(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0004512
(43) 공개일자 2023년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 403/14 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 17/04* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
(52) CPC특허분류
C07D 403/14 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7036308
(22) 출원일자(국제) 2021년04월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월19일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2021/050971
(87) 국제공개번호 WO 2021/214469
국제공개일자 2021년10월28일
(30) 우선권주장
2005858.2 2020년04월22일 영국(GB)

(71) 출원인
헵테얼즈 테라퓨틱스 리미티드
영국 씨비21 6디지, 캠브리지쉬어, 캠브리지, 그레이트 아빙돈, 그란타 파크
(72) 발명자
콘그리브 마일즈 스튜어트
영국 씨비21 6디지, 캠브리지쉬어, 캠브리지, 그레이트 아빙돈, 그란타 파크, 헵테얼즈 테라퓨틱스 리미티드 내
필드하우스 샬롯
영국 씨비21 6디지, 캠브리지쉬어, 캠브리지, 그레이트 아빙돈, 그란타 파크, 헵테얼즈 테라퓨틱스 리미티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **H4 길항제 화합물**

(57) 요 약

본원의 개시내용은 신규 화합물, 히스타민 H4 수용체 길항제로서의 그의 용도 및 H4 수용체와 관련된 장애을 치료, 예방, 개선, 제어 또는 위험을 감소시킴에 있어서의 그의 용도에 관한 것이다.

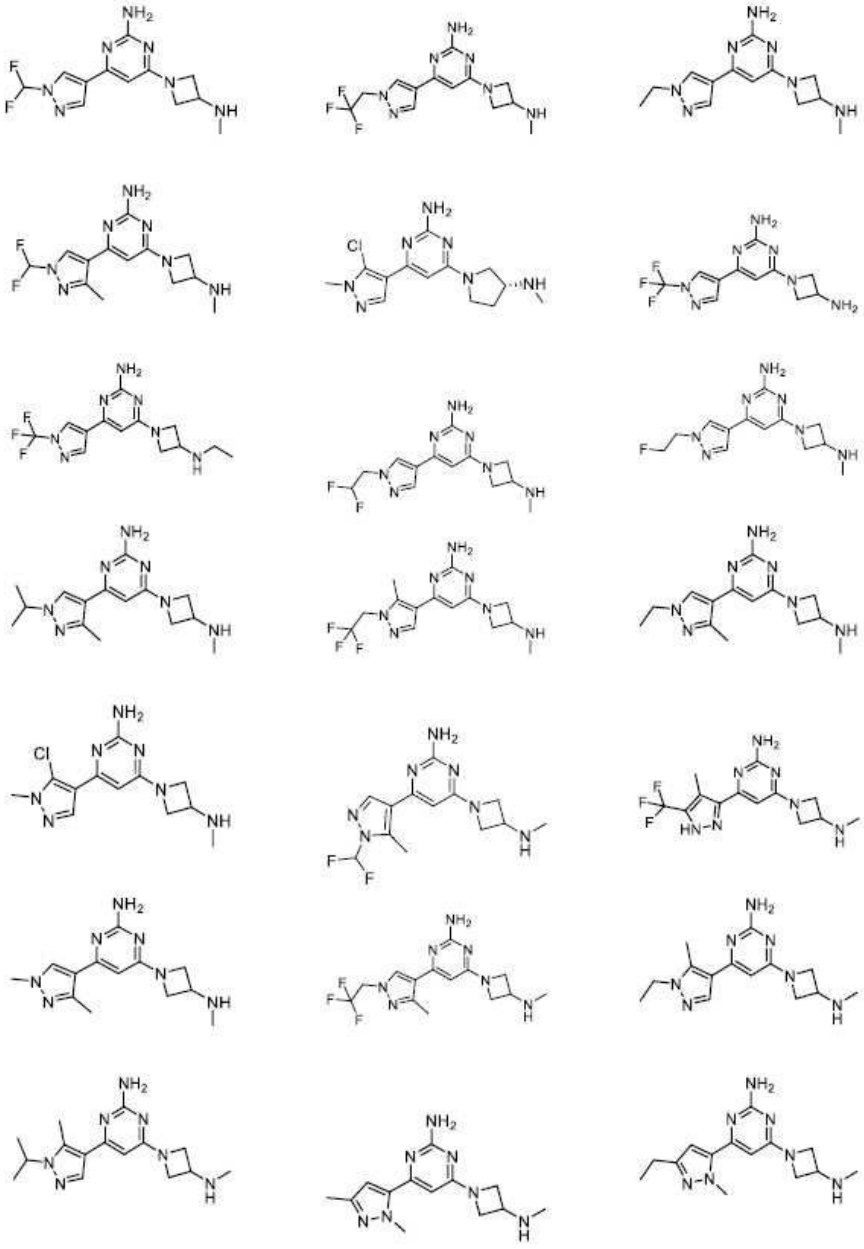
(52) CPC특허분류
A61P 1/04 (2018.01)
A61P 11/06 (2018.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 17/04 (2018.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
(72) 발명자
스웨인 니겔 알란
영국 씨비21 6디지, 캠브리지쉬어, 캠브리지, 그레이트 아빙돈, 그란타 파크, 헵테얼즈 테라퓨틱스 리미티드 내
픽워쓰 마크
영국 씨비21 6디지, 캠브리지쉬어, 캠브리지, 그레이트 아빙돈, 그란타 파크, 헵테얼즈 테라퓨틱스 리미티드 내
한나 던컨 로버트
영국 씨비21 6디지, 캠브리지쉬어, 캠브리지, 그레이트 아빙돈, 그란타 파크, 헵테얼즈 테라퓨틱스 리미티드 내

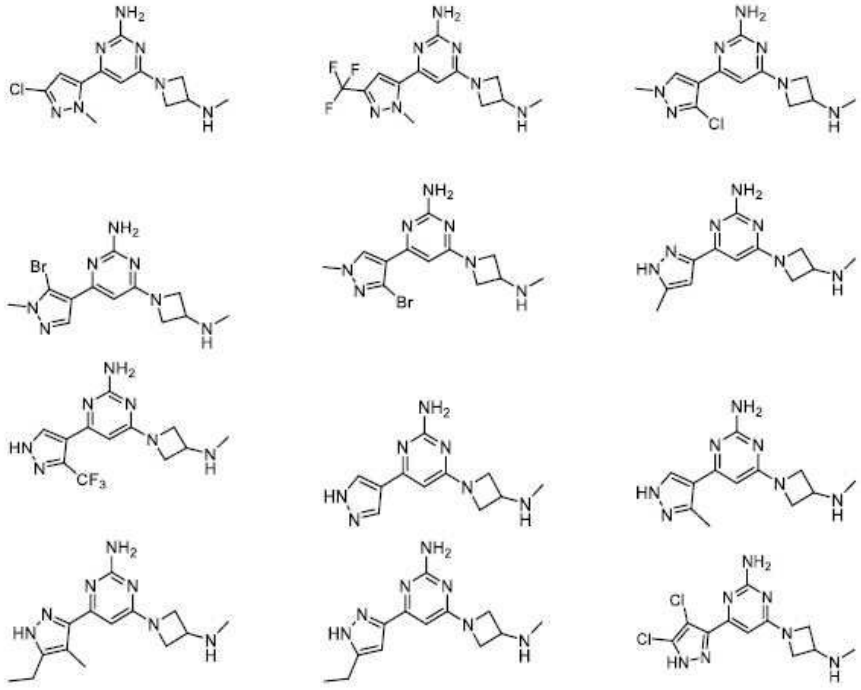
명 세 서

청구범위

청구항 1

다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 화합물:

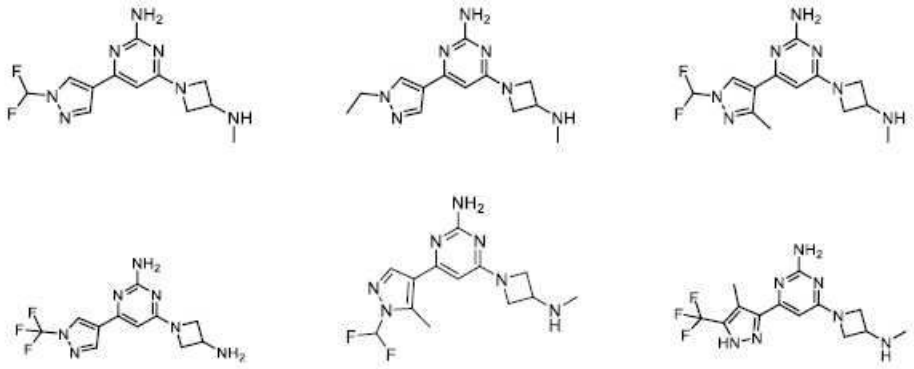




또는 이의 염.

청구항 2

제1항에 있어서 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물:



또는 이의 염.

청구항 3

제1 또는 2항에 따르는 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1 내지 3 항 중 어느 한 항에서 정의된 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 5

의약에 사용하기 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 제4항에 따른 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, H4수용체 활성을 갖는 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, 낮은 hERG 활성을 나타내는 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 천식, 만성 소양증, 피부염, 류마티스 관절염, 위궤양 및 대장염을 포함하는 염증성 장애의 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 신규 화합물 및 히스타민 H4 수용체 길항제로서의 용도에 관한 것이다. 본원에 기재된 화합물은 H4 수용체가 관련된 질병의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 본 출원은 또한 이들 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 및 H4 수용체가 관여하는 이러한 질병의 예방 또는 치료에 있어서 이들 화합물 및 조성물의 제조 및 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 히스타민은 세포질 과립에 저장되고 다양한 면역학적 및 비면역학적 자극에 반응하여 방출되는 비만 세포에서 생성되는 단기 작용 생체 아민이다. 비만 세포로부터의 히스타민 방출은 전통적으로 홍반, 두드러기, 가려움증, 빈맥, 저혈압, 심실 세동, 기관지 경련, 심장 및 호흡 정지를 포함한 과민 반응을 특징짓는 경증 내지 중증 징후 및 증상과 관련되어 있다. 현재까지 호염기구, 뉴런 및 암세포를 포함한 수많은 추가 출처가 확인되었다. 광범위한 생리학적 과정을 조절하는 것 외에도 히스타민은 알레르기 및 아나필락시스, 천식 및 만성 염증, 자가면역, 심혈관, 신경정신병 및 내분비 장애, 암을 비롯한 병리학적 상태와 관련이 있다.

[0003] 히스타민은 주로 다양한 세포 유형에서 차등적으로 발현되고 종 사이에 상당한 변이를 나타내는 4가지 유형의 G-단백질 결합 수용체(GPCR)에 결합함으로써 다면발현 작용을 발휘한다. H2 수용체는 위산 분비를 담당한다; H3 수용체는 CNS에서 히스타민 및 기타 신경 조절제의 방출을 제어하고 H1 수용체는 각성 및 염증 반응과 관련이 있다.

[0004] 2000년에 확인된 고친화성 H4 수용체는 구성적 활성을 나타내며 비만 세포, 단핵구, 수지상 세포, 호산구, 호염기구, 호중구 및 T 세포를 비롯한 면역계의 세포에서 주로 발현되지만 독점적인 것은 아니다. 이 발견은 급성 및 만성 염증, 자가면역 질환, 숙주 방어 및 신경병성 통증에서 치료 가능성이 있는 새로운 약물 표적의 매력적인 전망으로 이어졌다.

[0005] H4R은 가장 가까운 이웃인 H3R과 40%만 상동성을 공유하며 H2와 H1 길항제 모두 히스타민 유도 호산구 주화성을 억제하는 것으로 나타났다. 히스타민은 백일해 독소(PTx)에 민감한 방식으로 포스콜린 유도 cAMP 반응을 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 H4R이 이종삼량체 Gαi/o 단백질을 통해 신호를 전달함을 시사한다. 이종 세포 시스템(예: HEK293 세포)에서 H4R의 일시적인 발현은 H4 리간드 신호 전달 및 결합을 측정하여 각각 기능적 효능 및 수용체 친화도의 추정치를 생성하는 데 널리 사용되는 방법이다.

[0006] 이러한 기술을 사용한 H4R 길항제의 발견과 천식, 만성 소양증, 피부염, 류마티스 관절염, 위궤양 및 대장염을 포함한 다양한 동물 질병 모델에서의 연구는 H4R 길항제가 심오한 항염증 효과를 유발한다는 것을 확인했고 이 수용체를 표적으로 하는 것에 대한 치료적 이익을 검증했다. 중등도에서 중증의 아토피 피부염 환자를 대상으로 한 첫 H4R 길항제 2a상 임상 시험이 이미 수행되어 H4가 환자의 약물가능 표적임을 추가로 확인했다.

[0007] 다수의 공개된 H4R 리간드에도 불구하고 우수한 약물 후보 품질을 갖는 새로운 H4R 길항제를 개발할 필요가 남아 있다. 이러한 길항제는 H1-H3 수용체에 대한 완전한 선택성과 함께 우수한 낮은 nM 효능 및 친화도를 나타내야 한다. 이러한 길항제는 전염증 반응의 유도와 관련된 위험으로 인해 작용제 활성을 나타내지 않아야 하며, 다양한 질병 동물 모델에서 PK/PD를 지원하기 위해 종에 걸쳐 유사한 약리학적 프로파일을 이상적으로 나타내야 한다. 이러한 길항제는 대사적으로 안정적이어야 하고, PK가 우수하고, 독성이 없어야 하며, 광범위한 안전 패널 프로파일링에서 우수한 H4 특이성을 보여야 한다.

[0008] 인간의 ether-a-go-go 관련 유전자(hERG)는 빠르게 활성화되는 지연 정류기 칼륨 채널(IKr)의 기공 형성 소단위를 인코딩하며, 이는 심실 재분극과 심전도의 QT 간격을 결정하는 데 중요한 역할을 하며, QT 간격은 심실의 탈분극과 재분극에 걸리는 시간이다. hERG는 구조적으로 다양한 화합물의 광범위한 억제에 매우 민감하다는 것이 널리 알려져 있다. 세포막을 가로질러 전류를 전도하는 채널 능력이 약물의 적용으로 억제되거나 손상되면 QT

증후군이라는 잠재적으로 치명적인 장애를 초래할 수 있다. 시장에서 임상적으로 성공한 다수의 약물은 hERG를 억제하는 경향이 있으며 부작용으로서 돌연사의 위험을 수반하므로 hERG 억제는 약물 개발 중에 피해야 하는 중요한 표적 표적이 되었다.

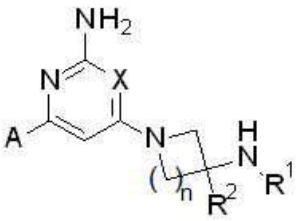
[0009] 본 발명의 화합물은 H4 수용체의 길항제이다. 특정 화합물은 hERG 억제가 낮아 특히 유용하다.

발명의 내용

[0010] **본발명**

[0011] 본 발명은 H4 수용체 길항제로서의 활성을 갖는 화합물을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 H4 수용체 길항작용과 낮은 hERG 활성을 조합한 화합물을 제공한다.

[0012] 따라서, 본발명은 식 (1)의 화합물:

[0013]  (1);

[0014] 또는 이의 염을 제공하고, 여기서;

[0015] X는 CH 또는 N;

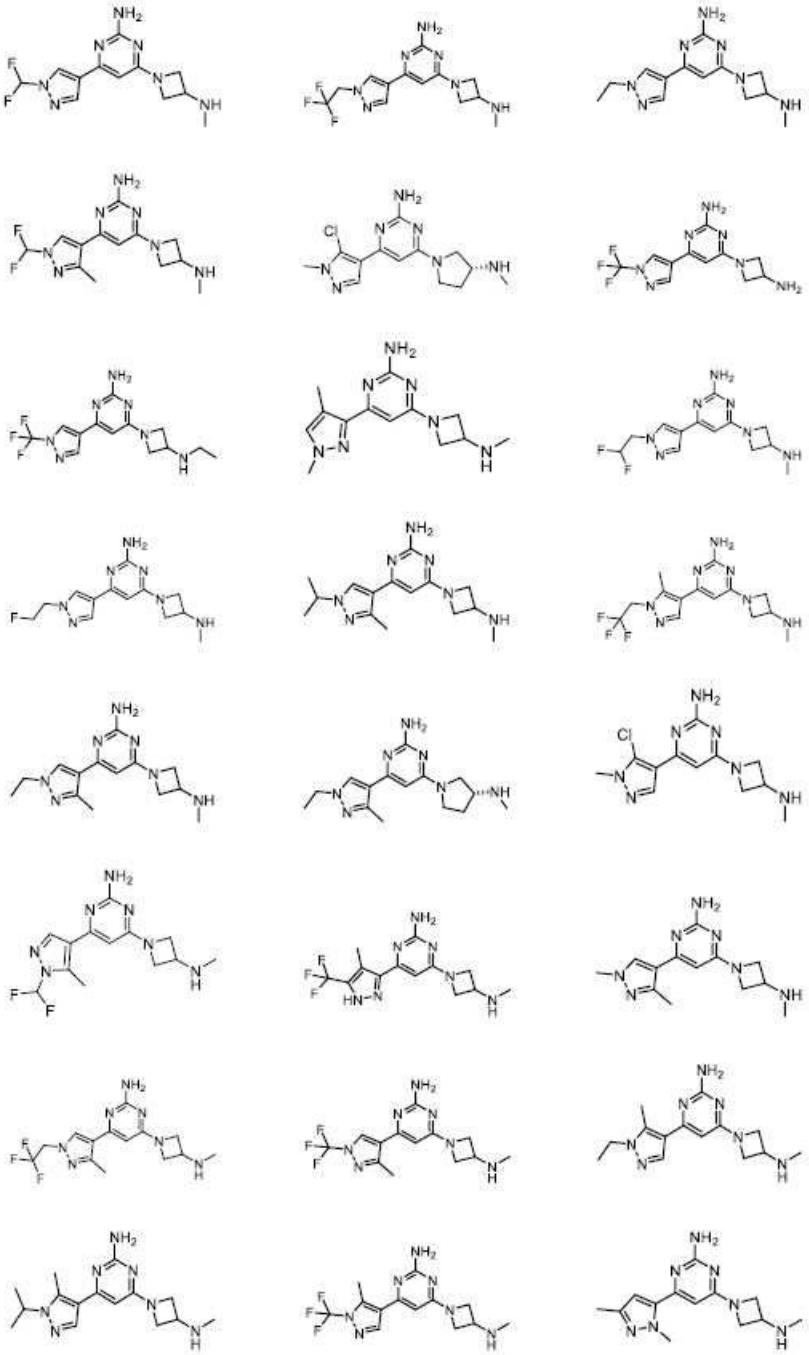
[0016] n은 1 또는 2;

[0017] R^1는 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 선택되고;

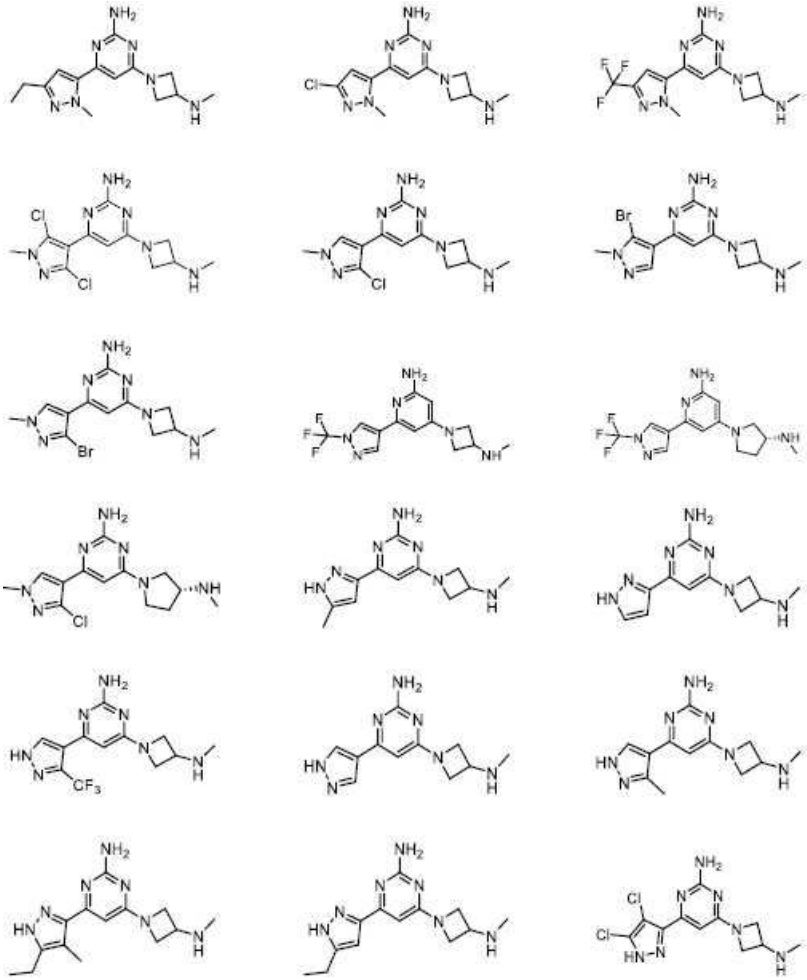
[0018] R^2는 H; 및

[0019] A는 임의로 치환된 피라졸 링을 나타내고;

[0020] 여기서 상기 화합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0021]

[0022] 

[0023] 또는 이의 염.

