(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0090831
(43) 공개일자 2022년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 417/10 (2006.01) *A61K 31/4439* (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01) *A61K 31/5377* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07D 417/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 417/10 (2013.01)
A61K 31/4439 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0181737
(22) 출원일자 2020년12월23일
심사청구일자 2020년12월23일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이진호
대구광역시 달성군 다사읍 달구벌대로 812, 102동 2308호(강창하이츠)
홍빅터석봉
대구광역시 달서구 성지로 11, 102동 1402호(용산동, 성서영남우방타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 11 항

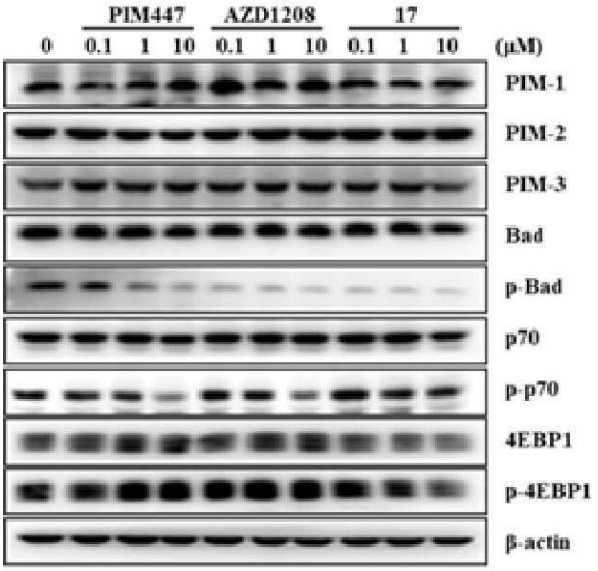
(54) 발명의 명칭 **2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

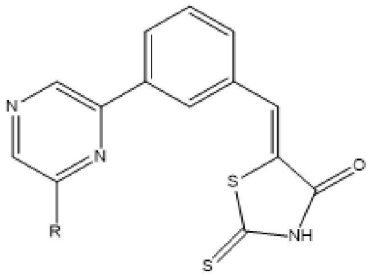
본 발명은 티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게 PIM 단백질 키나아제에 대한 억제 활성을 갖는 티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



[화학식 Ⅰ]



상기 화학식 I에서, 상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/497 (2013.01)
A61K 31/5377 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 417/14 (2013.01)

(72) 발명자
김신
대구광역시 수성구 청호로 418, 103동 701호(범어동, 빌리브범어)
윤양환
대구광역시 동구 아양로50길 85-1(효목동)
정승익
대구광역시 달서구 신당로 56, 107동 805호(신당동, 성서주공1단지아파트)
추현성
대구광역시 달성군 화원읍 명곡로 30, 301동 703호(명곡미래빌3단지)

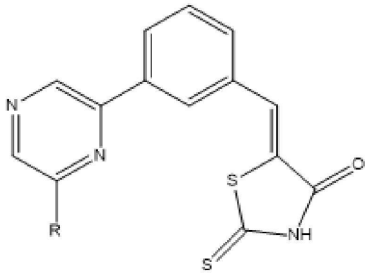
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 Ⅰ로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 중에서 선택된 화합물:

[화학식 Ⅰ]



상기 화학식 I에서,

상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 R^1 내지 R^3 중 어느 하나는 C_1 내지 C_4 알킬기이고, 나머지 두 개는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 것인, 화합물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

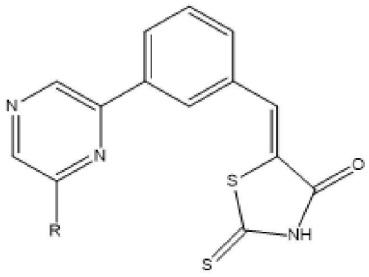
상기 화학식 Ⅰ로 표시되는 화합물은 5-(3-(6-메톡시피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-Methoxypyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **3c**); 5-(3-(6-(사이클로펜틸아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **4**); 5-(3-(6-(사이클로헥실아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **5**); 5-(3-(6-(사이클로펜틸옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **6**); 5-(3-(6-(사이클로헥실옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **7**); 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **17**); 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **18**); 5-(3-(6-((2-(디에틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-

(Diethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (19)] (화합물 **19**); 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2- thioxothiazolidin-4-one](화합물 **20**); 및 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **21**)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인, 화합물.

청구항 4

하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 R^1 내지 R^3 중 어느 하나는 C_1 내지 C_4 알킬기이고, 나머지 두 개는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 것인, PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 5-(3-(6-메톡시피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-Methoxypyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **3c**); 5-(3-(6-(사이클로펜틸아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **4**); 5-(3-(6-(사이클로헥실아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **5**); 5-(3-(6-(사이클로펜틸옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **6**); 5-(3-(6-(사이클로헥실옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **7**); 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **17**);

5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **18**); 5-(3-(6-((2-(디에틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Diethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (19)] (화합물 **19**); 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2- thioxothiazolidin-4-one](화합물 **20**); 및 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **21**)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인, PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

상기 PIM 키나아제 과발현 질환은 PIM1, PIM2 및 PIM3로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 PIM 키나아제 발현 또는 활성이 상향 조절된 암인, PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 암은 전립선암, 결장암, 식도암, 자궁내막암, 난소암, 자궁암, 신장암, 간암, 췌장암, 위암, 유방암, 폐암, 두경부의 암, 갑상선암, 교모세포종, 육종, 방광암, 림프종, 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성적 림프구성 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 미만성 큰-B 세포 림프종, 외투 세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종 또는 다발성 골수종인, PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 9

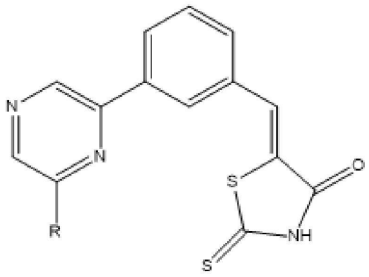
제 4 항에 있어서,

상기 PIM 키나아제 과발현 질환은 면역 장애인 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 알러지, 천식, 낭창, 염증성 장 질환 또는 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 장 증후군, 췌장염, 게실증, 그레이브스병, 소아 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염, 강직 척추염, 중증 근무력증, 혈관염, 자가면역 갑상선염, 피부염, 건선, 경피증, 전신 경화증, 백반증, 이식편 대 숙주 질환, 쇼그렌 증후군, 사구체신염 또는 I형 임신 당뇨병인, PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 10

PIM 키나아제를 발현하는 분리된(isolated) 세포 속에서 그 키나아제를 억제하는 인 비트로(in vitro) 방법으로서, 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 상기 분리된(isolated) 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 PIM 키나아제의 억제 방법:

[화학식 I]



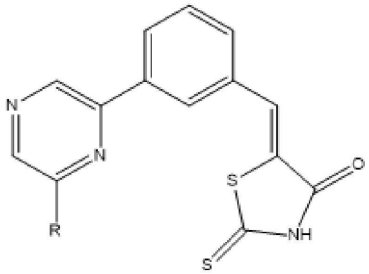
상기 화학식 I에서,

상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

청구항 11

하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 PIM 키나아제 과발현 억제용 조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

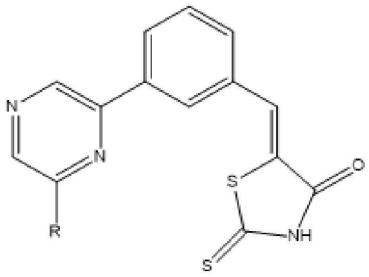
상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게 PIM 단백질 키나아제에 대한 억제 활성을 갖는 티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다.

