



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0126346
(43) 공개일자 2019년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 513/04 (2006.01) A61K 31/542 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 513/04 (2013.01)
A61K 31/542 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7028606
(22) 출원일자(국제) 2018년03월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년09월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/055403
(87) 국제공개번호 WO 2018/162445
국제공개일자 2018년09월13일
(30) 우선권주장
62/468,070 2017년03월07일 미국(US)
17189778.8 2017년09월07일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
얀센 파마슈티카 엔.브이.
벨기에왕국 베-2340-비어세 투른호우트세베크 30
(72) 발명자
반 브란트 스벤 프란시스크스 안나
벨기에왕국 2340 비어세 투른호우트세베크 30 안
센 파마슈티카 엔브이내
기즈센 헨리쿠스 야코부스 마리아
벨기에왕국 2340 비어세 투른호우트세베크 30 안
센 파마슈티카 엔브이내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

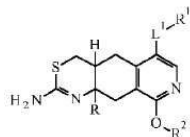
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 베타 세크레타제의 억제제

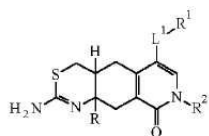
(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 I 및 화학식 II:

[화학식 I]



[화학식 II]



(여기서, 라디칼은 본 명세서에 정의된 바와 같음)로 나타난 구조를 갖는 베타-세크레타제의 삼환식 억제제에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물을 포함하는 제약 조성물, 이러한 화합물 및 조성물의 제조 방법 및 베타-세크레타제가 관련된 장애, 예컨대 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 경증 인지 장애, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매(dementia with Lewy bodies), 다운 증후군(Down's syndrome), 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease) 관련 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매, 연령 관련 황반 변성, 제2형 당뇨병 및 다른 대사성 장애의 예방 및 치료를 위한 이러한 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

(72) 발명자

보스 앤 마를렌

벨기에왕국 2340 비어세 투른호우트세베크 30 얀센
파마슈티카 엔브이내

오엘리치 다니엘

벨기에왕국 2340 비어세 투른호우트세베크 30 얀센
파마슈티카 엔브이내

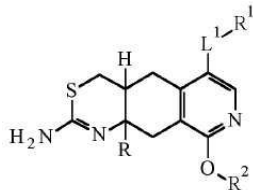
명세서

청구범위

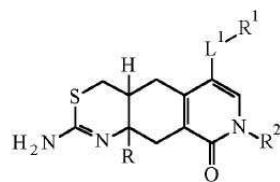
청구항 1

하기 화학식 I의 화합물, 또는 이의 호변이성질체 또는 입체이성질체 형태, 또는 이들의 제약상 허용가능한 부가염 또는 용매화물:

[화학식 I]



[화학식 II]



[식 중,

R은 할로, C₁₋₃알킬옥시, 시아노, 2-시아노-피리딘-5-일, 3-시아노-피리딘-5-일, 및 피리미딘-5-일로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환된 페닐이며;

-L¹-은 -CH₂-NH-(C=O)- 및 -(C=O)-NR^{1a}-로부터 선택되며;

R¹은 C₃₋₆시클로알킬, Ar, Het, Ar-CH₂-, Het-CH₂-, 및 4-모르폴리닐-CH₂-로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서,

Ar은 페닐, 또는 할로, 시아노, C₁₋₃알킬, 모노-할로-C₁₋₃알킬, 폴리-할로-C₁₋₃알킬, C₃₋₆시클로알킬, C₁₋₃알킬옥시, 모노-할로-C₁₋₃알킬옥시 및 폴리할로-C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 치환된 페닐이며;

Het는 피리딜, 피리미디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티아디아졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 1H-벤즈이미다졸릴, 벤족사졸릴, 및 벤조티아졸릴(이들 각각은 할로, 시아노, C₁₋₃알킬, 모노-할로-C₁₋₃알킬, 폴리-할로-C₁₋₃알킬, C₃₋₆시클로알킬, C₁₋₃알킬옥시, 모노-할로-C₁₋₃알킬옥시 및 폴리할로-C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되며;

a) R^{1a}는 H 또는 C₁₋₃알킬이거나, 또는

b) -NR¹R^{1a}는 함께 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 피페라진-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 5,7-디히드로-6H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-일, 6,7-디히드로피라졸로[1,5-a]피리미딘-4(5H)-일, 및 8-옥사-3-아자비시클로[3.2.1]옥트-3-일(이들 각각은 C₁₋₃알킬, C₁₋₃알킬옥시, (C₁₋₃알킬옥시)C₁₋₃알킬, C₃₋₆시클로알킬, 시아노, 옥소, 할로-페닐, (C₁₋₃알킬)페닐, (C₁₋₃알킬옥시)페닐, 할로-페닐옥시, (C₁₋₃알킬)페닐옥시, (C₁₋₃알킬옥시)페닐옥시, C₁₋₃알킬-(C=O)-, C₃₋₆시클로알킬-(C=O)-, 피리딜, 피리미디닐, 피라졸릴, 및 티아졸릴로 이루어진 군으로부터 각각

독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 복소환식 라디칼을 형성하며;

R^2 는 수소 또는 C_{1-3} 알킬임].

청구항 2

제1항에 있어서,

$-L^1$ -은 $-(C=O)-NR^{1a}$ -이며;

a) R^{1a} 는 H 또는 C_{1-3} 알킬이고, R^1 은 C_{3-6} 시클로알킬, Ar, 및 Het로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는

b) $-NR^{1a}$ 는 함께 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 피페라진-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 5,7-디히드로-6H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-일, 6,7-디히드로피라졸로[1,5-a]피리미딘-4(5H)-일, 및 8-옥사-3-아자비시클로[3.2.1]옥트-3-일(이들 각각은 C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알킬옥시, $(C_{1-3}$ 알킬옥시) C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, 시아노, 옥소, 할로-페닐, $(C_{1-3}$ 알킬)페닐, $(C_{1-3}$ 알킬옥시)페닐, 할로-페닐옥시, $(C_{1-3}$ 알킬)페닐옥시, $(C_{1-3}$ 알킬옥시)페닐옥시, C_{1-3} 알킬- $(C=O)-$, C_{3-6} 시클로알킬- $(C=O)-$, 피리딜, 피리미디닐, 피라졸릴, 및 티아졸릴로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 복소환식 라디칼을 형성하며; 여기서,

Ar은 페닐, 또는 할로, 시아노, C_{1-3} 알킬, 모노-할로- C_{1-3} 알킬, 폴리-할로- C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-3} 알킬옥시, 모노-할로- C_{1-3} 알킬옥시- 및 폴리할로- C_{1-3} 알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 치환된 페닐이며;

Het은 피리딜, 피리미디닐, 피라지닐, 및 피리다지닐(이들 각각은 할로, 시아노, C_{1-3} 알킬, 폴리-할로- C_{1-3} 알킬, 및 C_{1-3} 알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

$-NR^{1a}$ 는 함께 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 피페라진-1-일, 모르폴린-4-일, 1,1-디옥시도티오모르폴린-4-일(이들 각각은 C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알킬옥시, $(C_{1-3}$ 알킬옥시) C_{1-3} 알킬, 시아노, 옥소, C_{1-3} 알킬- $(C=O)-$, 및 C_{3-6} 시클로알킬- $(C=O)-$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 복소환식 라디칼을 형성하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

$-L^1$ -은 $-CH_2-NH-(C=O)-$ 이며;

R^1 은 C_{3-6} 시클로알킬, Ar, Het, $Ar-CH_2-$, $Het-CH_2-$, 및 4-모르폴리닐- CH_2- 로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서,

R^1 은 C_{3-6} 시클로알킬, Ar, Het, 및 4-모르폴리닐- CH_2- 로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서,

Ar은 페닐, 또는 할로, 시아노, C_{1-3} 알킬, 모노-할로- C_{1-3} 알킬, 폴리-할로- C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-3} 알킬옥시,

모노-할로-C₁₋₃알킬옥시- 및 폴리할로-C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 치환된 페닐이며;

Het는 피리딜, 피리미디닐, 피라지닐, 및 피리다지닐(이들 각각은 할로, 시아노, C₁₋₃알킬, 폴리-할로-C₁₋₃알킬, 및 C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

R은 할로, C₁₋₃알킬옥시, 시아노, 2-시아노-피리딘-5-일, 3-시아노-피리딘-5-일, 및 피리미딘-5-일로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 치환된 페닐인 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 치료적 유효량과, 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 8

제약상 허용가능한 담체를 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 치료적 유효량과 혼합하는 단계를 포함하는 제약 조성물의 제조 방법.

청구항 9

의약으로 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 화합물.

청구항 10

알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애, 노쇠(senility), 치매, 루이 소체 치매, 다운 증후군, 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병 관련 치매 또는 베타-아밀로이드 관련 치매의 치료, 방지 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 화합물.

청구항 11

알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 다운 증후군, 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병 관련 치매 및 베타-아밀로이드 관련 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 장애를 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 제7항에 따른 제약 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

베타-부위 아밀로이드 절단 효소 활성을 조절하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 제7항에 따른 제약 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

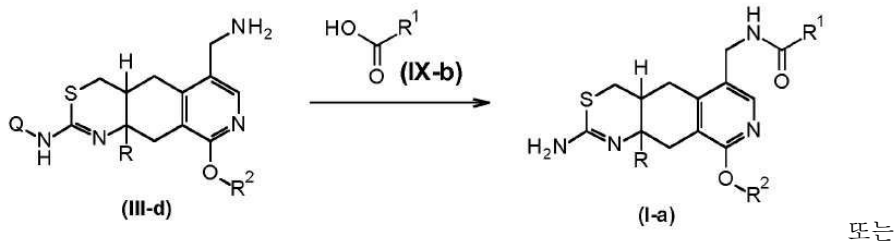
알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 다운 증후군, 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병 관련 치매 또는 베타-아밀로이드 관련 치매를 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조에 있어서의 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 청구된 화합물 또는 제7항에 청구된 제약 조성물의 용도.

청구항 14

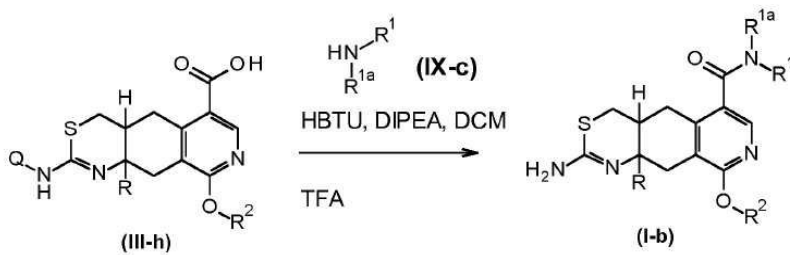
다음의 단계 a) 또는 b)를 포함하는, R, R¹ 및 R²가 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화학식 I-a 또는 화학식 I-b에 따른 화합물의 제조 방법:

a) 적절한 염기의 존재 하에, 커플링 시약의 존재 하에, 화학식 III-d(여기서, Q는 보호기임)의 화합물을 화학

식 IX-b(여기서, R^1 은 제1항 또는 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같음)의 화합물과 반응시키는 단계



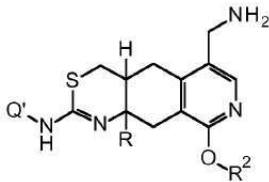
b) 커플링 시약 및 적절한 염기의 존재 하에, 화학식 III-h(여기서, Q는 보호기이며, R 및 R^2 는 제1항 또는 제6항에 정의된 바와 같음)의 중간체를 화학식 IX-c(여기서, R^1 및 R^{1a} 는 제1항 내지 제3항 또는 제6항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같음)의 아민과 반응시키는 단계



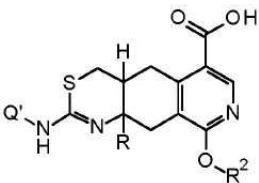
청구항 15

하기 화학식 III-d' 또는 화학식 III-h'의 화합물:

[화학식 III-d']



[화학식 III-h']



(식 중, Q'는 H 또는 보호기이며, R 및 R^2 는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같음).

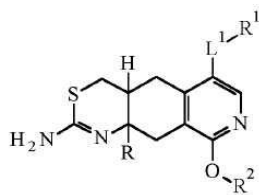
발명의 설명

기술 분야

본 발명은 하기 화학식 I 및 화학식 II:

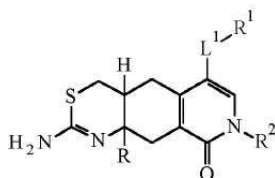
[0001]

[0002] [화학식 I]



[0003]

[0004] [화학식 II]



[0005]

[0006] 로 나타난 구조를 갖는 베타-세크레타제의 삼환식 억제제, 및 이의 호변이성질체 및 입체이성질체 형태에 관한 것이며, 여기서, 라디칼은 본 명세서에 정의된 바와 같다. 본 발명은 또한 이러한 화합물을 포함하는 제약 조성물, 이러한 화합물 및 조성물의 제조 방법 및 베타-세크레타제가 관련된 장애, 예컨대 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 경증 인지 장애, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매(dementia with Lewy bodies), 다운 증후군(Down's syndrome), 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병(Parkinson's disease) 관련 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매, 연령 관련 황반 변성, 제2형 당뇨병 및 다른 대사성 장애의 예방 및 치료를 위한 이러한 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 알츠하이머 질환(AD)은 노화와 관련된 신경변성 질환이다. AD 환자는 인지 결핍 및 기억 상실뿐만 아니라 불안과 같은 행동상의 문제를 겪는다. AD에 걸린 사람들의 90% 초과는 이 장애의 산발성 형태를 갖는 반면, 이러한 사례 중 10% 미만은 가족성 또는 유전성이다. 미국에서 65세의 사람 10명 중 약 1명이 AD를 갖는 반면, 85세에서는 매 2명의 개인 중 1명이 AD에 걸린다. 초기 진단으로부터의 평균 기대 수명은 7년 내지 10년이며, AD 환자는 노인 원호 생활 시설(assisted living facility)에서의 또는 가족 구성원에 의한 광범위한 관리를 필요로 한다. 고령 인구수가 증가함에 따라, AD에 대한 의학적 관심이 증가하고 있다. AD에 현재 이용가능한 치료법은 단지 질환의 증상을 치료하는 것이며, 이 병과 관련된 행동상의 문제를 제어하기 위한 항불안제 및 항정신병제뿐만 아니라 인지 특성을 개선하기 위한 아세틸콜린에스테라제 억제제도 포함한다.

[0008] AD 환자의 뇌에서의 특징적인 병리학적 특성은 타우(tau) 단백질의 과인산화에 의해 생성되는 신경원섬유 농축체(neurofibrillary tangle) 및 베타-아밀로이드 1-42(Abeta 1-42) 펩티드의 응집에 의해 형성되는 아밀로이드 플라크이다. Abeta 1-42는 올리고머를 형성한 다음, 원섬유를 형성하고, 궁극적으로는 아밀로이드 플라크를 형성한다. 올리고머 및 원섬유는 특히 신경독성인 것으로 여겨지며, AD와 연관된 대부분의 신경학적 손상을 야기할 수 있다. Abeta 1-42의 형성을 예방하는 에이전트(agent)는 AD 치료용 질환 조절제(disease-modifying agent)가 될 잠재성을 갖는다. Abeta 1-42는 770개의 아미노산으로 구성된 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)로부터 생성된다. Abeta 1-42의 N-말단이 베타-세크레타제(ARN-5091)에 의해 절단된 다음, 감마-세크레타제가 C-종결 말단을 절단한다. 감마-세크레타제는 Abeta 1-42에 더하여, 주된 절단 생성물인 Abeta 1-40뿐만 아니라 Abeta 1-38 및 Abeta 1-43도 또한 유리시킨다. 이러한 Abeta 형태들 또한 응집하여 올리고머 및 원섬유를 형성할 수 있다. 따라서, BACE1의 억제제는 Abeta 1-42뿐만 아니라 Abeta 1-40, Abeta 1-38 및 Abeta 1-43의 형성도 방지할 것으로 예상되며, AD 치료에서 잠재적인 치료제가 될 것이다.

[0009] 제2형 당뇨병(T2D)은 인슐린 저항성 및 췌장 베타-세포로부터의 부적절한 인슐린 분비에 의해 야기되며 이는 불량한 혈당 조절 및 고혈당을 초래한다. T2D에 걸린 환자는 미세혈관 및 대혈관 질환과, 당뇨병성 신병증, 망막 병증 및 심혈관계 질환을 포함하는 일련의 관련 합병증의 위험이 증가된다. T2D의 유병률의 증가는 세계 인구의 증가 중인 좌식 생활방식 및 고에너지 식품 섭취와 연관된다.

[0010] 베타-세포 부전 및 그 결과에 따른 극적인 인슐린 분비 감소 및 고혈당은 T2D의 발병의 전조이다. 대부분의 현재의 치료법은 명백한 T2D를 특징짓는 베타-세포 매스(mass)의 손실을 방지하지 않는다. 그러나, GLP-1 유사체,

가스트린 및 기타 에이전트의 최근의 개발은, 베타-세포의 보존 및 증식의 달성이 가능함을 보여주며, 이는 개선된 내당성 및 명백한 T2D로의 더 느린 진행을 초래한다.

[0011] Tmem27은 베타-세포 증식 및 인슐린 분비를 촉진하는 단백질로 확인되었다. Tmem27은 베타-세포의 표면으로부터 지속적으로(constitutively) 탈락되는 42 kDa 막 당단백질로서, 이는 전장 세포 Tmem27의 분해에서 생긴다. 트랜스제닉(transgenic) 마우스에서의 Tmem27의 과다발현은 베타-세포 매스를 증가시키며, 당뇨병의 식이-유발된 비만(diet-induced obesity; DIO) 모델에서 내당성을 개선시킨다. 더욱이, 설치류 베타-세포 증식 분석법(예를 들어, INS1e 세포를 사용함)에서의 Tmem27의 siRNA 킥아웃(knockout)은 증식 속도를 감소시키며, 이는 베타-세포 매스의 조절에서의 Tmem27의 역할을 나타낸다.

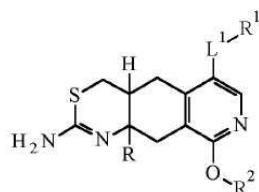
[0012] BACE2는 Tmem27의 분해에 책임이 있는 프로테아제이다. 이것은 막-결합 아스파르틸 프로테아제이며, 인간 췌장 베타-세포에서 Tmem27과 공존한다. 이것은 또한 APP, IL-1R2 및 ACE2를 분해시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. ACE2를 분해시키는 능력은 고혈압의 조절에서의 BACE2의 가능한 역할을 나타낸다.

[0013] 게다가, BACE1 및/또는 BACE2의 억제제는 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 동맥 혈전증, 자가면역/염증성 질환, 암, 예컨대 유방암, 심혈관계 질환, 예컨대 심근 경색 및 뇌졸중, 피부근염, 다운 증후군(Down's Syndrome), 위장 질환, 다형성 교모세포종, 그레이브스병(Graves Disease), 헌팅턴병(Huntington's Disease), 봉입체 근염(inclusion body myositis; IBM), 염증 반응, 카포시 육종(Kaposi Sarcoma), 코스트만병(Kostmann Disease), 홍반성 루푸스, 대식세포성 근막염, 소아기 특발성 관절염, 육아종성 관절염, 악성 흑색종, 다발성 골수종, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 척수소뇌성 실조증 1형, 척수소뇌성 실조증 7형, 휘플병(Whipple's Disease) 또는 윌슨병의 치료적 및/또는 예방적 치료에 사용될 수 있다.

발명의 내용

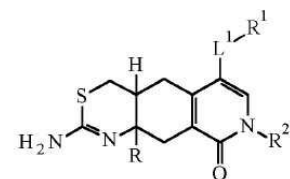
[0014] 본 발명은 하기 화학식 I 및 화학식 II의 화합물 및 이의 호변이성질체 및 입체이성질체 형태와, 이들의 제약상 허용가능한 부가염 및 용매화물에 관한 것이다:

[0015] [화학식 I]



[0016]

[0017] [화학식 II]



[0018]

[0019] 식 중,

[0020] R은 할로, C₁₋₃알킬옥시, 시아노, 2-시아노-피리딘-5-일, 3-시아노-피리딘-5-일, 및 피리미딘-5-일로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환된 페닐이며;

[0021] -L¹-은 -CH₂-NH-(C=O)- 및 -(C=O)-NR^{1a}-로부터 선택되며;

[0022] R¹은 C₃₋₆시클로알킬, Ar, Het, Ar-CH₂-, Het-CH₂-, 및 4-모르폴리닐-CH₂-로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서,

[0023] Ar은 페닐, 또는 할로, 시아노, C₁₋₃알킬, 모노-할로-C₁₋₃알킬, 폴리-할로-C₁₋₃알킬, C₃₋₆시클로알킬, C₁₋₃알킬옥시, 모노-할로-C₁₋₃알킬옥시 및 폴리할로-C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3

개의 치환체로 선택적으로 치환된 페닐이며;

[0024] Het는 피리딜, 피리미디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티아디아졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 1H-벤즈이미다졸릴, 벤조사졸릴, 및 벤조티아졸릴(이들 각각은 할로, 시아노, C₁₋₃알킬, 모노-할로-C₁₋₃알킬, 폴리-할로-C₁₋₃알킬, C₃₋₆시클로알킬, C₁₋₃알킬옥시, 모노-할로-C₁₋₃알킬옥시 및 폴리할로-C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0025] a) R^{1a}는 H 또는 C₁₋₃알킬이거나, 또는

[0026] b) -NR^{1a}는 함께 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 피페라진-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 5,7-디히드로-6H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-일, 6,7-디히드로피라졸로[1,5-a]피리미딘-4(5H)-일, 및 8-옥사-3-아자비시클로[3.2.1]옥트-3-일(이들 각각은 C₁₋₃알킬, C₁₋₃알킬옥시, (C₁₋₃알킬옥시)C₁₋₃알킬, C₃₋₆시클로알킬, 시아노, 옥소, 할로-페닐, (C₁₋₃알킬)페닐, (C₁₋₃알킬옥시)페닐, 할로-페닐옥시, (C₁₋₃알킬)페닐옥시, (C₁₋₃알킬옥시)페닐옥시, C₁₋₃알킬-(C=O)-, C₃₋₆시클로알킬-(C=O)-, 피리딜, 피리미디닐, 피라졸릴, 및 티아졸릴로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 복소환식 라디칼을 형성하며;

[0027] R²는 수소 또는 C₁₋₃알킬이다.

