



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월21일
(11) 등록번호 10-2755657
(24) 등록일자 2025년01월13일

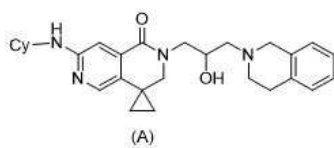
- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) A61K 31/4725 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2022.08)
A61K 31/4725 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7015656</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년10월12일
심사청구일자 2022년05월10일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년05월10일</p> <p>(65) 공개번호 10-2022-0080160</p> <p>(43) 공개일자 2022년06월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/120284</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/068953
국제공개일자 2021년04월15일</p> <p>(30) 우선권주장
201910969743.2 2019년10월12일 중국(CN)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
WO2019173804 A1
(뒷면에 계속)</p> <p>전체 청구항 수 : 총 6 항</p> | <p>(73) 특허권자
난징 산훙 팔마세우티칼 컴퍼니 리미티드
중국, 지양수 프로빈스, 난징, 난징 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨로프먼트 존, (210038) 9 후이쥙 로드</p> <p>(72) 발명자
왕, 용
중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9</p> <p>자오, 리웬
중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 무한</p> |
|--|--|

심사관 : 강신건

(54) 발명의 명칭 PRMT5 억제제로서의 치환 삼환류 화합물 및 그의 응용

(57) 요약

본 발명은 의학 화학의 분야에 속하며, PRMT5 억제제로서의 치환 삼환류 화합물 및 그의 응용에 관한 것이며, 구체적으로, 본 발명은 식 (A)로 표시되는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물, 이들의 제조방법 및 이들의 화합물을 포함하는 약학적 조성물 그리고 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 이들의 화합물 또는 조성물의 용도를 제공한다. 본 발명의 화합물은 PRMT5에 대하여 유의한 억제활성을 나타낸다.



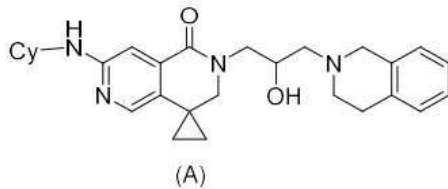
- | | |
|--------------------------------|-----------------|
| (52) CPC특허분류 | (56) 선행기술조사문헌 |
| <i>A61P 35/00</i> (2018.01) | W02019094311 A1 |
| (72) 발명자 | JP2022554154 A |
| 관, 수 | JP2016505001 A |
| 중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크 | JP2016505000 A |
| 놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9 | W02020259478 A1 |
| 정, 귀광 | |
| 중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크 | |
| 놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9 | |
| 선, 웨이 | |
| 중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크 | |
| 놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9 | |
| 양, 퉁팅 | |
| 중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크 | |
| 놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9 | |
| 잔, 캉닝 | |
| 중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크 | |
| 놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9 | |
| 스, 치치 | |
| 중국 지양수 210038 난징 난징 이코노믹 앤드 테크 | |
| 놀로지컬 디벨로프먼트 존 후이쥙 로드 9 | |
-

명세서

청구범위

청구항 1

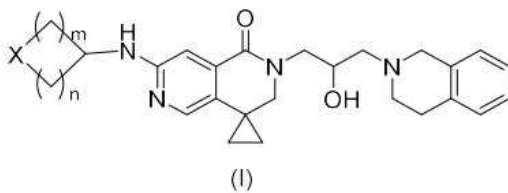
일반식 (A)로 표시되는 화합물 또는 그의 입체 이성질체, 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물.



여기서, Cy는 3~10원 헤테로고리로부터 선택되며, 상기 3~10원 헤테로고리는 하나 또는 복수의 N 또는 O의 헤테로 원자를 포함하며, 상기 3~10원 헤테로고리는 C₁₋₃알킬 아실기로 치환되어도 좋다.

청구항 2

일반식 (I)로 표시되는 화합물 또는 그의 입체 이성질체, 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물.



여기서, X는 O, C(R¹)(R²) 및 N(R³)으로부터 선택되며, R¹, R², R³은 각각 독립적으로 수소 및 C₁₋₆알킬 아실기로부터 선택되거나, R¹ 및 R²는 이들에 결합된 탄소 원자와 함께 3원~8원 헤테로고리를 형성하며, 상기 3원~8원 헤테로고리는 하나 또는 복수의 N 또는 O의 헤테로 원자를 포함하며, 상기 3원~8원 헤테로고리는 임의로 C₁₋₆알킬 아실기로 치환되어도 좋으며,

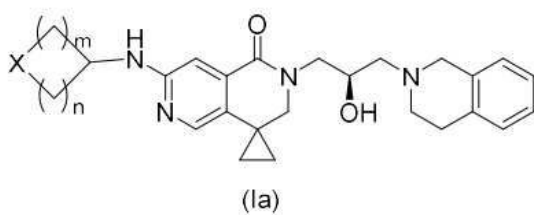
m은 1, 2, 3 또는 4이며,

n은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

청구항 3

제2항에 있어서,

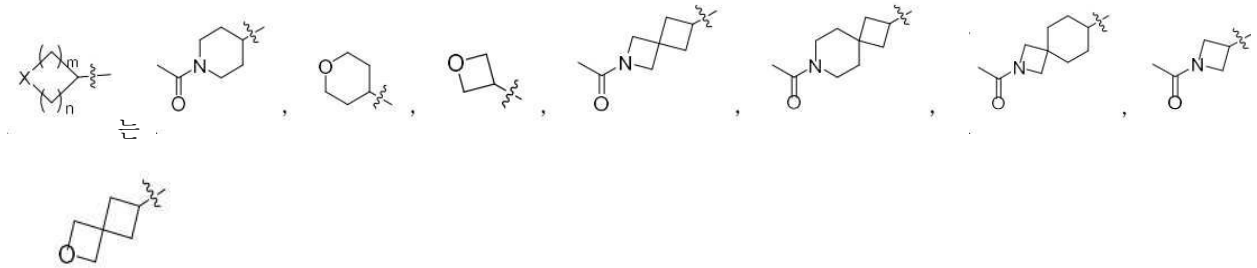
일반식 (I)는 하기 일반식 (Ia)의 구조를 갖는 화합물 또는 그의 입체 이성질체, 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물.

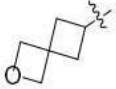


여기서, X, m 및 n은 제2항에 기재된 정의를 갖는다.

청구항 4

제2항에 있어서,

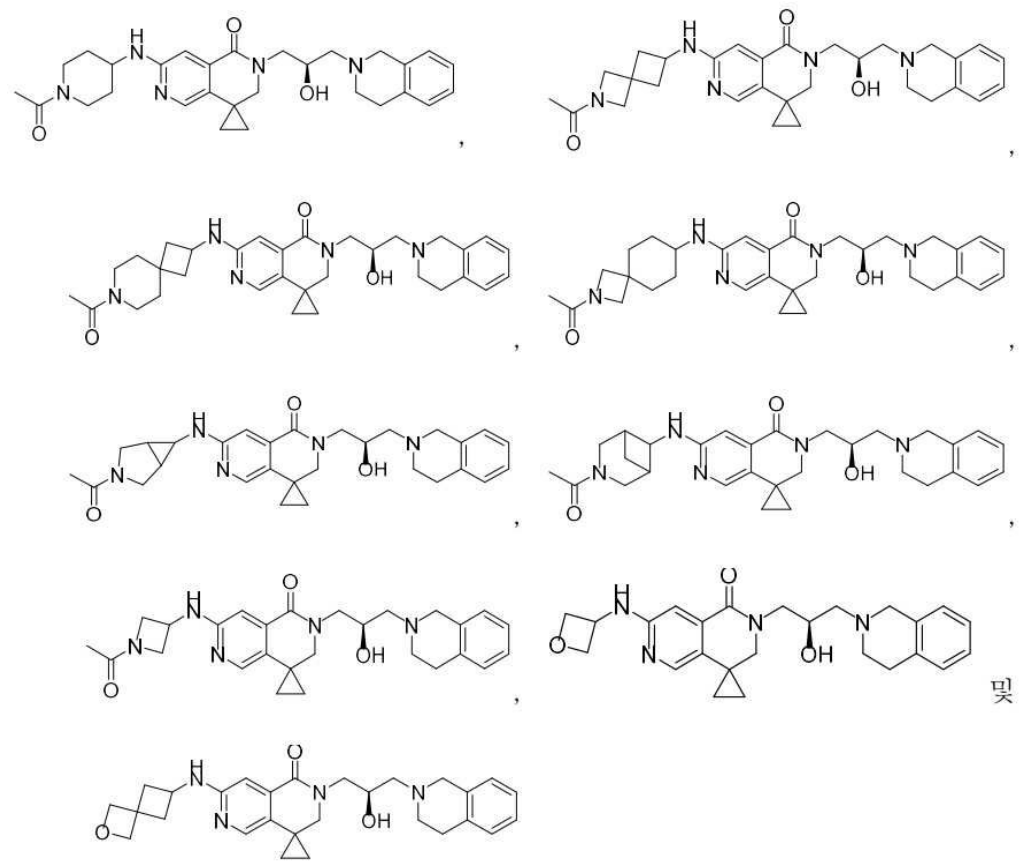


및 로부터 선택되는 화합물 또는 그의 입체 이성질체, 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화합물로부터 선택되는 화합물 또는 그의 입체 이성질체, 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물.



청구항 6

제1항 내지 제5항의 어느 한 항에 기재된 화합물 또는 그의 입체 이성질체, 약학적으로 허용되는 염 또는 용매

화물 및 약학적으로 이용 가능한 담체를 포함하는 암을 치료하기 위한 약물 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 의약 화학의 분야에 속하며, 구체적으로 PRMT5 억제제로서의 치환 삼환류 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물, 이들의 제조방법 및 이들의 화합물을 포함하는 약학적 조성물 그리고 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 이들의 화합물 또는 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] DNA의 수식은 세포 성장 및 발육의 여러 단계에서 유전자의 발현을 트러거하는 프로그램에서 중심적인 역할을 하는데, 아르기닌 메틸화는 신호 전달, 전사, RNA 가공, DNA 재편성 및 복원을 포함하는 세포 과정에서 중요한 역할을 한다. 단백질 아르기닌 메틸전이효소 (PRMTs)는 메틸기를 S-아데노실메티오닌 (SAM)에서 아르기닌의 구아니딘 질소로 전이함으로써 특정한 아르기닌 잔기의 메틸화를 촉매하며, 아르기닌 메틸화를 촉매하는 방식에 따라 PRMTs에 대하여 모노메틸화 및 비대칭 디메틸화를 촉매하는 I형 (PRMT 1, 2, 3, 4, 6 및 8), 모노메틸화 및 대칭 디메틸화를 촉매하는 II형 (PRMT5 및 PRMT9) 및 모노메틸화만을 진행하는 III형 (PRMT7)의 3종류로 분류할 수 있다.

[0003] 여기서, PRMT5는 메틸전이효소 복합체 단백질 50 (MEP50)에 특이적으로 결합하여, 히스톤 H3 및 H4를 대칭적으로 메틸화하며, 특정한 표적 게놈의 전사를 조절할 수 있다. PRMT5에 촉매된 히스톤 H3 아르기닌 8 (R8) 및 H4R3 대칭 디메틸화는 예를 들어 암 억제 유전자 7 (ST7), 망막아세포종 (RB) 종양 억제 유전자 패밀리 및 수용체 0형 단백질 티로신 인산 효소 (PTPROt)와 같은 몇가지 종양억제 유전자의 발현을 억제하는 것을 나타냈다.

[0004] PRMT5는 히스톤을 메틸화하는 능력 외에, 세포 조정의 과정에서 중요한 역할을 하도록 몇가지 중요한 전사 인자를 메틸화할 수도 있다. PRMT5는 p53을 메틸화하여 그의 DNA 결합 활성을 변화시킴으로써, p53이 제어하는 유전자 발현 프로그램의 변화를 일으킬 수 있다. PRMT5는 N-MYC를 메틸화하여 그의 단백질 안정성을 변화시키며 신경아세포종에서의 발암 활성을 높이는 것도 나타났다. PRMT5는 E2F-1 및 NF-kB/p65을 포함하는 전사 인자를 직접적으로 메틸화하여, 그의 표적 유전자의 발현을 유도할 수도 있다. PRMT5는 핵 전사 인자를 수식할 수 있을 뿐만아니라, golgin, 리보솜 단백질 S10 (RPS10)와 같은 세포질 단백질을 메틸화할 수도 있다. 따라서, PRMT5는 그 자체의 표적 유전자를 직접적으로 조정하는 능력 외에, 주요한 전사 인자의 대칭 메틸화에 의해 글로벌한 유전자 발현에 간접적으로 영향을 주어, 세포의 성장, 증식 및 분화에 영향을 줄 수도 있다.

[0005] 대량의 연구에 의해 PRMT5는 B 세포 및 T 세포 림프종, 전이성 흑색종, 신경아세포종 및 교모세포종, 배아세포종, 난소암, 비인두암, 유선암, 결장 직장암 및 위암을 포함하는 여러 종류 및 침습성의 암에서 과다 발현하고 있는 것이 확인되었다. 현재의 연구에서는 PRMT5는 세포 성장 및 증식의 제어에서 중요한 역할을 하며 그의 과다 발현이 세포 형질 전환을 촉진하는 것이 나타났다.

[0006] 암세포에서 강화된 PRMT5의 발현은 그의 표적 종양 억제 유전자의 전사 사이렌싱에 관련된다. PRMT5는 프로모터

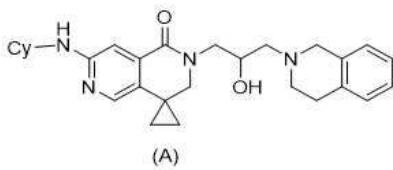
히스톤 H3R8 및 H4R3의 메틸화에 의해, 그리고 E2F1 및 NF-kB/p65을 포함하는 주요한 전사 인자의 특정한 아르기닌 잔기를 수식하여 글로버한 크로마틴 변화를 일으킴으로써 암세포의 성장을 촉진할 수 있다. PRMT5는 R110에서 메틸화되며 MCF-7 세포에서 그의 종양 억제 활성을 상실하도록 프로그램성 세포사 4 (PDCD4)와 상호 작용을 할 수도 있다. 전체적으로 말하면, PRMT5의 과다 발현은 성장 촉진 단백질 및 종양 억제 단백질과 상호 작용함으로써 암세포 성장, 존활 및 전이에 기여할 수 있다.

