

명세서

발명의 명칭: 신규한 테트라헤테로사이클 화합물

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 테트라헤테로사이클 화합물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 KRAS 단백질 저해제로서 유용한 신규한 테트라헤테로사이클 화합물 이성질체, 및 이를 포함하는 암 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] RAS 유전자는 미토겐 활성화 단백질 키나아제(mitogen activated protein kinase, MAPK) 및 포스파티딜이노시톨 3 키나아제(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) 경로 내에서 신호 전달을 담당하며, 빈번한 돌연변이로 인해 종양 유전자로서 알려져 있다. RAS 유전자 패밀리는 KRAS, NRAS, 및 HRAS로 분류되는데, 이들 세 개의 유전자는 네 개의 단백질 즉, 스플라이스 변이체 K-Ras4A 및 K-Ras4B와, N-Ras 및 H-Ras를 인코딩한다. K-Ras는 Ras 유발 암(86%)에서 가장 빈번하게 돌연변이된 동형체(mutated isoform)이며 N-Ras(11%) 및 H-Ras(3%)가 그 뒤를 잇는다(비특허문헌 1). 예를 들어 췌장암, 폐암, 결장 선암종(colon adenocarcinoma), 결장직장암 및 직장 선암종(rectal adenocarcinomas)을 포함하는 암의 15.95%에서 KRAS의 발암성 변화가 관찰된다(비특허문헌 2).
- [3] 대부분 코돈 12, 13, 61에 위치하는 기능 획득 오류 돌연변이(gain-of-function missense mutation)는 RAS 단백질을 항시(constitutively) 활성화하며, 다양한 유형의 인간 암에서 검출된다. 종양 Ras 돌연변이의 98%가 활성 부위 아미노산 잔기 G12, G13 및 Q61에서 발견되며, 이들 돌연변이는 고유(intrinsic) 및 GAP 매개 GTP 가수분해를 손상시켜 하위 신호 전달을 비정상적으로 활성화시킨다(비특허문헌 3). K-Ras G12 돌연변이(89%)가 인간 암에서 우세하며, G13 돌연변이(9%) 및 Q61 돌연변이(1%)가 그 뒤를 잇는다. 코돈 12 돌연변이 형태로는 코돈 12 Gly→Asp (G12D) (36%), 코돈 12 Gly→Val (G12V) (23%), 코돈 12 Gly→Cys (G12C) (14%)가 있으며, G12D는 코돈 12 변이 중에서 가장 흔한 돌연변이다. 또한, 코돈 13 Gly→Asp (G13D) (7%) 및 코돈 61 Gln→His (Q61H) (0.6%)의 돌연변이도 관찰된다(비특허문헌 1).
- [4] 악성종양에서 KRAS의 잘 알려진 역할과 다양한 종양 유형에서 KRAS의 돌연변이 보고는 KRAS가 암 치료를 위한 효율적인 타겟이 될 수 있음을 보여준다. 본 발명자들은 새로운 KRAS 저해제를 개발하여 본 발명을 완성하였다.
- [5] [선행기술문헌]
- [6] [비특허문헌]
- [7] (비특허문헌 1) *Scientific Reports* 6(1):21949
- [8] (비특허문헌 2) *J Cancer Metastasis Treat* 2021;7:26
- [9] (비특허문헌 3) *Cancer Biol Ther.* 2006 August; 5(8): 928-932

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 신규한 테트라헤테로사이클 화합물, 이성질체, 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 이를 포함하는 암 치료를 위한 약학적 조성물, 이를 제공하기 위한 제조 방법 및 중간체를 제공한다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.
- [12] 본 발명의 다른 일 양상은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명의 다른 일 양상은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염을 제조하기 위한 제조 방법 및 이에 사용되는 중간체를 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명은 KRAS 단백질 저해제로서 유용한 신규한 테트라헤테로사이클 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, KRAS 단백질 저해 활성을 나타낼 수 있어 암 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [15] 본 명세서에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.

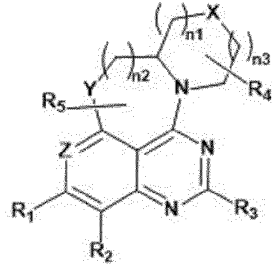
[16]

[17] 테트라헤테로사이클 화합물

- [18] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[19] [화학식 1]

[20]



[21] 상기 식에서,

[22] R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, C_{1-3} 알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된

[23] 페닐, 피리디닐, 나프틸, 인다졸릴, 벤조티아졸릴, 또는 벤조티오펜일이며;

[24] R^2 는 수소 또는 할로젠이고;

[25] R^3 은 수소, C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 4-10원의 헤테로사이클, 또는 $-O-(L)_m-A_1$ 이고, 이 때 A_1 는 하나 이상의 R^7 로 각각 치환되거나 비치환된 C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 4-10원의 헤테로사이클, 6-10원의 아릴, 5-10원의 헤테로아릴, 또는 4-10원의 융합헤테로아릴이고;

[26] L 은 R^7 로 치환되거나 비치환된 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{3-8} 사이클로알킬렌이고;

[27] R^7 은 각각 독립적으로 할로젠, 옥소(=O), =CH₂, -OCF₃, -OCHF₂, 아미노, 시아노, -N(C_{1-3} 알킬)₂, -NH(C_{1-3} 알킬), 치환 또는 비치환된 C_{1-3} 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{1-3} 할로알킬, 치환 또는 비치환된 C_{1-3} 알콕시, 치환 또는 비치환된 C_{3-4} 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로사이클이고;

[28] R^4 은 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, 또는 C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알콕시이고;

[29] X 는 O, CH₂ 또는 NR⁸이고;

[30] R^8 은 수소 또는 R^9 로 1-3회 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 또는 C_{3-6} 헤테로사이클로알킬이고;

[31] R^9 은 각 경우에 독립적으로 산소, 하이드록시, -C₁₋₄알킬 또는 -O-C₁₋₄알킬이고;

[32] Y 는 NH, O, S, SO, 또는 SO₂이고;

[33] Z 는 CR⁶ 또는 N이고;

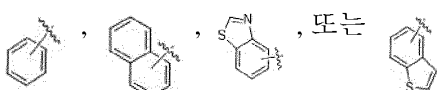
[34] R^5 는 수소, C_{1-3} 알킬, 시아노, 또는 아미노이고;

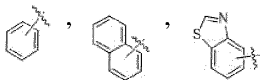
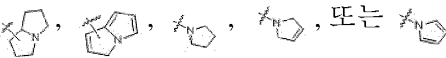
[35] R^6 은 수소, 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 알킬이고;

[36] n_1 , n_2 , n_3 , 및 m 은 각각 1 내지 3의 정수이고;

[37] 헤테로사이클, 헤테로아릴, 및 융합헤테로아릴은 각각 N, S 또는 O 중 어느 하나 이상을 헤테로 원자로 포함한다.

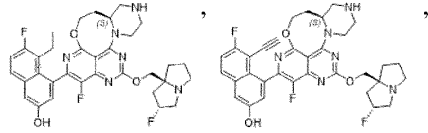
[38]

- [39] 일 구현 예에서,
- [40] R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, C_{1-3} 알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된
- [41] 페닐, 나프틸, 벤조티아졸릴, 또는 벤조티오펜일이며;
- [42] X는 O, CH_2 또는 NH이고;
- [43] Y는 O 일 수 있다.
- [44]
- [45] 일 구현 예에서,
- [46] R^3 은 $-O-(L)_m-A_1$ 이고, 이 때 A_1 는 하나 이상의 R^7 로 각각 치환되거나 비치환된 4-10원의 헤테로사이클 또는 5-10원의 융합헤테로아릴 일 수 있다.
- [47]
- [48] 일 구현 예에서,
- [49] R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된
- [50]
- [51] 청구항 1에 있어서,
- [52] R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된
- [53]  , 또는  이며;
- [54] R^3 은 $-O-(L)_m-A_1$ 이고, 이 때 A_1 는 하나 이상의 R^7 로 각각 치환되거나 비치환된 4-10원의 헤테로사이클 또는 5-10원의 융합헤테로아릴이고;
- [55] L은 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{3-8} 사이클로알킬렌이고;
- [56] R^7 은 각각 독립적으로 할로젠, 옥소(=O), $=CH_2$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, 아미노, 시아노, C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 할로알킬, 또는 C_{1-3} 알콕시이고;
- [57] R^4 은 수소이고;
- [58] X는 O, CH_2 또는 NH이고;
- [59] Z는 CR^6 또는 N이고;
- [60] R^5 는 수소 또는 C_{1-3} 알킬이고;
- [61] R^6 은 할로젠이고;
- [62] n_1, n_2, n_3 , 및 m은 각각 1 내지 3의 정수인 것인 화합물.
- [63]
- [64] 일 구현 예에서,

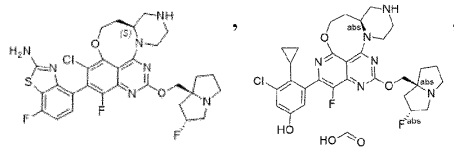
- [65] Z는 N인 경우,
- [66] R¹은 하이드록시, 할로젠, C₁₋₃할로알킬, C₁₋₃알킬, C₂₋₆알켄일, C₂₋₆알킨일, C₃₋₆사이클로알킬, C₁₋₃알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된 페닐 또는 나프틸이고;
- [67] Z는 CR⁶인 경우,
- [68] R¹은 하이드록시, 할로젠, C₁₋₃할로알킬, C₁₋₃알킬, C₂₋₆알켄일, C₂₋₆알킨일, C₃₋₆사이클로알킬, C₁₋₃알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된 벤조티아졸릴 또는 벤조티오펜일 일 수 있다.
- [69]
- [70] 일 구현 예에서,
- [71] R³은 -O-(L)_m-A₂이고, 이 때 A₂는 , 또는  이고, 이들은 할로젠, C₁₋₃알킬, C₁₋₃알콕시, 및 =CH₂로부터 각각 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환 또는 비치환되고;
- [72] -(L)_m-은 메틸렌 또는  일 수 있다.
- [73]
- [74] 일 구현 예에서,
- [75] R¹은 하이드록시, 할로젠, C₁₋₃알킬, C₂₋₆알켄일, C₂₋₆알킨일, C₃₋₆사이클로알킬, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된
- [76] , 또는  이고;
- [77] R²는 할로젠이고;
- [78] R³은 -O-(L)_m-A₁이고, 이 때 A₁는 할로젠, C₁₋₃알킬, C₁₋₃알콕시, 및 =CH₂로부터 각각 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환 또는 비치환된
- [79] , 또는  이고, 이 때 -(L)_m-은 메틸렌 또는  이고;
- [80] R⁴은 수소이고;
- [81] X는 O, CH₂ 또는 NH이고;
- [82] Y는 O이고;
- [83] Z는 CH, C(C₁₋₃알킬), 또는 N이고;
- [84] R⁵는 수소 또는 C₁₋₃알킬일 수 있다.
- [85]

[86] 일 구현 예에서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화합물로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있다:

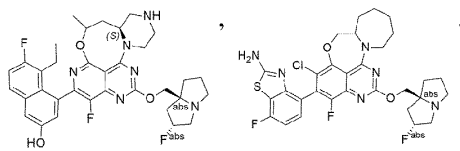
[87]



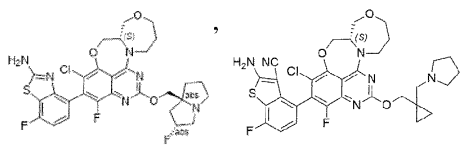
[88]



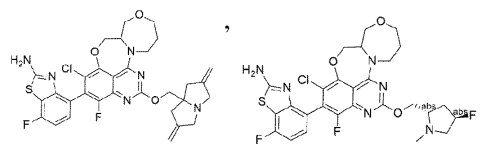
[89]



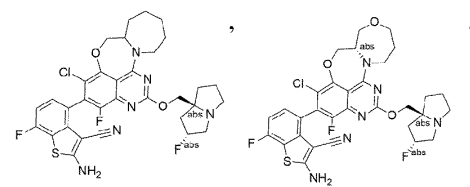
[90]



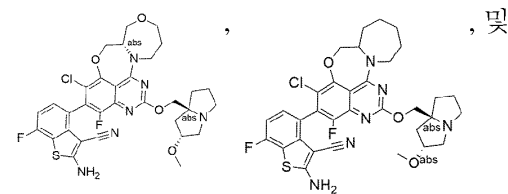
[91]



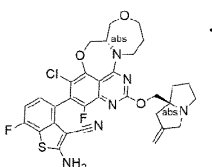
[92]



[93]



[94]



- [95]
- [96] 다른 일 양상은 상기 언급된 어느 하나의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [97] 일 구현예에서, 상기 조성물은 KRAS 단백질 저해 활성을 나타내는 것일 수 있다.
- [98]
- [99] **정의**
- [100] 본 명세서에서 사용된 용어 "할로젠"은 다른 언급이 없으면, 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 말한다.
- [101] 본 명세서에서 사용된 용어 "알킬"은 다른 언급이 없으면, 직쇄형 또는 분지형의 포화된 1가의 탄화수소기를 말한다.
- [102] 본 명세서에서 사용된 용어 "알킬렌"은 $(-\text{CH}_2-)_n$ 를 갖는 2가 직쇄형 또는 분지형 탄화수소기를 말하며, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 이소부틸렌 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [103] 본 발명에 사용된 용어 "알켄일"은 다른 언급이 없으면, 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 함유하는 1가의 탄화수소기를 말하며, 각각의 이중결합은 *E*- 또는 *Z*-형의 입체 배치 형태를 가질 수 있다.
- [104] 본 발명에 사용된 용어 "알킨일"은 다른 언급이 없으면, 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 함유하는 1가의 탄화수소 라디칼을 말한다.
- [105] 본 명세서에서 사용된 용어 "알콕시"는 다른 언급이 없으면, 직쇄형 또는 분지형 탄화수소 잔기가 산소로 연결된 것을 말한다.
- [106] 본 명세서에서 사용된 용어 "아릴"은 다른 언급이 없으면, 치환 또는 비치환될 수 있는 방향족기를 말하며, 모노사이클릭 또는 바이사이클릭, 또는 바이사이클릭 이상의, 치환 또는 비치환될 수 있는 방향족기를 포함하며, 불포화 또는 부분적으로 포화된 아릴을 포함하고, 예컨대 C_{6-15} 아릴을 포함할 수 있고, 예를 들어 페닐, 비페닐, 나프틸, 톨루일, 또는 나프탈렌일 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 본 명세서에서 사용된 용어 "헤테로아릴"은 다른 언급이 없으면, N, O, 및 S로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 모노사이클릭 또는 바이사이클릭, 또는 바이사이클릭 이상의, 치환 또는 비치환될 수 있는 방향족기를 말하며, 불포화 또는 부분적으로 포화된 헤테로아릴을 포함하고, 예컨대 C_{4-15} 헤테로아릴을 포함할 수 있다. 예를 들어, 모르폴린일, 피페리딘일, 피롤리딘일, 또는 피롤리진일 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [108] 본 명세서에서 사용된 용어 "융합헤테로아릴"은 상기 헤테로아릴기가 또 다른 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클로알킬기와 융합된 방식으로 연결된, 불포화 또는 부분적으로 포화된, 치환 또는 비치환된 고리 시스템을 말한다. 예컨대

C_{8-20} 헤테로아릴을 포함할 수 있고, 예를 들어, 9원, 10원, 11원, 12원, 13원, 14원 또는 15원의 벤조-융합된 헤테로아릴기일 수 있다. 예를 들어, 융합헤테로아릴은 5+5원, 5+6원, 5+7원, 6+6원, 또는 6+7원의 융합 고리 시스템을 이룰 수 있다. 또한, 융합헤테로아릴은 예를 들어, 피롤리진, 벤조티아졸, 벤즈티아졸린일, 벤조티오펜일, 벤조퓨란일, 이소벤조퓨란일, 벤조티오닐, 인돌일, 이소인돌린일, 인다졸린일, 벤즈이미다졸린일, 벤즈옥사졸린일, 벤즈이속사졸린일, 벤즈티아디아졸릴, 벤즈옥사디아졸린일, 벤즈트리아졸린일, 퀴놀린일, 이소퀴놀린일, 또는 퀴나졸린일 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

- [109] 본 명세서에서 사용된 용어 "부분적으로 포화된"은 상기 정의된 아릴, 헤테로아릴, 또는 융합헤테로아릴 고리 내에 적어도 하나의 포화 사이트 즉, 적어도 하나의 단일 결합을 포함하는 것을 말한다. 본 명세서에서 용어, "불포화된"은 상기 정의된 아릴, 헤테로아릴, 또는 융합헤테로아릴 고리 내에 포화 사이트, 즉, 단일 결합을 포함하지 않는 것을 지칭한다.
- [110] 본 명세서에서 사용된 용어 "사이클로알킬"은 다른 언급이 없으면, 치환 또는 비치환될 수 있는, 포화 또는 부분 불포화의, 모노사이클릭, 바이사이클릭, 또는 폴리사이클릭 탄화수소 고리를 말하며, 브릿지사이클로알킬, 융합사이클로알킬, 스피로사이클로알킬을 포함한다. 예컨대 C_{3-10} 사이클로알킬 또는 C_3-6 사이클로알킬을 포함할 수 있고, 예를 들어 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 또는 사이클로헵틸 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [111] 본 명세서에서 사용된 용어 "사이클로알킬렌"은 사이클로알켄으로부터 유도된 라디칼 (divalent radical)을 말한다.
- [112] 본 명세서에서 사용된 용어 "헤테로사이클" 또는 "헤테로사이클로알킬"은 다른 언급이 없으면, N, O, 및 S로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는, 치환 또는 비치환될 수 있는, 포화 또는 부분 불포화의, 모노사이클릭, 바이사이클릭, 또는 폴리사이클릭 비방향족 고리를 말하며, 브릿지헤테로사이클, 융합헤테로사이클, 스피로헤테로사이클을 포함한다. 상기 용어는 일환 또는 다환의, 환상 알킬을 포함하며, 예컨대 C_{4-15} 헤테로사이클로알킬을 포함할 수 있고, 예를 들어 피페리딘일, 피페라진일, 피롤리딘일, 모르폴린일, 티오모르폴린일, 테트라하이드로푸란일(tetrahydrofuranlyl), 테트라하이드로피란일(tetrahydro-2H-pyranlyl), 이미다졸리딘일, 피롤리딘-2-온(pyrrolidin-2-one), 피롤리진일, 또는 피롤일 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 헤테로사이클은 탄소 연결기 또는 헤테로원자 연결기일 수 있다. 예를 들어, 헤테로사이클의 고리 원자 중 질소를 통해 기본 분자에 연결된 헤테로사이클은 N-모르폴린일, N-피페리딘일, N-피롤리딘일, 또는 N-피롤일 일 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [113] 본 명세서에서 사용된 용어 "융합헤테로사이클" 또는 "융합사이클로알킬"은 다른 언급이 없으면, 치환 또는 비치환된 고리 시스템을 말한다. 고리 개수에 따라 이환형, 삼환형, 사환형 또는 그 이상의 다환형 융합사이클로알킬로 구분될

수 있다. 융합사이클로알킬은 각각의 고리가 다른 고리와 인접한 탄소 원자 쌍을 공유하고, 하나 이상의 고리는 하나 이상의 이중 결합을 공유할 수 있지만, 이들 고리들 중 어느 것도 완전한 공액 π -전자 시스템을 갖지는 않는 다환 사이클로알킬을 말하며, 예컨대 C_{3-20} 융합사이클로알킬을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이환형 융합사이클로알킬은 "바이사이클로알킬"로도 지칭되고, 융합되는 두 개의 고리를 각각 이루는 원자의 수에 따라 5+6 형태의 바이사이클로알킬 또는 6+6 형태의 바이사이클로알킬일 수 있다.

