



등록특허 10-2311234



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월12일

(11) 등록번호 10-2311234

(24) 등록일자 2021년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01) C07D 413/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 487/04 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7035575

(22) 출원일자(국제) 2014년06월26일

심사청구일자 2019년06월11일

(85) 번역문제출일자 2015년12월16일

(65) 공개번호 10-2016-0026880

(43) 공개일자 2016년03월09일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/063467

(87) 국제공개번호 WO 2014/207082

국제공개일자 2014년12월31일

(30) 우선권주장

13174108.4 2013년06월27일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

JP2008222557 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이선희

(54) 발명의 명칭 바이러스 감염 및 기타 질환의 치료를 위한 피롤로[3,2-D]파리미딘 유도체

(57) 요 약

본 발명은 피롤로[3,2-d]파리미딘 유도체, 그 제조 방법, 약제학적 조성물 및 질환의 치료 및/또는 치료요법에서의 그들의 사용에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07D 413/12 (2013.01)

C07D 413/14 (2013.01)

(72) 발명자

라스트 스테판 울리엔

벨기에 베-2547 린트 크라우벨쇼에베 59

엠브레히츠 베르너

벨기에 베-2340 비어세 브램스트라트 7

온커스 팀 휴고 마리아

벨기에 베-2220 하이스트-오프-덴-베르크 볼로스트
라트 2아

라보이송 피에르 장-마리 베르나르

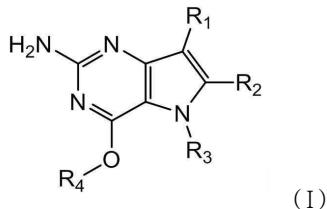
벨기에 베-1331 로지레스 뤼 졸리에 3

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물:



여기서,

R₁은 H, 불소 또는 메틸이고;

R₂는 H, 할로겐 또는 C₁₋₃ 알킬이고;

R₃는, 아릴옥시, 헤테로아릴옥시, 헤테로사이클, 할로겐, 아릴, 헤테로아릴, 알킬아미노, 디알킬아미노, C₁₋₆ 알킬, 카복실산, 카복실 에스테르, 카복실 아미드, 니트릴, 또는 C₁₋₆ 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C₁₋₆ 알킬이거나;

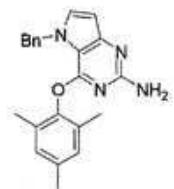
R₃는, 할로겐, 아릴옥시, 헤�테로아릴옥시, 아릴, 헤�테로아릴, 알킬아미노, 디알킬아미노, C₁₋₆ 알킬, 카복실산, 카복실 에스테르, 카복실 아미드, 술폰아미드, 니트릴, 또는 C₁₋₆ 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 알킬아릴 또는 알킬헤테로아릴이고;

R₄는, 하이드록실, C₁₋₆ 알킬, C₃₋₇ 사이클로알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₁₋₆ 알킬로 선택적으로 더 치환된 C₃₋₇ 사이클로알킬, 및 C₁₋₆ 알킬로 선택적으로 더 치환된 헤�테로아릴로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C₁₋₆ 알킬이거나;

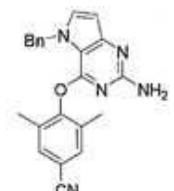
R₄는, 할로겐, 아릴옥시, 헤�테로아릴옥시, 아릴, 헤�테로아릴, 알킬아미노, 디알킬아미노, C₁₋₆ 알킬, 카복실산, 카복실 에스테르, 카복실 아미드, 술폰아미드, 니트릴, 또는 C₁₋₆ 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 알킬아릴 또는 알킬헤테로아릴이고;

여기서, 상기 헤�테로아릴은 N, O 및 S로부터 선택된 하나 또는 2개의 헤테로원자를 포함하되;

단, 상기 화합물은, 하기 2개의 화합물을 제외한 화합물이다:



(5-벤질-4-(메시틸옥시)-5H-피롤로[3,2-d]파리미딘-2-아민)



(4-(2-아미노-5-벤질-5H-피롤로[3,2-d]파리미딘-4-일옥시)-3,5-디메틸벤조니트릴).

청구항 2

제1항에 있어서, R_3 는 (치환 또는 비치환) CH_2 -아릴기이고, R_1 , R_2 , 및 R_4 는 제1항에 기술된 바와 같은, 화합물.

청구항 3

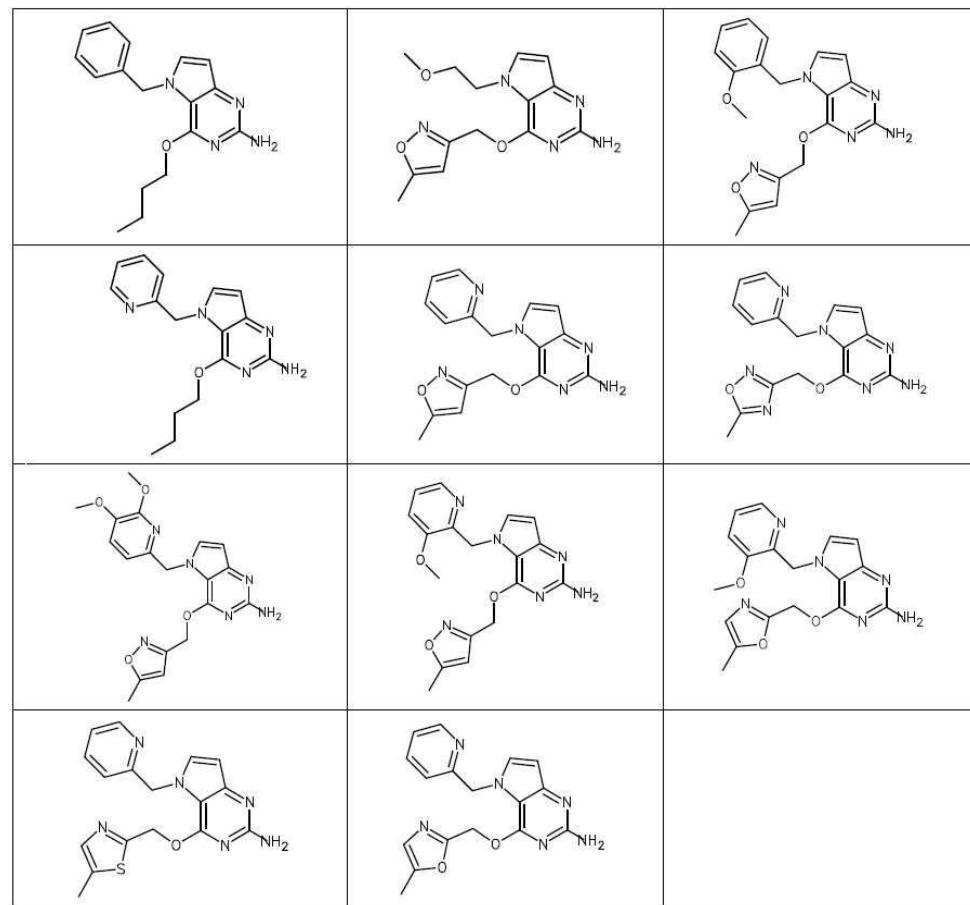
제1항에 있어서, R_3 는 제1항에 기술된 바와 같이 선택적으로 더 치환된 CH_2 -아릴기 또는 CH_2 -헵테로아릴기이고, R_4 는 CH_2 -헵테로아릴기이며, R_1 및 R_2 는 제1항에 기술된 바와 같은, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, R_1 은 불소이고, R_2 는 수소이고, R_3 및 R_4 는 제1항에 기재된 바와 같은, 화합물.