[0007] 상기와 같이, PRMT5 억제제는 종양 등의 관련 질병의 치료에서 명확한 메커니즘을 가지고 있으며, 종양 치료의 분야에서 신규의 치료 수단이 될 가능성이 높으므로 임상 요구를 충족할 수 있도록 보다 안전하고 보다 효과적인 PRMT5 억제제를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 목적은 일반식 (A)로 표시되는, PRMT5 억제 활성을 갖는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 제공하는 것이다.



[0009] .

[0010] 여기서,

[0011] Cy는 헤테로고리로부터 선택되며, 상기 헤테로고리는 할로젠, 히드록시기, 알킬기, 할로젠화 알킬기, 히드록시 알킬기, 알콕시기, 할로젠화 알콕시기, 히드록시 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노알킬 아미노기, 알킬 아실 아미노기, 알킬 아실기, 알킬 설포닐기, 아미노 아실기, 알킬 아미노 아실기, 비스알킬 아미노기, 알케닐기, 알킬닐기, 할로젠화 알킬 아실기, 히드록시 알킬 아실기, 시클로알킬 아실기, 헤테로고리 아실기, 시클로알킬기, 헤테로고리, 아릴기, 헤테로아릴기 및 옥소기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환되어도 좋다.

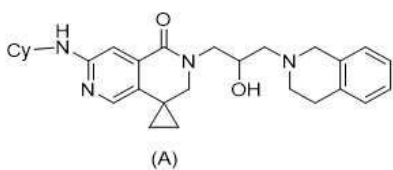
[0012] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물 및 약학적으로 이용 가능한 담체를 포함하는 조성물, 그리고 본 발명의 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물 및 기타 일종 또는 복수종의 약물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 더 다른 목적은 본 발명의 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 이용하여 PRMT5 매개성 질병을 치료하는 방법, 그리고 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 약물의 제조에 있어서의 본 발명의 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물의 응용을 제공하는 것이다.

[0015] 상기 발명의 목적에 대하여, 본 발명은 하기의 기술안을 제공한다.

[0016] 제1형태에 있어서, 본 발명은 일반식 (A)로 표시되는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 제공한다.



[0017] .

[0018] 여기서,

[0019] Cy는 헤테로고리로부터 선택되며, 상기 헤테로고리는 할로젠, 히드록시기, 알킬기, 할로젠화 알킬기, 히드록시 알킬기, 알콕시기, 할로젠화 알콕시기, 히드록시 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노알킬 아미노기, 알킬 아실 아미노기, 알킬 아실기, 알킬 설포닐기, 아미노 아실기, 알킬 아미노 아실기, 비스알킬 아미노기, 알케닐기, 알키닐기, 할로젠화 알킬 아실기, 히드록시 알킬 아실기, 시클로알킬 아실기, 헤테로고리 아실기, 시클로알킬기, 헤테로고리, 아릴기, 헤테로아릴기 및 옥소기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환되어도 좋다.

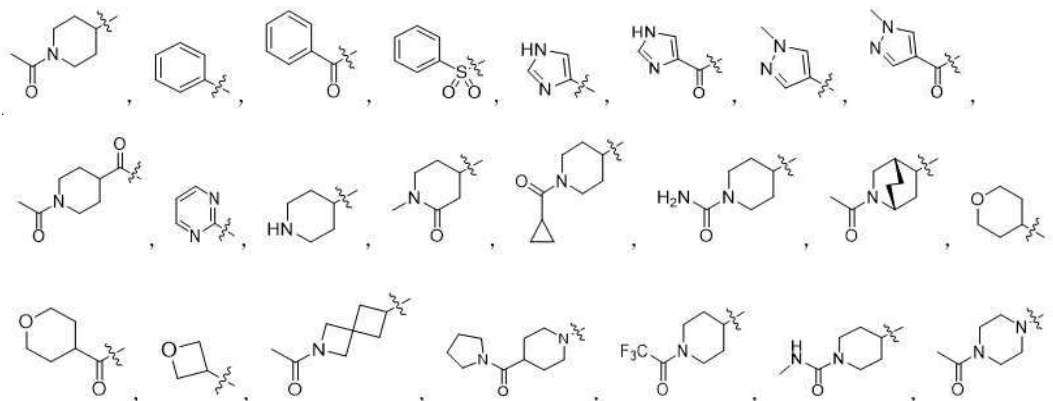
[0020] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 화합물은 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물이며, 여기서,

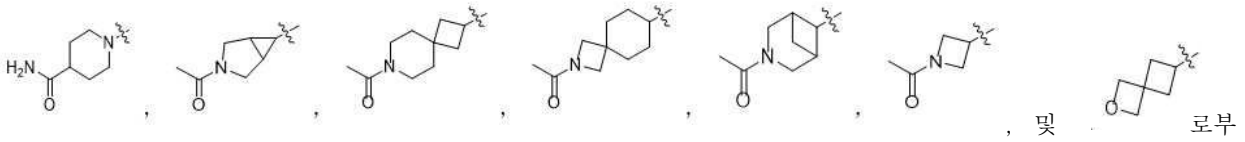
[0021] Cy는 3~12원 헤테로고리로부터 선택되며, 상기 3~12원 헤테로고리는 할로젠, 히드록시기, C₁₋₆알킬기, 할로젠화 C₁₋₆알킬기, 히드록시 C₁₋₆알킬기, C₁₋₆알콕시기, 할로젠화 C₁₋₆알콕시기, 히드록시 C₁₋₆알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노C₁₋₆알킬 아미노기, C₁₋₆알킬 아실 아미노기, C₁₋₆알킬 아실기, C₁₋₆알킬 설포닐기, 아미노 아실기, C₁₋₆알킬 아미노 아실기, 비스C₁₋₆알킬 아미노기, C₂₋₁₀알케닐기, C₂₋₁₀알키닐기, 할로젠화 C₁₋₆알킬 아실기, 히드록시 C₁₋₆알킬 아실기, C₃₋₁₂시클로알킬 아실기, 3~12원 헤테로고리 아실기, C₃₋₁₂시클로알킬기, 3~12원 헤테로고리, 6~12원 아릴기, 5~12원 헤테로아릴기 및 옥소기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환되어도 좋다.

[0022] 더 바람직하게는, Cy는 3~10원 헤테로고리로부터 선택되며, 상기 3~10원 헤테로고리는 할로젠, 히드록시기, C₁₋₃알킬기, 할로젠화 C₁₋₃알킬기, 히드록시 C₁₋₃알킬기, C₁₋₃알콕시기, 할로젠화 C₁₋₃알콕시기, 히드록시 C₁₋₃알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노C₁₋₃알킬 아미노기, C₁₋₃알킬 아실 아미노기, C₁₋₃알킬 아실기, C₁₋₃알킬 설포닐기, 아미노 아실기, C₁₋₃알킬 아미노 아실기, 비스C₁₋₃알킬 아미노기, C₂₋₆알케닐기, C₂₋₆알키닐기, 할로젠화 C₁₋₃알킬 아실기, 히드록시 C₁₋₃알킬 아실기, C₃₋₈시클로알킬 아실기, 3~8원 헤테로고리 아실기, C₃₋₈시클로알킬기, 3~8원 헤테로고리, 6~8원 아릴기, 5~8원 헤테로아릴기 및 옥소기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환되어도 좋다.

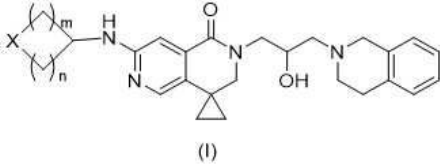
[0023] 보다 더 바람직하게는, Cy는 3~10원 헤테로고리로부터 선택되며, 상기 헤테로고리는 하나 또는 복수의 N, O 또는 S의 헤테로 원자를 더 포함하며, 또한 상기 3~10원 헤테로고리는 할로젠, 히드록시기, C₁₋₃알킬기, 할로젠화 C₁₋₃알킬기, 히드록시 C₁₋₃알킬기, C₁₋₃알콕시기, 할로젠화 C₁₋₃알콕시기, 히드록시 C₁₋₃알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노C₁₋₃알킬 아미노기, C₁₋₃알킬 아실 아미노기, C₁₋₃알킬 아실기, C₁₋₃알킬 설포닐기, 아미노 아실기, C₁₋₃알킬 아미노 아실기, 비스C₁₋₃알킬 아미노기, C₂₋₆알케닐기, C₂₋₆알키닐기, 할로젠화 C₁₋₃알킬 아실기, 히드록시 C₁₋₃알킬 아실기, C₃₋₈시클로알킬 아실기, 3~8원 헤테로고리 아실기, C₃₋₈시클로알킬기, 3~8원 헤테로고리, 6~8원 아릴기, 5~8원 헤테로아릴기 및 옥소기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환되어도 좋다.

[0024] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 일반식 (A)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물에 의하면, Cy는





[0025] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 일반식 (A)는 하기의 일반식 (I)의 구조를 갖는 일반식 (A)로 표시되는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 제공한다.



[0026] 여기서,

[0028] X는 O, S, C(R¹)(R²) 및 N(R³)으로부터 선택되며, R¹, R², R³은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시기, 알킬기, 할로젠화 알킬기, 히드록시 알킬기, 알콕시기, 할로젠화 알콕시기, 히드록시 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노알킬 아미노기, 알킬 아실 아미노기, 알킬 아실기, 아미노 아실기, 알킬 아미노 아실기, 비스알킬 아미노기 및 시클로알킬기로부터 선택되며, 또한 R¹ 및 R²는 이들에 결합된 탄소 원자와 함께 헤테로고리를 형성하며, 상기 헤테로고리는 임의로 할로젠, 히드록시기, 알킬기, 할로젠화 알킬기, 히드록시 알킬기, 알콕시기, 할로젠화 알콕시기, 히드록시 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노알킬 아미노기, 알킬 아실 아미노기, 알킬 아실기, 아미노 아실기, 알킬 아미노 아실기, 비스알킬 아미노기 및 시클로알킬기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환되며,

[0029] m은 1, 2, 3 또는 4이며,
 [0030] n은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

[0031] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 화합물은 일반식 (I)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물이며, 여기서,

[0032] R¹, R², R³은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시기, C₁₋₆알킬기, 할로젠화 C₁₋₆알킬기, 히드록시 C₁₋₆알킬기, C₁₋₆알콕시기, 할로젠화 C₁₋₆알콕시기, 히드록시 C₁₋₆알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노 C₁₋₆알킬 아미노기, C₁₋₆알킬 아실 아미노기, C₁₋₆알킬 아실기, 아미노 아실기, C₁₋₆알킬 아미노 아실기, 비스C₁₋₆알킬 아미노기 및 C₃₋₁₂시클로알킬기로부터 선택된다.

[0033] 더 바람직하게는, R¹, R², R³은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시기, C₁₋₃알킬기, 할로젠화 C₁₋₃알킬기, 히드록시 C₁₋₃알킬기, C₁₋₃알콕시기, 할로젠화 C₁₋₃알콕시기, 히드록시 C₁₋₃알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노C₁₋₃알킬 아미노기, C₁₋₃알킬 아실 아미노기, C₁₋₃알킬 아실기, 아미노 아실기, C₁₋₃알킬 아미노 아실기, 비스C₁₋₃알킬 아미노기 및 C₃₋₈시클로알킬기로부터 선택된다.

[0034] 보다 더 바람직하게는, R¹, R², R³은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 할로젠화 C₁₋₃알킬기, 히드록시 C₁₋₃알킬기, C₁₋₃알콕시기, 할로젠화 C₁₋₃알콕시기, 히드록시 C₁₋₃알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노C₁₋₃알킬 아미노기, C₁₋₃알킬 아실 아미노기, C₁₋₃알킬 아실기, 아미노 아실기, C₁₋₃알킬 아미노 아실기, 비스C₁₋₃알킬 아미노기 및 C₃₋₈시클로알킬기로부터 선택된다.

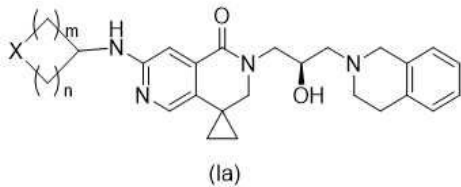
[0035] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 화합물은 일반식 (I)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물이며, 여기서,

[0036] R^1 및 R^2 는 이들에 결합된 탄소 원자와 함께 3원~8원 헤테로고리를 형성하며, 상기 헤테로고리는 하나 또는 복수의 N, O 또는 S의 헤테로 원자를 더 포함하며, 또한 상기 헤테로고리는 임의로 할로젠, 히드록시기, 알킬기, 할로젠화 알킬기, 히드록시 알킬기, 알콕시기, 할로젠화 알콕시기, 히드록시 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노알킬 아미노기, 알킬 아실 아미노기, 알킬 아실기, 아미노 아실기, 알킬 아미노 아실기, 비스알킬 아미노기 및 시클로알킬로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환된다.