[0002] [화학식 I]



[0003]

[0004] 상기 화학식 I에서, 상기 R은 C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

배 경 기 술

[0005] 단백질 키나아제는 그 중에서도 세포 성장, 생존, 분화, 장기 형성, 형태 발생, 신혈관 형성, 조직 회복 및 재생을 포함하는 다양한 생물학적 과정을 조절한다. 단백질 키나아제는 또한 암을 포함하는 인간 질환의 숙주에서 특별한 역할을 한다.

[0006] 단백질 키나아제 패밀리 중 하나인 PIM 키나아제는 암의 마우스 모델에서 몰로니 백혈병 바이러스(Moloney leukemia virus)의 우선적인 통합 사이트로서 확인되었다. 상세하게, 세 가지의 비-수용체 세린/트레오닌 키나아제인 PIM1, PIM2 및 PIM3은 유전자 전사 및 단백질 번역에 영향을 미침으로써 세포 증식 및 생존을 조절한다. PIM 키나아제의 과발현은 매우 다양한 혈액암 및 고형암에서 검출된다. 상세하게, 급성림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML) 및 다발성 골수종(MM)과 같은 혈액암에서 PIM 키나아제의 발현 증가가 보고되었다. PIM-2 발현은 급성림프아구성 백혈병(ALL) 및 급성 골수성 백혈병(AML)보다 다발성 골수종 (MM)에서 유의하게 더 높다. 반면 PIM-1 발현은 다발성 골수종 (MM) 보다 급성림프아구성 백혈병(ALL) 및 급성 골수성 백혈병(AML)에서 더 높다. PIM 키나아제는 생존, 아폽토시스, 증식, 세포주기 조절 및 이동과 같은 많은 암 특정 경로에서 중요한 역할을 하기 때문에 신약 개발의 유망한 표적이 된다.

[0007] 포스포릴화에 의해 활성화를 필요로 하는 많은 다른 단백질 키나아제와는 대조적으로, PIM 키나아제는 본질적으로 활성화되며, 패밀리 일원은 중복된 기질 표적 및 생물학적 기능을 가지며, 패밀리 일원 간의 차이는 일부, 이의 다양화된 조직 분포에 의해 좌우된다. PIM 키나아제의 발현은 시토카인 및 성장 인자에 의해 유도된다. 이에 따라, PIM 키나아제는 약물 개발 노력을 위한 유용한 표적으로서 확인되었다.

[0008] 한편, 다양한 소분자가 PIM 키나아제의 ATP-경쟁 억제제로 보고되었다. 예로서 Pan-PIM 키나아제 억제제는 PIM 선택적 억제제보다 더 높은 치료 가치를 가질 것으로 예상되는데, 세 가지 이소폼(three isoforms)은 중복 기능을 가지고 있고 그 발현 수준은 종양 유형에 따라 달라지기 때문이다. 치환된 벤질리덴-1,3-티아졸로딘-2,4-디온(TZD)은 ATP-경쟁 PIM 키나아제 억제제로 밝혀졌으며 AZD1208 발견의 핵심 구조적 모티프가 되었다. TZD 유도체는 상기 3 가지 PIM 키나아제 이소폼 모두의 강력한 억제제로 확인된바 있다.

[0009] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 PIM 키나아제의 발현 또는 활성과 관련된 질환, 예를 들어, 암 및 다른 질환을 치료하기 위해 유용한 PIM 키나아제의 신규한 억제제를 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 일본등록특허 제6378918호 (2018.08.03. 등록)

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Bioorganic & Medicinal Chemistry 25 (2017) 2657-2665

발명의 내용

해결하려는 과제

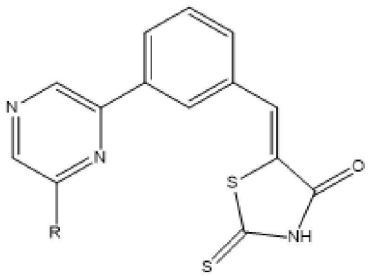
[0012] 본 발명자들은 신규한 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체를 합성하였고 이들을 PIM 키나아제에 대한 억제 활성을 평가하고, 종래의 PIM 키나아제에 대한 억제 활성을 갖는다고 알려진 TZD와 비교하여 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체가 PIM 키나아제에 대한 억제 효율이 우수하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 상세하게, 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체는 대조군인 TZD 보다 EOL-1 세포주 및 Molm-16 세포주에서 세포의 성장을 2 내지 6 배 이상 현저하게 억제시켰음을 확인하였고, pBAD 및 p4EBP1 발현을 조절함을 확인하였는바, PIM 키나아제 과다발현 질환에 유용하다는 것을 알게 되었다.

[0013] 따라서, 본 발명은 PIM 키나아제 억제제로 유용한 2-티옥소티아졸리딘-4-온(2-Thioxothiazolidin-4-one) 유도체 및 이의 PIM 과다발현 질환 예방 또는 치료 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 중에서 선택된 화합물을 제공함으로써, 상기 과제를 해결한다.

[0016] [화학식 I]



[0017]

[0018] 상기 화학식 I에서, 상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 PIM 키나아제를 발현하는 분리된(isolated) 세포 속에서 그 키나아제를 억제하는 인 비트로(in vitro) 방법으로서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 상기 분리된(isolated) 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 PIM 키나아제의 억제 방법을 제공한다.

[0021] 또한, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 PIM 키나아제 과발현 억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] PIM 단백질 키나아제에 대한 억제 활성을 갖는 본 발명의 화합물 I인 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 화합물은 PIM 단백질 키나아제를 효과적으로 억제할 수 있어 PIM 단백질 키나아제의 과활성화에 의해 유발되는 비정상

적 세포 성장과 연관된 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 17의 농도를 증가하여 처리한 Molm-16 세포주에 대한 웨스턴 블롯 분석 수행 결과이다.

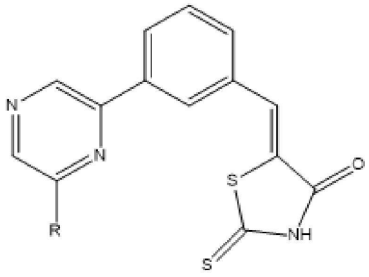
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 일실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0027] 본 발명자들은 신규한 2-티옥소티아졸리딘-4-온(로다닌) 유도체를 합성하였고 이들을 PIM 키나아제에 대한 억제 활성을 평가하고 TZD와 비교하여, 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체가 PIM 키나아제에 대한 억제 효율이 우수하다는 것을 확인함으로써, 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체가 PIM 키나아제 발현 또는 활성이 상향조절된 암 질환(혈액암, 고형암) 또는 염증 치료에 유용함을 알게 되었다.

[0028] 따라서, 본 발명은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 중에서 선택된 화합물을 제공한다.

[0029] [화학식 I]

[0030] 

[0031] 상기 화학식 I에서, 상기 R은 C_1 내지 C_4 알콕시, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 아미노기, C_5 내지 C_{10} 사이클로알킬로 치환된 옥시; 또는 $R^2R^1N-(CH_2)n-NR^3-$ (여기서, R^1 내지 R^3은 각각 독립적으로 수소 원자; 할로; C_1 내지 C_4 알콕시; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택되는 치환기이고, n은 1 내지 5의 정수임)를 나타낸다.

[0032] 상세하게, 상기 화학식 I에서, R^1 내지 R^3 중 어느 하나는 C_1 내지 C_4 알킬기이고, 나머지 두 개는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C_1 내지 C_4 알킬기;에서 선택될 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 상기 화합물 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 PIM 단백질 키나아제에 대한 억제 활성을 확인하였는바, PIM 단백질 키나아제의 과활성화에 의해 유발되는 비정상적 세포 성장과 연관된 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[0034] 상세하게, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 5-(3-(6-메톡시피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-Methoxypyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **3c**); 5-(3-(6-(사이클로펜틸아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **4**); 5-(3-(6-(사이클로헥실아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **5**); 5-(3-(6-(사이클로펜틸옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 **6**); 5-(3-(6-(사이클로헥실옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **7**); 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 **17**); 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리

덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one](화합물 18); 5-(3-(6-((2-(디에틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Diethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (19)] (화합물 19); 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2- thioxothiazolidin-4-one](화합물 20); 및 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (화합물 21)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 PIM 키나아제 과발현 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0036] 상기 PIM 키나아제 과발현 질환은 PIM1, PIM2 및 PIM3로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 PIM 키나아제 발현 또는 활성이 상향 조절된 암일 수 있다.