[0028] 본 발명의 실례로는 제약상 허용가능한 담체 및 상기 기술한 화합물 중 임의의 것을 포함하는 제약 조성물이 있다. 본 발명의 실례로는 상기 기술한 화합물 중 임의의 것과 제약상 허용가능한 담체를 혼합함으로써 제조되는 제약 조성물이 있다. 본 발명의 실례로는 상기 기술한 화합물 중 임의의 것과 제약상 허용가능한 담체를 혼합하는 것을 포함하는, 제약 조성물을 제조하는 방법이 있다.

[0029] 본 발명의 예시에는 베타-세크레타제 효소에 의해 매개되는 장애를 치료하는 방법이 있으며, 본 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 임의의 상기 기술한 화합물 또는 제약 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0030] 본 발명의 추가의 예시에는 베타-세크레타제 효소의 억제를 필요로 하는 대상체에게 임의의 상기 기술한 화합물 또는 제약 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 베타-세크레타제 효소를 억제하는 방법이 있다.

[0031] 본 발명의 일례로는 치료를 필요로 하는 대상체에게 상기 기술한 화합물 또는 제약 조성물 중 임의의 것의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병, 경도 인지 장애, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 다운 증후군, 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병 관련 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매, 및 연령-관련 황반 변성, 바람직하게는 알츠하이머병, 제2형 당뇨병 및 기타 대사성 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 장애를 치료하는 방법이 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 예로는 치료를 필요로 하는 대상체에서 (a) 알츠하이머병, (b) 경도 인지 장애, (c) 노쇠, (d) 치매, (e) 루이 소체 치매, (f) 다운 증후군, (g) 뇌졸중 관련 치매, (h) 파킨슨병 관련 치매, (i) 베타-아밀로이드 관련 치매, 또는 (j) 연령-관련 황반 변성, (k) 제2형 당뇨병 및 (l) 기타 대사성 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 상기 기술한 화합물 중 임의의 것이 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명은 이상에서 정의된 화학식 I 및 화학식 II의 화합물 및 이의 제약상 허용가능한 부가염 및 용매화물에 관한 것이다. 화학식 I의 화합물은 베타-세크레타제 효소(베타-부위 절단 효소, BACE, BACE1, Asp2 또는 메맵신(memapsin) 2, 또는 BACE2로도 알려짐)의 억제제이며, 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애, 노쇠, 치매, 뇌졸중 관련 치매, 루이 소체 치매, 다운 증후군, 파킨슨병 관련 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매, 및 연령-관련 황반 변성, 바람직하게는 알츠하이머병, 경도 인지 장애 또는 치매, 더 바람직하게는 알츠하이머병, 제2형 당뇨병 및 기타 대사성 장애의 치료에 유용할 수 있다.

- [0034] 일 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은,
- [0035] $-L^1-*i*$ $-(C=O)-NR^{1a}-$ 이며;
- [0036] a) R^{1a} 가 H 또는 C_{1-3} 알킬이고, R^1 이 C_{3-6} 시클로알킬, Ar, 및 Het-로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는
- [0037] b) $-NR^1R^{1a}$ 는 함께 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 피페라진-1-일, 모르폴린-4-일, 티오모르폴린-4-일, 5,7-디히드로-6H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-일, 6,7-디히드로피라졸로[1,5-a]피리미딘-4(5H)-일, 및 8-옥사-3-아자비시클로[3.2.1]옥트-3-일(이들 각각은 C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알킬옥시, (C_{1-3} 알킬옥시) C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, 시아노, 옥소, 할로-페닐, (C_{1-3} 알킬)페닐, (C_{1-3} 알킬옥시)페닐, 할로-페닐옥시, (C_{1-3} 알킬)페닐옥시, (C_{1-3} 알킬옥시)페닐옥시, C_{1-3} 알킬-(C=O)-, C_{3-6} 시클로알킬-(C=O)-, 피리딜, 피리미디닐, 피라졸릴, 및 티아졸릴로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 복소환식 라디칼을 형성하며; 여기서,
- [0038] Ar은 페닐, 또는 할로, 시아노, C_{1-3} 알킬, 모노-할로- C_{1-3} 알킬, 폴리-할로- C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-3} 알킬옥시, 모노-할로- C_{1-3} 알킬옥시 및 폴리할로- C_{1-3} 알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환된 페닐이며;
- [0039] Het는 피리딜, 피리미디닐, 피라지닐, 및 피리다지닐(이들 각각은 할로, 시아노, C_{1-3} 알킬, 폴리-할로- C_{1-3} 알킬, 및 C_{1-3} 알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0040] R, 및 R^2 는 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I 및 화학식 II의 화합물에 관한 것이다.
- [0041] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은,
- [0042] $-L^1-*i*$ $-(C=O)-NR^{1a}-$ 이며;
- [0043] $-NR^1R^{1a}$ 가 함께 피롤리딘-1-일, 피페리딘-1-일, 피페라진-1-일, 모르폴린-4-일, 및 1,1-디옥시도티오모르폴린-4-일(이들 각각은 C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알킬옥시, (C_{1-3} 알킬옥시) C_{1-3} 알킬, 시아노, 옥소, C_{1-3} 알킬-(C=O)-, 및 C_{3-6} 시클로알킬-(C=O)-로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 복소환식 라디칼을 형성하며;
- [0044] R 및 R^2 가 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I 및 화학식 II의 화합물에 관한 것이다.
- [0045] 추가 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은,
- [0046] $-L^1-*i*$ $-CH_2-NH-(C=O)-$ 이며;
- [0047] R^1 이 C_{3-6} 시클로알킬, Ar, Het, Ar- CH_2- , Het- CH_2- , 및 4-모르폴리닐- CH_2- 로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0048] R 및 R^2 가 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I 및 화학식 II의 화합물에 관한 것이다.
- [0049] 추가 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은,
- [0050] $-L^1-*i*$ $-CH_2-NH-(C=O)-$ 이며;
- [0051] R^1 이 C_{3-6} 시클로알킬, Ar, Het, 및 4-모르폴리닐- CH_2- 로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서,
- [0052] Ar은 페닐, 또는 할로, 시아노, C_{1-3} 알킬, 모노-할로- C_{1-3} 알킬, 폴리-할로- C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-3} 알킬옥시, 모노-할로- C_{1-3} 알킬옥시 및 폴리할로- C_{1-3} 알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2 또는 3개의 치환체로 치환된 페닐이며;

[0053] Het는 피리딜, 피리미디닐, 피라지닐, 및 피리다지닐(이들 각각은 할로, 시아노, C₁₋₃알킬, 폴리-할로-C₁₋₃알킬, 및 C₁₋₃알킬옥시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환됨)로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0054] R 및 R²가 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I 및 화학식 II의 화합물에 관한 것이다.

[0055] 추가 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은,

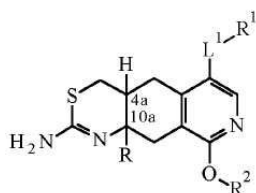
[0056] R이 할로, C₁₋₃알킬옥시, 시아노, 2-시아노-피리딘-5-일, 3-시아노-피리딘-5-일, 및 피리미딘-5-일로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 치환된 페닐이며;

[0057] L¹, R 및 R¹이 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I 및 화학식 II의 화합물에 관한 것이다.

[0058] 추가 실시 형태에서, R²는 C₁₋₃알킬, 구체적으로 메틸이다.

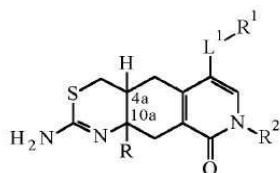
[0059] 구체적으로 본 발명은 삼환식 스캐폴드에서의 탄소 중심인 C_{4a} 및 C_{10a}가 시스 배열의 것인(즉, H 및 R이 스캐폴드의 평면 밖으로 동일한 쪽으로 돌출된) 화합물에 관한 것이다:

[0060] [화학식 I]



[0061]

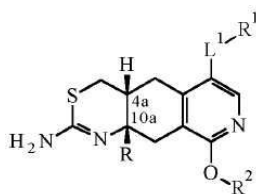
[0062] [화학식 II]



[0063]

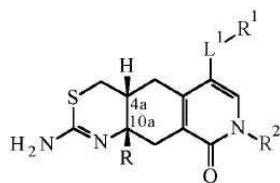
[0064] 따라서, 구체적으로, 본 발명은 하기에 나타낸 바와 같은 화학식 I' 및 화학식 II"의 화합물 및 화학식 I' 및 화학식 II"의 화합물에 관한 것이며, 여기서, 화학식 I' 및 화학식 II'에서, 삼환식 코어는 그림의 평면 내에 있고, H 및 R은 그림의 평면 위로 돌출되어 있거나(이때 결합은 볼드 웨지 로 나타냄), 삼환식 코어는 그림의 평면 내에 있고, H 및 R은 그림의 평면 아래로 돌출되어 있다(이때 결합은 평행한 선들의 웨지 로 나타냄):

[0065] [화학식 I']



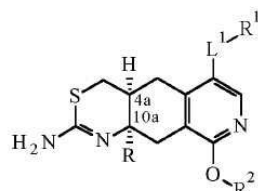
[0066]

[0067] [화학식 II']



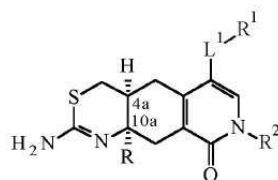
[0068]

[0069] [화학식 I'']



[0070]

[0071] [화학식 II'']



[0072]

[0073] 정의

[0074] "할로"는 플루오로, 클로로 및 브로모를 나타내고; "C₁₋₃알킬"은 각각 1개, 2개 또는 3개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형 포화 알킬 기, 예를 들어 메틸, 에틸, 1-프로필, 2-프로필 등을 나타내고; "C₁₋₃알킬옥시"는 C₁₋₃알킬이 이전에 정의된 바와 같은 에테르 라디칼을 나타내고; "모노- 및 폴리할로C₁₋₃알킬"은 이전에 정의된 바와 같은, 1개, 2개, 3개 또는 가능할 경우 더 많은 할로 원자로 치환된, 이전에 정의된 바와 같은 C₁₋₃알킬을 나타내고; "모노- 및 폴리할로C₁₋₃알킬옥시"는 모노- 및 폴리할로C₁₋₃알킬이 이전에 정의된 바와 같은 에테르 라디칼을 나타내고;

[0075] "C₃₋₆시클로알킬"은 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 나타낸다.

[0076] 본원에서 사용되는 바와 같이, "대상체"라는 용어는 치료, 관찰 또는 실험의 대상이거나 대상이었던 동물, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간을 지칭한다.

[0077] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"이라는 용어는 치료 중인 질환 또는 장애의 증상의 완화를 포함하는, 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의가 조사 중인 조직계, 동물 또는 인간에서의 생물학적 또는 의학적인 반응을 유도하는 활성 화합물 또는 약제의 양을 의미한다.

[0078] 본원에서 사용되는 용어 "조성물"은 특정된 성분을 특정된 양으로 포함하는 생성물뿐만 아니라, 특정된 성분을 특정된 양으로 조합함으로써 직접적으로 또는 간접적으로 생성되는 임의의 생성물을 포함하고자 한다.

[0079] 이상 및 이하에서, "화학식 I의 화합물"이라는 용어는 이의 부가염, 용매화물 및 입체이성질체를 포함함을 의미한다.

[0080] 이상 또는 이하에서, "입체이성질체" 또는 "입체화학적 이성질체 형태"라는 용어는 상호교환가능하게 사용된다.

[0081] 본 발명은 순수한 입체이성질체로서 또는 2가지 이상의 입체이성질체의 혼합물로서의 화학식 I의 화합물의 모든 입체이성질체를 포함한다.

[0082] 거울상 이성질체는 서로 겹쳐지지 않는(non-superimposable) 거울상인 입체이성질체이다. 한 쌍의 거울상 이성질체의 1:1 혼합물은 라세미체 또는 라세미 혼합물이다. 부분입체 이성질체(diastereomer 또는 diastereoisomer)는 거울상 이성질체가 아닌 입체이성질체며, 즉, 이들은 거울상으로서 관련되어 있지 않다. 화

합물이 이중 결합을 포함하는 경우, 치환체는 E 또는 Z 배열일 수 있다. 만일 화합물이 2치환된 시클로알킬 기를 포함하면, 치환체들은 시스 또는 트랜스 배열일 수 있다. 따라서, 본 발명은 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, E 이성질체, Z 이성질체, 시스 이성질체, 트랜스 이성질체 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0083] 절대적인 배열 형태는 칸-인골드-프렐로그(Cahn-Ingold-Prelog) 시스템에 따라 명시된다. 비대칭 원자에서의 배열은 R 또는 S로 명시된다. 절대 배열이 알려지지 않은 분할 화합물은 이 화합물이 평면 편광을 회전시키는 방향에 따라서 (+) 또는 (-)로 표기될 수 있다.

[0084] 특정 입체이성질체가 확인될 때, 이는 상기 입체이성질체에 다른 이성질체가 실질적으로 없음을 의미하며, 즉, 상기 입체이성질체가 50% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 더 바람직하게는 10% 미만, 훨씬 더 바람직하게는 5% 미만, 특히 2% 미만, 그리고 가장 바람직하게는 1% 미만의 다른 이성질체와 결부됨을 의미한다. 따라서, 화학식 I의 화합물이, 예를 들어 (R)로서 명시될 때, 이는 본 화합물에 (S) 이성질체가 실질적으로 없음을 의미하고; 화학식 I의 화합물이, 예를 들어 E로서 명시될 때, 이는 본 화합물에 Z 이성질체가 실질적으로 없음을 의미하며; 화학식 I의 화합물이, 예를 들어 시스로서 명시될 때, 이는 본 화합물에 트랜스 이성질체가 실질적으로 없음을 의미한다.

[0085] 의약에서 사용하기 위하여, 본 발명의 화합물의 부가염은 비독성의 "제약상 허용가능한 부가염"을 말한다. 그러나, 다른 염이 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 제약상 허용가능한 부가염의 제조에 유용할 수 있다. 화합물의 적합한 제약상 허용가능한 부가염은, 예를 들어 화합물의 용액을 염산, 황산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 아세트산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 탄산 또는 인산과 같은 제약상 허용가능한 산의 용액과 혼합함으로써 형성될 수 있는 산 부가염을 포함한다. 더욱이, 본 발명의 화합물이 산성 모이어티를 가질 경우, 이의 적합한 제약상 허용가능한 부가염은 알칼리 금속 염, 예컨대 나트륨 또는 칼륨 염; 알칼리 토금속 염, 예컨대 칼슘 또는 마그네슘 염; 및 적합한 유기 리간드에 의해 형성된 염, 예컨대 4차 암모늄 염을 포함할 수 있다.

[0086] 제약상 허용가능한 부가염의 제조에 사용될 수 있는 대표적인 산은 다음과 같은 것을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 아세트산, 2,2-디클로로-아세트산, 아실화 아미노산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, L-아스파르트산, 벤젠술폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, (+)-캄포르산, 캄포르술폰산, 카프르산, 카프로익산, 카프릴산, 신남산, 시트르산, 시클람산, 에탄-1,2-디술폰산, 에탄술폰산, 2-히드록시-에탄술폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티신산, 글루코헵톤산, D-글루콘산, D-글루쿠론산, L-글루탐산, 베타-옥소-글루타르산, 글리콜산, 히프루산, 브롬화수소산, 염산, (+)-L-락트산, (±)-DL-락트산, 락토비온산, 말레산, (-)-L-말산, 말론산, (±)-DL-만델산, 메탄술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 1-히드록시-2-나프트산, 니코틴산, 질산, 올레인산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 인산, L-피로글루탐산, 살리실산, 4-아미노-살리실산, 세바스산, 스테아르산, 숙신산, 황산, 탄닌산, (+)-L-타르타르산, 티오시안산, p-톨루엔술폰산, 트리플루오로메틸술폰산, 및 운데실렌산. 제약상 허용가능한 부가염의 제조에 사용될 수 있는 대표적인 염기는 다음과 같은 것을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 암모니아, L-아르기닌, 베네타민, 벤자틴, 수산화칼슘, 콜린, 디메틸에탄올아민, 디에탄올아민, 디에틸아민, 2-(디에틸아미노)-에탄올, 에탄올아민, 에틸렌-디아민, N-메틸-글루카민, 히드라민, 1H-이미다졸, L-라이신, 수산화마그네슘, 4-(2-히드록시에틸)-모르폴린, 피페라진, 수산화칼륨, 1-(2-히드록시에틸)-피롤리딘, 2차 아민, 수산화나트륨, 트리에탄올아민, 트로메타민 및 수산화아연. 특정한 염으로는 트리플루오로아세트산 부가염이 있다.

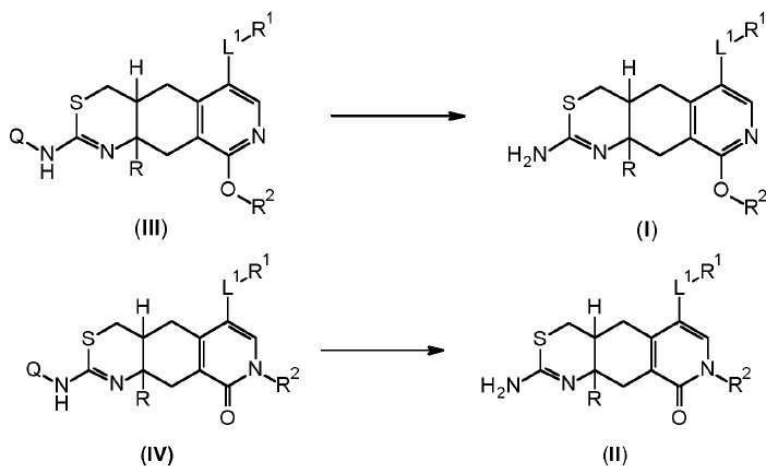
[0087] 화합물의 명칭은 CAS(Chemical Abstracts Service)에 의해 공인된 명명 규정(nomenclature rule)에 따라, 또는 국제 순수 응용 화학 연맹(International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC)에 의해 공인된 명명 규정에 따라 생성되었다. 호변이성질체 형태의 경우에는, 그 구조의 도시된 호변이성질체 형태의 명칭이 생성되었다. 다른 비-도시된 호변이성질체 형태도 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0088] 화합물의 제조

[0089] 실험 절차 1

[0090] 화학식 I 및 화학식 II에 따른 최종 화합물을 화학식 III 및 화학식 IV의 중간체 화합물의 탈보호에 의해 제조할 수 있으며, 여기서, Q는 염기 불안정성(예를 들어 아실) 또는 산 불안정성(예를 들어 트리틸) 보호기를 나타낸다(반응식 1). 이러한 반응은 본 기술 분야에 공지된 반응 조건 하에 수행될 수 있다.

[0091] [반응식 1]



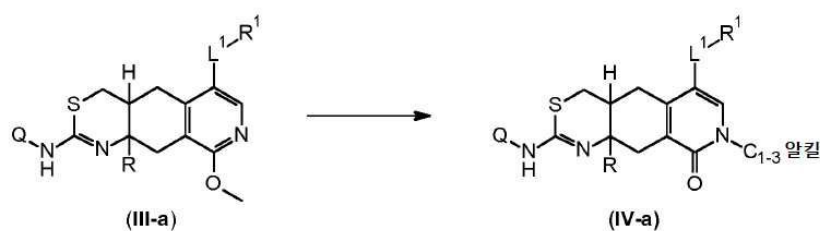
[0092]

[0093] 중간체 화합물의 제조

[0094] 실험 절차 2

[0095] R²가 C₁₋₃알킬인 화학식 IV의 중간체(본원에서 화학식 IV-a의 중간체로 지칭됨)를 R²가 메틸인 화학식 III의 상응하는 중간체(본원에서 화학식 III-a의 중간체로 지칭됨)와 C₁₋₃알킬 요오다이드의 반응에 의해 제조할 수 있다 (반응식 2). 상기 반응은 예를 들어 반응 혼합물을 100℃에서 가열하는 것과 같은 열적 조건 하에 수행될 수 있다. 반응식 2에서, 모든 변수는 화학식 I에서와 같이 정의된다.

