



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0018084
(43) 공개일자 2017년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 491/052 (2006.01) *A61K 31/4162*
(2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 491/052 (2013.01)
A61K 31/4162 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7002960
(22) 출원일자(국제) 2015년07월10일
심사청구일자 2017년02월02일
(85) 번역문제출일자 2017년02월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/040021
(87) 국제공개번호 WO 2016/007905
국제공개일자 2016년01월14일
(30) 우선권주장
62/022,946 2014년07월10일 미국(US)

(71) 출원인
더 리젠크스 오브 더 유니버시티 오브 콜로라도, 어
바디 코포레이트
미국 콜로라도 80203 덴버 제8 플로어 그랜트 스
트리트 1800
(72) 발명자
테오도레스쿠, 댄
미국, 콜로라도 80111, 잉글우드, 이. 크레스트리
지 레인 10264
벤페, 마이클
미국, 콜로라도 80013, 오로라, 이. 맨스필드 플
레이스 21497
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 RAL GTPASES를 타겟으로 하는 항암용 화합물 및 이의 사용방법

(57) 요 약

대상에서 Ral GTPase를 억제함으로써 대상자의 암의 성장 또는 전이를 억제하는 방법, 및 본 발명의 방법에 유용한 Ral GTPase의 소분자 억제제. 본 발명의 화합물을 함유하는 약제 학적 조성물 및 이를 사용하는 방법.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

로스, 레이비드

미국, 콜로라도 80503, 니워트, 코만치 로드 8787

얀, 채오

미국, 콜로라도 80247, 덴버, 에이피티. 6-202,

이. 미시시피 에비뉴 9123

레이건, 필립

미국, 콜로라도 80209, 덴버, 에이피티. 1215, 이
스트 베이오드 에비뉴 3329

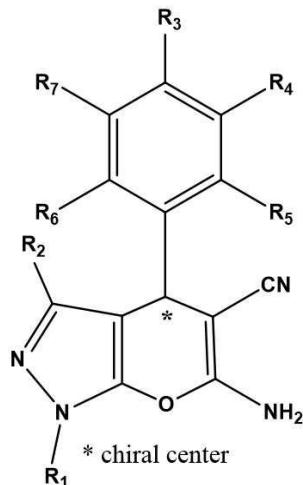
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 라세메이트(racemates) 및 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R₁은 수소, 할로젠, -OH, O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, C₆-C₁₂ 아릴, 치환된 C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂R₈ 및 -NHCO₂R₈로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R₂는 수소, 할로젠, -OH, O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, C₆-C₁₂ 아릴, 치환된 C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂R₈ 및 -NHCO₂R₈로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R₃, R₄, R₅, R₆ 및 R₇은 독립적으로 수소, 할로젠, -OH, -O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, 이미다졸, C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂-R₈, -NHCO₂-R₈, 및 선택적으로 할로젠, 산소 C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴 및 C₁-C₆ 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, 및 선택적으로 할로젠, C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴 및 C₁-C₆ 알콕시로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₆-C₁₂ 아릴; 또는,

R₃ 및 R₄는 함께 시클로헥산, 1,4-디옥산 또는 페닐을 형성하고; 및,

R₈은 선택적으로 할로젠, 산소, C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴 및 C₁-C₆ 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, 또는 선택적으로 할로젠, C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, 및 C₁-C₆ 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₆-C₁₂ 아릴이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R_1 은 할로젠, C_1-C_6 알킬, 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴, 수소, 메틸, 페닐, 메틸-페닐, 메톡시로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 라세메이트(racemates) 및 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 R_2 는 할로젠, C_1-C_6 알킬, 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴, 수소, 메틸, 페닐, 메틸-페닐, 메톡시로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 라세메이트(racemates) 및 염.

청구항 4

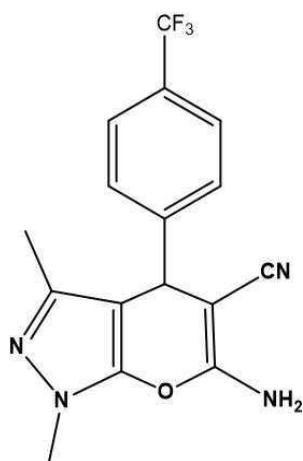
제1항에 있어서,

상기 R_3 는 수소, 할로젠, 메톡시, 선택적으로 할로젠으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 시아노, 이미다졸, 및 할로젠과 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 라세메이트(racemates) 및 염.

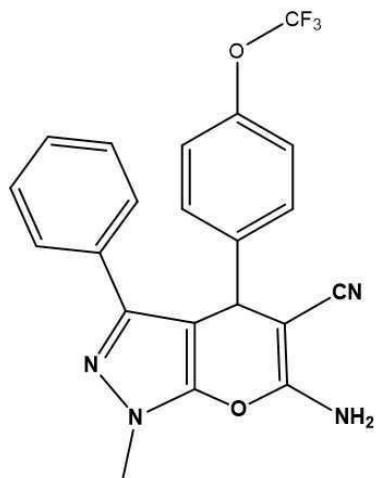
청구항 5

제1항에 있어서,

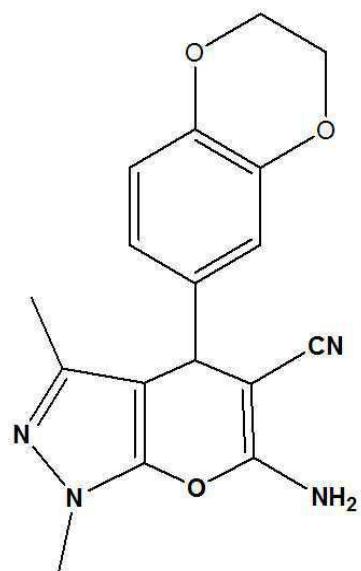
상기 화합물은 하기 화학식으로 표시되는 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 라세메이트(racemates) 및 염:



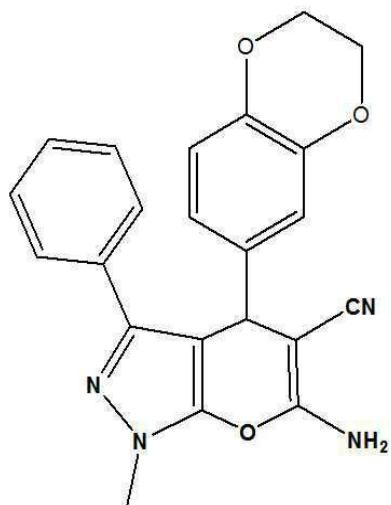
6-아미노-1,3-디메틸-4-(4-(트리 플루오로 메틸) 폐닐)-1,4-디하드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴,



6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(4-(트리 플루오로메톡시) 폐닐)-1,4-디하드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴,



6-아미노-4-(2,3-디하드로 벤조 [b] [1,4] 디 옥신-6-일)-1,3-디메틸-1,4-디하드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴, 및,



6-아미노-4-(2,3-디하드로 벤조 [b] [1,4] 디 옥신-6-일)-1-메틸-3-페닐-1,4-디하드로파라노[2,3-c]파라졸-

5-카보 니트릴.

청구항 6

최소한 하나의 제1항의 화합물 및 최소한 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7

제6항의 약학적 조성물을 포함하는 약학적 패키지(pharmaceutical package).

청구항 8

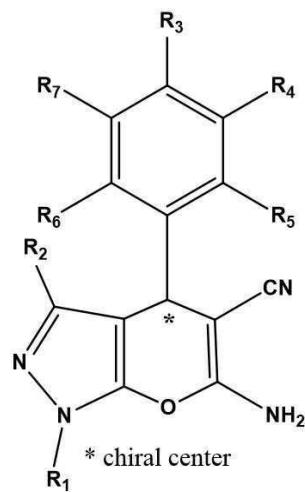
제6항의 약학적 조성물, 상기 조성물에 대한 처방정보 및 용기를 포함하는 약학적 키트.

청구항 9

치료학적으로 유효한 양의 Ral GTPase를 저해하는 화합물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 대상(subject)에서 암의 전이 방지, 암의 예방, 치료 또는 개선 방법이되,

여기서 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 라세메이트(racemates) 및 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R₁은 수소, 할로젠, -OH, O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, C₆-C₁₂ 아릴, 치환된 C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂R₈ 및 -NHCO₂R₈로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R₂는 수소, 할로젠, -OH, O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, C₆-C₁₂ 아릴, 치환된 C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂R₈ 및 -NHCO₂R₈로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 및 R_7 은 독립적으로 수소, 할로젠, $-OH$, $-O-R_8$, C_1-C_{12} 알킬, C_3-C_{12} 알케닐, C_4-C_{12} 디에닐, C_6-C_{12} 트리에닐, C_8-C_{12} 테트라에닐, 이미다졸, C_6-C_{12} 아릴, C_1-C_{12} 알콕시, 카르복시, 시아노, C_1-C_{12} 알카노일옥시, C_1-C_{12} 알킬싸이오, C_1-C_{12} 알킬설포닐, C_2-C_{12} 알콕시카보닐, C_2-C_{12} 알카노일아미노, $S-R_8$, $-SO_2-R_8$, $-NHSO_2-R_8$, $-NHCO_2-R_8$, 및 선택적으로 할로젠, 산소 C_1-C_6 알킬, C_6-C_{10} 아릴 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 및 선택적으로 할로젠, C_1-C_6 알킬, C_6-C_{10} 아릴 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴; 또는,

R_3 및 R_4 는 함께 시클로헥산, 1,4-디옥산 또는 페닐을 형성하고; 및,

R_8 은 선택적으로 할로젠, 산소, C_1-C_6 알킬, C_6-C_{10} 아릴 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 또는 선택적으로 할로젠, C_1-C_6 알킬, C_6-C_{10} 아릴, 및 C_1-C_6 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴이다).

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 R_1 은 할로젠, C_1-C_6 알킬, 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴, 수소, 메틸, 페닐, 메틸-페닐, 메톡시로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 R_2 는 할로젠, C_1-C_6 알킬, 및 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴, 수소, 메틸, 페닐, 메틸-페닐, 메톡시로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

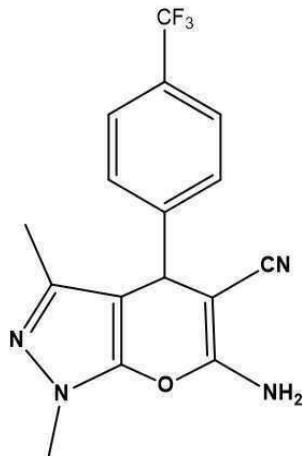
제9항에 있어서,

상기 R_3 은 수소, 할로젠, 메톡시, 선택적으로 할로젠으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 시아노, 이미다졸, 및 할로젠과 C_1-C_6 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C_6-C_{12} 아릴로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

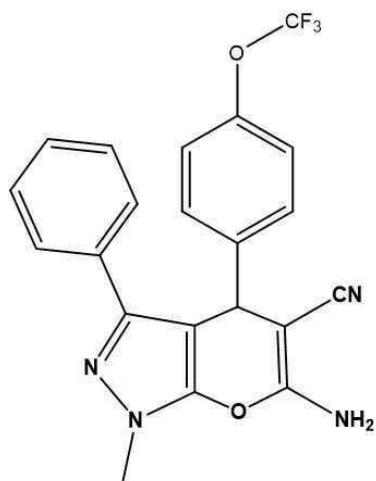
청구항 13

제1항에 있어서,

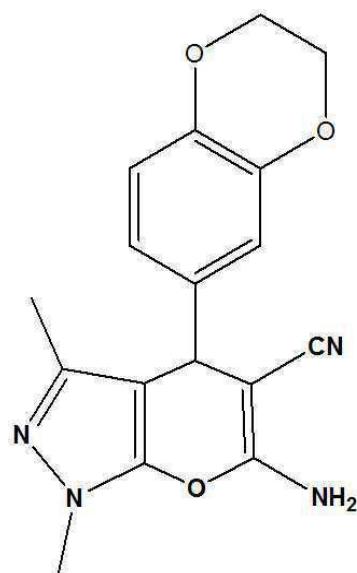
상기 화합물은 하기 화학식으로 표시되는 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 방법:



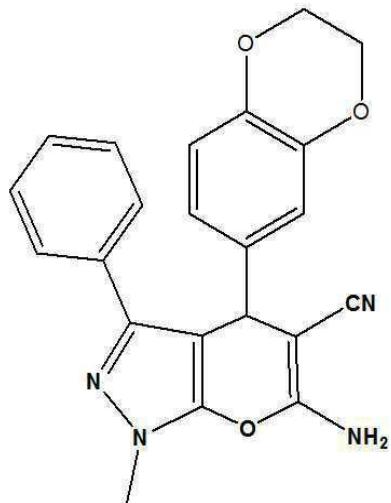
6-아미노-1,3-디메틸-4-(4-(트리 플루오로 메틸) 페닐)-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴,



6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(4-(트리 플루오로메톡시) 페닐)-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴,



6-아미노-4-(2,3-디하이드로 벤조 [b] [1,4] 디 옥신-6-일)-1,3-디메틸-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴, 및,



6-아미노-4-(2,3-디히드로 벤조 [b] [1,4] 디 옥신-6-일)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보 니트릴.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 화합물은 약학적 조성물로 포함되어 상기 대상에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서.

상기 약학적 조성물은 본질적으로 약학적으로 유효량의 화합물, 및 약학적으로 허용 가능한 담체로 이루어진 경구 투여 또는 비경구 투여에 적합한 단일-상의 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 방법.

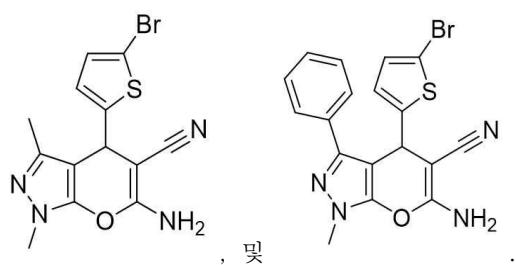
청구항 16

제14항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 하나 이상의 GGTase-I(geranylgeranyltransferase type I) 억제제, 수술, 화학 요법, 방사선, 면역 요법 또는 이의 조합과 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

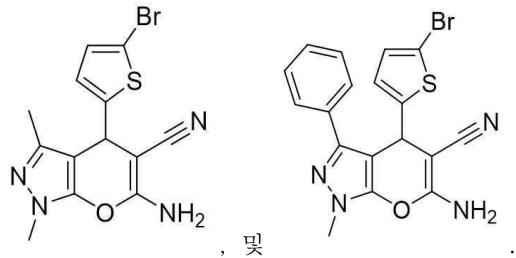
하기 화학식으로부터 선택되는 화학 구조를 가지는 화합물:



청구항 18

치료학적으로 유효한 양의 Ral GTPase를 저해하는 화합물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 대상(subject)에서 암의 전이 방지, 암의 예방, 치료 또는 개선 방법이되,

상기 화합물은 하기로부터 선택되는 화학 구조를 가진다:



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치료학적 화합물, 이를 함유하는 약학적 조성물 및 암의 치료에서 이의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Ras는 다른 어느 암 유전자(oncogene)보다 더욱 빈번하게 암에서 변이된다. 따라서, Ras는 합리적으로 디자인된 항암제의 개발을 위하여 주목되었지만, 아직까지 성공적인 개발이 이루어지지 않았다. 1989년에, 몇몇 그룹들은 Ras 막 연합 및 변화에 필수적인 파르네실 지질(farnesyl lipids)에 의한 Ras 단백질의 번역 후 변형(posttranslational modification)을 밝혀냈다. 파르네실전달효소(FTase)는 이후 정제되었고, 특정되었으며, 얼마 지나지 않아, 제라닐제라닐 지질(geranylgeranyl lipid)과 함께 Ras를 변화시키는 제2의 프레닐전달효소(second prenyltransferase)인, 제라닐제라닐전이효소(geranylgeranyltransferase) 타입 I(GGTase-I)이 발견되었다. GGTase-I 억제제 (GGTIs)들이 연구되어 졌으며 및 GGTI-2417과 같은 적어도 하나의 억제제는 MiaPaCa2 췌장 세포 라인의 체외 성장(in vitro growth) 및 생존을 억제하는 것으로 나타났다. 하지만, 이러한 억제 효과들은 미미한 것으로 어떠한 GGTI의 임상 실험도 수행되지 않았다.

[0003] Ral(Ras-유사) GTPase는 GTPase의 Ras 하위 패밀리의 구성원이며 활성 GTP 결합과 비활성 GDP 결합 상태 사이를 순환하는 분자 스위치로서 작용하여 Ral 특이 적 구아닌 계열 중 하나와의 상호 작용시 활성화된다. Ral-GEFs는 Ral에서 GDP 방출을 촉진하여 GTP가 그 자리에서 결합하도록 한다. Raf와 포스포이노시티드-3-키나제(phoinositide-3-kinase)(PI3-K)와 함께 Ral-GEFs는 단백질이 세포 내에서 Ras 단백질에 결합하여 조절되는 3종의 단백질을 구성한다. Ral-GTPase는 인간 Ras와 46%-51%의 동일성을 공유하며 Ras 신호 및 Ras 종양 형성의 중요한 구성 요소이며 종양에서 돌연변이 Ras의 중요한 작동제이다(Genes & Cancer 2011 2 (3) : 275-287). Ral GTPase는 암 환자의 주요 사망 원인인 종양 전이에도 매우 관련되어 있다. 따라서 Ral 단백질은 Ras와 유사한 치료제 발명의 임상적으로 중요한 표적입니다. 그러나 Ras 또는 다른 GTPase에 대한 임상적으로 유용한 억제제를 얻지 못한 바, 이 목표 군이 치료적 도전 과제임을 알 수 있다. 이것에 대한 하나의 이유는 구아닌 뉴클레오타이드 GDP/GTP에 대한 높은 친화성과 세포에서 이들 뉴클레오타이드의 밀리몰 농도 때문에 억제를 위한 작은 G 단백질의 활성 부위를 직접적으로 표적화 할 수 없다는 것이다. 그러나 Ras 및 다른 GTPase와 달리 RalA 또는 RalB 돌연변이는 효과적인 항암 치료법을 개발할 가능성 있는 접근법을 만드는 인간 암 또는 암 세포주에서 드물다(<1 %).

[0004] 따라서, Ral GTPase는 고형 종양의 예방 및 치료 및 이들 암의 전이에 대한 강력한 치료 표적을 제공하며, 암 치료를 위한 Ral GTPases를 억제하는 효과적인 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 암 치료를 위한 Ral GTPases 억제 화합물 및 이를 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물 또는 상기 약학적 조성물을 포함하는 약학적 패키지를 제공한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물 또는 상기 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 대상에게 투여함으로부터 암의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

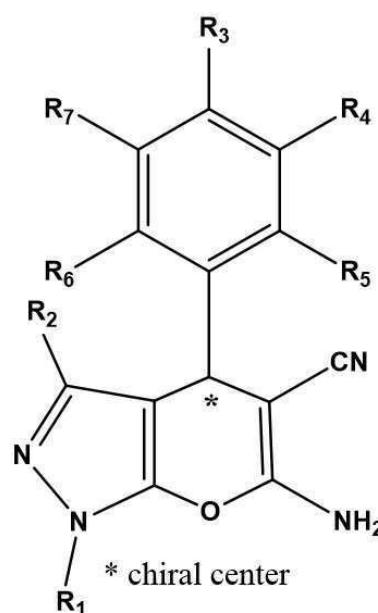
[0008] 본 발명은 Ral GTPase에 결합하고 효과적으로 억제하는 소분자 및 이를 사용하는 치료 방법을 제공한다. 본 발명자들의 발견은 뉴클레오타이드 결합 포켓과는 다른 비활성, 그러나 활성이 아닌 단백질 구조에서 이용 가능한 부위를 확인한 컴퓨터 분석에 기초한다. 이 포켓에 작은 분자를 분자적으로 도킹하여 실험적 검증을 한 결과 적어도 3종의 화합물이 만들어졌는데, 이 화합물은 실험대상인 RalBP1에 대한 시험 관내 Ral 결합, 마우스의 섬유아세포에서의 Ral 매개 세포 확산 및 인간 암 세포주의 고정 독립 성장을 억제했다. 2개의 화학적으로 관련된 화합물의 전달은 생체 내 유리한 약물 동력학 및 종양 약물 흡수를 나타내었다. 이들 화합물 유도체의 합성은 RalB에 대한 결합 표면 플라즈마 공명 및 15N-HSQC NMR에 의해 확인된 본 발명의 화합물로부터 유도되었다. 이들 화합물은 siRNA Ral 붕괴와 유사한 정도로 이종 이식 성장을 억제한다.

[0009] 본 발명의 화합물은 인간 종양 이종 이식에서 동등하게 RalA 및 RalB 둘다의 활성을 억제한다. 종양 형성 및 전이에서의 RalA 및 RalB의 뚜렷하고 때로는 적대적인 역할이 제안되었지만, 유전 마우스 모델은 발달 및 종양 형성 모두에서 실질적인 중복을 나타내었다. 본 연구는 RalA와 RalB GTPase 모두를 억제하는 화합물의 중요성과 임상 유용성을 뒷받침한다.

[0010] 본 발명의 화합물은 Ral siRNA에 의해 유도된 성장 억제 효과를 모방하고 RalA 및 RalB의 활성을 억제하지만 이 종 이식 종양 샘플에서 밀접하게 관련된 GTPase Ras 또는 RhoA는 억제하지 않으면서 거의 타겟 이탈 효과가 없는 Ral에 대해 선택적이다. NMR 적정 실험 결과, 이들 화합물은 RalB-GDP에만 결합하지만 RalB-GTP에는 결합하지 않아 Ral로부터 Ral-GEFs(Ral-specific guanine nucleotide exchange factors)와 Ral로부터의 GDP 방출을 방지하고, 그 자리에 GTP 결합을 하며, Ral 활성-의존 표현형(phenotypes)을 억제한다.

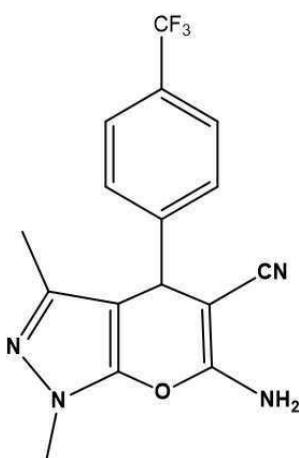
[0011] 생화학적, 세포 내 및 생체 내 분석에 이은 계산 기반 스크리닝은 암 치료에서의 임상적 사용을 위해 Ral 단백질에 결합하여 효과적으로 억제하는 본 발명의 소분자를 확인하였다. 따라서, 본 발명은 Ral GTPase를 저해할 수 있는 분자뿐만 아니라 이들 분자의 치료적 용도를 이용하여 대상에서 암의 성장 및 전이를 예방 또는 지연시킨다. 본 발명은 또한 이들 화합물을 함유하는 약학적 조성물 및 암을 치료 또는 예방하기 위해 상기 화합물 및 상기 약학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 한 양태로 Ral GTPase 억제 활성을 가지며 하기 화학 구조를 갖는 본 발명의 화합물, 약학적으로 허용 가능한 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체, 라세미체 및 이들의 염을 제공한다:



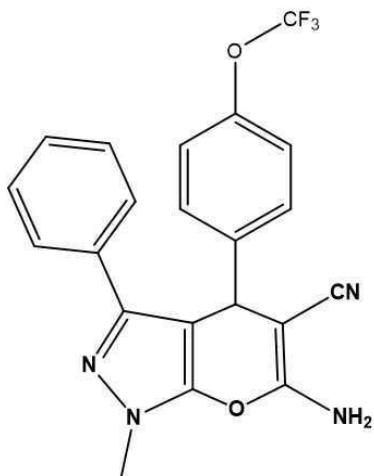
[0013]

- [0014] 상기 화학식에서,
- [0015] 상기 화학식 1에서,
- [0016] R₁은 수소, 할로젠, -OH, O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, C₆-C₁₂ 아릴, 치환된 C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂R₈ 및 -NHCO₂R₈로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0017] R₂는 수소, 할로젠, -OH, O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, C₆-C₁₂ 아릴, 치환된 C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂R₈ 및 -NHCO₂R₈로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0018] R₃, R₄, R₅, R₆ 및 R₇은 독립적으로 수소, 할로젠, -OH, -O-R₈, C₁-C₁₂ 알킬, C₃-C₁₂ 알케닐, C₄-C₁₂ 디에닐, C₆-C₁₂ 트리에닐, C₈-C₁₂ 테트라에닐, 이미다졸, C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₁₂ 알콕시, 카르복시, 시아노, C₁-C₁₂ 알카노일옥시, C₁-C₁₂ 알킬싸이오, C₁-C₁₂ 알킬설포닐, C₂-C₁₂ 알콕시카보닐, C₂-C₁₂ 알카노일아미노, S-R₈, -SO₂-R₈, -NHSO₂-R₈, -NHCO₂-R₈, 및 선택적으로 할로젠, 산소 C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴 및 C₁-C₆ 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, 및 선택적으로 할로젠, C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴 및 C₁-C₆ 알콕시로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₆-C₁₂ 아릴; 또는,
- [0019] R₃ 및 R₄는 함께 시클로헥산, 1,4-디옥산 또는 페닐을 형성하고; 및,
- [0020] R₈은 선택적으로 할로젠, 산소, C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴 및 C₁-C₆ 알콕시로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₁-C₁₂ 알킬, 또는 선택적으로 할로젠, C₁-C₆ 알킬, C₆-C₁₀ 아릴, 및 C₁-C₆ 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C₆-C₁₂ 아릴이다.
- [0021] 특정 실시예에서, 화합물의 R1 치환기는 선택적으로 할로젠, C1-C6 알킬 및 C1-C6 알콕시로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C6-C12 아릴, 수소, 메틸, 페닐, 메틸-페닐, 메톡시로부터 선택된다.
- [0022] 특정 실시예에서, 화합물의 R2 치환기는 할로젠, C1-C6 알킬 및 C1-C6 알콕시로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C6-C12 아릴, 수소, 메틸, 페닐, 메틸-페닐, 메톡시로부터 선택된다.
- [0023] 특정 실시예에서, 화합물의 R3 치환기는 수소, 할로젠, 메톡시, 선택적으로 할로젠으로 치환된 C1-C6 알킬, 시아노, 이미다졸 및 선택적으로 할로젠, 및 C1-C6 알콕시로부터 선택된 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C6-C12 아릴로부터 선택된다.
- [0024] 특정 실시예에서, 상기 화합물은 하기로부터 선택된 화학 구조를 갖는다:



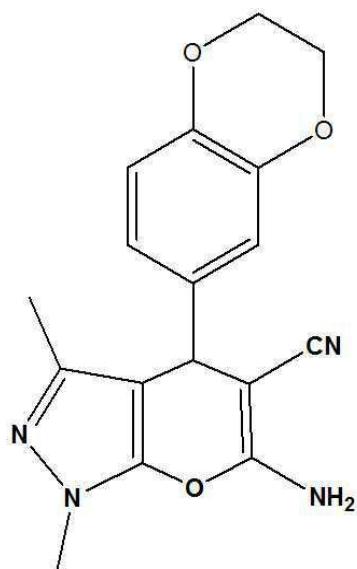
[0025]

[0026] 6-아미노-1,3-디메틸-4-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴,



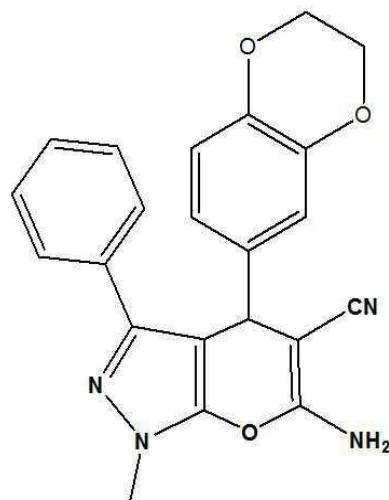
[0027]

[0028] 6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(4-(트리플루오로메톡시)페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴,



[0029]

[0030] 6-아미노-4-(2,3-디히드로벤조[b][1,4]디옥신-6-일)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴, 및,



[0031]

[0032] 6-아미노-4-(2,3-디히드로벤조[b][1,4]디옥신-6-일)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보

니트릴.

