(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0124666
(43) 공개일자 2019년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 417/06 (2006.01) *A61K 31/427* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C07D 417/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 417/06 (2013.01)
A61K 31/427 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0049372
(22) 출원일자 2019년04월26일
심사청구일자 2019년04월26일
(30) 우선권주장
1020180048774 2018년04월26일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
재단법인 의약바이오컨버젼스연구단
경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
김성훈
서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 역삼한신아파트 4-1005 (도곡동)
김종현
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 약학대학 29동 208호(신림동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 9 항

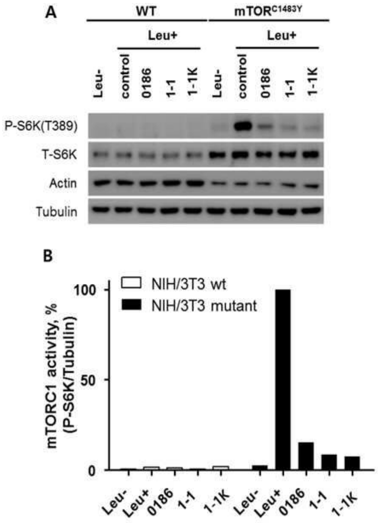
(54) 발명의 명칭 **mTOR 저해제로서의 신규 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 mTOR 저해제로서의 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 mTOR 저해 활성을 나타내는 화학식 1로 표시되는 신규 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 mTOR을 저해하는 효과 및 혈액-뇌 장벽 투과성이 매우 뛰어나 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료제 개발에 매우 유용하게 활용이 될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/16 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
C07D 417/14 (2013.01)

(72) 발명자

한균희
서울특별시 서초구 청계산로11길 8-19, 3호(신원동)

한정민
광주광역시 서구 풍암신흥로 40, 108동 106호(풍암동, 동부센트레빌아파트)

이철호
서울특별시 강서구 국회대로7길 77, 웅진빌딩 4층(화곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711052716
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어지원
연구과제명	중앙연계사업
기 여 율	1/2
주관기관	(재) 의약바이오컨버전스연구단
연구기간	2017.05.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711054836
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어지원
연구과제명	인간 Leucyl-tRNA synthetase 저해제 라이브러리 구축 및 이를 타겟으로 하는 항암제 개발
기 여 율	1/2
주관기관	연세대학교
연구기간	2017.05.01 ~ 2018.02.28

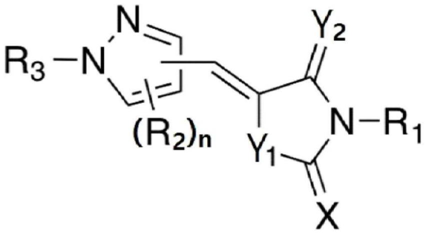
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; C_2~C_5 알케닐; C_3~C_{10} 헤테로아릴알킬; 또는 C_1~C_5 히드록시알킬이고,

R_2는 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬이고,

R_3은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; C_6~C_{15} 아릴; 또는 C_3~C_{15} 헤테로아릴이고,

X는 산소; 황; 또는 질소이고,

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 산소 또는 황이고,

n은 0, 1 또는 2이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R_1은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 알킬; C_2~C_3 알케닐; C_3~C_6 헤테로아릴알킬; 또는 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 히드록시알킬인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 R_2은 수소; 또는 치환 또는 비치환의 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 알킬인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 R_3은 치환 또는 비치환의 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 알킬; C_6~C_{10} 아릴; 또는 C_3~C_{10} 헤테로아릴이며, 이들이 치환되는 경우 그 치환기는 할로겐; C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; 및 C_1~C_5 알콕시로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 Y_1 은 황이고, Y_2는 산소인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화합물은

(5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-(2-퓨릴메틸)-5-[(1-메틸피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-메틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-에틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-알릴-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-알릴-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-알릴-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-메틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-에틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-알릴-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-에틸-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-에틸-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[(5-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[(3-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

(5Z)-5-[[1-페닐피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

(5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

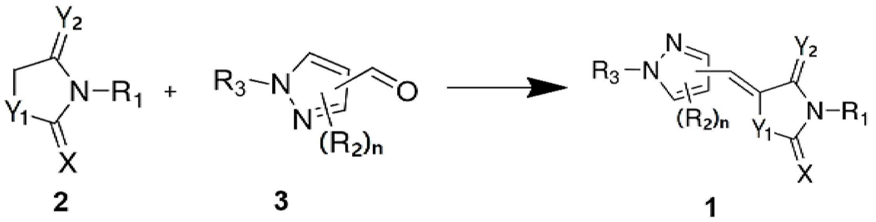
(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온 및

(5Z)-5-[[1-(4-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

하기 반응식에 의해 제조되는 제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법:

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

R_1, R_2, R_3, X, Y_1, Y_2 및 n은 제1항에서 정의한 바와 같다.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 mTOR(mechanistic target of rapamycin) 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 mTOR 경로 관련 뇌 질환은 간질, 알츠하이머, 헌팅턴병, 우울증, 파킨슨병, 결절성 경화증(Tuberous sclerosis), 자폐 스펙트럼 질환(Autism spectrum disorder), 코우덴 증후군(Cowden syndrome), 바나얀-릴리-루발카바 증후군(Bannayan-riley-rulvalcaba syndrome), 레미트-두크로스병(Lhermitte-Duclos disease), 신경섬유종증(Neurofibromatosis), 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis type 1), 자폐증(Autism), 비증후군성 자폐증(Nonsyndromic autism) 및 조현병(Schizophrenia)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 mTOR 저해제로서의 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 mTORC1 저해 활성을 나타내는 화학식 1로 표시되는 신규 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아미노산은 단백질 합성의 원료로 사용될 뿐만 아니라 단백질 대사를 조절하는 영양소로서 작용한다. 세포내에서 사용 가능한 아미노산의 작동은 mTORC1(mechanistic target of rapamycin complex 1)에 의해 매개가 되며, mTORC1은 단백질 합성, 자가소화작용, 세포 성장과 같은 다양한 세포 내 반응을 조절할 뿐만 아니라, 암, 비만, 당뇨 및 신경퇴행 등 다양한 인간 질환과도 밀접하게 관련이 되어 있다(Guertin and Sabatini, 2005; Zoncu et al., 2011; Laplante and Sabatini, 2012; Oddo, 2012).

[0005] FRAP(FKBP12 및 라파마이신 관련 단백질)로도 알려져 있는 mTOR(라파마이신의 포유류 타깃)은 비록 인지질을 인산화하지는 않지만, PIKK(포스포이노시타이드 3-키나제-유사 키나제) 패밀리의 289-kDa 세린/트레오닌 키나제이다.

[0007] 이 단백질은 C-말단 키나제 도메인, FKBP12-라파마이신 결합 도메인, 단백질-단백질 상호작용에 관련된 20 N-말

단 HEAT 반복, FAT(FRAP-ATM-TRRAP) 도메인 및 다른 PIKK에도 존재하는 C-말단 FAT 도메인을 포함하는 수개의 도메인을 포함한다(Wullschleger et al. (2006) Cell, 124, 471-484).

[0009] mTOR 키나제는 세포 성장 및 증식의 중심적인 조절자이며, 세포 대사 및 혈관형성에도 중요한 역할을 한다. mTOR는 PI3K/Akt 축에 의해 활성화되며 차례로 PI3K/Akt 신호 경로의 다운스트림 이펙터, 특히 세포 단백질 번역 기구의 두개의 주 조절자인 리보좀 단백질 S6 키나제(S6K1) 및 진핵 개시 인자 4E 결합 단백질(4E-BP1)을 인산화한다(mTOR 신호 경로는 Zoncu et al. (2011) Nature Rev. Mol. Cell Biol. 12, 21-35에 기재되어 있다).

[0011] 한편, mTORC1은 세포 성장, 단백질 합성, 성장인자의 조절 등과 같은 여러 가지의 upstream 신호를 조절한다. mTORC1에 성장인자와 에너지 신호를 전송하는 결절성경화증복합체(Tuberous Sclerosis Complex, TSC)는 Ras-like small GTPase, Rheb에 대한 GTPase-활성화 단백질(GTPase-activating protein, GAP)이고, Rheb의 GTP 가수분해를 촉진함으로써 mTORC1을 음성조절(negatively regulate)한다.

[0013] Rheb은 후기 엔도좀/라이소좀으로 이동할 수 있으며, 아미노산에 의해 유도되는 mTORC1 활성화에 필요하다. 라이소좀막에서, Rag GTPases와 Ragulator complex(MAPKSP1, ROBLD3 및 c11orf59)는 mTORC1에 대한 아미노산 유도성 도킹 사이트로서 작용한다.

[0015] 포유류는 네 가지의 Rag GTPases (RagA, RagB, RagC, RagD)를 발현한다. Rag GTPases는 필수적으로 RagA/C 또는 RagB/D의 헤테로 다이머를 형성하여 아미노산 유도성 mTORC1 활성화를 매개한다. 아미노산은 mTORC1을 라이소좀으로 이동하도록 유도하며, 라이소좀에서는 GTP가 결합된 RagB를 포함하고 있는 Rag 헤테로 다이머가 mTORC1과 상호작용한다.

[0017] 류신과 글루타민은 각각 Rag GTPase-의존성 및 비의존성 기작에 의해 mTORC1을 활성화 할 수 있다. RagA/B가 결손된 세포에서 글루타민은 ADP ribosylation factor 1(ARF1) GTPase를 통해 mTORC1을 여전히 활성화할 수 있다. 그러므로, mTORC1은 글루타민과 류신에 의해 다르게 조절될 수 있다. 그러나, Rag GTPase-의존성 류신 신호의 기능적 중요성은 잘 알려져 있지 않다.

[0019] 그런데, 이러한 mTOR가 과도하게 활성화되면서 발작, 자폐증, 경도 인지 장애, 피질 결절(cortical tuber), 종양 발생을 특징으로 하는 결절성경화증이 발생하게 된다. 약 90%의 결절성경화증 환자에게서 간질이 발생하게 되는데, 이는 주로 피질 결절(cortical tuber)에 의한 것으로 생각되고 있으나 아직 그 정확한 기전은 알고 있지 못한 상태이다.

[0021] mTOR가 과도한 활성화로 유발된 결절성경화증에 의해서 발생할 수 있는 간질(epilepsy)은 만성적인 신경 장애의 하나로, 뇌신경 세포의 불규칙한 흥분으로 뇌에 전기가 발생해 발작과 경련을 일으키는 질환이다. 간질은 여러 가지 원인에 의해 발생하며, 역학 연구에서는 환자의 1/3 이상이 뇌에 생긴 병리적 변화나 뇌손상의 과거 병력이 있는 것으로 보고되어 있고, 주요한 원인으로는 뇌졸중, 선천기형, 두부외상, 뇌염, 뇌종양, 퇴행성 뇌병증, 유전, 미숙아, 분만 전후의 손상 등을 들 수 있다.

[0023] 간질의 평균 유병률은 0.5~1%로, 만성 신경 질환 중에서 가장 유병률이 높은 질환 중 하나이다. 세계 보건 기구(WHO)의 조사에 의하면, 전 세계적으로 약 5천만 명의 간질 환자가 있으며, 이는 전 세계 질병 부담의 약 1%에 해당한다. 간질의 유병률은 연령에 따라 차이가 있는데, 소아와 고령층에서의 유병률이 높은 것이 특징이다. 최근 수명의 연장으로 인한 고령인구의 증가로 고령층에서의 간질 환자가 증가하고 있으며, 전체적인 간질 환자의 증가가 예상된다. 아직까지 간질의 근본적인 치료 방법은 없으며, 항간질 약물의 투여가 주된 치료법이다. 만성 간질 환자의 약 70%는 항간질 약물로써 조절될 수 있지만, 30% 정도는 항간질 약물 복합요법(polytherapy)에도

간질 발작이 조절되지 않는 약물 내성 간질(pharmacoresistant epilepsy)으로 진행한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 지난 20년간 새로운 종류의 항간질 약물들이 지속적으로 개발되고 시판되었으나, 여전히 약물 내성 간질 환자들의 비율은 줄어들고 있지 않은 실정이다. 향후 고령인구의 증가로 간질 환자들로 인한 사회적 부담이 크게 증가할 것으로 예상된다.

[0025] 한편, 간질 이외에 알츠하이머, 파킨슨병 및 헌팅턴병도 mTOR 경로와 관련이 되어 있다고 보고된 바 있다(Bov'e et al. (2011) Nature Reviews Neuroscience 12, 437-452).

[0026] 아베타(Abeta) 및 타우(tau)의 축적은 직접적으로 알츠하이머 병의 점진적 인식 결함을 야기 혹은 기여하는 것으로 간주되고 있다. mTOR는 이러한 아베타 및 타우 유도 신경퇴화에 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. mTOR 경로는 단백질 항상성 조절 및 이에 따라 신경 기능 조절에 중심 역할을 한다. 실제로, mTOR 신호전달은 서로 다른 형태의 학습 및 기억을 조절한다. 라파마이신은 인식 결함을 치유하며, 자가소화를 증가시킴에 의해 아베타 및 타우 병리학을 완화시킨다. 유사하게, 일부 mTOR 신호전달 성분들은 알츠하이머 병의 임상적 진단에서 인식 손상의 잠재적인 바이오마커일 수 있다. 따라서, 자가소화-리소좀 단백질 퇴화의 조절을 통해, mTOR-연관 제제는 알츠하이머 병의 중요한 치료 제제로 개발될 가능성이 매우 높다.

[0027] 헌팅턴병의 경우 폴리글루타민 영역 팽창에 의해 야기되는 9개의 유전성 신경퇴화 장애의 하나이다. 팽창된 폴리글루타민 단백질은 세포내 응집체에서 비정상적으로 축적된다. mTOR는 세포 모델, 유전자 이식 마우스 및 인간 뇌의 폴리글루타민 응집체에서 격리됨이 밝혀졌다. mTOR의 격리는 이의 키나아제 활성을 손상시키며, 자가소화를 유도하여, 돌연변이 헌팅틴 조각들에 대한 핵심 제거 경로이다. 헌팅턴병에서의 돌연변이 단백질은 신경세포에서 응집되고, 신경 세포 손상 및 독성을 일으킬 수 있다. mTOR 저해제인 라파마이신은 헌팅턴병의 동물 모델에서 헌팅틴 및 세포 사멸의 축적을 감쇠시키고, 신경변성으로부터 보호한다는 보고가 있다(Ravikumar et al., 2004. Nat Genet. 36(6):585-95). 또한, 라파마이신은 헌팅틴 응집물의 청소에서 일정한 역할을 하는 것으로 제안된 자가포식 반응을 유도한다.

[0028] 파킨슨병(PD)은 미스폴딩된(misfolded) 단백질의 축적 및 응집과 관련된 신경변성 질병이다. 응집의 방지 또는 미스폴딩된 단백질의 분해는 PD의 진행을 늦추거나 방지함으로써 치료 이익을 제공할 수 있다. 유비퀴틴 프로테아솜 시스템(UPS)은 응집된 단백질에 작용하는 중요한 분해 메커니즘이다. 라파마이신이 프로테아솜 억제제 락타시스틴(lactacystin)에 의해 유도된 도파민 작용성 신경 세포 사멸에 대한 신경보호를 제공한다는 것이 보고되었다. 라파마이신 효과는 미스폴딩된 단백질의 향상된 분해를 통한 자가포식 향상에 의해 부분적으로 매개된다는 것이 암시되었다(Pan et al., 2008. Neurobiol. Dis. 32(1):16-25). 따라서, 자가포식을 향상시킬 수 있는 mTOR 저해제 화합물은 파킨슨병 환자를 치료하는 유망한 전략일 수 있다.