[0096] [반응식 2]

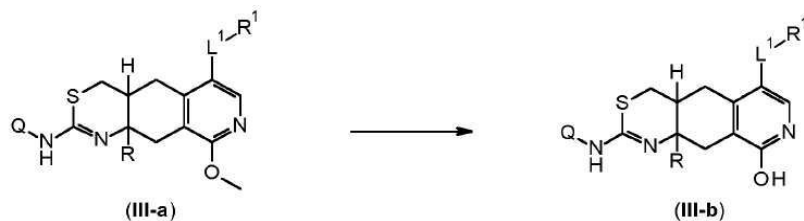


[0097]

[0098] 실험 절차 3

[0099] R²가 수소인 화학식 III의 중간체 화합물(본원에서 (III-b)로 지칭됨)을 본 기술 분야에 공지된 O-탈메틸화 절차에 따라, 화학식 III-a의 중간체 화합물로부터 제조할 수 있다. 상기 변환은 적합한 반응 조건 하에, 예컨대 편리한 온도, 전형적으로 50℃에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안 적합한 불활성 용매, 예컨대 아세토니트릴에서, 적합한 첨가제, 예컨대 요오드화나트륨의 존재 하에, 중간체(III-a)를 적합한 O-탈메틸화제, 예컨대 트리메틸클로로실란으로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다. 반응식 3에서, 모든 변수는 화학식 I에서와 같이 정의된다.

[0100] [반응식 3]



[0101]

[0102] 실험 절차 4

[0103] -L¹-R¹이 -CH₂-NH-(C=O)-R¹인 화학식 III의 중간체 화합물(본원에서 화학식 III-c의 중간체로 지칭됨)은 예를 들

어, 편리한 온도, 예컨대 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 용매, 예컨대 DCM에서, 염기, 예컨대 트리에틸아민 및 펩티드 커플링 시약, 예컨대 HBTU의 존재 하에 중간체(III-d)를 적절한 카르복실산으로 처리하는 것과 같은 표준 펩티드 커플링 방법에 의해 화학식 III-d의 중간체로부터 제조될 수 있다.

[0104]

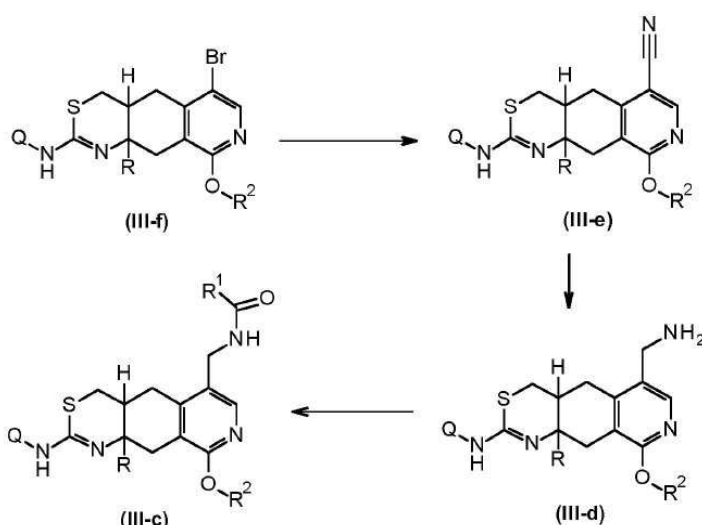
화학식 III-d의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 환원 절차에 의해, 예를 들어, 편리한 온도, 예컨대 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 용매, 예컨대 THF에 용해시킨 중간체 화합물(III-e)을 환원제, 예컨대 수소화알루미늄리튬으로 처리함으로써 화학식 III-e의 중간체 화합물로부터 제조될 수 있다.

[0105]

화학식 III-e의 중간체는 본 기술 분야에 공지된 시안화 절차에 따라 화학식 III-f의 상응하는 중간체로부터 제조될 수 있다. 상기 시안화는 반응이 완료될 때까지 적합한 온도, 예를 들어 120℃에서 적합한 불활성 용매, 예를 들어 DMA 등에서, 적합한 Pd 촉매, 예를 들어 비스(디벤질리덴아세톤)팔라듐 (0), 적합한 리간드, 예를 들어, 1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센, 및 아연 분말의 존재 하에 화학식 III-f의 상응하는 중간체 화합물을 시안화제, 예를 들어 시안화아연으로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다. 반응식 4에서, 모든 변수는 화학식 I에서와 같이 정의된다.

[0106]

[반응식 4]



[0107]

[0108]

실험 절차 5

[0109]

$-L^1-R^1$ 이 $-(C=O)-NR^{1a}R^1$ 인 화학식 III의 중간체 화합물(본원에서 화학식 III-g의 중간체로 지칭됨)은 예를 들어, 편리한 온도, 예컨대 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 용매, 예컨대 DCM에서, 염기, 예컨대 트리에틸아민 및 펩티드 커플링 시약, 예컨대 HBTU의 존재 하에 중간체(III-h)를 적절한 아민으로 처리하는 것과 같은 표준 펩티드 커플링 방법에 의해 화학식 III-h의 중간체로부터 제조될 수 있다.

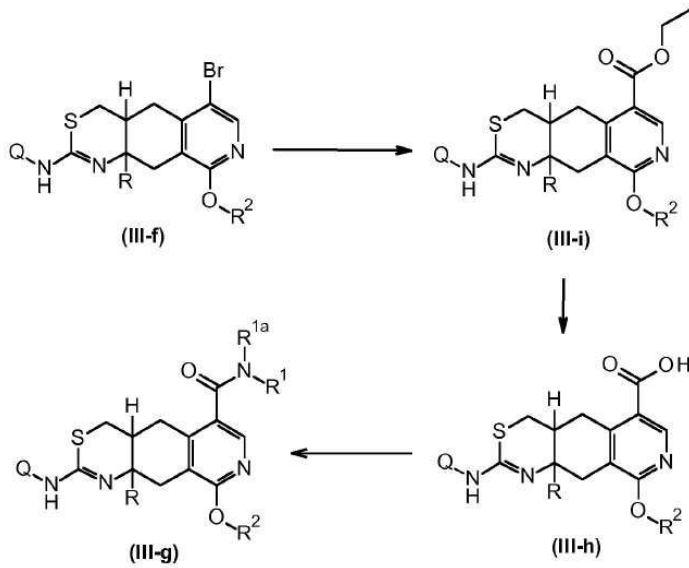
[0110]

화학식 III-h의 중간체 화합물은 표준 가수분해 절차, 예를 들어, 편리한 온도, 예컨대 80℃에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 용매들의 혼합물, 예컨대 물/디옥산에서, 중간체(III-i)를 수산화물, 예컨대 수산화리튬으로 처리함으로써 화학식 III-i의 중간체 화합물로부터 제조될 수 있다.

[0111]

화학식 III-h 및 화학식 III-i의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 팔라듐-촉매된 카르보닐화 절차에 따라 화학식 III-f의 상응하는 중간체로부터 제조될 수 있다. 상기 카르보닐화는 일산화탄소 분위기 하에, 적합한 반응 용매 또는 용매 혼합물, 예를 들어, THF/EtOH에서, 적합한 팔라듐 촉매, 예를 들어, 아세트산팔라듐, 적합한 리간드, 예컨대 1,3-비스(디페닐포스피노)프로판 및 적합한 염기, 예컨대 아세트산칼륨의 존재 하에, 화학식 III-f의 중간체 화합물을 교반시킴으로써 편리하게 수행될 수 있다. 반응은 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 오토클레이브에서 적합한 압력, 예를 들어 30 bar에서, 편리한 온도, 전형적으로 120℃에서 실시될 수 있다. 반응식 5에서, 모든 변수는 화학식 I에서와 같이 정의된다.

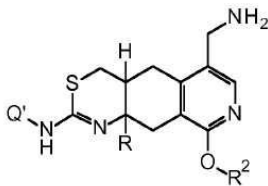
[0112] [반응식 5]



[0113]

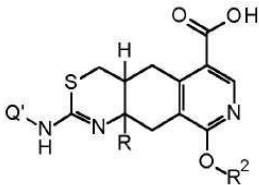
[0114] 화학식 III-d 및 화학식 III-h의 중간체는 본 발명의 화합물의 합성에서 유용한 중간체이다. 따라서 일 실시 형태에서, 본 발명은 하기 화학식 III-d'의 화합물 및 하기 화학식 III-h'의 화합물에 관한 것이다:

[0115] [화학식 III-d']



[0116]

[0117] [화학식 III-h']



[0118]

[0119] 여기서, Q'는 H 또는 보호기이며, R 및 R²는 본원에서 화학식 I의 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.

[0120] 실험 절차 6

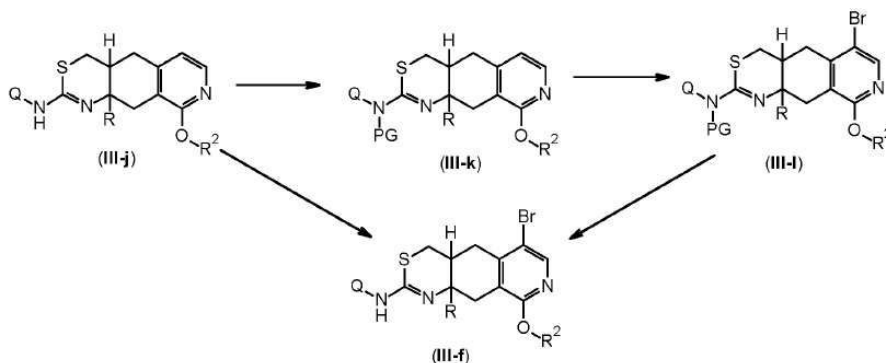
[0121] 화학식 III-f의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 브롬화 절차에 의해 화학식 III-j의 중간체 화합물로부터 제조될 수 있다. 상기 브롬화는 적합한 불활성 용매, 예를 들어, 아세토니트릴 등에서, 적합한 온도, 예를 들어 실온에서 반응이 완료될 때까지(예를 들어 16시간) 화학식 III-j의 상응하는 중간체 화합물을 브롬화제, 예를 들어 N-브로모숙신이미드로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다.

[0122] 화학식 III-j의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 절차에 따라 보호기 PG, 예를 들어 *tert*-부톡시카르보닐 기에 의해 보호될 필요가 있을 수 있다. 상기 반응은 적합한 반응 조건 하에, 예컨대 편리한 온도, 전형적으로 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안 적합한 불활성 용매, 예컨대 THF에서, 적합한 촉매, 예컨대 4-(디메틸아미노)피리딘(DMAP)의 존재 하에, 중간체 화합물(III-j)을 디-*tert*-부틸 디카르보네이트로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다.

[0123] 그 후, 보호된 중간체(III-k)를 상기에 설명된 바와 같이 브롬화하여 (III-l)을 생성하고, 그 후 이를 주위 온도에서, 니트하게(neat), 또는 적합한 용매에서 적합한 산, 예를 들어 트리플루오로아세트산 또는 포름산으로 처리함으로써 탈보호하여 중간체(III-f)를 생성할 수 있다.

[0124] 반응식 6에서, Q 및 PG는 보호기이며 모든 다른 변수는 화학식 I에서와 같이 정의된다.

[0125] [반응식 6]



[0126]

[0127] 실험 절차 7

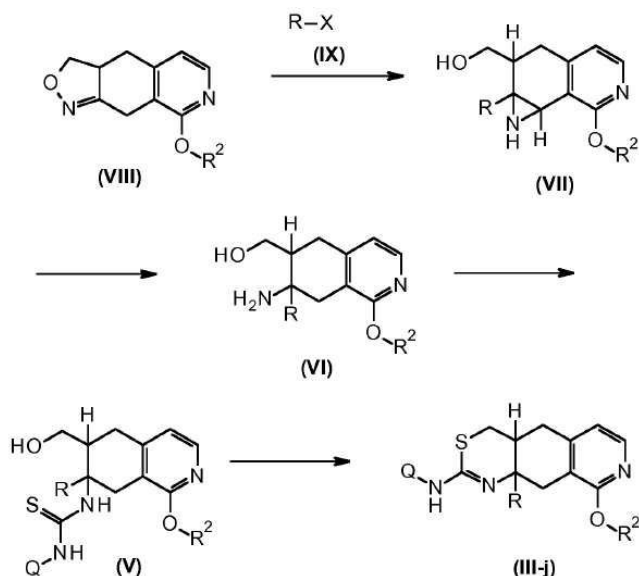
[0128] 화학식 III-j의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 환화 절차에 따라 화학식 V의 중간체 화합물로부터 제조될 수 있다. 상기 환화는 적합한 반응 조건 하에, 예컨대 편리한 온도, 전형적으로 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 반응 용매, 예를 들어 DCM에서, 화학식 V의 중간체 화합물을 적합한 시약, 예컨대 1-클로로-N,N-2-트리메틸프로페닐아민으로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다.

[0129] 중간체 V의 중간체 화합물은 편리한 온도, 전형적으로 실온에서, 반응이 완료될 때까지(예를 들어 3시간), 적합한 불활성 용매, 예를 들어 DCM에서, 화학식 VI의 상응하는 중간체 화합물을 적합한 시약, 예컨대 벤질 이소티오시아네이트와 반응시킴으로써(Q가 페닐(C=O)-인 화합물 (VI) 및 (III)을 생성함) 제조될 수 있다.

[0130] 화학식 VI의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 아지리딘 개환 절차에 따라 화학식 VII의 상응하는 중간체 화합물로부터 제조될 수 있다. 상기 반응은 수소 분위기 하에, 적절한 촉매, 예를 들어 라니(Raney)-니켈의 존재 하에, 적합한 용매, 예를 들어 알칸올, 예를 들어 메탄올, 에탄올 등에서, 편리한 온도, 전형적으로 실온에서, 반응이 완료될 때까지(예를 들어 6시간) 반응물들을 교반시킴으로써 실시될 수 있다.

[0131] 화학식 VII의 중간체 화합물은 화학식 VIII의 상응하는 중간체 화합물을 화학식 IX의 중간체와 반응시킴으로써 제조될 수 있으며, 여기서, X는 할로이오, R은 화학식 I에서 정의된 바와 같다. 상기 반응은 적합한 반응 조건 하에, 예컨대 적합한 온도(전형적으로 -78℃ 내지 실온의 범위)에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 반응 불활성 용매, 예컨대 THF에서 수행될 수 있다. 화학식 IX의 중간체 화합물은 상업적으로 입수되거나 문헌의 절차에 따라 합성될 수 있다.

[0132] [반응식 7]



[0133]

[0134] 실험 절차 8

[0135] 화학식 VIII의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 환화 절차에 따라 화학식 X의 상응하는 중간체 화합물을 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 환화는 적합한 반응 조건 하에, 예컨대 적합한 온도, 전형적으로 50℃에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안 적합한 반응 불활성 용매, 예컨대 THF에서, 화학식 X의 중간체 화합물을 적합한 산, 예를 들어 염산으로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다.

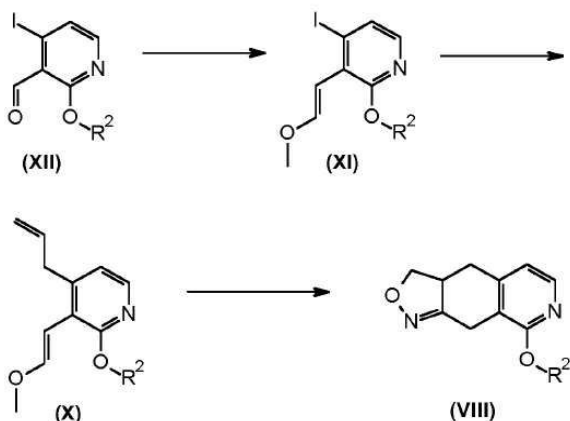
[0136] 화학식 X의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 커플링 절차에 따라 화학식 XI의 중간체 화합물을 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 변환은 적합한 금속화 시약, 예컨대 이소프로필마그네슘 클로라이드 리튬 클로라이드 착물, 및 적합한 유기큐프레이트(organocuprate) 전구체, 예를 들어 구리(I) 시아나이드 디(리튬 클로라이드) 착물 용액의 존재 하에 화학식 XI의 중간체 화합물을 상응하는 시아노큐프레이트 시약으로 전환시키고, 이어서 적합한 할라이드, 예컨대 알릴 브로마이드를 첨가함으로써 편리하게 수행될 수 있다. 반응은 편리한 온도, 전형적으로 -70℃ 내지 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 불활성 용매, 예를 들어 THF 등의 용매에서 수행될 수 있다.

[0137] 화학식 XI의 중간체 화합물은 본 기술 분야에 공지된 위티그(Wittig) 반응 절차에 따라 화학식 XII의 중간체 화합물을 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 반응은 편리한 온도, 전형적으로 -10℃ 내지 실온에서, 반응의 완료를 보장하는 시간 기간 동안, 적합한 염기, 예를 들어 포타슘 비스(트리메틸실릴)아미드의 존재 하에, 적합한 반응 불활성 용매, 예를 들어 톨루엔에서, 화학식 XII의 중간체 화합물을 적합한 포스포늄 염, 예를 들어, 메톡시메틸 트리페닐포스포늄 클로라이드로 처리함으로써 편리하게 수행될 수 있다.

[0138] 일반적으로 화학식 XII의 중간체 화합물은 상업적으로 입수되거나 문헌의 절차에 따라 합성될 수 있다.

[0139] 반응식 8에서, 모든 변수는 화학식 I에서와 같이 정의된다.

[0140] [반응식 8]

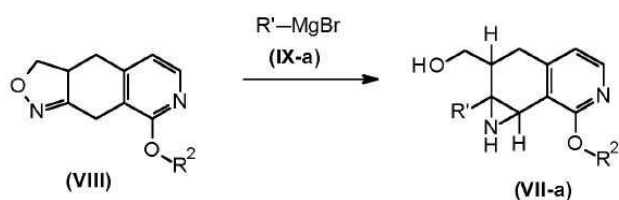


[0141]

[0142] 실험 절차 9

[0143] 대안적으로, 화학식 VIII의 중간체 화합물은 화학식 IX-a의 유기금속 화학종의 부가를 겪을 수 있으며, 여기서, R'는 당업자에게 공지된 절차, 예를 들어, 교차 커플링 반응, 알킬화 반응 및 탈보호 반응을 이용함으로써 R로 전환될 수 있는 임의의 라디칼이다. 중간체 화합물 (VII-a)은 이전의 실시예에 기술된 동일한 합성 경로를 이용한 합성에 들어갈 수 있다. 당업자라면 합성 시퀀스의 어느 지점이 R'의 R로의 전환의 수행에 적절한지를 판단할 수 있을 것이다.

[0144] [반응식 9]



[0145]

[0146] 화합물의 제조 - 유동 화학

[0147] 높은 성공률 범위(61~96%의 성공률)로 작동하는, 본원에 기술된 바와 같은 CyclopsTM 플랫폼을 이용하여 다수의 화합물을 합성 및 스크리닝하였다. 유동 합성 시스템은 Vapourtec® R4 반응기 및 R2 펌프 모듈을 이용하였으며, 이때 일체형 밸브 및 시약 루프는 FlowCommanderTM 소프트웨어에 의해 제어되었다. 화학반응의 복잡성에 따라 최대 4개의 반응기, 펌프 및 밸브를 이용하였다. 최종 반응기로부터의 산물은 HPLC 주입 밸브 내로 유동하여, 생성물의 분취물이 정제 시스템에 주입되게 할 수 있었다. 합성 시스템에서의 분산으로 인한 물질의 손실은 여러 방법으로 최소화되었다. 첫째, 소형 보어 튜빙을 상기 시스템 전체에 걸쳐 사용하였으며, 그 이유는 이것이 분산을 최소화하였기 때문이다. 둘째, 시약 루프 크기를 선택하여 반응물의 정상 상태 농도를 보장하고, 생성물을 반응기 내에서 얻었다. 마지막으로, HPLC로의 주입 시간은 분취물이 최대 생성물 농도 시점에, 즉, 정상 상태 조건 하에 취해지는 것을 보장하도록 조절하였다. 일반적으로, 새로운 시약병의 사용 및/또는 원 위치에서의 시약 생성은 합성 결과를 개선시킬 수 있다.

