



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0065092
(43) 공개일자 2024년05월14일

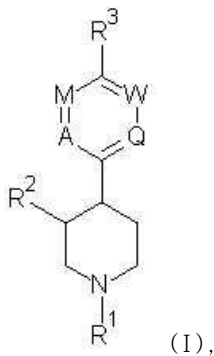
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) A61K 31/496 (2024.01)
A61K 31/497 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61P 37/00 (2006.01) C07D 498/04 (2006.01)
C07D 498/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2022.08)
A61K 31/496 (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7009335
(22) 출원일자(국제) 2022년09월22일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월20일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/076306
(87) 국제공개번호 WO 2023/046806
국제공개일자 2023년03월30일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2021/120406 2021년09월24일 중국(CN)
PCT/CN2022/089033 2022년04월25일 중국(CN)
- (71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
천 동동
중국 상하이 201203 차이룬 로드 레인 720 빌딩
넘버 5 로슈 알앤디 센터(차이나) 리미티드
- 데이 파비안
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호
프만-라 로슈 아게
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 자가면역 질환의 치료를 위한 피라졸로[3,4-b]피리딘 화합물

(57) 요약

본 발명은 화학식 (I)의 화합물로서,



R^1 내지 R^3 , A, M, W 및 Q는 본원에 기재된 바와 같은 화합물 및 이의 약제학적으로 허용되는 염, 그리고 상기 화합물을 포함하는 조성물 및 상기 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/497 (2013.01)

A61K 31/506 (2013.01)

A61K 31/553 (2013.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 37/00 (2018.01)

C07D 498/04 (2013.01)

C07D 498/10 (2013.01)

(72) 발명자

홍 신

중국 상하이 201203 차이룬 로드 레인 720 빌딩 넘
버 5 로슈 알앤디 센터(차이나) 리미티드

왕 샤오칭

중국 상하이 201203 차이룬 로드 레인 720 빌딩 넘
버 5 로슈 알앤디 센터(차이나) 리미티드

장 지셴

중국 상하이 201203 차이룬 로드 레인 720 빌딩 넘
버 5 로슈 알앤디 센터(차이나) 리미티드

주 웨이

중국 상하이 201203 차이룬 로드 레인 720 빌딩 넘
버 5 로슈 알앤디 센터(차이나) 리미티드

저우 거

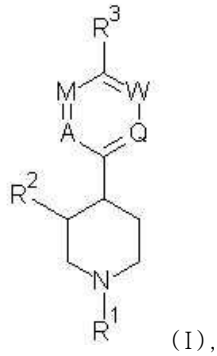
중국 상하이 201203 차이룬 로드 레인 720 빌딩 넘
버 5 로슈 알앤디 센터(차이나) 리미티드

명세서

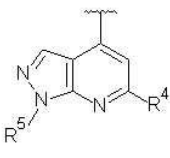
청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:



여기서

R^1 은  이고; 여기서 R^4 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

R^2 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

R^3 은 피페라지닐, (C_{1-6} 알콕시 C_{1-6} 알킬)피페라지닐, 3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-b][1,4]옥사지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피페리디닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리디닐, 아미노(C_{1-6} 알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

A는 N 또는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

M은 N 또는 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

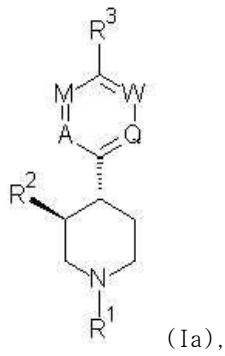
W는 N 또는 CH이고;

Q는 N 또는 CH이고;

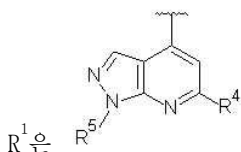
A, M, W 및 Q 중 두 개 이하가 동시에 N이라는 조건을 갖는다.

청구항 2

하기 화학식 (Ia)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:



여기서



R^2 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

R^3 은 피페라지닐, (C_{1-6} 알콕시 C_{1-6} 알킬)피페라지닐, 3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-b][1,4]옥사지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피페리디닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리디닐, 아미노(C_{1-6} 알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

A는 N 또는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

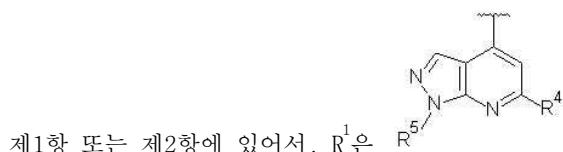
M은 N 또는 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

W는 N 또는 CH이고;

Q는 N 또는 CH이고;

A, M, W 및 Q 중 두 개 이하가 동시에 N이라는 조건을 갖는다.

청구항 3



청구항 4

제3항에 있어서, R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸인, 화합물.

청구항 5

제3항에 있어서, A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 C_{1-6} 알킬인, 화합물.

청구항 6

제5항에 있어서, A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 메틸인, 화합물.

청구항 7

제5항에 있어서, M은 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H인, 화합물.

청구항 8

제7항에 있어서, W는 CH인, 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, Q는 N인, 화합물.

청구항 10

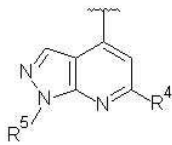
제9항에 있어서, R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리딘닐 또는 피페라지닐인, 화합물.

청구항 11

제10항에 있어서, R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제판-4-일, 3-아미노-4-메톡시-피롤리딘-1-일 또는 피페라진-1-일인, 화합물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,



R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

R^2 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리딘닐 또는 피페라지닐이고;

A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

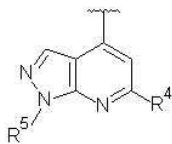
M은 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H이고;

W는 CH이고;

Q는 N인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 13

제13항에 있어서,



R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸이고;

R^2 는 H 또는 메틸이고;

R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제판-4-일, 3-아미노-4-메톡시-피롤리딘-1-일 또는 피페라진-1-일이고;

A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 메틸이고;

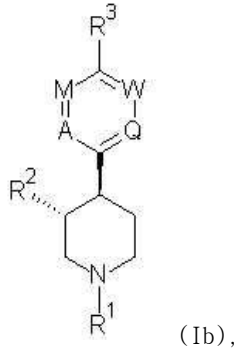
M은 CR⁷이고; 여기서 R⁷은 H이고;

W는 CH이고;

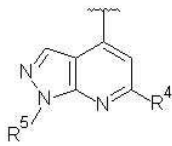
Q는 N인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 14

하기 화학식 (Ib)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:



여기서



R¹은 R⁵이고; 여기서 R⁴는 C₁₋₆알킬이고; R⁵는 C₁₋₆알킬이고;

R²는 C₁₋₆알킬이고;

R³은 피페라지닐, (C₁₋₆알콕시C₁₋₆알킬)피페라지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C₁₋₆알콕시)피페리디닐, 아미노(C₁₋₆알콕시)피롤리디닐, 아미노(C₁₋₆알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

A는 CH이고;

M은 CH이고;

W는 CH이고;

Q는 N이다.

청구항 15

제14항에 있어서, R⁴는 메틸이고; R⁵는 메틸이고; R²는 메틸인, 화합물.

청구항 16

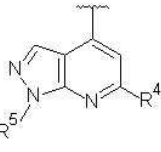
제14항 또는 제15항에 있어서, R³은 아미노-1,4-옥사제파닐인, 화합물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, R³은 6-아미노-1,4-옥사제판-4-일인, 화합물.

청구항 18

제14항에 있어서,



R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

R^2 는 C_{1-6} 알킬이고;

R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐이고;

A는 CH이고;

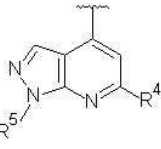
M은 CH이고;

W는 CH이고;

Q는 N인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 19

제18항에 있어서,



R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸이고;

R^2 는 메틸이고;

R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제판-4-일이고;

A는 CH이고;

M은 CH이고;

W는 CH이고;

Q는 N인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 20

다음으로부터 선택된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

1,6-디메틸-4-[4-(4-피페라진-1-일페닐)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일피리미딘-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1-메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1-메틸-4-[4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(2-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-2-피페라진-1-일-피리미딘-5-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

4-[4-(3-에틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;

4-[4-(3-메톡시-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;

(3S,4R)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민;

4-[4-[5-[(3R)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-3-메틸-2-피리딜]-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;

(3S,4S)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-메톡시-피페리딘-4-아민;

1-메틸-4-[시스-3-메틸-4-(6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1-메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

(3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-4-메톡시-피롤리딘-3-아민;

2-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난;

(6S)-4-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-1,4-옥사제판-6-아민;

4-[(3S,4R)-4-[5-[(3R)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-3-메틸-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;

4-[(3S,4R)-4-[5-(4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-7-일)-3-메틸-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;

(3R,4R)-1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민;

1-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-메틸-아제티딘-3-아민;

(4aR,7aR)-6-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-b][1,4]옥사진;

1,6-디메틸-4-[(3R,4S)-3-메틸-4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

1,6-디메틸-4-[(3S,4R)-3-메틸-4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

(3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-4-메톡시-피롤리딘-3-아민;

4-[(3R,4S)-4-[5-[(3R)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;

2-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-5-옥사-2,8-디아자

스피로[3.5]노난;

(3*S*,4*S*)-1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-메톡시-피페리딘-4-아민;

(6*S*)-4-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-1,4-옥사제판-6-아민;

(3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민;

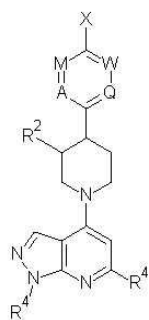
4-[(3*R*,4*S*)-4-[5-(4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-7-일)-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘; 및

1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-메틸-아제티딘-3-아민.

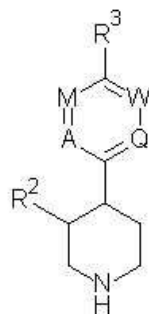
청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 제조하는 공정으로서,

a) 촉매 및 염기의 존재하에, 화학식 (IV)의 화합물,

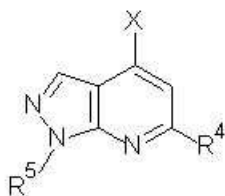


(IV) 및 R³-H 사이의 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성 반응;



b) 촉매 및 염기의 존재하에, 화학식 (VI)의 화합물,

(VI) 및 화학식 (II)의 화합물,



(II) 사이의 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성 반응;

c) 염기의 존재하에, 화학식 (VI)의 화합물 및 화학식 (II)의 화합물 사이의 직접 치환 반응 단계를 포함하고,

여기서

X는 할로젠이고;

단계 a) 및 b)에서, 촉매는 RuPhos Pd G2 또는 Pd₂(dba)₃/XantPhos이고; 염기는 Cs₂CO₃ 또는 *t*-BuONa이고;

단계 c)에서, 염기는 DIPEA 또는 CsF이고;

여기서 R^1 내지 R^5 , A, M, W 및 Q는 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 22

치료적으로 활성인 물질로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물 및 치료적으로 불활성인 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

전신 홍반성 루푸스 또는 루푸스 신염의 치료 또는 예방을 위한, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 25

전신 홍반성 루푸스 또는 루푸스 신염의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 26

TLR7 및 TLR8 및 TLR9 길항제에 대한 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 27

전신 홍반성 루푸스 또는 루푸스 신염의 치료 또는 예방을 위한, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 28

제21항의 공정에 따라 제조되는, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 29

전신 홍반성 루푸스 또는 루푸스 신염을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30

진술한 바와 같은 발명.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포유동물의 치료 및/또는 예방에 유용한 유기 화합물, 특히 전신 홍반성 루푸스 또는 루푸스 신염 치료에 유용한 TLR7 및 TLR8 및 TLR9의 길항제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 발명의 분야

[0003] 자가면역 결합조직 질환(CTD)에는 전신 홍반성 루푸스(SLE), 원발성 쇼그렌 증후군(pSjS), 혼합 결합조직 질환(MCTD), 피부 근염/다발성 근염(DM/PM), 류마티스 관절염(RA) 및 전신 경화증(SSc)과 같은 원형 자가면역 증후군이 포함된다. 류마티스 관절염(RA)을 제외하고는, 환자에게 실제로 효과적이고 안전한 치료법이 아직 제공되

지 못하고 있다. 전신 홍반성 루푸스(SLE)는 100,000명당 20 내지 150명의 유병률을 가진 원형 자가면역 결합조직 질환(CTD)을 나타내며, 피부 및 관절에서 일반적으로 관찰되는 증상에서부터 신장, 폐 또는 심부전에 이르기까지 별개의 기관에서 광범위한 염증 및 조직 손상을 일으킨다. 전통적으로, 전신 홍반성 루푸스(SLE)는 비특이적 항염증제 또는 면역 억제제로 치료되었다. 그러나, 면역 억제제, 예컨대 코르티코스테로이드제의 장기 사용은 부분적으로만 효과적이며 바람직하지 않은 독성 및 부작용과 관련이 있다. 벨리무맵은 전신 홍반성 루푸스(SLE) 환자의 일부에서만 보통 및 지연된 효능을 보임에도 불구하고 지난 50년간 루푸스에 대해 FDA 승인을 받은 유일한 약물이다 (Navarra, S. V. *et al Lancet* **2011**, 377, 721.). 기타 생물학적 제제, 예컨대 항-CD20 mAb, 특정 사이토카인에 대한 mAb 또는 특정 사이토카인의 가용성 수용체는 대부분의 임상 연구에서 실패했다. 따라서, 더 많은 비율의 환자 집단에서 지속적인 개선을 제공하고 많은 자가면역뿐만 아니라 자가염증 질환에 장기간 지속적으로 사용하기에 더 안전한 신규 치료법이 요구된다.

[0004]

톨 유사 수용체(Toll like receptor, TLR)는 다양한 면역 세포에서 광범위한 면역 반응을 개시할 수 있는 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR)의 중요한 패밀리아다. 천연 숙주 방어 센서로서, 엔도솜 TLR 7, 8 및 9는 바이러스, 박테리아로부터 유래된 핵산을 인식하고, 구체적으로 TLR7/8 및 TLR9는 각각 단일 가닥 RNA(ssRNA) 및 단일 가닥 CpGDNA를 인식한다. 그러나, TLR7, 8, 9의 비정상적인 핵산 감지는 광범위한 자가면역 및 자가염증성 질환의 핵심 교점으로 간주된다 (Krieg, A. M. *et al. Immunol. Rev.* **2007**, 220, 251. Jimenez-Dalmaroni, M. J. *et al Autoimmun Rev.* **2016**, 15, 1. Chen, J. Q., *et al. Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **2016**, 50, 1.). 항-RNA 및 항-DNA 항체는 SLE의 잘 확립된 진단 마커이며, 이러한 항체는 자기-RNA 및 자기-DNA 모두를 엔도솜에 전달할 수 있다. 자기-RNA 복합체는 TLR7 및 TLR8에 의해 인식될 수 있는 반면, 자기-DNA 복합체는 TLR9 활성화를 촉발할 수 있다. 실제로, 혈액 및/또는 조직으로부터 자기-RNA 및 자기-DNA의 제거 결함이 SLE(전신 홍반성 루푸스) 환자에서 분명하다. TLR7 및 TLR9는 SLE 조직에서 상향조절될 것으로 보고되었으며, 각각 루푸스 신염의 만성 및 활성과 상관관계가 있다. SLE 환자의 B 세포에서, TLR7 발현은 항-RNP 항체 생성과 상관관계가 있는 반면, TLR9 발현은 IL-6 및 항-dsDNA 항체 수준과 상관관계가 있다. 일관되게도, 루푸스 마우스 모델에서, TLR7은 항-RNA 항체에 필요하고, TLR9는 항-뉴클레오솜 항체에 필요하다. 반면, 마우스에서 TLR7 또는 인간 TLR8의 과발현은 자가면역 및 자가염증을 촉진한다. 또한, TLR8의 활성화는 구체적으로 mDC/대식세포의 염증성 사이토카인 분비, 호중구 네토시스(NETosis), Th17 세포의 유도 및 Treg 세포의 억제에 기여한다. B 세포의 자가항체 생성을 촉진하는 TLR9의 전술된 역할 외에도, pDC에서 자기-DNA에 의한 TLR9의 활성화는 또한 I 형 IFN 및 기타 염증성 사이토카인의 유도를 유발한다. 자가면역 질환의 발병기전, 및 많은 자가면역 질환 환자에서 TLR9를 쉽게 활성화할 수 있는 자기-DNA 복합체의 광범위한 존재에 대한 주요 기여인자로서, pDC 및 B 세포 모두에서의 TLR9의 이러한 역할을 감안할 때, TLR7 및 TLR8 경로의 억제 외에도 자기-DNA 매개 TLR9 경로를 추가로 차단하는 것이 추가 이점이 있을 수 있다. 종합하면, TLR7, 8 및 9 경로는 효과적인 무스테로이드 비세포독성 경구 약물이 존재하지 않는 자가면역 및 자가염증성 질환의 치료를 위한 새로운 치료 표적을 제시하며, 이러한 모든 경로를 바로 업스트림으로부터 억제하는 것이 만족스러운 치료 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 자가면역 및 자가염증성 질환의 치료를 위해 TLR7, TLR8 및 TLR9를 표적으로 하고 억제하는 경구 화합물을 발명했다.

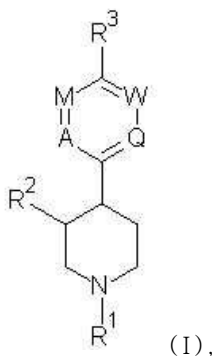
발명의 내용

[0005]

발명의 요약

[0006]

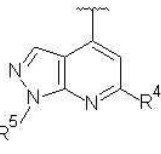
본 발명은 화학식 (I)의 신규 화합물로서,



[0007]

여기서

[0008]



[0009] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0010] R^2 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0011] R^3 은 피페라지닐, (C_{1-6} 알콕시 C_{1-6} 알킬)피페라지닐, 3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-b][1,4]옥사지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피페리디닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리디닐, 아미노(C_{1-6} 알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

[0012] A는 N 또는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

[0013] M은 N 또는 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0014] W는 N 또는 CH이고;

[0015] Q는 N 또는 CH이고;

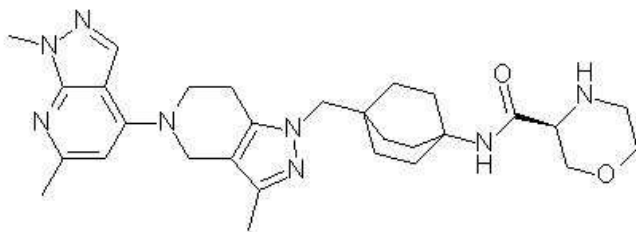
[0016] A, M, W 및 Q 중 두 개 이하가 동시에 N이라는 조건을 갖는, 화합물

[0017] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 (I) 또는 (Ia)의 신규 화합물, 이의 제조, 본 발명에 따른 화합물에 기초한 약제 및 이의 제조뿐만 아니라 TLR7 및 TLR8 및 TLR9 길항제로서, 그리고 전신 홍반성 루푸스 또는 루푸스 신염의 치료 또는 예방을 위한 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물의 용도에 관한 것이다. 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물은 우수한 TLR7 및 TLR8 및 TLR9 길항 활성을 나타낸다. 또한, 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물은 또한 우수한 세포독성, 광독성, 용해도, hPBMC, 인간 마이크로솜 안정성 및 SDPK 프로파일, 그뿐만 아니라 CYP 억제를 나타낸다.

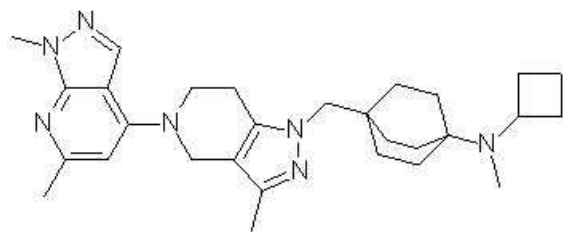
[0019] 노바티스 특허 W02018047081이 본 발명의 화합물과 동일한 피라졸로[3,4-b]피리디닐 모이어티를 갖는 화합물을 개시했지만, 노바티스 특허에 개시된 정보에 기초하여 4,5,6,7-테트라히드로-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘의 중심 비시클릭 코어 및 비시클로[2,2,2]옥탄/비시클로[1,1,1]펜탄 모이어티로의 말단 치환이 TLR7/8/9 활성화에 필수적이었고, 이는 또한 본 발명의 화합물과 비교하여 주요 구조적 차별화로 간주되었다. 반면에, W02018047081의 화합물 대부분은 미흡한 TLR9 활성을 나타냈다. 불행하게도 최고의 TLR9 활성을 갖는 N79(실시예 79)와 같이 TLR9 활성이 상대적으로 개선된 소수의 화합물은 여전히 인간 간 마이크로솜 안정성이 미흡하므로 (표 5 참조) 만족스럽지 못한 PK 프로파일을 갖는다.

[0020] 또 다른 노바티스 특허 W02019220390은 화합물 N8의 다형체(W02018047081의 실시예 8)를 개시했고, 이는 이 시리즈의 주요 화합물로 간주되었고 훨씬 더 낮은 TLR9 활성 및 유사한 미흡한 인간 간 마이크로솜 안정성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (표 5 참조).



[0021]

[0022] **화합물 N8** (hPBM TLR7/8/9 길항제 IFN α 분석 IC₅₀ (μ M): 0.004/0.166/4.28)



[0023]

[0024] **화합물 N79** (hPBM TLR7/8/9 길항제 IFN α 분석 IC₅₀ (μ M): 0.004/0.136/0.064)

[0025] **발명의 상세한 설명**

[0026] **정의**

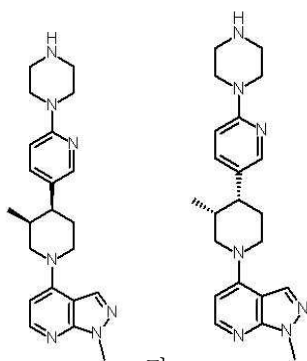
[0027] 용어 "C₁₋₆알킬"은 1 내지 6 개, 특히 1 내지 4 개의 탄소 원자를 포함하는 포화 직쇄 또는 분지쇄 알킬기, 예를 들어 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸 등을 나타낸다. 특정 "C₁₋₆알킬" 기는 메틸, 에틸 및 *n*-프로필이다.

[0028] 용어 "C₁₋₆알콕시"는 C₁₋₆알킬-O-를 나타낸다.

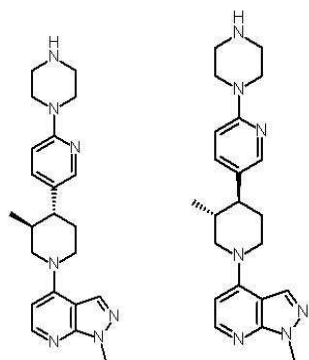
[0029] 용어 "할로젠" 및 "할로"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며 플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도를 나타낸다.

[0030] 용어 "할로피페리디닐"은 피페리디닐 기의 수소 원자 중 적어도 하나가 동일하거나 상이한 할로젠 원자, 특히 플루오로 원자로 대체된 피페리디닐 기를 나타낸다. 할로피페리디닐의 예는 플루오로피페리디닐 및 디플루오로피페리디닐을 포함한다.

[0031] 용어 "시스" 및 "트랜스"는 분자 또는 모이어티의 상대적 입체화학을 나타낸다. 예를 들어:



[0032] 시스-이성질체로서 실시예 18은 및 의 혼합물을 지칭하고; 유사하게, 트랜스-이성질체



로서 실시예 19는 및 의 혼합물을 지칭한다.

[0033] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 염을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 염은 산 및 염기 부가염 모두를 포함한다.

[0034] 용어 "약제학적으로 허용되는 산 부가염"은 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 탄산, 인산 및 유기산, 예컨대 포름산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말레산, 말론산, 석신산, 푸마르산, 타타르산, 시트르산, 아스파르트산, 아스코르브산, 글루탐산, 안트라닐산, 벤조산, 신남산, 만델산, 엠본산, 페닐아세트산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, *p*-톨루엔설폰산, 및 살리실산의 지방족, 지환족, 방향족, 방향지방족, 복소환, 카복실 및 설펜 부류로부터 선택된 유기산으로 형성된 약제학적으로 허용되는 염을 나타낸다.

[0035] 용어 "약제학적으로 허용되는 염기 부가염"은 유기 또는 무기 염기로 형성된 약제학적으로 허용되는 염을 나타낸다. 허용되는 무기 염기의 예는 소듐, 포타슘, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간 및 알루미늄 염을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 유기 비독성 염기에서 유도된 염은, 자연적으로 발생하는 치환된 아민, 환형 아민, 및 염기성 이온 교환 수지, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-디에틸아미노에탄올, 트리메타민, 디시클로헥실아민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브롬, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, *N*-에틸피페리딘, 및 폴리아민 수지를 포함하는, 1차, 2차, 및 3차 아민, 치환된 아민의 염을 포함한다.

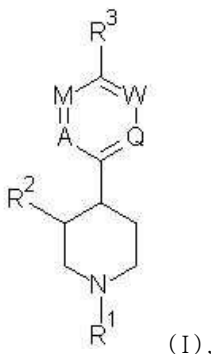
[0036] 용어 "약제학적 활성 대사산물"은 특정 화합물 또는 이의 염의 체내 대사를 통해 생성된 약리학적 활성 생성물을 나타낸다. 체내에 들어간 후 대부분의 약물은 이의 물리적 특성과 생물학적 효과를 변화시킬 수 있는 화학 반응을 위한 기질이 된다. 일반적으로 본 발명의 화합물의 극성에 영향을 미치는 이러한 대사 전환은 약물이 체내에 분포하고 체내로부터 배설되는 방식을 변경한다. 그러나, 일부 경우에, 치료 효과를 위해 약물의 대사가 필요하다.

[0037] 용어 "치료적 유효량"은 대상에게 투여될 때, 본원에 기재된 (i) 특정 질환, 병태 또는 장애를 치료하거나 예방하거나, (ii) 특정 질환, 병태, 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화, 개선 또는 제거하거나, (iii) 특정 질환, 병태 또는 장애의 하나 이상의 증상의 발병을 예방하거나 지연시키는 본 발명의 화합물 또는 분자의 양을 나타낸다. 치료적 유효량은 화합물, 치료되는 질환 상태, 치료되는 질환의 중증도, 대상의 연령 및 상대적 건강, 투여 경로 및 형태, 담당 의사 또는 수의사의 판단 및 기타 요인에 따라 달라질 것이다.

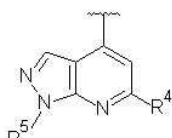
[0038] 용어 "약제학적 조성물"은 이를 필요로 하는 포유동물, 예를 들어 인간에게 투여될 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 치료적 유효량의 활성 약제학적 성분을 포함하는 혼합물 또는 용액을 나타낸다.

