(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월24일
(11) 등록번호 10-2331120
(24) 등록일자 2021년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/04 (2006.01) *A61K 31/454* (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01) *C07F 9/59* (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 401/04 (2013.01)
A61K 31/454 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7021355
(22) 출원일자(국제) 2015년01월08일
심사청구일자 2019년12월09일
(85) 번역문제출일자 2016년08월04일
(65) 공개번호 10-2016-0101194
(43) 공개일자 2016년08월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/010552
(87) 국제공개번호 WO 2015/105929
국제공개일자 2015년07월16일
(30) 우선권주장
61/925,405 2014년01월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2003035641 A1
EP01988077 A1

(73) 특허권자
브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니
미국 뉴저지 (우편번호 08540-4000) 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 피.오. 박스 4000
(72) 발명자
톰슨 3세, 로린 에이.
미국 06492 코네티컷주 월링포드 리서치 파크웨이 5 브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니 내
마코르, 존 이.
미국 08543 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니 내
(74) 대리인
양영준, 이귀동

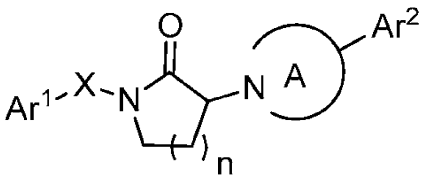
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이기철

(54) 발명의 명칭 **정신 장애의 치료를 위한 (R)-3-((3S,4S)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 및 그의 전구약물**

(57) 요 약

본 개시내용은 일반적으로 그의 염을 포함한 화학식 I의 화합물, 및 상기 화합물을 사용하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 상기 화합물은 NR2B NMDA 수용체의 리간드이며, 다양한 중추 신경계 장애의 치료에 유용할 수 있다.

<화학식 I>



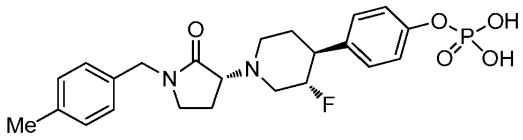
(52) CPC특허분류
A61K 31/675 (2013.01)
C07F 9/59 (2018.08)
C07F 9/65583 (2013.01)

명 세 서

청구범위

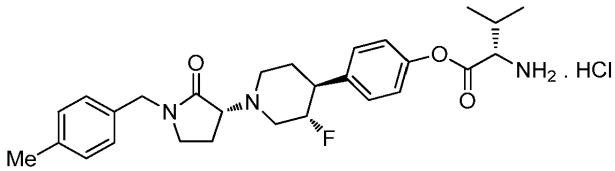
청구항 1

화합물 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트, 또는 그의 제약상 허용되는 염.



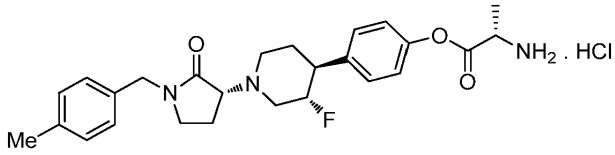
청구항 2

화합물 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노-3-메틸부타노에이트 히드로클로라이드, 또는 그의 제약상 허용되는 염.



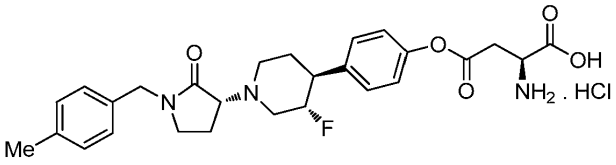
청구항 3

화합물 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노프로파노에이트 히드로클로라이드, 또는 그의 제약상 허용되는 염.



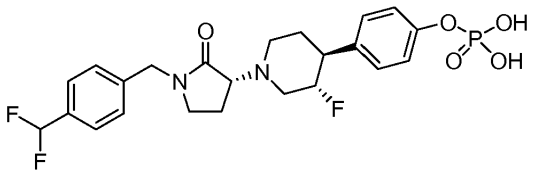
청구항 4

화합물 (*S*)-2-아미노-4-(4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페녹시)-4-옥소부탄산 히드로클로라이드, 또는 그의 제약상 허용되는 염.



청구항 5

화합물 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((R)-1-(4-디플루오로메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트, 또는 그의 제약상 허용되는 염.



청구항 6

우울증, 알츠하이머병, 신경병증성 통증 또는 파킨슨병의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 우울증의 치료에 관한 것인 제약 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 알츠하이머병의 치료에 관한 것인 제약 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 신경병증성 통증의 치료에 관한 것인 제약 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **[관련 출원의 상호-참조]**

[0002] 본 출원은 그 전체가 참조로 포함되는 2014년 1월 9일자 가특허 출원 USSN 61/925,405호의 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 본 개시내용은 일반적으로 그의 염을 포함한 화학식 I의 화합물, 및 상기 화합물을 사용하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 상기 화합물은 NR2B NMDA 수용체의 리간드이며, 다양한 중추 신경계 장애의 치료에 유용할 수 있다.

[0004] N-메틸-D-아스파르테이트 (NMDA) 수용체는 중추 신경계의 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트의 결합에 의해 게이팅되는 이온 채널이다. 이는 우울증, 신경병증성 통증, 알츠하이머병 및 파킨슨병을 비롯한 수많은 신경계 질환의 발병에 주요 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 기능적 NMDA 수용체는 주로 2개의 NR1 및 2개의 NR2 서브유닛으로 구성되는 사량체 구조이다. NR2 서브유닛은 하기 4종의 개별 하위유형으로 더 세분되는데: NR2A, NR2B, NR2C 및 NR2D, 이들은 뇌 전체에 걸쳐 차등적으로 분포된다. NMDA 수용체, 특히 NR2B 서브유닛-함유 채널의 길항제 또는 알로스테릭 조정제는 주요 우울 장애의 치료를 위한 치료제로서 조사된 바 있다 (문헌 [G. Sanacora, 2008, Nature Rev. Drug Disc. 7: 426-437]).

[0005] NR2B 수용체는 글루타메이트를 위한 것 이외의 추가적인 리간드 결합 부위들을 포함한다. 비-선택성 NMDA 길항제 예컨대 케타민은 채널을 통한 Ca^{++}의 수송을 방해하는 세공 차단제이다. 케타민은 i.v. 약물로서 인간 임상

시험에서 빠르고 오래 지속되는 항우울제 특성이 입증된 바 있다. 또한, 케타민의 반복되는 간헐적 주입에 의해 효능이 유지되었다 (문헌 [Zarate et al., 2006, Arch. Gen. Psychiatry 63: 856-864]). 하지만, 이와 같은 종류의 약물은 해리 효과를 비롯한 그의 CNS 부작용으로 인하여 제한된 치료적 가치를 갖는다.

[0006] 알로스테릭 비-경쟁적 결합 부위가 NR2B의 N-말단 도메인에서 또한 확인된 바 있다. 이 부위에 선택적으로 결합하는 작용제 예컨대 트락소프로딜(Traxoprodil)은 i.v. 약물로서 인간 임상 시험에서 지속적인 항우울제 반응 및 개선된 부작용 프로파일을 나타내었다 (문헌 [Preskorn et al., 2008, J. Clin. Psychopharmacol., 28: 631-637] 및 [F.S. Menniti, et al., 1998, CNS Drug Reviews, 4, 4, 307-322]). 그러나, 이러한 종류에서의 약물의 개발은 낮은 생체이용률, 저조한 약동학, 및 hERG 이온 채널을 비롯한 다른 약리학적 표적에 대한 선택성의 결핍에 의해 방해받고 있다. hERG 이온 채널의 차단은 잠재적으로 치명적인 토르사드 드 포인트(Torsades de pointe)를 비롯한 심장 부정맥으로 이어질 수 있으므로, 이러한 채널에 대한 선택성은 중요하다. 따라서, 주요 우울 장애의 치료에 있어서, 바람직한 내약성 프로파일을 가지는 효과적인 NR2B-선택성 음성 알로스테릭 조정제의 개발에 대한 충족되지 않는 임상적 요구가 남아 있다.

[0007] NR2B 수용체 길항제에 대해서는 PCT 공개 WO 2009/006437에 개시되어 있다.

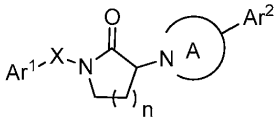
발명의 내용

[0008] 본 발명은 기술적 이점을 제공하는데, 예를 들어 화합물은 신규한 것으로써, NR2B 수용체의 리간드이며, 다양한 중추 신경계 장애의 치료에 유용할 수 있다. 또한, 화합물은 예를 들면 그의 작용 메카니즘, 결합, 억제 효능, 표적 선택성, 용해도, 안전성 프로파일 또는 생체이용률 중 1종 이상과 관련하여 제약 용도상의 이점을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명의 일 측면은 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다:

[0010] <화학식 I>

[0011] 

[0012] 식 중:

[0013] Ar^1은 페닐 또는 인다닐이며, 시아노, 할로, 알킬, 할로알킬 및 할로알콕시에서 선택되는 0-3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0014] Ar^2는 1개의 OR 치환기에 의해 치환되며 또한 시아노, 할로, 알킬, 할로알킬 및 할로알콕시에서 선택되는 0-3개의 치환기에 의해 치환된 페닐이고;

[0015] R은 알킬 에스테르, 아미노산 에스테르, 알콕시 에스테르, 포스폰산, 포스폰산 알킬 에스테르, 알콕시포스포노네이트산, 알콕시포스포네이트 알킬 에스테르, 알킬 카르바메이트, 아미노산 카르바메이트, 알킬 포스포르아미데이트, 아릴 포스포르아미데이트 및 술파메이트로 이루어진 군에서 선택되는 전구약물 모이어티이며;

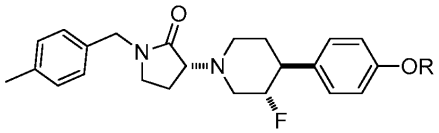
[0016] X는 결합 또는 C_1-C_3 알킬렌이고;

[0017] n은 1 또는 2이며;

[0018] 고리 A는 아제티디닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 호모피페리디닐 또는 호모피페라지닐이고, 할로, 알킬, 히드록시 또는 알콕시에서 선택되는 0-4개의 치환기에 의해 치환된다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 화학식의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다:

[0020] <화학식>



[0021]

[0022] 식 중, R은 알킬 에스테르, 아미노산 에스테르, 알콕시 에스테르, 포스폰산, 포스폰산 알킬 에스테르, 알콕시포스포노네이트산, 알콕시포스포네이트 알킬 에스테르, 알킬 카르바메이트, 아미노산 카르바메이트, 알킬 포스포르아미데이트, 아릴 포스포르아미데이트 및 술파메이트로 이루어진 군에서 선택되는 전구약물 모이어티이다.