[0024] 화합물은 H4 수용체 길항제로서 사용될 수 있다. 화합물은 약제 제조에 사용될 수 있다. 화합물 또는 약제는 천식, 만성 소양증, 피부염, 류마티스 관절염, 위궤양 및 대장염을 비롯한 염증성 장애를 치료, 예방, 개선, 조절 또는 위험을 감소시키는 데 사용할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] **발명의 상세한 설명**

[0026] 본발명은 신규 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 H4 수용체의 길항제로서의 신규 화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 H4 수용체 길항제로서 또는 H4 시스템 기능장애의 치료를 위한 약제의 제조에서의 신규 화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 선택적 H4수용체 길항제인 화합물, 조성물 및 약제에 관한 것이다.

[0027] 본 발명은 추가로 급성 및 만성 염증, 자가면역 질환, 숙주 방어 장애 및 신경병증성 통증의 치료에 유용한 화합물, 조성물 및 약제에 관한 것이다. 본 발명은 또한 천식, 만성 소양증, 피부염, 류마티스 관절염, 위궤양 및 대장염을 비롯한 염증성 장애의 치료에 유용한 화합물, 조성물 및 약제에 관한 것이다.

[0028] 본발명의 화합물은 식 (1)의 화합물:

[0029]  (1);

[0030] 또는 이의 염을 포함하고, 여기서;

[0031] X는 CH 또는 N;

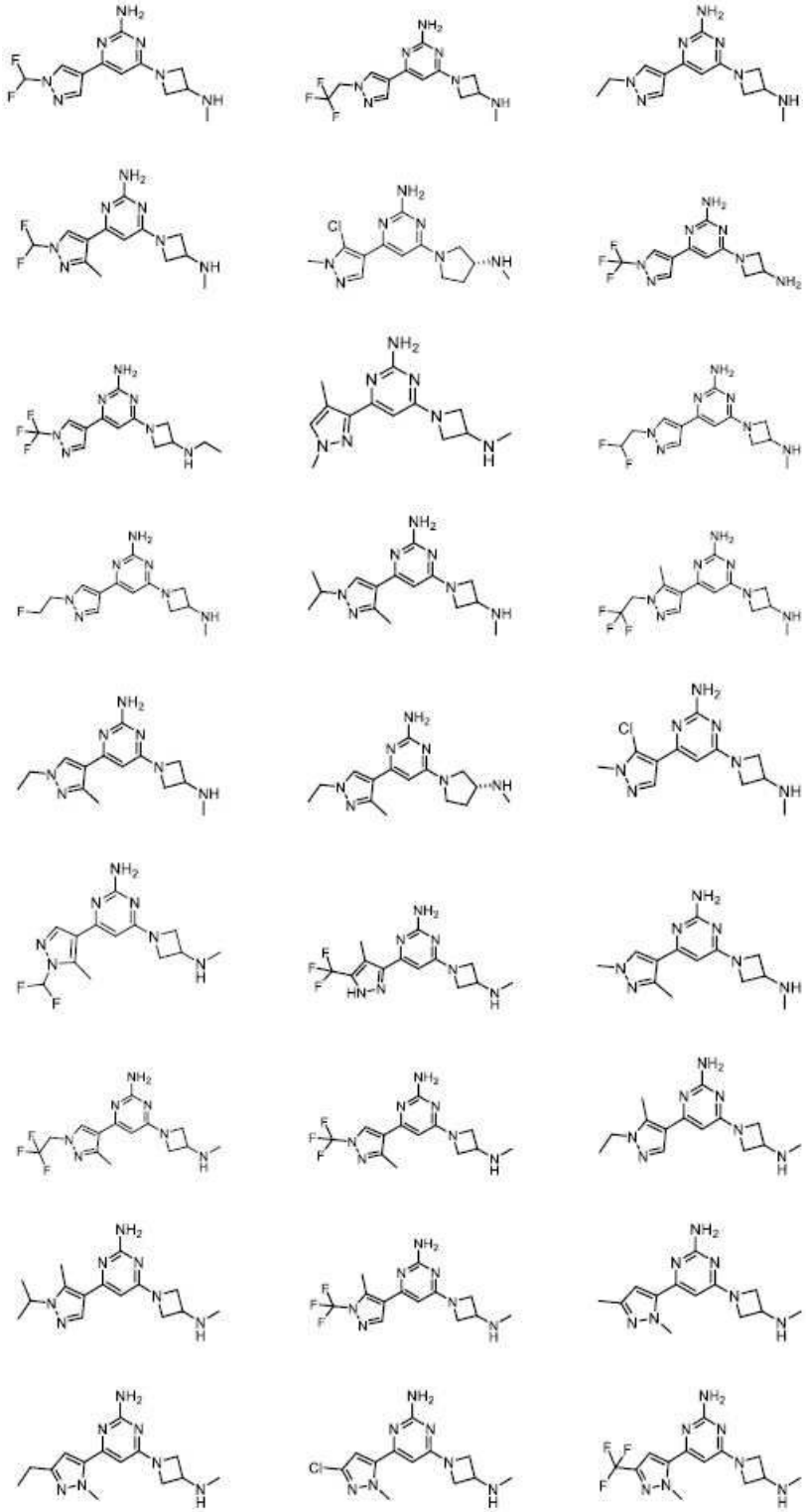
[0032] n은 1 또는 2;

[0033] R^1는 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 선택되고;

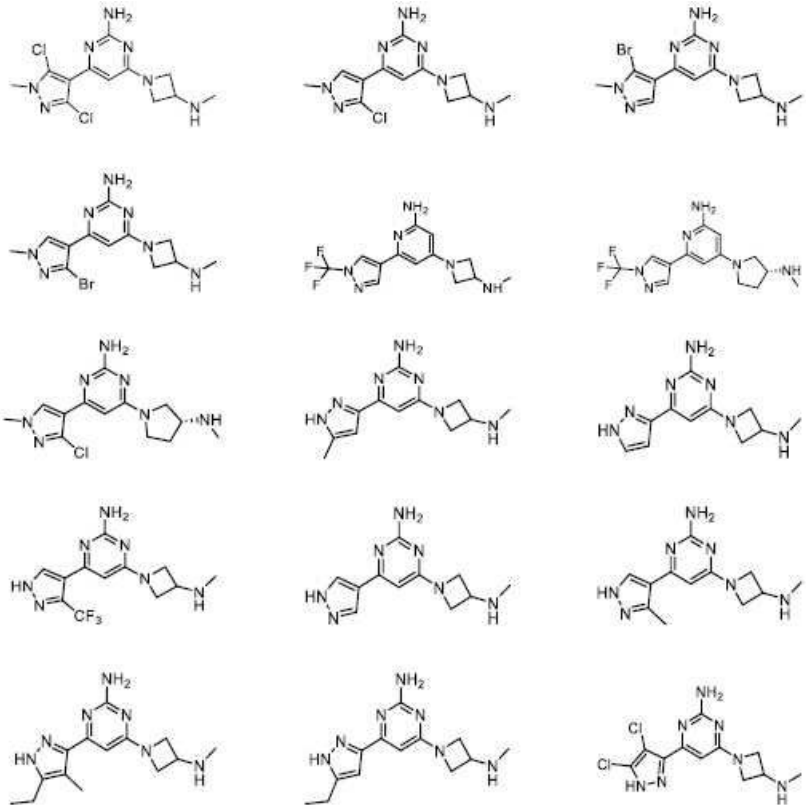
[0034] R^2는 H; 및

[0035] A는 임의로 치환된 피라졸 링을 나타내고;

[0036] 여기서 상기 화합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0037] 

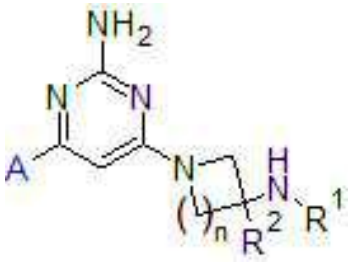
[0038]



[0039]

[0040] 또는 이의 염.

[0041] 본발명의 화합물은 식 (1a)의 화합물:



[0042] (1a);

[0043] 또는 이의 염을 포함하고, 여기서;

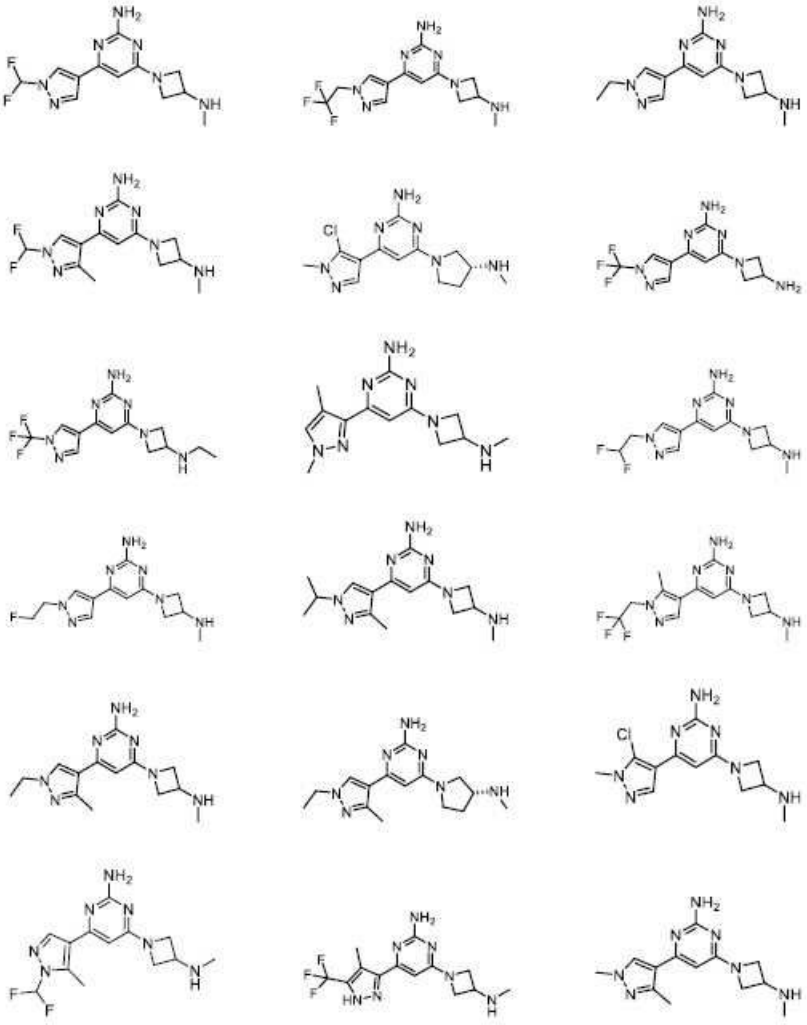
[0044] n은 1 또는 2;

[0045] R^1는 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 선택되고;

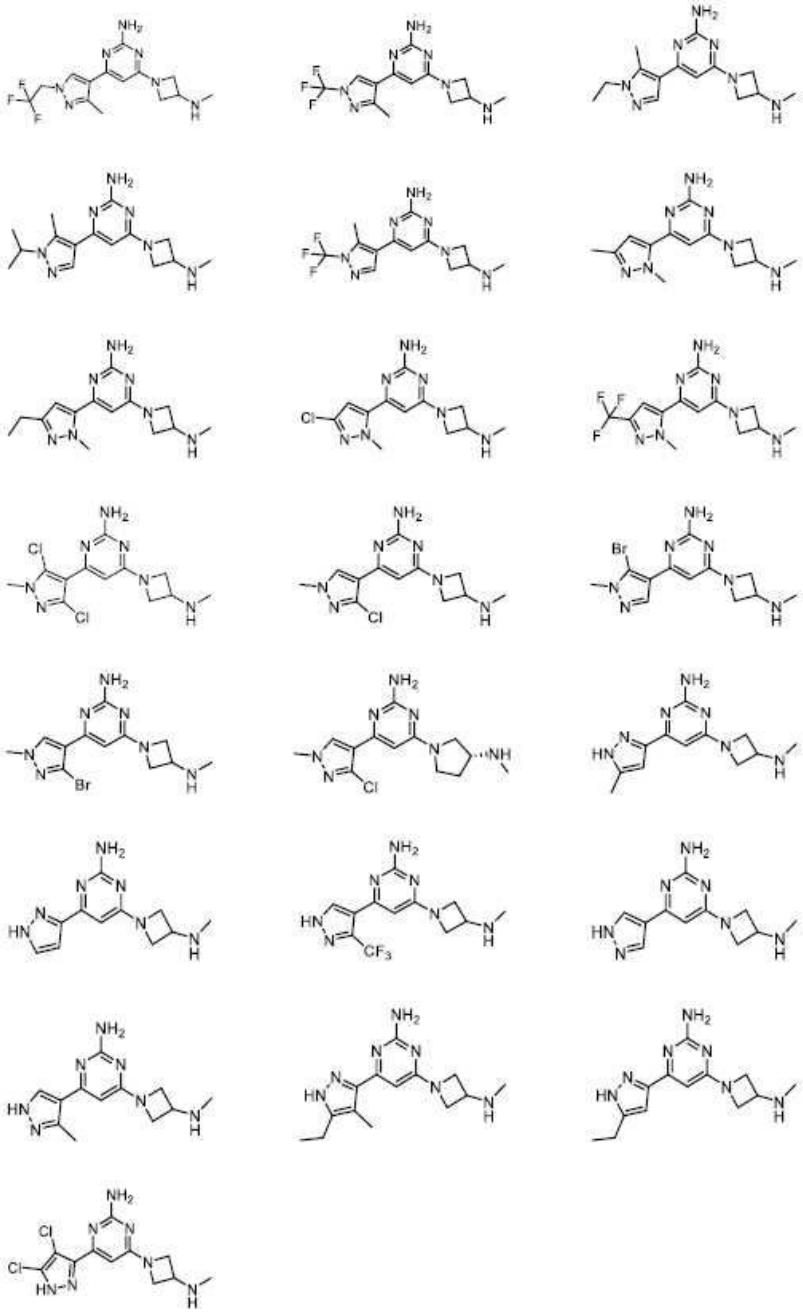
[0046] R^2는 H; 및

[0047] A는 임의로 치환된 피라졸 링을 나타내고;

[0048] 여기서 상기 화합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0049]



[0050]

[0051] 또는 이의 염.

[0052] 화합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0053] 4-(1-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0054] 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민;

[0055] 4-(1-에틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0056] 4-(1-(디플루오로메틸)-3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0057] (R)-4-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0058] 4-(3-아미노아제티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민;

[0059] 4-(3-(에틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민;

[0060] 4-(1,4-디메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0061] 4-(1-(2,2-디플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0062] 4-(1-(2-플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0063] 4-(1-이소프로필-3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0064] 4-(5-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0065] 4-(1-에틸-3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0066] (R)-4-(1-에틸-3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0067] 4-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0068] 4-(1-(디플루오로메틸)-5-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0069] 4-(4-메틸-5-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0070] 4-(1,3-디메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0071] 4-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0072] 4-(3-메틸-1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0073] 4-(1-에틸-5-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0074] 4-(1-이소프로필-5-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0075] 4-(5-메틸-1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0076] 4-(1,3-디메틸-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0077] 4-(3-에틸-1-메틸-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0078] 4-(3-클로로-1-메틸-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0079] 4-(1-메틸-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0080] 4-(3,5-디클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0081] 4-(3-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0082] 4-(5-브로모-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0083] 4-(3-브로모-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0084] 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-아민;

[0085] (R)-4-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-아민;

[0086] (R)-4-(3-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0087] 4-(5-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0088] 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1H-피라졸-3-일)피리미딘-2-아민;

[0089] 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민;

[0090] 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민;

[0091] 4-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0092] 4-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

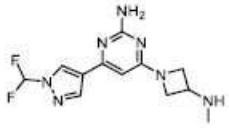
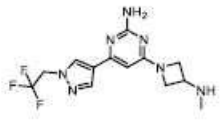
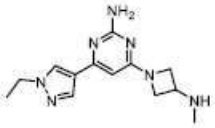
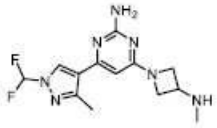
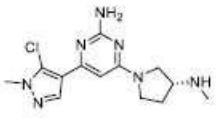
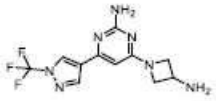
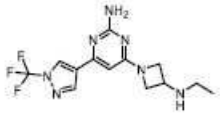
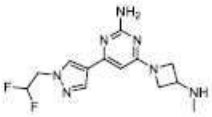
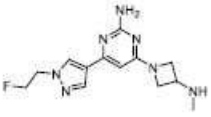
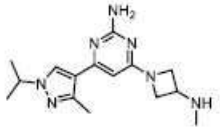
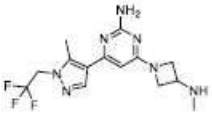
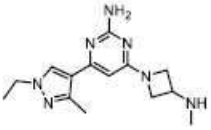
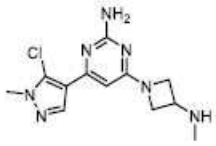
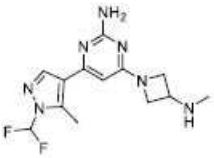
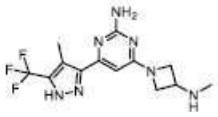
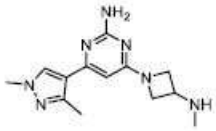
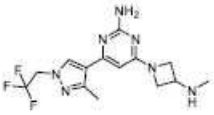
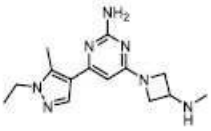
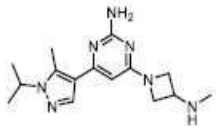
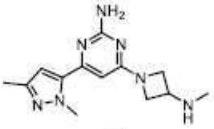
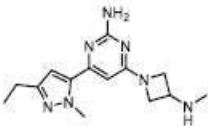
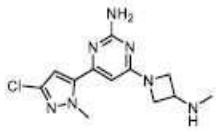
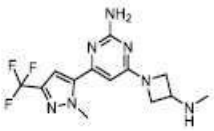
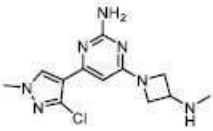
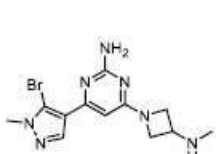
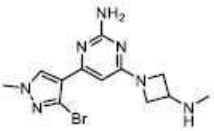
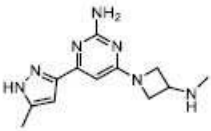
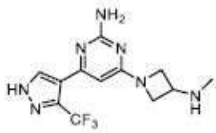
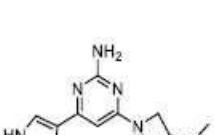
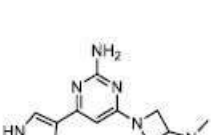
[0093] 4-(5-에틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

[0094] 4-(4,5-디클로로-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민;

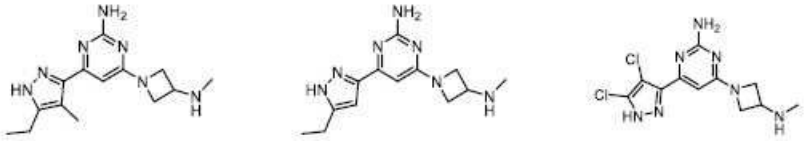
[0095] 또는 이의 염.