[0148] 실험 절차 10

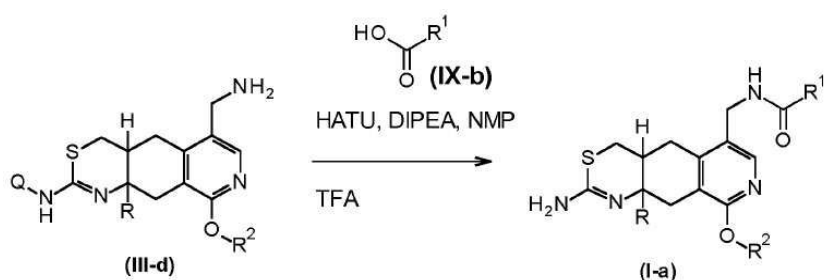
[0149] $-L^1-R^1$ 이 $-CH_2-NH-(C=O)-R^1$ 인 화학식 I의 화합물(본원에서 화학식 I-a의 화합물로 지칭됨)은 적절한 염기, 예컨대 DIPEA의 존재 하에 적절한 커플링 시약, 예를 들어 HATU를 사용하여 화학식 III-d의 중간체로부터 제조될 수 있으며, 여기서, Q는 보호기, 예를 들어 트리틸이다. 상기 반응은 1.2 당량만큼 적은 당량에서 작동하지만, 전형적으로 2 당량의 아민 또는 산 커플링 파트너(IX-b)를 사용하여 최대 전환을 보장한다. 전형적으로, (III-d)에 대하여 DIPEA는 3배 과량으로 존재하며, 1.2 당량의 HATU가 사용된다. 염기, 예컨대 DIPEA가 (III-d)에 첨가된다.

[0150] 아마이드 형성을 위한 주입 루프 크기는 각각의 구성요소에 있어서 전형적으로 250 μ L이다. 탈보호를 위한 산 용액, 예를 들어 TFA는, NMP 중 33% TFA를 0.5 ml 주입하는 것이다.

[0151] 전형적으로 아마이드 형성은 보호된 생성물을 제공하기 위하여 용매로서 NMP를 사용하여 40°C에서 20분 동안 유동 중에 수행된다.

[0152] 보호기, 예를 들어 트리틸 기는 공지된 절차에 따라, 예를 들어 NMP 중 33% TFA를 사용함으로써 제거될 수 있다. 그 후 이것은 첫 번째 반응의 유출물에 첨가되며, 상기 후속적인 혼합물은 전형적으로 120°C에서 15분 동안 가열된다. 반응식 10에서, 모든 변수는 화학식 I에서 정의된 바와 같다.

[0153] [반응식 10]

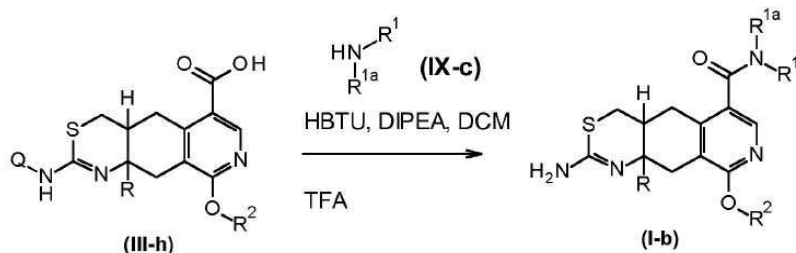


[0154]

[0155] 실험 절차 11

[0156] $-L^1-R^1$ 이 $-(C=O)-NR^{1a}R^1$ 인 화학식 I의 화합물(본원에서 화학식 I-b의 화합물로 지칭됨)은 반응의 완료를 보장하는 조건 하에 적합한 용매, 예를 들어 DCM에서 적절한 염기, 예컨대 DIPEA의 존재 하에 적절한 커플링 시약, 예를 들어 HBTU를 사용하여 화학식 IX-c의 아민과 반응시킴으로써 화학식 III-h의 중간체로부터 제조될 수 있으며, 여기서, Q는 보호기, 예를 들어 트리틸이다. 반응식 11에서, 모든 변수는 화학식 I에서 정의된 바와 같다.

[0157] [반응식 11]



[0158]

[0159] 약리학적 특성

[0160] 본 발명의 화합물 및 이의 제약상 허용가능한 조성물은 BACE를 억제하며, 따라서 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 다발 경색 치매, 다운 증후군, 파킨슨병 관련 치매, 알츠하이머형 치매, 혈관성 치매, HIV 질환으로 인한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 헌팅톤병으로 인한 치매, 피크병(Pick's disease)으로 인한 치매, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease)으로 인한 치매, 전측두엽 치매, 권투선수 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매, 및 연령-관련 황반 변성, 제2형 당뇨병 및 기타 대사성 장애의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0161] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료"라는 용어는 질환의 진행을 늦추거나, 중단시키거나, 저지 또는 중지시킬 수 있거나, 또는 증상을 완화할 수 있는 모든 과정을 말하는 것으로 의도되지만, 반드시 모든 증상을 완전히 없애는 것을 나타내는 것은 아니다.

[0162] 본 발명은 또한 AD, MCI, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 다발 경색 치매, 다운 증후군, 파킨슨병 관련 치매, 알츠하이머형 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매 및 연령 관련 황반 변성, 제2형 당뇨병 및 기타 대사성 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 화학식 I에 따른 화합물, 이의 입체이성질체 형태 또는 이들의 제약상 허용가능한 산 또는 염기 부가염에 관한 것이다.

[0163] 본 발명은 또한 AD, MCI, 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 다발 경색 치매, 다운 증후군, 파킨슨병 관련 치매, 알츠하이머형 치매, 베타-아밀로이드 관련 치매 및 연령 관련 황반 변성, 제2형 당뇨병 및 기타 대사성 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태의 위험의 감소, 조절, 개선, 예방 또는 치료에 사용하기 위한 화학식 I에 따른 화합물, 이의 입체이성질체 형태 또는 이들의 제약상 허용가능한 산 또는 염기 부가염에 관한 것이다.

[0164] 이상에서 이미 언급된 바와 같이, "치료"라는 용어는 반드시 모든 증상의 완전한 제거를 나타내는 것은 아니지만, 또한 상기에 언급된 임의의 장애에서의 증상의 치료를 말할 수 있다. 화학식 I의 화합물의 유용성을 고려하여, 이상에서 언급된 질환 중 어느 하나를 앓고 있는 대상체, 예컨대 인간을 포함하는 온혈 동물의 치료 방법, 또는 이를 앓고 있는 대상체, 예컨대 인간을 포함하는 온혈 동물의 예방 방법이 제공된다.

[0165] 상기 방법은 대상체, 예컨대 인간을 포함하는 온혈 동물에게의 치료적 유효량의 화학식 I의 화합물, 이의 입체이성질체 형태, 이들의 제약상 허용가능한 부가염 또는 용매화물의 투여, 즉 전신 또는 국소 투여, 바람직하게는 경구 투여를 포함한다.

[0166] 따라서 본 발명은 또한 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명에 따른 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 이상에서 언급된 질환 중 임의의 것의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0167] 또한 본 발명은 베타-부위 아밀로이드 절단 효소 활성의 조절 방법에 관한 것이며, 본 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명에 따른, 그리고 청구범위에 정의된 바와 같은 화합물 또는 본 발명에 따른, 그리고 청구범위에 정의된 바와 같은 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0168] 치료 방법은 또한 일일 1회 내지 4회 섭취의 요법으로 활성 성분을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 치료 방법에서, 본 발명에 따른 화합물은 바람직하게는 투여 전에 제형화된다. 이하에 기술된 바와 같이, 적합한 제약 제형은 용이하게 입수할 수 있는 잘 알려진 성분들을 사용하여 공지된 방법에 의해 제조된다.

[0169] 알츠하이머병 또는 이의 증상을 치료 또는 예방하는 데 적합할 수 있는 본 발명의 화합물은, 단독으로 또는 1가지 이상의 추가의 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 병용 요법은 화학식 I의 화합물 및 하나 이상의 추가의

치료제를 함유하는 단일한 약학적 투여 제형을 투여하는 것뿐만 아니라, 화학식 I의 화합물 및 각각의 추가의 치료제를 그 자체의 별개의 약학적 투여 제형으로 투여하는 것도 포함한다. 예를 들어, 화학식 I의 화합물과 치료제는 단일 경구 투여 조성물, 예를 들어 정제 또는 캡슐로 함께 환자에게 투여될 수 있거나, 또는 각각의 예이전트는 별개의 경구 투여 제형으로 투여될 수 있다.

[0170] 당업자는 본원에서 언급된 질환 또는 병태에 대한 대안적인 명명, 질병 분류, 및 분류 시스템에 친숙할 것이다. 예를 들어, 문헌[Diagnostic & Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5TM) of the American Psychiatric Association(제5판)]은, 신경 인지 장애(neurocognitive disorder; NCD)(주요 및 경도 신경 인지 장애 둘 다), 특히, 알츠하이머병, 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury; TBI), 루이 소체병, 파킨슨병 또는 혈관성 NCD(예를 들어, 다경색을 동반하는 혈관성 NCD)로 인한 신경 인지 장애와 같은 용어를 이용한다. 그러한 용어는 당업자에 의해 본원에 언급된 질환 또는 병태 중 일부에 대한 대안적 명명법으로 사용될 수 있다.

[0171] 제약 조성물

[0172] 본 발명은 또한 베타-세크레타제의 억제제 유익한 질환, 예를 들어 알츠하이머병(AD), 경도 인지 장애(MCI), 노쇠, 치매, 루이 소체 치매, 다운 증후군, 뇌졸중 관련 치매, 파킨슨병 관련 치매 및 베타-아밀로이드 관련 치매 및 연령 관련 황반 변성, 제2형 당뇨병 및 기타 대사성 장애를 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 화학식 I에 따른 화합물의 치료적 유효량 및 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0173] 활성 성분은 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 그것을 제약 조성물로서 제공하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 추가로, 본 발명에 따른 화합물을 제약상 허용가능한 담체 또는 희석제와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 담체 또는 희석제는 조성물의 다른 성분과 상용성이고 이의 수용자에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용가능"하여야 한다.

[0174] 본 발명의 제약 조성물은 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 활성 성분으로서의 염기 형태 또는 부가염 형태의 특정 화합물의 치료적 유효량을 제약상 허용가능한 담체와 친밀한 혼합물 형태로 배합하며, 이는 투여에 요망되는 제제의 형태에 따라 매우 다양한 형태를 취할 수 있다. 바람직하게는, 이들 제약 조성물은 바람직하게는 경구, 경피 또는 비경구 투여와 같은 전신 투여에 적합하거나; 또는 흡입, 코 스프레이, 점안액을 통하거나 크림, 겔, 샴푸 등을 통한 것과 같은 국소 투여에 적합한 일원화(unitary) 투여 형태이다. 예를 들어, 조성물을 경구 투여 형태로 제조함에 있어서, 통상의 약학적 매질 중 임의의 것, 예를 들어 현탁액, 시럽, 엘릭시르 및 용액과 같은 경구 액체 제제의 경우에는 물, 글리콜, 오일, 알코올 등; 또는 산제, 환제, 캡슐 및 정제의 경우에는 전분, 당, 카올린, 활택제, 결합제, 붕해제 등과 같은 고체 담체가 이용될 수 있다. 투여가 용이하기 때문에, 정제 및 캡슐이 가장 유리한 경구 단위 투여 형태를 대표하는데, 이 경우에는 약학적 고체 담체가 명백히 이용된다. 비경구 조성물의 경우, 담체는 대개 살균수를 적어도 아주 많이 포함하지만, 예를 들어 용해성을 돕기 위한 다른 성분이 포함될 수 있다. 예를 들어, 담체가 염수, 포도당 용액 또는 염수와 포도당 용액의 혼합물을 포함하는 주사가능한 용액이 제조될 수 있다. 주사가능한 현탁액이 또한 제조될 수 있는데, 이 경우에는 적절한 액체 담체, 현탁제 등이 이용될 수 있다. 경피 투여에 적합한 조성물에서, 담체는 작은 비율의 임의의 성질의 적합한 첨가제와 선택적으로 배합된, 침투 향상제 및/또는 적합한 습윤제를 선택적으로 포함하는데, 상기 첨가제는 피부에 대해 어떠한 상당한 해로운 효과도 야기하지 않는다. 상기 첨가제는 피부로의 투여를 용이하게 할 수 있고/있거나 요망되는 조성물을 제조하는데 도움을 줄 수 있다. 이들 조성물은 다양한 방법으로, 예를 들어 경피 패치, 스팟-온(spot-on) 또는 연고로서 투여될 수 있다.

[0175] 전술한 제약 조성물을 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위하여 단위 투여 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용되는 단위 투여 형태는 일원화 투여형으로서 적합한 물리적으로 별개인 단위를 말하며, 각각의 단위는 필요한 약학적 담체와 회합하여 요망되는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 성분을 함유한다. 그러한 단위 투여 형태의 예로는 정제(분할선이 있는(scored) 또는 코팅된 정제를 포함), 캡슐, 환제, 분말 패킷, 웨이퍼, 주사가능한 용액 또는 현탁액, 티스푼풀(teaspoonful), 테이블스푼풀(tablespoonful) 등, 및 이들의 분리형 멀티플(segregated multiple)이 있다.

[0176] 정확한 투여량 및 투여 빈도는 사용되는 화학식 I의 특정 화합물, 치료될 특정 병태, 치료될 병태의 중증도, 특정 환자의 연령, 체중, 성별, 장애의 범위 및 전신 상태(general physical condition)뿐만 아니라 개인이 복약 중일 수 있는 기타 약에 따라 달라지며, 이는 당업자에게 잘 알려진 바와 같다. 더욱이, 상기 일일 유효량은 치료되는 대상체의 반응에 따라 및/또는 본 발명의 화합물을 처방하는 의사의 평가에 따라 감소 또는 증가될 수 있음이 명백하다.

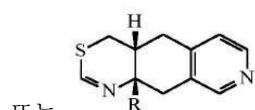
- [0177] 투여 방식에 따라, 제약 조성물은 0.05 중량% 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 70 중량%, 더 바람직하게는 0.1 중량% 내지 50 중량%의 활성 성분, 및 1 중량% 내지 99.95 중량%, 바람직하게는 30 중량% 내지 99.9 중량%, 더 바람직하게는 50 중량% 내지 99.9 중량%의 제약상 허용가능한 담체를 포함할 것이며, 모든 백분율은 조성물의 총 중량을 기준으로 한다.
- [0178] 본 발명의 화합물은 경구, 경피 또는 비경구 투여와 같은 전신 투여; 또는 흡입, 코 스프레이, 점안액을 통하거나 크림, 젤, 샴푸 등을 통한 것과 같은 국소 투여에 사용될 수 있다. 본 화합물은 바람직하게는 경구 투여된다. 정확한 투여량 및 투여 빈도는 사용되는 화학식 I의 특정 화합물, 치료될 특정 병태, 치료될 병태의 중증도, 특정 환자의 연령, 체중, 성별, 장애의 범위 및 전신 상태뿐만 아니라 개인이 복약 중일 수 있는 기타 약에 따라 달라지며, 이는 당업자에게 잘 알려진 바와 같다. 더욱이, 상기 일일 유효량은 치료받는 대상체의 반응에 따라 및/또는 본 발명의 화합물을 처방하는 의사의 평가에 따라 감소 또는 증가될 수 있음이 명백하다.
- [0179] 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 화학식 I의 화합물의 양은 치료되는 질환, 포유류 종, 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 그러나, 일반적인 가이드로서, 본 발명의 화합물의 적합한 단위 용량은, 예를 들어 바람직하게는 활성 화합물 0.1 mg 내지 약 1000 mg을 포함할 수 있다. 바람직한 단위 용량은 1 mg 내지 약 500 mg이다. 더 바람직한 단위 용량은 1 mg 내지 약 300 mg이다. 훨씬 더 바람직한 단위 용량은 1 mg 내지 약 100 mg이다. 그러한 단위 용량은 일일 1회 초과로, 예를 들어, 일일 2, 3, 4, 5 또는 6회 투여될 수 있지만, 바람직하게는 일일 1 또는 2회 투여되어, 70 kg 성인에 대한 총 투여량이 투여당 대상체의 체중 1 kg당 0.001 내지 약 15 mg의 범위가 되도록 한다. 바람직한 투여량은 투여당 대상체의 체중 1 kg당 0.01 내지 약 1.5 mg이고, 이러한 요법은 수 주일 또는 수 개월 동안, 그리고 일부의 경우에는 수 년 동안 확장될 수 있다. 그러나, 본 분야의 숙련자에 의해 잘 이해되듯이, 임의의 특정 환자를 위한 특정 용량 수준은 사용되는 특정 화합물의 활성; 치료받는 개인의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 시간 및 경로, 배설 속도; 앞서 투여된 다른 약물; 그리고 치료 중인 특정 질환의 중증도를 포함하는 다양한 인자에 의존할 것임이 이해될 것이다.
- [0180] 전형적인 투여량은 일일 1회, 또는 일일 다회로 복약되는 1 mg 내지 약 100 mg 정제 또는 1 mg 내지 약 300 mg 정제 1개이거나, 또는 일일 1회 복약되고 비례적으로 더 높은 함량의 활성 성분을 포함하는 지속 방출(time-release) 캡슐 또는 정제 1개일 수 있다. 상기 지속 방출 효과는 상이한 pH 값에서 용해되는 캡슐 재료, 삼투압에 의해서 서서히 방출하는 캡슐, 또는 임의의 다른 공지된 제어 방출 수단에 의해 얻어질 수 있다.
- [0181] 당업자에게 명백한 바와 같이 일부 경우에는 이들 범위 밖의 투여량을 사용하는 것이 필요할 수 있다. 또한, 임상의 또는 치료 의사는 개별 환자 반응과 함께, 치료법을 시작, 중단, 조정 또는 종료하는 방법 및 시기를 알 것임이 주지된다.
- [0182] 상기 제공된 조성물, 방법 및 키트에 있어서, 당업자는, 각각에서 사용하기에 바람직한 화합물들이 상기 바람직한 것으로 언급된 화합물이라는 것을 이해할 것이다. 조성물, 방법 및 키트에 훨씬 더 바람직한 화합물로는 하기 비제한적인 실시예들에 제공된 화합물들이 있다.
- [0183] 실험 파트
- [0184] 이하, 용어 "aq."는 수성을 의미하며, "r.m."은 반응 혼합물을 의미하며, "r.t." 또는 "RT"는 실온을 의미하며, "DIPEA"는 *N,N*-디이소프로필에틸아민을 의미하며, "DIPE"는 디이소프로필에테르를 의미하며, "THF"는 테트라히드로푸란을 의미하며, "DMF"는 디메틸포름아미드를 의미하며, "DCM"은 디클로로메탄을 의미하며, "EtOH"는 에탄올을 의미하며, "EtOAc"는 에틸아세테이트를 의미하며, "AcOH"는 아세트산을 의미하며, "iPrOH"는 이소프로판올을 의미하며, "iPrNH₂"는 이소프로필아민을 의미하며, "ACN" 또는 "MeCN"은 아세토니트릴을 의미하며, "MeOH"는 메탄올을 의미하며, "Pd(OAc)₂"는 디아세트산팔라듐(II)을 의미하며, "rac"는 라세믹을 의미하며, "sat."는 포화됨을 의미하며, "SFC"는 초임계 유체 크로마토그래피를 의미하며, "SFC-MS"는 초임계 유체 크로마토그래피/질량 분광법을 의미하며, "LC-MS"는 액체 크로마토그래피/질량 분광법을 의미하며, "GCMS"는 가스 크로마토그래피/질량 분광법을 의미하며, "HPLC"는 고성능 액체 크로마토그래피를 의미하며, "RP"는 역상을 의미하며, "UPLC"는 초고성능 액체 크로마토그래피를 의미하며, "R_t"는 체류 시간(분)을 의미하며, "[M+H]⁺"는 화합물의 유리 염기의 양성자화된 매스(mass)를 의미하며, "HATU"는 *O*-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N,N,N',N'*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트를 의미하며, "HBTU"는 *N,N,N',N'*-테트라메틸-*O*-(1*H*-벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트를 의미하며, "잔트포스(Xantphos)"는 (9,9-디메틸-9*H*-잔텐-4,5-디일)비스[디페닐포스핀]을 의미하며, "TFA"는 트리플루오로아세트산을 의미하며, "Et₂O"는 디에틸에테르를 의미하며, "DMSO"는 디메틸설폭시

드를 의미하며, "NMP"는 N-메틸피롤리돈을 의미하며, "NMR"은 핵 자기 공명을 의미하며, "LDA"는 리튬 디이소프로필아미드를 의미하며, "DIPA"는 디이소프로필아민을 의미하며, "n-BuLi"는 n-부틸리튬을 의미한다. "h"는 시간을 의미한다. "min"은 분을 의미하며, "sol."은 용액을 의미하며, "BOC"는 t-부톡시카르보닐을 의미하며, "DMA"는 N,N-디메틸아세트아미드를 의미하며, "DMAP"는 디메틸아미노피리딘을 의미하며, "mw"는 마이크로웨이를 의미하며, "NBS"는 N-브로모숙신이미드를 의미하며, "Pd(PPh₃)₄"는 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)을 의미하며, "DBU"는 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데스-7-엔을 의미하며, "SQD"는 단일 사중극자 검출기(Single Quadrupole Detector)를 의미하며, "MSD"는 질량 선택 검출기(Mass Selective Detector)를 의미하며, "BEH"는 가교된 에틸실록산/실리카 하이브리드(hybrid)를 의미하며, "DAD"는 다이오드 어레이 검출기(Diode Array Detector)를 의미하며, "HSS"는 고강도 실리카(High Strength 실리카)를 의미하며, "Q-ToF"는 사중극자 비행 시간형(Quadrupole Time-of-flight) 질량 분광계를 의미하며, "CLND"는 화학발광 질소 검출기(Chemiluminescent Nitrogen Detector)를 의미하며, "ELSD"는 증발 광 스캐닝 검출기(Evaporative Light Scanning Detector)를 의미한다.

