

미래원천뇌과학기술개발사업  
신경염증성 뇌질환 조절물질 개발  
Development of Modulators for Neuro-Inflammatory Diseases

2017. 1

**한국과학기술연구원**

Korea Institute of Science and Technology

## 제 출 문

한국과학기술연구원 원장 귀하

본 보고서를 “미래원천뇌과학기술개발사업”의 “신경염증성 뇌질환 조절물질 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2017. 2. 3

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원  
뇌과학연구소/뇌의약연구단  
주관연구책임자 : 금 교 창

연 구 원 : 김 동 진  
" : 조 용 서  
" : 남 길 수  
" : 추 현 아  
" : 임 상 민  
" : 이 재 균  
" : 강 용 구  
" : 이 화  
" : 이 주 현  
" : Armed Helmy  
Ebraheem Hassan  
" : 하 태 환  
" : 최 영 진  
" : 셀바라무떠사미  
" : 아쉬라프 카림

" : 진 회 원  
 " : 정 유 진  
 " : 김 영 재  
 " : 박 무 성  
 " : 비크람  
 " : 이 정 은  
 " : 윤 슬 기  
 " : 김 정 원  
 " : 신 윤 회  
 " : 황보 회  
 " : 조 현 미  
 " : 차 은 지  
 " : 서 지 수  
 " : 김 진 술  
 " : 부 호양 남  
 " : 엠빌리 나스  
 " : 임 지 용  
 " : 이 하 은  
 " : 정 원 회  
 " : 조 남 철  
 " : 임 성 수  
 " : Gadhe Changdev  
     Gorakshnath  
 " : 신 서 연  
 " : 강 수 환  
 " : 김 진 범  
 " : 박 중 현  
 " : 양 승 훈  
 " : 방 은 경

위탁연구기관명 : 한양대학교

위탁연구책임자 : 최 제 민

## 보고서 초록

과제관리번호	2E26650	해당단계 연구기간	3년차	단계 구분	1 / 2
연구사업명	미래원천뇌과학기술개발사업				
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	신경염증성 뇌질환 조절물질 개발			
연구책임자	금 교 창	해당단계 참여연구원수	총 : 50 명 내부 : 8 명 외부 : 42 명	해당단계 연구비	정부: 1,144,476 천원 기업: 0 천원 계: 1,144,476 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원 뇌과학연구소/뇌의약연구단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 : 한양대학교		연구책임자 : 최 제 민		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고서 면수 108
<p>1. SIP1 in vitro 효능 검증시스템 구축 및 약물 효능 검색</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ FLIPR를 이용한 초고속, 초고감도 calcium assay 시스템기반 약물 효능 검색</li><li>✓ internalization 및 β-arrestin recruitment 효능 검증 시스템기반 약물 효능 검색</li><li>✓ 선택성 검증을 위한 SIP3 &amp; SIP5 벡터 제작 및 Ca++ assay를 위한 세포주 확립</li></ul> <p>2. SIP1 agonist 선도물질 도출</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 약 250여종 유도체 합성 및 효능 검색으로 선도물질 도출 및 최적화</li><li>✓ SIP1 및 SIP5에 선택적으로 우수한 활성을 보이는 화합물 4종 합성</li><li>✓ 50배 이상의 편향적 신호전달 선택성 화합물 5종 도출</li><li>✓ In vivo efficacy (PLC test &amp; EAE model) → 효능 검증 (KDS3504 &amp; KDS1059)</li></ul> <p>3. Nrf2 activator 선도물질 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 다발성 경화증 치료제 Tecfidera보다 in vitro 효능 14배 우수한 KDS4043 도출</li><li>✓ Nrf2와 Keap1간의 Protein protein interaction 저해 물질 도출을 위한 가상검색</li><li>✓ Sulforaphane (SFN)보다 효능 및 안전성 우수한 KKPA4026 화합물 도출</li><li>✓ In vivo efficacy (EAE model) → 효능 검증 (VSC2 &amp; KDS4043)</li></ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	신경염증, 다발성 경화증, SIP 수용체, Nrf2 활성화, 조절물질, 신경염증성 동물모델			
	영 어	Neuro-inflammation, Multiple sclerosis, SIP receptors, Nrf2 activation, Modulators, EAE animal model			

## 요 약 문

### I. 제 목

신경염증성 뇌질환 조절물질 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

신경염증성 뇌질환 조절물질 연구를 통해 다발성 경화증을 포함하는 다양한 염증성 질환의 작용기전을 이해하고 낮은 부작용, 높은 선택성 및 효능을 갖는 다발성 경화증의 근원적 조절물질 개발을 목표로 함

### III. 연구개발의 내용 및 범위

- ◆ 화학정보학 기반 분자 모델링을 통해 조절물질 설계 및 평가
- ◆ 신경염증성 뇌질환 조절 타겟(S1P receptors & Nrf2)에 대한 in vitro 활성검증을 위한 셀라인 확립 및 평가 시스템 구축
- ◆ 1차적으로 타겟(S1P1 receptor)에 대한 조절 물질의 in vivo 효능검증을 위한 평가시스템을 구축하고, 2차적으로 신경염증성 뇌질환 동물모델에서의 활성 검증을 위해 EAE 동물모델 확립 및 효능 평가시스템 구축
- ◆ in vitro 활성 검색을 통해 Hit 화합물 도출 및 화합물 라이브러리 구축
- ◆ in vitro 활성 및 신경염증성 뇌질환 동물 모델에 효능을 보이는 화합물을 선택하여 구조 최적화를 통한 선도물질 도출과 이에 대한 약동력학과 in vitro 안정성 (hERG, CYP, 대사안정성 등)을 검색
- ◆ 조절물질을 이용한 신경 염증성 뇌질환 기전 연구 및 치료제 개발을 위한 약리적 프로파일 검증

#### IV. 연구개발결과

##### 1. S1P1 in vitro 효능 검증시스템 구축 및 약물 효능 검색

- ◆ FLIPR를 이용한 초고속, 초고감도 calcium assay 시스템기반 약물 효능 검색
- ◆ internalization 및  $\beta$ -arrestin recruitment 효능 검증 시스템기반 약물 효능 검색
- ◆ 선택성 검증을 위한 S1P3 & S1P5 벡터 제작 및  $Ca^{++}$  assay를 위한 세포주 확립

##### 2. S1P1 agonist 선도물질 도출

- ◆ 약 250여종 유도체 합성 및 효능 검색으로 선도물질 도출 및 최적화
- ◆ S1P1 및 S1P5에 선택적으로 우수한 활성을 보이는 화합물 4종 합성
- ◆ 50배 이상의 편향적 신호전달 선택성 화합물 5종 도출
- ◆ In vivo efficacy (PLC test & EAE model) → 효능 검증 (KDS3504 & KDS1059)

##### 3. Nrf2 activator 선도물질 최적화

- ◆ 다발성 경화증 치료제 Tecfidera보다 in vitro 효능 14배 우수한 KDS4043 도출
- ◆ Nrf2와 Keap1간의 Protein protein interaction 저해 물질 도출을 위한 가상검색
- ◆ Sulforaphane (SFN)보다 효능 및 안전성 우수한 KKPA4026 화합물 도출
- ◆ In vivo efficacy (EAE model) → 효능 검증 (VSC2 & KDS4043)

#### V. 연구개발결과의 기대효과

- ◆ 화학정보학을 이용한 조절물질 최적화 및 선도물질 발굴 기술은 신약개발 기술 향상에 기여할 것임.
- ◆ 현시대 식습관 및 스트레스로 인해 급증하고 있는 난치성 신경 염증성 질환에 대한 이해를 돕고, 특히 다발성 경화증의 치료기전을 찾는데 기여할 것으로 기대됨.
- ◆ 다양한 신경염증성 뇌질환의 작용기전 이해를 통해 근원적 치료물질 개발의 근거를 제공함과 동시에 다발성 경화증을 포함하는 신경염증성 질환에 대한 치료제 개발기술을 통해 국가경쟁력을 올릴 수 있음.
- ◆ 기존 경구용 다발성 경화증 치료제의 부작용 및 문제점을 극복하는 조절물질이 개발될 경우 글로벌 신약으로서 세계 의약품 시장의 경쟁력을 확보할 수 있음.
- ◆ 개발된 신경염증 조절물질은 다발성 경화증을 포함하여 다양한 신경염증성 질환에 적응증을 확대할 수 있음.

## S U M M A R Y

We aim to develop modulators of inflammatory diseases such as Multiple Sclerosis to investigate disease mechanisms of inflammatory diseases and develop lead compounds with low side effects, high selectivity and excellent potency for Multiple Sclerosis. As a result, we have produced S1P1 agonists or Nrf2 activators that can be employed to develop pre-clinical candidates for the treatment of Multiple Sclerosis.

## C O N T E N T S

Chapter 1. Overview of the Research Project

Chapter 2. Global Technology Status

Chapter 3. Research Results

Chapter 4. Achievements and Expected Contributions

Chapter 5. Application Plan

Chapter 6. Contract Research Results

Chapter 7. International Scientific Information

Chapter 8. References

Chapter 9. Experimental Procedure

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 위탁연구결과

제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 8 장 참고문헌

제 9 장 실험절차



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

신경염증성 뇌질환 조절물질 연구를 통해 다발성 경화증을 포함하는 다양한 염증성 질환의 작용기전을 이해하고 낮은 부작용, 높은 선택성 및 효능을 갖는 다발성 경화증의 근원적 조절물질 개발을 목표로 함.

### 제 2 절 연구개발의 필요성

#### 1. 신경염증성 뇌질환 연구의 중요성

■ 의학의 발달로 인간의 수명이 연장됨에 따라 장수와 더불어 삶의 질에 대한 만족도가 요구되는 현대사회에서 신경염증성 뇌질환의 발병은 급증하는 추세이지만 많은 연구에도 불구하고 그 병인의 기전에 대해서는 명확히 규명되지 않음. 신경염증성 질환은 감염, 외상 등 내 외부 자극에 의한 신경염증 (neuroinflammation)에 기인하며, 또한 잘못된 식습관이나 현재 사회의 스트레스에 의해 젊은 층에서도 신경 염증성 질환 발병이 증가하는 추세임.

■ 신경염증은 다발성 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병 등 대부분의 중추신경계 질환의 주원인으로 알려져 있으며(그림 1.1), microglia, astrocytes, cytokine, chemokine, complement protein, acute phase protein, oxidative injury 등의 복합적 세포반응을 동반하고 있음. 이에 따라 신경염증 바이오마커의 조절을 통하여 뇌에서 신경염증을 감소시킴으로써 다양한 신경질환 및 장애의 진행을 막을 수 있음.

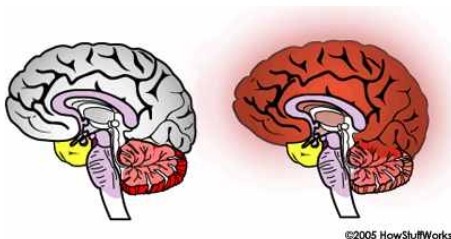


그림 1.1 신경염증은 중추신경계 질환의 주원인

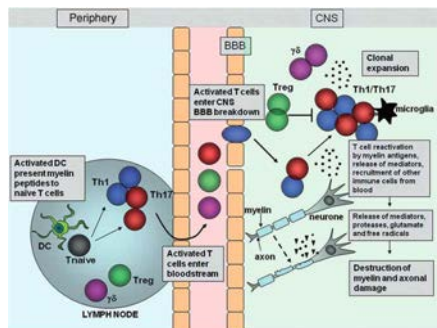
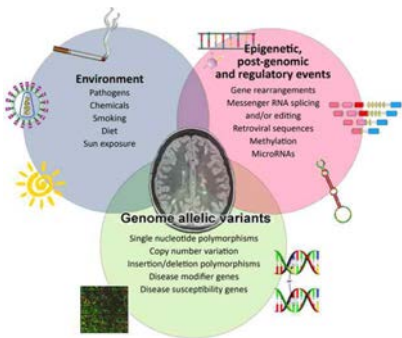
■ 대표적 신경염증성 뇌질환인 다발성 경화증, 알츠하이머, 파킨슨병은 세계 주요 7개국 시장에서 신경질환 치료제에서 상위의 점유율을 차지하고 있으며, 그 중에 1위인 다발성 경화증의 환자는 전 세계적으로 약 2백만명으로 추산되고 있으며, 그에 따른 다발성 치료제 시장의 규모는 2012년 기준 약 10조원에 달함 (그림 1.2). 특히, 다발성 경화증 치료제가 전체 신경질환 치료제 시장에서 점유율 1위임에도 불구하고 현재까지 단 3종의 경구용 치료

제가 출시되어 있는 가운데, 독자적으로 경구용 치료제를 개발할 경우 단기간 내에 블록버스터 신약으로 성장할 수 있을 것으로 기대됨.



그림 1.2 신경질환 치료제 시장에서 신경염증성 뇌질환 치료제 점유율 (Datamonitor 2012)

- 다발성 경화증 (Multiple Sclerosis)은 면역세포가 중추 신경계의 미엘린 수초를 공격하여 생기게 되는 자가면역 질환으로, 그 발병원인이 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만 유전적, 환경적 요인 등이 복합적으로 작용하여 일어나는 것으로 여겨지는 대표적 신경염증성 질환임 (그림 1.3).



Clin Exp Immunol. 2010 Oct;162(1):1-11

그림 1.3 다발성 경화증 발병의 잠재적 요인    그림 1.4 T 세포에 의한 다발성 경화증 발병 기작

- 다발성 경화증은 자가면역성 T 세포가 림프절에서 IFN $\gamma$ , IL-17과 같은 염증성 사이토카인의 발현에 중요한 역할을 하는 Th1/Th17 CD4 T 세포로 분화 후 순환계를 통해 이동, 뇌혈관 장벽을 통과하여 중추 신경계로 유입되고, 신경에서 염증성 사이토카인과 케모카인을 발현하여 demyelination을 유도하여 발병하게 됨 (그림 1.4). 주된 증상으로 운동 및 감각신경, 시신경 손상, 기억력 감퇴, 우울증 등이 있으며 (그림 1.5), 지속적인 약물 치료에

의한 병태 완화로 정상적인 생활이 가능하나 근원적 치료법은 현재까지 밝혀지지 않았음.  
또한, 일시적 회복 후 재발 가능성이 높아 발병 시 지속적인 처방을 필요로 하는 경제적 부담이 큰 질병 중 하나임.

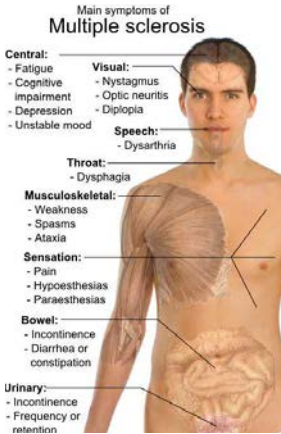


그림 1.5 다발성 경화증의 증상

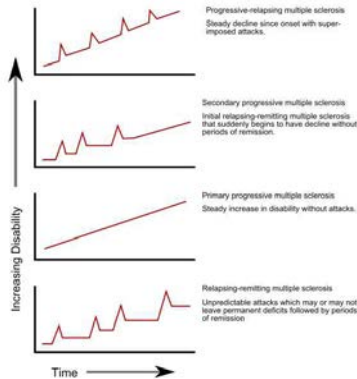


그림 1.6 다발성 경화증의 유형

■ 다발성 경화증은 가장 빈번한 재발 완화형 (relapsing remitting)과 원발성 (primary progressive), 진행형 (progressive-relapsing), 2차 진행형 (secondary progressive)의 네 가지 유형으로 나누어지며 (그림 1.6) 그 임상적 경과가 상이함. 뇌, 척수와 같은 중추 신경계에 직접적으로 손상이 나타나 가시적 증상이 나타나기 전까지는 진단이 어렵기 때문에, 효과적인 치료제 개발의 Needs가 절실한 실정임.

■ 다발성 경화증은 역학적으로 주로 20대에서 40대 사이의 젊은 연령층에서도 빈번하게 발병하며, 여성의 발병율이 남성보다 높은 편이며 최근 들어 환자수가 급증하고 있음 (그림 1.7, 1.8).

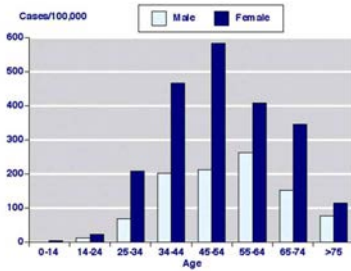


그림 1.7 성별 및 나이에 따른 다발성 경화증 환자 수 추이

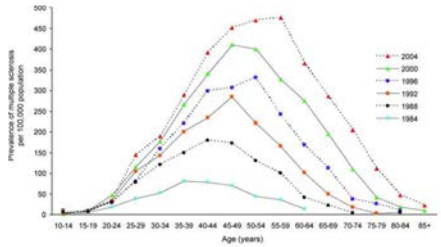


그림 1.8 연도에 따른 연령별 다발성 경화증 환자 수의 증가 (Neurology 2010)

- 아시아보다 유럽에서, 그리고 특정 위도에서 유병율이 유의하게 높다는 사실이 보고 되었음 (J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2011 Oct;82(10):1132-41) (그림 1.9). 국내의 경우 유병율이 비교적 높지 않아 연구가 활발하게 이루어지지 않았지만, 국내를 포함, 전 세계적으로 환자의 숫자가 점차 증가함에 따라 급속도로 연구의 중요성이 대두되고 있는 실정임.



그림 1.9 위도에 따른 다발성 유병율의 차이

- 다발성 경화증은 발병 후 사지운동 기능장애, 감각장애, 피로감, 시각장애 등 각종 중추신경계가 담당하는 기능의 이상 현상이 동반되며, 특히 50% 이상의 환자에서 운동기능장애가 나타나고 60% 이상의 환자에서 인지기능장애가 나타남. 젊은 연령대에서의 발병률이 높아 발병 시 경제 산업적 손실이 발생하게 되며, 여성에서 발병 시 결혼, 출산, 자녀의 양육 등에 큰 영향을 미치게 됨. 다발성 경화증 환자의 실직률은 질병이 시작되고 10~15년이 지난 후 60~80%로 조사되었으며 이는 생산 활동이 가장 활발한 연령에 해당하기 때문에 직, 간접 경제 손실이 막대함. 종합적으로, 다발성 경화증에 의해 경제, 산업적으로 많은 직, 간접 피해가 발생하고, 환자의 삶의 질 또한 매우 저하되고 있는 실정임.

- 국내의 경우, 다발성 경화증 유병율이 적어 외국과 비교하여 상대적으로 **빈약한 의료 지지 체계**가 구축되어 있으며, 이에 의해 **환자들의 높은 경제적 부담**이 발생하고 있는 실정임. 최근 치료제제의 보험 적용 등 정책적인 분야에서의 보조가 이루어지고 있으나, 아직까지 그 적용대상이 다른 질병에 비해 미비한 실정이며, 글로벌 신약 (예; 2010년 승인된 최초 경구용 치료제 Gilenya®)의 약가가 너무 높아 국내에서 시판이 미루어지고 있는 상황임. 따라서 국내 독자 치료제 개발은 글로벌 신약으로서의 가능성 뿐만 아니라 **국내 다발성 경화증 환자의 삶의 질 향상**에 크게 이바지 할 것임.

## 2. 연구개발의 필요성

- 현재 다양한 다발성 경화제 치료제가 시판되고 있으며 (그림 1.10), 다발성 경화증 치료제 시장의 블록버스터 신약인 인터페론 제제 Avonex와 Rebif의 특허가 2013년 만료되었으며, 이어서 2014년 Copaxone의 특허가 만료 예정에 있음. 기존 다발성 경화증 치료제는 높은 치료비용과 주사제라는 불편함에도 큰 시장을 형성하고 있었으나 최근에 접근성이 용이한 경구용 치료제 개발과 함께 치료제 시장이 경구용 투여제로 변화할 것으로 예측됨 (그림 1.10). 따라서, **국내에서 독자적으로 개량된 경구용 다발성 경화증 치료제를 개발할 경우, 기존 다발성 경화증 치료제보다 경쟁력있는 치료제로서 시장을 잠식할 수 있을 것으로 기대됨.**

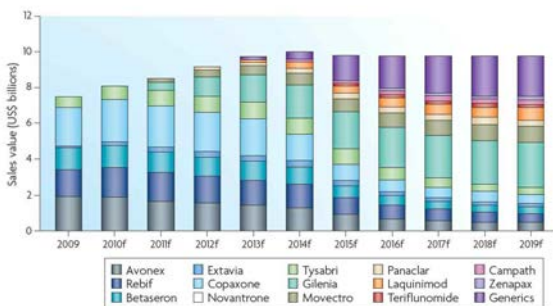


그림 1.10 다발성 경화증 치료제 시장의 점유율 동향 및 예측  
(Nat Rev Drug Discov. 2010 Oct;9(10):759-60)

- 현재 다발성 경화증 치료제로서 가장 대중적으로 사용되고 있는 것은 IFN $\beta$ (avonex, rebif)와 glatiramer acetate (GA, Copaxone)임. IFN $\beta$ 의 경우, 항원 다발성 경화증의 형성에 기여하는 면역세포인 Th1 T 세포의 기능을 억제하여 작용하는 것으로 알려져 있으나 Th17 T 세포 매개, 혹은 지속적인 투여에 의해 항 인터페론 항체가 형성되는 경우 그 효용성이 급격히 저하된다는 한계가 있으며, **주사제이기 때문에 접근성이 떨어지고, 높은 치료비용이 요구되며 다양한 부작용이 발생할 수 있다는 문제점이 있음** (Nat Med. 2010 April;

16(4): 406-412). GA는 중추 신경계 미엘린 수초의 구성 단백질인 Myelin Basic Protein (MBP)를 구성하고 있는 네 가지 아미노산을 무작위로 중합한 합성 단백질로서, 염증성 싸이토카인 단백질을 발현하여 다발성 경화증의 형성에 관여하는 Th1 T 세포 대신 IL-10을 형성하는 Th2 세포의 분화를 촉진시키거나, 항원 감작 반응에서 decoy로 작용하여 기능하는 것으로 보고 되었음 (Nat Med. 2010 (J Immunol. 2003 May 1;170(9):4483-8). 하지만, GA 또한 주사제제로 사용되기 때문에 접근성이 낮고, 다양한 부작용이 나타날 수 있다는 단점이 있음.

- IFN $\beta$ 와 GA 이후 기존 MS 치료제의 한계를 극복하기 위하여 다양한 약물이 개발되어 임상실험이 진행되었으며, 그 항목은 다음 표와 같음 (표 1.1).

품명	성분명	투여 방식	작용기전	Reference
Tysabri	Natalizumab	IV	면역세포의 Endothelial 세포막 $\alpha 4\beta 1$ -인테그린 수용체 결합을 억제, 중추 신경계로의 침투를 방어함.	Neurology. 2005 Apr 26;64(8):1336-42 Nature. 1992 Mar 5;356(6364):63-6.
Aubagio	teriflunomide	Oral	DHODH 효소 기능을 막음으로써 피리미딘의 de novo 합성을 억제, MS 질병을 유발하는 T 세포의 분열을 억제함.	Clin Immunol. 2012 Jan;142(1):49-56
Gilenya	fingolimod	Oral	S1P1-5에 작용하여 면역 세포가 림프절로부터 중추신경계로 이동하는 것을 억제함.	N Engl J Med 2010, 362:387-401
ABR215062	Laquinimod	Oral	T 세포 활성 및 혈뇌장벽 침투 억제, T 세포 기능을 조절하여 면역반응을 완화시킴.	Ther Adv Neurol Disord. 2013 Nov;6(6):343-52
Movectro	Cladribine	Oral	DNA 합성, 수복 기작을 억제하여 면역 세포의 세포자멸사를 유도	Expert Opin Emerg Drugs. 2011 Dec;16(4):697-712
Tecifedera (or BG-12)	Dimethyl fumarate	Oral	항산화 기작을 통하여 자가 활성 면역세포의 중추신경계 침투를 감소	N Engl J Med 2012, 367:1087-1097 N Engl J Med 2012, 367:1098-1107
Campath	Alemtuzumab	IV/ SC	B세포 및 T세포에 발현하고 있는 CD52에 특이적으로 작용하여 활성을 억제함.	Lancet. 1994 Jul 30;344(8918):298-301
Zenapax	Daclizumab	IV/ SC	IL-2 신호전달 기작 억제를 통해 유도된 CD56+ NK 세포에 의한 면역 반응 조절	Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5941-6

표 1.1 현재 출시되어 있는 다발성 경화증 치료제의 특징

- 최근 들어 출시된 다양한 치료제들은 기존 약물에 비해 증가된 효율을 보이지만, 여전히 **제발 방지율이 낮고 심장부작용, 두통, 어지러움증, 구토, 간기능 저하 등의 다양한 부작용을**

동반한다는 문제점을 갖고 있음. 또한, 현재까지도 근원적인 치료 및 회복 효과를 기대할 수 있는 약물이 개발되지 않아 이러한 unmet needs를 충족시킬 수 있는 개선된 치료제의 개발이 시급한 실정임.

- 경구용 투여제 중 하나인 Fingolimod (Gilenya®)는 S1P 수용체 agonist로 작용하여 활성화된 면역 세포가 림프절에서 순환계로 유입되는 것을 막아 결과적으로 중추신경계를 보호함(그림 1.11, 1.12). 경구용 투여제로서 접근성이 우수하고, 기존 치료제에 비해 효율적으로 작용을 하지만, S1P 수용체 신호전달 기작에 대해 비 선택적으로 작용하여 Vasoconstriction을 일으키는 등의 심장 관련 부작용이 존재함 (Br J Pharmacol. 2012 Jun;166(4):1411-8). 하지만, 이러한 부작용이 있음에도 불구하고 Fingolimod는 현재 다발성 경화증 치료제 시장에서 각광 받고 있는 치료제 중 하나임. 2013년도에 FDA의 승인을 받은 경구용 투여제 BG-12 (Tecfidera®)는 Nrf2 활성화제로서 인체 방어기작인 Nrf2를 활성화를 통해 항산화 및 항염증 관련 효소들을 과발현시켜 신경염증을 억제해 중추신경계를 보호함(그림 1.11, 1.12). 상대적으로 Fingolimod보다 낮은 독성으로 짧은 시간내에 블록버스터가 되었지만 여전히 위장장애 및 홍조의 부작용과 낮은 효율의 문제점을 보임.



그림 1.11 신경염증 억제를 통한 다발성 경화증 조절 타겟인 S1P agonist & Nrf2 activator



그림 1.12 경구용 다발성치료제 Gilenya® 와 Tecfidera®

- 그러므로 기존 경구용 다발성 경화증 치료제의 부작용 및 문제점을 극복할 수 있는 조절물질 연구는 신경염증성 뇌질환의 작용기전 이해를 돕고 근원적 치료물질 개발의 근거를 제공함으로써 신경염증성 질환에 대한 치료제 개발기술을 통해 글로벌 신약으로서 세계 의약품 시장에서 국가경쟁력을 확보할 수 있을 것임.

## 제 2 장 국내외 기술개발

### 제 1 절 연구개발 대상기술의 국내외 현황

#### 1. 세계적 수준

개념정립단계		기업화단계	O	기술안정화단계	
--------	--	-------	---	---------	--

- 다발성 경화증 치료제는 2010년까지 주사제 약물이 유일한 치료제였으며, 대부분의 시장을 차지하고 있었던 주사제 치료약물로는 인터페론 베타(IFN- $\beta$ ), 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate), 미토산트론(mitoxantrone), 나타리주맙(natalizumab) 등이 있음(그림 2.1).

Disease-modifying agent	Approved indication	Dose/Route	Frequency	Recommended tests
Glatiramer acetate (Copaxone®)	RR	20 mg/SC	q day	None
Interferon $\beta$ -1a (Avonex®)	Relapsing forms	30 $\mu$ g/IM	q week	LFTs and CBCs at baseline, 1 month, 3 months, 6 months, then periodically in absence of clinical symptoms
	Consistent with MS			TFTs q 6 months in those with thyroid consistent with MS thyroid dysfunction or as clinically indicated
Interferon $\beta$ -1a (Rebif®)	Relapsing forms	22 $\mu$ g or 44 $\mu$ g/SC (titration needed)	TIV	LFTs and CBCs at baseline, 1 month, 3 months, 6 months, then periodically in absence of clinical symptoms
				TFTs q 6 months in those with thyroid dysfunction or as clinically indicated, then periodic intervals in absence of clinical symptoms
Interferon $\beta$ -1b (Betaseron®)	Relapsing forms	250 $\mu$ g/SC (titration needed)	qOD	LFTs and CBCs at baseline, 1 month, 3 months, 6 months, then periodically in absence of clinical symptoms
	CIS with MRI features consistent with MS			TFTs q 6 months in those with thyroid dysfunction or as clinically indicated
Natalizumab (Tysabri®)	Relapsing forms	300 mg/IV	q 4 weeks	MRI with contrast of the brain prior to initiation
	Inadequate response to disease-modifying therapies			MRI and CSF testing for JC virus when suspecting PML
	Monotherapy only			Clinical follow-up at 3 and 6 months; then q 6 months thereafter
Mitoxantrone (Novantrone®)	Worsening RR, PR, or SP	12 mg/m <sup>2</sup> /IV	q 3 months	LVEF evaluation at baseline and prior to each dose
		Cumulative lifetime dose 140 mg/m <sup>2</sup>		Contraindicated if LVEF <50%
				LFTs and CBCs at baseline and prior to each dose

CBC = complete blood count with platelets, CIS = clinically isolated syndrome, DMT = disease-modifying therapy, LFT = liver function tests, LVEF = left ventricular ejection fraction, MS = multiple sclerosis, PML = progressive multifocal leukoencephalopathy, PR = progressive-relapsing, q = every, qOD = every other day, RR = relapsing-remitting, SC = subcutaneous, SP = secondary progressive, TFT = thyroid function tests, TIV = 3 times a week

그림 2.1 미국 FDA에서 승인된 다발성 경화증 치료제 (주사제)

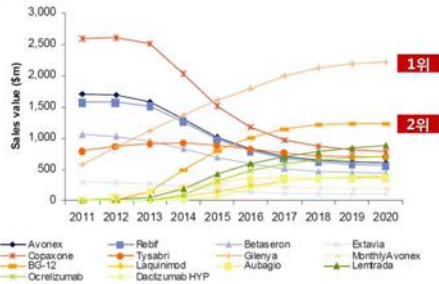
- IFN- $\beta$ : IFN- $\alpha$ 에 의해 유도되는 HLA class II 분자의 활성화 억제를 통해 항원 발현을 저해하고, T cell의 활성화를 억제함(Jiang et al., 1995). 또한 co-stimulatory molecule을 비활성화 시키고, autoreactive T cell 세포사멸(apoptosis)을 유도함(Genc et al., 1997; Sharief et al., 2001). 또한 T cell이 뇌혈관장벽의 혈관내피세포에 부착되는 것을 억제하



여 T cell의 뇌혈관장벽 투과를 막아줌(Calabresi et al., 1997). 현재 사용중인 인터페론 베타로는 IFN-β1a(Avonex, Rebif)와 INF-β1b(Betaferon)이 있으며 국내에는 Rebif와 Betaferon만 도입되어 있음.

