



약학박사 학위논문

Part I. 아데노신 A2A/A1 이중 길항기전의 1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-amine 계열 파킨슨병 치료제 도출 연구

Part II. 5-(N-Hydroxycarbamimidoyl) Benzofuran 계열 IDO1 저해제 도출 연구

2023년 8월

서울대학교 대학원

약학과 약품화학전공

정 주 영

Part I. 아데노신 A2A/A1 이중 길항기전의 1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-amine계열 파킨슨병 치료제 도출 연구

Part II. 5-(N-Hydroxycarbamimidoyl) Benzofuran 계열 IDO1 저해제 도출 연구

지도교수 이지우

- 이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함 2023년 7월
 - 서울대학교 대학원 약학과 약품화학전공 정 주 영

정주영의 약학박사 학위논문을 인준함 2023년 7월

위원	<u> </u> 장	(인)
부위·	원장	(인)
위	원	(인)
위	원	(인)
위	원	(인)

초 록

Part I. 아데노신 A_{2A}/A₁ 이중 길항기전의 1*H*-Pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-6-amine계열 파킨슨병 치료제 도출 연구

파킨슨병은 세계적으로 두 번째로 흔한 신경퇴화성 질환으로, 아직 근본적인 치료법이 부족합니다. 파킨슨병 환자들의 핵심 병리학적 소견은 뇌의 흑색질 조직 내 도파민 신경세포의 손실로 인해 도파민이 감소하는 것입니다. 현재, 레보도파(L-DOPA)는 파킨슨병의 운동 증상을 치료하는 표준 치료법입니다. 그러나 질병이 진행됨에 따라 파킨슨병 증상은 점차 치료에 저항성을 보이며, 불연속적인 약물 전달과 짧은 반감기 때문에 운동 합병증, 즉 약물 유발 운동 장애가 발생할 수 있습니다.

아데노신 수용체에 대한 약물의 변화를 통해 파킨슨병 증상을 조절하는 것은 여전히 가장 잘 연구된 비도파민계 접근 방법 중 하나입니다. 아데노신은 수용체 상호작용과 세포내 신호 전달을 통해 도파민계에 영향을 미칩니다.

이 연구에서는 A_{2A}와 A₁ 수용체의 이중 길항제로서 파킨슨병에 더 효과적이고 지속적이며 안전한 치료법을 찾기 위해 새로운 1*H*-피라졸로[3,4-*d*]피리미딘-6-아민(1*H*-pyrazolo [3,4-*d*]pyrimidin-6-amine) 코어 스캐폴드의 유도체들을 설계하고 합성했습니다. 이들 화합물 중 **11o**는 두 수용체 *h*A_{2A}과 *h*A₁ 모두에 대해 높은 결합 친화도(hA_{2A} K_i = 13.3 nM; hA₁ K_i = 55 nM)와 완전한 길항작용(hA_{2A} IC₅₀ = 136 nM; hA₁ IC₅₀ = 98.8 nM)을 나타냈습니다. **110**는 마우스에서 간 청소율(hepatic clearance)이 낮고 약동학적 특성이 우수하며 생체 이용률과 뇌 혈장 비율이 높은 것으로 나타났습니다. 또한 **110**는 심혈관 위험 및 돌연변이 유발 가능성이 매우 낮았으며 랫드와 개에서 내약성이 우수했습니다. MPTP로 유도한 파킨슨병 마우스 모델에서 실험한 결과, **110**는 약물로 악화된 동물의 행동학적 증상을 개선하는 경향이 확인되었습니다. 또한, **110**는 암컷 랫드에서 용량 의존적으로 할로페리돌로 유발된 카탈렙시(catalepsy)를 역전시켰으며, ED₅₀는 3~10 mg/kg 사이였습니다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, **110**는 강력한 이중 A_{2A}/A₁ 수용체 길항제로서 우수한 대사 및 안전성 프로필을 갖춘 파킨슨병 치료제의 잠재력 있는 약물 후보임이 입중되었습니다.

Part II. 5-(N-Hydroxycarbamimidoyl) Benzofuran 계열 IDO1 저해제 도출 연구

인체의 indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (*h*IDO1)과 tryptophan dioxygenase (*h*TDO)는 *L*-트립토판(*L*-Trp) 대사의 키누레닌 경로(KP)의 속도제한효소(rate-limiting enzyme)이며 면역 종양학에서는 체크포인트 억제제 병용 치료의 핵심 약물 표적이 되고 있습니다. 선택적이고 강력한 IDO1 저해제를 발굴하기 위해 새로운 스캐폴드로서 N-하이드록시벤조퓨란-5-카복시미다마이드(Nhydroxybenzofuran-5-carboximidamide)에 대한 구조-활성 관계(SAR) 연구를 체계적으로 수행하였습니다. 합성된 화합물 중 N-3-브로모페닐(N-3-bromophenyl) 유도체 19는 효소에 대해 0.44 μ M, HeLa 세포에서 1.1 μ M의 IC₅₀ 값으로 가장 강력한 억제력을 보였습니다. IDO1의 X-선 결정 구조로 19를 분자 모델링한 결과 헴 철과의 쌍극자 이온 상호작용, Cys129와의 할로겐 결합 및 두 가지 소수성 상호작용이 19의 높은 효능에 중요한 것으로 나타났습니다.

PART I 주요어: 아데노신 수용체 길항제; 이중 길항제; 파킨슨병; MPTP; 할로페리돌;

PART II 주요어: 인돌아민 2; 3-디옥시게나제 1; 키누레닌 경로; 면역 종양학

학 번 : 2018-36644

목 차

제 1	장 아	데노신 A _{2A} /A ₁ 이중 길항기전의 1 <i>H</i> -Pyrazolo[3	,4–
<i>d</i>]pyr	·imidin	-6-amine계열 파킨슨병 치료제 도출 연구]	10
;	제 1 절	연구의 배경	1
;	제 2 절	연구 결과	5
6	2.1	화학	5
6	2.2	생물학적 활성	10
6	2.2.1	인체의 A ₁ , A _{2A} 수용체에 대한 <i>in vitro</i> 활성	10
6	2.2.2	아데노신 수용체 하위 유형에 대한 선택성	13
6	2.2.3	파킨슨병 동물 모델에서의 in vivo 활성	14
4	2.3	약동학 연구	17
4	2.3.1	in vitro 대사 안정성	17
6	2.3.2	<i>in vivo</i> 약동학 연구	18
4	2.4	독성 연구	22
;	제 3 절	연구 재료 및 방법	23
	3.1	화학	23
ć	3.1.1	4a-4b에 대한 일반 절차 A	24
÷	3.1.2	8에 대한 일반 절차 B	27
:	3.1.3	11a~11w의 일반 절차 C	29
:	3.2	in vitro 인체 아데노신 수용체 결합력 및 기능도 분석	46
:	3.3	<i>h</i> ERG, AMES 및 대사 안정성 연구	48
:	3.4	동물 시험	51
:	3.4.1	파킨슨병의 MPTP 유도 마우스 모델	51
	3.4.2	네스트 빌딩	53
	3.4.3	할로페리돌 유발 카탈렙시 실험	54
	3.5	<i>in vivo</i> 약동학, 생체이용률 및 마우스에서의 뇌 혈장 비율	연구
			55
:	3.6	랫드와 개에서의 최대 내약 용량 연구	57
	3.7	통계 분석	59

제 4 절 결론	59
제 2 장 5-(<i>N</i> -Hydroxycarbamimidoyl) Benzofura IDO1 저해제 도출 연구	n 계열 61
제 1 절 연구의 배경 제 2 절 연구 결과 제 3 절 결론	61 64 73
참고문헌	75

Abstract	- 8	12	3
	• •		1

표 목차

그림 목차

[그림 1] 항파킨슨병 약제로서의 A _{2A} 수용체 길항제	. 3
[그림 2] 핵심 구조 설계	4
[그림 3] 인체의 아데노신 수용체에 대한 화합물 11o의 기능적 3	활성
	}
[그림 4] Sham과 vehicle, rasagiline, 11o(비강 내)로 처리한 MPT	[P-
병변이 있는 마우스의 둥지 짓기 평가 결과1	5
[그림 5] 할로페리돌(HP)을 주사한 암컷 랫드의 스텝 다운 지연 ·	시간
	3
[그림 6] 마우스 혈장(a)과 뇌(b)에서 시간 대비 11o의 평균	농도
)
[그림 7] IDO-1 선택적 억제제6	3
[그림 8] IDO1에서 19로 예상되는 바인딩 모드	'3

제 1 장 아데노신 A_{2A}/A₁ 이중 길항기전의 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-6-amine계열 파킨 슨병 치료제 도출 연구

제 1 절 연구의 배경

파킨슨병(PD)은 전 세계적으로 두 번째로 많이 발생하는 신경퇴행성 질환이지만 여전히 치료법이 부족합니다. 선조체의 도파민 고갈로 이어지는 도파민성 신경세포의 손실은 PD 환자에서 나타나는 핵심적인 병태생리학적 소견입니다. 레보도파(L-DOPA)는 파킨슨병의 운동 증상을 치료하기 위한 표준 치료(SOC)입니다^[1]. 레보도파는 뇌에서 고갈된 도파민을 대체하여 파킨슨병 환자의 운동 증상을 완화합니다. 그러나 PD 증상은 질병이 진행됨에 따라 점점 SOC에 불응하게 되어 motor-response oscillations (on-off periods) 및 약물 유발 이상운동증(drug-induced dyskinesias)을 포함하는 운동 합병증이 초래되는데, 이는 상당수 불연속적인 생체 내 약물 전달과 짧은 반감기가 그 원인입니다^[2]. 레보도파 흡입 분말, 엔타카폰 정제, 카르비도파/레보도파 장 현탁액, 카르비도파/레보도파/엔타카폰 정제. 아포모르핀 염산염 주사제 및 이스트라데필린(istradefylline) 정제를 포함하여 PD 환자의 오프 기간을 치료하기 위한 FDA 승인 요법들이 존재합니다. 하지만 이러한 옵션에도 불구하고 PD 환자들에게는 여전히 더 효과적이고 오래 지속되며 사용하기 안전한 치료법이 필요합니다.

간접적인 striatal 출력 경로의 adenosinergic 조절은 파킨슨병

증상을 조절하기 위해 가장 잘 연구되어진 비도파민성 접근법 중 하나입니다. 아데노신은 presynaptic 또는 postsynaptic 뉴런에서 수용체 상호작용 및 세포내 신호 전달을 통해 도파민 시스템에 영향을 미칩니다. 아데노신 수용체는 A₁, A_{2A}, A_{2B} 및 A₃의 4가지 하위 유형이 있으며, 이중에서도 A_{2A} 수용체의 역할은 파킨슨병에서 가장 광범위하게 연구되고 잘 알려져 있습니다.

파킨슨병에 대한 임상시험을 거친 5가지 A_{2A} 수용체 길항제의 화학구조는 그림 1과 같습니다. 이 중 이스트라데필린은 FDA 승인을 받은 first-in-class adenosine A_{2A} 수용체 길항제로 현재 임상에서 사용되고 있습니다^[3]. Merck에서 개발한 Preladenant는 임상 3상 시험에서 부정적인 결과로 인해 중단되었으며 Vernalis plc/Biogen Idec에서 개발한 vipadenant는 독성으로 인해 중단되었습니다. 또한 Acorda Therapeutics의 tozadenant 개발은 무과립구증 및 관련 심각한 부작용으로 인해 임상 3상에서 중단되었습니다^[4]. Sigma Tau에서 개발한 ST-1535도 중단되었는데 활성 대사 물질이 문제가 되었던 것으로 알려졌습니다.



그림 1. 항파킨슨병 약제로서의 A2A 수용체 길항제

이스트라데필린은 A_{2A} 수용체에 대해 매우 선택적이며 다른 아데노신 수용체 A₁, A_{2B} 및 A₃에 대해서는 훨씬 덜 선택적입니다^[5]. 뇌에서 도파민 신경세포의 presynaptic A₁ 수용체는 길항제가 존재할 때 A_{2A} 수용체와 상승적으로 작용할 수 있습니다^[6]. 따라서 매우 그럴듯한 가설은 A_{2A}/A₁ 수용체의 이중 길항제가 선택적 A_{2A} 길항제보다 PD에 훨씬 더 유익한 효과를 발휘할 수 있다는 것입니다^[7, 8].

본 연구에서는 앞서 언급한 가설을 바탕으로 1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-6-amine 모핵(**11o**)의 새로운 이중 A_{2A}/A₁ 길항제를 설계 및 합성하였고 이는 뛰어난 안전성 및 약동학(PK) 프로파일과 함께 높은 뇌 투과성과 대사 안정성을 가지고 있습니다. Preladenant 및 vipadenant는 이스트라데필린보다 *in vitro* 활성이 우수했지만 화합물의 chemical structure에 포함된 furan기로 인해 상대적으로 짧은 PK 프로파일을 가지며 대사적으로 덜 안정적이었습니다. 이러한 단점을 보완하기 위해 furan 고리 대신 페닐 또는 피리딜 고리를 도입했습니다(그림 2). Furan 고리를 페닐 고리로 교체한 후 관찰된 비교적 낮은 활성은 페닐 고리에 니트릴 그룹을 도입함으로써 극복되었습니다. 이 그룹을 피리딜 고리로 대체한 후에도 유사한 결과를 얻을 수 있었고, 니트릴 그룹을 도입한 경우 페닐 고리와 유사한 활성이 검출되었습니다. 하지만 이러한 긍정적인 활성 결과는 니트릴 그룹이 메타 위치에 있을 때만 잘 유지되었습니다.



R₁,R₂,R₃ = H, F, Me or CF₃ R₄ = H or F X = C or N

4a-b, 8, 11a-x

그림 2. 핵심 구조 설계

핵심 구조 설계를 위해서 처음에는 트리아졸, 피라졸 및 이미다졸이 피리미딘에 접합된 이중 고리 화합물들에 대해 연구했습니다(그림 2). 그 중 피라졸로피리미딘 고리가 가장 좋은 물리화학적 특성을 보였고 간단한 합성경로로 합성도 가능했습니다. 따라서, 본 연구에서는 피라졸로피리미딘 코어 구조를 갖는 일련의 유도체를 A_{2A} 및 A₁ 수용체 길항제(4a-b, 8, 11a-x)로서 평가하여 11o가 파킨슨병에 잠재적인

제 2 절 연구 결과

2.1. 화학

1*H*-피라졸로 [3,4-*d*]피리미딘-6-아민을 핵심 스캐폴드로 하는 A_{2A} 및 A₁ 수용체 길항제(화합물 **4a-b**, **8**, **11a-x**)의 합성은 효율적인 3단계 경로로 수행되었으며 세 가지 각기 다른 방법을 사용하여 합성 가능하였습니다. 세 가지 방법에 대한 일반적인 절차는 화학식 1, 화학식 2 및 화학식 3에 설명되어 있습니다.



화학식 1. 유도체 4a-b의 합성

Reagents and conditions: (a) 2-amino-4,6-dichloropyrimidine-5carboxaldehyde, DMF, TEA, 0-25 °C, 1 h, crude; (b) boronic acid pinacol ester (A), Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, dioxane/H₂O, 100 °C, 3 h, crude; (c) Fe/NH₄Cl, THF/H₂O, 80 °C, 2 h, 49-51%.



화학식 2. 유도체 8의 합성

Reagents and conditions: (a) 3-cyanophenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, dioxane/H₂O, 100 ℃, 16 h, crude; (b) 3-methyl-4nitrobenzyl chloride, K₂CO₃, DMF, 80 ℃, 16 h, 24%; (c) Fe/NH₄Cl, EtOH/H₂O, 60 ℃, 1 h, 38%.



