-Chloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-3-quinazolinyl)-3-phenylpropionic acid (11)

The ester **8d** (0.16g, 0.4 mmol) was dissolved in THF (3.0 mL), 2N NaOH (1.0 mL) and stirred for 40h. The mixture was diluted with water and evaporated. The aqueous phase was washed with diethyl ether and

acidified to pH 2~3 with 1N HCl. The mixture was extracted with ethyl acetate, dried over MgSO₄, and concentrated. The product was recrystallized from THF, ethyl acetate and hexane to give the acid 11 (0.12g, 89%) as a white solid. m.p. 277-279 °C; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ 3.38~3.61 (m, 2H, CH₂), 5.82 (dd, J = 6.2, 9.8 Hz, 1H, CH), 7.06~7.24 (m, 7H, ArH), 7.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 10.38 (br s, 1H, NH); MS(EI) *m/e* 299 [M⁺-CO₂], 147, 91.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

muscarinic agonist에 관한 약리작용이 우수한 화합물의 문헌조사를 통하여 arecoline 유도체 및 miramelin 유도체의 합성에 초점을 맞추었다. arecoline의 metabolic stability와 low efficacy 문제점을 보완하고자 benzoxazole 치환체가 유도된 tetrahydropyridine compound들을 설계하여 합성하여 arecoline, miramelin과 함께 그들의 약리학적 평가를 하였다. 이들의 muscarinic M_1 receptor affinity가 기존의 약물보다 효능이 뛰어나서 이들의 중요한 selectivity test시험 중이다. 수용체에 작용하는 약물들의 중요한 연구 초점 중의 하나는 약물의 selectivity가 있어야하며, 또한 효능면에서도 만족할 만한 결과이어야한다.

중추신경계 수용체에 대하여 약리작용을 보이는 화합물의 개발의 일환으로 흥분성 아미노산의 비정상적인 활성을 보정할 수 있는 그수용체에 경쟁적 제어작용을 보이는 글라이신의 유사체들을 합성하여 그들의 약리학적 평가, 즉 동물의 뇌세포로부터 분리 정제된 NMDA 수용체 혼합물과 동위원소를 함유하는 기질을 사용하여 약리실험방법의 확립하였다. 이와 같은 사회적인 배경 하에 본 연구에서는 중추신경계 질환의 연구의 일환으로 그 수용체들에 대하여 약리작용을 보이는 화합물들의 도출 및 동시에 그들의 약리학적 평가방법의 확립함에 의하여 국내에서의 제약학상의 선도적인 역할뿐만 아니라 국제적인 경쟁력의 확보함에 있어서 그 기술적인 근본을 마련하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

Heterocyclic compounds가 수많이 존재한다. 그중 약리 활성을 갖는 화합물을 중점으로 신약후보물질을 도출하기 위하여 중추신경계 수용체에 작용하는 약물의 연구를 계속하여 인간의 심각한 질환 치료제로서의 개발에 활용한다.

본 연구과정에서 파생되는 지식의 축적과 확립된 NMDA 수용체 길항제의 효능 검색방법 및 muscarinic receptor의 affinity, efficacy 효능 검색방법은 국내에서 이 계통의 약물을 개발하고자 하는데 가장 중요한 핵심기반기술이 될 것이며, 또한 앞으로의 전반적인 중추신경계 질환연구에 있어서 제약학상의 기술적인 근본을 마련한 것이다. 국내의 약리활성 시험연구의 확립과 기초의약화학 및 신경과학분야의 발전, 컴퓨터 모델링을 이용한 뇌생리활성 분자설계의 경험 축적, 중추신경계에 작용하는 약물의 연구를 통한 국내 정밀화학공업의 선진화 및 기술우위 확보, 우리 나라 고유의 신약개발 및 국제특허 획득을 꾀할 수 있을 것이다. 최근 급진적인 문명과 산업의 발전과 함께 뇌졸중이나 치매를 포함하는 중추신경계 질환에 사회적인 관심이 집중되어 지고 있다. 그럼에도 불구하고 이와 같은 질환에 대한 치료법의 개발은 전세계적으로 아직 기초단계에 머무르고 있으며, 현재 미국과 일본을 비롯한 세계제약 선진국들은 이와 같은 신경퇴행성 질환 치료제의 개발에 박차를 가하고 있다. 반면에 국내적으로는 이 분야에 연구가 아직은 미미하게 진행되어 지고 있으나 앞으로 2000년대에 있어서는 그 필요성이 한층 고조되어 질 것이다. 이와 같은 사회적인 배경 하에 본 연구에서는 중추신경계 질환의 연구의 일환으로 그 수용체들에 대하여 약리작용을 보이는 화합물들의 도출 및 동시에 그들의 약리학적 평가방법의 확립함에 의하여 국내에서의 제약학상의 선도적인 역할뿐만 아니라 국제적인 경쟁력의 확보함에 있어서 그 기술적인 근본을 마련하였다.