- [114] 본 명세서에서 사용된 용어 "융합헤테로사이클로알킬"은 다른 언급이 없으면, N, O, 및 S로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는, 치환 또는 비치환된 융합사이클로알킬을 말하며, 예컨대 C_{8-20} 헤테로융합사이클로알킬을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이환형 융합헤테로사이클로알킬은 "헤테로바이사이클로알킬"로도 지칭되고, 융합되는 두 개의 고리를 각각 이루는 원자의 수에 따라 5+6 융합 헤테로바이사이클로알킬 또는 6+6 융합 헤테로바이사이클로알킬일 수 있다. 예를 들어, 헥사하이드로-1H-피롤리진(hexahydro-1H-pyrrolizine)일 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [115] 본 명세서에서 사용된 용어 "입체 이성질체"는 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 광학적 또는 입체적으로 다른 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "거울상이성질체"는 본 발명에 따른 화합물에 대하여 존재할 수 있는 다양한 입체 이성질체와 기하 이성질체를 말한다.
- [116] 본원에 기재된 화합물은 비대칭 중심, 기하학적 중심(예를 들어, 이중 결합), 또는 둘 모두를 가질 수 있다. 특정 입체화학 또는 이성질체 형태가 구체적으로 표시되지 않는 한, 모든 키랄, 부분입체 이성질체, 라세미 형태 및 구조의 모든 기하 이성질체 형태가 의도된다.
- [117] 본 발명의 일 양상에 따른 화학식 1의 화합물들은 비대칭 탄소중심(부제탄소)을 가질 수 있으므로 거울상이성질체(R 또는 S 이성질체), 라세미체, 부분입체 이성질체, 또는 이들의 임의의 혼합물로서 존재할 수 있으며, 이들 모든 이성질체 및 혼합물은 본 발명의 범위에 포함된다.
- [118] 본원에 기재된 화합물은 키랄 중심을 가질 수 있고, 달리 언급하지 않는 한 각각의 키랄 중심은 독립적으로 R-배열 또는 S-배열 또는 이들의 혼합물일 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 화합물은 임의의 또는 모든 비대칭 원자에서 농축되거나(enriched) 분리된(resolved) 광학 이성질체를 포함한다. R-거울상이성질체 및 S-거울상이성질체의 라세미 혼합물, 및 R- 및 S-거울상이성질체뿐만 아니라 개별 광학 이성질체를 포함하는 거울상-농축 입체 이성질체 혼합물은 이들의 거울상이성질체 또는 부분입체 이성질체 파트너가 실질적으로 없도록 분리 또는 합성될 수 있으며, 이러한 입체 이성질체는 모두 본 기술의 범위 내에 있다.
- [119] 비대칭적으로 치환된 원자를 함유하는 본 개시내용의 화합물은 광학 활성(optically active) 또는 라세미 형태로 분리될 수 있다. 라세미 형태의 분리

(resolution), 광학 활성 출발 물질로부터의 합성, 또는 키랄 보조제의 사용과 같은 광학 활성 형태를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

- [120] 본 명세서에서 사용된 용어 "회전장애이성질체"는 서로 분리될 수 있는 모든 입체 이성질체를 말한다. 화합물을 구성하는 결합 가운데 탄소와 탄소가 이루는 단일 결합이 부피가 큰 치환기에 의해 자유롭게 회전하지 못하여 나타나는 이성질체이다. 비대칭 축으로부터 생성된 입체이성질체를 지칭하며, 안정한 비-상호 전환 부분입체이성질체 또는 거울상이성질체 중의 완전한 단리를 포함하여, 이성질체 중의 구별을 허용하기에 충분히 높은 회전 장벽이 존재하는 단일 결합 주위의 제한된 회전으로부터 생성될 수 있다.
- [121] 일 구현 예에 따른 화합물은 높은 확률로 회전장애이성질체가 발생할 수 있다.
- [122] 일 구현 예에 따른 화합물은 또한 "호변이성질체" 형태를 포함할 수 있다. 호변 이성질체 형태는 단일 결합과 인접한 이중 결합의 교환 및 수반되는 양성자의 이동으로 인해 발생한다. 호변이성질체 형태는 동일한 실험식 및 총 전하를 갖는 이성질체 양성자화 상태인 프로토티트로픽 호변이성질체를 포함한다. 호변 이성질체 형태는 평형 상태에 있거나 적절한 치환에 의해 한 형태로 입체적으로 고정될 수 있다.
- [123] 일 구현 예에 따른 화합물은 "동위원소변형체"를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 또한 하나 이상의 원자가 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자("동위원소")로 대체된다는 점을 제외하고는 본원에 기재된 화합물과 동일한 동위원소 표지된 화합물을 포함한다. 본 개시내용의 화합물은 또한 그러한 화합물을 구성하는 하나 이상의 원자에서 비천연 비율의 원자 동위원소를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소 및 염소의 동위원소, 예를 들어 ^2H ("D"), ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F 및 ^{36}Cl 를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 화합물은 중수소로 대체된 하나 이상의 H 원자를 가질 수 있다. 일반적으로, 수소 또는 H와 같은 특정 원소에 대한 언급 또는 서술은 해당 원소의 모든 동위원소를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, R기(group)가 수소 또는 H를 포함하는 것으로 정의되면 중수소 및 삼중수소도 포함된다. 중수소화 출발 물질은 쉽게 입수할 수 있으며 중수소 함유 화합물의 합성을 제공하기 위해 본원에 기술된 합성 방법에 적용된다. 많은 수의 중수소 함유 시약 및 빌딩 블록이 Aldrich Chemical Co.와 같은 화학 공급업체에서 상업적으로 이용 가능하다.
- [124] 본 명세서에서 사용된 용어 "용매화물"은 화학식 1의 화합물 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 용매 분자, 예를 들어 에탄올 또는 물을 포함하는 분자 복합체를 포함할 수 있다. 상기 용매 분자가 물인 복합체는 "수화물"로도 지칭된다.
- [125] 본 명세서에서 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않는 한 염의 염을 포함한다.

- [126]
- [127] **KRAS 단백질 저해제**
- [128] 키르스텐 랫트 육종 바이러스 종양유전자 동종체(Kirsten Rat Sarcoma Oncogene Homolog, KRAS)는 세포 외부의 신호를 세포 내 증식 및 생존 신호로 통합하는 GTP 가수분해효소(GTPase)이고 Ras, Rho, Rab, Arf, Ran의 small GTPase family 중 하나이다. 여러 수용체 타이로신 인산화 효소(receptor tyrosine kinase), 특히 상위에 EGFR로부터의 신호를 전달받아 KRAS의 GTPase cycle을 통해 하위로는 주요하게 Raf, PI3K로 신호를 전달함으로써, 세포증식을 포함한 다양한 프로세스를 조절한다.
- [129] GTPase cycle은 Guanine nucleotide exchange factors(GEF)의 작용으로 GTP가 결합된 활성화 상태에서 effector 단백질과 결합을 하게 되며, GTPase-activating protein(GAP)과 작용하여 GDP가 결합된 불활성화 상태가 된다.
- [130] KRAS GTP/GDP 결합부위외에도 GTP/GDP 결합에 관련된 단백질 구조 변환에 관련된 switch I/II가 보고되어 GTPase cycle을 저해할 수 있음이 증명되었다.
- [131] KRAS의 암과의 관련성이 보고되어 왔고, KRAS 활성을 저해하기 위한 다양한 시도가 있었지만 직접적인 drug 타겟으로 가능성은 낮게 보였다. 하지만 Sotorasib, Adagrasib이 비소세포폐암에서 승인되면서 약물 개발 가능성이 확인되었다.
- [132] 본 개시 내용의 화합물은 KRAS를 저해하는 화합물로서 KRAS 코돈 12, 13, 61 중 어느 하나의 돌연변이, 예컨대 KRAS G12D, KRAS G12V, KRAS G12C, KRAS G13D 및 KRAS Q61H 돌연변이 중 적어도 하나 이상을, 하지만 이에 한정되지는 않는 신규한 KRAS 저해제 화합물에 관한 것이다.
- [133]
- [134] **약학적 조성물**
- [135] 본 발명의 일 양상은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [136] 일 구현 예에서, 상기 조성물은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 치료적 유효량으로 포함할 수 있다.
- [137] 일 구현 예에서, 상기 조성물은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외에 다른 치료 약물을 더 포함할 수 있다.
- [138] 일 구현 예에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 더 포함할 수 있다.

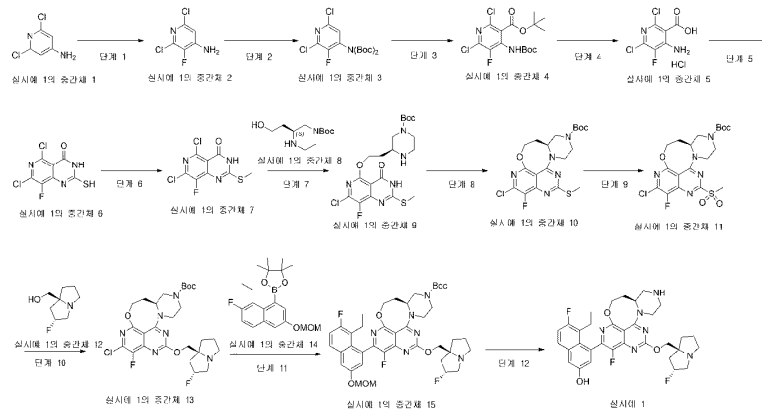
- [139] 일 구현 예에서, 상기 조성물은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 다른 치료 약물 중 어느 하나를 0.005% 내지 100%의 범위로 포함할 수 있고, 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제가 잔부 범위로 포함될 수 있다.
- [140] 일 구현 예에서, 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 암 치료를 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [141] 일 구현 예에서, 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이를 포함하는 약학적 조성물은 KRAS 단백질 저해 활성을 나타낼 수 있다.
- [142]
- [143] 투여 경로 및 투여 형태
- [144] 본 개시 내용의 화합물 및 약학적 조성물은 제약 분야에서 허용 가능한 임의의 적합한 투여 경로 및 투여 형태로 제공될 수 있다.
- [145]
- [146] 제조 방법
- [147] 본 개시내용의 화합물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 유기 합성 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 본 개시내용의 일부 화합물 및/또는 중간체는 상업적으로 입수가능하거나, 문헌에 공지되어 있거나, 통상의 기술자가 공지된 유기 합성기술 중 적절한 합성 방법을 선택하여 제조할 수 있다. 본 개시내용의 일부 화합물은 본 명세서에 기재된 반응식, 실시예 또는 중간체를 사용하여 합성될 수 있다. 통상의 기술자는 본 명세서에 기술된 합성 방법으로부터 반응 시간, 시약의 당량 수 및/또는 온도가 변형될 수 있고, 상이한 후처리 및/또는 정제 기술을 이용할 수 있음을 인식할 수 있다.
- [148] 합성된 화합물의 구조는 통상의 기술자에게 공지된 방법, 예를 들어 핵 자기 공명(NMR) 분광법 및/또는 질량 분광법에 의해 검증될 수 있다.
- [149]
- [150] 일반 정보
- [151] 별도의 언급이 없는 한 상업적 공급자로부터 얻은 시약 및 용매를 정제 또는 건조 없이 사용했다. ¹H NMR은 Bruker 400 MHz 및 500 MHz를 사용하여 기록되었고 TMS는 내부 표준으로 사용되었다. LCMS 분석은 SQD-2 질량 검출기(Single quadrupole)가 있는 Waters UPLC에서 수행되었으며, HPLC 분석은 Acquity UPLC H CLASS(WATERS)에서 수행되었다.
- [152]

- [153] 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 "약"의 의미를 포함하는 것으로 간주한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약"은 소정의 값 또는 범위의 5% 이내, 바람직하게는 1% 내지 2% 이내를 의미한다.
- [154] 본 명세서에서 용어 "내지"를 이용하여 표시된 수치 범위는 용어 "내지" 전과 후에 기재되는 수치를 각각 하한 및 상한으로서 포함하는 범위를 포함한다.
- [155] 본 명세서의 본문 내에서 인용된 모든 참조, 간행물, 발행된 특허 및 특허 출원 은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 여기에 포함된다.
- [156]
- [157] 이하, 본 발명을 하기 합성 반응식, 실시예 또는 시험예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들은 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로도 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[158]

실시예 1의 합성 반응식

[160]



- [161] 실시예 1: 5-에틸-6-플루오로-4-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올의 제조

[162] 단계 1) 실시예 1의 중간체 2: 2,6-디클로로-3-플루오로피리딘-4-아민의 제조

- [163] 용매 MeOH 및 물 혼합물(1:1, 500 mL, 20 vol) 중 2,6-디클로로피리딘-4-아민(실시예 1의 중간체 1(25.0 g, 154 mmol)의 교반 용액에 셀렉트플루오로(60.1 g, 169 mmol)를 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 45°C로 가열하고 16시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻고, 잔류물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 분리된 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카 겔(100-200 메시) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르(pet 에테르) 중 2% 에틸 아세테이트로 용출하여 2,6-디클로로-3-플루오로피리딘-4-아민(실시예 1의 중간체 2)(20.0 g, 72% 수율)

을 백색 고체로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.52(brs, 2H), 6.62(d, $J = 5.2$ Hz, 1H). MS(LCMS): 180.96 m/z [M+H].

[164] 단계 2) 실시예 1의 중간체 3: 터트-부틸(터트-부톡시카르보닐)(2,6-디클로로-3-플루오로피리딘-4-일)카르바메이트의 제조

[165] THF(10 mL, 10 vol) 중 2,6-디클로로-3-플루오로피리딘-4-아민(실시예 1의 중간체 2)(1.00 g, 2.63 mmol)의 교반 용액에 DMAP(0.06 g, 0.26 mmol) 및 Boc 무수물(1.10 mL, 5.26 mmol)을 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 60°C로 가열하여 6시간 동안 유지시켰다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 물(50 mL)로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출하고, 분리된 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메쉬) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르 중 1% 에틸 아세테이트로 용출하여 터트-부틸(터트-부톡시카르보닐)(2,6-디클로로-3-플루오로피리딘-4-일)카르바메이트(실시예 1의 중간체 3)(0.50 g, 50% 수율)을 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47(s, 18H), 7.15(d, $J = 4.40$ Hz, 1H).

[166] 단계 3) 실시예 1의 중간체 4: 터트-부틸 4-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-2,6-디클로로-5-플루오로니코티네이트의 제조

[167] THF(280 mL, 10 vol) 중 터트-부틸(터트-부톡시카르보닐)(2,6-디클로로-3-플루오로피리딘-4-일)카르바메이트(실시예 1의 중간체 3)(28.0 g, 73.7 mmol)의 교반 용액에 LDA(THF 중 1M)(147 mL, 147 mmol)를 -78°C에서 첨가하고 30분 동안 교반하고, 이어서 Boc 무수물(14.4 g, 66.3 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메쉬) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르 중의 5% 에틸 아세테이트로 용출하여 터트-부틸 4-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-2,6-디클로로-5-플루오로니코티네이트(실시예 1의 중간체 4)(26.0 g, 92% 수율)를 회백색 고체로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.50(s, 9H), 1.62(s, 9H), 7.21(brs, 1H). MS(LC-MS): 381.17 m/z [M+H].

[168] 단계 4) 실시예 1의 중간체 5: 4-아미노-2,6-디클로로-5-플루오로니코틴산의 제조

[169] 1,4-디옥산(130 mL, 5 vol) 중 터트-부틸 4-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-2,6-디클로로-5-플루오로니코티네이트(실시예 1의 중간체 4)(26.0 g, 68.4 mmol)의 교반 용액에 0°C에서 진한 HCl(130 mL, 5 vol)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온까지 가온하고 16시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축한 후, DCM으로 세척하고 여과하여 조 화합물 4-아미노-2,6-디클로로-5-플루오로니코틴산(실시예 1의 중간체 5)(18.0 g, 조

화합물)을 백색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.71(brs, 2H), 7.31(brs, 1H). MS(LC-MS): 224.82 m/z [M+H].

[170] 단계 5) 실시예 1의 중간체 6: 5,7-디클로로-8-플루오로-2-메르캅토피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온의 제조

[171] SOCl_2 (540 mL, 30 vol) 중 4-아미노-2,6-디클로로-5-플루오로니코틴산(실시예 1의 중간체 5)(18.0 g, 80.3 mmol)의 용액 50°C로 가열하고 8시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻고, 잔류물을 아세톤(20 mL)에 용해시키고, 여기에 NH_4SCN (20 mL 아세톤 중 1.0 g)을 실온에서 적가하고 1시간 동안 교반했다. 완료 후, 반응 혼합물을 물로 희석하고, 여과하고, 물로 세척하고 고진공 하에 건조하여 조 화합물 5,7-디클로로-8-플루오로-2-머캅토피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온(실시예 1의 중간체 6)(10.0 g, 49% 수율)을 회백색 고체로 얻었다. 상기 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 13.31(brs, 1H), 12.91(s, 1H). MS(LC-MS): 265.94 m/z [M+H].

[172] 단계 6) 실시예 1의 중간체 7: 5,7-디클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온의 제조

[173] MeOH(1500 mL, 150 vol) 중 5,7-디클로로-8-플루오로-2-머캅토피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온(실시예 1의 중간체 6)(10.0 g, 37.7 mmol)의 교반 용액에 0.1M NaOH(1500 mL, 150 vol) 및 MeI(2.50 mL, 41.5 mmol)를 실온에서 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물(500 mL)로 희석하고 진한 HCl로 약 pH 6 까지 산성화시켜 고체를 얻었고, 고체를 여과하고 물로 세척한 후 고진공 하에서 건조하여 조 화합물 5,7-디클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온(실시예 1의 중간체 7)(8.0 g, 조 화합물)을 연갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.60(s, 3H), 13.33(s, 1H). MS(LC-MS): 279.95 m/z [M+H].