- 글라티라머 아세테이트: glutamine, lysine, alanine, tyrosine 등 4개의 아미노산이 무작위로 결합된 합성분자로서 미엘린 수초 단백질인 MBP(myelin basic protein) 유사물질로 원래 다발성 경화증 동물모델 유도를 위해 만들어졌으나 도리어 EAE 유도를 막는 효과가 검증되었음. 작용 기전은 명확하지는 않으나 MBP가 HLA class II 분자에 결합할 때 MBP와 경쟁함으로써 MBP-reactive T cell이 활성화 되는 것을 억제할 것으로 추정됨(Neuhaus et al., 2001). 또한 글라티라머 아세테이트가 말초에서 proinflammatory cytokine을 생성하는 T helper(Th)1 cell을 anti-inflammatory cytokine을 분비하는 Th2 cell로 변형시켜 항염증 효과를 나타낸다고도 알려짐(Weber et al., 2004).
- 미토산트론: 급성 백혈병 치료제로 사용되던 항암제로 2000년 다발성 경화증에 대하여 FDA 승인을 받은 약물임. 분자량이 매우 작아 BBB를 통과하고, T cell, B cell, macrophage의 증식을 억제하고 APC의 항원제시기능을 저하시킨다고 알려짐. 또한 B세포 기능과 항체 생산을 억제하고, macrophage와 연관된 미엘린 수초 손상을 억제함으로써 다발성 경화증의 활성도를 감소시킴(Fox, 2004). 그러나 심장 독성이 나타나기 때문에 일정 용량 이상은 사용할 수 없음.
- 나탈리주맵: humanized 된 단일클론 항체로서 백혈구 표면의 adhesion molecule인 α-4 integrin(CD49)에 결합함으로써 백혈구가 혈관내피세포에 붙지 못하게 하여 T cell이 중추 신경계로 들어가지 못하게 함(Niino et al., 2006). 나탈리주맵은 재발-완화형 환자에게서 재발의 빈도를 줄이는데 뚜렷한 효과가 관명되어 2004년 FDA의 승인을 받았으나, 나탈리주맵을 투여받은 환자에게서 진행성 다초점성 백질뇌병증(progressive multifocal leukoencephalopathy)이 보고되어 나탈리주맵에 대한 사용을 철회하였다가 2006년 미국과 유럽에서 활동성, 재발성 다발성 경화증에 대한 단일치료제로 재승인 받은 상태임.
- 최근에 들어서, 기존의 항체 및 주사제 치료제의 **높은 치료비용과 불편함으로 인해 극대화된 경구용 치료제 요구와 함께 개발이 활발히 진행**되면서, 2010년 처음으로 Fingolimod (Gilenya®)라는 화합물이 경구용 치료제로 허가를 받은 후 최근에 2개의 경구용 치료제 (Teriflunomide (Aubagio®), BG-12 (Tecifedera®))가 추가로 승인을 받아 처방되고 있음.
- 그러나 현재 승인받은 3종의 경구용 치료제는 낮은 재발 방지율 (60% 미만)과 비선택성에 따른 부작용 (심장 부작용, 어지러움증, 간기능 저하, 구토 등)이 보고 되고 있으며, 좀 더 안전하게 장기 복용을 할 수 있는 치료제 개발의 요구가 대두되고 있음. 그럼에도 불구하고 Gilenya®와 Tecifedera® 두 경구용 치료제는 향후 매우 큰 시장을 형성할 것으로 예상됨 (그림 2.2).

다발성 경화증 → 세계 7대 주요시장 예측



전체 신경질환 치료제 → 세계 7대 주요시장 예측



그림 2.2 다발성 경화증 및 전체 신경질환 치료제 시장에서의 Gilenya®와 Tecifedera®

## 2. 국내수준

- 국내에서는 서양에 비해 상대적으로 다발성 경화증 환자 수가 매우 적고 이로 인해 희귀질환으로 지정되어 있어 다발성 경화증 치료제 개발은 초기단계임.
- 최근에 들어 의료 장비의 발전과 함께 진단 기술이 발달하면서 다발성 경화증으로 진단 받는 환자가 급격히 늘고 있으나, 첫 경구용 치료제인 Gilenya®를 포함해서 경구용 치료제 모두 아직도 국내에서 보험급여 적용에서 제외 되어 현재 적용대상인 주사제에 의존 하고 있음.
- 현재 유일하게 LG 생명과학에서 경구용 다발성 경화증 치료제 개발 연구를 진행하고 있으며 S1P1을 타겟으로 치료제 후보물질을 도출하여 전임상 시험을 진행 중임.

## 3. 국내의 연구현황

- ◆ 다발성 경화증 치료제의 개발과 관련된 임상 실험의 현황은 다음과 같음 (표 2.1).

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
National Institutes of Health Clinical Center	PPMS 환자에서의 Idebenone 효과 검증	Phase I/II Clinical Trial
Ospedale Civico, Lugano	MS 환자에서의 Prednisone 효과 검증	Phase IV Clinical Trial
AB Science	PPMS 환자에서의 Masitinib 효과 검증	Phase IIB/III
University of California, Los Angeles	임신한 MS 환자에서의 Estradiol의 병태 완화 검증	Recruting for clinical trial
MediciNova	MS 환자에서의 Ibudilast 효과 검증	Recruting for clinical trial
Novartis	MS 환자에서의 AIN457 (Secukinumab) 효과 검증	Phase II Clinical Trial
Novartis	MS 환자에서의 BAF-312 효능 검증	Phase III Clinical Trial
Merck Serono	MS 환자에서의 ONO-4641 효능 검증	Phase II Clinical Trial
Sheba Medical Center.	MS 환자에서 나타나는 인지 장애에 대한 Ritalin의 효과 검증	Recruting for clinical trial

표 2.1 다발성 경화증 치료 위한 임상실험 목록

#### 4. 본 연구결과의 중요성

- ◆ 본 연구를 통해 도출된 S1P1 리간드 선도물질은 효능에 중요한 S1P1 및 S1P5에 뛰어난 효능을 보이고 기존 약의 부작용에 관련된 S1P3에 효능이 뛰어나지 않은 훌륭한 선택성을 보이는 화합물로서, 기존의 다발성 경화증 경구치료제 보다 훨씬 뛰어난 효능 및 안전성을 보일 수 있는 신약후보 물질로 개발될 수 있을 것이라 전망함.
- ◆ 본 연구를 통해 도출된 Nrf2 activator 선도물질은 EAE 질환 유도에 중요한 역할을 하는 Th1과 Th17 세포의 분화를 동시에 억제할 수 있는 특성을 보유하므로 다발성 경화증에 대한 혁신신약 개발 후보물질로 활용될 수 있을 것이라 전망함.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 S1P1 수용체 조절물질 개발

#### 1. S1P1 수용체 조절물질 유효물질 도출

##### 가. 구조-기반 화합물 설계 및 가상 검색

- S1P1 antagonist ML056과 복합체로 되어 있는 S1P1 수용체 (pdb code: 3V2Y) 구조를 바탕으로 homology 모델링 방법을 사용하여 S1P3 및 S1P5 3차원 구조 시뮬레이션을 수행하였고, S1P1과 S1P5에 대한 활성 및 S1P3에 대한 selectivity 예측을 통한 신규 화합물 분자 설계 및 가상 검색 연구를 수행하였음 (그림 3.1).

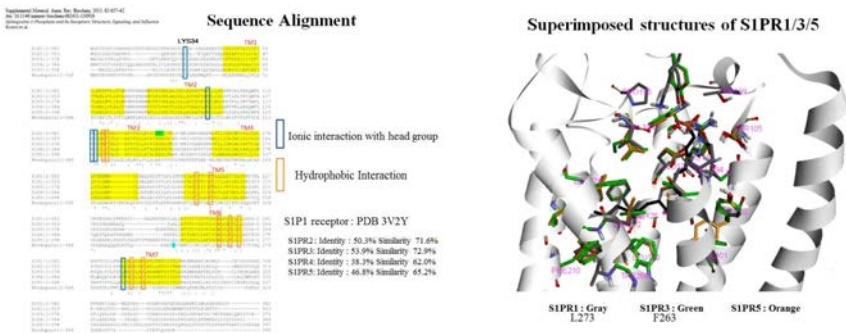


그림 3.1 Sequence alignment 와 homology 모델링방을 사용하여 3차원 구조 구축

- 구조기반 pharmacophore를 도출 및 active site docking study를 통해 S1P1/5 선택적 조절 물질을 예측 설계함 (그림 3.2)

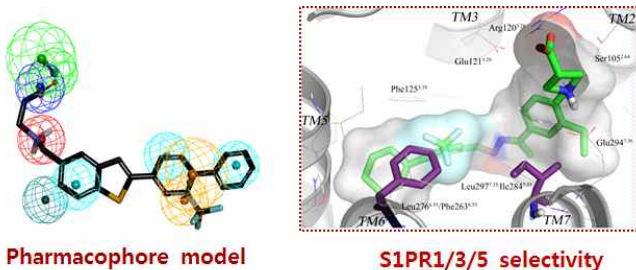


그림 3.2 구조기반 pharmacophore 도출 및 docking study

- 약물이 S1P3에 작용시 발생하는 심장계 부작용을 해소하기 위한 S1P1 vs S1P3의 선택성을 확보하기 위해 기능/효능/선택성에 대한 classification model을 구축하고 이를 이용한

가상검색을 통해 선택성이 우수한 조절물질을 예측 설계하였음 (그림 3.3)

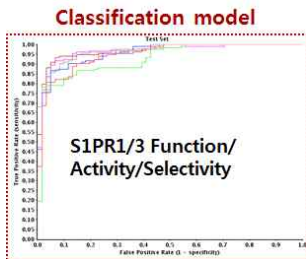


그림 3.3 Classification model 도출

- Molecular modeling을 통해 도출된 다양한 검색조건을 이용하여 1차적으로 백만종의 화합물을 pharmacophore 및 classification 모델을 이용해 virtual screening 하였고, 도출된 1000여 종의 화합물에 대해 receptor based docking study를 통해 100 여종의 활성 예측 화합물을 선별하였음. 선별된 100여종의 화합물에 대한 ADME/tox 예측 연구를 통해 최종적으로 30여종의 화합물을 도출 및 확보하였음 (그림 3.4)

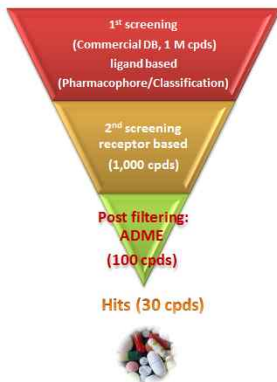


그림 3.4 Virtual screening strategy

#### 나. 활성 화합물 스크리닝

- KIST 뇌의약 연구단 보유한 1,000여종의 천연물 라이브러리 중 [식물종 1401개 extracts from 420 식물종], [해양종 571개 extracts from 441 해양종], [육상 미생물종 466개 extracts from 362 미생물종] GPCR focused 300여종에 대한 S1P1 효능 분석을 통해 3종

의 Hit compound를 도출하였음

- 1차년도에서 구조-기반 화합물 설계 [S1P1 antagonist ML056과 복합체로 되어 있는 S1P1 수용체 (pdb code; 3V2Y) 구조를 바탕으로 homology 모델링 방법을 사용하여 S1P3 및 S1P5 3차원 구조 시뮬레이션을 이용한 가상검색]을 통해 도출한 3종의 Hit scaffolds를 바탕으로 200 여종 이상의 유도체를 합성하였음 (그림 3.5)



그림 3.5 활성 화합물 스크리닝을 통한 Hit compounds 도출

## 2. S1P1 수용체 조절물질 선도물질 도출 및 유도체 화합물 합성

가. 테트라하이드로나프탈렌 유도체

- S1P1에 작용하는 선택적 조절물질 중에서 ono pharm에서 연구하는 ono-4641 화합물 구조와 2012년에 Science에서 보고된 X-ray 결정구조를 기반으로 하여 아래와 같은 스캐폴드의 화합물을 설계함 (그림 3.6)

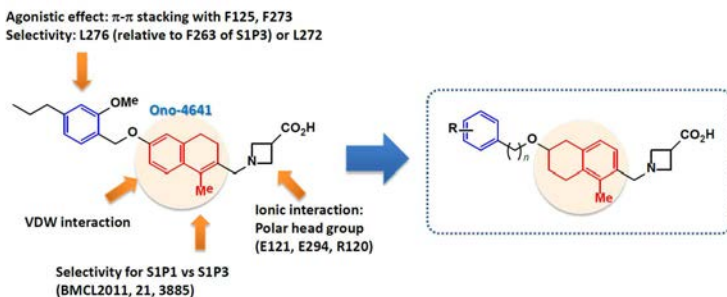


그림 3.6 S1P1 agonist로서의 신규 테트라하이드로나프탈렌 유도체의 구조

- 일차적으로 기존에 발표된 특허를 바탕으로 보다 효과적인 ono-4641의 합성법을 계획하였으며 아래와 같이 A 부분을 3 단계, B 부분을 4 단계로 각각 합성한 후 최종적으로 On-4641 화합물을 성공적으로 합성하였음(그림 3.7)

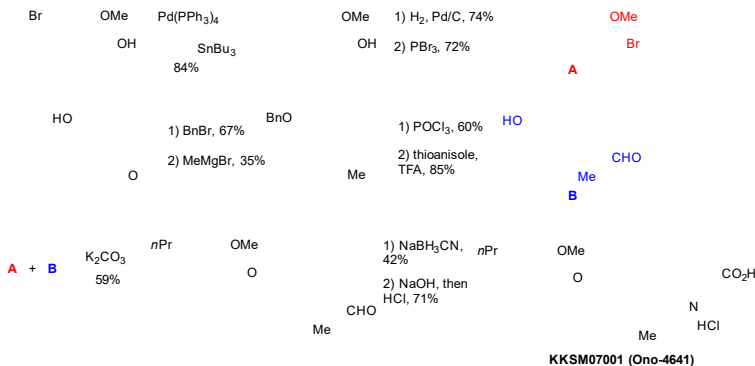


그림 3.7 Ono-4641 (KKSM07001)의 합성

- Ono-4641 (KKSM07001)의 우수한 약물 효능을 검증하기 위하여 아래의 그림에서와 보는 바와 같이 칼슘 어세이, 베타아레스틴 어세이 (2가지)를 수행하였으며 EC<sub>50</sub>가 각각 111.6 nM, 0.597 nM, 1.57 nM를 나타내고 있으며, 이 결과를 대조값으로 하여 설계한 화합물들의 약효를 비교 평가할 예정임(그림 3.8)

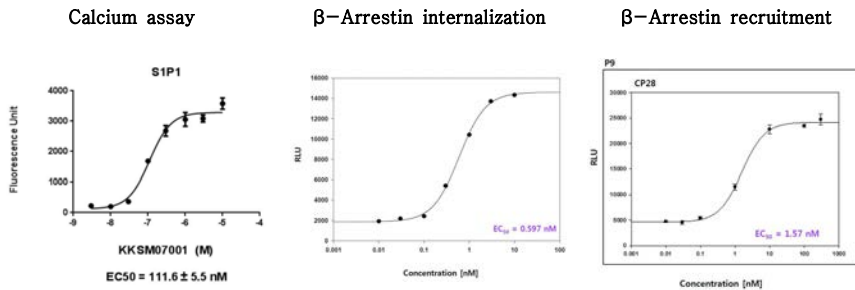
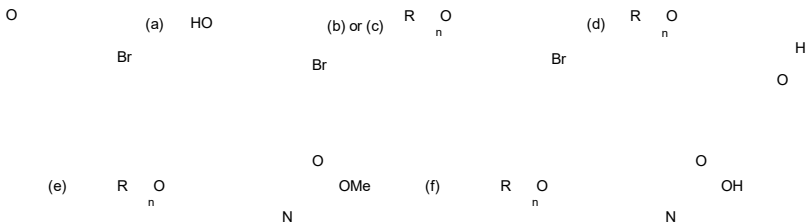


그림 3.8 Ono-4641 (KKSM07001)의 in vitro 어세이 결과

■ ono-4641 (KKSM07001)보다 더 효과적인 S1P1 agonist를 개발하고자 테트라하이드로나프탈렌을 기본 골격으로 가지고 있는 ono-4641의 유도체를 20종 합성하였음. 6-Bromo-2-tetralone으로부터 환원하고, alkylation을 통하여 ether를 합성하고 formylation, reductive alkylation 및 가수분해를 통하여 카르복시산 유도체들을 합성하였으며 카르복시산들을 환원하여 알콜 유도체들을 합성함 (그림 3.9)



Reaction conditions and reagents: (a)  $\text{LiAlH}_4$ , ether,  $0^\circ\text{C}$  to rt, 95%; (b)  $\text{NaOH}$ , TBAI, DMSO, rt; (c)  $\text{NaH}$ , THF, DMF, rt, 36–80%; (d)  $n\text{BuLi}$ , DMF,  $-78^\circ\text{C}$ , 60–83%; (e)

Methylazetidine-3-carboxylate, DIPEA,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 41–77%; (f)  $\text{NaOH}$ , MeOH, rt, 73%

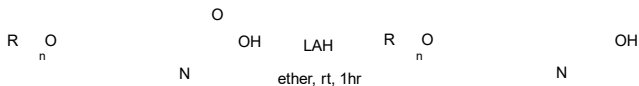


그림 3.9 Ono-4641 (KKSM07001)의 테트라하이드로나프탈렌 유도체 합성

■ 새로운 테트라하이드로나프탈렌 유도체들의 우수한 약물 효능을 검증하기 위하여 칼슘여세이를 진행하였으며 KKSM07016 화합물이  $10\ \mu\text{M}$ 와  $1\ \mu\text{M}$  concentrations에서 각각 90%와 85%의 아주 높은 efficacy를 보였음.  $\text{EC}_{50}$  value 에서도 대조화합물인 BAF312 ( $103 \pm 9\ \text{nM}$ )에 비교할 만한 활성 ( $314 \pm 29\ \text{nM}$ )을 보였다 (그림 3.10).



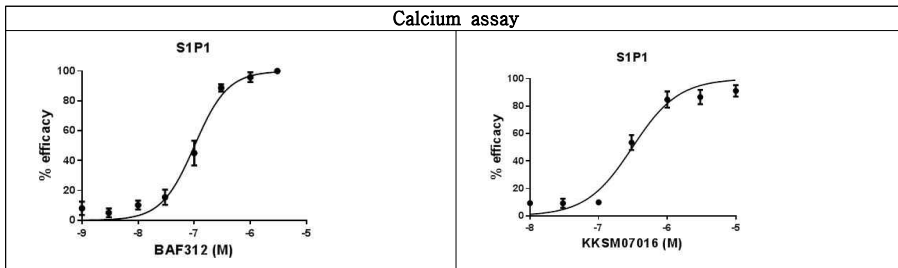


그림 3.10 BAF312 (control) 과 KKSM07016의 in vitro 어세이 결과

#### 나) 옥사다이하졸 유도체의 합성

- 옥사다이하졸 유도체는 S1P1 크리스탈 구조에 docking한 결과, 옥사다이하졸 유도체의 G score 값이 S1P1 길항제 ML-056 (G score -11.02)과 항진제 CYM-5442 (G score -11.8)의 G score와 상응하는 값은 보여 주어 유도체를 다음과 같이 합성하였음

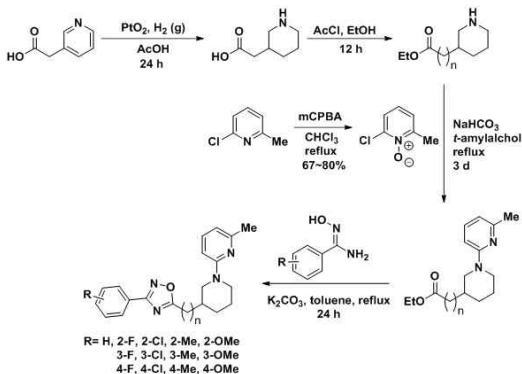


그림 3.11 옥사다이하졸 유도체의 합성

- 3-피리딜아세트산을 환원하고 esterification을 통하여 에틸 3-피페리딘오아세테이트를 합성하고, 피페리딘 아민에 6-메틸피리딘을 도입하고, 치환된 하이드록시벤즈이미다마이드를 이용하여 목적화합물을 합성함(그림 3.11)
- 또한 하이드록시아세타마이드에서 시작하여 TBS-protected 다이하이드록시아세티다마이드를 3스텝에 46% 수득물로 얻었고 그림 1에서 얻어진 ethyl 2-(1-(6-methylpyridin-2-yl)piperidin-3-yl)acetate과 반응하여 옥사다이하졸 구조를

합성한 뒤 아제티딘카르복실산을 도입하여 목적하는 화합물 아제티딘카르복실산이 포함된 옥사다리아졸 유도체 25종을 합성하였음(그림 3.12)

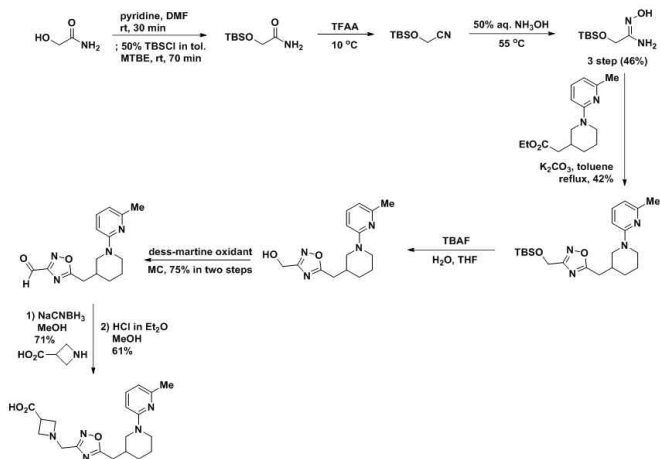


그림 3.12 옥사다리아졸 유도체의 합성 2

## 나) 피라졸로아제핀 유도체의 합성

- 기존의 알려진 S1P1 항진제를 바탕으로 피라졸로아제핀 구조를 기반으로 한 새로운 S1P1 항진제를 합성함. 다양한 폐녹시 그룹을 스즈키 커플링 반응으로 피라졸로아제핀 골리와 연결하여 유도체들을 3종 합성함 (그림 3.13).

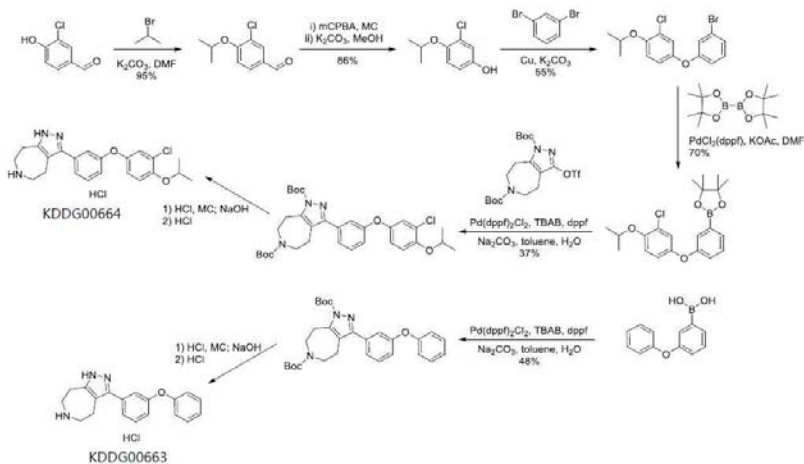
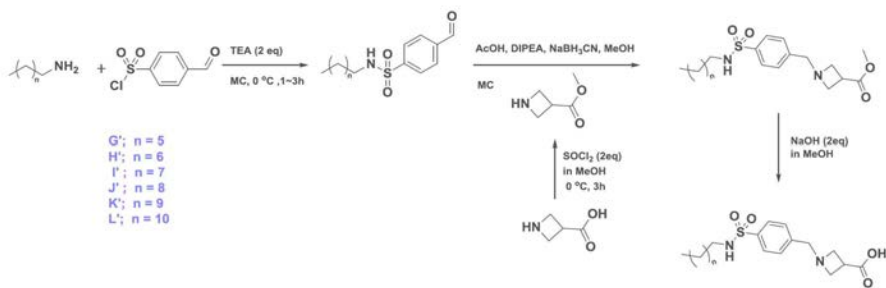


그림 3.13 피라졸로아제핀 유도체의 합성

## 다) 벤젠설포아마이드 유도체의 합성

- Sphingosine-1-phosphate 화합물과 같은 리피드성 알킬 그룹을 포함하고 있는 벤젠설포아마이드 유도체들을 디자인하고 총 20종을 합성함. 알킬레이션으로 벤젠설포아마이드를 얻고 reductive alkylation으로 원하는 유도체들을 합성함 (그림 3.14).



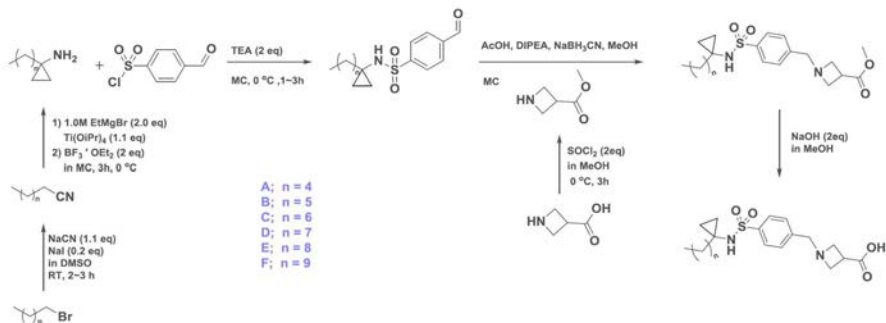


그림 3.14 벤젠설포아마이드 유도체의 합성

- S1P1 항진제로 알려진 azetidine 화합물에 sulfonamide moiety를 삽입하여, S1P1 수용체의 binding site에 hydrogen bonding등을 유발하여 기존의 항진제보다 활성이 높은 화합물을 개발하고자 함 (그림 3.15)

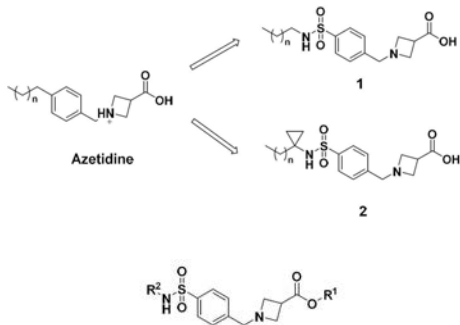
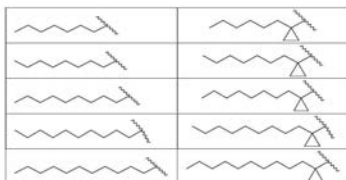
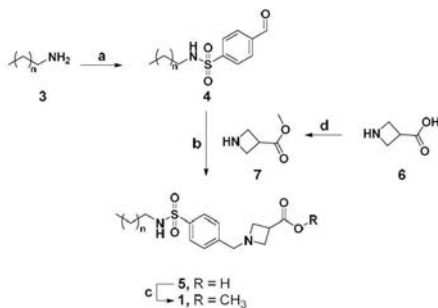
R<sup>1</sup> = H, CH<sub>3</sub>R<sup>2</sup> =

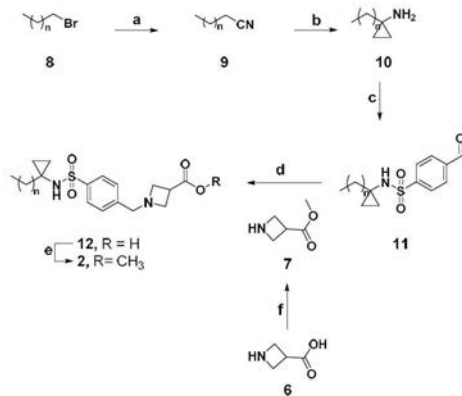
그림 3.15 Azetidine 화합물의 최적화 전략

■ 디자인한 S1P1 항진제는 다음과 같은 합성법을 사용하여 합성하였음 (그림 3.16)



Reaction condition and reagents: (a) TEA, DCM, 0 °C, 77%; (b) AcOH, DIPEA, NaBH<sub>3</sub>CN, DCM, MeOH, 0 °C, 56%; (c) NaOH, MeOH, rt, 58%; (d) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C to rt, 77%

Scheme 1. Synthesis of azetidine series



Reaction condition and reagents: (a) NaCN, NaI, DMSO, rt, 60 %; (b) Ti(O<sup>i</sup>Pr)<sub>4</sub>, 3.0M EtMgBr, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 52%; (c) TEA, DCM, 0 °C, 42%; (d) AcOH, DIPEA, NaBH<sub>3</sub>CN, DCM, MeOH, 0 °C, 78%; (e) NaOH, MeOH, rt, 78%; (f) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C to rt, 77%

그림 3.16 Azetidine 화합물의 합성 경로

라) 테트라하이드로아이소옥사졸로피리딘 유도체의 합성

- 현재 다발성 경화증 치료 목적으로 개발되어 문헌에 보고되어진 S1P1에 활성을 나타내는 화합물들 중 Siponimod(BAF312)와 GSK2263167의 구조적인 특징에 기초 하여 새로운 화합물을 설계하였음.
- 기본적으로 기존의 S1PR1,5에 작용하는 화합물의 경우 그 구조적인 특징은 lipophilic group와 polar head group로 구성되어 있으며, lipophilic group의 경우 S1PR1의 단백질 구조에서 Phe273, Phe210 또는 Trp269에 interaction하고, polar head group의 경우 Glu121, Arg120과 interaction하여 S1PR에 결합이 잘 이루어져 작용제로서의 기능을 가지게 되는 것임.
- 화합물의 중간에 위치한 옥심 혹은 옥사다리아졸 대신에 테트라하이드로 이소옥사졸로피리딘 도입 된 화합물을 설계 하였고 이들의 가상 pharmacophore 모델에 적용 그 결합 정도를 예측 하였고 그 결과가 좋은 화합물들을 선택 하여 합성하였음 (그림 3.17).