[0037] 상기 암은 전립선암, 결장암, 식도암, 자궁내막암, 난소암, 자궁암, 신장암, 간암, 췌장암, 위암, 유방암, 폐암, 두경부의 암, 갑상선암, 교모세포종, 육종, 방광암, 림프종, 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성적 림프구성 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 미만성 큰-B 세포 림프종, 외투 세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종 또는 다발성 골수종 일 수 있다.

[0038] 또한, 상기 PIM 키나아제 과발현 질환은 면역 장애인 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 알러지, 천식, 낭창, 염증성 장 질환 또는 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 장 증후군, 췌장염, 게실증, 그레이브스병, 소아 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염, 강직 척추염, 중증 근무력증, 혈관염, 자가면역 갑상선염, 피부염, 건선, 경피증, 전신 경화증, 백반증, 이식편 대 숙주 질환, 쇼그렌 증후군, 사구체신염 또는 I형 임신 당뇨병일 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 또한, 본 발명은 PIM 키나아제를 발현하는 분리된(isolated) 세포 속에서 그 키나아제를 억제하는 인 비트로(in vitro) 방법으로서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 상기 분리된(isolated) 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 PIM 키나아제의 억제 방법을 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 PIM 키나아제 과발현 억제용 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에 따른 화합물은 PIM를 비롯한 다양한 단백질 키나아제를 효과적으로 억제할 수 있어 그의 연관된 단백질 키나아제의 과활성화에 의해 유발되는 비정상적 세포 성장과 연관된 질환, 특히 암 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공하는 것이다.

[0048] **실시예 1: 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 합성**

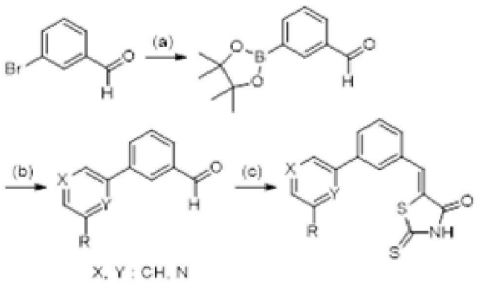
[0049] **1. 공통실험 분석 방법**

[0050] Bruker Spectrospin 400 (400MHz) 또는 JEOL ECA500 (500MHz) 분광계를 통해 ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 결과를 기록하였다. 화학적 이동 (δ)은 내부 표준으로 테트라메틸실란을 사용하여 ppm 로 보고하였다. Waters ACQUITY Quattro micro ™ API를 사용하여 질량 스펙트럼 결과를 얻었다. CEM Discover BenchMate를 사용하여 마이크로파 지원 반응을 수행하였다. E. Merck 실리카겔 60 F254 플레이트 (0.25mm)로 TLC를 수행하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(Silica gel column chromatography)는 Merck 실리카겔 60(230 - 400 mesh)을 사용하여 수행되었다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 출발 물질을 상업적으로 입수 가능한 공급원에서 얻었으며 추가 정제없이 사용하였다. 아울러, 모든 반응은 질소 분위기 하에서 수행되었다.

[0052] **2. 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 합성**

[0053] 반응식 1에 나타난 바와 같이 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체를 합성하였다. 2,6-디클로로 피라진과 아민 또는 알코올의 반응에서 치환된 피라진을 얻은 다음, 마이크로파 조사 하에서 스즈키 교차 결합 반응(Suzuki cross-coupling reaction)하여 벤즈알데히드의 위치에 부착했습니다. 얻어진 알데히드를 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 반응시켜 크노베나겔 축합반응(Knoevenagel condensation)을 통해 5-벤질리덴-2-티옥소티아졸리딘-4-온 유사체를 합성하였다.

[0054] [반응식 1]

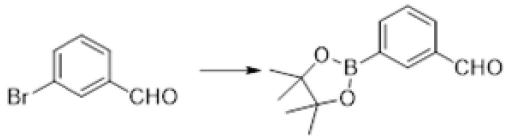


[0055]

[0056] 상기 반응식 1은 로다닌 화합물의 합성을 위한 시약 및 조건을 나타낸 것이다((a) 비스(피나콜라토)디보론[Bis(pinacolato)diboron], $PdCl_2$, KOAc, 1,4-디옥산-에탄올(5:1), 마이크로파, (b) Ar-Cl, $PdCl_2(PPh_3)_2$, 2 M K_2CO_3, 1,4-디옥산-에탄올(5:1), 마이크로파, (c) 2-thioxothiazolidin-4-one, 아세트산 나트륨, 아세트산, DMF, 마이크로파).

[0057] 아래는 상기 반응식 1을 통해 제조한 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체의 합성 데이터를 나타낸 것이다.

[0059] **(1) 3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤즈알데히드[3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzaldehyde] (R1) 합성**

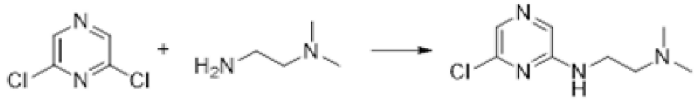


[0060]

[0061] 마이크로파 용기를 3-브로모벤즈알데히드 (1.1 mmol, 0.20 g), 1,4-디옥산 (2.0 mL) 및 EtOH (0.40 mL)로 채웠다. 비스(피나콜라토)디보론 (1.6 mmol, 0.41 g), KOAc (3.2 mmol, 0.32 g)를 첨가한 후, 혼합물을 N_2 가스로 5분 동안 퍼지(purge)했다. 반응 혼합물에 [1,1'- 비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II) ($PdCl_2$(dppf)) (0.032 mmol, 0.024 g)을 첨가하고, 혼합물에 110℃에서 10 분 동안 100 W 마이크로파를 조사하였다. 진공에서 용매를 제거한 후, 잔류물을 DCM으로 처리하고 셀라이트를 이용하여 여과하였다. 용매를 감압 제거하고 잔류물을 12 : 1 헥산/EA를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 0.25 g (95%)의 **R1** 화합물을 얻었다.

[0062] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10.06(s,1H), 8.32(s,1H), 8.07(d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 1.38 (s, 12H).

[0064] **(2) N-(6-클로로피라진-2-일)-N',N'-디메틸에탄-1,2-디아민[*N*-(6-Chloropyrazin-2-yl)-*N*’,*N*’-dimethylethane-1,2-diamine] (R2) 합성**

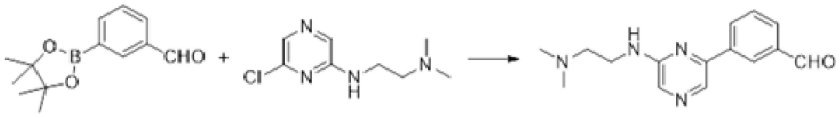


[0065]

[0066] N, N-디메틸에틸렌디아민 (1.6 mmol, 0.17 mL) 및 K_2CO_3 (2.7 mmol, 0.37 g)를 DMF 5.0 mL에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 2,6-디클로로피라진 (1.3 mmol, 0.20 g)을 첨가한 후, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매를 진공에서 제거한 후 잔류물을 EA로 처리하고 물로 세척하였다. 잔류물을 EA로 추출하고 추출물을 물과 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 $MgSO_4$로 건조시켰다. 잔류 물을 1 : 9 MeOH/DCM을 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 0.20 g (74%)의 **R2** 화합물을 수득하였다.