[0030] 다른 한편, 아미노아실-tRNA-합성효소(ARSs)는 단백질 합성에 필요할 뿐만 아니라 다양한 세포의 생리학적 반응에도 또한 관련되어 있다. ARS는 대응되는 tRNA에 아미노산이 결합하는 것을 촉진한다. 단백질 항상성을 유지하기 위하여, ARS는 아미노산 유용성을 감작시켜야 한다. 류신-tRNA-합성효소(LRS)는 RagD GTPase와 상호작용하고 RagD GTPase에 대한 GAP로써 작용함으로써 mTORC1 활성화를 위한 류신 센서로서 기능한다.

[0032] 따라서, LRS가 류신 센서로서의 기능을 저해하는 물질을 탐색해낸다면, 이 물질은 LRS와 RagD와의 결합을 저해하여 mTORC1의 활성화를 저해하고, 결과적으로 mTOR 저해제에 대한 잠재적 치료 적응증에 효과를 나타낼 것이다.

발명의 내용

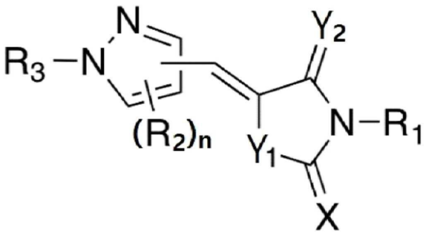
해결하려는 과제

[0034] 이에, 본 발명자들은 mTOR의 활성을 저해하여 mTOR 경로 관련 뇌 질환에 대한 치료효과를 나타낼 수 있는 신규 화합물을 발견하기 위해 예의 노력을 기울인 결과, 본 명세서에서 화학식 1로 표시되는 화합물이 mTOR 활성을 저해하는 효과 및 혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB) 투과성이 매우 우수하여 mTOR 경로와 관련된 뇌 질

환에 치료 효과를 나타낼 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0036] 따라서, 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다:

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 화학식 1에서,

[0040] R_1은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; C_2~C_5 알케닐; C_3~C_{10} 헤테로아릴알킬; 또는 C_1~C_5 히드록시알킬이고,

[0041] R_2는 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬이고,

[0042] R_3은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; C_6~C_{15} 아릴; 또는 C_3~C_{15} 헤테로아릴이고,

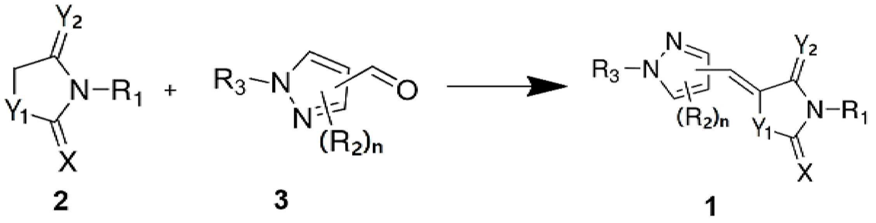
[0043] X는 산소; 황; 또는 질소이고,

[0044] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 산소 또는 황이고,

[0045] n은 0, 1 또는 2이다.

[0047] 본 발명의 다른 목적은 하기 반응식에 의해 제조되는 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법을 제공하는 것이다:

[0048] [반응식 1]



[0049]

[0050] 상기 반응식 1에서,

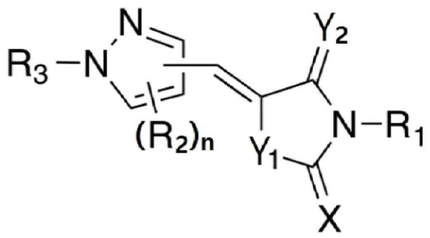
[0051] R_1, R_2, R_3, X, Y_1, Y_2 및 n은 상기 정의한 바와 같다.

[0053] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0055] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[0056] [화학식 1]

[0057] 

[0058] 상기 화학식 1에서,

[0059] R_1은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; C_2~C_5 알케닐; C_3~C_{10} 헤테로아릴알킬; 또는 C_1~C_5 히드록시알킬이고,

[0060] R_2는 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬이고,

[0061] R_3은 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; C_6~C_{15} 아릴; 또는 C_3~C_{15} 헤테로아릴이고,

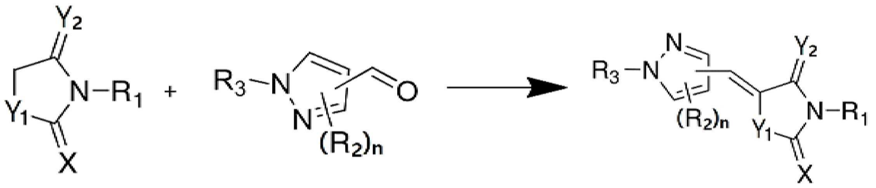
[0062] X는 산소; 황; 또는 질소이고,

[0063] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 산소 또는 황이고,

[0064] n은 0, 1 또는 2이다.

[0066] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 반응식에 의해 제조되는 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법을 제공한다:

[0067] [반응식 1]

[0068] 

2 3 1

[0069] 상기 반응식 1에서,

[0070] R_1, R_2, R_3, X, Y_1, Y_2 및 n은 상기 정의한 바와 같다.

[0072] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0074] 이하, 본 발명에 대해 보다 상세히 설명한다.

[0076] 본 발명에서 상기 "알킬"은 쇄 내에 1개 내지 5개의 탄소 원자를 포함하는, 직선형 또는 분지형일 수 있는 지방족 탄화수소 그룹을 의미한다. 바람직한 알킬 그룹은 상기 쇄 내에 1개 내지 3개의 탄소 원자를 포함한다. 보다 바람직한 알킬 그룹은 상기 쇄 내에 약 1개, 2개 또는 3개의 탄소 원자를 포함한다. 분지형은 하나 이상의 저급 알킬 그룹, 예를 들면, 메틸, 에틸 또는 프로필이 선형 알킬 쇄에 부착되어 있는 것을 의미한다. "저급알킬"은 직선형 또는 분지형일 수 있는 쇄 내에 1개 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 그룹을 의미한다. "알킬"은 치환되지 않을 수 있거나 또는, 동일하거나 또는 상이할 수 있는 하나 이상의 치환체에 의해 임의로 치환될 수 있다.

[0078] 본 발명에서 상기 “알케닐”은 쇄 내에 2 내지 5개의 탄소 원자 및 1개 이상의 이중 결합을 갖는 1가의 직선형 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 나타내며, 그의 예로는 에테닐, 프로페닐, 1-부트-3-에닐, 1-펜트-3-에닐, 1-헥스-5-에닐 등이 있으나 이에 한정되지 않고, 여기서 알케닐 라디칼은 독립적으로 본 발명에 기재된 치환기들 중 하나 이상의 기에 의해 임의로 치환될 수 있고, 이는 "시스" 및 "트랜스" 배향, 또는 다르게는 "E" 및 "Z" 배향을 갖는 라디칼을 포함한다. "알케닐"은 치환되지 않을 수 있거나 또는, 동일하거나 또는 상이할 수 있는 하나 이상의 치환체에 의해 임의로 치환될 수 있다.

[0080] 본 발명에서 상기 "아릴"은 단일 고리(예를 들어, 페닐), 다중 고리 (예를 들어, 비페닐) 또는 다중 축합된 고리(이 중 하나 이상이 방향족임; 예를 들어, 1,2,3,4-테트라히드로나프틸, 나프틸)를 갖는 1가의 방향족 카르보시클릭 라디칼을 나타내며, 이는 임의의 치환기로 일치환, 이치환 또는 삼치환될 수 있다.

[0082] 본 발명에서 상기 "헤테로아릴"은 질소, 산소 또는 황으로부터 선택된 1개 내지 4개의 헤테로원자를 함유하고 5 내지 15개의 원자를 갖는 융합된 고리계(이 중 하나 이상이 방향족임)를 포함하는 5-원, 6-원 또는 7-원 고리를 갖는 1가의 방향족 라디칼을 나타낸다. 헤테로아릴기의 예로는 피리디닐, 이미다졸릴, 피리미디닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 피라지닐, 테트라졸릴, 푸릴, 티에닐, 이속사졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이소티아졸릴, 피롤릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 인돌릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조푸라닐, 신놀리닐, 인다졸릴, 인돌리지닐, 프탈라지닐, 피리다지닐, 트리아지닐, 이소인돌릴, 프테리디닐, 퓨리닐, 옥사디아졸릴, 트리아졸릴, 티아디아졸릴, 티아디아졸릴, 푸라자닐, 벤조푸라자닐, 벤조티오페닐, 벤조티아졸릴, 벤족사졸릴, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 나프티리디닐 및 푸로피리디닐이 있다. 스피로 잔기도 상기 정의의 범위에 포함된다. 헤테로아릴기는 임의의 치환기로 일치환, 이치환 또는 삼치환될 수 있다.

[0084] 본 발명에서 상기 “헤테로아릴알킬”은 헤테로아릴 잔기(상기 정의된 바와 같음)로 치환된 알킬 잔기(상기 정의된 바와 같음)를 의미한다. 보다 바람직한 헤테로아릴알킬 라디칼은 5-원 또는 6-원 헤테로아릴-C_{1-3}-알킬일 수 있다. 헤테로아릴알킬은 임의의 치환기로 일치환, 이치환 또는 삼치환될 수 있다.

[0086] 본 발명에서 상기 “히드록시알킬"은 하나 또는 두 개의 히드록시기로 치환되며 1 내지 5개의 탄소원자를 포함하는 직선형 또는 분지형의 일가 탄화수소 라디칼을 의미하며, 예를들어, 이로 한정되는 것은 아니지만, 히드록시메틸, 2-히드록시에틸, 2-히드록시프로필, 3-히드록시프로필, 1-(히드록시메틸)-2-메틸프로필, 2-히드록시부틸, 3-히드록시부틸, 4-히드록시부틸, 2,3-디히드록시프로필, 1-(히드록시메틸)-2-히드록시에틸, 2,3-디히드록시부틸, 3,4-디히드록시부틸, 2-(히드록시메틸)-3-히드록시프로필 등 일 수 있다.

[0088] 본 발명에서 상기 "할로겐"은 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자 또는 요오드 원자를 의미한다.

[0090] 본 발명에 개시된 기들이 “치환”이라고 표현될 때, 이 기들은 임의의 적당한 치환기 또는 치환기들로 치환될 수 있는 것이다. 치환기의 예시적인 예로서는 본 발명에에 개시된 예시적인 화합물과 구체예에서 살펴볼 수 있는 것들, 그리고 할로겐(클로로, 요도, 브로모 또는 플루오로 기), 알킬, 하이드록실, 알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 알킬아미노, 카복시, 니트로, 아노, 티올, 티오에테르, 이민, 이미드, 아미딘, 구아니딘, 에나민, 아미노카보닐, 아실아미노, 포스포네이토, 포스핀, 티오카보닐, 설포닐, 설폰, 설폰아미드, 케톤, 알데히드, 에스테르, 우레아, 우레탄, 옥심, 하이드록실 아민, 알콕시아민, 아랄콕시아민, N-옥시드, 히드라진, 히드라지드, 히드라존, 아지드, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 시아네이트, 티오시아네이트 등을 들 수 있다.

[0092] 본 발명의 상기 화학식 1에서 상기 R_1은 바람직하게는 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 알킬; C_2~C_3 알케닐; C_3~C_6 헤테로아릴알킬; 또는 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 히드록시알킬일 수 있으며, 더 바람

직하게는 수소; 치환 또는 비치환의 C_1~C_2 직선형 알킬; C_2~C_3 알케닐; C_3~C_5 헤테로아릴알킬; 또는 C_1~C_2 직선형 히드록시알킬일 수 있으며, 가장 바람직하게는 수소, 메틸, 에틸, 에테닐, 프로페닐, 퓨릴메틸 및 히드록시에틸로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0094] 본 발명의 상기 화학식 1에서 상기 R_2은 바람직하게는 수소; 또는 치환 또는 비치환의 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 알킬일 수 있으며, 더 바람직하게는 치환 또는 비치환의 C_1~C_2 알킬일 수 있으며, 가장 바람직하게는 수소, 메틸 및 에틸로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0096] 본 발명의 상기 화학식 1에서 상기 R_3은 바람직하게는 치환 또는 비치환의 C_1~C_3 직선형 또는 분지형 알킬; C_6~C_{10} 아릴; 또는 C_3~C_{10} 헤테로아릴일 수 있으며, 더 바람직하게는 치환 또는 비치환의 C_1~C_2 알킬; C_6~C_{10} 아릴; 또는 C_3~C_5 헤테로아릴일 수 있으며, 가장 바람직하게는 치환 또는 비치환의 메틸, 페닐, 나프틸 및 피리딜로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0098] 본 발명의 상기 화학식 1에서 상기 R_3가 치환되는 경우 그 치환기는 바람직하게는 할로겐; C_1~C_5 직선형 또는 분지형 알킬; 및 C_1~C_5 알콕시로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 더 바람직하게는 할로겐; C_1~C_4 직선형 또는 분지형 알킬; 및 C_1~C_3 알콕시로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 염소, 불소, 메틸, 부틸, 아이소프로필 및 메톡시로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0100] 본 발명의 상기 화학식 1에서, 바람직하게는 상기 Y_1 은 황이고, Y_2는 산소일 수 있다.

[0102] 본 발명에서 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화합물들 중에서 선택될 수 있다:

[0103] (5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0104] (5Z)-3-(2-퓨릴메틸)-5-[(1-메틸피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0105] (5Z)-3-메틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0106] (5Z)-3-에틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0107] (5Z)-3-알릴-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0108] (5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0109] (5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0110] (5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0111] (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0112] (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0113] (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0114] (5Z)-3-알릴-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0115] (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0116] (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0117] (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0118] (5Z)-3-알릴-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0119] (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0120] (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0121] (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0122] (5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0123] (5Z)-3-메틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0124] (5Z)-3-에틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0125] (5Z)-3-알릴-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0126] (5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0127] (5Z)-3-에틸-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0128] (5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0129] (5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0130] (5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0131] (5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0132] (5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0133] (5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0134] (5Z)-3-에틸-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0135] (5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0136] (5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0137] (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0138] (5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0139] (5Z)-5-[(5-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0140] (5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0141] (5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0142] (5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0143] (5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0144] (5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0145] (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0146] (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0147] (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0148] (5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0149] (5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0150] (5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0151] (5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0152] (5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0153] (5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0154] (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0155] (5Z)-5-[(3-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0156] (5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0157] (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0158] (5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0159] (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

[0160] (5Z)-5-[[1-페닐피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0161] (5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

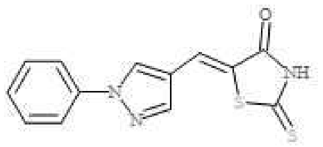
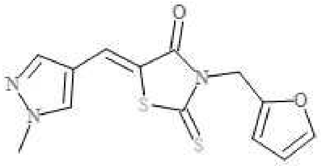
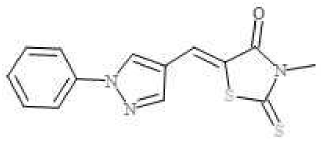
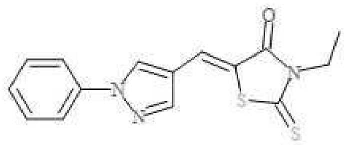
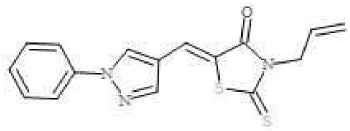
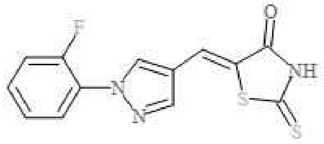
[0162] (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온 및