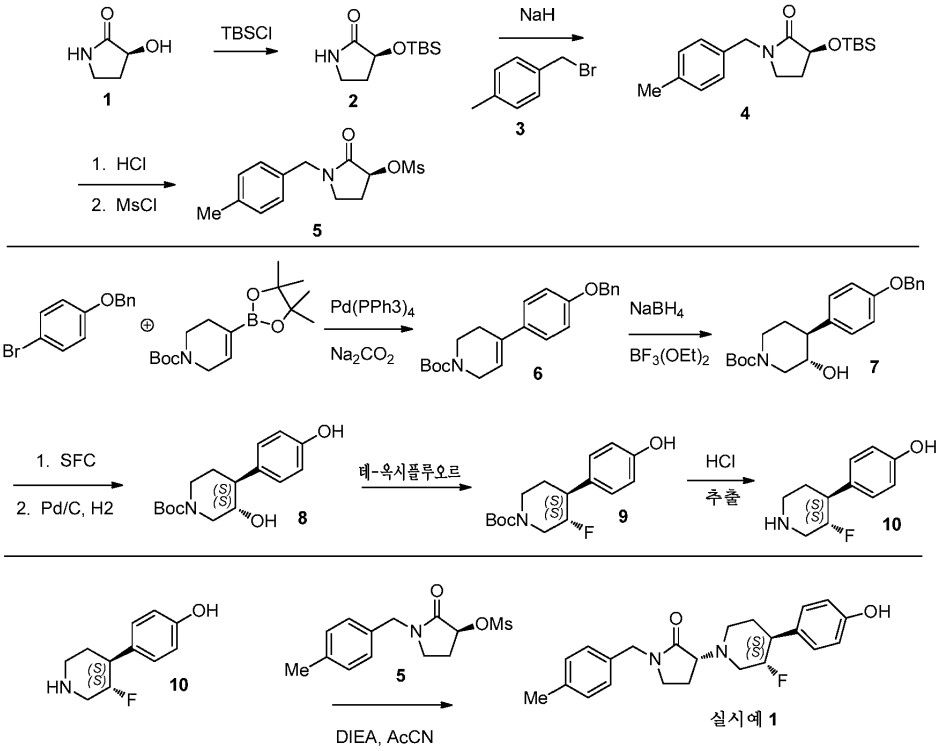
[0023] 합성 방법

[0024] 화학식 I의 화합물은 하기에서 기술되는 것들 및 관련 기술분야의 기술에 속하는 변형들을 포함하여, 관련 기술분야에 알려져 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 시약 및 중간체에 대해서는 관련 기술분야에 알려져 있다. 기타 시약 및 중간체들은 용이하게 구입가능한 물질들을 사용하여 관련 기술분야에 알려져 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 화합물의 합성을 기술하는 데에 사용되는 기호 (예컨대 번호지정된 "R" 치환기)는 단지 화합물을 제조하는 방법을 예시하고자 하는 것으로써, 청구범위 또는 명세서의 다른 부문에서 사용되는 기호와 혼동되어서는 안 된다. 하기의 방법들은 예시 목적의 것으로써, 본 발명의 영역을 제한하고자 하는 것은 아니다. 반응식들은 관련 기술분야에 알려져 있는 합당한 변형들을 포괄한다.

[0025] 반응식 1은 (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온인 실시예 1의 효과적인 합성을 나타낸다. 히드록시락탐 1은 광학적으로 순수한 형태로 시중에서 구입가능하다. 그것은 보호된 후, N-알킬화되어 락탐 4를 형성할 수 있다. 탈보호 및 메탄술포닐클로라이드를 사용한 히드록실 기의 활성화는 락탐 5로 이어진다. 별도로, 시중의 4-벤질옥시브로모벤젠과 시중의 *tert*-부틸 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-5,6-디히드로피리딘-1(2*H*)-카르복실레이트 사이의 스즈키(Suzuki) 커플링 반응에 의해 화합물 6이 제조될 수 있다. 계내에서 제조된 보란을 사용한 6의 처리 후 이어지는 산화는 트랜스 라세미 알콜 7의 형성을 초래한다. 알콜 7은 개별 거울상이성질체로 분리될 수 있으며, 치환된 페놀 8을 제조하기 위해 표준 조건하에서의 수소화를 사용하여 페놀이 차폐해제될 수 있다. 데-옥소플루오르 시약을 사용한 플루오르화는 선택적으로 트랜스 아릴 플루오라이드 9를 제공하며, 염산을 사용한 Boc 기의 탈보호는 염산염으로서의 피페리딘을 제공한다. 염기성 조건하에서의 간단한 추출은 유리 염기로서의 피페리딘 10을 제공한다. 중간 염기성 조건하에서의 피페리딘 10의 락탐 5와의 신중한 반응은 실시예 1의 표제 화합물인 (R)-3-((3S,4S)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온을 제공한다.

[0026] <반응식 1>

[0027] 반응식 1. (R)-3-((3S,4S)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온의 합성

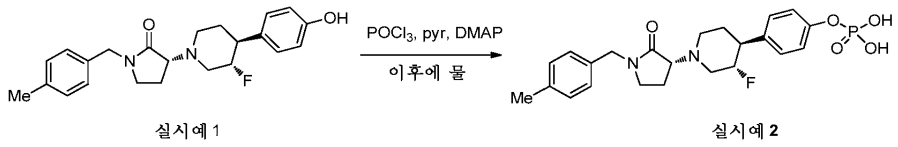


[0028]

[0029] 실시예 1의 화합물은 관련 기술분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 다양한 전구약물로 전환될 수 있다. 예컨대, 반응식 2에 따르면, $POCl_3$, 피리딘 및 DMAP을 사용한 페놀의 처리 후 이어지는 수성 가수분해는 실시예 1의 디히드로겐 포스페이트 에스테르인 실시예 2를 제공한다.

[0030] <반응식 2>

[0031] 반응식 2. 실시예 1 화합물의 포스폰산 전구약물인 실시예 2의 합성

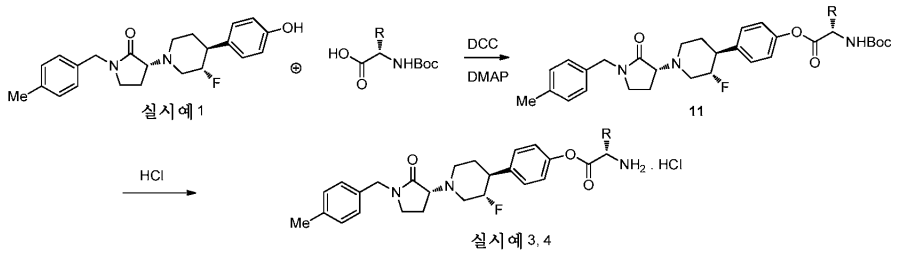


[0032]

[0033] 유사하게, 관련 기술분야에 알려져 있는 다양한 방법을 사용한, 그러나 바람직하게는 디시클로헥실카르보디이미드 및 4-디메틸아미노피리딘을 사용한 실시예 1 화합물의 Boc-보호된 아미노산과의 반응은 에스테르 11을 제공한다. 산, 바람직하게는 HCl에서의 Boc 기의 절단은 실시예 3 및 4의 화합물을 포함한 에스테르를 제공한다.

[0034] <반응식 3>

[0035] 반응식 3. 아미노산 전구약물의 합성



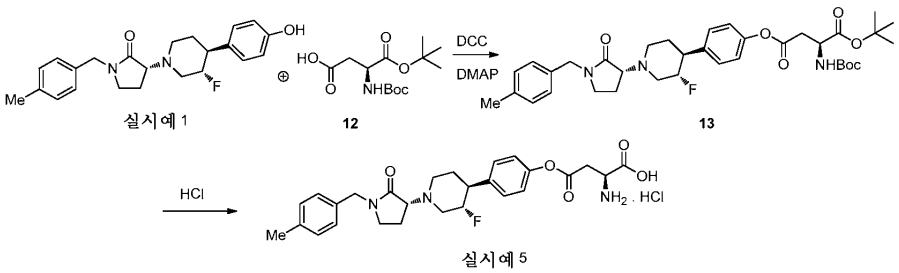
[0036]

[0037] 유사한 방식으로, Boc-보호된 아스파르트산 tert-부틸 에스테르 (12)가 비보호 측쇄를 통하여 실시예 1의 화합

물에 커플링됨으로써, 에스테르 13을 제공할 수 있다. HCl을 사용한 탈보호는 다시 실시예 5의 화합물을 제공한다.

[0038] <반응식 4>

[0039] 반응식 4. 측쇄 카르복실산을 통한 결합을 사용한 아스파르트산 전구약물의 합성



[0040]

[0041] **[구체적인 실시양태의 기술]**

[0042] 반응식에서 사용되는 약어들은 일반적으로 관련 기술분야에서 사용되는 규정에 따른다. 명세서 및 실시예에서 사용되는 화학적 약어들은 하기와 같이 정의된다: "NaHMDS"는 소듐 비스(트리메틸실릴)아미드; "DMF"는 N,N-디메틸포름아미드; "MeOH"는 메탄올; "NBS"는 N-브로모숙신이미드; "Ar"은 아릴; "TFA"는 트리플루오로아세트산; "LAH"는 수소화알루미늄리튬; "BOC"는 t-부톡시카르보닐; "DMSO"는 디메틸술폭시드; "h"는 시간; "EtOAc"는 에틸 아세테이트; "THF"는 테트라히드로푸란; "EDTA"는 에틸렌디아민테트라아세트산; "Et_2O"는 디에틸 에테르; "DMAP"는 4-디메틸아미노피리딘; "DCE"는 1,2-디클로로에탄; "ACN"은 아세토니트릴; "DME"는 1,2-디메톡시에탄; "HOBt"는 1-히드록시벤조트리아졸 수화물; "DIEA"는 디이소프로필에틸아민; "Nf"는 $CF_3(CF_2)_3SO_2$-; 그리고 "TMOF"는 트리메틸오르토포르메이트임.

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같은 약어들은 하기와 같이 정의된다: "1x"는 1회, "2x"는 2회, "3x"는 3회, "℃"는 섭씨 온도, "eq"는 당량, "g"는 그램, "mg"는 밀리그램, "L"는 리터, "mL"는 밀리리터, "μL"는 마이크로리터, "N"은 노르말, "M"은 몰, "mmol"은 밀리몰, "min"은 분, "h"는 시간, "rt"는 실온, "RT"는 체류 시간, "atm"은 기압, "psi"는 제곱 인치당 파운드, "conc."는 진한, "sat" 또는 "satd."는 포화, "MW"는 분자량, "mp"는 융점, "ee"는 거울상이성질체 과잉률, "MS" 또는 "Mass Spec"은 질량 분광측정법, "ESI"는 전기분무 이온화 질량 분광분석법, "HR"은 고해상도, "HRMS"는 고해상도 질량 분광측정법, "LCMS"는 액체 크로마토그래피 질량 분광측정법, "HPLC"는 고압 액체 크로마토그래피, "RP HPLC"는 역상 HPLC, "DCM"은 디클로로메탄, "TLC" 또는 "tlc"는 박층 크로마토그래피, "SFC"는 초임계 유체 크로마토그래피, "NMR"은 핵 자기 공명 분광분석법, "^1H"는 양성자, "δ"는 델타, "s"는 단일선, "d"는 이중선, "t"는 삼중선, "q"는 사중선, "m"은 다중선, "br"은 넓음, "Hz"는 헤르츠, 및 "R", "S", "E" 및 "Z"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 익숙한 입체화학 명칭이다.

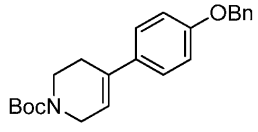
[0044] LC/MS 데이터는 하기의 조건을 사용하여 수득하였다:

[0045] 조건 A: 1.7분 동안 0-100 % B의 1 mL/분의 유량 구배 후 이어지는 100 % B 1.3분을 사용하는 아센티스(Ascentis) C18 50×2.1 mm, 2.7 ㎛ 컬럼. 용매 A : 물:아세토니트릴 (98:2) 중 10 mM NH4COOH; 용매 B = 물:아세토니트릴 (2:98) 중 10 mM NH4COOH.

[0046] 조건 B: 4분 동안의 0-100 % B인 0.8 mL/분의 유량 구배를 사용하는 페노메넥스(Phenomenex) C18 2.0×50 mm, 5 ㎛ 컬럼. 용매 A = 10 % MeOH/90 % 물/0.1 % TFA, 용매 B = 90 % MeOH/10 % 물/0.1 % TFA.

[0047] 중간체의 합성

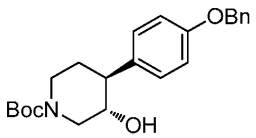
[0048] 중간체 A. *tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-5,6-디히드로피리딘-1(2H)-카르복실레이트



[0049]

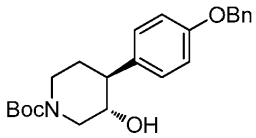
[0050] 아세토니트릴 1100 mL 중 시중의 1-(벤질옥시)-4-브로모벤젠 (104 g, 395 mmol) 및 시중의 *tert*-부틸 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-5,6-디히드로피리딘-1(2*H*)-카르복실레이트 (147 g, 474 mmol)의 용액을 2분 동안 질소로 퍼징하였다. 물 (1100 mL)을 첨가한 후, 이어서 탄산나트륨 (126 g, 1186 mmol) 및 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 (27.4 g, 23.7 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 질소로 퍼징한 다음, 90 ℃로 가열하고, 16시간 동안 교반하였다. 다음에, 반응 혼합물을 rt로 냉각시키고, 1 L의 에틸 아세테이트로 희석하였다. 층을 분리하고, 수성 층을 2개의 추가적인 250 mL 분량의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 층을 합하여, 200 mL의 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조한 후, 진공에서 증발시킴으로써, 오프-화이트 색상의 고체를 제공하였다. 석유 에테르 중 6 % 에틸 아세테이트를 사용하여 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 생성물을 정제함으로써 129 g (88 %)의 원하는 생성물을 제공하였다. LC/MS RT (조건 A) = 2.732분, (M-H)+ = 364.0. ^{1}H NMR (300MHz, 클로로포름-d) δ 7.49 - 7.30 (m, 5H), 7.27 (d, *J*=10.7 Hz, 2H), 6.99 - 6.87 (m, 2H), 6.03 - 5.87 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.05 (d, *J*=2.6 Hz, 2H), 3.62 (t, *J*=5.7 Hz, 2H), 2.49 (br. s., 2H), 1.49 (s, 9H).