[0067] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.77 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 3.39 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.26 (s, 6H).

[0069] **(3) 3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤즈알데히드[3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzaldehyde] (R3) 합성**



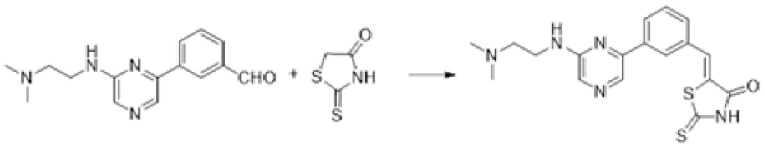
[0070]

[0071] 마이크로파 용기를 화합물 R1 (0.82 mmol, 0.19 g), 화합물 R2 (0.82 mmol, 0.16 g), 1,4-디옥산 (2.0 mL), EtOH (0.40 mL) 및 2M K_2CO_3 (2.5 mmol, 1.2 mL)을 채워 넣었다. N_2 분위기에서 비스(트리페닐포스핀)팔라듐디클로라이드($PdCl_2(PPh_3)_2$) (0.025 mmol, 0.018 g)를 첨가한 후 혼합물을 110℃에서 10 분 동안 100 W를 적용하여 조사하였다. 용매를 진공에서 제거했습니다. 잔류물을 DCM으로 처리한 후 셀 라이트를 사용하여 여과하였다. 여액을 수집하고 용매를 진공에서 제거하였다. 잔류 물을 1 : 9 MeOH/DCM 및 1 : 10 : 100 NH_4OH/MeOH/$CHCl_3$를 사용하여 실리카 겔상에서 2 회 연속 컬럼크로마토그래피로 정제하여 0.09 g (41%)의 **R3** 화합물을 수득하였다.

[0072] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10.09(s, 1H), 8.50(s, 1H), 8.30(s, 1H), 8.25(d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.61 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.51 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 5.7 Hz,

2H), 2.28 (s, 6H).

[0074] **(4) 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (17) 합성**

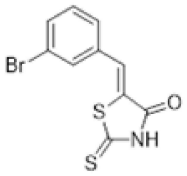


[0075]

[0076] 마이크로파 용기 내 아세트산 (1.0 mL)에 화합물 R3 (0.15 mmol, 0.041 g), 로다닌 (0.18 mmol, 0.024 g), NaOAc (0.61 mmol, 0.050g)를 첨가했다. 혼합물을 100 W를 적용하여 150℃에서 10 분 동안 조사했다. 용매를 진공에서 제거한 후 잔류물을℃에서 포화 K_2CO_3 용액으로 처리하고 EA로 추출했다. 추출물을 물로 세척하고 유기층을 무수 $MgSO_4$로 건조시켰다. 잔류물을 1:10:80 NH_4OH MeOH/$CHCl_3$을 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 0.028 g (24%)의 화합물 **17**을 수득 하였다.

[0077] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): ^{1}H-NMR(500 MHz, DMSO-d_6, CD_3OD) δ 8.37 (s, 1H), 8.24(s, 1H), 7.98(d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.82 (s, 6H); δ 8.41 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 3.80 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.87 (s, 6H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ 202.4, 182.2, 154.3, 147.8, 137.9, 136.0, 135.4, 133.5, 131.4, 130.0, 129.1, 127.8, 127.0, 124.8, 56.4, 43.4, 36.2 ; ESI-MS*m/z*: 386 $[M+H]^+$.

[0079] **(5) 5-(3-브로모벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-Bromobenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (2) 합성**

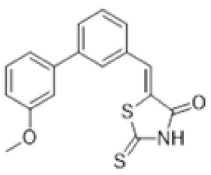


[0080]

[0081] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 3-브로모 벤즈알데히드를 화합물 2(0.12 g, 73%)로 제조하였다.

[0082] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 7.84(s, 1H), 7.70(d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6) : δ 195.9, 169.7, 135.9, 133.7, 132.0, 130.4, 129.0, 127.8, 123.1; ESI-MS *m/z*: 298, 300 $[M-H]^-$.

[0084] **(6) 5-((3'-메톡시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸렌)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-((3'-Methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methylene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (3a) 합성**

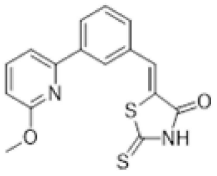


[0085]

[0086] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 3a를 제조하였다. 73% 수율.

[0087] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 7.92 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.64 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.99 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ 196.1, 169.9, 160.3, 141.5, 141.0, 134.2, 132.2, 130.7, 130.6, 129.9, 129.5, 129.3, 126.4, 119.6, 114.1, 112.8, 55.7; ESI-MS m/z: 328 $[M+H]^+$.

[0089] **(7) 5-(3-(6-메톡시피리딘-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-Methoxypyridin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (3b) 합성**

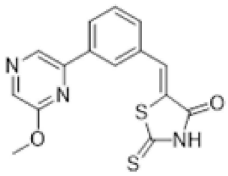


[0090]

[0091] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 3b를 제조하였다. 54% 수율.

[0092] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.40(s, 1H), 8.21(d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.84 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.70-7.61(m, 3H), 6.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) : δ 196.1, 169.9, 163.7, 152.7, 140.7, 139.5, 133.9, 132.0, 131.7, 130.3, 128.8, 128.5, 126.4, 113.6, 110.6, 53.4; ESI-MS m/z: 329 $[M+H]^+$.

[0094] **(8) 5-(3-(6-메톡시피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-Methoxypyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (3c) 합성**

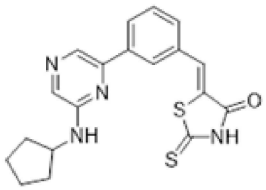


[0095]

[0096] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 3c를 제조하였다. 55% 수율.

[0097] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.90 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.26 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.74-7.67(m, 2H), 4.07 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 196.0, 169.9, 159.7, 147.0, 136.9, 134.8, 134.1, 133.7, 132.0, 131.6, 130.6, 129.0, 128.9, 126.7, 53.7; ESI-MS m/z: 330 $[M+H]^+$.

[0099] **(9) 5-(3-(6-(사이클로펜틸아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (4) 합성**

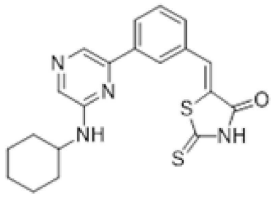


[0100]

[0101] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 4를 제조하였다. 54% 수율.

[0102] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.39 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.72(m, 2H), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.37-4.30 (m, 1H), 2.14-2.08 (m, 2H), 1.78-1.62 (m, 4H), 1.54-1.48 (m, 2H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ196.2, 170.0, 154.5, 146.9, 138.4, 134.0, 133.6, 132.9, 131.8, 130.3, 128.5, 127.6, 127.4, 126.5, 52.3, 32.9, 24.0; ESI-MS$m/z$: 383 $[M+H]^+$.

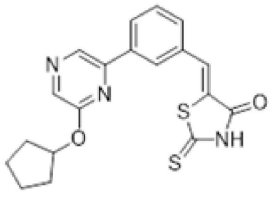
[0104] **(10) 5-(3-(6-(사이클로헥실아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (5) 합성**

[0105] 

[0106] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 5를 제조하였다. 66% 수율.

[0107] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ8.35(s, 1H), 8.32(s, 1H), 8.15(d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.01-3.94 (m, 1H), 2.05-2.02 (m , 2H), 1.77-1.74 (m, 2H), 1.64-1.62 (m, 1H), 1.56-1.47 (m, 2H), 1.31-1.17 (m, 3H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ195.5, 169.4, 153.4, 146.2, 137.8, 133.3, 133.1, 132.7, 131.2, 129.7, 127.9, 126.9, 126.4, 125.7, 48.4, 32.3, 25.4, 24.6; ESI-MS$m/z$: 397 $[M+H]^+$.