- [0033] 본 발명의 또 다른 양태는 치료가 필요한 대상에게 치료적 유효량의 Ral GTPase 효소 활성을 저해하는 화합물을 투여함으로써 암을 치료하는 방법이다. 상기 양태의 한 측면에서, 화합물은 Ral GTPase(RalA 또는 RalB 중 어느 하나)의 적어도 하나의 파라로그(paralog)를 억제하고, 이로부터 암의 성장 또는 전이를 억제한다. 이 실시 양태의 바람직한 측면에서, 화합물은 RalA 및 RalB 둘 모두의 파라로그를 억제한다.
- [0034] 본 발명의 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 상기 방법의 특정 실시 양태에서, 화합물은 본 발명의 약학적 조성물과 대상에게 투여된다.
- [0035] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나 이상의 제약상 허용되는 담체와 함께 하나 이상의 본 발명의 화합물을 함유하는 약학적 조성물이다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 실시 양태는 치료적 유효량의 적어도 하나의 본 발명의 화합물을 치료의 필요성 또는 암의 전이 또는 암의 전이가 의심되는 경우 대상에 투여함으로써 전이성 암, 특히 전이 췌장, 전립선, 폐, 방광, 피부 및/또는 대장을 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 실시 양태는 본 발명의 화합물 중 적어도 하나와 하나 이상의 다른 공지된 항암 또는 항염증 치료의 치료학적으로 유효한 조합물을 투여함으로써 암을 치료하는 방법이다. 예를 들어, 다른 항암 치료제는 게라닐게라닐트랜스퍼라제 타입 I(GGTase-I) 억제제를 포함하는 프레닐트랜스퍼라제 억제제, 수술, 화학 요법, 방사선, 면역 요법 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 약학적 조성물 중 임의의 것을 치료를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 것을 포함하는, 대상의 암의 예방, 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 화합물을 함유하는 치료 유효량의, 예를 들어, 본 발명의 적어도 하나의 화합물을 함유하는 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 대상에서 암의 전이를 예방하는 방법을 제공한다.
- [0040] 또한, 약학적 조성물 내에 본 발명의 하나 이상의 화합물의 치료 유효량을 포함하는 약학적 패키지가 제공된다. 상기 약학적 조성물은 환자에서 암의 예방, 치료 또는 개선에 사용되는 다른 화합물 또는 치료법과 별도로 혹은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 상기 패키지에는 처방 정보 및/또는 컨테이너(용기)가 포함될 수도 있다. 존재하는 경우, 처방 정보는 단독으로 또는 대상에서 암의 예방, 치료 또는 개선에 사용되는 다른 치료법과 병용하여 투여 및/또는 이들 약학적 조성물의 용도를 기술할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 실시 양태는 대상에서 암세포 수 또는 종양 부피에서 감소 또는 성장 억제를 나타내는 것으로 추정되는 억제제의 투여에 대한 반응에 대하여 대상을 실험함으로부터 Ral GTPase 활성의 추정된 억제제로의 치료에 대한 폐암을 갖는 대상의 감수성 시험 방법이다.
- [0042] 본 발명의 여타의 양태들은 기술된 본 발명의 실시예에서 설명될 것이며, 이하의 설명으로부터 명백해질 것이며, 발명의 실시에 의해 습득될 수도 있다. 그러나, 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변경 및 변형이 당업자에게 자명하고 본 발명의 범위 내에 포함되기 때문에, 실시예에 대한 다음의 설명은 단지 설명을 위한 것으로 이해되어야 한다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명은 대상에서 Ral GTPase를 억제함으로써 대상의 암 성장 또는 전이를 억제하는 방법, 및 본 발명의 방법에 유용한 Ral GTPase의 소분자 억제제(화합물)을 제공한다. 또한 본 발명의 화합물을 함유하는 약학적 조성물 및 이를 사용하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1a 및 1b는 Ral 단백질상의 표적 부위의 문자 모델링을 도시한다(리본(도 1a) 또는 표면(도 1b) 표면의 RalA-GDP 구조 모델).
- 알로스테릭 결합 부위는 스위치 II, 헬릭스 α 2 및 헬릭스 α 3에 의해 형성된다. exo84와 복합체의 RalA-GNP의 표면 표면(C-D) (도 1c, exo84는 표시되지 않음) 및 sec5와 복합체로된 RalA-GNP(도 1d, sec5는 표시되지 않음). 도 1b 및 1c에서 구/면은 바인딩 캐비티에서 수분 접근 가능 영역을 나타낸다. 모든 모델은 Accelrys

Discovery Studio 소프트웨어에서 게시된 구조를 사용하여 생성되었다.

도 2a는 화합물 BQU57 및 BQU85에 대한 화학적 합성도를 도시한다. 도 S3B-D는 Ra1에 결합된 BQU57의 특성을 보여준다. 도 2b는 100 μ M BQU57 존재하에서 Ra1B-GNP(100 μ M)의 화학적 변화를 보여준다. 도 2c는 BQU57의 농도가 증가함에 따라 Ra1B-GDP에서 선택된 잔기의 1H-15N-HSQC NMR 화학적 변화의 플롯을 나타낸다. BQU57과 Ra1B-GDP 사이의 결합에 대한 KD의 표면 플라스몬 공명 측정은 결합 곡선이 4.7 μ M의 KD 값을 제공함을 보여준다.

도 3a-3E는 Ra1에 결합하는 화합물의 특성을 나타낸다. 도 3a는 RBC8의 유도체인 BQU57의 구조를 보여준다. 도 3b는 100 μ M Ra1-GDP의 15N-HSQC 스펙트럼과 100 μ M BQU57이 존재하는 경우의 오버레이이다. 도 3c는 40 μ M과 100 μ M에서 BQU57의 농도가 증가할 때 및 없을 때 Ra1B-GDP의 선택된 잔기를 보여준다. 도 3d는 Ra1B-GDP 단독(100 μ M)과 100 μ M BQU57 존재하를 비교한 잔여 수의 함수로서 화학적 변화의 플롯을 보여준다. 도 3e는 등온 적정 열량계(ITC)를 사용하여 결정된 Ra1B-GDP에 대한 BQU57의 결합을 보여준다.

도 4a-4J는 인간 암 세포주에서 Ra1 억제제의 성장 억제 활성을 나타낸다. 4개의 인간 폐암 세포주의 고정 배양 되지 않은 성장에 대한 BUQ57(도 4a) 및 BQU85(도 4b) 처리의 효과. 세포를 다양한 농도의 약물을 함유한 연한 한천에 접종 하였고; 연한 한천에서 형성된 콜로니를 2-4 주 후에 추산되었다. Ra1 siRNA knockdown(H2122 및 H358)에 민감한 세포주는 회색이고 Ra1 siRNA knockdown에 강한 세포주(H460 및 Calu6)는 검정색이다. 데이터는 세 가지 독립적인 실험의 평균값을 나타낸다. 부드러운 한천에서의 약물 유도된 성장 억제에 대한 H2122(도 4c, 4D) 및 H358(도 4e, 4F) 세포에서의 Ra1A 및 Ra1B 모두의 siRNA 녹다운 효과. 세포를 48시간 동안 10/30/50 nM siRNA로 트랜스펙션하고, 수집하여 연한 한천 콜로니 형성 분석을 수행하였다. 연한 한천 콜로니 수에 대한 siRNA 단독의 효과를 도 4c(H2122) 및 도 4e(H358)에 나타내었다; 도 4d(H2122) 및 도 4f(H358)에서 DMSO 처리된 대조군의 % 비율로서 콜로니 형성에 대한 siRNA + 약물 처리의 효과를 나타낸다. 부드러운 한천에서의 약물-유도 성장 억제에 대한 H2122(도 4g, 4H) 및 H358(도 4i, 4J) 세포에서의 Ra1AG23V 및 Ra1BG23V의 과발현 효과. 부드러운 한천 콜로니 형성 분석 전에 H2122 세포를 48시간 동안 FLAG-Ra1AG23V 또는 FLAG-Ra1BG23V로 일시적으로 형질 감염시켰다. H358 세포는 FLAG-Ra1AG23V 또는 FLAG-Ra1BG23V로 안정적으로 형질 감염시켰다. 도 7f에서 과발현은 면역블로팅에 의해 확인되었다. 표시된 모든 결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸 것이다. *는 표시된 그룹 간의 통계적 유의 차를 나타낸다.

도 5a-도 5h는 폐암의 인간 이종 이식 모델에 대한 Ra1 억제제의 효과를 나타낸다. 단일 i.p. 50 mg/kg의 투여 3시간 후 누드 마우스에서 RBC8(도 5a) 및 BQU57(도 5b)의 조직 분포; 데이터는 3마리의 마우스의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다. (도 5c 및 도 5d) 50 mg/kg/일 RBC8 접종 개시 24시간 후에 인간 폐암 세포주 H2122의 이종 이식 종양 성장을 억제하였다. 데이터는 6마리의 마우스의 평균 \pm SEM(평균의 표준오차)을 나타낸다. Dunnett 검사 (* p <0.05)에 의해 결정된 바와 같이, 치료군의 종양 체적은 대조군과 통계적으로 달랐다. 전형적인 종양 외관은 도 5d에 표시한다. 도 5e는 H2122 세포의 이종 이식 종양 성장을 Ra1A 및 Ra1B 둘 다의 siRNA 결핍이 억제함을 보여준다. 세포를 24시간 동안 Ra1A 및 Ra1B에 대한 siRNA로 일시적으로 형질 감염시켰다; 이어서 누드 마우스에 세포를 접종하였다; 종양을 모니터링하고 전술한 바와 같이 측정하였다. 데이터는 6마리의 마우스의 평균 \pm SEM을 나타낸다. 치료 그룹의 종양 부피는 Dunnett 검사 (* p <0.05)로 측정 한 대조군과 통계적으로 차이가 있다. 도 5f는 BQU57 처리 (10/20/50 mg / kg / 일) 접종 24시간 개시 후에 H2122 세포의 이종 이식 종양 성장을 억제한 것을 보여준다. 데이터는 6마리의 마우스의 평균 \pm SEM을 나타낸다. 치료 그룹의 종양 양은 Dunnett 검사 (* p <0.05)로 측정 한 대조군과 통계적으로 차이가 있다. 도 5g는 단일 50mg / Kg i.p. 3시간 후의 누드 마우스에서 BQU85의 조직 분포를 나타낸다. 데이터는 3마리의 마우스의 평균 \pm 표준 편차를 나타낸다. 도 5h는 폐암의 인간 이종 이식 모델에 대한 BQU85 처리의 효과를 나타낸다. 접종 후 24 시간에 시작된 BQU85 처리(5/10/20/50 mg / kg / day)는 H2122 세포의 이종 이식 종양 성장을 억제하였다. 데이터는 6마리의 마우스의 평균 \pm SEM을 나타낸다.

도 6a-6E는 시험 관내에서 Ra1 억제제의 세포 흡수를 나타낸다. H2122 인간 폐암 세포를 10mM의 RBC8(도 6a), BQU57(도 6b), BQU85(도 6c) 및 RBC5(도 6d)로 처리 하였다. 세포를 상이한 시점(1, 5, 15, 30 및 60 분)에 수집하고 LC / MS-MS 방법(각 시점에 대해 n = 3)을 사용하여 세포의 약물 농도를 결정하였다. 도 6e는 RBC5, RBC8 및 BQU57에 의한 H2122 및 H358 세포에서의 Ra1 활성의 억제를 나타낸다. 세포를 고정-독립 조건하에서 성장시키고 10 μ M 화합물로 3 시간 동안 처리하였다. 이어서, 세포 용해물 중의 Ra1 활성을 Ra1BP1 아가로 오스비드를 이용한 풀다운 분석을 사용하여 측정하였다. 데이터는 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

도 7a 내지도 7f는 4개의 인간 폐암 세포주의 비 의존성 성장에 K-Ras 또는 Ra1 녹다운 또는 과발현의 영향을

나타낸다. 도 7a는 siRNA 트랜스팩션 후 H2122, H358, H460 및 Calu6 세포주에서 K-Ras의 siRNA 넉다운의 면역 블록을 나타낸다. 도 7b는 4개의 모든 라인이 연한 한천 콜로니 형성 분석을 사용하여 K-Ras 넉다운에 민감하다는 것을 보여준다. Ra1A, Ra1B 또는 Ra1A/B에 대한 siRNA를 48시간 동안 세포에 형질 감염시킨 다음 세포를 연한 한천 콜로니 형성 검정에 적용하여, 4 개의 인간 폐암 세포주의 고정 배양되지 않은 성장에 대한 Ra1 넉다운의 영향을 조사하였다. 도 7c는 세포주 H2122/H358이 Ra1 넉다운에 민감함을 보여준다. 도 7d는 세포주 H460/Calu6이 Ra1 넉다운에 민감하지 않다는 것을 보여준다. 도 7e는 다양한 농도의 siRNA로 처리한 후 48시간 후의 H2122 및 H358 세포주에서의 Ra1A 및 Ra1B의 넉다운의 면역 블록을 나타낸다. 도 7f는 H2122 및 H358 세포에서 구성적으로 활성인 Ra1AG23V 및 Ra1BG23V의 성공적인 과발현의 면역 블록을 나타낸다. H2122 세포를 48시간 동안 FLAG, FLAG-Ra1AG23V 및 FLAG-Ra1BG23V로 일시적으로 형질 감염시켰다. FLAG, FLAG-Ra1AG23V 및 FLAG-Ra1BG23V를 안정적으로 과발현하는 H358 세포는 G418 선택에 의해 생성되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

본 발명자들은 종양의 발생 및 전이에서의 주목할만한 임상적 중요성에 기초하여, 분자 표적으로서 Ra1 GTPase를 동정 및 사용하였다. 모든 GTPase와 마찬가지로, Ra1의 활성은 비활성(GDP-결합) 및 활성(GTP-결합) 형태 사이의 사이클링에 의존한다. 활성 Ra1 단백질은 Ra1 Binding Protein 1(Ra1BP1, RLIP76 또는 RIP1 (37)), Sec5/Exo85, 필라민 및 phospholipase D1을 포함하여 자체 효력을 통해 하류 과정을 중재한다. 따라서, Ra1-GDP가 아닌 Ra1-GTP에 결합하는 화합물은 작동자 결합을 입체적으로 억제하고 및/또는 GTP 결합 상태와 관련된 구조 변화를 차단하여 신호 전달의 봉쇄 및 Ra1 의존 암세포의 아폽토시스 감소를 유도하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물은 Ra1 GTPase 억제제의 가상 및 물리적 스크리닝을 사용하여 확인되었다.

[0046]

위에서 언급했듯이 Ra1은 비활성(GDP-결합) 양식과 활성(GTP-결합) 형태를 순환한다. Ra1-GTP(활성) 보다 Ra1-GDP(비활성)에 우선적으로 결합하여 비활성 상태의 Ra1을 안정화시키는 화합물을 발견하고자 하는 발명자는 Ra1A의 활성 및 비활성 형태의 3차원 구조를 검사했다. 이 분석은 뉴클레오티드 결합 부위 근처에서 포켓의 형태 차이를 나타냈지만(도 1). 이 포켓(알로스테릭 부위)은 이전에 기술된 C3bot 결합 부위와 유사하며, 스위치 II 영역(Ra170-Ra177), 헬릭스 α 2 (Ra178-Ra185) 및 헬릭스 α 3의 한면(도 1a)에 의해 구성된다. 비교에 사용된 결정 구조는 exo84(PDB 코드 1ZC4, Fig 1C) 또는 sec5(PDB 코드 (PDB code 1ZC4, 도 1c))와 복합체로된 Ra1A-GDP(PDB 코드 2BOV (도 1b) 및 Ra1A-GNP(비-가수분해성의 형태의 GTP)이다. 각각의 결합 부위의 계산된 체적(부피)은 Ra1A-GDP(도 1b)에서 175 \AA^3 , Ra1A-GNP-exo84에서 155 \AA^3 (도 1c) 및 Ra1A-GNP-sec5에서 116 \AA^3 (도 1d)이다. 상기의 Ra1B-GDP 결정 구조는 발표되지 않았지만, Ra1B-GNP 구조(PDB 코드 2KE5, 도 1)에서 이 결합 포켓은 거의 존재하지 않는다. Ra1A-GDP의 알로스테릭 부위인 Ra1A-GDP 포켓에 50만 개의 화합물을 도킹시켰다. 단백질-리간드 복합체는 계산된 상호 작용 에너지에 근거하여 채점하고 정렬하여, 88개의 화합물을 선별한 최고의 후보를 육안으로 검사했다. 88종의 화합물을 활성 세포 Ra1BP1에 대한 활성 Ra1A-GTP의 선택적 결합에 기초한 Ra1 활성에 대해 ELISA를 사용하여 배양중인 살아있는 세포에서 Ra1A 활성화를 억제하는 능력에 대해 평가하였다.

[0047]

또한, Ra1A 활성도는 페브로넥틴 코팅된 커버 슬립에 마우스 배아 섬유아세포 (MEF)가 펴지면서 지질 래프트 액 소사이토시스를 측정함으로써 독립적으로 분석되었다. 이들 세포에서 Ra1A의 siRNA 고갈은 확산을 억제하는 반면 caveolin (Cav1)-/-MEFs는 Ra1A 고갈에 내성을 나타낸다.

[0048]

TROSY ^{15}N -HSQC(Transverse Relaxation-Optimized Heteronuclear Single Quantity Coherence) NMR을 이용하여 화합물의 Ra1 표적 부위에 대한 직접 결합을 확인하였다. 본 발명자들은 GNP(이 시점에서 규명된 유일한 구조)와 복합체인 Ra1B의 NMR 구조에 초점을 맞추었다. Ra1B-GDP 및 Ra1B-GNP의 ^{15}N -HSQC NMR 스펙트럼을 먼저 측정하고 화학적 시프트 차이를 분석하였다. NMR 스펙트럼을 RBC8 또는 DMSO 대조군의 존재하에 기록하였다. 단백질에 작은 분자의 결합은 ^{15}N -HSQC 단백질 아미드 피크의 섭동(perturbation)에 의해 모니터 되었다. 100 \mu M RBC8의 부재 및 존재 하에서의 Ra1B-GDP(100 \mu M)의 ^{15}N -HSQC 스펙트럼은 알로스테릭 부위에 위치한 대표 잔기의 피크 위치에서 변화를 나타냈다. RBC8은 NMR 스펙트럼에서의 최소 화학적 변화가 나타내는 것과 동일한 조건하에서 Ra1B-GNP에 결합하지 않았다. 또한, 세포 기반 ELISA 분석에서 활성 Ra1의 수준에 영향을 미치지 않은 RBC5 도 Ra1B-GDP에서 화학적 이동 변화를 유도하지 않았기 때문에 추가적인 음성 대조군으로 사용되었다.

[0049]

구조적 특징을 포함한 모든 데이터에 기초하여, 일련의 RBC8 유도체를 합성하고 시험판 내에서 결합을 시험하였다. BQU57은 RBC8 비해 우수한 이의 성능 및 약물과 같은 특성으로 인하여, 선택되어 추가적인 평가를 수행하였

다. BQU57과 Ra1B-GDP 사이의 결합에 대한 상세한 NMR 분석이 수행되었다. 서열의 함수로서 BQU57에 의한 화학적 변화의 플롯은 스위치-II(아미노산 잔기 70-77) 및 헬릭스 α 2(아미노산 잔기 78-85) 영역에 현저한 변화를 나타내는 잔기가 있음을 보였다. Ra1B-GDP 결합 구조가 이용 가능하지 않기 때문에, Ra1A-GDP와의 유사성에 기초하여 상동성 모델이 생성되었고, 화합물에 반응하여 화학적 시프트 변화를 나타내는 잔기가 모델에서 매핑되었다. 대부분의 화학적 변화는 알로스테릭 부위에 국한되어 모델링에 기초한, 이 부위에 BQU57 결합의 배열과 일치한다. RBC8의 결과와 유사하게, BQU57은 NMR 스펙트럼에서 화학적 변화가 최소한으로 변화함으로부터 Ra1B-GNP(100mM)에 결합하지 않았다. NMR 화학적 이동 적정 분석은 BQU57의 결합이 화학량론적으로 약물을 명백한 한계 용해도까지 제한한다는 것을 나타냈다. Ra1B-GDP에 대한 BQU57의 결합은 또한 등온 적정 열량계(ITC)를 사용하여 측정하였으며 결과는 표면 플라즈마 공명(SPR)의 결과와 유사했다.

[0050] 인간 폐암 세포 성장에 대한 RBC8 및 BQU57의 영향을 평가하였다. Ra1은 부착비의존성(anchorage independence)에서의 역할로 잘 알려져 있는 바, 발명자는 연한 한천에서 성장 억제 검정을 수행하였다. 인간 폐암 세포가 약물 섭취, 생물학적 특이성 및 효과를 결정하기 위해 일련의 실험에 사용되었다.

[0051] RBC8, BQU57, BQU85 및 RBC5의 세포 흡수를 조사한 결과, 모든 화합물은 세포 내로 용이하게 들어가는 것으로 밝혀졌다. 모든 세포주는 K-Ras siRNA 결핍에 민감한 것으로 밝혀졌지만 H2122와 H358만이 Ra1 뉴다운(knockdown)에 민감했다. Ras와 비교하여 Ra1에 대한 상기 화합물의 특성을 판단하기 위해 상기의 특성을 사용하여, 본 발명자들은 연질 한천에서의 콜로니 형성 억제를 평가하였고, 그 결과 Ra1 의존성 H2122 및 H358 주가 민감하다는 것을 알 수 있었다. 또한, Ra1BP1 한천 비드를 사용한 Ra1 풀-다운 분석은 RBC5가 아니라 RBC8 및 BQU57이 H2122 및 H358 세포주 모두에서 Ra1A 및 Ra1B 활성화를 억제한다는 것을 보여주었다. Ra1에 대한 약물 특성을 추가로 결정하기 위해 화학-개놈 실험이 수행되었다. RBC8 또는 BQU57로 Ra1A 및 Ra1B의 siRNA 뉴다운을 갖는 H2122 및 H358 세포에서의 처리는 유의적인 억제를 나타내지 않았다. 함께 상기의 데이터는 RBC8 및 BQU57 가 Ra1 억제를 통해 부착비의존성(anchorage independence) 성장을 줄이는 것을 보여 주었다.