[174] 단계 7) 실시예 1의 중간체 9: 터트-부틸(S)-3-(2-((7-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트의 제조

[175] THF(80 mL, 10 vol) 중 5,7-디클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온(실시예 1의 중간체 7)(8.00 g, 28.7 mmol)의 교반 용액에 NaH(4.90 g, 129 mmol)를 0 °C에서 첨가하고 30분 동안 교반한 후, 터트-부틸(S)-3-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-카르복실레이트(7.90 g, 34.4 mmol)를 실온에서 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 차가운 얼음 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출하고, 분리된 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4

4로 건조하고, 여과하고 감압 하에서 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카 겔(100-200 메시) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 DCM 중 5% 메탄올로 용출하여 터트-부틸(S)-3-(2-((7-클로로-8-플루오로-2-2-(7-클로로-8-플루오로-2)-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 9)(6.0 g, 44% 수율)을 갈색 고체로 얻었다. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.42(s, 9H), 2.06(brs, 2H), 2.42(s, 3H), 3.04(d, *J* = 10.1Hz, 3H), 3.46(brs, 2H), 4.02(brs, 2H), 4.27(brs, 1H), 4.52(d, *J* = 8.8, 1H), 9.45(brs, 1H). MS(LC-MS): 474.37 *m/z* [M+H].

[176] 단계 8) 실시예 1의 중간체 10: 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

[177] DCM(60 mL, 10 vol) 중 터트-부틸(S)-3-(2-((7-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 9)(6.00 g, 12.7 mmol)의 교반 용액에 DIPEA(32.9 mL, 190 mmol)를 0°C에서 첨가하고 10분 동안 교반한 후, BOP-Cl(11.6 g, 45.6 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 5시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 물로 희석하고 DCM으로 추출하고, 분리된 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 감압 하에 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 분취용 HPLC(pre-HPLC)로 정제하여 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 10)(0.80 g, 14% 수율)를 갈색 고체로 얻었다. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.42(s, 9H), 1.97-2.10(m, 2H), 2.54(s, 3H), 3.07-3.22(m, 2H), 3.55(d, *J* = 5.60 Hz, 1H), 3.78(d, *J* = 12.8Hz, 1H), 3.86-3.91(m, 1H), 3.97(d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.22(t, *J* = 10.8Hz, 1H), 4.46(dd, *J* = 12.8, 4.8 Hz, 1H), 4.66-4.76(m, 1H). MS(LC-MS): 456.37 *m/z* [M+H].

[178] 단계 9) 실시예 1의 중간체 11: 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(메틸술포닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

[179] 용매 ACN과 물(2:1, 48 mL)의 혼합물 중 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 10)(0.40 g, 0.88 mmol)의 교반 용액에 0°C에서 옥손(0.65 g, 1.05 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 20분 동안 실온에서 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 조 화합물 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(메틸술포닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-

옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 11)(0.34g, 조 화합물)를 회백색 고체로 얻었다. MS(LCMS): 488.32 m/z [M+H].

- [180] 단계 10) 실시예 1의 중간체 13: 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조
- [181] THF(2.0 mL, 10 vol) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(0.01 g, 0.62 mmol)의 교반 용액에 NaH(0.031 g, 0.82 mmol)을 0°C에서 첨가하고 30분 동안 교반한 후, 이어서 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(메틸술폰닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 11)(0.20 g, 0.41 mmol)를 0°C에서 첨가했다. 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 4시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하고 감압 하에 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메시) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 DCM 중 2% 메탄올로 용출하여 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 13)(0.02 g, 9% 수율)을 회백색 고체로 얻었다. MS(LC-MS): 567.44 m/z [M+H].
- [182] 단계 11) 실시예 1의 중간체 15: 터트-부틸(S)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조
- [183] 용매 1,4-디옥산과 물(2.0 mL, 10 vol)의 혼합물 중 터트-부틸(S)-2-클로로-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 13)(0.20 g, 0.35 mmol) 및 2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(실시예 1의 중간체 14)(0.19 g, 0.53 mmol)의 교반 용액에 실온에서 Cs_2CO_3 (0.34 g, 1.06 mmol)를 첨가하고 N_2 기체 하에서 10분 동안 탈기시켰다. 여기에 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{DCM}$ (0.028 g, 0.03 mmol)을 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 80°C로 가열하고 16시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건

조시키고, 여과하고 감압 하에 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 분취용 HPLC로 정제하여 터트-부틸 (S)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 15)(0.04 g, 15% 수율)를 연황색 고체로 얻었다. MS(LC-MS): 765.71 m/z [M+H].

[184] 단계 12) 실시예 1: 5-에틸-6-플루오로-4-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올의 제조

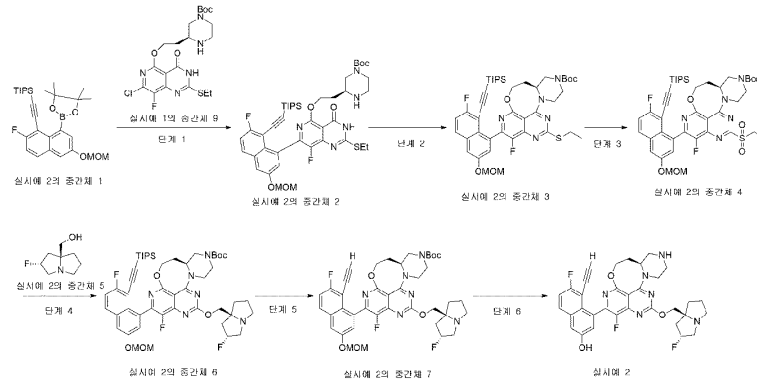
[185] DCM(1.2 mL, 30 vol) 중 터트-부틸 (S)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 15)(0.04 g, 0.05 mmol)의 교반 용액에 1,4-디옥산(0.80 mL) 중 4M HCl을 0°C에서 첨가하고 반응 혼합물을 실온까지 가온하고 4시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 분취용 HPLC로 정제하여 5-에틸-6-플루오로-4-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올(실시예 1)(0.006 g, 19% 수율)을 회백색 고체로 얻었다.

[186] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.76(t, J = 7.2 Hz, 2H), 0.85(t, J = 7.2 Hz, 1H), 1.75-1.79(m, 2H), 1.79-1.81(m, 2H), 1.99(brs, 2H), 2.05(brs, 1H), 2.12-2.28(m, 2H), 2.61(d, J = 12.8 Hz, 1H), 2.82-2.86(m, 2H), 2.93(brs, 1H), 3.02(s, 1H), 3.09(d, J = 4.12 Hz, 4H), 3.74-3.86(m, 1H), 3.98(d, J = 10.26 Hz, 1H), 4.02-4.20(m, 2H), 4.43-4.48(m, 1H), 5.03(t, J = 12.8 Hz, 1H), 5.21 & 5.35(brs, 1H), 6.91 & 7.11(d, J = 2.50 Hz, 1H), 7.28-7.30 (m, 1H), 7.31(d, J = 8.06 Hz, 1H), 7.74(dd, J = 8.88, 5.88 Hz, 1H), 9.92(brs, 1H). NH 및 -OH 양성자는 ^1H -NMR에서 보이지 않았다. MS(LC-MS): 621.40 m/z [M+H].

[187]

[188] 실시예 2의 합성 반응식

[189]



[190] 실시예 2: 5-에티닐-6-플루오로-4-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올의 제조

[191] 단계 1) 실시예 2의 중간체 2: tert-부틸 (S)-3-(2-((2-(에틸티오)-8-플루오로-7-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트의 제조

[192] 용매 1,4-디옥산 및 물(4:1, 2.5 mL)의 혼합물 중 tert-부틸(S)-3-(2-((7-클로로-2-(에틸티오)-8-플루오로-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 9)(0.10 g, 0.20 mmol) 및 ((2-플루오로-6-(메톡시메톡시)-8-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)나프탈렌-1-일)에티닐)트리소프로필실란(실시예 2의 중간체 1)(0.13 g, 0.25 mmol)의 교반 용액에 K_3PO_4 (0.13 g, 0.62 mmol)를 실온에서 첨가하고 N_2 기체 하에서 10 분 동안 탈기시켰다. 여기에 루포스(Ruphos)-Pd-G₃(0.02 g, 0.02 mmol)을 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 90°C로 가열하고 3시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트(2회)로 추출하고, 합한 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 하에 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메시) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 DCM 중 5% 메탄올로 용출하여 tert-부틸 (S)-3-(2-((2-(에틸티오)-8-플루오로-7-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 2)(0.35 g, 전체 4개 배치(4x100 mg) 수율, 조 화합물)를 연황색 고체로 얻었다. MS(LC-MS): 838.54 m/z [M+H].

[193] 단계 2) 실시예 2의 중간체 3: tert-부틸 (S)-12-(에틸티오)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-5,6,

6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

- [194] DCM(3.0 mL, 20 vol) 중 터트-부틸 (S)-3-(2-((2-(에틸티오)-8-플루오로-7-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 2)(0.15 g, 0.28 mmol)의 교반 용액에 BOP-Cl(0.254 g, 1.00 mmol) 및 DIPEA(0.70 mL, 4.04 mmol)(3.0 mL, 20 vol)를 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 50°C로 가열하고 5시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메쉬) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 DCM 중 5% MeOH로 용출하여 터트-부틸 (S)-12-(에틸티오)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 3)(0.13 g, 전체 2 배치 수율, 57% 수율)를 갈색 고체로 얻었다. MS(LCMS): 820.49 m/z [M+H].
- [195] 단계 3) 실시예 2의 중간체 4: 터트-부틸 (S)-12-(에틸술포닐)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조
- [196] 용매 ACN 및 물(2:1, 15.6 mL)의 혼합물 중 터트-부틸 (S)-12-(에틸티오)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 3)(0.13 g, 0.16 mmol)의 교반 용액에 옥손(0.24 g, 0.79 mmol)을 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 2시간 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물(10 mL) 및 에틸 아세테이트(2 x 20 mL)로 희석하고, 합한 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 감압 하에서 농축하여 조 화합물 터트-부틸 (S)-12-(에틸술포닐)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 4)(0.135 g, 조 화합물)을 담황색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. MS(LC-MS): 852.61 m/z [M+H].
- [197] 단계 4) 실시예 2의 중간체 6: 터트-부틸(S)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트리이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

- [198] THF(2.0 mL, 15 vol) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(실시예 2의 중간체 5)(0.031 g, 0.20 mmol)의 교반 용액에 NaO^tBu(0.025 g, 0.26 mmol)를 0°C에서 첨가하고 10분간 교반한 후 이어서 터트-부틸(S)-12-(에틸술폰닐)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트라이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 4)(0.135 g, 0.16 mmol)를 0°C에서 첨가했다. 반응 혼합물을 0°C에서 20분 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻고, 잔류물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트(2회)로 추출하고, 합한 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 증발시켰다. 감압 하에 조 화합물 터트-부틸(S)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트라이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 6)(0.135 g, 조 화합물)를 담황색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. MS(LC-MS): 917.64 *m/z* [M+H].
- [199] 단계 5) 실시예 2의 중간체 7: 터트-부틸(S)-2-(8-에티닐-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조
- [200] THF(3.4 mL, 25 vol) 중 터트-부틸(S)-1-플루오로-2-(7-플루오로-3-(메톡시메톡시)-8-((트라이소프로필실릴)에티닐)나프탈렌-1-일)-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 6)(0.135 g, 0.15 mmol)의 교반 용액에 TBAF(2.0 mL, 15 vol)를 0°C에서 첨가하고, 반응 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 NaHCO₃ 수용액(5 mL)으로 켄칭하고 에틸 아세테이트(2회)로 추출하고, 합한 유기층을 염수 용액으로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 감압하에 증발시켜 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 분취용 HPLC로 정제하여 터트-부틸(S)-2-(8-에티닐-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(실시예 2의 중간체 7)(0.03 g, 26% 수율)를 회백색 고체로 얻었다. MS(LC-MS): 761.55 *m/z* [M+H].

[207] 실시예 3: 4-((14aS)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-10-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민의 제조

- [208] 단계 1) 실시예 3의 중간체 2: 3-브로모-2,5-디플루오로아닐린의 제조
- [209] 용매 EtOH와 H₂O의 혼합물 중 1-브로모-2,5-디플루오로-3-니트로벤젠(실시예 3의 중간체 1)(10.0 g, 42.0 mmol)의 교반 용액(4:1, 250 mL)에 실온에서 Fe(7.03 g, 126 mmol) 및 NH₄Cl(13.5 g, 252 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 80°C로 가열하고 6시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완결된 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(100 mL)를 세척 용매로 사용하여 셀라이트 패드를 통해 여과하여 여액을 얻은 후, 여액을 물(50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메시) 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르 중 10% 에틸 아세테이트로 용출하여 3-브로모-2,5-디플루오로아닐린(실시예 3의 중간체 2)(10.0 g, 조 화합물)을 담황색의 점성 액체로 얻었다. ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 3.93(brs, 2H), 6.40-6.45(m, 1H), 6.59-6.64(m, 1H). MS(LC-MS): 208.02 *m/z* [M+H].
- [210] 단계 2) 실시예 3의 중간체 3: (Z)-N-(3-브로모-2,5-디플루오로페닐)-2-(하이드록시이미노)아세트아미드의 제조
- [211] H₂O (100 mL, 20 vol) 중 3-브로모-2,5-디플루오로아닐린(실시예 3의 중간체 2)(5.00 g, 24.1 mmol)의 교반 용액에 EtOH(14.0 mL) 중 NH₂OH.HCl(5.02 g 72.5 mmol), Na₂SO₄(27.4 g, 217 mmol) 및 1,2,2-트리클로로에탄-1,1-디올(5.99 g, 36.2 mmol)을 첨가하고 0°C에서 진한 HCl(3.5 mL)을 첨가하고 반응 혼합물을 60°C로 가열하고 16시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 실온으로 냉각하여 고체가 형성되었고, 고체를 물(50 mL)을 세척 용매로 사용하여 여과하고 고진공 하에서 건조하여 조 화합물(Z)-N-(3-브로모-2,5-디플루오로페닐)-2-(하이드록시이미노)아세트아미드(실시예 3의 중간체 3)(10.0 g, 전체 2 배치(2 x 5 g) 수율, 조 화합물)를 갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. ¹H NMR(401MHz, DMSO-d₆) δ 7.50-7.54(m, 1H), 7.78(s, 1H), 7.82-7.87(m, 1H), 10.11(s, 1H), 12.45(s, 1H). MS(LC-MS): 279.02 *m/z* [M+H].
- [212] 단계 3) 실시예 3의 중간체 4: 6-브로모-4,7-디플루오로인돌린-2,3-디온의 제조
- [213] H₂SO₄(50 mL, 10 vol)에 (Z)-N-(3-브로모-2,5-디플루오로페닐)-2-(하이드록시이미노)아세트아미드(실시예 3의 중간체 3)(5.00 g, 17.9 mmol)을 60°C에서 첨가하고, 반응 혼합물을 90°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 얼음처럼 차가운 물(50 mL)로 희석하여 고체를 얻었고, 고체를 여과하고 진공 하에서 건조하여 조 화합물 6-브로모-4,7-디플루오로인돌린-2,3-디온(실시예 3의 중간체 4)(4.0 g, 조 화합물)를 갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. MS(LC-MS): 259.88 *m/z* [MH].
- [214] 단계 4) 실시예 3의 중간체 5: 2-아미노-4-브로모-3,6-디플루오로벤조산의 제조

- [215] 2M NaOH 용액(84 mL, 11 vol) 중 6-브로모-4,7-디플루오로인돌린-2,3-디온(실시에 3의 중간체 4)(4.00 g, 15.3 mmol)의 교반 용액에 0°C에서 30% H₂O₂(9.53mL)에 첨가하고 반응 혼합물을 실온까지 가온하고 16시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 0°C에서 진한 HCl로 약 pH 3까지 산성화하여 고체를 얻었고, 고체를 여과하고 고진공 하에서 건조하여 조 화합물 2-아미노-4-브로모-3,6-디플루오로벤조산(실시에 3의 중간체 5)(4.0 g, 전체 2 배치(2 x 4 g) 수율, 조 화합물)을 갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.72(dd, *J* = 10.76, 5.25 Hz, 1H), 6.77-7.00(m, 2H), 13.42(brs, 1H). MS(LCMS): 252.06 *m/z* [M+H].
- [216] 단계 5) 실시에 3의 중간체 6: 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조산의 제조
- [217] DMF(40 mL, 13 vol) 중 2-아미노-4-브로모-3,6-디플루오로벤조산(실시에 3의 중간체 5)(3.00 g, 11.9 mmol)의 교반 용액에 NCS(2.48 g, 14.3 mmol)를 실온에서 첨가하고 반응 혼합물을 90°C로 가열하고 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물(100 mL)로 희석하여 고체를 얻었고, 고체를 여과하고 고진공 하에서 건조하여 조 화합물 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조산(실시에 3의 중간체 6)(3.0 g, 조 화합물)을 갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. MS(LCMS): 286.09 *m/z* [M+H].
- [218] 단계 6) 실시에 3의 중간체 7: 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤즈아미드의 제조
- [219] DMF(15 mL, 10 vol) 중 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조산(실시에 3의 중간체 6)(1.50 g, 5.26 mmol)의 교반 용액에 NH₄Cl(0.56 g, 10.5 mmol), HATU(2.20 g, 5.79 mmol) 및 DIPEA(2.03 g, 15.8 mmol)를 0°C에서 첨가하고, 반응 혼합물을 방치하였다. 실온으로 가온하고 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석하여 고체를 얻었고, 고체를 여과하고 고진공 하에서 건조하여 조 화합물 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤즈아미드(실시에 3의 중간체 7)(0.80 g, 조 화합물)를 갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. MS(LCMS): 285.08 *m/z* [M+H].
- [220] 단계 7) 실시에 3의 중간체 8: 7-브로모-2,6-디클로로-5,8-디플루오로퀴나줄린-4(3H)-온의 제조
- [221] 1,4-디옥산(8.0 mL, 10 vol) 중 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤즈아미드(실시에 3의 중간체 7)(0.80 g, 2.82 mmol)의 교반 용액에 티오포스젠(0.96 g, 8.45 mmol)을 0°C에서 첨가하고 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 105°C로 가열하고 2시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하

였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었고, 잔류물을 석유 에테르 중 20% 에틸 아세테이트로 세척하여 고체를 얻었고, 고체를 여과하고 고진공 하에서 건조하여 조 화합물 7-브로모-2,6-디클로로-5,8-디플루오로퀴나졸린-4(3H)-온(실시예 3의 중간체 8)(0.70 g, 조 화합물)을 담황색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. MS(LC-MS): 329.02 m/z [M+H].