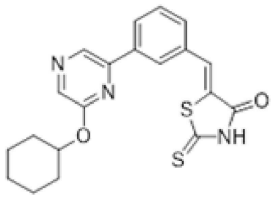
[0109] **(11) 5-(3-(6-(사이클로펜틸옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclopentyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (6) 합성**

[0110] 

[0111] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 6을 제조하였다. 49% 수율.

[0112] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ8.90(s, 1H),8.42(s, 1H),8.27(m, 2H), 7.77(m, 2H), 7.69 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.61-5.58 (m, 1H), 2.18-2.13 (m, 2H), 1.83-1.76 (m, 4H), 1.70-1.67 (m, 2H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ 159.3, 146.9, 137.1, 135.3, 134.3, 133.4, 132.9, 131.4, 130.6, 128.8, 128.1, 78.75, 32.85, 24.02; ESI-MS m/z: 384 $[M+H]^+$.

[0114] **(12) 5-(3-(6-(사이클로헥실옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-(Cyclohexyloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (7) 합성**

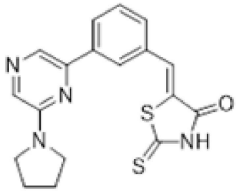


[0115]

[0116] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 7을 제조하였다. 49% 수율.

[0117] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.88(s, 1H), 8.34(s, 1H), 8.24(m, 2H), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.67 (t, J = 7.8Hz, 1H), 5.28-5.24 (m, 1H), 2.12-2.09 (m, 2H), 1.81-1.79 (m, 2H), 1.62-1.51 (m, 5H), 1.30-1.26 (m, 1H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ 195.4, 169.5, 158.3, 146.2, 136.4, 134.7, 133.6, 133.0, 132.8, 130.8, 130.0, 128.2, 126.7, 126.1, 73.6, 31.2, 25.0, 23.6; ESI-MS$m/z$: 398 [M+H]+.

[0119] **(13) 5-(3-(6-(피롤리딘-1-일)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘 -4-온[5-(3-(6-(Pyrrolidin-1-yl)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (8) 합성**

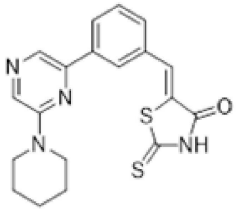


[0120]

[0121] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 8을 제조하였다. 37% 수율.

[0122] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.44(s, 1H), 8.39(s, 1H), 8.19(d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 3.56 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.02-1.98 (m, 4H); ^{13}CNMR(125 MHz, DMSO-d_6): δ ; ESI-MS m/z: 369 [M+H]+.

[0124] **(14) 5-(3-(6-(피페리딘-1-일)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘 -4-온[5-(3-(6-(Piperidin-1-yl)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (9) 합성**

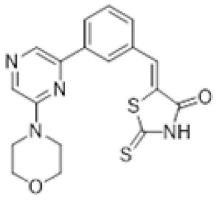


[0125]

[0126] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 9를 제조하였다. 70% 수율.

[0127] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.46(s, 1H), 8.37(s, 1H), 8.33(s, 1H), 8.18(d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 3.81-3.66 (m, 4H), 1.73-1.65 (m, 2H), 1.65-1.56 (m, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 195.5, 169.4, 153.5, 146.2, 137.4, 133.4, 131.7, 131.1, 130.4, 129.8, 128.0, 127.9, 127.6, 126.0, 44.8, 24.9, 24.1; ESI-MS$m/z$: 383 $[M+H]^{+}$.

[0129] **(15) 5-(3-(6-모르폴리노피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-Morpholinopyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (10) 합성**

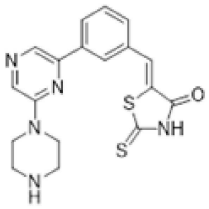


[0130]

[0131] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 10을 제조하였다. 75% 수율.

[0132] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.57(s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.35(s, 1H), 8.20(d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.77 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.68 (t, J = 4.5 Hz, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 196.2, 169.9, 154.4, 146.9, 137.9, 134.1, 131.8, 131.1, 130.5, 123.0, 129.9, 128.9, 128.8, 126.7, 66.3, 44.8; ESI-MS$m/z$: 385 $[M+H]^+$.

[0134] **(16) 5-(3-(6-(피페라진-1-일)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘 -4-온[5-(3-(6-(Piperazin-1-yl)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (11) 합성**

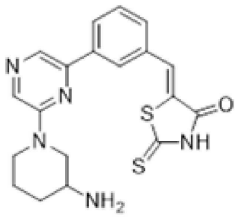


[0135]

[0136] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 R3 시리즈를 제조한 후, 화합물 11을 제조하기 위해 Boc를 제거하고자 하였다. 이에 DCM (4.0 mL) 및 트리플루오로 아세트산 (1.0 mL)에 이전 단계의 화합물에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하였다. 2.5 : 25 : 80 NH_4OH/MeOH/$CHCl_3$을 사용하여 잔류 물을 pH 12-14로 조정한 후 생성 된 고체를 증류수로 세척하였다. 고체를 1 : 10 : 100 NH_4OH/MeOH/$CHCl_3$를 사용하는 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 95 %의 화합물 **11**을 수득하였다.

[0137] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.62(s, 1H), 8.43(s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.14(d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 3.97 (t, J = 5.3 Hz, 4H), 3.29 (t, J = 5.3 Hz, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 158.7, 158.5, 153.5, 147.2, 137.5, 134.9, 131.6, 131.3, 130.4, 128.7, 128.1, 121.4, 119.0, 116.6, 79.7, 42.9, 41.6; ESI-MS m/z: 384 $[M+H]^+$.

[0139] **(17) (5-(3-(6-(3-아미노피페리딘-1-일)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아 졸리딘-4-온 [(5-(3-(6-(3-Aminopiperidin-1-yl)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (12) 합성**

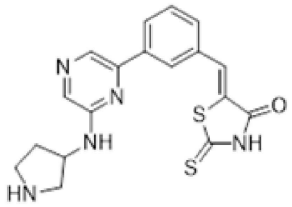


[0140]

[0141] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈를 제조한 후, 화합물 11의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 12를 제조하고 Boc를 제거하였다. 93% 수율.

[0142] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ8.53(s, 1H), 8.35(s, 1H), 8.30(s, 1H), 8.10(t, J = 3.5 Hz, 1H), 7.61(d, J = 5.5 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 4.38 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.05 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.42-3.28(m, 5H), 2.08-2.00 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.73-1.59 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ196.4, 158.6, 158.4, 154.0, 147.5, 137.7, 135.5, 131.0, 130.2, 129.6, 128.7, 127.6, 119.0, 116.6, 46.9, 46.7, 44.6, 28.54, 22.3; ESI-MS$m/z$: 398 $[M+H]^+$.

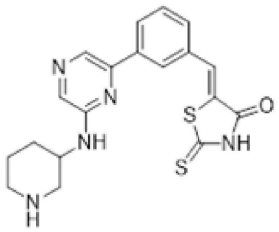
[0144] **(18) 5-(3-(6-(피롤리딘-3-일아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘 -4-온[5-(3-(6-(Pyrrolidin-3-ylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (13) 합성**

[0145] 

[0146] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈를 제조한 후, 화합물 11의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 13을 제조하고 Boc를 제거하였다. 71% 수율.