[0051] 중간체 B. (+/-)-*rel*-(3*S*,4*S*)-*tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-3-히드록시피페리딘-1-카르복실레이트

[0052] 

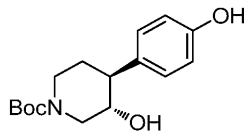
[0053] 수소화붕소나트륨 (15.5 g, 410 mmol)를 THF에 용해시키고, 용액을 0 ℃로 냉각하였다. 삼플루오린화붕소 에테레이트 (52.3 mL, 424 mmol)를 용액에 첨가하고, 혼합물을 rt로 가온시킨 후, 30분 동안 교반하였다. 다음에, THF 500 mL 중 *tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-5,6-디히드로피리딘-1(2H)-카르복실레이트 (50 g, 137 mmol, 중간체 A)의 용액를 첨가하고, 반응 혼합물을 rt에서 2시간 동안 교반하였다. 다음에, 100 mL 분량의 물을 혼합물에 천천히 첨가하였다 (주의: 비등이 관찰됨). 혼합물을 100 mL의 에탄올로 희석하고, 수산화나트륨 (228 mL, 수중 10 % 용액, 0.684 mol) 및 과산화수소 (20.5 mL, 0.684 mol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 환류 온도로 가열하고, 16시간 동안 교반하였다. 혼합물을 10 ℃로 냉각하고, 1 L의 DCM으로 희석하였다. 다음에, 1.5 L의 1.5 N HCl을 사용하여 pH를 7로 조정하였다. 다음에, 층을 분리하고, 추가적인 2개의 500 mL 분량 DCM을 사용하여 수성 층을 추출하였다. 유기 층을 합하여, 2×1 L의 물 및 200 mL의 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조한 후, 진공에서 증발시킴으로써, 오프-화이트 색상의 고체를 제공하였다. 500 mL의 석유 에테르를 사용하여 고체를 연화처리한 후, 여과에 의해 단리함으로써, 46.5 그램의 생성물 (HPLC에 의한 88 %, 99.0 % 순도)을 수득하였다. LC/MS RT (조건 A) = 2.372분, $(M+H)^+$ = 382.0. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 7.47 - 7.42 (m, 2H), 7.42 - 7.36 (m, 2H), 7.36 - 7.28 (m, 1H), 7.14 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.92 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.74 (d, *J*=5.5 Hz, 1H), 4.10 (br. s., 1H), 3.94 (br. s., 1H), 3.46 - 3.35 (m, 1H), 2.47 - 2.31 (m, 2H), 1.70 - 1.61 (m, 1H), 1.55 - 1.45 (m, 2H), 1.42 (s, 9H).

[0054] 중간체 C. (3*S*,4*S*)-*tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-3-히드록시피페리딘-1-카르복실레이트

[0055] 

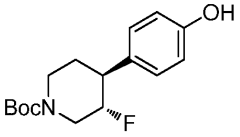
[0056] 라세미 *rel*-(3*S*,4*S*)-*tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-3-히드록시피페리딘-1-카르복실레이트 (112 g, 중간체 B)를 하기의 조건하에서 정제용 초임계 유체 크로마토그래피를 사용하여 개별 거울상이성질체로 분리하였다: 메탄올 중 60 %의 CO_2 및 40 %의 0.3 % 디에틸아민 용액을 사용하여 100.0 g/분의 유량으로 용리하는 룩스-셀룰로스-2 (250×21 mm), 5 ㎛ 컬럼과 함께 Thar SFC-250 기기를 이용하였음. 샘플을 74 mg/mL로 주사하였다. 55 %의 CO_2 및 45 %의 메탄올 중 0.3 % 디에틸아민 용액을 사용하여 3.0 g/분의 유량으로 용리하는 룩스-셀룰로스-2 (250×4.6 mm), 5 ㎛ 컬럼에서 분석용 SFC를 수행하였다. 회수율은 2.49분의 체류 시간으로 피크 1 50.0 g이었는데, 이는 원하는 (3S,4S)-*tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-3-히드록시피페리딘-1-카르복실레이트에 해당한다. 분석 데이터는 라세미체의 것과 일치하였다.

[0057] 중간체 D. (3*S*,4*S*)-*tert*-부틸 3-히드록시-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트

[0058] 

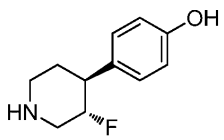
[0059] 메탄올 260 mL 중 (3S,4S)-*tert*-부틸 4-(4-(벤질옥시)페닐)-3-히드록시피페리딘-1-카르복실레이트 (26 g, 67.8 mmol, 중간체 C)의 용액을 압력 병 내에서 1.6 그램의 10 % 탄소상 팔라듐 (13.6 mmol)으로 처리하였다. 50 psi의 수소를 도입하고, 반응 혼합물을 16시간 동안 교반하였다. 셀라이트를 통하여 혼합물을 여과하고, 조 생성물 (18.9 g, 64.4 mmol)을 농축하였는데, 추가적인 정제 없이 진행하기에 충분하게 순수하였다. LC/MS RT (조건 B) = 2.970분, (M+H *t*-부틸의 손실을 수반)$^+$ = 238.0. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.10 (br. s., 1H), 7.01 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.65 (s, 2H), 4.70 (d, *J*=5.0 Hz, 1H), 4.09 (br. s., 1H), 3.93 (br. s., 1H), 3.17 (s, 2H), 2.79 - 2.63 (m, 1H), 2.34 (br. s., 1H), 1.68 - 1.57 (m, 1H), 1.44 (br. s., 1H), 1.42 (s, 9H).

[0060] 중간체 E. (3*S*,4*S*)-*tert*-부틸 3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트

[0061] 

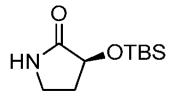
[0062] 아세토니트릴 270 mL 중 (3S,4S)-*tert*-부틸 3-히드록시-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트 (15.5 g, 61.4 mmol, 중간체 D)의 용액을 0 ℃로 냉각하였다. 교반 용액에, 첨가 깔때기를 통하여 65분에 걸쳐 톨루엔 중 비스(2-메톡시에틸)아미노황 트리플루오라이드 50 % 용액 (데옥소-플루오르(Deoxo-fluor), 58.4 mL, 159 mmol)을 적가하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 0 ℃에서 30분 동안 교반한 다음, rt가 되도록 하고, 추가 2시간 동안 교반하였다. 다음에, 포화 암모늄 클로라이드 용액 (150 mL)을 첨가하고, 혼합물을 2개의 150 mL 분량의 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 합하여, 황산나트륨 상에서 건조하고 농축함으로써, 조 생성물을 산출하였다. 헥산 중 0-15 % 아세톤의 구배를 사용하여 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피 (실리카 1.5 kg)에 의해 생성물을 정제함으로써, 11.9 g (75 %)의 원하는 (3S,4S)-*tert*-부틸 3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트를 산출하였다. LC/MS RT (조건 B) = 3.295분, (M+H t-부틸의 손실 및 플루오린의 제거를 수반)$^+$ = 220.0. ^{1}H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.15 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.83 (dt, *J*=8.6, 2.0 Hz, 2H), 4.59 - 4.48 (m, 1H), 4.47 - 4.37 (m, 1H), 4.23 - 4.12 (m, 1H), 2.88 - 2.68 (m, 3H), 1.96 - 1.84 (m, 1H), 1.80 - 1.66 (m, 1H), 1.51 (s, 9H).

[0063] 중간체 F. 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로피페리딘-4-일)페놀

[0064] 

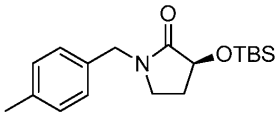
[0065] 무수 디옥산 (80 mL) 중 (3*S*,4*S*)-*tert*-부틸 3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트 (12.0 g, 40.6 mmol, 중간체 E)의 용액을 HCl (1,4-디옥산 중 4 M, 40.6 mL, 162 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 rt에서 6시간 동안 교반시킨 다음, 진공에서 증발시킴으로써, 원하는 생성물의 HCl 염을 제공하였다. 추가적인 단리 없이, HCl 염을 $CHCl_3$ 중에 현탁하고, 80 mL의 포화 $NaHCO_3$ 용액을 첨가하였다. 유기 층을 분리하고, 수성 층을 $CHCl_3$ (2×100 mL)로 추출하였다. 유기 층을 합하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고 농축함으로써, 표제 화합물 (7.1 g, 36.4 mmol, 90 %)을 제공하였다. LC/MS RT (조건 B) = 1.008분, LC/MS (M+H)$^+$ = 196.2.

[0066] 중간체 G. (*S*)-3-((*tert*-부틸디메틸실릴)옥시)피롤리딘-2-온

[0067] 

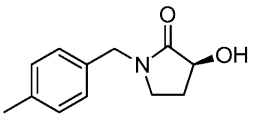
[0068] DCM (198 ml) 중 시중 (S)-3-히드록시피롤리딘-2-온 (5 g, 49.5 mmol)의 교반 용액을 DMAP (0.199 g, 1.632 mmol), 이미다졸 (6.73 g, 99 mmol) 및 TBDMS-Cl (8.94 g, 59.3 mmol)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 rt에서 16시간 동안 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하였다. 유기 층을 농축하고, 석유 에테르 중 50 % 에틸 아세테이트를 사용하여 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 조 반응 생성물을 정제하였다. 원하는 생성물을 백색의 고체 (8.1 g, 76 %)로서 단리하였다. LC/MS $(M+H)^+$ = 216.2. ^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 6.40 (br. s., 1H), 4.26 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 3.42 - 3.34 (m, 1H), 3.29 - 3.21 (m, 1H), 2.36 (dtd, *J*=12.7, 7.3, 3.3 Hz, 1H), 2.07 - 1.96 (m, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.15 (d, *J*=7.0 Hz, 6H).

[0069] 중간체 H. (*S*)-3-((*tert*-부틸디메틸실릴)옥시)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온

[0070] 

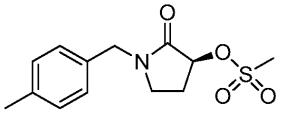
[0071] (S)-3-((*tert*-부틸디메틸실릴)옥시)피롤리딘-2-온 (5 g, 23.22 mmol, 중간체 G)을 무수 THF (46.4 ml)에 용해시키고, 반응 혼합물을 질소 분위기하에서 0 ℃로 냉각하였다. 다음에, 수소화나트륨 (1.393 g, 34.8 mmol)를 1 부분으로 첨가하고, 반응 혼합물을 5분 동안 교반시킨 후, 무수 THF (46.4 ml) 중 1-(브로모메틸)-4-메틸벤젠 (5.37 g, 29.0 mmol)을 적가하였다. 반응액을 0 ℃에서 5분 동안 교반시킨 다음, 냉각 배스를 제거하고, 혼합물을 밤새 rt로 가온시켰다. 물 (100 mL)을 사용하여 반응액을 조심스럽게 켄칭한 다음, 에틸 아세테이트 (3× 100 mL)로 추출하였다. 다음에, 합해진 유기 층을 염수 (200 mL)로 세척하고, 건조하였다 ($MgSO_4$). 진공에서의 용매의 증발은 조 생성물 (9.6 g, 오일)을 제공하였는데, 이후 헥산 중 0 %에서 20 % 에틸 아세테이트의 구배를 사용하여 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피 (실리카 330 g)에 의해 이를 정제함으로써, 6.53 g (88 %)의 원하는 생성물을 제공하였다. LC/MS (조건 B), RT = 4.320분, $(M+H)^+$ = 320.3. ^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.15 (s, 4H), 4.42 (s, 2H), 4.37 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 3.32 - 3.18 (m, 1H), 3.10 (dt, *J*=9.7, 7.5 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.29 (dtd, *J*=12.6, 7.6, 3.1 Hz, 1H), 1.97 - 1.84 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.20 (d, *J*=10.3 Hz, 6H).