[222] 단계 8) 실시예 3의 중간체 9: 3차-부틸(S)-3-(2-((7-브로모-2,6-디클로로-8-플루오로-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트의 제조

[223] THF(10 mL, 14 vol) 중 터트-부틸(S)-3-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-카르복실레이트(1.19 g, 3.65 mmol)의 교반 용액에 NaH(0.58 g, 24.3 mmol)를 0°C에서 첨가하고 0°C에서 30분 동안 교반했다. 여기에 THF(7.0 mL, 10 vol) 중 7-브로모-2,6-디클로로-5,8-디플루오로퀴나졸린-4(3H)-온(실시예 3의 중간체 8)(0.70 g, 3.04 mmol)의 용액을 0°C에서 첨가하고, 반응 혼합물을 실온까지 가온하고 3시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 포화 NH₄Cl 용액(20 mL)으로 희석하고 에틸 아세테이트(2 x 20 mL)로 추출하고, 합한 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 하에서 농축하여 조 화합물 터트-부틸(S)-3-(2-((7-브로모-2,6-디클로로-8-플루오로-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 9)(0.45 g, 조 화합물)를 갈색 고체로 얻었다. 조 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 그대로 사용하였다. ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.16-1.23(m, 2H), 1.37-1.43(m, 9H), 1.99-2.10(m, 2H), 2.81-3.13(m, 3H), 3.96-4.13 (m, 4H), 교환 가능한 양성자는 ¹H NMR에서 관찰되지 않았다. MS(LC-MS): 539.16 m/z [M+H].

[224] 단계 9) 실시예 3의 중간체 10: 터트-부틸(S)-10-브로모-7,11-디클로로-9-플루오로-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트의 제조

[225] DCM(5 mL, 11 vol) 중 터트-부틸(S)-3-(2-((7-브로모-2,6-디클로로-8-플루오로-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 9)(0.45 g, 0.77 mmol)의 교반 용액에 BOP-Cl(0.68 g, 2.69 mmol) 및 DIPEA(1.48 g, 11.5 mmol)를 0°C에서 첨가하고 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 16시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 DCM(15 mL)으로 희석하고 물(10 mL)로 세척하고, 분리된 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 감압 하에서 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메쉬)로 정제하고 석유 에테르 중 40% 에틸 아세테이트로 용출하여 터트-부틸(S)-10-브로모-7,11-디클로로-9-플루오로-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]

퀴나졸린-2-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 10)(0.15 g, 조 화합물)을 갈색 고체로 얻었다. MS(LC-MS): 521.23 m/z [M+H].

- [226] 단계 10) 실시예 3의 중간체 11: 터트-부틸 (14aS)-10-(2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-7-플루오로벤조[d]티아졸-4-일)-7,11-디클로로-9-플루오로-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트의 제조
- [227] 용매 1,4-디옥산과 물(2:1, 3.0 mL)의 혼합물 중 터트-부틸(S)-10-브로모-7,11-디클로로-9-플루오로-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 10)(0.15 g, 0.28 mmol) 및 터트-부틸(7-플루오로-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(0.095 g, 0.31 mmol)의 교반 용액에 Cs₂CO₃(0.27 g, 0.84 mmol)를 실온에서 첨가하고 5분 동안 탈기시켰다. 여기에 디클로로[비스(디페닐포스포노페닐)에테르]팔라듐(II)(0.02 g, 0.03 mmol)을 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 80°C로 가열하고 4시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 얼음처럼 차가운 물(10 mL)로 희석하고 에틸 아세테이트(2 x 15 mL)로 추출하고, 합한 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 하에서 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메쉬)로 정제하고 석유 에테르 중 40% 에틸 아세테이트로 용출하여 터트-부틸(14aS)-10-(2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-7-플루오로벤조[d]티아졸-4-일)-7,11-디클로로-9-플루오로-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 11)(0.07 g, 35% 수율)을 담황색 점성 고체로 얻었다. MS(LCMS): 709.35 m/z [M+H].
- [228] 단계 11) 실시예 3의 중간체 12: 터트-부틸(14aS)-10-(2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-7-플루오로벤조[d]티아졸-4-일)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트의 제조
- [229] DMF(1.0 mL, 6 vol) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(0.04 g, 0.25 mmol)의 교반 용액에 NaH(0.008 g, 0.32 mmol)를 0°C에서 첨가하고 1시간 동안 교반하였다. 여기에 터트-부틸 (14aS)-10-(2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-7-플루오로벤조[d]티아졸-4-일)-7,11-디클로로-9-플루오로-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 11)(0.15 g, 0.21 mmol)을 0°C에서 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 3시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 포화 NH₄Cl 용액(10 mL)으로 희석하고 에틸 아세테이트(2 x 15 mL)로 추출하고, 합한 유기층을 무수 Na₂

SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 하에서 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 실리카겔(100-200 메시)로 정제하고 DCM 중 5% 메탄올을 용출하여 터트-부틸(14aS)-10-(2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-7-플루오로벤조[d]티아졸-4-일)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 12)(0.05 g, 28% 수율)를 갈색 고체로 얻었다. MS(LCMS): 832.41 *m/z* [M+H].

[230] 단계 12) 실시예 3: 4-((14aS)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-10-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민의 제조

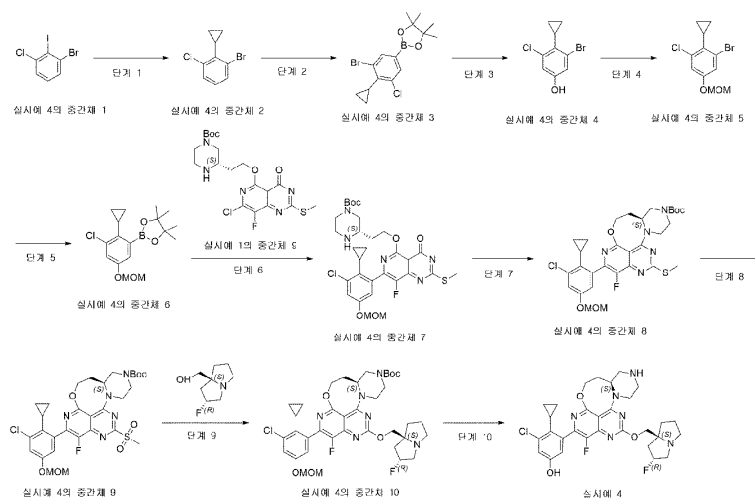
[231] 디옥산(1.0 mL, 20 vol) 중 4M HCl 중 터트-부틸(14aS)-10-(2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)-7-플루오로벤조[d]티아졸-4-일)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-2-카르복실레이트(실시예 3의 중간체 12)(0.05 g, 0.06 mmol)의 용액을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 TLC로 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 조 화합물을 얻었다. 조 화합물을 분취용 HPLC로 정제하여 4-((14aS)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나졸린-10-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민(실시예 3)(0.0075 g, 20% 수율)을 회백색 고체로 얻었다.

[232] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.70-1.91(m, 4H), 1.93-2.16(m, 3H), 2.54-2.56(m, 1H), 2.64-2.70(m, 1H), 2.77-2.82 (m, 3H), 3.00-3.10(m, 4H), 3.19-3.24(m, 1H), 3.64-3.74(m, 1H), 3.94(dd, *J* = 10.51, 2.25Hz, 1H), 4.06(dd, *J* = 10.51, 2.75 Hz, 1H), 4.24(q, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.43(brs, 1H), 4.55-4.93(m, 1H), 5.20-5.34(m, 1H), 7.01-7.06(m, 1H), 7.14-7.23(m, 1H), 7.89(d, *J* = 16.76 Hz, 2H), -NH 양성자는 ¹H NMR에서 관찰되지 않았다. MS(LCMS): 632.20 *m/z* [M+H].

[233]

[234] 실시예 4의 합성 반응식

[235]



[236] 실시예 4: 3-클로로-4-사이클로프로필-5-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)페놀의 제조

[237] 단계 1) 실시예 4의 중간체 2: 1-브로모-3-클로로-2-사이클로프로필벤젠의 제조

[238] 디옥산:물(100 mL:30 mL) 중 1-브로모-3-클로로-2-요오도벤젠(22 g, 69.65 mmol), 사이클로프로필보론산(15.21 g, 90.54 mmol), Pd(dppf)Cl₂(2.3 g, 3.16 mmol) 및 K₃PO₄(24.2 g, 113.96 mmol)의 혼합물을 N₂ 기체 하에서 100°C에서 7시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 1/0)에서는 SM1(R_f = 0.6)이 소모되고 새로운 지점(R_f = 0.7)이 형성되는 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트(200 mL × 2)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수 70 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 1/0)로 정제하여 1-브로모-3-클로로-2-사이클로프로필-벤젠(13 g, 81.25% 수율)을 무색 액체로 얻었다.

[239] ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.46(dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 1H), 7.30(dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 1H), 6.99(t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 1.81 - 1.71(m, 1H), 1.22 - 1.14(m, 2H), 0.81 - 0.73(m, 2H).

[240] 단계 2) 실시예 4의 중간체 3: 2-(3-브로모-5-클로로-4-사이클로프로필페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란의 제조

[241] 헥산(130 mL) 중 1-브로모-3-클로로-2-사이클로프로필벤젠(13 g, 56.52 mmol), [Ir(OMe)(COD)]₂(3.74 g, 5.65 mmol), 4,4'-디-tert-부틸-2,2'-비피리딘(1.82 g, 6.78 mmol) 및 4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(21.70 g, 169.56 mmol)의 혼합물을 60°C에서 3시간 동안 N₂ 기체 하에서 교반했다. TLC(PE/EA = 50/1)에서는 SM1(R_f = 0.3)이 소모되고 새로운 지점(R_f = 0.5)이 형성되는 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 용매를 제거하였다. 잔류물을 컬럼 크로마

토그래피(PE:EA = 50:1)로 정제하여 2-(3-브로모-5-클로로-4-사이클로프로필-페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(10.7 g, 53.18% 수율)을 무색 오일로 얻었다.

- [242] ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.87(s, 1H), 7.70(s, 1H), 1.78(tt, $J = 8.5, 5.8$ Hz, 1H), 1.33(s, 12H), 1.22 - 1.14(m, 2H), 0.77(q, $J = 5.8$ Hz, 2H).
- [243] 단계 3) 실시예 4의 중간체 4: 2-(3-브로모-5-클로로-4-사이클로프로필-페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란의 제조
- [244] THF/ H_2O (100/50 mL) 중 2-(3-브로모-5-클로로-4-사이클로프로필-페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(10.5 g, 29.49 mmol)의 용액에 AcOH(113.4 g, 1888.42 mmol, 107.5 mL) 및 H_2O_2 (2.05 g, 4.79 mmol, 15.96 mL, 30% 순도)를 0°C 에서 첨가하고 혼합물을 0°C 에서 1시간 동안 교반하였다. TLC(PE/EA = 15/1)에서는 SM1($R_f = 0.7$)이 소모되고 새로운 지점($R_f = 0.4$)이 형성되는 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 0°C 에서 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10% aq, 80 mL)로 킨칭하였다. 혼합물을 EA(100 mL $\times$ 2)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수 100 mL로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 혼합물을 여과하고 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE:EA=10:1)로 정제하여 3-브로모-5-클로로-4-사이클로프로필-페놀을 무색 오일(5.7 g, 78.62% 수율)로 얻었다.
- [245] ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.00(d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.83(d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 3.73(d, $J = 47.7$ Hz, 1H), 1.66(ddd, $J = 14.0, 7.0, 4.2$ Hz, 1H), 1.15 - 1.08(m, 2H), 0.71(q, $J = 5.7$ Hz, 2H).
- [246] 단계 4) 실시예 4의 중간체 5: 1-브로모-3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)벤젠의 제조
- [247] DCM(57 mL) 중 3-브로모-5-클로로-4-사이클로프로필페놀(5.7 g, 23.17 mmol)의 용액에 DIEA(4.49 g, 34.76 mmol) 및 메톡시메틸 하이포아브롬산염(3.19 g, 25.49 mmol)을 0°C 에서 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 25°C 에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 DCM(50 mL $\times$ 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 70 mL로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 20/1)로 정제하여 1-브로모-3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)벤젠(4 g, 59.52% 수율)을 무색 오일로 얻었다.
- [248] ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.12(d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.96(d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 5.04(s, 2H), 3.38(s, 3H), 1.61(s, 1H), 1.08 - 1.02(m, 2H), 0.65(dd, $J = 5.6, 1.1$ Hz, 2H).
- [249] 단계 5) 실시예 4의 중간체 6: 2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란의 제조
- [250] 디옥산(80 mL) 중 1-브로모-3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)벤젠(4 g, 13.79 mmol), KOAc(4.06 g, 41.38 mmol) 및 4,4,5,5-테트라메틸-2-(4,5,5-트리메틸-4-메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1,3,2-디옥사보롤란(7.0 g, 27.59 mmol)의 용

액에 Pd(dppf)Cl₂(1.0 g, 1.38 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 100°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트(50 mL × 3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수 70 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 10/1)로 정제하여 2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(1.4 g, 30.04% 수율)은 무색 오일로 얻었다. MS: m/z = 339.1(M+H⁺, ESI+)

[251] 단계 6) 실시예 4의 중간체 7: 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-4,4a-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트의 제조

[252] 디옥산/H₂O(16 mL/4 mL) 중 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(3-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-4,4a-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(실시예 1의 중간체 9, 1.4 g, 2.96 mmol), 2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(2.0 g, 5.92 mmol), 루포스(Ruphos)-Pd-G₃(742 mg, 0.89 mmol) 및 K₃PO₄(1.88 g, 8.88 mmol)의 용액을 N₂ 기체 하에서 90°C에서 3시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 원하는 질량이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(60 mL)로 켄칭하고 에틸 아세테이트(60 mL × 3)로 추출했다. 합한 유기층을 염수 60 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 0/1)로 정제하여 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메틸)페닐)-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-4,4a-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(700 mg, 36.46% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 650.3(M+H⁺, ESI+)

[253] 단계 7) 실시예 4의 중간체 8: 터트-부틸 (S)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

[254] DCM(47 mL) 중 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메틸)페닐)-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-4,4a-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(700 mg, 1.08 mmol)의 용액에 BoPCl(822 mg, 3.24 mmol) 및 DIEA(1.25 g, 9.71 mmol)를 첨가했다. 그 다음 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 원하는 질량이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고 DCM(40 mL × 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 60 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 1/1)로 정제하여 터트-부틸(S)-2-(3-클로로-2-사이클로

프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(140 mg, 68.06% 수율)를 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 632.4(M+H⁺, ESI+)

[255] 단계 8) 실시예 4의 중간체 9: tert-부틸 (6aS)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(메틸술피닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

[256] ACN/H₂O(10 mL/10 mL) 중 tert-부틸(S)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(110 mg, 0.17 mmol)의 용액에 옥산(536 mg, 0.87 mmol)을 첨가하고 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되었고 원하는 질량이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고 DCM(30 mL x 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 20 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하여 tert-부틸 (6aS)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(메틸술피닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(120 mg, 조 화합물)를 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 648.2(M+H⁺, ESI+)

[257] 단계 9) 실시예 4의 중간체 10: tert-부틸 (S)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

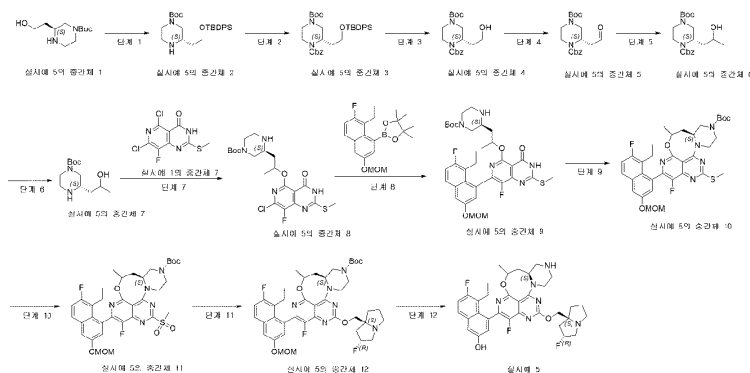
[258] THF(20 mL) 중 tert-부틸 (6aS)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(메틸술피닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(120 mg, 0.18 mmol) 및 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(44 mg, 0.28 mmol)의 용액에 t-BuONa(36 mg, 0.37 mmol)를 첨가하고 혼합물에 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되었고 원하는 질량이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(30 mL)로 희석하고 DCM(30 mL x 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 20 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 사전(pre)-TLC(DCM/MeOH = 10/1)로 정제하여 tert-부틸 (S)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥

- 사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(70 mg, 52.24% 수율)를 황색 고체로 얻었다. MS: $m/z = 743.3(M+H^+, ESI^+)$
- [259] 단계 10) 실시예 4: 3-클로로-4-사이클로프로필-5-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)페놀의 제조
- [260] EA(2 mL) 중 터트-부틸 (S)-2-(3-클로로-2-사이클로프로필-5-(메톡시메톡시)페닐)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(70 mg, 0.09 mmol)의 용액에 3M HCl(7 mL)을 첨가하고 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반했으며, LCMS는 출발 물질이 소비되고 원하는 질량이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 사전(pre)-HPLC(FA 조건)로 정제하여 3-클로로-4-사이클로프로필-5-((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)페놀(실시예 4)(2.76 mg, 4.9% 수율)을 백색 고체로 얻었다.
- [261] 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.35 (brs, 2H, FA), 6.95 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.52 (d, $J = 52.6$ Hz, 1H), 5.35 - 5.17 (m, 1H), 4.69 - 4.45 (m, 3H), 4.40 - 4.25 (m, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 1H), 4.01 - 3.57 (m, 3H), 3.48 - 3.32 (m, 3H), 3.25 - 3.13 (m, 2H), 3.06 - 2.93 (m, 1H), 2.73 - 2.44 (m, 3H), 2.40 - 2.22 (m, 3H), 2.20 - 2.02 (m, 2H), 1.90 - 1.77 (m, 1H), 0.75 - 0.57 (m, 2H), 0.23 - 0.03 (m, 2H). MS: $m/z = 599.6(M+H^+, ESI^+)$

[262]

[263] 실시예 5의 합성 반응식

[264]



- [265] 실시예 5: 5-에틸-6-플루오로-4-((6aS)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)페놀의 제조

드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올의 제조

[266] 단계 1) 실시예 5의 중간체 2: 터트-부틸 (S)-3-(2-((터트-부틸디페닐실릴)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트의 제조

[267] DCM(80 mL) 중 터트-부틸 (S)-3-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-카르복실레이트(8 g, 34.78 mmol), DMAP (848 mg, 6.95 mmol) 및 이미다졸 (4.73 g, 69.65 mol)의 혼합물에 TBDPSCI(19.11 g, 69.65 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 25°C에서 16 시간 동안 교반했다. TLC(PE/EA = 2/1)는 SM1(Rf = 0.2)이 소모되었으며 새로운 스팟(Rf = 0.4)이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 H₂O(100 mL)로 희석하고 DCM(150 mL x 3)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수(150 mL)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 여과하고 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 3:1)로 정제하여 터트-부틸(S)-3-(2-((터트-부틸디페닐실릴)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(14.55 g, 91% 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: m/z = 469.4(M+H⁺, ESI+)

[268] 단계 2) 실시예 5의 중간체 3: 1-벤질 4-(터트-부틸)(S)-2-(2-((터트-부틸디페닐실릴)옥시)에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트의 제조

[269] DCM(150 mL) 중 터트-부틸(S)-3-(2-((터트-부틸디페닐실릴)옥시)에틸)피페라진-1-카르복실레이트(14.55 g, 31.08 mmol)와 DIEA(6.01 g, 46.62 mmol)의 혼합물에 CBZCl(13.21 g, 77.7 mmol)을 0°C에서 첨가하고 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 H₂O(100 mL)로 희석하고 EA(150 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(150 mL)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 여과하고 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 50:1)로 정제하여 1-벤질 4-(터트-부틸)(S)-2-(2-((터트-부틸디페닐실릴)옥시)에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트(13.806 g, 73% 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: m/z = 688.2 (M+H⁺, ESI+)

[270] ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.64(d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 7.35(ddd, *J* = 40.3, 20.2, 11.1 Hz, 11H), 5.11(d, *J* = 17.9 Hz, 2H), 4.44 (s, 1H), 4.02 - 3.56 (m, 5H), 2.92 (td, *J* = 12.8, 2.9 Hz, 3H), 1.89 - 1.70 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.03 (s, 9H).