[0039] TLR7 및 TLR8 및 TLR9의 길항제

[0040] 본 발명은 (i) 화학식 (I)의 화합물로서,



[0042] 여기서



[0043] R¹은 R⁵이고; 여기서 R⁴는 H 또는 C₁₋₆알킬이고; R⁵는 C₁₋₆알킬이고;

[0044] R²는 H 또는 C₁₋₆알킬이고;

[0045] R^3 은 피페라지닐, (C_{1-6} 알콕시 C_{1-6} 알킬)피페라지닐, 3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-b][1,4]옥사지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피페리디닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리디닐, 아미노(C_{1-6} 알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

[0046] A는 N 또는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

[0047] M은 N 또는 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

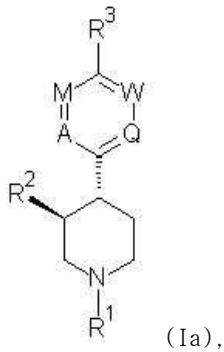
[0048] W는 N 또는 CH이고;

[0049] Q는 N 또는 CH이고;

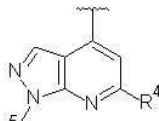
[0050] A, M, W 및 Q 중 두 개 이하가 동시에 N이라는 조건을 갖는, 화합물

[0051] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

[0052] 본 발명의 또 다른 구현에는 (ii) 화학식 (Ia)의 화합물로서,



[0053] 여기서



[0055] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0056] R^2 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0057] R^3 은 피페라지닐, (C_{1-6} 알콕시 C_{1-6} 알킬)피페라지닐, 3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-b][1,4]옥사지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피페리디닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리디닐, 아미노(C_{1-6} 알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

[0058] A는 N 또는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

[0059] M은 N 또는 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

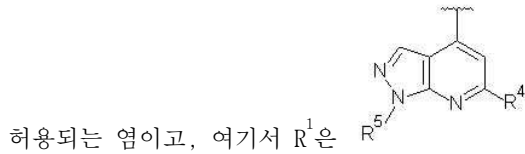
[0060] W는 N 또는 CH이고;

[0061] Q는 N 또는 CH이고;

[0062] A, M, W 및 Q 중 두 개 이하가 동시에 N이라는 조건을 갖는, 화합물

[0063] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0064] 본 발명의 추가 구현에는 (iii) (i) 또는 (ii)에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로



허용되는 염이고, 여기서 R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이다.

[0065] 본 발명의 추가 구현에는 (iv) (i) 내지 (iii) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸이다.

[0066] 본 발명의 추가 구현에는 (v) (i) 내지 (iv) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물이고, 여기서 A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이다.

[0067] 본 발명의 추가 구현에는 (vi) (i) 내지 (v) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 메틸이다.

[0068] 본 발명의 추가 구현에는 (vii) (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 M은 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H이다.

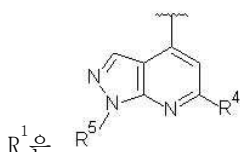
[0069] 본 발명의 추가 구현에는 (viii) (i) 내지 (vii) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 W는 CH이다.

[0070] 본 발명의 추가 구현에는 (ix) (i) 내지 (viii) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 Q는 N이다.

[0071] 본 발명의 추가 구현에는 (x) (i) 내지 (ix) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리딘닐 또는 피페라지닐이다.

[0072] 본 발명의 추가 구현에는 (xi) (i) 내지 (x) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제파-4-일, 3-아미노-4-메톡시-피롤리딘-1-일 또는 피페라진-1-일이다.

[0073] 본 발명의 추가 구현에는 (xii) (i) 내지 (xi) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물로서,



[0074] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0075] R^2 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

[0076] R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리딘닐 또는 피페라지닐이고;

[0077] A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

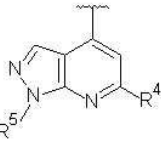
[0078] M은 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H이고;

[0079] W는 CH이고;

[0080] Q는 N인, 화합물

[0081] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0082] 본 발명의 추가 구현에는 (xiii) (i) 내지 (xii) 중 어느 하나에 따른 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물로서,



[0083] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸이고;

[0084] R^2 는 H 또는 메틸이고;

[0085] R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제판-4-일, 3-아미노-4-메톡시-피롤리딘-1-일 또는 피페라진-1-일이고;

[0086] A는 CR^6 이고; 여기서 R^6 은 H 또는 메틸이고;

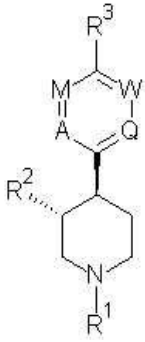
[0087] M은 CR^7 이고; 여기서 R^7 은 H이고;

[0088] W는 CH이고;

[0089] Q는 N인, 화합물

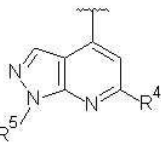
[0090] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0091] 본 발명의 또 다른 구현에는 (xiv) 화학식 (Ib)의 화합물로서,



[0092] (Ib),

[0093] 여기서



[0094] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0095] R^2 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0096] R^3 은 피페라지닐, (C_{1-6} 알콕시 C_{1-6} 알킬)피페라지닐, 4,7-디아자스피로[2.5]옥타닐, 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노나닐, 아미노-1,4-옥사제판닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피페리디닐, 아미노(C_{1-6} 알콕시)피롤리디닐, 아미노(C_{1-6} 알킬)아제티디닐 또는 아미노할로피페리디닐이고;

[0097] A는 CH이고;

[0098] M은 CH이고;

[0099] W는 CH이고;

[0100] Q는 N인, 화합물

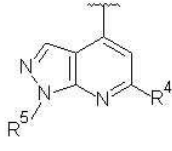
[0101] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0102] 본 발명의 추가 구현에는 (xv) (xiv)에 따른 화학식 (Ib)의 화합물이고, 여기서 R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸이고; R^2 는 메틸이다.

[0103] 본 발명의 추가 구현에는 (xvi) (xiv) 또는 (xv)에 따른 화학식 (Ib)의 화합물이고, 여기서 R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐이다.

[0104] 본 발명의 추가 구현에는 (xvii) (xiv) 내지 (xvi) 중 어느 하나에 따른 화학식 (Ib)의 화합물이고, 여기서 R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제파닐-4-일이다.

[0105] 본 발명의 추가 구현에는 (xviii) (xiv) 내지 (xvii) 중 어느 하나에 따른 화학식 (Ib)의 화합물로서,



[0106] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 C_{1-6} 알킬이고; R^5 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0107] R^2 는 C_{1-6} 알킬이고;

[0108] R^3 은 아미노-1,4-옥사제파닐이고;

[0109] A는 CH이고;

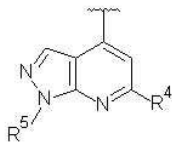
[0110] M은 CH이고;

[0111] W는 CH이고;

[0112] Q는 N인, 화합물

[0113] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0114] 본 발명의 추가 구현에는 (xix) (xiv) 내지 (xviii) 중 어느 하나에 따른 화학식 (Ib)의 화합물로서,



[0115] R^1 은 R^5 이고; 여기서 R^4 는 메틸이고; R^5 는 메틸이고;

[0116] R^2 는 메틸이고;

[0117] R^3 은 6-아미노-1,4-옥사제파닐-4-일이고;

[0118] A는 CH이고;

[0119] M은 CH이고;

[0120] W는 CH이고;

[0121] Q는 N인, 화합물

[0122] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0123] 본 발명의 또 다른 구현에는 다음으로부터 선택된 화학식 (I) 또는 (Ia) 또는 (Ib)의 화합물이다:

[0124] 1,6-디메틸-4-[4-(4-피페라진-1-일페닐)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

[0125] 1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

[0126] 1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

[0127] 1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일피리미딘-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

[0128] 1-메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

[0129] 1-메틸-4-[4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

- [0130] 1,6-디메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0131] 1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0132] 1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0133] 1,6-디메틸-4-[4-(2-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0134] 1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-2-피페라진-1-일-피리미딘-5-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0135] 1,6-디메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0136] 4-[4-(3-에틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0137] 4-[4-(3-메톡시-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0138] (3*S*,4*R*)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민;
- [0139] 4-[4-[5-[(3*R*)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-3-메틸-2-피리딜]-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0140] (3*S*,4*S*)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-메톡시-피페리딘-4-아민;
- [0141] 1-메틸-4-[*시스*-3-메틸-4-(6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0142] 1-메틸-4-[*트랜스*-3-메틸-4-(6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0143] 1,6-디메틸-4-[*시스*-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0144] 1,6-디메틸-4-[*트랜스*-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0145] 1,6-디메틸-4-[*시스*-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0146] 1,6-디메틸-4-[*트랜스*-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0147] 1,6-디메틸-4-[*시스*-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0148] 1,6-디메틸-4-[*트랜스*-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0149] (3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-4-메톡시-피롤리딘-3-아민;
- [0150] 2-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난;
- [0151] (6*S*)-4-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-1,4-옥사제판-6-아민;
- [0152] 4-[(3*S*,4*R*)-4-[5-[(3*R*)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-3-메틸-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0153] 4-[(3*S*,4*R*)-4-[5-(4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-7-일)-3-메틸-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0154] (3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민;
- [0155] 1-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-메틸-아제티딘-3-아민;
- [0156] (4*aR*,7*aR*)-6-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3,4,4*a*,5,7,7*a*-헥사히드로-2*H*-피롤로[3,4-b][1,4]옥사진;
- [0157] 1,6-디메틸-4-[(3*R*,4*S*)-3-메틸-4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;

- [0158] 1,6-디메틸-4-[(3S,4R)-3-메틸-4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0159] (3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-4-메톡시-피롤리딘-3-아민;
- [0160] 4-[(3R,4S)-4-[5-[(3R)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘;
- [0161] 2-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난;
- [0162] (3S,4S)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-메톡시-피페리딘-4-아민;
- [0163] (6S)-4-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-1,4-옥사제판-6-아민;
- [0164] (3R,4R)-1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민;
- [0165] 4-[(3R,4S)-4-[5-(4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-7-일)-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘; 및
- [0166] 1-[6-[(3R,4S)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-메틸-아세티딘-3-아민;
- [0167] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.
- [0168] **약제학적 조성물 및 투여**
- [0169] 또 다른 구현예는 본 발명의 화합물 및 치료적으로 불활성인 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물 또는 약제, 그뿐만 아니라 이러한 조성물 및 약제를 제조하기 위해 본 발명의 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 한 예에서, 화학식 (I)의 화합물은 주위 온도에서 적절한 pH에서 그리고 원하는 순도에서, 생리학적 으로 허용되는 담체, 즉, 생약 투여 형태로 사용되는 농도 및 투여량에서 수용자에게 무독성인 담체와 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 제제의 pH는 주로 특정 용도 및 화합물의 농도에 의존하지만, 바람직하게는 약 3 내지 약 8 범위이다. 한 예에서, 화학식 (I)의 화합물은 pH 5에서 아세테이트 버퍼에서 제제화된다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물은 멸균성이다. 화합물은 예를 들어 고체 또는 비정질 조성물로서, 동결건조 제제로서 또는 수용액으로서 저장될 수 있다.
- [0170] 조성물은 모범적인 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화되고 복용되고 투여된다. 이 맥락에서 고려해야 할 요인은 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 약제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정 및 의료 종사자에게 공지된 기타 요인을 포함한다. 투여될 화합물의 "유효량"은 이러한 고려사항에 의해 좌우될 것이며, 각각의 자극 리간드와의 TLR7, 8, 9 상호작용, 제1형 인터페론과 전염증성 사이토카인(예를 들어 TNF α , IL-6)의 생성을 유발하는 MYD88, IRF7, IRF5, NF κ B 등에 의해 매개되는 하류 신호 전달 및 모든 종류의 면역 세포의 활성화를 억제하는 데 필요한 최소량이다. 예를 들어, 이러한 양은 정상 세포 또는 포유동물 전체에 독성인 양 미만일 수 있다.
- [0171] 한 예에서, 용량당 비경구로 투여되는 본 발명의 화합물의 약제학적 유효량은 하루에 약 0.001 내지 1000 mg/kg, 대안적으로 약 0.001 내지 1000 mg/kg의 환자 체중의 범위일 것이며, 사용되는 화합물의 전형적인 초기 범위는 0.3 내지 15 mg/kg/일이다. 또 다른 구현예에서, 정제 및 캡슐과 같은 경구 단위 제형은 바람직하게는 약 0.1 내지 약 1000 mg의 본 발명의 화합물을 함유한다.
- [0172] 본 발명의 화합물은 경구, 국소(흡착 및 설하 포함), 직장, 질, 경피, 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 피내, 척수강내 및 경막외 및 비강, 바람직한 경우 국소 치료를 위해 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다.
- [0173] 본 발명의 화합물은 임의의 편리한 투여 형태, 예를 들어 정제, 분말, 캡슐, 용액, 분산액, 현탁액, 시럽, 스프레이, 좌약, 겔, 에멀전, 패치 등으로 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 약제학적 제제에서 통상적인 성분을 예를 들어 희석제, 담체, pH 조절제, 감미료, 증량제 및 추가 활성제를 포함할 수 있다.

- [0174] 전형적인 제제는 본 발명의 화합물 및 담체 또는 부형제를 혼합하여 제조된다. 적합한 담체 및 부형제는 당업자에게 공지되어 있고 예를 들어 Ansel, Howard C., et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R., et al. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; 및 Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005에 상세히 설명된다. 제제는 또한, 약물(다시 말하면, 본원 발명의 화합물 또는 이의 제약학적 조성물)의 우아한 외양을 제공하거나 또는 제약학적 산물(다시 말하면, 약제)의 제조를 보조하기 위해 한 가지 또는 그 이상의 완충액, 안정화제, 계면활성제, 침윤제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 보존제, 항산화제, 불투명화 작용제, 활택제, 가공 보조제, 착색제, 감미료, 방향제, 착향제, 희석제 및 다른 공지된 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0175] 적합한 경구 제형의 예는 약 0.1 내지 1000 mg 무수 락토스, 약 0.1 내지 1000 mg 소듐 크로스카르멜로스, 약 0.1 내지 1000 mg 폴리비닐피롤리돈(PVP) K30 및 약 0.1 내지 1000 mg 마그네슘 스테아레이트와 컴파운딩된 약 0.1 내지 1000 mg의 본 발명의 화합물을 함유하는 정제이다. 분말 성분이 먼저 함께 혼합된 다음 PVP 용액과 혼합된다. 생성된 조성물을 건조하고, 과립화하고, 마그네슘 스테아레이트와 혼합하고, 통상적인 장비를 사용하여 정제 형태로 압축할 수 있다. 에어로졸 제제의 예는 본 발명의 화합물, 예를 들어 0.1 내지 1000 mg을 적합한 완충액, 예를 들어 인산염 완충액에 용해하고, 필요한 경우 등장화제, 예를 들어 소듐 클로라이드와 같은 염을 첨가하여 제조될 수 있다. 예를 들어 0.2 마이크론 필터를 사용하여 용액을 여과하여 불순물 및 오염물을 제거할 수 있다.
- [0176] 따라서 일 구현예는 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 추가 구현예는 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용되는 염을 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0177] 또 다른 구현예는 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한, 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 또 다른 구현예는 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한, 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0178] 다음 구현예는 본 발명의 전형적인 구성을 예시하지만, 단지 이를 대표하는 역할을 한다.
- [0179] **조성물 A**
- [0180] 본 발명의 화합물은 하기 조성의 정제 제조를 위한 활성 성분으로서 그 자체로 공지된 방식으로 사용될 수 있다:
- [0181] 정제당
- [0182] 활성 성분 200 mg
- [0183] 미세결정질 셀룰로스 155 mg
- [0184] 옥수수 전분 25 mg
- [0185] 활석 25 mg
- [0186] 히드록시프로필메틸셀룰로스 20 mg
- [0187] 425 mg
- [0188] **조성물 B**
- [0189] 본 발명의 화합물은 하기 조성의 캡슐 제조를 위한 활성 성분으로서 그 자체로 공지된 방식으로 사용될 수 있다:
- [0190] 캡슐당
- [0191] 활성 성분 100.0 mg
- [0192] 옥수수 전분 20.0 mg
- [0193] 락토스 95.0 mg
- [0194] 활석 4.5 mg

[0195] 마그네슘 스테아레이트 0.5 mg

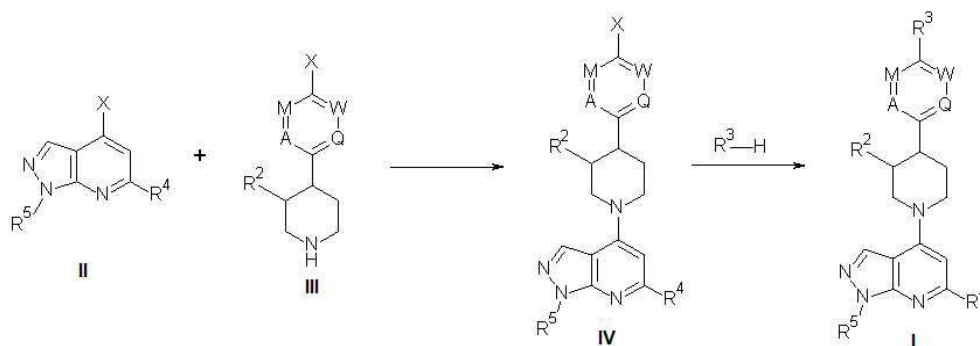
[0196] 220.0 mg

[0197] **합성**

[0198] 본 발명의 화합물은 임의의 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 이러한 화합물 및 이의 출발 물질을 합성하기 위한 적합한 공정은 하기의 반응식 및 실시예에 제공된다. 모든 치환기, 특히 R^1 내지 R^5 , A, M, W 및 Q는 달리 명시되지 않는 한 위에 정의된 바와 같다. 또한, 명시적으로 달리 언급되지 않는 한, 모든 반응, 반응 조건, 약어 및 기호는 유기 화학 분야의 통상의 기술자들에게 잘 알려진 의미를 갖는다.

[0199] 화학식 (I) 또는 (Ia) 또는 (Ib)의 화합물을 제조하기 위한 일반적인 합성 경로가 아래에 나타난다.

[0200] **반응식 1**

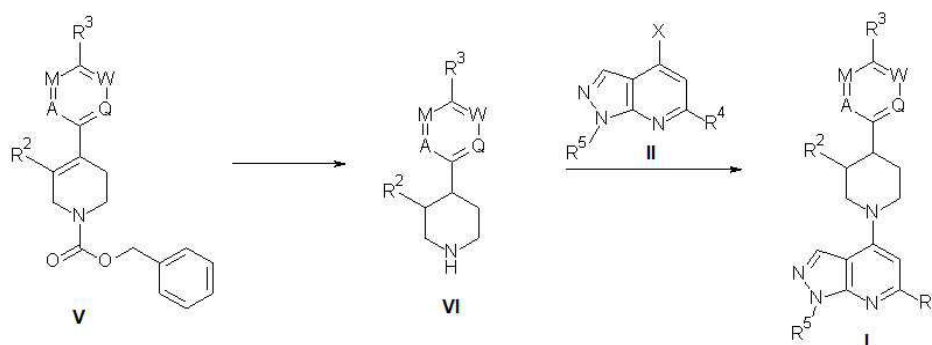


[0201]

[0202] 여기서 X는 할로젠이다.

[0203] 화학식 (II)의 화합물과 (III)의 커플링은 DIPEA 또는 CsF와 같은 염기의 존재하에 승온에서 직접 치환에 의해, 또는 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성을 통해 (참고문헌: *Acc. Chem. Res.* 1998, 31, 805-818; *Chem. Rev.* 2016, 116, 12564-12649; *Topics in Current Chemistry*, 2002, 219, 131-209; 및 이에 인용된 참고문헌) RuPhos Pd G2, $Pd_2(dba)_3$ /XantPhos와 같은 촉매 및 Cs_2CO_3 또는 $t-BuONa$ 와 같은 염기를 사용하여 달성되어 화학식 (IV)의 화합물을 제공할 수 있다. 이어서, 화학식 (IV)의 화합물과 R^3-H 의 커플링은 RuPhos Pd G2, $Pd_2(dba)_3$ /XantPhos와 같은 촉매 및 Cs_2CO_3 또는 $t-BuONa$ 와 같은 염기를 사용한 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성 조건하의 직접 커플링에 의해 달성되어 화학식 (I)의 화합물을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 화학식 (IV)의 화합물과 R^3-H 의 커플링은, 최종 화학식 (I)의 화합물을 얻기 전에 제거될 것인, R^3-H 로부터 유래한 보호기, 예를 들어 Boc 또는 Cbz를 포함하는 생성물을 제공할 수 있다.

[0204] **반응식 2**



[0205]

[0206] 여기서 X는 할로젠이다.

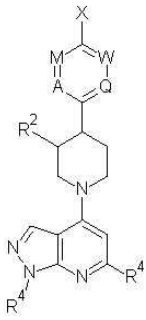
[0207] 화학식 (VI)의 화합물은 수소 분위기하에 $Pd(OH)_2/C$, Pd/C 또는 윌킨슨 촉매와 같은 촉매의 존재하에 화학식 (V)의 화합물로부터 수소화 반응에 의해 달성될 수 있다. Cbz 기는 동일한 조건하에 탈보호될 수도 있다. 이어서, 화학식 (VI)의 화합물과 (II)의 커플링이 DIPEA 또는 CsF와 같은 염기의 존재하에 승온에서 직접 치환에 의

해, 또는 RuPhos Pd G2, Pd₂(dba)₃/XantPhos와 같은 촉매 및 Cs₂CO₃ 또는 *t*-BuONa와 같은 염기를 사용하는 조건에서 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성에 의해 달성되어 화학식 (I)의 화합물을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 화학식 (VI)의 화합물과 (II)의 커플링은 최종 화학식 (I)의 화합물을 얻기 전에 제거될 것인, (VI)로부터 유래한 보호기, 예를 들어 Boc를 포함하는 생성물을 제공할 것이다.

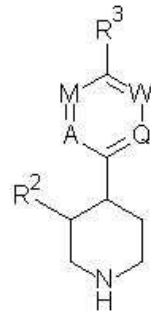
[0208] 본 발명의 화합물은 부분입체이성질체 또는 거울상이성질체의 혼합물로서 수득될 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려진 방법, 예를 들어 (카이랄) HPLC 또는 SFC에 의해 분리될 수 있다.

[0209] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물의 제조 방법에 관한 것이다:

[0210] a) 촉매 및 염기의 존재하에, 화학식 (IV)의 화합물,

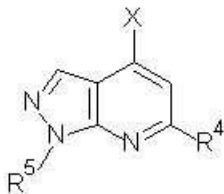


[0211] (IV) 및 R³-H 사이의 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성 반응;



[0212] b) 촉매 및 염기의 존재하에, 화학식 (VI)의 화합물,

(VI) 및 화학식 (II)의 화합물,



(II) 사이의 부흐발트-하르트비히 C-N 결합 형성 반응;

[0213] c) 염기의 존재하에, 화학식 (VI)의 화합물 및 화학식 (II)의 화합물 사이의 직접 치환 반응;

[0214] 여기서

[0215] 단계 a) 및 b)에서, 촉매는 예를 들어 RuPhos Pd G2, Pd₂(dba)₃/XantPhos일 수 있고; 염기는 예를 들어 Cs₂CO₃ 또는 *t*-BuONa일 수 있고;

[0216] 단계 c)에서, 염기는 DIPEA 또는 CsF일 수 있다.

[0217] 상기 공정에 따라 제조될 때 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물이 또한 본 발명의 목적이다.

[0218] 적응증 및 치료 방법

[0219] 본 발명은 TLR7 및 TLR8 및 TLR9를 통한 경로 활성화뿐만 아니라 모든 유형의 사이토카인 및 모든 형태의 자가-항체의 생산을 통해 매개되는 선천성 및 적응 면역 반응을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 각각의 다운스트림 생물학적 이벤트를 억제하는 TLR7 및/또는 TLR8 및/또는 TLR9 길항제로서 사용될 수 있는 화합물을 제공한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 형질세포양 수지상세포, B 세포, T 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 각질 세포, 상피 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 이러한 수용체(들)를 발현하는 모든 유형의 세포에서 TLR7 및/또는 TLR8 및/또는 TLR9를 차단하는 데 유용하다. 이와 같이, 화합물은 전신 홍반성 루푸스 및 루푸스 신염의 치료제

또는 예방제로서 사용될 수 있다.

[0220] 본 발명은 이를 필요로 하는 환자의 전신 홍반성 루푸스 및 루푸스 신염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0221] 또 다른 구현예는 이러한 치료를 필요로 하는 포유동물의 전신 홍반성 루푸스 및 루푸스 신염 치료 또는 예방 방법을 포함하고, 여기서 방법은 상기 포유동물에게 치료적 유효량의 화학식 (I)의 화합물, 입체이성질체, 호변 이성질체, 전구약물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하는 것을 포함한다.