[0096] 화합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물일 수 있다:

[0097]

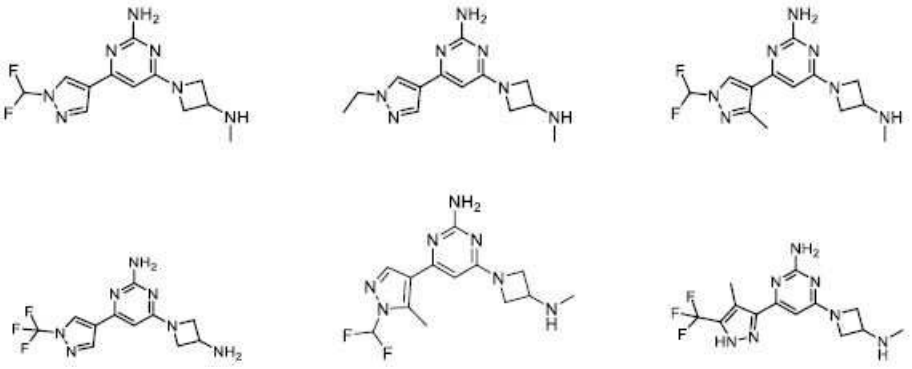































[0098]

[0099] 

[0100] 또는 이의 염.

[0101] 화합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물일 수 있다:

[0102] 

[0103] 또는 이의 염.

[0104] 화합물의 구체적인 예는 낮은 hERG 활성을 갖는 것을 포함한다. 본 발명의 화합물은 낮은 hERG 활성을 나타내며, 이는 상기 배경 섹션에 요약된 이유 때문에 특히 유리하다. 본원에서 특히 낮은 hERG 활성을 나타내는 화합물은 4.5 이하의 hERG pIC_{50}을 갖는 화합물이다.

[0105] **정의**

[0106] 본 출원에서는 달리 명시되지 않는 한 다음 정의가 적용된다.

[0107] 본원에 기재된 화합물 중 어느 것의 용도와 관련하여 용어 "치료"는 화합물이 문제의 질병이나 장애를 앓거나 앓을 위험이 있거나, 또는 잠재적으로 앓을 위험이 있는 대상체에게 투여되는 임의의 형태의 개입을 설명하는 데 사용된다. 따라서 "치료"라는 용어는 예방(예방) 치료와 질병 또는 장애의 측정 가능하거나 감지 가능한 증상이 나타나는 치료를 모두 포함한다.

[0108] 여기서 사용된 용어 "유효 치료량"(예를 들어, 질병 또는 병태의 치료 방법과 관련하여)은 원하는 치료 효과를 생성하는 데 효과적인 화합물의 양을 지칭한다. 예를 들어, 병태가 통증인 경우 유효 치료량은 원하는 수준의 통증 완화를 제공하기에 충분한 양이다. 원하는 수준의 통증 완화는 예를 들어 통증의 완전한 제거 또는 통증의 중증도 감소일 수 있다.

[0109] 기술된 화합물 중 임의의 것이 키랄 중심을 갖는 정도까지, 본 발명은 라세미체 형태이든 분해된 거울상이성질체든 이러한 화합물의 모든 광학 이성질체로 확장된다. 본원에 기술된 본 발명은 그러나 그렇게 제조된 임의의 개시된 화합물의 모든 결정 형태, 용매화물 및 수화물에 관한 것이다. 본원에 개시된 화합물 중 임의의 것이 카르복실레이트 또는 아미노 기와 같은 산 또는 염기 중심을 갖는 정도로, 상기 화합물의 모든 염 형태가 본원에 포함된다. 약제학적 용도의 경우 염은 약제학적으로 허용가능한 염으로 간주되어야 한다.

[0110] 언급될 수 있는 염 또는 약제학적으로 허용가능한 염은 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 이러한 염은 통상적인 수단에 의해, 예를 들어 임의로 용매 중에서, 또는 염이 불용성인 매질 중에서 유리 산 또는 유리 염기 형태의 화합물을 적절한 산 또는 염기의 하나 이상의 당량과 반응시키고, 이후 표준 기술(예를 들어 진공, 동결 건조 또는 여과)을 사용하여 상기 용매 또는 상기 매질을 제거하여 형성될 수 있다. 염은 또한 예를 들어 적합한 이온 교환 수지를 사용하여 염 형태의 화합물의 반대 이온을 다른 반대 이온과 교환함으로써 제조될 수 있다.

[0111] 약제학적으로 허용가능한 염의 예는 무기산 및 유기산으로부터 유도된 산 부가염, 및 나트륨, 마그네슘, 칼륨 및 칼슘과 같은 금속으로부터 유도된 염을 포함한다.

[0112] 산 부가 염의 예는 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아릴 설폰산(예를 들어 벤젠설폰산, 나

프탈렌-2-설폰산, 나프탈렌-1,5-디설폰산 및 p-톨루엔설폰산), 아스코르브산 (예를 들어 L-아스코르브산), L-아스파르트산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 부탄산, (+) 캠퍼산, 캠퍼-술폰산, (+)-(1S)-캠퍼-10-술폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 신남산, 시트르산, 시클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-히드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티신산, 글루코헵톤산, 글루콘(예를 들어 D-글루콘산), 글루쿠론산 (예를 들어 D-글루쿠론산), 글루탐산(예를 들어 L-글루탐산), α-옥소글루타르산, 글리콜산, 히푸르산, 브롬화수소산, 염산, 하이드로요오드산, 이세티온산, 젖산(예를 들어 (+)-L-젖산 및 (±)-DL-젖산), 락토비오닉산, 말레산, 말산(예를 들어 (-) -L-말산), 말론산, (±)-DL-만델산, 메타인산, 메탄설폰산, 1-히드록시-2-나프트산, 니코틴산, 질산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 팜산, 인산, 프로피온산, L- 피로글루탐산, 살리실산, 4-아미노 살리실산, 세바스산, 스테아르산, 숙신산, 황산, 탄닌산, 타르타르산(예를 들어(+)-L-타르타르산), 티오시안산, 운데실렌산 및 발레르산과 형성된 산 부가 염을 포함한다.

[0113] 또한, 화합물 및 이의 염의 임의의 용매화물이 포함된다. 바람직한 용매화물은 본 발명의 화합물의 고체 상태 구조(예를 들어 결정 구조)에 비독성 약제학적으로 허용가능한 용매 분자(이하에서 용매화 용매로 지칭됨)의 함입에 의해 형성된 용매화물이다. 그러한 용매의 예시는 물, 알코올(예를 들어 에탄올, 이소프로판올 및 부탄올) 및 디메틸술폭시드를 포함한다. 용매화물은 용매화 용매를 함유하는 용매 또는 용매 혼합물로 본 발명의 화합물을 재결정화함으로써 제조될 수 있다. 주어진 경우에 용매화물이 형성되었는지 여부는 열중량 분석(TGA), 시차 주사 열량계(DSC) 및 X선 결정학과 같은 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 화합물의 결정을 분석하여 결정할 수 있다.

[0114] 용매화물은 화학량론적 또는 비화학량론적 용매화물일 수 있다. 특정 용매화물은 수화물일 수 있고, 수화물의 예는 반수화물, 일수화물 및 이수화물을 포함한다. 용매화물과 용매화물을 제조하고 특성화하는 데 사용되는 방법에 대한 자세한 내용은 Bryn et al, Solid-State Chemistry of Drugs, Second Edition, 발행, SSCI, Inc of West Lafayette, IN, USA, 1999, ISBN 0-967-06710-3 참조.

[0115] 본 발명의 맥락에서 용어 "약제학적 조성물"은 활성제를 포함하고 추가로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 의미한다. 조성물은 예를 들어 투여 방식 및 제형의 특성에 따라 희석제, 보조제, 부형제, 비히클, 보존제, 충전제, 붕해제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 감미제, 향미제, 방향제, 항균제, 항진균제, 윤활제 및 분산제로부터 선택된 성분을 추가로 함유할 수 있다. 조성물은 예를 들어 정제, 당의정, 분말, 엘릭시르, 시럽, 현탁액을 비롯한 액체 제제, 스프레이, 흡입제, 정제, 로젠지, 에멀젼, 용액, 카셰, 과립, 캡슐 및 좌제, 뿐만 아니라 리포솜 제제를 포함한 주사 제제용 액체의 형태를 취할 수 있다.

[0116] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 동위원소 치환을 함유할 수 있고, 특정 원소에 대한 언급은 그 범위 내에서 원소의 모든 동위원소를 포함한다. 예를 들어, 수소에 대한 언급은 그 범위 내에 ^{1}H, ^{2}H (D), 및 ^{3}H (T)를 포함한다. 유사하게, 탄소 및 산소에 대한 언급은 각각 ^{12}C, ^{13}C 및 ^{14}C 및 ^{16}O 및 ^{18}O를 그들의 범위 내에 포함한다. 유사한 방식으로, 특정 작용기에 대한 언급은 문맥에서 달리 나타내지 않는 한 그 범위 내에 동위원소 변형을 포함한다. 예를 들어, 에틸 기 같은 알킬 기 또는 메톡시 기와 같은 알콕시 기에 대한 언급은 5개의 수소 원자가 모두 중수소 동위원소 형태인 에틸 기(과중수소에틸 기) 또는 3개의 수소 원자가 모두 중수소 동위원소 형태인 메톡시기(삼중수소메톡시 기)에서와 같이, 기의 수소 원자 중 하나 이상이 중수소 또는 삼중수소 동위원소 형태인 변형도 포함한다. 동위원소는 방사성 또는 비방사성일 수 있다.

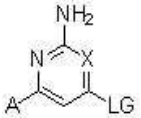
[0117] 치료 용량은 환자의 요구 사항, 치료되는 상태의 중증도 및 사용되는 화합물에 따라 달라질 수 있다. 특정 상황에 대한 적절한 투여량의 결정은 당업계의 기술 범위 내에 있다. 일반적으로, 치료는 화합물의 최적 투여량보다 적은 더 적은 투여량으로 시작된다. 그 후 상황에서 최적의 효과에 도달할 때까지 용량을 조금씩 증량한다. 편의상 필요에 따라 1일 총 투여량을 나누어 하루에 나누어 투여할 수 있다.

[0118] 물론, 화합물의 유효 용량의 크기는 치료될 상태의 중증도의 성질과 특정 화합물 및 그의 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 적절한 투여량의 선택은 과도한 부담 없이 당업자의 능력 범위 내이다. 일반적으로, 1일 용량 범위는 인간 및 비인간 동물의 체중 kg당 약 10㎍ 내지 약 30mg, 바람직하게는 인간 및 비인간 동물의 체중 kg당 약 50㎍ 내지 약 30mg, 예를 들어 인간 및 비인간 동물의 체중 kg당 약 50 ㎍ 내지 약 10 mg, 예를 들어 인간 및 비인간 동물의 체중 kg당 약 100 ㎍ 내지 약 30 mg, 예를 들어 인간 및 비인간 동물의 체중 kg당 약 100㎍ 내지 약 10mg, 가장 바람직하게는 인간 및 비인간 동물의 체중 kg당 약 100㎍ 내지 약 1mg일 수 있다.

[0119] **본발명의 화합물의 제조방법**

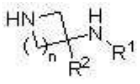
[0120] 하기를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 화합물의 제조 방법이 제공된다:

[0121] (A) 식 (10)의 화합물:



[0122] (10)

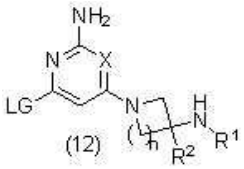
[0123] 을 식 (11)의 화합물:



[0124] (11)

[0125] 과 SNAr 조건 또는 전이 금속 촉매 결합 조건에서 반응시키는 단계; 여기서 A는 임의로 치환된 피라졸 링; R^1는 H, 메틸 또는 에틸; R^2는 H; x는 N 또는 CH; n은 1 또는 2; 및 LG는 적합한 이탈기를 나타냄; 또는

[0126] (B) 식 (12)의 화합물:



[0127] (12)

[0128] 을 식 (13)의 화합물:



[0129] (13)

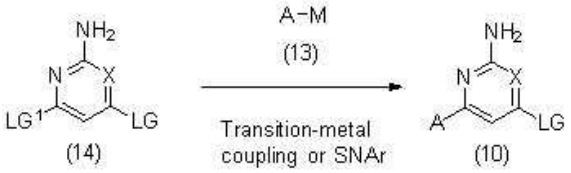
[0130] 과 전이 금속 촉매 커플링 조건 또는 SNAr 조건 하에서 반응시키는 단계; 여기서 A, R^1, R^2, X 및 n은 상기 정의된 바와 같고, LG는 적합한 이탈기를 나타내고, 존재하거나 부재할 수 있는 M은 적합하게 치환된 금속 또는 비금속을 나타냄; 또는

[0131] 공정 변형 (A)에서, 화학식 (10)의 화합물은 SNAr 조건 하에 화학식 (11)의 화합물과 반응할 수 있다. SNAr 반응은 전형적으로 3차 아민 염기 가령 TEA 또는 DIPEA 또는 무기 염기 가령 K_2CO_3, Cs_2CO_3 또는 $NaHCO_3$일 수 있는 염기의 존재 하에 임의로 적합한 용매 가령 H_2O, MeCN, 1,4-디옥산, THF, MeOH, EtOH, IPA, BuOH, DMF, NMP 또는 DMSO, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, 약 실온 내지 약 200℃ 사이의 온도에서, 통상적인 가열을 사용하거나 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열에 의해, 개방 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서, 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 임의로 KF 또는 은염과 같은 첨가제의 존재하에 과량의 화학식 (11)의 화합물 또는 화학량론적 양의 화학식 (11)의 화합물을 사용하여 수행된다. 임의로, 화학식 (11)의 화합물은 임의로 TEA 또는 DIPEA와 같은 3차 염기의 존재 하에 HCl, HBr 또는 TFA 염과 같은 산 염으로서 반응에 존재할 수 있다. 화학식 (10)의 화합물에서 이탈기 LG는 F, Cl 또는 Br과 같은 할로겐; OMe와 같은 알콕시기; 펜타플루오로페녹시와 같은 아릴옥시기; SMe와 같은 술페닐기, SOMe와 같은 술피닐기, SO2Me와 같은 술포닐기, OTs, OMs, ONs 또는 OTf와 같은 술포닐옥시기; 또는 히드록시기와 BOP, PyBOP 또는 HATU와 같은 펩티드 커플링 시약의 반응에 의해 생성된 이탈기일 수 있다.

[0132] 대안적으로, 공정 변형 (A)에서, 화학식 (10)의 화합물은 전이 금속 촉매된 커플링 조건 하에 화학식 (11)의 화합물과 반응할 수 있다. 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 NaO^tBu, KO^tBu, K_3PO_4, K_2CO_3 또는 Cs_2CO_3와 같은 무기 염기의 존재 하에 적합한 용매 가령 1,4-디옥산, THF, DME 또는 톨루엔, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, $Pd(OAc)_2$, $Pd_2(dba)_3$, $Pd(dppf)Cl_2$, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ or $Pd(PPh_3)_4$와 같은 아화학량론적 양의 전이 금속 촉매의 존재 하에, 임의로 PPh_3, PBu_3, P^tBu_3, XPhos, Xantphos 또는 BINAP와 같은 포스핀 리간드의 아화학량론적 양

의 존재하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 화학식 (11)의 화합물을 사용하여 수행된다. 화학식 (10)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl, Br 또는 I와 같은 할로겐, 또는 OT, OM, ON 또는 OTf와 같은 술포닐옥시기일 수 있다.

[0133] 화학식 (10)의 화합물은 하기 반응식 1에 나타낸 반응에 의해 제조할 수 있다:

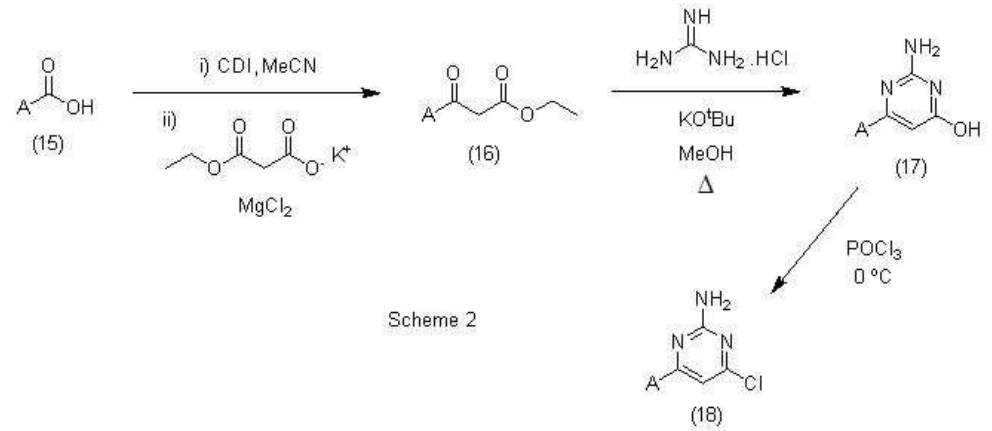


Scheme 1

[0134]

[0135] 따라서, X가 상기 정의된 바와 같고, LG 및 LG1이 동일하거나 상이할 수 있고 적합한 이탈기를 나타낼 수 있는 화학식 (14)의 화합물은, A가 정의된 바와 같고, 존재하거나 부재할 수 있는 M은 적합하게 치환된 금속 또는 비금속을 나타내는 화학식 (13)의 화합물과 전이 금속 촉매된 커플링 조건 하에 또는 SNAr 조건 하에 반응하여 화학식 (10)의 화합물을 형성할 수 있다. 전이 금속 촉매된 커플링 반응 또는 SNAr 반응은 일반적으로 공정 변형(B)에서 하기 기재된 바와 같이 수행되고, 화학식 (13) 및 화학식 (14)의 화합물은 상업적으로 입수가능하거나 당업자에게 알려진 단순한 출발 물질로부터 공개된 문헌에 보고된 표준 방법에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 때때로, 이들의 불안정성으로 인해, M이 존재하는 화학식 (13)의 화합물을 저온, 예를 들어 약 -78 ° C와 실온 사이에서 제자리에서 생성시키고 이를 사전 분리 없이 전이 금속 촉매 커플링 반응에서 추가로 반응시키는 것이 필요할 수 있다. 이러한 방법의 세부 사항은 출판된 문헌, 예를 들어 Oberli and Buchwald in Org. Lett., 2012, Vol. 14, No. 17, p 4606에 보고된 바와 같이 공지되어 있다.