[271] 단계 3) 실시예 5의 중간체 4: 1-벤질 4-(터트-부틸) (S)-2-(2-하이드록시에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트의 제조

[272] THF(150 mL) 중 1-벤질 4-(터트-부틸)(S)-2-(2-((터트-부틸디페닐실릴)옥시)에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트(13.806 g, 22.93 mmol)의 용액에 TBAF(91.7 mL, THF 중 1M)를 첨가한 후, 혼합물을 N₂ 기체 하에서 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 표적 화합물이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 H₂O(100 mL)로 희석하고 EA(150 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(150 mL)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 여과하고 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 5:1)로 정제

하여 1-벤질 4-(tert-부틸)(S)-2-(2-하이드록시에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트(7.4 g, 92% 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: $m/z = 387.2(M+H^+, ESI^+)$

- [273] 단계 4) 실시예 5의 중간체 5: 1-벤질 4-(tert-부틸)(S)-2-(2-하이드록시에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트의 제조
- [274] DCM(60 mL) 중 옥살릴 클로라이드(6.41 g, 50.5 mmol)의 용액에 디클로로메탄(50 mL) 중의 디메틸 설펍사이드(5.51 mg, 70.7 mmol)의 용액을 -78°C에서 첨가하였다. -78°C에서 0.5시간 동안 교반한 후, DCM(20 mL) 중 (S)-1-벤질 4-tert-부틸 2-(2-하이드록시에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트 (7.4 g, 20.2 mmol)의 용액을 혼합물에 첨가하였다. -78°C에서 3시간 동안 교반한 후 TEA(15.3 g, 151.5 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 추가로 0.5시간 동안 25°C로 가온했다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 표적 화합물이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 H₂O(60 mL)로 희석하고 DCM(60 mL x 3)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수(30 mL)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 여과하고 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 5:1)로 정제하여 1-벤질 4-(tert-부틸)(S)-2-(2-하이드록시에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트(5.4 g, 74.5% 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: $m/z = 363.2(M+H^+, ESI^+)$
- [275] 단계 5) 실시예 5의 중간체 6: 1-벤질 4-(tert-부틸)(2S)-2-(2-하이드록시프로필)피페라진-1,4-디카르복실레이트의 제조
- [276] 건조 THF(25 mL)에 용해된 1-벤질 4-(tert-부틸)(S)-2-(2-하이드록시에틸)피페라진-1,4-디카르복실레이트(5.4 g, 14.9 mmol)의 교반 용액에 1 M CH₃MgBr (THF 중 1M, 14.9 mL)을 0°C에서 첨가하였다. 반응물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였고, LCMS는 출발 물질이 소모되었으며 표적 화합물이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 포화 NH₄Cl(40 mL)로 쉐킹하고 DCM(60 mL x 3)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수(30 mL)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시켰다. 여과하고 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 5:1)로 정제하여 1-벤질 4-(tert-부틸)(2S)-2-(2-하이드록시프로필)피페라진-1,4-디카르복실레이트(2 g, 35.5 % 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: $m/z = 401.2(M+Na^+, ESI^+)$
- [277] 단계 6) 실시예 5의 중간체 7: tert-부틸 (3S)-3-(2-하이드록시프로필)피페라진-1-카르복실레이트의 제조
- [278] MeOH(20 mL) 중 1-벤질 4-(tert-부틸)(2S)-2-(2-하이드록시프로필)피페라진-1,4-디카르복실레이트(2 g, 5.29 mmol)의 현탁액에 Pd(OH)₂ (200 mg)를 첨가하고, 혼합물을 수소 분위기 하에 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 여액을 증발시켜 tert-부틸 (3S)-3-(2-하이드록시프로필)피페라진-1-카르복실레이트(1.01 g, 83% 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: $m/z = 245.2(M+H^+, ESI^+)$

- [279] 단계 7) 실시예 5의 중간체 8: 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)프로필)피페라진-1-카르복실레이트의 제조
- [280] THF(15 mL) 중 터트-부틸(3S)-3-(2-하이드록시프로필)피페라진-1-카르복실레이트(1.01 g, 4.14 mmol)의 혼합물에 NaH(553 mg, 13.8 mmol, 미네랄 오일 중 60% 현탁액)를 첨가하고 혼합물을 0°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 5,7-디클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)피리도[4,3-d]피리미딘-4(3H)-온(1.29 g, 4.61 mmol)을 혼합물에 첨가하고 혼합물을 60°C에서 1시간 더 교반하였다. TLC(EA/MeOH = 15/1)는 SM1(R_f = 0.2)이 소비되고 새로운 지점(R_f = 0.4)이 형성됨을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(40 mL)로 켄칭하고 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기층을 염수 60 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 0/1)로 정제하여 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)프로필)피페라진-1-카르복실레이트(934 mg, 46.3% 수율)를 백색 고체로 얻었다. MS: m/z = 488.1(M+H⁺, ESI+)
- [281] 단계 8) 실시예 5의 중간체 9: 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)프로필)피페라진-1-카르복실레이트의 제조
- [282] 디옥산/H₂O (8 mL/2 mL) 중 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)프로필)피페라진-1-카르복실레이트(934 mg, 1.92 mmol), 2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(691.2 mg, 1.92 mmol), 루포스(Ruphos)-Pd-G₃(481.5 mg, 0.576 mmol), K₃PO₄(1.22 g, 5.76 mmol)의 혼합물을 N₂ 기체 하에서 90°C에서 3시간 동안 교반했다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 표적 화합물이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(30 mL)로 희석하고 DCM(40 mL x 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 60 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 0/1)로 정제하여 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-5-일)옥시)프로필)피페라진-1-카르복실레이트(235 mg, 20% 수율)를 연황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 686.3(M+H⁺, ESI+)
- [283] 단계 9) 실시예 5의 중간체 10: 터트-부틸 (6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-5-메틸-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조
- [284] DCM(4 mL) 중 터트-부틸 (3S)-3-(2-((7-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-8-플루오로-2-(메틸티오)-4-옥소-3,4-디하이드로피리도[4,3-d]피리

미딘-5-일)옥시)프로필)피페라진-1-카르복실레이트(100 mg, 0.15 mmol)의 용액 DIEA(169 mg, 1.31 mmol) 및 BOPCl(114 mg, 0.45 mmol)를 첨가했다. 그 다음 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 표적 화합물이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고 DCM(30 mL x 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 60 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(PE/EA = 1/1)로 정제하여 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-5-메틸-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(40 mg, 41.2% 수율)를 백색 고체로 얻었다. MS: m/z = 668.3(M+H⁺, ESI+)

[285] 단계 10) 실시예 5의 중간체 11: 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-5-메틸-12-(메틸술포닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

[286] MeCN/H₂O (1 mL/1 mL) 중 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-5-메틸-12-(메틸티오)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(40 mg, 0.11 mmol)의 용액에 옥손(190.3 mg, 0.55 mmol)을 첨가하고 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되었고 원하는 질량이 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고 DCM(30 mL x 2)으로 추출했다. 합한 유기층을 염수 20 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하여 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-5-메틸-12-(메틸술포닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(50 mg, 65% 수율 조 화합물)를 백색 고체로 얻었다. MS: m/z = 700.2(M+H⁺, ESI+)

[287] 단계 10) 실시예 5의 중간체 12: 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트의 제조

[288] 건조 THF(2 mL)에 용해시킨 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-5-메틸-12-(메틸술포닐)-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(50 mg, 0.071 mmol) 및 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(16.9 mg, 0.106 mmol)의 용액에 t-BuONa(11

mg, 0.14 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 N₂ 기체 하에서 -60°C에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 출발 물질이 소비되고 원하는 질량이 형성되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(60 mL)로 켄칭하고 에틸 아세테이트(60 mL × 3)로 추출했다. 합한 유기층을 염수 60 mL로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 사전(pre)-TLC(PE/EA = 0/1)로 정제하여 터트-부틸(6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(20 mg, 36% 수율)를 얻었다. LC-MS MS: m/z = 779.3(M+H⁺, ESI+)

[289] 단계 11) 실시예 5: 5-에틸-6-플루오로-4-((6aS)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올의 제조

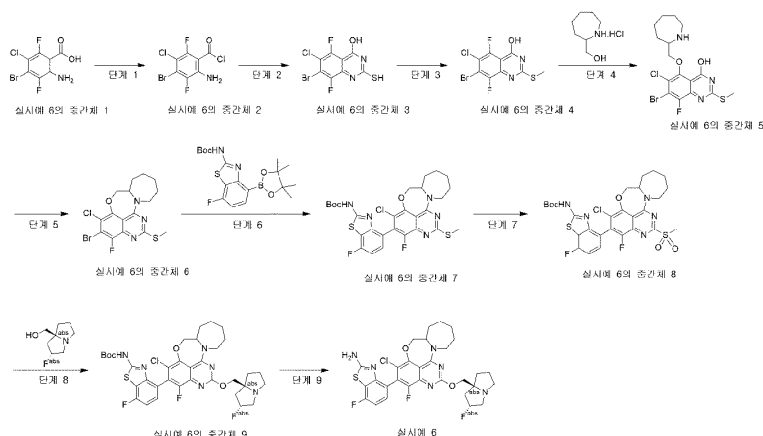
[290] EA(1 mL) 중 터트-부틸 (6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(20 mg, 0.25 mmol)의 용액에 3M HCl(2 mL)을 첨가하고 혼합물을 0°C에서 1분간 교반했다. 1시간 후, LCMS는 출발 물질이 소비되고 원하는 질량이 형성되었음을 보여주었다. 혼합물을 진공하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 사전(pre)-HPLC로 정제하여 터트-부틸 (6aS)-2-(8-에틸-7-플루오로-3-(메톡시메톡시)나프탈렌-1-일)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-5,6,6a,7,9,10-헥사하이드로-8H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-8-카르복실레이트(2.63 mg, 16.1% 수율)를 얻었다.

[291] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.49 (brs, 1H, FA), 7.71 - 7.57 (m, 1H), 7.32 - 6.90 (m, 3H), 5.55 - 5.20 (m, 2H), 4.64 - 4.52 (m, 1H), 4.41 (dd, J = 59.4, 11.3 Hz, 2H), 4.02 (dd, J = 30.6, 12.5 Hz, 1H), 3.66 - 3.40 (m, 3H), 3.26 - 2.92 (m, 5H), 2.91 - 2.65 (m, 2H), 2.60 - 2.34 (m, 3H), 2.28 - 2.08 (m, 4H), 2.05 - 1.92 (m, 1H), 1.88 - 1.74 (m, 1H), 1.47 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 0.98 - 0.82 (m, 3H). MS: m/z = 635.4(M+H⁺, ESI+)

[292]

[293] 실시예 6의 합성 반응식

[294]



- [295] 실시예 6: 4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민의 제조
- [296] 단계 1) 실시예 6의 중간체 2: 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조일 클로라이드의 제조
- [297] SOCl_2 (20 mL) 중 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조산 (2 g, 6.99 mmol)의 혼합물을 50°C 에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 원하는 생성물 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조일 클로라이드 (2.13 g, 100% 수율)를 갈색 오일로 얻었다. 조 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.
- [298] 단계 2) 실시예 6의 중간체 3: 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-머캅토퀴나졸린-4-올의 제조
- [299] 아세톤 (20 mL)에 용해된 NH_4SCN (1.6 g, 21.02 mmol)의 혼합물에 아세톤 (10 mL)에 용해된 2-아미노-4-브로모-5-클로로-3,6-디플루오로벤조일 클로라이드 (2.13 g, 6.98 mmol) 용액을 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물 (200 mL)로 채팅하고 용액을 EtOAc (100 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ 로 건조시키고, 여과하고 농축하여 원하는 생성물인 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-머캅토퀴나졸린-4-올 (2.78 g, 조 화합물)을 황색 고체로 얻었다. MS: $m/z = 326.9(\text{M}+\text{H}^+, \text{ESI}^+)$. 조 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.
- [300] 단계 3) 실시예 6의 중간체 4: 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올의 제조
- [301] MeOH (30 mL) 중 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-머캅토퀴나졸린-4-올 (2.78 g, 8.53 mmol)의 혼합물에 NaOH (1M, 17 mL, 17 mmol) 및 MeI (1.06 mL, 17.05 mmol)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1M HCl을 사용하여 pH=7로 조정 한 다음, 혼합물을 물

(150 mL)로 희석하고 EtOAc(100 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, Na₂SO₄(s)로 건조시키고, 여과하고 농축하여 잔류물을 얻었고, 이를 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 PE/EA = 5:1로 정제하여 원하는 생성물 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올(1.85 g, 64% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 340.9(M+H⁺, ESI+)

- [302] 단계 4) 실시예 6의 중간체 5: 5-(아제판-2-일메톡시)-7-브로모-6-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올의 제조
- [303] THF(5mL) 중 아제판-2-일메탄올 염산염(387 mg, 2.34 mmol)의 혼합물에 NaH(오일 중 60%, 280 mg, 11.67 mmol)를 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 10분 동안 교반하고 THF(15 mL) 중 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올(794 mg, 2.33 mmol)의 용액을 상기 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진한 NH₄Cl(aq)(150 mL)로 켄칭하고 혼합물을 EA(80 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 염수(50 mL)로 세척하고, Na₂SO₄(s)로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켜 황색 고체를 얻었다. 황색 고체를 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 DCM/MeOH = 5:1로 용출하여 원하는 생성물 5-(아제판-2-일메톡시)-7-브로모-6-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올(706 mg, 67.4% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 451.9(M+H⁺, ESI+)
- [304] 단계 5) 실시예 6의 중간체 6: 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조
- [305] DCM(20 mL) 중 5-(아제판-2-일메톡시)-7-브로모-6-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올(706 mg, 1.57 mmol) 및 DIEA(2.4 mL, 14.08)의 혼합물 mmol)에 BOPCl(1.2 g, 4.71 mmol)을 0°C에서 N₂ 기체 하에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 N₂ 기체 하에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(200 mL)로 희석하고 용액을 EtOAc(100 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(80 mL)로 세척하고, Na₂SO₄(s)로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켜 황색 고체를 얻었다. 황색 고체를 PE/EA = 10:1로 용출된 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 원하는 생성물 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(640 mg, 74.5% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 433.9(M+H⁺, ESI+)
- [306] 단계 6) 실시예 6의 중간체 7: 티트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트의 제조
- [307] 디옥산/H₂O(9:1, 5 mL) 중 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(300 mg, 0.7 mol), K₃PO₄(443 mg, 2.1 mmol) 및 티트-부틸(7-플루오로-4-

(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트 (548 mg, 1.39 mmol)의 혼합물에 루포스(Ruphos)-Pd-G₃(174 mg, 0.21 mmol)를 첨가했다. 용액을 N₂로 3회 퍼징하고, N₂ 기체 하에서 100°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(100 mL)로 희석하고 용액을 EtOAc(50 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, Na₂SO₄(s)로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켜 황색 고체를 얻었다. 황색 고체를 PE/EA = 10:1로 용리된 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 원하는 생성물 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(454mg, 조 화합물)를 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 620.3(M+H⁺, ESI+)

[308] 단계 7) 실시예 6의 중간체 8: 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(메틸술포닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트의 제조

[309] ACN:H₂O(3:1, 6 mL) 중 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3])의 혼합물에 옥손(2.2 g, 3.58 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응을 aq. Na₂SO₃(60 mL)으로 퀀칭하고 EtOAc(30 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 aq. Na₂SO₃(20 mL x 2) 및 염수(20 mL)으로 세척하고, Na₂SO₄(s) 상에서 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켜 원하는 생성물 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(메틸술포닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(434 mg, 조 화합물)를 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 652.2 (M+H⁺, ESI+)

[310] 단계 8) 실시예 6의 중간체 9: 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트의 제조

[311] THF(2 mL) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(51 mg, 0.32 mmol)의 혼합물에 NaH(오일 중 60%, 39 mg, 1.62 mmol)를 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 10분 동안 교반하고 THF(1 mL) 중 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(메틸술포닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-13-(메틸술포닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(210 mg, 0.32 mmol)를 상기 용액에 첨가했다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진한 NH₄Cl(aq)(40 mL)로 퀀칭하고 혼합물을 EA(20 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 염수(20 mL)로 세척하고, Na₂SO₄(s)로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켜 갈색 고체를 얻

었다. 갈색 고체를 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 PE/EA = 1:2로 용출하여 원하는 생성물 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(65 mg, 27.6% 수율)를 백색 고체로 얻었다. $m/z = 731.3(M + H^+, ESI^+)$

[312] 단계 9) 실시예 6: 4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민의 제조

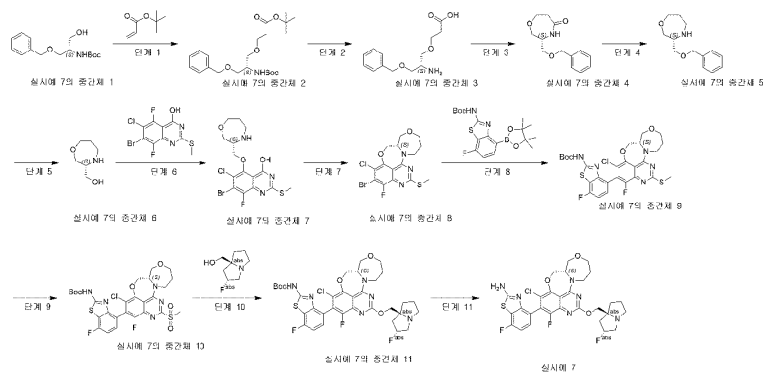
[313] DCM(1.5 mL) 중 터트-부틸 (4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(65 mg, 0.089 mmol)의 혼합물에 HCl/디옥산(1.5 mL)을 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 23시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공에서 농축 건조시켜 황색 고체를 얻었다. 황색 고체를 분취용 HPLC(Waters 2767/Qda, 컬럼: SunFireSunfire C18, 19*250 mm, 10 μ m; 이동상 A: 0.1% FA/H₂O, B: ACN, 유속: 20 mL/분, 구배: 20%~30%)로 정제하여 원하는 생성물 실시예 6(22.82 mg, 40.7% 수율)을 백색 고체로 얻었다.