[0147] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.41 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.14 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.76 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.65-7.59(m, 2H), 4.61-4.54 (m, 1H), 3.54-3.45 (m, 1H), 3.20-3.12 (m, 1H), 2.34-2.25 (m, 1H), 2.18-2.11 (m, 1H), 2.02-1.86 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 203.3, 183.6, 153.9, 147.7, 137.7, 136.5, 136.2, 133.3, 131.2, 130.0, 129.1, 127.8, 126.7, 124.1, 50.3, 44.6, 30.6; ESI-MS m/z: 384 [M+H]+.

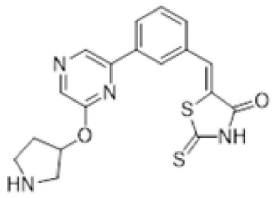
[0149] **(19) 5-(3-(6-(피페리딘-3-일아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리 딘-4-온 [5-(3-(6-(Piperidin-3-ylamino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (14) 합성**

[0150] 

[0151] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈를 제조한 후, 화합물 11의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 14를 제조하고 Boc를 제거하였다. 65% 수율.

[0152] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6):δ8.40 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.05 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.59(d, J = 4.5 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.32-4.22 (m, 1H), 3.52 (dd, J = 11.5, 3.0 Hz, 1H), 3.27-3.20 (m, 1H), 3.03-2.91 (m, 2H), 2.16-2.07 (m, 1H), 2.05-1.96 (m, 1H), 1.89-1.79 (m, 1H), 1.70-1.60 (m, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 202.4, 153.1, 147.2, 137.2, 135.6, 135.5, 132.6, 130.1, 129.3, 128.3, 127.6, 126.3, 123.7, 46.2, 44.1, 43.1, 27.9, 20.6; ESI-MS m/z: 398 $[M+H]^+$.

[0154] **(20) 5-(3-(6-(피롤리딘-3-일옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리 딘-4-온 [5-(3-(6-(Pyrrolidin-3-yloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (15) 합성**

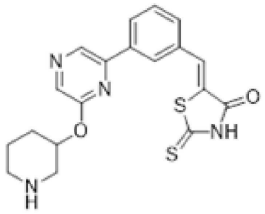


[0155]

[0156] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈를 제조한 후, 화합물 15의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 15를 제조하고 Boc를 제거하였다. 63% 수율.

[0157] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.95 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.12 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.67-7.57(m,2H), 7.31 (s, 1H), 5.87-5.82(m, 1H), 3.67 (dd, J = 13.2, 5.3 Hz, 1H), 3.56 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.47-3.39 (m, 2H), 2.49-2.43 (m, 1H), 2.34-2.27 (m, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 157.7, 146.9, 135.8, 135.6, 134.2, 133.8, 130.9, 129.6, 127.9, 126.6, 74.4, 50.0, 43.7, 30.5; ESI-MS m/z: 385 $[M+H]^+$.

[0159] **(21) 5-(3-(6-(피페리딘-3-일옥시)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리 딘-4-온 [5-(3-(6-(Piperidin-3-yloxy)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (16) 합성**

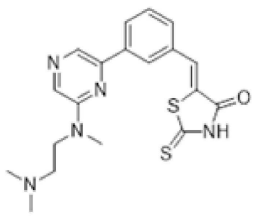


[0160]

[0161] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈를 제조한 후, 화합물 11의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 16을 제조하고 Boc를 제거하였다. 46% 수율.

[0162] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.93(s, 1H), 8.33(s, 1H), 8.31(s, 1H), 8.13(m, 1H), 7.63(m, 2H), 7.33 (s, 1H), 5.60-5.52 (m, 1H), 3.49-3.40 (m, 2H), 3.20-3.05 (m, 2H), 2.14-2.07 (m, 1H), 2.06-1.98 (m, 2H), 1.87-1.78 (m, 1H), 1.52-1.38 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ ; ESI-MS m/z: 399 $[M+H]^+$.

[0164] **(22) 5-(3-(6-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴) -2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (18) 합성**



[0165]

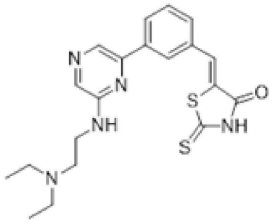
[0166] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 18을 제조하였다. 23% 수율.

[0167] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.51 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.05 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.63-7.56(m,2H), 7.32 (s, 1H), 4.04 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.32 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.18 (s, 3H), 2.81 (s, 6H); 또는 ^{1}H-NMR(500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.51(s, 1H), 8.26(s, 1H), 8.21(s, 1H), 8.05(d, J = 8.5 Hz, 1H),

7.63-7.56 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 4.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.17 (s, 3H), 2.83 (s, 6H);

[0168] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 202.6, 153.6, 147.7, 137.7, 136.2, 135.8, 131.2, 130.1, 130.0, 129.2, 128.1, 127.1, 124.6, 54.6, 44.6, 43.7, 36.2; ESI-MS *m/z*: 399 $[M+H]^+$.

[0170] **(23) 5-(3-(6-((2-(디에틸아미노)에틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티 옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((2-(Diethylamino)ethyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (19)] (19) 합성**

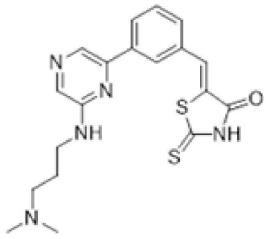


[0171]

[0172] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 19를 제조하였다. 71% 수율.

[0173] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.41(s, 1H), 8.28(s, 1H), 8.01(m, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.81-3.69 (m, 2H), 3.34 (br, 2H), 3.18 (br, 4H), 1.18 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ ; ESI-MS *m/z*: 414 $[M+H]^+$.

[0175] **(24) 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2- 티옥소티아졸리딘-4-온[5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2- thioxothiazolidin-4-one] (20) 합성**

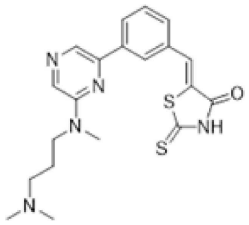


[0176]

[0177] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 20을 제조하였다. 36% 수율.

[0178] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.36(s, 1H), 8.36(s, 1H), 8.02(d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.54 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.79 (s, 6H), 2.10-1.99 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 202.9, 154.5, 147.6, 137.8, 136.0, 133.2, 131.8, 129.9, 128.2, 127.3, 126.6, 124.4, 55.6, 43.0, 37.8, 24.7; ESI-MS *m/z*: 400 $[M+H]^+$.

[0180] **(25) 5-(3-(6-((3-(디메틸아미노)프로필)(메틸)아미노)피라진-2-일)벤질리덴)-2-티옥소티아졸리딘-4-온 [5-(3-(6-((3-(Dimethylamino)propyl)(methyl)amino)pyrazin-2-yl)benzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (21) 합성**



[0181]

[0182] 화합물 17의 제조방법과 유사한 절차에 따라 화합물 R3 시리즈로 화합물 21을 제조하였다. 71% 수율.

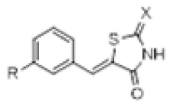
[0183] ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.39 (s,1H),8.34 (s,1H),8.11 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.52 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.25 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.18 (s, 6H), 2.08-1.97 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ 202.9, 154.5, 147.6, 137.8, 136.0, 133.2, 131.8, 129.9, 128.2, 127.3, 126.6, 124.4, 56.9, 47.7, 45.7, 36.0, 25.1; ESI-MS m/z: 414 $[M+H]^+$.

[0185] **실시예 2: 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체의 PIM 키나아제 억제 및 세포 성장 억제 효과 확인**

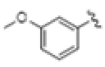
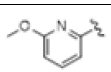
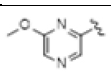
[0186] 2-티아졸리딘-4-온 유도체(2-thiazolidin-2-one derivative)인 TZD와 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체의 PIM-1, PIM-2, PIM-3에 대한 억제 효과와 EOL-1 세포주 및 Molm-16 세포주에 대한 성장 억제 효과를 확인하고자 하였다. PIM-1, PIM-2, PIM-3의 효소 활성을 평가하는 생화학적 검색방법은 형광 편광(fluorescence polarization) 방법을 이용하여 실험을 수행하였으며, EOL-1 세포주 및 Molm-16 세포주에 대한 성장 억제 효과 실험은 MTT 용액의 색변화를 통한 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 수행했다. 실험 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타냈다.