[0136] 대안적으로, X가 N을 나타내고 LG가 Cl을 나타내는 화학식 (10)의 화합물은 전형적으로 하기 반응식 2에 나타낸 반응 순서에 의해 제조될 수 있다:



Scheme 2

[0137]

[0138] 따라서, 화학식 (15)의 카르복실산은 먼저 당업자에게 공지된 다수의 표준 방법을 통해 이를 활성화함으로써, 예를 들어 MeCN과 같은 적합한 용매에서 CDI와 반응시킨 다음 $MgCl_2$와 같은 루이스 산의 존재 하에 칼륨 3-에톡시-3-옥소프로파노에이트와 같은 말론산 유도체와 반응시킴에 의해 상응하는 베타-케토 에스테르(16)로 상동화될 수 있다. 일단 형성되면, 베타-케토 에스테르(16)는 적합한 용매 가령 MeOH 내에서 KOtBu와 같은 적절한 염기의 존재 하에 구아니딘 또는 적절한 구아니딘 염과의 반응에 의해 아미노-히드록시피리미딘 유사체(17)로 고리화될 수 있다. 이렇게 형성된 아미노-히드록시피리미딘 유사체(17)는 이어서 적절한 용매의 존재 또는 부재하에 $POCl_3$와 반응하여 화학식 (18)의 화합물을 형성할 수 있다. 화학식 (15)의 화합물은 상업적으로 입수가능하거나, 당업자에게 공지된 단순한 출발 물질로부터 공개된 문헌에 보고된 표준 방법에 의해 쉽게 제조될 수 있다.

[0139] 화학식 (11)의 화합물은 상업적으로 입수가능하거나, 당업자에게 공지된 단순한 출발 물질로부터 공개된 문헌

에 보고된 표준 방법에 의해 쉽게 제조될 수 있다.

[0140] 대안적으로, 공정 변형 (B)에서, 화학식 (12)의 화합물은 전이 금속 촉매된 커플링 조건 하에 화학식 (13)의 화합물과 반응할 수 있다. 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 M이 존재하는 화학식 (13)의 화합물을 사용하여 수행된다. 예를 들어, M이 보론산 $-B(OH)_2$, 또는 $-B(OMe)_2$, $-B(OiPr)_2$ 또는 Bpin과 같은 보론산 에스테르, 또는 $-B(OiPr)_3Li$와 같은 리튬 트리알킬보레이트를 나타내는 경우, 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 $NaHCO_3$, Na_2CO_3, K_2CO_3, Cs_2CO_3 또는 K_3PO_4와 같은 무기 염기의 존재 하에 적합한 용매 가령 H_2O, MeCN, 1,4-디옥산, THF, Et_2O, DME, EtOH, IPA, DMF, NMP 또는 톨루엔, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, $Pd(OAc)_2$, $Pd_2(dba)_3$, $Pd(dppf)Cl_2$, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, $Pd(PPh_3)_4$ 와 같은 아화학량론적 양의 전이 금속 촉매의 존재 하에, 또는 XPhos Pd G2 와 같은 아화학량론적 양의 전이 금속 전촉매의 존재 하에, 임의로 PPh3, PBu3, PtBu3, XPhos, Xantphos 또는 BINAP와 같은 포스핀 리간드의 아화학량론적 양의 존재하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl, Br 또는 I와 같은 할로겐, 또는 OT, OM, 또는 OTf와 같은 술포닐옥시기일 수 있다.

[0141] 대안적으로, M이 트리플루오로보레이트 염 BF_3^-를 나타내는 경우, 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 Na_2CO_3, K_2CO_3, Cs_2CO_3 또는 K_3PO_4와 같은 무기 염기의 존재 하에 적합한 용매 가령 H_2O, MeCN, 1,4-디옥산, THF, MeOH 또는 EtOH, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, $Pd(OAc)_2$, $Pd_2(dba)_3$ 와 같은 아화학량론적 양의 전이 금속 촉매의 존재 하에, 또는 XPhos Pd G2 와 같은 아화학량론적 양의 전이 금속 전촉매의 존재 하에, 임의로 PPh_3, PCy_3 또는 RuPhos 와 같은 아화학량론적 양의 포스핀 리간드 존재하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl, Br 또는 I와 같은 할로겐일 수 있다.

[0142] 대안적으로, M이 $SnMe_3$ 또는 $SnBu_3$와 같은 트리알킬주석 기를 나타내는 경우, 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 일반적으로 1,4-디옥산, THF, DMF 또는 톨루엔과 같은 적합한 용매, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, $Pd(OAc)_2$, $Pd_2(dba)_3$, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ 또는 $Pd(PPh_3)_4$와 같은 전이금속 촉매의 화학양론적 양의 존재하에, 임의로 K_2CO_3 또는 CsF과 같은 무기 염기의 존재 하에, 임의로 LiCl, CuI, Bu_4NBr 또는 Et_4NCl과 같은 첨가제의 존재 하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl, Br 또는 I와 같은 할로겐일 수 있다.

[0143] 대안적으로, M이 존재하지 않을 때, 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 NaO^tBu, KO^tBu, K_3PO_4, K_2CO_3 또는 Cs_2CO_3와 같은 무기 염기의 존재 하에 적합한 용매 가령 1,4-디옥산, THF, DME 또는 톨루엔, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, $Pd_2(dba)_3$, $Pd(dppf)Cl_2$, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ 또는 $Pd(PPh_3)_4$와 같은 전이 금속 촉매의 아화학량론적 양의 존재하에, 임의로 PPh_3, PBu_3, P^tBu_3, XPhos, Xantphos 또는 BINAP와 같은 포스핀 리간드 존재하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl, Br 또는 I와 같은 할로겐, 또는 OT, OM, ON 또는 OTf와 같은 술포닐옥시기일 수 있다.

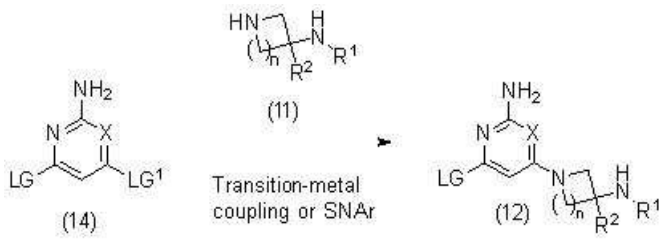
[0144] 대안적으로, M이 존재하지 않을 때, 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 NaO^tBu, KO^tBu, K_3PO_4, K_2CO_3 또는 Cs_2CO_3와 같은 무기 염기의 존재 하에 적합한 용매 가령 1,4-디옥산, DMF, DMSO 또는 톨루엔, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, CuI와 같은 전이 금속 촉매의 아화학량론적 양의 존재하에, 임의로 (S)-프롤린 또는 *trans*-N^1,N^2-디메틸시클로헥산-1,2-디아민과 같은 아민의 아화학량론적 양의 존재하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl, Br 또는 I

와 같은 할로겐일 수 있다.

[0145] 대안적으로, M이 존재하지 않을 때, 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 nBu_4OAc와 같은 유기 염기의 존재 하에 적합한 용매 가령 1,4-디옥산 내에서, XPhos Pd G2와 같은 전이 금속 전촉매의 아화학량론적 양의 존재하에, 임의로 XPhos과 같은 아화학량론적 양의 포스포 리간드 존재하에, 약 실온 내지 약 200℃의 온도에서, 개방된 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서 임의로 대기압보다 높은 압력에서, 기존의 가열 또는 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 Cl와 같은 할로겐일 수 있다.

[0146] 대안적으로, 공정 변형 (B)에서, 화학식 (12)의 화합물은 SNAr 조건 하에 화학식 (13)의 화합물과 반응할 수 있다. SNAr 반응은 전형적으로 3차 아민 염기 가령 TEA 또는 DIPEA 또는 무기 염기 가령 K_2CO_3, Cs_2CO_3, KOtBu, 또는 NaH의 존재 하에 임의로 적합한 용매 가령 THF, DMF, H2O, DMSO 또는 NMP, 또는 적합한 용매의 조합 내에서, 약 실온 내지 약 200℃ 사이의 온도에서, 통상적인 가열을 사용하거나 임의로 마이크로파 조사에 의한 가열에 의해, 개방 용기 또는 임의로 밀봉된 용기에서, 임의로 대기압보다 높은 압력에서, M이 부재인 화학식 (13)의 화합물을 사용하여 수행된다. 화학식 (12)의 화합물에서 이탈기 LG는 F, Cl 또는 Br과 같은 할로겐; OMe와 같은 알콕시기; 펜타플루오로페녹시와 같은 아릴옥시기; SMe와 같은 술페닐기, SOMe와 같은 술피닐기, SO2Me와 같은 술포닐기, OTs, OMs, ONs 또는 OTf와 같은 술포닐옥시기일 수 있다.

[0147] 화학식 (12)의 화합물은 하기 반응식 3에 나타낸 반응 순서에 의해 제조될 수 있다:



[0148] Scheme 3

[0149] 따라서, X가 상기 정의된 바와 같고, LG 및 LG1이 동일하거나 상이할 수 있고 적합한 이탈기를 나타낼 수 있는 화학식 (14)의 화합물은, R^1, R^2 및 n 가 정의된 바와 같은 화학식 (11)의 화합물과 SNAr 조건 하에 반응하여 화학식 (12)의 화합물을 형성할 수 있다. SNAr 반응 또는 전이 금속 촉매된 커플링 반응은 전형적으로 공정 변형 (A)에서 상기 기재된 바와 같이 수행된다.

[0150] 위에서 설명한 많은 반응에서 분자의 바람직하지 않은 위치에서 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해 하나 이상의 기를 보호하는 것이 필요할 수 있다. 보호기의 예, 및 작용기를 보호 및 탈보호하는 방법은 Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fifth Edition, Editor: Peter G. M. Wuts, John Wiley, 2014, (ISBN: 9781118057483)에서 찾을 수 있다. 특히, 화학식 (10) 또는 화학식 (12)의 화합물을 조작하기 위한 유용한 보호기는 2,5-디메틸-1*H*-피롤기; 화학식 (11) 또는 화학식 (12)의 화합물을 조작하기 위한 유용한 보호기는 BOC 및 CBZ를 포함하고; 화학식 (13)의 화합물을 조작하기 위한 유용한 보호기는 SEM 및 THP를 포함한다.

[0151] 전술한 방법에 의해 제조된 화합물은 당업자에게 널리 공지된 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 단리 및 정제될 수 있으며 이러한 방법의 예는 재결정화 및 크로마토그래피 기술, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피(예를 들어 플래시 크로마토그래피), HPLC 및 SFC를 포함한다.

[0152] **약제학적 제제**

[0153] 활성 화합물을 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 이를 약제학적 조성물(예를 들어 제형)로 제공하는 것이 바람직하다.

[0154] 따라서, 본발명은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 제약상 허용되는 부형제와 함께 상기 정의된 바와 같은 하나 이상의 본발명의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0155] 조성물은 정제 조성물일 수 있다.

[0156] 조성물은 캡슐 조성물일 수 있다.

[0157] 약제학적으로 허용가능한 부형제(들)는 예를 들어 담체(예를 들어 고체, 액체 또는 반고체 담체), 보조제, 희석제(예를 들어 충전제 또는 증량제와 같은 고체 희석제, 및 용매 및 공용매), 과립화제, 결합제, 유동 보조제, 코팅제, 방출 조절제(예를 들어 방출 지연 또는 지연 중합체 또는 왁스), 결합제, 붕해제, 완충제, 윤활제, 방부제, 항진균제 및 항균제, 항산화제, 완충제, 등장성 조절제, 증점제, 향미제, 감미료, 안료, 가소제, 맛 차폐제, 안정제 또는 약제학적 조성물에 통상적으로 사용되는 임의의 기타 부형제로부터 선택될 수 있다.

[0158] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 적절한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 이점/위험 비율에 상응하면서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 대상(예를 들어 인간 대상)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 의미한다. 각 부형제는 또한 제형의 다른 성분과 양립할 수 있다는 의미에서 "허용가능"해야 한다.

[0159] 본발명의 화합물을 함유하는 약제학적 조성물은 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있으며, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA 참조.

[0160] 약제학적 조성물은 경구, 비경구, 국소, 비강내, 기관지내, 설하, 안과, 귀, 직장, 질내 또는 경피 투여에 적합한 임의의 형태일 수 있다.

[0161] 경구 투여에 적합한 약제학적 투여 형태는 정제(코팅 또는 비코팅), 캡슐(경질 또는 연질 쉘), 캐플릿, 환제, 로젠지, 시럽, 용액, 분말, 과립, 엘릭시르 및 현탁액, 설하 정제, 웨이퍼 또는 구강 패치와 같은 패치를 포함한다.

[0162] 정제 조성물은 불활성 희석제 또는 담체, 예를 들어 당 또는 당 알코올, 예를 들어 락토스, 수크로스, 소르비톨 또는 만니톨; 및/또는 탄산나트륨, 인산칼슘, 탄산칼슘과 같은 비당 유래 희석제, 또는 미세결정질 셀룰로오스(MCC), 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스와 같은 셀룰로오스 또는 이들의 유도체, 및 옥수수 전분과 같은 전분과 함께 활성 화합물의 단위 투여량을 함유할 수 있다. 정제는 또한 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제 및 과립제, 붕해제(예를 들어 가교 카르복시메틸셀룰로오스와 같은 팽윤성 가교 중합체), 윤활제(예를 들어 스테아레이트), 보존제(예를 들어 파라벤), 산화 방지제(예를 들어 BHT), 완충제(예를 들어 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 및 시트레이트/바이카보네이트 혼합물과 같은 발포제와 같은 표준 성분을 함유할 수 있다. 이러한 부형제는 잘 알려져 있으므로 여기에서 자세히 논의할 필요가 없다.

[0163] 정제는 위액과 접촉 시 약물을 방출(즉시 방출 정제)하거나 장기간에 걸쳐 또는 GI 관의 특정 영역과 함께 제어된 방식으로 방출(제어 방출 정제)하도록 설계될 수 있다.

[0164] 약제학적 조성물은 전형적으로 약 1%(w/w) 내지 약 95%, 바람직하게는 %(w/w) 활성 성분 및 99%(w/w) 내지 5%(w/w)의 약제학적으로 허용되는 부형제(예를 들어 위에 정의된 바와 같이) 또는 그러한 부형제의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 조성물은 약 20%(w/w) 내지 약 90%(w/w) 활성 성분 및 80%(w/w) 내지 10%의 약학적 부형제 또는 부형제의 조합을 포함한다. 약제학적 조성물은 약 1% 내지 약 95%, 바람직하게는 약 20% 내지 약 90%의 활성 성분을 포함한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 예를 들어 앰플, 바이알, 좌약, 미리 충전된 주사기, 당의정, 분말, 정제 또는 캡슐과 같은 단위 용량 형태일 수 있다.

[0165] 정제 및 캡슐은 예를 들어 0-20% 붕해제, 0-5% 윤활제, 0-5% 유동 보조제 및/또는 0-99%(w/w) 충전제/또는 증량제(약물 용량에 따라 다름)를 함유할 수 있다. 정제 및 캡슐은 그들은 또한 0-10%(w/w) 폴리머 결합제, 0-5%(w/w) 산화 방지제, 0-5%(w/w) 안료를 포함할 수 있다. 서방성 정제는 또한 일반적으로 0-99%(w/w) 방출 제어(예를 들어 지연) 중합체(용량에 따라 다름)를 포함한다. 정제 또는 캡슐의 필름 코팅은 일반적으로 0-10%(w/w) 중합체, 0-3%(w/w) 안료 및/또는 0-2%(w/w) 가소제를 함유한다.

[0166] 비경구 제형은 일반적으로 0-20%(w/w) 완충제, 0-50%(w/w) 공용매 및/또는 0-99%(w/w) 주사용수(WFI)(용량 및 동결 건조 여부에 따라 다름)를 포함한다. 근육 내 저장소용 제형은 또한 0-99%(w/w) 오일을 함유할 수 있다.

[0167] 약제학적 제형은 단일 패키지, 일반적으로 블리스터 팩에 전체 치료 과정을 포함하는 "환자 팩"으로 환자에게 제공될 수 있다.

[0168] 본발명의 화합물은 일반적으로 단위 투여 형태로 제공될 것이며, 그 자체로 일반적으로 원하는 수준의 생물학적 활성을 제공하기에 충분한 화합물을 함유할 것이다. 예를 들어, 제형은 1 나노그램 내지 2 그램의 활성 성분, 예를 들어, 1나노그램에서 2밀리그램의 활성 성분을 함유할 수 있다. 이러한 범위 내에서, 화합물의 특정 하위 범위는 0.1밀리그램 내지 2그램의 활성 성분(더 일반적으로 10밀리그램 내지 1그램, 예를 들어 50밀리그램 내지

500밀리그램), 또는 1마이크로그램 내지 20밀리그램(예를 들어, 1마이크로그램 내지 10밀리그램, 예를 들어 0.1 밀리그램에서 2밀리그램의 활성 성분)이다.

[0169]

[0170] 경구 조성물의 경우, 단위 투여 형태는 1 밀리그램 내지 2 그램, 보다 전형적으로 10 밀리그램 내지 1 그램, 예를 들어 50 밀리그램 내지 1 그램, 예를 들어 100 밀리그램 ~ 1 그램 활성 화합물을 함유할 수 있다.

[0171] 활성 화합물은 원하는 치료 효과를 달성하기에 충분한 양(유효량)으로 이를 필요로 하는 환자(예를 들어, 인간 또는 동물 환자)에게 투여될 것이다. 투여되는 화합물의 정확한 양은 표준 절차에 따라 감독하는 의사에 의해 결정될 수 있다.