화학식 3. 유도체 11a-x 의 합성

Reagents and conditions: (a) ArCH₂X, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 16 h, 37– 74%; (b) (method A) boronic acid (A), Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, dioxane/H₂O, 110 °C, 16 h, (method B) sodium cyanopyridine– sulfinate, Pd(OAc)₂, K₂CO₃, PCy₃, dioxane, 120 °C, 16 h, 21–90%; (c) Fe/NH₄Cl, EtOH/H₂O, 60 °C, 1h, 7–68%.

화합물 4a 및 4b의 합성을 위해 히드라진을 사용하여 핵심 바이사이클릭 고리를 직접 합성했습니다(화학식 1). 핵심 스캐폴드인 1*H*-피라졸로 [3,4-*d*]피리미딘-6-아민은 히드라진과 2-아미노-4,6-디클로로피리미딘-5-카복스알데히드를 사용한 고리융합 반응을 통해 생성되었습니다. 피리미딘 시약은 양쪽에 두 개의 클로로 원자가 대칭을 이루기 때문에 알데히드와 축합한 후 얻은 히드라진은 피리미딘 양쪽에 있는 어떠한 클로로기와 반응하여도 동일한 중간체 2를 얻을 수 있게 되어 불필요한 부산물의 생성을 줄일 수 있으므로 매우 효율적입니다. 생성된 화합물 2의 염소를 Suzuki coupling을 사용하여 3-벤조니트릴기로 치환한 후 철 가루를 이용한 니트로 환원반응으로 최종 화합물을 얻을 수 있었습니다.

화합물 8의 합성을 위해 시판되는 4-클로로-1*H*-피라졸로[3,4-*d*]피리미딘-6-아민(5)을 Suzuki coupling에 의해 3-시아노페닐보론산과 반응시켜 화합물 6을 얻었습니다. 벤질 할라이드로 알킬화한 다음 니트로 환원을 통해 최종 생성물을 얻었습니다 (화학식 2).

화합물 11a-11x의 합성은 중간체 5를 먼저 상응하는 벤질 할로겐화물로 알킬화 한 다음, 다양한 치환기가 도입된 페닐 / 피리딜기를 사용하여 Pd 촉매 하에 진행되는 cross-coupling으로 합성하였다. 화학식 2와는 다른 합성 순서로 진행하였다.

Ortho 위치에 치환된 시아노피리딜 (표 1, A1과 A2)의 경우, 고전적인 Suzuki, Stille, Negishi coupling을 사용하여 합성을 진행했을 때 강한 전자 결핍으로 인해 반응이 원활히 진행되지 않았습니다. 하지만 이러한 문제는 Pd 촉매하에 진행한 desulfination coupling으로 해결할 수 있었습니다^[9, 10]. 최종 화합물은 화학식 2와 마찬가지로 철가루를 이용한 니트로 환원을 통해 얻을 수 있었습니다. 특히, 니트로 환원 과정에서 피리딜의 시아노 그룹도 Fe/NH4Cl에서 환원된 후 쉽게 가수분해되었습니다. Pd/C 수소분해 조건에서도 유사한 결과가 확인되었습니다. 그러나 Fe/NH4Cl에서 환원 시간을 단축함으로써 이 문제를 해결할 수 있었고, 반응은 일반적으로 1시간 이내에 완료되었습니다. 모든 최종 화합물은 normal phase prep-HPLC를 사용하여 순도 95% 이상으로 효율적으로 정제되었습니다.

표 1. 합성된 화합물의 hA_{2A} 수용체에 대한 결합 친화도



	Compounds		D.	D.	A_{2A}	A_1
	Compounds	K1	K2	К3	K _i (nM)*	K_i (nM)*
	Istradefylline				8.64	610
11a		Н	Н	Н	310	2470
11e		F	Н	Н	120	710
11k		Н	Me	Η	65	510
11p	A1	F	Н	F	47	380
11v		Η	CF_3	Η	10.2	250
11b		Н	Н	Н	31	650
11f		F	Н	Н	10.6	160
111	A2	Н	Me	Н	6.39	180
11q		F	Н	F	6.84	150
11c		Н	Н	Н	4790	32,000
11g		F	Н	Н	2640	32,800
11m	A3	Н	Me	Н	2480	21,200
11r		F	Н	F	1220	10,000
11d		Н	Н	Н	4720	8530
11h		F	Н	Η	3190	28,000
11n	A4	Η	Me	Η	1150	21,300
11s		F	Н	F	4920	_

4a		Н	Н	Н	16.38	_
11i		F	Н	Н	12.1	160
8		Н	Me	Н	11.1	110
11t	A5	F	Н	F	7.42	50
11w		Н	CF_3	Н	1.94	49
4b		Н	Н	Н	19.4	-
11j	F	F	Н	Н	16.4	63
110	CN CN	Н	Me	Н	13.3	55
11u	A6	F	Н	F	6.45	30
11x		Н	CF_3	Н	2.71	33

* Value is the average of the duplicate experiments.

2.2. 생물학적 활성

2.2.1. 인체의 A1, A2A 수용체에 대한 in vitro 활성

인체의 A_{2A} 수용체(hA_{2A}R)에 대한 합성 화합물의 결합 친화도는 인체 내 A_{2A} 수용체를 발현하는 인간 재조합 HEK-293 세포의 막 제제를 사용하여 리간드와 방사성 리간드 [³H]-DPCPX의 경쟁적 결합을 평가하여 측정했습니다^[11]. 표 1에 표시된 바와 같이, 인체의 A_{2A} 수용체(hA_{2A}R)에 대한 핵심 스캐폴드로 치환된 벤질아민의 A 그룹 (시아노피리딜 또는 시아노페닐)와 R1, R2 및 R3에 대한 구조-활성 관계(SAR)를 조사했습니다.

벤질아민의 R₁₋₃의 SAR에서 치환되지 않은 벤질아민 고리(**11a**d 및 **4a**-**b**)를 가진 화합물은 *h*A_{2A} 수용체에 대한 낮은 결합 친화도를 보인 반면, R₂의 CF₃는 가장 좋은 결과를 보였습니다. 활성 변화의 순서는 CF₃ > *di*-F > Me > F > H 순이었으며, 피리딜 그룹과 페닐 그룹 모두에서 **A** 그룹에 관계없이 유사한 패턴이 나타났습니다.

다음으로 A 그룹의 SAR을 조사했습니다. 피리딜 A 그룹에서는 피리딜 고리에서 'N'의 위치에 따라 활성이 크게 영향을 받았습니다. 일련의 화합물 A1-6 중에서 6-피콜리노니트릴 유도체(A2)가 가장 우수한 활성을 보였고, 그 다음으로 2-아이소니코티노니트릴 치환 화합물(A1)이 중간 정도의 활성을 보였습니다. 5-니코티노트릴(A3) 및 4-피콜리노니트릴 유도체(A4)는 매우 낮은 활성을 나타냈습니다. 페닐이 포함된 A 그룹은 모두 유망한 활성을 나타냈습니다. 3-벤조니트릴(A5)과 2-플루오로-3-벤조니트릴(A6) 사이에는 활성에 큰 변화가 거의 관찰되지 않았습니다. 전반적으로 시아노페닐 그룹은 A 그룹의 SAR에서 시아노피리딜 그룹보다 약간 더 나은 활성을

데스트한 화합물 중 A2, A5, A6기가 있는 화합물은 모두 좋은 활성을 보였습니다. 그러나 시아노피리딜기 A1-A4는 시아노페닐기(A5 및 A6, 미공개 데이터)를 가진 화합물보다 *h*A1 수용체에 대한 억제 활성이 낮았습니다. 최근 PD 동물 모델을 사용하여 보고된 연구 결과에 따르면 hA₁ 수용체에 대한 친화성이 PD에 긍정적으로 기여할 수 있다는 보고가 있습니다^[6,8]. 따라서 우리는 시아노페닐기(A5 및 A6)를 사용하면 시아노피리딜(A2)보다 PD에 더 높은 시너지 효과를 나타낼 수 있다는 가설을 세우고 실험을 진행하였습니다.

A_{2A} 수용체에 대한 K_i 값이 30 nM 미만인 화합물 목록에서 A₁ 수용체에 대한 K_i 값이 100 nM 미만인 화합물을 추가로 선택했습니다. 또한 약물을 비장 내 전달하는 것이 화합물의 뇌 노출을 극대화할 수 있기 때문에 용해도가 높은 화합물을 선정하는 것이 필요하다고 판단했습니다. **11v**, **11w**, **11x**와 같이 아닐린 옆에 강한 전자 끌기 그룹(EWG)인 CF₃가 있는 화합물은 염 형성의 어려움이 커 용해도가 크게 떨어집니다. R₁과 R₂에 불소기가 치환된 **11t**와 **11u**의 경우 역시 강한 EWG로 인해 염 형성이 불가능했습니다. 염 형성이 가능한 화합물 중 A_{2A}와 A₁ 수용체 모두에 가장 우수한 결합 친화도를 보인 화합물은 **11o**였습니다. 따라서 **11o**를 신약 후보물질로 선정하여 추가 연구를 진행하였습니다.

다음으로, A₁ 및 A_{2A} 아데노신 수용체에 대한 **11o**의 기능적 활성을 CHO-K1 (A₁) 및 HEK-293 (A_{2A}) 세포에서 c-AMP 시험을 사용하여 평가했습니다. **그림 3**에서 보는 바와 같이, **11o**는 A₁ 및 A_{2A} 아데노신 수용체에서 각각 98.8 nM 및 136 nM의 IC₅₀ 값으로 완전한 길항작용을 나타내었으며, 이는 **11o**가 이중 A₁/A_{2A} 길항제임을 나타냅니다.



그림 3. 인체의 아데노신 수용체에 대한 화합물 **11o**의 기능적 활성 (a) CHO-K1 세포의 A₁ 수용체 (b) HEK-293 세포의 A_{2A} 수용체

2.2.2. 아데노신 수용체 하위 유형에 대한 선택성

아데노신 수용체에 대한 선택성을 조사하기 위해 A₁, A_{2A}, A_{2B} 및 A₃의 네 가지 아데노신 수용체에 대한 **11o**의 결합 활성을 조사하고 비교했습니다.

11o는 A₁과 A_{2A} 수용체 모두에 대해 상대적으로 높은 선택성을 보여 각각 55 nM과 13.3 nM의 K_i 값을 보였으나, A_{2B}와 A₃ 수용체에는 각각 0.4 μM과 1.05 μM의 낮은 결합 친화력을 보여 화합물 11o가 이중 A_{2A}/A₁ 수용체 길항제임을 나타냈습니다(표 2).

표 2. 결합 활성에 따른 화합물 11o의 인체 내 아데노신 수용체에 대한 선택성

Adenosine Receptors	$\rm IC_{50}~(nM)^a$	K_i (nM) ^a	${n_{ m H}}^{ m b}$
A ₁	94	55	1.17
A _{2A}	24	13.3	0.79
A _{2B}	1220	400	0.98
A ₃	1130	1050	0.44

^a Value is the average of the duplicate experiments; ^b n_H , Hill coefficient. Values significantly greater or less than 1 represent either positive or negative cooperative binding, respectively, whereas a Hill coefficient of 1 indicates that the affinity of the receptor for the ligand is independent of other bound ligand(s).

2.2.3. 파킨슨병 동물 모델에서의 in vivo 활성

후속 연구에서는 MPTP-병변 마우스 모델을 사용하여 PD에서 110의 치료 효능을 평가했습니다^[12]. MPTP-병변 마우스 모델은 가장 잘 확립된 PD 모델 중 하나이며, 마지막 MPTP 투여 7일 후 HPLC를 사용하여 분석하였을 때 선조체 도파민의 약 90%가 손실된 것을 확인하였습니다^[13].

마지막 MPTP 처리 30분 후 **11o**를 투여하고 그 후 7일 동안 매일 1회 투여한 결과, 최대 10 mg/kg의 용량에서는 MPTP로 인한 도파민 고갈(데이터 미표시)을 회복시키지 못했습니다. 그러나 1 및 10 mg/kg 용량을 비강 내 투여한 후 마우스의 둥지 짓기 활동을 테스트한 결과, 화합물 11o는 유의미한 차이는 관찰되지 않았지만 부분적으로 활동 수준을 sham 수준에 가깝게 회복시켰습니다(그림 4). 종합하면, 화합물 11o는 도파민 수치에 영향을 미치지 않으면서도 MPTP에 감염된 마우스의 행동 결과에는 긍정적인 영향을 보였습니다. 현재 이에 대한 추가 연구로서 6-OHDA 랫드 모델에서 L-DOPA와 11o의 시너지 효과를 확인하는 흥미로운 접근 방식을 시도하고 있습니다.



그림 4. Sham과 vehicle, rasagiline, 11o(비강 내)로 처리한 MPTP-병변이 있는 마우스의 등지 짓기 평가 결과. The graph presents the mean nesting scores ± SEM (*n* = 12 rats per group). Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test (all mean values were compared to MPTP, vehicle). * *p* < 0.05 and ** *p* < 0.01.

또 다른 실험에서 화합물 11o는 할로페리돌로 유도된 암컷 랫드에서 용량 의존적으로 카탈렙시가 역전되는 결과를 가져왔습니다(그림 5). Vehicle 또는 다양한 양의 **11o**(0.3, 1, 3, 10 mg/kg)를 먼저 투여한 후 60분 후에 1 mg/kg 할로페리돌을 IP로 투여하였습니다. 할로페리돌 주입 후 60분 후 막대에서 내려오는 지연 시간을 측정하여 카탈렙시를 평가했을 때, **11o**는 용량 의존적으로 할로페리돌로 인한 카탈렙시를 역전시켰으며, 10 mg/kg에서 최대 효과가 관찰되었습니다. 이는 양성 대조군인 이스트라데필린(1 mg/kg)에서 관찰된 효과와 비슷했습니다.



그림 5. 할로페리돌(HP)을 주사한 암컷 랫드의 스텝 다운 지연 시간. Rats were administered with **11o** (PO) 60 min before haloperidol injection at increasing dose levels. Istradefylline (1 mg/kg, PO) was used as positive control. The graph presents the mean latency (seconds) ± SEM (n = 10 rats per group). Data were analyzed using the one-way ANOVA with Dunnett' s multiple comparisons test (all mean values were compared to vehicle). * p < 0.01.

2.3.1. in vitro 대사 안정성

11o의 대사 안정성을 이해하기 위해 5가지 종(CD-1 마우스, Sprague Dawley 랫드, beagle dogs, cynomolgus monkeys, 인간)의 동결 보존 간세포를 사용하여 체외 내 고유 클리어런스(CL_{int})를 조사했습니다(표 3).

표 3. 마우스, 랫드, 개, 원숭이 및 인체 간세포에서 11o 및 미다졸람의 반감기, intrinsic 클리어런스 및 extrapolated 클리어런스 값의 요약

	TT-1	с т:с.	T	01	Extrapolated
Species	(min)		(mL/min/10 ⁶ cells)		Clearance, CL (mL/min/kg)
-	110	Midazolam ^b	110	Midazolam	110
Mouse	70.9	49.9	0.00977	0.0139	115
Rat	46.9	21.9	0.0148	0.0317	69.2
Dog	ND^{a}	32.8	ND^{a}	0.0211	ND^{a}
Monkey	124	36.0	0.00558	0.0192	20.1
Human	184	68.3	0.00377	0.0101	9.58

^a ND: Not determined because little/no compound depletion was

observed. $^{\rm b}$ Midazolam (0.2 $\,\mu\,\text{M})$ was used as the positive control.

