

5-(2'-(N-(1-메틸-3-(3'-카바밀페닐)-n-프로필)아미노에틸)-8-히드록시-4-메틸카보스티릴 유도체의 합성 및 안정성 연구

윤성화[†] · 박규순*

아주대학교 공업화학과, *국민대학교 화학과

(Received August 9, 1995)

Synthesis and *in Vitro* Stability Evaluations of 5-(2'-(N-(1-methyl-3'-carbamyphenyl)-n-propyl)aminoethyl)-8-hydroxy-4-methylcarbostyryl Derivatives

Sung-Hwa Yoon[†] and Gyoosoon Park*

Department of Applied Chemistry, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

*Department of Chemistry, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract— The 5-(2'-(N-(1-methyl-3'-carbamyphenyl)-n-propyl)aminoethyl)-8-hydroxy-4-methylcarbostyryl derivatives which have isoelectronic and isosteric structural similarity with dobutamine without having the Catechol-O-Methyltransferase (COMT) vulnerable m-hydroxy group were synthesized via 7 synthetic steps, and their stabilities in phosphate buffer solution (pH=7.4), human blood, 80% human plasma and 20% rat liver homogenate were determined *in vitro* condition.

Keywords □ Dobutamine, cardiotonics, carbostyryl, reductive amination, isostere.

울혈성 심장병 치료제로 사용되고 있는 dobutamine (1)¹⁾은 뛰어난 치료효과에도 불구하고 짧은 약효와 정맥주사를 이용해야하는 불편함을 가지고 있어 이의 개선을 위한 다양한 분자변형법이 시도되었는데, 최근 Tuttle 등은 dobutamine의 구조중 질소가지에 붙은 페닐고리의 히드록시기를 carbamyl 기로 변형하여 합성한 KM-13 화합물 (2) 이 기존의 dobutamine 보다 훨씬 강력한 심장수축력과 다소의 경구투여 효과를 보여준다고 발표하였으나 이 화합물 역시 장기간의 약효를 얻지 못하였다.²⁾ 이러한 dobutamine의 짧은 약효는 신진대사과정에서 인체내의 Catechol-O-Methyltransferase(COMT) 효소에 의해 dobutamine 분자구조 중 catechol 고리내의 meta 위치에

있는 히드록시기가 쉽게 메틸화되어 비활성의 glucuronide 짝염을 이루는데 있다.³⁾

이러한 효소에 의한 비활성화를 줄이기 위하여 저자는 catechol 고리계와 구조적으로 isostere 의 관계에 있는 1-hydroxy-2-pyridone system 이 도입된 KM-13 isostere를 합성하여 보다 긴 약효시간을 가지는 새로운 심장약의 구조로 이용하고자 하였다.⁴⁾ 본 연구에서는 전보에서의 연구와 같이 carbostyryl 구조가 catechol 구조와 isosteres의 관계가 있다는 발표와⁵⁾ 이들 구조가 catechol과 분자구조적으로 유사함을 보이면서도 COMT 효소에 민감한 meta 위치의 히드록시기가 없어 신진대사 과정중의 비활성화를 방지할 수 있을 것이라는 가설하에, KM-13 구조의 catechol 구조 대신 carbostyryl 구조가 도입된 화합물 3, 4를 새로운 심장약의 구조로 도안하고, 이들을 합성하였으며, 이들 화합물의 화학적 및 생물학적 매체 내에서의 안정성을

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0331-219-2515 (팩스) 0331-214-8918

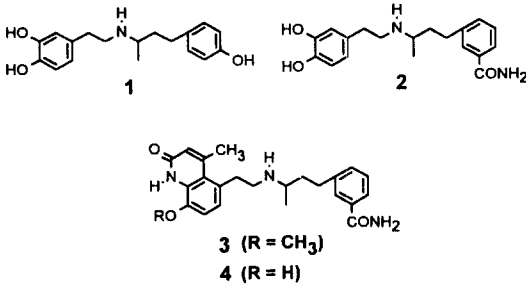


Fig. 1

in vitro 조건에서 측정하였다.