[0185] 입체화학적 배열의 할당 및 도해적 표현

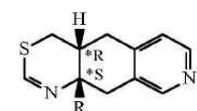
[0186] 중간체/화합물의 중심 C_{4a} 및 C_{10a}의 입체배열은 다음과 같이 표시되었다:

[0187] a) 중간체/화합물이 순수 거울상 이성질체이고 절대 입체배열이 공지되어 있는 경우, 코어는

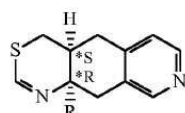


또는 로 표시되었음(예를 들어, 입체배열이 C_{4a}(R), C_{10a}(S)와 부합하고, 화합물이 단일 부분입체 이성질체로서 순수 거울상 이성질체인 경우);

[0188] b) 중간체/화합물이 순수 거울상 이성질체이지만 절대 입체배열이 결정되지 않은 경우, 코어는

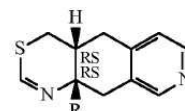


(여기서, 웨지는 시스 부분입체 이성질체를 나타내도록 무작위로 할당되었음)로 표시되었으며; 시스 상대 배열의 다른 순수 거울상 이성질체가 단리된 경우, 중간체/화합물은 상기 다른 단리 순수 거울상 이



성질체 중간체/화합물과 구별하기 위하여 로 표시되었음;

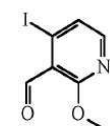
[0189] c) 중간체/화합물이 시스 상대 배열의 두 거울상 이성질체의 라세미 혼합물인 경우, 코어는 로 표시되었음.



[0190] 중간체/화합물의 입체화학적 절대 배열은 화학적 합성 방법 및 NMR(상대적 입체배열의 할당), 및 화합물 30 및 중간체 26, 및 다양한 순수 거울상 이성질체 유사체와 BACE 1 효소의 공결정화를 기반으로 합리화되었는데, 이는 화합물이 나타내는 시험관 내 활성과 함께, 화합물에서의 R 기의 바람직한 배향의 규명을 가능하게 하였다

[0191] A. 중간체의 제조

[0192] 중간체 1

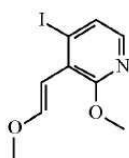


[0193]

[0194] THF (100 mL) 중 DIPA (3.5 mL, 25 mmol)의 혼합물을 -20℃까지 냉각시키고, n-BuLi (헵탄 중 2.7 M, 9.2 mL,

25 mmol)를 적가하였다. 10분간 교반시킨 후, 반응 혼합물을 -75℃까지 냉각시키고, THF (50 mL) 중 2-플루오로-3-요오도피리딘 (5.55 g, 25 mmol)을 적가하였다. 교반을 -65℃에서 2시간 동안 계속하였다. 반응 혼합물을 -75℃까지 냉각시키고, THF (25 mL) 중 에틸 포르메이트 (2.3 mL, 28 mmol)를 적가하였다. 10분 후 소듐 메톡사이드 (5.8 mL, 0.95 g/mL, 25 mmol, 25%의 순도)를 적가하였다. 냉각조를 제거하고, 반응 혼합물을 실온까지 되게 하고, 염수 (50 mL), Et₂O (100 mL)로 처리하고, 층들을 분리하였다. 수성 층을 Et₂O (100 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (50 mL)로 처리하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 중간체 1 (6.15 g, 94%)을 수득하고, 이를 다음 반응 단계에서 그대로 사용하였다.

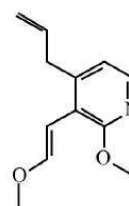
[0195] 중간체 2



[0196]

[0197] -10℃에서 톨루엔 (150 mL) 중 메톡시메틸 트리페닐포스포늄 클로라이드 (8.4 g, 24 mmol)의 교반 혼합물에 포타슘 비스(트리메틸실릴)아미드 (톨루엔 중 0.7 M, 34 mL, 24 mmol)를 적가하였다. 교반을 이 온도에서 30분 동안 계속하였다. 톨루엔 (20 mL) 중 중간체 1 (2.1 g, 8 mmol)을 적가하고, 2시간 후 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 켄칭하고, 층들을 분리하였다. 유기 층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 황갈색 오일을 수득하였다. 이 오일을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 10/90까지의 EtOAc/헵탄)로 정제하여 중간체 2를 오일로서 수득하였다 (1.86 g, 80%).

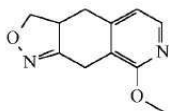
[0198] 중간체 3



[0199]

[0200] 내부 온도를 -65℃ 미만으로 유지하면서 THF (500 mL) 중 중간체 2 (30 g, 100 mmol)의 교반 및 냉각 (-70℃) 혼합물에 이소프로필마그네슘 클로라이드-리튬 클로라이드 착물 (105 mL, 1.3 M, 140 mmol)을 적가하였다. 첨가가 완료되었을 때, 교반을 1.5시간 동안 계속하였다. 그 후 구리(I) 시아나이드 디(리튬 클로라이드) 착물 용액 (105 mL, 1 M, 110 mmol)을 -70℃에서 적가하고, 15분 후 알릴 브로마이드 (28 mL, 31 mmol)를 적가하였다. 반응 혼합물을 실온까지 되게 하고, 그 후 염수 (100 mL)로 켄칭하고, Et₂O (0.3 L) 및 물 (0.1 L)로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 유기 층을 먼저, 청색이 사라질 때까지 암모니아로 일부씩 세척하고 (5 x 0.2 L), 그 후 염수 (0.1 L)로 세척하였다. 유기 층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 잔사를 수득하고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 98/2에서 100/0까지의 DCM/헵탄)로 정제하여 중간체 3 (19.6 g, 93%)을 수득하였다.

[0201] 중간체 4

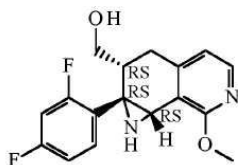


[0202]

[0203] THF (200 mL) 중 중간체 3 (19.6 g, 95 mmol)의 교반 용액을 수성 6 M HCl (70 mL, 420 mmol)로 처리하고, 반응 혼합물을 50℃에서 30분 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 얼음물 (0.2 L)에 붓고, 중성 pH가 될 때까지 포화 Na₂CO₃ 용액으로 처리하였다. 반응 혼합물을 DCM (3 x 0.1 L)으로 추출하고, 합한 유기 층을 MgSO₄로 건조시켰다. 생성된 용액에 트리에틸아민 (40 mL, 290 mmol), 그 후 히드록실아민 히드로클로라이드 (8 g, 120 mmol)를 첨가하고, 교반을 1시간 동안 계속하였다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO₃ 용액 (0.1 L)으로 희석시키고,

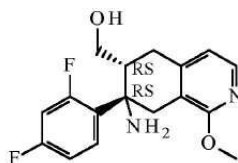
층들을 분리하였다. 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과시키고, 기계적 교반기가 갖추어져 있는 1 L 4구 플라스크로 옮기고, 0℃(내부 온도)까지 냉각시켰다. 이러한 냉각된 용액에, 차아염소산나트륨 (210 mL, 470 mmol)을 적가하였다. 완전한 첨가 후, 반응 혼합물을 실온까지 되게 하고, 교반을 실온에서 하룻밤 계속하였다. 층들을 분리하고, 수성 층을 DCM (0.2 L)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 고형물을 제공하고, 이를 DIPE (0.1 L)로부터 재결정화하여 중간체 4 (8.64 g, 44%)를 수득하였다.

중간체 5



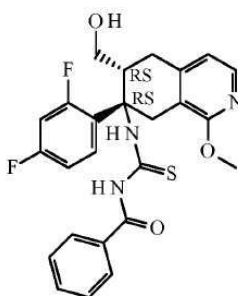
1-브로모-2,4-디플루오로벤젠 (9.699 mL, 70.51 mmol)을 질소 하에 43 mL의 THF에서 교반시키고, 반응 혼합물을 -15℃까지 냉각시켰다. 이소프로필마그네슘 클로라이드 (THF 중 2 M, 43.048 mL, 86.1 mmol)를 -15℃에서 적가하고, 반응 혼합물을 0~5℃에서 1시간 동안 교반시키고, 그 후 다시 -15℃까지 냉각시켰다. 43 mL의 THF에 용해시킨 중간체 4 (7.2 g, 35.26 mmol)를 적가하였다. 상기 혼합물을 실온에 도달시키고, 그 후 60 mL의 NH_4Cl 포화 용액에 적가하고, EtOAc로 추출하였다. 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 중간체 5 (11.15 g, 99%, 시스/트랜스 혼합물)을 제공하였다.

중간체 6



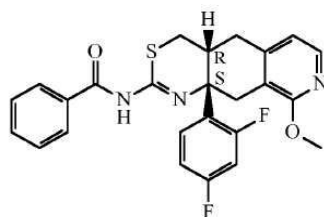
라니®-니켈 (64 g) 및 티오펜 (DIPE 중 4%, 85 mL) (EtOH (473 mL) 중)을 수소화 플라스크 내에 넣은 후, EtOH (473 mL)에 용해시킨 중간체 5 (17.2 g, 54 mmol)을 첨가하였다. 상기 플라스크를 탈기시키고, 그 후 수소가스로 플러시한 후 14℃에서 6시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 디칼라이트(dicalite)®에서 여과시키고, EtOH 및 THF로 세척한 후 생성물을 증발에 의해 농축시켰다. 생성물을 정제하였다 (실리카, 0/100에서 6/94까지의 MeOH/DCM). 순수한 분획을 증발시켜 중간체 6 (10.34 g, 60%)을 생성하였다.

중간체 7

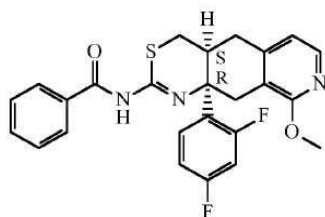


중간체 6 (2.32 g, 7.24 mmol)을 빙조에서 130 mL의 DCM에 용해시킨 후 20 mL의 DCM 중 벤조일 이소티오시아네이트 (1.66 g, 10.14 mmol)를 상기 혼합물에 적가하고, 반응물을 실온에서 1.5시간 동안 교반시켰다. 소량의 얼음을 여전히 교반 중인 반응 혼합물에 첨가하고, 생성물을 DCM을 사용하여 추출하고; 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켰다. 유기 층을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 80/20까지의 EtOAc/헵탄)로 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 수집하고, 증발에 의해 농축시켜 중간체 7 (3.50 g, 정량적)를 생성하였다.

[0213] 중간체 8a 및 8b



중간체 8a

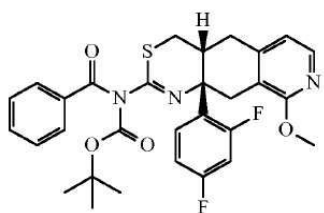


중간체 8b

[0214]

[0215] 중간체 7 (3.5 g, 7.24 mmol)를 질소 유동 하에 실온에서 DCM (91 mL)에서 교반시킨 후 1-클로로-N,N,2-트리메틸프로페닐아민 (2.62 mL, 19.80 mmol)을 적가하고, 반응 혼합물을 10분 동안 교반시켰다. 반응을 완료시키고, 그 후 반응물을 20 mL의 포화 NaHCO_3 수용액으로 켄칭하고, 10분 동안 교반시켰다. 유기 물질을 DCM을 사용하여 추출하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켰다. 이 물질을 DIPE에서 교반시켜 백색 고형물을 수득하고, 이를 여과 제거하고, 오븐에서 건조시켜 2.46 g의 혼합물을 생성하고, 이를 분취용 SFC (고정상: 키랄팩 디아셀(Chiralpak Diacel) AD 30 x 250 mm, 이동상: CO_2 , 0.2% $i\text{PrNH}_2$ 를 포함하는 MeOH)로 정제하여 중간체 8a (1.99 g, 33%, 순수한 거울상 이성질체) 및 중간체 8b (1.67, 28% 순수한 거울상 이성질체)를 생성하였다.

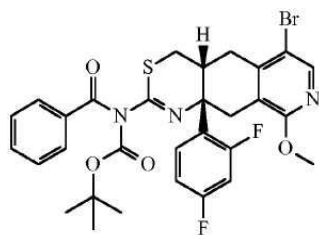
[0216] 중간체 9



[0217]

[0218] THF (20 mL, 0.89 g/mL, 0.25 mol) 중 중간체 8a (2.2 g, 0.0047 mol)의 교반 혼합물을 BOC-언하이드라이드 (1.24 g, 0.0057 mol) 및 DMAP (50 mg, 0.00041 mol)로 처리하였다. 실온에서 1시간 동안 교반시킨 후, 반응 혼합물을 포화 NaHCO₃ 용액 (20 mL), 물 (50 mL) 및 EtOAc (100 mL)로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc (50 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (20 mL)로 처리하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 중간체 9를 백색 폼으로 제공하였다 (2.77 g, 99%).

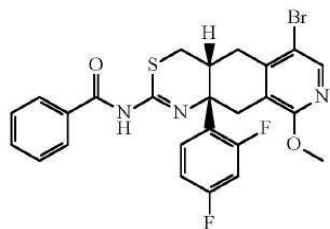
[0219] 중간체 10



[0220]

[0221] ACN (250 mL, 0.79 g/mL, 4.81 mol) 중 중간체 9 (2.77 g, 0.0049 mol)의 교반 혼합물에 N-브로모숙신이미드 (1 g, 0.0056 mol)를 조금씩 첨가하고, 그 결과 생성된 반응 혼합물을 실온에서 4일 동안 교반시키고, 그 후 추가의 N-브로모숙신이미드 (0.2 g, 0.0011 mol)를 첨가하고, 교반을 추가로 3시간 동안 계속하였다. 반응 혼합물을 40 mL의 포화 NaHCO_3 , 물 (0.1 L), EtOAc (200 mL)로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc (5 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (0.1 L)로 처리하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 황백색 고형물을 수득하였다. 이것은 헵탄 중 0~50% EtOAc의 구배를 이용하여 용출시키는 120 g 레디세프 (Redisep) 플래시 컬럼을 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 중간체 10을 밝은 백색 고형물로 수득하였다 (2.1 g, 수율 67%).

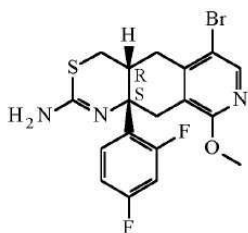
[0222] 중간체 11



[0223]

[0224] 중간체 10 (13.71 g, 21 mmol) 및 포름산 (79.7 mL, 2.1 mmol)을 실온에서 1시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물에 존재하는 포름산을 증발시키고, 생성물을 Na_2CO_3 으로 염기성화한 후 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켜 생성물을 생성하고, 이를 DIPE로부터 결정화하였다. 결정을 여과 제거하고, 건조시켜 중간체 11 (9.32 g, 81%)을 생성하였다.

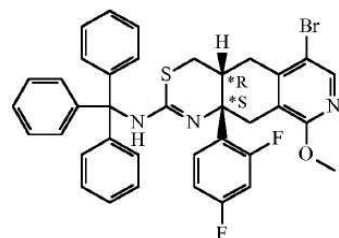
[0225] 중간체 12



[0226]

[0227] 중간체 11 (9.32 g, 17 mmol), DBU (25.5 mL, 171 mmol) 및 MeOH (192.8 mL)를 가압 튜브 내에 넣고, 60°C에서 하룻밤 교반시켰다. 반응 혼합물을 증발에 의해 농축시킨 후, 이 물질을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, DCM에서 DCM 중 5% MeOH까지)로 2회 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 증발에 의해 중간체 12 (6.84 g, 91%)를 생성하였다.

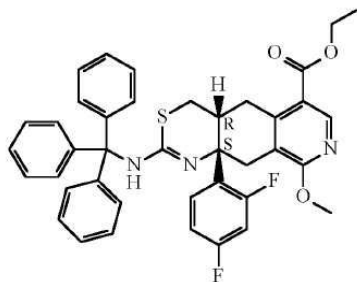
[0228] 중간체 13



[0229]

[0230] 중간체 12 (0.87 g, 1.976 mmol)을 건조 아세트니트릴 (76 mL)에 용해시키고, 그 후 Et_3N (0.55 mL, 3.95 mmol), 이어서 트리페닐메틸 클로라이드 (0.826 g, 2.96 mmol)를 첨가하였다. 그 후 반응 혼합물을 1.5시간 동안 80°C까지 가열하고, 그 후 용매를 증발시키고, 잔사를 EtOAc에 용해시켰다. K_2CO_3 을 사용한 상기 혼합물의 염기성화 후, 유기 층을 염수 (x3)로 세척하고, 상들을 분리하였다. 합한 유기 층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켰다. 조 생성물을 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (실리카 겔, 0/100에서 10/90까지의 EtOAc/헵탄)로 정제하였다. 요망되는 분획물을 수집하고, 진공에서 증발시켰다. 화합물을 MeOH에 의해 미분화하고, 결정을 여과 제거하고, 건조시켜 중간체 13 (1.3 g, 96%)를 백색 고형물로 생성하였다.

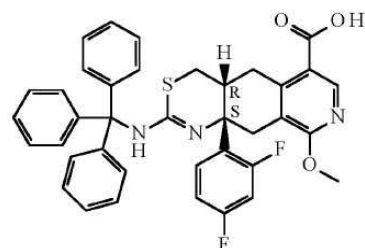
[0231] 중간체 14



[0232]

[0233] 75 mL 스테인리스강 오토클레이브를 질소 분위기 하에 중간체 13 (1.1 g, 1.61 mmol), Pd(OAc)₂ (77.2 mg, 0.34 mmol), 1,3-비스(디페닐포스피노)프로판 (44 mg, 0.107 mmol), 아세트산칼륨 (385 mg, 3.93 mmol), THF (20 mL) 및 EtOH (20 mL)로 채웠다. 오토클레이브를 닫고 30 bar CO로 가압하였다. 반응 혼합물을 120℃에서 19시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 증발시킨 후 물 및 DCM을 첨가하고, 혼합물을 디칼라이트®에서 여과시켰다. 유기 물질을 DCM으로 추출하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켜 1.48 g의 생성물을 생성하고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 2/98까지의 MeOH/DCM)로 정제하고, 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 증발에 의해 농축시켜 중간체 14 (0.902 g, 83%)를 생성하였다.

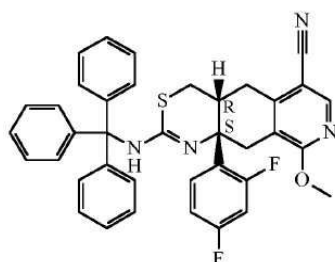
[0234] 중간체 15



[0235]

[0236] 요망되는 생성물로 완전히 전환될 때까지 중간체 14 (1.137 g, 1.682 mmol), 수산화리튬 (484 mg, 20.189 mmol), 물 (130 mL) 및 1,4-디옥산 (130 mL)을 80℃에서 3시간 동안 교반시켰다. 그 후 디옥산을 증발시키고, 혼합물을 대략 3의 pH가 될 때까지 AcOH로 산성화하였다. 후속적으로, 반응 혼합물을 DCM으로 추출하고, 유기 층을 수집하고, MgSO₄로 건조시키고, 용매를 진공에서 증발시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 5/95까지의 MeOH/DCM)로 정제하여 중간체 15를 생성하고, 이를 오븐에서 건조시켜 고형물 (0.845 g, 78%)을 수득하였다.

[0237] 중간체 16

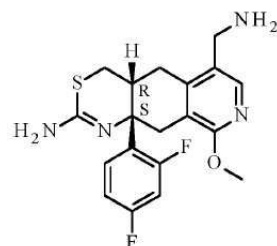


[0238]

[0239] 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0) (519.4 mg, 0.57 mmol) 및 1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센 (649.7 mg, 1.17 mmol)을 mw 바이알에서 DMA (106.7 mL)에서 혼합하고, 이 혼합물을 질소를 이용하여 10분 동안 탈기시켰다. 그 후 중간체 13 (1.6 g, 2.34 mol), 이어서 아연 (183.9 mg, 2.81 mmol) 및 Zn(CN)₂ (2.20 g, 18.8 mmol)를 첨가하였다. 상기 바이알은 뚜껑을 닫고, 150℃에서 4시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 열음물에 붓고, 교반시켰으며, 이는 갈색 고형물의 형성을 야기하였다. 상기 고형물을 여과 제거하고, DCM에 용해시키고, 물로 세척하였다. 유기 층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켰다. 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 1/99까지의 MeOH/DCM)로 정제하였다. 순수 분획을 합하고, 증발에 의해 농

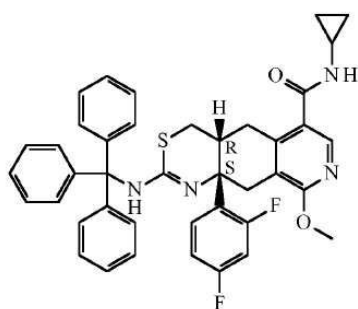
축시켜 중간체 16 (1.47 g, 정량적)을 생성하였다.