[0037] 더 바람직하게는, R^1 및 R^2 는 이들에 결합된 탄소 원자와 함께 3원~6원 헤테로고리를 형성하며, 상기 헤테로고리는 하나 또는 복수의 N, O 또는 S의 헤테로 원자를 더 포함하며, 또한 상기 헤테로고리는 임의로 할로젠, 히드록시기, C_{1-6} 알킬기, 할로젠화 C_{1-6} 알킬기, 히드록시 C_{1-6} 알킬기, C_{1-6} 알콕시기, 할로젠화 C_{1-6} 알콕시기, 히드록시 C_{1-6} 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노 C_{1-6} 알킬 아미노기, C_{1-6} 알킬 아실 아미노기, C_{1-6} 알킬 아실기, 아미노 아실기, C_{1-6} 알킬 아미노 아실기, 비스 C_{1-6} 알킬 아미노기 및 C_{3-12} 시클로알킬기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환된다.

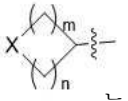
[0038] 보다 더 바람직하게는, R^1 및 R^2 는 이들에 결합된 탄소 원자와 함께 아지리디닐기, 아제티디닐기, 테트라히드로피롤릴기, 피페리디닐기, 디히드로피롤릴기, 테트라히드로피리디닐기, 피라졸리디닐기, 디히드로피라졸릴기, 이미다졸리디닐기, 디히드로이미다졸릴기, 피라졸릴기, 디히드로피라졸릴기, 옥사졸리디닐기, 디히드로옥사졸릴기, 티아졸리디닐기, 디히드로티아졸릴기, 이소옥사졸리디닐기, 디히드로이소옥사졸릴기, 이소티아졸리디닐기, 디히드로이소티아졸릴기, 헥사히드로피리미디닐기, 테트라히드로피리미디닐기, 디히드로피리미디닐기, 헥사히드로피리다지닐기, 테트라히드로피리다지닐기, 디히드로피리다지닐기, 피페라지닐기, 테트라히드로피라지닐기, 디히드로피라지닐기, 모르폴리닐기, 티오모르폴리닐기 또는 타우롤탐기를 형성하며, 상기 그룹은 임의로 할로젠, 히드록시기, C_{1-3} 알킬기, 할로젠화 C_{1-3} 알킬기, 히드록시 C_{1-3} 알킬기, C_{1-3} 알콕시기, 할로젠화 C_{1-3} 알콕시기, 히드록시 C_{1-3} 알콕시기, 니트로기, 카르복실기, 시아노기, 아미노기, 모노 C_{1-3} 알킬 아미노기, C_{1-3} 알킬 아실 아미노기, C_{1-3} 알킬 아실기, 아미노 아실기, C_{1-3} 알킬 아미노 아실기, 비스 C_{1-3} 알킬 아미노기 및 C_{3-12} 시클로알킬기로부터 선택되는 하나 또는 복수의 그룹으로 치환된다.

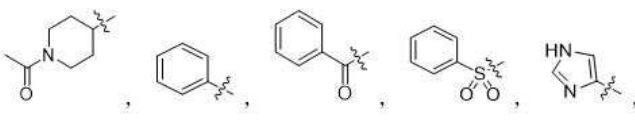
[0039] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 일반식 (Ia)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 제공한다.



[0040] 여기서, X, m 및 n은 상기 일반식 (I)에 기재된 정의를 갖는다.

[0041] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 일반식 (I) 또는 일반식 (Ia)의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학

[0042] 적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물에 따르면,  는



- [0047] 여기서, Cy는 일반식 (A)에 기재된 정의를 가지며, 식 (1)의 화합물 및 식 (2)의 화합물은 시판되는 화합물이거나, 본 기술분야의 통상의 기술자가 통상적인 기타 기술수단에 의해 합성해도 된다.
- [0048] 제3형태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0049] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명은 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한, 본 발명의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물 및 본 발명의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물 및 약학적으로 이용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물은 약학적으로 이용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 혼합하여 경구 또는 비경구 투여에 적합한 약물 제제로 제조될 수 있다. 투여 방법은 피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하, 비내 및 경구 경로를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 제제는 임의의 경로, 예를 들어 주입 또는 압주로 상피 또는 피부 점막 (예를 들어 구강 점막 또는 직장 등)을 통해 흡수하는 경로에 의해 투여될 수 있다. 투여는 전신일 수도 있고, 국소일 수도 있다. 경구 투여 제제의 예는 고체 또는 액체 제형을 포함하며, 구체적으로, 정제, 환제, 과립제, 분말, 캡슐제, 시럽, 유제, 현탁제 등을 포함한다. 상기 제제는 본 기술분야의 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 또한 약물 제제 분야에서 통상적으로 사용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0052] 제4형태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 식 (A), 식 (I) 또는 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물, 또는 이들을 포함하는 약학적 조성물의 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 방법 그리고 PRMT5 매개성 질병을 치료하는 약물의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.
- [0053] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 식 (A), 식 (I) 또는 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물, 또는 이들을 포함하는 약학적 조성물의 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 방법 그리고 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 약물의 제조에 있어서의 용도를 제공하며, 상기 PRMT5 매개성 질병은 증식성 질병, 대사 질병 또는 혈액 질병을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 기재된 PRMT5 매개성 질병은 암이다.
- [0054] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 기재된 PRMT5 매개성 질병은 청각 신경종, 선암, 부신암, 향문암, 혈관육종 (예를 들어, 림프관 육종, 림프관 내피 육종, 혈관 육종), 부속기암, 양성 단클론성 감마병증, 담낭암 (예를 들어, 담관암), 방광암, 유방암 (예를 들어, 유방선암, 유방 유두상암, 유선암, 유방 수질암, 삼중 음성 유선암), 뇌암 (예를 들어, 수막종, 신경교종, 예를 들어 성상세포종, 희소돌기아교종, 수모세포종), 기관지암, 유암종, 자궁경부암 (예를 들어 자궁경부선암), 용모막암, 척색종, 두개인두종, 결장직장암 (예를 들어, 결장암, 직장암, 결장직장선암), 상피암, 뇌실막종, 내피 육종 (예를 들어, 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma), 다발성 특발성 출혈성 육종), 자궁내막암 (예를 들어, 자궁암, 자궁육종), 식도암 (예를 들어, 식도선암, 바렛 선암 (Barrett's adenocarcinoma)), 유잉 육종 (Ewing sarcoma), 안구암 (예를 들어, 안내 흑색종, 망막모세포종), 가족성 호산구 과립구 증가증, 담낭암, 위암 (예를 들어, 위선암), 위장관 기질 종양 (GIST), 두경부암 (예를 들어, 두경부 편평 세포암, 구강암 (예를 들어, 구강 편평 세포암 (OSCC), 인후암 (예를 들어, 후두암, 인두암, 비인두암, 구인두암)), 조혈계암 (예를 들어, 백혈병, 예를 들어 급성 림프구성 백혈병 (ALL) (예를 들어, B-세포 ALL, T-세포 ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML) (예를 들어, B-세포 AML, T-세포 AML), 만성 골수성 백혈병 (CML) (예를 들어, B-세포 CML, T-세포 CML) 그리고 만성 림프구성 백혈병 (CLL) (예를 들어, B-세포 CLL, T-세포 CLL); 림프종 예를 들어 호지킨 림프종 (HL) (예를 들어, B-세포 HL, T-세포 HL) 그리고 비호지킨 림프종 (NHL) (예를 들어, B-세포 NHL 예를 들어 미만성 거대세포 림프종 (DLCL) (예를 들어, 미만성 거대B-세포 림프종 (DLBCL)), 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종 (CLL/SLL), 맨틀 세포 림프종 (MCL), 변연 B 세포 림프종 (예를 들어, 점막 관련 림프 조직 (MALT) 림프종, 결절 변연 B-세포 림프종, 비장 변연 B-세포 림프종), 원발성 중격 B-세포 림프종, 버킷 림프종 (Burkitt lymphoma), 림프구성 림프종 (즉, "발덴스트롬의 거대글로불린혈증 (Waldenström's macroglobulinemia)"), 모세포 백혈병 (HCL), 면역모세포성 대세포 림프종, 전구 B-림프모구 림프종 그리고 일차 중추 신경계 림프종 (CNS) 림프종; 그리고 T-세포 NHL 예를 들어 전구 T-림프모구 림프종/백혈병, 말초 T-세포 림프종 (PTCL) (예를 들어, 피부 T-세포 림프종 (CTCL) (예를 들어, 과립 유육종 (mycosis fungoides), 세자리 증후군 (Sezary syndrome)), 혈관성 면역모세포성 T-세포 림프종, 결절외 자연 살해 T-세포 림프종, 장병증형 T-세포 림프종, 피하 지방염 유사 T-세포 림프종, 역형성 대세포 림프종);

상기와 같이 설명된 일종의 또는 복수종의 백혈병/림프종의 혼합물; 그리고 다발성 골수종 (MM), 중쇄 질환 (예를 들어, α 체 질환, γ 체 질환, μ 체 질환), 혈관모세포종, 염증성 근섬유모세포종, 면역 세포 아밀로이드 증, 신장암 (예를 들어, 신모세포종 또는 윌스 종양 (Wilms'tumor), 신세포암), 간암 (예를 들어, 간세포암 (HCC), 악성 간세포종), 폐암 (예를 들어, 기관지암, 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐선암), 평활근육종 (LMS), 비만세포종 (예를 들어, 전신성 비만세포종), 골수이형성 증후군 (MDS), 중피종, 골수증식성 질환 (MPD) (예를 들어, 진성 적혈구 증가증 (PV), 특발성 혈소판 증가증 (ET), 특발성 골수의 화생 (AMM) 또는 골수 섬유증 (MF), 만성 특발성 골수섬유증 변성, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 호중구 백혈병 (CNL), 호산구성 백혈구 감소증 (HES)), 신경모세포종, 신경섬유종 (예를 들어, 1형 또는 2형 다발성 신경 섬유종 (NF), 신경초종증 (schwannomatosis)), 신경내분비암 (예를 들어, 위장 축장 신경내분비종양 (GEP-NET), 카르시노이드 종양), 골육종, 난소암 (예를 들어, 낭선암, 난소배아암, 난소 선암, 난소 투명 세포암, 난소 장액성 낭선암), 유두선암, 췌장암 (예를 들어, 췌장선암, 관내 유두 점액종 (IPMN), 섬세포 종양), 음경암 (예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병 (Paget's disease)), 송과종, 원발성 신경외배엽 종양 (PNT), 전립선암 (예를 들어, 전립선 선암), 직장암, 횡문근육종, 타액관암, 피부암 (예를 들어, 편평 세포암 (SCC), 각막극세포종 (KA), 흑색종, 기저 세포암 (BCC)), 소장암 (예를 들어, 부속기암), 연조직 육종 (예를 들어, 악성 섬유성 조직구종 (MFH), 지방육종, 악성 말초 신경초 종양 (MPNST), 연골육종, 섬유육종, 점액육종), 피지선암, 땀샘암, 활액종, 고환암 (예를 들어, 정자 세포 종양, 고환 배아암), 갑상선암 (예를 들어, 갑상선 유두암, 유두상 갑상선암 (PTC), 유두 갑상선암), 요도암, 질암 그리고 외음부암 (예를 들어, 외음부의 파제트병), 수모세포종, 선양낭성암, 흑색종, 교모 세포종을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0055] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 기재된 PRMT5 매개성 질병은 당뇨병 또는 비만증과 같은 대사성 병증을 포함한다.

[0056] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 기재된 PRMT5 매개성 질병은 겸상 적혈구 질병 또는 β-지중해 빈혈과 같은 헤모글로빈증을 포함한다.

[0057] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 기재된 PRMT5 매개성 질병은 염증성 및 자가면역성 질병을 포함한다.

[0058] 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 일반식 I로 표시되는 화합물 또는 그의 이성질체, 약학적으로 허용되는 염, 용매화물, 결정 또는 전구약물, 또는 이들을 포함하는 약학적 조성물이 PRMT5 매개성 질병을 치료하기 위한 방법 그리고 PRMT5 매개성 질병을 치료하는 약물의 제조에 있어서의 용도를 제공하며, 상기의 PRMT5 매개성 질병은 유방암, 식도암, 방광암, 폐암, 조혈계암, 림프종, 수모세포종, 신경수모세포종, 직장선암, 결장암, 위암, 췌선암, 간암, 선형 낭포암, 전립선암, 폐암, 두경부 편평 세포암, 뇌암, 간세포암, 흑색종, 핏돌기교종, 콜로이드 모세포암, 고환암, 난소 투명 세포암, 난소장액성 낭선암, 갑상선암, 다발성 골수종 (AML), 신세포암, 맨틀 세포 림프종, 삼중 음성 유방암, 비소세포 폐암, 헤모글로빈증, 당뇨병 및 비만증을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0059] 용어의 정의

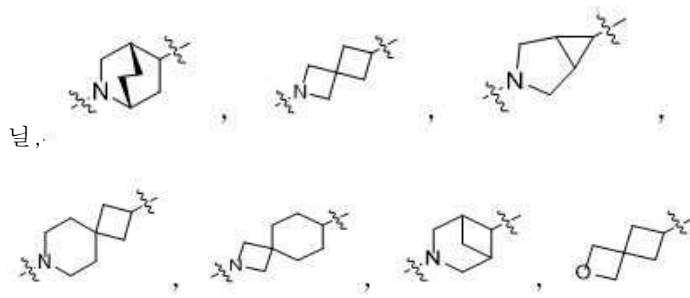
[0060] 반대의 설명이 없는 한, 명세서 및 특허청구범위에서 사용되는 용어는 하기의 의미를 갖는다.

[0061] 본 발명의 화합물 중의 "수소", "탄소", "산소"는 그들의 모든 동위원소를 포함한다. 동위원소는 같은 원자수를 갖지만 다른 질량수를 갖는 원자를 포함한다고 이해해야 한다. 예를 들어, 수소의 동위원소는 프로튬, 삼중수소 및 중수소를 포함하며, 탄소의 동위원소는 ¹²C, ¹³C 및 ¹⁴C를 포함하며, 산소의 동위원소는 ¹⁶O 및 ¹⁸O 등을 포함한다.