청구항 5

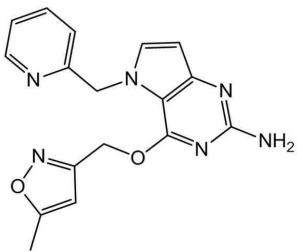
제1항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물이 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 화합물:



청구항 6

제1항에 있어서, 아래의 화학적 구조를 가지는 화합물:

[화학식 (II)]



청구항 7

하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제, 희석제, 또는 담체와 함께 제1항 또는 제6항에 따른 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는, 바이러스 감염 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한, 제1항 또는 제6항에 따른 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 피롤로[3,2-*d*]페리미딘 유도체, 그 제조 방법, 약제학적 조성물 및 질환의 치료 및/또는 치료요법에서의 그들의 사용에 관한 것이다.

[0002]

본 발명은 피롤로[3,2-*d*]페리미딘 유도체의 사용, 보다 상세하게는 틀-유사 수용체(TLR)의 조절 또는 작용이 관여하는 바이러스 감염, 면역 또는 염증 장애의 치료에서의 피롤로[3,2-*d*]페리미딘 유도체의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

틀-유사 수용체는 세포외 루이신 풍부 도메인 및 보존 영역을 포함하는 세포질 확장을 특징으로 하는 1차 경막 단백질이다. 선천성 면역시스템은 특정 타입의 면역 세포의 세포 표면상에 발현된 이를 틀-유사 수용체들을 통해 병원체-관련 분자 패턴을 인식할 수 있다. 외래 병원체의 인식은 사이토킨의 생성 및 세포상의 공-자극 분자의 상향 조절을 활성화한다. 이는 T 세포 행동의 조절을 이끈다.

[0004]

대부분의 포유류 종은 10 내지 15개 타입의 틀-유사 수용체를 갖고 있다. 13개의 TLR들(간단히, TLR1 내지 TLR13로 명명)이 인간 및 마우스에서 확인되었으며, 이를 다수의 등가 형태가 다른 포유류 종에서 발견되었다. 그러나 인간에서 발견된 특정 TLR의 등가물들이 모든 포유류에 존재하는 것은 아니다. 예를 들면, 인간에서 TLR10과 유사한 단백질을 코딩하는 유전자가 마우스에 존재하지만, 레트로바이러스에 의해 과거 어떤 시점에서 손상된 것으로 보인다. 한편, 마우스는 TLR 11, 12 및 13을 발현하나, 이를 중 어떤 것도 인간에서는 나타나지 않는다. 다른 포유류는 인간에서 발견되지 않는 TLR들을 발현할 수 있다. 다른 비-포유류 종은, 타키푸구 복어에서 발견되는 TLR14에 의해 입증되는 바와 같이, 포유류와 다른 TLR들을 가질 수 있다. 이는 인간의 선천성 면역의 모델로서 실험 동물을 사용하는 과정을 복잡하게 할 수 있다.

[0005]

틀 유사 수용체에 관한 리뷰는 하기 학술지 논문을 참조한다. Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, p33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., *Annual Rev. Immunology*, 21, p335-376, 2003; Ulevitch, R. J., *Nature Reviews: Immunology*, 4, p512-520, 2004.

[0006]

WO2000/006577에서의 헤테로사이클 유도체, WO98/01448 및 WO99/28321에서의 아데닌 유도체 및 WO2009/067081에서 피리미딘들과 같은 틀-유사 수용체에 대해 활성을 나타내는 화합물이 이전에 기술된 바 있다.

[0007]

일정한 바이러스 감염의 치료에서는, C형 간염 바이러스(HCV)의 경우에서처럼, 인터페론(IFN-알파)의 주기적 주사가 투여될 수 있다. 경구로 이용가능한 소분자 IFN 유도인자는 잠재적인 이점을 제공하는데, 감소된 면역원성 및 투여의 편의성이다. 따라서, 신규한 IFN 유도인자는 바이러스 감염의 치료를 위한 잠재적으로 효과적인 새로운 유형의 약물이다. 항바이러스 효과를 가지는 소분자 IFN 유도인자의 문헌 내 하나의 예는 문헌(De Clercq,

E.; Descamps, J.; De Somer, P. *Science* 1978, 200, 563-565)을 참조한다.

[0008] 인터페론 α 는, 또한, 일정한 유형의 암의 치료에서 다른 약물들과 조합하여 환자에게 제공된다. 또한, TLR 7/8 아고니스트들도 백신 어쥬번트로서 관심을 받고 있는데, 이는 현저한 Th1 반응을 유도하는 TLR 7/8 아고니스트들의 능력 때문이다.

[0009] 그러나, 선행기술의 화합물에 비해 바람직한 선택성, 및 개선된 안전성 프로파일을 갖는 신규한 톨-유사 수용체 조절제에 대한 강한 요구가 존재한다.