[314] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.33 (s, 0.31H, FA), 7.96 - 7.85 (m, 2H), 7.20 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.04 (q, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.27 (d, $J = 55.1$ Hz, 1H), 4.87 - 4.59 (m, 2H), 4.48 - 4.37 (m, 1H), 4.11 - 3.95 (m, 3H), 3.14 - 2.96 (m, 4H), 2.87 - 2.76 (m, 1H), 2.14 - 1.55 (m, 13H), 1.30 - 1.16 (m, 1H). $m/z = 631.4(M + H^+, ESI^+)$

[315]

[316] 실시예 7의 합성 반응식

[317]



[318] 실시예 7: 4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥

사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민의 제조

- [319] 단계 1) 실시예 7의 중간체 2: 터트-부틸(S)-3-(3-(벤질옥시)-2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)프로폭시)프로파노에이트의 제조
- [320] t-BuOH(72 mL) 중 터트-부틸(S)-(1-(벤질옥시)-3-하이드록시프로판-2-일)카르바메이트(9 g, 31.99 mmol) 및 Cs₂CO₃(10.6 g, 32.53 mmol)의 용액에 터트-부틸 아크릴레이트(72 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(250 mL)로 희석하고 용액을 에틸 아세테이트(150 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르(pet 에테르)/에틸 아세테이트 = 10:1로 정제하여 원하는 생성물 터트-부틸(S)-3-(3-(벤질옥시)-2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)프로폭시)프로파노에이트(10.05 g, 76.8% 수율)를 무색 오일로 얻었다. MS: m/z = 410.2(M+H⁺, ESI⁺)
- [321] 단계 2) 실시예 7의 중간체 3: (S)-3-(2-아미노-3-(벤질옥시)프로폭시)프로판산의 제조
- [322] HCl/디옥산(20 mL) 중 터트-부틸(S)-3-(3-(벤질옥시)-2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)프로폭시)프로파노에이트(2 g, 4.89 mmol)의 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공에서 농축하여 조 생성물 (S)-3-(2-아미노-3-(벤질옥시)프로폭시)프로판산(1.81 g, HCl염)을 황색 오일로 얻었다. MS: m/z = 254.0(M+H⁺, ESI⁺). 조 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.
- [323] 단계 3) 실시예 7의 중간체 4: (S)-3-((벤질옥시)메틸)-1,4-옥사제판-5-온의 제조
- [324] DCM(18 mL) 중 (S)-3-(2-아미노-3-(벤질옥시)프로폭시)프로판산(1.71 g, 6.72 mmol) 및 TEA(7.5 mL, 53.96 mmol)의 용액에 HATU(3.08 g, 8.1 mmol)을 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(150 mL)로 희석하고 용액을 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1:1로 정제하여 원하는 생성물 (S)-3-((벤질옥시)메틸)-1,4-옥사제판-5-온(1.43 g, 90.5 % 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 236.1(M+H⁺, ESI⁺)
- [325] 단계 4) 실시예 7의 중간체 5: (S)-3-((벤질옥시)메틸)-1,4-옥사제판의 제조
- [326] THF(5 mL) 중 LAH(THF 중의 1 M, 11.5 mL, 11.33 mmol)의 혼합물에 THF(5 mL) 중 (S)-3-((벤질옥시)메틸)-1,4-옥사제판-5-온(1.33 g, 5.66 mmol)을 0°C에서 N₂ 기체 하에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 H₂O(1 mL)로 킨칭한 후 Na₂SO₄를 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고, 여액을 수집하여 진공에서 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고

석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1:2로 정제하여 원하는 생성물 (S)-3-((벤질옥시)메틸)-1,4-옥사제판(1 g, 80% 수율)을 황색 오일로 얻었다. MS: m/z = 222.2(M+H⁺, ESI⁺)

[327] 단계 5) 실시예 7의 중간체 6: (R)-(1,4-옥사제판-3-일)메탄올의 제조

[328] MeOH(10 mL) 중 (S)-3-((벤질옥시)메틸)-1,4-옥사제판(0.95 g, 4.30 mmol)의 혼합물에 Pd/C(0.5 g, 60%)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂(15 psi) 하에 25°C에서 40시간 동안 교반하였다. 반응물을 셀라이트로 여과하고, 여액을 수집하고 진공에서 농축하여 (R)-(1,4-옥사제판-3-일)메탄올의 조 생성물(637 mg, 조 화합물)을 백색 고체로 얻었다. MS: m/z = 132.1(M+H⁺, ESI⁺). 조 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[329] 단계 6) 실시예 7의 중간체 7: (S)-5-((1,4-옥사제판-3-일)메톡시)-7-브로모-6-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올의 제조

[330] THF(4 mL) 중 (R)-(1,4-옥사제판-3-일)메탄올(300 mg, 2.29 mmol)의 혼합물에 NaH(오일 중 60%, 275 mg, 11.46 mmol)를 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 10분 동안 교반하고 THF(4 mL) 중 7-브로모-6-클로로-5,8-디플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올(779 mg, 2.29 mmol)의 용액에 상기 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진한 NH₄Cl(aq)(150 mL)로 켄칭하고 혼합물을 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 DCM/MeOH = 5:1로 용출하여 원하는 생성물 (S)-5-((1,4-옥사제판-3-일)메톡시)-7-브로모-6-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올(319 mg, 30.9% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 454.0(M+H⁺, ESI⁺)

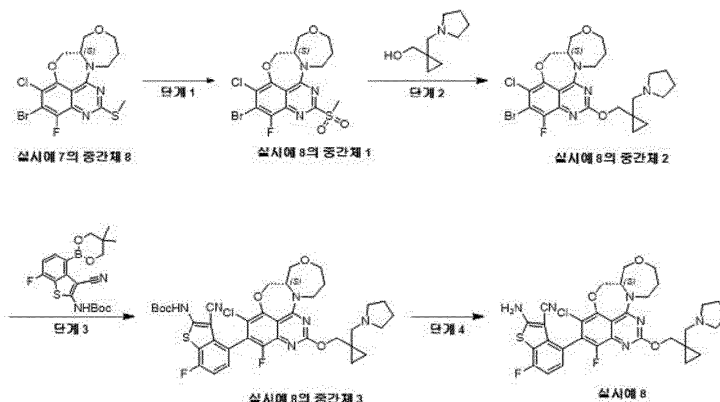
[331] 단계 7) 실시예 7의 중간체 8: (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조

[332] DCM(5 mL) 중 (S)-5-((1,4-옥사제판-3-일)메톡시)-7-브로모-6-클로로-8-플루오로-2-(메틸티오)퀴나졸린-4-올의 혼합물(319 mg, 0.71 mmol) 및 DIEA(1 mL, 6.05 mmol)의 혼합물에 BOPCl(540 mg, 2.12 mmol)을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(150 mL)로 켄칭하고 용액을 에틸 아세테이트(70 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 4:1로 용출하여 원하는 생성물 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(142 mg, 46.4% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 435.9(M+H⁺, ESI⁺)

- [333] 단계 8) 실시예 7의 중간체 9: 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트의 제조
- [334] 디옥산/H₂O(9:1, 5 mL) 중 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(142 mg, 0.33 mol), K₃PO₄(209 mg, 0.98 mmol) 및 터트-부틸 (7-플루오로-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(259 mg, 0.66 mmol)의 혼합물에 루포스(Ruphos)-Pd-G₃(82 mg, 0.10 mmol)을 첨가했다. 용액을 N₂로 3회 퍼징하고, N₂ 기체 하에서 100°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(100 mL)로 희석하고 용액을 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(50 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1:1로 용출하여 원하는 생성물 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(143 mg, 70% 수율)를 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 622.2(M+H⁺, ESI+)
- [335] 단계 9) 실시예 7의 중간체 10: 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술폰닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트의 제조
- [336] THF:H₂O(1:1, 4 mL) 중 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(140 mg, 0.23 mmol)의 혼합물에 옥손(693 mg, 1.13 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응을 aq. Na₂SO₃(80 mL)로 퀀칭하고 용액을 에틸 아세테이트(30 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 aq. Na₂SO₃(20 mL x 2) 및 염수(20 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축하여 조 생성물 터트-부틸(4-((14aS)-12-클로로)-10-플루오로-8-(메틸술폰닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(140 mg, 조 화합물)를 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 654.2(M+H⁺, ESI+)
- [337] 단계 10) 실시예 7의 중간체 11: 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트의 제조

- [338] THF(2 mL) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(34 mg, 0.21 mmol)의 혼합물에 NaH(오일 중 60%, 26 mg, 1.08 mmol)를 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 10분 동안 교반하고 THF(3 mL) 중 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술폰닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(140 mg, 0.21 mmol)의 용액을 상기 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진한 NH₄Cl(aq)(40 mL)을 첨하고 혼합물을 에틸 아세테이트(20 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 염수(20 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 Pre-TLC(에틸 아세테이트, R_f=0.4)로 정제하여 원하는 생성물 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(30 mg, 19% 수율)를 백색 고체로 얻었다. MS: *m/z* = 733.3(M+H⁺, ESI+)
- [339] 단계 11) 실시예 7: 4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민의 제조
- [340] HCl/디옥산(2 mL) 중 터트-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-일)카르바메이트(30 mg, 0.04 mmol)의 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 분취용 HPLC(Waters 2767/Qda, 컬럼: SunFireSunfire C18, 19*250 mm, 10 μm; 이동상 A: 0.1% FA/H₂O, B: ACN, 유속: 20 mL/분; 구배: 20%~30%)를 첨가하여 원하는 생성물 실시예 7(2.47 mg, 9.5% 수율)을 백색 고체로 얻었다.
- [341] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.56 (s, 0.72H-FA), 7.24 - 7.14 (m, 1H), 6.97 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.39 - 5.25 (m, 1H), 5.11 - 5.00 (m, 1H), 4.83 - 4.70 (m, 3H), 4.62 - 4.54 (m, 1H), 4.47 - 4.42 (m, 1H), 4.39 - 4.12 (m, 4H), 4.08 - 3.97 (m, 1H), 3.85 - 3.76 (m, 1H), 3.60 - 3.46 (m, 2H), 3.14 - 3.05 (m, 1H), 2.36 - 2.17 (m, 4H), 2.06 - 1.87 (m, 4H). MS: *m/z* = 633.3(M+H⁺, ESI+)
- [342]
- [343] 실시예 8의 합성 반응식

[344]



[345] 실시예 8: 2-아미노-4-((S)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸) 사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카보니트릴의 제조

[346] 단계 1) 실시예 8의 중간체 1: (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술포닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조

[347] THF/H₂O(1:1, 8 mL) 중 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸티오)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(197 mg, 0.45 mmol)의 혼합물에 옥손(1.4 g, 2.28 mmol)을 0°C에서 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응을 aq. Na₂SO₃ (80 mL)로 켄칭하고 용액을 에틸 아세테이트(30 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 aq. Na₂SO₃ (20 mL x 2) 및 염수(20 mL)로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켜 조 생성물(S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술포닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(227 mg, 조 화합물)을 황색 고체로 얻었다. MS: $m/z = 467.9(M+H^+, ESI^+)$. 조 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[348] 단계 2) 실시예 8의 중간체 2: (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸) 사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린

[349] THF (2 mL) 중 (1-(피롤리딘-1-일메틸) 사이클로프로필)메탄올(79 mg, 0.51 mmol)의 교반 용액에 NaH(60% in 미네랄 오일, 20 mg, 0.51 mmol)을 질소 가스 하에 0°C에서 첨가하고 20분 동안 교반하였다. 이 후, (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술포닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(160 mg, 0.34 mmol)을 첨가하고 상온에서 16 시간 동안 추가 교반하였다. 반응이 완료된 후, 염화 암모늄 수용액(20

mL)을 가하여 반응을 종결시키고 에틸 아세테이트(3 x 25 mL)를 가하여 유기층을 추출하였다. 얻은 유기층을 염수(60 mL)를 가하여 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 여과 및 감압 농축하여 잔류물을 얻었다. 얻은 잔류물을 메탄올/DCM = 1 : 6을 용출 조건으로 하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 원하는 화합물 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(50 mg, 26.6% 수율)을 얻었다.

[350] 단계 3) 실시예 8의 중간체 3: 터트-부틸 (4-((S)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-3-시아노-7-플루오로벤조 [b]티오펜-2-일)카르바메이트

[351] 1,4-디옥산(3 mL) 중 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(50 mg, 0.09 mmol)의 교반 용액에 터트-부틸 (3-시아노-4-(5,5-디메틸-1,3,2-디옥사보리난-2-일)-7-플루오로벤조 [b]티오펜-2-일)카르바메이트(73 mg, 0.18 mmol), K_3PO_4 (57 mg, 0.27 mmol), KF(10 mg, 0.18 mmol) 및 DPEphos-PdCl₂(14 mg, 0.02 mmol)을 첨가하고 질소 가스 하에 105 °C에서 4 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결된 후 반응 혼합물을 상온으로 냉각하고 감압 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 역상 크로마토그래피 (컬럼: SunFire Sunfire C18, 19*250 mm, 10 μm ; 이동상 A: 0.1% $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$, B: 아세토니트릴; 유속: 20 mL/분; 구배: 35%-50%) 정제하여 원하는 화합물 터트-부틸 (4-((S)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-3-시아노-7-플루오로벤조 [b]티오펜-2-일)카르바메이트(12 mg, 17.3% 수율)를 흰색 고체로 얻었다. MS: m/z = 753.4 ($\text{M}+\text{H}^+$, ESI+)

[352] 단계 4) 실시예 8: 2-아미노-4-((S)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조 [b]티오펜-3-카보나이트릴

[353] 1,4-디옥산/염산 혼합 용액(4 M, 2.5 mL) 중 터트-부틸 (4-((S)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-3-시아노-7-플루오로벤조 [b]티오펜-2-일)카르바메이트(12 mg, 0.16 mmol)의 교반 용액을 상온에서 6 시간 동안 방치하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 감압 농축하여 잔류물을 얻었다. 얻은 잔류물을 Prep-HPLC (컬럼: XBridge XBridge C18 19*250 mm, 10 μm ; 이동상 A: 0.1% $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, B: 아세토니트릴; 유속: 20 mL/분; 구배: 45%~50%; 머무름 시간: 16분 중 6.4-9 분) 정제하여 원하는

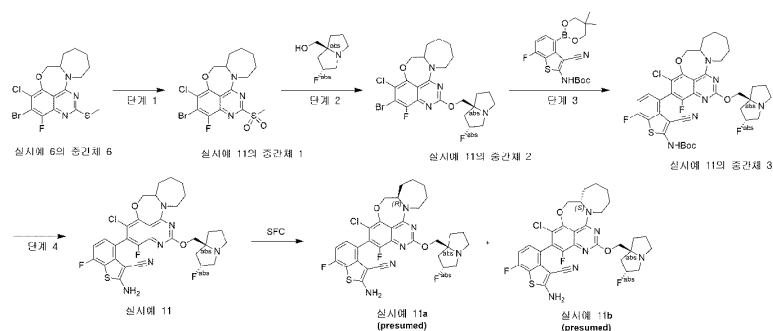
화합물인 2-아미노-4-((S)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카보니트릴 (0.70 mg, 6.7% 수율)을 얻었다.

[354] ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.55 (brs, 2.25H, FA), 7.22 (dd, J = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 7.10 - 7.02 (m, 1H), 4.53 - 4.44 (m, 4H), 4.40 - 3.33 (m, 1H), 4.30 - 4.16 (m, 3H), 4.10 - 3.94 (m, 2H), 3.91 - 3.74 (m, 2H), 3.62 - 3.45 (m, 5H), 2.28 - 2.16 (m, 1H), 2.08 - 1.92 (m, 5H), 0.94 - 0.74 (m, 4H). MS: m/z = 653.0 ($\text{M}+\text{H}^+$, ESI+)

[355]

[356] 실시예 11의 합성 반응식

[357]



[358] 실시예 11: 2-아미노-4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보니트릴의 제조

[359] 단계 1) 실시예 11의 중간체 1: 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸술포닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조

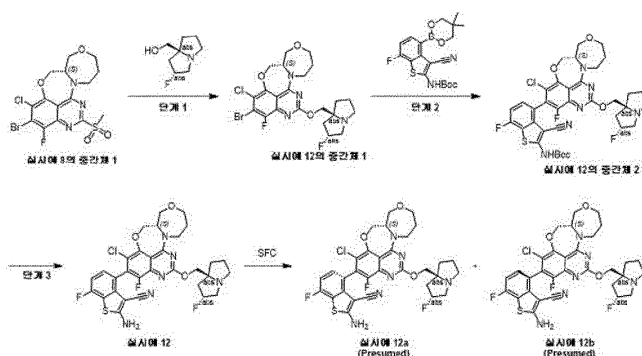
[360] THF/ H_2O (1:1, 4 mL) 중 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸티오)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(300 mg, 0.70 mmol)의 혼합물에 옥손(2.14 g, 3.48 mmol)을 0°C 에서 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 aq. Na_2SO_3 (80 mL)로 퀀칭하고 용액을 에틸 아세테이트(30 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 aq. Na_2SO_3 (20 mL x 2) 및 염수(20 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축하여 조 생성물 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸술포닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(365 mg, 조 화합물)은 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 466.0($\text{M}+\text{H}^+$, ESI+). 조 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

- [361] 단계 2) 실시예 11의 중간체 2: 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조
- [362] THF(2 mL) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(125 mg, 0.79 mmol)의 혼합물에 NaH(오일 중 60%, 95 mg, 3.96 mmol)를 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 10분 동안 교반하고 THF(10 mL) 중 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(메틸술폰닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-13-(메틸술폰닐)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(365 mg, 0.79 mmol)의 용액을 상기 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진한 NH₄Cl(aq)(100 mL)로 켄칭하고 혼합물을 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 염수(30 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피 정제하고 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1:2로 용출하여 원하는 생성물 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(319 mg, 74.7% 수율)을 황색 고체로 얻었다. MS: m/z = 545.0(M+H⁺, ESI+)
- [363] 단계 3) 실시예 11의 중간체 3: 터트-부틸(4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-3-시아노-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트의 제조
- [364] 5 mL의 톨루엔 중 2-브로모-3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(220 mg, 0.41 mol), Cs₂CO₃(396 mg, 1.22 mmol) 및 DPEphos-PdCl₂(73 mg, 0.10 mmol)의 혼합물을 N₂로 3회 퍼징했다. 용액을 N₂ 기체 하에서 80°C에서 10분 동안 교반하였다. 이어서 터트-부틸 (3-시아노-4-(5,5-디메틸-1,3,2-디옥사보리난-2-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트(328 mg, 0.81 mmol)을 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 N₂로 3회 퍼징한 후, 110°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(200 mL)로 희석하고 용액을 에틸 아세테이트(100 mL x 3)로 추출했다. 합한 유기상을 염수(80 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1:2로 정제하여 원하는 생성물 터트-부틸 (4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-3-시아노-7-플