표 1

[0187]



1 2, 3a-c
X = O X = S

구분			IC_{50}(μM)[a]			EC_{50}(μM)[b]	
Compound	R	X	PIM-1	PIM-2	PIM-3	EOL-1	Molm-16
1	Bromo	O	0.22	N.D.[c]	N.D.	N.D.	N.D.
2	Bromo	S	0.16	1.6	0.28	N.D.	N.D.
3a		S	0.073	0.50	0.019	>10	>10
3b		S	0.019	0.089	0.004	1.0	3.3
3c		S	0.011	0.048	0.004	0.012	>10

[a] Biochemical enzyme assays (n = 2) were conducted as described previously, and the ATP concentration was set to the K_m value of each PIM kinase isoform.

[b] The values reported are an average of four independent data points.

[c] N.D., not determined.

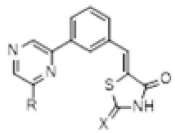
[0188] 상기 표 1의 결과, 벤젠의 3 위치에서 방향족 고리에 의한 브로모 그룹의 치환기는 2-티옥소티아졸리딘-4-온(로다닌)의 억제 활성을 2 배 이상 증가시켰음을 확인할 수 있다. 아울러, 2-티옥소티아졸리딘-4-온(로다닌)의 피리디닐(pyridinyl)(화합물 3b) 유사체 및 피라지닐(pyridinyl)(화합물 3c)는 페닐 유사체 (화합물 3a)보다

PIM 키나아제에 대해 더 높은 억제 효과를 보였다.

[0189] 피라지닐 유사체(화합물 3c)는 인간 골수성(호산구성) 백혈병 세포주 EOL-1의 성장을 억제하는데 가장 높은 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, EOL-1 세포주 및 Molm-16 세포주에서 세포의 성장을 TZD 보다 2배 내지 6 배 이상 현저하게 억제시켰음을 확인할 수 있었다. 이에 본 발명에서 피라지닐 유사체에 다양한 치환기를 치환하여 PIM-1, PIM-2, PIM-3에 대한 억제 효과를 추가로 확인하였다.

표 2

[0190]



구분			IC_{50}(μM)[a, b]		
Compound	R	X	PIM-1	PIM-2	PIM-3
4	Cyclopentylamino	S	0.005	0.052	0.003
5	Cyclohexylamino	S	0.003	0.069	0.002
6	Cyclopentyloxy	S	0.015	0.34	0.006
7	Cyclohexyloxy	S	0.009	0.69	0.007
7a[c]	Cyclohexyloxy	O	0.006	0.097	0.003
8	Pyrrolidin-1-yl	S	0.045	0.91	0.020
9	Piperidin-1-yl	S	0.030	0.30	0.022
10	Morpholino	S	0.004	0.061	0.002
11	Piperazin-1-yl	S	0.001	0.010	0.001
12	3-Aminopiperidin-1-yl	S	0.001	0.009	0.001
13	Pyrrolidin-3-ylamino	S	0.002	0.008	0.001
14	Piperidin-3-ylamino	S	0.001	0.006	<0.001
15	Pyrrolidin-3-yloxy	S	0.002	0.016	0.002
16	Piperidin-3-yloxy	S	0.001	0.013	0.001
17	$Me_2N(CH_2)_2NH$-	S	0.001	0.007	0.001
17a[c]	$Me_2N(CH_2)_2NH$-	O	<0.001	0.006	<0.001
18	$Me_2N(CH_2)_2N(Me)$-	S	< 0.001	0.003	< 0.001
19	$Et_2N(CH_2)_2NH$-	S	< 0.001	0.005	< 0.001
20	$Me_2N(CH_2)_3NH$-	S	< 0.001	0.002	< 0.001
20a[c]	$Me_2N(CH_2)_3NH$-	O	0.003	0.017	<0.001
21	$Me_2N(CH_2)_3N(Me)$-	S	0.001	0.016	0.001

[a] IC_{50} value of compounds 4-7, 17 - 20 as reported in reference Yun, Y. Master's thesis, Keimyung University, 2019.

[b] Biochemical enzyme assays (n = 2) were conducted as described previously , and the ATP concentration was set to the K_m value of each PIM kinase isoform.

[c] IC_{50} value of the TZD analogas reported in *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2014**, *62*, 906.

[0191] 상기 표 2는 다양한 치환기를 갖는 TZD 유도체와 2-티옥소티아졸리딘-4-온(로다닌) 유도체에 대한 PIM-1, PIM-2, PIM-3에 대한 억제 활성을 나타낸 결과로서, 표 1에서 도입된 피라진 고리에 다양한 치환체를 부착하여 pan-PIM 키나아제 억제 활성을 향상시켰음을 확인할 수 있었다. 상세하게, 본 발명에 따른 화합물 4, 5, 6 및 7의 경우, 5 원 또는 6 원 사이클로알킬 치환기(Five-membered cycloalkyl groups or six-membered cycloalkyl groups)는 아민(amine) 또는 에테르 결합(ether linkage)을 통해 부착되었는데, 사이클로알킬 치환기(Cycloalkyl groups)는 PIM-1 및 PIM-3에 대한 억제 활성에 영향을 미치지 않았음을 확인할 수 있었다. 그러나 사이클로알킬기가 에테르 결합한 화합물(화합물 6 및 7)의 경우 사이클로알킬기가 아민으로 결합한 화합물(화합

물 4 및 5)에 비해 PIM-2에 대한 억제 활성을 실질적으로 6 배 이상 감소하였음을 확인할 수 있었다.

[0192] 대조적으로, 아미노기를 포함하는 사이클로알킬 고리 치환기를 갖는 화합물은 연결 유형(화합물 13, 14, 15 및 16)에 관계없이 억제 활성을 향상시켰다. 피롤리딘 및 피페리딘과 같은 헤테로사이클(heterocycle) 치환기를 피라진 고리(화합물 8 및 9)에 직접 부착하면 세 가지 PIM 키나아제 모두에 대한 억제 활성이 감소했지만, 사이클로알킬 고리 화합물 또는 고리의 치환기에 친수성 그룹(hydrophilic group)의 추가는 PIM 키나아제 억제 활성을 회복하였다(화합물 10, 11 및 12). 특히, 모르폴린 치환기를 갖는 화합물(화합물 10)은 PIM 키나아제 억제 활성을 회복하였고, 피페라진 치환기를 갖는 화합물(화합물 11)과 3-아미노피페리딘 치환기를 갖는 화합물(화합물 12)은 PIM 키나아제 억제 활성을 개선하였다.

[0193] 다음으로, 질소 연결(nitrogen linkage)을 사용하여 몇몇 알킬아민(alkylamines)을 피라진 고리(pyrazine ring)에 부착하여 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체(화합물 17-21)를 준비하였다. 실험 결과, 아실릭알킬아민(acylic alkylamine)의 도입은 매우 강력한 억제 효과를 나타냈다. 상세하게, 피라진 고리(pyrazine ring)와 알킬아민(alkylamine) 사이의 에틸렌(Ethylene)과 프로필렌(propylene) 사슬은 2 차 및 3 차 아민 링커(화합물 17-21)에 의해 잘 치환이 되었다. 또한, 디메틸아미노(dimethylamino) 말단기 또는 디에틸아미노(diethylamino) 말단기를 갖는 알킬아민 함유 화합물(화합물 17-21) 간의 활성은 눈에 띄는 차이가 없었다.