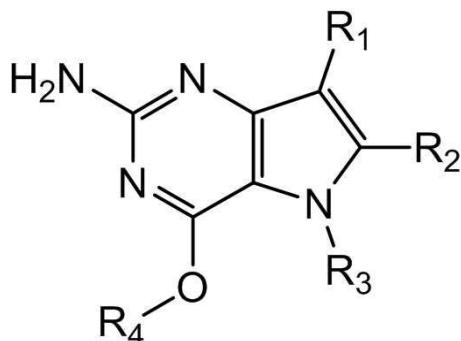
발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명에 따르면, 화학식 (I)의 화합물, 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 그의 다형이 제공되며,

[0011] [화학식 (I)]



[0012]

[0013] R_1 은 H, 불소 또는 메틸이고;

[0014] R_2 는 H, 할로겐 또는 C_{1-3} 알킬이고;

[0015] R_3 는 아릴옥시, 헤테로사이클, 할로겐, 아릴, 알킬아미노, 디알킬아미노, C_{1-6} 알킬, 카복실산, 카복실 에스테르, 카복실 아미드, 니트릴, 또는 C_{1-6} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이거나;

[0016] R_3 는 할로겐, 아릴옥시, 아릴, 알킬아미노, 디알킬아미노, C_{1-6} 알킬, 카복실산, 카복실 에스테르, 카복실 아미드, 술폰아미드, 니트릴, 또는 C_{1-6} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 알킬아릴이고;

[0017] R_4 는 하이드록실, C_{1-6} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬, C_{2-6} 알케닐 또는 C_{1-6} 알킬에 의해 선택적으로 더 치환된 아릴 및 C_{1-6} 알킬로 선택적으로 더 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이거나;

[0018] R_4 는 할로겐, 아릴옥시, 아릴, 알킬아미노, 디알킬아미노, C_{1-6} 알킬, 카복실산, 카복실 에스테르, 카복실 아미드, 술폰아미드, 니트릴, 또는 C_{1-6} 알콕시로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 알킬아릴이다.

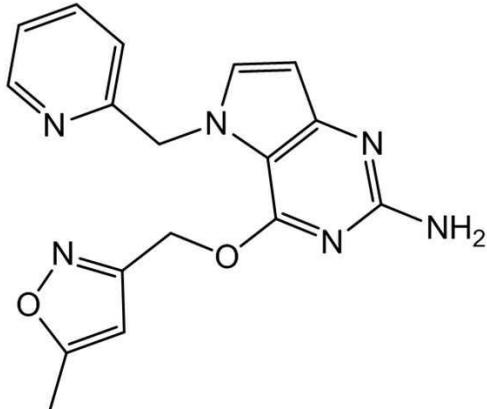
[0019] 바람직한 화합물은 화학식 (I)의 화합물로서, R_3 는 (치환 또는 비치환) CH_2 -아릴기이고, R_1 , R_2 , 및 R_4 는 전술된 바와 같다.

[0020] 제2 구현예는 화학식 (I)의 화합물로서, R₃ 및 R₄는 전술된 바와 같이 선택적으로 더 치환된 CH₂-아릴기이고, R₁, 및 R₂는 전술된 바와 같다.

[0021] 다른 바람직한 구현예는 화학식 (I)의 화합물로서, R₁은 불소이고, R₂는 수소이며, R₃ 및 R₄는 전술된 바와 같다.

[0022] 가장 바람직한 화합물은 아래의 화학적 구조를 가지는 화학식 (II)의 화합물이다:

[0023] [화학식 (II)]



[0024]

[0025] 화학식 (I) 및 (II)의 화합물 및 그 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 다행은 의약품, 특히 톨-유사 수용체(특히 TLR7 활성의 조절제)로서의 활성을 갖는다.

[0026] 추가 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제, 희석제 또는 담체와 함께, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물 또는 다행을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0027] 나아가, 본 발명에 따른 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 또는 다행 또는 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 또는 다행을 포함하는 약제학적 조성물은 약제로서 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 측면은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 또는 다행 또는 상기 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 그 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 또는 다행을 포함하는 약제학적 조성물을 TLR7의 조절에 관련된 임의의 질병의 치료에 사용할 수 있다는 것이다.

[0029] 용어 "알킬"은 특정 수의 탄소 원자를 함유하는 직쇄, 또는 분지쇄 포화 지방족 탄화수소를 지칭한다.

[0030] 용어 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 지칭한다.

[0031] 용어 "알킬아릴"은 아릴(여기서, "아릴"은 아래에 정의된 바와 같음)로 치환된 특정 수의 탄소 원자를 함유하는 직쇄, 또는 분지쇄 포화 지방족 탄화수소를 지칭한다.

[0032] 용어 "알케닐"은, 적어도 2개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합으로 이루어진, 위에서 정의된 바와 같은 알킬을 지칭한다.

[0033] 용어 "사이클로알킬"은 특정 수의 탄소 원자를 함유하는 탄소환 고리를 지칭한다.

[0034] 용어 "알콕시"는, 예를 들어 메톡시기 또는 에톡시기와 같이, 산소에 단일 결합된 알킬(탄소 및 수소 사슬)기를 지칭한다.

[0035] 용어 "아릴"은 N, O 및 S, 특히 N 및 O로부터 선택된 하나 또는 2개의 헤테로원자를 선택적으로 포함하는 방향족 고리 구조를 의미한다. 상기 방향족 고리 구조는 5, 6 또는 7개의 고리 원자를 가질 수 있다. 특히, 상기 방향족 고리 구조는 5 또는 6개의 고리 원자를 가질 수 있다.

[0036] 용어 "아릴옥시"는 방향족 고리 구조를 지칭한다. 상기 방향족 고리는 산소에 단일 결합된다.