[0052] Ra1의 GTP 형성과 비교하여, GDP 형성에 대한 상기 화합물의 특성을 H2122 및 H358 세포에서 Ra1AG23V 또는 Ra1BG23V의 활성 형태를 구성적으로 과다 발현시킴으로써 평가하였다. (G23V 돌연변이는 GTP 가수 분해의 Ra1GAP 매개된 활성화를 방지하여 활성 상태로 Ra1을 고정시킨다.) Ra1AG23V와 Ra1BG23V 둘 모두 RBC8과 BQU57 화합물의 성장 억제 효과를 구할 수 있다.

[0053] 인간 폐암 마우스 모델에서 Ra1 활성 및 종양 성장의 억제를 평가하였다. 먼저, RBC8과 BQU57의 약동학은 생체 이용률을 테스트하기 위해 마우스에서 먼저 분석되었으며, RBC8과 BQU57은 좋은 약물 후보로 평가되는 유의적인 특성을 보여 주었다.

표 1. 선택 화합물의 약동학 특성 분석.

표 1

	RBC8	BQU57
복용량(mg/kg) i.p. n=3	50.0	50.0
Co(μ M)	41.2 ± 4.2	41.6 ± 5.1
T _{1/2} (hr)	0.58 ± 0.26	1.50 ± 0.11
AUC _{0-5hr} (mg · h/mL)	139.6 ± 18.8	28.6 ± 2.1

[0056] 종양 조직 내로의 화합물 침투를 측정하고, 투여 3시간 후에 종양 조직에서 실질적인 화합물 양을 검출하였다.

[0057] 이종 이식 종양 성장에 대한 Ra1 억제제의 영향을 누드 마우스에서 시험하였다. RBC8은 Ra1A 및 Ra1B의 이종 뉴다운과 동일한 크기의 순서로 종양 성장을 억제하였고, 두 번째 폐암 세포주인 H358은 유사한 결과를 산출하였다. BQU57 및 BQU85는 또한 생체 내(in vivo) 시험하였고 용량 의존 성장 억제 효과가 관찰되었다.

[0058] H2122 이종 이식에서 Ra1 GTPase 활성을 생체 내(in vivo) 평가하였다. Ra1 활성의 Ra1BP1 풀다운 측정은 RBC8 및 BQU57에 의해 Ra1A 및 Ra1B 모두 유의적인 억제를 나타내었다. 중요하게도, Ra1 활성의 BQU57-유도 투여-의존성 억제는 종양 성장의 억제와 상관관계를 나타내었다. 또한, Ras 및 RhoA 활성은 BQU57 처리 종양에서 측정되었으며, 유의한 억제는 관찰되지 않았고, 본 발명의 Ra1 억제제의 선택성을 추가로 입증하였다.

[0059] 따라서, 본 발명은 Ra1 GTPase 억제 화합물을 제공한다. 상기 화합물은 불활성 형태의 Ra1 단백질에 결합하여

GEF로-유도 활성 또는 GTP 교환을 막을 수 있으며, 준수한 타겟 효과와 함께 Ral에 대해 선택적이다. 따라서, 본원의 Ral GTPase 억제제는 GTP 결합시 Ral 단백질의 관련 구조 변화를 차단하여 작동제 결합 및 하류 신호를 방지하는데 사용될 수 있다.

[0060] 따라서, 본 발명은 또한 대상(subject)에서 Ral GTPase를 억제함으로써 대상(subject)에서 암의 성장 및/또는 전이를 억제하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시예에서, Ral GTPase는 RalA 및 RalB 파라고그 중 적어도 하나이다. 본 명세서에서 사용된 "파라고그 (paralog)"라는 용어는 동일 계놈에서 상이한 위치를 차지하기 위해 복제된 생물체의 유전자를 지칭하기 위해 사용된다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 대상에게 투여함으로써 대상자의 암의 성장 및/또는 전이를 억제하는 방법을 제공한다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "화합물"은 단순 또는 복합 유기 분자, 웹티드, 단백질 또는 올리고 뉴클레오타이드와 같은 화학적 또는 생물학적 분자를 의미한다.

[0063] 본원에서 "약학적으로 허용 가능한"이라는 문구는 과도한 독성, 자극(가려움), 알레르기 반응 또는 여타의 문제 없이, 또는 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 합병증 없이 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여(복용) 형태를 말한다.

[0064] "약학적으로 허용되는 염"은 모 화합물이 이의 개시된 산 또는 염기 염을 제조함으로써 개질된 화합물의 유도체를 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 염의 예는 아민과 같은 염기성 잔기의 알칼리 또는 유기 염, 또는 카르복실 산과 같은 산성 잔기의 무기 또는 유기산 염을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 약학적으로 허용 가능한 염은 모 화합물의 예를 들어 비독성 무기 또는 유기산부터 통상적인 비독성 염 또는 4차 암모늄염을 포함한다. 이러한 통상적인 비독성 염은 염산, 브롬 산, 황산, 살포산, 인산, 질산 등과 같은 무기산; 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 파모익산, 말레산, 히드록시 말레산, 페닐 아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 살파닐산, 2-아세톡시 벤조산, 푸마르산과 같은 유기산으로부터 제조된 염, 톨루엔 솔폰산, 메탄 솔폰산, 에탄디솔폰산, 옥살산, 이세티온산 등으로부터 제조된 염을 들 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 합리적인 이득/위험 비율에 상응하는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물의 형태이다.

[0065] 본원에서 제공된 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염 형태는 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 잔기를 함유하는 본 발명의 화합물로부터 합성된다. 일반적으로, 이러한 염은 예를 들어 이들 화합물의 유리산 또는 염기 형태를 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 물 또는 유기 용매 중 또는 이들의 혼합물 중에서 반응시킴으로써 제조되며; 일반적으로, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판을 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적절한 염의 목록은 1985년 펜실베니아 주 이스튼 Remington 's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company의 1418 페이지에 나와있다.

[0066] "대상(subjects)"이라는 용어는 원숭이, 원숭이, 오랑우탄, 비비 원숭이, 긴팔 원숭이 및 침팬지와 같은 인간 또는 영장류와 같은 포유류를 의미한다. "대상"이라는 용어는 또한, 반려 동물, 예를 들어, 개 및 고양이를 지칭할 수 있다; 동물원 동물; 이와 상동한 동물, 예를 들면, 말; 젖소, 돼지 및 양과 같은 가축 동물; 및 질병 모델 동물, 예를 들어, 토끼, 마우스 및 래트를 포함한다. 대상은 사람 또는 사람이 아닌 것일 수 있다. 대상은 나이가 다양할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 대상은 인간 유아, 즉, 출생 후 약 1세까지; 인간 아아, 즉, 1 세-12 세 사이의 인간; 사춘기 인간, 즉, 약 12세-18세 사이의 인간; 또는 성인, 즉, 약 18세 이상의 인간. 일부 실시 양태에서, 대상은 성인 남성 또는 여성이다.

[0067] 본 발명의 화합물의 "치료학적 유효량" 또는 "치료학적 양"이란 용어는 암을 갖는 대상에게 투여한 후 암의 형성 또는 진행을 억제하는데 효과적인 양을 의미한다.

[0068] "용매화물"이란 용어는 용매와 화합물의 상호 작용에 의해 형성된 화합물을 의미한다. 적합한 용매화물은 일수화물 및 반수화물을 비롯한 수화물과 같은 약학적으로 허용 가능한 용매화물이다.

[0069] 키랄 중심을 갖는 본 발명의 화합물은 광학활성 및 라세미체(라세메이트) 형태로 존재할 수 있고, 이를 분리 할 수 있다는 것은 당업자에게 쉽게 이해될 것이다. 본 발명의 화합물은 본원에 기재된 치료학적으로 유용한 성질을 갖는 임의의 라세믹, 광학 활성, 위치 이성질체 또는 입체 이성질체 형태 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 키랄 중심을 갖는 경우, 이들은 거울상 이성질체로서 존재할 수 있다. 화합물이 2개 이상의 키랄 중심을 보유하는 경우, 이들은 부분 입체 이성질체로서도 존재할 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 제조 방법이 입체 이성질체의 혼합물을 발생시키는 경우, 이들 이성질체는 분취용 크

로마토그래피와 같은 통상적인 기술에 의해 분리될 수 있다. 화합물은 입체 특이적합성 또는 분해에 의해 라세미체 또는 개별 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체로 제조될 수 있다. 예를 들어, 화합물은 광학적으로 활성인 산과의 염 형성에 의한 입체 이성질체 쌍의 형성과 같은 표준 기술에 의해 그의 성분 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체로 분해 될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 통상의 표준 기술로, 예를 들어 (-)-디-p-톨루일-D-타르타르산 및/또는 (+)-디-p-톨루일-L-타르타르산과 같은 광학 활성 산과 염을 형성함으로써 입체 이성질쌍을 형성한 후 이어서 분별 결정 및 유리 염기를 재생성하는 것과 같은 기술을 사용하여 상기 화합물의 성분 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체로 분리될 수 있다. 상기 화합물은 또한 입체 이성질체 에스테르 또는 아미드의 형성에 이어서 크로마토그래피 분리 및 키랄 보조제의 제거에 의해 분해될 수 있다. 대안적으로, 상기 화합물은 키랄 HPLC 칼럼을 사용하여 분리될 수 있다. 모든 입체 이성질체, 라세믹 혼합물, 부분 입체 이성질체 및 거울상 이성질체가 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0070] 당해 기술 분야에서 광학 활성 형태를 제조하는 방법은 잘 알려져 있다(예를 들어, 재결정화 기술, 광학 활성 출발 물질로부터의 합성, 키랄 합성 또는 키랄 고정상을 이용한 크로마토그래피 분리에 의한 라세미체의 분리에 의한 방법). 본 발명의 범위는 존재할 수 있는 다양한 이성질체뿐만 아니라 형성될 수 있는 이성질체의 다양한 혼합물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 화합물, 그의 출발 물질 및/또는 중간체의 분리는 공지된 공정, 예를 들어, 화합물에 대한 4권의 요약서 광학 재결정화 공정에 의해 수행될 수 있다: Optical Resolution Information Center, Manhattan College, Riverdale, N.Y., and in Enantiomers, Racemates and Resolutions, Jean Jacques, Andre Collet and Samuel H. Wilen; John Wiley & Sons, Inc., New York, 1981 또한 이의 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다. 기본적으로, 화합물의 분해(resolution)법은 부분 결정화, 증류 또는 크로마토그래피에 의해 분리 가능한 형태를 생성하는 거울상 이성질체로 순수한 모이어티의 화학적 또는 효소적 부착에 의한 부분 입체 이성질체의 물리적 특성의 차이에 기초한다.

[0071] 본 발명의 약학적 조성물을 제조하기 위해 본 발명의 화합물과 조합하여 사용되는 화학 물질은 상업적으로 구입할 수 있다. 이의 염을 포함하는 본 발명의 화합물은 유기 합성 업계의 당업자에게 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명의 화합물은 사용되는 시약 및 물질에 적합한 용매에서 수행되는 반응을 사용하여 수행될 수 있는 변형에 적합하게 제조될 수 있다. 유기 합성 분야의 당업자는 분자의 다양한 부분에 존재하는 작용기가 제안된 시약 및 반응과 양립해야 한다는 것을 이해한다. 반응 조건과 양립할 수 있는 치환체에 대한 이러한 제한은 당업자에게는 쉽고 자명할 것이고 대안적인 방법이 사용될 수 있다.

[0072] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 화합물 및 동물, 특히 대상에게 생물학적 활성제를 전달하기 위한 당 업계에서 일반적으로 허용되는 매개체인 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 당업자가 결정하고 수용할 수 있는 다수의 인자에 따라 제형화된다. 상기 다수의 인자는 이에 제한되지 않으나, 제제화되는 활성제의 유형 및 성질; 약제-함유 조성물이 투여될 대상; 조성물의 의도된 투여 경로; 및 상기 치료적 징후가 표적화됨을 특징으로하는 방법 등이 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 수성 및 비수성 액체 매질뿐만 아니라 다양한 고체 및 반고체 투약 형태를 포함한다. 이러한 담체는 활성제 이외에 다수의 상이한 성분 및 첨가제를 포함할 수 있으며, 이러한 부가적인 성분은 다양한 이유로, 예를 들어, 당해 분야의 숙련자에게 공지된 활성제의 안정화를 위해 제형에 포함될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 담체 및 이들의 선택과 관련된 인자에 대한 설명은 1985년 펜실베니아 주 이스튼(Easton, Pa.)의 맥 출판사인 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed에 나타나 있다.

[0073] 본 발명은 추가로 본원에서 제공되는 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상을 치료하거나 대상에서의 암 전이를 예방하는 방법을 제공한다. 상기 조성물은 일반적으로 암을 예방, 개선, 감소 또는 억제하는데 효과적인 양으로 본 발명의 화합물의 치료 유효량을 포함한다. 이러한 양은 전형적으로 조성물이 투여되는 대상 체중 1킬로그램 당 약 0.1 내지 약 100mg의 화합물을 포함한다. 치료 유효량은 당업자에게 만족스러운 임의의 투여 요법에 따라 투여될 수 있다.

[0074] 투여는 예를 들어 다양한 경구 수단에 의해 수행될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 제약 조성물은 수성 텍스트로스 및 식염수와 같은 다양한 수성 매질; 글리콜 용액은 또한 유용한 담체이고, 바람직하게는 활성 성분의 수용성 염, 적합한 안정화제 및 필요하다면 완충제를 함유한다. 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제는 단독으로 또는 조합하여 적합한 안정화제이며; 구연산과 그 염, EDTA도 사용된다. 또한, 비경구 용액은 염화 벤잘코늄, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올과 같은 보존제를 함유할 수 있다.

[0075] 대안적으로, 조성물은 캡슐, 정제 및 분말과 같은 고형 투여 형태로 경구 투여될 수 있고; 또는 엘리서르, 시럽 및/또는 혼탁액과 같은 액체 형태로 존재할 수 있다. 젤라틴 캡슐은 활성 성분 및 락토오스, 전분, 마그네슘 스

테아레이트, 스테아르산 또는 셀룰로스 유도체와 같은 적절한 담체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 유사 희석제를 사용하여 압축된 정제를 제조할 수 있다. 정제 및 캡슐은 일정기간 동안 약물의 연속 방출을 제공하는 서방형 제품으로 제조될 수 있다. 압축된 정제는 설탕으로 코팅되거나 필름으로 코팅되어 불쾌한 맛을 차폐하거나 대기로부터 활성 성분을 보호하거나 위장관에서 정제가 선택적으로 붕괴되도록 할 수 있다.

[0076] 본 발명의 바람직한 제제는 본질적으로 치료 유효량의 본 발명의 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체로 이루어진 암의 개선, 치료 또는 예방을 위한 비경구 또는 경구 투여에 적합한 단 염기성 약학적 조성물이다.

[0077] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예 : 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브유 및 주로 사용되는 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트가 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0078] 이들 조성물은 또한 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 조성물에 설탕, 염화나트륨 등의 등장 화제를 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주로 사용되는 의약 형태의 장기간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 포함에 의해 초래될 수 있다.

[0079] 어떤 경우에는, 약물의 효과를 연장 시키기 위해, 피하 또는 근육 내 주사로부터 약물의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이것은 불량한 수용성을 갖는 결정질 또는 비정질 물질의 액체 혼탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이어서, 약물의 흡수 속도는 용해 속도에 의존하며, 이는 다시 결정 크기 및 결정 형태에 의존할 수 있다. 다르게는, 비경구 투여 약물의 지연 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해 또는 혼탁시킴으로써 달성된다.

[0080] 주사용 디폿(depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜라이드와 같은 생분해성 폴리머에서 약물의 마이크로 캡슐화 매트릭스를 형성함으로써 만들어진다. 중합체에 대한 약물의 비율 및 사용된 특정 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 디폿 주사형 제제는 또한 신체 조직과 양립할 수 있는 리포솜 또는 마이크로 에멀젼에 약물을 포함시킴으로써 제조된다. 주사 가능한 물질은 예를 들어 세균 여과 필터를 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다.

[0081] 정제와 같은 고체 조성물을 제조하기 위해, 주요 활성 성분을 약학 부형제와 혼합하여 본 발명의 화합물의 균질 혼합물을 함유하는 고체 예비 조성물을 형성한다. 이러한 예비 조성물을 균질한 것으로 언급할 때, 활성 성분이 조성물 전체에 고르게 분산되어 조성물이 정제, 환제 및 캡슐과 같은 유효하게 효과적인 단위 투여형으로 쉽게 세분될 수 있음을 의미한다. 이어서, 상기 고체 예비 제제는 예를 들어, 본 발명의 치료 화합물 0.1 내지 약 500mg을 함유하는 상기 유형의 단위 투약 형태로 세분된다.

[0082] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제형은 캡슐, 카세트, 환제, 정제, 분말, 과립의 형태로 또는 수성 또는 비 수성 액체 중의 용액 또는 혼탁액으로서, 또는 수 중유 또는 물 (유성 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로오스 및 아카시아와 같은 불활성 염기를 사용하는) 향미료로서 또는 소 정량의 화합물 또는 화합물을 각각 함유하는 것일 수 있다. 본 발명을 유효 성분으로 함유한다. 본 발명의 화합물 또는 화합물은 또한 볼 루스, 전해질 또는 페이스트로서 투여 될 수 있다.

[0083] 경구 투여용 본 발명의 고체 제제(캡슐, 정제, 환제, 당의정, 분말, 과립제 등)에서, 활성 성분은 구연산 나트륨 또는 인산이 칼슘과 같은 하나 이상의 제약 상 허용되는 담체 및/또는 다음 중 어느 것 : (1) 전분, 락토오스, 수크로스, 글루코오스, 만니톨 및/또는 규산과 같은 충전제 또는 중량제; (2) 결합제, 예를 들어 카르복시 메틸셀룰로스, 알긴산 염, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로즈 및/또는 아카시아; (3) 글리세롤과 같은 보습제; (4) 한천-탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트 및 탄산나트륨과 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용액 지연제; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예를 들어 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴설페이트 및 이들의 혼합물과 같은 윤활제; 및 (10) 착색제. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 약제 학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 락토오스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐 내의 충전제로서 사용될 수 있다.

[0084] 정제는 선택적으로 하나 이상의 보조 성분을 사용하여 압축 또는 성형하여 제조할 수 있다. 압축된 정제는 결합제(예 : 젤라틴 또는 히드록시 프로필 메틸셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 방부제, 붕해제(예 : 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교 결합된 나트륨 카르복시 메틸셀룰로오스), 표면 활성제 또는 분산제를 사용하여 제조할 수 있다. 몰드된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤화된 분말 화합물의 혼합물을 적합한 기계에서 성형

함으로써 제조될 수 있다.

[0085] 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제와 같은 본 발명의 약제 학적 조성물의 정제 및 다른 고형 제형은 선택적으로 약제 학적으로 공지된 장용 코팅제 및 다른 코팅제와 같은 코팅제 및 외피제로 선별 또는 준비될 수 있다-제제화된 예술. 이들은 또한 원하는 방출 프로파일, 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소 구체를 제공하기 위해 예를 들어 다양한 비율로 허드록시 프로필 메틸 셀룰로오스를 사용하여 그 안에 활성 성분의 느린 또는 제어된 방출을 제공하도록 제형화 될 수 있다. 그들은 예를 들어 세균 보유 필터를 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다. 이들 조성물은 또한 임의로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 선택적으로 지연된 방식으로 활성 성분만 또는 바람직하게는 위장관의 특정 부분에서 활성 성분을 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 임베딩 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 마이크로 캡슐화된 형태일 수 있다.

[0086] 본 발명의 정제 또는 환제는 피복되거나 연장된 작용의 이점을 제공하는 투약 제형을 제공하도록 배합될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제는 내부 투약 및 외부 투약 성분을 포함할 수 있으며, 후자는 전자 투약 성분에 대한 외피의 형태이다. 두 구성 요소는 위장에서 봉괴에 저항하고 내부 구성 요소가 그대로 십이지장으로 통과하거나 방출이 지연되도록 역할을 하는 장충에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질이 장용성 코팅층 또는 코팅에 사용될 수 있으며, 이러한 물질은 다수의 폴리머산 및 셀락, 세틸알코올 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질과 폴리머산의 혼합물을 포함한다.

[0087] 본 발명의 화합물의 경구 투여를 위한 액체 투여 제형은 약학적으로 허용 가능한 에멀젼, 마이크로 에멀젼, 용액, 혼탁액, 시럽 및 엘리서를 포함한다. 활성 성분 이외에, 액체 투여 제형은 당 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 용해제 및 유화제, 예컨대 에틸알콜, 이소 프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히 면직물, 땅콩, 옥수수, 세균, 올리브, 캐스터 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르 비탄 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0088] 불활성 희석제 외에도, 경구 조성물은 습윤제, 유화제 및 혼탁제, 감미제, 향료, 착색제, 향료 및 방부제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.

[0089] 혼탁액은 활성 화합물 이외에, 예를 들어 에톡시화 이소 스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세 결정 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸트 및 이들의 혼합물과 같은 혼탁제를 함유할 수 있다.

[0090] 직장 또는 질 투여를 위한 본 발명의 약제 학적 조성물의 제형은 좌제로서 제공 될 수 있으며, 좌약은 본 발명의 하나 이상의 화합물을, 예를 들어 코코아 버터를 포함하는 하나 이상의 적합한 비 자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하며, 실온에서 고체이지만 체온에서 액체이며, 따라서 직장 또는 질강에서 용해되어 활성 화합물을 방출할 것이다. 질내 투여에 적합한 본 발명의 제형은 적절한 것으로 당 업계에 공지된 담체를 함유하는 페서리, 탤판, 크림, 젤, 페이스트, 발포체 또는 스프레이 제제를 포함한다.

[0091] 본 발명의 화합물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투약 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치, 점안제 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 제약상 허용되는 담체, 및 임의의 완충제, 또는 필요할 수 있는 추진체와 함께 무균 조건하에서 혼합될 수 있다.

[0092] 연고제, 페이스트, 크림 및 젤은 활성 성분 이외에 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0093] 분말 및 스프레이이는 활성 성분 이외에 락토오스, 탈크, 규산, 수산화 알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 분말 또는 이들 물질의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 스프레이이는 클로로 폴루오로 탄화수소 및 부탄 및 프로판과 같은 휘발성 치환되지 않은 탄화수소와 같은 통상적인 추진제를 추가로 함유할 수 있다.

[0094] 경피 패치는 본 발명의 화합물의 신체로의 제어된 전달을 제공한다는 추가적인 이점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 본 발명의 하나 이상의 화합물을 엘라스토머 기질 물질과 같은 적절한 매질에 용해, 분산 또는 혼입시킴으로써 제조될 수 있다. 흡수 촉진제는 또한 피부를 통과하는 화합물의 플럭스를 증가시키는데 사용될 수 있다. 이러한 플럭스의 속도는 속도 제어 멤브레인을 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 젤에 화합물을 분산시킴으로써 조절할 수 있다.