[0222] 실시예

[0223] 본 발명은 다음 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나 이들은 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0224] 약어

[0225] 본 발명은 다음 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나 이들은 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0226] 본원에서 사용된 약어는 다음과 같다:

[0227] ACN: 아세토니트릴

[0228] AIBN: 아조비스이소부티로니트릴

[0229] Boc₂O: 디-*tert* 부틸 디카르보네이트

[0230] CbzCl: 벤질클로로포르메이트

[0231] CyPF-*t*-Bu: *R*)-1-[(*S*)-2-(디시클로헥실포스포노)페로세닐]에틸]디-*tert*-부틸포스핀

[0232] DCM: 디클로로메탄

[0233] DEA: 디에틸아민

[0234] DIPEA: *N,N*-디이소프로필에틸아민

[0235] DMA: 디메틸아세트아미드

[0236] DMF: *N,N*-디메틸포름아미드

[0237] DMFDMA: *N,N*-디메틸포름아미드 디메틸 아세탈

[0238] dtbbpy: 4,4'-디-*tert*-부틸-2,2'-디피리딜

[0239] EtOAc 또는 EA: 에틸 아세테이트

[0240] FA: 포름산

[0241] HLM 인간 간 마이크로솜

[0242] IC₅₀: 절반 억제 농도

[0243] Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)(PF₆): [4,4'-비스(1,1-디메틸에틸)-2,2'-비피리딘-N1,N1']비스[3,5-디플루오로-2-[5-(트리플루오로메틸)-2-피리디닐-N]페닐-C]이리듐(III) 헥사플루오로포스페이트

[0244] JackiePhos: 비스(3,5-비스(트리플루오로메틸)페닐)(2',4',6'- 트리이소프로필-3,6-디메톡시비페닐-2-일)포스핀

[0245] LCMS 액체 크로마토그래피-질량 분석법

[0246] MS: 질량 분석법

[0247] [Pd(알릴)Cl]₂: 알릴팔라듐(II) 클로라이드 이합체

[0248] Pd₂(dba)₃: 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐

- [0249] Pd[P(*o*-tol)₃]₂: 비스(트리-*o*-톨릴포스핀)팔라듐
- [0250] PE: 석유 에테르
- [0251] prep-HPLC: 분취용 고성능 액체 크로마토그래피
- [0252] rt: 실온
- [0253] RuPhos Pd G2:
클로로(2-디시클로헥실포스피노-2',6'-다이소프로폭시-1,1'-비페닐)[2-(2'-아미노-1,1'-비페닐)]팔라듐(II) 제2 세대
- [0254] SFC: 초임계 유체 크로마토그래피
- [0255] TCDI: 1,1'-티오카르보닐디이미다졸
- [0256] TEA: 트리메틸아민
- [0257] TFA: 트리플루오로아세트산
- [0258] Tf₂O: 트리플루오로메탄설폰산 무수물
- [0259] THF: 테트라히드로푸란
- [0260] TTMS: 1,1,1,3,3,3-헥사메틸-2-트리메틸실릴-트리실란
- [0261] v/v: 부피비
- [0262] XantPhos: 4,5-비스(디페닐포스피노)-9,9-디메틸잔텐
- [0263] **일반적 실험 조건**
- [0264] 중간체 및 최종 화합물을 다음 기기 중 하나를 사용하는 플래시 크로마토그래피로 정제했다: i) Biotage SP1 시스템 및 Quad 12/25 카트리지 모듈. ii) ISCO 콤비-플래시 크로마토그래피 기기. 실리카 겔 브랜드 및 기공 크기: i) KP-SIL 60 Å, 입자 크기: 40-60 μm; ii) CAS registry NO: Silica Gel: 63231-67-4, 입자 크기: 47-60 마이크론 실리카 겔; iii) Qingdao Haiyang Chemical Co., Ltd의 ZCX, 기공: 200-300 또는 300-400.
- [0265] 중간체 및 최종 화합물을 XBridgeTM Prep-C18 (5 μm, OBDTM 30 × 100 mm) 컬럼, SunFireTM Prep-C18 (5 μm, OBDTM 30 × 100 mm) 컬럼, Phenomenex Synergi-C18 (10 μm, 25 × 150 mm) 또는 Phenomenex Gemini-C18 (10 μm, 25 × 150 mm)을 사용하는 역상 컬럼 상의 분취용 HPLC에 의해 정제했다. Waters AutoP 정제 시스템 (샘플 매니저 2767, 펌프 2525, 검출기: Micromass ZQ 및 UV 2487, 용매 시스템: 아세트ونی트릴 및 물 중 0.1% 암모늄 하이드록사이드; 아세트ونی트릴 및 물 중 0.1% FA 또는 아세트ونی트릴 및 물 중 0.1% TFA). 또는 Gilson-281 정제 시스템 (펌프 322, 검출기: UV 156, 용매 시스템: 아세트ونی트릴 및 물 중 0.05% 암모늄 하이드록사이드; 아세트ونی트릴 및 물 중 0.225% FA; 아세트ونی트릴 및 물 중 0.05% HCl; 아세트ونی트릴 및 물 중 0.075% TFA; 또는 아세트ونی트릴 및 물).
- [0266] SFC 카이랄 분리를 위해, 중간체를 Mettler Toledo Multigram III 시스템 SFC, Waters 80Q 분취용 SFC 또는 Thar 80 분취용 SFC, 용매 시스템: CO₂ 및 IPA(IPA 중 0.5% TEA) 또는 CO₂ 및 MeOH(MeOH 중 0.1% NH₃ · H₂O), 역압 100bar, 254 또는 220 nm의 검출 UV를 사용하여 카이랄 컬럼(Daicel chiralpak IC, 5 μm, 30 × 250 mm), AS(10 μm, 30 × 250 mm) 또는 AD(10 μm, 30 × 250 mm)에 의해 분리했다.
- [0267] 화합물의 LC/MS 스펙트럼을 LC/MS(WatersTM Alliance 2795-Micromass ZQ, Shimadzu Alliance 2020-Micromass ZQ 또는 Agilent Alliance 6110-Micromass ZQ)를 사용하여 얻었고, LC/MS 조건은 다음과 같았다 (실행 시간 3 또는 1.5 분):
- [0268] 산성 조건 I: A: H₂O 중 0.1% TFA; B: 아세트ونی트릴 중 0.1% TFA;
- [0269] 산성 조건 II: A: H₂O 중 0.0375% TFA; B: 아세트ونی트릴 중 0.01875% TFA;
- [0270] 염기성 조건 I: A: H₂O 중 0.1% NH₃ · H₂O; B: 아세트ونی트릴;

[0271] 염기성 조건 II: A: H₂O 중 0.025% NH₃ · H₂O; B: 아세토니트릴;

[0272] 중성 조건 : A: H₂O; B: 아세토니트릴.

[0273] 질량 스펙트럼 (MS): 일반적으로 모 질량을 나타내는 이온만이 기록되며, 달리 명시되지 않는 한 언급된 질량 이온은 양의 질량 이온(MH)⁺이다.

[0274] NMR 스펙트럼은 Bruker Avance 400 MHz를 사용하여 얻었다.

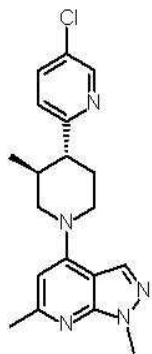
[0275] 마이크로파 보조 반응은 Biotage Initiator Sixty 마이크로파 합성기에서 수행되었다. 공기에 민감한 시약과 관련된 모든 반응은 아르곤 또는 질소 분위기하에 수행되었다. 달리 언급되지 않는 한, 시약은 추가 정제 없이 상업적 공급업체로부터 받은 대로 사용되었다.

[0276] **제조예**

[0277] 하기 실시예는 본 발명의 의미를 설명하기 위한 것으로 의도되지만 본 발명의 의미 내에서 제한을 나타내어서는 안 된다:

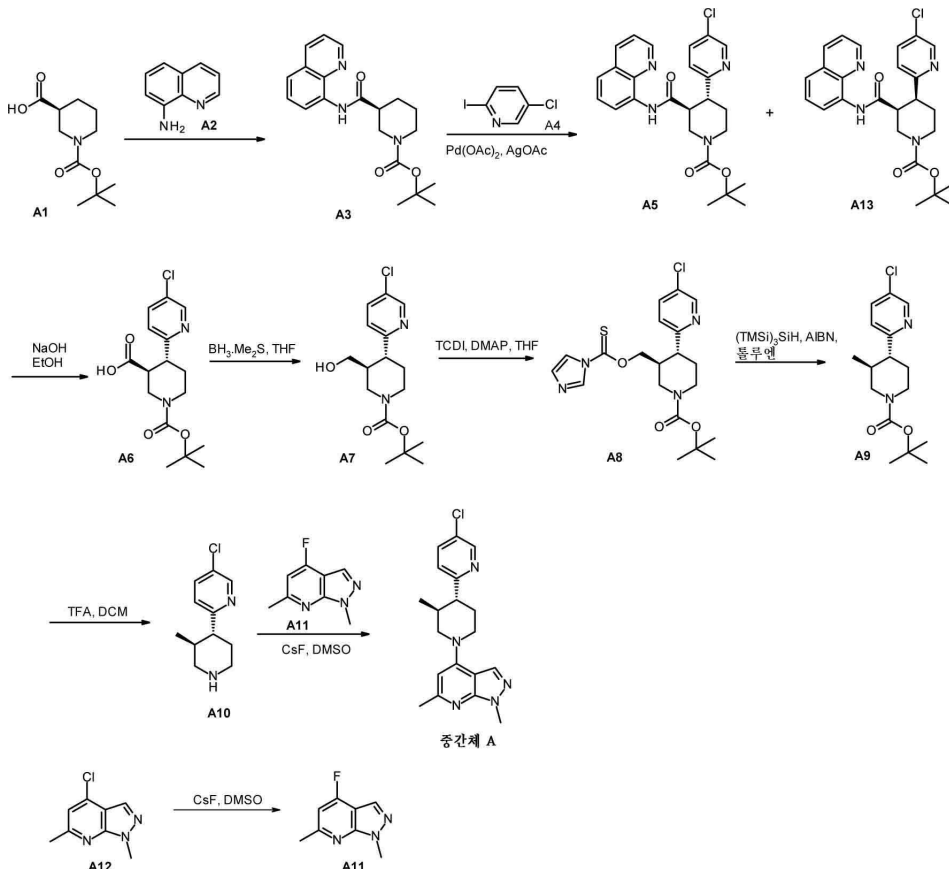
[0278] **중간체 A**

[0279] 4-[(3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



[0280]

[0281] 표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0282]

[0283] 단계 1: *tert*-부틸 (3*S*)-3-(8-퀴놀릴카르바모일)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 A3)의 제조

[0284] DMF(1000 mL) 중 8-아미노퀴놀린(화합물 A2, CAS: 578-66-5, 판매 회사: Accela, 69.17 g, 479.78 mmol)의 용액에 HATU(190.60 g, 501.59 mmol) 및 DIPEA(233 mL, 1309 mmol)를 첨가했다. 반응물을 0 °C에서 1 시간 동안 교반했다. 그다음 (3*S*)-1-*tert*-부톡시카르보닐피페리딘-3-카르복실산(화합물 A1, CAS: 88495-54-9, 판매 회사: Accela, 100.00 g, 436.17 mmol)을 첨가했다. 반응물을 0 °C에서 15 시간 동안 교반했다. EtOAc(200 mL) 및 얼음물(50 mL)을 첨가하고 분리했다. 수성상을 EtOAc(200 mL)로 두 번 추출했다. 조합된 유기층을 염수(300 mL)로 4 회 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 진공하에 농축했다. 잔류물을 EA/PE(1:5)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 A3(120 g)을 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 356 (MH⁺), 측정치 356 (MH⁺).

[0285]

단계 2: *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(8-퀴놀릴카르바모일)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 A5) 및 *tert*-부틸 (3*S*,4*S*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(8-퀴놀릴카르바모일)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 A13)의 제조

[0286]

tert-부틸 (3*S*)-3-(8-퀴놀릴카르바모일)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 A3, 50.00 g, 140.67 mmol), 5-클로로-2-아이오도-피리딘(화합물 A4, CAS: 244221-57-6, 판매 회사: Bide Pharmatech, 77.00 g, 322.18 mmol) 및 Pd(OAc)₂(3.15 g, 14.07 mmol), AgOAc(46.70 g, 281.35 mmol)의 혼합물을 N₂로 탈기한 다음, 110 °C에서 48 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과했다. 여액을 진공하에 농축했다. 잔류물을 EA/PE(1/10 내지 1/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 추가로 정제하여 화합물 A5(20.00 g) 및 화합물 A13(15.00 g)을 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 467 (MH⁺), 측정치 467 (MH⁺).

[0287]

단계 3: (3*S*,4*R*)-1-*tert*-부톡시카르보닐-4-(5-클로로-2-피리딜)피페리딘-3-카르복실산(화합물 A6)의 제조

[0288]

에탄올(200 mL) 중 *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(8-퀴놀릴카르바모일)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 A5, 17.00 g, 36.41 mmol)의 용액에 소듐 하이드록사이드(14.57 g, 364.22 mmol)를 첨가한 다음 85 °C에서 16 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 감압하에 농축했다. 잔류물을 HCl(3 M)를 사용하여 pH 6으로 중화했다. 혼합물을 DCM(300mL)으로 세 번 추출했다. 유기상을 진공에서 농축했다. 잔류물을

PE/EA(5/1 내지 1/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **A6**(11.50 g)을 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 341 (MH^+), 측정치 285 ($M-C_4H_8+H^+$).

[0289] 단계 4: *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(히드록시메틸)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 **A7**)의 제조

[0290] THF(50 mL) 중 (3*S*,4*R*)-1-*tert*-부톡시카르보닐-4-(5-클로로-2-피리딜)피페리딘-3-카르복실산(화합물 **A6**, 11.50 g, 33.74 mmol)의 용액에 $BH_3 \cdot Me_2S$ (13.5 mL, 134.98 mmol)를 0 °C에서 첨가했다. 첨가 후, 반응 혼합물을 25 °C에서 N_2 분위기하에 16 시간 동안 추가로 교반했다. 휘발성 물질을 제거하여 백색 고체 잔류물을 얻은 다음 메탄올(50 mL)을 첨가했다. 30 분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 농축하고 메탄올(50 mL)을 다시 첨가했다. 그다음 잔류물을 10% 시트르산을 적가하여 처리했다. 혼합물을 DCM(200 mL)으로 세 번 추출했다. 조합된 유기층을 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 진공에서 농축했다. 잔류물을 PE/EA(3/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **A7**(8.00 g)을 무색 검으로 얻었다. MS: 계산치 327 (MH^+), 측정치 271 ($M-C_4H_8+H^+$).

[0291] 단계 5: *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(이미다졸-1-카르보티오일옥시메틸)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 **A8**)의 제조

[0292] THF(60 mL) 중 *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(히드록시메틸)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 **A7**, 4.00 g, 12.24 mmol) 및 TCDI(4.36 g, 24.48 mmol)의 용액에 DMAP(299 mg, 2.45 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 25 °C에서 3 시간 동안 교반했다. 그다음 반응 혼합물을 농축하고 잔류물을 PE/EA(1/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **A8**(5.00 g)을 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 437 (MH^+), 측정치 437 (MH^+).

[0293] 단계 6: *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 **A9**)의 제조

[0294] 톨루엔(250 mL) 중 *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-(이미다졸-1-카르보티오일옥시메틸)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 **A8**, 5.00 g, 11.44 mmol)의 혼합물에 트리스(트리메틸실릴)실란(17 mL, 47.56 mmol) 및 AIBN(1877 mg, 11.44 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 10 분 동안 탈기하고 85 °C에서 5 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 진공하에 농축했다. 잔류물을 PE/EA(5/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼 및 pre-HPLC로 정제하여 화합물 **A9**(두 배치의 조합, 4.00 g)을 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 311 (MH^+), 측정치 255 ($M-C_4H_8+H^+$).

[0295] 단계 7: 5-클로로-2-[(3*S*,4*R*)-3-메틸-4-피페리딜]피리딘(화합물 **A10**)의 제조

[0296] DCM(20 mL) 중 *tert*-부틸 (3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 **A9**, 4.00 g, 12.87 mmol)의 용액에 TFA(31 mL, 123.08 mmol)를 0 °C에서 첨가했다. 혼합물을 25 °C에서 16 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 진공하에 농축했다. 잔류물을 pre-HPLC로 정제하여 화합물 **A10**(2.70 g)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 211 (MH^+), 측정치 211 (MH^+).

[0297] 단계 8: 4-플루오로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 **A11**)의 제조

[0298] DMSO(60 mL) 중 4-클로로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 **A12**, CAS: 19867-78-8, 판매 회사: PharmaBlock, 4.60 g, 25.33 mmol) 및 세슘 플루오라이드(19.24 mg, 126.64 mmol)의 혼합물을 120 °C에서 18 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 물(100 mL)에 첨가하고, EA(100 mL)로 세 번 추출했다. 조합된 유기층을 염수(200 mL)로 두 번 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 농축했다. 잔류물을 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **A11**(4.00 g, 약간의 화합물 **A12** 함유)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 166 (MH^+), 측정치 166 (MH^+).

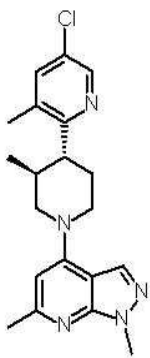
[0299] 단계 9: 4-[(3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(중간체 **A**)의 제조

[0300] DMSO(50 mL) 중 4-플루오로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 **A11**, 2.12 g, 12.81 mmol) 및 5-클로로-2-[(3*S*,4*R*)-3-메틸-4-피페리딜]피리딘(화합물 **A10**, 2.70 g, 12.81 mmol)의 혼합물에 CsF(3.72 mg, 64.07 mmol)

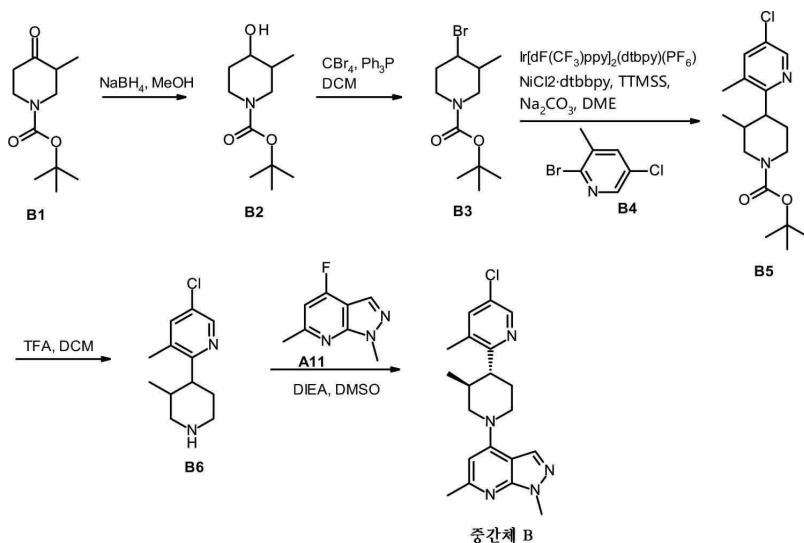
1)를 첨가했다. 반응물을 120 °C에서 12 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 얼음물(200 mL)에 붓고 EA(250 mL)로 세 번 추출했다. 조합된 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공하에 농축했다. 잔류물을 PE/EA(1/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 미정제 생성물을 얻었고 이를 SFC(구배: CO₂ 중 55% MeOH(0.05% DEA), 컬럼: Daicel Chiralpak IC, 250×30 mm, 10 μm)로 추가로 정제하여 **중간체 A**(2.52 g, 더 느린 용리)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 356 (MH⁺), 측정치 356 (MH⁺).

중간체 B

4-[(3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-3-메틸-1-피페리딘]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



단계 1: *tert*-부틸 4-히드록시-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B2)의 제조

메탄올(500 mL) 중 *tert*-부틸 3-메틸-4-옥소피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B1, CAS: 181269-69-2, 판매 회사: PharmaBlock, 50.00 g, 234.44 mmol)의 용액에 NaBH₄(13.30 g, 351.67 mmol)를 일부분씩 0°C에서 첨가했다. 0°C에서 1 시간 동안 교반한 다음 20 °C에서 2.5 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 포화 암모늄 클로라이드 수용액으로 킨칭하고 메탄올을 제거하기 위해 감압하에 농축했다. 그다음 혼합물을 디클로로메탄으로 추출하고, 조합된 유기층을 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 농축하여 화합물 B2(50.40 g)를 밝은 황색 오일로 얻었다.

단계 2: *tert*-부틸 4-브로모-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B3)의 제조

DCE(500 mL) 중 *tert*-부틸 4-히드록시-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B2, 45.00 g, 209.02 mmol)의 혼합물에 Ph₃P(71.27 g, 271.73 mmol)를 20°C에서 첨가하고, 이어서 CBr₄(110.91 g, 334.43 mmol)를 20°C에서 첨가했다. 플라스크를 탈기하고 N₂로 네 번 피징했다. 25 °C에서 15 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반한 후, 반응 혼합물을 농축하고, 잔류물을 PE/EA(100/0 내지 100/5)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물

B3(35.00 g)을 밝은 황색 오일로 얻었다.

단계 3: *tert*-부틸-4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B5)의 제조

교반 막대가 장착된 1000 mL 바이알에 2-브로모-5-클로로-3-메틸-피리딘(화합물 B4, CAS: 65550-77-8, 판매 회사: Accela, 22.00 g, 106.55 mmol), *tert*-부틸 4-브로모-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B3, 38.53 g, 138.52 mmol), Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)(PF₆)(0.85 g, 1.07 mmol), NiCl₂·dtbpy(0.21 g, 0.530 mmol), TTMS(26.50 g, 106.55 mmol), Na₂CO₃(22.59 g, 213.11 mmol) 및 DME(500 mL)를 첨가했다. 바이알을 밀봉하고 질소로 퍼징했다. 혼합물을 교반하고 반응 온도를 25 °C로 유지시키기 위한 냉각 팬이 있는 34 W 청색 LED 램프(7 cm 거리)로 14 시간 동안 조사했다. 반응물을 여과하고, 용매의 혼합물(DCM/MeOH=10/1, 5 mL)로 세 번 세척했다. 여액을 농축하고 잔류물을 PE/EA(5/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 B5(7.00 g)를 밝은 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 325 (MH⁺), 측정치 269 (M-C₄H₈+H⁺).

단계 4: 5-클로로-3-메틸-2-(3-메틸-4-피페리딜)피리딘(화합물 B6)의 제조

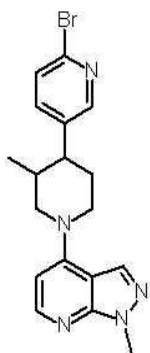
DCM(30 mL) 중 *tert*-부틸-4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B5, 7.00 g, 21.55 mmol)의 용액에 TFA(10 mL)를 0 °C에서 적가했다. 20 °C에서 2 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 농축하고 잔류물을 DCM(50 mL)에 용해하고 포화 NaHCO₃ 용액으로 염기성화했다. 혼합물을 DCM(40 mL)으로 세 번 추출했다. 조합된 유기층을 50 mL 염수로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고 농축하여 화합물 B6(4.80 g)을 밝은 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 225 (MH⁺), 측정치 225 (MH⁺).

단계 5: 4-[(3*S*,4*R*)-4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(중간체 B)의 제조

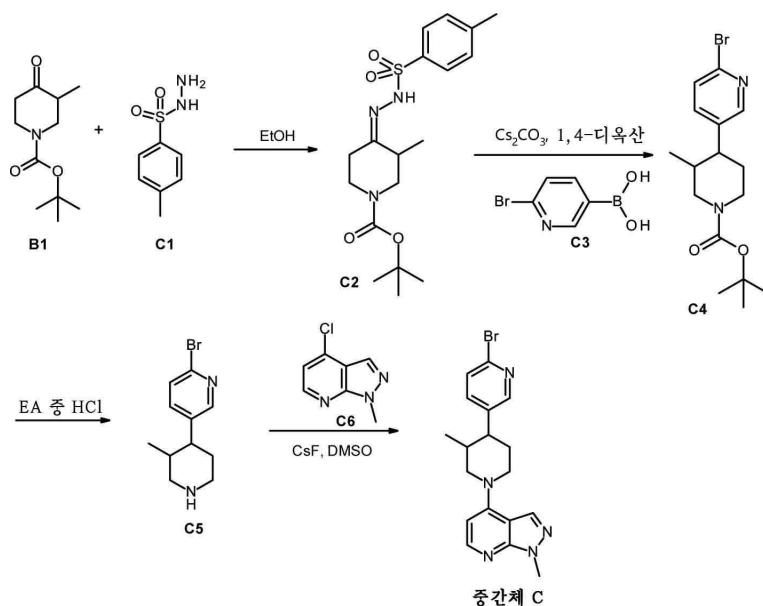
DMSO(40 mL) 중 5-클로로-3-메틸-2-(3-메틸-4-피페리딜)피리딘(화합물 B6, 4.60 g, 20.47 mmol) 및 4-플루오로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 A11, 3.72 g, 22.52 mmol)의 혼합물에 DIPEA(2.37 g, 40.94 mmol)를 첨가했다. 반응물을 120 °C에서 3 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 얼음물(400 mL)에 붓고, EA(80 mL)로 3 회 추출했다. 조합된 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공하에 농축했다. 잔류물을 EA/PE(1/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 혼합물(5.40 g)을 밝은 갈색 고체로 얻었다. 혼합물을 SFC(구배: CO₂ 중 40% EtOH (0.1% NH₃H₂O), 컬럼: Daicel Chiralpak AD, 250×30 mm, 10 μm)로 계속 정제하여 중간체 B(2.10 g)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 370 (MH⁺), 측정치 370 (MH⁺).

중간체 C

4-[4-(6-브로모-3-피리딜)-3-메틸-1-피페리딜]-1-메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



[0319] 표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0320]

[0321] 단계 1: *tert*-부틸-3-메틸-4-(*p*-톨릴설폰닐히드라조노)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 C2)의 제조

[0322] 에탄올(10 mL) 중 *tert*-부틸-3-메틸-4-옥소피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 B1, CAS: 181269-69-2, 판매 회사: PharmaBlock, 300 mg, 1.41 mmol)의 용액에 4-메틸벤젠설폰히드라지드(화합물 C1, 341 mg, 1.83 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 70 °C에서 3 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 농축하여 미정제 생성물 화합물 C2(537 mg)을 얻었고 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용했다. MS: 계산치 382 (MH⁺), 측정치 382 (MH⁺).

[0323] 단계 2: *tert*-부틸 4-(6-브로모-3-피리딜)-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 C4)의 제조

[0324] 1,4-디옥산(5 mL) 중 *tert*-부틸-3-메틸-4-(*p*-톨릴설폰닐히드라조노)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 C2, 537 mg, 1.41 mmol)의 용액에 (6-브로모피리딘-3-일)보론산(화합물 C3, CAS: 223463-14-7, 판매 회사: Accela, 369 mg, 1.83 mmol) 및 Cs₂CO₃(1.38 g, 4.22 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 120°C에서 N₂ 하에 16 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 고체를 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기층을 농축하고 EA/PE(0% 내지 70%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물 C4(50 mg)를 무색 오일로 얻었다. MS: 계산치 355 (MH⁺), 측정치 355 (MH⁺).

[0325] 단계 3: 2-브로모-5-(3-메틸-4-피페리딜)피리딘(화합물 C5)의 제조

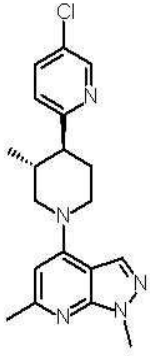
[0326] HCl(EA 중 1M, 10 mL, 10 mmol) 중 *tert*-부틸 4-(6-브로모-3-피리딜)-3-메틸-피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 C4, 50 mg, 141 μmol)의 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반했다. 혼합물을 농축하여 원하는 생성물 C5(41 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 255 (MH⁺), 측정치 255 (MH⁺).