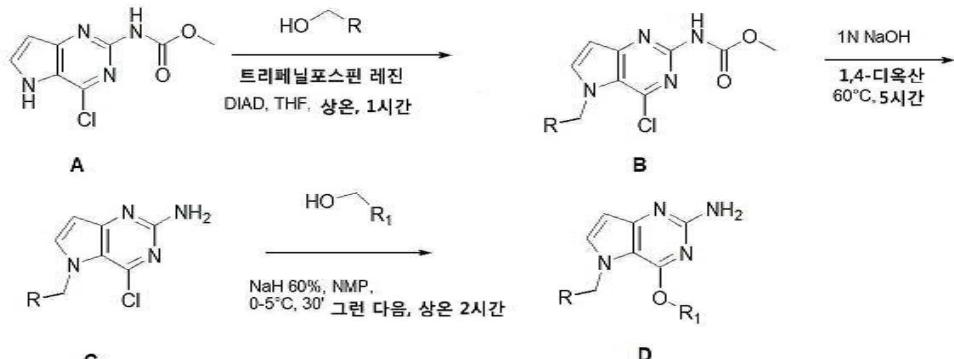
- [0037] 용어 "헤테로사이클"은 포화되거나 부분적으로 포화되고, 테트라하이드로퓨란, 디옥산 또는 다른 환형 에테르를 포함하는 분자를 지칭한다. 질소를 함유하는 헤테로사이클은, 예를 들어 아제티딘, 모폴린, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘 등을 포함한다. 다른 헤테로사이클은, 예를 들어, 티오모폴린, 디옥솔리닐, 및 환형 설폰을 포함한다.
- [0038] 화학식 (I) 및 (II)의 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 이들의 산부가염 및 염기염을 포함한다. 적당한 산부가염은 비-독성 염을 형성하는 산으로부터 형성된다. 적당한 염기염은 비-독성 염을 형성하는 염기로부터 형성된다.
- [0039] 본 발명의 화합물은 또한 비용매화 및 용매화 형태로 존재할 수 있다. 용어 "용매화물"은 본원에 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 용매 분자, 예를 들면, 에탄올을 포함하는 분자 복합체를 기술하기 위해 사용된다.
- [0040] 용어 "다형"은 둘 이상의 형태 또는 결정 구조로 존재하는 본 발명의 화합물의 능력을 지칭한다.
- [0041] 본 발명의 화합물은 결정형 또는 무정형 산물로 투여될 수 있다. 이들은 예를 들면 침전, 결정화, 동결 건조, 분무 건조 또는 증발 건조와 같은 방법에 의해 예컨대 고체 플러그, 분말 또는 필름으로서 수득될 수 있다. 이들은 단독으로 또는 본 발명의 하나 이상의 다른 화합물과 조합하여 또는 하나 이상의 다른 약물과 조합하여 투여될 수 있다. 일반적으로 이들은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 제제로서 투여될 것이다. 용어 "부형제"는 본 발명에서 본 발명의 화합물 이외의 임의의 성분을 기술하기 위해 사용된다. 부형제의 선택은 주로 특정 투여 모드, 용해도 및 안정성에 대한 부형제의 효과 및 제형의 성질과 같은 인자에 의존한다.
- [0042] 본 발명의 화합물 또는 이들의 임의의 하위그룹은 투여 목적에 따라 다양한 약제학적 형태로 제제화될 수 있다. 적합한 조성물로서 전신 투여 약물에 통상적으로 채용되는 모든 조성물이 인용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물을 제조하기 위하여, 유효량의 특정 화합물, 선택적으로 염 형태를 활성성분으로서 약제학적으로 허용 가능한 담체와 친밀한 혼합에 의해 합하고, 이때 담체는 투여에 바람직한 제제 형태에 따라 다양한 형태를 가질 수 있다. 이들 약제학적 조성물은 바람직하게 예를 들면, 경구, 직장 또는 경피 투여에 적합한 단일 제형으로 존재한다. 예를 들면, 경구 제형의 조성물을 제조하는데 임의의 통상적인 약제학적 매질이 채용될 수 있으며, 혼탁액, 시럽, 엘리실, 에멀젼 및 용액과 같은 경구 액체 제제의 경우에는 예를 들면, 물, 글리콜, 오일, 알콜 등; 분말, 필, 캡슐 및 정제의 경우에는 전분, 슈가, 카울린, 희석제, 활택제, 결합제, 봉해제 등과 같은 고체 담체를 채용할 수 있다. 투여의 편의성 때문에, 경제 및 캡슐제는 가장 유용한 경구 복용 단위 형태를 대표하며, 이 경우 고체 약제학적 담체가 자명하게 채용된다. 또한 사용 직전 액체 형태로 전환될 수 있는 고체 형태 제제도 포함된다. 경피 투여에 적합한 조성물에서 담체는 선택적으로 투과 증강제 및/또는 적당한 습윤제를 포함하며, 선택적으로 피부에 상당한 유해효과를 일으키지 않는 적합한 임의의 성질의 첨가제를 부차적 비율로 조합할 수 있다. 상기 첨가제는 피부 투여를 촉진하며/하거나 원하는 조성물을 제조하는데 도움이 될 수 있다. 이들 조성물은 다양한 방식, 예컨대 경피 패치, 스폽-온, 연고로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 흡입 또는 통기를 통해 이러한 방식으로 투여하기 위해 당업계에 사용되는 방법 및 제형으로 투여될 수 있다. 따라서, 일반적으로 본 발명의 화합물은 용액, 혼탁액 또는 건조 분말의 형태로 폐에 투여될 수 있다.
- [0043] 투여 편의성 및 용량 균일성을 위해 전술한 약제학적 조성물을 단위 제형으로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 발명에서 단위 제형은 요구되는 약제학적 담체와 함께 바람직한 치료학적 효과를 산출하도록 계산된 예정된 양의 활성 성분을 포함하는 단위로, 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 구별되는 단위들을 지칭한다. 이러한 단위 제형의 예는 정제(분할선이 있는 정제 또는 코팅된 정제를 포함), 캡슐, 필, 분말 패킷, 웨이퍼, 좌제, 주사 가능한 용액 또는 혼탁액 등 및 이들의 분리된 배수들이다.
- [0044] 감염 질환의 치료분야의 당업자는 후술하는 검사 결과로부터 유효량을 결정할 수 있다. 일반적으로 유효 일일량은 0.01 mg/체중 kg 내지 50 mg/체중 kg, 더 바람직하게 0.1 mg/체중 kg 내지 10 mg/체중 kg으로 사료된다. 요구되는 용량을 하루에 걸쳐 적합한 간격으로 둘, 셋, 넷 이상의 하위-용량으로 투여하는 것이 적합할 수 있다. 상기 하위-용량은 예컨대 단위 제형당 1 내지 1000 mg, 및 특히 5 내지 200 mg의 활성성분을 포함하는 단위 제형으로서 제형화될 수 있다.
- [0045] 정확한 용량과 투여빈도는 당업자에 알려져 있는 바와 같이, 사용되는 특정 화학식 (I)의 화합물, 치료될 특정 병태, 치료될 병태의 심각도, 특정 환자의 나이, 체중 및 일반적인 신체적 상태 및 각자가 복용하고 있는 다른 약물에 좌우된다. 나아가, 치료되는 대상의 반응 및/또는 본 발명의 화합물을 처방하는 의사의 평가에 의존하여 유효량이 감소되거나 증가될 수 있음을 명백하다. 전술한 유효량 범위는 단지 가이드라인이며 본 발명의 범위나

사용을 임의의 정도로 제한하지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 실험 섹션

[0047] 도식 1. 전체 반응 도식

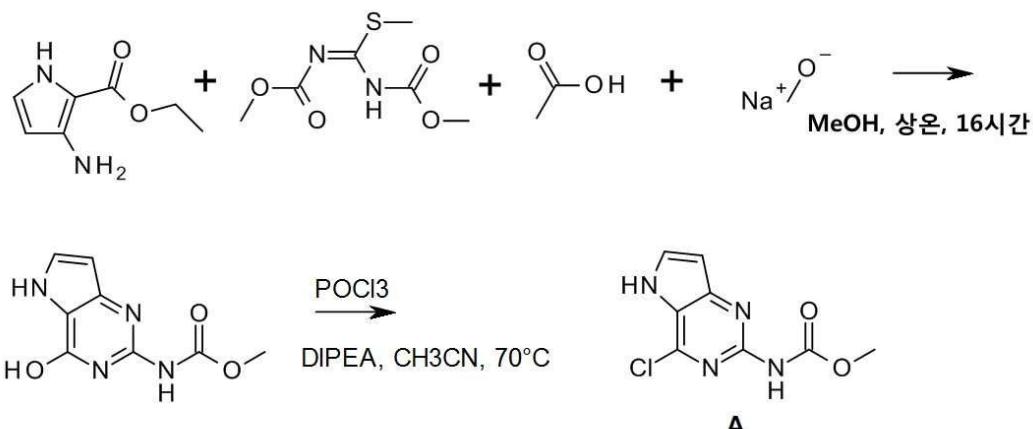


[0048]