[0062] 본 발명의 "이성질체"는 원자 조성 및 연결 방식이 같지만, 3차원 공간 배열이 상이한 분자를 가리키며, 부분입체 이성질체, 거울상 이성질체, 시스-트랜스 이성질체, 및 그들의 혼합물, 예를 들어 라셀 혼합물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 많은 유기 화합물은 모두 광학 활성 형태로 존재하며, 즉 그들은 평면 편광의 평면을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학 활성 화합물을 설명할 경우, 접두사 D, L 또는 R, S는 분자의 키랄 중심의 절대 위치 배열을 표시하는 데 사용된다. 접두사 D, L 또는 (+), (-)는 화합물의 평면 편광 회전을 명명하기 위한 부호이며, (-) 또는 L은 화합물이 좌회전성인 것을 가리키며, 접두사 (+) 또는 D는 화합물이 우회전성인 것을 가리킨다. 이들의 입체 이성질체의 화학 구조는 같으나, 이들의 입체 구조는 상이하다. 특정한 입체 이성질체는 거울상 이성질체일 수 있으며, 이성질체의 혼합물은 통상적으로 거울상 이성질체 혼합물이라고 지칭한다. 50:50의 거울상 이성질체 혼합물은 화학 반응 과정에서 입체 선택성 또는 입체 방향성을 갖지 않을 수 있는 라셀 혼합물 또는 라셀체라고 지칭된다. 용어 "라셀 혼합물" 및 "라셀체"는 동등 물의 2개의 거울상 이성질체의 혼합물

을 가리키며, 광학 활성이 결핍하다.

- [0063] 출발물질 및 방법의 선택에 따라, 본 발명의 화합물은 대칭 탄소 원자의 수량에 따라 예를 들어 라셈체 및 부분 입체 이성질체 혼합물과 같은 가능한 이성질체 중의 하나 또는 그들의 혼합물의 형태로 존재할 수 있다. 광학 활성의 (R)- 또는 (S)- 이성질체는 키랄성 신포논 또는 키랄성 시약을 사용하여 제조하거나, 통상적인 기술을 사용하여 분리할 수 있다.
- [0064] 획득한 임의의 입체 이성질체의 혼합물은 성분의 물리 화학적 성질의 차이에 따라 예를 들어, 크로마토그래피 및/또는 분별 결정법에 의해 순수하거나 기본적으로 순수한 기하 이성질체, 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체로 분리할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬, 요오드를 가리킨다. 본 발명의 "할로젠화"는 불소, 염소, 브롬 또는 요오드로 치환되는 것을 가리킨다.
- [0066] 본 발명의 "알킬기"는 직쇄 또는 분기쇄의 포화 지방 탄화수소 그룹을 가리키며, 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자의 직쇄 또는 분기쇄의 그룹을 포함하며, 더 바람직하게는 1 내지 3개의 탄소 원자의 직쇄 또는 분기쇄 그룹을 포함하며, 비제한적 예로 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, sec-부틸기, n-펜틸기, 1,1-디메틸 프로필기, 1,2-디메틸 프로필기, 2,2-디메틸 프로필기, 1-에틸 프로필기, 2-메틸 부틸기, 3-메틸 부틸기, n-헥실기 등을 포함한다. 알킬기는 치환된 것이거나 비치환된 것일 수 있으며, 치환될 경우, 치환기는 임의의 이용가능한 연결점에 있을 수 있다.
- [0067] 본 발명의 "카보닐기", "아실기"는 모두 -C(O)-를 가리킨다.
- [0068] 본 발명의 "설폰닐기"는 -S(O)₂-를 가리킨다.
- [0069] 본 발명의 "설폰아미드기"는 -S(O)₂NH-를 가리킨다.
- [0070] 본 발명의 "할로젠화 알킬기"는 적어도 하나의 할로젠으로 치환된 알킬기를 가리킨다.
- [0071] 본 발명의 "히드록시 알킬기"는 적어도 하나의 히드록시기로 치환된 알킬기를 가리킨다.
- [0072] 본 발명의 "알콕시기"는 -O- 알킬기를 가리킨다. 알콕시기의 비제한적 예는 메톡시기, 에톡시기, 프로폭시기, n-프로폭시기, 이소프로폭시기, 이소부톡시기, sec-부톡시기 등을 포함한다. 알콕시기는 임의로 치환된 또는 비치환된 알콕시기일 수 있으며, 치환될 경우, 치환기는 임의의 이용가능한 연결점에 있을 수 있다.
- [0073] 본 발명의 "시클로알킬기"는 환상의 포화 탄화수소기를 가리킨다. 적합한 시클로알킬기는 치환 또는 비치환된 3-12개의 탄소 원자를 갖는 단환, 이환 또는 삼환 포화 탄화수소기, 예를 들어 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기일 수 있다.
- [0074] 본 발명의 "헤테로고리"는 1 내지 4개의 시클로 헤테로 원자 (여기서 각 헤테로 원자는 독립적으로 질소, 산소, 황, 붕소, 인 및 규소로부터 선택됨)를 갖는 3-원 내지 12-원 비방향족환계의 그룹 ("3-12원의 헤테로고리")를 가리킨다. 하나 또는 복수의 질소 원자를 포함하는 헤테로고리 그룹에서, 연결점은 원자가가 허용하는 한 탄소 또는 질소 원자일 수 있다. 헤테로고리 그룹은 단환 ("단환 헤테로고리") 또는 융합, 가교, 스피로의 시클로계 (예를 들어 비시클로계 (또는 "비시클로 헤테로고리"))일 수 있으며, 포화되거나 부분적 포화될 수 있다. 적합한 헤테로고리는 피페리딘기, 아제티딘기, 아지리딘기, 테트라히드로피롤기, 피페라지닌기, 디히드로퀴나 줄리닌기, 옥사라닌기, 옥세타닌기, 테트라히드로푸라닌기, 테트라히드로피라



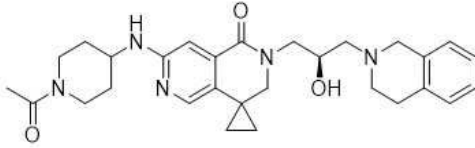
등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 헤테로고리의 각 예는 임의로 치환된 것이거나 비치환된 것일 수 있으며, 치환될 경우, 치환기는 임의의 이용가능한 연결점에 있을 수 있다.

- [0075] 본 발명의 "아릴기"는 6개 내지 12개의 탄소 원자, 바람직하게는 약 6 내지 약 10개의 탄소 원자를 포함하는 단환 또는 축합 다환의 방향족계를 포함하며, 바람직하게는 단환 또는 축합 이환의 방향족계를 포함한다. 적합한 아릴기는 페닐기, 나프틸기, 안트라세닐기, 플루오레닐기, 인다닐기를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 아릴기는 임의로 치환된 것이거나 비치환된 것일 수 있으며, 치환될 경우, 치환기는 임의의 이용가능한 연결점에 있을 수 있다.
- [0076] 본 발명의 "헤테로아릴기"는 적어도 하나의 탄소 원자가 헤테로 원자로 대체된 아릴기를 가리키며, 바람직하게는 5-12개의 원자로 구성되며 (5-12원 헤테로아릴기), 더 바람직하게는 5-10개의 원자로 구성되며 (5-10원 헤테로아릴기), 상기 헤테로 원자는 O, S, N이다. 상기 헤테로아릴기는 이미다졸릴기, 피롤릴기, 푸릴기, 티에닐기, 피라졸릴기, 옥사졸릴기, 티아졸릴기, 이소옥사졸릴기, 이소티아졸릴기, 옥사디아졸릴기, 트리아졸릴기, 테트라졸릴기, 인돌릴기, 피리디닐기, 피리미디닐기, 피리다지닐기, 피라지닐기, 트리아지닐기, 이소인돌릴기, 벤조피라졸기, 벤즈이미다졸릴기, 벤조푸라닐기, 벤조피라닐기, 벤조티에닐기, 벤조옥사졸릴기, 벤조티아졸릴기, 벤조이소옥사졸릴기, 벤조이소티아졸릴기, 퀴놀리닐기, 이소퀴놀리닐기, 퀴나졸리닐기, 시놀리닐기, 퀴녹살리닐기, 벤조옥사지닐기, 벤조티아지닐기, 이미다졸리피리디닐기, 피리미도피라졸릴, 피리미디나졸릴 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 헤테로아릴기는 임의로 치환된 것이거나 비치환된 것일 수 있으며, 치환될 경우, 치환기는 임의의 이용가능한 연결점에 있을 수 있다.
- [0077] 본 발명의 "약학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 염을 가리키며, 이러한 염은 포유류 체내에 사용될 경우 안전성 및 유효성이 있으며, 또한 있어야 하는 생물 활성을 가지고 있다.
- [0078] 본 발명의 "용매화물"은 통상적인 의미에서 용질 (예를 들어 활성 화합물, 활성 화합물의 염) 및 용매 (예를 들어 물)을 조합하여 형성한 복합물을 가리킨다. 용매는 본 기술분야의 통상의 기술자에 공지되거나 용이하게 결정되는 용매를 가리킨다. 물의 경우, 용매화물은 통상적으로 수화물, 예를 들어 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물 또는 그의 대체량 등을 가리킨다.
- [0079] 화학식 (A)를 갖는 화합물의 체내 작용은 부분적으로 화학식 (A)를 갖는 화합물을 투여한 후 인체 또는 동물 체내에서 형성한 일종의 또는 복수종의 대사물을 거쳐 발휘할 수 있다. 상기와 같이, 화학식 (A)를 갖는 화합물의 체내 작용은 전구체 화합물 ("전구약물")의 대사를 거쳐 발휘할 수도 있다. 본 발명의 "전구약물"은 생물체 중의 생리학적 조건에서, 효소, 위산 등과 반응에 의해 본 발명의 화합물로 변환되는 화합물, 즉 효소의 산화, 환원, 가수 분해 등에 의해 본 발명의 화합물로 변환되는 화합물 및/또는 위산 등의 가수 분해 반응 등에 의해 본 발명의 화합물로 변환되는 화합물 등을 가리킨다.
- [0080] 본 발명의 "결정"은 규칙적인 내부 구조를 갖지 않는 비정질 고체와 달리 그의 내부 구조가 3차원으로 규칙적으로 구성 원자 (또는 그의 그룹)를 중복하여 형성한 고체를 가리킨다.
- [0081] 본 발명의 "약학적 조성물"은 임의의 일종의 본 발명에 기재된 화합물을 포함하며, 대응하는 이성질체, 전구약물, 용매화물, 약학적으로 허용되는 염 또는 그의 화학적 보호 형태, 및 일종 또는 복수종의 약학적으로 이용가능한 담체 및/또는 기타 일종 또는 복수종의 약물을 포함하는 혼합물을 가리킨다. 약용 조성물의 목적은 생물체에 대한 화합물의 투여를 촉진하는 것이다. 상기 조성물은 통상적으로 일종 또는 복수종의 키나제 매개성 질병을 치료 및/또는 예방하는 약물의 제조에 사용된다.
- [0082] 본 발명의 "약학적으로 이용 가능한 담체"는 유기체에 대하여 현저한 자극성을 일으키지 않으며 투여되는 화합물의 생물 활성 및 성질을 방해하지 않는 담체를 가리키며, 어떠한 통상적인 담체 매질이 본 발명의 화합물과 상용하지 않는 한, 모든 용매, 희석제 또는 기타 부형제, 분산제, 계면활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 방부제, 고체 바인더, 윤활제 등을 포함한다. 약학적으로 허용되는 담체의 일부 예로 당류, 예를 들어 유당, 포도당, 자당; 녹말, 예를 들어 옥수수 녹말 및 감자 녹말; 셀룰로오스 및 그의 유도체, 예를 들어 카복실메틸셀룰로오스 나트륨, 그리고 셀룰로오스 및 아세트산 셀룰로오스; 엿당, 젤라틴 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0083] 본 발명의 "부형제"는 약용 조성물에 첨가되어 화합물의 투여를 더 촉진하는 불활성 물질을 가리킨다. 부형제는 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 각종 당류 및 여러가지 유형의 녹말, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물성 기름, 폴리에틸렌 글리콜을 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 "PRMT5"는 하나 또는 복수의 돌연변이 (예를 들어, 보수적 치환)를 포함하는 야생형 PRMT5 또는 PRMT5의 임의의 돌연변이체 또는 변이체일 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

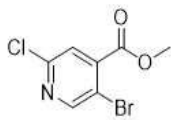
[0085] 이하 실시예를 결부하여 본 발명을 더 상세히 설명하지만, 본 발명은 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다. 하기 실시예에 사용되는 재료는 특별히 설명되지 않는 한, 모두 상업적으로 구입하여 얻은 것이다.

[0086] 실시예 1: (R)-7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-[2,6]나프티리딘]-1'-온



[0087]

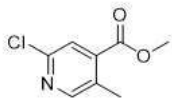
[0088] 단계 1: 5-브로모-2-클로로 이소니코틴산 메틸의 제조



[0089]

[0090] 5-브로모-2-클로로 이소니코틴산 (10g, 42.292mmol)을 메탄올에 용해시키며, 0 °C에서 9.2mL의 설폭사이드 클로라이드 (9.2mL, 126.8mmol)를 첨가하였다. 적하 완료 후, 반응액을 80 °C로 가열하여, 10시간 반응시킨 후, LCMS로 반응 종료를 모니터링하며, 아세트산 에틸 (200mL)을 첨가하며, 포화 탄산 나트륨 수용액으로 PH를 약 8 정도로 조정하였다. 유기상 및 수상을 분리한 후, 수상을 아세트산 에틸로 3회 추출하며, 유기상을 합병하여 포화 염화나트륨으로 1회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 유기상을 건조한 후 농축하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 250.0, 252.0.