실험방법

시약은 Aldrich Chemical Co.의 제품을 사용하였고, 용매는 일급시약을 사용하였다. 융점은 Fischer-Johns melting point apparatus로 측정하였으며, 이에 대한 보정은 하지 않았다. IR 스펙트럼은 Perkin-Elmer 281 스펙트로포토메타로 측정하였고, ¹H NMR 스펙트럼은 TMS 를 내부표준물질로 하여 Varian EM 390 스펙트로포토메타로 기록하였다. 원소분석은 미국에 있는 Atlantic Microlab, Inc.로 부터 얻었다. 칼럼크로마토그래피는 silica gel(Kieselgel 60, 230~400 mesh, Merck)를 사용하였다. 액체크로마토그래피는 Autochrome M 500 pump, Rheodyne 7125 injector with 20 µl loop와 Spectroflow 757 자외선-가시광선 검출기를 이용하였다.

N-(2-(3'-amino-4'-methoxyphenyl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (8) 의 합성 - 화합물은 발표된 방법을 이용하여 합성하였다.⁶⁾

mp: 87-88°C (lit.⁶⁾ 87~88°C)

¹H-NMR(CDCl₃): 2.70(2H, t, CH₂), 3.47(2H, m, CH₂NH), 3.83(5H, s, OCH₃ & NH₂), 6.50~6.85(3H, m, ArH), 7.10(1H, br., NH).

N-(2-(3'-(N-acetoacetyl)amino-4'-methoxyphenyl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (9) 의 합성 - 화합물 8 (5.82 g, 0.0222 mol) 을 20 ml 무수 THF에 녹인 용액에, diketene (2.05 ml, 1.2 eq.)를 질소 기류 하에서 주사기를 이용하여 천천히 적가한다. 혼합물을 3시간 반 환류 한 후, 감압하여 농축시킨다음 얻어진 침전물을 칼럼크로마토그래피(건개용매: ethyl acetate-hexane(1:1)) 하여 화합물 9 를 얻었다

수득율 : 6.12 g, (79.6 % yield).

mp: 104~105°C

IR(nujol): 3290(amide), 1720(C=O), 1675(C=O) cm⁻¹.

¹H-NMR(CDCl₃): 2.32(3H, s, COCH₃), 2.75(2H, t, CH₂), 3.60(2H, s, COCH₂CO), 3.50~3.70(2H, m, CH₂NH), 3.90(3H, s, OCH₃), 6.90(2H, s, ArH), 8.23(1H, s, ArH), 9.27(1H, br., NH).

5-(2'-Trifluoroacetamido)ethyl-8-methoxy-4-methylcarbostyryl (10) 의 합성 - 화합물 9 (720 mg, 2.08 mmol) 를 25 ml 진한 황산에 녹인 용액을 약 90°C 온도에서 12시간 교반하였다. 용액을 얼음 용액에 조심하여 붓고, 얻어진 침전물을 물로 씻은 후, 건조하여 화합물 10을 회색의 고체로 얻었다.

수득율: 292 mg(45 % yield).

mp: 224~227°C

IR(nujol): 3245(br., CONH₂), 1715(C=O), 1645(C=O).

¹H-NMR(TFA): 2.90(3H, t, CH₃), 3.25~3.80(4H, m, CH₂CH₂), 3.95(3H, s, OCH₃), 7.17(1H, s, =CH), 7.15~7.45(2H, m, ArH), 7.70(1H, br., NH).

MS(70 eV): 328(M⁺).

5-(2'-Aminoethyl)-8-methoxy-4-methylcarbostyryl (11) 의 합성 - 화합물 10 (10.50 g, 0.0320 mol) 을 31.6 ml 의 에탄올과 72 ml의 증류수, 36 ml 의 진한 염산에 녹인 후, 이를 10시간 환류하였다. 침전물을 걸르고, 용액을 감압하여 얻어진 침전물을 함께 모은 후, 이를 methanolic HCl-ether 용액에서 염산 염으로 재침전 하였다.(수득율: 8.20 g, 95.4 %).