중간체 17



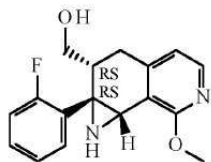
중간체 16 (1.47 g, 2.3 mmol)을 질소 유동 하에 -20°C 에서 THF (건조) (147 mL)에 용해시키고, LiAlH_4 (THF 중 2 M, 2.34 mL, 4.7 mmol)를 적가하였다. 상기 반응물을 실온까지 가온하고, 16시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 빙조에서 냉각시키고, 10 mL의 로셀(Rochelle) 염 용액 (H_2O 중 1.5 M)으로 켄칭하였다. 유기 물질을 DCM으로 추출하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켰다. 이것을 실리카에서 정제하고(용출제: DCM $\rightarrow$ 5% MeOH/ NH_3 (DCM 중)), 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 증발에 의해 농축시키고, 오븐에서 2 시간 동안 건조시켜 중간체 16 (0.74 g, 50%)을 생성하고; 220 mg의 출발 물질을 회수하였다.

중간체 18



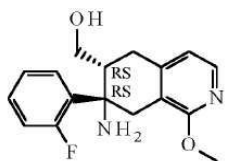
중간체 15 (90 mg, 0.14 mmol)를 DCM (2.25 mL)에서 교반시키고, DIPEA (0.12 mL, 0.70 mmol) 및 HBTU (52.69 mg, 0.139 mmol)를 첨가하고, 교반을 실온에서 0.5시간 동안 계속하였다. 시클로프로필아민 (0.0116 mL, 0.167 mmol)을 상기 용액에 첨가하고, 교반을 실온에서 1시간 동안 계속하였다. NaOH (1 N 용액, 3 mL)를 첨가하고, 반응 혼합물을 5분 동안 교반시켰다. 유기 층을 분리하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켰다. 유기 잔사를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 4/96까지의 MeOH/DCM)로 정제하고, 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 증발에 의해 농축시켜 중간체 18 (135 mg, 72%의 순도, 정량적)을 생성하였다.

중간체 19



2-플루오로페닐마그네슘 브로마이드의 교반, 냉각 (5°C) 불균질 혼합물 (20 mL, 1 M, 20 mmol)에 톨루엔 (40 mL) 중 중간체 4 (2 g, 9.8 mmol)의 용액을 적가하였다. 첨가가 완료되었을 때, 교반을 30분 동안 계속하고, 그 후 반응 혼합물을 포화 NH_4Cl 수용액 (50 mL), 물 (0.1 L)로 켄칭하고, 층들을 분리하였다. 수성 상을 EtOAc (3 x 0.1 L)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (0.1 L)로 처리하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 잔사를 제공하고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 100/0까지의 EtOAc/DCM)로 정제하여 중간체 19를 황백색 폼으로 수득하였다 (2.45 g, 83%, 시스/트랜스: 93/7).

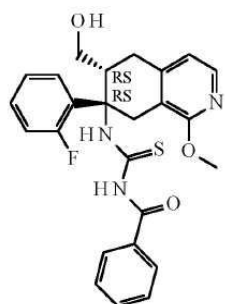
[0249] 중간체 20



[0250]

[0251] 중간체 6의 합성에 대하여 보고한 것과 유사한 합성 절차에 따라 중간체 20을 제조하였다. 중간체 19 (2.8 g, 9.32 mmol)로부터 출발하여 중간체 20을 수득하고, 이를 다음 단계에서 그대로 사용하였다 (2.8 g, 정량적, 시스/트랜스: 96/4).

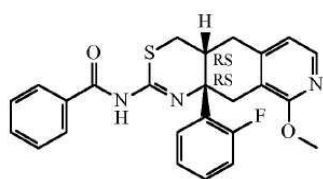
[0252] 중간체 21



[0253]

[0254] 중간체 7의 합성에 대하여 보고한 것과 유사한 합성 절차에 따라 중간체 21을 제조하였다. 중간체 20 (1.6 g, 5.29 mmol)로부터 출발하여, 중간체 21을 백색 폼으로 수득하였다 (2.22 g, 90%, 시스).

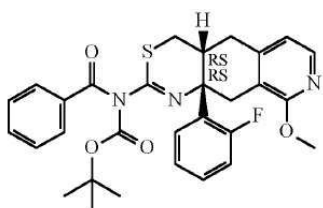
[0255] 중간체 22



[0256]

[0257] 중간체 8의 합성에 대하여 보고한 것과 유사한 합성 절차에 따라 중간체 22를 제조하였다. 중간체 21 (2.22 g, 4.77 mmol)로부터 출발하여, 중간체 22를 백색 고형물로서 수득하였다 (1.4 g, 66%, 시스).

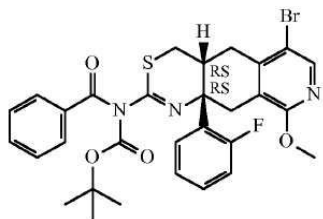
[0258] 중간체 23



[0259]

[0260] THF (20 mL) 중 중간체 22 (1.5 g, 3.4 mmol)의 교반 혼합물에 BOC-언하이드라이드 (0.9 g, 4.1 mmol) 및 DMAP (0.01 g, 0.082 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO₃ 수용액 (5 mL)으로 희석시키고, 층들을 분리하고, 유기 층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 2/98까지의 MeOH/DCM)로 정제하여 중간체 23을 백색 고형물로 수득하였다 (1.1 g, 60%, 시스).

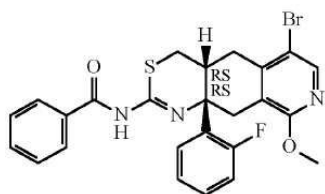
[0261] 중간체 24



[0262]

[0263] MeCN (50 mL) 중 중간체 23 (1.1 g, 2 mmol)의 교반 현탁물에 NBS (0.46 g, 2.6 mmol)를 조금씩 첨가하였다. 16시간 후, 반응 혼합물을 DCM (0.1 L) 및 포화 NaHCO_3 수용액으로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 유기 층을 염수로 처리하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 고형물을 제공하였다. 이러한 조 물질을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 50/50까지의 EtOAc/헵탄)로 정제하여 중간체 24를 백색 고형물로 수득하였다 (0.8 g, 64%, 시스).

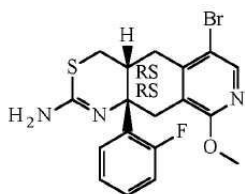
[0264] 중간체 25



[0265]

[0266] DCM (20 mL) 중 중간체 24 (0.8 g, 1.3 mmol)의 교반 혼합물을 TFA (1 mL, 13 mmol)로 처리하였다. 실온에서 1 시간 후, pH가 대략 8이 될 때까지 상기 혼합물을 포화 NaHCO_3 수용액으로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 유기 층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 중간체 25를 백색 고형물로 제공하였다 (0.67 g, 99%, 시스).

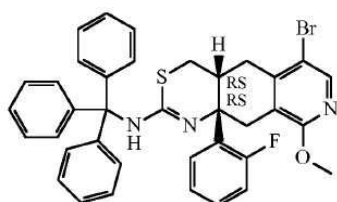
[0267] 중간체 26



[0268]

[0269] DCM (5 mL) 중 중간체 25 (0.15 g, 0.24 mol)의 교반 혼합물에 TFA (1 mL, 13 mmol)를 첨가하였다. 10분 후 반응 혼합물을 DCM (20 mL) 및 포화 NaHCO_3 수용액 (염기성 pH가 될 때까지)으로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 유기 층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 오일을 제공하였다. 이 오일을 MeOH (10 mL)에 용해시키고, DBU (0.36 mL, 2.4 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 65°C에서 16시간 동안 가열하고, 그 후 반응 혼합물을 진공에서 농축시켜 오일을 수득하였다. 이 오일을 플래시 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 4/96까지의 MeOH 중 7 M 암모니아/DCM)로 정제하여 오일을 수득하고, 이를 Et_2O 로 미분화하였다. 생성된 백색 고형물을 건조시켜 (진공 오븐, 60°C, 1시간) 중간체 26 (47 mg, 47%, 시스)을 수득하였다.

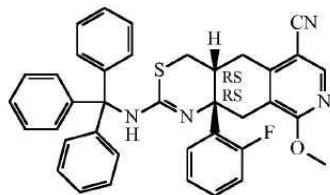
[0270] 중간체 27



[0271]

[0272] 중간체 13의 합성에 대하여 보고한 것과 유사한 합성 절차에 따라 중간체 27을 제조하였다. 중간체 26 (0.47 g, 1.11 mmol)으로부터 출발하여, 중간체 27을 수득하였다 (0.396 g, 54%, 시스).

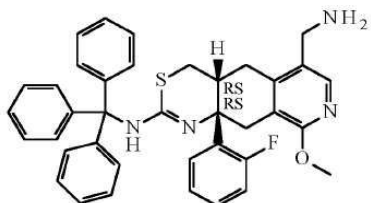
[0273] 중간체 28



[0274]

[0275] 마이크로웨이브용 튜브를 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0) (25 mg, 0.027 mmol), 1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센 (30 mg, 0.053 mmol) (디메틸아세트아미드 (10 mL) 중)로 채우고, 질소를 이용하여 탈기시키고, 그 후 중간체 27 (150 mg, 0.226 mmol), 아연 분말 (5 mg, 0.076 mmol) 및 시안화아연 (108 mg, 0.9 mmol)을 첨가하였다. 상기 튜브는 뚜껑을 닫고, 120℃에서 12시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고, 얼음물 (30 mL)에 붓고, EtOAc (2 x 20 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (2 x 5 mL)로 처리하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 갈색 고형물을 제공하였다. 이 고형물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 1/99까지의 MeOH/DCM)로 정제하여 중간체 28을 백색 고형물 (0.159 g, 정량적, 시스)로 수득하고, 이를 다음 단계에서 그대로 사용하였다.

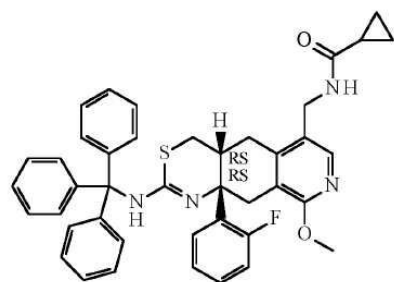
[0276] 중간체 29



[0277]

[0278] THF (10 mL) 중 중간체 28 (0.24 g, 0.39 mmol)의 빙냉 용액에 수소화알루미늄리튬 (THF 중 2 M, 0.39 mL, 0.79 mmol)을 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에 도달하게 하고, 16시간 동안 교반시켰다. 그 후 포화로셀럼 용액 (5 mL), 이어서 EtOAc (20 mL)를 첨가하고, 층들을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc (3 x 10 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과 후 진공에서 농축시켰다. 그 후 조 물질을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 5/95까지의 MeOH 중 7 M 암모니아/DCM)로 정제하여 중간체 29 (0.14 g, 58%, 시스)를 수득하였다.

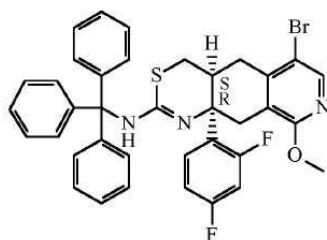
[0279] 중간체 30



[0280]

[0281] DCM (20 mL) 중 중간체 29 (0.12 g, 0.195 mmol), 시클로프로판 카르복실산 (20 mg, 0.23 mmol) 및 트리에틸아민 (0.1 mL, 0.72 mmol)의 교반 혼합물에 HBTU (90 mg, 0.237 mmol)를 한꺼번에 첨가하였다. 실온에서의 2시간 교반 후, 반응 혼합물을 물 (1 mL)로 희석시키고, 층들을 분리하였다. 후속적으로 유기 층을 물 (2 mL) 및 1 M HCl (0.5 mL), 그 후 1 M NaOH (1 mL)로 처리하였다. 상기 용액을 MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 진공에서 농축시켜 황백색 고형물을 수득하고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 50/50까지의 EtOAc/헵탄)로 정제하여 중간체 30을 백색 고형물로 수득하였다 (85 mg, 64%, 시스).

[0282] 중간체 31



[0283]

[0284] 중간체 8b로부터 출발하여, 중간체 14 (순서대로 중간체 8a, 9, 10, 11, 12, 13에서 14)의 합성에 대해 보고된 것과 유사한 합성 절차에 따라 중간체 31을 제조하였다.

[0285] B. 최종 화합물의 제조

[0286] 실시예 E1 - 일반 절차의 유동 화학에 따른 아미드 화합물의 제조

[0287] 하나의 용기 내에서 중간체 17 (25 mg) 및 염기 (예를 들어 DIPEA (17 μ L))를 용매 (예를 들어 NMP (400 μ L))에 용해시켰다. 두 번째 및 세 번째 용기 내에서 커플링제 (예를 들어 HATU (17.6 mg)) 및 산 커플링제 (2 당량)를 용매 (예를 들어 NMP (400 μ L))에 용해시켰다. 마지막 용기 내에 산의 스톡 용액 (예를 들어 NMP 중 33% TFA (2 mL))을 넣었다.

[0288] 처음 세 용기를 Gilson 215에 로딩하고, 250 μ L 주입 루프 내로, 그리고 후속적으로 2 mL 스테인리스강 코일(40 $^{\circ}$ C까지 가열됨)에 주입하였으며, 이때 각각의 펌프는 33 μ L/분으로 작동하였다. 산 (TFA) 용액을 0.5 mL 주입 루프에 로딩하였으며, 이는 120 $^{\circ}$ C까지 가열된 2 mL 스테인리스강 코일 내로 자동적으로 피크 매칭되었다. 산 (TFA) 펌프를 33 μ L/분으로 작동시켰다. 유출물은 20 μ L 루프를 통하여 플랫폼의 정제 및 분석 파트 내로 자동적으로 주입되었다.

[0289] RP HPLC에 대한 언급은 분취용 HPLC를 사용하여 정제된 샘플과 관련된다. 분획을 냉동 건조에 의해 동결건조시켰다. 구배 프로파일은 각 샘플에 대한 것을 기반으로 하여 조정하여 요구되는 화합물과 임의의 중간체 사이의 분할을 최대화하였다.

[0290] 분취용 HPLC 시스템은 다음 구성요소로 이루어졌다:

[0291] H₂ 헤드(0.3 내지 30 ml/분)를 갖춘 Gilson 322 펌프

[0292] 세미-프렙 플로우 셀(semi-prep flow cell)(0.5 mm의 경로 길이)을 갖춘 Gilson 155 검출기

[0293] Gilson 819 주입 모듈

[0294] Gilson 506 시스템 계면 모듈

[0295] 100 x 16 mm의 튜브를 수용하도록 세팅된 Gilson FC204 분획 수집 장치

[0296] 컨트롤은 Unipoint 5.11을 통한 것이었다

[0297] HPLC 컬럼: 페노메닉스 루나(Phenomenex Luna), 5 μ m C18 (2), 150 mm x 21.2 mm

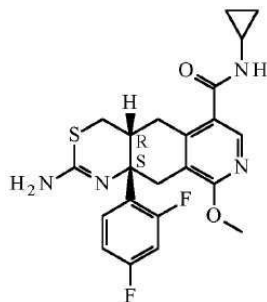
[0298] 용매 A: 10 mM 아세트산암모늄을 함유하는 HPLC 등급 물(pH는 조정되지 않음)

[0299] 용매 B: HPLC 등급 아세토니트릴

[0300] 검출: 230 및 260 nm

[0301] 온도: 주위 온도

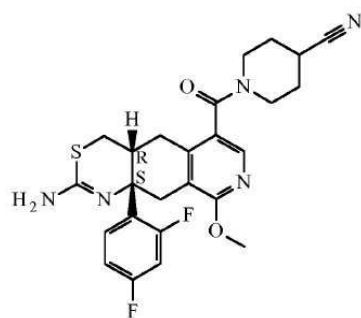
[0302] 실시예 E2 - 화합물 1의 제조



[0303]

[0304] 중간체 18 (135 mg, 0.20 mmol)을 60℃에서 1.5시간 동안 TFA (6 mL)에서 교반시켰다. TFA를 증발시키고, 유기 잔사를 Na_2CO_3 으로 중화시킨 후 DCM과 물 사이에 분배시켰다. 유기 층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과시키고, 증발에 의해 농축시켰다. 이것을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, 0/100에서 8/92까지의 MeOH/DCM)로 정제하고, 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 증발에 의해 농축시켰다. 생성물을 추가로 오븐에서 하룻밤 건조시켜 화합물 1 (52 mg, 60%)을 생성하였다.

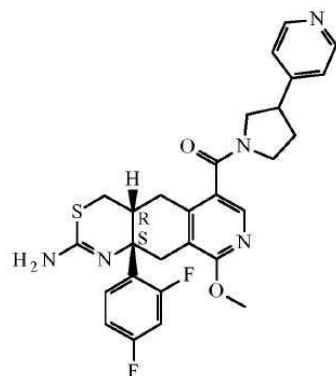
[0305] 실시예 E3 - 화합물 22의 제조



[0306]

[0307] 중간체 15(100 mg, 0.154 mmol)를 NMP (300 μL)에 용해시키고, N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (81 μL , 0.463 mmol) 및 피페리딘-4-카르보닐트릴 (17.01 mg, 0.154 mmol), 이어서 HATU (70.4 mg, 0.185 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응물을 10분 동안 정치시키고, 그 후 LCMS로 분석하였더니 반응이 완료된 것으로 밝혀졌다. 2,2,2-트리플루오로아세트산 (151 μL , 1.975 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 120℃에서 20분 동안 가열하였다. 상기 혼합물을 물에 붓고, DCM으로 추출하였다. 유기 상을 수집하고, 여과시키고, 증발시켜 검을 제공하고, 이를 RP HPLC (용매 B - 최소 10%, 중간체 55%, 최대 95%)로 정제하여 화합물 22를 백색 고형물로 제공하였다 (21.6 mg, 28%).

[0308] 실시예 E4 - 화합물 26의 제조

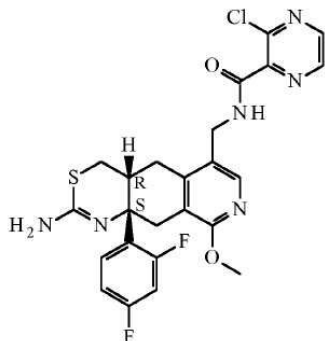


[0309]

[0310] 중간체 15 (100 mg, 0.154 mmol)를 NMP (300 μL)에 용해시키고, N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (100 mg, 0.772 mmol) 및 4-(피롤리딘-3-일)피리딘 (22.88 mg, 0.154 mmol), 이어서 HATU (70.4 mg, 0.185 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응물을 10분 동안 정치시키고, 그 후 LCMS로 분석하였더니 반응이 완료된 것으로 밝혀졌다. 상기 혼합물을 물에 붓고, DCM으로 추출하였다. 유기 상을 수집하고, 여과시키고, 증발시켜 검을 제공하였다.

2,2,2-트리플루오로아세트산 (151 μ L, 1.975 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 120℃에서 20분 동안 가열하였다. 상기 혼합물을 물에 붓고, DCM으로 추출하였다. 유기물을 건조시키고, 여과시키고, 증발시켜 검을 제공하고, 이를 RP HPLC (용매 B - 최소 10%, 중간체 60%, 최대 95%)로 정제하여 화합물 26을 백색 고형물로 제공하였다 (14.1 mg, 17%).

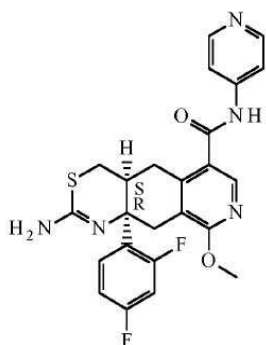
[0311] 실시예 E5 - 화합물 48의 제조



[0312]

[0313] 중간체 17 (50 mg, 0.079 mmol)을 NMP (300 μ L)에 용해시키고, N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (41.3 μ L, 0.237 mmol) 및 3-클로로피라진-2-카르복실산 (13.78 mg, 0.087 mmol), 이어서 HATU (36.1 mg, 0.095 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응물을 10분 동안 정치시키고, 그 후 LCMS로 분석하였더니 반응이 완료된 것으로 밝혀졌다. 2,2,2-트리플루오로아세트산 (151 μ L, 1.975 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 120℃에서 20분 동안 가열하였다. 상기 혼합물을 물에 붓고, DCM으로 추출하였다. 유기물을 건조시키고, 여과시키고, 증발시켜 검을 제공하고, 이를 RP HPLC (용매 B - 최소 10%, 중간체 55%, 최대 95%)로 정제하여 화합물 48을 백색 고형물로 제공하였다 (10 mg, 24%).