- [0095] 약학적 제형은 흡입 또는 통기에 의한 투여 또는 코 또는 안구 내 투여에 적합한 투여를 포함한다. 흡입에 의한 상부(비강) 또는 하부 호흡계로의 투여를 위해, 본 발명의 화합물을 주입기, 분무기 또는 가압 팩 또는 에어로졸 스프레이를 전달하는 다른 편리한 수단으로부터 편리하게 전달된다. 가압 팩은 디클로로 디플루오로 메탄, 트리클로로 플루오로 메탄, 디클로로 테트라 플루오로 에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스와 같은 적절한 추진체를 포함할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다.
- [0096] 대안적으로, 흡입 또는 통기에 의한 투여를 위해, 조성물은 건조 분말, 예를 들어 본 발명의 항암 화합물 중 하나 이상의 분말 혼합물 및 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 형태를 취할 수 있다. 분말 조성물은 예를 들어 캡슐 또는 카트리지, 또는 젤라틴 또는 블리스터 팩(blister pack)에서 단위 투여 형태로 제공될 수 있으며, 상기 분말로부터 흡입기, 주입기 또는 계량 투여 흡입기의 도움을 받아 투여될 수 있다.
- [0097] 비강 내 투여를 위해, 본 발명의 화합물은 코 병약 또는 액체 병 분무기 또는 계량 투여형 흡입기와 같은 액체 분무 수단에 의해 투여될 수 있다. 전형적인 분무기는 Mistometer(Wintrop)와 Medihaler(Riker)가 있다.
- [0098] 점안제 또는 점안제와 같은 점적제는 또한 하나 이상의 분산제, 용해제 또는 혼탁 제를 또한 함유하는 수성 또는 비수성 염기와 제제화될 수 있다. 액체 스프레이는 가압 팩에서 편리하게 전달된다. 드롭은 단순한 안 점적 캡이 달린 병 또는 특별한 모양의 클로저로 액체 내용물을 떨어뜨리는데 적합한 플라스틱병을 사용하여 전달할 수 있다.
- [0099] 제형은 단위 용량 또는 다회 밀폐 용기, 예를 들어 멸균된 액체 담체, 예를 들어 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 동결 건조된 상태로 앰플 및 바이알로 제공될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 혼탁액은 전술한 유형의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0100] 본 발명에 의해 제공되는 투여 제제는 본 발명의 치료 화합물을 단독으로 또는 다른 치료적 활성 성분과 조합하여, 및 약학적으로 허용 가능한 비활성 부형제를 함유할 수 있다. '약학적으로 허용 가능한 불활성 부형제'라는 용어는 희석제, 결합제, 윤활제/활택제, 착색제 및 방출 개질 중합체 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0101] 적합한 항산화제는 당 업계에 공지된 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 항산화제 중에서 선택될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 항산화제의 예는 부틸 화 히드록시 아니 솔(BHA), 아스코르브산 나트륨, 부틸 화 히드록시 톨루엔 (BHT), 아황산나트륨, 구연산, 말산 및 아스코르브산을 포함한다. 산화 방지제는 투약 제형의 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%의 농도로 본 발명의 투약 제형에 존재할 수 있다.
- [0102] 적합한 킬레이트제는 당 업계에 공지된 하나 이상의 킬레이트제 중에서 선택될 수 있다. 적합한 킬레이트제의 예로는 EDTA(edodium dietate), 에데트산, 구연산 및 이들의 조합을 들 수 있다. 킬레이트제는 투여 제제의 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0103] 투여 형태는 락토스, 설탕, 옥수수 전분, 변형된 옥수수 전분, 만니톨, 소르비톨 및/또는 셀룰로스 유도체, 예컨대 목재 셀룰로오스 및 미정 질 셀룰로오스와 같은 하나 이상의 희석제를 전형적으로 약 20 중량% 내지 약 80 중량%이다.
- [0104] 복용 형태는 약 60% w / w 이하의 양으로 하나 이상의 결합제를 포함할 수 있다. 에틸 바인더, 젤라틴, 아라비아 고무, 폴리비닐 알코올, 풀루란, 카르보머, 예비 젤라틴화 전분, 한천, 트라가칸트, 알긴산 나트륨, 미정질 셀룰로오스 등을 포함한다.
- [0105] 적합한 봉해제의 예는 나트륨 전분 글리콜레이트, 크로스카멜로스 나트륨, 크로스포비돈, 저치환 하이드록시 프로필 셀룰로오스 등을 포함한다. 농도는 투여 형태의 0.1 중량% 내지 15 중량%로 다양할 수 있다.
- [0106] 윤활제/활택제의 예로는 콜로이드성 이산화규소, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 탈크, 경화 피마 자유, 지방산의 자당 에스테르, 미세 결정질 왁스, 엘로우 밀랍, 흰 밀랍 등이 포함된다. 농도는 투여 형태의 0.1 중량% 내지 15 중량%로 다양할 수 있다.
- [0107] 방출 개질 중합체는 본 발명의 치료 화합물을 함유하는 연장된 방출 제제를 형성하는데 사용될 수 있다. 방출 개질 중합체는 수용성 중합체 또는 수 불용성 중합체 일 수 있다. 수용성 중합체의 예는 폴리비닐피롤리돈, 히드록시 프로필 셀룰로오스, 히드록시 프로필 메틸셀룰로오스, 비닐 아세테이트 공중 합체, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리사카라이드(알긴산 염, 크산탄 겹 등), 메틸셀룰로오스 및 이들의 혼합물을 포함한다. 수 불용성 중합체의 예로는 메타크릴레이트, 아크릴산 공중 합체와 같은 아크릴레이트; 셀룰로오스 유도체, 예컨대 애

틸 셀룰로스 또는 셀룰로오스 아세테이트; 폴리에틸렌 및 고 분자량 폴리비닐알코올을 포함한다.

[0108] 또한, 본 발명은 (a) Ral GTPase 및 잠재적인 치료 화합물을 하기 조건을 포함하는 조건하에서 결합시키는 단계; 및 (b) Ral GTPase를 제거하는 단계; 상호 작용하고; (b) Ral GTPase의 효소 활성을 모니터링하는 단계; 잠재적인 치료 화합물이 첨가되지 않은 대조 샘플과 비교하여 효소 활성을 억제 할 때 잠재적인 치료 화합물이 추가 연구를 위해 선택되는 방법. 일 실시예에서, 잠재적 치료 화합물은 약제, 사이토카인, 소분자 약물, 세포-투과성 소분자 약물, 호르몬, 인터류킨의 조합, 렉틴, 이중 특이적 항체, 및 웨티드 모방체를 포함한다.

[0109] 본 발명의 일 실시 양태는 대상에서 암의 전이 또는 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다. 본 발명의 관련 실시 양태는 대상에서 암의 전이 또는 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 조성물에 관한 것이다.

[0110] 본 발명의 다른 실시 양태는 대상에서 암의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 약제의 제조에 있어서의 본 발명의 화합물 또는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0111] 본원에 인용된 각 간행물 또는 특허는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

실시예

[0113] 다음의 실시예는 본 발명의 특정 양상, 실시 양태 및 구성을 설명하기 위해 제공되며, 첨부된 청구 범위에 기재된 바와 같이 본원에 대한 제한으로 해석되어서는 안된다.

실시예 1-Ral 억제제의 분자 모델링

[0115] Ral-GTP(활성)보다 Ral-GDP(비활성)에 우선적으로 결합하는 화합물을 발견하기 위해 분자 모델링을 사용하여 이러한 분자가 비활성 상태를 안정화시킬 것으로 기대했다. 활성 및 비활성 형태의 RalA의 3 차원 구조 검사는 뉴클레오타이드 결합 부위 근처의 포켓 형태의 차이를 나타냈다(도 1). 이 포켓(알로스테릭 부위)은 이전에 기술된 C3bot 결합 부위와 유사하며, 스위치 II 영역(Ra170-Ra177), 헬릭스 α 2(Ra178-Ra185) 및 헬릭스 α 3의 한면(도 1a)에 의해 구성된다. 비교에 사용된 결정 구조는 exo84(PDB 코드 1ZC4, Fig 1C) 또는 sec5(PDB 코드 (PDB code 1ZC4, 도 1c))와 복합체로된 RalA-GDP(PDB 코드 2BOV (도 1b) 및 RalA-GNP(비)-가수분해성의 형태의 GTP)이다. 각각의 결합 부위의 계산된 체적(부피)은 RalA-GDP(도 1b)에서 175 \AA^3 , RalA-GNP-exo84에서 155 \AA^3 (도 1c) 및 RalA-GNP-sec5에서 116 \AA^3 (도 1d)이다. 상기의 RalB-GDP 결정 구조는 발표되지 않았지만, RalB-GNP 구조(PDB 코드 2KE5, 도 1)에서 이 결합 포켓은 거의 존재하지 않는다.

[0116] 우리는 RalA-GDP의 알로스테릭 부위에 결합하는 작은 분자를 확인하기 위해 구조 기반 가상 선별 접근법을 따랐다. 2.66 \AA 인간 RalA-GDP (PDB : 2BOV), exo84 (PDB : 1ZC4)와의 복합체에서의 RalA-GNP, sec5 (PDB : 1UAD) 결정 구조와의 복합체에서의 RalA-GNP는 RCSB 단백질 데이터 뱅크(rcsb.org). AutoDock4는 초기 라이브러리 스크리닝에 사용되었다. ChemDiv 라이브러리 (반응성 그룹을 보유하고 있는 것으로 알려진 물질, ADME / 독성, pH 7에서 Lipinski의 법칙 및 Veber의 법칙 2) 이외의 물리 화학적 성질을 가진 ChemDiv 라이브러리는 반응성 그룹을 보유하고 있는 화합물을 제외하고 ZINC 업격한 도킹 프로토콜을 사용하여 RalA-GDP에서 식별된 사이트에 도킹했다. 리간드 분자는 AutoDockTools에 제공된 리간드 준비 모듈에 의해 Gasteiger 전하와 극성 수소 원자가 지정되었다. AutoDock4의 Lamarckian 유전자 알고리즘을 사용하여 구조 검색 공간에 대한 리간드 바인딩 에너지를 평가했다. 단백질-리간드 복합체를 계산하고, 계산된 상호 작용 에너지에 기초하여 분류하고, 88개 화합물의 선택을 유도하는 최고 후보의 검사를 수행하였다.

실시예 2-세포-기반 기능 분석

[0118] 88개의 선택된 화합물을 배양중인 살아있는 세포에서 RalA 활성화를 억제하는 능력에 대해 평가하였다.

[0119] 인간 방광암 세포주 J82 및 폐암 세포주 H2122, H358, H460 및 Calu6은 ATCC로부터 수득하였다. 사용된 항체는 인간 RalA (BD Biosciences, # 610222), RalB (Millipore # 04-037) 및 FLAG 태그 (Novagen # 71097)에 대한 것이다. Ras (# BK008) 및 RhoA (# BK036)에 대한 활성 분석 키트는 Cytoskeleton (텐버, 콜로라도 주)에서 얻은 것이다. 우리는 활성 단백질 RalBP1에 대한 활성 RalA-GTP의 선택적 결합에 기초한 Ral 활성에 대해 ELISA를 사용했다.

[0120] FLAG-RalA를 안정적으로 과발현하는 J82 세포를 6-웰플레이트에서 웰당 800,000 세포로 플레이팅하고 16시간 동안 배양하였다(1시간, 37°C). 세포를 시험 화합물(50 \mu M) 또는 DMSO 대조군을 함유하는 500 \mu l 의 새로운 배지로 처리하였다. 이어서 세포를 열음으로 차가운 PBS로 세척하고 빙냉 용해 완충액(50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM

NaCl, 1 % Igепal ca-630, 10 mM MgCl₂ 및 프로테아제 억제제를 함유하는 750 μ l)에 수집하였다. 용해물을 원심 분리로 제거한 후 상층 액을 플래시 동결시키고 시험할 때까지-80°C에서 보관하였다. ELISA 분석을 위해 HisGrab 니켈 코팅 96-웰플레이트 스트립(Pierce, # 15142)을 ELISA 완충액(50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween 20 및 10 mM MgCl₂)으로 처리하였다. 이후, Ra1BP1 (0.5 μ g / 100 μ l)을 웰에 첨가하고 흔들어 주면서(2시간 RT) 배양했다. 이어서, 플레이트를 200 μ l ELISA 완충액으로 3회 세척하였다. 플레이트를 얼음에 놓고 용해 액 또는 용해 완충액 대조액(100 μ l)을 4회에 걸쳐 웰에 첨가하였다. 그 후 플레이트를 4°C에서 흔들어 항온 배양한 후 냉장 ELISA 완충액으로 2회 세척하였다. 마우스 항-FLAG (Sigma, F1804) 항체(ELISA 완충액 중 1 : 20,000)를 웰 당 100 μ l 씩 첨가하고 배양하였다(1시간, 4°C). 세 번 세척 후, HRP (피어스, # 31430) (1 : 2,500)에 접합된 염소 항 마우스 항체를 웰 당 100 μ l 씩 첨가하고 배양하였다 (1시간, 4°C). HRP(Vector Laboratories, # SK-4400)를 3번 세척한 후 100 μ l로 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 황산(100 μ l, 2N)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 바이오텍 시너지(Biotek Synergy) H1 플레이트 판독기(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT)상에서 OD450에서 흡광도를 판독하였다; OD540에서 동일한 웰에 대한 판독 값을 빼서 흡광도를 백그라운드 흡광도에 대해 보정하였다.

[0121] FLAG 표지된 Ra1A를 안정적으로 발현하는 J82 사람의 방광암 세포는 항-Ra1 항체가 제공하는 것보다 단백질 검출을 향상시켰다. 이것은 분석에 향상된 동적 범위를 제공했다. 결합된 Ra1A의 양은 상대적 활성화 상태에 비례한다.

[0122] 독립적인 접근법은 피브로넥틴 코팅 coverslips에 마우스 배아 섬유아세포 (MEFs)의 확산 동안 지질 exocytosis에 필요한 Ra1A 활동을 평가하는데 사용되었다. 간단히 야생형 또는 caveolin-/-마우스 배아 섬유아세포를 24시간 동안 처리하며, Accutase (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA)로 배양 플레이트에서 분리하여 0.2 % 혈청 및 0.5 % 메틸셀룰로오스가 함유된 DMEM에 재현탁하고, 혼탁액(90분, 37°C)에서 유지하였다. 부유 상태에서 세포를 억제제(50 μ M 또는 DMSO 대조군, 1시간)로 처리하였다. 처리 후, 세포를 0.2 % 혈청을 함유하는 DMEM으로 1회 행구고(4°C, 2 μ g / mL 인간 피브로넥틴) 밤새 코팅된 24-웰플레이트에 모든 처리로부터의 동일한 수의 세포를 첨가하였다. 세포를 30분 동안 페지시킨 후 표준 프로토콜을 사용하여 포름 알데히드로 고정시켰다. 시각화를 가능하게 하기 위해 세포를 라바 세포(활성 모티프)로 분류하고 Nikon TE300 형광 현미경으로 시각화했다. 각 웰의 3개의 뚜렷한 영역을 영상화하고 세포 확산 영역을 ImageJ (NIH)를 사용하여 정량화하였다.

[0123] 상기 세포들에서 Ra1A의 siRNA 고갈은 확산을 억제하는 반면 caveolin (Cav1)-/-MEFs는 Ra1A 고갈에 내성을 나타낸다. 인간 Ra1A 및 Ra1B 또는 둘 모두에 대한 siRNA는 공개된 서열을 사용하여 Dharmacon (Boulder, CO)에서 수득하였다.

실시예 3-시험 관내 결합 검정

[0125] 목표물에 대한 화합물의 직접 결합을 확인하기 위해 TROSY ¹⁵N-HSQC (Transverse Relaxation-Optimized Heteronuclear Single Quantum Coherence) NMR을 사용했다. pET16b(Novagen) 플라스미드의 Ra1B(Q72L 돌연변이)는 Dr. Darerca Owen (Cambridge University)로부터 받았다. Ra1B는 GDP 또는 비가수 분해성 형태의 GTP, GMPNPP (GNP, Sigma-Aldrich)를 로딩하기 위한 추가 단계로 정제하였다. 균일 한 ¹³C¹⁵N 이중 표지 단백질은 ¹⁵N-NH4Cl과 ¹³C-포도당이 보충된 M9 배지에서 생산되었다. 50 mM 인산나트륨, pH 7.6, 100 mM NaCl 및 1 mM MgCl₂에서 NMR을 위해 제조된 샘플을 제조하였다. 모든 NMR 실험은 25°C Agilent 900 MHz 시스템으로 기록했다. Ra1B-GNP 복합체에 대한 공명할당은 Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB, 코드 : 15230)에 기탁된 이전에 발표된 연구로부터 얻어졌다. RNCB, GDP 복합체의 화학 이동 할당은 HNCACB, CBCA (CO) NH 및 COCNH-TOCSY 실험을 사용하여 독립적으로 얻어졌다. 모든 NMR 데이터는 NMRPipe를 사용하여 처리되었으며 CCPNMR 분석 프로그램을 사용하여 분석되었다. 할당은 PINE을 사용한 자동 할당과 수동 검증에 의해 획득되었다. ¹⁵N-HSQC 실험은 중수소화된 DMSO로 재구성된 화합물의 첨가 후 Ra1B 단백질(100mM)로부터의 아미드 이동을 모니터링하는데 사용되었다. 최종 시료의 DMSO 농도는 0.5 % 또는 1 %; 0.5 % 또는 1 % 중수소 DMSO로 대조 샘플을 제조하고 화합물을 함유하는 모든 샘플을 상응하는 DMSO 대조군과 비교하였다.

[0126] GNP와 복합체인 Ra1B의 NMR 구조만이 규명되었기 때문에 (PDB code 2KE5, BMRB entry 15230), 우리는 이 이성 질체(isoform)에 초점을 맞추었다. Ra1B-GDP 및 Ra1B-GNP의 ¹⁵N-HSQC NMR 스펙트럼을 먼저 결정하고 화학적 쉬프트 차이를 분석하였다. NMR 스펙트럼을 RBC8 또는 DMSO 대조군의 존재하에 기록하였다. 단백질에 작은 분자의 결합은 ¹⁵N-HSQC 단백질 아미드 피크의 섭동에 의해 모니터 되었다. 100 μ M RBC8의 부재 및 존재하에서 Ra1B-GDP (100 μ M)의 ¹⁵N-HSQC 스펙트럼은 알로스테릭 부위에 위치한 대표 잔기의 피크 위치에서 변화를 나타냈다.

한편, RBC8은 NMR 스펙트럼의 화학적 이동 변화가 거의 없는 동일한 조건하에서 Ra1B-GNP에 결합하지 않았다.

[0127] 구조적 특징을 포함한 모든 데이터에 기초하여, 일련의 RBC8 유도체를 합성하고 시험관 내에서 결합을 시험하였다. 우리는 BQU57 및 BQU85를 RBC8 및 약물과 같은 특성에 비해 우수한 성능으로 인해 추가 평가를 위해 선택하였다(도 3a, 도 2).

[0128] 화합물 BQU57 및 BQU85에 대한 합성 도식을 도 2a에 나타내었다.

[0129] A. 6-아미노-1,3-디메틸-4-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-1,4-디히드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (BQU57): 에탄올 (10 mL) 중의 4-(트리플루오로메틸)벤즈알데히드 (500 mg, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 트리에틸아민 (400 μ L mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0분 동안 교반한 후, 1H-피라졸-5(4H)-온 (321 mg, 2.87 mmol)을 첨가하고, 캡핑하고, 실온에서 22시간 동안 교반한 후, 농축하고 크로마토그래피 (Si02; 메틸렌 클로라이드 중 2 % MeOH)로 정제하여 BQU57를 황색 고체로 수득하였다 (445 mg, 1.33 mmol, 46 % 수율).

[0130] 1H-NMR (400 MHz) DMSO-D6: 7.28 (s, 4H), 7.10 (brs, 2H), 4.64 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 1.64 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO-D6: 160.1, 147.6, 144.7, 143.9, 142.9, 129.9, 122.3, 121.4, 120.6, 96.2, 58.2, 36.8, 33.9, 12.8.

[0131] B. 6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(4-(트리플루오로메톡시)페닐)-1,4-디히드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (BQU085): 에탄올 (6.0 mL) 중의 4-(트리플루오로메톡시)벤즈알데히드 (0.327 g, 1.72 mmol, 1.0 equ.), 말로노니트릴 (0.114 g, 1.72 mmol, 1.0 equ.) 및 트리에틸아민 (0.240 mL, 1.72 mmol, 1.0 equ) 10분 동안 교반한 후 1H-피라졸-5(4H)-온 (0.300 g, 1.72 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고 Si02 (2 % 메탄올-디클로로 메탄) 상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 BQU_03_85을 황색 고체로 수득하였다 (174mg, 0.421mmol, 25 %).

[0132] 1H-NMR (400MHz) DMSO : 7.47-7.45 (d, 2H), 7.26-7.24 (d, 2H), 7.20-7.14 (m, 7H), 5.08 (s, 1H), 3.76 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.3, 147.4, 146.0, 144.7, 144.1, 133.1, 129.8, 128.6, 128.0, 126.5, 121.7, 121.2, 120.4, 95.3, 59.3, 37.4, 34.5.

[0133] BQU57과 Ra1B-GDP 사이의 결합에 대한 상세한 NMR 적정이 수행되었다. 100 μ M BQU57의 부재(흑색) 및 존재(마젠타)에서의 Ra1B-GDP (100 μ M)의 NMR 스펙트럼을 도 3b에 나타내었다. 용량-의존적인 화학적 변화를 나타내는 대표적인 잔기가 도 3c에 도시되어 있다. 100 μ M의 BQU57을 이용한 화학적 이동 변화도가 생성되었으며(도 3d), 중요한 화학적 이동 변화를 나타내는 잔기(강조 표시된 막대)는 스위치 II (aa 70-77) 및 헬리스 α 2 (aa 78-85)에 위치하였다. Ra1B-GDP의 결정 구조가 없는 경우, 상동성 모델은 Ra1A-GDP와의 서열 유사성에 기초하여 생성되었고, 약물 존재하에서 화학적 시프트 변화를 겪은 잔기는 이 모델 상에서 매핑되었다(도 3e). 이것은 화학적 시프트 변화의 대다수가 알로스테릭 부위에 국한되며, BQU57이 예측된 부위에 결합한다는 것을 확인한다. RBC8과 유사하게, BQU57 (100 μ M)은 NMR 스펙트럼에서 최소한의 화학적 변화가 나타난 것처럼 Ra1B-GNP (100 μ M)에 결합하지 않았다(도 2b).

[0134] NMR 화학적 이동 적정의 분석은 BQU57의 결합이 약물의 명백한 제한 용해도 (단백질없는 대조군 실험에서 약 75 μ L로 추정됨)까지 화학양론적 이었다는 것을 나타내었다(도 2c). 결과적으로 Ra1B-GDP에 대한 BQU57의 결합은 등온 적정 열량계 (ITC)를 사용하여 결정되었다. ITC 실험은 MicroCal iTC200 시스템을 사용하여 수행되었다. 단백질 및 약물 모두 50 mM 인산 나트륨, pH 7.6, 100 mM NaCl 및 1 mM MgCl2에서 제조하였다. 최종 DMSO 농도를 1%로 조정하였다. Ra1B-GDP 단백질 (500 μ M)을 주사기에 넣고 약물 (25 μ M) 또는 대조군으로서 완충액으로 적정하였다. 모든 실험은 25°C에서 수행되었다. ITC는 KD = 7.7 ± 0.6 μ M을 산출했다(도 3f). 이 결과는 SPR(Surface Plasma Resonance)에 의해 확인되었다. SPR 실험은 Biacore 3000 시스템을 사용하여 수행되었다. 작동 완충액: PBS, pH 7.4, 1 μ M GDP, 2 mM MgCl2, 3 % DMSO. 재생 버퍼: PBS, pH 7.4, 1 μ M GDP, 2 mM MgCl2. Ra1B 단백질은 CM5 칩 상에 고정화되었다; 러닝 완충액 중 화합물 BQU57의 샘플을 60분 접촉 시간 동안 30 μ L / 분으로 주입 한 다음 5 분 재생시켰다. SPR은 분석 민감도가 낮더라도 4.7 ± 1.5 μ M의 KD를 나타냈다.

[0135] DSF(Differential scanning fluorometry)는 화합물과 Ra1B-GDP 사이의 결합을 평가하는 데 사용되었다. 용용 온도는 단백질의 소수성 영역에 결합하는 SYPRO 오렌지의 증가를 모니터링함으로써 측정되었다. DSF는 10 mM Ra1B-GDP 및 10 μ M Ra1B-GPNPP, 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 2.5 mM MgCl2 및 1 mM DTT 완충액 중 4 x SYPRO 오렌지를 함유하는 플레이트를 제조함으로써 수행하였다. DMSO의 최종 농도가 모든 샘플에서 1%가 되도록 각 웰에 시험 화합물을 첨가하였다. 열 용합 곡선은 라이트 사이클러 480(Roche)에서 수득하였다. 용용 온도는 곡선을 정규화하고 전이 곡선의 중간점에서 온도를 얻음으로써 얻어졌다. DSF는 BQU57과 Ra1B-GDP 사이의 용량

의존성 결합을 확인하였으며, 또한 뉴클레오타이드 의존성을 입증하였다.

[0136] 실시예 4-시험 관내 인간 폐암 세포 성장에 대한 효과

인간 폐암 세포 성장에 대한 RBC8 및 BQU57의 영향을 평가하였다. Ra1은 앵커리지 독립성에서의 역할로 잘 알려져 있기 때문에 우리는 연한 한천에서 성장 억제 검정을 실시했다. 4개의 인간 폐암 세포 H2122, H358, H460 및 Calu6을 약물 흡수, 생물학적 특이성 및 효과를 결정하기 위해 일련의 실험에 사용하였다. 연질 아가에서 앵커리지-독립 조건하에서 인간 폐암 세포의 성장 억제를 측정하기 위해, 세포를 웰 1개당 15,000으로 6-웰플레이트 (1 % 저 용점 아가로 오스 2 ml로 만든베이스 층으로 코팅 됨)에 다양한 농도의 약물을 함유하는 0.4 % 저용점 한천 3ml에 잘 섞는다. 배양 후 2 내지 4주 (세포주에 의존), 세포를 1 mg / ml MTT로 염색하고 콜로니를 현미경으로 계수하였다. IC50 값은 DMSO 처리된 대조군과 비교하여 콜로니 수를 50 % 감소시키는 약물의 농도로 정의하였다.

[0138] siRNA 처리에 의해 유도된 성장 효과를 위해, 기재된 방법 및 서열을 사용하여 Ra1A, Ra1B 또는 둘 모두(Ra1A / B)에 대한 50 nM siRNA로 세포를 형질 감염시켰다. 72시간 후, 세포를 연한 한천 콜로니 형성 분석에 제공하였다.