[0072] 중간체 I. (*S*)-3-히드록시-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온

[0073] 

[0074] HCl (1,4-디옥산 중 4 M, 25.5 ml, 102 mmol)을 rt에서 무수 DCM (20.4 mL) 중 (*S*)-3-((*tert*-부틸디메틸실릴)옥시)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 (6.53 g, 20.44 mmol, 중간체 H)의 용액에 1 부분으로 첨가하였다. 약간의 발열이 나타났다. 반응 혼합물을 rt에서 2시간 동안 교반시킨 다음, 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 DCM (100 mL) 중에 수용하고, 포화 중탄산나트륨 용액 (100 mL) 및 염수 (50 mL)로 세척한 다음, 용액을 $MgSO_4$ 상에서 건조하여 잔류물로 농축하였다. 헥산 중 40 %에서 100 % 에틸 아세테이트의 구배를 사용하여 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피 (실리카 120 g)에 의해 조 생성물을 정제함으로써, 3.73 g (89 %)의 원하는 생성물을 제공하였다. LC/MS (조건 B), RT = 2.338분, $(M+H)^+$ = 206.2. ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.26 - 7.02 (m, 4H), 4.43 (d, *J*=3.5 Hz, 2H), 4.41 - 4.37 (m, 1H), 3.66 (d, *J*=2.6 Hz, 1H), 3.34 - 3.05 (m, 2H), 2.41 (dddd, *J*=12.8, 8.4, 6.6, 2.2 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.93 (dq, *J*=12.8, 8.8 Hz, 1H).

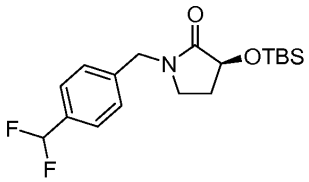
[0075] 중간체 J. (*S*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일 메탄술포네이트



[0076]

[0077] 트리에틸아민 (0.509 ml, 3.65 mmol)을 질소 분위기하에 0 ℃에서 무수 DCM (12.18 ml) 중 (*S*)-3-히드록시-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 (0.5 g, 2.436 mmol, 중간체 I)의 냉각된 용액에 첨가하였다. 다음에, 메탄술포닐 클로라이드 (0.198 ml, 2.56 mmol)를 적가하고, 반응액을 0 ℃에서 15분 동안 교반시킨 후, 포화 중탄산나트륨 용액 (10 mL)을 사용하여 켄칭하였다. 혼합물을 rt로 가온시키고, 수성 층을 분리한 후, DCM (2x)으로 추출하였다. 합해진 유기 층을 $MgSO_4$ 상에서 건조하고, 진공에서 증발시킴으로써, 백색의 고체 (0.73 g)를 제공한 다음, 그것을 헥산 중 0 %에서 50 % 에틸 아세테이트의 구배를 사용하여 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피 (실리카 40 g)에 의해 정제함으로써, 백색 고체로서의 원하는 생성물 0.63 g (91 %)을 제공하였다.

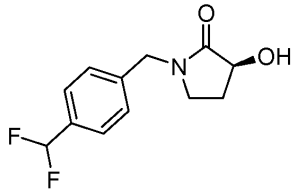
[0078] 중간체 K. (*S*)-3-(*tert*-부틸디메틸실릴옥시)-1-(4-디플루오로메틸)벤질)피롤리딘-2-온



[0079]

[0080] 무기 오일 중 수소화나트륨 (232 mg, 5.31 mmol)의 60 % 분산액을 0 ℃에서 THF (7 mL) 중 (*S*)-3-((*tert*-부틸디메틸실릴)옥시)피롤리딘-2-온 (762 mg, 3.54 mmol, 중간체 G)의 교반 용액에 첨가하였다. 15분 후, THF (7 mL) 중 1-(브로모메틸)-4-(디플루오로메틸)벤젠 (980 mg, 4.43 mmol)의 용액을 반응 혼합물에 첨가하였다. 생성 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 수 그램의 얼음 펠렛을 사용하여 반응액을 조심스럽게 켄칭하였다. 생성 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 합해진 유기 층을 물로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조한 후, 여과하고, 진공에서 농축하였다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (0-30 % EtOAc/헥산)를 사용하여 조 반응 혼합물을 정제함으로써, 원하는 생성물 (440 mg, 35 % 수율)을 백색의 고체로서 산출하였다. LCMS $(M+H)^+$ 356.3; ^1H NMR (500MHz, 클로로포름-d) δ 7.49 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.35 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 6.65 (br. t, *J*=1.0 Hz, 1H), 4.56 - 4.44 (m, 2H), 4.38 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 3.27 (ddd, *J*=9.7, 8.7, 3.4 Hz, 1H), 3.13 (dt, *J*=9.7, 7.4 Hz, 1H), 2.36 - 2.27 (m, 1H), 1.98 - 1.90 (m, 1H), 0.96 (br. s., 9H), 0.22 - 0.20 (m, 3H), 0.20 - 0.18 (m, 3H).

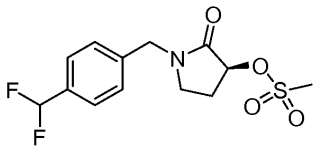
[0081] 중간체 L. (*S*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-3-히드록시피롤리딘-2-온



[0082]

[0083] 디옥산 중 4 M HCl (0.62 mL, 2.5 mmol)의 용액을 rt에서 디클로로메탄 (1.24 mL) 중 (*S*)-3-(tert-부틸디메틸실릴옥시)-1-(4-디플루오로메틸)벤질)피롤리딘-2-온 (440 mg, 1.24 mmol, 중간체 K)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축함으로써, 원하는 생성물 (368 mg, 정량 수율)을 산출하였다: LC-MS $(M+H)^+$ 242.1.

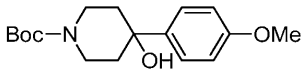
[0084] 중간체 M. (*S*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일 메탄술포네이트



[0085]

[0086] 트리에틸아민 (0.319 mL, 2.29 mmol) 및 메탄술포닐 클로라이드 (0.131 mL, 1.68 mmol)를 0 ℃에서 디클로로메탄 (7.63 mL) 중 (*S*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-3-히드록시피롤리딘-2-온 (368 mg, 1.53 mmol, 중간체 L)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 1시간 동안 교반하였다. 생성 혼합물을 물로 희석하고, 수성 혼합물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 합해진 유기 층을 10 % 중탄산나트륨 용액으로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조한 후, 여과하고, 진공에서 농축하였다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (0-100 % EtOAc)를 사용하여 조 물질을 정제하였다. 순수한 분획들을 합하고, 진공에서 농축함으로써, 원하는 생성물 (322 mg, 66 % 수율)을 백색의 고체로서 산출하였다. LC-MS (M+H)$^+$ 320.1; ^{1}H NMR (500MHz, 클로로포름-d) δ 7.53 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 7.38 - 7.33 (m, 2H), 6.67 (br. t, *J*=1.0 Hz, 1H), 5.27 (dd, *J*=8.2, 7.5 Hz, 1H), 4.60 - 4.49 (m, 2H), 3.41 - 3.35 (m, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.27 (dt, *J*=9.9, 7.3 Hz, 1H), 2.64 - 2.55 (m, 1H), 2.27 (ddt, *J*=13.9, 8.9, 7.1 Hz, 1H).

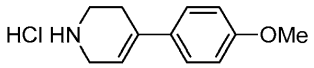
[0087] 중간체 N. *tert*-부틸 4-히드록시-4-(4-메톡시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트



[0088]

[0089] 시중 tert-부틸 4-옥소피페리딘-1-카르복실레이트 (2.0 g, 10.0 mmol)와 디에틸 에테르 (30 ml)의 혼합물을 0 ℃로 냉각하였다. 이와 같은 혼합물에, (4-메톡시페닐)마그네슘 브로마이드의 용액 (디에틸 에테르 중 0.5 M, 30 ml, 15 mmol)을 적가하였다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 rt로 가온시키고, 2시간 동안 교반하였다. 다음에, 150 ml의 빙냉수를 사용하여 그것을 천천히 켄칭한 다음, 생성 혼합물을 3×150 ml의 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 합하여, 건조하고, 여과한 후, 진공하에 농축하였다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (30:70 에틸 아세테이트:헥산)에 의해 정제함으로써, 원하는 생성물 (3.0 g, 100 % 수율)을 제공하였다. LC-MS(ES-API): m/z 305.5 (M-H)$^+$; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.37 (q, *J*=1.0 Hz, 2H), 6.86 (q, *J*=1.0 Hz, 2H), 4.94 (s, 1H), 3.82 (d, *J*=11.5 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.13 (br. s, 2H), 1.75 (td, *J*=12.9, 4.8 Hz, 2H), 1.56 (d, *J*=12.3 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

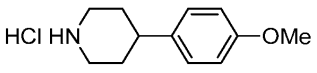
[0090] 중간체 O. 4-(4-메톡시페닐)-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 히드로클로라이드



[0091]

[0092] *tert*-부틸 4-히드록시-4-(4-메톡시페닐)피페리딘-1-카르복실레이트 (700 mg, 2.27 mmol, 중간체 N)와 디옥산 중 HCl (4.0 ml, 16 mmol)의 혼합물을 rt에서 3시간 동안 교반하였다. 조 물질을 진공하에 농축하고, 고체 잔류물을 3×10 ml의 DCM으로 세척함으로써, 비-극성 불순물을 제거하였다. 원하는 염을 미세 고체 (480 mg, 93 %)로서 수집하였다. LCMS (ES-API) m/z 190.2 (M+H)$^+$; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.37 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.08 - 5.98 (m, 1H), 5.11 (s, 1H), 3.97 (br. s., 1H), 3.52 (s, 1H), 3.32 (s, 3H), 2.47 - 2.37 (m, 1H).

[0093] 중간체 P. 4-(4-메톡시페닐)피페리딘 히드로클로라이드

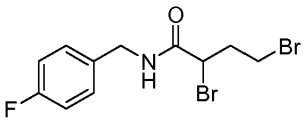


[0094]

[0095] 메탄올 (20 mL) 중 4-(4-메톡시페닐)-1,2,3,6-테트라히드로피리딘, HCl (3.00 g, 13.3 mmol, 중간체 O)의 교반 용액에, 10 % 탄소상 팔라듐 (1.4 g)을 첨가하고, 반응 혼합물을 수소 20 psi에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 패드를 통하여 여과하고, 에틸 아세테이트로 그것을 세척한 후, 합해진 유기 분획을 농축

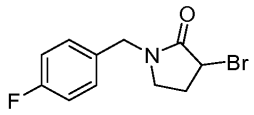
함으로써, 백색의 고체 (2.0 g, 70 % 수율)를 수득하였다: LCMS (ES-API), m/z 192.1 $(M+H)^+$; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.13 - 8.36 (m, 2H), 7.14 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 6.90 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.07 - 2.87 (m, 4H), 2.87 - 2.65 (m, 4H).

[0096] 중간체 Q. 2,4-디브로모-N-(4-플루오로벤질)부탄아미드

[0097] 

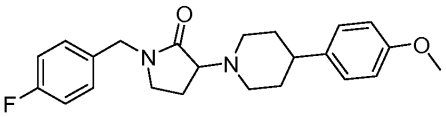
[0098] TEA (8.91 mL, 63.9 mmol) 및 2,4-디브로모부타노일 클로라이드 (5.07 mL, 38.4 mmol)를 0 ℃에서 디에틸 에테르 (15 mL) 중 시중 (4-플루오로페닐)메탄아민 (4.0 g, 32.0 mmol)의 용액에 순차적으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 rt로 가온시키고, 추가 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하였다. 고체를 디에틸 에테르로 세척하였다. 여과액을 진공에서 농축함으로써, 2,4-디브로모-*N*-(4-플루오로벤질)부탄아미드 (8.0 g, 71 % 수율)을 함유하는 조 혼합물을 산출하였다: LCMS (ES-API), m/z 354, 356 $(M+H)^+$.