루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트(176mg, 조 화합물)를 황색 오일로 얻었다. MS: $m/z = 755.4(M+H^+, ESI^+)$

- [365] 단계 4) 실시예 11의 중간체 4: 2-아미노-4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카보니트릴의 제조
- [366] HCl/디옥산(5 mL) 중 터트-부틸 (4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2-일)-3-시아노-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트(166 mg, 0.22 mmol)의 혼합물에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 진공에서 농축 건조시켰다. 잔류물을 분취용 HPLC(Waters 2767/Qda, 컬럼: SunFireSunfire C18, 19*250 mm, 10 μ m; 이동상 A: 0.1% FA/H₂O, B: ACN, 유속: 20 mL/분; 구배: 20%~30%)를 첨가하여 백색 고체인 실시예 11a(40 mg)와 백색 고체인 실시예 11b(17.08 mg)를 원하는 생성물로 얻었다. HPLC 결과 실시예 11a는 깨끗하지 않았으며 분취용 HPLC(Waters 2767/Qda, 컬럼: XBridge XBridge C18, 19*250 mm, 10 μ m; Mobile Phase A: 10 mmol NH₄HCO₃/H₂O, B: ACN, 유속: 20 mL/분, 구배: 30%~40%, 체류 시간: 7-8분, 16 분)로 정제하여 순수한 실시예 11a(15.29 mg)을 백색 고체로 얻었다. MS: $m/z = 655.4(M+H^+, ESI^+)$
- [367] HNMR(실시예 11a): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.04 (s, 2H), 7.30 - 7.21 (m, 1H), 7.18 - 7.10 (m, 1H), 5.27 (d, $J = 54.7$ Hz, 1H), 4.86 - 4.71 (m, 1H), 4.70 - 4.58 (m, 1H), 4.52 - 4.41 (m, 1H), 4.12 - 4.02 (m, 2H), 4.01 - 3.95 (m, 1H), 3.15 - 2.94 (m, 4H), 2.88 - 2.77 (m, 1H), 2.14 - 1.45 (m, 14H)
- [368] HNMR(실시예 11b): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.14 (s, 0.40H-FA), 8.08 (s, 2H), 7.29 - 7.21 (m, 1H), 7.19 - 7.04 (m, 1H), 5.29 (d, $J = 53.8$ Hz, 1H), 4.75 - 4.56 (m, 2H), 4.39 - 4.25 (m, 1H), 4.17 - 3.98 (m, 3H), 3.18 - 2.99 (m, 4H), 2.91 - 2.81 (m, 1H), 2.20 - 1.50 (m, 14H)
- [369]
- [370] 실시예 12의 합성 반응식

[371]



[372] 실시예 12: 2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보니트릴의 제조

[373] 단계 1) 실시예 12의 중간체 1: (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조

[374] THF(5 mL) 중 ((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메탄올(78 mg, 0.49 mmol)의 혼합물에 NaH(오일 중 60%, 60 mg, 2.5mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 0°C에서 10분 동안 교반하고 THF(5 mL) 중 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술폰닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-14-테트라하이드로-12-클로로-10-플루오로-8-(메틸술폰닐)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(227 mg, 0.49 mmol)의 용액을 상기 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 기체 하에서 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진한 NH₄Cl(aq)(100 mL)로 켄칭하고 혼합물을 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 염수(30 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트로 용출하여 원하는 생성물 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린(122 mg, 46% 수율)를 황색 오일로 얻었다. MS: m/z = 547.1(M + H⁺, ESI+)

[375] 단계 2) 실시예 12의 중간체 2: tert-부틸 (4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린의 제조

.6,7-테]퀴나졸린-11-일)-3-시아노-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트의 제조

- [376] 4mL의 디옥산 중 (S)-11-브로모-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린 (91 mg, 0.17 mmol), 터트-부틸(3-시아노-4-(5,5-디메틸-1,3,2-디옥사보리난-2-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트(135 mg, 0.33 mmol), K_3PO_4 (107 mg, 0.5 mmol), KF(19 mg, 0.33 mmol) 및 DPEphos-PdCl₂(24 mg, 0.034 mmol)의 혼합물을 N₂로 3회 퍼징했다. 이어서, 용액을 105°C에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 물(80 mL)로 희석하였다. 용액을 에틸 아세테이트(40 mL x 3)로 추출했다. 유기 상을 염수(20 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하고 에틸 아세테이트로 용출하여 원하는 생성물 터트-부틸(4-(((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H)-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린-11-일)-3-시아노-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트(40 mg, 31.7% 수율)를 황색 오일로 얻었다. MS: m/z = 757.3(M+H⁺, ESI+)
- [377] 단계 3) 실시예 12: 2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린-11-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보니트릴의 제조
- [378] HCl/디옥산(2 mL) 중 터트-부틸(4-(((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-테]퀴나졸린-11-일)-3-시아노-7-플루오로벤조[b]티오펜-2-일)카르바메이트(40 mg, 0.05 mmol)의 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 분취용 HPLC(Waters 2767/Qda, 컬럼: SunFireSunfire C18, 19*250 mm, 10 μ m; 이동상 A: 0.1% FA/H₂O, B: ACN, 유속: 20 mL/분; 구배: 20%~30%)를 첨가하여 원하는 생성물인 실시예 12a(1.94 mg, 5.6% 수율) 및 실시예 12b(1.32 mg, 3.8% 수율)를 백색 고체로 얻었다. MS: m/z = 657.3(M+H⁺, ESI+)
- [379] HNMR(실시예 12a): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.15 (dd, J = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 7.02 - 6.92 (m, 1H), 5.59 - 5.33 (m, 1H), 5.06 - 4.96 (m, 1H), 4.69 - 4.36 (m, 4H), 4.27 - 4.10 (m, 2H), 4.01 - 3.69 (m, 5H), 3.55 - 3.34 (m, 3H), 2.70 - 2.42 (m, 2H), 2.32 - 2.23 (m, 2H), 2.17 - 1.88 (m, 4H)
- [380] HNMR(실시예 12b): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.43 (brs, 0.61H-FA), 7.18 - 7.09 (m, 1H), 7.03 - 6.90(m, 1H), 5.52 - 5.31 (m, 1H), 5.04 - 4.92 (m, 1H), 4.73 - 4.63

(m, 2H), 4.59 - 4.37 (m, 4H), 4.26 - 4.18 (m, 1H), 4.17 - 4.08 (m, 1H), 3.99 - 3.89 (m, 1H), 3.85 - 3.58 (m, 4H), 3.57 - 3.43 (m, 2H), 2.57 - 2.37 (m, 2H), 2.35 - 2.24 (m, 1H), 2.22 - 2.11 (m, 3H), 1.99 - 1.89 (m, 2H).

[381]

[382] 이와 유사한 방법으로 각 실시예 기재 화합물 제조에 적절한 시료를 사용하여 하기 표 1의 실시예 1 내지 15의 화합물을 제조하였다.

[383] [표 1]

[384]

번호	구조식	IUPAC 명칭	Mass (M+H ⁺ , ES(+))
1		5-에틸-6-클로로-4-((S)-1-클로로-2-옥소-2H-테트라하이드로-1H-피리딘-7a(5H)-일)메틸-2-옥소-2H-테트라하이드로-1H-피리딘-4-일리덴-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일	MS (LC-MS): 621.40 m/z [M+H]
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 0.76 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 0.85 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 1.75-1.79 (m, 2H), 1.79-1.81 (m, 2H), 1.99 (brs, 2H), 2.05 (brs, 1H), 2.12-2.28 (m, 2H), 2.61 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 2.82-2.86 (m, 2H), 2.93 (brs, 1H), 3.02 (s, 1H), 3.09 (d, J = 4.12 Hz, 4H), 3.74-3.86 (m, 1H), 3.98 (d, J = 10.26 Hz, 1H), 4.02-4.20 (m, 2H), 4.43-4.48 (m, 1H), 5.03 (t, J = 12.8 Hz, 1H), 5.21 & 5.35 (brs, 1H), 6.91 & 7.11 (d, J = 2.50 Hz, 1H), 7.28-7.30 (m, 1H), 7.31 (d, J = 8.06 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 8.86, 5.88 Hz, 1H), 9.92 (brs, 1H)			
2		5-에틸-6-클로로-4-((S)-1-클로로-2-옥소-2H-테트라하이드로-1H-피리딘-7a(5H)-일)메틸-2-옥소-2H-테트라하이드로-1H-피리딘-4-일리덴-3,8,10a,11,13-펜타아자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일	MS (LC-MS): 617.31 m/z [M+H]
¹ H NMR (401 MHz, DMSO-d ₆) δ 1.72-2.23 (m, 8H), 2.58-2.63 (m, 1H), 2.82-2.87 (m, 2H), 2.98-3.16 (m, 6H), 3.73 (dd, J = 10.88, 1.38 Hz, 1H), 3.94-3.98 (m, 1H), 4.06-4.17 (m, 3H), 4.42 (dd, J = 12.51, 5.50 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 12.51 Hz, 1H), 5.21-5.34 (m, 1H), 7.04-7.24 (m, 1H), 7.35-7.36 (m, 1H), 7.42-7.46 (m, 1H), 7.95 (dd, J = 9.13, 5.88 Hz, 1H)			

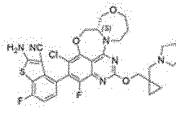
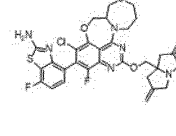
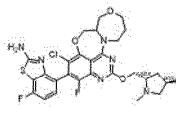
[385]

3		4-((14aS)-11-클로로-9-플루오로-7-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-1,3,4,13,14,14a-헥사하이드로-2H-피라지노[1',2':5,6][1,5]옥사조시노[4,3,2-데]퀴나올린-10-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민	MS (LCMS): 632.20 m/z [M+H]
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 1.70-1.91 (m, 4H), 1.93-2.16 (m, 3H), 2.54-2.56 (m, 1H), 2.64-2.70 (m, 1H), 2.77-2.82 (m, 3H), 3.00-3.10 (m, 4H), 3.19-3.24 (m, 1H), 3.64-3.74 (m, 1H), 3.94 (dd, J = 10.51, 2.25 Hz, 1H), 4.06 (dd, J = 10.51, 2.75 Hz, 1H), 4.24 (q, J = 11.6 Hz, 1H), 4.43 (trs, 1H), 4.55-4.93 (m, 1H), 5.20-5.34 (m, 1H), 7.01-7.06 (m, 1H), 7.14-7.23 (m, 1H), 7.89 (d, J = 16.76 Hz, 2H)			
4		3-클로로-4-사이클로프로필-5-(((S)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-6,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)페놀 포름산염	MS: m/z = 599.6(M+H ⁺ , ES1 ⁺)
¹ H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.35 (trs, 2H, FA), 6.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.52 (d, J = 52.6 Hz, 1H), 5.35 - 5.17 (m, 1H), 4.69 - 4.45 (m, 3H), 4.40 - 4.25 (m, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 1H), 4.01 - 3.57 (m, 3H), 3.48 - 3.32 (m, 3H), 3.25 - 3.13 (m, 2H), 3.06 - 2.93 (m, 1H), 2.73 - 2.44 (m, 3H), 2.40 - 2.22 (m, 3H), 2.20 - 2.02 (m, 2H), 1.90 - 1.77 (m, 1H), 0.75 - 0.57 (m, 2H), 0.23 - 0.03 (m, 2H)			
5		5-메틸-6-플루오로-4-(((6aS)-1-플루오로-12-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5-메틸-5,6a,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)페놀 포름산염	MS: m/z = 635.4 (M+H ⁺ , ES1 ⁺)

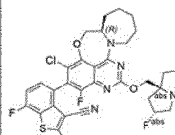
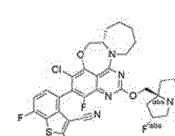
[386]

		드로-5H-4-옥사-3,8,10a,11,13-펜타자벤조[4,5]사이클로옥타[1,2,3-데]나프탈렌-2-일)나프탈렌-2-올	
¹ H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.49 (trs, 1H, FA), 7.71 - 7.57 (m, 1H), 7.32 - 6.90 (m, 3H), 5.55 - 5.20 (m, 2H), 4.64 - 4.52 (m, 1H), 4.41 (dd, J = 59.4, 11.3 Hz, 2H), 4.02 (dd, J = 30.6, 12.5 Hz, 1H), 3.66 - 3.40 (m, 3H), 3.26 - 2.92 (m, 5H), 2.91 - 2.65 (m, 2H), 2.60 - 2.34 (m, 3H), 2.28 - 2.08 (m, 4H), 2.05 - 1.92 (m, 1H), 1.88 - 1.74 (m, 1H), 1.47 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 0.98 - 0.82 (m, 3H)			
6		4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-2-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민	m/z = 631.4 (M+H ⁺ , ES1 ⁺)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.33 (s, 0.31H, FA), 7.96 - 7.85 (m, 2H), 7.20 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 7.04 (q, J = 8.0 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 55.1 Hz, 1H), 4.87 - 4.59 (m, 2H), 4.48 - 4.37 (m, 1H), 4.11 - 3.95 (m, 3H), 3.14 - 2.96 (m, 4H), 2.87 - 2.76 (m, 1H), 2.14 - 1.55 (m, 13H), 1.30 - 1.16 (m, 1H)			
7		4-(((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민	MS: m/z = 633.3 (M+H ⁺ , ES1 ⁺)

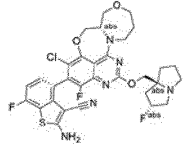
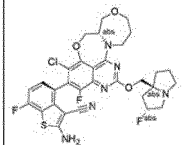
[387]

¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.56 (s, 0.72H-Fa), 7.24 ~ 7.14 (m, 1H), 6.97 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 5.39 ~ 5.25 (m, 1H), 5.11 ~ 5.00 (m, 1H), 4.83 ~ 4.70 (m, 3H), 4.62 ~ 4.54 (m, 1H), 4.47 ~ 4.42 (m, 1H), 4.39 ~ 4.12 (m, 4H), 4.08 ~ 3.97 (m, 1H), 3.85 ~ 3.76 (m, 1H), 3.60 ~ 3.46 (m, 2H), 3.14 ~ 3.05 (m, 1H), 2.36 ~ 2.17 (m, 4H), 2.06 ~ 1.87 (m, 4H)	
8	 2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-((1-(피롤리딘-1-일메틸)사이클로프로필)메톡시)-4,5,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노 [3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-11-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴 MS: <i>m/z</i> = 653.0 (H⁺, ESI⁺)
¹ H NMR (400 MHz, MeOD-d ₄) δ 8.55 (brs, 2.25H, Fa), 7.22 (dd, <i>J</i> = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 7.10 ~ 7.02 (m, 1H), 4.53 ~ 4.44 (m, 4H), 4.40 ~ 3.33 (m, 1H), 4.30 ~ 4.16 (m, 3H), 4.10 ~ 3.94 (m, 2H), 3.91 ~ 3.74 (m, 2H), 3.62 ~ 3.45 (m, 5H), 2.28 ~ 2.16 (m, 1H), 2.08 ~ 1.92 (m, 5H), 0.94 ~ 0.74 (m, 4H)	
9	 4-(12-클로로-8-((2,6-디메틸테트라하이드로-1H-피롤리딘-7a(5H)-일)메톡시)-10-플루오로-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-11-일)-7-플루오로벤조[d]티아졸-2-아민 N/A
10	 4-(12-클로로-10-플루오로-8-((2S,4R)-4-플루오로-1-메틸피롤리딘-2-일)메톡시)-4,5,14,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-11-일)-7-플루오로벤조 N/A

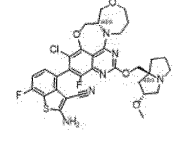
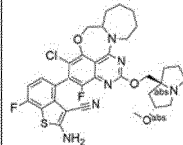
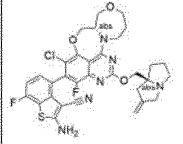
[388]

		[d]티아졸-2-아민	
N/A			
11a (presumed)	 2-아미노-4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리딘-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노 [2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-2-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	MS: <i>m/z</i> = 655.4 (M+H ⁺ , ESI ⁺)	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.04 (s, 2H), 7.30 ~ 7.21 (m, 1H), 7.18 ~ 7.10 (m, 1H), 5.27 (d, <i>J</i> = 54.7 Hz, 1H), 4.66 ~ 4.71 (m, 1H), 4.70 ~ 4.58 (m, 1H), 4.52 ~ 4.41 (m, 1H), 4.12 ~ 4.02 (m, 2H), 4.01 ~ 3.95 (m, 1H), 3.15 ~ 2.94 (m, 4H), 2.88 ~ 2.77 (m, 1H), 2.14 ~ 1.45 (m, 14H)			
11b (presumed)	 2-아미노-4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-플루오로테트라하이드로-1H-피롤리딘-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노 [2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나올린-2-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	MS: <i>m/z</i> = 655.4 (M+H ⁺ , ESI ⁺)	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.14 (s, 0.4H-Fa), 8.08 (s, 2H), 7.29 ~ 7.21 (m, 1H), 7.19 ~ 7.04 (m, 1H), 5.29 (d, <i>J</i> = 53.8 Hz, 1H), 4.75 ~ 4.56 (m, 2H), 4.39 ~ 4.25 (m, 1H), 4.17 ~ 3.98 (m, 3H), 3.16 ~ 2.99 (m, 4H), 2.91 ~ 2.81 (m, 1H), 2.20 ~ 1.50 (m, 14H)			

[389]

12a (presumed)		2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로 테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노 [3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-1(1-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	MS: m/z = 657.3 (M+H ⁺ , ES1+)
¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 7.15 (dd, J = 8.4, 5.1 Hz, 1H), 7.02 - 6.92 (m, 1H), 5.59 - 5.33 (m, 1H), 5.06 - 4.96 (m, 1H), 4.69 - 4.36 (m, 4H), 4.27 - 4.10 (m, 2H), 4.01 - 3.68 (m, 5H), 3.55 - 3.34 (m, 3H), 2.70 - 2.42 (m, 2H), 2.32 - 2.23 (m, 2H), 2.17 - 1.88 (m, 4H)			
12b (presumed)		2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-플루오로 테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노 [3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-1(1-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	MS: m/z = 657.3 (M+H ⁺ , ES1+)
¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 8.43 (trs, 0.6H-Fa), 7.18 - 7.09 (m, 1H), 7.03 - 6.90 (m, 1H), 5.52 - 5.31 (m, 1H), 5.04 - 4.92 (m, 1H), 4.73 - 4.63 (m, 2H), 4.59 - 4.37 (m, 4H), 4.26 - 4.18 (m, 1H), 4.17 - 4.08 (m, 1H), 3.99 - 3.89 (m, 1H), 3.85 - 3.58 (m, 4H), 3.57 - 3.43 (m, 2H), 2.57 - 2.37 (m, 2H), 2.35 - 2.24 (m, 1H), 2.22 - 2.11 (m, 3H), 1.99 - 1.69 (m, 2H)			

[390]

13		2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((2R,7aS)-2-메톡시 테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-1(1-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	N/A
N/A			
14		2-아미노-4-(3-클로로-1-플루오로-13-(((2R,7aS)-2-메톡시 테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-5a,6,7,8,9,10-헥사하이드로-5H-아제피노[2',1':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-2(1-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	667.3 (peak 1), 667.4 (peak 2)
N/A			
15		2-아미노-4-((14aS)-12-클로로-10-플루오로-8-(((S)-2-메틸테트라하이드로-1H-피롤리진-7a(5H)-일)메톡시)-4,5,14a-테트라하이드로-1H,3H-[1,4]옥사제피노[3',4':3,4][1,4]옥사제피노[5,6,7-데]퀴나졸린-1(1-일)-7-플루오로벤조[b]티오펜-3-카르보닐트릴	651.2
N/A			

[391]

[392] <시험 예 1: KRAS Nucleotide Exchange Assay>

[393]

[394] 시험 목적[395] KRAS^{WT}, KRAS^{G12D}, KRAS^{G12V} 돌연변이의 SOS1 매개 Nucleotide 교환 활성에 대한 화합물의 억제 효과 평가[396] 시험 원리

[397] 라벨이 부착되지 않은 KRAS 결합 GDP와 형광 라벨이 부착된 GTP의 SOS1 매개 교환을 모니터링하는 방법으로, 공여체 Tb cryptate로 표지된 GST 항체와 수용체 DY-647P1 GTP가 근접하게 있을 때 두 형광체 사이의 에너지 전달을 기반으로 검출한다.