[0139] 화학 유전 실험을 위해, siRNA 처리된 세포를 다양한 농도의 약물의 존재하에 연한 한천에 접종하였다. 과발현 실험을 위해, FLAG, FLAG-Ra1AG23V 또는 FLAG-Ra1BG23V를 안정적으로 과발현하는 H358 세포를 생성시키고, 세포를 약물 존재하에 부드러운 한천 콜로니 형성 검정에 적용시켰다. H2122 세포에서 FLAG-Ra1AG23V 또는 FLAG-Ra1BG23V를 안정적으로 과발현시키려는 시도는 성공적이지 못했고, H2122를 이용한 구조 실험은 FLAG, FLAG-Ra1AG23V 또는 FLAG-Ra1BG23V로 일시적으로 형질 감염시킨 후 72시간 후에 소프트 한천 콜로니 형성 분석법 약의 시험 화합물이 세포 내로 얼마나 잘 들어가는지를 정량하기 위해 H2122 인간 폐암 세포를 6-웰 플레이트에 3 x 105 세포로 과종하고 16시간 동안 고정시켰다. 화합물(10 μ M)을 개별적으로 3회 투여하였다; 세포를 서로 다른 시점 (1, 5, 15, 30 및 60 분)에서 500 μ l의 빙냉 ACN : MeOH : H2O (1 : 1 : 1)로 수집하였다. 세포 용해물 중의 약물 농도는 하기 실시예 5에 상세히 기술된 마우스에서의 약동학 및 약력학 연구와 관련하여 기재된 LC / MS-MS 방법을 사용하여 결정하였다.

[0140] RBC8, BQU57 및 BQU85의 세포 내 섭취를 시험 한 결과, 모든 약물이 쉽게 세포 내로 들어간다는 것을 보여 주었다(도 6). 약물 처리에 의해 H2122 및 H358 세포에서 Ra1 활성이 억제되는지를 확인하기 위해 Ra1 활성 풀다운 분석을 수행하였다. 세포를 약물으로 3시간 동안 처리하고 수집하고 Ra1BP1 풀다운 분석 키트(Millipore # 14-415)를 사용하여 Ra1 활성을 측정하였다. RBC8 및 BQU57은 두 세포주에서 Ra1A 및 Ra1B 활성을 억제하지 않았다(도 6e).

[0141] 또한, 모든 라인은 K-Ras siRNA 결핍에 민감한 것으로 밝혀졌지만(도 7a, 7b) H2122와 H358만이 Ra1 뉴다운(knockdown)에 민감했다 (도 7c, 7D). 이 특성을 이용하여 Ra1에 대한 화합물의 특이성을 밀접하게 관련된 GTPase와 비교하여 결정하였고, 우리는 연한 한천에서의 콜로니 형성의 저해를 평가하였고 H240 및 Calu6 세포는 민감하지 않은 H2122 및 H358을 주목하였다 (도 4a, b, k). RBC8에 대한 IC50은 H2122에서 3.5 μ M 및 H358에서 3.4 μ M이며; H2122에서 BQU57 2.0 μ M 및 H358에서 1.3 μ M이었다. 다음으로 Ra1에 대한 약물 특이성을 추가로 결정하기 위해 화학-계놈 실험을 수행했다. Ra1A 및 Ra1B와 RBC8 또는 BQU57의 siRNA 뉴다운을 갖는 H2122 및 H358 세포의 처리는 유의적인 추가 저해를 초래하지 않았다(도 4c-4f, 도 7e). 함께, 이 데이터는 RBC8, BQU57 및 BQU85가 Ra1 억제를 통한 비부착증식(anchorage independent growth)을 감소 시킨다는 것을 나타낸다.

[0142] Ra1의 GTP 형태와 비교하여 GDP에 대한 화합물의 특이성을 다루기 위해, H2122 및 H358 세포에서 Ra1AG23V 또는 Ra1BG23V의 구성 활성 형태를 과발현시켰다. G23V 돌연변이는 GTP 가수 분해의 Ra1GAP 매개된 활성화를 방지하고 따라서 Ra1을 활성 상태로 고정시킨다. 우리는 Ra1AG23V와 Ra1BG23V가 화합물의 성장 억제 효과를 구할 수 있음을 발견하였다(도 4g-4j, 도 7f).

[0143] 실시예 5-생체 내(in vivo)에서의 약동학, 약력학 및 종양 성장

[0144] 인간의 폐암 마우스 모델에서 Ra1 활성 및 종양 성장의 억제를 평가하였다. RBC8과 BQU57의 약물 동태학(PK)을 누드 마우스에서 먼저 분석하여 생체 이용률을 테스트했다. 단일 복강 내 주사 (50mg / Kg) 후, 혈액 샘플을 투여 후 0 내지 5시간 간격으로 (9시간 지점) 수집하였다. 곡선 하 면적(AUC), Cmax 및 t 1/2를 포함하는 약물 동력학 파라미터는 LC-MS / MS에 의한 비구획법을 사용하여 추정되었으며 우수한 약물 후보를 정의하는 유리한 성질을 나타내었다(상기 표 1 참조).

[0145]

우리는 다음으로 종양 조직으로의 화합물 침투를 결정하였다. 이를 위해, 멸균된 누드 마우스(Ncr nu / nu, National Cancer Institute, Fredrick, MD)를 5 내지 6주령에 접종하고, 온도 및 습도가 일정한 무균 마이크로 격리기 케이지에서 2주 동안 적응시켰다. 마우스는 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있었다. 로그-상 성장에서 H2122 세포는 사용 당일에 수확되었다. 세포를 보충되지 않은 RPMI 1640 배지에 혼탁시키고, 0.1 mL (2×10^5 세포)를 마우스당 4개의 사이트에 s.c. 주사하였다. H358 이종 이식편의 경우, 세포(5×10^6)를 마트리겔(최종 농도 20 %)과 혼합하고, 0.1mL를 사이트당 s.c. 주사하였다. 세포 접종 후 마우스를 매일 모니터링하고 매주 두 번 무게를 측정하고 종양이 보일 때 캘리퍼스 측정을 시작했다. 종양 체적은 $(L \times W^2)/2$ 에 의해 계산되었으며, 여기서 L은 종양의 더 긴 길이의 측정치이고 W는 종양의 더 작은 길이의 측정치이다. 접종 후 다음 날부터 약물 치료가 시작되었다. 화합물을 DMSO에 용해시키고 주말을 제외하고 매일 10/20/50 mg / kg i.p. 주사하였다. 종양 크기를 고려한 대조군과 약물 처리 동물 간의 차이로 평가 한 대조군(DMSO) 또는 약물 처리 동물에서 명백한 독성을 관찰되지 않았다. 도 5a, 도 5b 및 도 5g에서, 화합물 3의 실질적인 양은 투여 3시간 후 종양 조직에서 검출되었다. 이종 이식 종양 성장에 대한 Ra1 억제제의 영향을 누드 마우스에서 시험하였다. 마우스에게 H2122 인간 폐암 세포를 피하 접종하고 24시간 접종 후 RBC8 50 mg/kg/d(주말 제외)로 복강 내로 처리하였다. RBC8은 Ra1A 및 Ra1B (도 5e)의 이종 네다운과 동일한 크기 순서로 종양 성장 (도 5c-d)을 억제하였고, 두 번째 폐암 세포주 H358은 유사한 결과를 나타내었다. BQU57 및 BQU85는 또한 여러 가지 상이한 용량(5, 10, 20 및 50 mg / kg / d) 및 용량 의존적 성장 억제 효과가 생체 내에서 시험되었다(도 5f, 5h).

[0146]

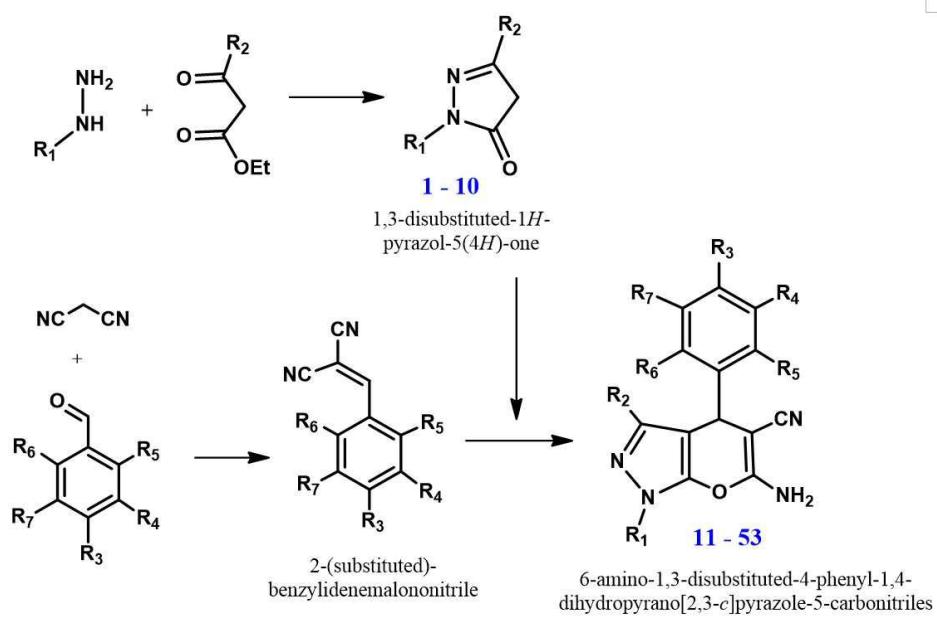
마지막으로, 우리는 H2122 이종 이식에서 생체 내(in vivo)에서 Ra1 GTPase 활성을 평가했다. 누드 마우스에게 5×10^6 의 H2122 세포 마우스 당 4 개의 위치에서 s.c. 주사하였다. 종양 크기는 10일 만에 평균 250 mm^3 에 이르렀으며, 이 시점에서 마우스에게 다양한 농도의 RBC8 또는 BQU57의 i.p. 투여하였다. 종양은 RBC8 또는 BQU57 주사 후 3시간에 수집하였다. 이어서, 종양 샘플에서의 Ra1A 및 Ra1B 활성을 Ra1BP1 풀다운 분석 키트 (Millipore # 14-415)를 사용하여 측정하였다. 종양 샘플에서 Ras 및 RhoA 활성을 각각의 풀다운 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 모든 활성 분석은 웨스턴 블랏팅을 최종 판독값으로 사용했다. 면역 블롯의 정량화를 위해, 각 블롯상의 밴드를 먼저 각각의 내부 대조군(최종 레인에서 재조합 Ra1, Ras 또는 Ra1 단백질 10 ng)으로 정규화한 다음, 그 숫자를 상이한 룻에서 비교하였으며, 하나의 치료 조건. H2122 종양(중간 크기 250 mm^3)을 보유한 마우스에게 RBC8(50 mg / kg) 또는 BQU57(10/20/50 mg / kg)의 단일 복강 내 투여량을 투여하고, 투여 후 3 시간에 종양을 수집하였다. Ra1 활성의 Ra1BP1 풀다운 측정은 RBC8 및 BQU57에 의한 Ra1A 및 Ra1B 모두의 유의적인 억제를 나타내었다. BQU57에 의해 유발된 Ra1 활성의 용량 의존적 저해는 종양 성장의 억제와 관련이 있고, Ras 및 RhoA 활성은 BQU57 처리된 종양에서 또한 측정되었으며, 유의적인 억제는 관찰되지 않았으며, 이를 Ra1 억제제의 선택성을 추가로 입증하였다.

실시예 6-본 발명의 화합물의 합성

본 발명의 화합물은 하기 합성 스킴 및 재료에 따라 합성되었다.

[0149]

화합물 합성 계획



[0150]

표 2

[0151]

Compound Number	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
1	Ph	Me	---	---	---	---	---
2	Ph	Me	---	---	---	---	---
3	Me	Ph	---	---	---	---	---
4	Ph	Ph	---	---	---	---	---
5	CH ₂ -Ph	Ph	---	---	---	---	---
6	Me	m, p-DiOMe-Ph	---	---	---	---	---
7	Ph	m, p-DiOMe-Ph	---	---	---	---	---
8	Ph	p-OMe-Ph	---	---	---	---	---
9	Me	p-OMe-Ph	---	---	---	---	---
10	Me	Me	H	H	H	H	H
11	Me	Ph	H	H	H	H	H
12	Ph	Me	H	H	H	H	H
13	Ph	Ph	H	H	H	H	H
14	Ph	p-OMe-Ph	H	H	H	H	H
15	Me	p-OMe-Ph	H	H	H	H	H
16	Me	m, p-diOMe-Ph	H	H	H	H	H
17	Me	Me	F	H	H	H	H
18	Ph	Me	F	H	H	H	H
19	Me	Ph	F	H	H	H	H
20	Ph	Ph	F	H	H	H	H
21	Me	m, p-diOMe-Ph	F	H	H	H	H
22	Ph	p-OMe-Ph	F	H	H	H	H
23	Ph	m, p-diOMe-Ph	F	H	H	H	H
24	Me	p-OMe-Ph	F	H	H	H	H
25	Me	Me	H	F	H	H	F
26	Me	Ph	H	F	H	H	F
27	Ph	Me	OMe	H	H	H	H
28	Me	Me	OMe	H	H	H	H

29	Me	Ph	OMe	H	H	H	H
30	Ph	Ph	OMe	H	H	H	H
31	Ph	p-OMe-Ph	OMe	H	H	H	H
32	Me	p-OMe-Ph	OMe	H	H	H	H
33	Me	Me	OMe	F	H	H	H
34	Me	Me	OMe	H	OMe	OMe	H
35	Me	Ph	OMe	F	H	H	H
36	Me	Me	CF ₃	H	H	H	H
37	Me	Ph	CF ₃	H	H	H	H
38	Me	Me	O-CF ₃	H	H	H	H
39	Me	Ph	O-CF ₃	H	H	H	H
40	Me	Me	CN	H	H	H	H
41	Me	Ph	CN	H	H	H	H
42	Me	Me	CH(CH ₃) ₂	H	H	H	H
43	Me	Ph	CH(CH ₃) ₂	H	H	H	H
44	Me	Me	O-CH ₂ -	CH ₂ -O-	H	H	H
45	Me	Ph	O-CH ₂ -	CH ₂ -O-	H	H	H
46	Me	Me	N:	H	H	H	H
47	Me	Ph	N:	H	H	H	H
48	Me	Me	H	N:	H	H	H
49	Me	Ph	H	N:	H	H	H
50	Me	Me	H	Br	N:	H	H
51	Me	Ph	H	Br	N:	H	H
52	Me	Me	imidazole	H	H	H	H
53	Me	Ph	imidazole	H	H	H	H

[0152] 재료 및 방법

[0153] 앤리스알데히드, 벤즈알데히드, 1,4-벤조디옥산-6-카복스알데히드, 벤질-히드라진, 6-브로모-2-페리딘카복스알데히드, 중수소화 클로로폼(CDC13), 중수소화 디메틸 솔록사이드(DMSO-d6), 3,5-디플루오로벤즈알데히드, 에틸아세토아세테이트, 에틸 벤조일아세테이트, 에틸 3,4-디메톡시벤조일아세테이트, 에틸-히드로큐프레인 히드로클로라이드, 에틸-4-메톡시벤조일아세테이트, 4-플루오로벤즈알데히드, 3-플루오로-4-메톡시벤즈알데히드, 4-포르밀벤조니트릴, 4-이소프로필벤즈알데히드, 4-(1H-이미다졸-1-일)벤즈알데히드, 말로노니트릴, 메틸-히드라진, 페닐-히드라진, 3-페리딘카복스알데히드, 나트륨에톡시드, 트리메틸아민(TEA), 2,4,6-트리메톡시벤즈알데히드 및 4-(트리플루오로메톡시)벤즈알데히드는 시그마 알드리치 케미칼 캄파니(Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO))로부터 구입하였다. Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)로부터 에틸 아세테이트(EtOAc), HPLC 등급 메탄올(MeOH), HPLC 등급 아세토 니트릴(ACN), HPLC 등급 물(H₂O), 포름산, 암모늄 아세테이트, 헥산 및 메틸렌 클로라이드(DCM)를 구입하였다. 에탄올은 Decon Laboratories, Inc. (King of Prussia, PA)에서 구입했다. Silica Gel 60 Å 40-63 μm은 Sorbent Technologies (Norcross, GA)에서 구입했다.

[0154] ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼은 400 MHz Bruker NMR, Avance III 400을 사용하여 기록되었다. 화학적 쉬프트는 ppm으로 보고된다. Shimadzu HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD) 및 Leap auto-sampler (LEAP Technologies, Carrboro, NC)가 장착된 Applied Biosystems Sciex 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하였다. 액체 크로마토그래피는 Agilent Technologies, Zorbax extended-C18 50 x 4.6 mm, 5 마이크론 컬럼을 40 oC에서 0.4 mL / min의 유속으로 사용했다. 이동상은 A : 10 mM (NH₄OAc), H₂O 중 0.1 % 포름산, 및 B : 50:50 ACN : MeOH로 구성되었다. 사용된 크로마토그래피 법은 1.0 분 동안 95 % A이고; 3.0 분에 95 % B로 상승시키고 4.5 분 동안 유지하고, 마지막으로 8.5 분에 95 % A로 복귀시키고 1.0 분 (총 실행 시간 9.5 분) 동안 유지 하였다. 합성된 화합물을하기 조건을 사용하는 전기 분사 이온화 양이온 모드 (ESI +)를 통해 모니터링 하였다 : i) 5500V의 이온-분무 전압; ii) 온도 450 oC; iii) 커튼 가스 (CUR; 10으로 설

정) 및 충돌 활성 해리 (CAD; 5로 설정) 가스는 질소 였고; iv) 이온 소스 가스 1 개 (GS1) 및 2 개 (GS2); v) 입구 전위를 10V로 설정; vi) 4 중 1 (Q1) 및 (Q3)을 단위 분해능으로 설정; vii) 체류 시간은 200 msec로 설정되었다. 및 viii) 데 클러스터링 전위 (DP), 충돌 에너지 (CE) 및 충돌 셀 출구 전위 (CXP)는 전압 (V)이다. 시료 (10 μ L)를 LC / MS-MS로 분석하였다. NMR 및 LC / MS-MS 분석에 의해 판단되듯이, 모든 정제된 화합물은 97% 이상의 순도를 보였다.

[0155] 합성:

[0156] 3-메틸-1-페닐-1H-피라졸-5(4H)-온(1) : EtOH (130 mL) 중의 에틸 아세토 아세테이트(9.02 mL, 71.2 mmol)의 용액을 0°C에서 페닐-하이드라진(페닐-하이드라진) (7.00 g, 64.7 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 주위 온도로 천천히 가온한 다음 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc : 헥산; 1 : 1)로 정제하여 밝은 황색 분말로서 1 (7.60 g, 43.6 mmol, 67 % 수율)을 수득하였다.

[0157] 1 H-NMR (400 MHz) CDCl₃ : 7.87-7.85 (d, 2H), 7.41-7.37 (t, 2H), 7.19-7.16 (t, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.19 (s, 3H) 13 C-NMR (100MHz) CDCl₃ : 170.5, 156.2, 138.0, 128.8, 125.0, 118.8, 43.0, 17.0; LC / MS-MS : 175.0-> 77.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 56, CE = 25, CXP = 4, tR = 3.52 min.

[0158] 1,3-디메틸-1H-피라졸-5(4H)-온 (2): EtOH (200 mL) 중 에틸 아세토아세테이트(15.1 mL, 119 mmol)의 용액을 메틸 히드라진(5.00 g, 109 mmol)으로 0°C에서 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 천천히 가온한 다음 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc : 헥산; 1 : 1)로 정제하여 결정(DCM 및 헥산)으로 정제한 후 흰색 고체로 2를 수득하였다(8.02 g, 71.5 mmol, 66 %).

[0159] 1 H-NMR (400 MHz) CDCl₃: 3.25 (s, 3H), 3.16 (s, 2H), 2.08 (s, 3H), 13 C-NMR (100 MHz) CDCl₃: 172.2, 155.4, 138.0, 41.3, 31.0, 16.8. LC/MS-MS: 113.2-> 82.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 61, CE = 25, CXP = 4, tR = 2.9 min.

[0160] 1-메틸-3-페닐-1H-피라졸-5(4H)-온 (3): 에틸 벤조일 아세테이트(18.4 mL, 95.5 mmol)의 EtOH (180 mL)을 0 °C에서 메틸-하이드라진(86.8 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 천천히 가온한 다음 60 °C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc : 헥산; 1 : 1)로 정제하여 밝은 황색 고체로서 결정화(에탄올)에 의한 정제 후 3을 수득하였다(11.0g, 63.1mmol, 73 % 수율).

[0161] 1 H-NMR (400 MHz) CDCl₃: 7.67-7.65 (m, 2H), 7.42-7.41 (m, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.41 (s, 3H), 13 C-NMR (100 MHz) CDCl₃: 171.8, 154.2, 131.0, 130.3, 128.8, 125.6, 37.9, 31.4. LC/MS-MS: 175.0 -> 77.2 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 66, CE = 43, CXP = 4, tR = 3.45 min.

[0162] 1,3-디페닐-1H-피라졸-5(4H)-온 (4): 에틸 벤조일아세테이트(12.2 mL, 71.2 mmol)의 EtOH (130 mL) 용액을 0°C에서 페닐-하이드라진 (7.00 g, 71.2 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 서서히 가온시키고 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc : 헥산; 1 : 4) 및 결정화 (EtOH)로 정제하여 화합물 4를 회백색 고체로 수득하였다(6.75 g, 28.6 mmol, 44 %).

[0163] 1 H-NMR (400 MHz) DMSO: 11.8 (s, 1H), 7.84-7.82 (d, 4H), 7.50-7.40 (m, 4H), 7.34-7.27 (m, 2H), 6.02 (s, 1H), 13 C-NMR (100 MHz) DMSO: 154.2, 150.0, 139.3, 133.8, 129.3, 129.0, 128.2, 126.1, 125.5, 121.5, 85.5; LC/MS-MS: 237.0 -> 77.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 81, CE = 68, CXP = 4, tR = 4.15 min.

[0164] 1-벤질-3-페닐-1H-피라졸-5(4H)-온 (5): 에틸 벤조일아세테이트(4.80 mL, 28.2 mmol)의 EtOH(60 mL) 중의 용액을 0°C에서 벤질-하이드라진(5.00 g, 25.6 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 천천히 가온하고 60°C(16 시간)로 가열하였다. 반응 혼합물을 농축시키고 EtOH(100 mL)로 희석시킨 다음 나트륨 에톡 사이드 3.0 g을 첨가하고 교반하였다(40 시간). 고체를 여과하고 용매를 진공에서 제거하였다. 잔류물을 실리카겔(4 : 1 헥산 : EtOAc 내지 100 % EtOAc)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 밝은 오렌지색 고체로서 5(25.5mg, 1.02mmol, 4 % 수율)를 수득하였다.

[0165] 1 H-NMR (400 MHz) DMSO: 11.2 (s, 1H), 7.71-7.70 (d, 2H), 7.37-7.31 (m, 4H), 7.27-7.20 (m, 4H), 5.85 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 13 C-NMR (100 MHz) DMSO: 153.6, 148.6, 138.3, 134.4, 128.8, 128.7, 127.6, 127.5, 125.1, 83.7, 50.0; LC/MS-MS: 251.1 -> 91.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 2, CE = 33, CXP = 14, tR = 4.01 min.

[0166] 3-(3,4-디메톡시페닐)-1-메틸-1H-피라졸-5(4H)-온 (6): EtOH(60 mL) 중 3,4-디메톡시 벤조일아세트산에틸(5.00

g, 19.8 mmol)을 0°C에서 메틸-하이드라진(0.95 mL, 19.8 mmol, 1.0 eq.)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 서서히 가온시키고 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔(헥산 : EtOAc; 4 : 1 내지 1 : 1) 크로마토그래피로 밝은 황색 분말로서 정제하여 6을 수득하였다(1.86 g, 7.94 mmol, 44 % 수율).

[0167] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 7.35–7.35 (d, 1H), 7.06–7.04 (dd, 1H), 6.87–6.85 (d, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 3.39 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 171.6, 154.1, 151.1, 149.4, 124.1, 119.6, 110.7, 107.3, 55.9, 55.9, 38.0, 31.3; LC/MS-MS: 235.1 → 219.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 66, CE = 33, CXP = 14, tR = 3.26 min.

[0168] 3-(3,4-디메톡시페닐)-1-페닐-1H-피라졸-5(4H)-온: (7): EtOH(60 mL) 중의 3,4-디메톡시 벤조일아세트산에틸(3.00 g, 11.9 mmol)을 0°C에서 페닐-하이드라진(1.17 mL, 10.8 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 서서히 가온시키고 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔 상에서 크로마토그래피(헥산 : EtOAc; 4 : 1 내지 1 : 1)로 정제하여 결정화(EtOH)에 의한 정제 후에 노란색 분말로 7을 수득하였다(920 mg, 2.32 mmol, 22 %).

[0169] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 8.00–7.97 (d, 1H), 7.48–7.42 (m, 3H), 7.25–7.21 (t, 1H), 7.17–7.14 (dd, 1H), 6.91–6.89 (d, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.83 (s, 2H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 170.1, 154.4, 151.4, 149.4, 138.1, 128.8, 125.2, 123.8, 120.1, 119.1, 110.7, 107.6, 56.0, 56.0, 39.7; LC/MS-MS: 297.0 → 218.2 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 96, CE = 37, CXP = 18, tR = 3.98 min.

[0170] 3-(4-메톡시페닐)-1-페닐-1H-피라졸-5(4H)-온 (8): EtOH(100 mL) 중 에틸-4-메톡시 벤조일아세테이트(7.00 g, 27.8 mmol)의 용액을 0°C 페닐-하이드라진(2.50 mL, 25.3 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 서서히 가온시키고 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔상의 크로마토그래피(헥산 : EtOAc, 4 : 1 내지 1 : 1)로 정제하여 3-(4-메톡시페닐)-1-페닐-1H-피라졸-5(4H)-온을 밝은 황색 고체로서 수득하였다(8; 5.21 g, 19.6 mmol, 78 % 수율).