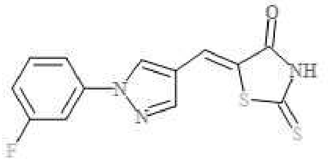
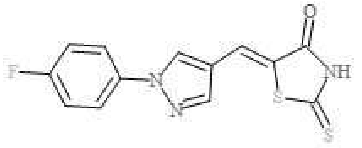
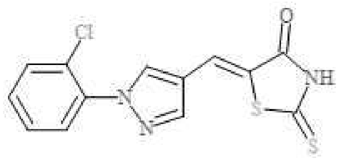
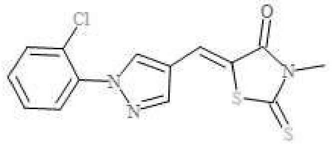
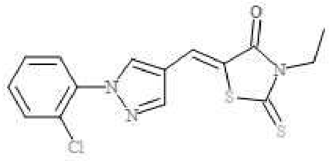
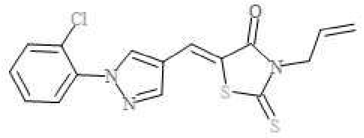
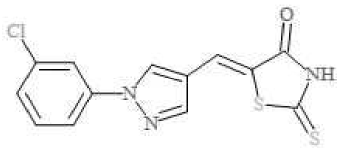
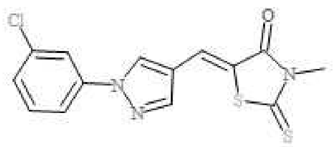
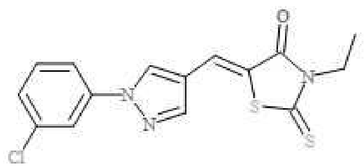
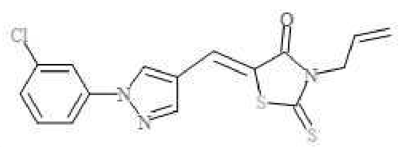
[0163] (5Z)-5-[[1-(4-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

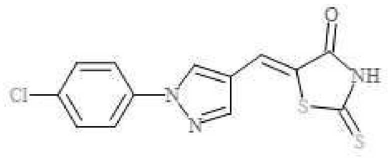
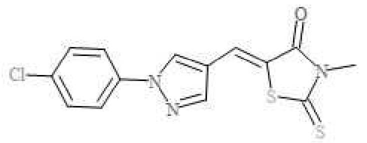
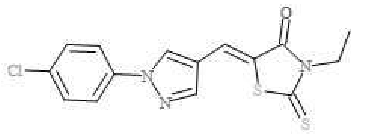
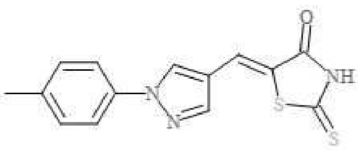
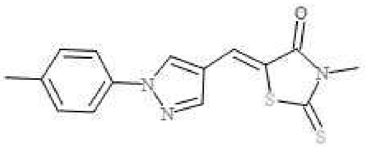
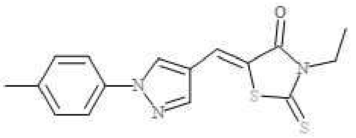
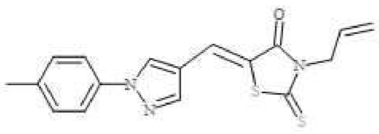
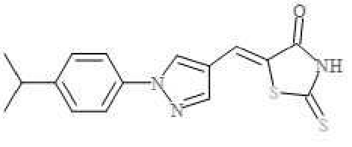
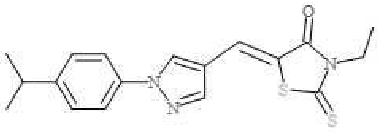
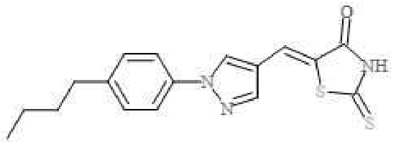
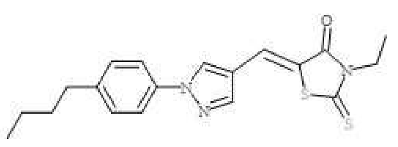
[0165] 상기 나열한 화합물의 구조식을 하기 표 1에 정리하여 나타내었다:

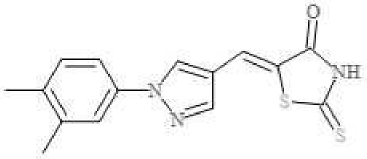
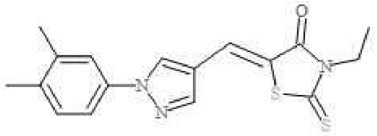
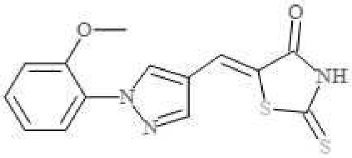
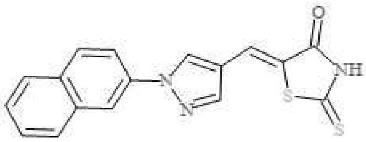
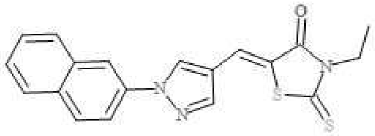
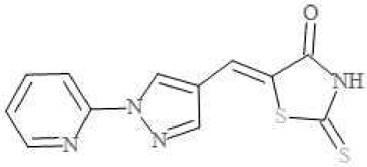
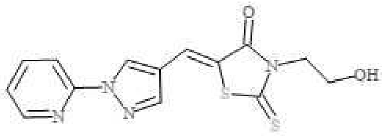
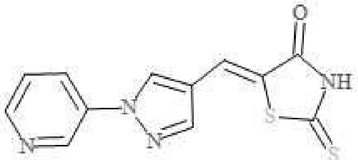
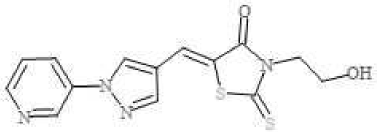
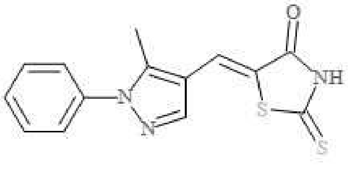
표 1

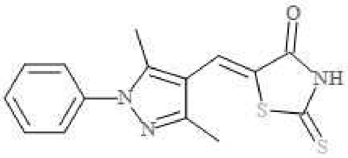
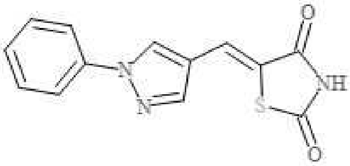
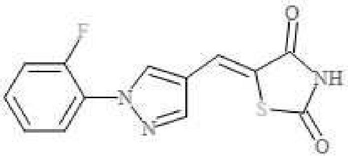
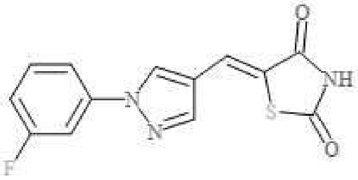
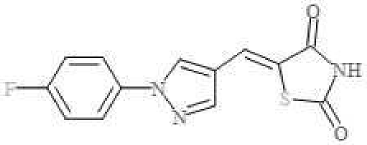
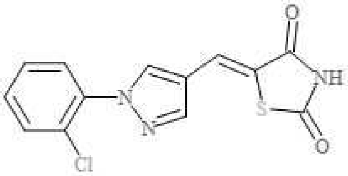
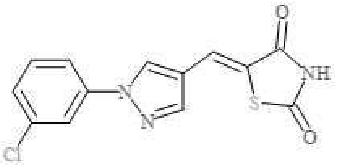
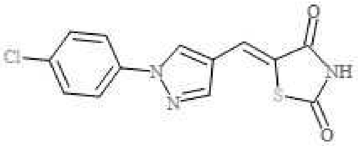
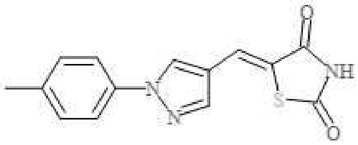
[0167]

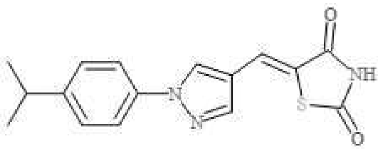
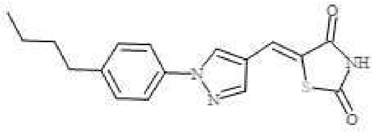
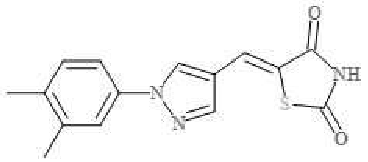
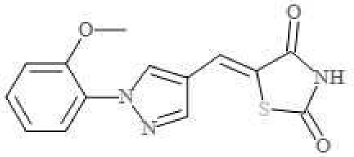
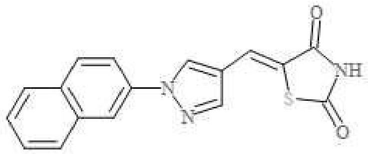
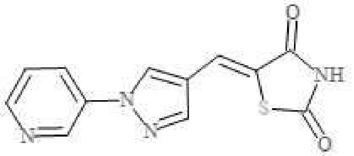
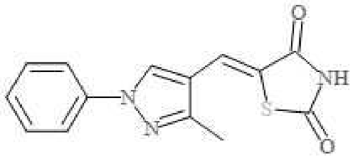
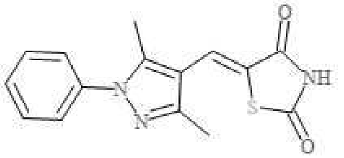
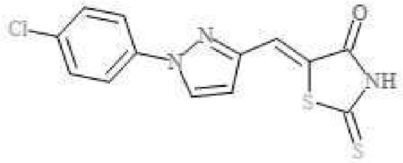
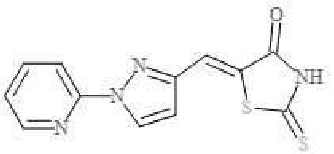
1		(5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
2		(5Z)-3-(2-퓨릴메틸)-5-[(1-메틸피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
3		(5Z)-3-메틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
4		(5Z)-3-에틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
5		(5Z)-3-알릴-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
6		(5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

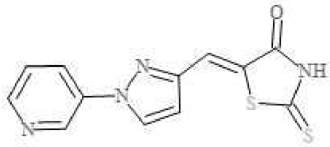
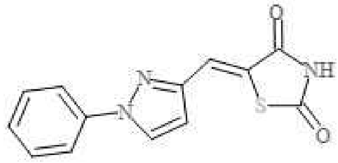
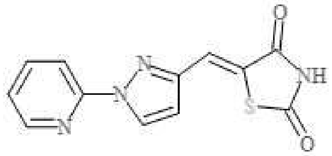
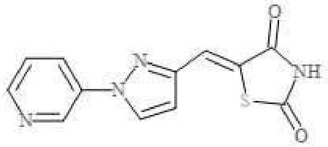
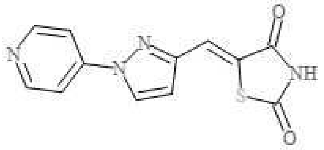
7		(5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
8		(5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
9		(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
10		(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
11		(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
12		(5Z)-3-알릴-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
13		(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
14		(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
15		(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
16		(5Z)-3-알릴-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

17		(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
18		(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
19		(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
20		(5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
21		(5Z)-3-메틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
22		(5Z)-3-에틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
23		(5Z)-3-알릴-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
24		(5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
25		(5Z)-3-에틸-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
26		(5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
27		(5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

28		(5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
29		(5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
30		(5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
31		(5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
32		(5Z)-3-에틸-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
33		(5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
34		(5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
35		(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
36		(5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
37		(5Z)-5-[(5-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

38		(5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
39		(5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
40		(5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
41		(5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
42		(5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
43		(5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
44		(5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
45		(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
46		(5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

47		(5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
48		(5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
49		(5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
50		(5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
51		(5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
52		(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
53		(5Z)-5-[(3-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
54		(5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
55		(5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
56		(5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온

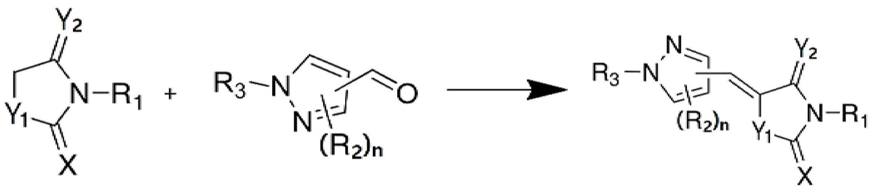
57		(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온
58		(5Z)-5-[[1-페닐피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
59		(5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
60		(5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온
61		(5Z)-5-[[1-(4-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온

[0168] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로나 생리학적으로 허용되는 다양한 유기산 또는 무기산에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 적합한 유기산으로는, 예를 들면 카르복실산, 포스폰산, 술폰산, 아세트산, 프로피온산, 옥탄산, 데칸산, 글리콜산, 락트산, 푸마르산, 숙신산, 아디프산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 글루탐산, 아스파르트산, 말레산, 벤조산, 살리실산, 프탈산, 페닐아세트산, 벤젠술폰산, 2-나프탈렌술폰산, 메틸황산, 에틸황산, 도데실황산 등을 사용할 수 있고, 적합한 무기산으로는, 예를 들면 염산, 황산 또는 인산 등을 사용할 수 있다.

[0170] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물, 라세미체, 또는 입체 이성질체를 모두 포함할 수 있다.

[0172] 본 발명은 또한 하기 반응식에 의해 제조되는 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법을 제공한다:

[0173] [반응식 1]



2 3 1

[0174]

[0175] 상기 반응식 1에서,

[0176] R_1, R_2, R_3, X, Y_1, Y_2 및 n은 상기에서 정의한 바와 같다.

[0178] 본 발명의 제조방법에서, 상기 반응은 화합물 2 및 화합물 3을 루이스(Lewis) 또는 광산 촉매의 존재하에 용매 존재 또는 부재하에서 혼합, 가열하는 것으로 수행될 수 있다. 유용한 촉매의 예를 들자면 HCl, HBr, H_2SO_4, 아세트산, 트리플루우오로산, p-톨루엔설폰산, 트리메틸실릴클로라이드, 트리메틸실릴요오다이드, 삼불화붕소 에테레이트, 염화구리(I), 염화제2철, 염화인듐(III), 이테르븀 트리플레이트, 염화세륨(III), 염화지르코늄(IV), 옥시염화지르코늄(IV), 브롬화리튬, 페닐피루브산, 염화칼슘, 폴리포스페이트 에스테르, 또는 고체 클레이 산 촉매, 예컨대 몬모릴로나이트 KSF 클레이 또는 이들 촉매의 조합물이 있다.

[0180] 유용한 용매는 바람직하게는 극성 용매, 예컨대 아세토니트릴, 아세트산, 메탄올, 에탄올, 또는 기타 알콜, 테트라하이드로푸란, 디메틸포름아미드, 디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 또는 디옥산을 포함할 수 있다.

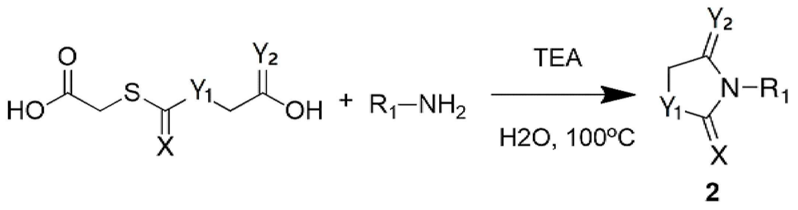
[0182] 가열은 통상적인 가열 조건 또는 마이크로웨이브 조건하에서 행해질 수 있다.

[0184] 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 제조방법은 상기 화합물 2와 화합물 3을 통상적인 축합반응에 적용함으로써 상기 화학식 1의 화합물을 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물 2와 화합물 3을 유기용매 하에서 아세트산 소듐을 첨가한 후 50~80℃ 10~20시간 교반하는 크노에베나겔(knoevenagel) 축합반응에 의해 상기 화학식 1의 화합물을 제조할 수 있다.