제 6 장 참고문헌

1. Drug Res 1976, 26: 951-6.
2. a. Bromidge, S.M. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1185-90.
b. Orlek, B. et al., J. Med. Chem., 1991, 34: 2726-35.
3. Toja, E. et al., Eur. J. Med. Chem., 1991, 26: 853-68.
4. Khachaturian, Z. S. Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch. Neurol. 1985, 42, 1097-1105.
5. Gorevic, P.; Goni, F.; Pons-Estel, B.; Alvarez, F.; Peress, R.; et al. Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in Alzheimer's disease: Immunohistological studies. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1986, 45, 647-664.
6. (a) Wong, E.H.F.; Kemp, J.A.; Priestley, T.; Knight, A.R.; Woodruff, G. N.; Iversen, L.L.; The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 7104-7108. (b) Huettner, J. E.; Bean, B. P. Block of N-methyl-D-aspartate activated current by the anticonvulsant MK-801; Selective binding to open channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 1307-1311.
7. Mori, H.; Masake, H.; Yamakura, T.; Mishina, M. Identification by mutagenesis of Mg^{2+} block site of the NMDA receptor channel. Nature 1992, 358, 673-675.
8. (a) Skolnick, P.; Marvizon, J. C. G.; Jackson, B. W.; Monn, J. A.; Rice, K. C.; Lewin, A. H. Blockade of N-Methyl-D-Aspartate Induced Convulsions by 1-Amino-cyclopropanecarboxylates. Life Sci. 1989, 45, 1647-1655. (b) Miller, R.; La Grone, J.; Skolnick, P.; Boje, K. M. High Performance Liquid Chromatographic Assay for 1-Aminocyclopropanecarboxylic Acid from Plasma and Brain. J. Chromatogr. 1992, 578, 103-108. (c) Trullas, R.; Folio, T.; Young, A.; Miller, R.; Boje, K.; Skolnick, P. 1-Aminocyclopropanecarboxylates Exhibit Antidepressant and Anxiolytic Actions in Animal Models. Eur. J. Pharmacol. 1991, 203,

- 379-385. (d) Monahan, J. B.; Hood, W. F.; Compton, R. R.; Cordi, A. A.; Williams, R. M. Identification of a Novel Structural Class of Positive Modulators of the N-methyl-D-Aspartate Receptor, with Actions mediated through the Glycine Recognition Site. *Eur. J. Pharmacol. Mol. pharmacol. Sect.* 1990, 189, 373-379.
9. (a) Fletcher, E. J.; Lodge, D. Glycine Reverses Antagonism of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) by 1-Hydroxy-3-amino-pyrrolidone-2(HA-966) but not by D-2-Amino-5-phosphonovalerate (D-AP5) on Rat Cortical Slices. *Eur. J. Pharmacol.* 1988, 151, 161-162. (b) Foster, A. C.; Kemp, J. A. Ha-966 Antagonizes N-Methyl-D-Aspartate Receptors through a Selective Interaction with the Glycine Modulatory Site. *J. Neurosci.* 1989, 9, 2191-2196. (c) Williams, B. J.; Leeson, P. d.; Hannah, G.; Baker, R. Resolution and Synthesis of the Individual Enantiomers of the Glycine Antagonist 3-Amino-1-hydroxypyrrolidin-2-one (HA-966) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1989, 1740-1742.
10. Beneveniste, M.; Vyklicky, L., Jr.; Mayer, J. L.; Clements, J. A kinetic analysis of the modulation of N-Methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J. Physiol.* 1990, 428, 333-357.
11. (a) Leser, r. A.; tong, G.; jahr, c. E. Interactions between the Glycine and Glutamate binding sites fo the NMDA Receptor. *J. Neurosci.* 1993, 13, 1088-1096. (b) Beneviste, M.; Mayer, M. L. Kinetic analysis of antagonist action at N-Methyl-D-aspartate receptors: two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys. J.* 1991, 59, 560-573. (c) Clements, J. D.; Westbrook, G. L. activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-Methyl-D-aspartate receptor. *Neuron.* 1991, 7, 605-613. (d) Lynch, D. r.; Anegawa, N. J.; Verdoorn, T.; Pritchett, D. B. N-Methyl-D-aspartate Receptors: different Subunit Requirements for Binding of Glutamate Antagonists, glycine Antagonists, and Channel-blocking Agents. *Mol. pharmacol.* 1994, 45, 540-545.

12. De Amici, M. et al., J. Med. Chem., 1992, 35: 1915-20.
13. Saunders, J. et al., J. Med. Chem., 1987, 30: 969-75.
14. Fischer, A. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1992, 2: 839-44.
15. Wei, H., et al., Life Sci 1992, 50: 355-63.
16. Shapiro, G., et al., J. Med. Chem., 1992, 35: 15-27.
17. Trybulski, E.J., J. Med. Chem., 1993, 36: 3533-41.
18. Engstrom, C., et al., Psychopharmacology 1987, 91: 161-7.
19. Moon, M. W., et al., J. Med. Chem., 1991, 34: 2314-27.
20. Wermuth, C. G., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1992, 2: 833-8.
21. Wermuth, C. G., et al., Farmaco 1993, 48: 253-74.