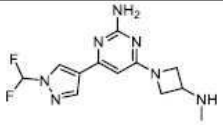
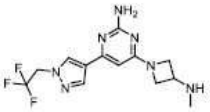
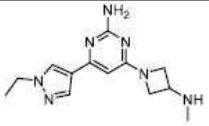
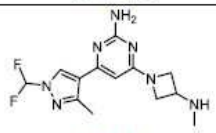
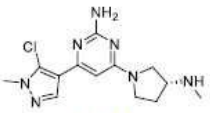
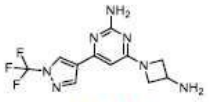
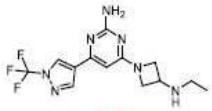
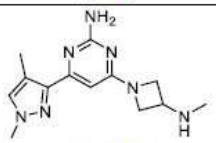
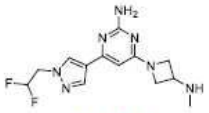
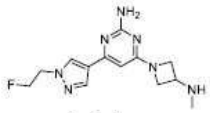
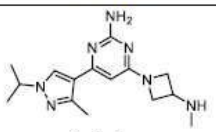
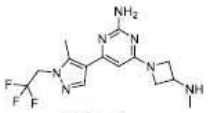
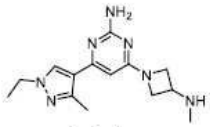
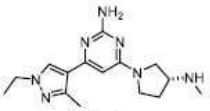
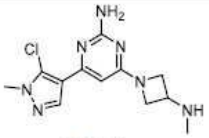
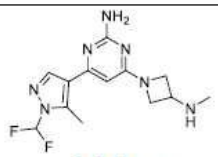
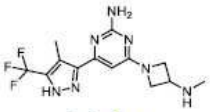
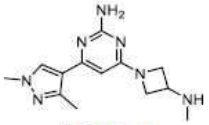
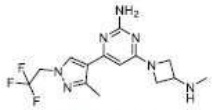
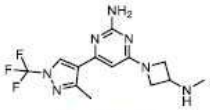
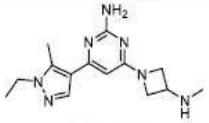
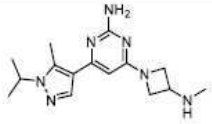
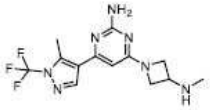
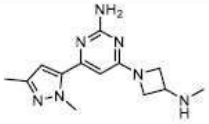
[0172] **실시예**

[0173] 이제 본 발명이 하기 실시예를 참조하여 예시될 것이지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0174] **실시예 1 내지 42**

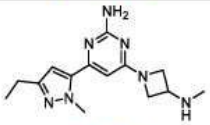
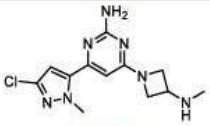
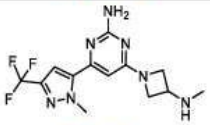
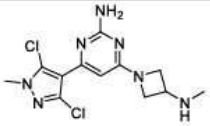
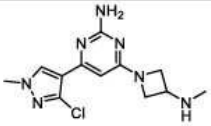
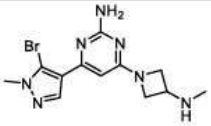
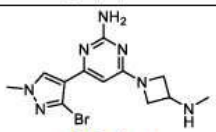
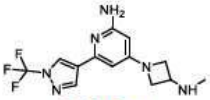
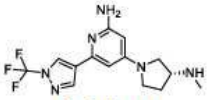
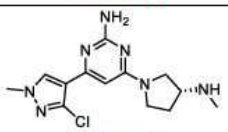
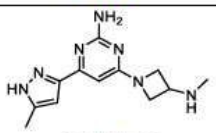
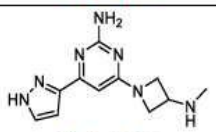
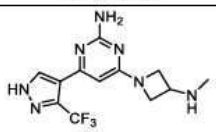
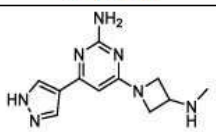
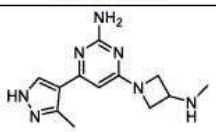
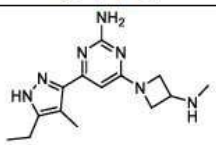
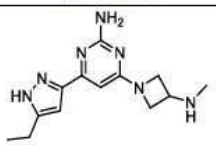
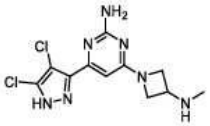
[0175] 하기 **표 1**에 기재된 실시예 1 내지 42의 화합물을 제조했다. 그의 NMR 및 LCMS 특성 및 이의 제조에 사용된 방법은 **표 3**에 나타낸다. 실시예 각각에 대한 출발 물질은 **표 2**에 열거된다. 실시예 20, 23, 32 및 33의 경우 제안된 합성 경로가 표시된다.

[0176] **표 1 - 실시예 화합물**

 실시예 1	 실시예 2	 실시예 3
 실시예 4	 실시예 5	 실시예 6
 실시예 7	 실시예 8	 실시예 9
 실시예 10	 실시예 11	 실시예 12
 실시예 13	 실시예 14	 실시예 15
 실시예 16	 실시예 17	 실시예 18
 실시예 19	 실시예 20	 실시예 21
		

[0177]

[0178]

실시예 22	실시예 23	실시예 24
 실시예 25	 실시예 26	 실시예 27
 실시예 28	 실시예 29	 실시예 30
 실시예 31	 실시예 32	 실시예 33
 실시예 34	 실시예 35	 실시예 36
 실시예 37	 실시예 38	 실시예 39
 실시예 40	 실시예 41	 실시예 42

[0179] **일반 절차**

[0180] 제조 경로가 포함되지 않은 경우 관련 중간체는 상업적으로 입수가능한다. 상용 시약은 추가 정제 없이 사용되었다. 실온(RT)은 약 20-27° C를 나타낸다. ^{1}H NMR 스펙트럼은 Bruker, 또는 Jeol 기기에서 400 MHz에서 기록되었다. 화학적 이동 값은 백만분율(ppm), 즉 (δ) 값으로 표시된다. NMR 신호의 다중성에 대해 다음 약어가 사용된다: s=단일선, br=광대역, d=이중선, t=삼중선, q=사중선, quint=오중선, td=이중선의 삼중선, tt=삼중선의 삼중선, qd=이중선의 사중선, ddd=이중선의 이중선의 이중선, ddt=삼중선의 이중선의 이중선, m=다중선. 커플링 상수는 Hz로 측정된 *J* 값으로 나열된다. NMR 및 질량 분광법 결과는 배경 피크를 설명하도록 수정되었다. 크로마토그래피는 60 - 120 메시 실리카겔을 사용하여 수행되고 질소 압력(플래시 크로마토그래피) 조건에서 수행되는 컬럼 크로마토그래피를 말한다. '기본 실리카'를 사용한 컬럼 크로마토그래피는 Biotage® KP-NH 실리카겔을 사용하는 것을 지칭한다. 'C18 실리카'를 사용하여 역상 조건에서 수행한 컬럼 크로마토그래피는 Biotage® KP-C18 실리카겔을 사용하는 것을 지칭한다. 반응 모니터링을 위한 TLC는 Merck의 특정 이동상과 실리카겔 F254를 고정상으로 사용하는 TLC를 지칭한다. 마이크로파 매개 반응은 Biotage Initiator 또는 CEM Discover 마이크로파 반응기에서 수행되었다.

[0181] **LCMS 분석**

[0182] 화합물 LCMS 분석을 아래 표에 주어진 장비 및 방법을 사용하여 전기분무 조건 하에서 수행했다:

[0183]

시스템	장비이름	LC 검출기	질량 검출기
1	Shimadzu Nexera	포토 다이오드 어레이	LCMS-2020
2	Agilent 1290 RRLC	포토 다이오드 어레이	Agilent 6120

방법 이름	용매 시스템	칼럼 사용	구배	UV 범위	질량 범위	칼럼 온도 · C	유속 mL/min
1	(A) 0.1% 물 내 NH_3 (B) 0.1%아세토니트릴 내 NH_3	X-Bridge C18 50 x 4.6 mm, 3.5 μm 또는 등가	0.01 min 에서 95:5, 5.0 min 에서 10:90 & 5.80 min 에서 7.20 min 까지 5:95, 7.21 min 에서 10.0 min 까지 95:5	200 - 400nm	60-1000 amu	주변	1.00
2	(A) 5 mM 물 내 암모늄 바이카보네이트 (B) 100% 아세토니트릴	X-Bridge C18 50 x 4.6mm, 3.5μm 또는 등가	0.01 min 에서 95:5, 3.5 min 에서 10:90 & 4.5 min 에서 6.0 min 까지 5:95, 6.01 min 에서 8.0 min 까지 95:5	200 - 400nm	60-1000 amu	주변	1.00

[0184]

[0185] 실험 부분 및 표 2 및 3 내 LCMS 데이터는 다음 형식으로 주어진다: **(장비 시스템, 방법):** 질량 이온, 체류 시간, UV 검출 파장.

[0186] **화합물 정제**

[0187] 화합물의 최종 정제는 데이터가 다음 형식으로 제공되는 아래에 설명된 기기 및 방법을 사용하여 분취 역상 HPLC에 의해 수행되었다: 정제 기술: [상(컬럼 설명, 컬럼 길이 × 내부 직경, 입자 크기), 용매 유속, 구배 - 이동상 A(시간 경과에 따른), 이동상(A), 이동상(B)에서 이동상 B의 %로 제공].

[0188] **분취용 HPLC 정제:**

[0189] SPD-20A UV 검출기가 있는 Shimadzu LC-20AP 바이너리 시스템

[0190] Gilson Trilution 소프트웨어로 제어되는 321 펌프, GX-271 액체 처리기 및 Gilson 171 DAD가 있는 Gilson 반분취용 HPLC 시스템

[0191] **정제 방법 A**

[0192] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 12 mL / min, 구배 0% - 30% (17 min에 걸쳐), 100 % (1 min에 걸쳐), 100% - 0% (4 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0193] **정제 방법 B**

[0194] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 12 mL / min, 구배 0% - 15% (24 min에 걸쳐), 15% - 15% 3 min(에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0195] **정제 방법 C**

[0196] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 16 mL / min, 구배 5% - 15% (18 min에 걸쳐), 15% - 15% (2 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0197] **정제 방법 D**

[0198] Prep HPLC: [역상 (X-select CSH 페닐 Hexyl C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 3% - 3% (40 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0199] **정제 방법 E**

[0200] Prep HPLC: [역상 (Gemini-NX C-18, 150 × 21.2 mm, 5 μm), 16 mL / min, 구배 5% - 30% (25 min에 걸쳐), 100% (3 min에 걸쳐), 100% - 5% (4 min에 걸쳐), 이동상 (A): 5 mM 암모늄 바이카보네이트 + 0.1% 물 내 암모니아, (B): 100% 아세토니트릴].

[0201] **정제 방법 F**

[0202] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 13 mL / min, 구배 5% - 20% (22 min에 걸쳐), 20% - 20% (3 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 5% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0203] **정제 방법 G**

[0204] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 13 mL / min, 구배 0% - 15% (24 min에 걸쳐), 15% - 15% (5 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0205] **정제 방법 H**

[0206] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 30% (15 min에 걸쳐), 100 % (1 min에 걸쳐), 100% - 0% (4 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0207] **정제 방법 I**

[0208] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 15% (25 min에 걸쳐), 15% - 15% (4 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 5% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0209] **정제 방법 J**

[0210] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 5% - 12% (28 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 5% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0211] **정제 방법 K**

[0212] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 15% (18 min에 걸쳐), 15% - 15% (5 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (3 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0213] **정제 방법 L**

[0214] Prep HPLC: [역상 (X-select CSH 페닐 Hexyl C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 20% (23 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (3 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0215] **정제 방법 M**

[0216] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 18 mm, 5 μm), 14 mL / min, 구배 0% - 20% (22 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0217] **정제 방법 N**

[0218] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 18 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 20% (22 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (2 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0219] **정제 방법 O**

[0220] Prep HPLC: [역상 (X-select CSH 페닐 Hexyl C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 5% (22

min에 걸쳐), 5% - 5% (2 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0221] **정제 방법 P**

[0222] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 13 mL / min, 구배 10% - 15% (24 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0223] **정제 방법 Q**

[0224] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 30% (17 min에 걸쳐), 100% (1 min에 걸쳐), 100% - 0% (4 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0225] **정제 방법 R**

[0226] Prep HPLC: [역상 (X-Bridge C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 14 mL / min, 구배 10% - 30% (20 min에 걸쳐), 30% - 30% (2 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 10% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 5 mM 암모늄 바이카보네이트 + 0.1% 물 내 암모니아, (B): 100% 아세토니트릴].

[0227] **정제 방법 S**

[0228] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 20% (20 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0229] **정제 방법 T**

[0230] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 5% - 20% (20 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0231] **정제 방법 U**

[0232] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 12 mL / min, 구배 0% - 20% (25 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0233] **정제 방법 V**

[0234] Prep HPLC: [역상 (Gemini NX C-18, 150 × 21.2 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 15% (18 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0235] **정제 방법 W**

[0236] Prep HPLC: [역상 (Gemini NX C-18, 150 × 21.2 mm, 5 μm), 16 mL / min, 구배 0% - 8% (18 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0237] **정제 방법 X**

[0238] Prep HPLC: [역상 (X-select CSH 페닐 Hexyl C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 14 mL / min, 구배 0% - 20% (20 min에 걸쳐), 100% (3 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0239] **정제 방법 Y**

[0240] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 14 mL / min, 구배 0% - 15% (20 min에 걸쳐), 15% - 15% (2 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0241] **정제 방법 Z**

[0242] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 14 mL / min, 구배 0% - 15% (20 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0243] **정제 방법 AA**

[0244] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 10% (25 min에 걸쳐), 10% - 10% (2 min에 걸쳐), 100 % (3 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0245] **정제 방법 AB**

[0246] Prep HPLC: [역상 (X-Bridge C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 5% - 27% (26 min에 걸쳐), 100% (3 min에 걸쳐), 100% - 5% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 5 mM 암모늄 바이카보네이트 + 0.1% 물 내 암모니아, (B): 100% 아세토니트릴].

[0247] **정제 방법 AC**

[0248] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 30% (17 min에 걸쳐), 100 % (1 min에 걸쳐), 100% - 0% (4 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0249] **정제 방법 AD**

[0250] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 10% (18 min에 걸쳐), 10% - 10% (2 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0251] **정제 방법 AE**

[0252] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 150 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 10% (12 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (2 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 포름산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0253] **정제 방법 AF**

[0254] Prep HPLC: [역상 (X-Bridge C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 12% (25 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (8 min에 걸쳐), 이동상 (A): 5 mM 암모늄 바이카보네이트 + 0.1% 물 내 암모니아, (B): 100% 아세토니트릴].

[0255] **정제 방법 AG**

[0256] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 15% (18 min에 걸쳐), 100 % (3 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0257] **정제 방법 AH**

[0258] Prep HPLC: [역상 (X-Bridge C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 12% (20 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (5 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0259] **정제 방법 AI**

[0260] Prep HPLC: [역상 (Sunfire C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 17 mL / min, 구배 0% - 20% (17 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (4 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0261] **정제 방법 AJ**

[0262] Prep HPLC: [역상 (X-Bridge C-18, 250 × 19 mm, 5 μm), 15 mL / min, 구배 0% - 10% (28 min에 걸쳐), 10% - 10% (6 min에 걸쳐), 100 % (2 min에 걸쳐), 100% - 0% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오

로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0263] **정제 방법 AK**

[0264] Prep HPLC: [역상 (YMC-Actus Triart C-18, 250 × 20 mm, 5 μm), 16 mL / min, 구배 5% - 20% (24 min에 걸쳐), 100% (2 min에 걸쳐), 100% - 5% (6 min에 걸쳐), 이동상 (A): 0.1% 물 내 트리플루오로아세트산, (B): 100% 아세토니트릴].

[0265] **약어**

[0266] CDI = 카르보닐디이미다졸

[0267] DAST = 디에틸아미노설퍼 트리플루오리드

[0268] DCM = 디클로로메탄

[0269] DIPEA = *N*,*N*-디이소프로필에틸아민

[0270] ESI = 전자 분무 이온화

[0271] EtOAc = 에틸 아세테이트

[0272] h = 시간(들)

[0273] H_2O = 물

[0274] HCl = 염화수소, 염산

[0275] HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피

[0276] IPA = 프로판-2-올

[0277] LC = 액체 크로마토그래피

[0278] MeCN = 아세토니트릴

[0279] MeOH = 메탄올

[0280] min(s) = 분(들)

[0281] MS = 질량 분광계

[0282] nm = 나노미터

[0283] NMR = 핵자기공명

[0284] $POCl_3$= 클로라이드옥시염화인

[0285] RT = 실온

[0286] sat. = 포화

[0287] SFC = 초임계 유체 크로마토그래피

[0288] TEA = 트리에틸아민

[0289] TFA = 트리플루오로아세트산

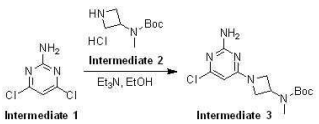
[0290] THF = 테트라하이드로푸란

[0291] TLC = 박층 크로마토그래피

[0292] **중간체의 합성:**

[0293] **경로 1**

[0294] **중간체 3, *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-클로로피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일) (메틸) 카바메이트의 제조에 의해 예시된 피리미딘의 제조를 위한 대표적 절차**

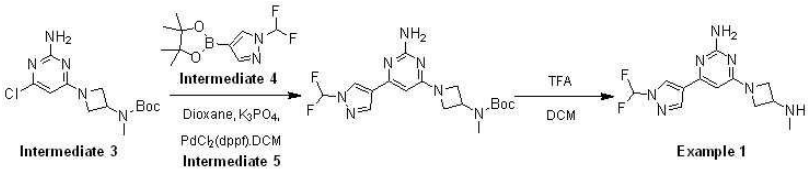
[0295] 

[0296] 4,6-디클로로피리미딘-2-아민 **중간체 1** (2 g, 12.27mmol)를 EtOH (50 mL) 중 *tert*-부틸 *N*-(아제티딘-3-일)-*N*-메틸카바메이트 하이드로클로라이드 **중간체 2** (3.0 g, 12.9 mmol)의 교반 용액, 이후 Et_3N (8 mL, 30.6 mmol)에 RT에서 조금씩 부가했다. 얻어진 현탁액을 환류로 가온하고 2시간 동안 유지했다. 혼합물을 냉각시키고 물(30mL)를 한방울씩 부가했다. 얻어진 고체를 단리하고, 물로 세척하고 건조시켜 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-클로로피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일) (메틸) 카바메이트 **중간체 3** (3 g, 79%)를 백색 고체로서 얻었다. **중간체 3**에 대한 데이터는 표 2에 있다.

[0297] **일반 합성 절차:**

[0298] **경로 A**

[0299] **실시예 1, 4-(1-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민의 제조에 의해 예시된 피리미딘의 제조를 위한 대표적 절차**

[0300] 

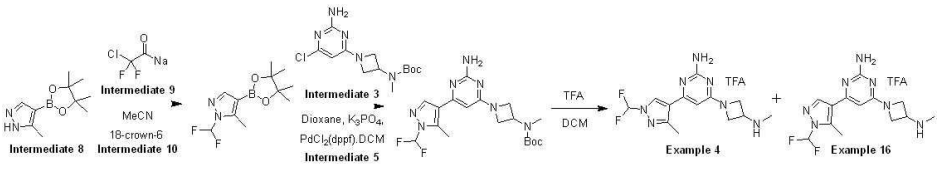
[0301] *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-클로로피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 **중간체 3**, (0.350 g, 1.11 mmol), 1-(디플루오로메틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 **중간체 4** (0.300 g, 1.23 mmol), K_3PO_4 (0.711 g, 3.36 mmol)을 1,4-디옥산 (4 mL) 및 물 (1 mL) 내에 용해시키고 RM을 15 min 동안 탈기했다. Pd(dppf)Cl_2.DCM **중간체 5**, (0.090 g, 0.11 mmol)를 부가하고 RM을 70°C에서 16h 동안 교반했다. 반응물을 물 (10 mL)로 희석하고, 에틸 아세테이트 (3 x 20 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기 층을 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 농축하고 미정제 잔사를 얻었고 이를 칼럼 크로마토그래피 (Neutral Alumina, 0-35% EtOAc: 헥산)에 의해 정제하여 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일) (메틸) 카바메이트 (0.4 g, 90.7%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0302] **LCMS (시스템 1, 방법 1):** m/z 395 (M+H)+ (ESI +ve), 2.88 min에서, 220 nm

[0303] *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 (0.400 g, 0.10 mmol)를 DCM (4 mL) 내에 용해시키고, TFA를 (2 mL) 한방울씩 0°C에서 부가하고 RM을 실온에서 3h 동안 교반했다. 용매를 진공에서 증발시키고 톨루엔(3 x 10 mL)과 공비하여 미정제 잔사를 얻었고 이를 **정제 방법 A**에 의해 정제하여 4-(1-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민 **실시예 1** (245 mg, 82.0%)의 디 TFA 염을 백색 고체로서 얻었다. **실시예 1**에 대한 데이터는 표 3에 있다.