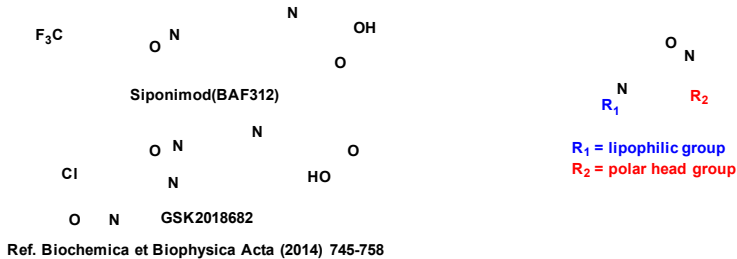


그림 3.17 Tetrahydroisoxazolopyridine 유도체 화합물의 설계

- 가상 pharmacophore 모델에서 높은 G-스코어를 나타낸 두 화합물을 선택 하였고 그 결합 모양을 아래 나타내었음 (그림 3.18).

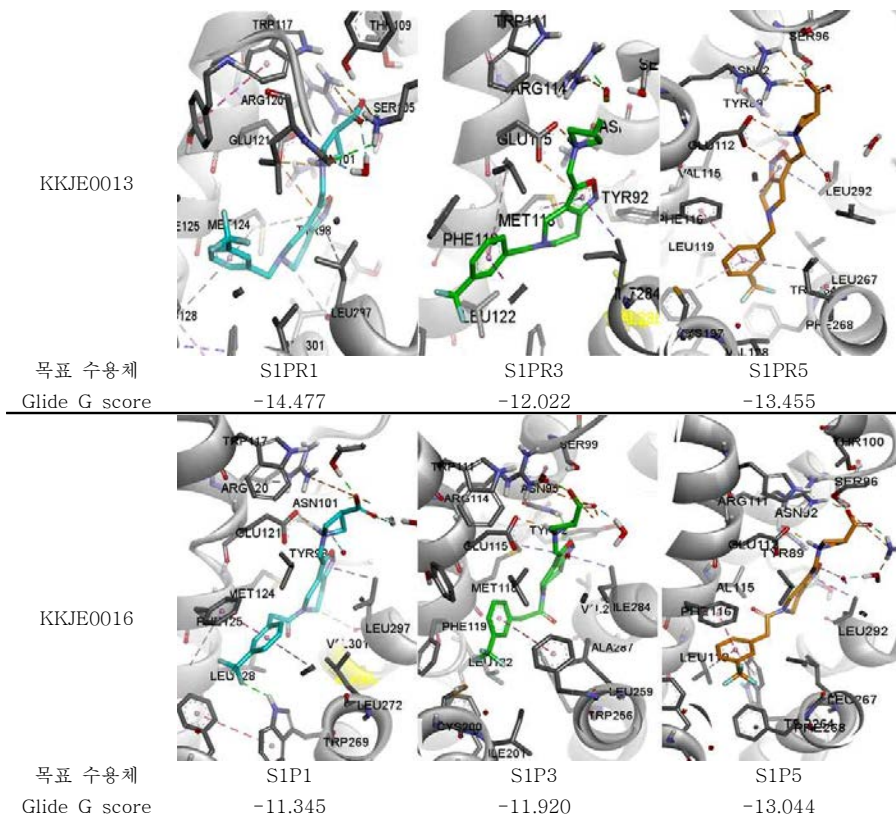


그림 3.18 컴퓨터 분자 모델링에 의한 KKJE0013, KKJE0016 화합물의 glide g score 값

## ■ Tetrahydroisoxazolopyridine 유도체 합성경로 설계 및 합성

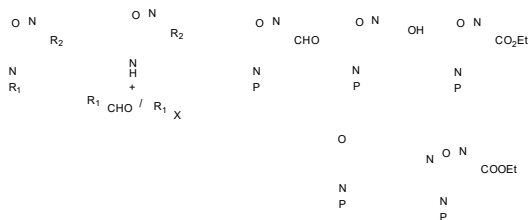
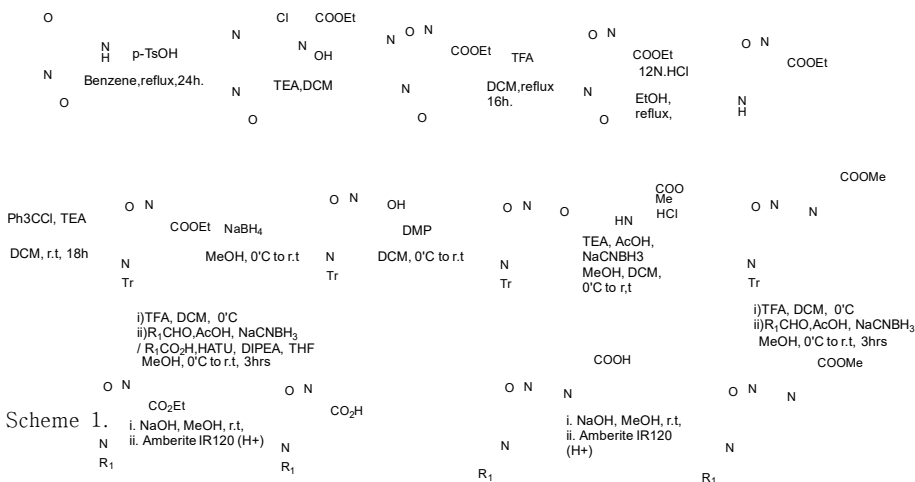


그림 3.19 Tetrahydroisoxazolopyridine 유도체 합성 전략

- Pyrrolidine을 출발물질로 하여 Tetrahydroisoxazolopyridine 3-carboxylate 를 합성 한 후 carboxylate기를 환원시켜 알콜로 변형 한 후 다시 산화반응으로 알데히드 화합물을 합성한 후 reductive alkylation 반응으로 다양한 polar head group을 포함 하는 R<sub>2</sub> 기능기들을 도입 하고자 하였음 (그림 3.19).
- 합성 경로를 아래 그림에 도시화 하여 나타 내었고 이 화합물을 중간화합물로 이용하여 R<sub>1</sub>-CHO 화합물들과 결합시키는 반응경로를 설계 하였고 각 단계에 해당 하는 화학반을 법을 이용 하여 총 30여종의 화합물을 합성 하였음 (그림 3.20)



Scheme 1

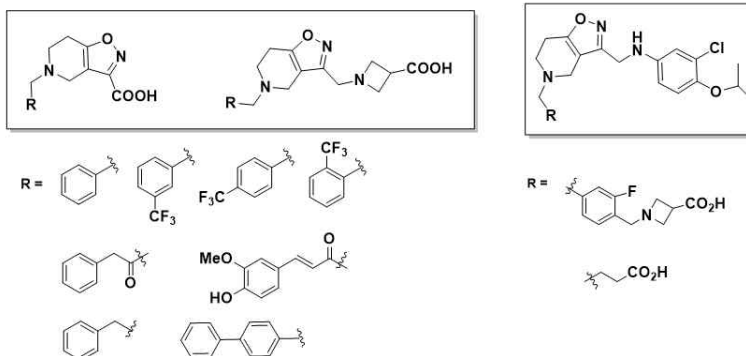


그림 3.20 Tetrahydroisoxazolopyridine 유도체 합성 경로 및 화합물





- 실제 합성 방법을 정리 하여 아래 표에 도시화 하였고 이 방법에 따라 총 11종의 화합물을 합성하였음 (그림 3.22).

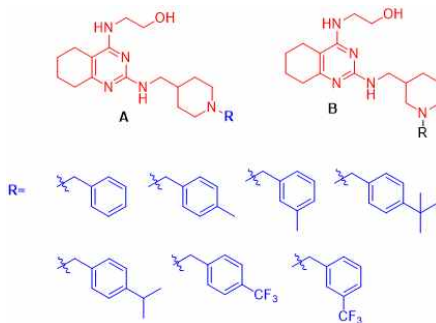
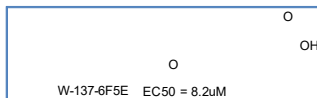


그림 3.22 테트라하이드로퀴나졸린 유도체의 합성

#### 마) W-137-6F5E 유도체의 합성

- 해양천연물 라이브러리의 S1P1에 대한 활성 검색결과 가장 높은 활성을 나타낸 화합물로서 W-137-6F5E (S1P1  $EC_{50} = 8.2 \mu M$ )이 발굴되었음. W-137-6F5E 화합물은 해조류로부터 추출, 분리하여 얻어진 화합물로서 화합물의 용량이 매우 적어 보다 정확한 S1P1의 활성 검색과 in vivo 에서의 뇌신경 염증 억제활성 검증을 위해 수백 mg 단위의 화합물이 필요했음. 이를 위해 화학적 합성 방법을 고안 하였고 유기합성방법으로 화합물을 합성 하여 구조분석과 활성 검색을 하고자 하였음. 이와 더불어 그의 화학구조적 변화를 준 유도체들을 고안하여 W-137-6F5E보다 높은 활성을 나타내는 신규 물질을 발굴하고자 하였음.



- Suberic acid monomethyl ester를 출발물질로 Wittig 반응을 이용 E-alkene을 형성 시키고자 하였음. 카보닐기의 존재로 스테릴라이즈드 일라이드가 되도록 포스핀 알켄을 해당

하는 acid chloride 로 기능을 변형 시켜 합성 하고자 하였음 (그림 3.23).

#### Total synthesis

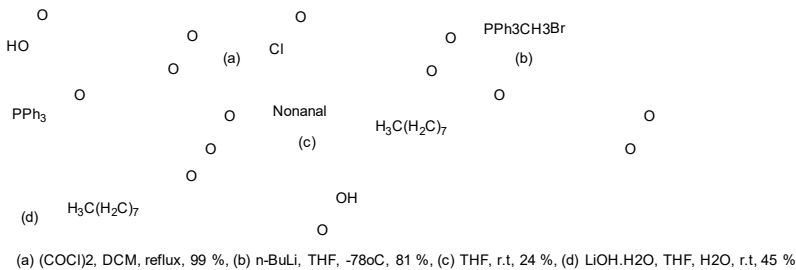
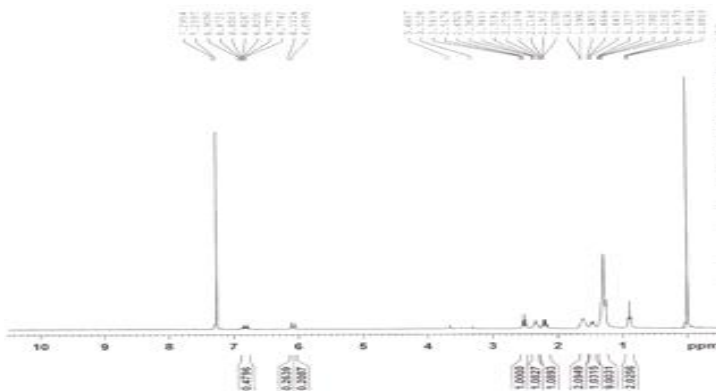


그림 3.23 (E)-8-oxooctadec-9-enoic acid의 전합성

- Suberic acid monomethyl ester 5.23 g 를 출발물질로 하여 oxalyl chloride와 반응 시켜 정량적으로 카르복실산을 카르복스클로라이드로 변형시킨후 n-BuLi 하에서 menthylene triphenyl phosphonium bromide 와 반응 시켜phosphonium ylide를 높은 수율로 합성 하였음. 이를 nonanal 과 반응 시켜 E-alkene 을 24% 수율로 얻어 가수 분해 하여 목적 하는 화합물 (E)-8-oxooctadec-9-enoic acid을 4단계반응을 통해 총 55% 수율로 610 mg을 합성 하였음. 화합물의 최종 구조 확인은 천연 추출물 W-137-6F5E 의 NMR spectrum 을 비교 하여 두 화합물이 같음을 확인 하였음 (그림 3.24)



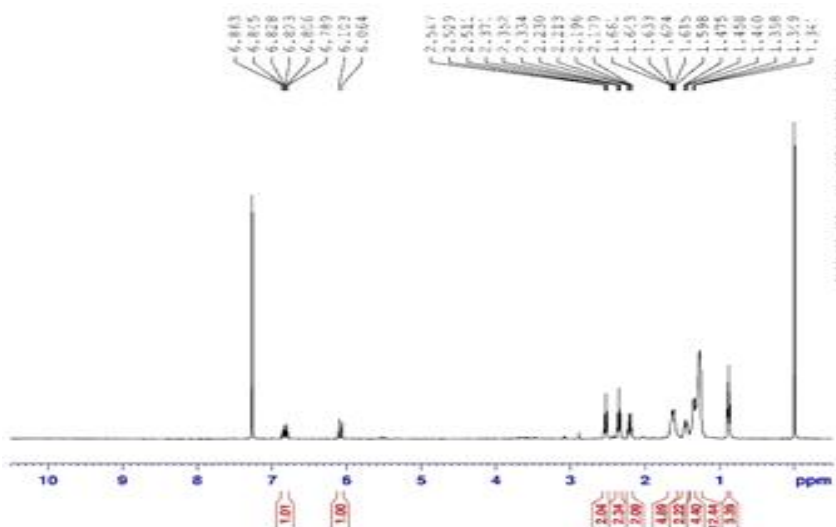


그림 3.24. 합성된 (E)-8-oxooctadec-9-enoic acid의  $^1\text{H}$  NMR

#### ■ 신규 유도체의 고안 및 합성

W-137-6F5E 의 화합물의 화학구조를 아래 그림에 제시된 것처럼 왼쪽 A 부분과 오른쪽 B 부분을 각각 사슬의 길이변화, 친유성기의 도입으로 화학구조적 변화를 준 화합물 유도체를 합성 하고자 하였음 (그림 3.25).

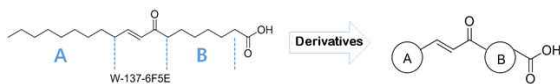


그림 3.25. W-137-6F5E 유도체 전략

- 우선 A, B에 phenyl ring을 도입하여 분자 구조를 평면적이게 만들고자 하였음. 천연물 구조의 길이를 기준으로 하여 유도체의 길이 탄소수 18개로 구성되도록 정하여 합성하였음. 합성 경로 및 방법을 아래에 나타내었음.
- 벤조프로파노익에시드를 출발물질로 하여 Friedel-craft 아실화 반응으로 bromoacetyl group을 페닐링의 para 위치에 도입시키고 해당하는 phosphonium salt 와 phosphonium ylide를 거쳐 다양한 알데히드 화합물과 Wittig Reaction 시켜 E-alkene을 합성하였음. 이와 같이 합성된 화합물들을 가수분해 시켜 목적하는 유도체 6종을 합성하였음.
- 6종 화합물들에 대한 S1P1에 대한 생리 활성 검색을 하였으며 그 결과로 최초 천연물로부터 발굴된 화합물에 비해 좋은 활성을 보이는 화합물을 도출하였음.

### 3. 효능 검색 시스템 확립 및 검증

#### 가. In vitro 효능 검색 시스템 확립 및 검증

##### (1) Calcium assay 효능 검증 시스템 확립

- S1P1 receptor가 과 발현된 Calcium optimized cell line 확립 및 FLIPR를 이용한 고효율, 초고속 calcium assay 시스템을 구축하였음. S1P1 agonist로서 다발성 경화제 치료제로 처

방되고 있는 FTY720-p 화합물을 이용하여 스크리닝 시스템을 검증한 결과,  $EC_{50} = 5.19$  nM의 유효성있는 결과를 통해 calcium assay 시스템을 검증하였음(그림 3.26)

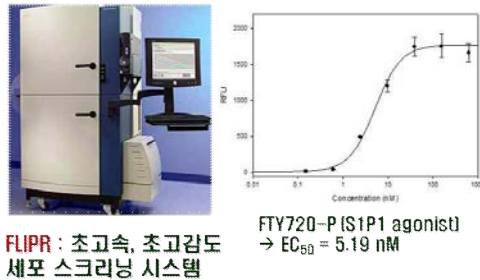


그림 3.26 calcium assay 효능 검증 시스템

## (2) Internalization assay 효능 검증 시스템 확립

- S1P1 receptor 타겟의 다발성 경화증 치료기전은 agonist에 의한 beta-arrestin의 recruitment와 이로 인한 receptor의 internalization에 기인함. S1P1 receptor는 lymph node에 있던 lymphocyte가 혈류로 나가는데 중요 인자이며, internalization에 의해 S1P1 receptor가 감소함에 따라 혈액의 lymphocyte level이 감소하게 되면 자가면역질환의 면역 반응을 낮추어 줌으로써 치료효과를 보임
- 따라서 S1P1 agonist로서의 합성화합물에 대한 in vitro 효능 검증에서 calcium assay와 함께 internalization을 검증할 수 있는 평가 시스템이 필수적임. DiscoverRx의 셀라인을 이용하여 S1P1의 internalization 효능을 평가할 수 있는 어레이 시스템을 확립하였음. 또한 FTY720-p를 이용한 효능 평가를 통해 어레이 시스템을 검증하였음(그림 3.27)

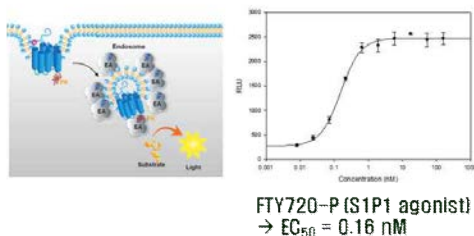


그림 3.27 S1P1 internalization assay 시스템

### (3) $\beta$ -arrestin assay 효능 검증 시스템 확립

- 선택적 신호전달 (Biased Ligand) ; GPCR은 리간드 혹은 효능제가 수용체에 결합하게 되면 수용체의 구조가 바뀌며, 주로 G-단백질과 연결되어 연쇄적인 반응에 의한 다양한 세포 반응이 일어나지만,  $\beta$ -arrestin과 같은 다른 scaffold 단백질과 결합을 유도하기도 함 (그림 3.28).
- 편향된 신호에 관한 구조와 기전 측면은 잘 알려지지 않았지만, 유일한 신호전달 과정에 선택적으로 영향을 주는 biased 리간드는 생물학적 연구위상과 약물 후보로 상당한 치료 효과를 가져올 것으로 예상됨.

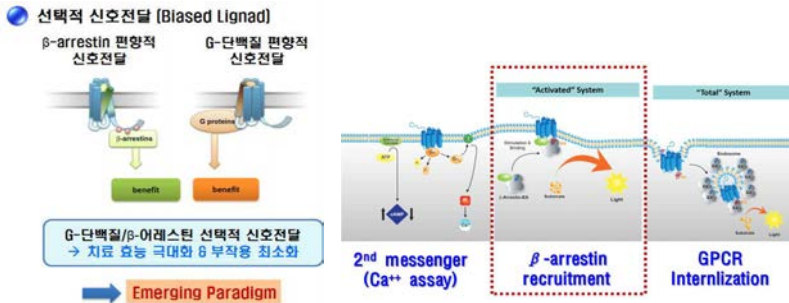


그림 3.28 선택적 신호전달 모식도 및 S1P1  $\beta$ -arrestin assay 시스템

- S1P1 수용체 타겟의 다발성 경화증 치료기전은 agonist에 의한  $\beta$ -arrestin의 recruitment과 이로 인한 수용체의 internalization에 기인하므로, S1P1 internalization 효능을 평가하는 어세이 시스템과 함께, G-단백질 신호경로에 의한 calcium assay와 비교하여 선택적 신호전달 효능을 평가할 수 있는 어세이 시스템을 확립하였음. 또한 S1P1 ligand인 S1P와 S1P1 agonist로 알려진 BAF312(Siponimod)를 이용한 효능 평가를 통해 어세이 시스템을 검증하였음 (그림 3.29)

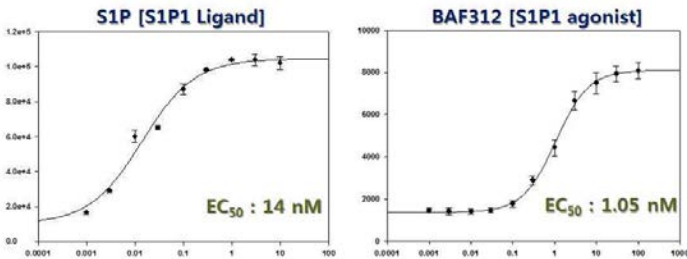


그림 3.29 효능 평가를 통한 S1P1  $\beta$ -arrestin assay 시스템 검증

#### (4) S1P3/5 세포주 구축 및 assay 시스템 확립

- 기존 치료제 중 하나인 Fingolimod (Gilenya®)는 S1P 수용체 agonist로 작용하여 활성화된 면역 세포가 림프절에서 순환계로 유입되는 것을 막아 결과적으로 중추신경계를 보호하지만, S1P 수용체 신호전달 기작에 대해 비 선택적으로 작용하여 S1P3에 작용하여 Vasoconstriction을 일으키는 등의 심장 관련 부작용이 존재함
- 반면 S1P5 신호전달은 oligodendrocyte에서 myelination을 유도하여 S1P1에 수용체 타겟의 치료기전과 시너지 효과를 보일 수 있으므로, S1P 수용체 family에 대한 특이성을 분석할 수 있는 어sey 시스템을 확립함
- 다양한 발현 벡터로의 제작을 위하여 Gateway system cloning을 이용한 entry clone으로 제작하였으며, HA-tagging, GFP-tagging, IRES vector의 3종의 발현 벡터로 전환하였으며, FLIPR Calcium 6 (Ca-6)를 이용한 효과적인  $Ca^{2+}$  assay를 위한 최적의 조건을 보유하고 있는 GPCR (S1P1) 발현 세포주 (1차년도 제작) 기준으로 각각의 ligand 및 agonist로 알려진 화합물에 대한 반응성을 비교하고, 이를 통한 약효 검색법을 구축하였음 (그림 3.30)

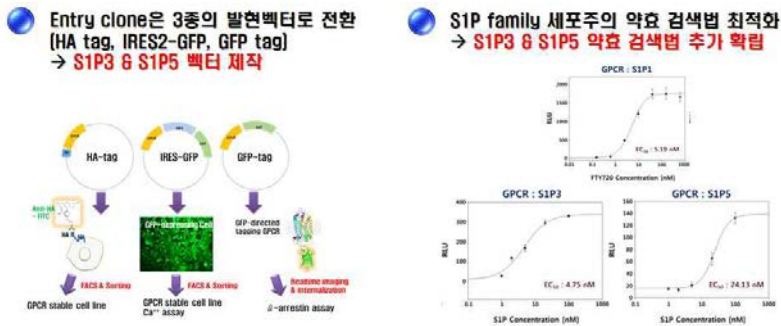


그림 3.30 S1P3, S1P5 약효 검색법 추가 확립 및 검증

#### 나. In vivo 효능 검색 시스템 확립 및 검증

##### (1) PLC in vivo 효능 평가시스템 구축

- 일차적 in vivo 효능은 S1P1 receptor의 internalization에 의한 혈액 내 lymphocyte의 감소를 확인함으로써 검증할 수 있음. 이를 위해 rat에 활성 화합물을 경구 투여한 후 경과 시간에 따라 혈액을 채취하여 hematology 분석을 통해 peripheral lymphocyte counting (PLC)을 통해 효능을 평가함
- S1P1 agonist인 FTY720을 이용하여 효능평가 시스템을 검증하였음. in vivo 효능 평가의



경우 in vitro에서 사용하는 FTY720-p와는 달리 다발성 경화증 치료제 Gilenya 와 같은 form의 FTY720을 투여하였음. 10 mg/kg 투여시 48시간 동안 70% 이상 lymphocyte의 감소 효능을 나타냈으며, 0.1 mg/kg 투여 시 3일간 50% 정도의 감소를 동반한 후 회복됨을 확인하였음. 이러한 결과는 FTY720에 대한 PLC 보고들을 바탕으로 유효성이 있는 결과임을 확립함 (그림 3.31)

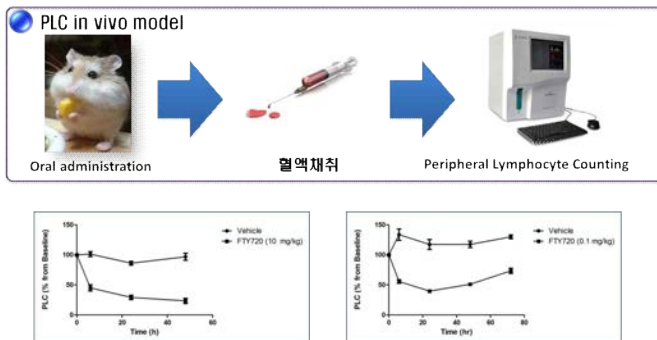


그림 3.31 PLC in vivo model 확립 및 평가 시스템 검증

## (2) 신경 염증성 뇌질환 동물모델 (EAE) 확립 및 평가시스템 검증

- Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 와 Mycobacterium tuberculosis를 emulsify하여 MOG 펩타이드와 혼합한 후, pertussis toxin과 함께 경구 투여하고 MOG 펩타이드의 농도 및 투여횟수 등의 조건을 EAE score 3이 되도록 최적화하여 EAE 동물모델을 구축하였음
- 경구투여 약물효능 분석을 위해 EAE, 동물모델의 꼬리, 뒷다리 및 앞다리 마비 정도에 따른 score 기준체계 확립하였음(그림 3.32)

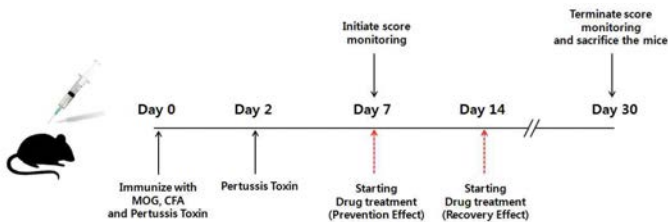
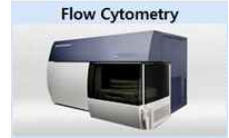


그림 3.32 체계 적인 약물 효능 평가를 위한 EAE 동물 질환 실험 계획 모식도

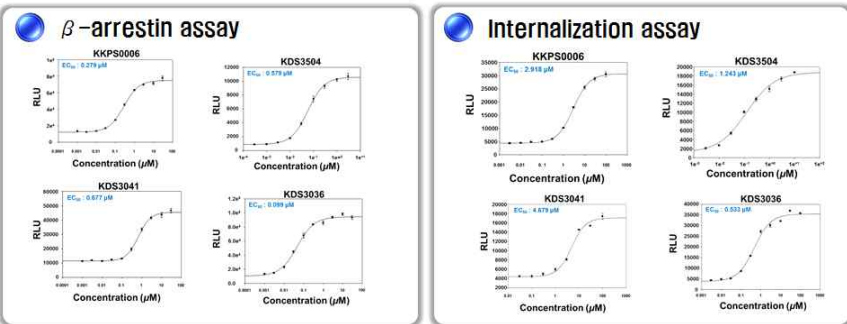
- Spinal cord 분리기술을 정립하고, Collagenase와 Dnase를 처리하여 얻은 단일세포 (single cell suspension)에서 percoll을 이용해 mononuclear cell을 분리하여 Th1, Th17과 같은 침투된 림프구 분석 기술 확립함
- 중추신경조직을 H&E 조직염색법을 이용하여 조직학적으로 염증정도 및 면역세포 침윤을 분석할 수 있는 조건 확립함
- Spleen과 spinal cord에서 분리한 세포를 PMA/Ionomycin으로 자극하고 유세포분석기 (FACS)를 이용하여 싸이토카인의 발현을 intracellular staining으로 측정하는 실험 조건 구축함
- Peripheral blood lymphocyte counting, draining lymph node, spinal cord 및 spleen counting을 통해 경구 투여한 약물의 세포의 이동에 대한 조절 효능을 분석하는 기술 확립함
- 각각의 확립된 기술을 토대로 EAE 모델의 score, spinal cord의 Th1, Th17 세포의 싸이토카인, Brain histology를 종합적으로 분석하여 EAE 동물에서의 치료 효과를 분석하는 기반을 구축함



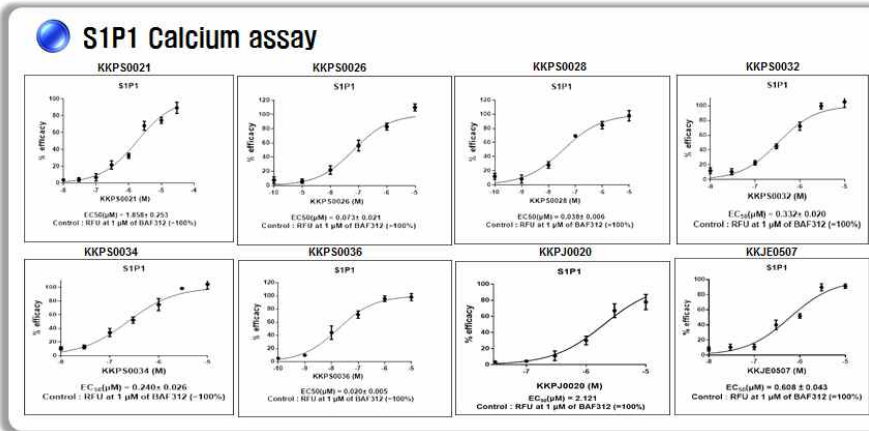
#### 4. S1P1 수용체 조절물질 선도물질 도출

##### 가. S1P1 선도물질 도출

250종의 유도체 중에서 확립한 S1P1 어세이를 이용하여 효능이 좋은 ( $EC_{50}$  수백 nM 수준) 선도물질을 12종 도출하였으며, 일부 compounds는 S1P1-G단백질 신호전달경로 (Calcium assay) 혹은 beta-arrestin scaffold 또는 수용체의 internalization 효능이 좋은 특징을 포함하고 있음 (그림 3.33).