[0327] 단계 4: 4-[4-(6-브로모-3-피리딜)-3-메틸-1-피페리딜]-1-메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(중간체 C)의 제조

[0328] DMSO(15 mL) 중 4-클로로-1-메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 C6, CAS: 1268520-92-8, 판매 회사: PharmaBlock, 35 mg, 211 μmol) 및 2-브로모-5-(3-메틸-4-피페리딜)피리딘(화합물 C5, 41 mg, 141 μmol)의 용액에 CsF(107 mg, 703 μmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 130 °C에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응물을 EA로 희석하고, 물(30 mL)로 네 번 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공하에 농축했다. 잔류물을 EA(10% MeOH 포함)/PE(0% 내지 70%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 중간체 C(42 mg)를 얻었다. MS: 계산치 386 (MH⁺), 측정치 386 (MH⁺).

[0329] 중간체 D

[0330] 4-[(3*R*,4*S*)-4-(5-클로로-2-피리딜)-3-메틸-1-피페리딘]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



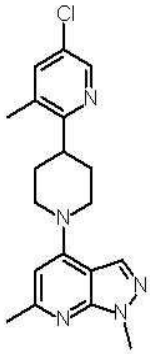
[0331]

[0332] 표제 화합물을 화합물 A5 대신 화합물 A13을 사용하여 중간체 A의 제조와 유사하게 제조했다. 중간체 D를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 356 (MH⁺), 측정치 356 (MH⁺). (참고: 중간체 A13을 에탄올에서 소듐 하이드록사이드로 처리하면, 피페리딘 고리상의 3-위치의 입체 중심이 *S* 배열에서 *R* 배열로 에피머화되어 (3*R*,4*S*)-1-tert-부톡시카르보닐-4-(5-클로로-2-피리딜)피페리딘-3-카르복실산을 얻는다.)

[0333]

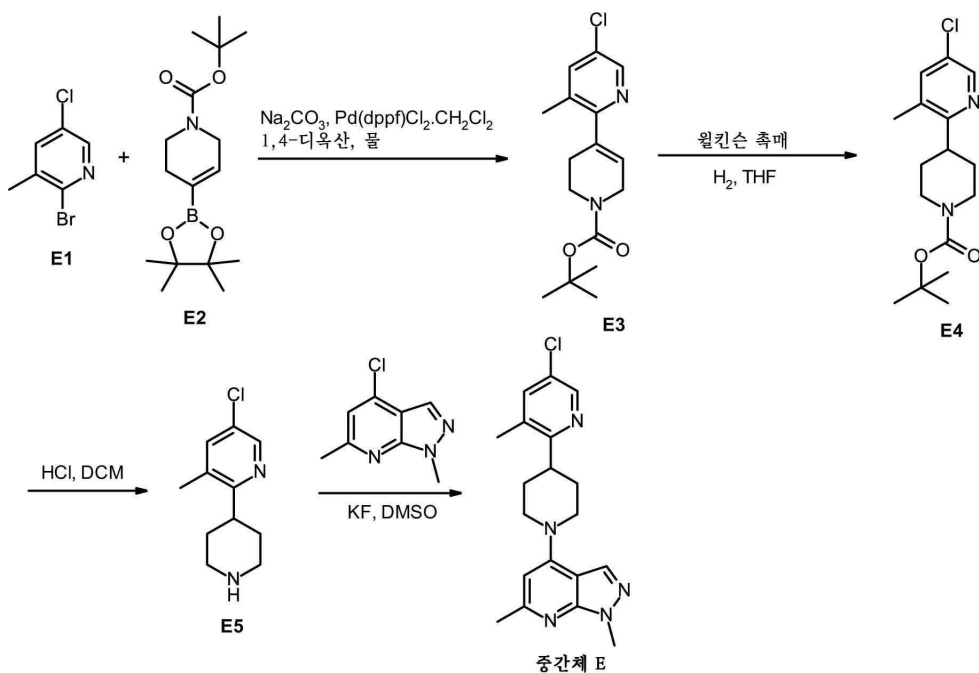
중간체 E

[0334] 4-[4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-1-피페리딘]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



[0335]

[0336] 표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0337]

[0338] 단계 1: *tert*-부틸 4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 E3)의 제조

[0339] 1,4-디옥산(400 mL) 중 2-브로모-5-클로로-3-메틸-피리딘(화합물 E1, 15.00 g, 72.65 mmol) 및 *tert*-부틸 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 E2, 24.71 g, 79.91 mmol)의 혼합물에 물(40 mL) 중 소듐 카르보네이트(15.40 g, 145.30 mmol) 및 Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (5.93 g, 7.26 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 95℃에서 16 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 1,4-디옥산(10 mL)으로 세 번 세척했다. 여액을 농축하고, 미정제물을 PE/EA(5/1 내지 3/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 E3(9.40 g)을 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 309 (MH⁺), 측정치 309 (MH⁺).

[0340] 단계 2: *tert*-부틸 4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 E4)의 제조

[0341] 테트라히드로푸란(120 mL) 중 *tert*-부틸 4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 E3, 6.00 g, 19.43 mmol)의 용액에 트리스(트리페닐포스핀)로듐(I) 클로라이드(4.49 g, 4.86 mmol)를 첨가했다. 플라스크를 탈기하고 H₂로 네 번 퍼징했다. 혼합물을 60 °C에서 36 시간 동안 수소 분위기(45 psi)하에 교반했다. 혼합물을 셀라이트상에서 여과하고 고체를 메탄올(5 mL)로 세척했다. 용매를 진공하에 제거하고 미정제물을 PE/EA(5/1 내지 3/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 E4(4.50 g)를 회백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 311 (MH⁺), 측정치 311 (MH⁺).

[0342] 단계 3: 5-클로로-3-메틸-2-(4-피페리딜)피리딘(화합물 E5)의 제조

[0343] DCM(50 mL) 중 *tert*-부틸 4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜) 피페리딘-1-카르복실레이트(화합물 E4, 4.50 g, 14.48 mmol)의 용액에 디옥산 중 HCl(10 mL)을 0℃에서 첨가했다. 25 °C에서 16 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 화합물 E5(3.56 g)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 211 (MH⁺), 측정치 211 (MH⁺).

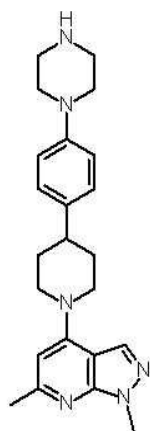
[0344] 단계 4: 4-[4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(중간체 E)의 제조

[0345] DMSO(30 mL) 중 4-클로로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(1.15 g, 6.33 mmol) 및 5-클로로-3-메틸-2-(4-피페리딜)피리딘(화합물 E5, 1.72 g, 6.97 mmol)의 혼합물에 KF(3.67 g, 63.32 mmol)를 첨가했다. 반응물을 120 °C에서 15 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 얼음물(200 mL) 및 수성 NaHCO₃(50 mL)에 붓고, EA(250 mL)로 세 번 추출했다. 조합된 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공하에 농축했다. 미정제물을 PE/EA(5/1 내지 0/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 중간체 E(819 mg)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 356 (MH⁺), 측정치 356 (MH⁺).

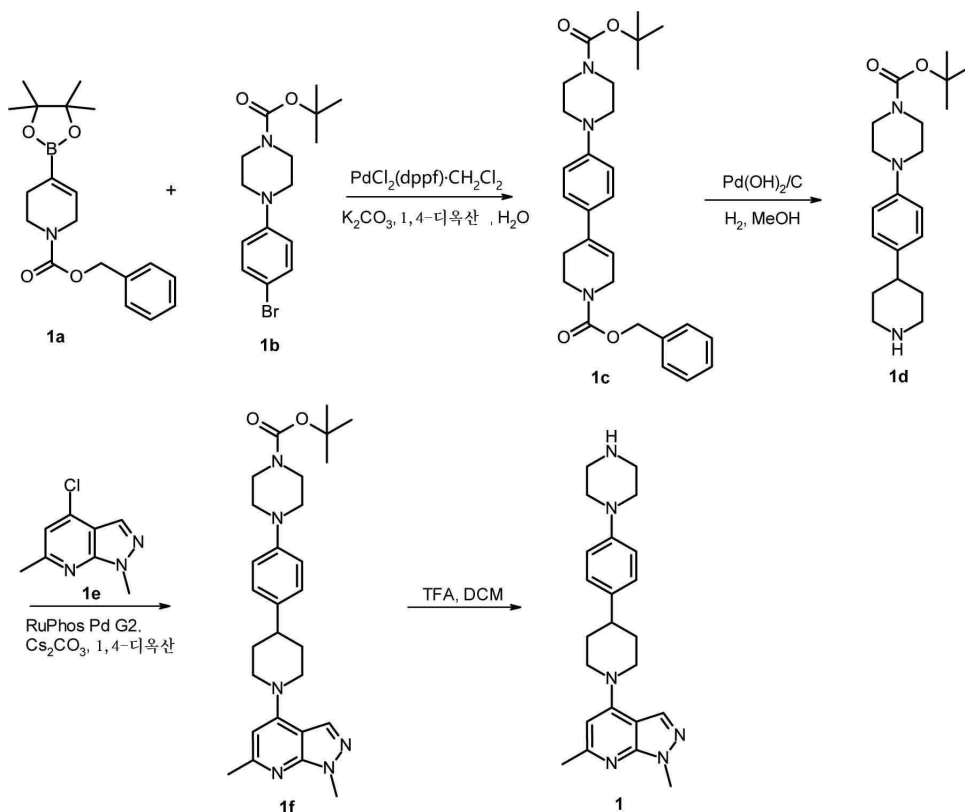
[0346] 실시예 1

[0347] 1,6-디메틸-4-[4-(4-피페라진-1-일페닐)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘

[0348]



[0349] 표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0350]

[0351] 단계 1: *tert*-부틸 4-[4-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일)페닐]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 1c)의 제조

[0352]

1,4-디옥산(5 mL) 및 물(1 mL) 중 벤질 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로피리딘-1(2*H*)-카르복실레이트(화합물 1a, CAS: 286961-15-7, 판매 회사: Accela, 100 mg, 291 μ mol), *tert*-부틸 4-(4-브로모페닐)피페라진-1-카르복실레이트(화합물 1b, CAS: 352437-09-3, 판매 회사: Accela, 99.4 mg, 291 μ mol)의 혼합물에 K₂CO₃(121 mg, 874 μ mol) 및 PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂(24 mg, 29 μ mol)를 첨가했다. 혼합물을 N₂로 충전하고 100 °C에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 고체를 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기상을 농축하고 EA/PE(0% 내지 60%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 1c(83 mg)를 얻었다. MS: 계산치 478 (MH⁺), 측정치 478 (MH⁺).

[0353]

단계 2: *tert*-부틸 4-[4-(4-피페리딜)페닐]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 1d)의 제조

[0354]

MeOH(10 mL) 중 *tert*-부틸 4-[4-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일)페닐]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 1c, 83 mg, 174 μ mol)의 혼합물에 Pd(OH)₂(탄소 중 10 wt.%, 12 mg, 87 μ mol)를 첨가했다. 현탁액을 H₂로 3 회 퍼징한 다음, 수소 풍선하에 실온에서 밤새 교반했다. 혼합물을 여과하고 농축하여 미정제 생성물 화합물 1d(60 mg)을 얻었고 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용했다. MS: 계산치 346 (MH⁺), 측정치 346 (MH⁺).

[0355]

단계 3: *tert*-부틸 4-[4-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-4-피페리딜]페닐]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 1f)의 제조

[0356]

1,4-디옥산(2 mL) 중 4-클로로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 1e, CAS: 19867-78-8, 판매 회사: PharmaBlock, 24 mg, 130 μ mol) 및 *tert*-부틸 4-[4-(4-피페리딜)페닐]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 1d, 30 mg, 87 μ mol)의 혼합물에 RuPhos Pd G2(7 mg, 9 μ mol) 및 Cs₂CO₃(85 mg, 261 μ mol)를 첨가했다. 혼합물을 N₂로 충전하고, 110 °C에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 고체를 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기상을 농축하고 EA(10% MeOH 포함)/PE(0% 내지 60%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로

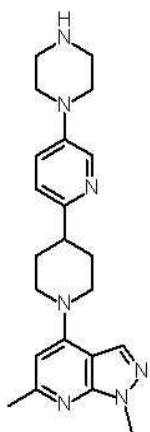
정제하여 원하는 생성물 **1f**를 얻었다. MS: 계산치 491 (MH^+), 측정치 491 (MH^+).

단계 4: 1,6-디메틸-4-[4-(4-피페라진-1-일페닐)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘의 제조

화합물 **1f**를 DCM(10 mL) 및 TFA(2 mL)에 용해하고 실온에서 2 시간 동안 교반했다. 혼합물을 농축하고 ACN/물 (0.5% TFA 포함)(0% 내지 30%)의 구배로 용리하는 역 플래시 컬럼으로 정제하여 **실시예 1**(36 mg)을 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 391 (MH^+), 측정치 391 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.36 (s, 1H), 7.23 - 7.18 (m, 2H), 7.01 - 6.96 (m, 2H), 6.70 (s, 1H), 4.60 (br d, J = 13.3 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.56 (br t, J = 12.7 Hz, 2H), 3.39 - 3.33 (m, 8H), 3.01 (tt, J = 3.8, 11.9 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H), 2.14 - 2.07 (m, 2H), 1.84 (dq, J = 3.9, 12.7 Hz, 2H).

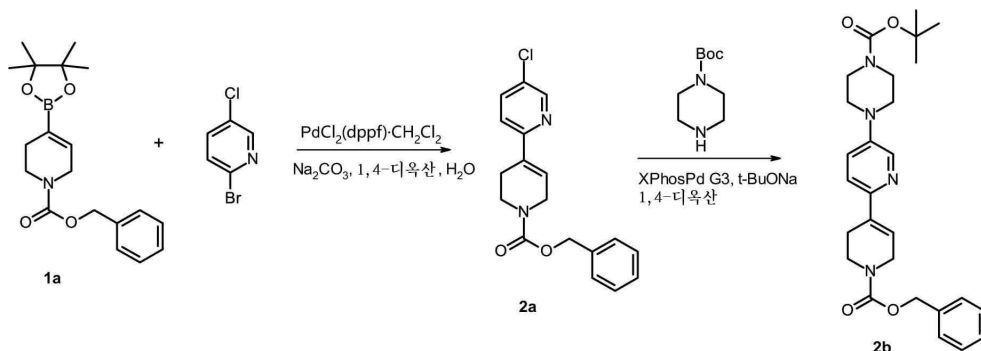
실시예 2

1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘



표제 화합물을 화합물 **1c** 대신 *tert*-부틸 4-[6-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일)-3-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **2b**)를 사용하여 **실시예 1**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 2**(44 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 392 (MH^+), 측정치 392 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.22 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.15 (dd, J = 2.6, 8.6 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.23 (br d, J = 13.1 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.25 - 3.09 (m, 6H), 3.05 - 2.89 (m, 5H), 2.53 (s, 3H), 2.09 - 2.01 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 3H).

화합물 **2b**를 다음 반응식에 따라 제조했다:



단계 1: 벤질 4-(5-클로로-2-피리딜)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 2a)의 제조

1,4-디옥산(10 mL) 및 물(1mL) 중 2-브로모-5-클로로피리딘(CAS: 40473-01-6, 판매 회사: Accela, 1.00 g, 5.2 mmol), 벤질 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **1a**, 1.80 g, 5.24 mmol) 및 소듐 카르보네이트(1.20 g, 11.32 mmol)의 용액에 $PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$ (380 mg, 0.52 mmol)를 N_2 하에 첨가했다. 혼합물을 80°C에서 16 시간 동안 N_2 하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 여과하고 여액을 감압하에 농축하여 용매를 제거하고, 잔류물을 EA/PE(1/5 내지 1/0)의 구배로 용리하는

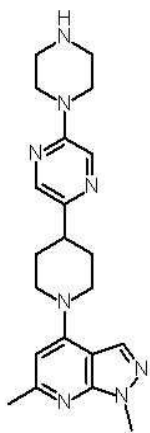
플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **2a**(1.50 g)를 갈색 오일로 얻었다. MS: 계산치 329 (MH^+), 측정치 329 (MH^+).

단계 2: *tert*-부틸 4-[6-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일)-3-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **2b)의 제조**

1,4-디옥산(5 mL) 중 벤질 4-(5-클로로-2-피리딜)-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **2a**, 500 mg, 1.52 mmol), *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트(566 mg, 3.04 mmol) 및 소듐 *tert*-부톡사이드(225 mg, 2.34 mmol)의 용액에 Xphos-Pd-G3(129 mg, 0.15 mmol)를 N_2 하에 첨가했다. 혼합물을 100 °C에서 3 시간 동안 N_2 하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 셀라이트상에서 여과하고 여액을 감압하에 농축하여 용매를 제거하고, 미정제물을 EA/PE(1/5 내지 1/0)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **2b**(223 mg)를 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 479 (MH^+), 측정치 479 (MH^+).

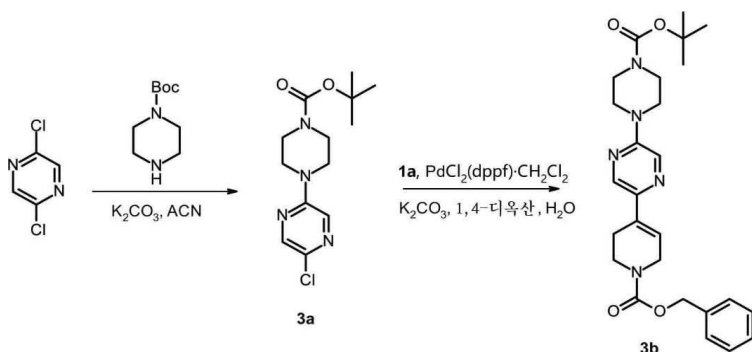
실시예 3

1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘



표제 화합물을 화합물 **1c** 대신 *tert*-부틸 4-[5-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일)피라진-2-일]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **3b**)를 사용하여 **실시예 1**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 3**(23 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 393 (MH^+), 측정치 393 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.09 - 8.06 (m, 1H), 8.01 - 7.98 (m, 1H), 7.93 - 7.91 (m, 1H), 6.24 - 6.22 (m, 1H), 4.29 - 4.21 (m, 2H), 4.07 - 4.04 (m, 3H), 3.55 - 3.50 (m, 4H), 3.27 - 3.18 (m, 2H), 3.02 - 2.97 (m, 4H), 2.97 - 2.89 (m, 1H), 2.57 - 2.54 (m, 3H), 2.07 - 1.93 (m, 4H).

화합물 **3b**를 다음 반응식에 따라 제조했다:



단계 1: *tert*-부틸 4-(5-클로로피라진-2-일)피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **3a)의 제조**

ACN(20 mL) 중 2,5-디클로로피라진(CAS: 19745-07-4, 판매 회사: Accela, 2.00 g, 13.42 mmol) 및 *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트(2.75 g, 14.77 mmol)의 용액에 포타슘 카르보네이트(2.78 g, 20.14 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 80 °C에서 16 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 여과하고 여액을 감압하에 농축하여 용매를 제거하고, 잔류물을 PE/EA(10/1 내지 3/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물

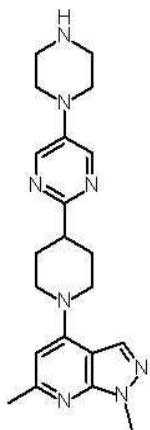
물 **3a**(1.50 g, 5.02 mmol)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 299 (MH^+), 측정치 299 (MH^+).

[0377] 단계 2: *tert*-부틸 4-[5-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일)피라진-2-일]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **3b**)의 제조

[0378] 1,4-디옥산(10 mL) 및 물(1 mL) 중 *tert*-부틸 4-(5-클로로피라진-2-일)피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **3a**, 1.45 g, 4.85 mmol) 및 벤질 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **1a**, 1.83 g, 5.34 mmol)의 혼합물에 K_2CO_3 (1.34 g, 9.71 mmol) 및 $PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$ (198 mg, 0.24 mmol)를 첨가했다. 플라스크를 탈기하고 N_2 로 네 번 퍼징했다. 혼합물을 90°C에서 16 시간 동안 N_2 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 물(10 mL)로 희석하고, EA(20 mL)로 세 번 추출했다. 조합된 유기층을 염수(50 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 농축하여 미정제 생성물을 얻었고 이를 PE/EA(5/1 내지 3/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **3b**(1.50 g)를 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 480 (MH^+), 측정치 480 (MH^+).

[0379] 실시예 4

[0380] 1,6-디메틸-4-[4-(5-피페라진-1-일피리미딘-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘

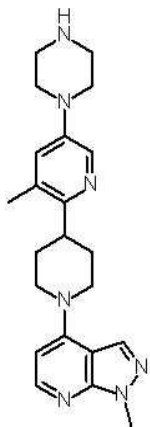


[0381]

[0382] 표제 화합물을 2-브로모-5-클로로피리딘 대신 5-브로모-2-아이오도피리미딘(CAS: 183438-24-6, 판매 회사: Accela)을 사용하여 실시예 2의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 4(3.5 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 393 (MH^+), 측정치 393 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.40 (s, 2H), 8.08 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.02 - 4.90 (m, 2H), 4.33 (br d, J = 13.2 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.26 - 3.20 (m, 4H), 3.18 - 3.11 (m, 1H), 3.03 - 2.95 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.13 - 1.94 (m, 4H).

[0383] 실시예 5

[0384] 1-메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘

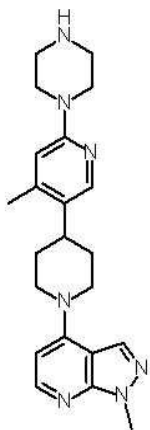


[0385]

[0386] 표제 화합물을 2-브로모-5-클로로피리딘 및 화합물 **1e** 대신 2-브로모-5-클로로-3-메틸-피리딘(CAS: 65550-77-8, 판매 회사: Accela) 및 4-클로로-1-메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘(CAS: 1268520-92-8, 판매 회사: PharmaBlock)을 사용하여 **실시예 2**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 5**(29 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 392 (MH^+), 측정치 392 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.16 (s, 1H), 8.10 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.41 (br d, J = 13.7 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.41 - 3.33 (m, 2H), 3.29 - 3.22 (m, 1H), 3.18 - 3.10 (m, 4H), 3.04 - 2.93 (m, 4H), 2.40 (s, 3H), 2.10 - 1.95 (m, 2H), 1.88 (br dd, J = 1.5, 12.5 Hz, 2H).

[0387] **실시예 6**

[0388] 1-메틸-4-[4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘

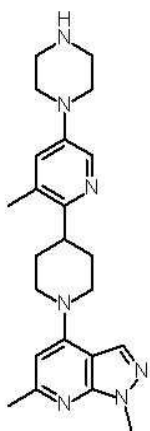


[0389]

[0390] 화합물 **1e** 및 화합물 **1b** 대신 4-클로로-1-메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘(CAS: 1268520-92-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 *tert*-부틸 4-(5-브로모-4-메틸-2-피리딜)피페라진-1-카르복실레이트(CAS: 944582-92-7, 판매 회사: Bide Pharmatech)를 사용하여 **실시예 1**의 제조와 유사하게 표제 화합물을 제조했다. **실시예 6**(35 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 392 (MH^+), 측정치 392 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.45 (s, 1H), 8.06 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.86 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.70 - 4.62 (m, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.94 - 3.84 (m, 4H), 3.65 (br t, J = 12.1 Hz, 2H), 3.44 - 3.36 (m, 4H), 3.35 - 3.24 (m, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.14 (br d, J = 12.3 Hz, 2H), 1.90 (dq, J = 3.5, 12.6 Hz, 2H).

[0391] **실시예 7**

[0392] 1,6-디메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘



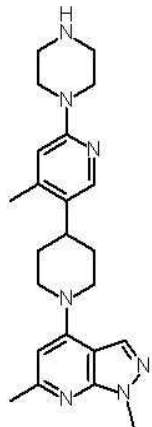
[0393]

[0394] 표제 화합물을 2-브로모-5-클로로피리딘 대신 2-브로모-5-클로로-3-메틸-피리딘(CAS: 65550-77-8, 판매 회사: Accela)을 사용하여 **실시예 2**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 7**(61 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.07 (s, 1H), 7.96 (d, J = 2.9 Hz, 1H),

7.21 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.37 (br d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.35 (br d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.29 - 3.21 (m, 2H), 3.15 (br dd, $J = 3.9, 6.1$ Hz, 4H), 3.02 - 2.94 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.08 - 1.96 (m, 2H), 1.89 - 1.80 (m, 2H).

[0395] 실시예 8

[0396] 1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘

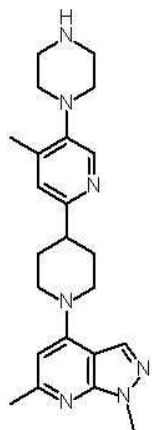


[0397]

[0398] 화합물 **1e** 및 화합물 **1b** 대신 4-브로모-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘(CAS: 1783407-55-5, 판매 회사: Accela) 및 *tert*-부틸 4-(5-브로모-4-메틸-2-피리딜)피페라진-1-카르복실레이트(CAS: 944582-92-7, 판매 회사: Bide Pharmatech)를 사용하여 실시예 1의 제조와 유사하게 표제 화합물을 제조했다. 실시예 8(32 mg)을 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.27 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.54 (br d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.82 - 3.73 (m, 4H), 3.51 (br t, $J = 12.6$ Hz, 2H), 3.35 - 3.25 (m, 4H), 3.19 - 3.12 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.03 (br d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 1.77 (dq, $J = 3.5, 12.6$ Hz, 2H).

[0399] 실시예 9

[0400] 1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘

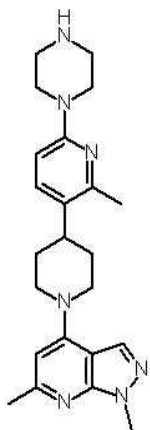


[0401]

[0402] 단계 1에서 2,5-디클로로피라진 대신 5-브로모-2-클로로-4-메틸피리딘(CAS: 778611-64-6, 판매 회사: Accela)을 사용하고, S_NAr 반응(K_2CO_3 , CAN)을 부흐발트 커플링 반응(XantPhos, $Pd_2(dba)_3$, *t*-BuONa, 톨루엔)으로 대체하여 실시예 3의 제조와 유사하게 표제 화합물을 제조했다. 실시예 9(61 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.09 (d, $J = 3.4$ Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.37 (br d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.30 - 3.23 (m, 2H), 3.06 - 3.01 (m, 4H), 3.02 - 2.99 (m, 1H), 3.00 - 2.93 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.05 - 1.97 (m, 2H), 1.97 - 1.85 (m, 2H).