5종의 간세포에 1µM 11o를 배양했을 때 마우스, 랫드, 원숭이, 사람 간세포에서 배양 후 각각 70.9, 46.9, 124, 184분 만에 t_{1/2} 값을 가지며 소실되었습니다. 시험 조건에서 이 화합물은 개 간세포에서 반감기, 고유 클리어런스 및 추정 클리어런스 값이 결정될 수 없을 만큼 안정적이었습니다. 잘 확립된 간 제거 모델을 사용하여 이러한 반감기를 측정한 결과 CL_{int} 값은 9mL/min/million 세포당 0.0098(마우스), 0.0148(랫드), 0.056(원숭이), 0.0038(인간)로 나타났습니다. 추정된 CL_{int} 값(mL/min/kg)은^[14] 115(마우스), 69.2(랫드), 20.1(원숭이), 9.6(인간)이었습니다. 인체 간세포에서 화합물 11o의 CL_{int}는 이 실험에서 양성 대조군으로 사용된 미다졸람의 40% 미만이었습니다. 반감기를 기준으로 간세포에서 11o의 안정성은 개 >> 사람 > 원숭이 > 마우스 > 랫드 순이었으며, 이는 11o가 개 간세포에서 매우 안정적이었던 반면 랫드에서는 가장 안정적이지 않았음을 나타냅니다.

2.3.2. in vivo 약동학 연구

11o를 마우스에 경구 투여했을 때, 혈장 농도가 용량 의존적으로 증가하는 것으로 나타났습니다(그림 6a). 또한 경구 및 정맥 투여 모두 뇌에서 약물 검출이 가능했고 용량에 비례하는 수준의 11o가 검출되어(그림 6b) 뇌 침투가 양호함을 나타내었습니다.



그림 6. 마우스 혈장(a)과 뇌(b)에서 시간 대비 11o의 평균 농도. 11o는 경구(PO) 또는 정맥(IV)으로 투여되었습니다. 각 시점에 각 그룹에서 세 마리의 마우스를 샘플링하여 혈액과 뇌를 수집하였습니다. 혈장 및 브레인 샘플 속 11o의 농도는 LC-MS/MS를 사용하여 분석했습니다.

마우스 혈장 내 **11o**의 약동학 파라미터는 **표 4**에 설명되어 있습니다. PO 투여 후 모든 용량에서 T_{max}는 2시간이었습니다. T_{1/2} 값은 1, 3 및 10 mg/kg 용량에서 각각 4.38시간, 3.66시간 및 5.69시간이었습니다. C_{max} 값은 1, 3 및 10 mg/kg 용량에서 각각 36.8 ng/mL, 81.4 ng/mL 및 367 ng/mL이었고, AUC_{last} 값은 세 가지 용량에서 176 h · ng/mL, 577 h · ng/mL 및 2248 h · ng/mL이었습니다. 정맥주사 투여 후 T_{max}는 0.083시간, T_{1/2} 값은 3.95시간이었고, C_{max} 및 AUC_{last} 값은 각각 459 ng/mL 및 332h · ng/mL였습니다.

표 4. 마우스 혈장에서 11o의 약동학 매개변수 및 생체이용률

Dose	Dose	T_{max}	T _{1/2}	C_{max}	AUC _{last}	BA °
(mg/kg)	Route	(h)	(h)	(ng/mL)	(h · ng/mL)	(%)
1	РО	2.00	4.38	36.8	176	53.0
3	РО	2.00	3.66	81.3	577	57.9
10	РО	2.00	5.69	367	2249	67.7
1	IN	0.50	NC ^a	23.3	74.9	22.6
3	IN	0.50	NR ^b	53.9	183	18.4
10	IN	0.50	7.40	88.5	444	13.4
1	IV	0.083	3.95	459	332	100

^a NC = not reported due to insufficient data points for the elimination phase or no exposure. ^b NR = not reported due to a poor goodness of fit (R_2 < 0.8) for the elimination phase. ^c % Bioavailability (BA) = $[(AUC/Dose)/(AUC_{IV}/Dose_{IV})] \times$ 100; AUC_{last} for the 1 mg/kg IV dose was used for the calculation.

비강 내(IN) 투약은 모든 그룹에서 0.5시간의 짧은 T_{max}를 나타냈는데, 이는 이 경로를 통해 화합물이 PO에 비해 더 빨리 체내에 도달했음을 나타냅니다. T1/2 값은 10 mg/kg 용량 그룹의 경우 7.4시간이었습니다. 다른 2개 용량 그룹의 T_{1/2} 값은 제거 단계의 데이터 포인트가 불충분하거나 제거 단계의 적합도(R² <0.8)가 좋지 않아 계산되지 않았습니다. 1, 3, 10 mg/kg 용량에 대한 Cmax 값은 각각 23.3 ng/mL, 53.9 ng/m 및 88.5 ng/mL이었으며, AUC_{last} 값은 각각 74.9, 183 및 444 h · ng/mL이었습니다.

경구 생체이용률은 정맥주사 투여 그룹과 비교하여 AUC_{last}를 기준으로 평가했으며, 데이터는 **표** 5에 정리하였습니다. 경구 투여 후 **110**의 생체 이용률은 1, 3, 10 mg/kg 용량 그룹에서 각각 53%, 57.9%, 67.7%로 양호한 생체 이용률을 나타냈습니다. IN 투여 후 생체 이용률은 용량에 따라 13.4-22.6%로 상대적으로 낮았습니다.

Dose	Dose	T_{max}	T _{1/2}	C_{max}	AUC _{last}	
(mg/kg)	Route	(h)	(h)	(ng/mL)	(h · ng/mL)	D/P Katio
1	PO	2.00	NC ^a	5.58	4.26	0.0242
3	РО	0.50	3.23	12.8	56.4	0.0977
10	РО	2.00	7.71	48.1	375	0.167
1	IN	0.50	NC	9.63	5.23	0.0698
3	IN	0.50	NC	15.9	14.2	0.0776
10	IN	0.50	3.74	38.2	81.3	0.183
1	IV	0.083	NR ^b	410	246	0.741

표 5. 마우스 뇌에서 110의 약동학 파라미터 및 뇌/혈장 비율

^a NC = not reported due to insufficient data points for the elimination phase or no exposure. ^b NR = not reported due to a poor goodness of fit (R2 < 0.8) for the elimination phase. ^c B/P ratio = (Brain AUC_{last}/Plasma AUC_{last}).

있습니다. PO 및 IN 투여 모두 뇌에서 검출 가능한 수준의 11o를 확인하였으며, 1, 3 및 10 mg/kg의 용량에서 각각 4.26/5.23, 56.4/14.2 및 375/81.3 h·ng/mL의 유의한 AUC_{last} 값을 나타냈습니다. B/P 비율은 PO 투여 그룹의 경우 0.0242-0.167, IN 투여 그룹의 경우 0.0698-0.183 범위였습니다. 이러한 결과를 바탕으로 11o는 IN 경로를 통해 전달될 때 더 낮은 AUC_{last}에도 불구하고 PO 경로와 비교했을 때 뇌에 더 빨리 도달하는 것으로 추정되었습니다.

2.4. 독성 연구

110의 잠재적 심장 독성을 평가하기 위해 수동 패치 클램프 방법을 사용하여 hERG(human-ether-a-go-go) 발현 HEK 세포주에서 hERG liability를 평가했습니다^[15]. IC₅₀은 116 μM으로, 이 값은 생리적으로 적절한 용량에서 화합물의 *h*ERG liability가 낮다는 것을 시사합니다(**표** 6).

표 6.11o의 hERG 억제, 돌연변이 유발성 및 최대 내약 용량

Toxicity	
<i>h</i> ERG inhibition	$IC_{50} = 116 \ \mu M$
AMES	no mutagenicity up to 1867 μ g/plate

MTD (rat)	>1000 mg/kg
MTD (dog)	>400 mg/kg

박테리아 돌연변이 유발 연구에서^[16, 17] 돌연변이를 역전시키는 능력을 평가하여 **11o**의 돌연변이 유발 가능성도 테스트하였습니다. **11o**는 최대 1867µg/plate에서 양성 돌연변이 유발 반응을 일으키지 않았으며, 이는 이 화합물이 돌연변이 유발성이 없음을 시사합니다.

다음으로 랫드와 개를 대상으로 110의 최대 내약 용량(MTD)을 조사했습니다. 수컷 및 암컷 Sprague Dawley 랫드에서 110를 단회 경구 투여한 후의 MTD는 1000 mg/kg을 초과했으며 체중 감소나 사망률은 관찰되지 않았습니다. 수컷 및 암컷 비글견에서 MTD를 평가한 결과, 화합물을 단회 경구 투여한 후 얻은 값은 >400 mg/kg이었으며, 수컷(-5.7%)과 암컷(-6.5%) 모두에서 체중이 약간 감소했으나 이는 시험 부작용이나 시험 약물과 관련이 있는 현상은 아닌 것으로 간주되었습니다. 이러한 결과는 110의 단일 용량이 랫드와 개에서 각각 최대 1000 mg/kg 및 400 mg/kg까지 내약성이 우수함을 나타냅니다.

제 3 절 연구 재료 및 방법

3.1. 화학

¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼의 경우 Bruker Avance III 400MHz 분광기를 사용했습니다. 결합 상수는 헤르츠, 피크 배수는 NMR에서 s(싱글렛), d(더블렛), dd(더블렛의 더블렛), t(트리플렛), m(멀티렛), br d(넓은 더블렛), br s(넓은 싱글렛) 및 td(더블렛의 트리플렛)로 표시했습니다. 화학물질의 순도를 분석하는 데 사용된 HPLC는 Agilent 1100 LC/G1956A(컬럼: Agilent Eclipse Plus C18 3.5 µm, 4.6 × 150 mm), Agilent 1100 LC/G1956A(컬럼: Waters Xbridge@C18 3.5 µm, 4.6 × 150 mm); Agilent 1200/G6410B(컬럼: Eclipse Plus C18 3.5 µm 4.6 × 150 mm); SHIMADZU LC 20AB(컬럼: Xbridge@C18 3.5 μm 4.6 × 150 mm). 경우에 따라 prep-HPLC(컬럼: Phenomenex Luna C18 150 × 25 mm × 10 µm; 이동상: [물(0.225% FA)-ACN]; B%: 23-53%, 10분)를 사용하여 화학 물질을 정제했습니다. LC/MS는 SHIMADZU LCMS-2020(컬럼: kinetex EVO C18 $2.1 \times$ 30 mm, 5 μ m), Agilent 1200/G6110A(컬럼: ACE Excel 5 C18 2.1 × 30 mm, 5 µm)를 사용하여 측정했습니다. 고해상도 질량 스펙트럼(HRMS)은 Agilent G6520 Q-TOF를 사용하여 전기분무 이온화(ESI)로 측정했습니다.

3.1.1. 4a-4b에 대한 일반 절차 A

4-Chloro-1-(4-nitrobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3, 4-d] pyrimidin-6-

amine (2)

2-amino-4,6-dichloropyrimidine-5-carboxaldehyde (1.0 eq)를 DMF에 녹이고 TEA (5.0 eq) 및 4-니트로 페닐 히드라진 1 (1.0 eq, 2 HCl)을 0 ℃에서 첨가한 후 혼합물을 25 ℃에서 1 시간 동안 교반하였습니다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트로 희석하고 염수로 세척했습니다. 유기층을 농축하여 갈색 고체를 얻었습니다. 화합물 2 (crude)는 황색 고체로 얻어졌습니다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.40 (br d, J = 8.8 Hz, 4H), 5.56 (s, 2H).

3-(6-Amino-1-(4-nitrobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl)benzonitrile (**3a**)

중간체 2 (1.00 eq), 3-cyanophenylboronic acid pinacol ester (1.5 eq) Na₂CO₃ (2.0 eq) 및 Pd(PPh₃)₄ (0.05 eq)의 혼합물을 H₂O 및 다이옥산에서 탈기하고 N₂로 세 번 퍼지하고 혼합물을 N₂ 하에서 100 ℃ 조건으로 3 시간 동안 교반했습니다. 반응 혼합물을 여과하여 불용물을 제거했습니다. 여과액을 진공 상태에서 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 잔류물을 물로 trituration했습니다. 그런 다음 혼합물을 EtOH로 trituration했습니다. 화합물 **3a** (crude)를 황색 고체로 수득하였습니다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.59-8.44 (m, 3H), 8.20 (br d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.07 (br d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 7.6 Hz, 1H),

7.43 (br d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (br s, 2H), 5.62 (s, 2H).

3-(6-Amino-1-(4-aminobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-

d]pyrimidin-4-yl)benzonitrile (**4a**)

중간체 3 (1.0 eq), Fe (5.0 eq) NH4Cl (5.0 eq)을 THF와 H2O에 넣고 80 ℃에서 2시간 동안 교반한 후 여과 및 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 필터케이크를 25 ℃에서 1 N HCl로 quench 하였습니다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, dichloromethane / THF = 1/0 to 10/1) 로 정제했습니다. 생성물 4a (수율 51.3 %, 순도 99.2 %)를 노란색 고체로 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.52-8.46 (m, 2 H), 8.36 (s, 1 H), 8.06-8.04 (m, 1 H), 7.79 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.08 (s, 2 H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 6.50 (dd, *J* = 6.8, 1.6 Hz, 2 H), 5.25 (s, 2 H), 5.05 (s, 2 H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 162.5, 158.6, 156.4, 148.6, 138.2, 134.8, 133.6, 133.5, 132.2, 130.7, 129.1, 124.6, 118.9, 114.1, 112.6, 105.0, 49.7; HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₅N₇ [M + H]⁺ 341.1389, found: 341.1386.

3-(6-Amino-1-(4-aminobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-

d]pyrimidin-4-yl)-2-fluorobenzonitrile (**4b**)

화합물 3b와 4b를 일반 절차 A에 따라 순차적으로 처리하여 4b를 황색

고체(91.0g, 252mmol, 49.0% 수율, 98.27% 순도)로 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.18-8.12 (m, 2 H), 7.98 (d, J =3.6 Hz, 1 H), 7.60 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.13 (s, 2 H), 6.98 (d, J =8.4 Hz, 2 H), 6.50 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 5.24 (s, 2 H), 5.06 (s, 2 H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.6, 161.8, 159.2, 155.6 (d, J =15.9 Hz, 1C), 148.7, 137.0 (d, J = 3.5 Hz, 1C), 136.3, 133.8 (d, J =8.3 Hz, 1C), 129.1, 126.3 (d, J = 3.9 Hz, 1C), 126.1 (d, J = 11.9 Hz, 1C), 124.5, 114.4, 114.1, 106.8, 102.0 (d, J = 15.9 Hz, 1C), 49.7; HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₄FN₇ [M + H]⁺ 359.1295, found: 359.1289.

3.1.2. 8에 대한 일반 절차 B

3-(6-Amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl)benzonitrile (6)

상업적으로 이용가능한 4-chloro-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidin-6-amine 5 (1.0 eq), (3-cyanophenyl)boronic acid (1.2 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq) and Na₂CO₃ (2 eq)를 dioxane에 넣고 질소로 세 번 퍼지한 후 100 ℃에서 16시간 동안 질소 하에 교반하였습니다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트와 물을 사용하여 층 분리하였습니다. 그 중 유기상을 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 감압으로 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 화합물 **6**(500 mg, crude)을 황색 고체로 수득하여 별도의 추가 정제 없이 다음 단계에
사용하였습니다: MS: m/z = 237.1 (M + 1, ESI⁺).

3-[6-Amino-1-[(3-methyl-4-nitro-

phenyl)methyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]benzonitrile (7)

4-(chloromethyl)-2-methyl-1-nitro-benzene (500 mg, 1.27 eq)와 3-(6-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4yl)benzonitrile (1.0 eq)를 DMF에 녹인 후, K₂CO₃ (2.0 eq)를 첨가하였습니다. 혼합물을 80 ℃에서 16시간 동안 교반하고, 반응 혼합물을 감압 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 잔류물을 prep-HPLC로 정제하였습니다: (column: Phenomenex Luna C18 150 × 25mm × 10µm; mobile phase: [water (0.225% FA)-ACN]; B%: 40-70%, 10 min). 화합물 7(200 mg, 수율 24%)을 황색 고체로 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.56-8.42 (m, 3H), 8.10-8.06 (m, 1H), 8.00-7.92 (m, 1H), 7.86-7.76 (m, 1H), 7.40-7.30 (m, 1H), 7.24-7.08 (m, 3H), 5.65-5.43 (m, 2H), 2.49 (s, 3H); MS: m/z = 386.0 (M + 1, ESI⁺).