[0194] 종합하여 보건데, 상기 표 1 및 표 2의 결과를 통해, 피라진 고리(pyrazine ring)에 다양한 치환기를 갖는 2-티옥소티아졸리딘-4-온(2-Thioxothiazolidin-4-one) 유도체는 종래의 TZD 유도체 보다 PIM 키나아제에 대한 억제 효율이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0195] 아울러, 알킬아민(alkylamines)을 피라진 고리(pyrazine ring)에 질소로 연결한 형태인 본 발명에 따른 화합물 17, 18, 20, 21에 대해서 TZD 유사체와 세포 성장 억제 효과를 비교하기 위해 EC_{50}(μM) 값을 측정하고 그 결과를 하기 표 3에 나타냈다.

표 3

[0196]

Rhodanine analogs [EC_{50}(μM)[a]]			TZD analogs [EC_{50}(μM)[a]]		
Compound	EOL-1	Molm-16	Compound	EOL-1	Molm-16
17	0.020	0.014	17a	0.087	0.028
18	0.037	0.010			
20	0.042	0.021	20a	0.29	0.061
21	0.031	0.002			
[a] The values reported are an average of four independent data points.					

[0197] 상기 표 3의 결과, 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온(2-Thioxothiazolidin-4-one) 유도체는 EOL-1 세포주 및 Molm-16 세포주에서 세포의 성장을 TZD 보다 억제시킴을 확인할 수 있었다.

[0199] **실시예 3: 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체 중 화합물 17에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과**

[0200] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 배양된 Molm-16 세포를 수거한 후 1.0 x 106 개의 Nolm-16 세포에 50-100 μL RIPA buffer (0.1 mM sodium orthovanadate, 137 mM NaCl, 15 mMEGTA, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS, 15 mM MgCl2, 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 μM leupeptin, adjusted to pH 7.2)를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포액을 30분 간 원심 분리하여(12,000 rpm) 상층을 수거하였다. Thermo Scientific 사 (미국)의 단백질 정량 키트로 단백질 농도를 측정하고 정량한 수, 50 μg의 단백질을 polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Immunobilon-P membrane (Millipore 사, 미국)에 단백질을 전기이송법으로 옮긴 후 표적 단백질에 대한 특이 항체(PIM-1, PIM-2, PIM-3, p-BAD, BAD, p-4EBP1, 4EBP1, p70S6 키나아제, p-p70S6 키나아제, 및 β-actin)를 붙여서 ECL Western blot kit (Millipore 사, 미국)을 이용하여 단백질 발현 정도를 분석하였다.

[0201] 비히클 대조군(DMSO)으로 4 시간 처리하거나 상이한 농도별(0.1, 1, 10 μM)로 화합물 17을 Molm-16 세포주에 처리하고 웨스턴 블롯 분석을 수행하고, 그 결과를 도 1에 나타냈다. 이때 PIM447 (EC_{50} = 0.017 μM) 및 AZD1208 (EC_{50} = 0.020 μM) 화합물을 참조로 사용하였다. PIM 키나아제의 생리학적 다운 스트림 신호 전달은

단백질 번역 조절제(4EBP1, S6 리보솜 단백질) 및 세포아폽토시스 조절제(BAD)를 포함하여 많은 기질의 인산화를 통해 매개되는바, 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유사체가 이들 단백질에 조절에 영향에 미치는지 확인하고자 하였다.

[0202] 도 1의 결과, 본 발명에 따른 화합물 17이 phospho-BAD(pBAD, Ser112에서 인산화 된 것임) 및 phospho-4EBP1(p4EBP1, Thr70에서 인산화된 것임)의 발현을 용량 의존적 방식으로 조절함을 확인할 수 있었다. 즉, 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유사체의 4EBP1 및 BAD의 인산화를 차단하는 시험관 내 표적 효과를 입증하였다. 따라서, 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체는 PIM 기질 발현을 조절함을 확인할 수 있었다.

[0204] **실시예 4: 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체의 다른 키나아제에 대한 활성 평가**

[0205] 대표물질로서 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체인 화합물 17을 최종농도 1 μM에서 15 개의 키나아제에 대한 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체의 선택성을 평가하고자 하였다. 키나아제 활성은 Eurofins Discovery Service의 KinaseProfiler™을 이용하여 Eurofins사의 내부 radiometric kinase activity assay 프로토콜 기준 하에 측정하였다.

표 4

[0206]

구분	Enzyme	activity in %[a]	구분	Enzyme	activity in %[a]
1	Aurora-A	89	9	JNK3	94
2	CDK2/cyclinA	61	10	KDR	77
3	CK2	-2	11	MAPK2	97
4	cSRC	93	12	Met	124
5	Flt3	91	13	Plk1	86
6	GSK3β	56	14	SAPK2a	107
7	IRAK4	101	15	TAK1	111
8	JAK2	85	16		

[a] Values were obtained from the KinaseProfiler™ projectofEurofins.

[0207] 상기 표 4의 결과, 본 발명에 따른 화합물 17은 1μM 농도에서 CK2에 대해 강한 억제를 나타내고, CDK2, GSK3 및 KDR에 대해 약하거나 중간 정도의 억제를 나타냈다. 세 가지 PIM 키나아제 모두에 대한 화합물 17의 IC_{50} 값이 한 자리 나노 몰 범위에 있기 때문에 CK2를 제외하고 실험한 모든 다른 키나아제 보다 PIM 키나아제에 대해 100 배 이상 더 선택성을 갖음을 확인할 수 있었다. 한편 TZD 유사체는 1 μM 농도에서 IRAK4, JNK3, KDR 및 Met를 약하게만 억제하였음이 연구된 바 있는데(억제율은 22% 미만), 대조적으로 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체인 화합물 17은 Aurora-A, CDK2, GSK3, JAK2, KDR 및 Plk1에 대해 11 내지 54% 억제율과 CK2에서 완전한 억제를 나타냈음을 확인할 수 있었다.

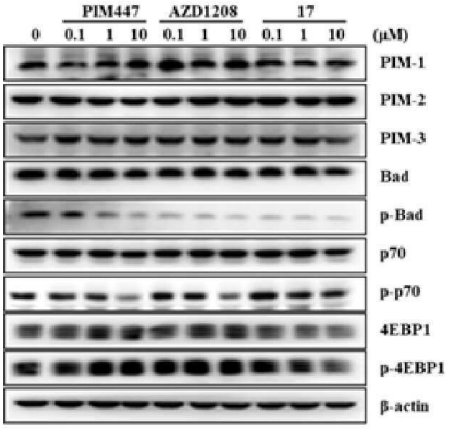
[0208] 종합하여 보건데, 본 발명에서는 PIM 키나아제의 강력하고 선택적인 억제제로서 일련의 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체를 확인하였다. 본 발명에 따른 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체는 세 가지 PIM 키나아제에 대한 억제 효과가 있고, 나아가 EOL-1 세포주 및 Molm-16 세포주에 대한 항증식 활성은 TZD 보다 훨씬 높았음을 확인하였다. 또한, 본 발명에서는 4EBP1 및 BAD의 인산화를 차단하는 2-티옥소티아졸리딘-4-온 유도체의 시험관 내 표적 효과를 입증하였다.

[0209] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 PIM 단백질 키나아제를 효과적으로 억제할 수 있어 PIM 단백질 키나아제의 과활성화에 의해 유발되는 비정상적 세포 성장과 연관된 질환, 특히 암 질환, 염증, 면역 장애 등의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[0211] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1


PIM447
AZD1208
17
0
0.1
1
10
0.1
1
10
0.1
1
10
(μM)
PIM-1
PIM-2
PIM-3
Bad
p-Bad
p70
p-p70
4EBP1
p-4EBP1
β-actin