Compounds	Calcium assay ( $EC_{50}$ , $\mu M$ )	β-arrestin assay ( $EC_{50}$ , $\mu M$ )	Internalization assay ( $EC_{50}$ , $\mu M$ )
KKPS0006	0.065	0.279	2.918
KDS3504	1.22	0.579	1.243
KDS3041	> 10	0.677	4.679
KDS3036	> 10	0.099	0.533
해양 천연물 1	> 30	25.8	8.2



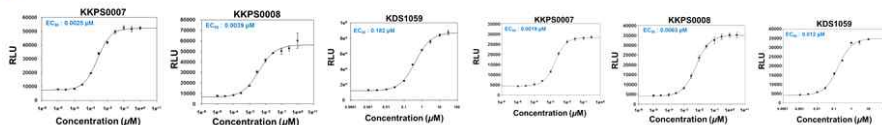
Compounds	Calcium assay ( $EC_{50}$ , $\mu M$ )	Compounds	Calcium assay ( $EC_{50}$ , $\mu M$ )
KKPS0021	1.858	KKPS0034	0.240
KKPS0026	0.073	KKPS0036	0.020
KKPS0028	0.038	KKPJ0020	2.121
KKPS0032	0.332	KJJE0507	0.608

그림 3.33 S1P1 선도물질 도출

### 나. S1P1 선도물질 최적화

- 선도 물질들은 기존의 FDA 승인 비선택적 효능제 (Fingolimod) 대비 비슷한 효능을 보일 수 있도록 optimization을 하였고, 그 결과 효능이 뛰어난 ( $EC_{50}$  수 nM 수준) KKPS0007, KKPS0008, KDS1059 3종의 화합물을 도출하였음
- 또한 3종의 최적화 화합물은 GPCR 신호전달경로에 대한 서로 다른 선택성을 가졌으며 [KKPS0008 S1P1-G단백질 신호전달경로 (Calcium assay) 선택성, KKPS0007, KDS1059 beta-arrestin scaffold 또는 수용체의 internalization 선택성], FDA 승인 비선택적 효능제 (Fingolimod)보다 편향적 (Biased) ligand를 도출하였음 (그림 3.34)

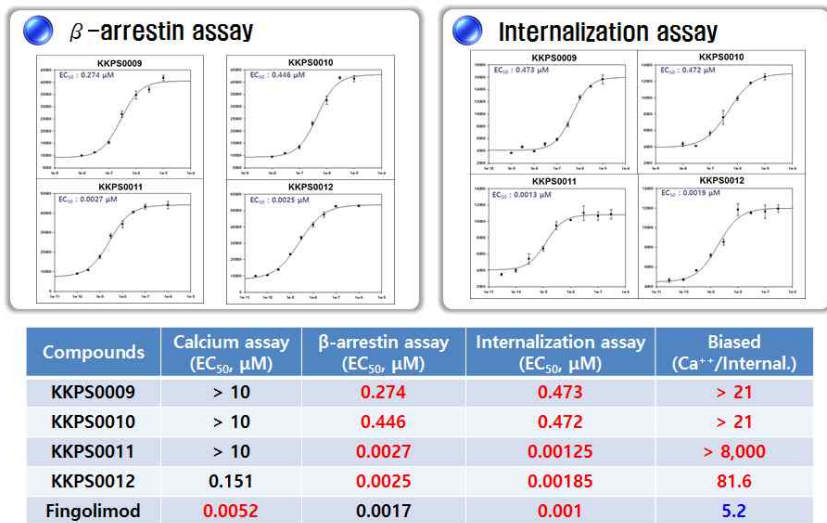
### 활성 최적화



Compounds	Calcium assay ( $EC_{50}$ , $\mu$ M)	$\beta$ -arrestin assay ( $EC_{50}$ , $\mu$ M)	Internalization assay ( $EC_{50}$ , $\mu$ M)	Biased ( $Ca^{2+}$ /Internal)	S1P3 agonistic effect ( $EC_{50}$ , $\mu$ M)
KKPS0007	0.368	0.0025	0.0019	194	> 1
KKPS0008	0.0015	0.0039	0.0063	0.24	> 1
KDS1059	1.72	0.182	0.012	143	nd
Fingolimod	0.0052	0.0017	0.001	5.2	0.012 (ref)

그림 3.34 S1P1 선도물질 최적화

- beta-arrestin 편향적 KKPS0007, KDS1059를 더욱 최적화 하여 편향적 (Biased) ligand를 10종 추가로 더 도출하였음 (그림 3.35).



### ● 편향적 (biased) 리간드 추가 도출

Cpds	S1P1 Calcium % efficacy (at 10 μM)	S1P1 $\beta$ -arrestin		S1P1 Internalization	
		% efficacy (at 10 μM)	EC <sub>50</sub>	% efficacy (at 10 μM)	EC <sub>50</sub>
KKPS0022	22.3	84.6	629 nM	106.6	557 nM
KKPS0025	12.6	109.6	7.15 nM	119.4	4.82 nM
KKPS0027	6.7	96.7	3.21 nM	129.6	3.86 nM
KKPS0031	8.1	72.7	277 nM	93.3	5.49 nM
KKPS0033	20.9	88.2	60.4 nM	133.3	3.33 nM
KKPS0035	30.6	104.1	7.87 nM	119.6	6.49 nM

$\beta$ -arrestin pathway에 편향적인 (biased) ligand 도출

그림 3.35 S1P1 편향적 리간드 도출

- S1P1 및 S1P5 선택성 평가를 위해 S1P3 agonistic effect를 보았을 때, 비선택적 효능제 (Fingolimod) 보다 뛰어난 선택성을 가지는 선택적인 S1P1 리간드를 도출하였음 (그림 3.36).

### S1P1/5 vs S1P3 선택적인 리간드 도출

Cpds	S1P1 Calcium assay (EC <sub>50</sub> , μM)	S1P3 Calcium assay (EC <sub>50</sub> , μM)	S1P5 Calcium assay (EC <sub>50</sub> , μM)	Ratio S1P1, S1P5 vs S1P3
KKPS0008	0.0015	> 10	0.0014	>6,600, >7,100
Fingolimod	0.0052	0.469	0.064	90, 7.3

Cpds	S1P1 Calcium		S1P3 Calcium	S1P5 Calcium
	% efficacy (at 10 μM)	EC <sub>50</sub> (μM)	% efficacy (at 10 μM)	% efficacy (at 10 μM)
KKPS0026	102.8	0.073 ± 0.021	12.6	56.7
KKPS0028	109.0	0.038 ± 0.006	12.9	53.6
KKPS0032	106.6	0.332 ± 0.020	11.4	51.9
KKPS0036	109.6	0.020 ± 0.005	7.3	49.1

#### S1P1 & S1P5에 선택적인 ligand 도출

그림 3.36 S1P1&S1P5 선택적 리간드 도출

- S1P1 최적화 화합물은 효능 (activity) 분석과 동시에 물성 (property)을 동시에 진행함. 약물대사의 75%를 관여하는 CYP 효소에 대한 활성 억제 평가를 통해 S1P1 Hit 화합물을 포함한 최적화 화합물이 대사 안정성을 보임을 확인하였음 (그림 3.37)

### CYP inhibition

Compounds	Remaining Activity at 10 μM				
	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
KKPS0007	36.4	~ 100	54.4	94.3	88.5
KKPS0008	49.6	~100	53.5	92.8	94.2
KDS1059	90.5	97.7	99.2	99.2	98.1
KDS3504	90.4	88.0	93.4	105.6	91.2

그림 3.37 S1P1 최적화 화합물의 대사 안정성 평가 요약 (CYP)

## 4. In vivo 효능 평가

### 가. PLC 효능 평가

- 일차적 *in vivo* 효능은 S1P1 receptor의 internalization에 의한 혈액 내 lymphocyte의 감소를 확인함으로써 검증할 수 있음. 이를 위해 rat에 활성 화합물을 경구 투여한 후 경과 시간에 따라 혈액을 채취하여 hematology 분석을 통해 peripheral lymphocyte counting (PLC)을 통해 효능을 평가함.
- 1차년도에 구축한 PLC *in vivo* 효능 평가를 바탕으로 S1P1 최적화 화합물이 녹을 수 있는 Vehicle에 대한 다발성 경화증 치료제 Gilenya와 같은 form의 FTY720의 효능 분석 시스템을 구축하였고, 부작용을 최소화시킨 선택적 효능제로 알려진 Siponimod을 통한 대조 실험

시스템을 구축하였음. FDA 승인 비선택적 효능제인 Fingolimod와 Siponimod 모두 48 시간까지 혈액내 lymphocyte 수를 감소시켰음 (그림 3.38).

### PLC test

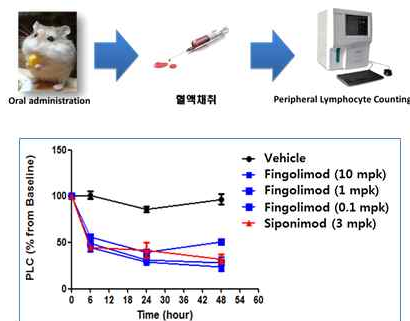


그림 3.38 PLC *in vivo* 효능 평가 시스템 구축

- S1P1 타겟 선도물질인 KDS3504 화합물을 대상으로 PLC 효능 평가를 진행한 결과 *in vivo*에서 S1P1 수용체 타겟으로 작동하여 면역 세포가 림프절에서 순환계로 유입되는 것을 막음을 hematology 분석을 통한 peripheral lymphocyte counting (PLC)을 통해 검증하였고, 알려진 효능제 대비하여 회복력이 높음을 검증하였음 (그림 3.39).

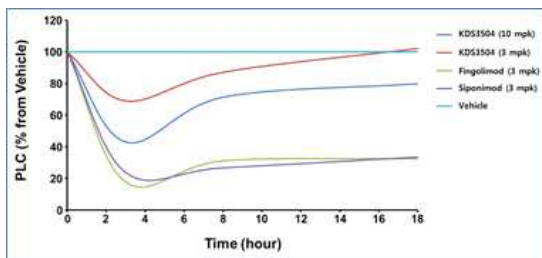


그림 3.39 PLC 분석을 통한 S1P1 타겟물질 *in vivo* 효능 평가

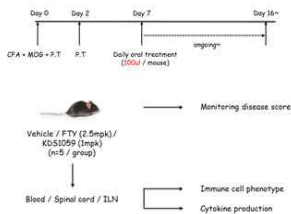
나. 신경 염증성 뇌질환 동물모델 (EAE)을 통한 S1P1 최적화 화합물 효능 평가

- 1차년도에 구축한 신경 염증성 뇌질환 동물모델 [Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)와 Mycobacterium tuberculosis를 emulsify하여 MOG35-55 펩타이드와 혼합하여 복강 내 주사하고, pertussis toxin을 피하 주사하여 유도함]에 대해 꼬리, 뒷다리 및 앞다리 마비 정도에 따른 disease 기준 [임상적인 증상이 없으면 0점, 늘어진 꼬리가 나타나면 1점, 뒷다리에 부분적인 마비가 나타나면 2점, 뒷다리에 완전한 마비가 나타나면 3점, 뒷다리에 완전

한 마비와 앞다리에 완전한 마비가 나타나면 4점, 빈사 상태 또는 사망에 이르면 5점]을 통해 S1P1 최적화 화합물의 효능을 평가하였음.

- S1P1 최적화 화합물인 KDS1059에 대하여 면역조치 후 7일 후부터 매일 구강을 통해 주입하였고, 다발성 경화증 치료제 Gilenya와 같은 form의 FTY720와 같은 증상 완화 효과를 보임을 검증하였음 (그림 3.40)

### EAE model



Compounds	Calcium assay (EC <sub>50</sub> $\mu$ M)	$\beta$ -arrestin assay (EC <sub>50</sub> $\mu$ M)	Internalization assay (EC <sub>50</sub> $\mu$ M)	Biased (Ca <sup>2+</sup> /internal)
KDS1059	1.72	0.182	0.012	143
Fingolimod	0.0052	0.0017	0.001	5.2

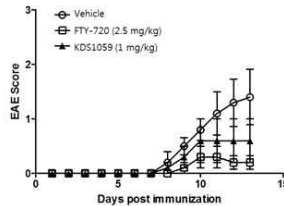


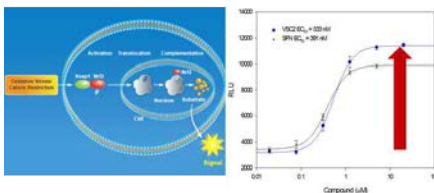
그림 3.40 S1P1 타겟 최적화 화합물(KDS1059)의 다발성 경화증 질환 완화 검증

## 제 2 절 Nrf2 activator 개발

### 1. 효능 검색 시스템 확립 및 검증

#### 가. Nuclear Translocation assay 시스템

DiscoverRx의 cell line을 이용하여 Nrf2 activation 어세이 시스템을 구축하고, 이를 통해 최적화 화합물의 Efficacy 및 Potency를 동시에 평가하였음. 선도물질 VSC2 화합물의 in vitro 효능을 평가한 결과 Nrf2 activator로 잘 알려진 sulforaphane (SFN)대비 우수한 efficacy를 확인하였음(그림 3.41)



- ✓ Nrf2 activation 효능 검증 시스템 확립
- ✓ 선도물질 VSC2 화합물 도출
- ✓ VSC2: 대조군인 sulforaphane보다 우수한 efficacy

그림 3.41 Nrf2 activator 최적화를 위한 in vitro 효능 검증 시스템







## Protective effect against $H_2O_2$ -induced cytotoxicity

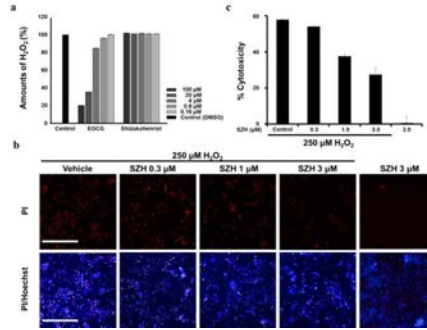


그림 3.43. SZH의 신경세포보호 효능 검증

## 2. 선도물질 SVC2의 효능 검증

- 선도물질 SVC2 화합물에 대한 항염증 효능을 activated microglia cell을 이용하여 검증하였음. BV-2 cell에 선도물질을 처리한 후 항염증 관련 효소의 발현억제 효능을 mRNA level과 protein level의 변화를 통해 관찰 한 결과, 농도 의존적으로 억제 효능을 나타냄을 확인함.
- 또한 염증 관련 cytokines들의 발현도 농도 의존적으로 억제함을 확인함 (그림 3.44)

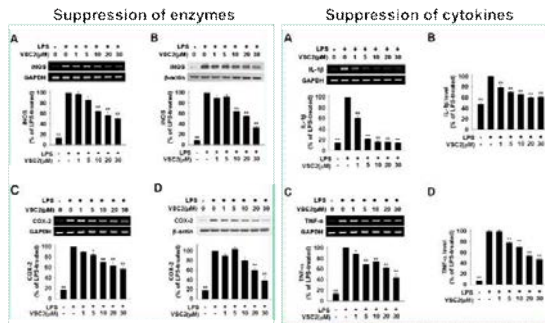


그림 3.44 선도물질 SVC2의 in vitro 항염증 효능

- Nrf2의 nuclear translocation을 western blot으로 검증한 결과 농도 의존적으로 Nrf2 활성화에 의한 nuclear translocation을 확인하였음. 반면에 선도물질 VSC2에 의해 염증관련 transcriptional factor인 NF- $\kappa$ B의 nuclear translocation이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였음(그림 3.45)

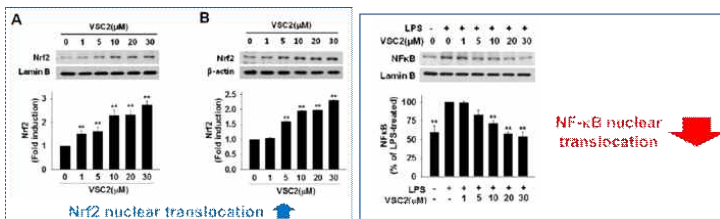


그림 3.45 선도물질 VSC2의 Nrf2 및 NF- $\kappa$ B에 대한 활성화 검증

### 3. 선도물질 최적화

- Nrf2 activator 선도물질인 VSC2의 최적화를 통해 활성 및 대사 안정성이 현저히 우수한 KDS4043의 최적화 화합물을 도출하였음(그림 3.46).

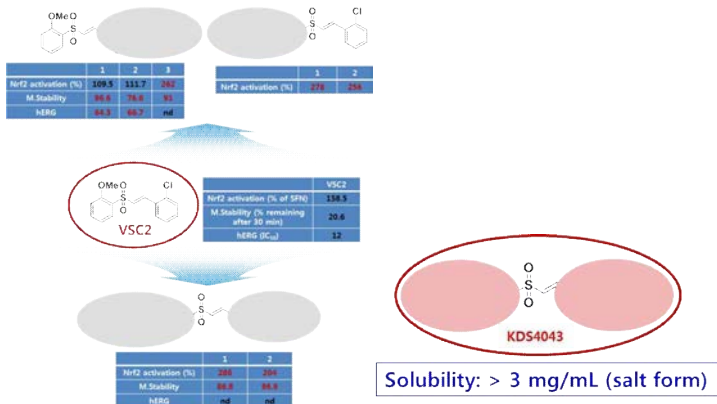


그림 3.46. 선도물질 VSC2의 최적화 화합물 KDS4043 도출

- DiscoverRx의 cell line을 이용하여 Nrf2 activation 어레이 시스템을 구축하고, 이를 통해

최적화 화합물의 Efficacy 및 Potency를 동시에 평가하였음. 최적화물질 KDS4043 화합물의 in vitro 효능을 평가한 결과 MS 치료제로 FDA 승인을 받은 dimethyl fumarate(DMF) 대비 8배 이상 우수한 효능을 확인하였음(그림 3.47).

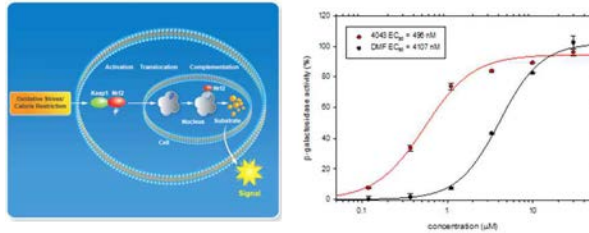


그림 3.47. In vitro Nrf2 활성화 효능 검증

- 또한 Nrf2 activator 선도물질인 VSC2의 최적화를 통해 도출한 KDS4043의 활성 및 대사 안정성을 보기 위해 Physicochemical properties를 확인한 결과 현저히 우수한 안정성을 나타냄(그림 3.48).

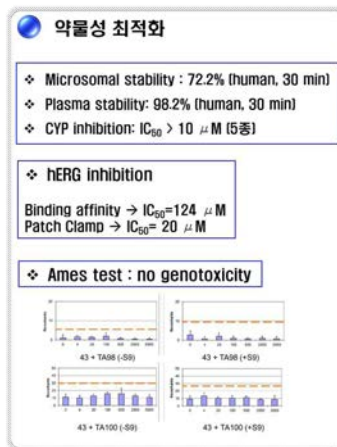


그림 3.48 최적화 화합물 KDS4043에 대한 ADME/Tox를 통한 약물성 평가

- Nrf2 activator 선도물질인 KDS4043의 최적화를 통해 아주 우수한 활성을 가진 신규 화합물인 KDS4072를 도출하였음. 신규화합물인 KDS4072의 Efficacy 및 Potency를 동시에 평

가하였음. 최적화물질 KDS4043 화합물의 in vitro 효능을 평가한 결과 효과가 아주 우수한 치료제로 알려진 bardoxolone methyl(CDDO-Me)와 비교하여 우수한 cy 및 낮은 독성을 나타내었음(그림

meth  
effica  
3.49)

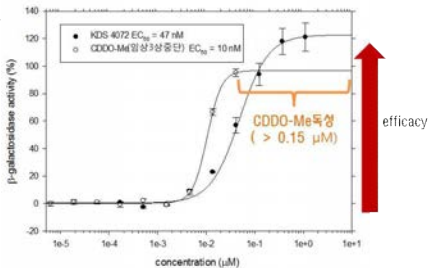
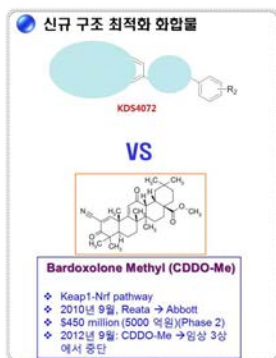


그림 3.49 신규 화합물 KDS4072 도출 및 In vitro Nrf2 활성화 효능 검증

#### 4. 신규 기전 Nrf2 activator 발굴

가. 가상 검색 유효물질 도출

- 최근에 단백질 간 결합에 의해 유발되는 신호 전달을 차단하여 질환 치료를 연구하는 Protein-protein interaction (PPI) 연구가 대두되고 있음. Keap1과 Nrf2의 단백질간 결합을 저해할 수 있는 PPI inhibitor를 개발하기 위해서 가상검색을 실시하였음(그림 3.50).

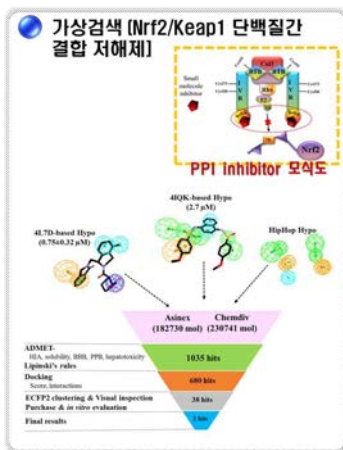


그림 3.50. 구조 시뮬레이션을 이용한 가상 검색

- 다양한 PPI library를 이용하여 가상 검색을 실시한 결과, Nrf2를 활성화 시킬 수 있는 물질들을 도출하였고 in vitro 효능을 시험한 결과 기존의 PPI 대조물질(*J. Med. Chem.*, 2014)에 비해 활성이 6배 이상 우수한 Hit compound KKPA4026을 도출함(그림 3.51).

### 가상검색 도출물질: Nrf2 활성화 효능

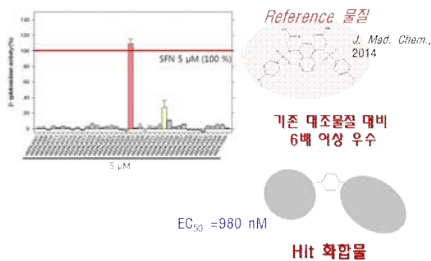


그림 3.51 활성 화합물 스크리닝을 통한 Hit compounds 도출

- 또한, 분자모델링 기법을 이용하여 Keap1과 PPI inhibitor인 Hit compound KKPA4026을 Docking study를 실시함 (그림 3.52).

### Docking Study

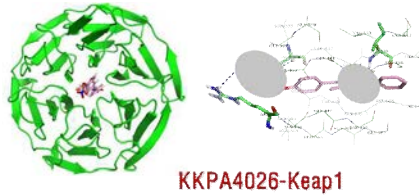


그림 3.52 Target 단백질에 대한 binding pattern 분석

#### 나. 유효물질의 in vitro 효능 검증

- 유효물질 KKPA4026 화합물에 대한 항염증 효능을 activated microglia cell을 이용하여 검증하였음. BV-2 cell에 선도물질을 처리한 후 항염증 관련 엔자임의 발현억제 효능을 mRNA level과 protein level의 변화를 통해 관찰 한 결과, 농도 의존적으로 억제 효능을 나타냄을 확인함.
- 또한 염증 관련 cytokines들의 발현도 농도 의존적으로 억제함을 확인함 (그림 3.53)

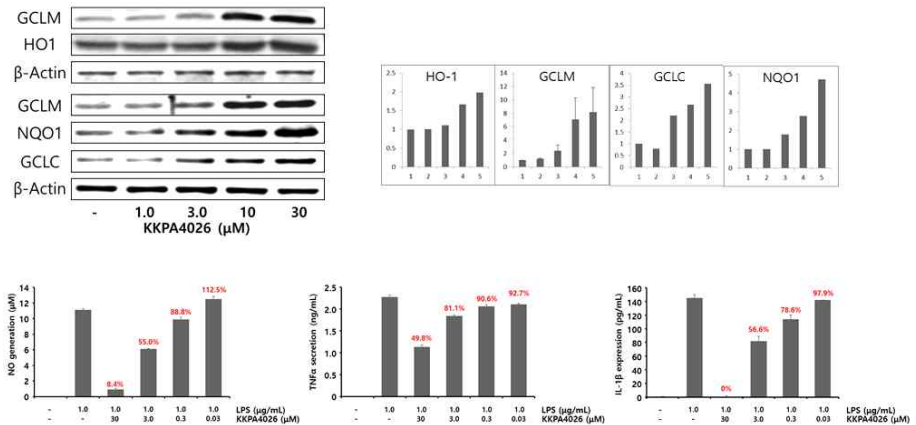


그림 3.53 KKPA4026의 in vitro 항염증 효능

#### 다. 유효물질 유도체 합성 및 효능 평가

- KKPA 4026의 유도체를 약 50여종 합성하여 Nrf2 activation assay 시스템으로 화합물의

효능을 평가하였음. 그 결과 유효물질의 KKPA 4026 과 비슷한 in vitro 효능의 KKPP0034를 도출하였음 (그림 3.54).

Compounds	Activity (EC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	Compounds	Activity (EC <sub>50</sub> , $\mu$ M)
KKPA4026	0.980	KKPP0034	0.9
KKPP0028	< 5.0	KKPP0035	3.2
KKPP0032	0.5	KKPP0040	3.3
KKPP0033	4.5	KKPP0042	2.2

Activity: SFN (5  $\mu$ M) activity 대비

그림 3.54 KKPA 4026 유도체의 활성

## 5. In vivo 효능 평가

### 가. 선도물질 VSC2의 In vivo 효능 평가

- 선도물질 VSC2 화합물에 대한 in vivo 효능을 평가하기 위해 EAE 모델을 이용하여 약물 투여 후 행동의 변화를 관찰하였음. EAE 모델을 만든 후 7일째부터 화합물을 투여한 결과 대조군에 비해 EAE score (clinical score)가 향상 됨을 확인하였음 (그림 3.55)

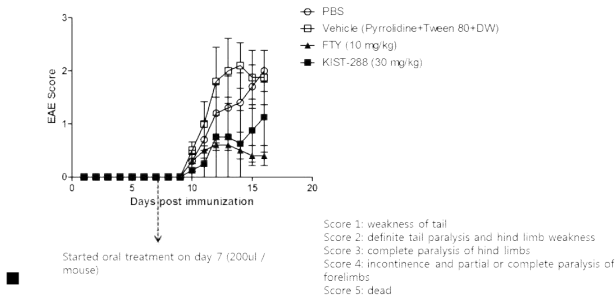
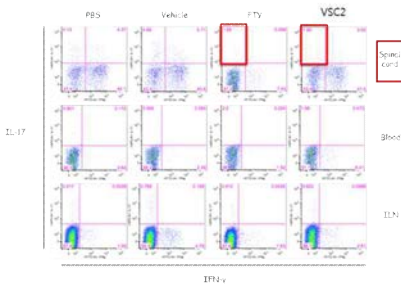


그림 3.55 선도물질 VSC2의 EAE 모델에서의 효능 검증

- EAE 모델에서 효능을 검증한 후 FACS를 이용하여 cytokine의 expression 정도와 spinal cord에서의 immune cell phenotype을 분석한 결과 SVC2 화합물 처리군에서 IL-17의 현저한 감소를 확인하였으며 spinal cord에서 F4/80과 NK cell의 현저한 감소를 확인하였음. 이는 선도물질 VSC2 화합물이 innate immune response에 관련이 있는 macrophages와 NK cell에 영향을 줌으로써 EAE 모델에서 효능을 나타냄을 알수 있음 (그림 3.56)



### Cytokine expression



### Immune cell phenotype

#### Spinal cord

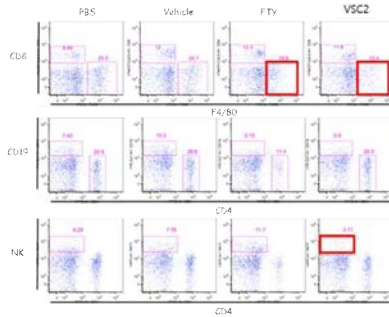


그림 3.56 선도물질 VSC2의 in vivo 효능 기전 연구

- 또한 자가면역질환을 유도하는 Th1, Th17 세포조절능 효능평가를 통하여 VSC2가 염증성 사이토카인 IL-17 과 IFN- $\gamma$ 의 발현 및 대식세포와 CD4 T 세포를 억제함으로써, 이러한 기작이 EAE 병변을 조절하데 기여하는 것으로 예상됨 (그림 3.57).

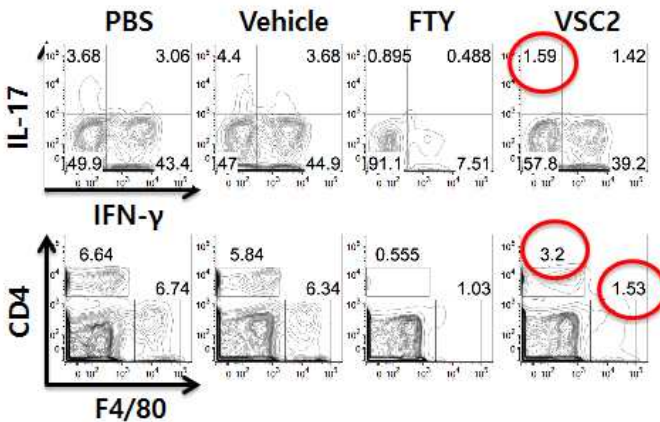


그림 3.57 VSC2의 Th1, Th7 세포조절능 효능평가 결과

### 나. 선도물질 KDS4043의 In vivo 효능 평가

- 선도물질 KDS4043 화합물에 대한 in vivo 효능을 평가하기 위해 EAE 모델을 이용하여 약

물 투여 후 행동의 변화를 관찰하였음. EAE 모델을 만든후 7일째부터 화합물을 투여한 결과 대조군에 비해 EAE score (clinical score)가 향상 됨을 확인하였음 (그림 3.58).