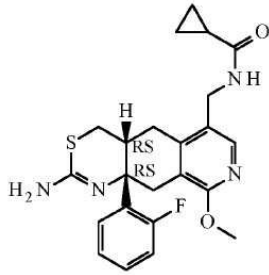
[0314] 실시예 E6 - 화합물 4의 제조



[0315]

[0316] 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘 (440 mL) 및 THF (220 μ L) (0.150 ml/min) 및 LHDMS (THF 중 1.0 M, 220 μ L, 0.22 mmol) (0.050 ml/min) 중 중간체 31 (33.8 mg, 0.05 mmol) 및 4-아미노피리딘 (5.2 mg, 0.055 mmol)의 두 용액을 2개의 시린지 펌프로 펌핑하고, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)® 마이크로반응기에서 50℃에서 혼합하였다 (V = 1 mL, Rt = 5 min). 그 후 TFA (880 μ L, 11.5 mmol)를 상기 조 혼합물에 첨가하고, 마이크로웨이브 조사 하에 120℃에서 5분 동안 가열하였다. 용매들을 진공에서 증발시켜 조 물질을 생성하고, 이를 RP HPLC (고정상: C18 선파이어(Sunfire) 30 x 100 mm 5 μ m, 이동상: 구배: 80%의, 물 중 0.1% TFA 용액, 20%의 CH₃CN으로부터 0%의, 물 중 0.1% TFA 용액, 100%의 CH₃CN까지)로 정제하여 화합물 4 (11 mg, 43%)를 생성하였다.

[0317] 실시예 E7 - 화합물 29의 제조



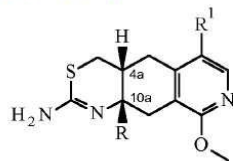
[0318]

[0319] MeOH (7 mL) 및 아세트산 (7 mL) 중 중간체 30 (0.085 g, 0.012 mmol)의 교반 혼합물을 80℃에서 16시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축시키고, 그 후 DCM (20 mL)으로 희석시키고, 포화 수성 Na₂CO₃ (2 mL)로 처리하였다. 층들을 분리하고, 유기 층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과시키고, 농축시켜 오일을 제공하고, 이를 컬럼 크로마토그래피 (4 g 레디셉(RediseP) 플래시 컬럼, 구배: 0~10% 7 N NH₃/MeOH (DCM 중))로 정제하여 화합물 29 (0.032 g, 59%)를 백색 고형물로 수득하였다.

[0320] 하기 표 1 및 표 2에는 예시되고 (*Ex. No.), 상기 실시예들 (Ex. No.) 중 하나와 유사하게 제조된 화학식 I 및 화학식 II의 화합물이 열거되어 있다. 염 형태가 표시되지 않은 경우, 화합물은 유리 염기로서 수득되었다. 'Ex. No.'는 실시예 번호(상기 프로토콜에 따라 화합물을 합성함)를 말한다. 'Co. No.'는 화합물 번호를 의미한다.

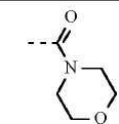
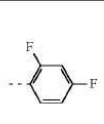
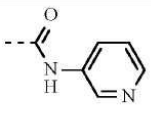
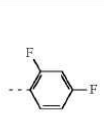
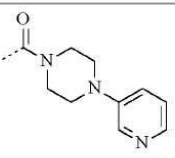
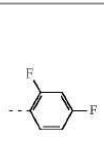
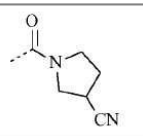
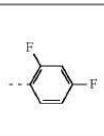
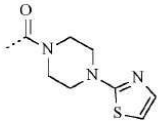
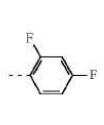
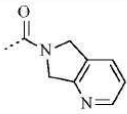
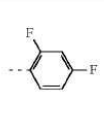
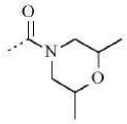
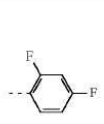
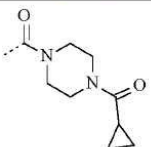
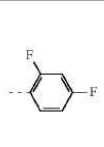
[0321] [표 1]

C_{4a}(R), C_{10a}(S) 배열의 화학식 I의 화합물

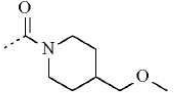
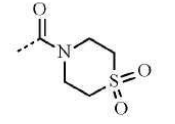
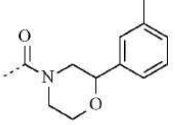
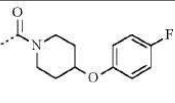
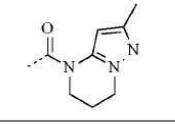
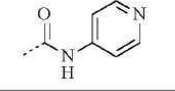
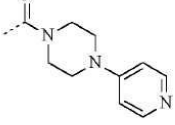
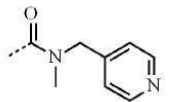


Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
1	*E2			
1a				.TFA

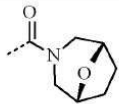
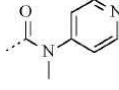
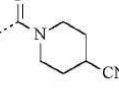
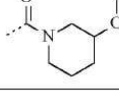
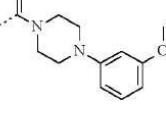
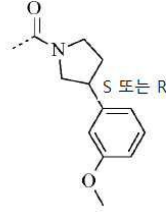
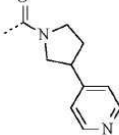
[0322]

Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
2	E2			.TFA
2a				
3	E2			
5	E3			
6	E3			
7	E3			
8	E3			
9	E3	 시스 또는 트랜스		
10	E3			

[0323]

Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
11	E3			
12	E3			
13	E3			
14	E3			
15	E3			
16	E3			
17	E3			
18	E3			

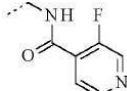
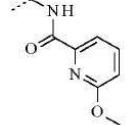
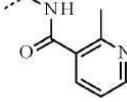
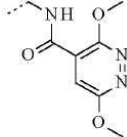
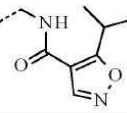
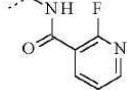
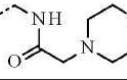
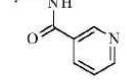
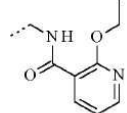
[0324]

Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
19	E3			
20	E3			
21	E3			
22	*E3			
23	E3			
24	E3			
25	E3			
26	*E6			

[0325]

Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
27	E3			
28	E1			
30	E11			.TFA
31 31a	E1			.TFA
32 32a	E26			.TFA
33	E1			
34	E1			
35	E1			
36	E1			
37	E1			

[0326]

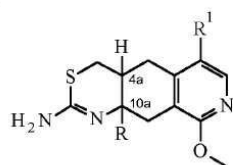
Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
38	E1			
39	E1			
40	E1			
41	E1			
42	E1			
43	E1			
44	E1			
45	E1			
46	E1			

[0327]

Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	염 형태
47	E1			
48	*E5			
49	E1			
50	E1			
51	E1			

[표 2]

화학식 I 및 화학식 II의 화합물



Co. No.	Ex. No.	R ¹	R	입체배열/염
4	*E6			C _{4a} (S);C _{10a} (R) 단일 부분입체 이성질체 순수 거울상 이성질체/ . TFA
29	*E7			C _{4a} (RS);C _{10a} (RS) 단일 부분입체 이성질체 시스, 라세미 혼합물

C. 분석 파트

LCMS(액체 크로마토그래피/질량 분광법)

LCMS의 일반 절차

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 측정을 LC 펌프, 다이오드-어레이(DAD) 또는 UV 검출기, 및 각각의 방법에 명시된 바와 같은 컬럼을 사용하여 수행하였다. 필요할 경우, 추가의 검출기를 포함시켰다(하기의 방법에 대한 표를 참조).

컬럼으로부터의 유동물을 대기압 이온 공급원과 함께 구성된 질량 분광계(MS)로 가져왔다. 화합물의 공칭 단일 동위원소 분자량(MW)의 확인을 허용하는 이온을 얻기 위하여 조정 파라미터(예를 들어, 스캐닝 범위, 드웰(dwell) 시간...)를 설정하는 것은 당업자의 지식 이내이다. 적절한 소프트웨어를 사용하여 데이터 획득을 수행하였다.

화합물은 이들의 실험적 체류 시간(R_t) 및 이온에 의해 설명된다. 데이터의 표에 상이하게 명시되어 있지

않다면, 보고된 분자 이온은 $[M+H]^+$ (양성자화된 분자) 및/또는 $[M-H]^-$ (탈양성자화된 분자)에 상응한다. 다수의 동위원소 패턴을 갖는 분자(예를 들어 Br, Cl)에 있어서, 보고된 값은 최저 동위원소 질량에 대하여 얻어진 것이다. 모든 결과는 사용된 방법과 일반적으로 연관되어 있는 실험적 불확실성을 가지고서 얻어졌다.

[표 3]

LCMS 방법 코드(유량은 mL/분 단위로 표현되며; 컬럼 온도(T)는 °C 단위로 표현되고;

실행 시간은 분 단위로 표현됨)

방법 코드	기기	컬럼	이동상	구배	유량 ----- Col T	실행 시간
1	워터스(Waters): 얼라이언스(Alliance) [®] -DAD - ZQ 및 ELSD 2000 올테크(Alltech)	워터스 : 엑스테라(Xterra) MS C18 (3.5µm, 4.6*100mm)	A: 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 중 25 mM CH ₃ COONH ₄ B: CH ₃ CN C: CH ₃ OH D: (40% CH ₃ CN 및 40% CH ₃ OH 및 20% H ₂ O(0.25% CH ₃ COOH 를 포함함)	6.5 분 내에 100% A 로부터 1% A, 49% B 및 50% C 까지, 0.5 분 내에 1% A 및 99% B 까지, 1 분 내에 100% D 까지, 1.0 분 동안 유지, 0.5 분 내에 100% A 까지, 1.5 분 동안 유지.	1.6 ----- - 40	11
1	워터스: 어퀴티(Acquity) [®] UPLC [®] - DAD 및 SQD	워터스: HSS T3 (1.8 µm, 2.1*100 mm)	A: 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 중 10 mM CH ₃ COONH ₄ B: CH ₃ CN	2.10 분 내에 100% A 로부터 5% A 까지, 0.90 분 내에 0% A 까지, 0.5 분 내에 5% A 까지	0.7 ----- - 55	3.5
2	워터스: 어퀴티 [®] UPLC [®] - DAD 및 SQD	워터스 : BEH C18 (1.7 µm, 2.1*50 mm)	A: 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 중 10 mM CH ₃ COONH ₄ B: CH ₃ CN	1.3 분 내에 95% A 로부터 5% A 까지, 0.7 분 동안 유지.	0.8 ----- - 55	2
3	워터스: 어퀴티 [®] 아이클래스(IClass) UPLC [®] - DAD 및 세보(Xevo) G2-S QTOF	워터스: CSH [™] C18 (1.7 µm, 2.1x50 mm)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ (6.5 mM) + 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	4.6 분 내에 95% A 로부터 5% A 까지, 0.4 분 동안 유지	1 ----- - 50	5

용점

값들은 최고 값이거나 용융 범위이며, 이 분석 방법과 일반적으로 연관되어 있는 실험적 불확실성을 가지고서 얻어진다.

다수의 화합물에 대하여, 용점을 DSC823e (메틀러-톨레도(Mettler-Toledo))로 측정하였다. 용점을 30°C/분의 온도 구배를 이용하여 측정하였다. 최대 온도는 300°C였다.

[0342] [표 4]

분석 데이터 - R_t는 체류 시간(분)을 의미하며, [M+H]⁺는 화합물의 양성자화된 것의 질량을 나타내고, 방법은 (LC)MS에 이용한 방법을 나타냄.

Co. No.	R _t	[M+H] ⁺	방법	용점
1	1.59	445	1	n.d.
2	0.81	475	2	n.d.
3	0.84	482	2	n.d.
4	1.80	482.1	3	n.d.
5	5.17	551.62	3	n.d.
6	5.02	484.53	3	n.d.
7	5.56	557.65	3	n.d.
8	5.05	508.55	3	n.d.
9	5.34	503.58	3	n.d.
10	5.08	542.61	3	n.d.
11	5.49	517.60	3	n.d.
12	5.03	523.59	3	n.d.
13	6.64	565.65	3	n.d.
14	6.68	583.64	3	n.d.
15	3.86	525.59	3	n.d.
16	5.19	482.52	3	n.d.
17	4.45	551.62	3	n.d.
18	4.96	510.57	3	n.d.
19	5.1	501.56	3	n.d.
20	5.57	473.55	3	n.d.
21	4.91	496.54	3	n.d.
22	5.21	498.56	3	n.d.
23	5.33	503.58	3	n.d.
24	6.39	580.66	3	n.d.
25	6.3	565.65	3	n.d.
26	5.04	536.61	3	n.d.
27	4.67	516.58	3	n.d.
29	1.47	441	1	n.d.
30	0.83	496	2	n.d.
31a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[0343]

Co. No.	R _t	[M+H] ⁺	방법	용점
32a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	5.57	520.57	3	n.d.
34	5.66	525.58	3	n.d.
35	5.32	564.54	3	n.d.
36	5.93	565.53	3	n.d.
37	5.45	532.53	3	n.d.
38	5.02	514.53	3	n.d.
39	5.83	526.57	3	n.d.
40	4.85	510.57	3	n.d.
41	5.46	557.58	3	n.d.
42	6.01	528.59	3	n.d.
43	5.06	514.53	3	n.d.
44	4.71	518.59	3	n.d.
45	4.82	496.54	3	n.d.
46	5.83	540.60	3	n.d.
47	5.81	526.57	3	n.d.
48	5.18	531.98	3	n.d.
49	5.49	557.58	3	n.d.
50	4.97	497.53	3	n.d.
51	5.93	536.57	3	n.d.

n.d.는 결정되지 않음을 의미하며, b.r.은 넓은 범위를 의미함

[0344]

[0345]

NMR

[0346]

다수의 화합물에 있어서, ¹H NMR 스펙트럼을, 용매로서 클로로포름-*d*(중수소화 클로로포름, CDCl₃) 또는 DMSO-*d*₆(중수소화 DMSO, 디메틸-*d*66 솔폭시드)을 사용하여, 400 MHz에서 작동하는 브루커(Bruker) DPX-400 분광계, 또는 600 MHz에서 작동하는 것, 360 MHz에서 작동하는 브루커 DPX-360 분광계에서 기록하였다. 화학적 이동 (δ)은 테트라메틸실란(TMS)에 대하여 백만분당 부(ppm)로 기록하였으며, 이를 내부 표준으로 사용하였다.

[0347]

[표 5]

¹H NMR 결과

Co. No.	¹ H NMR 결과
2	¹ H NMR (360 MHz, 클로로포름- <i>d</i>) δ ppm 2.80 - 3.45 (m, 10 H) 3.53 - 3.87 (m, 7 H) 3.93 (s, 3 H) 6.79 - 6.94 (m, 2 H) 7.29 - 7.38 (m, 1 H) 7.87 (s, 1 H)
4*	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2.90 - 3.43 (m, 7 H) 3.96 (s, 3 H) 7.22 - 7.33 (m, 2 H) 7.39 - 7.50 (m, 1 H) 8.17 (d, <i>J</i> =6.82 Hz, 2 H) 8.48 (s, 1 H) 8.76 (d, <i>J</i> =6.83 Hz, 2 H) 8.91 (br. s, 1 H) 9.54 (br. s, 1 H) 10.96 (br. s., 1 H) 11.66 (s, 1 H)

* 티오아미딘 기는 양성자화됨

[0348]

[0349]

D. 약리학적 실시예

[0350]

본 발명에 제공된 화합물들은 베타-부위 APP 절단 효소 1(BACE1)의 억제제이다. 아스파르트 프로테아제인 BACE1의 억제는 알츠하이머병(AD)의 치료와 관련되어 있다고 생각된다. 베타-아밀로이드 전구체 단백질(APP) 유래 베타-아밀로이드 펩티드(Aβeta)의 생성 및 축적은 AD의 발병과 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. Aβeta는, Aβeta 도메인의 N-말단 및 C-말단에서의 순차적 절단(각각 베타-세크라타제 및 감마-세크라타제에 의해)에 의해 아밀로이드 전구체 단백질(APP)로부터 생성된다.

[0351]

화학식 I의 화합물은 효소 활성을 억제하는 능력에 의해 실질적으로 BACE1에 효과를 가질 것으로 예상된다. 이

와 같은 화합물, 더 구체적으로 화학식 I에 따른 화합물의 확인에 적합한, 하기에 기술된 SKNBE2 세포에서의 생화학적 형광 공명 에너지 전달(Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) 기반 분석법 및 세포 알파리사(α Lisa) 분석법을 사용하여 테스트되는 이와 같은 억제제의 거동을 표 8 및 표 9에 나타낸다.

[0352] BACE1의 생화학적 FRET 기반 분석

[0353] 이 분석법은 형광 공명 에너지 전달(FRET) 기반 분석법이다. 이 분석법을 위한 기질은 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 베타-세크레타제 절단 부위의 '스웨디시(Swedish)' Lys-Met/Asn-Leu 돌연변이를 함유하는 APP 유래 13개 아미노산 펩티드이다. 이 기질은 또한 2개의 형광단을 함유한다: (7-메톡시쿠마린-4-일) 아세트산(Mca)은 320 nm에서 여기 파장 및 405 nm에서 방출 파장을 갖는 형광 공여체이고, 2,4-디니트로페닐(Dnp)은 독점적인 켄처 수용체이다. 이들 2개의 그룹 사이의 거리는 광 여기시에, 공여체 형광 에너지가 공명 에너지 전달을 통해 수용체에 의해 상당히 켄칭되도록 선택되었다. BACE1에 의한 절단시에, 형광단 Mca는 켄칭 그룹 Dnp로부터 분리되어 공여체의 최대 형광 수율을 회복시킨다. 형광의 증가는 단백질 분해 속도와 선형적으로 관련되어 있다.

[0354] 간략하게는 384웰 포맷에서 0.04 μ g/ml의 최종 농도의 재조합 BACE1 단백질을 화합물 또는 DMSO의 존재 하에 인큐베이션 완충제(50 mM 시트레이트 완충제(pH 5.0), 0.05% PEG) 중 20 μ M 기질과 함께 실온에서 450분 동안 인큐베이션한다. 그 다음에, 단백질 분해의 양을 상이한 인큐베이션 시간(0분, 30분, 60분, 90분, 120분 및 450분)에 형광 측정(320 nm에서의 여기 및 405 nm에서의 방출)에 의해 직접 측정한다. 모든 실험에 있어서, 시간 곡선(0분과 120분 사이 30분 마다)을 이용하여 고 대조군의 최저 기저 신호가 발견되는 시간을 결정한다. 이 시점(Tx)에서의 신호를 이용하여 450분에서의 신호에서 감산한다. 결과를 T450과 Tx 사이의 차이로서, RFU로 표현한다.

[0355] 최소 자승 합 방법에 의해 %Controlmin 대 화합물 농도의 그래프에 최적 부합 곡선을 피팅한다. 이로부터, IC₅₀ 값(활성의 50% 억제를 야기하는 억제 농도)을 획득할 수 있다.

[0356] LC = 저 컨트롤 값의 중앙값

[0357] = 저 컨트롤: 효소를 이용하지 않는 반응

[0358] HC = 고 컨트롤 값의 중앙값

[0359] = 고 컨트롤: 효소를 이용한 반응

[0360] %효과 = $100 - [(\text{샘플} - \text{LC}) / (\text{HC} - \text{LC}) * 100]$

[0361] %Control = (샘플/HC)*100

[0362] %Controlmin = (샘플-LC) / (HC-LC)*100

[0363] 하기의 예시된 화합물을 본질적으로 상기에 기술된 바와 같이 테스트하였으며, 이들은 하기의 활성을 나타냈다:

[0364] [표 6]

화합물 번호	생화학적 FRET 기반 분석 pIC ₅₀
1	7.12
1a	7.18
2	6.66
2a	6.62
3	7.12
22	6.89
28	7.69
30	7.53
30a	7.18
31	7.09
31a	6.95
32	6.96
32a	6.74
48	7.66

[0365]

[0366] SKNBE2 세포에서의 세포 알파리사 분석

[0367] 2회의 알파리사 분석에 있어서, 생성되어 인간 신경모세포종 SKNBE2 세포의 배지 내로 분비된 Abeta 토탈 및 Abeta 1-42의 수준을 정량화한다. 본 분석법은, 야생형 아밀로이드 전구체 단백질(hAPP695)을 발현하는 인간 신경모세포종 SKNBE2를 기반으로 한다. 본 화합물들을 희석하여 상기 세포에 첨가하고, 18시간 동안 인큐베이션하고, Abeta 1-42 및 Abeta 토탈을 측정한다. Abeta 토탈 및 Abeta 1-42를 샌드위치 알파리사에 의해 측정한다. 알파리사는, 스트렙타비딘 코팅된 비드에 부착되어 있는 바이오티닐화 항체 AbN/25와, 수용체 비드에 콘쥬레이션된 항체 Ab4G8 또는 cAb42/26(각각 Abeta 토탈 및 Abeta 1-42 검출용)을 사용하는 샌드위치 분석법이다. Abeta 토탈 또는 Abeta 1-42의 존재 하에서 비드들은 매우 근접하게 된다. 공여체 비드의 여기는 일중항 산소 분자의 방출을 유발시키고, 이러한 산소 분자의 방출은 수용체 비드에서 에너지 전달의 캐스케이드를 촉발시켜 그 결과 광 방출이 일어난다. 1시간의 인큐베이션 후 발광을 측정한다(650 nm에서 여기, 615 nm에서 방출).