3-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)benzonitrile (**8**)

에탄올(12 mL)과 물(4 mL)에 중간체 **7**(150 mg, 1.0 eq)을 혼합하고 철가루(5.0 eq)와 NH4Cl (8.0 eq)을 첨가했습니다. 혼합물을 60 ℃에서 1시간 동안 교반 하였습니다. 반응 혼합물을 여과하고 감압 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 생성된 잔류물을 prep-HPLC로 정제하였습니다 (column: Phenomenex Luna C18 150 × 25 mm*10 μm; mobile phase: [water (0.225% FA)-ACN]; B%: 23-53%, 10 min). 생성물 **8**(54.26 mg, 수율 38%, 순도 98.27%)을 백색 고체로 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.51 (s, 1H), 8.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.79 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz,1H), 6.52 (d, J = 8.0Hz,1H), 5.23 (s, 2H), 4.80-4.78 (m, 2H), 1.99 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 162.0, 158.1, 155.9, 146.1, 137.8, 134.4, 133.1, 133.0, 131.8, 130.3, 129.6, 126.2, 124.4, 120.9, 118.4, 113.7, 112.1, 104.5, 49.2, 17.5; HRMS (ESI) calc. for C₂₀H₁₇N₇ [M + H]⁺ 355.1545, found: 355.1544.

3.1.3. 11a~11w의 일반 절차 C

4-Chloro-1-(3-methyl-4-nitrobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-

d]pyrimidin-6-amine (9c)

DMF 용액에 4-chloro-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-6amine **5** (1.0 eq) 와 4-(chloromethyl)-2-methyl-1-nitrobenzene (0.8 eq)를 넣고, K₂CO₃ (2.0 eq)를 첨가하여 80°C에서 16시간 동안 교반 하였습니다. 반응 혼합물을 실온으로 두고 여과한 후 진공 조건에서 농축하여 crude 화합물 9c를 얻었습니다. 화합물 9c는 노란색 고체로 얻어졌으며 (800 mg, crude), 별도의 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였습니다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.08 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (s, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 2.49 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 161.65, 156.06, 153.70, 148.06, 142.45, 133.17, 132.96, 131.27, 125.87, 124.87, 106.19, 48.92, 19.57; HRMS (ESI) calc. for C₁₃H₁₂ClN₆O₂ [M + H]⁺ 319.0705, found: 319.0708.

3-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)-2-fluorobenzonitrile (**10o**)

다이옥산과 물에 (3-cyano-2-fluoro-phenyl)boronic acid (1.2 eq), 중간체 9c (1.0 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq), Na₂CO₃ (2.0 eq)의 혼합물을 질소로 세번 퍼징한 후 질소 하에서 110 ℃로 16 시간 동안 교반하였습니다. 반응 혼합물을 여과하고 감압 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 생성된 잔류물을 flash silica-gel 크로마토그래피를 사용해 정제하였습니다. (ISCO^{®®}; 40 g SepaFlash^{®®} Silica Flash Column, eluent of 0-80% EtOAc/petroleum ether gradient @ 40 mL/min). 화합물 10o를 황색 고체(수율 90%, 순도 98.54%)로 수득하였습니다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22-8.18 (m, 2H), 8.11 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.24-7.22 (m, 3H), 5.56 (s, 2H), 2.52 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.32, 161.35, 158.74, 155.85, 155.32, 148.02, 142.77, 136.53 (d, J = 3.6 Hz, 1C), 135.88, 134.22 (d, J = 8.0 Hz, 1C), 133.18, 131.39, 125.95-125.83 (m, 1C), 125.53 (d, J = 12.5 Hz, 1C), 124.90, 113.82, 106.23, 101.58 (d, J = 15.0 Hz, 1C), 48.56, 19.64; HRMS (ESI) calc. for C₂₀H₁₅FN₇O₂ [M + H]⁺ 404.1266, found: 404.1268.

3-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)-2-fluorobenzonitrile (**11o**)

물과 에탄올에 중간체 10o (1.0 eq)를 넣은 후 철가루 (5.0 eq) 과 NH₄Cl (8.0 eq)를 이어 추가했습니다. 혼합물을 60 ℃에서 1시간 동안 교반한 후 반응 혼합물을 여과하고 감압 농축하여 잔류물을 얻었습니다. 생성된 잔류물은 prep-HPLC를 이용하여 정제했습니다 (column: Phenomenex Synergi C18 150 × 25 mm × 10 μm; mobile phase: [water (0.225%FA)-ACN]; B%: 16-46%, 11 min), 1차 정제로 89% 순도의 화합물을 얻었습니다. 잔류물을 prep-HPLC로 추가 정제했습니다: (column: Phenomenex Luna C18 150 × 25 mm × 10 μm; mobile phase: [water (0.225% FA)-ACN]; B%: 18-48%,10 min). 화합물 11o를 백색 고체(수율 59%, 순도 97.78%)로 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17-8.13 (m, 2H), 7.96 (d, J =

3.6 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.89 (d, J = 1.6Hz, 1H), 6.84 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.22 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 4.81 (br s, 2H), 2.00 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.2, 161.3, 158.7, 155.1 (d, J = 15.8 Hz, 1C), 146.1, 136.6, 135.8, 133.3 (d, J = 8.4 Hz, 1C), 129.7, 126.2, 125.9, 125.7 (d, J = 12.5 Hz, 1C), 124.3, 120.9, 113.9, 113.7, 106.3, 101.5 (d, J = 15.9 Hz, 1C), 49.2, 17.4; HRMS (ESI) calc. for $C_{20}H_{16}FN_7$ [M + H]⁺ 373.1451, found: 373.1466.

2-(6-Amino-1-(4-aminobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-

d]pyrimidin-4-yl)isonicotinonitrile (**11a**)

화합물 9a 및 10a를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 8%, 순도 95.02%)로서 11a를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.08 (dd, J = 5.2, 0.8 Hz, 1H), 8.67 (t, J = 1.4 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.95 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.48 (dd, J = 6.8, 1.6 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.03 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 162.0, 156.6, 156.4, 155.7, 151.1, 148.2, 134.8, 128.5, 127.1, 124.1, 123.6, 120.6, 116.6, 113.7, 104.4, 49.1; HRMS (ESI) calc.

for $C_{18}H_{14}N_8$ [M + H]⁺ 342.1341, found: 342.1334.

6-(6-Amino-1-(4-aminobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-

d]pyrimidin-4-yl)picolinonitrile (**11b**)

화합물 9a 및 10b를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 11%, 순도 98.25%)로서 11b를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.65 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.31 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.12 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.26 (s, 2H), 5.03 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.0, 155.8, 148.1, 139.5, 134.5, 132.6, 130.7, 128.8, 129.2, 125.5, 124.1, 113.7, 104.4, 49.1; HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₄N₈ [M + H]⁺ 342.1341, found: 342.1334.

5-(6-Amino-1-(4-aminobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)nicotinonitrile (**11c**)

화합물 9a 및 10c를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 7%, 순도 98.17%)로서 11c를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 9.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.91 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.12 (s, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.03 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.0, 156.0, 155.8, 154.0, 152.4, 148.2, 139.4, 133.1, 132.3, 128.6, 124.0, 116.6, 113.6, 109.6, 104.8, 49.2; HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₄N₈ [M + H]⁺ 342.1341, found: 342.1345. 4-(6-Amino-1-(4-aminobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-

d]pyrimidin-4-yl)picolinonitrile (**11d**)

화합물 9a 및 10d를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 백색 고체(수율 18%, 순도 95.28%)로서 11d를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.40 (dd, *J* = 5.0, 1.8 Hz, 1H), 7.19 (s, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.04 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.0, 156.0 (d, *J* = 2.5 Hz, 1C), 152.2, 148.2, 145.2, 133.6, 132.8, 128.6, 127.4, 126.4, 123.9, 117.4, 113.6, 104.8, 49.2; HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₄N₈ [M + H]⁺ 342.1341, found: 342.1365.

2-(6-Amino-1-(4-amino-2-fluorobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)isonicotinonitrile (**11e**)

화합물 9b 및 10e를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 32%, 순도 96.12%)로서 11e를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.08 (dd, *J* = 4.8, 0.8 Hz, 1H), 8.68 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.08 (dd, *J* = 5.2, 1.6 Hz, 1H), 7.13 (s, 2H), 6.88 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.32-6.31 (m, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.6, 162.4, 160.2, 157.0, 156.1, 151.6, 151.0 (d, *J* = 11.6 Hz, 1C), 135.5, 131.2 (d, J = 6.7 Hz, 1C), 127.6, 124.1, 121.1, 117.1, 110.4, 110.2 (d, J = 2.5 Hz, 1C), 104.8, 100.2 (d, J = 25.05 Hz, 1C), 43.2; HRMS (ESI) calc. for $C_{18}H_{13}FN_8$ [M + H]⁺ 360.1247, found: 360.1253.

6-[6-Amino-1-[(4-amino-2-fluorophenyl)methyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]pyridine-2carbonitrile (**11f**)

화합물 9b 및 10f를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 30%, 순도 96.38%)로서 11f를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.65 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.31 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.13 (s, 2H), 6.86 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.31 (dd, J = 5.4, 1.8Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.1, 162.0, 159.7, 156.6, 156.5, 155.8, 150.5 (d, J = 11.5 Hz, 1C), 139.5, 134.7, 132.6, 130.6 (d, J = 6.6 Hz, 1C), 125.5, 117.3, 109.9, 109.8 (d, J = 2.4 Hz, 1C), 104.3, 99.8 (d, J =23.8 Hz, 1C), 42.8 (d, J = 3.2 Hz, 1C); HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₃FN₈ [M + H]⁺ 360.1247, found: 360.1238.

5-(6-Amino-1-(4-amino-2-fluorobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)nicotinonitrile (**11g**) 화합물 9b와 10g을 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 13%, 순도 94.57%)로서 11g을 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 9.23 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.91 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.14 (s, 2H), 6.90 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.4, 156.47 (d, *J*F = 13.9 Hz), 154.52, 152.90, 151.08 (d, *J*F = 11.5 Hz), 139.86, 133.74, 132.78, 131.30 (d, *J*F = 5.7 Hz), 117.12, 110.27, 110.21, 110.04, 105.13, 100.20 (d, *J*F = 23.8 Hz), 43.26 (d, *J*F = 3.3 Hz); HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₃FN₈ [M + H]⁺ 360.1247, found: 360.1251.

4-(6-Amino-1-(4-amino-2-fluorobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)picolinonitrile (**11h**)

화합물 9b 및 10h를 일반 절차 C에 따라 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 7%, 순도 95.76%)로서 11h를 수득하였습니다; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.40 (dd, *J* = 5.2, 1.6 Hz, 1H), 7.19 (s, 2H), 6.89 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.30 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.2, 162.0, 159.8, 156.1 (d, *J* = 6.6 Hz, 1C), 152.2, 150.6 (d, *J* = 11.5 Hz, 1C), 145.2, 133.6, 133.1, 130.9, 127.4, 126.4, 117.4, 109.7, 109.6, 104.7, 99.7 (d, *J* = 23.9 Hz, 1C), 42.9 (d, J = 3.2 Hz, 1C); HRMS (ESI) calc. for $C_{18}H_{13}FN_8$ [M + H]⁺ 360.1247, found: 360.1244.

3-(6-Amino-1-(4-amino-2-fluorobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)benzonitrile (**11i**)

화합물 9b와 10i를 순차적으로 처리하여 회백색 고체(수율 19%, 순도 97.66%)로서 11i를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.51 (s, 1H), 8.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.79 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.07 (s, 2H), 6.88 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 6.32-6.29 (m, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.28 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.1, 162.0, 158.2, 156.0, 150.6, 150.5, 137.7, 134.4, 133.2, 133.1, 131.7, 130.8 (d, J = 6.7 Hz, 1C), 130.2, 118.4, 112.1, 109.8 (d, J = 12.5Hz, 1C), 104.4, 99.7 (d, J = 24.1 Hz, 1C), 42.8 (d, JF = 4.1 Hz, 1C); HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₄FN₇ [M + H]⁺ 359.1295, found: 359.1304.

3-(6-Amino-1-(4-amino-2-fluorobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)-2-fluorobenzonitrile (**11j**)

화합물 9b와 10j를 순차적으로 처리하여 백색 고체(수율 31%, 순도 97.40%)로서 11j를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.21-8.10 (m, 2H), 7.98 (d, J =

3.7 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.14 (s, 2H), 6.97-6.84 (m, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.31-6.28 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.27 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.16, 161.31, 159.72, 158.71, 155.34, 155.06, 150.60 (d, J = 11.6 Hz), 136.56 (d, JF = 3.3 Hz), 135.84, 133.51 (d, JF = 8.3 Hz), 130.86 (d, JF = 5.8 Hz), 125.88 (d, JF = 4.1 Hz), 125.65 (d, JF = 11.6 Hz), 113.90, 109.82, 109.63, 106.17, 101.51 (d, JF = 15.8 Hz), 99.72 (d, JF = 24.0 Hz), 42.75; HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₃F₂N₇ [M + H]⁺ 377.1200, found: 377.1210.

2-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)isonicotinonitrile (**11k**)

화합물 9c와 10k를 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 10%, 순도 96.15%)로서 11k를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.08 (dd, J = 4.8, 0.8 Hz, 1H), 8.67 (dd, J = 1.6, 1.2 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 5.2, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.82 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.80 (s, 2H), 1.98 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 162.0$, 156.6, 156.4, 155.7, 151.1, 146.1, 134.8, 129.5, 127.1, 126.1, 124.4, 123.6, 120.9, 120.6, 116.6, 113.7, 104.4, 49.2, 17.4; HRMS (ESI) calc. for $C_{19}H_{16}N_8$ [M + H]⁺ 356.1498, found: 356.1493. 6-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)picolinonitrile (**111**)

화합물 9c와 10l을 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 10%, 순도 98.87%)로서 11l을 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.65 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.31 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.82 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.80 (s, 2H), 1.99 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 162.0, 156.5, 156.3, 155.9, 146.0, 139.4, 134.5, 132.6, 130.7, 129.5, 126.0, 125.5, 124.4, 120.9, 117.3, 113.7, 104.3, 49.2, 17.4; HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₆N₈ [M + H]⁺ 356.1498, found: 356.1488.

5-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)nicotinonitrile (**11m**)

화합물 9c와 10m을 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 15%, 순도 97.57%)로서 11m을 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.53 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 9.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.91 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.12 (s, 2H), 6.88 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.83 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.80 (s, 2H), 1.99 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.0, 156.0, 155.8, 154.0, 152.4, 146.1,
139.4, 133.0, 132.4, 129.6, 126.2, 124.3, 120.9, 116.7, 113.7,
109.6, 104.8, 49.2, 17.5; HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₆N₈ [M + H]⁺
356.1498, found: 356.1495.

4-(6-Amino-1-(4-amino-3-methylbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-yl)picolinonitrile (**11n**)

화합물 9c와 10n을 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 7%, 순도 95.38%)로서 11n을 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.40 (dd, J = 5.0, 1.4 Hz, 1H), 7.17 (s, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1), 6.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 1.99 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 161.99, 155.98, 155.95, 152.18, 146.09, 145.24, 133.54, 132.79, 129.58, 127.33, 126.37, 126.17, 124.24, 120.86, 117.34, 113.69, 104.80, 49.25; HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₆N₈ [M + H]⁺ 356.1498, found: 356.1493.