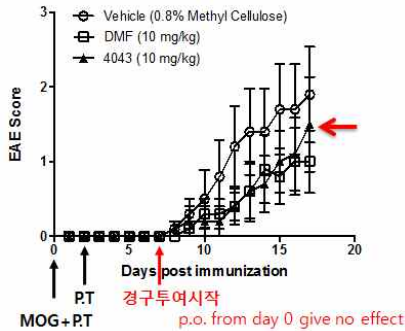


그림 3.58. 선도물질 KDS4043의 EAE 모델에서의 효능 검증

- 또한 자가면역질환을 유도하는 Th1, Th17 세포조절능 효능평가를 통하여 KDS4043이 염증성 사이토카인 IL-17 과 IFN- $\gamma$  발현을 억제하여, Th1, Th17 세포의 분화를 억제하는 것으로 확인됨. 이와는 대조적으로 KDS4043은 조절 T 세포의 분화에는 큰 영향이 없었음 (그림 3.59).

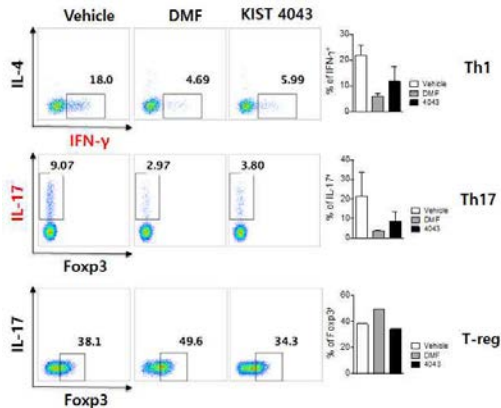


그림 3.59 KDS4043의 Th1, Th17 세포조절능 효능평가 결과

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구성과 요약 및 최종목표 달성도

성과목표	연구성과	최종목표 달성도 (%)
<b>1. 선택적인 S1P 수용체 조절물질질을 이용한 다발성 경화증 관련 우수 선도물질 도출 연구</b>		
S1P 수용체 조절물질 도출을 위한 고효율 in vitro 스크리닝 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ FLIPR를 이용한 calcium assay 시스템 구축 및 약물 효능 검색</li> <li>✓ S1P1 internalization 효능 검증 시스템 구축 및 약물 효능 검색</li> <li>✓ S1P1 beta-arrestin의 recruitment 효능 검증 시스템 구축 및 약물 효능 검색</li> <li>✓ S1P1 agonist의 선택성을 확인하기 위한 S1P3/S1P5 세포주 구축 및 S1P3/S1P5에 대한 효능 검증 시스템 구축 및 약물 효능 검색</li> </ul>	100
가상검색과 활성검색을 통한 hit 화합물 도출	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 구조기반 pharmacophore 도출 및 active site docking S1P1/5 선택적 조절물질 예측설계 및 가상검색을 통해 30여종의 hit compounds 도출</li> <li>✓ 천연물 라이브러리에 대해 S1P1 효능에 대한 검색을 통해 3종의 hit compound 도출</li> </ul>	100
S1P 수용체 조절 화합물 라이브러리 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 도출된 hit compound를 바탕으로 250 여종 합성</li> <li>✓ S1P1 및 S1P5에 선택적으로 우수한 활성을 보이는 화합물 4종 도출</li> <li>✓ 50배 이상의 편향적 신호전달 선택성 화합물 5종 도출</li> </ul>	100
in vivo 활성 검증 시스템 확립 및 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Rat를 이용한 peripheral lymphocyte counting (PLC) 효능 검증 시스템 구축 및 약물 효능검색 (KDS3504)</li> <li>✓ 다발성 경화증 동물 모델인 EAE 모델 확립 및 약물을 이용한 검증완료 (KDS1059)</li> </ul>	100
<b>2. Nrf2 활성화를 통한 신경염증성 뇌질환 관련 우수 조절물질 도출 연구</b>		
Nrf2 활성화 물질의 in vitro 스크리닝 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Nrf2 activation에 의한 nuclear translocation assay 시스템 확립 및 150여종 화합물 약효 검색 완료</li> <li>✓ Nrf2 activator 기전 검증을 위한 in vitro 시스템 확립</li> </ul>	100
in vitro 효능 검증을 통한 유효 화합물 최적화 및 약물성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Nrf2 activator 선도물질 VSC2를 도출하여 항산화 효능, 항염증 효능, 신경세포 보호 효능 검증</li> <li>✓ Nrf2 activator 선도물질 VSC2을 최적화하여 활성 및 대사안정성이 현저히 우수한 최적화 화합물 KDS4043 도출</li> <li>✓ Keap1과 Nrf2의 단백질간 결합을 저해할 수 있는 PPI inhibitor의 개발을 위한 가상검색을 실시하여 KKPA4026 도출</li> <li>✓ KKPA4026의 항염증 효능 검증</li> </ul>	100
in vivo 활성 검증 시스템 확립 및 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 다발성 경화증 동물 모델인 EAE 모델 확립 및 약물을 이용한 검증완료 (VSC2, KDS4043)</li> </ul>	100

## 제 2 절 논문 및 특허 성과 및 기여도

### 1. 논문 및 특허 성과 현황

성과지표			목표	실적			
분야	유형	지표명	3년 발표 논문수	2014	2015	2016	합계
과학적 성과	논문	JCR 상위 10% 이내 논문	10	2	4	4	10
		JCR 상위 20% 이내 논문	5	4	5	7	16
		20% 이상 SCIEI 논문	15	6	17	18	41
	특허	출원/등록	10편/5편	6/8	9/1	3/5	18/14

### 2. 관련분야에의 기여도

- 기존 치료제 중 하나인 Fingolimod (Gilenya®)는 S1P 수용체 신호전달 기작에 대해 비선택적으로 특허 S1P3에도 작용하여 Vasoconstriction을 일으키는 등의 심장 관련 부작용이 존재함.
- S1P5 신호전달은 oligodendrocyte에서 remyelination을 유도하여 S1P1에 수용체 타겟의 치료기전과 시너지 효과를 보일 수 있음.
- 본 연구를 통해 도출된 S1P1 리간드 선도물질은 효능에 중요한 S1P1 및 S1P5에 뛰어난 효능을 보이고 S1P3에 효능이 뛰어나지 않은 훌륭한 선택성을 보이는 화합물로서, 기존의 다발성 경화증 경구치료제 보다 훨씬 뛰어난 효능 및 안전성을 보일 수 있는 신약후보 물질로 개발될 수 있을 것이라 전망함.
- S1P1 수용체 타겟의 다발성 경화증 치료기전은 agonist에 의한 beta-arrestin의 recruitment와 이로 인한 수용체의 internalization (기능적 antagonism)에 기인하므로,  $\beta$ -arrestin 편향적 신호전달을 유도할 수 있는 biased ligand들의 개발이 치료 효능의 극대화 및 부작용을 최소화 할 수 있을 것이라 기대되고 있음.
- 본 연구를 통해 도출된 S1P1 편향적 효능제는 다발성 경화증 치료를 위한 뛰어난 효능 및 안전성을 보일 수 있는 신약후보 물질로 개발될 수 있을 것이라 전망함.
- 본 연구를 통해 도출된 Nrf2 activator 선도물질은 EAE 질환 유도에 중요한 역할을 하는 Th1과 Th17 세포의 분화를 동시에 억제할 수 있는 특성을 보유하므로 다발성 경화증에 대한 혁신신약 개발 후보물질로 활용될 수 있을 것이라 전망함.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

구 분	내 용
개발의 필요성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 현대사회에서 고령화, 식습관 및 스트레스등으로 다발성경화증, 알츠하이머, 파킨슨병등 신경염증성 뇌질환의 발병이 급증하는 추세</li> <li>○ 신경염증을 치료할 수 있는 근원적 치료제 부재</li> <li>○ 부작용이 낮고 효능이 우수한 다발성 경화증 경구치료제 개발 필요</li> </ul>
기술의 주요 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 기술의 특징           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신경 염증 조절을 통한 다발성 경화증 치료제 후보물질               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ SIP(Sphingosine-1-Phosphate)1/5 수용체 활성화 작용 후보물질 도출                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존의 다발성 경화증 치료제의 문제점을 개선한 다른 subtype에 대한 선택성 확보를 통한 심장계 부작용 감소 및 신경 재생 효과가 우수한 후보물질 도출</li> </ul> </li> <li>▪ Nrf2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 활성화를 통한 신경 염증 조절 선도물질 도출                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 약물의 효능을 개선한 항염증 효과가 우수하고 약물성이 우수한 선도물질 도출</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> <li><input type="checkbox"/> 적용가능 분야           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다발성 경화증 치료제 및 다양한 신경염증성 질환의 치료제로서 적응증 확대 가능</li> </ul> </li> <li><input type="checkbox"/> 시장성           <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다발성 경화증 치료제는 2012년 전세계적으로 9조원 정도로 신경계 질환중 1위로서 약물 개발 성공시 시장성이 높음</li> </ul> </li> </ul>
기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신경염증성 뇌질환의 작용기전 이해를 통해 근원적 치료물질 개발 근거 제공</li> <li>○ 다발성 경화증을 포함하는 신경염증성 질환에 대한 치료제 개발로 세계 의약품 시장 경쟁력 확보</li> </ul>
도출예상시기	○ 2018년 12월
지재권 관련사항	○ 특허 출원 준비중
담당자	○ 한국과학기술연구원, 금교창

## 제 6 장 위탁연구결과

### 제 1 절 연차별 연구내용

연차	연구 목표	연구 내용
1차년도	신경 염증성 뇌질환 EAE 동물모델 확립 및 경구 투여약물 효능 분석기술 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ MOG 펩타이드, CFA (Complete Freund's Adjuvant), pertussis toxin (PT)을 이용한 EAE 동물모델 유도 조건 및 질병 스코어 기준 체계 확립.</li> <li>✓ EAE 동물모델에 경구 투여된 화합물의 효능에 대한 <b>FACS 분석</b> 기술 구축.</li> <li>✓ 화합물의 용해도가 우수한 vehicle의 조건 및 동물 모델에서의 독성 여부 확인.</li> <li>✓ 화합물의 농도를 최적화 및 화합물 처리 day point 조건 구축.</li> </ul>
2차년도	EAE 동물모델에서의 약물 후보 물질 효능 평가를 통한 물질 선별	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ EAE 동물모델에 다양한 약물 후보 물질의 EAE 질병 억제능력 스크리닝.</li> <li>✓ Hit 화합물 효능을 최적화 하기위한 다양한 vehicle, 적정농도, 적정 투여 scheme을 확립.</li> <li>✓ 다양한 화합물 스크리닝을 통한 Hit 화합물 효능을 <b>질병 Scoring, Spinal cord, lymph node, blood에서 면역세포</b> 분석하여 EAE 동물모델 저해 <b>in vivo</b> 기작 예측.</li> </ul>
3차년도	EAE 동물모델에서 효능이 선별된 약물 후보 물질 효능 평가 및 기작연구, 물질 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 선별된 약물 후보물질들을 <b>예측된 기작</b>에 따라 EAE 유도 전과 후로 구분하여 경구 위한 Spinal cord에서의 다양한 면역세포의 활투여하고 시기에 따른 EAE 유도 억제 여부를 분석.</li> <li>✓ EAE 질병 저해 효능의 예측된 기작을 검증하기 성 검증, <b>염증성 싸이토카인 발현 분석</b>을 통해 약물 후보 물질의 효능 및 기작 검증.</li> <li>✓ In vitro 에서 <b>T 세포의 Th1, Th17 세포로의 분화 조절</b>관련 기작을 검증하기 위하여 KIST 화합물에 의한 T 세포 분화 조절 효능 및 기작 규명.</li> </ul>

제 2 절 연구내용 개요

1. 전체 연구 개요

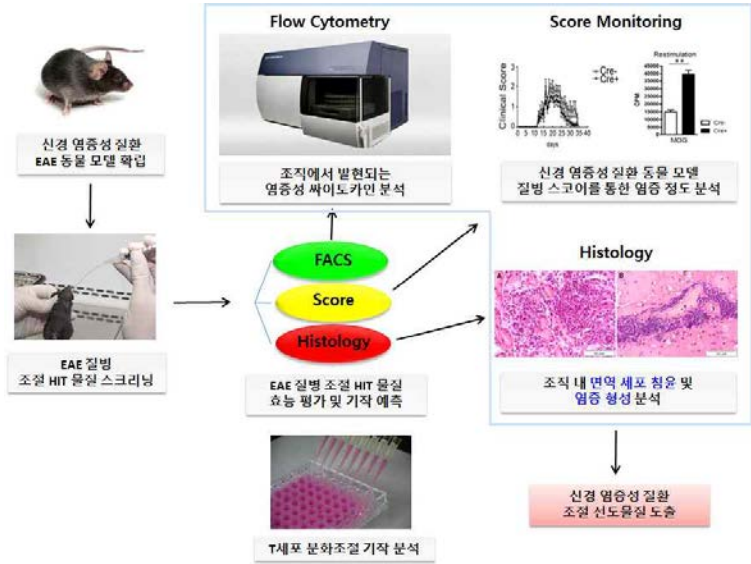


그림 6.1 전체 연구 흐름도

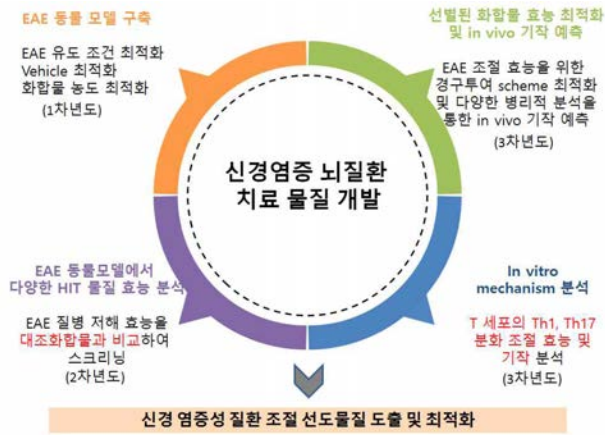


그림 6.2 연구 목표 및 연차별 연구목표

### 제 3 절 연구내용

#### 1. VSC2 (KIST288)의 EAE 동물 모델에서의 효능 평가

- 신경 염증성 뇌질환 동물모델 [Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)와 Mycobacterium tuberculosis를 emulsify하여 MOG35-55 펩타이드와 혼합하여 복강 내 주사하고, pertussis toxin을 피하 주사하여 유도함]에 대해 꼬리, 뒷다리 및 앞다리 마비 정도에 따른 disease 기준 [임상적인 증상이 없으면 0점, 늘어진 꼬리가 나타나면 1점, 뒷다리에 부분적인 마비가 나타나면 2점, 뒷다리에 완전한 마비가 나타나면 3점, 뒷다리에 완전한 마비와 앞다리에 완전한 마비가 나타나면 4점, 빈사 상태 또는 사망에 이르면 5점]을 통해 S1P1 최적화 화합물의 효능을 평가하였음 (그림 6.3).

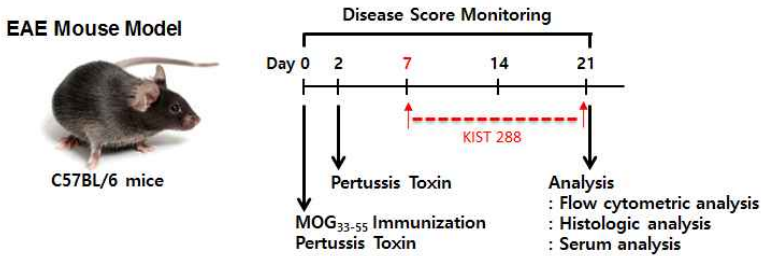


그림 6.3 VSC2 투여 계획

- EAE 모델이 유도된 후 7일째부터 VSC2를 구강을 통해 투여하고 21일째 Flow cytometric 분석, Histologic 분석, Serum 분석을 통해 VSC2의 효능을 검증하고자 함.

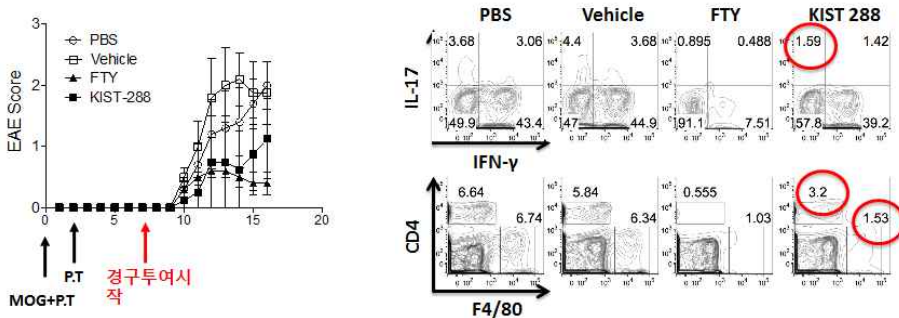


그림 6.4 VSC2의 in vivo 효능 검증결과

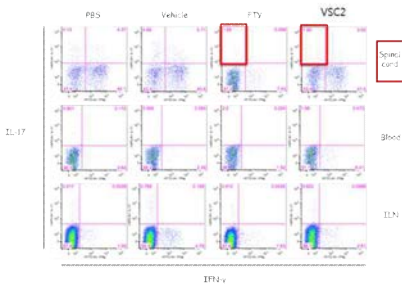
- 그 결과 VSC2 화합물 투여 후, EAE score (clinical score)가 향상됨을 확인하여 VSC2의 EAE 질병 저해 효능이 관찰되었으며, VSC2에 의한 염증성 사이토카인 IL-17 발현 (&



IFN- $\gamma$  및 대식세포와 CD4 T 세포가 억제되는 기작으로 EAE 병변을 조절하는 것으로 예상됨 (그림 6.4).

- EAE 모델에서 효능을 검증한 후 FACS를 이용하여 cytokine의 expression 정도와 spinal cord에서의 immune cell phenotype을 분석한 결과 VSC2 화합물 처리군에서 IL-17의 현저한 감소를 확인하였으며 spinal cord에서 F4/80과 NK cell의 현저한 감소를 확인하였음. 이는 선도물질 VSC2 화합물이 innate immune response에 관련이 있는 macrophages와 NK cell에 영향을 줌으로써 EAE 모델에서 효능을 나타냄을 알수 있음 (그림 6.5)

### Cytokine expression



### Immune cell phenotype

#### Spinal cord

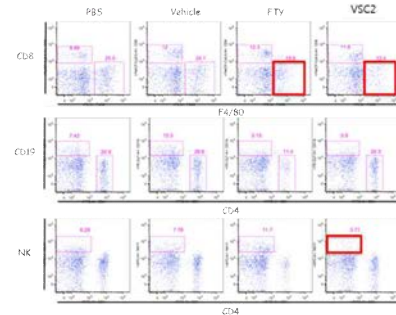


그림 6.5 VSC2의 in vivo 효능 기전 연구

## 2. KDS4043 (KIST 4043)의 EAE 동물 모델에서의 효능 평가

### EAE Mouse Model



C57BL/6 mice

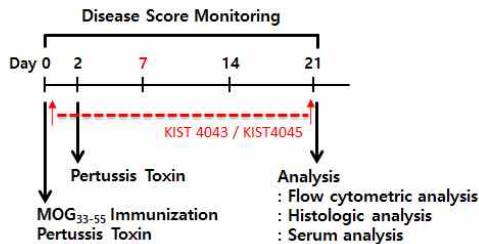


그림 6.6 KDS4043 (& KIST 4045) 투여 계획

- EAE 모델의 유도과 동시에 KDS4043의 경구 투여를 21일간 시작하고, 21일째 Flow cytometric 분석, Histologic 분석, Serum 분석을 통해 KDS4043의 효능을 검증하고자 함 (그림 6.6).

- Day 0부터 KDS 4043을 투여하였을 때는 EAE 질병 조절 효능을 확인할 수 없었음 (그림 6.7)

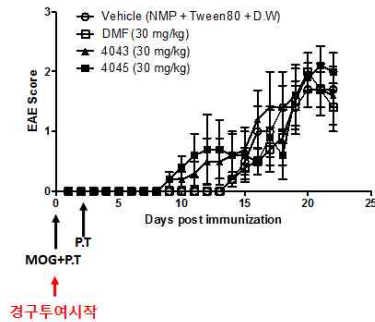


그림 6.7 KDS4043의 in vivo 효능 검증결과

- EAE 모델이 유도된 후 7일째부터 KDS4043을 경구 투여하고 21일째 Flow cytometric 분석, Histologic 분석, Serum 분석을 통해 KDS4043의 효능을 검증하고자 함.

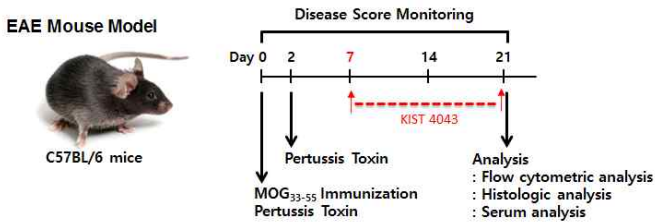


그림 6.8 개선된 KDS 4043 투여 계획

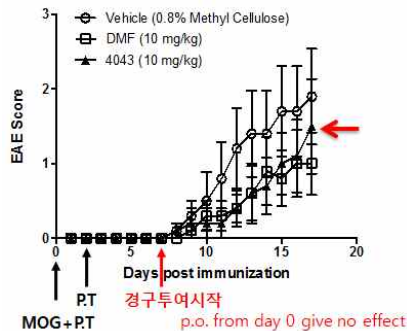


그림 6.9 KDS4043의 in vivo 효능 검증결과

- EAE 모델 유도 후 7일째부터 KDS4043 화합물을 경구 투여한 결과 대조군에 비해 EAE score (clinical score)가 향상됨을 확인하여 KDS4043의 EAE 질병 저해 효능을 확인하였음 (그림 6.9).
- 또한 KDS4043 처리군의 spinal cord를 분석하여 CD4 T 세포에서의 염증성 싸이토카인 IFN- $\gamma$  발현 감소를 확인하였음 (그림 6.10).

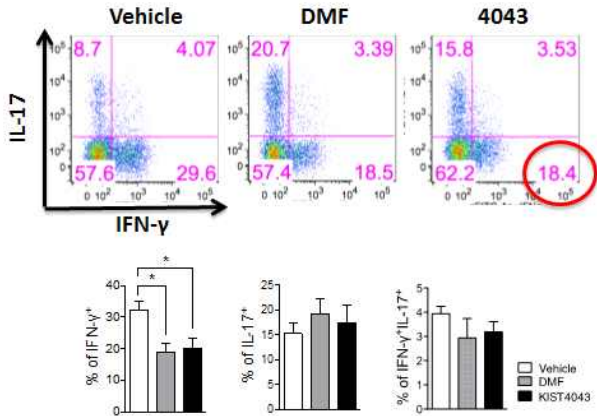


그림 6.10 KDS4043의 EAE 동물 모델의 spinal cord에서의 효능 평가

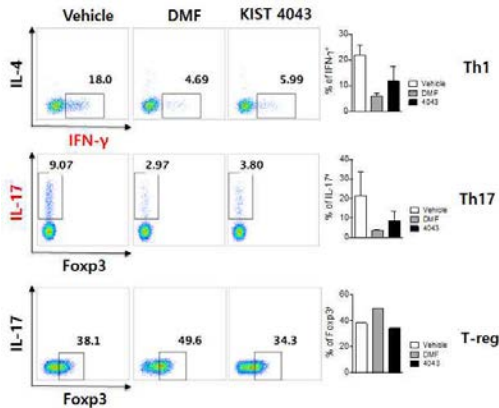


그림 6.11 KDS4043의 Th1, Th17 세포조절능 효능평가 결과

- 또한 자가면역질환을 유도하는 Th1, Th17 세포조절능 효능평가를 통하여 KDS4043이 염증성 싸이토카인 IL-17 과 IFN- $\gamma$  발현을 억제하여, Th1, Th17 세포의 분화를 억제하는 것으로 확인됨. 이와는 대조적으로 KDS4043은 조절 T 세포의 분화에는 큰 영향이 없었음 (그림 6.11).

## 제 4 절. 연구결과 요약

1. EAE 조절 효능을 위한 경구 투여 scheme을 최적화하여 day 7부터 VSC2, KDS 4043 화합물을 경구 투여한 결과 EAE 질병 지해 효능을 확인하였으며, 병리적 분석을 위해 분리한 spinal cord의 T 세포에서 염증성 싸이토카인 IL-17와 IFN- $\gamma$ 발현이 각각 VSC2와 KDS 4043 화합물에 의해 억제된 것을 확인하였음.
2. 위의 결과를 통해 KIST 288 화합물이 Th17 세포, KIST 4043 화합물이 Th1 세포의 기능 혹은 염증성 싸이토카인 발현을 억제하여 EAE 동물모델에서의 질병 조절 효능을 가지는 것으로 생각되며, in vitro에서 자가면역질환을 유도하는 Th1, Th17 세포조절능 효능평가를 통하여 KDS4043이 염증성 싸이토카인 IL-17 과 IFN- $\gamma$  발현을 억제하여, Th1, Th17 세포의 분화를 억제할 수 있음을 확인하였음.

## 제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 다발성 경화증 치료제 목록

Brand	Molecule	Originator company	Partner	Approval date US	Approval date Japan	Approval date EU
Ampyra	dalfampridine	Acorda Therapeutics	Biogen	January 2010	n/a	July 2011
Aubagio	teriflunomide	Sanofi	n/a	September 2012	n/a	August 2013
Avonex	interferon beta-1a	Biogen	n/a	July 1996	November 2006	March 1997
Betaseron/Betaferon	interferon beta-1b	Bayer	n/a	September 1993	November 2000	June 1996
Copaxone	glatiramer acetate	Teva	Takeda	March 1997	September 2015	August 2000
Extavia	interferon beta-1b	Novartis	Bayer	August 2009	n/a	January 2009
Gilenya	fingolimod	Novartis	Mitsubishi Tanabe	September 2010	September 2011	March 2011
Lemtrada	alemtuzumab	Sanofi	Bayer	November 2014	n/a	September 2013
Plegridy	peginterferon beta-1a	Biogen	n/a	August 2014	n/a	July 2014
Rebif	interferon beta-1a	Merck Serono	Pfizer	March 2002	n/a	July 1998
Tecfidera	dimethyl fumarate	Biogen	n/a	March 2013	NDA	February 2014
Tysabri	natalizumab	Biogen	n/a	November 2004	April 2014	June 2006
NDA = New Drug Application						

출처: BioMedTracker, 2015

## 제 2 절 다발성 경화증 치료제 Gilenya (Fingolimod) SWOT 분석

Strengths	Weaknesses
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Greater efficacy than first-line treatments</li> <li>• Demonstrated early treatment effect</li> <li>• First-to-market oral treatment</li> <li>• Once-daily dosing</li> <li>• High tolerability</li> <li>• High price tolerated by payers</li> <li>• Global availability</li> <li>• Novartis possesses prior experience in the multiple sclerosis market with Extavia (interferon beta-1b)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contraindicated in patients with cardiac problems</li> <li>• Strict monitoring during dosing required</li> <li>• Side effects include skin malignancies and elevated liver enzymes</li> <li>• Suppresses immune system, increasing risk of infection</li> <li>• Only approved for second-line use in EU</li> <li>• Ineffective for progressive multiple sclerosis</li> </ul>
Opportunities	Threats
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Development for early forms of multiple sclerosis</li> <li>• Switch from patients that are unresponsive to injections</li> <li>• Uptake in treatment-naïve patients</li> <li>• Expansion to include chronic inflammatory demyelinating neuropathy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uptake of Tecfidera (dimethyl fumarate)</li> <li>• Generic and biosimilar entry introducing greater cost competition</li> <li>• Generic fingolimod from 2019</li> </ul>

출처: Datamonitor Healthcare, 2016

### 제 3 절 다발성 경화증 치료제 Tecfidera (Dimethyl Fumarate) SWOT 분석

Strengths	Weaknesses
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Greater efficacy than first-line injectable treatments</li> <li>• High tolerability</li> <li>• Limited monitoring requirements and no contraindications</li> <li>• Unique mechanism of action</li> <li>• Oral therapy</li> <li>• Biogen is the leading company in the multiple sclerosis market</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Twice-daily dosing</li> <li>• Premium pricing over standard first-line injectable treatments</li> <li>• Third-to-market oral drug behind Gilenya (fingolimod) and Aubagio (teriflunomide)</li> <li>• Emerging association with progressive multifocal leukoencephalopathy</li> </ul>
Opportunities	Threats
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Switch from patients unable to tolerate injections</li> <li>• Uptake in treatment-naïve patients</li> <li>• Investigate use in progressive multiple sclerosis</li> <li>• Investigate in pediatrics</li> <li>• Gain approval in Japan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Established competition from Gilenya</li> <li>• Potential restricted pricing and reimbursement in EU markets</li> <li>• Generic and biosimilar entry introducing greater cost competition</li> <li>• Potential competitor dimethyl and monomethyl fumarate products in development</li> </ul>

출처: Datamonitor Healthcare, 2016

## 제 4 절 다발성 경화증 치료제 개발 목록

Drug	Lead company	Target	Drug type	Phase
Zinbrya	Biogen	Cluster of differentiation 25 (CD25)	Monoclonal antibody	NDA/BLA
BAF312/siponimod	Novartis	Sphingosine 1-phosphate receptor (S1P-R)	Small molecule	Phase III
Botox - Therapeutic	Allergan	SNARE proteins (eg synaptobrevin, syntaxin, SNAP-25)	Natural protein	Phase III
masitinib	AB Science	Fibroblast growth factor receptor KIT/c-KIT; platelet-derived growth factor receptor	Small molecule	Phase III
Nerventra	Teva	T lymphocytes	Small molecule	Phase III
ocrelizumab	Roche	Cluster of differentiation 20 (CD20)	Monoclonal antibody	Phase III
ozanimod	Celgene	Sphingosine 1-phosphate receptor (S1P-R)	Not specified	Phase III
ponesimod	Actelion	Sphingosine 1-phosphate receptor (S1P-R)	Not specified	Phase III
BLA = Biologic License Application; NDA = New Drug Application				

출처: BioMedTracker, 2015



## 제 5 절 다발성 경화증 치료제 후보물질 Ozanimode SWOT 분석

Strengths	Weaknesses
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oral tablet, once-daily dosing</li> <li>• No association with cardiac side effects</li> <li>• No association with progressive multifocal leukoencephalopathy</li> <li>• High likelihood of clinical success; clinical precedent for sphingosine 1-phosphate agonists</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No robust data yet on relapse reduction efficacy</li> <li>• Trailing Gilenya (fingolimod) by several years</li> <li>• Celgene is a newcomer to the multiple sclerosis market</li> </ul>
Opportunities	Threats
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Position as a better tolerated alternative to Gilenya with less strict safety monitoring requirements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Competition from other pipeline drugs in the class, including ponesimod and siponimod</li> <li>• Generic and biosimilar entry introducing greater cost competition</li> <li>• Emergence of safety events during longer-term treatment</li> </ul>

출처: Datamonitor Healthcare, 2016

## 제 6 절 다발성 경화증 치료제 후보물질 Siponimod SWOT 분석

Strengths	Weaknesses
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oral tablet, once-daily dosing</li> <li>• No association with progressive multifocal leukoencephalopathy</li> <li>• High likelihood of clinical success; clinical precedent for sphingosine 1-phosphate agonists</li> <li>• In simultaneous development for RRMS and SPMS</li> <li>• Novartis now has a portfolio of multiple sclerosis drugs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Undifferentiated efficacy profile in RRMS</li> <li>• Associated with first-dose cardiac effects</li> <li>• Trailing Gilenya (fingolimod) by several years</li> <li>• Also behind development of ozanimod</li> </ul>
Opportunities	Threats
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transition existing Gilenya patients onto siponimod</li> <li>• Position as preferred drug for SPMS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contraindications and warnings due to cardiac side effects</li> <li>• Competition from other pipeline drugs in the class, including ozanimod and ponesimod</li> <li>• Generic and biosimilar entry introducing greater cost competition</li> <li>• Emergence of safety events during longer-term treatment</li> </ul>

RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis; SPMS = secondary progressive multiple sclerosis

출처: Datamonitor Healthcare, 2016

## 제 8 장 참고문헌

1. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Oct;82(10):1132-41.
2. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):406-12.
3. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol*. 2003 May 1;170(9):4483-8.
4. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology*. 2005 Apr 26;64(8):1336-42.
5. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992 Mar 5;356(6364):63-6.
6. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clin Immunol*. 2012 Jan;142(1):49-56.
7. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010 Feb 4;362(5):387-401.
8. Efficacy and safety of laquinimod in multiple sclerosis: current status. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013 Nov;6(6):343-52. doi: 10.1177/1756285613499424.
9. Emerging oral drugs for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2011 Dec;16(4):697-712.
10. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Sep 20;367(12):1087-97.
11. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Sep 20;367(12):1098-107.
12. Preliminary evidence from magnetic resonance imaging for reduction in disease activity after lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Lancet*. 1994 Jul 30;344(8918):298-301.
13. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5941-6.
14. FTY720 (fingolimod) increases vascular tone and blood pressure in spontaneously

hypertensive rats via inhibition of sphingosine kinase. *Br J Pharmacol.* 2012 Jun;166(4):1411–8.

15. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):151–5.

16. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest.* 1997 Jun 1;99(11):2664–71.

17. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1057–62.

18. Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann Neurol.* 1997 May;41(5):669–74.

19. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* 2001 Mar 27;56(6):702–8.

20. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain.* 2004 Jun;127(Pt 6):1370–8.

21. Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology.* 2004 Dec 28;63(12 Suppl 6):S15–8.

22. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2006 May;59(5):748–54.

23. Discovery of potent Keap1–Nrf2 protein–protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis. *J Med Chem.* 2014 Mar 27;57(6):2736–45.

## 제 9 장 실험절차

### 1) Heptanenitrile

Bromohexane (0.85 ml, 6.06 mmol) was added slowly portionwise to a solution of sodium cyanide (327 mg, 6.67 mmol) and sodium iodide (181 ml, 1.21 mmol) in DMSO (3 mL) at room temperature and stirred for 3 h. After completion of the reaction, EA was added to the reaction mixture and washed with distilled water, extracted with EA. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexanes: EA = 10:1) and evaporated to give the desired product (406 mg, 3.65 mmol) in 60% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.90–7.85 (m, 2H), 7.61–7.56 (m, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.48 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 2.53 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 1.46 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 195.3, 154.6, 134.5, 131.8, 129.7, 128.4, 79.6, 64.5, 53.1, 43.8, 28.4

### 2) Undecanenitrile

Following the same procedure used for the synthesis of undecanenitrile, the reaction of 1-bromodecane (1.87 ml, 9.04 mmol), sodium cyanide (488 mg, 9.95 mmol), and sodium iodide (271 mg, 1.81 mmol) gave the desired product (791 mg, 4.73 mmol) in 52% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.33 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.70–1.59 (m, 2H), 1.48–1.38 (m, 2H), 1.36–1.20 (m, 12H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 119.7, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7, 28.6, 25.4, 22.6, 17.0, 14.0

### 3) 1-hexylcyclopropan-1-amine

A solution of heptanenitrile (1.22 ml, 8.99 mmol) and titanium(IV) isopropoxide (2.93 ml, 9.89 mmol) in anhydrous ether was treated dropwise ethylmagnesium bromide (6.0 mL, 18.0 mmol) under N<sub>2</sub> at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. To a mixture was added boron trifluoride diethyl etherate (2.26 ml, 18.0 mmol) at 0 °C. After complete addition, the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. After completion of the reaction, the mixture was diluted with EA and washed with distilled water and 10% sodium hydroxide, extracted with EA. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered through a pad of celite, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM: Mix = 4:1) and evaporated to give the desired product (385 mg, 2.72 mmol) in 30% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.16 (brs, 2H), 1.74–1.65 (m, 2H), 1.59–1.48 (m, 2H), 1.41–1.25 (m, 6H), 1.22 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 0.70 (t, J = 6.7 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 35.6, 34.8, 31.5, 28.9, 25.5, 22.5, 14.1, 10.2

## 4) 1-heptylcyclopropan-1-amine

Following the same procedure used for the synthesis of 1-heptylcyclopropan-1-amine, the reaction of octanenitrile (1.22 ml, 8.0 mmol), titanium(IV) isopropoxide (2.61 ml, 8.8 mmol), ethylmagnesium bromide (5.3 mL, 16 mmol), and boron trifluoride diethyl etherate (2.0 ml, 16 mmol) in anhydrous ether (10 ml) gave the desired product (488 mg, 3.14 mmol) in 39% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.41 (brs, 2H), 1.73–1.65 (m, 2H), 1.58–1.48 (m, 2H), 1.39–1.21 (m, 8H), 1.17 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 0.93–0.83 (m, 3H), 0.69 (t, J = 6.6 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 35.2, 34.8, 31.8, 29.2, 29.0, 25.5, 22.6, 14.1, 10.2

## 5) 1-octylcyclopropan-1-amine

Following the same procedure used for the synthesis of 1-heptylcyclopropan-1-amine, the reaction of nonanenitrile (1.22 ml, 7.18 mmol), titanium(IV) isopropoxide (2.34 ml, 7.90 mmol), ethylmagnesium bromide (4.8 mL, 14.4 mmol), and boron trifluoride diethyl etherate (1.81 ml, 14.4 mmol) in anhydrous ether (10 ml) gave the desired product (580 mg, 3.42 mmol) in 48% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.21 (s, 2H), 1.73–1.67 (m, 2H), 1.58–1.48 (m, 2H), 1.40–1.18 (m, 12H), 0.87 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 0.70 (t, J = 6.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 35.6, 34.8, 31.9, 29.3, 29.3, 29.2, 25.6, 22.7, 14.1, 10.2

## 6) 1-nonylcyclopropan-1-amine

Following the same procedure used for the synthesis of 1-heptylcyclopropan-1-amine, the reaction of decanenitrile (1.22 ml, 6.53 mmol), titanium(IV) isopropoxide (2.13 ml, 7.18 mmol), ethylmagnesium bromide (1.86 mL, 13.1 mmol), and boron trifluoride diethyl etherate (1.65 ml, 13.1 mmol) in anhydrous ether (5 ml) gave the desired product (441 mg, 2.40 mmol) in 37% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.52–1.23 (m, 16H), 0.92 (t, J = 6.3 Hz, 3H), 0.55 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 0.43–0.36 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 40.5, 34.1, 31.9, 29.7, 29.6, 29.3, 26.2, 22.7, 14.4, 14.1

## 7) 1-decylcyclopropan-1-amine

Following the same procedure used for the synthesis of 1-heptylcyclopropan-1-amine, the reaction of undecanenitrile (1.04 g, 6.22 mmol), titanium(IV) isopropoxide (2.03 ml, 6.84 mmol), ethylmagnesium bromide (4.15 mL, 12.4 mmol), and boron trifluoride diethyl etherate (1.56 ml, 12.4 mmol) in anhydrous ether (10 ml) gave the desired product (632 mg, 3.20 mmol) in 52% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 (brs, 2H), 1.74–1.63 (m, 2H), 1.40–1.18 (m, 18H), 0.88 (t, J = 8.6 Hz, 3H), 0.70 (t, J = 8.6 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 35.6, 34.9, 31.9, 30.9, 29.6, 29.4, 29.3, 25.7, 22.7, 14.1, 10.2

## 8) 4-formyl-N-(1-hexylcyclopropyl)benzene sulfonamide

A solution of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (500 mg, 2.44 mmol) in DCM (3 ml) was treated dropwise 1-hexylcyclopan-1-amine (328 mg, 2.32 mmol) and TEA (0.93 mL, 4.88 mmol) under N<sub>2</sub> at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 3 h at 0 °C. After completion of the reaction, the mixture was diluted with EA, washed with distilled water and extracted with EA. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexanes: EA = 4:1) and evaporated to give the desired product (179 mg, 0.58 mmol) in 24% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 1.37–1.03 (m, 10H), 0.83 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.79–0.71 (m, 2H), 0.57–0.45 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.8, 147.5, 138.8, 130.1, 127.8, 36.9, 35.9, 31.7, 28.9, 25.7, 22.5, 14.0, 13.2

## 9) 4-formyl-N-(1-heptylcyclopropyl)benzene sulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-(1-heptylcyclopropyl)benzene sulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (500 mg, 2.44 mmol), 1-heptylcyclopan-1-amine (360 mg, 2.32 mmol), and TEA (0.93 mL, 4.88 mmol) in DCM (2 ml) gave the desired product (329 mg, 1.02 mmol) in 42% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.24 (brs, 1H), 1.36–1.02 (m, 12H), 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.79–0.72 (m, 2H), 0.55–0.47 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.8, 147.5, 138.8, 130.1, 127.8, 36.9, 35.9, 31.7, 29.2, 29.2, 25.7, 22.6, 14.1, 13.2

## 10) 4-formyl-N-(1-octylcyclopropyl)benzene sulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-(1-octylcyclopropyl)benzene sulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (353 mg, 1.73 mmol), 1-octylcyclopan-1-amine (277 mg, 1.64 mmol), and TEA (0.66 mL, 3.46 mmol) in DCM (2 ml) gave the desired product (214 mg, 0.64 mmol) in 37% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.10–8.00 (m, 4H), 1.35–1.06 (m, 14H), 0.88 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.76 (dd, J = 6.6, 5.1 Hz, 2H), 0.51 (dd, J = 6.7, 5.2 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.7, 147.6, 139.0, 130.1, 127.8, 36.9, 36.0, 31.8, 29.5, 29.3, 29.2, 25.7, 22.6, 14.1, 13.3

## 11) 4-formyl-N-(1-nonylcyclopropyl)benzene sulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-(1-nonylcyclopropyl)benzene sulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (100 mg, 0.49 mmol), 1-nonylcyclopan-1-amine (99 mg, 0.54 mmol),

and TEA (0.19 mL, 0.98 mmol) in DCM (0.5 mL) gave the desired product (73 mg, 0.21 mmol) in 39% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.32 (s, 1H), 1.36–1.03 (m, 18H), 0.88 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.79–0.72 (m, 2H), 0.53–0.47 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.8, 147.5, 138.8, 130.1, 127.8, 36.9, 35.9, 31.9, 29.5, 29.3, 29.3, 25.7, 22.7, 14.1, 13.2.

#### 12) 4-formyl-N-(1-decylcyclopropyl)benzene sulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-(1-decylcyclopropyl)benzene sulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (600 mg, 2.93 mmol), 1-decylcyclopropan-1-amine (549 mg, 2.78 mmol), and TEA (1.12 mL, 0.79 mmol) in DCM (3 mL) gave the desired product (290 mg, 0.79 mmol) in 27% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.09–7.98 (m, 4H), 1.40–1.00 (m, 18H), 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 0.76 (dd, J = 6.6, 5.1 Hz, 2H), 0.51 (dd, J = 6.8, 5.2 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.8, 147.4, 138.8, 130.1, 127.8, 36.9, 36.0, 31.9, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 25.8, 22.7, 14.1, 13.3

#### 13) 4-formyl-N-heptylbenzenesulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-heptylbenzenesulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (500 mg, 2.44 mmol), heptan-1-amine (0.34 mL, 2.32 mmol), and TEA (0.93 mL, 4.89 mmol) in DCM (3 mL) gave the desired product (532 mg, 1.88 mmol) in 77% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.03 (s, 4H), 4.52–4.38 (m, 1H), 3.00 (q, J = 5.1 Hz, 2H), 1.53–1.40 (m, 2H), 1.33–1.14 (m, 8H), 0.86 (t, J = 5.2 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.8, 145.4, 138.8, 130.2, 127.7, 43.4, 31.6, 29.7, 28.7, 26.4, 22.5, 14.0

#### 14) 4-formyl-N-octylbenzenesulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-octylbenzenesulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (300 mg, 1.47 mmol), octan-1-amine (0.23 mL, 1.40 mmol), and TEA (0.56 mL, 2.94 mmol) in DCM (0.5 mL) gave the desired product (323 mg, 1.08 mmol) in 77% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.80–8.00 (m, 4H), 3.75–3.54 (m, 1H), 3.10–2.81 (m, 2H), 1.54–1.40 (m, 2H), 1.40–1.17 (m, 10H), 0.93–0.90 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.1, 148.3, 140.4, 130.6, 127.8, 43.4, 31.9, 29.4, 29.3, 29.1, 26.5, 22.7, 14.1

#### 15) 4-formyl-N-nonylbenzenesulfonamide



Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-nonylbenzenesulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (300 mg, 1.47 mmol), nonan-1-amine (0.26 ml, 1.39 mmol), and TEA (0.56 mL, 2.94 mmol) in DCM (2 ml) gave the desired product (243 mg, 0.78 mmol) in 57% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.10–7.90 (m, 4H), 5.10 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.99 (q, J = 9.1 Hz, 2H), 1.56–1.36 (m, 2H), 1.36–1.10 (m, 12H), 0.86 (t, J = 9.0 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.9, 145.4, 138.8, 130.2, 127.7, 43.4, 31.8, 29.6, 29.4, 29.1, 29.0, 26.5, 22.6, 14.1

#### 16) 4-formyl-N-decylbenzenesulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-decylbenzenesulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (410 mg, 2.0 mmol), decan-1-amine (0.37 ml, 1.90 mmol), and TEA (0.19 mL, 0.98 mmol) in DCM (2 ml) gave the desired product (474 mg, 1.46 mmol) in 77% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.03 (s, 4H), 3.00 (dt, J = 6.7, 6.2 Hz, 2H), 1.51–1.41 (m, 2H), 1.32–1.16 (m, 14H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

#### 17) 4-formyl-N-undecylbenzenesulfonamide

Following the same procedure used for the synthesis of 4-formyl-N-undecylbenzenesulfonamide, the reaction of 4-formylbenzene sulfonyl chloride (500 mg, 2.44 mmol), undecan-1-amine (0.50 ml, 2.32 mmol), and TEA (0.93 mL, 4.89 mmol) in DCM (3 ml) gave the desired product (744 mg, 2.19 mmol) in 90% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.09–8.02 (m, 4H), 4.51–4.43 (m, 1H), 3.06–2.90 (m, 2H), 1.51–1.42 (m, 2H), 1.37–1.16 (m, 16H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.8, 158.9, 146.8, 130.2, 128.5, 43.4, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 26.5, 22.7, 14.1

#### 18) Methyl 1-(4-(N-(1-hexylcyclopropyl) sulfamoyl) benzyl) azetidine-3-carboxylate

A solution of 4-formyl-N-undecylbenzenesulfonamide (300 mg, 0.97 mmol) in DCM (4 ml) was added acetic acid (0.22 ml, 3.88 mmol) at room temperature. To a resulting mixture was added a mixture of azetidine ester (167 mg, 1.45 mmol), and DIPEA (0.11 mL, 1.45 mmol) in MeOH (3 ml) under N<sub>2</sub> for 10 min. to a mixture solution was added sodium cyanoborohydride (61 mg, 0.97 mmol) at 0 °C. After complete addition, the reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C. After completion of the reaction, the mixture was quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub>, washed with water and extracted with EA. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced

pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexanes/ EA = 1:2) and evaporated to give the desired product (222 mg, 0.54 mmol) in 56% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.70 (s, 2H), 3.61–3.51 (m, 2H), 3.42–3.32 (m, 3H), 1.33–1.02 (m, 10H), 0.84 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.74 (dd, J = 6.5, 5.0 Hz, 2H), 0.45 (dd, J = 6.7, 5.1 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.3, 142.5, 141.1, 128.8, 127.2, 62.5, 56.8, 52.0, 36.7, 35.6, 33.8, 31.7, 29.0, 25.6, 22.5, 14.0, 13.1

19) Methyl 1-(4-(N-(1-heptylcyclopropyl) sulfamoyl) benzyl) azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-(1-heptylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (300 mg, 0.93 mmol), acetic acid (0.21 ml, 3.71 mmol), azetidine ester (160 mg, 1.39 mmol), DIPEA (0.11 mL, 1.39 mmol), and sodium cyanoborohydride (58 mg, 0.93 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (308 mg, 0.73 mmol) in 78% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.69 (s, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.64–3.55 (m, 2H), 3.44–3.34 (m, 3H), 2.06 (s, 1H), 1.34–1.10 (m, 10H), 1.10–1.01 (m, 2H), 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.79–0.67 (m, 2H), 0.51–0.38 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.2, 142.0, 141.3, 128.9, 127.2, 62.2, 56.5, 52.0, 36.7, 35.5, 33.7, 31.7, 29.3, 29.2, 25.7, 22.6, 14.1, 13.0

20) Methyl 1-(4-(N-(1-octylcyclopropyl) sulfamoyl) benzyl) azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-(1-octylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (300 mg, 0.89 mmol), acetic acid (0.21 ml, 3.56 mmol), azetidine ester (153 mg, 1.33 mmol), DIPEA (0.10 mL, 1.33 mmol), and sodium cyanoborohydride (56 mg, 0.89 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (261 mg, 0.60 mmol) in 67% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.89 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.59–3.50 (m, 2H), 3.40–3.31 (m, 3H), 1.34–1.00 (m, 14H), 0.88 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.82–0.68 (m, 2H), 0.62–0.49 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.4, 141.0, 128.8, 127.3, 62.6, 56.9, 52.0, 36.8, 35.7, 33.9, 31.9, 29.5, 29.4, 29.2, 25.8, 22.7, 14.1, 13.2

21) Methyl 1-(4-(N-(1-nonylcyclopropyl) sulfamoyl) benzyl) azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-(1-nonylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of

benzene sulfonamide (228 mg, 0.65 mmol), acetic acid (0.15 ml, 2.60 mmol), azetidine ester (112 mg, 0.98 mmol), DIPEA (0.08 mL, 0.98 mmol), and sodium cyanoborohydride (41 mg, 0.65 mmol) in a mixture of DCM (5 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (174 mg, 0.39 mmol) in 59% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.85–7.77 (m, 2H), 7.45–7.38 (m, 2H), 4.87 (s, 1H), 3.74–3.70 (m, 3H), 3.70–3.65 (m, 2H), 3.58–3.48 (m, 2H), 3.39–3.29 (m, 3H), 1.37–1.00 (m, 16H), 0.92–0.83 (m, 3H), 0.79–0.70 (m, 2H), 0.51–0.39 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.4, 143.0, 140.9, 128.8, 127.3, 62.7, 56.9, 52.0, 36.7, 35.7, 34.0, 31.9, 29.6, 29.3, 29.3, 25.8, 22.7, 14.1, 13.2

## 22) Methyl 1-(4-(N-(1-decylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-(1-decylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (257 mg, 0.70 mmol), acetic acid (0.16 ml, 2.81 mmol), azetidine ester (122 mg, 1.06 mmol), DIPEA (0.08 mL, 1.06 mmol), and sodium cyanoborohydride (44 mg, 0.70 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (165 mg, 0.36 mmol) in 51% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 5.22 (brs, 1H), 3.75–3.69 (m, 3H), 3.69–3.64 (m, 2H), 3.59–3.48 (m, 2H), 3.40–3.30 (m, 3H), 1.36–0.98 (m, 18H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 0.74 (dd, J = 6.3, 5.1 Hz, 2H), 0.45 (dd, J = 6.5, 5.2 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.4, 142.9, 141.0, 128.8, 127.2, 62.7, 56.9, 52.0, 36.7, 35.6, 33.9, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 25.7, 22.7, 14.1, 13.1

## 23) Methyl 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (300 mg, 1.06 mmol), acetic acid (0.24 ml, 4.23 mmol), azetidine ester (183 mg, 1.59 mmol), DIPEA (0.12 mL, 1.59 mmol), and sodium cyanoborohydride (66.6 mg, 1.06 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (234 mg, 0.61 mmol) in 56% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.41 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.61–3.51 (m, 2H), 3.41–3.31 (m, 3H), 2.94 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 1.49–1.39 (m, 2H), 1.31–1.16 (m, 8H), 0.86 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.3, 142.5, 138.9, 129.0, 127.2, 62.5, 56.8, 52.0, 43.3, 33.8, 31.6, 29.6, 28.7, 26.5, 22.5, 14.0

## 24) Methyl 1-(4-(N-octylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl

1-(4-(N-octylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (280 mg, 0.94 mmol), acetic acid (0.22 ml, 3.76 mmol), azetidine ester (162 mg, 0.94 mmol), DIPEA (0.11 mL, 1.41 mmol), and sodium cyanoborohydride (59 mg, 0.94 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (120 mg, 0.30 mmol) in 32% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.84–7.57 (m, 2H), 7.42 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.44 (brs, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.61–3.50 (m, 2H), 3.42–3.30 (m, 3H), 2.94 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 1.50–1.38 (m, 2H), 1.33–1.18 (m, 10H), 0.86 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)  $\delta$  173.4, 142.9, 138.8, 128.9, 127.2, 62.7, 57.0, 52.1, 43.3, 33.9, 31.7, 29.6, 29.1, 29.0, 26.5, 22.6, 14.1

25) Methyl 1-(4-(N-nonylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-nonylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (342 mg, 1.10 mmol), acetic acid (0.25 ml, 4.40 mmol), azetidine ester (190 mg, 1.65 mmol), DIPEA (0.13 mL, 1.65 mmol), and sodium cyanoborohydride (69 mg, 1.10 mmol) in a mixture of DCM (2 ml) and MeOH (2 ml) gave the desired product (252 mg, 0.61 mmol) in 55% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.83–7.77 (m, 2H), 7.42 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.55–4.41 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.61–3.51 (m, 2H), 3.41–3.30 (m, 3H), 2.93 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 1.50–1.37 (m, 12H), 1.34–1.15 (m, 12H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.2, 142.6, 138.6, 128.7, 127.0, 62.4, 56.7, 51.9, 43.1, 33.7, 31.6, 29.4, 29.2, 29.0, 28.9, 26.3, 22.4, 13.9

26) Methyl 1-(4-(N-decylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-decylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (320 mg, 0.98 mmol), acetic acid (0.23 ml, 3.93 mmol), azetidine ester (169 mg, 1.47 mmol), DIPEA (0.11 mL, 1.47 mmol), and sodium cyanoborohydride (62 mg, 0.98 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (143 mg, 0.34 mmol) in 35% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.60–3.50 (m, 2H), 3.39–3.31 (m, 3H), 2.93 (q, J = 6.5, 6.7 Hz, 2H), 1.48–1.39 (m, 2H), 1.32–1.17 (m, 16H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.4, 143.0, 138.8, 128.9, 127.2, 62.7, 57.0, 52.0, 43.3, 34.0, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 26.5, 22.7, 14.1

27) Methyl 1-(4-(N-undecylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate

Following the same procedure used for the synthesis of methyl 1-(4-(N-undecylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylate, the reaction of benzene sulfonamide (400 mg, 1.18 mmol), acetic acid (0.27 ml, 4.71 mmol), azetidine ester (203 mg, 1.77 mmol), DIPEA (0.14 mL, 1.77 mmol), and sodium cyanoborohydride (74 mg, 1.18 mmol) in a mixture of DCM (3 ml) and MeOH (3 ml) gave the desired product (168 mg, 0.38 mmol) in 43% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.53 (brs, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.61–3.52 (m, 2H), 3.41–3.31 (m, 3H), 2.93 (brs, 2H), 1.49–1.39 (m, 2H), 1.33–1.17 (m, 16H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.3, 142.7, 138.9, 128.9, 127.2, 62.6, 56.9, 52.0, 43.3, 33.9, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 26.5, 22.7, 14.1

## 28) 1-(4-(N-(1-hexylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

To a solution of azetidine-3-carboxylate (80 mg, 0.20 mmol) in MeOH (0.5 ml) was added sodium hydroxide (16 mg, 0.39 mmol) and H<sub>2</sub>O (0.01 ml, 0.39 mmol) at room temperature. After completion of the reaction, the mixture was quenched with Amberlite ◆ resin, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by recrystallization to give the desired product (77 mg, 0.196 mmol) in 98% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.81 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.18 (brs, 2H), 4.03–3.81 (m, 4H), 3.25 (s, 1H), 1.29–0.94 (m, 8H), 0.77 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.60–0.47 (m, 2H), 0.40–0.27 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 176.7, 143.9, 136.8, 130.0, 127.2, 58.5, 57.1, 36.8, 34.9, 34.8, 31.6, 28.8, 25.4, 22.2, 13.1, 12.1

## 29) 1-(4-(N-(1-heptylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-(1-heptylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (100 mg, 0.24 mmol), and sodium hydroxide (18.8 mg, 0.47 mmol) gave the desired product (76 mg, 0.19 mmol) in 78% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 4.28 (s, 2H), 4.41–4.38 (m, 4H), 3.38–3.27 (m, 1H), 1.30–1.05 (m, 10H), 1.05–0.97 (m, 2H), 0.79 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.59–0.47 (m, 2H), 0.40–0.39 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 175.4, 144.4, 135.4, 130.1, 127.3, 57.9, 57.0, 36.8, 34.8, 34.4, 31.6, 29.1, 29.0, 25.4, 22.3, 13.0, 12.0

## 30) 1-(4-(N-(1-octylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-(1-octylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction

of azetidine-3-carboxylate (100 mg, 0.23 mmol), and sodium hydroxide (18.4 mg, 0.46 mmol) gave the desired product (74 mg, 0.18 mmol) in 76% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.91 (q, J = 9.0 Hz, 4H), 3.31–3.22 (m, 1H), 1.29–1.14 (m, 10H), 1.14–0.94 (m, 2H), 0.80 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.60–0.45 (m, 2H), 0.40–0.28 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 177.4, 143.7, 137.8, 129.7, 127.1, 59.2, 57.2, 36.8, 35.1, 34.8, 31.7, 29.3, 29.2, 29.0, 25.4, 22.3, 13.1, 12.0

31) 1-(4-(N-(1-nonylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-(1-nonylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (100 mg, 0.22 mmol), and sodium hydroxide (35.2 mg, 0.88 mmol) gave the desired product (52 mg, 0.12 mmol) in 55% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.02 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.40–3.34 (m, 2H), 3.21–3.15 (m, 3H), 1.35–1.10 (m, 12H), 1.10–1.00 (m, 2H), 1.00–0.90 (m, 2H), 0.90–0.81 (m, 3H), 0.60–0.47 (m, 2H), 0.41–0.29 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO) δ 174.7, 143.1, 142.2, 129.0, 126.8, 62.3, 56.9, 36.7, 35.3, 34.2, 31.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 25.8, 22.5, 14.4, 12.8

32) 1-(4-(N-(1-decylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-(1-decylcyclopropyl)sulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (80 mg, 0.17 mmol), and sodium hydroxide (22.8 mg, 0.57 mmol) gave the desired product (40 mg, 0.089 mmol) in 52% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.95 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.39 (brs, 2H), 4.24–4.06 (m, 4H), 3.43 (brs, 1H), 1.41–1.17 (m, 16H), 1.17–0.98 (m, 2H), 0.99–0.87 (m, 3H), 0.70–0.60 (m, 2H), 0.53–0.40 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ 175.6, 144.3, 135.7, 130.0, 127.3, 58.0, 57.1, 36.8, 34.8, 34.6, 31.6, 29.3, 29.3, 29.1, 29.0, 25.4, 22.3, 13.0, 12.0

33) 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (100 mg, 0.26 mmol), and sodium hydroxide (21 mg, 0.52 mmol) gave the desired product (31 mg, 0.083 mmol) in 32% yield: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.90 (dt, J = 23, 9.0 Hz, 4H), 3.31–3.22 (m, 1H), 2.74 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.38–1.27 (m, 2H),