[0403] 실시예 10

[0404] 1,6-디메틸-4-[4-(2-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘

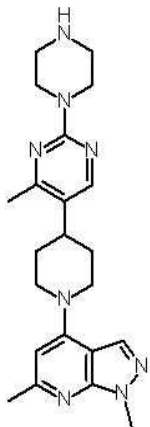


[0405]

[0406] 단계 1에서 2,5-디클로로피라진 대신 3-브로모-6-플루오로-2-메틸피리딘(CAS: 375368-83-5, 판매 회사: Accela)을 사용하고, S_NAr 반응 조건(K_2CO_3 , CAN)을 (DIPEA, DMF)로 대체하여 실시예 3의 제조와 유사하게 표제 화합물을 제조했다. 실시예 10(7 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (400MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.10 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.38 (br d, J = 13.1 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.49 - 3.43 (m, 4H), 3.32 - 3.26 (m, 2H), 3.11 - 3.01 (m, 1H), 2.99 - 2.92 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 1.97 - 1.89 (m, 2H), 1.86 - 1.75 (m, 2H).

[0407] 실시예 11

[0408] 1,6-디메틸-4-[4-(4-메틸-2-피페라진-1-일-피리미딘-5-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘

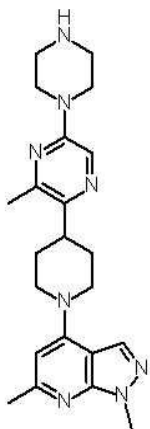


[0409]

[0410] 표제 화합물을 2,5-디클로로피라진 대신 5-브로모-2-클로로-4-메틸피리미딘(CAS: 633328-95-7, 판매 회사: Accela)을 사용하여 실시예 3의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 11(34 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 407 (MH^+), 측정치 407 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.10 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.27 (br d, J = 12.8 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.81 - 3.74 (m, 4H), 3.18 (dt, J = 2.6, 12.5 Hz, 2H), 2.95 - 2.81 (m, 5H), 2.57 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.97 - 1.82 (m, 4H).

[0411] 실시예 12

[0412] 1,6-디메틸-4-[4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘

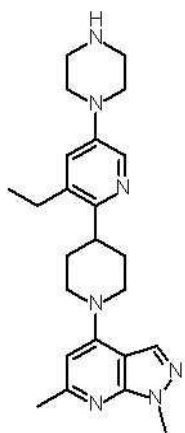


[0413]

[0414] 표제 화합물을 2,5-디클로로피라진 대신 2,5-디클로로-3-메틸-피라진(CAS: 107378-41-6, 판매 회사: Bide)을 사용하여 **실시예 3**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 12**(16 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 407 (MH^+), 측정치 407 (MH^+). ^1H NMR (400MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.09 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.37 (br d, J = 13.3 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.59 - 3.50 (m, 4H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 3.32 - 3.28 (m, 1H), 3.28 - 3.17 (m, 1H), 3.00 - 2.88 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.07 - 1.94 (m, 2H), 1.93 - 1.82 (m, 2H).

[0415] **실시예 13**

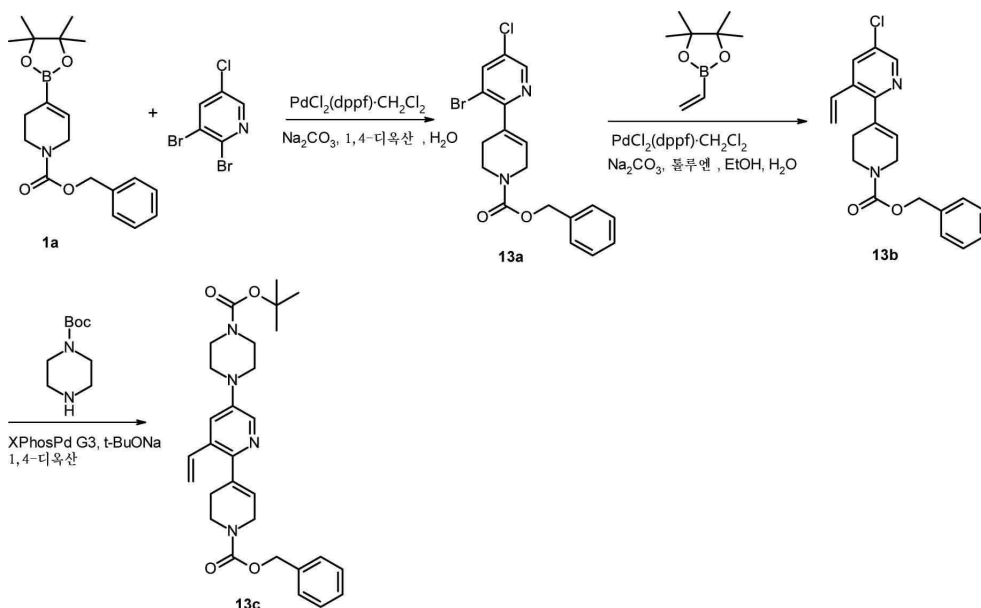
[0416] 4-[4-(3-에틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘



[0417]

[0418] 표제 화합물을 화합물 **1c** 대신 *tert*-부틸 4-[6-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일)-5-비닐-3-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **13c**)를 사용하여 **실시예 1**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 13**(5 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 420 (MH^+), 측정치 420 (MH^+). ^1H NMR (400MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.10 (s, 1H), 7.99 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.39 (br d, J = 13.4 Hz, 2H), 4.01(s, 3H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 3.32 - 3.23 (m, 2H), 3.20 - 3.12 (m, 4H), 3.04 - 2.95 (m, 4H), 2.77 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.18 - 2.02 (m, 2H), 1.85 (br d, J = 11.1 Hz, 2H), 1.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H).

[0419] 화합물 **13c**를 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0420]

[0421] 단계 1: 벤질 4-(3-브로모-5-클로로-2-피리딜)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **13a**)의 제조

[0422] 1,4-디옥산(10 mL) 및 물(1 mL) 중 벤질 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **1a**, 2.53 g, 7.37 mmol) 및 2,3-디브로모-5-클로로피리딘(CAS: 137628-17-2, 판매 회사: Accela, 2.00 g, 7.37 mmol)의 혼합물에 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (301 mg, 0.37 mmol) 및 Na_2CO_3 (1.56 g, 14.74 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 80°C에서 0.5 시간 동안 N_2 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 고체를 1,4-디옥산(15mL)으로 세 번 세척하고 농축했다. 잔류물을 PE/EA(3/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **13a**(680 mg, 1.67 mmol)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 407 (MH^+), 측정치 407 (MH^+).

[0423] 단계 2: 벤질 4-(5-클로로-3-비닐-2-피리딜)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **13b**)의 제조

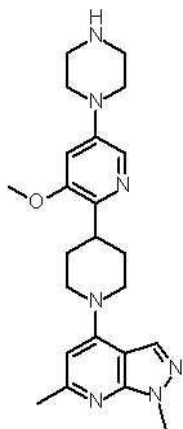
[0424] 톨루엔(1 mL), 에탄올(0.5 mL) 및 물(0.5 mL) 중 벤질 4-(3-브로모-5-클로로-2-피리딜)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **13a**, 100 mg, 0.25 mmol), 비닐보론산 피나콜 에스테르(94 mg, 0.61 mmol) 및 Na_2CO_3 (20 mg, 0.490 mmol)의 혼합물에 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (20 mg, 0.02 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 100°C에서 1 시간 동안 N_2 분위기하에 교반했다. 이 반응을 네 번 반복했다(각각 100 mg의 화합물 **13c**에 대해). 조합된 반응 혼합물을 여과하고 EtOH로 세척했다. 여액을 농축했다. 잔류물을 PE/EA(5/1 내지 0/1)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **13b**(260 mg)를 밝은 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 355 (MH^+), 측정치 355 (MH^+).

[0425] 단계 3: *tert*-부틸 4-[6-(1-벤질옥시카르보닐-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일)-5-비닐-3-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **13c**)의 제조

[0426] 1,4-디옥산(2.5 mL) 중 *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트(105 mg, 0.56 mmol) 및 벤질 4-(5-클로로-3-비닐-2-피리딜)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-카르복실레이트(화합물 **13b**, 100 mg, 0.28 mmol)의 혼합물에 Xphos-Pd-G3(24 mg, 0.03 mmol) 및 *t*-BuONa(67 mg, 0.70 mmol)를 첨가했다. 100°C에서 1.5 시간 동안 N_2 하에 교반한 후, 반응 혼합물을 또 다른 동일한 배치와 조합하고 워크업한 다음, 혼합물을 여과하고, EtOH로 세척하고 농축했다. 잔류물을 PE/EA(1/0 내지 1/8)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **13c**(90 mg)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 505 (MH^+), 측정치 505 (MH^+).

[0427] 실시예 14

[0428] 4-[4-(3-메톡시-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘

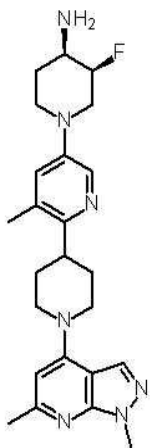


[0429]

[0430] 표제 화합물을 5-브로모-2-클로로-4-메틸피리딘 5-브로모-2-클로로-3-메톡시-피리딘(CAS: 286947-03-3, 판매 회사: Accelea)을 사용하여 **실시예 9**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 14**(37 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 422 (MH^+), 측정치 422 (MH^+). ^1H NMR (400MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.09 (s, 1H), 7.70 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.37 (br d, J = 13.2 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.44 (tt, J = 3.9, 11.7 Hz, 1H), 3.32 - 3.25 (m, 2H), 3.20 (dd, J = 4.0, 6.2 Hz, 4H), 3.03 - 2.94 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.07 - 1.95 (m, 2H), 1.94 - 1.85 (m, 2H).

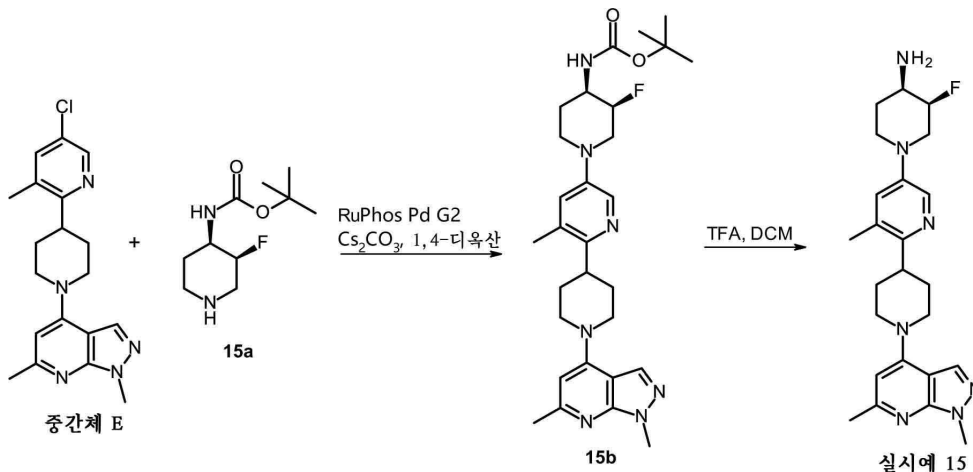
[0431] **실시예 15**

[0432] (3*S*,4*R*)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-피페리딘-4-아민



[0433]

[0434] 표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0435]

[0436] 단계 1: *tert*-부틸 *N*-[(3*S*,4*R*)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-4-피페리딜]카르바메이트(화합물 15b)의 제조

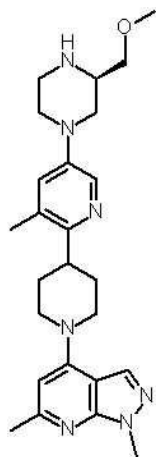
[0437] 1,4-디옥산 중 4-[4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘(중간체 E, 50 mg, 0.14 mmol) 및 *tert*-부틸 *N*-[(3*S*,4*R*)-3-플루오로-4-피페리딜]카르바메이트(화합물 15a, CAS: 1434126-99-4, 판매 회사: PharmaBlock, 40 mg, 0.18 mmol)의 혼합물에 RuPhos Pd G2(11 mg, 0.014 mmol) 및 세슘 카르보네이트(92 mg, 0.28 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 110 °C로 밤새 가열했다. 실온으로 냉각한 후, 고체를 여과하고 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기층을 농축하고 EA(10% MeOH 포함)/PE(0 내지 80%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 15b를 얻었고 이를 다음 단계에서 직접 사용했다. MS: 계산치 538 (MH⁺), 측정치 538 (MH⁺).

[0438] 단계 2: (3*S*,4*R*)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-플루오로-4-피페리딘-4-아민(실시예 15)의 제조

[0439] DCM(5 mL) 및 TFA(2 mL) 중 화합물 15b의 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반했다. 혼합물을 농축하고 ACN/물(0.05% TFA 포함)(0 내지 30%)의 구배로 용리하는 역 플래시 컬럼으로 정제하여 실시예 15(56 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 438 (MH⁺), 측정치 438 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-*d*₄) δ = 8.37 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.08 (d, *J* = 49.2 Hz, 1H), 4.76 - 4.61 (m, 2H), 4.48 - 4.34 (m, 1H), 4.16 - 4.03 (m, 4H), 3.76 - 3.59 (m, 4H), 3.43 - 3.25 (m, 1H), 3.24 - 3.09 (m, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.22 - 2.09 (m, 4H), 2.09 - 2.00 (m, 2H).

[0440] 실시예 16

[0441] 4-[4-[5-[(3*R*)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-3-메틸-2-피리딜]-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



[0442]

[0443]

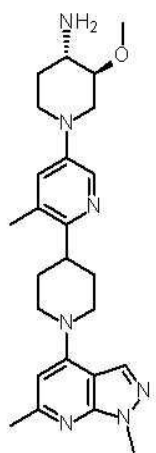
표제 화합물을 화합물 **15a** 대신 *tert*-부틸 (2*R*)-2-(메톡시메틸)피페라진-1-카르복실레이트(CAS: 1023301-73-6, 판매 회사: PharmaBlock)를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 16**(58 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 450 (MH⁺), 측정치 450 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.37 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.70 - 4.62 (m, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.98 - 3.90 (m, 2H), 3.72 - 3.57 (m, 6H), 3.52 - 3.46 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.36 - 3.27 (m, 1H), 3.20 - 3.06 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.14 - 2.03 (m, 4H).

[0444]

실시예 17

[0445]

(3*S*,4*S*)-1-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3-메톡시-피페리딘-4-아민



[0446]

[0447]

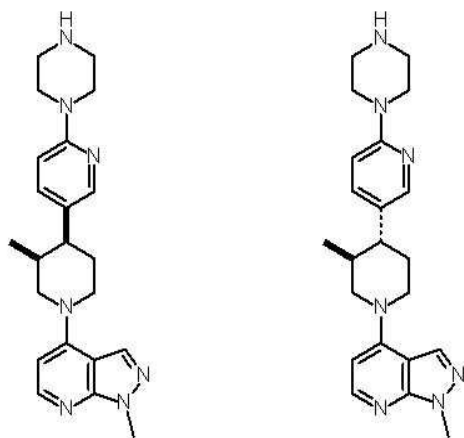
표제 화합물을 화합물 **15a** 대신 *tert*-부틸 *N*-[(3*S*,4*S*)-3-메톡시-4-피페리딜]카르바메이트(CAS: 907544-19-8, 판매 회사: PharmaBlock)를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 17**(50 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 450 (MH⁺), 측정치 450 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.37 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.74 - 4.65 (m, 2H), 4.39 - 4.29 (m, 1H), 4.08 (s, 3H), 4.03 - 3.91 (m, 1H), 3.75 - 3.60 (m, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.41 - 3.32 (m, 1H), 3.26 - 3.14 (m, 1H), 3.00 (dt, *J* = 2.7, 12.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 10.1, 12.5 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.21 - 2.09 (m, 5H), 1.79 (dq, *J* = 4.6, 12.5 Hz, 1H).

[0448]

실시예 18 및 실시예 19

[0449]

1-메틸-4-[시스-3-메틸-4-(6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘(실시예 18) 및 1-메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘(실시예 19)



(실시예 18)

(실시예 19)

[0450]

[0451]

표제 화합물을 화합물 15a 및 중간체 E 대신 *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트 및 중간체 C를 사용하여 실시예 15의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 18 및 실시예 19를 prep-HPLC로 분리했다.

[0452]

실시예 18(6 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 392 (MH^+), 측정치 392 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.50 (s, 1H), 8.07 – 7.99 (m, 2H), 7.69 (dd, J = 2.3, 8.9 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.70 (br d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.54 (br d, J = 13.4 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.85 – 3.77 (m, 5H), 3.68 – 3.54 (m, 1H), 3.39 – 3.33 (m, 5H), 2.46 – 2.28 (m, 2H), 1.98 (br dd, J = 2.8, 13.8 Hz, 1H), 0.72 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

[0453]

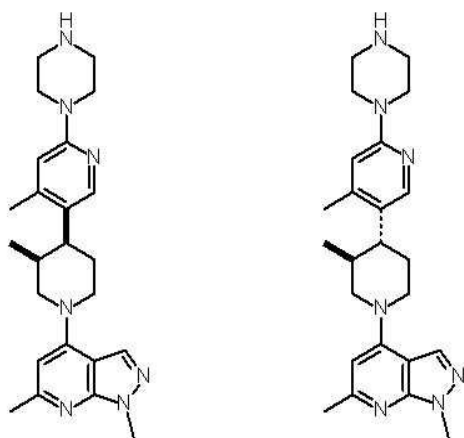
실시예 19(8 mg)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 392 (MH^+), 측정치 392 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.41 (s, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 2H), 7.70 (dd, J = 2.3, 9.0 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.65 (br d, J = 13.8 Hz, 1H), 4.55 (br d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.85 – 3.78 (m, 4H), 3.66 – 3.53 (m, 1H), 3.38 – 3.33 (m, 4H), 3.28 – 3.23 (m, 1H), 2.65 (dt, J = 4.0, 11.4 Hz, 1H), 2.09 – 1.86 (m, 3H), 0.89 (d, J = 6.5 Hz, 3H). 두 분자의 상대적 배열은 2D-NMR에 의해 확인되었다.

[0454]

실시예 20 및 실시예 21

[0455]

1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘(실시예 20) 및 1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘(실시예 21)

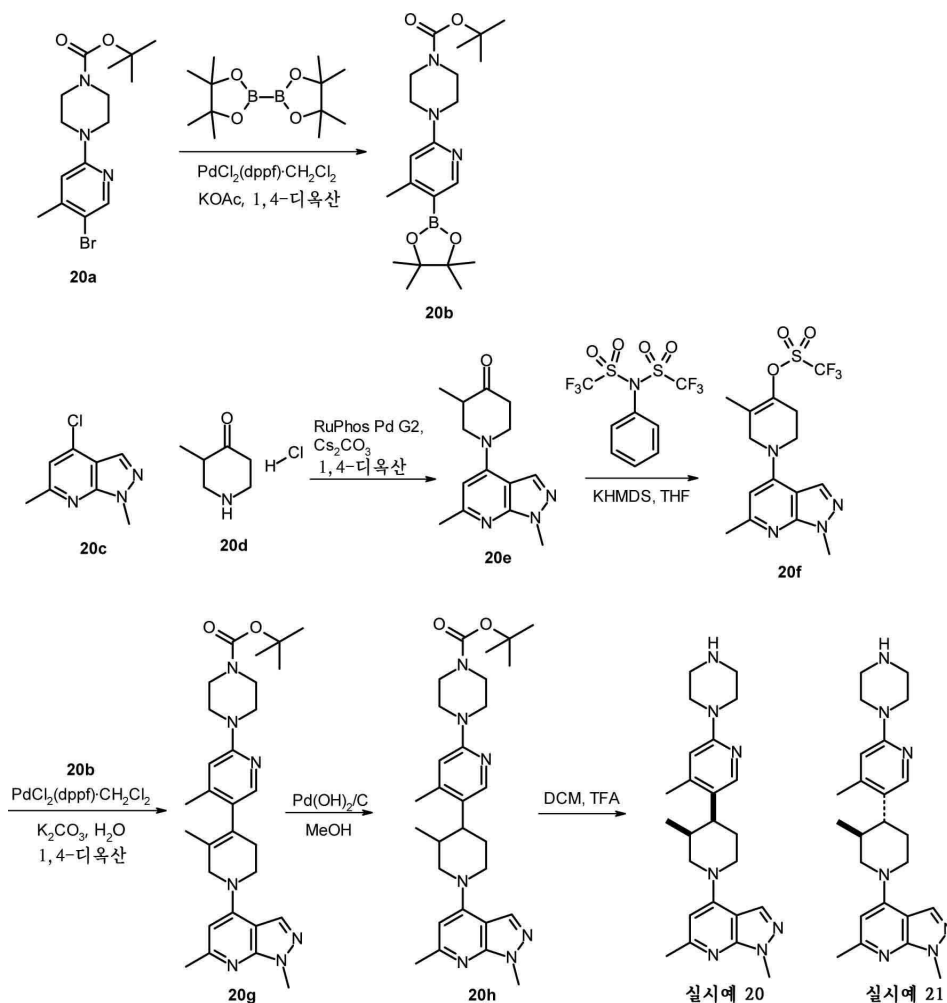


(실시예 20)

(실시예 21)

[0456]

[0457] 표제 화합물을 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0458]

[0459] 단계 1: *tert*-부틸 4-[4-메틸-5-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-2-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 20b)의 제조

[0460]

1,4-디옥산(10 mL) 중 *tert*-부틸 4-(5-브로모-4-메틸피리딘-2-일)피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **20a**, CAS: 944582-92-7, 판매 회사: Bide Pharmatech, 100 mg, 281 μmol) 및 4,4,4',4',5,5,5',5'-옥타메틸-2,2'-비(1,3,2-디옥사보롤란)(107 mg, 421 μmol)의 혼합물에 포타슘 아세테이트(83 mg, 842 μmol) 및 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (23 mg, 28 μmol)를 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 충전하고, 110 $^\circ\text{C}$ 에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 고체를 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기층을 농축하고 미정제 생성물 화합물 **20b**(113 mg)를 얻었고, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용했다. MS: 계산치 404 (MH^+), 측정치 404 (MH^+).

[0461]

단계 2: 1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-피페리딘-4-온(화합물 20e)의 제조

[0462]

1,4-디옥산(20 mL) 중 4-클로로-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘(화합물 **20c**, CAS: 19867-78-8, 판매 회사: PharmaBlock, 511 mg, 2.82 mmol) 및 3-메틸피페리딘-4-온 히드록로라이드(화합물 **20d**, CAS: 4629-78-1, 판매 회사: PharmaBlock, 351 mg, 2.35 mmol)의 혼합물에 RuPhos Pd G2(182 mg, 235 μmol) 및 Cs_2CO_3 (2.29 g, 7.04 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 충전하고 110 $^\circ\text{C}$ 에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 고체를 여과하고 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 혼합물을 농축하고 EA(10% MeOH 포함)/PE(0% 내지 80%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물 **20e**(272 mg)을 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 259 (MH^+), 측정치 259 (MH^+).

[0463]

단계 3: [1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일] 트리플루오로메탄설퍼

포네이트(화합물 20f)의 제조

[0464] THF(10 mL) 중 1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-피페리딘-4-온(화합물 20e, 200 mg, 774 μ mol)의 용액에 KHMDS(THF 중 0.5M, 2.32 mL, 1.16 mmol)를 -78°C에서 첨가하고 0.5 시간 동안 교반했다. 그다음 1,1,1-트리플루오로-N-페닐-N-(트리플루오로메틸설포닐)메탄설포나미드(415 mg, 1.16 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 -78°C에서 추가 2 시간 동안 교반했다. 실온으로 가온한 후, 혼합물을 EA(10% MeOH 포함)/PE(0% 내지 60%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 직접 정제하여 원하는 생성물 화합물 20f(230 mg)를 얻었다. MS: 계산치 391 (MH^+), 측정치 391 (MH^+).

[0465] **단계 4: tert-부틸 4-[5-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일]-4-메틸-2-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 20g)의 제조**

[0466] 1,4-디옥산(5 mL) 및 물(1 mL) 중 [1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일] 트리플루오로메탄설포네이트(화합물 20f, 50 mg, 128 μ mol) 및 tert-부틸 4-[4-메틸-5-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-2-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 20b, 113 mg, 280 μ mol)의 혼합물에 K_2CO_3 (53 mg, 384 μ mol) 및 $PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$ (21 mg, 26 μ mol)를 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 충전하고 100 °C에서 2 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 고체를 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기층을 농축하고 미정제 생성물 화합물 20g(66 mg)를 얻었고, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용했다. MS: 계산치 518 (MH^+), 측정치 518 (MH^+).

[0467] **단계 5: tert-부틸 4-[5-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-4-메틸-2-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 20h)의 제조**

[0468] tert-부틸 4-[5-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일]-4-메틸-2-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 20g, 66 mg, 128 μ mol)가 들어 있는 플라스크에 $Pd(OH)_2$ (탄소 중 10 wt.%, 8.99 mg, 64 μ mol) 및 MeOH(10 mL)를 첨가했다. 현탁액을 H_2 로 3 회 퍼징한 다음, 수소 풍선하에 실온에서 밤새 교반했다. 혼합물을 여과하고 농축했다. 잔류물을 EA(10% MeO 포함)/PE(0% 내지 80%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물 20h(25 mg)를 얻었다. MS: 계산치 520 (MH^+), 측정치 520 (MH^+).

[0469] **단계 6: 1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘(실시예 20) 및 1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(4-메틸-6-피페라진-1-일-3-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘(실시예 21)의 제조**

[0470] DCM(10 mL) 중 tert-부틸 4-[5-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-4-메틸-2-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 20h, 25 mg, 48 μ mol)의 혼합물에 TFA(2 mL)를 첨가했다. 실온에서 2 시간 동안 교반한 후, 혼합물을 농축하고 ACN/물(0.5% TFA 포함)(0% 내지 30%)의 구배로 용리하는 역 플래시 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물을 얻었다. 실시예 20 및 실시예 21의 구조를 2D-NMR로 확인했다.