2-[6-Amino-1-[(4-amino-2,6-difluorophenyl)methyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]pyridine-4carbonitrile (**11p**)

화합물 9d와 10p를 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 16%,

순도 98.30%)로서 11p를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.07 (dd, J = 4.8, 0.8 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.06 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.20-6.14 (m, 2H), 5.79 (s, 2H), 5.26 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 161.89, 156.53, 156.42, 155.66, 151.13 (d, J = 4.1 Hz, 1C), 135.07, 127.13, 123.61, 120.60, 116.63, 104.13, 97.91, 96.07, 95.79, 36.82 (br s, 1C); HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₂F₂N₈ [M + H]⁺ 378.1153, found: 378.1155.

6-[6-Amino-1-[(4-amino-2,6-difluoro-

phenyl)methyl]pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl]pyridine-2carbonitrile (**11q**)

화합물 9d와 10q를 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 21%, 순도 95.11%)로서 11q를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.65 (dd, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.31 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 8.23 (dd, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.12 (s, 2H), 6.18 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 5.79 (s, 2H), 5.26 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.33, 161.93, 156.48, 156.33, 155.82, 139.44, 134.79, 132.58, 130.66, 125.54, 117.32, 104.09, 97.91, 96.06, 95.79, 36.86; HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₂F₂N₈ [M + H]⁺ 378.1153, found: 378.1151. 5-[6-Amino-1-[(4-amino-2,6-difluoro-

phenyl)methyl]pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl]pyridine-3carbonitrile (**11r**)

화합물 9d와 10r을 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 30%, 순도 99.42%)로서 11r을 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.52 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 9.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.89 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.13 (s, 2H), 6.18 (d, J = 10.4 Hz, 2H), 5.25 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.75 (d, J = 11.5 Hz, 1C), 162.37, 161.33 (d, J =11.5 Hz, 1C), 156.36 (d, J = 18.0 Hz, 1C), 154.47, 152.89, 151.64, 139.82, 133.79, 132.80, 117.12, 110.03, 104.98, 98.32, 96.85-95.49 (m, 1C), 37.33 (br s, 1C) ; HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₂F₂N₈ [M + H]⁺ 378.1153, found: 378.1155.

4-[6-Amino-1-[(4-amino-2,6-difluorophenyl)methyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]pyridine-2carbonitrile (**11s**)

화합물 9d와 10s를 순차적으로 처리하여 노란색 고체(수율 24%, 순도 95.51%)로서 11s를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (dd, J = 5.2, 0.8 Hz, 1H), 8.59 (dd, J = 1.6, 0.8 Hz, 1H), 8.40-8.38 (m, 2H), 7.19 (s, 2H), 6.22-6.16 (m, 2H), 5.80 (s, 2H), 5.27 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.3 (d, J = 11.6 Hz, 1C), 162.00, 160.8 (d, J = 11.5 Hz, 1C), 156.0, 152.2, 151.2, 145.2, 133.5, 133.1, 127.3, 126.4, 117.3, 104.6, 97.8, 96.0-95.8 (m, 1C), 36.9; HRMS (ESI) calc. for C₁₈H₁₂F₂N₈ [M + H]⁺ 378.1153, found: 378.1155.

3-[6-Amino-1-[(4-amino-2,6-difluoro-

phenyl)methyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]benzonitrile (11t)

화합물 9d와 10t를 순차적으로 처리하여 황색 고체(수율 33%, 순도 97.91%)로서 11t를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.49 (t, J = 1.4 Hz, 1H), 8.45 (td, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.05 (td, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 7.79 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.07 (s, 2H), 6.21-6.15 (m, 2H), 5.80 (s, 2H), 5.25 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.28 (d, J = 12.3 Hz, 1C), 161.94, 160.86 (d, J = 12.3 Hz, 1C), 158.11, 155.93, 151.16, 137.75, 134.36, 133.27, 133.11, 131.74, 130.26, 118.43, 112.13, 104.28, 97.91, 96.15-95.93 (m, 1C), 95.78, 36.84 (br s, 1C); HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₃F₂N₇ [M + H]⁺ 377.1200, found: 377.1202.

3-(6-Amino-1-(4-amino-2,6-difluorobenzyl)-1*H*pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl)-2-fluorobenzonitrile (**11u**) 화합물 **9d**와 **10u**를 순차적으로 처리하여 노란색 고체(수율 33%, 순도 98.28%)로서 11u를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.14 (dd, J = 7.8, 6.6 Hz, 2H), 7.93 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 2H), 6.20-6.15 (m, 2H), 5.80 (s, 2H), 5.24 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.34, 162.11, 161.30, 160.92, 158.71, 155.12 (d, J = 23.8 Hz, 1C), 151.18, 136.84-136.24 (m, 1C), 135.84, 133.61 (d, J = 8.2 Hz, 1C), 125.90 (d, J = 4.1 Hz, 1C), 125.67 (d, J = 12.3 Hz, 1C), 113.93, 106.03, 101.51 (d, J = 15.6 Hz, 1C), 97.85, 96.25-95.98 (m, 1C), 95.87-95.36 (m, 1C), 36.82 (br s, 1C); HRMS (ESI) calc. for C₁₉H₁₂F₃N₇ [M + H]⁺ 395.1106, found: 395.1117.

2-[6-Amino-1-[[4-amino-3-

(trifluoromethyl)phenyl]methyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-

yl]pyridine-4-carbonitrile (11v)

화합물 9e와 10v를 순차적으로 처리하여 노란색 고체(수율 53%, 순도 97.10%)로서 11v를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.08 (dd, J = 5.2, 0.8 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 7.14 (s, 2H), 6.77 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.59 (s, 2H), 5.31 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.0, 156.7, 156.5, 155.6, 151.1, 145.7, 135.2, 132.6, 127.2, 125.3, 123.9, 123.6, 120.6, 117.0, 116.6, 110.1, 110.0, 104.3, 48.4; HRMS (ESI) calc. for $C_{19}H_{13}F_3N_8$ [M + H]⁺ 410.1215, found: 410.1217.

3-(6-Amino-1-(4-amino-3-(trifluoromethyl)benzyl)-1Hpyrazolo [3,4-d] pyrimidin-4-yl benzonitrile (**11w**)

화합물 9e와 10w를 순차적으로 처리하여 흰색 고체(수율 21%, 순도 99.14%)로서 11w를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.52 (s, 1H), 8.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.79 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.21-7.18 (m, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.78 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.59 (s, 2H), 5.30 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.07, 158.28, 156.03, 145.72, 137.66, 134.41, 133.39, 133.11, 132.68, 131.76, 130.24, 126.31, 125.37 (q, JF =5.5 Hz), 123.86, 118.39, 116.98, 112.14, 110.17 (q, JF = 29.0 Hz), 104.48, 48.49; HRMS (ESI) calc. for C₂₀H₁₄F₃N₇ [M + H]⁺ 409.1263, found: 409.1259.

3-(6-Amino-1-(4-amino-3-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-

pyrazolo [3,4-d] pyrimidin - 4-yl) - 2-fluorobenzonitrile (11x)

화합물 9e와 10x를 순차적으로 처리하여 회백색 고체(수율 15%, 순도 98.23%)로서 11x를 수득하였습니다;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17-8.13 (m, 2H), 8.00 (d, J =

3.6 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.21-7.19 (m, 1H), 7.15 (s, 2H), 6.78 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 162.24, 155.28 (d, JF = 14.8 Hz, 1C), 145.78, 136.58 (d, JF = 3.3 Hz), 135.88, 133.84, 132.74, 126.32, 125.89 (d, JF = 4.1 Hz), 125.52, 123.77, 117.02, 113.91, 110.15 (d, JF = 29.5 Hz), 106.23, 101.53 (d, JF = 16.4 Hz), 48.50; HRMS (ESI) calc. for C₂₀H₁₃F₄N₇ [M + H]⁺ 427.1169, found: 427.1170.

3.2. in vitro 인체 아데노신 수용체 결합력 및 기능도 분석

아데노신 수용체에 대한 방사성 리간드 결합 분석은 Eurofins Discovery Services (Panlabs, Taiwan)에서 수행했습니다. 화합물의 스톡 용액을 DMSO로 제조하고 배양 완충액을 사용하여 원하는 농도로 더 희석했습니다. 분석의 최종 DMSO 농도는 1.0%였습니다. 아데노신 A1 스크리닝을 위해 A1 수용체를 안정적으로 발현하는 인간 재조합 CHO-K1 세포(CHO-K1-hA1AR clone3, EPDST, R200510)의 멤브레인 전구체 10μg을 배양 완충액(20mM HEPES, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl 1.40 nM)에서 1 nM [³H]DPCPX와 함께 25 ℃에서 90분 동안 배양했습니다. 비특이적 결합은 100 μM R(-)-PIA의 존재 하에서 평가되었습니다. 멤브레인을 여과하고 3번 세척한 후 특이적으로 필터를 카운팅하여 결합한 [³H]DPCPX를

판별하였습니다. 화합물들은 10 μM에서 스크리닝했습니다. A_{2A} 스크리닝을 위해 A2A 수용체를 안정적으로 발현하는 인간 재조합 HEK-293 세포(PerkinElmer, RBHA2AM)의 멤브레인 전구체를 배양 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 U/mL Adenosine Deaminase)에서 0.05 µM [³H]CGS-21680과 함께 25 ℃에서 90분 동안 배양했습니다. 비특이적 결합은 50.0 µM NECA의 존재 하에서 평가되었습니다. 멤브레인을 여과하고 3번 세척한 필터를 카운팅하여 특이적으로 결합한 [³H]CGS-21680를 후 판별하였습니다. A_{2B} 스크리닝을 위해, A_{2B} 수용체를 안정적으로 발현하는 인간 재조합 HEK-293 세포(PerkinElmer, ES-013-M)의 멤브레인 전구체를 배양 완충액(50mM Tris-HCl, pH 6.5, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.01% Bacitracin)에서 1.6 nM [³H]MRS1754와 함께 25°C에서 90분 동안 배양했습니다. 비특이적 결합은 100 μM NECA의 존재 하에서 평가되었습니다. 멤브레인을 여과하고 3번 세척한 후 필터를 카운팅하여 특이적으로 결합한 [³H]MRS1754를 판별하였습니다. A3 스크리닝을 위해 A3 수용체를 안정적으로 발현하는 인간 재조합 CHO-K1 세포(PerkinElmer, ES-012-M)의 멤브레인 전구체를 배양 완충액(25mM HEPES, pH 7.4, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA)에서 0.5 nM [¹²⁵I]AB-MECA와 함께 25°C에서 60분 동안 배양했습니다. 비특이적 결합은 1.0 μM IB-MECA의 존재 하에서 평가되었습니다.

IC₅₀ 값은 MathIQ[™](ID Business Solutions Ltd., Guildford,

UK)를 사용한 비선형 least-squares regression analysis으로 산출되었습니다. 억제 상수(K_i)가 제시된 경우, 화합물의 관찰된 IC₅₀, 분석에 사용된 방사성 리간드의 농도, 리간드의 K_D에 대한 historical values(Eurofins Panlabs, Inc.에서 실험적으로 얻은 값)을 사용하여 Cheng 및 Prusoff 방정식을^[18] 사용하여 K_i 값을 계산했습니다. Competitive binding curve의 기울기를 결정짓는 Hill 계수(n_H)는 MathIQ[™]를 이용하여 계산되었습니다. Hill 계수가 1.0과 현저히 차이가 나면 바인딩 변위가 단일 바인딩 사이트의 질량 작용 법칙을 따르지 않는다는 것을 의미할 수 있습니다.

기능적 연구를 위한 A₁ 및 A_{2A} 수용체 cyclic AMP HTRF (homogeneous time resolved fluorescence) 분석은 EuroscreenFast(Charleroi, Belgium)에서 CHO-K1(A₁) 및 HEK293(A_{2A}) 안정 세포주를 사용하여 CPA(A₁) 및 NECA(A_{2A})를 reference agonist로, DPCPX(A₁) 및 ZM241385(A_{2A})를 reference antagonist 화합물로 하여 수행되었습니다.

3.3. *h*ERG, AMES 및 대사 안정성 연구

Nova Research Laboratories(New Orleans, LA, 미국)에서 안정적으로 발현된 HEK 세포를 사용하여 **11o** 급성 노출에 대한 *h*ERG 이온 채널 차단 프로파일을 수행하였습니다.

실험에는 인체 IKr과 동등한 복제된 hERG가 사용되었습니다. 세포는

Cytogentrics Bioscience GmbH(Jachim-Jungius-Strafe 9, 18,059 Rostock, Germany)에서 공급받았습니다. 내부 및 외부 기록, 데이터 수집과 분석 방식은 앞서 설명한 바와 동일하였습니다^[15].

AMES 박테리아 reverse-mutation 시험은 OECD 가이드라인 471. "박테리아 역변이 시험" 및 ICH S2(R1), "인체 사용 의약품의 유전독성 시험 및 데이터 해석에 관한 지침"에^[19] 따른 시험기관의 표준 운영 절차(SOP)에 따라 Frontage laboratories inc. (Frontage laboratories, Concord, OH, USA)에서 수행되었습니다. 시험 약물의 평가는 최초에 Ames et al.^[16]이 기술하고 Maron과 Ames^[17]에 의해 업데이트된 플레이트 통합 방법론에 의해 수행되었습니다. 이 시험법은 광범위한 종류의 화학적 돌연변이 유발 물질을 검출하는 것으로 확인되었습니다^[16, 20]. 돌연변이원성 평가의 경우, TA98 및 TA100 (tester strains source: Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA). TA98 lot number 5464D, part number 71-098L; TA100 lot number 5439D, part number 71-100L)을 플레이트 통합 방법을 사용하여 S9의 유무에 관계없이 중복 플레이트/조건으로 vehicle 단독 및 최소 8가지 농도의 110에 노출시켰습니다. 용해도에 의해 제한되지 않는 한, 11o는 최대 농도 5000 μg/plate (용량 수준은 5000, 1581, 500, 158, 50, 15.8, 5.0 and 1.5 µg/plate)에서 평가되어야 했습니다. 그러나 11o는 제한적인 용해도를 나타내었고 시험된 최고 농도는 1867 μg/plate였습니다. 배양 후, 배양 plates에서 박테리아 background lawn의 상태와 침전물을 확인하고 기록했습니다. 콜로니 수는 육안

또는 자동 콜로니 카운터(Scan 1200 Automated colony counter and scan software)를 사용하여 집계했습니다.

110의 대사 안정성은 Frontage Laboratories Inc.의 SOP에 따라 마우스, 랫드, 개, 원숭이 및 사람의 동결 보존 간세포에서 측정되었습니다. 전임상 동물용 및 인체 동결 보존 간세포(BioIVT, Westbury, NY, USA)를 37 ℃ 수조에서 얼음이 거의 녹을 때까지 부드럽게 흔들면서 해동했습니다. 세포가 가라앉지 않도록 37 ℃에서 미리 데운 해동 배지가 들어 있는 원심분리기 튜브(50mL)로 세포 현탁액을 즉시 옮기고 부드럽게 흔들어주었습니다. 세포 현탁액을 50×g, 4 ℃에서 5분간 원심분리했습니다. 상층액은 버리고 펠릿을 37 ℃에서 예열된 배양 배지(5mL)에 다시 현탁했습니다. 현탁액에서 생존 가능한 세포의 비율을 Trypan blue staining법으로 측정하여 생존율이 70% 이상인지 확인했습니다. 11o를 간세포 현탁액(1million cells/mL)이 포함된 24-well plate에서 5% CO₂ 및 95% 공기 상태에서 37 ℃에서 4시간 동안 배양했습니다. 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240분마다 시료를 중복하여 제거하고 ACN(내부 표준물질이 포함된 3 volumes)으로 처리했습니다. 샘플을 원심분리하고 적절한 다중 반응 모니터링(MRM) 전환을 사용하여 LC/MS/MS로 상등액의 모 화합물에 대해 분석했습니다. 미다졸람(0.2 µM)을 양성 대조군으로 포함하여 각 종의 간세포의 생존력을 확인했습니다. 각 시점마다 간세포 추출물의 LC/MS/MS(MRM) 분석을 통해 11o 및 미다졸람의 제거 여부를 확인하였습니다. 각 시료에 대해 내부 표준물질에 대한 분석물질의 피크

50

면적비를 구하고 다양한 시점의 피크 면적비를 t = 0에서 얻은 피크 면적비와 비교하여 **11o**의 제거 속도를 평가하였습니다. T_{1/2}를 구하고(using the linear portion of semi-log plot of the area ratio vs. time) well-stirred model을 사용하여 CL_{int} 값을 산출하였습니다.