1.24–1.10 (m, 8H), 0.78 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$  177.8, 142.9, 138.3, 131.4, 128.6, 60.1, 58.7, 44.1, 36.4, 32.8, 30.7, 29.9, 27.6, 23.6, 14.4

34) 1-(4-(N-octylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (70 mg, 0.18 mmol), and sodium hydroxide (14.4 mg, 0.36 mmol) gave the desired product (37 mg, 0.097 mmol) in 54% yield:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.69 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.52 (brs, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.47–3.37 (m, 2H), 3.22 (brs, 3H), 2.76–2.66 (m, 2H), 1.48–1.29 (m, 2H), 1.29–1.10 (m, 10H), 0.86 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO)  $\delta$  174.4, 145.5, 140.8, 128.6, 126.4, 56.4, 42.5, 33.6, 31.1, 28.9, 28.5, 28.4, 25.9, 21.9, 13.9

35) 1-(4-(N-nonylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (70 mg, 0.17 mmol), and sodium hydroxide (13.6 mg, 0.34 mmol) gave the desired product (38.6 mg, 0.097 mmol) in 57% yield:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.95 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.70 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.32–4.20 (m, 4H), 3.53 (quintet,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 2.87 (t,  $J$  = 2.9 Hz, 2H), 1.52–1.40 (m, 2H), 1.39–1.21 (m, 12H), 0.92 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$  174.5, 142.1, 134.9, 130.3, 127.4, 57.6, 56.6, 42.7, 31.6, 29.3, 29.1, 28.9, 28.8, 26.2, 22.3, 13.0

36) 1-(4-(N-decylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of 1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (50 mg, 0.12 mmol), and sodium hydroxide (9.6 mg, 0.24 mmol) gave the desired product (25 mg, 0.061 mmol) in 51% yield:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.72 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.52 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.24–3.17 (m, 4H), 2.75–2.65 (m, 2H), 1.48–1.29 (m, 2H), 1.29–1.10 (m, 14H), 0.86 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO)  $\delta$  174.7, 143.4, 139.6, 129.1, 126.9, 62.3, 57.0, 43.0, 34.1, 31.7, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 26.4, 22.6, 14.4

37) 1-(4-(N-undecylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid

Following the same procedure used for the synthesis of

1-(4-(N-heptylsulfamoyl)benzyl)azetidine-3-carboxylic acid, the reaction of azetidine-3-carboxylate (100 mg, 0.23 mmol), and sodium hydroxide (18.4 mg, 0.46 mmol) gave the desired product (51 mg, 0.12 mmol) in 52% yield:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.93 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.65 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 4.64 (s, 1H), 4.34 (s, 2H), 4.19-4.01 (m, 4H), 3.49-3.38 (m, 1H), 2.87 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.51-1.40 (m, 2H), 1.40-1.22 (m, 16H), 0.93 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$  175.2, 141.9, 135.5, 130.2, 127.4, 57.1, 42.7, 34.4, 31.6, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 28.8, 26.3, 22.3, 13.0

### 38) Methyl azetidine-3-carboxylate

A solution of azetidine carboxylic acid (2.0 g, 19.9 mmol) in MeOH (75 ml) was treated dropwise thionyl chloride (3.03 ml, 41.5 mmol) under  $\text{N}_2$  at 0 °C for 20 min. The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature. After completion of the reaction, the mixture was evaporated to give the desired product (1.76 g, 15.3 mmol) in 77% yield:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  4.32-4.18 (m, 4H), 3.80-3.70 (m, 4H);

### Ethyl 5-acetyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carboxylate (1)

1-acetyl-4-piperidone (10.0 mL, 77.39 mmol), p-toluenesulfonic acid (747.27 mg, 3.87 mmol)를 benzene (60 mL)에 녹인 용액에 pyrrolidine (7.45 mL)을 천천히 넣어준 후, 하루 동안 환류 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후, 반응 현탁액을 농축시킨 후, 진공 감압하여 화합물 1 (14.28 g, 95%)을 얻었다,

### Ethyl 5-acetyl-3a,4,5,6,7-tetrahydro-7a-(pyrrolidin-1-yl)isoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carboxylate (2)

화합물 1 (14.28 g, 73.51 mmol)과 ethyl (E)-2-chloro-2-(hydroxyimino)acetate (24.8 g, 162.52 mmol)을 DCM (200 mL)에 녹인 용액에 TEA (9.48 mL, 154.78 mmol)를 0 °C에서 천천히 적가 후 상온에서 16시간 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 반응 용액을 0 °C로 낮추어 준 후 10 wt%의 citric acid 용액으로 닦아준 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  용액과 DCM으로 추출 후 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압여과 후 농축시킨다. 그 후 진공 감압하여 화합물 2 (14.55 g, 64.0%)를 합성하였다.

Ref. US patent ; US 2009/0076001 A1

화합물 2 (14.55 g, 47.03 mmol)를 녹인 EtOH (50 mL) 용액에 36% HCl (20 mL)을 0 °C에서 천천히 적가 후 1 시간 동안 환류 교반한다. 그 후 0 °C에서 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 반응 용액을 천천히 중화시킨 후 DCM으로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOH = 25 : 1)를 이용하여 화합물 3



(7.73 g, 84.0%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  (ppm) 4.43 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.98 (t,  $J = 1.6$  Hz, 2H), 3.16 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 2.28 – 2.79 (m, 2H), 1.42 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H)

#### Precedure of reductive amination

화합물 KKJE0004,5,6,7,18,28 는 아래 합성 방법으로 합성하였다.

Aldehyde (1.2 mol eq)를 녹인 MeOH 용액에 질소 조건하에서 glacial acetic acid (1.2 mol eq)와 화합물 3 (1.0 mol eq)을 천천히 적가 후 상온에서 20분 동안 교반시킨다. 그 후  $\text{NaCNBH}_3$  (1.2 mol eq)를 천천히 적가 후 2시간 동안 상온에서 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $\text{H}_2\text{O}$ 로 잔여  $\text{NaCNBH}_3$ 의 활성을 제거한 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액과 DCM으로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 8 또는 10 : 1)를 이용하여 화합물 4a, 5a, 6a, 7a, 18a (60~98%)를 합성하였다.

#### Precedure of amide coupling

화합물 KKJE0008,9,10 은 아래 합성 방법으로 합성하였다.

Carboxylic acid (1.2 mol eq)를 녹인 THF 용액에 질소 조건하에 DIPEA (4.0 mol eq)와 HATU (1.2 mol eq)를 순서대로 넣고 상온에서 20분간 교반한다. 그 후 화합물 3을 천천히 적가 후 상온에서 2~3 시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1~4 : 1)를 이용하여 화합물 8a, 9a, 10a, 28a (75~100%)를 합성하였다.

#### Procedure of Hydrolysis

Ethylester (1.0 mol eq)이 녹여져 있는 MeOH 용액에 NaOH 가루 (2~4.0 mol eq)를 넣어준 뒤, 상온에서 3~12시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 Amberlite IR120 resin 을 반응 용액이 중화 될 때까지 천천히 적가, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화합물 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 28 (13~98%)를 합성하였다.

Comp No.	Solvent	<sup>1</sup> H NMR 400MHz
KKJE0004 화합물 4	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.38 - 7.27 (m, 5H), 3.86 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 2.96 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 5.2 Hz, 2H)
KKJE0005 화합물 5	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.85 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.64 (s, 2H), 2.87 - 2.83(m, 4H)
KKJE0006 화합물 6	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.70 - 7.51 (m, 4H), 3.84 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 2.87 - 2.84 (m, 4H)
KKJE0007 화합물 7	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.64 - 7.57 (s, 4H), 3.84 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 2.88 - 2.83(m, 4H)
KKJE0008 화합물 8	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.36 - 7.21 (m, 5H), 4.75 (s, 0.95H), 4.57 (s, 1.05H), 4.47~4.41(m, 2H), 3.96 (t, J = 5.8 Hz, 1.05H), 3.86 (s, 0.95H), 3.82 (s, 1.05H), 3.72 (t, J = 5.6 Hz, 0.95H), 2.89 (t, J = 5.8 Hz, 1.05H), 2.52 (t, J = 5.8 Hz, 0.95H), 1.42 (t, J = 7Hz, 3H)
KKJE0009 화합물 9	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.61 - 7.45 (m, 4H), 4.70 (s, 2H), 4.00 (s, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.94 (t, J = 6 Hz, 1H), 3.87 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 2.84 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 2.78 (t, J = 5.8 Hz, 1H)
KKJE0010 화합물 10	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.55 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.1 (dd, J <sub>1</sub> = 1.8 Hz, J <sub>2</sub> = 8.2 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 14.1 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.93 (d, J = 17 Hz, 2H)
KKJE0018 화합물 18	CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm) 7.67 (d, J = 8 Hz, 4H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 7.38 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 2.94 (s, 2H), 2.82 (s, 2H)
KKJE0028 화합물 28	CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm) 7.71 - 7.65 (m, 2H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.77 - 4.70 (m, 3H), 4.42 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.93 (bs, 2H), 3.00 (s, 2H), 1.44 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 1.40 (t, J = 7.2 Hz, 3H)

## Ethyl 5-trityl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carboxylate (3a)

화합물 3 (4.10 g, 73.51 mmol)을 녹인 DCM (70 mL) 용액에 질소 조건 하에서 Trityl chloride (4.10 g, 14.25 mmol)과 TEA (2.0 mL, 14.25 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가, 상온에서 17시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 H<sub>2</sub>O를 이용하여 유기층으로 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 그 후 진공 감압하여 화합물 3a (5.14 g, 98.8%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm) 7.52 - 7.16 (m, 15H), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.96 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.66 (s, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

## (5-Trityl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methanol (3b)

화합물 3a (9.45 g, 18.54 mmol)를 녹인 MeOH (100 mL) 용액에 질소 조건에서 NaBH<sub>4</sub> (1.51 g, 39.08 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가한 후, 상온에서 1.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaBH<sub>4</sub>의 활성을 제거한 DCM으로 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1)를 이용하여 화합물 3b (6.42 g, 82.9%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm) 7.52 - 7.16 (m, 15H), 4.64 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.30 (s, 2H), 2.90 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.64 (s, 2H), 1.70 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H)

## 5-Trityl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carbaldehyde (3c)

화합물 3b (109.7 mg, 0.28 mmol)를 녹인 DCM (10 mL) 용액에 질소 조건하에서 Dess-Martin periodinane (140.8 mg, 0.33 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가한 후 상온에서 1시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 celite filter를 이용하여 감압 여과 후 여액을 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1)를 이용하여 화합물 3c (109.0 mg, 100%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm) 10.12 (s, 1H), 7.51 - 7.16 (m, 15H), 3.48 (s, 2H), 2.98 (s, 2H), 2.65 (s, 2H).

## Methyl-((4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methyl)azetidine-3-carboxylate (3d)

5-trityl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carbaldehyde (2.14 g, 5.42

mmol)을 녹인 DCM (20 mL) 용액에 acetic acid (0.32 mL, 5.42 mmol)을 적가한 후 상온에서 10분간 교반한다. 4-azetidine methylester (903.3 mg, 5.98 mmol)을 녹인 MeOH (10 mL) 용액에 TEA (0.84 mL, 5.96 mmol)을 앞서 만들었던 반응 용액에 질소 조건하에서 천천히 적가 상온에서 20분간 교반한다. 그 후 NaCNBH<sub>3</sub> (358.3 mg, 5.42 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가 후 상온에서 1시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaCNBH<sub>3</sub>의 활성을 제거 후 H<sub>2</sub>O와 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 다시 DCM (20 mL)에 녹인 후 질소 조건하 0 °C에서 TFA (1.23 mL, 16.25 mmol)을 천천히 적가 후 상온에서 15분간 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 중화 및 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 5 : 1)를 이용하여 화합물 3d (934.0 mg, 68.6%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm) 3.80 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 3.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.38 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.33 - 3.26 (m, 1H), 3.15 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.75 - 2.73 (m, 2H), 2.45 (s, 1H)

#### Methyl azetidine-3-carboxylate hydrochloride (36)

Azetidine carboxylic acid (2.0 g, 19.24 mmol)를 녹인 MeOH (30 mL) 용액에 0 °C 질소 조건 하에서 thionyl chloride (2.86 mL, 39.44 mmol)을 적가 후 30분 동안 0 °C에서 교반한 뒤 상온에서 2.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 농축시킨다. 농축시킨 후 진공 감압하여 화합물 36 (2.92 g, 100.0%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz MeOD<sub>4</sub>)

δ 4.32~4.22 (m, 4H), 3.83~3.72 (m, 4H).

#### (4-Cyclohexylphenyl)methanol (37)

4-cyclohexylbenzoic acid (246.9 mg, 1.21 mmol)을 LAH (5.2 mL, 5.20 mmol ; 1M in diethyl ether)가 들어있는 diethylether (5 mL)에 질소 조건, 0 °C에서 천천히 적가한 후 상온에서 1.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인한 후 0 °C에서 3M KOH 수용액을 넣어준 후 소량의 H<sub>2</sub>O를 첨가한다. 그 후 celite filter로 감압 여과한 뒤 여액을 H<sub>2</sub>O와 diethylether를 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 37 (213.9 mg, 93.0%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ (ppm) 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.52 - 2.47 (m, 1H), 1.88

- 1.82 (m, 4H), 1.77 - 1.73 (m, 1H), 1.47 - 1.23 (m, 6H).

#### 4-Cyclohexylbenzaldehyde (37a)

화합물 37 (295.5 mg, 1.55 mmol)를 녹인 DCM (20 mL) 용액에 질소 조건하에서 Dess-Martin periodinane (790.4 mg, 1.86 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가한 후 상온에서 1 시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 celite filter를 이용하여 감압 여과 후 여액을 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 3 : 1)를 이용하여 화합물 37a (257.4 mg, 88.0%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9.96 (s, 1H), 7.80 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.61 - 2.55 (m, 1H), 1.88 - 1.85 (m, 4H), 1.79 - 1.75 (m, 1H), 1.49 - 1.22 (m, 5H).

#### Precedure of reductive amination

KKJE0011,12,14,19,20,21,22,23,24,25 와 KKJE26 은 아래 합성 방법으로 합성하였다.

Aldehyde (1.5 mol eq)를 녹인 MeOH 용액에 질소 조건하에서 glacial acetic acid (1.5 mol eq)와 화합물 3d (1.0 mol eq)를 천천히 적가 후 상온에서 20~30분 동안 교반시킨다. 그 후  $\text{NaCNBH}_3$  (1.5 mol eq)를 천천히 적가 후 1~3시간 동안 상온에서 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $\text{H}_2\text{O}$ 로 잔여  $\text{NaCNBH}_3$ 의 활성을 제거한 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액과 DCM으로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 5~20 : 1)를 이용하여 화합물 11a~14a, 19a~25a, 27a (57~97%)를 합성하였다.

Methyl(E)-1-((5-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methyl)

#### azetidine-3-carboxylate (17a)

(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylic acid (375.2 mg, 0.98 mmol)를 녹인 THF 용액에 질소 조건하에 DIPEA (0.57 mL, 3.26 mmol)와 HATU (375.2 mg, 0.98 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 20분간 교반한다. 그 후 화합물 3d (204.6 mg, 0.81 mmol)를 천천히 적가 후 상온에서 2.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1 에서 EtOAc : EtOH = 25 : 1)를 이용하여 화합물 17a를 합성하였다.

Ethyl5-(2-phenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carboxylate (15a)

화합물 3 (698.9 mg, 3.56 mmol)을 녹인 DCM (20 mL) 용액에 질소 조건 하에서 2-phenylacetyl chloride (0.47 mL, 3.56 mmol)과 TEA (0.63 mL, 4.45 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가, 상온에서 1시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 반응 용액을 HCl 수용액 (1M, 10 mL)과 NaOH 수용액 (2M, 10 mL)을 순서대로 적가, H<sub>2</sub>O와 DCM을 이용하여 유기층으로 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 15a를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.36 - 8.21 (m, 5H), 4.75 (s, 0.9H), 4.57 (s, 1.1H), 4.47 - 4.41 (m, 2H), 3.95 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.1H), 3.86 (s, 0.9H), 3.82 (s, 1.1H), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.9H), 2.89 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.1H), 2.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.9H), 1.44 - 1.40 (m, 3H).

Ethyl5-(2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)acetyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carboxylate (16a)

2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)acetic acid (870.1 mg, 4.26 mmol)를 녹인 THF (20 mL) 용액에 질소 조건하에 DIPEA (2.48 mL, 14.21 mmol)와 HATU (1.64 g, 4.26 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 20분간 교반한다. 그 후 화합물 3 (696.4 mg, 3.55 mmol)를 천천히 적가 후 상온에서 3시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (EtOAc : EtOH = 30 : 1)를 이용하여 화합물 16a (1.03 g, 76.0%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.56 - 7.42 (m, 4H), 4.76 (s, 0.8H), 4.62 (s, 1.2H), 4.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.98 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.2H), 3.89 (s, 0.8H), 3.87 (s, 1.2H), 3.78 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.8H), 2.90 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.2H), 2.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.8H), 1.42 (dt, *J*<sub>1</sub> = 3.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 10.7 Hz, 3H)

#### Procedure of NaBH<sub>4</sub> reduction

화합물 15a, 16a (1 mol eq)를 녹인 MeOH 용액에 질소 조건에서 NaBH<sub>4</sub> (2 mol eq)을 0 °C에서 천천히 적가한 후, 상온에서 10~25분 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaBH<sub>4</sub>의 활성을 제거한 뒤 DCM으로 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (15b ; Hex : EtOAc = 1 : 1, 16b ; EtOAc : EtOH = 20 : 1)를 이용하여 화합물 15b (90.0%), 16b (94.3%)를 합성하였다.

1-(3-(Hydroxymethyl)-6,7-dihydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-5(4H)-yl)-2-phenylethan-1-one (15a)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.36 - 7.19 (m, 5H), 4.77 (d, *J* = 6.0 Hz, 1.2H), 4.66 (d, *J* = 6.4 Hz, 0.8H), 4.62 (s, 1.2H), 4.45 (s, 0.8H), 3.96 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.8H), 3.85 (s, 1.2H), 3.82 (s, 0.8H), 3.71 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.2H), 2.84 (t, *J* = 6.0 Hz, 0.8H), 2.48 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.2H), 1.93 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.6H), 1.56 (t, *J* = 6.0 Hz, 0.4H).

1-(3-(Hydroxymethyl)-6,7-dihydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-5(4H)-yl)-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)ethan-1-one (16a)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.55 - 7.43 (m, 4H), 4.75 (dd, *J*<sub>1</sub> = 4.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 11.1 Hz, 2H), 4.64 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 3.97 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 2.84 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 2.67 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 2.05 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.5H), 1.82 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.5H).

#### Procedure of Dess-Martin Periodinane oxidation

화합물 15b, 16b (1 mol eq)를 녹인 DCM 용액에 질소 조건하에서 Dess-Martin periodinane (1.2 mol eq)을 0 °C에서 천천히 적가한 후 상온에서 1시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 celite filter를 이용하여 감압 여과 후 여액을 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 15c (100%), 16c (85.4%)를 합성하였다.

5-(2-Phenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carbaldehyde (15b)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.17 (s, 0.43H), 10.11 (0.57H), 7.36 - 7.21 (m, 5H), 4.77 (s, 0.87H), 4.60 (s, 1.13H), 3.96 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.13H), 3.86 (s, 0.87), 3.81 (s, 1.13H), 3.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.87H), 2.90 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.13H), 2.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 1.87H).

5-(2-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)acetyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carbaldehyde (16b)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.21 (s, 0.45H), 10.17 (s, 0.55H), 7.55 - 7.45 (m, 4H), 4.82 (s, 0.9H), 4.66 (s, 1.1H), 4.02 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.1H), 3.92 (s, 0.9H), 3.89 (s, 1.1H), 3.80 (t, *J* = 5.6 Hz, 0.9H), 2.95 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.1H), 2.76 (t, *J* = 5.4 Hz, 0.9H).

### Precedure of reductive amination

15c, 16c (1 mol eq)을 녹인 DCM 용액에 acetic acid (1.0 mol eq)을 적가한 후 상온에서 10분간 교반한다. 4-azetidine methylester (1.1 mol eq)을 녹인 MeOH 용액에 TEA (1.1 mol eq)을 넣고, 앞서 만들었던 반응 용액에 질소 조건하에서 천천히 적가 상온에서 30분간 교반한다. 그 후 NaCNBH<sub>3</sub> (1.0 mol eq)을 0 °C에서 천천히 적가 후 상온에서 1시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaCNBH<sub>3</sub>의 활성을 제거 후 H<sub>2</sub>O와 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 15d (33.0%), 16d (67.9%)를 합성하였다.

Methyl 1-((5-(2-phenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methyl)azetidine-3-carboxylate (15c)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.35 - 7.22 (m, 5H), 4.56 (s, 1.1H), 4.41 (s, 0.9H), 3.94 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.9H), 3.85 (s, 1.1H), 3.83 (s, 0.9H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 1.1H), 3.64 (s, 1.1H), 3.55 (s, 0.9H), 3.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 1.1H), 3.42 - 3.24 (m, 3.9H), 2.80 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.9H), 2.48 (t, *J* = 5.6 Hz, 1.1H).

Methyl 1-((5-(2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)acetyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methyl)azetidine-3-carboxylate (16c)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.55 - 7.42 (m, 4H), 4.58 (s, 0.95H), 4.45 (s, 1.05H), 3.95 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.05H), 3.89 (s, 1.05H), 3.88 (s, 0.95H), 3.74 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.95H), 3.71 (s, 3H), 3.65 (s, 0.95H), 3.61 (s, 1.05H), 3.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.46 - 3.37 (m, 3H), 3.34 - 3.21 (m, 1H), 2.82 (t, *J* = 5.8 Hz, 1.05H), 2.67 (t, *J* = 5.8 Hz, 0.95H).

### Procedure of Hydrolysis

Ethylester (1.0 mol eq)이 녹여져 있는 MeOH 용액에 NaOH 가루 (2~4.0 mol eq)를 넣어준 뒤, 상온에서 3~12시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 Amberlite IR120 resin을 반응 용액이 중화 될 때까지 천천히 적가, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 5~10 : 1)를 이용하여 화합물 11~17, 19~25, 27 (27~100%)을 합성하였다.

5-(3-Cyano-4-isopropoxybenzoyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-carboxylate (27a)



3-cyano-4-isopropoxybenzoic acid (562.0 mg, 2.71 mmol)를 녹인 THF (15 mL)용액에 질소 조건하에 DIPEA (1.73 mL, 9.86 mmol)와 HATU (1.04 g, 2.71 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 20분간 교반한다. 그 후 화합물 3 (483.3 mg, 2.46 mmol)를 천천히 적가 후 상온에서 3시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1 에서 1 : 1)를 이용하여 화합물 27a (888.9 mg, 94.1%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.71 ~ 7.65 (m, 2H), 7.03 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 4.77 - 4.70 (m, 3H), 4.42 (q,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 3.93 (bs, 2H), 3.00 (s, 2H), 1.44 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 6H), 1.40 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H).

5-(3-(Hydroxymethyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-5-carbonyl)-2-isopropoxybenzonitrile (27b)

화합물 27a (351.1 mg, 0.92 mmol)를 녹인 MeOH (50 mL)용액에 질소 조건에서  $\text{NaBH}_4$  (70.7 mg, 1.83 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가한 후, 상온에서 2시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후  $\text{H}_2\text{O}$ 로 잔여  $\text{NaBH}_4$ 의 활성을 제거한 DCM으로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 20 : 1)를 이용하여 화합물 27b (263.6 mg, 84.3%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.69 - 7.64 (m, 2H), 7.02 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 4.75 - 4.63 (m, 3H), 4.60 (bs, 2H), 3.89 (bs, 2H), 2.93 (bs, 2H), 2.10 (bs, 1H), 1.44 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H).

5-(3-Formyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-5-carbonyl)-2-isopropoxybenzonitrile (27c)

화합물 27b (187.4 mg, 0.55 mmol)를 녹인 DCM (5 mL) 용액에 질소 조건하에서 Dess-Martin periodinane (279.4 mg, 0.66 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가한 후 상온에서 7시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 celite filter를 이용하여 감압 여과 후 여액을 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 20 : 1)를 이용하여 화합물 27a를 합성하였다.

Methyl-((5-(3-cyano-4-isopropoxybenzoyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-yl)methyl)azetidine-3-carboxylate (27d)

화합물 27c (326.7 mg, 0.96 mmol)을 녹인 MeOH (7 mL) 용액에 acetic acid (0.06 mL, 1.06 mmol)을 적가한 후 상온에서 10분간 교반한다. 4-azetidine methylester (160.5 mg,

1.06 mmol)을 녹인 MeOH (3 mL) 용액에 TEA (0.15 mL, 1.06 mmol)를 넣고 앞서 만들었던 반응 용액에 질소 조건하에서 천천히 적가 상온에서 15분간 교반한다. 그 후 NaCNBH<sub>3</sub> (63.7 mg, 1.06 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가 후 상온에서 4.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaCNBH<sub>3</sub>의 활성을 제거 후 H<sub>2</sub>O와 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (DCM : MeOH = 15 : 1 에서 10 : 1)를 이용하여 화합물 27d (273.7 mg, 64.8%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.69 – 7.64 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.76 – 4.70 (m, 1H), 4.54 (bs, 2H), 3.86 (bs, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 3.49 (bs, 2H), 3.45 (bs, 2H), 3.27 (bs, 1H), 2.90 (s, 2H), 1.44 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H)

Comp No.	Solvent	<sup>1</sup> H NMR 400MHz
KKJE0011	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> ) δ (ppm) 7.39 – 7.26 (m, 5H), 4.13 (s, 2H), 4.01 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 2H), 3.92 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.38 – 3.32 (m, 1H), 2.89 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 2.82 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H)
KKJE0012	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm) 7.84 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.68 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.60 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.43 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.93 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.86 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 3.47 (s, 2H), 3.35 – 3.26 (m, 1H), 2.87 – 2.79 (m, 4H)
KKJE0013	D <sub>2</sub> O	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, D <sub>2</sub> O) δ (ppm) 3.67 – 7.51 (m, 4H), 4.16 (s, 2H), 4.07 (t, <i>J</i> = 9.4 Hz, 2H), 3.92 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.44 – 3.33 (m, 1H), 2.91 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 2.81 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H)
KKJE0014	D <sub>2</sub> O	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, D <sub>2</sub> O) δ (ppm) 7.69 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 4.18 (s, 2H), 4.09 (t, <i>J</i> = 9.6 Hz, 2H), 3.94 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.44 ~ 3.35 (m, 1H), 2.92 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 2.81 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H)
KKJE0015	No Data	No Data

Comp No.	Solvent	<sup>1</sup> H NMR 400MHz
KKJE0016	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> )
		δ (ppm) 7.60 – 7.50 (m, 4H), 4.56 (s, 2H), 4.10 – 3.67 (m, 10H), 3.36 – 3.31 (m, 1H), 2.83 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 0.9H), 2.77 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1.1H)
KKJE0017	D <sub>2</sub> O	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, D <sub>2</sub> O)
		δ (ppm) 7.42 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz, 1H), 7.19 (d, <i>J</i> = 14.4 Hz, 1H), 6.89 – 6.83 (m, 2H), 4.60 – 3.90 (m, 10H), 3.84 (s, 3H), 3.50 – 3.42 (m, 1H), 2.88 – 2.84 (m, 2H)
KKJE0019	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> )
		δ (ppm) 7.61 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 4H), 7.47 – 7.41 (m, 4H), 7.34-7.30 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.89 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.79 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 3.47 (s, 2H), 3.34 – 3.25 (m, 1H), 2.92 – 2.81 (m, 4H)
KKJE0020	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> )
		δ (ppm) 7.37 – 7.32 (m, 4H), 7.13 – 7.09 (m, 1H), 6.99 – 6.94 (m, 4H), 4.12 (s, 2H), 4.00 (t, <i>J</i> = 9.2 Hz, 2H), 3.91 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 3.38 – 3.30 (m, 1H), 2.92 – 2.81 (m, 4H)
KKJE0021	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> )
		δ (ppm) 7.28 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.19 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.96 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 3.87 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.36 – 3.30 (m, 1H), 2.90 – 2.80 (m, 4H), 2.50 (bs, 1H), 1.85 – 1.74 (m, 5H), 1.50 – 1.31 (m, 5H)
KKJE0022	MeOD <sub>4</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD <sub>4</sub> )
		δ (ppm) 7.28 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.19 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.96 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 3.87 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.36 – 3.30 (m, 1H), 2.90 – 2.80 (m, 4H), 2.50 (bs, 1H), 1.85 – 1.74 (m, 5H), 1.50 – 1.31 (m, 5H)
KKJE0023	CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
		δ (ppm) 4.04 (s, 2H), 3.90 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 3.78 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 3.66 (s, 2H), 3.32 – 3.26 (m, 1H), 3.05 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 2.91 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 2.75 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 1.64 – 1.60 (m, 2H), 1.44 – 1.35 (m, 2H), 0.97 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H)
KKJE0024	CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
		δ (ppm) 4.03 (s, 2H), 3.89 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 3.78 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.34 – 3.26 (m, 1H), 3.03 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 2.90 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 2.73 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 3H), 1.65 (bs, 2H), 1.35 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 6H), 0.92 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H)
KKJE0025	CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
		δ (ppm) 4.00 (s, 2H), 3.87 (t, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 3.73 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.34 – 3.26 (m, 1H), 3.02 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 2.89 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H), 2.73 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 1.65 (bs, 2H), 1.36 ~ 1.31 (m, 10H), 0.90 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 3H)
KKJE0026	CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
		δ (ppm) 4.02 (s, 2H), 3.89 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 3.76 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.34 – 3.25 (m, 1H), 3.03 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 2.90 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 2.73 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 1.65 (bs, 2H), 1.36 – 1.30 (m, 14H), 0.90 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H)

## 2-Chloro-1-isopropoxy-4-nitrobenzene (38)

2-chloro-4-nitrophenol (1.50 g, 8.48 mmol)을 녹인 acetone (20 mL) 용액에 질소 조건 하에서 2-Iodopropane (5.13 mL, 50.85 mmol)과  $K_2CO_3$  (2.43 g, 16.95 mmol)을 적가, 상온에서 하루 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $H_2O$ 와 DCM를 이용하여 유기층으로 추출, 무수  $Na_2SO_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1)를 이용하여 화합물 38 (1.82 g, 100.0%)를 합성하였다.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.30 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J_1$  = 2.6 Hz,  $J_2$  = 9.0 Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J_1$  = 0.4 Hz,  $J_2$  = 9.2 Hz, 1H), 4.77 - 4.69 (m, 1H), 1.45 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H).