[0186] 상기 반응식 1에 따라 제조된 생성물은 세척, 농축, 에틸 아세테이트 추출, 건조, 컬럼 크로마토 그래피 등의 추가 단계를 통하여 정제할 수 있으며, IR, NMR, 녹는점(mp) 측정 등을 통하여 구조 및 물리화학적 특성을 분석할 수 있다.

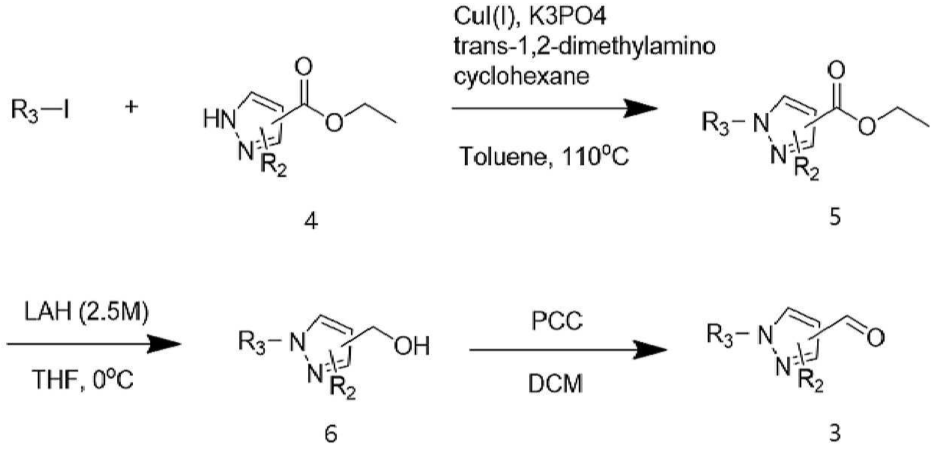
[0188] 한편, 상기 반응식 1에서 화합물 2 및 화합물 3은 각각 상업적으로 구매 가능한 화합물을 이용할 수도 있으며, 또는 예를 들어 상기 화합물 2는 하기 반응식 2에 따라, 상기 화합물 3은 하기 반응식 3에 따라 합성하여 이용할 수도 있다:

[0190] [반응식 2]



[0191]

[0192] [반응식 3]



[0193]

[0195] 상기 반응식 2 및 3에서,

[0196] R_1, R_2, R_3, X, Y_1, Y_2 및 n은 상기에서 정의한 바와 같다.

[0198] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 LRS와 RagD의 결합을 저해함으로써, mTORC1의 활성을 억제하는 효과가 매우 우수한 것으로 확인이 되었다.

[0200] mTOR는 다양한 생리학적 및 병리학적 신호전달체계에 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 간질 발생(epileptogenesis) 과정에 매우 밀접하게 관련이 있어 간질 치료를 위한 중요한 타겟이 될 수 있음이 보고된 바 있다(Pharmacological Reports, vol 67, issue 3, 636-646).

[0202] LRS(leucyl tRNA synthetase)는 mTORC1로의 아미노산 신호전달의 핵심매개체로 기능한다. 즉, LRS가 아미노산 의존적으로, mTORC1으로의 신호전달 매개체인 Rag GTPase에 직접적으로 결합하고, Rag GTPase에 대한 GTPase-activating protein(GAP)의 역할을 하여 Rag GTPase가 mTORC1을 활성화한다. 또한, 류실-tRNA 합성효소(leucyl tRNA synthetase, LRS)가 아미노산으로부터 유도되는 mTORC1의 활성화에 있어 중요한 역할을 수행하여, LRS가 세포내의 류신 농도를 감지하고 류신에서 유도되는 mTORC1의 활성화에 영향을 미친다. Rag 단백질은 Ras small GTPase 중 Rag subfamily 에 속하고 RagA, RagB, RagC, RagD의 네 가지 종류가 존재한다. 이중 A와 B는 이스트의 Gtr1p GTPase의 오솔로그 (ortholog)이고 C와 D는 이스트의 Gtr2p 의 오솔로그이다. RagD는 A 혹은 B와 함께 결합하여 이합체 (dimer)를 이루며 아미노산에 의한 mTORC1 활성을 매개한다. (Trends in Biochemical Sciences, 33: 565-568, 2008). 따라서, LRS와 RagD 간의 결합을 저해하면 mTORC1의 활성화가 저해되어 mTOR 경로와 관련된 뇌 질환을 치료하는 효과가 나타날 수 있다.

[0204] 다른 한편, 자가소화, 또는 세포 내 자기-소화는 단백질 및 세포소기관 분해와 연관된 세포 경로이며, 인간 질병 및 생리학과 놀라운 다수의 연관성을 갖는다. 예를 들면, 자가소화 오작용은 암, 신경퇴화, 미생물 전염 및 노화와 연관된다. 역설적으로, 자가소화가 세포에 대한 주요 보호 과정이나, 이는 또한 암세포에서 세포 사멸에 역할을 할 수도 있다.

[0206] 그런데, mTOR는 자가소화의 주요 음성 조절 축이다. mTOR의 직접적 억제제 및 mTOR를 활성화하는 경로의 억제제는 이어서 자가소화를 유도할 수 있다. mTOR 키나아제는 성장 인자 및 영양소 레벨에 반응하여 세포 성장 및 자가소화를 조절한다. 결과적으로 이러한 자가소화는 세포를 신경퇴화를 유도하는 손상으로부터 보호한다. 세포소기관 및 오래 생존한 단백질에 대한 주요 분해 경로인 자가소화는 뉴런의 생존을 위해 필수적이다. 종래 보고

에 따르면, 특히 알츠하이머, 헌팅턴병, 파킨슨병과 같은 일부 주요 신경퇴화 질병의 원인으로서 자가소화 결함이 제시되고 있다. 이러한 연구들에서의 발견들은 질병의 초기 단계에서 자가소화가 변형되며, 자가소화의 오기능이 알츠하이머, 헌팅턴병, 파킨슨병 등의 신경 퇴화성 뇌 질환의 병리학적 진행에 중요한 역할을 하는 것을 나타내 주고 있다.

[0208] 또한, mTOR 경로는 우울증의 발생과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. mTOR 신호전달의 감소가 우울증 동물모델을 이용한 연구에서 확인되었다. 특히 우울증 환자에게서 생기는 신경생화학적 변화와 유사한 변화를 유발시키는 스트레스 모델인 장기간 예측 불가능한 스트레스(chronic unpredictable stress, CUS) 모델을 이용한 연구에서 mTOR의 신호전달의 변화가 관찰되었다. 장기간의 CUS는 설치류에게서 우울증 환자의 증상인 쾌감상실와 유사한 손상된 보상 현저성(impairedreward salience)을 일으키는 것으로 알려져 있다. CUS에 노출된 설치류에서 관찰되는 우울행동은 전전전두엽, 해마 그리고 편도체(amygdala)에서 인산화된 mTOR의 감소와 mTOR 신호전달의 하위 요소인 p70S6K의 인산화 정도의 감소와 연관이 있는 것으로 알려졌다. 그리고 mTOR 유전자를 제거한 생쥐에게서는 CUS에 의해서 발생한 우울행동과 거의 유사한 행동이 관찰이 된 바 있다(Neurosci Biobehav Rev 2012;36:2085-2117, J Psychiatry Neurosci 2013;38:306-316., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2013;40:240-245.)

[0210] 즉, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴병, 우울증 등의 신경 퇴화성 뇌 질환들의 병리기전도 mTOR 경로와 관련이 되어 있으며(Bov'e et al. (2011) Nature Reviews Neuroscience 12, 437-452), mTOR 저해제가 이들 뇌 질환에 대한 치료 타켓이 될 수 있다.

[0212] 이외에도, mTOR 신호전달체계의 기능이상과 관련된 뇌 질환으로 결절성 경화증(Tuberous sclerosis), 자폐 스펙트럼 질환(Autism spectrum disorder), 코우덴 증후군(Cowden syndrome), 바나얀-릴리-루발카바 증후군(Bannayan-riley-rulvalcaba syndrome), 레미트-두크로스병(Lhermitte-Duclos disease), 신경섬유종증(Neurofibromatosis), 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis type 1), 자폐증(Autism), 비증후군성 자폐증(Nonsyndromic autism), 조현병(Schizophrenia) 등이 보고된 바 있다(Neuron 84, October 22, 2014)

[0214] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0216] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 상기 화합물은 LRS와 RagD와의 결합을 저해하여 mTOR의 활성을 억제하는 효과 이외에도, 혈액-뇌 장벽(BBB) 투과성이 매우 높은 것으로 나타나 뇌에 직접적으로 작용하여 뇌 질환 치료에 우수한 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0218] 본 발명에서 상기 mTOR 경로 관련 뇌 질환은 바람직하게는 mTOR 복합체 1(mTORC1) 경로와 관련된 뇌 질환일 수 있으며, 더 바람직하게는 간질, 알츠하이머, 파킨슨병, 우울증, 헌팅턴병, 결절성 경화증(Tuberous sclerosis), 자폐 스펙트럼 질환(Autism spectrum disorder), 코우덴 증후군(Cowden syndrome), 바나얀-릴리-루발카바 증후군(Bannayan-riley-rulvalcaba syndrome), 레미트-두크로스병(Lhermitte-Duclos disease), 신경섬유종증(Neurofibromatosis), 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis type 1), 자폐증(Autism), 비증후군성 자폐증(Nonsyndromic autism) 및 조현병(Schizophrenia)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 간질일 수 있다.

[0220] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다.

[0222] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0224] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다. 예컨대, 본 발명의 약학적 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30 게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하는 방법, 또는 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다.

[0226] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

[0228] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0230] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0232] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물의 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01ug 내지 1,000mg, 가장 바람직하게는 0.1ug 내지 100mg일 수 있다. 그러나 상기 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 약학적 조성물을 퇴행성 신경질환 치료제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0234] 본 발명에서 상기 '치료'는 mTOR 경로 관련 뇌 질환의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 바람직하게는 간질, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴병 등을 치유하거나, 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시

키는 것을 포함할 수 있으며, 이들 뇌 질환으로부터 비롯된 한 가지 증상 또는 대부분의 증상을 완화시키거나, 치유하거나 예방하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0236] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 mTORC1을 저해하는 효과 및 혈액-뇌 장벽 투과성이 매우 뛰어나 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료에 매우 유용하게 활용이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0238] 도 1은 mTOR C1483Y 돌연변이를 보유하는 NIH3T3 세포에 실시예 1-1의 화합물 또는 이의 염을 처리한 후 S6K의 인산화 여부를 면역블로팅으로 확인한 결과(A) 및 이를 정량화하여 나타낸 그래프(B)이다(Leu: 류신).

도 2는 SW620 세포에 실시예 1-1의 화합물 또는 이의 염을 처리한 후 RagD의 GTP 가수분해 여부를 면역블로팅을 통해 확인한 결과이다(Leu: 류신)

도 3은 SW620 세포에 실시예 1-1의 화합물 또는 이의 염을 처리한 후 LRS와 RagD의 상호작용이 저해되는지를 면역침전법을 통해 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 화합물들의 혈액-뇌 장벽(BBB) 투과성을 in vitro Pion BBB-PAMPA assay kit를 이용하여 분석한 결과이다.

도 5는 7주령 C57BL/6 수컷 마우스에 실시예 1-1 화합물의 염(100mg/kg) 또는 라파마이신(Rapa, 2mg/kg)을 복강투여한 후 뇌의 신피질(Neocortex) 및 해마(hippocampus)에서 S6K의 인산화 여부 및 단백질의 발현을 면역블로팅을 통해 확인한 결과이다.

도 6은 7주령 C57BL/6 수컷 마우스에 실시예 1-1 화합물의 염을 다양한 농도로 복강투여한 후 뇌의 신피질(Neocortex) 및 해마(hippocampus)에서 S6K의 인산화 여부 및 단백질의 발현을 면역블로팅을 통해 확인한 결과이다.

도 7은 실시예 1-1 화합물의 염(0, 5, 10 또는 20mg/kg)을 7일간 매일 복강투여한 알츠하이머 동물모델 마우스의 해마에서 아밀로이드 β 플라그의 생성 정도를 ThS-염색을 통해 확인한 결과이다.

도 8은 실시예 1-1 화합물의 염(0, 5, 10 또는 20mg/kg)을 7일간 매일 복강투여한 알츠하이머 동물모델 마우스의 뇌 전체에서 ThS-양성인 아밀로이드 플라그를 정량화하여 나타낸 결과이다.

도 9는 TSC2 CKO 간질 동물모델 마우스에 라파마이신(3mg/kg) 또는 실시예 1-1 화합물의 염(10mg/kg)을 4주간 매일 복강투여한 후, mTORC1의 활성화(p-S6K (T389)의 발현으로 표현), mTORC2의 활성화 (p-AKT (S473)의 발현으로 표현) 및 자가포식 마커(LC3 II 증가 또는 p62 절단)의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0239] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0240] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0242] <실시예 1>

[0243] <u>화합물의 제조</u>

[0245] <실시예 1-0> 반응 출발물질의 제조

[0246] 이하 실시예 제조에 사용될 반응 출발물질을 상기 반응식 2 및 반응식 3에 따라 제조하였다.

[0247] 구체적으로, N-치환된 로다닌을 제조하기 위하여 2,2'-[싸이오카보닐비스(설페인다일)]다이아세틱애시드(1eq)와 물 현탁액에 치환기를 포함한 아민(1eq)와 트리에틸아민(1eq)를 가한 후 100℃에서 20시간동안 교반하였다. 반

응 종료 후, 반응 혼합물을 감압 농축한 후 얻어진 농축물을 컬럼 크로마토그래피 (용리액 : 초산에틸/헥산 1:1 부피비 혼합액) 방법으로 정제하여 상기 화학식 1의 화합물 2를 얻었다(2-30%).

[0249] 또한, N-치환된-피라졸-3-카바알데히드를 제조하기 위하여 톨루엔 용액에 1H-피라졸-3-카복실레이트 에틸 에스터와 다양한 치환기(R_3)를 가진 아이오도 유도체 (1.05eq) 및 요오드화구리(I) (cat.), 인산포타슘(2.5eq) 및 트랜스-1,2-다이메틸아미노싸이클로헥산(0.2eq)를 가한 후 110℃, 2시간 조건하에 마이크로웨이브 반응기를 통해 반응을 진행하여 상기 반응식 3의 화합물 5를 제조하였다. 상기 화합물 5를 둥근 바닥 플라스크를 아르곤 치환한 후 무수 테트라하이드로퓨란을 가한 뒤, 해당 용액을 0℃로 냉각하였다. 반응 용액에 리튬 알루미늄 하이드라이드(테트라하이드로푸란 2.5M 용액, 1.5eq)를 천천히 가한 후 0℃에서 한 시간동안 교반하였다. 반응 종료 후 디에틸에테르, 증류수 및 15%(wt%) 수산화소듐 수용액을 가하여 반응을 종결시킨 뒤 생성된 현탁액을 여과하여 여과액을 감압 농축시켜 상기 반응식 3의 화합물 6을 합성하였고 추가적인 정제과정 없이 다음 반응에 이용하였다. 상기 화합물 6은 디클로로메탄 용액 하에서 피리디늄 클로로크로메이트(3eq)를 가한 뒤, 상온에서 2시간동안 교반하였다. 반응 종료 후 반응 현탁액에 다량의 디에틸에테르를 가한 뒤 여과시켰다. 얻어진 여과액을 감압 농축시킨 후 농축물을 컬럼 크로마토그래피(용리액 : 초산에틸/헥산 1:1 부피비 혼합액) 방법을 통해 정제하여 상기 반응식 1의 화합물 3을 얻었다.