3.4. 동물 시험

3.4.1. 파킨슨병의 MPTP 유도 마우스 모델

10주령의 수컷 C57BL/6J 마우스는 Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, Freiburg, Germany)에서 구입하여 QPS 오스트리아에서 관리했습니다. 설명된 모든 절차는 QPS Austria의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 검토 및 승인을 받았습니다. 동물 실험은 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 오스트리아 지침(Tierversuchsgesetz 2012-TVG 2012, BGB1. I Nr. 114/2012)을 준수했습니다. 동물 실험은 오스트리아 정부의 승인을 받았습니다(Amt der Steiermarkischen Landersregierung, Abteilung 13-Umwelt and Raumordnung Austria, ABT13-78Jo234-2018).

동물들이 도착하자마자 배정된 동물실로 옮겨져 사육 포장을 풀고 건강 상태를 확인했습니다. 동물들은 연구 시작 전 최소 1주일 동안 적응 훈련을 받았습니다. 동물들은 Rettenmaier에서 제공한 표준화된 설치류 침구 위에 통풍이 잘되는 개별 공간에서 단독 사육되었습니다. 실내 온도는 20~24 ℃로 유지하고 상대 습도는 45~65%로 유지했습니다. 동물들은 일정한 조명 주기(12시간 점등/소등)에 따라 사육되었습니다. 건조된 펠렛 형태의 표준 설치류 사료(Altromin)와 상수도를 동물에게 자유로이 제공했습니다.

건강 상태가 양호한 것으로 보이는 동물들을 연구에 포함시켰습니다. 모든 동물은 무작위로 시작 그룹(코호트)에 배정되었습니다. 시작 그룹의 동물 수는 동일한 연령과 균일한 처치를 보장하기 위해 제한하였습니다. 총 144마리의 수컷 C57BL/6J 마우스가 12개 그룹에 배정되었습니다(n = 12/그룹). 11개 그룹(그룹 2~12)은 1일차에 2시간 간격으로 20 mg/kg MPTP를 4회 복강 내(IP)로 처리했습니다. Probenecid 또는 vehicle은 첫 번째 MPTP 또는 vehicle 치료(예: MPTP 좌복부, probenecid 우복부)와 함께 IP 주사(250 mg/kg)를 통해 투여하였습니다. 한 그룹은 vehicle만 투여하고(그룹 1) 대조군으로 사용했습니다. 그룹 4는 첫 번째 MPTP 주사 30분 전에 IP 주사를 통해 양성 대조군/기준군(rasagiline)을 투여했습니다. 마지막 MPTP 치료 30분 후 첫 번째 화합물 투여를 실시했습니다. 각 그룹은 vehicle(그룹 2 PO 및 3 IN), 경구(그룹 5~8) 또는 비강 내(그룹 9~12)를 통해 4가지 용량의 11o를 투여받았습니다. 동물은 7일 연속으로 화합물 또는 vehicle로 처리되었습니다. PO의 경우, 각 마우스는 체중당 10 µL/g의 화합물을 투여받았습니다. IN의 경우, 동물의 체중을 평균 30g으로 하여 전체 치료 기간 동안의 농도 계산을 위한 기준으로 삼았습니다. 각 동물은 5

52

μL per naris (동물당 10μL)의 양을 투여받았습니다.

3.4.2. 네스트 빌딩

행동 평가는 3일째 예정된 치료 2시간 후에 실시했습니다. 모든 동물은 무작위 순서로 둥지 짓기 및 야외 실험에 참여했습니다.

개별 둥지 짓기 행동을 테스트하기 위해 마우스를 나무 조각 침구와 한 평방미터의 압축 솜('nestlet')이 들어 있는 케이지에 개별적으로 가두어 두었습니다. 다른 둥지 재료(e.g., wood wool)는 제공하지 않았습니다. 네슬렛(nestlet)은 둥지 상태 평가 전날 야간 단계가 시작되기 약 2~3시간 전에 도입했으며, 실험 다음 날 야간 단계가 시작된 후 2~3시간 이내에 둥지 짓기 행동을 평가했습니다. Cotton square의 도입과 둥지 상태 평가 사이의 시간은 모든 실험에서 동일하게 설정했습니다. 둥지 조작 및 구축된 둥지의 구성은 5점 척도에^[21] 따라 다음과 같이 평가하였습니다:

1. 네슬렛이 눈에 띄게 훼손되지 않음(90% 이상 온전함);

2. 네슬렛이 부분적으로 찢어짐(50%~90% 온전함);

 대부분의 네슬렛이 훼손되었어도 둥지를 만든 위치를 식별할 수 없음: 네슬렛의 50% 미만이 온전하게 남아있지만 찢어진 90% 미만의 재료가 케이지 바닥 면적의 1/4 이내에 있음, 즉 솜이 둥지로 모이지 않고 케이지 주변에 흩어져 있는 경우;

4. 식별할 수 있지만 평평한 모양의 둥지: 네슬렛의 90% 이상이 찢어져

53

있고, 재료가 케이지 바닥 면적의 1/4 이내에 둥지로 모여 있지만 둥지 모양이 평평하고 둘레의 50% 미만에서 마우스 몸 높이보다 높은 벽(옆으로 말려 있음)이 있음;

5. (거의) 완벽한 둥지: 네슬렛의 90% 이상이 찢어져 있고, 둥지는
 분화구 모양이며 둘레의 50% 이상 마우스 몸 높이보다 높은 벽이 있음.

3.4.3. 할로페리돌 유발 카탈렙시 실험

총 120마리의 암컷 Sprague Dawley 랫드 (275~300 g)를 Charles River Laboratories(Charles River, Senneville, QC, Canada)에서 구입하여 Atuka, Inc.에서 관리하였습니다. 모든 동물 실험은 CCAC 가이드라인과 IACUC 승인 동물 사용 프로토콜(AUP)에 따라 Atuka사에서 수행되었으며, 본 연구에 대한 IACUC 번호는 6606.0.3입니다.

랫드의 배송 후 치료 시작까지 1주일의 적응 기간이 제공되었습니다. 적응 첫날에 동물의 체중을 측정한 후 그 이후에는 매주 제중을 측정했습니다. 랫드는 케이지 2칸에 표준 온도(21 ± 2°C)의 조명 제어 환경(오전 6시부터 오후 6시까지 불 켜짐)에서 사육되었으며, 사료(Teklad 7912, Harlan, Madison, WI, USA)와 물을 자유로이 이용할 수 있었습니다. 연구는 동물실험윤리위원회(CCAC) 가이드라인과 동물실험윤리위원회(IACUC)가 승인한 동물실험계획서(AUP)에 따라 수행되었습니다. 카탈렙시 연구에는 12개의 그룹의 랫드가 사용되었습니다. 각 치료 그룹에는 10마리의 랫드가 포함되었습니다(총 N = 120마리의 랫드). 치료는 3번의 연속적인 치료 구간으로 나누어 진행되었으며, 각 구간 내에서 치료 순서는 무작위로 정해졌고, 해당 구간 내에서 모든 치료가 완료된 후 다음 구간으로 진행되었습니다. Vehicle (0.5% methyl cellulose, Sigma-Aldrich, St-Louis, MI, USA), **110** 또는 이스트라데필린을 t = 0분에 경구로 투여하고 60분 후(t = 60분)에 할로페리돌(1 mg/kg, SC)을 투여했습니다. 카탈렙시는 60분 후에 추가로 평가했습니다(t = 120).

각 동물의 행동은 바 테스트에서 수행 능력을 측정함으로써 평가되었습니다. 할로페리돌 투여 후 60분(vehicle, **11o** 또는 이스트라데필린 투여 후 120분)이 경과한 후 카탈렙시를 평가했습니다. 카탈렙시를 평가하기 위해 동물의 두 앞발을 흔들리지 않는 표면 6cm 위에 매달린 다웰 로드(직경 약 0.7cm) 위에 올려놓도록 배치했습니다. 동물이 막대에서 두 발을 떼어내고 다시 표면 위에 놓는 데 걸리는 시간(적정 지연 시간)을 초 단위로 측정했습니다. 테스트는 세 번 반복하여 실시했으며 세 번의 테스트 평균값을 산출하였습니다.

3.5. in vivo 약동학, 생체이용률 및 마우스에서의 뇌 혈장 비율 연구

9~10주령의 수컷 Crl:CD-1 마우스를 미국 찰스 리버 연구소에서 구입하여 실험 전 12시간 주기로 전등을 켜고 끄는 온도 조절실에서 표준 음식과 물을 자유로이 제공하였습니다. 설명된 모든 절차는 Frontage Laboratories Inc.의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 검토 및 승인을 받았습니다.

PO 투여 실험에서는 마우스에게 DMSO에 용해된 110를 투여했습니다: PEG400 (1:3, v:v)을 가비지를 통해 투여했습니다. 정맥 투여의 경우에도 DMSO에 용해된 110를 투여했습니다: PEG400: 식염수(1:3:6, v:v)를 1mL/kg의 용량으로 꼬리 정맥에 주입했습니다. IN 투여의 경우, 동물이 용량을 흡입할 수 있도록 DMSO에 용해된 11o와 적절한 투여 용액 25μL를 콧구멍 근처에 놓았습니다. 각 혈액 및 브레인 회수 시점에 대해 각 그룹에서 세 마리의 마우스를 샘플링했습니다. 시점은 PO 및 IN 투여의 경우 0.5, 1, 2, 4, 8, 24시간, IV 투여의 경우 0.083, 1, 2, 4, 8, 24시간이었습니다. 마우스는 이소플루란 마취 하에 말단 후안와 채혈을 통해 안락사시킨 후 시설 SOP에 따라 흉강을 개복했습니다. 목표량 1mL의 혈액을 K3EDTA 항응고제가 포함된 튜브에 채취한 후 여러 번 뒤집은 다음 습윤 얼음 위에 올려놓고 냉장 상태(5°C에서 10분간 2000×g으로 설정)에서 원심분리했습니다. 이렇게 얻은 혈장은 11o 농도로 분석될 때까지 -70°C를 유지하도록 설정된 냉동고에 보관했습니다. 각 동물에서 뇌를 적출하고 종결 이후 무게를 측정하여 급속 냉동한 후 차후 사용할 때까지 보관했습니다.

혈장 및 브레인 PK 분석은 인증된 소프트웨어 시스템인 WinNolin Version 6.2.1(Pharsight, Mountain View, CA, USA)을 사용하여 진행되었습니다. 비구획 분석은 경구 투여의 경우 혈관 외 투여 모델을, 정맥 투여의 경우 IV 볼러스 모델을 사용하여 수행되었습니다. 최고 혈장 및 브레인 농도, 최고 혈장 농도에 도달하는 시간, 반감기, 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적(Cmax, Tmax, T1/2 및 AUC)은 110 시료 채취 시간/용량 그룹별 평균 혈장 농도로부터 산출되었습니다. PK 파라미터 산정에는 노미날 채혈 시간이 사용되었습니다. 용량 비례성을 평가하고 PO 투여에 대한 생체이용률을 산정하였습니다.

3.6. 랫드와 개에서의 최대 내약 용량 연구

랫드와 개를 대상으로 한 최대 내약 용량 연구는 실험 시설의 SOP에 따라 Frontage Laboratories Inc에서 수행되었습니다. 설명된 모든 절차는 Frontage Laboratories Inc의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 검토 및 승인을 받았습니다.

랫드 MTD 연구를 위해 미국 Charles River Laboratories에서 생후 8.1~9.6주령의 수컷 및 암컷 Sprague Dawley 랫드(Rattus norvegicus)를 구입하여 실험 전 12시간 켜고 끄는 조명 주기가 있는 온도 조절실에서 표준 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 관리하였습니다. 동물들은 투여를 시작하기 전에 최소 6일에서 16일 동안 시험 시설에 적응했습니다.

동물들은 0.5% 메틸 셀룰로오스 용액 안에 **11o**를 10 mL/kg 용량 부피에서 150 mg/kg 용량 수준으로 (이 초기 용량 레벨은 사용 가능한 데이터와 EPA의 독성 추정 소프트웨어 도구(TEST) 버전 4.2.1을 사용한 예상 독성에 근거하여 선택되었습니다) 시작하여 경구 경관을 통해 투여받았습니다. 후속 투여는 직전 투여 3일 또는 4일 후에 이루어졌으며, 기존 투여 결과에 따라 투여량을 증가시켰습니다. 이 절차는 네 번의 투여 과정이 완료될 때까지 계속되었습니다. 임상 관찰을 위해 연구 기간 동안 오전과 오후에 한 번씩 실험 동물을 모니터링하였습니다. 체중은 투약 전날에 측정했습니다. 데이터는 Provantis[™](Instem LSS Ltd., Staffordshire, UK)를 사용하여 전산으로 수집 및 기록되었습니다.

비글 MTD 연구용으로, Marshall BioResources(North Rose, NY, USA)에서 조달한 1.3~1.4세의 수컷 및 암컷 비글 견종들은 Frontage Laboratories의 test facility stock colony에 제공되었습니다. 동물의 건강 상태는 담당 수의사가 직접 점검하였습니다. 연구에 사용하기 전에 동물로부터 수접한 데이터는 시험 시설 이력으로 관리되었습니다. 각 투여 때마다 동일한 실험 동물을 사용했습니다. 동물들은 0.5% 메틸 셀룰로오스 용액 안에 **11o**를 단일 용량으로 5 mL/kg 용량 부피에서 50 mg/kg 용량 수준으로 시작하여 경구 경관을 통해 투여받았습니다. 후속 투여는 직전 투여 3일 또는 4일 후에 이루어졌으며, 기존 투여 결과에 따라 투여량을 증가시켰습니다. 이 절차는 네 번의 투여 과정이 완료될 때까지 계속되었습니다. 동물들은 각 용량 투여 전 하룻밤 동안 금식하고 투여 후 약 4시간 후에 음식을 제공받았습니다. 임상 관찰을 위해 연구 기간 동안 오전과 오후에 한 번씩 동물들을 모니터링했습니다.

58

체중은 투여 전날 측정했습니다. 데이터는 ProvantisTM(Instem LSS Ltd., Staffordshire, UK)를 사용하여 전산으로 수집 및 기록되었습니다.

3.7. 통계 분석

통계 분석은 GraphPad Prism 8.3.0을 사용하여 수행되었습니다. 데이터는 콜모고로프-스미르노프 시험(Kolmogorov-Smirnov test)을 사용하여 정규성 여부를 확인하였습니다. 정규 분포가 확인된 경우, 그룹 간 차이는 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 통해 검증한 후 Bonferroni 또는 Dunnett 사후 분석(post hoc analysis)을 실시했습니다. 데이터가 정규 분포가 아닌 경우, 그룹 간 차이는 Kruskal-Wallis 검정으로 테스트한 다음 다중 비교를 위해 Dunn의 사후 검정으로 분석하였습니다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타내었습니다.