[0304] **경로 B**

[0305] **실시예 4, 4-(1-(디플루오로메틸)-3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민 및 실시예 16, 4-(1-(디플루오로메틸)-5-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민의 제조에 의해 예시된 피리미딘의 제조를 위한 대표적 절차**

[0306] 

[0307] 5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 **중간체 8** (1.0 g, 4.81 mmol)를 아세토니

트릴 (10 mL) 내 용해시키고, 18-Crown-6 **중간체 10** (254 mg, 0.96 mmol) 및 소듐 클로로디플루오로아세테이트 **중간체 9** (879 mg, 5.77 mmol)을 부가하고 반응 혼합물을 80 °C에서 24 h 동안 가열했다. 침전물을 여과로 제거하고 여액을 농축하고 미정제 생성물을 얻었고 이를 칼럼 크로마토그래피 (Neutral Alumina, 헥산 내 0 내지 35 % 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 1-(디플루오로메틸)-5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 및 1-(디플루오로메틸)-3-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (조합시킨 1 g, 80.6 %)의 혼합물을 회백색 고체로서 얻었다.

[0308] **LCMS (시스템 2, 방법 2):** 이성질체 1, UV 3.52분, 202nm 및 이성질체 2, UV 3.63분, 202nm.

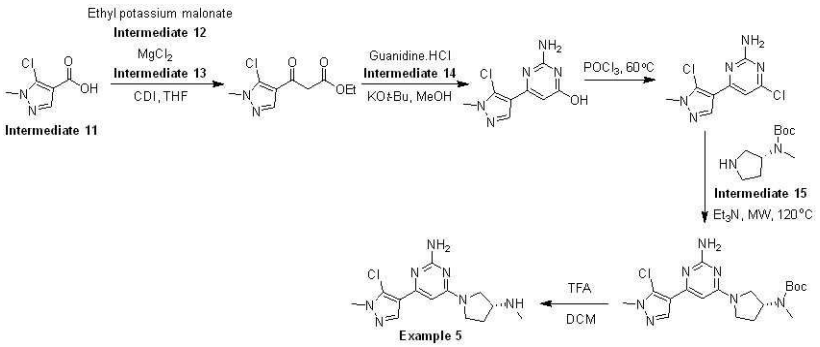
[0309] 1-(디플루오로메틸)-5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 및 1-(디플루오로메틸)-3-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (조합시킨 1 g, 3.87 mmol) 및 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-클로로피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 **중간체 3** (1.1 g, 3.50 mmol)을 1,4-디옥산 (10 mL) 내에 RT에서 용해시켰다. 물 (2 mL), K_3PO_4 (2.23 g, 10.51 mmol)을 부가하고 혼합물을 15 min 동안 탈기했다. $PdCl_2$(dppf).DCM **중간체 5** (280 mg, 0.35 mmol)를 부가하고 혼합물을 70°C에서 16 h 동안 교반했다. 반응 혼합물을 H_2O (50 mL) 및 에틸 아세테이트 (35 mL) 사이에서 분배시키고, 수성 층을 추가로 에틸 아세테이트 (2 × 35 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기 층을 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 용매 농축하고 미정제 잔사를 얻었고 이를 칼럼 크로마토그래피 (Neutral Alumina, DCM 내 0 내지 2% 메탄올)에 의해 정제하여 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1-(디플루오로메틸)-5-메틸-1H-피라졸-4-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 및 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1-(디플루오로메틸)-3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 (조합시킨 630 mg, 39.7 %)의 혼합물을 황색 검으로서 얻었다.

[0310] **LCMS (시스템 2, 방법 2)**: 이성질체 1, m/z 410.2 (M+H)+ (ES+), 3.35 min에서, 202 nm & 이성질체 2, m/z 410.2 (M+H)+ (ES+), 3.40 min에서, 202 nm.

[0311] *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1-(디플루오로메틸)-5-메틸-1H-피라졸-4-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 및 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1-(디플루오로메틸)-3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 (조합시킨 800 mg, 1.95 mmol)를 DCM (8 mL) 내에 0 °C에서 용해시키고, TFA (4 mL)를 한 방울씩 부가하고 혼합물 실온에서 3 h동안 교반했다. 반응 혼합물을 농축하고 미정제 잔사를 톨루엔 (3 x 5 mL)과 공비하여 미정제 생성물을 얻었고 이를 **정제 방법 D**에 의해 정제하여 4-(1-(디플루오로메틸) -3-메틸-1H-피라졸-4-일) -6-(3-(메틸아미노) 아제티딘-1-일) 피리미딘-2-아민 TFA 염 **실시예 4** (362 mg, 43.8 %)를 백색 고체로서 및 4-(1-(디플루오로메틸)-5-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노) 아제티딘-1-일) 피리미딘-2-아민 TFA 염 **실시예 16** (150 mg, 18.1 %)를 백색 고체로서 얻었다. **실시예 4** 및 **실시예 16**에 대한 데이터는 표 3에 있다.

[0312] **경로 C**

[0313] **실시예 5, (*R*)-4-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민의 제조에 의해 예시된 피리미딘의 제조를 위한 대표적 절차**

[0314] 

[0315] 5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-카르복실산 **중간체 11** (1.0 g, 6.25 mmol)를 THF (50 mL) 내에 용해시키고 0oC로 냉각시켰다. 카르보닐디이미다졸 (1.51 g, 9.37 mol)를 강한 교반 하에서 부가하고 혼합물을 RT에서 1 h 동안 교반했다. 반응 혼합물을 0oC로 냉각시키고, 에틸 포타슘 말로네이트 **중간체 12** (1.59 g, 9.37 mol) 및 마그네슘 클로라이드 **중간체 13** (0.89 g, 9.37 mol)을 부가하고 반응 혼합물을 RT에서 16 h 동안 교반했다. 용매를 감

압 하에서 증발시키고, 반응 혼합물을 H_2O (50 mL)로 희석하고, 1M HCl 용액 (10 mL)의 부가로 산성화시키고, EtOAc (3 x 100 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기 층을 염수 용액 (50 mL)로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조시키고 농축하고 에틸 3-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-3-옥소프로파노에이트 (1.01 g, 70%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0316] **LCMS (시스템 2, 방법 2)**: m/z 231.1 (M+H)+ (ES+), 2.63 min에서, 254 nm.

[0317] 에틸 3-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-3-옥소프로파노에이트 (0.9 g, 3.9 mmol)를 MeOH (15.0 mL) 내에 0°C에서 용해시키고, 포타슘-*tert*-부톡사이드 (1.31 g, 11.7 mmol) 및 구아니딘 하이드로클로라이드 **중간체 14** (0.743 g, 7.82 mmol)을 부가하고 반응 혼합물 70oC에서 16 h 동안 가열했다. RT로 냉각 후 용매를 감압 하에서 증발시키고 황색 고체를 얻었고 이를 물 (50 mL) 내 현탁시키고, 1M HCl 용액 (10 mL)의 부가로 산성화시키고, DCM (3 x 50 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기 층을 Na2SO4 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축하고 2-아미노-6-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-올 (0.8 g, 91%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0318] **LCMS (시스템 2, 방법 2)**: m/z 226.1 (M+H)+ (ES+), 1.81 min에서, 230 nm.

[0319] 2-아미노-6-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-올 (0.8 g, 3.5 mmol)를 함유하는 마이크로파 바이알에 인 옥시클로라이드 (3.0 mL)를 0°C에서 부가하고 얻어진 용액을 70oC에서 16 h 동안 가열했다. 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, 빙냉수(20mL)에 붓고, 수성 층을 고체 NaHCO3를 첨가하여 중화하고, EtOAc(3 x 50mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 층을 염수 (100 mL)로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조시키고 농축하고 4-클로로-6-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-2-아민 (0.38 g, 44%)를 백색 고체로서 얻었다.

[0320] **LCMS (시스템 2, 방법 1)**: m/z 244.1 (M+H)+ (ES+), 2.54 min에서, 240 nm.

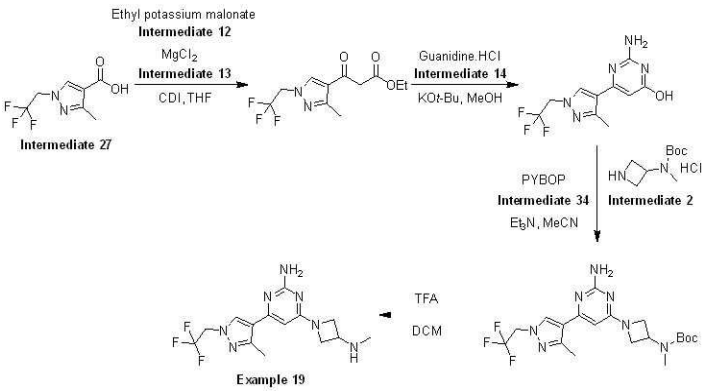
[0321] 4-클로로-6-(5-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-3-일) 피리미딘-2-아민 (0.18 g, 0.74 mmol) 및 *tert*-부틸 (*R*)-메틸(피롤리딘-3-일) 카바메이트 **중간체 15** (0.296 g. 1.48 mol)를 35mL 마이크로웨이브 바이알의 Et-3N(5.0mL)에 용해시키고 생성된 혼합물을 120℃에서 16시간 동안 가열했다. 이 시간 후, 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, DCM(100mL)을 첨가하고, 유기층을 H2O(50mL) 및 염수 용액(50mL)으로 세척하고 농축하여 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔 60-120, DCM 중 0-5% MeOH) 로 정제하여 미정제 생성물을 얻었고 tert-부틸 (R)-(1-(2-아미노-6-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)을 제공함)피리미딘-4-일)피롤리딘-3-일)(메틸)카바메이트(0.230g, 76%)를 갈색 점착성 검으로 얻었다.

[0322] **LCMS (시스템 2, 방법 1)**: m/z 408.2 (M+H)+ (ES+), 3.19 min에서, 254 nm.

[0323] *tert*-부틸 (*R*)-(1-(2-아미노-6-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-일) 피롤리딘-3-일) (메틸) 카바메이트 (0.23 g, 0.57 mmol)를 DCM (1.0 mL) 내에 용해시키고, TFA (1.0 mL)를 0°C에서 부가하고 반응 혼합물을 RT에서 1 h 동안 교반했다. 용매를 감압 하에서 증발시키고 및 잔사를 **정제 방법 E**에 의해 정제하여 (*R*)-4-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노) 피롤리딘-1-일) 피리미딘-2-아민 **실시예 5** (35 mg, 20%)를 백색 고체로서 얻었다. **실시예 5**에 대한 데이터는 표 3에 있다.

[0324] **경로 D**

[0325] **실시예 19, 4-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민의 제조에 의해 예시된 피리미딘의 제조를 위한 대표적 절차**

[0326] 

[0327] 3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-카르복실산 **중간체 27** (1.0 g, 4.8 mmol)를 N2 가스 하에서 건조 THF (100 mL) 내에 용해시키고 용액을 0oC로 냉각시켰다. 카르보닐디이미다졸 (1.6 g, 9.6 mmol)를 부가하고 혼합물을 RT에서 1 h 동안 교반했다. 반응 혼합물을 0oC로 냉각시키고, 에틸 포타슘 말로네이트 **중간체 12** (1.63 g, 9.6 mmol) 및 마그네슘 클로라이드 **중간체 13** (0.9 g, 9.6 mmol)을 부가하고 반응 혼합물을 RT에서 16 h 동안 교반했다. 이 시간 후 용매를 증발시키고, 잔사를 H_2O (50 mL)로 희석하고, 수성 층을 1N HCl 용액 (20 mL) 부가로 산성화시키고 EtOAc (3 x 100 mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 층을 염수 용액 (50 mL)으로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조시키고 농축하고 미정제 생성물을 얻었고, 이를 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔; 60-120 메쉬; 0-40% 헥산 내 EtOAc)에 의해 정제하여 에틸 3-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-3-옥소프로파노에이트 (0.52 g, 40%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0328] **LCMS (시스템 2, 방법 2)**: m/z 277.0 (M+H)+ (ES+), 2.84 min에서, 244 nm

[0329] 에틸 3-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-3-옥소프로파노에이트 (0.5 g, 1.79 mol)를 MeOH (15 mL) 내에 0oC에서 용해시키고, 포타슘-tert-부톡사이드 (0.6 g, 0.00539 mol) 및 구아니딘 하이드로클로라이드 **중간체 14** (0.345 g, 3.59 mmol)을 부가하고 반응 혼합물을 70oC에서 16 동안 가열했다. 이 시간 후 용매를 증발시키고 황색 고체를 얻었고 이를 물 (50 mL) 내 현탁시키고, 1M HCl 용액 (10 mL)의 부가로 산성화시키고, DCM (3 x 50 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기 층을 Na2SO4 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축하고 2-아미노-6-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-올 (0.38 g, 77%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0330] **LCMS (시스템 2, 방법 2)**: m/z 274.2 (M+H)+ (ES+), 1.85 min에서, 240 nm

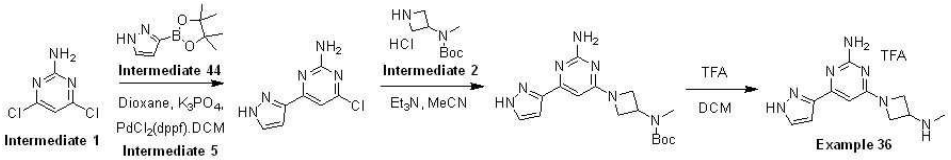
[0331] 2-아미노-6-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-올 (0.38 g, 1.39 mmol) 및 *tert*-부틸 아제티딘-3-일(메틸)카바메이트 **중간체 2** (0.463 g. 2.08 mmol)을 Et_3N (5.0 mL) 및 MeCN (8.0 mL) 내 0oC에서 용해시켰다. PYBOP **중간체 34** (1.08 g, 2.08 mmol)를 0oC에서 부가하고 반응 혼합물을 80°C에서 16 h 동안 가열했다. 이 시간 후, 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, DCM(100mL)을 첨가하고, 유기층을 H2O(50mL) 및 염수 용액(50mL)으로 세척하고 용매 농축하여 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔 60-120, DCM 중 0-5% MeOH) 로 정제하여 미정제 생성물을 얻었고 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 (0.410 g, 66%)를 갈색 점착성 검으로 얻었다.

[0332] **LCMS (시스템 2, 방법 1)**: m/z 442.3 (M+H)+ (ES+), 3.03 min에서, 214 nm

[0333] *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일) 피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일) (메틸)카바메이트 (0.41 g, 0.929 mmol)를 DCM (2.0 mL) 내에 0oC에서용해시키고, TFA (2.0 mL)를 부가하고 반응 혼합물을 RT에서 1 h 동안 교반했다. 용매를 감압 하에서 증발시키고 잔사를 **정제 방법 R**에 의해 정제하여 4-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민 **실시예 19** (27 mg, 33%)를 백색 고체로서 얻었다. **실시예 19**에 대한 데이터는 표 3에 있다.

[0334] **경로 E**

[0335] **실시예 36, 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1H-피라졸-3-일)피리미딘-2-아민의 제조에 의해 예시된 피리미딘의 제조를 위한 대표적 절차**

[0336] 

[0337] 4,6-디클로로피리미딘-2-아민 **중간체 1** (1 g, 12.0 mmol), 3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 **중간체 44** (1.40 g, 7.20 mmol) 및 K_3PO_4 (3.88 g, 18.9 mmol)을 1,4-디옥산 (20 mL) 및 물 (4 mL) 내에 질소 하에서 용해시키고 20 min 동안 탈기했다. Pd(dppf)C12.DCM **중간체 5** (497 mg, 0.60 mmol)를 부가하고 반응 혼합물을 80°C에서 16 h 동안 교반했다. 냉각 후, 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고, 에틸 아세테

이트 (3 x 50 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기층을 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 농축하고 미정제 잔사를 얻었고 이를 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔; 60-120 메쉬, 0 - 28% 헥산 내 EtOAc)에 의해 정제하여 4-클로로-6-(1H-피라졸-3-일) 피리미딘-2-아민 (230 mg, 19.5%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0338] **LCMS (시스템 1, 방법 1)**: m/z 196 (M+H)+ (ES+), 2.62 min에서, 254 nm

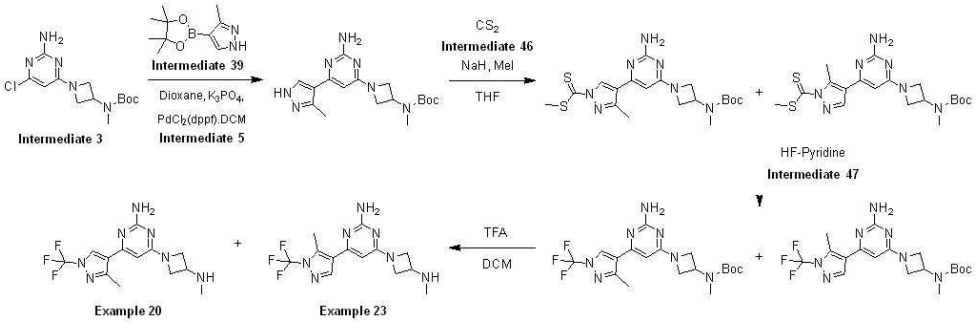
[0339] 4-클로로-6-(1H-피라졸-3-일)피리미딘-2-아민 (210 mg, 1.0 mmol) 및 *tert*-부틸 아제티딘-3-일(메틸)카바메이트 하이드로클로라이드 **중간체 2** (401 mg, 2.1 mmol)을 MeCN (10 mL) 내에 용해시키고, Et_3N (4 mL)를 부가하고 반응을 90°C에서 6 h 동안 교반했다. 반응 혼합물 냉각시키고, 물 (30 mL)로 희석하고, 에틸 아세테이트 (3 x 30 mL)로 추출하고, 조합시킨 유기층을 건조시키고 (Na_2SO_4), 여과하고 농축하고 미정제 *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1H-피라졸-3-일) 피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 (추정 100%)를 회백색 고체로서 얻었고 이를 정제없이 사용했다.

[0340] **LCMS (시스템 1, 방법 1)**: m/z 346 (M+H)+ (ES+), 2.98 min에서, 240 nm

[0341] *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(1H-피라졸-3-일)피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트 (570 mg, 1.6 mmol)를 DCM (3 mL) 내에 0oC에서 용해시키고, TFA (1.5 mL)를 한방울씩 부가하고 반응 혼합물을 3h 동안 실온에서 교반했다. 용매를 농축하고 잔사를 톨루엔 (3 x 3 mL)과 공비하여 미정제 생성물을 얻었고 이를 **정제 방법 AI**에 의해 정제하여 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1H-피라졸-3-일)피리미딘-2-아민 **실시예 36** (151 mg, 37.3%)를 백색 고체로서 얻었다. **실시예 36**에 대한 데이터는 표 3에 있다.