[0171] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 7.99–7.97 (d, 1H), 7.66–7.64 (d, 2H), 7.44–7.40 (t, 2H), 7.22–7.18 (t, 1H), 6.94–6.92 (d, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.68 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 170.1, 161.5, 154.4, 138.2, 128.8, 127.5, 125.0, 123.5, 118.8, 114.2, 55.3, 39.6; LC/MS-MS: 267.0 → 77.2 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 81, CE = 65, CXP = 4, tR = 4.15 min.

[0172] 3-(4-메톡시페닐)-1-메틸-1H-피라졸-5(4H)-온 (9): EtOH (100 mL) 중의 에틸-4-메톡시 벤조일아세테이트(7.00 g, 27.8 mmol)의 용액을 0°C에서 메틸-하이드라진(1.30 mL, 25.2 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 주위 온도로 서서히 가온시키고 60°C(3 시간)로 가열하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔상에서 크로마토그래피(헥산 : EtOAc; 4 : 1 내지 1 : 1)로 정제하여 EtOH로부터 결정화 후 밝은 황색의 고체로 화합물 9를 수득하였다(3.00 g, 14.7 mmol, 58 % 수율).

[0173] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 10.9 (s, 1H), 7.63–7.60 (d, 2H), 6.92–6.90 (d, 2H), 5.70 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.54 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 161.1, 153.4, 147.9, 126.3, 114.6, 114.4, 83.1, 59.7, 31.3; LC/MS-MS: 205.0 → 190.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 51, CE = 29, CXP = 12, tR = 3.44 min.

[0174] 6-아미노-1,3-디메틸-4-페닐-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보나이트릴 (10): EtOH (10 mL) 중 벤즈알데하이드(290 μL, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 밀리몰) 및 TEA(400 μL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 2(322 mg, 2.87 밀리몰)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 19시간 후에 농축시키고, EtOH 및 헥산으로 세척하였다. 미정질의 결과물을 SiO2상에서 컬럼크로마토그래피(100 % EtOAc로 세정된 헥세인 중의 25 % EtOAc)로 정제한 후, EtOH로부터 재결정화하여 황색 분말로 10을 수득하였다(263 mg, 0.988 mmol, 34 % 수율).

[0175] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.34–7.32 (m, 2H), 7.25–7.23 (t, 1H), 7.19–7.17 (d, 2H), 7.05 (s, 2H), 4.57 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 1.66 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 159.9, 144.6, 144.4, 142.9, 128.8, 128.0, 127.3, 120.6, 96.5, 58.7, 37.5, 33.8, 12.8; LC/MS-MS: 267.0 → 201.3 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 61, CE = 29, CXP = 12, tR = 3.74 min.

[0176] 6-아미노-1-메틸-3,4-디페닐-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (11): EtOH (10 mL) 중 벤즈알데하이드(290 μL, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA(400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 3(500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 21시간 후에 농축시키고, EtOH 및 헥

세인으로 세척하고; EtOH로부터 재결정화하여 백색 고체로 11을 수득하였다(282 mg, 8.58 mmol, 30 % 수율).

[0177] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.41-7.38 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.21-7.18 (m, 6H), 4.88 (s, 1H), 4.77 (s, 2 H), 3.83 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 158.1, 146.0, 144.8, 144.6, 133.2, 128.7, 128.5, 127.9, 127.8, 127.1, 126.4, 120.5, 95.7, 59.9, 38.2, 34.5; LC/MS-MS: 329.1 -> 263.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 71, CE = 31, CXP = 18, tR = 4.00 min.

[0178] 6-아미노-3-메틸-1,4-디페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (12)의 합성: 무수 DCM (60 mL) 중의 벤즈알데히드(290 μ L, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol) 및 1 (500 mg, 2.87 mmol)의 용액에 무수 Na2SO4(407 mg, 2.87 mmol) 및 에틸-하이드로큐프레인 하이드로클로라이드(46 mg, 0.122 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온(25 시간)에서 교반 하였다. 여과하고 DCM으로 세척 한 후, 용매를 감압하에 제거하였다. 미정제 혼합물을 실리카겔상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피(헥산 : EtOAc; 1 : 1)로 처리하여 백색 고체로서 화합물 12를 수득하였다(270 mg, 0.822 mmol, 29 % 수율).

[0179] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 7.69-7.66 (d, 2H), 7.50-7.46 (t, 2H), 7.39-7.26 (m, 6H), 4.68 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 1.91 (s, 3H), 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 158.1, 146.4, 143.8, 141.9, 137.5, 129.2, 128.8, 127.8, 127.5, 126.7, 121.2, 119.0, 98.3, 64.0, 37.4, 12.8; LC/MS-MS: 329.1-> 263.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 56, CE = 31, CXP = 18, tR = 4.18 min.

[0180] 6-아미노-1,3,4-트리페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (13): EtOH(10m1) 중 벤즈알데히드(290 μ L, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol), 및 TEA (400 μ L, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0분 동안 교반한 후, 4(678 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 침전물을 여과하고 EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 백색 고체로 화합물 13을 수득하였다(330mg, 0.845mmol, 29 % 수율).

[0181] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 7.82-7.80 (d, 2H), 7.55-7.50 (m, 4H), 7.41-7.37 (t, 1H), 7.32-7.22 (m, 8H), 4.96 (s, 1H), 4.68 (s, 2H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 157.5, 147.7, 144.9, 142.6, 137.5, 132.2, 129.3, 128.8, 128.2, 128.1, 127.5, 127.4, 127.1, 126.9, 121.6, 118.9, 97.5, 64.8, 38.2; LC/MS-MS: 391.1-> 325.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 91, CE = 33, CXP = 22, tR = 4.33 min.

[0182] 6-아미노-3-(4-메톡시페닐)-1,4-디페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (14): EtOH (10 mL) 중의 벤즈알데히드(290 μ L, 2.87 mmol, 1.0 당량), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol, 1.0 equ) 및 TEA(400 μ L, 2.87 mmol, 1.0 당량)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 8(764 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 19시간 후에 농축시키고, EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화시켜 백색 고체로 14를 수득하였다(695 mg, 1.65 mmol, 58 % 수율).

[0183] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.94-7.92 (d, 2H), 7.58-7.53 (m, 4H), 7.41-7.37 (t, 1H), 7.27-7.16 (m, 7H), 6.83-6.81 (d, 2H), 5.04 (s, 1H), 3.71 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 159.5, 159.0, 146.6, 145.6, 144.5, 137.9, 129.8, 128.9, 128.3, 128.0, 127.3, 127.1, 125.1, 121.1, 120.3, 114.1, 97.5, 59.8, 55.5, 37.9; LC/MS-MS: 421.2 -> 355.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 71, CE = 33, CXP = 24, tR = 4.3 min.

[0184] 6-아미노-3-(4-메톡시페닐)-1-메틸-4-페닐-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보나이트릴 (15): EtOH (10 mL) 중의 벤즈알데하이드(290 μ L, 2.87 mmol, 1.0 당량), 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol, 1.0 equ.) 및 TEA(400 μ L, 2.87 mmol, 1.0 당량)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 9(583 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후 농축시켰다. 미정질의 물질을 컬럼 크로마토그래피(헥산 중 25 % EtOAc 및 100 % EtOAc로 램프)에 의해 정제한 후, EtOH로부터 재결정화하여 황색 고체로 15를 수득하였다(80.9 mg, 8 % 수율, 0.226 mmol).

[0185] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.42-7.40 (d, 2H), 7.23-7.21 (m, 2H), 7.15-7.13 (d, 3H), 7.06 (s, 2H), 6.77-6.75 (d, 2H), 4.93 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 159.1, 159.0, 145.9, 144.8, 144.5, 128.8, 127.8, 127.7, 127.1, 125.8, 120.5, 113.9, 95.0, 59.9, 55.4, 38.2, 34.4; LC/MS-MS: 359.1 -> 293.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 76, CE = 31, CXP = 20, tR = 4.0 min.

[0186] 6-아미노-3-(3,4-디메톡시페닐)-1-메틸-4-페닐-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (16): EtOH (5 mL) 중의 벤즈알데히드(145 μ L, 1.44 mmol), 말로노니트릴(90.0 mg, 1.44 mmol) 및 TEA(200 μ L, 1.44 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 6(336 mg, 1.44 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후 농축시켰다. 미정질의 물질을 컬럼 크로마토그래피(100 % EtOAc로 램프된 헥산 중 25 % EtOAc)로 정제한 후, EtOH로

부터 재결정화하여 황색 고체로 16을 수득하였다(48.5 mg, 9 % 수율, 0.124 mmol).

[0187] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 7.29-7.28 (d, 2H), 7.23-7.21 (d, 2H), 7.00-6.98 (d, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.72-6.70 (d, 2H), 4.84 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.60 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 157.6, 148.7, 148.6, 146.1, 145.7, 143.1, 128.9, 127.5, 127.4, 125.6, 119.3, 119.2, 110.9, 109.7, 94.7, 64.4, 55.7, 55.6, 38.3, 34.1; LC/MS-MS: 389.1 → 323.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 66, CE = 31, CXP = 22, tR = 3.82 min.

[0188] 6-아미노-4-(4-플루오로페닐)-1,3-디메틸-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (17): EtOH (8.0 mL) 중의 4-플루오로벤즈알데히드(300 μL, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA(400 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 2(322 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후에 농축시키고, EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 백색 고체로 화합물 17을 수득하였다(335 mg, 41 % 수율, 1.17 mmol).

[0189] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.23-7.20 (m, 2H), 7.16-7.12 (m, 2H), 7.07 (s, 2H), 4.61 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 1.67 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 162.7, 159.9 (d), 144.6, 142.9, 140.7, 129.9, 120.6, 115.5 (d), 96.3, 56.4, 36.7, 33.8, 12.8; LC/MS-MS: 285.1 → 219.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 61, CE = 27, CXP = 14, tR = 3.8 min.

[0190] 6-아미노-4-(4-플루오로페닐)-3-메틸-1-페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (18): EtOH (10 mL) 중의 4-플루오로벤즈알데히드 (356 mg, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol, 1.0 equ) 및 TEA(400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 1(500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 18시간 후 농축시키고, 침전물을 여과하고 EtOH로부터 재결정화시켜 화합물 18(85.0 mg, 0.245 mmol, 9 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0191] 1H-NMR (400 MHz) CDC13: 7.68-7.66 (d, 2H), 7.50-7.46 (t, 2H), 7.34-7.32 (t, 1H), 7.28-7.22 (m, 2H), 7.08-7.04 (t, 2H), 4.68 (s, 3H), 1.91 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) CDC13: 158.0, 146.2, 143.7, 137.8, 137.5, 129.4, 129.2, 126.8, 121.2, 118.8, 115.8, 115.6, 98.1, 63.8, 36.7, 12.8; LC/MS-MS: 347.1 → 281.1 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 11, CE = 31, CXP = 18, tR = 4.16 min.

[0192] 6-아미노-4-(4-플루오로페닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (19): EtOH (10 mL) 중의 4-플루오로벤즈알데히드(300 μL, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA(400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 3(500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20시간 후에 진공하에 농축시키고, EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 화합물 19 (182mg, 0.525mmol, 18 % 수율)를 밝은 황색 고체로서 수득하였다.

[0193] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.50-7.48 (d, 2H), 7.22-7.18 (m, 5H), 7.11 (s, 2H), 7.05-6.98 (t, 2H) 5.04 (s, 1H), 3.78 (s, 3H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 162.5, 159.1, 146.0, 144.6, 140.9, 133.1, 129.8 (d), 128.5, 127.9, 126.5, 120.4, 115.4 (d), 95.5, 59.7, 37.4, 34.5; LC/MS-MS: 347.1 → 281.0 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 66, CE = 31, CXP = 14, tR = 4.0 min.

[0194] 6-아미노-4-(4-플루오로페닐)-1,3-디페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (20): 에탄올 (10 mL) 중의 4-플루오로벤즈알데히드(300 μL, 2.87 mmol), 말로노니트릴(190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA(400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 4(678 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 18시간 후, 형성된 침전물을 여과하고 EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 20(240 mg, 0.588 mmol, 20 % 수율)을 백색 분말로서 수득하였다.

[0195] 1H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.94-7.92 (d, 2H), 7.61-7.55 (m, 4H), 7.42-7.38 (t, 1H), 7.28-7.24 (m, 7H), 7.06-7.02 (t, 2H), 5.15 (s, 1H); 13C-NMR (100 MHz) DMSO: 162.6, 159.0, 146.8, 145.6, 140.6, 137.8, 132.5, 130.0, 129.9 (d), 128.6, 128.6, 127.3, 127.0, 121.3, 120.2, 115.5 (d), 97.9, 59.6, 37.0; LC/MS-MS: 410.4 → 242.2 m/z; GS1 and GS2 at 30, DP = 21, CE = 47, CXP = 16, tR = 4.6 min.

[0196] 6-아미노-3-(3,4-디메톡시페닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-메틸-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (21): EtOH (10 mL) 중 4-플루오로벤즈알데하이드(300 μL, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol, 1.0 equ) 및 TEA (400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 6 (672 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 17시간 후, 형성된 침전물을 여과하고 EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 21(782 mg,

1.93 mmol, 67 % 수율)을 백색 분말로서 수득하였다.

[0197] ^1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.20-7.18 (m, 2H), 7.09-7.03 (m, 5H), 6.96-6.95 (d, 1H), 6.80-6.78 (d, 1H), 5.02 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.62 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100MHz) DMSO : 162.6, 159.0, 148.7, 146.0, 144.6, 141.0, 129.8, 129.7, 125.9, 120.4, 119.0, 115.7, 115.4, 111.8, 109.8, 94.7, 55.8, 55.7, 37.3, 34.4; LC / MS-MS : 407.1 \rightarrow 341.1 m / z; 30, DP = 71, CE = 33, CXP = 22, tR = 3.9 분에서 GS1 및 GS2.

[0198] 6-아미노-4-(4-플루오로페닐)-3-(4-메톡시페닐)-1-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (22): EtOH (10 mL) 중의 4-플루오로벤즈알데하이드 (300 μL , 2.87 mmol), 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL , 2.87 mmol, 1.0 equ)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 8 (764 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 17시간 후, 형성된 침전물을 여과하고, EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 22 (800mg, 1.83mmol, 64 % 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0199] ^1H -NMR (400MHz) DMSO : 7.93-7.91 (d, 2H), 7.55-7.53 (m, 4H), 7.41-7.37 (t, 1H), 7.26-7.23 (m, 4H), 7.07-7.05 , 2H), 6.84-6.82 (d, 2H), 5.11 (s, 1H), 3.72 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100MHz) DMSO : 162.6, 159.0, 146.6, 145.5, 140.7, 140.6, 137.9, 130.0, 129.9 (d), 128.3, 127.1, 125.0, 121.1, 120.2, 115.5 (d), 114.1, 97.3, 59.6 , 55.5, 37.0; LC / MS-MS : 439.2 \rightarrow 373.0 m / z; 30, DP = 61, CE = 35, CXP = 24, tR = 4.3 분에서 GS1 및 GS2.

[0200] 6-아미노-3-(3,4-디메톡시페닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (23) EtOH (3.0 mL) 중 4-플루오로벤즈알데하이드 (70.0 mL, 0.675 mmol), 말로노니트릴 (45.0 mg, 0.675 mmol) 및 TEA (90.0 mL, 0.675 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 200 mg, 0.675 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 19시간 후 농축시키고, 미정제 물질을 칼럼 크로마토그래피 (100 % EtOAc로 중류된 헥산 중 25 % EtOAc)로 정제하였다. 황색 고체를 EtOH로부터 재결정화시켜 추가로 정제하여 화합물 23 (164mg, 0.350mmol, 12 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0201] ^1H NMR (400 MHz) CDC13 : 7.80-7.78 (d, 2H), 7.52-7.48 (t, 2H), 7.38-7.35 (t, 1H), 7.25-7.21 (m, 2H), 7.05-6.95 , 4H), 6.75-6.73 (d, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.71 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100MHz) CDC13 : 163.2, 157.8, 149.2, 148.7, 147.5, 144.9, 138.6, 137.4, 129.3, 129.1 (d), 127.1, 125.0, 121.5, 119.8, 119.0, 115.8 (d), 110.8, 109.9 , 96.6, 64.0, 55.8, 55.7, 37.5; LC / MS-MS : 469.3 \rightarrow 403.1 m / z; 30, DP = 6, CE = 35, CXP = 26, tR = 4.2 분에서 GS1 및 GS2.

[0202] 6-아미노-4-(4-플루오로페닐)-3-(4-메톡시페닐)-1-메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (24) EtOH (10 mL) 중의 2-플루오로벤즈알데하이드 (300 μL , 2.87 mmol), 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL , 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 9 (586 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 19시간 후에 농축시키고, 형성된 침전물을 EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 화합물 24 (350mg, 0.930mmol, 32 % 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0203] ^1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.43-7.40 (d, 2H), 7.20-7.16 (m, 2H), 7.10 (s, 2H), 7.06-7.02 (t, 2H), 6.78-6.76 (d, 2H), 4.99 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.69 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100MHz) DMSO : 162.5, 159.1, 145.8, 144.6, 141.0, 141.0, 129.8 (d), 127.8, 125.7, 120.5, 115.5 (d), 113.9, 94.9, 59.7, 55.4, 37.4, 34.4; LC / MS-MS : 377.1 \rightarrow 311.1 m / z; 30, DP = 66, CE = 33, CXP = 20, tR = 4.0 분에서 GS1 및 GS2.

[0204] 6-아미노-4-(3,5-디 플루오로페닐)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (25)의 합성 : 3,5-디 플루오로벤즈알데하이드 , EtOH (10 mL) 중 트라이 에틸 아민 (0.408 g, 2.87 밀리몰), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 밀리몰) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 5 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 밀리몰). 반응 혼합물을 23시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 EtOH로부터 재결정시키고 EtOH 및 n-헥산으로 세척하여 25 (291 mg, 0.963 mmol, 34 % 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0205] ^1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.15 (br-s, 2H), 7.09-7.05 (t, 1H), 6.92-6.89 (m, 2H), 4.66 (s, 1H), 3.57 (s, 3H) 1.68 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100MHz) DMSO : 163.9 (d, CF), 163.8 (d, CF), 160.2, 149.2 (t), 144.8, 142.9, 120.4, 111.2 (m), 102.9 37.1, 33.9, 12.8. LC / MS-MS : 303.9 \rightarrow 236.9 m / z; 30, DP = 11, CE = 31, CXP = 16, tR = 4.19 분에서 GS1 및 GS2.

[0206] 6-아미노-4-(3,5-디 플루오로페닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (26)의 합성 : EtOH (10 mL) 중 디 플루오로벤즈알데하이드 (0.408 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol)

및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (0.500 g, 2.87 mmol, 1 equ.). 반응 혼합물을 23시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 EtOH로부터 재결정화시켜 화합물 26 (282 mg, 0.77 mmol, 27 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0207] 1H-NMR (400MHz) DMSO : 7.48-7.47 (d, 2H), 7.24-7.17 (m, 5H), 6.97-6.92 (m, 1H), 6.87-6.85 (d, 2H), 5.11 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 163.5 (d, CF), 163.5 (d, CF), 159.5, 146.1, 144.7, 133.0, 128.6, 128.1, 126.6, 126.5, 120.2, 111.3 (d), 102.8, 95.5, 58.5, 37.6, 34.6. LC / MS-MS : 365.1 → 299.0 m / z; 30, DP = 86, CE = 27, CXP = 20, tR = 4.38 분에서 GS1 및 GS2.

[0208] 6-아미노-4-(4-메톡시페닐)-3-메틸-1-페닐-1,4-디 하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보 니트릴 (27) : 아민스 알데히드 (350 μl, EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 1 (500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후에 농축시키고, 침전물을 EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 27 (800mg, 78 % 수율, 2.23mmol)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0209] 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.80-7.78 (d, 2H), 7.51-7.47 (t, 2H), 7.32-7.28 (t, 1H), 7.18-7.16 (m, 4H), 6.91-6.89 (s, 2H), 4.62 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 1.79 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.7, 158.6, 145.7, 144.2, 138.0, 136.0, 129.7, 129.2, 126.5, 120.5, 120.3, 114.3, 99.3, 59.0, 55.4, 36.4, 13.0; LC / MS-MS : 359.2 → 293.0 m / z; 30, DP = 71, CE = 29, CXP = 20, tR = 4.14 분에서 GS1 및 GS2.

[0210] 6-아미노-4-(4-메톡시페닐)-1,3-디메틸-1,4-디하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카르보니트릴 (28)의 합성 : 아민스 알데히드 (350 μl, 2.87 mmol), EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 2 (321 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 칼럼 크로마토그래피 (100 % EtOAc로 헹구어 진 헥산 중 25 % EtOAc)로 정제하였다. 황색 고체를 EtOH 및 헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 화합물 28 (370 mg, 1.25 mmol, 44 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0211] 1H NMR (400 MHz) CDCl₃ : 7.12-7.10 (d, 2H), 6.85-6.83 (d, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.55 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 1.80 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) CDCl₃ : 158.8, 157.9, 144.5, 144.4, 134.5, 128.8, 119.3, 114.0, 96.4, 64.2, 55.2, 36.7, 33.7, 12.7; LC / MS-MS : 297.0 → 231.2 m / z; 30, DP = 61, CE = 27, CXP = 16, tR = 3.71 분에서 GS1 및 GS2.

[0212] 6-아미노-4-(4-메톡시페닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디 하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보 니트릴 (29) : 아민스 알데히드 (350 μl, EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 3 (500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후에 농축시키고, 침전물을 EtOH 및 헥산으로 세척하고, 생성물을 EtOH로부터 재결정화시켜 백색 고체로서 화합물 (29) (210 mg, 20 % 수율, 0.586 mmol)을 수득하였다.

[0213] 1H-NMR (400MHz) DMSO : 7.50-7.48 (d, 2H), 7.21-7.17 (m, 3H), 7.05-7.02 (m, 4H), 6.76-6.74 (d, 2H), 4.91 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.64 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 158.9, 158.3, 146.0, 144.6, 136.9, 133.2, 128.9, 128.5, 127.8, 126.4, 120.6, 114.1, 95.9, 60.3, 55.3, 37.5, 34.5; LC / MS-MS : 359.2 → 293.0 m / z; 30, DP = 66, CE = 29, CXP = 20, tR = 3.98 분에서 GS1 및 GS2.

[0214] 6-아미노-4-(4-메톡시페닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디 하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보나이트 릴 (30) : 아민스 알데히드 (350 μl, EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 4 (678 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후 농축시키고, 침전물을 EtOH 및 헥산으로 세척하였다. 생성물을 EtOH로부터 재결정화하여 백색 고체로서 화합물 30 (1.05 g, 87 % 수율, 2.50 mmol)을 수득하였다.

[0215] 1H-NMR (400MHz) DMSO : 7.94-7.92 (d, 2H), 7.63-7.61 (d, 2H), 7.57-7.53 (t, 2H), 7.40-7.36 (t, 1H), 7.29-7.23 (s, 3H), 7.15 (s, 2H), 7.13-7.11 (d, 2H), 6.78-6.76 (d, 2H), 5.02 (s, 1H), 3.65 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 158.9, 158.4, 146.7, 145.6, 137.9, 136.5, 132.6, 129.8, 129.0, 128.7, 128.5, 127.2, 127.0, 121.2, 120.3, 114.2, 98.3, 60.2, 55.3, 37.1; LC / MS-MS : 421.2 → 355.0 m / z; 30, DP = 81, CE = 35, CXP = 24, tR = 4.32 분에서 GS1 및 GS2.

[0216] 6-아미노-3,4-비스 (4-메톡시페닐)-1-페닐-1,4-디 하이드로피라노[2,3-c]피라졸-5-카보 니트릴 (31) : 아민스 알데히드 (350 μL, 2.87 EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol, 1.0 equ.) 및 TEA (400 μL,

2.87 mmol, 1.0 equ)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, (764 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후에 농축시키고, 침전물을 EtOH 및 헥산으로 세척 한 후, EtOH로부터 재결정화시켜 31 (1.06 g, 2.35 mmol, 82 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) DMSO : 7.93-7.91 (d, 2H), 7.56-7.52 (m, 4H), 7.38-7.35 (t, 1H), 7.15-7.11 (m, 4H), 6.83-6.78 (m, 4H), 4.98 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.66 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) DMSO : 159.5, 158.9, 158.4, 146.6, 145.5, 137.9, 136.6, 129.8, 129.0, 128.3, 127.0, 125.2, 121.0, 120.4, 114.2, 114.1, 97.7, 60.3, 55.5, 55.3, 37.1 ; LC / MS-MS : 452.3 \rightarrow 89.1 m / z; 30, DP = 36, CE = 39, CXP = 4, tR = 3.47 분에서 GS1 및 GS2.