제 4 절 결론

본 연구에서는 항파킨슨병제로서 1*H*-pyrazolo [3,4*d*]pyrimidin-6-amine 코어 스캐폴드를 갖는 일련의 새로운 아데노신 A_{2A} 수용체 길항제를 3단계의 짧은 경로를 갖는 효율적인 합성 방법을 통해 설계 및 합성하였습니다. 그 중 2-플루오로-3-시아노페닐 A 그룹을 갖는 화합물 **11o**는 A₁ 및 A_{2A} 수용체 모두에 대해 완전한 길항작용을 나타내면서 A_{2A} 및 A₁ 수용체에 대한 높은 선택성을 나타냈습니다. 동물 연구에서는 이 화합물이 파킨슨병의 MPTP 유도 마우스 모델에서 둥지 짓기 행동을 개선하는 긍정적인 경향을 보였으며, 암컷 랫드에서 할로페리돌에 의해 유도된 카탈렙시를 용량 의존적으로 역전시키는 것으로 확인되었습니다. 마우스, 랫드, 개, 원숭이 및 인간의 간세포를 대상으로 한 시험관 내 대사 연구에서 이 화합물은 이들 종에서 상대적으로 낮은 클리어런스를 보였습니다. 마우스에 경구 및 비강 내 투여했을 때 **11o**는 우수한 생체이용률, 우수한 뇌/혈장 비율 및 PK 프로파일을 나타냈습니다. 화합물 **11o**는 심장 독성 위험과 돌연변이 유발 가능성이 낮거나 전혀 없었으며, 랫드와 개에서 각각 1000 mg/kg 이상과 400 mg/kg 이상의 MTD를 나타냈습니다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, **11o**는 이중 A_{2A}/A₁ 수용체 길항제이고 파킨슨병 치료를 위한 좋은 잠재적 약물 후보로서 추가 연구 가치가 있는 약물 후보로 판단됩니다.

제 2 장 5-(*N*-Hydroxycarbamimidoyl) Benzofuran 계열 IDO1 저해제 도출 연구

제 1 절 연구의 배경

L-트립토판(L-Trp) 대사는 키누레닌 경로(KP), 세로토닌 생산 경로, 장내 미생물에 의한 인돌 유도체로의 직접 전환 등 세 가지 중요한 경로를 따르게 됩니다^[22]. 포유류 세포에서 대부분의 L-Trp 분자는 주로 면역 조절 기능, 세포 증식 억제, 생식 및 중추 신경계를 조절하는 것으로 알려진 KP를 통해 대사됩니다. KP에서 L-Trp는 속도 제한 효소인 인돌아민 2,3-다이옥시게나제 1 및 2(IDO1 및 IDO2) 또는 트립토판 2,3-다이옥시게나제(TDO)에 의해 N-포밀-1-키누레닌으로 먼저 전환되며, 이는 면역 치료제의 매력적인 표적이 됩니다. 실제로 이러한 효소의 과발현은 교모세포종, 흑색종, 폐암, 난소암, 대장암과 같이 예후와 생존율이 좋지 않은 다양한 유형의 암에서 흔히 발견됩니다^[23].

L-Trp의 대사적 고갈과 IDO1/IDO2 및 TDO에 의한 키누레닌 대사 산물의 생성은 이펙터 T 세포와 NK 세포를 억제하고, 순환 T 조절 세포 (Treg)를 활성화하고, CD4 + T 세포의 Treg로의 분화를 촉진하고, 가용성 매개체 분비를 통해 면역 억제 미세 환경을 자극하여 면역 억제를 유발할 수 있습니다. 따라서 IDO1/IDO2 및 TDO 저해는 항종양 면역을 효과적으로 향상시키는 촉망받는 차세대 항암 면역

61

치료제 요법으로 주목받고 있습니다^[24]. IDO 억제의 면역 요법에 대한 임상 시험은 단일 제제 또는 단일 클론 항체(mAb)(항-세포독성 T 림프구 관련 단백질 4(CTLA-4) mAb 및 항 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)/프로그램된 사멸 리간드 1(PD-L1) mAb) 또는 방사선과의 조합 요법으로 수행되었지만 현재까지 주목할 만한 성공은 없었습니다.

IDO1 선택적 억제제 중 에파카도스타트(INCB-024360)(1), 나복시모드(GDC-0919)(2), 리노도스타트(BMS-986205)(3)는 IDO1 효소 또는 그 아포 형태에 높은 친화력을 보였습니다(그림 7)^[25-29]. 에파카도스타트는 IDO1 억제제 임상 개발의 선도적인 후보 물질이었지만 절제 불가능하거나 전이성 흑색종 환자를 대상으로 한 3상 임상 시험에서 효능을 입증하는 데 실패했습니다. 펨브롤리주맙 및 항 PD-1 mAb와 병용한 에파카도스타트도 위약과 펨브롤리주맙 병용에 비해 무진행 생존기간 또는 전체 생존기간을 개선하지 못하여 ECHO-301/Keynote-252 임상시험은 조기 종료되었습니다^[30].

62



그림 7. IDO-1 선택적 억제제

비록 이러한 실패로 인해 IDO1 억제제 관련 개발은 탄력을 잃었지만, 새로운 가능성을 확인하기 위한 임상시험과 중개연구는 여전히 활발히 진행되고 있습니다. 또한 종양 미세환경에서는 Treg의 침투와 함께 IDO와 PD-L1의 발현이 증가하는 것이 관찰되었으며,^[31] PD-1 또는 CTLA4 차단은 IDO1의 상향조절을 유도하여 종양 주변의 면역억제 환경을 유발할 수 있다고 알려져 있습니다^[23, 31]. 따라서 이러한 IDO 억제제의 개발은 면역 병용치료에서 우수한 항암 활성과 매우 양호한 안전성 프로파일로 시너지 효과를 낼 수 있다는 점에서 여전히 중요한 가치를 지니고 있습니다.

본 연구에서는 에파카도스타트로부터 새롭게 고안된 스캐폴드로서 N-하이드록시벤조퓨란-5-카복시이미다마이드 (N-
hydroxybenzofuran-5-carboximidamide)를 새로운 IDO1 선택적 억제제로서 연구하였습니다. 효소 및 세포 기반 분석에서 저해 효과를 평가하기 위해 *N* -하이드록시아미딘의 *N*-치환체와 벤조퓨란의 2-치환체를 변화시켜가며 구조-활성 관계(SAR)를 연구했습니다. 또한 선택적 억제제의 분자 모델링을 수행하여 활성 부위에서의 결합 모드를 확인하였습니다.

제 2 절 연구 결과

5-(N-치환-N-하이드록시카바미미도일) 벤조퓨란 유도체는 일반적으로 해당 벤조퓨란 알데히드에서 알독심 형성, 알독심의 α-염소화 및 아민의 친핵성 치환을 포함하는 3단계 합성 과정을 거쳐 N-하이드록시아미딘을 형성하는 방식으로 합성되었습니다 (화학식 4).



화학식 4. 5-(N-하이드록시카바미미도일) 벤조퓨란 유도체의 합성 Reagents and conditions: (a) NEt₃, NH₂OH·HCl, CH₂Cl₂, r.t., 16 h; (b) NCS, DMF, 50 °C, 3 h; (c) $R^3(CH_2)_nNH_2$, THF, r.t., 16 h.

상업적으로 이용 가능한 벤조퓨란-5-카복스알데히드 4를 히드록실아민을 처리하여 해당 알독심 5로 전환하였고 그 결과 수율이 매우 높았습니다. 알독심 5에 대한 *α*-염소화는 옥시이미딕 염화물 6을 제공하기 위해 *N*-클로로숙신이미드(NCS)를 친유성으로 첨가하여 수행했습니다. 염소화는 50℃를 일정하게 유지하여 온도 제어 상태에서 수행되었으며, 그렇지 않을 경우 낮은 수율이 발생하였습니다. 처음에는 옥시이미드 염화물을 추가 정제 없이 다음 단계에 바로 사용했지만 다루기 어려운 부산물이 발생했습니다. 따라서 고순도의 최종 화합물을 얻기 위해 옥시이미딕 염화물 6을 정제하고 해당 1차 아민과 반응시켜 최종 *N*-하이드록시아미딘 7을 얻었습니다.

2-알콕시메틸 벤조퓨란 유도체 합성을 위해 4-시아노페놀 8을 MeOH에서 요오드 및 암모니아로 처리하고 요오드화시켜 4-하이드록시-3-아이오도벤조니트릴 9를 생성했습니다. 벤조니트릴 9를 10 mol% Pd (II) 촉매 및 diisopropyl 아민의 존재하에 propargyl 알코올과 반응하였습니다. 9와 propargyl 알코올의 소노가시라 반응으로 아세틸렌 중간체를 형성한 다음 2-(하이드록시메틸)벤조퓨란 10으로 고리화되는 순차적인 2 단계 반응을 수행했습니다^[32]. 그 후, 10의 히드록시메틸기는 *tert*-부틸디메틸실릴 (TBS) 그룹에 의해 보호되거나 메틸 또는 시클로프로필메틸 그룹으로 알킬화됨으로서 11을 생성하였습니다. 11의 니트릴기는 적절한 알데히드 12로 환원되었고,

이는 화학식 1에 설명된 것과 동일한 경로를 따라 3 단계에 걸쳐 최종 N-하이드록시아미딘 13으로 전환되었습니다. 2-(히드록시메틸)벤조 퓨란 유도체의 경우, 13의 TBS 그룹을 테트라부틸암모늄-플루오라이드를 사용하여 제거하였고 최종 14를 확보하였습니다 (화학식 5).



화학식 5. 2-알콕시메틸 5-(N-하이드록시카바미미도일)벤조퓨란 유도체의 합성

Reagents and conditions: (a) I₂, 20% NH₄OH, MeOH, r.t., 2 h; (b) propargyl alcohol, Pd(dppf)Cl₂, DIPA, CuI, toluene/THF (2:1), 100 ℃, 10 h; (c) i) TBSCl, imidazole, DMF, r.t., 30 min; ii) MeI, NaH, DMF, r.t., 1 h; iii) (chloromethyl)cyclopropane, NaH, DMF, r.t., 12 h; (d) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -10 ℃, 30 min; (e) NEt₃, NH₂OH·HCl, CH₂Cl₂, r.t., 3 h; (f) NCS, DMF, 50 ℃, 3 h; (g) R²(CH₂)_nNH₂, THF, r.t., 16 h; (h) TBAF, THF, r.t., 1 h.

IDO1에 대한 합성 화합물의 억제 효과는 IFN-γ로 처리한 HeLa 세포에서 진행된 효소 또는 세포 분석에서 기질 *L*-Trp와 함께 배양한 후 480nm의 흡광도에서 키누레닌 농도를 측정하여 평가되었습니다. IC₅₀((half maximal inhibition concentration) 값은 vehicle control 대비 억제 백분율을 기준으로 계산되었으며 **표 7-10**에 기재되어 있습니다^[26, 33, 34].

표 7. 페닐기 치환체의 억제 활성

Compd	R ₃	R_4	IDO1 (IC _{50,} µM)	
		-	Enzyme	HeLa cells
15	Н	Н	> 30	19
16	Н	Cl	> 30	> 30
17	F	Н	32.7	20
18	Cl	Н	0.69	1.5
19	Br	Н	0.44	1.1
20	CF_3	Н	1.2	1.9
21	F	F	22.7	14.0
22	Cl	F	5.2	1.8
23	Br	F	1.6	2.6
24	CF_3	F	1.2	2.2
25	F	Cl	> 30	10.3

26	Me	Me	> 30	> 30
27	COCH ₃	Η	> 30	> 30
28	$CONHCH_2(c-hexyl)$	Η	> 30	>30
29	CONHCH ₂ Ph	Η	> 30	>30
30	CO-(4-methylpiperidin-1-yl)	Η	> 30	>30
31	O(CH ₂) ₃ CH ₃	Η	> 30	> 30
32	OPh	Η	> 30	> 30
33	CH_2Ph	Η	> 30	> 30
34	CH_2OPh	Η	> 30	> 30
35	Ph	Η	11.0	11.9

표 8. 벤질기 치환체의 억제 활성

Compd	R	IDO1 (IC _{50,} µM)		
-		Enzyme	HeLa cells	
36	*-	> 30	28.2	
37	*-	> 30	5.8	
38	*	22	17.6	
39	* * S	> 30	16.2	
40	*	> 30	> 30	
41	*	> 30	> 30	



표 9. 벤조퓨란 C(2)-치환체의 억제 활성

Compd R ¹		R	IDO1 (IC _{50,} μM)		
			Enzyme	HeLa cells	
42	HO*	F	1.7	2.4	
43	HO~*	Cl	8.0	5.9	
44	HO*	Br	0.71	1.2	
45	_O*	F	7.1	6.1	
46	_O*	Cl	1.0	2.2	
47	_0*	Br	0.93	2.5	
48	۵_۰۰*	F	2.2	8.0	
49	۵۰۰	Cl	1.5	17.6	
50	۵_۰۰*	Br	0.4	3.2	
51	*	F	11	10.6	
52	*	Cl	0.9	10.8	
53	*	Br	0.9	8.6	



표 10. 디벤조퓨란 스캐폴드의 억제 활성

	H		N R	
Compd	R	n	IDO1 (IC _{50,} µM)	
			Enzyme	HeLa cells

54	3-Cl	0	1.8	7.6
55	3-Br	0	1.3	10.8
56	3-Cl-4-F	0	9.6	22.8
57	3-Br-4-F	0	2.4	16.2
58	$3,5-(OMe)_2$	0	> 30	>30
59	3-C1	1	3.6	29.6

먼저, *N* -하이드록시-*N*-페닐벤조퓨란-5-카복시미다마이드 유도체에 대한 SAR을 살펴보았습니다(**표** 7). 치환되지 않은 페닐 유도체(15)는 HeLa 세포에서 IC₅₀ 값이 19μM로 약한 활성을 보였습니다. 4-클로로페닐 유도체(16) 역시 효소 또는 세포 기반 분석에서 활성을 나타내지 않았습니다. 3-할로겐화페닐 유도체 중 3-플루오로페닐 유도체 17은 15에 비해 억제 활성이 개선되지는 않았지만, 3-클로로페닐 18과 3-브로모페닐 19 유도체는 효소에서 각각 0.69 및 0.44 μM의 IC₅₀ 값과 HeLa 세포에서는 1.5 및 1.1 μM의 IC₅₀ 값으로 강력한 억제력을 보여주었습니다. 반면, 3-트리플루오로메틸페닐 유도체 20도 우수한 억제력을 보였지만 18과 19보다는 낮은 억제력을 나타내었습니다.

이중 치환 유도체에서 17-20에 4-플루오로 원자를 도입하여 21-24를 생성하였을 때 활성이 향상되지는 않았지만 23과 24는 여전히 좋은 억제력을 보였습니다. 3-플루오로-4-클로로페닐 25와 3,4-디메틸페닐 26 유도체는 예상대로 비활성인 것으로

확인되었습니다. 3-위치에 극성을 띤 부피가 큰 그룹을 도입하면 탁월한 억제 효과를 보였기 때문에 다른 유형의 벌키 그룹을 추가로 탐색했습니다. 안타깝게도 알킬카보닐(27), N-알킬아마이드(28-30), 알킬옥시(31), 아릴옥시(32), 아릴알킬(33, 34)을 포함한 대부분의 부피가 큰 그룹은 효소 및 세포 기반 분석에서 모두 비활성인 것으로 밝혀졌습니다. 1,1' -비페닐 유도체(35)만이 중간 정도의 억제 효과를 나타냈습니다.