[0251] **<실시예 1-1> (5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0252] 둥근바닥 플라스크에 에탄올 용액에 1H-1-페닐미라졸-4-카복사알데히드(1 eq)와 로다닌(1.2eq) 및 아세트산소듐(1.2eq) 을 가한 후, 60℃에서 15 시간동안 교반하였다. 반응이 종결되면, 반응 현탁액을 상온으로 냉각시킨 후 반응 과정에서 생성된 침전을 여과시킨 후, 다량의 물과 에탄올 및 디에틸에테르로 세척하여 목적하는 화합물을 89%의 수율로 수득하였다.

[0253] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.75 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.54 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.40 - 7.36 (m, 2H).

[0255] **<실시예 1-1 칼륨염> (5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 칼륨염 제조**

[0256] 상기 실시예 1-1 화합물(1eq)과 수산화칼륨(1.1eq)를 각각 메탄올 용액에 첨가하고, 60℃에서 30분간 교반을 하여 완전히 녹였다. 상기 혼합물을 다시 1시간 동안 60℃에서 교반하고, 반응 종결 후 상온으로 식혔다. 반응 생성물은 여과를 통해 얻었으며 적당량의 메탄올로 세척하여 실시예 1-1 화합물의 칼륨염(실시예 1-1K)을 수득하였다.

[0258] **<실시예 1-2> (5Z)-3-(2-퓨릴메틸)-5-[(1-메틸피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0259] 반응식 1로부터 합성한 3-(퓨란-2-일메틸)-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-메틸-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0260] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.28 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, J = 1.0 Hz), 6.40 (s, 2H), 5.20 (s, 2H),3.92 (s, 3H); ESI (m/z) 306 (MH+).

[0262] **<실시예 1-3> (5Z)-3-메틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0263] 3-메틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0264] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 8.14 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.73 (d, 3H, J = 8.0 Hz), 7.52 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.39 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 3.53 (s, 3H).

[0266] <실시예 1-4> (5Z)-3-에틸-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0267] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0268] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.91 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.94 - 7.91 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.58 - 7.56 (m, 2H), 7.44 - 7.39 (m, 1H), 4.07 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz).

[0270] <실시예 1-5> (5Z)-3-알릴-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0271] 3-알릴-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0272] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 8.13 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.74 - 7.70 (m, 3H), 7.51 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.41 - 7.37 (m, 1H), 5.91 - 5.83 (m, 1H), 5.33 - 5.25 (m, 2H), 4.75 (d, 2H, J = 5.6 Hz).

[0274] <실시예 1-6> (5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0275] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(2-플루오로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0276] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.73 (s, 1H), 8.69 - 8.68 (m, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.86 - 7.82 (m, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.56 - 7.47 (m, 2H), 7.44 - 7.39 (m, 1H).

[0278] <실시예 1-7> (5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0279] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3-플루오로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0280] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.73 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.87 - 7.79 (m, 2H), 7.62 - 7.56 (m, 2H), 7.27 - 7.22 (m, 1H).

[0282] <실시예 1-8> (5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0283] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-플루오로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0284] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.67 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.93-7.90 (m, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.36 (t, 2H, J = 8.8 Hz); ESI (m/z) 306 (MH+).

[0286] <실시예 1-9> (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0287] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(2-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0288] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 13.70 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.76 - 7.64 (m, 3H), 7.60 - 7.53 (m, 2H).

[0290] <실시예 1-10> (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0291] 3-메틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(2-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0292] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 8.14 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.63 - 7.57 (m, 2H), 7.46 - 7.40

(m, 2H), 3.53 (s, 3H).

[0294] **<실시예 1-11> (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0295] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(2-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0296] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.69 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.77 - 7.64 (m, 2H), 7.62 - 7.52 (m, 2H), 4.07 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.19 (t, 3H, J = 7.2 Hz).

[0298] **<실시예 1-12> (5Z)-3-알릴-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0299] 3-알릴-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(2-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0300] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.71 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.77 - 7.65 (m, 2H), 7.61 - 7.53 (m, 2H), 5.92 - 5.79 (m, 1H), 5.21 - 5.10 (m, 2H), 4.66 - 4.63 (m, 2H).

[0302] **<실시예 1-13> (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0303] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0304] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 13.73 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.07 - 8.06 (m, 1H), 7.94 - 7.90 (m, 1H), 7.60 - 7.55 (m, 2H), 7.48 - 7.44 (m, 1H).

[0306] **<실시예 1-14> (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0307] 3-메틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0308] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 8.12 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.63 - 7.61 (m, 1H), 7.45 (t, 1H, J = 8.2 Hz), 7.37 - 7.35 (m, 1H), 3.53 (s, 3H).

[0310] **<실시예 1-15> (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0311] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0312] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.95 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.08 - 8.07 (m, 1H), 7.94 - 7.91 (m, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.61 - 7.55 (m, 1H), 7.48 - 7.45 (m, 1H), 4.06 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.20 (t, 3H, J = 7.1 Hz).

[0314] **<실시예 1-16> (5Z)-3-알릴-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0315] 3-알릴2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0316] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.96 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.94 - 7.92 (m, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.58 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 7.48 - 7.46 (m, 1H), 5.90 - 5.81 (m, 1H), 5.21 - 5.12 (m, 2H), 4.65 - 4.64 (m, 2H).

[0318] **<실시예 1-17> (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0319] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0320] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 13.72 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.96 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 7.62 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 7.59 (s, 1H).

[0322] **<실시예 1-18> (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-메틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0323] 3-메틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0324] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.92 (s, 1H), 8.20 (s. 1H), 7.97 (d, 2H, J = 9.2 Hz), 7.78 (s, 1H), 7.63 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.40 (s, 3H).

[0326] **<실시예 1-19> (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0327] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0328] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 8.09 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.68 (d, 3H, J = 8.0 Hz), 7.48 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 4.19 (dd, 2H, J = 14.2, 7.2 Hz), 1.30 (t, 3H, J = 6.8 Hz).

[0330] **<실시예 1-20> (5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0331] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0332] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.71 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.80 - 7.78 (m, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.36 - 7.34 (m, 2H), 2.36 (s, 3H).

[0334] **<실시예 1-21> (5Z)-3-메틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0335] 3-메틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0336] 1H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 8.09 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.61 - 7.58 (m, 2H), 7.31 - 7.29 (m, 2H), 3.53 (s, 3H), 2.42 (s, 3H).

[0338] **<실시예 1-22> (5Z)-3-에틸-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0339] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0340] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.82 - 7.81 (m, 3H), 7.37 - 7.34 (m, 2H), 4.07 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 2.37 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, J = 7.2 Hz).

[0342] **<실시예 1-23> (5Z)-3-알릴-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0343] 3-알릴-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0344] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.81 - 7.79 (m, 3H), 7.36 - 7.34 (m, 2H), 5.90 - 5.81 (m, 1H), 5.21 - 5.11 (m, 2H), 4.65 - 4.63 (m, 2H), 2.36 (s, 3H).

[0346] **<실시예 1-24> (5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0347] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-이소프로필페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0348] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.71 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.82 - 7.80 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.43 - 7.40 (m, 2H), 3.01 - 2.91 (m, 1H), 1.24 (d, 6H, J = 6.8 Hz).

[0350] **<실시예 1-25> (5Z)-3-에틸-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0351] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-이소프로필페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0352] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.86 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.82 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.78 (s, 1H), 7.42 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 4.06 (q, 2H, J = 6.8 Hz), 2.93-3.00 (m, 1H), 1.24 (d, 6H, J = 6.8 Hz), 1.19 (t, 3H, J = 7.0 Hz).

[0354] **<실시예 1-26> (5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0355] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-부틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0356] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.71 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.81 - 7.79 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.37 - 7.35 (m, 2H), 2.63 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 1.62 - 1.54 (m, 2H), 1.37 - 1.27 (m, 2H), 0.91 (t, 3H, J = 7.4 Hz).

[0358] **<실시예 1-27> (5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0359] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(4-부틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0360] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.78-7.82 (m, 3H), 7.36 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 4.06 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 2.64 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 1.55-1.62 (m, 2H), 1.28-1.37 (m, 2H), 1.19 (t, 3H, J = 7.0 Hz), 0.91 (t, 3H, J = 7.4 Hz).

[0362] **<실시예 1-28> (5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0363] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3,4-디메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0364] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.70 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.61 - 7.58 (m, 2H), 7.30 - 7.28 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).

[0366] **<실시예 1-29> (5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-3-에틸-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0367] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(3,4-디메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0368] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.81 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.62 - 7.60 (m, 1H), 7.30 - 7.28 (m, 1H), 4.06 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 2.31 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.19 (t, 3H, J = 7.0 Hz).

[0370] <실시예 1-30> (5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0371] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(2-메톡시페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0372] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.70 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.68 - 7.65 (m, 2H), 7.47 - 7.42 (m, 1H), 7.31 - 7.29 (m, 1H), 7.14 - 7.10 (m, 1H), 3.90 (s, 3H).

[0374] <실시예 1-31> (5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0375] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(나프탈렌-2-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0376] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 13.73 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.06 - 7.99 (m, 2H), 7.64 - 7.55 (m, 3H).

[0378] <실시예 1-32> (5Z)-3-에틸-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0379] 3-에틸-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(나프탈렌-2-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0380] 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 9.03 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.13 - 8.12 (m, 2H), 8.07 - 7.99 (m, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.65 - 7.54 (m, 2H), 4.08 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.21 (t, 3H, J = 7.1 Hz).

[0382] <실시예 1-33> (5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0383] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0384] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.75 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.56 - 8.55 (m, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.08 - 8.04 (m, 1H), 7.99 - 7.97 (m, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.47 - 7.44 (m, 1H).

[0386] <실시예 1-34> (5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0387] 반응식 1로부터 합성한 3-(2-하이드록시에틸)-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0388] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.07 (s, 1H), 8.56 - 8.55 (m, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.09 - 8.05 (m, 1H), 8.00 - 7.98 (m, 1H), 4.94 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 4.12 (t, 2H, J = 6.2 Hz), 3.66 (q, 2H, J = 6.4 Hz).

[0390] <실시예 1-35> (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0391] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(피리딘-3-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0392] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.74 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 8.94 (s,1H), 8.62 - 8.60 (m, 1H), 8.35 - 8.31 (m, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.62 - 7.59 (m, 2H).

[0394] <실시예 1-36> (5Z)-3-(2-히드록시에틸)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0395] 반응식 1로부터 합성한 3-(2-하이드록시에틸)-2-티옥소티아졸리딘-4-온과 1-(피리딘-3-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0396] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 9.00 (s, 1H), 8.62 - 8.61 (m, 1H), 8.36 - 3.33 (m, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.63 - 7.60 (m, 1H), 4.94 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 4.12 (t, 2H, J = 6,2 Hz), 3.66 (q, 2H, J = 6.0 Hz).

[0398] **<실시예 1-37> (5Z)-5-[(5-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0399] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 5-메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0400] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 13.70 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.97 - 7.94 (m, 2H), 7.54 - 7.49 (m, 2H), 7.41 - 7.34 (m, 2H), 2.42 (s, 3H).

[0402] **<실시예 1-38> (5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0403] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 3,5-디메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0404] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 13.68 (s, 1H), 7.56 - 7.43 (m, 6H), 2.34 (s, 3H), 2.31 (s, 3H).

[0406] **<실시예 1-39> (5Z)-5-[(1-페닐피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0407] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0408] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 12.48 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.91 - 7.87 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.58 - 7.53 (m, 2H), 7.42 - 7.37 (m, 1H).

[0410] **<실시예 1-40> (5Z)-5-[[1-(2-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0411] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(2-플루오로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0412] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 12.50 (s, 1H), 8.64 - 8.63 (m, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.86 - 7.81 (m, 2H), 7.56 - 7.48 (m, 2H), 7.44 - 7.38 (m, 1H); ESI m/z 288[M-H].

[0414] **<실시예 1-41> (5Z)-5-[[1-(3-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0415] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(3-플루오로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0416] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 12.51 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.83 - 7.76 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.62 - 7.56 (m, 1H), 7.26 - 7.21 (m, 1H); ESI m/z 288[M-H].

[0418] **<실시예 1-42> (5Z)-5-[[1-(4-플루오로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0419] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(4-플루오로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0420] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.67 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.96 - 7.87 (m, 2H), 7.45 - 7.35 (m, 3H).

[0422] <실시예 1-43> (5Z)-5-[[1-(2-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0423] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(2-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0424] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.42 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.74 - 7.65 (m, 2H), 7.55 - 7.50 (m, 3H).

[0426] <실시예 1-44> (5Z)-5-[[1-(3-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0427] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(3-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0428] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.76 (s, 1H), 8.03 - 8.01 (m, 2H), 7.89 - 7.87 (m, 1H), 7.58 - 7.54 (m, 1H), 7.43 - 7.42 (m, 2H).

[0430] <실시예 1-45> (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0431] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(4-클로로페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0432] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.71 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.93 - 7.90 (d, 2H), 7.62 - 7.59 (m, 2H), 7.45 (s, 1H).

[0434] <실시예 1-46> (5Z)-5-[[1-(p-톨릴)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0435] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(4-메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0436] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 12.48 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.78 - 7.73 (m, 3H), 7.36 - 7.34 (m, 2H), 2.36 (s, 3H).

[0438] <실시예 1-47> (5Z)-5-[[1-(4-아이소프로필페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0439] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(4-이소프로필페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0440] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 12.47 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.80 - 7.73 (m, 3H), 7.42 - 7.40 (m, 2H), 3.01 - 2.91 (m, 1H), 1.23 (d, 6H, J = 6.8 Hz).

[0442] <실시예 1-48> (5Z)-5-[[1-(4-부틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0443] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(4-부틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0444] 1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.63 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.76 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.45 (s, 1H), 7.45 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 2.63 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 1.53-1.64 (m, 2H), 1.26-1.39 (m, 2H), 0.91 (t, 3H, J = 7.4 Hz).

[0446] <실시예 1-49> (5Z)-5-[[1-(3,4-디메틸페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0447] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(3,4-디메틸페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0448] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 12.48 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.72 - 7.69 (m, 2H), 7.60 - 7.57 (m, 1H), 7.30 - 7.28 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).

[0450] **<실시예 1-50> (5Z)-5-[[1-(2-메톡시페닐)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0451] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(2-메톡시페닐)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0452] 1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 12.46 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.68 - 7.65 (m, 1H), 7.46 - 7.42 (m, 1H), 7.30 - 7.28 (m, 1H), 7.14 - 7.10 (m, 1H), 3.90 (s, 3H).

[0454] **<실시예 1-51> (5Z)-5-[[1-(2-나프틸)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0455] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(나프탈렌-2-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0456] 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 8.83 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.98-8.10 (m, 5H), 7.53-7.63 (m, 2H), 7.50 (s, 1H).

[0458] **<실시예 1-52> (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0459] 티아졸리딘-2,4-디온과 1-(피리딘-3-일)-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0460] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.51 (s, 1H), 9.16 - 9.15 (m, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.61 - 8.59 (m, 1H), 8.32 - 8.29 (m, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.62 - 7.59 (m, 1H).

[0462] **<실시예 1-53> (5Z)-5-[(3-메틸-1-페닐-피라졸-4-일)메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0463] 티아졸리딘-2,4-디온과 3-메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0464] 1H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 12.49 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.92 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.50-7.56 (m, 3H), 7.34-7.39 (m, 1H), 2.41 (s, 3H).

[0466] **<실시예 1-54> (5Z)-5-[(3,5-디메틸-1-페닐-피라졸-4-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조**

[0467] 티아졸리딘-2,4-디온과 3,5-디메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0468] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 8.57 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 - 7.49 (m, 2H), 7.44 - 7.43 (m, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.34 (s, 3H); 13C NMR (100MHz, DMSO-d6) d 168.3, 167.4, 148.0, 139.5, 139.0, 129.6 (2), 128.4, 125.4, 125.0 (2), 124.1, 114.5, 13.5, 12.9.