[0368] 최소 자승 합 방법에 의해 %Controlmin 대 화합물 농도의 그래프에 최적 부합 곡선을 피팅한다. 이로부터, IC₅₀ 값(활성의 50 % 억제제를 야기하는 억제 농도)을 수득할 수 있다.

[0369] LC = 저 컨트롤 값의 중앙값

[0370] = 저 컨트롤: 알파리사에서 바이오티닐화 Ab를 이용하지 않고서, 화합물 없이 사전 인큐베이션된 세포

[0371] HC = 고 컨트롤 값의 중앙값

[0372] = 고 컨트롤: 화합물 없이 사전 인큐베이션된 세포

[0373] %효과 = $100 - [(\text{샘플} - \text{LC}) / (\text{HC} - \text{LC}) * 100]$

[0374] %Control = (샘플/HC)*100

[0375] %Controlmin = (샘플-LC) / (HC-LC)*100

[0376] 하기의 예시된 화합물을 본질적으로 상기에 기술된 바와 같이 테스트하였으며, 이들은 하기의 활성을 나타냈다:

[0377] [표 7]

화합물 번호	SKNBE2 세포 에서의 세포 알파리사 분석 Abeta 42 pIC ₅₀	SKNBE2 세포 에서의 세포 알파리사 분석 Abeta 토탈 pIC ₅₀
1	8.02	
1a	7.72	7.64
2	7.32	
2a	7.33	7.3
3	7.25	
22	7.07	
28	7.54	
30	7.31	
30a	7	7.09
31	7.48	
31a	7.39	7.36
32	7.41	
32a	7.07	7.02
48	7.78	

[0378]

[0379] BACE2의 생화학적 FRET 기반 분석

[0380] 이 분석법은 형광 공명 에너지 전달(FRET) 기반 분석법이다. 이 분석법을 위한 기질은 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 베타-세크레타제 절단 부위의 '스웨디시' Lys-Met/Asn-Leu 돌연변이를 함유한다. 이 기질은 또한 2개의 형광단을 함유한다: (7-메톡시쿠마린-4-일) 아세트산(Mca)은 320 nm에서 여기 파장 및 405 nm에서 방출 파장을 갖는 형광 공여체이고, 2,4-디니트로페닐(Dnp)은 독점적인 켄치 수용체이다. 이들 2개의 그룹 사이의 거리는 광 여기시에, 공여체 형광 에너지가 공명 에너지 전달을 통해 수용체에 의해 상당히 켄칭되도록 선택되었다. 베타-세크레타제에 의한 절단시에, 형광단 Mca는 켄칭 그룹 Dnp로부터 분리되어 공여체의 전체 형광 수율을 회복시킨다. 형광의 증가는 단백질 분해 속도와 선형적으로 관련되어 있다.

[0381] 간략하게는 384웰 포맷에서 0.4 µg/ml의 최종 농도의 재조합 BACE2 단백질을 화합물의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션 완충제(50 mM 시트레이트 완충제(pH 5.0), 0.05% PEG, DMSO 없음) 중 10 µM 기질과 함께 실온에서 450분 동안 인큐베이션한다. 그 다음에, T=0 및 T=450 (320 nm에서 여기 및 405 nm에서 방출)에서의 형광 측정에 의해 단백질 분해의 양을 직접 측정한다. 결과를 T450과 T0 사이의 차이로서 RFU(상대 형광 단위)로 표현한다.

[0382] 최소 자승 합 방법에 의해 %Controlmin 대 화합물 농도의 그래프에 최적 부합 곡선을 피팅한다. 이로부터, IC₅₀ 값(활성의 50% 억제제를 야기하는 억제 농도)을 획득할 수 있다.

[0383] LC = 저 컨트롤 값의 중앙값

[0384] = 저 컨트롤: 효소를 이용하지 않는 반응

[0385] HC = 고 컨트롤 값의 중앙값

[0386] = 고 컨트롤: 효소를 이용한 반응

[0387] %효과 = 100-[(샘플-LC) / (HC-LC)*100]

[0388] %Control = (샘플/HC)*100

[0389] %Controlmin = (샘플-LC) / (HC-LC)*100

[0390] 하기의 예시된 화합물을 본질적으로 상기에 기술된 바와 같이 테스트하였으며, 이들은 하기의 활성을 나타냈다:

[0391] [표 8]

화합물 번호	생화학적 FRET 기반 분석 pIC ₅₀
1	6.77
1a	6.78
2	5.82
2a	5.84
3	6.55
22	5.96
28	6.01
30	6.45
30a	6.16
31	6.98
31a	6.9
32	6.51
32a	6.23
48	6.7

[0392]

[0393] 생화학적 분석 - 자동화

[0394] 일반적 방법

[0395] 달리 표시되지 않으면, 모든 생화학적 물질을 영국 도싯 폴 소재의 시그마-알드리치 케미칼 컴퍼니(Sigma-Aldrich Chemical Company)로부터 구매하고, 분석 등급 이상의 등급의 비수성 용매를 영국 러퍼버러 소재의 서모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)으로부터 구매하였다. 밀리큐(MilliQ) 물 (엘릭스(Elix) 5 및 밀리큐 그라디언트(MilliQ Gradient); 머크 밀리포어(Merck Millipore))을 생물학적 완충제를 구성하는 기본 수성 용매로 사용하였다. 5.0의 최종 pH가 달성될 때까지 50 mM 트리소듐 시트레이트 (1.06448; 머크 바이오사이언시스(Merck Biosciences))의 교반 용액에 50 mM 시트르산 용액 (1.00244; 머크 바이오사이언시스)을 첨가함으로써 기본 분석 완충제를 제조하였다. 이것에 40% 폴리에틸렌 글리콜("PEG")(P1458; 시그마 알드리치) 용액을 0.05%의 최종 농도까지 첨가하였으며; 따라서 기본 완충제는 0.05% PEG를 함유하는 50 mM 시트르산나트륨(pH 5.0)으로 이루어졌다. 모든 분석을 일상적으로 384웰 분석 플레이트 (코스타(Costar) 4514; 코닝 라이프 사이언시스(Corning Life Sciences))에서 실시하고, 이를 37 ± 1°C에서 60분 동안 인큐베이션한 후 종점 형광 강도를 판독하였다. (7-메톡실 쿠마린-4-일)아세트산계 기질인 β-세크레타제 기질 VI (M2465; 바캠(Bachem))을 100% DMSO (D/4121/PB08; 서모피셔) 중 1 mM 스톡으로 제조하였다. DMSO를 기본 완충제에 1% (vol./vol.)의 최종 농도까지 첨가함으로써 분석 완충제를 제조하였다. β-세크레타제 I (18.64 μM; "BACE1") 및 β-세크레타제 II (4.65 μM; "BACE2")를 벨기에 비어스 소재의 얀센 파마슈티카(Janssen Pharmaceutica)로부터 입수하고, 냉동 분취물 (대략 20 μl)로서 보관하고, 필요할 경우 해동시켰다.

[0396] 수동 분석

[0397] 전형적으로 12.5 μl의 분석 완충제를 분석 플레이트의 B열 내지 P열에 분배하였다. 분석 완충제 중에 적절하게 희석시킨 테스트 화합물 18.75 μl를 A열에 첨가하였다. 6.25 μl의 샘플 분취물을 A열로부터 B열로 옮기고, 샘플을 피펫으로 3회 혼합하였다. 이 공정을 플레이트 아래에서 반복하고, 혼합 후 N열에서 6.25 μl의 용액을 버렸다. 0열 및 P열을 양성 및 음성 대조군으로 표기하였다. P열에 6.25 μl의 기본 완충제를 첨가하였다. 기본 완충제에 희석시킨 6.25 μl의 효소 (신선하게 제조한 40 nM BACE1 또는 40 nM BACE2)를 A열 내지 0열에 첨가하였다. 분석을 시작하기 위하여, 6.25 μl의 신선 제조 80 μM 기질(100% DMSO 용액 중 1 mM을 HPLC 등급 물 (옵티마(Optima) W6-212; 서모피셔) 내에 희석시킴으로써 제조함)을 모든 웰에 첨가하였다. 분석 플레이트는 뚜껑을 덮고 37±1°C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 웰당 9회 판독의 프로토콜 (50 ms 적분; 3의 치밀도, 0.25 mm의 이격치; 스펙트라맥스 패러다임(SpectraMAX Paradigm) 플레이트 판독기; TUNE 카트리지; SoftMax Pro v 6.3 소프트웨어; 영국 버크셔 오징엄 소재의 몰레큘라 디바이시스 유케이 리미티드(Molecular Devices UK Ltd.))을 이용하고, 상기 9개의 판독치의 중앙값을 텍스트 파일로 출력하여, 360/405 nm(여기/방출)에서 웰의 형광 강도를 판독하였다. 판매 회사가 공급하는 비선형 회귀 분석 모델을 이용하여, Prism 소프트웨어 v 6.3

(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 그래프패드 인크.(GraphPad Inc.))을 이용하여 데이터 분석을 실시하였다. IC₅₀ 결정을 위하여, 4 파라미터 로지스틱 변수 기울기 모델을 이용하여 미가공 형광 강도 데이터를 피팅시켰으며, 이때 '최하위(bottom)'는 음성 대조군에 대하여 보정하였다.

[0398] 자동화 바이오어세이 하드웨어

[0399] Cyclops 바이오어세이 모듈은 분획 수집 스테이션, 시약 스테이션, 액체 처리 로봇, 플레이트 스토어 및 일체형 플레이트 판독기(스펙트라맥스 패러다임, TUNE 카트리지, SoftMax Pro v 6.3; 분획물 크기 디바이스)로 이루어져 있다. 분획 수집 스테이션은 H-포탈 캐리지(독일 에슬링겐 소재의 페스토 아게 운트 코. 카게(Festo AG & Co. KG))에 장착된 384웰 수집 플레이트(P-384-240SQ-C; 미국 캘리포니아주 유니온 시티 소재의 악시젠(Axygen)), 시린지 드라이브 및 두방향 6구 주입 밸브(200 μ l 루프를 갖춘)(스위스 스켄콘 소재의 VICI 아게 인터내셔널(VICI AG International))로 구성되었다. 주입 밸브의 출력은 384웰 수집 플레이트의 모든 위치에 대하여 주소 지정이 가능하였다. 시약 스테이션은 유압식으로 냉각시킨(10~12℃) 알루미늄 세그먼트들로 이루어졌으며; 상기 세그먼트 각각은 SBS 마이크로타이터 플레이트 풋프린트를 수용하도록 제조되었다. 독립적인 주소 지정 가능 시약 스테이션들은 이러한 섹션들 내에 수용되었다. 필요할 경우, 맞춤형 알루미늄 하우징을 이용하여 실험실용 표준 플라스틱 제품(예를 들어, 에펜도르프(Eppendorf) 튜브, 팔콘(Falcon) 튜브 등)을 수용하였다. 필요할 경우, 그리고 필요한 때에, 시약 저장체의 뚜껑을 덮었으며, 뚜껑은 테플론(Teflon)-코팅된 탐침자가 용액에 접근할 수 있는 구멍을 포함하였다. 액체 처리 시스템에 존재하는 시약은 다음과 같았다:

[0400] ● 뚜껑을 덮은 시약 저장체(390007; 영국 레더헤드 소재의 포베어 사이언시즈 리미티드(Porvair Sciences Ltd.))에 담긴 탐침자 세척 용액 (대략 150 ml; 33.3:33.3:33.3의 물:프로판-2-올 (P/7508/17; 서모피셔):메탄올 (M/4058/17; 서모피셔)).

[0401] ● 분석 완충액

[0402] ● HPLC 등급 물

[0403] ● 5 ml 에펜도르프 튜브 (0030 119.401; 에펜도르프)에 담긴 기본 완충제 중에 희석시킨 40 nM BACE1

[0404] ● 1.5 ml 에펜도르프 튜브 (0030 000.919; 에펜도르프)에 담긴, 100 mM 염화나트륨 및 20% 글리세롤 (16374; 미국 오하이오주 클레블랜드 소재의 유에스비 코포레이션(USB Corp.))을 함유하는 25 mM 트리스 (648311; 영국 노팅엄 소재의 머크 바이오사이언시즈)(pH 7.5) 중에 희석시킨 400 nM BACE2

[0405] ● (주위 온도에서 유지된) 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 담긴 100% DMSO 중 1 mM 기질

[0406] ● 2개의 빈 1.5 ml 에펜도르프 튜브

[0407] 액체 처리 시스템은 그리퍼 아암(gripper arm) 및 단일 테플론-코팅 스테인리스강 탐침자가 갖추어진 LISSY 시스템(독일 프랑크푸르트 소재의 진세르 아날리티크 게엠베하(Zinsser Analytik GmbH))으로 구성되었다. 모든 액체 처리 단계 사이에, 테플론-코팅 스테인리스강 탐침자를 탐침자 세척 용액, 이어서 시스템용 액체(물)로 세척하였다. 바이오어세이 시스템의 제어는 WinLISSY 소프트웨어(진세르 아날리티크) 및 SoftMax Pro(이는 WinLISSY 자동 커맨드 컨트롤 하에 있음)를 사용하여 성취하였다. 플레이트 스토어는 분석 플레이트(코스타 4514)의 스택을 수용하였다. 입력 및 출력 릴레이는 바이오어세이 모듈과 Cyclops 컨트롤 소프트웨어 사이의 점점 폐쇄 컨트롤 및 피드백을 가능하게 하였다. 플레이트 스토어는 액체 처리 시스템이 접근할 수 있는 분석 플레이트 스택을 수용하는 알루미늄 랙이었다.

[0408] 자동화 바이오어세이 과정

[0409] 희석 모듈의 출력은 '로드' 위치에 세팅된 수집 스테이션 주입 밸브를 통하여 유동하였다. 폴링 모드를 입력하도록 세팅된 WinLISSY를 이용하여, Cyclops 컨트롤 소프트웨어에 의한 점점 폐쇄에 의해 바이오어세이 프로토콜이 시작되었다. 첫 번째 작동은 주입 밸브를 '주입' 위치로 트리거링하여 루프 내용물들을 격리시키고, 분획 수집 시스템은 루프 내용물들을 수집 플레이트 상의 주소 지정 가능 웰에 분배하였다. 부수적으로, 액체 처리 시스템은 분석 플레이트를 액체 처리 베드 상의 분석 스테이션에 전달하였다. 액체 처리 시스템은, 분석 플레이트의 컬럼 상에, B열로부터 P열까지 분석 플레이트의 두 컬럼에 12.5 μ l의 분석 완충제를 아래로 분배하였다. A열에 수집 플레이트의 각각의 웰로부터의 테스트 화합물 18.75 μ l를 첨가하였다. A열로부터의 샘플 분취물 6.25 μ l를 B열로 옮겼다. 이 과정을 상기 컬럼 둘 다에 대하여 플레이트 아래로 반복하고, 6.25 μ l의 시약을 N열에서 버렸다. O열 및 P열을 양성 및 음성 대조군으로 표기하였다. P열에 6.25 μ l의 분석 완충제를 첨가하였

다. 첫 번째 컬럼의 A열 내지 O열에 기본 완충제 중에 보관된 40 nM BACE1 6.25 μ l를 첨가하였다. BACE2 효소 첨가를 위하여, 17.5 μ l의 400 nM BACE2를 157.5 μ l의 기본 완충제로 희석시켰다. 이것은 175 μ l의 용액을 표기된 수용 에펜도르프 튜브에서 5회 피펫팅함으로써 혼합하였으며, 그 후 6.25 μ l의 희석 BACE2를 각각의 컬럼에 첨가하였다. MCA 기질에 있어서, 100% DMSO 중 1 mM MCA 기질 30.8 μ l를 385 μ l의 HPLC용 물로 희석시켰다. 이것은 400 μ l를 표기된 수용 에펜도르프 튜브에서 5회 피펫팅함으로써 혼합하였으며, 6.25 μ l를 각각의 컬럼에 첨가하였다. 그 후 분석 플레이트를 플레이트 판독기 캐리지에 옮기고, 드로어를 닫고, 어세이 인큐베이션을 시작하였다. 60분 후, WinLISSY는, 형광 강도를 판독하는 프로토콜 파일을 로딩 및 실행하도록 플레이트 판독기에 지시하는 서브루틴을 실행하였다. 이러한 프로토콜 파일은 마이크로타이터 플레이트를 판독하여 상응하는 데이터를 텍스트 파일로서 작성하는 데 필요한 파라미터를 포함하였다. 형광 강도는 웰당 9회 판독의 프로토콜 (50 ms 적분; 3의 치밀도, 0.25 mm의 이격치)을 이용하여 360/405 nm(여기/방출)에서 판독하였으며, 상기 9개의 판독치의 중앙값을 텍스트 파일로 출력하였다.

[0410] Cyc10ps 바이오어세이 데이터의 분석

[0411] Cyc10ps 소프트웨어는 바이오어세이 공유 데이터 파일 폴더를 폴링하도록 세팅되었다. 데이터의 저장시에, WinLISSY는 출력 점점 폐쇄 시그널을 보내서 바이오어세이가 완료되었음을 Cyc10ps에게 알려주었다. Cyc10ps 소프트웨어에 의해 상기 데이터를 열고, 가공하고, 분석하였다. 데이터 가공은 테스트 물품의 각각의 농도를 상응하는 열에 첨부하는 것으로 이루어졌다(이때 데이터는 희석 모듈로부터 받음). 그 후, 4 파라미터 로지스틱 모델을 이용한 비선형 회귀 분석에 의해 데이터를 분석하여(MATLAB; 영국 캠브리지 소재의 매스웍스(MathWorks)) IC₅₀을 결정하였다. 그 범위는 기준선(즉, P열)과 최대 관찰 양성 대조군 비율(즉, O열) 사이에서 고정되었다. 데이터 품질을 유지하기 위하여, 자동화 바이오어세이 데이터 분석을 통제하도록 규칙을 정하였다. 첫 번째 경우에서, 75% 이상의 활성 또는 25% 이하의 활성이 관찰될 경우, 데이터를 거부하였다. 이것은 양호한 분석의 실시예 충분한 적정 데이터가 있음을 보장하였다. 그 후, 피트의 질을 R 자승 값으로 판단하였다. 이 값이 0.85 아래로 떨어지면, 데이터를 거부하였다. 모든 경우에, 거부는 바이오어세이 실패 태그가 시스템에 보고되게 하였다. 이상치 분석을 이전에 기술된 바와 같이 실시하였으며(문헌[Motulsky, H.J. and Brown, R.E., (2006), *BMC Bioinformatics*, 7, 123]), 이때 Q 값은 10%였다. 자동화 IC₅₀ 분석을 위하여, 최대 3개의 이상치를 피트 플래그 오류 생성 전에 배제할 수 있다. 바이오어세이 데이터의 교차 확인은, '최하위'를 음성 대조군에 대하여 보정한 미가공 형광 강도 데이터를 피팅하기 위한 비선형 회귀 분석용 4 파라미터 로지스틱 변수 기울기 모델을 이용한 Prism 소프트웨어 v 6.3(그래프패드 인크.)을 이용하여 분석함으로써 달성하였다.

[0412] [표 9]

Co. No.	자동화 분석 BACE1 pIC ₅₀	자동화 분석 BACE2 pIC ₅₀
1a	7.4	7.14
2a	7.24	6.49
5	6.84	6.49
6	7.25	6.55
7	6.49	6.06
8	6	5.45
9	6.44	5.67
10	6.31	5.84
11	6.81	6.11
12	6.3	6.08
13	7.16	6.51
14	7.96	7.41
16	7.27	6.86
17	6.8	5.625
18	8.07	7.52
19	7.73	6.93
20	7.3	6.71
21	6.95	6.49
22	7.46	6.45
23	7.21	6.49
24	7.21	7.2
25	7.83	7.055
26	7.805	6.295
27	6.02	5.38
30a	7.38	6.33
31a	7.15	7.06
32a	7.2	6.76
33	7.24	6.75
34	6.66	6.27
35	6.86	6.14
36	7.66	7.44
37	7.6	7.15
38	7.72	6.94
39	6.74	6.41
40	6.95	6.73
41	7.1	6.29

[0413]

Co. No.	자동화 분석 BACE1 pIC ₅₀	자동화 분석 BACE2 pIC ₅₀
42	7.13	6.86
43	7.68	7.01
44	7.38	7.1
45	8.07	7.53
46	7.44	6.39
47	7.59	6.68
48	7.915	7.14
49	7.46	6.75
50	6.94	6.51

[0414]