SAR 분석 결과 4-위치 치환은 활성에 불리하지만 3-위치에 부피가 큰 할로겐을 도입하는 것이 활성에 중요하다는 것을 알 수 있었습니다. 이들의 효능은 특정 그룹의 크기와 극성을 설명하는 해당 몰 굴절률(MR) 값(Br = 0.888 > C1 = 0.603 > CF₃ = 0.502 > F = 0.092)과 상관관계가 높은 것으로 추정되었습니다.

다음으로 표 7의 결과에 따라 페닐, 3-클로로 페닐, 3-클로로 -4-플루오로 페닐, 헤테로사이클릭 및 사이클로프로필 고리의 1-탄소 상동 유사체 (36-41)를 검토하였습니다 (표 8). 대부분의 유도체들은 활성이 약하거나 거의 없었으며, 탄소 연결 없이 직접 결합된 유도체에 비해 활성이 상대적으로 약하다는 것을 확인할 수 있었습니다.

이어서 가장 활성이 강한 3-할로페닐 유도체(17-19)의 2-하이드록시메틸(42-44), 2-메톡시메틸(45-47), 2-(사이클로프로필메톡시)메틸(48-50), 2-페닐벤조퓨란(51-53) 유사체를 살펴보았습니다 (표 9). SAR 분석 결과, 이들은 표 7에서 확인된 것과 유사한 패턴을 보였으며, 할로겐의 크기가 커질수록 활성이 증가했습니다. 벤조퓨란의 2번 위치에 있는 사이드 체인은 안정적으로 활성이 유지되는 경향을 보였습니다.

마지막으로, 강력한 억제제(18, 19, 22, 23)의 디벤조퓨란 대체화합물들(54-59)에 대해 연구하였습니다(표 10). 이들의 활성은 표 9의 2-페닐벤조퓨란 유도체와 유사했으며(52 vs 54, 53 vs 55), 이는 디벤조퓨란 고리가 2-페닐벤조퓨란의 고리화된 유형임을 추정 가능하게 하였습니다. SAR은 벤조퓨란 유도체와 유사한 패턴을 보였습니다.

IDO1에 대한 새로운 스캐폴드의 결합 모드를 조사하기 위해 가장 강력한 억제제인 19를 IDO1 X-선 결정 구조에 도킹하는 연구를 진행하였습니다^[35, 36]. 그림 8와 같이 19의 결합 모드는 에파카도스타트의 결합 모드와 유사한 것으로 나타났습니다^[37]. *N*-하이드록시아미딘의 히드록실기는 헴 철과 강력한 쌍극자 이온 상호 작용을 형성합니다. 3-브로모페닐기는 Tyr126, Val130, Phe164, Leu234로 구성된 소수성 포켓(포켓 A)에 깊숙이 결합하여 Phe163과 $\pi - \pi$ 스태킹 상호작용을 형성합니다. 또한 3-Br 그룹은 Cys129의 황과 강한 할로겐 결합 상호작용을 나타냅니다. 반면, 벤조퓨란 고리는 두 번째 소수성 포켓(포켓 B)을 점유하는 것으로 확인되었습니다.



그림 8. IDO1에서 19로 예상되는 바인딩 모드. The key interacting residues are marked and displayed as capped-stick representations with carbon atoms in gray. Halogen bonding is drawn as a purple dashed line, and bonding with heme is displayed as a green dashed line. The bottom panel shows the 2D interactions.

제 3 절 결론

요약하면, 본 연구에서는 N-hydroxy-N -substituted benzofuran-5-carboximidamide 계열 화합물들을 IDO 저해제로서 효소 및 세포-기반 활성 억제도에 대해 평가하였습니다. SAR 분석 결과 N-페닐 치환된 유도체에서 페닐 고리의 치환기 위치가 73 효능에 가장 큰 영향을 미치고 3-position이 치환되었을 때 억제력이 가장 뛰어났습니다. 3-position의 치환기 중에서 할로겐은 그 크기가 증가함에 따라(Br>Cl>F) 높은 효능을 나타냈는데, 아마도 이것은 할로겐 결합을 형성하기 때문인 것으로 짐작됩니다. 그러나 다른 유형의 치환기는 비치환된 페닐 유도체에 비해 어떠한 유익한 효과도 나타내지 못했습니다. One-carbon homologous와 dibenzofuran 계열 유도체는 효소 억제 활성을 나타내지 못하는 것으로 밝혀졌습니다. IDO1의 X-선 결정 구조에서 가장 강력한 19의 분자 모델링은 N-하이드록실 그룹과 햄 철의 쌍극자 이온 상호작용, 브로모 원자와 시스테인 황의 할로겐 결합, 두 개의 소수성 상호작용이 19가 강력한 활성을 나타낼 수 있는 핵심 상호작용임을 보여주었습니다.

참고 문헌

- Tanner, C.M. Exploring the clinical burden of OFF periods in Parkinson Disease. Am. J. Manag. Care 2020, 26, S215– S264.
- Poewe, W.; Antonini, A. Novel formulations and modes of delivery of Levodopa. *Mov. Disord.* 2015, *30*, 114–120.
- Jenner, P.; Mori, A.; Aradi, S.D.; Hauser, R.A. Istradefylline—A first generation adenosine A_{2A} antagonist for the treatment of Parkinson's disease. *Exp. Rev. Neurother.* 2021, *21*, 317–333.
- LeWitt, P.A.; Aradi, S.D.; Hauser, R.A.; Rascol, O.
 Parkinsonism Relat. Disord. 2020, 80 (Suppl. 1), S54–S63.
- Saki, M.; Yamada, K.; Koshimura, E.; Sasaki, K.; Kanda, T. In vitro pharmacological profile of the A_{2A} receptor antagonist istradefylline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2013, *386*, 963–972.
- Shook, C.; Rassnick, S.; Wallace, N.; Crooke, J.; Ault, M.; Chakravarty, D.; Barbay, K.; Wang, A.; Powell, M.T.; Leonard, K.; et al. Design and characterization of optimized adenosine A_{2A}/A₁ receptor antagonists for the treatment of Parkinson's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1402–1417.

- Mihara, T.; Iwashita, A.; Matsuoka, N. A novel adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonist ASP5854 ameliorates motor impairment in MPTP-treated marmosets; Comparison with existing anti-Parkinson's disease drugs. *Behav. Brain. Res.* 2008, 194, 152–161.
- Markovic, T.; Rocke, B.N.; Blakemore, D.C.; Mascitti, V.; Willis, M.C. Pyridine sulfinates as general nucleophilic coupling partners in palladium-catalyzed cross-coupling reactions with aryl halides. *Chem. Sci.* 2017, *8*, 4437–4442.
- Markovic, T.; Murray, P.R.D.; Rocke, B.N.; Shavnya, A.; Blakemre, D.C.; Willis, M.C. Heterocyclic allylsulfones as latent heteroaryl nucleophiles in palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 15916-15923.
- 10.Mihara, T.; Mihara, K.; Yarimizu, J.; Mitani, Y.; Matsuda, R.; Yamamoto, H.; Aoki, S.; Akahane, A.; Iwashita, A.; Matsuoka, N. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A₁ and A_{2A} receptor dual antagonist, 5– [5-amino-3(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, *323*, 708-719.

- 11.Varani, K.; Gessi, S.; Dalpiaz, A.; Borea, P.A.
 Pharmacological and biochemical characterization of purified
 A_{2A} adenosine receptors in human platelet membranes by
 [3H]CGS21680 binding. *Br. J. Pharmacol.* 1996, *117*, 1693–1701.
- 12.Obach, R.S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug. Met. Dis.* **1999**, *27*, 1350– 1359.
- 13.Crumb, W.J., Jr.; Johannesen, V.J.; Strauss, D.G. An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive in vitro proarrhythmia assay (CiPA) proposed ion channel panel. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2016, 81, 251–262.
- 14. Ames, B.N.; McCann, J.; Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1975, *31*, 347– 364.
- 15.Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 1983, 113, 173– 215.
- 16.Gerlach, M.; Riederer, P. Animal models of Parkinson's 77

disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* **1996**, *103*, 987– 1041.

- 17.Jackson-Lewis, V.; Przedborski, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat. Protoc.* 2007, *2*, 141–151.
- 18.Cheng, Y.; Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- 19.0ECD. OECD Guideline 471 (Genetic Toxicology: Bacterial Reverse Mutation Test), Ninth Addendum to the OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Adopted July 21, 1997; OECD: Paris, France, 1997.
- 20.Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 950–954.
- 21.Deacon, R.M.J. Assessing nest building in mice. Nat. Protoc.2006, 1, 1117–1119.
- 22.Modoux M, Rolhion N, Mani S, Sokol H. Tryptophan metabolism as a pharmacological target. *Trends Pharmacol Sci.* **2020**;42:60-71.

- 23.Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, Halmos G, Székvölgyi L. The role of indoleamine-2,3dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol.* 2018;9:151.
- 24.Munn DH, Mellor AL. IDO in the tumor microenvironment: Inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends Immunol.* **2016**;37:193-207.
- 25.Hunt JT, Balog A, Huang C, Lin T-A, Lin T-A, Maley D, et al. Structure, in vitro biology and in vivo pharmacodynamic characterization of a novel clinical IDO1 inhibitor [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2017;77(13 Suppl):Abstract nr 4964. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-4964
- 26.Yue EW, Douty B, Wayland B, Bower M, Liu X, Leffet L, Wang Q, Bowman KJ, Hansbury MJ, Liu C, Wei M, Li Y, Wynn R, Burn TC, Koblish HK, Fridman JS, Metcalf B, Scherle PA, Combs AP. Discovery of potent competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with in vivo pharmacodynamic activity and efficacy in a mouse melanoma model. J Med Chem. 2009;52:7364-7367.

- 27.Liu X, Shin N, Koblish HK, Yang G, Wang Q, Wang K, Leffet L, Hansbury MJ, Thomas B, Rupar M, Waeltz P, Bowman KJ, Polam P, Sparks RB, Yue EW, Li Y, Wynn R, Fridman JS, Burn TC, Combs AP, Newton RC, Scherle PA. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood.* 2010;115:3520–3530.
- 28.Mautino MR, Jaipuri FA, Waldo J, Kumar S, Adams J, Van Allen C, et al. NLG919, a novel indoleamine-2,3dioxygenase (IDO)-pathway inhibitor drug candidate for cancer therapy [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2013;73(8 Suppl):Abstract nr 491. doi:10.1158/1538-7445.AM2013-491
- 29.Nelp MT, Kates PA, Hunt JT, Newitt JA, Balog A, Maley D, Zhu X, Abell L, Allentoff A, Borzilleri R, Lewis HA, Lin Z, Seitz SP, Yan C, Groves JT. Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2018;115: 3249-3254.
- 30.Long GV, Dummer R, Hamid O, Gajewski TF, Caglevic C, Dalle S, Arance A, Carlino MS, Grob JJ, Kim TM, Demidov

L, Robert C, Larkin J, Anderson JR, Maleski J, Jones M, Diede SJ, Mitchell TC. Epacadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO– 301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol.* **2019**;20:1083-1097.

- 31.Le Naour J, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G, Vacchelli E. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. Oncoimmunology. 2020;9:1777625.
- 32. Amatore C, Blart E, Genet JP, Jutand A, Lemaire-Audoire S, Savignac M. New synthetic applications of water-soluble acetate Pd/TPPTS catalyst generated in situ. evidence for a true Pd(0) species intermediate. J Org Chem. 1995;60;6829-6839
- 33.Shimizu T, Nomiyama S, Hirata F, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. J Biol Chem. 1978;253:4700-4706.
- 34.Röhrig UF, Majjigapu SR, Grosdidier A, Bron S, Stroobant V, Pilotte L, Colau D, Vogel P, Van den Eynde BJ, Zoete V, Michielin O. Rational design of 4-aryl-1,2,3-triazoles for indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition. J Med Chem. 2012;55:5270-5290.

- 35.The IDO1 protein was prepared with Protein Preparation Wizard Workflow provide in Maestro module of Schrodinger Suite 2019-2. The receptor grid was generated 25 x 25 x 25 Å space region centered at the original ligand of the complex structure. The default values were assigned. The docking of compound 19 was performed using the extra precision(XP) mode in Glide. The docking model of compound 19 was displaced using PyMOL version 2.0.4.
- 36.Tojo S, Kohno T, Tanaka T, Kamioka S, Ota Y, Ishii T, Kamimoto K, Asano S, Isobe Y. Crystal structures and structure-activity relationships of imidazothiazole derivatives as IDO1 inhibitors. Acs Med Chem Lett. 2014;5:1119-1123.
- 37.Yue EW, Sparks R, Polam P, Modi D, Douty B, Wayland B, Glass B, Takvorian A, Glenn J, Zhu W. INCB24360 (Epacadostat), a highly potent and selective indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor for immuno-oncology. ACS Med Chem Lett. 2017;8:486-491.

Abstract

PART I: Discovery of Novel Dual Adenosine A_{2A} and A₁ Receptor Antagonists with 1*H*Pyrazolo [3,4 -*d*]pyrimidin-6amine Core Scaffold as AntiParkinson's Disease Agents

PART II: Discovery of 5-(*N*hydroxycarbamimidoyl) benzofuran derivatives as novel indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors

> Juyoung Jung Pharmaceutical Chemistry Major Department of Pharmacy The Graduate School Seoul National University

PART I: Discovery of Novel Dual Adenosine A_{2A} and A_1 Receptor Antagonists with 1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-amine Core Scaffold as Anti-Parkinson's Disease Agents

New compounds with 1H-pyrazolo [3, 4-d] pyrimidin-6-amine core scaffolds were synthesized and characterized in vitro to determine their affinity for human A_{2A} and A_1 receptors. Among the tested compounds, a few compounds displayed nanomolar binding affinities for both receptors. One particular compound, 110, showed high binding activities (hA_{2A} K_i = 13.3 nM; hA_1 K_i = 55 nM) and full antagonism (hA_{2A} IC₅₀ = 136 nM; hA_1 IC₅₀ = 98.8 nM) toward both receptors. Further tests showed that 110 has low hepatic clearance and good pharmacokinetic properties in mice, along with high bioavailability and a high brain plasma ratio. In addition, 110 was associated with very low cardiovascular risk and mutagenic potential, and was well-tolerated in rats and dogs. When tested in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease, 110 tended to improve behavior. Moreover, **110** dose-dependently reversed haloperidol-induced catalepsy in female rats, with graded ED₅₀ of between 3 and 10 mg/kg. Taken together, these results suggest that this potent dual A_{2A}/A_1 receptor antagonist, **110**, is a good candidate for the treatment of Parkinson's disease with an excellent metabolic and safety profile.

PART II: Discovery of 5-(*N*-hydroxycarbamimidoyl) benzofuran derivatives as novel indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors

Human indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (hIDO1) and tryptophan

dioxygenase (*h*TDO) are rate-limiting enzymes in the kynurenine pathway (KP) of *L*-tryptophan (*L*-Trp) metabolism and are becoming key drug targets in the combination therapy of checkpoint inhibitors in immunoncology. To discover a selective and potent IDO1 inhibitor, a structure-activity relationship (SAR) study of *N*hydroxybenzofuran-5-carboximidamide as a novel scaffold was investigated in a systematic manner. Among the synthesized compounds, the *N*-3-bromophenyl derivative **19** showed the most potent inhibition, with an IC₅₀ value of 0.44 μ M for the enzyme and 1.1 μ M in HeLa cells. The molecular modeling of **19** with the X-ray crystal structure of IDO1 indicated that dipole-ionic interactions with heme iron, halogen bonding with Cys129 and the two hydrophobic interactions were important for the high potency of **19**.

PART I Keywords: Adenosine receptor antagonists; dual antagonists; Parkinson's disease; MPTP; haloperidol;
PART II Keywords: Indoleamine 2; 3-deoxygenase 1; kynurenine pathway; immuno-oncology;

Student Number: 2018-36644