[0470] **<실시예 1-55> (5Z)-5-[[1-(4-클로로페닐)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조**

[0471] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 반응식 2로부터 합성한 1-(4-클로로페닐)-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0472] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.72 (s, 1H), 8.73 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.96 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.67

(d, 2H, J = 8.8 H), 7.58 (s, 1H), 7/02 (d, 1H, J = 2.4 Hz).

[0474] <실시예 1-56> (5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0475] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 반응식 2로부터 합성한 1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0476] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.73 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.54 - 8.54 (m, 1H), 8.16 - 8.12 (m, 1H), 8.01 - 7.98 (m, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 7.03 (s, 1H).

[0478] <실시예 1-57> (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]-2-티옥소-티아졸리딘-4-온의 제조

[0479] 2-티옥소티아졸리딘-4-온과 반응식 2로부터 합성한 1-(피리딘-3-일)-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0480] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.66 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.55 - 8.54 (m, 1H), 8.27 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.61 - 7.57 (m, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.70 (s, 1H).

[0482] <실시예 1-58> (5Z)-5-[[1-페닐피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0483] 티아졸리딘-2,4-디온과 반응식 2로부터 합성한 1-페닐-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0484] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.5 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.94 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.73 (s, 1H), 7.58 (t, 2H, J = 8.0 Hz), 7.39 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 6.97 (s, 1H).

[0486] <실시예 1-59> (5Z)-5-[[1-(2-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0487] 티아졸리딘-2,4-디온과 반응식 2로부터 합성한 1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0488] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.49 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.53 - 8.53 (m, 1H), 8.12 - 8.09 (m, 1H), 7.99 - 7.97 (m, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.45 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 6.99 (s, 1H).

[0490] <실시예 1-60> (5Z)-5-[[1-(3-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0491] 티아졸리딘-2,4-디온과 반응식 2로부터 합성한 1-(피리딘-3-일)-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0492] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ12.49 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.60 - 8.59 (m, 1H), 8.32 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.73 (s, 1H), 7.65 - 7.62 (m, 1H), 7.02 (s, 1H).

[0494] <실시예 1-61> (5Z)-5-[[1-(4-피리딜)피라졸-3-일]메틸렌]티아졸리딘-2,4-디온의 제조

[0495] 티아졸리딘-2,4-디온과 반응식 2로부터 합성한 1-(피리딘-4-일)-1H-피라졸-3-카발데히드를 상기 실시예 1-1과 같은 방법으로 반응시켜 목적 화합물을 수득하였다.

[0496] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.51 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.73 - 8.72 (m, 2H), 7.94 - 7.93 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.03 (s, 1H).

[0498] <실시예 2>

[0499] mTORC1 억제 활성 평가

[0501] <2-1> mTORC1 활성 억제효과 평가(1)

[0502] 본 발명에 따른 상기 화합물들의 mTORC1에 대한 활성 억제효과를 평가하기 위하여 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0504] 대장암 세포주인 SW620은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 세포주를 24 웰 플레이트에 분주하여 24시간 배양 후, 류신 아미노산이 포함되어 있지 않은 배지에서 1시간 30분 처리하고 나서 다시 류신이 함유된 배지에서 15분 배양하였다. 상기 실시예 1-1 내지 1-62 화합물은 최종 농도 20uM로 류신이 함유된 배지에서 배양 시 첨가하였다. Cell lysate 20ug을 전기영동하여 분리하고 mTORC1 활성을 보기 위하여 phospho-p70 S6 Kinase (Thr380) 항체 (#9206, Cell Signaling Technology사)를 사용하여 웨스턴 블롯방법으로 분석하였다. 각 웰의 DMSO만 처리한 음성대조군과 화합물을 처리한 군을 비교하여 mTORC1 활성 억제효과를 평가하였다.

표 2

[0506]

mTORC1 억제효과(1) (%, 20uM)

실시예	억제효과(%)	실시예	억제효과(%)	실시예	억제효과(%)
1-1	98.54±0.33	1-22	77.21±0.84	1-43	52.34±3.97
1-2	74.4±0.2	1-23	15.74±10.22	1-44	50.76±5.28
1-3	53.97±1.49	1-24	93.18±2.50	1-45	64.18±3.13
1-4	68.36±1.69	1-25	36.86±3.47	1-46	74.39±0.62
1-5	45.82±3.59	1-26	59.73±3.55	1-47	74.36±1.23
1-6	86.58±2.50	1-27	51.70±7.12	1-48	69.53±2.04
1-7	88.23±0.55	1-28	47.13±3.15	1-49	68.36±2.99
1-8	97.1±1.8	1-29	4.02±6.64	1-50	38.93±16.04
1-9	92.76±1.09	1-30	88.27±1.18	1-51	53.08±1.81
1-10	50.52±3.69	1-31	40.20±1.02	1-52	93.50±1.38
1-11	67.22±1.41	1-32	75.04±5.32	1-53	71.70±1.70
1-12	70.93±2.39	1-33	93.50±1.59	1-54	71.17±4.46
1-13	94.90±0.77	1-34	82.94±1.10	1-55	74.6±6.5
1-14	46.72±14.22	1-35	96.45±0.55	1-56	97.04±0.65
1-15	72.46±1.79	1-36	80.88±1.10	1-57	90.20±1.29
1-16	3.74±10.43	1-37	96.82±0.71	1-58	59.51±4.35
1-17	86.7±3.1	1-38	75.78±2.60	1-59	91.00±1.78
1-18	50.17±12.77	1-39	93.53±1.84	1-60	81.52±3.79
1-19	54.17±8.55	1-40	41.03±10.21	1-61	91.50±1.30
1-20	83.30±1.76	1-41	49.37±7.34	1-1K	98.26±0.16
1-21	71.18±5.04	1-42	73.81±2.77		

[0507] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 화합물들은 20uM에서 유의적으로 mTORC1의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있다. 특히, 실시예 1-1, 실시예 1-1K(실시예 1-1의 칼륨염) 실시예 1-6, 실시예 1-7, 실시예 1-8, 실시예 1-9, 실시예 1-13, 실시예 1-17, 실시예 1-24, 실시예 1-30, 실시예 1-33, 실시예 1-35, 실시예 1-37, 실시예 1-39, 실시예 1-52, 실시예 1-56, 실시예 1-57, 실시예 1-59 및 실시예 1-61의 화합물들은 20uM의 농도에서 85% 이상의 우수한 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0509] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 간질 발생(epileptogenesis) 과정 및 자가소화에 밀접하게 연관된 mTOR를 저해하는 활성이 뛰어나 mTOR 경로와 관련된 뇌 질환의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단할 수 있었다.

[0511] <2-2> mTORC1 활성 억제효과(IC50) 평가(2)

[0512] 상기 실시예 <2-1>에서 선별된 화합물들의 mTORC1에 대한 활성 억제효과 (IC50)를 평가하기 위하여 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0514] 대장암 세포주인 SW620은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 세포주를 24 웰 플레이트에 분주하여 24시간 배양 후, 선별된 각 화합물들을(최종 농도 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20uM) 10% FBS가 포함된 배지에서 6시간 동안 배양 시 첨가하였다. Cell lysate 20ug을 전기영동하여 분리하고 mTORC1 활성을 보기 위하여 phospho-p70 S6 Kinase (Thr380) 항체 (#9206, Cell Signaling Technology사)를 사용하여 웨스턴 블롯 방법으로 분석하였다. 각 웰의 DMSO만 처리한 음성대조군과 화합물을 처리한 군을 비교하여 mTORC1 활성 억제효과를 평가하였다.

표 3

[0515]

mTORC1 억제효과(IC50) 평가

실시예	억제효과 IC50(uM)	실시예	억제효과 IC50(uM)
1-1	0.045±0.002	1-35	0.0872±0.0146
1-6	0.1237±0.0235	1-37	0.0799±0.0113
1-7	0.0917±0.0012	1-39	0.1076±0.0133
1-8	0.086±0.002	1-52	0.0934±0.0197
1-9	0.1623±0.0279	1-56	0.083±0.010
1-13	0.1298±0.0073	1-57	0.103±0.015
1-17	0.069±0.004	1-59	0.216±0.038
1-24	0.0890±0.0094	1-61	0.094±0.019
1-30	0.0942±0.0019	1-1K	0.024±0.004
1-33	0.0896±0.0289		

[0516] 상기 실시예 1-1 내지 1-61 화합물들 중에서 우수한 저해활성(20uM에서 85% 이상의 저해활성)을 보였던 화합물들을 선별하여 추가적으로 mTORC1의 저해활성을 평가해 보았다.

[0518] 그 결과, 상기 표 3에 나타낸 바와 같이 각 화합물들은 IC50가 1uM 이하인 것을 확인할 수 있었으며, 더 나아가 일부 화합물들은 IC50 100nM 이하의 매우 뛰어난 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0520] **<2-3> 변이체 mTOR를 발현하는 세포에서 S6K 단백질의 인산화 변화 확인**

[0521] mTOR 경로의 하위 조절자인 S6K는 mTOR 활성과 직접적으로 관련되어 있다. 즉, 활성화된 mTOR는 S6K의 T389 잔기를 인산화 시키기 때문에, S6K의 인산화 정도를 평가함으로써 mTOR의 활성을 확인할 수 있다.

[0522] 이에, 본 발명자는 상기 실시예 2-1에서 가장 우수한 mTOR 저해 활성을 나타내는 것으로 확인된 실시예 1-1 화합물 및 이의 염을 간질을 유발하는 것으로 알려진 mTOR 돌연변이(C1483Y)를 보유하는 NIH3T3 세포에 처리한 후, S6K의 인산화 정도를 확인하는 실험을 진행하였다. 양성 대조군으로는 한국 공개특허 제10-2017-0107404에

기재된 실시예 1-214 화합물(도면에서 "0186"으로 표시)을 사용하였다.

[0524] 구체적으로, C1483Y 돌연변이를 보유하는 NIH3T3 세포를 6시간 동안 20 uM의 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염으로 처리하고, 90분 동안 류신을 결핍 시킨 후, 15분 동안 류신으로 재자극 하였다. 세포용해물을 항-포스포 S6K 항체(Cell Signaling Technology, # 9205)로 면역 블로팅하여 S6K의 인산화 정도를 분석하였다. 이에 대한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0526] 도 1에 나타낸 바와 같이, mTOR C1483Y 돌연변이를 보유하는 NIH3T3 세포에 류신을 처리하면 야생형 NIH3T3 세포와 비교해 S6K의 인산화가 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 류신을 처리한 세포에 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염을 처리한 결과 S6K의 인산화가 현저히 저하되는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 본 발명에 따른 화합물이 mTOR 활성의 강력한 저해제임을 다시 한번 확인하였다.

[0528] <실시예 3>

[0529] LRS와 RagD의 결합 저해 활성 평가

[0530] 본 발명자는 상기 실시예 2에서 화학식 1의 화합물들이 mTOR의 활성을 저해하는 효과가 매우 우수하다는 것을 확인한 후, 이들 화합물들이 mTOR의 활성을 저해하는 기전을 확인하고자 하였다.

[0531] 전술한 바와 같이, LRS(leucyl tRNA synthetase)는 mTORC1로의 아미노산 신호전달의 핵심매개체로 기능한다. LRS가 아미노산 의존적으로, mTORC1으로의 신호전달 매개체인 Rag GTPase에 직접적으로 결합하고, Rag GTPase에 대한 GTPase-activating protein(GAP)의 역할을 하여 Rag GTPase가 mTORC1을 활성화한다.

[0532] 따라서, LRS와 RagD와의 결합이 차단되면 RagD의 GTP 분해가 저하되고, 결과적으로 mTOR의 활성이 억제되는 효과가 나타난다.

[0534] <3-1> RagD GTP 가수분해 저해 활성(GTP-agarose Bead Pulldown Assay)

[0535] GTP와 결합된 RagD를 분석하기 위하여 GTP-agarose bead pulldown assay를 수행하였다.

[0536] SW620 세포를 1시간 동안 10uM의 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염으로 처리하고, 90분 동안 류신을 결핍 시킨 후, 15분 동안 류신으로 재자극 하였다. 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, GTP-결합 버퍼(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM PMSF, 20 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1xphosphatase inhibitor cocktail)에서 세포를 수득하였다. 15초간 세포를 초음파 처리하여 용해하고, 세포용해물을 4 ℃에서 10분간, 13000 x g에서 원심분리한 후 상등액을 수득하였다. 얻어진 단백질 용액(500ul의 GTP-결합 버퍼에 포함된)에 100ul의 GPT-agarose bead(시그마 알드리치, Cat no. G9768)를 처리하고 4 ℃에서 30분간 방치하였다. 이후, 비드를 GTP-결합 버퍼로 세척하고, 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 세척된 비드를 다시 한번 30분간 처리하였다. 비드를 다시 세척하고, 회수된 상등액을 4 ℃에서 밤샘 방치하였다. 혹시 포함 되었을지 모를 오염원들을 분리하기 위해 GTP-결합 버퍼로 5회 세척한 후, 항-RagD 또는 ARF1 항체를 이용하여 면역블롯 분석을 수행함으로써 GTP-결합 단백질을 분석하였다. ARF1은 음성 대조군으로 사용하였다. 양성 대조군으로는 한국 공개특허 제10-2017-0107404에 기재된 실시예 1-214 화합물(도면에서 "0186"으로 표시)을 사용하였다.

[0538] 이에 대한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0539] 도 2에 나타낸 바와 같이, 화합물을 처리하지 않은 대조군(Con)에서는 류신을 처리하였을 때 RagD가 검출이 되지 않았다. 즉, LRS에 의해 RagD에서 GTP가 가수분해되어 검출이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해, 상기 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염을 처리한 시험군에서는, RagD가 류신을 처리하지 않은 대조군과 비슷한 정도로 검출이 되었고, 이는 곧 실시예 1-1의 화합물 또는 이의 염이 LRS의 활성을 저해하여 류신 처리에 의한 RagD의 GTP 가수분해가 저해되었음을 의미한다.

[0541] <3-2> LRS와 RagD의 상호작용에 대한 직접적인 저해 활성

[0542] 상기 실시예 3-1에서 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 염이 LRS에 의한 RagD의 GTP 가수분해를 저해하는 활성이 있음을 확인하였다.

[0543] 이에, 본 발명자는 그 다음으로 본 발명에 따른 화합물이 LRS와 RagD의 상호작용을 직접적으로 저해하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0545] SW620 세포를 1시간 동안 10uM의 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염으로 처리하고, 90분 동안 류신을 결핍 시킨 후, 15분 동안 류신으로 재자극 하였다. 세포를 프로테아제 저해제가 포함된 용해 버퍼를 이용하여 용해시키고, 면역침전을 위해 1차 항체를 상기 세포 용해물에 첨가하고 4℃에서 2시간 동안 교반하며 방치하였다. 50%의 단백질 아가로스 G-세파로스 슬러리를 첨가하고, 4시간 더 방치하였다. 차가운 용해 버퍼로 3회 세척한 후, 침전물을 SDS 샘플 버퍼에 용해시키고 SDS-PAGE로 분리하고 항-LRS 또는 항-RagD 항체를 이용하여 면역블롯팅 하였다. 양성 대조군으로는 한국 공개특허 제10-2017-0107404에 기재된 실시예 1-214 화합물(도면에서 “0186”으로 표시)을 사용하였다.

[0547] 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0548] 도 3에 나타낸 바와 같이, 화합물을 처리하지 않은 대조군(Con) 세포에서는 RagD와 LRS가 모두 검출이 되어 RagD와 LRS가 직접적으로 상호작용하고 있음을 확인할 수 있었다. 이에 반해, 본 발명에 따른 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염을 처리한 세포에서는 항-LRS 항체를 이용한 침전물에서 RagD가 거의 검출이 되지 않았으며, 항-RagD 항체를 이용한 침전물에서는 LRS가 거의 검출이 되지 않아 이들의 상호작용이 실시예 1-1 화합물 또는 이의 염에 의해 직접적으로 저해되고 있음을 알 수 있었다.