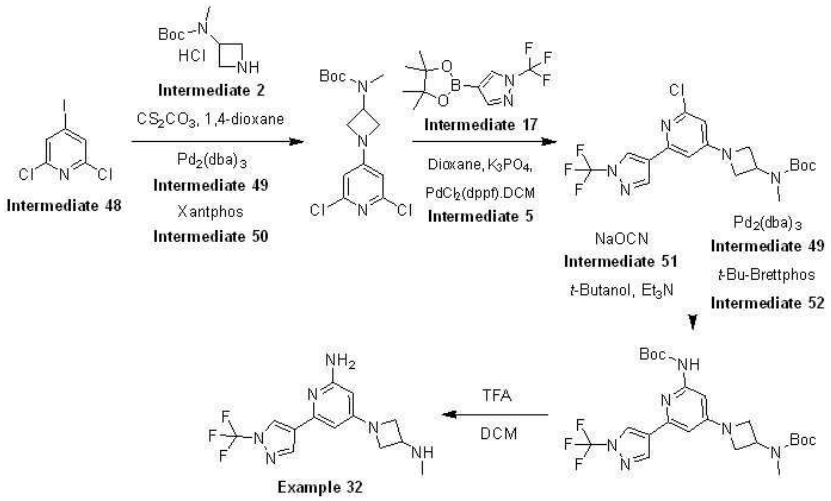
[0342] **경로 F**

[0343] **실시예 20, 4-(3-메틸-1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민 및 실시예 23, 4-(5-메틸-1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민의 제조 절차**

[0344] 

[0345] **경로 G**

[0346] **실시예 32, 4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-아민 및 실시예 33, (*R*)-4-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-아민의 제조 절차**

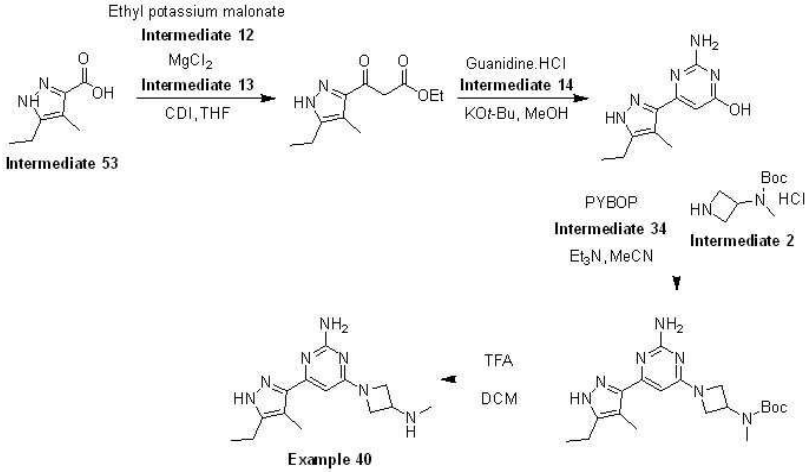


[0347]

[0348] **실시예 33의** 합성에 대해서 **중간체 2**를 **중간체 17**로 대체.

[0349] **경로 H**

[0350] **실시예 40, 4-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민의 제조 절차**



[0351]

[0352] 5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-카르복실산 **중간체 53** (0.75 g, 4.87 mmol)를 건조 THF (100 mL) 내에 용해시키고 용액을 0oC로 냉각시켰다. 카르보닐디이미다졸 (1.57 g, 9.74 mmol)를 강한 교반 하에서 부가하고 혼합물을 RT에서 1 h 동안 교반했다. 반응 혼합물을 0oC로 냉각시키고, 이후 에틸 포타슘 말로네이트 **중간체 12** (1.62 g, 9.74 mmol) 및 마그네슘 클로라이드 **중간체 13** (0.935 g, 9.74 mol)를 부가하고 반응 혼합물을 RT에서 밤새 교반했다. 반응 완료후, 용매를 감압 하에서 증발시키고, 반응 혼합물을 H_2O (50 mL)로 희석하고, 수성 층을 1N HCl 용액 (30 mL) 부가로 산성화시키고, EtOAc (3 x 100 mL)로 추출하고 조합시킨 유기 층을 염수 용액 (50 mL)로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하고 미정제 생성물을 얻었고, 이를 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔; 60-120 메쉬; 0-40% EtOAc/헥산)에 의해 정제하여 에틸 3-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)-3-옥소프로파노에이트 (0.71 g, 65%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0353] **LCMS (시스템 1, 방법 2)**: m/z 225.3 (M+H)+ (ES+), 2.80 min에서, 240 nm

[0354] 에틸 3-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)-3-옥소프로파노에이트 (0.7 g, 3.12 mmol)를 MeOH (15 mL) 내에 용해시키고, 포타슘-*tert*-부톡사이드 (1.05 g, 9.37 mmol) 및 구아니딘 하이드로클로라이드 **중간체 14** (0.6 g, 6.25 mmol)을 0oC에서 부가하고, 반응 혼합물을 RT로 가온하고 이후 70oC에서 밤새 가열했다. 반응 완료후, 반응 혼합물을 RT로 냉각시키고, 용매를 감압 하에서 증발시키고 황색 고체를 얻었고, 이를 1 N HCl (5 mL)을 한 방울씩 부가하여 산성화시키고 수성 층을 EtOAc (3 x 50 mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 층을 염수 용액 (50 mL)로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축하고 2-아미노-6-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)피리미딘-4-올 (0.68 g, 99%)를 회백색 고체로서 얻었다.

[0355] **LCMS (시스템 1, 방법 2)**: m/z 220.3 (M+H)+ (ES+), 1.81 min에서, 202 nm

[0356] POCl3 (2.0 mL)를 2-아미노-6-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일) 피리미딘-4-올 (0.68 g, 3.1 mmol)에 0oC에서 부가하고 반응 혼합물을 70oC에서 밤새 가열했다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 빙조에 붓고, 고체 NaHCO3를 첨가하여 중화하고, 수성 층을 EtOAc (3 x 50 mL)로 추출하고 조합시킨 유기 층을 염수 용액 (50 mL)로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하고 미정제 잔사를 얻었고 이를 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔; 60-120 메쉬; 0-40% EtOAc/헥산)에 의해 정제하여 4-클로로-6-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일) 피리미딘-2-아민 (401 mg, 54%)를 황색 고체로서 얻었다.

[0357] **LCMS (시스템 2, 방법 2)**: m/z 238.3 (M+H)+ (ES+), 2.75 min에서, 214 nm

[0358] 4-클로로-6-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일) 피리미딘-2-아민 (189 mg, 7.97 mmol) 및 *tert*-부틸 아제티딘-3-일(메틸)카바메이트 **중간체 2** (0.354 g. 1.59 mmol)을 트리에틸아민 (5.0 mL) 내에 용해시키고 반응 혼합물을 120°C에서 밤새 가열했다. 반응 완료후, 반응 혼합물을 RT로 냉각시키고, DCM (100 mL)를 부가하고, 유기 층을 H_2O (50 mL), 염수 (50 mL)로 세척하고, 농축하고 미정제 생성물을 얻었고, 이를 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔 60-120 메쉬, 0-5% MeOH: DCM)에 의해 정제하여*tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일) 피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일) (메틸)카바메이트 (230 mg, 74%)를 갈색 점성 검으로서 얻었다.

[0359] **LCMS (시스템 2, 방법 1)**: m/z 273.3 (M+H)+ (ES+), 3.03 min에서, 202 nm

[0360] *tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일) 피리미딘-4-일) 아제티딘-3-일) (메틸)카바메이트 (230 mg, 5.94 mmol)를 DCM (2.0 mL) 내에 용해시키고, TFA (2.0 mL)를 0oC에서 부가하고 반응 혼합물을 RT에서 1h 동안 교반했다. 용매를 감압 하에서 증발시키고 얻어진 미정제 생성물을 prep-HPLC에 의해 정제하여 4-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노) 아제티딘-1-일) 피리미딘-2-아민의 디트리플루오로 아세테이트 염 **실시예 40** (33 mg, 19%)를 백색 고체로서 얻었다. **실시예 40**에 대한 데이터는 표 3에 있다.

[0361] 표 2 - 중간체

표 2				
중간체 번호	이름	합성 경로	사용된 중간체	데이터
1	4,6-디클로로피리미딘-2-아민	-	-	시판, CAS: 56-05-3
2	*tert*-부틸 아제티딘-3-yl(메틸)카바메이트 하이드로클로라이드	-	-	시판, CAS: 943060-59-1
3	*tert*-부틸 (1-(2-아미노-6-클로로피리미딘-4-일)아제티딘-3-일)(메틸)카바메이트	1	1 & 2	LCMS (시스템 1, 방법 1): m/z 314.2 $(M+H)^+$ (ES+), 3.53 min 에서, 262 nm
4	1-(디플루오로메틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1206640-82-5
5	Pd(dppf)Cl_2.DCM	-	-	시판, CAS: 95464-05-4
6	4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1049730-42-8
7	1-에틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 847818-70-6
8	5-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 936250-20-3
9	소듐 클로로디플루오로아세테이트	-	-	시판, CAS: 1895-39-2
10	18-Crown-6	-	-	시판, CAS: 17455-13-9
11	5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 54367-66-7
12	에틸 포타슘 말로네이트	-	-	시판, CAS: 6148-64-7
13	마그네슘 클로라이드	-	-	시판,

[0362]

				CAS: 7786-30-3
14	구아니딘 하이드로클로라이드	-	-	시판, CAS: 50-01-1
15	*tert*-부틸 (*R*)-메틸(피롤리딘-3-일) 카바메이트	-	-	시판, CAS: 392338-15-7
16	*tert*-부틸 아제티딘-3-일카바메이트 하이드로클로라이드	-	-	시판, CAS: 217806-26-3
17	4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1-(트리플루오로 메틸)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1046831-98-4
18	*tert*-부틸 아제티딘-3-일(에틸) 카바메이트	-	-	시판, CAS: 929716-69-8
19	1,4-디메틸-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 2223043-80-7
20	1-(2,2-디플루오로에틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1049730-40-6
21	1-(2-플루오로에틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1049730-39-3
22	1-이소프로필-3-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 2068065-34-7
23	5-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 288251-53-6
24	1-에틸-3-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 2019997-43-2
25	4-메틸-5-(트리플루오로메틸)-	-	-	시판, CAS: 1623156-88-6

[0363]

[0364]

	1H-피라졸-3- 카르복실산			
26	1,3-디메틸-4- (4,4,5,5-테트라메틸- 1,3,2-디옥사보롤란-2- 일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1046832-21-6
27	3-메틸-1-(2,2,2- 트리플루오로에틸)-1H- 피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 113100-55-3
28	1-에틸-5-메틸-1H- 피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 887408-72-2
29	1-이소프로필-5-메틸- 1H-피라졸-4- 카르복실산	-	-	시판, CAS: 1007541-94-7
30	1,3-디메틸-5- (4,4,5,5-테트라메틸- 1,3,2-디옥사 보롤란- 2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 847818-79-5
31	3-에틸-1-메틸-1H- 피라졸-5-카르복실산	-	-	시판, CAS: 26308-42-9
32	3-클로로-1-메틸-1H- 피라졸-5-카르복실산	-	-	시판, CAS: 173841-02-6
33	(1-메틸-3- (트리플루오로메틸)- 1H-피라졸-5-일)보론산	-	-	시판, CAS: 344591-91-9
34	PYBOP	-	-	시판, CAS: 128625-52-5
35	3,5-디클로로-1-메틸- 1H-피라졸-4- 카르복실산	-	-	시판, CAS: 134589-53-0
36	3-클로로-1-메틸-1H- 피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 137343-52-3
37	5-브로모-1-메틸-1H- 피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 54367-67-8
38	4-(4,4,5,5- 테트라메틸-1,3,2- 디옥사보롤란-2-일)-3- (트리플루오로메틸)- 1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 1218790-40-9
39	3-메틸-4-(4,4,5,5- 테트라메틸-1,3,2- 디옥사보롤란-2-일)- 1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 936250-20-3

40	4,5-디클로로-1H-피라졸-3-카르복실산	-	-	시판, CAS: 115964-19-7
41	3-브로모-1-메틸-1H-피라졸-4-카르복실산	-	-	시판, CAS: 1399653-86-1
42	4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 269410-08-4
43	5-메틸-1H-피라졸-3-카르복실산	-	-	시판, CAS: 402-61-9
44	3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸	-	-	시판, CAS: 844501-71-9
45	5-에틸-1H-피라졸-3-카르복실산	-	-	시판, CAS: 4027-59-2
46	카본 디설파이드	-	-	시판, CAS: 75-15-0
47	HF-피리딘	-	-	시판, CAS: 62778-11-4
48	2,6-디클로로-4-아이오도피리딘	-	-	시판, CAS: 98027-84-0
49	$Pd_2(dba)_3$	-	-	시판, CAS: 51364-51-3
50	Xantphos	-	-	시판, CAS: 161265-03-8
51	소듐 시아네이트	-	-	시판, CAS: 917-61-3
52	*t*-Bu-Brettphos	-	-	시판, CAS: 1160861-53-9
53	5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-카르복실산	-	-	시판, CAS: 957129-38-3

[0365]

[0366] **표 3 - 실시예 화합물**

[0367]

표 3 - 실시예 화합물

표 3

Ex. No.	이름	합성 방법 및 중간체 사용	정제 또는 단리 방법	^{1}H NMR	LCMS 시스템 및 방법	LCMS 데이터
1	4-(1-(디플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 4 & 5	RP HPLC 방법 A	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.80 (s, 3H), 4.25 - 4.35 (m, 1H), 4.35 - 4.45 (m, 2H), 4.58 - 4.72 (m, 2H), 6.51 (s, 1H), 7.66 (t, J = 60 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.86 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 296.3 (MH)$^+$ (ES+), 1.91 min 에서, 202 nm
2	4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민	A 3, 6 & 5	RP HPLC 방법 B	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.81 (s, 3H), 4.23 - 4.32 (m, 1H), 4.32 - 4.46 (m, 2H), 4.56 - 4.72 (m, 2H), 5.12 (q, J = 8.6 Hz, 2H), 6.42 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.56 (s, 1H). 5 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 328.2 (MH)$^+$ (ES+), 2.07 min 에서, 240 nm
3	4-(1-에틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 7 & 5	RP HPLC 방법 C	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.51 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 2.78 (s, 3H), 4.11 - 4.45 (m, 5H), 4.60 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.39 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 2	m/z 274.2 (MH)$^+$ (ES+), 1.87 min 에서, 254 nm
4	4-(1-(디플루오로메틸)-3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘	B 8, 9, 10, 3 & 5	RP HPLC 방법 D	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.51 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 4.24 - 4.34 (m, 1H), 4.34 - 4.49 (m, 2H), 4.58 - 4.74 (m, 2H), 6.18 (s, 1H), 7.65 (t, J = 59.5 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 310.2 (MH)$^+$ (ES+), 1.97 min 에서,

[0368]

5	(*R*)-4-(5-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 11, 12, 13, 14 & 15	RP HPLC 방법 E	1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 1.76 (s, 1H), 2.02 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 3.08 - 3.54 (m, 5H), 3.83 (s, 3H), 5.97 (s, 2H), 6.11 (s, 1H), 7.94 (s, 1H). 한 교환가능한 양성자가 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 308.2 (MH)+ (ESI+), 1.86 min 에서, 242 nm
6	4-(3-아미노아제티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민	1 & A 1, 16, 17 & 5	RP HPLC 방법 F	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 4.17 - 4.45 (m, 3H), 4.52 - 4.77 (m, 2H), 6.52 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 9.02 (s, 1H). 6 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 300.2 (MH)+ (ESI+), 2.04 min 에서, 235 nm
7	4-(3-(에틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민	1 & A 1, 18, 17 & 5	RP HPLC 방법 G	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.36 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 3.14 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 4.25 - 4.46 (m, 3H), 4.55 - 4.72 (m, 2H), 6.50 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.96 (s, 1H). 5 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 328.2 (MH)+ (ESI+), 2.95 min 에서, 235 nm
8	4-(1,4-디메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 19 & 5	RP HPLC 방법 H	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.27 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.65 - 3.78 (m, 1H), 3.78 - 3.95 (m, 5H), 4.22 - 4.36 (m, 2H), 6.05 (s, 1H), 7.44 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 274.5 (MH)+ (ESI+), 1.95 min 에서, 202 nm
9	4-(1-(2,2-디플루오로에틸)-1H-	A 3, 20 & 5	RP HPLC	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.78 (s, 3H), 4.20 - 4.47 (m, 3H), 4.53 - 4.77 (m, 4H),	시스템 2	m/z 310.2 (MH)+

[0369]

	파라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민		방법 I	6.07 - 6.47 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.45 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	방법 2	(ES+), 1.95 min 에서, 230 nm
10	4-(1-(2-플루오로에틸)-1H-파라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 21 & 5	RP HPLC 방법 J	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.36 (s, 3H), 3.63 - 3.76 (m, 1H), 3.77 - 3.89 (m, 2H), 4.20 - 4.31 (m, 2H), 4.40 - 4.57 (m, 2H), 4.67 - 4.85 (m, 2H), 6.00 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.18 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 292.4 $(MH)^+$ (ES+), 에서 1.68 min, 311 nm
11	4-(1-이소프로필-3-메틸-1H-파라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 22 & 5	RP HPLC 방법 K	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.51 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 2.45 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 4.21 - 4.71 (m, 6H), 6.02 (s, 1H), 8.22 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 2	m/z 302.2 $(MH)^+$ (ES+), 2.07 min 에서, 242 nm
12	4-(5-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-파라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 23, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 L	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.56 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 4.17 - 4.73 (m, 5H), 5.07 (q, J = 8.6 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 7.93 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 342.4 $(MH)^+$ (ES+), 2.06 min 에서, 225 nm
13	4-(1-에틸-3-메틸-1H-파라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 24 & 5	RP HPLC 방법 M	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.48 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 4.19 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 4.21 - 4.31 (m, 1H), 4.49 (m, 4H), 6.02 (s, 1H), 8.17 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 2	m/z 288.2 $(MH)^+$ (ES+), 1.95 min 에서,

[0370]

14	(*R*)-4-(1-에틸-3-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민	1 & A 1, 15, 24 & 5	RP HPLC 방법 N	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.49 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 2.35 (s, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.53 - 2.65 (m, 1H), 2.81 (s, 3H), 3.69 - 4.09 (m, 5H), 4.20 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 6.18 (s, 1H), 8.17 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 2	m/z 302.2 (MH)$^+$ (ESI+), 1.96 min 에서, 254 nm
15	4-(5-클로로-1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 11, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 O	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.78 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.32 - 4.18 (m, 1H), 4.43 - 4.32 (m, 2H), 4.54 - 4.73 (m, 2H), 6.30 (s, 1H), 8.01 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 294.2 (MH)$^+$ (ESI+), 2.22 min 에서, 245 nm
16	4-(1-(디플루오로메틸)-5-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	B 8, 9, 10, 3 & 5	RP HPLC 방법 D	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.65 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 4.23 - 4.31 (m, 1H), 4.33 - 4.46 (m, 2H), 4.54 - 4.71 (m, 2H), 6.13 (s, 1H), 7.65 (t, J = 57.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 310.2 (MH)$^+$ (ESI+), 2.03 min 에서, 240 nm
17	4-(4-메틸-5-(트리플루오로메틸)-1*H*-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 25, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 P	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.40 (s, 3H), 2.79 (s, 3H), 4.12 - 4.77 (m, 5H), 6.23 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 328.2 (MH)$^+$ (ESI+), 2.39 min 에서, 245 nm
18	4-(1,3-디메틸-1*H*-	A	RP HPLC	^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.43 (s, 3H),	시스템	m/z 274.3

[0371]