도식 1의 A형의 화합물을 극성 비양성자성 용매, 예를 들어 THF 중에서 미츠노부(Mitsunobu) 조건을 이용하여 알코올로 기능화시킬 수 있다. 1,4-디옥산 중 염기 조건 하에 메틸 카바메이트의 절단을 수행하여 중간체 C를 형성하였다. C 내에서 염소의 이동을, 극성 비양성자성 용매(예컨대, NMP) 중에서 알코올 및 염기(예컨대, Na H)로 수행하여 D형의 화합물을 형성하였다.

[0049]

[0050] 중간체 A의 제조



[0051]

3-아미노-2-에톡시카보닐피를 하이드로클로라이드(25.8 g, 135.3 mmol)를 디클로로메탄 및 포화 NaHCO₃ 사이에 분획화하였다. 유기층을 MgSO₄로 건조하였고, 고체를 여과를 통해 제거하였고, 여과물의 용매를 증발시켜서 건조하였다. 잔류물을, 1,3-비스(메톡시카보닐)-2-메틸-2-티오슈도유레아(32.1 g, 156 mmol) 및 아세트산(39 mL, 677 mmol)과 함께 메탄올(500 mL)에 용해하였고, 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 침전물이 나타났고, 교반을 밤새 계속하였다. 소디움 메톡사이드(73.1 g, 1353 mmol)를 첨가하였다. 발열 반응을 관찰하였고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 혼합물을, 아세트산으로 pH 5가 되도록 하였고, 침전물을 여과하여 분리하고, 필터 상에서 물(2 x 350 mL), 아세토니트릴(350 mL) 및 디이소프로필에테르(350 mL)로 고체화(titration)하였다. 수득한 메틸 N-(4-하이드록시-5H-피롤로[3,2-d]피리미딘-2-일)카바메이트를 오븐에서 건조하였다.

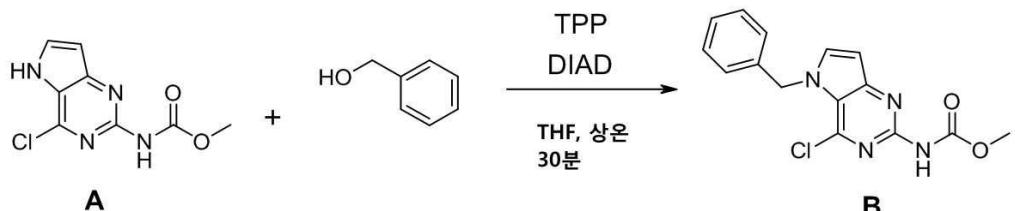
[0052]

메틸 N-(4-하이드록시-5H-피롤로[3,2-d]피리미딘-2-일)카바메이트(25 g, 120 mmol)를 오버헤드 교반기(300 rpm)가 구비된 500 mL 멀티 넥 플라스크 내 350 mL 아세토니트릴 중에 상온에서 분주하였다. POCl₃(22.1 mL, 238.2 mmol)를 첨가한 다음, 반응 혼합물을 교반하면서 70°C까지 가열하였다. 디이소프로필에틸아민(41.4 mL, 240.2 mmol)을 0.2 mL/분의 유속으로 시린지 펌프를 통해 적가하였다.

[0054] 반응 혼합물을 상온까지 냉각한 다음, 물(500 mL) 중 아세트산 나트륨(78.8 g, 961 mmol)의 교반 용액에 45°C에서 투입하였다. 유기물을 증발시켰고, 잔류 액체를 교반하고, 얼음 조에서 냉각하였다. 형성된 고체를 여과하여 분리하고, 아세토니트릴로 세척하고, 디이소프로필에테르로 고체화하여 중간체 A를 제공하였고, 진공 하에 건조하였다. LC-MS m/z = 227($M+H$)

[0055] 중간체 B의 제조

[0056]



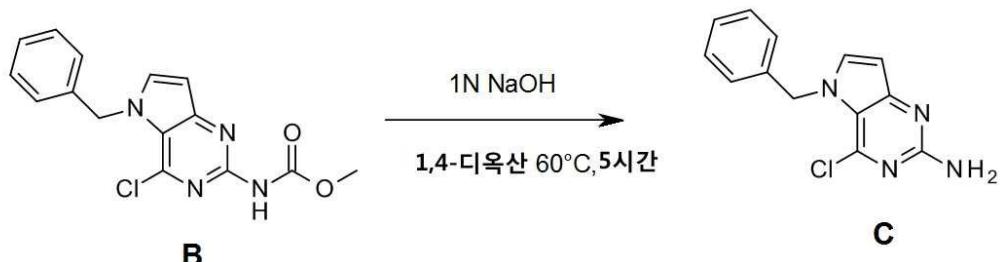
[0057]

[0058] 무수 THF(15 mL) 중 트리페닐포스핀(0.69 g, 2.6 mmol), 벤질알코올(0.28 mL, 2.6 mmol) 및 A(500 mg, 2.2 mmol)의 혼탁액에 DIAD(0.64 mL, 3.3 mmol)를 상온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 30분 간 교반하였다. 혼합물을 감압 하에 농축하였다. 생성물을 헵坦 대 에틸 아세테이트 구배; 100–0 내지 90–10을 이용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물 분획을 수집하고, 감압 하에 농축하였다. 생성물을 디이소프로필에테르 중에 고체화하고, 여과하여 분리하고, 진공 하에 건조하여 얇은 황색 고체로서 B를 제공하였다. LC-MS $m/z = 317(M+H)$

[0059] 수지 결합 트리페닐포스핀을 이용한 방법 2.