[0217] 6-아미노-3,4-비스 (4-메톡시페닐)-1-메틸-1,4-디 하이드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카보 니트릴 (32) : 아니스 알데히드 (350 μL , 2.87 (10 mL) 중의 말로노니트릴 (190 mg, 2.87 mmol) 및 TEA (400 μL , 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 9 (689 mg, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24시간 후 농축시키고, 침전물을 EtOH 및 헥세인으로 세척 한 후, EtOH로부터 재결정화하여 32 (690 mg, 1.78 mmol, 62 % 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) DMSO : 7.42-7.40 (d, 2H), 7.05-7.03 (d, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.78-6.75 (dd, 4H), 4.86 3.73 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.66 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) DMSO : 159.0, 158.9, 158.3, 145.9, 144.5, 136.9, 128.9, 127.7, 125.9, 120.6, 114.1, 113.9, 95.3, 60.3, 55.4, 55.3, 37.5, 34.3; LC / MS-MS : 389.2 \rightarrow 323.0 m / z; 30, DP = 66, CE = 29, CXP = 22, tR = 3.94 분에서 GS1 및 GS2.

[0218] 6-아미노-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (33)의 합성 : 3-플루오로 EtOH (10 mL) 중 4-메톡시 벤즈알데하이드 (0.442 g, 2.87 밀리몰), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 밀리몰) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 5 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 18시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 EtOH로부터 재결정화시키고, 고체를 EtOH 및 n-헥산으로 세척하여 31 (475 mg, 1.51 mmol, 53 % 수율)을 밝은 주황색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) DMSO : 7.10-7.04 (m, 3H), 6.95-6.93 (m, 2H), 4.53 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 1.65 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) DMSO : 159.9, 153.0 (d, CF), 146.4 (d), 144.6, 142.9, 137.6 (d), 124.1, 120.6, 115.4 (d), 114.0, 96.2, 58.5, 56.4, 36.6, 33.9, 12.8. LC / MS-MS : 315.0 \rightarrow 248.9 m / z; 30, DP = 66, CE = 27, CXP = 16, tR = 4.05 분에서 GS1 및 GS2.

[0219] 6-아미노-1,3-디메틸-4-(2,4,6-트리 메톡시페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (34) : 2,4, EtOH (10 mL) 중 6-트리 메톡시 벤즈알데하이드 (0.563 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 26시간 후 농축시켰다. 미정제 물질을 SiO2상에서 칼럼 크로마토그래피 (DCM 중 2 % MeOH)로 정제하였다. 황색 고체를 EtOH로부터 재결정시키고 EtOH 및 n-헥산으로 세척하여 화합물 34 (60 mg, 0.168 mmol, 6 % 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) DMSO : 6.72 (s, 2H), 6.20 (brs, 2H), 4.97 (s, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.53 (s, 6H), 1.65 ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) DMSO : 161.3, 160.1, 145.4, 142.1, 121.3, 111.7, 96.5, 93.1, 91.2, 57.0, 56.6, 55.5, 33.7, 26.1, LC / MS-MS : 357.1 \rightarrow 189.0 m / z; 30, DP = 56, CE = 29, CXP = 12, tR = 4.07 분에서 GS1 및 GS2.

[0220] 6-아미노-4-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디 하이드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카보 니트릴 (35) : 3-아미노-4-EtOH (10 mL) 중 4-플루오로-4-메톡시 벤즈알데하이드 (0.442 g, 2.87 밀리몰), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 밀리몰) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (0.500 g, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 18시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 EtOH로부터 재결정화시켜 화합물 35 (348 mg, 0.927 mmol, 33 % 수율)을 밝은 백색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) DMSO : 7.50-48 (d, 2H), 7.22-7.15 (m, 3H), 7.07 (brs, 2H), 6.97-6.89 (m, 3H), 4.96 3.74 (s, 3H), 3.71 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) DMSO : 159.1, 152.8 (d, CF), 146.1 (d), 146.0, 144.6, 137.9 (d), 133.2, 128.6, 127.9, 126.5, 124.0, 120.5, 115.2, 113.9, 95.4, 59.7, 56.3, 37.2, 34.5. LC / MS-MS : 377.1 \rightarrow 311.1 m / z; 30, DP = 66, CE = 31, CXP = 20, tR = 4.27 분에서 GS1 및 GS2.

[0221] 6-아미노-1,3-디메틸-4-(4-(트리 플루오로 메틸) 페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (36)의 합성 : 4-(트리 플루오로 메틸) 벤즈알데하이드 (0.500g, 2.87mmol), 말로노니트릴 (0.190g, 2.87mmol) 및 TEA (0.40mL, 2.87mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321g, 2.87mmol) mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축하고 SiO2 (DCM 중의 2 % MeOH)상에서 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 36 (445 mg, 1.33 mmol, 46 % 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) DMSO : 7.28 (s, 4H), 7.10 (brs, 2H), 4.64 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 1.64 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) DMSO : 160.1, 147.6, 144.7, 143.9, 142.9, 129.9, 122.3, 121.4, 120.6, 96.2, 58.2, 36.8, 33.9, LC / MS-MS : 337.2 \rightarrow 59.1 m / z; 30, DP = 26, CE

= 31, CXP = 10, tR = 5.10 분에서 GS1 및 GS2.

[0222] 6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(4-(트리 플루오로 메틸) 페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (37) : 4-EtOH (6 mL) 중 트라이 플루오로 아세틸 아세토 나이트 릴 (0.10 g, 1.72 mmol), 트라이 플루오로 메틸) 벤즈알데하이드 (0.300 g, 1.72 mmol), 말로노니트릴 (0.114 g, 1.72 mmol) 및 TEA (0.240 mL, 1.72 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반한 후, 1.72 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후 농축시키고, SiO2 (DCM 중의 2 % MeOH)에서 2 회 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제 한 후, EtOAc : 헥산 (1 : 1)으로 광으로서 37 (120 mg, 0.301 mmol, 18 % 황색 고체. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.58-7.56 (d, 2H), 7.49-7.47 (d, 2H), 7.37-7.35 (d, 2H), 7.20-7.17 (m, 5H), 5.17 (s, 1H), 3.77 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.4, 149.3, 146.1, 144.7, 133.0, 128.8, 128.6, 128.0, 126.4, 126.0, 125.7 (d), 123.3, 120.3, 94.9, 59.0, 37.9, LC / MS-MS : 397.1 → 331.0 m / z; 30, DP = 96, CE = 33, CXP = 22, tR = 4.44 분에서 GS1 및 GS2.

[0223] 6-아미노-1,3-디메틸-4-(4-(트리 플루오로메톡시) 페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (38) : 4-(트리 플루오로메톡시) EtOH (10 mL) 중 벤즈알데하이드 (0.546 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol). 반응 혼합물을 22시간 후에 농축하고 SiO2 (DCM 중 2 % MeOH)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 38 (359 mg, 1.03 mmol, 36 % 수율)을 주황색 고체로서 수득하였다. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.68-7.66 (d, 2H), 7.40-7.38 (d, 2H), 7.14 (brs, 2H), 4.71 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 1.64 s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 160.2, 149.2, 144.7, 142.9, 129.0, 127.2, 125.9, 124.1, 120.5, 95.8, 57.8, 37.2, 33.9, LC / MS-MS : 352.0 → 335.1 m / z; 30, DP = 26, CE = 9, CXP = 24, tR = 4.31 분에서 GS1 및 GS2.

[0224] 6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(4-(트리 플루오로메톡시) 페닐)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (39) : 4-EtOH (6 mL) 중의 벤즈알데하이드 (0.327 g, 1.72 mmol), 말로노니트릴 (0.114 g, 1.72 mmol) 및 TEA (0.240 mL, 1.72 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (300 mg, 1.72 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축하고 SiO2 (DCM 중의 2 % MeOH)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 39 (174 mg, 0.421 mmol, 25 % 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. 1H-NMR (400MHz) DMSO : 7.47-7.45 (d, 2H), 7.26-7.24 (d, 2H), 7.20-7.14 (m, 7H), 5.08 (s, 1H), 3.76 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.3, 147.4, 146.0, 144.7, 144.1, 133.1, 129.8, 128.6, 128.0, 126.5, 121.7, 121.2, 120.4, 95.3, 59.3, 37.4, 34.5. LC / MS-MS : 413.1 → 346.9; 30, DP = 86, CE = 33, CXP = 24, tR = 4.49 분에서 GS1 및 GS2.

[0225] 6-아미노-4-(4-시아노 페닐)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (40)의 합성 : 4-포르밀 벤조 니트릴 (0.376g, 2.87 EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 18시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 SiO2상에서 컬럼 크로마토그래피 (DCM 중 2 % MeOH)로 정제하였다. 황색 고체를 EtOH 및 n-헥산으로 세척하고, EtOH로부터 재결정화하여 40 (484 mg, 1.66 mmol, 58 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.78-7.76 (d, 2H), 7.38-7.36 (d, 2H), 7.17 (brs, 2H), 4.70 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 1.63 s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 160.2, 150.1, 144.7, 142.9, 133.0, 129.2, 120.4, 119.2, 110.2, 95.6, 57.5, 37.4, 33.9, LC / MS-MS : 292.0 → 226.2 m / z; 30, DP = 51, CE = 31, CXP = 14, tR = 3.90 분에서 GS1 및 GS2.

[0226] 6-아미노-4-(4-시아노 페닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (41)의 합성 : 4-포르밀 벤조 니트릴 (0.376 g, 2.87 mmol), EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 18시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 EtOH 및 n-헥산으로부터 재결정화시켜 화합물 41 (160 mg, 0.453 mmol, 16 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.68-7.66 (d, 2H), 7.48-7.46 (d, 2H), 7.35-7.33 (d, 2H), 7.22-7.19 (m, 5H), 5.17, 3.77 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.4, 150.2, 146.1, 144.7, 133.0, 132.8, 129.1, 128.7, 128.1, 126.5, 120.2, 119.1, 110.0, 94.7, 58.6, 38.0, 34.6. LC / MS-MS : 354.2 → 288.1 m / z; 30, DP = 66, CE = 33, CXP = 20, tR = 4.21 분에서 GS1 및 GS2.

[0227] 6-아미노-4-(4-이소프로필 페닐)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (42) : 4-이소프로필 벤즈알데하이드 (0.425 g, 2.87 EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고, 침전물을 여과하고 EtOH로 세척하여 42 (163 mg, 0.528 mmol, 18 % 수율)을 밝은 황색 고체로서 수득하였다. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.16-7.14 (d, 2H), 7.05-7.03 (d, 2H), 6.99 (s, 2H), 4.50 (s,

1H), 3.56 (s, 3H) 2.79 (m, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.17-1.15 (d, 6H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 160.0, 147.2, 144.6, 142.9, 141.9, 127.9, 126.7, 120.8, 96.7, 58.8, 37.1, 33.9, 33.4, 24.3, 12.9. LC / MS-MS : 309.1 -> 243.0 m / z; 30, DP = 71, CE = 31, CXP = 16, tR = 4.44 분에서 GS1 및 GS2.

[0228] 6-아미노-4-(4-아이소 프로필 폐닐)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (43) : 4-아이소 프로필 벤즈알데히드 (0.254 g, 1.72 mmol), 에탄올 (6 mL) 중의 말로노니트릴 (0.114 g, 1.72 mmol) 및 TEA (0.240 mL, 1.72 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (0.300 g, 1.72 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고 SiO₂상에서 2 회 컬럼 크로마토그래피 (DCM 중 2 % MeOH) 및 이어서 EtOAc : 헥산; 1 : 1로 정제하여 43 (207 mg, 0.559 mmol, 33 % 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 7.50-7.48 (d, 2H), 7.22-7.16 (m, 3H), 7.09-7.02 (m, 6H), 4.92 (s, 1H), 3.76 (s, 3H) 2.80-2.73 (m, 1H), 1.12-1.10 (d, 6H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 159.2, 147.1, 146.1, 144.5, 142.3, 133.3, 128.6, 127.9, 127.7, 126.7, 126.4, 120.7, 95.9, 60.1, 37.9, 34.5, 33.3, 24.2. LC / MS-MS : 371.1 -> 305.0 m / z; 30, DP = 106, CE = 29, CXP = 20, tR = 4.60 분에서 GS1 및 GS2.

[0229] 6-아미노-4-(2,3-디히드로 벤조 [b] [1,4] 디 옥신-6-일)-1,3-디메틸-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (44) : EtOH (10 mL) 중 1,4-벤조 디 옥산-6-카르 복스 알데히드 (0.471 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol) 5 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 23시간 후에 농축시키고 미정제 물질을 EtOH로부터 재결정화시키고 EtOH 및 n-헥산으로 세척하여 화합물 44 (131 mg, 0.404 mmol, 14 % 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 6.98 (brs, 2H), 6.76-6.74 (d, 1H), 6.59-6.57 (m, 2H), 4.43 (s, 1H), 4.18 (s, 4H), 3.56 s, 3H), 1.67 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 159.9, 144.6, 143.5, 143.0, 142.6, 137.7, 120.7, 120.7, 117.3, 116.5, 96.6, 64.5, 64.4, 58.9, 36.8, 33.9. LC / MS-MS : 325.0 -> 259.1 m / z; 30, DP = 51, CE = 29, CXP = 18, tR = 3.98 분에서 GS1 및 GS2.

[0230] 6-아미노-4-(2,3-디히드로 벤조 [b] [1,4] 디 옥신-6-일)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5 (45) : EtOH (10 mL) 중 1,4-벤조 디 옥산-6-카르 복스 알데히드 (0.471 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol) 10 분 동안 교반한 후, 3 (0.500 g, 2.87 밀리몰)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23시간 후에 농축시키고, 미정제 물질을 SiO₂ (DCM 중 2 % MeOH)상에서 칼럼 크로마토그래피로 정제 한 다음, EtOH로부터 재결정화하여 45 (93 mg, 0.240 mmol, 8 % 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 7.53-7.51 (d, 2H), 7.25-7.18 (m, 3H), 7.03 (brs, 2H), 6.98-6.66 (d, 1H), 6.60-6.57 (m, 2H), 4.86 (s, 1H), 4.13 (s, 4H), 3.75 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 159.1, 146.0, 144.5, 143.5, 142.5, 138.1, 133.3, 128.7, 127.9, 126.5, 120.6, 120.5, 117.2, 116.3, 95.8, 64.4, 64.3, 60.2, 37.5, LC / MS-MS : 387.1 -> 321.0 m / z; 30, DP = 66, CE = 31, CXP = 22, tR = 4.25 분에서 GS1 및 GS2.

[0231] 6-아미노-1,3-디메틸-4-(페리딘-4-일)-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (46) : 3-페리딘 카 복스 알데히드 (0.307 g, 2.87 mmol), 에탄올 (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축하고 SiO₂ (DCM 중의 2 % MeOH)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 EtOH로 세척하여 밝은 주황색 고체로서 화합물 46 (132 mg, 0.493 mmol, 17 % 수율)을 수득하였다. ¹H-NMR (400MHz) DMSO : 8.49-8.48 (d, 2H), 7.18-7.18 (m, 4H), 4.61 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 1.66 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 160.4, 152.9, 150.3, 144.8, 142.9, 123.4, 120.4, 95.2, 57.1, 36.8, 33.9, LC / MS-MS : 268.0 -> 189.1 m / z; 30, DP = 56, CE = 25, CXP = 12, tR = 3.38 분에서 GS1 및 GS2.

[0232] 6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(페리딘-4-일)-1,4-디 하이드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카보 니트릴 (47) : 3-페리딘 카 복스 알데히드 (EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 밀리몰) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (500 mg, 2.87 밀리몰)을 첨가하였다. 22시간 후, 침전물을 여과하고 EtOH 및 헥산으로 세척하여 47 (340 mg, 1.03 mmol, 36 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H-NMR (400MHz) DMSO : 8.38-8.36 (dd, 2H), 7.48-7.46 (d, 2H), 7.22-7.13 (m, 7H), 5.08 (s, 1H), 3.77 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 159.6, 153.0, 150.1, 146.1, 144.7, 133.0, 128.7, 128.1, 126.5, 123.2, 120.2, 94.3, 58.2, 37.4, 34.6. LC / MS-MS : 330.1 -> 80.1 m / z; 30, DP = 76, CE = 63, CXP = 4, tR = 3.94 분에서 GS1 및 GS2.

[0233] 6-아미노-1,3-디메틸-4-(페리딘-3-일)-1,4-디히드로피라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (48)의 합성 : 3-페리딘 카르 복스 알데히드 (0.307 g, 2.87 mmol), 에탄올 (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA

(0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 5 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고, 침전물을 여과하고 EtOH로 세척하여 48 (463 mg, 1.73 mmol, 60 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 8.43-8.43 (d, 2H), 7.53-7.51 (d, 1H), 7.34-7.31 (m, 1H), 7.14 (brs, 2H), 4.63 3.57 (s, 3H), 1.64 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 160.2, 149.4, 148.8, 144.8, 142.8, 139.7, 135.8, 124.2, 120.5, 95.7, 57.8, 35.0, 33.9, LC / MS-MS : 268.0 → 189.2m / z; 30, DP = 71, CE = 34, CXP = 12, tR = 3.5 분에서 GS1 및 GS2.

[0234] 6-아미노-1-메틸-3-페닐-4-(페리딘-3-일)-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (49) : 3-페리딘 카복스 알데하이드 (EtOH (10 mL) 중의 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 밀리몰) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (500 mg, 2.87 밀리몰). 22시간 후에 백색 침전물이 형성되고 여과되었다. 형성된 침전물을 EtOH로 재결정화하여 49 (389 mg, 1.19 mmol, 41 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 8.41-8.40 (d, 1H), 8.30-8.29 (dd, 1H), 7.49-7.47 (d, 3H), 7.23-7.16 (m, 6H), 5.12 (s, 1H), 3.77 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 159.4, 149.3, 148.5, 146.1, 144.7, 139.9, 135.6, 133.0, 128.6, 128.0, 126.5, 124.0, 120.4, 94.8, 58.9, 35.6, LC / MS-MS : 330.1 → 80.1 m / z; 30, DP = 56, CE = 57, CXP = 14, tR = 3.96 분에서 GS1 및 GS2.

[0235] 6-아미노-4-(6-브로모 페리딘-2-일)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (50) : 6-브로모-EtOH (10 mL) 중 2-페리딘 카복스 알데하이드 (0.307 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 22시간 후에 반응 혼합물을 여과하고 침전물을 여과하고 EtOH로 세척하여 50 (427 mg, 1.23 mmol, 43 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 7.73-7.69 (t, 1H), 7.50-7.48 (d, 1H), 7.32-7.30 (d, 1H), 7.19 (brs, 2H), 4.69 3.56 (s, 3H), 1.71 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 164.4, 160.7, 144.7, 142.9, 141.4, 140.8, 127.0, 122.0, 120.5, 95.3, 56.3, 39.3, 33.9, LC / MS-MS : 348.0 → 283.0 m / z; 30, DP = 66, CE = 25, CXP = 18, tR = 4.00 분에서 GS1 및 GS2.

[0236] 6-아미노-4-(6-브로모페리딘-2-일)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (51) : 6-아미노-4-EtOH (10 mL) 중의 4-브로모-2-페리딘 카복스 알데하이드 (0.307 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (500 mg, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 22시간 후에 반응 혼합물을 여과하고 침전물을 여과하고 EtOH로 세척하여 51 (971 mg, 2.38 mmol, 83 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 7.59-7.53 (t, 1H), 7.52-7.50 (d, 2H), 7.38-7.35 (d, 1H), 7.30-7.26 (d, 1H), 7.24-7.21 m, 5H), 5.12 (s, 1H), 3.76 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 164.4, 160.0, 146.0, 144.7, 141.2, 140.5, 133.0, 128.6, 128.1, 126.9, 126.4, 122.2, 120.2, 94.6, 57.5, 39.3, LC / MS-MS : 408.0 → 175.1 m / z; 30, DP = 86, CE = 31, CXP = 10, tR = 4.28 분에서 GS1 및 GS2.

[0237] 4-(4-(1H-아미노-1-일)-페닐)-6-아미노-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (52) : 의 EtOH (10 mL) 중 4-(1H-아미노-1-일)-벤즈알데하이드 (0.494 g, 2.87 mmol), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 mmol) 및 TEA (0.40 mL, 2.87 mmol)의 혼합물을 1.0 분 동안 교반하였다. 이어서 2 (0.321 g, 2.87 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고 SiO₂ (DCM 중 2 % MeOH)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 52 (322 mg, 0.967 mmol, 34 % 수율)을 밝은 갈색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 8.20 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.58-7.56 (d, 2H), 7.29-7.27 (d, 2H), 7.09-7.07 4.64 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 1.68 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 160.1, 144.7, 143.2, 143.0, 136.1, 136.0, 130.3, 129.5, 121.0, 120.7, 118.5, 95.3, 58.4, 36.9, 33.9. LC / MS-MS : 333.3 → 266.9 m / z; 30, DP = 61, CE = 41, CXP = 18, tR = 3.4 분에서 GS1 및 GS2.

[0238] 4-(4-(1H-아미노-1-일)-페닐)-6-아미노-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (53) : EtOH (6 mL) 중의 4-(1H-아미노-1-일)-벤즈알데하이드 (0.296 g, 1.72 mmol), 말로노니트릴 (0.114 g, 1.72 mmol) 및 TEA (0.240 mL, 1.72 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반하였다. 이어서 3 (0.300 g, 1.72 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고, SiO₂ (DCM 중 2 % MeOH)상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 53 (308 mg, 0.780 mmol, 45 % 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz) DMSO : 8.15 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.54-7.52 (d, 2H), 7.49-7.47 (d, 2H), 7.28-7.13 7.04 (s, 1H) 5.09 (s, 1H) 3.78 (s, 3H); ¹³C-NMR (100MHz) DMSO : 159.2 145.1, 144.6, 143.5, 135.9, 135.9, 133.2, 130.2, 129.3, 128.7, 128.0, 126.5, 120.7, 120.5, 118.4, 95.4, 59.6, 37.6, 34.6. LC / MS-MS : 395.2 → 144.0 m

/ z; 30, DP = 101, CE = 59, CXP = 8, tR = 3.89 분에서 GS1 및 GS2.

[0239] 화합물 54



Chemical Formula: C₁₃H₁₁BrN₄OS

Molecular Weight: 351.22

[0240]

[0241] 6-아미노-4-(5-브로모티 오펜-2-일)-1,3-디메틸-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (54)의 합성 : 5-브로모티 오펜 에탄올 (10 mL) 중의 2-브로모-2-카바 알데히드 (0.548 g, 2.87 밀리몰), 말로노니트릴 (0.190 g, 2.87 밀리몰) 및 트라이 에틸 아민 (0.40 mL, 2.87 밀리몰)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 2 (0.321 g, 2.87 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 여과하고, 침전물을 에탄올로 재결정화하여 화합물 54 (221 mg, 0.628 mmol, 22 % 수율)를 밝은 주황색 고체로서 수득하였다. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.18 (s, 2H), 7.02-7.02 (d, 1H), 6.86-6.85 (d, 1H), 4.93 (s, 1H), 3.56 (s, 3H), 1.81 s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.9, 151.9, 144.2, 143.1, 130.3, 126.0, 120.3, 110.8, 95.8, 58.3, 33.9, 33.2, LC / MS-MS : 352.9 → 287.0 m / z; 30, DP = 66, CE = 29, CXP = 18, tR = 4.3 분에서 GS1 및 GS2.

[0242] 화합물 55



Chemical Formula: C₁₈H₁₃BrN₄OS

Molecular Weight: 413.29

[0243]

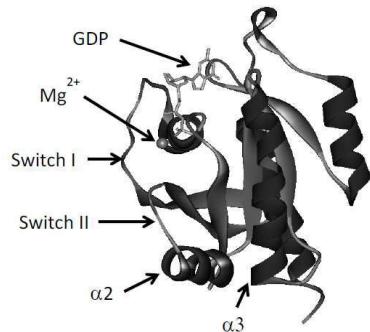
[0244] 6-아미노-4-(5-브로모싸이오펜-2-일)-1-메틸-3-페닐-1,4-디히드로파라노[2,3-c]파라졸-5-카르보니트릴 (55)의 합성 : 5-에탄올 (6 mL) 중 브로모티 오펜-2-카르 브 알데히드 (0.328 g, 1.72 mmol), 말로노니트릴 (0.114 g, 1.72 mmol) 및 트리 에틸 아민 (0.240 mL, 1.72 mmol)의 혼합물을 10 분 동안 교반한 후, 3 (1.72 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 22시간 후에 농축시키고 SiO₂ (DCM 중의 2 % MeOH)상에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 55 (80 mg, 0.194 mmol, 11 % 수율)를 주황색 고체로서 수득하였다. 1H NMR (400 MHz) DMSO : 7.61-7.59 (d, 2H), 7.30-7.23 (m, 5H), 6.92-6.91 (d, 1H), 6.78-6.77 (d, 1H), 5.41 (s, 1H), 3.74 (s, 3H); 13C-NMR (100MHz) DMSO : 159.3, 151.9, 145.4, 144.8, 133.0, 130.3, 128.8, 128.2, 126.6, 125.8, 120.2, 110.4, 95.2, 59.1, 34.5, 33.9. LC / MS-MS : 415.1 → 348.0 m / z; 30, DP = 81, CE = 31, CXP = 22, tR = 4.5 분에서 GS1 및 GS2.