	퍼라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)퍼리미딘-2-아민	3, 26 & 5	방법 Q	2.78 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.13 - 4.77 (m, 5H), 6.03 (s, 1H), 8.09 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	2 방법 1	(MH)+ (ES+), 1.89 min 에서, 202 nm
19	4-(3-메틸-1-(2,2,2-트리플루오로에틸)-1H-퍼라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)퍼리미딘-2-아민	D 27, 12, 13, 14, 2 & 34	RP HPLC 방법 R	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.36 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 3.64 - 3.73 (m, 1H), 3.81 (dd, J = 9.0, 4.9 Hz, 2H), 4.24 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 5.84 (s, 1H), 8.09 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 342.2 (MH)+ (ES+), 2.06 min 에서, 240 nm
20	4-(3-메틸-1-(트리플루오로메틸)-1H-퍼라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)퍼리미딘-2-아민					
21	4-(1-에틸-5-메틸-1H-퍼라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)퍼리미딘-2-아민	C 28, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 S	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.42 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 2.52 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 4.23 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.31 - 4.49 (m, 3H), 4.55 - 4.76 (m, 2H), 6.01 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 288.2 (MH)+ (ES+), 1.82 min 에서, 243 nm
22	4-(1-이소프로필-5-메틸-1H-퍼라졸-4-일)-6-(3-	C 29, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 T	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.48 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 2.51 (s, 3H), 2.77 (s, 3H), 4.21 - 4.30 (m, 1H), 4.31 - 4.45 (m, 2H), 4.54 -	시스템 1	m/z 302.3 (MH)+ (ES+),

[0372]

	(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민			4.65 (m, 2H), 4.65 - 4.75 (m, 1H), 6.01 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	방법 2		1.99 min 에서, 243 nm
23	4-(5-메틸-1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민						
24	4-(1,3-디메틸-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 30 & 5	RP HPLC 방법 U	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.28 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.22 - 4.31 (m, 1H), 4.34 - 4.47 (m, 2H), 4.57 - 4.70 (m, 2H), 6.25 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 274.3 $(MH)^+$ (ES+), 1.83 min 에서, 254 nm	
25	4-(3-에틸-1-메틸-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 31, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 V	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.26 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 2.61 - 2.73 (m, 2H), 2.78 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.21 - 4.33 (m, 1H), 4.36 - 4.51 (m, 3H), 4.55 - 4.73 (m, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 288.3 $(MH)^+$ (ES+), 1.99 min 에서, 244 nm	
26	4-(3-클로로-1-메틸-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 32, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 W	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.77 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.20 - 4.31 (m, 1H), 4.31 - 4.50 (m, 2H), 4.54 - 4.66 (m, 2H), 6.29 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 294.2 $(MH)^+$ (ES+), 2.10 min 에서, 214 nm	

[0373]

27	4-(1-메틸-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-5-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 33 & 5	RP HPLC 방법 X	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.78 (s, 3H), 3.31 (s, 2H), 4.23 - 4.35 (m, 1H), 4.36 - 4.55 (m, 3H), 4.58 - 4.75 (m, 2H), 6.38 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 2	m/z 328.2 $(MH)^+$ (ES+), 2.57 min 에서, 254 nm
28	4-(3,5-디클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	D 35, 12, 13, 14, 2 & 34	RP HPLC 방법 Y	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.80 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.25 - 4.33 (m, 1H), 4.35 - 4.45 (m, 2H), 4.59 - 4.71 (m, 2H), 6.23 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 328.2 $(MH)^+$ (ES+), 2.02 min 에서, 304 nm
29	4-(3-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 36, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 Z	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.81 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 4.24 - 4.32 (m, 1H), 4.34 - 4.48 (m, 2H), 4.58 - 4.72 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 294.2 $(MH)^+$ (ES+), 1.89 min 에서, 310 nm
30	4-(5-브로모-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 37, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 AA	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.78 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.21 - 4.33 (m, 1H), 4.33 - 4.48 (m, 2H), 4.55 - 4.73 (m, 3H), 6.36 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 338.2 $(MH)^+$ (ES+), 1.87 min 에서, 243 nm
31	4-(3-브로모-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-	D 41, 12, 13, 14, 2	RP HPLC 방법 AF	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.81 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.25 - 4.33 (m, 1H), 4.34 - 4.46 (m, 2H), 4.58 - 4.72 (m, 2H), 6.41 (s,	시스템 1	m/z 338.2 $(MH)^+$ (ES+),

[0374]

		& 34		1H), 8.21 (s, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	방법 2	1.91 min 에서, 242 nm
32	(메틸아미노)아세티딘-1-일)피리미딘-2-아민					
	4-(3-(메틸아미노)아세티딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-아민					
33	(*R*)-4-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)-6-(1-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-아민					
34	(*R*)-4-(3-클로로-1-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)피롤리딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 36, 12, 13, 14 & 15	RP HPLC 방법 AB	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.83 - 2.01 (m, 1H), 2.20 - 2.32 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 3.33 - 3.37 (m, 2H), 3.45 - 3.57 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 6.38 (s, 1H), 8.04 (s, 1H). 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 308.2 $(MH)^+$ (ESI+), 1.92 min 에서, 241 nm
35	4-(5-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아세티딘-1-일)피리미딘-2-아민	D 43, 12, 13, 14, 2 & 34	RP HPLC 방법 AH	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.39 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 4.21 - 4.49 (m, 3H), 4.53 - 4.75 (m, 2H), 6.46 (s, 1H), 6.73 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 260.3 $(MH)^+$ (ESI+), 1.67 min 에서, 240 nm
36	4-(3-	E	RP HPLC	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.39 (s, 3H),	시스템	m/z 246.2

[0375]

	(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1H-피라졸-3-일)피리미딘-2-아민	1, 44, 5, & 2	방법 AI	3.67 - 3.77 (m, 1H), 3.81 - 3.91 (m, 2H), 4.24 - 4.34 (m, 2H), 6.18 (s, 1H), 6.47 - 6.53 (m, 1H), 7.73 - 7.78 (m, 1H), 7.81 (d, J = 2.68 Hz, 1H), 3 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	1 방법 2	(MH)+ (ESI+), 1.87 min 에서, 242 nm
37	4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민	A 3, 38 & 5	RP HPLC 방법 AC	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.79 (s, 3H), 4.24 - 4.42 (m, 3H), 4.58 - 4.68 (m, 2H), 6.14 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 5 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 314.3 (MH)+ (ESI+), 1.93 min 에서, 304 nm
38	4-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)-6-(1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-아민	A 3, 42 & 5	RP HPLC 방법 AG	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.80 (s, 3H), 4.24 - 4.32 (m, 1H), 4.33 - 4.49 (m, 2H), 4.56 - 4.72 (m, 2H), 6.06 (s, 1H), 8.04 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 314.3 (MH)+ (ESI+), 1.43 min 에서, 260 nm
39	4-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	A 3, 39 & 5	RP HPLC 방법 AD	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.54 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 4.23 - 4.32 (m, 1H), 4.32 - 4.48 (m, 2H), 4.56 - 4.72 (m, 2H), 6.41 (s, 1H), 8.33 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 260.3 (MH)+ (ESI+), 1.53 min 에서, 241 nm
40	4-(5-에틸-4-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	H 53, 12, 13, 14, 2 & 34	RP HPLC 방법 AK	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.26 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.70 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 4.22 - 4.52 (m, 3H), 4.52 - 4.76 (m, 2H), 6.18 (s, 1H).4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 1	m/z 288.4 (MH)+ (ESI+), 에서 2.04 min, 304

[0376]

41	4-(5-에틸-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	D 45, 12, 13, 14, 2 & 34	RP HPLC 방법 AJ	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 1.34 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 2.78 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 4.25 - 4.50 (m, 3H), 4.58 - 4.74 (m, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.78 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 1 방법 2	m/z 274.3 (MH)+ (ES+), 1.85 min 에서, 202 nm
42	4-(4,5-디클로로-1H-피라졸-3-일)-6-(3-(메틸아미노)아제티딘-1-일)피리미딘-2-아민	C 40, 12, 13, 14 & 2	RP HPLC 방법 AE	1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 2.78 (s, 3H), 4.14 - 4.26 (m, 3H), 4.43 - 4.53 (m, 2H), 6.46 (s, 1H). 4 교환가능한 양성자 관찰되지 않음.	시스템 2 방법 1	m/z 313.2 (MH)+ (ES+), 2.71 min 에서, 245 nm

[0377] **생물학적 활성**

[0378] 실시예 A

[0379] H4 작용제 기능성 cAMP Gi 분석

[0380] HEKf 세포를 인간 H4 수용체를 발현하는 배큘로바이러스를 사용하여 밤새 감염시킨 다음, 1,200rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 세포 동결 배지(Sigma)에서 동결시키고 -150℃에서 보관했다. 분석 당일에 세포를 해동하고 1,500개 세포/웰의 밀도를 달성하기 위해 500nM IBMX를 포함하는 HBSS에 재현탁시켰다. H4 리간드를 DMSO에서 제조하고 낮은 부피 플레이트에서 25 nL로 LabCyte ECHO 음향 분배로 스탬핑했다. 10 μL/웰 세포를 1 μM forskolin의 존재하에 플레이팅하고 1,200 rpm에서 1분 동안 원심분리하고 Cisbio cAMP 검출 시약을 총 부피 20 μL/웰에 추가하기 전에 30분 동안 인큐베이션했다. 길항제 분석을 위해, 세포를 30분 동안 H4 길항제 리간드와 함께 사전 인큐베이션한 후 EC80 농도의 히스타민을 첨가하고 추가로 30분 인큐베이션했다. 검출 시약을 첨가하고 실온에서 60분 동안 진탕한 후 PheraStar 플레이트 판독기에서 HTRF를 사용하여 cAMP 축적을 측정했다. 효능제 효능을 정량화하기 위해 4-매개변수 로지스틱 적합 방정식을 사용하여 EC50 값을 생성했다. 기능적 길항제 친화도 값은 길항제 분석 데이터를 사용하여 pKb 값을 계산하기 위해 Cheng-Prusoff 방정식을 사용하여 생성되었다.

[0381] H4 길항제 기능적 동적 질량 재분배 분석

[0382] HEKf 세포를 인간 H4 수용체를 발현하는 배큘로바이러스를 사용하여 감염시키고, 10,000개 세포/웰의 밀도로 피브로넥틴 코팅된 EPIC 플레이트에 플레이팅하고 37° C에서 밤새 인큐베이션했다. 세포의 배지를 웰당 20mM HEPES가 포함된 30μL HBSS로 변경하고 LabCyte ECHO 음향 분배에 의해 웰당 30nL DMSO를 첨가했다. 실온에서 2시간 평형화한 후, DMSO에서 제조된 30nL의 H4 리간드를 LabCyte ECHO 음향 분배로 시드 EPIC 플레이트에 스탬핑하고 세포 동적 질량 재분배를 Corning EPIC 플레이트 판독기를 사용하여 모니터링했다. 45분 측정 후, 30 nL/웰의 히스타민 EC80을 첨가하고 모니터링하여 길항제 분석 데이터를 얻었다. 농도 반응 곡선을 생성하기 위해 최대 기준선 보정 반응(pm)을 사용했다. 효능제 효능을 정량화하기 위해 4-매개변수 로지스틱 적합 방정식을 사용하여 EC50 값을 생성했다. 기능적 길항제 친화도 값은 길항제 분석 데이터를 사용하여 pKb 값을 계산하기 위해 Cheng-Prusoff 방정식을 사용하여 생성되었다.

[0383] hERG 분석

[0384] hERG 분석 데이터는 아래에 설명된 실험 프로토콜을 사용하여 영국 캠브리지 소재의 Metrion Biosciences에서 결정했다:

[0385] 인간 에테르-아-고-고 관련 유전자를 안정적으로 발현하는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주를 표준 배양 조건에서 성장시키고 계대시켰다. 세포 건강, 수율, 밀봉 및 분석 품질을 최적화하도록 설계된 해리 프로토콜을 사용하여 분석을 위해 세포를 준비했다. 테스트 샘플은 100% DMSO에서 10mM 스톡 용액으로 제공되었다. 모든 샘플 취급 및 연속 희석은 유리 용기와 유리 라이닝 플레이트를 사용하여 수행되었다. 외부 기록 용액(0.3% DMSO v/v)으로의 1:333배 희석을 사용하여 10mM 샘플 스톡 용액으로부터 30μM의 최고 작업 농도를 준비했다. 단일 농도 분석에서 테스트 샘플을 최소 3개의 개별 세포에 대해 30μM에서 스크리닝했다. pIC_{50} 분석에서 테스트 샘플을 최소 3개의 개별 세포에 대해 1, 3, 10 및 30μM에서 스크리닝했다. 각 4점 농도-반응 곡선은 동일한 세포에 각 농도의 누적 이중 샘플 추가를 사용하여 구성되었다.

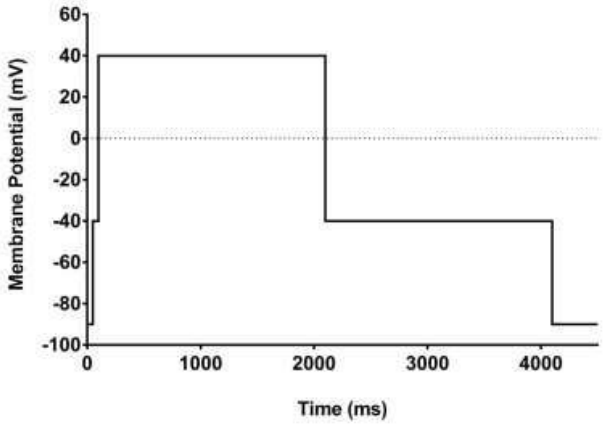
[0386] 모든 실험은 QPatch 자동화 패치 클램프 플랫폼에서 수행되었다. QPatch 실험을 위한 외부 및 내부 기록 솔루션의 구성은 아래 표 A에 나타낸다. 각 실험에 앞서 모든 용액을 여과(0.2μm)했다.

[0387] **표 A:** hERG 연구에 사용된 외부 및 내부 용액의 조성(mM)

구성성분	세포내 용액 (mM)	세포외 용액 (mM)
NaCl	-	140
KCl	70	2
KF	60	-
HEPES	10	10
$MgCl_2$	-	1
$CaCl_2$	-	2
글루코스	-	5
EGTA	5	-
MgATP	5	-
pH	7.2 (KOH)	7.4 (NaOH)

[0388]

[0389] 모든 기록은 기존의 전체 셀 구성으로 이루어졌으며 표준 단일 홀 칩(Rchip 1.5 - 4 MΩ)을 사용하여 실온(~ 21° C)에서 수행되었다. 직렬 저항(4 - 15MΩ)은 > 80%로 보상되었다. 전류는 아래와 같이 산업 표준 "+40 / -40" 전압 프로토콜을 사용하여 -90mV의 유지 전위에서 유도되었다; 이것은 0.1Hz의 자극 주파수에서 적용되었다.



[0390]

[0391] hERG 분석에 사용되는 QPatch 전압 프로토콜.

[0392] 전체 셀 구성을 달성할 때 비히클(외부 기록 용액 내 0.3% DMSO v/v)을 각 셀에 2회의 볼루스 추가로 적용했으며 안정적인 기록을 달성할 수 있도록 각 추가 사이에 2분의 기록 기간을 적용했다. 비히클 기간 후 다음 중 하나:

[0393] i) i) 단일 농도 분석의 경우 - 단일 농도의 테스트 샘플을 30㎛M에서 2분 간격으로 테스트 농도당 5회 볼루스 추가로 적용했다; 또는

[0394] ii) ii) pIC_{50} 분석의 경우 - 4가지 농도의 테스트 샘플을 2분 간격으로 테스트 농도당 2회의 볼루스 첨가로 1㎛M에서 30㎛M까지 적용했다;

[0395] 그런 다음 hERG 테일 전류 진폭에 대한 효과를 4분의 기록 기간 동안 측정했다. 전압 프로토콜의 각 스윕에 대해 개별 세포의 막 전류 및 수동 특성을 QPatch 분석 소프트웨어에 의해 기록했다. -40mV까지의 테스트 펄스 동안 도출된 피크 바깥쪽 꼬리 전류 진폭은 -40mV까지의 초기 사전 펄스 단계 동안 측정된 순간 누설 전류에 대해 측정되었다. QC 목적을 위해 분석을 위한 최소 전류 진폭은 비히클 기간이 끝날 때 측정된 > 200pA 피크 바깥쪽 전류이다. QPatch 분석 소프트웨어는 각 농도 적용 기간이 끝날 때 마지막 3개의 스윕에 대한 평균 피크 전류를 계산하고 데이터를 Excel로 내보내고 Pipeline Pilot(Biovia, USA)에서 실행 중인 생물정보학 제품군을 사용하여 조사한다. 템플릿은 대조군(즉, 비히클) 기간이 끝날 때 측정된 값에 대한 평균 피크 전류 또는 전하의 감소로 각 테스트 농도 적용 기간에 대한 억제율을 계산한다. 각 셀의 억제 백분율 값을 사용하여 각각 매우 낮은 농도와 매우 높은 농도로 고정된 0 및 100% 억제 수준과 자유 힐 기울기 계수를 사용하여 4개 매개변수 로지스틱 피팅을 사용하여 농도-반응 곡선을 구성한다. 그런 다음 IC_{50}(50% 억제 농도) 및 힐 계수가 결정되지만 힐 기울기가 0.5 > nH < 2.0 이내인 세포의 데이터만 포함된다. 아래에 보고된 IC_{50} 데이터는 최소 3개의 개별 세포(N ≥ 3)의 평균을 나타낸다. 관례에 따라 최고 농도에서 > 40% 차단을 달성하지 못한 테스트 샘플은 적합하지 않거나 제한되지 않은 적합성으로 인해 모호한 IC_{50} 값을 생성한다. 이 경우 테스트된 최고 농도보다 0.5 로그 단위 높은 임의의 IC_{50} 값이 반환된다. 예를 들어, 샘플이 30㎛M의 최고 농도에서 > 40% 차단의 평균 억제를 입증하지 못하면 100㎛M의 IC_{50} 값, 즉 pIC_{50} ≤ 4.0이 보고된다.

[0396]

실시예 번호	인간 H4 DMR fpK_b	hERG pIC_{50}
티오피아미드[1]	6.5	-
JNJ-7777120[2]	8.5	≤ 4.0
JNJ-39758979[3]	8.5	≤ 4.0
토레포란트[4]	7.9	5.5
PF-3893787[5]	9.1	5.1
화합물 61[6]	9.1	5.2
화합물 48[7]	9.0	-
1	8.9	<4.0
2	7.8	<4.0
3	8.4	<4.0
4	8.6	<4.0
5	8.4	<4.0
6	7.9	<4.0
7	8.1	4.37
8	8.1	4.63
9	7.9	<4.0
10	8.3	<4.0
11	8.0	<4.0
12	8.1	4.41
13	8.0	<4.0
14	7.0	4.54
15	8.1	<4.0
16	8.7	<4.0
17	9.0	<4.0
18	8.1	<4.0
19	7.3	<4.5
20	-	-
21	8.6	<4.0
22	8.1	<4.0
23	-	-
24	6.9	<4.0
25	7.0	-
26	7.8	<4.0
27	7.8	4.35
28	-	-
29	8.8	<4.0

[0397]

30	8.8	<4.0
31	8.1	<4.5
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	8.4	<4.5
36	-	-
37	7.5	<4.5
38	8.3	<4.5
39	8.4	<4.5
40	-	<4.5
41	8.1	<4.5
42	8.2	<4.0

[0398] [1] Changlu Liu *et al*, J Pharmacol Exp Ther., 299, (2001), 121-130.

[0399] [2] Jennifer D. Venable *et al*, J. Med. Chem., 48, (2005), 8289-8298.

[0400] [3] Brad M. Savall *et al*, J. Med. Chem., 57, (2014), 2429-2439.

[0401] [4] Robin L Thurmond *et al*, Ann Pharmacol Pharm., 2, (2017), 1-11.

[0402] [5] Charles E. Mowbray *et al*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 21, (2011), 6596-6602.

[0403] [6] Rogier A. Smits *et al*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 23, (2013), 2663-2670.

[0404] [7] Chan-Hee Park *et al*, J. Med. Chem., 61, (2018), 2949-2961.