[0099] 중간체 R. 3-브로모-1-(4-플루오로벤질)피롤리딘-2-온

[0100] 

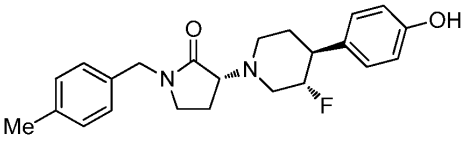
[0101] 무기 오일 중 NaH (1.70 g, 42.5 mmol)의 60 % 분산액을 0 ℃에서 THF (25 mL) 중 2,4-디브로모-*N*-(4-플루오로벤질)부탄아미드 (10.0 g, 28.3 mmol, 중간체 Q)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 rt로 가온시키고, 추가 2시간 동안 교반하였다. 얼음을 사용하여 반응 혼합물을 조심스럽게 켄칭하고, 물로 희석하였다. 생성 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 합해진 유기 층을 물로 세척한 다음, 염수 용액으로 세척하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에 위치시킨 다음, 여과하고, 진공에서 농축하였다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (10 % EtOAc/헥산)를 사용하여 조 생성물을 정제함으로써, 원하는 생성물 (5.90 g, 64 % 수율)을 산출하였다: LCMS (ES-API), m/z 272.4, 274.3 $(M+H)^+$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 2.12 - 2.27 (m, 1H) 2.56 - 2.68 (m, 1H) 3.27 (dd, *J*=7.78, 3.26 Hz, 2H) 4.29 - 4.38 (m, 1H) 4.40 - 4.57 (m, 1H) 4.73 (dd, *J*=7.03, 3.01 Hz, 1H) 7.04 - 7.35 (m, 4H).

[0102] 중간체 S. 1-(4-플루오로벤질)-3-(4-(4-메톡시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온

[0103] 

[0104] TEA (0.768 mL, 5.51 mmol)를 아세토니트릴 (10 mL) 중 3-브로모-1-(4-플루오로벤질)피롤리딘-2-온 (0.3 g, 1.10 mmol, 중간체 R) 및 4-(4-메톡시페닐)피페리딘 히드로클로라이드 (0.276 g, 1.213 mmol, 중간체 P)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밀봉하고, 화학용 전자레인지에서 100 ℃로 1시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 rt로 냉각하고, 진공에서 농축하였다. 잔류물을 EtOAc로 희석하였다. 유기 혼합물을 물 및 염수 용액으로 세척하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하여, 진공에서 농축함으로써, 1-(4-플루오로벤질)-3-(4-(4-메톡시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (0.35 g, 83 % 수율)을 함유하는 조 혼합물을 산출하였다: LCMS (ES-API), m/z 383.2 $(M+H)^+$.

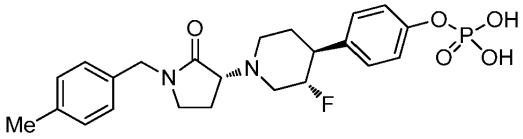
[0105] 실시예 1. (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온



[0106]

[0107] 아세토니트릴 100 mL 중 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로피페리딘-4-일)페놀 (7.10 g, 36.4 mmol, 중간체 F) 및 DIEA (16 mL, 92 mmol)의 용액을 80 ℃로 가열하였다. 이 용액을 4시간의 기간에 걸쳐 아세토니트릴 (80 mL) 중 (*S*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일 메탄술포네이트 (10.5 g, 37.0 mmol, 중간체 J)의 용액으로 적가 처리하였다. 첨가가 완료된 후, 반응 혼합물을 80 ℃에서 16시간 동안 교반하였다. 다음에, 반응 혼합물을 rt로 냉각시키고, 회전 증발에 의해 부피를 80 mL로 감소시켰다. 다음에, 포화 NH_4Cl 용액 (100 mL)을 첨가하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM (2×100 mL)으로 추출하고, 유기 층을 합하여, Na_2SO_4 상에서 건조한 후, 진공에서 농축함으로써, 조 생성물을 제공하였다. 용매 A 중 용매 B 0 %에서 20 %의 구배를 사용하여 용리하며 여기서 용매 B = 20 % 메탄올/DCM이고 용매 A = DCM인 실리카 겔 크로마토그래피 (실리카 겔 750 g)에 의해 조 생성물을 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 합하였다. 용매를 증발하여 LC/MS 분석 (조건 B)에 의한 97 %의 순도를 갖는 9.3 그램의 원하는 생성물을 수득하였다. 이렇게 수득된 생성물 (8.5 g)을 아세톤:헥산 (1:5, 200 mL) 중에 슬러리화하고, 여과에 의해 고체 생성물을 단리한 후, 공기 건조하였다. 조심스러운 SFC 분석은 생성물 중 불순물 2.1 %의 존재를 나타내었다. 셀4 0.46×25 cm 5 ㎛ 컬럼을 사용하고 3 mL/분으로 CO_2 중에서 45 % 메탄올을 사용하여 용리하였는데, 원하는 생성물은 3.800분에서 용리되었으며, 원치 않는 불순물은 4.848분에서 용리되었다. 다음에, 80 mg/mL 용액 1.5 mL를 주사하는 150 mL/분의 셀4 3×25 cm 5 ㎛ 컬럼을 사용하는 SFC 크로마토그래피에 의해 생성물을 추가적으로 정제하였다. 활성 분획의 농축은 7.82 그램 (20.4 mmol, 56 %)의 >99.7 % 순수 실시예 1을 백색의 분말로서 제공하였다. LC/MS (조건 B), RT = 2.512분, $(M+H)^+$ = 383.3. ^{19}F NMR δ -182.83. ^1H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.20 - 7.08 (m, 6H), 6.98 - 6.78 (m, 2H), 5.68 (s, 1H), 4.77 - 4.54 (m, 1H), 4.53 - 4.34 (m, 2H), 3.68 (t, *J*=8.8 Hz, 1H), 3.41 - 3.29 (m, 1H), 3.28 - 3.09 (m, 2H), 2.82 (d, *J*=10.8 Hz, 1H), 2.74 - 2.54 (m, 2H), 2.47 (td, *J*=9.9, 3.6 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.19 - 1.94 (m, 2H), 1.92 - 1.80 (m, 2H). ^{13}C NMR (101MHz, 클로로포름-d) δ 172.4, 154.9, 137.5, 133.3, 133.0, 129.5, 128.7, 128.3, 115.5, 92.6, 90.8, 65.0, 54.4, 54.2, 48.7, 48.0, 47.8, 46.8, 43.7, 31.7, 31.6, 21.1, 19.6.

[0108] 실시예 2. 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트

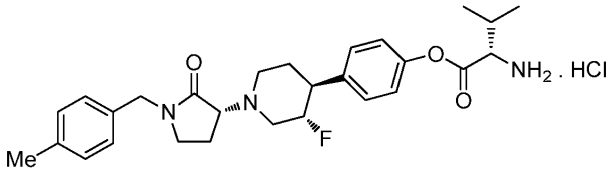


[0109]

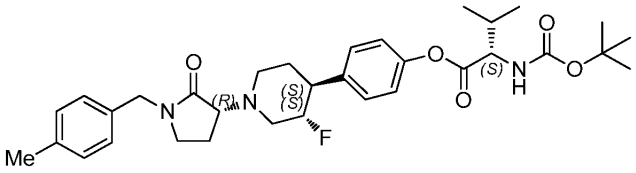
[0110] 디클로로메탄 10 mL 중 (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 (100 mg, 0.261 mmol, 실시예 1)의 현탁액에, 피리딘 (0.106 mL, 1.31 mmol) 및 DMAP (160 mg, 1.31 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 -20 ℃로 냉각하였다. 냉각된 용액에, $POCl_3$ (0.122 mL, 1.31 mmol)를 적가한 다음, 반응 혼합물을 rt로 가온시키고, 1시간 동안 교반하였다. 물 (10 mL)을 첨가하고, 혼합물을 1.5시간 동안 교반하였다. 다음에, 층을 분리하고, 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조한 후, 증발시켜 건조하였다. 20 % B에서 50 % B의 구배를 사용하여 15 mL/분으로 7분에 걸쳐 용리하며 여기서 용매 A = 수중 10 mM 암모늄 아세테이트, pH 4.5이고 용매 B = 아세토니트릴인 시메트리(Symmetry) C8 (300×17 mm) 7 mM 컬럼에서의 HPLC에 의해 조 생성물을 정제하였다. 생성물 RT = 2.2분이었다. 적절한 분획으로부터 동결건조에 의해 백색의 고체로서 원하는 생성물 (5.8 mg, 4.7 %)을 단리하였다. LCMS (조건 A) RT = 1.720분, $(M+H)^+$ = 463.2. ^1H NMR (400MHz, 메탄올-d4) δ 7.29 - 7.16 (m, 8H), 4.74 (br. s., 1H), 4.61 - 4.34 (m, 2H), 4.01 (t, J=8.3 Hz, 1H), 3.82 - 3.62 (m, 1H), 3.35 (m, 2H), 3.05 (br. s., 2H), 2.79 (br. s., 2H), 2.34 (s, 4H), 2.18 (br.

s., 1H), 2.02 - 1.87 (m, 1H), 1.83 (br. s., 1H). ^{19}F NMR (376 MHz, 메탄올-d4) δ -185.143. ^{31}P NMR (162 MHz, 메탄올-d4) δ -4.260.

[0111] 실시예 3. (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노-3-메틸부타노에이트 히드로클로라이드

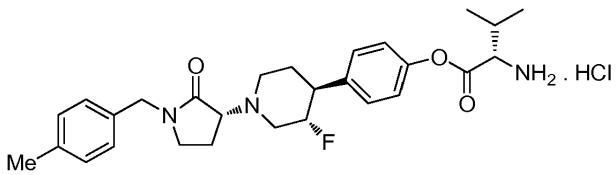
[0112] 

[0113] 단계 3A. (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부타노에이트

[0114] 

[0115] DCM (3 mL) 중 (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 (0.02 g, 0.052 mmol, 실시예 1)의 용액에, (*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄산 (0.059 g, 0.272 mmol)에 이어 DCC (0.032 g, 0.157 mmol) 및 DMAP (6.39 mg, 0.052 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 다음에, 물 (10 mL)을 첨가하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM (3×10 mL)로 추출하고, 유기 층을 합하여, Na_2SO_4 상에서 건조한 후, 조 생성물로 농축하였다. 석유 에테르 중 35 % 에틸 아세테이트를 사용하여 용리하는 정제용 TLC에 의해 조 생성물을 정제함으로써, 정제된 생성물 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부타노에이트 (27 mg, 79 %)를 제공하였다. LC/MS (조건 A) RT = 2.523분, $(M+H)^+$ = 582.2. ^{1}H NMR (400MHz, 메탄올-d_4) δ 7.36 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.18 (s, 4H), 7.08 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 4.80 - 4.59 (m, *J*=10.0, 10.0, 5.0 Hz, 1H), 4.51 (d, *J*=15.0 Hz, 1H), 4.39 (d, *J*=15.0 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J*=8.3, 6.3 Hz, 1H), 3.72 (t, *J*=8.8 Hz, 1H), 3.56 - 3.40 (m, 1H), 3.32 - 3.22 (m, 2H), 2.86 - 2.61 (m, 2H), 2.47 (td, *J*=10.0, 5.0 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.32 - 2.23 (m, 1H), 2.22 - 2.01 (m, 2H), 1.88 (dd, *J*=9.5, 4.0 Hz, 2H), 1.74 (dt, *J*=13.4, 3.8 Hz, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.42 - 1.30 (m, 1H), 1.09 (dd, *J*=10.0, 7.0 Hz, 6H). ^{19}F NMR (376MHz, 메탄올-d4) δ -184.32.