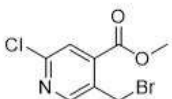
[0091] 단계 2: 2-클로로-5-메틸 이소니코틴산 메틸의 제조



[0092]

[0093] 5-브로모-2-클로로 이소니코틴산 메틸 (10g, 51.8mmol) 및 테트라(트리페닐 포스핀)팔라듐 (4.6g, 3.98mmol)을 무수N,N-디메틸포름아미드 (DMF, 25mL)에 첨가하였다. 아르곤 가스의 보호하에 트리메틸 알루미늄 (2M 톨루엔 용액, 51.9mmol, 25.95mL)을 첨가하며, 첨가 완료 후, 반응계를 80 °C로 승온하여 밤새 교반하면서 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 반응액을 얼음물 (500mL)에 넣어 반응을 멈추며, 아세트산 에틸 (500mL)을 넣어 추출하였다. 유기상은 포화 염화나트륨 수용액으로 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조한 후 용매를 감압증류로 제거하였다. 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 186.0.

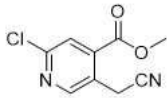
[0094] 단계 3: 5-(브로모 메틸)-2-클로로 이소니코틴산 메틸의 제조



[0095]

[0096] 2-클로로-5-메틸 이소니코틴산 메틸 (5.14g, 27.69mmol)를 사염화 탄소 (50mL)에 용해시키며, N-브로모숙신이미드 (4.93g, 27.7mmol), 과산화 벤조일 (1g, 4.13mmol)을 첨가하여, 80 °C에서 교반하면서 밤새 반응시켰다. LCMS로 반응 종료를 모니터링하며, 유기 용매를 감압하여 제거한 후, 물 및 아세트산 에틸을 첨가하여 추출하며, 유기상을 포화 염화나트륨으로 2회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 264.0, 266.1.

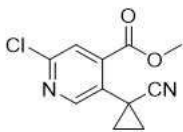
[0097] 단계 4: 2-클로로-5-(시아노 메틸)이소니코틴산 메틸의 제조



[0098]

[0099] 5-(브로모 메틸)-2-클로로 이소니코틴산 메틸 (5.29g, 20.1mmol)를 무수 아세트니트릴 (35mL)에 용해시키며, 트라이메틸실릴 시안화물 (2.20g, 22.17mmol)을 첨가하며, -10 °C로 강온하였다. 해당 반응액에 테트라부틸 암모늄 플루오라이드 (7.88g, 30.14mmol)를 천천히 적하하며, 적하 완료 후 0 °C로 승온하여 3시간 반응시켰다. LCMS로 반응 종료를 모니터링하며, 반응액을 규조토로 흡인 여과한 후, 물을 첨가하며, 아세트산 에틸로 추출하며, 유기상을 포화 염화나트륨으로 2회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 211.0.

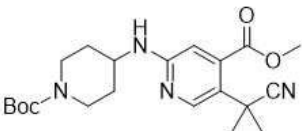
[0100] 단계 5: 2-클로로-5-(1-시아노 시클로프로필)이소니코틴산 메틸의 제조



[0101]

[0102] 2-클로로-5-(시아노 메틸)이소니코틴산 메틸 (1.5g, 7.12mmol)를 무수 디메틸 설펝사이드 (DMSO, 25mL)에 용해시키며, 1,2-디브로모에탄 (2.0g, 10.65mmol), 탄산 세슘 (4.64g, 14.24mmol)을 첨가하였다. N₂보호 하에, 70 °C에서 1시간 반응시켰다. LCMS로 반응 완료를 모니터링한 후, 실온으로 냉각하며, 물을 첨가하며, 아세트산 에틸로 추출하며, 유기상층을 포화 염화나트륨으로 2회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 237.0.

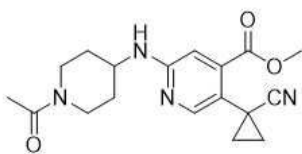
[0103] 단계 6: 2-((1-(tert-부톡시 카보닐)피페리딘-4-일)아미노)-5-(1-시아노 시클로프로필)이소니코틴산 메틸의 제조



[0104]

[0105] 2-클로로-5-(1-시아노 시클로프로필)이소니코틴산 메틸 (0.1g, 0.38mmol)를 무수 테트라히드로퓨란 (THF, 3mL)에 용해시키며, 4-아미노 피페리딘-1-카복실산 tert-부틸 (114.1mg, 0.57mmol), 탄산 세슘 (247.6mg, 0.76mmol), 클로로(2-비시클로 헥실 포스핀-2',6'-디이소프로필-1,1'-비페닐)[2-(2-아미노 에틸 페닐)]팔라듐 (II) (31.82mg, 0.04mmol)을 첨가하며, N₂ 보호 하에, 70 °C에서 밤새 반응시켰다. LCMS로 반응 종료를 모니터링하며, 물을 첨가하며, 아세트산 에틸로 추출하며, 유기상을 포화 염화나트륨으로 2회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 401.2.

[0106] 단계 7: 2-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-5-(1-시아노 시클로프로필)이소니코틴산 메틸의 제조

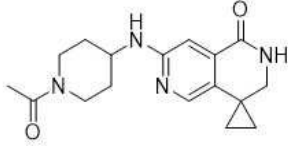


[0107]

[0108] 2-((1-(tert-부톡시 카보닐)피페리딘-4-일)아미노)-5-(1-시아노 시클로프로필)이소니코틴산 메틸 (162mg, 0.405mmol)를 무수 염화 메틸렌 (4mL)에 용해시키며, 얼음 욕조를 이용하여 0 °C로 하고 트리플루오로아세트산 (0.4mL, 5.38mmol)을 천천히 적하하며, 적하 완료 후 얼음 욕조를 철거하며, 실온에서 밤새 교반하였다. 유기용매를 감압 증류하여 제거한 후, 무수 염화 메틸렌 (5mL)을 첨가하였다. 해당 용액에 N,N-디이소프로필 에틸아

민을 pH가 7-8이 될 때까지 첨가한 후 *N,N*-디이소프로필 에틸아민 (52.3mg, 0.405mmol)을 더 첨가하며, 아세트산 무수물 (49.0mg, 0.48mmol)을 첨가하고, 실온에서 2시간 교반하였다. LCMS로 반응 완료를 모니터링한 후, 반응액에 물을 첨가하여 반응을 멈춘 후, 염화 메틸렌로 추출하며, 유기상을 포화 염화나트륨으로 2회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 농축하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z : $[M+H]^+$ = 343.2.

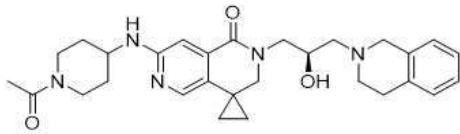
[0109] 단계 8: 7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2',3'-디히드로-1'*H*-스피로[시클로프로판-1,4'-[2,6]나프티리딘]-1'-온의 제조



[0110]

[0111] 2-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-5-(1-시아노 시클로프로필)이소니코틴산 메틸 (311.0mg, 0.91mmol)를 메탄올에 용해시키며, 얼음 욕조로 0 °C로 하고 6수화 이염화 코발트 (865.4mg, 3.64mmol)를 첨가하며, 수소화 붕소 나트륨 (207.26mg, 5.48mmol)을 배치로 천천히 첨가하며, 0 °C에서 0.5시간 교반한 후 상온에서 1시간 교반하였다. LCMS로 반응 미완료를 모니터링하며, 반응액에 포화 염화 암모늄 수용액을 첨가하여 반응을 멈춘 후, 아세트산 에틸로 추출하며, 유기상을 포화 염화나트륨으로 2회 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z : $[M+H]^+$ = 315.2

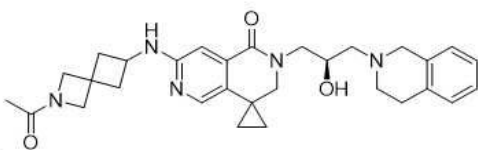
[0112] 단계 9: (*R*)-7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1*H*)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'*H*-스피로[시클로프로판-1,4'-[2,6]나프티리딘]-1'-온의 제조



[0113]

[0114] 7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2',3'-디히드로-1'*H*-스피로[시클로프로판-1,4'-[2,6]나프티리딘]-1'-온 (45mg, 0.175mmol)을 무수 DMF (5mL)에 용해시키며, 질소 가스의 보호 하에 0 °C까지 강온하며 NaH (11.45mg, 0.48mmol)를 천천히 첨가하며, 0.5시간 후 (*R*)-2-(옥시레인-2-일메틸)-1,2,3,4-테트라히드로 이소퀴놀린 (32.53mg, 0.172mmol)을 첨가하며, 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS로 반응 미완료를 모니터링하며, 10mg NaH, 33mg (*R*)-2-(옥시레인-2-일메틸)-1,2,3,4-테트라히드로 이소퀴놀린을 보충 첨가하며, 계속하여 2시간 반응시켰다. LCMS로 반응 종료를 모니터링하며, 유기 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12-8.23 (m, 1H), 7.10-7.16 (m, 4H), 6.65-6.80 (m, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.12-4.25 (m, 1H), 3.94-4.10 (m, 1H), 3.71-3.87 (m, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.42-3.54 (m, 2H), 3.36-3.41 (m, 1H), 3.11-3.25 (m, 2H), 2.75-2.94 (m, 3H), 2.65-2.80 (m, 2H), 2.36-2.48 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.80-2.00 (m, 2H), 1.15-1.36 (m, 2H), 0.80-0.97 (m, 4H). LC-MS m/z : $[M+H]^+$ = 504.3.

[0115] 실시예 2: (*R*)-7'-((2-아세틸-2-아자스피로[3.3]헵토-6-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1*H*)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'*H*-스피로[시클로프로판-1,4'-[2,6]나프티리딘]-1'-온



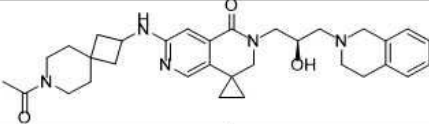
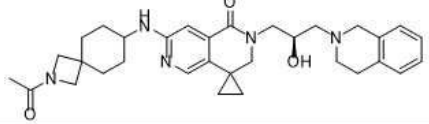
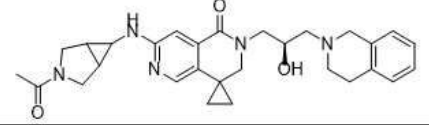
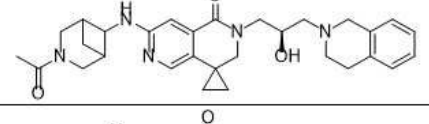
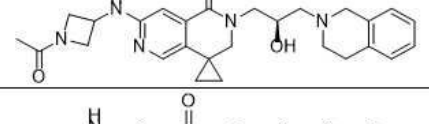
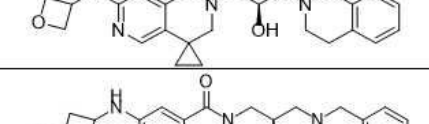
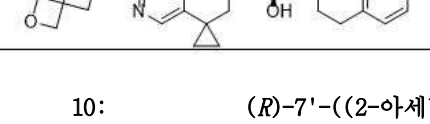
[0116]

[0117] 제조방법은 실시예 1의 단계 6 중의 4-아미노 피페리딘-1-카르복실산 *tert*-부틸을 6-아미노-2-아자스피로[3.3]헵탄-2-카르복실산 *tert*-부틸로 대체한 것을 제외하고 실시예 1의 제조방법과 동일하게 하여, 표제 화합물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.71 (s, 1H), 7.00-7.15 (m, 4H), 6.87 (m, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.16

(s, 1H), 4.04-4.10 (m, 3H), 3.88 (m, 1H), 3.70-3.80 (m, 3H), 3.61-3.63 (m, 2H), 2.80-2.83 (m, 2H), 2.70-2.72 (m, 2H), 2.18-2.20 (m, 1H), 1.98-2.02 (m, 4H), 1.72 (s, 3H), 1.24-1.30 (m, 4H), 0.94-1.0 (m, 4H). LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 516.3.

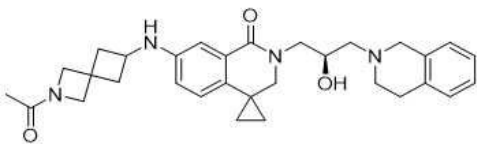
[0118] 본 발명의 실시예 1의 합성 방법에 따라, 기타 시판 원료를 사용하여 실시예 3 내지 9의 화합물을 합성하였으며, 이들의 화합물의 특징 파라미터는 표 1에 나타난 바와 같다.

[0119] [표 1]

실시예	화합물 구조	LC-MS m/z: [M+H] ⁺
3		544.3
4		544.3
5		502.3
6		516.3
7		476.3
8		435.3
9		475.3

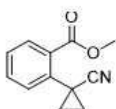
[0120]

[0121] 실시예 10: (R)-7'-((2-아세틸-2-아자스피로[3.3]헵토-6-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온



[0122]

[0123] 단계 1: 2-(1-시아노 시클로프로필)벤조산 메틸의 제조

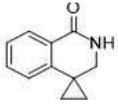


[0124]

[0125] 수산화 나트륨 (4.46g, 111mmol)을 3구 플라스크에 넣어, 0 °C에서 20mL의 무수 N,N-디메틸포름아미드를 첨가하며, 5min 교반하며, 2-(시아노 메틸)벤조산 메틸 (7.80g, 44.6mmol)의 N,N-디메틸포름아미드 용액 (80mL)을 첨가하며, 0 °C에서 30min 교반하며, 그 다음 1,2-디브로모에탄 (10.0g, 53.5mmol)을 천천히 적하하며, 적하 완료 후 실온에 옮겨 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 20mL의 포화 염화 암모늄 용액을 첨가하여 반응을 멈추며,

아세트산 에틸 (30mL X 3)로 추출하며, 유기상을 합병하며, 수세 (10mL X 2)하며, 포화 식염수로 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=202.