화합물 11의 free base 는 다음과 같이 얻었다: 염산 염인 화합물 11 (3.00 g, 0.0112 mol) 을 소량의 증류수에 녹인 후, 묽은 암모니아 수로 용액을 염기화한 다음 200 ml 의 methylene chloride 로 추출하였다. 추출액을 건조한 후, 여과하고 감압하여 free base인 화합물 11 (2.34 g, 90.2% yield)을 흰색의 고체로 얻었다.

mp(HCl salt): 235~245°C(dec.)

mp(free base): 159~160°C

¹H-NMR(DMSO-d₆: HCl salt): 2.70(3H,t,CH₃), 2.90~3.15(2H, br., CH₂), 3.20~3.55(2H, m, CH₂), 3.92(3H, s, OCH₃), 6.53(1H, s, =CH), 7.03-7.27

(2H, m, ArH), 8.40(3H, br., NH_3^+). MS(70 eV, free base): 232(M^+).

5-(2'-(N-(1-methyl-3-(3'-carbamyphenyl)-n-propyl)aminoethyl)-8-methoxy-4-methylcarbostyryl (3)의 합성
- 화합물 **11** (1.34 g, 0.0050 mol) 과 3-(3'-oxobutyl) benzamide (0.95 g, 0.0050 mol) 를 35 ml 의 메탄올 과 25 ml 의 에탄올에 녹인 현탁액에 250 mg 의 sodium cyanoborohydride 를 상온에서 넣는다. 반응 용액을 24시간 교반 한 후, 감압하여 얻어진 흰 침전물을 칼럼크로마토그래피(전개용매: methanol-chloroform(3 : 1)) 하여 화합물 **3** (460 mg, 22.0% yield) 을 얻었다. 화합물 **3**의 초산염은 acetic acid-methanol 용액으로 부터 얻었다.

mp(AcOH salt): 141-145°C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 ; AcOH salt): 1.35(3H, d, CH_3), 1.60~2.20(3H, br., CHCH_2), 2.00(3H, s, CH_3COOH), 2.80(5H, s, CH_3 & CH_2), 3.10~3.35(2H, br., CH_2), 3.50~3.75(2H, br., CH_2), 3.98(3H, s, OCH_3), 6.63(1H, s, =CH), 7.20(2H, m, ArH), 7.57(2H, m, ArH), 7.95(2H, m, ArH)
Anal. Cald for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$: C, 66.97; H, 7.11; N, 8.98. Found: C, 66.53; H, 7.18; N, 8.90.

5-(2'-(N-(1-methyl-3-(3'-carbamyphenyl)-n-propyl)aminoethyl)-8-hydroxy-4-methylcarbostyryl (4)의 합성
- 화합물 **3** (570 mg, 0.00140 mol) 을 50 ml 무수 methylene chloride에 녹인 다음, 이 용액에 30 ml 의 1.0 M BBr_3 용액을 저온에서 질소기류하에서 천천히 적 가하였다. 반응물을 메탄올로 끝낸 후, 감압하여 얻어진 노란색의 침전물을 칼럼크로마토그래피(전개용매: methanol-chloroform(3 : 1)) 하여 화합물 **4** (263 mg, 48.1% yield) 를 연한 노란색의 고체로 얻었다.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 1.50(3H, d, CH_3), 1.80~2.20(3H, br., CHCH_2), 2.80(5H, s, CH_3 & CH_2), 2.75~2.85(2H, br., CH_2), 3.10~3.70(4H, br., $2 \times \text{CH}_2\text{Ar}$), 6.67(1H, s, =CH), 7.20(2H, m, ArH), 7.55(2H, m, ArH), 7.97(2H, m, ArH)