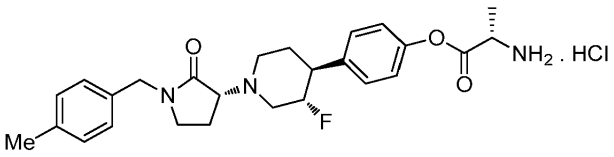
[0116] 단계 3B. (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노-3-메틸부타노에이트 히드로클로라이드

[0117] 

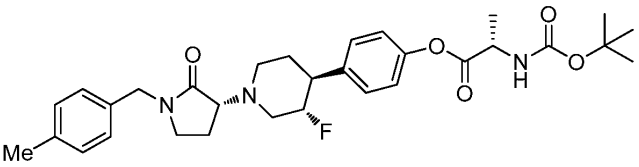
[0118] -20 ℃의 DCM (1.5 mL) 중 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부타노에이트 (0.025 g, 0.043 mmol)의 용액에, 디에틸 에테르 중 HCl (2.5 ml, 2.50 mmol, 1.0 M)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 10분에 걸쳐 천천히 rt로 가온한 다음, rt에서 19시간 동안 교반시켰다. 다음에, 진공에서 용매를 제거함으로써, 옅은 황색의 반고체를 제공하였다. 다음에, 15 mL/분으로 12분에 걸쳐 10 % 용매 B에서 75 % 용매 B의 구배를 사용하며 여기서 용매 A = 수중 0.05 % HCl이고 용매 B = 아세토니트릴인 선파이어(Sunfire) C18 (250×20 mm) 5 μm 컬럼에서의 RP-HPLC에 의해 조 생성물을 정제하였다. 활성 분획을 동결건조에 의해 농축함으로써, 오프-화이트 색상의 고체로서 실시예 2의

표제 화합물인 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노-3-메틸부타노에이트 히드로클로라이드 10.2 mg (44 %)을 제공하였다. LC-MS (방법 A) RT = 2.20분, $(M+H)^+$ = 482.2. ^{1}H NMR: (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 8.64 - 8.78 (m, 3H) 7.38 - 7.46 (m, 2H) 7.23 (d, J=8.53 Hz, 2H) 7.18 (s, 4H) 5.04 - 5.26 (m, 1H) 4.42 (d, J=9.54 Hz, 3H) 4.17 - 4.23 (m, 2H) 3.29 - 3.40 (m, 4H) 3.19 - 3.28 (m, 2H) 2.30 (s, 6H) 2.04 - 2.19 (m, 2H) 1.11 (dd, J=12.55, 7.03 Hz, 6H). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d6) δ -183.904.

[0119] 실시예 4. (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노프로파노에이트 히드로클로라이드

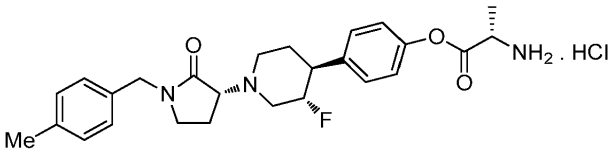
[0120] 

[0121] 단계 4A. (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)프로파노에이트

[0122] 

[0123] DCM (5 mL) 중 (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 (0.03 g, 0.078 mmol, 실시예 1)의 용액에, (*S*)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)프로판산 (0.077 g, 0.408 mmol)에 이어 DCC (0.049 g, 0.235 mmol) 및 DMAP (9.58 mg, 0.078 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 rt에서 18시간 동안 교반하였다. 다음에, 물 (15 mL)을 첨가하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM (3×15 mL)으로 추출하고, 유기 층을 합하여, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 조 생성물로 농축하였다. 석유 에테르 중 20 % 에틸 아세테이트를 사용하여 용리하는 정제용 TLC에 의해 조 생성물을 정제함으로써, 오프-화이트 색상의 반고체로서 정제된 생성물 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)프로파노에이트 (0.032 g, 0.058 mmol, 74 % 수율)를 제공하였다. LC-MS (방법 A) RT = 2.40분, $(M+H)^+$ = 554.2. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 7.51 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 7.44 - 7.32 (m, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.21 - 7.09 (m, 4H), 7.07 - 6.98 (m, *J*=8.5 Hz, 2H), 4.62 (d, *J*=4.5 Hz, 1H), 4.39 (d, *J*=15.1 Hz, 1H), 4.30 (d, *J*=15.1 Hz, 1H), 4.27 - 4.17 (m, 1H), 3.58 (t, *J*=8.5 Hz, 1H), 3.50 - 3.40 (m, 1H), 3.22 - 3.07 (m, 2H), 2.81 - 2.64 (m, 3H), 2.39 - 2.31 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.17 - 2.04 (m, 1H), 1.93 (dd, *J*=12.8, 8.3 Hz, 1H), 1.78 (br. s., 1H), 1.74 - 1.59 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.39 (d, *J*=2.5 Hz, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d6) δ -180.172.

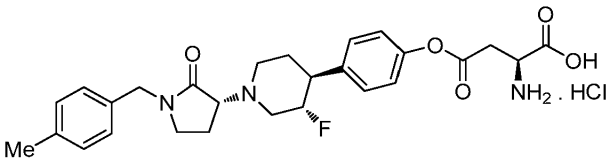
[0124] 단계 4B. (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노프로파노에이트 히드로클로라이드

[0125] 

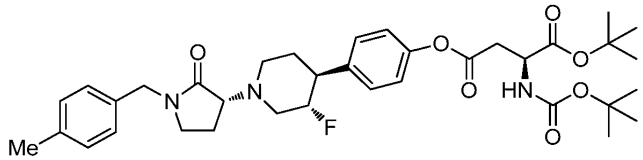
[0126] -20 ℃의 DCM (2 mL) 중 (S)-4-((3S,4S)-3-플루오로-1-((R)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)프로파노에이트 (0.032 g, 0.058 mmol)의 용액에, 디에틸 에테르 중 HCl (2.0 ml, 2.0 mmol, 1.0 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 10분에 걸쳐 천천히 rt로 가온한 다음, rt에서 19시간 동안 교반시켰다. 다음에, 진공에서 용매를 제거함으로써, 옅은 황색의 반고체를 제공하였다. 다음에,

15 mL/분으로 7분에 걸쳐 10 % 용매 B에서 40 % 용매 B의 구배를 사용하며 여기서 용매 A = 수중 0.05 % HCl이고 용매 B = 아세토니트릴인 키네텍스(Kinetex) C18 (250×20 mm) 5 ㎛ 컬럼에서의 RP-HPLC에 의해 조 생성물을 정제하였다. 활성 분획을 동결건조에 의해 농축함으로써, 오프-화이트 색상의 고체로서 실시예 4의 표제 화합물인 (*S*)-4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 2-아미노프로파노에이트 히드로클로라이드 4.7 mg (16 %)을 제공하였다. LC-MS (방법 A) RT = 1.762분, $(M+H)^+$ = 454. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 7.41 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.24 - 7.10 (m, 6H), 5.10 - 4.85 (m, 1H), 4.45 - 4.22 (m, 4H), 4.04 - 3.94 (m, 1H), 3.34 - 3.18 (m, 4H), 3.06 (d, *J*=12.0 Hz, 2H), 2.43 - 2.31 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.24 - 2.14 (m, 1H), 2.13 - 2.01 (m, 1H), 2.01 - 1.85 (m, 1H), 1.58 (d, *J*=7.0 Hz, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d6) δ -183.778.

[0127] 실시예 5. (*S*)-2-아미노-4-(4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페녹시)-4-옥소부탄산 히드로클로라이드

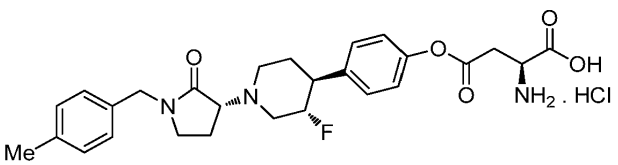
[0128] 

[0129] 단계 5A. (*S*)-1-*tert*-부틸 4-(4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐) 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)숙시네이트

[0130] 

[0131] DCM (5 mL) 중 (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)-1-(4-메틸벤질)피롤리딘-2-온 (0.03 g, 0.078 mmol)의 용액에, (*S*)-4-(tert-부톡시)-3-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-4-옥소부탄산 (0.118 g, 0.408 mmol)에 이어 DCC (0.049 g, 0.235 mmol) 및 DMAP (9.58 mg, 0.078 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 rt에서 18시간 동안 교반하였다. 다음에, 물 (15 mL)을 첨가하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM (3×15 mL)으로 추출하고, 유기 층을 합하여, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 조 생성물로 농축하였다. 석유 에테르 중 25 % 에틸 아세테이트를 사용하여 용리하는 정제용 TLC에 의해 조 생성물을 정제함으로써, 오프-화이트 색상의 반고체로서 정제된 생성물 (37 mg, 68 %)을 제공하였다. LC-MS (방법 A) RT = 2.55분, $(M+H)^+$ = 654.4. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 7.46 - 7.34 (m, 2H), 7.20 - 6.98 (m, 6H), 4.82 - 4.53 (m, 1H), 4.43 - 4.24 (m, 2H), 4.11 (d, *J*=14.1 Hz, 1H), 3.58 (t, *J*=8.8 Hz, 1H), 3.48 - 3.39 (m, 1H), 3.22 - 3.07 (m, 3H), 3.02 (dd, *J*=16.1, 6.5 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J*=15.8, 7.8 Hz, 1H), 2.78 - 2.63 (m, 2H), 2.38 - 2.31 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.17 - 2.03 (m, 1H), 1.98 - 1.86 (m, 1H), 1.78 (br. s., 1H), 1.74 - 1.58 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.39 (s, 9H). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d6) δ -180.707.

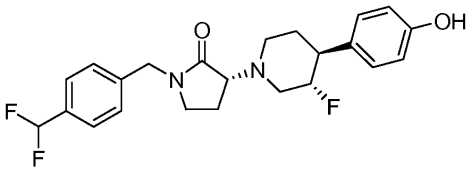
[0132] 단계 5B. (*S*)-2-아미노-4-(4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페녹시)-4-옥소부탄산 히드로클로라이드

[0133] 

[0134] -20 ℃의 DCM (2 mL) 중 (*S*)-1-*tert*-부틸 4-(4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐) 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)숙시네이트 (0.032 g, 0.049 mmol)의 용액에, 디에틸

에테르 중 HCl (2.0 ml, 2.0 mmol, 1.0 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 10분에 걸쳐 천천히 rt로 가온한 다음, rt에서 19시간 동안 교반시켰다. 다음에, 진공에서 용매를 제거함으로써, 옅은 황색의 반고체를 제공하였다. 다음에, 15 mL/분으로 7분에 걸쳐 10 % 용매 B에서 40 % 용매 B의 구배를 사용하며 여기서 용매 A = 수중 0.05 % HCl이고 용매 B = 아세토니트릴인 YMC 트리아르트(Triart) C18 (150×19 mm) 5 ㎛ 컬럼에서의 RP-HPLC에 의해 조 생성물을 정제하였다. 활성 분획을 동결건조에 의해 농축함으로써, 오프-화이트 색상의 고체로서 실시예 5의 표제 화합물인 (*S*)-2-아미노-4-(4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((*R*)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페녹시)-4-옥소부탄산 히드로클로라이드 17 mg (57 %)을 제공하였다. LC-MS (방법 A) RT = 1.808분, $(M+H)^+$ = 498.2. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 7.36 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.21 - 7.03 (m, 8H), 6.75 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 4.95 - 4.72 (m, 1H), 4.42 - 4.24 (m, 3H), 4.10 (t, *J*=5.3 Hz, 1H), 4.07 - 4.01 (m, 1H), 3.93 - 3.84 (m, 1H), 3.83 - 3.68 (m, 1H), 3.33 - 3.10 (m, 5H), 3.04 (br. s., 1H), 2.93 (br. s., 1H), 2.89 - 2.71 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.96 (br. s., 1H), 1.82 (br. s., 1H). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d6) δ -180.707.