[0550] <실시예 4>

[0551] <u>혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB) 투과성 평가</u>

[0552] 본 발명자는 상기 실시예 2에서 화학식 1의 화합물들이 매우 우수한 mTOR 저해활성을 나타내는 것을 확인한 후, 상기 화합물들이 mTOR 경로 관련 뇌 질환의 치료약물로서 개발되어 혈액-뇌 장벽에 대한 높은 투과성을 나타낼 수 있을지를 확인하고자 하였다.

[0554] <4-1> 화합물의 *in silico* 물리화학적 성질 분석

[0555] 본 발명에 따른 화합물들의 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB) 투과성을 평가하기 전에 *in silico* 방법을 이용하여 각 화합물의 친유성(lipophilicity)을 예측해 보았다. 저분자 화합물의 BBB 투과도를 결정하는 가장 중요한 요소 중의 하나가 친유성 이기 때문에 실험적 평가를 진행하기 전에 각 화합물의 친유성을 평가하는 것은 사전에 BBB 투과 정도를 예측할 수 있는 하나의 지표가 될 수 있다. 이를 위해 친유성을 측정하는 파라미터인 logP와 분자의 극성 표면 영역(molecular polar surface area, PSA)를 Discovery Studio 2018 (Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèemes, 2016) 프로그램을 이용하여 예측하였다.

[0557] LogP 값은 화합물의 지용성을 나타내기 위한 지표로서, 섞이지 않는 두 용매인 물과 옥탄올(octanol)에 화합물을 녹였을 때 물과 옥탄올층에 녹아 있는 화합물 농도의 비를 분배계수로 나타낸 값이다. 예를 들어, 특정 화합물의 logP 값이 3이라면, 이는 물보다 옥탄올에 1000배 정도 더 잘 녹는 정도의 친유성을 지니고 있다는 것을 의미한다. 특정 화합물이 혈액-뇌 장벽을 통과하기 위해서는 지용성이 커야 하지만, 지용성이 지나치게 클 경우에는 혈장 단백질인 알부민 등과 같은 물질에 화합물이 비특이적으로 결합하기 때문에 혈액-뇌 장벽 투과성이 저하될 수 있다. 혈액-뇌 장벽을 투과하기 위해 적절한 logP 값은 1~4 수준인 것으로 보고되고 있다.

[0559] 한편, 친유성 이외에도 분자의 극성 표면 영역(PSA)이 화합물의 혈액-뇌 장벽 투과성을 결정하는데 중요한 요인으로 작용할 수 있다 (J. Am. Soc. Exp. Neurother. (2005) Vol. 2, 541). PSA는 저분자 화합물의 극성 표면의 정도를 2D approximation을 통해 예측한 파라미터로서, 질소 및 산소 원자와 그들에 부착된 극성 수소에 의해 점유되는 표면적으로서 정의된다. 이는 수소 결합 능력 및 극성을 강하게 반영하는 수치이다. 일반적으로 극성 표면 영역은 약물이 세포 내로 투과되는 경향성을 보기 위한 파라미터로 사용되며, 140Å을 넘을 경우에는 세포막을 잘 투과하지 못하는 경향이 있다.

[0561] 본 발명의 실시예 1-1 내지 1-61 화합물들의 logP 및 PSA 수치를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

화합물의 물리화학적 성질 *in silico* 분석

실시예	LogP	PSA	실시예	LogP	PSA	실시예	LogP	PSA
1-1	3.067	104.31	1-22	4.108	95.52	1-43	2.833	89.29
1-2	2.462	108.66	1-23	4.376	95.52	1-44	2.833	89.29
1-3	3.273	95.52	1-24	4.262	104.31	1-45	2.833	89.29
1-4	3.622	95.52	1-25	4.816	95.52	1-46	2.655	89.29
1-5	3.89	95.52	1-26	4.922	104.31	1-47	3.362	89.29
1-6	3.273	104.31	1-27	5.477	95.52	1-48	4.023	89.29
1-7	3.273	104.31	1-28	4.04	104.31	1-49	3.141	89.29
1-8	3.273	104.31	1-29	4.595	95.52	1-50	2.152	98.52
1-9	3.732	104.31	1-30	3.051	113.54	1-51	3.077	89.29
1-10	3.938	95.52	1-31	3.976	104.31	1-52	1.018	102.18
1-11	4.287	95.52	1-32	4.531	95.52	1-53	2.451	89.29
1-12	4.555	95.52	1-33	2.456	117.2	1-54	2.596	89.29
1-13	3.732	104.31	1-34	2.122	128.63	1-55	4.16	104.31
1-14	3.938	95.52	1-35	1.917	117.2	1-56	2.884	117.2
1-15	4.287	95.52	1-36	1.583	128.63	1-57	2.345	117.2
1-16	4.555	95.52	1-37	3.213	104.31	1-58	2.597	89.29
1-17	3.732	104.31	1-38	3.496	104.31	1-59	1.985	102.18
1-18	3.938	95.52	1-39	2.168	89.29	1-60	1.446	102.18
1-19	4.287	95.52	1-40	2.374	89.29	1-61	1.446	102.18
1-20	3.554	104.31	1-41	2.374	89.29			
1-21	3.76	95.52	1-42	2.374	89.29			

[0563]

[0564] **<4-2> *in vitro* 혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB) 투과성 평가**

[0565] 구체적으로, Pion BBB-PAMPA 분석 키트를 수동적, 세포간 투과성의 *in vitro* 모델로 사용 하였다. 필터에 고정화된 인공막을 공여체와 수용체 구획 사이에 두었다. 선별된 각 화합물을 기증자 구획에 도입한 다음 기증자 및 수용체 구획내의 약물 농도를 측정 하여 화학식 1의 화합물 및 양성대조군의 BBB 투과성을 평가하였다.

[0567] 이에 대한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0568] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물들은 기존에 뇌질환 치료제로 사용이 되는 hydroxychloroquine, progesterone, corticosterone, rivastigmine, carbamazepine 및 5-FU와 비교해도 우수한 인공막 투과도 결과를 보이고 있고, mTOR 저해제 (rapamycin, temsirolimus, INK128)와의 비교에서도 가장 우수한 투과도를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, mTOR 활성 저해효과를 나타내는 것으로 알려진 한국 공개특허 제10-2017-0107404에 기재된 실시예 1-214 화합물(도면에서 "0186"으로 표시)과 동등 또는 그 이상의

투과도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0570] <실시예 5>

[0571] *in vivo* mTOR 저해 활성 및 BBB 투과성 평가

[0572] 7주령의 C57BL/6 수컷 마우스에 상기 실시예 1-1 화합물의 염 또는 양성대조군으로서 라파마이신을 7일간 매일 복강투여한 후 뇌의 신피질(neocortex) 및 해마(hippocampus)에서 S6K의 인산화 정도를 분석함으로써 mTOR의 활성화에 대한 화합물의 효과를 평가하였다.

[0573] 실시예 1-1 화합물의 염은 100mg/kg(in 10% DMAC, 15% Tween 80, 75% 0.1M Na2HPO4, pH9.4)으로, 라파마이신은 2mg/kg(in 10% DMAC, 15% Tween 80, 75% saline)의 용량으로 투여하였다.

[0575] 이에 대한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0576] 도 5에 나타낸 바와 같이, 실시예 1-1 화합물의 염을 투여한 동물에서 인산화된 S6K가 검출이 되지 않아 mTORC1의 활성이 화합물의 처리에 의해 저해되었음을 확인할 수 있었다.

[0577] 한편, 실시예 1-1 화합물의 염 처리에 의해 AKT의 인산화 정도는 변화가 없는 것으로 보아 mTORC2의 활성은 저해되지 않은 것을 알 수 있었으며, LC3 II 또는 p62의 분해로부터 확인할 수 있는 자가 포식(autophagy) 작용은 화합물의 처리에 의해 증가되었음을 알 수 있었다.

[0579] 한편, 본 발명자는 상기 결과를 바탕으로 실시예 1-1 화합물의 염의 농도별 mTOR 저해활성을 평가해 보고자 하였다. 즉, 상기 실험방법과 동일한 방법으로 실시예 1-1 화합믈의 염 0, 1, 2.5, 5, 10, 20 및 50mg/kg을 동물에게 투여한 후 뇌의 신피질 및 해마에서 S6K의 인산화 정도 및 단백질의 발현 정도를 분석해 보았다.

[0581] 이에 대한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0582] 도 6에 나타낸 바와 같이, 실시예 1-1 화합물의 염은 농도 의존적으로 동물의 뇌에서 S6K의 인산화를 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 곧 상기 실시예 1-1 화합물의 염이 농도 의존적으로 동물의 혈액-뇌 장벽을 투과하여 mTOR 저해 활성을 나타낸 것으로 판단할 수 있었다.

[0584] <실시예 6>

[0585] <u>알츠하이머 동물모델에서 아밀로이드 플라그 제거능 평가</u>

[0586] 실험에는 7개월령의 수컷 B6C3H/APP/PS1 마우스를 Jackson Lab (Bar Harbor, Maine, USA)에서 구매하여 사용하였다. 이 마우스들은 모두 키메릭 마우스/인간 아밀로이드 전구체 단백질 및 돌연변이 인간 presenilin 1을 발현하는 이중 형질 전환 마우스이며, 이 둘은 모두 CNS 뉴런에 관한 것이다. 두 돌연변이 모두 초기 발병 알츠하이머와 관련이 있다.

[0588] 상기 제조된 실시예 1-1 화합물의 염(1-1K)을 마우스 당 0, 5, 10 또는 20mpk(mg/kg)로, 7일간 매일 1회씩 복강투여 하였다. 용매는 10% DMAC, 15% Tween 80, 75% 0.1M Na_2HPO_4 buffer를 사용하였다.

[0590] 면역조직학적 분석을 위해 마우스를 2% Avertin (20 μg g^{-1}, 복강 내)으로 마취시키고 0.9% 식염수로 관류한 후 얼음처럼 차가운 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. B6C3H/APP/PS1 마우스의 절제된 뇌를 4% 파라포름알데히드(pH 7.4)에서 16 시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 샘플을 Cryoprotection을 위해 30% sucrose에 담그고 Cryostat(Microm HM 525, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 35μm 두께로 슬라이스 하였다. Aβ 플라크를 시각화하기 위해, 슬라이싱된 뇌 절편을 티오플라빈 S (thioflavin S, ThS)로 7분 동안

염색하였다. 티오플라빈 S는 Sigma-Aldrich (카탈로그 번호 T-1892)에서 구입했다. 500 μM의 티오플라빈 S (ThS)를 50% 에탄올에 용해시켰다. 100%, 95% 및 70% 에탄올로 연속 세정한 후, 절편을 PBS로 옮겼다.

[0591] 면역형광을 위해, 상대적으로 두꺼운 자유 부동 뇌 섹션을 염소 항-GFAP 항체와 함께 4℃에서 7일간 인큐베이션 하였다. 이어서 절편을 Alexa Fluor 594- 접합 당나귀 항-염소 IgG (1 : 200, Abcam, ab150132)와 함께 밤새 4 ℃에서 인큐베이션 하였다. 4'6'-디아미노-2-페닐인돌이염산염수화물 (DAPI, 1 mg / mL, 1 : 2000, Sigma)을 사용하여 핵 대조 염색을 수행하였다.

[0592] 이미지는 Leica DM2500 형광 현미경으로 촬영했다. 플라크 수는 ImageJ 소프트웨어 프로그램을 사용하여 각각의 마우스의 단일 뇌 이미지로부터 계산하였다.

[0594] 이에 대한 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0595] APP/PS1 마우스의 뇌에 있는 Aβ 침착은 6개월령에서 검출될 수 있다. Aβ 침착물에 대한 실시예 1-1K의 영향을 조사하기 위해, 고정된 뇌 조직에서 아밀로이드 플라그에 대한 ThS 염색을 수행하였다.

[0596] 도 7 및 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 아밀로이드 플라크 침착 물이 실시예 1-1K 처리 APP/PS1 마우스의 뇌에서 용매 투여 대조군(vehicle) APP/PS1 마우스의 뇌에서 보다 현저하게 감소되어 있었다. 이를 통해 본 발명의 화합물 처리가 아밀로이드 플라크의 침착을 완화한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0598] <실시예 7>

[0599] <u>TSC CKO 간질 동물 모델에서 mTORC1의 저해 활성 평가</u>

[0600] 동물의 관리는 서울대학교 동물 실험위원회가 승인한 동물 프로토콜에 따라 수행되었다. $TSC2^{GFAP1}$ CKO 마우스를 다음과 같이 생성하였다. $TSC2^{flox/flox}$ 마우스를 1차로 동일한 GFAP-Cre 마우스 라인과 교배시켰다. 그 결과 생성된 $TSC2^{flox/+}$; GFAP-Cre 마우스를 다른 $TSC2^{flox/flox}$ 마우스와 교배시켜 $TSC2^{flox/flox}$; GFAP-Cre 마우스를 생성시켰다. 라파마이신(3mg/kg)과 실시예 1-1K (10mg/kg)를 매일 4회 복강 내 주사(I.P.)하였다. 라파마이신 및 실시예 1-1K 화합물은 주사 완충액 (10% DMAC, 15% TWEEN80, 75% 0.1M Na_2HPO_4 완충액)에 용해시켰다.

[0602] 웨스턴 블롯 분석을 위하여, 마우스 대뇌 신피질(neocortex)과 해마를 해부하고 세포 용해 완충액(Cell Signaling, Beverly, MA, USA)에서 초음파 처리하였다. 4℃에서 1시간 동안 15,000rpm에서 원심분리한 후, 상등액을 수득하고 단백질 농도를 Bradford 방법 (Pierce, Rockford, IL, USA)으로 측정하였다. 동량의 총 단백질 추출물을 SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 1% TTBS 완충액 (10mM 트리스 (Tris), 10 % 트리스 (Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) 중의 항-p-S6K (T389) (Cell Signaling, # 9205), 항-S6K (Cell Signaling, # 9202), 항-Actin (Santa Cruz Biotechnology, # sc-1616), 항-p-AKT (S473) (Cell signaling, # 4060), 항-AKT (Cell signaling, # 2920), 항-p62/SQSTM1 (Cell signaling, # 39749) 및 항-LC3A (Cell signaling, # 4108) 항체로 인큐베이션한 후, 막을 퍼옥시다아제-접합된 2차 항체와 반응시켰다. 향상된 화학 발광 시약(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 신호를 검출하였다.

[0604] 이에 대한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0605] 도 9는 4주간 각 실험물질을 투여한 TSC2 CKO 마우스의 대뇌 피질과 해마에서 phospho-S6K (T389) 수준을 나타낸다. mTORC1 활성화는 p-S6K (T389) 발현에 반영된 바와 같이, 대조군에 비해 라파마이신 또는 실시예 1-1K 투여 마우스에서 감소한 것을 확인할 수 있었다. mTORC2 활성화는 p-AKT (S473)가 반영한 것처럼 라파마이신 또는 실시예 1-1K의 영향을 받지 않았다. mTORC1 억제와 일치하게, autophagy(LC3 II 증가 또는 p62 절단)는 라파마이신 또는 실시예 1-1K에 의해 유도되는 것으로 확인되었다.