HPLC 분석법 연구 - 안정성 연구에 필요한 적절한 HPLC 분석 조건을 다음의 조건에서 얻었다. 즉, Bio-Sil-ODS 5 (10 μm) silica packing column 을 고정 상으로 이용하고, acetonitrile-water-acetic acid-hexanesulfonic acid sodium salt (40 : 50 : 1 : 0.1) 를 이동상으로 하여, 1.5 ml/min 의 flow rate에서 화

합물 **3**과 **4**의 retention time을 3.8분 과 2.4분에서 각각 얻었다. 이 경우, biological media 피크는 1.6분에 나타났다.

화합물 3, 4의 pH=7.4 phosphate 완충용액에서의 안정성 연구 - 37°C 에서 완충용액(pH=7.4, 4.9 ml) 에 5.3×10^{-2} 몰 농도의 화합물을 50 μl 첨가한다. 적당한 시간마다, 100 μl 의 시료를 채취하고 이를 저온의 40% acetonitrile-water 900 μl 에 녹인다. 채취된 시료는 액체크로마토그래피로 분석 때까지 0°C로 보관하였다.

화합물 3, 4의 혈액에서의 안정성 연구 - 메탄올에 녹인 0.061 M 농도의 화합물 30 μl 를 37°C의 헤파린으로 처리된 혈액 3.0 ml에 첨가하여 초기농도가 6.1×10^{-4} M 인 용액으로 만들어 잘 섞는다. 적당한 시간에 100 μl 의 시료를 취한다음 즉시 900 μl 의 차거운 acetonitrile에 부은 후 잘 흔든다음, 냉장고에 보관한다. 이 때 최종 농도는 6.1×10^{-5} M 이 된다. 모든 시료를 모은 후, 이를 13,000 rpm 에서 5분간 원심분리한 후 액체크로마토그래피로 분석 때까지 0°C로 보관하였다.

화합물 3, 4의 80% 혈장에서의 안정성 연구 - 37°C 에서 메탄올에 녹인 0.061 M 농도의 화합물 30 μl 를 항응고제인 citrate phosphate-dextrose 용액으로 끓힌 80% 혈장 3.0 ml에 첨가하여 초기농도가 6.1×10^{-4} M 인 용액으로 만들어 잘 섞는다. 적당한 시간에 100 μl 의 시료를 취한다음 즉시 900 μl 의 차거운 acetonitrile 에 부은 후 잘 흔든다음, 냉장고에 보관한다. 이 때 최종 농도는 6.1×10^{-5} M이 된다. 모든 시료를 모은 후, 이를 13,000 rpm 에서 5분간 원심분리한 후 액체크로마토그래피로 분석 때까지 0°C로 보관하였다.

화합물 3, 4의 20% rat liver homogenate에서의 안정성 연구 - 쥐의 liver homogenate는 다음과 같이 만들었다: 한 마리의 Sprague-Dawley 쥐를 죽인 후, 간을 제거하여 무게를 잰 후 이를 0.05 M 인산완충용액(pH=7.4) 에서 쥐의 간 세포를 균질화하여 20% liver homogenate를 만들었다. 메탄올에 녹인 5.3×10^{-3} M 농도의 화합물 30 μl 를 37°C의 liver homogenate 에 넣어 잘 흔든다. 이 때의 초기 농도는 5.3×10^{-5} M 이었다. 적당한 시간에 100 μl 의 시료를 취한다음 즉시 400 μl 의 차거운 acetonitrile 에 부은 후 잘 흔든다음, 냉장고에 보관한다. 이 때 최종 농도는 1.0×10^{-5} M이 된다. 모든 시료를 모은 후, 이를 13,000 rpm 에서 5분간 원심분리한 후 액체크로마토그래피로 분석 때까지