[0245] 본 발명의 전술한 예들은 예시 및 설명의 목적으로 제공되었다. 또한, 이들 실시예는 본 발명을 본원에 개시된 형태로 제한하려는 것은 아니다. 결과적으로, 본 발명의 설명의 교시 및 관련 기술의 숙련도에 상응하는 변형 및 수정은 본 발명의 범위 내에 있다. 본 명세서에 제공된 실시예에 설명된 특정 실시예는 본 발명을 실시하기 위해 알려진 최선의 모드를 더 설명하고 당업자가 그러한 또는 다른 실시예에서 및 특정 애플리케이션에 의해 요구되는 다양한 변형 예에서 본 발명을 이용할 수 있게 하려는 것이다. 또는 용도에 관한 것이다. 첨부된 청구

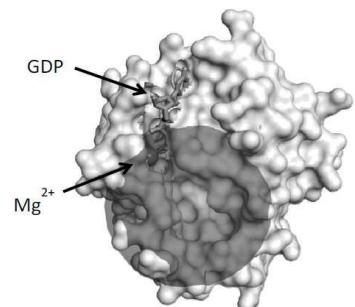
범위는 종래 기술에 의해 허용되는 범위 내에서 대안적인 실시예를 포함하는 것으로 해석되어야한다.

도면

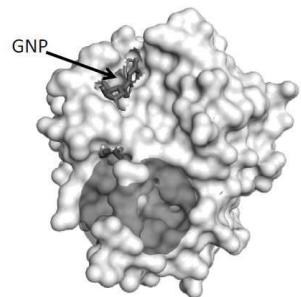
도면1a



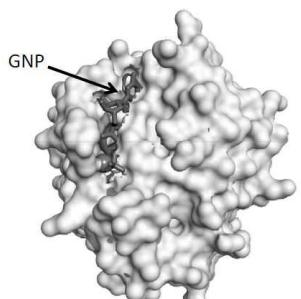
도면1b



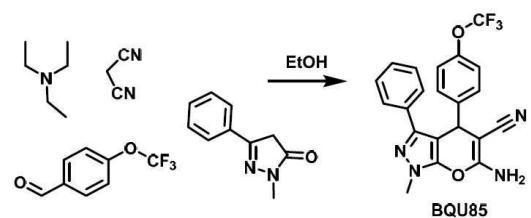
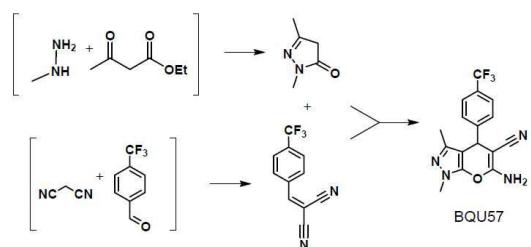
도면1c



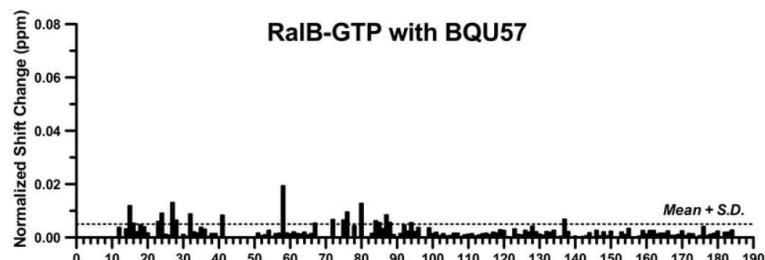
도면1d



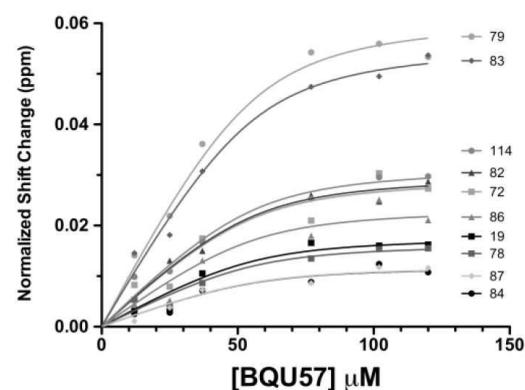
도면2a



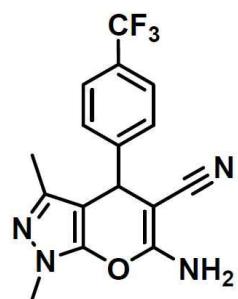
도면2b



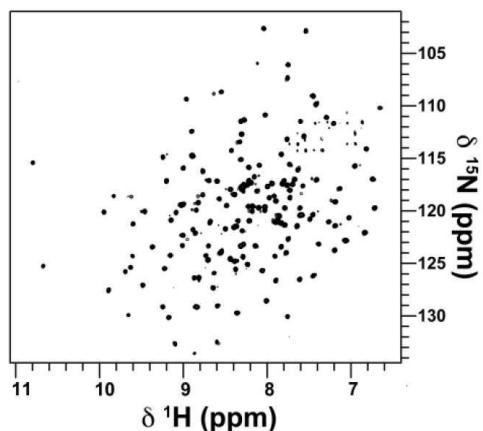
도면2c



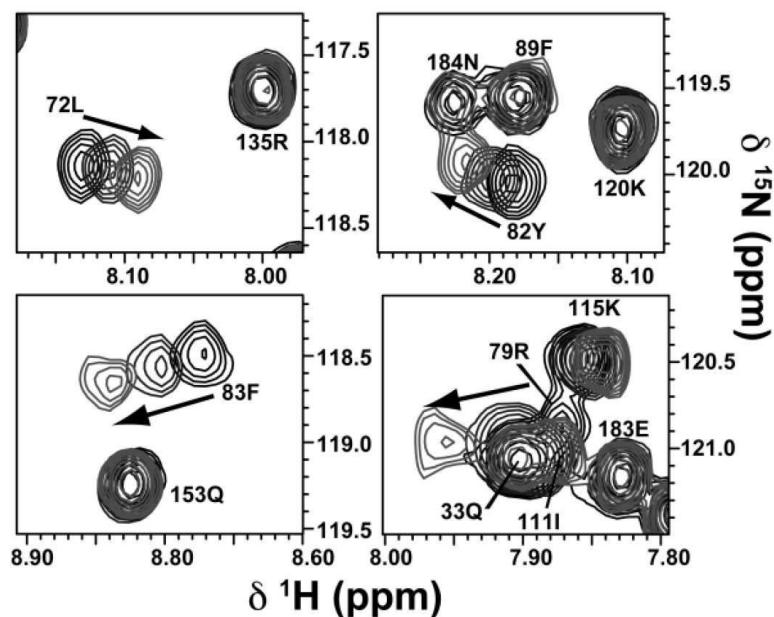
도면3a



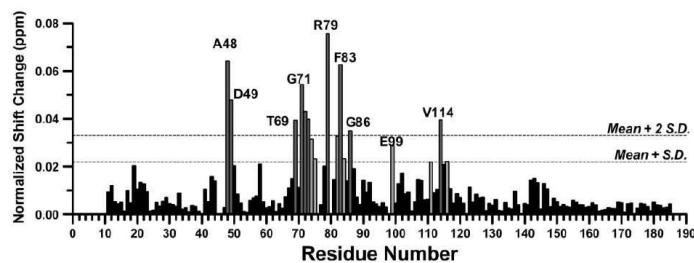
도면3b



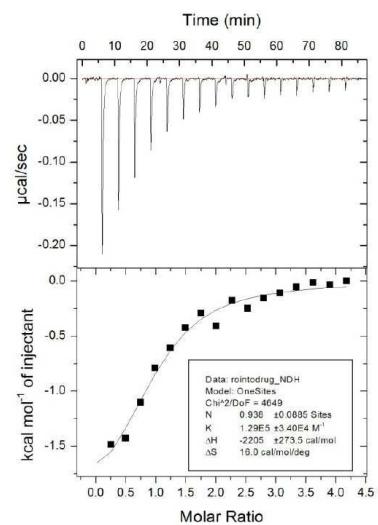
도면3c



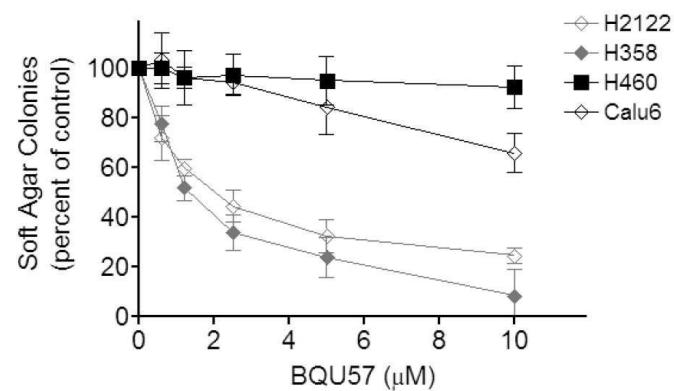
도면3d



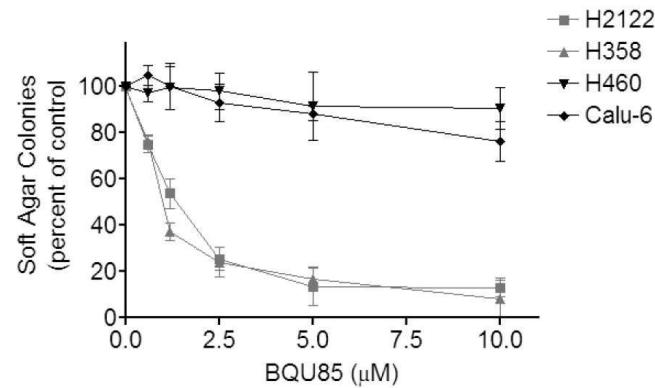
도면3e



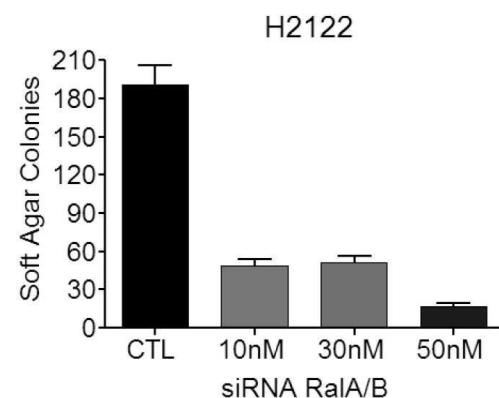
도면4a



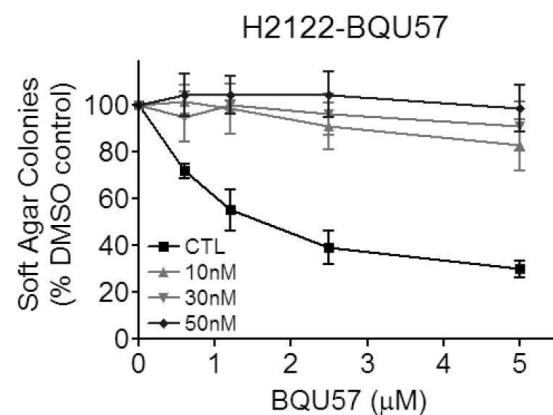
도면4b



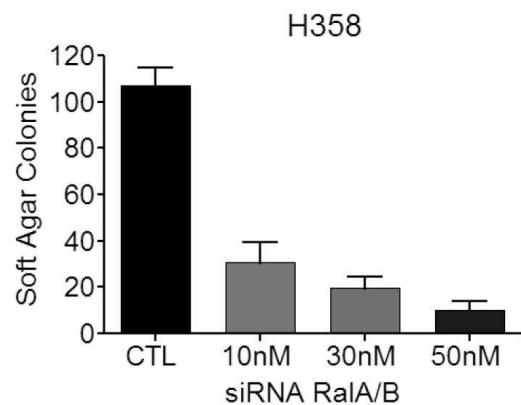
도면4c



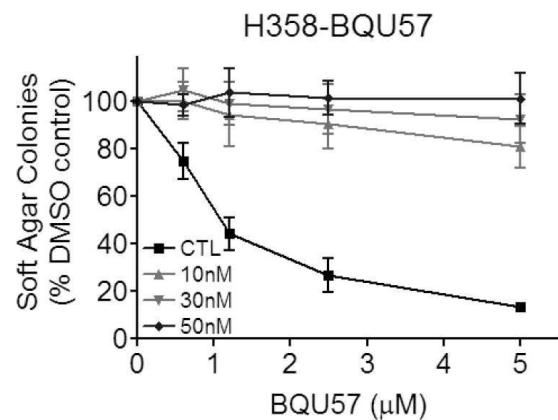
도면4d



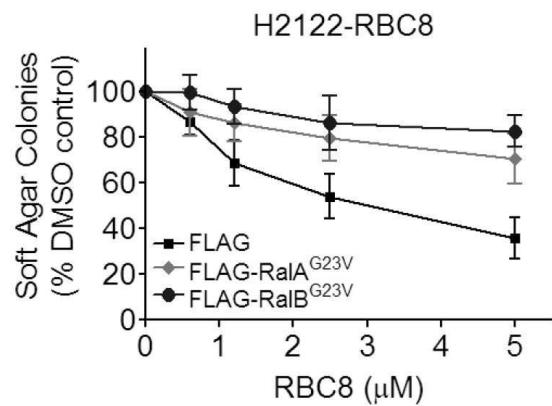
도면4e



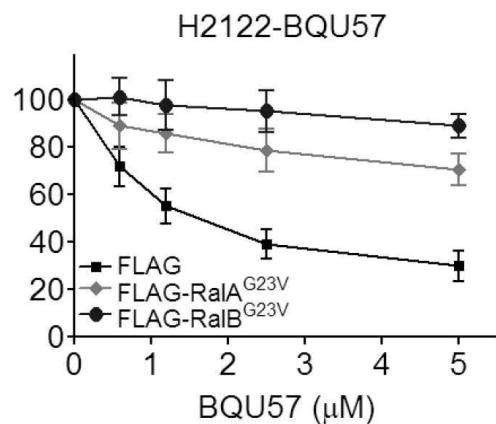
도면4f



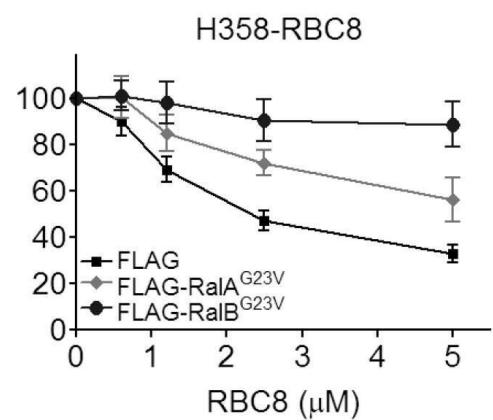
도면4g



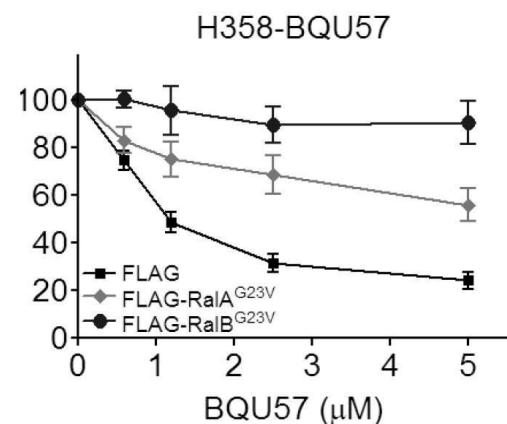
도면4h



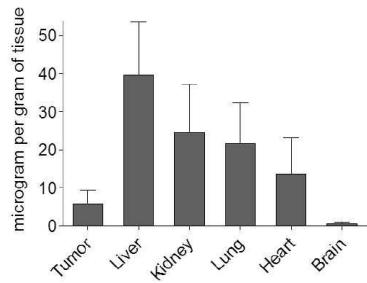
도면4i



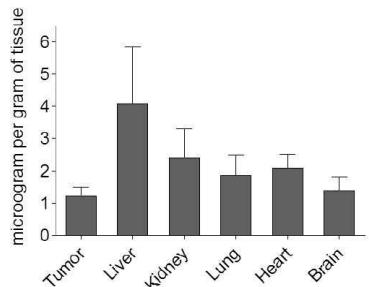
도면4j



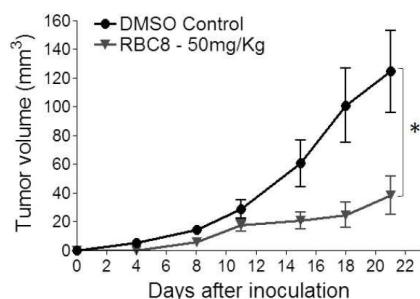
도면5a



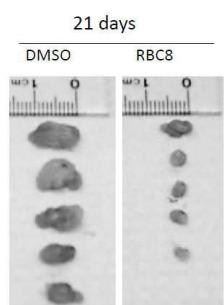
도면5b



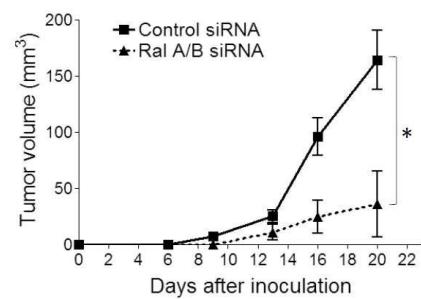
도면5c



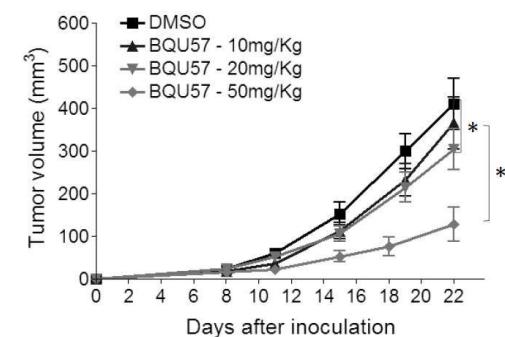
도면5d



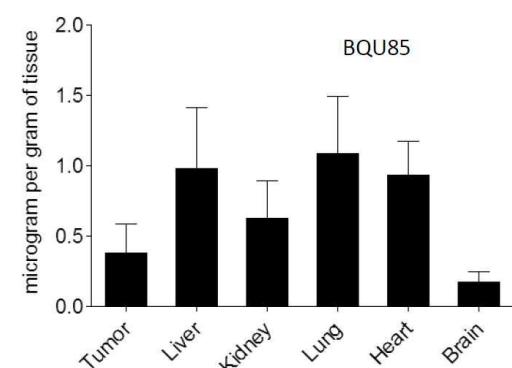
도면5e



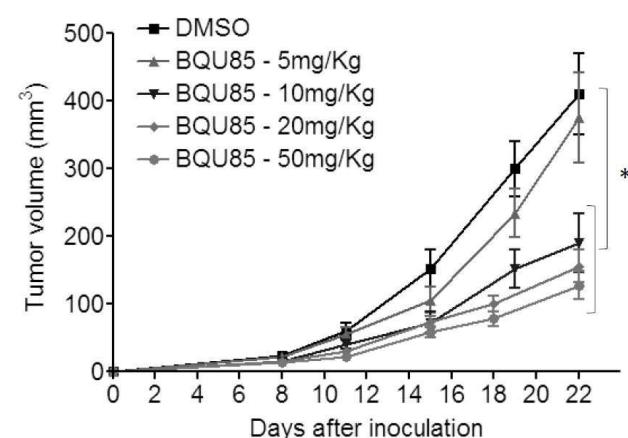
도면5f



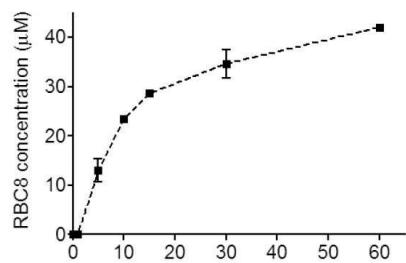
도면5g



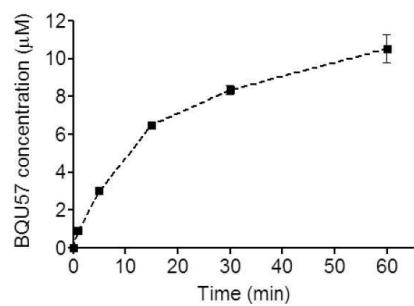
도면5h



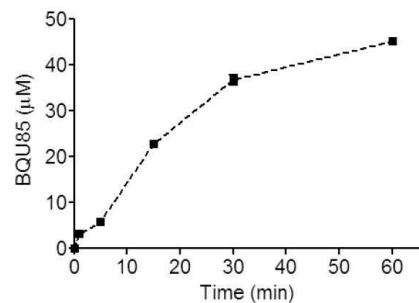
도면6a



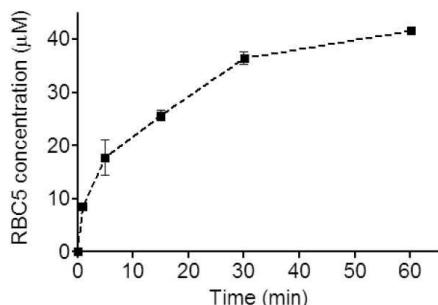
도면6b



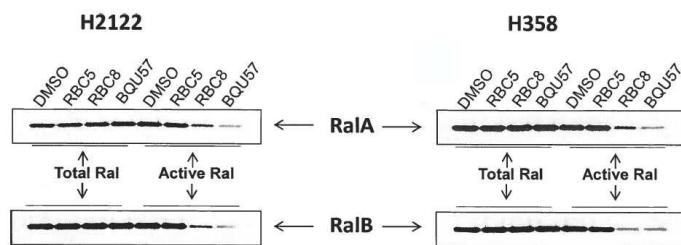
도면6c



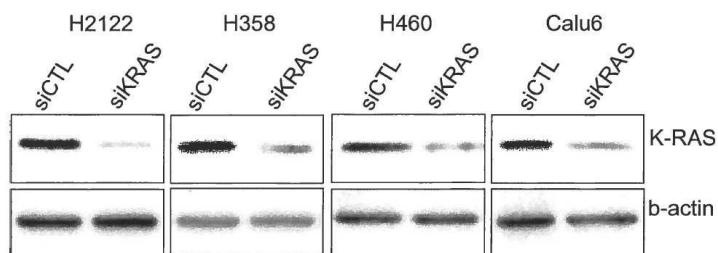
도면6d



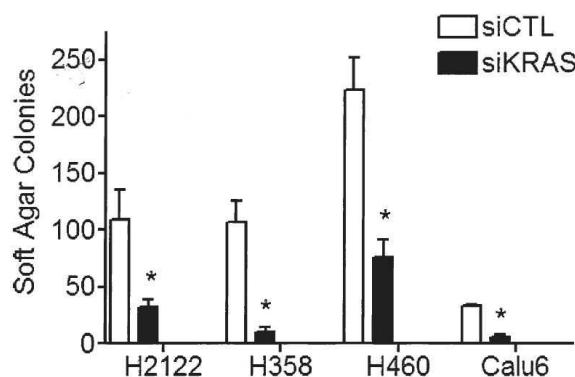
도면6e



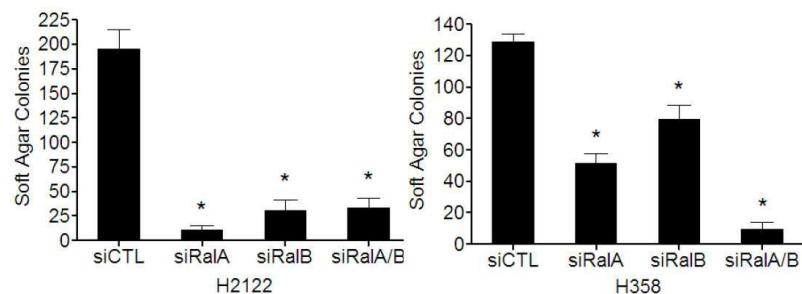
도면7a



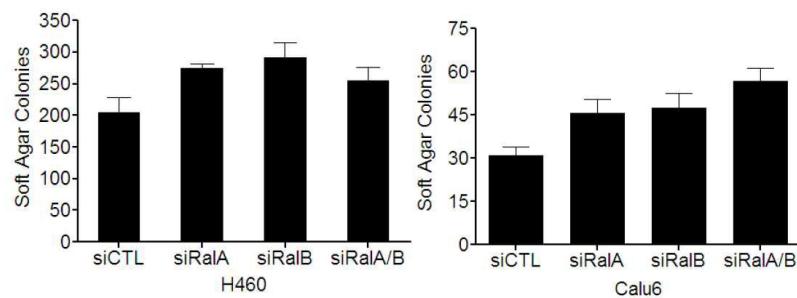
도면7b



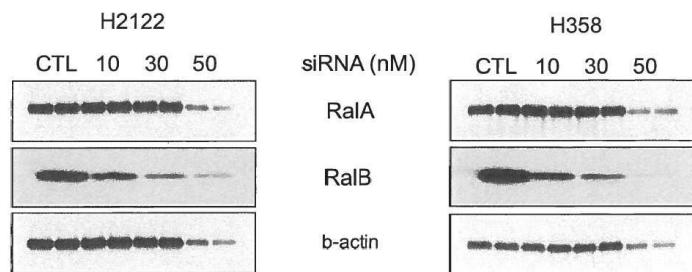
도면7c



도면7d



도면7e



도면7f