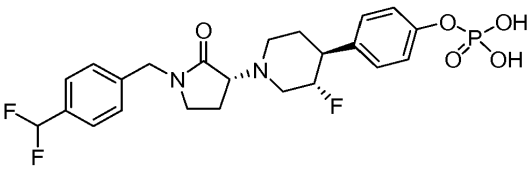
[0135] 실시예 6. (*R*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온



[0136]

[0137] 아세토니트릴 5.0 mL 중 (*S*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일 메탄술포네이트 (500 mg, 1.57 mmol, 중간체 M)의 용액을 85 ℃로 유지되는 아세토니트릴 5.0 mL 중 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로피페리딘-4-일)페놀 히드로클로라이드 (363 mg, 1.57 mmol, 중간체 F)와 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민 (1.09 mL, 6.26 mmol)의 교반 혼합물에 1.5시간에 걸쳐 적가하였다. 첨가 완료 후, 반응 혼합물을 85 ℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축하였다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (0-100 % EtOAc/헥산)를 사용하여 잔류물을 정제함으로써, 1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (235 mg, 35 % 수율)의 부분입체이성질체 혼합물 (락탐 입체중심의 부분적인 에피머화)을 산출하였다. 부분입체이성질체 혼합물 (780 mg)의 샘플을 정제용 키랄 SFC (컬럼 = 룩스 셀룰로스(Lux Cellulose)-2 (21×250 mm, 5 ㎛); 등용매성 용매 = 20 % 메탄올 (15 mM 암모니아 포함)/80 % CO_2; 온도 = 35 ℃; 유량 = 60 mL/분; 주사 부피 = 1.0 mL (MeOH 중 ~20 mg/mL) 13분 간격으로 누적; λ = 210 nM; 피크 1 = 19.6분, 피크 2 = 24.5분)에 의해 분리함으로써, 실시예 6의 표제 화합물 (피크-1, 389 mg) 및 (*S*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (피크 2, 242 mg)을 산출하였다. 실시예 6의 데이터: LC-MS m/z 419.3 $(M+H^+)$; ^{1}H NMR (500MHz, 클로로포름-d) δ 7.50 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 7.34 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 7.15 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.91 - 6.80 (m, 2H), 6.65 (t, *J*=56.4 Hz, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.77 - 4.43 (m, 3H), 3.68 (t, *J*=8.8 Hz, 1H), 3.42 - 3.33 (m, 1H), 3.29 - 3.14 (m, 2H), 2.85 (d, *J*=10.4 Hz, 1H), 2.78 - 2.69 (m, 1H), 2.69 - 2.57 (m, 1H), 2.48 (td, *J*=9.9, 4.9 Hz, 1H), 2.21 - 2.11 (m, 1H), 2.04 (dq, *J*=13.0, 8.6 Hz, 1H), 1.94 - 1.82 (m, 2H). 실시예 114, P-1의 상대적 및 절대적 배위는 단일 결정 X-선 분석에 의해 확인되었다.

[0138] 실시예 7. 4-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-1-((R)-1-(4-메틸벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트

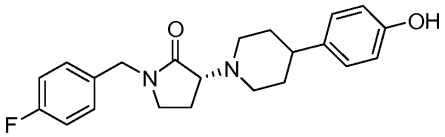


[0139]

[0140] 디클로로메탄 (10 mL) 중 (*R*)-1-(4-(디플루오로메틸)벤질)-3-((3*S*,4*S*)-3-플루오로-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (100 mg, 0.239 mmol, 실시예 6의 것)의 현탁액에, -20 ℃에서 트리에틸아민 (0.233 ml,

1.67 mmol)을 첨가하였다. 냉각된 용액에, -20 ℃에서 $POCl_3$ (0.111 ml, 1.20 mmol)를 첨가한 다음, 반응 혼합물을 -20 ℃에서 2-3시간 동안 교반하였다. 물 (10 mL)을 첨가하고, 혼합물을 1.5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄으로 추출하였다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과한 후, 진공에서 농축하였다. 용매 A = pH 4.5 수중 10 mM 암모늄 아세테이트 및 용매 B = 아세토니트릴의 구배를 사용하여 용리하는 루나 (LUNA) C8 (250 mm × 19 mm ID) 5 ㎛ 컬럼에서의 역상 정제용 HPLC에 의해 조 생성물을 정제하였다. 적절한 분획으로부터 동결건조에 의해 백색의 고체로서 실시예 7의 표제 화합물 (21 mg, 18 %)을 단리하였다. LCMS $(M+H)^+$ = 499.2; ^{1}H NMR (400MHz, 메탄올-d4) δ ppm 7.55 (d, *J*=8.03 Hz, 2H) 7.41 (d, *J*=8.03 Hz, 2H) 7.21 (s, 4H) 6.62 - 6.92 (m, 1H) 4.51 - 4.64 (m, 3H) 3.76 (t, *J*=8.78 Hz, 1H) 3.43 - 3.51 (m, 1H) 3.36 (d, *J*=6.02 Hz, 1H) 3.26 - 3.30 (m, 1H) 2.81 (br. s., 1H) 2.70 - 2.78 (m, 1H) 2.59 - 2.69 (m, 1H) 2.48 (td, *J*=9.91, 4.77 Hz, 1H) 2.17 - 2.27 (m, 1H) 2.06 - 2.15 (m, 1H) 1.80 - 1.89 (m, 2H).

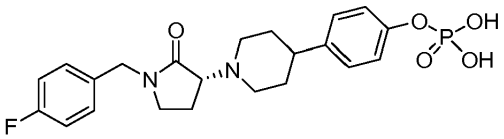
[0141] 실시예 8. (*R*)-1-(4-플루오로벤질)-3-(4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온



[0142]

[0143] -78 ℃인 N_2 분위기하의 무수 디클로로메탄 (100 mL) 중 1-(4-플루오로벤질)-3-(4-(4-메톡시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (3 g, 7.9 mmol, 중간체 S)의 용액에, 디클로로메탄 중 1 M 붕소트리브로마이드 (39 mL, 39 mmol)를 첨가하고, 생성 혼합물을 교반하면서 3시간에 걸쳐 실온까지 가온시켰다. 물 (30 mL)을 사용하여 반응액을 켄칭하고, 유기 층을 분리하여, 물 및 염수로 세척한 후, 농축하였다. 석유 에테르 중 15 % EtOAc를 사용하는 실리카 겔 상 속성 크로마토그래피에 의해 조 생성물을 정제함으로써, 라세미 1-(4-플루오로벤질)-3-(4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (2.1 g, 73 % 수율)을 산출하였다; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.49 - 1.74 (m, 4H) 1.90 - 2.11 (m, 2H) 2.24 - 2.42 (m, 2H) 2.65 - 2.80 (m, 2H) 2.99 - 3.23 (m, 3H) 3.40 - 3.54 (m, 1H) 4.27 - 4.46 (m, 2H) 6.61 - 6.70 (m, 2H) 6.95 - 7.04 (m, 2H) 7.17 - 7.31 (m, 4H) 9.10 - 9.16 (m, 1H). LCMS (ES-API) 369.2 m/z $(M+H)^+$. 3 mL/분의 총 유량으로, 35 % 용매 B를 사용하여 용리하며 여기서 용매 A = CO_2이고 용매 B = 메탄올 중 0.3 % DEA인 키랄팩(Chiralpak)-IA 250 mm × 4.6 mm 5 ㎛ 컬럼 상에서의 SFC를 통하여 라세미체의 일부 (40 mg)를 분리하였다. 피크 1은 4.35분의 RT를 나타내었으며 (11 mg), 피크 2는 6.29분의 RT를 나타내었다 (13 mg). 실시예 8 (피크 2)의 데이터: LC/MS $(M+H)^+$ = 369.2; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.47 - 1.59 (m, 1H) 1.65 - 1.75 (m, 1H) 1.84 - 1.96 (m, 1H) 2.03 - 2.12 (m, 1H) 2.24 - 2.43 (m, 1H) 2.63 - 2.72 (m, 2H) 2.72 - 2.85 (m, 2H) 2.96 - 3.05 (m, 2H) 3.09 - 3.23 (m, 2H) 3.41 - 3.54 (m, 1H) 4.23 - 4.50 (m, 2H) 6.58 - 6.71 (m, 2H) 6.96 - 7.10 (m, 2H) 7.15 - 7.21 (m, 2H) 7.26 - 7.34 (m, 2H) 9.06 - 9.19 (m, 1H).

[0144] 실시예 9. (*R*)-4-(1-(1-(4-플루오로벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트



[0145]

[0146] 옥시염화인 (1.27 mL, 13.6 mmol)를 THF (10 mL)가 충전되어 있는 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 얼음/메탄올 배스를 사용하여 용액을 0 ℃ 미만으로 냉각하였다. THF (18 mL) 중 (*R*)-1-(4-플루오로벤질)-3-(4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)피롤리딘-2-온 (1.00 g, 2.71 mmol, 실시예 8)의 현탁액을 첨가하였다. 5분 후, 5 ℃ 미만의 배스 온도에서 트리에틸아민 (0.946 mL, 6.79 mmol)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 90분 동안 교반하였다. 1 N 수성 수산화나트륨 (8.69 mL, 8.69 mmol)의 용액을 적가하였다. pH는 ~0인 것으로 측정되었다. 혼합물을 rt로 가온시키고, 3시간 동안 교반하였다. 조 반응 혼합물을 < 30 ℃의 진공에서 농축함으로써, 투명한 용액을 산출하였다. 용액을 1 N 수성 NaOH로 pH ~1까지 연화처리하였다. 혼합물을 얼음 배

스에서 냉각하였다. 반-고체를 분쇄하였다. 전체 액체를 경사분리하였다. 반-고체를 90 % 에탄올에 현탁시킨 다음, 진공 여과에 의해 수집하였다. 생성물은 (*R*)-4-(1-(1-(4-플루오로벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트의 HCl 염 (560 mg, 42 %)인 것으로 추정되었다. 메탄올 중 25 % 나트륨 메톡시드 (250 mg, 1.16 mmol)의 용액을 메탄올 중 (*R*)-4-(1-(1-(4-플루오로벤질)-2-옥소피롤리딘-3-일)피페리딘-4-일)페닐 디히드로겐 포스페이트 HCl (560 mg, 1.16 mmol)의 슬러리에 첨가하였다. 혼합물을 투명해질 때까지 교반한 다음, 진공에서 농축하였다. 잔류물을 90 % 에탄올/물에 용해시키고, 냉동고에서 냉각하였다. 진공 여과를 사용하여 고체 침전물을 수집하였다. 고진공하에서 고체를 건조함으로써, 실시예 9의 표제 화합물 (230 mg, 19 % 수율)을 산출하였다: LC/MS $(M+H)^+$ = 449.2; ^{1}H NMR (500MHz, 메탄올-d_4) δ 7.35 - 7.25 (m, 2H), 7.21 - 7.11 (m, 4H), 7.11 - 7.03 (m, 2H), 4.55 - 4.35 (m, 2H), 3.61 (t, J=8.8 Hz, 1H), 3.30 - 3.20 (m, 2H), 3.19 - 3.11 (m, 1H), 2.92 - 2.84 (m, 1H), 2.75 (td, J=11.1, 3.5 Hz, 1H), 2.55 - 2.41 (m, 2H), 2.23 - 2.13 (m, 1H), 2.12 - 2.00 (m, 1H), 1.84 - 1.70 (m, 4H); ^{31}P NMR (202 MHz, 메탄올-d_4) δ ppm -3.38.

[0147] 생물학적 방법

[0148] ***방사성리간드 결합 검정.*** ^{3}H Ro 25-6981을 사용하여 8-10주령의 수컷 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 래트 (하를란(Harlan), 네덜란드)의 전뇌에서 NR2B-하위유형 NMDA 수용체에 대한 결합을 결정하기 위한 결합 실험을 수행하였다 (문헌 [Mutel V; Buchy D; Klingelschmidt A; Messer J; Bleuel Z; Kemp JA; Richards JG . *Journal of Neurochemistry* , 1998, 70(5):2147-2155]). 래트를 마취 없이 길로틴 (동물 윤리 위원회에 의해 승인된 것)을 사용하여 참수하고, 수확된 뇌를 순간-동결하고, 멤브레인 제조를 위하여 3-6개월 동안 -80 ℃에서 저장하였다.

[0149] 멤브레인 제조를 위하여, 50 mM KH_2PO_4 (KOH를 사용하여 7.4로 pH 조정), 1 mM EDTA, 0.005 % 트리톤(Triton) X 100 및 프로테아제 억제제 칵테일 (시그마알드리치(Sigma Aldrich))로 구성되는 균질화 완충제 중에서, 20분 동안 얼음상에서 래트 전뇌를 해동하였다. 다운스(Dounce) 균질화기를 사용하여 해동된 뇌를 균질화하고, 48000 ×g로 20분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 저온 완충제에 재현탁하고, 다운스 균질화기를 사용하여 다시 균질화하였다. 이어서, 균질화물을 분취하여, 순간-동결한 후, -80 ℃에서 3-4개월 이하 동안 저장하였다.