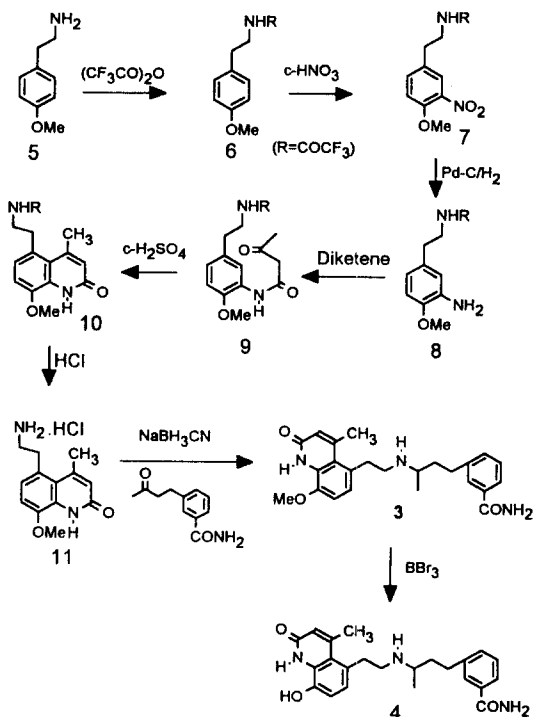
0°C로 보관하였다.

결과 및 고찰

화합물 합성 - 목표물질인 화합물 3, 4는 Scheme I에서와 같이 aminocarbostyryl 11과 상응하는 케토화합물과의 reductive amination 반응으로 얻을 수가 있으므로, 먼저 화합물 11을 합성하고자 하였다. 화합물 11의 합성에 중요한 중간체인 3-아미노-4-메톡시페네틸아민 8은 발표된 방법⁶⁾ 이용하여 합성하였다. 즉, 출발물질인 p-methoxyphenethylamine을 먼저 trifluoroacetyl 기로 보호한 후, 이를 nitration 시키고, 수소화 반응을 시켜 화합물 8을 출발물질로부터 67%의 수득

율로 얻었다. 화합물 8을 THF 환류 조건에서 diketene과 반응시켜 anilide 화합물 9를 얻은 다음, 이를 산 조건 하에서 고리화 반응을 시켜 carbostyryl ring 화합물 10을 얻고자 하였다. 진한 황산, 진한 염산 그리고 진한 인산을 사용하여 고리화 반응을 시도하였으며, 이들 조건 중 진한 황산 조건에서 12시간 가열한 반응 조건에서 45%의 가장 좋은 수득율을 얻었다. 마지막으로 화합물 10의 trifluoroacetyl 기를 메탄올-염산 조건에서 비보호시켜 화합물 11을 95%의 수득율로 얻은 다음, 이를 3-(3'-oxobutyl)benzamide 와 sodium cyanoborohydride 존재하에서 reductive amination을 이용한 coupling 반응을 시켜 목표물질인 화합물 3을 22%의 수득율로 얻었다. 화합물 4는 화합물 3을 demethylation 시켜 얻었으며, 이의 생성은 ¹H-NMR 에서 methoxy peak의 사라짐으로 부터 확인하였다.

안정성 연구 - 합성된 carbostyryl 유도체 3, 4의 화학적 및 생물학적 매체내에서의 안정성을 *in vitro* 조건에서 pH=7.40인 0.05몰 인산완충용액, 혈액, 80% 혈장 그리고 쥐의 20% liver homogenate에서 액체크로마토그래피 분석법으로 측정하였다. Table I에서 보는 바와 같이 화합물 3 및 4는 pH=7.40 완충용액에서 매우 안정하여 21일 동안 전혀 분해되지 않았다. 혈액내에서도 두 화합물 모두 상당한 안정성을 보였으나 이들 중 6.6시간의 실험시간 동안 화합물 3이 다소의 분해를 보인데 반하여, 화합물 4는 전혀 변화를 보이지 않았다. 이러한 경향은 80% 혈장 내에서도 나타난바, 화합물 3이 화합물 4보다 다소 빠르게 분해되었다. 이러한 결과는 carbostyryl 화합물의 경우, 그 구조에서 화학적으로 쉽게 분해되는 에스테르 결합이나 catechol기가 없기 때문에 효소의 반응에 대하여 매우 안정성을 보여주는 것으로서 약효의 지속 가능성을 보여주는 것이었다. Carbostyryl 화합물이 간 효소, 특히 COMT 효소에 대하여 안정한지를 보기 위하여 쥐의 20% liver homogenate에서 안정