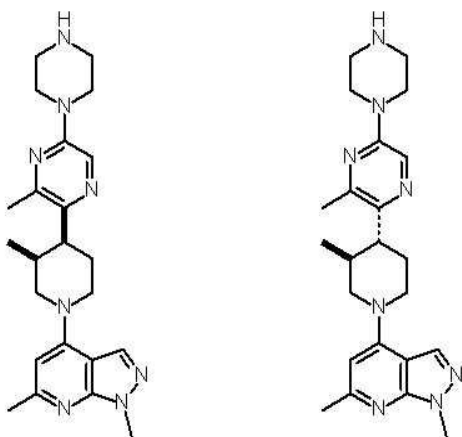
[0471] 실시예 20(9 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 420 (MH^+), 측정치 420 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.45 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.71 (br d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.55 (br d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.97 - 3.87 (m, 4H), 3.83 (br d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.62 (br t, J = 12.4 Hz, 1H), 3.53 (td, J = 3.6, 12.9 Hz, 1H), 3.46 - 3.39 (m, 4H), 2.65 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.54 - 2.41 (m, 2H), 1.93 - 1.84 (m, 1H), 0.76 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

[0472] 실시예 21(2 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 420 (MH^+), 측정치 420 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.24 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.56 - 4.43 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.73 - 3.68 (m, 4H), 3.54 - 3.43 (m, 1H), 3.28 - 3.23 (m, 4H), 3.20 - 3.13 (m, 1H), 2.83 (dt, J = 3.9, 11.5 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.10 - 1.99 (m, 1H), 1.99 - 1.92 (m, 1H), 1.76 - 1.65 (m, 1H), 0.81 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0473] 실시예 22 및 실시예 23

[0474]

1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘(실시예 22) 및 1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-피라진-2-일)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-b]피리딘(실시예 23)



[0475]

(실시예 22) (실시예 23)

[0476]

표제 화합물을 화합물 **24c** 대신 *tert*-부틸 4-[5-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일]-6-메틸-피라진-2-일]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **22b**)를 사용하여 실시예 24 및 실시예 25의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 22 및 실시예 23의 구조를 2D-NMR로 확인했다.

[0477]

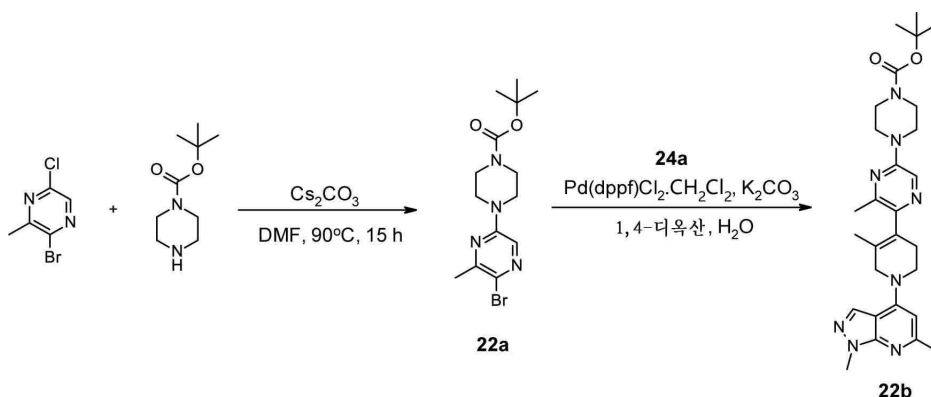
실시예 22(1 mg)를 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 421 (MH⁺), 측정치 421 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.30 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.60 (br d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 4.50 (br d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.87 – 3.80 (m, 5H), 3.59 (br s, 1H), 3.35 – 3.33 (m, 4H), 3.07 – 3.00 (m, 1H), 2.64 – 2.60 (m, 4H), 2.52 (s, 4H), 1.96 (br s, 1H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H).

[0478]

실시예 23(1 mg)을 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 421 (MH⁺), 측정치 421 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.37 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.51 (br d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.43 (br d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.09 – 4.06 (m, 3H), 3.90 – 3.80 (m, 5H), 3.79 – 3.68 (m, 1H), 3.60 – 3.53 (m, 1H), 3.36 – 3.35 (m, 1H), 3.34 – 3.32 (m, 3H), 2.62 (s, 3H), 2.56 – 2.43 (m, 5H), 1.93 (br d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 0.72 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H).

[0479]

화합물 **22b**를 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0480]

[0481]

단계 1: *tert*-부틸 4-(5-브로모-6-메틸-피라진-2-일)피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **22a**)의 제조

[0482]

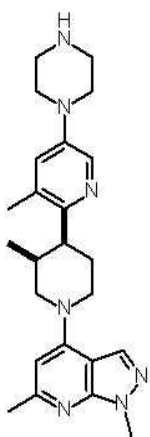
DMF(3 mL) 중 2-브로모-5-클로로-3-메틸-피라진(200 mg, 0.96 mmol)의 용액에 *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트(180 mg, 0.96 mmol) 및 세슘 카르보네이트(314 mg, 0.96 mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 90 °C에서 15 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 여과하고 여액을 감압하에 농축했다. 잔류물을 MeOH/DCM(0% 내지 10%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 **22a**(77 mg)를 황색 오일로 얻었다. MS: 계산치 357 (MH⁺), 측정치 357 (MH⁺).

[0483] 단계 2: *tert*-부틸 4-[5-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일]-6-메틸-피라진-2-일]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 22b)의 제조

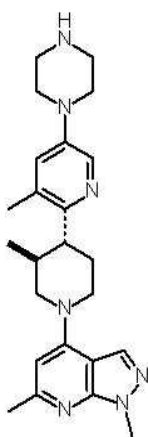
[0484] 1,4-디옥산(5 mL) 및 물(1 mL) 중 1,6-디메틸-4-[5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-1-일]피라졸로[3,4-*b*]피리딘(화합물 24a, 95 mg, 0.26 mmol)의 용액에 *tert*-부틸 4-(5-브로모-6-메틸-피라진-2-일)피페라진-1-카르복실레이트(화합물 22a, 77 mg, 0.22 mmol), Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂(18 mg, 0.22 mmol) 및 K₂CO₃(45 mg, 0.32 mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 90℃에서 2 시간 동안 N₂ 분위기하에 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 감압하에 농축하고, 잔류물을 MeOH/DCM(0% 내지 10%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 화합물 22b(130 mg)를 갈색 오일로 얻었다. MS: 계산치 519 (MH⁺), 측정치 519 (MH⁺). 실시예 22 및 실시예 23의 구조를 2D-NMR로 확인했다.

[0485] 실시예 24 및 실시예 25

[0486] 1,6-디메틸-4-[시스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘(실시예 24) 및 1,6-디메틸-4-[트랜스-3-메틸-4-(3-메틸-5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘(실시예 25)



(실시예 24)



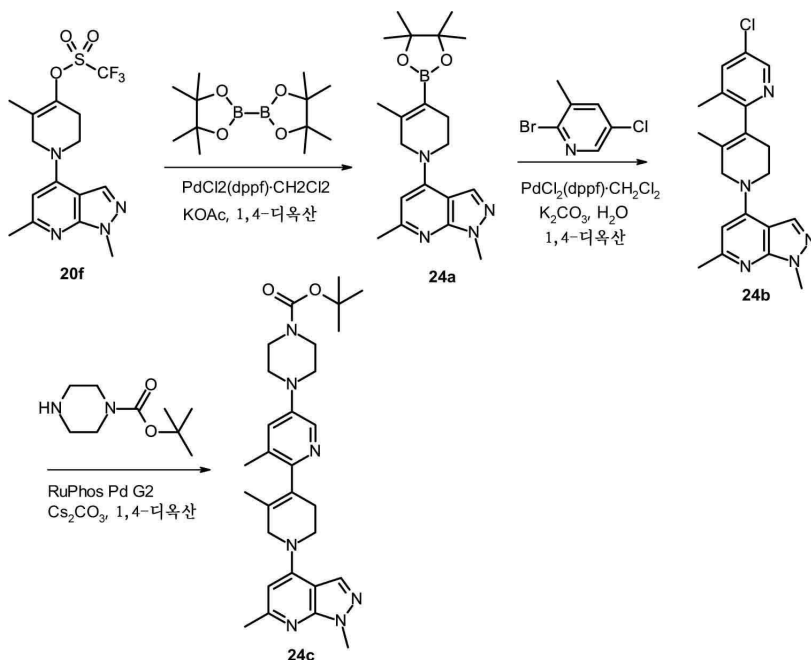
(실시예 25)

[0488] 표제 화합물을 화합물 20g 대신 *tert*-부틸 4-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2*H*-피리딘-4-일]-5-메틸-3-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 24c)를 사용하여 실시예 20 및 실시예 21의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 24 및 실시예 25의 구조를 2D-NMR로 확인했다.

[0489] 실시예 24(16 mg)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 420 (MH⁺), 측정치 420 (MH⁺). ¹H NMR (500 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.42 (s, 1H), 8.20 - 8.14 (m, 1H), 7.99 - 7.91 (m, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.70 (br d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.53 (br d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.86 (br d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 3.73 - 3.60 (m, 5H), 3.49 - 3.33 (m, 4H), 2.76 - 2.61 (m, 4H), 2.60 - 2.52 (m, 4H), 2.03 - 1.93 (m, 1H), 0.76 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H).

[0490] 실시예 25(8 mg)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 420 (MH⁺), 측정치 420 (MH⁺). ¹H NMR (500 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.33 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (br s, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.67 (br d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.57 (br d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.69 - 3.53 (m, 6H), 3.44 - 3.36 (m, 4H), 3.36 - 3.24 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.45 - 2.35 (m, 1H), 2.12 - 2.00 (m, 2H), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

[0491] 화합물 **24c**를 다음 반응식에 따라 제조했다:



[0492]

[0493]

단계 1: 1,6-디메틸-4-[5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-일]피라졸로[3,4-b]피리딘(화합물 **24a**)의 제조

[0494]

1,4-디옥산(10 mL) 중 [1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일] 트리플루오로메탄설포네이트(화합물 **20f**, 300 mg, 0.768 mmol) 및 4,4,4',4',5,5,5',5'-옥타메틸-2,2'-비(1,3,2-디옥사보롤란)(292.72 mg, 1.15 mmol)의 혼합물에 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (63 mg, 0.077 mmol) 및 포타슘 아세테이트(226 mg, 2.31 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 충전하고 90 °C에서 2 시간 동안 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 고체를 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기층을 농축하고 미정제 생성물 화합물 **24a**(283 mg)를 얻었고 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용했다. MS: 계산치 369 (MH^+), 측정치 369 (MH^+).

[0495]

단계 2: 4-[4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-일]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘(화합물 **24b**)의 제조

[0496]

1,4-디옥산(10 mL) 및 물(2 mL) 중 1,6-디메틸-4-[5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-일]피라졸로[3,4-b]피리딘(화합물 **24a**, 283 mg, 0.768 mmol) 및 2-브로모-5-클로로-3-메틸-피리딘(CAS: 65550-77-8, 판매 회사: Accela, 175 mg, 0.845 mmol)의 혼합물에 $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (31 mg, 0.038 mmol) 및 K_2CO_3 (212 mg, 1.54 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 충전하고 90 °C에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 DCM(20mL)으로 세 번 추출하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 농축하고 EA/PE(0% 내지 30%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물 화합물 **24b**(260 mg)를 얻었다. MS: 계산치 368 (MH^+), 측정치 368 (MH^+).

[0497]

단계 3: *tert*-부틸 4-[6-[1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-4-일]-5-메틸-3-피리딜]피페라진-1-카르복실레이트(화합물 **24c**)의 제조

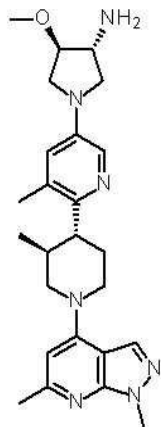
[0498]

1,4-디옥산(5 mL) 중 4-[4-(5-클로로-3-메틸-2-피리딜)-5-메틸-3,6-디히드로-2H-피리딘-1-일]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘(화합물 **24b**, 130 mg, 0.353 mmol), 및 1-Boc-피페라진(99 mg, 0.530 mmol)의 혼합물에 세슘 카르보네이트(230 mg, 0.707 mmol) 및 RuPhos Pd G2(27 mg, 0.035 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 N_2 로 충전하고 110 °C에서 밤새 교반했다. 실온으로 냉각한 후, 고체를 여과하고 EA(10 mL)로 두 번 세척했다. 조합된 유기층을 농축하고 EA(10% MeOH 포함)/PE(0% 내지 80%)의 구배로 용리하는 플래시 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물

24c(136 mg)를 얻었다. MS: 계산치 518 (MH^+), 측정치 518 (MH^+).

[0499] 실시예 26

[0500] (3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-4-메톡시-피롤리딘-3-아민

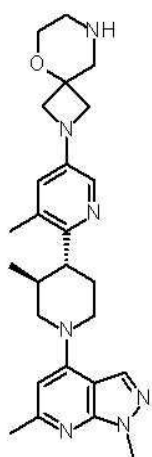


[0501]

[0502] 표제 화합물을 화합물 15a 및 중간체 E 대신 *tert*-부틸 *N*-[(3*R*,4*R*)-4-메톡시피롤리딘-3-일]카르바메이트(CAS: 1932066-52-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 중간체 B를 사용하여 실시예 15의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 26(75 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 450 (MH^+), 측정치 450 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.34 (s, 1 H), 7.85 (d, J = 2.50 Hz, 1 H), 7.58 (d, J = 2.50 Hz, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 4.69 (br d, J = 14.01 Hz, 1 H), 4.59 (br d, J = 13.01 Hz, 1 H), 4.19 (dt, J = 5.63, 2.94 Hz, 1 H), 4.09 (s, 3 H), 3.99 (dt, J = 6.25, 3.38 Hz, 1 H), 3.87 (dd, J = 11.51, 5.50 Hz, 1 H), 3.80 (dd, J = 11.26, 6.25 Hz, 1 H), 3.68 – 3.58 (m, 1 H), 3.55 (dd, J = 11.26, 3.25 Hz, 1 H), 3.51 – 3.42 (m, 4 H), 3.40 – 3.32 (m, 2 H), 2.64 (s, 3 H), 2.57 (s, 3 H), 2.44 – 2.33 (m, 1 H), 2.14 – 2.04 (m, 2 H) 0.90 (d, J = 6.50 Hz, 3 H).

[0503] 실시예 27

[0504] 2-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난



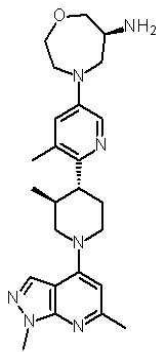
[0505]

[0506] 표제 화합물을 화합물 15a 및 중간체 E 대신 *tert*-부틸 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난-8-카르복실레이트(CAS: 1251005-61-4, 판매 회사: PharmaBlock) 및 중간체 B를 사용하여 실시예 15의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 27(65 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 462 (MH^+), 측정치 462 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.06 (s, 1H), 7.60 (d, J =2.5 Hz, 1H), 6.78 (d, J =2.4 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.38 (br d, J = 13.8 Hz, 1H), 4.29 (br d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.91 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.74 –

3.63 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 2.99 - 2.96 (m, 1H), 2.92 - 2.87 (m, 1H), 2.84 - 2.80 (m, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.31 (br dd, $J = 6.5, 11.0$ Hz, 1H), 1.98 - 1.88 (m, 1H), 1.84 - 1.75 (m, 1H),, 0.77 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

[0507] 실시예 28

[0508] (6S)-4-[6-[(3S,4R)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-b]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-1,4-옥사제판-6-아민

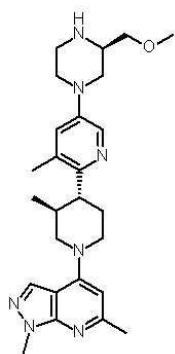


[0509]

[0510] 표제 화합물을 화합물 15a 및 중간체 E 대신 *tert*-부틸 *N*-[(6S)-1,4-옥사제판-6-일]카르바메이트(CAS: 2306247-11-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 중간체 B를 사용하여 실시예 15의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 28(75 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 450 (MH^+), 측정치 450 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) $\delta = 8.39$ (s, 1H), 8.11 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.73 (br d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 4.63 (br d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.20 - 4.09 (m, 5H), 4.05 - 3.98 (m, 1H), 3.95 - 3.80 (m, 5H), 3.75 - 3.62 (m, 2H), 3.47 - 3.34 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.54 - 2.45 (m, 1H), 2.23 - 2.12 (m, 2H), 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

[0511] 실시예 29

[0512] 4-[(3S,4R)-4-[5-[(3R)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-3-메틸-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-b]피리딘



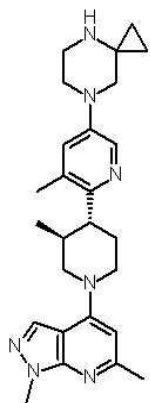
[0513]

[0514] 표제 화합물을 화합물 15a 및 중간체 E 대신 *tert*-부틸 (2R)-2-(메톡시메틸)피페라진-1-카르복실레이트(CAS: 1023301-73-6, 판매 회사: PharmaBlock) 및 중간체 B를 사용하여 실시예 15의 제조와 유사하게 제조했다. 실시예 29(147 mg)를 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 464 (MH^+), 측정치 464 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) $\delta = 8.37$ (s, 1H), 8.21 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.71 (br d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 4.65 - 4.58 (m, 1H), 4.15 - 4.04 (m, 5H), 3.77 - 3.70 (m, 1H), 3.70 - 3.62 (m, 3H), 3.54 - 3.49 (m, 1H), 3.48 - 3.41 (m, 4H), 3.38 - 3.31 (m, 3H), 3.25 (br dd, $J = 10.3, 13.7$ Hz, 1H), 2.66 (s, 3H), 2.64 - 2.59 (m, 3H), 2.53 - 2.44 (m, 1H), 2.20 - 2.11 (m, 2H), 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

[0515] 실시예 30

[0516] 4-[(3S,4R)-4-[5-(4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-7-일)-3-메틸-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸

로[3,4-b]피리딘



[0517]

[0518]

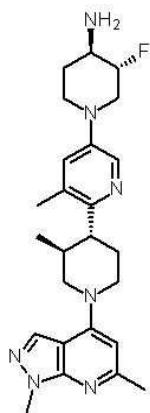
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-4-카르복실레이트(CAS: 674792-08-6, 판매 회사: Accela) 및 **중간체 B**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 30**(42 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 446 (MH^+), 측정치 446 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.34 (s, 1H), 8.20 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.97 (br s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.73 - 4.65 (m, 1H), 4.59 (br d, J = 13.3 Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.74 - 3.69 (m, 2H), 3.68 - 3.59 (m, 1H), 3.58 - 3.49 (m, 4H), 3.45 - 3.33 (m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.48 - 2.35 (m, 1H), 2.20 - 2.03 (m, 2H), 1.22 - 1.03 (m, 4H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0519]

실시예 31

[0520]

(3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딘]-5-메틸-3-피리딘]-3-플루오로-피페리딘-4-아민



[0521]

[0522]

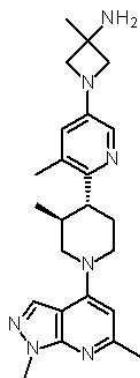
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-[(3*R*,4*R*)-3-플루오로피페리딘-4-일]카르바메이트(CAS: 1523530-29-1, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 B**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 31**(44 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 452 (MH^+), 측정치 452 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.33 (s, 1H), 8.19 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.78 - 4.63 (m, 2H), 4.57 (br d, J = 13.0 Hz, 1H), 4.35 - 4.27 (m, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.98 - 3.88 (m, 1H), 3.66 - 3.57 (m, 1H), 3.57 - 3.46 (m, 1H), 3.37 - 3.31 (m, 2H), 3.08 - 2.97 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.44 - 2.34 (m, 1H), 2.28 - 2.19 (m, 1H), 2.13 - 2.02 (m, 2H), 1.82 (dq, J = 4.3, 12.6 Hz, 1H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0523]

실시예 32

[0524]

1-[6-[(3*S*,4*R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딘]-5-메틸-3-피리딘]-3-메틸-아제티딘-3-아민



[0525]

[0526]

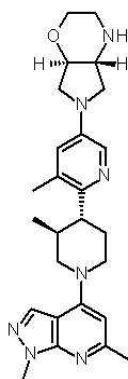
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-(3-메틸아제티딘-3-일)카르바메이트 히드로클로라이드 카르바메이트(CAS: 1408076-37-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 B**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 32**(66 mg)를 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 420 (MH⁺), 측정치 420 (MH⁺). ¹H NMR (500 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.33 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.67 (br d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 4.58 (br d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.12 - 4.06 (m, 5H), 3.67 - 3.58 (m, 1H), 3.37 - 3.31 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.43 - 2.34 (m, 1H), 2.12 - 2.05 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

[0527]

실시예 33

[0528]

(*4aR,7aR*)-6-[6-[(*3S,4R*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-5-메틸-3-피리딜]-3,4,4a,5,7,7a-헥사히드로-2H-피롤로[3,4-*b*][1,4]옥사진



[0529]

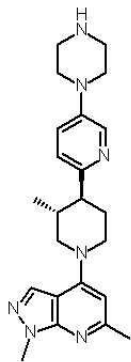
[0530]

표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 (*4aR,7aR*)-옥타히드로피롤로[3,4-*b*]모르폴린-4-카르복실레이트(CAS: 1932337-68-2, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 B**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 33**(66 mg)을 밝은 황색 고체로 얻었다. MS: 계산치 462 (MH⁺), 측정치 462 (MH⁺). ¹H NMR (500 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.33 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.68 (br d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.64 - 4.52 (m, 1H), 4.25 (dd, *J* = 3.7, 13.1 Hz, 1H), 4.21 - 4.12 (m, 1H), 4.08 (s, 3H), 4.04 - 3.97 (m, 1H), 3.89 - 3.80 (m, 2H), 3.63 (dt, *J* = 7.6, 10.1 Hz, 2H), 3.52 (dd, *J* = 2.1, 13.3 Hz, 1H), 3.49 - 3.44 (m, 1H), 3.40 (dd, *J* = 4.2, 12.9 Hz, 1H), 3.37 - 3.32 (m, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.43 - 2.34 (m, 1H), 2.14 - 2.07 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

[0531]

실시예 35

[0532] 1,6-디메틸-4-[(3*R*,4*S*)-3-메틸-4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘

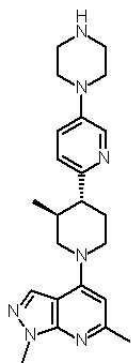


[0533]

[0534] 표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 35**(5 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.35 (s, 2H), 8.05 – 7.85 (m, 1H), 7.77 – 7.62 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.67 (br d, J = 13.4 Hz, 1H), 4.60 – 4.51 (m, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.66 – 3.56 (m, 5H), 3.44 – 3.36 (m, 4H), 3.30 – 3.19 (m, 1H), 3.09 – 2.95 (m, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.33 – 2.19 (m, 1H), 2.17 – 1.99 (m, 2H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0535] **실시예 34**

[0536] 1,6-디메틸-4-[(3*S*,4*R*)-3-메틸-4-(5-피페라진-1-일-2-피리딜)-1-피페리딜]피라졸로[3,4-*b*]피리딘

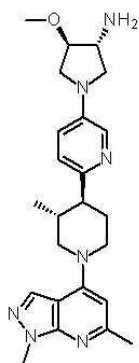


[0537]

[0538] 표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 피페라진-1-카르복실레이트 및 **중간체 A**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 34**(20 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.35 (s, 1H), 8.32 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 2.9, 9.0 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.69 – 4.62 (m, 1H), 4.55 (br dd, J = 2.2, 13.9 Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.63 – 3.53 (m, 5H), 3.47 – 3.36 (m, 4H), 3.29 – 3.22 (m, 1H), 2.95 (dt, J = 4.4, 11.2 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.30 – 2.17 (m, 1H), 2.15 – 1.98 (m, 2H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0539] **실시예 36**

[0540] (3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-4-메톡시-피롤리딘-3-아민



[0541]

[0542]

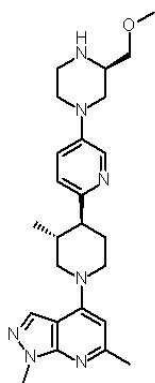
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-[(3*R*,4*R*)-4-메톡시피롤리딘-3-일]카르바메이트(CAS: 1932066-52-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 36**(28 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 436 (MH^+), 측정치 436 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.35 (s, 1H), 7.99 (d, J = 2.75 Hz, 1H), 7.73 – 7.67 (m, 1H), 7.67 – 7.60 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.71 – 4.63 (m, 1H), 4.61 – 4.53 (m, 1H), 4.24 – 4.15 (m, 1H), 4.09 (s, 3H), 4.00 (td, J = 3.2, 6.3 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 5.6, 11.1 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 6.3, 11.3 Hz, 1H), 3.62 – 3.54 (m, 2H), 3.50 – 3.43 (m, 4H), 3.29 – 3.22 (m, 1H), 3.01 (dt, J = 4.3, 11.4 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.28 – 2.02 (m, 3H), 0.90 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

[0543]

실시예 37

[0544]

4-[(3*R*,4*S*)-4-[5-[(3*R*)-3-(메톡시메틸)피페라진-1-일]-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



[0545]

[0546]

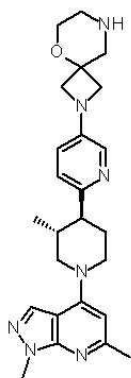
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 (2*R*)-2-(메톡시메틸)피페라진-1-카르복실레이트(CAS: 1023301-73-6, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 37**(5 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 450 (MH^+), 측정치 450 (MH^+). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.05 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.11 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 4.27 (br d, J = 13.0 Hz, 1H), 4.18 (br d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.55 (br t, J = 12.7 Hz, 2H), 3.46 – 3.34 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.17 – 3.09 (m, 3H), 3.01 – 2.92 (m, 1H), 2.88 – 2.72 (m, 2H), 2.62 – 2.47 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.09 – 1.98 (m, 1H), 1.86 – 1.75 (m, 2H), 0.69 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

[0547]

실시예 38

[0548]

2-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난



[0549]

[0550]

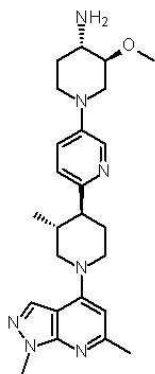
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 5-옥사-2,8-디아자스피로[3.5]노난-8-카르복실레이트 (CAS: 1251005-61-4, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 38**(11 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 448 (MH⁺), 측정치 448 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.07 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 2.8, 8.4 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.38 (br d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.29 (br d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.70 (br d, *J* = 7.8 Hz, 4H), 3.31 - 3.22 (m, 1H), 3.02 (s, 2H), 2.99 - 2.89 (m, 1H), 2.85 - 2.77 (m, 2H), 2.63 - 2.56 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.20 - 2.04 (m, 1H), 1.98 - 1.87 (m, 2H), 0.81 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H).