[0060] 무수 THF(21 mL) 중 트리페닐포스핀 수지(2.6 g, 7.7 mmol), 벤질알코올(0.39 mL, 3.7 mmol), 및 A(700 mg, 3.1 mmol)의 혼탁액에 DIAD(0.90 mL, 4.6 mmol)를 상온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 패킹된 데칼라이트(decalite)로 여과하고, 메탄올로 세척하였다. 여과물을 진공에서 농축하였다. 생성물을 디이소프로필에테르 중에서 고체화하고, 여과하여 분리하고, 진공 하에 건조하여 얇은 황색고체인 B를 제공하였다. LC-MS m/z = 317(M+H)

[0061] 중간체 C의 제조



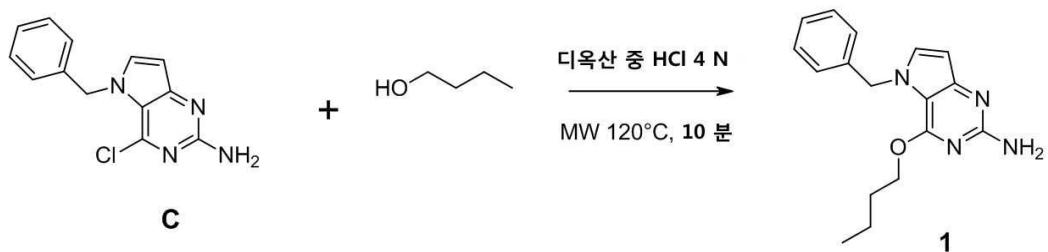
[0062]

[0063] B(738 mg, 2.3 mmol)를 50 mL 유리 관 내 1,4-디옥산(11 mL) 중에 용해하였고, NaOH(5.6 mL, 1 N 수용액)를 첨가하였다. 혼합물을 5시간 동안 60°C까지 가열하였다. 혼합물을 냉각하고, 진공에서 농축하였다. 잔류물을 물을 처리하였고, 침전물을 여과하여 분리하고, 진공 하에 건조하여 C를 고체로서 제공하였다. 다음 단계에서 생성물을 다음과 같이 사용하였다. LC-MS m/z = 259(M $^+$ H)

[0064]

[0065]

방법 1.



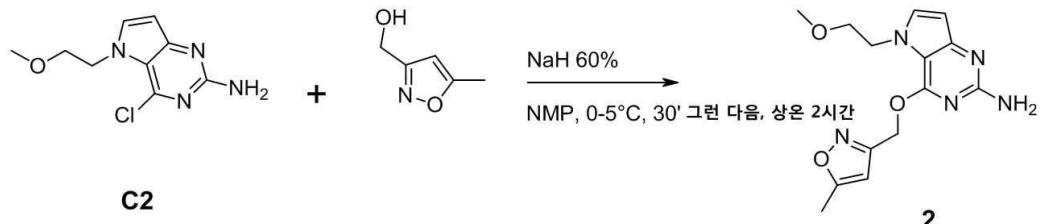
[0066]

[0067]

디옥산(0.46 mL, 1.9 mmol) 중 중간체 C(240 mg, 0.93 mmol), *n*-부틸알코올(3.2 mL, 35 mmol), 및 4 N HCl을 7 mL 전자레인지 바이알에 넣었다. 바이알을 밀봉하였고, 혼합물을 120°C에서 10분 간 가열하였다. 혼합물을 냉각하고 진공에서 농축하였다. 잔류물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화하였고, 디클로로메탄으로 추출하였다. 유기층을 분리하고, 건조(MgSO₄)하였고, 고체를 여과하여 제거하였으며, 여과물을 감압 하에 농축하였다. 생성물을 디클로로메탄-메탄올:100-0 내지 95-5 구배를 이용한 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 가장 좋은 분획을 수집하였고, 감압 하에 농축하였다. 생성물을 디이소프로필에테르 내에서 고체화하였고, 고체를 여과하여 분리하고, 진공 하에 건조하여 백색 고체로서 1을 제공하였다.

[0068]

방법 2.



[0069]

[0070]

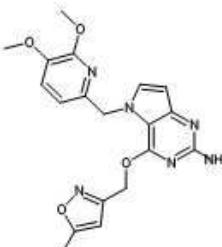
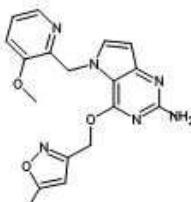
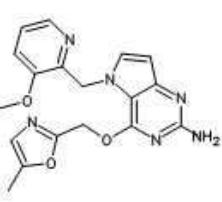
중간체 C2(250 mg, 1.1 mmol), 및 3-하이드록시메틸-5-메틸이속사졸(0.16 mL, 1.65 mmol)을 7 mL 바이알 내 NMP(3 mL)에 용해하였다. 혼합물을 얼음 조 상에서 냉각하였고, NaH(66 mg, 1.65 mmol, 미네랄 오일 중 60% 분산)를 N₂하에 첨가하였고, 혼합물을 0~5°C에서 30분 간 교반한 다음, 따뜻하게 하여 상온에 도달하도록 하였고, 2시간 동안 교반을 계속하였다. 그런 다음, 미정제(crude) 반응 혼합물을 분취 HPLC(고정상: RP Vydac Denali C18 10 μm, 200 g, 5 cm), 이동상: 물 중 0.25% NH₄OAc 용액, CH₃CN)로 정제하였는데, 원하는 분획들을 수집하였고 진공에서 농축하였다. 생성물을 CH₃CN으로부터 결정화하고, 여과하여 분리하고, 진공하에 건조하여 백색 고체인 2를 제공하였다.

【표 1】 화학식 (I)의 화합물 및 상응하는 분석 데이터. 화합물은 실험

섹션에 기술된 방법에 따라 제조되었다.

#	구조	^1H NMR	LC 방법, Rt(분)	LC-MS 질량 확인 ($\text{M}+\text{H}$)
1		^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-\text{d}_6$) δ ppm 0.85 (t, $J=7.37$ Hz, 3 H) 1.26 (dq, $J=15.02, 7.39$ Hz, 2 H) 1.56 – 1.63 (m, 2 H) 4.30 (t, $J=6.38$ Hz, 2 H) 5.39 (s, 2 H) 5.72 (s, 2 H) 6.08 (d, $J=3.08$ Hz, 1 H) 7.03 – 7.08 (m, 2 H) 7.19 – 7.25 (m, 1 H) 7.26 – 7.32 (m, 2 H) 7.48 (d, $J=3.08$ Hz, 1 H)	B, 1.98	297
2		^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-\text{d}_6$) δ ppm 2.41 (d, $J=0.66$ Hz, 3 H) 3.17 (s, 3 H) 3.57 (t, $J=5.50$ Hz, 2 H) 4.29 (t, $J=5.50$ Hz, 2 H) 5.50 (s, 2 H) 5.82 (s, 2 H) 6.03 (d, $J=2.86$ Hz, 1 H) 6.37 (d, $J=0.88$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=2.86$ Hz, 1 H)	A, 0.69	304
3		^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-\text{d}_6$) δ ppm 2.33 – 2.38 (m, 3 H) 3.79 (s, 3 H) 5.34 (s, 2 H) 5.38 (s, 2 H) 5.75 (s, 1 H) 5.86 (s, 2 H) 6.12 (d, $J=3.08$ Hz, 1 H) 6.40 – 6.47 (m, 1 H) 6.78 (td, $J=7.48, 0.66$ Hz, 1 H) 7.00 (d, $J=7.92$ Hz, 1 H) 7.24 (td, $J=7.80, 1.80$ Hz, 1 H) 7.43 (d, $J=2.86$ Hz, 1 H)	B, 1.62	366