Scheme I

Table I— *In Vitro* Half Lives(hr) of Compounds(3, 4) in pH 7.40 Phosphate Buffer, in 100% Human Blood, in 80% Human Plasma and in 20% Rat Liver Homogenate

Compd.	pH 7.40	100% Human blood ^a	80% Human Plasma ^b	20% Liver Homogenate ^c
3	d	189 (0.999)	94.4(0.995)	f
4	d	g	345 ^d (0.957)	f

a: Whole human blood. b: Plasma from one individual. c: Liver from one rat. d: No decomposition observed over 21 day period. e: Experiment followed for < one half-life. f: No decomposition observed over 80 min. g: No decomposition observed over 6.6 Hours.

성을 실험하였다. 앞에서의 결과에 마찬가지로 두 화합물 모두 liver homogenate가 성질을 잃어버리는 80분간의 실험측정 기간동안 분해하지 않았다. 이러한 결과는 catechol 고리구조가 간 효소의 좋은 기질인데 반하여, carbostyryl 고리구조는 간 효소, 특히 COMT 효소에 반응성이 작음을 보여주고 있다.

Catechol 고리와 isoelectronic and isosteric 구조 관계를 가지는 carbostyryl system을 도입한 dobutamine 유도체를 anilide 화합물 **9**의 고리화 반응으로부터 얻어진 aminocarbostyryl 화합물 **11**과 상응하는 케토화합물과의 coupling 반응으로 합성하였다. 합성된 carbostyryl 유도체 **3**, **4**는 *in vitro* 조건에서 pH = 7.40 인산완충용액과 혈액, 80% 혈장, 그리고 쥐의 liver homogenate에서 매우 안정하였다. 이들의 약리 효과는 현재 연구 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 한국학술진흥재단 연구비에 의하여 이룩되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Weiner, N.: The Pharmacological Basis of Therapeutics Gilman, A. G., Goodman, L. S. and Gilman, A. Eds., Macmillan Publishing Co., New York, 156 (1980).
- 2) Caldwell, R. W., Nash, C. B., Smulkowski, M. and Tuttle, R. R.: Cardiovascular effects of KM-13, a new, orally effective, cardiotoxic sympathomimetics amine. *J. Cardiovascu. Pharmacol.* **9**, 375 (1987).
- 3) Murphy, P. J., Williams, T. L. and Kau, D. L.: Disposition of dobutamine in dog. *J. Pharmacol. Exp. & Ther.* **199**, 423 (1970).
- 4) Yoon, S-H.: Synthesis of 4-(2'-(N-(1-methyl-3'-carbonylphenyl)-n-propyl)aminoethyl)-1-hydroxy-2-pyridone. *Yakhak Hoeji* **37**, 36 (1993).
- 5) Kaiser, C., Dandridge, P. A., Garney, E., Flaim, K. E., Zeid, R. L. and Hieble, J. P.: Dopamine receptor agonist of some 5-(2-aminoethyl)carbostyryl. *J. Med. Chem.* **28**, 1803 (1985).
- 6) DeMarinus, R. M., Gallagher Jr., G., Hall, R. F., Franz, R. G., Webster, C., Huffman, R. F., Schwartz, M. S., Kaiser, C. and Ross, S. T.: Syntheses and *in vitro* evaluation of 4-(2-aminoethyl)-2(3H)-indolone and related compounds as peripheral prejunctional dopamine receptor agonists. *J. Med. Chem.* **29**, 939 (1986).

1) Weiner, N.: The Pharmacological Basis of