[0607] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 우수한 mTOR 저해활성 및 혈액-뇌 장벽 투과

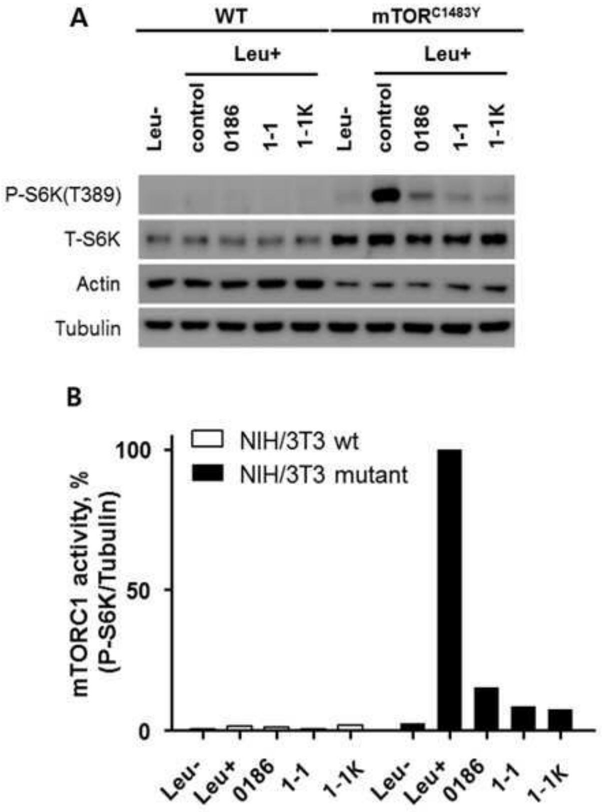
성을 나타내어 mTOR 경로 관련 뇌 질환 치료제로서 매우 유용하게 활용일 될 수 있을 것임을 알 수 있었다.

산업상 이용가능성

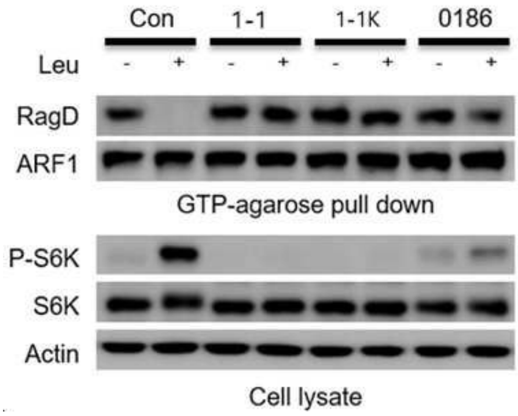
[0609] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 mTORC1을 저해하는 효과 및 혈액-뇌 장벽 투과성이 매우 뛰어나 mTOR 경로 관련 뇌 질환 예방 또는 치료제 개발에 매우 유용하게 활용이 될 수 있어 산업상 이용가능성이 매우 우수하다.

도면

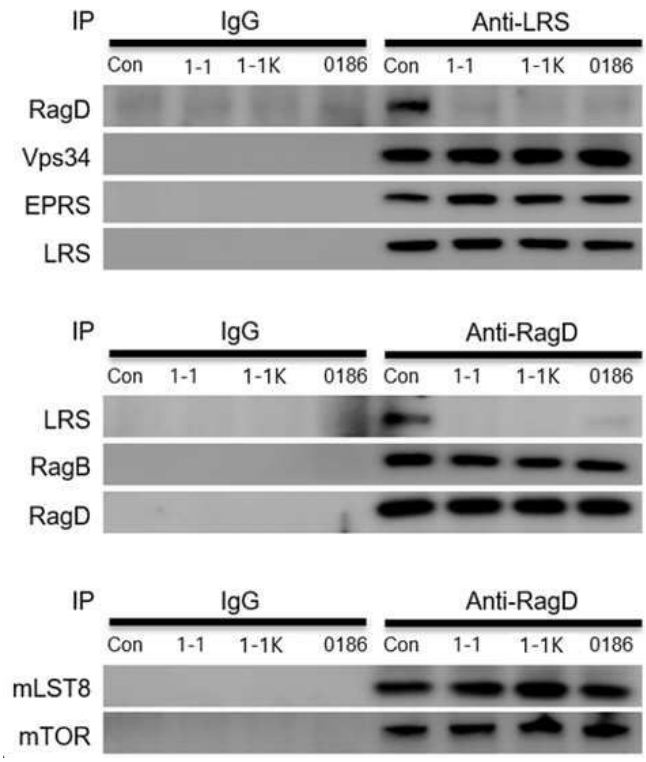
도면1



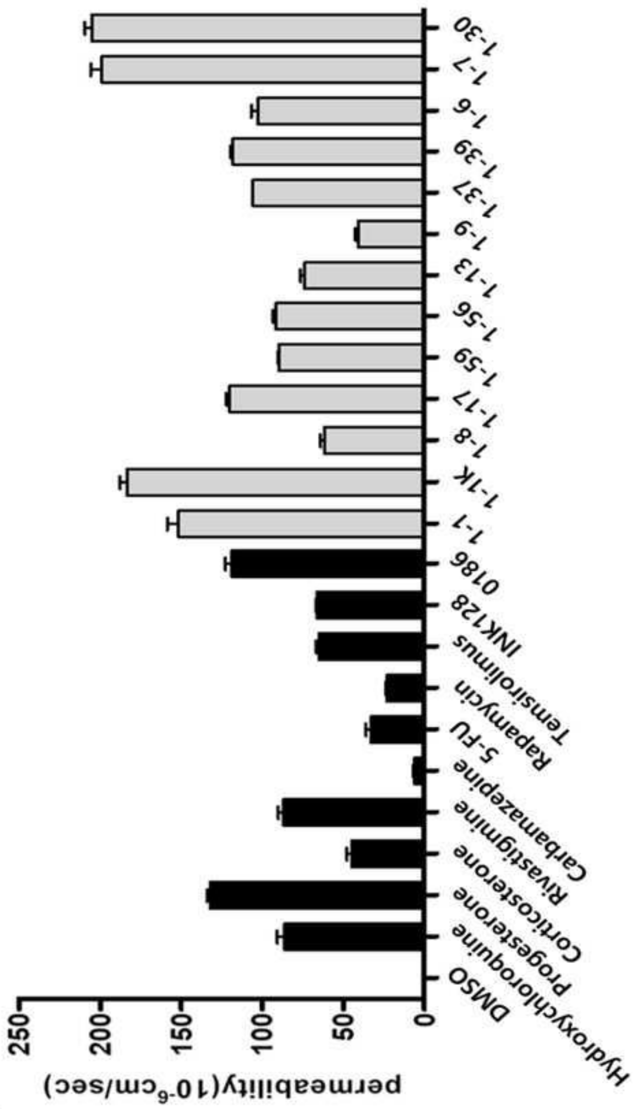
도면2



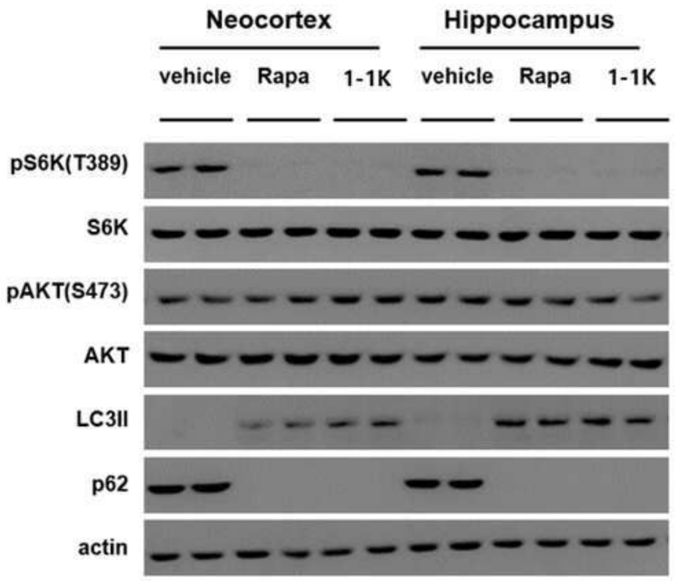
도면3


IP
IgG
Anti-LRS
Con 1-1 1-1K 0186 Con 1-1 1-1K 0186
RagD
Vps34
EPRS
LRS
IP
IgG
Anti-RagD
Con 1-1 1-1K 0186 Con 1-1 1-1K 0186
LRS
RagB
RagD
IP
IgG
Anti-RagD
Con 1-1 1-1K 0186 Con 1-1 1-1K 0186
mLST8
mTOR

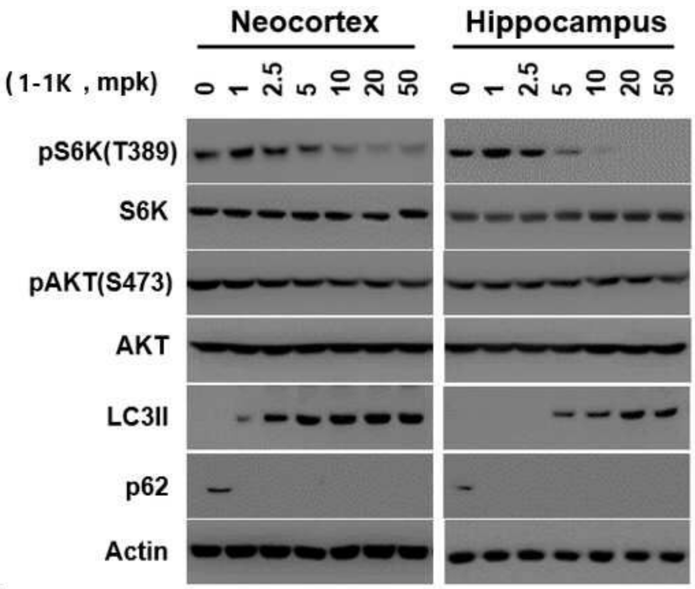
도면4


1-30
1-7
1-6
1-39
1-37
1-9
1-13
1-56
1-59
1-17
1-8
1-1K
1-1
0186
INK128
Temsirolimus
Rapamycin
5-FU
Carbamazepine
Rivastigmine
Corticosterone
Progesterone
Hydroxychloroquine
DMSO
0
50
100
150
200
250
permeability(10-6cm/sec)

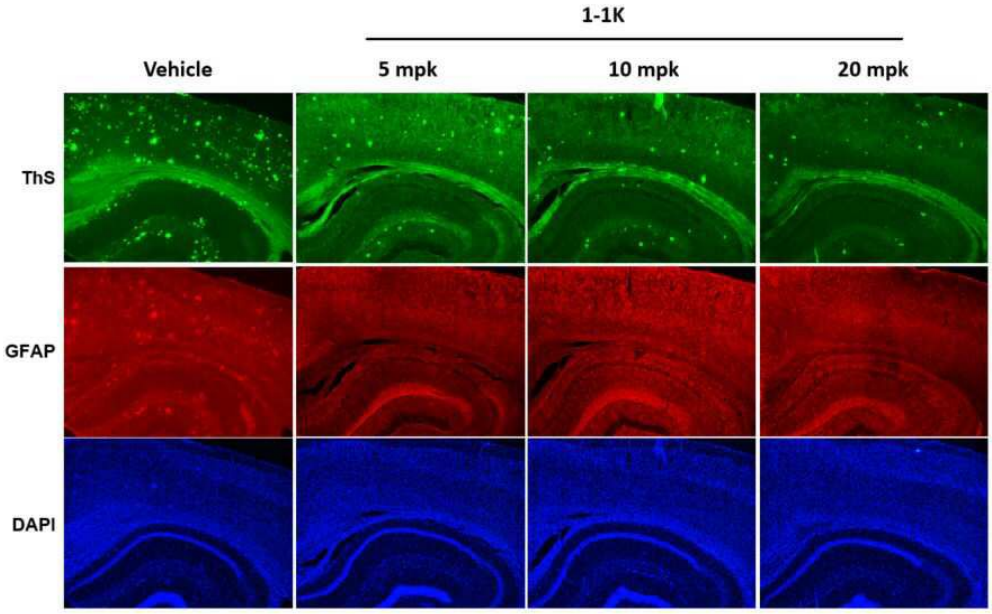
도면5


Neocortex
Hippocampus
vehicle
Rapa
1-1K
vehicle
Rapa
1-1K
pS6K(T389)
S6K
pAKT(S473)
AKT
LC3II
p62
actin

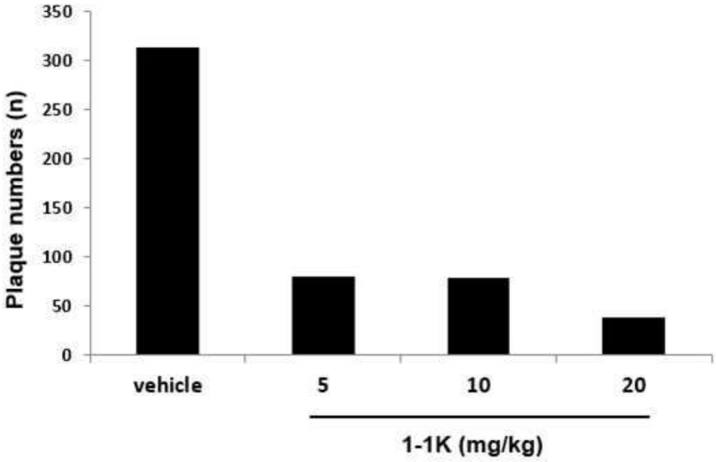
도면6


Neocortex
Hippocampus
(1-1K , mpk)
0 1 2.5 5 10 20 50
0 1 2.5 5 10 20 50
pS6K(T389)
S6K
pAKT(S473)
AKT
LC3II
p62
Actin

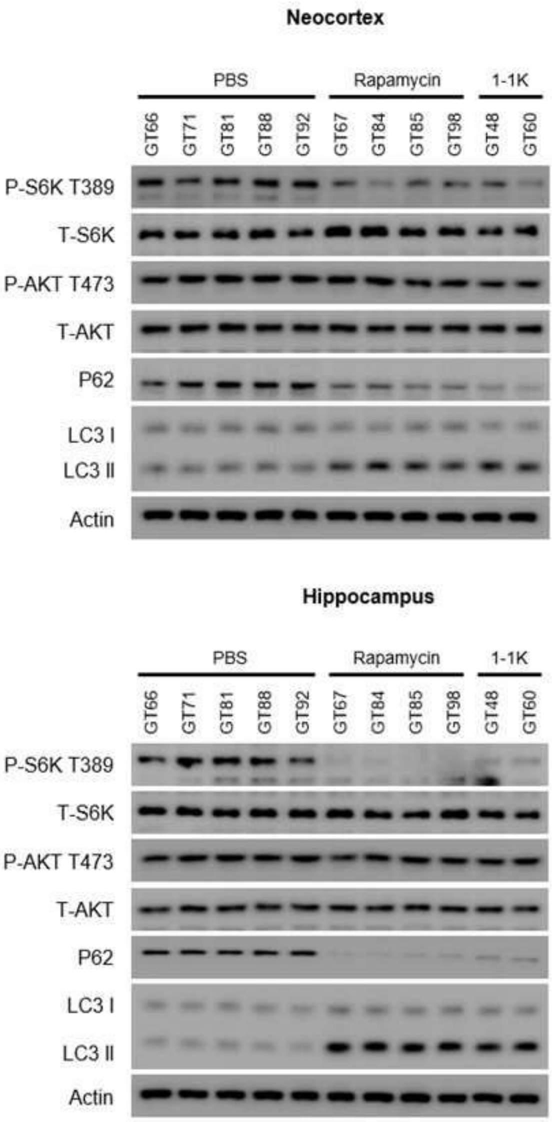
도면7


1-1K
Vehicle
5 mpk
10 mpk
20 mpk
ThS
GFAP
DAPI

도면8


350
300
250
200
150
100
50
0
Plaque numbers (n)
vehicle
5
10
20
1-1K (mg/kg)

도면9


Neocortex
PBS
Rapamycin
1-1K
GT66
GT71
GT81
GT88
GT92
GT67
GT84
GT85
GT98
GT48
GT60
P-S6K T389
T-S6K
P-AKT T473
T-AKT
P62
LC3 I
LC3 II
Actin
Hippocampus
PBS
Rapamycin
1-1K
GT66
GT71
GT81
GT88
GT92
GT67
GT84
GT85
GT98
GT48
GT60
P-S6K T389
T-S6K
P-AKT T473
T-AKT
P62
LC3 I
LC3 II
Actin