[0551]

실시예 39

[0552]

(3*S*,4*S*)-1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-메톡시-피페리딘-4-아민



[0553]

[0554]

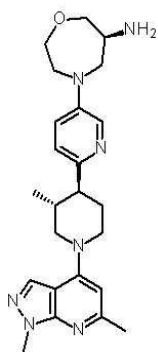
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-[(3*S*,4*S*)-3-메톡시-4-피페리딜]카르바메이트 (CAS: 907544-19-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 39**(19 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 450 (MH⁺), 측정치 450 (MH⁺). ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ = 8.37 - 8.36 (m, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.67 (br d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 4.61 - 4.52 (m, 1H), 4.35 (br dd, *J* = 12.2, 3.4 Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.98 (br d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.64 - 3.57 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.40 (td, *J* = 10.0, 4.4 Hz, 1H), 3.29 - 3.14 (m, 2H), 2.95 - 3.10 (m, 2H), 2.74 (dd, *J* = 12.2, 10.3 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.29 - 2.04 (m, 4H), 1.81 (qd, *J* = 12.6, 4.7 Hz, 1H), 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

[0555]

실시예 40

[0556]

(6*S*)-4-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-1,4-옥사제판-6-아민



[0557]

[0558]

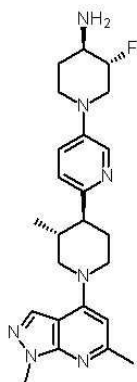
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-[(6*S*)-1,4-옥사제판-6-일]카르바메이트(CAS: 2306247-11-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 40**(70 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 436 (MH^+), 측정치 436 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.28 (s, 1H), 8.18 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 2.8, 9.2 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.60 (br d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.49 (br d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.10 - 3.97 (m, 5H), 3.95 - 3.88 (m, 1H), 3.84 - 3.78 (m, 2H), 3.77 - 3.68 (m, 3H), 3.64 - 3.47 (m, 2H), 3.27 - 3.21 (m, 1H), 3.01 (dt, J = 3.8, 11.5 Hz, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.25 - 2.14 (m, 1H), 2.14 - 2.07 (m, 1H), 2.06 - 1.94 (m, 1H), 0.85 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0559]

실시예 41

[0560]

(3*R*,4*R*)-1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딜]-3-피리딜]-3-플루오로-4-피페리딘-4-아민



[0561]

[0562]

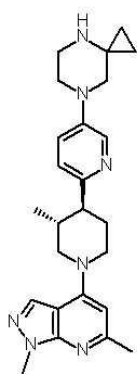
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-[(3*R*,4*R*)-3-플루오로피페리딘-4-일]카르바메이트(CAS: 1523530-29-1, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 41**(10 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 438 (MH^+), 측정치 438 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.09 - 8.03 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.30 (dd, J = 3.0, 8.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.38 - 4.21 (m, 2H), 4.18 - 4.13 (m, 1H), 3.94 - 3.82 (m, 4H), 3.55 (br dd, J = 1.3, 12.7 Hz, 1H), 3.24 - 3.19 (m, 2H), 3.18 - 3.09 (m, 1H), 2.92 - 2.78 (m, 2H), 2.77 - 2.66 (m, 2H), 2.49 (dt, J = 4.7, 11.1 Hz, 1H), 2.09 - 1.89 (m, 2H), 1.86 - 1.76 (m, 2H), 1.52 (br dd, J = 4.1, 12.4 Hz, 1H), 1.24 - 1.14 (m, 1H), 0.68 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0563]

실시예 42

[0564]

4-[(3*R*,4*S*)-4-[5-(4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-7-일)-2-피리딜]-3-메틸-1-피페리딜]-1,6-디메틸-피라졸로[3,4-*b*]피리딘



[0565]

[0566]

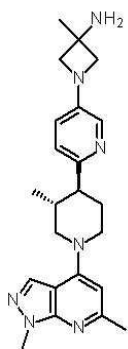
표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 4,7-디아자스피로[2.5]옥탄-4-카르복실레이트(CAS: 674792-08-6, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 42**(19 mg)를 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 432 (MH^+), 측정치 432 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) δ = 7.99 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.24 (dd, J = 2.9, 8.7 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.26 (br d, J = 13.1 Hz, 1H), 4.20 - 4.11 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.19 - 3.08 (m, 3H), 3.01 - 2.96 (m, 2H), 2.95 (s, 2H), 2.86 - 2.78 (m, 1H), 2.53 - 2.45 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.07 - 1.97 (m, 1H), 1.89 - 1.75 (m, 2H), 0.68 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.59 (br d, J = 8.4 Hz, 4H).

[0567]

실시예 43

[0568]

1-[6-[(3*R*,4*S*)-1-(1,6-디메틸피라졸로[3,4-*b*]피리딘-4-일)-3-메틸-4-피페리딘]-3-피리딘]-3-메틸-아세트딘-3-아민



[0569]

[0570]

표제 화합물을 화합물 **15a** 및 **중간체 E** 대신 *tert*-부틸 *N*-(3-메틸아세트딘-3-일)카르바메이트 히드로클로라이드 카르바메이트(CAS: 1408076-37-8, 판매 회사: PharmaBlock) 및 **중간체 D**를 사용하여 **실시예 15**의 제조와 유사하게 제조했다. **실시예 43**(33 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: 계산치 406 (MH^+), 측정치 406 (MH^+). ^1H NMR (500 MHz, 메탄올- d_4) δ = 8.24 (s, 1H), 7.83 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 2.9, 8.9 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 4.56 (br d, J = 13.6 Hz, 1H), 4.46 (br d, J = 12.7 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.03 - 3.95 (m, 5H), 3.48 (br t, J = 12.0 Hz, 1H), 3.19 - 3.11 (m, 1H), 2.91 (dt, J = 4.2, 11.5 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.19 - 1.90 (m, 3H), 1.60 (s, 3H), 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0571]

실시예 44

[0572]

다음 테스트는 HEK293-Blue-hTLR-7/8/9 세포 분석에서 화학식 (I) 및 (Ia)의 화합물의 활성을 결정하기 위해 수행되었다.

[0573]

HEK293-Blue-hTLR-7 세포 분석:

[0574]

안정한 HEK293-블루-hTLR-7 세포주를 인비보젠(InvivoGen, Cat.#: hkb-htlr7, San Diego, California, USA)으로부터 구입했다. 이러한 세포는 원래 NF- κ B의 활성화를 모니터링함으로써 인간 TLR7의 자극을 연구하기 위해 설계되었다. SEAP(분비된 배아 알칼리 포스파테이스) 리포터(reporter) 유전자는 5개의 NF- κ B 및 AP-1-결합 부위에 융합된 IFN- β 최소 프로모터의 제어하에 배치되었다. SEAP는 TLR7 리간드로 HEK-Blue hTLR7 세포를 자극

하여 NF- κ B 및 AP-1을 활성화하여 유도되었다. 따라서 리포터 발현은 20 시간의 인큐베이션 동안 R848(Resiquimod)과 같은 리간드의 자극하에 TLR7 길항제에 의해 감소되었다. 세포 배양 상청액 SEAP 리포터 활성은 640 nm의 파장에서, 알칼리성 포스파테이스의 존재에서 보라색 또는 파란색으로 변하는 검출 매체인 QUANTI-Blue™ 키트(Cat.#: rep-qbl, Invivogen, San Diego, Ca, USA)를 사용하여 결정되었다.

[0575] HEK293-Blue-hTLR7 세포를 4.5 g/L 글루코스, 50 U/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 100 mg/mL 노모신, 2 mM L-글루타민, 10% (v/v) 열-불활성화 소 태아 혈청을 포함하는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM)에서 상기 DMEM 중의 1%의 최종 DMSO 및 10 μ L의 20uM R848의 존재에서 연속 희석으로 20 μ L 테스트 화합물을 첨가하며 96-웰 플레이트에서 170 μ L의 부피로 250,000~450,000 세포/mL의 밀도에서 인큐베이션했고, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C하에 20 시간 동안 인큐베이션을 수행한다. 이후 각 웰의 20 μ L의 상청액을 180 μ L Quanti-blue 기질 용액과 함께 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션하고 분광광도계를 사용하여 620~655 nm에서 흡광도를 판독했다. TLR7 활성화가 다운스트림 NF- κ B 활성화로 이어지는 신호전달 경로가 널리 수용되었으므로, TLR7 길항제를 평가하기 위해 유사한 리포터 분석이 변경되었다.

[0576] **HEK293-Blue-hTLR-8 세포 분석:**

[0577] 안정한 HEK293-Blue-hTLR-8 세포주를 InvivoGen(Cat.#: hkb-htlr8, San Diego, California, USA)으로부터 구입했다. 이러한 세포는 원래 NF- κ B의 활성화를 모니터링함으로써 인간 TLR8의 자극을 연구하기 위해 설계되었다. SEAP(분비된 배아 알칼리 포스파테이스) 리포터(reporter) 유전자는 5개의 NF- κ B 및 AP-1-결합 부위에 융합된 IFN- β 최소 프로모터의 제어하에 배치되었다. SEAP는 TLR8 리간드로 HEK-Blue hTLR8 세포를 자극하여 NF- κ B 및 AP-1을 활성화하여 유도되었다. 따라서 리포터 발현은 20 시간의 인큐베이션 동안 R848과 같은 리간드의 자극하에 TLR8 길항제에 의해 감소되었다. 세포 배양 상청액 SEAP 리포터 활성은 640 nm의 파장에서, 알칼리성 포스파테이스의 존재에서 보라색 또는 파란색으로 변하는 검출 매체인 QUANTI-Blue™ 키트(Cat.#: rep-qbl, Invivogen, San Diego, Ca, USA)를 사용하여 결정되었다.

[0578] HEK293-Blue-hTLR8 세포를 4.5 g/L 글루코스, 50 U/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 100 mg/mL 노모신, 2 mM L-글루타민, 10% (v/v) 열-불활성화 소 태아 혈청을 포함하는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM)에서 상기 DMEM 중의 1%의 최종 DMSO 및 10 μ L의 60uM R848의 존재에서 연속 희석으로 20 μ L 테스트 화합물을 첨가하며 96-웰 플레이트에서 170 μ L의 부피로 250,000~450,000 세포/mL의 밀도에서 인큐베이션했고, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C하에 20 시간 동안 인큐베이션을 수행한다. 이후 각 웰의 20 μ L의 상청액을 180 μ L Quanti-blue 기질 용액과 함께 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션하고 분광광도계를 사용하여 620~655 nm에서 흡광도를 판독했다. TLR8 활성화가 다운스트림 NF- κ B 활성화로 이어지는 신호전달 경로가 널리 수용되었으므로, TLR8 길항제를 평가하기 위해 유사한 리포터 분석이 변경되었다.

[0579] **HEK293-Blue-hTLR-9 세포 분석:**

[0580] 안정한 HEK293-Blue-hTLR-9 세포주를 InvivoGen(Cat.#: hkb-htlr9, San Diego, California, USA)으로부터 구입했다. 이러한 세포는 원래 NF- κ B의 활성화를 모니터링함으로써 인간 TLR9의 자극을 연구하기 위해 설계되었다. SEAP(분비된 배아 알칼리 포스파테이스) 리포터(reporter) 유전자는 5개의 NF- κ B 및 AP-1-결합 부위에 융합된 IFN- β 최소 프로모터의 제어하에 배치되었다. SEAP는 TLR9 리간드로 HEK-Blue hTLR9 세포를 자극하여 NF- κ B 및 AP-1을 활성화하여 유도되었다. 따라서 리포터 발현은 20 시간의 인큐베이션 동안 ODN2006(Cat.#: tlr1-2006-1, Invivogen, San Diego, California, USA)과 같은 리간드의 자극하에 TLR9 길항제에 의해 감소되었다. 세포 배양 상청액 SEAP 리포터 활성은 640 nm의 파장에서, 알칼리성 포스파테이스의 존재에서 보라색 또는 파란색으로 변하는 검출 매체인 QUANTI-Blue™ 키트(Cat.#: rep-qbl, Invivogen, San Diego, California, USA)를 사용하여 결정되었다.

[0581] HEK293-Blue-hTLR9 세포를 4.5 g/L 글루코스, 50 U/mL 페니실린, 50 mg/mL 스트렙토마이신, 100 mg/mL 노모신, 2 mM L-글루타민, 10% (v/v) 열-불활성화 소 태아 혈청을 포함하는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM)에서 상기 DMEM 중의 1%의 최종 DMSO 및 10 μ L의 20uM ODN2006의 존재에서 연속 희석으로 20 μ L 테스트 화합물을 첨가하며 96-웰 플레이트에서 170 μ L의 부피로 250,000~450,000 세포/mL의 밀도에서 인큐베이션했고, CO₂ 인큐베이터에서 37 °C하에 20 시간 동안 인큐베이션을 수행한다. 이후 각 웰의 20 μ L의 상청액을 180 μ L Quanti-blue 기질 용액과 함께 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션하고 분광광도계를 사용하여 620~655 nm에서 흡광도를 판독했다. TLR9 활성화가 다운스트림 NF- κ B 활성화로 이어지는 신호전달 경로가 널리 수용되었으므로, TLR9 길항제를 평가하기 위해 유사한 리포터 분석이 변경되었다.

[0582] 화학식 (I) 또는 (Ia)의 화합물은 인간 TLR7 및 TLR8 억제 활성(IC_{50} 값) $<0.5 \mu M$ 을 갖는다. 더욱이, 일부 화합물은 또한 인간 TLR9 억제 활성 $<0.5 \mu M$ 을 갖는다. 본 발명의 화합물의 활성 데이터는 표 2에 나타났다.

[0583] 표 2. HEK293-Blue-hTLR-7/8/9 세포 분석에서 본 발명의 화합물의 활성

실시예 번호	HEK/hTLR7 IC_{50} (μM)	HEK/hTLR8 IC_{50} (μM)	HEK/hTLR9 IC_{50} (μM)
1	0.053	0.012	0.275
2	0.027	0.021	0.142
3	0.020	0.050	0.124
4	0.031	0.059	0.379
5	0.008	0.064	0.364
6	0.007	0.037	0.208
7	0.011	0.029	0.052
8	0.052	0.008	0.195
9	0.039	0.031	0.120
10	0.039	0.013	0.212
11	0.037	0.042	0.104
13	0.026	0.044	0.168
14	0.012	0.013	0.225
15	0.024	0.047	0.130
16	0.023	0.032	0.143
17	0.022	0.039	0.073
20	0.050	0.006	0.220
21	0.016	0.003	0.372
22	0.049	0.006	0.315
23	0.011	0.007	0.368
24	0.082	0.005	0.076
25	0.009	0.007	0.098
26	0.012	0.014	0.109
27	0.009	0.007	0.184
28	0.007	0.002	0.126
29	0.005	0.008	0.238
31	0.005	0.009	0.219
32	0.008	0.015	0.186
33	0.011	0.003	0.079
34	0.082	0.011	0.165
35	0.006	0.009	0.158
36	0.018	0.021	0.170
37	0.009	0.013	0.332
38	0.013	0.011	0.192
39	0.012	0.010	0.211
40	0.009	0.007	0.173
41	0.006	0.010	0.231
43	0.016	0.006	0.203

[0584]

[0585] 실시예 45

[0585]

[0586] hERG 채널 억제 분석:

[0586]

[0587] hERG 채널 억제 분석은 생체 내 심장 독성과 관련된 hERG 억제를 나타내는 화합물을 식별하는 매우 민감한 측정 방법이다. hERG K^+ 채널은 인간에서 복제되었고 CHO(중국 햄스터 난소) 세포주에서 안정적으로 발현되었다. CHO_{hERG} 세포를 패치-클램프(전압-클램프, 전체 세포) 실험에서 사용했다. 세포는 전압 패턴에 의해 자극되어 hERG 채널을 활성화하고 $I_{K_{hERG}}$ 전류(hERG 채널의 신속 지연 외향 정류기 포타슘 전류)를 전도했다. 세포가 몇 분 동안 안정화된 후, $I_{K_{hERG}}$ 의 진폭과 동역학이 0.1 Hz (6 bpm)의 자극 주파수에서 기록되었다. 그 후, 테스트 화합물을 증

[0587]

가하는 농도로 제제에 첨가했다. 각 농도에 대해 정상 상태 효과에 도달하기 위한 시도가 이루어졌으며, 일반적으로 두번째로 가장 높은 농도가 적용되는 3 내지 10분 이내에 달성되었다. I_{hERG} 의 진폭 및 동역학은 대조군 값 (100%로 간주)과 비교되는 약물의 각 농도로 기록된다. (참고문헌: Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. 2003; Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. Cardiovasc. Res. 58:32-45, Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. 2006; hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. Nature 440:463-469, Webster R, Leishman D, Walker D. 2002; Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de pointes. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 5:116-26).

[0588] hERG의 결과가 표 3에 주어진다. 안전성 비율(hERG IC_{20} / EC_{50}) > 30은 잠재적인 hERG 관련 심장독성으로부터 TLR7/8/9 경로를 억제함으로써 약리학을 구별할 수 있는 충분한 창을 제시한다. hERG 책임을 평가하기 위한 초기 선택성 지수 역할을 하는 아래의 hERG IC_{20} / TLR7/8/9 IC_{50} 의 계산에 따르면, 분명히 참조 화합물 ER-887258, ER-888285, ER-888286, R1 및 R2는 본 발명의 화합물에 비해 훨씬 더 좁은 안전성 창을 갖는다.

[0589] 표 3. hERG 및 안전성 비율 결과

실시에 번호	hERG IC_{20} (μ M)	hERG IC_{50} (μ M)	hERG IC_{20} / TLR7 IC_{50}	hERG IC_{20} / TLR8 IC_{50}	hERG IC_{20} / TLR9 IC_{50}
1	4.0	>10.0	75.5	333.3	14.5
2	>10.0	>20.0	>370.4	>476.2	>70.4
6	4.4	>10.0	628.6	118.9	21.2
7	5.1	>20.0	463.6	175.9	98.1
11	7.5	>20.0	202.7	178.6	72.1
12	7.0	>20.0	205.9	233.3	15.5
25	>10.0	>20.0	>1111.1	>1428.6	>102.0
26	>10.0	>20.0	>833.3	>714.3	>91.7
28	6.4	>20	914.3	3200.0	50.8
29	4.4	>10	880.0	550.0	18.5
30	4.9	>10.0	544.4	350.0	11.6
32	4.4	>10.0	550.0	293.3	23.7
33	4.1	>10.0	372.7	1366.7	51.9
35	4.4	>10.0	733.3	488.9	27.8
36	>10.0	>20.0	>555.6	>476.2	>58.8
37	>10.0	>20.0	>1111.1	>769.2	>30.1
38	5.2	>20.0	400.0	472.7	27.1
40	5.9	>20.0	655.6	842.9	34.1
43	>10.0	>20.0	>625.0	>1666.7	>49.3

[0590]
[0591] 실시예 46

[0592] 인간 PBMC 세포 기반 분석

[0593] HEK 리포터 세포주와 달리, 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 주로 림프구, 단핵구 및 수지상 세포로 구성된 혈액 내 일차 인간 면역 세포를 나타낸다. 이들 세포는 TLR7, TLR8 또는 TLR9를 발현하므로, 각각의 리간드 자극에 대한 자연적인 반응자이다. 이들 TLR이 활성화되면, PBMC는 시험관 내 및 생체 내에서 유사한 사이토카인 및 케모카인을 분비하므로, 인간 PBMC에서 TLR7/8/9 길항제의 시험관 내 효능은 생체 내 약력학적 반응으로 쉽게 변환 가능하다.

[0594] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 밀도 구배(Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare life Sciences)에 의해 서로 채취한 리튬-헤파린화(리튬 헤파린 플러스 혈액 수집 튜브, BD Vacutainer®) 건강한 기증자 전혈로부터 분리했다. 간단히 말하면, 50mL의 혈액을 다공성 장벽이 있는 50mL 코니칼 튜브(Leucosep tube, Greiner bio-one)에서 25mL PBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} 없음)로 희석하고, 여기에 회전 후 15.5mL Ficoll-Paque를 깔았다. 브레이크를 꺼

진 위치에 두고 튜브를 20 분 동안 $800 \times g$ (1946 rpm)에서 원심분리하고, PBMC를 백혈구연층으로부터 수집했다. 그다음 세포를 PBS에서 두 번 세척하고, 적혈구를 5-10 분 동안 실온에서 2mL(적혈구 용해 완충액, Alfa Aesar)에서 현탁에 의해 용해했다. PBS에서의 최종 세척 후, PBMC를 10% 소 태아 혈청(Sigma)이 보충된 GlutaMAXTM(Gibco)을 포함하는 RPMI-1640 배지에 2×10^6 세포/mL의 최종 농도로 재현탁하고 조직 배양 처리된 둥근 바닥 96-웰 플레이트(Corning Incorporated)에서 $150 \mu\text{L}/\text{웰}$ (3×10^5 세포/웰)을 플레이트팅했다.

100% DMSO에 용해되고 연속 희석된 길항제 화합물(본 발명의 화합물)을 세포에 이중으로 첨가하여 1%의 최종 농도 DMSO(v/v)를 얻었다. PBMC를 30 분 동안 37°C , 5% CO_2 에서 길항제 화합물과 함께 배양한 후 웰당 $48 \mu\text{L}$ 완전 배지에 다양한 TLR 작용제 시약을 다음과 같이 첨가했다 (최종 농도 표시): TLR9에 대해 $1 \mu\text{M}$ 의 CpG ODN 2216(InvivoGen), TLR8에 대해 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ORN 06/LyoVec(InvivoGen) 및 TLR7 및 TLR8에 대해 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 R848(InvivoGen). PBMC를 밤새 37°C 에서 5% CO_2 와 함께 인큐베이션했다. 세포 배양 상청액을 수집하고, 다양한 인간 사이토킨의 수준을 Luminex 분석(ProcartaPlexTM Multiplex Immunoassay, Invitrogen) 또는 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 ELISA 절차(eBioscience, ThermoFisher Scientific)에 의해 분석했다. 세포 생존율 분석(CellTiter Glo®Luminescent Cell Viability Assay, Promega)으로 세포의 생존율을 또한 확인했다.

표 4. hPBMC 결과

실시에 번호	hPBMC/TLR9 IC ₅₀ (nM)
2	470
6	617
7	420
14	340
21	848
25	320
26	330
27	380
28	520
29	710
30	780
31	410
32	320
33	146
35	870
40	540
43	470

실시에 47

인간 마이크로솜 안정성 분석

인간 마이크로솜 안정성 분석은 인간 간 마이크로솜에서 테스트 화합물의 대사 안정성의 초기 평가에 사용된다.

인간 간 마이크로솜(Cat.NO.: 452117, Corning, USA; Cat.NO.: H2610, Xenotech, USA)을 100 mM 포타슘 포스페이트 완충액, pH 7.4에서 테스트 화합물과 함께 10 분 동안 37°C 에서 사전 인큐베이션했다. NADPH 재생 시스템을 추가하여 반응이 시작되었다. 최종 인큐베이션 혼합물은 100 mM 포타슘 포스페이트 완충액, pH 7.4에서 $1 \mu\text{M}$ 테스트 화합물, 0.5 mg/mL 간 마이크로솜 단백질, 1 mM MgCl_2 , 1 mM NADP, 1 유닛/mL 이소시트르산 탈수소효소 및 6 mM 이소시트르산을 포함했다. 37°C 에서 0, 3, 6, 9, 15 및 30 분의 인큐베이션 시간 후, $300 \mu\text{L}$ 의 차가운 아세토니트릴(내부 표준 포함)을 $100 \mu\text{L}$ 인큐베이션 혼합물에 첨가하여 반응을 종료했다. 침전 및 원심분리 후, 샘플에 남아 있는 화합물의 양을 LC-MS/MS로 측정했다. 0 분 및 30 분에 NADPH 재생 시스템이 없는 대조군을 또한 제조하고 분석했다. 본 발명의 화합물은 상기 분석에서 결정된 우수한 인간 간 마이크로솜 안정성을 나타냈고, 결과는 아래 표 5에 나타난다.

[0602] 표 5. 본 발명의 화합물의 인간 간 마이크로솜 안정성

실시에 번호	인간 마이크로솜의 제거율 (mL/분/kg)
N8	16.3
N79	18.2
2	8.2
3	9.3
5	9.1
6	9.3
7	6.2
12	9.7
13	7.2
14	6.7
19	6.2
20	9.0
21	7.8
27	9.1
28	6.2
29	6.8
32	8.8
33	6.2
34	9.8
35	6.2
37	6.2
38	7.8
39	6.7
40	8.1
41	7.2
43	6.5

[0603]

[0604] 실시예 48

[0605] 3T3 시험관내 광독성 분석

[0606] 광독성은 특정 화학물질에 대한 최초 노출 및 빛에 대한 후속 노출 후 유발되거나, 화학 물질의 전신 투여 후 피부 조사에 의해 유사하게 유발되는 독성 반응으로 정의된다. 이 연수에서 사용된 분석은 Balb/c 3T3 마우스 섬유모세포를 사용한 간단한 시험관내 세포독성 분석을 사용하여 화학물질의 광독성 가능성을 검출하도록 설계된다. 이 테스트의 원리는 UVA-광의 비독성 조사량에 노출되거나 노출되지 않고 테스트될 때 화학물질의 세포독성의 비교이다. 세포독성은 처리 1 일 후 생체 염료인 뉴트럴 레드(NR)의 흡수에 의해 결정되는 세포 성장 속도의 용량 의존적 감소로 표현된다.

[0607] 1. 방법

[0608] 원액의 제조 및 테스트 항목의 투여량

[0609] 소량의 물질을 칭량하고 세포의 노출 시작 직전에 DMSO에서 새로 제제화했다. 이 원액 또는 DMSO와의 적절한 희석액을 세포 현탁액에 첨가하여 필요한 최종 농도를 얻었다. 모든 용액은 일반적으로 Eppendorf 캡에서 제조되었고 사용 후 폐기되었다.

[0610] 기준 물질

[0611] 클로르프로마진(HCL)(Sigma, Batch/Lot No.: 120M1328V), 테스트 농도: 300 μ g/mL, 용매: PBS / 3% DMSO

[0612] UV 흡수 스펙트럼의 측정

[0613] 그대로 또는 UV-A 또는 UV-B 사전 조사한 흡수 스펙트럼은 Lambda-2 스펙트럼 광도계(Perkin Elmer)로 240 nm 내지 400 nm에서 기록되었다.