#	구조	¹ H NMR	LC 방법, Rt(분)	LC-MS 질량 확인 (M+H)
4		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 0.77 (t, J=7.4 Hz, 3 H), 1.12 (dq, J=15.0, 7.4 Hz, 2 H), 1.40 – 1.50 (m, 2 H), 4.21 (t, J=6.4 Hz, 2 H), 5.49 (s, 2 H), 5.73 6 (s, 2 H), 6.11 (d, J=2.9 Hz, 1 H), 6.65 (d, J=7.9 Hz, 1 H), 7.21 – 7.28 (m, 1 H), 7.47 (d, J=3.1 Hz, 1 H), 7.69 (td, J=7.7, 1.8 Hz, 1 H), 8.47 – 8.53 (m, 1 H)	A, 0.81	298
5		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.35 (s, 3 H) 5.37 (s, 2 H) 5.47 (s, 2 H) 5.84 – 5.90 (m, 3 H) 6.14 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.72 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.24 (dd, J=6.93, 4.95 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 7.65 (td, J=7.70, 1.76 Hz, 1 H) 8.47 (d, J=4.18 Hz, 1 H)	B, 1.29	337
6		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.57 (s, 3 H) 5.45 (s, 2 H) 5.51 (s, 2 H) 5.85 (s, 2 H) 6.13 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.85 (d, J=7.70 Hz, 1 H) 7.22 (dd, J=7.04, 5.06 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 7.64 (td, J=7.65, 1.65 Hz, 1 H) 8.43 (d, J=4.18 Hz, 1 H)	B, 1.14	338

#	구조	¹ H NMR	LC 방법, Rt(분)	LC-MS 질량 확인 (M+H)
7		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.36 (s, 3 H) 3.74 (s, 3 H) 3.71 (s, 3 H) 5.29 (s, 2 H) 5.40 (s, 2 H) 5.85 (s, 2 H) 5.93 (s, 1 H) 6.12 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 6.29 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.11 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.50 (d, J=3.08 Hz, 1 H)	B, 1.45	397
8		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.36 (s, 3 H) 3.80 (s, 3 H) 5.31 (s, 2 H) 5.48 (s, 2 H) 5.75 – 5.81 (m, 3 H) 6.07 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 7.25 (dd, J=8.25, 4.73 Hz, 1 H) 7.36 – 7.41 (m, 2 H) 7.90 (dd, J=4.73, 0.99 Hz, 1 H)	A, 0.72	367
9		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.23 (d, J=1.10 Hz, 3 H) 3.77 (s, 3 H) 5.32 (s, 2 H) 5.45 (s, 2 H) 5.77 (s, 2 H) 6.07 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.79 (d, J=1.10 Hz, 1 H) 7.21 (dd, J=8.25, 4.73 Hz, 1 H) 7.33 (dd, J=8.36, 1.32 Hz, 1 H) 7.37 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 7.88 (dd, J=4.73, 1.21 Hz, 1 H)	B, 1.26	367

부석 방법

LCMS 일반적인 적차

고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 측정을 LC 펌프, 다이오드 어레이(DAD) 또는 UV 검출기 및 각각의 방법에 명시된 바와 같은 컬럼을 사용하여 수행하였다. 필요하다면, 추가적인 검출기들이 포함되었다(아래의 방법 표 참조).

컬럼으로부터의 흐름은, 기압 이온원을 가지도록 구성된 질량 분광계(Mass Spectrometer, MS)로 이송되었다. 화합물의 공칭 단동위원소 분자량(MW)의 식별을 가능하게 하는 이온을 수득하기 위해 조정 파라미터(예컨대, 스캔 범위, 체류 시간...)을 설정하는 것은 당업자의 지식 내이다. 데이터 획들은 적절한 소프트웨어로 수해되었다.

화합물은 그들의 실험적 체류 시간(R_t) 및 이온에 의해 설명된다. 데이터의 표에서 다르게 명시되지 않는 한, 보고된 분자 이온은 $[M+H]^+$ (양성자화 분자) 및/또는 $[M-H]^-$ (탈양성자화 분자)에 상응한다. 화합물이 직접적으로 이온화될 수 없는 경우, 부가물의 유형이 구체화(즉, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, 등...)된다. 다중 동위원소 패턴을 가지는 분자(Br , Cl ...)의 경우, 보고된 값은 가장 낮은 동위원소 질량에 대해 얻어진 값이다. 모든 결과는 사용된 방법과 일반적으로 관련된 실험적인 불확실성을 가지고 얻어졌다.

이하에서, "SQD"는 단일 사중극자 검출기(Single Quadrupole Detector)를, "MSD"는 질량 선택 검출기(Mass Selective Detector), "RT"는 상온, "BEH"는 가교된 에틸실록산/실리카 하이브리드, "DAD"는 다이오드 어레이 검출기(Diode Array Detector), "HSS"는 고강도 실리카(High Strength silica), "Q-ToF"는 사중극자 비행시간법 질량 분광계(Quadrupole Time-of-flight mass spectrometer), "CLND"는 화학발광 질소 검출기(ChemiLuminescent Nitrogen Detector), "ELSD"는 증발 광산란 검출기(Evaporative Light Scanning Detector)를 의미한다.

[0081] LC-MS 방법 코드(흐름은 mL/분으로 나타냄; 컬럼 온도(Col T)는 °C로 나타냄; 실행 시간은 분으로 나타냄).