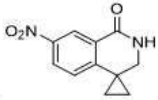
[0126] 단계 2: 2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0127]

[0128] 2-(1-시아노 시클로프로필) 벤조산 메틸 (13.3g, 66.1mmol)를 150mL의 무수 에탄올에 용해시키며, 6수화 염화 코발트 (31.5g, 132mmol)를 첨가하며, 0 °C에서 수소화 붕소 나트륨 (7.54g, 198mmol)를 배치로 첨가하며, 실온에 옮겨 1h 반응시킨 후 80 °C에서 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 흡인 여과하며, 여과액으로부터 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=174.

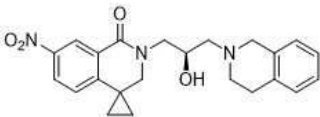
[0129] 단계 3: 7'-니트로-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0130]

[0131] 2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (6.33g, 36.6mmol)을 얼음 욕조 하에 냉각한 농황산 (30mL)에 용해시키며, -10 °C에서 질산 칼륨 (3.69g, 36.6mmol)을 배치로 첨가하며, 실온에 옮겨 1h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 얼음물에 넣어, 고체를 석출시키며, 흡인 여과하며, 여과 케이크를 건조하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=219.

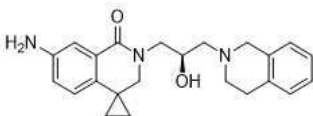
[0132] 단계 4: (R)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-7'-니트로-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0133]

[0134] 7'-니트로-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (300mg, 1.38mmol)을 10mL의 DMSO에 용해시키며, 탄산 세슘 (900mg, 2.75mmol)을 첨가한 후 실온에서 0.5h 교반하며, (R)-2-(옥시레인-2-일메틸)-1,2,3,4-테트라히드로 이소퀴놀린 (520mg, 2.75mmol)을 첨가하며, 100 °C에서 3h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 물 50mL를 첨가하며, 아세트산 에틸 (30mL X 3)로 추출하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺= 408.

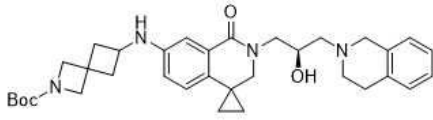
[0135] 단계 5: (R)-7'-아미노-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0136]

[0137] (R)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-7'-니트로-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (500mg, 1.23mmol), 환원 철분말 (274mg, 4.9mmol), 염화 암모늄 (260mg, 4.90mmol)을 10mL의 에탄올 및 2mL의 물의 혼합 용액에 첨가하며, 75 °C에서 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 여과하며, 여과액으로부터 용매를 감압 증류로 제거하며, 염화 메틸렌 20 mL을 첨가하여, 여과하며, 여과액으로부터 용매를 감압 증류하여 제거하여, 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺= 378.

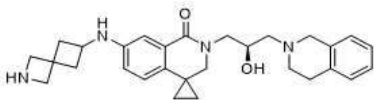
[0138] 단계 6: (R)-6-((2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-1'-옥소-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-7'-일)아미노)-2-아자스피로[3.3]헵탄-2-카르복실산 tert-부틸의 제조



[0139]

[0140] (R)-7'-아미노-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (200mg, 0.526mmol), 6-옥소-2-아자스피로[3.3]헵탄-2-카르복실산 tert-부틸 (65.06mg, 0.582mmol)을 5mL의 메탄올에 용해시키며, 빙초산 1방울을 첨가하며, 실온에서 0.5h 교반하며, 얼음 욕조에서 피리딘 보레인 (74.0mg, 0.796mmol)을 적하하며, 실온에서 0.5h 교반하였다. 완전히 반응시킨 후, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 573.

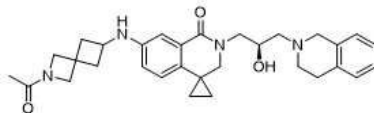
[0141] 단계 7: (R)-7'-((2-아자스피로[3.3]헵토-6-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0142]

[0143] (R)-6-((2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-1'-옥소-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-7'-일)아미노)-2-아자스피로[3.3]헵탄-2-카르복실산 tert-부틸 (180mg, 0.315mmol)을 10mL의 염화 수소 메탄올 (4.0mol/L) 용액에 용해시키며, 실온에서 0.5h 교반하였다. 완전히 반응시킨 후, 용매를 감압 증류로 제거하여, 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺ = 473.

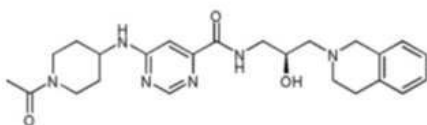
[0144] 단계 8: (R)-7'-((2-아세틸-2-아자스피로[3.3]헵토-6-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0145]

[0146] (R)-7'-((2-아자스피로[3.3]헵토-6-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (140mg, 0.297mmol)을 10mL의 염화 메틸렌에 첨가하며, 용액이 약염기성이 될 때까지 트리에틸아민을 첨가하며, 완전히 용해한 후, 아세트산 무수물 (61.0mg, 0.593mmol)을 첨가하며, 실온에서 15min 교반하였다. 완전히 반응시킨 후, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.74 (s, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.14-7.12 (m, 4H), 7.06-7.00 (m, 1H), 4.25-4.23 (m, 1H), 4.05-3.83 (m, 5H), 3.70-3.61 (m, 2H), 3.45-3.37 (m, 2H), 3.05-2.90 (m, 4H), 2.87-2.72 (m, 2H), 2.02-1.98 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 1.84-1.81 (m, 1H), 1.79-1.76 (m, 3H), 1.34-1.02 (m, 4H). LC-MS m/z: [M+HCO₂]⁻ = 559.

[0147] 비교예 1: (S)-6-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-N-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)피리미딘-4-포름아미드



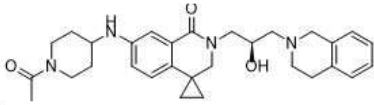
[0148]

(화합물 A)

[0149] WO2014/100719 (PCT/US2013/077235) 중의 화합물 208에 개시된 방법을 참조하여 상기 식으로 표시되는 화합물

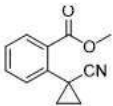
A를 제조하며, 수소 스펙트럼 및 질량 스펙트럼에 의해 동정하였다.

[0150] **비교예 2:** (R)-7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온



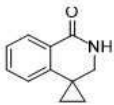
(화합물 B)

[0152] **단계 1:** 2-(1-시아노 시클로프로필)벤조산 메틸의 제조



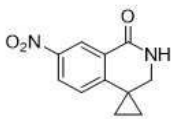
[0153] 수소화 나트륨 (4.46g, 111mmol)을 3구 플라스크에 넣고, 0 °C에서 20mL의 무수 N,N-디메틸포름아미드를 첨가하며, 5min 교반하며, 2-(시아노 메틸)벤조산 메틸 (7.80g, 44.6mmol)의 N,N-디메틸포름아미드 용액 (80mL)을 천천히 첨가하며, 0°C에서 30min 교반한 후 1,2-디브로모에탄 (10.0g, 53.5mmol)을 천천히 적하하며, 적하 완료 후 실온에 옮겨 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 20mL의 포화 염화 암모늄 용액을 첨가하여 반응을 멈추며, 아세트산 에틸 (30mL X 3)로 추출하며, 유기상을 합병하며, 수세 (10mL X 2)하며, 포화 식염수로 세척하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=202.

[0155] **단계 2:** 2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



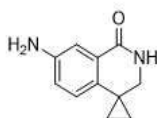
[0156] 2-(1-시아노 시클로프로필)벤조산 메틸 (13.3g, 66.1mmol)를 150mL의 무수 에탄올에 용해시키며, 6 수화 염화 코발트 (31.5g, 132mmol)를 첨가하며, 0°C에서 수소화 붕소 나트륨 (7.54g, 198mmol)을 배치로 첨가하며, 실온에 옮겨 1h 반응시킨 후 80°C에서 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 흡인 여과하며, 여과액으로부터 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=174.

[0158] **단계 3:** 7'-니트로-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0159] 2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (6.33g, 36.6mmol)을 얼음 욕조로 냉각한 농 황산 (30mL)에 용해시키며, -10°C에서 질산 칼륨 (3.69g, 36.6mmol)을 배치로 첨가하며, 실온에 옮겨 1h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 얼음물에 넣어, 고체를 석출시키며, 흡인 여과하며, 여과 케이크를 건조하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=219.

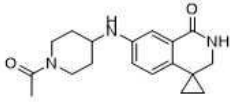
[0161] **단계 4:** 7'-아미노-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조



[0162] 7'-니트로-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (4.57g, 210mmol)을 40mL의 에탄

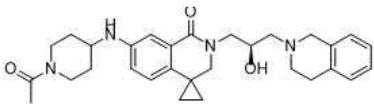
을 및 10mL의 물의 혼합 용매에 용해시키며, 철분 (2.93g, 52.4mmol), 염화 암모늄 (3.33g, 62.9mmol)을 첨가하며, 80°C에서 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 흡인 여과하며, 여과액을 감압 농축하며, 염화 메틸렌 (30mL X 3)으로 추출하며, 유기상을 합병하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=189.

[0164] **단계 5: 7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온의 제조**



[0165] 7'-아미노-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (1.55g, 8.24mmol), 1-아세틸-4-피페리돈 (1.16g, 8.24mmol)을 20mL의 메탄올에 용해시키며, 빙초산 (0.472 mL, 8.24 mmol)을 첨가하며, 실온에서 2h 반응시켰다. 그 다음 0°C에서 보란피리딘 착체 (1.24mL, 12.4mmol)를 천천히 첨가하며, 실온에 옮겨 2h 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 포화 탄산 수소 나트륨 용액으로 pH가 염기성이 될 때까지 조정하며, 염화 메틸렌 (20mL X 3)로 추출하며, 유기상을 합병하며, 무수 황산 나트륨으로 건조하며, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 표제 화합물을 얻었다. LC-MS m/z: [M+H]⁺=314.

[0167] **단계 6: (R)-7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2'-(3-(3,4-디히드로 이소퀴놀린-2(1H)-일)-2-히드록시 프로필)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (화합물 B)의 제조**



[0168] 7'-((1-아세틸 피페리딘-4-일)아미노)-2',3'-디히드로-1'H-스피로[시클로프로판-1,4'-이소퀴놀린]-1'-온 (1.56g, 4.98mmol)을 10mL의 무수 N,N-디메틸포름아미드 용액에 용해시키며, 0°C에서 수소화 나트륨 (0.299g, 7.48mmol)을 배치로 첨가하며, 30min 교반하며, (R)-2-(옥시레인-2-일메틸)-1,2,3,4-테트라히드로 이소퀴놀린 (0.942g, 4.98mmol)의 N,N-디메틸포름아미드 용액 (5mL)을 첨가하며, 실온에 옮겨 밤새 반응시켰다. 완전히 반응시킨 후, 8mL 포화 염화 암모늄 용액을 첨가하여 반응을 멈추며, 용매를 감압 증류로 제거하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하며, prep-HPLC (액상을 제조)를 제조하고 분리하여 표제 화합물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.16-7.23 (m, 1H), 7.05-7.16 (m, 3H), 6.99-7.05 (m, 1H), 6.65-6.77 (m, 2H), 5.57 (d, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.19 (d, 1H), 3.94-4.10 (m, 1H), 3.71-3.87 (m, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.42-3.54 (m, 2H), 3.34-3.41 (m, 1H), 3.11-3.25 (m, 2H), 2.75-2.94 (m, 3H), 2.62-2.74 (m, 2H), 2.36-2.48 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.79-1.96 (m, 2H), 1.12-1.36 (m, 2H), 0.75-0.97 (m, 4H). LC-MS m/z: [M+H]⁺=503.

[0170] **실험예 1 화합물의 체외의 키나제 활성의 평가**

[0171] **1. 실험 재료**

[0172] 화합물: 상기 실시예에서 제조된 본 발명의 화합물에 대하여, 각 화합물은 DMSO를 사용하여 10mM의 모액으로 제조하며, 최종적으로 10개의 농도로 희석하여 검출하며, 최종 농도는 10000.00nM, 3333.33nM, 1111.11nM, 370.37nM, 123.46nM, 41.15nM, 13.72nM, 4.57nM, 1.52nM, 0.51nM이다.

[0173] 시약 및 소모품: PRMT5는 Active Motif 사로부터 구입되며, 제품 번호는 31921이며; 폴리캡타이드 기질 H4(1-21)Slac은 GL Biochem (Shanghai) 사로부터 구입되며, 제품 번호는 342095이며; [³H]-SAM은 PerkinElmer 사로부터 구입되며, 제품 번호는 NET155V001MC이며; SAM은 Sigma로부터 구입되며, 제품 번호는 A7007-100MG이며; SAH는 Sigma 사로부터 구입되며, 제품 번호는 A9384-25MG이며; DTT는 Sangon Biotech (Shanghai) 사로부터 구입되며, 제품 번호는 A620058-0005이다. Corning-3657은 Corning 사로부터 구입되며, 제품 번호는 3657이며; Echo Qualified 384-Well은 Labcyte 사로부터 구입되며, 제품 번호는 P-05525이며; FlashPlate는 Perkin Elmer로부터 구입되며, 제품 번호는 SMP410J001PK이다.