UV 방사선원:	UV-A에 대해:	필터 H1을 갖춘 Sol 500	
		주 스펙트럼:	315-690 nm
		방사조도:	약 1.67 mW/cm ²
		방사선량:	약 5 J/cm ²
UV-B에 대해:	Philips TL 20W/12		
		주 스펙트럼:	290-320 nm
		방사조도:	약 0.083 mW/cm ²
		방사선량:	약 0.05 J/cm ²

[0615] 광독성의 결정

[0614] 이 연구를 위해 INVITTOX 프로토콜 No 78(독성학의 시험관내 기술의 ERGATT/FRAME 데이터 뱅크. INVITTOX PROTOCOL No 78. 3T3 NRU 광독성 분석. 1994년 3월)에 따라 변경된 Borenfreund 및 Puerner의 뉴트럴 레드 흡수(Neutral Red uptake, NRU) 분석(Borenfreund, E, Puerner JA. 독성은 형태학적 변경 및 뉴트럴 레드 흡수에 의해 시험관내 결정됨. Toxicology Lett. 1985; 24:119-124.)이 테스트 항목의 가능한 광독성 가능성을 조사하기 위해 조정되었다. 이 분석은 배양된 쥐 섬유모세포의 리소솜으로의 뉴트럴 레드 염료의 활성 흡수에 기반한다. 리소솜 막은 많은 광독성 화합물의 작용 부위로 알려져 있기 때문에, 이 분석은 광독성 손상 가능성의 측정치를 제공할 수 있다.

[0617] 세포 배양 준비

[0618] 쥐 섬유모세포 클론 A 31(ATCC no. CCL 163 - 계대 번호 108)을 37°C에서 6% CO₂의 가습 분위기에서 sDMEM(10% 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 units/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 보충된 돌베코 최소 필수 배지)이 들어 있는 175 cm² 조직 배양 등급 플라스크에서 배양했다. 세포가 컨플루언스(confluence)에 접근하기 전에 세포는 트립신화에 의해 플라스크로부터 제거되었다. 분석에서 사용하기 전에, 세포를 100 µl 부피의 sDMEM에서 1x 10⁴ 세포/웰의 농도로 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 옮기고 24 시간 동안 부착되도록 했다.

[0619] 테스트 항목에 대한 노출

[0620] 쥐 섬유모세포와 함께 인큐베이션하기 위해, 테스트 항목을 PBS / 3% DMSO에 희석했다 (자세한 농도는 결과 참조).

[0621] 배양 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), GlutaMAX(Gibco Ref 21885-025), 10% 소 태아 혈청(FBS)(Gibco Ref 10270-106), 100IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Gibco Ref 15140-122))을 웰로부터 제거하고 쥐 섬유모세포를 PBS로 세척했다. 그 후 테스트 항목을 포함하는 100 µL의 PBS / 3% DMSO를 첨가하고 표적 세포를 1 시간 동안 37°C에서 6% CO₂와 함께 인큐베이션했다.

[0622] UV 노출

[0623] 각 테스트 항목에 대해 마이크로타이터 플레이트가 표 6에 따라 준비되었다. "UVA 플레이트"는 약 5 J/cm² UVA 광에 노출되었고, "다크 플레이트"는 암실에 보관되었고 세포독성 대조군 역할을 했다. 클로르프로마진 히드로클로라이드를 포함한 플레이트는 양성 대조군 역할을 했다. UV 플럭스는 UV-미터(Dr. Groebel RM21)를 사용한 측정치였다.

[0624] UV 조사 후, 테스트 항목을 웰로부터 제거하고(PBS를 사용한 1회 세척 단계) sDMEM으로 교체했다. 그다음 표적 세포를 밤새 37°C에서 6% CO₂ 중에서 인큐베이션했다.

표 6. 96-웰 마이크로타이터 플레이트 셋업

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	U01	U02	U03	U04	U05	U06	U07	U08	S2	S1
B	S1	S2									S2	S1
C	S1	S2									S2	S1
D	S1	S2									S2	S1
E	S1	S2									S2	S1
F	S1	S2									S2	S1
G	S1	S2									S2	S1
H	S1	S2									S2	S1

96-웰 마이크로타이터 플레이트가 다음과 같이 준비되었다:

각 플레이트는 표준 세포 생존율 곡선의 계산을 위해 뉴트럴 레드 용액과 함께 인큐베이션되지 않거나 (0% 표준 - S1) 뉴트럴 레드로 염색된 (100% 표준 -S2) 테스트 항목이 없이 세포 및 용매가 있는 웰을 포함했다. U01-U08로 표시된 웰은 상이한 테스트 항목 농도를 포함했다.

뉴트럴 레드 흡수

사용할 준비가 된 뉴트럴 레드(NR) 염색 용액은 다음과 같이 새로 제조되었다:

- 0.4% 수성 원액을 빛으로부터 차단하고 사용 전에 여과하여 NR 결정을 제거했다.
- 그다음 원액의 1:40 희석액을 sDMEM에서 제조하고 세포에 첨가했다.

인큐베이션 후 분석될 웰을 뉴트럴 레드를 함유하는 100 μ L의 sDMEM으로 채웠다. 표적 세포를 NR과 함께 3 시간 동안 37°C에서 6% CO₂ 중에서 인큐베이션했다.

뉴트럴 레드 흡수의 측정

혼입되지 않은 뉴트럴 레드를 표적 세포에서 제거하고 웰을 적어도 100 μ L의 PBS로 세척했다. 그다음 150 μ L의 뉴트럴 레드 탈착 용액(이중증류수(aqua bidest) 중 1% 빙초산, 50% 에탄올)을 첨가하여 혼입된 염료를 정량적으로 추출했다. 뉴트럴 레드가 세포로부터 추출되고 균일 용액이 형성될 때까지 마이크로타이터 플레이트 진탕기에서 플레이트의 적어도 10 분의 격렬한 진탕 후, 생성된 착색 용액의 흡수를 540 nm에서 SPECTRAmax PLUS 마이크로타이터 플레이트 리더(Molecular Devices)로 측정했다.

세포 생존율의 계산

세포 생존율을 SOFTmax Pro 소프트웨어 패키지(Molecular Devices)로 계산했다. 먼저 2점 표준 곡선(0% 및 100% 생존율)을 다음 공식에 기반하여 프로그램의 선형 곡선 맞춤 옵션으로 계산했다:

$$Y = A + (B \times X)$$

(A = 선의 y-절편; B = 선의 기울기;

0% 세포 생존율 = 용매가 있지만, 테스트 항목 및 뉴트럴 레드가 없는 세포;

100% 세포 생존율 = 용매 및 뉴트럴 레드가 있지만, 테스트 항목이 없는 세포)

이를 통해 증가하는 농도의 테스트 화학물질과 함께 인큐베이션된 세포의 생존율을 계산했다. 클로르프로마진(HCl)이 실험에서 양성 대조군 역할을 했다.

IC₅₀ 값의 계산

모든 계산은 SOFTmax Pro 분석 소프트웨어 패키지를 사용하여 수행되었다

[0645] (Molecular Devices - for details see: http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/SoftMax_Pro_User_Guide.pdf)

[0646] **광독성에 대한 판별 인자 계산**

[0647] 광독성 가능성을 평가하기 위해, UV 노출 유무에 따라 결정된 IC₅₀ 값을 비교했다.

[0648] 인자 = IC₅₀ (-UV) / IC₅₀ (+UV)

[0649] 광독성 테스트 화학물질과 비광독성 테스트 화학물질 사이의 구별을 위해 >5의 컷오프 인자가 적용되었다 (Liebsch M, Spielmann H, Balls M, Brand M, Doering B, Dupuis J, Holzhueter HG, Klecak G, L.Eplattenier H, Lovell W, Maurer T, Moldenhauer F, Moore L, Pape W, Pfannenbecker U, Potthast JM, De Silva O, Steiling W, Willshaw A. First results of the EC/COLIPA Validation Project. In Vitro Phototoxicity Testing. In: In Vitro Skin Toxicology: Irritation, Phototoxicity, Sensitization; Vol. 10. Alternative Methods in Toxicology, -Eds. Rougier A, Maibach HI, Goldberg AM; Mary Ann Liebert Publ.: New York, USA 1994, pp. 243-251).

[0650] 테스트된 최고 농도에서도 쥐 섬유모세포에 세포독성이 아니지만, UV 노출 후 세포 생존율의 강한 용량 의존성 감소를 나타내는 테스트 항목도 광독성으로 간주된다 (Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape W, Pechovitch G, Silva DeO, Holzhuetter, HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lowell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast JM, Csato M, Sladowski D, Steiling W, Brantom P. The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: Results of phase II (blind trial). Part 1: The 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology in Vitro 1998, 12: 305-327).

[0651] 테스트 결과는 아래에 나타나고, 본 발명의 화합물은 매우 우수한 광독성 프로파일을 나타냈다.

[0652] **표 7. 본 발명의 화합물에 대한 3T3 테스트 결과**

실시에 번호	광독성 인자	IC ₅₀ (UV-A) (μg/mL)
28	1	>120
40	1	>120

[0654] **실시에 49**

[0655] **배아 줄기 세포 테스트**

[0656] 시험관내 마우스 배아 줄기 세포 테스트(mEST) 분석은 Roche에서 시행하는 일상적인 분석이다. 원래 EST는 마우스 129 균주로부터 유래한 배반포 유래 영구 배아 마우스 ESC(mESC) D3 세포주를 기반으로, 배아독성의 스크리닝을 위한 시험관내 모델로서 1997년에 Horst Spielmann 및 그의 그룹에 의해 개발되었고, 유럽 동물대체시험법 검증센터(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)에 의해 검증되었다.

[0657] 본 발명자들은 분석법을 약제학적 화합물에 적용할 수 있도록 접근법을 더욱 최적화하고 수정했다.

[0658] **생물학적 평가변수 및 평가변수 측정:**

[0659] 물질 처리 10 일 후의, 분화된 세포를 나타내는 3T3 섬유모세포의 세포독성(성장 억제) 및 미분화 배아 줄기 세포(D3)의 세포독성은 두 가지 분석 평가변수 역할을 한다. 이는 황색 가용성 기질 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드(MTT)를 세포 내에 격리되는 어두운 청색 불용성 포르마잔 생성물로 전환시키는, 살아 있는 세포의 온전한 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소의 사용에 의해 결정되고, 세포막을 가용화한 후 흡광도 관독기(570nm)를 사용하여 정량적으로 검출된다.

[0660] 세 번째 평가변수는 10 일의 처리 후 심장 근육 세포인 심근으로의 ES 세포의 분화 억제이다. 이 세포의 박동은 현미경으로 평가된다.

[0661] **물질 및 시약**

[0662] mESC 세포: ES-D3 [D3] (ATCC® CRL-1934™)

[0663] 마우스 섬유모세포: BALB/3T3 클론 A31(ATCC® CCL-163™)

[0664] Balb/c 3T3 세포 클론 A31: American Type Culture Collection (ATCC) Cat No CCL-163

- [0665] ES-D3 (D3): American Type Culture Collection (ATCC) Cat No CRL-1934
- [0666] m-LIF: Sigma, Cat No L5158-5UG
- [0667] NEAA (100x): Gibco, Cat No 11140-035
- [0668] 트리판 블루 0.04%: Gibco, Cat No T10282
- [0669] MTT: Tocris Bioscience, Cat No 5224/500
- [0670] 5-플루오로우라실: Sigma, Cat No F-6627-5G
- [0671] 페니실린/스트렙토마이신: Gibco, Cat No 15140-122
- [0672] PBS (-CaCl₂/-MgCl₂): Gibco, Cat No 14190-094
- [0673] FCS: Hyclone, Cat No SH30070.03
- [0674] 글루코스, 글루타민, NaHCO₃를 포함하는 DMEM: Gibco, Cat No 41966-029
- [0675] 방법
- [0676] 제조
- [0677] 배지 및 평가변수 분석 용액
- [0678] 배양 배지:
- | 3T3 | D3 |
|------------------|------------------|
| 10% FCS | 20% FCS |
| 4 mM 글루타민 | 2 mM 글루타민 |
| 50 U/ml 페니실린 | 50 U/ml 페니실린 |
| 50 µg/ml 스트렙토마이신 | 50 µg/ml 스트렙토마이신 |
| | 1% NAA |
| | 0.1 mM β-ME |
| | 1000 U/ml m-LIF |
| | (계대배양에만 별도로 첨가됨) |
- [0679]
- [0680] 분석 배지:
- | 3T3 | D3 |
|------------------|------------------|
| 10% FCS | 20% FCS |
| 4 mM 글루타민 | 2 mM 글루타민 |
| 50 U/ml 페니실린 | 50 U/ml 페니실린 |
| 50 µg/ml 스트렙토마이신 | 50 µg/ml 스트렙토마이신 |
| | 1% NAA |
| | 0.1 mM β-ME |
- [0681]
- [0682] 세포 냉동용 배지:
- | 3T3 | D3 |
|------------------|------------------|
| 20% FCS | 40% FCS |
| 4 mM 글루타민 | 2 mM 글루타민 |
| 50 U/ml 페니실린 | 50 U/ml 페니실린 |
| 50 µg/ml 스트렙토마이신 | 50 µg/ml 스트렙토마이신 |
| | 1% NAA |
| | 0.1 mM β-ME |
| 7 % DMSO | 7 % DMSO |
- [0683]
- [0684] β-메르캅토에탄올(β-ME) (10 mM)
- [0685] 17.5 µL β-ME를 25 mL의 PBS에 첨가한다
- [0686] 4℃에서 최대 1 주 동안 보관한다

- [0687] FCS
- [0688] FCS를 수조(37℃)에서 한 번 해동하고 100mL, 50 mL 및 25mL의 분취량을 제조한다.
- [0689] 여러 번 해동을 피한다
- [0690] -20℃에서 보관한다
- [0691] MTT-용액
- [0692] 5mg MTT/ml PBS
- [0693] Millipore의 멸균 필터를 사용하고 8mL 및 4 mL의 분취량을 제조한다
- [0694] -20℃에서 보관한다
- [0695] MTT-탈착-용액
- [0696] 20% SDS를 물/DMF, 1:1에 용해하고, 아세트산으로 pH를 4.5로 조정한다
- [0697] 테스트 화합물
- [0698] 원액: 200 mM
- [0699] 용매: 100% DMSO
- [0700] **분화 분석**
- [0701] **0일차**
- [0702] 1) D3 세포에 대해 트립신 0.05% EDTA를 사용한 세포 계대.
- [0703] 2) 세포 현탁액의 어셈블리: 50 mL Falcon 튜브에서 (각 테스트에 대해) 18 ml 배지로 세포를 2.5×10^4 / mL로 희석한다.
- [0704] 3) 페트리 접시(PD) 준비: 5-10 mL 멸균 Dulbecco's PBS(Gibco)를 각 접시 바닥에 첨가하고, 전체 접시에 분배한다.
- [0705] 4) Eppendorf 튜브에서 일련의 테스트 화합물 희석: 5 μL의 화합물(1:400 희석) 및 5 μL 대조군 용액(DMSO)을 2 mL 세포 현탁액에 첨가하고, 볼텍싱한다.
- [0706] 5) 페트리 접시에 매달린 방울의 준비: 튜브를 볼텍싱하고, 현탁액을 자동 피펫으로 흡입하고 20 μl 방울을 페트리 접시의 뚜껑에 다중 분배하고, 총 2 ml을 방울의 동심원(~ 100 방울)에 첨가하고; 빠르지만 부드럽게 덮개를 짓히고 PD에 두고; 3 일 동안 37℃ / 5% CO₂에서 인큐베이션한다.
- [0707] **3일차**
- [0708] 1) 14 mL PP 튜브에서 일련의 화합물 희석
- [0709] 농축에 대한 6 개의 튜브; 5 mL 분석 배지로 채운다
- [0710] DMSO(용매 대조군)에 대한 1 개의 튜브를 5 mL 분석 배지로 채운다
- [0711] 2) Eppendorf 튜브에서 일련의 화합물 희석
- [0712] 12.5 μL의 화합물(1:400 희석) 및 12.5 μL 대조군 용액을 첨가하고, 볼텍싱한다
- [0713] 3) 박테리아 페트리 접시에 배아체를 옮긴다
- [0714] PD 뚜껑을 조심스럽게 돌리고, 곰팡이 오염에 대해 방울을 확인한다
- [0715] 5 mL의 제조된 용액으로 방울을 여러 번 행군다
- [0716] 박테리아 페트리 접시에 옮긴다
- [0717] 3 일 동안 37 °C / 5% CO₂에서 인큐베이션한다

[0718] **5일차**

- [0719] 1) 50 mL 튜브에서 일련의 화합물 희석
- [0720] 농축에 대한 6 개의 튜브; 25 mL 분석 배지로 채운다
- [0721] DMSO(용매 대조군)에 대한 1 개의 튜브를 25 mL 배지로 채운다
- [0722] 2) 1.5 mL 튜브에서 일련의 화합물 희석
- [0723] 62.5 μ L의 화합물(1:400 희석) 및 대조군 용액(DMSO)을 첨가하고, 볼텍싱한다
- [0724] 3) 96 웰 플레이트의 준비
- [0725] 각 화합물에 대해 2 개의 플레이트, 화합물-플레이트-레이아웃 참조
- [0726] 220 μ L 배지/화합물/용매 혼합물을 모든 96 웰에 첨가한다
- [0727] 낮은 농도로 시작한다
- [0728] 4) 배아체의 피펫팅
- [0729] 페트리 접시에서 배아체를 시각적으로 제어한다
- [0730] 25 μ L 팁을 사용하여, 각 웰에 하나의 배아체를 피펫팅한다
- [0731] 적어도 하나의 배아체가 각 웰에 존재하는지 보장하기 위해 플레이트를 시각적으로 확인한다
- [0732] 3 일 동안 37°C / 5% CO₂에서 인큐베이션한다

[0733] **10일차**

- [0734] 박동 심근 세포에 대해 각 웰을 현미경으로 시각화했다
- [0735] 분석 배지 및 DMSO 대조군은 박동 심근 세포의 적어도 80%(허용 기준 참조)를 나타내야 한다

[0736] **세포독성 분석**

- [0737] 모든 물질에 대해 농도가 0.2 mol/L인 원액이 생성된다. 테스트 물질을 DMSO 용액에 희석한다.

[0738] **0일차**

- [0739] 1) D3 및 3T3 세포주에 대한 세포 현탁액을 생성한다
- [0740] 2) 3T3에 대해 2.5×10^4 세포/mL, 1D3 세포에 대해 1.5×10^4 세포/mL
- [0741] 3) 96-웰 다중 웰 플레이트의 외부 웰에 200 μ L 배지를 피펫팅한다 (블랭크)
- [0742] 4) 96-웰 다중 웰 플레이트의 나머지 내부 웰에 50 μ L 세포 현탁액을 첨가한다 (샘플)
- [0743] 5) 2 시간 동안 37°C / 5% CO₂에서 인큐베이션하여 세포가 부착되도록 한다
- [0744] 6) 테스트 물질 또는 DMSO 대조군을 피펫팅하여 5 mL 튜브에서 2 mL 배지 및 6.67 μ L 테스트 물질의 농도를 생성한다
- [0745] 7) 150 μ L/웰의 용액을 샘플 웰에 첨가한다 (총 200 μ L/웰)
- [0746] 8) 3 일 동안 37°C / 5% CO₂에서 인큐베이션한다

[0747] **3, 5 및 7일차**

- [0748] 1) mL 튜브에서 5 μ L의 테스트 물질(또는 DMSO 대조군)(1:400)을 첨가하여 2 mL의 배지(3T3 또는 D3 세포 배지)를 희석한다
- [0749] 2) 바닥에 있는 세포층을 손상시키지 않고 진공 펌프로 배지를 제거한다
- [0750] 3) 200 μ L의 희석된 테스트 물질(및 DMSO 대조군)을 적절한 샘플 웰에 첨가한다

- [0751] 인큐베이션:
- [0752] 3일차: 37℃/ 5% CO₂에서 2 일
- [0753] 5일차: 37℃/ 5% CO₂에서 2 일
- [0754] 7일차: 37℃/ 5% CO₂에서 3 일
- [0755] 10일차
- [0756] 광학 현미경으로 세포 변화, 물질 침전 또는 기타 다른 효과를 시각적으로 예비로 관찰한다
- [0757] MTT-측정:
- [0758] 1) 4 mL MTT를 40 mL DMEM에 첨가하고 37℃까지 가온하여 최종 MTT 용액을 생성한다
- [0759] 2) 배지를 조심스럽게 폐기하여 96-웰 플레이트로부터 배지를 제거한다
- [0760] 3) 200 μ L의 MTT 용액을 다중벽 피펫을 사용하여 각 웰에 첨가한다
- [0761] 4) 플레이트를 3 시간 동안 37℃/ 5% CO₂에서 인큐베이션한다
- [0762] 5) MTT-탈착 용액을 37℃로 가온한다
- [0763] 6) MTT-용액을 조심스럽게 제거한다
- [0764] 7) 130 μ L의 MTT-탈착 용액을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 30 분 동안 37℃에서 인큐베이터에서 인큐베이션한 다음, 플레이트를 적어도 2-3 시간 동안 플레이트 진탕기에 놓는다
- [0765] 8) 570 nm에서 플레이트 리더에서 흡수를 측정한다
- [0766] 허용 기준
- [0767] 분화 평가변수: 유효한 분석의 허용에 필요한 전체 분석에서 박동 심근세포의 적어도 80%
- [0768] 세포독성 평가변수
- [0769] DMSO 대조군 및 POS 대조군의 허용 가능한 범위 및 D3(약 1.8 - 2.2) 및 3T3(0.8 - 1.0)의 OD 값의 결정은 이들의 적절한 범위에 있어야 한다.
- [0770] 데이터 분석
- [0771] 분화 평가변수:
- [0772] 박동 심근세포의 총 수 결정 (웰당 적어도 하나의 박동 심근세포 = 하나의 양성 계수, 웰당 박동 심근세포 없음 = 음성 계수), 양성 DMSO 대조군에 대해 정규화
- [0773] 세포독성 평가변수
- [0774] 블랭크의 OD 570의 평균값의 결정 (값은 플라스틱 재료에 대한 염료의 접착 및 배지의 잔류량을 나타낸다). 샘플 값으로부터 이 값을 차감하고 수정된 값으로 계속 계산한다.
- [0775] 처리된 샘플 웰의 OD 570의 평균값 결정. 용매 대조군 웰의 OD 570의 평균 값의 측정은 100%로 설정된다. 생존율은 DMSO 용매 대조군에 대해 정규화된 %로 계산된다.
- [0776] 예측 모델
- [0777] 마이크로플레이트 리더에 의해 생성된 광학 밀도(OD570)의 데이터 파일을 EXCEL 스프레드시트에 복사했다. 평균 OD 값, 표준 편차 및 생존율이 자동으로 계산되었다. 분석으로부터 다음 평가변수가 스프레드시트의 농도-반응 곡선으로부터 그래픽으로 계산될 수 있다:
- [0778] IC50 D3 - 50%의 D3 세포가 사멸되는 테스트 물질의 농도
- [0779] IC50 3T3 - 50%의 3T3 세포가 사멸되는 테스트 물질의 농도.
- [0780] ID50 D3 - D3 세포의 수축성 심근세포로의 분화가 50% 감소되는 테스트 물질의 농도.

[0781] 세포독성 분석의 D3 및 3T3 세포의 IC50 값 및 D3 분화 분석의 ID50이 Scholz et al. 1999a에 의해 사용된 수정된 예측 모델로부터 개발된 통계 평가에 입력되었다:

$$D12_3 = \frac{\lg IC50\ D3 + \lg IC50\ 3T3}{2} - \lg ID50$$

[0782] $D12_3 < 0.5$ 는 "음성"을 의미한다

[0784] $D12_3 > 0.6$ 은 "양성"을 의미한다

[0785] 0.5 내지 0.6의 예측 점수는 경계선 결과로 표시된다.

[0786] 예를 들어 용해도가 IC50 또는 ID50 값이 하나 이상의 용량 반응 곡선에 대해 결정될 수 없을 정도로 테스트된 용량 범위를 제한하는 경우 결정적이지 않은 결과도 가능하다 (Withlow et al. 2007)

[0787] **표 8. 본 발명의 화합물에 대한 mEST 결과**

실시예 번호	예측 점수 D12_3
28	0.44
40	0.36

[0789] **실시예 50**

[0790] **수컷 위스터-한 래트를 대상으로 단일 용량 약동학(PK) 연구**

[0791] 선택된 화합물의 약동학적 특성은 수컷 위스터-한 래트(판매 회사: Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd)를 대상으로 단일 투여 PK 연구에 의해 평가되었다. 간략하게, 두 그룹의 동물에게 각 화합물의 단일 용량을 2 mg/kg의 정맥내로(IV, 볼루스) 또는 10 mg/kg의 경구로(PO, 위관 영양법) 투여했다. 혈액 샘플(약 150 μ L)을 투여 후 5 분(IV의 경우에만), 15 분, 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 7 시간 및 24 시간 에 정맥을 통해 수집했다. 혈액 샘플을 EDTA-K2 항응고제가 들어 있는 튜브에 넣고 3000 rpm에서 15 분 동안 4°C에서 원심분리하여 샘플에서 혈장을 분리했다. 원심분리 후, 생성된 혈장을 LC/MS/MS를 사용한 생분석을 위해 깨끗한 튜브로 옮겼다. 약동학적 파라미터는 비구획 분석을 사용하여 계산되었다. 분포 용적(Vss), 반감기 ($T_{1/2}$) 및 제거율(CL)은 IV 투여 후 혈장 농도-시간 곡선을 기반으로 얻어졌다. 최고 농도(C_{max})는 PO 투여 후 실험 관찰로부터 직접 기록되었다. 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적(AUC_{0-last})은 최종 검출 가능 농도까지 선형 사다리꼴 법칙을 사용하여 계산되었다. 생체이용률(F)은 IV 및 PO 투여 후 용량 정규화된 AUC_{0-last} 를 기준으로 계산되었다.

[0792] 약물의 Vss는 약물이 혈장이 아닌 신체 조직에 분포되는 정도를 나타낸다. Vss는 조직에 분포되는 약물의 양에 정비례한다. 더 높은 Vss는 더 많은 조직 분포의 양을 나타낸다.

[0793] IV 및 PO 투여 후 PK 파라미터의 결과는 표 9에 주어진다.

[0794] **표 9. 본 발명의 화합물에 대한 PK 파라미터**

실시예 번호	PO C_{max} (ng/mL)	PO AUC_{0-last} (h*ng/mL)	IV AUC_{0-last} (h*ng/mL)	CL (mL/분/kg)	Vss (L/kg)	$T_{1/2}$ (h)	F (%)
7	465	7514	1516	16	16.8	14.7	100
26	620	9260	2197	10.3	12.5	15.7	84.3
28	122	1800	974	30.2	16.7	8.84	37
40	216	2837	1062	32.8	13.2	7.26	53.4