[398] 시험조건 및 절차[399] 재료

[400] GST-tagged KRAS WT 또는 돌연변이 단백질 (amino acids 2-169),

[401] SOS1(amino acids 564-1049),

[402] Labeled GTP (GTP-DY-647P1),

[403] Assay Buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% BSA, 0.0025% NP40)[404] 시험 절차[405] 1. KRAS 단백질을 assay buffer로 희석하여 최종 농도의 1.5배가 되도록 한 후 Tb cryptate anti-GST 항체를 혼합하여 각 assay well에 10 µL씩 첨가하였다(최종 농도는 KRAS^{WT}, KRAS^{G12D}, KRAS^{G12V} 모두 20 nM).

[406] 2. 화합물을 DMSO로 용해 후 희석하여 최종 농도의 100배로 준비하였다.

[407] 3. ECHO acoustic dispenser (Beckman)를 이용하여 assay well에 화합물을 분주하고, KRAS/Ab 혼합물과 부드럽게 섞으며 60분 동안 배양하였다.

[408] 4. SOS1과 labeled GTP를 섞고 assay buffer로 최종 농도의 3배로 희석하고 5 µL의 용액을 assay well에 첨가하여 반응을 개시하였다 (labeled GTP의 최종 농도는 0.15 µM, SOS1의 최종 농도는 WT에서 7.5 nM, G12D에서 12.5 nM, G12V에서 50 nM). Blank well에는 assay buffer와 labeled GTP만 넣었다.

[409] 5. Pherastar Plate Reader(BMG)를 사용하여 Ex/Em=(337/665; 337/620)에서 반응을 모니터링하였다.

[410] 6. 반응 개시 후 약 25분에서 HTRF 신호를 분석하였다(G12V는 60분 반응).

[411] 7. Nucleotide 교환 활성은 DMSO 반응 값 대비 차이를 퍼센트로 표현하며, IC₅₀ 값은 GraphPad 4.0 software에서 four-parameter logistic 방정식을 기반으로 계산하였다.[412] $HTRF\ signal = \frac{ems\ 665}{ems\ 620} \times 10000$

[413] 시험 결과를 표 2에 나타내었다.

[414] [표 2]

[415] 시험 결과

[416]

실시예	G12D IC ₅₀ (nM)	G12V IC ₅₀ (nM)	G12C IC ₅₀ (nM)	G13D IC ₅₀ (nM)	WT IC ₅₀ (nM)
1	5.95	-	-	-	6.5
2	2.75	2.89	-	-	-
3	7.84	-	-	-	-
4	52.5	-	-	-	-
5	12.5	-	-	-	-
6	5.90	5.90	2.36	11.1	-

[417]

[418] <시험예 2: KRAS NanoBRET Assay>

[419]

[420] 시험 목적

[421] KRAS(WT, G12D 또는 G12V) HEK293 세포에 대한 화합물의 NanoBRET 표적 결합 평가

[422] 시험 조건 및 절차

[423] 화합물 제조

[424] 시험화합물은 10 mM stock으로 용해되었으며 기준화합물인 BI-2582 및 MRTX1133 (MedChemExpress)는 각 10 mM과 1 mM stock으로 DMSO에 용해되었다.

[425] 세포배양

[426] NanoBRET KRAS(WT, G12D 또는 G12V)-NanoLuc Fusion vector와 tracer K-2는 Promega 제품으로, HEK293 cell line은 ATCC에서 구입하였다. HEK293 세포는 10% FBS와 100 µg/mL 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 EMEM 배지를 사용하고, 5% CO₂와 95% 공기의 가습 대기에서 37°C로 배양하였다.

[427] 시험 절차

[428] 1. HEK293 Cell에 NanoBRET KRAS (WT, G12D 또는 G12V)-NanoLuc Fusion Vector를 transfection 한다.

[429] 2. Phenol red가 없는 Opti-MEM에서 transfection된 cell의 density를 2 X 10⁵ cells/mL로 조정하고 20x K-2 tracer를 cell과 섞는다.[430] 3. 384 well에 cell과 tracer mixture를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 한 시간 둔 후, 상온에서 15분 방치한다.

[431] 4. Substrate와 시험화합물 용액을 cell과 tracer를 분주한 384 well에 처리하고 15분간 상온에서 반응한다.

[432] 5. Envision 2104 plate reader를 사용하여 공여체 emission wavelength (460 nm)와 수용체 emission wavelength (600 nm)에서 측정한다.

[433] 6. 수용체 emission 값(600 nm)을 공여체 emission 값(460 nm)으로 나누어 BRET ratio를 계산하고 tracer가 포함되지 않은 BRET ratio를 소거하여 background를 보정한다.

- [434] 6. DMSO 처리 시 BRET ratio 대비 화합물 처리 시 BRET ratio *100으로 BRET 반응을 계산한다.
- [435] 7. GraphPad Prism 4 program에서 sigmoidal dose-response 방정식에 기반하여 IC₅₀ 값을 산출한다.
- [436]
- [437] <시험 예 3: Cell proliferation assay>
- [438]
- [439] 시험 목적
- [440] 72시간 동안 AsPC-1 pancreatic cancer(KRAS G12D mutation) 또는 SW480 colon cancer(KRAS G12V mutation) 세포에서 시험 화합물의 세포 생존성 테스트
- [441] 시험조건 및 절차
- [442] 재료
- [443] 기준화합물 Staurosporine은 Sigma-Aldrich(Saint Louis, MI)로부터 구입하였고, CellTiter-Glo® 2.0 Luminescent cell viability assay reagent (cat# G9243)은 Promega(Madison, WI)에서 구입하였다. AsPC-1 및 SW480 cell line은 American Type Culture Collection (Manassas, VA)에서 구입했다. AsPC-1 세포는 RPMI-1640(ATCC, cat#30-2001), SW480 세포는 DMEM(ATCC cat#30-2002)으로 배양되었으며, 10% FBS(Sigma-Aldrich, cat#F2442)와 100 µg/mL의 페니실린-스트렙토마이신(Sigma-Aldrich, cat#P4333)을 첨가한 배지를 사용하였다. 세포들은 5%의 CO₂와 95%의 공기의 가습된 대기에서 37°C로 배양되었다.
- [444] 시험절차
- [445] 1. 시험화합물과 기준화합물 Staurosporine을 DMSO 용액에 용해하여 Source Plate에서 20 mM(시험화합물)과 10 mM(대조화합물 Staurosporine)을 제조하고 DMSO로 3 fold, 10 dose로 희석하였다.
- [446] 2. Source Plate에서 10개 용량의 125 nL 시험화합물 또는 25 nL 기준화합물을 Echo 655를 이용해서 384-well 배양 plate(VWR, cat#82050-076)의 well에 분주하였다.
- [447] 3. 384-well 세포 배양 Plate에 2000개의 AsPC-1 또는 SW480 세포가 포함된 배양액 25 µL를 각각 분주하였다.
- [448] 4. 세포는 화합물과 함께 37°C, 5% CO₂ 조건에서 72시간 동안 배양하였다.
- [449] 5. Plate의 각 well에 CellTiter-Glo 2.0 시약을 25 µL씩 첨가하였다.
- [450] 6. 내용물을 orbital shaker에 2분간 혼합한 후 15분간 상온에서 Luminescence 시그널을 안정화하였다.
- [451] 7. Luminescence 시그널은 Envision 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer, Santa Clara, CA)로 측정되었으며, 생존하는 세포의 수는 각 배양액에 존재하는 ATP의 정량화를 통해 측정되었다.

[452] 8. GraphPad Prism 4 program에서 Sigmoidal dose-response 방정식에 기반하여 IC_{50} 값을 계산하였다.

[453] 시험 결과를 표 3에 나타내었다.

[454] [표 3]

[455] 시험 결과

[456]

실시예	AsPC-1	SW480
1	C	-
2	C	C
3	B	-
6	A	-
7	A	-
11a	B	-
11b	A	-
12a	B	-
12b	A	-

[457] ($IC_{50} < 2 \mu M = A$; $IC_{50} \geq 2 \mu M, < 20 \mu M = B$; $IC_{50} > 20 \mu M = C$)

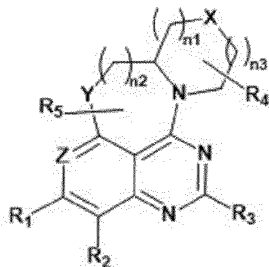
[458]

[459] 이제까지 본 발명에 대하여 그 구체예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 바람직한 실시예 및 다양한 대안적인 실시예를 참조하여 구체적으로 도시되고 설명되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 식에서,

R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, C_{1-3} 알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된

페닐, 피리디닐, 나프틸, 인다졸릴, 벤조티아졸릴, 또는 벤조티오펜일이며;

R^2 는 수소 또는 할로젠이고;

R^3 은 수소, C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 4-10원의 헤테로사이클, 또는 $-O-(L)_m-A_1$ 이고, 이 때 A_1 는 하나 이상의 R^7 로 각각 치환되거나 비치환된 C_{1-3} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 4-10원의 헤테로사이클, 6-10원의 아릴, 5-10원의 헤테로아릴, 또는 5-10원의 융합헤테로아릴이고;

L 은 R^7 로 치환되거나 비치환된 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{3-8} 사이클로알킬렌이고;

R^7 은 각각 독립적으로 할로젠, 옥소(=O), $=CH_2$, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, 아미노, 시아노, $-N(C_{1-3}알킬)_2$, $-NH(C_{1-3}알킬)$, 치환 또는 비치환된 C_{1-3} 알킬, 치환 또는 비치환된 C_{1-3} 할로알킬, 치환 또는 비치환된 C_{1-3} 알콕시, 치환 또는 비치환된 C_{3-4} 사이클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로사이클이고;

R^4 은 각각 독립적으로 수소, 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, 또는 C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알콕시이고;

X 는 O, CH_2 또는 NR^8 이고;

R^8 은 수소 또는 R^9 로 1-3회 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 또는 C_{3-6} 헤테로사이클로알킬이고;

R^9 은 각 경우에 독립적으로 산소, 하이드록시, $-C_{1-4}$ 알킬 또는 $-O-C_{1-4}$ 알킬이고;

Y 는 NH, O, S, SO, 또는 SO_2 이고;

Z는 CR⁶ 또는 N이고;

R⁵는 수소, C₁₋₃알킬, 시아노, 또는 아미노이고;

R⁶은 수소, 하이드록시, 할로젠, C₁₋₃알킬이고;

n1, n2, n3, 및 m은 각각 1 내지 3의 정수이고;

헤테로사이클, 헤테로아릴, 및 융합헤테로아릴은 각각 N, S 또는 O 중 어느 하나 이상을 헤테로 원자로 포함한다.

[청구항 2]

청구항 1에 있어서,

R¹은 하이드록시, 할로젠, C₁₋₃할로알킬, C₁₋₃알킬, C₂₋₆알켄일, C₂₋₆알킨일, C₃₋₆사이클로알킬, C₁₋₃알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된

페닐, 나프틸, 벤조티아졸릴, 또는 벤조티오펜일이며;

X는 O, CH₂ 또는 NH이고;

Y는 O인 화합물.

[청구항 3]

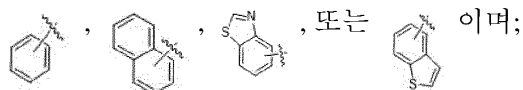
청구항 1에 있어서,

R³은 -O-(L)_m-A₁이고, 이 때 A₁는 하나 이상의 R⁷로 각각 치환되거나 비치환된 4-10원의 헤테로사이클 또는 5-10원의 융합헤테로아릴인 것인 화합물.

[청구항 4]

청구항 1에 있어서,

R¹은 하이드록시, 할로젠, C₁₋₃알킬, C₂₋₆알켄일, C₂₋₆알킨일, C₃₋₆사이클로알킬, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된



R³은 -O-(L)_m-A₁이고, 이 때 A₁는 하나 이상의 R⁷로 각각 치환되거나 비치환된 4-10원의 헤테로사이클 또는 5-10원의 융합헤테로아릴이고;

L은 C₁₋₃알킬렌 또는 C₃₋₈사이클로알킬렌이고;

R⁷은 각각 독립적으로 할로젠, 옥소(=O), =CH₂, -OCF₃, -OCHF₂, 아미노, 시아노, C₁₋₃알킬, C₁₋₃할로알킬, 또는 C₁₋₃알콕시이고;

R⁴은 수소이고;

X는 O, CH₂ 또는 NH이고;

Z는 CR⁶ 또는 N이고;

R⁵는 수소 또는 C₁₋₃알킬이고;

R⁶은 할로젠이고;

n1, n2, n3, 및 m은 각각 1 내지 3의 정수인 것인 화합물.

[청구항 5]

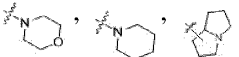
청구항 1에 있어서,

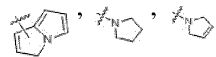
Z는 N인 경우,

R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, C_{1-3} 알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된 페닐 또는 나프틸이고;

Z 는 CR^6 인 경우,

R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 할로알킬, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, C_{1-3} 알콕시, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된 벤조티아졸릴 또는 벤조티오펜일인 것인 화합물.

[청구항 6] 청구항 1에 있어서, R^3 은 $-O-(L)_m-A_2$ 이고, 이 때 A_2 는 ,

, 또는  이고,

이들은 할로젠, C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알콕시, 및 $=CH_2$ 로부터 각각 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환 또는 비치환되고;

$-(L)_m$ -은 메틸렌 또는  인 화합물.

[청구항 7] 청구항 1에 있어서,

R^1 은 하이드록시, 할로젠, C_{1-3} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-6} 사이클로알킬, 아미노, 및 시아노로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되거나 비치환된

, 또는  이고;

R^2 는 할로젠이고;

R^3 은 $-O-(L)_m-A_1$ 이고, 이 때 A_1 는 할로젠, C_{1-3} 알킬, C_{1-3} 알콕시, 및 $=CH_2$ 로부터 각각 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환 또는 비치환된

, 또는  이고, 이 때 $-(L)_m$ -은 메틸렌 또는  이고;

R^4 은 수소이고;

X 는 O, CH_2 또는 NH이고;

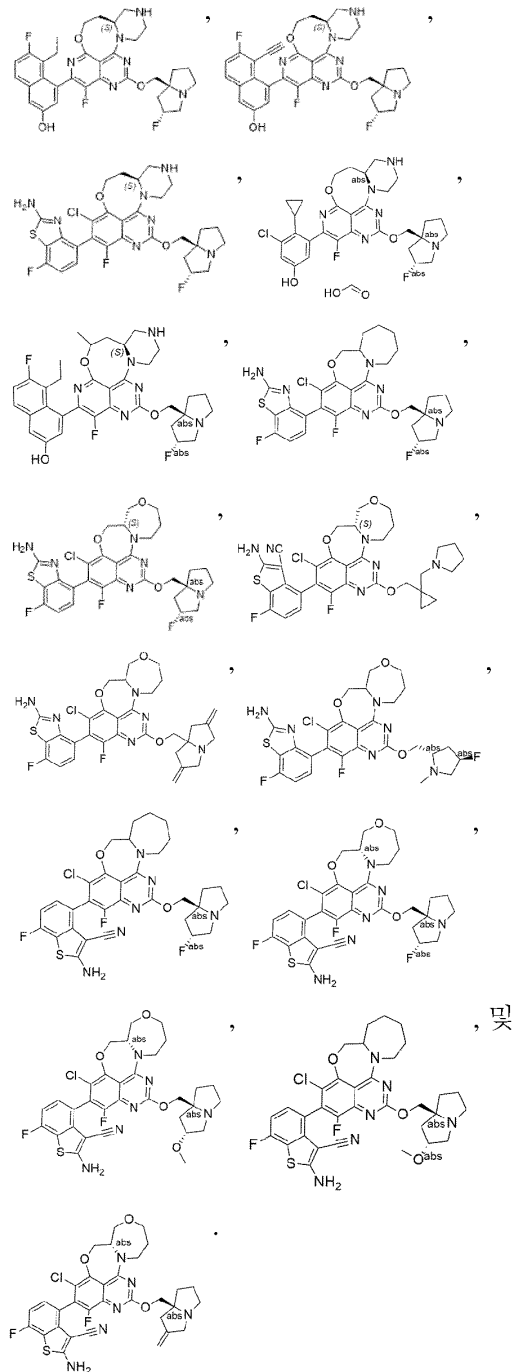
Y 는 O이고;

Z 는 CH, $C(C_{1-3}$ 알킬), 또는 N이고;

R^5 는 수소 또는 C_{1-3} 알킬인 것인 화합물.

[청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화합물로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입

체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물, 이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:



[청구항 9] 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 이의 입체 이성질체, 부분입체 이성질체, 거울상이성질체, 회전장애이성질체, 이의 용매화물,

이의 동위원소변형체, 이의 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 치료를 위한 약학적 조성물.

[청구항 10] 청구항 9에 있어서, KRAS 단백질 저해 활성을 나타내는 것인 약학적 조성물.