- [0174] 기기: 섬광 계수기는 PerkinElmer 사로부터 구입되며, 모델 번호는 MicroBeta2이며; 초음파 나노리터 액체 처리 시스템은 Labcyte 사로부터 구입되며, 모델 번호는 Echo 550이다.
- [0175] **2. 실험 방법**
- [0176] 2.1. 반응 완충액 및 반응 종결액의 제조: 1배의 반응 완충액의 성분은 10mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.01% Tween-20; 1mM DTT이다. 반응 종결액의 성분은 125 μ M의 ³H-SAM 용액이다.
- [0177] 2.2 화합물의 제조
- [0178] 2.2.1 화합물의 희석
- [0179] 화합물을 100%의 DMSO로 용해시켜 10mM의 모액으로 만든 후, 화합물을 Echo384 웰 플레이트에서 필요한 농도로 희석시켰다.
- [0180] 2.2.2 384 반응 플레이트로의 화합물의 전이
- [0181] Echo550 기기를 사용하여 상기 희석된 화합물 250nL을 Echo384 웰 플레이트로부터 384 웰 반응 플레이트로 전이시켰다.
- [0182] 2.3 효소학 반응
- [0183] 2.3.1 1.67배의 효소 용액의 제조
- [0184] PRMT5를 1배의 반응 완충액에 첨가하여, 1.67배의 효소 용액을 형성하였다.
- [0185] 2.3.2 2.5배의 기질 용액의 제조
- [0186] 폴리펩타이드 기질 및 [³H]-SAM을 1배의 반응 완충액에 첨가하여, 2.5배의 기질 용액 (최종 농도는 각각 100nM 및 250nM)을 형성하였다.
- [0187] 2.3.3 384 웰 플레이트에 효소 용액을 첨가
- [0188] 384 웰 반응 플레이트의 웰에 15 μ L의 1.67배의 효소 용액을 첨가하였다. 효소 활성이 없는 대조군 웰에 대하여, 효소 용액을 대신하여 15 μ L의 1배의 반응 완충액을 사용하였다. 1000rpm에서 1min 원심분리하며, 실온에서 15분간 인큐베이션하였다.
- [0189] 2.3.4 384 웰 플레이트에 기질 용액을 첨가하여 효소학 반응을 개시
- [0190] 384 웰 반응 플레이트의 각 웰에 10 μ L의 2.5배의 기질 용액을 첨가하였다. 1000rpm에서 1min 원심분리하였다. 25°C에서 60분간 반응시켰다.
- [0191] 2.3.5 효소학 반응의 종료
- [0192] 384 웰 반응 플레이트의 각 웰에 5 μ L의 반응 종결액을 첨가하여 반응을 종결하였다. 시험 플레이트의 각 웰로부터 25 μ L를 취하여 Flashplate로 옮기며, 실온에서 1h 방치하였다. 그 다음 0.1%의 Tween-20 용액으로 Flashplate를 3회 세척하였다.
- [0193] 2.4 MicroBeta 2로 데이터를 판독
- [0194] 2.4 억제율의 계산
- [0195] Microbeta 2에서 데이터를 복사하였다. 데이터를 억제율 데이터로 변환하였다. 여기서 최대값은 DMSO 대조군의 전환율을 가리키며, 최소값은 효소 활성이 없는 대조군의 전환율을 가리킨다. 억제율(%) = (최대값-샘플값)/(최대값-최소값) X 100%.
- [0196] 데이터를 GraphPad에 입력하며, "log(inhibitor) vs. response -- Variable slope"를 사용하여 곡선 피팅을 진행하여, IC₅₀을 얻었다. 일부 화합물의 IC₅₀ 결과를 표 2에 나타냈다.

[0197] [표 2]

시험 화합물	효소의 종류	IC ₅₀ (nM)
		PRMT5
실시예 1		32.66
실시예 2		49.70
실시예 10		2659

[0198]

[0199]

실험예 2 화합물의 체외의 세포 활성의 평가

[0200]

1. 실험 재료

[0201]

시험 화합물: 상기 실시예에서 제조된 본 발명의 화합물에 대하여, 각 화합물은 DMSO를 사용하여 10mM의 모액으로 제조하며, 최종적으로 8개의 농도로 희석하여 검출을 진행하며, Z-138 세포 실험의 화합물의 최종 농도는 33333.00nM, 6666.60nM, 1333.32nM, 266.66nM, 53.33nM, 10.67nM, 2.13nM, 0.43nM이며, MDA-MB-468 및 NCI-H358 세포 실험 화합물의 최종 농도는 50000nM, 10000nM, 2000nM, 400nM, 80nM, 16nM, 3.2nM, 0.64nM이다.

[0202]

인간 맨틀 세포 림프종 세포 Z-138, 삼중음성 유방암 세포 MDA-MB-468, 인간 비소세포 폐암 세포 NCI-H358은 미국 표준 균주 분양기관 (ATCC)으로부터 구입하였다.

[0203]

시약: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMEM 배지)는 제품 번호가 ATCC 30-2005이며; Leibovitz's L-15 Medium (L-15 배지)는 제품 번호가 Gibco 11415-064이며; 1640 배지는 제품 번호가 Gibco 22400089이며; 말혈청은 제품 번호가 Gibco 16050122이며; Fetal Bovine Serum은 제품 번호가 Gibco 10099-141이며; 페니실린-스트렙토마이신은 제품 번호가 Gibco 15140-122이며; 피루브산 나트륨은 제품 번호가 Gibco 11360070이며; CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay는 제품 번호가 Promega G7571.CCK-8 증식 억제 검출 키트는 제품 번호가 KeyGEN KGA317이다.

[0204]

2. 실험 방법

[0205]

2.1 세포의 소생:

[0206]

2.1.1 Z-138 세포의 소생: 액체 질소 탱크로부터 Z-138 세포의 동결 보존 튜브를 꺼내 37°C의 욕조에 넣어, 가볍게 흔들어 최대한 빨리 해동시켰다. 해동된 후 동결 보존 튜브를 꺼내, 알코올 슴볼로 소독한 후 뚜껑을 열고, 세포액을 흡인하여 원심분리관에 주입하며, 1mL의 10%의 말혈청을 포함한 완전 배지를 첨가하며, 균일하게 혼합한 후 원심분리기에 넣어, 1000rpm으로 5min 원심분리하였다. 그 후 상청액을 버리며, 완전 배지를 첨가하여 세포가 완전히 흩어지고 재현탁될 때까지 피펫팅을 반복하였다. 적합한 농도로 배양 접시에 접종하였다. 37°C, 5% CO₂, 95% 습윤 공기의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0207]

2.1.2 MDA-MB-468 세포의 소생: 액체 질소 탱크로부터 MDA-MB-468 세포의 동결 보존 튜브를 꺼내 37°C의 욕조에 넣어, 가볍게 흔들어 최대한 빨리 해동시켰다. 해동된 후 동결 보존 튜브를 꺼내, 알코올 슴볼로 소독한 후 뚜껑을 열고, 세포액을 흡인하여 원심분리관에 주입하며, 1mL의 10%의 FBS를 포함한 L-15 배지를 첨가하며, 균일하게 혼합한 후 원심분리기에 넣어, 1000rpm으로 5min 원심분리하였다. 그 후 상청액을 버리며, 완전 배지를 첨가하여 세포가 완전히 흩어지고 재현탁될 때까지 피펫팅을 반복하였다. 적합한 농도로 배양 접시에 접종하였다. 37°C, 95% 습윤 공기의 무CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0208]

2.1.3 NCI-H358 세포의 소생: 액체 질소 탱크로부터 NCI-H358 세포의 동결 보존 튜브를 꺼내 37°C의 욕조에 넣어, 가볍게 흔들어 최대한 빨리 해동시켰다. 해동된 후 동결 보존 튜브를 꺼내, 알코올 슴볼로 소독한 후 뚜껑을 열고, 세포액을 흡인하여 원심분리관에 주입하며, 1mL의 10% FBS를 포함한 1640 배지를 첨가하며, 균일하게 혼합한 후 원심분리기에 넣어, 1000rpm으로 5min 원심분리하였다. 그 후 상청액을 버리며, 완전 배지를 첨가하여 세포가 완전히 흩어지고 재현탁될 때까지 피펫팅을 반복하였다. 적합한 농도로 배양 접시에 접종하였다. 37°C, 5% CO₂, 95% 습윤 공기의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0209]

2.2 세포 배양 및 계대:

[0210]

2.2.1 Z-138 세포 배양 및 계대: 세포를 약 80-90%로 성장시키며, 배지 (IMDM 배지 + 10% 말혈청 + 1% 페니실

린-스트렙토마이신)를 15mL의 원심분리관에 전이하며, 1000rpm으로 5min 원심분리하였다. 상청액을 제거하며, 완전 배지를 사용하여 세포를 재현탁하며, 필요한 밀도에 따라 배양 접시에 접종하며, 37°C, 5% CO₂, 95% 습윤 공기에서 인큐베이터에 넣어 배양하며, 세포 성장 상황에 따라 2-3일마다 배양액을 1차 보충하거나 계대를 진행하였다.

[0211] 2.2.2 MDA-MB-468 세포 배양 및 계대: 세포를 약 80-90%로 성장시키며, 배지 (Leibovitz's L-15 Medium 배지 + 10% FBS +1% 페니실린-스트렙토마이신)를 15mL의 원심분리관에 전이하며, 1000rpm으로 5min 원심분리하였다. 상청액을 제거하며, 완전 배지를 사용하여 세포를 재현탁하며, 필요한 밀도에 따라 배양 접시에 접종하며, 37°C, 95% 습윤 공기에서 CO₂가 없는 인큐베이터에 넣어 배양하며, 세포 성장 상황에 따라 2-3일마다 배양액을 1차 보충하거나 계대를 진행하였다.

[0212] 2.2.3 NCI-H358 세포 배양 및 계대: 세포를 약 80-90%로 성장시키며, 배지 (1640 배지 + 10% FBS + 1% 페니실린-스트렙토마이신 +1mM 피루브산 나트륨)를 15mL의 원심분리관에 전이하며, 1000rpm으로 5min 원심분리하였다. 상청액을 제거하며, 완전 배지를 사용하여 세포를 재현탁하며, 필요한 밀도에 따라 배양 접시에 접종하며, 37°C, 5% CO₂, 95% 습윤 공기에서 CO₂ 인큐베이터에 넣어 배양하며, 세포 성장 상황에 따라 2-3일마다 배양액을 1차 보충하거나 계대를 진행하였다.

[0213] **2.1 실험 단계:**

[0214] 실험 제1일째:

[0215] Z-138 세포가 계대된 후 1000개/웰의 밀도로 완전 배지에 재현탁하며, 96웰 배양 플레이트 내에 접종하였다. 가장자리의 배지의 증발이 빨라 내부의 플레이트 웰의 배양 조건에 차이가 너무 큰 것을 방지하도록 96웰 플레이트의 가장 외주에 있는 36개의 웰에는 200 μL의 PBS를 충전하였다. 60개의 내부 웰의 최좌열은 공백웰이며, 세포를 첨가하지 않으며, 등체적의 PBS를 충전하였다. 나머지의 54개의 웰은 다중 채널 피펫으로 세포를 플레이팅하며, 각 웰은 대응하는 세포를 포함하는 100 μL의 배지이며, 플레이팅 완료 후, 96웰 플레이트를 두드려 세포가 균일하게 현탁시키며, 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 37°C에서 24h 배양하였다.

[0216] MDA-MB-468 세포가 계대된 후 대응하는 밀도인 2000개/웰로 완전 배지에 재현탁하며, 96웰 배양 플레이트 내에 접종하였다. 가장자리의 배지의 증발이 빨라 내부의 플레이트 웰의 배양 조건에 차이가 너무 큰 것을 방지하도록 세포의 외측 한 바퀴에는 200 μL의 PBS를 충전하였다. 60개의 내부 웰의 최좌열은 공백웰이며, 세포를 첨가하지 않으며, 등체적의 PBS를 충전하였다. 나머지의 54개의 웰은 다중 채널 피펫으로 세포를 플레이팅하며, 각 웰은 100 μL이며, CO₂가 없는 인큐베이터에 넣어 37°C에서 24h 배양하였다.

[0217] NCI-H358 세포가 계대된 후 대응하는 밀도인 1000개/웰로 완전 배지에 재현탁하며, 96웰 배양 플레이트 내에 접종하였다. 가장자리의 배지의 증발이 빨라 내부의 플레이트 웰의 배양 조건에 차이가 너무 큰 것을 방지하도록 세포의 외측 한 바퀴에는 200 μL의 PBS를 충전하였다. 60개의 내부 웰의 최좌열은 공백웰이며, 세포를 첨가하지 않으며, 등체적의 PBS를 충전하였다. 나머지의 54개의 웰은 다중 채널 피펫으로 세포를 플레이팅하며, 각 웰은 100 μL이며, 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 37°C에서 24h 배양하였다.

[0218] 실험 제2일째:

[0219] Z-138 세포는 원래의 배지 (100 μL)에 기초하여, 50 μL의 (3X) 약물을 첨가하며, 각 농도군에 두개의 복수 웰로 설정하며, CO₂ 인큐베이터에 넣어 7일간 배양을 계속하였다. 화합물은 다음과 같이 제조하였다. 미리 화합물 1-2mg을 칭량하며, DMSO를 사용하여 10mM의 모액을 제조하였다. 완전 배지를 사용하여 약물을 희석하며, 약물의 최종 농도는 33333.00nM을 개시 최고 농도로 하며, 1:4의 구배로 차례로 6666.60nM, 1333.32nM, 266.66nM, 53.33nM, 10.67nM, 2.13nM, 0.43nM인 7개의 농도 구배로 희석하였다. ① 10mM의 모액을 취하여 1:4로 대응하는 합계 8개의 농도 (10 μL 모액+40 μL DMSO)의 약액으로 희석하였다. ②5 μL ①의 약물을 첨가한 495 μL의 완전 배지를 취하여, 대응하는 농도 (3X)(10배로 희석)로 제조하였다.

[0220] MDA-MB-468 세포는 원래의 배지 (100 μL)에 기초하여, 100 μL의 (2X) 약물을 첨가하며, 각 농도군에 두개의 복수 웰로 설정하며, CO₂가 없는 인큐베이터에 넣어 7일간 배양을 계속하였다. 화합물은 다음과 같이 제조하였다. 미리 화합물 1-2mg을 칭량하며, DMSO를 사용하여 10mM의 모액을 제조하였다. 완전 배지를 사용하여 약물을 희석하며, 약물의 최종 농도는 50000nM을 개시 최고 농도로 하며, 1:4의 구배로 차례로 50000nM, 10000nM, 2000nM,

400nM, 80nM, 16nM, 3.2nM, 0.64nM인 7개의 농도 구배로 희석하였다. ① 10mM의 모액을 취하여 1:4로 대응하는 합계 8개의 농도 (10 μL 약액 + 40 μL DMSO)의 약액으로 희석하였다 ② 5 μL ①의 약물을 첨가한 495 μL의 완전 배지를 취하여, 대응하는 농도 (2X)(100배로 희석)로 제조하였다.