## 3-Chloro-4-isopropoxyaniline (38a)

화합물 38 (542.6 mg, 2.52 mmol)을 녹인 MeOH (2 mL) 용액에 Iron powder (425.8 mg, 7.55 mmol)과  $NH_4Cl$  (108.8 mg, 2.01 mmol) 수용액 ( $H_2O$  6 mL), 을 넣고, 상온에서 1.6시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $H_2O$ 와 DCM를 이용하여 유기층으로 추출, 무수  $Na_2SO_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1)를 이용하여 화합물 38a (440.5 mg, 94.3%)를 합성하였다.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 6.80 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.73 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 6.51 (dd,  $J_1$  = 2.8 Hz,  $J_2$  = 8.4 Hz, 1H), 4.35 - 4.28 (m, 1H), 3.48 (bs, 2H), 1.32 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H).

## 3-Chloro-4-isopropoxy-N-((5-trityl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methyl)aniline (38b)

화합물 3c (957.8 mg, 2.48 mmol)를 녹인 MeOH (20 mL) 용액에 질소 조건하에서 glacial acetic acid (0.17 mL, 2.92 mmol)와 화합물 38a (541.4 mg, 2.92 mmol)을 천천히 적가 후 상온에서 30분 동안 교반시킨다. 그 후  $NaCNBH_3$  (192.9 mg, 2.92 mmol)를 천천히 적가 후 1시간 동안 상온에서 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $H_2O$ 로 잔여  $NaCNBH_3$ 의 활성을 제거한 후 포화  $NaHCO_3$  수용액과 DCM으로 추출, 무수  $Na_2SO_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1)를 이용하여 화합물 38b (745.8 mg, 54.4%)를 합성하였다.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.51 - 7.15 (m, 15H), 6.76 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 6.59 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J_1$  = 2.8 Hz,  $J_2$  = 8.8 Hz, 1H), 4.35 - 4.20 (m, 1H), 4.20 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 3.88 (bs, 1H), 3.19 (bs, 2H), 2.86 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H), 2.61 (bs, 2H), 1.32 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H).

## 3-Chloro-4-isopropoxy-N-((4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-yl)methyl)aniline (38c)

화합물 3c (374.5 mg, 0.67 mmol)을 녹인 MeOH (10 mL)에 HCl (1.25 M in MeOH) 0.8 mL를 적가, 상온에서 10분간 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 중화 및 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 20 : 1에서 10 : 1)를 이용하여 화합물 38c (92.9 mg, 82.7%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J*<sub>1</sub> = 3.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.6 Hz, 1H), 4.35 - 4.29 (m, 3H), 3.94 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.74 (t, *J* = 1.6 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.75 - 2.72 (m, 2H), 1.32 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H).

#### Methyl 3-oxopropanoate (39)

Methyl 3,3-dimethoxypropanoate (0.3 mL, 2.04 mmol)이 녹여져 있는 acetone (10 mL)에 H<sub>2</sub>O (0.37 mL, 20.39 mmol)을 적가 한 후 Amerrlite IR120 resin 20 mg 를 넣고 10시간 동안 환류 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액 진공 감압하여 화합물 39를 합성 하였다.

Methyl 3-(3-(((3-chloro-4-isopropoxyphenyl)amino)methyl)-6,7-dihydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-5(4H)-yl)propanoate (38d)

화합물 39 (32.6 mg, 0.32 mmol)를 녹인 MeOH (1 mL) 용액에 질소 조건하에서 glacial acetic acid (0.02 mL, 0.32 mmol)와 화합물 38c (95.7 mg, 0.27 mmol)을 천천히 적가 후 상온에서 15분 동안 교반시킨다. 그 후 NaCNBH<sub>3</sub> (21.2 mg, 0.32 mmol)를 천천히 적가 후 30분 동안 상온에서 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaCNBH<sub>3</sub>의 활성을 제거한 후 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액과 DCM으로 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 38d (65.0 mg, 60.0%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.8 Hz, 1H), 4.34 - 4.27 (m, 3H), 3.97 (bs, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.41 (s, 2H), 2.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.84 - 2.80 (m, 4H), 2.54 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.352 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H).

#### Methyl piperidine-4-carboxylate hydrochloride (40)

Piperidine-4-carboxylic acid (3.65 g, 27.71 mmol)를 녹인 MeOH (20 mL) 용액에 0 °C 질소 조건 하에서 thionyl chloride (4.03 mL, 49.88 mmol)을 적가 후 30분 동안 0 °C에서 교반한 뒤 상온에서 2.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 농축시킨다. 농축시킨 후 진공 감압하여 화합물 40 (4.98 g, 100.0%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD<sub>4</sub>) δ (ppm) 3.73 (s, 3H), 3.37 (dt, *J*<sub>1</sub> = 4.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 12.9 Hz, 2H), 3.02 (dt, *J*<sub>1</sub> = 12.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.8 Hz, 2H), 2.78 - 2.73 (m, 1H), 2.17 - 2.13 (m, 2H), 1.93 - 1.82 (m, 2H).

## Methyl 2-(3-chloro-4-isopropoxyphenyl)acetate (41)

2-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)acetic acid (1.0 g, 5.25 mmol)를 녹인 MeOH (10 mL) 용액에 0 °C 질소 조건 하에서 thionyl chloride (0.76 mL, 9.45 mmol)을 적가 후 30분 동안 0 °C에서 교반한 뒤 상온에서 2.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 농축시킨다. 농축시킨 후 진공 감압하여 화합물 41 (1.05 g, 100.0%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  (ppm) 7.26 (s, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J_1$  = 1.4 Hz,  $J_2$  = 8.2 Hz, 1H), 5.26 (bs, 1H), 3.70 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 3H), 3.54 (s, 2H).

## (41a)

Methyl 2-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)acetate (1.11 g, 5.52 mmol)을 녹인 acetone (10 mL) 용액에 질소 조건 하에서 2-Iodopropane (3.37 mL, 33.12 mmol)과  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.53 g, 11.04 mmol)을 적가, 상온에서 하루 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $\text{H}_2\text{O}$ 와 DCM를 이용하여 유기층으로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 4 : 1)를 이용하여 화합물 41a (1.16 g, 86.5%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.29 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (dd,  $J_1$  = 2.4 Hz,  $J_2$  = 8.4 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.57 - 4.48 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 1.37 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 6H).

## 2-(3-Chloro-4-isopropoxyphenyl)ethan-1-ol (41b)

Methyl 2-(3-chloro-4-isopropoxyphenyl)acetate (1.04 g, 4.29 mmol)을 LAH (8.8 mL, 8.80 mmol ; 1M in diethyl ether)가 들어있는 diethylether (10 mL)에 질소 조건, 0 °C에서 천천히 적가한 후 상온에서 1.5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인한 후 0 °C에서 3M KOH 수용액을 넣어준 후 소량의  $\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가한다. 그 후 celite filter로 감압 여과한 뒤 여액을  $\text{H}_2\text{O}$ 와 diethylether를 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 41b (825.8 mg, 89.6%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.23 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.04 (dd,  $J_1$  = 2.4 Hz,  $J_2$  = 8.4 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.55 - 4.46 (m, 1H), 3.21 (q,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 2.77 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 1.56 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 1.36 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H).

## 3-Chloro-4-isopropoxyphenethyl 4-methylbenzenesulfonate (41c)

화합물 41b (692.2 mg, 3.23 mmol)을 녹인 DCM (10 mL) 용액에 질소 조건 하에서 p-Toluenesulfonyl chloride (737.6 mg, 3.87 mmol)과 TEA (0.54 mL, 3.87 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가, 상온에서 하루 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $\text{H}_2\text{O}$ 를 이용하여 유기층으로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시킨다. 그 후 진공 감압하여 화합물 41c (1.15 g, 96.3%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.67 (dt,  $J_1 = 1.8\text{Hz}$ ,  $J_2 = 8.4\text{Hz}$ , 2H), 7.28 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 2H), 7.03 (d,  $J = 2.0\text{ Hz}$ , 1H), 6.94 (dd,  $J_1 = 2.4\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 8.4\text{ Hz}$ , 1H), 6.82 (d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , 1H), 4.54 - 4.45 (m, 1H), 4.16 (t,  $J = 6.8\text{ Hz}$ , 2H), 2.85 (t,  $J = 6.8\text{ Hz}$ , 2H), 2.43 (s, 3H), 1.36 (d,  $J = 6.0\text{ Hz}$ , 6H).

#### 2-(3-Chloro-4-isopropoxyphenyl)-N-ethylethan-1-amine (41d)

화합물 41c (2.62 g, 7.09 mmol)을 녹인 DMF (15 mL) 용액에 질소 조건 하에서 ethyl amine (14.2 mL, 14.18 mmol) 천천히 적가, 65  $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후  $\text{H}_2\text{O}$ 로 희석한 후 1 N HCl 수용액을 넣고 diethylether과 함께 추출한다. 수층은 다시 포화  $\text{NH}_4\text{OH}$  수용액을 넣은 뒤 ethyl acetate와 함께 추출한다 그 후 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축시켜 화합물 41d (1.44 g, 84.1%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.21 (d,  $J = 2.4\text{ Hz}$ , 1H), 7.02 (dd,  $J_1 = 2.0\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 8.4\text{ Hz}$ , 1H), 6.87 (d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , 1H), 4.54 - 4.45 (m, 1H), 2.87 (t,  $J = 7.0\text{ Hz}$ , 2H), 2.75 (t,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , 2H), 2.70 (q,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , 2H), 1.36 (d,  $J = 6.0\text{ Hz}$ , 6H), 1.14 (t,  $J = 6.0\text{ Hz}$ , 3H).

#### 2-Chloro-4-formylbenzoic acid (42)

250 mL 둥근 바닥 플라스크에 3-chloro-4-methylbenzoic acid (1.67 g, 9.4930 mmol), NBS (4.07 g, 22.4036 mmol), benzoyl peroxide (118.5mg, 0.48 mmol)를 넣고  $\text{CCl}_4$  (40 mL)에 용해시킨다. 반응 용액은 38시간 동안 환류 교반하고 TLC로 반응 종결을 확인한 후 상온으로 식혀준다. 반응 용액은 감압 여과와 다음 남은 필터 케이크를  $\text{CCl}_4$  (20 mL)로 닦아 준다. 정제 한 필터 케이크를 진공 감압한 뒤 생성된 고체 (1.92 g, 5.84 mmol)를 녹인 EtOH (10 mL)을 100 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣은 뒤 따뜻한  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL)에 녹아있는  $\text{AgNO}_3$  (1.99 g, 11.68 mmol) 수용액을 50~55  $^{\circ}\text{C}$ 에서 교반하며 천천히 적가하면 초록색 침전물이 생기게 된다. 50  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 교반 후 상온으로 식힌 뒤 celite filter를 통해 초록색 침전물을 제거하고, 여과액은 감압 여과 후 농축시킨다. 그 후  $\text{H}_2\text{O}$ 와 소금물로 ethyl acetate로 추출한 뒤 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 진공 감압하여 화합물 42를 합성하였다.

#### Benzyl 3-chloro-4-formylbenzoate (42a)

화합물 42 (86.7 mg, 0.47 mmol)을 녹인 DMF (10 mL) 용액에 질소 조건 하에서 60 wt% suspension of NaH in mineral oil (23.5 mg, 0.5872 mmol)를 넣고 40분간 상온에서 교반한다. 그 후 benzyl bromide (0.072 mL, 0.5872 mmol)를 천천히 적가하면 붉은색의 비균일한 상태가 되는데 그 상태로 4.5시간 동안 교반하게 되면은 붉은색의 균일한 반응 용액이 된다. TLC로 반응의 종결을 확인한 뒤 1 N HCl 수용액 (3 mL)을 넣고 ethyl acetate와 추출한 뒤 유기층은 다시 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액 (15 mL)과 소금물로 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (Hex : EtOAc = 10 : 1)를 이용하여 화합물 42a (123.8 mg, 95.5%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10.52 (s, 1H), 8.14 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 8.05 (dd,  $J_1 = 2.4$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz, 1H), 7.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.47 - 7.35 (m, 5H), 5.39 (s, 2H).

#### 4-((Benzyloxy)carbonyl)-2-chlorobenzoic acid (42c)

80%  $\text{NaClO}_4$  (198.1 mg, 1.75 mmol)이 녹아있는 수용액 ( $\text{H}_2\text{O}$  0.9 mL)에 화합물 42a (462.8 mg, 1.68 mmol), sulfamic acid (168.6 mg, 1.70 mmol)이 녹아 있는 water (1.8 mL), ACN (1.3 mL)에 녹아있는 혼합용액을 적가한다. 상온에서 1시간 교반 후, 반응 용액에 포화  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (2.2 mL)과 1 N HCl (4.4 mL)을 넣고 ethyl acetate (5 mL씩 3회)와 추출한다. 유기층은 소금물로 한번 더 닦아준 뒤 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (Hex : EtOAc = 1 : 1)를 이용하여 화합물 42c (463.1 mg, 94.6%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  (ppm) 8.17 (s, 1H), 8.06 - 8.31 (m, 2H), 7.46 - 7.36 (m, 5H), 5.39 (s, 2H).

#### Methyl 1-(4-((benzyloxy)carbonyl)-2-chlorobenzoyl)piperidine-4-carboxylate (42d)

화합물 42c (446.1 mg, 1.53 mmol)를 녹인 DMF (5 mL)용액에 질소 조건하에 DIPEA (1.07 mL, 6.14 mmol)와 HATU (648.3 mg, 1.69 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 15분간 교반한다. 그 후 화합물 40 (294.8 mg, 1.69 mmol)를 천천히 적가 후 상온에서 17시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (Hex : EtOAc = 5 : 1)를 이용하여 화합물 42d (421.8 mg, 53.4%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.10 (dd,  $J_1 = 1.4$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz, 1H), 8.02 - 7.99 (m, 1H), 7.46 - 7.31 (m, 6H), 5.38 (s, 2H), 4.60 - 4.50 (m, 1H), 3.70 (d,  $J = 1.6$  Hz, 3H), 3.42 - 3.33 (m, 1H), 3.15 - 2.96 (m, 1H), 2.07 - 2.03 (m, 1H), 1.87 - 1.54 (m, 3H).

#### 3-Chloro-4-(4-(methoxycarbonyl)piperidine-1-carbonyl)benzoic acid (42e)

화합물 42d (322.8 mg, 0.78 mmol)을 녹인 MeOH (3 mL) 용액에 5% Pd/C (32.3 mg) 넣은 뒤  $\text{H}_2$  gas 풍선을 3-way 아답터에 끼운 뒤, 상온에서 30분간 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후, celite filter를 이용하여 감압 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (DCM : MeOH = 10 : 1)를 이용하여 화합물 42e (252.7 mg, 100.0%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  (ppm) 8.08 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 8.03 - 8.00 (m, 1H), 7.41 (dd,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 25.8$  Hz, 1H), 4.52 - 4.48 (m, 1H), 3.68 (d,  $J = 1.6$  Hz, 3H), 3.40 - 3.36 (m, 1H), 3.23 - 3.07 (m, 2H), 2.73 - 2.65 (m, 1H), 2.06 - 1.85 (m, 2H), 1.79 - 1.53 (m, 2H).



Methyl-(2-chloro-4-((3-chloro-4-isopropoxyphenethyl)(ethyl)carbamoyl)benzoyl)piperidine-4-carboxylate (34)

화합물 42e (218.5 mg, 0.67 mmol)를 녹인 DMF (5 mL)용액에 질소 조건하에 DIPEA (0.47 mL, 2.68 mmol)와 HATU (283.4 mg, 0.74 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 10분간 교반한다. 그 후 화합물 41d (178.4 mg, 0.74 mmol)를 천천히 적가 후 상온에서 2시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (DCM : MeOH = 20 : 1)를 이용하여 화합물 34 (201.9 mg, 54.8%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.37 - 6.79 (m, 6H), 4.60 - 4.49 (m, 2H), 3.71 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 3h), 3.67 - 3.63 (m, 2H), 3.51 - 3.41 (m, 2H), 3.11 - 2.88 (m, 4H), 2.71 - 2.57 (m, 2H), 2.07 - 2.04 (m, 1H), 1.83 - 1.52 (m, 3H), 1.37 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 6H), 1.28 - 1.26 (m, 1.3H), 1.03 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 1.7H).

1-(2-Chloro-4-((3-chloro-4-isopropoxyphenethyl)(ethyl)carbamoyl)benzoyl)piperidine-4-carboxylic acid (35)

화합물 34 (134.6 mg, 0.25 mmol)이 녹여져 있는 MeOH (10 mL)용액에 NaOH 가루 (19.6 mg, 0.48 mmol)를 넣어준 뒤, 상온에서 5시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 Amberlite IR120 resin을 반응 용액이 중화 될 때까지 천천히 적가, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 10 : 1)를 이용하여 화합물 35 (130.9 mg, 100.0%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  (ppm) 7.47 - 6.82 (m, 6H), 4.60 - 4.57 (m, 1H), 4.51 - 4.46 (m, 1H), 3.70 - 3.62 (m, 2H), 3.48 (bs, 1H), 3.44 - 3.35 (m, 1H), 3.23 - 3.07 (m, 3H), 2.92 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 2.73 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 2.67 - 2.58 (m, 1H), 2.05 (d,  $J$  = 10.8 Hz, 1H), 1.88 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 1H), 1.79 - 1.54 (m, 2H), 1.32 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 6H), 1.17 (dt,  $J_1$  = 6.9 Hz,  $J_2$  = 93.7 Hz, 3H).

3-Chloro-N-(3-chloro-4-isopropoxyphenethyl)-N-ethyl-4-formylbenzamide (32a)

화합물 42 (996.7 mg, 5.34 mmol)를 녹인 DMF (15 mL)용액에 질소 조건하에 DIPEA (3.74 mL, 21.37 mmol)와 HATU (2.26 g, 5.88 mmol)를 순서대로 넣고 상온에서 15분간 교반한다. 그 후 화합물 41d (1.42 g, 5.88 mmol)를 천천히 적가 후 상온에서 2시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결 확인 후 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 희석하고 DCM을 이용하여 추출, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 그로마토그래피 (Hex : EtOAc = 4 : 1 에서 2 : 1)를 이용하여 화합물 32a (1.66 g, 76.0%)를 합성하였다.

Methyl-(2-chloro-4-((3-chloro-4-isopropoxyphenethyl)(ethyl)carbamoyl)benzyl)piperidine-4-carboxylate (32)

화합물 32a (1.13 g, 2.76 mmol)을 녹인 MeOH (20 mL) 용액에 acetic acid (0.16 mL, 2.76 mmol)을 적가한 후 상온에서 10분간 교반한다. 화합물 40 (595.8 mg, 3.32 mmol)을 녹인 MeOH (7 mL) 용액에 TEA (0.47 mL, 3.32 mmol)를 넣고 앞서 만들었던 반응 용액에 질소 조건하에서 천천히 적가 상온에서 25분간 교반한다. 그 후 NaCNBH<sub>3</sub> (219.4 mg, 3.32 mmol)을 0 °C에서 천천히 적가 후 상온에서 3시간 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 H<sub>2</sub>O로 잔여 NaCNBH<sub>3</sub>의 활성을 제거 후 H<sub>2</sub>O와 DCM을 이용하여 추출, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 2 : 1 에서 1 : 1)를 이용하여 화합물 32 (461.5 mg, 31.2%)를 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.51 - 6.77 (m, 6H), 4.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.63 (bs, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.41 (bs, 1H), 3.14 (bs, 1H), 2.88 - 2.86 (m, 3H), 2.69 (bs, 1H), 2.37 - 2.29 (m, 1H), 2.22 (dt, *J*<sub>1</sub> = 11.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz, 2H), 1.92 - 1.74 (m, 4H), 1.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H), 1.15 (d, *J* = 86.8 Hz, 3H).

1-(2-Chloro-4-((3-chloro-4-isopropoxyphenethyl)(ethyl)carbamoyl)benzyl)piperidine-4-carboxylic acid (33)

화합물 32 (315.9 mg, 0.59 mmol)이 녹여져 있는 MeOH (10 mL)용액에 NaOH 가루 (47.2 mg, 1.1798 mmol)를 넣어준 뒤, 상온에서 하루 동안 교반한다. TLC로 반응의 종결을 확인 후 Amberlite IR120 resin을 반응 용액이 중화 될 때까지 천천히 적가, 감압 여과 후 농축 시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (DCM : MeOH = 10 : 1) 를 이용하여 화합물 33 (240.2 mg, 78.1%)을 합성하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD<sub>4</sub>) δ (ppm) 7.60 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 40.8 Hz, 1H), 7.38 - 6.74 (m, 5H), 4.63 - 4.54 (m, 1H), 3.93(d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.70 - 3.60 (m, 2H), 3.48 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.20 - 3.09 (m, 3H), 2.91 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.72 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 2.53 (bs, 2H), 2.38 - 2.31 (m, 1H), 2.03 - 1.77 (m, 4H), 1.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H), 1.28 (t, *J* = 6.4 Hz, 1.8H), 1.04 (t, *J* = 6.4 Hz, 1.2H).

### 3. KKPS0008 화합물 유도체 합성방법

#### 7-Methylbenzo[d]isoxazol-3-amine (1)

*N*-hydroxyacetamide (17 g, 216.00 mmol) 를 DMF (250 mL), H<sub>2</sub>O(25mL)에 녹인 현탁액에 tBuOK (26 g, 216.00 mmol)를 0°C에서 천천히 적가 후, 1시간 동안 상온에서 교반한다. 2-fluoro-3-methylbenzonitrile (9.1 mL, 72.00 mmol)를 반응 용액에 적가하고 4 시간 동안 환류 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc = 3 : 1)를 이용하여 흰색 고체 화합물 1 (9.72 g, 91 %)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 - 7.23 (m, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.40 (s, 18H).

*tert*-Butyl (7-methylbenzo[d]isoxazol-3-yl)dicarbamate (2)

화합물 1 (9.72 g, 65.60 mmol)를 DCM (200 mL)에 녹인 용액에  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (34.0 mL, 144.32 mmol)과 TEA (46.0 mL, 328.00 mmol), DMAP (810 mg, 6.56 mmol)을 적가 후, overnight 상온 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc : MC = 15 : 1 : 1)를 이용하여 하얀색 고체 화합물 2 (19.8 g, 86 %)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 - 7.23 (m, 3H), 4.38 (br, 2H) 2.59 (s, 3H).

*tert*-Butyl (7-(bromomethyl)benzo[d]isoxazol-3-yl)dicarbamate (3)

화합물 2 (19.8 g, 57.00 mmol)를 anhydrous Benzene (200 mL)에 녹인 용액에 NBS (13.3 g, 74.00 mmol), AIBN (955 mg, 5.7 mmol)을 적가 후, 4 시간 동안 환류 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (Hex : EtOAc : MC = 5 : 1 : 1)를 이용하여 하얀색 고체 화합물 21 (20.00 g, 82%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.61 - 7.33 (m, 3H), 4.80 (s, 2H), 1.42 (s, 18H).

Methyl 1-((3-aminobenzo[d]isoxazol-7-yl)methyl)piperidine-4-carboxylate (4)

화합물 3 (10.0 g, 23.40 mmol)를 acetonitrile (200 mL) 녹인 용액에 methyl piperidine-4-carboxylate (6.57 mL, 46.80 mmol), DIPEA (5.35 mL, 30.42 mmol)을 천천히 적가 후, 상온에서 하루 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 DCM (150 mL)와 TFA (50 mL)에 녹이고 상온에서 overnight 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, 포화  $\text{NaHCO}_3$ 수용액으로 중성화를 하고 DCM로 희석시킨 다음, 증류수로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 컬럼 크로마토그래피 (MC : MeOH = 20 : 1)를 이용하여 노란색 고체 화합물 4 (3.14 g, 46%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.53 (d,  $J$  = 7.2, 1H), 7.44 - 7.41 (m, 1H), 7.23 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 4.38 (br, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.94 - 2.89 (m, 2H), 2.32 - 2.24 (m, 1H), 2.17 - 2.10 (m, 2H), 1.91 - 1.86 (m, 2H), 1.83 - 1.72 (m, 2H).

3-cyano-4-isopropoxybenzoyl chloride (5)

3-cyano-4-isopropoxybenzoic acid (3.4 g, 16.40 mmol)를 anhydrous DCM (200 mL)에 녹인 현탁액에  $(\text{COCl})_2$  (3 mL, 33 mmol)을 0°C에서 천천히 적가 후, 상온에서 2 시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, 용매와  $(\text{COCl})_2$ 를 증발시킨다. 베이지색 고체 화합물 5 (4.0 g, 108%)를 얻었고 다른 정제 과정 없이 바로 다음 반응에 사용한다.

Methyl 1-((3-(3-cyano-4-isopropoxybenzamido)benzo[d]isoxazol-7-yl)methyl)piperidine-4-carboxylate (6)

화합물 4 (1.86 g, 6.44 mmol)를 anhydrous DCM (200 mL)에 녹인 용액에 화합물 5 (1.73 g, 7.73 mmol), Pyridine (0.81 mL, 10.0 mmol)을 적가 후, 상온에서 2 시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (MC : MeOH = 25 : 1)를 이용하여 노란색 고체 화합물 6 (627 mg, 20%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.80 (br, 1H), 8.34 (br, 1H), 8.22 (br, 1H), 8.05 (d,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 7.60 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.33 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 4.83 - 4.76 (m, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.94 - 2.91 (m, 2H), 2.33 - 2.26 (m, 1H), 2.18 - 2.12 (m, 2H), 1.92 - 1.88 (m, 2H), 1.80 - 1.73 (m, 2H), 1.47 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H).

4-isopropoxy-3-(trifluoromethyl)benzoyl chloride

4-isopropoxy-3-(trifluoromethyl)benzoic acid (1.11 g, 4.48 mmol)를 anhydrous DCM (100mL)에 녹인 현탁액에  $(\text{COCl})_2$ (0.77mL, 8.96mmol)을 0℃에서 천천히 적가 후, 상온에서 2 시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, 용매와  $(\text{COCl})_2$ 를 증발시킨다. 보라색 액체 화합물 5 (1.19 g, 100%)를 얻었고 다른 정제 과정 없이 바로 다음 반응에 사용한다

Methyl 1-((3-(4-isopropoxy-3-(trifluoromethyl)benzamido)benzo[d]isoxazol-7-yl)methyl)piperidine-4-carboxylate (8)

화합물 4 (1.08 g, 3.73 mmol)를 anhydrous Pyridine (50 mL)에 녹인 용액에 화합물 7 (1.19 g, 4.48 mmol)을 적가 후, 상온에서 overnight 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 (MC : MeOH = 25 : 1)를 이용하여 노란색 고체 화합물 8 (1.26 g, 65%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.27 (s, 1H), 8.28 - 8.27 (m, 1H), 8.20 - 8.16 (m, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 8.0Hz, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 7.2Hz, 1H), 7.32 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 8.8Hz, 1H), 4.81 - 4.75 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.94 - 2.90 (m, 2H), 2.34 - 2.25 (m, 1H), 2.27 - 2.11 (m, 2H), 1.91 - 1.88 (m, 2H), 1.84 - 1.73 (m, 2H), 1.44 (d,  $J$  = 6.0Hz, 1H).

1-((3-(4-isopropoxy-3-(trifluoromethyl)benzamido)benzo[d]isoxazol-7-yl)methyl)piperidine-4-carboxylic acid (9)

화합물 26 (760 mg, 1.46 mmol)를 THF (6 mL),  $\text{H}_2\text{O}$ (6mL)에 녹인 용액에  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (123mg, 2.92mmol)적가 후, 6 시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, 1N HCl 수용액으로 PH 2까지 산성화한다. EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을

무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 ( only ethanol )를 이용하여 하얀색 고체 화합물 9 (73 mg, 10%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.33 – 8.25 (m, 2H), 8.08 – 8.05 (m, 1H), 7.72 – 7.69 (m, 1H), 7.45 – 7.34 (m, 2H), 4.81 – 4.75 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.30 – 3.20 (m, 2H), 2.77 – 2.70 (m, 2H), 2.41 – 2.32 (m, 1H), 2.05 – 1.39 (m, 4H), 1.41 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 6H).

1-((3-(3-Cyano-4-isopropoxybenzamido)benzo[d]isoxazol-7-yl)methyl)piperidine-4-carboxylic acid (10)

화합물 6 (953 mg, 2.00 mmol)를 THF (6 mL),  $\text{H}_2\text{O}$ (6mL)에 녹인 용액에  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (168mg,4.00mmol)적가 후, 6 시간 동안 교반한다. TLC로 반응 종결을 확인한 후, 1N HCl 수용액으로 PH 2까지 산성화한다. EtOAc로 희석시킨 다음, 소금물로 추출한다. 유기층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조, 여과 후 농축시킨다. 농축시킨 여액을 컬럼 크로마토그래피 ( only ethanol )를 이용하여 하얀색 고체 화합물 10 (23 mg, 2.5%)를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  8.36 – 8.27 (m, 2H) 8.08 (d,  $J$  = 10.8Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H), 7.46 – 7.34 (m, 2H), 4.83 – 4.76 (m, 1H), 4.30 (s, 2H), 3.30 – 3.10 (m, 2H), 2.80 – 2.60 (m, 2H), 2.39 – 2.38 (m, 1H), 2.04 – 1.97 (m, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 2H), 1.45 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 6H).

## 주 의

1. 이 보고서는 한국과학기술연구원에서 시행한 기관고유사업 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국과학기술연구원의 기관고유사업 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.