방법 코드	기기	컬럼	이동상	구배	흐름 ---- Col T	실행 시간
A	Waters: Acquity® UPLC® -DAD 및 SQD	Waters: BEH C18 (1.7 μm, 2.1*50 mm)	A: 95% H ₂ O 중 10 mM CH ₃ COONH ₄ + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	1.3 분 내 95% A에서 5% A로, 0.7분 간 유지.	0.8 ---- 55	2
B	Waters: Acquity® UPLC® -DAD 및 SQD	Waters: HSS T3 (1.8 μm, 2.1*100 mm)	A: 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 중 10 mM CH ₃ COONH ₄ B: CH ₃ CN	2.10분 내 100% A에서 5% A로, 0.90 분 내 0% A로, 0.5분 내 5% A로	0.8 ---- 55	3.5

[0082]

화학식 (I) 및 (II)의 화합물의 생물학적 활성

[0084] 생물학적 어세이의 기술

[0085] TLR7 및 TLR8 활성 평가

[0086] 화합물의 인간 TLR7 및/또는 TLR8을 활성화시키는 능력을 TLR7 또는 TLR8 발현 벡터 및 NF κ B-luc 리포터 구축체로 일시적으로 트랜스펙션된 HEK293 세포를 사용하여 세포 리포터 어세이에서 평가하였다.

[0087] 간략하게, HEK293 세포를 배양 매질(10% FCS 및 2 mM 글루타민으로 보충한 DMEM)에서 성장시켰다. 15 cm 접시에서 세포를 트랜스펙션하기 위해, 세포를 트립신-EDTA로 분리시키고, CMV-TLR7 또는 TLR8 플라즈미드(1700 ng), NF κ B-luc 플라즈미드(850 ng) 및 트랜스펙션 시약의 믹스로 트랜스펙션하고, 습윤한 5% CO₂ 대기에서 48시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이후 트랜스펙션된 세포를 PBS에서 세척하고, 트립신-EDTA로 분리시키고 매질 내 1.25 x 10⁵ 세포 /mL의 밀도로 재현탁하였다. 이후 100% DMSO 내 화합물 200 nL가 이미 존재하는 384-웰 플레이트의 각 웰에 40 마이크로리터의 세포를 분배하였다. 그 후 37°C, 5% CO₂에서 6시간 인큐베이션하고, 15 μL의 스테디 라이트 플러스 기질(Perkin Elmer)을 각 웰에 가하고 ViewLux ultraHTS 마이크로플레이트 이미저(Perkin Elmer) 상에서 판독하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 사중으로 수행된 측정으로부터 용량 반응 곡선을 생성하였다. 각 화합물에 대해 최저효과농도(LEC)값을 결정하였으며, LEC는 시험 표준편차의 적어도 두 배의 효과를 유발하는 농도로 정의된다.

[0088] 병행하여, 화합물 독성을 384-웰 플레이트에서 유사한 일련의 화합물 희석액을 웰당 40 μL의 CMV-TLR7 구조체 단독(1.25 x 10⁵ 세포/mL)으로 트랜스펙션된 세포와 함께 사용하여 측정하였다. 세포 생육성은 웰당 15 μL의 ATP 라이트(Perkin Elmer)를 추가하고, 37°C, 5% CO₂에서 6시간 인큐베이션한 후 ViewLux ultraHTS 마이크로플레이트 이미저(Perkin Elmer)로 판독하여 측정하였다. 데이터는 CC₅₀로 나타내었다.

[0089] 병행하여, 유사한 일련의 화합물 희석액(100% DMSO 내 200 nL의 화합물)을 웰당 40 μL의 NF κ B-1uc 리포터 구조체 단독(1.25 x 10⁵ cells/mL)으로 트랜스펙션된 세포와 함께 사용하였다. 37°C, 5% CO₂에서 6 시간 인큐베이션후, 15 μL의 Steady Lite Plus 기질(Perkin Elmer)을 각 웰에 가하여 루시퍼라제 활성을 측정하고, 판독은 ViewLux ultraHTS 마이크로플레이트 이미저(Perkin Elmer)상에서 수행하였다. 카운터스크린 데이터를 LEC로서 보고하였다.

[0090] ISRE 프로모터 요소의 활성화

[0091]

화합물의 IFN-I 유도 잠재성도 평가되었으며, 이는 PBMC로부터의 조절된 매질에 의해 인터페론-자극 반응성 요소(ISRE)의 활성화를 측정하여 평가되었다. ISRE 요소의 서열 GAAACTGAACT는 IFN-I 가 그 수용체 IFNAR (Clontech, PT3372-5W)에 결합시 활성화된 STAT1-STAT2-IRF9 전사 인자에 매우 반응성이 높다. 플라즈미드 pISRE-Luc(Clontech사 (ref. 631913))는 ISRE 요소 5 카피, 이어 개똥벌레 루시퍼라제 ORF를 함유한다. pISRE-Luc(HEK-ISREluc)가 안정하게 트랜스펙션된 HEK293 세포주는 조절된 PBMC 세포 배양 매질 르로파일을 수립하였다.

[0092]

간략하게, 표준 피콜 원심분리 프로토콜을 사용하여 적어도 두 공여자의 벼피코트로부터 PBMC를 제조하였다. 분리된 PBMC를 10% 인간 AB 혈청으로 보충된 RPMI 배지에 재현탁하고, 2×10^5 세포/웰을 화합물(70 μL 총부피)을 함유하는 384-웰 플레이트에 배분하였다. 밤새 인큐베이션 후, 30 μL 내 5×10^3 HEK-ISREluc 세포/웰을 함유하는 384-웰 플레이트(하루전 플레이트됨)에 상동액 10 μL 를 이송하였다. 이어서 24 시간 동안 인큐베이션하고, 40 μL /웰 Steady Lite Plus 기질(Perkin Elmer)을 사용하여 루시퍼라제 활성을 어세이함으로써 ISRE 요소의 활성화를 측정하고, ViewLux ultraHTS 마이크로플레이트 이미저(Perkin Elmer)로 측정하였다. 각 화합물의 HEK-ISREluc 세포에 대한 자극 활성을 LEC값으로 나타내었다. LEC값은 시험 표준 편차의 적어도 두 배 위의 루시퍼라제 활성을 나타내는 PBMC에 적용된 화합물 농도로 정의된다. 차례로 LEC는 일정량의 PBMC 배양 배지의 이송의 ISRE 활성화 정도를 가리킨다. 재조합 인터페론 α -2a(Roferon-A)를 표준 대조 화합물로 사용하였다.

【표 2】 화학식 (I)의 화합물의 활성. 모든 화합물은 24 μM 를 초과하는

CC50을 나타낸다.

#	인간 TLR 7 (LEC) μM	인간 TLR 8 (LEC) μM	HEK-ISRE (LEC) μM luc
1	0.6	>25	0.4
2	2.7	>25	0.5
3	0.1	>25	0.03
4	1.4	>25	0.6
5	0.4	>25	0.1
6	3.9	>25	2
7	0.08	>25	0.03
8	0.03	>25	0.01
9	0.07	>25	NA
10	0.5	>25	NA
11	0.6	>25	NA

[0093]

NA = 이용 불가

[0094]