[0221] NCI-H358 세포는 원래의 배지 (100 μL)에 기초하여, 100 μL의 (2X) 약물을 첨가하며, 각 농도군에 두개의 복수 웰로 설정하며, 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 7일간 배양을 계속하였다. 화합물은 다음과 같이 제조하였다. 미리 화합물 1-2mg을 칭량하며, DMSO를 사용하여 10mM의 모액을 제조하였다. 완전 배지를 사용하여 약물을 희석하며, 약물의 최종 농도는 50000nM을 개시 최고 농도로 하며, 1:4의 구배로 차례로 50000nM, 10000nM, 2000nM, 400nM, 80nM, 16nM, 3.2nM, 0.64nM인 7개의 농도 구배로 희석하였다. ① 10mM의 모액을 취하여 1:4로 대응하는 합계 8개의 농도 (10 μL 약액 + 40 μL DMSO)의 약액으로 희석하였다. ② 5 μL ①의 약물을 첨가한 495 μL의 완전 배지를 취하여, 대응하는 농도 (2X)(100배로 희석)로 제조하였다.

[0222] 실험 제8일째:

[0223] Z-138 세포를 7일간 약물 처리한 후, 미리 30min 전에 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay를 취하여, 실온으로 평형시켰다. 공백웰은 PBS를 흡인 제거하며, 150 μL의 완전 배지를 첨가한 후, 공백웰, 투여웰 및 DMSO웰에 모두 75 μL의 Celltiter-Glo reagent를 첨가하며, 실온에서 2min 진탕하였다. 실온에서 부화를 10min 계속한 후, 각 웰로부터 180 μL씩 흡입하여 불투명한 백색 플레이트에 전이하며, 기포를 제거한 후, 화학 발광 신호를 검출하며, 진탕하며, Read 샘플 주입 조건은 500ms이다. 마이크로플레이트 리더로부터 도출된 A. U.값에 따라, 용매 대조웰에 대한 각 웰의 억제율: Inhibition (%) = 100 - (A.U. 실험웰 - A.U. 공백웰) / (A.U. 용매 대조웰 - A.U. 공백웰) * 100. 상이한 약물 농도 및 그에 대응하는 억제율에 따라, GraghPad 5.0 소프트웨어를 사용하여 IC₅₀ 그래프를 작성하며, 데이터를 분석하여, 최종 IC₅₀ 값을 획득하며, 실험 결과는 표 3에 표시하였다.

[0224] MDA-MB-468 및 NCI-H358 세포는 7일간 약물 처리한 후, 웰 내의 배지를 흡인 제거하며, CCK-8을 첨가한 완전 배지 (CCK-8: 완전 배지=1:10) 100 μL를 첨가하며, 제1 종열 PBS를 공백 대조웰로 하며, 100 μL의 CCK-8을 동시적으로 첨가한 후, 인큐베이터에 넣어 40min-2h 정도 배양하며, CCK-8의 발색의 명암에 따라 최적의 검출 시간을 결정하였다 (DMSO군의 OD 값은 1.0 정도일 경우 최적이다). CCK-8이 오렌지색으로 발색되며, 그리고 육안으로 확인할 수 있는 일정한 구배가 나타나면, 96웰 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내, 실온에 두어 5-10분간 평형시켰다. 마이크로플레이트 리더 소프트웨어를 열어, 검출 파라미터를 조정하며, 450nm에서의 흡광도 (OD 값)를 검출하였다. 배양 플레이트의 덮개를 제거하여, 직접적으로 배양 플레이트를 수평으로 플레이트 홈에 넣어 데이터 판독을 시작하였다. 데이터 판독 완료 후, 프로그램을 보존하며, 데이터를 도출하며, 소프트웨어 및 컴퓨터를 종료하였다. 마이크로플레이트 리더로 도출된 OD 값에 따라, 용매 대조웰에 대한 각 웰의 억제율: Inhibition (%) = 100 - (OD 실험웰 - OD 공백웰) / (OD 용매 대조웰 - OD 공백웰) * 100을 계산하였다. 상이한 약물 농도 및 그에 대응하는 억제율에 따라, GraghPad 5.0 소프트웨어를 사용하여 IC₅₀ 그래프를 작성하며, 데이터를 분석하여, 최종 IC₅₀ 값을 획득하며, 실험 결과는 표 3에 표시하였다.

[0225] [표 3]

세포의 종류 시험 화합물	IC50 (nM)		
	Z-138 세포	MDA-MB-468 세포	NCI-H358 세포
실시예 1	3.07	11.57	8.90
실시예 2	2.20	7.35	5.02
화합물A	19.49	116.00	73.20
화합물 B	4.33	41.28	15.35

[0226]

[0227] 상기 실험으로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물은 인간 맨틀 세포 림프종 세포 Z-138, 삼중음성 유방암 세포 MDA-MB-468, 인간 비소세포 폐암 세포 NCI-H358에 대하여 모두 양호한 억제 활성을 나타냈으며, 림프종, 삼중음성 유방암, 비소세포 폐암의 치료제가 가능성이 매우 높다.

[0228] 실험예 3 전기 생리학적 수동 패치 클램프에 의한 hERG 칼륨 통로에 대한 화합물의 작용을 검출

[0229] hERG 칼륨 이온 통로는 약물 안전 스크리닝의 표준이다. hERG 칼륨 이온 통로이 차단되면 심장 중독 및 심실 제

분극의 연장을 이어질 수 있으며, 심각한 경우 돌연사로 이어질 수 있다. hERG 칼륨 통로의 억제 작용을 갖는 약물은 임상 약물 사용의 잠재적인 장애가 될 수 있다. 따라서, hERG 칼륨 이온 통로에 대한 화합물의 억제 작용이 약하면 안전성이 높다. 약물에 의한 QT 간격 연장은 치명적인 심실성 부정맥 및 갑작스런 사망 위험의 증가와 관련이 있다.

[0230] **1 실험 재료**

[0231] 주요 시약: 페니실린-스트렙토마이신 용액 (100 X), DMEM/F12는 Gibco 사로부터 구입하며; 소 태아 혈청은 PAA 사로부터 구입하며; DMSO, EGTA, MgATP는 Sigma 사로부터 구입하며; KCl, CaCl₂·2H₂O, MgCl₂·6H₂O, NaCl은 Sinopharm 사로부터 구입하며; 포도당은 General-reagent 사로부터 구입하며; HEPES는 Solarbio 사로부터 구입하며; quinindium은 aladdin 사로부터 구입하였다.

[0232] 기기: TI-S-FLU 현미경은 Nikon 사로부터 구입하며; SMZ-140/143 현미경은 Motic 사로부터 구입하며; EPC-10 증폭기, Patchmaster V2X60는 HEKA 사로부터 구입하며; TMC-36 방진 테이블은 TMC 사로부터 구입하며; MP-225, MPC-200 매니플레이터, ROE-200 마이크로 매니플레이터, P-97 피펫 풀러는 Sutter 사로부터 구입하며; VC3-8PP 관류 투여계는 ALA 사로부터 구입하였다.

[0233] **2 실험 방법**

[0234] 시험 용매의 제조: 세포 외액의 제조 (mM): 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 포도당 및 10 HEPES (pH 7.4); 세포 내액의 제조 (mM): 130 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 5 MgATP 및 10 HEPES (pH 7.2); 음성 대조군의 제조: 세포 외액 + 0.3% DMSO; 양성 대조군: quinindium.

[0235] 화합물의 처리: 화합물을 칭량하며 DMSO에 용해시켜, 10mM의 모액을 제조하며, DMSO를 사용하여 모액을 3.3, 1.1, 0.37, 0.12mM의 농도의 2차 모액으로 희석했다. 각각 90 μL의 모액 및 2차 모액을 취하여 30mL의 세포 외액에 희석하며, 전기생리학적 검출에 사용하였다. 화합물의 최종 농도는 30, 10, 3.3, 1.1, 0.37 μM이며, DMSO의 최종 농도는 3:1000이다.

[0236] 안정적으로 형질 감염된 세포 배양: 세포주는 hERG 칼륨 이온 통로가 과발현된 HEK-293 세포에서 유래되었으며, 뉴욕 대학 의학원의 Mohamed Boutjdir 박사의 실험실에서 기술 지원을 제공받은 후 PharmaCore Labs와 협력하여 확립 및 검증되었다. 세포를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 세포 밀도가 배양 접시의 80%에 도달하면, 먼저 인산염 완충액 (PBS)으로 예비 세척한 후 트립신/EDTA로 세포를 2-3min 소화하며, 세포 배지를 첨가해 소화를 중단하며, 가볍게 세포를 붙여 원심분리관에 전이하며, 1000rpm으로 3min 원심분리하며, 상청액을 버리며, 세포 배지를 첨가하며, 가볍게 세포를 피펫팅하여 균일하게 혼합한 후, 배양 접시에 전이하여 계대 배양을 진행하거나, 세포를 원형 슬라이드에 떨어뜨려 배양 접시에 놓고 세포를 부착시킨 후 실험에 사용했다.

[0237] 세포 배지의 조성: DMEM, 15% 소 태아 혈청 및 1%100 X 페니실린-스트렙토마이신.

[0238] 전기 생리학적 수동 패치 클램프 시스템 실험: 안정화된 형질 감염된 세포를 50% 미만의 세포 밀도로 유리 슬라이드에 접종하여, 밤새 배양하였다. 실험용 세포를 하나의 독립 현미경 스테이지에 매립된 약 1mL의 욕조로 전이하며, 세포 외액을 2.7mL/min의 관류 속도로 관류하였다. 5분간 안정화시킨 후 실험을 개시하면 된다. 막 전류는 HEKA EPC-10 패치 클램프 증폭기 및 PATCHMASTER 수집 시스템을 사용하여 기록하였다. 모든 실험은 모두 실온 (22-24°C)에서 진행하였다. 실험에서 P-97 마이크로 피펫 풀러를 사용하여 전극 (BF150-110-10)을 똑바로 시켰다. 전극 내경은 1-1.5mm이며, 내액으로 채워진 후의 입수 저항은 2-4MΩ이다. hERG 칼륨 통로의 전기 생리학적 자극 방식은 먼저 막 전압을 -80mV로 클램프하며, 세포에 지속적으로 2s, +20mV의 전압으로 자극을 주어, hERG 칼륨 통로를 활성화하며, 다시 -50mV로 재분극하여, 5s 지속시켜, 외향 테일 전류를 생성하며, 자극 주파수는 15s마다 1회이다. 전류값은 테일 전류의 피크값이다. 실험에서 전체 세포 기록 모드에서 통로 전류를 기록하였다. 우선 세포 외액을 관류하여 (약 1분마다 2mL) 지속적으로 기록하며, 전류의 안정화 (5분간 내에 전류 감소 (Run-Down)은 5% 미만)를 기다리며, 이때 테일 전류 피크는 대조 전류값이다. 그 다음 측정 약물을 포함하는 세포 외액을 관류하며 hERG 전류에 대한 약물의 억제 작용이 안정화 상태에 도달할 때까지 지속적으로 기록하며, 이때 테일 전류의 피크값은 약물 첨가 후의 전류값이다. 안정화 상태의 표준은 최근 3개의 연속적인 전류 기록 라인이 중첩되는 여부에 따라 판단하였다. 안정화 상태에 도달한 후, 세포 외액으로 관류 및 린스한 후, hERG 전류가 약물 첨가 전의 크기로 회복되거나 접근하는 경우, 관류를 계속하여 기타 농도 또는 약물을 시험할 수 있다. 실험에서 사용된 세포가 정상적으로 반응하는지를 확인하기 위하여 양성 대조군으로 30 μM의 quinindium을 사용하였다.

[0239] **3 파라미터 분석 및 데이터 분석의 통계**

[0240] 본 연구에서는 대조군 및 약물 처리군의 전류 최대값을 측정하며, 처리군의 최대 전류값이 대조군의 최대 전류값에 차지하는 비율을 계산하여, 시험 농도에서 hERG 칼륨 이온 통로에 대한 측정 화합물의 작용 효과를 평가하였다 (Mean±SE).

[0241] 실험 데이터는 PATCHMASTER V2X60을 사용하여 수집하며, Origin 8.5 소프트웨어 및 Microsoft Excel을 사용하여 분석 및 통계를 진행하였다. 실험 결과는 표 4에 표시하였다.

[0242] [표 4]

시험 화합물	hERG IC50 (µM)
실시예 1	5.24
실시예 2	15.07
화합물 B	2.71

[0243]

[0244] 상기 실험으로부터 알 수 있다시피, 본 발명의 실시예 1 및 2의 화합물은 hERG 칼륨 통로에 대한 억제 작용이 적으며, 심장에 대한 독성이 낮으며, 화합물 B보다 우수하였다.

[0245] 또한, 화합물 B는 이체 심장 실험에서 현저히 연장된 QT 기간이 나타내지만, 본 발명의 실시예 1 및 2의 화합물은 이체 심장 실험에서 QT 기간에 영향을 미치지 않는 것이 나타내었다. 본 발명의 화합물은 보다 양호한 심장 안정성을 갖는다.

[0246] 본 발명은 상기에서 상세히 설명했지만, 본 발명의 요지 및 범위를 벗어나지 않는 한 본 발명에 대하여 다양한 수정 및 변경을 할 수 있는 것은 본 기술분야의 통상의 기술자에 있어서 이해될 것이다. 본 발명의 권리 범위는 본 명세서에 기재된 상세한 설명에 한정되는 것이 아니라, 청구범위에 속해야 한다.