[0150] 경쟁 결합 검정을 수행하기 위하여, 해동된 멤브레인 균질화물을 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다 (20 μg/웰). 실험 화합물을 100 % DMSO 중에 연속 희석하고 검정 플레이트의 각 열에 첨가함으로써, 검정 플레이트의 DMSO 농도를 최종 반응 부피의 1.33 %에서 유지하면서 원하는 화합물 농도를 달성하였다. 다음에, ^{3}H Ro 25-6981 (4 nM)을 검정 플레이트에 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 후, 멤브레인 결합 방사성리간드를 GF/B 필터 플레이트 (실온에서 1시간 동안 0.5 % PEI로 처리된 것) 상으로 수확하였다. 필터 플레이트를 50 ℃에서 20분 동안 건조하고, 마이크로신트(microscint) 20과 함께 10분 동안 인큐베이션한 후, 최종적으로 탑카운트(TopCount) (퍼킨 엘머(Perkin Elmer))에서 계수(count)를 판독하였다. MK-0657 (이 화합물의 제조에 대해서는 WO 2004 108705호에 실시예 1로 기재되어 있음) (40 μM)을 사용하여 비-특이적 결합을 결정하였다. CPM 값을 % 억제로 전환하고, 맞춤 제작된 소프트웨어를 사용하여 농도 반응 곡선을 플롯팅하였다. 각 실험을 2회 이상 반복하여 실험 화합물에 대한 최종 결합 K_i 값을 수득하였다. 이 검정법을 사용하여, 실시예 1의 화합물은 4 nM의 결합 Ki를 나타내었으며, 실시예 6의 화합물은 4 nM의 결합 Ki를 나타내었고, 실시예 8의 화합물은 1.4 nM의 결합 Ki를 나타내었다.

[0151] ***생체외 점유 검정.*** 본 검정은 실시예 1의 화합물이 투여 후 동물에서 뇌-상주성 NR2B-하위유형 수용체를 점유한다는 것을 입증한다. 7-9주령의 수컷 CD-1 마우스에 10 % 디메틸아세트아미드, 40 % PEG-400, 30 % 히드록시프로필 베타시클로덱스트린 및 30 % 물로 구성되는 비히클 중 실험 화합물을 정맥내로 투여하고, 투여 15분 후 참수에 의해 전뇌를 수확하였다. 뇌 샘플을 즉시 순간-동결하여, -80 ℃에서 저장하였다. 다음날, 투여된 뇌 샘플을 얼음 상에서 15-20분 동안 해동한 후, 이어서 50 mM KH_2PO_4 (KOH를 사용하여 7.4로 pH 조정), 1 mM EDTA, 0.005 % 트리톤 X 100 및 프로테아제 억제제 칵테일 (시그마알드리치)로 구성되는 저온 균질화 완충제 중에서 폴리트론(Polytron)을 사용하여 10초 동안 균질화하였다. 다운스 균질화기를 사용하여 조 균질화물을 추가적으로 균질화한 후, 모든 동물로부터의 균질화된 멤브레인 분취액을 급속-동결하여, 추가 사용시까지 -80 ℃에서 저장하였다. 모든 균질화 과정은 얼음 상에서 수행하였다.

[0152] 점유율을 측정하기 위하여, 먼저 멤브레인 균질화물을 얼음 상에서 해동한 다음, 25 게이지 니들(needle)을 사용하여 니들-균질화하였다. 균질화된 멤브레인 (6.4 mg/ml)을 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 이어서 ^{3}H Ro 25-6981 (6 nM)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 4 ℃의 진탕기에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, GF/B 필터 플레이트 (실온에서 1시간 동안 0.5 % PEI로 처리된 것) 상으로 수확하였다. 필터 플레이트를 50 ℃에서 20분 동안 건조하고, 마이크로신트 20과 함께 10분 동안 인큐베이션한 후, 탑카운트 (퍼킨 엘머)에서 판독하였다. 각 용량 또는 화합물 군은 4-5마리의 동물로 구성되었다. 대조 동물 군에는 비히클 단독을 투여하였다. 각 동물로부터의 멤브레인을 삼중으로 검정 플레이트에 첨가하였다. 비히클-투여 동물로부터의 멤브레인 균질화물을 함유하는 웰에 첨가된 10 μM Ro 25-6981을 사용하여 비-특이적 결합을 결정하였다. 특이적 계수/분은 하기의 방정식을 사용하여 각 동물에 대하여 각 화합물 용량에서 % 점유율로 전환하였다:

[0153] % 점유율 (동물 A)

$$= 100 - \left(\frac{\textit{동물 A의 특이적 CPM}}{\textit{대조군의 평균 CPM}} \times 100\right)$$

[0154]

[0155] 이 절차를 사용하여, 실시예 1의 화합물은 3 mg/Kg의 i.v. 투여 후 95 %의 NR2B 수용체 점유율을 나타내었다. 약물 수준은 통상적인 방식으로 질량 분광분석법에 의해 측정하였다. 이 용량에서 혈장에서의 약물 수준은 1106 nM이었으며, 균질화된 뇌 조직에서의 약물 수준은 1984 nM이었다. 실시예 6의 화합물은 3 mg/Kg의 i.v. 투여 후 97 %의 NR2B 수용체 점유율을 나타내었다. 이 용량에서 혈장에서의 약물 수준은 1800 nM이었으며, 균질화된 뇌 조직에서의 약물 수준은 2200 nM이었다. 실시예 8의 화합물은 3 mg/Kg의 i.v. 투여 후 96 %의 NR2B 수용체 점유율을 나타내었다. 이 용량에서 혈장에서의 약물 수준은 570 nM이었으며, 균질화된 뇌 조직에서의 약물 수준은 900 nM이었다.

[0156] ***hERG 전기생리학 검정.*** 패치 클램프(patch clamp) 기술을 사용하여 hERG 채널을 안정적으로 발현하는 HEK 293 세포에서 hERG 활성에 대하여 실험 화합물들을 평가하였다. hERG 발현 세포가 플레이팅된 커버슬립(coverslip)을 실험 챔버에 위치시키고, 실온에서 하기로 구성되는 (mM로 나타냄) 용액을 관류하였다: 140 NaCl, 4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 글루코스, 10 HEPES (pH 7.4, NaOH). 보로실리케이트 패치 피펫은 하기를 함유하는 내부 용액으로 충전되었을 때, 2-4 Mohm의 팁 저항을 가졌다: 130 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 EGTA, 10 HEPES, 5 ATP-K_2 (pH 7.2, KOH). 피클램프(pClamp) (액손 인스트루먼츠(Axon instruments)) 소프트웨어에 의해 제어되는 악소패치(Axopatch) 200B (액손 인스트루먼츠, 캘리포니아 유니온 시티) 패치 클램프 증폭기를 사용하여 전세포 구성에서 -80 mV로 세포를 클램핑하였다. 기가실(gigaseal)의 형성시, 하기의 전압 프로토콜을 반복적으로 (0.05 Hz) 적용하고 테일 전류(tail current)를 기록하였다: 2초 동안의 -80 mV에서 +20 mV로의 탈분극 단계 후, 테일 전류를 유도하기 위한 -65 mV (3초)로의 과분극 단계, 및 이후의 유지 전위로의 복귀. 테일 전류의 안정화 후, 화합물을 적용하였다. 먼저, 세포외 용액 단독 (대조)의 존재하에, 및 이어서 증가하는 농도의 화합물을 함유하는 세포외 용액에서, 테일 전류를 기록하였다. 각 화합물 농도는 2-5분 동안 적용하였다. 대조 용액의 존재하에 기록된 피크 테일 전류에 대비한 피크 테일 전류의 감소로서, 각 농도에서의 백분율 억제를 계산하였다. 데이터 분석은 맞춤 제작된 소프트웨어에서 수행하였다. 서로 다른 농도에서의 퍼센트 억제를 플롯팅함으로써 농도 반응 곡선을 수득하고, 이어서 그것을 4 파라미터 방정식과 피팅하여 hERG IC_{50} 값을 계산하였다. 이 절차를 사용하여, 실시예 1의 화합물은 IC_{50} = 28 μM인 불량한 hERG 채널 억제제이었다. 실시예 6의 화합물은 IC_{50} = 13.5 μM인 불량한 hERG 채널 억제제이었다.

[0157] ***마우스 강제 수영 시험 (mFST).*** 강제 수영 시험 (FST)은 전임상 연구에서 항우울제 화합물을 평가하는 데에 사용되는 동물 모델이다. 변형된 포르솔트(Porsolt) 등의 방법 (문헌 [Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 1977; 229:327-36])과 유사하게 FST를 수행하였다. 이 패러다임에서, 마우스는 물로 채워진 탈출불가능한 실린더 내에서 수영하도록 강제된다. 이러한 조건하에서, 마우스는 처음에는 탈출하기 위한 노력을 하게 되며, 궁극적으로는 부동 거동을 나타내게 되는데; 이와 같은 거동은 수동적인 스트레스-대응 전략 또는 우울증-유사 거동으로 해석된다. 수영 탱크는 플라스틱으로 제작된 박스 내부에 위치시켰다. 각 탱크는 실린더 높이까지의 불투명한 플라스틱 시트에 의해 서로 분리하였다. 한번에 3마리의 마우스를 시험에 적용하였다. 물 (20-cm 깊이, 24-25 ℃로 유지)이 담긴 개별 유리 실린더 (46 cm 높이 × 20 cm 직경) 내에 마우스를 위치시키는 것에 의해, 6분 동안 수영 기간을 수행하였다. 이 물 높이에서는, 마우스 꼬리가 용기의 바닥에 닿지 않는다. 물속에

서 허우적거리지 않고 마우스가 수동적으로 떠서 유지되거나 그의 코/머리를 물 위로 유지하거나 떠서 유지하는 데에 필요한 동작만을 수행하는 경우, 마우스가 부동인 것으로 판단하였다. 총 6분의 시험 동안 부동 기간을 평가하고, 부동 기간 (초)으로 나타내었다. 각 마우스는 1회만 시험하였다. 각 기간 종료시에는, 마우스를 건조한 천으로 건조한 후, 체온저하를 방지하기 위한 열 블랭킷 상에 위치한 그의 원래의 케이지로 돌려보냈다. 물은 각 시험 후 교체하였다. 모든 시험 기간을 비디오 카메라 (소니 핸디캠(Sony Handicam), 모델: DCR-HC38E; PAL)로 기록하고, 포스드 스윔 스캔(Forced Swim Scan) 버전 2.0 소프트웨어 (미국 버지니아 레스턴 소재 클레버 시스템즈 인크(Clever Systems Inc.); 문헌 [Hayashi E, Shimamura M, Kuratani K, Kinoshita M, Hara H. Automated experimental system capturing three behavioral components during murine forced swim test. Life Sci. 2011 Feb 28;88(9-10):411-7] 및 [Yuan P, Tragon T, Xia M, Leclair CA, Skoumbourdis AP, Zheng W, Thomas CJ, Huang R, Austin CP, Chen G, Guitart X. Phosphodiesterase 4 inhibitors enhance sexual pleasure-seeking activity in rodents. Pharmacol Biochem Behav. 2011; 98(3):349-55] 참조)를 사용하여 점수화를 수행하였다. NCE 시험을 위하여: 수영 기간 15분 전에 i.v. 경로에 의해 마우스에 시험 화합물을 투여하고, 다음 6분 동안 부동 시간을 기록하였다. FST 종료시, 빠른 참수 방법에 의해 마우스를 안락사시키고, 혈장 및 뇌 샘플을 수집한 후, 추가 분석시까지 -80 ℃에서 저장하였다. 마우스 강제 수영 검정에서, 실시예 1의 화합물은 pH 4의 30 % 히드록시프로필 베타시클로덱스트린/70 % 시트레이트 완충제인 비히클 중에서 5 mL/Kg의 투여 부피로 정맥내 투여되었다. 실시예 1의 화합물은 이러한 조건하의 1 mg/Kg에서 통계적으로 유의한 부동 시간의 감소를 나타내었다. 이 용량에서, 약물 수준은 혈장에서 268 +/- 128 nM, 그리고 뇌에서 749 +/- 215 nM이었다. NR2B 수용체 점유율은 상기에서 기록된 바와 같이 결정되었는데, 73 %인 것으로 결정되었다. 실시예 6의 화합물은 동일한 조건하의 1 mg/Kg에서 통계적으로 유의한 부동 시간의 감소를 나타내었다. 약물 수준은 혈장에서 360 nM이었다. NR2B 수용체 점유율은 79 %인 것으로 결정되었다.